



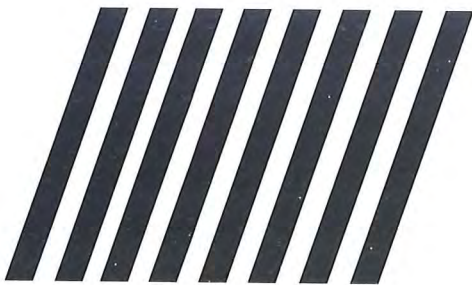
วารสาร

วิทยาศาสตร์มข.

KKU SCIENCE JOURNAL

ปีที่ 31 ฉบับที่ 4 (ต.ค. - ธ.ค. 46) Vol. 31 No. 4 (Oct. - Dec. '03)





วารสาร
วิทยาศาสตร์ปู
KKU SCIENCE JOURNAL

ISSN 0125 - 2364

เจ้าของ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สำนักงาน

คณะวิทยาศาสตร์ ตึก 6

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วัตถุประสงค์

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

กำหนดออก

ปีละ 4 ฉบับ

ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม

ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน

ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน

ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม

ค่าบำรุง ปีละ 75 บาท ข่ายปลีกเล่มละ 20 บาท

การบอกรับเป็นสมาชิก

แจ้งความจำนงค์เป็นจดหมาย หรือกรอกใบสมัครเป็นสมาชิก พร้อมค่าบำรุงเป็นธนาคัตติ หรือเช็คไปรษณีย์ในนามของนางบุญคุ้ม เหลือสิน ฝ่ายจัดการส่งจ่าย ป.ท.มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

ที่ปรึกษา

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
รองคณบดีฝ่ายวิชาการ

บรรณาธิการ

มานิตย์ โหมยิตระกูล

กองบรรณาธิการ

เฉลิม เรื่องวิรัชชัย
สมเดช กนกเมธากุล
ศักดิ์สิทธิ์ จันทรไทย
บำรุง สมสวัสดิ์
วิทยา อมรกิจบำรุง
ประนอม จันทรโทย
นฤมล แสงประดับ
เสาวนิต ทองพิมพ์
พิสิญฐ์ เจริญสุขใจ
เที่ยง ภูมิสะอาด
อำนวยการ มณีศรีวงศ์กุล
บุญทรัพย์ ไวกำ

ฝ่ายศิลป์และภาพ

กิลเลน ดิณนรเศรษฐ์
บุญส่ง กองสุข

ฝ่ายเหรียญก

บุญคุ้ม เหลือสิน

ฝ่ายจัดการและ

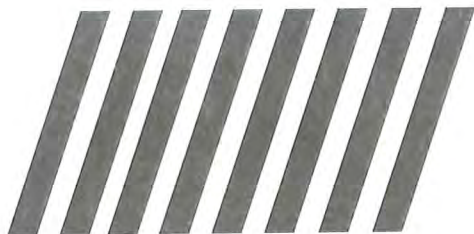
ทัศนีย์ จิตตะกวี

เลขานุการ

สมศักดิ์ อุ้นจันท์
สุคนธ์ กลิ่นผกา

**บทความและงานวิจัย
ได้รับการกลั่นกรอง
จากผู้ทรงคุณวุฒิ**

บทความหรือข้อคิดเห็นใด ๆ ในวารสารนี้เป็นของผู้เขียน ไม่จำเป็นต้องสอดคล้องกับทัศนะของกองบรรณาธิการ



วิทยาศาสตร์
KKU SCIENCE JOURNAL

ISSN 0125 - 2364

Advisory Committee Dean, Faculty of Science
Associate Dean for Academic Affairs

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.

Editor

Manit Kosittrakun

Editorial Board

Chalerm	Ruangviriyachai
Somdej	Kanokmedhakul
Saksit	Chanthai
Bamrung	Somsawasdi
Vittaya	Amornkitbamrung
Pranom	Chantaranothai
Narumon	Sangpradub
Soawanit	Tongpim
Pisit	Chareonsudjai
Tiang	Poomsa-ard
Amnuay	Maneesriwongkul
Boonsup	Waikham

Artists

Kilen	Tinnoraset
Boonsong	Koungsook

Treasurer

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

Managing Staff

Tassanee	Jittakhawee
Somsak	Unjantee
Sukhon	Klinpaka

and Secretary

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 **แถม**

เรียน ท่านสมาชิการสารฯ และท่านผู้อ่านที่รัก

กองบรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์ มข. ขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิดังต่อไปนี้
ที่ได้กรุณาพิจารณาบทความ ซึ่งได้รับการตีพิมพ์ในวารสารฯ ปีที่ 31 ฉบับที่ 1 - ฉบับที่ 4

- | | | | |
|------------------|-----------------|-------------------|---------------|
| ● รศ.เที่ยง | ภูมิสะอาด | ● รศ.อำนวย | มณีศรีวงศ์กุล |
| ● รศ.วรางคณา | สังสิทธิสวัสดิ์ | ● ดร.สันติ | แมนศิริ |
| ● ผศ.ไพบุลย์ | มงคลถาวรชัย | ● ดร.พรเทพ | ถนนแก้ว |
| ● รศ.ชุติมา | คูคู่สมุทร | ● รศ.ดร.สุมนทิพย์ | บุญนาถ |
| ● รศ.รัตนา | มหาชัย | ● ผศ.ดร.ศาสตร์ | วงศ์ธนวุธ |
| ● รศ.ชัชวาลย์ | เรืองประพันธ์ | ● ผศ.ดร.นาถธิดา | วีระปรียากร |
| ● รศ.ดร.สุจิตรา | ยังมี | ● ผศ.ดร.นฤมล | แสงประดับ |
| ● ผศ.ดร.ชูศักดิ์ | พูนสวัสดิ์ | | |

มหาวิทยาลัยขอนแก่น **สวัสดีครับ**
บรรณาธิการ

From CNS-Drugs to Anti-Neoplastic Agents: Cholecystokinin (CCK)-Antagonists as Modern Anti-Cancer Agents

Eric Lattmann¹ and Pornthip Lattmann²

Abstract

Early anti-cancer research was dominated by the development of alkylating agents, followed by the discovery of a variety of anti-metabolites. Current anti-cancer drugs are designed towards molecular targets in order to reduce their toxicity and to enhance the selectivity towards the cancer cells. Within an increasingly growing number of molecular targets, cholecystokinin (CCK), as a neuropeptide and modulator, became an important anti-cancer target, especially when it was shown that CCK regulates the invasiveness of human pancreatic cancer cell lines via the protein kinase C pathway. The low potency and the lack of subtype receptor selectivity of those early non-peptide CCK-antagonists, was improved in the following generations of CCK antagonists. These potent and selective antagonists have shown disappointing results in clinical trials due to a very poor bioavailability. Loxiglumide, CI-988, devazipide, L-365,260 and YM022 are highlighted including in vivo studies and clinical trials. Moreover, CCK antagonists were found useful in the enhancement of the analgesic effects of morphine and the anti-neoplastic effect of cis-platinum. Overall the anti-neoplastic effects of CCK antagonists are inconclusive.

Introduction

Cholecystokinin (CCK) is produced by I cells of the duodenal and jejunal mucosa and exists most prominently as an eight amino-acid hormone (CCK-8). CCK has long been recognized as having an effect on the regulation of pancreatic secretion (Mineo et al., 1995) and of gallbladder contraction (Ivy and Goldberg, 1928). CCK has also been found in the brain, where it is widely distributed and may therefore have an effect as a neuromodulator or perhaps as a neurotransmitter.

Several gastrointestinal (GI) hormones such as gastrin, CCK, and bombesin, have been reported to affect the development of pancreatic cancer. The receptors for these hormones are found in normal and neoplastic pancreatic cells. Activation of these receptors enhances pancreatic carcinogenesis and promotes the growth of established pancreatic carcinoma either *in vitro* or *in vivo*. Studies have shown that these GI hormone antagonists may play an inhibitory role in the development of pancreatic cancer (Guo and Townsend, 2000).

¹ The School of Pharmacy, Aston University, Aston Triangle, Birmingham B4 7ET / United Kingdom;

* Author for correspondence, 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

From CNS drugs to new anticancer agents

Peptide hormones such as CCK regulate and promote the growth of various normal gastrointestinal tissues as well as certain visceral cancers (Hudd et al., 1989). If CCK promotes cell growth, CCK antagonists are ideal chemical anti-cancer targets. Many scientists have discovered specific peptide and non-peptide antagonists of CCK_B/gastrin receptors up to date, mainly for the area of neuroscience. As a result of extensive research, a number of new chemical classes have been developed with a high potency and selectivity towards the CCK receptor subtypes (Lattmann et al., 2000).

Amino acid derivatives

During the 1970s amino acid derivatives (Figure 1) were found to contain antigestrin activity (Vidal et al., 1980; Stening and Grossman, 1969). The chemical similarities of gastrin and CCK made it possible for such derivatives to demonstrate CCK antagonist activity. Proglumide, the first putative gastrin antagonist clinically available, has long been used in the treatment of peptic ulcers, because of its antisecretory and gastroprotective activities. Several studies have subsequently demonstrated that proglumide is also a weak CCK_A receptor antagonist (Jensen et al., 1986) and despite its low potency, it has been used as the reference CCK and gastrin antagonist for several years.

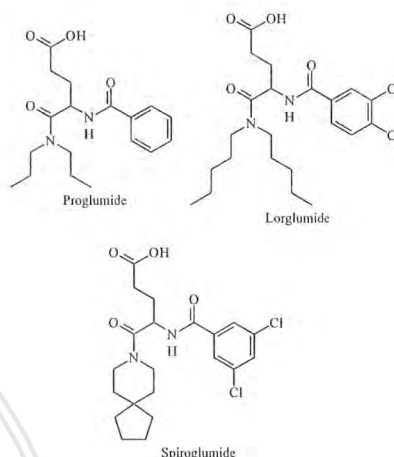


Figure 1 Structures of early amino acid derivatives as CCK antagonist

Rotta research group produced analogues of proglumide, which showed varying degrees of selectivity for CCK_A receptors and even suggested possible sub-types of the peripheral receptors. Some derivatives had a higher affinity for pancreatic CCK_A receptors mediating gallbladder contraction. Lorglumide showed up to a 26-fold increase in potency for blocking CCK-stimulated gallbladder contraction but only a two-fold increase for blocking CCK-stimulated pancreatic amylase secretion (Makovec et al., 1986). Intravenous administration of lorglumide (Wakatsuki et al., 1997) antagonized the CCK-induced reduction of gastric emptying in rats, acceleration of intestinal transport in mice, increase in ileal motility in rabbits, gallbladder contraction in guinea pigs and acceleration of gallbladder emptying in mice but showed reduced activity when orally administered. Further structural modifications to lorglumide resulted in CR2194 (spiroglumide). Spiroglumide exhibited CCK_B/gastrin antagonist in the micromolar range, with excellent oral bioavailability. However, it has poor selectivity for CCK_B/gastrin

receptor, which raises doubts of its potential therapeutic usefulness.

The effect of loxiglumide (LXG) was studied on the invasiveness of two human pancreatic cancer cell lines. Cells were treated with LXG for 24 h, and examined in the invasion assay. Interestingly, the invasiveness of cancer cells and expression of MMP-9 were decreased by LXG in a dose-dependent manner (Hirata et al., 1996).

Loxiglumide and proglumide as early anti-cancer agents

Effects of caerulein (CCK), 5-FU and loxiglumide (CR-1505) were studied on the growth of human pancreatic cancer cell line, KP-1 N, *in vitro*. CR-1505 was also studied on liver metastasis in nude mice. The growth of KP-1 N was stimulated approximately 40% by addition of 10^{-10} M of CCK *in vitro*. CR-1505 antagonized the action of CCK, that is, the 40% growth rate increase was suppressed by addition of 25 μ M CR-1505. Moreover, the growth rate of the cells was dose-dependently decreased by the addition of CR-1505. 5-FU also dose-dependently inhibited the growth of KP-1 N in culture. 5-FU, as a standard anti-cancer drug, decreased the growth rate of KP-1 N in combination with CR-1505.

In *in vivo* studies a number of metastatic nodules were found in the liver of nude mice a month after injections of KP-1 N cells into the spleen. CR-1505 suppressed the liver metastasis in nude mice (Shimazoe et al., 1992). Another study has shown that lorglumide (3×10^{-5} mol/l) also reduced the basal growth to 30% of control, which was reversed to 78% by 10^{-5} mol/l gastrin. Here, proglumide had no effect on the basal growth of the

MKN45G cell line (Watson et al., 1992).

The growth-regulating effects of pentagastrin, gastrin and the gastrin-receptor antagonist proglumide were investigated in three established cell lines derived from human colorectal carcinomas *in vitro* and after transplantation into nude mice. *In vitro* a significant increase of cell growth in the SW 403 cell line incubated with pentagastrin or gastrin was observed. In the Lovo cell line this effect was only detected after synchronization of cell growth. Pentagastrin and gastrin had no effect on the growth of the Ls 174 T cell line. Proglumide reduced cell proliferation in all these three cell lines as well as in the L929S cell line derived from fibroblasts, which served as control. After transplantation into nude mice all tumor cell lines increased, Lovo and Ls 174 T as undifferentiated tumor, SW 403 as differentiated. Pentagastrin increased and proglumide decreased growth in SW 403 tumors (Imdahl et al., 1989).

Further, the effects of loxiglumide (CR-1505) on the growth of human pancreatic cancer were studied. Human gastrointestinal cancer xenografted tumors (one esophageal, one gastric, two colorectal, two biliary tract, and two pancreatic cancers) were transplanted into nude mice. The mice were given CR-1505 at 250 mg/kg daily for 14 days, either subcutaneously or intragastrically, and the tumor volumes before and after treatment were compared. CR-1505 inhibited the growth of the two pancreatic cancer cell lines, but did not inhibit the growth of the other cell lines. CR-1505 also inhibited *in vitro* DNA synthesis in the two pancreatic cancer cell lines at lower concentrations than in the other cell lines. The effect of CR-1505 was inhibited in both pancreatic cancer cell lines by oral administration of the trypsin-inhibitor, camostate (FOY-305). These

results suggested that CR-1505 might specifically inhibit the growth of human pancreatic cancers (Nio et al., 1993).

The effects of CCK and loxiglumide (CR-1505) were investigated on four freshly separated and six xenografted human pancreatic cancers (Singh et al., 1987). The level of DNA synthesis in only one of five tested pancreatic cancers was enhanced by CCK at concentrations of 0.01-10 nM, while in the other four cancers the DNA synthesis was not affected. The levels of DNA, RNA, and protein synthesis (by ³H-thymidine, ³H-uridine, and ³H-leucine incorporation tests, respectively) in all the tested cancers were dose-dependently inhibited by loxiglumide at concentrations of 20-2000 μ M, and the IC_{50} of loxiglumide for DNA synthesis in pancreatic cancers was $156 \pm 80 \mu$ M (SD). The *in vivo* effect of loxiglumide was assessed using a xenografted cancer cell line (PC-HN) transplanted in nude mice. The *in vivo* 50% lethal dose of loxiglumide for nude mice was about 500 mg/kg. Death was caused by respiratory failure due to severe congestion of the lung after the administration of a large dose of loxiglumide. The growth of a PC-HN transplanted in the nude mice was significantly inhibited by subcutaneous loxiglumide at 250 mg/kg, twice a day for 28 days, which did not cause death (Morimoto et al., 1993).

Clinical trials of loxiglumide

The effects and safety of loxiglumide on advanced pancreatic cancer were investigated in humans. A perspective, controlled (2.4 g/day vs. placebo), randomized, double-blind, parallel-group study was performed in 64 patients affected by

nonresectable histologically diagnosed pancreatic cancer. The patients were stratified according to sex and stage (A, T3/N0-N1/M0; B, T1-T2-T3/N0-N1/M1; C, relapse after surgical exeresis). Tumor size (by computed tomography scan) and mortality rate were evaluated as efficacy criteria. Clinical symptoms and physical signs, laboratory tests, and adverse reactions were checked every 6 weeks as efficacy/tolerability criteria. Forty-two male and twenty-two female patients were considered. A homogeneous distribution of the patients was demonstrated in the two treatment groups. Group C was not statistically evaluated for survival and tumor evolution because of its small number. Three patients dropped out for causes not related to the therapy. No toxic reactions to the drug were reported. Tumor size monitoring within groups A and B demonstrated a similar increase in both the loxiglumide and the placebo group. Survival in group A was higher than in group B ($p = 0.0003$). In group B, survival was lower in females (F) than in males (M) ($F = 61.00 \pm 6.47$ days, $M = 140.44 \pm 22.15$ days; $p = 0.012$), while survival by sex was similar in group A and in global analysis. Survival by treatment was similar for groups A and B. Survival by surgery was higher ($p = 0.049$) for surgical palliation than for nonoperated patients. The tumor grade affected survival but it did not vary by therapy. Sure efficacy of loxiglumide in advanced pancreatic cancer was not demonstrated by the results. In consideration of its documented tumor growth inhibiting action, it was suggested that loxiglumide be tested for recurrence prevention after resective surgery (Militello et al., 1997).

Tryptophan dipeptoid derivatives

A research group at Parke-Davis (Boden et al., 1993; Kerwin et al., 1991) examined the activity of CCK-30-33 fragments, in binding experiments on CCK_B/gastrin receptors. This led to the development of CI-988 (Figure 2), which exhibited 1600-fold selectivity for CCK_B over CCK_A receptors. Structural C-terminal modifications led to alternative compounds, which demonstrated sub-nanomolar affinity for CCK_B/gastrin receptors. Compound (1) (Figure 2) displayed high affinity ($IC_{50} = 0.3$ nM). Further structural modifications, to optimize the substitution on the phenyl ring of (1) led to the analogue (2) (Figure 2). This showed exceptionally high affinity for CCK_B/gastrin receptors, ($IC_{50} = 0.08$ nM) and was 940 times more selective over the CCK_A receptor. However, due to the high molecular weight and the dipeptoid structure these derivatives have a low bioavailability, and therefore, are not suitable drugs for oral therapy.

Evaluation of CI-988 as anti-cancer agent

The effect of a new, potent and selective CCK_B receptor antagonist, CI-988 on the growth of LoVo, a human colon cancer cell line both *in vitro* and *in vivo* was investigated. Basal growth of LoVo *in vitro* was inhibited by up to $58.93 \pm 7.30\%$ with concentrations of CI-988 as low as 1×10^{-11} mol/l whereas the addition of gastrin (G17) at 0.5 nmol/l had no effect (Romani et al., 1996). In their further studies, the dose-response relationship of CI-988 on the growth of LoVo, a human colon cancer cell line, was studied *in vivo*. LoVo was grown for 10 days in nude mice that were then orally treated with CI-988 at 1, 5, 10, 25 and 50 mg/kg per day for 20 days. CI-988 significantly inhibited the growth of xenografts at all concentrations except the highest concentration of 50 mg/kg per day ($P < 0.00001$; ANOVA). The largest inhibitory activity was caused

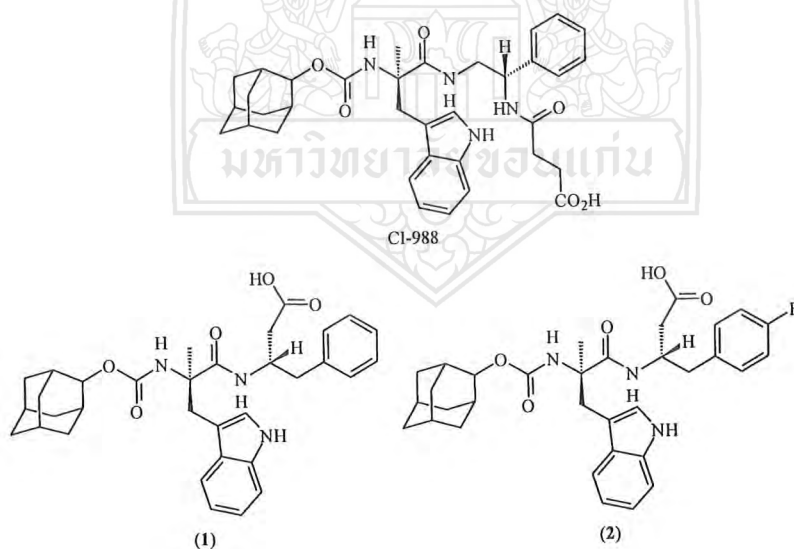


Figure 2 Tryptophan dipeptoid CCK_B antagonists

by the 10 mg/kg per day dose, causing a 47% inhibition at day 29 ($P = 0.00003$; Newman-Keul's test).

Benzodiazepine derivatives

The discovery of asperlicin (Figure 3) was historically important, as it initiated the discovery programmes leading to potent and specific CCK_A

and CCK_B receptor antagonists. This naturally occurring benzodiazepine derivative was isolated from the fungus *Aspergillus alliaceus*. Asperlicin showed selectivity for CCK_A receptors and at the time of its discovery was the most potent nonpeptide CCK antagonist known with an IC_{50} of $1.4 \mu\text{M}$.

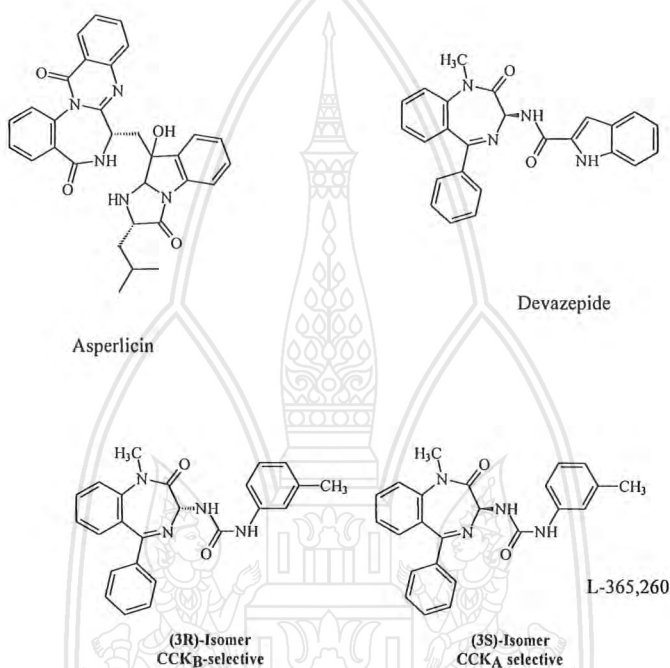


Figure 3 Asperlicin, the 3-amido-1,4-benzodiazepine derivative L-364,718 / MK-329 / devazepide and the two stereoisomers of the 3-ureido-1,4-benzodiazepine derivative L-365,260

Asperlicin represented a major advance in the development of CCK receptor antagonists. It demonstrated 300-400 times more affinity for pancreatic and gallbladder CCK receptors than proglumide. However, this compound demonstrated scarce stability and poor oral bioavailability (Bock et al., 1986). By combining the elements of asperlicin, L-364,286 was the first successful synthetic analogue, in which the diazepam-like structure is linked with a 3-amido group. New efforts to optimize

the CCK_A antagonist activity of these benzodiazepine derivatives led to devazepide (MK-329, formerly L-364,718) an extremely potent and orally active CCK_A antagonist ($\text{IC}_{50} = 0.1 \text{ nM}$ inhibition of ^{125}I - CCK -8 rat pancreas binding). This compound had a more than 1000-fold selectivity for the CCK_A receptor and a longer lasting efficacy. Devazepide possessed a potent CCK_A blocking activity in different tissues (Hosontanti et al., 1988; Anderson and Dockray, 1988). The pancreatic amylase

secretion was antagonized with a 2,000,000 times higher potency than proglumide. Devazepide has been claimed (Silver et al., 1989) to be a selective antagonist inhibiting the effects of CCK-8 (sincalide) on food intake. In contrast, when CCK-8 was secreted from the gastric mucosa, the release of both bile from the gallbladder, and the release of digestive enzymes from the pancreas were stimulated (Dunlop, 1998). Devazepide was a key tool in the autoradiographical demonstration of the presence of CCK_A receptors in the various regions of the brain (Hill et al., 1989). During the extensive development of L-364,718 it was noted that some analogues lost their selectivity for CCK_A.

Devazepide in the treatment of cancer

Devazepide (L-364,718) inhibited *in vitro* proliferation of cells and induced morphological changes in the mucous-secreting, autonomously proliferating human cancer colon cell line (HT29-S-B6). Addition of devazepide (10 μ M) for at least 3 days in the exponential phase of growth enhanced the baseline production of gastric M1 mucins 2-3-fold and that of carcinoembryonic antigens 5-fold. Moreover, devazepide induced an increase in the amount of the MUC-5AC mRNA expressed by HT29-S-B6 cells. The increase in mucins secretion, induced by devazepide, was persistent after removal and independent of the presence of serum (Forgue-Lafitte et al., 1996). MK-329 inhibited the growth of CCK receptor-positive human pancreatic cancer in athymic mice. Based on these activities and the ability of MK-329 to transiently increase food intake and to enhance morphine analgesia in murine models, an open trial (Abbruzzese et al., 1992) of MK-329 was conducted in 18 patients

with advanced pancreatic cancer in whom the CCK receptor status of the tumors was unknown. Tumor response, pain control, and nutritional parameters (hunger rating, caloric intake, body weight, and anthropometrics) were serially assessed. The results of the study failed to demonstrate any impact of MK-329 on tumor progression, pain, or nutrition. Toxicity was mild and limited to nausea, vomiting, diarrhea, and abdominal cramps, with 17 of 18 patients able to tolerate treatment.

Ureido-1,4-benzodiazepine derivatives

When the 3-amido linkage was replaced with a benzamido urea, the CCK_A affinity decreased and the CCK_B affinity increased substantially. The most interesting compound developed by Merck scientists (Evans et al., 1986) was L-365,260. L-365,260 (Bock, DiPardo and Evans, 1989) showed a high affinity for CCK_B receptors in rats, mice and in humans. L-364,718 was reported to have a 125 fold greater affinity for pancreatic CCK_A receptors than for gastrin receptors. L-365,260 has shown only an 80 fold greater affinity for gastrin/CCK_B receptors than for pancreatic CCK_A.

Both L-364,718 and L-365,260 (Figure 3) were investigated (Dourish et al., 1989) whether the satiety response to CCK is mediated by CCK_A or CCK_B receptors. L-365,260 was reported to be 100 times more potent than devazepide in increasing feeding frequency and preventing satiated rats. The conclusion from the study was that endogenous CCK causes satiety by interaction with CCK_B receptors in the brain.

The potent CCK_B-selective L-365, 260 and related analogues are dependent upon the

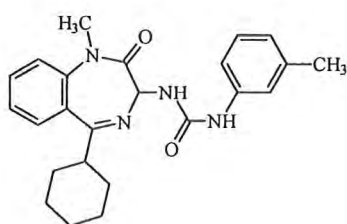
stereochemistry at the C-3 position of the benzodiazepine ring. The (3S)-enantiomer is generally being CCK_A selective and the (3R)-isomer CCK_B selective. L-365,260 shows high affinity for CCK_B receptors in rats, mice and in humans. Although L-365,260 represents a benzodiazepine structure, it has no affinity to GABA-A receptors and does not induce tolerance and withdrawal in animal models. During phase I clinical trials it was found that L-365, 260 had a limited oral bioavailability due to its low aqueous solubility and bio-distribution studies in mice (Haradahira et al., 1998). It has shown very low brain uptakes (<0.8% dose/gram) after intravenous injections.

L-365,260 and its role in cancer

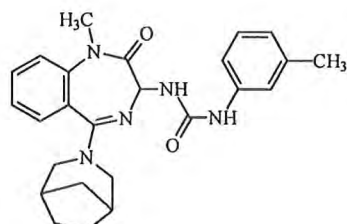
The cell line LN 36 responded *in vitro* (Ohlsson et al., 1999) with an increased cell number to stimulation by gastrin-17 and decreased cell number to inhibition by the CCK_B receptor antagonist L-365,260. Specific CCK receptor and gastrin receptor antagonists were used to assess what role, if any, these receptors have in autocrine cell growth. Although the CCK receptor antagonist, L-364,718, inhibited cell proliferation in a broad spectrum of

cell lines, the gastrin antagonist, L-365,260, had no effect on cell proliferation. In addition neither added gastrin-17 nor sulfated CCK-8, could reverse the inhibitory action of L-364,718. It is proposed that L-364,718 inhibits cell proliferation independently of classical gastrin/CCK receptors (Thumwood, Hong and Baldwin, 1991).

