



วารสาร

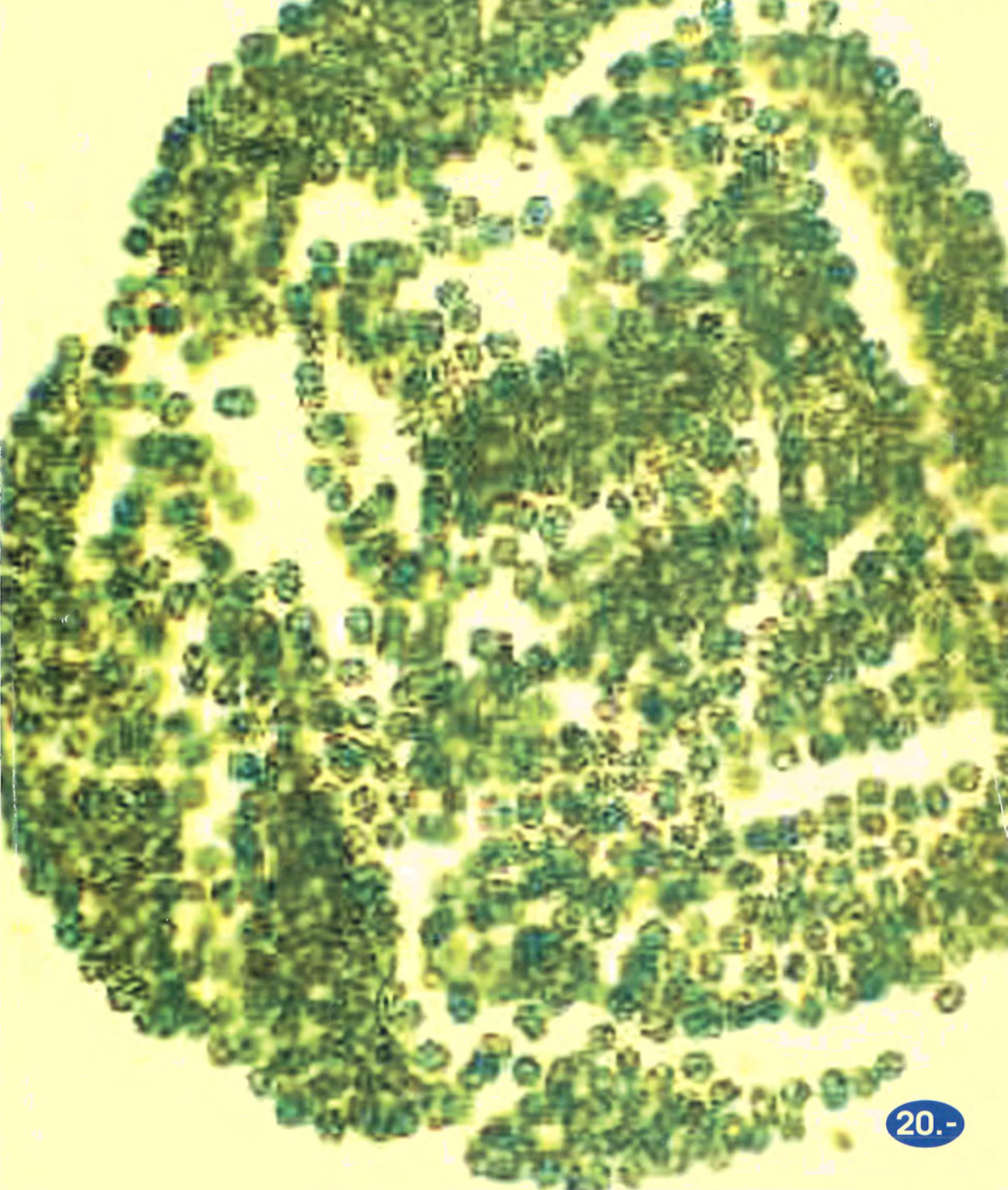
ISSN 0125 - 2364

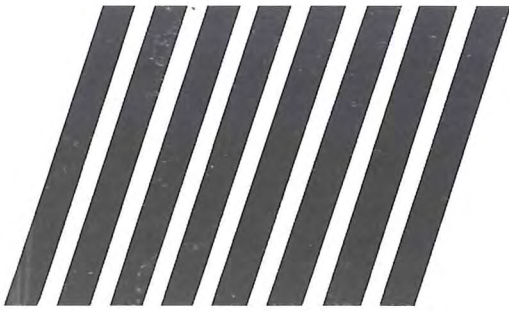
วิทยาศาสตร์ มข.

K K U S C I E N C E J O U R N A L

ปีที่ 30 ฉบับที่ 2 (เม.ย. - มิ.ย. 45)

Vol. 30 No. 2 (Apr. - Jun. '02)





วิทยาศาสตร์
KKU SCIENCE JOURNAL

ISSN 0125-2364

เจ้าของ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สำนักงาน

คณะวิทยาศาสตร์ ตึก 6
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อส่งเสริมและเผยแพร่วิชาการ ในสาขาวิชาต่าง ๆ ทางด้านวิทยาศาสตร์
2. เพื่อเผยแพร่ผลงานด้านการวิจัย และการศึกษา ค้นคว้าของอาจารย์และนักศึกษา
3. เพื่อเป็นสื่อกลางการแลกเปลี่ยนความรู้และแนวความคิดทางวิชาการระหว่างอาจารย์ นักศึกษาและผู้สนใจ ทั้งภายในและภายนอกสถาบัน

กำหนดออก

ปีละ 4 ฉบับ

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

ค่าบำรุง ปีละ 75 บาท ทยปสีก เล่มละ 20 บาท

การบอกรับเป็นสมาชิก

แจ้งความจำนงค์เป็นจดหมาย หรือกรอกใบสมัครเป็นสมาชิก พร้อมส่งค่าบำรุงเป็นราคาเต็ม หรือเช็คไปรษณีย์ในนามของนางบุญกั้น เหลือล้น ฝ่ายจัดการ สั่งจ่าย ป.ท.มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

ที่ปรึกษา

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
รองคณบดีฝ่ายวิชาการ

บรรณาธิการ

มานิตย์ โหมิตระกูล

กองบรรณาธิการ

เฉลิม เรื่องวิรัชชัย
สมเดช กนกเมธากุล
ศักดิ์สิทธิ์ จันทน์ไทย
บำรุง สมสวัสดิ์
วิทยา อมรกิจบำรุง
ประนอม จันทรโนทัย
นฤมล แสงประดับ
เสาวนิต ทองพิมพ์
พิสิษฐ์ เจริญสุดใจ
เที่ยง ภูมิสะอาด
อำนวยการ มณีศรีวงศ์กุล
บุญทรัพย์ ไวล่า

ฝ่ายศิลป์และภาพ

กิเลน ดิณนรเศรษฐ์
บุญส่ง กองสุข

ฝ่ายเศรษฐกิจ

บุญคุ้ม เหลือล้น

ฝ่ายจัดการและ เลขานุการ

ทัศนีย์ จิตตะกวี
สมศักดิ์ อุ่ณจันท์
สุคนธ์ กลิ่นผกา

บทความและงานวิจัย
ได้รับการกลั่นกรอง
จากผู้ทรงคุณวุฒิ

บทความหรือข้อคิดเห็นใด ๆ ในวารสารนี้เป็นของผู้เขียน ไม่จำเป็นต้องสอดคล้องกับทัศนะของกองบรรณาธิการ

วารสาร

วิทยาศาสตร์บูรพา

K K U S C I E N C E J O U R N A L

ปีที่ 30 ฉบับที่ 2

Volume 30 Number 2

บรรณาธิการแถลง

บทความ

- A New Authentication Scheme
for Distributed Systems

Selma Abedelrahman

Lawan Ahmed

Mohamad Daud

Abdul Rahman Ramli..... 75

- Antibody Directed Enzyme Prodrug
Therapy (ADEPT)

Natthida Weerapreeyakul..... 88

- มหันตภัยสำหรับพิษ

ธีรศักดิ์ สมดี..... 99

- ทฤษฎีพาโกรัสสำหรับพื้นที่

สกล คงบุญ..... 108

วารสาร

วิทยาศาสตร์ชุมชน

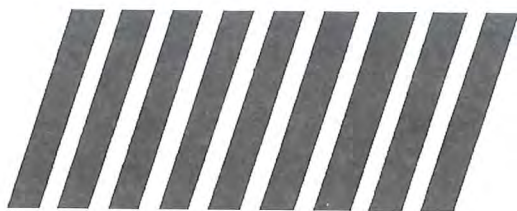
K K U S C I E N C E J O U R N A L

ปีที่ 30 ฉบับที่ 2

Volume 30 Number 2

งานวิจัย

- Synthesis and Affinity of 4H-[1,2,4]-
triazolo-[4,3-a]-[1,4]-benzodiazepines
as Selective Cholecystokinin Ligands
Eric Lattmann
Michael Offel
David R. Poyner
Pornthip Arayarat..... 114
- การศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียโอซิน
ที่ผลิตโดยแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จาก
อาหารหมัก
ปาริชาติ พุ่มขจร
พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ..... 126
- ระเบียบวิธีเพโทรฟ-กาเลอรีนขึ้นประกอบอันตะ
ของปัญหามลภาวะทางอากาศสถานะอยู่ตัว
สุพจน์ ไวทยางกูร..... 137



075875 ISSN 0125-2364
วิทยาาสตร์
KKU SCIENCE JOURNAL

Publisher

Faculty of Science, Khon Kaen University,
Thailand.

Office

Faculty of Science, Building 6, Khon Kaen
University.

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 |

Subscription rate

75 baht per annum. Single issue price
20 baht.

Membership

Membership request can be made by letter or by completing the membership form, with the fee paid in the form of a postal order or postal cheque sent to Mrs. Boonkoom Lualon, Managing Staff, Khon Kaen University Post Office, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002.

Advisory Committee

Dean, Faculty of Science
Associate Dean for Academic Affairs

Editor

Manit Kositrakun

Editorial Board

Chalerm	Ruangviriyachai
Somdej	Kanokmedhakul
Saksit	Chanthai
Bamrung	Somswasdi
Vittaya	Amornkitbamrung
Pranom	Chantaranothai
Narumon	Sangpradub
Saowanit	Tongpim
Pisit	Chareonsudjai
Tiang	Poomsa-ard
Amnuay	maneesriwongkul
Boonsup	Waikham

Artists

Kilen	Tinnoraset
Boonsong	Koungsook

Treasurer

Boonkoom	Lualon
----------	--------

Managing Staff and Secretary

Tassanee	Jittakhawee
Somsak	Unjantee
Sukhon	Klinpaka

**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.

บรรณานุกรม *แดง*

เรียน ท่านสมาชิกวารสาร ฯ และท่านผู้อ่านที่รัก

เนื่องจากวารสารฯ ปีที่ 28 (2543) มีเพียง 2 ฉบับ (ฉบับที่ 1 และฉบับที่ 2) และวารสารฯ ปีที่ 29 (2544) มีเพียงฉบับเดียว (ฉบับที่ 1-4) ดังนั้น ผู้ที่สมัครเป็นสมาชิกในปี พ.ศ. 2543 จะได้รับวารสารฯ ปีที่ 29 ฉบับที่ 1-4 และวารสารฯ ปีที่ 30 ฉบับที่ 1 เป็นการชดเชย ในขณะที่ผู้ที่สมัครเป็นสมาชิกในปี พ.ศ. 2544 จะได้รับวารสารฯ ปีที่ 30 ฉบับที่ 1 ฉบับที่ 2 และฉบับที่ 3 เป็นการชดเชย โดยท่านไม่ต้องจ่ายค่าบำรุงเพิ่มเติมแต่ประการใด

สวัสดิ์ครับ
บรรณาธิการ

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

A New Authentication Scheme for Distributed Systems

Selma Abedelrahman¹, Lawan Ahmed², Mohamad Daud¹ and Abdul Rahman Ramli²

Abstract

With the increasingly widespread use of computer networks, the achievement of privacy and security has become increasingly important. In the past decade, various kinds of authentication mechanisms have been developed for protecting information or resources from unauthorized access. However, most of them are either vulnerable or very expensive to implement. In this paper, we analyzed the weaknesses of most of the developed systems and proposed a new distributed access control mechanism. The proposed model is a combination of some existing schemes in a very efficient and cost-effective manner. Unlike most of the known authentication schemes, our new authentication scheme can be practically implemented.

Introduction

Access to remote instrumentation resources via open networks, whether for monitoring, control of experiments, or collection and manipulation of data requires that authentication and access control mechanisms be in place in order to provide safeguards against unauthorized access to assure confidentiality as well as privacy of proprietary. Moreover, awkward, intrusive, and expensive security will delay widespread use of remote instrument resources in open environments (Ford, 1993). In addition, security architecture and supporting infrastructure should be general enough to enable enforcement of resource owner specified use-conditions that can also be used for operations like automatic brokering of computing and storage resources.

In order to provide the required capabilities in a manageable, cost-effective, and usable manner, the security architecture must be flexible and effective, and easily deployed, administered, and used. In order to realize its potential not only for transparent access control, but also as the basis of an

¹ Department of Bio-agric Engineering, Universiti Putra Malaysia (UPM), 43400, Serdang Selangor, Malaysia

² Department of Computer and Communication Systems Engineering, Universiti Putra Malaysia (UPM), 43400, Serdang Selangor, Malaysia

automated resource brokering system, all aspects of the security process after certificates are obtained must be able to be automated (Gollmann, 1999). The overall goal of the security architecture, then, is to encode, distribute, protect, and then act on information that is needed to provide routine, secure availability of remote resources in a widely distributed environment, and to enable a level of automated processing that will permit resource brokering (Park, 1999).

This paper is organized as follows: The next section describes the current access control mechanism, and the drawback of each mechanism is highlighted. It briefly discusses the concept of cryptography and its role in access control. This gives a brief discussion of the related cryptographic and security systems concept and their limitations. We introduce the proposed model in section three, which defines the system design for the purpose of description, analysis, implementation, and operation plans. The last section concludes the findings.

Current Access Control Systems

At present, people rely less and less on personal face-to-face contact as they need to use computer and telecommunication technology to access information both at home, office, shops, etc. Therefore, this signifies the importance of protecting information from unauthorized access. The aspect of protecting information by authenticating users to ensure authorized access is commonly known as the *Access Control System (ACS)*.

In the 1970s, under the sponsorship of the US Department of Defense, work on developing models for secure information systems was carried out. Bell and La Padula (1973) published a paper that modeled computer security after military secrecy methods and Biba (1977) published another based on integrity. One of the constraints of Bell La Padula model is that it was developed in the context of military secure systems and assumed the existence of a method of classifying the security levels of users and information. The concept of "mandatory access control" is not appropriate for commercial information systems as there is no application of security classifications to data and security clearance accorded to employees in commercial organizations.

There has been further research but these are largely deviations based on the above two models, like the Clark-Wilson model (Clark, 1987). In 1983, the US Government introduced the Trusted System Evaluation Criteria (TSEC) to provide computer manufacturers with a set of guidelines and an evaluation system for the development of trusted computer systems, known as the Orange Book. This prompted commercial and government organizations to turn to TSEC as a guideline for the development of secure information systems. The European Community produced a set of criteria called the ITSEC. It is common for manufacturers to build the criteria spelt out into their new commercial product. The drawback of TSEC and ITSEC is that their specifications are limited to the use of mathematical concepts to achieve the objective of maintaining secrecy and integrity by introducing

concepts like mandatory and discretionary access controls. There are no specifications for the development of access devices and it is largely left to technologists.

Currently there are several types of access devices. Generally, they fall into one of the following categories:

1. Verification of something known, like password, PIN. This category is known as *codeword*. Details are provided in the next subsection.
2. Verification of something possessed, like smart card. This is referred to as *token*. Token has some drawbacks; as there are many cases of forgery of tokens, people have also been known to be complacent in their handling of the token.
3. Verification of some unique features of our body. This is known as *biometric*. One of the limitation of this method is that it is very expensive to implement. Moreover, it is also not common and therefore cannot fit into our daily life style.

1. Password (Codewords)

Identification is an essential part of securing information processing systems and networks. Source identification can be achieved by the use of either secret key or public key cryptosystems. In general, it is the process of obtaining assurance that the identity of some participant in a networking scenario is as claimed. For example, when a user seeks the services of a computer, the computer needs to make sure that the user is not forging a false identity. The classical solution to this is through the use of *passwords*.

The National Computer Security Center defines the probability of guessing a particular password as:

$$P = \frac{L \times R}{S}$$

Where, L is the password lifetime (the maximum amount of time it can be used before it must be changed). R is the guess rate (the number of guesses per unit time that it is possible to make). S is the password space (the total number of unique passwords that can be used). S is defined in turn as $S = A^M$, where A is the number of characters in the alphabet (the set of characters that may be used in a password), and M is the password length.

If we assume that most people restrict their passwords to upper-case and lower-case letters, numbers, and punctuation. A takes a value of about 92. Now, let us assume that a password lifetime is up to one year, and that a password can be tried at a rate of 1,000 per second (a reasonable value on many of today's architectures), we can compute the probabilities of guessing passwords of various lengths as follows:

Table 1 Probability of guessing passwords

Password lifetime	Password length	Probability of guessing
1 month	6	1 in 250
	7	1 in 21,500
	8	1 in 1,980,000
3 months	6	1 in 78
	7	1 in 7,200
	8	1 in 660,000
6 months	6	1 in 39
	7	1 in 3,600
	8	1 in 330,000
1 year	6	1 in 19
	7	1 in 1,800
	8	1 in 165,000

As we lower our estimate of A (for example, it would probably be more realistic to assume only letters and numbers, for a value of 62) or increase our estimate of R (to account for faster processors), these probabilities only get worse. Manipulating our equation also gives us a procedure for determining the minimum acceptable password length for a given system:

1. Establish an acceptable password lifetime L (a typical value might be one month).
2. Establish an acceptable probability P (the probability might be no more than 1 in 1,000,000).
3. Solve for the size of the password space S , using the equation derived from the previous one:

$$P = \frac{L \times R}{S}$$

4. Determine the length of the password, M , from the equation:

$$M = \frac{\log S}{\log A}$$

Using this procedure with $L = 1$ month, $R = 1,000$ guesses/second, $A = 92$, and $P = 1$ in 1,000,000, we end up with $M = 7.85$, which rounds up to 8. Thus the minimum acceptable password length to insure no better than 1 in 1,000,000 chance of guessing the password is eight characters. There are other means for securing codewords. One of the most effective means is known as a one-way function.

1.1 One-way functions

A function $f: X \rightarrow Y$ is one-way if it is easy to compute $f(x)$ for every $x \in X$, whereas it is hard for most $y \in Y$ to figure out any $x \in X$ such that $f(x) = y$ (Brassard, 1988). However, our current state of knowledge does not allow us to prove that one-way functions exist at all. Nevertheless, we have candidates in the sense of functions that we know how to compute efficiently whereas no efficient algorithms are known to invert them. A simple example of a candidate one-way function is integer multiplication. It is easy to multiply very large integers whereas even the most powerful computer with the best available algorithm is incapable of factoring a mere three hundred digit number that is the product of two roughly equal size primes. Incapable means “incapable within a reasonable time such as the age of universe”.

Example of a candidate one-way function is modulo exponentiation. Let n and a be integers and that $1 < a < n$, and let the function $f_{a,n}: \mathbb{Z}_n \rightarrow \mathbb{Z}_n$ defined by $f_{a,n}(m) = a^m \bmod n$. It is not immediately obvious that this function can be computed efficiently when all the three parameters (a , n and m) are several hundred digit long. By analogy with real analysis, the reverse operation is known as the discrete logarithm problem: given integers a , n and x , find some integer m such that $a^m \bmod n = x$. For example $5^4 \bmod 21 = 16$, hence 4 is a solution to the discrete logarithm of 16 in base 5, modulo 21. 3 on the other hand, has no logarithms base 5, modulo 21. No algorithm is currently known to exist for the computation of large discrete logarithms in a reasonable time, even on the fastest computers.

One-way functions are useful for password protection. A notion more relevant to cryptography is that of trap-door one-way functions. A function $f: X \rightarrow Y$ is trap-door one-way if it can be computed efficiently both forwards and backwards yet one can disclose an efficient algorithm to compute f such that even complete knowledge of how this algorithm works does not enable one to figure out an efficient algorithm to reverse the computation.

2. Cryptographic mechanism

Cryptography is the method of converting data from a human readable form to a modified form and then back to its original readable form to make unauthorized access difficult. Cryptography is needed to make electronic transactions as trustworthy and legally binding as physical communication.

Different access control mechanisms with high level of security have been developed. So one may like to know the role of encryption techniques in such system. One of its use is, of course, its standard application – the protection of data transmitted across conventional links. Generally, cryptography is used to:

- ensure data privacy by encrypting data.
- ensure data integrity by recognizing if data have been manipulated in an unauthorized way.
- ensure data uniqueness by checking that data are “original”, and not a “copy” of the “original”. The sender attaches a unique identifier to the “original” data. This unique identifier is then checked by the receiver of the data.

The original data may be in a human-readable form such as a text file, or it may be in a computer-readable form such as a database, spreadsheet or graphics file. The original data are called unencrypted data or plain text. The modified data are called encrypted data or cipher text. The process of converting the unencrypted data are called encryption. The process of converting encrypted data to unencrypted data are called decryption. Cryptography can be classified as either conventional or asymmetric, depending on the type of keys used.

2.1 Symmetric algorithm

In order to convert the data, you need to have an encryption algorithm and a key. If the same key is used for both encryption and decryption, that key is called a secret key and the algorithm is called a symmetric algorithm. Symmetric algorithms include DES, Triple DES, Rijndael, RC2, RC4, IDEA, Blowfish, CAST, Red Pike and a host of others.

The Data Encryption Standard (DES) was invented by the IBM Corporation in the 1970s. During the process of becoming a standard algorithm, it was modified according to recommendations from the National Security Agency (NSA). The algorithm has been studied by cryptographers for nearly 20 years. DES has a 56-bit key, which offers 2^{56} or 7×10^{16} possible variations. The relatively short length of the key has been perceived as a weakness of DES, and DES ciphers have been cracked in increasingly short periods of time. On January 2, 1997, the National Institute of Standards and Technology (NIST) in the U.S. announced the proposed development of an Advanced Encryption Standard (AES) to replace DES as a federally-sanctioned trusted symmetric encryption algorithm. On September 12, 1997, NIST made a formal call for researchers to submit algorithms as candidates for the AES. Fifteen candidates were accepted, and in August 1999, these were narrowed down to five finalists. On October 2, 2000, NIST announced that Rijndael, invented by the Belgian researchers Joan Daemen and Vincent Rijmen, was the winner.

Rijndael is a block cipher with a 128-bit (16-byte) block. However, DES's speed and reliability and (primarily) the convenience associated with the fact that it has become the world standard make it likely that DES will continue to be used – at least until its successor, Advanced Encryption Standard (AES), has been finalized and widely implemented.

Triple-DES is a method of using DES to provide additional security. Triple-DES can be done with two or three keys. Since the algorithm performs an encrypt-decrypt-encrypt sequence, this is sometimes called the EDE mode.

2.2 Asymmetric algorithm

If different keys are used for encryption and decryption, the algorithm is called an asymmetric algorithm. There are few asymmetric algorithms in common use. These include RSA, DSA and Diffie-Hellman as well as El Gamal and various forms of Elliptic Curve Cryptography (ECC). ECC represents a different way of doing public-key cryptography. The major advantage of ECC over other public-key algorithms is the smaller key size. A fairly typical key size for RSA is 1024 bits, whereas a 160-bit ECC key offers the same level of security. Elliptic curve cryptography uses a different algebraic group from the other asymmetric algorithms. The public keys and private keys are defined as points on an elliptic curve. In effect, ECC is an emerging technology that is still being developed. It is not as widely implemented in applications as RSA or DSA.

Asymmetric algorithms deal with extremely complex mathematics typically involving the factoring of large prime numbers. Asymmetric algorithms are typically stronger than a short key length symmetric algorithm but because of their complexity, they are used in signing a message or a certificate. They are not ordinarily used for data transmission encryption.

3. Comparing the two schemes

The security of asymmetric ciphers comes from the fact that it is very hard to derive one key, given the other. The security of symmetric ciphers depends entirely on how securely the users store the keys. The different types of cipher are suited to different situations. Asymmetric ciphers have the useful property that one key can be made freely available (the “public key”) while the other is kept secret, known only to the owner (the “private key”). The keys can then be used for two purposes:

- i) To securely transmit data to the owner without having to agree a shared secret key for that data by encrypting it with the owner’s public key.
- ii) For the owner to prove his/her identity by encrypting data of an agreed form with his/her secret key; if the public key decrypts it to the correct form, then the owner must have encrypted it. This is the basis of *electronic signing*.

Asymmetric ciphers frequently involve complicated mathematics such as repeated modular multiplication of numbers up to and over 1000 bits in length; this makes them very slow to implement. For this reason, they are used mainly to encrypt small amounts of data such as the key for a symmetric algorithm. For large amounts of data, we first encrypt the data with a symmetric algorithm and then encrypt the symmetric key with an asymmetric algorithm.

In general, longer keys provide stronger encryption. The length of a key is usually given in bits, and represents how many possible keys there are. If a key is 8 bits long, there will be 2^8 possible keys, or 256. If a key is 40 bits long, there will be 2^{40} , or just over 1,000,000,000,000. The longer the key, the more difficult it is to crack the cipher simply by trying all possible keys.

For symmetric ciphers, the best attack is usually to try all possible keys. For asymmetric ciphers, there is a mathematical relationship between the encryption and decryption key that an attacker can use to simplify the search. This means that the keys for asymmetric ciphers need to be longer than the keys for symmetric ciphers to achieve the same level of security. For example, it takes the same amount of effort for researchers to break 56-bit DES (a symmetric cipher) as it takes to break 512-bit RSA (an asymmetric cipher).

However, the speed of each algorithm is worth considering. Symmetric ciphers have the advantage of speed; they frequently run between 100 and 1,000 times faster than typical asymmetric ciphers. This makes them the cipher of choice when you are encrypting files for local storage. If you want to send a secure message to someone else, however, you need a way of securely transmitting the key. The idea of combining symmetric and asymmetric ciphers to form a hybrid protocol to send secure messages forms the basis for most current working cryptographic architectures. The following simple secure communications protocol illustrates this.

1. Generate a DES key.
2. Encrypt the message M with the DES key to get M^* .
3. Get the recipient's RSA public key.
4. Encrypt the DES key with the recipient's RSA public key to get K^* .
5. Send $\{K^*, M^*\}$.

4. Other related control mechanisms

Router– A router has the ability to filter IP addressees, allowing you to limit lists of addresses attempting to access your site. The major drawback of this mechanism is that client firewalls and proxy servers use the router's address instead of that of the client's workstation. Another drawback is that routers are usually difficult to manage, and do not support authentication (Yeager and Mcgrath,1996).

Firewall– A firewall can provide access control by IP address, Internet domain and network service (e.g. HTTP or FTP). It can also provide user authentication using application proxies. The major drawback with an application-level approach is that it only provides server-level access, not directory- or page-level.

Web server– A Web server can provide access control based on hostname, Internet domain, shared secret (username/password), digital certificates and tokens. The drawback is that

administration is different for each vendor, and the authorization model is not scalable (Yeager and Mcgrath, 1996).

Application server– An application server receives requests from the Web server, and usually provides username/password authentication and session time-outs. The drawback with an application-level approach is that administration is usually accomplished programmatically (Stein, 1998).

DBMS– Operating at the application level, database management system (DBMS) security protects tables based on access control lists. The user's authentication information must be passed from the Web server to the back-end DBMS. Administration, however, is very complex and not scalable, and the DBMS slows down considerably due to security checking (Jepson, 1996).

The Proposed Model

Considering the above mentioned lapses/drawback of the mechanisms, we develop a new scheme that combines some of the techniques in a cost-effective manner. Briefly, our design is based on the following objectives:

1. Create a system which will develop a “profile” for each user by type of service and access method. Each user can vary his inquiry data based on the type of services he requests.
2. Allow interactive input for choice of variables and parameters.
3. Make it easy to modify, delete and add variable as service offerings change.
4. Provide an error message explaining rejection for each captured record.

The data characteristics of the system have to be specific and unique based on type of web access data being analyzed. Unique data fields can be isolated through the interactive function of the system to determine critical fields. The data will determine the solution path.

The data fields in this system are:

1. Type of access
2. User name
3. User identification
4. Password
5. Email address
6. Location of the user

This type of data can be used to determine several types of variations. Possible variations include access from different locations or different types of access. The general framework is given in Figure 1.

