



วารสาร

วิทยาศาสตร์มข.

KKU SCIENCE JOURNAL

ปีที่ 33 ฉบับที่ 1-2 (ม.ค.-มิ.ย. 48) Vol.33 No. 1-2 (Jan.-Jun.'05)





วารสาร
วิทยาศาสตร์ปู
KKU SCIENCE JOURNAL

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

แจ้งความจำนงค์เป็นจดหมายหรือกรอกใบสมัครเป็นสมาชิก พร้อมค่าบำรุงเป็นธนาคัติ หรือเช็คไปรษณีย์ ในนามของนางบุญคุ้ม เหลือสิน ฝ่ายจัดการ
ส่งจาย ป.ท. มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

ที่ปรึกษา

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
รองคณบดีฝ่ายวิชาการ

บรรณาธิการ

นฤมล แสงประดับ

กองบรรณาธิการ

กิตติกร นาคประสิทธิ์
งามนิจ อางอินทร์
ชุติมา หาญจวนิช
ประเสริฐ แข่งขัน
สมปอง ธรรมศิริรักษ์
สมเดช กนกเมธากุล
สุพรรณิ อึ้งปัญต์วงศ์
เสาวนิต ทองพิมพ์
อัจฉราภรณ์ ภักดี

ฝ่ายศิลป์และภาพ

กิเลน ดิฉนรเศรษฐ์
สุชาติ เทพภูเขียว

ฝ่ายเหรียญกษาปณ์

บุญคุ้ม เหลือสิน

ฝ่ายจัดการและ เลขานุการ

ศุภลักษณ์ ทองปัน
สมศักดิ์ อุ่นจันทิ

**บทความและงานวิจัย
ได้รับการกลั่นกรอง
จากผู้ทรงคุณวุฒิ**

วารสาร

วิทยาศาสตร์ชุมชน

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

ปีที่ 33 ฉบับที่ 1-2

Volume 33 Number 1-2

บรรณาธิการแถลง

บทความ

- ☐ ผลเฉลยของกำหนดการแข่งเส้นใน 2 ตัวแปร
จิระยุทธ เวทย์วีระพงศ์..... 1
- ☐ สามเหลี่ยมที่มีพื้นที่เท่ากับความยาวของเส้นรอบรูป
มิตรี กระพี้แดง..... 5
- ☐ การหาและการตรวจสอบความถูกต้องของ
ดีเทอร์มิแนนต์
นิรุต มีเกิด..... 9
- ☐ วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง
รัชยาพร อโนราช และนาถธิดา วีระปรียากร.... 13

วารสาร

วิทยาศาสตร์ชุมชน

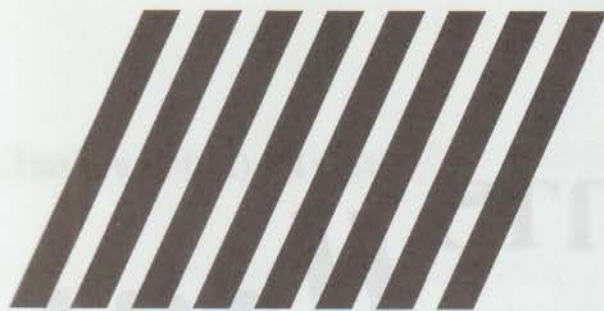
K K U S C I E N C E J O U R N A L

ปีที่ 33 ฉบับที่ 1-2

Volume 33 Number 1-2

งานวิจัย

- ☐ การหาสูตรโมเลกุลทั่วไปของสารประกอบ
อะลิเฟติกไฮโดรคาร์บอน โดยสมบัติทางกราฟ
ฟิสิกัล ภูผาสุข..... 19
- ☐ คุณภาพยาเม็ด ไกลเบนคลาไมด์
กมลทิพย์ จูดาทิศ, อมรพรรณ อุ่นชัย
และศุภลักษณ์ พริ้งเพระ..... 23
- ☐ การศึกษาความแม่นยำและความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์
องค์ประกอบน้ำหนักและคุณภาพของนมสดและนมปรุงแต่ง
ที่จำหน่ายใน 4 จังหวัด ภาคตะวันออกเฉียงเหนือในช่วงปี
2544 - 2546
วิไล เส, โสภิน บำเพ็ญทรัพย์
และไพรวลัย อินทร์อุดม..... 32
- ☐ การชักนำการกลายพันธุ์ การแยกและการหาสภาวะที่
เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลลาเนสของเชื้อรา
สายพันธุ์กลาย
อารี ฤทธิบุรณ และ สุนันทา มีชนะ..... 41
- ☐ *In vitro* propagation of orchid, *Grammatophyllum*
speciosum
Somporn Prasertsongskun I and
Ekasit Ponsoda..... 53



วิทยาาสตร์
KKU SCIENCE JOURNAL

Publisher

Faculty of Science, Khon Kaen University,
Thailand.

Office

Faculty of Science, Building 6, Khon Kaen
University.

Objectives

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

Publishing frequency

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

Number 1 January - March

Number 2 April - June

Number 3 July - September

Number 4 October - December

Subscription rate

75 baht per annum. Single issue price 20 baht.

Membership

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

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

Editor Narumon Sangpradub

Editorial Board Kittikorn Nakpasit
Ngamnij Arch-int
Chutima Hanjavanit
Prasert Kaengkan
Sompong Thammasirirak
Somdej Kanokmedhakul
Supunnee Ungpansattawong
Soawanit Tongpim
Adcharaporn Pagdee

Artists Kilen Tinnoraset
Suchart Thepphukhieo

Treasurer Boonkoom Lualon

Managing Staff Suphaluk Tongpun
And Secretary Somsak Unjantee

**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 opinion of the editorial board.

บรรณาธิการ แถลง

สวัสดีค่ะ ท่านสมาชิกวารสารฯ และท่านผู้อ่านทุกท่าน

ขอแนะนำกองบรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์ มข. ชุดใหม่ซึ่งประกอบด้วยตัวแทนจากทุกภาควิชาฯ และสำนักงานคณบดีดังรายนามที่ปรากฏ กองบรรณาธิการฯ ชุดนี้ได้ร่วมกับกองบรรณาธิการฯ ชุดเดิมในการจัดทำวารสารวิทยาศาสตร์ มข. เล่มปีที่ 32 ฉบับที่ 4 (ตุลาคม - ธันวาคม 2547) ซึ่งท่านได้รับไปเรียบร้อยแล้ว สำหรับวารสารวิทยาศาสตร์ มข. ฉบับนี้เป็นเล่มรวมของฉบับปีที่ 33 เล่มที่ 1-2 (มกราคม - มิถุนายน 2548) เนื้อหาประกอบด้วยบทความวิจัย 4 เรื่อง คือ คุณภาพยาเม็ดไกลเบนคลาไมด์ การวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำมันและคุณภาพของนมสดและนมปรุงแต่ง การชักนำ การกลายพันธุ์ การแยก และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไโซลันเนสของเชื้อราสายพันธุ์กลาย และการขยายพันธุ์ต้นกล้ากล้วยไม้ว่านเพชรหึง และบทความปริทรรศน์ 5 เรื่อง คือ ผลเฉลยของกำหนดการเชิงเส้นใน 2 ตัวแปร สามเหลี่ยมที่มีพื้นที่เท่ากับความยาวเส้นรอบรูป การหาและการตรวจสอบความถูกต้องของดีเทอร์มิแนนต์ การหาสูตรโมเลกุลทั่วไปของสารประกอบอะลิเฟติกไฮโดรคาร์บอนโดยสมบัติทางกราฟ และวิธีทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง ซึ่งน่าติดตามทุกเรื่อง

กองบรรณาธิการฯ ขอขอบคุณทุกท่านที่ให้เกียรติส่งเรื่องมาเพื่อตีพิมพ์ และสมัครเป็นสมาชิกวารสารฯ คอยพบกับวารสารวิทยาศาสตร์ มข. ปีที่ 33 ฉบับที่ 3-4 ในเร็วๆ นี้ค่ะ

บรรณาธิการ

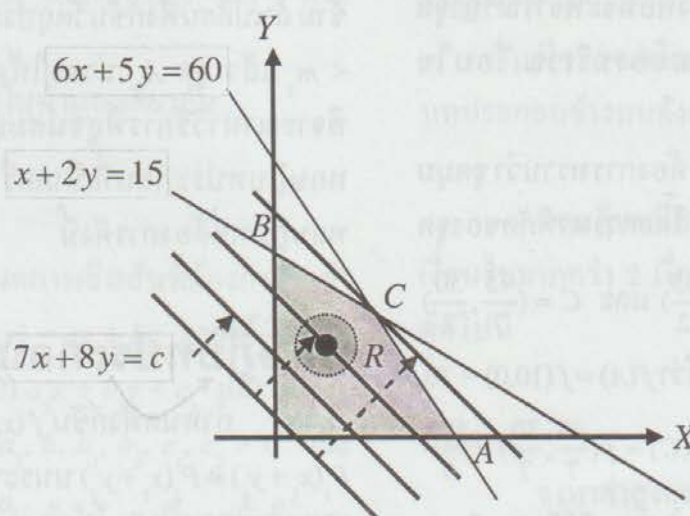
ผลเฉลยของกำหนดการเชิงเส้นใน 2 ตัวแปร

จีระยุทธ เวทย์วีระพงศ์

ผลเฉลยของกำหนดการเชิงเส้นใน 2 ตัวแปร สามารถหาได้โดยใช้วิธีการทางเรขาคณิต พบว่าการพิจารณาความชันของเส้นตรงที่กำหนด สมการวัตถุประสงค์ และความชันของเส้นตรงของเงื่อนไขที่เป็นขอบของบริเวณที่เป็นไปได้ของคำตอบทั้งหมดสามารถบอกตำแหน่งของจุดที่ให้ผลเฉลยที่ต้องการได้

บทนำ

พิจารณาตัวอย่างของกำหนดการเชิงเส้นใน 2 ตัวแปร x, y ต่อไปนี้ ต้องการหาค่าสูงสุดของ ฟังก์ชันวัตถุประสงค์ $f(x, y) = 7x + 8y$ ภายใต้เงื่อนไข (1) $x + 2y < 15$, (2) $6x + 5y < 60$ และ $x > 0, y > 0$



รูปที่ 1 การพิจารณาทางเรขาคณิตของปัญหากำหนดการเชิงเส้นใน 2 ตัวแปร x, y

จากเงื่อนไขที่กำหนด จะได้บริเวณ R (ส่วนที่แรเงา) เป็นบริเวณที่เป็นไปได้ของคำตอบทั้งหมด ซึ่งมีจุด $(0,0)$, A , B , C เป็นจุดมุมของบริเวณดังกล่าว เมื่อพิจารณาใช้กลุ่มของเส้นขนาน $7x + 8y = c$ โดยการเลื่อนเส้นตรงไปในทิศทางที่ทำให้ค่า c เพิ่มขึ้น จะเห็นได้ว่า ค่า c ที่มากที่สุดที่เส้นตรง $7x + 8y = c$ แตะขอบของบริเวณ R จะให้ค่าสูงสุดของฟังก์ชันวัตถุประสงค์ และให้ตำแหน่งของจุดที่เป็นผลเฉลยของปัญหา ซึ่งจะเห็นได้ว่า จุดที่ให้ผลเฉลยจะต้องเป็นจุดมุมหรือจุดที่อยู่บนขอบของบริเวณ R เพราะว่า สำหรับจุดใดๆที่เป็นจุดที่อยู่ภายในแล้ว จะสามารถสร้างบริเวณวงกลมเล็กๆที่มีจุดดังกล่าวเป็นจุดศูนย์กลาง และให้บริเวณของวงกลมทั้งหมดอยู่ภายใน R จะได้ว่า ยังสามารถขยับเลื่อนเส้นตรง $7x + 8y = c$ ที่ผ่านจุดดังกล่าว ให้มีค่า c เพิ่มขึ้นได้อีกโดยที่ยังไม่หลุดออกจากบริเวณของเงื่อนไข R ซึ่งแสดงว่า จุดภายในยังไม่ใช่จุดที่ให้ค่าสูงสุด ดังนั้นจึงเป็นการเพียงพอที่จะพิจารณาหาจุดที่ให้ผลเฉลยเฉพาะที่จุดมุมของบริเวณเงื่อนไขเท่านั้น

จากปัญหาดังกล่าว ต้องการทราบว่าจุดมุม A, B หรือ C ให้ค่า f สูงสุด โดยการหาพิกัดของจุดจะได้ว่า $A = (10, 0)$, $B = (0, \frac{15}{2})$ และ $C = (\frac{45}{7}, \frac{30}{7})$ จากการแทนค่าโดยตรง จะได้ว่า $f(A) = f(10, 0) = 70$, $f(B) = f(0, \frac{15}{2}) = 60$ และ $f(C) = f(\frac{45}{7}, \frac{30}{7}) = \frac{555}{7}$ ดังนั้นจุด C ให้ค่า f สูงสุดเท่ากับ $\frac{555}{7}$ จะเห็นว่าโดยวิธีการนี้จำเป็นต้องหาพิกัดของจุดมุมทั้งหมดของบริเวณเงื่อนไข คำนวณหาค่าฟังก์ชันที่ได้จากแต่ละจุดมุม และเปรียบเทียบกันเพื่อหาจุดที่ให้ค่าฟังก์ชันสูงสุด บทความนี้จะนำเสนออีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการพิจารณาและบอกว่าจุดมุมใดให้ค่าฟังก์ชันสูงสุดโดยไม่ต้องทำการคำนวณตามวิธีการดังกล่าว

การพิจารณาความชันของเส้นตรงที่กำหนดสมการวัตถุประสงค์และเส้นตรงของเงื่อนไข

จากตัวอย่างดังกล่าว จะได้เส้นตรงของสมการวัตถุประสงค์เป็น $y = c + \left(\frac{-7}{8}\right)x$ และได้เส้น

ตรงของเงื่อนไขเป็น $y = 15 + \left(\frac{-1}{2}\right)x$ และ

$y = 60 + \left(\frac{-6}{5}\right)x$ ให้ m เป็นความชันของสมการ

วัตถุประสงค์ m_1 เป็นความชันของส่วนของเส้นตรง BC และ m_2 เป็นความชันของส่วนของเส้นตรง CA

จะได้ว่า $m = \frac{-7}{8}$, $m_1 = \frac{-1}{2}$ และ $m_2 = \frac{-6}{5}$

ตามลำดับ ให้สังเกตว่าเรามี $m_2 < m < m_1$ และได้ว่าจุด C ให้ค่าฟังก์ชันสูงสุด

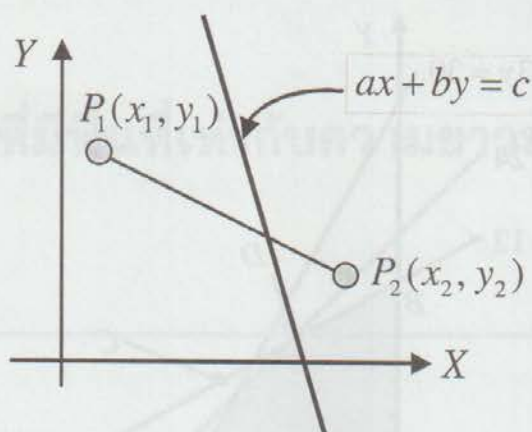
จากการสังเกต ดังสมมติฐานได้ว่า ถ้าหากเปลี่ยนฟังก์ชันวัตถุประสงค์ให้มีความชัน $m > m_2$ แล้วจุด B น่าจะให้ค่าฟังก์ชันสูงสุด ในทางตรงกันข้าม ถ้าเปลี่ยนฟังก์ชันวัตถุประสงค์ให้มีความชัน $m < m_2$ แล้วจุด A น่าจะให้ค่าฟังก์ชันสูงสุด เมื่อพิจารณาหาวิธีการพิสูจน์สมมุติฐานดังกล่าว จะได้ทฤษฎีบทประกอบที่เป็นเครื่องมือสำคัญที่นำไปสู่ทฤษฎีบทที่ต้องการดังนี้

ทฤษฎีบทประกอบ

กำหนดฟังก์ชัน $f(x, y) = ax + by$ และจุด $P_1(x_1 + y_1) \neq P_2(x_2 + y_2)$ บนระนาบ XY เมื่อ a, b เป็นค่าคงที่ โดยที่ $b > 0$ และ $x_1 < x_2$ ให้ $m = \frac{-a}{b}$ และ

$$m_1 = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \quad \text{จะได้ว่า}$$

1. ถ้า $m < m_1$ แล้ว $f(P_1) < f(P_2)$
2. ถ้า $m > m_1$ แล้ว $f(P_2) < f(P_1)$



รูปที่ 2 ภาพประกอบการพิสูจน์ทฤษฎีบทประกอบ

พิสูจน์

1. จาก $\frac{-a}{b} < \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$ และเงื่อนไข $b > 0$

และ $x_2 - x_1 > 0$ จะได้ว่า $-a(x_2 - x_1) < b(y_2 - y_1)$ ซึ่งทำให้
ได้ว่า $ax_1 + by_1 < ax_2 + by_2$ นั่นคือ $f(P_1) < f(P_2)$ ตาม
ที่ต้องการ

2. พิสูจน์ได้ในทำนองเดียวกัน

ทฤษฎีบท

ปัญหาคำหนดการเชิงเส้นที่ต้องการหาค่า
สูงสุดของฟังก์ชัน $f(x, y) = ax + by$ ภายใต้เงื่อนไข

(1) $a_1x + b_1y < c_1$, (2) $a_2x + b_2y < c_2$ และ $x > 0$,
 $y > 0$ โดยที่ $a, a_1, a_2, b, b_1, b_2, c_1, c_2 > 0$ และ

$\frac{-a_2}{b_2} = m_2 < m_1 = \frac{-a_1}{b_1}$ ถ้าให้ B เป็นจุดที่เส้นตรง

$l_1: a_1x + b_1y = c_1$ ตัดแกน Y A เป็นจุดที่เส้นตรง l_1 :
 $a_2x + b_2y = c_2$ ตัดแกน X และ C เป็นจุดตัดระหว่าง l_1

และ l_2 และให้ $m = \frac{-a}{b}$ แล้วจะได้ว่า

1. ถ้า $m < m_2$ แล้วจุด A ให้ค่าสูงสุด
2. ถ้า $m_2 < m < m_1$ แล้วจุด C ให้ค่าสูงสุด
3. ถ้า $m_1 < m$ แล้วจุด B ให้ค่าสูงสุด

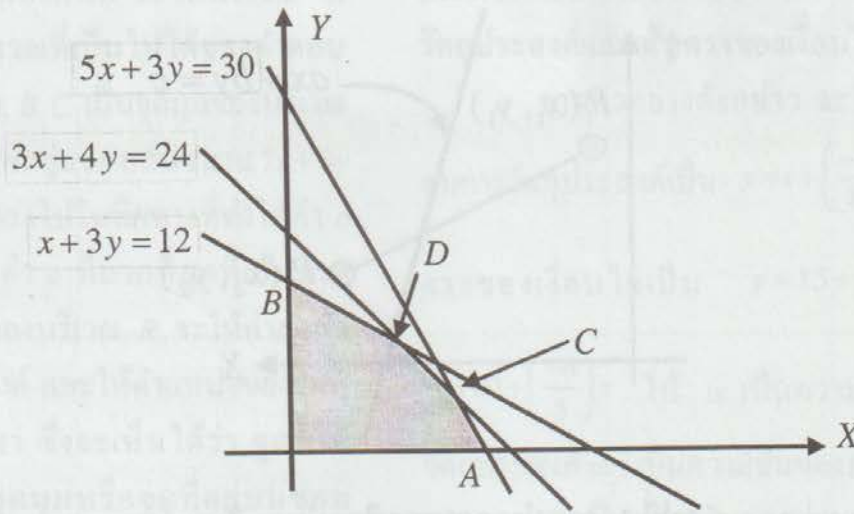
พิสูจน์

พิจารณาในแต่ละกรณีและใช้ทฤษฎี
บทประกอบข้างบนดังกล่าว

ทฤษฎีบทนี้สามารถขยายใช้ได้กับกรณีที่มี
เงื่อนไขมากกว่า 2 เงื่อนไข ดังจะแสดงในตัวอย่าง
ต่อไปนี้

ตัวอย่าง

จงหาค่าสูงสุดของฟังก์ชัน $f(x, y) = 8x + 13y$
ภายใต้เงื่อนไข (1) $x + 3y < 12$, (2) $3x + 4y < 24$,
(3) $5x + 3y < 30$ และ $x > 0, y > 0$



รูปที่ 3 ภาพประกอบตัวอย่างการใช้ทฤษฎีบท

พิจารณาเส้นตรงของเงื่อนไขทั้ง 3 จะได้

ความชัน $m_1 = \frac{-1}{3}, m_2 = \frac{-3}{4}, m_3 = \frac{-5}{3}$ ตาม

ลำดับ โดยมีความชันของเส้นตรงของฟังก์ชันวัตถุ

ประสงค์เป็น $m = \frac{-8}{13}$ จากการพิจารณาจะได้ว่า m_3

$< m_2 < m < m_1$ ดังนั้นจุด D เป็นจุดที่ให้ค่า f สูงสุด

บรรณานุกรม

ภาควิชาคณิตศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. (2539).

คณิตศาสตร์ 2. ภาควิชาคณิตศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

จีระยุทธ เวทย์วิระพงศ์และ ทมะ ดวงนามล. (2545).

