The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences

Volume 13
Issue 4 *1988*

Article 3

1-1-1988

Effect of Semicarbazide in the Microbiological Assay of the Combination of Streptomycin with Various Antibiotics(ผลของ semicarbazide ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณยาปฏิชีวน...

อารีรตน์ ลออปักษา

วิมลมาศ ลิปิพันธ์

พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/tjps

Part of the Pharmacology Commons

Recommended Citation

ลออปักษา, อารีรตน์; ลิปิพันธ์, วิมลมาศ; and พงษ์เพ็ชร, พิณทิพย์ (1988) "Effect of Semicarbazide in the Microbiological Assay of the Combination of Streptomycin with Various Antibiotics(ผลของ semicarbazide ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณยาปฏิชีวน...," *The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*: Vol. 13: Iss. 4, Article 3.
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/tjps/vol13/iss4/3

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

650 ง 7ก ปฏิชีวะ:
650 ง 0 ก Streptomycin
650 ง 0 ก Semicarbazide
62991834

ปฐมนิพนธ์

ORIGINAL ARTICLE

ผลของ semicarbazide ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณยาปฏิชีวนะที่ผสมกับ streptomycin โดยวิธีทางจุลชีววิทยา

*อารีรัตน์ ลออปักษา, ภ.ม.**
*วิมลมาศ ลิปิพันธ์, Ph.D.**
*พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร, วท.ม.**

บทคัดย่อ

ความเข้มข้นต่ำสุดของ semicarbazide hydrochloride ที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ *Sarcina lutea* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ที่ใช้ในการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะมีค่าเท่ากับ 6.0, 10.0 และ 4.0 มก./มล. ตามลำดับ ดังนั้นเพื่อป้องกันผลรบกวนในการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะต้องใช้ semicarbazide hydrochloride ในความเข้มข้นที่ต่ำกว่าค่านี้ Streptomcin ในความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล. จะถูกยับยั้งฤทธิ์การฆ่าเชื้อทดสอบ *B. subtilis* ได้โดยใช้ semicarbazide hydrochloride ในความเข้มข้นต่ำสุด 1.5 มก./มล. ในปริมาตรที่เท่ากัน เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ ในเวลา 180 นาที และถูกยับยั้งฤทธิ์การฆ่าเชื้อ โดยใช้ semicarbazide hydrochloride ในความเข้มข้น 2.0 มก./มล. ในเวลา 30 นาที แต่เมื่อทดลองบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ความเข้มข้นต่ำสุดของ semicarbazide hydrochloride ที่มีผลยับยั้งการฆ่าเชื้อทดสอบโดย streptomycin มีค่า 3.0 มก./มล. ในเวลา 60 นาที และความเข้มข้น 4.0 มก./มล. สามารถยับยั้งการฆ่าเชื้อทดสอบได้ในเวลา 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 ต่ำกว่าและในเวลาที่สั้นกว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ semicarbazide hydrochloride ที่สามารถยับยั้งฤทธิ์การฆ่าเชื้อทดสอบโดย streptomycin มีค่า 2.0 มก./มล. เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ ในเวลา 30 นาที

* ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับผลของ semicarbazide hydrochloride ต่อยาปฏิชีวนะตัวอื่นในกลุ่ม aminoglycoside พบว่า ความเข้มข้น 0.5-2.0 มก./มล. เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 37°ซ ไม่มีผลยับยั้งการฆ่าเชื้อทดสอบ *B.subtilis* โดย dihydrostreptomycin แต่ความเข้มข้นที่สูงกว่า 1.0-1.5 มก./มล. มีผลยับยั้งการฆ่าเชื้อทดสอบ *S.aureus* โดย kanamycin สำหรับผลต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม penicillin พบว่า ความเข้มข้นของ semicarbazide hydrochloride 0.5-10.0 มก./มล. เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 37°ซ ไม่มีผลยับยั้งการฆ่าเชื้อทดสอบ *S.aureus* โดย penicillin G สำหรับผลต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม rifamycin จะได้ผลคล้ายคลึงกับยาปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycoside คือความเข้มข้น 0.5-2.0 มก./มล. เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ ในเวลา 60 ถึง 120 นาที และ 0.5-1.5 มก./มล. เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ในเวลา 60 นาที จะไม่มีผลยับยั้งการฆ่าเชื้อทดสอบ *S.lutea* โดย rifampin เวลาที่ใช้บ่มทั้งหมดส่วนใหญ่ไม่ควรบ่มในเวลาที่นานกว่า 120 นาที ดังนั้นในการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะเหล่านี้ที่ผสมกับ streptomycin จะต้องพิจารณาถึงความเข้มข้นของ semicarbazide hydrochloride ที่ใช้ในการยับยั้งฤทธิ์การฆ่าเชื้อทดสอบโดย streptomycin และจะต้องคำนึงถึงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการบ่มเพื่อไม่ให้มีผลกับยาปฏิชีวนะตัวอื่นที่ต้องการวิเคราะห์ (ไทยเภสัชสาร ปีที่ 13 (4) : หน้า 373-385 (2531))

บทนำ

ยาปฏิชีวนะมีบทบาทสำคัญมากในการรักษาโรคติดเชื้อต่าง ๆ การรักษาอาจต้องใช้ยารวมในการต้านเชื้อโดยการใช้ยา 2 ตัว หรือมากกว่า เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการรักษามากที่สุด แต่การใช้ยารวมอาจมีปฏิกิริยาระหว่างยาที่มีผลต่อเชื้อและผู้ป่วย ยาอาจมีฤทธิ์ต่อเชื้อต่างกันโดยอาจเสริมฤทธิ์กันหรือต้านฤทธิ์กัน การรวมยาอาจทำให้เกิดพิษเพิ่มมากขึ้นจากพิษของยาแต่ละตัวรวมกันหรือมากกว่า จึงต้องระมัดระวังเป็นอย่างยิ่ง (1 - 3) การวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะในเมื่อมียาอื่นอยู่ด้วยโดยทางจุลชีววิทยา อาจทำได้โดย การใช้เชื้อจำเพาะที่ไวต่อยาปฏิชีวนะที่ต้องการวิเคราะห์ในสภาวะที่เหมาะสม หรือการใช้สารยับยั้ง หรือทำลายฤทธิ์ของยาตัวอื่นในการวิเคราะห์ เช่น การใช้ semicarbazide เป็นสารยับยั้งฤทธิ์ของ streptomycin (4)

จุดมุ่งหมายในการวิจัยนี้เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้ semicarbazide ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีผลยับยั้งฤทธิ์ของ streptomycin และศึกษาผลที่มีต่อยาปฏิชีวนะอื่น ๆ โดยทางจุลชีววิทยาเพื่อประโยชน์ในการนำสภาวะที่เหมาะสมนั้นไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณยาปฏิชีวนะที่ผสมอยู่กับ streptomycin ในการควบคุมคุณภาพของยาปฏิชีวนะรวมโดยการวิเคราะห์หาปริมาณยาที่ต้องการในตำรับ และสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณยาในซีรั่ม เนื้อเยื่อ หรือของเหลวในร่างกายภายหลัง ในผู้ป่วยที่ได้รับยารวมซึ่งจะทำให้ทราบถึงปริมาณยาที่มีผลต่อการรักษาและหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงที่เป็นพิษ

วัสดุและวิธีทดลอง

I. วัสดุ

1. เชื้อจุลินทรีย์

1.1 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

1.2 *Sarcina lutea* ATCC 9341

1.3 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P

2. สารปฏิชีวนะและสารเคมี

2.1 Streptomycin sulphate ความแรง 767.05 ไมโครกรัม/มก.

2.2 Dihydrostreptomycin sulphate 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 Semicarbazide hydrochloride (The British Drug Houses LTD., England)

2.7 Antibiotic assay medium (Difco Laboratory, U.S.A.)

II. วิธีการทดลอง

1. การศึกษาหาปริมาณ semicarbazide ที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

1.1 การเตรียมสารละลาย semicarbozide

ชั่ง semicarbazide และเตรียมเป็นสารละลายโดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวทำละลายให้มีความเข้มข้น 0, 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.

