บทที่ 1

บทนำ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติความเป็นมา

เพนิซิลลินเป็นยาปฏิชีวนะที่ถูกค้นพบโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษชื่อ Sir Alexander Fleming ในปี ค.ศ.1928 (1,2) Fleming พบว่าเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) รอบโคโลนีของเชื้อราที่ปนเปื้อนมาในจานเลี้ยงเชื้อ Staphylococci ที่ได้ศึกษาอยู่ ต่อมาพบว่าสารที่เชื้อราปลดปล่อยออกมาสามารถทำลายเชื้อ Staphylococci และเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค (phathogenic bacteria) ชนิดต่างๆ ได้ Fleming ได้จำแนกเชื้อราที่สร้างสารดังกล่าวเป็น Penicillium notatum ในปี ค.ศ.1932 Clutterbuck และคณะได้ทดลองแยกสารดังกล่าวออกมา แต่ไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากใช้อีเทอร์ในการสกัดสารซึ่งทำให้สารนั้นเกิดการสูญเสียคุณสมบัติในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (3) ในปี ค.ศ.1938 Chain และผู้ร่วมงานได้ประสบความสำเร็จในการแยกสารดังกล่าวและทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วน (partial purification) เมื่อนำไปทดสอบในสัตว์ทดลองซึ่งผลออกมาเป็นที่น่าพอใจ (4) ต่อมาในปี ค.ศ.1943 สารชนิดนี้ถูกนำไปใช้รักษาผู้ป่วยในสงครามโลกครั้งที่ 2 เป็นผลสำเร็จ และเรียกชื่อสารนี้ว่า เพนิซิลลิน

เชื้อราที่สามารถสร้างเพนิซิลลินได้นอกเหนือไปจาก P. notatum แล้วยังมีเชื้อราอีกหลายชนิดที่สามารถสร้างเพนิซิลลินได้ ได้แก่ Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ต่างๆ

ปัจจุบันนี้พบว่าฤทธิ์ของยาเพนิซิลลิน จี สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบที่มีรูปร่างกลม นอกจากนี้ยังสามารถทำลายเชื้อ Clostridia sp. และ Corynebacterium diphtheriae ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคคอตีบ (diphtheria) และทำลายเชื้อ Bacillus sp., Treponema pallidum ที่ทำให้เกิดโรคซิฟิลิส (syphillis) ในคน (1)

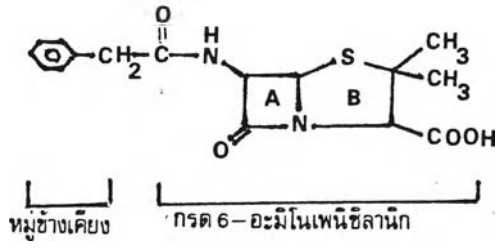
เพนิซิลลิน จี เป็นยาปฏิชีวนะจากธรรมชาติที่มีประโยชน์ทางการแพทย์และมีความสำคัญทางอุตสาหกรรมยา ถึงแม้ว่าปัจจุบันประสิทธิภาพของการรักษาโดยใช้เพนิ-ซิลลิน จี ได้ลดลงเพราะการดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ แต่เพนิซิลลิน จี ก็ยังมีความสำคัญ

อยู่มากเพราะเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตยาที่เป็นอนุพันธ์ของเพนิซิลลิน จี หลายชนิดซึ่งผลิตขึ้นมาเพื่อนำมาใช้แทนยาเพนิซิลลิน จี อนุพันธ์ของเพนิซิลลินที่ผลิตใช้อยู่ในปัจจุบันมีหลายชนิดและมีประสิทธิภาพสูง จึงนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางมากและนับว่าเป็นกลุ่มยาที่มีการใช้มากกว่ายาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ ดังนั้นเพนิซิลิน จี จึงมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมยาอยู่มากในฐานะที่เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์อนุพันธ์ต่างๆ (5)

