บทที่ 2

วารสารปริทรรศน์

2.1 ประวัติการค้นพบสารปฏิชีวนะ

การค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับสารปฏิชีวนะได้มีการเริ่มต้นมาเป็นเวลานาน กว่า 2500 ปีมาแล้วชาวจีนพบว่าเชื้อรา (Fungi) ที่เจริญบนถั่วเหลืองสามารถนำมาใช้รักษาโรคที่เป็นฝี และโรคติดเชื้ออื่นๆได้ และต่อมาพบว่าดินและพืชจะเป็นแหล่งของแบคทีเรีย และราที่ผลิตสารปฏิชีวนะ ในปี ค.ศ. 1877 Pasture และ Joubert เป็นผู้ค้นพบจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์โดยพบว่าโรคแอนแทรกซ์ (anthrax) ที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลไล (bacilli) จะเจริญอย่างรวดเร็วในยูรีน (urine) ที่ปราศจากเชื้อชนิดอื่น แต่จะไม่มีการเพิ่มจำนวนและตายอย่างรวดเร็วถ้ามีการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอากาศ ประวัติของการค้นพบสารปฏิชีวนะสามารถกล่าวโดยสังเขปได้ดังนี้ (Goodman and Gilman, 1975)

ค.ศ. 1881 Tyndall รายงานแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารที่มีราขึ้นปะปน จะตายหมด

ค.ศ. 1901 Emmerrich และ Low พบว่า ถ้านำเอาสารแขวนลอย (suspension) ของ *Pseudomonas aeruginosa* ฉีดเข้ากระต่ายก่อนที่จะฉีด *Bacillus anthracis* กระต่ายจะไม่เป็นโรคแอนแทรกซ์ เขาเรียกสารที่ยับยั้งการเจริญของ *B. anthracis* นี้ว่า pycocyanase เพราะคิดว่าสารนี้ทำหน้าที่เหมือนเอนไซม์ของ *Bacillus pycocyaneus*

ค.ศ. 1929 Alexander Fleming พบว่าเมื่อเลี้ยง *Staphylococcus aureus* ในจานเพาะเชื้อซึ่งมีราขึ้นปะปน จะเกิดบริเวณใสๆ รอบโคโลนีของราที่เจริญ แสดงว่าบริเวณนี้ไม่มีแบคทีเรียเจริญ เนื่องจากราสร้างสารพิษออกมาทำลายแบคทีเรียแต่ยังไม่ทราบชื่อของรา ต่อมาได้ศึกษาจนทราบว่ารานี้คือ *Penicillium notatum* และเรียกสารที่ราสร้างหรือผลิตว่าเพนนิซิลลิน

ค.ศ. 1939 Dubos ได้ตรวจดินจากรัฐนิวเจอร์ซี พบเชื้อ *Bacillus brevis* สร้างสารเคมีทำลายแบคทีเรียแกรมบวกได้ สารนี้ได้แก่แกรมมิซิดิน (gramicidin) และทัยโรซิดิน (tyrocidin) และในปีเดียวกันนี้พบ *Penicillium griseofulvum* สร้างกริซีโอฟุลวิน (griseofulvin) ยับยั้งการเจริญของราได้ดี

ค.ศ. 1944 Waksman ได้พบ *Streptomyces griseus* ผลิตสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคต่างๆได้ดี และเรียกสารนี้ว่าสเตรปโตมัยซิน

ค.ศ. 1945 มีการค้นพบ *Bacillus licheniformis* สร้างแบซิแทรซิน ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค.ศ. 1947 Burkholder ได้ตรวจดินจากเมืองเวเนซูเอลลา พบ *Streptomyces* sp. ผลิตสารเคมีเรียกว่าคลอแรมฟีนิคอล (chloramphenicol) หรือ คลอโรมัยเซทิน (chloromycetin) ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบและริคเกตเซีย จึงตั้งชื่อแบคทีเรียนี้ว่า *Streptomyces venezuelae*

ค.ศ. 1948 พบ *Streptomyces aureofaciens* สร้างออรีโอมัยซิน (aureomycin) หรือคลอเททราซัยคลิน (chlortetracycline) ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิดที่ดื้อต่อสเตรปโตมัยซิน และ เพนนิซิลลิน

ค.ศ. 1949 พบ *Streptomyces fradiae* สร้างนีโอมัยซิน ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ดี

ค.ศ. 1950 พบ *Streptomyces puniceus* สร้างวิโอมัยซิน (viomycin) ยับยั้งการเจริญของเชื้อวัณโรคได้ดี และพบ *Aspergillus fumigatus* สร้างฟูมิจิลลิน (fumigillin) ยับยั้งการเจริญของเชื้อบิด *Entamoeba histolytica* ได้ดี

ค.ศ. 1952 พบ *Streptomyces erythreus* สร้างอีรีโทรมัยซิน (erythromycin) ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี

ค.ศ. 1953 พบ *Streptomyces rimosus* สร้างเททราซัยคลิน (tetracycline) ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ดี

ค.ศ. 1954 พบ *Streptomyces* sp. สร้างซัยโคลซีรีน (cycloserine) ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี

ค.ศ. 1956 พบ *Streptomyces nodusus* สร้างแอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) ยับยั้งการเจริญของราได้ดี และพบ *Streptomyces orientalis* สร้างแวนโคมัยซิน (vancomycin) ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี

ค.ศ. 1957 พบ *Streptomyces kanamyceticus* สร้างคานามัยซิน ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ดี และพบ *Streptomyces mediterranei* สร้างไรฟามัยซิน (rifamycin) ยับยั้งการเจริญของมัยโคแบคทีเรีย (mycobacteria) ได้ดี

ค.ศ. 1963 พบ *Micromonospora purpurea* สร้างเจนทาไมซิน ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ดี

ปัจจุบันได้มีการค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ มากมายและนำมาใช้รักษาโรคอย่างแพร่หลาย สำหรับจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตสารปฏิชีวนะที่สำคัญได้แก่ แบคทีเรีย รา และ แอคติโนมัยซีทส์

2.2 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารปฏิชีวนะ

วิธีการสำคัญที่ใช้ในการวิเคราะห์สารปฏิชีวนะ แบ่งได้เป็นประเภทต่างๆ ดังนี้ (Hugo and Russel, 1984)

2.2.1 วิธีทางจุลชีววิทยา (Microbiological method) เช่น วิธีแพร่ทางวุ้น (agar diffusion method) เป็นต้น

2.2.2 วิธีทางภูมิคุ้มกัน (Immunological method) เช่น hemagglutination inhibition assay เป็นต้น

2.2.3 วิธีทางโครมาโตกราฟี (Chromatography method) เช่น วิธีไฮ เพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟี เป็นต้น

2.2.4 วิธีทางเอ็นไซม์ (Enzymatic method) เช่น acetylating radioenzyme assay

2.2.5 วิธีทางเคมี (Chemical method) เช่น paper electrophoresis assay

2.2.6 วิธีทางฟลูโอเรสเซนต์ (Fluorescent assay) เช่น fluorescene quenching assay

การเลือกใช้วิธีการวิเคราะห์ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของงาน บางครั้งอาจจำเป็นต้องใช้หลายวิธีร่วมกัน ซึ่งสิ่งที่ควรคำนึงถึงคือ ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่วิเคราะห์ ปริมาตรของสารที่วิเคราะห์ คุณสมบัติของสารที่วิเคราะห์ เช่น มีสารผสมร่วมหลายชนิด เป็นต้น จำนวนสารที่วิเคราะห์ ความละเอียดของค่าความแรงของสารที่วิเคราะห์ และความสามารถและความชำนาญของบุคลากรที่ทำการวิเคราะห์ เช่น นักจุลชีววิทยา นักเคมี เป็นต้น (มาลิน จุลศิริ, 2540)

2.3 สารปฏิชีวนะคานามัยซิน

คานามัยซินเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycoside antibiotics) ค้นพบครั้งแรกโดย Umezawa และคณะ ในปี 1957 ซึ่งสารปฏิชีวนะกลุ่มนี้มีความสำคัญทางการแพทย์ โดยมีประโยชน์ในการรักษาโรคของมนุษย์ สัตว์ และพืช สารปฏิชีวนะชนิดแรกที่ค้นพบคือ สเตรปโตมัยซิน ซึ่งใช้ในการรักษาวัณโรคในมนุษย์ ต่อมามีการค้นพบนีโอมัยซิน คานามัยซิน เจนทาไมซิน เป็นต้น ซึ่งออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้กว้าง การพัฒนาของสารปฏิชีวนะกลุ่มนี้ยังมีอย่างต่อเนื่อง และได้มีการแบ่งกลุ่มตามการสังเคราะห์ทางชีววิทยา (biosynthesis) ที่คล้ายกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 (Vandamme, 1984)

ตารางที่ 1 สารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์

Deoxystreptamine-containing antibiotics	
4,5-disubstituted	Neomycin, paromomycin, lividomycin, ribostamycin, xylostasin, butirosin and related substances
4,6-disubstituted	Kanamycin, nebramycin, seldomycin, gentamicin and related substances
Monosubstituted	Destomycin, hygromycin B and related substances
Streptidine (bluensidine)-containing antibiotics	Streptomycin and related substances
Actinamine-containing antibiotics	Spectinomycin
Monoaminocyclitol-containing antibiotics	Validamycin, hygromycin A, minosaminomycin, kasugamycin, fortimicin and related substances

