FACULTY OF SCIENCE
KHON KAEN UNIVERSITY

วิทยาศาสตร์ มข.

KKU SCIENCE JOURNAL

ปีที่ 35 ฉบับที่ 2 (เม.ย. - มิ.ย. 50) Vol. 35 No. 2 (Apr. - Jun. 07)

วารสาร วิทยาศาสตร์ มข.
KKU SCIENCE JOURNAL
ISSN 0125 - 2364

เจ้าของ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สำนักงาน

คณะวิทยาศาสตร์ ตึก 6 มหาวิทยาลัยขอนแก่น
อ.เมือง จ.ขอนแก่น 400002
โทรศัพท์ 0-4320-2372 โทรสาร 0-4320-2371

วัตถุประสงค์

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

กำหนดออก ปีละ 4 ฉบับ

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

ที่ปรึกษา
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์ (ละออศรี เสนาะเมือง)
รองคณบดีฝ่ายวิชาการ (เอกพรรณ สวัสดิ์ชิตัง)

บรรณาธิการ
นฤมล แสงประดับ

กองบรรณาธิการ
กิตติกร นาคประสิทธิ์
งามนิจ อาจอินทร์
ชุติมา หาญจวณิช
ประเสริฐ แข่งขัน
สมปอง ธรรมศิริรักษ์
สมเดช กนกเมธากุล
สุพรรณี อึ้งปัญสัตวงศ์
เสาวนิต ทองพิมพ์
อัจฉราภรณ์ ภักดี
ธรรมพิเชษฐ แพ่งโยธา
นุชจรินทร์ พงศ์นพรัตน์

ฝ่ายศิลป์และภาพ
กิเลน ดิฉนรเศรษฐ์
สุชาติ เทพภูเขียว

ฝ่ายเหรัญญิก
บุญคุ้ม เหลือล้น

ฝ่ายจัดการและเลขานุการ
ศุภลักษณ์ ทองปัน
สมศักดิ์ อุ่นจันที

บทความและงานวิจัย ได้รับการกลั่นกรอง จากผู้ทรงคุณวุฒิ

บทความหรือข้อคิดเห็นใด ๆ ในวารสารนี้เป็นของผู้เขียน ไม่จำเป็นต้องสอดคล้องกับทัศนะของกองบรรณาธิการ

สารบัญ Table of Contents

ISSN 0125 - 2364

วารสาร
วิทยาศาสตร์ มข.
KKU SCIENCE JOURNAL

ปีที่ 35 ฉบับที่ 2 Volume 35 Number 2

บรรณาธิการแถลง

บทความ

- ฟังก์ชันคลื่นของสถานะพื้นของโบซอนที่ถูกกักในสนามแม่เหล็กที่ขึ้นกับทิศทาง
  ชาญเรืองฤทธิ์ จันทร์นอก 61
- ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA)
  หนูเดือน เมืองแสน 67
- พัฒนาการเข้าอาศัยของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาในรากพืช การดูดซับและการเคลื่อนย้ายฟอสฟอรัส Development of Root Colonization of Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Phosphorus Uptake and Transportaion
  โสภณ บุญลือ 73

งานวิจัย

- Further Studies of Bioactive Flavonoids from *Kaempferia parviflora*
  Chavi Yenjai Khaetthareeya Sutthanut Bungon Sripanidkulchai Nate MungKhun Chalayut Wongma Siriboon Mukdasai Teeraporn Kongkaew 82
- การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน และกรดไขมันของจิ้งหรีดทองลาย (*Gryllus* sp.) ที่เลี้ยงเพื่อการค้า
  บรรจง เชื้อเมืองพาน วิรัช ว่องพัฒนากุล ปวีณา พงษ์ดนตรี 88

สารบัญ (ต่อ) Table of Contents (cont.)