รายงานการฝึกงานภาคฤดูร้อน หัวข้อเรื่อง
กำหนดการเชิงเส้นใน 2 ตัวแปร. ภาควิชา
คณิตศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

๒๒๒๒๒

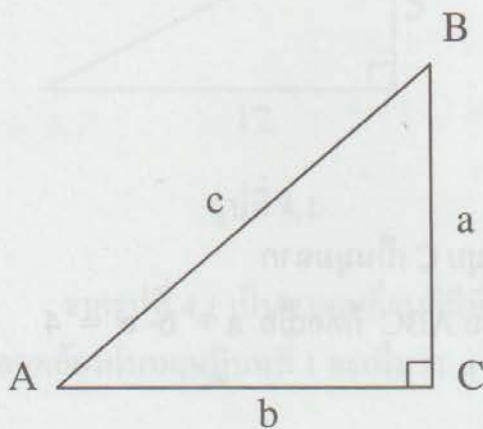
สามเหลี่ยมที่มีพื้นที่เท่ากับความยาวของเส้นรอบรูป

มิตรี กระพีแดง'

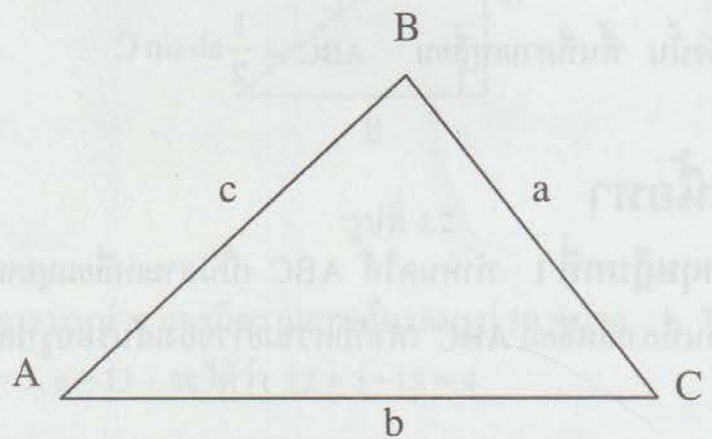
บทนำ

บทความนี้จะพิจารณาสามเหลี่ยมที่มีพื้นที่เท่ากับความยาวของเส้นรอบรูป เพื่อหาความสัมพันธ์ของด้านทั้งสามของสามเหลี่ยมโดยในบทความนี้เป็นสามเหลี่ยมมุมฉากและเป็นสามเหลี่ยมใดๆ ความสัมพันธ์ของความยาวของด้านทั้งสามของสามเหลี่ยม มีค่าเป็นไป ตามทฤษฎีบทที่ 1 และ 2

ความรู้พื้นฐาน



รูปที่ 1



รูปที่ 2

ทฤษฎีบทพีทาโกรัส ถ้า ABC เป็นสามเหลี่ยมมุมฉาก ซึ่งมี $\angle C$ เป็นมุมฉาก ดังรูปที่ 1 จะได้ว่า

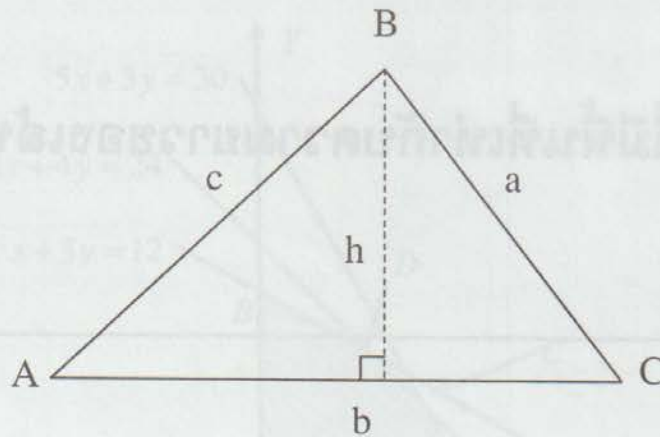
$$c^2 = a^2 + b^2$$

กฎของโคไซน์ ถ้า ABC เป็นสามเหลี่ยมใดๆ ดังรูปที่ 2

$$c^2 = a^2 + b^2 - 2ab \cos C$$

$$a^2 = b^2 + c^2 - 2bc \cos A$$

$$b^2 = a^2 + c^2 - 2ac \cos B$$



รูปที่ 3

พื้นที่สามเหลี่ยม

$$\text{พื้นที่สามเหลี่ยม } ABC = \frac{1}{2} \times \text{ฐาน} \times \text{สูง}$$

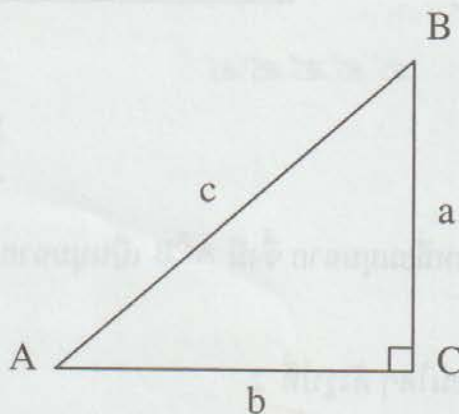
จากรูปที่ 3 จะได้ $h = a \sin C$

$$\text{ดังนั้น พื้นที่สามเหลี่ยม } ABC = \frac{1}{2} ab \sin C$$

เนื้อหา

ทฤษฎีบทที่ 1 กำหนดให้ ABC เป็นสามเหลี่ยมมุมฉาก ซึ่งมีมุม C เป็นมุมฉาก

พื้นที่สามเหลี่ยม ABC เท่ากับความยาวของเส้นรอบรูปสามเหลี่ยม ABC ก็ต่อเมื่อ $a + b - c = 4$



พิสูจน์ โดยทฤษฎีบทพีทาโกรัส จะได้

$$a^2 + b^2 - c^2 = 0$$

$$a^2 + 2ab + b^2 - c^2 = 2ab$$

$$(a + b)^2 - c^2 = 2ab$$

$$(a + b + c)(a + b - c) = 2ab \dots\dots\dots(1)$$

(→) สมมติว่า พื้นที่สามเหลี่ยม ABC เท่ากับความยาวของเส้นรอบรูปสามเหลี่ยม ABC

นั่นคือ
$$\frac{1}{2}ab = a + b + c$$

แทนค่า $a + b + c = \frac{1}{2}ab$ ลงใน (1) จะได้ $\frac{1}{2}ab (a + b - c) = 2ab$

ดังนั้น $(a + b - c) = 4$

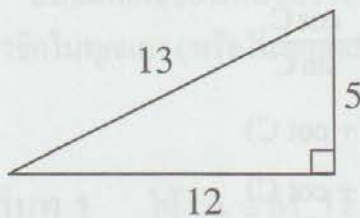
(←) สมมติว่า $(a + b - c) = 4$

แทนค่า $(a + b - c) = 4$ ลงใน (1) จะได้ $(a + b + c) 4 = 2ab$

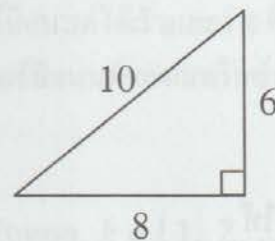
$$(a + b + c) = \frac{1}{2}ab$$

นั่นคือ ความยาวของเส้นรอบรูปสามเหลี่ยม ABC เท่ากับ พื้นที่สามเหลี่ยม ABC ดังนั้นพื้นที่สามเหลี่ยม ABC เท่ากับความยาวของเส้นรอบรูปสามเหลี่ยม ABC ก็ต่อเมื่อ $a + b - c = 4$

ตัวอย่างของสามเหลี่ยมที่สอดคล้องกับ ทฤษฎีบทที่ 1



รูปที่ 4.1



รูปที่ 4.2

จากรูปที่ 4.1 เป็นสามเหลี่ยมที่มีพื้นที่ 30 ตารางหน่วย และมีความยาวเส้นรอบรูป 30 หน่วย ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีบทที่ 1 จะเห็นว่า $a = 12, b = 5, c = 13$ จะได้ว่า $12 + 5 - 13 = 4$

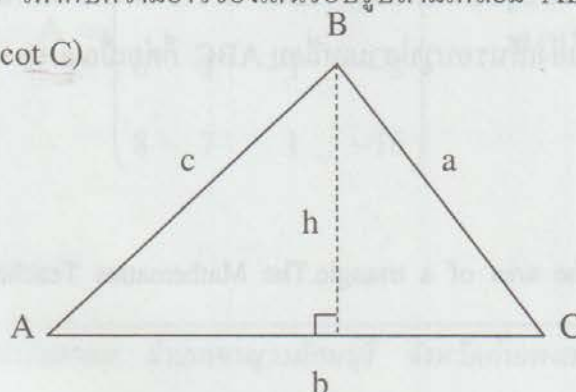
#

จากรูปที่ 4.2 เป็นสามเหลี่ยมที่มีพื้นที่ 24 ตารางหน่วย และมีความยาวเส้นรอบรูป 24 หน่วย ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีบทที่ 1 จะเห็นว่า $a = 8, b = 6, c = 10$ จะได้ว่า $8 + 6 - 10 = 4$ #

ทฤษฎีบทที่ 2 กำหนดให้ ABC เป็นสามเหลี่ยมใดๆ

พื้นที่สามเหลี่ยม ABC เท่ากับความยาวของเส้นรอบรูปสามเหลี่ยม ABC ก็ต่อเมื่อ

$$a + b - c = 4(\csc C + \cot C)$$



พิสูจน์ โดยกฎของโคไซน์ จะได้

$$c^2 = a^2 + b^2 - 2ab \cos C$$

และได้

$$a^2 + b^2 - c^2 = 2ab \cos C$$

$$a^2 + 2ab + b^2 - c^2 = 2ab + 2ab \cos C$$

$$(a + b)^2 - c^2 = 2ab (1 + \cos C)$$

ดังนั้น

$$(a + b + c)(a + b - c) = 2ab (1 + \cos C) \dots\dots\dots(2)$$

(→) สมมติว่า พื้นที่สามเหลี่ยม ABC เท่ากับความยาวของเส้นรอบรูปสามเหลี่ยม ABC

นั่นคือ

$$\frac{1}{2}ab \sin C = a + b + c$$

แทนค่า $a + b + c = \frac{1}{2}ab \sin C$ ลงใน (2) จะได้

$$\frac{1}{2}ab \sin C (a + b - c) = 2ab (1 + \cos C)$$

$$(a + b - c) = \frac{4}{\sin C} (1 + \cos C)$$

$$= 4 \left(\frac{1}{\sin C} + \frac{\cos C}{\sin C} \right)$$

$$= 4 (\csc C + \cot C)$$

(←) สมมติให้

$$(a + b - c) = 4 (\csc C + \cot C)$$

$$= 4 \left(\frac{1}{\sin C} + \frac{\cos C}{\sin C} \right)$$

$$= \frac{4}{\sin C} (1 + \cos C)$$

แทนค่า $(a + b - c) = \frac{4}{\sin C} (1 + \cos C)$ ลงใน (2) จะได้

$$(a + b + c) \frac{4}{\sin C} (1 + \cos C) = 2ab (1 + \cos C)$$

$$(a + b + c) = \frac{1}{2}ab \sin C$$

นั่นคือ ความยาวของเส้นรอบรูปสามเหลี่ยม ABC เท่ากับ พื้นที่สามเหลี่ยม ABC ดังนั้นพื้นที่สามเหลี่ยม ABC เท่ากับความยาวของเส้นรอบรูปสามเหลี่ยม ABC ก็ต่อเมื่อ $a + b - c = 4 (\csc C + \cot C)$

บรรณานุกรม

Bates, M. (1979) Serendipity on the area of a triangle. The Mathematics Teacher. (72):273-275.

การหาและการตรวจสอบความถูกต้องของดีเทอร์มิแนนต์

นิรุต มีเกิด¹

ในการหาดีเทอร์มิแนนต์ของเมทริกซ์นั้น สามารถหาได้หลายวิธี เช่น หาโดยใช้ทฤษฎีการกระจายตัวประกอบร่วมเกี่ยว (cofactor) เป็นต้น

บทความนี้จะนำทฤษฎีบทและบทแทรกทางคณิตศาสตร์เกี่ยวกับสมบัติพิเศษบางประการของดีเทอร์มิแนนต์มาประยุกต์ใช้ในการหาค่าและตรวจสอบความถูกต้อง ซึ่งในที่นี้จะพิจารณาบนเมทริกซ์จัตุรัสที่มีสมาชิกเป็นจำนวนเต็ม

สมบัติพิเศษอย่างหนึ่งที่จะช่วยในการพิจารณาหาค่าของดีเทอร์มิแนนต์ได้เร็วและง่าย คือ ถ้าผลรวมยอดของสมาชิกในทุกแถว (หรือในทุกสดมภ์) มีค่าเท่ากับศูนย์ แล้วค่าดีเทอร์มิแนนต์ของเมทริกซ์นั้นจะเท่ากับศูนย์

ทฤษฎีบท 1 ให้ $A \in M_n(z)$ ซึ่ง $\sum_{j=1}^n a_{kj} = 0$ สำหรับทุกๆ $k \in \{1, 2, \dots, n\}$

แล้ว $\det A = 0$ (Meekoed, 2003)

บทแทรก 1 ให้ $A \in M_n(z)$ ซึ่ง $\sum_{i=1}^n a_{ik} = 0$ สำหรับทุกๆ $k \in \{1, 2, \dots, n\}$

แล้ว $\det A = 0$ (Meekoed, 2003)

ตัวอย่าง 1 ให้

$$A = \begin{pmatrix} 2 & 7 & -9 & 0 \\ 3 & 1 & 18 & -22 \\ 6 & 3 & -1 & -8 \\ 8 & 7 & 1 & -16 \end{pmatrix}$$

จงหา $\det A$

วิธีทำ

เนื่องจาก $2 + 7 - 9 + 0 = 0$

$$3 + 1 + 18 - 22 = 0$$

$$6 + 3 - 1 - 8 = 0$$

$$8 + 7 - 1 - 16 = 0$$

ดังนั้น $\det A = 0$

#

ตัวอย่าง 2

ให้

$$B = \begin{pmatrix} 5 & -7 & 3 & 1 \\ 0 & -3 & 0 & 2 \\ 2 & 0 & 4 & -5 \\ -7 & 10 & -7 & 2 \end{pmatrix} \quad \text{จงหา } \det B$$

วิธีทำ

เนื่องจาก $5 + 0 + 2 - 7 = 0$

$$-7 - 3 + 0 + 10 = 0$$

$$3 + 0 + 4 - 7 = 0$$

$$1 + 2 - 5 + 2 = 0$$

ดังนั้น $\det B = 0$

#

ส่วนการตรวจสอบความถูกต้องของดีเทอร์มิแนนต์นั้น สามารถใช้สมบัติพิเศษที่ว่า ถ้ากลุ่มลำดับของสมาชิกในแต่ละแถว (หรือในแต่ละสดมภ์) สามารถหา ห.ร.ม. ได้ แล้ว ห.ร.ม. นี้จะหารดีเทอร์มิแนนต์ลงตัว

ทฤษฎีบท 2 ให้ $A \in M_n(\mathbb{Z})$ ซึ่ง A สามารถหา ห.ร.ม. ของ $\sum_{j=1}^n a_{1j}, \sum_{j=1}^n a_{2j}, \dots, \sum_{j=1}^n a_{nj}$ ได้

$$\text{แล้ว } \left(\sum_{j=1}^n a_{1j}, \sum_{j=1}^n a_{2j}, \dots, \sum_{j=1}^n a_{nj} \right) \mid \det A \quad (\text{Meekoed, 2003})$$

บทแทรก 2 ให้ $A \in M_n(\mathbb{Z})$ ซึ่ง A สามารถหา ห.ร.ม. ของ $\sum_{i=1}^n a_{i1}, \sum_{i=1}^n a_{i2}, \dots, \sum_{i=1}^n a_{in}$ ได้

$$\text{แล้ว } \left(\sum_{i=1}^n a_{i1}, \sum_{i=1}^n a_{i2}, \dots, \sum_{i=1}^n a_{in} \right) \mid \det A \quad (\text{Meekoed, 2003})$$

ตัวอย่าง 3 ให้

$$C = \begin{pmatrix} 4 & 7 & 9 & 8 \\ 5 & 1 & 3 & 5 \\ 1 & 2 & 1 & 3 \\ 3 & 8 & 6 & 4 \end{pmatrix}$$

ค่าของ $\det C$ คือข้อใด ?

- ก. -273 ข. -127 ค. 39 ง. 142

ผลเฉลย เนื่องจาก $4 + 7 + 9 + 8 = 28, 5 + 1 + 3 + 5 = 14, 1 + 2 + 1 + 3 = 7$ และ $3 + 8 + 6 + 4 = 21$ จะได้ ห.ร.ม. ของ $(28, 14, 7, 21) = 7$ ซึ่งจะเห็นว่า $7 \mid -273$ แต่ $7 \nmid -127$ $7 \nmid 39$ และ $7 \nmid 142$ ดังนั้นคำตอบที่ถูกต้อง คือ ข้อ ก. #

ตัวอย่าง 4 ให้

$$D = \begin{pmatrix} 2 & 0 & 3 & 8 & -1 \\ 8 & 1 & 1 & 2 & -8 \\ 5 & 7 & 4 & 6 & 12 \\ 1 & 1 & 7 & 8 & -7 \\ 2 & 0 & 3 & 12 & 4 \end{pmatrix}$$

ค่าของ $\det D$ คือข้อใด ?

- ก. -150 ข. -205 ค. -270 ง. 187

ผลเฉลย เนื่องจาก $2 + 8 + 5 + 1 + 2 = 18, 0 + 1 + 7 + 1 + 0 = 9, 3 + 1 + 4 + 7 + 3 = 18, 8 + 2 + 6 + 8 + 12 = 36, -1 - 8 + 12 - 7 + 4 = 0$ จะได้ ห.ร.ม. ของ $(18, 9, 18, 36, 0) = 9$ ซึ่งจะเห็นว่า $9 \mid -270$ แต่ $9 \nmid -150$ $9 \nmid -205$ และ $9 \nmid 187$ ดังนั้นคำตอบที่ถูกต้อง คือ ข้อ ค. #

ตัวอย่าง 5 ให้

$$E = \begin{pmatrix} 8 & 1 & 3 \\ 7 & 3 & 1 \\ 5 & 1 & 6 \end{pmatrix}$$

ค่าของ $\det E$ คือข้อใด ?

- ก. 38 ข. 75 ค. 79 ง. 90

ผลเฉลย เนื่องจาก $8+7+5=20$, $1+3+1=5$, $3+1+6=10$

จะได้ ห.ร.ม. ของ $(20, 5, 10)=5$ ซึ่งจะเห็นว่า $5 \mid 75$ และ $5 \mid 90$ แต่ $5 \nmid 38$ และ $5 \nmid 79$ ดังนั้นคำตอบที่อาจเป็นไปได้มี 2 ข้อ คือ ข้อ ข. หรือ ข้อ ง. เมื่อกำหนดค่าแล้วจะได้ว่า $\det E = 75$ ดังนั้นคำตอบที่ถูกต้อง คือ ข้อ ข. #

บรรณานุกรม

- จรัส อินสม. (2546). คู่มือคณิตศาสตร์เพิ่มเติม เล่ม 2 ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 4 ภาคเรียนที่ 2. กรุงเทพมหานคร. สำนักพิมพ์แม็ค.
- ส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, สถาบัน. (2546). หนังสือเรียนสาระการเรียนรู้เพิ่มเติม คณิตศาสตร์ เล่ม 2 ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 4. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว.
- Meekoed, N. (2003). Some Special Properties of Determinants. *KKU Science Journal*. 31(4) : 214-217.

วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในหลอดทดลอง

รัชยาพร อโนราช¹ และ นาถธิดา วีระปรียากร¹

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ อยู่วณอกสุดของออร์บิทัล อะตอมหรือโมเลกุลเหล่านี้ไม่เสถียร คือมีอายุสั้นมากประมาณ 1 หรือ $10^{-3} - 10^{-10}$ วินาทีและไวต่อการทำปฏิกิริยา เช่น ไวต่อการทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในร่างกาย อนุมูลอิสระสามารถทำลายเซลล์หรือเนื้อเยื่อส่งผลให้เกิดอาการผิดปกติหรือก่อโรคในคน ตัวอย่างอนุมูลอิสระ ได้แก่ reactive oxygen species (ROS) เช่น superoxide ($O_2^{\cdot-}$), hydroxy free radical ($HO^{\cdot}$), oxide ของ nitrogen (NO , $NO_2^{\cdot}$) และ lipid radical ($RO^{\cdot}$, $ROO^{\cdot}$, $R^{\cdot}$) อนุมูลอิสระ เหล่านี้ส่วนใหญ่อาจเกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมปกติของร่างกายซึ่งร่างกายจะมีกลไกป้องกันการทำลายเซลล์และซ่อมแซมส่วนที่ถูกทำลายจากอนุมูลอิสระ (Simic and Taylor, 1988) กลไกเหล่านี้ประกอบด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น catalase, peroxidase, superoxide dismutase และ cytochrome oxidase นอกจากนี้ยังมีสารที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระในธรรมชาติ เช่น วิตามินซี, glutathione และกรดยูริก เป็นต้น สารเหล่านี้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและละลายน้ำ ในขณะที่วิตามินเอ วิตามินอี และสารชนิดสเตียรอยด์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สามารถละลายในไขมัน หากเกิดความไม่สมดุลของกลไกการ

ป้องกันปริมาณอนุมูลอิสระ เช่น เนื่องจากมีความบกพร่องของเอนไซม์ หรือความผิดปกติของร่างกาย จะทำให้มีอนุมูลอิสระมากเกินไป อนุมูลอิสระจะสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลเป้าหมาย เช่น โปรตีน ดีเอ็นเอ หรือไขมันได้ง่าย โดยเฉพาะกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid) กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวนี้เป็นส่วนประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่าง ๆ ภายในเซลล์ หากเกิดการเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระจะมีผลทำให้การทำงานของร่างกายผิดปกติไป และเป็นสาเหตุของโรคต่าง ๆ ตัวอย่างของโรคที่มีสาเหตุเนื่องมาจากอนุมูลอิสระ ได้แก่ Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Ischemic reperfusion injury, Arthritis, Myocardial infarction, Arteriosclerosis, หรือมะเร็ง เป็นต้น (Olsson and Yuan, 1996; Thomas and Stocker, 2000; Kong and Lillehei, 1998; Leu and Maa, 2002) ปัจจุบันสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปมาก ร่างกายได้รับตัวกระตุ้นที่ทำให้มีโอกาสเกิดอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น เอนไซม์ที่มีผลลดปริมาณอนุมูลอิสระ เช่น superoxide dismutase และ peroxidase ไม่สามารถควบคุมการเกิดอนุมูลอิสระได้ทั่วถึงจึงทำให้เสี่ยงต่อการเกิดความผิดปกติทางพยาธิสภาพต่าง ๆ ขึ้น ดังนั้นการศึกษาหาสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระหรือที่รู้จักกันว่าสารต้าน

ออกซิเดชันหรือสารแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) นั้นจึงมีความสำคัญ ซึ่งการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในปัจจุบัน มีวิธีการแตกต่างกันไปหลายวิธี มีทั้งการศึกษาแบบในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) ซึ่งแต่ละวิธีก็มีข้อจำกัด ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากหลาย ๆ วิธีการ เพื่อผลลัพธ์ที่สอดคล้องกัน ทำให้ทราบถึงกลไกในสารออกฤทธิ์ ซึ่งเนื้อหาที่จะกล่าวถึงต่อไปนี้จะนำเสนอหลักการและวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองที่มีอยู่ในปัจจุบัน และตรวจวัดด้วยเครื่องมือทางสเปกโทรสโกปี ที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจกรองฤทธิ์ของสารตัวอย่างได้

วิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Trolox equivalent antioxidant capacity assay (TEAC I) (Miller et al., 1993)

หลักการ เป็นการทำปฏิกิริยาออกซิเดชันของ 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-sulfonic acid) (ABTS) กับ metmyoglobin และ H_2O_2 ได้สารอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ที่มีสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร หากสารตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจะยับยั้งการดูดกลืนแสงของอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$

ขั้นตอนการทดลอง เตรียมสารละลายผสมของ ABTS, H_2O_2 กับ metmyoglobin ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline solution) pH 7.4 เพื่อทำให้เกิด $ABTS^{\bullet+}$ ส่วนตัวอย่างที่จะนำมาทดลองให้ละลายในน้ำ ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ $ABTS^{\bullet+}$ ที่ลดลง ณ เวลาต่าง ๆ หลังจากผสมสารตัวอย่างที่จะทดสอบกับ $ABTS^{\bullet+}$

TEAC with MnO_2 (TEAC II) (Miller et al., 1996)

หลักการ เป็นการทำปฏิกิริยาออกซิเดชันของ ABTS กับ manganese dioxide (MnO_2) โดยการกรอง ABTS ผ่าน MnO_2 เพื่อให้ได้ $ABTS^{\bullet+}$ ที่มีค่าการดูดกลืนแสง

ที่ 734 นาโนเมตรแล้วนำไปทำปฏิกิริยากับสารที่จะทดสอบ หากสารที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน การดูดกลืนแสงของ $ABTS^{\bullet+}$ จะลดลง ขั้นตอนการทดลอง เตรียม ABTS ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 mM, pH 7.4 (PBS) กรองผ่านผง MnO_2 แล้วนำไปกรองต่อผ่าน syringe filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เพื่อกำจัด MnO_2 ที่เกินมาแล้วเจือจางด้วย 5 mM PBS, pH 7.4 ทำการปรับความเข้มข้นเพื่อให้วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ประมาณ 0.700 ± 0.020 ที่ค่าความยาวคลื่น 743 นาโนเมตร ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องจะได้สารละลายของอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ในการทดสอบใช้สารละลาย $ABT^{\bullet+}$ 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายที่ต้องการทดสอบในน้ำ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเขย่า 30 วินาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 60 วินาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV - Vis spectrophotometer หลังจากเวลา 2 นาที การทดลองต้องมีหลอดทดลองที่เป็น blank (PBS) และหลอดควบคุม (สารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ และน้ำ) การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะดูจากการดูดกลืนแสงที่ลดลง ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

TEAC assay with ABTS and $K_2O_8S_2$ (TEAC III) (Re et al., 1999)

หลักการ คล้ายกับ TEAC I และ II โดยพิจารณาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารที่จะทดสอบจากการไปลดปริมาณอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ แต่สามารถใช้ทดสอบได้ทั้งสารตัวอย่างที่มีความชอบน้ำ (hydrophilic) หรือสารที่มีความชอบไขมัน (lipophilic) ถ้าสารที่ทดสอบมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจะลดลง

ขั้นตอนการทดลอง เตรียมสารละลายผสมระหว่าง ABTS 7 mM ในน้ำ กับสารละลาย 2.45 mM potassium persulfate ($K_2O_8S_2$) ทิ้งไว้ 12 – 24 ชั่วโมง เพื่อ

ให้ปฏิกิริยาการเกิดเป็น $ABTS^{•+}$ สมบูรณ์และเพื่อให้ค่าการดูดกลืนแสงคงที่ หลังจากนั้นเจือจางสารละลายที่มี $ABTS^{•+}$ ด้วยน้ำ หรือเอทานอลให้มีการดูดกลืนแสงประมาณ 0.700 ± 0.020 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เติมน้ำที่จะทดสอบฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย $ABTS^{•+}$ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 45 วินาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีภายใน 1 นาทีที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ฤทธิ์ด้านออกซิเดชันคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใช้ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารที่ทดสอบ

TRAP assay (Total radical-trapping antioxidant parameter assay) (Ghiselli et al., 1995)

หลักการ เป็นการหาความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระโดยรวม (total radical trapping) ของสารที่ทดสอบ เนื่องจาก peroxy radical จากตัวกำเนิดอนุมูลอิสระ (radical generator) 2,2'-azo-bis (2-amidino-propane) hydrochloride (ABAP) จะทำลายการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence) ของโปรตีน R-Phycoerythrin ซึ่งเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น excitation 495 นาโนเมตร และที่ความยาวคลื่น emission 575 นาโนเมตร ถ้าสารที่ทดสอบมีฤทธิ์ด้านออกซิเดชันจะสามารถจับกับอนุมูลอิสระจาก ABAP ทำให้การเรืองแสงของ R-phycoerythrin เพิ่มขึ้น หากสามารถจับกับอนุมูลอิสระได้อย่างสมบูรณ์จะทำให้การเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ของ R-phycoerythrin คงอยู่เป็นเวลานาน ซึ่งสามารถวัดได้โดย spectrofluorometer

ขั้นตอนการทดลอง เตรียมสารละลายแขวนตะกอนของ R- phycoerythrin ในความเข้มข้นของสาร 100 ไมโครลิตร ใน phosphate buffer saline, pH 7.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปผสมกับ phosphate buffer saline, pH 7.4 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และเติมน้ำที่ทดสอบ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เริ่มปฏิกิริยา

ออกซิเดชันโดยการเติมน้ำละลาย 26 mM ABAP นำสารละลายผสมไปวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ ทุก ๆ 5 นาที ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่ทดสอบดูจากการเพิ่มการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ของ R-phycoerythrin

DPPH assay (Brand-Williams et al., 1995; Sumanont, 2001)

หลักการ สารที่มีฤทธิ์ด้านออกซิเดชันจะจับกับอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ที่มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ดังนั้นถ้าสารมีฤทธิ์ด้านออกซิเดชันจะลดการดูดกลืนแสงของ DPPH

ขั้นตอนการทดลอง เตรียมสารละลาย DPPH ในความเข้มข้น 2.4 มิลลิกรัมในเมทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายของ DPPH ในปริมาตร 1.95 มิลลิลิตร มาผสมกับสารที่จะทดสอบที่มีปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ณ เวลาต่าง ๆ ฤทธิ์ด้านออกซิเดชันอันเนื่องมาจากการจับกับอนุมูลอิสระหาได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใช้สารความเข้มข้นต่าง ๆ

DMPD assay (N,N-dimethyl p-phenyldiamine assay) (Fogliano et al., 1999)

หลักการ N,N-dimethyl p-phenyldiamine (DMPD) จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจากการทำปฏิกิริยากับ $Fe(III)Cl_3$ ได้อนุมูลอิสระ $DMPD^{•+}$ ที่มีสีม่วง และสามารถดูดกลืนแสงที่ 505 นาโนเมตร ถ้าสารที่ทดสอบมีฤทธิ์ด้านออกซิเดชันจะสามารถจับกับอนุมูลอิสระ ทำให้สีจางลง และวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ลดลง

ขั้นตอนการทดลอง เตรียมสารละลาย 1 มิลลิลิตรของสารละลาย DMPD ในน้ำในความเข้มข้น 100

mM (2.09 มิลลิกรัมของ DMPD ในน้ำ 10 มิลลิลิตร) ปิเปตสารละลาย DMPD 1 มิลลิลิตร ลงใน 100 มิลลิลิตร 0.1 M acetate buffer, pH 5.25 หลังจากนั้นเติมสารละลายความเข้มข้น 0.05 M ของ 0.ferric chloride ในปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ได้ DMPD^{•+} ที่มีสีม่วง ปรับความเข้มข้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.900±0.100 ทั้งนี้สารละลายของ DMPD^{•+} จะคงที่ อยู่ได้นาน 12 ชั่วโมง นำสารละลาย DMPD^{•+} 1 ไมโครลิตร มาผสมกับสารที่จะทดสอบในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและเขย่านาน 10 นาที ที่ 25 องศาเซลเซียส วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 505 นาโนเมตร

TBA method (thiobarbituric acid assay) (Weerapreeyakul et al., 2004)

หลักการ สมองหมูประกอบด้วยกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวอยู่เป็นจำนวนมาก จึงสามารถเกิด lipid peroxidation ได้อนุมูลอิสระที่ออกซิเจนสามารถเข้าจับและเกิดปฏิกิริยาถูกโซ่ต่อกับ Thiobarbituric acid (TBA) ได้เป็น Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ที่มีสีชมพูและตรวจวัดค่า fluorescence ด้วย spectrofluorometer ที่ excitation 528.5 นาโนเมตร และ emission 551 นาโนเมตร ดังนั้นถ้า สารที่ทดสอบมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจะลดการสร้าง TBARS ทำให้มีสีชมพูจางลง

ขั้นตอนการทดลอง เตรียมสมองหมูปอด (Porcine brain homogenate) จากสมองหมู ในอัตราส่วนของ สมองหมู 4 g กับสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 38 ml ปิเปตสมองหมูปอดในสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติม 467 mM, KCl 600 ไมโครลิตร เติม 4 mM, phosphate buffer, pH 7.4 ปริมาตร 1.15 มิลลิลิตร เติมสารละลาย

ของสารที่จะทดสอบ แล้วนำไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติม 35% HClO₄ 0.4 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บส่วนบน 1.5 มิลลิลิตร เติม 1% TBA ใน 50% glacial acetic acid ในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ต้มใน เครื่องอ่างน้ำ (waterbath) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำส่วนที่ได้ไปวัดด้วย spectrofluorometer ที่ความยาวคลื่น excitation 528.5 นาโนเมตรและ ความยาวคลื่น emission 551 นาโน เมตร

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิก (Schlessier et al., 2002)

หลักการ วิตามิน ซี (ascorbic acid) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพราะฉะนั้นจึงมีการหาปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีโครงสร้างอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ วิตามินซีหรือเป็นวิตามินซี ในพืช ผักหรือผลไม้ โดย จะแยกสารดังกล่าวออกจากตัวอย่างด้วย trichloroacetic acid แล้วนำวิตามินซีไปทำปฏิกิริยาต่อกับ dinitrophenylhydrazine reagent ให้สารผลิตภัณฑ์ที่มีสี ที่สามารถวัดการดูดกลืนแสง โดย UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร **ขั้นตอนการทดลอง** นำสารละลายตัวอย่างใน ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติม trichloroacetic acid 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงเก็บ เฉพาะส่วนบนในปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้ว นำมาเติม dinitrophenylhydrazine reagent 100 ไมโครลิตร ให้ความร้อนแก่สารละลายผสม 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง แล้วนำมาเติมกรดซัลฟูริก 400 ไมโครลิตร เก็บไว้ในที่มีदनาน 20 นาที ก่อนนำไป วัดด้วย UV-Vis spectrophotometer ที่ ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลทั้งหมดโดยวิธีของ Folin- Ciocalteu Method (Singleton and Rossi, 1965)

หลักการ สารในกลุ่มฟีนอลสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับ phosphomolybdic acid และ puosphotungtic acids ซึ่งเป็นส่วนประกอบในสาร Folin-ciocalteu reagent เกิดสารผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินแกมเขียวที่สามารถดูดกลืนแสง UV-Vis ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ขั้นตอนการทดลอง นำสารละลายตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลายของ Folin-iocalteu reagent 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายของ $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ ในความเข้มข้น 202.5 กรัม/ลิตร ในปริมาตร 800 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสง UV-Vis ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ทำการหาปริมาณของสารฟีนอลทั้งหมด (total phenol) เทียบเท่ากับปริมาณของกรดแกลลิก (gallic acid monohydrate) ซึ่งใช้เป็นสารฟีนอลมาตรฐาน

สรุป
การศึกษาวิธีวิเคราะห์หาสารต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองทั้ง 10 วิธีที่กล่าวมาส่วนใหญ่การเรียกชื่อวิธีวิเคราะห์จะเรียกตามสารที่เข้าทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ แต่ละวิธีที่ศึกษาก็จะมีลักษณะแตกต่างกัน (ตารางที่ 1) ทั้งในด้านเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ เวลา และชนิดของสารที่ใช้ทำปฏิกิริยากับสารที่จะทดสอบ ซึ่งแต่ละวิธีจะแสดงถึงกลไกการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน สำหรับ 2 วิธีสุดท้ายเป็นการทดสอบว่าตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์นั้นมีสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระหรือไม่เป็นการศึกษาทางอ้อมถึงปริมาณสารเทียบเท่ากับวิตามินซีหรือสารฟีนอลทั้งหมด หากพบว่าตัวอย่างมีสารกลุ่มดังกล่าวอาจกล่าวได้ว่าตัวอย่างนั้นอาจจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทั้งนี้ควรพิจารณาประกอบกับการศึกษาฤทธิ์วิธีอื่นๆ เพราะแม้ว่าจะเป็นสารกลุ่มดังกล่าวเหมือนกันในแต่ละตัวอย่าง แต่อาจจะมีกลไกในการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน ดังนั้นการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระควรจะทำหลาย ๆ วิธี ทั้งนี้สารที่ทดสอบตัวเดียวกันอาจให้ผลการทดสอบแตกต่างกันเมื่อใช้วิธีการทดสอบที่ต่างกัน

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ

ลักษณะทั่วไป วิธีทดสอบ	เวลาที่ใช้ในการ เกิดผลิตภัณฑ์	สีของ ผลิตภัณฑ์	ความคงตัวของ ผลิตภัณฑ์	ตัวกลาง (media)	อุปกรณ์ที่ใช้ ศึกษา
TEAC I	-	-	-	Aq	UV-Vis
TEAC II	~125 นาที	เขียวแกมน้ำเงิน	2 นาที	Aq	UV-Vis
TEAC III	12-24 ชั่วโมง	เขียวแกมน้ำเงิน	1 นาที	Aq or EtOH	UV-Vis
TRAP	>10 นาที	-	>5 นาที	Aq	SF
DPPH	30 นาที	ม่วง	1 นาที	MeOH	UV-Vis
DMPD	10 นาที	ม่วง	12 ชั่วโมง	Aq	UV-Vis
TBA	50 นาที	ชมพู	15 นาที	Aq	SF
Determination of vitamin C	80 นาที	-	-	Aq	UV-Vis
Folin-Ciocalteu	120 นาที	น้ำเงินแกมเขียว	-	Aq	UV-Vis

เอกสารอ้างอิง

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss. Technol.* 28:25-30.
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G. and Ritieni, A. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J. Agric. Food Chem.* 47:1035-1040.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E. and Ferro, A. (1995). A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biol. Med.* 18:29-36.
- Kong, Q. and Lillehei, K. O. (1998). Antioxidant inhibitors for cancer therapy. *Med. Hypotheses.* 51(5):405-409.
- Leu, T. H. and Maa, M. C. (2002). The molecular mechanisms for the antitumorigenic effect of curcumin. *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents.* 2(3):357-370.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C. A., Davies, M. J., Gopinathan, V. and Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84:407-412.
- Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M. and Rice-Evans, C. A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 384:240-242.
- Olsson, A. G. and Yuan, X. M. (1996). Antioxidants in the prevention of atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 7(6):374-380.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* 26(9-10):1231-1237.
- Schlessier, K., Harwat, M., Bohm, V. and Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different *in Vitro* methods. *Free Rad. Res.* 36(2):177-187.
- Simic, M. G. and Taylor, K. A. (1988). Introduction to peroxidation and antioxidation mechanisms. *Basic Life Sci.* 49:1-10.
- Singleton, V. L. and Rossi, Jr., J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16:144-158.
- Sumanont, Y. (2001). Synthesis of Manganese-base Superoxide Dismutase Mimics and Evaluation for Radical Scavenging Ability. M.S. Thesis. Mahidol University.
- Thomas, S. R. and Stocker, R. (2000). Molecular action of vitamin E in lipoprotein oxidation: implications for atherosclerosis. *Free Radical Biol. Med.* 28(12):1795-1805.
- Weerapreeyakul, N., Yenjai, C., Sumanont, Y., Vorarat, S., Anorach, R. and Kulanuwat, P. (2004). Antioxidation activities and stability studies of compounds extracted from *Mallotus repandus* (Willd) Muell Arg. In: The 1st Asian Symposium for Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University. Fukuoka, Japan. January 30-31, 2004. P. 122-125.

การหาสูตรโมเลกุลทั่วไปของสารประกอบ อะลิเฟติกไฮโดรคาร์บอน โดยสมบัติทางกราฟ

พิกุล ภูผาสุข¹

บทนำ

กราฟคือโครงสร้างที่ประกอบด้วยจุดยอด (vertex) และ เส้นเชื่อม (edge) โดยที่แต่ละเส้นจะเชื่อม 2 จุดยอดเข้าด้วยกัน จะเขียนแทนกราฟด้วยสัญลักษณ์ $G = (V, E)$ หรือ G เมื่อ V แทนเซตที่ไม่เป็นเซตว่างของจุดยอดทั้งหมดในกราฟ และ E แทนเซตของเส้นเชื่อมทั้งหมดในกราฟ จะเขียนสัญลักษณ์ uv แทนเส้นเชื่อมที่เชื่อมจุดยอด u และ v *วิถี (path)* คือกราฟที่มีลักษณะเป็นทางเดินเปิด (ไม่ตัดกัน) *วง (cycle)* คือวิถีที่มีจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดเป็นจุดเดียวกัน *กราฟเชื่อมโยง (connected graph)* คือกราฟที่ 2 จุดยอดใดๆ ที่แตกต่างกันจะมีวิถีเชื่อมถึงกันเสมอ *กราฟต้นไม้ (tree)* คือกราฟเชื่อมโยงที่ไม่บรรจุวง ถ้า G เป็นกราฟและ v เป็นจุดยอดในกราฟแล้ว $G-v$ คือกราฟที่เกิดจากการลบจุดยอด v และทุกเส้นเชื่อมที่เชื่อมกับจุดยอด v ออก จะเรียกจำนวนของเส้นเชื่อมทั้งหมดที่เชื่อมกับจุดยอด v ว่า *ระดับชั้น (degree)* ของ v เขียนแทนด้วยสัญลักษณ์ $d(v)$ เนื่องจากเส้นเชื่อม 1 เส้นจะเชื่อม 2 จุดยอดทำให้เกิดผลรวมของระดับชั้นของจุดยอดเท่ากับ 2 จึงทำให้ได้บทตั้งต่อไปนี้

บทตั้ง 1 [1] (Hand-shaking Lemma) ผลรวมของระดับชั้นของจุดยอดทั้งหมดในกราฟใดๆ จะมีค่าเป็น 2 เท่าของจำนวนเส้นเชื่อม (นั่นคือ ถ้า $G = (V, E)$ แล้วจะได้ว่า $\sum_{v \in V} d(v) = 2|E|$)

ถ้าเราเลือกวิถีที่ยาวที่สุดในกราฟต้นไม้มาพิจารณา จะเห็นว่าจุดยอดทั้งสองจะมีระดับชั้นเป็น 1 ดังนั้นจึงทำให้ได้บทตั้งต่อไปนี้

บทตั้ง 2 [1] สำหรับกราฟต้นไม้ใดๆ จะมีจุดยอดที่มีระดับชั้น 1 อย่างน้อยสองจุด

ต่อไปจะพิจารณาความสัมพันธ์ของจำนวนจุดยอดและจำนวนเส้นเชื่อมในกราฟต้นไม้โดยอาศัยบทตั้ง 2 ดังนี้

ทฤษฎีบท 1 [1] ให้ G เป็นกราฟเชื่อมโยงที่มีจุดยอด n จุดและ เส้นเชื่อม m เส้น แล้ว G เป็นกราฟต้นไม้ ก็ต่อเมื่อ $m = n-1$ พิสูจน์

ให้ G เป็นกราฟเชื่อมโยงที่มีจุดยอด n จุด และมีเส้นเชื่อม m เส้น และให้ G เป็นกราฟต้นไม้ ถ้า G มีจุดยอดเพียงจุดเดียว จะได้ว่าไม่มีเส้นเชื่อม

เกิดขึ้น นั่นคือ $m=0=1-1$ สมมติว่าถ้ากราฟต้นไม้ใด ๆ มีจุดยอด k จุด แล้ว $m=k-1$ พิจารณากราฟต้นไม้ G ที่มีจุดยอด $k+1$ จุด โดยบทตั้ง 2 จะต้อง มีจุดยอด v ที่ $d(v)=1$ โดยสมมติฐาน $G-v$ จะมีเส้นเชื่อม $k-1$ เส้น ดังนั้น G จะมีเส้นเชื่อมทั้งหมด $(k-1)+1=k$ เส้น โดยหลักการอุปนัยเชิงคณิตศาสตร์ จะได้ว่า $m=n-1$ ในทางตรงกันข้าม ให้ G มีเส้นเชื่อมทั้งหมด $m=n-1$ เส้น สมมติว่า G บรรจวนทำการลบเส้นเชื่อมออกจากวงจรกระทั่งกราฟที่ได้เป็นกราฟต้นไม้ โดยให้จำนวนเส้นเชื่อมที่ลบออกเท่ากับ k ดังนั้นกราฟที่ได้จะมีจำนวนเส้นเชื่อมเท่ากับ $n-1$ เส้น เนื่องจาก $k > 1$ ดังนั้นจำนวนเส้นเชื่อมทั้งหมดใน G เท่ากับ $n-1+k > n-1+1=n > n-1=m$ เส้น ซึ่งขัดแย้ง ดังนั้น G เป็นกราฟต้นไม้

ทฤษฎีบท 2 ถ้า G เป็นกราฟที่มีจุดยอด n จุด และมีเส้นเชื่อม m เส้น เมื่อ G สร้างจากกราฟต้นไม้โดยการเพิ่มเส้นให้มี 1 จุดยอดเท่านั้นที่มีเส้นเชื่อม r เส้น ($r > 2$) แล้วจะได้ว่า $m = n + r - 2$ พิสูจน์

ให้ G เป็นกราฟที่มีจุดยอด n จุด และมีเส้นเชื่อม m เส้น เมื่อ G สร้างจากกราฟต้นไม้โดยการเพิ่มเส้นให้มี 1 จุดยอดเท่านั้นที่มีเส้นเชื่อม r เส้น ($r > 2$) ทำการลบเส้นเชื่อมออกจาก G จำนวน $r-1$ เส้น กราฟที่ได้จะเป็นกราฟต้นไม้ซึ่งมีจำนวนเส้นเชื่อมเท่ากับ $n-1$ เส้น ดังนั้น G จะมีจำนวนเส้นเชื่อมเท่ากับ $(n-1) + (r-1) = n + r - 2$ เส้น

สารประกอบอะลิเฟติกไฮโดรคาร์บอน

สารประกอบอะลิเฟติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) มีทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ อัลเคน (alkane) มีสูตรโมเลกุลทั่วไปคือ $C_n H_{2n+2}$ สูตรโครงสร้างของอัลเคนจะมีเฉพาะ $C-C$ และ $C-H$ เท่านั้น อัลคีน (alkene) มีสูตรโมเลกุลทั่วไปคือ $C_n H_{2n}$ สูตรโครงสร้างของอัลคีนจะมี $C=C$ จำนวน 1 พันธะ นอกเหนือจากนั้นจะเป็น $C-C$ และ $C-H$ อัลไคน์ (alkyne) มีสูตรโมเลกุลทั่วไปคือ $C_n H_{2n-2}$ สูตรโครงสร้างของอัลไคน์จะมี $C \equiv C$ จำนวน 1 พันธะ นอกเหนือจากนั้นจะเป็น $C-C$ และ $C-H$ เราจะทำการพิสูจน์เพื่อหาสูตรโมเลกุลทั่วไปของสารประกอบทั้ง 3 ชนิดนี้ โดยใช้สมบัติทางกราฟ

ทฤษฎีบท 3 สารประกอบอัลเคน อัลคีน อัลไคน์ มีสูตรโมเลกุลทั่วไปคือ $C_n H_{2n+2}$, $C_n H_{2n}$ และ $C_n H_{2n-2}$ ตามลำดับ
พิสูจน์

กำหนดให้อะตอมของ C และ H ทั้งหมดคือจุดยอดในกราฟ G และพันธะที่จับกับอะตอมต่างๆคือเส้นเชื่อมในกราฟ G ถ้าให้สูตรโมเลกุลของสารประกอบอะลิเฟติกไฮโดรคาร์บอนคือ $C_n H_x$ เมื่อ n คือจำนวนอะตอมของคาร์บอน และ x คือจำนวนอะตอมของไฮโดรเจน เราจะเริ่มพิจารณาสารประกอบทีละชนิดดังนี้

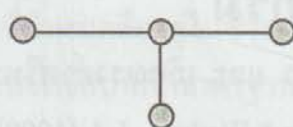
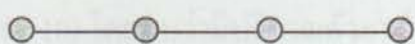
อัลเคน เนื่องจากคาร์บอน 1 อะตอมสามารถเกิดพันธะเดี่ยวจำนวน 4 พันธะ นั่นคือระดับชั้นของคาร์บอน 1 อะตอมเท่ากับ 4 และเนื่องจากไฮโดรเจน 1 อะตอมสามารถเกิดพันธะเดี่ยว 1 พันธะ นั่นคือระดับชั้นของไฮโดรเจน 1 อะตอมเท่ากับ 1 ดังนั้นโดย hand-shaking lemma จะได้ว่า

$\sum_{v \in G} d(v) = 4n + x = 2m$ เมื่อ m คือจำนวนเส้นเชื่อมของ G เนื่องจาก G เป็นกราฟต้นไม้ โดยทฤษฎีบท 1 จะได้ว่า $m = (n + x) - 1$ เส้น ดังนั้น $4n + x = 2(n + x - 1)$ นั่นคือ $2n + 2 = x$ จะได้สูตรโมเลกุลทั่วไปของอัลเคนคือ $C_n H_{2n+2}$

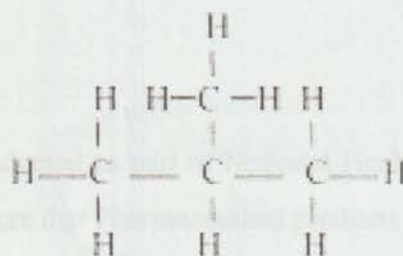
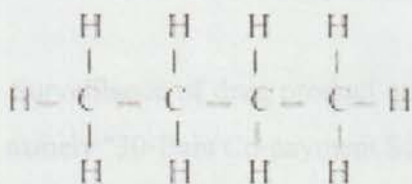
อัลคีน เนื่องจากสูตรโครงสร้างจะต้องมี $C = C$ จำนวน 1 พันธะ จะได้ว่า G เป็นกราฟที่ได้จากการเพิ่มเส้นให้ 1 จุดยอดของกราฟต้นไม้มีเส้นเชื่อมกัน 2 เส้น โดยทฤษฎีบท 2 จะได้ว่า $m = n + x + 2 - 2 = n + x$ เส้น และโดย hand-shaking lemma จะได้ว่า $\sum_{v \in G} d(v) = 4n + x = 2m$ ดังนั้น $4n + x = 2(n + x)$ นั่นคือ $x = 2n$ จะได้สูตรโมเลกุลทั่วไปของอัลคีนคือ $C_n H_{2n}$

ตัวอย่างที่ 1 ต้องการหาไอโซเมอร์ทั้งหมดของ $C_4 H_{10}$

เนื่องจากอะตอมของ C มีทั้งหมด 4 อะตอม ดังนั้นกราฟที่แตกต่างกันที่มี 4 จุด มี 2 รูปแบบ ดังนี้

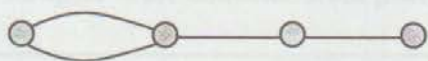


ซึ่งจะได้ไอโซเมอร์ทั้งหมดคือ

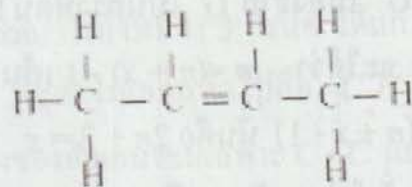
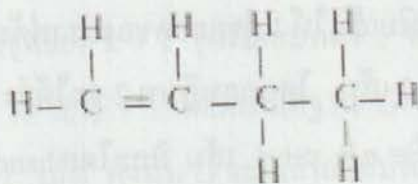


ตัวอย่างที่ 2 ต้องการหาไอโซเมอร์ทั้งหมดของ $C_4 H_8$

เนื่องจากอะตอมของ C มีทั้งหมด 4 อะตอม ดังนั้นกราฟที่แตกต่างกันที่มี 4 จุด มี 2 รูปแบบ ดังนี้



ซึ่งจะได้ไอโซเมอร์ทั้งหมดคือ

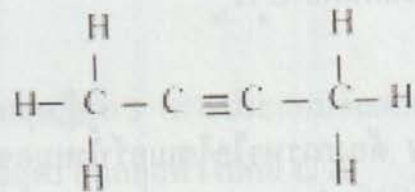
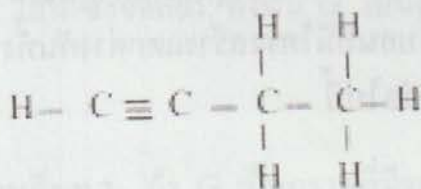


ตัวอย่างที่ 3 ต้องการหาไอโซเมอร์ทั้งหมดของ C_4H_6

เนื่องจากอะตอมของ C มีทั้งหมด 4 อะตอม ดังนั้นกราฟที่แตกต่างกันที่มี 4 จุด มี 2 รูปแบบ ดังนี้



ซึ่งจะได้ไอโซเมอร์ทั้งหมดคือ



บรรณานุกรม

ชัยยุทธ ช่างสาร และ เลิศณรงค์ ศรีพนม. (2543). เคมีประยุกต์. กรุงเทพฯ: ว. เพ็ชรสกุล จำกัด.

