# การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ semicarbazide ในการวิเคราะห์หาปริมาณยาปฏิชีวนะที่ผสมกับ streptomycin โดยวิธีทางจุลชีววิทยา

**The Study of Semicarbazide Effect on the Microbiological Assay of the Combination of Streptomycin with Various Antibiotics**


โดย

อารีรัตน์ ลออปักษา

และคณะ



615.329
92
ร451
ฉ.1



2530

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2528-2529

รายงานการวิจัย

เรื่อง

# การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ semicarbazide ในการวิเคราะห์หาปริมาณยาปฏิชีวนะที่ผสมกับ streptomycin โดยวิธีทางจุลชีววิทยา

# The Study of Semicarbazide Effect on the Microbiological Assay of the Combination of Streptomycin with Various Antibiotics

โดย

อารีรัตน์ ลออปักษา (พงษ์โสภิดา)

วิมลมาศ ลิปิพันธ์

พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร

กิ่งฟ้า ทรัพย์มนชัย*

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

* คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

2530

# การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ semicarbazide ในการวิเคราะห์หาปริมาณยาปฏิชีวนะที่ผสมกับ streptomycin โดยวิธีทางจุลชีววิทยา

อารีรัตน์ ลออปักษา ภ.บ, ภ.ม. วิมลมาศ ลิปิพันธ์ ภ.บ., ภ.ม.
พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร ภ.บ., วท.ม. กิ่งฟ้า ทรัพย์มนชัย ภ.บ., ภ.ม.*

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
*คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

## บทคัดย่อ

ความเข้มข้นของ semicarbazide hydrochloride ต่ำสุดที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ *Sarcina lutea* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ที่ใช้ในการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะมีค่าเท่ากับ 6.0, 10.0 และ 4.0 มก./มล. ตามลำดับ ดังนั้นเพื่อป้องกันผลรบกวนในการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะต้องใช้ความเข้มข้นของ semicarbazide hydrochloride ต่ำกว่าค่านี้ streptomycin ในความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล. จะถูกยับยั้งฤทธิ์การฆ่าเชื้อทดสอบ *B. subtilis* ได้โดยใช้ semicarbazide hydrochloride ในความเข้มข้นต่ำสุด 1.5 มก./มล. ปริมาตรเท่ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ นาน 180 นาที และความเข้มข้นขนาด 2.0 มก./มล. สามารถยับยั้งการฆ่าเชื้อทดสอบโดย streptomycin ได้ในเวลาต่ำสุด 30 นาที เมื่อทดลองบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ความเข้มข้นต่ำสุดของ semicarbazide hydrochloride ที่มีผลต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อทดสอบโดย streptomycin มีค่า 3.0 มก./มล. ในเวลา 60 นาที และความเข้มข้นขนาด 4.0 มก./มล. สามารถยับยั้งได้ในเวลาต่ำสุด 30 นาที ส่วนความเข้มข้นของ semicarbazide hydrochloride สูงสุดที่สามารถยับยั้งการฆ่าเชื้อโดย streptomycin ได้ทุกระยะเวลาที่ทำการทดลอง เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 ° และ 37 °ซ มีค่าเท่ากับ 4.0 และ 6.0 มก./มล. ตามลำดับ จากการทดลองนี้แสดงว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ จะใช้ปริมาณของ semicarbazide hydrochloride ต่ำกว่าและใช้เวลาน้อยกว่า. ความเข้มข้นที่เหมาะสม

ของ semicarbazide hydrochloride ที่จะไปยับยั้งฤทธิ์การฆ่าเชื้อทดสอบโดย streptomycin มีค่าเป็น 2.0 มก./มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ ในเวลา 30 นาที สำหรับผลของ semicarbazide hydrochloride ต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycoside อื่น พบว่า ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 ถึง 2.0 มก./มล. ทั้งที่อุณหภูมิ 30 ° และ 37 °ซ ไม่มีผลต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อทดสอบ *B. subtilis* โดย dihydrostreptomycin แต่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.0 ถึง 1.5 มก./มล. ขึ้นไปมีผลต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อทดสอบ *S.aureus* โดย kanamycin ส่วนยาปฏิชีวนะกลุ่ม penicillin พบว่า ความเข้มข้นของ semicarbazide hydrochloride ตั้งแต่ 0.5 ถึง 10.0 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 30 ° และ 37 °ซ ไม่มีผลต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อทดสอบ *S. aureus* โดย penicillin G ยา rifampin ในกลุ่ม rifamycin จะคล้ายคลึงกับยาปฏิชีวนะในกลุ่ม aminoglycoside ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 ถึง 2.0 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 30 °ซ และตั้งแต่ 0.5 ถึง 1.5 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 37 °ซ จะไม่มีผลต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อทดสอบ *S.lutea* โดย rifampin. เวลาที่ใช้บ่มทั้งหมดส่วนใหญ่ไม่ควรบ่มเกิน 120 นาที. การวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะเหล่านี้ที่ผสม streptomycin จึงต้องพิจารณาถึงความเข้มข้นของ semicarbazide hydrochloride ที่ใช้ในการยับยั้งฤทธิ์การฆ่าเชื้อทดสอบโดย streptomycinรวมถึงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมเพื่อไม่ให้มีผลกับยาปฏิชีวนะตัวที่ต้องการวิเคราะห์ จากการทดลองวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะ penicillin จากยาปฏิชีวนะรวม penicillin กับ streptomycin พบว่า การใช้ semicarbazide hydrochloride ในการวิเคราะห์จะได้ค่าความแรงของ penicillin G เฉลี่ย (% labeled amount) เท่ากับ 112.56 $\pm$ 6.86% ใกล้เคียงกับการใช้จุลินทรีย์ที่ไวจำเพาะมีค่า 112.02 $\pm$ 4.99% และในการศึกษาระดับยา rifampin ในซีรั่ม และน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยวัณโรคของเยื่อหุ้มสมองจำนวน 5 รายที่ได้รับยารวมร่วมกับ streptomycin และยาอื่นโดยการใช้ semicarbazide hydrochloride ทำให้ทราบความเข้มข้นของยาเฉลี่ยต่อผลการรักษาโรคโดยเปรียบเทียบกับ MIC ต่อเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของน้ำไขสันหลัง) มีค่า 0.10-0.57 ไมโครกรัม/มล. และทำให้ทราบความเข้มข้นของ rifampin ในน้ำไขสันหลังเฉลี่ยในสัปดาห์เป็น 4.52% ของยาในซีรั่ม จากการทดลองวิเคราะห์เหล่านี้นับได้ว่ามีประโยชน์ต่อการควบคุมคุณภาพ การรักษาโรค และการวิจัยต่อไป

# The Study of Semicarbazide Effect on the Microbiological Assay of the Combination of Streptomycin with Various Antibiotics

Areerat Laorpaksa, B.Sc. (Pharm), M.Sc. (Pharm)
Vimolmas Lipipun, B.Sc. (Pharm), M.Sc. (Pharm)
Pintip Pongpech, B.Sc. (Pharm), M.Sc.
Kingfah Supmonchai, B.Sc.(Pharm), M.Sc. (Pharm)*

Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Silpakorn University

## Abstract

The semicarbazide hydrochloride in concentrations at least 6.0, 10.0 and 4.0 mg./ml. could inhibit the microbiological test organisms of *Sarcina lutea* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P and *Bacillus subtilis* ATCC 6633 respectively. In the microbiological assay of antibiotics must be added semicarbazide hydrochloride in concentrations less than these according to the interference. Streptomycin in concentration of 100 mcg./ml. was antagonistic with semicarbazide hydrochloride in concentration at least 1.5 mg./ml. (equal volume) against *B. subtilis* at 37° C in 180 min. and in concentration of 2.0 mg./ml. in at least 30 min. whereas at 37° C the lowest concentration was 3.0 mg./ml. in 60 min. and 4.0 mg./ml. in at least 30 min. The maximal concentration of semicarbazide hydrochloride to neutralize the activity of streptomycin against the test organism at 30° and 37° C were 4.0 and 6.0 mg./ml. respectively. The experiments suggested that in case of incubation at 30° C was used in lower concentration of semicarbazide hydrochloride and less time than at 37° C.

The suitable concentration to neutralize the activity of streptomycin was 2.0 mg./ml. at 30° C in 30 min. For the semicarbazide hydrochloride effects on the other aminoglycoside antibiotics, the concentrations of 0.5 to 2.0 mg./ml. either 30° or 37° C was no effect to dihydrostreptomycin aganist *B.subtilis* but 1.0 to 1.5 mg./ml. or more was antagonist the activity of kanamycin against *S.aureus* In penicillin group, the semicarbazide hydrochloride in concentrations of 0.5 to 10.0 mg./ml. at 30° and 37° C were no effect to neutralize the activity of penicillin G against *S.aureus*. Rifampin, the rifamycin group, was the same as the aminoglycoside antibiotics that 0.5 to 2.0 mg./ml. at 30° C and 0.5 to 1.5 mg./ml. at 37° C were no effect to rifampin against *S. lutea*. The most of incubation time to neutralize activity should be less than 120 min. The microbiological assay of the combination with streptomycin must be consideration of the concentrations of semicarbazide hydrochloride, temperature and time for preventing the influence of antibiotic to be assayed. In this study the assay of penicillin in the combination of penicillin and streptomycin by the use of selective inactivation was compared to the specific strain of test organism. The potency of penicillin G (% labeled amount) in the assay with semicarbazide hydrochloride was 112.56 $\pm$ 6.86% closed to 112.02 $\pm$ 4.99% in the assay with *S.lutea*. The rifampin concentration in cerebrospinal fluid (CSF) and serum of five tuberculous meningitis patients treated with rifampin, streptomycin and other drugs were assayed by using semicarbazide hydrochloride. The levels of rifampin in CSF were 0.10-0.57 mcg./ml.which ensure therapeutic concentration to MIC against *Mycobacterium tuberculosis* (0.1 mcg/ml). The average concentration of rifampin in CSF in a week was 4.52% of the corresponding

serum levels. From this study, the determination of the potency and concentration of drug in combined with streptomycin by the use of semicarbazide hydrochloride are valuable to the quality control, the treatment and other researches.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยนี้จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2528-2529

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ ในเรื่องเครื่องมือและสถานที่ในการปฏิบัติการ รวมทั้งพนักงานและเจ้าหน้าที่ในภาควิชาที่ช่วยในการเตรียมอุปกรณ์ และขอขอบคุณอย่างยิ่งแด่ รองศาสตราจารย์ สมิง เก่าเจริญ หน่วยเภสัชวิทยาคลีนิคและพิษวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี ผู้ซึ่งช่วยเหลือและให้คำแนะนำ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ปรีดา พัวประดิษฐ์ หน่วยประสาทวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ธีรวัฒน์ เหมะจุฑา หน่วยประสาทวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อภาษาไทย ..... | I |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... | III |
| กิตติกรรมประกาศ ..... | VI |
| สารบัญตาราง ..... | VIII |
| สารบัญรูป ..... | IX |
| คำศัพท์ย่อ ..... | X |
| บทที่ | |
| 1 บทนำ ..... | 1 |
| 2 วัสดุและวิธีการ ..... | 4 |
| 3 ผลการทดลอง ..... | 15 |
| 4 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง ..... | 31 |
| เอกสารอ้างอิง ..... | 35 |
| ภาคผนวก ..... | 39 |