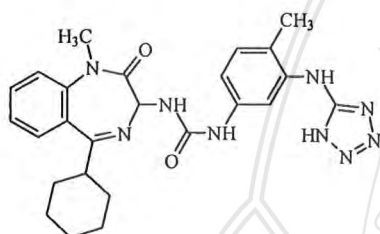
One of the most potent and selective CCK_B receptor ligands is L-708,474 (Chamber et al., 1993). L-708,474 (Figure 4) displayed a 30-fold higher affinity than L-365,260 ($IC_{50} = 8.5$ nM) at the CCK_B receptor and was found markedly more selective for CCKB receptors over CCKA (6,500-fold vs. 87-fold). The enhanced binding affinities of the 5-cyclohexyl benzodiazepines demonstrated the importance of the size of the lipophilic substituent at the C-5 position of the benzodiazepine template. L-708,474 ($IC_{50} = 0.28$ nM) was an exceptionally high affinity ligand at the CCK_B receptor. L-708,474 is considerably more potent than either the cyclopentyl ($IC_{50} = 16$ nM) or the cyclobutyl ($IC_{50} = 29.9$ nM) analogues. It has shown an increased lipophilicity in comparison to L-365,260, enhanced potency and selectivity for the CCK_B receptor, but a decreased bioavailability.



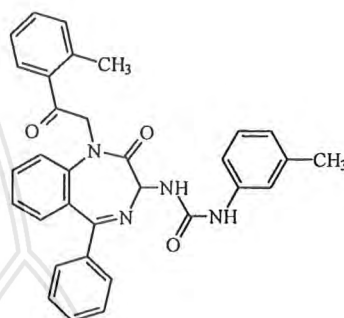
L-708,474



L-740,093



L-737,425



YM 022

Figure 4 3-Ureido-1,4-benzodiazepine derivative L-708,474, the 3-ureido-1,4-benzodiazepine derivative L-740,093, the 3-ureido-1,4-benzodiazepine derivative L-737,425 and the 1-benzoylmethyl 3-ureido-1,4-benzodiazepine derivative YM022

Based on Merck's phase 1 trials with L-365,260 a second generation of CCK_B/gastrin receptor antagonists was developed. The chemists at Merck hoped to increase the oral bioavailability of the newly synthesized compounds by introducing groups with water-solubilizing properties.

One of the compounds with an increased bioavailability (Showell et al., 1994; Castro et al., 1997), L-740,093, which contains a basic amidine structure, was found to be extremely potent. L-740,093 (Figure 4) showed a one hundred times fold improved water solubility as HCl salt compared to L-365,260. L-740,093 displayed an IC₅₀ of 0.1 nM for the CCK_B receptor and had a CCK_A/CCK_B

ratio of approximately 16000. Thus L-740,093 seems to be suitable for oral treatment in humans.

Another approach to increase the water solubility of L-365,260 in order to achieve good levels of oral bioavailability, was successfully performed by incorporating acidic solubilizing groups into the 3-phenyl ring of the acylurea moiety (Bock et al., 1994). The C5-cyclohexyl derivatives incorporating aminotetrazole group (L-737,425) was the most potent and selective (CCK_A/CCK_B = 37000) antagonists so far reported for CCK-B/gastrin receptors (Figure 4). However, the preparation of this compound includes a synthetic complexity.

A novel series of 1-aroylethyl analogues of L-365,260 was prepared and evaluated for activity as CCK_B/gastrin receptor antagonist by the Yamanouchi group (Semple et al., 1997). YM022 (Yuji et al., 1994; Semple et al., 1996) has shown to be a significantly more potent antagonists of pentagastrin than L-365,260. YM022 (Figure 4) exhibited a very high CCKB/gastrin receptor affinity ($IC_{50} = 0.11$ nM) and a CCK_A/CCK_B ratio about 1300 (Masato et al., 1995). YM022 showed, compared to L-365,260, a better bioavailability and is a compromise between the lipophilicity and selectivity for the CCK_B receptor. However, the improvement in the obtained potency did not compensate the increase in synthetic complexity.

The antiproliferative potency of YM022 was evaluated by using N-hCCKBR cells. YM022 had the most potent activities in competing with [125I]CCK-8 or [125I]gastrin I binding, inhibition of CCK-8- or gastrin I-induced phosphoinositide hydrolysis and increasing cytoplasmic free calcium. Interestingly, a potent antagonist for rat CCK_B/gastrin receptors did not have such activities in N-hCCKBR cells. YM022 inhibited the CCK-8- or gastrin I-induced [methyl-3H]thymidine incorporation of N-hCCKBR cells in a dose-dependent manner. In the absence of exogenous peptide ligands, YM022 also inhibited the proliferation of several human cancer cell lines expressing the genes for both gastrin and its receptor. These results suggest that YM022 could intervene in the autocrine stimulation of human tumor cell lines through CCK_B/gastrin receptors. N-hCCKBR cells are an excellent tool to screen for novel human CCK_B/gastrin receptor antagonists possessing antiproliferative activity for human cancer cells (Murayama et al., 1996).

Recent clinical studies

In an open study the CCK receptor subtypes were characterized in medullary thyroid cancer by measuring the expression of CCK_A and CCKB/gastrin receptor mRNA. Biopsy specimens were analyzed using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). All 6 patients with medullary thyroid cancer had positive pentagastrin tests preoperatively. CCK_B/gastrin receptors, but not CCK_A receptors were detected by RT-PCR in all six biopsy specimens. By contrast, no CCK receptors were found in normal thyroid tissues or in other thyroid tumors (follicular adenoma, papillary carcinoma, or anaplastic carcinoma). It was concluded that the presence of CCKB/gastrin receptors in medullary thyroid tumors might have important clinical implications (Amiri-Mosavi et al., 1999).

Potential of clinical effects

It was reported that the CCK antagonist proglumide potentiated morphine analgesia. The effect of proglumide on spinal and supraspinal mu and spinal delta analgesia were investigated in mice in order to understand more fully the opiate receptor subtypes involved with this effect. It was found that proglumide alone had no effect on tailflick latencies, but increased, in a dose-dependent manner, tailflick latencies in morphine-tolerant mice. Proglumide also potentiated morphine analgesia in naive mice in a dose-dependent manner, with a maximal effect at 5-10 mg/kg. It both shifted the dose-response curve for morphine analgesia to the left and prolonged morphine's duration of action. Proglumide increased the sensitivity of supraspinal mu 1 receptor mechanisms of analgesia without

influencing spinal mechanisms. Proglumide administered subcutaneously potentiated the analgesic actions of intracerebroventricular [D-Ala²,MePhe⁴,Gly(ol)⁵]enkephalin (DAGO; (μ 1), but not intrathecal DAGO (μ 2) or [D-Pen²,D-Pen⁵]enkephalin (DPDPE; δ). The selective μ 1 receptor antagonist naloxonazine blocked proglumide-enhanced morphine analgesia (Bodnar et al., 1990).

As CCK receptors are present on pancreatic carcinoma cells it was determined whether either CCK itself or an antagonist of CCK could modulate the sensitivity of the human pancreatic cell line MIA-PaCa2 to cisplatin (DDP). The IC_{50} for a 1-h exposure to DDP was $35.3 \pm 3.2 \mu M$. Exposure to CCK-8 octapeptide at physiologic and supra-physiologic concentrations did not alter the sensitivity of MIA-PaCa2 cells to DDP. The CCK receptor antagonist MK-329 was directly cytotoxic to the MIA-PaCa2 cells on a constant exposure schedule with an IC_{50} of $9.5 \pm 1.4 \mu M$. MK-329 enhanced the sensitivity of MIA-PaCa2 cells to DDP by a factor of 3.5 and the interaction between DDP and MK-329 was shown to be synergistic by median-effect analysis. At a level of 50% cell kill, the combination index was 0.58 ± 0.10 . The ability of MK-329 to sensitize cells to DDP was schedule-dependent and required prolonged exposure to the antagonist following a 1-h exposure to DDP (Jamshidipour et al., 1994).

Conclusion

The most promising results in the cancer area are based on the non-potent and non-selective CCK antagonists lorglumide and proglumide. These early CCK antagonists lack potency and subtype

receptor selectivity. Later work led by Merck was focused on benzodiazepines and all clinical trials failed due to a very poor bioavailability. No clinical trials have been carried out with the second generation of Merck's water soluble ureas neither as a CNS drug nor as an anti-cancer agent. Various other major pharmaceutical companies designed and tested ureas, known for their use in analytical chemistry to form insoluble precipitates, which were very close to Merck's original structure. It can be expected that "really" novel compounds not belonging to the class of benzodiazepines or ureas will be identified in combinatorial libraries with a great potential impact in cancer research. Remarkable are the ongoing findings in which the cocomittant administration of CCK antagonists enhanced the desired effects of other pharmaceuticals.

References

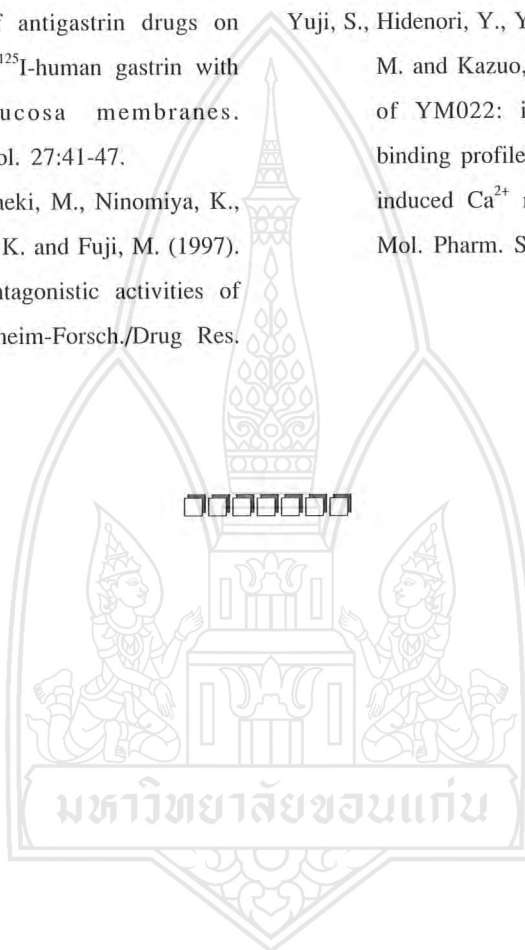
- Abbruzzese, J.L., Gholson, C.F., Daugherty, K., Larson, E., DuBrow, R., Berlin, R. and Levin, B. (1992). A pilot clinical trial of the cholecystokinin receptor antagonist MK-329 in patients with advanced pancreatic cancer. *Pancreas*. 7:165-171.
- Amiri-Mosavi, A., Ahlman, H., Tisell, L.E., Waengberg, B., Kaelby, L., Forssell-Aronsson, E., Lundberg, P.A., Lindstedt, G. and Nilsson, O. (1999). Expression of cholecystokinin-B/gastrin receptors in medullary thyroid cancer. *Eur. J. Surg.* 165:628-31.
- Anderson, L. and Dockray, G.L. (1988). The cholecystokinin antagonist L-364,718 inhibits the action of cholecystokinin but not bombesin on rat pancreatic secretion *in vivo*. *Euro. J. Pharmacol.* 146:307-311.

- Bock, M.G., DiPardo, R.M. and Evans B.E. (1989). Benzodiazepine gastrin and brain cholecystokinin receptor ligands L-365,260. *J. Med. Chem.* 32:13-24.
- Bock, M.G., Di Pardo, R.M. and Rittle, K.E. (1986). Cholecystokinin antagonists. Synthesis of asperlicin analogues with improved potency and water solubility. *J. Med. Chem.* 29:1941-1952.
- Bock, M.G., Di Pardo, R.M., Mellin, E.C. and Newton, N.C. (1994). Second-generation benzodiazepine CCK-B antagonists. Development of subnanomolar analogues with selectivity and water solubility. *J. Med. Chem.* 37:722-724.
- Bodnar, R.J., Paul, D. and Pasternak, G.W. (1990). Proglumide selectively potentiates supraspinal mu 1 opioid analgesia in mice. *Neuropharmacol.* 29:507-10.
- Boden, P.R., Higginbottom, M., Hill, D.R., Horwell, D.C., Hughes, J., Rees, D.C., Roberts, E., Singh, L., Suman-Chauhan, N. and Woodruff, G.N. (1993). Cholecystokinin dipeptoid antagonists: design, synthesis and anxiolytic profile of some novel CCK-A and CCK-B and "mixed" CCK-A/CCK-B antagonists. *J. Med. Chem.* 36:552-565.
- Castro, L.C., Broughton, H.B., Russell, M.G.N., Rathbone, R. and Watt, A.P. (1997). 5-(Piperidin-2-yl)- and 5-(homopiperidin-2-yl)-1,4-benzodiazepines: high-affinity, basic ligands for the cholecystokinin-B receptor. *J. Med. Chem.* 40:2491-2501.
- Chamber, M.S., Hobbs, S.C., Flecher, S.R., Matassa, V.G., Mitchell, P.J., Watt, A.P., Baker, R., Freedman, S.B., Patel, S. and Smith, A.J. (1993). L-708,474: the C5-cyclohexyl analogue of L-365,260, a selective high affinity ligand for the CCK-B/gastrin receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3:1919-1924.
- Dourish, C.T., Rycroft, W. and Iversen, S.D. (1989). Postponement of satiety by blockade of brain cholecystokinin-B receptors. *Science.* 245:1509-1511.
- Dunlop, J. (1998). CCK receptor antagonists. *Gen. Pharmacol.* 31:519-524.
- Evans, B.E., Rittle, K.E., Bock, M.G., DiPardo, R.M., Freidinger, R.M., Whitter, W.L., Veber, D.F. and Anderson, P.S. (1986). Design of potent, orally effective, non-peptidal antagonists of the peptide hormone cholecystokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:4918-4922.
- Forgue-Lafitte, M.E., Coudray, A.M., Aubert, J.P., Gespach, C. and Bara, J. (1996). Devazepide (L-364,718) inhibits growth and increases expression of tumor markers in HT29-S-B6 cells. *Acad. Sci. III.* 319:1133-1138.
- Guo, Y.S. and Townsend, C.M. (2000). Roles of gastrointestinal hormones in pancreatic cancer. *J. Hepatobiliary Pancreat Surg.* 7:276-285.
- Haradahira, T., Inoue, O., Kobayashi, K. and Suzuki, K. (1998). Synthesis and evaluation of ¹¹C-labeled nonpeptide antagonists for cholecystokinin receptors: [¹¹C] L-365,260 and [¹¹C]L-365,346. *Nucl. Med. Biol.* 25:203-208.
- Hill, D.R., Shaw, T.M., Graham, W. and Woodruff, G.N. (1989). Autoradiographical detection of cholecystokinin-A receptors in primate brain using ¹²⁵I bolton Hunter CCK-8 and ³H-MK-329. *J. Neurosci.* 10:1070-1081.

- Hirata, M., Itoh, M., Tsuchida, A., Oishi, H., Hanada, K. and Kajiyama, G. (1996). Cholecystokinin receptor antagonist, loxiglumide, inhibits invasiveness of human pancreatic cancer cell lines. *FEBS Lett.* 383:241-244.
- Hosontanti, R., Chowdhury, P., McKay, D. and Rayford, P.L. (1988). Effect of L-364,718, a new CCK antagonist, on amylase secretion in isolated rat pancreatic acini. *Pancreas.* 3:95-98.
- Hudd, C., LaRegina, M.C., Devine, J.E., Palmer, D.C., Herbold, D.R., Beinfeld, M.C., Gelder, F.B. and Johnson, F.E. (1989). Response to exogenous cholecystokinin of six human gastrointestinal cancers xenografted in nude mice. *Am. J. Surg.* 157:386-394.
- Imdahl, A., Eggstein, S., Crone, C. and Farthmann, E.H. (1989). Growth of colorectal carcinoma cells: regulation *in vitro* by gastrin, pentagastrin and the gastrin-receptor antagonist proglumide. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 115:388-392.
- Ivy, A.C. and Goldberg, E.A. (1928). The discovery of a substance released from the upper intestine and produced gallbladder contractions. *Am. J. Physiol.* 86:599-606.
- Jamshidipour, R., Pinho, E.B., Hom, D.K. and Howell, S.B. (1994). Enhancement of the cytotoxicity of cisplatin by the cholecystokinin antagonist MK-329 in a human pancreatic cancer cell line. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 34:484-90.
- Jensen, R.T., Zhou, Z.C., Murphy, R.B., Jones, S.W. and Setnikar, I. (1986). Structural features of various proglumide-related cholecystokinin receptor antagonists. *Am. J. Physiol.* 251:839-846.
- Kerwin, J.F., Wagenaar, F., Kopecka, H., Lin, W. and Miller, T. (1991). Cholecystokinin antagonists: (R)-tryptophan-based hybrid antagonists of high affinity and selectivity for CCK-A receptors. *J. Med. Chem.* 34:3350-3359.
- Lattmann, E., Arayarat, P. and Singh, H. (2000). Small organic molecules as cholecystokinin antagonists. *KKU Science J.* 34:288-299.
- Makovec, F., Bani, M., Chiste, R., Revel, L. and Rovati, L.C. (1986). Differentiation of central and peripheral cholecystokinin receptors by new glutaramic acid derivatives and cholecystokinin-antagonistic activity. *Arzmeim-Forsch./Drug Res.* 36:98-102.
- Masato, S., Yutaka, K., Yoshinori, O., Akito, N. and Keiji, M. (1995). New 1,4-benzodiazepin-2-one derivatives as gastrin/cholecystokinin-B antagonists. *Chem. Pharm. Bull.* 43:2159-2167.
- Militello, C., Sperti, C., Di Prima, F. and Pedrazzoli, S. (1997). Clinical evaluation and safety of loxiglumide (CCK-A receptor antagonist) in nonresectable pancreatic cancer patients. Italian Pancreatic Cancer Study Group. *Pancreas.* 14:222-228.
- Mineo, H., Iwaki, N., Kogishi, K., Zabielski, R., Onaga, T., and Kato, S. (1995). Effects of intravenous infusions of cholecystokinin (CCK)-8 on exocrine and endocrine pancreatic secretion in conscious sheep. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology.* p.111, 133-138.
- Morimoto, H., Nio, Y., Tsubono, M., Tseng, C.C., Kawabata, K., Masai, Y., Hayashi, H., Baba, N., Manabe, T. and Hosokawa, Y. (1993).

- Inhibitory effects of a cholecystokinin antagonist, loxiglumide (CR-1505), on the growth of freshly separated and xenografted human pancreatic cancer. *J. Surg. Oncol.* 53:47-53.
- Murayama, T., Matsumori, Y., Iwata, N., Ito, M., Taniguchi, T., Chihara, K. and Matsui, T. (1996). Antiproliferative effect of a novel cholecystokinin-B/gastrin receptor antagonist, YM022. *Jpn. J. Cancer Res.* 87:743-50.
- Nio, Y., Tsubono, M., Morimoto, H., Kawabata, K., Masai, Y., Hayashi, H., Manabe, T., Imamura, M. and Fukumoto, M. (1993). Loxiglumide (CR-1505), a cholecystokinin antagonist, specifically inhibits the growth of human pancreatic cancer lines xenografted into nude mice. *Cancer.* 72:599-606.
- Ohlsson, B., Fredaong, N. and Axelson, J. (1999). The effect of bombesin, cholecystokinin, gastrin, and their antagonists on proliferation of pancreatic cancer cell lines. *Scand. J. Gastroenterol.* 34:1224-1229.
- Romani, R., Howes, L.G. and Morris, D.L. (1996). Gastrin receptor antagonist CI-988 inhibits growth of human colon cancer *in vivo* and *in vitro*. *Aust. N. Z. J. Surg.* 66:235-237.
- Romani, R., Howes, L.G. and Morris, D.L. (1996). Dose dependent *in vivo* inhibition of human colorectal cancer (LoVo) by the gastrin receptor antagonist, CI-988. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23:438-340.
- Semple, G., Ryder, H., Kendrick, D.A., Szelke, M., Ohta, M., Satoh, M., Nisida, A., Akuzawa, S., Miyata, K., Rooker, D.P. and Batt, A.R. (1997). (3R)-N(tert-butylcarbonylmethyl)-2,3-dihydro-2-oxo-5-(2-pyridyl)-1H-1,4-benzodiazepin-3-yl)-N-(3-(methylamino)phenyl)urea (YF476): a potent and orally active gastrin/CCK-B antagonist. *J. Med. Chem.* 40:331-341.
- Semple, G., Ryder, H., Kendrick, D.A., Szelke, M., Ohta, M., Satoh, M., Nisida, A., Akuzawa, S. and Miyata, K. (1996). Synthesis and biological activity of 1-alkylcarbonylmethyl analogues of YM022. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6:51-54.
- Shimazoe, T., Funakoshi, A. and Kono, A. (1992). Effects of UFT and loxiglumide (CR-1505) on liver metastasis of human pancreatic cancer cell line, KP-1 N in nude mice. *Gan. To. Kagaku Ryoho.* 19:1321-1325.
- Showell, G.A., Bourrain, S., Neduvilil, J.G., Fletcher, A.E., Baker, R., Watt, A.P., Fletcher, A.E., Freedman, S.P., Kemp, J.A., Marshall, G.R., Patel, S., Smith, A.J. and Matassa, V.G. (1994). High affinity and potent water soluble 5-amino-1,4-benzodiazepine CCK_B/gastrin receptor antagonists containing a cationic solubilizing group. *J. Med. Chem.* 37:719-721.
- Silver, A.J., Flood, J.F., Song, A.M. and Morley, J.E. (1989). Evidence for a physiological role for CCK in the regulation of food intake in mice. *Am. J. Physiol.* 256:646-652.
- Singh, P., Le, S., Beauchamp, R.D., Townsend, C.M. and Thompson, J.C. (1987). Inhibition of pentagastrin-stimulated up-regulation of gastrin receptors and growth of mouse colon tumor *in vivo* by proglumide, a gastrin receptor antagonist. *Cancer Res.* 47:5000-5004.
- Stening, G.F. and Grossman, M.I. (1969). Gastrin-related peptides as stimulant of

- pancreatic and gastric secretion. *Am. J. Physiol.* 217:262-266.
- Thumwood, C.M., Hong, J. and Baldwin, G.S. (1991). Inhibition of cell proliferation by the cholecystokinin antagonist L-364,718. *Exp. Cell. Res.* 92:189-92.
- Vidal, Y., Plana, R.R., Cifarelli, A. and Bizzarri, D. (1980). Effects of antigastrin drugs on the interaction of ^{125}I -human gastrin with rat gastric mucosa membranes. *Hepata-Gastroenterol.* 27:41-47.
- Wakatsuki, K., Saito, T., Saeki, M., Ninomiya, K., Kasai, H., Kimura, K. and Fuji, M. (1997). Cholecystokinin antagonistic activities of loxiglumide. *Arzneim-Forsch./Drug Res.* 47:1130-1133.
- Watson, S.A., Morris, D.L., Durrant, L.G., Robertson, J.F. and Hardcastle, J.D. (1992). Inhibition of gastrin-stimulated growth of gastrointestinal tumour cells by octreotide and the gastrin/cholecystokinin receptor antagonists, proglumide and lorglumide. *Eur. J. Cancer.* 28:1462-1467.
- Yuji, S., Hidenori, Y., Yumiko, H., Akito, N., Keito, M. and Kazuo, H. (1994). Characterization of YM022: its CCK_B /gastrin receptor binding profile and antagonism to CCK-8 -induced Ca^{2+} mobilization. *Eu. J. Pharm. Mol. Pharm. Sec.* 269:249-254.



Rational Design of the Bioreductive Anticancer Agents

Natthida Weerapreeyakul¹

Abstract

Solid tumors have been found to be under hypoxic conditions. The reductase enzymes in these cancer cells are overexpressed when compared with those in the normal cells. Irregular shape of the blood vessels and condensed mass in the tumor lead to poor delivery of chemotherapeutic agents, while hypoxia leads to resistance to radiation therapy. Thus, the rational design of the bioreductive anticancer agents uses these disadvantages as advantages. The bioreductive anticancer agent is the compound that will be activated by the reductase enzyme under the hypoxic condition in the tumor cells. Controlled bioreductive activation of the bioreductive anticancer agents can lead to specific drug release only at the tumor sites and hence reduces toxicity during systemic distribution.

Physiology and Anatomy of Solid

Tumors

Solid tumors are aggregated masses of cancer cells caused by changes or mutation in genes that control healthy cell division. Alteration or damage of these genes results in cell proliferation and subsequent cancerous tumors. Blood flow to the solid tumors is highly irregular with the development of oxygen depleted area (hypoxia) and coincides with nutrient and energy deprivation as well as severe tissue acidosis (Jain, 1994; Brown and Giaccia, 1998) (Figure 1). These result in poor delivery of therapeutic agents and resistance to radiation therapy. Hypoxia leads to resistance of solid tumors to anticancer drugs because it causes cell proliferation to slow down or to come to an end. As these cells are farthest from blood vessels, their resistance to killing by most

cycle-active chemotherapeutic agents increases.

Resistance of solid tumors to radiation therapy is due to resistance to cell killing of the hypoxic tumor cells. Therefore, hypoxic conditions limit the response of solid tumors to conventional chemotherapy as well as radiotherapy.