Wilson, R. J. and Watkins, J. J. (1990). Graph : an introductory approach . Singapore: John Wiley & Sons.

คุณภาพยาเม็ด ไกลเบนคลาไมด์

กมลทิพย์ จูดาทิศ, อมรพรรณ อุ่นชัยและสุภลักษณ์ พริ้งเพระ¹

บทคัดย่อ

การเฝ้าระวังคุณภาพยาภายหลังจัดซื้อหรือภายหลังส่งมอบยาของโรงพยาบาลของรัฐเป็นส่วนหนึ่งในโครงการสร้างหลักประกันสุขภาพดีถ้วนหน้า ภายใต้โครงการ "30 บาท รักษาทุกโรค" ซึ่งเป็นการรับรองว่าผลิตภัณฑ์ยาในท้องตลาดในประเทศไทยมีมาตรฐานด้านการบ่งชี้ยา ความแรง คุณภาพยา ความบริสุทธิ์ และประสิทธิภาพของยา ในการศึกษาครั้งนี้ได้สุ่มเก็บตัวอย่างยาในช่วงเดือนตุลาคม 2545 ถึงเดือนกันยายน 2546 โดยความร่วมมือของสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดและโรงพยาบาลของรัฐ ไกลเบนคลาไมด์ (glibenclamide) เป็นยาในบัญชียาหลักแห่งชาติตัวหนึ่งซึ่งถูกคัดเลือกมาศึกษาคุณภาพยาเนื่องจากการสั่งจ่ายมากในผู้ป่วยโรคเบาหวาน จากตัวอย่างยาทั้งหมด 40 ตัวอย่างที่สุ่มเก็บจากฝ่ายเภสัชกรรมโรงพยาบาลของรัฐและร้านขายยา มาตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ขอนแก่นตามมาตรฐานตามตำรายา British Pharmacopoeia 2000 ในหัวข้อปริมาณตัวยาสำคัญ ความสม่ำเสมอของตัวยา เวลาในการกระจายตัว และสารเจือปนโดยใช้วิธี HPLC จากตัวอย่างยา 40 ตัวอย่าง จากผู้ผลิต 20 บริษัท และนำเข้า 1 บริษัท พบว่าตัวอย่างยาเข้ามาตรฐานด้านปริมาณตัวยาสำคัญ 36 ตัวอย่าง (ร้อยละ 90) คือพบในช่วง 95.0-104.4 % ศึกษามาตรฐานด้านปริมาณตัวยาสำคัญ 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 10) โดยพบว่าปริมาณตัวยาสำคัญต่ำกว่ามาตรฐานที่กำหนดคืออยู่ในช่วง 91.7-93.0% ของปริมาณที่แจ้ง ส่วนความสม่ำเสมอของตัวยาเวลาในการกระจายตัวและสารเจือปนเข้ามาตรฐานทุกตัวอย่าง ในการศึกษาครั้งนี้สามารถช่วยให้บุคลากรสาธารณสุขที่เกี่ยวข้องใช้เป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจในการจัดซื้อยาและเป็นแรงผลักดันให้มีการบังคับใช้หลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิต (GMP) กับผู้ผลิตยาต่อไป

Abstract

Surveillance of drug product quality is currently conducted as part of National Health Coverage Program namely "30-Baht Co-payment Scheme". This is to ensure that Pharmaceutical products marketed in Thailand meet the standard specifications of identity, strength, quality, purity, and potency. The present study was performed during October 2002 to September 2003 in co-operation with the Provincial Public Health Offices and government hospitals. Glibenclamide tablets were one of selected drug products from the National Essential Drug List. Selection criteria of this study was based on wide usage for treatment of diabetes. A total of 40 samples were collected from pharmacy units in government hospitals and drug stores and were

¹ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ขอนแก่น ถนนหน้าศูนย์ราชการ อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40000

analyzed for % labelled amount, uniformity of content, related substances, and disintegration time quality according to the British Pharmacopoeia 2000 requirements at the Regional Medical Sciences Center in Khon Kaen. The results revealed that most drug products conformed to the pharmaceutical standards. However, it was found that 4 out of 40 products (10 percent) were unconformed to the standards with respect to the amount of active ingredient. The information of the quality of glibenclamide tablets would be helpful for health care providers to make product decisive selection and for effective regulatory enforcement of good manufacturing practice (GMP).

บทนำ

ในปี พ.ศ. 2542 ได้มีการศึกษาคุณภาพยาเม็ดไกลเบนคลาไมด์ โดยกองยา (ปัจจุบันเป็นสำนักยาและวัตถุเสพติด) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยเก็บตัวอย่างยาจากบริษัทผลิตยาในประเทศ 31 แห่ง และนำเข้า 1 แห่ง จำนวน 48 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณตัวยาเข้ามาตรฐาน 41 ตัวอย่าง (85.4%) ผิดมาตรฐาน 7 ตัวอย่าง (14.6%) พบว่าสาเหตุที่ผิดมาตรฐานทุกตัวตรวจพบปริมาณตัวยาสำคัญเกินมาตรฐานที่กำหนด ส่วนความสม่ำเสมอของตัวยา เวลาในการกระจายตัว และปริมาณสารเจือปนเข้ามาตรฐานตาม British Pharmacopoeia 1998 ทุกตัวอย่าง (อนงค์นุช เนยเมืองปัก และนิดาพรรณ เรืองฤทธิ์พันธ์, 2542)

ในปีงบประมาณ 2546 กลุ่มงานยา ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ขอนแก่น ได้ทำการศึกษาคุณภาพยาเม็ดไกลเบนคลาไมด์ ภายใต้โครงการสร้างหลักประกันคุณภาพและมาตรฐานบริการด้านยา ซึ่งกำหนดให้มีการเฝ้าระวังคุณภาพยาภายหลังการจัดซื้อหรือส่งมอบให้แก่หน่วยงานของรัฐ เพื่อเป็นการประกันคุณภาพยาและใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกยาในโครงการสุขภาพดีถ้วนหน้า ซึ่งเน้นให้ผลตรวจวิเคราะห์ของผู้ผลิตเป็นหลักในการจัดซื้อ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างยาจากสถานพยาบาลของรัฐและร้านขายยา ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2545 ถึงเดือนกันยายน 2546 โดยความร่วมมือของสำนักงานสาธารณสุข

จังหวัด และเจ้าหน้าที่โรงพยาบาลของรัฐมาตรวจวิเคราะห์ตามเกณฑ์มาตรฐานและวิธีการตามตำรายา BP 2000 โดยตรวจในหัวข้อปริมาณตัวยาสำคัญ (content of active ingredients) ความสม่ำเสมอของตัวยา (uniformity of content) เวลาในการกระจายตัว (disintegration time) และสารเจือปน (related substances) เพื่อประเมินคุณภาพยาของทุกผลิตภัณฑ์บนมาตรฐานสากลและเท่าเทียมกัน โดยไม่ได้อ้างอิงวิธีวิเคราะห์และมาตรฐานตามทะเบียนยาของแต่ละตัวอย่าง

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาคุณภาพยาเม็ดไกลเบนคลาไมด์ ภายหลังการจัดซื้อหรือส่งมอบยาของโรงพยาบาลของรัฐและร้านขายยา

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างยาเม็ดไกลเบนคลาไมด์

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาคุณภาพยาเม็ดไกลเบนคลาไมด์ โดยสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดประสานกับโรงพยาบาลในแต่ละจังหวัดหรือเขตในการวางแผนสุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ยาเพื่อไม่ให้เกิดความซ้ำซ้อน พร้อมบันทึกรายละเอียดแต่ละตัวอย่างลงในแบบฟอร์มการเก็บตัวอย่างและแนบหนังสือนำส่งของหน่วยงานส่งมายังสำนักยาและ

วัตถุเสพติด หรือส่งมายังศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ในเขตพื้นที่รับผิดชอบ จากนั้นสำนักยาและวัตถุเสพติดและศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ในเขตพื้นที่ รับผิดชอบ ก็จะรวบรวมตัวอย่างส่งต่อมายังศูนย์ วิทยาศาสตร์การแพทย์ขอนแก่นเพื่อทำการตรวจ วิเคราะห์ โดยตัวอย่างที่นำมาศึกษาครั้งนี้มีทั้งหมด 40 ตัวอย่าง

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

เครื่อง high performance liquid chromatography ยี่ห้อ Waters 2410 ประกอบด้วย Waters 2690 separations module และ Waters 996 photodiode array detector, Ultrasonic bath ยี่ห้อ Sonicator รุ่น SC-52, analytical balance ยี่ห้อ METTER รุ่น AE 200, pH meter ยี่ห้อ Metrohm รุ่น 744, stainless steel column 10 cm x 4.6 mm packed with stationary phase C 5 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Waters รุ่น Sherisorb ODS1, กระดาษกรอง ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Whatman, microbalance ยี่ห้อ Satorius รุ่น R2000, disintegration tester ยี่ห้อ Vankel รุ่น VK 100, UV-lamp model ยี่ห้อ CAMAG รุ่น UV-cabinet II และ เครื่อง automatic TLC autosampler 4 ยี่ห้อ CAMAG

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมีที่ใช้ชนิด analytical reagent grade: potassium dihydrogen orthophosphate, orthophosphoric acid สารเคมีที่ใช้ชนิด HPLC reagent grade: methanol, acetonitrile สารมาตรฐาน : Glibenclamide ASEAN reference substance control no. 195093, Sulfonamide = 4-[2-(5-chloro-2-methoxybenzamido) ethyl] benzenesulfonamide BPCRS batch No.1378, Urethane = methyl- N-4-[2-(5-chloro-2-methoxybenzamido)ethyl] benzenesulfonylcarbamate

BPCRS batch No.1740

การวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญ (British Pharmacopoeia , 2000)

วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐานไกลเบนคลาไมด์ 50 มิลลิกรัม ละลายใน methanol 10 มิลลิลิตร นำไปวางในเครื่อง ultrasonic bath นาน 20 นาที ปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตรด้วย methanol เจือจางสารละลายที่ได้ 1 ส่วน ด้วย methanol 3 ส่วน เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน กรองด้วยกระดาษกรอง 0.2 ไมโครเมตร

วิธีการเตรียม mobile phase

เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ เข้มข้น 1.36% w/v ชั่ง potassium dihydrogen orthophosphate 1.36 กรัม ละลายน้ำ ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 3.0 ด้วย orthophosphoric acid นำสารละลายบัฟเฟอร์ เข้มข้น 1.36 % w/v 53 ส่วน ผสมกับ acetonitrile 47 ส่วน ผสมให้เข้ากัน นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตร

วิธีการเตรียมตัวอย่าง

บดตัวอย่างยาเม็ดไกลเบนคลาไมด์ จำนวน 20 เม็ด ชั่งตัวอย่างยาให้มีปริมาณตัวยา 5 มิลลิกรัม เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร เติมน้ำ methanol 20 มิลลิลิตร ทำให้อาการกระจายโดยใช้เครื่อง ultrasonic bath ช่วย กรองด้วยกระดาษกรอง ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

สภาวะของเครื่อง high performance liquid chromatograph

อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีด 20 ไมโครลิตร Detector : UV 300 nm ระยะเวลาที่ใช้ : 7 นาที

การวิเคราะห์ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลาย ตัวอย่าง บันทึกโครมาโทแกรม วัดพื้นที่ใต้พีค คำนวณปริมาณไกลเบนคลาไมด์ ใน 1 เม็ด และ เปรียบเทียบกับปริมาณที่แจ้ง

เกณฑ์การตัดสิน British Pharmacopoeia 2000 กำหนดให้มีปริมาณด้วยสำคัญ 95.0-105.0% ของปริมาณที่แจ้ง

การหา Uniformity of content ในตัวอย่าง (British Pharmacopoeia, 2000)

วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน

นำสารละลายมาตรฐานไกลเบนคลาไมด์เข้มข้น 0.025 % w/v มา 20 มิลลิลิตร เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง ultrasonic bath จนยากระจายทั่ว กรองด้วยกระดาษกรอง 0.2 ไมโครเมตร

วิธีการเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างยาไกลเบนคลาไมด์ 1 เม็ด เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร เติมน้ำ methanol 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง ultrasonic bath จนยากระจายทั่ว กรองด้วยกระดาษกรอง ขนาด 0.2 ไมโครเมตร การเตรียม mobile phase สภาพของเครื่อง HPLC และการวิเคราะห์ทำเช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาปริมาณด้วยสำคัญ ทำการวิเคราะห์จนครบ 10 เม็ด

เกณฑ์ตัดสิน British Pharmacopoeia 2000 กำหนดให้มีความสม่ำเสมอของตัวอย่างในช่วง 85.0-115.0% ของปริมาณเฉลี่ย

การหาเวลาในการกระจายตัวในตัวอย่าง (British Pharmacopoeia, 2000)

เครื่องมือทดสอบการกระจายตัวตามที่กำหนดใน British Pharmacopoeia 2000 ตัวอย่างจำนวนหน่วยที่ทดสอบ 6 เม็ด น้ำยาดักกลาง น้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 ± 1 °C

วิธีการทดสอบการกระจายตัวในตัวอย่าง

เติมน้ำกรองลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิตามที่กำหนดไว้ เปิดเครื่อง disintegration tester ตั้งอุณหภูมิให้ได้ 37.5 °C นำ disintegration beaker ใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นเติม medium (น้ำ) รอจนอุณหภูมิถึง 37 ± 1 °C นำ basket rack,

6 tube ใส่เม็ดยาลงไป tube ละ 1 เม็ด จนครบ 6 tube จับเวลาตั้งแต่เม็ดยาสัมผัส medium จนยาแตกตัวหมด เกณฑ์การตัดสิน เมื่อยากระจายตัวหมดในเวลาไม่เกิน 15 นาที

การควบคุมคุณภาพ

- ทำ system suitability ทุกครั้งที่ทดสอบ โดยการฉีดสารละลายมาตรฐาน 5 ครั้ง จากนั้นหา %RSD < 2 และเมื่อวิเคราะห์ไปได้ 20 เข้มจะมี การฉีดสารละลายมาตรฐานอีกครั้งและเทียบกับ response ที่ได้กับครั้งแรกผลที่ได้ต้องไม่ต่างกันมาก (+10%)

- การหาปริมาณด้วยสำคัญและ ปริมาณสารเจือปน ทำการทดสอบตัวอย่างและ 2 ซ้ำและในการหาปริมาณด้วยสำคัญค่า RPD < 3

การหาปริมาณสารเจือปนในตัวอย่าง (British Pharmacopoeia, 2000)

ใช้วิธี thin layer chromatography plate ; silica gel GF 254 (Merk) mobile phase ; chloroform : cyclohexane : ethanol : glacial acetic acid (45 : 45 : 5 : 5) การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง

Solution (1): สกัด ไกลเบนคลาไมด์ จากผงยาตัวอย่างที่สมมูลกับไกลเบนคลาไมด์ 20 มิลลิกรัม ด้วยสารละลายผสมของ dichloromethane และ acetone (20:10) 5 มิลลิลิตรจำนวน 4 ครั้ง รวบรวมสารละลายจากการสกัดนำไประเหยให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 °C ความดัน 2 kPa จากนั้นนำไปละลายด้วยส่วนผสมของ chloroform และ methanol (1:1) 4 มิลลิลิตร Solution (2) : sulfonamide BPCRS 0.012% w/v ในส่วนผสมของ chloroform และ methanol (1:1) Solution (3) : urethane 0.002% w/v ในส่วนผสมของ chloroform และ methanol (1:1) Solution (4) : glibenclamide ARS 0.5% w/v ในส่วนผสมของ chloroform และ methanol (1:1)

Spot สารละลาย 1,2,3,4 ชนิดละ 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น TLC ปล่อยให้แห้ง แล้วนำไปแช่ใน mobile phase ให้ความสูงของ mobile phase ที่ซึมขึ้นบนแผ่น TLC ประมาณ 15 เซนติเมตร นำ plate ขึ้นปล่อยให้แห้งในตู้ดูดควันและนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

การแปลผล spot ใน solution (1) ที่มีค่า Rf ใกล้กับ solution (2) และ solution (3) จะต้องพิจารณาและความเข้มของ spot ไม่เกิน solution (2) และ solution (3) ตามลำดับ

เกณฑ์ตัดสิน ปริมาณสารเจือปน sulfonamide ไม่เกิน 2.4% ของปริมาณ ไกลเบนคลาไมด์ และมีปริมาณเจือปนของ urethane ไม่เกิน 0.4% ของปริมาณไกลเบนคลาไมด์

ผลการวิเคราะห์

จากผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพยาเม็ด ไกลเบนคลาไมด์ ที่มีจำหน่ายในโรงพยาบาลของรัฐ และร้านขายยาในประเทศที่เก็บตัวอย่างโดยสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดและฝ่ายเภสัชกรรมโรงพยาบาลของรัฐ ซึ่งดำเนินการในปีงบประมาณ 2546 รวมทั้งหมด 40 ตัวอย่าง จากผู้ผลิตในประเทศ 20 บริษัท และนำเข้า 1 บริษัท พบว่าตัวอย่างยามีปริมาณตัวยาสำคัญเข้ามาตรฐานจำนวน 36 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 90.0 ผิดมาตรฐาน 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 10.0 ส่วนความสม่ำเสมอของตัวยาเวลาในการกระจายตัวและปริมาณสารเจือปนเข้ามาตรฐานตาม British Pharmacopoeia 2000 ทุกตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการตรวจสอบคุณภาพยาเม็ด ไกลเบนคลาไมด์

รายการ	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวนเข้ามาตรฐาน (ร้อยละ)	จำนวนผิดมาตรฐาน (ร้อยละ)	หมายเหตุ
ปริมาณตัวยาสำคัญ	40	36 (90)	4 (10)	
ความสม่ำเสมอของตัวยา	40	40 (100)	0 (0)	%RSD (0.72-6.09)
เวลาในการกระจายตัว	40	40 (100)	0 (0)	ค่าเฉลี่ย= 3.25 นาที SD=1.81 นาที
ปริมาณสารเจือปน	40	40 (100)	0 (0)	

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ยาเม็ดไกลเบนคลาไมด์จำแนกตามผู้ผลิต แสดงปริมาณตัวยาสำคัญ อายุของผลิตภัณฑ์และสาเหตุที่ผิดมาตรฐาน

ผู้ผลิต	จำนวน	เข้า มาตรฐาน	ผิด มาตรฐาน	ปริมาณตัวยา สำคัญ(%la)	อายุของ ผลิตภัณฑ์ (เดือน)	สาเหตุที่ผิด มาตรฐาน
A	3	2	1	91.7-102.1	16-20	ปริมาณตัวยาสำคัญ
B	5	3	2	91.9-99.3	8-20	ปริมาณตัวยาสำคัญ
C	5	5	-	96.7-101.8	15-21	
D	4	4	-	95.0-97.5	12-35	
E	4	4	-	95.9-102.8	13-42	
F	4	4	-	95.4-100.4	12-26	
G	2	2	-	97.4-100.3	18	
H	1	1	-	104.4	37	
I	1	1	-	97.0	16	
J	1	-	1	93.0	27	ปริมาณตัวยาสำคัญ
K	1	1	-	101.8	21	
L	1	1	-	97.8	17	
M	1	1	-	101.5	19	
N	1	1	-	101.9	14	
O	1	1	-	102.4	24	
P	1	1	-	97.4	36	
Q	1	1	-	98.4	17	
R	1	1	-	99.8	15	
S	1	1	-	102.7	20	
T	1	1	-	96.7	16	

ตารางที่ 3 แสดงความสม่ำเสมอของตัวยาและเวลาในการกระจายตัว ของตัวอย่างยาเม็ด ไกลเบนคลาไมด์ จำแนกตามบริษัทยา

ผู้ผลิต	จำนวน	ความสม่ำเสมอของตัวยา			เวลาในการกระจายตัว(นาที)
		ปริมาณยาต่ำสุด-สูงสุด ในจำนวน 10 เม็ด (%Ia)	ค่าเฉลี่ย	%RSD	
A	3	87.8-104.9	100.5	3.21	3.29
B	5	91.0-106.1	93.8	3.08	5.38
C	5	92.8-105.1	96.7	2.05	2.82
D	4	94.5-106.2	99.2	2.47	1.74
E	4	92.1-106.4	96.9	2.90	3.07
F	4	94.9-105.6	96.8	1.78	6.50
G	2	95.2-105.6	99.2	2.37	1.49
H	1	96.6-104.2	99.4	2.12	3.23
I	1	96.2-99.3	95.6	1.02	1.07
J	1	98.7-101.8	94.2	1.11	1.20
K	1	100.0-104.8	104.6	1.75	0.49
L	1	94.5-105.1	93.2	3.37	4.41
M	1	93.4-107.4	101.1	4.50	3.42
N	1	93.0-105.8	98.8	4.02	1.44
O	1	96.5-102.9	103.0	2.20	2.50
P	1	98.0-102.0	98.8	3.54	4.15
Q	1	94.6-104.6	96.5	3.41	2.15
R	1	92.8-111.5	96.0	6.09	5.45
S	1	95.4-102.8	97.9	1.98	3.28
T	1	95.7-101.4	95.1	1.89	4.17