ISSN 0125 - 2364

วารสาร
วิทยาศาสตร์ มข.
KKU SCIENCE JOURNAL

ปีที่ 35 ฉบับที่ 2 Volume 35 Number 2

งานวิจัย

❐ ไครอลของตัวยาเบต้า-บลอคเกอร์บางชนิด
โดยเทคนิคแค็บพิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส
Chiral Separation of Some β-blocker Drugs
by Capillary Electrophoresis การแยกสาร
Janpen Intaraprasert..... 95

❐ การศึกษาเปรียบเทียบการใช้สารละลายเดกแทรน
ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการแยกเม็ดเลือดขาว
ชนิดนิวโทรฟิลในกระต่าย
ปรานอม ภูชฎาภิรมย์..... 108

❐ เปรียบเทียบ ลักษณะสัณฐานวิทยา การเจริญ
และความคงตัวของแบคเทอริโอฟาจที่จำเพาะต่อ
Salmonella typhi และ *Shigella dysenteriae*
Comparison of morphology, growth and
stability of *S. typhi* and *S. dysenteriae*
specific bacteriophages
กัญญ์จนา นึกดี..... 113

❐ การศึกษาอิทธิพลของตัวแปรบางประการที่มี
ผลกระทบต่อสมบัติของไพโอไซยานิน
A study on an influence of some factors
affecting on pyocyanin
สันติ ทองธรรมมา ศักดิ์สิทธิ์ จันทร์ไทย
วรรณดี บัญญัตรัชต เฉลิม เรืองวิริยะชัย..... 123

ISSN 0125 - 2364

วารสาร วิทยาศาสตร์ มข.

KKU SCIENCE JOURNAL

Publisher

Faculty of Science, Khon Kaen University, Thailand.

Office

Faculty of Science, Building 6, Khon Kaen University. Khonkaen Thailand, 40002

Tel. 0-4320-2372 Fax 0-4320-2371

Objectives

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

Publishing frequency

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

Number 1 January - March
Number 2 April - June
Number 3 July - September
Number 4 October - December

Advisory Committee Dean, Faculty of Science (La-Orsri Sanoamuang)
Associate Dean for Academic Affairs (Ekaphan Swatsitang)

Editor Narumon Sangpradub

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

Artists Kilen Tinnoraset, Suchart Thepphukhieo

Treasurer Boonkoom Lualon

Managing Staff and Secretary Suphaluk Tongpun, 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 opinions of the editorial board.

บรรณาธิการแถลง

สวัสดีคะ **ท่านผู้อ่านที่รักและเคารพทุกท่าน**

เนื่องจากความผิดพลาดในการพิมพ์ฉบับที่ 1 ทำให้บางส่วนของบทวิจัยเรื่อง Further Studies of Bioactive Flavonoids from *Kaempferia parviflora* โดย รศ.ดร.ฉวี เย็นใจ และคณะ ขาดหายไป ทางกองบรรณาธิการกราบขออภัยท่านเป็นอย่างสูง และขอลงบทวิจัยนี้ใหม่ในเล่มนี้

กองบรรณาธิการขอแสดงความยินดีกับ ผศ.ดร.โสภณ บุญลือ ที่ท่านได้ย้ายมาประจำที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และขอแสดงความเสียใจกับการจากไปของ นสพ.อนุชัย นิเวศน์ปฐมวัฒน์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ท่านผู้อ่านติดตามบทความของท่านทั้งสองได้ในฉบับนี้ นอกเหนือจาก 2 เรื่องดังกล่าวแล้ว วารสารฉบับนี้ยังมีเรื่องที่น่าสนใจอื่นๆ เช่น ไมโครอาร์เอ็นเอ การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันและกรดไขมันของจิ้งหรีดทองลาย และการผลิตไพโอไซยานินจากแบคทีเรีย เป็นต้น

ก่อนจากกันขอเรียนเชิญทุกท่านมาร่วมกิจกรรมและชมนิทรรศการสัปดาห์วิทยาศาสตร์ ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในระหว่างวันที่ 16-18 สิงหาคม 2550