Important biochemical events take place in hypoxic solid tumors to create drug resistance. Overexpression of efflux pumps (e.g., multidrug resistance protein and P-glycoprotein) to pump anticancer agents out of the cancer cells has been demonstrated (Chao et al., 1992; Jedlitschky et al., 1996; Hirohashi et al., 2000). Cellular transport and metabolism are also altered in cancer cells (Ripple et al., 1993; Skarsgard et al., 1995; Vaupel et al., 1989). For example, increased bioreductive enzyme expression is an adaptive strategy of solid tumors to

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

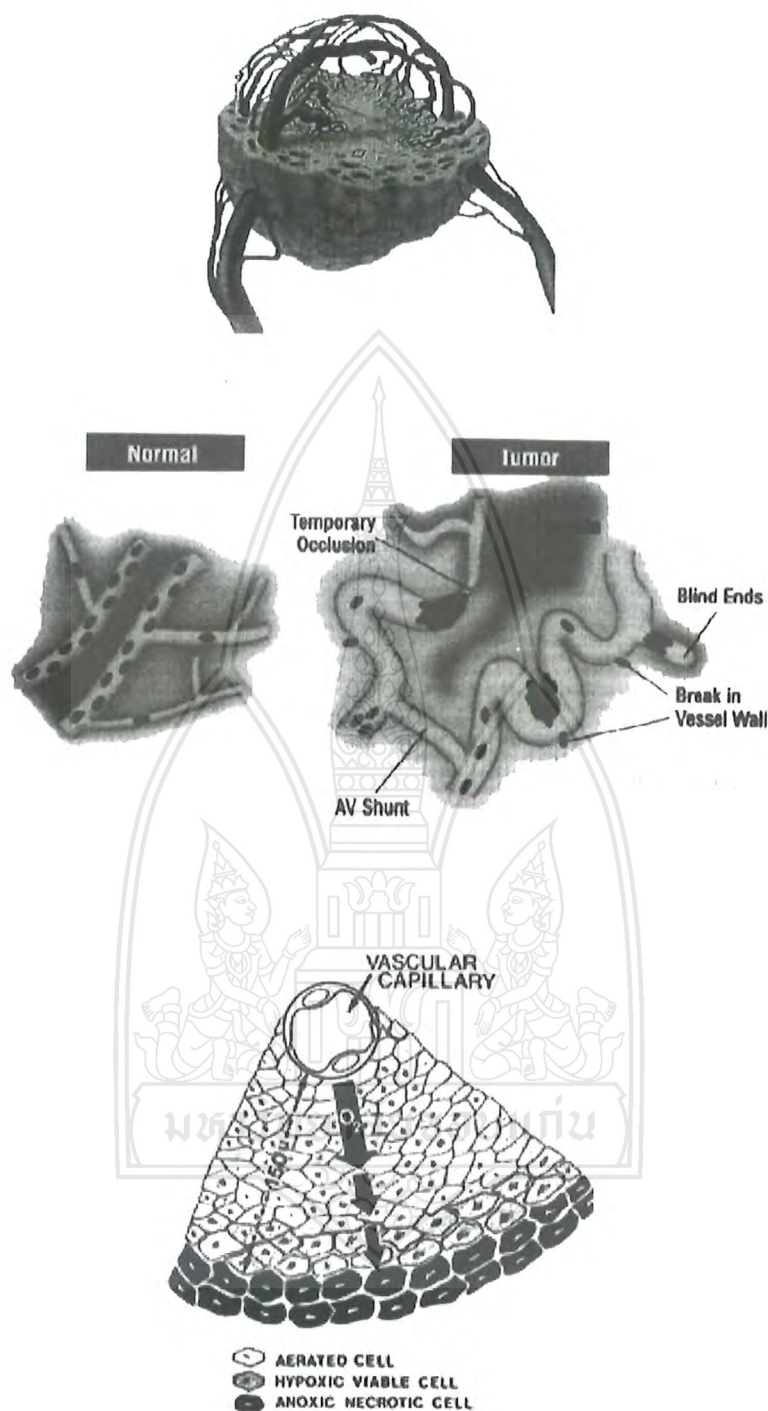


Figure 1 Microenvironment in hypoxic solid tumors in comparison with normal tissues. Since the blood vessels are tortuous, irregular and compressed in the tumor center, hypoxia develops from peripheral to the tumor core (Jain, 1994; Brown and Giaccia, 1998).

detoxify anticancer agents (Schlager and Powis, 1990; Hopkin, 1996). Moreover, hypoxic environment of solid tumors further contributes to the reductive environment in tumors (Kennedy et al., 1980a; 1980b; Rockwell, 1992; Olive et al., 1994). Several reports of development of hypoxic regions with consistently high level of bioreductive enzymes (e.g., DT-diaphorase, xanthine oxidase, cytochrome P450 reductase and cytochrome b5 reductase) have been documented for a wide variety of solid tumors in animals as well as in humans (Schlager and Powis, 1990; Workman and Stratford, 1993; Rampling et al., 1994; Beall et al., 1994; Mikami et al., 1996). Elevated levels of DT-diaphorase are expressed in breast, lung, liver and colon tumors (Smitskamp-Wilms et al., 1995; Fitzsimmons et al., 1996). Since hypoxic cells provide an environment more conducive to reductive reactions, this biochemical specificity of solid tumors leads to an advantage and offers a potential for development of bioreductive antitumor drugs. The reductase enzymes in solid tumors can cause effective bioreductive activation of quinone-based drugs (e.g., mitomycin C and EO9) and N-oxide derivatives (Sartorelli et al., 1994; Tomasz and Palom, 1997; Smith et al., 1997; Brown and Giaccia, 1998). Some of the bioreductive agents (i.e., mitomycin C, porfiromycin, tirapazamine and diaziquone) have undergone clinical trials (Haffty et al., 1997a; 1997b; Boyer, 1997; Vokes, 2000; Beall and Winski, 2000). These reports indicated that the biochemical specificity of reductase enzymes could be utilized to activate the bioreductive drugs leading to effective antitumor treatment.

Bioreductive Activation

Bioreductive activation is the mechanism whereby prodrugs (mostly quinone) undergo

reductive activation to become cytotoxic and selectively kill hypoxic cells. Those prodrugs are thus called bioreductive agents. Intracellular activation of bioreductive agent requires enzymatic reduction and can be catalyzed by both one-electron reductases (i.e., xanthine oxidase, cytochrome P450 reductase or cytochrome b5 reductase) and two-electron reductase (i.e., DT-diaphorase) (Pan et al., 1984; Beall et al., 1995; Mikami et al., 1996; Fitzsimmons et al., 1996). The one-electron reduction is substantially reversible by oxygen leading to subsequent futile redox cycling, which produces reactive oxygen species (i.e., superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) or hydroxyl radical ($HO^{\cdot}$) (Monks et al., 1992). The prodrug could be regenerated via redox cycling in adjacent well-oxygenated cells during one-electron bioreductive activation. The two-electron reduction of bioreductive quinone agent produces comparatively stable hydroquinone and protects against redox cycling and oxidative stress from reactive oxygen species (Monks et al., 1992; Gutierrez, 2000).

Bioreductive activation occurs via electron transfer between reductase enzyme, substrate and cofactor. DT-diaphorase is a good target for rational bioreductive drug design because of elevated levels of DT-diaphorase in several types of human tumor and its ability to activate quinone-based antitumor agents. DT-diaphorase is a flavoprotein (homodimer of 273 residues, one FAD per monomer) (Li et al., 1995; Chen et al., 2000). There are three important regions on the catalytic site of DT-diaphorase: one that tightly binds to FAD, one that binds the adenine ribose portion of NAD(P), and one that binds either the hydride acceptor (substrate) or the hydride donor (the nicotinamide moiety of NAD(P)H. After the cofactor NAD(P)H

reduces the flavin (FAD), NAD(P)^+ leaves the catalytic site and allows the quinone substrate to bind at the vacated position with the FADH₂ (Faig et al., 2000). The overlap of the hydride acceptor (substrate) and donor site (NAD(P)H) is consistent with the ping-pong (double displacement) kinetics of DT-diaphorase (Figure 2) (Faig et al., 2000; Foster et al., 2000). During the catalytic cycle, DT-diaphorase undergoes local conformational change. The residues surrounding the active site of reductive enzyme (e.g., DT-diaphorase) play pivotal roles in the electron transfer reactions by modulating the reduction potential of the redox centers. Therefore, isoalloxazine ring of FAD adopts two different conformations depending on the oxidation state: the oxidized form is planar and the reduced form is bent at the center (butterfly conformation) (Faig et al., 2000). The FAD-enzyme interactions appear to stabilize the flat oxidized form (Faig et al., 2000; Foster et al., 2000).

Bioreductive Alkylating Agents

Various prodrugs (bioreductive agents) have been designed to utilize the reductive environment in hypoxic solid tumors. The ideal bioreductive agents should be administered as an inactive drug (prodrug), which will only be activated by reductive enzymes within the hypoxic tumor cells. The substantial selectivity of bioreductive drugs depends on the presence of overexpressed reductive enzymes in human tumor cells and the hypoxic microenvironment for the bioreductive activation process (Adams and Stratford, 1994). There are four main classes of bioreductive drugs that have undergone clinical or preclinical evaluation in the treatment of solid tumors (Adams and Stratford,

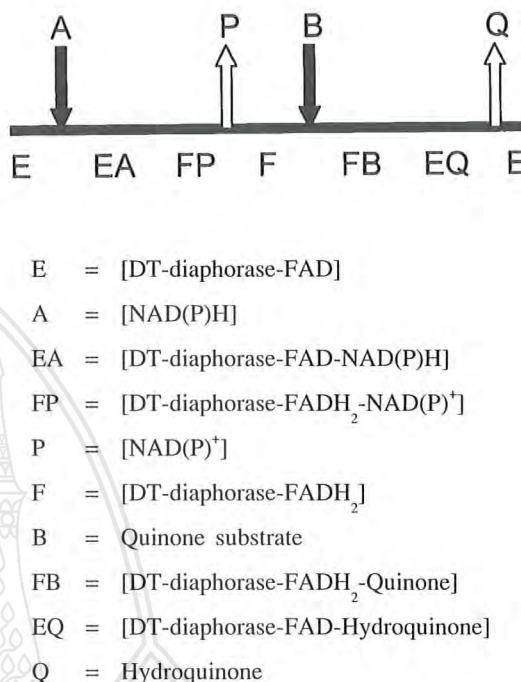


Figure 2 Ping-pong mechanism of DT-diaphorase catalyzed bioreductive activation of quinone substrate. The feature of ping-pong mechanism is that one or more products are released before all the substrates are bound.

1994; Brown and Giaccia, 1998) including quinone-based compounds (e.g., mitomycin C and EO9), nitroheterocyclics (e.g., RB6145), aromatic N-oxide (e.g., tirapazamine) and aliphatic N-oxide (e.g., AQ4N (1,4-bis-[[2-(dimethylamino-N-oxide)-ethyl]amino]5,8-dihydroxyanthracene-9,10-dione) (Airley et al., 2000). However, the best substrates for the overexpressed reductive enzymes in the tumor (e.g., DT-diaphorase and xanthine oxidase) are quinone type of drugs (Beall and Winski, 2000; Gutierrez, 2000).

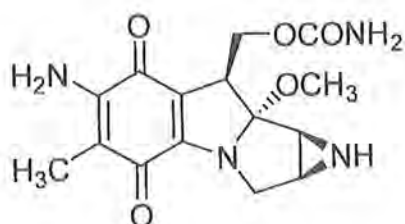
Quinone-containing alkylating agents represent a class of drug called "bioreductive alkylating agents" (Lin et al., 1974). The oxidation

state of quinone influences the activity of an adjacent alkylating moiety (Lin et al., 1972; Lin and Sartorelli, 1976). Therefore, reduction of quinone can be modulated to acquire activation of alkylating activity of these agents (Lin et al., 1972). Upon bioreduction, the bioreductive alkylating agents generate electrophilic species (mono- or bifunctional alkylating species), which subsequently bind covalently to cellular macromolecules (Lin et al., 1972; Lin and Sartorelli, 1976). Examples of bioreductive alkylating agents are mitomycin C, EO9, porfiromycin and diaziquinone (Beall and Winski, 2000). Mitomycin C is an approved bioreductive alkylating agent for clinical treatment of tumors of the stomach, pancreas, colon and breast or used as combination therapy (Teicher, 1997).

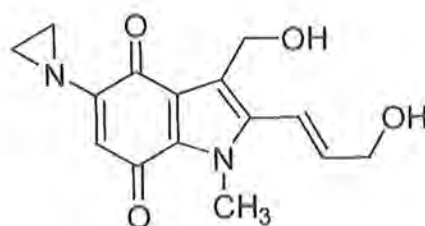
Although several bioreductive agents have been shown to be active against *in vitro* tumor cell cultures, some of them have exhibited toxicity *in vivo* (Denny and Wilson, 1986; Rockwell, 1992) largely due to inadequate drug delivery and lack of tumor site specificity (Hopkin, 1996; Jain, 1996). Toxicity can also be attributed to non-optimal reduction potential or activation in non-target tissue sites. The positive results from *in vivo* animal data may not be able to predict the success of these bioreductive agents in the clinic. Although the drug EO9 demonstrated excellent antitumor activity in hypoxic tumor cells and in solid tumor animal model, it failed in clinical studies due to its short half-life (rapid elimination) and poor biodistribution (Beall and Winski, 2000; Begleiter, 2000). Moreover, clinical use of bioreductive quinone-based drug (mitomycin C) is also limited due to its severe side effect (i.e., severe myelosuppression) (Begleiter, 2000). Therefore, effective anticancer drug delivery to solid tumors has been recognized as a major therapeutic challenge.

Tumor Targeted Drug Delivery Systems (TDDS)

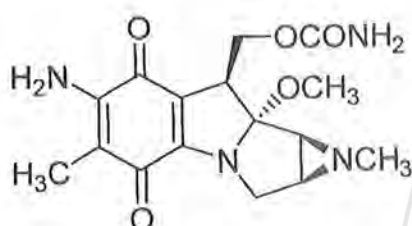
The tumor targeted drug delivery systems (TDDS) were originally designed in an attempt to control bioreductive properties in novel drug carrier systems, such that the carriers can effectively exploit the bioreductive environment in solid tumors for the purpose of drug targeting. The bioreductive activation was optimized by design of the carrier systems independent of the drug portion. The reduction potential of TDDS was optimized by specific substituents on the carrier system. The bioreductive activation of TDDS can occur in the presence of bioreductive enzymes, which are usually overexpressed in most solid tumor. TDDS were synthesized as amide derivatives of melphalan with appropriate quinone propionic acids, using typical peptide coupling procedures. A conformationally constrained bioreductive promoiety is attached to a model anticancer agent melphalan (as its methyl ester) to create a tumor targeted drug delivery systems (TDDS). The conformational constraint in the quinone-containing promoiety was created by the presence of the *gem*-dimethyl group on the propionic acid spacer linking the drug and the promoiety and the methyl group at position C6' on the quinone ring ("trimethyl lock") (Figure 3). Various functional groups (R_1) were incorporated at the C3' position in TDDS to alter reduction potential and thereby achieved control over reductive and bioreductive activation (Step 1) as well as the chemical step of cyclization to cause drug release (Step 2) (Gharat et al., 1998, Weerapreeyakul et al., 2000). Upon reduction (rate determining step) in the bioreductive environment of solid tumors (as dictated by the electronic properties of



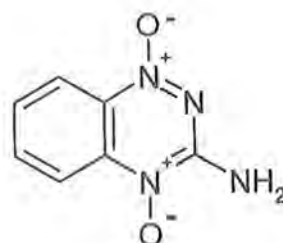
Mitomycin C



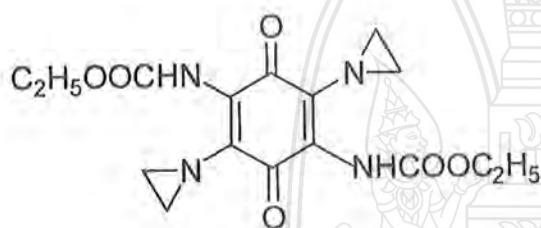
EO9



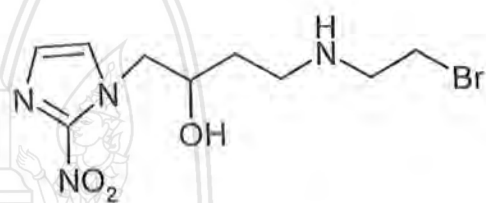
Porfiromycin



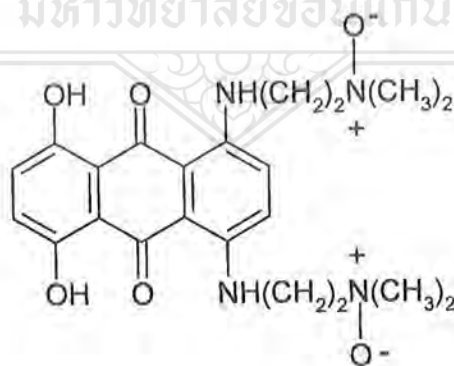
Tirapazamine



Diaziquinone



RB6145



AQ4N

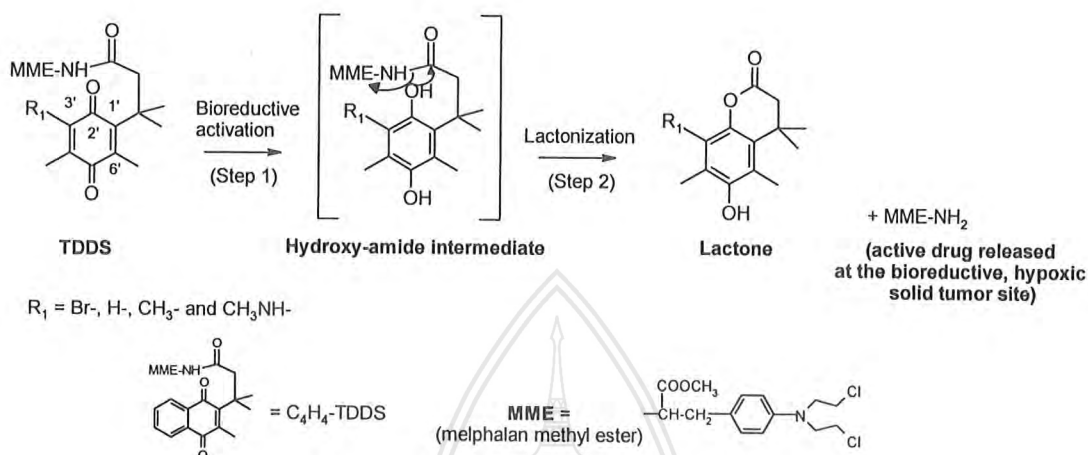


Figure 3 Principle of bioreductive activation of the TDDS. Reduction of TDDS to form the unstable hydroquinone intermediate is followed by intramolecular cyclization to generate the lactone, simultaneously releasing the model antitumor agent, MME. It is anticipated that R_1 will influence the rate of bioreduction (Step 1) as well as the rate of intramolecular cyclization (Step 2) due to electronic effects on the neighboring group participation reaction.

substituents on the TDDS, the expression of reductase enzymes, and the level of hypoxia), TDDS are “reduced” to a hydroxy-amide intermediate which then rapidly cyclizes to form the lactone, simultaneously releasing melphalan methyl ester (MME) at the bioreductive, hypoxic core of solid tumors (Figure 3). The rate of bioreductive activation catalyzed by the reductase enzymes can be modulated by electronic properties of R_1 substituents at position C3' on the quinone ring. Thus, bioreductive activation of TDDS (Figure 3) can lead to tumor targeted drug delivery in a controlled manner.

Melphalan was initially selected as the model drug because it is clinically used in the treatment of solid tumors. Melphalan is an alkylating agent (Figure 4) that causes DNA-base-pair code misreading (resulting in scission),

depurination and DNA strand cross linking. These lead to interference with DNA replication, transcription of RNA and nucleic acid function (Hemminki and Kallama, 1986; Smith et al., 1994; Osborne et al., 1995; Masta et al., 1995; Bauer and Povirk, 1997) as well as result in induction of apoptosis (programmed cell death) (Dyson et al., 1986; Ochs, 1999). The alkylating agent has been used in the treatment of breast cancer, multiple myeloma, malignant melanoma, ovarian carcinoma and neuroblastoma (Samuels and Bitran, 1995). However, the efficacy of alkylating drugs was generally reported to be low due to resistance mechanism from cancer cells via DNA repair process (Stanley, 1995). Rapid hydrolysis degradation of melphalan has been known to occur at a pharmacophore (bischloroethyl amine portion), which is critical for alkylating activity (Bolton

et al., 1993) (Figure 4). Glutathione (GSH) attacks at the bischloroethyl amine portion of melphalan was also reported to decrease its activity (Bolton et al., 1993) (Figure 4). GSH conjugates may be

susceptible to extrusion by multidrug resistance protein (MRP) (Chao et al., 1992). Hence, increased stability of melphalan is important for its efficacy.

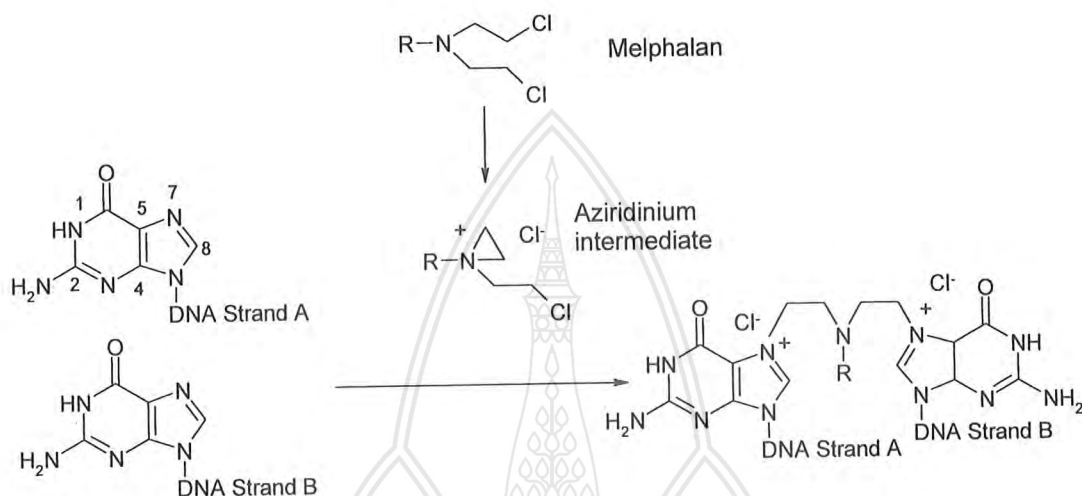


Figure 4 Alkylation of melphalan to the DNA. Formation of aziridinium intermediates from each of the bischloroethyl groups enables alkylation through covalent binding with the 7-nitrogen of guanine on DNA, producing an alkylated purine. Alkylation of a second guanine residue results in cross-linking of DNA strands (Salmon and Sartorelli, 1992).

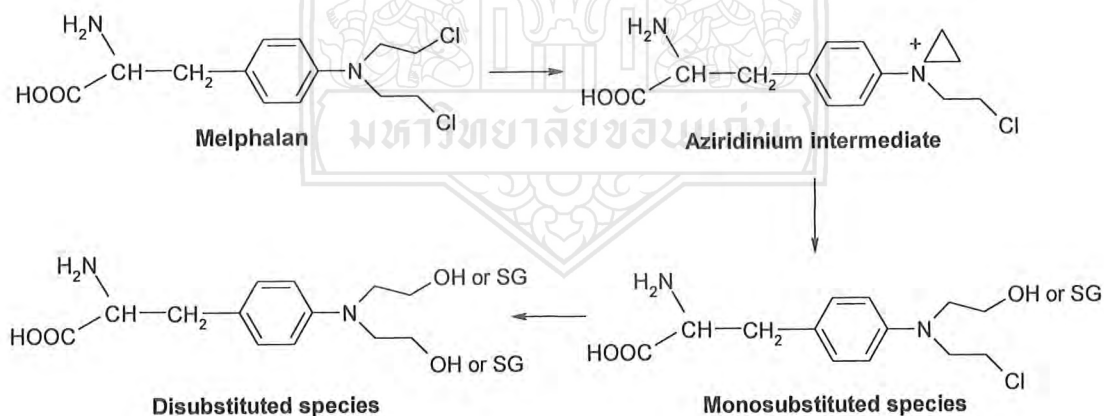


Figure 5 Schematic representation of hydrolysis or glutathione (GSH) catalyzed degradation of melphalan at the bischloroethyl amine side chains (Bolton et al., 1993).

Preliminary data on reductive behavior of TDDS and their reductive activation *in vitro* were reported by Gharat et al., (1998). Changes in reduction potential as influenced by electronic properties of substituents (R_1) on the TDDS were found to control the rate of drug delivery. TDDS bearing electron-withdrawing group (Br-TDDS) exhibited high reduction potential and were easily reduced under strong reducing agent (NaBH_4). TDDS bearing electron-donating group (CH_3 -TDDS) with lower redox potential were observed to have less reductive activation. Most recently, TDDS have been used to carry anticancer agents across the blood-brain barrier, particularly by modulating their interactions at the cerebrovasculature (Killian et al., 2000; Killian and Chikhale, 2001).

Conclusion

Solid tumors provide an environment conducive to bioreduction due to hypoxia and overexpression of bioreductive enzymes. These physiological and biochemical properties of the solid tumors have led to design of optimized bioreductive anticancer agents. Controlled bioreductive activations of the bioreductive anticancer agents can lead to specific drug release only at the tumor sites and hence reduces toxicity during systemic distribution.

References

- Adams, G. E. and Stratford, I. J. (1994). Bioreductive drugs for cancer therapy: the search for tumor specificity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol.* 29:231-238.
- Airley, R. E., Monagham, J. E. and Stratford, I. J. (2000). Hypoxia and disease: opportunities for novel diagnostic and therapeutic prodrug strategies. *The Pharmaceutical J.* 264:666-673.
- Bauer, G. B. and Povirk, L. F. (1997). Specific and kinetics of interstrand and intrastrand bifunctional alkylation by nitrogen mustards at a G-G-C Sequence. *Nucleic Acids Res.* 25:1211-1218.
- Beall, H. D., Mulcahy, R. T., Siegel, D., Traver, R. D., Gibson, N. W. and Ross, D. (1994). Metabolism of bioreductive antitumor compounds by purified rat and human DT-diaphorase. *Cancer Res.* 54:3196-3201.
- Beall, H. D., Murphy, A. M., Siegel, D., Hargreaves, R. H., Butler, J. and Ross, D. (1995). Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate): quinone oxidoreductase (DT-diaphorase) as a target for bioreductive antitumor quinones: quinone cytotoxicity and selectivity in human lung and breast cancer cell lines. *Mol. Pharmacol.* 48:499-504.
- Beall, H. D. and Winski, S. L. (2000). Mechanisms of action of quinone-containing alkylating agents I: NQO1-directed drug development. *Front. Biosci.* 5:629-638.
- Begleiter, A. (2000). Clinical application of quinone-containing alkylating agents. *Front. Biosci.* 5:153-171.
- Bolton, M. G., Hilton, J., Robertson, K. D., Streeter, R. T., Colvin, O. M. and Noe, D. A. (1993). Kinetic analysis of the reaction of melphalan with water, phosphate and glutathione. *Drug Metab. Dispos.* 21:986-996.

- Boyer, M. J. (1997). Bioreductive agents: a clinical update. *Oncol. Res.* 9:391-395.
- Brown, J. M. and Giaccia, A. J. (1998). The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res.* 58:1408-1416.
- Chao, C. C., Huang, Y. T., Ma, C. M., Chaw, W. Y. and Lin-Chao, S. (1992). Overexpression of glutathione-S-transferase and evaluation of thiol pools in a multidrug-resistant human cancer cell line. *Mol. Pharmacol.* 41:69-75.
- Chen, S., Wu, K. and Knox, R. (2000). Structure-function studies of DT-diaphorase (NQO1) and NRH:quinone oxidoreductase (NQO2). *Free Radic. Biol. Med.* 29:276-284.
- Denny, W. A. and Wilson, W. R. (1986). Considerations for the design of nitrophenyl mustards as agents with selective toxicity for hypoxic tumor cells. *J. Med. Chem.* 29:879-887.
- Dyson, J. E. D., Simmons, D. M., Daniel, J., McLaughlin, J. M., Quirke, P. and Bird, C. C. (1986). Kinetic and physical studies of cell death induced by chemotherapeutic agents or hyperthermia. *Cell Tissue Kinet.* 19:311-324.
- Faig, M., Bianchet, M. A., Talalay, P., Chen, S., Winski, S., Ross, D. and Amzel, L. M. (2000). Structures of recombinant human and mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase: species comparison and structural changes with substrate binding and release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:3177-3182.
- Fitzsimmons, S. A., Workman, P., Grever, M., Paull, K., Camalier, R. and Lewis, A. D. (1996). Reductase enzyme expression across the National Cancer Institute Tumor Cell Line Panel: correlation with sensitivity to mitomycin C and EO9. *J. Natl. Cancer Inst.* 88:259-269.
- Foster, C. E., Bianchet, M. A., Talalay, P., Faig, M. and Amzel, M. (2000). Structures of mammalian cytosolic quinone reductases. *Free Radic. Biol. Med.* 29:241-245.
- Gharat, L., Visser, P., Brummelhuis, M., Guiles R. and Chikhale, P. J. (1998). Reductive-activation of conformationally-constrained anticancer drug delivery systems. *Med. Chem. Res.* 8:444-456.
- Gutierrez, P. L. (2000). The role of NAD(P)H oxidoreductase (DT-diaphorase) in the bioactivation of quinone-containing antitumor agents: a review. *Free Rad. Biol. Med.* 29:263-275.
- Haffty, B. G., Son, Y. H., Papac, R., Sasaki, C. T., Weissberg, J. B., Fischer, D., Rockwell, S., Sartorelli, A. C. and Fischer, J. J. (1997a). Chemotherapy as an adjunct to radiation in the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck: results of the Yale mitomycin randomized trials. *J. Clin. Oncol.* 15:268-276.
- Haffty, B. G., Son, Y. H., Wilson, L. D., Papac, R., Fischer, D., Rockwell, S., Sartorelli, A. C., Ross, D., Sasaki, C. T. and Fischer, J. J. (1997b). Bioreductive alkylating agent porfiromycin in combination with radiation therapy for the management of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiat. Oncol. Invest.* 5:235-245.