วิจารณ์

จากการศึกษาคุณภาพยาเม็ดไกลเบนคลาไมด์ ที่สุ่มเก็บจากโรงพยาบาลของรัฐและร้านขายยา จำนวน 40 ตัวอย่าง พบว่ามีตัวอย่างยาผิดมาตรฐาน ด้านปริมาณตัวยาสำคัญ 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 10.0 สาเหตุเนื่องมาจากปริมาณตัวยาสำคัญต่ำกว่า มาตรฐานที่กำหนด คือตรวจพบ 91.7-93.0 % ของ ปริมาณที่แจ้ง (ตารางที่ 2) ซึ่งแตกต่างจากตัวอย่างยา ที่เก็บจากผู้ผลิตโดยตรง ที่มีผู้ศึกษาไว้ว่าสาเหตุที่ ทำให้ตัวยา ผิดมาตรฐานเกิดจากมีปริมาณตัวยาสำคัญเกินมาตรฐานที่กำหนด (British Pharmacopoeia, 1998) (อนันต์ นนเมืองปัก และนิศาพรณ เรืองฤทธิ์, 2542) ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าอายุ ของยาที่ผิดมาตรฐานอยู่ในช่วง 12-27 เดือน ทั้งที่อายุ ของยาเม็ดไกลเบนคลาไมด์ที่ระบุที่ฉลากข้างกล่อง โดยบริษัทผู้ผลิตมีอายุตั้งแต่ 3-5 ปี ส่วนตัวอย่างยาที่ เข้ามาตรฐานด้านปริมาณตัวยาสำคัญมีอายุของยา ตั้งแต่ 11-42 เดือน การที่ตัวอย่างยาหมดอายุก่อน กำหนดแสดงให้เห็นว่ายาไม่มีความเสถียรตามที่ ฉลากระบุ ซึ่งผู้ผลิตควรจะต้องไปศึกษาความ คงสภาพของผลิตภัณฑ์เพิ่มเติม เพื่อให้รู้ว่ายาที่มีอายุ เท่าไรเพื่อจะได้กำหนดช่วงเวลาหมดอายุที่เหมาะสม

ส่วนความสม่ำเสมอของตัวยา (uniformity of content) พบว่าเข้ามาตรฐานตามตำรายา British Pharmacopoeia 2000 และมีค่า % RSD อยู่ในช่วง 0.72-6.09 โดยทุกตัวอย่างมีค่าเฉลี่ย % RSD อยู่ที่ 2.64 (ตารางที่ 3) แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ที่นำมาศึกษา ในครั้งนี้ ส่วนใหญ่มีความสม่ำเสมอของตัวยาคือ ซึ่งใน British Pharmacopoeia 2000 ไม่ได้กำหนด ค่า % RSD ไว้ ซึ่งต่างจาก USP 23 กำหนดให้การ ทา content uniformity ในตัวอย่างชุดแรก (10 เม็ด) มีค่า %RSD < 6 ซึ่งถ้าเกินต้องทำการทดสอบชุดที่ สองเพิ่มอีก 20 เม็ด

ส่วนเวลาในการกระจายตัว (Disintegration time) พบว่าเข้ามาตรฐานตามข้อกำหนด BP 2000 ทุก ตัวอย่าง คือไม่เกิน 15 นาที จากตัวอย่างยา 40 ตัวอย่าง พบว่ามีเวลาในการกระจายตัวเฉลี่ยอยู่ที่ 3.25 นาที และค่า SD =1.81 นาที แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างยา ส่วนใหญ่มีเวลาในการกระจายตัวใกล้เคียงกัน

ในการหาสารเจือปน (related substance) ในยาเม็ดไกลเบนคลาไมด์ ซึ่งมีตัวหลักอยู่ 2 ชนิด คือ sulfonamide และ urethane โดยใช้วิธี TLC ซึ่งเป็นการหาปริมาณแบบ semiquantitative โดยการเปรียบเทียบขนาดและความเข้มของ spot โดยดูผ่านเครื่อง อุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จากการวิเคราะห์พบว่ายาเม็ดไกลเบนคลาไมด์ทุกตัวอย่าง มี related substance ไม่เกินมาตรฐานตามที่ British Pharmacopoeia 2000 กำหนด คือมีปริมาณ sulfonamide ไม่เกิน 2.4% ของปริมาณไกลเบนคลาไมด์ และ urethane ไม่เกิน 0.4 % ของปริมาณไกลเบนคลาไมด์

ข้อมูลการวิจัยครั้งนี้ได้เผยแพร่ส่งให้ หน่วยงานเจ้าของผลิตภัณฑ์โดยได้ลงรายละเอียด เกี่ยวกับตัวยาทันหมด เพื่อให้หน่วยงานของรัฐ นำข้อมูลไปใช้ประกอบการตัดสินใจเลือกซื้อยาหรือ คินยาในคราวต่อไปได้

สรุป

ตัวอย่างยาที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ส่วนใหญ่ มีคุณภาพดี แต่ยังมีตัวอย่างยาบางตัวอย่างผิด มาตรฐานด้านปริมาณตัวยาสำคัญ ดังนั้นบริษัทผู้ผลิต ควรให้ความสำคัญต่อความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ ให้มากขึ้น เพื่อจะได้ระบุวันหมดอายุของยาที่ เหมาะสมได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเกสท์กรหญิงลักษณา
ลือประเสริฐ ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การ
แพทย์ขอนแก่นที่ให้การสนับสนุน และตรวจการ
นำเสนอผลงาน

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์
การแพทย์และ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์
ส่วนภูมิภาคทั้ง 13 ศูนย์

สำนักงานสาธารณสุขจังหวัด และ
โรงพยาบาลของรัฐทุกแห่ง

เอกสารอ้างอิง

อนงค์นุช เนยเมืองปัก และนิดาพรณ เรืองฤทธิชนก.
(2542). คุณภาพยาเม็ดไกลเบนคลาไมด์.
สารตำรายา. 7(3): หน้า 57-61.

British Pharmacopoeia Volume II. (2000).
London : Her Majesty's Stationery Office.
p. 1983, A231, A214-215

The United States Pharmacopeia 23. (1995). The United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockvill. p. 1838-1839.

การศึกษาความแม่นยำและความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำนมและคุณภาพของนมสดและนมปรุงแต่งที่จำหน่ายใน 4 จังหวัด ภาคตะวันออกเฉียงเหนือในช่วงปี 2544 - 2546

วิไล เสง, โสภิน บำเพ็ญทรัพย์ และไพรวลัย อินทร์อุดม¹

บทคัดย่อ

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ขอนแก่นได้ทดสอบความแม่นยำและความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำนมในนมสดและนมปรุงแต่งพบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันในการวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมดและไขมันของนมสดเท่ากับร้อยละ 0.30 และ 0.08 ตามลำดับ ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันในการวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมด ไขมันและน้ำตาลซูโครสของนมปรุงแต่งเท่ากับร้อยละ 2.07, 0.18 และ 2.68 ตามลำดับ ค่าการกลับคืนของการวิเคราะห์น้ำตาลซูโครสที่เติมลงในนมสดที่ความเข้มข้นในระดับร้อยละ 2.03, 4.02 และ 8.04 มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วงร้อยละ 100.62 - 102.71 และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันร้อยละ 0.49 - 2.94 จากนั้นวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำนมในนมสดและนมปรุงแต่งที่จำหน่ายในเขตจังหวัดขอนแก่น กาฬสินธุ์ สกลนคร และเลย ตามโครงการคุ้มครองผู้บริโภคในปีงบประมาณ 2544-2546 พบตัวอย่างที่มีองค์ประกอบน้ำนมต่ำกว่าเกณฑ์กำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขโดยรวมร้อยละ 20 (จาก 90 ตัวอย่าง) นมสดร้อยละ 20.83 (จาก 48 ตัวอย่าง) นมปรุงแต่งร้อยละ 19.00 (จาก 42 ตัวอย่าง) เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวหน่วยงานที่เกี่ยวข้องต้องเพิ่มการกำกับดูแลให้คำแนะนำการผลิตผลิตภัณฑ์นมตลอดจนการเลี้ยงโคนมที่ดีด้วย

Abstract

The precision and accuracy of the method for determining the composition of fresh milk and flavored milk were tested by the Regional Medical Science center in Khon Kean. The results showed that the relative standard deviation of determining total solids and fat in fresh milk were 0.30 and 0.08 %, respectively and the relative standard deviation of total solids, fat and sucrose in flavored milk were 2.07, 0.18, and 2.68 %, respectively. The range of average recovery of flavored milk samples fortified with sucrose at 2.03, 4.02 and 8.04 %w/w. was 100.62 - 102.71 % and the range of the relative standard deviation was 0.49 - 2.94 %. Chemical analysis of 90 samples of fresh milk and flavored milk followed by a survey on quality and safety

¹ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ขอนแก่น ถนนหน้าศูนย์ราชการ อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40000

of milk distributed in Khon Kean, Loei, Kalasin and Sakon Nakhon during the fiscal years 2001 to 2003 showed that 20 % of the combined samples ($n = 90$), 20.83 % of the fresh milk samples ($n = 48$) and 19 % of the flavored milk samples ($n = 42$) were substandard based on the Ministry of Public Health Notification. To solve this problem, the responsible organization must closely monitor the production of milk products and the farming management. It should also give advice on these aspects.

บทนำ

น้ำนมประกอบด้วยไขมัน โปรตีน น้ำตาล แล็กโทสและแร่ธาตุต่างๆ ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำนมมักวิเคราะห์ในรูปของไขมันและของแข็งไม่รวมไขมัน (ซึ่งเดิมเรียกว่าธาตุน้ำนมต่อมาเรียกว่าเนื้อม)

เนื่องจากโคนมเป็นสัตว์ที่เจริญเติบโตและผลิตนมได้ดีในสภาพอากาศในประเทศเขตร้อน เมื่อนำมาเลี้ยงในประเทศไทยที่มีลักษณะอากาศแบบร้อนชื้น ทำให้โคนมต้องปรับตัวเพื่อรักษาสมดุลความร้อนภายในร่างกายหรือตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมจึงมีการลดการกินอาหารและเพิ่มการดื่มน้ำ ประกอบกับพืชอาหารสัตว์ส่วนใหญ่ที่เจริญเติบโตในอากาศแบบร้อนชื้นจะมีโปรตีนและแร่ธาตุโดยเฉพาะฟอสฟอรัสต่ำ จึงทำให้ประสบปัญหาต่างๆ ในการเลี้ยงโคนมเช่น ลูกโค โครุ่นและโคสาวมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ ผลผลิตนมต่ำ องค์ประกอบน้ำนมมีค่าต่ำกว่ามาตรฐานที่ควรจะเป็นและความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำเป็นต้น (จิระชัย กาญจนพฤตพงศ์, 2542) จากการทดสอบคุณภาพน้ำนมดิบจำนวน 60,284 ตัวอย่างจากศูนย์รวมนม 12 ศูนย์ขององค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) เขตภาคกลางในช่วงปี พ.ศ. 2539 ถึง 2542 พบว่ามีค่าของแข็งไม่รวมไขมันเฉลี่ย 8.47, 8.44, 8.38 และ 8.42 ตามลำดับ (สุทธิศักดิ์ แก้วแกมจันทร์และคณะ, 2544)

กระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดให้นมและผลิตภัณฑ์นมเป็นอาหารควบคุมเฉพาะและควบคุมคุณภาพตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ดังนี้ ฉบับที่ 149 พ.ศ. 2536 เรื่องนมโคได้กำหนดให้นมโคต้องมีธาตุน้ำนมไม่น้อยกว่าร้อยละ 8.5 และมีไขมันทั้งหมดไม่น้อยกว่า ร้อยละ 3.2 ต่อมา กระทรวงสาธารณสุขได้ยกเลิกประกาศฉบับเดิมและออกประกาศกระทรวงสาธารณสุขเรื่องนมโคใหม่ อีก 2 ครั้งคือฉบับที่ 218 พ.ศ. 2544 ซึ่งกำหนดให้ธาตุน้ำนมไม่รวมไขมันเนยไม่น้อยกว่า ร้อยละ 8.25 ของน้ำหนักและไขมันเนยไม่น้อยกว่าร้อยละ 3.2 ของน้ำหนักสำหรับน้ำนมดิบชนิดเต็มไขมันเนยที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และฉบับที่ 265 พ.ศ. 2545 กำหนดให้เนื้อมไม่รวมไขมันเนยไม่น้อยกว่า ร้อยละ 8.25 ของน้ำหนักและไขมันเนยไม่น้อยกว่าร้อยละ 3.2 ของน้ำหนักสำหรับนมสดชนิดเต็มไขมัน ส่วนนมปรุงแต่ง กระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดคุณภาพตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 35 พ.ศ. 2522 เรื่องนมปรุงแต่ง กำหนดให้นมปรุงแต่งต้องมีธาตุน้ำนมไม่รวมไขมัน ไม่น้อยกว่าร้อยละ 8 ของน้ำหนัก และมีสิ่งปรุงแต่งไม่เกินร้อยละ 6 ของน้ำหนัก ต่อมาได้ยกเลิกประกาศเรื่องนมปรุงแต่งฉบับเดิม และออกประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 266 พ.ศ. 2545 เรื่องนมปรุงแต่งกำหนดให้เนื้อมไม่รวมไขมันเนยหรือไขมันไม่น้อยกว่าร้อยละ 7.7 ของน้ำหนัก และมีไขมันไม่น้อยกว่าร้อยละ 3 ของน้ำหนัก สำหรับนมปรุงแต่งชนิดเหลวเต็มไขมันเนยหรือเต็มไขมัน

จากรายงานการวิเคราะห์หัตถ์พาสเจอร์ไรส์ทั่วประเทศโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในปี พ.ศ. 2542 จำนวน 59 ตัวอย่าง พบว่ามีธาตุน้ำมันไม่รวมไขมันในมันต่ำกว่าเกณฑ์กำหนด 19 ตัวอย่าง (ร้อยละ 18.6) (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2542) และจากรายงานการวิเคราะห์หัตถ์นมโรงเรียนประเภท นมสดพาสเจอร์ไรส์ นมปรุงแต่งพาสเจอร์ไรส์ นมสดยูเอชทีและนมปรุงแต่งยูเอชที ในจังหวัดขอนแก่น ปี พ.ศ. 2541 ถึง 2543 จำนวน 36 ตัวอย่างโดยศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ขอนแก่น พบว่ามีธาตุน้ำมันไม่รวมไขมันต่ำกว่าเกณฑ์กำหนด 15 ตัวอย่าง (ร้อยละ 41.67) (ไพรวลัย อินทร์อุดมและคณะ, 2545) เพื่อควบคุมคุณภาพนมสดและนมปรุงแต่งซึ่งเป็นที่ยอมรับของประชาชนโดยทั่วไปและเป็นนมที่โรงเรียนซื้อเพื่อเป็นอาหารเสริมแก่นักเรียน กระทรวงสาธารณสุขจึงกำหนดให้ผู้ผลิตส่งตรวจคุณภาพนมประจำปีตามโครงการคุ้มครองผู้บริโภค ซึ่งก่อนหน้านี้นักผลิตที่มีเลขทะเบียนสำหรับอาหารแล้วผู้ผลิตไม่ต้องส่งตรวจ จะมีการสุ่มเก็บตัวอย่างจากร้านค้าส่งตรวจโดยเจ้าหน้าที่จากสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดเพียงส่วนเดียว ดังนั้นระหว่างปี พ.ศ. 2544-2546 ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ขอนแก่นจึงวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำมันในนมสดและนมปรุงแต่งที่จำหน่ายในพื้นที่รับผิดชอบ 4 จังหวัดซึ่งได้แก่ขอนแก่น กาฬสินธุ์ สกลนคร และเลย ตามโครงการคุ้มครองผู้บริโภคเพื่อหาร้อยละของตัวอย่างนมที่มีองค์ประกอบน้ำมันต่ำกว่าเกณฑ์กำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขเพื่อเป็นแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

นมสด และนมปรุงแต่ง รวมทั้งสิ้นจำนวน 90 ตัวอย่างจากผู้ผลิต 28 ราย ส่งโดยเอกชน จำนวน 39 ตัวอย่างและเจ้าหน้าที่สำนักงานสาธารณสุข จำนวน 51 ตัวอย่าง

วิธีวิเคราะห์

การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดในนม ทำตาม AOAC International 1999, 925.23

การวิเคราะห์ไขมันในนม ทำตาม AOAC International 1999, 905.02

การวิเคราะห์น้ำตาลซูโครสในนม ใช้วิธี Liquid chromatographic method ดัดแปลงจาก AOAC International 1999, 980.13 โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ดังนี้

สารเคมีและสารมาตรฐาน: carrez I solution (potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate 3.60 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร) carrez II solution (zinc sulfate heptahydrate 7.2 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร) สารละลายน้ำตาลซูโครสมาตรฐาน 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร (อบน้ำตาลมาตรฐาน ซูโครส ในตู้อบสูญญากาศ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นใน desiccators ชั่งน้ำหนักแล้วอบซ้ำจนน้ำหนักคงที่ จากนั้นชั่งน้ำตาลซูโครสมา 10 กรัม ละลายในน้ำแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร)

การเตรียม calibration curve: เตรียมสารละลายมาตรฐานซูโครสที่มีความเข้มข้น 0.001, 0.002, 0.004, 0.006, และ 0.008 กรัมต่อมิลลิลิตร โดยปีเปิดสารละลายมาตรฐานซูโครส (0.1 กรัม ต่อ มิลลิลิตร) 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 และ 8.0 มิลลิลิตรตามลำดับลงในขวดขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ถึงขีด เขย่าให้เข้ากัน กรองด้วยกระดาษกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้ววัดด้วย High performance liquid chromatograph (HPLC)

เครื่องมือและอุปกรณ์: เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Water รุ่น 2690, เครื่องตรวจวัดชนิด Refractive index ยี่ห้อ Water รุ่น 2410 คอลัมน์ชนิด carbohydrate 4 ไมโครเมตร (250 x 4 มิลลิเมตร) อ่างความถี่สูง (ultrasonic bath) กระดาษกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร กระดาษกรอง กรวยกรอง ขวดชมพู ขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ตู้อบสูญญากาศ (vacuum oven) และ desiccators

สภาวะเครื่อง HPLC: เฟสเคลื่อนที่เป็นส่วนผสมของ acetonitrile และ น้ำ (70:30) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีด 20 ไมโครลิตร เวลาในการวิเคราะห์ต่อ 1 ตัวอย่าง (running time) 10 นาที

ขั้นตอนการวิเคราะห์: ชั่งตัวอย่างนมที่ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ประมาณ 10 กรัม จดน้ำหนัก (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) แล้วถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติม carrez I solution ปริมาณ

5 มิลลิลิตร เขย่าประมาณ 1 นาทีและเติม carrez II solution ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เขย่าประมาณ 1 นาที เช่นเดียวกัน ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน ประมาณ 30 นาที แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 และกระดาษกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร ตามลำดับ จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ตามสภาวะการทดลองข้างต้น

การคำนวณ :

ปริมาณน้ำตาลซูโครส (ร้อยละของน้ำหนัก) = $C \times V \times 100 / W$

เมื่อ C คือ ความเข้มข้นที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (กรัมต่อมิลลิลิตร)

W คือ น้ำหนักของตัวอย่างนม(กรัม)

V คือ ปริมาตรของตัวทำละลาย (มิลลิลิตร)

การวิเคราะห์เนื้อมักรวมไขมัน ทำตาม AOAC International 1999, 990.21

การคำนวณ :

เนื้อมักรวมไขมัน(ร้อยละของน้ำหนัก) = TS - Fat - Sucrose

เมื่อ TS คือ ปริมาณของแข็งทั้งหมดในนม (ร้อยละของน้ำหนัก)

Fat คือ ปริมาณไขมันในนม (ร้อยละของน้ำหนัก)

Sucrose คือ ปริมาณน้ำตาลซูโครสในนม (ร้อยละของน้ำหนัก)

การทดสอบประสิทธิภาพวิธี

ทดสอบความแม่นยำ(precision)ในการวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด ไขมันและน้ำตาลซูโครสในตัวอย่างนมสดยูเอชทีและนมปรุงแต่งยูเอชทีรสหวาน โดยวิเคราะห์ซ้ำในตัวอย่างเดียวกัน 7 ครั้ง แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย(mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(standard deviation, SD) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (relative standard deviation, %RSD) ทดสอบความถูกต้อง (accuracy) ในการวิเคราะห์น้ำตาลซูโครสในนม โดยวิเคราะห์นมสดยูเอชทีที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 2, 4 และ 8 ของน้ำหนัก วิเคราะห์ซ้ำ 7 ครั้งในแต่ละระดับความเข้มข้น แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน และร้อยละการได้กลับคืน (%recovery)

ผลการศึกษา

ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ไขมันและของแข็งทั้งหมดได้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน(%RSD) ในนมสดเท่ากับร้อยละ 0.30 และ 0.08 ตามลำดับ ในนมปรุงแต่งได้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน(%RSD)ของวิธีวิเคราะห์ไขมันของแข็งทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลซูโครสเท่ากับร้อยละ 2.07, 0.18 และ 2.68 ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 1 ส่วนความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส ในนมปรุงแต่งได้ทดลองที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.03, 4.02 และ 8.04 ได้ค่าร้อยละการกลับคืน 100.62, 102.41 และ 102.71 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เติม(ร้อยละของน้ำหนัก) กับค่าพื้นที่ของพีคที่วัดได้ ได้ค่าความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง(correlative coefficient, r^2) เท่ากับ 0.999972

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความแม่นยำในการวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด ไขมันและน้ำตาลซูโครส ในตัวอย่างนมสดยูเอชทีและนมปรุงแต่งยูเอชทีรสหวาน

รายการวิเคราะห์	ค่าที่วัดได้ (mean $\pm$ SD)	%RSD
ไขมัน		
นมสด	3.36 $\pm$ 0.01	0.30
นมปรุงแต่งยูเอชทีรสหวาน	3.87 $\pm$ 0.08	2.07
ของแข็งทั้งหมด		
นมสด	11.92 $\pm$ 0.01	0.08
นมปรุงแต่งยูเอชทีรสหวาน	16.22 $\pm$ 0.03	0.18
น้ำตาลซูโครส		
นมปรุงแต่งยูเอชทีรสหวาน	3.73 $\pm$ 0.10	2.68

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความถูกต้อง ในการวิเคราะห์น้ำตาลซูโครสในนมปรุงแต่งยูเอชทีรสหวาน

ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เติม (ร้อยละ ของน้ำหนัก)	ค่าที่วัดได้ (mean $\pm$ SD)	%RSD	% Recovery
2.03	2.04 $\pm$ 0.06	2.94	100.62
4.02	4.12 $\pm$ 0.02	0.49	102.41
8.04	8.26 $\pm$ 0.13	1.57	102.71
			เฉลี่ย = 101.91

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบไขมันในนมสดและนมปรุงแต่งรวมทั้งสิ้น 90 ตัวอย่าง ในช่วงปีงบประมาณ 2544 2545 และ 2546 พบว่ามีจำนวนตัวอย่าง ไม่เข้าเกณฑ์กำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขร้อยละ 20 ในนมสดจำนวน 48 ตัวอย่าง ไม่เข้าเกณฑ์ร้อยละ 20.83 และนมปรุงแต่งจำนวน 42 ตัวอย่าง ไม่เข้าเกณฑ์ร้อยละ 19 ดังแสดงในตารางที่ 3 ตัวอย่างนมสดไม่เข้าเกณฑ์ฯ คิดเป็นร้อยละ 70 (จาก 10 ตัวอย่าง) โดยพบปริมาณไขมันน้อยกว่าเกณฑ์ฯกำหนด สำหรับนมปรุงแต่งคิดเป็นร้อยละ 87.5 (จาก 8 ตัวอย่าง) โดยพบปริมาณเนื้อมันไม่รวมไขมันน้อยกว่าเกณฑ์ฯ ดังแสดงในตาราง

ที่ 4 นอกจากนี้พบจำนวนตัวอย่างที่ไม่เข้าเกณฑ์ฯ ที่ส่งตรวจ โดยผู้ผลิตและสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดคิดเป็นร้อยละ 20.51 (จาก 39 ตัวอย่าง) และร้อยละ 19.61 (จาก 51 ตัวอย่าง) ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 5 ปริมาณไขมัน (ร้อยละของน้ำหนัก) ในนมสดและนมปรุงแต่งมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 3.60 ถึง 3.72 และ 3.14 ถึง 3.53 ตามลำดับ ส่วนปริมาณเนื้อมันไม่รวมไขมัน (ร้อยละของน้ำหนัก) ในนมสดและนมปรุงแต่งมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 8.40 ถึง 11.64 และ 8.11 ถึง 10.80 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6 และตารางที่ 7

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำหนักในนมสดและนมปรุงแต่งในปีงบประมาณ 2544 - 2546

ปีงบประมาณ	นมสด (ตัวอย่าง)		นมปรุงแต่ง (ตัวอย่าง)	
	จำนวนทั้งหมด	ไม่เข้าเกณฑ์ฯ(ร้อยละ)	จำนวนทั้งหมด	ไม่เข้าเกณฑ์ฯ(ร้อยละ)
2544	2	0	16	2 (12.5)
2545	12	2 (16.67)	17	5 (29.41)
2546	34	8 (23.53)	9	1 (11.11)
รวม	48	10 (20.83)	42	8 (19)

ตารางที่ 4 ลักษณะองค์ประกอบที่ไม่เข้าเกณฑ์กำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข

ปีงบประมาณ	นมสด (ตัวอย่าง)			นมปรุงแต่ง (ตัวอย่าง)		
	ทั้งหมด	ไขมันน้อยกว่าเกณฑ์ฯ	เนื้อมันน้อยกว่าเกณฑ์ฯ	ทั้งหมด	ไขมันน้อยกว่าเกณฑ์ฯ	เนื้อมันน้อยกว่าเกณฑ์ฯ
2544	0	0	0	2	0	2
2545	2	1	1	5	0	5
2546	8	6	2	1	1	0
รวม	10	7	3	8	1	7

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการไม่เข้าเกณฑ์ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขของตัวอย่างที่ส่งตรวจโดยผู้ผลิตและสำนักงานสาธารณสุขจังหวัด

ปีงบประมาณ	ผู้ผลิตส่งตรวจ (ตัวอย่าง)		สำนักงานสาธารณสุขส่งตรวจ (ตัวอย่าง)	
	ทั้งหมด	ไม่เข้าเกณฑ์ฯ(ร้อยละ)	ทั้งหมด	ไม่เข้าเกณฑ์ฯ(ร้อยละ)
2544	15	2 (13.33)	3	0
2545	15	5 (33.33)	14	2 (14.29)
2546	9	1 (11.11)	34	8 (23.53)
รวม	39	8 (20.51)	51	10 (19.61)

ตารางที่ 6 ปริมาณไขมันในนมที่ส่งตรวจโดยผู้ผลิตและสำนักงานสาธารณสุขจังหวัด(สสจ.)