1.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

1.2.1 การเตรียมเชื้อ *S. lutea* และ *S. aureus* โดยการเพาะเชื้อบน Medium No. 1 agar slant แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชม. ใช้น้ำเกลือ 0.9% ปราศจากเชื้อ ล้างเชื้อแล้วปรับความขุ่นของเชื้อที่ได้โดยเมื่อนำมาเจือจาง 1 : 10 และนำไปอ่านค่าได้ 25% transmittance ที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ในการทดลองใช้เชื้อในปริมาณ 2.0% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.2.2 การเตรียมสปอร์ของ *B. subtilis* ทำโดยการเพาะเชื้อบน Medium No. 1 agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 16-24 ชม. ใช้น้ำเกลือ 0.9% ปราศจากเชื้อ ปริมาตรประมาณ 3 มล. ล้างเชื้อและนำมาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อใน Roux bottle นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 5 วัน หลังจากนั้นล้างสปอร์โดยใช้น้ำเกลือ 0.9% ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 50 มล. นำไปปั่น (4000 รอบ/นาที นาน 20 นาที) และเทส่วนน้ำทิ้ง เติมน้ำเกลือ 0.9% ปราศจากเชื้อลงไปผสมกับตะกอนเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อ (Vegetative Cells) โดยความร้อน (heat-shock) ที่อุณหภูมิ 70°ซ นาน 30 นาที เก็บสปอร์ไว้ในตู้เย็น ในการทดลองใช้สปอร์ในปริมาณ 0.1% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.3 การทดลอง

ก) การเตรียมจานเลี้ยงเชื้อ ทำโดยหลอมอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิ 45-48°ซ เติมเชื้อหรือสปอร์ที่เตรียมไว้ลงในอาหาร ผสมให้เข้ากันแล้วปิเปต 15 มล. ลงในจานเลี้ยงเชื้อ (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มม.) รอจนอาหารแข็ง ใช้ cork borer No.3 เจาะหลุมในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ระยะห่างเท่า ๆ กัน จำนวน 6 หลุม แล้วใช้เครื่องดูดวุ้นออก

ข) หยอดสารละลายของ semicarbazide ลงในแต่ละหลุมโดยใช้ micropipette ขนาด 50 ไมโครลิตร โดยแต่ละความเข้มข้นจะทดสอบกับแต่ละเชื้อให้ได้ค่าอย่างน้อย 5 ค่า ทิ้งจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. ก่อนนำไปบ่มที่ 37°ซ นาน 24 ชม.

1.4 การวัดผล

วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส (inhibition zone) ของแต่ละความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแต่ละชนิดโดยใช้เวอร์เนีย และนำมาหาค่าเฉลี่ย

จากการทดลองจะทำให้ทราบค่าความเข้มข้นสูงสุดของ semicarbazide ที่ไม่มีผลต่อเชื้อทดสอบ และสามารถนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2. *การหาปริมาณ semicarbazide ที่ยับยั้งฤทธิ์การฆ่าเชื้อโดย streptomycin*

2.1 การเตรียมสารละลาย semicarbazide

เตรียมโดยวิธีเดียวกับข้อ 1.1 ให้มีความเข้มข้น 0, 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) และละลายใน phosphate buffer pH 7.8-8.0 ให้มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล.