ที่มา: Vandamme, 1984

2.3.1 จุลินทรีย์ที่สร้างคานามัยซิน

คานามัยซินเป็นสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินบริเวณ Nagano Prefecture ประเทศญี่ปุ่นคือ *Streptomyces kanamyceticus* ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Umezawa และคณะ ในปี 1957 (Umezawa *et al.*, 1960) ต่อมาพบว่านอกจากเชื้อดังกล่าวยังมี *Streptomyces mikakiensis* และ *Streptomyces canus* ที่สามารถผลิตคานามัยซินได้เช่นเดียวกัน แต่ในเชิงอุตสาหกรรมยังผลิตได้น้อย (Abou-Zeid and Issa,1971)

2.3.2 ลักษณะบางประการของ *Streptomyces kanamyceticus*

โคโลนีของ *S. kanamyceticus* เมื่อเจริญบนอาหารวุ้นจะมีสีเหลือง โดยอาจมีสีเขียวหรือสีชมพูปนอยู่ด้วย ไมซีเลียมมีความกว้างประมาณ 1 ไมโครเมตร และมีการแตกแขนง (branching) ส่วนของไมซีเลียมที่เจริญอยู่ในอากาศเรียกว่า แอเรียล ไมซีเลียม (aerial mycelium) จะมีสีขาวถึงสีเหลืองอ่อน สร้างก้านชูสปอร์ (sporophores) ที่ปลายเส้นใย ไม่พบส่วนเส้นใยที่ม้วนเป็นเกลียว (spiral) หรือกันหอย (whorl) ไมซีเลียมที่เจริญฝังลงในอาหารเรียกว่า เวเจตเททีฟ ไมซีเลียม (vegetative mycelium) จะใส (hyaline) พบว่าสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลอ่อนในอาหารบางชนิด เช่น glucose-asparagine agar และสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้หลายชนิด ซึ่งลักษณะการเจริญจะแตกต่างกันไปตามแต่ชนิดของอาหารที่ใช้ เช่น Glycerol-Czapek 's agar, Krainsky 's glucose, Asparagine agar, Calcium malate agar, Starch plate, Potato plug, Carrot plug, Blood agar, เป็นต้น (Umezawa *et al*., 1957)

2.3.3 การสังเคราะห์คานามัยซิน

การสังเคราะห์คานามัยซินทางชีววิทยา จะมีขั้นตอนสรุปดังนี้

Glucose

↓

Glucose-6-phosphate

↓

myoinosital

↓

2-deoxystreptamine-(P) (2DS)

2-deoxystreptamine-(P)(2DS) + NDP-6-amino-6-deoxy-D-glucose (6AG) +
UDP-3-amino-3-deoxy-D-glucose (3AG)

↓

Kanamycin A

2-deoxystreptamine-(P) (2DS) + NDP-2,6-diamino-2,6-dideoxy-D-glucose +
UDP-3-amino-3-deoxy-D-glucose (3AG)

↓

Kanamycin B

2-deoxystreptamine-(P) (2DS) + NDP-glucosamine +
UDP-3-amino-3-deoxy-D-glucose (3AG)

↓

Kanamycin C

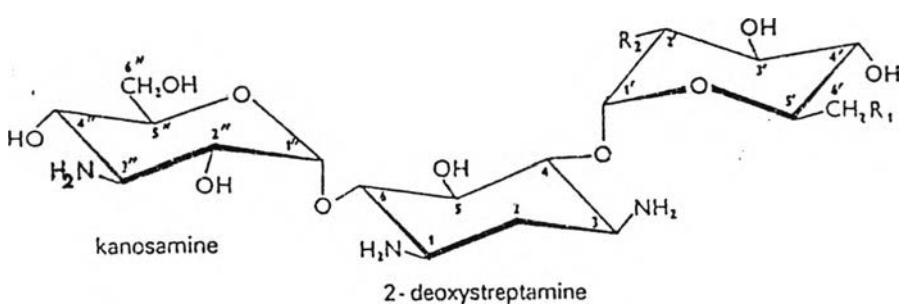
3AG 2DS และ 6AG สามารถสังเคราะห์ได้จากกลูโคส นอกจากนี้ 6AG ยังสามารถสังเคราะห์ได้จากกลูโคซามีน (glucosamine) (Umezawa *et al.*, 1968) สารเริ่มต้น (precursor) ในการสังเคราะห์คานามัยซิน ได้แก่ พาโรมามีน (paromamine) 4-ออกซี-(อัลฟา-ดี-กลูโคซามินีล)-2-ดีออกซีสเตรปทามีน (4-O-(α-D-glucosaminyl)-2-deoxystreptamine) 2-ดีออกซีสเตรปทามีน (2DS) และกลูโคซามีน (Umezawa *et al.*,1957,1969) ส่วนการสังเคราะห์คานามัยซินแบบกึ่งสังเคราะห์ พบว่าคานามัยซินซี สามารถสังเคราะห์ได้โดยเริ่มจากพาโรมามีนหรือสังเคราะห์ได้จากคานามัยซินบี (Umezawa *et al.*, 1957, 1968, 1969, 1977, 1986)

2.3.4 กลไกการออกฤทธิ์ (Mode of action)

เนื่องจากคานามัยซินจัดเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ ซึ่งมีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนเช่นเดียวกันกับนีโอมัยซิน เจนทาไมซิน และสเตรปโตมัยซิน เป็นต้น แต่จะมีปฏิกิริยาในการยับยั้งที่แตกต่างจากสเตรปโตมัยซิน คานามัยซินจะมีผลต่อไรโบโซม โดยทำปฏิกิริยาได้หลายบริเวณ (multiple site) ขณะที่สเตรปโตมัยซินจะมีผลต่อไรโบโซมอย่างเฉพาะเจาะจงเพียงบริเวณเดียว (single site) (Gale *et al.*, 1981) คานามัยซินมีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนของ 70S ไรโบโซม ไม่มีผลโดยตรงต่อปฏิกิริยา ribosome-bound acetylphe-tRNA แต่จะยับยั้งปฏิกิริยาการกระตุ้นโดยปัจจัย EF-G ที่รวมกับ GTP โดยการออกฤทธิ์จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของคานามัยซิน เช่น ในการรักษาโรคติดเชื้อของทางเดินปัสสาวะที่ปริมาณความเข้มข้นของคานามัยซินต่ำกว่า 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน แต่มีผลน้อยต่อการกระตุ้นการอ่านรหัสผิดบน mRNA (misreading) ที่ความเข้มข้นของคานามัยซิน 5-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะทำให้เกิดการอ่านรหัสบน mRNA ผิด โดยเฉพาะบริเวณการอ่านรหัสหยุด (terminal sign) เป็นผลให้เกิดการสะสมของสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) ที่ยาวผิดปกติ และคานามัยซินที่ปริมาณความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนได้มากขึ้น (Franklin and Snow, 1989)

2.3.5 โครงสร้างและสมบัติทางเคมีของคานามัยซิน

คานามัยซินมีโครงสร้างหลัก 3 ส่วน คือ 3-อะมิโน-3-ดีออกซี-ดี-กลูโคส (3-amino-3-deoxy-D-glucose (3AG)) 2-ดีออกซีสเตรปทามีน (2-deoxystreptamine (2DS) และอะมิโนซูการ์ ซึ่งส่วนที่เป็นอะมิโนซูการ์จะแตกต่างกันในแต่ละอนุพันธ์ของคานามัยซิน (Golberg *et al.*, 1972) โครงสร้างหลักของคานามัยซินแสดงดังรูปที่ 1



Kanamycin A : $R_1 = NH_2$, $R_2 = OH$

Kanamycin B : $R_1 = NH_2$, $R_2 = NH_2$

Kanamycin C : $R_1 = OH$, $R_2 = NH_2$

รูปที่ 1 โครงสร้างหลักของคานามัยซิน (Korzybski *et al.*, 1967)

คานามัยซินมี 3 อนุพันธ์ คือ คานามัยซินเอ (kanamycin A) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{18}H_{36}O_{11}N_4$ มีอะมิโนซูการ์เป็น 6-อะมิโน-6-ดีออกซี-ดี-กลูโคส (6-amino-6-deoxy-D-glucose (6AG)) (R_1= NH_2, R_2= OH) มีจุดหลอมเหลว 263-268 องศาเซลเซียส คานามัยซินบี (kanamycin B) มีสูตรโมโลกุลเป็น $C_{18}H_{37}O_{10}N_5$ มีอะมิโนซูการ์เป็น 2,6-ไดอะมิโน-2,6-ไดดีออกซี-ดี-กลูโคส (2,6-diamino-2,6-dideoxy-D-glucose) (R_1= NH_2, R_2 = NH_2) มีจุดหลอมเหลวสูงกว่า 170 องศาเซลเซียส (Maeda *et al.*, 1958) คานามัยซินซี (kanamycin C) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{18}H_{36}O_{11}N_4$ มีอะมิโนซูการ์เป็น 2–อะมิโน-2-ดีออกซี-ดี-กลูโคส (2-amino-2-deoxy-D-glucose) (glucosamine) (R_1 = OH, R_2 = NH_2) มีจุดหลอมเหลวประมาณ 270 องศาเซลเซียส (Golberg *et al.*, 1972)

ในการผลิตคานามัยซิน อนุพันธ์คานามัยซินเอ จะเป็นอนุพันธ์หลักที่ผลิตขึ้น (Umezawa *et al.*, 1960) คานามัยซินทั้ง 3 อนุพันธ์ มีสมบัติละลายได้ดีในน้ำ ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์เช่น อะซีโตน (acetone) เอธิลอะซีเตท (ethyl acetate) บิวทิลอะซีเตท (butyl acetate) อีเทอร์ (ether) เบนซีน (benzene) ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) (Maeda *et al.*, 1958) ทุกอนุพันธ์ของคานามัยซินจะให้ผลบวกเมื่อทดสอบด้วยปฏิกิริยานินไฮดริน (ninhydrin) ที่ละลายในไพริมิดีน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ทดสอบสารที่มีหมู่เอมีน (Scott, 1969) ให้ผลลบเมื่อทดสอบด้วยปฏิกิริยา Tollens ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ (Umezawa *et al.*, 1960)