- Hemminki, K. and Kallama S. (1986). Reactions of nitrogen mustards with DNA. *LARC Sci. Publ.* 78:55-70.
- Hirohashi, T., Suzuki, H., Chu, X.-Y., Tamai, I., Tsuji, A. and Sugiyama, Y. (2000). Function and expression of multidrug-resistance-associated protein family in human colon adenocarcinoma cells (Caco-2). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292:265-270.
- Hopkin, K. (1996). Cancer in focus. *J. NIH Res.* 9:37-41.
- Jain, R. K. (1994). Barriers to drug delivery in solid tumors. *Sci. Am.* 271:58-65.
- Jain, R. K. (1996). Delivery of molecular medicine to solid tumors. *Science* 271:1079-1080.
- Jedlitschky, G., Leier, I., Buchholz, U., Barnouin, K., Kurz, G. and Keppler, D. (1996). Transport of glutathione, glucuronate and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res.* 56:988-994.
- Kennedy, K. A., Rockwell, S. and Sartorelli, A. C. (1980a). Preferential activation of mitomycin C to cytotoxic metabolites by hypoxic tumor cells. *Cancer Res.* 40:2356-2360.
- Kennedy, K. A., Teicher, B. A., Rockwell, S. and Sartorelli, A. C. (1980b). The hypoxic tumor cell, a target for selective cancer chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* 29:1-8.
- Killian, D. M., Gharat, L. and Chikhale, P. J. (2000). Modulating blood-brain interaction of amino acid-based anticancer agents. *Drug Delivery* 7:21-25.
- Killian, D. and Chikhale, P. J. (2001). A bioreversible prodrug approach designed to shift mechanism of brain uptake for amino acid-based anticancer agents. *J. Neurochem.* 76:966-974.
- Li, R., Bianchet, M. A., Talalay, P. and Amzel, L. M. (1995). The three dimensional structure of NAD(P)H:quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprotection and chemotherapy: mechanism of the two electron reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:8846-8850.
- Lin, A. J., Cosby, L. A., Shansky, C. W. and Sartorelli, A. C. (1972). Potential bioreductive alkylating agents. I. Benzoquinone derivatives. *J. Med. Chem.* 15:1247-1252.
- Lin, A. J., Cosby, L. A. and Sartorelli, A. C. (1974). Quinones as an anticancer agents: potential bioreductive alkylating agents. *Cancer Chemotherapy Rep.* 24:23-25.
- Lin, A. J. and Sartorelli, A. C. (1976). Potential bioreductive alkylating agents. VI. Determination of the relationship between oxidation-reduction potential and antineoplastic activity. *Biochem. Pharmacol.* 25:206-207.
- Masta, A., Gray, P. J. and Phillips, D. R. (1995). Nitrogen mustard inhibits transcription and translation in a cell free system. *Nucleic Acids Res.* 23:3508-3515.
- Mikami, K., Naito, M., Tomida, A., Yamada, M., Sirakusa, T. and Tsuruo, T. (1996). DT-Diaphorase as a critical determinant of sensitivity to mitomycin C in human colon and gastric carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 56:2823-2826.

- Monks, T. J., Hanzlik, R. P., Cohen, G. M., Ross, D. and Graham, D. G. (1992). Contemporary issues in toxicology. Quinone chemistry and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 112:2-16.
- Ochs, K., Sobol, R. W., Wilson, S. H. and Kaina, B. (1999). Cells deficient in DNA polymerase beta are hypersensitive to alkylating agent-induced apoptosis and chromosomal breakage. *Cancer Res.* 59:1544-1551.
- Olive, P. L., Vikse, C. M. and Durand, R. E. (1994). Hypoxic fractions measured in murine tumors and normal tissue using the comet assay. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 23:487-491.
- Osborne, M. R., Wilman, D. E. and Lawley, P. D. (1995). Alkylation of DNA by the nitrogen mustard bis(2-chloroethyl) methylamine. *Chem. Res. Toxicol.* 8:316-320.
- Pan, S., Andrews, P. A. and Glover, C. J. (1984). Reductive activation of mitomycin C and mitomycin C metabolites catalyzed by the NADPH-cytochrome P-450 reductase and xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 259:959-966.
- Rampling, R., Cruickshank, G., Lewis, A. D., Fitzsimmons, S. A. and Workman, P. (1994). Direct measurement of pO_2 distribution and bioreductive enzymes in human malignant brain tumors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 29:427-431.
- Ripple, M., Mulcahy, R. T. and Wilding G. (1993). Characteristics of the glutathione/glutathione-S-transferase detoxification system in melphalan resistance human prostate cancer cells. *J. Urol.* 150:209-214.
- Rockwell, S. (1992). Use of hypoxia-directed drugs in the therapy of solid tumors. *Seminars in Oncol.* 19:29-40.
- Salmon, S. E. and Sartorelli, A. C. (1992). Cancer chemotherapy. In: Katzung, B. G. (ed.). *Basic & Clinical Pharmacology*. Norwalk: Appleton & Lange. p.771.
- Samuels, B. L. and Bitran, J. D. (1995). High-dose intravenous melphalan: a review. *J. Clin. Oncol.* 13:1786-1799.
- Sartorelli, A. C., Hodnick, W. K., Belcourt, M. F., Tomasz, M., Haffty, B., Fischer, J. J. and Rockwell, S. (1994). Mitomycin C: a prototype bioreductive agent. *Oncol. Res.* 6:501-508.
- Schlager, J. J. and Powis, G. (1990). Cytosolic NAD(P)H:(quinone-acceptor)oxidoreductase in human normal and tumor tissue: effects of cigarette smoking and alcohol. *Int. J. Cancer* 45:403-409.
- Skarsgard, L. D., Skwarchuk, M. W., Vinczan, A., Kristl, J. and Chaplin, D. J. (1995). The cytotoxicity of melphalan and its relationship to pH, hypoxia and drug uptake. *Anticancer Res.* 15:219-224.
- Smith, B. L., Bauer, G. B. and Povirk, L. F. (1994). DNA damage induced by bleomycin, neocarzinostatin and melphalan in a precisely positioned nucleosome. Asymmetry in protection at the periphery of nucleosome-bound DNA. *J. Biol. Chem.* 269:30587-30594.
- Smith, P. J., Blunt, N. J., Desnoyers, R., Giles, Y. and Patterson, L. H. (1997). DNA topoisomerase II-dependent cytotoxicity of alkylaminoanthraquinones and their N-oxides. *Cancer Thermother. Pharmacol.* 39:455-461.

- Smitskamp-Wilms, E., Giaccone, G., Pinedo, H. M., Van der Laan, B. F. A. M. and Peters, G. J. (1995). DT-diaphorase activity in normal and neoplastic human tissues; an indicator for sensitivity to bioreductive agents? *Br. J. Cancer* 72:917-921.
- Stanley, K. B. (1995). Clinical drug resistance: the role of factors other than P-glycoprotein. *Am. J. Med. (suppl.)* 99:40S-44S.
- Teicher, B. A. (1997). Antitumor alkylating agents. In: DeVita, Jr. V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A., (eds.). *Cancer: Principle and Practice of Oncology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. p.405-418.
- Tomasz, M. and Palom, Y. (1997). The mitomycin bioreductive antitumor agents: cross-linking and alkylating of DNA as the molecular basis of their activity. *Pharmacol. Ther.* 76:73-87.
- Vaupel P., Kallinowski, F. and Okunieff, P. (1989). Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer. Res.* 49:6449-6465.
- Vokes, E. E., Kiess, M. S., Haraf, D. J., Stenson, K., List, M., Humerickhouse, R., Dolan, M. E., Pelzer, H., Sulzen, L., Witt, M. E., Hsieh, Y.-C., Mittal, B. B. and Weichselbaum, R. R. (2000). Concomittance chemoradiotherapy as primary therapy for locoregionally advanced head and neck cancer. *J. Clin. Oncol.* 18:1652-1661.
- Weerapreeyakul, N., Visser, P., Brummelhuis, M., Gharat, L. and Chikhale, P. J. (2000). Reductive and bioreductive activation is controlled by electronic properties of substituents in conformationally-constrained anticancer drug delivery systems. *Med. Chem. Res.* 10:149-163.
- Workman, P. and Stratford, I. J. (1993). The experimental development of bioreductive drugs and their role in cancer therapy. *Cancer and Metastasis Rev.* 12:73-82.

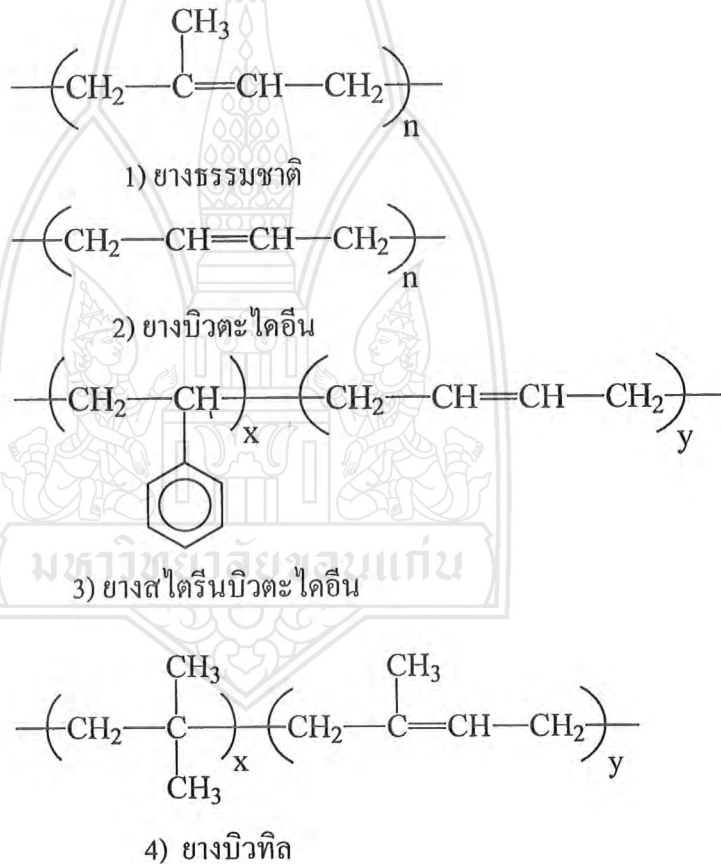
กลไกการยึดติดในยางรถยนต์

ไชยวัฒน์ รักสกุลพิวัฒน์¹

บทนำ

ยางรถยนต์จัดเป็นวัสดุคอมโพสิตประเภทหนึ่งซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือ ยางคอมพาวด์ (rubber compound) กับ วัสดุเสริมแรง (reinforcing materials) ยางคอมพาวด์ประกอบด้วย ยาง สารเติมเต็ม (filler) และสารเชื่อมโยงโมเลกุล (vulcanizing agent) ยางที่

ใช้มีหลายชนิด เช่น ยางธรรมชาติ (natural rubber, NR) ยางบิวตะไดอีน (butadiene rubber, BR) ยางสไตรีนบิวตะไดอีน (styrene butadiene rubber, SBR) ยางบิวทิล (butyl rubber, IIR) ยางเหล่านี้มีพันธะคู่ในโมเลกุล (ดังแสดงในรูปที่ 1) เพื่อที่จะสามารถเชื่อมโยงโมเลกุลด้วยซัลเฟอร์ได้

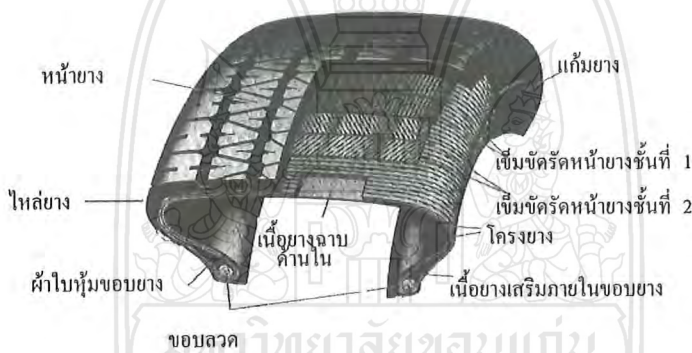


รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ ยางธรรมชาติ (1) ยางบิวตะไดอีน (2) ยางสไตรีนบิวตะไดอีน (3) และยางบิวทิล (4)

¹ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

ในแต่ละส่วนของยางรถยนต์อาจประกอบด้วยยางหนึ่งชนิดหรือหลายชนิดผสมกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของยางที่ต้องการ สำหรับสารเติมเต็มที่ใช้ได้แก่คาร์บอนแบล็ค และ/หรือซิลิกา ส่วนสารเชื่อมโยงโมเลกุลโดยทั่วไปนิยมใช้สารที่มีซัลเฟอร์เป็นตัวเชื่อมโยงโมเลกุล สำหรับวัสดุเสริมแรงที่ใช้อยู่ในรูปที่เรียกว่า คอร์ด (cord) ซึ่งผลิตได้จากวัสดุหลายชนิด เช่น เหล็ก (steel) ไนลอน (nylon) พอลิเอสเตอร์ (polyester) ใยแก้ว (fiber glass) เรยอน (rayon) พอลิอะรามิด (polyaramids) การเลือกใช้คอร์ดชนิดใดขึ้นอยู่กับชนิด และส่วนต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบของยางรถยนต์

ส่วนประกอบที่สำคัญของยางรถยนต์แสดงไว้ในรูปที่ 2 ประกอบด้วย หน้ายาง (tread) แก้มยาง (side wall) ผ้าใบหุ้มขอบยาง (chafer) เข็มขัดรัดหน้ายาง (belt) โครงยาง (carcass) เนื้อยางฉาบด้านใน (liner)



รูปที่ 2 ส่วนประกอบที่สำคัญของยางรถยนต์

เนื่องจากยางรถยนต์มีองค์ประกอบหลัก 2 ส่วนคือ ยางคอมปาวด์ กับ วัสดุเสริมแรง ดังนั้นความแข็งแรงของการยึดติดกันระหว่างยางคอมปาวด์และวัสดุเสริมแรงจึงเป็นตัวกำหนดความคงทน (durability) ของผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตาม ยางคอมปาวด์และวัสดุเสริมแรงมีความแตกต่างกันอย่างมาก กล่าวคือ วัสดุเสริมแรงจะมีความเป็นขี้ผึ้งและมีค่ามอดูลัสสูง ส่วนยางคอมปาวด์จะไม่มีขี้ผึ้ง และมีค่ามอดูลัสต่ำ

เนื้อยางเสริมความแข็งแรงในขอบยาง (bead filler หรือ apex) ไหล่ยาง (tread shoulder) ขอบลวด (beads wire) ซึ่งมีหน้าที่ในการล็อกยางล้อเข้ากับกระทะ

เข็มขัดรัดหน้ายางชั้นที่ 1 อาจใช้วัสดุเสริมแรงเป็นไนลอน พอลิอะรามิด หรือเหล็ก เช่น เข็มขัดรัดหน้ายางชั้นที่ 1 ของยางเรเดียลสำหรับรถยนต์นั่งและรถกระบะมักทำจากไนลอน ส่วนเข็มขัดรัดหน้ายางชั้นที่ 1 ของยางสำหรับรถบรรทุกจะทำจากใยเหล็ก เข็มขัดรัดหน้ายางชั้นที่ 2 มักทำจากใยเหล็ก โครงยางทำจากพอลิเอสเตอร์ ใยเหล็ก ไนลอนหรือเรยอน โครงยางของยางเรเดียลสำหรับรถยนต์นั่งและรถกระบะอาจทำจากพอลิเอสเตอร์ ไนลอนหรือ เรยอนก็ได้ ส่วนโครงยางของรถบรรทุกอาจทำจากเหล็ก ผ้าใบหุ้มขอบยางมักทำจากพอลิเอสเตอร์ หรือ เรยอน ส่วนขอบลวดจะทำจากใยเหล็ก

ดังนั้นการยึดติดกันระหว่างยางคอมปาวด์และวัสดุเสริมแรงจึงเป็นหัวข้อสำคัญซึ่งจะได้กล่าวถึงในรายละเอียดต่อไป

ปัจจัยที่มีผลต่อความคงทนของยางรถยนต์ นอกจากความแข็งแรงการยึดติด (adhesion strength) ระหว่างยางคอมปาวด์และวัสดุเสริมแรงแล้ว อีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงคือความแข็งแรงของวัสดุเสริมแรง วัสดุเสริมแรงที่ใช้ในยุคแรกของยางรถยนต์

คือในประมาณปี ค.ศ. 1930 เป็นเส้นใยฝ้าย ต่อมา มีการใช้เรยอน และเมื่อมีความต้องการยางรถยนต์ที่ใช้ กับรถที่มีความเร็วสูง บรรทุกน้ำหนักมาก และอายุการใช้งานนาน ก็มีการเปลี่ยนแปลงวัสดุเสริมแรงให้เหมาะสมตามไปด้วย ปัจจุบันวัสดุเสริมแรงที่ใช้ ทั่วไปกับยางรถยนต์คือ เหล็ก ไนลอน และพอลิ เอสเทอร์ ซึ่งเราจะกล่าวถึงกลไกการยึดติดของวัสดุ เหล่านี้กับยางคอมปาวด์ต่อไป

ก่อนที่จะกล่าวถึงกลไกการยึดติดระหว่าง ยางคอมปาวด์กับวัสดุเสริมแรงแต่ละชนิด จะพิจารณา ทฤษฎีการยึดติด (adhesion theories) ซึ่งใช้อธิบายถึง การยึดติดกันของพื้นผิวสองชนิด โดยทั่วไปแล้ว กลไก การยึดติดกันระหว่างพื้นผิวสองชนิดสามารถจำแนก ออกได้เป็น 4 กลไกด้วยกันคือ

1. การยึดติดทางเชิงกล (mechanical interlocking) กลไกชนิดนี้ขึ้นกับความขรุขระของพื้นผิว และความสามารถของกาวที่แทรกเข้าไปล้อมรอบ พื้นผิวที่ขรุขระนั้น ถ้าล้อมรอบไม่หมดก็จะทำให้เกิด ช่องว่างขึ้น เป็นผลให้ความแข็งแรงของการยึดติดลดลง

2. พันธะเคมี (chemical bonding) กลไก ชนิดนี้จะมีได้ก็ต่อเมื่อเกิดปฏิกิริยาเคมีระหว่างหมู่ ฟังก์ชันของกาวและหมู่ฟังก์ชันที่อยู่บนพื้นผิวของรู พรุนที่ฐานรอง (substrates)

3. การแพร่ (diffusion) เมื่อพื้นผิวทั้งสองที่ มีความคล้ายคลึงกัน (compatible) มาสัมผัสกันก็จะมีการแพร่ของโมเลกุลที่เคลื่อนที่ได้เกิดขึ้น เป็นผลให้ เกิดอินเตอร์เฟซ (interphase) ขึ้น ความแข็งแรงการ ยึดติดขึ้นกับอุณหภูมิ น้ำหนักโมเลกุล เวลาที่สัมผัส กันก่อนที่โมเลกุลจะหยุดเคลื่อนที่ สัมประสิทธิ์การแพร่ ระยะทางระหว่างพื้นผิว และความเข้มข้นของ โมเลกุลที่เคลื่อนที่

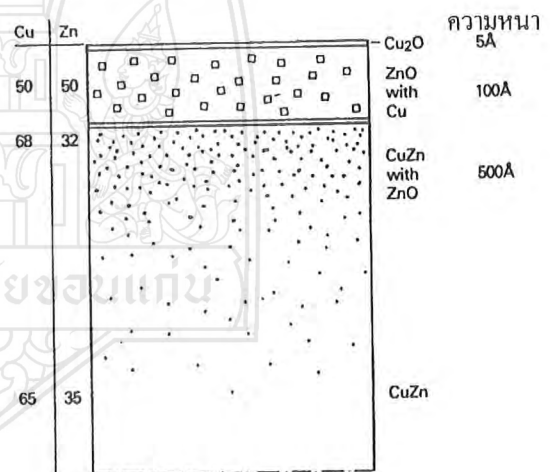
4. การดูดซับ (adsorption) กลไกนี้เกิดขึ้น โดยโมเลกุลของกาวไปยึดเกาะที่ใดที่หนึ่งของฐาน รองด้วยแรงบางชนิด เช่น พันธะไฮโดรเจน อันตร กิริยาแบบมีขั้ว แรงแวนเดอร์วาลส์หรือ อันตรกิริยา แบบมีการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอน ดังนั้น กลไกแบบนี้ จึงเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า พันธะเคมีชนิดทุติยภูมิ (secondary bonding)

สำหรับกลไกการยึดติดระหว่างยางคอมปาวด์กับวัสดุ เสริมแรงชนิดต่าง ๆ ก็สามารถอธิบายได้ด้วยกลไก เหล่านี้ การจะเกิดกลไกแบบใดขึ้นนั้นขึ้นกับประเภท ของพื้นผิว โดยในพื้นผิวบางประเภทก็อาจมีหลาย กลไกเกิดขึ้นพร้อมกันก็ได้ ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียด ของแต่ละพื้นผิวต่อไป

เมื่อทราบถึงทฤษฎีการยึดติดแล้ว เราจะมา พิจารณากลไกการยึดติดระหว่างยางคอมปาวด์กับ วัสดุเสริมแรงแต่ละชนิด

กลไกการยึดติดของคอร์ดเหล็ก กับยางคอมปาวด์

คอร์ดเหล็กที่ใช้เป็นองค์ประกอบของยาง รถยนต์จะถูกเคลือบด้วยทองเหลือง (CuZn) เสมอ เพื่อ ทำหน้าที่ยึดติดกับยางคอมปาวด์ ดังนั้นเมื่อคอร์ด เหล็กสัมผัสกับอากาศก็จะเกิดชั้นออกไซด์ของโลหะ ต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 3

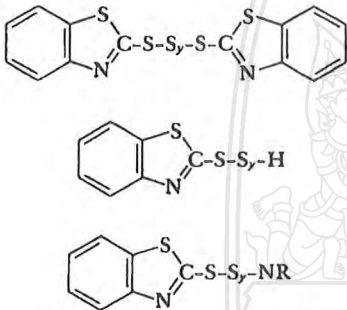


รูปที่ 3 การเกิดชั้นออกไซด์ของโลหะต่างๆ บนคอร์ดเหล็กที่เคลือบด้วยทองเหลือง

จากรูปจะเห็นว่าชั้นแรกจะเป็นชั้นของ คอปเปอร์ออกไซด์ (Cu_2O) ถัดไปเป็นชั้นของซิงค์ ออกไซด์ (ZnO) ที่มีคอปเปอร์(Cu)ร่วมอยู่ด้วย ชั้นถัด ลงไปเป็นทองเหลืองที่มีซิงค์ออกไซด์ร่วมอยู่ด้วย

ปริมาณของซิงค์ออกไซด์นี้จะ ลดลงไปเรื่อย ๆ จนหมด
ชั้นสุดท้ายเป็นหลัก หลักที่ใช้ผลิตคอร์ดหลัก
นอกจากมีธาตุหลักเป็นองค์ประกอบแล้วยังมี
คาร์บอน (0.65%) โครเมียม (0.05%) คอปเปอร์
(0.02%) แมงกานีส (0.60%) ซิลิกอน(0.25%) และ
ซัลเฟอร์ (0.03%) ธาตุเหล่านี้ทำหน้าที่เพิ่มความแข็งแรง
ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและช่วยในการ
ขึ้นรูปของเหล็ก

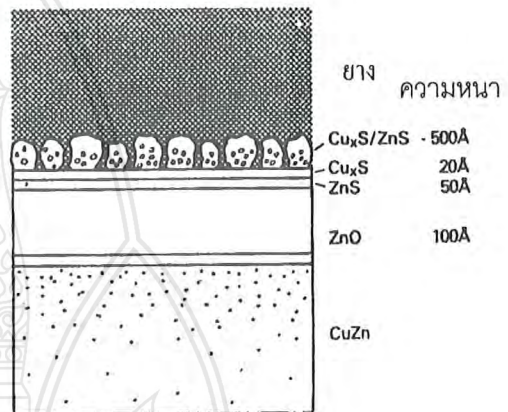
เมื่อนำคอร์ดหลักไปผลิตเป็นยางรถยนต์นั้น
ชั้นสุดท้ายของการผลิตยางรถยนต์คือการบ่มเพื่อ
ทำให้เกิดการเชื่อมโยงโมเลกุลของยางซึ่งทำให้ยางมี
ความแข็งแรง ในช่วงเริ่มต้นของการบ่ม ซัลเฟอร์จะทำ
ปฏิกิริยากับตัวเร่งปฏิกิริยาในยางคอมปาวด์ ทำให้
เกิดสารประกอบต่าง ๆ ที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา ($R-S^*_y$)
ซึ่งมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 4 สารเหล่านี้จะแพร่
ไปยังคอร์ดหลักและถูกดูดซับบนพื้นผิวของทองเหลือง
เมื่อรับอิเล็กตรอนจากคอปเปอร์ก็จะแตกตัวเป็น S^{2-}_y



รูปที่ 4 สารประกอบต่าง ๆ ซึ่งว่องไวต่อปฏิกิริยา
สูงที่เกิดขึ้นในขั้นตอนของการบ่ม

เนื่องจาก ซิงค์ออกไซด์มีคุณสมบัติเป็นสาร
กึ่งตัวนำ ทั้งอิเล็กตรอน คอปเปอร์ไอออน (Cu^+) และ
ซิงค์ไอออน (Zn^{2+}) ที่มีอยู่ในชั้นซิงค์ออกไซด์ จะ
แพร่ไปยังพื้นผิวของคอร์ด Cu^+ และ Zn^{2+} จะทำ
ปฏิกิริยากับ S^{2-}_y เกิดเป็นคอปเปอร์ซัลไฟด์ (Cu_xS)
โดยที่ x มีค่าอยู่ระหว่าง 1.8-2 และ ซิงค์ซัลไฟด์ (ZnS)
แต่เนื่องจากการเกิดซิงค์ซัลไฟด์เป็นปฏิกิริยาที่ช้า
ดังนั้น พื้นผิวของคอร์ดจะปกคลุมด้วยแผ่นฟิล์ม

คอปเปอร์ซัลไฟด์ ส่วน คอปเปอร์ออกไซด์ที่อยู่ชั้น
บนสุดจะเปลี่ยนเป็นคอปเปอร์ซัลไฟด์อย่างรวดเร็ว ใน
ขณะเดียวกันโมเลกุลของยางคอมปาวด์ก็จะไหล
เข้าไปในรูพรุนของคอปเปอร์ซัลไฟด์ และลือคไวกับ
ผลึกซัลไฟด์ทำให้สามารถยึดติดกับคอร์ดหลักไว้ได้
ดังแสดงในรูปที่ 5 สำหรับ ซิงค์ซัลไฟด์ และ เหล็ก
ซัลไฟด์ (FeS) จะไม่สามารถยึดติดกับยางคอมปาวด์
เพราะปฏิกิริยาเกิดได้ช้า และไม่มีรูพรุนจึงไม่สามารถ
ลือคกับโมเลกุลของยางได้

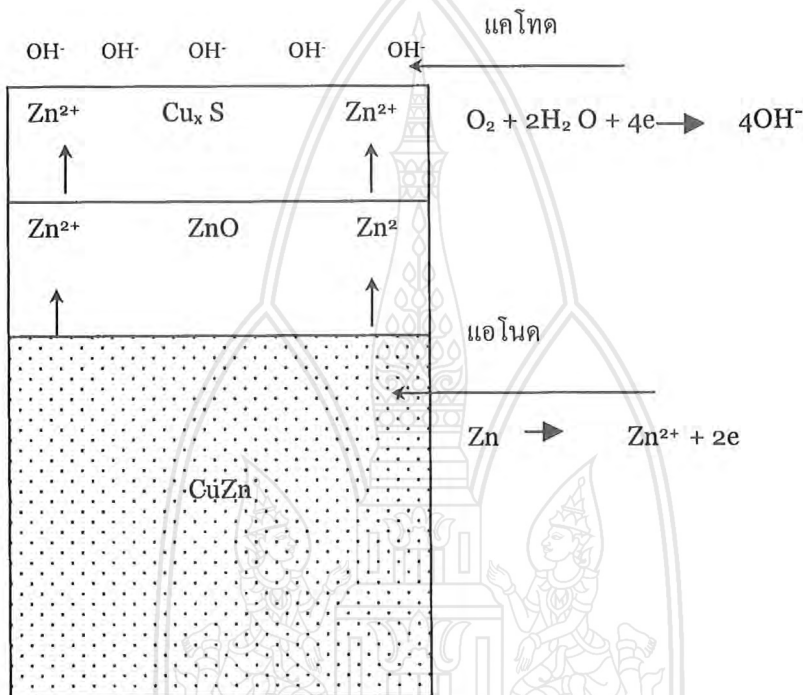


รูปที่ 5 พื้นผิวระหว่างหน้าของการยึดติดระหว่าง
ยางคอมปาวด์และคอร์ดหลัก

ความแข็งแรงและความทนทานของการยึดติด
ระหว่างคอร์ดหลักกับยางคอมปาวด์ขึ้นอยู่กับปัจจัย
หลายชนิด เช่น ปริมาณของคอปเปอร์ที่รวมอยู่ในชั้น
ซิงค์ออกไซด์ต้องมีมากพอ ถ้ามีคอปเปอร์น้อยหรือ
ไม่มีเลยจะทำให้เกิดคอปเปอร์ซัลไฟด์น้อยหรือไม่มีเลย
ผลก็คือทำให้เกิดชั้นซิงค์ซัลไฟด์ปกคลุมพื้นผิว เป็น
ผลให้ความแข็งแรงของการยึดติดต่ำ นอกจากนี้
ชั้นซิงค์ออกไซด์ต้องเป็นเนื้อเดียวกัน และมีความ
หนาไม่มากหรือน้อยเกินไป เพราะทั้งสองกรณีทำให้
เกิดซิงค์ซัลไฟด์แทนคอปเปอร์ซัลไฟด์ ซึ่งเมื่อได้รับ
ความร้อนนานเกินไป (overcure) ก็จะทำให้ความ
แข็งแรงของการยึดติดลดลงได้ เพราะผลึกของ
คอปเปอร์ซัลไฟด์โตเพิ่มขึ้น เนื่องจากคอปเปอร์ที่อยู่
ในชั้นซิงค์ออกไซด์ยังใช้ไม่หมด เมื่อผลึกคอปเปอร์