2.3 การทดลอง

ก) การเตรียมจานเลี้ยงเชื้อทำเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 1.3 ก. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง คือ สปอร์ของ *B. subtilis* ใช้อาหาร Medium No. 5 ในการวิเคราะห์ และเจาะ 6 หลุม

ข) ผสมสารละลายข้อ 2.1 และ 2.2 โดยใช้ปริมาตรเท่ากันในหลอดทดลอง เขย่าด้วยเครื่องผสม (Mixer) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30°ซ (อุณหภูมิห้อง) และ 37°ซ แล้วนำสารละลายผสมมาหยอดลงหลุม ในเวลาต่าง ๆ กัน ของการบ่ม คือ 0, 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที ตามลำดับ จานเลี้ยงเชื้อที่หยอดแล้วจะต้องทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชม.

2.4 การวัดผล

วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสของแต่ละค่าที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ กันแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

3. *การศึกษาผลของ semicarbazide ที่ยับยั้งฤทธิ์ฆ่าเชื้อของยาปฏิชีวนะกลุ่มต่าง ๆ*

3.1 การศึกษาผลของ semicarbazide ที่ยับยั้งฤทธิ์ฆ่าเชื้อของยาปฏิชีวนะในกลุ่ม streptomycin

ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ dihydrostreptomycin และ kanamycin ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม aminoglycosides เช่นเดียวกับ streptomycin

3.2 การศึกษาผลของ semicarbazide ที่ยับยั้งฤทธิ์ฆ่าเชื้อของยาปฏิชีวนะในกลุ่มอื่น

ยาปฏิชีวนะในการทดลองนี้คือยากลุ่ม penicillin ได้แก่ penicillin G sodium และยากลุ่ม rifamycins ได้แก่ rifampin

การเตรียมสารละลาย semicarbazide การเตรียมสารละลายยาปฏิชีวนะ การทดลอง และการวัดผลทำได้เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2 แต่ใช้เวลาบ่ม 60, 120 และ 180 นาที, pH ของ phosphate buffer, อาหารเลี้ยงเชื้อ และเชื้อทดสอบที่ใช้ในการวิเคราะห์ แสดงในตารางที่ 1 (5)

ตารางที่ 1 สภาวะของยาปฏิชีวนะต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษาผลของ semicarbazide

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 ก่อนหยอดหลุม

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

ผลการทดลอง

1. ปริมาณ semicarbazide ที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

จากการทดลอง ความเข้มข้นของ semicarbazide 0-2.0 มก./มล. ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อทดสอบทั้ง 3 ชนิด คือ *S. lutea, S. aureus* และ *B. subtilis* แต่ความเข้มข้น 10.0 มก./มล. หรือมากกว่าจะมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้งหมดโดยทำให้เกิดโซนใส ผลแสดงในตาราง 2

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

ตารางที่ 2 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดย semicarbazide.

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

2. ปริมาณ semicarbazide ที่มีผลยับยั้งการฆ่าเชื้อโดย streptomycin

ในการทดลองใช้ความเข้มข้นของ semicarbazide 0-10.0 มก./มล. ผสมกับ streptomycin ที่มีความเข้มข้นขนาดคงที่เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มล. ในปริมาตรเท่ากัน ทำการทดลอง 2 ชุด คือบ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 37°ซ พบว่ามีอุณหภูมิ 30°ซ (ตารางที่ 3) ความเข้มข้นต่ำสุดของ semicarbazide ที่มีผลยับยั้งการฆ่าเชื้อทดสอบ *B. subtilis* โดย streptomycin มีค่า 1.5 มก./มล. ในเวลา 180 นาที และความเข้มข้นขนาด 2.0 มก./มล. สามารถยับยั้งได้ในเวลา 30 นาที ส่วนความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถยับยั้งการฆ่าเชื้อโดย streptomycin ได้ทุกระยะเวลา มีค่า 4.0 มก./มล.