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาโดยใช้จุลินทรีย์จำเพาะ ..... | 2 |
| 2 | การยับยั้งฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะระหว่างการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา ... | 3 |
| 3 | ผลการยับยั้งการเจริญของ semicarbazide ที่มีต่อเชื้อทดสอบ .... | 16 |
| 4 | ผลของ semicarbazideต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อ *Bacillus subtilis* โดย streptomycin ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ..... | 17 |
| 5 | ผลของ semicarbazide ต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อ *Bacillus subtilis* โดย streptomycin ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ..... | 18 |
| 6 | ผลของ semicarbazide ต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อ *Bacillus subtilis* โดย dihydrostreptomycin ที่อุณหภูมิ 30 ° และ 37 °ซ ..... | 20 |
| 7 | ผลของ semicarbazide ต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดย kanamycin ที่อุณหภูมิ 30 ° และ 37 °ซ ..... | 21 |
| 8 | ผลของ semicarbazide ต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดย penicillin G ที่อุณหภูมิ 30 ° และ 37 °ซ ..... | 23 |
| 9 | ผลของ semicarbazide ต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อ *Sarcina lutea* โดย rifampin ที่อุณหภูมิ 30 ° และ 37 °ซ ..... | 24 |
| 10 | ผลเปรียบเทียบการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะ penicillin G จากยาปฏิชีวนะรวม penicillin-streptomycin โดยใช้ semicarbazide และเชื้อจุลินทรีย์ที่ไวจำเพาะ ..... | 26 |
| 11 | ระดับยา rifampin ในซีรั่มผู้ป่วยวัณโรคของเยื่อหุ้มสมองภายหลังได้รับยารวม ..... | 28 |
| 12 | ระดับยาของ rifampin ในน้ำไขสันหลังผู้ป่วยวัณโรคของเยื่อหุ้มสมองภายหลังได้รับยารวม ..... | 29 |

# สารบัญรูป


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ความเข้มข้นเฉลี่ยของยา rifampin ในซีรัม (.) และ น้ำไขสันหลัง (×) ที่ช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ในผู้ป่วยวัณโรคของเยื่อหุ้มสมอง | 30 |


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## คำศัพท์ย่อ

| | | |
|---|---|---|
| ก. | = | กรัม |
| ชม. | = | ชั่วโมง |
| °ซ | = | องศาเซลเซียส |
| % | = | เปอร์เซ็นต์ |
| มก. | = | มิลลิกรัม |
| มม. | = | มิลลิเมตร |
| มล. | = | มิลลิลิตร |
| ล. | = | ลิตร |
| หน่วย | = | หน่วยสากล (IU = International Unit) |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

## บทนำ

ยาปฏิชีวนะมีบทบาทสำคัญมากในการรักษาโรคติดเชื้อ การเลือกและใช้ยาปฏิชีวนะทางคลินิคจะขึ้นอยู่กับ การวินิจฉัยโรค การทดสอบความไวของเชื้อ รวมทั้งการวิเคราะห์ชีรั่มของผู้ป่วยทำให้ทราบปริมาณยาที่เพียงพอต่อการรักษา อันตรายจากการเลือกใช้ยาไม่ถูกต้องหรือเหมาะสม จะทำให้เกิดการแพ้ยาเพิ่มมากขึ้น การเปลี่ยนแปลงของเชื้อที่อาศัยอยู่ตามปกติ (normal flora) ในร่างกายทำให้เกิดการติดเชื้อจากเชื้อที่ดื้อต่อยา การเกิดพิษโดยตรงจากการใช้ยาเป็นระยะเวลานาน เช่นการทำลายไต หรือเส้นประสาทการได้ยิน จากการใช้ยาปฏิ-ชีวนะในกลุ่ม aminoglycoside และการดื้อยาของเชื้อมากขึ้น[1] ยิ่งไปกว่านั้นในการรักษาโรคติดเชื้ออาจต้องใช้ยารวมในการต้านเชื้อ โดยการใช้ยา 2 ตัวหรือมากกว่า เพื่อให้ได้ประ-สิทธิภาพในการรักษามากที่สุด การใช้ยารวมอาจมีปฏิกิริยาระหว่างยาที่มีผลต่อเชื้อและผู้ป่วย ยาอาจมีฤทธิ์ต่างกันต่อเชื้อโดยยาตัวหนึ่งมีผลเพิ่ม หรือยับยั้งผลของยาตัวอื่นได้ การรวมยาอาจทำให้เกิดพิษเพิ่มมากขึ้นเป็นผลบวก หรือมากกว่าผลบวกได้ จึงต้องระมัดระวังเป็นอย่างยิ่ง[1-3]

การใช้ยาปฏิชีวนะรวมโดยการใช้ยาพร้อมกัน 2 ตัวหรือมากกว่า มักใช้ใน[1,2,4]

1. ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อร่วมกันหลายชนิด การใช้ยา 2 ตัวหรือมากกว่าซึ่งมีผลต่อเชื้อต่างกัน จะให้ผลมากกว่าการใช้ยาตัวเดียว เพื่อให้มีฤทธิ์กว้าง

2. การติดเชื้อรุนแรงที่ยังไม่ทราบสาเหตุแน่ชัด เพื่อครอบคลุมเชื้อก่อโรคโดยดูจากลักษณะอาการทางคลินิค ระหว่างรอผลการทดสอบหาสาเหตุทางห้องปฏิบัติการ

3. การเพิ่มฤทธิ์ในการต้านเชื้อทำให้เสริมฤทธิ์กัน และอาจสามารถลดขนาดของยาตัวหนึ่งหรือทั้ง 2 ตัวได้ หรือการใช้ยารวมจะให้ผลฆ่าเชื้อได้รวดเร็ว และสมบูรณ์มากกว่าการใช้ยาตัวใดตัวหนึ่งเพียงตัวเดียว ตัวอย่างที่ดีที่สุดในการเสริมฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะคือ การใช้ยารวม penicillinกับ streptomycin หรือ gentamycin เช่นในการรักษาเยื่อหุ้มหัวใจ

อักเสบจากเชื้อที่เกี่ยวกับลำไส้ (enterococcal endocarditis) การใช้ยา penicillin อย่างเดียว มักเกิดการกลับมาของโรค (relapse)[5-7]

4. การป้องกันหรือลดการดื้อยาจากเชื้อที่ mutant ในระหว่างการรักษา โดยเฉพาะโรคติดเชื้อเรื้อรังโดยการใช้ยาตัวที่ 2 หรือ 3 ที่ไม่มีปฏิกิริยาต่อกัน ในทางปฏิบัติปัจจุบันใช้กับการรักษาวัณโรค[8-10]

การใช้ยาร่วมกันอาจเป็นการให้ยาแต่ละชนิดแยกกัน หรือยาหลายชนิดถูกเตรียมอยู่ในตำรับเดียวกันซึ่งผลิตขายโดยบริษัทต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก การควบคุมคุณภาพของยาปฏิชีวนะรวมโดยการวิเคราะห์หาปริมาณยาที่ต้องการในตำรับ และการวิเคราะห์ยาในซีรั่ม เนื้อเยื่อ หรือของเหลวในร่างกายของผู้ป่วยที่ได้รับยารวมจะทำให้ทราบถึงปริมาณยาต่อผลการรักษาและหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงที่มีพิษ จะต้องมีวิธีจำเพาะโดยต้องไม่ให้ยาตัวอื่นมีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณยาปฏิชีวนะที่ต้องการ[11]

การวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะในเมื่อมียาตัวอื่นอยู่ด้วยโดยทางจุลชีววิทยา อาจทำได้โดย[11]

1. การใช้เชื้อจำเพาะที่ไวต่อยาปฏิชีวนะที่ต้องการวิเคราะห์และสภาวะที่เหมาะสม

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาโดยใช้จุลินทรีย์จำเพาะ

| ยาปฏิชีวนะที่ต้องการวิเคราะห์ | ยาปฏิชีวนะที่ไม่ต้องการวิเคราะห์ | เชื้อจุลินทรีย์ | สภาวะ |
|---|---|---|---|
| Aminoglycoside | cephalothin<br>ampicillin<br>carbenicillin<br>clindamycin<br>chloramphenicol | *Staphylococcus epidermidis* | Aerbic<br>pH 7.4 |
| Aminoglycoside | cephalosporin<br>(ไม่ 50 มล./ล.)<br>ampicillin<br>carbenicillin<br>tetracycline<br>chloramphenicol<br>cotrimoxazole<br>anti-Gram + ve<br>(e.g. clindamycin) | *Klebsiella edwardsii*<br>(N.C.T.C. 10896) | Aerobic<br>pH 7.4 |
| Clindamycin | gentamicin | *Clost.perfringens* | Anaerobic |
| Penicillin G | streptomycin<br>(ไม่ 80 มล./ล.) | *Sarcina lutea* | Aerobic |
| Carbenicillin<br>(typical<br>therapeutic<br>concentrations | gentamicin<br>(typical therapeutic<br>concentrations) | *Pseudomonas aeruginosa*<br>(N.C.T.C. 10701) | Aerobic<br>pH 6.4 |

2. การใช้สารยับยั้ง หรือทำลายฤทธิ์ของยาตัวอื่นในการวิเคราะห์

ตารางที่ 2 การยับยั้งฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะในระหว่างการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

| ยาปฏิชีวนะ | สารยับยั้ง* | สารทำลาย |
|---|---|---|
| B-lactam antibiotics | - | B lactamase |
| Aminoglycosides | laurylsulphate 20 ก./ล. หรือ sodium polyanethol sulphonate 10 ก./ล. | - |
| Cycloserine | D-alanine 20 มก./ล. | |
| Erythromycin | - | mild acid (0.1 NHCl) |
| Streptomycin | semicarbazide 1 ก./ล. | |
| Sulphonamides | para-amino benzoic acid 200 มก./ล. | - |
| Tetracyclines | - | magnesium sulphate 50 ก./ล. |
| Trimethoprim | thymidine 10 มก./ล. | - |

* เติมลงในอาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์

จุดมุ่งหมายในการวิจัยนี้ก็เพื่อ

1. ศึกษา semicarbazide ที่เป็นสารเคมีที่มีผลยับยั้งฤทธิ์ของ streptomycin และผลที่มีต่อยาปฏิชีวนะอื่น ๆ

2. นำประโยชน์มาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณยาปฏิชีวนะในยารวมโดยวิธีทางจุลชีววิทยา เนื่องจากพบว่ามียาปฏิชีวนะจำนวนมากที่ให้ร่วมกับ streptomycin โดยศึกษาวิจัยวิเคราะห์ปริมาณยา penicillinจากตำรับยารวม penicillin กับ streptomycin และเปรียบเทียบกับการใช้เชื้อจำเพาะที่ไวต่อยา penicillin

3. ใช้ตรวจหาปริมาณยาปฏิชีวนะ rifampin ในปีรั่มและน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยวัณโรคของเยื่อหุ้มสมองที่ได้รับยารวมที่มี streptomycin ซึ่งยังเป็นยาตัวหนึ่งที่สำคัญที่ใช้ในการรักษาวัณโรคอยู่ด้วย