สวัสดีคะ

ว.วิทย. มข. 35(1) 61-66 (2550) KKU Sci. J.35(1) 61-66 (2007)

ฟังก์ชันคลื่นของสถานะพื้นของโบซอนที่ถูกกักในสนามแม่เหล็กที่ขึ้นกับทิศทาง

ชาญเรืองฤทธิ์ จันทร์นอก[1]

บทนำ

การควบแน่นโบส-ไอน์สไตน์ (Bose-Einstein Condensation) เป็นปรากฏการณ์ที่สำคัญในทางฟิสิกส์ของสสารควบแน่น โดยไอน์สไตน์ (A. Einstein) และโบส (S. Bose)ได้เสนอไว้ในทางทฤษฎีเมื่อปี ค.ศ. 1924 เพื่อใช้อธิบายคุณสมบัติของอนุภาคโบซอน (boson) ที่อุณหภูมิต่ำมากๆ โดยโบซอน (boson) เป็นอนุภาคหรืออะตอมที่มีเลขสปินเป็นจำนวนเต็ม ซึ่งสามารถใช้สถิติของโบส-ไอสไตน์ (Bose-Einstein Statistics) ในกลศาสตร์สถิติเพื่ออธิบายพฤติกรรมได้

นักวิทยาศาสตร์สามารถทำการทดลองเพื่อพิสูจน์ปรากฏการณ์นี้ได้เมื่อปี ค.ศ. 1995 โดยทำการลดอุณหภูมิให้ต่ำมากๆ ลงจนใกล้อุณหภูมิศูนย์องศาสัมบูรณ์และกักแก๊สเจือจางของอะตอมอัลคาไลน์ (alkaline atoms) ไว้ในสนามแม่เหล็ก (Anderson et al. 1995; Bradley et al, 1995; Davis et al, 1995) การทดลองการควบแน่นโบส-ไอสไตน์ได้นำไปสู่การศึกษาสมบัติของสถานะพื้น (ground state) และสถานะถูกกระตุ้น (exited state) ของอะตอมโบซอนที่ถูกกักในสนามแม่เหล็ก โดยมีทฤษฎีทางฟิสิกส์ที่สำคัญในการศึกษาสมบัติของสถานะของโบซอน คือ ทฤษฎีสนามเฉลี่ย (mean field theory) ซึ่งสามารถใช้ได้ในขอบเขตของ $\rho\, a^3 << 1$ โดยที่ ρ คือ ความหนาแน่นของอะตอมในระบบที่ถูกกัก และ a คือ ระยะการกระเจิงแบบ s-wave (s-wave scattering length) โดยระยะการกระเจิงแบบ s-wave นี้เป็นระยะการกระเจิงที่ได้จากวิธีการประมาณทางควอนตัมที่พลังงานต่ำ

จากทฤษฎีสนามเฉลี่ยนี้สถานะพื้นและสถานะถูกกระตุ้น สามารถอธิบายได้โดยสมการของกรอสส์-ปิเตฟสกี (Gross-Piteavskii equation) (Gross 1961, 1963; Piteavskii, 1961) โดยสามารถสมการนี้โดยวิธีการคำนวณเชิงตัวเลข (Dalfovo and Stringari, 1996) และวิธีการเชิงวิเคราะห์แบบประมาณ (Baym and Patrick, 1996; Perez-Garcia et al, 1996; Bohm et al, 1998) โดยงานวิจัยที่สำคัญในการหาผลเฉลยของสมการดังกล่าว คือ ผลงานของ Baym และ Patrick (1996) ซึ่งพิจารณาฟังก์ชันคลื่นทดลอง (trial wave function) ในรูปฟังก์ชันคลื่นแบบเกาส์เซียน (Gaussian wave function) ใน 3 มิติ โดยฟังก์ชันคลื่นนี้จะใช้ได้เป็นอย่างดีในกรณีที่อะตอมที่ควบแน่นมีปริมาณไม่มาก แต่สำหรับกรณีที่จำนวนอะตอมที่ควบแน่นมีปริมาณมากๆ ฟังก์ชันคลื่นที่ใช้ในการอธิบายในกรณีนี้จะได้มาจากวิธีการประมาณแบบโทมัส-เฟรมี (Thomas Fermi approximation) (Dalfovo