ตารางที่ 3 ผลของ semicarbazide ที่ยับยั้งฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *Bacillus subtilis* โดย streptomycin ที่อุณหภูมิ 30°ซ

Semicarbazide (มก./มล.)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ย (มม.) ในเวลาต่าง ๆ 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

เมื่อทดลองที่อุณหภูมิ 37°ซ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4 ความเข้มข้นต่ำสุดของ semicarbazide ที่มีผลยับยั้งการฆ่าเชื้อทดสอบ *B. subtilis* โดย streptomycin มีค่า 3.0 มก./มล. ในเวลา 60 นาที และความเข้มข้นขนาด 4.0 มก./มล. สามารถยับยั้งได้ในเวลาต่ำสุด 30 นาที ส่วนความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถยับยั้งการฆ่าเชื้อโดย streptomycin ได้ทุกระยะเวลา มีค่า 6.0 มก./มล.

ใน control ซึ่งเป็น streptomycin ที่ไม่มี semicarbazide (มีค่าเป็น 0) พบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ยเมื่อเวลาต่าง ๆ กันเปลี่ยนไปเล็กน้อย โดยมีค่าเฉลี่ย 15.44 ± 0.36 มม. ที่อุณหภูมิ 30°ซ และ 16.82 ± 0.43 มม. ที่อุณหภูมิ 37°ซ

จากการทดลอง การบ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 37°ซ ให้ผลแตกต่างกันในปริมาณต่ำสุดของ semicarbazide ที่ใช้ โดยที่อุณหภูมิ 30°ซ ใช้ปริมาณของ semicarbazide ต่ำกว่า คือ 2.0 มก./มล. ในเวลา 30 นาที เพื่อยับยั้งฤทธิ์ฆ่าเชื้อของ streptomycin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล.

3. ผลของ semicarbazide ที่ยับยั้งฤทธิ์ฆ่าเชื้อของยาปฏิชีวนะกลุ่มต่าง ๆ

3.1 ผลของ semicarbazide ที่ยับยั้งฤทธิ์การฆ่าเชื้อของยาปฏิชีวนะในกลุ่ม streptomycin (dihydrostreptomycin, kanamycin)

ความเข้มข้นของ semicarbazide 0.5 - 2.0 มก./มล. ทั้งที่อุณหภูมิ 30 และ 37°ซ ไม่มีผลยับยั้งการฆ่าเชื้อ *B. subtilis* โดย dihydrostreptomycin ในระยะเวลา 60 ถึง 180 นาที โดยเปรียบเทียบกับ control dihydrostreptomycin เมื่อไม่มี semicarbazide ที่อุณหภูมิและระยะเวลาเดียวกันจะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ยใกล้เคียงกันมาก และผลจากการใช้ความเข้มข้นของ semicarbazide 3.0 - 10.0

ตารางที่ 4 ผลของ semicarbazide ที่ยับยั้งฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *Bacillus subtilis* โดย streptomycin ที่อุณหภูมิ 37°ซ

Semicarbazide (มก./มล)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ย (มม.) ในเวลาต่าง 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

มก./มล. ปรากฏว่าขนาดของโซนใสเฉลี่ยจะค่อย ๆ ลดลงเมื่อความเข้มข้นของ semicarbazide มากขึ้นและระยะเวลาที่บ่มไว้นานขึ้น ค่าต่ำสุดเท่ากับ 13.9 มม. ผลแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลของ semicarbazide ที่ยับยั้งฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *Bacillus subtilis* โดย dihydrostreptomycin ที่อุณหภูมิ 30 และ 37°ซ

Semicarbazide (มก./มล.)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ย (มม.) ในเวลาต่าง 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

ส่วนผลของ semicarbazide ที่ยับยั้งฤทธิ์ฆ่าเชื้อของ kanamycin ที่อุณหภูมิ 30°ซ และ 37°ซ พบว่าทำให้ kanamycin มีผลยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ค่อย ๆ ลดลง ในความเข้มข้นของ semicarbazide ตั้งแต่ 1.0 - 1.5 มก./มล. เมื่อเปรียบเทียบกับ control ผลแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลของ semicarbazide ที่ยับยั้งฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดย kanamycin ที่อุณหภูมิ 30 และ 37°ซ

