

วารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ปีที่ 37 ฉบับที่ 2 (เม.ย. - มิ.ย. 52) Vol. 37 No.2 (Apr. - Jun. 09)



วารสาร

ISSN 0125 - 2364
วิทยาศาสตร์ชุมชน
KKU SCIENCE JOURNAL

เจ้าของ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สำนักงาน

คณะวิทยาศาสตร์ ตึก 6 มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อ.เมือง จ.ขอนแก่น 400002

โทรศัพท์ 0-4320-2372 โทรสาร 0-4320-2371

วัตถุประสงค์

1. เพื่อส่งเสริมและเผยแพร่วิทยาการในสาขาวิชาต่าง ๆ ทางด้านวิทยาศาสตร์
2. เพื่อเผยแพร่ผลงานทางด้านการวิจัย และการศึกษา ค้นคว้าของอาจารย์และนักศึกษา
3. เพื่อเป็นสื่อกลางการแลกเปลี่ยนความรู้ และแนวความคิดทางวิชาการระหว่างอาจารย์ นักศึกษา และผู้สนใจ ทั้งภายในและภายนอกสถาบัน

กำหนดออก ปีละ 4 ฉบับ

- ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม
ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน
ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน
ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม

ที่ปรึกษา

คณะบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ละออศรี เสนาะเมือง)

บรรณาธิการ

สมปอง ธรรมศิริรักษ์

กองบรรณาธิการ

กิตติกร นาคประสิทธิ์
ศาสตรา วงศ์ธนวุธ
ชุติมา หาญจวนิช
เอกพรรณ สวัสดิ์ตั้ง
ศักดิ์ดา ดาดวง
สมเดช กนกเมธากุล
สุพรรณิ อึ้งปัญสดวงศ์
งานนิจ นนทโส
อัจฉราภรณ์ ภักดี

ฝ่ายศิลป์และภาพ

กิลเลน คิณนรเศรษฐ์
สุชาติ เทพภูเขียว

ฝ่ายเทคนิค

บุญคุ้ม เหลือล้ำ

ฝ่ายจัดการและ เลขานุการ

สุภาพร พิมพ์วารี
สมศักดิ์ อุ่นจันทิ
วุฒิฉัตร น้อยนรินทร์
วิญญู จิมพลี

**บทความและงานวิจัย
ได้รับการกลั่นกรอง
จากผู้ทรงคุณวุฒิ**

บทความหรือข้อคิดเห็นใด ๆ ในวารสารนี้เป็นของผู้เขียน ไม่จำเป็นต้องสอดคล้องกับทัศนะของกองบรรณาธิการ



วารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ปีที่ 37 ฉบับที่ 2 (เม.ย. - มิ.ย. 52) Vol. 37 No. 2 (Apr. - Jun. 09)

บรรณาธิการแสดง

บทความ

- ☐ กลไกตอบสนองของไซยาโนแบคทีเรียต้านภาวะ
เครียดจากแสงที่มีความเข้มสูง
Responsive Mechanisms of Cyanobacteria
against Intense Light Stress
เสาวรัตน์ จันทะโร.....

121
- ☐ การกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ปนเปื้อน
ในก๊าซชีวภาพโดยจุลินทรีย์
Hydrogen Sulfide Removal from Biogas
by Microorganisms
ศุภาพร หวังศิริเจริญ
วสุ ปฐมอารีย์.....

130
- ☐ โพลาร์ออร์แกนิกเคมีคัลอินทิเกรทีฟแซมเพลอร์
สำหรับสารอินทรีย์ในตัวอย่างน้ำ
Polar Organic Chemical Integrative Sampler
for Organic Compounds in Aqueous Samples
จิตติมา รุจิราลัย.....

137
- ☐ การใช้ประโยชน์ฟิล์มไคโตซานเป็นระบบนำส่งยา
แบบควบคุมการปลดปล่อย
Utilization of Chitosan Films as Controlled
Release Drug Delivery Systems
น้อย เนียมสา มังกร ศรีสะอาด
ยอดธง ไพบาก.....

147



วารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ปีที่ 37 ฉบับที่ 2 (เม.ย. - มิ.ย. 52) Vol. 37 No. 2 (Apr. - Jun. 09)

บทความ

- ☐ พิษแมงป่อง : น่ากลัว หรือ น่าใช้
Scorpion Toxin : Dreadful or Applicable
นันทวัน เอื้อวงศ์กุล
ศักดิ์ดา ดาดวง..... 157

งานวิจัย

- ☐ Isolation and Analysis of Antibacterial
Substance Produced from *P. aeruginosa*
TISTR 781
Kanda Saosoong
Wirach Wongphathanakul
Chanokporn Poasiri
Chalerm Ruangviriyachai..... 163

- ☐ ยีน *matK* และ *trnH-psbA* intergenic spacer
ในการนำมาใช้เป็น DNA barcode: การประเมิน
เบื้องต้นโดยการตรวจสอบความผันแปรภายใน
Alpinia galanga (L.) Wild.
matK Versus *trnH-psbA* Intergenic Spacer
to be used as DNA Barcodes; Preliminary
Evaluation by the Assessment of Intraspecific
Sequence Variation in *Alpinia galanga*. (L.) Wild.
มัทนา จงกา
ดวงกมล แม้นศิริ
สุรพล แสนสุข..... 173



วารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ปีที่ 37 ฉบับที่ 2 (เม.ย. - มิ.ย. 52) Vol. 37 No. 2 (Apr. - Jun. 09)

งานวิจัย

- ❑ ผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่อไรฝุ่น
Dermatophagoides pteronyssinus (Trouessart)
 Acaricidal Activity of Essential Oil of
 Medicinal Plants against House Dust Mite,
Dermatophagoides pteronyssinus (Trouessart)
 อามร อินทร์สังข์
 จรงค์ศักดิ์ พุมนวน.....

183
- ❑ สมบัติไดอิเล็กทริกของข้าวเปลือกเหนียว (*Oryza sativa* Linn)
 Dielectric Properties of Glutinous Rice Paddy
 (*Oryza sativa* Linn)
 กาญจนนา สิริกุลรัตน์
 นรินทร์ สิริกุลรัตน์.....

192
- ❑ การหาดัชนีการเก็บเกี่ยวผลของ Longkong โดยการวัดสีผิว
 ผล Longkong ด้วย Longkong Color Meter
 Determining the Harvesting Index of
 Longkong Fruit by Skin Color Analysis
 with Longkong Color Meter
 พวงทิพย์ แก้วทับทิม
 ธวัช ชิตตระการ
 ไตรภพ ม่วงสุวรรณ
 ภัทร อัยรักษ์.....

202
- ❑ ควอซี-ไอดีลวงนัยทั่วไปของกึ่งกรุป
 Generalized Quasi-Ideals of Semigroups
 รัตนากรณ์ ศรีภากรณ์
 รณสรณ์ ชินรัมย์.....

213



วารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ปีที่ 37 ฉบับที่ 2 (เม.ย. - มิ.ย. 52) Vol. 37 No. 2 (Apr. - Jun. 09)

งานวิจัย

- การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในเครื่องแกงเผ็ดแดง
ที่จำหน่ายในตลาดสด
Aflatoxin Contamination in Commercial
Red Curry Paste Sold in Fresh Markets.

นริศรา ม่วงศรีจันทร์

เวณิกา เบ็ญจพงษ์

วีรยา การพานิช

ปราณี พัฒนกุลอนันต์.....

221

มหาวิทยาลัยขอนแก่น



Advisory Committee Dean, Faculty of Science
(La-Orsri Sanoamuang)

Publisher

Faculty of Science, Khon Kaen University,
Thailand.

Office

Faculty of Science, Building 6, Khon Kaen
University. Khonkaen Thailand, 40002
Tel. 0-4320-2372 Fax 0-4320-2371

Objectives

1. To promote dissemination of knowledge
in all fields of science.
2. To publish research results of faculty,
researchers and students.
3. To be a medium for the exchange of
knowledge and ideas among faculty,
researchers and students of Khon Kaen
University and other institutions.

Publishing frequency

KKU Science Journal is a quarterly
journal. Each volume consists of 4 numbers.

Number 1 January - March

Number 2 April - June

Number 3 July - September

Number 4 October - December

Editor

Sompong Thammasirak

Editorial Board

Kittikorn Nakpasit
Sartra Wongthanavasu
Chutima Hanjavanit
Ekaphan Swatsitang
Sakda Daduang
Somdej Kanokmedhakul
Supunnee Ungpansattawong
Ngamnit Nontaso
Adcharaporn Pagdee

Artists

Kilen Tinnoraset
Suchart Thepphukhieo

Treasurer

Boonkoom Lualon

Managing Staff and Secretary

Suphaporn Phimwapi
Somsak Unjantee
Vuttichat Noynarin
Wishanu Chimplee

All articles published in
KKU Science Journal have been
peer reviewed.

The views and opinions expressed in this journal are those of the author(s), and do not necessarily reflect the views and opinions of the editorial board.

บรรณาธิการ **แถลง**

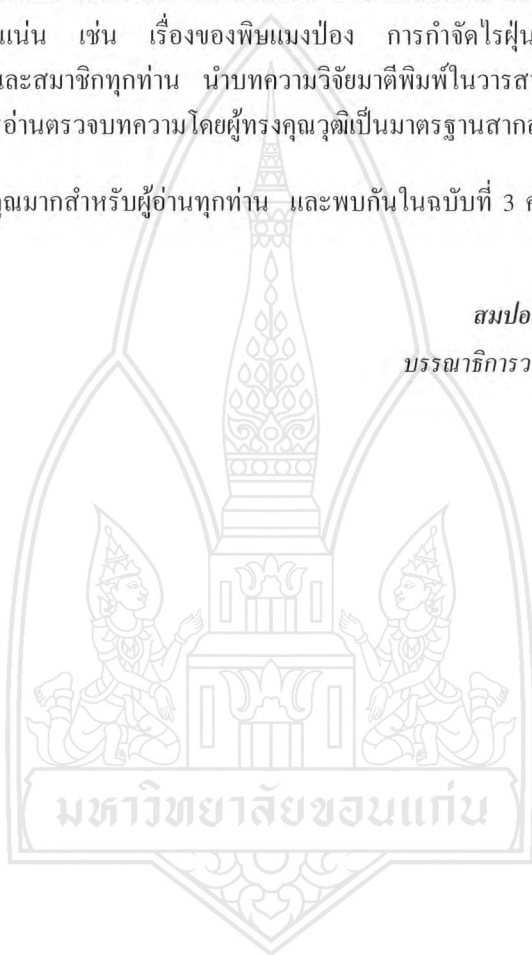
สวัสดิ์ค่ะ ท่านผู้อ่านที่รักและเคารพทุกท่าน

วารสารฉบับนี้เป็นฉบับที่สองของปีแล้วค่ะ ยังเหมือนเดิมค่ะ คือมีความรู้ เนื้อหา วิชาการ ด้านวิทยาศาสตร์อัดแน่น เช่น เรื่องของพิษแมงป่อง การกำจัดไรฝุ่น เป็นต้น ขอโอกาสนี้ เชิญชวนท่านผู้อ่านและสมาชิกทุกท่าน นำบทความวิจัยมาตีพิมพ์ในวารสารของเรานะคะ รับรอง ค่ะว่า ใช้เวลาในการอ่านตรวจบทความโดยผู้ทรงคุณวุฒิเป็นมาตรฐานสากล

ขอบพระคุณมากสำหรับผู้อ่านทุกท่าน และพบกันฉบับที่ 3 ค่ะ

สมปอง ธรรมศิริรักษ์

บรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์ มข.



กลไกตอบสนองของไซยาโนแบคทีเรียต้านภาวะเครียด จากแสงที่มีความเข้มสูง

Responsive Mechanisms of Cyanobacteria against Intense Light Stress

เสาวรัตน์ จันทะโร ^{1*}

บทนำ

ในหลายปีที่ผ่านมา ผลกระทบของภาวะเครียดจากแสง ซึ่งได้แก่ ปริมาณความเข้มแสงที่สูงขึ้น และปริมาณรังสีอัลตราไวโอเลตหรือรังสียูวีที่เพิ่มขึ้น บริเวณผิวโลก (Stapleton, 1992) มีอิทธิพลอย่างเห็นได้ชัดต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์ด้วยแสง เช่น พืชและไซยาโนแบคทีเรีย การได้รับพลังงานแสงที่มากเกินไปต่อการใช้งานในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงสามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ (Melis, 1999) โดยผ่านภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ที่สร้างอนุมูลอิสระในรูปแบบของชนิดออกซิเจนที่ไวปฏิกิริยา (reactive oxygen species หรือ ROS) ขึ้นในระบบแสง (photosystem) ที่สามารถทำลายชีวโมเลกุลสำคัญภายในเซลล์ และเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Halliwell and Gutteridge, 1999) โดยปกติแล้วสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์แสงมีกลไกการตอบสนองต่อภาวะเครียดจากแสงหลายกลไก อาทิเช่น การซ่อมแซมและการสังเคราะห์โปรตีนในระบบแสง (Aro *et al.*, 1993) การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารประกอบเชิงซ้อนที่เก็บเกี่ยว

แสง (light-harvesting complex) (Lao and Glazer, 1996) การสังเคราะห์สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ภายในเซลล์ และการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ต้านออกซิเดชัน เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) และคาตาเลส (catalase) (Hertwig *et al.*, 1992) เป็นต้น การตอบสนองของพืชต่อภาวะเครียดจากแสงเหล่านี้ ประกอบด้วยกลไกการตอบสนองทั้งในระยะสั้นและระยะยาว (Anderson *et al.*, 1995) แต่การตอบสนองหรือการปรับตัวของพืชดังกล่าวก็ยังมีขีดจำกัด ล้วนแล้วแต่ทำให้เกิดปัญหาทางด้านเกษตรกรรมและแหล่งอาหารหลักของโลกที่ลดลงตามมา ด้วยเหตุที่ไซยาโนแบคทีเรียจัดว่าเป็นสิ่งมีชีวิตพวกโปรคาริโอตที่มีสมบัติพิเศษคือ สามารถเจริญเติบโตง่ายและปรับตัวได้ในช่วงกว้างท่ามกลางภาวะเครียดทางชีวภาพและกายภาพของสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังสามารถสังเคราะห์แสงได้คล้ายพืชชั้นสูง จึงมักนิยมใช้เป็นตัวแทนในการวิจัยเกี่ยวกับระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง นอกจากนี้ การศึกษากลไกการตอบสนองและการปรับตัวภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตภายใต้ภาวะเครียดเหล่านี้ยังดำเนินต่อไป หลายกลุ่มวิจัย

¹ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

* E-mail: saowarath.j@chula.ac.th

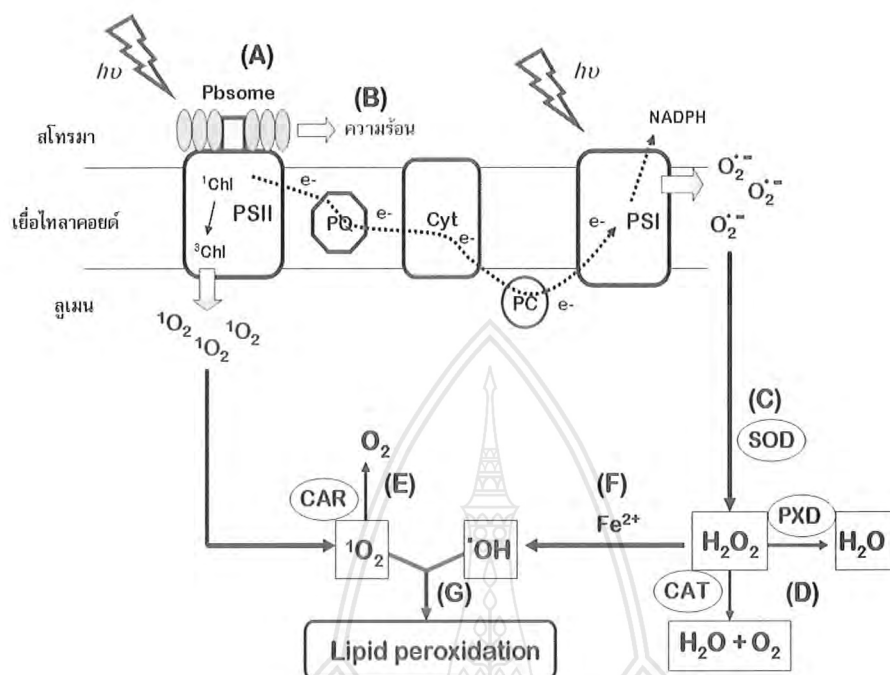
มุ่งพัฒนางานวิจัยพื้นฐานทางชีวเคมีและเทคโนโลยีชีวภาพให้เกิดประโยชน์ในการรักษาแหล่งอาหารของโลกการสร้างพลังงานทดแทนและการปรับปรุงพันธุ์พืชให้อยู่รอดได้ภายใต้ภาวะเครียดเนื่องจากสิ่งแวดล้อมในอนาคต

ไซยาโนแบคทีเรีย หรือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (cyanobacteria หรือ blue green algae) จัดอยู่ในอาณาจักรโปรคาริโอตา (prokaryota kingdom) divisions ไซยาโนไฟตา (division of cyanophyta) (Woese *et al.*, 1990) ซึ่งไม่มีออร์แกเนลล์ที่สำคัญเหล่านี้ อาทิเช่น ไมโทคอนเดรีย แวกคิวโอล เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม เยื่อหุ้มคลอโรพลาสต์และเยื่อหุ้มนิวเคลียส เป็นต้น ดังนั้น ออร์แกเนลล์สำคัญในการสังเคราะห์ด้วยแสงในไซยาโนแบคทีเรีย คือ เยื่อไทลาคอยด์ (thylakoid membranes) ซึ่งกระจายตัวอยู่ในส่วนของไซโทพลาซึม จากที่กล่าวมาข้างต้น ไซยาโนแบคทีเรียมีสมบัติพิเศษ คือ สามารถสังเคราะห์แสงและผลิตออกซิเจนออกมาเหมือนพืชชั้นสูง (oxygenic photosynthesis) ในปัจจุบัน นักวิจัยจึงนิยมใช้ไซยาโนแบคทีเรียเป็นต้นแบบในการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ *Synechocystis* sp. PCC 6803 ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างเซลล์เดี่ยวตัวแรกที่ทราบจีโนมแล้ว ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1996 (Kaneko *et al.*, 1996) นอกจากนี้ ไซยาโนแบคทีเรียยังสามารถเติบโตได้ภายใต้ภาวะความเครียดจากสิ่งแวดล้อมในช่วงที่กว้าง (Joset *et al.*, 1996) อาทิเช่น ความเค็ม ออสโมซิส (Jantaro *et al.*, 2003; Jantaro *et al.*, 2005) แสงที่มีความเข้มสูง (He *et al.*, 2001) และภาวะแห้งแล้ง (Williams *et al.*, 2008) เป็นต้น

แสง (light) ในเชิงฟิสิกส์ เป็นรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าในทุกช่วงความยาวคลื่น ซึ่งแหล่งกำเนิดของแสงมาจากหลายแหล่ง ได้แก่ ดวงอาทิตย์ หลอดไฟฟ้า และไฟ เป็นต้น แหล่งกำเนิดหลัก คือ แสงจากดวงอาทิตย์ซึ่งมีสเปกตรัมของรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่สามารถแบ่งออกเป็น 3 ส่วนตามการเพิ่มของความยาวคลื่น นั่นคือ ช่วงรังสียูวี (100-400 นาโนเมตร) ช่วงแสงที่มองเห็นได้ (400-700 นาโนเมตร) และช่วงอินฟราเรด

(700-106 นาโนเมตร) ตามลำดับ โดยปกติแล้วสิ่งมีชีวิตจำพวกโฟโตออโตโทรป (photoautotroph) เช่น พืช สาหร่ายสีเขียว และไซยาโนแบคทีเรีย จะใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน แต่เมื่อใดที่เซลล์ได้รับแสงที่มีความเข้มสูงมากเกินไปจนนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ก็อาจส่งผลกระทบต่อที่รุนแรง จนทำให้เซลล์ถึงแก่ความตายได้ (Melis, 1999)

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ภายใต้ภาวะเครียดจากแสง เป็นภาวะที่เซลล์ถูกเหนี่ยวนำให้มีการสร้างอนุมูลอิสระในรูปแบบของชนิดออกซิเจนที่ไวปฏิกิริยา (reactive oxygen species หรือ ROS) ขึ้นในระบบแสง (photosystem) โดย ROS ที่เกิดขึ้นรวมถึง อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot -}$) อนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\cdot}$) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และออกซิเจนซิงเกิลต (1O_2) เป็นต้น (Foyer *et al.*, 1994) จากรูปที่ 1 ผลของแสงที่มีความเข้มสูงต่อการเกิด ROS ในไซยาโนแบคทีเรีย เห็นได้ชัดเจนว่าเมื่อแสงที่มีความเข้มสูงตกกระทบบริเวณเยื่อไทลาคอยด์ (thylakoid membranes) ของไซยาโนแบคทีเรีย ไฟโคบิลิโซม (คำย่อ Pbsome) ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เก็บเกี่ยวแสงจะดูดกลืนพลังงานที่มากเกินไปและปล่อยออกมาในรูปของความร้อน นอกจากนี้ คลอโรฟิลล์ซึ่งเป็นรงควัตถุในระบบแสงที่ 2 (PSII) จะดูดกลืนพลังงานที่มากเกินไปด้วยเช่นกัน แล้วส่งผลให้เกิดอนุมูลออกซิเจนซิงเกิลต (1O_2) ออกมา โดยอนุมูลออกซิเจนซิงเกิลตเป็นผลิตภัณฑ์ของการถ่ายโอนพลังงานมากกว่าการถ่ายโอนอิเล็กตรอนของรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสงซึ่งมีการใช้ออกซิเจนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ปฏิกิริยาที่รุนแรงอันหนึ่งจะเกิดขึ้นเมื่ออนุมูลซูเปอร์ออกไซด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาฮาเบอร์-เวสส์ (Haber-Weiss reaction) ที่ถูกเร่งด้วยโลหะ จนก่อเกิดอนุมูลออกซิเดนต์ที่มีฤทธิ์รุนแรง (รูปที่ 1 F และ G) นั่นคือ อนุมูลไฮดรอกซิลที่สามารถเข้าไปทำลายชีวโมเลกุลจำพวกลิพิด โปรตีน และดีเอ็นเอภายในเซลล์ โดยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันและกรดอะมิโน เป็นต้น (Scandalios, 1997)



รูปที่ 1 ระบบการป้องกันและการปรับตัวของไซยาโนแบคทีเรียภายใต้ภาวะเครียดจากแสงที่มีความเข้มสูง (ตัวย่อ Pbsome คือไฟโคบิลิโซม Chl คือคลอโรฟิลล์ PSII คือระบบแสงที่สอง PQ คือ พลาส-โทควิโนน Cyt คือไซโทโครม PSI คือระบบแสงที่หนึ่ง PC คือพลาสโทไซยานิน SOD คือซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส PCD คือเปอร์ออกซิเดส CAT คือคาทาเลส และ CAR คือแคโรทีนอยด์) (ดัดแปลงจาก Foyer et al., 1994)

กลไกในการตอบสนองเพื่อความอยู่รอดในไซยาโนแบคทีเรียต่อภาวะเครียดจากแสงที่มีความเข้มสูง สามารถแบ่งออกได้หลักๆ ดังนี้

1. กระบวนการซ่อมแซมในระบบแสงศูนย์กลางปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสงของระบบแสงที่ 2 (PSII) ประกอบด้วยโปรตีน D1 และ D2 ซึ่งจับไขว่กันเป็นลักษณะเฮเทอโรไดเมอร์ ในขณะที่เซลล์ได้รับพลังงานมากเกินไปของแสงที่มีความเข้มสูง พบว่าโปรตีน D1 ที่มีขนาด 32 กิโลดาลตัน ถูกทำลายด้วยออกซิเจนเชิงกลตที่เกิดขึ้นได้ไวกว่าโปรตีน D2 (Kyle et al., 1984; Melis, 1999; Aro et al., 1993) อย่างไรก็ตาม ภายหลังจากนั้นจะเกิดการคืนสภาพกลับมาของโปรตีน D1 ได้ไวเช่นเดียวกัน (Melis, 1999) ซึ่งกระบวนการซ่อมแซมในระบบแสงดังกล่าวที่เกิดขึ้น

(Aro et al., 1993; Melis, 1999; Yokthongwattana and Melis, 2006) จะประกอบด้วยขั้นตอนตามลำดับดังต่อไปนี้ คือ

- การสลายของโปรตีน D1 ซึ่งถูกทำลาย
- การสังเคราะห์โปรตีน D1 ขึ้นมาใหม่
- การสอดแทรกโปรตีน D1 ซึ่งถูกสังเคราะห์ใหม่เข้าไปในเยื่อไทลาคอยด์
- การจับตัวกับคลอโรฟิลล์และโปรตีน D2 บริเวณศูนย์กลางปฏิกิริยา
- และการรวมกลุ่มกับโปรตีนภายในระบบแสงที่ 2 ตัวอื่น ๆ

สำหรับการเกิดภาวะการยับยั้งด้วยแสง (photoinhibition) ในขณะที่เซลล์ได้รับแสงที่มีความเข้มสูงนานเกินไป พบว่ามีสาเหตุมาจากการทำลายเนื่องจาก

ภาวะเครียดจากออกซิเดชันนั้นเกิดได้รวดเร็วกว่ากระบวนการซ่อมแซมในระบบแสง จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงของเซลล์ลดลงไปในที่สุด (Powles, 1984; Aro *et al.*, 1993)

2. การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารประกอบเชิงซ้อนที่เก็บเกี่ยวแสง (Light-harvesting complex) ไฟโคบิลิโซม (phycobilisomes หรือ PBS) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เก็บเกี่ยวแสงหลักในไซยาโนแบคทีเรีย (Glazer, 1985) โดยอยู่บริเวณรอบนอกเยื่อเมมเบรน ที่สามารถเก็บเกี่ยวพลังงานแสงและถ่ายโอนพลังงานแบบทิศทางเดียว (unidirectional energy flow) ไปยังศูนย์กลางปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสง (ดูภาพที่ 1 A) PBS จะประกอบด้วยโครโมโปรตีนจำพวกอัลโล-ไฟโคไซยานิน (allophycocyanin หรือ AP) ไฟโค-ไซยานิน (phycocyanin หรือ PC) ไฟโคอิทริน (phycoerythrin หรือ PE) หรือไฟโคอิโรโทรไซยานิน (phycoerythrocyanin) ซึ่งรงควัตถุเหล่านี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นกับคุณภาพของแสงที่มันได้รับ (Grossman *et al.*, 2001) โดยอาศัยกระบวนการ Complementary Chromatic Adaptation หรือ CCA ที่เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบโปรตีนใน PBS นั้นเอง (Bennett and Bogorad, 1973; Grossman and Kehoe, 1997) นอกจากนี้ ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของ PBS อาทิเช่น ความเข้มแสง อุณหภูมิ ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และปริมาณสารอาหาร เป็นต้น (Tandeau de Marsac and Houmard, 1993; Grossman *et al.*, 1993) โดยในปี ค.ศ. 1997 Tandeau de Marsac ได้แบ่งไซยาโนแบคทีเรียตามกระบวนการ CCA ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่ม 1 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตทั้ง PE และ PC แต่ไม่เปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของไฟโคบิลิโปรตีนเหล่านี้เมื่อคุณภาพแสงเปลี่ยนไป

กลุ่ม 2 สายพันธุ์ที่สามารถผลิต PE ได้เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับแสงสีเขียว แต่ปริมาณ PC ไม่เปลี่ยนแปลง

กลุ่ม 3 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตทั้ง PE และ PC เมื่อคุณภาพแสงเปลี่ยนไป โดยไซยาโนแบคทีเรีย *Fremyella diplosiphon* เป็นต้นแบบเด่นของกลุ่มนี้ที่มีการศึกษามานานทั้งในชีววิทยาเชิงแสง (Photobiology) และชีววิทยาเชิงโมเลกุล (Molecular Biology) (บทบทวน, ดู Grossman *et al.*, 2001; Stowe-Evans and Kehoe, 2004)

3. การจัดกระจายขึ้นใหม่ของพลังงานการไรระหว่างระบบแสง (Redistribution of excitation energy) หรือ State transitions การปรับเปลี่ยนปริมาณสัมพันธของระบบแสง (photosystem stoichiometry) ในไซยาโนแบคทีเรีย จะเกิดขึ้นเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ด้วยแสงของเซลล์ให้มีความเหมาะสมเมื่ออยู่ภายใต้ภาวะแสงที่เปลี่ยนไป (Fujita, 1997) ในปี ค.ศ. 1987 Fujita และ Murakami ได้ทำการศึกษาปริมาณของระบบแสงที่ 1 (PSI) ระบบแสงที่ 2 (PSII) ไฟโคบิลิโซม (PBS) และสารประกอบเชิงซ้อน Cyt b_6-f ในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* PCC 6714 ภายใต้ภาวะที่แตกต่างกันของการเลี้ยงแบบ Autotroph และ Heterotroph พบว่าปริมาณสัมพันธของ PSI ต่อ PSII เปลี่ยนแปลงไปขึ้นกับคุณภาพของแสง ในขณะที่ปริมาณสัมพันธของ PSII ต่อ Cyt b_6-f และ PBS ต่อ PS II ค่อนข้างคงที่ในการเลี้ยงทั้งสองแบบ ดังนั้น ผลจากการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสัมพันธในระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง จึงขึ้นอยู่กับปริมาณของ PSI ที่เปลี่ยนไป ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นได้เนื่องจากกลไกการตอบสนองต่อสภาวะรีดอกซ์ (redox state) ของแหล่งรวมอิเล็กตรอนระหว่างสองระบบแสง (Fujita, 1997) อย่างไรก็ตาม กลไกการตอบสนองต่อความเข้มแสงที่สูงเป็นระยะเวลานานอาจส่งผลไปยังการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกทั้งในระดับยีนและระดับโปรตีนของสิ่งมีชีวิตได้เช่นกัน (บทบทวน ดู Scheibe *et al.*, 2005)

4. การรักษาเสถียรภาพของเยื่อเมมเบรนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงด้วยการปลดปล่อยความร้อน (ดังรูปที่ 1B) โดยปกติในพืชชั้นสูงจะมีระบบหนึ่งเพื่อ

รักษาสมดุลภายใต้ภาวะแสงที่มีความเข้มต่ำหรือสูง ผ่านทางวัฏจักรซีเอแซนทิน (zeaxanthin cycle) แต่ในไซยาโนแบคทีเรียมีระบบที่แตกต่างออกไปเนื่องจากมีองค์ประกอบของโปรตีนเก็บเกี่ยวแสงที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสงเกิดขึ้นในขณะที่ได้รับแสงความเข้มขึ้นต่ำหรือเหมาะสม โดยคลอโรฟิลล์บริเวณที่เก็บเกี่ยวแสงดูดซับพลังงานควอนตัมของแสงและใช้ประโยชน์พลังงานทั้งหมดในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง สำหรับพลังงานของโมเลกุลคลอโรฟิลล์ ซึ่งเกิดที่ถูกเร้าจะเคลื่อนย้ายไปยังคลอโรฟิลล์ของศูนย์กลางปฏิกิริยาของระบบแสงที่ 1 และ 2 แล้วเกิดการแยกประจุขึ้น เรียกว่า Photochemical quenching (qP) ดังนั้น ระบบป้องกันและการปรับตัวอันหนึ่งของไซยาโนแบคทีเรียในช่วงแรกเมื่อได้รับแสงที่มีความเข้มสูงขึ้นหรือมีพลังงานเพิ่มมากขึ้น คือ การปลดปล่อยโมเลกุลคลอโรฟิลล์ซึ่งเกิดที่ถูกเร้าออกมาเป็นฟลูออเรสเซนซ์ (qF) (บทบทวน ดู Karapetyan, 2007) ทั้งนี้หากระบบการปรับตัวนี้ไม่สามารถควบคุมปริมาณพลังงานที่มากเกินไปได้ พลังงานที่ดูดซับไว้แต่แรกจะถูกส่งผ่านออกมาเป็นความร้อน เรียกว่า Nonphotochemical quenching (NPQ) ในรูปแบบ High-energy-state quenching (qE) (บทบทวน ดู Holt *et al.*, 2004) ส่งผลให้เกิดสภาวะทริเปต (triplet state) ของคลอโรฟิลล์ได้ โดยอันตรกิริยาระหว่างคลอโรฟิลล์ทริเปตกับออกซิเจนจะสร้างออกซิเจนซิงเกต (singlet oxygen) ออกมาทำลายระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง (บทบทวน ดู Karapetyan, 2007)

5. การเหนี่ยวนำชีวสังเคราะห์ของพอลิเปปไทด์ภายในระบบแสง ในกลุ่มของโปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับแสงที่มีความเข้มสูง เรียกว่า Early light-inducible proteins หรือ ELIPs (Adamska *et al.*, 1992; Pötter and Kloppstech, 1993) หรือเรียกว่า High light-inducible proteins (HLIPs) (He *et al.*, 2001; Dolganov *et al.*, 1995) โดยในฐานข้อมูลของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803

(Kaneko *et al.*, 1996) พบว่า ยีนที่เข้ารหัสโปรตีนเหล่านี้มี 5 ชนิดด้วยกัน นั่นคือ HliA HliB HliC HliD และ HemH (ยีนของโปรตีนที่เกิดจากการรวมของพอลิเปปไทด์ที่คล้าย Hli กับเฟอร์โรคลา-เทส) โดยเฉพาะยีนจำนวน 4 ยีน (HliA-D) มีความคล้ายคลึงกับพอลิเปปไทด์ของสารประกอบเชิงซ้อนที่เก็บเกี่ยวแสงในพืชชั้นสูง ในขณะที่ไซยาโนแบคทีเรียได้รับแสงที่มีความเข้มสูง พบว่า เกิดการเหนี่ยวนำปริมาณพอลิเปปไทด์ Hli ให้มีการสร้างสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม ชนิดของพอลิเปปไทด์ Hli ก็มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน เช่น ปริมาณ HliC เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเซลล์ได้รับแสงนานถึง 24 ชั่วโมง ในขณะที่ HliA และ HliB เพิ่มขึ้นรวดเร็วเฉพาะในช่วง 1-9 ชั่วโมงแรกที่ได้รับแสงที่มีความเข้มสูงเท่านั้น (He *et al.*, 2001) ซึ่งพบว่า กลไกที่เกิดขึ้นนี้มีอิทธิพลต่อความอยู่รอดของไซยาโนแบคทีเรียในภาวะดังกล่าวอย่างชัดเจน เนื่องจากการสร้างสายพันธุ์กลายของไซยาโนแบคทีเรียโดยการยับยั้งการทำงานของยีน HliA-D แล้ว ไซยาโนแบคทีเรียไม่สามารถอยู่รอดได้ภายใต้ความเข้มแสงที่สูง พอลิเปปไทด์ Hli จึงอาจทำหน้าที่สำคัญส่วนหนึ่งเกี่ยวกับการลดการเกิดออกซิเดชันภายในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย (Jantaro *et al.*, 2006) และต่อมายังค้นพบว่า HLIPs มีหน้าที่ในการรักษาเสถียรภาพของสารประกอบเชิงซ้อนของระบบแสงที่ 1 ในภาวะเครียดเนื่องจากแสงที่มีความเข้มสูงด้วยเช่นกัน (Wang *et al.*, 2008)

6. การสังเคราะห์สารต้านออกซิเดชัน แคโรทีนอยด์ในไซยาโนแบคทีเรีย นอกจากจะทำหน้าที่เป็นรงควัตถุในการสังเคราะห์ด้วยแสงแล้ว ยังทำหน้าที่ในการกระจายพลังงานส่วนเกินที่เกิดขึ้นเนื่องจากคลอโรฟิลล์ซึ่งถูกเร้า และลดการเกิดอนุมูลอิสระในรูปแบบของชนิดออกซิเจนที่ไวปฏิกิริยา (ROS) ได้ (Adams *et al.*, 1993) อาทิเช่น โดยการเปลี่ยนรูปของออกซิเจนซิงเกตให้เป็นออกซิเจน (Foyer *et al.*, 1994) (ดังรูปที่ 1 E) โดยปกติแล้วในไซยาโนแบคทีเรียประกอบด้วยแคโรทีนอยด์หลายชนิด ได้แก่ บีทา-

แคโรทีน (β -carotene) ซีแซนทีน (zeaxanthin) เอไชนีโอน (echinenone) แคน-ทาแซนทีน (canthaxanthin) และไมโซแซนโทฟิลล์ (myxoxanthophyll) เป็นต้น ซึ่งแตกต่างกันไปในไซยาโนแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ อย่างไรก็ตาม มีการพบว่าปริมาณของแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นภายใต้ภาวะเครียดจากแสงที่มีความเข้มสูง ดังนั้นเป็นไปได้ว่าแคโรทีนอยด์ทำหน้าที่เพิ่มความสามารถในการป้องกันระบบการสังเคราะห์ด้วยแสงนั่นเอง (Schagerl and Müller, 2006) จากที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นว่าไซยาโนแบคทีเรียไม่มีวัฏจักรซีแซนทีนในการปรับตัวภายใต้แสงที่มีความเข้มสูงเหมือนพืช ดังนั้น ปริมาณซีแซนทีนที่พบภายในเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย จึงเป็นผลผลิตจากบีทา-แคโรทีนเท่านั้น (Demmig-Adams, 1990)

7. การสังเคราะห์เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ด้านออกซิเดชัน การสังเคราะห์เอนไซม์ที่มีหน้าที่เกี่ยวกับการต้านออกซิเดชันที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ได้แก่ การสังเคราะห์เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) (รูปที่ 1 C) ที่สามารถเปลี่ยนอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) การสังเคราะห์เอนไซม์คาตาเลส (catalase) และเปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ที่สามารถเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นน้ำและออกซิเจน (รูปที่ 1 D) (Tytler et al, 1984; Foyer et al., 1994) เป็นต้น ในกรณีที่ระบบของเอนไซม์ที่ต้านออกซิเดชันไม่สามารถควบคุมสถานการณ์ได้จะส่งผลให้ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หลงเหลือในระบบ และสามารถทำปฏิกิริยากับอะตอมเหล็ก (II) หรือเหล็กเฟอร์รัส (ferrous iron) ที่เป็นผลมาจากการที่สารประกอบเชิงซ้อนจำพวกฮีม (heme) เหล็กที่ไม่ใช่ฮีมหรือกลุ่มเหล็ก-ซัลเฟอร์ (iron-sulfur clusters) ถูกทำลายโดยแสงที่มีความเข้มสูง และสร้างอนุมูลอิสระที่ร้ายแรงกว่าตัวอื่น ๆ คือ อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลออกมา (รูปที่ 1 F) (Abdul-Tehrani et al., 1999) ดังที่กล่าวไว้แล้วข้างต้น

สรุป

ในภาวะของโลกที่เปลี่ยนไป ณ ปัจจุบัน ส่งผลถึงการเปลี่ยนแปลงและการปรับตัวของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ภาวะความเครียดจากแสงที่มีความเข้มสูงก็มีผลเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์ด้วยแสงที่เป็นแหล่งอาหารของโลก การศึกษาและเข้าใจระบบป้องกันและปรับตัวภายใต้ภาวะเครียดจากแสงที่มีความเข้มสูงของพืชและไซยาโนแบคทีเรียจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษาเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ด้วยวิทยาการสมัยใหม่ทางชีวเคมี และเทคโนโลยีชีวภาพ ในการแก้ไขหรือบรรเทาปัญหาการขาดแคลนแหล่งอาหารของโลกในอนาคต

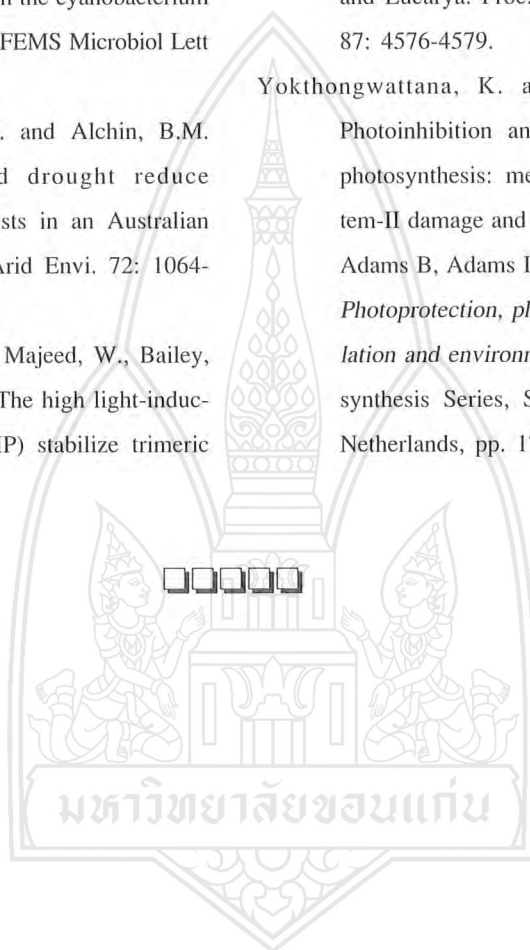
เอกสารอ้างอิง

- Abdul-Tehrani, H., Hudson, A.J., Chang, Y-S., Timms, A.R., Hawkins, C., Williams, J.M., Harrison, P.M., Guest, J.R., and Andrews, S.C. (1999) Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and *fur* mutants are iron deficient. *J. Bacteriol.* 181: 1415-1428.
- Adams III, W.W., Demmig-Adams, B. and Lange, O.L. (1993) Carotenoid composition and metabolism in green and blue-green algal lichens in the field. *Oecologia* 94: 576-584.
- Adamska, I., Ohad, I. and Klopstsch, K. (1992) Synthesis of the early light-inducible protein is controlled by blue light and related to light stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 2610-2613.
- Anderson, J.M., Chow, W.S., and Park, Y.-I. (1995). The grand design of photosynthesis: Acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynth. Res.* 46: 129-139.

- Aro, E.M., McCaffery, S., and Anderson, J.M. (1993). Photoinhibition and D1 protein degradation in peas acclimated to different growth irradiances. *Plant Physiol.* 103: 835-843.
- Bennett, A., and Bogorad, L. (1973) Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J. Cell Biol.* 58: 419-435.
- Demmig-Adams, B. (1990) Carotenoids and photo-protection in plants: a role for the xanthophylls seaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* 1020: 1-24.
- Dolganov, N.A.M., Bhaya, D. and Grossman, A.R. (1995) Cyanobacterial protein with similarity to the chlorophyll a/b binding proteins of higher plants: evolution and regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 636-640.
- Foyer, C.H., Descourvières, P. And Kunert, K.J. (1994) Protection against oxygen radicals : an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17: 507-523.
- Fujita, Y (1997) A study on the dynamic features of photosystem stoichiometry: Accomplishment and problems for future studies. *Photosynth. Res.* 53: 83-93.
- Fujita, Y. and Murakami, A. (1987) Regulation of electron transport composition in cyanobacterial photosynthetic system: Stoichiometry among Photosystem I and II complexes and their light harvesting antennae and Cyt b₆-f complex. *Plant Cell Physiol.* 28: 1547-1553.
- Glazer, A. N. (1985) Light harvesting by phycobilisomes. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 14: 47-77.
- Grossman, A. R. , Schaefer, M. R., Chiang, G. G., and Collier, J.L. (1993) Environmental effects on the light-harvesting complex of cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 175: 575-582.
- Grossman, A. R., and Kehoe, D. M. (1997) Phosphorelay control of phycobilisome biogenesis during complementary chromatic adaptation. *Photosynth. Res.* 53: 95-108.
- Grossman, A.R., Bhaya, D. and He, Q. (2001) Tracking the light environment by cyanobacteria and the dynamic nature of light harvesting. *J. Biol. Chem.* 276:11449-11452.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (1999). Free radicals in biology and medicine, pp. 1-104, Oxford University Press Inc., New York.
- He, Q., Dolganov, N., Bjorkman, O. and Grossman, A.R. (2001) The high light-inducible polypeptides in *Synechocystis* PCC6803. *J. Biol. Chem.* 276: 306-314.
- Hertwig, B., Streb, P., and Feierabend, J. (1992) Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiol.* 100: 1547-1553.
- Holt, N.E., Fleming, G.R. and Niyogi, K.K. (2004) Toward an understanding of the mechanism of nonphotochemical quenching in green plants. *Biochemistry* 43: 8281-8289.
- Jantaro, S., Mäenpää, P., Mulo, P. and Incharoensakdi, A. (2003) Content and biosynthesis of polyamines in salt and osmotically-stressed cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 228: 129-135.
- Jantaro, S., Incharoensakdi, A., Jans_n, T., Mulo, P. and Mäenpää, P. (2005) Effects of long-term ionic and osmotic stress conditions on

- photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Functional Plant Biol.* 32: 807-815.
- Jantaro, S., Ali, Q., Lone, A., and He, Q. (2006) Suppression of the lethality of high light to a quadruple hli mutant by the inactivation of the regulatory protein PfsR in *Synechocystis* PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 281: 30865-30874.
- Joset, F., Jeanjean, R. and Hagemann, M. (1996) Dynamics of the response of cyanobacteria to salt stress: Deciphering the molecular events. *Physiol. Plant.* 96: 738-744.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 3:109-136.
- Karapetyan, N.V. (2007) Non-photochemical quenching of fluorescence in cyanobacteria. *Biochemistry (Moscow)* 72: 1385-1395.
- Kyle, D.J., Ohad, I., and Arntzen, C. J. (1984) Membrane protein damage and repair: selective loss of a quinone-protein function in chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 81: 4070-4074.
- Lao, K. and Glazer, A.N. (1996) Ultraviolet-B photodestruction of a light-harvesting complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 5258-5263.
- Melis, A. (1999) Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo*? *Trends Plant Sci.* 4: 130-135.
- Pitter, E. and Kloppstech, K. (1993) Effects of light stress on the expression of early light-inducible proteins in barley. *Eur. J. Biochem.* 214: 779-786.
- Powles, S.B. (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 15-44.
- Scandalios, J.G. (1997) Oxidative stress and defense mechanisms in plants: introduction. *Free Radical Biol. Med.* 3: 471-172.
- Schagerl, M. and Müller, B. (2006) Acclimation of chlorophyll a and carotenoid levels to different irradiances in four freshwater cyanobacteria. *J. Plant Physiol.* 163: 709-716.
- Scheibe, R., Backhausen, J.E., Emmerlich, V. and Holtgreve, S. (2005) Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. *J. Exp. Bot.* 56: 1481-1489.
- Stapleton, A.E. (1992) Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *Plant Cell* 4: 1353-1358.
- Stowe-Evans, E.L. and Kehoe, D.M. (2004) Signal transduction during light-quality acclimation in cyanobacteria: a model system for understanding phytochrome-response pathways in prokaryotes. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3: 495-502.
- Tandeau de Marsac, N. (1997) Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 130: 82-91.

- Tandeau de Marsac, N. and Houmard, J. (1993) Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli, new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 104: 119-190.
- Tytler, E.M., Wong, T. and Codd, G.A. (1984) Photoinactivation in vivo of superoxide dismutase and catalase in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 23: 239-242.
- Williams, W.J., Eldridge, D.J. and Alchin, B.M. (2008) Grazing and drought reduce cyanobacterial soil crusts in an Australian *Acacia* woodland. *J. Arid Envi.* 72: 1064-1075.
- Wang, Q., Jantaro, S., Lu, B., Majeed, W., Bailey, M. and He, Q. (2008) The high light-inducible polypeptides (HLIP) stabilize trimeric photosystem I complex under high light conditions in *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Physiol.* 147: 1239-1250.
- Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains archaea, bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 4576-4579.
- Yokthongwattana, K. and Melis, A. (2006) Photoinhibition and recovery in oxygenic photosynthesis: mechanism of a photosystem-II damage and repair cycle, In Demmig-Adams B, Adams III WW, Mattoo AK (eds) *Photoprotection, photoinhibition, gene regulation and environment*. Advances in Photosynthesis Series, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 175-191.



การกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ปนเปื้อนในก๊าซชีวภาพ โดยจุลินทรีย์

Hydrogen Sulfide Removal from Biogas by Microorganisms

ศุภาพร หวังศิริเจริญ¹ และ วสุ ปฐมอารีย์^{1*}

ก๊าซชีวภาพเป็นก๊าซที่เกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างซับซ้อน ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน เพื่อใช้เป็นสารอาหารในการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่สร้างก๊าซมีเทนในสภาพที่ไร้ออกซิเจน (Anaerobic digestion) โดยพลังงานที่ได้จะถูกใช้ในการเจริญเติบโต สารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่จะถูกสลายให้เป็นกรดไขมัน, กรดอินทรีย์, แอลกอฮอล์, คาร์บอนไดออกไซด์, ไฮโดรเจน, แอมโมเนีย และซัลไฟด์ ซึ่งจะเป็นสารที่แบคทีเรียกลุ่มที่สร้างมีเทน (Methanogenic bacteria) นำไปใช้ในการสร้างก๊าซมีเทนต่อไป แหล่งที่มาของก๊าซชีวภาพนอกจากการหมักของมูลสัตว์แล้ว ก๊าซชีวภาพยังได้จากแหล่งอุตสาหกรรมอื่นได้อีกด้วย เช่น โรงงานอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษ โรงกลั่นน้ำมัน โรงบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น โดยก๊าซชีวภาพเป็นก๊าซผสมระหว่างก๊าซมีเทน (CH_4) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักประมาณร้อยละ 60-65 ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ร้อยละ 34-39 และก๊าซอื่นๆ เช่น ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ก๊าซแอมโมเนีย (NH_3) ก๊าซไนโตรเจน (N_2) และก๊าซไฮโดรเจน (H_2) สำหรับก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์พบว่า

มีประมาณร้อยละ 0.1-2 ขึ้นกับชนิดของสารอินทรีย์ที่มีการย่อยสลาย (Lastella *et al.*, 2002) โดยทั่วไปแล้วก๊าซชีวภาพที่ได้จากมูลสัตว์หรือน้ำเสียที่มีปริมาณซัลเฟตสูงจะมีปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์สูงตามไปด้วย (Schieder *et al.*, 2003) เมื่อก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์รวมตัวกับความชื้นที่ปนอยู่ในก๊าซชีวภาพจะเกิดเป็นกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ซึ่งมีสมบัติเป็นกรดแก่ที่มีฤทธิ์ในการกัดกร่อนสูง (Tchobanoglous *et al.*, 2003) ทำความเสียหายแก่วัสดุอุปกรณ์ต่างๆ เช่น หัวเผาก๊าซ (Burner) และเครื่องยนต์ของชุดผลิตพลังงานไฟฟ้าจากก๊าซชีวภาพ เครื่องยนต์ต้องเปลี่ยนน้ำมันเครื่องเร็วขึ้น ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการบำรุงรักษา ถ้าก๊าซชีวภาพถูกปล่อยสู่บรรยากาศจะถูกออกซิไดซ์เป็นซัลเฟตที่เมื่อรวมตัวกับไอน้ำและกลั่นตัวจะเกิดเป็นฝนกรด นอกจากนี้ ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ยังมีกลิ่นเหม็นและมีความเป็นพิษสูง เมื่อได้รับเข้าไปในร่างกายปริมาณน้อยๆ (15-50 ppm.) จะก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อเยื่อเมือก อาจก่อให้เกิดการปวดหัว คลื่นไส้ และอาเจียนได้ แต่ถ้าได้รับเข้าไปในปริมาณมาก (200-300 ppm.) จะมีผลต่อระบบการหายใจนำไปสู่อาการ

¹ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

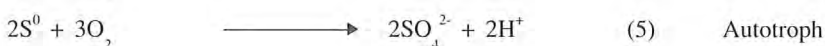
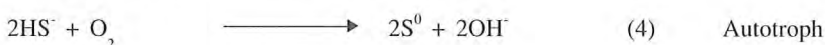
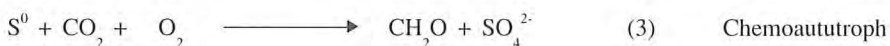
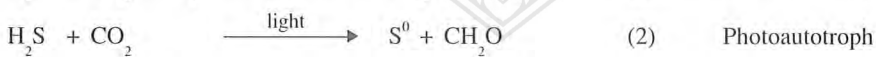
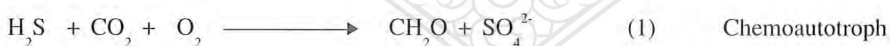
* Corresponding Author , E-mail: wasu@chiangmai.ac.th

หมดสติได้ และถ้าได้รับที่ความเข้มข้นมากกว่า 700 ppm. อาจทำให้เสียชีวิตได้ (Syed et al., 2006)

ข้อกำหนดของชุดผลิตพลังงานไฟฟ้าจากก๊าซชีวภาพกำหนดให้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เข้าระบบได้ในความเข้มข้นไม่เกิน 100 ppm. (Wellinger and Linberg, 2002) ดังนั้น การกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ออกจากก๊าซชีวภาพจึงมีความสำคัญ ในปัจจุบันระบบบำบัดก๊าซส่วนใหญ่อาศัยปฏิกิริยาทางเคมีในขั้นตอนการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ เช่น กระบวนการออกซิเดชัน (Zinc oxidation) การกำจัดด้วยกระบวนการคลอส (Clause process) การดูดซับด้วยเอมีน (Amine absorption unit) การกำจัดด้วยกระบวนการออกซิเดชันในของเหลว (Liquid phase oxidation) เป็นต้น ซึ่งพบว่า มีประสิทธิภาพในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้สูงถึง 90-95% โดยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ จะถูกเปลี่ยนไปเป็น elemental sulfur (S^0) แต่พบว่า ต้องใช้สารเคมีและพลังงานในปริมาณมาก ทำให้มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง (Buisman et al., 1989) ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงได้มีความสนใจในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยเฉพาะการใช้จุลินทรีย์ โดยแบคทีเรียที่นำมาใช้ควรมีลักษณะดังนี้ คือ ความสามารถสูงในการเปลี่ยนก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นซัลเฟอร์ มีความต้องการสารอาหารในการเจริญไม่ยุ่งยาก และสามารถแยกซัลเฟอร์ออกจากเซลล์ได้ง่าย สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่มีการรายงานว่าสามารถ

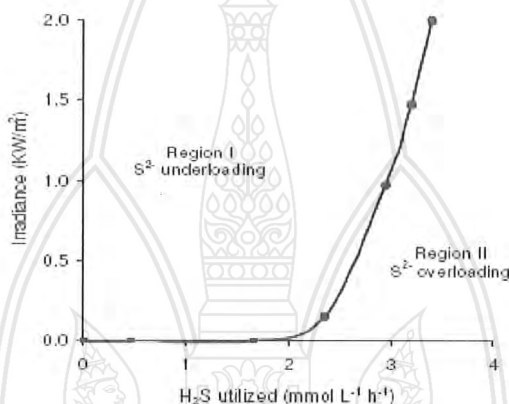
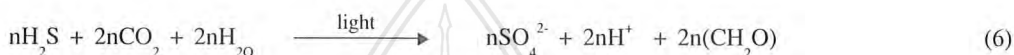
ออกซิไดซ์ซัลเฟอร์และกำจัดกลิ่นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มของออโตโทรฟิกแบคทีเรีย และกลุ่มเฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรีย

1. ออโตโทรฟิกแบคทีเรีย (Autotrophic bacteria หรือ autotroph) หมายถึง แบคทีเรียที่สามารถสร้างอาหารได้เอง โดยอาศัยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน บางชนิดสามารถใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน (Phototrophic bacteria หรือ Photoautotroph) และบางชนิดใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งพลังงาน (Chemoautotroph) ตัวอย่างเชื้อที่มีการศึกษากำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ได้แก่ *Thiobacillus thioparus* (Chung et al., 1996; Oyarzun et al., 2003) *Thiobacillus ferrooxidans* (Jensen and Webb, 2001) *Chlorobium limicola* (Syed et al., 2006) *Acidithiobacillus thiooxidans* (Lee et al., 2006) เป็นต้น แบคทีเรียเหล่านี้สามารถที่จะเจริญเติบโตได้เองในถังกรองก๊าซชีวภาพโดยต้องการสารอาหารที่จำเป็นในระบบเพียงเล็กน้อย สำหรับตัวอย่างปฏิกิริยาการออกซิเดชันที่พบว่าเกิดขึ้นจากออโตโทรฟิกแบคทีเรียแสดงได้ดังสมการ 1-5 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอาจแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของแบคทีเรีย เช่น *Chlorobium limicola* สามารถออกซิไดซ์ซัลไฟด์ให้เป็น elemental sulfur (S^0) ภายใต้สภาวะที่มีแสงดังแสดงในสมการที่ 2 เป็นต้น



van Niel curve ในรูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการปล่อยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เข้าสู่ระบบ (feed rate, $\text{mmol L}^{-1}\text{h}^{-1}$) และความเข้มของแสง (Irradiance, KW/m^2) ของแบคทีเรียในกลุ่ม Photoautotroph เมื่อระบบอยู่ในสมดุล คือ ปริมาณการไหลของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เข้าสู่ระบบและความเข้มของแสงอยู่บนเส้นกราฟ ปริมาณซัลไฟด์ทั้งหมดที่เข้าสู่ระบบจะถูก

ออกซิไดซ์เป็น elemental sulfur ทั้งหมด แต่ถ้าปริมาณซัลไฟด์ทั้งหมดที่เข้าสู่ระบบมีมากเกินไป ปริมาณของแสงไม่เพียงพอในการเกิดปฏิกิริยาจะเกิดการสะสมของซัลไฟด์ขึ้น ถ้าปริมาณซัลไฟด์ทั้งหมดที่เข้าสู่ระบบมีน้อยเกินไป ปริมาณแสงส่วนเกินจะทำให้เกิดการสะสมของซัลเฟตดังสมการที่ 6



รูปที่ 1 van Niel curve แสดงภาวะสมดุลของปริมาณไฮโดรเจนซัลไฟด์และปริมาณแสงต่อการเกิดและสะสมของซัลเฟต (ที่มา Syed *et al.*, 2006)

นอกจากนี้พบว่า ผลผลิตที่เกิดขึ้นได้จากปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ไฮโดรเจนซัลไฟด์นอกจากซัลเฟตและ elemental sulfur แล้ว ยังอาจเป็นซัลไฟต์ (Sulfite) และซัลไฟด์ ได้อีกด้วย (Chung *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2008)

แบคทีเรียในกลุ่ม *Thiobacillus* sp. เป็นเชื้อที่มีการใช้กันอย่างกว้างขวางในการศึกษาการเปลี่ยนก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ไปเป็นสารประกอบซัลเฟอร์ชนิดอื่นโดยวิธีทางชีวภาพ (Chung *et al.*, 1996; Cha *et al.*, 1999 และ Oyarzun *et al.*, 2003) แบคทีเรียกลุ่มนี้มี

ความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่หลากหลาย เช่น สภาวะขาดออกซิเจนหรือสภาวะที่เป็นกรด เป็นต้น นอกจากนี้ เชื้อในกลุ่ม *Thiobacillus* sp. หลายชนิดมีลักษณะที่ชอบสภาวะกรดและสามารถเจริญได้ภายใต้ pH ที่ต่ำ (pH 1-6) ดังแสดงในตารางที่ 1 อย่างไรก็ตาม การที่มีผลิตภัณฑ์ที่เป็นซัลเฟตสะสมอยู่ในปริมาณมากเมื่อมีการรวมตัวกับน้ำที่อยู่ภายในถังกรองชีวภาพจะทำให้เกิดสภาวะที่เป็นกรดและมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเอง

ตารางที่ 1 สภาวะในการเจริญของออโทโทรฟิกแบคทีเรียกลุ่ม *Thiobacillus* ที่สามารถกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์หรือสารประกอบซัลเฟอร์ชนิดอื่น

Conditions	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	<i>Thiobacillus novellus</i>	<i>Thiobacillus thioparus</i>	<i>Thiobacillus denitrificans</i>
pH growth range	-	0.5-6.0	5.7-9.0	5-9	-
Optimum pH	1.3-4.5	2.0-3.5	7.0	7.5	6.8-7.4
Optimum temperature (°C)	30-35	28-30	30	28	28-32
Trophy	Obligate chemoautotroph	Obligate chemoautotroph	Facultative chemoautotroph	Obligate chemoautotroph	Obligate chemoautotroph
Example energy source	Ferrous ion and reduced sulfur compound	hydrogen sulfide, elemental sulfur	hydrogen sulfide, dimethyl sulfide, dimethyl disulfide	thiosulfate, sulfide	thiosulfate, tetrathionate, sulfide, elemental sulfur
Oxygen requirement	Facultative anaerobe	Strictly aerobe	Strictly aerobe	Strictly aerobe	Facultative anaerobe

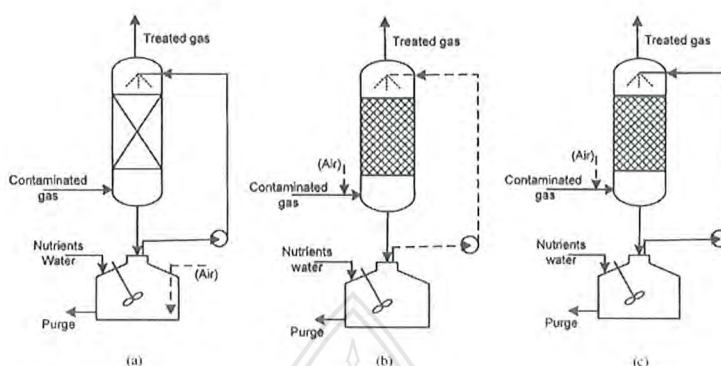
ที่มา : Syed et al., 2006

2. เฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรีย (Heterotrophic bacteria หรือ heterotroph) หมายถึง แบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สามารถสร้างอาหารได้เอง ต้องอาศัยสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน บางชนิดสามารถใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน (Photoheterotroph) เช่น green nonsulfur bacteria สกุล *Chloroflexus* หรือ purple nonsulfur bacteria สกุล *Rhodospseudomonas* และบางชนิดใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งพลังงาน (Chemoheterotroph) เช่น แบคทีเรียในสกุล *Rhodococcus* เฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรียชนิดแรกที่มีการนำมาใช้กำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในก๊าซชีวภาพ คือ *Xanthomonas* sp. ที่แยกได้จากดินพีท โดยสามารถออกซิไดซ์ไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นโพลิซัลไฟด์ การนำแบคทีเรียชนิดนี้มีมาประยุกต์ใช้มีข้อดี คือ อัตราการเจริญเร็วทำให้ใช้เวลาในการเริ่มเดินระบบสั้น และไม่มีกรลดลงของค่าความเป็นกรดค้าง (Cho et al., 1992) ตัวอย่างของเฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ คือ *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากปุ๋ยหมักมูลสุกร (Yun et al., 1997) โดยพบว่า เชื้อสามารถ

ออกซิไดซ์ซัลไฟด์ได้จากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรเจนซัลไฟด์ออกซิเดสภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน โดยมีผลิตภัณฑ์หลักที่ได้เป็น elemental sulfur ดังสมการที่ 7 (Nakada and Ohta, 1999)



นอกจากนี้ มีรายงานการใช้ *Pseudomonas putida* ในรูปเซลล์ตรึงเพื่อกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์พบว่า มีประสิทธิภาพ 96% ในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำช่วง 5-65 ppm และเมื่อความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์สูงขึ้นประสิทธิภาพในการกำจัดจะลดลง (Chung et al., 2001) ระบบที่ใช้ในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์โดยวิธีทางชีวภาพสามารถจำแนกได้เป็น 3 ประเภท คือ 1) bioscrubber 2) biofilter และ 3) biotrickling filter ดังแสดงในรูปที่ 2 โดยการจำแนกประเภทของระบบขึ้นอยู่กับ การดูดซับก๊าซในส่วนที่เป็นของเหลวหรือตัวกลาง



รูปที่ 2 ระบบที่ใช้ในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ออกจากก๊าซชีวภาพ (a) bioscrubber (b) biofilter (c) biotrickling filter (ที่มา Syed et al., 2006)

1) Bioscrubber ระบบนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเรียกว่า bioscrubber tower จะเป็นส่วนที่ก๊าซชีวภาพสัมผัสกับของเหลวและถูกของเหลวดูดซับไว้ จากนั้นจะถูกออกซิไดซ์โดย sulfur oxidizing bacteria ที่อยู่ในของเหลวก่อนที่จะเข้าสู่ถังที่มีการเติมอากาศต่อไป มีรายงานการใช้ระบบ bioscrubber ในระดับห้องปฏิบัติการร่วมกับเชื้อ *Thiobacillus* sp. ในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ความเข้มข้นเฉลี่ย 5 ppm พบว่า ระบบมีประสิทธิภาพในการกำจัดสูงกว่า 99% หลังจากเดินระบบเป็นเวลา 3 วัน (Koe and Yang, 2000) ต่อมา Potivichayanon และคณะ (2006) รายงานการใช้เชื้อ *Acinetobacter* sp. และ *Alcaligenes faecalis* ร่วมกันในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ พบว่า มีประสิทธิภาพในการกำจัด 98% โดยพบว่า ไฮโดรเจนซัลไฟด์ถูกออกซิไดซ์เปลี่ยนไปเป็นซัลเฟต

2) Biofilter ก๊าซชีวภาพจะผ่านเข้ามาและผ่านตัวกรองที่มีรูพรุนให้เชื้อแบคทีเรียยึดเกาะ มีการให้ความชื้นและสารอาหารเพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตได้ ตัวกลางที่มีเคยการวิจัยทำได้จากวัสดุหลายประเภท เช่น Chung และคณะ (1996) ได้ทำการตรึงเซลล์ *Thiobacillus thioeparus* CH11 ด้วยแคลเซียมแอลจิเนต และมีประสิทธิภาพในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้มากถึง 98% ต่อมาในปี 2001 Chung และคณะ ได้ทดลองตรึงเซลล์ของเชื้อ *Pseudomonas putida* CH11

ร่วมกับเชื้อ *Arthobacter oxydans* CH8 ในแคลเซียมแอลจิเนตเพื่อกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์และก๊าซแอมโมเนียด้วย ซึ่งพบว่า ความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์และก๊าซแอมโมเนียจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดยที่ความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์สูงจะไปยับยั้งการเจริญของ heterotrophic sulfur oxidizing bacteria ทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนซัลไฟด์ และที่ความเข้มข้นของก๊าซแอมโมเนียสูงจะทำให้เกิดสภาวะกรดขึ้นในระบบ Oyarzün และคณะ (2003) ทำการตรึงเซลล์ของ *Thiobacillus thioeparus* ATCC23645 ด้วยดินพีท พบว่า มีประสิทธิภาพในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ 100% เมื่อให้ความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เริ่มต้น 355 ppm นอกจากนี้ ยังมีรายงานการใช้เซลล์ตรึงของ *Acidithiobacillus thiooxidans* ในขรามิคเพื่อกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ความเข้มข้นสูง 200-2200 ppm (Lee et al., 2006)

3) Biotrickling filter หลักการทำงานของ biotrickling filter เหมือนกับ biofilter ยกเว้นก๊าซจะผ่านชั้น pack bed ที่มีตัวกลางที่มีเชื้อแบคทีเรียเกาะอยู่ และมีการสเปรย์น้ำหรืออาหารเหลว ซึ่งจะมีการหมุนเวียนน้ำในระบบอยู่ตลอด ในปี 2005 Chung และคณะ ศึกษาการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ใน

ก๊าซผสมของเชื้อ *Pseudomonas putida* CH11 โดยระบบ biotrickling filter ที่มีถ่านกัมมันต์เป็นตัวกลาง พบว่า มีประสิทธิภาพในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ 100% ต่อมา Jin และคณะ (2007) ใช้ระบบ biotrickling filter ในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์และเมทานอล จากกระบวนการผลิตกระดาษ โดยพบว่า ระบบมีประสิทธิภาพในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ 100 % ที่ความเข้มข้น 12 ppm

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า ประสิทธิภาพในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จากก๊าซชีวภาพ โดยวิธีทางชีวภาพขึ้นกับหลายปัจจัย ประกอบด้วย ความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ก่อนเข้าระบบ และอัตราการไหลเข้าระบบของก๊าซชีวภาพ จะต้องไปสูงเกินกว่าความสามารถของเชื้อในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ทัน ถ้าหากก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เข้มข้นมากเกินไปจะทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดลดลง, อัตราการเติมอากาศ, ระยะเวลาที่ใช้ในการบำบัด, ความเป็นกรด-ด่างของระบบ, พื้นที่ผิวสัมผัสและโครงสร้างทางกายภาพของตัวกลาง เช่น พลาสติกผงคาร์บอน เป็นต้น นอกจากนี้ ยังรวมถึงชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ยึดติดกับตัวกลางด้วย (Hong and Park, 2005; Kim et al., 2008)

ปัจจุบันระบบที่ใช้จุลินทรีย์สำหรับการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ปนเปื้อนในก๊าซชีวภาพที่เป็นที่นิยม ได้แก่ ระบบตัวกรองทางชีวภาพ (biofilter) ซึ่งมีข้อดีในเรื่องการประหยัดค่าใช้จ่ายและมีความปลอดภัยสูงกว่าการใช้สารเคมี เนื่องจากเป็นวิธีการประยุกต์ใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ตามธรรมชาติ แต่วิธีนี้ก็ยังมีข้อจำกัดนอกเหนือจากที่กล่าวมาข้างต้นเช่นกัน คือ อาจพบปัญหาความไม่สม่ำเสมอในการทำงานหรือความไม่เสถียรของระบบบำบัดได้ การศึกษาและวิจัยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จะมีส่วนช่วยในการปรับปรุงและพัฒนากระบวนการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ให้มีประสิทธิภาพในการทำงานดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- Buisman, C.J.N., Post, R., Ijspreet, P., Geraats, S., and Lettinga, G. (1989). Biotechnological process for sulphide removal with sulphur reclamation. *Acta Biotechnologica*. 9: 271-283.
- Cha, J.M., Cha, W.S., and Lee, J.H. (1999). Removal of organosulphur odour compounds by *Thiobacillus novellas* SRM, sulphur-oxidizing microorganism. *Process Biochemistry*. 34(6-7): 659-665.
- Cho, K.S., Hiromi, M. and Shoda, M. (1992). Degradation of hydrogen sulfide by *Xanthomonas* sp. strain DY44 isolated from peat. *Applied and Environmental Microbiology* 58:1183-1189.
- Chung, Y.C., Huang, C., and Tseng, C.P. (1996). Operation optimization of *Thiobacillus thioparus* CH11 biofilter for hydrogen sulfide removal. *Journal of Biotechnology*. 52: 31-38.
- Chung, Y.C., Huang, C. and Tseng, C.P. (2001). Biological elimination of H_2S and NH_3 from waste gases by biofilter packed with immobilized heterotrophic bacteria. *Chemosphere*. 43: 1043-1050.
- Chung, Y.C., Lin, Y.Y. and Tseng, C.P. (2005). Removal of high concentration of NH_3 and coexistent H_2S by biological activated carbon (BAC) biotrickling filter. *Bioresource Technology* 96: 1812-1820.
- Hong, J.H. and Park, K.J. (2005). Compost biofiltration of ammonia gas from bin composting. *Bioresource Technology*. 96: 741-745.

- Jensen, A.B. and Webb, C. (2001). Treatment of H_2 -containing gases: A review of microbiological alternatives. *Enzyme and Microbial Technology*. 17: 2-10.
- Jin, Y., Veiga, M.C. and Kennes, C. (2007). Co-treatment of hydrogen sulfide and methanol in a single-stage biotrickling filter under acidic conditions. *Chemosphere*. 68: 1186-1193.
- Kim, J.H., Rene, E.R. and Park, H.S. (2008). Biological oxidation of hydrogen sulfide under steady and transient state condition in an immobilized cell biofilter. *Bioresource Technology*. 99: 583-588.
- Koe, L.C.C. and Yang, F. (2000). Evaluation of a pilot-scale bioscrubber for the removal of hydrogen sulphide. *Water and Environment Journal*. 14: 432-435.
- Lastella, G., Testa, C., Cornacchia, G., Notornicola, M., Voltasio, F., and Sharma, V.K. (2002). Anaerobic digestion of semi-solid organic waste: Biogas production and its purification. *Energy Conversion and Management* 43: 63-75.
- Lee, E.Y., Nae Yoon, L., Kyung-Suk, C. and Hee Wook, R. (2006). Removal of hydrogen sulfide by sulfate-resistant *Acidithiobacillus thiooxidans* AZ11. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101: 309-314.
- Nakada, Y. and Ohta, Y. (1999). Purification and properties of hydrogen sulfide oxidase from *Bacillus* sp. BN53-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 87: 452-455.
- Oyarzún, P., Arancibia, F., Canales, C., and Aroca, E.G. (2003). Biofiltration of high concentration of hydrogen sulphide using *Thiobacillus thiooparus*. *Process Biochemistry*. 30: 165-170.
- Potivichayanon, S., Pokethitiyook, P. And Kruatrachue. (2006). Hydrogen sulfide removal by a novel fixed-film bioscrubber system. *Process Biochemistry*. 41: 708-715.
- Schieder, D., Quicker, P., Schneider, R., Winter, H., Prechtel, S. and Faulstich M. (2003). Microbiological removal of hydrogen sulfide from biogas by means of a separate biofilter system: Experiment with technical operation. *Water Science and Technology*. 48(4): 209-212.
- Syed, M., Soreanu, G., Falletta, P., and Beland, M. (2006). Removal of hydrogen sulfide from gas streams using biological processes - A review. *Canadian Biosystems Engineering*. 48: 2.1-2.14.
- Tchobanoglous, G., Burton, F.L., and Stensel, H.D. (2003). *Wastewater Engineering. Treatment and Reuse*, 4th edition. McGraw-Hill Companies, New York, NY. Cap. 14: 1505-1532.
- Wellinger, A. and Linberg, A. (2002). Biogas upgrading and Utilization-IEA Bioenergy Task 24. Paris: International Energy Association. 20.
- Yun, S.I. and Ohta, Y. (1997). Some physiological properties of microorganism capable of deodorizing farm animal feces. *Bioresource Technology*. 60: 21-26.



โพลาร์ออร์แกนิกเคมีคัลอินทิเกรทีฟแซมเพลอร์ สำหรับสารอินทรีย์ในตัวอย่างน้ำ

Polar Organic Chemical Integrative Sampler for Organic Compounds in Aqueous Samples

ฐิติมา รุจิราลัย¹

บทนำ

การเก็บตัวอย่างน้ำเป็นวิธีที่สำคัญในตอนเริ่มต้นของขั้นตอนการวิเคราะห์ทางเคมี วิธีที่นิยม คือ การเก็บตัวอย่างแบบแอคทีฟ (active sampling) ซึ่งเป็นการเก็บแบบจุด (grab) หรือแบบรวม (composite) ณ เวลาใดเวลาหนึ่งเป็นวันหรือสัปดาห์ มีข้อเสีย คือ หากต้องการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยในระดับนาโนกรัมต่อลิตรหรือพิโคกรัมต่อลิตร จะต้องเก็บตัวอย่างน้ำมากถึง 1-5 ลิตร ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้เป็นเพียงความเข้มข้นเฉพาะเวลาที่เก็บ ต้องใช้ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยากก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ เช่น การกรอง การเพิ่มความเข้มข้น การแยกตัวรบกวนออกจากตัวอย่าง ทำให้เสียเวลาและเพิ่มความผิดพลาดในการวิเคราะห์มากขึ้น นอกจากนี้ วิธีการเก็บแบบแอคทีฟไม่เหมาะต่อการศึกษาความเป็นพิษหรือความเข้มข้นของสารที่เปลี่ยนแปลงในช่วงเวลาที่ติดต่อกันนาน ดังนั้น Alvarez (1999) ได้พัฒนาตัวเก็บตัวอย่างน้ำแบบพาสซีฟ (passive sampling) เรียกว่า โพลาร์-ออร์แกนิกเคมีคัลอินทิเกรทีฟแซมเพลอร์ (polar organic chemical integrative sampler) หรือโพซิส (POCIS)

ซึ่งประกอบด้วยของแข็งดูดซับ (sorbent) บรรจุอยู่ในเยื่อ (membrane) ทำหน้าที่ดูดซับสารอินทรีย์ที่มีสมบัติในการละลายน้ำและไหลอย่างอิสระ (free flow) จากตัวอย่างน้ำเข้าไปสะสมอยู่ในของแข็งดูดซับ สารอินทรีย์ที่ถูกดูดซับสามารถถูกสกัดออกจากของแข็งดูดซับด้วยวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (solid phase extraction) โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม แล้วถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิคต่างๆ ที่เหมาะสมต่อไป เช่น โครมาโทกราฟี (chromatography) หรือสเปกโทรสโกปี (spectroscopy) ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในน้ำที่วิเคราะห์ได้จะคิดเป็นความเข้มข้นเฉลี่ยตามเวลาที่ถูกดูดซับ (time weighted average (TWA) concentration) ทำให้โพซิสมีข้อเด่นกว่าตัวเก็บตัวอย่างแบบแอคทีฟอื่นๆ คือ ความเข้มข้นที่วัดได้เป็นความเข้มข้นที่แท้จริง (true concentration) ของสารอินทรีย์ปริมาณน้อยที่ละลายอยู่ในน้ำ และให้ข้อมูลในการศึกษาเชิงความเป็นพิษที่มีต่อสัตว์น้ำได้อย่างถูกต้องตามเวลาที่ผ่านไปเป็นระยะหลายสัปดาห์ และ/หรือหลายเดือน (Alvarez, 1999; Alvarez et al., 2004)

¹ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

หลักการการเก็บตัวอย่างน้ำแบบพาสซีฟด้วยโพซิส

โพซิสมีหลักการเดียวกับตัวเก็บตัวอย่างน้ำแบบพาสซีฟอื่นๆ เช่น ตัวเก็บตัวอย่างที่อาศัยการสกัดแบบปริมาณน้อยด้วยเฟสของแข็ง (solid-phase microextraction sampler) และตัวเก็บตัวอย่างที่ใช้เยื่อกึ่งซึมผ่านได้ (semipermeable membrane device, SPMD) โดยทั่วไปหลักการของตัวเก็บตัวอย่างแบบพาสซีฟเกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของสารที่จะวิเคราะห์ (analyte) ที่มีความเข้มข้นต่ำมากๆ หรือเข้าใกล้ศูนย์ ถูกรักษาให้มีสภาวะที่คงที่ ณ ที่ผิวของเฟสตัวรับ (receiving phase) เช่น ตัวทำละลาย หรือของแข็งดูดซับ โดยสารที่จะวิเคราะห์มีการไหลอย่างอิสระและแพร่ (diffusion) อย่างต่อเนื่องจากเฟสน้ำ (bulk

water phase) ผ่านเยื่อที่จำกัดเฉพาะการแพร่ (diffusion-limiting membrane) ซึ่งทำหน้าที่แยกเฟสตัวรับจากเฟสน้ำ แล้วไปยังเฟสตัวรับ ซึ่งมีการสมมติให้เฟสตัวรับไม่เกิดสมดุลกับน้ำ จะทำให้เกิดการสะสมของสารที่จะวิเคราะห์ในเฟสตัวรับ แสดงได้ดังรูปที่ 1 ความแตกต่างระหว่างศักย์เคมี (chemical potential) ของสารในเฟสน้ำและเฟสตัวรับทำให้เกิดค่าการรับอันเกิดจากแรงผลักดัน (force driving uptake) และเมื่อมีการใช้เยื่อเพื่อแยกเฟสทั้งสองเฟส จะทำให้เกิดการถ่ายเทมวล (mass transfer) ส่วนการไหลสุทธิ (net flow) ของการแพร่ของสารจากเฟสน้ำไปยังเฟสตัวรับ จะเกิดขึ้นต่อเนื่องถึงสมดุลหรือถึงเวลาที่ต้องการหยุดเก็บตัวอย่าง (Vrana et al., 2005; Mills et al., 2007)



รูปที่ 1 หลักการของตัวเก็บตัวอย่างน้ำแบบพาสซีฟด้วยโพซิส (Mills et al., 2007)

โดยทั่วไป การถูกดูดซับหรือการสะสม (accumulation) ของสารอินทรีย์ในตัวเก็บตัวอย่างแบบพาสซีฟเป็นไปตามกราฟแสดงชนิดการทำงานของตัวเก็บตัวอย่างแบบพาสซีฟดังแสดงในรูปที่ 2 ซึ่งสามารถแบ่งได้ 2 ช่วงหลัก คือ ช่วงจลน์ (kinetic regime) และช่วงสมดุล (equilibrium regime) (Alvarez, 1999 และ Vrana et al., 2005) ในช่วงแรกของรูปที่ 2 ความเข้มข้นของสารที่จะวิเคราะห์ในตัวเก็บตัวอย่างเป็นส่วนโดยตรงกับเวลาที่เก็บ กราฟที่ได้จึงเป็นเส้นตรงจัดเป็นช่วงจลน์ หลังจากนั้นเป็นเส้นโค้ง (curvilinear) แล้วตามด้วยช่วงสมดุล ซึ่งความเข้มข้นที่อยู่ในตัวเก็บ

ตัวอย่างจะคงที่ตลอดเวลาเมื่อเวลาผ่านไป สำหรับโพซิสจะถูกใช้งานในช่วงจลน์เท่านั้น (Alvarez, 1999; Alvarez et al., 2004) โดยมีการสมมติว่า อัตราการถ่ายเทมวลของสารไปยังเฟสตัวรับเป็นส่วนโดยตรงกับความแตกต่างของความเข้มข้นแอคติวิตี (activity) ของสารในเฟสน้ำและในเฟสตัวรับ ซึ่งในตอนเริ่มต้นโพซิสทำงานในช่วงเป็นเส้นตรงโดยไม่คิดอัตราการคาย (rate of desorption) ของสารจากเฟสตัวรับไปยังน้ำ สมการลำดับที่ 1 ที่ใช้แสดงความเข้มข้นเทียบกับเวลาของโพซิสคือ

$$C_s = C_w k_u t$$

เมื่อ C_s เป็นความเข้มข้นของสารที่จะวิเคราะห์ในของแข็งดูดซับ C_w เป็นความเข้มข้นของสารในตัวอย่างน้ำ k_u เป็นค่าคงที่อัตราการรับ (uptake rate constant) มีหน่วยเป็นลิตรหรือมิลลิลิตรต่อวัน กรัม (L, mL/d g) และ t เป็นเวลาอาจนานถึง 2 เดือน สามารถเรียกช่วงจนอีกชื่อหนึ่งว่า ช่วงอินทิเกรต (integrative regime)

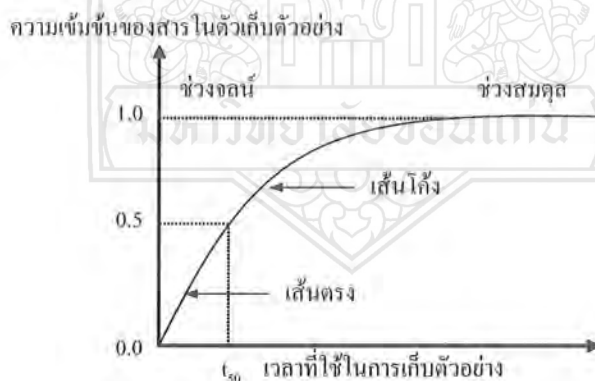
สมการข้างต้นสามารถจัดเรียงใหม่ได้ว่า

$$C_w = C_s M_s / R_s t$$

เมื่อ M_s เป็นมวลของของแข็งดูดซับ และ R_s เป็นอัตราการเก็บตัวอย่าง (sampling rate) ซึ่งมาจากค่า k_u หรืออาจแสดงถึงปริมาตรของน้ำที่ปราศจากสารต่อหน่วยเวลาเก็บ มีหน่วยเป็นลิตรหรือมิลลิลิตรต่อวัน ดังนั้น C_w ในสมการนี้จึงเป็นความเข้มข้นเฉลี่ยตามเวลาที่ถูกลดลงในเฟสน้ำ ซึ่งคำนวณได้เมื่อทราบค่า C_s , M_s , R_s และ t

ถ้า R_s ขึ้นอยู่กับชนิดของสารและการไหลของน้ำ (water flow) หรือความแรงของกระแสน้ำ (turbulence) ในสภาวะการทดลอง เช่น ค่า R_s ของไดูรอน (diuron) และฟลูออซีทีน (fluoxetine) ในสภาวะที่ไม่มี

การคนซึ่งเปรียบเสมือนกระแสน้ำที่ไหลนิ่ง (quiescent) เป็น 0.005 และ 0.012 ลิตรต่อวันตามลำดับ และในสภาวะที่มีการคนซึ่งเปรียบเสมือนกระแสน้ำที่ไหลอย่างรุนแรง เป็น 0.045 และ 0.086 ลิตรต่อวัน ตามลำดับ (Alvarez et al., 2004) นอกจากนั้น ค่า R_s ไม่ขึ้นกับค่า C_w แต่ขึ้นกับอุณหภูมิ ผลของสิ่งมีชีวิตในน้ำ เช่น ไลเคน สำหรับ เกาะที่ผิวของตัวเก็บตัวอย่าง (bio-fouling) และภาวะความเค็มของน้ำ (salinity) ค่า R_s ของยา 12 ชนิด เช่น คาเฟอีน (caffeine) ไดอะซีแพม (diazepam) ไบบูโพรเฟน (ibuprofen) และนาโพรเซน (naproxen) เป็นคั่น ในน้ำที่มีภาวะความเค็มและอุณหภูมิต่างกัน มีค่าที่แตกต่างกันอยู่ในช่วงประมาณ 3.5-0.2 ลิตรต่อวัน กรัมของของแข็งดูดซับ (Togola and Budzinski, 2007) อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันค่า R_s ของสารแต่ละชนิดยังไม่มีการแพร่หลาย การทำงานของโพซิสในช่วงจนนี้ส่งผลให้โพซิสสามารถใช้เก็บตัวอย่างสารที่มีความเข้มข้นแปรตามเวลาหรือมีความเข้มข้นต่ำๆ และทำให้ผู้ใช้ได้ข้อมูลของสารได้เป็นอย่างดี หากต้องการศึกษาในเชิงความเป็นพิษของสาร (toxicity assessment) ในตัวอย่างน้ำเมื่อเวลาผ่านไป

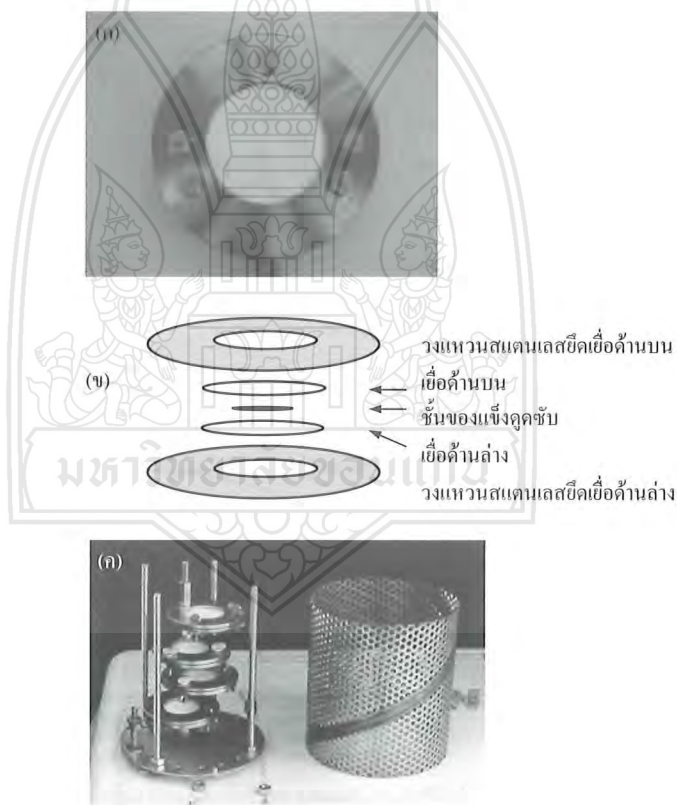


รูปที่ 2 กราฟแสดงชนิดการทำงานของตัวเก็บตัวอย่างแบบพาสซีฟ ซึ่งโพซิสทำงานในช่วงจน เมื่อ t_{50} เป็นเวลาที่ครึ่งหนึ่งของเวลาทั้งหมดที่เข้าสู่สมดุล (Alvarez, 1999; Vrana et al., 2005)

ส่วนประกอบของโพซิส

โพซิสประกอบด้วย 3 ส่วนที่สำคัญดังแสดงในรูปที่ 3 คือ 1. ของแข็งดูดซับที่ทำหน้าที่เป็นเฟสตัวรับ ซึ่งวางอยู่ระหว่างเยื่อ 2 แผ่น ส่วนใหญ่เป็นของแข็งดูดซับประเภทเดียวกันกับของแข็งที่ใช้ในเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง 2. เยื่อที่จำกัดเฉพาะการแพร่ชนิดพอลิเอเทอร์ซัลโฟน (polyethersulphone) 2 แผ่น ทำหน้าที่ที่ยึดของแข็งดูดซับ เยื่อนี้มีรูพรุนขนาด 0.1 ไมโครเมตร และเส้นผ่าศูนย์กลางยาว 7 เซนติเมตร ให้น้ำหรือสารอินทรีย์ที่ละลายอยู่ในน้ำแพร่ผ่านเข้าไปถึงชั้นของแข็งดูดซับเท่านั้น ทำให้สามารถแยกสารออกจากอนุภาคหรือตะกอนที่อยู่ในน้ำได้ ส่วนการเกิด bio-fouling ซึ่งโดยทั่วไปเป็นอุปสรรคต่อความเข้มข้นของ

สารอินทรีย์ที่ถูกดูดซับ ส่งผลต่อการทำงานของเยื่อชนิดนี้น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับเยื่อชนิดพอลิเอทิลีน (polyethylene) ในตัวเก็บตัวอย่างที่ใช้เยื่อกึ่งซึมผ่านได้ (SPMD) และ 3. วงแหวนสแตนเลสสำหรับยึดเยื่อ 2 วง ซึ่งเยื่อและวงแหวนสแตนเลสถูกประกบและยึดเข้ากันด้วยนอต (knot) สามารถนำโพซิสจำนวนมากกว่าหนึ่งโพซิสมาต่อกันแล้ววางในภาชนะทรงกระบอกสำหรับใส่โพซิส (canister) ดังรูปที่ 3 (ค) โพซิสขนาดมาตรฐานจะมีพื้นที่ผิวต่อสัดส่วนมวลของของแข็งดูดซับเท่ากับ 180 ตารางเซนติเมตรต่อกรัม โพซิสที่ใช้ในภาคสนามอาจมีเพียงพื้นที่ผิว 41 ตารางเซนติเมตรก็สามารถเก็บตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 3 (ก) โพซิสที่มองจากด้านบน (ข) โพซิสที่มองจากด้านข้าง และ (ค) โพซิสจำนวน 4 โพซิสต่อกันแล้ววางในภาชนะทรงกระบอกสำหรับใส่โพซิส (canister) (Alvarez, 1999; Alvarez *et al.*, 2005; Rujiralai, 2007)

โพซิสแบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามชนิดของแข็งดูดซับ (Alvarez *et al.*, 2004) ได้แก่

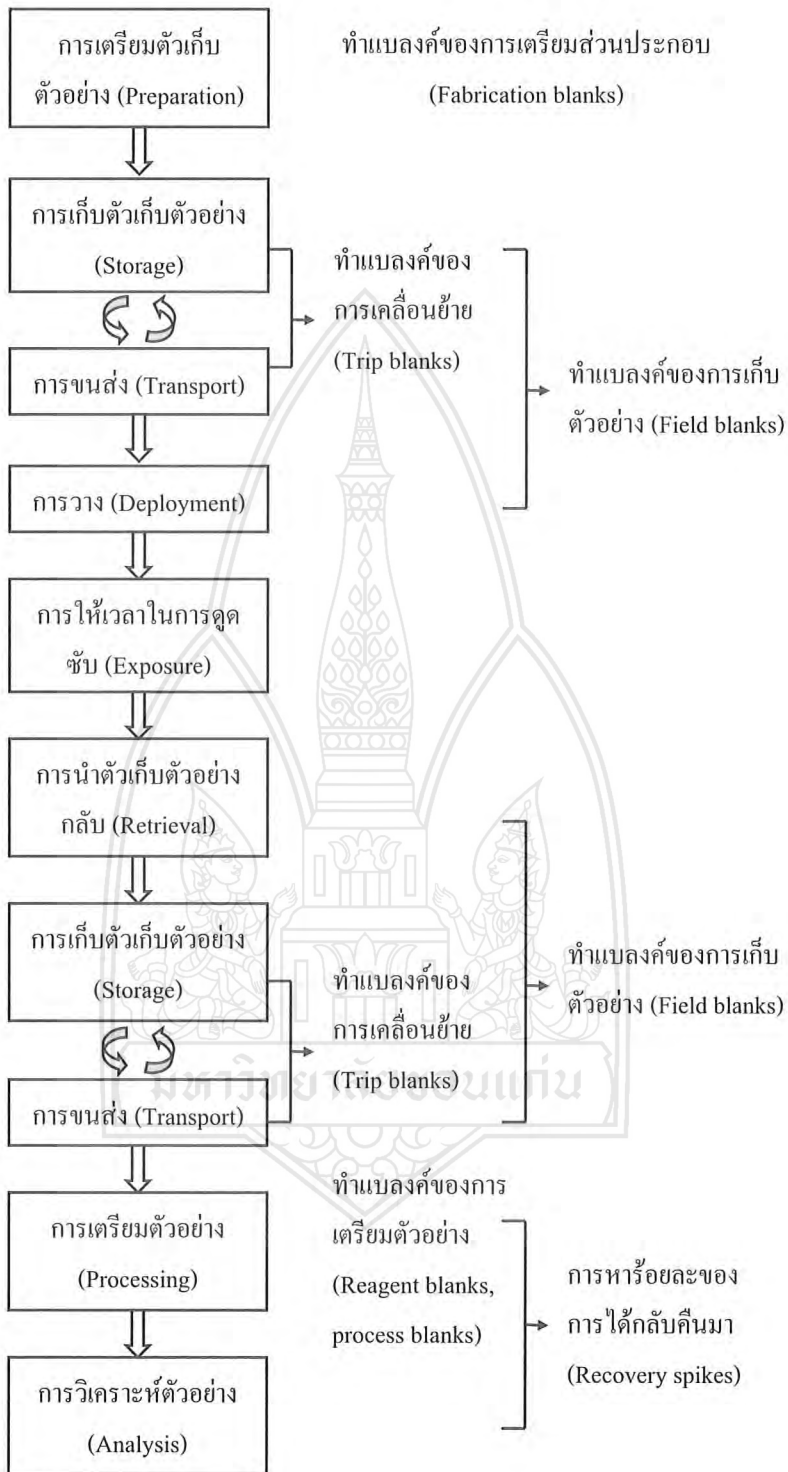
1. โพซิสชนิด Generic ประกอบด้วยของแข็งดูดซับ 3 ชนิดผสมกันในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 โดยน้ำหนัก คือ Isolute ENV+ ซึ่งเป็นของแข็งดูดซับชนิดไฮดรอกซีเลตเตดพอลิสไตรีนไดไวนิลเบนซีน (hydroxylated polystyrene-divinylbenzene) และของผสมระหว่าง Ambersorb 1500 ซึ่งเป็นของแข็งดูดซับชนิดคาร์บอนเซียส (carbonaceous adsorbent) กระจายตัวบน S-X3 Bio-beads ขนาด 200-400 mesh ซึ่งเป็นของแข็งดูดซับชนิดสไตรีนไดไวนิลเบนซีน-โคพอลิเมอร์ (styrene divinylbenzene copolymer) โพซิสชนิดนี้ประยุกต์ใช้กับการเก็บตัวอย่างสารอินทรีย์ทั่วไปที่มีไขมันและละลายน้ำได้ดี เช่น สารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ สอร์โม่ธรรมชาติและสอร์โม่สังเคราะห์ เป็นต้น

2. โพซิสชนิด Pharmaceuticals ประกอบด้วยของแข็งดูดซับชนิดเดียว คือ Oasis HLB ขนาด 228 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นโคพอลิเมอร์ของพอลิไดไวนิลเบนซีน-โคไวนิลไพร์โรลิโดน (poly[divinylbenzene]-co-N-vinylpyrrolidone) โพซิสชนิดนี้เหมาะกับสารอินทรีย์ที่มีไขมันและละลายน้ำได้ดี ซึ่งเป็นพวกรักษาโรค (pharmaceuticals) เช่น ยาฆ่าเชื้อ (antibiotics) ยาต้านโรคซึมเศร้า (anti-depressants) และยาคลายกังวล (psychiatric drugs) เป็นต้น

โพซิสทั้งสองชนิดนำมาใช้พร้อมกันได้ในการเก็บตัวอย่าง ทำให้ได้ชนิดสารอินทรีย์ที่ต้องการเก็บที่หลากหลายและได้ข้อมูลเกี่ยวกับสารอินทรีย์ที่ละลายในน้ำมากขึ้น หากพิจารณาถึงค่าสัมประสิทธิ์การแพร่กระจายระหว่างชั้นออกทานอลและน้ำ (octanol/water partition coefficient, $\log K_{ow}$) ของสารอินทรีย์ต่างๆ โพซิสสามารถเก็บตัวอย่างสารอินทรีย์ที่มีค่า $\log K_{ow}$ น้อยกว่า 3 หลังจากเก็บตัวอย่างแล้วสารที่ถูกดูดซับจะถูกสกัดด้วยวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง และนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือทางเคมีต่อไป ซึ่งความเข้มข้นของสารที่สกัดได้อยู่ในช่วงไมโครกรัมต่อลิตรถึงนาโนกรัมต่อลิตร (Vrana *et al.*, 2005)

การประยุกต์ใช้โพซิส

มีการควบคุมคุณภาพของการเก็บตัวอย่างโดยใช้โพซิสและตัวเก็บตัวอย่างแบบพาสซีฟอื่นๆ ร่วมกับขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์ เพื่อให้กระบวนการวิเคราะห์เกิดความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) มากขึ้นดังแสดงในรูปที่ 4 (Vrana *et al.*, 2005) โดยทั่วไปการควบคุมคุณภาพขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และขั้นตอนการวิเคราะห์ วัสดุหรือสารเคมีที่ใช้ร่วมกับตัวเก็บตัวอย่างจะต้องระบุถึงความบริสุทธิ์ การปนเปื้อน (contamination) ในขั้นตอนต่างๆ เช่น การขนส่ง (transport) การวาง (deployment) ซึ่งต้องควบคุมโดยการทำให้เป็นศูนย์ (blank) ประโยชน์ของโพซิสมีหลายข้อ เช่น ให้ความไวที่สูง (sensitivity) สามารถเก็บสารอินทรีย์ที่มีความเข้มข้นน้อยมาก (ultratrace) ในน้ำได้ มีความจำเพาะ (selectivity) กับสารอินทรีย์ที่ต้องการเก็บมากกว่าตัวเก็บตัวอย่างแบบพาสซีฟอื่นๆ เพราะใช้ของแข็งดูดซับที่เฉพาะกับสารมากกว่าและมีความเที่ยงสูง เหมาะกับการหาความเข้มข้นของสารที่เปลี่ยนแปลงตามเวลาหรือฤดูกาล ดังนั้น โพซิสจึงใช้ในการตรวจ (screening) ชนิดสารอินทรีย์ต่างๆ ที่อยู่ในแม่น้ำและลำธารที่มีน้ำที่ผ่านการบำบัดปนอยู่ (treated sewage effluent streams) ในประเทศทางยุโรปและอเมริกา ดังสรุปในตารางที่ 1 (Mills *et al.*, 2007) และใช้ในการศึกษาความเป็นเอสโตรเจน (estrogenic activity) ของสารเอสโตรเจนจากสิ่งแวดล้อม (environmental estrogens) ที่อยู่ในแม่น้ำและน้ำที่ผ่านการบำบัด (Vermeirssen *et al.*, 2008) นอกจากนี้ ใช้โพซิสในการหาปริมาณความเข้มข้นเฉลี่ยตามเวลาที่ถูกดูดซับของกลุ่มสอร์โม่เอสโตรเจนในสิ่งแวดล้อมที่เป็นน้ำด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2 (Alvarez *et al.*, 2004; Vermeirssen *et al.*, 2005; Metthiessen *et al.*, 2006; Vermeirssen *et al.*, 2006; Vermeirssen *et al.*, 2008) หรือใช้หาปริมาณความเข้มข้นของยาและสารก่อกรวนสอร์โม่บางชนิด (endocrine disrupting compounds) ที่ละลายอยู่ในแม่น้ำและน้ำเสีย (Alvarez *et al.*, 2005; Arditoglou and Voutsas, 2008) ความเข้มข้นเฉลี่ย



รูปที่ 4 การควบคุมคุณภาพของการใช้โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนแบบพาสซีฟ (Vrana et al., 2005)

ตารางที่ 1 การใช้โพชิสในการตรวจหาชนิดสารอินทรีย์ที่ละลายอยู่ในแม่น้ำและและลำธารที่มีน้ำที่ผ่านการบำบัดปนอยู่ในประเทศทางยุโรปและอเมริกา คัดแปลงจาก Mills *et al.*, 2007

Chemicals	Chemicals	Chemicals
<u>Pharmaceuticals</u>	<u>Polar pesticides</u>	<u>Natural and synthetic hormones</u>
Acetaminophen	Alachlor	17β-estradiol
Azithromycin	Atrazine (and other triazines)	17α-ethynylestradiol
Carbamazepine	Chlorpyrifos	Estrone
Dephenhydramine	Desethylatrazine and	Estriol
Propranolol	desisopropylatrazine	<u>Fire Retardants</u>
Sulfa drugs (antibiotics)	Diazinon	Fryol CEF
Tetracycline antibiotics	Dichlorvos	Fryol FR2
Thiabendazole	Diuron	Tri(2-butoxyethyl)phosphate
	Isoproturon	
	Metolachlor	
<u>Illicit drugs</u>	<u>Plasticizers</u>	<u>Fragrances</u>
Methamphetamine	Diethylhexyl phthalate	3-Methyl-1H-indole
Methylenedioxymethamphetamine	Triphenyl phosphate	Indole
<u>Various personal care and industrial products and degradation products</u>		Methyl salicylate
Alkyl phenols (octyl and nonyl phenols)		Tonalide
Benzophenone		HHCB (1,3,4,6,7,8-hexahydro-
Caffeine		5,6,6,7,8,8-hexamethylcyclo-
Cotinine		pentagamma-2-benzopyran and
DEET (N,N-Diethyl-m-toluamide)		related isomers)
Indole		<u>Faecal contamination marker</u>
Triclosan		Urobilin
Triethyl citrate		

ตารางที่ 2 การใช้โพชิสในการหาปริมาณกลุ่มฮอร์โมนเอสโตรเจนในสิ่งแวดล้อมที่เป็นน้ำ

Country	Sample type	Detection	Concentration (ng POCIS ⁻¹)			Reference
			E1	E2	EE2	
UK	River water	HPLC-DAD	<25	<25-590	<25	Alvarez <i>et al.</i> (2004)
Switzerland	River water	YES	-	0.4-76.7	-	Vermeirssen <i>et al.</i> (2005)
Switzerland	River water	LC/MS/MS	-	0.6-43.8	-	Vermeirssen <i>et al.</i> (2005)
UK	Stream water	LC/MS/MS	0.10-9.31 ^a	0.00-0.89 ^a	0.00 ^a	Matthiessen <i>et al.</i> (2006)
UK	Stream water	YES	-	0.0-26.5 ^a	-	Matthiessen <i>et al.</i> (2006)
Switzerland	River water	YES	-	0.23-4.60	-	Vermeirssen <i>et al.</i> (2006)
Greece	River water, water from gulf, harbor and canal	GC/MS	nd	nd	nd	Vermeirssen <i>et al.</i> (2008)

หมายเหตุ : ^ang L⁻¹
อักษรย่อ : E1, Estrone; E2, 17(-Estradiol; EE2, 17(-Ethynylestradiol; GC/MS, Gas Chromatography/Mass Spectrometry; HPLC-DAD, High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection; LC/MS/MS, Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry; nd, Not Detected; YES, Yeast Estrogen Screen

ตามเวลาที่ถูกดูดซับของกลุ่มสารอินทรีย์อยู่ในช่วงระดับนาโนกรัม ซึ่งอาจรายงานเป็นนาโนกรัมต่อลิตรเมื่อทราบค่า R_s หรือนาโนกรัมต่อโพซิสเมื่อไม่ทราบค่า R_s

นอกจากนี้ มีการเปรียบเทียบการใช้โพซิสกับการเก็บตัวอย่างแบบแอคทีฟ เช่น Alvarez *et al.* (2005) ได้เก็บตัวอย่างน้ำในลำธารโดยใช้โพซิสและเก็บตัวอย่างแบบคอลัมน์ (water-column sampling) แล้วทำการสกัดสารและวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี (Gas chromatography/mass spectrometry) และลิดวิดโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี (Liquid chromatography/mass spectrometry) และรายงานว่ ชนิดของสารอินทรีย์ที่เก็บโดยใช้โพซิสพบเป็นจำนวนมากกว่าชนิดของสารที่เก็บโดยใช้คอลัมน์ และมีสารอินทรีย์ 13 ชนิดตรวจวัดได้จากการใช้โพซิสเท่านั้น เช่น ไทอะเบนดาโซล (thiabendazole) อินโดล (indole) เมทิลซาลิซิลเลท (methyl salicylate) และเพนตะคลอโรฟีนอล (pentachlorophenol) เป็นต้น

Vermeirssen *et al.* (2006) และ Vermeirssen *et al.* (2008) ได้รายงานว่ ปริมาณเอสโตรเจนในตัวอย่างน้ำเมื่อใช้โพซิสและตรวจวัดด้วยเทคนิคที่เรียกว่า recombinant yeast assay (YES) ให้ผลความเป็นเอสโตรเจนที่สอดคล้องและน่าเชื่อถือกับค่าที่ได้จากการประมาณ แต่ผลความเป็นเอสโตรเจนเมื่อใช้การเก็บแบบแอคทีฟให้ค่าที่ไม่คงที่มาก และได้กล่าวถึงข้อดีของโพซิสเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเก็บแบบแอคทีฟว่า โพซิสเป็นตัวเก็บตัวอย่างที่เหมาะสมในการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียและปริมาณของสารอินทรีย์ต่างๆ ที่ปนเปื้อนในแม่น้ำ เพื่อที่จะใช้ในการตรวจสอบคุณภาพน้ำ

Mazzella *et al.* (2008) ได้รายงานว่ ความเข้มข้นเฉลี่ยตามเวลาที่ถูกดูดซับของดีเอทิลเทอบิวทิลลาซีน (diethylterbutylazine) เทอบิวทิลลาซีน (terbutylazine) และไอโซโพรทีวโรน (isoproturon) ในน้ำเมื่อใช้โพซิสมีค่าที่สูงเกินไปอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 11-49 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการเก็บแบบแอคทีฟ ซึ่งมีสาเหตุจากการใช้ค่า R_s ที่

ไม่เหมาะสมกับสภาวะที่ทดสอบ อย่างไรก็ตาม มีการเสนอให้ใช้โพซิสในการตรวจวัดสารที่ได้กล่าวมาข้างต้นในช่วงฤดูกาลหรือเวลาสั้นๆ เช่น น้ำท่วม

มีการใช้โพซิสร่วมกับ SPMD ในน้ำหรือบริเวณที่มีน้ำระบายนจากการทำเกษตรกรรม ซึ่ง SPMD เป็นตัวเก็บตัวอย่างสารอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำหรือสารที่ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยโพซิส เช่น พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons) พอลิคลอรีเนเตดไบฟีนิล (polychlorinated biphenyls) และสารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์กลุ่มออร์แกโนคลอรีน (organochlorine) หรือกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต (organophosphate) เป็นต้น ทำให้สามารถตรวจพบชนิดสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำได้หลากหลายมากขึ้น และสามารถตรวจวัดความเข้มข้นของสารในระดับที่ต่ำๆ ได้ (Petty *et al.*, 2004; Alvarez *et al.*, 2008; Harman *et al.*, 2008)

ดังนั้นจึงเห็นได้ว่า สามารถใช้โพซิสในการเก็บตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าการเก็บแบบแอคทีฟ อย่างไรก็ตาม โพซิสก็มีจุดด้อยอยู่ตรงที่เยื่อสามารถถูกทำลายได้ง่ายในกระแสน้ำที่ไหลอย่างรุนแรงและเป็นที่สนใจของงูขโมยได้ ซึ่งทางแก้ก็อาจใช้ตาข่ายลวดสแตนเลสคลุมที่ผิวเยื่อ ออกแบบภาชนะที่ใช้ใส่โพซิสอย่างเหมาะสม เพื่อป้องกันไม่ให้เยื่อฉีกขาดได้ง่าย และอาจจำเป็นต้องติดตั้งกล่องหรือสัญญาณกันขโมย แต่ก็ส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการเก็บตัวอย่างเพิ่มมากขึ้น (Rujiralai, 2007)

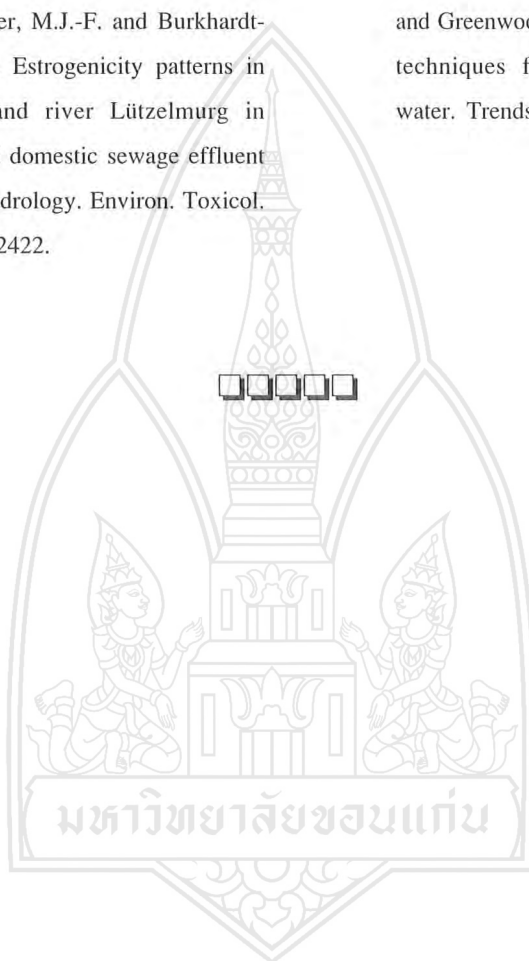
บทสรุป

ปัจจุบันโพซิสเริ่มเป็นที่นิยมมากขึ้นในการใช้เป็นตัวเก็บตัวอย่างน้ำในสิ่งแวดล้อม เพื่อที่จะศึกษาชนิดและหาปริมาณของสารอินทรีย์ต่างๆ ที่สามารถละลายน้ำได้ โพซิสมีประโยชน์ในการหาสารที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ถึงระดับนาโนกรัมต่อลิตร และเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะใช้ในการศึกษาผลของความเป็นพิษและ/หรือผลความเป็นเอสโตรเจนต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำของสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำเป็นระยะเวลานานได้

เอกสารอ้างอิง

- Alvarez, D.A. (1999). Development of an integrative sampling device for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. PhD Thesis. University of Missouri-Columbia, Columbia, USA.
- Alvarez, D.A., Petty, J.D., Huckins, J.N., Jones-Lepp, T.L., Getting, D.T., Goddard, J.P. and Manahan, S.E. (2004). Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 1640-1648.
- Alvarez, D.A., Stackelberg, P.E., Petty, J.D., Huckins, J.N., Furlong, E.T., Zaugg, S.D. and Meyer, M.T. (2005). Comparison of a novel passive sampler to standard water-column sampling for organic contaminants associated with wastewater effluents entering a New Jersey stream. *Chemosphere* 61: 610-622.
- Alvarez, D.A., Cranor, W.L., Perkins, S.D., Clark, R.C., Smith, S.B. (2008). Chemical and toxicologic assessment of organic contaminants in surface water using passive samplers. *J. Environ. Qual.* 37: 1024-1033.
- Arditsoglou, A. and Voutsas, D. (2008). Passive sampling of selected endocrine disrupting compounds using polar organic chemical integrative samplers. *Environ. Pollut.* 156: 316-324.
- Harman, C., Tollefsen, K.-E., B_yum, O., Thomas, K. and Grung, M. (2008). Uptake rates of alkylphenols, PAHs and carbozoles in semi-permeable membrane devices (SPMDs) and polar organic chemical integrative samplers. *Chemosphere* 72: 1510-1516.
- Matthiessen, P., Arnold, D., Johnson, A.C., Pepper, T.J., Pottinger, T.G. and Pulman, K.G.T. (2006). Contamination of headwater streams in the United Kingdom by oestrogenic hormones from livestock farms. *Sci. Total Environ.* 367: 616-630.
- Mazzella, N., Debenest, T. and Delmas, F. (2008). Comparison between the polar organic chemical integrative sampler and the solid-phase extraction for estimating herbicide time-weighted average concentrations during a microcosm experiment. *Chemosphere* 73: 545-550.
- Mills, G.A., Vrana, B., Allan, I., Alvarez, D.A., Huckins, J.N. and Greenwood, R. (2007). Trends in monitoring pharmaceuticals and personal-care products in the aquatic environment by use of passive sampling devices. *Anal. Bioanal. Chem.* 387: 1153-1157.
- Petty, J.D., Huckins, J.N., Alvarez, D.A., Brumbaugh, W.G., Cranor, W.L., Gale, R.W., Rastall, A.C., Jones-Lepp, T.L., Leiker, T.J., Rostad, C.E. and Furlong, E.T. (2004). A holistic passive integrative sampling approach for assessing the presence and potential impacts of waterborne environmental contaminants. *Chemosphere* 54: 695-705.
- Rujiralai, T. (2007). Detection and quantification of estrogens in the environment. PhD Thesis. University of Bristol, Bristol, UK.
- Togala, A. and Budzinski, H. (2007). Development of polar organic integrative samplers for analysis of pharmaceuticals in aquatic systems. *Anal. Chem.* 79: 6734-6741.
- Vermeirssen, E.L.M., K_rner, O., Sch_nenberger, R., Suter, M.J.-F. and Burkhardt-Holm, P.

- (2005). Characterization of environmental estrogens in river water using three pronged approach: Active and passive water sampling and the analysis of accumulated estrogens in the bile of caged fish. *Environ. Sci. Technol.* 39: 8191-8198.
- Vermeirssen, E.L.M., Suter, M.J.-F. and Burkhardt-Holm, P. (2006). Estrogenicity patterns in the Swiss midland river Lützelrmurg in relation to treated domestic sewage effluent discharges and hydrology. *Environ. Toxicol. Chem.* 25: 2413-2422.
- Vermeirssen, E.L.M., Eggen, R.I.L., Escher, B.I. and Suter, M.J.-F. (2008). Estrogens in Swiss rivers and effluents -Sampling matters. *Chimia* 62: 389-394.
- Vrana, B., Mills, G.A., Allan, I.J., Dominiak, E., Svensson, K., Knutsson, J., Morrison, G. and Greenwood, R. (2005). Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *Trends Anal. Chem.* 24: 845-868.



การใช้ประโยชน์ฟิล์มไคโตซานเป็นระบบนำส่งยา แบบควบคุมการปลดปล่อย

Utilization of Chitosan Films as Controlled Release Drug Delivery Systems

น้อย เนียมสา¹ มังกร ศรีสะอาด¹ ยอดธง ไบมาก^{1*}

บทคัดย่อ

ไคโตซานเป็นพอลิแซคาไรด์ที่สามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพ และเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต ที่เตรียมโดยการกำจัดหมู่อะซิโตนของไคติน ไม่นานมานี้ได้มีความสนใจในวัสดุที่มีไคโตซานเป็นองค์ประกอบหลัก และการประยุกต์ใช้งานเป็นระบบนำส่งยาแบบควบคุมการปลดปล่อย ทั้งยาที่ละลายน้ำได้ดีและละลายน้ำได้น้อย ฟิล์มไคโตซานที่บรรจุยาถูกเตรียมโดยเทคนิคการระเหยตัวทำละลาย เราจะได้กล่าวถึงการประยุกต์ใช้ฟิล์มไคโตซานเป็นระบบนำส่งยาแบบควบคุมการปลดปล่อย โดยปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อพฤติกรรมของการปลดปล่อยยาจากฟิล์มไคโตซานได้ถูกรายงานและวิจารณ์

Abstract

Chitosan is a biodegradable and biocompatible polysaccharide, prepared by deacetylation of chitin. In recent years, considerable attention has been given to chitosan-based materials and their applications in the field of controlled release drug delivery systems for both highly and poorly water-soluble drugs. The drug-loaded chitosan films were prepared by a solvent evaporation method. We will review the current controlled release drug delivery applications of the chitosan films. Various factors influenced on the drug release behaviors from chitosan films were reported and discussed.

คำสำคัญ: พอลิเมอร์ที่สามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพ ฟิล์มไคโตซาน ระบบนำส่งยาแบบควบคุมการปลดปล่อย

Keywords: Biodegradable polymers, chitosan films, controlled release drug delivery systems

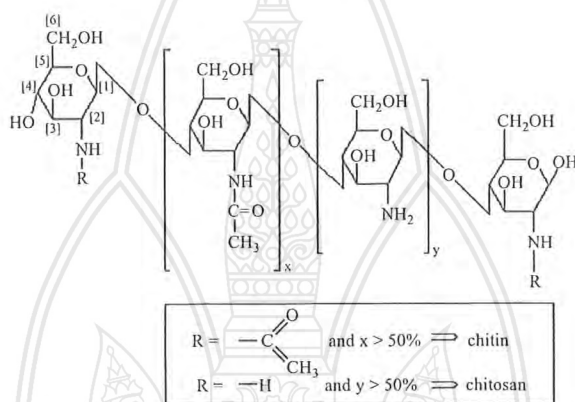
¹ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ต.ขามเรียง อ.เมือง จ.มหาสารคาม 44000

* Corresponding Author, E-mail : yodthong.b@msu.ac.th

บทนำ

ไคโตซาน (chitosan) เป็นพอลิเมอร์ที่สามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพและเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต ไคโตซานเตรียมได้จากไคติน (chitin) โดยการทำให้ปฏิกิริยาคีโอะซิไทลเลชัน (deacetylation) โดยการใช้ด่างเข้มข้น หรือ เอนไซม์ (Ravi Kumar *et al.*, 2004) ไคตินเป็นพอลิเมอร์ที่มีมากในธรรมชาติเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส โดยไคตินเป็นส่วนประกอบของโครงสร้างเปลือกนอกของสัตว์จำพวกแมลง ปู กุ้ง และแกนหมึก เป็นต้น ดังนั้น ไคโตซานที่สามารถเตรียม

ได้จากไคตินจึงจัดเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymers) สำคัญที่มีมากในธรรมชาติอีกชนิดหนึ่ง โครงสร้างทางเคมีของไคตินและไคโตซานแสดงในรูปที่ 1 โดยแกนหลัก (back bone) ของสายโซ่โพลีเมอร์ของไคตินและไคโตซานมีโครงสร้างที่เหมือนกัน แต่แตกต่างกันที่หมู่แทนที่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่สองในวงแหวนไพราโนส คือ หน่วยของไคตินจะมีหมู่แทนที่เป็นหมู่อะเซทาไมด์ (acetamide group, $-\text{NHCOCH}_3$) ขณะที่หน่วยของไคโตซานจะมีหมู่แทนที่เป็นหมู่อะมิโน (amino group, $-\text{NH}_2$)



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของไคตินและไคโตซาน (ที่มาของภาพ Khor and Lim, 2003)

ดังนั้น ไคตินหลังคีโอะซิไทลเลชันจึงเป็นไคพอลิเมอร์ โดยหากมีจำนวนหน่วยที่ซ้ำ กันของไคตินมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จะเรียกไคพอลิเมอร์นั้นว่า ไคติน ในทางกลับกัน หากมีจำนวนหน่วยที่ซ้ำ กันของไคโตซานมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จะเรียกไคพอลิเมอร์นั้นว่า ไคโตซาน ระดับ หรือ เปอร์เซ็นต์การเกิดคีโอะซิไทลเลชัน (%deacetylation, %DD) ซึ่งเป็นระดับของการเปลี่ยนหน่วยไคตินเป็นไคโตซาน เป็นค่าหนึ่งที่ใช้แบ่งเกรดของไคโตซานที่เตรียมได้ นอกเหนือจากค่าน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน

ไคโตซานมีคุณสมบัติหลายอย่างที่เหมาะสมสำหรับนำมาประยุกต์ใช้งานมากกว่าไคติน เช่น สามารถละลายได้ดีกว่า โดยสามารถละลายในสารละลายของกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก และกรด

แลคติก เป็นต้น จึงทำการขึ้นรูปในสภาวะสารละลายได้ง่ายกว่า และมีคุณสมบัติในการต้านจุลชีพ (antimicrobial) ที่ดีกว่า เป็นต้น (Zheng and Zhu, 2003) จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น ไคโตซานจึงมีการศึกษา วิจัย และประยุกต์ใช้งานในด้านต่างๆ มากมาย ได้แก่ ฟิล์มห่อหุ้มอาหาร (food packaging) (Srinivasa *et al.*, 2002) วัสดุเคลือบอาหารที่สามารถรับประทานได้ (edible coating material) (Pliansirichai *et al.*, 2005; Jeon *et al.*, 2002) วัสดุบำบัดน้ำเสีย (waste water treatment material) (Guibal *et al.*, 1994) วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) (Hsu *et al.*, 2004) วัสดุเคลือบอุปกรณ์ศัลยกรรมกระดูก (orthopaedic devices) (Martino *et al.*, 2005) วัสดุปิดบาดแผล (wound dressing) (Wittaya-areekul and Prahsarn, 2006) และ

ระบบนำส่งยาแบบควบคุมการปลดปล่อย (controlled release drug delivery systems) (Ravi Kumar *et al.*, 2004) เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม โคลโคซานเป็นพอลิเมอร์ที่ชอบน้ำ (hydrophilic polymer) ซึ่งมีผลทำให้เกิดการบวมตัว (swelling) เมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ ดังนั้น จึงต้องมีการทำปฏิกิริยาการเชื่อมขวาง (cross-linking) ระหว่างสายโซ่โมเลกุล ทำให้ได้โคลโคซานที่มีโครงสร้างโมเลกุลแบบร่างแห (network) ซึ่งโคลโคซานที่มีโครงสร้างโมเลกุลแบบร่างแหนี้จะมีการบวมตัวที่ลดลง โดยสารที่ทำให้เกิดการเชื่อมขวาง (cross-linking agent) ที่นิยมใช้ ได้แก่ กลูตาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde) (Illum, 1998) และ โซเดียม ซิเตรต (sodium citrate) (Shu *et al.*, 2001) เป็นต้น

ในบทความนี้จะได้กล่าวถึงรายละเอียดในการประยุกต์ใช้โคลโคซานเป็นระบบนำส่งยาแบบควบคุมการปลดปล่อย (controlled release drug delivery systems) ในรูปแบบฟิล์ม

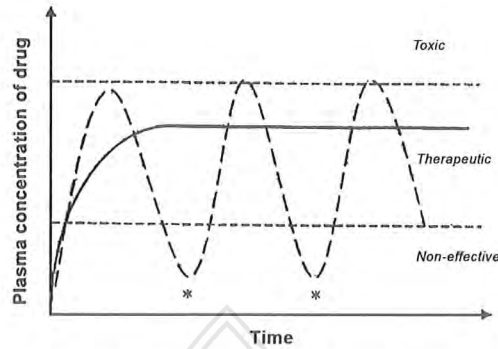
ระบบนำส่งยาแบบควบคุมการปลดปล่อย

การรักษาโรคโดยการให้ยา (drug therapy) โดยทั่วไปแล้วผู้ทำการรักษาจะต้องทำการควบคุมระดับความเข้มข้นของยาในพลาสมาของผู้ป่วย (plasma concentration of drug) ให้มีค่าให้อยู่ในช่วงของการรักษา (therapeutic level) เพื่อให้ยาเกิดผลในการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพราะหากความเข้มข้นของยามีค่ามากกว่าช่วงของการรักษา อาจทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์จากการได้รับยาเกินขนาด และหากความเข้มข้นของยามีค่าต่ำกว่าช่วงของการรักษา จะทำให้ยาไม่มีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องมีการให้ยาแก่ผู้ป่วยหลายๆ ครั้งในการรักษา

โดยความเข้มข้นของยาจะมีความมากขึ้นเมื่อมีการให้ยาในแต่ละครั้ง ซึ่งบางครั้งอาจทำให้มีความเข้มข้นของยามากกว่าช่วงของการรักษา จากนั้นความเข้มข้นของยาจะมีความลดลง ซึ่งบางครั้งอาจมีความต่ำกว่าช่วงของการรักษา โดยการให้ยาแบบดังกล่าว

ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของยาในพลาสมาเป็นแบบฟันเลื่อย ซึ่งแสดงการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของยาที่เป็นแบบฟันเลื่อยได้ดั่งเส้นประ (---) ในรูปที่ 2 ดังนั้น จึงได้มีการพัฒนาระบบนำส่งยาแบบควบคุมการปลดปล่อย (controlled-release drug delivery systems) ซึ่งยาจะค่อยๆ ถูกปลดปล่อยออกมาจากระบบนำส่งยา ทำให้ความเข้มข้นของยามีค่าอยู่ในช่วงของการรักษาตลอดระยะเวลาของการปลดปล่อย โดยแสดงการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของยาได้ดั่งเส้นทึบ (—) ในรูปที่ 2 ซึ่งนอกจากจะเป็นการช่วยลดอาการข้างเคียงที่เกิดจากการได้รับยาเกินขนาดแล้ว ยังเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการบริหารยาด้วย นอกจากนี้ ยาเก่าที่ถูกเลิกใช้เพราะมีอาการข้างเคียงที่รุนแรงอาจได้รับการพัฒนานำกลับมาใช้ในรูปแบบระบบนำส่งยาแบบควบคุมการปลดปล่อยได้อีกด้วย โดยเฉพาะยาที่ละลายน้ำได้น้อย (hydrophobic drugs) ซึ่งมีระยะเวลาอยู่ในร่างกายได้น้อย และถูกกำจัดออกจากร่างกายได้เร็ว นั้น การกักเก็บยาในระบบนำส่งยาที่สามารถป้องกันการถูกกำจัดออกจากร่างกายได้ จะทำให้มีการใช้ยาในการรักษาอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ดังนั้น การวิจัยและพัฒนาาระบบนำส่งยาแบบควบคุมการปลดปล่อยในรูปแบบต่างๆ จะช่วยทำให้การบริหารยาในการรักษามีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

สำหรับหลักการของระบบนำส่งยาแบบควบคุมการปลดปล่อยนั้น ยาถูกหุ้มด้วยพอลิเมอร์ที่สามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพ และ/หรือ พอลิเมอร์ที่สามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตที่มีรูปร่างของระบบนำส่งยาแบบต่างๆ ได้แก่ ฟิล์ม เจล อนุภาคไมโคร และ อนุภาคนาโน เป็นต้น โดยพอลิเมอร์ที่สามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพเป็นพอลิเมอร์ที่มีการศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน เมื่อมีการใช้งาน ยาจะถูกปลดปล่อยออกมาจากระบบนำส่ง 2 ขั้นตอน ตามลำดับ คือ ในขั้นตอนแรกยาถูกปลดปล่อยออกมาโดยการแพร่ออกจากระบบนำส่ง และขั้นตอนที่สองเป็นการปลดปล่อยยาเมื่อเกิดการกักร่อนของระบบนำส่ง (Edlund and Albertsson, 2002b)

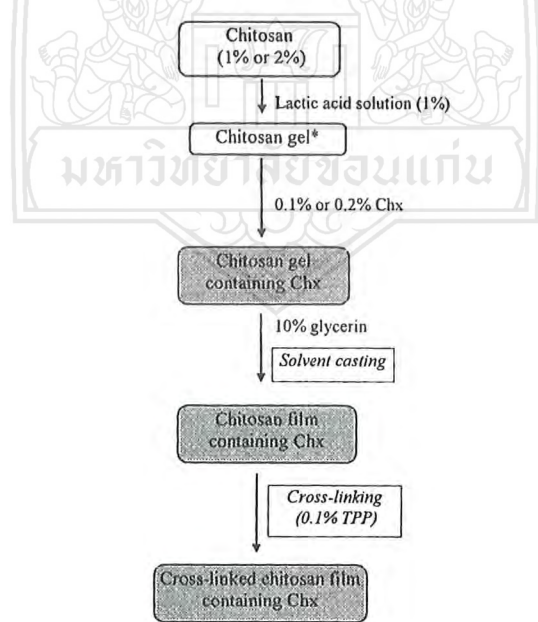


รูปที่ 2 ระดับความเข้มข้นของยาในเลือดผู้ป่วยที่เวลาต่างๆ เมื่อมีการให้ยา (*) ในแต่ละครั้ง (---) กับการให้ยาในรูปแบบควบคุมการปลดปล่อย (ที่มาของภาพ Edlund and Albertsson, 2002a)

ฟิล์มไคโตซานสำหรับนำส่งยาที่ละลายน้ำได้ดี

ฟิล์มไคโตซานสามารถเตรียมได้ด้วยเทคนิคการเคลือบของสารละลาย (solution casting method) พบว่า มีการใช้ฟิล์มไคโตซานบรรจุยาที่ละลายน้ำได้ดีเป็นระบบนำส่งยาแบบเฉพาะที่และควบคุมการปลดปล่อย (local and controlled release drug delivery system) ได้แก่ ยาคลอร์เฮกซิดีน กลูโคเนท (chlorhexidine gluconate, Chx) ที่เป็นยาด้านจุลชีพ ซึ่งมีการใช้เป็นส่วนผสมของน้ำยาบ้วนปาก โดยมีการใช้ฟิล์ม

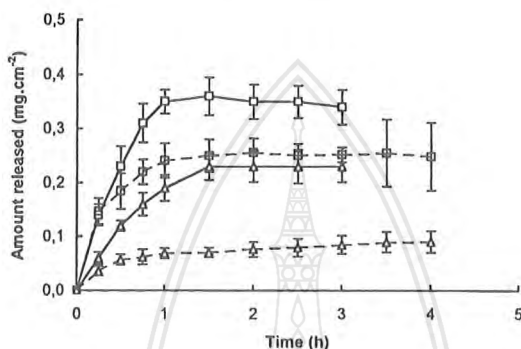
ไคโตซานที่บรรจุยานี้เพื่อวัตถุประสงค์ในการรักษา ร่องลึกปริทันต์ (periodontal pocket) (Senel *et al.*, 2000) โดยทำการละลายยาคลอร์เฮกซิดีน กลูโคเนท ก่อนทำการเตรียมฟิล์ม มีการใช้กลีเซอริน (glycerin) เป็นพลาสติกไซเซอร์ เพื่อให้ฟิล์มมีความยืดหยุ่นมากขึ้น และทำปฏิกิริยาการเชื่อมขวางโมเลกุลของไคโตซานโดยใช้ tripolyphosphate pentasodium salt (TPP) เป็นสารเชื่อมขวาง การเตรียมฟิล์มไคโตซานที่บรรจุยาดังกล่าว แสดงไว้ในรูปที่ 3



รูปที่ 3 การเตรียมฟิล์มไคโตซานที่บรรจุยาคลอร์เฮกซิดีน กลูโคเนท (ที่มาของภาพ Senel *et al.*, 2000)

สำหรับการทดสอบการปลดปล่อยยาคลอร์-
เฮกซิดีน กลูโคเนทจากฟิล์มไคโตซาน ได้มีการทดสอบ
แบบ อิน วิโทร (in vitro) โดยทดสอบการปลดปล่อยยา
ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้ผลการ
ทดสอบ ดังรูปที่ 4 ซึ่งพบว่า ปริมาณการปลดปล่อย

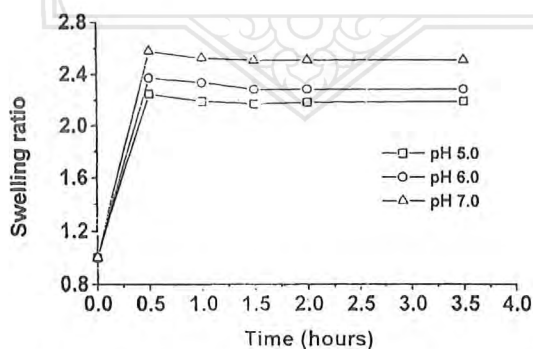
(amount release) ของปริมาณยาต่อพื้นที่ของฟิล์มมีค่า
เพิ่มมากขึ้น เมื่อปริมาณยาที่บรรจุอยู่ในฟิล์มเพิ่มมาก
ขึ้น และอัตราการปลดปล่อยยาก็มีค่าลดลง เมื่อฟิล์ม
ไคโตซานผ่านการเกิดปฏิกิริยาเชื่อมขวาง (Senel *et al.*,
2000)



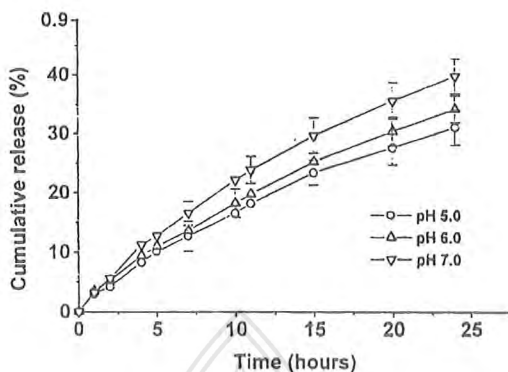
รูปที่ 4 รูปแบบการปลดปล่อยที่เวลาต่างๆ ของยาคลอร์เฮกซิดีน กลูโคเนทจากฟิล์มไคโตซานที่บรรจุยา 0.1% (Δ) และ 0.2% (□) เมื่อเส้นประและเส้นทึบแสดงถึงฟิล์มที่ไม่เกิดการเชื่อมขวางและเกิดการเชื่อมขวางตามลำดับ (ที่มาของภาพ Senel *et al.*, 2000)

การเกิดปฏิกิริยาเชื่อมขวางของโมเลกุลของ
ไคโตซาน พบว่า มีอิทธิพลต่ออัตราการปลดปล่อยยา
เช่นกัน ดังการทำปฏิกิริยาเชื่อมขวางด้วยโซเดียม
ซิทเรตที่มีสภาวะค่าพีเอชต่างๆ พบว่าที่พีเอช 5 โมเลกุล
ของไคโตซานจะเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมขวางในปริมาณ

ที่มากกว่าที่พีเอช 6 และ 7 จึงทำให้ฟิล์มไคโตซาน
มีอัตราการบวม (swelling ratio) ในน้ำที่น้อยกว่า ดัง
รูปที่ 5 ซึ่งอัตราการบวมในน้ำของฟิล์มมีความสัมพันธ์
โดยตรงกับอัตราการปลดปล่อยยาไรโบฟลาวิน (ribo-
flavin) ดังแสดงในรูปที่ 6



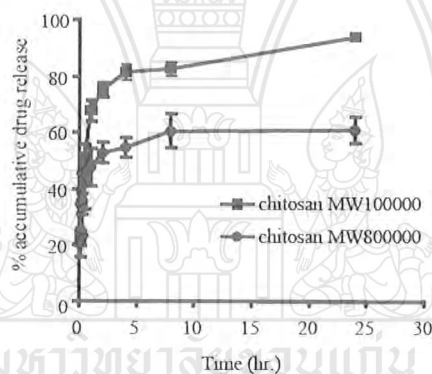
รูปที่ 5 อัตราการบวมของฟิล์มไคโตซานแบบเชื่อมขวางที่บรรจุยาไรโบฟลาวิน ที่เวลาต่างๆ ที่เตรียมโดยมีการ
เกิดปฏิกิริยาการเชื่อมขวางด้วยโซเดียม ซิทเรตที่มีสภาวะพีเอช ต่างๆ (ที่มาของภาพ Shu *et al.*, 2001)



รูปที่ 6 รูปแบบการปลดปล่อยยาโรโบรฟลาวินจากฟิล์มไคโตซานแบบเชื่อมขวาง ที่เวลาต่างๆ ที่เตรียมโดยมีการเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมขวางด้วยไซเตียม ซิเทรตที่มีสภาวะพี เอช ต่างๆ (ที่มาของภาพ Shu *et al.*, 2001)

สำหรับอิทธิพลของน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานที่มีต่ออัตราการปลดปล่อยยาที่ละลายน้ำได้ดี มีการศึกษาโดยใช้ยาเมทิมาโซล (methimazole) ซึ่งเป็นยาที่มีฤทธิ์ในการรักษาไทรอยด์เป็นพิษ พบว่า อัตรา

การปลดปล่อยยาเมทิมาโซลมีค่าลดลง เมื่อน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานที่ใช้เตรียมฟิล์มมีค่ามากขึ้น (Piriyaprasarth *et al.*, 2004) ดังแสดงในรูปที่ 7

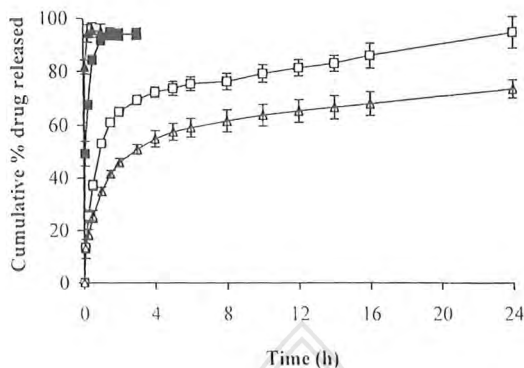


รูปที่ 7 รูปแบบการปลดปล่อยยาเมทิมาโซลจากฟิล์มไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน (ที่มาของภาพ Piriyaprasarth *et al.*, 2004)

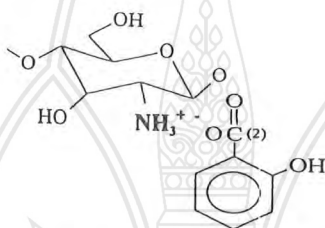
ฟิล์มไคโตซานสำหรับนำส่งยาที่ละลายน้ำได้น้อย

มีการศึกษาอิทธิพลของน้ำหนักโมเลกุลและค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดดีเอสซีเอสของไคโตซานที่มีผลต่ออัตราการปลดปล่อยยาที่ละลายน้ำได้น้อย เช่น กรดซาลิไซลิก (salicylic acid) ซึ่งเป็นยาต้านเชื้อรา (Puttipipatkachorn *et al.*, 2001) วิธีการ คือ ทำการกระจายผลึกยาในสารละลายไคโตซานก่อนการเตรียมฟิล์ม รูปแบบการปลดปล่อยแสดงดังรูปที่ 8 ซึ่ง

พบว่า ฟิล์มไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่มากกว่าจะมีอัตราการปลดปล่อยยาน้อยกว่า เมื่อมีเปอร์เซ็นต์การเกิดดีเอสซีเอส (%DD) เท่ากัน และฟิล์มไคโตซาน ที่มีค่า %DD ที่มากกว่าจะมีอัตราการปลดปล่อยยาน้อยกว่า เมื่อน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน ทั้งนี้เนื่องจากไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและมีค่า %DD มากจะสามารถเกิดพันธะกับโมเลกุลของยาได้ ดังแสดงในรูปที่ 9 ยังถูกปลดปล่อยออกมาได้ช้า



รูปที่ 8 รูปแบบการปลดปล่อยที่เวลาต่างๆ ของกรดชาลิไซคลิก จากฟิล์มไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล (M.W.) และค่า %DD ต่างๆ (■) M.W. 50,000-60,000 และ 82%DD (▲) M.W. 50,000-60,000 และ 100%DD (△) M.W. 800,000-100,000 และ 85%DD และ (○) M.W. 800,000-100,000 และ 100%DD (ที่มาของภาพ Puttipatkhachorn *et al.*, 2001)



รูปที่ 9 การเกิดพันธะระหว่างโมเลกุลของไคโตซานและกรดชาลิไซคลิก (ที่มาของภาพ Puttipatkhachorn *et al.*, 2001)

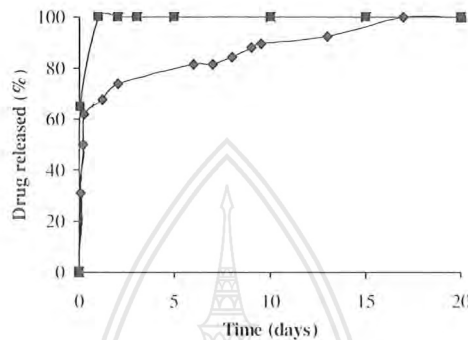
ต่อมายังได้มีการปรับปรุงฟิล์มไคโตซานที่บรรจุยาที่ละลายน้ำได้น้อย เพื่อลดอัตราการปลดปล่อยยา ทำให้ควบคุมการปลดปล่อยยาดูยาวนานขึ้น ในงานวิจัยดังกล่าวนี้ได้ใช้ยาอิพริฟลาโวน (ipriflavone) ซึ่งเป็นยาที่ละลายน้ำได้น้อยที่ใช้ในการรักษาโรคปริทันต์ (Perugini *et al.*, 2003) โดยทำการเปรียบเทียบอัตราการปลดปล่อยยาดังกล่าวจากฟิล์มไคซาน เมื่อทำการบรรจุยาในฟิล์มโดยตรง และทำการบรรจุยาในอนุภาคไมโครของพอลิ (ดี,แอล-แลคไทด์-โค-ไกลโคไลด์) (poly(D,L-lactide-co-glycolide), PDLLG) ที่เป็นพอลิเมอร์ที่สามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพและสามารถเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต (Baimark and Srisa-ard, 2005) ซึ่งอนุภาคไมโครนี้บรรจุอยู่ในฟิล์มไคโตซานอีกที ดังแสดงอนุภาคไมโครในฟิล์มไคโตซานใน

รูปที่ 10 ซึ่งพบว่า อนุภาคไมโครมีขนาดในช่วง 5-15 ไมครอน



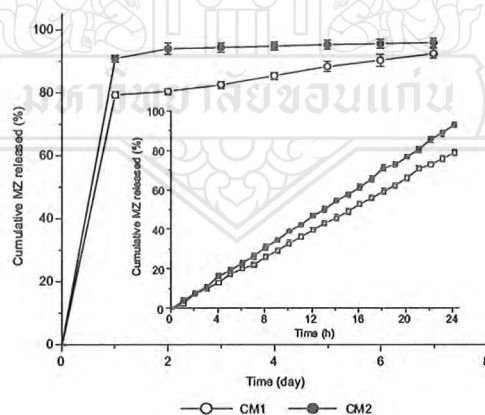
รูปที่ 10 ฟิล์มไคโตซานที่บรรจุอนุภาคไมโครของพอลิ(ดี,แอล-แลคไทด์-โค-ไกลโคไลด์) ที่บรรจุยาอิพริฟลาโวนภายในอนุภาค (ที่มาของภาพ Perugini *et al.*, 2003)

สำหรับรูปแบบการปลดปล่อยยาอิพริฟลาโวน ละลายน้ำได้น้อยนี้มีค่าลดลงเมื่อยาบรรจุอยู่ในอนุภาค ไมโครโคร จากฟิล์มไคโตซานโดยตรงและฟิล์มที่มีอนุภาคไมโครโคร ได้แสดงดังรูปที่ 11 พบว่า อัตราการปลดปล่อยยาที่



รูปที่ 11 รูปแบบการปลดปล่อยยาอิพริฟลาโวนจาก (■) ฟิล์มไคโตซาน และ (◆) ฟิล์มไคโตซานที่บรรจุอนุภาคไมโครโคร (ที่มาของภาพ Perugini *et al.*, 2003)

การเติมพลาสติกไซเซอร์ลงในฟิล์มไคโตซาน ในปริมาณที่แตกต่างกัน พบว่า ยามิโตรนิดาโซลถูก เพื่อให้ฟิล์มมีความอ่อนตัวดีขึ้นนั้น พบว่า มีผลต่อ ปลดปล่อยออกมาจากฟิล์มไคโตซานได้เร็วขึ้น เมื่อ การปลดปล่อยยาจากฟิล์มไคโตซานด้วย (Barat *et al.*, ปริมาณโพรไพลีน ไกลคอล มากขึ้น ทั้งนี้เนื่องมาจาก 2007) รูปที่ 12 แสดงรูปแบบการปลดปล่อยยามิโตร- ฟิล์มไคโตซานมีความชอบน้ำมากขึ้นเมื่อมีการเติม นิดาโซล (metronidazole, MZ) จากฟิล์มไคโตซานที่ พลาสติกไซเซอร์ชนิดนี้ มีการเติมโพรไพลีน ไกลคอล เพื่อเป็นพลาสติกไซเซอร์



รูปที่ 12 อิทธิพลของปริมาณโพรไพลีน ไกลคอล ต่อการปลดปล่อยยามิโตรนิดาโซล เมื่อชุด CM1 และ CM2 เป็นฟิล์มไคโตซานที่บรรจุยามิโตรนิดาโซล ที่มีการเติมโพรไพลีน ไกลคอล ปริมาณ 10% และ 40% โดยมวล ตามลำดับ (ที่มาของภาพ Barat *et al.*, 2007)

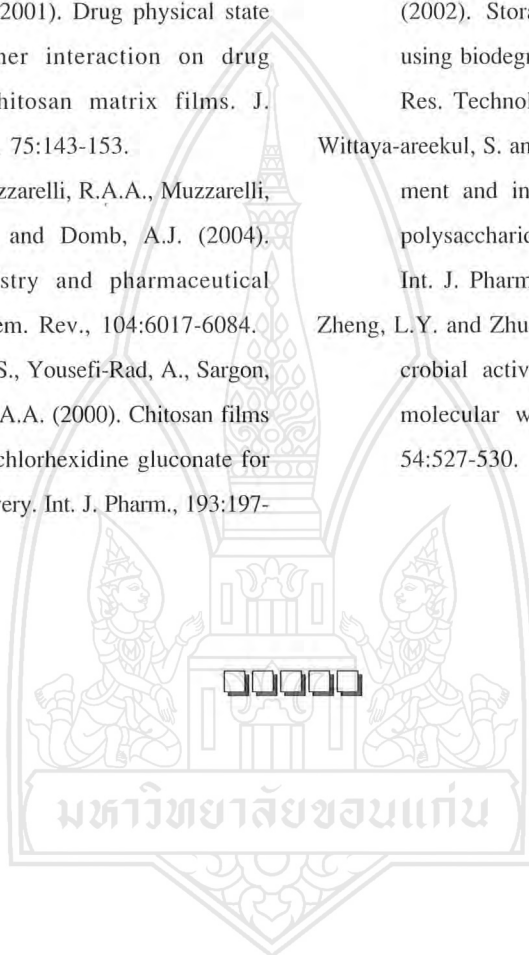
บทสรุป

ฟิล์มไคโตซานมีศักยภาพในการใช้เป็นระบบนำส่งยาแบบควบคุมการปลดปล่อย ทั้งยาที่ละลายน้ำได้ดีและละลายน้ำได้น้อย โดยมีปัจจัยหลายอย่างที่มีส่งผลต่ออัตราการปลดปล่อยยาจากฟิล์มไคโตซาน ได้แก่ น้ำหนักโมเลกุล และ %DD ของไคโตซาน ปริมาณการเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมขวาง ความเข้มข้นของยา การเกิดพันธะระหว่างยาและไคโตซาน การบรรจุยาที่ละลายน้ำได้น้อยในอนุภาคไมโครที่กระจายตัวในฟิล์มไคโตซาน และการเติมพลาสติกไซเซอร์ ดังนั้นการพิจารณาถึงปัจจัยต่างๆ ดังกล่าวเหล่านี้จะสามารถทำให้ออกแบบและเตรียมฟิล์มไคโตซานที่บรรจุยาและสามารถควบคุมอัตราการปลดปล่อยยาสำหรับประยุกต์ใช้ทางเภสัชกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

- Baimark, Y. and Srisa-ard, M. (2005). Synthetic bioabsorbable polyesters for use in medical and pharmaceutical applications. *J. Sci. Technol. Mahasarakham University*, 24:75-83.
- Barat, R., Srinatha, A., Pandit, J.K., Anupurba, S. and Mittal, N. (2007). Chitosan inserts for periodontitis: Influence of drug loading, plasticizer and crosslinking on in vitro metronidazole release. *Acta Pharm.*, 57:469-477.
- Edlund, U. and Albertsson, A.-C. (2002a). Degradable Polymer Microspheres for Controlled Drug Delivery In: *Degradable Aliphatic Polyesters*. Adv. Polym. Sci., Albertsson, A.-C. Ed.; Springer: Berlin, 157: 72.
- Edlund, U. and A. -C. Albertsson, A.-C. (2002b). Degradable Polymer Microspheres for Controlled Drug Delivery In: *Degradable Aliphatic Polyesters*. Adv. Polym. Sci., Alberts-son, A.-C. Ed.; Springer: Berlin, 157: 80.
- Guibal, E., Saucedu, I., Jansson-Charrier, M., Delanghe, B. and Le Cloirec, P. (1994). Uranium and vanadium sorption by chitosan and derivatives. *Water Sci. Technol.*, 30:183-190.
- Hsu, S.-H., Whu, S.W., Tsai, C.L., Wu, Y.-H., Chen, H.-W. and Hsieh, K.-H. (2004). Chitosan scaffold materials: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *J. Polym. Res.*, 11:141-147.
- Illum, L. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm. Res.*, 15:1326-1331.
- Jeon, Y.-J., Kamil, J.Y.V.A. and Shahidi, F. (2002). Chitosan as an edible film for quality preservation of herring and atlantic cod. *J. Agric. Food Chem.*, 50:5167-5678.
- Khor, E. and Lim, L.Y. (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 24:2339-2349.
- Martino, A.D., Sittinger, M. and Risbud, M.V. (2005). Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, 26: 5983-5990.
- Piriaprasarth, S., Nunthanid, J., Daronkaisorn, W., Sae-iao, S., Yuttawat, S., Santithanes, Tangsombutpaiboon, S., Srimornsak, P. and Opanasopit, P. (2004). Study of in vitro release and skin permeation of chitosan films loaded with methimazole for transdermal delivery. *Proceeding in 30th Congress on Science and Technology of Thailand*, 19 - 21 October 2004, Bangkok, Thailand.
- Perugini, P., Genta, I., Conti, B., Modena, T. and Pavanetto, F. (2003). Periodontal delivery of ipriflavone: new chitosan/PLGA film delivery system for a lipophilic drug. *Int. J. Pharm.*, 252:1-9.

- Pliansirichai, M., Khangkhun, P., Tosruksa, K. and Khonyuen, P. (2005). Extending the storage life of the Banana, hom thong (Musa AAA), by using chitosan. *J. Sci. Technol. Mahasarakham University*, 24:13-23.
- Puttipipatkachorn, S., Nunthanid, J., Yamamoto, K. and Peck, G.E. (2001). Drug physical state and drug-polymer interaction on drug release from chitosan matrix films. *J. Control. Release*, 75:143-153.
- Ravi Kumar, N.M.V., Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C., Sashaiw, S. and Domb, A.J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem. Rev.*, 104:6017-6084.
- Senel, S., Ikinici, G., Kas, S., Yousefi-Rad, A., Sargon, M.F. and Hincal, A.A. (2000). Chitosan films and hydrogel of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *Int. J. Pharm.*, 193:197-203.
- Shu, X.Z., Zhu, K.J. and Song, W. (2001). Novel pH-sensitive citrate cross-link chitosan film for drug controlled release. *Int. J. Pharm.*, 212:19-28.
- Srinivasa, P.C., Baskaran, R., Ramesh, M.N., Harish Prashanth, K.V. and Thanranathan, R.N. (2002). Storage studies of mango packed using biodegradable chitosan film. *Eur. Food Res. Technol.*, 215:504-508.
- Wittaya-areekul, S. and Prahsarn, C. (2006). Development and in vitro evaluation of chitosan-polysaccharides composite wound dressings. *Int. J. Pharm.*, 313:123-128.
- Zheng, L.Y. and Zhu, J.-F. (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polym.*, 54:527-530.



พิษแมงป่อง : น่ากลัว หรือ นำใช้ Scorpion Toxin : Dreadful or Applicable

นันทวัน เอื้อวงศ์กุล¹ และ ศักดา ดาดวง^{1*}

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติได้รับความสนใจมาก มีการศึกษา ค้นคว้า วิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากธรรมชาติอย่างกว้างขวาง เพื่อพัฒนาและค้นหาผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีฤทธิ์สูงกว่าปลอดภัยกว่า มีผลข้างเคียงน้อยกว่าที่มีใช้ในปัจจุบัน ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางทรัพยากรธรรมชาติติดอันดับ 1 ใน 10 ของโลก แต่กลับพบว่า การใช้ทรัพยากรมักไม่คุ้มค่าและยั่งยืน ทรัพยากรจำนวนมากสูญหาย สูญพันธุ์ไปทั้งๆ ที่ยังขาดการศึกษา ขณะที่ทรัพยากรคล้ายกันที่มีในท้องถิ่นอื่นกลับมีการศึกษาอย่างลึกซึ้ง จนนำไปสู่การพัฒนามาใช้ ทั้งทางด้านการแพทย์ อุตสาหกรรม และเกษตรกรรม และน้ำพิษของสัตว์ต่างๆ ก็เป็นทรัพยากรธรรมชาติอย่างหนึ่งที่ผู้คนแทบไม่ให้ความสนใจเลย แต่แท้จริงแล้วเป็นหยดมหัศจรรย์ที่มาจากสิ่งมีชีวิตที่บางครั้งมีขนาดเล็กจิ๋ว แต่กลับทำให้นมนุษย์ต้องบาดเจ็บล้มตายมาแล้วมากมาย

น้ำพิษเป็นของเหลวในร่างกายสิ่งมีชีวิต ประกอบด้วยสารชีวโมเลกุลมากมาย มีความเข้มข้นสูง และมีฤทธิ์สูง ในที่นี้จะไม่กล่าวถึงซึ่งเป็นที่ยูจกกันดีถึงพิษงูอันร้ายกาจ แต่จะเน้นถึงน้ำพิษของสัตว์ในกลุ่มแมลง น้ำพิษแมลงบางชนิดรุนแรงอย่างไม่น่าเชื่อ เช่น แมงป่องชนิด *Androctonus australis hector* ในประเทศออสเตรเลีย มีค่า LD₅₀ ในหนูทดลองราว 1.1 มิลลิกรัม

ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (LD₅₀ หรือ lethal dose 50 คือ ปริมาณสารที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง) (Clot-Faybesse และคณะ, 2001) หรือแค่เพียง 70 มิลลิกรัม ก็อาจทำให้นมนุษย์ที่น้ำหนักตัว 70 กิโลกรัมเสียชีวิตได้ หรือน้ำพิษของแมงมุมแม่หมาดำ (*Latrodectus mactans*) ในสหรัฐอเมริกา มีค่า LD₅₀ ในหนูทดลอง 0.26 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (Daly และคณะ, Javascript:popRef('end-a1') Javascript:popRef('end-a2')2001) หรือแค่เพียง 18 มิลลิกรัม ก็ทำให้ชายร่างใหญ่เสียชีวิตได้เช่นกัน หรือถ้าจะให้ใกล้ตัวสักนิด น้ำพิษของมดคันไฟตัวเล็ก ๆ เพียง 1 ตัว ที่มีปริมาตรเพียง 40 นาโนลิตร (1 นาโนลิตร คือ 1 ใน 1,000,000 ของมิลลิลิตร) ก็อาจทำให้เราต้องเจ็บๆ คันๆ ปวดแสบ ปวดร้อนไปได้หลายวันเลยทีเดียว ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ทราบว่า ชีวโมเลกุลเหล่านี้มีฤทธิ์สูงมาก และการศึกษาทางด้านชีวเคมีในเชิงลึกของน้ำพิษของสัตว์ต่างๆ จะช่วยเพิ่มโอกาสของการค้นพบโมเลกุลใหม่ๆ ที่มีฤทธิ์สูง มีความคงตัวดี แล้วนำมาพัฒนาใช้ในทางการแพทย์ อุตสาหกรรม หรืองานอื่นๆ ได้ ซึ่งตัวอย่างที่เด่นชัด ก็ได้แก่ ตัวยา captopril (Koh และคณะ, 2006) ดัดแปลงมาจาก Teprotide (เป็นเปปไทด์ในน้ำพิษของงูอเมริกาใต้ชนิด *Bothrops jararaca*) captopril มีฤทธิ์เป็น angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor

¹ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

* Corresponding Author, E-mail : sakdad@kku.ac.th

ใช้รักษาโรคความดันโลหิตสูง หรือว่าจะเป็น eptibatide ซึ่งเป็น integrin inhibitor ใช้ป้องกันเลือดแข็งตัวในหลอดเลือดในผู้ป่วยโรคหัวใจ แต่ยังมีรายงานการใช้ mellitin จากพิษผึ้ง ซึ่งมีฤทธิ์ antiinflammatory เพื่อรักษาผู้ป่วย rheumatoid arthritis (Hartman และคณะ, 1991) นอกจากนี้ ยังมี charybdotoxin, margatoxin จากแมงป่องชนิดต่าง ๆ ถูกนำมาใช้ในงานวิจัยเกี่ยวกับ ion channel จนทำให้ทราบโครงสร้างของ channel อย่างถ่องแท้ (Garcia และคณะ, 1999) เป็นต้น

ในบทความนี้จะขอล่าเน้นไปที่พิษแมงป่อง เนื่องจากน้ำพิษของแมงป่องมีการศึกษาไว้ค่อนข้างมาก โดยเฉพาะในแมงป่องต่างประเทศ และมีความพยายามในการวิจัยน้ำพิษแมงป่องเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ และด้านอื่น ๆ กันค่อนข้างมาก

แมงป่องเป็นสัตว์พิษชนิดหนึ่งที่มีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง เป็นสัตว์ที่จัดอยู่ในไฟลัม Arthropoda คลาส Scorpionida อันดับ Scorpiones ทั่วโลกมีประมาณ 1,200 ชนิด เป็นสัตว์ที่พบได้ทั่วไปแม้ในทะเลทรายที่ร้อนระอุ น้ำพิษแมงป่องมีไว้เพื่อหาอาหารและป้องกันตัว น้ำพิษประกอบด้วย toxin, เอนไซม์, โปรตีนและสารเคมีหลายชนิด สำหรับ toxin ที่เป็นตัวออกฤทธิ์หลัก คือ neurotoxin ซึ่งมีผลโดยตรงต่อ ion channel ทั้ง 4 ชนิด คือ sodium, potassium, chloride และ calcium channel ส่วนเอนไซม์ที่พบมากได้แก่ hemolytic enzyme ซึ่งมีฤทธิ์ทำลายเม็ดเลือด, proteolytic enzyme มีฤทธิ์ในการสลายโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์ นอกจากนี้ ยังมีเอนไซม์อื่นๆ เช่น phospholipase, nucleotidase เป็นต้น และสารเคมีที่เกี่ยวข้องกับอาการแพ้ เช่น histamine, catecholamine, serotonin, dopamine, noradrenaline, acetylcholine เป็นต้น ผลจาก toxin, เอนไซม์และส่วนประกอบอื่นๆ ในพิษแมงป่องจะทำให้การเกิดตายของเซลล์ ส่งผลให้เกิดการอักเสบ บวมแดงของบริเวณที่ได้รับพิษ หากพิษมีความรุนแรง ก็จะทำให้มีอาการอาเจียน ท้องร่วง ความดันเลือดสูง กล้ามเนื้อกระตุก ชัก หัวใจเต้นช้า เป็น

ลม เป็นอัมพาต จนกระทั่งถึงขั้นโคมา ระบบหัวใจล้มเหลวและเสียชีวิตได้ (Uawonggul และคณะ, 2006; Daduang และ Uawonggul, 2008)

ปัจจุบันมีการศึกษาพิษแมงป่องอย่างกว้างขวาง พบการรายงานถึงพิษแมงป่องในแมมีลิ Buthidae มากที่สุด และมี toxin ที่แยกได้จากพิษแมงป่องชนิดต่างๆ ถึงราว 250 ชนิด พิษแมงป่องถูกนำมาพัฒนาเพื่อใช้ในการแพทย์กันมาก พบรายงานการใช้พิษในการรักษาโรคมะเร็ง, ความผิดปกติของระบบประสาท, ภูมิคุ้มกันบกพร่อง, อาการสูญเสียมวลกระดูกอันเป็นผลมาจากโรคเยื่อหุ้มฟันอักเสบ, มาลาเรีย, การติดเชื้อจากแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส อะมีบา ปรสิตต่างๆ สำหรับโรคมะเร็งนั้น Soroceanu และคณะ (1998) รายงานถึงการนำ Chlorotoxin (CTx) ที่แยกบริสุทธิ์ได้จากแมงป่องชนิด *Leiurus quinquestriatus* ซึ่งมีสมบัติเป็น chloride channel blocker มาใช้เป็น biospecific marker เพื่อการวินิจฉัยผู้ป่วยมะเร็งสมองระยะแรกที่เกิดจากการเจริญเติบโตของเซลล์ glioma ที่ผิดปกติ เซลล์มะเร็งจะมีการแสดงของยีน chloride channel สูงกว่าเซลล์ปกติ และมีการแยกบริสุทธิ์เปปไทด์คล้ายคลึงกับ CTx (CTx-like peptide) จากแมงป่องชนิด *Buthus martensii* พบว่า เปปไทด์ชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ glioma ที่ผิดปกติในหนูทดลองได้ โดยขัดขวางการทำงานของ chloride ion channel (Fu และคณะ, 2007) นอกจากนั้น ยังมีการพัฒนา CTx ร่วมกับอนุภาคนาโนที่ใช้เป็นตัวขนส่งยา (CTx-Bound Superparamagnetic Nanoparticles) เพื่อยับยั้งการขยายตัวและรักษามะเร็ง ซึ่งเมื่อทดสอบกับมะเร็งทรวงอก ถ้าใส่ใหญ่ ผิวหนัง ปอด รังไข่ ต่อมลูกหมาก พบว่า สามารถยับยั้งได้ถึง 98% และทำให้ยาเข้าถึงเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้น (Veisoh และคณะ, 2009) และเนื่องจากความจำเพาะและการออกฤทธิ์ของ toxin ต่อ ion channel ของเซลล์ จึงมีผู้นำพิษแมงป่องมาใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษากลไกและออกแบบยาเพื่อการรักษาโรคที่เกิดจากความผิดปกติของการส่งกระแสประสาท เช่น พาร์กินสัน (Parkinson), อัลไซเมอร์

(Alzheimer), ลมชัก เป็นต้น และ *Buthus martensii* antiepileptic peptide (BmK AEP) ซึ่งส่งผลต่อ sodium channel เป็นเปปไทด์จากพิษแมงป่องชนิดแรกที่มีฤทธิ์ยับยั้งความผิดปกติของการส่งกระแสประสาทดังกล่าว (Wang และคณะ, 2000) นอกจากนี้ยังมีการใช้ toxin ต่างๆ ได้แก่ C119 ที่แยกบริสุทธิ์จาก *Centruroides limpidus limpidus* และ TsTx จาก *Tityus serrulatus* เป็นแบบจำลองในการศึกษาความผิดปกติของ sodium channel ต่ออาการลมชักบางชนิดอีกด้วย (Sandoval และ Lebrun, 2003)

โรคภูมิคุ้มกันทำลายตัวเอง (Autoimmune disease) เกิดจากความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน โดยเกิดการจดจำว่า เซลล์ตนเองเป็นสิ่งแปลกปลอม จึงสร้างแอนติบอดีออกมาต่อต้านและทำลายตนเอง เช่น Systemic Lupus Erythematosus หรือ SLE (หรือที่รู้จักกันดีในนาม “โรคพุ่มพวง”), อาการหนังแข็ง (multiple sclerosis), หลอดเลือดสมองตีบหรือแตก (stroke), หัวใจเต้นผิดปกติ (arrhythmia), หัวใจขาดเลือด (ischemia), ภาวะหยุดหายใจชั่วคราว (apnoea), ภาวะปอดบวมน้ำ (pulmonary oedema) เป็นต้น พบรายงานการใช้พิษแมงป่องเพื่อบำบัดรักษาโรคเหล่านี้ ได้แก่ พิษแมงป่องชนิด *Mesobuthus famulus* (Singh และ Deshpande, 2009), *Androctonus maurertanicus*, *Leiurus quinqueatriatus* และ *Buthus tamulus* (Mirshafiey, 2007) โดยพิษไปขัดขวางการทำงานของ ion channel ของ T cell อย่างไรก็ดีตาม ยังเป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นในสัตว์ทดลองเท่านั้น

สำหรับการใช้พิษแมงป่องในการยับยั้งการสูญเสียมวลกระดูกจากโรคเยื่อหุ้มฟันอักเสบนั้น toxin ที่ใช้คือ Kalitoxin ที่แยกบริสุทธิ์ได้จาก *Androctonus maurertanicus* มีฤทธิ์ขัดขวางการทำงานของ potassium channel พบว่า toxin นี้สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน RANKL ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดการสูญเสียมวลกระดูกชนิด osteoclast และการแสดงออกสูงขึ้นเมื่อมีอาการเยื่อหุ้มฟันอักเสบ จากการศึกษาทดลองในหนูทดลองเป็นเวลา 10 วัน พบว่า การ

สูญเสียมวลกระดูกลดลงถึง 84% (Lund, 2004) อีกทั้งยังพบการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการใช้พิษแมงป่อง *Buthus martensi* ในการยับยั้ง hyperalgesia (อาการไวต่อความเจ็บปวด) ซึ่งอยู่ระหว่างทำการศึกษา (Wang และคณะ, 2000) ส่วนการใช้พิษแมงป่องกับโรคมาลาเรียนั้น Conde และคณะ (2000) รายงานว่า โปรตีน Scorpine ที่แยกบริสุทธิ์ได้จากแมงป่องชนิด *Pandinus imperator* หรือแมงป่องจักรพรรดิในทวีปแอฟริกา มีฤทธิ์เป็น potassium channel blocker สามารถยับยั้งเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium berghei* ในระยะ ookinete และ gamete ได้ ต่อมา Possani และคณะ (2002) นำเอา Scorpine ภายโณให้กับยุงที่เป็นพาหะของโรคมาลาเรีย พบการยับยั้งการพัฒนาของเชื้อมาลาเรียดังกล่าวในยุง ซึ่งนับเป็นการศึกษาด้านแบบเพื่อการกำจัดเชื้อมาลาเรีย เนื่องจาก toxin จำนวนหนึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับ defensin จึงมีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของ toxin อยู่มาก Dai และคณะ (2002) รายงานถึงเปปไทด์ที่แยกได้จากน้ำพิษแมงป่อง *Opisthacanthus madagascariensis* สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus*, *S. saprophyticus*, *Bacillus thuringensis*, *B. subtilis*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นต้น และ Scorpine สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* และ *B. subtilis* ได้ด้วย (Conde และคณะ, 2000) นอกจากนี้ Opiscorpine จากน้ำพิษแมงป่องแอฟริกาชนิด *Opisthophthalmus carinatus* สามารถยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (Zhu และ Tytgat, 2004) และยังพบการยับยั้งปรสิต *Leishmania* ซึ่งก่อให้เกิดโรค leishmaniasis ในมนุษย์ ของพิษแมงป่องชนิด *Tityus discrepans* (Borges และคณะ, 2006) กลไกในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ส่วนมากนี้คาดว่าเกิดเนื่องมาจากพิษทำให้เกิดการเสียสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์หรือผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ (du Plessis และคณะ, 2008) นอกจากนี้ยังพบรายงานถึงการใช้พิษแมงป่องในการพัฒนาเป็นสารกำจัดแมลงเพื่อทดแทนสารเคมีที่ใช้ในปัจจุบันอีกด้วย (Zlotkin และคณะ, 2000; Gurevitz และคณะ, 2007)

ส่วนการศึกษาน้ำพิษแมงป่องในประเทศไทย นั้นยังไม่มีมากนัก แม้ว่าในประเทศไทยพบแมงป่อง ไม่น้อยกว่า 18 ชนิด แต่อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยเกี่ยวกับ พิษแมงป่องรายงานไว้โดย Uawonggul และคณะ (2007) พบว่า พิษแมงป่องช้าง (Giant scorpion หรือ *H. laoticus*, รูปที่ 1) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและ เชื้ออะมีบาได้ แมงป่องชนิดนี้มีขนาดราว 10 เซนติเมตร ลำตัวมีสีดำสนิท พบมากในเขตภาคตะวันออกเฉียง-เหนือของไทย ลาว กัมพูชา และตอนกลางของ เวียดนาม รายงานชิ้นนี้ได้ทำการแยกบริสุทธิ์ toxin ที่มีชื่อว่า Heteroscorpine-1 (HS-1) จากพิษแมงป่องช้าง ด้วย gel filtration และ ion exchange chromatography มีมวลโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight (MALDI-TOF) ราว 8.3 KDa ขึ้นของ HS-1 ประกอบ

ขึ้นจาก 1440 นิวคลีโอไทด์ มี intron คั่นกลางยาวกว่า 1 กิโลเบส เมื่อแปลงเป็นลำดับกรดอะมิโนได้ 95 ตัว ที่ปลาย N มี leading sequence ยาว 19 กรดอะมิโน โพลีเปปไทด์ที่ได้คล้ายคลึงกับ Scorpine ถึง 80% หลังจากทำการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วย วิธี disc diffusion พบว่า HS-1 ยับยั้งการเจริญเติบโต ของ *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus subtilis* ได้ โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ของเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์เมื่อสังเกตภายใต้ scanning electron microscope และ HS-1 ยังมีฤทธิ์ยับยั้ง เชื้ออะมีบา (*Acanthamoeba* spp.) ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรค กระจุกตาอักเสบ โดยทำลายเชื้อในระยะ trophozoite ได้ดีกว่า cyst (Uawonggul และคณะ, ข้อมูลยังไม่ตีพิมพ์) ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการทางการแพทย์ได้ ต่อไป



รูปที่ 1 แมงป่องช้าง (*Heterometrus laoticus*) (จาก ศักดา และเอื้อวงศ์กุล, 2547)

ประเทศของเรามีสัตว์พิษมากมาย นอกจากงู และแมงป่องช้างแล้ว ยังมีสัตว์พิษอื่น เช่น แมงป่อง มดคันไฟ มดตะนอย มดไฟป่า ตะขาบ คอห่านเสือ ต่อหูลุม แตน ผึ้งหลวง ผึ้งมี้ม ผึ้งโพรง แมงหมาล่า แมงกู่ ปลาดุก ปลาแขยง ปลาดุกนา เป็นต้น แต่ก็แทบจะไม่มีข้อมูลใด ๆ ทางชีวเคมีของน้ำพิษ ยิ่งไปกว่านั้น กระแสโลกาภิวัตน์ทำให้เราได้รับเอาสิ่งต่างๆ ที่ ถือกันว่าเป็นความเจริญก้าวหน้าเข้ามามากมาย อันส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตประจำถิ่น มีการกำจัดทิ้งด้วยเหตุ

ว่ามีอันตราย น่ารังเกียจ หรือน่ากลัว การเผาและทำลาย ป่าซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่ จากการเกษตรกรรมแผนใหม่ที่ใช้พื้นที่มากเพื่อเน้นพืชเชิงเดี่ยว รวมทั้งการใช้สารเคมีทางการเกษตร เหล่านี้ล้วนทำให้พืชและสัตว์ดั้งเดิม สูญหายหรือสูญพันธุ์ไปเป็นจำนวนมาก สัตว์พิษเอง ก็ตกอยู่ในสภาพดังกล่าว ดังนั้น งานวิจัยด้านน้ำพิษจึงต้องกระทำอย่างเร่งรีบด้วยเทคโนโลยีสมัยใหม่ จำเป็น ต้องได้รับการสนับสนุนอย่างเพียงพอทั้งทางด้านบุคลากร และงบประมาณ ก่อนที่ทรัพยากรอันมีค่าจะสูญหายไป

ไม่หลงเหลือให้ได้อีกสักอันอีก หรือตกไปอยู่ในมือของนักวิจัยต่างชาติที่ใช้เทคโนโลยีขั้นสูงเข้ามาศึกษาทรัพยากรของเรา แล้วนำข้อมูลไปจดสิทธิบัตร เราเองมักเพิกเฉยในตอนแรก แต่เมื่อใดก็ตามที่สิทธิบัตรดังกล่าวมีมูลค่า มีผลประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ ถึงตอนนั้น ต่อให้ลุกขึ้นมาเรียกร้องคืนด้วยความพยายามสักเท่าใด ทุกอย่างก็คงจะสายเกินไป เช่นดังอดีตที่เกิดขึ้นมาแล้วครั้งแล้วครั้งเล่ากับทรัพยากรในท้องถิ่นบ้านเรา

เอกสารอ้างอิง

- ศักดิ์ดา ดาดวง, นันทวัน เอื้อวงศ์กุล. (2547) แมงป่องช้าง. กรุงเทพฯ. บริษัท โรงพิมพ์กรุงเทพ (1984) จำกัด. 58 หน้า.
- Borges, A., Silva, S., Op den Camp, H. J., Velasco, E., Alvarez, M., Alfonzo, M. J., Jorquera, A., De Sousa, L. and Delgado, O. (2006) In vitro leishmanicidal activity of *Tityus discrepans* scorpion venom. *Parasitol Res.* 99(2): 167-173.
- Clot-Faybesse O, Devaux C, Rochat H, Guieu R. (2001) In vivo neurotoxicity of *Androctonus australis hector* scorpion venom: evidence that the supra-thoracic nervous system is not implicated in the clinical manifestations. *Toxicon.* 39(7),1003-1007.
- Conde, R., Zamudio, F.Z., Rodríguez, M.H. and Possani, L.D. (2000) Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett.* 471: 165-168.
- Daduang, S., Uawonggul, N., (2008) Herbal therapies of snake and insect bites in Thailand, in: Watson, R.R., Preedy, V.R. (Eds.), *Botanicals Medicine in Clinical Practice.* CAB International, Oxford, pp. 814-822.
- Dai, L., Corzo, G., Naoki, H., Andriantsiferana, M. and Nakajima, T. (2002) Purification, structure-function analysis, and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 24, 293(5): 1514-22.
- Daly, F.F., Hill, R.E., Bogdan, G.M., Dart, R.C. [Javascript:popRef\('end-al'\)](#) (2001) Neutralization of *Latrodectus mactans* and *L. hesperus* Venom by Redback Spider (*L. hasseltii*) Antivenom *J Toxicol Clin Toxicol.* 39(2), 119-123.
- du Plessis, L.H., Elgar, D. and du Plessis, J.L. (2008) Southern African scorpion toxins: an overview. *Toxicon.* 51(1): 1-9.
- Fu, Y.J., Yin, L.T., Liang, A.H., Zhang, C.F., Wang, W., Chai, B.F., Yang, J.Y. and Fan, X.J. (2007) Therapeutic potential of chlorotoxin-like neurotoxin from the Chinese scorpion for human gliomas. *Neurosci Lett.* 22, 412(1): 62-67.
- Garcia, M.L., Hanner, M., Knaus, H.G., Slaughter, R., Kaczorowski G.J. (1999) Scorpion toxins as tools for studying potassium channels. *Methods Enzymol.* 294, 624-639.
- Gurevitz, M., Karbat, I., Cohen, L., Ilan, N., Kahn, R., Turkov, M., Stankiewicz, M., Stühmer, W., Dong, K. and Gordon, D. (2007) The insecticidal potential of scorpion β -toxins. *Toxicon.* 49: 473-489.
- Hartman, D.A., Tomchek, L.A., Lugay, J.R., Lewin, A.C., Chau, T.T., Carlson, R.P. (1991) Comparison of antiinflammatory and anti-allergic drugs in the melittin- and D49 PLA2-induced mouse paw edema models. *Agents Actions.* 34(1-2), 84-8.

- Koh, D.C., Armugam, A., Jeyaseelan, K. (2006) Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol Life Sci.* 63(24), 3030-3041.
- Lund, A. E. (2004) Scorpion venom compound inhibits bone loss. *J Am Dent Assoc.* 3: 286-290.
- Mirshafiey, A. (2007) Venom therapy in multiple sclerosis. *Neuropharmacology.* 53(3): 353-361.
- Mortari, M. R., Cunha, A. O., Ferreira, L. B. and dos Santos, W. F. (2007) Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application. *Pharmacol Ther.* 114(2): 171-183.
- Possani, L. D., Corona, M., Zurita, M. and Rodríguez, M. H. (2002) From noxiustoxin to scorpine and possible transgenic mosquitoes resistant to malaria. *Arch Med Res.* 33(4):398-404.
- Sandoval M.R., Lebrun I. (2003) TsTx toxin isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom induces spontaneous recurrent seizures and mossy fiber sprouting. *Epilepsia.* 44(7), 904-911.
- Singh, S. K. and Deshpande, S. B. (2009) Nociceptive vascular reflexes evoked by scorpion venom modulate cardiorespiratory parameters involving vanilloid receptor 1 in anaesthetised rats. *Neurosci Lett.* 27, 451(3): 194-198.
- Soroceanu, L., Gillespie, Y., Khzaeli, M. B. and Sontheimer, H. (1998) Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors. *Cancer Res.* 1, 58(21): 4871-4879.
- Uawonggul, N., Chaveerach, A., Thammasirak, S., Arkaravichien, T., Chuachan, C. and Daduang, S. (2006) Screening of plants acting against *Heterometrus laoticus* scorpion venom activity on fibroblast cell lysis. *J Ethnopharmacol.* 16, 103(2): 201-207.
- Uawonggul, N., Thammasirak, S., Chaveerach, A., Arkaravichien, T., Bunyatratchata, W., Ruangjirachuporn, W., Jearanaiprepame, P., Nakamura, T., Matsuda, M., Kobayashi, M., Hattori, S. and Daduang, S. (2007) Purification and characterization of Heteroscorpine-1 (HS-1) toxin from *Heterometrus laoticus* scorpion venom. *Toxicon.* 49(1): 19-29.
- Veisheh, O., Gunn, J. W., Kievit, F. M., Sun, C., Fang, C., Lee, J. S. and Zhang, M. (2009) Inhibition of tumor-cell invasion with chlorotoxin-bound superparamagnetic nanoparticles. *Small.* 5(2): 256-264.
- Wang, C. Y., Tan, Z. Y., Chen, B., Zhao, Z. Q. and Ji, Y. H. (2000) Antihyperalgesia effect of BmK IT2, a depressant insect-selective scorpion toxin in rat by peripheral administration. *Brain Res Bull.* 53(3):335-338.
- Zhu, S. and Tytgat, J. (2004) The scorpine family of defensins: gene structure, alternative polyadenylation and fold recognition. *Cell Mol Life Sci.* 61(14): 1751-63.
- Zlotkin, E., Fishman, Y. and Elazar, M. (2000) AaIT: from neurotoxin to insecticide. *Biochimie.* 82(9-10): 869-881.



Isolation and Analysis of Antibacterial Substance Produced from *P. aeruginosa* TISTR 781

Kanda Saosoong¹, Wirach Wongphathanakul¹, Chanokporn Poasiri¹
and Chalerm Ruangviriyachai^{1*}

Abstract

Yellow antibiotic can be produced by *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781 when grown in King's A medium. Isolation of this substance was performed by an Amberlite XAD-16 resin column and subsequently purified by solid phase extraction method. The Chromabond® SiOH cartridge was selected for phenazine purification in this study since its surface structure (siloxane bond and silanol group) was suitable for isolation of aromatic heterocyclic hydrocarbon compound from non-aqueous solution. The result of the study was that antibiotic can be isolated into 3 bands as yellow, yellow-green and blue band, respectively. The first yellow band of antibiotic was homogeneous by TLC confirmation with Rf 0.77 and also by HPLC with retention time of 20.4 min. As the study of chemical structure by spectroscopic techniques, isolated yellow antibiotic is 1-hydroxyphenazine. In addition, according to the study of biological property, this yellow antibacterial substance can inhibit some of microorganisms that are *Escherichia coli* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, 1-hydroxyphenazine, solid phase extraction, antibacterial substance

Introduction

Phenazine compounds, one group of bacterial natural products, encompass a large family of heterocyclic nitrogen-containing compound, water soluble, colored compounds and secondary metabolites primarily obtained from soil or marine habitats (Laursen and Nielsen, 2004). Most studies of phenazine bacterial natural products are focused on *Pseudomonas aeruginosa*. This strain produces a

variety of redox active compounds including pyocyanin (PYO), phenazine-1-carboxylic acid (PCA), 1-hydroxyphenazine (1-OH-PHZ) and phenazine-1-carboxamide (PCN) (Chin-A-Woeng et al., 2003). The 1-hydroxyphenazine is a yellow phenazine pigment, low-molecular weight, chloroform soluble and also exhibits as a redox cyclic compound (Ramafi et al., 2000). For the important of 1-hydroxyphenazine, it has an antifungal activity against variety of

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen, 40002

* Corresponding Author, E-mail : chal_ru@kku.ac.th

microorganisms, for example *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*, the risk factor of pulmonary candidiasis (Kerr et al., 1999). Furthermore, the application of modified electrodes and the electrochemical active polymers containing phenazine structure poly(1-hydroxyphenazine) have been studied. The electropolymerization of phenazine in acidic aqueous media was studied on a gold electrode by cyclic quartz crystal microbalance measurements (Puskás and Inzel, 2005). As the reasons for these importance properties, thus, this compound is interested for this study.

For the purification process of bacterial phenazine, solid phase extraction (SPE) method was selected to extract phenazine in this study as the reason of their benefits including rapid isolation, purified extract and reduction in the consumption of organic solvents (Thurman and Mill, 1998). The chemical structure of bacterial phenazine antibiotic was analyzed by spectroscopic techniques including UV, IR, NMR and GC-MS techniques (Brisbane et al., 1987; Kumar et al., 2004). For the important of phenazine antibiotic produced by strains of *Pseudomonas* has activity against a wide range of plant pathogenic fungi and also has antibacterial properties. For example of these properties, phenazine produced by *P. chlororaphis* PCL 1391 can control tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Bolwerk et al., 2003).

In this study, the production, isolation and purification of phenazine from *P. aeruginosa* TISTR 781 was investigated. Especially, Chromabond® SiOH cartridge was selected for purification of phenazine. Furthermore, the chemical structure of phenazine was analyzed by spectroscopic techniques including UV, IR, NMR and GC-MS techniques. Finally, the

antibacterial activity of the phenazine antibiotic from *P. aeruginosa* TISTR 781 was tested with *Escherichia coli* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Materials and methods

Microorganisms

The bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027) was used to investigate the production of phenazine in this study. This bacterium was purchased from the Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR). The commonly tested bacteria that is *Escherichia coli* and the plant pathogenic bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* for the study of biological property studied were kindly contributed from Department of Microbiology, Faculty of Science and Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture from Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand. The stock cultures of all bacteria were maintained on nutrient agar at 4 °C.

The production of phenazine

P. aeruginosa TISTR 781 strain was streaked on Luria-Bertani (LB) agar plates (Hernandez et al., 2004) and incubated at room temperature (~28 °C) for 24 hours. A single colony was picked up and further cultured in King's A (KA) liquid medium (Byng et al., 1977). Batch fermentation performed in 500 mL shaking flasks containing 200 mL of the growth medium, which was shaken on a rotary shaker at 200 rpm at room temperature (~28 °C) for 1 day. For detection of the phenazine compound, the maximum absorption spectrum of the supernatant was scanned by a UV-Visible spectrophotometer in range of 200-500 nm (Ohfuji et al., 2004).

Isolation and purification of phenazine derivatives

After the cultures were incubated for 1 day, the excess amount of NaCl and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ were added into the solution for proteins precipitation. The solution was then adjusted pH to 7.0 with 1 M HCl or 1 M NaOH. The precipitated proteins and residues were removed by filtering through Whatman No. 42 filter paper. Furthermore, the solution was also centrifuged at 3,500 rpm for 15 min to remove smaller particle. The supernatant was slowly applied through an Amberlite XAD-16 resin (Fluka, France) column (55 cm x 5.5 cm, i.d.) (Stead *et al.*, 1996). The XAD resin was washed with large volume of water until the eluate was clear and then the resin was eluted with 70% (v/v) acetonitrile in water. The same color of eluate was collected fractionally, concentrated by evaporation with a low pressure rotary evaporator and then lyophilized with a freeze-dryer equipment to give crude phenazine.

SPE was selected for phenazine purification. The normal phase SPE sorbent that is Chromabond[®] SiOH cartridge, unmodified silica with 60 Å mean pore diameter and 45 µm mean particle size (Macherey-Nagel, Germany) was used in this study. As this procedure, the crude phenazine was dissolved in water, filtered through 0.2 µm filter membrane and extracted with 5% methanol: dichloromethane for 3 times. The lower organic phase was combined and concentrated by using rotary evaporation. Sample solution was then adsorbed on this cartridge that had previously been equilibrated with dichloromethane. And then, eluted with dichloromethane, 5% methanol: dichloromethane and followed by 10% methanol: dichloromethane, respectively. The purity of phenazine was then

determined by TLC (Merck, Germany) using dichloromethane: methanol (1:1, v/v) as a developing solvent. Additionally, for more efficiency of phenazine purity estimation, RP-HPLC was also used under gradient elution using the Waters HPLC system with a C₁₈ reversed phase column. As mobile phase, elution was undertaken on solvent A; water: TFA (HPLC grade, BDH Chemicals, England) (100:0.01, v/v) and solvent B; water: acetonitrile (HPLC grade, LabScan, Ireland): TFA (10:90:0.01, v/v) (Fernández and Pizzarro, 1997). The solvent flow rate was 1 mL min⁻¹ and monitoring at 254 nm with a photodiode array detector.

Analysis of phenazine derivatives

For analysis of phenazine derivatives as isolated, the UV spectra were measured in 0.2 M HCl with an AGILENT 8453 UV-Visible spectrophotometer in 200-500 nm range. The functional groups of each phenazine were measured with KBr disk using a Perkin Elmer Spectrum one FT-IR spectrophotometer recording from 4,000 to 450 cm⁻¹. The KBr was heated in oven at 110°C to remove humidity before used. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Varian Gemini NMR 400 MHz NMR spectrometer using chloroform-*d* (Sigma Chemical Co., USA) as a solvent. GC-MS analysis of the phenazines were undertaken on a Finnigan Polaris Q, Ion Trap mass spectrometer couple with a Trace GC chromatograph and Combi Pal autoinjection for inject GC system. This analysis was performed on a 30-m ZB-5 (5% phenyl-95% dimethyl polysiloxane) capillary column of internal diameter 0.25 mm and 0.25 µm film thickness. All phenazines in dichloromethane were injected into a column oven temperature of 100°C; after 1 min, a temperature ramp of 20°C min⁻¹ increased the column oven temperature

to 280°C. Electron impact (EI) mass spectra (70 eV) of the parent compounds were recorded.

Biological activity test of phenazine

Antimicrobial activity of crude and purified phenazine was preliminary determined by disc diffusion method as Kirby-Bauer standard method with two tested bacterial species including *Escherichia coli* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Briefly, Mueller-Hinton (Oxoid, England) agar plates were prepared, spread with the bacterial suspension in sterile water and then allowed to dryness. The crude and purified phenazine was dissolved in ethanol, soaked with sterile paper disc and allowed to dry. The obtained paper discs were applied to the agar plate and incubated at 35°C or room temperature for 24 hours. The 100 % ethanol was used as the negative control. Finally, the zone of inhibition was measured in mm.

Results and discussion

P. aeruginosa TISTR 781 can grow on LB agar plate after 24 hours and several single colonies were obtained. After the bacterium grown in KA liquid medium at room temperature, the blue-green solution was appeared preliminarily indicating one of phenazine derivatives production that was pyocyanin (blue color). For primarily confirmation of phenazine, the supernatant gave absorption wavelength at 278 and 388 nm in 0.2 M HCl, which consistent with previous reported (Fernández and Pizzarro, 1997).

After isolation of phenazine derivatives using an Amberlite XAD-16 resin column, it was appeared to be 2 bands (dark yellow and blue) on a column and the interested blue fraction was collected. When the eluate was evaporated and

lyophilized, crude phenazine obtained was approximately 1.01 gL⁻¹ bacterial culture. The crude phenazine was purified by SPE method using a Chromabond® SiOH cartridge (Figure 1). It was found that 3 bands isolated appeared on this cartridge as yellow, yellow-green and blue band when eluted with dichloromethane, 5% methanol: dichloromethane and follow by 10% methanol: dichloromethane, which was collected fractionally, as shown in Figure 2.

Especially, according to TLC assessment, two purified phenazines obtained [Figure 2 (a) and (c)] can be generated by a Chromabond® SiOH cartridge as single spot on TLC plate with R_f 0.77 and R_f 0.53, respectively. Additionally, by mean of HPLC analysis, these purified phenazines were homogeneous with retention time of 20.4 min and 12.7 min, respectively, as shown in Figure 3 (b) and (c). The chromatogram of crude phenazine was also illustrated in Figure 3 (a). The mechanism of this sorption is through hydrogen bonding from hydroxyl group of silica and phenazine. As the proximity of the functional group of the surface of the silica gives rise to hydrogen bonding interaction. Hence, Chromabond® SiOH cartridge is a proper sorbent for phenazine purification. In accordance with more efficiency and higher selectivity of this sorbent, thus, a Chromabond® SiOH cartridge was selected and used for this study. Moreover, this solid phase extraction method is simple and requires less consumption of organic solvent.

The first purified yellow pigment isolated from a Chromabond® SiOH cartridge was analyzed by spectroscopic techniques. Its UV spectrum in 0.2 M HCl showed absorbance at 274 and 383 nm (Figure 4). The IR spectrum of this yellow compound with KBr disk showed the following major

absorption bands; 3205, 3040, 1563, 1520, 1116, 760 and 737 cm^{-1} . The data showed that the bacterial compound containing of O-H, C-O and aromatic functional group in molecule. In the ^1H NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3), a complex resonance in the $\delta = 7.30$ to 8.30 region indicated the presence of seven aromatic protons. ^{13}C NMR spectrum (100 MHz CDCl_3) of the compound showed peaks at δ 151.7, 144.1, 143.7, 141.2, 134.7, 131.8, 130.8, 130.5, 129.7, 129.2, 119.9 and 108.2 ppm (data not shown). The compound chromatographed on GC as a single peak with a retention time of 8.45 min; the electron-impact mass spectrum possessed intense ions at m/z 196 and 168 together with a series of less abundant fragments (Figure 5). As the details of the

data, the first purified yellow phenazine isolated from a Chromabond® SiOH cartridge in this study has been identified as 1-hydroxyphenazine which corresponding to the previous reports (Stead *et al.*, 1996, Ohfujii *et al.*, 2004), its structure was shown in Figure 6. The obtained crude and yellow phenazine pigment were tested for an antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. The antibacterial activity was achieved by measuring the zone of inhibition. It was found that crude and yellow phenazine pigment from *P. aeruginosa* TISTR 781 can exhibit as antagonism toward *Escherichia coli* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Figure 7).



Figure 1 The photograph of Chromabond(r) SiOH cartridge used



Figure 2 The solutions isolated from Chromabond® SiOH cartridge, (a) the first yellow band, (b) the second yellow-green band and (c) the third blue band

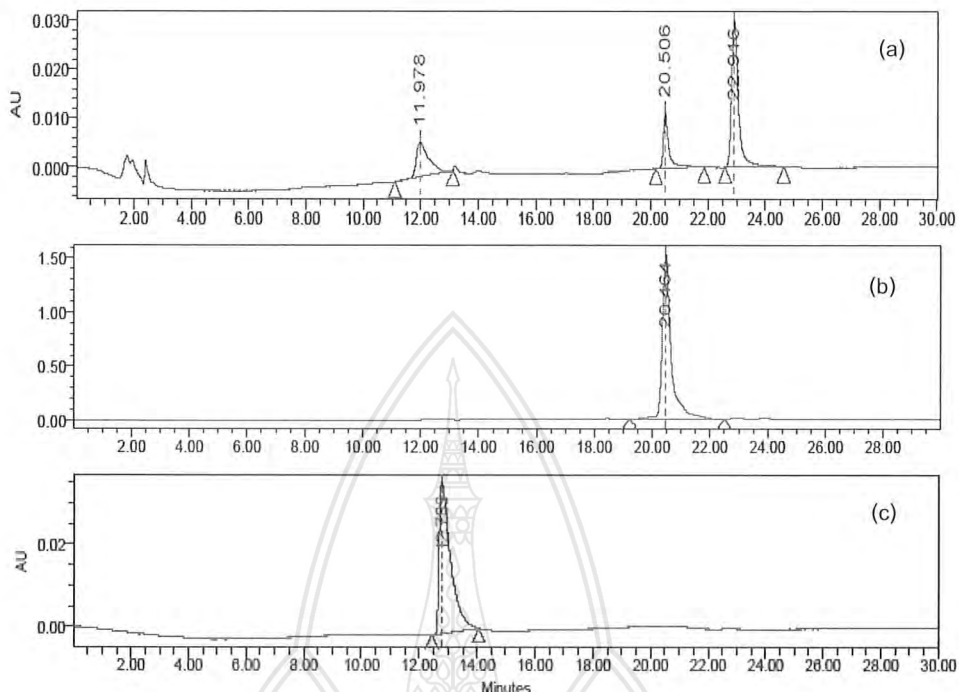


Figure 3 Chromatogram of (a) crude (b) yellow phenazine pigment and (c) blue phenazine pigment

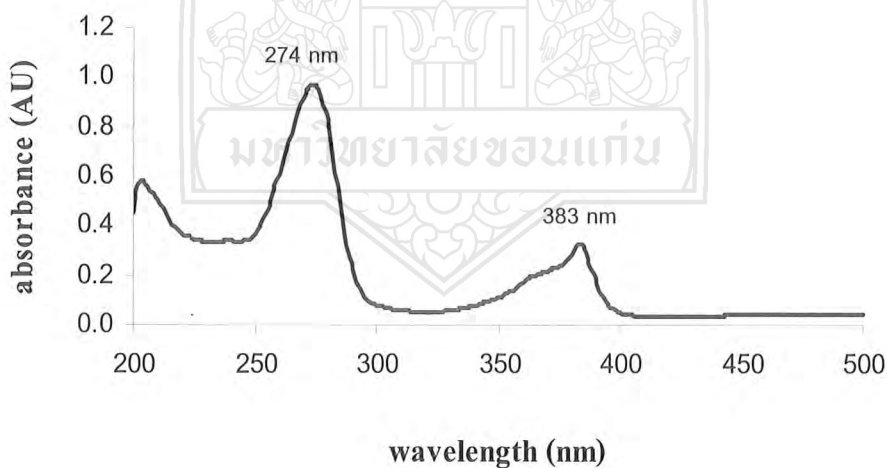


Figure 4 UV absorption spectrum of yellow purified phenazine in 0.2 M HCl (λ_{max} = 274 and 383 nm)

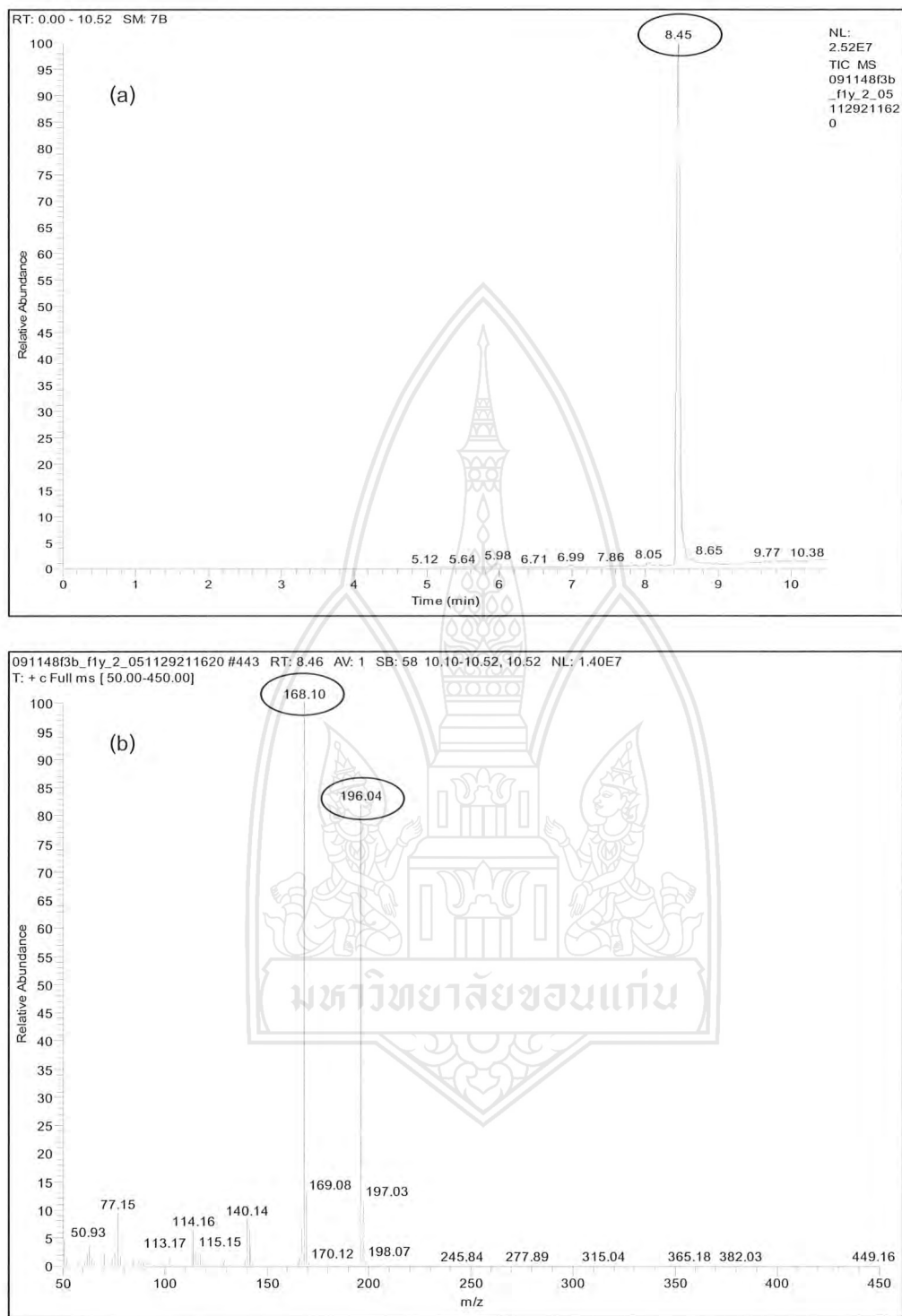


Figure 5 (a) chromatogram (b) mass spectrum of yellow purified phenazine

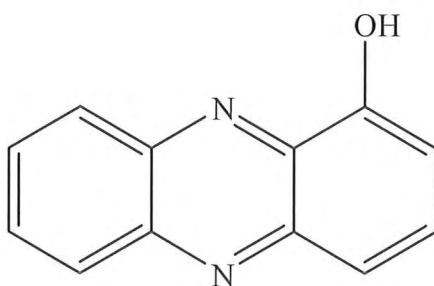


Figure 6 Structure of 1-hydroxyphenazine (Stead *et al.*, 1996; Ohfuji *et al.*, 2004)

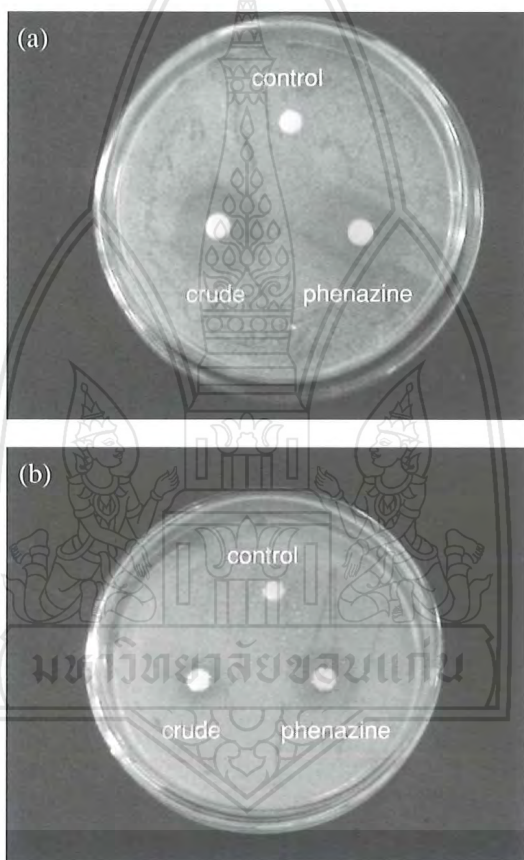


Figure 7 The antibacterial activity of phenazine produced from *P. aeruginosa* TISTR 781 against (a) *Escherichia coli* and (b) *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Conclusions

The yellow phenazine pigment can be produced by *P. aeruginosa* TISTR 781 in KA medium at ambient temperature with vigorous shaking incubation for 24 hours. For firstly confirmation of phenazine, the absorption wavelength of supernatant was at 278 and 388 nm, which indicated that at least one of phenazine derivatives (pyocyanin) can be produced. As phenazine isolation procedure using Amberlite XAD-16 resin, the interested blue solution was acquired in the second fraction and the crude phenazine obtained was approximately 1.01 gL⁻¹ bacterial culture.

In the part of phenazine purification, a Chromabond® SiOH cartridge was investigated in this study since its surface structure was suitable for isolation of aromatic heterocyclic hydrocarbon as phenazine compounds. As the result, 3 bands isolated appeared on the Chromabond® SiOH cartridge when eluting with dichloromethane, 5 % methanol: dichloromethane and 10 % methanol: dichloromethane, respectively. The purity of each fraction was determined by TLC technique using the mixture of methanol: dichloromethane (1:1, v/v) as the developing solvent. It was found that two purified phenazine pigment can be generated as single spot with R_f 0.77 of the first yellow band and R_f 0.53 of the last blue band. In addition, the purity estimation using HPLC analysis, these purified phenazine pigments were also homogeneous with retention time of 20.4 and 12.7 min, respectively. The advantages of phenazine extraction with SPE method in this study are simple, the enormous time saving, purified extracts and reduction in the consumption of organic solvents. Furthermore, based on spectroscopic analysis, the yellow antibiotic isolated from

the Chromabond® SiOH cartridge is identified as 1-hydroxyphenazine. In the study of antibacterial activity test, both crude and purified yellow antibiotic pigment can inhibit *Escherichia coli* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Department of Chemistry and Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University for instruments and experiment facilities. Financial support from the Center for Innovation in Chemistry: Postgraduate Education and Research Program in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education and **Khon Kaen University Research Grant** are also gratefully acknowledged.

References

- Bolwerk, A., Lagopodi, A.L., Wijffjes, A.H.M., Lamers, G.E.M., Chin-A-Woeng, T.F.C., Lugtenberg, B.J.J. and Bloemberg, G.V. (2003). Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Mol. Plant-Microb. Interact. 16: 983-993.
- Brisbane, P.G., Janik, L.J., Tate, M.E. and Warren, R.F.O. (1987). Revised structure for the phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (NRRL B-15132). Antimicrob. Agents Chemother. 31: 1967-1971.
- Byng, G.S., Eustice, D.C. and Jensen, R.A. (1979). Biosynthesis of phenazine pigments in mutant and wild-type cultures of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 138(3): 846-

852.

Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.J.J. (2003). Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist*. 157: 503-523.

Fernández, R.O. and Pizarro, R.A. (1997). High-performance liquid chromatographic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. *J. Chromatogr. A*. 771: 99-104.

Hernandez, M.E., Kappler, A. and Newman, D.K. (2004). Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. *J. Appl. Microbiol.* 70(2): 921-928.

Kerr, J.R., Taylor, G.W., Hoiby, N., Cole, P.J. and Wilson, R. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *J. Clin. Pathol.* 52(5): 385-387.

Kumar, R.S., Ayyadurai, N., Pandiaraja, P., Reddy, A.V., Venkateswarlu, Y., Prakash, O. and Sakthivel, N. (2004). Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. *J. Appl. Microbiol.* 10: 1-10.

Laursen, J.B. and Nielsen, J. (2004). Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. *Chem Rev.* 104: 1663-

1685.

Ohfuji, K., Sato, N., Hamada-Sato, N., Kobayashi, T., Imada, C., Okuma, H. and Watanabe, E. (2004). Construction of a glucose sensor based on a screen-printed electrode and a novel mediator pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosens. Bioelectron.* 19: 1237-1244.

Puskás, Z. and Inzel, G. (2005). Formation and redox transformations of polyphenazine. *Electrochim. Acta*. 50: 1481-1490.

Ramafi, G., Anderson, R., Theron, A.J., Feldman, C., Taylor, G.W., Wilson, R. and Cole, P.J. (2000). CGS 21680, dibutyl cyclic AMP and rolipram attenuate the pro-inflammatory interactions of the *Pseudomonas aeruginosa*-derived pigment, 1-hydroxyphenazine, with human neutrophils. *Pulm Pharmacol Ther.* 13: 293-299.

Stead, P., Rudd, B.A.M., Bradshaw, H., Noble, D. and Dawson, M.J. (1996). Induction of phenazine biosynthesis in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* by L-N-(3-oxohexanoyl) homoserine lactone. *FEMS Microbiol.* 140(1): 15-22.

Thurman, E.M. and Mill, M.S. (1998). *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*. John Wiley & Son, USA, pp. 13-15.



ยีน *matK* และ *trnH-psbA* intergenic spacer ในการนำมาใช้เป็น DNA barcode: การประเมินเบื้องต้นโดยการตรวจสอบความผันแปรภายใน *Alpinia galanga* (L.) Wild.

matK Versus *trnH-psbA* Intergenic Spacer to be used as DNA Barcodes; Preliminary Evaluation by the Assessment of Intraspecific Sequence Variation in *Alpinia galanga*. (L.) Wild.

มัทนา จงกกา¹ ดวงกมล แม้นศิริ^{2*} สุรพล แสนสุข³

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ตรวจสอบความแปรผันของลำดับดีเอ็นเอภายในสปีชีส์ (intraspecific variation) ของดีเอ็นเอ 2 บริเวณ ได้แก่ ยีน *matK* และบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer เพื่อประเมินความเหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เป็น DNA barcode ในการประเมินยีน *matK* นั้นใช้ลำดับดีเอ็นเอจาก *A. galanga* var. *galanga* จำนวน 1 แทกซา (4 ตัวอย่าง) และ *A. assimilis* Ridl. จำนวน 1 แทกซา (1 ตัวอย่าง) ผลการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของยีน *matK* ของทั้ง 5 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าไม่มีความแปรผันของลำดับดีเอ็นเอจาก *A. galanga* var. *galanga* ทั้ง 4 ตัวอย่าง แต่ลำดับดีเอ็นเอจาก *A. assimilis* นั้นแตกต่างจากกลุ่มของ *A. galanga* var. *galanga* โดยมีค่าความแตกต่างเท่ากับ 2.25% ในทางตรงกันข้าม พบว่ามีความผันแปรของลำดับดีเอ็นเอภายในสปีชีส์ของดีเอ็นเอบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer ซึ่งใช้ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของ *A. blepharocalyx* var. *glabrior* (Hand.-Mazz.) T. L. Wu จำนวน 1 แทกซา (2 ตัวอย่าง) และใช้ *A. vittata* Bull. จำนวน 1 แทกซา (1 ตัวอย่าง) เป็น out group ผลการประเมินค่าความแปรผันของลำดับดีเอ็นเอบริเวณนี้ในสปีชีส์ของ *A. blepharocalyx* var. *glabrior* จำนวน 2 ตัวอย่าง พบว่า มีค่าเท่ากับ 0.57% และมีค่าความแปรผันระหว่างสปีชีส์เมื่อเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของ *A. blepharocalyx* var. *glabrior* กับ *A. vittata* เท่ากับ 3.28-3.43% ผลการวิจัยแสดงให้เห็นในขั้นต้นว่า ยีน *matK* อาจมีประสิทธิภาพสูงกว่าบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer ในการใช้เป็น DNA barcode เนื่องจากไม่แสดงความผันแปรภายในสปีชีส์ซึ่งจะทำให้ใช้ในการระบุจัดจำแนกชนิดได้ง่าย อย่างไรก็ตาม คุณสมบัตการไม่มีความผันแปรของลำดับดีเอ็นเอภายในสปีชีส์เดียวกันนี้ ควรได้รับการยืนยันโดยการศึกษาที่มีตัวอย่างจากสปีชีส์เดียวกันและจากต่างสปีชีส์จำนวนมากขึ้น

¹ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

² ศูนย์อนุรักษ์ธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

³ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น วิทยาเขตหนองคาย อ.เมือง จ.หนองคาย 43000

* Corresponding Author , E-mail: duatho@kku.ac.th

Abstract

Intraspecific variation of two DNA regions: *matK* and *trnH-psbA* intergenic spacer were evaluated for their suitability to be used as DNA barcodes. For the evaluation of *matK*, DNA sequences from 1 taxa (4 samples) of *Alpinia galanga* var. *galanga* and 1 taxa (1 sample) of *A. assimilis* Ridl. were analyzed. Comparison of 5 *matK* sequences showed that there was no intraspecific variation of *matK* among four *A. galanga* var. *galanga* taxa, whereas *matK* sequence of *A. assimilis* differed from those of *A. galanga* var. *galanga* taxa for 2.25%. In contrast to the case of *matK*, intraspecific variation was observed in *trnH-psbA* intergenic spacer. Three sequences of *trnH-psbA* intergenic spacer obtained from 1 taxa (2 samples) of *A. blepharocalyx* var. *glabrior* (Hand.-Mazz.) T. L. Wu and 1 taxa (1 sample) of *A. vittata* Bull. as an outgroup were compared. Intraspecific variation between the two taxa of *A. blepharocalyx* var. *glabrior* was determined to be 0.57% and interspecific variation when compared to *trnH-psbA* intergenic spacer of *A. vittata* was 3.28-3.43%. These results preliminary suggest that *matK* gene may have higher potential than *trnH-psbA* intergenic spacer to be used as DNA barcode, especially for *Alpinia*, to due the absence of intraspecific variation which should lead to simple species identification based on its sequence. Nonetheless, this uniformity of *matK* gene sequence within species is yet to be confirmed by the analysis of sequences from more samples of the same species as well as samples from other species.

คำสำคัญ: พืชสกุลข่า, interspecific variation, intraspecific variation, *matK*, *trnH-psbA* intergenic spacer

Keywords: *Alpinia* Roxb., interspecific variation, intraspecific variation, *matK*, *trnH-psbA* intergenic spacer

บทนำ

นักวิทยาศาสตร์ได้จัดจำแนกสิ่งมีชีวิตบนโลกนี้ด้วยวิธีการต่างๆ เพื่อตรวจสอบและระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต การระบุและจำแนกสิ่งมีชีวิตจะใช้ลักษณะทางสัณฐาน และกายวิภาคเป็นส่วนใหญ่ จนมาถึงยุคปัจจุบันข้อมูลเหล่านี้ก็ยังใช้ได้เป็นอย่างดี แต่เนื่องจากการระบุและจำแนกสิ่งมีชีวิตต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในสิ่งมีชีวิตกลุ่มนั้นๆ จึงจะสามารถระบุและจำแนกได้อย่างถูกต้อง ผู้ที่ไม่ตระหนักในความสำคัญของการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตให้ถูกต้อง อาจละเลยที่จะพยายามสอบถามจากผู้เชี่ยวชาญ ทำให้มีการระบุชนิดผิดพลาดไม่ว่าจะเป็นการระบุสิ่งมีชีวิตคนละชนิดที่มีความคล้ายคลึงกันเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน หรือการระบุสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันเป็นคนละชนิด เนื่องจากมีความแปรผันของลักษณะทำให้ดูแตกต่างกัน

นักวิทยาศาสตร์จึงได้มีแนวคิดในการใช้ลำดับดีเอ็นเอในการระบุชนิดสิ่งมีชีวิต โดยเทคนิคที่เรียกว่า

การทำ DNA barcoding ซึ่งหมายถึง การใช้ลำดับดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 800 bp ในดีเอ็นเอบริเวณที่มีวิวัฒนาการในระดับที่เหมาะสมและเพียงพอจนเกิดความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอที่ทำให้แยกแยะสปีชีส์ที่ต่างกันได้ในขณะเดียวกันดีเอ็นเอบริเวณนี้ควรมีความต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตในสปีชีส์เดียวกันต่ำ เพื่อแสดงเอกลักษณ์หรือเป็น DNA barcode สำหรับระบุชนิดสิ่งมีชีวิต ถึงแม้กรอบแนวคิดเรื่องการใช้ดีเอ็นเอในการระบุชนิดพืชจะไม่ใช่เรื่องที่เพิ่งถูกกล่าวถึง และได้มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับเรื่องนี้จำนวนมาก ตัวอย่างเช่น ในปี ค.ศ 1994 Liu และ Schardl ได้พบจำนวนซ้ำของลำดับดีเอ็นเอ (n=4-7) ภายในบริเวณ ITS1 ของพืชดอก ซึ่งความแตกต่างที่พบนั้นนำมาใช้ในการระบุชนิดและจัดจำแนกพืชดอกได้ แต่การใช้ดีเอ็นเอบริเวณใดบริเวณหนึ่งเป็นมาตรฐานในการระบุชนิดสิ่งมีชีวิต หรือ DNA barcode ซึ่งเป็นแนวคิดที่เจาะจงมากขึ้นนี้ มีจุดเริ่มต้นสำคัญจากความสำเร็จในการทดลองใช้

ลำดับดีเอ็นเอในยีน Cytochrome C oxidase I (COI) ในการระบุชนิดสัตว์ (Hebert *et al.*, 2003) ความสำเร็จดังกล่าวนำมาซึ่งความเชื่อมั่นในศักยภาพของลำดับดีเอ็นเอของยีน COI ในการระบุชนิดสิ่งมีชีวิต โดยคณะผู้วิจัยได้เสนอว่า ยีน COI มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็น DNA barcode นักวิจัยจากกลุ่มวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องควรร่วมมือกันในการรวบรวมและจัดทำฐานข้อมูลของลำดับดีเอ็นเอในยีน COI จากสัตว์ชนิดต่างๆ ไปพร้อมกับการหาวิธีมาตรฐานสำหรับใช้ประโยชน์จากฐานข้อมูลนี้ในการระบุชนิดของสัตว์ต่อไป แนวคิดเรื่อง DNA barcode ได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์จนถึงปัจจุบันได้เกิดความร่วมมือในระดับนานาชาติ โดยการจัดตั้งองค์กรต่างๆ เช่น The Consortium for the Barcode of Life (CBOL), Canadian Centre for DNA Barcoding, Global Biodiversity Information Facility (GBIF) ทำงานในการรวบรวมและปรับปรุงวิธีการในการใช้ DNA barcode สำหรับการระบุสิ่งมีชีวิตหลายกลุ่ม ซึ่งค่อนข้างประสบความสำเร็จในกลุ่มสัตว์ (Hebert *et al.*, 2003) แต่สำหรับกลุ่มพืชนั้นยังคงถือว่าอยู่ในขั้นตอนการทดสอบหาวิธีการที่เหมาะสม เนื่องจากยีน COI ในพืชมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการที่ช้ากว่าสัตว์มาก จึงไม่มีความแตกต่างของลำดับที่เพียงพอสำหรับจำแนกชนิดพืช (Kress *et al.*, 2005)

ความก้าวหน้าของการทำ DNA barcoding ในพืช กล่าวได้ว่าอยู่ในช่วงของการหาบริเวณที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็น DNA barcode โดยนักวิทยาศาสตร์ได้มุ่งความสนใจไปที่ดีเอ็นเอในพลาสติด ซึ่งน่าจะมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการที่เพียงพอจะทำให้เกิดความแตกต่างของลำดับ ทำให้สามารถจำแนกพืชคนละชนิดออกจากกันได้ จากการศึกษาดีเอ็นเอในพลาสติด 9 บริเวณ ร่วมกับดีเอ็นเอบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) จากนิวคลีอัส พบว่า *trnH-psbA* intergenic spacer แสดงศักยภาพของการเป็นดีเอ็นเอบริเวณที่อาจเป็น DNA barcode ได้ เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีความแตกต่างระหว่างชนิดของพืชในสกุลต่างๆ ที่ใช้ทดสอบ

เป็นส่วนใหญ่ และยังเป็นบริเวณที่สามารถเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction) ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุดเมื่อเทียบกับบริเวณอื่นๆ และยังมีขนาดที่ไม่ยาวเกินไป (204-645 คู่เบส) อีกด้วย (Kress *et al.*, 2005)

ข้อมูลล่าสุดจากการประชุมโดยนักวิทยาศาสตร์จาก Royal Botanic Gardens, Kew, The National Museum of Natural History และ Canadian Centre for DNA Barcoding ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2550 ซึ่งจัดที่ New York Botanical Garden ได้ระบุไว้ว่า ดีเอ็นเอในพลาสติดบริเวณ *matK*, *rpoC1*, *rpoB* และ *trnH-psbA* intergenic spacer น่าจะเป็นบริเวณที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็น DNA barcode ในการระบุชนิดพืช (<http://www.kew.org/barcoding/update.html>)

จากการทบทวนงานวิจัยที่มีมาก่อน ทำให้ผู้วิจัยเล็งเห็นว่า การประเมินดีเอ็นเอบริเวณหนึ่งๆ ว่ามีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็น DNA barcode หรือไม่ ควรเริ่มต้นจากการประเมินระดับความแปรผันของลำดับดีเอ็นเอบริเวณนั้นภายในสปีชีส์ (intraspecific variation) และความผันแปรระหว่างสปีชีส์ (interspecific variation) โดยดีเอ็นเอบริเวณที่จะทำการศึกษาได้แก่ *matK* และ *trnH-psbA* intergenic spacer ซึ่งทั้งสองบริเวณนี้เป็นบริเวณที่ถูกเสนอให้อยู่ในกลุ่มดีเอ็นเอที่อาจมีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็น DNA barcode สำหรับการระบุชนิดพืช

พืชที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ พืชสกุล *Alpinia* จำนวน 4 ชนิด คือ *A. galanga* var. *galanga*, *A. assimilis*, *A. blepharocalyx* var. *glabrior* และ *A. vittata* เพื่อประเมินว่า ดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวภายในชนิดเดียวกันและต่างชนิดกันมีความเหมือนหรือต่างกันหรือไม่ และหากแตกต่างกัน ความแตกต่างนั้นอยู่ในระดับใด โดยดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการใช้เป็น DNA barcode คือ ดีเอ็นเอบริเวณที่มีความแปรผันภายในสปีชีส์ต่ำ แต่มีความแปรผันระหว่างสปีชีส์ที่ชัดเจน

วิธีการศึกษา

1. การเก็บตัวอย่างพืช

สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชสกุล *Alpinia* (ตารางที่ 1) จากนั้นตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ แล้วจัดทำเป็นตัวอย่างเป็นพันธุ์ไม้แห้งเก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์พืชภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เก็บตัวอย่างใบสดสำหรับสกัดดีเอ็นเอห่อในแผ่นอลูมิเนียม ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนถึงเวลาใช้งาน

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *matK* และบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction)

นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพืชตัวอย่างโดยใช้วิธีดัดแปลงของ Doyle & Doyle (1987) เป็นต้นแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *matK* และบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer โดยใช้ไพรเมอร์ *matKF* และ *matKR* สำหรับการทำพีซีอาร์บริเวณยีน *matK* และใช้ไพรเมอร์ *trnH-psbAF* และ *trnH-psbAR* สำหรับการทำพีซีอาร์บริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer (ตารางที่ 2) ส่วนประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ได้แก่

genomic DNA 20-40 ng, 10x buffer, $MgCl_2$ 2.5 mM, dNTP 0.2 mM, ไพรเมอร์แต่ละชนิด 0.5 μM และ Taq DNA polymerase 1 unit ขั้นตอนปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน *matK* เริ่มจาก pre-denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดยทั้ง 3 ขั้นตอนทำซ้ำเป็นจำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอนสุดท้ายคือ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที และบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer เริ่มจาก pre-denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที โดยทั้ง 3 ขั้นตอนทำซ้ำเป็นจำนวน 35 รอบ และสิ้นสุดด้วย final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบผลปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5% เทียบกับ 100 bp DNA marker

ตารางที่ 1 จำนวนและสถานที่เก็บตัวอย่างพืช

ดีเอ็นเอ	ชนิดพืช	ตัวอย่างที่	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ภาค	เลขอ้างอิง
<i>matK</i>	<i>A. galanga</i> var. <i>galanga</i>	1	อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จ.เพชรบูรณ์	เหนือ	<i>D. Maensiri</i> 10 (KKU)
		2	อำเภอนาแห้ว จ.เลย	ตะวันออกเฉียงเหนือ	<i>S. Saensouk</i> 62 (KKU)
		3	อำเภอกู่เรือ จ.เลย	ตะวันออกเฉียงเหนือ	<i>S. Saensouk</i> 87 (KKU)
		4	น้ำตกตาดโฒะ จ.ตรัง	ใต้	<i>D. Maensiri</i> 19 (KKU)
	<i>A. assimilis</i>	5	จ.ชลบุรี	ตะวันออก	<i>S. Saensouk</i> 83 (KKU)
<i>trnH-psbA</i> intergenic spacer	<i>A. blepharocalyx</i> var. <i>glabrior</i>	1	อำเภอนาแห้ว จ.เลย	ตะวันออกเฉียงเหนือ	<i>S. Saensouk</i> 88 (KKU)
		2	อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จ.เพชรบูรณ์	เหนือ	<i>D. Maensiri</i> 4 (KKU)
	<i>A. vittata</i>	3	มหาวิทยาลัยขอนแก่น วิทยาเขตหนองคาย จ.หนองคาย	ตะวันออกเฉียงเหนือ	<i>D. Maensiri</i> 14 (KKU)

ตารางที่ 2 ลำดับดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

ไพรเมอร์	ลำดับดีเอ็นเอ
<i>matKF</i>	5' CCTATCCATCTGGAAATCTTAG 3_
<i>matKR</i>	5' GTTCTAGCACAAAGAAAGTCG 3_
<i>trnH-psbAF</i>	5' ACTGCCTTGATCCACTTGGC 3_
<i>trnH-psbAR</i>	5' CGAAGCTCCATCTACAAATGG 3_

3. การหาลำดับดีเอ็นเอของยีน *matK* และบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับที่สถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี

4. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอ

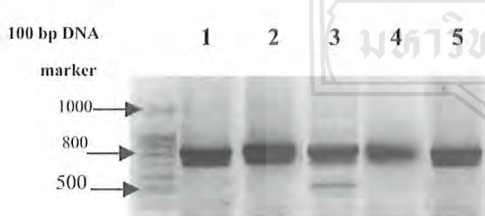
วิเคราะห์ผลลำดับดีเอ็นเอที่ได้ด้วยโปรแกรม blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อยืนยันว่าเป็นลำดับดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการ แล้วทำการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอแต่ละบริเวณในพืชแต่ละชนิดด้วยโปรแกรม ClustalW2 จาก <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/> เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับดีเอ็นเอแต่ละบริเวณภายในสปีชีส์ และระหว่างสปีชีส์ของพืชตัวอย่าง จากนั้นนำข้อมูล

มาสร้างแผนโคโรแกรม เพื่อศึกษาการจัดกลุ่มตามข้อมูลของลำดับดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม NTSYS version 2.10

ผลการศึกษา

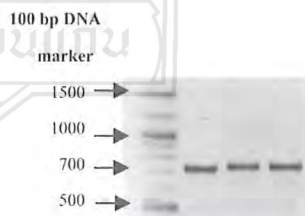
1. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน *matK* และบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้ผลผลิตที่มีขนาด 800 bp และ 750 bp จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน *matK* และบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer ตามลำดับ (ภาพที่ 1 และภาพที่ 2) ซึ่งมีขนาดสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีมาก่อน (Techaprasan *et al.*, 2006 และ Samuel *et al.*, 2006) หลังจากนั้นส่งผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอต่อไป



ภาพที่ 1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *matK* ของพืช 5 ตัวอย่าง

- 1 = *A. galanga* var. *galanga* (น้ำหนาว)
- 2 = *A. galanga* var. *galanga* (นาเห้ว)
- 3 = *A. galanga* var. *galanga* (ญี่เหว)
- 4 = *A. galanga* var. *galanga* (ตรัง)
- 5 = *A. assimilis* (ชลบุรี)



ภาพที่ 2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer ของพืช 3 ตัวอย่าง

- 1 = *A. blepharocalyx* var. *glabrior* (นาเห้ว)
- 2 = *A. blepharocalyx* var. *glabrior* (น้ำหนาว)
- 3 = *A. vittata* (หนองคาย)

2. ลำดับดีเอ็นเอของยีน *matK* และบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer

ได้ลำดับดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์หาลำดับของ ยีน *matK* ประมาณ 800 bp ในทุกตัวอย่าง และบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer ประมาณ 750 bp ใน ทุกตัวอย่างเช่นเดียวกัน เพื่อความถูกต้องของข้อมูล ได้นำข้อมูลลำดับดีเอ็นเอจากทั้งสองสายในแต่ละ ตัวอย่างมาเปรียบเทียบกัน พบว่า มีความสอดคล้อง ของข้อมูลทุกชุด คือ ลำดับดีเอ็นเอจากทั้งสองสายมี ลำดับที่เหมือนกัน

3. ความผันแปรของลำดับดีเอ็นเอยีน *matK* และบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer

ยืนยันข้อมูลลำดับดีเอ็นเอว่าเป็นลำดับของยีน *matK* หรือบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer ด้วย โปรแกรม *blastn* เพื่อยืนยันว่าเป็นบริเวณดังกล่าว พบว่า ทุกข้อมูล คือ ลำดับดีเอ็นเอที่ต้องการจริง ดัง แสดงในตารางที่ 3 ซึ่งแสดง Accession number ของ ข้อมูลจากฐานข้อมูลที่มีจำนวนลำดับดีเอ็นเอเหมือนกับ ข้อมูลที่ได้จากรายงานวิจัยนี้มากที่สุด รวมถึงแสดง เปอร์เซ็นต์ของลำดับดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างดีเอ็นเอ จากฐานข้อมูลและดีเอ็นเอจากงานวิจัยในแต่ละคู่ด้วย

จากนั้นวิเคราะห์หาตำแหน่งที่แตกต่างของลำดับดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม *ClustalW2* เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ ทางพันธุกรรมและความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอของ ดีเอ็นเอทั้งสองบริเวณของพืชตัวอย่าง ผลจากการ วิเคราะห์ พบว่า พืชชนิด *A. galanga* var. *galanga* ทุก ตัวอย่างมีลำดับดีเอ็นเอของยีน *matK* เหมือนกันตั้งแต่ ลำดับที่ 1 ถึง 802 แต่ใน *A. assimilis* นั้นมีลำดับ ดีเอ็นเอที่แตกต่างจากตัวอย่างอื่นทั้งหมด 18 ตำแหน่ง (ภาพที่ 3) และทุกตำแหน่งที่แสดงความแตกต่างเป็น ความแตกต่างที่สามารถแยก *A. galanga* var. *galanga* ออกจาก *A. assimilis* ได้ทั้งสิ้น ลำดับที่แปรผันทั้งหมด จึงจัดเป็นความผันแปรระหว่างสปีชีส์ (*interspecific variation*) ส่วนผลจากการวิเคราะห์บริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer นั้น (ภาพที่ 4) พบว่า มีความแตก- ต่างในตำแหน่งต่างๆ กันทั้งหมด 26 ตำแหน่ง แต่มี เพียงบางตำแหน่งเท่านั้นที่อาจมีประโยชน์ในการใช้ จำแนกชนิด เนื่องจากความแตกต่างทั้ง 26 ตำแหน่ง มีเพียง 22 ตำแหน่ง ที่เป็นการแปรผันระหว่างสปีชีส์ ซึ่งไม่พบว่าแตกต่างกันภายในกลุ่มสปีชีส์ของ *A. blepharocalyx* var. *glabrior*

ตารางที่ 3 ผลการยืนยันข้อมูลลำดับดีเอ็นเอว่าเป็นลำดับของยีน *matK* หรือบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer

ดีเอ็นเอ	ตัวอย่างพืช	Accession number ของ ลำดับดีเอ็นเอจากฐานข้อมูล	คำอธิบายข้อมูลดีเอ็นเอในฐานข้อมูล	% ความเหมือน
<i>matK</i>	<i>A. galanga</i> var. <i>galanga</i> 1-4	AF478815	<i>Alpinia galanga</i> tRNA-Lys (<i>trnK</i>) gene, intron; and maturase K (<i>matK</i>) gene, complete cds; chloroplast genes for chloroplast product	99%
	<i>A. assimilis</i> 5	AF478810	<i>Alpinia calcarata</i> tRNA-Lys (<i>trnK</i>) gene, intron; and maturase K (<i>matK</i>) gene, complete cds; chloroplast genes for chloroplast products	99%
<i>trnH-psbA</i> intergenic spacer	<i>A. blepharocalyx</i> var. <i>glabrior</i> 1-2	EU552529	<i>Alpinia officinarum</i> isolate D30 <i>PsbA</i> (<i>psbA</i>) gene, partial cds; <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer, complete sequence; tRNA-His (<i>trnH</i>) gene, partial sequence; and ribosomal protein S19 gene, complete cds; chloroplast	96%
	<i>A. vittata</i> 3			97%

เพื่อทดสอบการจำแนกตัวอย่างพืชแต่ละชนิด โดยอาศัยลำดับดีเอ็นเอจากทั้งสองบริเวณที่ศึกษานอกเหนือจากการเรียงเทียบเพื่อแสดงความผันแปรของลำดับแล้วได้ทำการสร้างเดนโดรแกรม โดยใช้โปรแกรม NTSYS version 2.10 สำหรับยีน *matK* ผลจากการหาค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง (Similarity Coefficient) (ตารางที่ 4) จะเห็นได้ว่า *A. galanga* var. *galanga* น้ำหนั 1 *A. galanga* var. *galanga* นาแก้ว 2 *A. galanga* var. *galanga* ภูเรือ 3 และ *A. galanga* var. *galanga* ตรัง 4 มีค่าความเหมือนเมื่อเทียบแต่ละชนิดเท่ากับ 1 แต่ *A. assimilis* มีค่าความเหมือนเมื่อเทียบกับ *A. galanga* var. *galanga* เท่ากับ 9.77 ผลจากการทำเดนโดรแกรม (ภาพที่ 5) สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบไปด้วย *A. galanga* var. *galanga* น้ำหนั 1 *A. galanga* var. *galanga* นาแก้ว 2 *A. galanga* var. *galanga* ภูเรือ 3 และ *A. galanga* var. *galanga* ตรัง 4 และกลุ่มที่ 2 มีตัวอย่างเดียว คือ *A. assimilis* กับ ส่วนบริเวณ *trnH*-

psbA Intergenic spacer ผลจากการทำ Similarity Coefficient (ตารางที่ 5) จะเห็นได้ว่า *A. blepharocalyx* var. *glabrior* นาแก้ว 1 เมื่อเทียบกับ *A. blepharocalyx* var. *glabrior* น้ำหนั 2 มีค่าความเหมือนกันเท่ากับ 9.95 *A. blepharocalyx* var. *glabrior* นาแก้ว 1 เมื่อเทียบกับ *A. vittata* มีค่าความเหมือนกันเท่ากับ 9.68 *A. blepharocalyx* var. *glabrior* น้ำหนั 2 เมื่อเทียบกับ *A. vittata* มีค่าความเหมือนกันเท่ากับ 9.67 ผลจากการทำเดนโดรแกรม (ภาพที่ 6) สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบไปด้วย *A. blepharocalyx* var. *glabrior* นาแก้ว และ *A. blepharocalyx* var. *glabrior* น้ำหนั 2 และกลุ่มที่ 2 มีตัวอย่างเดียว คือ *A. vittata*

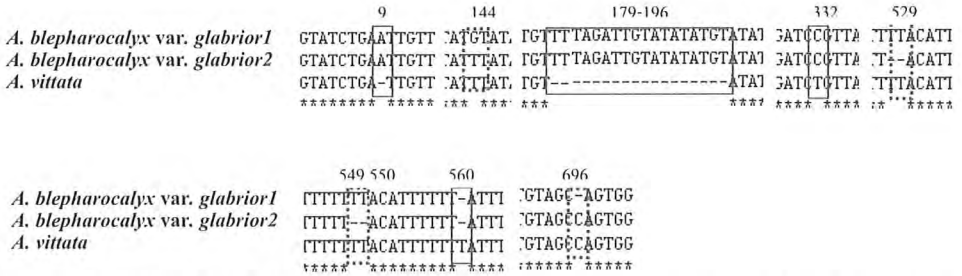
เดนโดรแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลของยีน *matK* และบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer ได้แสดงให้เห็นว่าพืชต่างสปีชีส์ถูกแยกออกไปอยู่คนละกลุ่ม ซึ่งเป็นการเพิ่มความน่าสนใจให้กับดีเอ็นเอทั้งสองบริเวณในการนำมาใช้เป็น DNA barcode



ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของยีน *matK* ของพืช 5 ตัวอย่าง (แสดงบางส่วน)

กรอบเส้น — แสดงตำแหน่งที่มีลำดับดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นความผันแปรระหว่างสปีชีส์

หมายเลขบนกรอบสี่เหลี่ยมแสดงตำแหน่งของลำดับดีเอ็นเอในการเรียงเทียบ



ภาพที่ 4 การเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของบริเวณ trnH-psbA intergenic spacer ของพืช 3 ตัวอย่าง (แสดงบางส่วน)

กรอบเส้น ——— แสดงตำแหน่งที่มีลำดับดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ซึ่งจัดเป็นความผันแปรระหว่างสปีชีส์

กรอบเส้น - - - - - แสดงตำแหน่งที่มีลำดับดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ซึ่งจัดเป็นความผันแปรภายในสปีชีส์

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

พืชสกุล *Alpinia* ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้เป็นพืชที่เก็บรวบรวมมาจากถิ่นอาศัยตามธรรมชาติที่แตกต่างกันจากภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย เพื่อนำมาศึกษาลำดับดีเอ็นเอในพลาสติกบริเวณเป็น *matK* และบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer โดยทำการศึกษายีน *matK* ในพืช 2 ชนิด 5 ตัวอย่าง (*A. galanga* var. *galanga* 4 ตัวอย่าง และ *A. assimilis* 1 ตัวอย่าง) และบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer จากพืชจำนวน 2 ชนิด 3 ตัวอย่าง (*A. blepharocalyx* var. *glabrior* 2 ตัวอย่าง และ *A. vittata* 1 ตัวอย่าง) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบความผันแปรของลำดับดีเอ็นเอตำแหน่งดังกล่าวในพืชสกุล *Alpinia* ภายในชนิดเดียวกัน (intraspecific variation) และต่างชนิดกัน (interspecific variation) เพื่อประเมินความเหมาะสมของดีเอ็นเอ

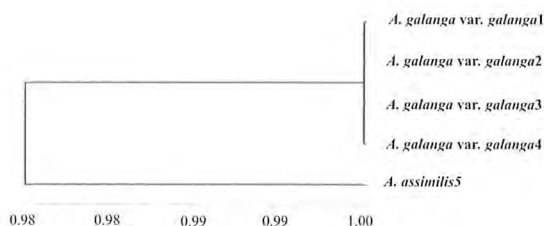
สองบริเวณนี้ในการนำมาใช้เป็น DNA barcode ต่อไป ซึ่งพบว่า จากการนำลำดับดีเอ็นเอแต่ละบริเวณในแต่ละตัวอย่างมาทำการเปรียบเทียบเพื่อหาความแตกต่างภายในชนิดและต่างชนิดกัน โดยใช้โปรแกรม ClusterW2 พบว่า ยีน *matK* แสดงความแตกต่างของลำดับระหว่างกลุ่ม *A. galanga* var. *galanga* 4 ตัวอย่าง และ *A. assimilis* 1 ตัวอย่าง เท่ากับ 2.25% ซึ่งสอดคล้องกับเดนโดรแกรมที่จัดให้ *A. galanga* var. *galanga* ทั้ง 4 ตัวอย่างอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่ให้ *A. assimilis* อยู่อีกกลุ่ม ส่วนบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer พบว่า มีความผันแปรของลำดับดีเอ็นเอในสปีชีส์เดียวกันเท่ากับ 0.57% และความผันแปรต่างสปีชีส์มีค่าตั้งแต่ 3.28-3.43% ซึ่งสอดคล้องกับเดนโดรแกรมที่จัดให้ *A. blepharocalyx* var. *glabrior* ทั้ง 2 ตัวอย่างอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่ให้ *A. vittata* อยู่อีกกลุ่ม

ตารางที่ 4 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงโดยใช้ลำดับดีเอ็นเอของยีน *matK* ในพืช 5 ตัวอย่าง

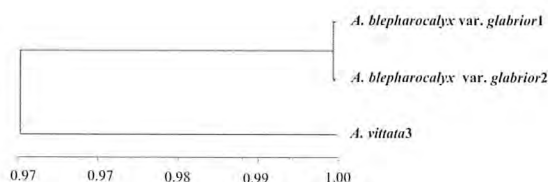
ตัวอย่างพืช	1	2	3	4	5
1. <i>A. galangal</i> var. <i>galanga</i> 1	1.000				
2. <i>A. galangal</i> var. <i>galanga</i> 2	1.000	1.000			
3. <i>A. galangal</i> var. <i>galanga</i> 3	1.000	1.000	1.000		
4. <i>A. galangal</i> var. <i>galanga</i> 4	1.000	1.000	1.000	1.000	
5. <i>A. assimilis</i> 5	0.977	0.977	0.977	0.977	1.000

ตารางที่ 5 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงโดยใช้ลำดับดีเอ็นเอของบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer ในพืช 3 ตัวอย่าง

ตัวอย่างพืช	1	2	3
1. <i>A. blepharocalyx</i> var. <i>glabrior</i> 1	1.000		
2. <i>A. blepharocalyx</i> var. <i>glabrior</i> 2	0.995	1.000	
3. <i>A. vittata</i> 3	0.968	0.967	1.000



ภาพที่ 5 เดนโดแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของยีน *matK* ในพืช 5 ตัวอย่าง



ภาพที่ 6 เดนโดแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer ในพืช 3 ตัวอย่าง

จากการประเมินเบื้องต้นในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า ดีเอ็นเอทั้ง 2 บริเวณมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็น DNA barcode โดยยีน *matK* มีประสิทธิภาพดีกว่าบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer เพราะไม่มีความผันแปรของลำดับดีเอ็นเอบริเวณนี้ในสปีชีส์เดียวกันเลย การจำแนกชนิดโดยอาศัยความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอในบริเวณยีน *matK* จึงทำได้ง่าย และชัดเจน อย่างไรก็ตาม ยังคงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่า ลำดับดีเอ็นเอบริเวณนี้ในสปีชีส์อื่นจะมีความผันแปรภายในสปีชีส์เช่นเดียวกันหรือไม่ ก่อนที่จะสรุปวิธีการประยุกต์ใช้ลำดับดีเอ็นเอบริเวณนี้เป็น DNA barcode ต่อไป ส่วนบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer มีบางตำแหน่งที่ปรากฏเป็นตำแหน่งที่ใช้ในการจำแนกพืชต่างสปีชีส์ออกจากกันในงานวิจัยนี้ แต่ยังคงต้องถูกประเมินต่อไปว่า สามารถแสดงเอกลักษณ์ที่แตกต่างกันของสิ่งมีชีวิตระดับชนิดได้จริงหรือไม่ โดยการเปรียบเทียบกับพืชชนิดเดียวกันและต่างชนิดกันด้วยตัวอย่างจำนวนมากขึ้น

ถึงแม้ว่าเทคนิคนี้จะง่าย สะดวก รวดเร็ว แต่ในบางขั้นตอนจำเป็นที่จะต้องพัฒนาให้มีประสิทธิภาพเพื่อให้ได้ลำดับดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ เช่น การสกัดดีเอ็นเอจะต้องให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพเพียงพอในการทำพีซีอาร์ รวมถึงการปรับเงื่อนไขในการทำพีซีอาร์และเลือกใช้ไพรเมอร์ให้เหมาะสมกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละบริเวณ การศึกษาให้แน่ใจว่าบริเวณลำดับที่ใช้เป็นไพรเมอร์เป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์ในกลุ่มพืชที่

ศึกษาจริง เป็นอีกประเด็นหนึ่งที่ไม่ควรมองข้าม แม้ในงานวิจัยนี้ก็พบว่า เกิดอุปสรรคในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในพืชบางตัวอย่าง ซึ่งอาจมีสาเหตุจากความไม่เหมาะสมของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer

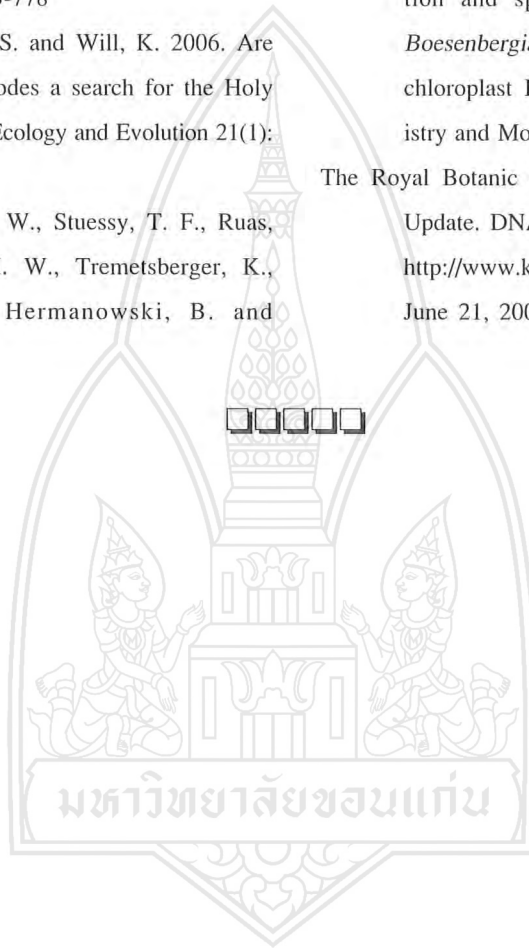
กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์ ประจำปี 2550 รหัสทุน 50231114 ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L. and deWaard, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*. 270: 313-321
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A. and Janzen, D. H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants.

- Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America 102(23): 8369-8374.
- Liu, J., S. and Schardi, C., L. 1994. A conserved sequence in internal transcribed spacer 1 of plant nuclear rRNA genes. *Plant Molecular Biology*. 26: 775-778
- Rubinoff, D., Cameron, S. and Will, K. 2006. Are plant DNA barcodes a search for the Holy Grail. *Trends in Ecology and Evolution* 21(1): 1-2.
- Samuel, R., Gutermann, W., Stuessy, T. F., Ruas, C. R., Lack, H. W., Tremetsberger, K., Talavera, S., Hermanowski, B. and Ehrenorfer, F. 2006. Molecular phylogenetics reveals *Leontodna* (Asteraceae, Lactuceae) to be diphyletic. *American Journal of Botany* 93(8): 1193-1205.
- Techaprasan, J., Ngamriabsakul, Ch., Klinbunga, S., Chusacultanaichai, S. 2006. Genetic variation and species identification of Thai *Boesenbergia* (Zingiberaceae) analyzed by chloroplast DNA polymorphism. *Biochemistry and Molecular Biology* 39(4): 361-370.
- The Royal Botanic Gardens, Kew. 2007. Phase 2 Update. DNA barcoding. Available Source: <http://www.kew.org/barcoding/update.html>. June 21, 2007



ผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่อไรฝุ่น

Dermatophagoides pteronyssinus (Trouessart)

Acaricidal Activity of Essential Oil of Medicinal Plants against House Dust Mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart)

อำมร อินทร์สังข์¹ และ จรงค์ศักดิ์ พุ่มนวน^{1*}

บทคัดย่อ

การทดสอบประสิทธิภาพการรมของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร 9 ชนิด ต่อไรฝุ่น *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart) โดยใช้เครื่อง knockdown chamber ขนาด $2.5 \times 10^4 \text{ cm}^3$ ทดสอบที่ความเข้มข้น 0 (95% ethanol), 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 และ 1.5% (0, 0.012, 0.06, 0.12, 0.6, 1.2 และ $1.8 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) ที่ปริมาตร 3 cm^3 โดยใช้ ethanol 95% เป็นตัวทำละลาย รมนาน 1 ชั่วโมง และตรวจนับอัตราการตายที่ 24 ชั่วโมง พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและอบเชยความเข้มข้น 1% ($1.2 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นสูงสุด 100% มีค่า LC_{50} เท่ากับ 0.092 และ $0.232 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ตามลำดับ รองลงมา คือ น้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชัน ไพล ตะไคร้บ้าน และตะไคร้หอม คือ มีค่า LC_{50} เท่ากับ 0.561, 0.704, 0.811 และ $0.935 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ตามลำดับ จากการนำน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพสูงมาผสมเป็นสูตรน้ำมันหอมระเหยโดยมีน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูหรืออบเชยความเข้มข้น 1% เป็นสารประกอบหลัก และมีไพลหรือตะไคร้หอม ความเข้มข้น 1% เป็นสารประกอบรอง และเพิ่มกลิ่นด้วยน้ำมันหอมปรุงแต่งจากดอกกลาวนเดอร์ มะลิ ยูคาลิปตัส และกาแฟ ความเข้มข้น 0.25% พบว่า ทุกสูตรสามารถฆ่าไรฝุ่นได้ 100% ทุกสูตรที่ใช้กลิ่นกาแฟและกลิ่นมะลิสามารถกลบกลิ่นของสารประกอบหลักและรองได้ดี

Abstract

Fumigation by essential oils obtained from 9 selected medicinal plants were applied to house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart). Essential oils at various concentrations of 0 (95% ethanol as control), 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 and 1.5% (0, 0.012, 0.06, 0.12, 0.6, 1.2 and $1.8 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) with volume of 3 cm^3 were applied within $2.5 \times 10^4 \text{ cm}^3$ knockdown chamber. The fumigation period was 1 hour, and mortality of house dust mite was observed at 24 hours after fumigation. It was found that essential oils

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ 10520

* Corresponding Author , E-mail: kpjarong@kmitl.ac.th

of clove, *Syzygium aromaticum* and cinnamon, *Cinnamomum bejolghota* were successful to kill the mite as 100% mortality at concentration of 1% ($1.2 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) and presented the LC_{50} of 0.092 and $0.232 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, respectively, followed by turmeric, cassumunar ginger, lemon grass and citronella grass which presented LC_{50} of 0.561, 0.704, 0.811 and $0.935 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, respectively. Various essential oil formulations with the main components of clove or cinnamon essential oils at 1% concentration were also performed. Essential oils of cassumunar ginger or citronella grass 1% concentration were used as minor components together with various perfumes, lavender, jasmine blue gum and coffee at 0.25%. All formulations could completely kill the mite as well as coffee and jasmine perfumes showed strongly smelling.

คำสำคัญ: ไรฝุ่น น้ำมันหอมระเหย การรม

Keywords: house dust mite, essential oils, fumigation

บทนำ

ไรฝุ่น พบในบ้านเรือนเช่น ที่นอน หมอน ผ้าห่ม โซฟา ผ้าผืน พรม และตุ๊กตา ไรฝุ่นมีชีวิตอยู่โดยการกินเศษขี้โคล ขี้รังแค สะเก็ดผิวหนังเป็นอาหาร วรรณะ และคณะ (2542) กล่าวว่า ไรฝุ่นเป็นสาเหตุที่ก่อโรคมะเร็งได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ซึ่งเป็นปัญหาสาธารณสุขในหลายประเทศทั่วโลก ในประเทศไทย พบว่า 60-80% ของโรคมะเร็งมีสาเหตุมาจากไรฝุ่น โดยเฉพาะไร *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart) และ *Blomia tropicalis* Bronswijk (อามร และสุภักขา, 2547) โดยมีผู้ป่วยโรคมะเร็งประมาณ 6-7 ล้านคน ใช้จ่ายเกี่ยวกับค่ายาเฉลี่ยปีละ 6,000 บาท/คน (สุภัทรา, 2545)

โดยทั่วไปการกำจัดไรฝุ่นกระทำได้โดยยาก โดยเฉพาะไรฝุ่นในพูกที่นอน อีกทั้งการใช้สารเคมีก็เป็นสิ่งที่ไม่ควรปฏิบัติเช่นกัน การใช้พืชสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพเพื่อควบคุมไรฝุ่นจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ โดยเฉพาะในด้านความปลอดภัยของผู้ที่อาศัย การทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าไรจากรากของ *Paonia suffruticosa* กับไรฝุ่น *D. pteronyssius* และ *Dermatophagoides farinae* ด้วยวิธีการสัมผัสและวิธีการรม เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมโดยใช้ benzyl benzoate, dibutyl phthalate และ N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) ของ Kim et al. (2004) พบว่าสารประกอบที่อยู่ในรากของ *P. suffruticosa* คือ paeonol

และ benzoic acid ต่อไร *D. pteronyssius* โดย paeonol และ benzoic acid มีค่า LD_{50} เท่ากับ 7.08 และ $7.22 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ benzyl benzoate มีค่า LD_{50} เท่ากับ $7.14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ในขณะที่ dibutyl phthalate และ DEET มีผลน้อยมากกับไร *D. pteronyssius* ในส่วนไร *D. farinae* พบว่า paeonol และ benzoic acid มีค่า LD_{50} เท่ากับ 7.82 และ $6.58 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ในขณะที่ benzyl benzoate, dibutyl phthalate และ DEET มีค่า LD_{50} 7.72, 33.92 และ $36.34 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ตามลำดับ ในวิธีการรมควัน พบว่า paeonol และ benzoic acid มีประสิทธิภาพดีมากเมื่อทดสอบในภาชนะปิดมิดชิด ส่วน Miyazaki (1996) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันจาก hiba wood, *Thujopsis dolabrata* variety *hondae* ซึ่งเป็นพืชที่มีผลต่อไรฝุ่น *D. pteronyssius* โดยนำไปผสมกับ culture medium 3 ชนิดคือ animal food, dry yeast และ sawdust พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ในการขับไล่ไรฝุ่นได้อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยองค์ประกอบของน้ำมันที่มีผลต่อไร 2 ชนิด คือ cedrol และ thujopsene Chang et al. (2001) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ essential oil และองค์ประกอบของ Hayata heartwood, *Taiwania cryptomerioides* กับไรฝุ่น *D. pteronyssius* และ *D. farinae* พบว่า ที่ความเข้มข้น $12.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ essential oil ทำให้ไรฝุ่น *D. pteronyssius* ตาย 67% และ *D. farinae* ตาย 36.7% โดยอนุพันธ์ของสารที่มีคุณสมบัติในการฆ่าไรฝุ่น ได้แก่ alpha-cadinol,

T-muurolol, ferruginol และ T-cadinol โดย alpha-cadinol มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ มีอัตราการตาย 100% ที่ความเข้มข้น $6.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ กับไรฝุ่นทั้งสองชนิด ส่วน Kwon and Ahn (2002) ศึกษาประสิทธิภาพในการฆ่าไรจากเหง้า *Cnidium officinale* กับไรฝุ่น *D. pteronyssinus* ด้วยวิธีการสัมผัสและรมควันเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุมโดยใช้ benzyl benzoate และ DEET พบว่าองค์ประกอบที่อยู่ในเหง้าของ *C. officinale* คือ butyridenephthalide ซึ่งมีค่า LD_{50} เท่ากับ $6.46 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ในขณะที่ benzyl benzoate และ DEET มีค่า LD_{50} เท่ากับ 6.68 และ $17.98 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ตามลำดับ และวิธีรมควัน พบว่า butyridenephthalide ที่ความเข้มข้น $12.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ มีประสิทธิภาพดีมาก คือ มีอัตราการตายของไรฝุ่น 100%

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาชนิดของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นในห้องปฏิบัติการ โดยวิธีการรวม รวมถึงการผสมสูตรของน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เชิงการค้าต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงไรฝุ่น

ไรฝุ่น *D. pteronyssinus* ที่ใช้ในการทดลอง ได้จากการเลี้ยงในขวดเลี้ยงไรฝุ่น (mite bottle) (รูปที่ 1A) โดยเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (mite chamber) (รูปที่ 1B) ซึ่งมีภาชนะพลาสติกใส่สารละลายอิ่มตัวของ KCl เพื่อรักษาความชื้นภายในตู้ที่ $25 \pm 1^\circ\text{C}$ และความชื้น $86 \pm 1\% \text{RH}$ ส่วนสารอาหารที่ใช้เลี้ยง คือ อาหารหนูบดละเอียด จมูกข้าวสาลี และยีสต์ อัตราส่วนเท่ากับ 4:4:1 (ดัดแปลงจาก Insung and Boczek, 1995)

2. การสกัดน้ำมันหอมระเหย

นำพืชสมุนไพรแต่ละชนิด (ตารางที่ 1) มาสกัดเอาน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ (water distillation) โดยเติมน้ำให้พอท่วม ดมจนเดือดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ไขส่วนที่เป็นน้ำมันหอมระเหย

เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็นอุณหภูมิ 12°C เพื่อใช้ในการทดสอบกับไรฝุ่นต่อไป

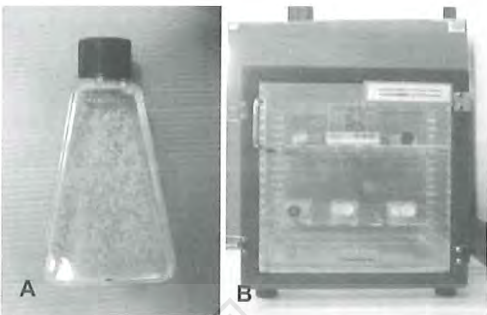
3. การทดสอบน้ำมันหอมระเหยต่อไรฝุ่น

เตรียมไรฝุ่น *D. pteronyssinus* เพื่อทำการทดสอบโดยใช้ฟูกัน 1 เส้น สุ่มเช็ดตัวเต็มวัยของไรฝุ่นไม่จำกัดเพศ จำนวน 10 ตัว ใส่ลงในกรงทดสอบไรฝุ่น (mite cage) (รูปที่ 2A) ซึ่งมีขนาดกว้างxยาวxสูง $3 \times 5 \times 0.45 \text{ cm}$ ทำการทดสอบทั้งหมด 5 ซ้ำ การทดลองเตรียมสารละลายของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร (ตารางที่ 1.) ความเข้มข้น 0 (ethanol 95%), 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 และ 1.5% หลังจากนั้นนำกรงทดสอบไรฝุ่นที่เตรียมไว้ วางในเครื่อง knock-down chamber (รูปที่ 2B) ขนาด $2.5 \times 10^4 \text{ cm}^3$ ปิดฝาฉีดสารละลายปริมาตร 3 cm^3 ให้อัตราความเข้มข้น 0, 0.012, 0.06, 0.12, 0.6, 1.2 และ $1.8 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ตามลำดับ รมนาน 1 ชั่วโมง และตรวจนับอัตราการตายที่ 24 ชั่วโมง

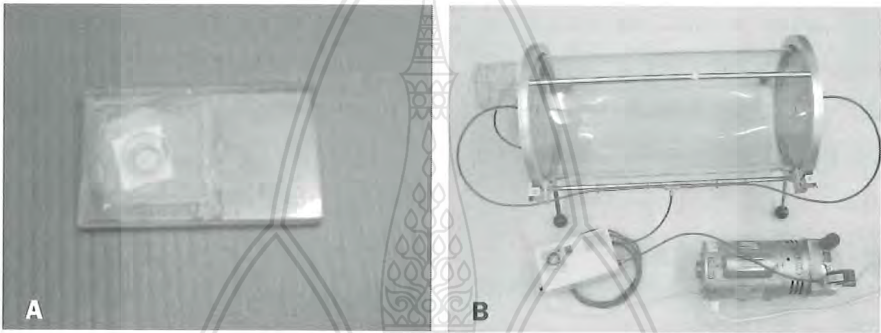
โดยในการทดลองต่อไปผสมสูตรน้ำมันหอมระเหยจากพืชกับน้ำมันหอมปรุงแต่ง (ตารางที่ 2) และทดสอบกับไรฝุ่นอีกครั้งดังที่กล่าวไว้ข้างต้นเพื่อให้ได้สูตรผสมน้ำมันหอมระเหยจากพืชที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดไรฝุ่น

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบ completely randomize design (CRD) แบ่งกลุ่มประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรตามอัตราการตายที่เกิดขึ้นเป็น 4 กลุ่ม คือ มีอัตราการตายของไรฝุ่นระหว่าง 0-24.9% (ไม่มีประสิทธิภาพ: no effect; N), 25-49.9% (มีประสิทธิภาพต่ำ: low; L), 50-74.9% (มีประสิทธิภาพปานกลาง: moderate; M) และ 75-100% (มีประสิทธิภาพสูง: high; H) และนำข้อมูลที่ได้อาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ โดยโปรแกรม SAS (statistical analysis system) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และหาค่า LC_{50} โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS probit analysis



รูปที่ 1 A: ขวดเลี้ยงไรฝุ่น (mite bottle), B: ตู้ควบคุมความชื้น (mite chamber)



รูปที่ 2 ชุดทดสอบไรฝุ่นด้วยวิธีการรม A: กรงทดสอบไรฝุ่น (mite cage), B: เครื่อง knockdown chamber

ตารางที่ 1 น้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรที่ใช้การทดลองเพื่อกำจัดไรฝุ่น, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart)

วงศ์ / ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ชื่อภาษาไทย	ส่วนของพืชที่ใช้
Myrtaceae			
1. <i>Syzygium aromaticum</i> Merr. Et Perry	Clove	กานพลู	ช่อดอก
Lauraceae			
2. <i>Cinnamomum bejolghota</i> (Buch.-Ham.)	Cinnamon	อบเชย	เปลือกต้น
Piperaceae			
3. <i>Piper nigrum</i> L.	Pepper	พริกไทย	เมล็ด
Zingiberaceae			
4. <i>Zingiber cassumunar</i> Roxb	Cassumunar ginger	ไพล	เหง้า
5. <i>Curcuma longa</i> Linn.	Turmeric	ขมิ้นชัน	เหง้า
Libiatae			
6. <i>Ocimum basilicum</i> Linn.	Sweet basil	โหระพา	ใบ
Gramineae			
7. <i>Cymbopogon nardus</i> (Linn.) Rendle	Citronella grass	ตะไคร้หอม	ใบ
8. <i>Cymbopogon citratus</i> (Deex Nees) Stapf.	Lemon grass	ตะไคร้บ้าน	ใบ
Palmae			
9. <i>Cocos nucifera</i> Linn.	Coconut	มะพร้าว	ผล

ตารางที่ 2 น้ำมันหอมปรุงแต่ง (perfumes) ที่ใช้ผสมในสูตรทดลองเพื่อกำจัดไรฝุ่น, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart)

น้ำมันหอมปรุงแต่ง	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์	ชื่อสามัญ
1. ยูคาลิปตัส	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Myrtaceae	Blue gum
2. มะลิ	<i>Jasminum sambac</i> Ait.	Oleaceae	Jasmine
3. กาแฟ	<i>Coffea arabica</i> Linn.	Rubiaceae	Arabica coffee
4. ลาเวนเดอร์	<i>Lavandula angustifolia</i> Miller.	Lamiaceae	Lavander

ผลการทดลอง

จากการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร 9 ชนิด ได้แก่ กานพลู อบเชย ขมิ้นชัน ตะไคร้บ้าน โพล ตะไคร้หอม พริกไทยดำ โหระพา และมะพร้าว ในการควบคุมไรฝุ่น *D. pteronyssinus* โดยวิธีการรมด้วยเครื่อง Knockdown chamber และตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายที่ 24 ชั่วโมง พบว่า น้ำหอมระเหยจากกานพลูและอบเชยมีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นสูงสุด คือ ที่ความเข้มข้น 0.5% (0.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) สามารถฆ่าไรฝุ่นได้ 100 และ 83.3% ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 1% (1.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) น้ำมันหอมระเหยจากทั้งสองชนิดสามารถฆ่าไรฝุ่นได้ 100%

มีค่า LC_{50} เท่ากับ 0.092 และ 0.232 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ตามลำดับ รองลงมา คือ น้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชัน ตะไคร้บ้าน โพล และตะไคร้หอม คือ ที่ความเข้มข้น 1.5% (1.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) สามารถฆ่าไรฝุ่นได้ 93.3, 90, 76.7 และ 76.7% ตามลำดับ มีค่า LC_{50} เท่ากับ 0.561, 0.811, 0.704 และ 0.935 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากพริกไทยดำและโหระพามีประสิทธิภาพปานกลางในการฆ่าไรฝุ่น คือ ที่ความเข้มข้น 1.5% (1.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) สามารถฆ่าไรฝุ่นได้ 50-70% และน้ำมันหอมระเหยจากยูคาลิปตัสและมะพร้าวมีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นต่ำกว่า 50% (ตารางที่ 3) โดยกลั่นน้ำมันหอมปรุงแต่งมีผลน้อยมากต่อการตายของไรฝุ่น (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 เปอร์เซนต์การตายของไรฝุ่น, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart) ที่เกิดจากน้ำมันหอมระเหยจากพืชที่ความเข้มข้นต่างๆ

น้ำมัน หอมระเหย จากพืช	% การตาย ^{1/} % ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)							LC_{50} ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Slop (df=5)	S.E.
	0.00 (0.000)	0.01 (0.012)	0.05 (0.060)	0.1 (0.120)	0.5 (0.600)	1.0 (1.200)	1.5 (1.800)			
1. กานพลู	7.7 N ^{2/}	23.3 N	60.0 M	76.7 H	100 H	100 H	100 H	0.092	5.467	0.902
2. อบเชย	7.7 N	13.3 N	33.3 L	63.3 M	83.3 H	100 H	100 H	0.232	3.266	0.295
3. ขมิ้นชัน	7.7 N	10.0 N	20.0 N	50.0 M	60.0 M	83.3 H	93.3 H	0.561	1.466	0.102
4. ตะไคร้บ้าน	7.7 N	10.0 N	13.3 N	23.3 N	40.0 L	73.3 M	90.0 H	0.811	1.428	0.094
5. โพล	7.7 N	13.3 N	40.0 L	46.7 L	56.7 M	70.0 M	76.7 H	0.704	0.871	0.080
6. ตะไคร้หอม	7.7 N	6.67 N	16.7 N	33.3 L	46.7 L	63.3 M	76.7 H	0.935	1.054	0.083
7. พริกไทยดำ	7.7 N	10.0 N	20.0 N	26.7 L	36.7 L	46.7 L	50.3 M	1.519	0.632	0.077
8. โหระพา	7.7 N	13.3 N	16.7 N	26.7 L	36.7 L	43.3 L	50.0 M	1.579	0.609	0.077
9. มะพร้าว	7.7 N	10.0 N	16.7 N	23.3 N	30.0 L	36.7 L	46.7 L	1.810	0.583	0.078

^{1/} ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ, ^{2/} H=high (75.0-100%), M=moderate (50.0-74.9%), L=low (25.0-49.9%), N=non effect (0-24.9%)

ตารางที่ 4 เพอร์เซ็นต์การตายของไรฝุ่น, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart) ที่เกิดจากน้ำมันหอม
ปรุงแต่งที่ความเข้มข้น 0.25% (0.3 µg/cm³)

น้ำมันหอมปรุงแต่งจากพืช	เปอร์เซ็นต์การตาย ¹⁾ (%)
กลุ่มควบคุม	7.7±6.7 b ²⁾
ยูคาลิปตัส	31.1±7.8 a
มะลิ	11.1±9.3 b
กาแฟ	17.8±13.0 b
ลาเวนเดอร์	14.4±11.3 b

¹⁾ ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ, ²⁾ ตัวเลขในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างในทางสถิติที่ระดับความนัยได้ 0.05 โดยวิธี DMRT

จากการนำน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าไรฝุ่นมาผสมเป็นสูตรน้ำมันหอมระเหย โดยมีน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและอบเชยเป็นสารประกอบหลัก ความเข้มข้น 1% โดยมีไพลและตะไคร้หอมเป็นสารประกอบรอง ความเข้มข้น 1% และมีน้ำมันหอมระเหยจากดอกลาเวนเดอร์ มะลิ ยูคาลิปตัส และกาแฟ ความเข้มข้น 0.25% เป็นน้ำมันหอมปรุงแต่งเพื่อกลบกลิ่นของสารประกอบหลัก และสารประกอบรอง พบว่า ทุกสูตรที่มีน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูหรืออบเชยสามารถฆ่าไรฝุ่นได้ 100% ทุกสูตรที่ใช้กลิ่นกาแฟสามารถกลบกลิ่นของสารประกอบหลักและรองได้ดีที่สุด รองลงมา คือ กลิ่นมะลิ ส่วนกลิ่นลาเวนเดอร์สามารถกลบกลิ่นของกานพลูได้แต่ไม่สามารถกลบกลิ่นของอบเชยได้ และกลิ่นจากยูคาลิปตัสไม่สามารถกลบกลิ่นได้ในทุกสูตร (ตารางที่ 5) สำหรับน้ำมันตะไคร้บ้านไม่ได้นำมาใช้เป็นสารประกอบรอง เนื่องจากในการทดลองศึกษาเบื้องต้น พบว่ามีกลิ่นแรง น้ำมันหอมปรุงแต่งกลบกลิ่นได้ยากมาก

ตารางที่ 5 เพอร์เซ็นต์การตายของไรฝุ่น, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart) ที่เกิดจากสูตรน้ำมัน
หอมระเหยพืชสมุนไพร

สูตรน้ำมันหอมระเหย	ความเข้มข้น (%)	% การตาย	กลิ่น
กานพลู : ตะไคร้หอม : ลาเวนเดอร์	1 : 1 : 0.25	100	มีกลิ่นลาเวนเดอร์อ่อนๆ สามารถกลบกลิ่นของกานพลูและตะไคร้หอมได้
กานพลู : ตะไคร้หอม : มะลิ	1 : 1 : 0.25	100	มีกลิ่นมะลิชัดเจน สามารถกลบกลิ่นของกานพลูและตะไคร้หอมได้หมด
กานพลู : ตะไคร้หอม : ยูคาลิปตัส	1 : 1 : 0.25	100	มีกลิ่นยูคาลิปตัสอ่อนๆ ไม่สามารถกลบกลิ่นของกานพลูและตะไคร้หอมได้
กานพลู : ตะไคร้หอม : กาแฟ	1 : 1 : 0.25	100	มีกลิ่นกาแฟชัดเจน สามารถกลบกลิ่นของกานพลูและตะไคร้หอมได้หมด
กานพลู : ไพล : ลาเวนเดอร์	1 : 1 : 0.25	100	มีกลิ่นลาเวนเดอร์อ่อนๆ สามารถกลบกลิ่นของกานพลู และไพลได้
กานพลู : ไพล : มะลิ	1 : 1 : 0.25	100	มีกลิ่นมะลิชัดเจน สามารถกลบกลิ่นของกานพลูและไพลได้หมด
กานพลู : ไพล : ยูคาลิปตัส	1 : 1 : 0.25	100	มีกลิ่นยูคาลิปตัสอ่อนๆ ไม่สามารถกลบกลิ่นของกานพลูและไพลได้

ตารางที่ 5 เเปอร์เซ็นต์การตายของไรฝุ่น, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart) ที่เกิดจากสูตน้ำมันหอมระเหยพืชสมุนไพร (ต่อ)

สูตน้ำมันหอมระเหย	ความเข้มข้น (%)	% การตาย	กลิ่น
กานพลู : ไพล : กาแฟ	1 : 1 : 0.25	100	มีกลิ่นกาแฟชัดเจน สามารถกลบกลิ่นของกานพลูและไพลได้หมด
อบเชย : ตะไคร้หอม : ลาเวนเดอร์	1 : 1 : 0.25	100	มีกลิ่นลาเวนเดอร์อ่อนมาก ไม่สามารถกลบกลิ่นของอบเชยและตะไคร้หอมได้
อบเชย : ตะไคร้หอม : มะลิ	1 : 1 : 0.25	100	มีกลิ่นมะลิ สามารถกลบกลิ่นของอบเชยและตะไคร้หอมได้หมด
อบเชย : ตะไคร้หอม : ยูคาลิปตัส	1 : 1 : 0.25	100	มีกลิ่นยูคาลิปตัสอ่อนมาก ไม่สามารถกลบกลิ่นของอบเชยและตะไคร้หอมได้
อบเชย : ตะไคร้หอม : กาแฟ	1 : 1 : 0.25	100	มีกลิ่นกาแฟชัดเจน สามารถกลบกลิ่นของอบเชยและตะไคร้หอมได้หมด
อบเชย : ไพล : ลาเวนเดอร์	1 : 1 : 0.25	100	มีกลิ่นลาเวนเดอร์อ่อนมาก ไม่สามารถกลบกลิ่นของอบเชยและไพลได้
อบเชย : ไพล : มะลิ	1 : 1 : 0.25	100	มีกลิ่นมะลิ สามารถกลบกลิ่นของอบเชยและไพลได้หมด
อบเชย : ไพล : ยูคาลิปตัส	1 : 1 : 0.25	100	มีกลิ่นยูคาลิปตัสอ่อนมาก ไม่สามารถกลบกลิ่นของอบเชยและไพลได้
อบเชย : ไพล : กาแฟ	1 : 1 : 0.25	100	มีกลิ่นกาแฟชัดเจน สามารถกลบกลิ่นของอบเชยและไพลได้หมด

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและอบเชยมีประสิทธิภาพในการฆ่าไรฝุ่นสูงสุด คือ ที่ความเข้มข้น 1% ($1.2 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) สามารถฆ่าไรฝุ่นได้ 100% รองลงมา คือ น้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชัน ตะไคร้บ้าน ไพล และตะไคร้หอม คือ ที่ความเข้มข้น 1.5% ($1.8 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) สามารถฆ่าไรฝุ่นได้ 93.3, 90, 76.7 และ 76.7% ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากพริกไทยดำและโหระพาสามารถฆ่าไรฝุ่นได้ 50-70% และน้ำมันหอมระเหยจากมะพร้าวสามารถฆ่าไรฝุ่นได้ต่ำกว่า 50% ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kim et al. (2003) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูกับไรฝุ่น *D. pteronyssinus* ด้วยวิธีการสัมผัสพบว่า สารประกอบ methyleugenol ในน้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพในการกำจัดไรฝุ่นมากที่สุด คือ มีค่า LD_{50} เท่ากับ $0.67 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ รองลงมา คือ isoeugenol,

eugenol และ acetyleugenol โดยมีค่า LD_{50} เท่ากับ 1.55, 3.71 และ $5.41 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ตามลำดับ สำหรับวิธีรมควันพบว่า สารประกอบทั้ง 4 ชนิด ในน้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพดีมากเมื่อทดสอบในภาชนะที่ปิดมิดชิด และจากการศึกษาของ Saad et al. (2006) เกี่ยวกับผลของสาร monoterpenoidal ในน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่อไรฝุ่น *D. pteronyssinus* โดยการผสมกับอาหารเลี้ยงไรฝุ่น พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูมีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าไรฝุ่นสูงสุด มีค่า LD_{50} เท่ากับ 29.78×10^{-6} g ต่อปริมาณฝุ่น 0.5 g ที่ 24 ชั่วโมง รองลงมา คือ น้ำมันหอมระเหยจาก matrecary, chenopodium, fennel และ caraway มีค่า LD_{50} เท่ากับ 104.45×10^{-6} , 117.53×10^{-6} , 156.42×10^{-6} และ 158.05×10^{-6} g ต่อปริมาณฝุ่น 0.5 g ตามลำดับ ที่ 24 ชั่วโมง โดยสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชส่วนใหญ่เป็นสารประเภท alcohols, aldehydes, alkanes และ

terpenoids โดยเฉพาะ monoterpenoids มีประสิทธิภาพสูงในการรม (Kwon and Ahn, 2002; Kim et al., 2004)

จากการนำน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าไรฝุ่นมาผสมเป็นสูตรน้ำมันหอมระเหยโดยมีน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและอบเชยเป็นสารประกอบหลัก โพลและตะไคร้หอมเป็นสารประกอบรอง และมีน้ำมันหอมระเหยจากดอกลาเวนเดอร์ มะลิ ยูคาลิปตัส และกาแฟ ความเข้มข้น 0.25% เป็นเพิ่มกลิ่นเพื่อกลบกลิ่นของสารประกอบหลักและสารประกอบรอง พบว่า ทุกสูตรที่มีน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูหรืออบเชยสามารถฆ่าไรฝุ่นได้ 100% ทุกสูตรที่ใช้กลิ่นกาแฟและมะลิสามารถกลบกลิ่นของสารประกอบหลักและรองได้ดีที่สุด สูตรน้ำมันหอมระเหยต่างๆ เหล่านี้ สามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อกำจัดไรฝุ่นได้

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยชุดการควบคุมไรฝุ่นโดยใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืชที่ได้รับการสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (BRT) ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์วิจัยพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ (BRT R_651001)

เอกสารอ้างอิง

วรรณะ มหาทิตติคุณ สิริจิต วงศ์กำชัย และ สมควร สุวรรณโท. (2542). ชีวิตวิทยาของไรฝุ่นและการกำจัดสารภูมิแพ้จากไรฝุ่น. วารสารกัญและสัตววิทยา. 21(4): 279-82.

สุภัทรา เตียวเจริญ. (2545). การรักษาโรคภูมิแพ้. หน้า 82-95. ใน การประชุมเชิงปฏิบัติการ Workshop on House Dust Mites: Systematics and Medical Importance. กรุงเทพฯ: คณะเทคโนโลยี

การเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อามร อินทร์สังข์ และสุภัทรา จันทร์หอม. (2547). ความหลากหลายและชีววิทยาของไรฝุ่น ในอำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี. หน้า 35-42. ใน รายงานการวิจัยในโครงการ BRT (2547).

Chang, S.T., Chen, P.F., Wang, S.Y., Wu., H.H. (2001). Antimite activity of essential oils and their constituents from *Taiwania cryptomerioides*. *J. Med. Entomol.* 38(3): 455-457.

Insung, A., Boczek., J. (1995). Effect of some extracts of medicinal and spicy plants on acarid mites. 211-223. In Proceedings of the Symposium on Advances of Acarology in Poland. Poland.

Kim, E.H., Kim, H.K., Ahn., Y.J. (2003). Acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *J. Agric. Food Chem.* 51(4): 885-889.

Kim, H.K., Tak, J.H., Ahn., Y.J. (2004). Acaricidal activity of *Paenoiia suffruticosa* root bark-derived compounds against *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *J. Agric. Food Chem.* 52(26): 857-861.

Kwon, J.H., Ahn., Y.J. (2002). Acaricidal activity of butylenephthalide identified in *Cnidium officinale* rhizome against *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *J. Agric. Food Chem.* 50(16): 4479-4483.

Miyazaki, Y. (1996). Effect of hiba (*Thujopsis dolabrata* variety *hondae*) wood oil on the

house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*). *J. Jpn. Wood Res. Soc.* 42(6): 624-626.

Saad, E.Z., Hussien, R., Saher, F., Ahmed., Z. (2006).

Acaricidal activities of some essential oils

and their monoterpenoidal constituents against

house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *J. Zhejiang*

Univ. Sci. B. 7(12): 957-962.



สมบัติไดอิเล็กทริกของข้าวเปลือกเหนียว (*Oryza sativa* Linn)

Dielectric Properties of Glutinous Rice Paddy

(*Oryza sativa* Linn)

กาญจนา สิริกุลรัตน์^{1*} และ นรินทร์ สิริกุลรัตน์²

บทคัดย่อ

ข้าวเปลือกเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 (*Oryza sativa* Linn) ที่เก็บเกี่ยวในช่วงอายุต่างๆ กัน ตั้งแต่ 1 สัปดาห์ หลังจากต้นข้าวตั้งท้องจนกระทั่งแก่จัด ถูกนำไปวัดสมบัติไดอิเล็กทริกด้วยเครื่องวิเคราะห์ห้อมพีแดนซ์ ความแม่นยำสูงในช่วงความถี่ 100 Hz - 1MHz จากผลการทดลอง พบว่า ค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของรวงข้าวที่เก็บเกี่ยว ทุกช่วงอายุและเมล็ดข้าวเปลือกมีค่าเพิ่มขึ้นตามปริมาณความชื้นในรวงข้าวและเมล็ดข้าวเปลือก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การกำหนดเฉลี่ย (R^2) ประมาณ 0.94 ค่าคงตัวไดอิเล็กทริกในรวงข้าวสดมีค่ากระจายในช่วง 10 - 120 และลดลงเป็น 3 - 20 ในรวงข้าวแห้ง จากการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารในเมล็ดข้าวเปลือก พบว่า ปริมาณคาร์โบไฮเดรตมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อข้าวมีอายุมากขึ้น และมีมากที่สุดในช่วงแก่ คือ ประมาณร้อยละ 48 โดยน้ำหนัก นอกจากนั้นยังพบว่า ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์สอดคล้องกับค่าคงตัวไดอิเล็กทริกที่เพิ่มขึ้นในเมล็ดข้าวแห้ง สำหรับค่าแฟกเตอร์การสูญเสีย พบว่า ในรวงข้าวสดมีสูงกว่ารวงข้าวแห้งเล็กน้อย โดยมีการกระจายในช่วง 0.005 - 0.07

Abstract

Glutinous rice paddy, Niaw San - pah - tawng 1 (*Oryza sativa* Linn) harvested at different maturity from 1 week after a booting stage until a mature stage was investigated for the dielectric properties by using the precision impedance analyzer in the frequency range of 100 Hz - 1 MHz. From the experimental results, it was found that the dielectric constant of all rice specimens was dependent on the moisture content with the average coefficient of determination (R^2) of about 0.94. The dielectric constant in fresh rice specimens varied in the range of 10 - 120 and decreased to 3 - 20 in dried rice specimens. From food ingredient analysis, the carbohydrate content was found to increase as the rice maturity increased with the highest value of 48 % in the mature rice and the increase of the carbohydrate content was found to relate with the increase

¹ สาขาวิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50300

² ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

* Corresponding Author, E- mail: kanjanas@cmru.ac.th

of the dielectric constant in dried rice specimen. For the loss tangent measurement, it was found that the loss tangent of the fresh rice specimen was higher than that of the dried rice specimen with the value deviated in the range of 0.005 - 0.07.

คำสำคัญ: ข้าว ค่าคงตัวไดอิเล็กทริก แฟกเตอร์การสูญเสีย

Keywords: rice, dielectric constant, loss factor

บทนำ

การศึกษาสมบัติทางไฟฟ้าและไดอิเล็กทริก โดยเฉพาะการหาค่าคงตัวไดอิเล็กทริก(dielectric constant) หรือค่าสภาพยอมสัมพัทธ์ (relative permittivity) ได้ถูกนำมาใช้กับพืชผลทางการเกษตรอย่างแพร่หลาย จากทฤษฎีแม่เหล็กไฟฟ้าพื้นฐาน เมื่อนำวัสดุไดอิเล็กทริกซึ่งปกติมักเป็นวัสดุกลุ่มฉนวนไฟฟ้าบรรจุลงไประหว่างแผ่นตัวนำคู่ขนาน ถ้าวัดระยะห่างระหว่างแผ่นคู่ขนานมีค่าน้อยเมื่อเทียบกับขนาดของแผ่นตัวนำ จะพบว่า ความจุไฟฟ้าของระบบซึ่งเทียบเท่ากับตัวเก็บประจุแผ่นคู่ขนาน มีค่าเป็น

$$C = \epsilon_0 \epsilon_r A/d \quad (1)$$

โดยที่ C คือ ความจุไฟฟ้าของระบบ ϵ_r คือ ค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของวัสดุไดอิเล็กทริก ϵ_0 คือ ค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของที่ว่าง (dielectric constant of free space) A คือ พื้นที่ของแผ่นตัวนำ และ d คือ ระยะห่างระหว่างแผ่นตัวนำ สำหรับแฟกเตอร์การสูญเสีย (loss factor) กรณีตัวเก็บประจุ C ต่อขนานกับความต้านทานรั่วไหล (R) ที่ความถี่ไฟฟ้าเป็น ω มีค่าเป็น

$$\tan \delta = 1 / \omega RC \quad (2)$$

จากการศึกษา พบว่า ได้มีการศึกษาสมบัติไดอิเล็กทริกของวัสดุที่เป็นผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิด เนลสัน (Nelson,1992 and Nelson, 2005) ได้กล่าวถึงความสัมพันธ์ระหว่างค่าคงตัวไดอิเล็กทริกกับผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิด นอกจากนั้นยังได้ทบทวนวิธีการทดสอบหาสมบัติไดอิเล็กทริกและแสดงให้เห็นว่า ผลผลิตทางการเกษตรบางชนิดมีค่าคงตัวไดอิเล็กทริกขึ้นกับความถี่ ความชื้นสัมพัทธ์ อุณหภูมิและความหนาแน่น ทั้งยังได้แสดงถึงการนำ

เอาค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของผลผลิตบางชนิดไปประยุกต์ใช้และได้นำเสนอหลักการใช้สมบัติไดอิเล็กทริกไมโครเวฟสำหรับตรวจวัดปริมาณความชื้นในธัญพืช สมบัติทางไฟฟ้าของผลผลิตมีความสัมพันธ์กับปริมาณที่บ่งถึงคุณภาพของผลผลิต เช่น ความชื้น ความหนาแน่น นอกจากนั้นยังพบว่า สมบัติทางไฟฟ้าที่ตอบสนองต่อคลื่นความถี่วิทยุของข้าวสาลีมีความสัมพันธ์อย่างยิ่งต่อความหนาแน่นของแป้งที่ได้จากข้าวสาลี (Nelson, 1984) สำหรับคลื่นความถี่วิทยุที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้สำหรับผลผลิตทางการเกษตรแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มที่สอดคล้องกับการศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของผลผลิตทางการเกษตร คือ การปรับสภาพเมล็ดพันธุ์ กระบวนการผลิตเพื่อปรับปรุงพันธุ์ การวัดลักษณะทางไฟฟ้าของผลผลิต (ณัฐศักดิ์, 2548) Thakur and Holmes (2001) ได้ใช้หัวเกเตอร์สามมิติของวิธีไฟไนต์เอลเมนต์ (FEM) แสดงโมเดลสภาพยอมของเมล็ดข้าวโดยใช้การแผ่รังสีแบบกระเจิงจากสนามที่อยู่ไกล (scattered far field radiation) ซึ่งถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อหาสภาพยอมของเมล็ดข้าว พบว่า วัสดุที่มีลักษณะเป็นเมล็ดมีค่าคงตัวไดอิเล็กทริกอยู่ระหว่าง 1 และ 7 และมีค่าแฟกเตอร์การสูญเสียระหว่าง 0.001 และ 1.0 การศึกษาเพื่อสร้างโมเดลของค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของข้าวที่ปลูกในพื้นที่ที่คลองของเมืองเฉิง ตอนใต้ของประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน (Liao, et al., 2002) โดยแบ่งการเจริญเติบโตของข้าวเป็น 5 ช่วง คือ ระยะย้ายปลูก ระยะต้นอ่อน ระยะออกรวง ระยะงอกเมล็ด และระยะโตเต็มวัย โดยใช้ Debye - Cole dual - dispersion model พบว่า ข้าวมีค่าคงตัวไดอิเล็กทริกที่ต่างกัน ค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของข้าวต้นฤดูต่างจากข้าวปลาย

ฤดูอย่างชัดเจน นอกจากนั้นยังพบว่า ค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของข้าวแปรค่าตามความถี่ของคลื่นไมโครเวฟ ความชื้นสัมพัทธ์ อุณหภูมิ และความหนาแน่นของวัสดุแห้ง แต่ความถี่ไม่มีผลต่อค่าคงตัวไดอิเล็กทริก

เนื่องจากข้าวเป็นอาหารสำคัญของประชากรโลก ปัจจุบันประเทศต่างๆ ได้เร่งรัดการเพิ่มผลผลิตข้าวเพื่อให้เพียงพอต่อการบริโภคภายในประเทศและการส่งออก ไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีพื้นที่อุดมสมบูรณ์เหมาะแก่การปลูกข้าว และเป็นประเทศผู้ผลิตและส่งออกข้าวเป็นอันดับหนึ่งของโลก โดยมีสัดส่วนการส่งออกร้อยละ 36 (อาทิตย์, 2550) แต่ปัญหาด้านการส่งออกและด้านคุณภาพของผลผลิตยังต้องมีการแก้ไข ข้าวเหนียวสันป่าตอง 1 (Niaw San - pah - tawng 1) เป็นพันธุ์ข้าวที่ได้จากการผสมพันธุ์ข้าวสายพันธุ์ BKNLR75001-B-CNT-B-RST-36-2 กับพันธุ์ข้าวสายพันธุ์ กช 2 ที่สถานีทดลองข้าวสันป่าตอง เมื่อปี พ.ศ. 2527 ปลูกคัดเลือกจนได้สายพันธุ์ SPTLR84051-32-2-2-4 คณะกรรมการบริหารกรมวิชาการเกษตร มีมติให้เป็นพันธุ์รับรอง เมื่อวันที่ 19 มกราคม 2543 ข้าวเหนียวพันธุ์นี้มีเมล็ดพันธุ์เรียวยาว เมื่อนึ่งสุกแล้วมีความนุ่มนวลรับประทาน เป็นข้าวเหนียวที่มีคุณภาพสูง ต้นสูง ทรงกอตั้ง ใบสีเขียว กาบใบสีเขียว ใบตรงตรง รวงยาว ระแงะถี่ รวงแน่น คอรวงสั้น ฟางแข็ง ใบแก่ข้า ข้าวเปลือกเป็นสีฟาง (ศูนย์ข้อมูลการเกษตร / ฝ่ายแผนงานพัฒนาการเกษตร, 2550) เพื่อประโยชน์ของการผลิตข้าวและการเก็บรักษาข้าวให้มีคุณภาพ งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาสมบัติไดอิเล็กทริกของข้าวเปลือกเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ในช่วงอายุและความชื้นต่างกันและศึกษาสารอาหารในเมล็ดข้าวเปลือกสดที่มีอายุการเก็บเกี่ยวต่างกันรวมทั้งความสัมพันธ์ของปริมาณเหล่านี้ ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาคาดว่าจะสามารถนำไปประยุกต์เพื่อตรวจวัดความชื้นและคุณภาพของข้าวโดยใช้ค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของข้าวเป็นตัวบ่งชี้

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

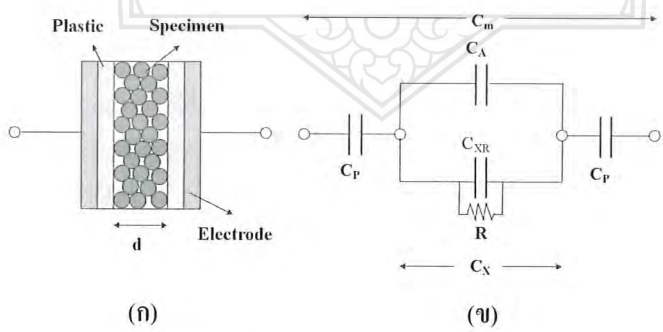
ในการศึกษครั้งนี้ได้นำรวงข้าวเปลือก พันธุ์ข้าวเหนียวสันป่าตอง 1 ซึ่งปลูกในช่วงเดือนธันวาคม 2550 ถึงเดือนเมษายน 2551 ในอำเภอสนทราย จังหวัดเชียงใหม่ ที่มีอายุการเจริญเติบโตต่างกัน คือ 1 สัปดาห์ 2.5 สัปดาห์ 4 สัปดาห์ และข้าวที่แก่จัดซึ่งมีอายุ 5 สัปดาห์หลังจากต้นข้าวตั้งท้อง โดยกำหนดให้เป็นกลุ่มตัวอย่าง s1 s2.5 s4 และ s5 ตามลำดับ ลักษณะของกลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษาสมบัติไดอิเล็กทริกแบ่งเป็นสองลักษณะ คือ ในช่วงอายุ 1 - 5 สัปดาห์ได้ทำการศึกษาดัวย่างข้าวทั้งรวง สำหรับตัวอย่างข้าวเปลือกที่แก่จัดได้ศึกษาเมล็ดข้าวเปลือกด้วย สำหรับการวิเคราะห์สารอาหาร ศึกษาเฉพาะส่วนของเมล็ดข้าวเปลือก จึงกำหนดให้กลุ่มตัวอย่างเมล็ดข้าวเปลือกสดที่ได้จากรวงข้าวตามอายุการเก็บเกี่ยวที่กำหนดเป็นกลุ่มตัวอย่าง s1* s2.5* s4* และ s5* ตามลำดับ ในการวัดได้นำตัวอย่างรวงข้าวหรือตัวอย่างเมล็ดข้าวเปลือกบรรจุในกล่องพลาสติกรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาด 20.55 x 12.94 x 2.51 ลูกบาศก์เซนติเมตร จนเต็มกล่อง ช่องว่างระหว่างแผ่นพลาสติกที่บรรจุข้าวมีขนาด 1.92 เซนติเมตร ด้านข้างของกล่องประกบด้วยข้าวโลหะแบบแผ่นถุ๋นหนาที่ทำด้วยอะลูมิเนียมขนาด 20.15 x 12.00 ตารางเซนติเมตร ในการทดลองนี้ได้วัดสัดส่วนปริมาตรของข้าวที่อยู่ภายในกล่องบรรจุตัวอย่างข้าวต่อปริมาตรของกล่อง (volume fraction of rice), (V_{EX}) ความจุไฟฟ้าของกล่องเปล่า (C_H) ความจุไฟฟ้าของแผ่นพลาสติกที่ใช้บรรจุรวงข้าว (C_P) และความจุไฟฟ้าของระบบขณะที่กล่องบรรจุข้าวเปลือกจนเต็มกล่อง (C_m) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์อิมพีแดนซ์ความแม่นยำสูง (precision impedance analyzer) Agilent model 4284A ในช่วงความถี่ 100 Hz - 1 MHz ในงานวิจัยนี้ได้ใช้รูปแบบจำลองการกระจายอย่างสม่ำเสมอของไดอิเล็กทริก สองชนิด สำหรับหาค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของรวงข้าวที่มีอายุและความชื้นต่างๆ กัน โดยนำรวงข้าวอบในเตาอบที่อุณหภูมิประมาณ 80 °C ร่วมกับการวางรวงข้าวในบริเวณที่มีอากาศถ่ายเทสะดวก เพื่อลด

ความชื้นในข้าว แล้วจึงนำกลับไปยังสมบัติไดอิเล็กทริก สลับกับการลดความชื้นลงจนรวงข้าวแห้งสนิท สำหรับการศึกษาค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของตัวอย่าง เมล็ดข้าวเปลือกที่แก่จัดนั้น ใช้วิธีเดียวกับที่ทดลอง ในรวงข้าว บันทึกความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศและ อุณหภูมิห้องทุกครั้งที่ทดลอง สำหรับการวิเคราะห์ ปริมาณความชื้น ไขมัน โปรตีน เส้นใย เถ้า และ คาร์โบไฮเดรตของเมล็ดข้าวเปลือกในแต่ละช่วงอายุ ใช้วิธีมาตรฐานของ Association of Official Analytical Chemists 2000 (AOAC, 2000) โดยสถานบริการ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (สวท.มช.) สถิติที่ใช้ในการวิจัย คือ สถิติเชิงพรรณนา หาค่าเฉลี่ยของค่าคงตัวไดอิเล็กทริก ความคลาดเคลื่อน

ของระบบ (systematic error) ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของค่าเฉลี่ย (standard deviation of mean) การเขียน กราฟความสัมพันธ์ต่าง ๆ ใช้โปรแกรมออริจิน 8 และ ใช้โปรแกรมไมโครซอฟเอกเซลในการวิเคราะห์ความ ถดถอยเชิงเส้น (linear regression) ของความสัมพันธ์ ลักษณะของรวงข้าวเหนียวสันป่าตอง 1 ที่ ใช้ในการศึกษา แสดงดังรูปที่ 1 สำหรับวิธีการที่ใช้ ในการวิเคราะห์สมบัติไดอิเล็กทริกของข้าวในการ ทดลองนี้ ดัดแปลงจากวิธีการวัดในการทดลองศึกษา สมบัติไดอิเล็กทริกของกล้วย (กาญจนา และนรินทร์, 2551) ลักษณะการบรรจุตัวอย่างข้าวและระบบที่ใช้ ในการศึกษาสมบัติไดอิเล็กทริกของรวงข้าวและเมล็ด ข้าวเปลือก แสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 1 รวงข้าวเหนียวสันป่าตอง 1 อายุ 1 สัปดาห์ และอายุ 5 สัปดาห์ หลังตั้งท้อง



(ก)

(ข)

รูปที่ 2 ระบบที่ใช้บรรจุข้าวเพื่อศึกษาสมบัติไดอิเล็กทริก ระบบ

(ก) ภาพตัดขวางของระบบ (ข) วงจรเทียบเท่าของระบบ

จากวงจรเทียบเท่าในรูปที่ 2 (ข) สัญลักษณ์ C_P ที่อยู่ทั้งสองข้าง หมายถึง ความจุไฟฟ้าของแผ่นพลาสติกที่ใช้บรรจุตัวอย่างข้าวที่ใช้ในการศึกษา C_A หมายถึง ความจุไฟฟ้าของอากาศที่แทรกอยู่ระหว่างช่องว่างของข้าวที่บรรจุในกล่อง สำหรับ C_{XR} หมายถึง ความจุไฟฟ้าของตัวอย่างข้าวที่บรรจุอยู่ในกล่อง R หมายถึง ความต้านทานไฟฟ้าเทียบเท่าที่เกิดขึ้นภายในเนื้อของตัวอย่างข้าว ทำการวัดความจุไฟฟ้าของกล่องเปล่ากำหนดให้มีสัญลักษณ์เป็น C_H และความจุไฟฟ้าของช่องว่างอากาศที่อยู่ภายในกล่องเปล่า คือ C_O ซึ่งคำนวณปริมาณต่าง ๆ ได้จากความสัมพันธ์ดังต่อไปนี้

$$C_O = C_P C_H / (C_P - 2C_H) \quad (3)$$

และ C_A มีความสัมพันธ์กับสัดส่วนของปริมาตรอากาศที่อยู่ภายในกล่องบรรจุตัวอย่างข้าวต่อปริมาตรของกล่อง ดังสมการ

$$C_A = C_O V_{FA} \quad (4)$$

เมื่อกำหนดให้ V_{FA} คือ สัดส่วนของปริมาตรอากาศที่อยู่ภายในกล่องบรรจุตัวอย่างข้าวต่อปริมาตรของกล่อง

จากการพิจารณาตามแบบจำลองที่กล่าวมา เมื่อ C_X เป็นค่าความจุไฟฟ้าของตัวอย่างข้าวในกล่องที่หักค่าความจุไฟฟ้าของแผ่นพลาสติกออกแล้ว จะได้ว่า

$$C_{XR} = C_X - C_A \quad (5)$$

ดังนั้น ค่าคงตัวไดอิเล็กทริกหรือสภาพยอมสัมพัทธ์ของข้าวหาได้จาก

$$\epsilon_r = C_{XR} d^2 / \epsilon_0 V V_{FX} \quad (6)$$

เมื่อ ϵ_0 คือ ค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของสุญญากาศ มีค่า 8.85×10^{-12} F/m

V คือ ปริมาตรของกล่องเปล่า หาได้จากผลคูณระหว่าง ระยะห่างของแผ่นพลาสติก (d) กับพื้นที่ของข้าวอะลูมิเนียม

V_{FX} คือ สัดส่วนปริมาตรของข้าวที่อยู่ภายในกล่องบรรจุตัวอย่างข้าวต่อปริมาตรของกล่อง ซึ่งเป็นแฟกเตอร์ที่ทำให้การคำนวณหาค่าคงตัวไดอิเล็กทริกไม่ขึ้นกับจำนวนตัวอย่างข้าวที่ใช้วัดในกล่อง

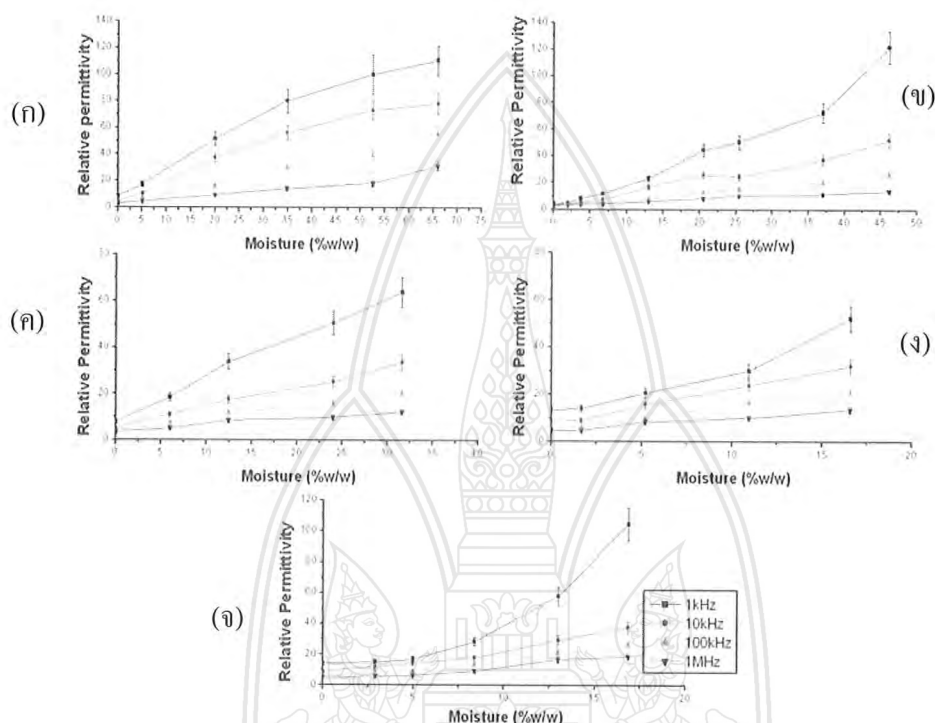
ผลและการอภิปรายผล

ในการศึกษาครั้งนี้ ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศอยู่ในช่วงร้อยละ 60 - 80 อุณหภูมิห้องอยู่ในช่วง $27 - 34^\circ\text{C}$ จากผลการทดลองพบว่า ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศมีผลต่อค่าความจุไฟฟ้าของอากาศที่วัดได้ จึงทำให้ค่า C_O หรือค่า C_A เปลี่ยนแปลงได้ อย่างไรก็ตาม ปริมาณดังกล่าวไม่มีผลต่อค่าคงตัวไดอิเล็กทริกที่ได้จากการทดลองนี้ เนื่องจากปริมาณดังกล่าวถูกนำไปหักออกจากค่าความจุไฟฟ้าที่วัดได้ (C_X) ก่อนการคำนวณหาค่าคงตัวไดอิเล็กทริก สำหรับความคลาดเคลื่อนของระบบที่ใช้มีค่าประมาณร้อยละ 10

การศึกษาค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของข้าวตัวอย่างแต่ละช่วงอายุ คือ ตัวอย่างรวงข้าว s1, s2.5, s4 และ s5 เป็นตัวอย่างรวงข้าวที่เก็บเกี่ยวหลังต้นข้าวตั้งท้องประมาณ 1 สัปดาห์ถึง 5 สัปดาห์ และตัวอย่างข้าวกลุ่ม s1*, s2.5*, s4* และ s5* หมายถึงตัวอย่างเมล็ดข้าวเปลือกที่ได้จากรวงข้าวที่เก็บเกี่ยวหลังต้นข้าวตั้งท้องประมาณ 1 สัปดาห์ถึง 5 สัปดาห์ ซึ่งมีความชื้นต่างกัน พบว่า ค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของข้าวตัวอย่างแปรตามความชื้นของข้าวทั้งในกรณีที่เป็นรวงข้าวและเมล็ดข้าวเปลือก เมื่อตัวอย่างรวงข้าวมีความชื้นลดลงค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของรวงข้าวมีค่าลดลงในทุกช่วงอายุ ผลการทดลองดังกล่าวสัมพันธ์กับธรรมชาติของโมเลกุลของน้ำซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของผลิตภัณฑ์การเกษตร มีลักษณะเป็นโมเมนต์ไดโพลไฟฟ้าถาวร (permanent electric dipole moment) ซึ่งจะเกิดโพลาไรเซชัน (polarization) หรือการเรียงตัวตามสนามไฟฟ้าภายนอกที่ป้อนเข้าไป ส่งผลให้สนามไฟฟ้าภายในลดลงและค่าคงตัวไดอิเล็กทริกมีค่าเพิ่มขึ้น โดยจะเพิ่มขึ้นมากหรือน้อยขึ้นกับปริมาณน้ำภายในผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารอื่นๆ ในผลิตภัณฑ์ก็สามารถเกิดโพลาไรเซชันได้เช่นกัน สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของตัวอย่างข้าวที่มีอายุและความชื้นเท่ากันกับความถี่ พบว่า มีค่าคงตัวไดอิเล็กทริกลดลงเมื่อใช้ความถี่สูงขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 3 (ก) - (จ) รูปที่ 3 (ก) แสดงผลของรวงข้าวตัวอย่าง

s1 ซึ่งความชื้นของรวงข้าวสดมีค่าร้อยละประมาณ 66 โดยน้ำหนัก ค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของรวงข้าวมีค่าประมาณ 110 ± 11 - 31 ± 3 และลดลงเหลือค่าประมาณ 8.80.9 - 3.10.3 ในรวงข้าวแห้ง ในช่วงของความถี่ 1

kHz - 1MHz รูปที่ 3 (ข) - (จ) แสดงผลของรวงข้าว ตัวอย่าง s2.5 s4 s5 และเมล็ดข้าวเปลือก กลุ่มตัวอย่าง s5*



รูปที่ 3 ค่าคงตัวไดอิเล็กทริกกับความชื้นของรวงข้าวที่เก็บเกี่ยวในระยะเวลาต่างกันและเมล็ดข้าวเปลือกอายุ 5 สัปดาห์ หลังต้นข้าวตั้งท้อง (ก) กลุ่มตัวอย่าง s1 (ข) กลุ่มตัวอย่าง 2.5 (ค) กลุ่มตัวอย่าง s4 (ง) กลุ่มตัวอย่าง s5 (จ) เมล็ดข้าวเปลือก กลุ่มตัวอย่าง s5*

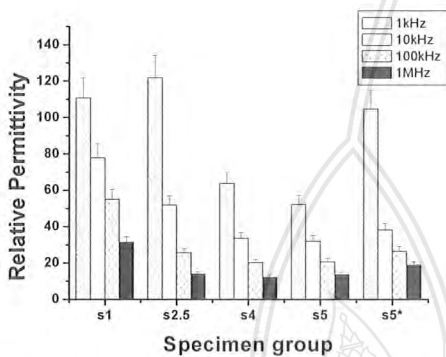
สำหรับการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นของ กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าคงตัวไดอิเล็กทริกกับความชื้นของข้าวจากกราฟรูปที่ 3 พบว่า สัมประสิทธิ์การกำหนด (the coefficient of determination; R^2) เฉลี่ยในรวงข้าวแต่ละกลุ่มตัวอย่าง มีค่าประมาณ 0.9337 0.9251 0.9674 0.901 และของเมล็ดข้าวเปลือกมีค่าประมาณ 0.928 ตามลำดับ แสดงว่า ความชื้นของ รวงข้าวและเมล็ดข้าวเปลือกมีอิทธิพลต่อค่าคงตัว ไดอิเล็กทริกค่อนข้างมากในทุกช่วงความถี่และทุกช่วง

อายุ

กรณีของรวงข้าวสดที่นำมาศึกษาเมื่อรวงข้าว ที่มีอายุมากขึ้นความชื้นของรวงข้าวลดลง โดยความชื้น ในช่วงอายุประมาณ 1 สัปดาห์ ถึง 5 สัปดาห์หลังต้น ข้าวตั้งท้อง แปรค่าในช่วงประมาณร้อยละ 66 - 17 โดย น้ำหนัก กราฟความสัมพันธ์ในรูปที่ 4 แสดงให้เห็นว่า ค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของรวงข้าวมีค่าลดลงเมื่อ ความถี่ มีค่ามากขึ้น และค่าคงตัวไดอิเล็กทริกมีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อรวงข้าวมีอายุเพิ่มมากขึ้น โดยรวงข้าวสดกลุ่ม

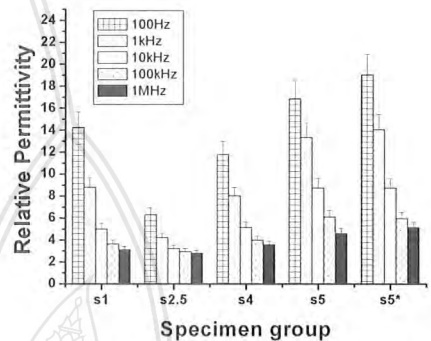
ตัวอย่าง s1 มีค่าคงตัวไดอิเล็กทริก ประมาณ 1108 ± 787 55 ± 5 และ 31 ± 3 ส่วนรวงข้าวสดกลุ่มตัวอย่าง s5 มีค่าคงตัวไดอิเล็กทริก ประมาณ 52 ± 5 32 ± 3 20 ± 2 และ 13 ± 1 สำหรับเมล็ดข้าวเปลือกสดกลุ่มตัวอย่าง s5* มีค่าคงตัวไดอิเล็กทริกประมาณ 102 ± 101 40 ± 3 26 ± 2 และ 19 ± 2 เมื่อใช้ความถี่ 1 kHz 10 kHz 100 kHz และ 1 MHz ตามลำดับ

สำหรับรวงข้าวแห้งความชื้นเป็นศูนย์ ให้ผลคล้ายกับรวงข้าวสด ค่าคงตัวไดอิเล็กทริกเฉลี่ยลดลงจากค่าที่กระจายในช่วง 20 - 120 สำหรับรวงข้าวสดไป



รูปที่ 4 ค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของรวงข้าวสดที่มีอายุการเก็บเกี่ยวต่างกันและเมล็ดข้างเปลือกสดอายุ 5 สัปดาห์ หลังต้นข้าวตั้งท้อง

เป็น 3 - 20 ในรวงข้าวแห้ง ดังกราฟรูปที่ 5 ในรวงข้าวอ่อนค่าคงตัวไดอิเล็กทริกมีค่าค่อนข้างต่ำและมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออายุของข้าวมากขึ้นยกเว้นในกลุ่ม s1 ค่าคงตัวไดอิเล็กทริกลดลงเมื่อความถี่มากขึ้นในทุกกลุ่มตัวอย่างและที่ความถี่ 100 Hz ค่าคงตัวไดอิเล็กทริกแปรปรวนอยู่ในช่วงซึ่งสามารถแสดงผลในกราฟนี้ได้ และพบว่ามีความถี่สูงค่าความถี่อื่นๆ ผลการทดลองที่ได้นี้มีค่าโดยเฉลี่ยสูงกว่าผลการทดลองของ Thakur and Holmes (2001) ซึ่งได้ค่าอยู่ในช่วงประมาณ 1 - 7



รูปที่ 5 ค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของรวงข้าวแห้งที่มีอายุการเก็บเกี่ยวต่างกัน และเมล็ดข้างเปลือกแห้งอายุ 5 สัปดาห์ หลังต้นข้าวตั้งท้อง

เมื่อพิจารณาความชื้นของรวงข้าวที่เก็บเกี่ยวในช่วงอายุต่างกัน พบว่า ความชื้นของรวงข้าวน้อยลง เมื่อรวงข้าวมีอายุมากขึ้นโดยมีความชื้นร้อยละ 66 โดยน้ำหนักที่อายุ 1 สัปดาห์ และมีค่าลดลงเป็น 17 ที่อายุ 5 สัปดาห์ จากการศึกษาค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของรวงข้าว พบว่า มีค่าลดลงเมื่ออายุรวงข้าวมากขึ้น แสดงว่า ความชื้นมีผลต่อค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของรวงข้าวดังที่ได้อภิปรายมาแล้วในตอนต้น ส่วนรวงข้าวที่มีอายุต่างกันซึ่งถูกอบแห้งแล้วมีค่าคงตัวไดอิเล็กทริกเพิ่มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้นอาจเป็นผลจากส่วนประกอบภายในรวงข้าวที่เปลี่ยนแปลงไป สำหรับการวัดค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของข้าวทั้งรวงนั้นเป็นความตั้งใจของการ

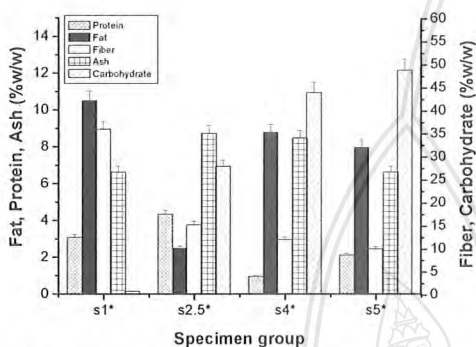
ออกแบบการวัดที่ได้จะพัฒนาให้สามารถทำการวัดแบบไม่ทำลายต่อไปได้และค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของรวงข้าวใกล้เคียงกับค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของเมล็ดข้าวเปลือกโดยในข้าวเปลือกมีความถี่สูงค่าความถี่น้อยทั้งในกรณีที่สุดและแห้ง ซึ่งแสดงในกราฟรูปที่ 4 และรูปที่ 5 กลุ่มตัวอย่าง s5 และกลุ่มตัวอย่าง s5* แสดงว่า ก้านของรวงข้าวมีผลต่อการวัดน้อยมาก ยกเว้นแฟกเตอร์การสูญเสียในเมล็ดข้าวเปลือกแห้งที่แสดงในกราฟรูปที่ 8 กลุ่มตัวอย่าง s5* ที่ให้ผลค่อนข้างแตกต่าง

จากการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน เกลือ และเส้นใย ในเมล็ดข้าวเปลือกที่เก็บเกี่ยวในช่วงอายุที่แตกต่างกันได้ปริมาณต่างๆ แสดงด้วยกราฟ

ในรูปที่ 6 ปริมาณที่เพิ่มขึ้นตามอายุของข้าวเปลือกอย่างชัดเจน คือ ปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละโดยน้ำหนักเพิ่มจาก 0.87 ± 0.07 ในกลุ่มตัวอย่าง s1* เป็น 48.9 ± 4.8 ในกลุ่มตัวอย่าง s5* ส่วนปริมาณที่ลดลงอย่างชัดเจนคือ ปริมาณเส้นใย โดยลดลงจากร้อยละโดยน้ำหนัก 36.1 ± 3.5 ในกลุ่มตัวอย่าง s1* เป็น 10.0 ± 0.1 ในกลุ่มตัวอย่าง s5* จากข้อมูลที่ได้ ค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของรวงข้าวมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อข้าวมีอายุการเก็บเกี่ยวมากขึ้นนั้น อาจเป็นเพราะปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้นในเมล็ดข้าวเปลือก ความสัมพันธ์นี้สอดคล้องกับที่พบในการวัดความสัมพันธ์ของค่าคงตัวไดอิเล็กทริกกับ

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในกล้วย (กาญจนา และนรินทร์, 2551) ผลการเพิ่มของค่าคงตัวไดอิเล็กทริกตามปริมาณคาร์โบไฮเดรตซึ่งมีสูตรทั่วไปเป็น $(C_6H_{10}O_5)_n$ เมื่อโครงสร้างดังกล่าวอยู่ในสนามไฟฟ้าย่อมเกิดโพลาไรเซชันคล้ายกับที่เกิดในโมเลกุลของน้ำและวัสดุทั่วไป การเพิ่มของปริมาณคาร์โบไฮเดรตจึงน่าจะเป็นผลให้ค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของข้าวเพิ่มขึ้นด้วย

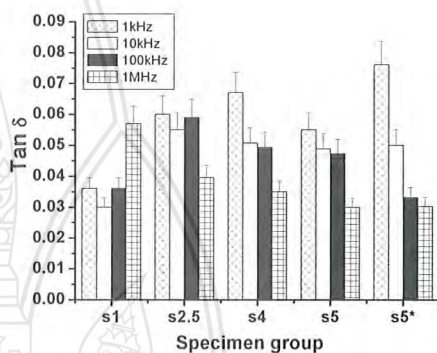
สำหรับแฟกเตอร์การสูญเสียไดอิเล็กทริกของรวงข้าวสดและเมล็ดข้าวเปลือกสดใน 5 กลุ่มตัวอย่างแสดงในรูปที่ 7



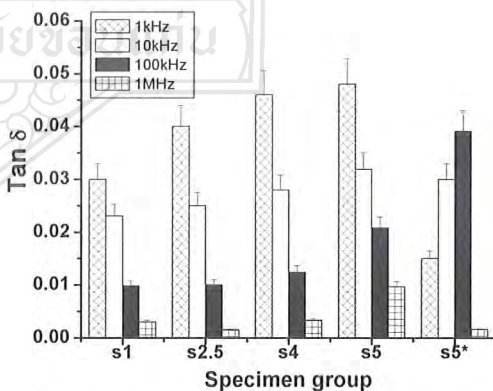
รูปที่ 6 ปริมาณสารอาหารในเมล็ดข้าวเปลือกสดที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาต่างกัน

จากกราฟรูปที่ 7 แฟกเตอร์การสูญเสียไดอิเล็กทริกของรวงข้าวสดซึ่งมีความชื้นแปรค่าอยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 15 ถึงร้อยละ 65 ขึ้นกับระยะเวลาเก็บเกี่ยวจนถึงเวลาที่ทำการทดสอบ อย่างไรก็ตามพบว่า ค่าแฟกเตอร์การสูญเสียไดอิเล็กทริกในทุกกลุ่มตัวอย่างมีค่ากระจายอยู่ในช่วงแคบๆ ประมาณ 0.03 - 0.07 และมีค่าโดยเฉลี่ยสูงกว่าในรวงข้าวแห้งอย่างชัดเจน ค่าแฟกเตอร์การสูญเสียไดอิเล็กทริกที่ความถี่ต่ำมีค่าสูงกว่าที่ความถี่สูง ยกเว้นในกลุ่ม s1 และ s2.5 ให้ผลที่ไม่ชัดเจนนัก

สำหรับแฟกเตอร์การสูญเสียไดอิเล็กทริกของรวงข้าวแห้งและเมล็ดข้าวเปลือกแห้งแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 7 แฟกเตอร์การสูญเสียไดอิเล็กทริกของรวงข้าวสดที่มีอายุการเก็บเกี่ยวต่างกัน และเมล็ดข้าวเปลือกสดอายุ 5 สัปดาห์ หลังข้าวตั้งทิ้ง



รูปที่ 8 แฟกเตอร์การสูญเสียไดอิเล็กทริกของรวงข้าวแห้งที่มีอายุการเก็บเกี่ยวต่างกัน และเมล็ดข้าวเปลือกแห้งอายุ 5 สัปดาห์ หลังข้าวตั้งทิ้ง

จากกราฟ แฟกเตอร์การสูญเสียไดอิเล็กทริกในทุกตัวอย่างของรวงข้าวแห้งและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้เฉพาะเมล็ดข้าวเปลือกแปรค่าอยู่ในช่วงประมาณ 0.002 - 0.05 ค่าแฟกเตอร์การสูญเสียไดอิเล็กทริกของรวงข้าวแห้งมีค่าลดลงเมื่อความถี่เพิ่มขึ้น สำหรับผลการทดลองที่ได้จากเมล็ดข้าวเปลือก กลุ่มตัวอย่าง s5* มีแนวโน้มในทางตรงกันข้าม

สรุปผล

ค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของรวงข้าวที่เก็บเกี่ยวทุกช่วงอายุมีค่าแปรตามความชื้นในข้าวอย่างชัดเจนรวมทั้งผลในเมล็ดข้าวเปลือกที่แก่จัด ผลการวิเคราะห์สถิติความถดถอยเชิงเส้น พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์การกำหนดเฉลี่ยประมาณ 0.94 ค่าความชื้นเมื่อเก็บเกี่ยวในกลุ่มตัวอย่างข้าวอ่อนสูงกว่าในกลุ่มตัวอย่างข้าวแก่และมีค่ากระจายในช่วงร้อยละ 17 - 66 โดยน้ำหนัก ค่าคงตัวไดอิเล็กทริกของกลุ่มตัวอย่างรวงข้าวสดมีค่าโดยเฉลี่ยกระจายอยู่ในช่วง 10 - 120 และลดลงเหลือประมาณ 3 - 20 ในกลุ่มตัวอย่างรวงข้าวแห้ง ผลการวัดปริมาณสารอาหารในเมล็ดข้าวเปลือกที่อายุเก็บเกี่ยวมากขึ้น พบว่า มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน โดยมีค่าสูงสุดในข้าวแก่จัดเป็นปริมาณร้อยละ 48 โดยน้ำหนัก นอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่มขึ้นของปริมาณคาร์โบไฮเดรตมีความสัมพันธ์สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของค่าคงตัวไดอิเล็กทริกในเมล็ดข้าวเปลือกแห้ง สำหรับแฟกเตอร์การสูญเสียในตัวอย่างรวงข้าวสดมีค่าโดยเฉลี่ยใกล้เคียงกันทุกช่วงความถี่และมีค่าสูงกว่ารวงข้าวแห้งเล็กน้อยมีค่าโดยเฉลี่ยกระจายอยู่ในช่วง 0.005 - 0.07

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยซึ่งได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2551

เอกสารอ้างอิง

- กาญจนา สิริกุลรัตน์ และน รินทร์ สิริกุลรัตน์.(2551). รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง สมบัติไดอิเล็กทริกของพืชผลทางการเกษตร (Dielectric Properties of Agricultural Crops). สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.11 - 18.
- ณัฐศักดิ์ กฤติกาเมษ. (2548). ศักยภาพของคลื่นความถี่วิทยุในการนำมาใช้กับผลิตผลทางการเกษตร. Post Harvest News Letter online. 4(4) เข้าถึงได้จาก www.phtnet.org/newsletter 3 กรกฎาคม 2551.
- ศูนย์ข้อมูลการเกษตร ฝ่ายแผนงานพัฒนาการเกษตร. (2550). ข้อมูลสารสนเทศจากสมุดข้าวไทย. เอกสารสำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดสุพรรณบุรี. 4: 34 - 35.
- อาทิตย์ โชติวิริยานิชย์. (2550). รายงานพิเศษข้าว. มติชนเทคโนโลยีชาวบ้าน. 19 (408): 54.
- AOAC. (2000). Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International (OMA) (17th Ed). Horwitz, W. (Ed.) Official Methods of Analysis. Arlington, USA.
- Liao, J. et al. (2002). Modeling of Microwave Dielectric Properties of Rice Growth Stages in Zhaoqing test site of Southern China. Geoscience and Remote Sensing Symposium, IEEE International.V.5: 2620 - 2622.
- Nelson, S.O. (1984). Density Dependence of the Dielectric Properties of Wheat and Whole Wheat flour. Journal of Microwave Power. V.19 (1): 55 - 64.
- Nelson, S.O. (1992). Measurement and Application of Dielectric Properties of Agricultural Products. Instrumentation and Measurement, IEEE Transaction. V.41 (1): 116 - 122.
- Nelson, S.O. (2005). Dielectric Properties Measurement for Agricultural Applications, Paper

number 053134, 200 ASAE Annual Meeting.
Thakur, S.K.P. and Holmes, W.S. (2001). Permittivity of Rice Grain from Electromagnetic Scattering, Fourth International Conference

on Electromagnetic Wave Interaction with Water and Moist Substances, Germany May 13 - 16, 2001: 203 - 210.



การหาดัชนีการเก็บเกี่ยวผลองกองโดยการวัดสีผิว ผลองกองด้วยผลองกองคัลเลอร์มิเตอร์

Determining the Harvesting Index of Longkong Fruit by Skin Color Analysis with Longkong Color Meter

พวงทิพย์ แก้วทับทิม^{1*} ธวัช ชิตตระกูล² ไตรภพ ผ่องสุวรรณ² และ ภัทร อัยรักษ์²

บทคัดย่อ

การกำหนดดัชนีการเก็บเกี่ยวผลองกองด้วยผลองกองคัลเลอร์มิเตอร์ โดยการวัดสเปกตรัมสีผิวของผลองกองซึ่งประกอบด้วยค่าความเข้มของแสง สีแดง สีเขียว และสีน้ำเงิน แล้วนำมาเปรียบเทียบกับอัตราส่วนของของแข็งที่ละลายได้ในของเหลวต่อกรด (TSS:TA) ของผลองกอง พบว่า ค่าความเข้มของแสงสีแดงมีการเปลี่ยนแปลงที่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของค่า TSS:TA มากที่สุด โดยที่ค่า TSS:TA มีการเปลี่ยนแปลงที่รวดเร็วอยู่สองช่วงเมื่อผลองกองมีอายุได้ 91 และ 96 วันนับจากวันที่ดอกแรกของช่อดอกบาน ซึ่งช่วงนี้สเปกตรัมแสงสีแดงมีค่าเท่ากับ 60 และ 67 หน่วย ตามลำดับ ดังนั้น จึงแบ่งระยะเก็บเกี่ยวเป็นสองช่วง ช่วงแรกเป็นดัชนีสำหรับการเก็บเกี่ยวผลองกองเมื่อมีอายุได้ 91 วัน ซึ่งเหมาะสำหรับการส่งออกไปขายในระยะไกล ซึ่งผลองกองยังมีรสชาติหวาน รสชาติหวานอมเปรี้ยว ส่วนช่วงที่สองการเก็บเกี่ยวเกิดขึ้นเมื่อผลองกองมีอายุได้ 96 วัน ซึ่งจะเหมาะสำหรับการเก็บเกี่ยวผลองกองเพื่อขายในระยะใกล้ๆ สวน เพราะผลองกองจะสุกมากขึ้นและมีรสชาติหอมหวาน นอกจากนี้ยังพบว่า ค่าความเข้มของสเปกตรัมสีแดงของผิวผลองกองมีค่าเพิ่มขึ้น 1.4 หน่วย / วัน ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวกำหนดวันเก็บเกี่ยวผลองกองล่วงหน้าของผลองกองคัลเลอร์มิเตอร์ได้ เครื่องมือผลองกองคัลเลอร์มิเตอร์นี้เหมาะสำหรับกำหนดระยะเวลาการเก็บเกี่ยวผลองกอง เนื่องจากสามารถกระทำได้อย่างรวดเร็ว ไม่ยุ่งยาก ไม่ทำลายผลผลิต และราคาต้นทุนถูก

Abstract

The red, green and blue skin color of Longkong were measured by using Longkong Color Meter (LCM). In addition, the ratio of total soluble solids per titratable acidity (TSS:TA) of each Longkong bunch was also measured for determining the harvesting index as well. The results showed that the changing of red

¹ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.เมือง จ.ปัตตานี 94000

² ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

* Corresponding Author , E-mail: pranglek@bunga.pn.psu.ac.th

color was linearly related with their TSS:TA value. The changing slope occur rapidly at the age of 91 days and 96 days which correspond with the red color of 60 and 67 units, respectively. This were a clue for proper harvesting of the Longkong bunches for long distant shipment market at the age of 91 days that its taste contain sweetness and sourness. For the second stage, the harvesting index occur at the age of 96 days, the Longkong fruits were contain a very good taste and it is proper to sell in the nearby local area. In addition, the rate of red color increase with 1.4 unit per day. LCM is a suitable device for determining the proper harvesting time of Longkong. This is the first Longkong harvesting device that is simple to use, non-destructive to the fruits and cheap to acquire.

คำสำคัญ : ลองกอง ดัชนีการเก็บเกี่ยว สีผิว

Keywords : Longkong (*Lansium domesticum* Corr.), Harvesting Index, Skin color.

บทนำ

ดัชนีการเก็บเกี่ยวลองกอง เป็นปัญหาสำคัญประการหนึ่งที่จะทำให้ได้ลองกองมีคุณภาพเพื่อการส่งออก (วิจิตรธรรม, 2546) ลองกองที่มีคุณภาพดีจะต้องมีระยะแก่และสุกบนต้น เนื่องจากผลลองกองไม่สามารถนำมาบ่มให้สุกได้เหมือนกับผลไม้ชนิดอื่นเช่น มะม่วง กัลย หรือ ทุเรียน เพราะลองกองเป็นผลไม้ประเภท non-climacteric ประเภทเดียวกับ ส้ม เงาะ และลิ้นจี่ นั่นคือค วามหวานของผลเกิดจากการเคลื่อนย้ายน้ำตาลภายในต้นเข้ามาเก็บสะสมไว้ในผล ไม่ใช่เกิดจากการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล (สุรจิตติ และคณะ, 2539) ไม่ควรเก็บเกี่ยวในขณะที่ยังมีรสเปรี้ยวอยู่หรือเก็บเกี่ยวล่าช้าเกินไป จะทำให้ผลหลุดร่วง ไม่สะดวกในการขนส่งไปขายในระยะทางไกล นอกจากนี้ ยังพบว่าลองกองในต้นเดียวกันผลจะสุกไม่พร้อมกัน (วิจิตรธรรม, 2546) ดังนั้น ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวผลลองกองเป็นเรื่องที่มีความสำคัญมากต่อคุณภาพผลผลิตและการพัฒนาผลผลิตเพื่อการส่งออก มีรายงานเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงผลลองกองในระหว่างสุกว่า การเปลี่ยนสีผิวผลเป็นดัชนีที่ดีที่สุดสำหรับกำหนดระยะสุกของลองกอง โดยเริ่มนับตั้งแต่ระยะที่ผิวลองกองเหลืองน้อยสุดซึ่งเห็นความแตกต่างได้ง่าย (Ahmad Tarnizi และคณะ, 1998) โดยผิวผลลองกองจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองใช้เวลา 87 วัน หลังจากติดผล

และหลังจากนั้น 11-17 วันสามารถเก็บเกี่ยวผลได้ วันที่ 11 ผลทั้งช่อจะมีขนาดใหญ่สุด ผิวเหลืองเต็มที่ และความหวานมีค่ามากที่สุด ในขณะที่วันที่ 17 ผลเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล อย่างไรก็ตาม ระยะเวลาของการเก็บเกี่ยวในขั้นตอนตามข้อกำหนดนี้ค่อนข้างสั้น นั่นคือ สามารถเก็บรักษาได้ประมาณ 4 วัน ดังนั้น การเก็บเกี่ยวในช่วงแรกๆ ของการเปลี่ยนสีผลอาจจะช่วยขยายอายุของผลไปได้นาน ดังนั้น ควรเก็บเกี่ยวผลในวันที่ 11 หรือช้ากว่านั้น (Norlia, 1997) การเก็บผลลองกองในระยะที่มีความสุกในช่อ 80% จะได้ลองกองมีรสชาติ หวานอมเปรี้ยวเล็กน้อย แต่ได้ข้อผลที่สวยงาม วางขายได้นานพอสมควร ในกรณีส่งออกเป็นผล (ไม่เป็นช่อ) ควรเก็บเกี่ยวเมื่อผลในช่อสุก 90-100% ลักษณะผลลองกองสุกที่ได้มาตรฐาน ได้จากการเปลี่ยนแปลงของสีผิวเปลือกลองกอง จากสีเหลืองนวลเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าลองกองสุกเต็มที่ บีบผลปลายช่อหากผลนิ่ม หรือชิมผลปลายช่อ ถ้าหวานสนิทไม่มีรสเปรี้ยวก็แสดงว่าลองกองสุกหมดทั้งช่อ สุ่มปลิดผลลองกองเพื่อแกะเปลือกดูกลีบเนื้อผลข้างใน หากเนื้อของกลีบผลมีสีใสเป็นแก้วไม่มีสีขุ่นมัวหรือยังมีสีขาวส่วนใดส่วนหนึ่งของกลีบเนื้อผลมองเห็นเมล็ดก็แสดงว่าสุกเต็มที่ ในต้นเดียวกันลองกองในแต่ละช่อจะสุกไม่พร้อมกัน เพราะการเกิดตาดอกและการบานของดอกในช่อไม่พร้อมกัน จึงควรทยอยเก็บเกี่ยวลองกองเฉพาะช่อที่สุก

ก่อน (ไสว, 2542) นอกจากนี้ ได้มีการศึกษาหาดัชนีการเก็บเกี่ยวขององุ่นโดยวิธีการคำนวณค่าหน่วยสะสมความร้อน (heat unit) พบว่า ค่าหน่วยความร้อนสะสมของผลองุ่นที่ใช้เป็นดัชนีการเก็บเกี่ยวขององุ่นเท่ากับ 1334.55 degree-days (อังสุมาลิน และคณะ, 2546) อย่างไรก็ตาม การพิจารณาดัชนีการเก็บเกี่ยวขององุ่นดังกล่าวข้างต้น ส่วนมากจะเป็นการสังเกตด้วยตาเปล่า หรือใช้การเทียบจากกระดาดเทียบสีมาตรฐาน ซึ่งทำให้ได้ค่าไม่แม่นยำ และบางวิธีต้องทำลายผลผลิต ได้มีการศึกษาหาดัชนีการเก็บเกี่ยวขององุ่นที่ให้ผลแม่นยำและไม่ทำลายผลผลิตโดยใช้วิธีการวิเคราะห์สเปกตรัมจากภาพถ่ายสีของผลองุ่นซึ่งถ่ายด้วยกล้องดิจิทัล โดยใช้แสงจากหลอด LED สีแดง และสีเขียว นับตั้งแต่ผลองุ่นยังอ่อนอยู่จนกระทั่งสุกมาก แล้วนำข้อมูลดิจิทัลดังกล่าวมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณสเปกตรัมของแสงสีแดง สีเขียว และสีน้ำเงิน ด้วยโปรแกรม Color Analysis of Longkong (CAOL) ที่ได้พัฒนาขึ้นมา เปรียบเทียบกับค่าอัตราส่วนของปริมาณของของแข็งที่ละลายทั้งหมด ต่อปริมาณกรด (TSS: TA) ในผลองุ่นแต่ละช่วงเวลาที่ยอดคล่องกับปริมาณสเปกตรัมแสงสีทั้งสามที่ทำการวิเคราะห์ผลจากการศึกษา พบว่า สเปกตรัมสีน้ำเงินจากการใช้หลอด LED สีแดง (Br) มีความเหมาะสมที่สุดที่จะนำมาใช้เป็นดัชนีชี้วัดการสุกขององุ่น โดยสเปกตรัมมีลักษณะลดลงแบบเชิงเส้นเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเจริณเติบโตของผลองุ่น โดยจะแปรผกผันกลับกับค่า TSS: TA ผลจากการวิเคราะห์สามารถสรุปได้ว่า ช่วงเวลาที่เหมาะสมที่ชาวสวนองุ่นควรตัดขอลองุ่น คือ ช่วงที่มีค่าระดับสีน้ำเงินต่อพิกเซลอยู่ในช่วง 8.67 - 2.39 ถ้าตัดองุ่นในช่วงที่ระดับสีน้ำเงินต่อพิกเซลมีค่าอยู่ระหว่าง 8.67-5.53 จะได้ผลองุ่นที่มีรสหวาน มีรสชาติหวานอมเปรี้ยว เหมาะสำหรับตัดไปขายในระยะไกล แต่ถ้าตัดองุ่นในช่วงที่มีค่าระดับสีน้ำเงินต่อพิกเซลอยู่ระหว่าง 5.54 - 2.39 จะได้ผลองุ่นที่มีรสชาติ หอม หวาน เหมาะสำหรับนำไปขายในระยะใกล้ๆ โดยที่ระดับสีน้ำเงินต่อพิกเซล

มีค่าลดลง 0.45/วัน ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการคาดคะเนวันตัดล่วงหน้าได้ (พวงทิพย์ และคณะ, 2550) วิธีดังกล่าวค่อนข้างจะสะดวกรวดเร็ว ให้ผลแน่นอน แต่ต้องกระทำภายใต้กล่องควบคุมแสง แต่ยังไม่มีการงานเกี่ยวกับการนำเครื่องมือวัดสีผิวผลองุ่นซึ่งไม่ทำลายผลผลิตและสะดวกรวดเร็วมาใช้

ดังนั้น ในการศึกษานี้จึงได้พัฒนาองุ่นคัดเลอริมิเตอร์ ขึ้น เพื่อเป็นเครื่องมือวัดหน่วยสีผิวผลองุ่นที่กำหนดดัชนีการเก็บเกี่ยวผลองุ่น โดยเปรียบเทียบกับอัตราส่วนระหว่างปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ต่อค่าความเป็นกรด (TSS:TA) ซึ่งถือเป็นค่ามาตรฐาน โดยที่ค่าของ TSS:TA จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วในระยะเก็บเกี่ยว นอกจากนี้ ยังนำผลที่ได้จากการศึกษามาเปรียบเทียบกับอายุขององุ่นโดยองุ่นที่มีอายุครบ 13 สัปดาห์ นับจากวันที่ดอกแรกของช่อบานจะสามารถเริ่มเก็บเกี่ยวผลผลิตได้

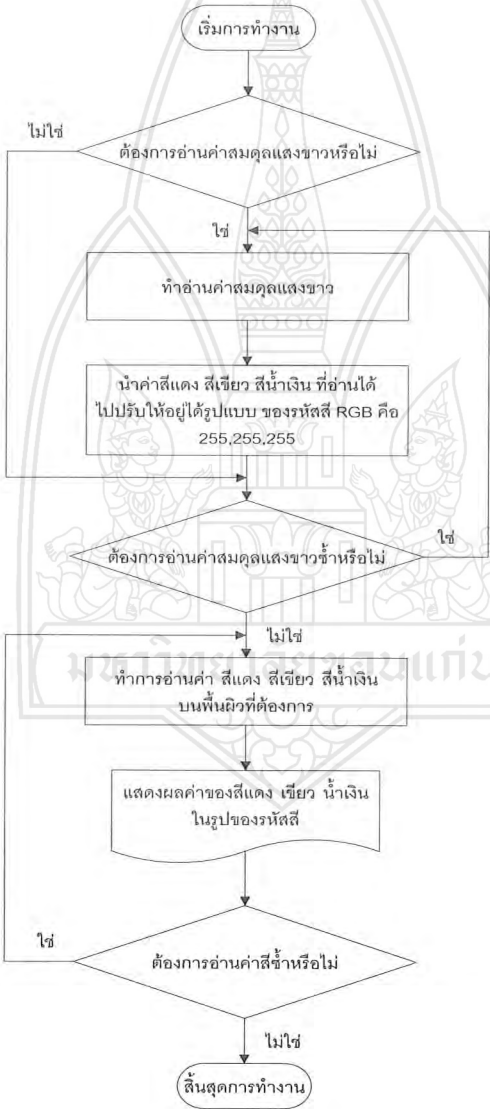
วิธีการวิจัย

พัฒนาเครื่องมือสำหรับวัดสีผิวผลองุ่น เรียกว่า องุ่นคัดเลอริมิเตอร์ โดยหลักการการทำงานขององุ่นคัดเลอริมิเตอร์ คือ ฉายแสงขาว ซึ่งประกอบด้วยสเปกตรัมของแสงสีแดง สีเขียว และสีน้ำเงิน (R, G, B) ไปตกกระทบที่ผิวของผลองุ่นแล้วสะท้อนกลับเข้าสู่ตัวตรวจวัดสีของแสงที่แสดงออกมาในรูปของแสงที่สะท้อน 3 องค์ประกอบ จากนั้นไมโครคอนโทรลเลอร์จะกำหนดความสามารถเก็บเกี่ยวองุ่นได้หรือไม่ (รูปที่ 1) การตรวจวัดสีของแสงที่สะท้อนที่ต้องการวัดเป็นแสงสะท้อนมาจากผิวของผลองุ่นก็เท่ากับเป็นการวัดสีของผิวผลองุ่นนั่นเอง

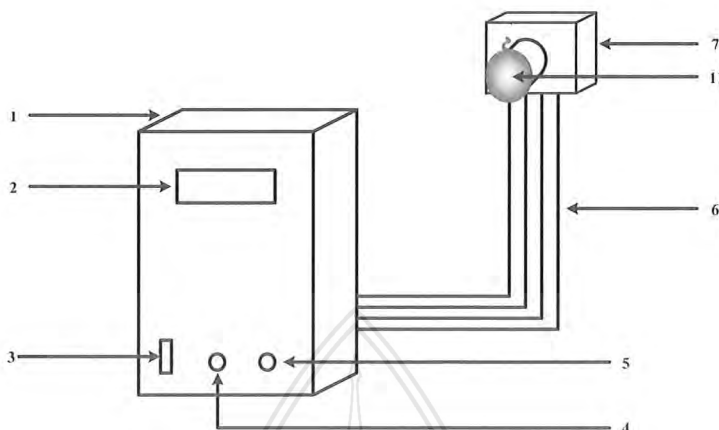
ส่วนประกอบของสเปกตรัมมิเตอร์ (รูปที่ 2) แบ่งออกเป็นสองส่วน คือ ตัวกล่องควบคุมหลัก (1) และกล่องเซนเซอร์ (7) กล่องควบคุมหลัก ประกอบด้วยแผงสวิตช์กดด้าน ด้านหน้าจะมีจอแสดงผล (2) ติดอยู่ ด้านหน้าจอแสดงผล จะเป็นปุ่ม Power (3) สำหรับเปิด-ปิดเครื่องมือ ทางด้านขวามือของปุ่ม Power เป็นปุ่ม YES (4) และ ถัดไปเป็น NO (5) ใช้สำหรับควบคุม

การทำงานของเครื่องมือ ในส่วนของกล่องเซนเซอร์ ประกอบด้วยผนังสีดำทั้งหกด้านเช่นกัน โดยผนังด้านหน้า จะติดเซนเซอร์ TCS230 (8) ไว้สำหรับรับแสงที่สะท้อนกลับมาจากผิวกล่อง (11) ซึ่งเท่ากับเป็นการวัดสีผิวผลของกล่องนั่นเอง โดยมีหลอดแอลอีดี (LED) (9) สีขาวสองหลอดติดอยู่ด้านข้างทั้งสองของ TCS230 ในลักษณะเฉียงเข้าหากันเล็กน้อย ทำหน้าที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงให้ไปตกกระทบที่ผิวผลของกล่อง โดยมีท่อ (10) ยาว 1.5-2 เซนติเมตร เส้น

ผ่านศูนย์กลางของท่อที่ฐาน 3.3-3.5 เซนติเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางที่ปลายปากท่อเป็น 2-2.5 เซนติเมตร โดยท่อนี้ครอบเซนเซอร์ TCS230 (8) และหลอด LED เพื่อป้องกันแสงภายนอกรบกวน และมีสายแพร์ (6) ต่อเชื่อมระหว่างกล่องควบคุมหลัก กับกล่องเซนเซอร์ ภายในกล่องควบคุมหลักและกล่องเซนเซอร์จะมีวงจรไฟฟ้าควบคุม การทำงานของเครื่องมือวัดความสูงของกล่องอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรแกรมคอมพิวเตอร์



รูปที่ 1 แผนภาพแสดงหลักการทำงานของเครื่องกล่องคัลเลอร์มิเตอร์



รูปที่ 2 ส่วนประกอบของเครื่องลองกองคัลเลอร์มิเตอร์

ได้ทำการทดลองที่สวนลองกอง อำเภอโคกโพธิ์ จังหวัดปัตตานี ต้นลองกองมีอายุประมาณ 10 ปี ต้นสูงประมาณ 7 เมตร โดยทำการเก็บข้อมูลในช่วงเดือนพฤศจิกายน 2549 - เดือนมกราคม 2550 แบ่งการทดลองออกเป็น 2 หัวข้อ (1) ศึกษาคุณสมบัติทางด้านเคมีของลองกองคือวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในของเหลวและปริมาณกรด และ (2) ศึกษาหน่วยของสีผิวผลลองกองด้วยลองกองคัลเลอร์มิเตอร์

(1) ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของลองกอง

สุกปายช่อดอกลองกองที่มีดอกแรกของช่อบานพร้อมกัน (อายุเท่ากัน) จำนวนทั้งหมด 26 ช่อ บันทึกวันที่ดอกแรกบาน นำลองกองทั้งช่อมาตรวจวัดอัตราส่วนของ TSS:TA เริ่มวัดตั้งแต่ลองกองมีอายุ 10 สัปดาห์ จนกระทั่งถึง 17 สัปดาห์ นับจากวันที่ดอกแรกของช่อบาน โดยจะแสดงในรูปของปริมาณของของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solids: TSS) ด้วยเครื่อง Hand Refractometer (ยี่ห้อ TAMCO รุ่น Salinity ผลิตจากประเทศญี่ปุ่น) ทำการเตรียมตัวอย่างโดยการปั่นตัวอย่างชิ้นลองกองให้ละเอียดจากนั้นนำมากั้นเอาน้ำลองกอง แล้วกรองน้ำลองกองด้วยผ้าขาวบาง นำน้ำลองกองที่ได้จากการกรองมาวัดค่าที่ได้เป็น %TSS จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณกรดที่ไทเทรต (titratable acidity: TA) และนำน้ำลองกองที่ได้จากการกรองส่วนหนึ่งมาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์

(sodium hydroxide solution) โดยใช้ Phenolphthalein เข้มข้น 1% เป็น indicator คำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดซิตริก (citric acid) แล้วหาอัตราส่วนของของแข็งที่ละลายน้ำได้ต่อปริมาณกรดที่ไทเทรต (TSS:TA)

(2) ศึกษาสเปกตรัมสีผิวผลลองกองด้วยลองกองคัลเลอร์มิเตอร์

การศึกษาน้ำของสีผิวผลลองกองด้วยลองกองคัลเลอร์มิเตอร์ ใช้ส่วนของเกสรตรสวนเดียวกันสุ่มเลือกลองกองช่อที่ผิวเกลี้ยง ไม่ขึ้นรา มาทั้งหมด 30 ช่อ มีดอกแรกของช่อบานพร้อมกันกับลองกองที่ใช้ในการศึกษาสมบัติทางเคมี ทั้งนี้เพื่อที่จะสามารถนำมาใช้เปรียบเทียบระยะเก็บเกี่ยวได้ มาทำการวัดสีผิวผลลองกองด้วยลองกองคัลเลอร์มิเตอร์ แต่ละช่อจะสุ่มเลือกมา 6 ผล โดยแบ่งเป็น ผลบน กลาง และล่าง ของช่อมาอย่างละ 2 ผล รวมเป็น 6 ผล ต่อ 1 ช่อ นำมาหาค่าเฉลี่ยของหน่วยสีผิว ทำการเก็บข้อมูลทุกวัน ผลที่วัดได้จะแสดงออกมาเป็นค่าของสีแดง สีเขียว และสีน้ำเงิน (R, G, B) อย่างไรก็ตาม การใช้ลองกองคัลเลอร์มิเตอร์ ต้องกระทำภายใต้สภาวะที่ไม่มีการรบกวนจากแสงภายนอก ดังนั้น จึงต้องมีการคลุมผ้าดำทั้งเครื่องมือและช่อลองกองเพื่อป้องกันการรบกวนจากแสงอาทิตย์

ผลการทดลอง

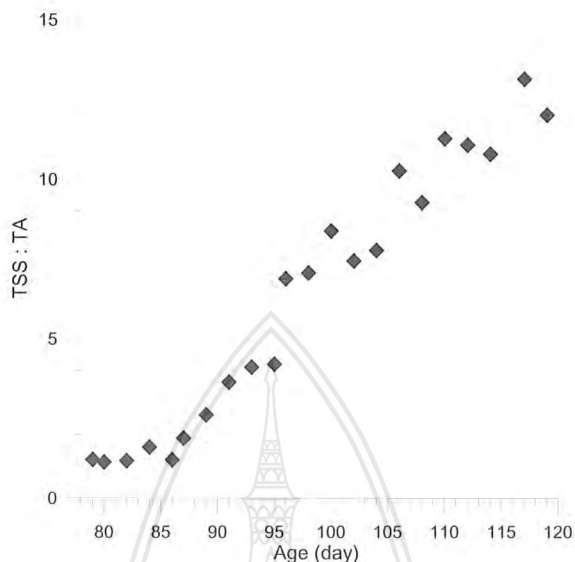
ผลจากการทดลองเพื่อศึกษาค้นหาการเก็บเกี่ยวของผลลองกอง ได้ทำการศึกษาหาค่าอัตราส่วนของ TSS:TA ของผลลองกอง เก็บข้อมูลวันเว้นวัน ทั้งหมด 26 วัน ซึ่งจะใช้ลองกองวันละ 1 ช่อ ดังนั้น จึงใช้ลองกองทั้งหมด 26 ช่อ และทำการวัดหน่วยสีผิวผลลองกองด้วยลองกองคัลเลอรีมิเตอร์ ทั้งหมด 30 ช่อ ทุกวัน แบ่งผลการทดลองออกเป็น 2 หัวข้อ คือ (1) ผลการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของลองกองและ (2) ผลการศึกษาหน่วยของสีผิวผลลองกองด้วยลองกองคัลเลอรีมิเตอร์

(1) ผลการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของลองกอง
ได้แสดงค่าของของแข็งที่ละลายน้ำได้ต่อกรด (TSS:TA) เทียบกับอายุของลองกองไว้ในตารางที่ 1 และรูปที่ 3 พบว่า ส่วนแรกเป็นช่วงแรกๆ ของการเจริญ

เติบโตของลองกอง การเปลี่ยนแปลงทางเคมีภายในผลลองกองค่อนข้างจะน้อย ดังจะเห็นได้ว่า เส้นกราฟส่วนนี้จะขนานกับแนวนอน นั่นคือ มีความชันน้อย เส้นกราฟในส่วนถัดมาจะเห็นว่ามิลักษณะเป็นเส้นตรงที่มีความชันเพิ่มขึ้นมาก นั่นคือ เป็นช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เป็นเพราะว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้มีค่าเพิ่มขึ้นมาก ในขณะที่ค่าความเป็นกรดมีค่าลดลงมากนั่นเอง โดยช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีอย่างรวดเร็ว แบ่งออกเป็น 2 ระยะ ระยะแรกช่วงที่ลองกองมีอายุเป็น 91 วัน นับจากวันที่ดอกแรกของลองกองบาน และระยะที่สองช่วงที่ลองกองมีอายุเป็น 96 วัน นับจากวันที่ดอกแรกของลองกองบาน จะเห็นว่า ระยะแรกการเปลี่ยนทางเคมีมีค่าน้อยกว่าเมื่อเทียบกับระยะที่สอง

ตารางที่ 1 อัตราส่วนระหว่างปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ต่อกรดของผลลองกอง

Age (days)	TSS:TA	Age (days)	TSS:TA	Age (days)	TSS:TA
72	1.22	91	3.64	112	11.07
74	0.92	93	4.11	114	10.79
76	0.85	95	4.20	117	13.14
77	0.84	96	6.88	119	12.01
79	1.21	98	7.06	122	15.96
80	1.13	100	8.38		
82	1.17	102	7.44		
84	1.60	104	7.77		
86	1.20	106	10.26		
87	1.88	108	9.27		
89	2.61	110	11.27		



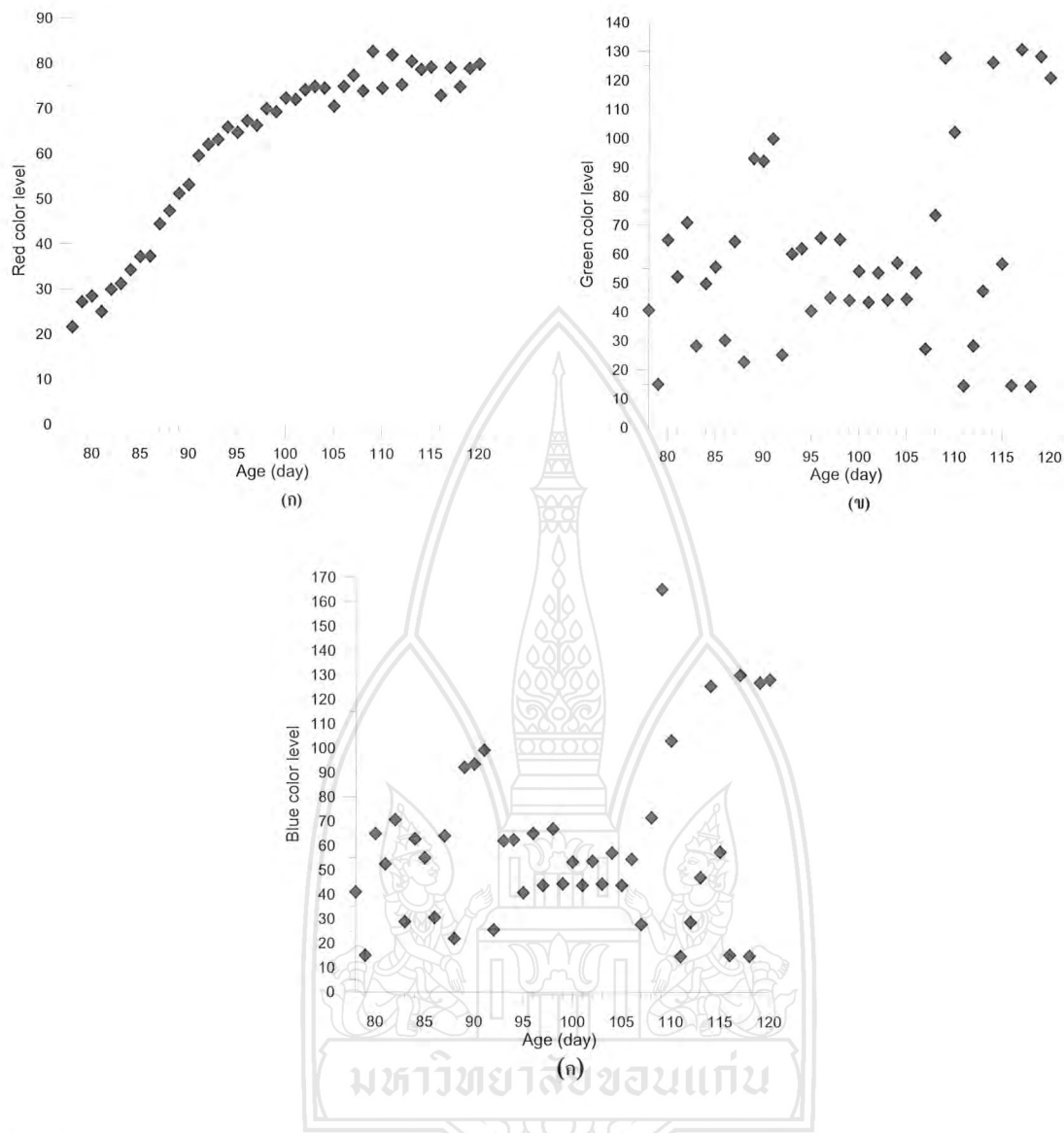
รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างอายุและอัตราส่วนของ TSS:TA ของผลลองกอง

(2) ผลการศึกษาสีผิวของลองกองด้วยลองกองคัลเลอร์มิเตอร์

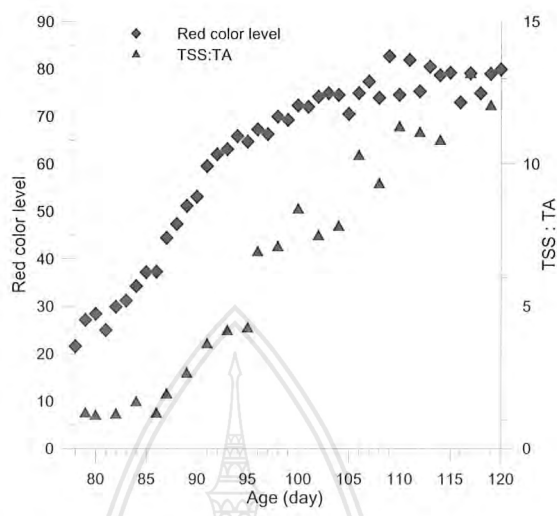
ได้แสดงผลการวัดสีผิวผลลองกองด้วยลองกองคัลเลอร์มิเตอร์ เปรียบเทียบกับอายุของลองกอง นับจากวันที่ดอกแรกบานไว้ในตารางที่ 2 และรูปที่ 4 พบว่า ในขณะที่ผลลองกองมีอายุมากขึ้นเรื่อยๆ ปริมาณสีแดงมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และเมื่อลองกองมีอายุ 91 วัน นับจากวันที่ดอกแรกบานของช่อลองกองบาน พบว่า สีแดงมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นสีแดงมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และมีค่าคงที่เมื่อลองกองมีอายุประมาณ 100 วัน นับจากวันที่ดอกแรกบานของช่อลองกองบาน ดังแสดงในรูปที่ 4(ก) ส่วนสีเขียวและสีน้ำเงินมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไม่เป็นรูปแบบที่แน่นอน จึงไม่สามารถสรุปได้ ดังแสดงในรูปที่ 4(ข) และ 4(ค)

แสดงผลจากการวัดสีแดงของผิวผลลองกองด้วยลองกองคัลเลอร์มิเตอร์ เปรียบเทียบกับอายุของ

ลองกองและค่า TSS:TA ได้แสดงไว้ในรูปที่ 5 โดยให้แกน X แทนอายุของลองกองนับจากวันที่ดอกแรกบาน แกน Y ป้อนภูมิแทนสีแดงของผิวผลลองกอง และแกน Y ทุติยภูมิแทนค่า TSS:TA พบว่า สีแดงมีค่าค่อนข้างคงที่ในช่วงแรกๆ ถึงอายุ 83 วัน นับจากวันที่ดอกแรกบานในช่อบาน หลังจากนั้นสีแดงมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วอีกครั้งเมื่ออายุได้ 91 วัน นับจากวันที่ดอกแรกบานของช่อบาน ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของค่า TSS:TA หลังจากนั้นสีแดงมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เช่นเดียวกับค่า TSS:TA จนกระทั่งลองกองมีอายุประมาณ 100 วัน นับจากวันที่ดอกแรกบานของช่อบาน พบว่า ค่าของสีแดงเริ่มคงที่ ในขณะที่ค่า TSS:TA มีอัตราการเปลี่ยนแปลงลดลงเช่นกัน ดังนั้น จึงเลือกสีแดงเป็นดัชนีในการกำหนดระยะเก็บเกี่ยวผลลองกอง



รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างอายุของลองกองและการเปลี่ยนแปลงของหน่วยสีแดง เขียว และน้ำเงิน (R, G, B) เทียบกับอายุ (ก) การเปลี่ยนแปลงของหน่วยสีแดง (R) (ข) การเปลี่ยนแปลงของหน่วยสีเขียว (G) (ค) การเปลี่ยนแปลงของหน่วยสีน้ำเงิน (B)



รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าของหน่วยสีแดง (R) และอัตราความหวานต่อกรด TSS:TA เทียบกับอายุของผลลองกอง

ตารางที่ 2 ค่าของหน่วยสีผิวผลลองกองโดยใช้เครื่องลองกองคัลเลอร์มิเตอร์

Age (days)	R	G	B	Age (days)	R	G	B
71	22.25	49.50	50.25	99	69.31	44.15	44.48
72	23.83	47.50	47.92	100	72.37	54.21	53.42
73	24.67	46.33	46.92	101	72.08	43.50	43.85
74	20.96	50.00	50.25	102	74.21	53.67	53.79
75	23.98	51.92	52.42	103	74.94	44.29	44.39
76	22.00	16.58	16.71	104	74.59	57.10	57.17
77	25.28	33.48	33.58	105	70.59	44.58	43.87
78	21.62	40.60	41.04	106	74.98	53.73	54.60
79	27.17	15.02	15.04	107	77.43	27.39	27.88
80	28.44	64.92	64.94	108	73.99	73.54	71.65
81	25.00	52.17	52.50	109	82.75	127.92	165.17
82	29.94	70.89	70.69	110	74.63	102.25	103.14
83	31.22	28.31	28.85	111	81.98	14.67	14.75
84	34.28	49.77	62.79	112	75.38	28.50	28.75
85	37.22	55.58	55.08	113	80.55	47.44	47.13
86	37.32	30.25	30.56	114	78.77	126.37	125.58
87	44.46	64.38	64.10	115	79.29	56.81	57.55
88	47.37	22.77	21.98	116	73.04	14.81	15.31

ตารางที่ 2 ค่าของหน่วยสีผิวผลองกองโดยใช้เครื่องลองกองคัลเลอร์มิเตอร์ (ต่อ)

Age (days)	R	G	B	Age (days)	R	G	B
89	51.21	93.04	92.21	117	79.19	130.85	130.14
90	53.13	92.17	93.50	118	74.97	14.58	14.89
91	59.58	99.85	99.21	119	79.07	128.47	126.99
92	62.09	25.23	25.56	120	80.00	121.13	128.27
93	63.17	60.13	62.04	121	80.05	131.26	130.05
94	65.90	61.98	62.50	122	83.42	135.63	138.67
95	64.76	40.44	40.77	123	80.50	130.50	129.56
96	67.32	65.65	65.10	124	81.04	134.38	134.21
97	66.33	45.00	43.81				
98	70.02	65.13	67.02				

สรุปผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาเพื่อประเมินดัชนีการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมของลองกองเพื่อการส่งออก โดยใช้ลองกองคัลเลอร์มิเตอร์ วัดสีผิวผลองกองในสวนของเกษตรกร ซึ่งวัดออกมาได้เป็นสีแดง สีเขียว และสีน้ำเงิน โดยจะทำการเก็บข้อมูลทุกๆ วัน ตั้งแต่ลองกองมีอายุ 71 วัน จนกระทั่งมีอายุ 119 วัน นับจากวันที่ดอกแรกของช่อลองกองบาน เปรียบเทียบกับอายุของลองกองนับจากวันที่ดอกแรกของช่อบาน และเปรียบเทียบกับค่า TSS:TA ดังแสดงในรูปที่ 5 พบว่า ค่าของสีแดงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นดัชนีบอกระยะเก็บเกี่ยวลองกองมากที่สุด เนื่องจากค่าของสีแดงมีการเปลี่ยนแปลงที่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของค่า TSS:TA มากที่สุด และจากการวิเคราะห์ค่า TSS:TA พบว่าการเปลี่ยนแปลงที่รวดเร็วอยู่สองช่วง ดังนั้น จึงสามารถแบ่งการเก็บเกี่ยวช่อลองกองได้เป็น 2 ระยะ ระยะแรกค่า TSS:TA มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วเมื่อลองกองมีอายุได้ 91 วัน นับจากวันที่ดอกแรกของช่อบาน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ahmad et al. (1998) ระยะนี้สีแดงมีค่าอยู่ในช่วง 60-67 ค่าดังกล่าวเหมาะสำหรับเริ่มเก็บเกี่ยวช่อลองกองเพื่อการส่งออกไปขายในระยะใกล้เคียงจะได้ลองกองที่มีข้อสวยงาม ผลองกอง

ติดกับก้านช่ออย่างหนาแน่น รสชาติหวานอมเปรี้ยว ระยะที่สองค่า TSS:TA มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วเมื่อลองกองมีอายุได้ 96 วัน นับจากวันที่ดอกแรกบาน ระยะนี้หน่วยสีแดงมีค่าตั้งแต่ 67 เป็นต้นไป ค่านี้เหมาะจะเป็นดัชนีในการเก็บเกี่ยวช่อลองกองเพื่อขายในระยะใกล้ๆ ส่วนจะได้ลองกองที่สุกมากและมีรสชาติหอมหวาน โดยค่า TSS:TA ในระยะที่สองมีการเปลี่ยนแปลงที่รวดเร็วกว่าเมื่อเทียบกับระยะแรกเนื่องจากระยะที่สองปริมาณของของแข็งที่ละลายน้ำได้มีค่าเพิ่มขึ้นมากกว่าระยะแรกในขณะที่ค่าความเป็นกรดมีค่าลดลงมากกว่าเมื่อเทียบกับระยะแรก ส่วนค่าของสีแดงของผิวผลองกองในระยะแรกจะเปลี่ยนแปลงรวดเร็วกว่าเมื่อเทียบกับระยะที่สอง เนื่องจากในระยะแรกเป็นการเปลี่ยนจากผิวสีเขียวเป็นผิวสีเหลือง ส่วนระยะที่สองเป็นการเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีเหลืองเข้มซึ่งค่าไม่แตกต่างกันมาก และหลังจากนั้นสีเหลืองจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลซึ่งไม่ได้เก็บข้อมูลเนื่องจากไม่มีผลต่อการเก็บเกี่ยว อย่างไรก็ตาม จากการศึกษา ค่าของ TSS:TA ที่วิเคราะห์พบว่ามีความค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากช่วงที่ทำการเก็บข้อมูลเป็นช่วงฤดูฝนของสามจังหวัดชายแดนภาคใต้

จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า การใช้ค่าของ สีแดงของผิวผลลองกองมาเป็นดัชนีในการเก็บเกี่ยว ลองกองโดยใช้ลองกองคัลเลอร์มิเตอร์เป็นเครื่องมือ วัดที่สามารถทำได้อย่างรวดเร็ว ไม่ยุ่งยาก ราคาถูก ที่สำคัญไม่ทำลายผลผลิต โดยสีแดงที่มีค่าในช่วง 60-67 ใช้เป็นดัชนีสำหรับเก็บเกี่ยวลองกองเพื่อการส่งออก และสีแดงที่มีค่า 67 เป็นต้นไป ใช้เป็นดัชนีสำหรับ เก็บเกี่ยวลองกองเพื่อไปขายในระยะใกล้ๆ ส่วน นอกจากนี้ พบว่า ค่าของสีแดงมีค่าเพิ่มขึ้น 1.4 หน่วย/วัน ซึ่ง อัตราส่วนนี้สามารถนำไปใช้ในการคาดคะเนวันเก็บ-เกี่ยวลองกองล่วงหน้าได้ ทั้งนี้เพื่อแก้ปัญหาการที่ ทำการวัดค่าสีแดงของผิวผลลองกองก่อนกำหนด ใช้ อัตราส่วนดังกล่าวมาคำนวณหาวันที่เหมาะสมล่วงหน้า ได้ โดยไม่ต้องทำการวัดซ้ำอีก อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก ผลลองกองในแต่ละซ่อสุกไม่พร้อมกัน ดังนั้น ควร สุ่มเลือกผลลองกองทั้งช่วงบน กลาง และล่าง ของแต่ละ ซ่อลองกอง ประมาณ 6 ผล มาทำการวัดและหาค่าของ สีแดงเฉลี่ยในการนำมากำหนดวันเก็บเกี่ยว

เอกสารอ้างอิง

วิจิตรธรรม ประทุมรัตน์. 2546. การผลิตลองกองเพื่อ การส่งออก (ออนไลน์). สืบค้นได้จาก: www.geocities.com/psplant/ps_seminar_Wichitwan.htm?200618. [กันยายน 20, 2551]

พวงทิพย์ แก้วทับทิม ธวัช ชิตตระการ ไตรภพ ผ่องสุวรรณ ภัทร อัยรักษ์ และ สมศักดิ์ คงแสง. 2550. การวิเคราะห์สเปกตรัมสีผิว ซ่อลองกอง (*Lansium domesticum* Corr.) เพื่อ หาช่วงเวลาเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม. ว.สงขลา นครินทร์ 29 : 1428-1438.

สุรกิตติ ศรีกุล ขจรวิทย์ พันธุ์ยางน้อย และชาย โฆรวิส, 2539. “เทคโนโลยีการผลิตลองกองให้มีคุณภาพ”. สุราษฎร์ธานี : ศูนย์วิจัยพืชสวน สุราษฎร์ธานี. 13 หน้า.

ไสว รัตนวงศ์. 2542. “การผลิตลองกองเพื่อการส่งออก”, กสิกร. 27 (กรกฎาคม- สิงหาคม 2542), 331-337.

อังสุมาลิน มิ่งเมือง มงคล แซ่หลิม และสายัณห์ สุดดี, 2546. การหาดัชนีการเก็บเกี่ยวลองกองโดย วิธีการคำนวณค่าหน่วยสะสมความร้อน. วารสาร แก่นเกษตร, 31(1), 1-8.

Ahmad Tarmizi, S., Norlia, Y., Pauziah, M. and Tham, S.L. 1998. Changes in fruit colour and composition of dokong (*Lansium domesticum* Corr.) during maturatio n. Journal of Tropical Agriculture and Food Science, 26, 127-133.

Norlia, Y. 1997. Flowering an fruiting of dokong (*Lansium domesticum* Corr.). In: Vejaysegaran, S., Pauziah, M., Mohamed, M.S. and Ahmad Tarmizi, S., ed., Proceedings of an international conference on tropical fruits, 23-26 July 1996, Kuala Lumpur. Serdang, Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MARDI), Vol 3, 281-286.



ควอซี-ไอดีลวางนัยทั่วไปของกึ่งกรุป

Generalized Quasi-Ideals of Semigroups

รัตนาภรณ์ ศรีภากรณ์¹ และ รณสรณ์ ชินรัมย์^{2*}

บทคัดย่อ

แนวคิดของควอซี-ไอดีลสำหรับกึ่งกรุปได้รับการแนะนำโดย โอ สไตน์เฟลด์ ในปี 1956 และมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง สำหรับในงานวิจัยนี้ เราศึกษา m -ไอดีลซ้าย n -ไอดีลขวา และ (m,n) -ควอซี-ไอดีล เราได้ขยายทฤษฎีสำหรับไอดีลซ้าย ไอดีลขวา และควอซี-ไอดีลของกึ่งกรุป เราแสดงว่าทุก (m,n) -ควอซี-ไอดีลของกึ่งกรุป S สามารถเขียนได้เป็นอินเตอร์เซกชันของ m -ไอดีลซ้ายและ n -ไอดีลขวาของ S ยิ่งไปกว่านั้น (m,n) -ควอซี-ไอดีลเล็กสุดเฉพาะกลุ่มของกึ่งกรุป S สามารถเขียนได้เป็นอินเตอร์เซกชันของ m -ไอดีลซ้ายเล็กสุดเฉพาะกลุ่มและ n -ไอดีลขวาเล็กสุดเฉพาะกลุ่มของ S

คำสำคัญ : ควอซี-ไอดีล, m -ไอดีลซ้าย, n -ไอดีลขวา, (m,n) -ควอซี-ไอดีล, (m,n) -ควอซี-ไอดีลเล็กสุดเฉพาะกลุ่ม

Abstract

The notion of quasi-ideals for semigroups was introduced by O. Steinfeld in the year 1956 and it has been widely studied. In this paper, we study m -left ideals, n -right ideals and (m,n) -quasi-ideals of semigroups. We generalize some theorems for left ideals, right ideals and quasi-ideals of semigroups. We show that every (m,n) -quasi-ideal of a semigroup S can be written as the intersection of an m -left ideal and an n -right ideal of S . Moreover, every minimal (m,n) -quasi-ideal of a semigroup S can be written as the intersection of a minimal m -left ideal and a minimal n -right ideal of S .

Keywords : quasi-ideals, m -left ideals, n -right ideals, (m,n) -quasi-ideals, minimal (m,n) -quasi-ideals.

¹ Department of Mathematics , PSU. Wittayanusorn School, Hat Yai, Songkhla 90112

² Department of Mathematics, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

* Corresponding Author, E-mail : ronnason.c@psu.ac.th

1. Introduction and Preliminaries

A subsemigroup Q of a semigroup S is called a *quasi-ideal* of S if $SQ \cap QS \subseteq Q$. The class of quasi-ideals in semigroups is a generalization of the class of one-sided ideals in semigroups. Moreover, every quasi-ideal of a semigroup S can be written as the intersection of a left ideal and a right ideal of S (Clifford and Preston, 1961, page 85). The notion of quasi-ideals for semigroups was introduced by O. Steinfeld in 1956 (Steinfeld, 1956) and it has been widely studied. Many papers cited in (Stienfeld, 1978), a book written by O. Steinfeld. Our aim of this paper, we study (m,n) -quasi-ideals and minimal (m,n) -quasi-ideals of semigroups.

In section 2, we study (m,n) -quasi-ideals of semigroups. We show that the intersection of an m -left ideal and an n -right ideal of a semigroup S is an (m,n) -quasi-ideal of S and every (m,n) -quasi-ideal can be obtained in this way.

In section 3, we study minimal (m,n) -quasi-ideals of semigroups. We have that every minimal (m,n) -quasi-ideal of a semigroup S can be written as the intersection of a minimal m -left ideal and a minimal n -right ideal of S .

2. (m,n) -quasi-ideals

The definition of (m,n) -quasi-ideals of semigroups are the following. A subsemigroup Q of a semigroup S is called an (m,n) -quasi-ideal of S if $S^m Q \cap Q S^n \subseteq Q$ where m and n are positive integers.

We have that a quasi-ideal Q of a semigroup S is a $(1,1)$ -quasi-ideal of S . Moreover, we have an (m,n) -quasi-ideal of S is a (k,l) -quasi-ideal of S for all $k \geq m$ and $l \geq n$. The following example show that an (m,n) -quasi-ideal of a semigroup S need not be a quasi-ideal of S .

Example 2.1. Let N be the set of all positive integer and $Q = \{3\} \cup \{k \in N \mid k \geq 9\}$. It is easy to see that Q is a subsemigroup of $N \setminus \{1\}$ under the usual multiplication. We have that

$$(N \setminus \{1\})^2 Q \cap Q(N \setminus \{1\})^3 \subseteq Q.$$

Then Q is a $(2,3)$ -quasi-ideal of $N \setminus \{1\}$.

Since $6 = 3 \cdot 2 \in (N \setminus \{1\})Q \cap Q(N \setminus \{1\})$, $(N \setminus \{1\})Q \cap Q(N \setminus \{1\}) \not\subseteq Q$. Therefore Q is not a quasi-ideal of $N \setminus \{1\}$.

The following lemma is well-known.

Lemma 2.1. Let S be a semigroup and T_i a subsemigroup of S for all $i \in I$. If $\bigcap_{i \in I} T_i \neq \phi$, then $\bigcap_{i \in I} T_i$ is a subsemigroup of S .

Proof. Assume that $\bigcap_{i \in I} T_i \neq \emptyset$. Let $a, b \in \bigcap_{i \in I} T_i$. Then $a, b \in T_i$ for all $i \in I$. Since T_i is a subsemigroup of S for all $i \in I$, $ab \in T_i$ for all $i \in I$. Hence $ab \in \bigcap_{i \in I} T_i$. Thus $\bigcap_{i \in I} T_i$ is a subsemigroup of S .

The following theorem holds.

Theorem 2.1. Let S be a semigroup and Q_i an (m, n) -quasi-ideal of S for all $i \in I$. If $\bigcap_{i \in I} Q_i \neq \emptyset$, then

$\bigcap_{i \in I} Q_i$ is an (m, n) -quasi-ideal of S .

Proof. Assume that $\bigcap_{i \in I} Q_i \neq \emptyset$. By Lemma 2.1, we have $\bigcap_{i \in I} Q_i$ is a subsemigroup of S . Next, let $c \in S^m (\bigcap_{i \in I} Q_i) \cap (\bigcap_{i \in I} Q_i) S^n$. Then $c = xq = py$ for some $x \in S^m, y \in S^n$ and $p, q \in \bigcap_{i \in I} Q_i$. Then $p, q \in Q_i$ for all $i \in I$. Then $c \in S^m Q_i \cap Q_i S^n$ for all $i \in I$. Since Q_i is a (m, n) -quasi-ideal of S for all $i \in I$, $c \in Q_i$ for all $i \in I$. Thus $c \in \bigcap_{i \in I} Q_i$. Therefore $\bigcap_{i \in I} Q_i$ is an (m, n) -quasi-ideal of S .

Note that the condition $\bigcap_{i \in I} Q_i \neq \emptyset$ is necessary. For example, let N be a semigroup of the set of all positive integers under the usual multiplication. For each $i \in N$, let $Q_i = \{k \in N \mid k \geq i\}$. It is easy to see that Q_i is a $(2, 3)$ -quasi-ideal of N for all $i \in N$ but $\bigcap_{i \in N} Q_i = \emptyset$.

Let A be a nonempty subset of a semigroup S and $\mathfrak{I} = \{Q \mid Q \text{ is an } (m, n)\text{-quasi-ideal of } S \text{ containing } A\}$. Then $\mathfrak{I}$ is not empty because $S \in \mathfrak{I}$. Let $(A)_{q(m, n)} = \bigcap_{i \in \mathfrak{I}} Q_i$. It is clearly see that $(A)_{q(m, n)}$ is nonempty because $A \subseteq (A)_{q(m, n)}$. By Theorem 2.1, $(A)_{q(m, n)}$ is an (m, n) -quasi-ideal of S . Moreover, $(A)_{q(m, n)}$ is the smallest (m, n) -quasi-ideal of S containing A . The (m, n) -quasi-ideal $(A)_{q(m, n)}$ is called the (m, n) -quasi-ideal of S generated by A .

Theorem 2.2. Let A be a nonempty subset of a semigroup S . Then

$$(A)_{q(m, n)} = \left(\bigcup_{i=1}^{\max\{m, n\}} A^i \right) \cup (S^m A \cap AS^n).$$

Proof. Let $k = \max\{m, n\}$ and $Q = \left(\bigcup_{i=1}^k A^i \right) \cup (S^m A \cap AS^n)$. Clearly, $A \subseteq Q$. Let $x, y \in Q$.

Case 1 : $x, y \in \bigcup_{i=1}^k A^i$. Then $xy \in A^t$ for some positive integer t . If $t \leq k$, then $xy \in \bigcup_{i=1}^k A^i$. If

$t > k$, then $xy \in S^m A \cap AS^n$.

Case 2 : $x \in S^m A \cap AS^n$ or $y \in S^m A \cap AS^n$. It is easy to see that $xy \in S^m A \cap AS^n$.

Therefore $xy \in Q$. Then Q is a subsemigroup of S containing A . Next, we have

$$\begin{aligned} S^m Q \cap Q S^n &= S^m \left(\left(\bigcup_{i=1}^k Y A^i \right) \cup (S^m A \cap A S^n) \right) \cap \left(\left(\bigcup_{i=1}^k Y A^i \right) \cup (S^m A \cap A S^n) \right) S^n \\ &\subseteq S^m \left(\left(\bigcup_{i=1}^k Y A^i \right) \cup S^m A \right) \cap \left(\left(\bigcup_{i=1}^k Y A^i \right) \cup A S^n \right) S^n \\ &\subseteq S^m A \cap A S^n \subseteq Q. \end{aligned}$$

Now we have Q is an (m, n) -quasi-ideal of S containing A .

To show Q is smallest, let Q' be any (m, n) -quasi-ideal of S containing A . Then $A^i \subseteq Q'$ for all positive integers i and $S^m A \cap A S^n \subseteq S^m Q' \cap Q' S^n \subseteq Q'$. Therefore $Q = \left(\bigcup_{i=1}^k Y A^i \right) \cup (S^m A \cap A S^n) \subseteq Q'$.

Hence, Q is the smallest (m, n) -quasi-ideal of S containing A . Therefore

$$(A)_{q(m,n)} = \left(\bigcup_{i=1}^{\max\{m,n\}} Y A^i \right) \cup (S^m A \cap A S^n), \text{ as required.}$$

Example 2.2. Let N be a semigroup of the set of all positive integers under the usual addition. We have

- (i) if $A = \{2\}$, then $(A)_{q(2,5)} = \{2, 4\} \cup \{k \in N \mid k \geq 6\}$ and
- (ii) if $A = \{3, 5\}$, then $(A)_{q(5,6)} = \{3, 5, 6\} \cup \{k \in N \mid k \geq 8\}$.

Let S be a semigroup. A subsemigroup L of S is called an m -left ideal of S if $S^m L \subseteq L$ where m is a positive integer. An n -right ideal of S is defined analogously. The proof of the following theorem is similar to the proof of Theorem 2.1.

Theorem 2.3. Let S be a semigroup. The following statements are true.

- (i) Let L_i be an m -left ideal of S for all $i \in I$. If $\bigcap_{i \in I} L_i \neq \emptyset$, then $\bigcap_{i \in I} L_i$ is an m -left ideal of S .
- (ii) Let R_i be an n -right ideal of S for all $i \in I$. If $\bigcap_{i \in I} R_i \neq \emptyset$, then $\bigcap_{i \in I} R_i$ is an n -right ideal of S .

Let A be a nonempty subset of a semigroup S and $\mathfrak{I} = \{L \mid L \text{ is an } m\text{-left ideal of } S \text{ containing } A\}$. Then $\mathfrak{I} \neq \emptyset$ because $S \in \mathfrak{I}$. Let $(A)_{l(m)} = \bigcap_{L \in \mathfrak{I}} L$. It is clearly see that $(A)_{l(m)} \neq \emptyset$ because $A \subseteq (A)_{l(m)}$. By Theorem 2.3(i), $(A)_{l(m)}$ is an m -left ideal of S . Moreover, $(A)_{l(m)}$ is the smallest m -left ideal of S containing A . The m -left ideal $(A)_{l(m)}$ is called the m -left ideal of S generated by A . The n -right ideal $(A)_{r(n)}$ of S generated by A is defined analogously. The proof of the following theorem is similar to the proof of Theorem 2.2.

Theorem 2.4. Let A be a nonempty subset of a semigroup S . The following statements are true.

- (i) $(A)_{l(m)} = \left(\bigcup_{i=1}^m A^i \right) \cup S^m A$.
- (ii) $(A)_{r(n)} = \left(\bigcup_{i=1}^n A^i \right) \cup AS^n$.

The following theorem is true.

Theorem 2.5. Let L and R be an m -left ideal and an n -right ideal of a semigroup S , respectively. Then $L \cap R$ is an (m, n) -quasi-ideal of S .

Proof. By properties of L and R , we have $R^m L^n \subseteq S^m L \cap RS^n \subseteq L \cap R$. Then $L \cap R$ is nonempty. By Lemma 2.1, we have $L \cap R$ is a subsemigroup of S . Next, we have

$$(S^m (L \cap R)) \cap ((L \cap R) S^n) \subseteq S^m L \cap RS^n \subseteq L \cap R.$$

Hence $L \cap R$ is an (m, n) -quasi-ideal of S .

The next theorem shows that every (m, n) -quasi-ideal can be written as the intersection of an m -left ideal and an n -right ideal of S .

Theorem 2.6. Every (m, n) -quasi-ideal Q of a semigroup S is the intersection of some m -left ideal and some n -right ideal of S .

Proof. Let Q be an (m, n) -quasi-ideal of S . Let $L = Q \cup S^m Q$ and $R = Q \cup QS^n$. To show L is a subsemigroup of S , let $a, b \in L$.

Case 1 : $a, b \in Q$. Since Q is a subsemigroup of S , $ab \in Q \subseteq L$.

Case 2 : $a \in Q$ and $b \in S^m Q$. Then $ab \in QS^m Q \subseteq S^m Q \subseteq L$.

Case 3 : $a \in S^m Q$ and $b \in Q$. Then $ab \in S^m Q^2 \subseteq S^m Q \subseteq L$.

Case 4 : $a \in S^m Q$ and $b \in S^m Q$. Then $ab \in S^m QS^m Q \subseteq S^m Q \subseteq L$.

Then L is a subsemigroup of S . Next, we have

$$S^m L = S^m (Q \cup S^m Q) = S^m Q \cup S^{2m} Q \subseteq S^m Q \subseteq L.$$

Hence L is an m -left ideal of S . Similarly, R is an n -right ideal of S .

$$\text{Since } S^m Q \cap QS^n \subseteq Q, L \cap R = (Q \cup S^m Q) \cap (Q \cup QS^n) = Q \cup (S^m Q \cap QS^n) = Q.$$

Hence $Q = L \cap R$.

3. Minimal (m,n) -quasi-ideals

An (m,n) -quasi-ideal of a semigroup S is called a *minimal (m,n) -quasi-ideal* of S if Q does not properly contain any (m,n) -quasi-ideal of S . *Minimal m -left ideals* and *minimal n -right ideals* are defined analogously. The following lemma is true.

Lemma 3.1. *Let S be a semigroup and $a \in S$. The following statements hold.*

- (i) $S^m a$ is an m -left ideal of S .
- (ii) $a S^n$ is an n -right ideal of S .
- (iii) $S^m a \cap a S^n$ is an (m,n) -quasi-ideal of S .

Proof. (i) We have $(S^m a)(S^m a) \subseteq S^m a$ and $S^m (S^m a) \subseteq S^m a$, (i) holds.

(ii) It is similar to (i).

(iii) It follows by (i), (ii) and Theorem 2.5.

The following theorem is true.

Theorem 3.1. *Let S be a semigroup and Q an (m,n) -quasi-ideal of S . Then Q is minimal if and only if Q is the intersection of some minimal m -left ideal L and some minimal n -right ideal R of S .*

Proof. Assume that $Q = L \cap R$ for some minimal m -left ideal L and some minimal n -right ideal R of S .

So $Q \subseteq L$ and $Q \subseteq R$. Let Q' be an (m,n) -quasi-ideal of S contained in Q . Then

$$S^m Q' \subseteq S^m Q \subseteq S^m L \subseteq L \text{ and } Q' S^n \subseteq Q S^n \subseteq R S^n \subseteq R.$$

It is easy to prove that $S^m Q'$ and $Q' S^n$ is an m -left ideal and an n -right ideal of S , respectively. By the minimality of L and R , we have $S^m Q' = L$ and $Q' S^n = R$. Hence $Q = L \cap R = S^m Q' \cap Q' S^n \subseteq Q'$. Then $Q = Q'$. Therefore Q is a minimal (m,n) -quasi-ideal of S .

Conversely, assume that Q is a minimal (m,n) -quasi-ideal of S . Let $a \in Q$. By Lemma 3.1, we have known that $S^m a, a S^n$ and $S^m a \cap a S^n$ are an m -left ideal, an n -right ideal and an (m,n) -quasi-ideal of S , respectively. Since $S^m a \cap a S^n \subseteq S^m Q \cap Q S^n \subseteq Q$, by the minimality of Q , $S^m a \cap a S^n = Q$.

Now we shall show that $S^m a$ is a minimal m -left ideal of S . Let L be an m -left ideal of S contained in $S^m a$. Then $L \cap a S^n \subseteq S^m a \cap a S^n = Q$. Since $L \cap a S^n$ is an (m,n) -quasi-ideal of S , therefore the minimality of Q implies that $L \cap a S^n = Q$. Then $Q \subseteq L$. Therefore $S^m a \subseteq S^m Q \subseteq S^m L \subseteq L$. This implies $L = S^m a$. Thus the m -left ideal $S^m a$ is minimal. The minimality of the n -right ideal $a S^n$ can be proved dually.

It is remarkable that not every semigroup contains a minimal (m,n) -quasi-ideal, for example we can see this example.

Example 3.1. Let N be a semigroup of the set of all positive integers under the usual addition. Suppose that N contains a minimal (m,n) -quasi-ideal Q . It is easy to see that Q is infinite. Let k be a minimum positive integer in Q . Let $Q' = Q \setminus \{k\}$. It is easy to see that Q' is an (m,n) -quasi-ideal of N and Q' is a proper subset of Q , this is a contradiction. Hence N does not contain a minimal (m,n) -quasi-ideal.

Now we give necessary and sufficient for the existence of a minimal (m,n) -quasi-ideal of a semigroup. The following corollary is obtained directly from Theorem 3.1.

Corollary 3.1. Let S be a semigroup. Then S has at least one minimal (m,n) -quasi-ideal if and only if S has at least one minimal m -left ideal and at least one minimal n -right ideal.

The following theorem holds.

Theorem 3.2. Let S be a semigroup. The following statements are true.

- (i) An m -left ideal L is minimal if and only if $S^m a = L$ for all $a \in L$.
- (ii) An n -right ideal R is minimal if and only if $a S^n = R$ for all $a \in R$.
- (iii) An (m,n) -quasi-ideal Q is minimal if and only if $S^m a \cap a S^n = Q$ for all $a \in Q$.

Proof. (i) Assume that L is minimal. Let $a \in L$. Then $S^m a \subseteq S^m L \subseteq L$. By Lemma 3.1(i), we have known that $S^m a$ is an m -left ideal of S . Since L is a minimal m -left ideal of S , $S^m a = L$.

Conversely, assume that $S^m a = L$ for all $a \in L$. To show L is minimal, let L' be an m -left ideal of S contained in L . Let $x \in L'$. Then $x \in L$, by assumption. $S^m x = L$. Now we have

$$L = S^m x \subseteq S^m L' \subseteq L'.$$

Then $L \subseteq L'$. This implies that L is minimal.

(ii) and (iii) can be proved similarly to (i).

Let S be a semigroup. S is called an (m,n) -quasi-simple semigroup if S is a unique (m,n) -quasi-ideal of S . An m -left simple semigroup and an n -right simple semigroup are defined analogously. The following theorem follows by Theorem 3.2.

Theorem 3.3. Let S be a semigroup. The following statements are true.

- (i) S is an m -left simple semigroup if and only if $S^m a = S$ for all $a \in S$.
- (ii) S is an n -right simple semigroup if and only if $a S^n = S$ for all $a \in S$.
- (iii) S is an (m, n) -quasi simple semigroup if and only if $S^m a \cap a S^n = S$ for all $a \in S$.

Proof. (i) Since S is m -left simple, S is a minimal m -left ideal of S . By Theorem 3.2(i), $S^m a = S$ for all $a \in S$.

Conversely, assume that $S^m a = S$ for all $a \in S$. By Theorem 3.2(i), S is a minimal m -left ideal of S . Then S is an m -left simple semigroup.

(ii) and (iii) can be proved similarly to (i).

Theorem 3.4. Let S be a semigroup. The following statements are true.

- (i) Let L be an m -left ideal of S . If L is an m -left simple semigroup, then L is a minimal m -left ideal of S .
- (ii) Let R be an n -right ideal of S . If R is an n -right simple semigroup, then R is a minimal n -right ideal of S .
- (iii) Let Q be an (m, n) -quasi-ideal of S . If Q is an (m, n) -quasi-simple semigroup, then Q is a minimal (m, n) -quasi-ideal of S .

Proof. (i) Let L be an m -left simple semigroup. By Theorem 3.3(i), $L^m a = L$ for all $a \in L$. For each $a \in L$, we have $L = L^m a \subseteq S^m a \subseteq S^m L \subseteq L$. Then $S^m a = L$ for all $a \in L$. By Theorem 3.2(i), L is minimal.

(ii) and (iii) can be proved similarly to (i).

Acknowledgements

The authors would like to thank referees for the useful and helpful suggestions.

References

- Clifford, A. H. and Preston, G. B. (1961). The Algebraic Theory of Semigroups. Vol. I. Amer. Math. Soc. Providence R. I.
- Steinfeld, O. (1956). Über die quasiideale von halbgruppen. Publ. Math. Debrecen. 4 : 262-275.
- Steinfeld, O. (1978). Quasi-ideals in Rings and Semigroups. Budapest. Akademiai Kiado.



การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในเครื่องแกงเผ็ดแดง ที่จำหน่ายในตลาดสด

Aflatoxin Contamination in Commercial Red Curry Paste Sold in Fresh Markets.

นริศรา ม่วงศรีจันทร์^{1*} เวณิกา เบ็ญจพงษ์²
วีรยา การพานิช³ และ ปราณิ พัฒนกุลอนันต์³

บทคัดย่อ

ผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดของประเทศไทยมีปัญหาการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปริมาณสูง โดยเฉพาะอาหารแห้งที่มีอายุการเก็บนาน การผลิตเครื่องแกงเผ็ดแดงนั้นมีวัตถุดิบสำคัญที่มีโอกาสปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน ได้แก่ พริกแห้ง และพริกไทย เพื่อทราบถึงสถานการณ์การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในเครื่องแกงเผ็ดแดงในการศึกษานี้จึงประเมินการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในเครื่องแกงเผ็ดแดงที่จำหน่ายในตลาดสด ของพื้นที่ศึกษา 5 จังหวัด ในภาคกลางของประเทศไทย รวมทั้งเครื่องแกงเผ็ดแดงที่ผลิตจากแหล่งผลิตระดับชุมชน และเครื่องแกงเผ็ดแดงที่เตรียมขึ้นเองตามหลักสุขาภิบาลที่ดี วิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่างเครื่องแกงเผ็ดแดงโดยวิธี HPLC จากการศึกษาพบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในเครื่องแกงเผ็ดแดงที่เก็บจากกรุงเทพมหานคร สุพรรณบุรี นครปฐม สมุทรสงคราม และสระบุรี ร้อยละ 58, 58, 50, 45 และ 42 ตามลำดับ โดยเครื่องแกงเผ็ดแดงจากกรุงเทพมหานคร และสุพรรณบุรี มีการเก็บตัวอย่างซ้ำ 2 ชุด พบว่า การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในตัวอย่างที่เก็บช่วงฤดูฝนสูงกว่าฤดูหนาว แต่ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่พบในตัวอย่างส่วนใหญ่ยังต่ำกว่าค่ามาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 รวมทั้งมาตรฐานของสหภาพยุโรป ยกเว้นตัวอย่างที่เก็บในฤดูฝน 2 ตัวอย่าง พบว่า เครื่องแกงเผ็ดแดงจากตลาดมีปริมาณอะฟลาทอกซินสูงกว่าเครื่องแกงเผ็ดแดงจากแหล่งผลิตระดับชุมชน และเครื่องแกงเผ็ดแดงที่เตรียมเอง อาจเนื่องมาจากที่มา และการเตรียมวัตถุดิบที่ต่างกัน ดังนั้น การเตรียมวัตถุดิบตามหลักเกณฑ์การผลิตที่ดี น่าจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถลดการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในเครื่องแกงเผ็ดแดงลงได้

¹ Institute of Nutrition, Mahidol University, Salaya, Nakhonpathom 73170

² Assistant Professor, Institute of Nutrition, Mahidol University, Salaya, Nakhonpathom 73170

³ Research scientists, Institute of Nutrition, Mahidol University, Salaya, Nakhonpathom 73170

* Corresponding Author, E-mail: nuwbe@mahidol.ac.th, narisara_mumu@hotmail.com

Abstract

The incidence of aflatoxin contamination is often high in some Thai foodstuffs, especially dried food with long self life. The main ingredients of red curry paste, such as dried chili and pepper are easily contaminated with aflatoxins. For investigation of the real problem of aflatoxin contamination in red curry paste, this study aimed to determine aflatoxin contents of commercial red curry paste that is sold in open markets from five provinces from central part of Thailand. The samples were also collected from the small scale production and homemade red curry paste prepared with good hygienic practice. Aflatoxin contents in samples were analyzed by HPLC. This study found that commercial red curry paste samples collected from Bangkok, Suphanburi, Nakhon Pathom, Samut Songkhram, and Saraburi provinces shown aflatoxins contaminate with the percentage of 58.3, 58.3, 50, 45.5 and 41.7 respectively. In Bangkok and Suphanburi, the samples were collected from two seasons; it was found that the levels of aflatoxins in the samples collecting within the rainy season tended to higher than the samples collecting in the dry season. However, the total aflatoxins in most samples were not over the levels of the standards of the Ministry of Public Health and the European Union except 2 samples collected in the rainy season. It also found that red curry past samples collected from open markets contained higher aflatoxins levels than the samples collected from small scale production and homemade red curry paste. It is possible that different preparing methods may provide different levels of aflatoxin contamination. Thus, the suitable preparation of raw materials with good practice may reduce the risk factors of aflatoxin contamination in red curry paste.

คำสำคัญ : เครื่องแกงเผ็ดแดง อะฟลาทอกซิน การปนเปื้อน

Keywords : Red curry paste, Aflatoxins, Contamination

Introduction

Food and feed contamination with toxicogenic moulds is an important issue, especially the *Aspergillus* species which is capable of growing on a great variety of food commodities and animal feed materials when the conditions of temperature, relative humidity and product moisture are favorable (Iamanka et al., 2007; Rosi et al., 2007) Aflatoxins are a group of extremely toxic metabolites produced by some *Aspergillus* species namely *A. flavus*, *A. parasiticus* and the rare *A. nomius* which grow on foods and/or feeds. Aflatoxins are a significant threat to both human and animal health because they present toxigenic, carcinogenic, teratogenic and

mutagenic potential. Twenty types of aflatoxins have been identified. Only four of them, that is, aflatoxin B_1 , B_2 , G_1 and G_2 (AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 and AFG_2), occur naturally and are significant contaminants of a wide variety of foods and feeds. *A. flavus* produces aflatoxin B_1 and B_2 while *A. parasiticus* gives rise to aflatoxin B_1 , B_2 , G_1 and G_2 . Aflatoxin B_1 is the most potent carcinogenic substance which is considered to be the most potent naturally occurring hepatocarcinogen known, the risk assessment of which is very well established (Sweeney and Dobson, 1998; Creppy, 2002) aflatoxin B_1 is classified by the International Agency of Research on Cancer as a Group 1 carcinogen (IARC, 1993)

Humans are exposed to aflatoxins via risky foods such as milk and dairy products, cereals, cacao, coffee, grapevine, dried fruits and various spices (Brera *et al.*, 2002; Colak *et al.*, 2006). The climatic conditions prevailing in the tropics are especially favorable for mould contamination and aflatoxin production (Cotty and Jaime, 2007). In Thailand, many studies found aflatoxin contamination in foodstuffs such as dried chili, garlic, onions, spices, shrimp paste, dried fish, dried shrimp, peanuts, peanut products, corn, sesame seed, rice, chili paste and curry paste (Shank *et al.*, 1972; Sauwaros *et al.*, 2530; Amara, 2537; Srisit *et al.*, 2538; Auma and Rusame, 2541; Niyom, 2547; Wirut *et al.*, 2548) Thai food is growing in popularity all over the world because of the huge variety of dishes. Thai food has a unique taste and is composed of components that are generally an advantage for health because Thai cooking makes particular use of fresh herbs and spices to create variety of dishes. Curry is a paste consumed extensively in Central part of Thailand both now and in the past. The main component of curry is curry paste which have been several type one of these is red curry paste using prepare various dishes such as Kaeng Ped, Kaeng Pa, Hor-Mok, Pad-Ped (Kunnikar and Nunta, 2542). Red curry paste preparation uses many raw materials such as dried chili, garlic, shallots, galingale, lemon grass, kaffir lime peel, shrimp paste and salt and different rural areas employ different cooking patterns of cooking and food consumption. Interestingly, many ingredients in red curry paste may have the risk of aflatoxin contamination because of unsuitable preparation and storage methods such as room temperature storage could promote fungal growth that produces toxins. That may increase

aflatoxin contamination in red curry paste impacting food safety and public health. In order to find approaches to manage and increase the safety of red curry paste, this study aimed to evaluate the situation of aflatoxin contamination in red curry paste which is the popular curry paste used in many traditional Thai foods and have higher exports. This information is useful for the improvement in the standard and quality of red curry paste which produced from various scales especially small scale production. Thus this study aimed to investigate the situation of aflatoxin contamination in commercial red curry paste sold in open markets in central part of Thailand comparing with red curry paste prepared by the local producing process.

Research Methodology

Study area: A stratified multistage sampling technique was used to select the study area.

Central part of Thailand: Five provinces (20% of total provinces in central part) those are Bangkok and four provinces in central part of Thailand, were selected by randomly including Suphanburi, Nakhon Pathom, Samut Songkhram, and Saraburi.

Bangkok was selected by purposive sampling. With a stratified sampling procedure six of fifty districts (12% of total districts) in Bangkok were randomly selected including Sai Mai, Samphanthawong, Phaya Thai, Suan Luang, Thawi Watthana and Bangkok Noi. In the second stage, a sample of distribution of red curry paste in the districts was taken from 2 stalls of fresh markets. The criteria for selection of the fresh markets sampled in the study included a large size and popularity in each district.

Suphanburi, Nakhon Pathom, Samut Songkhram, and Saraburi were randomly selected. For each province had sampling procedure following; the first stage, a sample from each province was selected by purposive sampling for the municipal district and randomly for one district outside the boundaries of the municipality. In the second stage, each district was randomly subdivided into three sub districts. In the third stage, a sample of distribution of red curry paste in the sub-districts was taken from two stalls of fresh markets selected for their large size and high popularity in each sub-district.

Sample collection:

1. A total of 84 samples of commercial red curry paste collected from fresh markets in five provinces.
2. A total of 5 samples of local producing red curry paste collected from all selected provinces except Bangkok
3. A total of 12 samples of homemade red curry paste were prepared with good practice according to the procedure in household including extrudes spoilt raw material and washing the ingredients until clean.

Determination of aflatoxin content

All samples analyzed aflatoxin contents using simple and rapid clean up method following Prapapan (1999) (Promhirangul, 1999) and derivatization techniques (TFA catalyzed reaction). Aflatoxins were separated using a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) equipped with RP 18 column and Jasco FP 920 Intelligent Fluorescence detector; excitation 350 nm, emission 450 nm. The isocratic mobile phase consisted of acetonitrile: methanol: water (25:11:64) at a flow rate of 0.9 ml/min. The injection volume was 20 μ l.

Preparation of sample

Twenty grams of sample was weighed into 500 ml screwed cap flask, 10 ml saturated NaCl solution and 100 ml chloroform was added. The flask was capped and shaken for 10 min using Wrist-action shaker set at fast rate. It was filtered through filter paper into 250 ml Erlenmeyer flask, filtration was done again through Na_2SO_4 into 100 ml glass-stopper graduated cylinder, and 50 ml of filtrate was collected and held for column chromatography. The filtrate (50 ml) was transferred to the florisil column; the solution was allowed to drain through the column by gravity. The graduated cylinder was rinsed with additional small portions of chloroform and the rinses were added to the column. When the filtrate reached the top of Na_2SO_4 column sides were rinsed with chloroform and drained similarly. The column was washed with 30 ml chloroform: hexane (1:1) and 20 ml chloroform: methanol (9:1). Aflatoxins were eluted with 30 ml acetone: water (99:1), elute was collected in 100 ml pear-shaped flask, and evaporated to dryness by rotary evaporator. The dried content was transferred to 4 ml amber vial with chloroform; it then was evaporated to dryness under stream of nitrogen with minimum heating. The residue was dissolved in 1 ml acetonitrile: water (9:1). The test solution (200 μ l) was transferred to each of two vials, 700 μ l TFA: acetic acid: water (2:1:7) was added, capped, and mixed well with Vortex. It was heated at 65°C for 8.5 min. Inject samples into HPLC in the same day as derivatized.

Preparation of standard

Aflatoxins standard (5, 10, 15, 20 and 25 μ l) were pipette to each 1 ml vial, and they were evaporated to dryness under stream of nitrogen with

minimum heating. Acetonitrile: water (9:1), 200 μ l was added; the vial was capped, and shaken with Vortex. TFA: acetic acid: water (2: 1: 7), 700 μ l was added. The vial was capped, and mixed well with vortex. It was heated at 65 °C for 8.5 min. Concentrations of standard were 1.11, 2.22, 3.33, 4.44 and 5.55 ng of AFB1, G1 and 0.33, 0.67, 1.00, 1.33 and 1.57 ng of AFB2, G2/ml.

Statistical analyses

Aflatoxin content differences were compared of samples from each province. The data has normal distribution using One-way analysis of variance (ANOVA), though data has a free distribution using Mann-Whitney-U test and Kruskal Wallis test. All statistically significant comparisons were at $P \leq 0.05$.

Results and discussion

Table 1 shows the level of aflatoxin contamination was conducted on commercial red curry paste, collected from fresh markets sampled in Bangkok, Suphanburi, Nakhon Pathom, Samut Songkhram, and Saraburi. It was found that 51% of commercial red curry paste samples in fresh markets collected from five provinces were contaminated with aflatoxins at low level, ranging from 0.41 to 9.67 micrograms per kilogram (ppb). According to Public Health Ministry Announcement No. 98, 1986 on Contaminated Food Standard, food should not be contaminated with aflatoxins over 20 ppb. Thai Community Products Standard on Curry Paste (129/2003), also using the same level, aflatoxin contamination in the red curry paste with dry chili as ingredient should not exceed 20 ppb. In addition, according to Standard of European Union, aflatoxin contamination in spices should not exceed

10 ppb. The result indicated that aflatoxin contamination of most red curry paste samples in five provinces collected in the same season (dry season) did not exceed the specified standard except two samples from Suphanburi collected during the rainy season. Aflatoxin content of samples in five provinces collecting during the dry season had no statistically significant difference ($p > 0.05$). However, this issue should be continuously monitored because the red curry paste production and distribution generally found in the market might affect aflatoxin contamination such as unsuitable storage awaiting distribution, aflatoxin contamination in raw materials from the process of cultivation, storing, and transporting after harvesting, no removal of mould-contaminated raw materials before production, or storage of raw materials in the unsuitable production places. All of these parameters created supportive conditions for aflatoxin contamination. Aflatoxin could be contaminated before cultivation because the mould which produced aflatoxin could grow in the seed and could be found in the cultivated soil. If broken products were not removed after harvest, mould and aflatoxin would increasingly spread in the products. Unsuitable drying could also increase aflatoxin in dried chili because humidity in chili would stimulate growth of this mould. Storage steps during transportation and distribution were very important because storage fungi could be high contaminated with aflatoxin if temperature and humidity was not suitably controlled (Anong, 2546). It was confirmed by the result of this study that found higher percentage of aflatoxin contamination in red curry paste collected from Bangkok and Suphanburi during the rainy season. In Suphanburi, 16.7% (2/12 samples) of red curry paste sold in the rainy season contained

aflatoxins exceeding the European Union Standard. This was probably due to the rainy season has optimum temperature and humidity for the development of fungi that could produce aflatoxins and promote the production of toxins more than the dry season (Cotty and Jaime, 2007).

Table 1 Total aflatoxins in commercial red curry paste samples collected from open markets.

Provinces	Seasonal collection	Percentage of contamination	Total aflatoxins (ppb)	
			Mean±SD	Min - Max
Bangkok,	dry	58.33 (7/12)	2.00 ± 2.88a	ND-9.67
	rainy	100 (12/12)	2.89 ± 1.25	0.99-4.29
Suphanburi	dry	58.33 (7/12)	1.64 ± 1.61 ^a	ND-4.52
	rainy	66.67 (8/12)	4.98 ± 5.47	ND-17.98
Nakhon pathom	dry	50 (6/12)	0.93 ± 1.21 ^a	ND-3.93
Samut Songkhram	dry	45.45 (5/11)	1.17 ± 1.80 ^a	ND-5.77
Saraburi	dry	41.67 (5/12)	0.63 ± 0.79 ^a	ND-1.87

^{a,b} indicated the statistically significant difference(p<0.05) of the amounts of aflatoxins between red curry paste inside each of province in the dry season.

ND = Not Detected

Table 2 shows the levels of aflatoxins in the red curry paste samples produced in five small scale production sources in 2 locations in Nakhon Pathom, and 1 each in Suphanburi, Samut Songkram and Saraburi. The contamination was detected in two red curry paste samples produced in Nakhon Pathom and Samut Songkhram at the levels of 0.31 and 0.43 ppb, respectively. However, the level of aflatoxins that found in the red curry paste samples of small scale production were lower than the level of aflatoxins in commercial red curry paste samples collected from open markets. The reason for low levels of aflatoxin is a result of appropriate procedure in raw material management before producing included removing irregular raw materials (uncompleted product, mould contamination), cutting, washing and drying processes. Data on raw material management in dried chili was obtained from 6 stalls in which was found an amount of aflatoxin in dried chili which is passed the appropriate procedure that was lower than uncontrolled dried chili as shown in Table 3.

Table 2 Total aflatoxins in red curry paste collected from five small scale production sources.

Total aflatoxins (ppb)				
Nakhon Pathom		Suphanburi (n=1)	Samutsongcham (n=1)	Saraburi (n=1)
Producer A (n=1)	Producer B (n=1)			
0.31	ND	ND	0.43	ND

Table 3 Total aflatoxins in dried chili before/after passed the appropriate procedure.

Treatment	Number of sample (n)	Total aflatoxins (ppb)	
		Mean $\pm$ SD	Min - Max
Before	6	0.28 $\pm$ 0.18 ^a (Aflatoxin G1)	0.15 - 0.63 (Aflatoxin G1)
After	6	0.13 $\pm$ 0.03 ^a (Aflatoxin G1)	0.10 - 0.17 (Aflatoxin G1)

^{a,b} indicated the statistically significant difference ($p \leq 0.05$) of the amounts of aflatoxins between before and after passed the appropriate procedure.

The result of aflatoxin contamination in homemade red curry paste is showed in Table 4. The researcher selected the suitable production models which have a good result in reducing microorganism, especially yeast and mould for preparing red curry paste following control formula and added/non added preservatives formula. The model of producing the red curry paste non added preservatives was the original formula adjusted salt quantity to 10% and roasted for 10 minutes at temperatures ranging 50 - 60°C. The red curry paste added 500 milligrams per kilogram sodium benzoate and 500 milligrams per kilogram potassium sorbate, two preservatives which were in a group of food additives approved by 129/2003 Thai Community Products Standard. There were two formulas of red curry paste used in this study, the municipal formula and the rural formula. Red curry paste added preservative both municipality and rural formulas were not found aflatoxin contamination on the production day and the final day of storage. Nevertheless, there was little aflatoxin contamination in the red curry paste non added preservatives. On the final day of storage (the days of sensory score less than two), aflatoxin was slightly higher than on the production day. Aflatoxin contamination was not found in the red

curry paste added benzoate and sorbate because these preservatives might inhibit the mould creating aflatoxins was in the group of *Aspergillus* spp., especially *Aspergillus Flavus* and *Aspergillus parasiticus* (Waranun, 2538). According to the study of Chipley (1993), the growth of *Aspergillus* spp. was inhibited by benzoic acid and benzoate salt at the lowest concentration level by 20 -300 milligrams per liter and pH of food should be 3.0 - 5.0 (Chipley, 1993). For preparation of municipality and rural red curry paste without preservatives, it found that the municipality red curry paste had more level of aflatoxins than the rural red curry paste. This was probably due to municipality red curry paste was used spices such as coriander seed, cumin, and pepper. These spices could be easily contaminated with aflatoxins (Sauvaros, 2530). Moreover, spices used for preparation red curry paste were not washed but only roasted. This normal roasting temperature of about 50 - 60 °C could not destroy aflatoxin which are heat resistant up to 260°C (Mann *et al.*, 1967). The red curry paste was prepared from several kinds of herbs and spices, especially dry chili and pepper which are at risk of aflatoxin contamination (Sauvaros, 2530). If the main raw materials such as dry chili, shallot, garlic, galangale,

lemongrass, kaffir lime skin were hygienically prepared by removing bad products, cutting and washing with a suitable method used in preparing the raw materials in this study, there was low aflatoxin contamination in the red curry paste.

Table 4 Total aflatoxins in different formulas of homemade red curry paste samples

Red curry paste	Day	Total aflatoxins (ppb)			
		Municipality formula		Rural formula	
		Experiment1	Experiment2	Experiment1	Experiment2
Control: 3.7% salt in municipality formula 10% salt in rural formula	0	ND	0.26	ND	ND
	11	0.52	0.31	ND	0.13
Adjusted salt to 10% and roasted	0	0.42	0.39	0.43	ND
	11	0.55	ND	0.48	ND
Added 500 ppm of benzoate and sorbate	0	ND	ND	ND	ND
	11	ND	ND	ND	ND

ND = Not Detected
11 days = the day was a final days of storage because red curry paste had deteriorated. Using strange odor judged deterioration of the red curry paste. Thai Industry Products Standard was settled score for odor evaluation by using four level of odor and two score mean red curry paste had bad and rancid odor but it still acceptable. The score below two was indicated that they were deteriorated.

Conclusions

Aflatoxin contents of commercial red curry paste, red curry paste produced in small scale production and homemade red curry paste did not exceed the 129/2003 Thai Community Products Standard. Commercial red curry paste and red curry paste produced in small scale production with unhygienic food handling practice had high aflatoxin contamination whereas red curry pastes hygienically produced had low aflatoxin contamination. In this study found aflatoxin contamination levels could be decreased if raw materials were prepared with good hygienic practice.

Acknowledgement

Office of national research council of Thailand provided the fund for this study. We appreciate the cooperation of Provincial Public Health office and community producers in small scale production for their valuable suggestion.

References

กรรณิการ์ พรหมเสาร์ และ นันทา เบญจศิลาภักย์. 2542. เกสรอยสำหรับไทย. เชียงใหม่: สำนักพิมพ์วรรณักษ์.

นิยม ชลิตะนาวัน. 2547. อันตรายพริกแกงสำเร็จรูปจากปนเปื้อนด้วยอะฟลาทอกซิน (Aflatoxin). วารสารศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร. 1(2): 13-16.

- วรนนท์ ศุภพิพัฒน์. 2538. อาการ โภชนาการ และสารเป็นพิษ. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แสงการพิมพ์.
- วิรัช เรืองศรีตระกูล, ทวี พรหมดี, ประดิษฐ์ เพียรรักษา. 2548. การวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินชนิดบี1 บี2 จี1 และจี2 ในอาหารจำพวกน้ำพริก โดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง. วารสารวิจัย มข. 10(3): 242-249.
- ศรีสิทธิ์ การุณยะวนิช, ดวงจันทร์ สุประเสริฐ, อุมาริบุญ, สุวัฒน์ โปษะวัฒนากุล, นพากรณ์ ปัญจะ. 2538. อะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์ในประเทศไทย. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 37(1): 19-32.
- เสาวรส อัมวิทยา, ธงรัช อนุเคราะห์นันท, พงนิย โกลมกิส, อังคณา ฉายประเสริฐ. 2530. แบคทีเรียและอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในสมุนไพร, เครื่องเทศ และเครื่องแกงในตลาดกรุงเทพฯ. สารศิริราช. 39(1): 27-36.
- อนงค์ บินทวิหค. 2546. สารพิษจากเชื้อรา: อะฟลาทอกซิน. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อมรวงศ์พุทธพิทักษ์. 2537. การปนเปื้อนของอาหารไทยระหว่าง พ.ศ. 2530-2534. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 36(1): 19-30.
- อุมาริบุญ, รัชมี วชิรโกลม. 2541. การวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินในน้ำพริกโดยวิธี TLC (Thin Layer Chromatography). วารสารวิชาการสาธารณสุข. 7(4): 482-489.
- Brera, C., Caputia, R., Maragliaa, M., Iavicolib, I., Salernoc, A., Carellib, G. 2002. Exposure assessment to mycotoxins in workplace: aflatoxins and ochratoxin A occurrence in airborne dusts and human sera. Microchem. J. 73: 167-173.
- Chipley JR, 1993. Sodium benzoate and benzoic acid. In: Antimicrobials in Foods, 2nd ed. Davidson PM, Branen AL. (Eds.) Marcel Dekker, New York, p.11.
- Colak, H., Bingol, E.B., Hampikyan, H., Nazli, B. 2006. Determination of aflatoxin contamination in red-scaled, red and black pepper by ELISA and HPLC. J Food Drug Anal. 14: 292-296.
- Cotty, P.J., Jaime, G.R. 2007. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. International Journal of Food Microbiology. 119: 109-115.
- Creppy, E. E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effect of mycotoxins in Europe. Toxicology Letters. 127: 19-28.
- Iamanka, B.T., de Manezes H.C., Vicente E., Leite R.S.F., Taniwaki M.H. 2007. Aflatoxigenic fungi and aflatoxins occurrence I sultan and dried fig commercialized in Brazil. Food Control. 18: 454-457.
- International Agency for Research on Cancer. 1993. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amine and mycotoxin. In: IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France: IARC Scientific Publication. 56: 19-23.
- Mann, G. E., Codifer, L. P., Dellea, F. G. 1967. Effect of heat on aflatoxin in oil seed meals. J Agricult Food Sci. 15: 1090-2.
- Promhirangul P. 1999. Study of aflatoxin content in noodle dishes sold in three areas of Bangkok. [M.S. Thesis in Food and Nutrition toxicology]. Nakhon Pathom: Faculty of Graduate Studies, Mahidol University.
- Rosi, P., Borsari, A., Ladi, S., Galanti, A., Fava, A., Girotti, S., Ferri, E., 2007. Aflatoxins M1

- in milk; Reliability of the immunoenzymatic assay. *Int. Dairy J.* 17: 429-435.
- Shank, R. C., Wogan, G. N., Gibson, J. B., Nondasuta, A. 1972. Dietary aflatoxins and human liver cancer. II. Aflatoxin in Market foods and foodstuffs of Thailand and Hongkong. *Fd Cosmet. Toxicol.* 10: 61-69.
- Sweeney, M. J., Dobson, A. D.W. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbial.* 43: 141-158.



ข้อแนะนำในการเขียนบทความลงวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ประเภทของเรื่องที่จะตีพิมพ์

1. รายงานผลการวิจัยและค้นคว้าหรือการสำรวจที่ยังไม่เคยตีพิมพ์ในวารสารหรือหนังสืออื่นมาก่อน
2. บทความปริทัศน์ ได้แก่ งานเขียนที่รวบรวมหรือเรียบเรียงจากเอกสารหรือหนังสือต่าง ๆ เพื่อเผยแพร่และฟื้นฟูงานด้านวิชาการระดับต่าง ๆ
3. บทความแสดงข้อคิดเห็นหรือข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในด้านวิชาการ เรื่องแปล ข่าววิชาการย่อความจากงานวิจัยหรือหนังสือใหม่ที่น่าสนใจ

รูปแบบของการเขียนและเตรียมต้นฉบับ

1. ต้นฉบับ ต้องเป็นตัวพิมพ์ Angsana New
 - 1.1 ชื่อเรื่อง ขนาดตัวอักษร 20 ตัวเข้ม ตำแหน่งตรงกลาง มีทั้งชื่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ
 - 1.2 ชื่อผู้เขียน ขนาดตัวอักษร 16 เอน ตำแหน่งขวาสุด และใส่หมายเลขไว้ท้ายนามสกุล เพื่อการระบุที่อยู่ด้านล่าง
 - 1.3 หัวข้อใหญ่ในแต่ละส่วน ขนาดตัวอักษร 16 ตัวเข้ม ตำแหน่งซ้ายสุด ยกเว้น บทคัดย่อ และ Abstract อยู่ตรงกลาง หัวข้อย่อยตามความเหมาะสม
 - 1.4 เนื้อความ ขนาดตัวอักษร 14
 - 1.5 คำว่า รูปที่ x และตารางที่ x ขนาดตัวอักษร 14 ตัวเข้ม ส่วนข้อความบรรยายต่อท้ายตัวปกติ
 - 1.6 ที่อยู่ ขนาดอักษร 12
 - 1.7 ช่องว่างระหว่างบรรทัดตามมาตรฐาน
 - 1.8 พิมพ์ลงในกระดาษขาว A4 (โรเนียวสัน) โดยใช้กระดาษหน้าเดียว ความยาวไม่เกิน 10 หน้า ส่งต้นฉบับ 2 ชุด (ไม่ต้องส่งแผ่นดิสก์ หรือแผ่นซีดีในขั้นตอนนี้ เมื่อได้รับแจ้งว่าได้ลงพิมพ์แล้ว ผู้เขียนส่งฉบับแก้ไข 1 ชุด พร้อมแผ่นดิสก์ หรือแผ่นซีดี)
2. ต้นฉบับ จะถูกพิจารณาโดยกองบรรณาธิการ และจะตอบรับการได้รับบทความโดยไม่ส่งต้นฉบับคืน ผู้เขียนควรจะอัดสำเนาเก็บไว้เป็นหลักฐานของตัวเอง 1 ฉบับ
3. ต้นฉบับ จะต้องมีความถูกต้องทั้งในด้านเนื้อหา และการใช้ภาษา รวมทั้งมีความสมบูรณ์ในรูปแบบพร้อมที่จะนำลงตีพิมพ์ได้
 4. ชื่อเรื่อง ให้ใช้ภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ ไม่ยาวเกินไป และหลีกเลี่ยงการใช้คำย่อโดยไม่จำเป็น
 5. ชื่อผู้เขียน เขียนชื่อภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษพร้อมทั้งบอกสถานที่ทำงานให้ชัดเจน
 6. เนื้อเรื่อง ใช้ได้ทั้งภาษาไทยล้วนและภาษาอังกฤษล้วน ถ้าใช้ภาษาไทย ภาษาอังกฤษที่ใช้ปนกับภาษาไทยนั้นให้พยายามแปลเป็นไทยเท่าที่จะทำได้ และให้เขียนคำเดิมกำกับในวงเล็บ การทับศัพท์ภาษาอังกฤษตลอดทั้งการเขียนตัวสะกด กรันต์ ในภาษาไทยให้ใช้ตามแบบราชบัณฑิตยสถาน

ข้อแนะนำในการเขียนบทความลงวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

7. ในกรณีของบทความวิจัย ต้องมีบทคัดย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ และแบ่งเนื้อหาของบทความเป็นบทนำ วิธีดำเนินงาน ผลการวิเคราะห์ บทสรุปและวิจารณ์

8. เิงอรรถ (footnote) ใช้เฉพาะที่จำเป็นเพื่อขยายหรือให้รายละเอียดเพิ่มเติมแก้ไขความเฉพาะตอนในบทความ

9. ตารางและภาพประกอบ คำบรรยายประกอบตารางหรือภาพประกอบควรจะสั้นและชัดเจน ถ้าเป็นภาพถ่ายให้ใช้ภาพขาว-ดำ ขนาดโปสการ์ด ภาพเขียนลายเส้นควรเขียนด้วยหมึกดำ ภาพที่เขียนต้องชัดเจนและมีขนาดที่เหมาะสม

10. เอกสารอ้างอิง หรือบรรณานุกรม แนะนำให้เขียนตามแบบที่ทางวารสารกำหนด

11. หากไม่ปฏิบัติตามข้อแนะนำในการเขียนบทความ บทความของท่านอาจไม่ได้รับการตีพิมพ์หรือตีพิมพ์ล่าช้า

ส่งต้นฉบับมาที่

กองบรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

E-mail: somkly@kku.ac.th, psupha@kku.ac.th

อภิสิทธิ์สำหรับการสำหรับผู้เขียน

เรื่องที่ได้รับการตีพิมพ์ ผู้เขียนจะได้รับวารสารฉบับนั้น 1 เล่ม

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

“ ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ”

“ With the Financial support of the Commission
on Higher Education ”

ตัวอย่าง

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันและกรดไขมันของจิ้งหรีดทองลาย (*Gryllus* sp.)
ที่เลี้ยงเพื่อการค้า

บรรจง เชื้อเมืองพาน¹ วิรัช ว่องพัฒนากุล² และ ปวีณา พงษ์คนตรี^{1*}

บทคัดย่อ

[illegible]

บทนำ

[illegible]

วิธีการ

XX
XX
XX

UNIVERSITY OF CALicut

รูปที่ 1 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

ตารางที่ 1 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

¹ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

² ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

* Corresponding Author, E-mail:

การเขียนเอกสารอ้างอิงในวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

เอกสารอ้างอิง (Reference) หมายถึง เอกสารหรือส่วนหนึ่งของเอกสารที่อ้างอิงถึงหรือแปลมาโดยตรง การเขียนเอกสารอ้างอิงในเนื้อหานี้ ให้ใช้ระบบชื่อและปี เช่น Williams (2001) รายงานว่า... หรือ... (Williams, 2001) การเขียนเอกสารอ้างอิงในตอนท้ายบทความนั้น ให้ใส่เฉพาะเล่มที่มีการอ้างอิงไว้แล้วในเนื้อหาเท่านั้น หากอ้างอิงจากเล่มภาษาไทย ต้องเขียนทั้งชื่อและนามสกุล

บรรณานุกรม (Bibliography) หมายถึง เอกสารที่ใช้อ้างอิงในลักษณะที่สรุปเป็นหลักการหรือทฤษฎีโดยมิได้อ้างอิงหรือแปลมาโดยตรง

การเขียนเอกสารอ้างอิง หรือบรรณานุกรม มีแนวทางการเขียนดังนี้

1. หนังสือ

ก. ภาษาไทย

ชื่อตัว นามสกุลของผู้แต่ง. (เลขปี พ.ศ.) ชื่อหนังสือ. (เล่มที่). (พิมพ์ครั้งที่). เมืองที่พิมพ์: โรงพิมพ์ หรือสำนักพิมพ์. เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง.

ข. ภาษาอังกฤษ

ชื่อสกุล, อักษรย่อชื่อต้น. อักษรย่อชื่อรอง. (เลขปี ค.ศ.). ชื่อหนังสือ. (เล่มที่). (พิมพ์ครั้งที่). เมืองที่พิมพ์: โรงพิมพ์หรือสำนักพิมพ์. เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง.

2. เอกสารราชการ

ชื่อหน่วยราชการ. (เลขปี พ.ศ. หรือ ค.ศ.). ชื่อเรื่อง. ชื่อหนังสือ. เมืองที่พิมพ์: โรงพิมพ์ หรือสำนักพิมพ์.

3. วารสาร

ก. ภาษาไทย

ชื่อตัว นามสกุลของผู้แต่ง. (เลขปี พ.ศ.). ชื่อบทความ. ชื่อวารสาร. เล่มที่ (ฉบับที่): เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้าย.

ข. ภาษาอังกฤษ

ชื่อสกุล, อักษรย่อชื่อต้น. อักษรย่อชื่อรอง. (เลขปี ค.ศ.). ชื่อบทความ. ชื่อวารสาร. เล่มที่ (ฉบับที่): เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้าย.

หมายเหตุ

- กรณีที่เป็นเอกสารอ้างอิงจากแหล่งอื่น ๆ นอกเหนือจากที่กำหนดข้างต้น เช่น จดสาร หนังสือพิมพ์ ฯลฯ ให้ยึดหลักการเขียนตามแบบข้างต้นโดยอนุโลม
- กรณีที่มีผู้เขียน 2 คน ให้เขียนตามแบบของผู้เขียนคนแรก แต่ให้เติมคำว่า “และ” หรือ “and” หน้าชื่อสุดท้ายในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ
- กรณีที่มีผู้เขียนมากกว่า 2 คนขึ้นไป ให้ใส่เฉพาะผู้แต่งชื่อแรกและใส่คำว่า “และคณะ” หรือ “et al.” ในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ (เฉพาะในเนื้อหาเท่านั้น)
- ถ้าเอกสารที่ถูกอ้างอิงอยู่ในระหว่างตีพิมพ์ ให้บอกรายละเอียดมากที่สุดและใช้คำว่า “ระหว่างตีพิมพ์” หรือ “in press” ในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ โดยวงเล็บต่อท้ายเอกสารอ้างอิงนั้น



มหาวิทยาลัยขอนแก่น