# บทที่ 2

# วัสดุและวิธีการ

## I. วัสดุ

### 1. เชื้อจุลินทรีย์

1.1 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

1.2 *Sarcina lutea* ATCC 9341

1.3 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P

### 2. สารปฏิชีวนะ

2.1 Streptomycin sulphate ความแรง 767.05 ไมโครกรัม/มก.

2.2 Dihydrostreptomycin ความแรง 780.0 ไมโครกรัม/มก.

2.3 Kanamycin acid sulphate ความแรง 694.13 ไมโครกรัม/มก.

2.4 Penicillin G sodium ความแรง 1670.0 ไมโครกรัม/มก.

2.5 Rifampin ความแรง 1000.0 ไมโครกรัม/มก.

2.6 Streptopen (Dumex)

### 3. สารเคมี

3.1 Semicarbazide hydrochloride (The British Drug Houses LTD. England)

3.2 Dibasic potassium phosphate (May & Baker LTD, England)

3.3 Monobasic potassium phosphate (May & Baker LTD., England)

3.4 Sodium chloride (BHD. Chemical LTD., England)

### 4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1 Antibiotic assay media No. 1 (Difco. Laboratory, U.S.A.)

4.2 Antibiotic assay media No. 2 (Difco. Laboratory, U.S.A.)

4.3 Antibiotic assay media No. 5 (Difco. Laboratory, U.S.A.)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



5. เครื่องมือ

5.1 Analytical balance H6T (E. Metler, Switzerland)

5.2 Autoclave model HA-3D (Hirayama Manufacturing Co., Japan)

5.3 Cork borer No. 3.

5.4 Deep freeze refrigerator (Continental, U.S.A.)

5.5 Hot air oven model 27 (Precision Scientific Co., U.S.A.)

5.6 Incubator model 6 (Precision Scientific Co., U.S.A.)

5.7 Measuring pipette (Brand, West Germany)

5.8 Micropipette (Brand, West Germany)

5.9 Petridish (10 x 100 มม.) (Pyrex, U.S.A.)

5.10 Roux bottle

5.11 Spectronic 710 (Bausch& Lomb U.S.A.)

5.12 Test tube (Pyrex, U.S.A.)

5.13 Volumetric flask (Brand, Germany)

5.14 Vortex cyclomixer (Clay-Adams, U.S.A.)

5.15 Water bath (Precision Scientific Co., U.S.A.)

5.16 Sliding Caliper Maub-CH. Stainless (FWP., Poland)

II. วิธีการ

1. การศึกษาหาปริมาณ semicarbazide ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

1.1 การเตรียมสารละลาย semicarbazide

ให้มีความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0, 16.0 และ 18.0 มก./มล. โดยการชั่ง semicarbazide และละลายให้ได้สัดส่วนที่ต้องการ หรือโดยการเจือจาง โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวทำละลาย

1.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

โดย *S. lutea*, และ *S. aureus* จะใช้ในรูปของเชื้อ

ส่วน *B.subtilis* จะใช้ในรูปสปอร์

การเตรียมเชื้อทำโดยการเพาะเชื้อบน Media No. 1 agar slantแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ นาน 24 ชม. ใช้น้ำเกลือ 0.9% ปราศจากเชื้อ ล้างเชื้อออกมาจากผิวหน้าของอาหาร แล้วปรับความขุ่นของเชื้อที่ได้โดยการวัดด้วยเครื่อง spectophotometer ที่ 580 นาโนเมตร ได้ค่า transmission 25% เมื่อเจือจางเป็น 1 : 10. เก็บเชื้อใช้ได้ 5 วัน ในตู้เย็น ปริมาณที่ใช้ในการทดลอง 2.0% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ส่วนการเตรียมสปอร์ ทำโดยการเพาะเชื้อบน Media No. 1 agar alant บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ นาน 16-24 ชม. ใช้น้ำเกลือ 0.9% ปราศจากเชื้อ ปริมาตรประมาณ 3 มล. ล้างเชื้อออกมาใส่ลงใน Roux bottle ที่มีอาหารแข็งเลี้ยงเชื้ออยู่แล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ นาน 5 วัน หลังจากนั้นล้างสปอร์ออกมาโดยใช้น้ำเกลือ 0.9% ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 50 มล. นำไปปั่น และเทส่วนน้ำทิ้ง เติมน้ำเกลือ 0.9% ปราศจากเชื้อลงไปผสมกับตะกอนเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยความร้อน (heat-shock) ที่อุณหภูมิ 70° ซ นาน 30 นาที เก็บสปอร์ไว้ในตู้เย็น ปริมาณที่ใช้ในการทดลอง 0.1% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.3 การทดลอง

ก) การเตรียม plate โดยหลอมอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เย็นลงที่ 48-50° ซ เติมเชื้อหรือสปอร์ที่เตรียมไว้ลงในอาหาร ผสมให้เข้ากันแล้วปิเปตดูดปริมาตร 15 มล. ลงใน plate ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็นจนอาหารแข็ง แล้วใช้ cork borer No. 3 เจาะลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ระยะห่างเท่า ๆ กัน โดย 1 plate จะเจาะ 6 หลุม แล้วใช้เครื่องดูดวุ้นออก

ข) หยอดสารละลายของ semicarbazide ลงใน plate แต่ละหลุม โดยใช้ micropipette ขนาดปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยแต่ละความเข้มข้นจะทดสอบกับแต่ละเชื้อได้ค่าอย่างน้อย 5 ค่า ทิ้ง plate ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. ก่อนนำไปบ่มที่ 37° ซ นาน 24 ชม.

1.4 การวัดผล

ให้อ่านค่าเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส (inhibition zone) ของแต่ละความเข้มข้นกับเชื้อแต่ละชนิดโดยใช้เวอร์เนีย และนำมาหาเฉลี่ย

จากการทดลองจะทำให้ทราบค่าสูงสุดของ semicarbazide ที่ไม่มีผลต่อเชื้อทดสอบและสามารถนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2. การหาปริมาณ semicarbazide ที่ยับยั้งฤทธิ์การฆ่าเชื้อโดย streptomycin

2.1 การเตรียมสารละลาย semicarbazide

ให้เตรียมโดยวิธีเดียวกับข้อ 1.1.1 ให้มีความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 มก./มล.

2.2 การเตรียมสารละลาย streptomycin

ชั่ง streptomycin (Standard) เตรียมให้มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล. โดยละลายใน phosphate buffer pH 7.8-8.0

2.3 การทดลอง

ก) การเตรียม plate เช่นเดียวกับข้อ 1.3 ก จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองคือ สปอร์ของ *B.subtilis* อาหารที่ใช้เป็น Media No. 5 และเจาะ 6 หลุม/plate

ข) ผสมสารละลายข้อ 2.1 และ 2.2 โดยใช้ปริมาตรเท่ากันในหลอดทดลอง เขย่าด้วยเครื่องผสม (Mixer) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ณ 30 ° ซ (อุณหภูมิห้อง) และ 37 ° ซ แล้วนำสารละลายผสมมาหยอดลงหลุม เมื่อเวลาต่าง ๆ กัน คือ 0, 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที ตามลำดับ plate ที่หยอดแล้วจะต้องทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ° ซ นาน 24 ชม. เช่นเดียวกับข้อ 1.3 ช

2.4 การวัดผล

ให้อ่านค่าเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสของแต่ละค่าที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ กันแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

จากการทดลองจะทำให้ทราบค่าของปริมาณ semicarbazide ที่ยับยั้งฤทธิ์การฆ่าเชื้อของ streptomycin

3. การศึกษาผลของ semicarbazide ต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อของยาปฏิชีวนะกลุ่มต่าง ๆ

3.1 การศึกษาผลของ semicarbazide ต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อของยาปฏิชีวนะในกลุ่ม streptomycin

ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดลองนี้คือ dihydrostreptomycin และ kanamycin ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม aminoglycosides

3.2 การศึกษาผลของ semicarbazide ต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อของยาปฏิชีวนะในกลุ่มอื่น

ยาปฏิชีวนะในการทดลองนี้คือยากลุ่ม penicillin ได้แก่ penicillin G sodium และยากลุ่ม rifamycins ได้แก่ rifampin

การเตรียมสารละลาย semicarbazide การเตรียมสารละลายยาปฏิชีวนะ การทดลอง และการวัดผล เช่นเดียวกับข้อ 2 โดยใช้ pH ของ phosphate buffer, อาหารเลี้ยงเชื้อ และเชื้อทดสอบ ดังนี้

| ยาปฏิชีวนะ | Phosphate buffer pH | Media No | เชื้อทดสอบ |
|---|---|---|---|
| Dihydrostreptomycin | 8.0 | 5 | *Bacillus subtilis* |
| Kanamycin | 8.0 | 5 | *Staphylococcus aureus* |
| Penicillin G Sodium* | 6.0 | 2 | *Staphylococcus aureus* |
| Rifamycin | 7.38+ | 1 | *Sarcina lutea* |

* เจือจาง 1 : 100 ก่อนหยอดหลุมใน plate

\+ ใช้สารละลาย methanol : phosphate buffer pH 7.38 = 20 : 80

4. การวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะ penicillin G จากยาปฏิชีวนะ penicillin-streptomycin

4.1 การวเคราะห์ยาปฏิชีวนะ penicillin G จากยาปฏิชีวนะผสม penicillin-streptomycin โดยใช้ semicarbazide

4.1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่ง standard ของ penicillin G 20 มก. (ความแรง 1670.0 หน่วย/มก.) ละลายโดย phosphate buffer pH 6.0 และเตรียมให้มีความเข้มข้น 0.64, 0.80, 1.00, 1.25 และ 1.56 ไมโครกรัม/มล.

4.1.2 การเตรียมสารละลายยาปฏิชีวนะผสม

ชั่งตัวอย่างมาโดยคำนวณให้มีตัวยา penicillin ใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ต้องการวิเคราะห์ (1.0 ไมโครกรัม/มล.)

ยาปฏิชีวนะรวม Pen-strep ขนาด 1 dose ประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| Streptomycin sulphate | 0.5 ก. | |
| Sodium penicillin G | 100,000 หน่วย | 400,000 หน่วย |
| Procaine penicillin G | 300,000 หน่วย | |

1 dose มีน้ำหนัก 1.055 กรัม/ขวด

Standard ของ penicillin 20 มก. มีความแรง $1670 \times 20 = 33,400$ หน่วย

จาก penicillin 400,000 หน่วย อยู่ในผงยา 1.055 ก.

" 33,400 $\frac{1.055 \times 33400}{400,000}$

$= 0.0880$ ก.

$\sim$ 90 มก.

ชั่งผงยาปฏิชีวนะรวม 90 มก. จะมีปริมาตรของ streptomycin ประมาณ 45 มก. ในvolumetric flask ขนาด 100 มล. ละลายน้ำกลั่นปริมาตร 45 มล.

คำนวณปริมาณของ semicarbazide ที่ใช้ทำปฏิกิริยาเพื่อยับยั้งฤทธิ์ของ streptomycin เติมลงไปเขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิและเวลา จากผลการทดลองจากข้อ 1 (ความเข้มข้น semicarbazide 1.5 มก./มล. ปริมาตร 0.5 มล. บ่มที่ 30° ซ นาน 60 นาที) ใช้ phosphate buffer pH 6.0 เติมให้ครบ 100 มล.