อนึ่งแต่ละอนุพันธ์ของคานามัยซินสามารถทำให้อยู่ได้หลายรูปแบบ โดยแต่ละรูปแบบ จะมีลักษณะแตกต่างกันออกไป เช่น คานามัยซินไฮโดรคลอไรด์ (kanamycin hydrochloride) มีลักษณะเป็นผงสีขาวรูปร่างไม่แน่นอน ละลายได้ดีในน้ำ เมธานอล (methanol) ละลายได้เล็กน้อยในเอธานอล (ethanol) แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ตัวอื่นๆ เช่น อะซีโตน เอธิลอะซีเตท อีเทอร์

คานามัยซินซัลเฟต (kanamycin sulfate) มีลักษณะเป็นผงสีขาวแต่จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองที่อุณหภูมิ 253 องศาเซลเซียส และเป็นสีดำที่อุณหภูมิ 276 องศาเซลเซียส ละลายได้ดีในน้ำ แต่ไม่ละลายในเมธานอล เอธานอล รวมทั้งตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ เช่น อะซีโตน เอธิลอะซีเตท อีเทอร์

คานามัยซินเบส (kanamycin base) ละลายได้ดีในน้ำ และเมธานอล แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ เช่น เอธิลอะซีเตท อีเทอร์ จากสมบัติการละลายและไม่ละลายในเมธานอล จึงสามารถเปลี่ยนรูปของคานามัยซินไฮโดรคลอไรด์ และคานามัยซินเบส เป็นตะกอนของคานามัยซินซัลเฟต (Umezawa *et al.*, 1960)

คานามัยซินเอ ไม่ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟูริกเข้มข้น จะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275-280 นาโนเมตร มีชื่อเรียกทางการค้า เช่น Kantrex Enterokanamycin Kanamycin A sulfate Kantrexil Resistomycin Kanabristol เป็นต้น

คานามัยซินบี ไม่ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต แต่เมื่อทำการไฮโดรไลซ์ในกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มัล เป็นเวลา 40 นาที จะดูดกลืนแสงได้เล็กน้อยที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร สามารถละลายได้ในน้ำและฟอร์มามีด (formamide) ละลายได้เล็กน้อยในคลอโรฟอร์ม และไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ แต่จะไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ตัวอื่นๆ

เมื่อทำการย่อยสลายคานามัยซินบีในกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มัล โดยให้ความร้อนเป็นเวลา 30 นาที พบว่าจะได้ degradation product ที่มีแอคติวิตีเหลืออยู่ 20 เปอร์เซนต์ ซึ่งในภาวะเดียวกันนี้คานามัยซินเอ จะไม่มีแอคติวิตีเหลืออยู่ คานามัยซินบีมีชื่อทางการค้า เช่น Bekamycin Aminodeoxykanamycin และ NK1006

คานามัยซินซี ไม่ดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต สามารถละลายในน้ำ ละลายได้เล็กน้อยในฟอร์มามีด แต่จะไม่ละลายในเมธานอล เอธานอล ไอโซโพรพานอล เอ็น-บิวทานอล (n-butanol) ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (isoamyl alcohol) เมธิลเอธิลคีโตน อะซีโตน คลอโรฟอร์ม คาร์บอนเตตระคลอไรด์ เบนซีน โทลูอีน ปิโตรเลียมอีเทอร์ เอสเทอร์ และไดออกเซน คานามัยซินซี เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มัล เป็นเวลา 10 นาที จะสูญเสียแอคติวิตีถึง 40 เปอร์เซนต์ และจะสูญเสียแอคติวิตีทั้งหมดเมื่อทำปฏิกิริยานาน 30 นาที

คานามัยซินซี จัดเป็นไอโซเมอร์ (isomer) ของคานามัยซินเอ สามารถออกฤทธิ์คล้ายคลึงกับคานามัยซินเอ แต่กรณีของแบคทีเรียแอซิดฟาสต์ คานามัยซินซีจะออกฤทธิ์ได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับคานามัยซินเอ นอกจากนี้คานามัยซินซียังถูกผลิตออกมาในปริมาณน้อยมาก (Budavari, 1989; Korzybski *et al.*, 1967; Schmitz *et al.*, 1958; Umezawa *et al.*, 1968; Umezawa *et al.*, 1969)

2.3.6 <u>การใช้คานามัยซินในการรักษาโรค</u>

คานามัยซินใช้รักษาโรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ เช่น โรคปอด ทอนซิลอักเสบ หลอดลมอักเสบ โรคที่เกิดจากอาการอักเสบของทางเดินปัสสาวะ เช่น ท่อปัสสาวะอักเสบ โรคติดเชื้อของผิวหนัง เยื่อบุอ่อน ต่อมน้ำเหลือง กระดูก อาการไอกรน วัณโรคปอด และวัณโรคของอวัยวะอื่นๆ (ไทยเมจิ ฟาร์มาซูติคอล, 2538)

ผลิตภัณฑ์คานามัยซินจะอยู่ในรูปของคานามัยซินซัลเฟต ($C_{18}H_{36}O_{11}N_4XH_2SO_4$) เช่น คานามัยซินโมโนซัลเฟต ในรูปแบบแคปซูล (capsule) ยาฉีดในรูปสารละลาย (solution) และครีม (ointment) (Umezawa, 1986) ปริมาณและวิธีการใช้ในผู้ใหญ่ให้วันละ 1-2 กรัม ในเด็กวันละ 30-35 มิลลิกรัม โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ การฉีดเข้าเส้นเลือด (Intravenous) ถ้าใช้รักษาอาการอักเสบของระบบทางเดินหายใจให้พ่นเข้าช่องจมูกด้วยเครื่องพ่นจมูก (ไทยเมจิ ฟาร์มาซูติคอล, 2538)

คานามัยซินให้ผลข้างเคียง ต่อระบบประสาทหู (ototoxicity) ทำให้หูอื้อ หูหนวก ทำให้อวัยวะรูปหอยโข่งของหูส่วนใน และ restibular portion ในหูของระบบประสาทรับเสียงถูกทำลาย เกิดอาการวิงเวียน ทรงตัวลำบาก เพราะเกิดจากการถูกกดของเส้นประสาทสมองคู่ที่ 8 นอกจากนี้ยังทำให้เกิดอาการแพ้ยา เป็นไข้ มีผื่นขึ้นตามผิวหนัง มีผลข้างเคียงต่อไต (nephrotoxicity) เช่นเดียวกับสเตรปโตมัยซิน นอกจากนี้ยังทำให้เกิด อาการช็อค อาการขัดในช่องอก หายใจขัด การบีบของหัวใจเร็วผิดปกติ ความดันโลหิตต่ำ เกิดอาการขาดวิตามินเค เช่น ปริมาณโปรทรอมบิน (prothrombin) ในเลือดต่ำ มีแนวโน้มที่เกิดการไหลออกของเลือด เกิดการขาดวิตามินบี เช่น ลิ้นอักเสบ เยื่อบุเมือกในปากอักเสบ เบื่ออาหาร เส้นประสาทอักเสบ ซึ่งจะพบเป็นส่วนน้อยอีกด้วย (Goodman and Gilman, 1975)

2.3.7 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ

2.3.7.1 สารพันธุกรรม

มีการศึกษาพบว่าการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะจะเกี่ยวข้องกับพลาสมิด โดยยีน (gene) ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์มักจะอยู่บนโครโมโซม และยีนที่ควบคุมการแสดงออกให้เกิดการสังเคราะห์อาจจะอยู่บนพลาสมิด (Baltz, 1980; Hopwood *et al*., 1977) เซลล์ที่ไม่มีพลาสมิดมีแต่โครโมโซมอาจจะไม่สามารถสังเคราะห์สารปฏิชีวนะได้ (Okanishi and Umezawa, 1978) ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์มักจะจัดเรียงกันอยู่เป็นกลุ่ม (cluster) บนโครโมโซม และอาจจะมีอยู่หลายกลุ่ม มักจะมียีนที่ควบคุมการทำให้เชื้อต้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่สังเคราะห์ได้นั้น อยู่ต่อกับยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์หรืออาจจะอยู่ในกลุ่มยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เลยก็ได้ แต่ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ และยีนที่ควบคุมการต้านทานจะไม่ถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ (promoter) เดียวกัน (Goodfellow *et al*., 1988) และการหายไปของพลาสมิดที่เกิดจากการถ่ายเชื้อ หรือการเก็บรักษาเชื้อจะทำให้จุลินทรีย์สูญเสียความสามารถในการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ (Okanishi *et al*., 1970)

2.3.7.2 สารอาหาร

แหล่งคาร์บอน (carbon source) ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้สังเคราะห์สารปฏิชีวนะได้นั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของสารปฏิชีวนะในการผลิตคานามัยซินโดย *Streptomyces kanamyceticus* K2-J ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 0.75 % สารสกัดจากเนื้อ (meat extract) 0.75 % เปปโตน (peptone) 0.3 % โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และ 1% ของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่า แป้ง (starch) ให้ผลผลิตของคานามัยซินสูงสุด กลูโคส (glucose) มอลโตส (maltose) จะให้ผลผลิตคานามัยซินรองลงมา และแลคโตส (lactose) จะให้ผลผลิตต่ำที่สุด (Umezawa *et al.*, 1960) และจากรายงานของ อรอนงค์ พริ้งศุลกะ (2540) ในการผลิตสารปฏิชีวนะโดย *S. kanamyceticus* UUNNK1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะคือแป้งในปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร

แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) ในการผลิตคานามัยซินสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายชนิด เช่น กากถั่วเหลือง (soybean meal) กากเมล็ดฝ้าย (cotton seed meal) กากถั่ว (peanut meal) สารสกัดจากเนื้อ (meat extract) เปปโตน (peptone) คอร์นสตีพลิเคอร์ (corn steep liquor) สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) จากการเพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* K2-J (Umezawa *et al.*, 1960) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 0.05 % โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.05 % แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.5 % โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และ 2 % ของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ พบว่ากากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการผลิตคานามัยซิน และการเติมคอร์นสตีพลิเคอร์ เปปโตน สารสกัดจากยีสต์ หรือไนเตรท เป็นต้น ในปริมาณเล็กน้อยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนหลักจะช่วยเพิ่มผลผลิตของคานามัยซิน (Umezawa *et al.*, 1957) มีรายงานการผลิตสารปฏิชีวนะโดย *S. kanamyceticus* UUNNK1 พบว่ากากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนหลัก และเปบโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนรองที่ปริมาณ 8 และ 1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะให้ผลผลิตของสารปฏิชีวนะสูงสุด (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2540) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าอาหารเลี้ยงเชื้อพวกอนินทรีย์สาร (synthetic media) จะให้ปริมาณการผลิตคานามัยซินต่ำ หรือไม่มีการผลิตเลย (Umezawa *et al.*, 1960)

แร่ธาตุ (Mineral) ชนิดและปริมาณของแร่ธาตุมีผลต่อการสังเคราะห์คานามัยซิน จากการเพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* ATCC 12853 ในอาหารเลี้ยงเชื้ออนินทรีย์สารต้องการแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) และไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ที่ความเข้มข้น 0.4 และ 1.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นของเหล็ก (Fe) และสังกะสี (Zn) ที่เหมาะสมในการผลิตคานามัยซินคือ 0.25 และ 0.575 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โมลิบดินัม (Mo) ที่ความเข้มข้น 0.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะเหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตคานามัยซิน แมงกานีส (Mn) และ แคลเซียม (Ca) ไม่มีผลต่อการผลิต แต่ทองแดง (Cu) โคบอลต์ (Co) นิเกิล (Ni) และวานาเดียม (V) มีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์คานามัยซิน

(Basak and Majumdar, 1975) และมีรายงานว่าการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต และซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$) จะเพิ่มปริมาณการผลิตคานามัยซิน (Umezawa *et al.*, 1960)

2.3.7.3 สารเริ่มต้น (precursor)

การสร้างสารปฏิชีวนะเมื่อเติมสารเคมีบางชนิดลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำหน้าที่เป็นส่วนประกอบของสารที่ต้องการผลิตได้โดยตรง ทำให้สังเคราะห์สารปฏิชีวนะได้เร็วและมากขึ้น สารเริ่มต้นของการสร้างคานามัยซิน ได้แก่ พาโรมามีน 4-ออกซิ-(อัลฟา-ดี-กลูโคซามีนิล-2-ดีออกซีสเตรปทามีน) 2-ดีออกซีสเตรปทามีน (2DS) และ กลูโคซามีน (Umezawa *et al.*, 1960; Golets *et al.*, 1995)

มีการเติมสารที่เรียกว่า ไบโอเรคกลูเลเตอร์ (bioregulator) ซึ่งไม่ใช่สารเริ่มต้น เช่น เอ-แฟคเตอร์ (A-factor) (2-isocapryloyol-3R-hydroxymethyl-γ-butyrolactone) ในการสังเคราะห์สเตรปโตมัยซิน (Khokhlov and Tovarova, 1979)

2.3.7.4 การให้อากาศ (aeration) และการกวน (agitation)

การผลิตคานามัยซินเป็นการหมักแบบใช้ออกซิเจน มีการกวนเพื่อเพิ่มการละลายของออกซิเจน พบว่าการให้ออกซิเจนที่มากเกินไปจะไม่มีผลต่อการสังเคราะห์คานามัยซิน แต่การลดการให้ออกซิเจนและอัตราการกวน จะส่งผลให้การสังเคราะห์ลดลง (Brinbery *et al.*, 1970) ในการหมักสารที่ใช้ลดการเกิดฟองคือ พาราฟินเหลว (liquid paraffin) น้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil) และซิลิโคน (silicone) เป็นต้น (Umezawa *et al.*, 1960)

2.3.7.5 อุณหภูมิ

S. kanamyceticus จะสามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้างคือ 25-35 องศาเซลเซียส แต่ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 27-29 องศาเซลเซียส (Umezawa *et al.*, 1960)

2.3.7.6 ค่าพีเอช

ค่าพีเอชมีความสำคัญต่อการผลิตสารปฏิชีวนะมาก พบว่าที่พีเอชต่ำกว่า 7.0 จะไม่มีการผลิตนีโอมัยซิน (Majumdar and Majumdar, 1971) และพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตคานามัยซิน จะอยู่ในช่วงที่เป็นด่างคือ 8.0-8.6 (Basak and Majumdar, 1973) และจากรายงานของ อรอนงค์ พริ้งศุลกะ (2540) ในการผลิตสารปฏิชีวนะโดย *S. kanamyceticus* UUNNK1 พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมคือ 8.0-8.6 จะมีการผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุด

2.3.7.7 เอนไซม์ (Enzyme)

ในการผลิตคานามัยซินเอนไซม์ที่มีความสำคัญ คือ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) เช่นเดียวกันกับการผลิตนีโอมัยซิน และสเตรปโตมัยซิน โดยการสร้างคานามัยซินจะมีผลโดยตรงกับแอคติวิตีของเอนไซม์ เอนไซม์ชนิดนี้จะถูกยับยั้งที่พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 7.0 การเติมแคลเซียม และแมกนีเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มการสร้างเอนไซม์และคานามัยซิน แต่แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ และ EDTA จะยับยั้งการสร้างเอนไซม์และคานามัยซิน (Basak and Majumdar, 1978)

2.3.8 การสกัดและการทำคานามัยซินให้บริสุทธิ์

2.3.8.1 การสกัด (extraction)

จากการเพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* เพื่อผลิตคานามัยซิน ในส่วนของน้ำหมักอาหารเลี้ยงเชื้อ (fermentation broth) จะพบคานามัยซินในส่วนน้ำใส (filtrate) แต่จะไม่พบในส่วนของเส้นใย ซึ่งส่วนน้ำใสเมื่อสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ เช่น บิวทานอล เอธิลอะซีเตท อีเธอร์ คลอโรฟอร์ม เบนซีน ที่ค่าพีเอช 2-9 พบว่าสารที่สกัดได้จะไม่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบคือ *Mycobacterium* sp. 607 แต่สารสกัดด้วยบิวทานอลจะสามารถยับยั้ง *Bacillus subtilis* ได้ (Umezawa *et al.*, 1960)

การแยกเส้นใยออกจากน้ำหมักอาหารเลี้ยง จะใช้การปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ซึ่งการปรับพีเอชของน้ำหมักอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.5-5.0 ด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) จะทำให้แยกส่วนของเส้นใยออกจากส่วนน้ำใสได้ดีขึ้น หรือการกรองจะง่ายขึ้นโดยตั้งน้ำหมักทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (Umezawa *et al.*, 1960)

2.3.8.2 การทำคานามัยซินให้บริสุทธิ์

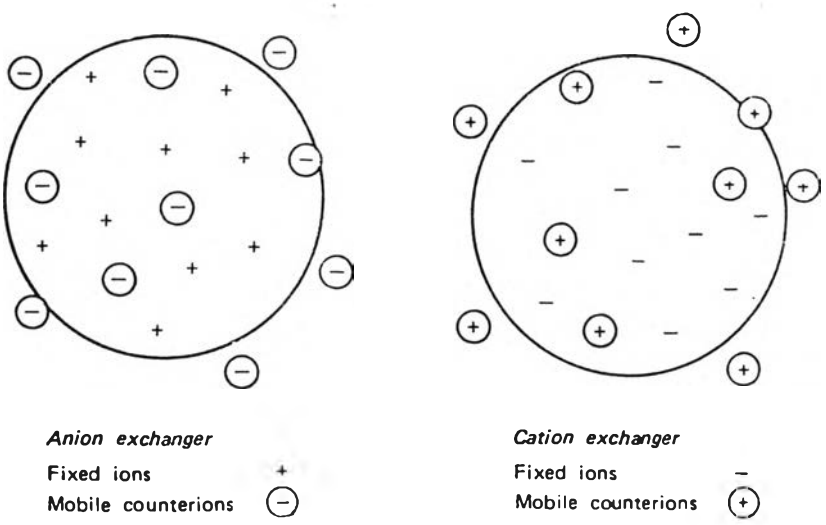
วิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Scott, 1971) เป็นวิธีการแยกโดยอาศัยแรงดึงดูดของประจุตรงข้าม ระหว่างประจุบนโมเลกุลของสารที่จะแยกกับประจุบนอนุภาคของเรซิน (resin) ซึ่งเป็นส่วนคงที่ โมเลกุลของสารใดที่ไม่มีประจุหรือประจุชนิดเดียวกันกับอนุภาคเรซินก็จะผ่านไปและถูกชะออกจากคอลัมน์ก่อนด้วยบัฟเฟอร์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นหรือเปลี่ยนพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ก็จะสามารถชะสารที่เกาะอยู่กับเรซินออกได้ อนุภาคเรซินแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ ตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation exchanger) มีอนุภาคเรซินเป็นประจุลบ และตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchanger) มีอนุภาคเรซินเป็นประจุบวก ดังแสดงในรูปที่ 2