Semicarbazide (มก./มล.)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ย (มม.) ในเวลาต่าง 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 0.5 - 10.0 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 30 และ 37°ซ ในระยะเวลาต่างกันตั้งแต่ 60 ถึง 180 นาที ไม่มีผลยับยั้งการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ของ penicillin G โดยเปรียบเทียบกับ control ที่อุณหภูมิและระยะเวลาเดียวกันโดยเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยที่วัดได้จะมีค่าใกล้เคียงกันมาก และในกลุ่ม control penicillin G ที่ไม่มี semicarbazide พบว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ยมีค่าลดลงเมื่อเวลามากขึ้น ผลแสดงในตารางที่ 7

ผลของ semicarbazide ต่อฤทธิ์การฆ่าเชื้อของ rifampin (ตารางที่ 8) จะคล้ายคลึงกับยาปฏิชีวนะในกลุ่ม streptomycin คือ ความเข้มข้นของ semicarbazide 0.5 - 2.0 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 30°ซ ในระยะเวลาตั้งแต่ 60 ถึง 120 นาที และเมื่อใช้ความเข้มข้น 0.5 - 1.5 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 37°ซ ในระยะเวลา 60 นาที ผลที่ได้คือ เส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ยมีค่าใกล้เคียงกับ ผลของกลุ่ม control ที่อุณหภูมิ และระยะเวลาเดียวกัน และเมื่อความเข้มข้นของ semicarbazide เท่ากับ 3.0 มก./มล. หรือสูงกว่า ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยจะมีค่าลดลงมากอย่างเห็นได้ชัด

ตารางที่ 7 ผลของ semicarbazide ที่ยับยั้งฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดย penicillin G ที่อุณหภูมิ 30 และ 37°ซ

Semicarbazide (มก./มล.)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ย (มม.) ในเวลาต่าง 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	17.3	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 8 ผลของ semicarbazide ที่ยับยั้งฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *Sarcina lutea* โดย rifampin ที่อุณหภูมิ 30 และ 37°ซ

Semicarbazide (มก./มล.)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ย (มม.) ในเวลาต่าง 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

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การศึกษาพบว่า semicarbazide มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของยาปฏิชีวนะ ดังนั้นจะต้องคำนึงถึงปริมาณที่ใช้เพราะถ้าหากใช้ในปริมาณที่ไม่เหมาะสมกล่าวคือ การใช้ในปริมาณมากเกินไป อาจจะเกิดความผิดพลาดในผลการทดลองคือ ได้ผลมากกว่าความจริงจากผลของ semicarbazide ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อร่วมเข้าไปด้วย *S. aureus* มีความไวต่อ semicarbazide ในความเข้มข้นสูง คือ 10.0 มก./มล. หรือสูงกว่า ส่วน *S. lutea* จะมีความไวในความเข้มข้น 6.0 มก./มล. หรือสูงกว่า และ *B. subtilis* มีความไวสูงกว่า คือใช้ความเข้มข้น 4.0 มก./มล. หรือสูงกว่า