[1]ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จ.อุบลราชธานี 34190

and Stringari, 1996; Baym and Patrick, 1996) แต่อย่างไรก็ตามฟังก์ชันคลื่นแบบนี้ยังไม่สามารถอธิบายคุณสมบัติผิวนอกของกลุ่มหมอกอะตอมได้ จากความไม่สมบูรณ์ของฟังก์ชันคลื่นทั้งสอง จึงมีแนวคิดที่ต้องหาฟังก์ชันคลื่นที่อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสมที่สามารถใช้ได้ในทุกกรณี โดยงานวิจัยของ Singh and Satheesha (1999) ได้นำเสนอรูปแบบอย่างง่ายของฟังก์ชันคลื่นสำหรับสถานะพื้นและสถานะถูกกระตุ้น ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ดีในหลายกรณี นอกจากนี้ยังสามารถใช้อธิบายปริมาณที่สำคัญทางฟิสิกส์ของการควบแน่นแบบโบส-ไอสไตน์

ฟังก์ชันคลื่นสำหรับสถานะพื้นที่ได้จากวิธีการแปรผัน

จากการทดลองการควบแน่นโบส-ไอสไตน์ มีแนวคิดเริ่มแรกในการศึกษาสมบัติของสถานะของโบซอนได้โดยสมการของกรอสส์-ปิเตฟสกี (Gross, 1961, 1963; Piteavskii, 1961) โดยพิจารณาสนามแม่เหล็กแบบขึ้นกับทิศทาง ที่ใช้กักอะตอมเป็นบ่อศักย์แบบฮาร์โมนิก (harmonic potential well) และพิจารณาอันตรกิริยาระหว่างอะตอมที่ถูกกักเป็นศักย์เป็นศักย์ยังผลที่ขึ้นกับระยะการกระเจิง s-wave ดังนั้น พลังงานสถานะพื้นของอะตอมโบซอนที่มีมวล m ที่ควบแน่นจะเป็นไปตามฟังก์ชันพลังงานของกรอสส์-ปิเตฟสกี (Gross-Piteavskii functional) ในสมการที่ (1)

$$E(\psi(\vec{r})) = \int\left[\frac{\hbar^2}{2m}\left|\nabla\psi(\vec{r})\right|^2 + \frac{m}{2}\left(\omega_\perp^{0\,2}x^2 + \omega_\perp^{0\,2}y^2 + \omega_z^{0\,2}z^2\right)\left|\psi(\vec{r})\right|^2 + \frac{2\pi\hbar^2 a}{m}\left|\psi(\vec{r})\right|^4\right]d\vec{r} \quad (1)$$

โดยที่ $\psi(\vec{r})$ คือ ฟังก์ชันคลื่นของอะตอมโบซอนที่ควบแน่น

$\omega_\perp^0$ คือ ความถี่เชิงมุมของสนามแม่เหล็กที่ใช้กักอะตอมในระนาบ x-y

ω_z^0 คือ ความถี่เชิงมุมของสนามแม่เหล็กที่ใช้กักอะตอมในแนว z

a คือ ระยะกระเจิงแบบ s-wave

โดยฟังก์ชันคลื่นที่ได้เป็นไปตามเงื่อนไขของการนอร์มอลไลซ์ (Normalization condition) คือ

$$\int\left|\psi(\vec{r})\right|^2 d\vec{r} = N \quad (2)$$

โดยที่ N คือ จำนวนของอะตอมโบซอนทั้งหมดที่ถูกกัก

สำหรับรูปแบบที่แน่ชัดของฟังก์ชันคลื่นสามารถหาได้จากการทำให้น้อยที่สุด (minimize) ของฟังก์ชันนอลพลังงาน (functional energy) ในสมการที่ (1) และใช้เงื่อนไขของการนอร์มอลไลซ์ ในสมการที่ (2) ซึ่งทำให้ได้สมการชโรดิงเกอร์แบบไม่เชิงเส้น (non-linear Schorodinger equation) เป็น