ปีงบประมาณ	ปริมาณไขมัน (ร้อยละของน้ำหนัก)			
	นมสด(mean ± SD)		นมปรุงแต่ง(mean ± SD)	
	ผู้ผลิตส่งตรวจ	สสจ.ส่งตรวจ	ผู้ผลิตส่งตรวจ	สสจ.ส่งตรวจ
2544	3.66 ± 0	3.61 ± 0	3.53 ± 0.55	3.14 ± 0.49
2545	3.60 ± 0.74	3.72 ± 0.53	3.27 ± 0.81	3.43 ± 0.36
2546	3.71 ± 0.29	3.36 ± 0.42	3.39 ± 0.1	3.21 ± 0.31

ตารางที่ 7 ปริมาณเนื้อมันไม่รวมไขมันในนมที่ส่งตรวจโดยผู้ผลิตและสำนักงานสาธารณสุขจังหวัด (สสจ.)

ปีงบประมาณ	ปริมาณเนื้อมัน (ร้อยละของน้ำหนัก)			
	นมสด(mean ± SD)		นมปรุงแต่ง(mean ± SD)	
	ผู้ผลิตส่งตรวจ	สสจ.ส่งตรวจ	ผู้ผลิตส่งตรวจ	สสจ.ส่งตรวจ
2544	8.98 ± 0	11.64 ± 0	8.97 ± 1.35	8.78 ± 1.44
2545	9.42 ± 1.34	8.61 ± 0.37	8.39 ± 1.72	8.11 ± 0.61
2546	8.4 ± 0.4	8.92 ± 0.78	10.8 ± 1.30	8.7 ± 0.42

สรุปผลและวิจารณ์

จากผลการทดสอบความแม่นยำและความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์องค์ประกอบไขมันในนมสดและนมปรุงแต่งพบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันในการวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมด ไขมัน ในนมสด เท่า กับ 0.30 และ 0.08 ตามลำดับ ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันในการวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมด ไขมัน และน้ำตาลซูโครสในนมปรุงแต่งร้อยละ 2.07, 0.18 และ 2.68 ตามลำดับ การวิเคราะห์น้ำตาลซูโครสในนมปรุงแต่งที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.03, 4.02 และ 8.04 ได้ค่าการกลับคืนเฉลี่ยอยู่ในช่วงร้อยละ 100.62 - 102.71 และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันอยู่ในช่วงร้อยละ 0.49 - 2.94 จากนั้นได้วิเคราะห์องค์ประกอบไขมันในนมสดและนมปรุงแต่งตามโครงการคุ้มครองผู้บริโภคในปี 2544 - 2546 รวมทั้งสิ้น 90 ตัวอย่างพบว่า มีจำนวนตัวอย่างไม่เข้าเกณฑ์กำหนด

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขร้อยละ 20 ซึ่งลดลงเมื่อเทียบกับช่วงปีงบประมาณ 2541 - 2543 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการยกเลิกประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับเดิมที่กำหนดให้มีเนื้อมันไม่รวมไขมันไม่น้อยกว่าร้อยละ 8.50 แล้วออกประกาศฉบับใหม่ซึ่งอนุญาตให้มีปริมาณเนื้อมันไม่รวมไขมันลดลงเป็นไม่น้อยกว่าร้อยละ 8.25 ในนมสดชนิดเต็มไขมัน ส่วนในนมปรุงแต่งชนิดเหลวเต็มมันเนยหรือเต็มไขมันจากประกาศฉบับเดิมกำหนดให้มีปริมาณเนื้อมันไม่รวมไขมันไม่น้อยกว่าร้อยละ 8 ประกาศฉบับใหม่ลดลงเป็นไม่น้อยกว่าร้อยละ 7.7 อีกทั้งได้กำหนดให้ผู้ผลิตต้องส่งตัวอย่างนมตรวจคุณภาพประจำปีด้วยทำให้ผู้ผลิตต้องควบคุมการผลิตให้ดีและสม่ำเสมอมากขึ้น เมื่อพิจารณาถึงการมีองค์ประกอบไขมันน้อยกว่าเกณฑ์กำหนดตามประกาศของนมสดและนมปรุงแต่งแล้วปรากฏว่ามี

จำนวนที่ใกล้เคียงกันคือร้อยละ 20.83 (จาก 48 ตัวอย่าง) และร้อยละ 19.00 (จาก 42 ตัวอย่าง) ตามลำดับ ลักษณะตัวอย่างไม่เข้าเกณฑ์ฯ ในนมสดส่วนใหญ่มิมีปริมาณไขมันน้อยกว่าเกณฑ์ฯ กำหนด สำหรับนมปรุงแต่งมีปริมาณเนื้อมันไม่รวมไขมันน้อยกว่าเกณฑ์ฯ นอกจากนี้พบจำนวนตัวอย่างที่มีองค์ประกอบน้ำนมไม่เข้าเกณฑ์ฯ ที่ส่งตรวจโดยผู้ผลิตและสำนักงานสาธารณสุขจังหวัด มีจำนวนที่ใกล้เคียงกันคือร้อยละ 20.51 (จาก 39 ตัวอย่าง) และร้อยละ 19.61 (จาก 51 ตัวอย่าง) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามตัวอย่างนมสดและนมปรุงแต่งที่มีปริมาณไขมันและเนื้อมันไม่รวมไขมันในช่วงปีงบประมาณ 2544-2546 ยังมีจำนวนที่สูงมากที่มีคุณภาพต่ำกว่าเกณฑ์ฯ กำหนด ทั้งนี้อาจเกิดจากน้ำนมดิบที่เป็นวัตถุดิบมีองค์ประกอบของน้ำนมที่ต่ำ การจัดการอาหารที่เหมาะสมแก่โคนมเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถปรับปรุงค่าปริมาณและองค์ประกอบน้ำนมของนมโคให้สูงขึ้น จากรายงานการศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความแปรผันของปริมาณและองค์ประกอบน้ำนมของนมโคภายใต้สภาพการเลี้ยงในประเทศเขตร้อนโดยเก็บข้อมูลจากฟาร์มโคนม 40 ฟาร์มพบว่าโคนมที่ได้รับอาหารตามมาตรฐานจะให้ผลผลิตสูงกว่าและน้ำนมมีปริมาณโปรตีน ไขมันและของแข็งไม่รวมไขมันสูงกว่าน้ำนมจากโคนมที่ได้รับอาหารต่ำกว่ามาตรฐาน นอกจากนี้ยังพบว่าฤดูร้อนโคนมให้น้ำนมที่มีองค์ประกอบต่ำกว่าฤดูอื่น (สุทธิศักดิ์ แก้วแกมจันทร์และคณะ, 2545) ดังนั้นในการแก้ไขปัญหาดังกล่าวหน่วยงานที่เกี่ยวข้องคงต้องเพิ่มการกำกับดูแลการผลิตนมและผลิตภัณฑ์นมซึ่งรวมทั้งดูแลให้คำแนะนำเกษตรกรในการเลี้ยงโคนมเช่น การจัดการเรื่องอาหารและการดูแลสุขภาพโคนมเป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เกษัชกร หึงษ์ลักษณะ ลือประเสริฐ ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ขอนแก่น และคุณน้อย ทองสกุลพานิชย์ ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนเจ้าหน้าที่กลุ่มคุ้มครองผู้บริโภคด้านอาหารที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงสาธารณสุข. (2522). พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 35 (พ.ศ. 2522) เรื่องกำหนดนมปรุงแต่ง (Flavored Milk) เป็นอาหารควบคุมเฉพาะและกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานและวิธีการผลิต. ราชกิจจานุเบกษาเล่มที่ 96 ตอนที่ 163 ลงวันที่ 21 กันยายน 2522.
- กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 265) พ.ศ. 2545 เรื่องนมโค [online] [อ้างเมื่อ 6 สิงหาคม 2547] จาก www.fda.moph.go.th/fda_net/html/product/food/ntf/milk_265.htm
- กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 266) พ.ศ. 2545 เรื่องนมปรุงแต่ง [online] [อ้างเมื่อ 6 สิงหาคม 2547] จาก www.fda.moph.go.th/fda_net/html/product/food/ntf/milk_266.htm
- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2542). เอกสารการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่องการควบคุมคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม. 21-22 ธันวาคม 2542. กรุงเทพฯ.

จิระชัย กาญจนพถุณพงศ์. (2542). โภชเบื้อองตัน
สำหรับโคนมในเขตร้อน. หน้า 27-41. ใน :
การจัดการดูแลและบำบัดรักษาโรคที่สำคัญ
ในโคนมเพื่อเพิ่มผลผลิต. โรงพยาบาลสัตว์
หนองโพ จังหวัดราชบุรี.

ไพรวลัยอินทร์อุดม, สุภาพร เวทีวุฒาจารย์, วิไล เ
และโสภิน บำเพ็ญทรัพย์. (2545). คุณภาพ
นมสดและผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มจากแหล่ง
ผลิตในเขต 6 และผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มจาก
โครงการนมโรงเรียนในจังหวัดขอนแก่น.
วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 30(4):253-261

สุทธิศักดิ์ แก้วแกมจันทร์, ประวิทย์ วิชชุตา, พรศรี
ชัยรัตนายุทธ์, วิไล สันติโสภาสรีและสมถวิล
พานิชยิ่ง. (2544). คุณภาพน้ำนมดิบจากศูนย์รวม
นมขององค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่ง
ประเทศไทยในเขตภาคกลาง. ภาควิชา
สัตวบาล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน [online]
[อ้างเมื่อ 22 สิงหาคม 2547] จาก <http://aggie.kps.ku.ac.th/animal/research/research.htm>

สุทธิศักดิ์ แก้วแกมจันทร์, ประวิทย์ วิชชุตา, พรศรี
ชัยรัตนายุทธ์, สิริพันธ์พร สิ้นธุวนิชย์, วิไล
สันติโสภาสรี, สมจิต สุรพัฒน์และโกวิทย์
นิธิชัย. (2545). ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความ
ผันแปรของปริมาณและองค์ประกอบน้ำนม
ของโคนมภายใต้สภาพการเลี้ยงในประเทศ
เขตร้อน. ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพง
แสน [online] [อ้างเมื่อ 22 สิงหาคม 2547]
จาก <http://aggie.kps.ku.ac.th/animal/research/research.htm>

Association of Official Analytical Chemists. (1999).
Official Methods of Analysis. 16th ed. 5th
revision. Volume II. Maryland: AOAC
International. Chapter 31 p. 13 and Chapter
33 p. 10-33.

๒๒๒๒๒๒

การชักนำการกลายพันธุ์ การแยกและการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราสายพันธุ์กลาย

อารี ฤทธิบุรณ และ สุนันทา มีชนะ¹

บทคัดย่อ

การศึกษาการก่อการกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อราจากดินในเขตจังหวัดชลบุรี ที่ผ่านการจำแนกเชื้อแล้วว่าเป็น *Aspergillus niger* (เรวดี ปรีบัว, 2547) ซึ่งสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยวิธีการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่า หลังจากฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตให้กับ สปอร์เชื้อราที่เวลา 3.5 นาที ความอยู่รอดของ *A. niger* เหลือประมาณร้อยละ 10 และสามารถแยกสายพันธุ์กลายของเชื้อได้ *A. niger* 18 สายพันธุ์ จึงนำมาทดสอบความสามารถของเชื้อราต่อการใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนในเชิงคุณภาพในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง พบว่าที่พีเอช เท่ากับ 6 เชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 1 มีค่าอัตราส่วนของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี สูงสุดเท่ากับ 3.16 ที่พีเอชเท่ากับ 7 เชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 13 มีค่าอัตราส่วนสูงสุดเท่ากับ 3.39 และที่พีเอช เท่ากับ 8 เชื้อรา สายพันธุ์กลาย *A. niger* หมายเลข ML 249 มีค่าอัตราส่วนสูงสุดเท่ากับ 3.61 เมื่อทดสอบความสามารถของเชื้อราต่อการใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนในเชิงปริมาณในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว พบว่าเชื้อรา สายพันธุ์กลาย ML 3 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสมากที่สุด (18.565 หน่วยต่อมล.) ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (13.11 หน่วยต่อมล.) และเมื่อใช้ขังข้าวโพดร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และทริปโตน 3 กรัมในโตรเจนต่อลิตร เลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์กลาย ML3 ในสภาวะอาหารเหลวที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 พบว่ามีการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสดีที่สุด โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 118.22 หน่วยต่อมล. และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย (0.11 หน่วยต่อมล.) ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสมากกว่าสายพันธุ์เดิม (41.89 หน่วยต่อ มล.) ถึง 2.82 เท่า

Abstract

The mutation and isolation of soil fungi in Chonburi province, Thailand were studied at 37°C. The mutants of *Aspergillus niger* were isolated after exposure of fungal spores to ultraviolet (UV) radiation at the wavelength of 254 nm for 3.5 min. The survival of soil fungi after UV irradiation treatment was 10 %. The irradiated fungi were plated out on minimal media containing xylan as the only carbon source. A total of eighteen mutants of *A. niger* were screened for xylanase activity by measuring a ratio between the diameter of clear zone formed around the colony and the diameter of colony. Results demonstrated that the mutant strains ML1, ML13, and ML249 had the maximum ratios between the diameter of clear zone and the diameter of

¹ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กทม.

colony of 3.16, 3.39, and 3.61, respectively. The optimum pH that provided the maximum xylanase activity for the mutant strains ML1, ML13, and ML249 were 6, 7, and 8, respectively. The maximum xylanase activity of 18.565 Unit/mL was obtained when the mutant ML13 was grown in a minimal liquid medium containing xylan as the sole carbon source. The mutant strain ML1 showed the second highest xylanase activity after ML13. The xylanase activity of mutant ML1 was 16.148 which significantly increased comparing to 13.11 Unit/mL of its wild-type. In addition, mutants, strain ML13, had a level of xylanase 2.28 fold higher than its wild-type strain. Cellulase was also detected at the level of 0.105 unit/ml in mutant ML13 when corn cob was used as carbon source.

บทนำ

ไซแลนเป็นโครงสร้างหลักที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชซึ่งเป็นส่วนของเฮมิเซลลูโลสที่เป็นวัสดุที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีกทั้งเป็นการช่วยลดแหล่งคาร์บอนที่มีอยู่บนโลก (Gupta, et al. 2000) การย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสทำได้โดยใช้กลุ่มของเอนไซม์เฮมิเซลลูเลสซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างหลักของไซแลนได้เป็นโอลิโกเมอร์สายสั้นๆ ในที่สุดจะได้เป็นน้ำตาลไซโลสและอะราบีโนส กลุ่มของเอนไซม์เหล่านี้ที่รู้จักกันดี ได้แก่ เอนไซม์เอนโดไซแลเนส (endo-1,4- β -D-xylan xylanohydrolase; E.C. 3.2.1.8) หรือเรียกว่าเอนไซม์ไซแลเนส (Sa'-Pereira, et al. 2002)

เอนไซม์ไซแลเนสมีการนำไปประยุกต์ใช้ในทางการค้ามากมาย เช่น ในอุตสาหกรรมกระดาษ (Gerber, et al. 1997) อาหารและอาหารสัตว์ (Coughlan and Hazlewood, 1993) เป็นต้น โดยช่วยปรับปรุง กระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ ทำให้ลดปริมาณการใช้คลอรีนลงได้ (Viikari, et al. 1994; Kirk and Jeffries, 1996) และการใช้เอนไซม์ไซแลเนสมาปรับปรุง กระบวนการ ผลิตอาหารและอาหารสัตว์จะช่วยทำให้กระบวนการผลิตทำได้ง่ายขึ้น เอนไซม์ไซแลเนสที่ใช้ในทางการค้าส่วนใหญ่ผลิตได้จากจุลินทรีย์พวก *Trichoderma*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobasidium* และ

Talaromyces spp. ซึ่งการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสของจุลินทรีย์เหล่านี้ตามปกติจะประสบผลสำเร็จได้โดยขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการผลิต และเนื่องจากแหล่งกำเนิดเอนไซม์ที่แตกต่างกันนี้ ทำให้มีวิธีการผลิตที่ต่างกัน (Suurnakki, et al. 1997; Clarke, et al. 2000) จึงมีผลต่อความสามารถในการนำสารอาหารเข้าไปใช้ในเซลล์ อัตราการผลิต ปริมาณและโครงสร้างทางเคมีของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ (Kulkarni, et al. 1999) อย่างไรก็ตาม การผลิตเอนไซม์ไซแลเนสในทางการค้า มีความต้องการผลิตเอนไซม์ให้ได้อย่างรวดเร็วและมีปริมาณสูง ซึ่งอาจทำได้โดยใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรเป็นวัตถุดิบ (Jain, 1995) ปรับปรุงกระบวนการผลิต เช่น ปรับปรุงสภาวะในการเลี้ยงเชื้อ (Haltrich, et al. 1996) หรือการแยกสายพันธุ์ กลายของเชื้อจุลินทรีย์ (Singh, et al. 1995)

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการปรับปรุงการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสโดยการคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายของ *Aspergillus niger* ซึ่งแยกได้จากดินในจังหวัดชลบุรีโดยเรวดี ปรีบัว (2547) ที่ได้จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลตให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสโดยการเลี้ยงเชื้อในสภาพอาหารเหลวและใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับพิจารณาถึงผลิตภัณฑ์เอนไซม์ไซแลเนสที่ปราศจากกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสหรือมีในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้นควบคู่ไปด้วย

วิธีการ

1. วัตถุดิบ

วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร ได้แก่ ชังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด และชานอ้อย ที่ผ่านการบดด้วยเครื่องบดอาหารสัตว์ให้มีขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร และไซเลนจาก oat spelt xylan

2. จุลินทรีย์

เชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้จากดินในจังหวัดชลบุรี ซึ่งได้จำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วว่าเป็น *A. niger* และเก็บรักษาในหลอดอาหารวุ้นเอียง potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการย้ายเชื้อทุกๆ เดือน

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 อาหารแข็งสูตร Complete medium (Demzin, 1986) ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) มอลโตส (BHA) 40.0, เปปโตน (Oxoid) 10.0, มอลต์สกัด (Oxid) 24.0 และวุ้น 20.0

3.2 อาหารสูตร Minimal medium (Demzin, 1986) ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) NaNO_3 3.0, KCl 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, KH_2PO_4 1.0, กลูโคส 40.0 และเติม NaCl ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ละลายส่วนประกอบตามลำดับในน้ำกลั่น ส่วนอาหารแข็งให้เติมวุ้น 18.0 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเป็น 6.0 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

3.3 อาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างเอนไซม์ไซลานเนส (Mendel and Weber, 1969) ใช้ในการคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนส ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) KH_2PO_4 2.0, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.4, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, ยูเรีย 0.3, โปรติโอสเปปโตน 0.23 และยีสต์สกัด 0.1 ละลายส่วนประกอบตามลำดับในน้ำกลั่น ยกเว้น $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ จะต้องเตรียมแยกออกมาเนื่องจาก

จะทำให้ตกตะกอน และเติมสารละลายแร่ธาตุ 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) FeSO_4 5.0, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.56 และ CoCl_2 2.0 จากนั้นเติมแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร ในกรณีใช้เป็นอาหารแข็งให้เติมผงวุ้น 18 กรัมต่อลิตร

3.4 อาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลานเนส (เรวดี ปรีบัว, 2547) ใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) KH_2PO_4 2.0, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.4, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, ยูเรีย 0.3, โปรติโอสเปปโตน 0.25, ยีสต์สกัด 0.05 และเติม Tween 80 ความเข้มข้น 2.0 มิลลิลิตรต่อลิตร การเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารในหัวข้อ 3.3

4. การเตรียมสปอร์ของเชื้อรา

นำสปอร์ของเชื้อมาละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผสม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และนับจำนวนของเชื้อราด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ ให้มีจำนวนสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (Montenecourt and Eveleigh, 1977)

5. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

เอนไซม์ไซลานเนสวิเคราะห์กิจกรรมตามวิธีของ Tang et al. 1987 และเอนไซม์เซลลูเลสวิเคราะห์กิจกรรมตามวิธีของ Mendels and Weber, 1969 เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลสและกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

โดย 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรตให้เป็นผลิตภัณฑ์ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

6. การหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์ของเชื้อรา หลังจากทำการฉายแสงอัตราไวโอเลตที่ระยะเวลาต่างๆ กัน

นำสารละลายสปอร์ของ *A. niger* ที่แยก

บริสุทธิ์แล้วจากดินในจังหวัดชลบุรี ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร มาทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลตและไมฉายแสงอัลตราไวโอเลตอย่างละหนึ่งชุด โดยจับเวลาในแต่ละช่วงเวลาตั้งแต่ 0, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที และเก็บสารละลายสปอร์ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรของทั้งสองชุด การทดลองไว้ในที่มีคนาน 3 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายสปอร์ที่เจือจางอย่างเหมาะสมมาทำการ spread plate ด้วยอาหาร complete medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนับจำนวนโคโลนีและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (จากค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ชุด) แล้วนำมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเพื่อให้ได้ killing curve สำหรับใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายต่อไปโดยเลือกเวลาใดเวลาหนึ่งที่เหมาะสม ซึ่งการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตจะใช้เวลาที่ทำให้เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดร้อยละ 10