ซัลไฟด์โตขึ้นก็จะทำให้เกิดความเค้นขึ้น เนื่องจากผลึกจะขยาย และสุดท้ายก็เกิดการแตกหักของผลึกได้ออกซิเจนและความชื้นก็มีผลทำให้ความแข็งแรงของการยึดติดระหว่างคอร์ดเหล็กกับยางคอมปาวด์ลดลงโดยจะเกิดกระบวนการกัดกร่อนของทองเหลือง ปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นในกรณีที่อยู่ในสภาวะแห้ง กระบวนการกัดกร่อนเป็นปฏิกิริยารีดอกซ์ โดย

ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ได้ซิงค์ไฮดรอกไซด์ (Zn^{2+}) ส่วนออกซิเจนและน้ำรับอิเล็กตรอนจากซิงค์แล้วเกิดปฏิกิริยารีดักชัน ซิงค์ไฮดรอกไซด์ (Zn^{2+}) ที่เกิดขึ้นจะแพร่ผ่านชั้นของ ซิงค์ออกไซด์ ไปยังพื้นผิวและเกิดเป็น $ZnO/Zn(OH)_2$ ปกคลุมชั้นคอปเปอร์ซัลไฟด์ ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 อิทธิพลของออกซิเจนและความชื้นต่อกระบวนการกัดกร่อนของคอร์ดเหล็ก

นอกจากนี้ ออกซิเจนยังสามารถออกซิไดซ์คอปเปอร์ซัลไฟด์ไปเป็นคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) ซึ่งคอปเปอร์ซัลเฟตนี้มีความแข็งแรงน้อยกว่าคอปเปอร์ซัลไฟด์และความชื้นยังสามารถละลายคอปเปอร์ซัลเฟตได้ด้วย ไฮดรอกไซด์ของคอปเปอร์ที่เกิดขึ้นจะละลายเข้าไปในยางคอมปาวด์ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในยางคอมปาวด์เร็วขึ้นด้วย

องค์ประกอบที่สำคัญของยางคอมปาวด์ เช่น อัตราส่วนของซัลเฟอร์ต่อตัวเร่ง มีผลต่อความแข็งแรงของการยึดติด เพื่อให้ได้การยึดติดที่แข็งแรง

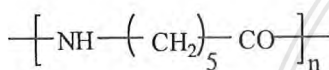
อัตราส่วนของซัลเฟอร์ต่อตัวเร่งต้องมากกว่า 4 นอกจากนี้ ตัวเร่งจะต้องไม่เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียรกับทองแดง

การเติมเกลือโคบอลต์หรือนิกเกิลที่ละลายได้ในยางคอมปาวด์เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยเพิ่มความแข็งแรงและความคงทนของการยึดติดระหว่างคอร์ดเหล็กกับยางคอมปาวด์ โดยโคบอลต์และนิกเกิลจะไปลดการนำไฟฟ้าของชั้นซิงค์ออกไซด์ ทำให้ซิงค์ไฮดรอกไซด์ (Zn^{2+}) แพร่ผ่านฟิล์มนี้ได้ช้าลง กระบวนการกัดกร่อนจึงเกิดได้น้อย นอกจากนี้โคบอลต์ยังทำให้ความหนา

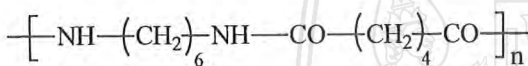
แน่นของการเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุลในยางคอมปาวด์เพิ่มขึ้น เป็นผลให้มอดูลัสของยางเพิ่มขึ้น ทำให้แรงที่ใช้สำหรับดึงเส้นใยออกจากยางคอมปาวด์สูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตามโคบอลต์จะทำปฏิกิริยากับซัลเฟอร์เพื่อเกิดเป็นชั้นคอปเปอร์ซัลไฟด์ ดังนั้นเมื่อมีการเติมโคบอลต์ลงไปยางคอมปาวด์ จึงต้องเติมซัลเฟอร์เพิ่มมากขึ้นด้วย

กลไกการยึดติดของคอร์ดีนลอนกับยางคอมปาวด์

เส้นใยลอนที่ใช้ผลิตคอร์ดีนที่มี 2 ชนิด คือ ไนลอน 6 และไนลอน 6/6 ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในรูปที่ 7



1) ไนลอน 6



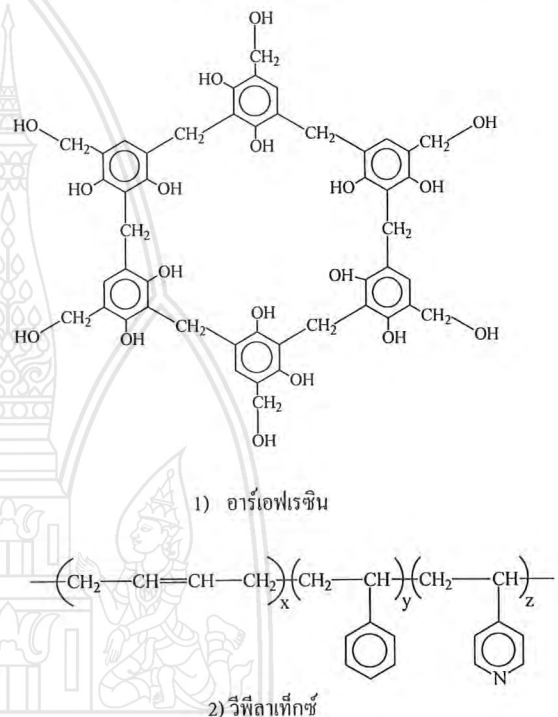
2) ไนลอน 6/6

รูปที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของ ไนลอน 6(1) และ ไนลอน 6/6 (2)

ไนลอนสองชนิดนี้มีสมบัติคล้ายกันมาก ไนลอนไม่สามารถยึดติดกับยางคอมปาวด์ได้ด้วยตัวเองจึงต้องใช้กาวเชื่อมโยงระหว่างคอร์ดีนกับยางคอมปาวด์ เนื่องจาก คอร์ดีนและยางมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันมากดังที่กล่าวมาแล้วในตอนต้นว่าคอร์ดีนมีความเป็นขั้วและมีมอดูลัสสูงในขณะที่ยางคอมปาวด์ไม่มีความเป็นขั้วและมีมอดูลัสต่ำ ดังนั้น กาวที่ใช้ต้องสามารถถ่ายเทแรงจากยางไปยังคอร์ดีนได้

กาวที่นิยมใช้ในการยึดติดยางคอมปาวด์กับคอร์ดีนลอนมีชื่อว่า รีซอร์ซินัล-ฟอร์มัลดีไฮด์-เลเท็กซ์ (resorcinol-formaldehyde-latex) หรือ เรียกชื่อย่อว่า

อาร์เอฟแอล (RFL) ซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือ รีซอร์ซินัล-ฟอร์มัลดีไฮด์ เรซิน (resorcinol-formaldehyde resin) หรือ เรียกชื่อย่อว่า อาร์เอฟเรซิน (RF resin) กับเลเท็กซ์ เลเท็กซ์ที่ใช้มักได้แก่ ไวนิลไพรีดีน เลเท็กซ์หรือวีพีเลเท็กซ์ ซึ่งมีองค์ประกอบของ ไวนิลไพรีดีน บิวตะไดอินและสไตรีน โครงสร้างของอาร์เอฟเรซินและวีพีเลเท็กซ์ แสดงในรูปที่ 8

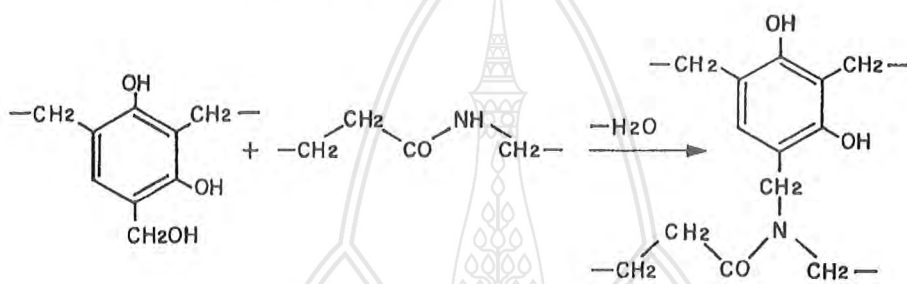


รูปที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของ อาร์เอฟเรซิน (1) และวีพีเลเท็กซ์ (2)

การยึดติดระหว่างคอร์ดีนกับยางคอมปาวด์ด้วยกาวจะต้องมีการเชื่อมโยงระหว่างพื้นผิวเกิดขึ้น 2 แบบ คือ การเชื่อมโยงพื้นผิวของยางคอมปาวด์กับกาว และ การเชื่อมโยงพื้นผิวของกาวกับคอร์ดีนลอน

กระบวนการที่จะยึดยางคอมปาวด์ติดกับคอร์ดีนลอนทำได้โดยการนำกาวไปติดไว้กับคอร์ดีนก่อนโดยการจุ่มคอร์ดีนลงในกาวแล้วนำไปผ่านความร้อนเพื่อให้คอร์ดีนแห้งและคงตัวที่อุณหภูมิ 200 ถึง 240 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5 ถึง 1 นาที สำหรับ

ไนลอน 6 และอุณหภูมิ 220 ถึง 230 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 0.5 ถึง 1 นาที สำหรับไนลอน 6/6 ในช่วงนี้ปฏิกิริยาระหว่างคอร์ดกับกาวจะแข็งแรง และการเชื่อมโยงโมเลกุลในอาร์เอฟแอลก็จะเกิดขึ้น ปฏิกิริยาระหว่างคอร์ดไนลอนกับกาวที่สำคัญคือปฏิกิริยาระหว่างหมู่เมทิลอล (methylol) ในอาร์เอฟเรซินโมเลกุลกับไฮโดรเจน ที่เกาะกับไนโตรเจนในโมเลกุลของไนลอนดังแสดงในรูปที่ 9 หลังจากนั้นจึงนำคอร์ดและยางคอมปาวด์ไปเข้ากระบวนการผลิต



รูปที่ 9 ปฏิกิริยาเคมีของอาร์เอฟเรซินกับไนลอน

นอกจากการเกิดพันธะเคมีระหว่างยางกับกาวแล้วยังมีการแพร่ระดับโมเลกุลและการเคลื่อนที่ของโมเลกุลทางเชิงกล เกิดขึ้นด้วย ดังนั้นการยึดติดระหว่างไนลอนกับยางคอมปาวด์ด้วยกาวอาร์เอฟแอล จึงมีความแข็งแรงสูง

ปัจจัยที่มีผลต่อความแข็งแรงของการยึดติดยางคอมปาวด์และคอร์ดไนลอนมีหลายประการที่ต้องคำนึงถึงเพื่อให้ได้การยึดติดที่เหมาะสม

1. สารหล่อลื่นที่ใช้ในการผลิตคอร์ด สารเหล่านี้บางชนิดจะเพิ่มความแข็งแรงของการยึดติด แต่บางชนิดก็ด้านทานการยึดติด

2. ปริมาณของกาวอาร์เอฟแอลที่เกาะอยู่กับคอร์ดต้องเหมาะสมโดยจะอยู่ในช่วง 4-6 เปอร์เซ็นต์

3. ความลึกที่กาวแทรกเข้าไปในเนื้อของคอร์ดต้องเหมาะสมโดยจะอยู่ในช่วง 2-3 มิลลิเมตร (filament) ที่เป็นองค์ประกอบของคอร์ด

4. อัตราส่วนของฟอรั่มลิตไฮด์ต่อรีซอร์ซินอลในกาวอาร์เอฟแอล อยู่ในช่วง 1.2 ต่อ 1 ถึง 2 ต่อ 1

ยางรถยนต์ และในขั้นตอนสุดท้ายของการผลิตยางรถยนต์คือการทำให้ยางคงรูปด้วยการบ่มโดยความร้อน (cure) ในขั้นตอนการบ่มนี้ ยางคอมปาวด์จะเกิดการเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุล (crosslink) โดยซัลเฟอร์ที่ขึ้นซัลเฟอร์ที่อยู่ในยางคอมปาวด์จะแพร่เข้าไปในกาวแล้วทำให้เกิดการเชื่อมโยงโมเลกุลของยางที่อยู่ในยางคอมปาวด์กับยางที่เป็นองค์ประกอบของเลเท็กซ์ขึ้น เรียกว่า การวัลคาไนเซชันร่วมหรือโควัลคาไนเซชัน (covulcanization)

5. อัตราส่วนที่เหมาะสมของอาร์เอฟเรซินต่อเลเท็กซ์ในกาวอาร์เอฟแอลคือ อาร์เอฟเรซิน 15 ถึง 20 ส่วนต่อเลเท็กซ์ 100 ส่วน

6. พีเอช ของกาวอาร์เอฟแอลควรมีค่าประมาณ 10

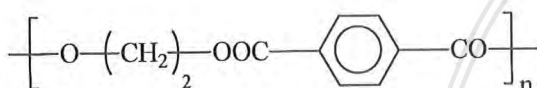
7. ชนิดของเลเท็กซ์ เลเท็กซ์ที่ใช้กันโดยทั่วไปประกอบด้วย บิวตะไดอิน 70% ไวนิลไพโลดีน 15 % และ สไตรีน 15 %

8. สภาวะของฟริตเมนต์ต้องเหมาะสมดังที่กล่าวมาแล้วเพราะถ้าให้ความร้อนต่ำเกินไปจะทำให้ปฏิกิริยาของกาวอาร์เอฟแอล กับคอร์ดไนลอนไม่เพียงพอ แต่ถ้าหากความร้อนสูงเกินไปจะทำให้กาวอาร์เอฟแอลมีการเชื่อมโยงโมเลกุลจนถึงขั้นที่ไม่สามารถเข้ากันได้กับยางคอมปาวด์

9. ยางคอมปาวด์ ที่ใช้เชื่อมโยกับคอร์ดต้องสามารถไหลมาสัมผัสกับคอร์ดได้เป็นอย่างดีตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นของการบ่ม

กลไกการยึดติดของคอรัลพอลิเอสเทอร์กับยางคอมปาวด์

เส้นใยพอลิเอสเทอร์ที่ใช้ผลิตคอรัลเกือบทั้งหมดได้จากพอลิเอทิลีนเทอร์เรพทาเรต (polyethyleneterephthalate) หรือ เรียกโดยย่อว่า พีโอที (PET) ซึ่งจัดเป็นพอลิเอสเทอร์ชนิดหนึ่งมีโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 โครงสร้างทางเคมีของพีโอที

เนื่องจากพีโอทีไม่มีหมู่ไฮโดรเจนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาภายในโมเลกุลจึงทำให้พื้นผิวของพีโอทีมีความเป็นขี้ด้า (hydrophobic) ดังนั้นจึงมีความสามารถในการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกาวอาร์เอฟแอลได้น้อยเป็นเหตุให้ความแข็งแรงของการยึดติดระหว่างคอรัลพอลิเอสเทอร์กับยางคอมปาวด์ต่ำ เพื่อให้การยึดติดระหว่างคอรัลพอลิเอสเทอร์กับยางคอมปาวด์สูงเพียงพอในการใช้งานจึงได้มีวิธีการปรับปรุงหลายวิธีได้แก่

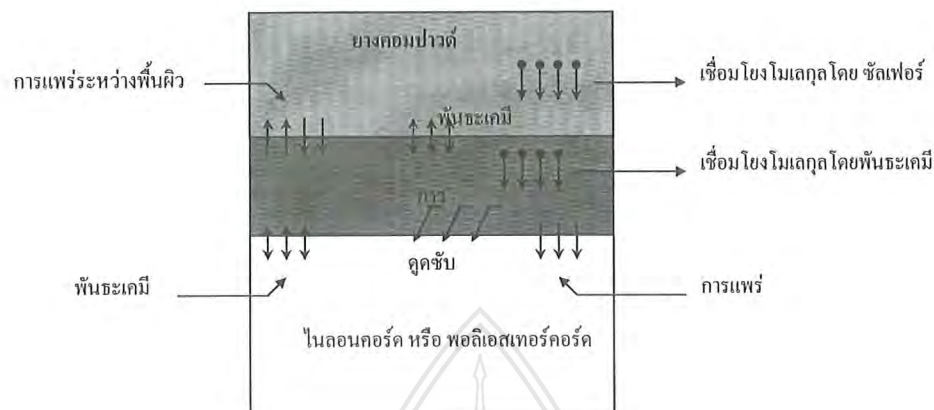
1. วิธีการเติมกาวแบบสองขั้นตอน (two-step process) กระบวนการนี้ ในขั้นแรกเติมสารเคมีที่สามารถกระตุ้นพื้นผิวของพีโอที เช่น สารประกอบอีพอกไซค์ไอโซไซยานเนต เพื่อให้มีความเป็นขี้ด้ามากขึ้น และในขั้นต่อไปเป็นการเติมกาวอาร์เอฟแอลมาตรฐานที่ใช้กับคอรัลในลอนลงไป

2. วิธีการเติมกาวแบบขั้นเดียว (one-step process) กระบวนการนี้จะเติมสารเคมีที่สามารถกระตุ้นพื้นผิวของพีโอทีลงไปในการอาร์เอฟแอล เช่น สารประกอบคลอโรฟีนอล แล้วเติมกาวที่ใช้ลงในคอรัลครั้งเดียว

3. วิธีการเติมสารเคมีที่กระตุ้นพื้นผิวของเส้นใยพีโอทีในขั้นตอนการผลิต ก่อนที่จะนำมาผลิตคอรัล คอรัลที่ได้จึงสามารถยึดติดกับกาวอาร์เอฟแอลมาตรฐานได้

4. วิธีการปรับปรุงพื้นผิวของเส้นใยพีโอทีที่ผลิตเป็นคอรัลแล้วโดยการกราฟท์ (graft) สารเคมีลงบนพื้นผิวของพีโอทีหรือทรีตเมนต์ด้วยพลาสมาเพื่อให้พื้นผิวพีโอทีมีหมู่ฟังก์ชันชนิดต่างๆ เช่น คาร์บอนิล ไฮดรอกซิล เป็นผลให้สามารถยึดติดกับกาวอาร์เอฟแอลมาตรฐานได้

ทั้ง 4 วิธีที่กล่าวมาข้างต้นมีจุดประสงค์เหมือนกัน คือ ทำให้กาวและพื้นผิวของคอรัลพีโอทีมีอันตรกิริยาต่อกันเพิ่มมากขึ้นซึ่งจะทำให้กาวสามารถแพร่และแทรกเข้าไปในพื้นผิวของคอรัลพีโอทีได้ แรงกระทำระหว่างพื้นผิวทั้งสองอาจเป็นพันธะไฮโดรเจนหรือโคโพล-โคโพล แต่ยังไม่มียางานใดพบว่ามีพันธะเคมีเกิดขึ้น ส่วนการยึดติดระหว่างกาวกับยางคอมปาวด์ก็จะมีกลไกเช่นเดียวกับที่เกิดกับคอรัลในลอนสรุปได้ว่า กลไกการยึดติดของคอรัลพีโอทีหรือคอรัลในลอนกับยางคอมปาวด์สามารถเขียนเป็นแผนภาพได้ดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 แผนภาพแสดงกลไกการยึดติดของคอร์ดพียูหรือคอร์ดไนลอนกับยางคอมปาวด์

ภายในยางคอมปาวด์จะเกิดการเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุลเป็นโครงร่างตาข่ายขึ้น โดยมีซัลเฟอร์เป็นตัวเชื่อมโยง สำหรับพื้นผิวระหว่างยางคอมปาวด์กับกาวอาร์เอฟแอล จะมีการเชื่อมโยงโมเลกุลเกิดขึ้นทั้งระหว่างโมเลกุลของยางกับเลเท็กซ์ หรือ อาร์เอฟเรซินกับยางและยังมีการแพร่ระหว่างพื้นผิวด้วย ภายในกาวอาร์เอฟแอลจะมีการเชื่อมโยงโมเลกุลของอาร์เอฟเรซินทำให้เกิดเป็นโครงสร้างแบบไอพีเอ็น (interpenetrating network, IPN)

สำหรับพื้นผิวของกาวกับคอร์ดไนลอนจะเกิดพันธะเคมีระหว่างไนลอนกับอาร์เอฟเรซินได้ นอกจากนี้ยังมีอันตรกิริยาระหว่างอาร์เอฟเรซินกับพื้นผิวของคอร์ดไนลอนได้ ส่วนพื้นผิวของคอร์ดพอลิเอสเตอร์กับกาวอาร์เอฟแอล หรือกาวอาร์เอฟแอลที่มีการดัดแปลงโดยการเติมสารที่สามารถกระตุ้นพื้นผิวของคอร์ดพอลิเอสเตอร์จะไม่มีพันธะเคมีแบบปฐมภูมิเกิดขึ้น จะมีเพียงอันตรกิริยาโดยพันธะทุติยภูมิชนิดต่างๆ เท่านั้นซึ่งทำให้พื้นผิวทั้งสองมีความเป็นขั้วใกล้เคียงกัน

บรรณานุกรม

- Chanel, S. and Pebere, N. (2001). An investigation on the corrosion of brass-coated steel cords for types by electrochemical techniques. *Corrosion Science*. 43:413-427.
- Kamma, T. (1992). Adhesion technology of textiles to rubber. *International Polymer Science and Technology*. 19(8):32-40.
- Mark, J. E, Erman, B. and Eirich, F. R. (1994). *Science and Technology of Rubber*. New York: Academic Press. p.675-702.
- Mather, J. (1971). Development of polyester-rubber adhesion. *Br. Polymer Journal*. 3:58-65.
- Porter, N.K. (1993). Some major variable in RFL formulation, and their effect on dipped cord properties. *Journal of Coated Fabrics*. 23:34-45.
- Rim, P. R. (1996). The high performance of PEN fibers in tyre. *Kaustschuk Gummi Kunststoffe*. 49:418-423.
- Solomon, T.S. (1985). Systems for tire cord-rubber adhesion. *Rubber Chemistry and Technology*. 58: 561-576.
- Wootton, D.B. (1982). *Textile Reinforcement of Elastomers*. New Jersey: Applied Science Publishers. p.97-115.

Some Special Properties Of Determinants

Niroot Meekoed¹

Abstract

In this research, the following theories have been found.

Theorem 3. Let $A \in M_n(R)$ be such that the greatest common divisor of

$$\sum_{j=1}^n a_{1j}, \sum_{j=1}^n a_{2j}, \dots, \sum_{j=1}^n a_{nj} \text{ exists, then } \left(\sum_{j=1}^n a_{1j}, \sum_{j=1}^n a_{2j}, \dots, \sum_{j=1}^n a_{nj} \right) \mid \det A.$$

Theorem 4. Let $A \in M_n(R)$ be such that $\sum_{j=1}^n a_{kj} = 0$, for all $k \in \{1, 2, \dots, n\}$,

then $\det A = 0$.

Introduction

In this section, some special properties of determinants over commutative ring with identity are studied.

Preliminaries

The symbol $M_n(R)$ denoted the set of $n \times n$ matrices over R , where R is a commutative ring with identity. The symbol A_{ij} denoted the cofactor of a_{ij} . The greatest common divisor of $a_1, a_2, \dots, a_n$ is denoted by $(a_1, a_2, \dots, a_n)$.

Theorem 1. If $A \in M_n(R)$, then $\det A = \sum_{i=1}^n a_{ij} A_{ij}$ (Hoffman and Kunze, 1971).

Theorem 2. If $A \in M_n(R)$, then $\sum_{i=1}^n a_{ik} A_{ij} = 0$, where $j \neq k$ (Hoffman and Kunze, 1971).

Some special properties of determinants

Theorem 3. Let $A \in M_n(R)$ be such that the greatest common divisor of

$$\sum_{j=1}^n a_{1j}, \sum_{j=1}^n a_{2j}, \dots, \sum_{j=1}^n a_{nj} \text{ exists, then } \left(\sum_{j=1}^n a_{1j}, \sum_{j=1}^n a_{2j}, \dots, \sum_{j=1}^n a_{nj} \right) \mid \det A.$$

¹ Faculty of Education, Naresuan University, Phitsanulok 65000

Proof Let $m = \left(\sum_{j=1}^n a_{1j}, \sum_{j=1}^n a_{2j}, \dots, \sum_{j=1}^n a_{nj} \right)$.

Then

$$m \mid \sum_{j=1}^n a_{ij} \quad \text{for all } i \in \{1, 2, \dots, n\}.$$

That is

$$\begin{aligned} m &\mid (a_{11} + a_{12} + \dots + a_{1n}) \\ m &\mid (a_{21} + a_{22} + \dots + a_{2n}) \\ m &\mid (a_{31} + a_{32} + \dots + a_{3n}) \\ &\vdots \\ m &\mid (a_{n1} + a_{n2} + \dots + a_{nn}). \end{aligned}$$

This implies that

$$\begin{aligned} m &\mid (a_{11} + a_{12} + \dots + a_{1n}) A_{11} \\ m &\mid (a_{21} + a_{22} + \dots + a_{2n}) A_{21} \\ m &\mid (a_{31} + a_{32} + \dots + a_{3n}) A_{31} \\ &\vdots \\ m &\mid (a_{n1} + a_{n2} + \dots + a_{nn}) A_{n1}. \end{aligned}$$

That is

$$\begin{aligned} m &\mid (a_{11}A_{11} + a_{12}A_{11} + \dots + a_{1n}A_{11}) \\ m &\mid (a_{21}A_{21} + a_{22}A_{21} + \dots + a_{2n}A_{21}) \\ m &\mid (a_{31}A_{31} + a_{32}A_{31} + \dots + a_{3n}A_{31}) \\ &\vdots \\ m &\mid (a_{n1}A_{n1} + a_{n2}A_{n1} + \dots + a_{nn}A_{n1}). \end{aligned}$$

Clearly,

$$\begin{aligned} m &\mid ((a_{11}A_{11} + a_{12}A_{11} + \dots + a_{1n}A_{11}) + (a_{21}A_{21} + a_{22}A_{21} + \dots + a_{2n}A_{21}) + \\ &\quad (a_{31}A_{31} + a_{32}A_{31} + \dots + a_{3n}A_{31}) + \dots + (a_{n1}A_{n1} + a_{n2}A_{n1} + \dots + a_{nn}A_{n1})). \end{aligned}$$

It follows that

$$\begin{aligned} m &\mid ((a_{11}A_{11} + a_{21}A_{21} + a_{31}A_{31} + \dots + a_{n1}A_{n1}) + \\ &\quad (a_{12}A_{11} + a_{22}A_{21} + a_{32}A_{31} + \dots + a_{n2}A_{n1}) + \\ &\quad (a_{13}A_{11} + a_{23}A_{21} + a_{33}A_{31} + \dots + a_{n3}A_{n1}) + \dots + \\ &\quad (a_{1n}A_{11} + a_{2n}A_{21} + a_{3n}A_{31} + \dots + a_{nn}A_{n1})) \end{aligned}$$

but $\sum_{i=1}^n a_{ik}A_{ij} = 0$, where $j \neq k$, then $m \mid (a_{11}A_{11} + a_{21}A_{21} + a_{31}A_{31} + \dots + a_{n1}A_{n1})$.