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2 + \frac{m}{2}\left(\omega_\perp^{0\,2}x^2 + \omega_\perp^{0\,2}y^2 + \omega_z^{0\,2}z^2\right) + \frac{4\pi\hbar^2 a}{m}\left|\psi(\vec{r})\right|^2\right]\psi(\vec{r}) = \mu\psi(\vec{r}) \quad (3)$$

เพื่อให้เข้าใจผลของสมการที่ (1), (2) และ (3) ได้ดีและง่ายขึ้น จึงจัดเทอมของตัวแปรต่างๆ ดังนี้ คือ

$$E_1 = \frac{E}{\hbar\omega_\perp^0}$$

$$\mu_1 = \frac{\mu E}{\hbar\omega_\perp^0}$$

$$\vec{r}_1 = \frac{\vec{r}}{a_\perp}$$

$$u_1 = \frac{8\pi\, aN}{a_\perp}$$

$$\nabla_1 = a_\perp \nabla$$

$$\psi_1(\vec{r}_1) = \sqrt{\frac{a_\perp^3}{N}}\,\psi(\vec{r}) \tag{4}$$

โดยที่

$$a_\perp = \sqrt{\frac{\hbar}{m\omega_\perp^0}} \tag{5}$$

ดังนั้น สมการที่ (1) จึงเขียนใหม่ได้ในรูป

$$\frac{E_1[\psi_1]}{N} = \int \frac{1}{2}\left[\left|\nabla_1\psi_1(\vec{r}_1)\right|^2 + \left(x_1^2 + y_1^2 + \lambda_0^2 z_1^2\right)\left|\psi_1(\vec{r}_1)\right|^2 + \frac{u_1}{2}\left|\psi_1(\vec{r}_1)\right|^4 \right] d\vec{r}_1 \tag{6}$$

โดยที่ $\lambda_0 = \dfrac{\omega_Z^0}{\omega_\perp^0}$ คือ พารามิเตอร์ของการกักอะตอมแบบไม่ขึ้นกับทิศทาง (anisotropic)

สมการที่ (2) เขียนใหม่ได้ในรูป

$$\int \left|\psi_1(\vec{r}_1)\right|^2 d\vec{r}_1 = 1 \tag{7}$$

และ สมการที่ (3) เขียนใหม่ได้ในรูป

$$\left[-\nabla_1^2 + \left(x_1^2 + y_1^2 + \lambda_1^2 z_1^2\right) + u_1\left|\psi_1(\vec{r}_1)\right|^2\right]\psi_1(\vec{r}_1) = 2\mu_1\psi_1(\vec{r}_1) \tag{8}$$

จะเห็นได้ว่าสมการชโรดิงเกอร์ (สมการที่ 8) มีรูปแบบที่ง่ายขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม เราไม่สามารถแก้ ปัญหาในสมการที่ (8) นี้ โดยวิธีการเชิงวิเคราะห์เพื่อหาผลเฉลยที่แน่ชัดได้ (exact solution) จึงต้องใช้วิธีการคำนวณเชิงตัวเลข (numerical method) เพื่อแก้ปัญหานี้