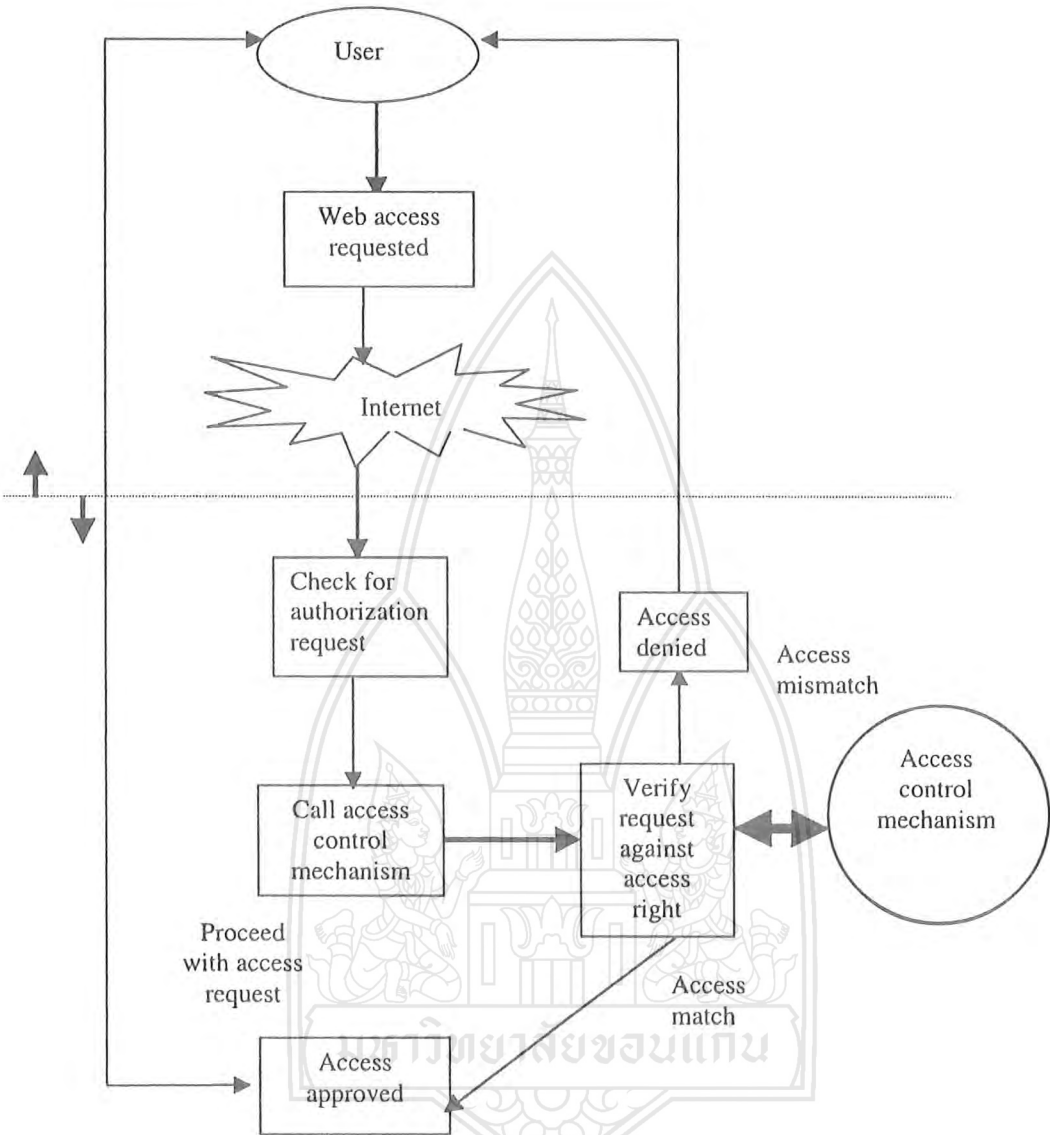


Figure 1 General framework

System characteristics and implementation

Inquiry records are edited to eliminate invalid records. Invalid records are pulled since they will make resulting patterns skew due to erroneous data in fields if the record is acceptable to the system. The resulting file consists of valid inquiries only. Valid records are sorted based on key variables contained in the record.

The pattern recognition module processes the output. It contains a description of variables and a pattern file. This system has the capability of interactive input for choice of variables and parameters. The pattern recognition module updates the profile pattern file through self-educating logic. The inquiry is analytically compared to the inquiry profile pattern and model of illegitimate access based on the information provided by the user during registration.

The file is in a format that allows further processing by investigators to analyze inquiry records that are convenient for investigators since they are manipulating questionable data only. The system contains a report module that can provide reports to security for a follow-up. The software used for building the system is JAVA Programming with MICROSOFT VISUAL J++ 6.0.

The module of the system is the request module which is embedded in user's browser to accept inputs and send them from the client end to the server end. The inputs include information with regard to the users as shown in Figures 2a, 2b, 2c and 2d. The system will later use this input to verify the users when a request for access is made.

Figure 2a Information request form

Figure 2b Confirmation details

Username:

Password:

please keep your password save for login next time

Figure 2c User name and password prompted

Client

Connect to:

Username:

Password:

User access

☐ First time ☒ Second time ☐ Third time

User Request

Figure 2d Subsequent request

Conclusion

In real practice, no single mechanism can solve today's security problems. Each can only address a piece of the problem. It is, therefore, essential to combine some of the mechanisms if optimum security is to be achieved. The proposed model is an example of such improvement in the area of authentication and access control. Though this is the first phase of our result, the result has been tested on different servers, and the outcome is as expected. As our web access control methods evolve, we will have methodologies in place to provide more secure environment.

References

- Bell, D. and LaPadula, L.J. (1973). Secure Computer System: Mathematical Foundation and Model. Vol.2. Mitre Corp, MTR 2547.
- Biba, R.R. (1977). Integrity Considerations for Secure Computer Systems: Unified Exposition and Multics Interpretation. Mitre Corp., MTR 3153.
- Brassard G. (1988). Modern Cryptology (Lecture Note in Computer Science 325). Springer-Verlag.
- Clark, D. and Wilson, D.R. (1987). A Comparison of Commercial and Military Computer Security Policies. IEEE Symposium on Security and Privacy.
- Ford, W. 1993. Computer Communications Security. New Jersey: PTR Prentice Hall.
- Gollmann, D. (1999). Computer Security. Chichester: John Wiley & Sons.
- Jepson, B. (1996). World Wide Web Database Programming for Windows NT. Toronto: Artech House, Inc.
- Lewis, L. (1995). Managing Computer Networks: A Case-based Reasoning Approach. Chichester: John Wiley & Sons.
- Park, J. (1999). Secure Attribute Services on the Web. George Mason University, Ph.D. Thesis [URL: [http:// www.gmu.edu/](http://www.gmu.edu/)].
- Stein, L. D. (1998). Web Security: A Step-by-step Reference Guide. Massachusetts: Addison Wesley.
- Yeager, J. N. and McGrath, E. R. (1996). Web Server Technology. San Francisco: Morgan Kaufmann Publisher, Inc.
- <http://www.dev.baltimore.com>
- <http://www.er.doe.gov/production/octr/mics>
- <http://www-itg.1b1.gov/~johnston>.

Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT)

Natthida Weerapreeyakul¹

Introduction

Many strategies have been exploited in the treatment of cancer such as chemotherapy, surgery, and radiation. However, due to the toxicity and lack of selectivity of the conventional chemotherapy, the new concept of targeting anticancer drugs by antibodies to the tumor antigen began in the early 1900s after the tumor antigens were defined. The idea of using enzymes as amplifiers to convert relatively nontoxic prodrugs into active cytotoxic agents had been explored in 1960s. This strategy has been called antibody directed enzyme prodrug therapy or ADEPT (Bagshawe, 1987 and 1990).

ADEPT Principle

ADEPT is a two-step approach (Figure 1). A conjugate of enzyme with a monoclonal antibody (or fragment) is administered to the body and localized at tumor sites as it is recognized by the antigen on the surface tumor cell membrane or in the extracellular fluid of the tumors. Thus the antibody-enzyme conjugate (AEC) is trapped in the tumors. After the AEC is localized at tumor sites and cleared from other tissues and blood to which the antibody does not bind, the prodrug will be administered systemically. Therefore, the prodrug is not activated in the normal tissues or blood. Administered prodrugs are converted to active cytotoxic drugs at the tumor sites, diffuse through the tumor mass and enter cells that fail to exhibit antigen as well as those that are antigenically marked. This phenomenon is called bystander effect.

¹ Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

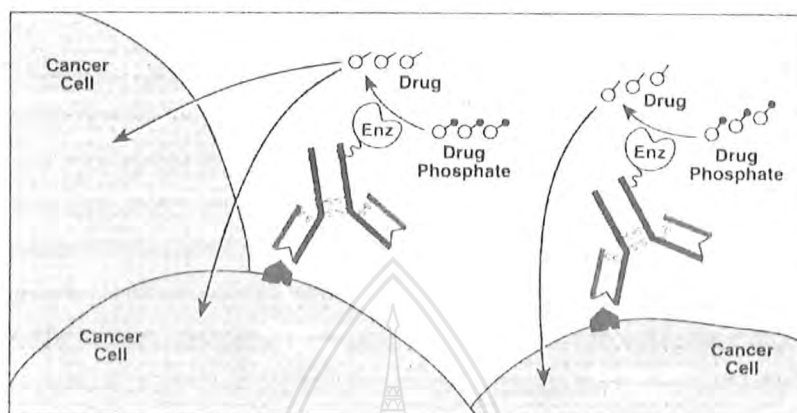


Figure 1 ADEPT principles. The prodrugs are activated to cytotoxic drugs by the enzyme present at the tumor. This activation occurs specifically at the tumor due to the binding between antibody–enzyme component and tumor antigen (Hudson and Black, 1992).

Potential advantages of ADEPT

A single enzyme molecule from the antibody–enzyme conjugate can activate many hundreds of prodrug molecules. Thus it overcomes the dosage problem of direct antibody–drug conjugates. The active drug will be generated in the extracellular space so that the smaller size of the active drug can penetrate and diffuse through the tumor tissues as well as the attack cells that do not express the target antigen in addition to those that do. Furthermore, the active anticancer drug will be confined in the tumor sites. As a consequence, the risk of second therapy as found in the conventional therapy will be reduced.

ADEPT Component

ADEPT is working by multifactorial systems consisting of prodrug, antibody–enzyme conjugate (AEC) and antigens on the cancer cells. It will require optimization in each component. The information of each component and their modification are reported herein.

1. Prodrug

Using prodrug is considered to be more beneficial than using active drug. The active drug can be degraded in blood and can produce toxicity to normal tissues while the prodrug can protect the normal tissues from toxicity. The first requirement of the prodrug is that it should be much less toxic than the drug derived from it; preferably 100–fold less toxic. The prodrug should be activated only by the targeted enzyme, then generate diffusible cytotoxin. The activation should fully exploit the small proportions of cells containing enzymes capable of activating the prodrug. The generated diffusible

cytotoxin on neighboring cells to which the antibody–enzyme conjugate does not bind is called bystander effect. It is also advantageous to select drugs that are not subject to multidrug resistance mechanism or are specific to a certain stage of the cell cycle. A short $t_{1/2}$ for the active drug is desirable to minimize its effects on bone marrow and other rapidly dividing tissues as a result of active drug diffusing out of the tumors into the blood. By designing the active drug to have a short biological $t_{1/2}$, any drug diffusing out of the tumor should be broken down before it reaches the normal cell renewal tissues. Due to the fact that only low concentration of the potent drug is needed at the tumor site, ADEPT allows use of extremely potent alkylating agent, e.g. nitrogen mustard which is too toxic to be readily used in conventional therapy (Melton and Sherwood, 1996). Examples of prodrugs corresponding with the activating enzymes are shown in Figure 2 and are listed in Table 1.

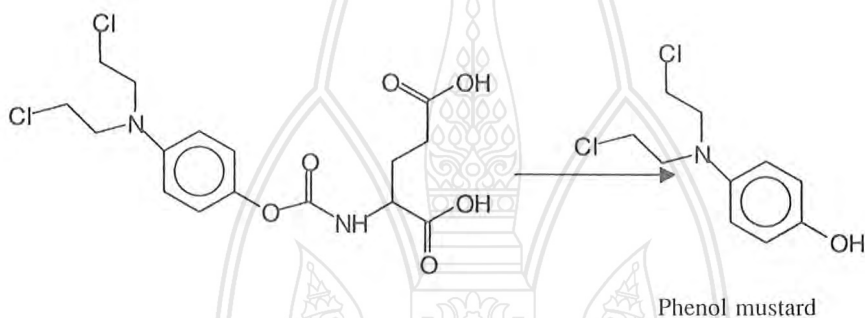


Figure 2 Activation of prodrug to its alkylating agent in ADEPT

2. Antigen target

Antigens exist as membrane–bound antigens or secreted antigens. The membrane–bound antigens have longer dwell time. For example, in one reported model of breast cancer, the antigen target (the oncoprotein c–ErbB2) was membrane–bound, therefore the AEC was retained at the tumor site for a prolonged period (Eccles et al., 1994). The secreted antigens accelerate the clearance of an AEC, but do not prevent localization at tumor sites. It was suggested that the membrane–bound antigenic targets are better targets for ADEPT than those secreted into the extracellular space or bloodstream.

The density of antigen expression is a critical factor. Ideally, the antigenic target should be expressed by the great majority of cells in a tumor population. Typically, it ranges from 3.5×10^{-3} to 220×10^{-3} antibody–binding sites per cell. Various substances including interferons, glucocorticoids, transforming growth factor, tumor necrosis factor, and butyrate have been reported to increase the expression of tumor–associated antigen, but their utility in practice has not yet been demonstrated (Bagshawe et al., 1994). To avoid complications that might arise from the expression of the antigen at critical sites in normal tissues as well as to exclude uptake at vital tissue sites, in particular haemopoietic

Table 1 List of selected prodrug activation systems development with the antigens and antibodies used (Deonarain and Epenetos, 1994)

Antibody/Antigen	Enzyme	Prodrug	Active drug
MAbs W14A and SB10/ chorionic gonadotropin	Carboxypeptidase G2	Benzoic and mustard- glutamic acid	Benzoic acid mustards
MAB L6 (against a carbohydrate antigen on human carcinomas)	Alkaline phosphatase	Etoposide phosphate, Doxorubicin phosphate, Mitomycin phosphate, Phenol mustard phosphate	Etoposide, Doxorubicin, Mitomycin, Phenol mustard
MAB BW431/26 carcinomaembryonic antigen (CEA)	Alkaline phosphatase	Etoposide phosphate	Etoposide
MAB KS1/4/UCLA-P3 human lung carcinoma	Carboxypeptidase A	Methotrexate-alanine	Methotrexate
MAB L6 (against a carbohydrate antigen on human carcinomas)	Cytosine deamidase	5-Fluorocytosine (5-FC)	5-Fluorouracil (5FU)
MAB L6 (against a carbohydrate antigen on human carcinomas)	Penicillin amidase	Doxorubicin- phenoxyacetamide, Melphalan- phenoxyacetamide, Palytoxin-4 hydroxy- phenoxyacetamide	Doxorubicin Melphalan Palytoxin
MAB H17E2/anti-placental alkaline phosphatase	beta-Glucosidase	Amygdalin	Cyanide
MAB 323/A3 (against a pancarcinoma membrane glycoprotein)	beta-Glucuronidase	Epirubicin-glucuronide	Epirubicin
MAB 12.8/ colon carcinoma	beta-Glucuronidase	Phenol mustard glucuronide	Phenol mustard
MAB BW431/26, Fa anti- CEA	beta-Glucuronidase	Daunomycinglucuronide	Daunomycin
MAB L6 [(see above), F(ab') ₂]	beta -Lactamase	Phenylenediamine mustard	Phenylenediamine mustard

tissues, the preliminary experiment (e.g. immunohistochemistry and immunoscintigraphy) for each antigenic target and antibody on human tissue is essential before using an antibody-based therapy in humans. However, such testing may not be feasible. The antigenic target that has been used in ADEPT systems is summarized in Table 1.

3. Antibody component

To avoid the immunogenicity of the antibody, the monoclonal-antibody was produced and used for ADEPT. Despite the great potential for the specific targeting of the monoclonal antibody, the pharmacokinetic problems of delivering monoclonal antibody were reported. These include: (i) slow elimination of monoclonal antibody from blood and poor vascular permeability; (ii) low and heterogeneous uptake; (iii) cross reactivity with normal tissues, and (iv) rapid metabolism of monoclonal antibody conjugates (Reilly et al., 1995). Using more stable linkage chemistry between antibody and conjugate moiety can inhibit this metabolism. Chimeric (mouse/human) and human monoclonal antibody have been developed to circumvent the problem of immunogenicity. The antibodies have been in the class of IgG1 or IgG2 due to their long life-span. IgM antibodies are seldom used due to its larger size which contributes to slower escape from the vascular compartment and slower penetration to the tumors. The very high affinity of the antibodies to the antigens is desirable. However, it can lead to the trap in the periphery of the tumors, where antibody first encounters antigen, thereby hindering its tumor penetration. The small antibody fragments such as single-chain variable regions (scFv) can be engineered to have high binding affinity. Therefore, scFv may localize efficiently in tumors and still clear rapidly from blood (Winter and Milstein, 1991; Michael et al., 1996).

Antibody fragment, when chemically conjugated to enzymes, may lose some tumor localizing efficiency compared with that of intact antibody when measured as a percentage of administered dose bound per unit weight of tumor. However, this may be counterbalanced by fragments giving more favorable tumor to normal tissue ratios and possibly by better tumor penetration. In studies with an AEC containing an antibody against carcino-embryonic antigen (antiCEA), F(ab')₂ fragments proved superior to intact monoclonal antibody (mAb) or Fab antibody fragment in terms of concentration and persistence at the tumor sites and in terms of tumor to blood ratio (Bagshawe, 1989).

The optimum size for AECs has not yet been defined. Bivalent fragments may have better dwell times at tumor sites than univalent forms, but *in vivo* testing is essential. The examples of antibodies for use in ADEPT are listed in Table 1.

4. Enzyme component

The design of the enzyme and the prodrugs are conducted respectively. Examples of enzymes for ADEPT are already shown in Table 1. An enzyme has to be capable of bioactivating prodrug.

It is requirement of ADEPT enzymes to have high activity within the host's cells. Factors influencing the choice of enzyme include low immunogenicity, pH optimum, small size, high stability *in vivo* and no expression in human tissues, or at least absence from extracellular fluid. Enzymes that require cofactors for their enzymatic activity are undesirable unless the cofactor can be easily and safely administered when the prodrug is given. For example, a cofactor will have to be present to supply a source of reducing equivalents for the bioreductive enzyme when it is needed. Human enzymes have the advantage of low immunogenicity but may lack specificity in the patient. Bacterial enzymes offer specificity but show an immunological problem. Many approaches to circumvent the immunogenicity include using the mutant human enzyme (e.g. mutant carboxypeptidase A1) such as carboxypeptidase-G2 (CPG2). As an example, the mutant human carboxypeptidase-G2 enzyme catalyses the hydrolytic cleavage of L-glutamic acid from folate. An advantage of having no human analogue of CPG2 leads to avoiding the risk of prodrug activation at nontumor sites (Smith et al., 1997).

5. Antibody-enzyme conjugate (AEC)

The conjugation of the antibody and the enzyme has been achieved by conventional thioether linkage. The thioether possesses greater stability *in vivo* compared with disulfide linkage (commonly used with antibody-toxin conjugates) (Smith et al., 1997). The localization of AEC in tumors has been demonstrated both in mice and in humans. However, the critical information required is the relative rate of clearance of enzyme activity from tumor and from normal tissues. The slower the clearance from tumor and the more rapid the clearance from blood and other normal tissues, the greater the selectivity of the system.

The percentage of an administered dose of antibody or AEC, whether composed of intact antibody or $F(ab')_2$ fragment, that is taken up by tumor in the xenograft mouse model of human cancer is usually in the range of 1 – 10% per gram of tumor at the most favorable time point and the figure for humans is in the range of 0.001 – 0.01 % (Britton et al., 1990). As a result, the residual enzyme activity may be present in normal tissue. It was reported to be possible to delay prodrug administration until 12 – 14 days post-AEC, during which AEC was largely cleared from normal tissues, allowing a tumoricidal dose to be given without normal tissue damage. An example was illustrated by the LS174T colon adenoma xenograft model (Bagshawe, 1989) and clinical colon cancer (Springer and Niculescu-Duvaz, 1994; Sharma et al., 1994) where, using $F(ab')_2$ anti-CEA-carboxypeptidase conjugates, the AEC is retained at the tumor for up to seven days. In contrast, in one reported model (Bagshawe et al., 1988) with achoriocarcinoma xenograft, the prodrugs were given 56–72 hours after administration of the AEC. The high concentration of target antigen (the β -fragment of human chorionic gonadotropin), resulted in the formation of immune complexes that accelerated clearance of the AEC from blood.

An antibody directed at any part of the AEC was reported to accelerate its clearance from plasma. It may be advantageous to use antibodies that also inactivate the enzyme during distribution to the tumor sites by reacting with or masking the enzyme active site (Sharma et al., 1994). The unlocalized AEC was reported to either be eliminated from the body or accelerated on its way by complexing the conjugate with an agent and was cleared very quickly from the blood. Such agents include carbohydrates or avidin. A monoclonal antibody designated SB43 inactivates the enzyme CPG2 and has been used successfully in its galactosylated form (SB43-gal) both in mice and in humans (Sharma et al., 1994; Rogers et al., 1995).

ADEPT has been shown to be a potential approach for cancer treatment with intensive optimization of each multifactorial components. However, there are still some reported problems along the studies.

Potential problems of ADEPT

1. Poor penetration of tumor by antibody-enzyme conjugate. As the intact antibodies (molecular mass ~140–160 KDa) are many times larger than the classical anticancer drugs (molecular mass 250–500 Da), the large molecules penetrate tumor masses more slowly than small ones.
2. AEC distintegration *in vivo*.
3. Inhibition of AEC localization in tumor by antigen in blood or activation of the prodrug by unbound circulating AEC.
4. Non-human enzymes may be immunogenic, the host response preventing repeated treatment with the same AEC. Thus in order to give more than one cycle of treatment, the AEC has to be nonimmunogenic for the body or for the concurrent administration of immunosuppressive agents (Bagshawe et al., 1994).

There are several strategies with the potential to overcome the problem of the immunogenicity of the AEC. One approach is to use human or humanized rodent enzymes. Another is to use human antibodies that have specific catalytic function (abzymes). Alternatively, improved immunosuppressive agents are becoming available and various means of inducing immune tolerance to soluble proteins may make it possible to induce tolerance before the patient is exposed to foreign proteins in the course of therapy.

5. Since conjugate is made with human enzymes, it can lead to lack of specificity or AEC heterogeneity.
6. Clearance of AEC from blood and normal tissues may be very slow; residual enzyme would activate prodrug. The resulting active drug reaching vital normal tissues such as bone marrow, would then be dose-limiting.

7. Differential toxicity of prodrug and drug of at least 100-fold is desirable; this determines the prodrug dose.

8. Relative cost to develop and produce ADEPT systems; only viable if therapy is effective in a high proportion of patients.

9. It was clear that substantial resources would be needed in terms of:

- i. antibody and antibody-fragment production
- ii. conjugation chemistry and/or recombinant approach for antibody-enzyme conjugation (AEC) production
- iii. the possibility of requiring accelerated blood-clearance systems for residual AEC
- iv. the identification of appropriate enzymes
- v. the production of relatively inert prodrugs that would be activated only by the chosen enzyme to produce highly cytotoxic agents with a short plasma half-life.

In considering the advantages over the disadvantages, ADEPT has been optimized and studied along the clinical trial. The example of the ADEPT approach that underwent clinical trial is described as follows.

Clinical data of ADEPT

The prodrug p-N-(mono-2-chloroethyl monomethyl)-aminobenzoyl glutamic acid was first undergone clinical trial in 1991 (Bagshawe et al., 1991). An antibody-enzyme conjugate was given IV, following 36-48 hr by a galactosylated anti-enzyme antibody. The multiple dose of prodrug was given when the plasma enzyme level had become undetectable. At the lower doses, the toxicity was minimum whereas at the higher dose, the myelosuppression and temporary regression of advanced disease were reported. No complications resulted from administration of the antibody-enzyme complex or enzyme inactivation antibody. The myelosuppression was due to the relatively long half-life of the active drug.

Phase I clinical trial of prodrug 4-[(2-chloroethyl)(2-mesyloxyethyl)amino] benzoyl-L-glutamic acid (CMDA) and the bifunctional alkylating drug (CJS11) releasing from it by the action of tumor-localized carboxypeptidase G2 were studied (Martin et al., 1997). SB43-Gal increases the clearance of the conjugate and the prodrug was administered by infusion based on the *in vivo* studies from animal model. This clinical trial showed inter-variation of pharmacokinetic parameters (e.g. elimination $t_{1/2}$ and plasma prodrug or drug level) among patients. It was reported that the conjugate could be localized at the tumor sites based on the determination of the conjugate from the biopsy sample of patients which revealed that the plasma conjugate was undetectable. The data showed the plasma drug concentration in addition to the plasma prodrug concentrations, which indicated the leak back of the active drug to the blood. However, no toxicity was reported.

Other similar approaches that are studied along with the ADEPT are the enzyme-prodrug therapy depending on gene delivery systems (GDEPT) and viral vectors (VDEPT) (Dachs et al., 1997; Springer et al., 2000; Han and Amidon, 2000). Gene directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) is the introduction of genes that encode enzymes capable of converting prodrugs to cytotoxic drugs. The GDEPT approach is later modified by using selectively replicating viruses (e.g. retroviral or adenoviral) as vectors to carry enzyme gene specifically into the cancer cells. This approach has been called virus directed enzyme prodrug therapy (VDEPT) (Hermiston, 2000). In addition to the VDEPT, there has been the treatment using liposomes and cationic lipid for delivery of the enzyme gene to the target tumor under the control of the tumor-selective promoters (Han and Amidon, 2000). These approaches have been currently explored.

In conclusion, the single variable fragment of antibody conjugate via thio linkage with the mutant human enzymes including short $t_{1/2}$ of active drug with high diffusible property is the optimized component of ADEPT and favorable for ADEPT approach. The desired high tumor to blood/normal tissue ratio will not be achieved without the assistance of the clearancing agent based on the literature review. ADEPT has demonstrated some potential for treatment of cancer as it allows use of an extremely potent cytotoxic drug. Thus, ADEPT possesses some advantages over the conventional cancer chemotherapy. However, intensive optimization of each multifactorial components is still essential based on some reported problems along the studies.

References

- Bagshawe, K. D. (1987). Antibody directed enzymes anticancer prodrug concept. *Br. J. Cancer.* 56:531-532.
- Bagshawe, K. D., Springer, C. J. and Searle, F. (1988). A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites. *Br. J. Cancer.* 58:700-703.
- Bagshawe, K. D. (1989). Toward generating cytotoxic agents at cancer sites. *Br. J. Cancer.* 60:275-281.
- Bagshawe, K. D. (1990). Antibody-directed enzyme/prodrug therapy (ADEPT). *Biochem. Soc. Trans.* 18:750-751.
- Bagshawe, K. D., Sharma, S. K., Springer, C. J., Antoniow, P., Boden, J. A., Rogers, G. T., Burke, P. J., Melton, R. G. and Sherwood, R. F. (1991). Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). Clinical report. *Dis. Markers.* 9:233-238.
- Bagshawe, K. D., Sharma, S. K., Springer, C. J. and Rogers, G. T. (1994). Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). A review of some theoretical, experimental and clinical aspects. *Ann. Oncol.* 5:879-891.

- Britton, K. E. (1990). Radiolabelled antibodies in therapy. In: Baldwin, R. W., Byers, V. S. and Mann, R. D. (eds.). *Monoclonal Antibodies*. Nashville: Parthenon Press. p.146-157.
- Deonarain, M. P. and Epeneto, A. A. (1994). Targeting enzymes for cancer therapy: old enzymes in new roles. *Br. J. Cancer*. 70:786-794.
- Eccles, S. A., Court, W. J., Box, G. A., Dean, C. J., Melton, R. G. and Springer, C. J. (1994). Regression of established breast carcinoma xenografts with antibody-directed enzyme prodrug therapy against c-ErbB2. *Cancer Res*. 54:5171-5177.
- Dachs, G. U., Dougherty, G. J., Stratford, I. J. and Chaplin, D. J. (1997). Targeting gene therapy to cancer: a review. *Oncol. Res*. 9:313-325.
- Han, H-K. and Amidon, G. L. (2000). Targeted prodrug design to optimize drug delivery. *AAPS Pharmsci*. 2(1): article 6 (<http://www.pharmsci.org/>)
- Hermiston, T. (2000). Gene delivery from replication-selective viruses: arming guided missiles in the war against cancer. *J. Clin. Invest*. 105:1169-1172.
- Hudson, R. A. and Black, C. D. (1992). Monoclonal antibodies: the keys to disease detection and treatment. In: Hudson, R. A. and Black, C. D. (eds.). *Biotechnology-The New Dimension in Pharmacy Practice: A Working Pharmacists' Guide*. Ohio: Council of Ohio Colleges of Pharmacy. p.9.
- Martin, J., Stribbling, S. M., Poon, G. K., Begent, R. H., Napier, M., Sharma, S. K. and Springer, C. J. (1997). Antibody-directed enzyme prodrug therapy: pharmacokinetics and plasma levels of prodrug and drug in a phase I clinical trial. *Cancer Chemother. Pharmacol*. 40:189-201.
- Melton, R. G. and Sherwood, R. F. (1996). Antibody-enzyme conjugate for cancer therapy. *J. Nat. Cancer Inst.*. 88:153-165.
- Michael, N. P., Chester, K. A., Melton, R. G., Robson, L., Nicholas, W., Boden, J. A., Pedley, R. B., Begent, H. J., Sherwood, R. F. and Minton, N. P. (1996). *In vitro* and *in vivo* characterization of a recombinant carboxypeptidase G92): anti-CEA scFv fusion protein. *Immunotechnology*. 2:47-57.
- Reilly, R. M., Sandhu, J., Alvarezdiez, T. M., Gallinger, S., Kirsh, J. and Stern, H. (1995). Problems of delivery of monoclonal-antibodies-pharmaceutical and pharmacokinetic solution. *Clin. Pharmacokinet*. 28:126-142.
- Roger, G. T., Burke, P. J., Sharma, S. K., Koodie, R. and Boden, J. A. (1995). Plasma-clearance of antibody-enzyme conjugate in ADEPT by monoclonal anti-enzyme — its effect on prodrug activation in vivo. *Br. J. Cancer*. 72:1357-1363.
- Sharma, S. K., Bagshawe, K. D., Burke, P. J., Boden, J. A., Roger, G. T., Springer, C. J., Melton, R. G. and Sherwood, R. F. (1994). Galactosylated antibodies and antibody-enzyme conjugates in antibody-directed enzyme prodrug therapy. *Cancer*. 73:1114-1120.