Hence $m \mid \det A$.

□

Corollary 1. Let $A \in M_n(R)$ be such that the greatest common divisor of

$$\sum_{i=1}^n a_{i1}, \sum_{i=1}^n a_{i2}, \dots, \sum_{i=1}^n a_{in} \text{ exists, then } \left(\sum_{i=1}^n a_{i1}, \sum_{i=1}^n a_{i2}, \dots, \sum_{i=1}^n a_{in} \right) \mid \det A.$$

Proof Obvious. □

Theorem 4. Let $A \in M_n(R)$ be such that $\sum_{j=1}^n a_{kj} = 0$, for all $k \in \{1, 2, \dots, n\}$,

then $\det A = 0$.

Proof Suppose that $\sum_{j=1}^n a_{kj} = 0$ for all $k \in \{1, 2, \dots, n\}$.

That is

$$\begin{aligned} a_{11} + a_{12} + \dots + a_{1n} &= 0 \\ a_{21} + a_{22} + \dots + a_{2n} &= 0 \\ a_{31} + a_{32} + \dots + a_{3n} &= 0 \\ &\vdots \\ a_{n1} + a_{n2} + \dots + a_{nn} &= 0. \end{aligned}$$

This implies that

$$\begin{aligned} (a_{11} + a_{12} + \dots + a_{1n}) A_{11} &= 0 \\ (a_{21} + a_{22} + \dots + a_{2n}) A_{21} &= 0 \\ (a_{31} + a_{32} + \dots + a_{3n}) A_{31} &= 0 \\ &\vdots \\ (a_{n1} + a_{n2} + \dots + a_{nn}) A_{n1} &= 0. \end{aligned}$$

That is

$$\begin{aligned} a_{11}A_{11} + a_{12}A_{11} + \dots + a_{1n}A_{11} &= 0 \\ a_{21}A_{21} + a_{22}A_{21} + \dots + a_{2n}A_{21} &= 0 \\ a_{31}A_{31} + a_{32}A_{31} + \dots + a_{3n}A_{31} &= 0 \\ &\vdots \\ a_{n1}A_{n1} + a_{n2}A_{n1} + \dots + a_{nn}A_{n1} &= 0. \end{aligned}$$

So we have

$$\begin{aligned} &(a_{11}A_{11} + a_{12}A_{11} + \dots + a_{1n}A_{11}) + (a_{21}A_{21} + a_{22}A_{21} + \dots + a_{2n}A_{21}) + \\ &(a_{31}A_{31} + a_{32}A_{31} + \dots + a_{3n}A_{31}) + \dots + (a_{n1}A_{n1} + a_{n2}A_{n1} + \dots + a_{nn}A_{n1}) = 0. \end{aligned}$$

It follows that

$$\begin{aligned} &(a_{11}A_{11} + a_{21}A_{21} + \dots + a_{n1}A_{n1}) + (a_{12}A_{11} + a_{22}A_{21} + \dots + a_{n2}A_{n1}) + \\ &(a_{13}A_{11} + a_{23}A_{21} + \dots + a_{n3}A_{n1}) + \dots + (a_{1n}A_{11} + a_{2n}A_{21} + \dots + a_{nn}A_{n1}) = 0 \end{aligned}$$

but $\sum_{i=1}^n a_{ik}A_{ij} = 0$, where $j \neq k$, hence $a_{11}A_{11} + a_{21}A_{21} + a_{31}A_{31} + \dots + a_{n1}A_{n1} = 0$.

Therefore $\det A = 0$. □

Corollary 2. Let $A \in M_n(R)$ be such that $\sum_{i=1}^n a_{ik} = 0$, for all $k \in \{1, 2, \dots, n\}$, then $\det A = 0$.

Proof Obvious. □

Reference

Hoffman, K. and Kunze, R. (1971). Linear Algebra. 2nd ed. New Jersey: Prentice-Hall. p.158-159.



The Indirect Tensile Strength of Weak Rock Materials as Determined by H-Ometer Test in Diametrical Position

H. Omar¹, J. Ahmad¹, M.S. Salsidu¹, N.M. Adam¹ and S. Hassim¹

Abstract

A device called H-Ometer has been developed to measure the indirect tensile strength of weak rock materials. The device is small and portable with 12 mm in diameter and 75 mm in length. In this study, the H-Ometer test was conducted on diametrical position of the weak rock samples which are subjected to incremental load until failure in tension occurs. The results for H-Ometer tests were then calculated for the indirect tensile strength. The indirect tensile strength of weak rocks are presented. The accuracy of the H-Ometer test in diametrical position is further investigated by simulating the test using finite element analysis. Both results are presented.

Introduction

The study of weak rock has received considerable attention over the past two decades due to extensive construction on them (Oliveira, 1993). Weak rock is sometimes known as soft rock, indurated soil or low-strength rock which is assessed from the rheological properties of rocks, namely deformability, uniaxial compressive strength, shear strength and their time dependency. It is important to define the lower limit for weak rocks; the borderline between soils and rocks (Rocha et al., 1966), and two parameters which serve as the best definition of the boundary between soils and rocks are the cohesion and uniaxial compressive strength. According to the International Society of Rock Mechanics (Brown, 1981) weak rock (including extremely weak and very weak rock)

ranges from 0.25 MPa to 25 MPa in compressive strength. However, this is not straightforward as the standard definitions for weak rock are significantly different according to various standards.

Vutukuri et al. (1974) illustrated that the evaluation of the tensile strength of rock was not a simple matter. The situation was further complicated with the presence of microscopic flaws in the rock material. Various studies to determine tensile testing of artificial weak rock, which was considered as difficult task, were conducted by Choi et al. (1988). In order to investigate the effects of test technique, some common laboratory test for tensile strength of weak rock was conducted on artificial weak rock. The analysis using finite element methods was also conducted to show if methods of interpretation are appropriate to the geometry and boundary conditions.

¹ Mountainous Terrain Development Research Centre, Faculty of Engineering, Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor, Malaysia

The determination of tensile strength of weak rock is a difficult task due to the inherent variability of natural weak rocks. Omar (2000) and Omar and Salsidu (2001) have developed a device to measure the indirect tensile strength of weak rocks. The device is small and portable with 12 mm in diameter and 75 mm in length (Figure 1). The device works with digital pump whereby the digital pump is an equipment to supply pressure by means of water as a medium to the main body of the H-Ometer. The detail of the H-Ometer is given by Omar (2000).

In this study, an artificial weak rock simulated as weakly cemented sandstone, which is assumed to be isotropic and homogeneous and contains no discontinuities was investigated based on the model of Bandis (1980). The properties of this artificial weak rock is similar to the naturally occurring weak sedimentary rock, which can be controlled and accurately determined in laboratory. The sample can also be reproduced within very high tolerances of geometry and well-defined material properties. The purpose of this research is to present the usefulness of the H-Ometer test which is employed to measure the indirect tensile strength of weak rock in diametrical testing position.

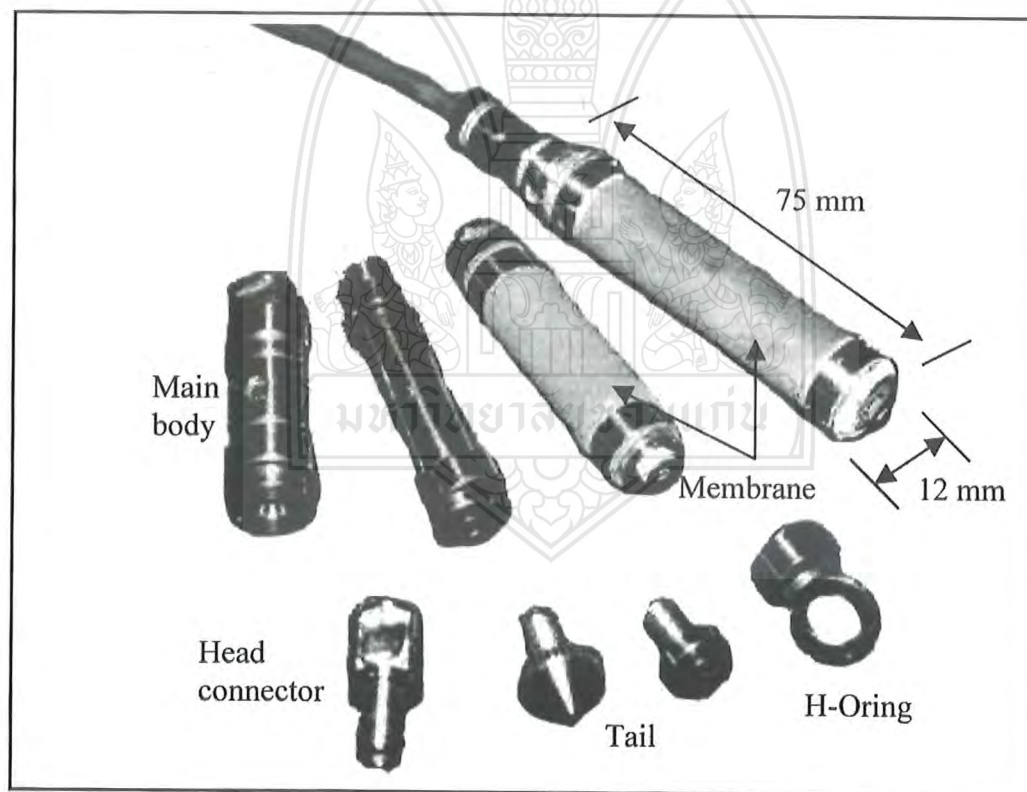


Figure 1 Schematic diagram of H-Ometer

The H-Ometer

The H-Ometer consists of six components, namely the main body, head connector, H-Oring, tails, tubing and membrane (Omar and Salsidu, 2001). The head connector, H-Oring, tails and membrane

components are attached to the main body and connected to the control unit via tubing which supplies the pressure to be exerted through annulus of the probe (Figure 2).

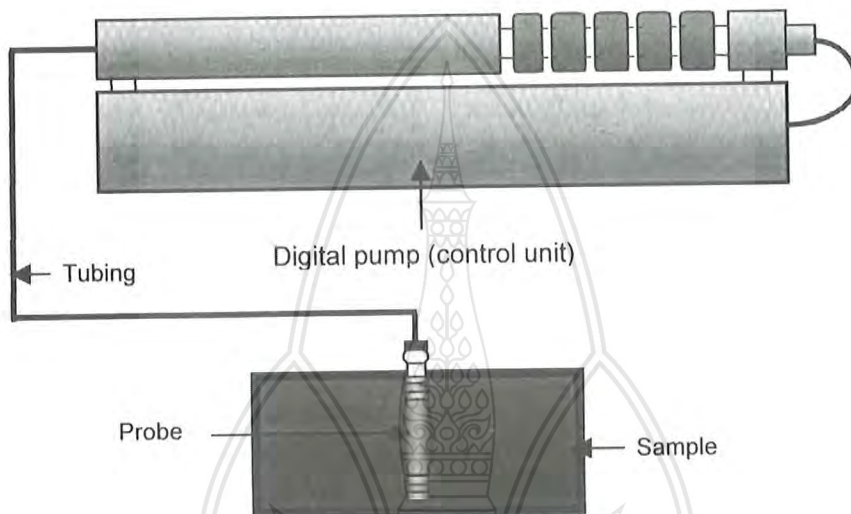


Figure 2 Schematic diagram of the H-Ometer set-up

Sample preparation and laboratory test

Several techniques can be adopted to produce the artificial weak rock. The most important element in the preparation of the weak rock specimen is the consistency in controlling its compressive strength and material properties (Bandis, 1980). This is because the quality assurance of the specimen is important to enable mixing at different batches of specimen at different time. It is therefore important to determine the curing period and strength gained by the specimen.

The specimen modeled is assured of its consistency in uniaxial compressive strength and material properties. The uniaxial compressive strength reveals that the specimen falls in the range of weakly

cemented sandstone. Table 1 shows the results of average strength acquired during the curing process.

The test begins when the membrane enclosing the probe and connected to the pump starts to inflate and gradually reaches the wall of pre-drilled hole at initial pressure, P_0 . In the elastic phase of the H-Ometer test curve, failure in tension involves crack initiation and crack propagation criterion. Crack initiation is assumed to occur when the minor principal stress exceeds the tensile strength of the material. Meanwhile, crack propagation can be determined by the linear elastic fracture mechanics theory, which is beyond the scope and limitation of this study.

The cavity expansion is assumed to start when the applied pressure is equal to the *in situ* horizontal stress, σ_h . Initially, the weak rock is considered to behave in the elastic manner where the material surrounding the probe is assumed to be linearly elastic. As pressure is increased further, the material starts to fail in tension in the form of cracks that initiate at the cavity wall and propagate into the surrounding material.

Curing process and strength of artificial weak rock

In this study, the technique used for curing process was done by oven drying the

specimens at 40°C for eight days before the actual strength is acquired. The oven drying technique was selected for curing instead of leaving it in normal room temperature due to the humid condition and inconsistency of temperature that does not permit the specimen to be completely cured and therefore is time consuming. Figure 3 shows the strength gained throughout the curing period. The graph plotted clearly shows that compressive strength remains consistent once the curing period reaches the eighth day. The curing test conducted on these specimens was recorded at two-day intervals. Average results of two specimens were obtained from uniaxial compressive strength test using the uniaxial compression testing device (Figure 4).

Table 1 Curing test results of artificial weak rock

Average uniaxial compressive strength (MPa)	Curing duration (days)
0.713 ± 0.2976	2
2.312 ± 0.2976	4
3.198 ± 0.2976	6
3.850 ± 0.2976	8
3.442 ± 0.2976	10
3.657 ± 0.2976	12
3.575 ± 0.2976	14
3.422 ± 0.2976	16
3.473 ± 0.2976	18
3.534 ± 0.2976	20

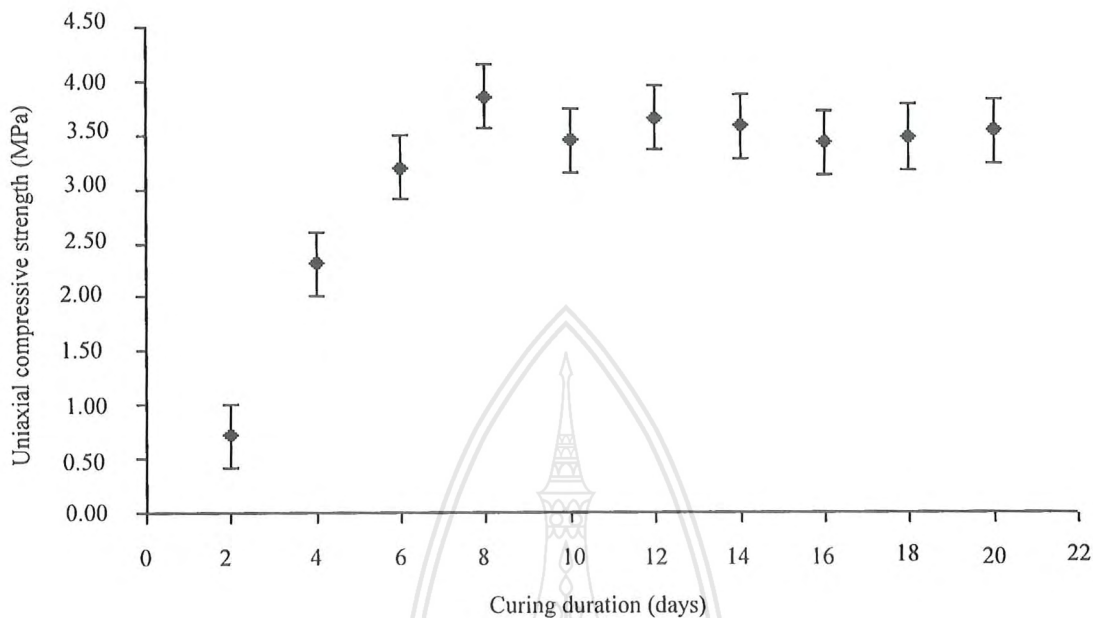


Figure 3 Curing strength of artificial weak rock

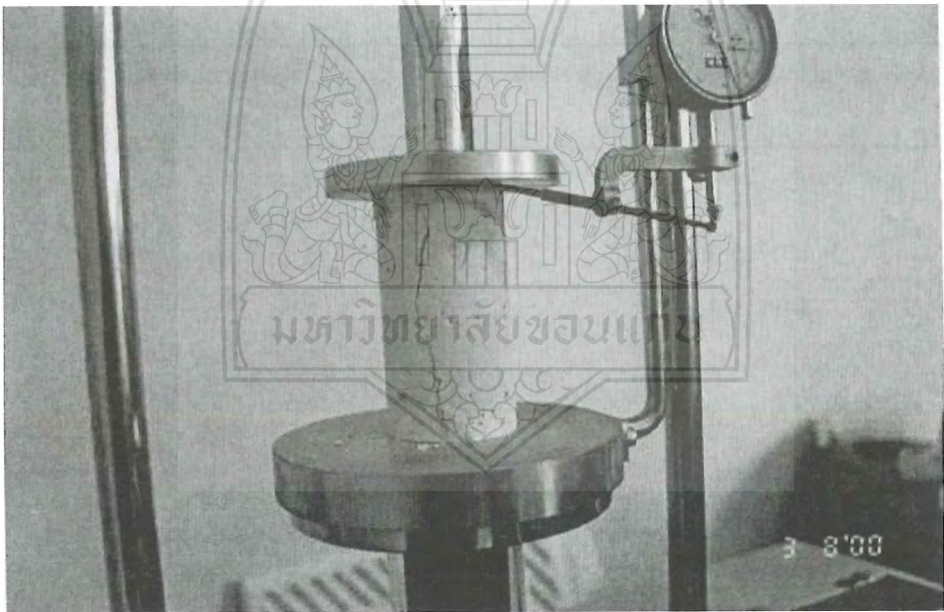


Figure 4 Uniaxial compressive strength test using tri-test stand ELE device

The results showed that an abrupt change in percentage of strength gain occurred from the first to the sixth day, and by the eighth day, percentage gain in strength is almost consistent. The strength gained on the second day of curing is 0.713 MPa and increased by 224% to 2.312 MPa by the fourth day. On the sixth day of curing, gain in strength is 3.198 MPa, which is a approximately 38.3% increase. Finally, consistent strength gain is

obvious by the eighth day onwards where compressive strength of specimen fluctuates by approximately 2%. This indicates that the specimen has reached its ultimate strength of approximately 3.565 MPa. Table 2 shows percentage of strength gained at each interval. The results show that the weak rock specimen reaches its ultimate strength by the eighth day of curing.

Table 2 Percentage strength gain from curing process

Percentage of strength gained at interval (%)	Curing period interval (days)
224	2
38.3	4
2.0	6
-10.6	8
6.2	10
-2.2	12
-4.3	14
1.5	16
1.7	18

The different percentage of water loss of the specimen was also determined at two-day intervals to obtain the difference in strength gain of the specimens. The percentage weight loss on drying is the percentage of water dried out during curing process (Omar and Salsidu, 2001). This was

done by recording the weight of specimen before and after the curing. The results show that once the ultimate strength is achieved, the percentage of weight loss on drying of specimen is almost consistent and varies by 0.05%. The average percentage of water loss of specimen on drying is 21.5% (Figure 5).

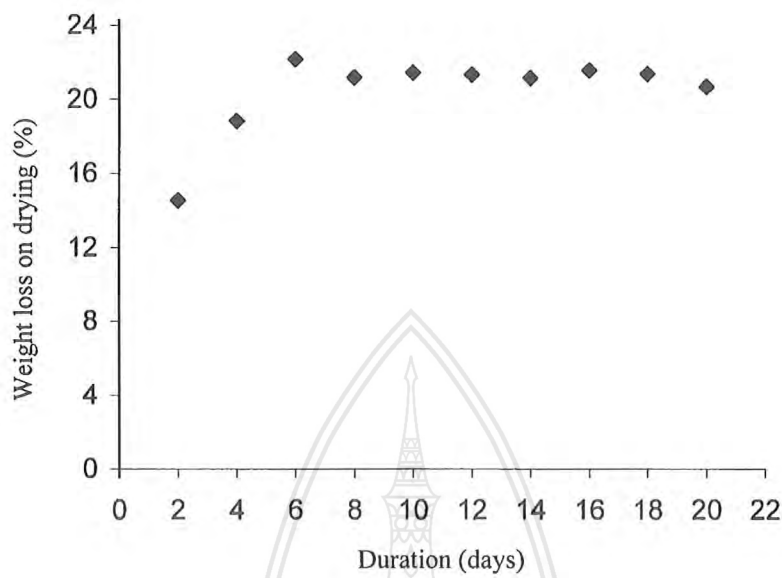


Figure 5 Percentage of water loss of specimen after curing

The other important parameter of this dimensions of specimen are required to run the test. specimen is the modulus of elasticity. It can be The mean value of modulus of elasticity of the obtained from indirect tensile modulus test using artificial weak rock obtained is 1025 ± 15.722 MPa the Universal Material Testing Apparatus or MATTA, (Table 3). where input such as the Poisson's ratio and

Table 3 Indirect tensile modulus test

Pulse No.	Load rise time (ms)	Unload time (ms)	Elastic modulus (MPa)
1	53	49	1050
2	54	51	1023
3	54	51	1009
4	55	50	1027
5	54	48	1015
Mean	54	50	1025 ± 15.72 (std. deviation)

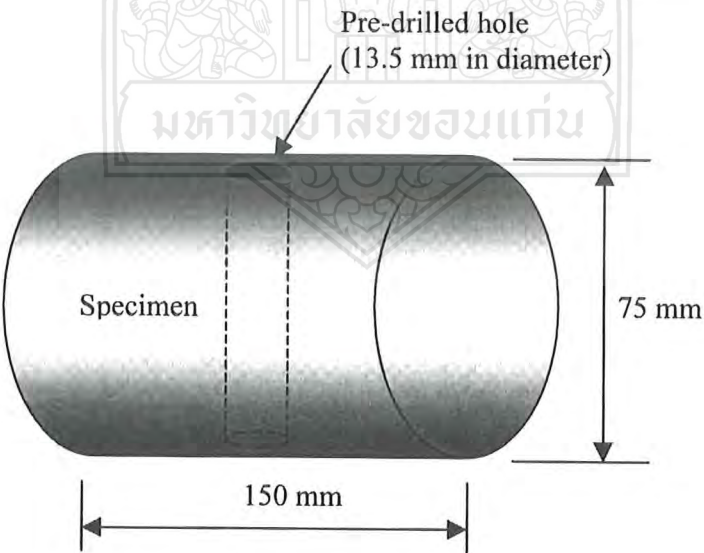
H-Ometer test - diametrical model

The diametrical model is tested in longitudinal position where a hole is drilled right through the middle part of the specimen as shown in Figure 6(a). The H-Ometer probe is placed upright into the pre-drilled hole in the weak rock specimens. The probe is connected by tubing,

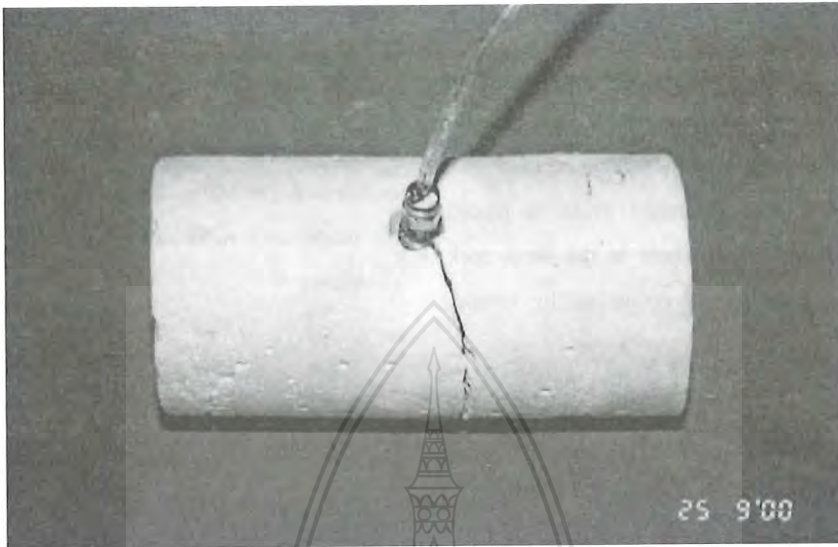
attached to the GDS pump {Figure 6(b)}. The percentage difference of tensile strength between the upper and lower range is approximately 12.4% and the average tensile strength of the diametrical model is 0.256 MPa. The pressure required to test the model until failure is approximately 0.865 MPa (Table 4).

Table 4 Tensile strength of diametrical model

Sample No.	Horizontal stress, σ_h (MPa)	Failure pressure, P_f (MPa)	Tensile strength, $\sigma_{HO(dia)}$ (MPa)
1D	0.330	0.910	0.250
2D	0.242	0.740	0.256
3D	0.320	0.871	0.271
4D	0.360	0.955	0.275
5D	0.310	0.872	0.252
6D	0.299	0.841	0.241
7D	0.310	0.865	0.244



a) Schematic diagram of diametrical model



b) Fractured diametrical model specimen from H-Ometer test

Figure 6 H-Ometer test in diametrical position

A further increase in pressure results in building up of stresses around the cavity wall of the specimen due to elastic expansion without crack initiation (Figure 7a). The H-Ometer expansion is considered to start once the applied pressure is equal to the horizontal stress, σ_h . As pressure is applied, initial tensile failure is initiated from small imperfections such as pores surrounding the cavity wall. The primary and secondary radial cracks start to develop at this stage, which are distributed around the cavity (Figure 7b). Cracks with least resistance to propagation will extend to tertiary or major cracks (Figure 7c). Finally, fracture occurs and it is likely that that tensile cracks are formed before the yield pressure is reached. Furthermore, due to the brittle nature of weak rocks, these cracks propagate extensively (Figure 7d). It is observed that the major cracks are formed in two directions in this test. These cracks propagate in the direction perpendicular to the minor principal stress direction that is the maximum tensile stress.

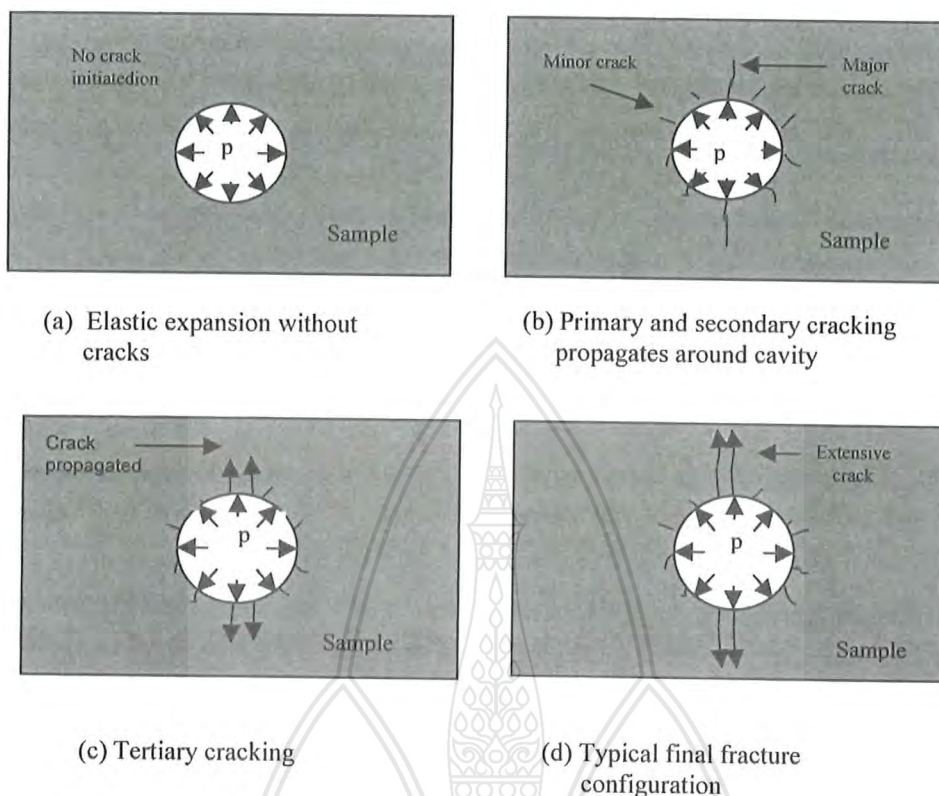


Figure 7 Crack propagation of the diametrical model

At this stage, the expansion of membrane takes place until it reaches the cavity wall, and this is denoted by initial pressure, P_0 . However, the initial pressure is not equal to the horizontal stress, σ_h because the initial pressure is a pressure required to fill the pocket wall. According to Haberfield and Johnston (1986), as cavity pressure is induced further, circumferential stress is equal to the tensile strength of material where crack initiated at elastic expansion, $2\sigma_h + \sigma_{HO(dia)}$, where $\sigma_{HO(dia)}$ is the tensile strength of the rock.