4.1.3 <u>การทดลอง</u>[12]

ก) การเตรียม plate เช่นเดียวกับข้อ 1.3 ก จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองคือ *S.aureus* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Media No. 1 เตรียม 15 plates ต่อ 1 ตัวอย่าง เจาะหลุม 6 หลุมต่อ plate

ข) หยอดสารละลาย โดยการแบ่ง plates ที่เตรียมไว้ออกเป็น 5 ชุด ๆ ละ 3 plates โดยทุกชุดแต่ละ plates จะหยอดสารละลายมาตรฐานค่ากลาง คือ 1.0 ไมโครกรัม/มล. สลับกับสารละลายมาตรฐานอื่น หรือสารละลายตัวอย่าง ดังนี้

| | | | |
|---|---|---|---|
| ชุด a | หยอดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น | 0.64 | ไมโครกรัม/มล. |
| ชุด b | หยอดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น | 0.80 | ไมดครกรัม/มล. |
| ชุด c | หลอดสารละลายตัวอย่าง ความเข้มข้น | 1.00 | ไมโครกรัม/มล. |
| ชุด d | หลอดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น | 1.25 | ไมโครกรัม/มล. |
| ชุด e | หยอดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น | 1.56 | ไมโครกรัม/มล. |

ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. ก่อนนำไปบ่มที่ 37° ซ นาน 24 ชม.

4.1.4 <u>การวัดผล</u>

ให้อ่านค่าเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใสของแต่ละชุด บันทึกผลนำไปคำนวณเพื่อหาค่านำไป plot กราฟของยามาตรฐาน และหาค่าความแรงของยาตัวอย่างได้ ดังนี้

ก) หาค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสของสารละลายมาตรฐานค่ากลาง (1.0 ไมโครกรัม/มล.) ของแต่ละชุดโดย 1 ชุด จะมี 9 ค่า

ข) หาค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสของสารละลายมาตรฐานค่ากลาง (1.0 ไมโครกรัม/มล.) รวมทั้งหมด 4 ชุด เท่ากับ 36 ค่า ยกเว้นจากชุดที่หยอดสลับกับสารละลายตัวอย่าง ค่าเฉลี่ยจาก 36 ค่า แทนด้วย C

ค) หาค่า correction factor ของแต่ละชุด โดยนำค่า C ตั้ง หักลบออกด้วยค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสของสารละลายมาตรฐานค่ากลาง ได้เครื่องหมาย + หรือ - ขึ้นกับค่าเฉลี่ยจาก ก. แต่ละชุดว่ามีค่าน้อยหรือมากกว่าค่า C

ง) หาค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสของแต่ละสารละลายมาตรฐาน (0.64, 0.80, 1.25, 1.56) ซึ่งจะมี 9 ค่าต่อชุด

จ) หาค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่ถูกต้องของแต่ละชุด โดยนำค่าเฉลี่ยจากข้อ ง บวกกับข้อ ค ตามเครื่องหมายถ้าเป็น + ก็นำไปบวกเพิ่มค่า, ถ้าเป็น - นำไปหักลดค่า

ฉ) นำค่าจากข้อ จ เขียนกราฟของยามาตรฐานบนกระดาษกราฟ semilog 2-cycle โดยให้ความเข้มข้นของยามาตรฐาน หน่วยไมโครกรัม/มก. อยู่บนแกน log (หรือแกน Y ) และเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส หน่วย มม. อยู่บนแกนนอน (หรือแกน X )

การคำนวณเส้นกราฟจะผ่านจุดต่ำสุด และจุดสูงสุด โดยใช้สูตร

$$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5}$$

$$H = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

L = ค่าเส้นผ่าศูนย์กลางที่คำนวณไว้สำหรับความเข้มข้นต่ำสุดของกราฟยามาตรฐาน

H = ค่าเส้นผ่าศูนย์กลางที่คำนวณได้สำหรับความเข้มข้นสูงสุดของกราฟยามาตรฐาน

C = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสของสารละลายมาตรฐานค่ากลาง 36 ค่า

a,b,d,e = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่ถูกต้องของสารละลายมาตรฐาน 0.64, 0.80, 1.25, 1.56 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ

หรือเขียนกราฟยามาตรฐานโดยผ่านจุดสูงสุดและจุดต่ำสุด

ช) หาค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสของสารละลายตัวอย่าง และค่าเฉลี่ยของเส่นผ่าศูนย์กลางของโซนใสของสารละลายมาตรฐานกลางในชุดนั้น และนำมาหาค่าความแตกต่าง (และติดเครื่องหมาย + หรือ - ไว้)

ซ) นำค่าความแตกต่างไปบวกตามเครื่องหมายกับค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสของสารละลายมาตรฐานในกราฟยามาตรฐาน

ฌ) คำนวณหาปริมาณของยาตัวอย่าง โดยอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟและคูณด้วย dilution factorได้ความแรงของยาเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของผงยา คำนวณ % labeled amount

$$\% \text{ labled amount} = \frac{\text{ความแรงของยา} \times \text{ปริมาณผงยาต่อ 1 ขวด} \times 100}{\text{ความแรงของยาที่ระบุบนฉลาก}}$$

4.2 <u>การวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะ penicillin G จากยาปฏิชีวนะรวม penicillin-streptomycinโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีความไวจำเพาะ</u>

4.2.1 <u>การเตรียมสารละลายยามาตรฐาน</u>

ชั่ง standard ของ penicillin G 20 มก. ความแรง 1670.0 หน่วย /มก. ละลายโดย phosphate buffer pH 6.0 และเตรียมให้มีความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.10, 0.20 และ 0.40 ไมโครกรัม/มก.

4.2.2 <u>การเตรียมสารละลายยาปฏิชีวนะผสม</u>

ชั่งตัวอย่างมาโดยคำนวณให้มีตัวยา penicillin ใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ต้องการวิเคราะห์ (0.10 ไมโครกรัม/มล.)เช่นเดียวกับ 4.1.2

4.2.3 <u>การทดลอง</u>

ก. การเตรียม plate เช่นเดียวกับข้อ 1.3 ก จุลินทรีย์ที่ใช้มีความไวต่อ penicillin มาก คือ *Sarcina lutea* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Media No 1.เตรียม 15 platesต่อ 1 ตัวอย่าง เจาะหลุม 6 หลุมต่อ plate

ข. หยอดสารละลาย เช่นเดียวกับข้อ 4.1.3 ข โดยมีสารละลายมาตรฐานค่ากลางคือ 0.1 ไมโครกรัม/มล.

4.2.4 การวัดผล เช่นเดียวกับข้อ 4.1.4

5. การวิเคราะห์หาปริมาณ refampin ที่ให้ร่วมกับ streptomycin ในซีรั่มและน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยโดยใช้ semicarbazide

5.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่ง standard ของ rifampin 100 มก. (ความแรง 1000 ไมโครกรัม/มก.) ละลายโดยสารละลายผสมของ methanol และ phosphate buffer pH 7.38 ในอัตราส่วน 20 : 80 (v/v) และเตรียมให้มีความเข้มข้น 0.20, 0.25, 0.30, 0.35 และ 0.40 ไมโครกรัม/มก .

5.2 การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างเลือดและน้ำไขสันหลังได้จากผู้ป่วยวัณโรคของเยื่อหุ้มสมองที่ได้รับการรักษาด้วยยารวมดังนี้

1. Isoniazid (INH) รับประทาน 300 มก./วัน
2. Pyrazinamide รับประทาน 1-1.5 มก./วัน
3. Rifampin รับประทาน 450-600 มก./วัน
4. Streptomycin ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 0.75-1 ก./วัน

เก็บเลือดและน้ำไขสันหลังจากผู้ป่วยหลังรับยาไปแล้ว 3 ชั่วโมง ในแต่ละวันนาน 1 สัปดาห์ แยกเก็บซีรั่มในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 ° ซ จนกว่าจะนำออกมาใช้ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ใช้ให้เจือจางด้วยสารละลายผสมเช่นเดียวกับข้อ 5.1 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่พอเหมาะที่จะเกิดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใสขนาดที่อยู่ในช่วงของความเข้มข้นในกราฟยามาตรฐาน (0.20 - 0.40 ไมโครกรัม/มก.)

เนื่องจาก *Sarcina lutea* ที่ใช้ในการทดสอบไวเฉพาะต่อยาปฏิชีวนะ rifampin และ streptomycin (แต่ดื้อต่อ isoniazid และ pyrazinamide) จึงต้องยับยั้งฤทธิ์ของ streptomycin โดยใช้สารละลาย semicarbazide 20 มก./มล. ปริมาณ 0.1 มก. ผสมกับตัวอย่าง 1.0 มล. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30° ซ นาน 60 นาที

5.3 การทดลอง

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 4.1.3

ก. การเตรียม plate

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ คือ *S. lutea*

อาหารเลี้ยงเชื้อ Media No. 1 (Difco)

เจาะหลุม 6 หลุมต่อ plate

ข. หยอดสารละลายมาตรฐาน

ชุด a หยอดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.20 ไมโครกรัม/มล.

ชุด b หยอดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัม/มล.

ชุด c หยอดสารละลายตัวอย่าง

ชุด d หยอดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.35 ไมโครกรัม/มล.

ชุด e หยอดสารละลายยามาตรฐาน 0.40 ไมโครกรัม/มล.

แต่ละชุดหยอดสลับกับสารละลายมาตรฐาน 0.30 ไมโครกรัม/มล.

5.4 การวัดผล

ให้อ่านค่าเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใสของแต่ละชุด บันทึกผลและนำไปคำนวณเพื่อหาค่านำไปสร้างกราฟยามาตรฐาน และหาค่าความแรงของยาในตัวอย่างได้ตามข้อ 4.1.4

# บทที่ 3

## ผลการทดลอง

1. ปริมาณ semicarbazide ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

จากการทดลองความเข้มข้นของ semicarbazide ในขนาด 0 ถึง 2.0 มก./มล. ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อทดสอบทั้งหมด 4 ชนิด คือ *S. lutea*, *S. aureus*, และ *B. subtilis* แต่ความเข้มข้นในขนาดตั้งแต่ 10.0 มก./มล. ขึ้นไปจะมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้งหมดโดยทำให้เกิดโซนใส ดูตาราง 3 หน้า 16

ความเข้มข้นของ semicarbazide ต่ำสุดที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. lutea*, *S.aureus*, และ *B.subtilis* มีค่าเท่ากับ 6.0, 10.0 และ 4.0 มก./มล. ตามลำดับ

2. ปริมาณ semicarbazide ที่มีผลต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อโดย Streptomycin

ในการทดลองใช้ความเข้มข้นของ semicarbazide 0 ถึง 10.0 มก./มล. ผสมกับ streptomycin ที่มีความเข้มข้นขนาดคงที่เท่ากับ 100 มก./มล. ปริมาตรเท่ากัน ทำการทดลอง 2 ชุด คือบ่มที่อุณหภูมิ 30° และ 37° ซ พบว่าที่อุณหภูมิ 30° ซ ดูตารางที่ 4 หน้า 17 ความเข้มข้นต่ำสุดของ semicarbazide ที่มีผลต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อทดสอบ *B. subtilis* โดย streptomycin มีค่า 1.5 มก./มล. ในเวลา 180 นาที และความเข้มข้นขนาด 2.0 มก./มล. สามารถยับยั้งได้ในเวลาต่ำสุด 30 นาที ส่วนความเข้มข้นสูงสุดมีค่า 4.0 มก./มล.ที่สามารถยับยั้งการฆ่าเชื้อโดย streptomycin ได้ทุกระยะเวลา