<u>คุณสมบัติทางเคมี</u>

เพนิซิลลิน จี เป็นสารที่มีโมเลกุลใหญ่และมีค่าความเป็นกรดสูง เพนิซิลลิน จี ที่ผลิตออกมาจากเชื้อราจะอยู่ในรูปกรดอิสระ ซึ่งละลายได้ดีในสารละลายอินทรีย์ แต่ถ้าอยู่ในรูปเกลือหรืออิออนละลายได้ดีในน้ำ (7,8)

โครงสร้างโมเลกุลของเพนิซิลลิน จี ประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญ คือ ส่วนนิวเคลียสได้แก่โมเลกุลของกรด 6-อะมิโนเพนิซิลลานิค (6-aminopenicillanic acid) และสารหมู่ข้างเคียง (side chain group)(1) โดยที่ส่วนนิวเคลียสประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนวงแหวนไธอาโซลิดีน (thiazolidine ring) เชื่อมอยู่กับส่วนวงแหวนเบตาแลคแตม (betalactam ring) (7) (รูปที่ 1)



A = วงแหวนเบตาแลคแตม (betalactam ring)

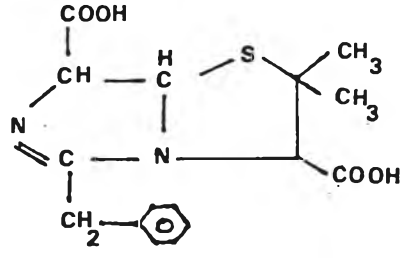
B = วงแหวนไธอาโซลิดีน (thiazolidine ring)

<u>รูปที่ 1</u> โครงสร้างโมเลกุลของเพนิซิลลิน จี (benzyl penicillin)

นิวเครียสของยาเพนิซิลลิน จี เป็นส่วนที่สำคัญในการออกฤทธิ์ ถ้าส่วนนิวเคลียสในโมเลกุลของยาถูกทำลายโดยทางเคมี หรือถูกเปลี่ยนแปลงไปในร่างกายแล้วฤทธิ์ของยาที่มีต่อจุลชีพจะสูญเสียไปด้วย (2)

เพนิซิลลิน จี สามารถถูกทำลายได้หลายกรณีด้วยกัน คือ

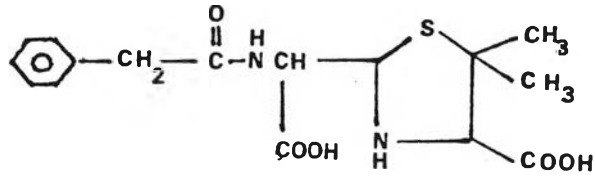
1 ถ้าอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรดจะเกิดการสลายในส่วนนิวเคลียสที่เป็นวงแหวนเบตาแลคแตมจะได้สารตัวใหม่เรียกว่า กรดเพนิลลิก (penillic acid) (9) (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 โครงสร้างโมเลกุลของกรดเพนิลลิก

ที่ pH 2-3 และที่อุณหภูมิห้อง ปฏิกิริยานี้จะเปลี่ยนแปลงสมบูรณ์ในเวลา 2-3 ชั่วโมง ดังนั้นในกระบวนการสกัดเพนิซิลลิน จี ซึ่งต้องทำในสภาวะที่เป็นกรด (pH 2-3) จะต้องทำในอุณหภูมิต่ำ

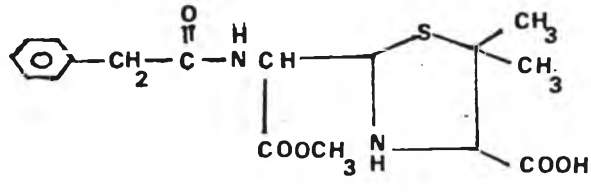
2 ถ้าอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เป็นด่างจะเกิดการสลายของเพนิซิลลิน จี ให้เป็นกรดเพนิซิลโลอิก (penicilloic acid) ที่บริเวณวงแหวนเบตาแลคแตม (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 โครงสร้างโมเลกุลของกรดเพนิซิลโลอิก