As pressure is applied, initial tensile failure is initiated from small imperfections such as pores surrounding the cavity wall. The primary and secondary radial cracks start to develop at this stage, which is distributed around the cavity (Figure 7c). Cracks with least resistance to propagation will extend to tertiary or major cracks. Finally, fracture

occurs and it is likely that that tensile cracks are formed before the yield pressure is reached. Furthermore, due to the brittle nature of weak rocks, these cracks propagate extensively. It is observed that the major cracks are formed in two directions in this test. These cracks propagate in the direction perpendicular to the minor principal stress direction that is the maximum tensile stress.

Finite element analysis (FEA)

The finite element method is a numerical procedure of finding solution to a complicated problem by establishing the response of interconnected element of finite dimensions with continuity and equilibrium considerations (Desai, 1974). In this study, the analytical work was carried out using LUSAS (London University Stress Analysis System) version 13.1 (1999) finite element software. This software

is user friendly and is used widely in engineering sciences particularly for load-deformation problems.

The accuracy of the diametrical model tested experimentally is further investigated by simulating the test using finite element analysis. A nonlinear finite element analysis has been carried out on both diametrical and axial models of artificial weak rock. The tensile strength results obtained from finite element analysis are discussed and compared with experimental H-Ometer test results. It is evident that the displacement increases linearly as the load increases and the response is linear until yielding occurs. It is likely that tensile cracks will be formed before the yield pressure is reached due to the brittle nature of the weak rock specimens. Results of deformation, crack pattern and load carrying capacity are discussed below.

FEA - simulation of diametrical model

The finite element analysis of the diametrical model is important to get insight of the failure

pattern and deformation of the model. This is important to determine at which load level yielding or fracture will occur when subjected to loading conditions (Table 5). The results show that as the material reaches the initial yield zone at load case 3, failure also initiates at this point. The values of tensile stress and displacement increase gradually as load is increased further into the yield zone until total fracture occurs at load case 7 with tensile value of 0.229 MPa. Deformation results of the simulated diametrical model are summarized in Table 5. Figure 8 shows the stress contour and deformation at different load cases of the model.

At load case 1 (0.4 MPa) and load case 2 (0.404 MPa), elastic deformation occurs without signs of crack initiation (Figure 8b). However, crack initiation is observed to start at load case 3 (0.605 MPa) with tensile value of 0.211 MPa where initial yielding occurs. This is evident from Figure 8c.

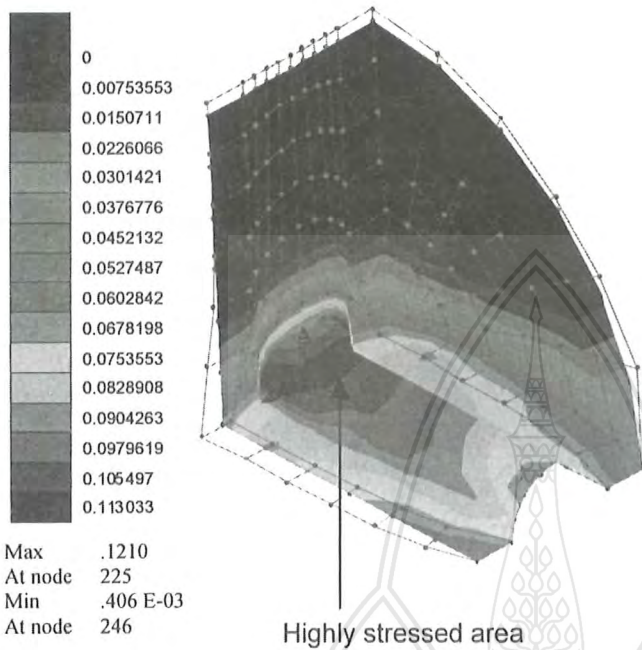
Table 5 Finite element results for diametrical model under tensile loading

Load case	Incremental load response (MPa)	Displacement (mm)	Tensile stress (FE(dia) (MPa)
1	0.400	0.6102x10 ⁻⁰³	0.121
2	0.404	0.9154x10 ⁻⁰³	0.181
3	0.605	0.1068x10 ⁻⁰²	0.211
4	0.706	0.1121x10 ⁻⁰²	0.219
5	0.742	0.1165x10 ⁻⁰²	0.226
6	0.774	0.1196x10 ⁻⁰²	0.229
7	0.798	0.1199x10 ⁻⁰²	0.229

As the material reaches further into the yield zone, the crack propagates even more until final rupture at load case 7 (0.798 MPa) where the final tensile value of the model is 0.229 MPa

(Figure 8g). The displacement value, however, is small and almost negligible which could be due to the sudden fracture of the brittle nature of material.

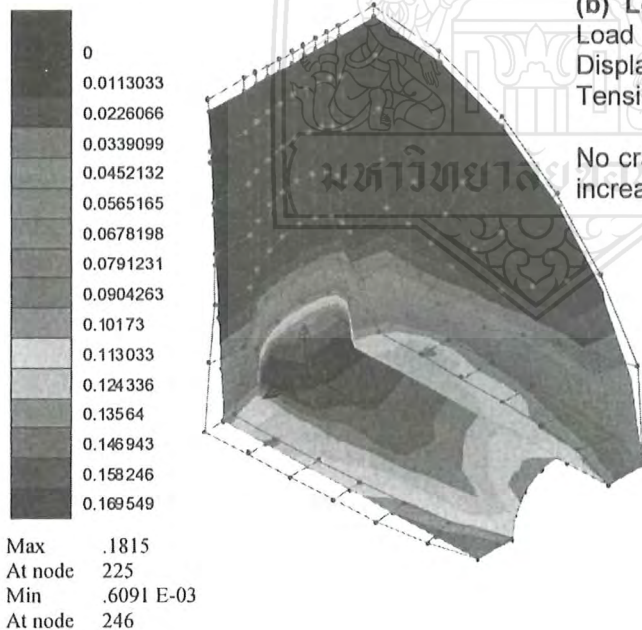
Stress contours of SE

**(a) Load case 1**

Load : 0.4 MPa
Displacement : 0.61×10^{-03} mm
Tensile stress : 0.121 MPa

No sign of initial yielding or crack propagation. Stress starts to build up around the cavity wall due to applied pressure.

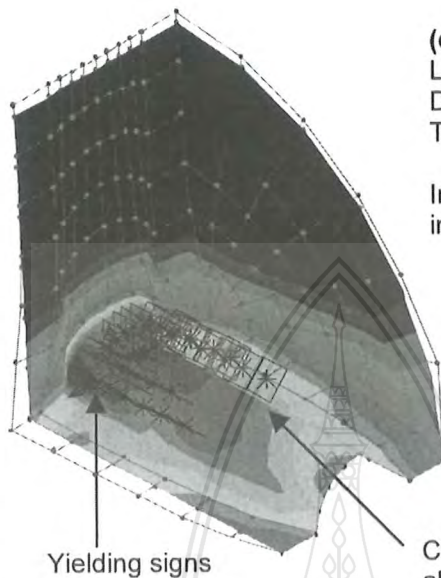
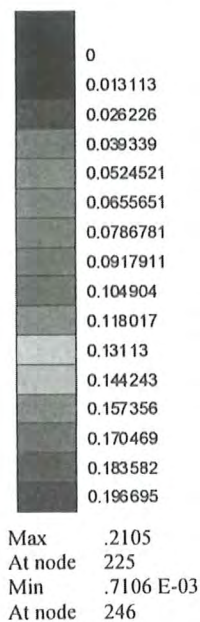
Stress contours of SE

**(b) Load case 2**

Load : 0.404 MPa
Displacement : 0.91×10^{-03} mm
Tensile stress : 0.181 MPa

No crack initiation. Stress intensity increases as load is increased.

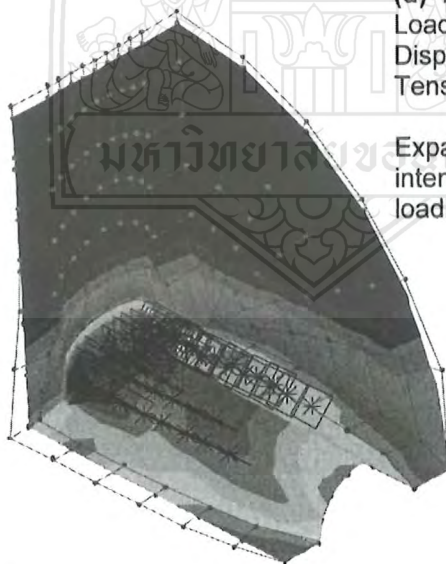
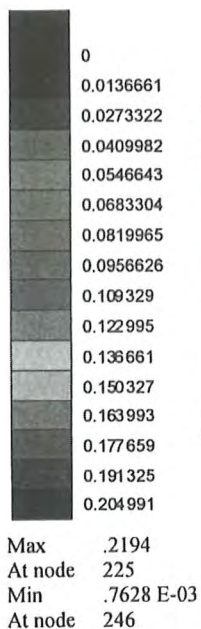
Stress contours of SE

**(c) Load case 3**

Load : 0.605 MPa
Displacement : 0.11×10^{-02} mm
Tensile stress : 0.211 MPa

Initial yielding and crack initiation are evident.

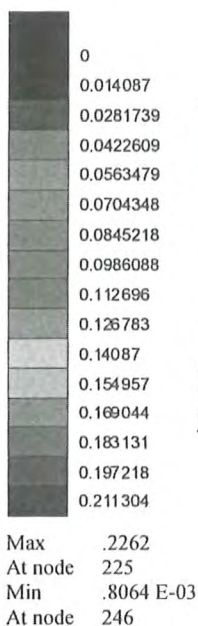
Stress contours of SE

**(d) Load case 4**

Load : 0.706 MPa
Displacement : 0.112×10^{-02} mm
Tensile stress : 0.219 MPa

Expansion of yield zone as stress intensity builds up due to incremental loading.

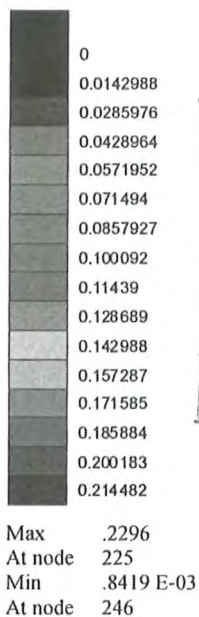
Stress contours of SE

**(e) Load case 5**

Load : 0.742 MPa
Displacement : 0.116×10^{-02} mm
Tensile stress : 0.226 MPa

Expansion of yield zone as stress intensity builds up due to incremental loading.

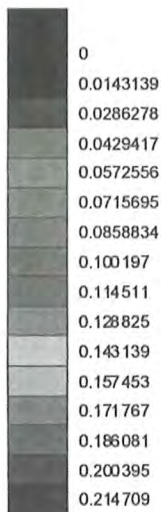
Stress contours of SE

**(f) Load case 6**

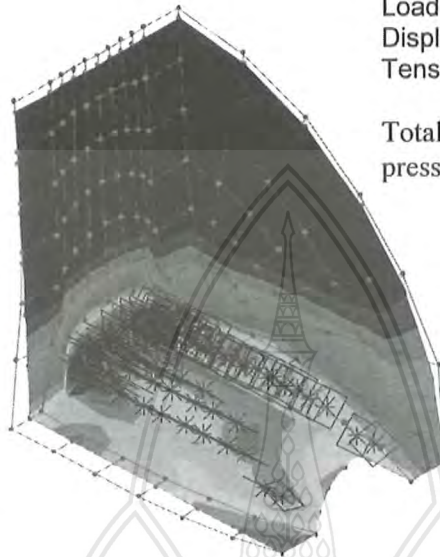
Load : 0.774 MPa
Displacement : 0.12×10^{-02} mm
Tensile stress : 0.2296 MPa

Cracks is propagated along the failure plane.

Stress contours of SE



Max .2299
At node 255
Min .8453 E-03
At node 246



(g) Load case 7

Load : 0.798 MPa
Displacement : 0.12×10^{-02} mm
Tensile stress : 0.229 MPa

Total fracture occurs at failure pressure.

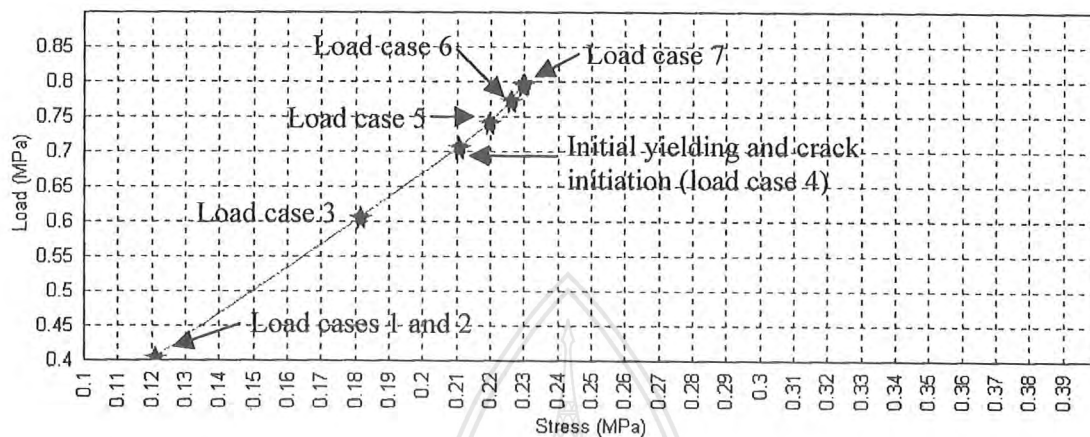
Figure 8 Stress contour of axial model under tensile load - (a) Load case 1, (b) Load case 2, (c) Load case 3, (d) Load case 4, (e) Load case 5, (f) Load case 6 and (g) Load case 7

At the final rupture stage in load case 7, the displacement is 0.1199×10^{-02} mm. The displacement is small because physically, no evidence of crack occurs although crack starts to propagate in load case 3. Sudden crack occurs prior to final rupture.

The load response graph for the diametrical model in Figure 9 shows the final failure pressure of the model. It clearly shows that the deformation occurs at the elastic zone and failure does not occur beyond the plastic zone. This is so because the material is brittle in nature and fracture occurs

suddenly before reaching the plastic zone, which indicates that yielding also occurs just before failure. This is also evident from experimental results obtained. For the diametrical model, load deformation response from the analysis shows 7 load cases with failure pressure of 0.798 MPa. Under tensile loading, the initial yielding starts at 88.5% or at load case 3 of the linear load - stress graph of the diametrical model. This indicates that the model does not undergo any changes due to the stress induced from load case 1 to load case 2

Tensile Stress of Diametrical Model



RsltLoad Node 255 / Stress SE Node 255

Figure 9 Load deformation graph of diametrical model

The failure pattern of the diametrical model by applied pressure onto the wall of cavity hole due to applied pressure can be clearly shown along propagates perpendicularly to the maximum tensile section Y-Y and Z-Z planes. The sectioned planes stress direction or radial direction, where the stress of diametrical model are shown in Figure 10. is induced along the plane throughout the Z-axis. Intensity of stress decreases as the length increases (Figure 11b). for section along the Y-Y plane (Figure 11a). However, it clearly shows that the stress induced

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

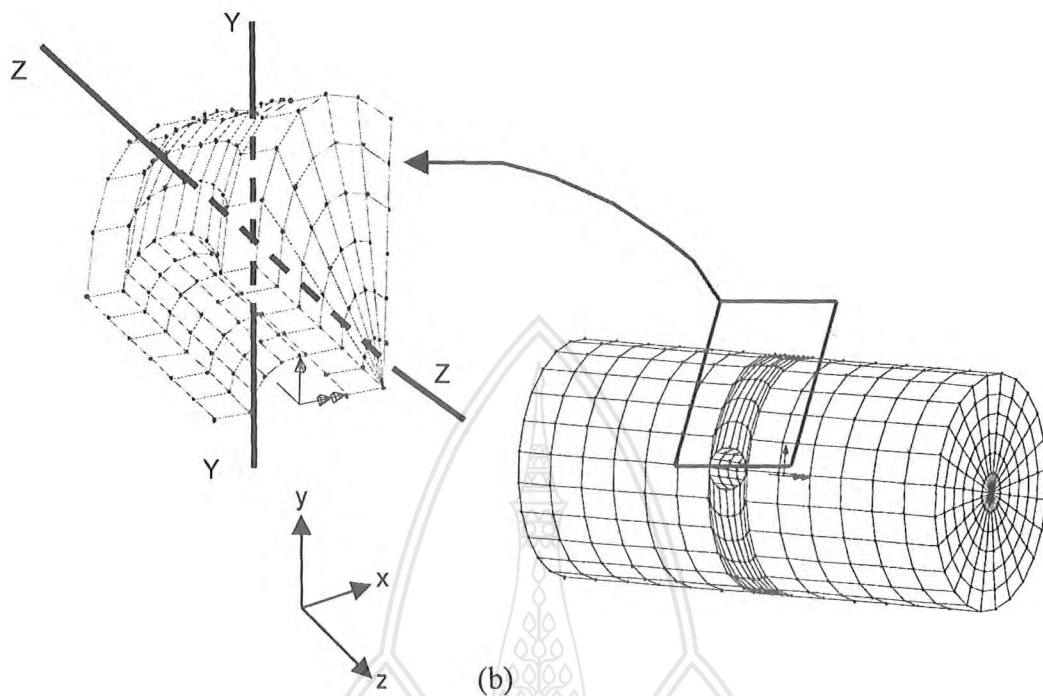
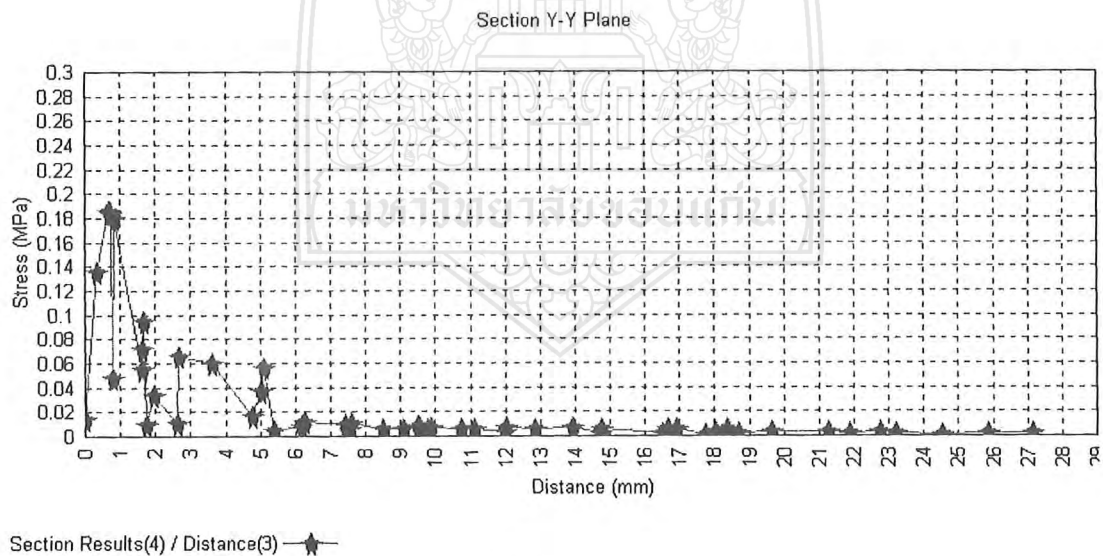


Figure 10 Half diametrical model showing Y-Y and Z-Z section planes



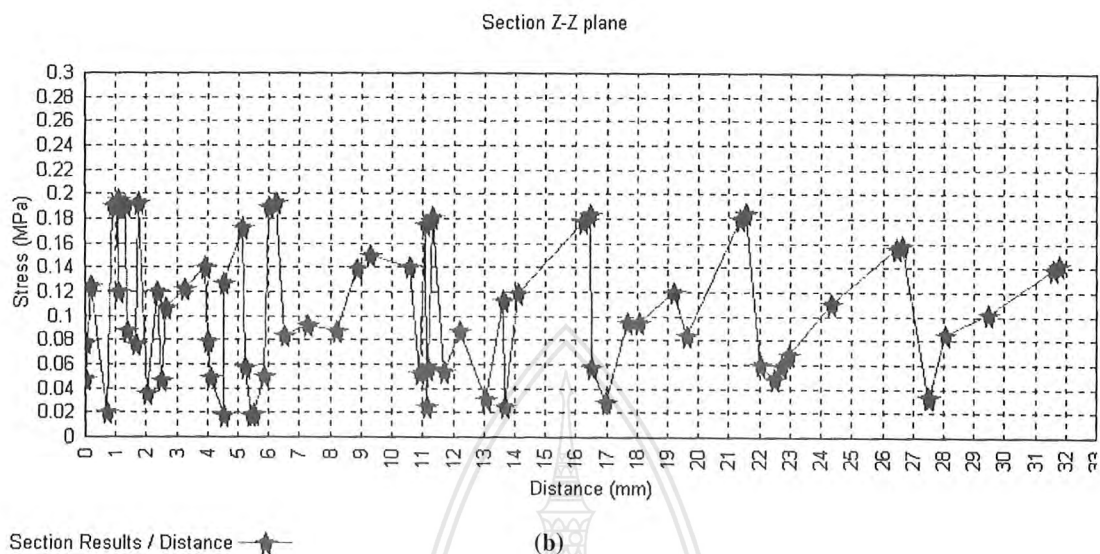


Figure 11 Stress intensity of section planes (a) Y-Y; (b) Z-Z

Tensile strength from H-Ometer tests and finite element analysis

The tensile strength of artificial weak rock from H-Ometer test and finite element analysis is summarized in Table 6. The range of tensile strength is from 0.241 to 0.275 MPa for the H-Ometer tests whereby tensile strength for finite element analysis

is 0.229 MPa. The percentage difference of the tensile strength between the upper and lower range is approximately 12.4 % and the average tensile strength of the diametrical model is 0.256 MPa. These indicate that the tensile strength values from the laboratory test are in close agreement with the result from finite element analysis.

Table 6 Tensile strength of artificial weak rock from the H-Ometer test and finite element analysis (FEA)

Specimen	1D	2D	3D	4D	5D	6D	7D
Tensile strength $\sigma_{HO(dia)}$ (MPa)	0.250	0.256	0.271	0.275	0.252	0.241	0.244
Average of tensile strength (MPa)	0.256						
Tensile strength from finite element model (MPa)	0.229						

Conclusion

The tensile strength of the weak rock for H-Ometer test is verified by comparing the numerical and experimental results. The test was conducted on diametrical model specimens which were subjected to incremental load until failure occurred, and at each load response, the deformation, crack pattern and tensile strength were determined. The results showed that the variation of tensile strength from H-Ometer test was approximately 17.4% with an upper and lower range of 0.256 MPa and 0.218 MPa.

A further study by simulating the H-Ometer test using finite element analysis was carried out to check the accuracy of the experimental model. The percentage different between the H-Ometer tests and finite element analysis is 11.7%. This is considered good.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Ministry of Science, Technology and Environment, Malaysia for funding this project via IRPA Grant 0302040083 and MTD-RC staff for their support given throughout this study.

References

- Bandis, S. (1980). Experimental Studies of Scale Effects on Shear Strength and Deformation of Rock Joints. Ph.D. Thesis. University of Leeds, UK.
- Brown, E.T. (ed.). (1981). Characterisation Testing and Monitoring - Commission on Testing Methods of the International Society for Rock Mechanics. Oxford: Pergamon Press.
- Choi, S.K., Haberfield, C.M. and Johnston, I.W. (1988). Determining the Tensile Strength of Soft Rock. Departmental Report, Department of Civil Engineering, Monash University, Victoria, Australia.
- Desai, C.S. (1974). A consistent finite element technique for work-softening behavior. Proceedings of International Conference on Computational Methods in Nonlinear Mechanics. University of Texas, Austin. p.969-978.
- Heberfield, C.M. and Johnston, I.W. (1986). Concepts for pressuremeter interpretation in soft work. In: Special Geomech. Symp. on Interpretation of Field Testing for Design Parameters. Adelaide, Canberra: I.E. Aust. p.65-69.
- LUSAS, Finite Element System Version 13 (1999). LUSAS Powerful FE Technology for Specialist Application: User Guide. Surrey: FEA Ltd.
- Oliveira, R. (1993). Weak Rock Materials. The Engineering Geology of Weak Rock. Rotterdam: Balkema.
- Omar, H. and Salsidu, M.S. (2001). A new indirect tensile strength measuring device for weak rock. Geotechnical Engineering Journal of the Southeast Asian Geotechnical Society. 32:75-81.
- Omar, H. (2000). A new strength device. UN Chronicle. XXXVII (4):16-17.
- Rocha, M., Silveira, A. Da, Grossman, N. and Oliveira, E. De. (1966). Determination of the deformability for masses along boreholes. In Proc. 1st Congr. ISRM, Lisbon. Vol. 1. p.697-704.
- Vutukuri, V.S., Lama. R.D. and Saluja, S.S. (1974). Handbook on Mechanical Properties of Rock, Vol. 1. Clausthal: Trans Tech Publications.

ความหลากหลายชนิดของหอยในลำน้ำพอง

ไพรัช ทาบลีแพร่¹ และสัมพันธ์ คุณสุข¹

บทคัดย่อ

การศึกษความหลากหลายชนิด (species diversity) ของหอยในลำน้ำพอง เก็บตัวอย่าง 8 บริเวณ เริ่มจากเดือนมกราคม 2545 ถึง มิถุนายน 2546 จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะความแตกต่างของเปลือก สามารถจำแนกได้ 29 ชนิด (species) โดยกลุ่มแรกเป็นพวกหอยฝาเดียว (gastropod) มี 16 ชนิด คือ *Adamietta housei*, *Anulotaia forcarti*, *Bithynia siamensis goniomphalos*, *Clea (Anentome) helena*, *Filopaludina martensi*, *F. munensis*, *F. polygramma*, *F. speciosa*, *Idiopoma umbilicata*, *Indoplanorbis exustus*, *Lymnaea (Radix) auricularia rubiginosa*, *Mekongia pongensis*, *Melanoides tuberculata*, *Pila polita*, *Pomacea canaliculata* และ *Tarebia granifera* กลุ่มที่สองเป็นพวกหอยกาบหรือหอยฝาคู่ (bivalve) พบทั้งหมด 13 ชนิด ประกอบด้วย *Corbicula* sp., *Cristaria plicata*, *Ensidents ingallsianus ingallsianus*, *Hyriopsis bialatus*, *Limnoperna siamensis*, *Physunio cambodiensis*, *P. eximius*, *P. modelli*, *Pilsbryconcha exilis*, *Pseudodon vondembuschianus ellipticus*, *Scabies crispata*, *S. nucleus* และ *Scaphula pinna*

Abstract

Species diversity of mollusks along the Pong River was investigated. The samples were collected from 8 sampling sites during January 2002 - June 2003. Twenty-nine species of mollusks were identified on the basis of their shell differences. Sixteen species of gastropods were *Adamietta housei*, *Anulotaia forcarti*, *Bithynia siamensis goniomphalos*, *Clea (Anentome) helena*, *Filopaludina martensi*, *F. munensis*, *F. polygramma*, *F. speciosa*, *Idiopoma umbilicata*, *Indoplanorbis exustus*, *Lymnaea (Radix) auricularia rubiginosa*, *Mekongia pongensis*, *Melanoides tuberculata*, *Pila polita*, *Pomacea canaliculata* and *Tarebia granifera*. Thirteen species of bivalves were *Corbicula* sp., *Cristaria plicata*, *Ensidents ingallsianus ingallsianus*, *Hyriopsis bialatus*, *Limnoperna siamensis*, *Physunio cambodiensis*, *P. eximius*, *P. modelli*, *Pilsbryconcha exilis*, *Pseudodon vondembuschianus ellipticus*, *Scabies crispata*, *S. nucleus* and *Scaphula pinna*.

¹ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

บทนำ

ลำนํ้าพองหรือเมื่อนํ้าพองเป็นเมื่อนํ้าหลักสายหนึ่งของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จัดเป็นแหล่งนํ้าที่มีทรัพยากรชีวภาพในปริมาณมากจึงสามารถหล่อเลี้ยงชุมชนตลอดลำนํ้ามาตั้งแต่บรรพกาล นอกจากชุมชนตลอดลำนํ้าจะได้นํ้าจากเมื่อนํ้าไปใช้ในชีวิตประจำวันและการเกษตรแล้ว ยังใช้ทรัพยากรชีวภาพอันได้แก่ กุ้ง หอย ปู และปลา เป็นต้น บริโภคเป็นอาหารในรูปแบบต่างๆ สำหรับสัตว์พวกหอยที่พบในลำนํ้าพอง เช่น หอยโข่ง หอยขม และหอยกาบ จัดเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังกลุ่มหนึ่งที่รู้จักกันทั่วไปและนิยมนำไปประกอบอาหารในหลายรูปแบบ ถือว่าเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญของชุมชนในแถบลุ่มนํ้าแห่งนี้ (ไพรัช ทาบทวีพร และคณะ, 2544)

เนื่องจากการเกิดปัญหาด้านคุณภาพของนํ้าในลำนํ้าพองส่งผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในเมื่อนํ้านี้ที่หล่อเลี้ยงชุมชนตลอดลำนํ้ามาตั้งแต่อดีตกาล ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายชนิดของหอยในครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของหอยซึ่งเป็นทรัพยากรชีวภาพชนิดหนึ่งที่มีอยู่ในลำนํ้าพอง และอาจจะเป็นดัชนีทางชีวภาพอันหนึ่งในการแสดงถึงคุณภาพของนํ้าในลำนํ้าพอง ข้อมูลที่ได้เป็นพื้นฐานสำคัญในการศึกษาวิทยาศาสตร์ชีวภาพหลายสาขา รวมทั้ง สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง สัตววิทยา สัตววิทยาทางการแพทย์ และวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม และยังสามารถใช้เป็นเอกสารอ้างอิงทางวิชาการเกี่ยวกับความหลากหลายของหอยนํ้าจืด สถาบันการศึกษาและหน่วยราชการต่างๆ เช่น กระทรวงศึกษาธิการ เกษตรและสหกรณ์ สาธารณสุข และกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม สามารถนำข้อมูลดังกล่าวไปใช้ได้

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

ทำการเก็บตัวอย่างหอยตลอดลำนํ้าพองในพื้นที่เก็บตัวอย่าง 8 บริเวณ คือ (1) บ้านสายหนัง (อำเภอสีชมพู) (2) บ้านกุดธาตุ ตำบลกุดธาตุ (อำเภอ

หนองนาคำ) ในเขื่อนอุบลรัตน์ 2 บริเวณ คือ (3) บ้านหนองผักแว่น ตำบลหัวทอง อำเภอภูเวียง และ (4) บ้านภูคำเบา ตำบลเขื่อน อำเภออุบลรัตน์ (5) บ้านห้วยทราย (อำเภออุบลรัตน์) (6) บ้านหนองบัวน้อย ตำบลกุดน้ำใส (อำเภอนํ้าพอง) (7) บ้านท่าโพธิ์ ตำบลท่ากระเสริม (อำเภอนํ้าพอง) และ (8) บ้านท่าหิน ตำบลศิลา (อำเภอเมือง) โดยไม่เลือกขนาดและชนิด เพื่อต้องการให้ได้จำนวนชนิดมากที่สุด ตัวอย่างของหอยบางส่วนจะเก็บรักษาในขวดเก็บตัวอย่าง และบางส่วนเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็ง ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างเริ่มจากเดือนมกราคม 2545 ถึง มิถุนายน 2546 ตัวอย่างของหอยที่เก็บได้ ทำการศึกษาลักษณะความแตกต่างของเปลือกเพื่อจำแนกชนิด โดยใช้คำบรรยายของ Brandt (1974), Upatham et al. (1983), Keawjam (1986), Klinhon (1989), Kijviriya (1990), Chithamvong (1992) และ Tarbsripair (1998)

ตัวอย่างของเปลือกหอยเก็บไว้ในห้องปฏิบัติการวิชาวิทยาศาสตร์ไม่มีกระดูกสันหลัง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผลการศึกษา

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างหอยในพื้นที่ตัวอย่าง 8 บริเวณตลอดลำนํ้าพอง จำแนกชนิดจากลักษณะความแตกต่างของเปลือก สามารถจำแนกได้ 29 ชนิด (species) แสดงดังตารางที่ 1 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ พวกหอยฝาเดียว (รูปที่ 1) และหอยกาบ (รูปที่ 2)

พวกหอยฝาเดียว (gastropod) มี 16 ชนิด ได้แก่ *Adamietta housei*, *Bithynia siamensis goniomphalos*, *Clea (Anentome) helena*, *Indoplanorbis exustus*, *Melanoides tuberculata*, *Lymnaea (Radix) auricularia rubiginosa* และ *Tarebia granifera* พวกหอยขม (viviparid snail) ได้แก่ *Anulotaia forcarti*, *Filopaludina martensi*, *F. munensis*, *F. polygramma*, *F. speciosa*, *Idiopoma umbilicata* และ *Mekongia pongensis* หอยโข่ง (apple snail, *Pila polita*) และ

หอยเชอรี่ (golden apple snail, *Pomacea canaliculata*) พวกรอยกาบหรือหอยฝาคู่ (bivalve) พบทั้งหมด 13 ชนิด ประกอบด้วยพวกรอยทรายหรือหอยเล็บม้า (*Corbicula* sp.) หอยสบนกหรือหอยเปลือกบาง (*Scabies crispata* และ *S. nucleus*) และกลุ่มของพวกรอยกิบก็ คือ *Cristaria plicata*, *Ensidents ingallsianus ingallsianus*, *Hyriopsis bialatus*, *Physunio cambodiensis*, *P. eximius*, *P. modelli*, *Pilsbryconcha exilis* และ *Pseudodon vondembuschianus ellipticus* และหอยแมลงภู่น้ำจืด (*Limnoperna siamensis* และ *Scaphula pinna*)

สรุปและวิจารณ์

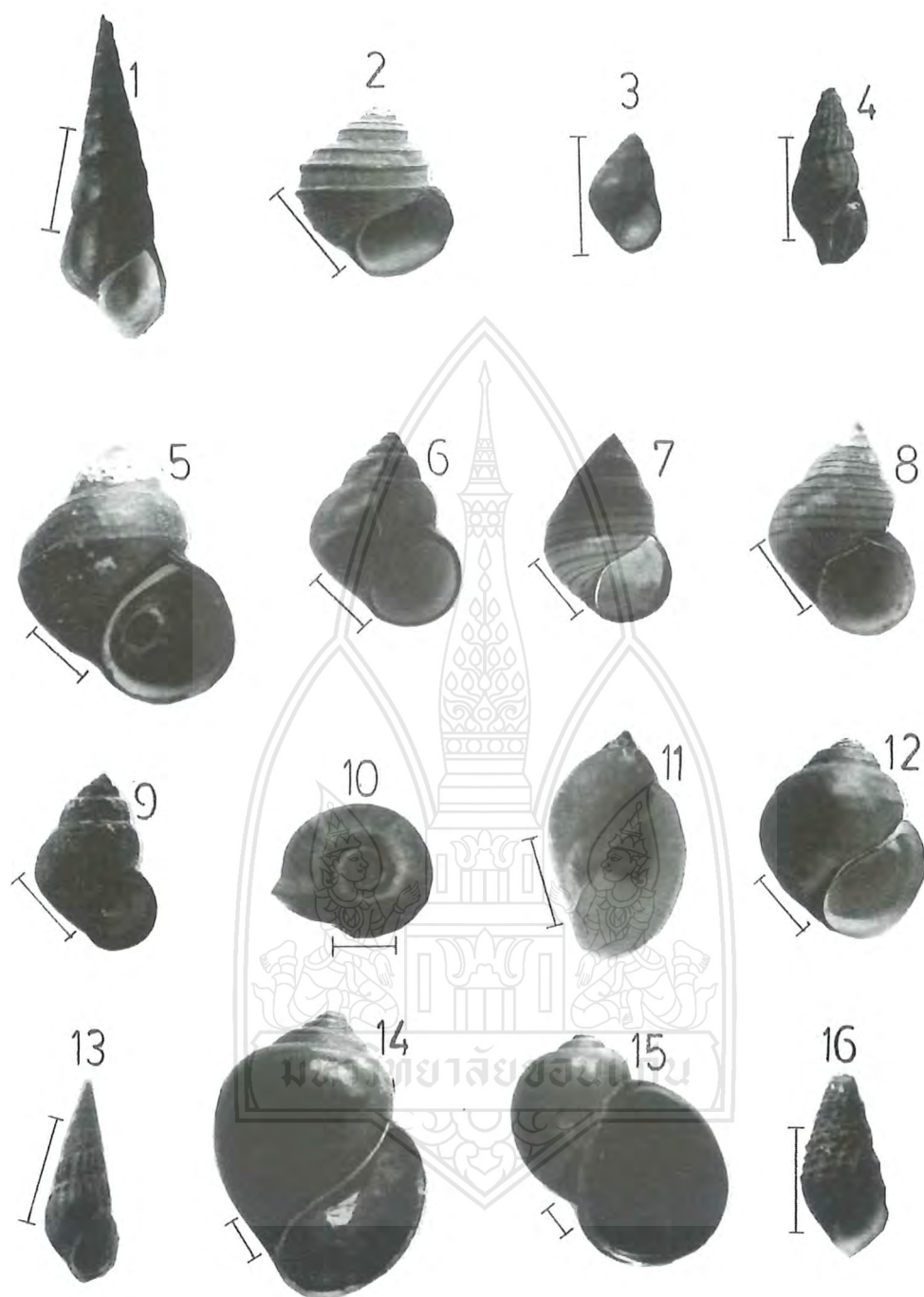
การศึกษาสำรวจความหลากหลายของหอยในลำน้ำพอง เก็บตัวอย่างหอย 8 บริเวณตลอดลำน้ำ พบทั้งหมด 29 ชนิด (เป็นหอยฝาเดียว 16 ชนิด และหอยกาบ 13 ชนิด) ซึ่งมีความหลากหลายของหอยมากกว่าในลำน้ำเข็ก จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งพบหอยฝาเดียว 12 ชนิด (Temcharoen et al., 1987) และในเขื่อนภูมิพลรวมถึงลำน้ำที่ไหลเข้า พบหอย 20 ชนิด (หอยฝาเดียว 16 ชนิด และหอยกาบ 4 ชนิด)

(Temcharoen et al., 1992) ในกรณีของพวกรอยฝาเดียวพบว่ามีความหลากหลายชนิดน้อยกว่าที่พบในแหล่งน้ำทั่วไปในเขตจังหวัดขอนแก่นซึ่งพบถึง 20 ชนิด (ไพรัช ทาบสีแพร และคณะ, 2538)

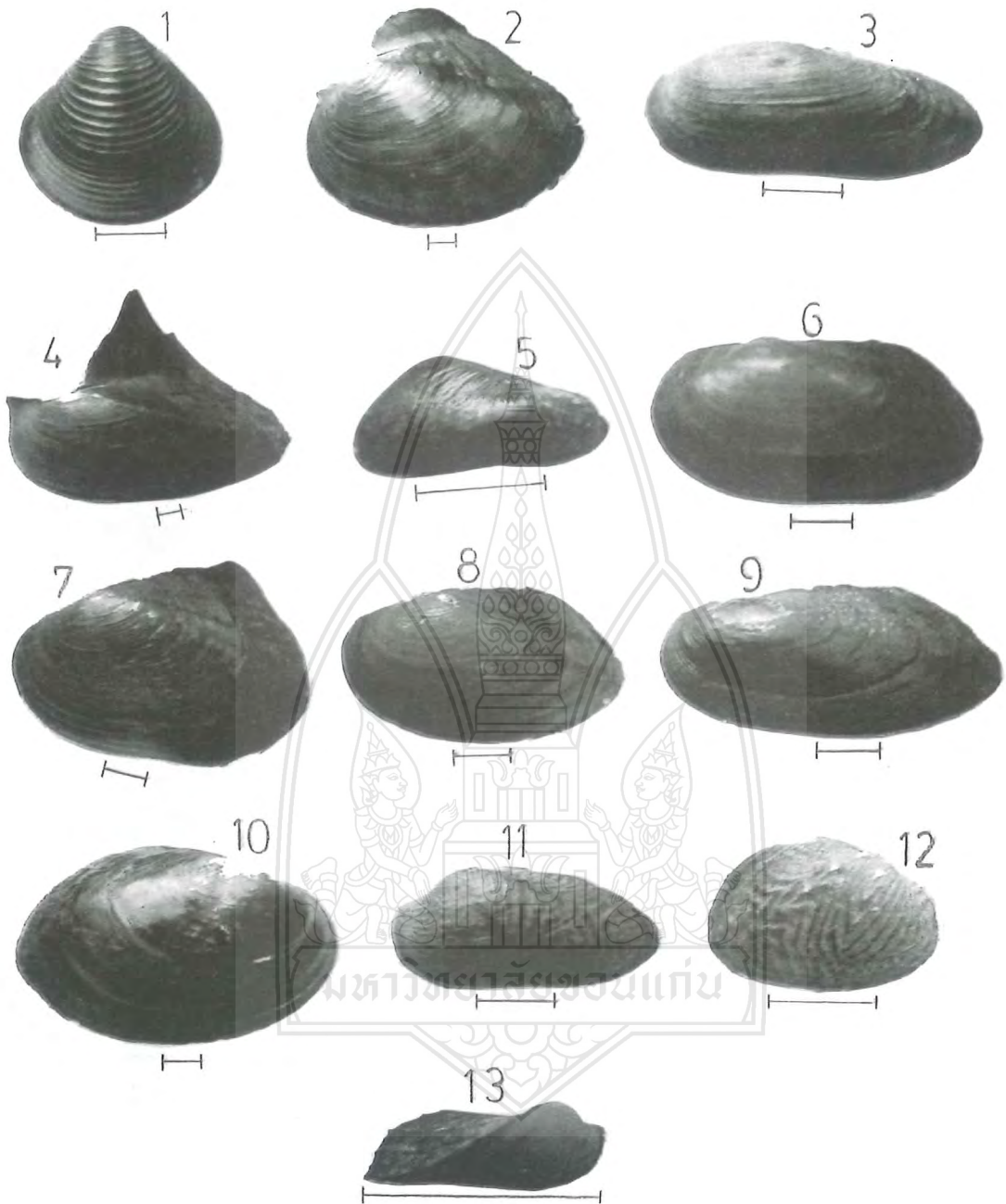
เมื่อพิจารณาแต่ละบริเวณของแหล่งเก็บตัวอย่างจะพบชนิดของหอยแตกต่างกัน โดยที่พวกรอยฝาเดียวส่วนมากพบในทุกบริเวณ ยกเว้น *Anulotaita forcarti* พบที่บ้านห้วยทราย สำหรับพวกรอยกาบทั้งหมด 13 ชนิดนั้น ชนิดที่พบในทุกบริเวณเก็บตัวอย่างคือ *Corbicula* sp., *Ensidents ingallsianus ingallsianus*, *Limnoperna siamensis*, *Scabies crispata* และ *Scaphula pinna* ชนิดซึ่งพบที่บ้านห้วยทรายเพียงบริเวณเดียวคือ *Physunio cambodiensis* โดยที่ *Scabies nucleus* พบที่บ้านสายหนึ่งและบ้านกุดธาตุ สำหรับพวกรอยกาบชนิดอื่นๆ พบในแหล่งเก็บตัวอย่างทั่วไป อย่างไรก็ตามแหล่งเก็บตัวอย่างที่หนองบัวน้อยพบหอยกาบน้อยชนิด สำหรับชนิดที่พบนั้นมีจำนวนน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่พบในบริเวณอื่นๆ ยกเว้น *Scabies crispata* ซึ่งมีจำนวนมาก

ตารางที่ 1 ชนิดของหอย (เรียงตามลำดับตัวอักษร) ในพื้นที่เก็บตัวอย่าง บริเวณเก็บตัวอย่าง คือ (1) บ้านสายหนัง (2) บ้านกุตราตุ (3) บ้านห้วยหนองผักแว่น (4) บ้านภูคำบัว (5) บ้านห้วยทราย (6) บ้านหนองบัวน้อย (7) บ้านท่าโพธิ์ และ (8) บ้านท่าหิน (+ : พบ, - : ไม่พบตัวอย่างหอย)

ชนิดของหอย (ชื่อวิทยาศาสตร์)	บริเวณเก็บตัวอย่าง							
	1	2	3	4	5	6	7	8
หอยฝาเดียว (รูปที่ 1)								
<i>Adamietta housei</i> (Lea, 1856)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Anulotaia forcarti</i> (Brandt, 1968)	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Bithynia (Digoniostoma) siamensis goniomphalos</i> (Morelet, 1866)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Clea (Anentome) helena</i> (Philippi, 1847)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Filopaludina martensi</i> (Frauenfeld, 1865)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Filopaludina munensis</i> (Brandt, 1974)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Filopaludina polygramma</i> (Martens, 1860)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Filopaludina speciosa</i> (Deshayes, 1876)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Idiopoma umbilicata</i> (Lea, 1856)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Indoplanorbis exustus</i> (Deshayes, 1834)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lymnaea (Radix) auricularia rubiginosa</i> (Michelin, 1831)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Mekongia pongensis</i> (Brandt, 1968)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Melanoides tuberculata</i> (Müller, 1774)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pila polita</i> (Deshayes, 1830)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pomacea canaliculata</i> (Lamarck, 1819)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Tarebia granifera</i> (Lamarck, 1822)	+	+	+	+	+	+	+	+
หอยกาบ (รูปที่ 2)								
<i>Corbicula</i> sp. (Mühlfelf, 1811)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cristaria plicata</i> (Leach, 1815)	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Ensidents ingallsianus ingallsianus</i> (Lea, 1852)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus</i> (Simpson, 1900)	+	+	-	-	+	-	+	+
<i>Limnoperna siamensis</i> (Morelet, 1875)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Physunio cambodiensis</i> (Lea, 1856)	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Physunio eximius</i> (Lea, 1856)	+	+	-	-	+	-	+	+
<i>Physunio modelli</i> (Brandt, 1974)	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Pilsbryconcha exilis exilis</i> (Lea, 1839)	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Pseudodon vondembuschianus ellipticus</i> (Conrad, 1840)	+	+	-	-	-		+	+
<i>Scabies crispata</i> (Gould, 1843)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Scabies nucleus</i> (LEA, 1856)	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Scaphula pinna</i> (Benson, 1856)	+	+	+	+	+	+	+	+



รูปที่ 1 พวกรอยฝาเดียว (1) *Adamietta housei*, (2) *Anulotaia forcarti*, (3) *Bithynia siamensis goniomphalos*, (4) *Clea (Anentome) helena*, (5) *Filopaludina martensi*, (6) *F. munensis*, (7) *F. polygramma*, (8) *F. speciosa*, (9) *Idiopoma umbilicata*, (10) *Indoplanorbis exustus*, (11) *Lymnaea (Radix) auricularia rubiginosa*, (12) *Mekongia pongensis*, (13) *Melanoides tuberculata*, (14) *Pila polita*, (15) *Pomacea canaliculata*, (16) *Tarebia granifera* (มาตราส่วน :1 เซนติเมตร)



รูปที่ 2 พวกรอยกบ (1) *Corbicula* sp., (2) *Cristaria plicata*, (3) *Ensidents ingallsianus ingallsianus*, (4) *Hyriopsis bialatus*, (5) *Limnoperna siamensis*, (6) *Physunio cambodiensis*, (7) *P. eximius*, (8) *P. modelli*, (9) *Pilsbryconcha exilis*, (10) *Pseudodon vondembuschianus ellipticus*, (11) *Scabies crispata*, (12) *S. nucleus*, (13) *Scaphula pinna* (มาตราส่วน :1 เซนติเมตร)

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัย การศึกษาแบบสหศาสตร์เพื่อการจัดการลำนํ้าพอง (Multidisciplinary Study for Integrated Management of the Pong River) ที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภททุนทั่วไปจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีงบประมาณ 2545-2546

เอกสารอ้างอิง

- ไพรัช ทาบสีแพร, สมาน เทศนา และรัตติกร สุดจริง. (2538). หอยฝาเดี่ยวน้ำจืดในเขตอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 23(1):10-17.
- ไพรัช ทาบสีแพร, พินิจ หวังสมนึก, สุภาพ ณ นคร, ศศิณี แจ่มจรรยา และ ญาดา พลแสน. (2544). ความหลากหลายของหอยที่ใช้เป็นอาหารในจังหวัดขอนแก่น. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 29(1-4):35-41.
- Brandt, R.A.M. (1974). The non-marine aquatic mollusca of Thailand. Archiv für Molluskenkunde. 105:1-423.
- Chithamvong, Y. P. (1992). Bithyniidae (Gastropoda: Prosobranchia) of Thailand: comparative external morphology. Malacological Review. 25:21-38.
- Keawjam, R. S. (1986). The apple snail of Thailand: distribution, habitats and shell morphology. Malacological Review. 19:61-81.
- Kijviriya, V. (1990). The studies of the Asiatic clams (*Corbicula*, Mulfeld, 1811) in Thailand: electrophoretic estimates of enzyme variation and the use of anatomy as a species indicator. Ph.D. Thesis. Mahidol University.
- Klinhon, U. (1989). The Thiaridae (Prosobranchia: Gastropod) of Thailand: their morphology, anatomy, allozyme and systematic relationship. Ph.D. Thesis. Mahidol University.
- Tarbsripair, P. (1998). The genus *Filopaludina* (Prosobranchia: Gastropod) of Thailand: morphology, anatomy, allozyme and systematic relationships. Ph.D. Thesis. Mahidol University.
- Temcharoen, P. (1992). Malacological survey in the Bhumibol Reservoir, the first dam constructed in Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 23(1):103-110.
- Temcharoen, P., Rojanapremsuk J. and Viboolyaratana, J. (1987). Malacological survey at Nam Khek River, Phitsanulok Province, North of Thailand. J. Parasit. Med. Ass. Thailand. 10(1):39-42.
- Upatham, E. S., Sommani, S., Kitikoon, V., Lohachit, C. and Burch, J. B. (1983). Identification key for the fresh-water and backish-water snail of Thailand. Malacological Review. 16:107-132.



ข้อแนะนำในการเขียนบทความลงวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ประเภทของเรื่องที่จะตีพิมพ์

1. รายงานผลการวิจัยและค้นคว้าหรือการสำรวจที่ยังไม่เคยตีพิมพ์ในวารสารหรือหนังสืออื่นมาก่อน
2. บทความปริทัศน์ ได้แก่งานเขียนที่รวบรวมหรือเรียบเรียงจากเอกสารหรือหนังสือต่าง ๆ เพื่อเผยแพร่และฟื้นฟูงานด้านวิชาการระดับต่าง ๆ
3. บทความแสดงข้อคิดเห็นหรือข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในด้านวิชาการ เรื่องแปล ข่าววิชาการ ย่อความจากงานวิจัยหรือหนังสือใหม่ที่น่าสนใจ

รูปแบบของการเขียนและเตรียมต้นฉบับ

1. ต้นฉบับ ต้องเป็นตัวพิมพ์ปกติ มีช่วงห่างระหว่างบรรทัดตามมาตรฐาน พิมพ์ลงในกระดาษขาว A 4 (โรเนียวสัน) โดยใช้กระดาษหน้าเดียว ความยาวไม่เกิน 10 หน้า ส่งต้นฉบับ 2 ชุด
2. ต้นฉบับ จะถูกพิจารณาโดยกองบรรณาธิการ และจะตอบรับการได้รับบทความโดยไม่ส่งต้นฉบับคืน ผู้เขียนควรจะต้องสำเนาเก็บไว้เป็นหลักฐานของตนเอง 1 ฉบับ
3. ต้นฉบับ จะต้องมีความถูกต้องทั้งในด้านเนื้อหา และการใช้ภาษา รวมทั้งมีความสมบูรณ์ในรูปแบบพร้อมที่จะนำลงตีพิมพ์ได้
4. ชื่อเรื่อง ให้ใช้ภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ ไม่ยาวเกินไป และหลีกเลี่ยงการใช้คำย่อโดยไม่จำเป็น
5. ชื่อผู้เขียน เขียนชื่อภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษพร้อมทั้งบอกสถานที่ทำงานให้ชัดเจน
6. เนื้อเรื่อง ใช้ได้ทั้งภาษาไทยล้วนและภาษาอังกฤษล้วน ถ้าใช้ภาษาไทย ภาษาอังกฤษที่ใช้ปนกับภาษาไทยนั้นให้พยายามแปลเป็นไทยเท่าที่จะทำได้ และให้เขียนคำเดิมกำกับในวงเล็บ การทับศัพท์ภาษาอังกฤษ ตลอดจนการเขียนตัวสะกด การันต์ ในภาษาไทยให้ใช้ตามแบบราชบัณฑิตยสถาน
7. ในกรณีของบทความวิจัย ต้องมีบทคัดย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ และแบ่งเนื้อหาของบทความเป็นบทนำ วิธีดำเนินงาน ผลการวิเคราะห์ บทสรุปและวิจารณ์
8. เชิงอรรถ (footnote) ใช้เฉพาะที่จำเป็นเพื่อขยายหรือให้รายละเอียดเพิ่มเติมแก่ใจความเฉพาะตอนในบทความ
9. ตารางและภาพประกอบ ถ้าบรรยายประกอบตารางหรือภาพประกอบควรจะสั้นและชัดเจน ถ้าเป็นภาพถ่ายให้ใช้ภาพขาว-ดำ ขนาดโปสเตอร์ ภาพเขียนลายเส้นควรเขียนด้วยหมึกดำ ภาพที่เขียนต้องชัดเจนและมีขนาดที่เหมาะสม
10. เอกสารอ้างอิง หรือบรรณานุกรม แนะนำให้เขียนตามแบบที่ทางวารสารกำหนด

ส่งต้นฉบับมาที่

กองบรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

อธิษฐานการสำหรับผู้เขียน

เรื่องที่ได้รับการตีพิมพ์ ผู้เขียนจะได้รับวารสารฉบับนั้น 2 เล่ม และสำเนาพิมพ์อีก 15 ชุด

การเขียนเอกสารอ้างอิงในวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

เอกสารอ้างอิง (Reference) หมายถึง เอกสารหรือส่วนหนึ่งของเอกสารที่อ้างอิงถึงหรือแปลมาโดยตรง การเขียนเอกสารอ้างอิงในเนื้อหานั้น ให้ใช้ระบบชื่อและปี เช่น Williams (2001) รายงานว่า... หรือ... (Williams, 2001) การเขียนเอกสารอ้างอิงในตอนท้ายบทความนั้น ให้ใส่เฉพาะเล่มที่มีการอ้างอิงไว้ในเนื้อหาเท่านั้น

บรรณานุกรม (Bibliography) หมายถึง เอกสารที่ใช้อ้างอิงในลักษณะที่สรุปเป็นหลักการหรือทฤษฎีโดยมิได้อ้างอิงหรือแปลมาโดยตรง

การเขียนเอกสารอ้างอิง หรือบรรณานุกรม มีแนวทางการเขียนดังนี้

1. หนังสือ

ก. ภาษาไทย

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

ข. ภาษาอังกฤษ

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

2. เอกสารราชการ

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

3. วารสาร

ก. ภาษาไทย

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

ข. ภาษาอังกฤษ

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

หมายเหตุ

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