เมื่อทดลองที่อุณหภูมิ 37° ซ ผลการทดลองในตารางที่ 5 หน้า 18 ความเข้มข้นต่ำสุดของ semicarbazide ที่มีผลต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อทดสอบ *B. subtilis* โดย streptomycin มีค่า 3.0 มก./มล. ในเวลา 60 นาที และความเข้มข้นขนาด 4.0 มก./มล. สามารถยับยั้งได้ในเวลาต่ำสุด 30 นาที ส่วนความเข้มข้นสูงสุดมีค่า 6.0 มก./มล. ที่สามารถยับยั้งการฆ่าเชื้อโดย streptomycin ได้ทุกระยะเวลา

045219

ใน control ซึ่งเป็น streptomycin ที่ไม่มี semicarbazide (มีค่าเป็น 0) พบว่าขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ยเมื่อเวลาต่าง ๆ กันเปลี่ยนไปเล็กน้อย โดยมีค่าเฉลี่ย 15.44 $\pm$ 0.36 มม. มีอุณหภูมิ 30 ° ซ และ 16.82 $\pm$ 0.43 มม. ที่อุณหภูมิ 37 ° ซ

จากการทดลองอุณหภูมิ 30 ° และ 37 ° ซ มีความแตกต่างกันในปริมาณต่ำสุดของ semicarbazide ที่ใช้ โดยที่อุณหภูมิ 30 ° ซ สามารถใช้ปริมาณของ semicarbazide ต่ำกว่าเพียง 2.0 มก./มล. ในเวลาต้ำสุด 30 นาที เพื่อยับยั้งผลการฆ่าเชื้อของ streptomycin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล.

ตารางที่ 3 ผลการยับยั้งการเจริญของ semicarbazide ที่มีต่อเชื้อทดสอบ

| Semicarbazide (มก./มล.) | ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ยที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (มม.) | | |
|---|---|---|---|
| | *Sarcina lutea* | *Staphylococcus aureus* | *Bacillus subtilis* |
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.25 | 0 | 0 | 0 |
| 0.5 | 0 | 0 | 0 |
| 1.0 | 0 | 0 | 0 |
| 2.0 | 0 | 0 | 0 |
| 4.0 | 0 | 0 | 12.2 |
| 6.0 | 11.6 | 0 | 15.9 |
| 8.0 | 12.2 | 0 | 17.1 |
| 10.0 | 14.4 | 14.2 | 20.9 |
| 12.0 | 15.7 | 14.3 | 20.7 |
| 14.0 | 16.3 | 14.6 | 23.3 |
| 16.0 | 16.5 | 15.0 | 23.4 |
| 18.0 | 17.2 | 15.9 | 24.3 |

ตารางที่ 4 ผลของ semicabazide ที่มีต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อ *Bacillus subtilis* โดย streptomycin ที่อุณหภูมิ 30 °ซ

| Semicarbazide (มก./มล.) | ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ย (มม.) ณ เวลาต่างๆ กัน(นาที) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 30 | 60 | 90 | 120 | 180 |
| 0 | 15.7 | 15.7 | 15.7 | 15.0 | 15.1 |
| 0.5 | 14.2 | 13.5 | 13.0 | 11.6 | 9.4 |
| 1.0 | 10.3 | 9.4 | 9.3 | 9.2 | 8.1 |
| 1.5 | 8.5 | 7.8 | 8.2 | 8.1 | 0 |
| 2.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5.0 | 7.9 | 7.9 | 7.9 | 8.6 | 8.6 |
| 6.0 | 8.0 | 8.0 | 8.8 | 9.0 | 9.4 |
| 8.0 | 9.1 | 8.9 | 9.1 | 9.7 | 10.6 |
| 10.0 | 10.2 | 11.4 | 10.2 | 11.3 | 11.2 |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ผลของ semicarbazide ต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อ *Bacillus subtilis* โดย streptomycin ที่อุณหภูมิ 37 °ซ

| Semicarbazide (มก./มล.) | ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ย (มม.) ณ เวลาต่าง ๆ กัน (นาที) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 30 | 60 | 90 | 120 | 180 |
| 0 | 16.9 | 17.3 | 16.6 | 17.1 | 16.2 |
| 0.5 | 15.2 | 14.0 | 13.4 | 12.3 | 11.8 |
| 1.0 | 12.0 | 11.4 | 11.3 | 11.3 | 11.0 |
| 1.5 | 10.9 | 10.6 | 10.5 | 10.4 | 10.1 |
| 2.0 | 9.6 | 9.6 | 9.2 | 9.3 | 9.0 |
| 3.0 | 8.1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8.0 | 9.5 | 10.0 | 10.2 | 9.2 | 11.7 |
| 10.0 | 10.9 | 11.3 | 11.5 | 11.0 | 12.0 |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ผลของ semicarbazide ต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อของยาปฏิชีวนะกลุ่มต่าง ๆ

3.1 ผลของ semicarbazide ต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อของยาปฏิชีวนะในกลุ่ม streptomycin (dihydrostreptomycin, kanamycin)

ความเข้มข้นของ semicarbazide ตั้งแต่ 0.5 ถึง 2.0 มก./มล. ทั้งที่อุณหภูมิ 30° และ 37°ซ ไม่มีผลต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อ *B.subtilis* ของ dihydrostreptomycin ในระยะเวลา 60 นาที ถึง 180 นาที โดยเปรียบเทียบกับ control dihydrostreptomycin เมื่อไม่มี semicarbazide ณ อุณหภูมิและระยะเวลาเดียวกันจะมีค่าเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ยใกล้เคียงกันมาก และความเข้มข้นของ semicarbazide ตั้งแต่ 3.0 ถึง 10.0 มก./มล. พบว่าขนาดของโซนใสเฉลี่ยจะค่อย ๆ ลดลงความความเข้มข้นของ semicarbazide ที่มากขึ้นและระยะเวลาที่บ่มไว้นานขึ้น ค่าต่ำสุดเท่ากับ 13.9 มม. ดูจากตารางที่ 6 หน้า 20

ส่วนผลของ semicarbazideต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อของ kanamycin ที่อุณหภูมิ 30° และ 37°ซ พบว่าทำให้ kanamycin มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *S.aureus* ลดลง จะเห็นได้ในความเข้มข้นของ semicarbazide ตั้งแต่ 1.0 – 1.5 มก./มล. ขึ้นไปเมื่อเปรียบเทียบกับ control ดูตารางที่ 7 หน้า 21

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ผลของ semicarbazide ต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อ *Bacillus subtilis* โดย dihydrostreptomycin ที่อุณหภูมิ 30 ° และ 37 °ซ

| Semicarbazide (มก./มล.) | ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ย (มม.) ณ เวลาต่าง ๆ กัน (นาที) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | อุณหภูมิ 30 °ซ | | | อุณหภูมิ 37 °ซ | | |
| | 60 | 120 | 180 | 60 | 120 | 180 |
| 0 | 17.9 | 17.5 | 17.6 | 17.9 | 17.5 | 17.6 |
| 0.5 | 17.8 | 17.5 | 17.3 | 17.9 | 17.5 | 17.6 |
| 1.0 | 17.8 | 17.5 | 17.3 | 17.9 | 17.5 | 17.5 |
| 1.5 | 17.7 | 17.5 | 17.9 | 17.9 | 17.2 | 17.3 |
| 2.0 | 17.5 | 17.4 | 17.2 | 17.5 | 17.2 | 17.3 |
| 3.0 | 16.5 | 16.5 | 16.4 | 16.5 | 16.5 | 16.5 |
| 4.0 | 16.2 | 15.2 | 15.5 | 16.5 | 15.4 | 15.0 |
| 5.0 | 16.0 | 15.5 | 15.2 | 16.5 | 14.6 | 14.5 |
| 6.0 | 15.3 | 14.6 | 14.6 | 15.0 | 14.6 | 13.9 |
| 8.0 | 14.3 | 15.5 | 14.1 | 14.5 | 14.2 | 13.9 |
| 10.0 | 15.7 | 15.0 | 14.5 | 16.5 | 15.0 | 13.9 |

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ตารางที่ 7 ผลของ semicarbazide ต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดย kanamycin ที่อุณหภูมิ 30 ° และ 37 °ซ

| Semicarbazide (มก./มล.) | ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ย (มม.) ณ เวลาต่าง ๆ กัน (นาที) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | อุณหภูมิ 30 °ซ | | | อุณหภูมิ 37 °ซ | | |
| | 60 | 120 | 180 | 60 | 120 | 180 |
| 0 | 13.6 | 13.2 | 12.5 | 13.6 | 13.2 | 12.4 |
| 0.5 | 13.6 | 12.5 | 12.0 | 13.6 | 12.6 | 11.2 |
| 1.0 | 12.8 | 12.0 | 12.0 | 13.0 | 11.8 | 10.7 |
| 1.5 | 12.8 | 12.0 | 10.8 | 12.5 | 11.1 | 10.9 |
| 2.0 | 11.5 | 11.0 | 10.2 | 11.9 | 10.7 | 10.2 |
| 3.0 | 11.0 | 9.7 | 9.0 | 10.7 | 9.0 | 9.2 |
| 4.0 | 9.5 | 9.2 | 8.0 | 9.2 | 8.5 | 8.0 |
| 5.0 | 8.5 | 7.6 | 7.6 | 8.2 | 7.5 | 7.5 |
| 6.0 | 8.3 | 7.6 | 7.6 | 8.0 | 7.5 | 7.5 |
| 8.0 | 8.3 | 7.6 | 7.6 | 8.0 | 7.5 | 7.5 |
| 10.0 | 8.5 | 8.4 | 8.5 | 8.5 | 8.2 | 8.0 |

3.2 ผลของ semicarbazide ต่อฤทธิ์การฆ่าเชื้อของยาปฏิชีวนะอื่น (penicillin G rifampin)

ความเข้มข้นของ semicarbazide ตั้งแต่ 0.5 ถึง 10.0 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 30° และ 37°ซ ในระยะเวลาต่างกันตั้งแต่ 60 ถึง 180 นาที ไม่มีผลต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อ *S.aureus* ของ penicillin G โดยเปรียบเทียบกับ control ณ อุณหภูมิและระยะเวลาเดียวกันโดยมีค่าเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยใกล้เคียงกันมาก และในกลุ่ม control penicillin G ที่ไม่มี semicarbazide พบว่า มีค่าเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ยลดลงเมื่อเวลามากขึ้น ดูตารางที่ 8 หน้า 23