7. การคัดเลือกสายพันธุ์กลาย

นำสารละลายสปอร์ของ *A. niger* มาทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 3.5 นาที แล้วเก็บไว้ในที่มีคนาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการ spread plate ด้วยอาหาร complete medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2-3 วัน แล้วย้ายเชื้อไปเลี้ยงบนอาหาร minimal medium เป็นระยะเวลา 2 วัน ซึ่งโคโลนีที่ไม่สามารถเจริญในอาหาร minimal medium แสดงว่าเป็นสายพันธุ์กลายชนิดออกโซโทรฟ

8. การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

ทำการคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายโดยเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส (xylanase activity) ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณกับเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยในเชิงปริมาณจะทำการวัดอัตราส่วนของขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี (Teather and Wood, 1982; Wynne

and Pemberton, 1986) จากการทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งที่มีไซเลน ปริมาณร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน มีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน คือ 6.0, 7.0, และ 8.0 และทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน ส่วนในเชิงปริมาณจะทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส โดยทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่มีไซเลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการปรับพีเอชของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0, 7.0 และ 8.0 และทำการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการแยกเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มาทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

9. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราที่คัดเลือกได้

9.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

ทำการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ไซเลน ชั่งข้าวโพด เปลือกข้าวโพด และชานอ้อย ที่มีขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

9.2 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

ทำการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัม/ลิตร

9.3 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

ทำการแปรผันชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังตารางที่ 1

9.4 พีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

ทำการแปรผันพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0

10. การวางแผนการทดลองและการ

วิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง) แบบ Duncan’s new Mulpittle-Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS version 11.0

ผลการทดลอง

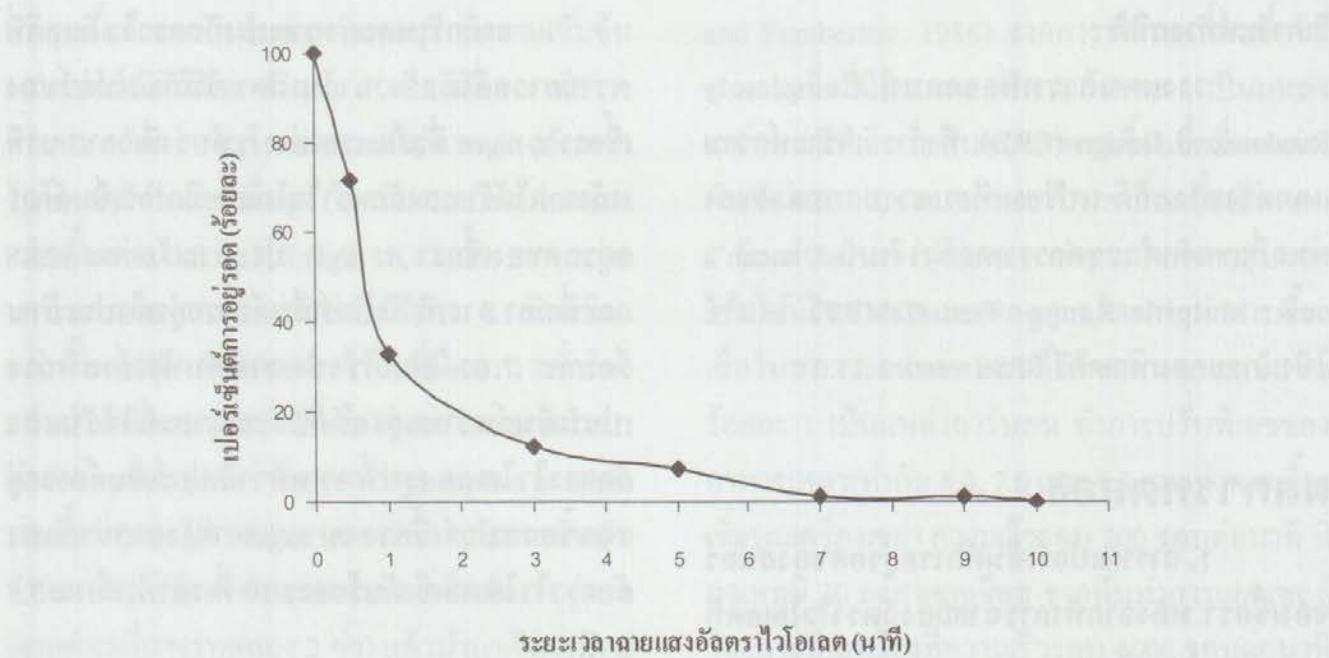
1. การหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์ของเชื้อรา หลังจากทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ระยะเวลาต่างๆ กัน

จากการทดลองฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ให้กับสปอร์ของเชื้อรา *A. niger* ที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่าที่เวลา 3 นาที หลังจากได้รับแสงอัลตราไวโอเลต มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อรา *A. niger* ประมาณร้อยละ 12.18 และที่เวลา 5 นาที มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดประมาณร้อยละ 7.01 จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดกับระยะเวลาที่ได้รับแสงอัลตราไวโอเลต (รูปที่ 1) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์เชื้อรา *A. niger* หลังจากฉายแสงอัลตราไวโอเลตเท่ากับร้อยละ 10 ที่เวลาประมาณ 3.5 นาที

ตารางที่ 1 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ต่างๆ สำหรับการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสม

สูตร	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)					
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	ยูเรีย	ยีสต์สกัด	โปรตีนไฮโดรไลเสต	น้ำข้าวโพด	ทรีปโตน
A	1.4	0	0	0	0	0
B	3.0	0	0	0	0	0
C	3.0	0	0	0	0	0
D	3.0	3.0	0	0	0	0
E	3.0	0	3.0	0	0	0
F	3.0	0	0	3.0	0	0
G	3.0	0	0	0	3.0	0
H	3.0	0	0	0	0	3.0
I	0	0	0	0	0	0
J	0	3.0	0	0	0	0
K	0	0	3.0	0	0	0
L	0	0	0	3.0	0	0
M	0	0	0	0	3.0	0
N	0	0	0	0	0	3.0
ชุดเปรียบเทียบ*	1.4	0.3	0.25	0	0	0

* อาหารสูตรที่ได้จากการหาสภาวะที่เหมาะสมของสายพันธุ์ดั้งเดิมของเชื้อ *Aspergillus niger* (เรวดี ปรีบัว, 2547)



รูปที่ 1 เปอร์เซนต์การอยู่รอดของเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆ กัน เมื่อใช้ระดับความเจือจางของสารละลายสปอร์เท่ากับ 10^{-4} สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2. การคัดเลือกสายพันธุ์กลายชนิดออกโซโทรฟของเชื้อรา *Aspergillus niger*

จากการทดลองฉายแสงอัลตราไวโอเลตแก่สปอร์เชื้อรา *Aspergillus niger* เพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายชนิดออกโซโทรฟที่มีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดร้อยละ 10 พบว่ามีสายพันธุ์กลายชนิดนี้ของ *A. niger* จำนวน 18 สายพันธุ์ ได้แก่ ML 1, 2, 3, 5, 13, 115, 168, 201, 209, 217, 223, 239, 241, 247, 249, 254, 405 และ 412

3. การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

จากการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสในเชิงปริมาณ พบว่าเชื้อราจำนวน 12 สายพันธุ์ ได้แก่ ML1, 2, 3, 5, 13, 115, 201, 209, 217, 241 และ 405 มีอัตราส่วนของขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยสายพันธุ์กลาย ML 1, 13 และ 249 ให้อัตราส่วนของขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูงสุดเท่ากับ 3.17, 3.38 และ 3.61 เมื่อเจริญในสภาวะพีเอช 6.0, 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ

ส่วนการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสในเชิงปริมาณ พบว่าเชื้อราสายพันธุ์กลายทุกสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ โดยสายพันธุ์กลาย ML 3 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 18.565 หน่วย/มล. และให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส เท่ากับ 0.298 หน่วย/มล. ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงที่สุดมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมเท่ากับ 1.4 เท่า (ตารางที่ 2)

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราที่คัดเลือกได้

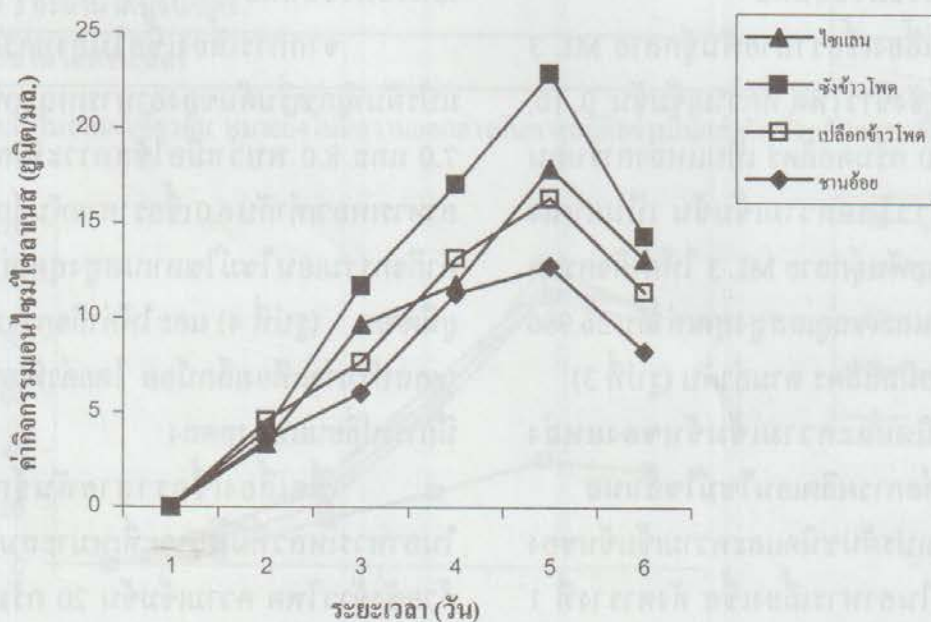
4.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

จากการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวที่มีชนิดใดชนิดหนึ่งของไซเลนซ์ข้าวโพด เปลือกข้าวโพด และขานอ้อย ความเข้มข้นเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อใช้ข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 3 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส-สูงสุดเท่ากับ 22.865 หน่วยต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 2) ส่วน *A. niger* สายพันธุ์ดั้งเดิมให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส เท่ากับ 17.728 หน่วยต่อมิลลิลิตร

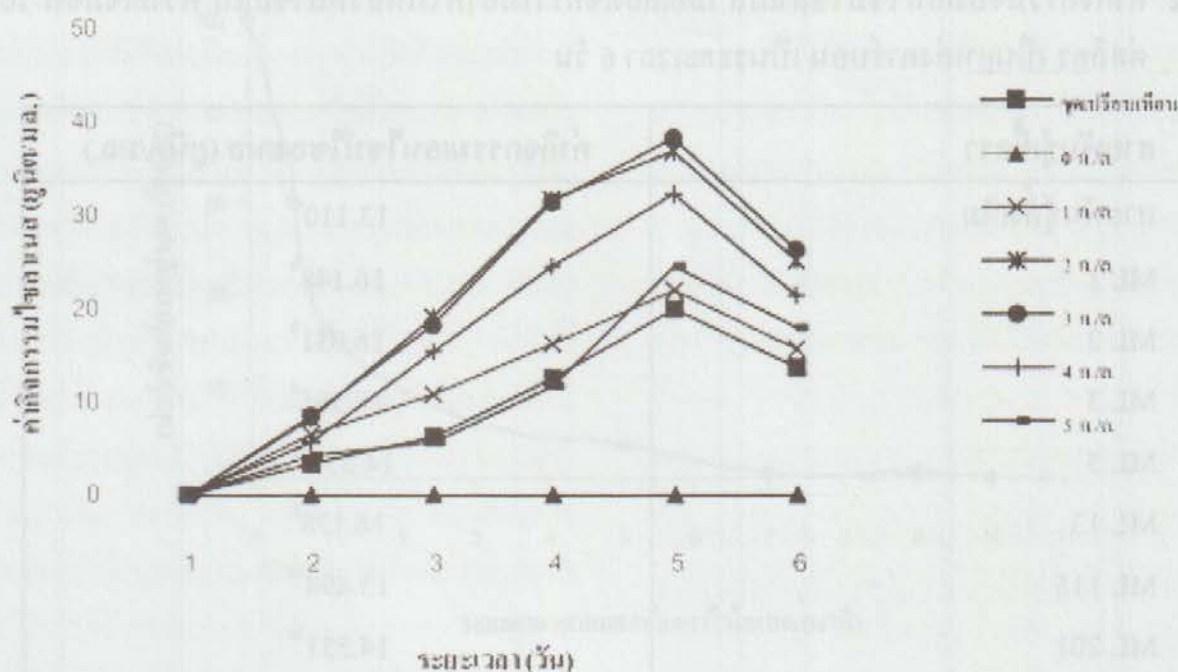
ตารางที่ 2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวที่มีไซเลน ความเข้มข้น 10 กรัม ต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นระยะเวลา 6 วัน

สายพันธุ์เชื้อรา	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส (ยูนิต/มล.)
สายพันธุ์ดั้งเดิม	13.110 ^{cd}
ML 1	16.148 ^b
ML 2	16.031 ^b
ML 3	18.565 ^a
ML 5	14.330 ^{bcd}
ML 13	16.178 ^b
ML 115	13.494 ^{cd}
ML 201	14.551 ^{bc}
ML 209	13.345 ^{bc}
ML 217	13.937 ^{bc}
ML 241	14.344 ^{bcd}
ML 249	12.485 ^d
ML 405	12.835 ^{cd}

ตัวอักษรเหมือนกันในสคมภ์เดียวกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05



รูปที่ 2 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 3 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอช เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ และทำการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 6 วัน



รูปที่ 3 ผลของความเข้มข้นของขังข้าวโพดที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซตานเนสของเชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 3 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอช เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ และทำการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 6 วัน

4.2 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซตานเนส

จากการเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 3 ในอาหารเหลวที่มีขังข้าวโพด ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อใช้ขังข้าวโพดความเข้มข้น เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 3 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซตานเนสและเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 36.986 และ 0.162 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 3)

4.3 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซตานเนส

จากการแปรผันชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังตารางที่ 1 พบว่าเมื่อใช้ทริปโตเนนความเข้มข้น 3.0 กรัมต่อลิตร (N) เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 3 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซตานเนสและเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 93.599 และ 90.008 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

4.4 พีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซตานเนส

จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีการแปรผันพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 พบว่าเมื่อใช้สภาวะพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0 เชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 3 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซตานเนสสูงสุดเท่ากับ 106.755 หน่วย/มล. (รูปที่ 4) และให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสปริมาณเพียงเล็กน้อย โดยค่าพีเอชของน้ำหมักมีการเปลี่ยนแปลงลดลง

เมื่อเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 3 ในอาหารเหลวที่มีสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งประกอบด้วยขังข้าวโพด ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และ ทริปโตเนน 3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีค่า พีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0 เลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็น

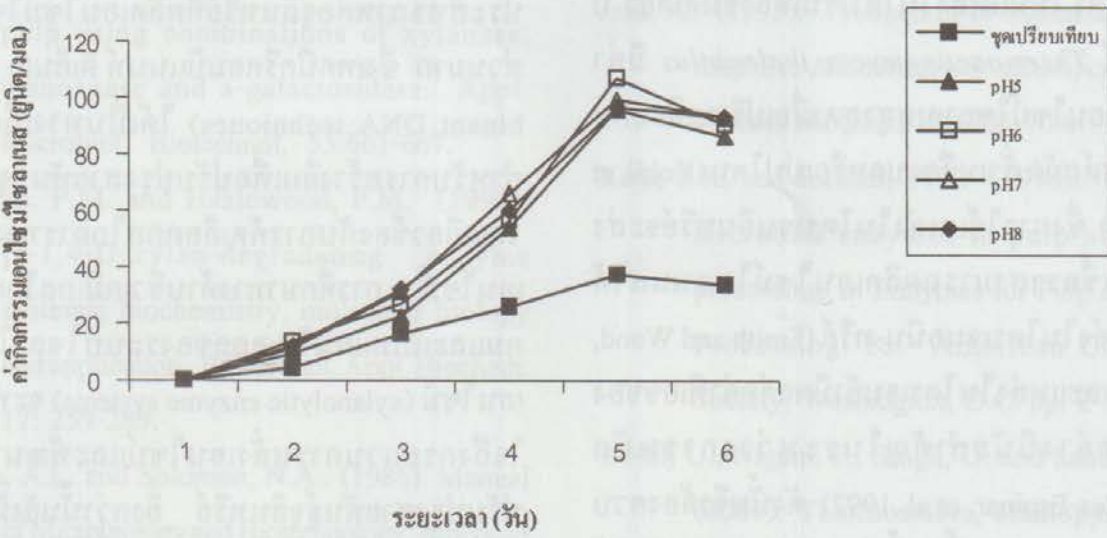
ระยะเวลา 6 วัน พบว่าเชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 3 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 118.216 และ 0.105 หน่วย/มล. ตามลำดับ ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนเชื้อรา *Aspergillus niger*

สายพันธุ์ดั้งเดิม เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว (เรวดี ปริ บัว, 2547) พบว่าให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส และ เซลลูเลส สูงสุดเท่ากับ 41.899 และ 0.111 หน่วย /มล. ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราสายพันธุ์ ML3

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส (หน่วยต่อมล.)
ชุดเปรียบเทียบ	38.886 ^g
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.4 กรัมต่อลิตร	41.362 ^g
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมในโตรเจน/ลิตร	78.631 ^{cd}
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมในโตรเจน/ลิตร+ยูเรีย 3 กรัมในโตรเจน/ลิตร	71.411 ^f
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมในโตรเจน/ลิตร+ยีสต์สกัด 3 กรัมในโตรเจน/ลิตร	75.586 ^{ef}
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมในโตรเจน/ลิตร+เปปโตน 3 กรัมในโตรเจน/ลิตร	74.678 ^{de}
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมในโตรเจน/ลิตร+น้ำแช่ข้าวโพด 3 กรัมในโตรเจน/ลิตร	34.784 ^b
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมในโตรเจน/ลิตร+ทริปโตน 3 กรัมในโตรเจน/ลิตร	80.707 ^c
ยูเรีย 3 กรัมในโตรเจน/ลิตร	74.792 ^{ef}
ยีสต์สกัด 3 กรัมในโตรเจน/ลิตร	79.750 ^c
เปปโตน 3 กรัมในโตรเจน/ลิตร	90.008 ^b
น้ำแช่ข้าวโพด 3 กรัมในโตรเจน/ลิตร	80.067 ^c
ทริปโตน 3 กรัมในโตรเจน/ลิตร	93.599 ^a

ตัวอักษรเหมือนกันในศตมภ์เดียวกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05



รูปที่ 4 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 3 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประเภททุนอุดหนุนการวิจัยประเภททั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2546 – 2547.

สรุปและวิจารณ์ผล

ในการคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายซึ่งเกิดจากการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตให้กับเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่แยกได้จากดินในจังหวัดชลบุรี เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส พบว่าเชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 3 เป็นเชื้อราที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 118.216 และ 0.105 ยูนิต์/มล.ตามลำดับ เมื่อเจริญในสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส ซึ่งมีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม เนื่องจากประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลสซึ่งย่อยสลายได้ง่ายมากกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ (Barber and Barber, 1974; Kuhad, 1999) ทริปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Kohli *et al.* (2001) รายงานว่าเมื่อใช้ทริปโตนความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว มีผลทำให้ *Thermoactinomyces thalophilus* มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยีสต์สกัด ถั่วเหลืองบดหรือเปปโตน (Kohli, *et al.* 2001) ซึ่งการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์จะส่งเสริมให้เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ดีกว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ (Smith and Wood, 1991b) และแหล่งไนโตรเจนยังมีผลต่อค่าพีเอชของอาหารอย่างมีนัยสำคัญในระหว่างการหมัก (Fernandez-Espinar, *et al.* 1992) ดังนั้นจึงต้องควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการหมักให้คงที่ เพื่อให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยทั่วไปเชื้อราสามารถเจริญและผลิต

เอนไซม์ได้ดีที่สภาวะพีเอชต่ำประมาณช่วงพีเอช 4 ถึง 6 (Haapala, *et al.* 1994) ซึ่งค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 เป็นค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 3 จากผลการทดลองนี้ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อราสายพันธุ์กลาย ML 3 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ดีกว่าเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิม แต่การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลานเนสในอุตสาหกรรมกระดาษ ซึ่งใช้สภาวะการทำงานที่อุณหภูมิและความดันสูง จึงต้องปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อราให้ได้เชื้อราที่มีการเจริญและการผลิตเอนไซม์ในสภาวะที่ใกล้เคียงกันกับสภาวะที่ใช้ในกระบวนการ อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลานเนสทางการค้าได้คาดหวังไว้ว่า สายพันธุ์ของเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสควรมีคุณสมบัติดังนี้ คือสามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้มาก มีความสามารถในการคงตัวต่ออุณหภูมิและพีเอชที่สูง หรือปราศจากกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส เป็นต้น การยืนยันถึงการใช้อยู่ของวัสดุเศษเหลือพวกเฮมิเซลลูโลสในทางการค้า ซึ่งต้องการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสให้ได้ปริมาณมากโดยใช้ต้นทุนต่ำ ในประเด็นนี้การแยกและการโคลนนิ่งไซลา-เนสซิน (xylanase gene) แสดงให้เห็นว่าเป็นขั้นตอนทางด้านวิศวกรรมที่มีประสิทธิภาพต่อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสส่วนมาก ซึ่งเทคนิครีคอมบิแนนท์ ดีเอ็นเอ (recombinant DNA techniques) ได้เป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการสร้างยีนเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ โดยเกี่ยวข้องกับการคัดเลือกลไกการทำงานของเอนไซม์ การศึกษาทางด้านชีวเคมี กลไกการควบคุมและแบบแผนโมเลกุลของระบบไซลาโนไลติกเอนไซม์ (xylanolytic enzyme systems) จะทำให้เข้าใจถึงกระบวนการหลังเอนไซม์และพัฒนาวิธีการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ ยิ่งกว่านั้นยังมีเทคนิคอื่นๆ ที่ใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ เช่น วิศวกรรมโปรตีน (protein engineering) การใช้สาร

เคมี (chemical modification) การตกผลึกด้วยรังสีเอกซ์เรย์ (X-ray crystallography) การก่อกลายพันธุ์โดยตรง (site-directed mutagenesis) เป็นต้น (Kulkarni, et al. 1999)

เอกสารอ้างอิง

เรวดี ปรีบัว. (2547). การแยกและคัดเลือกเชื้อราจากดินในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลันเนส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Barber, S and Benedito de Barder, C. (1974). Basic and applied research needs for optimizing utilization of rice bran as food and feed. Proceed of the rice by-product utilization international conference. Institue of Agrochemistry and Food Technology, Valencia. 4:1-99.

Clarke, J.H., Davisson, K., Rixon, J.E., Halstead, J.R., Fransen, M.P. Gilbert, H.J. and Hazlewood, G.P. (2000). A comparison of enzyme-aided bleaching of softwood paper pulp using combinations of xylanase, mannanase and α -galactosidase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53:661-667.

Coughlan, P.M. and Hazlewood, P.M. (1993). β -1,4-D-xylan-degradating enzyme systems: biochemistry, molecular biology and application. Biotechnol. Appl. Biochem. 17: 259-289.

Demzin, A.L. and Solomon, N.A.. (1986). Manual of Microbiology and Biotechnology. American Society for Microbilology, Washington, D.C. p.181.