- Smith, G. K., Banks, S., Blumenkopf, T. A., Cory, M., Humphreys, J., Laetherm, R. M., Miller, J., Moxham, C. P., Mullin, R., Ray, R. H., Walton, L. M. and Wolfe, L. A. (1997). Toward antibody-directed enzyme prodrug therapy with the T268G mutant of human carboxypeptidase A1 and novel *in vivo* stable prodrugs of methotrexate. *J. Biol. Chem.* 272:15804-15816.
- Springer, C. J. and Niculescu-Duvaz, I. (1994). Novel prodrugs of alkylating agents derived from 5-fluoro and 3 fluorobenzoic acids for antibody directed enzyme prodrug therapy. *J. Med. Chem.* 37:2361-2370.
- Springer, C. J., Niculescu-Duvaz, I. and Kirn, D. H. (2000). Prodrug-activating systems in suicide gene therapy. *J. Clin. Invest.* 105:1160-1167.
- Winter, G. and Milstein, C. (1991). Man-made antibodies. *Nature.* 349:293-299.



มหันตภัยสาหร่ายพิษ

ธีรศักดิ์ สมดี¹

เมื่อช่วงเดือนตุลาคม ปี พ.ศ. 2541 หลายท่านคงได้ยืมข่าวเกี่ยวกับสาหร่ายพิษและสารพิษที่ผลิตขึ้นจากสาหร่ายในแหล่งน้ำจืดที่ใช้สำหรับการอุปโภคและบริโภคบางแหล่งของประเทศไทย เช่น เชื้อนแม่กวอดุมธรา จังหวัดเชียงใหม่ เชื้อนลำตะคอง จังหวัดนครราชสีมา เชื้อนแก่งกระจาน จังหวัดกาญจนบุรี และอ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี ข่าวดังกล่าวเป็นการจุดชนวนให้ผู้ที่เกี่ยวข้องหลายฝ่าย รวมทั้งประชาชนทั่วไปตระหนักและให้ความสนใจกับปัญหาของแหล่งน้ำมากขึ้น เนื่องจากสารพิษดังกล่าวมีรายงานทางการแพทย์ยืนยันว่า เป็นสารส่งเสริมเนื้องอก ก่อให้เกิดมะเร็งในตับ และก่อให้เกิดลักษณะทางพยาธิสภาพต่อทางเดินอาหาร เกิดอาการท้องเสีย คลื่นไส้อาเจียน ตับอักเสบ เยื่อปอดอักเสบ และการอ่อนแรงของกล้ามเนื้อ

สาหร่ายที่เป็นสาเหตุ คือ *Microcystis aeruginosa* Kütz. ผลิตสารพิษที่เรียกว่า ไมโครซิสติน (microcystin) นักสาหร่ายวิทยาจัดให้อยู่ในกลุ่มของสาหร่าย โดยอาศัยลักษณะที่มีคลอโรฟิลล์-เอ คล้ายสาหร่ายชนิดอื่นๆ โดยจัดให้อยู่ในกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) ในขณะที่นักแบคทีเรียวิทยา จัดให้อยู่ในกลุ่ม oxygenic photosynthetic bacteria เนื่องจากมีลักษณะที่คล้ายกับแบคทีเรีย คือ มีลักษณะโพรแคริโอตเซลล์ (prokaryotic cell) เช่น ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส และไรโบโซมเป็นชนิด 70s จึงมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria)

M. aeruginosa เจริญในแหล่งน้ำจืดทั่วโลก (cosmopolitan species) ก่อให้เกิดปัญหากับแหล่งน้ำในหลายประเทศ เช่น ญี่ปุ่น ออสเตรเลีย แอฟริกาใต้ เคนยา บราซิล และสหรัฐอเมริกา ลักษณะที่พบมักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มเซลล์หรือโคโลนี (colony) ที่มีเมือกหุ้ม (รูปที่ 1) รูปร่างไม่แน่นอน ลอยเป็นฝ้าบนผิวน้ำ การจัดจำแนกชนิดอาศัยรูปร่างของโคโลนีเป็นหลัก ภายในโคโลนีประกอบด้วยเซลล์ที่มีรูปร่างกลม หรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4-5 ไมโครเมตร ภายในมีแก๊สแควคิวโอล (gas vacuole) ทำหน้าที่เก็บแก๊สไนโตรเจนเพื่อช่วยในการลอยตัวของเซลล์ ลักษณะพิเศษนี้ทำให้สามารถลอยตัวที่ระดับความลึกต่างๆ โดยมีปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมเป็นตัวกระตุ้น เช่น แสง อุณหภูมิ หรือแม้กระทั่งสารเคมีบางชนิด เช่น เมื่อความเข้มแสงลดลง เซลล์จะมีการปรับขนาดของแก๊สแควคิวโอลให้ใหญ่ขึ้น จนสามารถลอยตัวขึ้นมาบริเวณผิวน้ำเพื่อให้เซลล์รับแสงได้เต็มที่และเพียงพอต่อการสังเคราะห์ด้วยแสง ในทางตรงข้ามเมื่อเซลล์มีแรงดันเต่งเพิ่มขึ้นอันเป็นผลมาจากการสังเคราะห์ด้วยแสงของเซลล์ การเพิ่มแรงดันเต่งนี้จะทำให้แก๊สแควคิวโอลมีขนาดเล็กลงจึงเป็นผลให้เซลล์จมลงสู่ก้นแหล่งน้ำ สาหร่ายชนิดนี้มักเจริญเติบโตอย่างมากมาย (blooming) โดยลอยตัวอยู่บนผิวน้ำในสภาพที่ลมสงบ (รูปที่ 2) โดยเฉพาะในแหล่งน้ำที่มีปริมาณธาตุอาหารสูง (eutrophication) การเจริญอย่างมากของสาหร่ายก่อให้เกิดผลกระทบต่อระบบนิเวศวิทยา

¹ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002



รูปที่ 1 ลักษณะโคโลนีของ *M. aeruginosa*
(ที่มา : <http://bilbo.bio.purdue.edu/www-cyanosite/>)



รูปที่ 2 ลักษณะโคโลนีของ *M. aeruginosa* ที่ผิวน้ำ
(ที่มา : <http://bilbo.bio.purdue.edu/www-cyanosite/>)

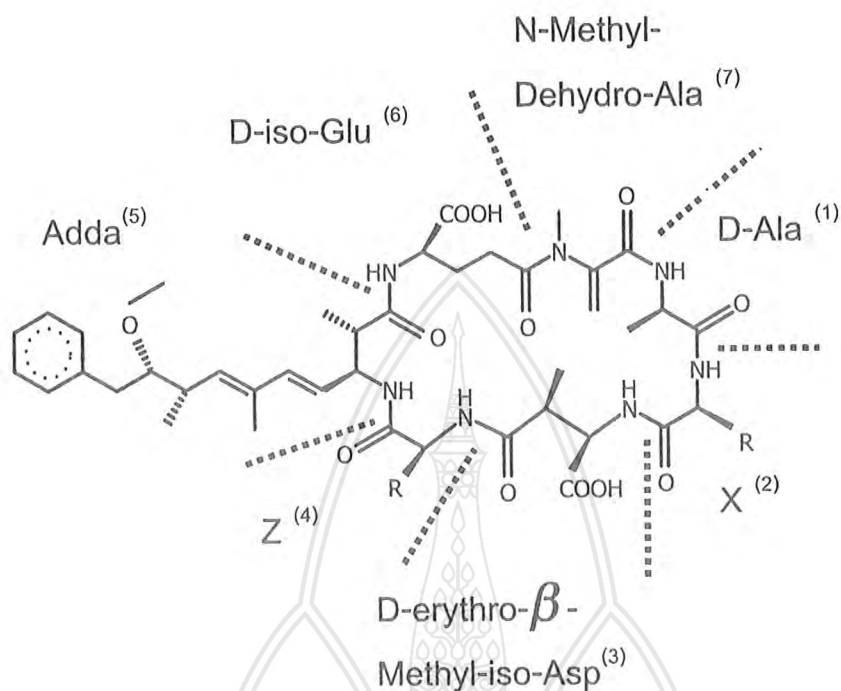
ทางน้ำ เช่น ออกซิเจนในน้ำลดลงหรือน้ำมีกลิ่นเน่าเหม็น ตัวอย่างการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* เช่น ในทะเลสาบวิกตอเรีย ประเทศเคนยา พบการเจริญเป็นชนิดเด่น (dominant species) มีปริมาณมากกว่า 90 % ของสาหร่ายทั้งหมด โดยพบความเข้มข้น 34,000 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ครอบคลุมพื้นที่ 6 ตารางกิโลเมตร จากรายงานวิจัยการศึกษาคุณภาพของน้ำและสาหร่ายในอ่างเก็บน้ำเขื่อนแม่กวงอุดมธารา จังหวัดเชียงใหม่ ในช่วงปี พ.ศ. 2539-2540 (Peerapornpisal et al., 1999) พบว่า ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์ต่อการเจริญของ *M. aeruginosa* คือ ปริมาณสารอาหาร โดยเฉพาะฟอสฟอรัสในรูปที่ละลายน้ำ (soluble reactive phosphorus หรือ orthophosphate) และฟอสฟอรัสรวม (total phosphorus) อย่างไรก็ตาม ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่ายชนิดนี้มีความแตกต่างกันไปในแต่ละภูมิภาค เช่น ในประเทศที่อยู่ในเขตอบอุ่น การเจริญของสาหร่ายดังกล่าวมักขึ้นอยู่กับแสงและอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ ประมาณ 15-30 องศาเซลเซียส

ไมโครซิสตินผลิตได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหลายชนิด เช่น *Anabaena flos-aquae*, *Anabaenopsis milleri*, *Oscillatoria limosa*, *Planktothrix agardhii* และ *Hapalosiphon fontinalis* แต่เนื่องจากสารพิษดังกล่าวถูกค้นพบและแยกเป็นครั้งแรกจาก *M. aeruginosa* สายพันธุ์ NRC-1 ในปี ค.ศ. 1959 ดังนั้น จึงตั้งชื่อสารพิษชนิดนี้ตามชื่อของสาหร่ายที่ถูกค้นพบ

ไมโครซิสตินมีโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนเพปไทด์ (cyclic peptides) ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 7 ตัว โดยกรดอะมิโนที่ปลายทั้งสองของสายเพปไทด์มาเชื่อมต่อกัน ทำให้มีโครงสร้างเป็นวงแหวน โครงสร้างทางเคมีของไมโครซิสติน (รูปที่ 3) โดยทั่วไปอาจเขียนในรูปง่าย ๆ ได้ดังนี้ คือ cyclo - (D-Ala⁽¹⁾ - X⁽²⁾ - D-MeAsp⁽³⁾ - Z⁽⁴⁾ - Adda⁽⁵⁾ - D-Glu⁽⁶⁾ - Mdha⁽⁷⁾ -) โดย X และ Z เป็นกรดอะมิโนชนิดใด ๆ D-MeAsp คือ D-erythro-β-methylaspartic acid Adda คือ 3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-deca-4,6-dienoic acid และ Mdha คือ N-methyldehydroalanine

ปัจจุบันไมโครซิสตินที่พบมีมากกว่า 50 ชนิด โดยมีรายงานว่า *M. aeruginosa* สามารถผลิตไมโครซิสตินได้มากกว่า 1 ชนิด แต่ที่พบได้บ่อยมี 3 ชนิด ได้แก่ ไมโครซิสตินชนิด -LR, -YR และ -RR ซึ่งชนิดของไมโครซิสตินที่แตกต่างกันนี้ถูกกำหนดโดยชนิดของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 2 และ 4 (X และ Z ตามลำดับ) ในโครงสร้างวงแหวนเพปไทด์ กล่าวคือ ไมโครซิสติน -LR มี X เป็นกรดอะมิโนลิวซีน (Leu) และ Z เป็นอาร์จินีน (Arg) ไมโครซิสติน -YR มี X เป็นไทโรซีน (Tyr) และ Z เป็น อาร์จินีน (Arg) และไมโครซิสติน -RR มี X และ Z เป็นอาร์จินีน (Arg) ทั้ง 2 ตำแหน่ง จากการศึกษาค้นคว้าความเป็นพิษของไมโครซิสตินแต่ละชนิด พบว่า ไมโครซิสตินชนิด -LR มีความเป็นพิษมากที่สุด และไมโครซิสตินชนิด -RR มีความเป็นพิษน้อยที่สุด

ไมโครซิสตินเป็นสารพิษประเภทเอนโดทอกซิน (endotoxin) คือ เป็นสารพิษที่เมื่อเซลล์ผลิตขึ้นแล้วยังคงเก็บอยู่ภายในเซลล์ และจะถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์สู่แหล่งน้ำก็ต่อเมื่อเซลล์ตายหรือเซลล์แก่ มนุษย์และสัตว์จะได้รับไมโครซิสตินโดยตรงจากการบริโภคน้ำในแหล่งน้ำที่มีสาหร่ายที่ผลิตสารพิษชนิดนี้เจริญอยู่ นอกจากนี้ ผู้ที่เล่นกีฬาทางน้ำอาจเกิดอาการระคายเคืองที่ผิวหนังและตา หรืออาจถึงขั้นกลืนน้ำหรือหายใจเอาละอองน้ำที่มีสารพิษเข้าไปโดยไม่ตั้งใจ จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ไมโครซิสตินเข้าสู่ร่างกาย



รูปที่ 3 โครงสร้างของไมโครซิสติน

ความเป็นพิษของสารไมโครซิสตินที่เด่นชัดที่สุด คือ เป็นสารที่เป็นพิษต่อตับ (hepatotoxin) โดยการทดลองฉีดสารไมโครซิสตินแก่หนูทดลอง พบว่า ไมโครซิสตินทุกชนิด มีค่าความเป็นพิษ LD₅₀ ในหนูทดลองระหว่าง 60-70 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ยกเว้นชนิด -RR, demethylated D-Asp และ Dha ซึ่งจะมีค่าความเป็นพิษในหนู LD₅₀ ระหว่าง 200-250 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยความเป็นพิษจะเปลี่ยนแปลงไปตามชนิด อายุ เพศและการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของสัตว์ อวัยวะแรกที่จะถูกทำลาย คือ ตับ โดยเซลล์ตับจะหดตัวเล็กลง เป็นผลให้เซลล์ตับซึ่งปกติเกาะตัวอยู่ติดกันต้องแยกออกจากกัน หลอดเลือดฝอยที่นำเลือดมาเลี้ยงเซลล์ตับก็ถูกแยกตามกันไปด้วย ดังนั้น เลือดที่ส่งมาตามหลอดเลือดฝอยจึงซึมออกมาและเกิดการสะสมหรือทำให้เกิดภาวะเลือดคั่งในตับ ซึ่งภาวะดังกล่าวก่อให้เกิดความเสียหายต่อตับ จนถึงเกิดอาการช็อคและตายได้ในที่สุด และพบการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งในหนูทดลองอย่างเด่นชัด นอกจากนี้ ยังมีอวัยวะอื่นๆ ที่ได้รับผลกระทบจากไมโครซิสติน เช่น ไต ปอด และทางเดินอาหาร ไมโครซิสตินยังสามารถส่งเสริมให้เกิดมะเร็ง (tumor promoter) โดยเฉพาะมะเร็งตับ เนื่องจากไมโครซิสตินเป็นโปรตีนซึ่งจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนฟอสฟาเทส ชนิด 1 และ 2A (protein phosphatase-1 and 2A) โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์โปรตีนไคเนส (protein kinase) เพื่อควบคุมปริมาณหมู่ฟอสเฟตที่ถูกเติมในโมเลกุลโปรตีนให้อยู่ในสภาวะที่สมดุล ซึ่งเอนไซม์โปรตีนไคเนสทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ส่วนเอนไซม์โปรตีนฟอสฟาเทส ทำหน้าที่ตัดหมู่ฟอสเฟต (dephosphorylation) ฉะนั้นเอนไซม์ทั้งสองชนิดจึงเกี่ยวข้องกับโปรตีนที่ควบคุมเมแทบอลิซึมของเซลล์ เช่น การแบ่งและขยายตัวของเซลล์ การยึด-หดตัวของกล้ามเนื้อ หากเอนไซม์โปรตีนฟอสฟาเทสถูกยับยั้ง จะมีผลทำให้การแบ่งเซลล์

ผิดปกติ จึงมีโอกาสเกิดมะเร็งสูงขึ้น

องค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) กำหนดค่ามาตรฐานของการปนเปื้อนไมโครซิสตินในน้ำดื่มไว้ว่า จะต้องมีความเข้มข้นไมโครซิสตินชนิด -LR ไม่เกิน 1 ไมโครกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ส่วนประเทศออสเตรเลียก็ได้กำหนดค่ามาตรฐานความปลอดภัยของน้ำดิบที่จะนำมาผลิตน้ำประปาต้องมีปริมาณ *M. aeruginosa* ไม่เกิน 15,000 เซลล์ต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร การวิเคราะห์และตรวจสอบไมโครซิสตินในปัจจุบันสามารถทำได้หลายวิธี ขึ้นกับเทคนิคพื้นฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ โดยทั่วไปสามารถแบ่งได้เป็น 3 วิธี คือ วิธีทางเคมีฟิสิกส์ (physico-chemical methods) วิธีทางภูมิคุ้มกัน (immunoassays) และวิธีทางเอนไซม์ (enzyme-based methods)

การวิเคราะห์และตรวจหาไมโครซิสติน

วิธีทางเคมีฟิสิกส์

วิธีทางเคมีฟิสิกส์ที่ง่ายที่สุดในการวิเคราะห์และตรวจสอบไมโครซิสติน คือ วิธีที่ใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี เช่น thin-layer chromatography ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง สามารถแยกและตรวจสอบไมโครซิสตินได้ วิธีนี้เป็นวิธีแรกเริ่มที่ใช้ในการวิเคราะห์ไมโครซิสติน ต่อมาได้มีการพัฒนามาใช้เทคนิคที่เรียกว่า overpressured layer chromatography (OPLC) เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการวิเคราะห์ ส่วนวิธีทางเคมีฟิสิกส์ที่นิยมมากที่สุด คือ วิธีที่ใช้เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) วิธีนี้สามารถแยกและตรวจสอบปริมาณของไมโครซิสตินได้ รวมทั้งยังให้ความแม่นยำสูงด้วย แต่มีความไวต่ำกว่าวิธี enzyme-linked immunosorbent assay ส่วนความไวในการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC นั้นจะขึ้นอยู่กับเครื่องวัด (detector) ที่ใช้ ซึ่งมีหลายแบบ เช่น UV-VIS detector, diode array detector (DAD) หรือ fluorescence detector (FD) โดยที่ DAD มีความไวในการวิเคราะห์ต่ำสุด และ FD มีความไวในการวิเคราะห์สูงสุด นอกจากนี้ ยังได้มีการพัฒนาใช้วิธี HPLC ร่วมกับเทคนิค tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) ซึ่งสามารถวิเคราะห์และตรวจสอบชนิดไมโครซิสตินได้ โดยให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะสูงขึ้น แต่เนื่องจากเทคนิคทาง MS/MS ต้องใช้เครื่องมือราคาแพงและในการวิเคราะห์ต้องอาศัยผู้ชำนาญเฉพาะทาง วิธีนี้จึงไม่ค่อยได้รับความนิยมเท่าวิธี HPLC วิธีที่เริ่มมีการนำมาใช้ในการวิเคราะห์ไมโครซิสตินเมื่อเร็วๆ นี้ คือ วิธีที่ใช้เทคนิค capillary electrophoresis (CE) วิธีนี้สามารถแยกและวิเคราะห์เปปไทด์ขนาดเล็ก เช่น ไมโครซิสตินได้ดี โดยความไวในการวิเคราะห์ขึ้นกับชนิดของเครื่องวัดที่ใช้ เช่น UV detector หรือ fluorescence detector ซึ่งพบว่า fluorescence detector จะให้ความไวในการวิเคราะห์สูงกว่า UV detector นอกจากนี้ ยังมีวิธีทางเคมีฟิสิกส์อีก 2 วิธี คือ วิธีที่ใช้เทคนิค liquid chromatography / mass spectrometry (LC/MS) และ nuclear magnetic resonance (NMR) ซึ่งทั้ง 2 วิธีนี้เป็นวิธีที่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง และในการวิเคราะห์ต้องอาศัยผู้ชำนาญทางด้านเทคนิคดังกล่าว

วิธีทางภูมิคุ้มกัน

วิธีทางภูมิคุ้มกันที่นิยมใช้ คือ เทคนิคที่เรียกว่า enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) วิธีนี้อาศัยหลักการของการทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะของแอนติเจนและแอนติบอดี โดยฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วยไมโครซิสติน จากนั้นทำการตรวจหาและแยกแอนติบอดีที่สนใจมาโคลนเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนต่อไป

ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้ในลักษณะที่เป็นมอโนโคลนัลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ซึ่งมีความจำเพาะสูง วิธีนี้มีความไวในการวิเคราะห์สูงมาก สามารถวิเคราะห์ในระดับพิโคกรัม (picogram, 10^{-12} กรัม) และเนื่องจากการผลิตออกมาจำหน่ายเป็นชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป จึงทำให้ใช้ง่าย สะดวก ทราบผลได้ในระยะเวลาอันสั้น จึงเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน แต่ข้อเสียคือมีราคาค่อนข้างแพง มีความจำเพาะต่อไมโครซิสตินชนิด -LR

วิธีทางเอนไซม์

วิธีนี้อาศัยสมบัติของไมโครซิสตินซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนฟอสฟาเทส-1 และ 2A ดังได้กล่าวไปแล้ว วิธีทางเอนไซม์ในการวิเคราะห์ไมโครซิสตินนี้ เรียกว่า protein phosphatase inhibition assays (PPINA) วิธีนี้แม้ว่าจะให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็วและมีความไวสูง แต่มีความจำเพาะต่ำ และไม่สามารถแยกชนิดของไมโครซิสตินได้ นอกจากนี้ ยังต้องใช้เอนไซม์ฟอสฟาเทส-1 หรือเอนไซม์ฟอสฟาเทส-2A ที่มีความบริสุทธิ์สูงเข้าร่วมในปฏิกิริยา รวมทั้งต้องใช้ p-nitrophenyl phosphate เป็นซับสเตรต จึงทำให้วิธีนี้มีข้อจำกัดหลายอย่าง และไม่ค่อยได้รับความนิยมในการใช้วิเคราะห์ไมโครซิสตินเท่าใดนัก

การกำจัดพิษไมโครซิสติน

ความพยายามในการกำจัดสาหร่ายพิษและไมโครซิสตินในน้ำมีด้วยกันหลายวิธี โดยทั่วไปการปรับปรุงคุณภาพน้ำที่ใช้อยู่ในปัจจุบันสามารถกำจัดได้เพียงบางส่วน ซึ่งถ้าเกิดปัญหาการเจริญเติบโตอย่างมาก และปล่อยสารพิษลงสู่แหล่งน้ำที่นำไปผลิตเป็นน้ำประปา จะก่อให้เกิดปัญหาย่างยากในขั้นตอนการบำบัดสารพิษและกำจัดสารอินทรีย์ที่ถูกปลดปล่อยออกนอกเซลล์ ซึ่งต้องผ่านกรรมวิธีต่างๆ ที่ยุ่งยาก ซับซ้อน และเสียค่าใช้จ่ายสูง ในระบบการผลิตน้ำประปาส่วนใหญ่กระทำเพียงการกรองเซลล์หรือเจือจางพิษเท่านั้น การกรอง การทำให้ตกตะกอน การเติมคลอรีน หรือการต้ม ไม่สามารถขจัดสารพิษให้หมดไปได้ วิธีการต่างๆ ที่นำมาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำและช่วยกำจัดเซลล์ *M. aeruginosa* และไมโครซิสติน เช่น การใช้แสง การใช้สารฆ่าสาหร่าย (algicides) การทำให้ตกตะกอน (coagulation/flocculation) การฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน (chlorination) และการใช้ออกซิเจน (ozonation) เป็นต้น

การใช้แสง

แม้ว่าไมโครซิสตินจะเป็นโปรตีนที่มีความทนทานต่อแสงธรรมชาติ แต่สารพิษดังกล่าวไม่ทนต่อแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) ไมโครซิสตินจะถูกทำลายได้ง่ายโดยแสงอัลตราไวโอเลตเมื่อมีไททาเนียมไดออกไซด์ (titanium dioxide, TiO_2) เป็นตัวกระตุ้น ในการกำจัดไมโครซิสตินโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตนี้พบว่าไมโครซิสติน-LR และ -YR จะถูกทำลายอย่างรวดเร็ว โดยมีช่วงครึ่งชีวิต (half-life) ต่ำกว่า 5 นาที และพบว่าประสิทธิภาพของวิธีนี้จะขึ้นอยู่กับปริมาณสารอินทรีย์ต่างๆ ในน้ำ

การใช้สารฆ่าสาหร่าย

การใช้สารฆ่าสาหร่ายเป็นขั้นตอนเพื่อควบคุมการเจริญของสาหร่ายในแหล่งน้ำ โดยต้องใช้สารเคมีบางชนิดที่มีสมบัติเป็นสารฆ่าสาหร่าย เช่น คอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate) คอปเปอร์ซิเตรท (copper citrate) โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (potassium permanganate) และคลอรีน (chlorine) อย่างไรก็ตาม การเลือกใช้วิธีนี้ต้องคำนึงถึงผลที่ตามมาคือเมื่อสาหร่ายตายจะมีการปลดปล่อยไมโครซิสตินออกมาสู่แหล่งน้ำอีก ดังนั้น ถ้าในแหล่งน้ำมีสาหร่ายที่ผลิตสารพิษชนิดนี้เจริญอยู่มากจะไม่นิยมเลือกใช้วิธีนี้ในการแก้ปัญหา นอกจากนี้จะมีวิธีกำจัดไมโครซิสตินที่มีประสิทธิภาพอยู่แล้ว ส่วนใหญ่วิธีนี้จึงใช้เพื่อเป็นการควบคุมปริมาณของสาหร่ายไม่ให้เจริญมากเกินไปเท่านั้น

การทำให้ตกตะกอน

การทำให้ตกตะกอนเป็นขั้นตอนหนึ่งในการปรับปรุงคุณภาพน้ำเพื่อผลิตเป็นน้ำประปา วิธีนี้อาจต้องใช้สารเคมีที่ช่วยในการตกตะกอน เช่น เฟอริกคลอไรด์ (ferric chloride) หรือ อะลูมิเนียมซัลเฟต (aluminium sulfate) โดยสารเคมีดังกล่าวจะช่วยให้อนุภาคขนาดเล็กต่าง ๆ รวมทั้งเซลล์สาหร่ายตกตะกอนได้ง่ายและเร็วขึ้น จึงเป็นวิธีกำจัด *M. aeruginosa* ได้วิธีหนึ่ง แต่วิธีนี้ไม่สามารถกำจัดไมโครซิสตินได้ อย่างไรก็ตาม วิธีการตกตะกอนนี้ก็อาจก่อให้เกิดผลเสีย คือ ทำให้เซลล์สาหร่ายถูกทำลาย เป็นผลให้มีการปล่อยไมโครซิสตินออกมาสู่แหล่งน้ำอีกดังได้กล่าวไปแล้ว

การฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน

ในกระบวนการผลิตน้ำประปา ขั้นตอนการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุดในการทำลายเชื้อโรคต่างๆ ในน้ำ แต่อย่างไรก็ตามพบว่า การเติมคลอรีนสามารถกำจัดไมโครซิสตินได้บ้าง โดยประสิทธิภาพในการกำจัดไมโครซิสตินจะขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารประกอบคลอไรด์ที่ใช้ เช่น ในรูปของสารละลายคลอรีน (aqueous chlorine) โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite) และแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ (calcium hypochlorite) ที่ความเข้มข้นประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถกำจัดไมโครซิสตินได้บางส่วน แต่สิ่งที่พึงระวังอีกอย่างของการเจริญของสาหร่ายในแหล่งน้ำดิบที่ใช้ผลิตน้ำประปา คือ สารอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากสาหร่าย (algogenic organic matter, AOM) จะทำปฏิกิริยากับคลอรีนที่ใช้ ก่อให้เกิดสารพวกไตรฮาโลมีเทน (trihalomethane, THM) ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) ซึ่งองค์การอนามัยโลกกำหนดค่ามาตรฐานของ THM ในน้ำดื่มให้ไม่เกิน 30 ไมโครกรัมต่อลิตร

การใช้โอโซน

การใช้โอโซนในการปรับปรุงคุณภาพน้ำ เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในประเทศแถบยุโรปและอเมริกาเหนือ ซึ่งวิธีนี้นอกจากจะสามารถฆ่าเชื้อโรค กำจัดสีและกลิ่นของน้ำแล้ว ยังสามารถกำจัดไมโครซิสตินได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ โดยโอโซนจะเข้าทำลายพันธะของไมโครซิสตินทำให้โครงสร้างถูกทำลายและเสียสภาพไป

นอกจากนี้ ยังมีรายงานวิธีที่ใช้กำจัดสาหร่ายและไมโครซิสตินอีกหลายวิธี เช่น การกรองในระดับอนุภาคขนาดเล็ก (microfiltration / ultrafiltration) การกรองผ่านทรายอย่างช้าๆ (slow sand filtration) การดูดซับด้วยคาร์บอนกัมมันต์ (activated carbon) เป็นต้น

แม้การกำจัดสาหร่ายและไมโครซิสตินในแหล่งน้ำ จะเป็นการแก้ปัญหาที่ปลายเหตุ แต่ทางที่ดีควรพิจารณาถึงสาเหตุที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนจนไม่ปลอดภัยต่อการอุปโภคบริโภค แนวทางแก้ไขปัญหาก็ต้องกระทำอย่างเร่งด่วน คือ ลดปริมาณการปนเปื้อนของสารอาหารที่เพิ่มขึ้นจนเป็นสาเหตุให้สาหร่ายเจริญขึ้นมากมาย ซึ่งสารอาหารดังกล่าวที่เกิดขึ้นอาจมาจากการปล่อยน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม บ้านเรือนหรือจากการเกษตรลงสู่แหล่งน้ำ น้ำที่ไหลลงสู่แหล่งน้ำดังกล่าวจะมีสารอาหารประเภทฟอสฟอรัส ไนโตรเจนและแอมโมเนียมซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย ทำให้สาหร่ายมีการเจริญเพิ่มอย่างรวดเร็ว ดังนั้น หากพิจารณาถึงต้นเหตุที่แท้จริงแล้ว การแก้ปัญหาก็ต้นเหตุน่าจะง่ายและประหยัดกว่าวิธีอื่นๆ คือ ประชาชนหรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้องที่อาศัยอยู่ในบริเวณใกล้แหล่งน้ำควรช่วยกันดูแล ไม่ปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำ ซึ่งนอกจากจะเป็นการรักษาสุขภาพแวดล้อม ทำให้แหล่งน้ำในพื้นที่ของตนสะอาด มีคุณภาพดี ยังเป็นการควบคุมการเจริญของสาหร่ายโดยทางอ้อม และช่วยป้องกันปัญหาแหล่งน้ำปนเปื้อนสาหร่ายพิษและสารพิษไมโครซิสตินได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด

บรรณานุกรม

- Carmichael, W. W. (1996). Toxic *Microcystis* and the environment. In : Watanabe, M. F., Harada, K. I., Carmichael, W. W. and Fujiki, H. (eds.). Toxic *Microcystis*. Boca Raton : CRC Press. p.1-11.
- Codd, G. A. (2001). The analysis of cyanobacterial toxins. In : Eutrophication and Toxic Cyanobacteria in Freshwater Reservoirs. 6th WRC Workshop. Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai.
- Hitzfeld, B. C., Höger, S. J. and Dietrich, D. R. (2000). Cyanobacterial toxin : removal during drinking water treatment and human risk assessment. Environmental Health Perspectives. 108 (1):113-122.
- Kuiper-Goodman, T., Falconer, I. and Fitzgerald, J. (1999). Human health aspects. In : Chorus, I. and Bartran, J. (eds.). Toxic Cyanobacteria in Water : A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management. London: E & FN Spon. p.113-153.
- Moore, R. E., Patterson, G. M. L., Mynderse, J. S. and Barchi, J. J. (1991). Biosynthesis of microcystin-LR : origin of the carbon on the adda and masp units. Journal of American Chemistry Society. 113(13):5083-5048.
- Mur, L. R., Skulberg, O. M. and Utkilen, H. (1999). Cyanobacteria in the environment. In : Chorus, I. and Bartran, J. (eds.). Toxic Cyanobacteria in Water : A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management. London: E & FN Spon. p.15-40.