ผลของ semicarbazide ต่อฤทธิ์การฆ่าเชื้อของ rifampin ดูตารางที่ 9 หน้า 24 จะคล้ายคลึงกับยาปฏิชีวนะในกลุ่ม streptomycin คือพบว่าความเข้มข้นของ semicarbazide ตั้งแต่ 0.5 ถึง 2.0 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 30°ซ ในระยะเวลาตั้งแต่ 60 ถึง 120 นาที และตั้งแต่ 0.5 ถึง 1.5 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 37°ซ ในระยะเวลา 60 นาที จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ยใกล้เคียงกับ control ณ อุณหภูมิ และระยะเวลาเดียวกัน และเมื่อความเข้มข้นของ semicarbazide มากขึ้นตั้งแต่ 3.0 ถึง 1.0 มก./มล. ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยจะลดลงมากอย่างเห็นได้ชัด

ตารางที่ 8 ผลของ semicarbazide ต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดย penicillin G ที่อุณหภูมิ 30 ° และ 37 °ซ

| Semicarbazide (มก./มล.) | ขนาดเส้นผ่าสูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ย(มม.) ณ เวลาต่าง ๆ กัน (นาที) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | อุณหภูมิ 30 °ซ | | | อุณหภูมิ 37 °ซ | | |
| | 60 | 120 | 180 | 60 | 120 | 180 |
| 0 | 19.0 | 17.5 | 15.7 | 19.3 | 17.0 | 15.5 |
| 0.5 | 19.0 | 17.5 | 15.5 | 18.9 | 17.2 | 15.0 |
| 1.0 | 19.0 | 17.9 | 15.8 | 19.3 | 17.0 | 15.9 |
| 1.5 | 19.0 | 17.8 | 15.6 | 19.3 | 17.0 | 14.8 |
| 2.0 | 19.3 | 17.7 | 15.8 | 19.3 | 17.1 | 14.8 |
| 3.0 | 19.1 | 17.9 | 15.8 | 19.3 | 17.1 | 14.9 |
| 4.0 | 19.0 | 17.5 | 15.8 | 19.3 | 17.1 | 14.9 |
| 5.0 | 19.0 | 17.5 | 15.8 | 19.3 | 17.1 | 15.7 |
| 6.0 | 19.1 | 17.2 | 15.8 | 18.8 | 17.1 | 15.2 |
| 8.0 | 19.0 | 17.2 | 15.8 | 18.9 | 17.0 | 15.2 |
| 10.0 | 19.0 | 17.2 | 15.6 | 18.2 | 17.1 | 14.8 |

ตารางที่ 9 ผลของ semicarbazide ต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อ *Sarcina lutea* โดย rifampin ที่อุณหภูมิ 30° และ 37°ซ

| Semicarbazide (มก./มล.) | ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ย (มม.) ณ เวลาต่าง ๆ กัน (นาที) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | อุณหภูมิ 30°ซ | | | อุณหภูมิ 37°ซ | | |
| | 60 | 120 | 180 | 60 | 120 | 180 |
| 0 | 31.4 | 30.5 | 30.8 | 31.2 | 30.8 | 30.5 |
| 0.5 | 31.0 | 30.5 | 30.8 | 30.2 | 30.9 | 30.3 |
| 1.0 | 31.4 | 30.5 | 28.8 | 30.2 | 24.2 | 22.3 |
| 1.5 | 31.2 | 30.2 | 23.5 | 30.0 | 19.0 | 20.5 |
| 2.0 | 31.0 | 30.6 | 23.3 | 26.2 | 17.2 | 14.7 |
| 3.0 | 25.9 | 17.0 | 15.9 | 20.5 | 12.3 | 12.9 |
| 4.0 | 19.1 | 15.4 | 15.3 | 14.5 | 12.1 | 12.0 |
| 5.0 | 16.5 | 13.5 | 14.6 | 12.5 | 12.3 | 12.0 |
| 6.0 | 13.5 | 13.5 | 13.6 | 12.5 | 12.3 | 11.9 |
| 8.0 | 13.2 | 13.2 | 12.8 | 12.5 | 12.1 | 11.9 |
| 10.0 | 13.0 | 13.0 | 11.6 | 12.5 | 12.3 | 11.3 |

4. ผลการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะ penicillin G จากยาปฏิชีวนะรวม penicillin-streptomycin โดยเปรียบเทียบใช้ semicarbazide กับการใช้จุลินทรีย์ที่มีความไวจำเพาะ

ผลการทดลองตารางที่ 10 หน้า 26 พบว่าการวิเคราะห์ penicillin G จากยาปฏิชีวนะรวม penicillin-streptomycin โดยการใช้ semicarbazide จะได้ค่าความแรงของ penicillin G หน่วยไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิกรัมของผงยารวมมากกว่าการวิเคราะห์โดยใช้จุลินทรีย์ที่มีความไวจำเพาะ *(S. lutea)* ในการทดลองที่ 1 และ 2 และน้อยกว่าในการทดลองที่ 3 อย่างไรก็ตามความแรงของ penicillin G เฉลี่ยทั้ง 2 วิธีมีค่าใกล้เคียงกันคือ การวิเคราะห์โดยวิธีใช้ semicarbazide มีค่า 426.78 $\pm$ 25.98 หน่วย/มก. หรือ 112.56 $\pm$ 6.86% labeled amount และการวิเคราะห์โดยวิธีใช้เชื้อ *S. lutea* มีค่าความแรง 424.71 $\pm$ 18.90 หน่วย/มก. หรือ 112.02 $\pm$ 4.99% labeled amount

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 ผลเปรียบเทียบการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะ penicillin G จากยาปฏิชีวนะรวม penicillin-streptomycin โดยใช้ semicarbazide และเชื้อจุลินทรีย์ที่ไวจำเพาะ

| การทดลองที่ | ความแรงของ Penicillin G (หน่วย/มก.) โดยการวิเคราะห์ใช้ | |
|---|---|---|
| | semicarbazide | เชื้อจุลินทรีย์ที่ไวจำเพาะ |
| 1 | 426.78 (112.56) | 420.59 (110.39) |
| 2 | 452.76 (119.42) | 445.33 (117.46) |
| 3 | 400.80 (105.71) | 408.22 (107.87) |
| เฉลี่ย $\pm$ SD | 426.78$\pm$25.98 (112.56$\pm$6.86) | 424.71$\pm$18.90 (112.02$\pm$4.99) |

( ) = % Labeled amount

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ rifampin ที่ให้ร่วมกับ streptomycin ในซีรั่มและน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยโดยใช้ semicarbazide

ความเข้มข้นของ rifampin ในซีรั่มและน้ำไขสันหลังในผู้ป่วย 5 ราย ภายหลังจากได้รับยารวมเพื่อรักษาวัณโรคของเยื่อหุ้มสมอง ดังแสดงในตารางที่ 11 หน้า 28 และตารางที่ 12 หน้า 29 ตามลำดับ ระดับยา rifampin เฉลี่ยในซีรั่มจากผู้ป่วยทั้ง 5 ราย ในวันที่ 3, 4, 5, 6, 7 มีค่าเป็น 10.54, 5.68, 8.76, 2.88 และ 5.26 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ ค่าระดับยาเฉลี่ยรวมใน 1 สัปดาห์มีค่าเท่ากับ 6.86 $\pm$ 3.76 ไมโครกรัม/มล.

ส่วนระดับยา rifampin เฉลี่ยในน้ำไขสันหลังจากผู้ป่วยทั้ง 5 รายมีค่าต่ำกว่าโดยในวันที่ 3, 4, 5, 6, 7 มีค่าเป็น 0.31, 0.1, 0.21, 0.18 และ 0.57 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ ค่าระดับยาเฉลี่ยรวมใน 1 สัปดาห์มีค่าเท่ากับ 0.31 $\pm$ 0.32 ไมโครกรัม/มล.

รูปที่ 1 หน้า 30 แสดงความเข้มข้นเฉลี่ยของ rifampin ในซีรั่มและน้ำไขสันหลังในผู้ป่วยวัณโรคของเยื่อหุ้มสมอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ระดับของยา rifampin ในซีรั่มผู้ป่วยวัณโรคของเยื่อหุ้มสมองภายหลังได้รับยารวม

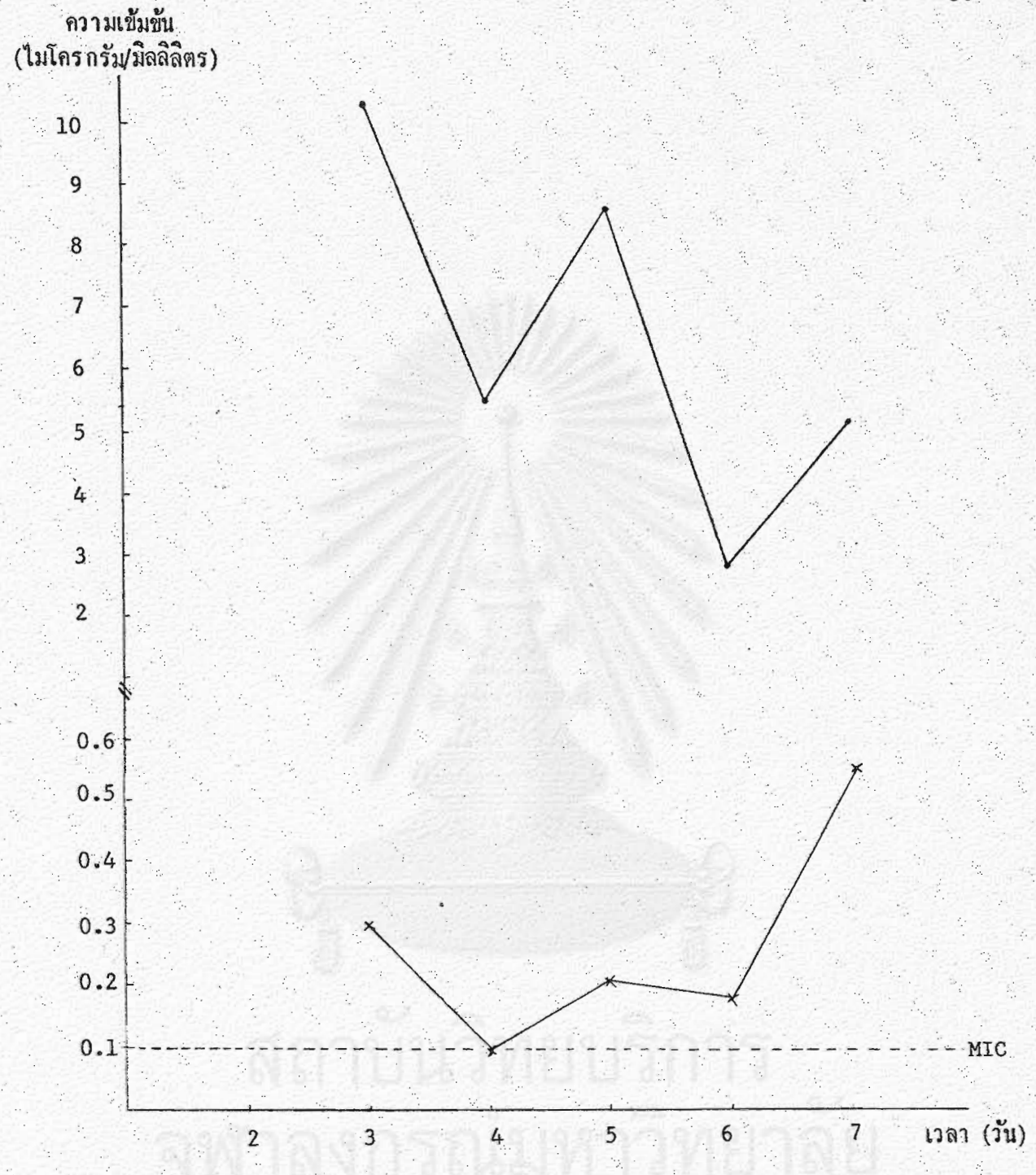
| ผู้ป่วย | ระดับเฉลี่ยของ rifampin (ไมโครกรัม/มล.) ภายหลังได้รับยา 3 ช.ม. ในวันที่ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 1 | 14.36 | 6.83 | 12.71 | - | - |
| 2 | 6.71 | - | - | - | 4.62 |
| 3 | - | 4.53 | - | - | - |
| 4 | - | - | 4.81 | 2.88 | 6.74 |
| 5 | - | - | - | - | 4.41 |
| ค่าเฉลี่ย | 10.54 | 5.68 | 8.76 | 2.88 | 5.26 |
| ค่าเฉลี่ยรวม $\pm$ SD | | | 6.86 $\pm$ 3.76 | | |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 ระดับของยา rifampin ในน้ำไขสันหลังผู้ป่วยวัณโรคของเยื่อหุ้มสมองภายหลังได้รับยารวม