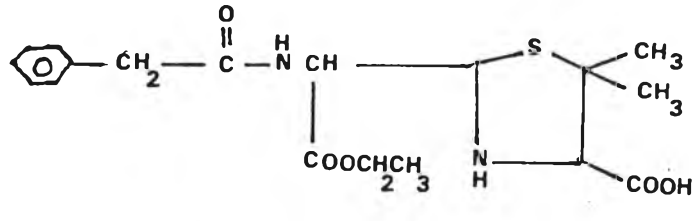
3 เอนไซม์เพนิซิลลิเนส (penicillinase)สามารถทำลายเพนิซิลลิน จี โดยทำลายวงแหวนเบตาแลคแตม ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทำนองเดียวกับการถูกทำลายด้วยด่าง ดังนั้นเอนไซม์นี้จึงมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า เบตาแลคแตมเมส (betalactamase) (2,9)

4 เมธานอล (methanol) และเอธานอล (ethanol) เป็นสารละลายอินทรีย์ที่ดีในการทำลายวงแหวนเบตาแลคแตม ในกรณีของเมธานอล เพนิซิลลิน จี จะถูกทำลายเป็นกรดเอลฟา เมธิลเพนิซิลโลอิก (α-methyl penicilloic acid) (9) (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 โครงสร้างของโมเลกุลของกรดเอลฟา เมธิลเพนิซิลโลอิก

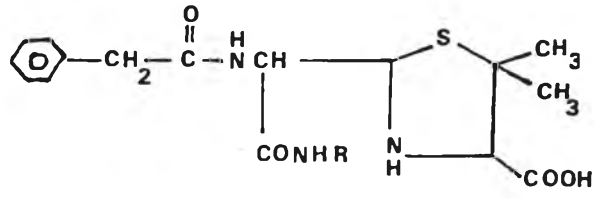
ในกรณีของเอทานอล เพนิซิลลิน จี จะถูกทำลายเป็นกรดเอลฟา เอธิลเพนิซิลโลอิก (α-ethyl penicilloic acid) (9) (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 โครงสร้างของโมเลกุลของกรดเอลฟา เอธิลเพนิซิลโลอิก

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5 เอมีนชนิดปฐมภูมิ (primary amines) สามารถทำลายเพนิซิลลิน จี เป็นกรดเอลฟา เอไมด์เพนิซิลโลอิก (α-amide penicilloic acid) (9) (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 โครงสร้างโมเลกุลของกรดเอลฟา เอไมด์เพนิซิลโลอิก

6 เพนิซิลลิน จี ถูกทำลายด้วยสารละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น ไดเอทธิล อีเทอร์ (diethyl ether) และอะซีโตน (acetone) ซึ่งโครงสร้างของเพนิซิลลิน จี ที่ถูกทำลายยังไม่แน่ชัด (3,21)

7 อุณหภูมิ เป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถทำลายโครงสร้างของเพนิซิลลิน จี เพนิซิลลิน จี ทั้งที่บริสุทธิ์และไม่บริสุทธิ์อยู่ในรูปสารละลายที่ 100 ° ซ.จะถูกทำลายหมดในเวลา 1 ชั่วโมง ส่วนผลึกเพนิซิลลิน จี โซเดียม ที่แห้งจะไม่ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 100 ° ซ. เป็นเวลา 30 วัน (9)