- Peerapornpisal, Y., Sonthichai, W., Somdee, T., Mulsin, P., Prommana, P. and Rott, E. (1999). The blooming of *Microcystis aeruginosa* Kütz. in the reservoir of Mae Kuang Udomtara Dam, Chiang Mai, Thailand. *Journal of Mycotoxins* (supplement' 99):257-262.
- Sivonen, K. and Jones, G. (1999). Cyanobacterial toxins. In : Chorus, I. and Bartran, J. (eds.). *Toxic Cyanobacteria in Water : A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. London: E & FN Spon. p.41-111.



ทฤษฎีพีทาโกรัสสำหรับพื้นที่

สกล คงบุญ¹

บทนำ

ทฤษฎีพีทาโกรัสเป็นทฤษฎีที่แสดงถึงความสัมพันธ์กันระหว่างพื้นที่ของจัตุรัสบนด้านของสามเหลี่ยมมุมฉาก ซึ่งเป็นทฤษฎีที่สำคัญทฤษฎีหนึ่งในเรขาคณิตเบื้องต้น ในระดับที่สูงขึ้นพบว่า มีการนำเอาทฤษฎีพีทาโกรัสไปประยุกต์ใช้ด้วย แต่ก็ยังเป็นเพียงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของเวกเตอร์เท่านั้น ในบทความนี้จะกล่าวถึงทฤษฎีที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ของหน้า (faces) ของรูปทรงสี่หน้ามุมฉาก (right tetrahedron) ซึ่งเป็นรูปทรงที่ประกอบด้วยสี่หน้า แต่ละหน้าเป็นรูปสามเหลี่ยม มีมุมสามหน้า (trihedral angle) สี่มุม มุมสามหน้ามุมหนึ่งเป็นมุมฉากทั้งสามหน้า ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ของหน้าของรูปทรงสี่หน้ามุมฉาก มีความคล้ายคลึงกับทฤษฎีพีทาโกรัสซึ่งเป็นที่รู้จักกันอยู่แล้ว

ความรู้พื้นฐาน

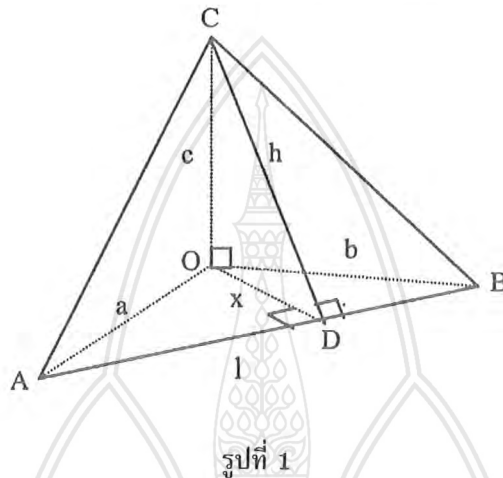
การแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ของหน้าของรูปทรงสี่หน้ามุมฉากนี้ได้แสดงการพิสูจน์ไว้หลายวิธี เริ่มจากวิธีอย่างง่ายโดยใช้สูตรการหาพื้นที่รูปสามเหลี่ยมและคุณสมบัติของสามเหลี่ยมคล้ายซึ่งเหมาะสมกับพื้นฐานความรู้ของนักเรียนระดับมัธยมศึกษา จากนั้นได้เสนอการพิสูจน์ที่ใช้ความรู้ในระดับที่สูงขึ้น เพื่อผู้สนใจจะได้เห็นวิธีการพิสูจน์ที่หลากหลายและเหมาะสมกับผู้สนใจซึ่งมีพื้นฐานความรู้ที่แตกต่างกัน ได้แก่ ความรู้เกี่ยวกับการคูณเวกเตอร์ และปริพันธ์สองชั้น ดังต่อไปนี้

1. รูปสามเหลี่ยมที่มีด้านสองด้านเป็น $\vec{a}$ และ $\vec{b}$ มีพื้นที่เท่ากับ $\frac{1}{2}|\vec{a} \times \vec{b}|$
2. เอกลักษณ์ของลากรองจ์ (Lagrange's identity) $|\vec{a} \times \vec{b}|^2 = |\vec{a}|^2 |\vec{b}|^2 - (\vec{a} \cdot \vec{b})^2$
3. บริเวณ R บนระนาบ xy มีพื้นที่เท่ากับ $\iint_R dydx$
4. พื้นที่ผิว (surface area) ของส่วนของระนาบ $z = f(x, y)$ ที่มีภาพฉาย (projection) บนระนาบ xy เป็นบริเวณ R_1 มีค่าเท่ากับ $\iint_{R_1} \sqrt{1 + (f_x)^2 + (f_y)^2} dA$

¹ ภาควิชาคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ต.ขามเรียง อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม 44150

พิทาโกรัสสำหรับพื้นที่

ทฤษฎี รูปทรงสี่หน้ามุมฉาก OABC มี OAB, OAC, OBC เป็นหน้าที่เป็นสามเหลี่ยมมุมฉาก โดยมีมุมที่ O เป็นมุมฉาก และ ABC เป็นหน้าที่อยู่ตรงข้ามมุมฉาก (hypotenuse face) ถ้า R_1, R_2, R_3 และ R เป็นพื้นที่ของหน้า OAB, OAC, OBC และ ABC ตามลำดับ แล้ว $R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2$



พิสูจน์
วิธีที่ 1

ให้ $OA = a, OB = b, OC = c, AB = l$ ลาก CD ตั้งฉากกับ AB ให้ $CD = h$ และลาก OD จะเห็นว่า OD เป็นเงาของ CD ดังนั้น OD ตั้งฉากกับ AB ให้ $OD = x$ จะได้

$$R = \text{พื้นที่สามเหลี่ยม} ABC = \frac{1}{2}hl$$

$$R^2 = \frac{1}{4}h^2l^2, \quad l^2 = a^2 + b^2$$

เนื่องจาก $\triangle OBD \sim \triangle OAB$ จะได้ $\frac{x}{a} = \frac{b}{l}, x^2 = \frac{a^2b^2}{l^2} = \frac{a^2b^2}{a^2 + b^2}$ และ $h^2 = x^2 + c^2$

ดังนั้น $h^2 = \frac{a^2b^2}{a^2 + b^2} + c^2 = \frac{a^2b^2 + a^2c^2 + b^2c^2}{a^2 + b^2}$

จะได้ $R^2 = \frac{1}{4}(a^2b^2 + a^2c^2 + b^2c^2)$

$$R_1 = \frac{1}{2}ab, \quad R_2 = \frac{1}{2}ac, \quad R_3 = \frac{1}{2}bc$$

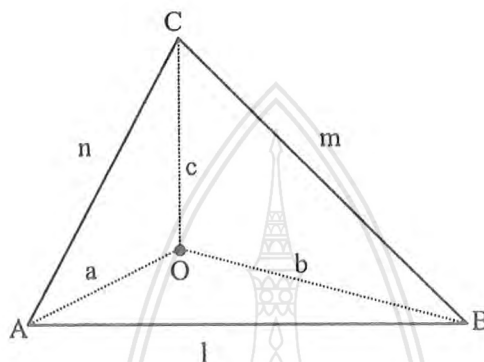
ดังนั้น $R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 = \frac{1}{4}(a^2b^2 + a^2c^2 + b^2c^2)$

นั่นคือ $R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 \quad \square$

วิธีที่ 2

จากวิธีที่ 1 $R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 = \frac{1}{4}(a^2b^2 + a^2c^2 + b^2c^2)$

ให้ $AB = 1$, $BC = m$ และ $AC = n$



รูปที่ 2

สามารถหา R = พื้นที่ของสามเหลี่ยม ABC โดยใช้สูตร

$$R = \sqrt{s(s-1)(s-m)(s-n)} \quad \text{เมื่อ } s = \frac{1}{2}(1+m+n)$$

ดังนั้น $R^2 = s(s-1)(s-m)(s-n)$

เมื่อแทนค่า s จะได้

$$\begin{aligned} R^2 &= \left(\frac{1+m+n}{2} \right) \left(\frac{1+m+n}{2} - 1 \right) \left(\frac{1+m+n}{2} - m \right) \left(\frac{1+m+n}{2} - n \right) \\ &= \left(\frac{1+m+n}{2} \right) \left(\frac{m+n-1}{2} \right) \left(\frac{1+n-m}{2} \right) \left(\frac{1+m-n}{2} \right) \\ &= \frac{1}{4} [(m+n)^2 - 1^2] \left[-\frac{1}{4} [(m-n)^2 - 1^2] \right] \\ &= \frac{1}{4} [m^2 + 2mn + n^2 - 1^2] \left[-\frac{1}{4} [m^2 - 2mn + n^2 - 1^2] \right] \end{aligned}$$

โดยทฤษฎีบทพีทาโกรัสแทนค่า 1, m และ n ให้อยู่ในรูป a , b และ c จะได้

$$R^2 = \frac{1}{4}(a^2b^2 + a^2c^2 + b^2c^2)$$

นั่นคือ $R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 \quad \square$

วิธีที่ 3

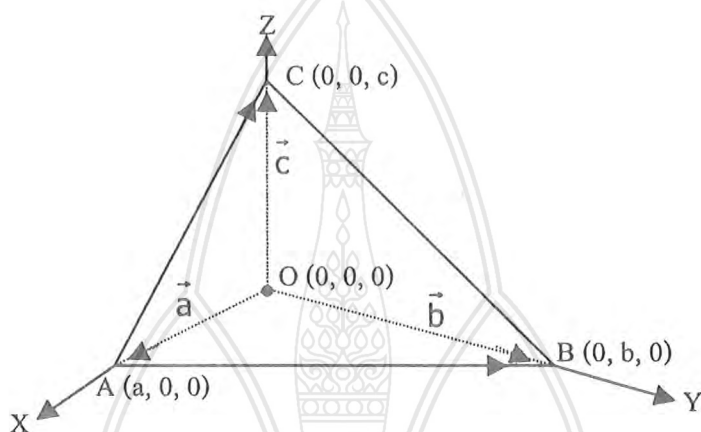
ให้พิกัดของจุด O, A, B และ C เป็น $(0, 0, 0)$, $(a, 0, 0)$, $(0, b, 0)$ และ $(0, 0, c)$ ตามลำดับ

จะได้

$$\overrightarrow{OA} = \vec{a} = \langle a, 0, 0 \rangle \text{ และ } |\vec{a}| = a$$

$$\overrightarrow{OB} = \vec{b} = \langle 0, b, 0 \rangle \text{ และ } |\vec{b}| = b$$

$$\overrightarrow{OC} = \vec{c} = \langle 0, 0, c \rangle \text{ และ } |\vec{c}| = c$$



รูปที่ 3

$$R_1 = \frac{1}{2} |\vec{a} \times \vec{b}| = \frac{1}{2} ab \text{ ในทำนองเดียวกัน}$$

$$R_2 = \frac{1}{2} ac \text{ และ } R_3 = \frac{1}{2} bc$$

ดังนั้น

$$R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 = \frac{1}{4} (a^2b^2 + a^2c^2 + b^2c^2)$$

$$R = \frac{1}{2} |\overrightarrow{AB} \times \overrightarrow{AC}| = \frac{1}{2} |(\vec{b} - \vec{a}) \times (\vec{c} - \vec{a})|$$

จะได้

$$\begin{aligned} R^2 &= \frac{1}{4} |(\vec{b} - \vec{a}) \times (\vec{c} - \vec{a})|^2 \\ &= \frac{1}{4} \left[|\vec{b} - \vec{a}|^2 |\vec{c} - \vec{a}|^2 - ((\vec{b} - \vec{a}) \cdot (\vec{c} - \vec{a}))^2 \right] \\ &= \frac{1}{4} \left[((\vec{b} - \vec{a}) \cdot (\vec{b} - \vec{a})) ((\vec{c} - \vec{a}) \cdot (\vec{c} - \vec{a})) - (\vec{b} \cdot \vec{c} - \vec{a} \cdot \vec{c} - \vec{b} \cdot \vec{a} + \vec{a} \cdot \vec{a})^2 \right] \\ &= \frac{1}{4} (a^2b^2 + a^2c^2 + b^2c^2) \end{aligned}$$

ดังนั้น

$$R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 \quad []$$

วิธีที่ 4

โดยวิธีการเดียวกับวิธีที่ 3 จะได้ $R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 = \frac{1}{4}(a^2b^2 + a^2c^2 + b^2c^2)$

$$\begin{aligned} \text{เนื่องจาก } R &= \frac{1}{2} |\overrightarrow{AB} \times \overrightarrow{AC}| = \frac{1}{2} |<-a, b, 0> \times <-a, 0, c>| \\ &= \frac{1}{2} |<bc, ac, ab>| \\ &= \frac{1}{2} \sqrt{a^2b^2 + a^2c^2 + b^2c^2} \end{aligned}$$

$$\text{จะได้ } R^2 = \frac{1}{4}(a^2b^2 + a^2c^2 + b^2c^2)$$

$$\text{ดังนั้น } R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 \quad []$$

วิธีที่ 5 จากรูปที่ 3 จะได้

$$\text{สมการเส้นตรง AB คือ } y = -\frac{b}{a}x + b \text{ จะได้ } R_1 = \int_0^a \int_0^{-\frac{b}{a}x+b} dy dx = \frac{1}{2}ab$$

$$\text{สมการเส้นตรง AC คือ } z = -\frac{c}{a}x + c \text{ จะได้ } R_2 = \int_0^a \int_0^{-\frac{c}{a}x+c} dz dx = \frac{1}{2}ac$$

$$\text{สมการเส้นตรง BC คือ } y = -\frac{b}{c}z + b \text{ จะได้ } R_3 = \int_0^c \int_0^{-\frac{b}{c}z+b} dy dz = \frac{1}{2}bc$$

$$\text{ดังนั้น } R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 = \frac{1}{4}(a^2b^2 + a^2c^2 + b^2c^2)$$

ให้ $P(x, y, z)$ เป็นจุดใดๆ บนระนาบ ABC จะได้ $(\overrightarrow{AB} \times \overrightarrow{AC}) \cdot \overrightarrow{AP} = 0$

ซึ่งเป็นสมการของระนาบ ABC คือ $z = c - \frac{c}{a}x - \frac{c}{b}y$ และได้ $\frac{\partial z}{\partial x} = -\frac{c}{a}$ และ $\frac{\partial z}{\partial y} = -\frac{c}{b}$

โดยการใช้สูตรการหาพื้นที่ (surface area) ส่วนของระนาบ $z = c - \frac{c}{a}x - \frac{c}{b}y$ ที่มีภาพฉาย (projection) บนระนาบ XY เป็นบริเวณ R_1

$$\begin{aligned} \text{จะได้ } R &= \iint_{R_1} \sqrt{1 + \left(\frac{\partial z}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial z}{\partial y}\right)^2} dA \\ &= \sqrt{1 + \left(-\frac{c}{a}\right)^2 + \left(-\frac{c}{b}\right)^2} \iint_{R_1} dA \end{aligned}$$

$$\text{จะได้ } R^2 = \frac{1}{4}(a^2b^2 + a^2c^2 + b^2c^2)$$

$$\text{ดังนั้น } R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 \quad []$$

สรุปและข้อเสนอแนะ

บทความนี้เป็นการแสดงความสัมพันธ์ของพื้นที่ของหน้าของรูปทรงสี่หน้ามุมฉาก กล่าวคือ สำหรับรูปทรงสี่หน้า OABC ที่มีมุมสามหน้าที่จุดกำเนิด O เป็นมุมฉากทั้งสามหน้า ถ้า R_1 , R_2 , R_3 และ R เป็นพื้นที่ของหน้า OAB, OAC, OBC และ ABC ตามลำดับแล้ว ความสัมพันธ์ $R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2$ ดังที่ได้แสดงการพิสูจน์แล้วในหัวข้อ 3

ทฤษฎีดังกล่าวข้างต้นเป็นการแสดงความสัมพันธ์ของรูปทรงสี่หน้ามุมฉากซึ่งเป็นรูปทรงในปริภูมิสามมิติ มีคำถามที่น่าสนใจและควรทำการศึกษาต่อไป คือ ในกรณีที่เป็รูปทรงหลายหน้ามุมฉาก (right polyhedron) ที่มีมุมหลายหน้าที่จุดกำเนิด O เป็นมุมฉากทุกหน้าในปริภูมิ n มิติ เมื่อ $n \geq 4$ ทฤษฎีนี้จะเป็นจริงหรือไม่

บรรณานุกรม

- ศรีบุตร์ แวเจริญ. (2530). การวิเคราะห์เชิงเวกเตอร์. กรุงเทพฯ ฯ : โรงพิมพ์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. หน้า 206.
- Quadrat, Jean-P., Lasserre, Jean-B. and Hiriart - Urruty, Jean-B. (2001). Pythagoras' theorem for areas. Amer. Math. Monthly. 108:549.
- Thomas, Jr., G.B. and Finney, R.L. (1966). Calculus and Analytic Geometry. 9th ed. Reading, Massachusetts: Addison-Wesley Publishing Company. p.815-816, 824.

Synthesis and Affinity of 4H-[1,2,4]-triazolo-[4,3-a]-[1,4]-benzodiazepines as Selective Cholecystokinin Ligands

Eric Lattmann¹, Michael Offel¹, David R. Poyner¹ and Pornthip Arayarat²

Abstract

A series of 4H-triazolo-1,4-benzodiazepines has been synthesized in 3 steps from p-chloro-amino-benzophenone. This commercially available ketone and the ethylester of glycine, nor-valine and tryptophan were refluxed in pyridine to give the 1,4-benzodiazepine template **1a** - **1c**. The thioamide intermediates **2a** - **2c** were synthesized from 1,4-benzodiazepines using Lawesson's reagent in pyridine under reflux conditions. These reactive intermediates were converted with acetyl hydrazide in n-butanol into the desired 4H-triazolo-1,4-benzodiazepine **3a** - **3b**. The biological evaluation in a receptor binding assay has identified the 3-propyl-1,4-benzodiazepine **2b** as a potent CCK-B ligand, having an IC_{50} at 0.3 μ M. The indolmethyl derivative **3c** displayed a binding affinity for the CCK-A receptor subtype of about 1.2 μ M.

Introduction

Cholecystokinin (CCK) (Trivedi and Bharat, 1994; Francesco, 1993) is a 33 amino acid peptide that acts both as a central neurotransmitter / neuromodulator and as a gut hormone (Makovec and D'Amato, 1997). Its peripheral effects are mediated mainly through the A receptor subtype while the central effects are correlated with the CCK-B receptor subtype (Evan et al., 1993). The CCK-B (CCK_2) receptor is involved in many pathological situations, and amongst these, anxiety and panic are particularly relevant targets for therapeutic interventions. Various circulating forms of CCK occur such as CCK-8, CCK-5, and even the shortened CCK-4 fragment displays the full bioactivity (Lattmann et al., 2000). Sulphated CCK-5 is widely studied as an ideal panic triggering agent.

The best evidence that CCK is strongly related to panic attacks is based on experiments in which CCK-4 was administered to healthy volunteers who panicked shortly after the injection (Wilson et al., 1996). Those physiological reactions were significantly blocked or reduced by administering

¹ The School of Pharmacy, Aston University, Birmingham B4 7ET UK; E-mail: e.lattmann@aston.ac.uk, Fax: +44-(0) 121 359 0733

² Department of Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

Merck's CCK antagonists.

One of the most successful 1,4-benzodiazepines worldwide is Alprazolam (Xanax[®]), which is chemically a 1,2,4-triazolo-1,4-benzodiazepine derivative. It is readily absorbed in man when orally administered (Bertram, 1995). Although, 4-unsubstituted triazolo-1,4-benzodiazepines such as Alprazolam show a high affinity towards the GABA-A/benzodiazepine receptor complex, it is reported that the introduction of a triazole ring into the CCK-B antagonist L-365,260 has resulted in the desired enhanced binding on the CCK receptor (Bock et al., 1988).

Here, we report our results of the SAR-optimization of 3-n-propyl-1,4-benzodiazepines and 3-indolylmethyl-1,4-benzodiazepines, which were converted via thioamides into the corresponding triazolo-derivatives.

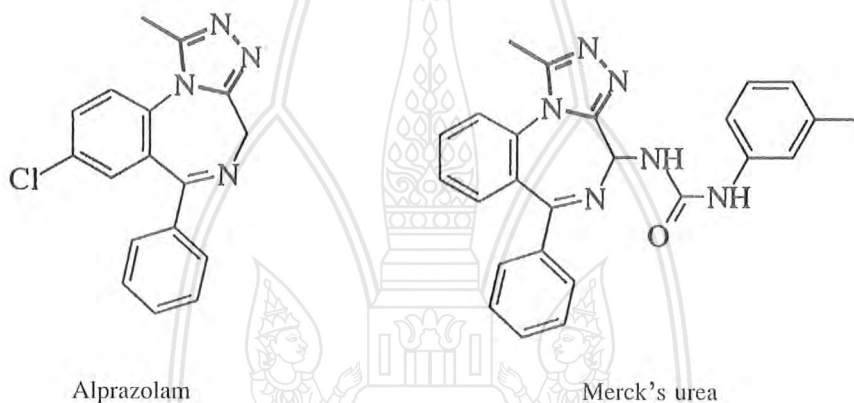
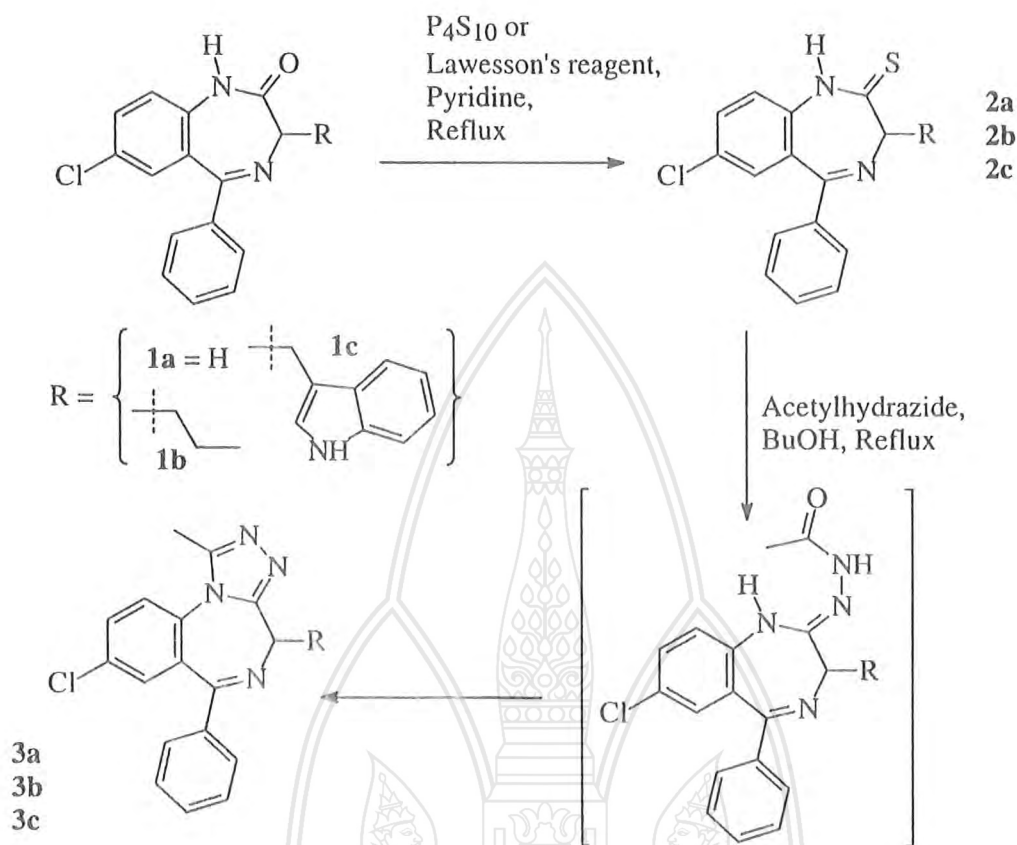


Figure 1 Structures of Alprazolam and Merck's triazolo-CCK-B antagonist

Chemistry

The preparation of the 4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a]-1,4-benzodiazepines **3a-3c** via the thioamide **2a-2c** intermediates is outlined in the synthetic Scheme 1.



Scheme 1 Synthesis of [1,2,4]-triazolo-1,4-benzodiazepines

The essential benzodiazepine templates **1a**, **1b** and **1c** were prepared by refluxing 5-chloro-2-aminobenzophenone with 2 equivalent of the α -amino acid ethylesters HCl for 48 hours in the presence of a catalytic amount of dimethylaminopyridine (DMAP). Glycine ethylester HCl reacted to the desired seven-membered ring structure **1a** in only 19 % yields and other methods using aminobenzophenones with dichloroacetylchloride followed by ammonia are known for the preparation of Nor-methyldiazepam **1a**. Nor-valine ethylester HCl gave 62% of **1b** under the same reaction conditions and tryptophan ethylester HCl furnished the 3-indolylmethyl-1,4-benzodiazepine **1c** in 58 % yield. The templates **1a**–**1c** were converted into their thioamides **2a**–**2c** with tetraphosphorus decasulfide (P_4S_{10}) by refluxing in pyridine. The thioamide **2a** was formed in 14% yield while the 3-substituted templates were formed in 46% for **2b** and 31% for **2c**. An improved method in which tetraphosphorus decasulfide was replaced by 2,4-bis(4-methoxyphenyl)-2-4-dithioxo-1,2,3,4-dithiadiphosphetane (Lawesson(s reagent) furnished the thioamides **2b** and **2c** in 75% and 54% yield, respectively (Scheibye, Pederson and Lawesson, 1978). The desired 1,2,4-triazolo-1,

4-benzodiazepines **3a–3c** were synthesized from the thioamides **2a–2c** under reflux conditions with 3 equivalent of acetylhydrazide in *n*-butanol. High temperature was essential to convert the hydrazone intermediates into the triazolo-benzodiazepines in moderate yields. *n*-Butanol with a boiling point of 117.7°C was found to be the best solvent. An overview of the triazolo-benzodiazepines and their precursors is given in Figure 2.