Fernandez-Espinar, M.T., Ramon, D., Pinaga, F. and Valles, S. (1992). Xylanase production by *Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiol. Lett. 91 :91-96.

Gerber, P.J., Heitmann, J.A. and Joyce, T.W. (1997). Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma*. Biores. Technol. 61:127-140.

Gupta, R., Kuhad, R.C., Bhushan, B. and Hoondal, G. S. (2001). Improved xylanase production from a haloalkalophilic *Staphylococcus* sp. SG-13 using inexpensive agricultural residues. World J. Microbiol. Biotechnol. 17:5-8.

Haapala, R., Linko, S., Parkkinen, E. and Suominen, P. (1994). Production of endo-1,4- β -glucanase and xylanase by *Trichoderma reesei* immobilized on polyurethane foam. Biotechnol. Techniq. 8:401-406.

Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, D.K., Steiner, W. and Zupancie, S. (1996). Production of fungal xylanases. Biores. Technol. 58:137-161.

Jain, A. (1995). Production of xylanase by thermophilic *Melanocarpus albomyces* IIS 68. Process Biochem. 30:705-709.

Kirk, T.K. and Jeffries, T.W. (1996). Roles for microbial enzymes in pulp and paper processing. In Enzymes for Pulp and Paper Processing. ed. American Chemistry Society, Washington, D.C. pp. 2-14.

Kohil, U., Nigam, P., Singh, D. and haudhary, K.. (2001). Thermostable, alkalopphilic and cellulase free xylanase production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C. Enzyme Microb. Technol. 28:606-610.

- Kuhad, R.C. (1999). Lignocellulose biotechnology: Current and future prospects. *Crit. Rev. Biotechnol.* 13:151-172.
- Kulkarni, N., Shendye, A. and Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 23:411-456.
- Kulkarni, N., Shendye, A. and Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Lett.* 23:411-456.
- Mandels, M. and Weber, J. (1969). The production of cellulase. In *Advances in Chemistry Serology*. Gould, R.E., ed. American Chemistry Society, Washington, D.C. pp. 391-398.
- Montenecourt, B.S. and Eveleigh, D.E. (1977). Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. *Appl. Environ. Microbiol.* 134:777-782.
- Sa'-Pereira, P., Costa-Ferreria, M. and Aires-Barros, M.R. (2002). Enzymatic properties of a neutral endo-1,3(4)- β -xylanase Xyl II from *Bacillus subtilis*. *J. Biotechnol.* 94:265-275.
- Singh, A., Kuhad, R.C. and Kumar, M. (1995). Xylanase production by a hyperxylanolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. *Enzyme Microb. Technol.* 17:551-553.
- Smith, D.C. and Wood, T.M. (1991b). Xylanase production by *Aspergillus awamori*. Development of a medium and optimization of the fermentation parameters for the production of extracellular xylanase and β -xylosidase while maintaining low protease production. *Biotechnol. Bioeng.* 38:883-890.
- Suurn?kki, A., Tenkanen, M., Buchert, J. and Viikari, L. (1997). Hemicellulases in the bleaching of chemical pulps. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 57:261-287.
- Tang, L.U.L., Yu, E.K.C., Louis-Seize, G.W. and Saddler, J.W. (1987). Inexpensive, rapid procedure for bulk purification of cellulase-free beta, 1-4, D-xylanase for high specific activity. *Biotechnol. Bioeng.* 30:96-106.
- Teather, R.M. and Wood, P.J. (1982). Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:777-780.
- Viikari, L., Kantelinen, A., Buchert, J. and Plus, J. (1994). Enzymatic accessibility of xylans in lignocellulosic materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 124-129.
- Wynne, E.C. and Pemberton, J.M. (1986). Cloning of gene cluster from *Cellvibrio mixtus* which codes for cellulase, chitinase, amylase and pectinase. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:1362-1367.

In vitro* propagation of orchid, *Grammatophyllum speciosum

Somporn Prasertsongskun¹ and Ekasit Ponsoda¹

บทคัดย่อ

ทำการขยายพันธุ์ต้นกล้ากล้วยไม้ว่านเพชรหึง (*Grammatophyllum speciosum*) โดยนำต้นอ่อนกล้วยไม้ว่านเพชรหึงเลี้ยงในอาหารสูตร MS, VW, VW ดัดแปลง, CUI และจิตราพรรณ IV เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25 + 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 50 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าสูตรอาหารจิตราพรรณ IV ให้ผลดีที่สุดเมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่นๆ โดยพบว่า ต้นกล้ากล้วยไม้ว่านเพชรหึงมีจำนวนราก (5.97 ราก/ต้น) ความสูง (7.83 ซม./ต้น) และน้ำหนักสด (2.73 กรัม/ต้น) เฉลี่ยสูงที่สุด

Abstract

Micropropagation of *Grammatophyllum speciosum* was investigated. Seedling of this orchid was cultured on Murashige and Skoog (1962; MS), Vacin and Went (1949; VW), modified Vacin and Went, CUI (Sumpaokit, 1993) and Chitrapan IV (Piluek, 1993) media. All cultures were incubated at 25+2°C under cool white fluorescent light at intensity of 50 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ for a 16-h. Chitrapan IV medium was proved to be more beneficial to the growth of orchid than the other media. It significantly yielded per cultured plant, the highest average number of roots (5.97 roots/plantlet), shoot length (7.83 cm/plantlet) and fresh weight (2.73 gm/plantlet).

¹Department. of Science, Faculty of Science and Technology, Songkla University, Pattani, Thailand 94000

Introduction

Grammatophyllum speciosum, known as the tiger orchid, is the world's largest orchid (Pelekidis, 2003). It is epiphyte and grows in the crotches of large trees. This orchid can grow up to 15 feet long and found in tropical forests of Thailand. Nowadays, *G. speciosum* declines due to destruction of natural forest. Therefore, it is essential to take measures for the conservation and propagation of this orchid.

There are many reports on micropropagation of orchid using tissue culture. This technique has promoted the rapid propagation. Sheelavatamath et al. (2000) has reported that propagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., the endangered orchid was achieved through rhizome section culture. In addition, the propagation of *Cymbidium* using shoot-tip culture, protocorm-like bodied or callus as explants has been studied (Nayak et al. 2002; Huan et al. 2004). There are also many factors affecting growth of orchid. For example, variation of medium formulation has effected to the growth (Peak and Yeung, 1991; Adelberg et al., 1997). To date, there are no reports on the use of tissue culture and no systematic study has been made on tissue culture especially the effect of medium on propagation of *G. speciosum*. The objective of this study was to compare the propagation of *G. speciosum* using various types of media.

Materials and Methods

Plant material

The plant material used in this study was seedling of *G. speciosum* germinated in Vacin and Went medium.

Nutrient media and culture conditions.

Seedling of *G. speciosum* was cultured on five different media including Murashige and Skoog (1962; MS), Vacin and Went (1949; VW), modified Vacin and Went (supplemented with 15% coconut water), CUI (Sumpaokit, 1993) and Chitrapan IV (Piluek, 1993). Composition of CUI medium are 150 g/l potato, 1.25 g/l KNO_3 , 30g/l sucrose and 4g/l agar and composition of Chitrapan IV medium are 2g/l orchid fertilizer (formula 21-21-21), 1 capsule viterra vitamin, 1% coconut water, 0.2% activated charcoal, 50g/l banana, 20g/l sucrose and 5g/l agar. One seedling was implanted per culture. All cultures were illuminated by fluorescent light at $50 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ and maintained at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ with a photoperiod of 16-h. Thirty explants were used for each treatment and the experiment was carried out in duplicate. Data were recorded after culture for 12 weeks. All data were analyzed by ANOVA according to completely randomized design. Tukey's HSD was employed for the statistical evaluation.

Results and Discussion

Seedling of *G. speciosum* grew on all media. Greatest average number of roots, shoot length and fresh weight were observed on Chitrapan IV media (Table 1). The plant in VW medium was produced in higher number of leaves than that in other media. However, no significant different was observed between Chitrapan IV and VW media gave more leaves than roots. Seedling of *G. speciosum* with roots and leaves cultured on different media was shown in Figure 1. It was found that *G. speciosum* did not grow well in MS medium while it grow very well in Chitrapan IV and modified VW

media consisted of 15%coconut water and 0.2% activated charcoal. Ge et al. (2004) reported that coconut water, obtained from fresh coconut fruits contained sugar and many other substances. As a result of successful seedling culture of *G. speciosum*, coconut water was required as a supplement at some stage of the culture process. Huetteman and Preece (1993) described that coconut water is an organic growth factor which showed cytokinin like activity. Cytokinin play various important functions in cell division and induce axillary as well as adventitious shoot formation from meristematic explants. Ishii

et al. (1998) reported that orchid consumed the medium containing coconut water for protocorm-like bodied (PLB) formation. In this experiment banana was also found to be effective for seedling development in Chitrapan IV.

Activated charcoal was known to absorb many types of molecules and inclusion in culture media could have beneficial effects on the growth (Paek and Yeung, 1991). *G. speciosum* was developed well in MS and Knudson media supplement with 0.1% activated charcoal (Sheelavatamath et al., 2000).

Table 1 Effects of culture media on seedling culture of *G. speciosum*.

Type of media	Average no. of leaves	Average no. of roots	Shoot length (cm)	Fresh weight (g)
MS	3.90±0.42 ^a	2.07±0.55 ^a	1.40±0.34 ^a	0.27±0.09 ^a
VW	5.48±0.48 ^b	3.17±0.84 ^b	3.50±0.96 ^b	0.44±0.12 ^{ab}
Modified VW	4.20±0.71 ^a	3.10±1.07 ^b	4.43±1.67 ^b	0.99±0.49 ^c
CUI	5.13±0.85 ^b	5.03±1.32 ^c	3.38±0.88 ^b	0.67±0.25 ^b
Chitrapan IV	5.23±0.65 ^b	5.97±1.26 ^b	7.83±1.61 ^c	2.73±0.65 ^d

Each value represented the mean+S.E. of 30 replicated explants which were recorded after culture for 12 weeks. The different letters indicated significant difference at p<0.05 by Tukey's HSD.

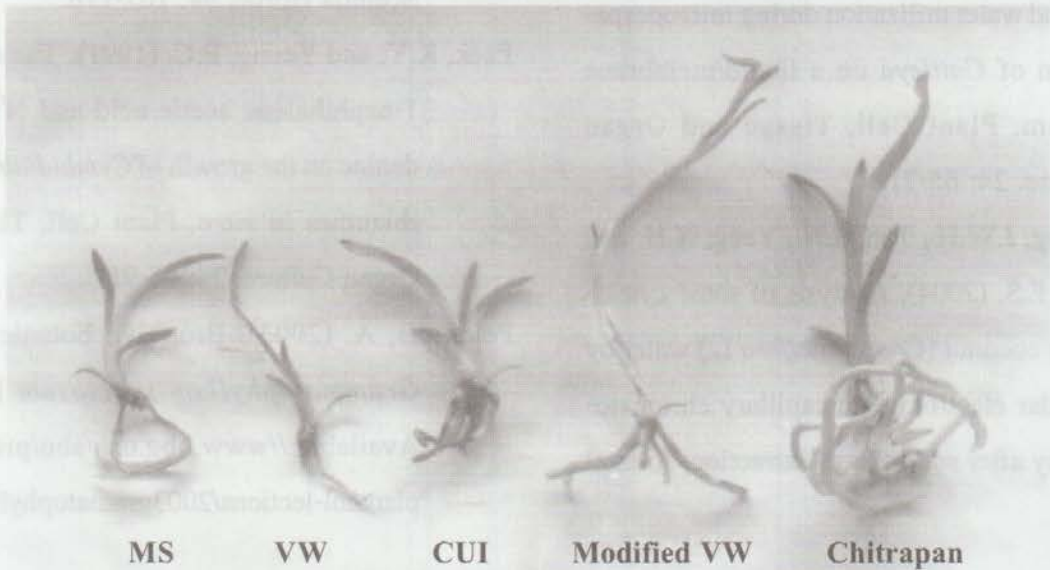


Figure 1 Seedling of *G. speciosum* on different media.

Conclusion

The culture medium is one of the limiting factors for plant growth. Coconut water, banana and activated charcoal are also a great benefit to plant growth. Our results indicated that Chitrapan IV medium contained enough nutrients growth of *G. speciosum* seedling. For future work, it will be interesting to transfer these cultured orchids to pot and garden.

Acknowledgments

The authors wish to thank Mr. Werachat Anuwat for his support plant materials and Dr. Vanida Chairgulprasert for reading the manuscript. This experiment was conducted in the tissue culture laboratory of Biology Section, Department of Science, Faculty of Science and Technology, Pattani, Thailand.

References

- Adelber, J.W., Desamero, N.V., Andrew Hale, S. and Young, R.E. (1997). Long-term nutrient and water utilization during microporpagation of *Cattleya* on a liquid/membrane system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 24: 65-71.
- Ge, L., Young, J.W.H., Tan, S.N., Yang, X.H. and Ong, E.S. (2004). Analysis of some cytokinin in coconut (*Cocos nucifera* L.) water by micellar electrokinetic capillary chromatography after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*. 1084: 119-126.
- Huan Le Van, T., Takamura, T. and Tanaka, M. (2004). Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structure in *Cymbidium* orchid. *Plant Science*. 166: 1443-1449.
- Huetteman, C.A. and Preece, J.E. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 33: 105-119.
- Ishii, Y., Takamura, T., Goi, M. and Tanaka, M. (1998). Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep*. 17: 446-450.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15:473-497.
- Nayak, N.R., Sahoo, S., Patnaik, S. and Rath, S.P. (2002). Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae), *Sceintia Hortic*. 94: 107-116.
- Paek, K.Y. and Yeung, E.C. (1991). The effects of 1-naphthalene acetic acid and N⁶-benzyladenine on the growth of *Cymbidium forrestii* rhizomes *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 24: 65-71.
- Pelekidis, A. (2003). Brooklyn botanic garden: *Grammatophyllum speciosum* [online]. Available://www.bbg.org/abo/pressroom/plantcol-lections/2003gramatophyllum.html

[October 26,2004].

Culture. 60: 151-154.

Piluek, C. (1993). Seed Culture and Tissue Culture of Orchid. Kasetsart University. Bangkok. (in Thai).

Sumpaokit, S. (1993). Organic medium for culture of callus and seedling of *Dendrobium* sp., MS.c. Thesis, Chulalongkorn University. (in Thai).

Sheelavantmath, S.S., Murthy, H.N., Pyati, A.N., Ashok Kumar, H.G. and Ravishankar, B.V.(2000). *In vitro* propagation of the endangered orchid, *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. Through rhizome section culture. Plant Cell, Tissue and Organ

Vacin, E. and Went, F. (1949). Some pH change in nutrient solution. Botan. Gaz. 110: 605-613.

๕๕๕๕๕๕

ข้อแนะนำในการเขียนบทความลงวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ประเภทของเรื่องที่จะตีพิมพ์

1. รายงานผลการวิจัยและค้นคว้าหรือการสำรวจที่ยังไม่เคยตีพิมพ์ในวารสารหรือหนังสืออื่นมาก่อน
2. บทความปริทัศน์ ได้แก่งานเขียนที่รวบรวมหรือเรียบเรียงจากเอกสารหรือหนังสือต่าง ๆ เพื่อเผยแพร่และฟื้นฟูงานด้านวิชาการระดับต่าง ๆ
3. บทความแสดงข้อคิดเห็นหรือข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในด้านวิชาการ เรื่องแปลข่าววิชาการ ข้อความจากงานวิจัยหรือหนังสือใหม่ที่น่าสนใจ
4. เรื่องที่จะตีพิมพ์ ต้องไม่เคยได้รับการตีพิมพ์ในวารสารอื่น หรือ Proceedings ของการประชุมทางวิชาการมาก่อน

รูปแบบของการเขียนและเตรียมต้นฉบับ

1. ต้นฉบับ ต้องเป็นตัวพิมพ์ปกติ มีช่วงห่างระหว่างบรรทัดตามมาตรฐาน พิมพ์ลงในกระดาษขาว A4 (โรเนียวสั้น) โดยใช้กระดาษหน้าเดียว ความยาวไม่เกิน 10 หน้า ส่งต้นฉบับ 2 ชุด
2. ต้นฉบับ จะถูกพิจารณาโดยกองบรรณาธิการ และจะตอบรับการได้รับบทความโดยไม่ส่งต้นฉบับคืน ผู้เขียนควรจะทำสำเนาเก็บไว้เป็นหลักฐานของตัวเอง 1 ฉบับ
3. ต้นฉบับ จะต้องมีความถูกต้องทั้งในด้านเนื้อหา และการใช้ภาษา รวมทั้งมีความสมบูรณ์ในรูปแบบพร้อมที่จะนำลงตีพิมพ์ได้
4. ชื่อเรื่อง ให้ใช้ภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ ไม่ยาวเกินไป และหลีกเลี่ยงการใช้คำย่อโดยไม่จำเป็น
5. ชื่อผู้เขียน เขียนชื่อภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษพร้อมทั้งบอกสถานที่ทำงานให้ชัดเจน
6. เนื้อเรื่อง ใช้ได้ทั้งภาษาไทยล้วน และภาษาอังกฤษล้วน ถ้าใช้ภาษาไทย ภาษาอังกฤษที่ใช้ปนกับภาษาไทยนั้นให้พยายามแปลเป็นไทยเท่าที่จะทำได้ และให้เขียนคำเดิมกำกับในวงเล็บ การทับศัพท์ภาษาอังกฤษ ตลอดทั้งการเขียนตัวสะกด การันต์ ในภาษาไทยให้ใช้ตามแบบราชบัณฑิตยสถาน
7. ในกรณีของบทความวิจัย ต้องมีบทคัดย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ และแบ่งเนื้อหาของบทความเป็นบทนำ วิธีดำเนินงาน ผลการวิเคราะห์ บทสรุปและวิจารณ์
8. เชิงอรรถ (footnote) ใช้เฉพาะที่จำเป็นเพื่อขยายหรือให้รายละเอียดเพิ่มเติมแก่ใจความเฉพาะตอนในบทความ
9. ตารางและภาพประกอบ คำบรรยายประกอบตารางหรือภาพประกอบควรจะสั้นและชัดเจน ถ้าเป็นภาพถ่ายให้ใช้ภาพขาว-ดำ ขนาดโปสเตอร์ ภาพเขียนลายเส้นควรเขียนด้วยหมึกดำ ภาพที่เขียนต้องชัดเจนและมีขนาดที่เหมาะสม
10. เอกสารอ้างอิง หรือบรรณานุกรม แนะนำให้เขียนตามแบบที่ทางวารสารกำหนด

ส่งต้นฉบับมาที่

กองบรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

อภิสิทธิ์สำหรับการตีพิมพ์

เรื่องที่ได้รับการตีพิมพ์ ผู้เขียนจะได้รับวารสารฉบับนั้น 2 เล่ม และสำเนาพิมพ์อีก 15 ชุด

การเขียนเอกสารอ้างอิงในวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

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

บรรณานุกรม (Bibliography) หมายถึง เอกสารที่ใช้อ้างอิงในลักษณะที่สรุปเป็นหลักการหรือทฤษฎี โดยมีได้อ้างอิงหรือแปลมาโดยตรง

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.). ชื่อเรื่อง. ชื่อหนังสือ. เมืองที่พิมพ์ : โรงพิมพ์ หรือสำนักพิมพ์. เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง.

2. เอกสารราชการ

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

3. วารสาร

ก. ภาษาไทย

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

ข. ภาษาอังกฤษ

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

หมายเหตุ

1. กรณีที่เป็นเอกสารอ้างอิงจากแหล่งอื่น ๆ นอกเหนือจากที่กำหนดข้างต้น เช่น จุลสาร หนังสือพิมพ์ ฯลฯ ให้ยึดหลักการเขียนตามแบบข้างต้นโดยอนุโลม
2. กรณีที่มีผู้เขียน 2 คน ให้เขียนตามแบบของผู้เขียนคนแรก แต่ให้เติมคำว่า "และ" หรือ "and" หน้าชื่อสุดท้ายในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ
3. กรณีที่มีผู้เขียนมากกว่า 2 คนขึ้นไป ให้ใส่เฉพาะชื่อแรก และใส่คำว่า "และคณะ" หรือ "et al." ในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ (เฉพาะในเนื้อหาเท่านั้น)
4. ถ้าเอกสารที่ถูกอ้างอิงอยู่ในระหว่างตีพิมพ์ ให้บอกรายละเอียดมากที่สุดและใช้คำว่า "ระหว่างตีพิมพ์" หรือ "in press" ในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ โดยวงเล็บต่อท้ายเอกสารอ้างอิงนั้น

วัตถุประสงค์

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

กำหนดออก

ปีละ 4 ฉบับ

ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม

ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน

ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน

ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม



ใบสมัครเป็นสมาชิก

"วารสารวิทยาศาสตร์ มข."

☐ สมาชิกใหม่

☐ ต่ออายุ

ชื่อ-สกุล.....

ที่อยู่.....

รหัสไปรษณีย์.....หมายเลขสมาชิก.....

ตั้งแต่ฉบับที่.....ปีที่.....ถึงฉบับที่.....ปีที่.....รวม.....ฉบับ

พร้อมนี้ได้ส่งเงินจำนวน.....บาท มาทาง

อัตราค่าบำรุง

☐ ฐานนิติสงฆ์จ่าย ป.ท.มข.

1 ปี 4 เล่ม 75 บาท

☐ เช็กไปรษณีย์

2 ปี 8 เล่ม 150 บาท

☐ เงินสด

3 ปี 12 เล่ม 200 บาท

ลายเซ็นผู้สมัคร.....

- หมายเหตุ 1. ส่งเงินทางธนาคารหรือเช็คไปรษณีย์ ในนามของนางบุญคุ้ม เหลือล้น คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ส่งจ่าย ป.ท. มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002
2. กรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงที่อยู่ กรุณาแจ้งให้ทราบล่วงหน้า ไม่น้อยกว่า 1 เดือน ก่อนเดือนสุดท้ายของกำหนดวารสารออก เพื่อความสะดวกในการส่งวารสารให้แก่ท่าน

หนังสือในโครงการผลิตตำรา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น



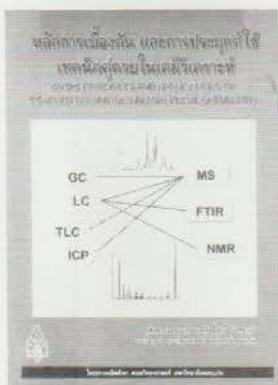
สถิติพื้นฐาน พร้อม
ตัวอย่างการวิเคราะห์
ด้วยโปรแกรม MINITAB
SPSS และ SAS

รองศาสตราจารย์ชัชวาล เรืองประพันธ์
พิมพ์ครั้งที่ 2 2543 • 510 หน้า
ISBN 974-675-666-4
ราคา 180 บาท



การวิเคราะห์ฟังก์ชันขั้น
ต้น

รองศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ ไวทัยางกูร
2547 • 344 หน้า
ISBN 974-367-958-8
ราคา 200 บาท



หลักการเบื้องต้นและ
การประยุกต์ใช้เทคนิค
เคมีวิเคราะห์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศักดิ์สิทธิ์ จันทน์ไทย
2543 • 202 หน้า
ISBN 974-678-333-2
ราคา 150 บาท

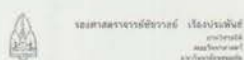


แมงป่องข้าง

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศักดิ์ดา คางวง
นางสาวนันท์วัน เอื้อวงศ์กุล
2547 • 64 หน้า
ISBN 974-435-571-9
ราคา 160 บาท



การวิเคราะห์ข้อมูลด้วย
โปรแกรม
SPSS for Windows



รองศาสตราจารย์ชัชวาล เรืองประพันธ์
2544 • 620 หน้า
ISBN 974-654-608-2
ราคา 300 บาท



สเปกโทรสโกปีในการพิสูจน์
โครงสร้างของสารอินทรีย์

รองศาสตราจารย์ ดร.สมเดช กนกเมธากุล
2547 • 238 หน้า
ISBN 974-435-348-1
ราคา 180 บาท