ธรรมชาติของสารที่นำมาใช้เป็นเรซิน ได้แก่ สารพวกโพลีสไตรีน (polystyrene) ที่เติมหมู่แอซิดิคเช่น $-SO_3H$ $-COOH$ หรือหมู่เบซิคเช่น $-NR_3$ $-NH_3^+$ ดังแสดงในตารางที่ 2 ตัวเลขตามหลังชื่อเรซินจะบอก degree of cross-linkage เช่น โดเวกซ์ 50-X8 หมายถึงมีการใส่สาร divinylbenzene ในขณะที่ทำการสังเคราะห์โพลีเมอร์นี้ลงไป 8 เปอร์เซนต์ หรือโดเวกซ์ 50-X2 โดเวกซ์ 50-X12 เป็นต้น โพลีเมอร์ใดที่ปริมาณร่างแหสูงจะทำให้โมเลกุลสารผ่านไปได้ช้า ดังนั้นเรซินพวกนี้จึงไม่เหมาะที่จะใช้แยกสารโมเลกุลใหญ่ๆ ส่วนมากจะใช้ในการแยกสารโมเลกุลเล็กที่มีประจุเช่น เปปไทด์ หรือน้ำตาลที่มีฟอสเฟตเป็นต้น และสารอีกประเภทคือ สารพวกโพลีแซคคาไรด์ที่ใช้มากคือ เซลลูโลส และเซฟาเดกซ์ (sephadex) ที่เติมหมู่ diethylaminoethyl (DEAE) หมู่ carboxymethyl (CM) หมู่ฟอสเฟต หรือเติมหมู่ benzoylated-DEAE (B-DEAE) หมู่เหล่านี้จะเพิ่มความสามารถในการดูดซับโดยเฉพาะเหมาะสำหรับใช้แยกสารโมเลกุลใหญ่ที่มีประจุเช่นโปรตีน กรดนิวคลีอิค ดังแสดงในรูปที่ 3

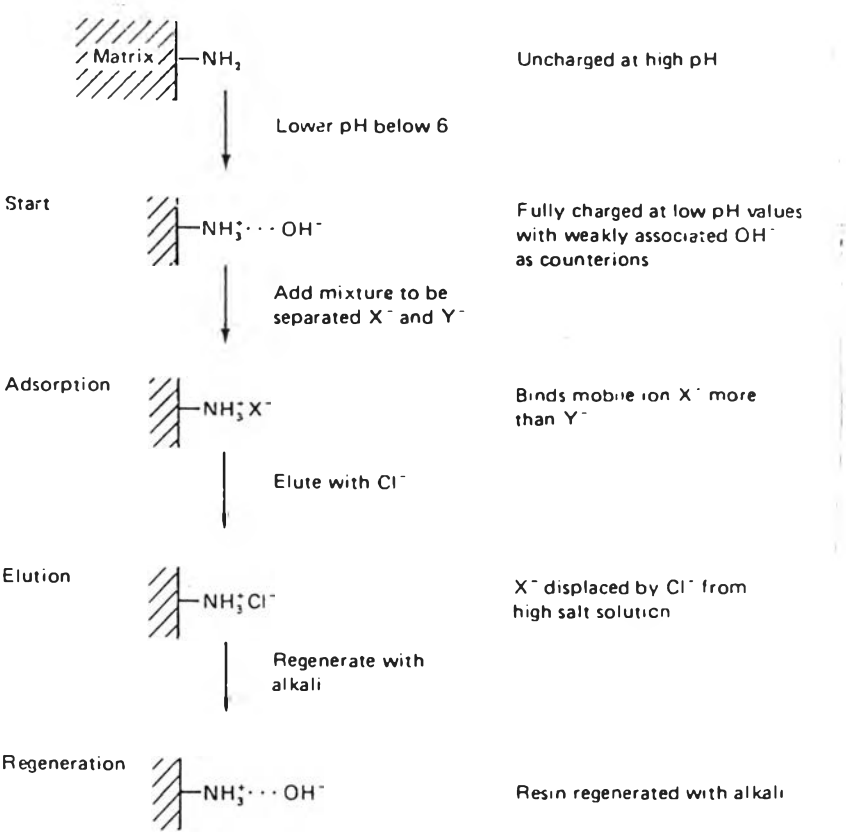
ตารางที่ 2 ชนิดของเรซินที่ใช้ในโครมาโตกราฟี

ชนิด	ชื่อ	หมู่ปฏิกิริยา (functional group)
Strongly acidic Cation exchanger	Dowex 50 Amberlite IR-120 Duolite C-20 Aminex A – 6	$-SO_3^-H^+$
Weakly acidic Cation exchanger	Amberlite IRC- 50 Duolite CC – 3 Dowex 3	$-COO^-Na^+$
Weakly basic anion Exchanger	Amberlite IR-45 Duolite A-2	$-N^+H(R)_2Cl^-$
Strongly basic anion exchanger	Dowex 1x2 Amberlite IRA-400 Duolite A-101	$-CH_2N^+(CH_3)_3Cl^-$

ที่มา: Scott, 1971



รูปที่ 2 ประเภทของเรซิน (Plummer, 1987)



รูปที่ 3 ขั้นตอนการแลกเปลี่ยนประจุ (Plummer, 1987)

วิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการทำคานามัยซินให้บริสุทธิ์ เนื่องจากคานามัยซินมีสมบัติเป็นประจุบวก จึงถูกดูดซับไว้ในคอลัมน์ที่มีเรซินชนิดแลกเปลี่ยนประจุบวก เรซินที่ใช้คือ แอมเบอร์ไลต์ (Amberlite) IRC-50 จัดเป็นประเภทแลกเปลี่ยนประจุบวกแบบกรดอย่างอ่อน (Weakly acidic cation exchanger) จะมีหมู่ที่ทำปฏิกิริยา (functional group) เป็นคาร์บอกซิลิค ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่ามีการใช้เรซินแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 ในการทำสารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ให้บริสุทธิ์ได้ เช่น ฟอร์ติไมซิน (fortimicin) (Okachi *et al.*,1977) อิโนสามัยซิน (inosamycin) (Tsunakawa *et al.*,1985) สปอราไรซิน (sporaricin) (Deushi *et al.*,1979) เซลโดมัยซิน (seldomycin) (Sato *et al.*, 1977) ซอร์บิสทิน (sorbistin) (Tsukura *et al.*, 1976) อิสทามัยซิน (Istamycin) (Okami *et al.*, 1979) โบฮอลมัยซิน (Boholmycin) (Saitoh *et al.*, 1988) เป็นต้น

เรซินชนิดนี้จะใช้ในขั้นตอนแรกของการทำคานามัยซินให้บริสุทธิ์ โดยเมื่อผ่านส่วนน้ำใสลงคอลัมน์ที่มีเรซินแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 คานามัยซินจะถูกดูดซับโดยเรซิน แล้วล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นเมื่อชะคอลัมน์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) หรือแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) จะได้สารละลายของคานามัยซินไฮโดรคลอไรด์ คานามัยซินซัลเฟต หรือ คานามัยซินเบส ตามลำดับ

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำคานามัยซินให้บริสุทธิ์เมื่อใช้เรซินแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 คือ อัตราการไหลผ่านคอลัมน์ ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง และความสูงของคอลัมน์ ขนาดของอนุภาคเรซินที่ใช้ เช่น เรซินอนุภาคขนาด 200-400 เมช (mesh) จะมีความละเอียดในการแยกดีกว่าใช้เรซินอนุภาคขนาด 50-100 เมช และพีเอชของส่วนน้ำใสก่อนลงคอลัมน์ควรจะมีค่าเท่ากับพีเอชของเรซินในคอลัมน์ ซึ่งจะสัมพันธ์กับสารละลายที่ใช้ชะคอลัมน์ เช่น ถ้าใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ควรปรับพีเอชของส่วนน้ำใสก่อนลงคอลัมน์ให้ได้เท่ากับ 6.3-6.5 จึงจะเหมาะสม และการผ่านสารละลายคานามัยซินลงคอลัมน์ที่มีเรซินแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 ซ้ำอีกหลายครั้ง จะทำให้คานามัยซินมีความบริสุทธิ์มากขึ้น (Umezawa *et al.*, 1957; Umezawa *et al.*, 1960)

จากรายงานของ Umezawa และคณะ (1960) ที่ว่าความสามารถ (capacity) ของเรซินแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 ในการจับประจุของคานามัยซิน ขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของคานามัยซินที่ผ่านลงคอลัมน์ คือเมื่อผ่านส่วนน้ำใสที่ได้จากน้ำหมักอาหารเลี้ยงเชื้อลงคอลัมน์ที่มีเรซินชนิดนี้ ประสิทธิภาพของเรซิน 1 มิลลิลิตร จะจับคานามัยซินได้เท่ากับ 5-10 มิลลิกรัม หลังจากนั้นนำสารละลายคานามัยซินที่ได้นี้ผ่านลงคอลัมน์ที่มีเรซินชนิดนี้ครั้งที่ 2 ประสิทธิภาพของเรซิน 1 มิลลิลิตร จะจับคานามัยซินได้เท่ากับ 10-30 มิลลิกรัม

จากขั้นตอนการทำคานามัยซินให้บริสุทธิ์ โดยการใช้เรซินแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 พบว่าสารละลายคานามัยซินที่ได้จะมีสีเหลือง ซึ่งสีคือส่วนที่ไม่บริสุทธิ์ (impurity) การกำจัดสีทำได้โดยใช้ผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) (Umezawa *et al.*, 1960)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แต่การใช้ผงถ่านกัมมันต์มีข้อควรระวังคือ ผงถ่านกัมมันต์สามารถดูดซับสารชนิดอื่นๆ ได้ดีเช่นเดียวกับสีของสารละลายจึงไม่ควรใช้ในปริมาณมาก เพราะจะทำให้สารสูญเสียแอคติวิตี (Fessenden and Fessenden, 1983)