การพัฒนากระบวนการสกัดแยกและการทำให้เพนิซิลลิน จี บริสุทธิ์

ในการสังเคราะห์เพนิซิลลิน จี โดยการเลี้ยงเชื้อ Penicillium chrysogenum ในอาหารเหลว เพนิซิลลิน จี ที่ได้ออกมาปะปนกับสิ่งเจือปนชนิดอื่นหลายชนิด จึงจำเป็นจะต้องมีวิธีการสกัดแยกเพนิซิลลิน จี ออกจากสิ่งเจือปนเหล่านั้น ในปี ค.ศ.1946 Whitmore และคณะ (10) แยกเพนิซิลลิน จี โดยผ่านน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อไปบนคาร์บอน (carbon process) เพนิซิลลิน จี จะถูกดูดซับด้วยคาร์บอนต่อจากนั้นจะชะออกด้วยอะซีโตน วิธีนี้จะแยกเพนิซิลลิน จี ออกมาได้ 30-40% ต่อมาในปี ค.ศ.1949 Florey และคณะ (11) แยกเพนิซิลลิน จี โดยการสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction process) การสกัดได้อาศัยค่าความเป็นกรดด่างและคุณสมบัติของเพนิซิลลิน จี ในรูปกรดอิสระซึ่งละลายได้ดีในสารละลายอินทรีย์

วิธีนี้ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ดังนี้

1 สกัดเพนิซิลลิน จี จากน้ำหมักที่ปรับค่าความเป็นกรดด่าง 2.5-3.0 ด้วยเอมิลอะซิเตต (amyl acetate)

2 สกัดเพนิซิลลิน จี จากเอมิลอะซิเตตด้วยบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 7.0

3 สกัดเพนิซิลลิน จี จากบัฟเฟอร์ด้วยคลอโรฟอร์ม (chloroform)

4 สกัดเพนิซิลลิน จี จากคลอโรฟอร์มด้วยสารละลายเกลือโซเดียม

การแยกด้วยวิธีนี้จะแยกเพนิซิลลิน จี ออกมาได้ 50%

Loven และคณะ (12) ได้เติมอลูมิเนียมซัลเฟต (aluminium sulfate) หรือกรดแทนนิค (tannic acid) เพื่อตกตะกอนโปรตีนบางชนิดที่ละลายอยู่ในน้ำหมักก่อนจะนำไปสกัดด้วยเอมิลอะซิเตต เพื่อป้องกันการเกิดการรวมตัวระหว่างน้ำกับตัวทำละลาย (emulsion) ปี ค.ศ.1954 Sylvester และคณะ (9) ได้มีการเติมสารที่ช่วยลดการรวมตัวระหว่างน้ำกับตัวทำละลาย (demulsifying agent) ได้แก่ ultrawet 30 E หรือ cethyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) ลงไปในน้ำหมัก แล้วจึงนำไปสกัดด้วยเอมิลอะซิเตตทำให้แยกเอมิลอะซิเตตออกจากน้ำหมักได้ง่ายขึ้น ปี ค.ศ.1979 Queener และ Swartz (6) ได้แยกเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมักและตกผลึกได้เพนิซิลลิน จี ที่บริสุทธิ์ โดยแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

1 สกัดเพนิซิลลิน จี จากน้ำหมักที่ปรับค่าความเป็นกรดด่าง 2.5-3.0 ไปยังเอมิลอะซิเตต

2 เติมผงถ่านลงในสารที่สกัดได้เพื่อกำจัดสิ่งเจือปน

3 ตกผลึกด้วยสารละลายโซเดียม

วิธีนี้สามารถแยกเพนิซิลลิน จี ได้ถึง 78%

<u>เหตุจูงใจในการทำวิจัย</u>

ข้อมูลเกี่ยวกับการพัฒนาการสกัดแยกและการทำเพนิซิลลิน จี ให้บริสุทธิ์ที่กล่าวมาเป็นข้อมูลที่รวบรวมมาจากรายงานผลการวิจัย แต่ไม่มีรายละเอียดในขั้นตอนต่างๆ มากพอที่จะนำไปปฏิบัติในกระบวนการผลิตเพราะเป็นความลับทางอุตสาหกรรม ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแยกและทำให้เพนิซิลลิน จี บริสุทธิ์ทุกขั้นตอนอย่างละเอียด เพื่อที่จะใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ขั้นตอนการวิจัย

1 หาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมัก (culture filtrate) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ Penicillium chrysogenum A 88

2 หาสภาวะที่เหมาะสมในการบจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยคาร์บอนก่อนการตกผลึก

3 หาชนิดและปริมาณของเกลือโซเดียมที่เหมาะสมในการตกผลึก