| ผู้ป่วย | ระดับเฉลี่ยของ rifampin (ไมโครกรัม/มล.) ภายหลังได้รับยา 3 ช.ม. ในวันที่ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 1 | 0.14 | 0.10 | 0.11 | - | - |
| 2 | 0.48 | - | - | - | 1.16 |
| 3 | - | 0.10 | - | - | - |
| 4 | - | - | 0.31 | 0.18 | 0.26 |
| 5 | - | - | - | - | 0.30 |
| ค่าเฉลี่ย | 0.31 | 0.10 | 0.21 | 0.18 | 0.57 |
| ค่าเฉลี่ยรวม ± SD | | | 0.31 ± 0.32 | | |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 1 ความเข้มข้นเฉลี่ยของยา rifampin ในซีรั่ม (.) และน้ำไขสันหลัง (×) ที่ช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ในผู้ป่วยวัณโรคของเยื่อหุ้มสมอง

# บทที่ 4

## วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การศึกษาพบว่า semicarbazide มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของยาปฏิชีวนะ ดังนั้นจะต้องคำนึงถึงปริมาณที่ใช้เพราะถ้าหากไม่เหมาะสมโดยใช้มากเกินไป ผลการทดลองอาจความผิดพลาดได้ผลมากกว่าความจริงจากผลของ semicarbazide ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อร่วมเข้าไปด้วย. *S. aureus* มีความไวต่อ semicarbazide ในความเข้มข้นสูงตั้งแต่ 10.0 มก./มล. ขึ้นไป ส่วน *S. lutea* จะมีความไวในความเข้มข้นตั้งแต่ 6.0 มก./มล. และ *B. subtilis* มีความไวสูงกว่าคือตั้งแต่ 4.0 มก./มล. ขึ้นไป

Semicarbazide hydrochloride ในทางเคมีใช้เป็น reagent สำหรับ ketone และ aldehydes สามารถให้สารประกอบลักษณะผลึกที่มีจุดหลอมเหลวเฉพาะ[13] และในทางจุลชีววิทยาใช้เป็นตัวยับยั้งหรือต้าน (microbiological antagonist) ต่อ streptomycinในการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะรวมโดยการเติมลงในอาหารที่ใช้วิเคราะห์ 1 ก./ล.[11] ส่วนปริมาณ semicarbazide ที่มีผลต่อการยับยั้งการฆ่าเชื้อ *B. subtilis* โดย streptomycin จากการทดลองนี้โดยการผสม semicarbazide กับ streptomycin และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30° และ 37°ซ ในเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าที่อุณหภูมิ 30°ซ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้เมื่อใช้ streptomycin 100 ไมโครกรัม/มก. คือ 1.5 มก./มล. (ในช่วงเวลา 180 นาที) ต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 37°ซ ซึ่งมีค่า 3.0 มก./มล. (ในเวลา 60 นาที) และจากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ semicarbazide ที่เหมาะสมคือความเข้มข้น 2.0 มก./มล. สามารถยับยั้งการฆ่าเชื้อของ streptomycin ได้ในระยะเวลาสั้นที่สุด คือ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ และเป็นความเข้มข้นที่เชื้อ *B. subtilis* ยังไม่ไวต่อ semicarbazide ซึ่งจากการทดลองข้างต้นมีค่าตั้งแต่ 4.0 มก./มล. ขึ้นไป ในการทดลองพบว่าหลังจากความเข้มข้นของ semicarbazide ที่สูงขึ้นจากความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการฆ่าเชื้อโดย streptomycin ได้แล้วจะเกิดโซนใสขึ้นอีกและมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ semicarbazide เพิ่มขึ้น อาจ

เนื่องจากผลของ semicarbazide ในความเข้มข้นที่สูงเกินหรือที่เหลือไปทำให้มีผลยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ

ผลของ semicarbazide ที่มีผลยับยั้งต่อการฆ่าเชื้อโดยยาปฏิชีวนะในกลุ่ม streptomycin หรือ aminoglycosides คือ dihydrostreptomycin และkanamycin จะมีผลในความเข้มข้นของ semicarbazide ตั้งแต่ 3.0 และ 1.0-1.5 มก./มล. ขึ้นไปตามลำดับ และความเข้มข้นต่ำกว่าจะไม่มีผลหรือมีผลน้อยมาก เช่นเดียวกับยากลุ่ม rifamycin คือ rifampin ส่วนในกลุ่ม penicillins พบว่าความเข้มข้นของ semicarbazide ตั้งแต่ 0.5 ถึง 10.0 มก./มล. ไม่มีผลต่อการฆ่าเชื้อเลย

ดังนั้นการใช้ semicarbazide ในการยับยั้งต่อการฆ่าเชื้อโดย streptomycin เพื่อวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่ม streptomycin (aminoglycoside) และยาปฏิชีวนะในกลุ่มอื่นข้างต้นได้จะต้องใช้ในความเข้มข้นของ semicarbazide ที่ไม่มีผลต่อยาปฏิชีวนะที่ต้องการวิเคราะห์ หรือปริมาณที่ใช้จะต้องต่ำกว่าปริมาณที่ไปมีผลต่อยาปฏิชีวนะตัวอื่นที่ต้องการวิเคราะห์ซึ่งผสมอยู่กับ streptomycin รวมทั้งพิจารณาความเข้มข้นต่ำสุดของ semicarbazide ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบด้วย ในกลุ่ม control ที่ไม่มี semicarbazide พบว่าจะมีค่าเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ยลดลงเมื่อเวลามากขึ้นด้วยดังนั้นเวลาที่ใช้ในการบ่ม (ไม่ควรเกิน 120 นาที) เป็นปัจจัยหนึ่งที่จะต้องนำมาพิจารณาในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมของ semicarbazide ที่ใช้ รวมทั้งอุณหภูมิด้วยเพราะมีผลต่อยาปฏิชีวนะที่ไวต่ออุณหภูมิมากรวมทั้งมีผลต่อ semicarbazide ในการยับยั้งต่อการฆ่าเชื้อโดยยาปฏิชีวนะ ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของยาปฏิชีวนะนั้น ๆ

ได้มีผู้ศึกษาพบว่า *S. lutea* (ATCC 9341) สามารถใช้ในการวิเคราะห์ penicillin ได้โดยไม่มีผลจาก streptomycin ที่มีอยู่ด้วย ในเมื่อมีปริมาณของ streptomycin ไม่เกิน 80 ไมโครกรัม/มล. ผสมกับ penicillin ตั้งแต่ 1 หน่วย/มล. ขึ้น จึงได้มีการนำไปใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์ยารวม[11,14]

ในการวิจัยได้นำ semicarbazide มาใช้ในการวิเคราะห์ penicillin G จากยารวม penicillin-streptomycin เปรียบเทียบกับการใช้ *S. lutea* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความไวจำเพาะต่อ penicillin G จากการทดลองได้ค่าความแรงของ penicillin G เฉลี่ยมีค่า 426.78 ± 25.98 หน่วย/มก. ของผงยา ซึ่งใกล้เคียงกับการวิเคราะห์โดยใช้จุลินทรีย์ที่มีความไวจำเพาะซึ่งมีค่า 424.71 ± 18.90 หน่วย/มก.ของผงยา และเมื่อคำนวณเป็น %labeled amount พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกัน คือ 112.56 ± 6.86% และ 112.02 ± 4.97% ตามลำดับ แม้ว่าในการทดลองวิเคราะห์โดยใช้ semicarbazide จะได้ค่าความแรงมากกว่าวิธีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะใน 2 จาก 3 การทดลอง. นอกจากนั้นแต่ละการทดลองโดยวิธีทั้ง 2 แบบพบว่ามีความแตกต่างกันในค่าความแรงที่ได้เพราะในการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยามักมีปัจจัยหลายอย่างที่จะต้องควบคุมเนื่องจากมีอิทธิพลต่อผลการทดลองที่ได้ ได้แก่ ปริมาณของเชื้อ ความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเสื่อมของยามาตรฐาน เป็นต้น ดังนั้นจะต้องทำกราฟของยามาตรฐานใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง และควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ให้ใกล้เคียงกันทุกครั้งที่ทำการทดลอง[15,16] ผลจากการทดลองเมื่อนำไปเทียบกับมาตรฐานกำหนด[17] ซึ่งระบุให้มีปริมาณยา penicillin G sodium ไม่ต่ำกว่า 90% และสูงไม่เกิน 120% แสดงว่า ความแรงรวมของ penicillin G ในยาเตรียมที่เป็นยารวมอยู่ในกำหนด

การใช้ยารวมในการรักษาโรคที่สำคัญอันหนึ่งคือ การรักษาวัณโรคของเยื่อหุ้มสมองเกิดจาก *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งพบว่าจำเป็นต้องใช้ยารักษาอย่างน้อย 2 ชนิดร่วมกัน เพื่อป้องกันหรือลดการดื้อยา[18] และต้องคำนึงถึงฤทธิ์ของยารักษาโรครวมถึงการผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มสมองทั้งในภาวะที่เยื่อหุ้มสมองกำลังอักเสบ และการอักเสบลดลงแล้ว[19,21] การให้ยารักษวัณโรคหลาย ๆ ชนิดร่วมกันมีได้หลายรูปแบบ (regimens) แต่ยังไม่สามารถสรุปรูปแบบที่เหมาะสมที่สุดในการรักษาได้[22] การศึกษาระดับยารักษาวัณโรคในซีรั่มและน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยจะทำให้ทราบถึงความสามารถของยาที่ผ่านเข้าสู่ร่างกาย และการผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มสมองจริงหรือไม่ ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาวิเคราะห์ปริมาณยาปฏิชีวนะ rifampin ที่ให้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ streptomycin และยาอื่น ๆ คือ isoniazid และ pyrazinamide เพื่อรักษาวัณโรคของเยื่อหุ้มสมองโดยใช้ semicarbazide ที่ยับยั้งผลการฆ่าเชื้อทดสอบของ streptomycin เติมในซีรั่มและน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยก่อนการวิเคราะห์ ปริมาณ semicarbazide ที่ใช้ได้คำนวณจากผลการศึกษาปริมาณของ streptomycin ในซีรั่มและน้ำ