เมื่อผ่านขบวนการทำคานามัยซินให้บริสุทธิ์ จะต้องเก็บคานามัยซินให้อยู่ในรูปของตะกอนคานามัยซินเบส ตะกอนคานามัยซินไฮโดรคลอไรด์ หรือตะกอนคานามัยซินซัลเฟต ซึ่งในทางการค้าคานามัยซินจะอยู่ในรูปคานามัยซินซัลเฟต การเปลี่ยนรูปของคานามัยซินใช้สมบัติการละลายและไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมธานอล ซึ่งคานามัยซินไฮโดรคลอไรด์ และคานามัยซินเบสละลายได้ดีในเมธานอล แต่คานามัยซินซัลเฟต จะไม่ละลายในเมธานอลดังนั้นจึงสามารถเปลี่ยนรูปของคานามัยซินไฮโดรคลอไรด์เป็นคานามัยซินซัลเฟต โดยนำสารละลายของคานามัยซินไฮโดรคลอไรด์ละลายด้วย 50-90 เปอร์เซนต์ เมธานอล แล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ที่อิ่มตัวด้วย 50-90 เปอร์เซนต์ เมธานอล จะได้ตะกอนของคานามัยซินซัลเฟต (Umezawa *et al*., 1960)

สารละลายคานามัยซินเบสที่ได้จากการชะคอลัมน์ด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ จะสามารถเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของตะกอนคานามัยซินซัลเฟตได้โดยปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 ด้วยกรดซัลฟูริก จากนั้นเติม 95 เปอร์เซนต์ ของเมธานอลปริมาตร 4 เท่าลงในสารละลายคานามัยซิน จะได้ตะกอนของคานามัยซินซัลเฟต (Umezawa *et al*., 1960)

การทำคานามัยซินให้บริสุทธิ์ โดยวิธีของ Umezawa และคณะ (1960) นำส่วนน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* K2-J เป็นเวลา 65 ชั่วโมง มีปริมาณคานามัยซิน 220 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรองแยกส่วนของเส้นใย ส่วนน้ำใสที่ได้มีปริมาณคานามัยซิน 210 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำส่วนน้ำใสผ่านลงคอลัมน์ที่มีเรซินแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 ในรูปโซเดียม (Na^+ form) คานามัยซินจะถูกดูดซับไว้โดยเรซิน ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มัล รวมลำดับส่วนที่มีแอคติวิตี แล้วเจือจางสารละลายคานามัยซินไฮโดรคลอไรด์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 5 เท่า จากนั้นนำสารละลายคานามัยซินที่ได้โดยวิธีดังกล่าวข้างต้นผ่านลงคอลัมน์ที่มีเรซินแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 ในรูปโซเดียม คานามัยซินจะถูกดูดซับไว้ในเรซิน ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มัล รวมส่วนน้ำไหลที่มีแอคติวิตีปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 เปอร์เซนต์ แล้วนำไปทำให้เข้มข้นโดยการระเหยภายใต้สุญญากาศ (vacuum evaporation) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนได้ปริมาตรลดลง 5 เท่า จากนั้นเก็บคานามัยซินในรูปตะกอนคานามัยซินไฮโดรคลอไรด์ โดยเติมเมธานอล กรองเอาส่วนใส กำจัดส่วนที่ไม่ละลายแล้วเติมอะซีโตน จะได้ตะกอนคานามัยซินไฮโดรคลอไรด์ มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลอ่อน มีประสิทธิภาพ (potency) 350 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ซึ่งตรวจสอบโดยวิธีทางจุลชีววิทยา

การเปลี่ยนรูปของคานามัยซินไฮโดรคลอไรด์ให้เป็นคานามัยซินซัลเฟต ทำได้โดยนำตะกอนคานามัยซินที่ได้จากวิธีดังกล่าวข้างต้น ละลายใน 60 เปอร์เซนต์ เมธานอล กรองส่วนใสเพื่อกำจัดส่วนที่ไม่ละลายแล้วเติม 60 เปอร์เซนต์ เมธานอลที่อิ่มตัวด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต จะได้ตะกอนของคานามัยซินซัลเฟต ล้างตะกอนด้วย 80 เปอร์เซนต์ เมธานอล ทำให้แห้งจะได้คานามัยซินซัลเฟต มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลอ่อน มีประสิทธิภาพของคานามัยซิน 370 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม (Umezawa *et al*., 1960)

จากการทำคานามัยซินให้บริสุทธิ์ โดยใช้เรซินแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 ตามวิธีดังกล่าวข้างต้นไม่สามารถแยกอนุพันธ์ของคานามัยซินเอ บี และ ซี ออกจากกันได้

มีรายงานการแยกคานามัยซินเอ และ บี (Weinstein and Wagman, 1978) โดยหลังจากผ่านส่วนน้ำใสลงคอลัมน์ที่มีเรซินแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น แล้วชะคอลัมน์ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ รวมลำดับส่วนที่มีแอคติวิตี ปรับพีเอชเท่ากับ 6.0 แล้วจึงนำสารละลายคานามัยซินที่ได้ ทำให้เข้มข้นด้วยการระเหยภายใต้สุญญากาศ จากนั้นเติม 7.0 กรัม ของโซเดียมโดเดซิลเบนซีนซัลโฟเนท (sodium dodecyl benzenesulfonate) ต่อสารละลายคานามัยซิน 70 มิลลิลิตร ซึ่งขั้นตอนนี้คานามัยซินเอจะไม่ตกตะกอน จะเกิดการตกตะกอนของคานามัยซินบีโดเดซิลเบนซีนซัลโฟเนท กรองตะกอนด้วยสารช่วยกรองคือไดโคไลต์ (Dicolite) แล้วละลายตะกอนด้วย เมธานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตกตะกอนคานามัยซินบีซ้ำ โดยเติมกรดซัลฟูริกเจือจางจนไม่มีการตกตะกอนอีก แล้วกรองเก็บตะกอน นำตะกอนของคานามัยซินที่ได้ละลายน้ำ แล้วผ่านลงคอลัมน์ที่มีเรซินแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น แล้วชะคอลัมน์ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ รวมลำดับส่วนที่มีแอคติวิตี ทำสารละลายคานามัยซินเบสที่ได้ให้เข้มข้นด้วยการระเหยภายใต้สุญญากาศ แล้วเติมเมธานอลปริมาตรเป็น 7 เท่า ของสารละลายเพื่อกำจัดตะกอนที่ปนเปื้อนทิ้งไป แล้วเติมอะซีโตนปริมาตร 5 เท่า ของสารละลาย กรองแยกเก็บตะกอนของคานามัยซินบีเบส การทำซ้ำในขั้นตอนการตกตะกอนด้วยโซเดียมโดเดซิลเบนซีนซัลโฟเนท กรองตะกอน ละลายตะกอนด้วยเมธานอล และเติมกรดซัลฟูริก จะทำให้ได้คานามัยซินบีบริสุทธิ์มากขึ้น

2.3.9 <u>การตรวจสอบคานามัยซินโดยวิธีทางเคมี</u>

การใช้เทคนิคและเครื่องมือทางโครมาโตกราฟี ในการตรวจสอบคานามัยซินมีดังนี้คือ

2.3.9.1 Paper Chromatography (PC)

เทคนิคขั้นพื้นฐานของ PC มีหลักการที่ง่าย โดยกระดาษกรองซึ่งเป็นพวกเซลลูโลส เช่น กระดาษกรองวัตแมน (Whatman) เบอร์ 1 ใช้เป็นตัวกลางในการแยกสำหรับ PC

มิติเดียว (one dimensional PC) กระดาษกรองจะถูกตัดให้มีขนาด ความกว้าง 5 เซนติเมตร ยาว 20 เซนติเมตร แต่สำหรับ PC 2 มิติ (two dimensional PC) จะใช้กระดาษกรองขนาดกว้าง 20 เซนติเมตร ยาว 20 เซนติเมตร กระดาษกรองที่ใช้จะมีรูพรุนต่างๆกัน ซึ่งมีทั้งละเอียด ปานกลาง และหยาบ ความพรุนของกระดาษกรองจะเป็นตัวกำหนดการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย กระดาษที่มีความพรุนน้อยหรือละเอียดมาก จะทำให้การเคลื่อนที่ของตัวทำละลายช้า แต่จะทำให้เกิดการแยกที่ดี ถ้ากระดาษที่ใช้หนาจะทำให้ความจุของสารตัวอย่างเพิ่มขึ้นซึ่งเหมาะในการใช้งานด้านขยายส่วน (แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2539)

มีรายงานการตรวจสอบคานามัยซิน โดยนำส่วนน้ำใสที่แยกจากน้ำหมักมาตรวจสอบด้วยวิธี PC ซึ่งมีระบบของตัวทำละลาย (solvent system) คือ 2 เปอร์เซนต์ โทลูอีนซัลโฟนิกแอซิด (toluene sulfonic acid) น้ำ และเอ็น-บิวทานอล ตรวจสอบแถบด้วยสีย้อม สามารถแยกสารออกเป็น 3 แถบ โดยแถบที่มีค่า R_f เท่ากับ 0 เป็นคานามัยซินซี แถบที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.21-0.26 เป็นคานามัยซินเอ และแถบที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.3 เป็นคานามัยซินบี (Cron *et al*., 1958)

2.3.9.2 ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin-Layer Chromatography, TLC)

TLC มีลักษณะคล้ายกับ PC แต่แทนที่จะใช้กระดาษกรองก็ใช้แผ่นกระจกหรืออะลูมิเนียม หรือแผ่นพลาสติก เป็นแบบ open bed ซึ่งมีขนาดไม่เหมือนกับของ PC โดยเคลือบด้วยผงของแข็งที่มีรูพรุน และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-40 ไมโครเมตร เฟสคงที่ (stationary phase) ที่นิยมใช้กันมาก คือ ซิลิกาเจล (silica gel) อลูมินา (alumina) เซลลูโลส (cellulose) และโพลีเอไมด์ (polyamides) การที่จะทำให้เฟสคงที่ยึดกับแผ่นและมี mechanical strength ดี จะต้องเติมตัวยึด (binder) เช่น เติมแคลเซียมซัลเฟต ($CaSO_4$) 5-10 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก

การตรวจหา (detection) เนื่องจากสารที่เคลือบ TLC เป็นพวกซิลิกาและอลูมินา ซึ่งเฉื่อย (inert) มากกว่ากระดาษ ดังนั้นสารละลายที่ไวต่อปฏิกิริยามากสามารถนำมาใช้ในการบอกตำแหน่งของสารที่แยกออกจากกันได้ กรดซัลฟูริกเข้มข้นสามารถนำมาพ่นให้เป็นฝอยลงบนแผ่นซิลิกาได้ และทำให้สารอินทรีย์เกิดเป็นสีดำ (charred) ซึ่งมองเห็นได้ชัดหลังจากให้ความร้อนกับแผ่น TLC นอกจากนี้ยังสามารถใช้สารเคมีที่ทำให้เกิดสี เช่น ไอโอดีน ได้อีกด้วย หรืออาจใช้วิธีส่องแผ่น TLC ด้วยแสงยูวี สารที่ให้ฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence) จะมองเห็นได้ บางครั้งอาจผสมสารฟลูออเรสเซนส์เข้าไปกับสารเคลือบแผ่น TLC และเมื่อส่องด้วยแสงยูวีจะเห็นสารเป็นจุดสีดำบนพื้นของฟลูออเรสเซนส์ อย่างนี้เรียกว่าเกิด quenching effect

ใน TLC และ PC ลำดับของการยึดเหนี่ยวสาร คือค่า R_f ซึ่งค่านี้ให้นิยามว่าเป็นอัตราส่วนของระยะทางที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่การคำนวณหาค่า R_f โดยปกติแล้วการคำนวณหาระยะทางให้วัดจากจุดกึ่งกลางของแถบที่ปรากฏ

การที่จะทำค่า R_f ให้ได้เท่ากันทุกครั้งใน TLC นั้นยากกว่าใน PC เพราะว่า TLC มีตัวแปรจากการทดลองมาก ค่า R_f จะขึ้นอยู่กับปัจจัยดังต่อไปนี้

1. ธรรมชาติของตัวดูดซับ ได้แก่ ธรรมชาติทางเคมี ขนาดอนุภาค พื้นที่ผิว และตัวยึด (binder) เป็นต้น
2. ธรรมชาติของเฟสเคลื่อนที่ ได้แก่ ความบริสุทธิ์ ความถูกต้องของการผสม ปริมาณความชื้นและการระเหย เป็นต้น
3. แอคติวิตีของตัวดูดซับ ความหนา และความสม่ำเสมอ
4. อุณหภูมิของเครื่องมือ
5. ปริมาณของสารตัวอย่างที่ใช้
6. สมดุลความดันไอ (vapor pressure equilibrium) ระหว่างแผ่น TLC กับบรรยากาศในถังที่ใช้ (แม้น อมรสิทธิ์ และ อมรเพชรสม , 2539)

ในการตรวจสอบคานามัยซิน ด้วยวิธี TLC มีซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (adsorbent) ใช้การตรวจสอบด้วยวิธีไบโอออโทกราฟ (bioautograph) มีเชื้อทดสอบคือ *Bacillus subtilis* KY 4273 ใช้ระบบตัวทำละลาย 3 ระบบ โดยระบบตัวทำละลายที่ I คือ 10 เปอร์เซนต์ ของแอมโมเนียมอะซีเตท (CH_3COONH_4) ต่อ เมธานอล เท่ากับ 1 : 1 (ปริมาตร ต่อ ปริมาตร) ได้แถบที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.75 0.82 และ 0.84 เป็นคานามัยซินเอ บี และ ซี ตามลำดับ ระบบตัวทำละลายที่ II ประกอบด้วย เอ็น-บิวทานอล ต่อ เอธานอล ต่อ คลอโรฟอร์ม ต่อ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เท่ากับ 4 : 5 : 2 : 5 (ปริมาตร ต่อปริมาตร) จะให้แถบที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.25 0.16 และ 0.17 เป็นคานามัยซินเอ บี และ ซี ตามลำดับ และระบบตัวทำละลายที่ III ประกอบด้วย คลอโรฟอร์ม ต่อ เมธานอล ต่อ 17 เปอร์เซนต์ ของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เท่ากับ 2 : 1 : 1 (ปริมาตร ต่อ ปริมาตร) ในการทดสอบใช้ส่วนบนของตัวทำละลาย จะให้แถบที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.77 0.80 และ 0.84 เป็นคานามัยซินเอ บี และซี ตามลำดับ (Sato *et al*., 1977)

2.3.9.3 วิธีไฮ เพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟี (HPLC)

เทคนิค HPLC สารละลายตัวพา (mobile phase) ที่เป็นของเหลวจะถูกปั๊มผ่านคอลัมน์แยกสาร ที่เป็นท่อบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสคงที่ (stationary phase) เมื่อตัวอย่างซึ่งเป็นองค์ประกอบหลายชนิดละลายอยู่ในรูปของเหลว ถูกนำเข้าสู่ระบบปกติโดยการฉีดด้วยปริมาตรจำกัดที่จุดฉีด (injector) ก่อนเข้าสู่คอลัมน์ และแพร่กระจายเข้าสู่ระบบการไหล หน้าที่ของสารละลายตัวพาคือ ล้างตัวอย่างในขณะไหลผ่านคอลัมน์ ทำให้เกิดการแยกองค์ประกอบแต่ละชนิดออกจากกัน อันเนื่องมาจากความแตกต่างของแรงที่เกิดเนื่องด้วยอันตรกิริยา (interaction)

ขององค์ประกอบกับเฟสคงที่ และสารละลายตัวพา แต่ละองค์ประกอบจะใช้เวลาตั้งแต่เริ่มฉีดจนกระทั่งออกจากปลายคอลัมน์ ซึ่งเวลาส่วนใหญ่ของการเดินทาง เป็นช่วงเวลาที่เป็นสมบัติเฉพาะตัว (retention time) ของแต่ละสาร แต่ต้องระวังว่าภายใต้ภาวะของการแยกนั้น สารบางชนิดที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน อาจจะใช้เวลาแยกใกล้เคียงกันจนเกิดการทับซ้อนกันได้

กฎโดยทั่วไปเกี่ยวกับการแยกสาร คือ องค์ประกอบใดที่สามารถเกิดอันตรกิริยา หรือสามารถกระจายตัวอยู่ในชั้นของเฟสคงที่ได้ดีกว่า ก็จะใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์ได้นานกว่า และในทางตรงกันข้าม สารใดที่มีอันตรกิริยากับสารละลายตัวพาดีกว่าก็จะถูกชะ (elute) ออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่า หรือใช้เวลาในคอลัมน์น้อยกว่านั่นเอง

เครื่องตรวจวัดของ HPLC อาจจำแนกได้เป็น 2 ชนิดใหญ่คือ เครื่องตรวจวัดที่มีความจำเพาะต่อตัวถูกละลาย (solute specific detector) ได้แก่ ยูวี วิสิเบิล (UV visible) ฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence) และอิเลคโตรเคมิคอล (electrochemical) ซึ่งตรวจวัดสมบัติของโมเลกุลสาร และเครื่องตรวจวัดที่มีความจำเพาะต่อมวล (mass specific detector) ได้แก่ Refractive Index (RI) และคอนดัคติวิตี (Conductivity) ซึ่งเป็นเครื่องตรวจวัดที่ไวต่อสมบัติของสารละลายตัวพา เครื่องตรวจวัดเหล่านี้ได้รับการพัฒนาโดยมุ่งเน้นในเรื่องความไว (sensitivity) การตอบสนองที่รวดเร็ว และลดการขยายของแถบ (band spreading)

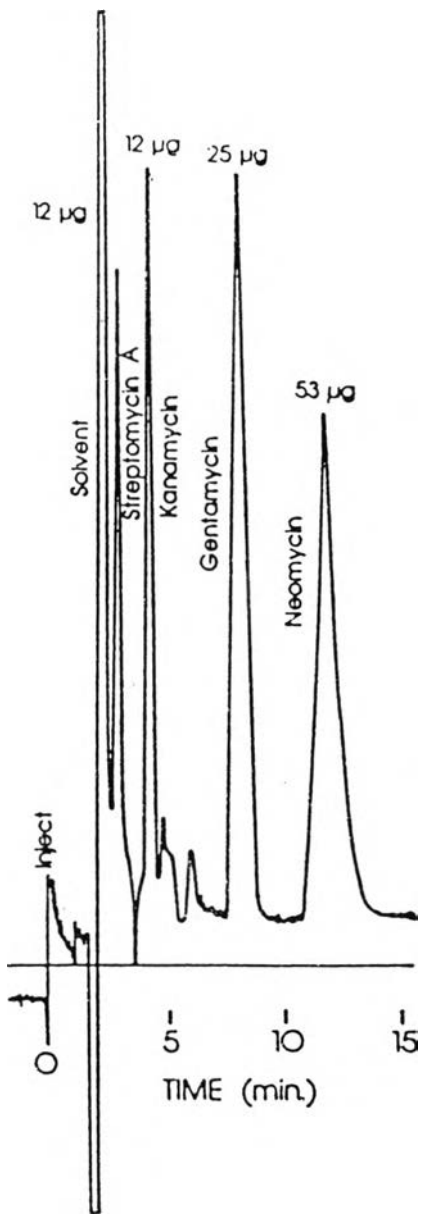
เครื่องตรวจวัดชนิดยูวี วิสิเบิล มีประโยชน์สำหรับการวิเคราะห์สารอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ เครื่องตรวจวัดชนิดนี้มีทั้งแบบความยาวคลื่นเดี่ยวมักจะใช้ที่ 254 นาโนเมตร และแบบที่เปลี่ยนความยาวคลื่นได้ในช่วง 190-325 นาโนเมตร การดูดกลืนแสงยูวี เป็นสมบัติของโมเลกุล ดังนั้นในแต่ละสารประกอบจึงมีการดูดกลืนแสงที่จำเพาะของตัวเอง เครื่องตรวจวัดชนิดนี้จัดเป็นชนิดที่มีความไวสูง สามารถตรวจวัดสารได้หลายประเภท ในปริมาณต่ำถึงระดับนาโนกรัม (nanogram level)

เครื่องตรวจวัดชนิด RI ใช้ในการตรวจวัดสารที่มีหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ที่ไม่เหมาะสมต่อการตรวจวัดด้วยยูวี เครื่องตรวจวัดชนิด RI จะมีการตอบสนองเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของมวลต่อหน่วยปริมาตร (mass specific response) เครื่องตรวจวัดชนิดนี้ได้ถูกประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรทและในการหาปริมาณน้ำตาล ซึ่งสามารถตรวจวัดสารปริมาณต่ำถึงระดับไมโครกรัม

เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนส์ และชนิดอิเลคโตรเคมิคอล เป็นเครื่องตรวจวัดที่มีความไวและความจำเพาะสูงสามารถใช้ตรวจวัดสารปริมาณต่ำระดับพิโคกรัม (picogram) (วิริยะ มีศิริ, 2537)

การใช้วิธี HPLC วิเคราะห์สารปฏิชีวนะพบว่าชนิดของเครื่องตรวจวัดที่ใช้มาก คือ ยูวี วิสิเบิล เช่น ใช้ในการวิเคราะห์เพนนิซิลลิน เซฟาโลสปอริน ควิโนโลน (quinolone) กลุ่มไกลโคเปปไทด์ (glycopeptide) เป็นต้น แต่มีข้อยกเว้นในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ เพราะสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ไม่มีสมบัติในการดูดกลืนแสงซึ่งชนิดของเครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้คือฟลูออเรสเซนส์ ยกเว้น นีโอมัยซิน และ โนโวไบโอซิน (novobiocin) จะใช้เครื่องตรวจวัดชนิดยูวี วิสิเบิล (Jehl *et al.*, 1990)

การตรวจสอบคานามัยซินโดยวิธี HPLC พบว่ามีการใช้เครื่องตรวจวัดแบบ RI โดยวิธี Reverse phase ion-pair chromatography โดยมีระบบดังนี้คือขนาดคอลัมน์ที่ใช้ยาว 15 เซนติเมตร มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางกว้าง 4.6 มิลลิเมตร ชนิดของคอลัมน์ คือ C_{18} Reverse phase Lichrosorb มีสารละลายตัวพา (mobile phase) คือ 60 เปอร์เซนต์ ของเมธานอล ต่อ 40 เปอร์เซนต์ ของ 0.05 โมลาร์ กรดแคมโฟซัลโฟนิค (camphosulfonic acid) ที่พีเอช 1.7 อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที จะพบพีคของคานามัยซินที่เวลา 4.1 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4 สารที่ใช้เป็น ion pairing คือ กรดแคมโฟซัลโฟนิค ซึ่งการตรวจสอบด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย แสดงพีคได้ชัดเจน แต่มีข้อเสียคือ ไม่สามารถวิเคราะห์สารได้ในระดับต่ำกว่าไมโครกรัม (White and Zarembo, 1981)



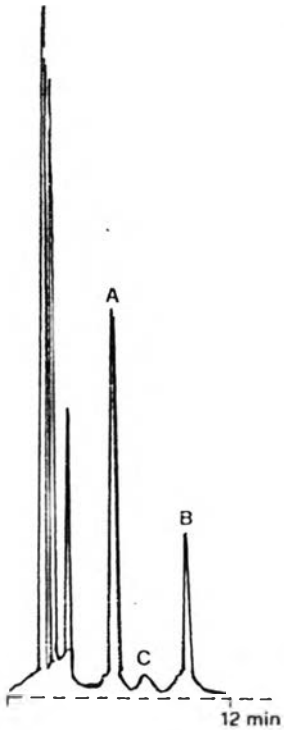
รูปที่ 4 โครมาโตแกรมของคานามัยซิน โดยวิธี HPLC ใช้เครื่องตรวจวัดชนิด RI (White and Zarembo, 1981)

มีรายงานการใช้เครื่องตรวจวัดชนิด RI สามารถแยกคานามัยซินเอ และ บี ออกจากกันได้ โดยใช้คอลัมน์ Zipac SCX (37-44 ไมครอน) ขนาดคอลัมน์สูง 1 เมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลางกว้าง 2 มิลลิเมตร มีสารละลายตัวพา คือ แอมโมเนียมฟอสเฟต ($(NH_4)_3PO_4$) 0.01 โมลาร์ พีเอช 9.1 แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือ มีสัญญาณรบกวน และไม่สามารถตรวจสอบสารที่ปริมาณความเข้มข้นต่ำได้ (Mays *et al.*, 1976)

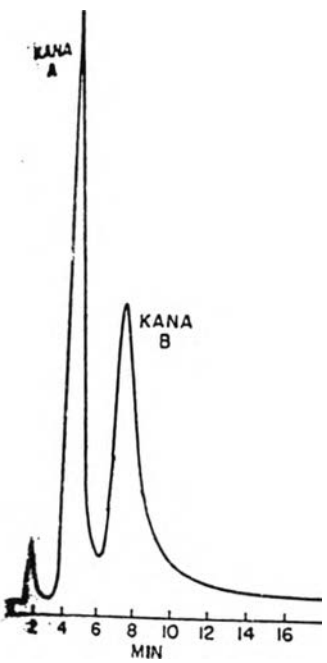
จากการใช้เครื่องตรวจวัดชนิด RI แล้วไม่สามารถตรวจวัดสารที่มีปริมาณความเข้มข้นต่ำได้ ดังนั้นจึงมีการใช้เครื่องตรวจวัดชนิดยูวี วิสิเบิล เนื่องจากคานามัยซินไม่มีสมบัติในการ ดูดกลืนแสง จึงต้องมีการทำปฏิกิริยาให้เกิดสีก่อนโดยการทำ pre-column derivatized ก่อนที่จะนำไปตรวจวัด

มีรายงานการใช้เครื่องตรวจวัดชนิดยูวี วิสิเบิล ในการวิเคราะห์คานามัยซิน เจนทาไมซิน สิโสมัยซิน (sisomycin) โทบรามัยซิน (tobramycin) และอะมิคาซิน (amikacin) โดยใช้คอลัมน์ C_8 reverse phase ขนาดคอลัมน์สูง 25 เซนติเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลางกว้าง 0.46 มิลลิเมตร มีการทำปฏิกิริยา pre column derivatized ด้วยกรดไตรไนโตรเบนซีนซัลโฟนิค (2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid) ที่ค่าการดูดกลืนแสง 350 นาโนเมตร มีสารละลายตัวพาคือ 0.02 โมลาร์ โปแตสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ต่อ อะซีโตไนไตรล์ (Acetonitrile) ต่อ เมธานอล เท่ากับ 40 : 46 : 15 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ช่วงความเข้มข้นของสารที่สามารถตรวจวัดได้คือ 0.01-0.15 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตรที่ใช้ตรวจวัดคือ 25 ไมโครลิตร สำหรับสารปฏิชีวนะทุกชนิดดังได้กล่าวข้างต้น ยกเว้นเจนทาไมซินใช้ปริมาตร 35 ไมโครลิตร จะพบพีคของคานามัยซินเอ (A) คานามัยซินบี (B) คานามัยซินซี (C) ดังแสดงในรูปที่ 5 (Gambardella *et al.*, 1985)

การตรวจสอบคานามัยซินโดยวิธี HPLC ใช้เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนส์ โดยใช้ Post-column fluorimetric detection มีระบบดังนี้คือ ใช้คอลัมน์ HS Pellionex SCX ใช้ fluorescene-*o*-PTH เป็นตัวตรวจวัด excitation wavelength 375 นาโนเมตร และ emission wavelength 480 นาโนเมตร มีสารละลายตัวพาคือ K^+ EDTA 0.01 โมลาร์ พีเอช 9.5 จะสามารถแยกอนุพันธ์ของคานามัยซินเอ (A) และคานามัยซินบี (B) ซึ่งแสดงพีคที่แยกได้ชัดเจนดังแสดงในรูปที่ 6 ซึ่งข้อดีของวิธีนี้คือ ให้ผลถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว โดยใช้เวลาวิเคราะห์ไม่เกิน 15 นาที และสามารถวิเคราะห์คานามัยซินในปริมาณความเข้มข้นต่ำในระดับนาโนกรัม (Mays *et al.*, 1976)



รูปที่ 5 โครมาโตแกรมของคานามัยซินเอ บี และซี โดยวิธี HPLC ใช้เครื่องตรวจวัดชนิดยูวีวิสิเบิล (Gambardella *et al.*, 1985)



รูปที่ 6 โครมาโตแกรมของคานามัยซินเอ และบี โดยวิธี HPLC ใช้เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนส์ (Mays *et al.*,1976)