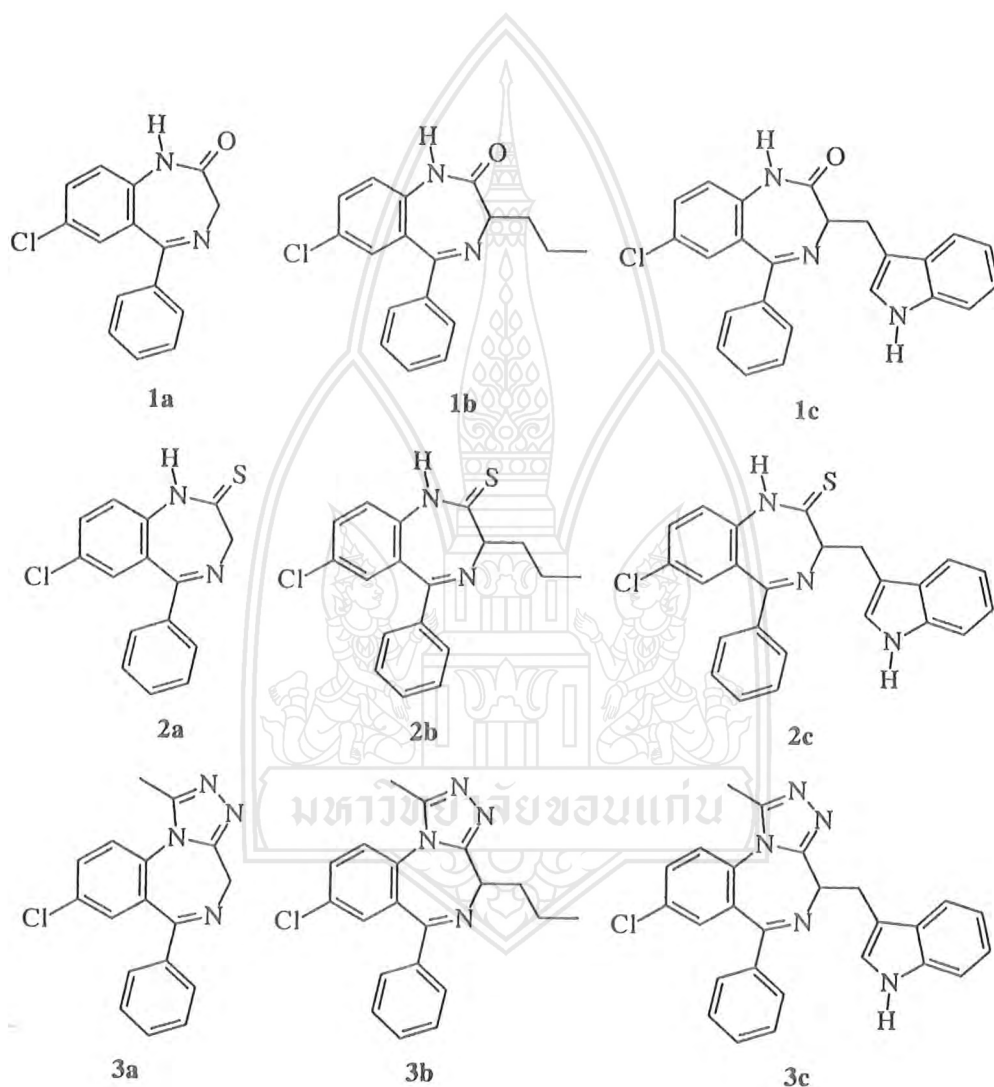


Figure 2 Overview of reaction intermediates and synthetic targets

Pharmacology

¹³¹I-CCK-8 receptor binding assay

CCK-A and CCK-B receptor binding assays were performed by using guinea pig pancreas and guinea pig cerebral cortex, respectively. Membranes from male guinea pig brain tissues were prepared according to the modified method described by Saita et al. (1994). Pancreatic membranes were obtained similarly as described by Charpentier et al. (1998). After the incubation procedure, the bound radioactivity was determined by gamma counting. All binding assays were carried out in duplicate with *L*-365260 as internal standard and the results are summarized in Table 1.

Table 1 Chemical yields and receptor binding data of [1,2,4]-triazolo-1,4-benzodiazepines and their precursors

Entry	R	Yield [%]	CCK-A [μ M]	CCK-B [μ M]
1a	H	19	>50	>50
1b	Propyl	62	13	0.6
1c	Indolylmethyl	58	3	15
2a	H	76	>50	>50
2b	Propyl	75	11	0.3
2c	Indolylmethyl	54	11	9
3a	H	61	>50	>50
3b	Propyl	34	25	32
3c	Indolylmethyl	17	1.2	22

The SAR study involved the triazolo-ring annelation and a bioisosteric modification in which the oxygen of the amide was replaced by sulphur. The effects on the affinity towards the CCK receptor subtypes were investigated for 3-alkylated and 3-arylated 1,4-benzodiazepines.

The 3-propyl-1,4-benzodiazepine **1b** is a moderately potent and CCK-B selective ligand (Lattmann et al., 2001) and the 3-indolyl-1,4-benzodiazepines such as **1c** have been developed further as Asperlicin analogues (Lattmann et al., 2001).

As reaction intermediates, the binding properties of the thioamides have been studied. The propyl-thioamide **2b** has shown an increased CCK-B affinity, compared to the parent CCK-B lead structure **1b**, with an IC_{50} of 300 nM. The enhanced CCK-B activity of the thioamide correlates with the findings on sulfated and unsulfated CCK forms. These sulphated forms of CCK and gastrin are more potent than the non-sulphated forms (Zavros and Shulkes, 1997).

The introduction of an additional [1,2,4]-triazolo-ring into the 3-indolylmethyl-1,4-benzodiazepine template had an effect on the potency and the selectivity of the CCK ligand. The triazolo-3-indolylmethyl-1,4-benzodiazepine **3c** exhibited a selectivity for the peripheral CCK-A receptor subtype with a decreased affinity on the CCK-B receptor.

The 3-propyl-[1,2,4]-triazolo-1,4-benzodiazepine **3b** displayed a decreased binding on the CCK-A and the CCK-B receptors. Certain benzodiazepines acting on the GABA-A receptor (e.g. diazepam, lorazepam) antagonized the effects of CCK in the periphery (Kubota et al., 1985; Meldrum et al., 1986) and in the central nervous system which is an as yet undefined mechanism. Alprazolam, an unsubstituted triazolo-benzodiazepine, did not possess any binding activity on the CCK receptor subtypes.

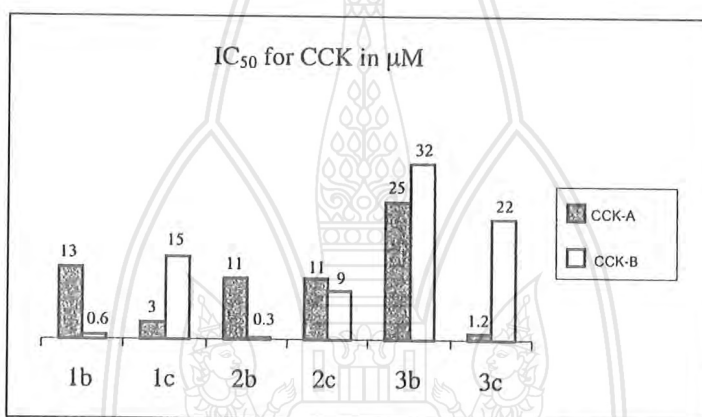


Diagram 1 CCK-A/CCK-B receptor binding data of 3-propyl- and 3-indolylmethyl-1,4-benzodiazepines, the thioamides and triazolo-derivatives

Conclusion

In the series of 1,4-benzodiazepines, the introduction of an additional triazolo-ring to the 3-indolylmethyl-1,4-benzodiazepine skeleton **1c** have resulted in an enhanced binding affinity towards the peripheral CCK-A receptor (Figure 3). This [1,2,4]-triazolo-1,4-benzodiazepine **3c** displayed a comparable bioactivity to Asperlicin ($EC_{50} = 1.4 \mu M$), a natural product which was isolated from a fermentation mixture. In addition to a better binding affinity, **3c** should also display a better bioavailability due to the improved water solubility. The racemic compound **2b**, which was synthesized only as a reaction intermediate, was the most potent CCK-B ligand of these series. The 3-propyl-1,4-benzodiazepine-thioamide **2b** has shown an IC_{50} of 300 nM and further evaluation is in progress.

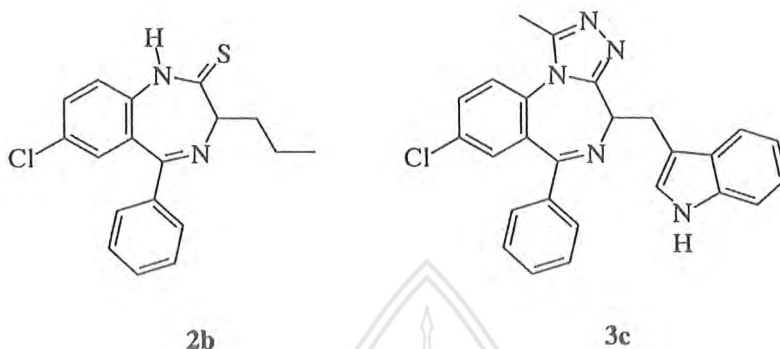


Figure 3 Overview of the optimized substituted 1,4-benzodiazepine derivatives with enhanced affinity and selectivity towards the CCK-A and the CCK-B receptor

Experimental section

Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (APCI-MS) was carried out on a Hewlett-Packard 5989B quadrupole instrument with an APCI accessory and automatic injection using a Hewlett-Packard 1100 series auto sampler. IR spectra were recorded as KBr disc on a Mattson 3000 FT-IR spectrophotometer. Proton NMR spectra were obtained from a Bruker AC 250 instrument operating at 250 MHz with TMS as internal standard.

Preparation of the 1,4-benzodiazepine template 1a-1c

A solution of 20 mmol (4.62 g) of 5-chloro-2-aminobenzophenone and 40 mmol of the α -amino acid ethylester HCl salts [glycine (5.6 g), nor-valine (7.9 g) and tryptophan (11.4 g)] in 40 ml of pyridine containing 3% of DMAP as a catalyst were refluxed under nitrogen for 48 hours. During the first 6 hours, 20 ml of the solvent was slowly distilled off and replaced by fresh pyridine. After completion, the reaction mixture was concentrated in vacuum. The residue was washed with 50 ml of water and was subsequently dissolved in 100 ml of ethyl acetate. The organic phase was filtered to separate from unreacted α -amino acids, dried over sodium sulphate and was finally evaporated off in vacuum. The reaction products were separated from 5-chloro-2-amino-benzophenone by solid extraction on 50-mesh silica gel with ether as eluent.

7-Chloro-5-phenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-one 1a

Yield: 19%; MW 271; APCI + m/s: $m/z = 271$; TLC (ether): $R_f = 0.4$; IR (KBr disc) $\nu_{\max} = 3207, 2960, 1679$ (C=O), 1604, 1476, 1093, 794 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO) δ (ppm) 4.31 (s, 2 H, C3:-H₂), 7.1–7.65 (m, 8 H, arom. H), 9.65 (s, 1 H, N1:-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl₃) δ (ppm) 56.2 (C-3), 121.9, 128.6, 129.5, 129.7, 130.8, 131.4, 137.3, 139.4, 164.8, 168.7.

7-Chloro-5-phenyl-3-propyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-one 1b

Yield: 62%; MW 313; APCI + m/s: m/z = 313 (80%), 268 (15%), 264 (5%); TLC (ether): R_f = 0.72; IR (KBr disc) $\nu_{\max}$ = 3218, 3123, 2962, 1687 (C=O), 1608, 1480, 1320, 1220, 826 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm) 0.99 (t; 3H, $J=7$ Hz, C3:-(CH_2)₂ CH_3), 1.3-1.5 (m, 2H, C3:-(CH_2)₂ CH_3), 2.23 (m, 2H, C3:-(CH_2)₂ CH_3), 4.08 (t, 1H, $J=5$ Hz, C3:-H), 7.15-7.7 (m, 8 arom. H), 10.3 (s, 1H, N1:-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm) 14.5 (C3:-(CH_2)₂ CH_3), 19.3 (C3:-(CH_2)₂ CH_3), 33.1 (C3:-(CH_2)₂ CH_3), 63.2 (C3:-(CH_2)₂ CH_3), 122.8, 124.9, 129.1, 130.2, 130.8, 131.6, 135.7, 137.4, 168.0, 172.5.

7-Chloro-3-(1H-indol-3-ylmethyl)-5-phenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-one 1c

Yield: 58%; MW 400; APCI + m/s: m/z = 400 (90%), 271 (10%); TLC (ether): R_f = 0.28; IR (KBr disc) $\nu_{\max}$ = 3411, 3220, 2921, 1677 (C=O), 1600, 1481, 1322, 1226, 1095, 829 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm) 3.68 (t, $J=9$ Hz, 1 H, C3:-H), 3.82 (m, 2 H, C3:-(CH_2)-indole), 7.0-7.7 (m, 13 H, arom. H), 8.05 (br s, 1 H, indole NH), 8.68 (br s, 1 H, N1:-H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm) 26.9 (C3:-(CH_2)-indole), 64.2 (C-3), 111.0, 118.9, 119.1, 120.6, 121.9, 128.6, 129.0, 129.5, 129.7, 130.8, 131.6, 136.5, 137.3, 139.4, 168.0, 171.8.

Experimental procedure for the formation of the thioamides 2a-2c**Preparation of 7-chloro-5-phenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepine-2-thione 2a**

A stirred mixture of the template 1a (1.74 g, 6.4 mmol), dry pyridine (50 ml) and P_4S_{10} (3.12 g, 7 mmol) was refluxed under nitrogen for 4 hours, cooled and concentrated in vacuum. The suspension of the residue in ice water was extracted with 50 ml of dichloromethane. The organic phase was washed with brine, dried (Na_2SO_4), concentrated in vacuum and purified further by column chromatography on 50-mesh silica gel with ether as eluent.

Yield: 76%; MW 287; APCI + m/s: m/z = 287; mp 245-247°C; TLC (ether): R_f = 0.58; IR (KBr disc) $\nu_{\max}$ = 3445, 2921, 2852, 1676, 1577, 1472, 1382, 1175, 994, 771 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm) 4.43 (br s, 2 H, C3:-(H_2)), 7.15-7.55 (m, 8 H, arom. H), 10.4 (br s, 1 H, N1:-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm) 67.5 (C-3), 126.8, 128.6, 129.0, 129.8, 130.8, 131.7, 138.0, 163.9 (C-5), 194.8 (C=S).

Preparation of 7-Chloro-5-phenyl-3-propyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-thione 2b

1.8 g (6 mmol) of template 1b and Lawesson's reagent (2.67 g, 6.6 mmol) were refluxed in 50 ml of pyridine. The reaction was completed after 8-10 hours. The reaction mixture was cooled, concentrated in vacuum and the suspension of the residue in ice water was extracted with 50 ml of

dichloromethane. The organic phase was filtered, dried and evaporated in vacuum. The crude product was further purified by column chromatography with ether as eluent.

Yield: 75%; MW 329; APCI + m/s: m/z = 329 (80%), 295 (10%), 268 (10%); mp: 238–242°C; TLC (ether): R_f = 0.85; IR (KBr disc) ν_{max} = 3440, 2952, 1614, 1569, 1475, 1318, 1160, 1027, 828, 698 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm) 0.9–1.7 (br m, 5H), 2.1–2.5 (m, 2H), 4.09 (m, 1H, C3:-H), 7.2–7.6 (m, 8 arom. H), 11.6 (s, 1H, N1:-H). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm) 14.5 (C3:-CH₂-CH₃), 19.5, (C3:-CH₂-CH₂-CH₃), 36.3 (C3:-CH₂-CH₂-CH₃), 67.1 (C-3), 124.9, 128.3, 128.9, 129.8, 130.2, 130.6, 131.8, 135.2, 137.8, 169.2, 202.3 (C=S).

Preparation of 7-Chloro-3-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-5-phenyl-1,3-dihydro-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-thione 2c

2.16 g (5.4 mmol) of template 1c and Lawesson's reagent (2.5 g, 6.2 mmol) were refluxed in 50 ml of pyridine for 18–20 hours. 1.21 g (54%) of the product was obtained as previously described. The crude product was purified by column chromatography with ether as eluent.

Yield: 54%; MW 416; APCI + m/s: m/z = 416 (90%), 287 (10%); TLC (ether): R_f = 0.6; IR (KBr disc) ν_{max} = 3268, 3077, 2882, 1604, 1567, 1467, 1328, 1150, 1025, 829 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm) 3.81 (m, 2H, C3:-CH₂-indole), 4.49 (m, 1H, C3:-H), 7.0–7.7 (m, 13H, arom. H), 8.2 (s, 1H, indole NH), 9.8 (s, 1H, N1:-H).

Experimental procedure for the formation of 4*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*a*][1,4]benzodiazepines

8-Chloro-1-methyl-6-phenyl-4*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*a*][1,4]benzodiazepine 3a

A mixture of 0.8 g (2.8 mmol) benzodiazepine-2-thione 2a and acethydrazide (0.56 g, 7.6 mmol) was refluxed in 25 ml of *n*-BuOH for 4 hours under nitrogen. The mixture was cooled, concentrated in vacuum and the remaining residue was suspended in ice water (20 ml). The solid product was collected by filtration and dissolved in EtOAc. The solution was dried with K₂CO₃ and concentrated in vacuum. The product was purified by column chromatography with ether / 10% methanol as eluent giving 675 mg (78%) of the product.

Yield: 61%; MW 309; APCI + m/s: m/z = 309; mp: 228°C; TLC (ether/10% methanol): R_f = 0.2; IR (KBr disc) ν_{max} = 3401, 3062, 1660, 1606, 1542, 1484, 1448, 1378, 1312, 998 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm) 2.67 (s, 3H, C1:-CH₃), 4.11 (d, 1H, J=13.8 Hz), 5.51 (d, 1H, J=13.8 Hz), 7.25–7.6 (m, 8H, arom. H).

8-Chloro-1-methyl-6-phenyl-4-propyl-4*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*a*][1,4]benzodiazepine 3b

0.86 g (2.6 mmol) of template 2b and acethydrazide (0.58 g, 7.8 mmol) were refluxed in 25 ml of *n*-butanol for 12 hours to give the title product (0.68 g, 75%). The reaction mixture was

cooled, concentrated in vacuum and the suspension of the residue in ice water was extracted with EtOAc (50 ml). The organic phase was dried with K_2CO_3 , filtered, and evaporated in vacuum. The product was purified further by column chromatography with ether/10% methanol.

Yield: 34%; MW 351; APCI + m/s: m/z = 351; mp: 217–219°C; TLC (ether/10% methanol): R_f = 0.45; IR (KBr disc) ν_{max} = 3420, 2925, 2865, 1604, 1531, 1482, 1424, 1301, 1096, 695 cm^{-1} . 1H -NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) 1.0 (s, 3H, (C3'-(CH₂)₂CH₃), 1.4–1.9 (br m, 4H, C3'-(CH₂)₂CH₃), 2.61 (s, 3H, C1'-(CH₃), 4.52 (s, 1H, C4'-(H), 7.2–7.7 (m, 8 H, arom. H). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) 12.1 (C4'-(CH₂)₂CH₃), 22.5, 31.7, 56.5 (C-4), 124.6, 128.3, 129.2, 130.7, 130.9, 131.2, 131.4, 132.1, 138.4, 165.9.

8-Chloro-4-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-1-methyl-6-phenyl-4*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*a*][1,4]benzodiazepine 3c

The desired product (665 mg, 54%) was obtained by the previously described method by refluxing 1.2 g (3 mmol) of template 2c and acethydrazide (0.6 g, 8.1 mmol) in 25 ml of *n*-butanol for 24 hours.

Yield: 17%; MW 440; APCI + m/s: m/z = 440 (60%), 429 (40%); TLC (ether/10% methanol): R_f = 0.55; IR (KBr disc) ν_{max} = 3420, 2964, 1679, 1641, 1465, 1378, 1157, 1099, 740, 699 cm^{-1} . 1H -NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) 2.43 (s, 3H, C1'-(CH₃), 3.0 (m, 2H, C4'-(CH₂-indole), 7.0–7.8 (m, 13 H, arom. H), 8.2 (s, 1 H, indole NH).

^{131}I -CCK-8 receptor binding assay

CCK-A and CCK-B receptors were performed by using guinea pig pancreas and guinea pig cerebral cortex, respectively.

CCK-B-binding assay: For the tissue preparation, the cerebral cortex was weighed after dissection, and then homogenized in 25 ml of ice cold 0.32 M sucrose for 15 strokes at 500 rpm. It was centrifuged at 1000 g (3000 rpm) for 10 min. The supernatant was centrifuged at 20,000 g (13000 rpm) for 20 min. The pellet was redispensed in the required volume of assay buffer as defined below (5 strokes of homogenizer at 500 rpm). The final tissue concentration was 1 g original weight to 120 ml buffer. The tissue was stored in aliquots at $-70^\circ C$.

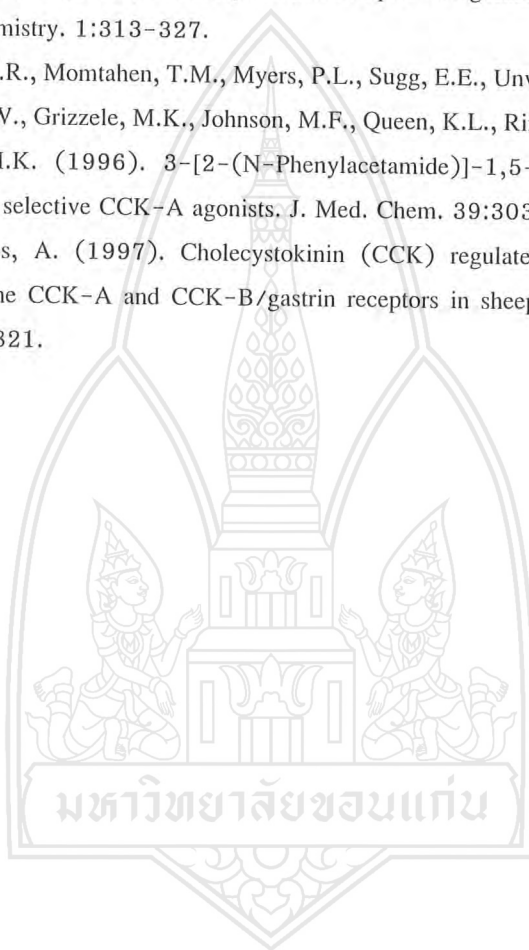
For the binding assay, the radioligand (^{125}I -Bolton Hunter labelled CCK, NEN) was used at 25 pM. The drugs were incubated with the membranes (0.1 mg/ml) in the assay buffer containing 20mM Hepes, 1 mM EGTA, 5 mM $MgCl_2$, 150 mM NaCl, pH 6.5 for 2 hours at room temperature. The incubations were terminated by centrifugation. The membrane pellets were washed twice with water and the bound radioactivity was measured in a γ -counter.

CCK-A-binding assay: This was essential as described for the CCK-B-assay except that pancreas was used instead of cerebral cortex.

References

- Bertram, G.K. (1995). Basic & Clinical Pharmacology. 6th edition. Connecticut: Appleton & Lange, p.335.
- Bock, M.G., DiPardo, R.M., Evans, B.E., Rittle, K.E., Veber, D.F., Freidinger, R.M., Chang, R.S. and Lotti, V.J. (1988). Cholecystokinin antagonists: synthesis and biological evaluation of 4-substituted 4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepines. J. Med. Chem. 31 (1): 176-181.
- Charpentier, B., Pelaprat, D., Durieux, C., Dor, A., Reibaud, M., Blanchard, J.C. and Roques, B.P. (1988). Cyclic cholecystokinin analogues with high selectivity for central receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 85:1968-1972.
- Evans, B.E., Rittle, K.E., Bock, M.G., DiPardo, R.M., Freidinger, R.M., Whitter, W.L., Lundell, G.F., Veber, D.F., Anderson, P.S., Chang, R.S.L., Lotti, V.J., Gilbert, K.F., Garsky, V.M., Leighton, J.L., Carson, K.I., Mellin, E.C., Smith, A.J. and Patel, S. (1993). Development of 1,4-benzodiazepine cholecystokinin type B antagonists. J. Med. Chem. 36:4276-4292.
- Francesco, M. (1993). CCK-B/gastrin-receptor antagonists. Drugs of the Future. 18:919-931.
- Kubota, K., Sugaya, K., Matsuda, I. and Matsuoka, Y. (1985). Cholecystokinin antagonism by benzodiazepines in the contractile response of the isolated guinea pig gallbladder. Jpn. J. Pharmacol. 37:101-106.
- Lattmann, E., Arayarat, P. and Singh, H. (2000). Small organic molecules as cholecystokinin antagonists. J. Science (KKU). 34:288-299.
- Lattmann, E., Billington, D.C., Poyner, D.R., Howitt, S.B. and Offel, M. (2001). Solid phase synthesis of 3-alkylated 1,4-benzodiazepines as non-peptidal cholecystokinin antagonists. Pharm. Lett. 11:5-8.
- Lattmann, E., Billington, D.C., Poyner, D.R., Howitt, S.B. and Offel, M. (2001). Synthesis and evaluation of asperlicin analogues as non-peptidal cholecystokinin antagonists. Drug Design and Discovery. 17:219-230.
- Makovec, F. and D'Amato, M. (1997). CCK_B / gastrin receptor antagonists as potential drugs for peptic ulcer therapy. DDT. 2:283-293.
- Meldrum, L.A., Bojarski, J.D. and Calam, D. (1986). Benzodiazepines inhibit the action of cholecystokinin. J. Eur. Pharmacol. 123:427-431.

- Saita Y., Yazawa, H., Honma, Y., Nishida, A., Miyata, K. and Honda, K. (1994). Characterization of YM022: its CCKB/gastrin receptor binding profile and antagonism to CCK-8-induced Ca^{2+} mobilization. *Eur. J. Pharmacol.* 269:249-254.
- Scheibye, S., Pederson, B.S. and Lawesson, S.O. (1978). Dithiadiphosphetane and their application for organic syntheses. *Bull. Soc. Chim. Belg.* 87:227-232.
- Trivedi, B.K. and Bharat, J. (1994). Cholecystokinin receptor antagonists: current status. *Current Medicinal Chemistry.* 1:313-327.
- Wilson, T.M., Henke, B.R., Momtahan, T.M., Myers, P.L., Sugg, E.E., Unwalla, R.J., Croom, D.K., Dougherty, R.W., Grizzle, M.K., Johnson, M.F., Queen, K.L., Rimele, T.J., Yingling, J.D. and James, M.K. (1996). 3-[2-(N-Phenylacetamide)]-1,5-benzodiazepines: orally active, binding selective CCK-A agonists. *J. Med. Chem.* 39:3030-3034.
- Zavros, Y. and Shulkes, A. (1997). Cholecystokinin (CCK) regulates somatostatin secretion through both the CCK-A and CCK-B/gastrin receptors in sheep. *J. Physiol. (London).* 505(3):811-821.



การศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียโอซิน ที่ผลิตโดยแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก

ปาริชาติ พุ่มขจร¹ และ พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ¹

บทคัดย่อ

จากการนำเชื้อแลกติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 4,673 ไอโซเลตที่แยกได้จากอาหารหมัก 23 ตัวอย่าง มาทำการคัดเลือกเชื้อที่สร้างแบคทีเรียโอซินโดยวิธี agar spot assay พบว่ามีเพียง 10 ไอโซเลตที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินมายับยั้งการเจริญของ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ได้ แต่เมื่อนำส่วนใสปราศจากเซลล์ของเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลต ดังกล่าวไปทดสอบฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินโดยวิธี swab-paper disc พบว่า มีเพียง 9 ไอโซเลต ที่ยังคงยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* ได้ แล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลต ดังกล่าว ถูกจัดจำแนกเป็นแบคทีเรียในสกุล *Lactococcus* และ *Pediococcus* เมื่อทำการศึกษาคูสมบัติของแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดย *Lactococcus* sp. (SK2.1) พบว่า แบคทีเรียโอซินดังกล่าวมีคุณสมบัติดังนี้ ไวต่อเอนไซม์ proteinase K สามารถทนความร้อนที่ 100 °C. ได้นานอย่างน้อย 30 นาที ความสามารถในการยับยั้งเชื้ออื่นมีค่อนข้างแคบ (narrow spectrum of inhibition) จึงทำให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่นำมาทดสอบได้ ถูกผลิตออกมามากที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร และมีกลไกการทำลายเซลล์ของ *L. mesenteroides* เป็นแบบทำให้เซลล์ตายโดยที่เซลล์ไม่แตกสลาย

Abstract

Ten out of 4,673 isolates of lactic acid bacteria (LAB) isolated from 23 fermented food samples were screened for bacteriocin production against *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 by agar spot assay. Culture supernatants from nine out of the ten LAB isolates were shown to have bacteriocin activity against *L. mesenteroides* by using swab - paper disc method. The nine LAB isolates were identified as bacteria in the genus *Lactococcus* and *Pediococcus*. A bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. (SK2.1) had the following properties. It was sensitive to proteinase K and resistant to heat at 100 °C for 30 min. Because of having narrow spectrum of inhibition, it could not inhibit other bacteria tested. Its concentration was highest after 24 hours of incubation. Lastly, it had a bactericidal property without cell lysis against *L. mesenteroides*.