ไขสันหลังจะมีค่าไม่เกิน 30-100 ไมโครกรัม/มล. เมื่อได้รับยาในขนาดรักษา (0.5-1 กรัม/วัน) [2,4,9] จึงใช้ปริมาณ semicarbazide ไม่เกิน 2.0 มก./มล. ในการยับยั้งผลการฆ่าเชื้อทดสอบโดย streptomycin

จากการศึกษาทำให้ทราบระดับของยา rifampin ในซีรัมและน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยจำนวน 5 รายภายหลังได้รับยารวม 3 ช.ม. ในแต่ละวันเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อวัณโรค (Minimal inhibition concentration หรือ MIC) ที่มีผู้ศึกษาไว้มีค่าเท่ากับ 0.1 ไมโครกรัม/มล. ในน้ำไขสันหลัง[23] พบว่ามีค่าเฉลี่ย (0.10-0.57 ไมโครกรัม/มล.) เท่ากับหรือมากกว่า MIC ของเชื้อวัณโรค จากข้อมูลดังกล่าวยังสามารถคำนวณหาความเข้มข้นเฉลี่ยของยาใน 1 สัปดาห์ ของผู้ป่วยรวม มีค่าความเข้มข้นเฉลี่ย 6.86 $\pm$ 3.76 ไมโครกรัม/มล. ในซีรัมและ 0.31 $\pm$ 0.32 ไมโครกรัม/มล. ในน้ำไขสันหลัง นำไปใช้ประโยชน์ต่อการวิจัยและการรักษาวัณโรคของเยื่อหุ้มสมองได้ต่อไป

นอกจากนี้ rifampin สามารถผ่านเยื่อหุ้มสมองของผู้ป่วยเพียงพอในน้ำไขสันหลังจะต้องมีค่าความเข้มข้นประมาณ 20% หรือน้อยกว่าความเข้มข้นของยาในเลือด[24-28] จากการทดลองคำนวณจากความเข้มข้นเฉลี่ยของยาในสัปดาห์ของผู้ป่วยรวมพบว่ามีค่า 4.52%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# เอกสารอ้างอิง


1. Jawetz, E., Melnick, J.E., Adelberg, E.A. Antimicrobial Chemotherapy in Review of Medical Microbiology 15th ed., Lange Medical Publications, Drawer, L., Los Altos, California, p. 177-145, 1982.

2. Gilman, A.G., Goodman, L.S., Rall, T.W., and Murad, F., Chemotherapy of Microbial Disease in The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th ed., Macmillan Publishing Company, New York, p. 1066-1094, 1985.

3. Rahall, J.J. Antibiotic Combination : The Clinicle relevance of Synergy and Antagonism, Medicine, 57 : 179, 1978

4. Meyers, F.H., Jawetz, E. and Goldfein, A. Combination of Antimicrobial Drugs in Review of Medical Pharmacology, 7th ed., Lange Medical Publications, Maruzen Asia (Pte) Ltd., Singapore, p. 598-602, 1980.

5. Sande, M.A., and Scheld, W.M. : Combination Antibiotic Therapy of Bacterial Endocarditis. Am. Intern. Med., 92 : 390-395., 1980.

6. Mandell, G.L., Kaye, D., Levison,M.L., and Hook, E.W., Enterococcal Endocarditis : A review of 38 Cases Arch. Intern. Med. 125 : 258-264, 1970.

7. Wilson, W.R., Wilkowske, C.J., Wright. A.J., Sande, M.A., and Geraci, J.E., Treatmant of Streptomycin-susceptible and Streptomycin-resistant Enterococcal Endocarditis Ann. Intern. Med., 100 : 816-823, 1984.

8. Goth, A., Drugs Used in Treatment of Tuberculosis in Medical Pharmacology, 9th ed., The C.V. Mosby Company, Saint Louis, p. 616-622, 1978.

9. Jawetz, E., Anti-infective Chemotherapeutic & Antibiotic Agents in Current Medical Diagnosis and Treatment (Krupp, M.A. and Chatton, M.J. eds.) Maruzen Asia Edition, Lange Medical Publications Singapore, p. 930-956, 1983.

10. Lester, T.W., Drug-resistant and Atypical Mycobacterial Disease, Bacteriology and treatment. Arch. Intern. Med., 139 : 1399-1401, 1979.

11. Holt, H.A. and Reeves,D.S. Assays of Mixtures of Antibiotic in Laboratory Method in Antimicrobial Chemotherpy, Churchill Livingstone, Endinburgh, London and New York, p. 164-167, 1978.

12. Code of Federal Redulations. Title 21 Food and Drugs Part 300-499, The Office of the Federal Register, National Archives and Records Service, General Services Administration, U.S. Goverment Printing Office, Washingtion, p. 244-262, 1979.

13. Windholz, M., Budavari, S., Blumetti, R.F., and Otterbein, E.S., The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 10th ed., Merck & Co., Inc., New York, p. 1214, 1983.

14. Raahave, D., Paper Disk-Agar Diffusion Assay of Penicillin in the Presence of Streptomycin. Antimicrob. Ag. Chemother., 6 : 603-605, 1974.

15. Kavanagh, F. Introduction in Analytical Microbiology Vol. II., Academic Press, New York and London, p 1-12, 1972.

16. Hugo, W.B., and Russell, A.D., Principles of Method of Assaying Antibiotics in Pharmaceutical Microbiology, 3rd ed., Blackwell Scientific., Publications,Osney Mead, Oxford, p. 140-142, 1983.

17. The United State Pharmacopoea 21st Revision, The National Formulary, 16th ed., United State Pharmacopoca Convention, Inc, Rockville, p. 594, 1980.

18. Steiner, P. and Portugaleza, C.,Tuberculous Menigitis in Children A Review of 25 Cases Observed between the Years 1965 and 1970 at the Kings County Medical Center of Brooklyn with Special Reference to the Problem of Infection with Primary Drug-resistant Strain of *M.Tuberculosis*. Ann. Rev. Respir. Dis., 107 : 22-29, 1973.

19. Bradbury, M.W., The Barrier to Drugs, Neurotransmitters and Metabolites in The Concept of a Blood-Brain Barrier, Chichester, John Wiley & Sons, p. 323-350, 1979.

20. Forgan-Smith, R., Elard, G.A., Newton, D. and Mitchison, D.A., Pyrazinamide and Other Drugs in Tuberculous Miningitis, Lancet, 2 : 374, 1973.

21. Place, V.A., Pyle, M.W. and Huerga, J.D.L., Ethambutol in Tuberculous Meningitis, Am. Rev. Respir. Dis., 99 : 783-785, 1969.

22. Kernbaum, S. and McCracken, G.H., Treatment of Tuberculous Meningitis (Letter). J. Pediatr., 87(5) : 837-838, 1975.

23. Yoshikawa, T.T. and Jujita, N.K. "Antituberculous drug" Med. Clin. North. Am., 66(1) : 209-219, 1982.

24. Sifontes, J.E., Rifampin in Tuberculosis Merningitis J. Pediatr. 87(6) : 1015-1017, 1975.

25. D' Oliveira, J.J.G; Cerebrospinal Fluid Concentrations of Rifampin in Meningeal Tuberculosis Am. Rev. Respir. Dis. , 106 : 432-437, 1972.

26. Sippel, J.E., Mikhail, I.A. and Girgis, N.I., Rifampin Concentration in Cerebrospinal Fluid of Patients with Tuberculous Meningitis. Am. Rev. Respir. Dis., 109 : 579-580, 1974.

27. Ostrow, J.H. and Bobrowitz, I.D. Levels of Rifampin in Cerebrospinal Fluid (Letter) Chest., 63(4) : 648-649., 1973.

28. Pilheu, J.A., Rifampin Concentrations in Cerebrospinal Fluid of Patients with Tuberculus Meningitis (Letter) Am. Rev. Respir. Dis., 111(2) : 240, 1975.

# ภาคผนวก

## 1. การเตรียมสารละลาย

### 1.1 น้ำเกลือ 0.9%

| | |
|---|---|
| Sodium chloride | 0.9 ก. |
| Distilled water q.s. | 1000.0 มล. |

ละลาย sodium chloride ในน้ำกลั่น กรองผ่านกระดาษกรองแล้วฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 °ซ 15 นาที

### 1.2 Phosphate buffer pH 6.0

| | |
|---|---|
| Dibasic potassium phosphate | 2.0 ก. |
| Monobasic potassium phosphate | 8.0 ก. |
| Distilled water q.s. | 1000.0 มล. |

ละลายสารทั้ง 2 ในน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วย 18N phosphoric acid หรือ 10N potassium hydroxide ให้ได้ pH 5.95-6.05 และผ่านการฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 °ซ 15 นาที

### 1.3 Phosphate buffer pH 7.38

| | |
|---|---|
| Dibasic potassium phosphate | 7.6 ก. |
| Monobasic potassium phosphate | 2.1 ก. |
| Distilled water q.s. | 1000.0 มล. |

ละลายสารทั้ง 2 ในน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วย 18N phosphoric acid หรือ 10N potassium hydroxide ให้ได้ pH ตามต้องการ และฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 °ซ 15 นาที

1.4 Phosphate buffer pH 8.0

| | | |
|---|---|---|
| Dibasic potassium phosphate | 16.73 | ก. |
| Monobasic potassium phosphate | 0.523 | ก. |
| Distilled water q.s. | 1000.0 | มล. |

ละลายสารทั้ง 2 ในน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วย18N phosphoric acid หรือ 10N potassium hydroxide ให้ได้ pH 7.9-8.1แล้วผ่านการฆ่าเชื้อด้วย autoclaveอุณหภูมิ 121 °ซ 15 นาที

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 Antibiotic medium No. 1

| | | |
|---|---|---|
| Peptone | 6.0 | ก. |
| Pancreatic digest of casein | 4.0 | ก. |
| Yeast extract | 3.0 | ก. |
| Beef extract | 1.5 | ก. |
| Dextrose | 1.0 | ก. |
| Agar | 15.0 | ก. |
| Distilled water q.s. | 1000.0 | มล. |

ชั่ง dehydrate medium มา 30.5 ก. ละลายในน้ำกลั่น 1000 มล. ต้มจนเดือดเพื่อให้ละลายหมดและผ่านการฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 °ซ 15 นาที pH สุดท้ายเท่ากับ 6.5-6.6

2.2 Antibiotic medium No. 2

| | | |
|---|---|---|
| Peptone | 6.0 | ก. |
| Yeast extract | 3.0 | ก. |
| Beef extract | 1.5 | ก. |
| Agar | 15.0 | ก. |
| Distilled water q.s. | 1000.0 | มล. |

ชั่ง dehydrate medium มา 25.5 ก. ละลายในน้ำกลั่น 1000 มล. ต้มจนเดือดเพื่อให้ละลายหมด และผ่านการฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 °ซ 15 นาที pH สุดท้ายเท่ากับ 6.5-6.6

2.3 Antibiotic medium No. 5

สูตรส่วนประกอบเช่นเดียวกับ 2.2 ยกเว้นให้ปรับ pH สุดท้าย หลังฆ่าเชื้อด้วย autoclave121 °ซ 15 นาที เป็น 7.8-8.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย