การสกัดและการทำให้ เพนิซิลลิน จี บริสุทธิ์

นางสาว เบ็ญจรัก วายุภาพ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2533

ISBN 974-577-672-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19100922

Extraction and Purification of Penicillin G

Miss Benjaluck Vayouparp

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkong University

1990

ISBN 974-577-672-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสกัดและการทำให้เพนิซิลลิน จี บริสุทธิ์
โดย	นางสาว เบ็ญจรัก วายุภาพ
ภาควิชา	หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

_____ คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____ ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ขำวิวรรธน์)

_____ กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล)

_____ กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

เชิญจรัก วายุภาพ : การสกัดและการทำให้เพนิซิลลิน จี บริสุทธิ์
(Extraction and Purification of Penicillin G)
อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร.นลิน มิลอุบล , 63 หน้า ISBN 974-577-672-6

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาหาขั้นตอนและสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแยกเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา Penicillium chrysogenum A 63 และการทำให้เพนิซิลลิน จี บริสุทธิ์

การสกัดเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมักทำได้โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักให้ที่ค่าเป็น 3 แล้วเติมซิตริลไตรเมทธิลแอมโมเนียมโบรไมด์ 0.1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงในน้ำหมักก่อนการสกัด ต่อจากนั้นสกัดด้วยเอมิลอะซิเตต โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเอมิลอะซิเตตและน้ำหมัก 1:1 การสกัดทำที่อุณหภูมิ 4° ซ. เป็นเวลาครั้งละ 30 นาที และทำซ้ำ 3 ครั้ง สิ่งปนเปื้อนในเพนิซิลลิน จี ที่สกัดได้จะถูกขจัดออกโดยการดูดซับด้วยผงถ่าน ผงถ่าน 0.5% (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) เป็นปริมาณที่เหมาะสม การดูดซับทำที่อุณหภูมิ 30° ซ. เป็นเวลา 30 นาที ทำสารละลายเพนิซิลลิน จี ที่ได้ให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยแห้งระบบสูญญากาศ แล้วตกผลึกโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ที่ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ เติมจนกระทั่งค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 จะได้ผลึกเกลือโซเดียมของเพนิซิลลิน จี ประมาณ 52% ที่มีความบริสุทธิ์ประมาณ 96%

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2532 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

Wenjeluck Vayouparp : (Extraction and Purification of Penicillin G.

Thesisadvisor :Asso.Prof. Naline Nilubol , Ph.D., 63 pp.

ISBN 974-577-672-6

The scope of this work is to study steps and optimal conditions for extraction and purification of Penicillin G from the culture broth of Penicillium chrysogenum A 88.

The pH of the culture broth was adjusted to 3 and 1 gram of cetyl trimethyl ammonium bromide was added to 100 ml of culture broth to give 0.1% (w/v) before extracting. Extraction was performed at 4° C for 3 times with equal volume of amyl acetate for each time.

Activated carbon was added to the extract to 0.5% (gram/ 100 ml) and stirred at 30° C for 30 minutes to remove impurity. The extract was then concentrated by rotary evaporating at 30° C under vacumm. Penicillin G was crystallized by adding sodium hydrogen carbonate solution to the extract to givethe final pH of 7. This process yielded 52.6% of Penicillin G sodium salt with 96%purity.

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2532 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ ให้แนวความคิด กำลังใจ และความเข้าใจ อันมีค่ายิ่งตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ขำวิวรรธน์ และรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ท่านผู้อำนวยการสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์และสารเคมี จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี และขอขอบคุณนักวิจัย เจ้าหน้าที่สถาบันฯ ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณท่านคณาจารย์หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และขอขอบคุณ พี่ เพื่อน และน้องทุกคน ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือ และให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้าตลอดการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัย

ท้ายสุดนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ พ่อ แม่ และพี่ ของข้าพเจ้าที่ให้ความช่วยเหลือ ความเข้าใจ กำลังกาย กำลังใจ และกำลังทรัพย์ ในการทำวิทยานิพนธ์ตั้งแต่เริ่มต้นจนเสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญรูป..... ฌ

คำย่อ..... ฎ

บทที่

1 บทนำ

1 ประวัติความเป็นมา..... 1

2 คุณสมบัติทางเคมี..... 2

3 การพัฒนากระบวนการสกัดแยกและการทำให้เพนิซิลลิน จี บริสุทธิ์..... 5

4 เหตุจูงใจในการทำวิจัย..... 6

5 ขั้นตอนการทำวิจัย..... 7

2 วิธีการทดลอง

1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง..... 8

2 เชื้อจุลินทรีย์ การเก็บ และการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง..... 9

3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยวิธี HPLC (High Performance Liquid Chromatography)..... 11

4 การสกัดแยกและการทำให้เพนิซิลลิน จี บริสุทธิ์..... 11

3 ผลการทดลอง

3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ P. chrysogenum A 88 13

3.1.1 หาชนิดและสารที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนในน้ำหมัก.... 14

3.1.2 ปริมาณของซิตัลไตรเมตธิวแอมโมเนียมโบรไมด์ที่เหมาะสม..... 15

3.1.3 ค่า pH ที่เหมาะสมในการสกัดแยกเพนิซิลลิน จี 16
3.1.4 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมักด้วยเอมิลอะซิเตต..... 17
3.1.5 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโดยมีตัวแปรร่วม 4 ตัวแปร คือ อัตราส่วนระหว่างน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตต ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด pH ของน้ำหมัก และ จำนวนครั้งที่ใช้ในการสกัด.... 18
3.1.6 การลดปริมาณเอมิลอะซิเตตที่ใช้ในการสกัด..... 19
3.2 สภาวะที่เหมาะสมในการขจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยผงถ่านก่อนตกผลึก
3.2.1 ชนิดและปริมาณผงถ่านที่เหมาะสมในการขจัดสิ่งปนเปื้อน..... 22
3.2.2 เวลาที่เหมาะสมในการขจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยผงถ่าน..... 28
3.2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณผงถ่านที่ใช้และประสิทธิภาพในการตกผลึก..... 29
3.2.4 ชะล้างผงถ่านด้วย 80% (ปริมาตรต่อปริมาตร)อะซิโตน..... 30
3.3 การหาชนิดและปริมาณของเกลือโซเดียมที่เหมาะสมในการตกผลึก
3.3.1 สารประกอบโซเดียมที่เหมาะสมในการตกผลึก..... 31
3.3.2 ความเข้มข้นของโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตที่เหมาะสม..... 32
3.3.3 หาเปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์ของเพนิซิลลิน จี 41
4 บทสรุปและวิจารณ์..... 45
เอกสารอ้างอิง..... 52
ภาคผนวกที่
1 สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัย..... 55
2 ลักษณะโครมาโตแกรมของเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการสังเคราะห์ของ P. chrysigenum A 88 เมื่อใช้เพนิซิลลิน วี เป็นสารมาตรฐานวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC..... 57
3 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณเพนิซิลลิน จี วิเคราะห์โดย HPLC.... 58
4 การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์..... 59
ประวัติผู้เขียน..... 63

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลการใช้สารช่วยในการตกตะกอนโปรตีน.....	14
2	pH ที่เหมาะสมในการสกัดแยกเพนิซิลลิน จี.....	16
3	ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่สกัดได้จากน้ำหมักเมื่อใช้ระยะเวลาต่างๆ.....	17
4	ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการสกัดเมื่อแปรผัน อัตราส่วนระหว่างน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตต ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด pH ของน้ำหมัก และจำนวนครั้งที่ใช้ในการสกัด.....	19
5	ผลการหาอุณหภูมิและปริมาณที่เหมาะสมในการขจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยผงถ่าน..	23
6	การหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณผงถ่านที่ใช้และประสิทธิภาพของการตกผลึก.....	30
7	ปริมาณเกลือโซเดียมของเพนิซิลลิน จี ที่ตกผลึกเมื่อใช้สารประกอบโซเดียมต่างกัน 3 ชนิด.....	32
8	การหาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตที่เหมาะสม.....	33
9	ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่สกัดแยกออกจากน้ำหมักในแต่ละขั้นตอน.....	35
10	ปริมาณเพนิซิลลิน จี ถูกทำลายด้วยกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน.....	36

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างโมเลกุลของเพนิซิลลิน จี	2
2	โครงสร้างโมเลกุลของกรดเพนิลิก	3
3	โครงสร้างโมเลกุลของกรดเพนิซิลโลอิก	3
4	โครงสร้างโมเลกุลของกรดแอลฟาเมธิลเพนิซิลโลอิก	4
5	โครงสร้างโมเลกุลของกรดแอลฟาเอธิลเพนิซิลโลอิก	4
6	โครงสร้างโมเลกุลของกรอแอลฟาเอไมด์เพนิซิลโลอิก	5
7	การรวมตัวระหว่างน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตตภายหลังการสกัด	13
8	ลักษณะของการแยกชั้นระหว่างน้ำหมักกับเอมิลอะซิเตตเมื่อเติมซิติลไตรเมตธิวแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB) 0.03 , 0.05 , 0.07 และ 0.1% (น้ำหนักต่อปริมาตร)	15
9	การสกัดแยกโดยนำเอมิลอะซิเตตผ่านการสกัดครั้งที่ 3 มาสกัดน้ำหมักใหม่	21
10	ลักษณะโครมาโตแกรมของเพนิซิลลิน จี	24
11	ลักษณะโครมาโตแกรมของเพนิซิลลิน จี ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 30° ซ. เป็นเวลา 30 นาที	25
12	ลักษณะโครมาโตแกรมของเพนิซิลลิน จี	26
13	ลักษณะโครมาโตแกรมของเพนิซิลลิน จี ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 35° ซ. เป็นเวลา 30 นาที	27
14	เอมิลอะซิเตตที่ผ่านการสกัดก่อนเติมผงถ่านและหลังเติมผงถ่านที่เวลา 30 นาที และใช้ปริมาณผงถ่าน 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5% (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	28
15	สรุปขั้นตอนการสกัดและแยกเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมัก	34
16	ลักษณะโครมาโตแกรมของเพนิซิลลิน จี ถูกทำลายด้วยกรดฟอสฟอริค ความเข้มข้น 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร)	37
17	ลักษณะโครมาโตแกรมของเพนิซิลลิน จี มาตรฐาน	42
18	ลักษณะโครมาโตแกรมของเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการทดลอง	43
19	ผลิกเพนิซิลลิน จี โซเดียม	44

คำย่อ

°ซ.	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซนต์
มล.	=	มิลลิลิตร
ชม.	=	ชั่วโมง
ml	=	มิลลิลิตร
M	=	โมลาร์
pH	=	ความเป็นกรดด่าง
HPLC	=	ไฮเพอรฟอรมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี
PAA	=	กรดฟีนิลอะซิติก