¹ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190

บทนำ

แล็กติกแอซิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียในวงศ์ *Lactobacillaceae* สามารถเจริญได้ดีในที่ที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (microaerophilic) ติดสีแกรมบวก (gram-positive) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ในการผลิตอาหารหมักนิยมใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียเป็นหัวเชื้อ (starter culture) เติมลงในอาหารเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์อาหารหมักตามต้องการ อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacteria) และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (spoilage bacteria) ได้ (Itoh et al., 1995) ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาหารเน่าเสีย เป็นผลเนื่องจากเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ (กรดแล็กติก และกรดอะซิติก) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น (Daeschel, 1989) แบคเทอริโอซินเป็นสารที่สร้างโดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรียหลายชนิด มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างจำเพาะจึงแตกต่างไปจากฤทธิ์ของกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Tagg et al., 1976) ด้วยเหตุนี้จึงมีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านให้ความสนใจในการหาเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินเพื่อจะได้นำเชื้อดังกล่าว หรือแบคเทอริโอซินที่เชื้อสร้างไปใช้ประโยชน์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (de Vuyst and Vandamme, 1994)

ในการศึกษานี้ได้ทำการแยกเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมัก เช่น ปลาร้า แหนม และผักดอง จากนั้นนำเชื้อที่แยกได้ไปทดสอบความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซิน นอกจากนี้ ยังศึกษาคุณสมบัติที่สำคัญบางประการของสารแบคเทอริโอซินดังกล่าวด้วย เชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินอาจจะเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์และในอุตสาหกรรม

อุปกรณ์และวิธีการ

อาหารหมักที่ใช้ในการแยกเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย

อาหารหมักที่ใช้ในการแยกเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ได้แก่ แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ผักดอง โดยเก็บตัวอย่างมาจากตลาดสด อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี รวมทั้งสิ้นจำนวน 23 ตัวอย่าง

การคัดเลือกเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน

การคัดเลือกเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ ทำโดยวิธี agar spot assay (Spelhaug and Harlander, 1989) โดยนำตัวอย่างอาหารมาทำให้เจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้ได้ความเข้มข้นพอเหมาะ แล้วเชยเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร 0.2% glucose MRS agar โดยวิธี cross streak บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เททับผิวหน้าอาหารด้วย 0.2% glucose MRS soft agar (0.7% agar) ซึ่งผสมด้วยเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ที่ผ่านการบ่มข้ามคืน (10^8 colony forming unit (cfu)/ml) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตบริเวณสีที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย เลือกโคโลนีที่ให้บริเวณใสทำการแยกเชื้อให้ได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์อีกครั้ง นำมาเก็บใน MRS broth ที่มี 20% glycerol สามารถเก็บไว้ได้นานที่อุณหภูมิ -20°ซ.

การเตรียมส่วนใสปราศจากเซลล์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

เลี้ยงแลคติกแอสิดแบคทีเรียในอาหาร 0.2% glucose MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 13,000 g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสปราศจากเซลล์มากรองผ่านกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อ (ขนาดรูของกระดาษกรองเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร) แล้วเก็บไว้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบในขั้นต่อไป

การทดสอบการสร้างแบคทีเรียโอซินในส่วนใสปราศจากเซลล์

การทดสอบการสร้างแบคทีเรียโอซินในส่วนใสปราศจากเซลล์ของเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ทำโดยวิธี swab-paper disc method (พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และปาริชาติ พุ่มขจร, 2541) โดยนำส่วนใสปราศจากเซลล์ปริมาตร 25 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อซึ่งวางอยู่บนอาหาร 0.2% glucose MRS agar ที่ป้ายผิวหน้าอาหารให้ทั่วด้วยเชื้อแบคทีเรียทดสอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบแผ่นกระดาษกรอง

การหาปริมาณของแบคทีเรียโอซินทำได้โดยการนำส่วนใสปราศจากเซลล์ที่พบว่ามีความสามารถในการสร้างแบคทีเรียโอซินไปเจือจางครั้งละ 2 เท่า (two-fold dilution) เป็น 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 และ 1:128 ตามลำดับ แล้วจึงนำไปทดสอบโดยวิธี swab-paper disc method รายงานปริมาณของแบคทีเรียโอซินเป็นค่า arbitrary unit (AU)/ml (Tahara and Kanatani, 1996) ซึ่งหมายถึงส่วนกลับของค่าความเจือจางสูงสุดที่ยังสามารถตรวจพบบริเวณใสรอบแผ่นกระดาษกรอง

การทดสอบผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนและความร้อนต่อแบคทีเรียโอซิน

การทดสอบผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อแบคทีเรียโอซินทำโดยนำส่วนใสปราศจากเซลล์ที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อ และทดสอบแล้วว่ามีความสามารถในการสร้างแบคทีเรียโอซินมาเติม proteinase K (1.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 โดยวิธี swab-paper disc method ส่วนการทดสอบผลของความร้อน ทำโดยนำส่วนใสปราศจากเซลล์ที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อและทดสอบแล้วว่ามีความสามารถในการสร้างแบคทีเรียโอซิน ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 โดยวิธี swab-paper disc method

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นของแบคทีเรียโอซิน

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น นอกเหนือจากเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 แบคทีเรียที่นำมาทดสอบ คือ *Streptococcus pneumoniae* DMS 5851, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736 โดยใช้วิธี swab-paper disc method โดยนำเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดบ่มข้ามคืนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* เลี้ยงใน nutrient broth ส่วน *Streptococcus*

pneumoniae เลี้ยงใน MRS broth) นำเชื้อป้ายบนผิวหน้าอาหารแข็งชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียนั้น หยดส่วนใสปราศจากเซลล์ของแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอซินลงบนแผ่นกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อที่วางอยู่บนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบแผ่นกระดาษกรอง

การหาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน

นำเชื้อแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ผ่านการบ่มข้ามคืนปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมลงใน 0.2% glucose MRS broth (12 มิลลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เก็บตัวอย่างครั้งละ 1 มิลลิตรทุก 12 ชั่วโมง โดยเริ่มจากชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48 และ 60 ตามลำดับ นำไปหาปริมาณของแบคทีเรียโอซินโดยวิธี swab-paper disc method และรายงานเป็นค่า AU/ml

การศึกษากลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยแบคทีเรียโอซิน

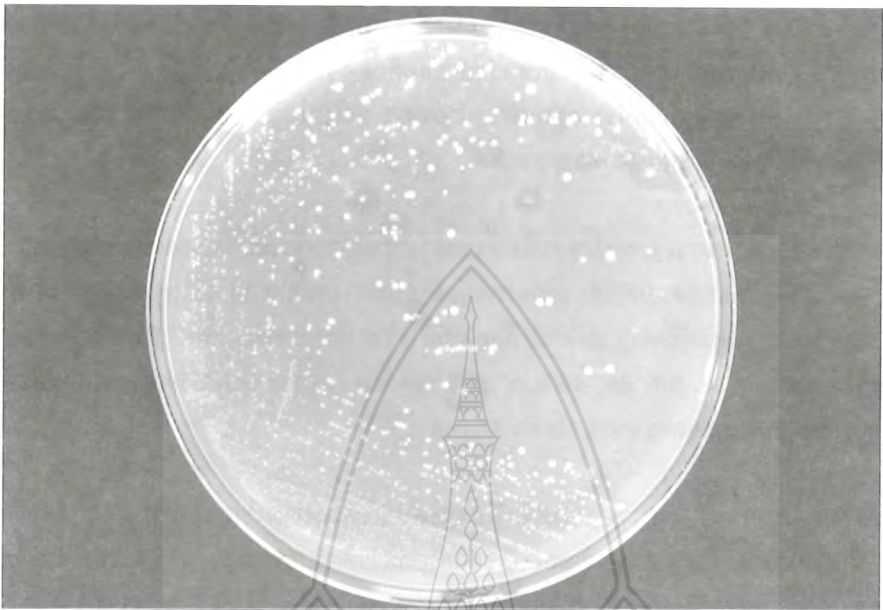
นำส่วนใสปราศจากเซลล์ของแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มิลลิตร มาเติมลงในหลอดที่มีเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ที่บ่มข้ามคืนใน 0.2% glucose MRS broth ปริมาตร 15 มิลลิตร จากนั้นเก็บตัวอย่างของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ครั้งละ 2 มิลลิตร ที่เวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที นำไปวัดค่าความขุ่น (OD เท่ากับ 650 นาโนเมตร) และนับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตโดยวิธี plate count method (ใช้อาหาร 0.2% glucose MRS agar) ใช้ MRS broth แทนส่วนใสปราศจากเซลล์เป็นชุดควบคุม (control)

การจำแนกชนิดของแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน

จำแนกชนิดแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ในระดับสกุล (genus) ตามวิธีของ Schillinger (Schillinger and Lucke, 1987)

ผลการทดลอง

การคัดเลือกเชื้อแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินได้จากตัวอย่างอาหารจำนวน 23 ตัวอย่าง ด้วยวิธี agar spot assay โดยใช้ 0.2% glucose MRS agar และใช้แบคทีเรียทดสอบ คือ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 พบว่ามี 10 ไอโซเลต จาก 4,673 ไอโซเลต (คิดเป็น 0.21%) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ (รูปที่ 1) เมื่อนำเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลต ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 โดยวิธี swab-paper disc method พบว่ามี 9 ไอโซเลต ที่ยังคงยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ได้ (ตารางที่ 1)

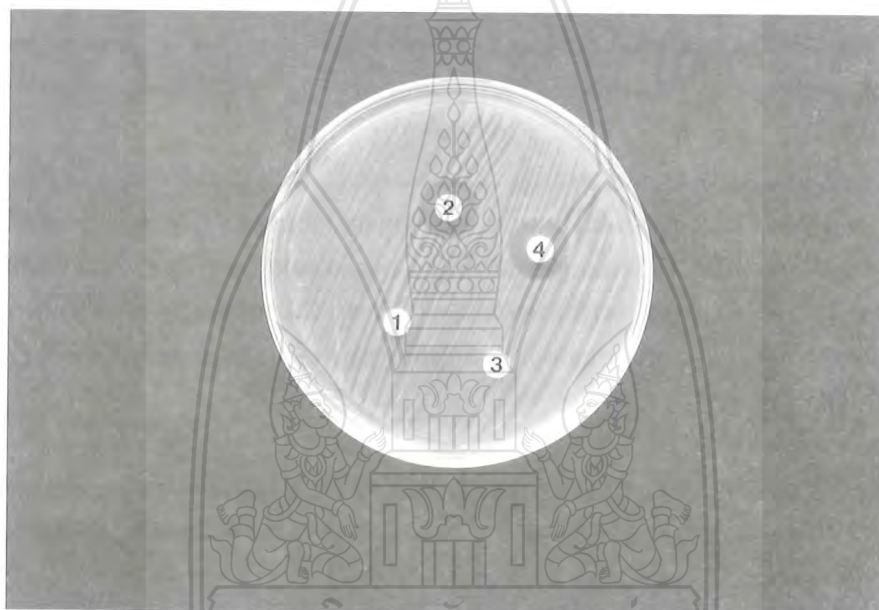


รูปที่ 1 บริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สร้างแบคทีริโอซินยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ทดสอบโดยวิธี agar spot assay

ตารางที่ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบกระดวยกรอง เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 โดยวิธี swab-paper disc method

เชื้อแลกติกแอซิดแบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบกระดวยกรอง (มิลลิเมตร)
SK1.1	11
SK2.1	12
SK3.1	11
SK1.2	12
SK2.2	ไม่เกิดบริเวณใส
SK4.1	10
SK5.1	9
FS1.4	12
FS2.4	10
FS1.10	12

การทดสอบความคงตัว (stability) ของแบคทีเรียโอซินต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน โดยนำส่วนใสปราศจากเซลล์ของแลกติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ มาเติมเอนไซม์ proteinase K แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ทดสอบอีกครั้งพบว่า ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบของแบคทีเรียโอซินจะสูญเสียไป ทำให้ไม่พบบริเวณใสรอบกระดาศกรงเกิดขึ้นเลย (รูปที่ 2) การทดสอบผลของความร้อนต่อแบคทีเรียโอซิน โดยนำส่วนใสปราศจากเซลล์ของแลกติกแอซิดแบคทีเรียไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °ซ. ที่เวลาต่างๆ ปรากฏว่า ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบยังคงมีอยู่เช่นเดิมเมื่อให้ความร้อนเป็นเวลา 30 นาที (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ผลของเอนไซม์ proteinase K และความร้อนต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ของแบคทีเรียโอซินในส่วนใสปราศจากเซลล์ของเชื้อแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (SK2.1) 1= MRS broth (control); 2= ส่วนใสปราศจากเซลล์ของเชื้อ SK2.1; 3= ส่วนใสปราศจากเซลล์ของเชื้อ SK2.1 + proteinase K; 4= ส่วนใสปราศจากเซลล์ของเชื้อ SK2.1+ heat (100°ซ, 30 นาที)

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน ในส่วนใสปราศจากเซลล์ของแลคติก แอสิดแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลต ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นนอกเหนือจาก *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 พบว่า เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นทุกชนิดที่นำมาทดสอบไม่ถูกยับยั้ง โดยแบคทีเรียโอซิน

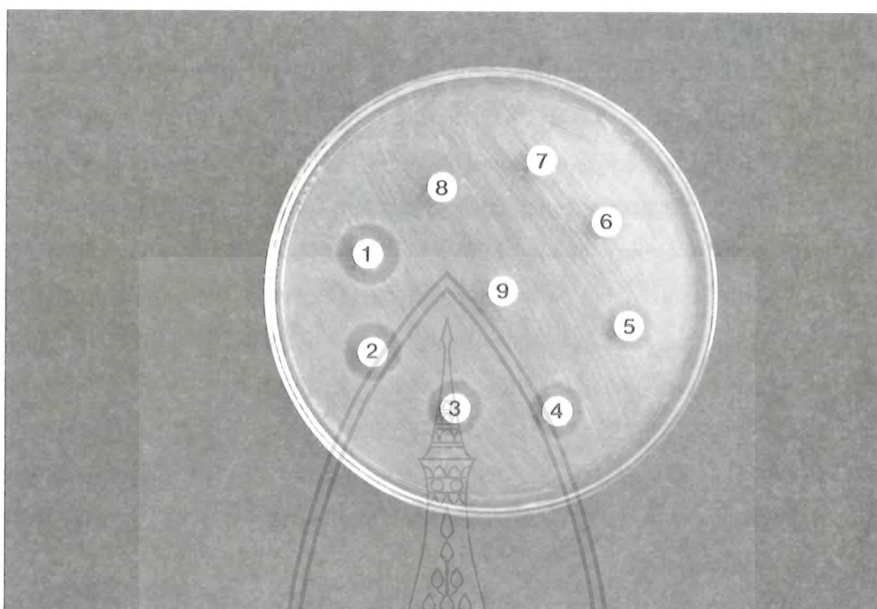
เชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ทั้ง 9 ไอโซเลต เมื่อนำไปจำแนกชนิด ในระดับสกุลตามวิธีของ Schillinger ปรากฏว่า 7 ไอโซเลต เป็นเชื้อในสกุล *Lactococcus* ส่วนอีก 2 ไอโซเลต เป็นเชื้อในสกุล *Pediococcus*

ในการศึกษาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน และกลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียทดสอบของแบคทีเรียโอซิน ได้เลือกเฉพาะเชื้อ *Lactococcus* sp. (SK2.1) มาใช้ในการศึกษา เนื่องจากให้บริเวณใสรอบกระดาดทรงค่อนข้างกว้างเมื่อเทียบกับเชื้อตัวอื่น (ตารางที่ 1) พบว่า เชื้อสร้างแบคทีเรียโอซินออกมามากที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 2 และรูปที่ 3) โดยสามารถตรวจพบ บริเวณใสรอบกระดาดทรงได้ที่ระดับความเจือจางสูงสุดเท่ากับ 1:16 หรือมีปริมาณแบคทีเรียโอซินเป็น 640 AU/ml

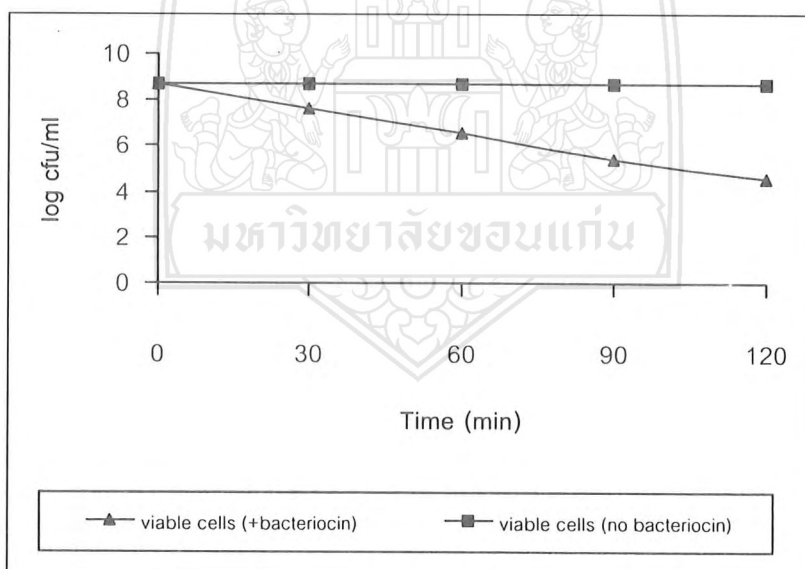
เมื่อเติมส่วนใสปราศจากเซลล์ของเชื้อ *Lactococcus* sp. (SK2.1) ลงไปในหลอดที่มีเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ที่บ่มไว้ข้ามคืน แล้วเก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ มาวัดค่าความขุ่น (OD_{650}) และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต เปรียบเทียบกับชุดควบคุม เพื่อศึกษากลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียทดสอบ พบว่า ทุกช่วงเวลาที่นำตัวอย่างออกมาวัดค่าความขุ่นจะให้ค่า OD ที่ไม่แตกต่างกัน และยังให้ค่าเท่ากับกับชุดควบคุมด้วย แต่เมื่อนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตกลับพบว่า จำนวนเซลล์ลดลงและแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4)

ตารางที่ 2 ผลการยับยั้งเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 โดยส่วนใสปราศจากเซลล์ของเชื้อ SK2.1 เมื่อบ่มที่เวลาต่าง ๆ (+ = มีบริเวณใสเกิดขึ้นรอบกระดาดทรง - = ไม่มีบริเวณใสเกิดขึ้นรอบกระดาดทรง)

ระดับความเจือจาง	เวลา (ชั่วโมง)					
	0	12	24	36	48	60
1:1 (undiluted)	-	+	+	+	+	+
1:2	-	+	+	+	+	+
1:4	-	+	+	+	+	+
1:8	-	+	+	+	+	+
1:16	-	-	+	-	-	-
1:32	-	-	-	-	-	-
1:64	-	-	-	-	-	-
1:128	-	-	-	-	-	-



รูปที่ 3 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 โดยแบคทีริโอซินในส่วนใสปราศจากเซลล์ของเชื้อ SK2.1 เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง; 1 = 1:1, 2 = 1:2, 3 = 1:4, 4 = 1:8, 5 = 1:16, 6 = 1:32, 7 = 1:64, 8 = 1:128 และ 9 = MRS broth (control)



รูปที่ 4 ผลของแบคทีริโอซินที่สร้างโดยเชื้อ *Lactococcus* sp. (SK2.1) ต่อเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เชื้อแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จำนวน 4,673 ไอโซเลต เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างแบคทีเรียโอซินโดยวิธี agar spot assay พบว่ามีเพียง 10 ไอโซเลต เท่านั้นที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินมายับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบได้ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การตรวจพบ (detection rate) จะได้เท่ากับ 0.21% ซึ่งถือว่าสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์การตรวจพบที่รายงานโดย Coventry et al. (1997) อย่างไรก็ตาม เปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อที่สร้างแบคทีเรียโอซินอาจแตกต่างกันได้บ้าง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิธีการที่ใช้ในการตรวจหาและชนิดของอาหารที่นำมาแยกเชื้อ (Garver and Muriana, 1993) เมื่อนำเชื้อที่แยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลต ไปทดสอบการสร้างแบคทีเรียโอซินโดยวิธี swab-paper disc method พบว่า มีเพียง 9 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ได้ การที่ผลการทดสอบการสร้างแบคทีเรียโอซินของสองวิธีนี้แตกต่างกัน เนื่องจากใน swab-paper disc method นำเฉพาะส่วนใสปราศจากเซลล์ของเชื้อมาทดสอบ ดังนั้น หากแบคทีเรียโอซินที่ผลิตออกมานั้นมีครึ่งชีวิตสั้นหรือไม่เสถียร ก็จะสูญเสียความสามารถในการยับยั้งเชื้อไปได้ (Geis et al., 1983)

เนื่องจากเอ็นไซม์ย่อยโปรตีนสามารถทำลายความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ ดังนั้น สารยับยั้งที่มีอยู่ในส่วนใสปราศจากเซลล์จึงน่าจะเป็นโปรตีน (Muriana and Klaenhammer, 1991) และโปรตีนดังกล่าวน่าจะมีขนาดเล็กหรือมีโครงสร้างไม่ซับซ้อน เมื่อได้รับความร้อนจึงไม่เสียสภาพหรือยังคงความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ (Daeschel et al., 1990)

ความสามารถของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบจะแตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของแบคทีเรียโอซิน (Nettles and Barefoot, 1993; Yildirim and Johnson, 1998; Tahara and Kanatani, 1996) โดยทั่วไปแบคทีเรียโอซินมักจะมีคุณสมบัติสำคัญประการหนึ่ง คือ มีความจำเพาะอย่างมาก (highly specific) ต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบ หรืออีกนัยหนึ่งคือมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอื่นได้บางชนิด (narrow spectrum of inhibition) ซึ่งต่างจากคุณสมบัติของยาปฏิชีวนะ (Tagg et al., 1976; Daeschel, 1989; de Vuyst and Vandamme, 1994) ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรียโอซินจะต้องมีที่รับ (receptor) สำหรับแบคทีเรียโอซินนั้น (Tagg et al., 1976) ในการทดลองนี้เมื่อนำแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อแลกติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลต ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบชนิดอื่น ปรากฏว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่นำมาทดสอบได้เลย แสดงว่า แบคทีเรียโอซินดังกล่าวนี้ น่าจะมีความจำเพาะต่อเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 เท่านั้น คุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อได้อย่างจำเพาะเช่นนี้จึงยิ่งช่วยสนับสนุนว่า สารดังกล่าวน่าจะเป็นแบคทีเรียโอซิน (Tagg et al., 1976; Klaenhammer, 1988)

กลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยแบคทีเรียโอซินส่วนใหญ่เป็นการฆ่าเซลล์ (bactericidal) (Nettles and Barefoot, 1993) ในการทดลองนี้ได้เลือกแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactococcus* sp. (SK2.1) มาศึกษากลไกการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 โดยการวัดความขุ่น และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต พบว่า แบคทีเรียโอซินสามารถทำให้เซลล์แบคทีเรียทดสอบตายโดยเซลล์ไม่แตกสลาย (nonlysis) เนื่องจากจำนวนเซลล์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดในขณะที่ค่าความขุ่นยังคงเดิม แบคทีเรียโอซินที่มีกลไกการยับยั้งในลักษณะเดียวกันนี้ ได้แก่ แกสเซอร์ซิน A (gassericin A) (Kawai

et al., 1994), เพดดิโอซิน PD-1 (pediocin PD-1) (Green et al., 1997) และแพลนทาริซิน KW30 (plantaricin KW30) (Kelly et al., 1996) เป็นต้น

Lactococcus sp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้หลายชนิด เช่น ดิโพลคอคซิน (diplococcin) แลคโตสเตรปซิน (lactostrepsin) แลคโตคอคซิน (lactococcin) และนิซิน (nisin) (Uhlman et al., 1992; Kojic et al., 1991; Liu and Hansen, 1990) เป็นต้น ดังนั้น สิ่งที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไปคือ จำแนกสปีชีส์ของ *Lactococcus* sp. ที่แยกได้ ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของแบคเทอริโอซิน ที่เชื้อสร้างและปัจจัยที่มีผลต่อการสร้าง ตลอดจนยืนยันที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินชนิดนี้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ที่จัดสรรงบประมาณประจำปี 2543 ให้แก่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ซึ่งเป็นเงินทุนที่ใช้ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และปาริชาติ พุ่มขจร. (2541). วิธีการอย่างง่ายในการทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซิน. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 26(4):281-288.
- Coventry, M.J., Gordon, J.B., Wilcock, A., Harmark, K., Davidson, B.E., Hickey, M.W., Hiller, A.J. and Wan, J. (1997). Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin. J. Appl. Microbiol. 83:248-258.
- Daeschel, M.A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Tech. 43:164-167.
- Daeschel, M.A., McKenney, M.C. and McDonald, L.C. (1990). Bactericidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. Food Microbiol. 7:91-98.
- de Vuyst, L. and Vandamme, E.J. (1994). Lactic acid bacteria and bacteriocins : their practical importance. In : de Vuyst, L. and Vandamme, E.J. (eds.), Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria. Glasgow: Blackie Academic & Professional. p.1-12.
- Garver, K.I. and Muriana, P.M. (1993). Detection, identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from retail food products. J. Food Microbiol. 19:241-258.
- Geis, A., Singh, J. and Teuber, M. (1983). Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. Appl. Environ. Microbiol. 45:205-211.
- Green, G., Dicks, L.M.T., Bruggeman, G., Vandamme, E.J. and Chikindas, M.L. (1997). Pediocin PD-1, a bactericidal antimicrobial peptide from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. J. Appl. Microbiol. 83:127-132.
- Itoh, T., Fujimoto, Y., Kawai, Y., Toba, T. and Saito, T. (1995). Inhibition of food-borne pathogenic bacteria by bacteriocin from *Lactobacillus gasseri*. Letter in Appl. Microbiol. 21:137-141.

- Kawai, Y., Saito, T., Toba, T., Samant, S.K. and Itoh, T. (1994). Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (gassericin A) from *Lactobacillus gasseri* LA 39. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58:1218-1221.
- Kelly, W.J., Asmundson, R.V. and Huang, C.M. (1996). Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products. *J. Food Microbiol.* 33:209-218.
- Klaenhammer, T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70:337-349.
- Kojic, M., Svircevic, J., Banina, A. and Topisirovic, L. (1991). Bacteriocin-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* S50. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1835-1837.
- Liu, W. and Hansen, J.N. (1990). Some chemical and physical properties of nisim, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2551-2558.
- Muriana, P.M. and Klaenhammer, T.R. (1991). Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:114-121.
- Nettles, C.G. and Barefoot, S.F. (1993). Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 56(4):338-356.
- Schillinger, U. and Lucke, F-K. (1987). Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiol.* 4:199-208.
- Spelhaug, S.R. and Harlander, S.A. (1989). Inhibition of food borne bacterial pathogens by bacteriocin from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *J. Food Prot.* 52:856-862.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40(3):722-756.
- Tahara, T. and Kanatani, K. (1996). Isolation, partial characterization and mode of action of acidocin J1229, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1229. *J. Appl. Bacteriol.* 81:669-677.
- Uhlman, L., Schillinger, U., Rupnow, J.R. and Holzapfel, W. H. (1992). Identification and characterization of two bacteriocin-producing strains of *Lactococcus lactis* isolated from vegetables. *J. Food. Microbiol.* 16:141-151.
- Yildirim, Z. and Johnson, M.G. (1998). Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *J. Food. Prot.* 61(1):47-51.

ระเบียบวิธีเพโทรฟ-กาเลอร์คินขึ้นประกอบอันตะ ของปัญหามลภาวะทางอากาศสถานะอยู่ตัว

สุพจน์ ไทเที่ยงกร¹

บทคัดย่อ

การเสนอระเบียบวิธีเพโทรฟ-กาเลอร์คิน ขึ้นประกอบอันตะสำหรับการแก้ปัญหามลภาวะทางอากาศสถานะอยู่ตัว โดยการสมมติให้โดเมนของตัวแปรอิสระเป็นโดเมนมีขอบเขต ด้วยเงื่อนไขขอบ และการสมมติให้ผลเฉลยประมาณค่าเป็นพหุนามระดับชั้นหนึ่งในแต่ละตัวแปรบนแต่ละชั้นประกอบสี่เหลี่ยมผืนผ้า เสนอดตัวอย่างของปัญหาด้วยรูปภาพ

Abstract

The Petrov-Galerkin finite element methods for solving the steady state air pollution problem is proposed. The domain of the independent variables is assumed to be the bounded domain, with a particular form of boundary conditions. The approximate solution is assumed to be the polynomial of degree one in each variable on each equal rectangular element. An example of the problem is illustrated.

บทนำ

ในการพัฒนารูปแบบคณิตศาสตร์สำหรับพลศาสตร์มลภาวะทางอากาศในบรรยากาศเป็นกระบวนการเคลื่อนย้ายและการแพร่ของมลภาวะทางอากาศ ซึ่งสามารถอธิบายด้วยสมการเชิงอนุพันธ์ย่อยในสมการ (1)

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} + u \frac{\partial \phi}{\partial x} + v \frac{\partial \phi}{\partial y} + (w - w_s) \frac{\partial \phi}{\partial z} - \mu \Delta \phi - \frac{\partial}{\partial z} \left(v \frac{\partial \phi}{\partial z} \right) + \sigma \phi = f \quad (1)$$

เมื่อ ϕ เป็นความเข้มข้นของมลภาวะทางอากาศ t เป็นเวลา u , v และ w เป็นส่วนประกอบของความเร็วลม w_s เป็นค่าคงตัวจำนวนบวก ซึ่งเป็นความเร็วของมลภาวะที่ตกลงด้วยแรงโน้มถ่วง เป็นค่าคงตัวจำนวนบวก ซึ่งเป็นสัมประสิทธิ์การเคลื่อนย้ายของมลภาวะทางอากาศ และเป็นสัมประสิทธิ์ของการแพร่ และ

$$\Delta = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2}$$

¹ ภาควิชาคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

Dang และ Ngo (1991, 1994) ได้ศึกษาสมการ และหาผลเฉลยเชิงตัวเลขโดยใช้วิธีผลต่างอันตะ ซึ่งกำหนดเงื่อนไขต่อไปนี้

1. แหล่งกำเนิดมลภาวะจะเป็นความเข้มข้นมลภาวะที่จุด $(0,0,h)$ และมีกำลังคงตัว Q นั่นคือ $f = Q\delta(x)\delta(y)\delta(z-h)$ เมื่อ $\delta(x)$ คือฟังก์ชันเดลตา
2. การเกิดมลภาวะเป็นแบบสถานะอยู่ตัว นั่นคือ $\frac{\partial \phi}{\partial t} = 0$
3. ความเร็วลมจะมีเฉพาะทิศทางตามแกน X นั่นคือ $u = u(z) > 0, v = w = 0$

ในงานวิจัยนี้กำหนดเงื่อนไขเพิ่มอีก คือ ในระดับพื้นดินและระดับความสูง H ซึ่งเป็นความสูงระดับล่างของระดับผกผันมีฟลักซ์เป็นศูนย์

รูปแบบทางคณิตศาสตร์

จากสมการ (1) และเงื่อนไขเป็น

1. แหล่งกำเนิดมลภาวะจะเป็นความเข้มข้นมลภาวะที่จุด $(0,0,h)$ และมีกำลังคงตัว Q นั่นคือ $f = Q\delta(x)\delta(y)\delta(z-h)$ เมื่อ $\delta(x)$ คือฟังก์ชันเดลตา
2. การเกิดมลภาวะเป็นแบบสถานะอยู่ตัว นั่นคือ $\frac{\partial \phi}{\partial t} = 0$
3. ความเร็วลมจะมีเฉพาะทิศทางตามแกน X นั่นคือ $u = u(z) > 0, v = w = 0$
4. ในระดับพื้นดินและระดับความสูง H ซึ่งเป็นความสูงระดับล่างของระดับผกผันมีฟลักซ์เป็นศูนย์ นั่นคือ $\frac{\partial \phi(x,0)}{\partial z} = 0$ และ $\frac{\partial \phi(x,H)}{\partial z} = 0$

ภายใต้เงื่อนไขข้างต้น ในเทอมการแพร่ในทิศทางแกน X จะไม่คำนึง สมการ (1) จะอยู่ในรูป

$$u \frac{\partial \phi}{\partial x} - w_s \frac{\partial \phi}{\partial z} - \mu \frac{\partial^2 \phi}{\partial y^2} - \frac{\partial}{\partial z} \left(v \frac{\partial \phi}{\partial z} \right) + \sigma \phi = Q\delta(x)\delta(y)\delta(z-h) \quad (2)$$

และสมมติเส้นแหล่งกำเนิดอยู่ในแนวแกน Y ซึ่งจะพิจารณาปัญหาเพียงสองมิติ ดังนั้น สมการ (2) จึงอยู่ในรูป

$$u \frac{\partial \phi}{\partial x} - w_s \frac{\partial \phi}{\partial z} - \frac{\partial}{\partial z} \left(v \frac{\partial \phi}{\partial z} \right) + \sigma \phi = Q\delta(x)\delta(z-h) \quad (3)$$

แหล่งกำเนิดอยู่ที่ความสูง h ตามแกน Z เป็นฟังก์ชัน δ สมประสิทธิการแพร่ v ความเร็วลม u เป็นฟังก์ชันของ z ดังนั้น ปริภูมิ $\{(x,z) \in \mathbb{R}^2 \mid x > 0, 0 < z < H\}$ จะเป็นโดเมนสำหรับปัญหาต่อไปนี้

$$u(z) \frac{\partial \phi}{\partial x} - w_s \frac{\partial \phi}{\partial z} - \frac{\partial}{\partial z} \left(v(z) \frac{\partial \phi}{\partial z} \right) + \sigma \phi = 0 \quad \text{สำหรับทุก } x > 0, 0 < z < H \quad (4)$$

เงื่อนไขขอบ บนแกน Z คือ

$$\phi(0,z) = \frac{Q}{u(z)} \delta(z-h) \quad \text{สำหรับทุก } 0 < z < H \quad (5)$$

เมื่อ h เป็นความสูงของแหล่งกำเนิด และ Q เป็นอัตราการกระจาย
เงื่อนไขขอบ บนระดับพื้นดินและระดับผกผัน คือ

$$v(0) \frac{\partial \varphi(x, 0)}{\partial z} = 0 \quad \text{สำหรับทุก } x > 0 \quad (6)$$

และ

$$v(H) \frac{\partial \varphi(x, H)}{\partial z} = 0 \quad \text{สำหรับทุก } x > 0 \quad (7)$$

ตามลำดับ

จากสมการ (4) - (7) เปลี่ยนให้เป็นไร้มิติ โดยการหารตัวแปร $x, z, h, \varphi, u, v, w$ และ s ด้วยนิพจน์ $\frac{H^2 u(H)}{v(H)}, H, H, \frac{Q}{u(H)H}, u(H), v(H), \frac{v(H)}{H}$ และ $\frac{v(H)}{H^2}$ ตามลำดับ ตัวแปรใหม่ในไร้มิติจะใช้ตัวแปรเดิม
ดังนั้น จะได้ระบบสมการเป็น

$$u(z) \frac{\partial \varphi}{\partial x} - w_s \frac{\partial \varphi}{\partial z} - \frac{\partial}{\partial z} \left(v(z) \frac{\partial \varphi}{\partial z} \right) + \sigma \varphi = 0 \quad \text{สำหรับทุก } x > 0, 0 < z < 1 \quad (8)$$

เงื่อนไขขอบ บนแกน Z คือ

$$\varphi(0, z) = \frac{\delta(z-h)}{u(z)} \quad \text{สำหรับทุก } 0 < z < 1 \quad (9)$$

เงื่อนไขขอบ บนระดับพื้นดินและระดับผกผัน คือ

$$v(0) \frac{\partial \varphi(x, 0)}{\partial z} = 0 \quad \text{สำหรับทุก } x > 0 \quad (10)$$

และ

$$v(1) \frac{\partial \varphi(x, 1)}{\partial z} = 0 \quad \text{สำหรับทุก } x > 0 \quad (10)$$

ตามลำดับ

ในงานวิจัยนี้ จะใช้ระเบียบวิธีเพทรอฟ-กาเลอร์คินชั้นประกอบอันดับสอง ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งของการคำนวณเชิงตัวเลขในการแก้ปัญหาคณิตศาสตร์สองมิติของสมการทางอากาศสถานะอยู่ตัวในสมการ (8) - (11)

วิธีประมาณค่าชั้นประกอบอันดับสอง

ให้ $\Omega = \{(x, z) \in \mathbb{R}^2 \mid x > 0, 0 < z < 1\}$ เป็นโดเมน และแบ่งโดเมนออกเป็นชั้นประกอบสี่เหลี่ยมผืนผ้า ดังรูปที่ 1 ในระบบพิกัด (x, z) แปลงเป็นระบบพิกัด (ξ, η) ด้วยความสัมพันธ์ คือ

$$\frac{x}{a} = \frac{\xi+1}{2}, \quad \frac{z}{b} = \frac{\eta+1}{2} \quad (12)$$

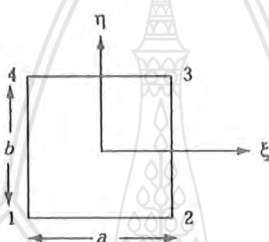
และให้

$$L(\varphi) \equiv u(z) \frac{\partial \varphi}{\partial x} - w_s \frac{\partial \varphi}{\partial z} - \frac{\partial}{\partial z} \left(v(z) \frac{\partial \varphi}{\partial z} \right) + \sigma \varphi \quad (13)$$

ในรูปแบบของสมการขึ้นประกอบอันตะ ผลเฉลยโดยประมาณ ของผลเฉลย φ ในทุกชั้นประกอบจะอยู่ในรูปผลบวกเชิงเส้นของผลเฉลยทุกจุดต่อของชั้นประกอบ เมื่อเลือกผลบวกเชิงเส้น คือ

$$\varphi(x, z) \approx \hat{\varphi}(x, z) = \sum_j \varphi_j \phi_j(x, z) \quad (14)$$

เมื่อ φ_j เป็นค่าความเข้มข้นของมลภาวะทางอากาศ ณ จุดต่อ j และ $\phi_j(x, z)$ เป็นฟังก์ชันพื้นฐาน ณ จุดต่อ j



รูปที่ 1 แสดงชั้นประกอบสี่เหลี่ยมผืนผ้าของชั้นประกอบอันตะ

ดังนั้น ในทุกชั้นประกอบจะได้

$$L(\hat{\varphi}) \equiv R \quad (15)$$

เมื่อ R คือ เศษตกค้างที่เกิดขึ้นด้วยวิธีวิธีเพรอป-กาเลอรีคิน จะเลือกฟังก์ชันน้ำหนัก $\omega_i(x, z)$ ซึ่งทำให้เศษตกค้างเป็นศูนย์ ดังนั้น จะได้

$$\iint_{\Omega} L(\hat{\varphi}) \omega_i(x, z) dx dz = 0 \quad (16)$$

เนื่องจาก การอินทิกรัล (16) โดยการอินทิเกรตทีละส่วน จะได้

$$\begin{aligned} & \iint_{\Omega} \left(u(z) \frac{\partial \hat{\varphi}}{\partial x} - w_s \frac{\partial \hat{\varphi}}{\partial z} - \frac{\partial}{\partial z} \left(v(z) \frac{\partial \hat{\varphi}}{\partial z} \right) + \sigma \hat{\varphi} \right) \omega_i(x, z) dx dz \\ &= \iint_{\Omega} u(z) \frac{\partial \hat{\varphi}}{\partial x} \omega_i(x, z) dx dz - w_s \iint_{\Omega} \frac{\partial \hat{\varphi}}{\partial z} \omega_i(x, z) dx dz \\ & \quad - \iint_{\Omega} \frac{\partial}{\partial z} \left(v(z) \frac{\partial \hat{\varphi}}{\partial z} \right) \omega_i(x, z) dx dz + \iint_{\Omega} \sigma \hat{\varphi} \omega_i(x, z) dx dz = 0 \end{aligned} \quad (17)$$

ถ้าอินทิกรัลเป็นการอินทิเกรตในบริเวณปิด Ω_c ด้วยขอบ $\partial\Omega_c$ ระบบรักษาปิดโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงพลังงาน แล้วโดยใช้ทฤษฎีบทกรีน เมื่อ Ω_c เป็นโดเมนย่อยของแต่ละชั้นประกอบอันตะ และ $\partial\Omega_c$ เป็นขอบของโดเมนย่อยชั้นประกอบอันตะ เมื่อหาอินทิเกรตในแต่ละโดเมนย่อยของชั้นประกอบอันตะ จะได้

$$\iint_{\Omega_c} u(z) \frac{\partial \hat{\varphi}}{\partial x} \omega_i(x, z) dx dz - w_s \iint_{\Omega_c} \frac{\partial \hat{\varphi}}{\partial z} \omega_i(x, z) dx dz$$

$$+ \iint_{\Omega_c} v(z) \frac{\partial \hat{\phi}}{\partial z} \frac{\partial \omega_i(x, z)}{\partial z} dx dz + \iint_{\Omega_c} \sigma \hat{\phi} \omega_i(x, z) dx dz = 0 \quad (18)$$

เนื่องจากผลลัพธ์จะใช้ได้สำหรับทุกบริเวณปิด Ω_c การอินทิเกรตในสมการ (18) สามารถเปลี่ยนระบบเป็นระบบ (ξ, η) ในทุกชั้นประกอบ ดังนั้น จะได้สมการเป็น

$$\int_{-1}^1 \int_{-1}^1 \left[u(\eta) \frac{\partial \hat{\phi}}{\partial x} \omega_i(\xi, \eta) - w_s \frac{\partial \hat{\phi}}{\partial z} \omega_i(\xi, \eta) + v(\eta) \frac{\partial \hat{\phi}}{\partial z} \frac{\partial \omega_i(\xi, \eta)}{\partial z} + \sigma \hat{\phi} \omega_i(\xi, \eta) \right] |J| d\xi d\eta = 0 \quad (19)$$

เมื่อ

$$\frac{\partial \hat{\phi}}{\partial x} = \sum_{j=1}^4 \varphi_j \frac{\partial \phi_j}{\partial \xi} \frac{\partial \xi}{\partial x} = \frac{2}{a} \sum_{j=1}^4 \varphi_j \frac{\partial \phi_j}{\partial \xi} \quad (20)$$

$$\frac{\partial \hat{\phi}}{\partial z} = \sum_{j=1}^4 \varphi_j \frac{\partial \phi_j}{\partial \eta} \frac{\partial \eta}{\partial z} = \frac{2}{b} \sum_{j=1}^4 \varphi_j \frac{\partial \phi_j}{\partial \eta} \quad (21)$$

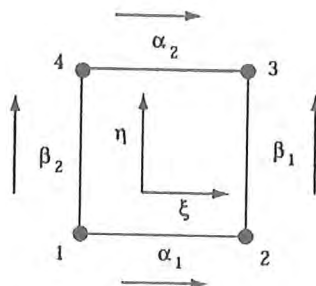
$$|J| = \begin{vmatrix} \frac{\partial x}{\partial \xi} & \frac{\partial x}{\partial \eta} \\ \frac{\partial z}{\partial \xi} & \frac{\partial z}{\partial \eta} \end{vmatrix} = \frac{ab}{4} \quad (22)$$

ฟังก์ชันพื้นฐานจะอยู่ในรูปแบบ ต่อไปนี้

$$\left. \begin{aligned} \phi_1(\xi, \eta) &= \frac{1}{4}(1-\xi)(1-\eta), & \phi_2(\xi, \eta) &= \frac{1}{4}(1+\xi)(1-\eta) \\ \phi_3(\xi, \eta) &= \frac{1}{4}(1+\xi)(1+\eta), & \phi_4(\xi, \eta) &= \frac{1}{4}(1-\xi)(1+\eta) \end{aligned} \right\} \quad (23)$$

ให้ฟังก์ชันน้ำหนักอยู่ในรูปแบบ ต่อไปนี้

$$\left. \begin{aligned} \omega_1(\xi, \eta) &= G_1(\xi, \alpha_1) H_1(\eta, \beta_2) \\ \omega_2(\xi, \eta) &= G_2(\xi, \alpha_1) H_1(\eta, \beta_1) \\ \omega_3(\xi, \eta) &= G_2(\xi, \alpha_2) H_2(\eta, \beta_1) \\ \omega_4(\xi, \eta) &= G_1(\xi, \alpha_2) H_2(\eta, \beta_2) \end{aligned} \right\} \quad (24)$$



รูปที่ 2 ฟังก์ชันน้ำหนักสมมาตรสำหรับจุดต่อ 4 จุด นิยามในพิกัด (ξ, η)

เมื่อ

$$G_1(\xi, \alpha_1) = \frac{1}{4}[(1+\xi)(3\alpha_1\xi - 3\alpha_1 - 2) + 4] \quad (25)$$

$$G_2(\xi, \alpha_1) = \frac{1}{4}[(1+\xi)(-3\alpha_1\xi + 3\alpha_1 + 2)] \quad (26)$$

$$G_1(\xi, \alpha_2) = \frac{1}{4}[(1+\xi)(3\alpha_2\xi - 3\alpha_2 - 2) + 4] \quad (27)$$

$$G_2(\xi, \alpha_2) = \frac{1}{4}[(1+\xi)(-3\alpha_2\xi + 3\alpha_2 + 2)] \quad (28)$$

$$H_1(\eta, \beta_1) = \frac{1}{4}[(1+\eta)(3\beta_1\eta - 3\beta_1 - 2) + 4] \quad (29)$$

$$H_2(\eta, \beta_1) = \frac{1}{4}[(1+\eta)(-3\beta_1\eta + 3\beta_1 + 2)] \quad (30)$$

$$H_1(\eta, \beta_2) = \frac{1}{4}[(1+\eta)(3\beta_2\eta - 3\beta_2 - 2) + 4] \quad (31)$$

$$H_2(\eta, \beta_2) = \frac{1}{4}[(1+\eta)(-3\beta_2\eta + 3\beta_2 + 2)] \quad (32)$$

ดังนั้น จะได้

$$\omega_1(\xi, \eta) = \frac{1}{16}[(1+\xi)(3\alpha_1\xi - 3\alpha_1 - 2) + 4][(1+\eta)(3\beta_2\eta - 3\beta_2 - 2) + 4] \quad (33)$$

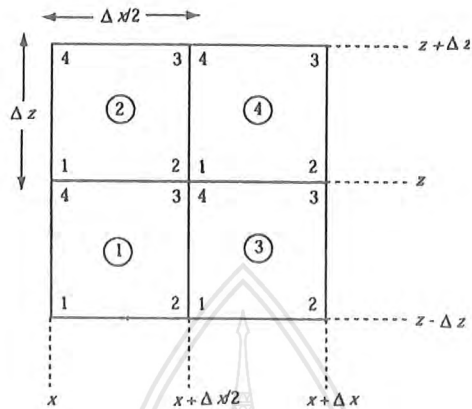
$$\omega_2(\xi, \eta) = \frac{1}{16}[(1+\xi)(-3\alpha_1\xi + 3\alpha_1 + 2)][(1+\eta)(3\beta_1\eta - 3\beta_1 - 2) + 4] \quad (34)$$

$$\omega_3(\xi, \eta) = \frac{1}{16}[(1+\xi)(-3\alpha_2\xi + 3\alpha_2 + 2)][(1+\eta)(-3\beta_2\eta + 3\beta_2 + 2)] \quad (35)$$

$$\omega_4(\xi, \eta) = \frac{1}{16}[(1+\xi)(3\alpha_2\xi - 3\alpha_2 - 2) + 4][(1+\eta)(-3\beta_2\eta + 3\beta_2 + 2)] \quad (36)$$

สำหรับทุกชั้นประกอบ อินทิเกรตสมการ จะอยู่ในรูปสมการ

$$\sum_{j=1}^4 M_j^k \phi_j^k = 0, \quad k = 1, 2, 3, 4 \quad (37)$$



รูปที่ 3 แสดงกลุ่มของชิ้นประกอบ 4 ชิ้นประกอบ

เมื่อ

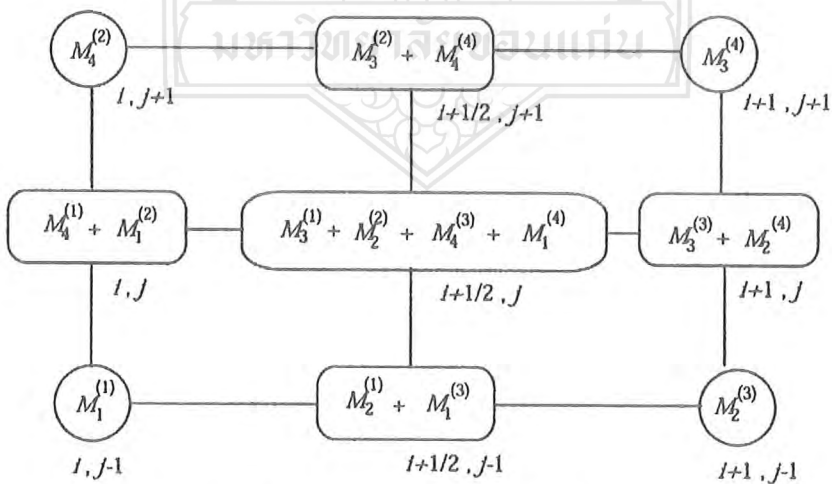
$$M_j^k = A_j^k + B_j^k + C_j^k + D_j^k$$

$$A_j^k = \frac{\Delta z}{4} \int_{-1}^1 \int_{-1}^1 u(\eta) \frac{\partial \phi_j(\xi, \eta)}{\partial \xi} \omega_k(\xi, \eta) d\xi d\eta$$

$$B_j^k = w_s \frac{\Delta x}{4} \int_{-1}^1 \int_{-1}^1 \frac{\partial \phi_j(\xi, \eta)}{\partial \eta} \omega_k(\xi, \eta) d\xi d\eta$$

$$C_j^k = \frac{\Delta x}{8} \int_{-1}^1 \int_{-1}^1 v(\eta) \frac{\partial \phi_j(\xi, \eta)}{\partial \eta} \frac{\partial \omega_k(\xi, \eta)}{\partial \eta} d\xi d\eta$$

$$D_j^k = \sigma \frac{\Delta x \Delta z}{8} \int_{-1}^1 \int_{-1}^1 \phi_j(\xi, \eta) \omega_k(\xi, \eta) d\xi d\eta$$



รูปที่ 4 กลุ่มสมการชิ้นประกอบอันตะ

ผลรวมทั้งหมดของสมการชั้นประกอบอันดับสำหรับ 4 ชั้นประกอบจะเป็นไปตามรูปที่ 4 ถ้าชั้นประกอบ ถูกจัดระดับแนวนอนที่ $i, i + \frac{1}{2}$ และ $i+1$ ในแนวดิ่งที่ $j-1, j$ และ $j+1$ จากสมการ และจากความสัมพันธ์ตามรูปที่ 4 จะได้สมการต่อไปนี้

$$\begin{aligned} & M_1^{(1)}\varphi_{i,j-1} + (M_2^{(1)} + M_1^{(3)})\varphi_{i+1/2,j-1} + M_2^{(3)}\varphi_{i+1,j-1} + \\ & + (M_4^{(1)} + M_1^{(2)})\varphi_{i,j} + (M_3^{(1)} + M_2^{(2)} + M_4^{(3)} + M_1^{(4)})\varphi_{i+1/2,j} + (M_3^{(3)} + M_2^{(4)})\varphi_{i+1,j} + \\ & + M_4^{(2)}\varphi_{i,j+1} + (M_3^{(2)} + M_4^{(4)})\varphi_{i+1/2,j+1} + M_3^{(4)}\varphi_{i+1,j+1} = 0 \end{aligned} \quad (38)$$

ถ้าส่วนประกอบบนระดับ $i + \frac{1}{2}$ เมื่อคูณด้วย θ และ $1-\theta$ จะเป็นส่วนประกอบระดับ $i+1$ และ i ในแนวนอน ดังนั้นสมการ จะเป็นสมการต่อไปนี้

$$\begin{aligned} & (M_2^{(3)} + \theta(M_2^{(1)} + M_1^{(3)}))\varphi_{i+1,j-1} + ((M_3^{(3)} + M_2^{(4)}) + \theta(M_3^{(1)} + M_2^{(2)} + M_4^{(3)} + M_1^{(4)}))\varphi_{i+1,j} \\ & + (M_3^{(4)} + \theta(M_3^{(2)} + M_4^{(4)}))\varphi_{i+1,j+1} = (M_1^{(1)} + (1-\theta)(M_2^{(1)} + M_1^{(3)}))\varphi_{i,j-1} + \\ & + ((M_4^{(1)} + M_1^{(2)}) + (1-\theta)(M_3^{(1)} + M_2^{(2)} + M_4^{(3)} + M_1^{(4)}))\varphi_{i,j} + \\ & + (M_4^{(2)} + (1-\theta)(M_3^{(2)} + M_4^{(4)}))\varphi_{i,j+1} \end{aligned} \quad (39)$$

ผลเฉลยเชิงตัวเลขของปัญหาปริภูมิสองมิติของมลภาวะทางอากาศสถานะอยู่ตัว

การกระจายของจุดต่อแนวดิ่งหนาแน่นตรงกลางแหล่งกำเนิด ด้วยสมการต่อไปนี้

$$\frac{1}{\Delta z_v} = \frac{1}{\Delta z_r} \exp \left[-A_1 (z_k - h)^2 \right], \quad \left. \begin{array}{l} v = k, i = 1 \text{ for } z_k > h \\ v = k-1, i = 2 \text{ for } z_k \leq h \\ k = 2, 3, \dots, n-1 \end{array} \right\} \quad (40)$$

เมื่อ

$$\left. \begin{array}{l} z_1 = 0 \\ z_k = \sum_{i=1}^{k-1} \Delta z_i, \quad k = 2, 3, \dots, n-1 \\ z_n = 1 \end{array} \right\} \quad (41)$$

Δz_s เป็นความกว้างของช่วงตอนแรกทางบนและล่างจากแหล่งกำเนิด A_1 และ A_2 เป็นพารามิเตอร์ของการกระจาย n เป็นจำนวนจุดต่อในแนวดิ่ง Δz_s และ n เป็นพารามิเตอร์อิสระ เมื่อกำหนดค่า Δz_s และ n ให้แล้วค่าของ A_1 และ A_2 จะเป็นค่าที่สอดคล้องในความสัมพันธ์ ((40) และ (41)) และมีค่าที่ใกล้เคียงที่เป็นไปได้มากกว่าค่าอื่น ๆ สำหรับการให้จำนวนจุดต่อ คำน้อยสุดของ Δz_s หมายถึง เกรูปเล็กสุดของการกระจาย นี่คือการเข้มข้นบนจุดต่อ จะมากเมื่อใกล้แหล่งกำเนิด โดยการเลือก Δz_s ในช่วงพิสัย

$$\frac{1}{2(n-1)} < \Delta z_s < \frac{1}{(n-1)}$$

ความกว้างของช่วงในแนวดิ่ง Δz_s มีค่าเปลี่ยนแปลงโดยการกำหนดค่าของ Δz_s และ n ค่า Δz_s และ z_k รวม A_1 และ A_2 เป็นการคำนวณโดยวิธีทำซ้ำจากความสัมพันธ์ ((40) และ (41))

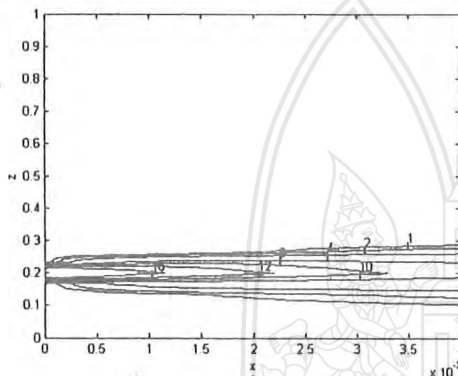
ความเข้มข้นของมลภาวะ ณ แหล่งกำเนิดแสดงด้วยนิพจน์ฟังก์ชัน θ ในเงื่อนไข (9) เป็นการคำนวณค่าประมาณเชิงตัวเลขโดยฟังก์ชันชั้นบันได คือ สมการต่อไปนี้

$$\varphi(0, z) = \begin{cases} 0, & 0 \leq z < h - \frac{\Delta z_s}{2} \\ \frac{1}{u_s \Delta z_s}, & h - \frac{\Delta z_s}{2} \leq z \leq h + \frac{\Delta z_s}{2} \\ 0, & h + \frac{\Delta z_s}{2} < z \leq 1 \end{cases} \quad (42)$$

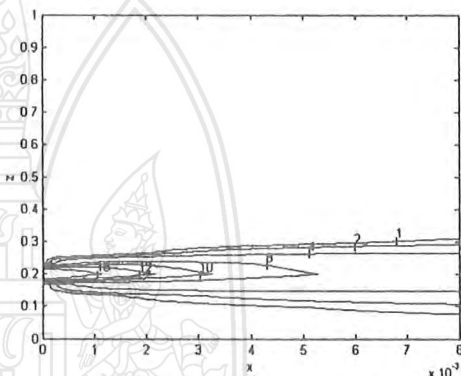
เมื่อ $u_s = u_k$ ณ แหล่งกำเนิด

ผลการทดลองเชิงตัวเลข

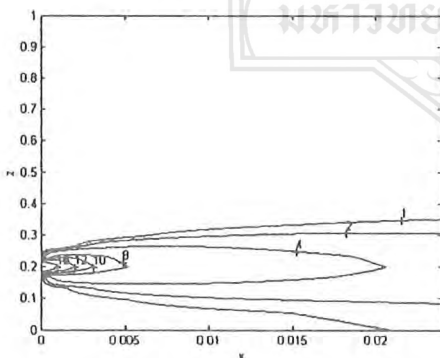
ในการคำนวณจะเขียนโปรแกรมคำนวณและเขียนกราฟโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป MatLab รุ่น 12 โดยกำหนดให้ $n = 21$, $h = 0.2$, $v(z) = z$, $\Delta z_s = 0.033$, $\theta = 0.125$, $\alpha_1 = 0.125$, $\alpha_2 = 1.0$, $\beta_1 = 0.125$, $\beta_2 = 0.0$



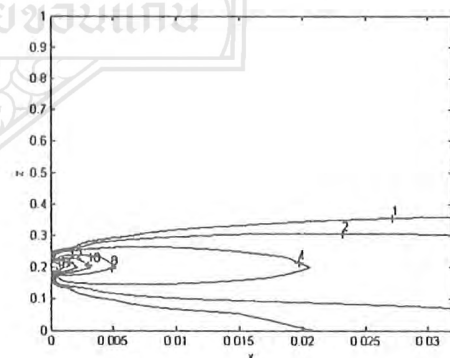
รูปที่ 5 (ก) เมื่อ $x = 40\Delta x$



รูปที่ 5 (ข) เมื่อ $x = 80\Delta x$

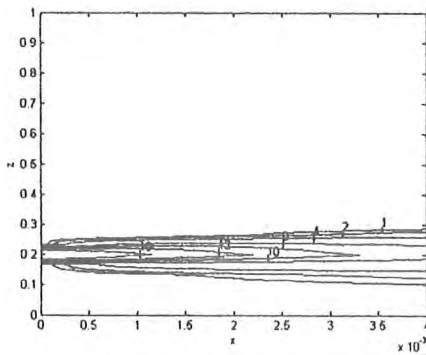
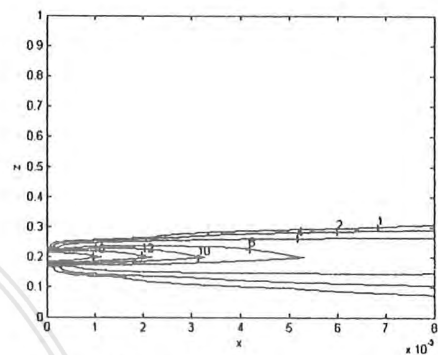
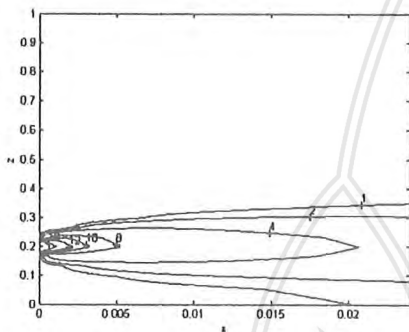
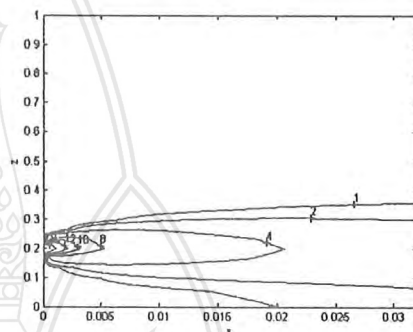


รูปที่ 5 (ค) เมื่อ $x = 240\Delta x$

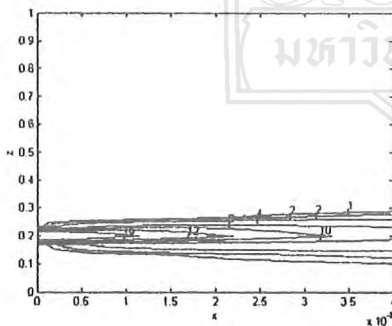
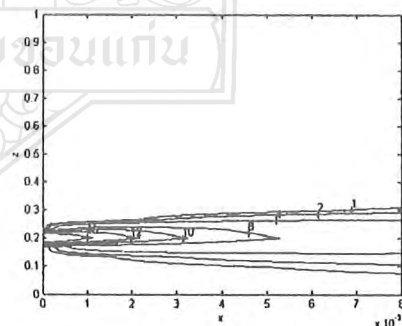


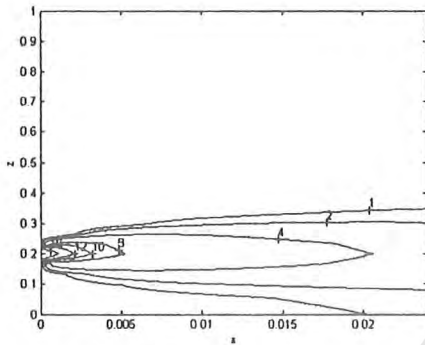
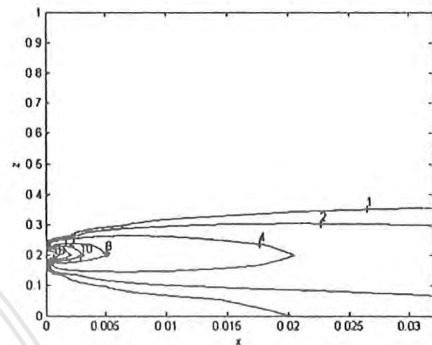
รูปที่ 5 (ง) เมื่อ $x = 320\Delta x$

รูปที่ 5 แสดงลำดับการกระจายความเข้มข้นของมลภาวะทางอากาศ ณ ระยะต่าง ๆ ในระนาบ XZ ผลคำนวณเมื่อ $\Delta x = 10^{-4}$, $u(z) = 1$, $w_g = 0.0$ และ $\sigma = 0.0$ ตามลำดับ

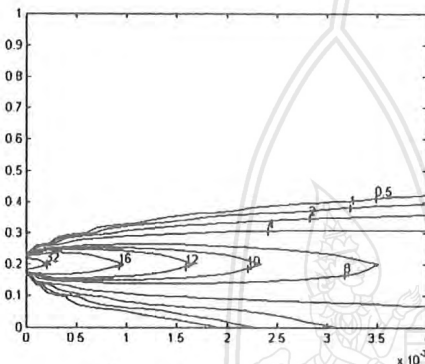
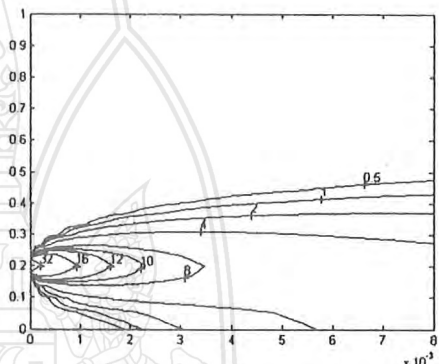
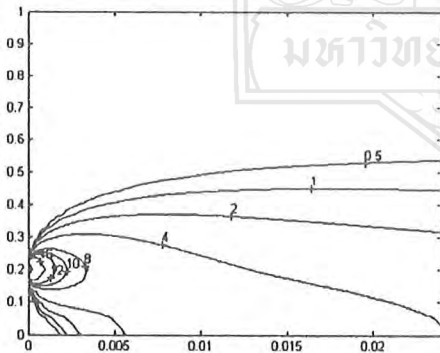
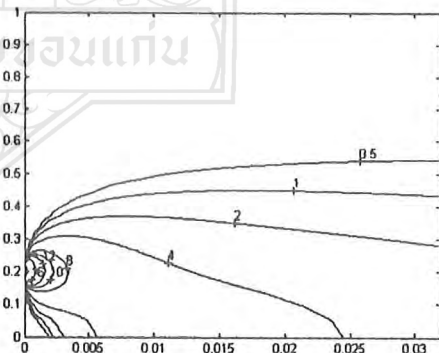
รูปที่ 6 (ก) เมื่อ $x = 40\Delta x$ รูปที่ 6 (ข) เมื่อ $x = 80\Delta x$ รูปที่ 6 (ค) เมื่อ $x = 240\Delta x$ รูปที่ 6 (ง) เมื่อ $x = 320\Delta x$

รูปที่ 6 แสดงลำดับการกระจายความเข้มข้นของมลภาวะทางอากาศ ณ ระยะต่าง ๆ ในระนาบ XZ ผลคำนวณเมื่อ $\Delta x = 10^{-4}$, $u(z) = 1$, $w_g = 0.125$ และ $\sigma = 0.0$ ตามลำดับ

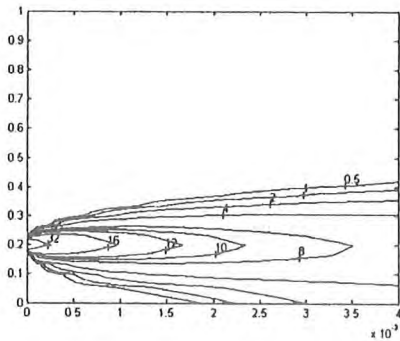
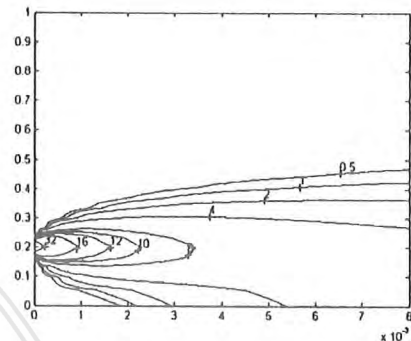
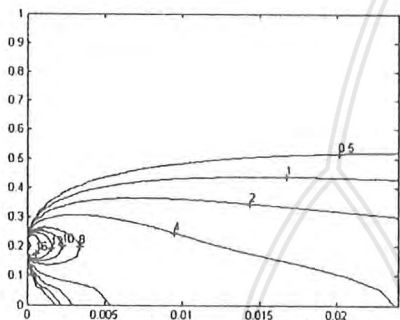
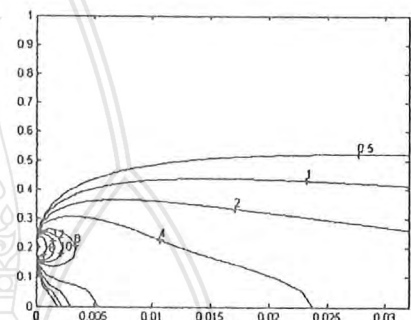
รูปที่ 7 (ก) เมื่อ $x = 40\Delta x$ รูปที่ 7 (ข) เมื่อ $x = 80\Delta x$

รูปที่ 7 (ค) เมื่อ $x = 240\Delta x$ รูปที่ 7 (ง) เมื่อ $x = 320\Delta x$

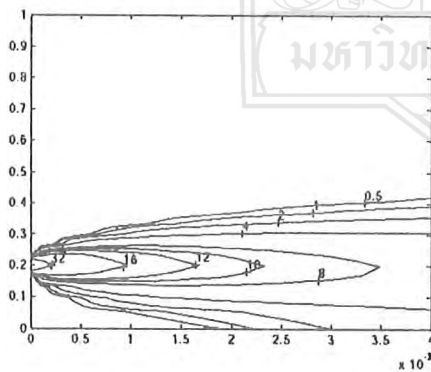
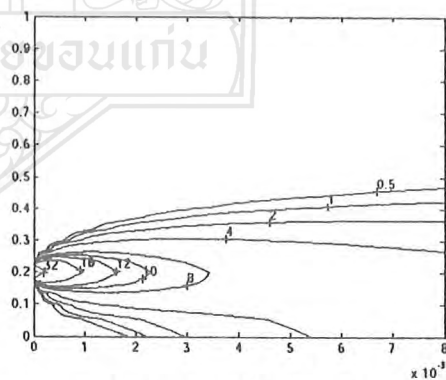
รูปที่ 7 แสดงลำดับการกระจายความเข้มข้นของมลภาวะทางอากาศ ณ ระยะต่าง ๆ ในระนาบ XZ ผลคำนวณเมื่อ $\Delta x = 10^{-4}$, $u(z) = 1$, $w_g = 0.125$ และ $\sigma = 0.125$ ตามลำดับ

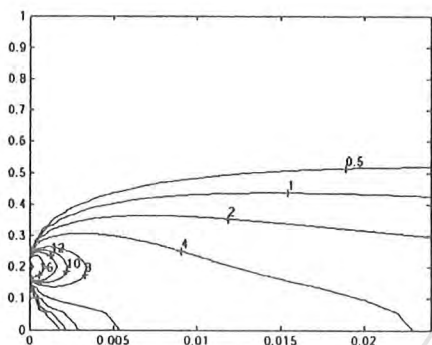
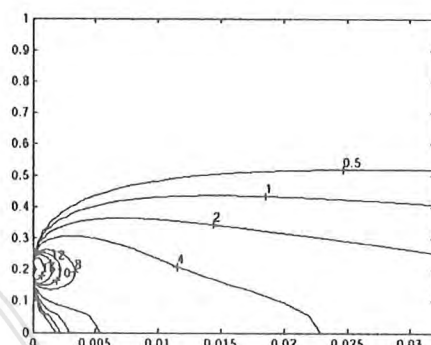
รูปที่ 8 (ก) เมื่อ $x = 40\Delta x$ รูปที่ 8 (ข) เมื่อ $x = 80\Delta x$ รูปที่ 8 (ค) เมื่อ $x = 240\Delta x$ รูปที่ 8 (ง) เมื่อ $x = 320\Delta x$

รูปที่ 8 แสดงลำดับการกระจายความเข้มข้นของมลภาวะทางอากาศ ณ ระยะต่าง ๆ ในระนาบ XZ ผลคำนวณเมื่อ $\Delta x = 10^{-4}$, $u(z) = z^{0.5}$, $w_g = 0.0$ และ $\sigma = 0.0$ ตามลำดับ

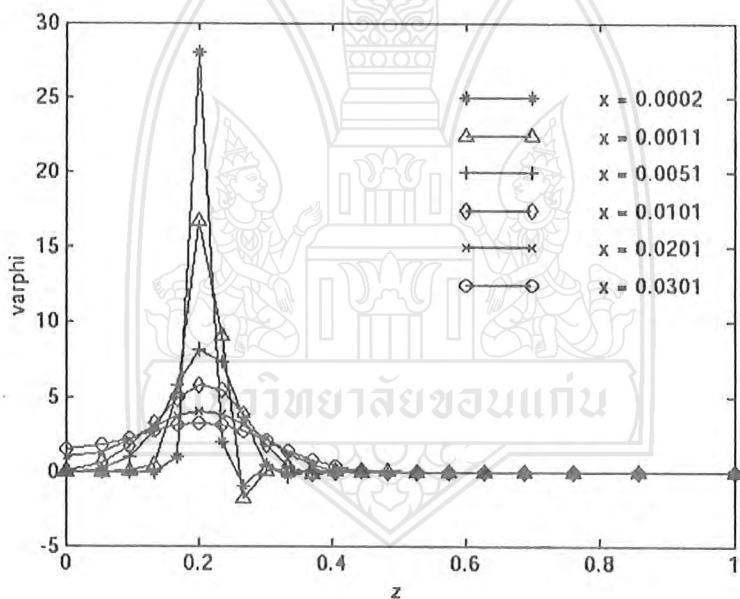
รูปที่ 9 (ก) เมื่อ $x = 40\Delta x$ รูปที่ 9 (ข) เมื่อ $x = 80\Delta x$ รูปที่ 9 (ค) เมื่อ $x = 240\Delta x$ รูปที่ 9 (ง) เมื่อ $x = 320\Delta x$

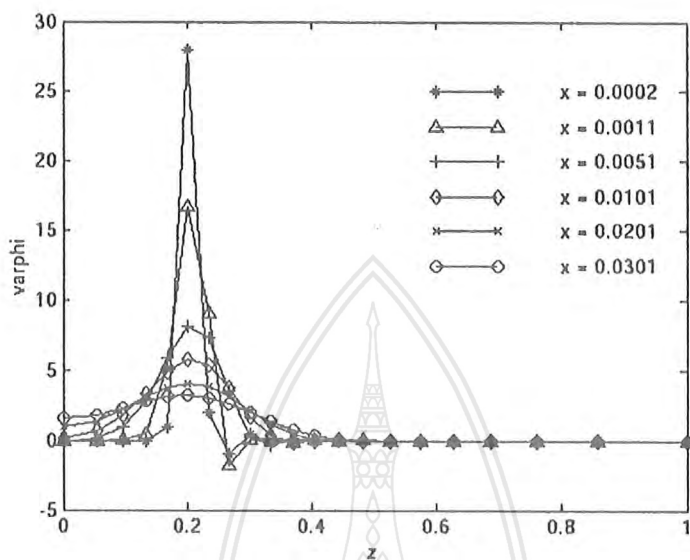
รูปที่ 9 แสดงลำดับการกระจายความเข้มข้นของมลภาวะทางอากาศ ณ ระยะต่าง ๆ ในระนาบ XZ ผลคำนวณเมื่อ $\Delta x = 10^{-4}$, $u(z) = z^{0.5}$, $w_g = 0.125$ และ $\sigma = 0.0$ ตามลำดับ

รูปที่ 10 (ก) เมื่อ $x = 40\Delta x$ รูปที่ 10 (ข) เมื่อ $x = 80\Delta x$

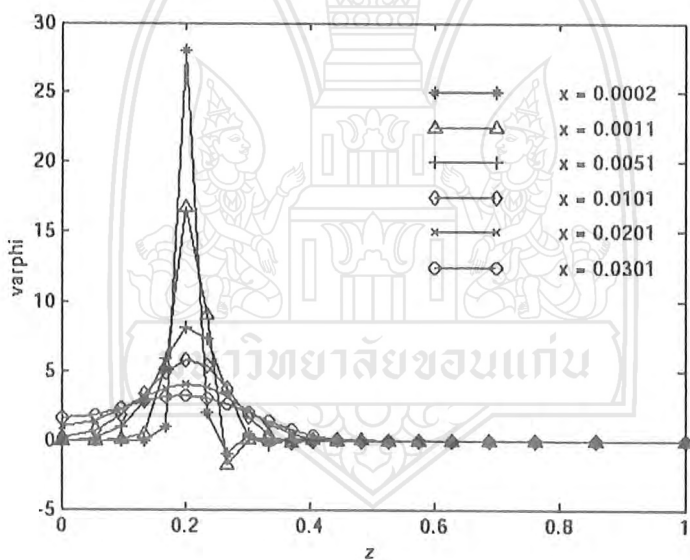
รูปที่ 10 (ค) เมื่อ $x = 240\Delta x$ รูปที่ 10 (ง) เมื่อ $x = 320\Delta x$

รูปที่ 10 แสดงลำดับการกระจายความเข้มข้นของมลภาวะทางอากาศ ณ ระยะต่าง ๆ ในระนาบ XZ ผลคำนวณเมื่อ $\Delta x = 10^{-4}$, $u(z) = z^{0.5}$, $w_g = 0.125$ และ $\sigma = 0.125$ ตามลำดับ

รูปที่ 11 (ก) เมื่อ $w_g = 0.0$, $\sigma = 0.0$

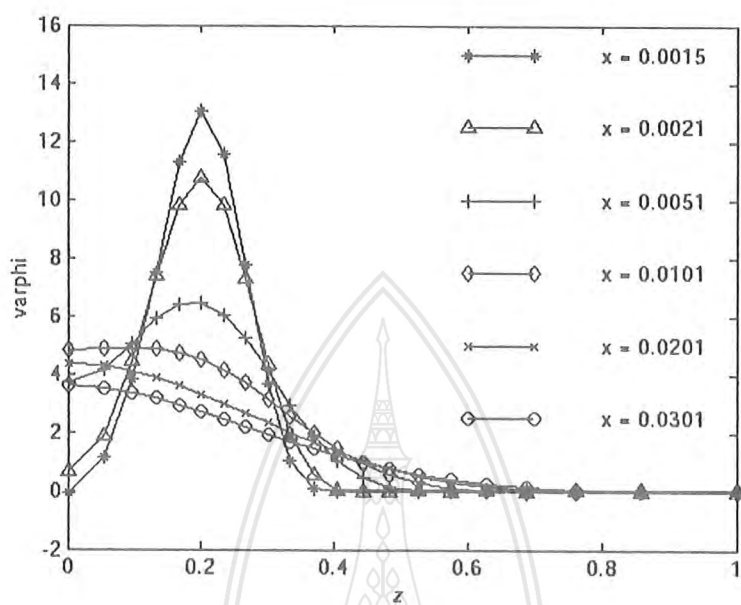
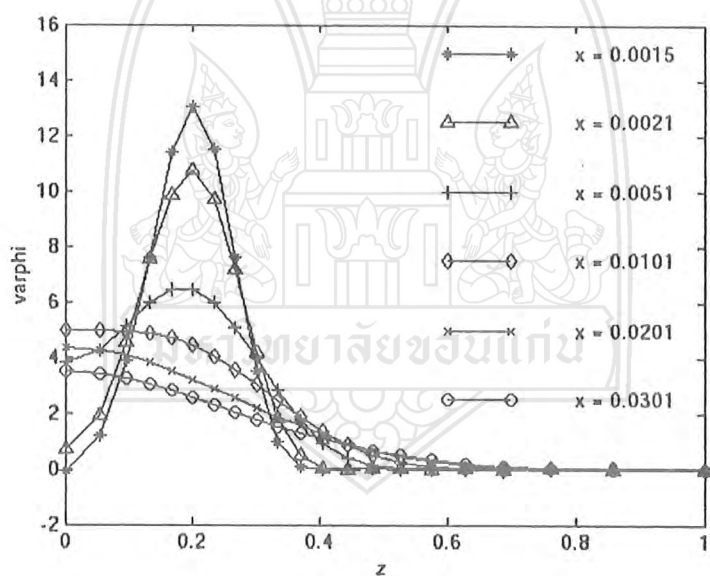


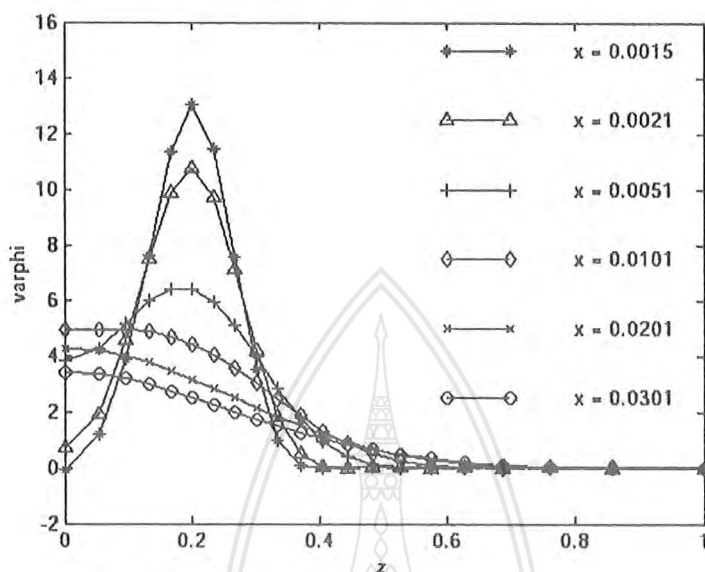
รูปที่ 11 (ข) เมื่อ $w_g = 0.125$, $\sigma = 0.0$



รูปที่ 11 (ค) เมื่อ $w_g = 0.125$ และ $\sigma = 0.125$

รูปที่ 11 แสดงความเข้มข้น $\varphi(x)$ ณ ระยะทาง x ที่แตกต่างจากแหล่งกำเนิด คำนวณจาก $\Delta x = 10^{-4}$, $\sigma(z) = 1$

รูปที่ 12 (ก) เมื่อ $w_g = 0.0$, $\sigma = 0.0$ รูปที่ 12 (ข) เมื่อ $w_g = 0.125$, $\sigma = 0.0$



รูปที่ 12 (ค) เมื่อ $w_g = 0.125$ และ $\sigma = 0.125$

รูปที่ 12 แสดงความเข้มข้น $\varphi(x)$ ณ ระยะทาง x ที่แตกต่างจากแหล่งกำเนิด คำนวณจาก $\Delta x = 10^{-4}$, $u(z) = z^{0.5}$

สรุปผลและงานอนาคต

งานวิจัยนี้จะพบว่า ระเบียบวิธีเพอร์ฟ-กาลอร์คินชั้นประกอบอันตะของปัญหามลภาวะทางอากาศสถานะอยู่ตัว ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากวิธีหนึ่ง การคำนวณหาความเข้มข้นของมลภาวะทางอากาศ การกำหนดค่า θ , α_1 , β_1 , α_2 , β_2 มีผลต่อการคำนวณ แนวทางวิจัยต่อไปคือ การหาค่า θ , α_1 , β_1 , α_2 , β_2 ที่เหมาะสมที่สุด และการกำหนดตาข่ายในทิศทางแนวดิ่งแบบไม่เป็นแบบเดียวกันอย่างอื่นมีผลกระทบต่อผลการคำนวณอย่างไร

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุวรรณ ถังมณี สาขาวิชาคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี Prof. Dr. John J.H. Miller, Department of Mathematics, Trinity College, Dublin, Ireland รองศาสตราจารย์ ดร. อโนทัย ตีรวานิช และรองศาสตราจารย์ ชัชวาลย์ เรืองประพันธ์ ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้ให้คำปรึกษาและแนะนำผู้ทำการวิจัยตลอดมา และ ภาควิชาคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่อำนวยความสะดวกในการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- Dang, Q. A. and Ngo, V. L. (1991). Exact Solution of Stationary Problem of Air Pollution. Preprint 91/13, Institute of Mathematics, Hanoi.
- Dang, Q. A. and Ngo, V. L. (1994). Numerical Solution of a Stationary Problem of Atmospheric Pollution. Preprint 92/3, Institute of Mathematics, Hanoi.
- Evans, D.J. and Abdullah, A.R. (1986). Boundary value techniques for finite element solutions of the diffusio-convection equation. International Journal for Numerical Methods in Engineering. 23:1145-1159.



ข้อแนะนำในการเขียนบทความลงวารสาร วิทยาศาสตร์ มข.

ประเภทของเรื่องที่จะตีพิมพ์

1. รายงานผลวิจัยและค้นคว้าหรือการสำรวจที่ยังไม่เคยตีพิมพ์ในวารสารหรือหนังสืออื่นมาก่อน
2. บทความปริทัศน์ ได้แก่งานเขียนที่รวบรวมหรือเรียบเรียงจากเอกสารหรือหนังสือต่าง ๆ เพื่อเผยแพร่และฟื้นฟูงานด้านวิชาการระดับต่าง ๆ
3. บทความแสดงข้อคิดเห็นหรือข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในด้านวิชาการ เรื่องแปล ข่าววิชาการย่อความจากงานวิจัยหรือหนังสือใหม่ที่น่าสนใจ

รูปแบบของการเขียนและการเตรียมต้นฉบับ

1. ต้นฉบับ ต้องเป็นต้นฉบับปกติ มีช่วงห่างระยะบรรทัดตามมาตรฐาน พิมพ์ลงในกระดาษขาว A4 (โรเนียวส้น) โดยใช้กระดาษหน้าเดียว ความยาวไม่เกิน 10 หน้า ส่งต้นฉบับ 2 ชุด หรือต้นฉบับพิมพ์ 1 ชุด และ Diskette ของบทความนั้น
2. ต้นฉบับ จะถูกพิจารณาโดยกองบรรณาธิการ และจะตอบรับการได้รับบทความโดยไม่ส่งต้นฉบับคืน ผู้เขียนควรจะทำสำเนาเก็บไว้เป็นหลักฐานของตนเอง 1 ฉบับ
3. ต้นฉบับ จะต้องมีความถูกต้องทั้งในด้านเนื้อหา และการใช้ภาษา รวมทั้งมีความสมบูรณ์ในรูปแบบพร้อมที่จะนำลงตีพิมพ์ได้
4. ชื่อเรื่อง ให้ใช้ภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ ไม่ยาวเกินไป และหลีกเลี่ยงการใช้คำย่อโดยไม่จำเป็น
5. ชื่อผู้เขียน เขียนชื่อภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษพร้อมทั้งบอกสถานที่ทำงานให้ชัดเจน
6. เนื้อเรื่อง ใช้ได้ทั้งภาษาไทยล้วนหรือภาษาอังกฤษล้วน ถ้าใช้ภาษาไทย ภาษาอังกฤษที่ใช้ปนกับภาษาไทยนั้นให้พยายามแปลเป็นไทยเท่าที่จะทำได้และให้เขียนคำเดิมกำกับในวงเล็บ การทับศัพท์ภาษาอังกฤษตลอดทั้งการเขียนตัวสะกดการันต์ในภาษาไทยให้ใช้ตามแบบราชบัณฑิตยสถาน
7. ในกรณีของบทความวิจัย ต้องมีบทคัดย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ และแบ่งเนื้อหาของบทความเป็นบทนำ วิธีดำเนินงาน ผลการวิเคราะห์ บทสรุปและวิจารณ์
8. เชิงอรรถ (footnote) ใช้เฉพาะที่จำเป็นเพื่อขยายหรือให้รายละเอียดเพิ่มเติมแกใจความเฉพาะตอนในบทความ
9. ตารางและภาพประกอบ คำบรรยายประกอบตารางหรือภาพประกอบควรจะสั้นและชัดเจน ถ้าเป็นภาพถ่ายให้ใช้ภาพขาว-ดำ ขนาดโปสการ์ด ภาพเขียนลายเส้นควรเขียนด้วยหมึกดำ ภาพที่เขียนต้องชัดเจนและมีขนาดที่เหมาะสม
10. เอกสารอ้างอิง หรือบรรณานุกรม แนะนำให้เขียนตามแบบที่ทางวารสารกำหนด

ส่งต้นฉบับมาที่

กองบรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

อภินันทนาการสำหรับผู้เขียน

เรื่องที่ได้รับการตีพิมพ์ ผู้เขียนจะได้รับวารสารฉบับนั้น 2 เล่ม และสำเนาพิมพ์อีก 15 ชุด

การเขียนเอกสารอ้างอิงในวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

เอกสารอ้างอิง (Reference) หมายถึง เอกสารหรือส่วนหนึ่งของเอกสารที่อ้างอิงถึงหรือแปลมาโดยตรง การเขียนเอกสารอ้างอิงในเนื้อหา นั้น ให้ใช้ระบบชื่อและปี เช่น Williams (2001) รายงานว่า... หรือ ... (Williams, 2001) การเขียนเอกสารอ้างอิงในตอนท้ายบทความนั้น ให้ใส่เฉพาะเล่มที่มีการอ้างอิงไว้แล้วในเนื้อหาเท่านั้น

บรรณานุกรม (Bibliography) หมายถึง เอกสารที่ใช้อ้างอิงในลักษณะที่สรุปเป็นหลัก การหรือทฤษฎีโดยมิได้อ้างอิงหรือแปลมาโดยตรง จึงไม่ต้องอ้างอิงในเนื้อหา แต่สรุปรวมเป็นรายชื่อเอกสารในส่วนของบรรณานุกรมโดยคำนึงถึงลำดับตัวอักษร

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 : โรงพิมพ์ หรือสำนักพิมพ์. 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

- กรณีที่นี้เป็นเอกสารอ้างอิงจากแหล่งอื่น ๆ นอกเหนือจากที่กำหนดข้างต้น เช่น จุลสาร, หนังสือพิมพ์ ฯลฯ ให้ยึดหลักการเขียนตามแบบข้างต้นโดยอนุโลม
- กรณีที่ผู้เขียน 2 คน ให้เขียนตามแบบของผู้เขียนคนแรก แต่ให้เติมคำว่า “และ” หรือ “and” หน้าชื่อสุดท้ายในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ
- กรณีที่ผู้เขียนมากกว่า 2 คนขึ้นไป ให้ใส่เฉพาะผู้แต่งชื่อแรกและใส่คำว่า “และคณะ” หรือ “et al.” ในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ (เฉพาะในเนื้อหาเท่านั้น)
- ถ้าเอกสารที่ถูกอ้างอิงอยู่ในระหว่างตีพิมพ์ ให้บอกรายละเอียดมากที่สุดและใช้คำว่า “ระหว่างตีพิมพ์” หรือ “in press” ในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ โดยวงเล็บต่อท้ายเอกสารอ้างอิงนั้น