Semicarbazide hydrochloride ในทางเคมีใช้เป็น reagent ของ ketone และ aldehydes โดยทำให้เกิดสารประกอบลักษณะผลึกที่มีจุดหลอมเหลวเฉพาะ (6) และในทางจุลชีววิทยาใช้เป็นตัวยับยั้งหรือต้าน (microbiological antagonist) ฤทธิ์ของ streptomycin ในการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะรวมโดยการเติมลงในอาหารที่ใช้วิเคราะห์ 1 ก./ล. (4) ส่วนปริมาณ semicarbazide ที่มีผลยับยั้งการฆ่าเชื้อ *B. subtilis* โดย streptomycin จากการทดลองนี้โดยการผสม semicarbazide กับ streptomycin และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 และ 37°ซ ในเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าที่อุณหภูมิ 30°ซ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ คือ 1.5 มก./มล. (ในช่วงเวลา 180 นาที) เมื่อใช้ streptomycin 100 ไมโครกรัม/มก. ที่อุณหภูมิ 37°ซ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้มีค่า 3.0 มก./มล. (ในเวลา 60 นาที) และจากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ semicarbazide ที่เหมาะสมคือความเข้มข้น 2.0 มก./มล. ซึ่งสามารถยับยั้งการฆ่าเชื้อโดย streptomycin ได้ในระยะเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ และเป็นความเข้มข้นที่เชื้อ *B. subtilis* ยังไม่ไวต่อ semicarbazide และจากการทดลองข้างต้นมีค่าความเข้มข้น 4.0 มก./มล. หรือสูงกว่า ในการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ semicarbazide ที่สูงกว่าค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการฆ่าเชื้อโดย streptomycin ได้แล้วจะมีผลทำให้เกิดโซนใสขึ้นอีกและมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ semicarbazide สูงขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก semicarbazide ในความเข้มข้นที่สูงกว่าหรือที่เหลือไปทำให้มีผลยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ

ความเข้มข้นของ semicarbazide ที่มีผลยับยั้งการฆ่าเชื้อโดยยาปฏิชีวนะในกลุ่ม streptomycin หรือ aminoglycosides คือ dihydrostreptomycin และ kanamycin มีค่า 3.0 และ 1.0 - 1.5 มก./มล. หรือสูงกว่าตามลำดับ และความเข้มข้นต่ำกว่าจะไม่มีผลหรือมีผลน้อยมาก เช่นเดียวกับยากลุ่ม rifamycins คือ rifampin เมื่อบ่มนาน 60 นาที ถึง 120 นาที ส่วนในกลุ่ม penicillins พบว่าความเข้มข้นของ semicarbazide 0.5 - 10.0 มก./มล. ไม่มีผลต่อการฆ่าเชื้อเลย

ดังนั้นการใช้ semicarbazide ในการยับยั้งการฆ่าเชื้อโดย streptomycin เพื่อวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่ม streptomycin (aminoglycoside) และยาปฏิชีวนะในกลุ่มอื่นข้างต้นจะต้องใช้ semicarbazide ในความเข้มข้นที่ไม่มีผลต่อยาปฏิชีวนะที่ต้องการวิเคราะห์ หรือปริมาณที่ใช้จะต้องต่ำกว่าปริมาณที่ไปมีผลต่อยาปฏิชีวนะตัวอื่นที่ต้องการวิเคราะห์ ซึ่งผสมอยู่กับ streptomycin รวมทั้งพิจารณาความเข้มข้นต่ำสุดของ semicarbazide ที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบด้วย ในกลุ่ม control ที่ไม่มี semicarbazide พบว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเฉลี่ยมีค่าลดลงเมื่อเวลามากขึ้นด้วย ดังนั้นเวลาที่ใช้ในการบ่ม (ไม่ควรเกิน 120 นาที) เป็นปัจจัยหนึ่งที่จะต้องนำมาพิจารณาในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการใช้ semicarbazide รวมทั้งอุณหภูมิ

ที่ใช้ในการบ่ม ซึ่งมีผลต่อยาปฏิชีวนะที่ไวต่ออุณหภูมิมากรวมทั้งมีผลต่อ semicarbazide ในการยับยั้งการฆ่าเชื้อโดยยาปฏิชีวนะ ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของยาปฏิชีวนะนั้น ๆ

กิติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายวิจัยคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนงบประมาณแผ่นดินสนับสนุนการวิจัยนี้ และขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ ในเรื่องเครื่องมือและสถานที่ในการปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

1. Jawetz, E., Melnick, Adelberg, E.A. (1982) Antimicrobial Chemotherapy in Review of Medical Microbiology, 15th ed., pp. 126-127, Lange Medical Publications, Drawer, L., Los Altos, California.
2. Gilman, A.G., Goodman, L.S., Rall, T.W., and Murad, F, (1985) Chemotherapy of Microbial Disease in the Pharmacological Basis of Therapeutics, 17th ed., pp. 1066-1094. Macmillan Publishing Company, New York.
3. Rahall, J.J. (1978) Antibiotic Combination The Clinical relevance of Synergy and Antagonism, Medicine, 57:179.
4. Holt, H.A. and Reeves, D.S. (1978) Assays of Mixtures of Antibiotic in Laboratory Method in Antimicrobial Chemotherapy, pp. 164-167. Livingstone, Edinburgh, London and New York.
5. Code of Federal Requlations (1979) Title 21 Food and Drug part 300-499, pp. 244-262. The Office of the Federal Register, National Archieves and Record Service, General Services Administration, U.S. Government Printing Office, Washington.
6. Windholz, M., Budavari, S., Blumetti, R.F., and Otterbein, E.S., (1983) The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 10th ed., pp. 1214, Merck & Co., Inc., New York.

Effect of Semicarbazide in the Microbiological Assay of the Combination of Streptomycin with Various Antibiotics

Areerat Laorpaksa, M.Sc. (Pharm) *
Vimolmas Lipipun, Ph.D. *
Pintip Pongpech, M.Sc. *

Abstract

The lowest concentrations of semicarbazide hydrochloride for the inhibition of the test organisms : *Sarcina lutea* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P and *Bacillus subtilis* ATCC 6633 were 6.0, 10.0 and 4.0 mg/ml, respectively. In order to eliminate the interference in the microbiological assay of antibiotics, the concentrations of semicarbazide hydrochloride used should be lower than above concentrations. The activity of streptomycin in concentration of 100 mcg/ml was neutralized by the lowest concentration of semicarbazide hydrochloride of 1.5 mg/ml in equal volume in the inhibition of *B. subtilis* at 30°C for 180 min. and in the concentration of 2.0 mg/ml for the incubation at 30°C for 30 min. The lowest concentration of semicarbazide hydrochloride for the incubation at 37°C for 60 min and the incubation at 37°C for 30 min were 3.0 and 4.0 mg/ml, respectively. The highest concentration of semicarbazide hydrochloride which neutralized the activity of streptomycin against the test organism at 30 and 37°C were 4.0 and 6.0 mg/ml, respectively. This investigation showed that the concentration of semicarbazide hydrochloride and the time used in the incubation at 30°C was lower and shorter than those used in the incubation at 37°C. The appropriate concentration which neutralized the activity of streptomycin for the incubation at 30°C for 30 min. was 2.0 mg/ml

The effects of semicarbazide hydrochloride on other aminoglycosides was that the concentrations of 0.5-2.0 mg/ml either in the incubation at 30 or 37°C had no effect on dihydrostreptomycin against *B. subtilis* but 1.0-1.5 mg/ml or higher neutralized the activity of kanamycin against *S. aureus*. For penicillin group, semicarbazide hydrochloride in concentrations of 0.5-10.0 mg/ml in the incubation at 30 and 37°C had no effect in neutralizing the activity of penicillin G against *S. aureus*. For rifamycin group, the result was the same as those of the aminoglycosides. Semicarbazide hydrochloride in the concentration of 0.5-2.0 mg/ml in the incubation at 30°C for 60-120 min. and 0.5-1.5 mg/ml at 37°C for 60 min. had no effect on rifampin against *S. lutea*. Most of the incubation time used that resulted in the neutralization of the activity should be shorter than 120 min. Therefore, in the elimination of the interference in the assay of antibiotics in the combination with streptomycin, the factors of which should be considered were the concentrations of semicarbazide hydrochloride,temperature and time for the incubation. (Th. J. Pharm. Sci., Vol. 13 No. 4, 373-385 (1988))

* Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.