Baym and Patrick (1996) ได้วิเคราะห์ผลการทดลองในการเกิดการควบแน่นของแก๊สรูบีเดียม (Rubidium gas) ที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโบสแก๊ส (bose gase) โดยได้ใช้วิธีการประมาณการแปรผัน (variational aproximatiom method) หาค่าของฟังก์ชันคลื่นของสถานะพื้นออกมา ในรูปของสมการ (9)

$$\psi(\vec{r}) = N^{1/2}\omega_{\perp}^{1/2}\omega_{z}^{1/4}\left(\frac{m}{\pi\hbar}\right)^{3/4} \exp\left[-m(\omega_{\perp}r_{\perp}^{2} + \omega_{z}z^{2})/2\hbar\right] \quad (9)$$

โดยความถี่ยังผล (effective frequencies) $\omega_{\perp}$ และ ω_{z} คือ พารามิเตอร์การแปรผัน (variational parmeters) ฟังก์ชันคลื่นที่ได้ในสมการที่ (9) สามารถบอกคุณสมบัติต่างๆ ของอะตอมที่ควบแน่น เช่น การกระจายของอะตอมในทิศทางต่างๆ และบอกถึงพฤติกรรมของพลังงานของอะตอมที่ถูกกัก แต่อย่างไรข้อเสียของฟังก์ชันคลื่นนี้ คือ สามารถใช้ได้ในกรณีที่จำนวนอะตอมที่ถูกกักมีค่าน้อย ต่อมา Singh and Satheesha (1999) ได้เสนอฟังก์ชันคลื่นในรูปแบบใหม่ขึ้นมาที่มีความสมบูรณ์มากขึ้น จากวิธีการแปรผัน ดังในสมการที่ (10)

$$\psi_{1}(\vec{r}_{1}) = \left(\frac{p}{2\pi\Gamma(3/2p)}\right)^{1/2}\lambda_{*}^{1/4}\left(\frac{\omega_{\perp}}{\omega_{\perp}^{0}}\right)^{3/4} \exp\left[-\frac{1}{2}\left(\frac{\omega_{\perp}}{\omega_{\perp}^{0}}\right)^{p}(r_{1\perp}^{2} + \lambda z_{1}^{2})^{p}\right] \quad (10)$$

โดยที่ λ , $\omega_{\perp}$ และ p คือ พารามิเตอร์การแปรผัน ที่หาได้จากการมินิไมซ์ (minimization) ซึ่งพลังงาน E_{1} ในสมการ (6) และฟังก์ชันคลื่น เป็นไปตามเงื่อนไขการนอร์มอลไลซ์ตามสมการที่ (7)

การใช้ฟังก์ชันคลื่นสำหรับอะตอมที่ถูกกัก

เราพิจารณาการใช้ฟังก์ชันคลื่นจากสมการที่ (10) ใน 2 กรณี ที่สำคัญ คือ

- กรณีอะตอมที่ถูกกักมีจำนวนน้อยๆ

ในกรณีนี้อันตรกิริยาระหว่างอะตอมจะมีค่าน้อยมาก หรือระยะของการกระเจิงในสมการที่ (8) มีค่าน้อยมากๆ ($a << 0$) จนสามารถละทิ้งได้ ซึ่งจะมีผลทำให้ผลเฉลยมีลักษณะเป็นฟังก์ชันคลื่นแบบเกาส์เซียน (gaussian wave function) เมื่อพิจารณาสมการ (10) จะเห็นได้ว่าเราสามารถลดรูปฟังก์ชันคลื่นให้อยู่ในรูปแบบเกาส์เซียนได้ โดยการให้ค่า p เข้าสู่ 1 ($p \approx 1$) นั่นเอง

- กรณีอะตอมที่ถูกกักมีจำนวนมากๆ

ในกรณีนี้อันตรกิริยาระหว่างอะตอมจะมีค่ามาก ทำให้พลังงานศักย์มีค่ามาก เราจึงละทิ้งค่าพลังงานจลน์ (u_{1}) ในสมการที่ (8) ได้ ซึ่งสามารถพิจารณาได้เป็น 2 กรณี คือ

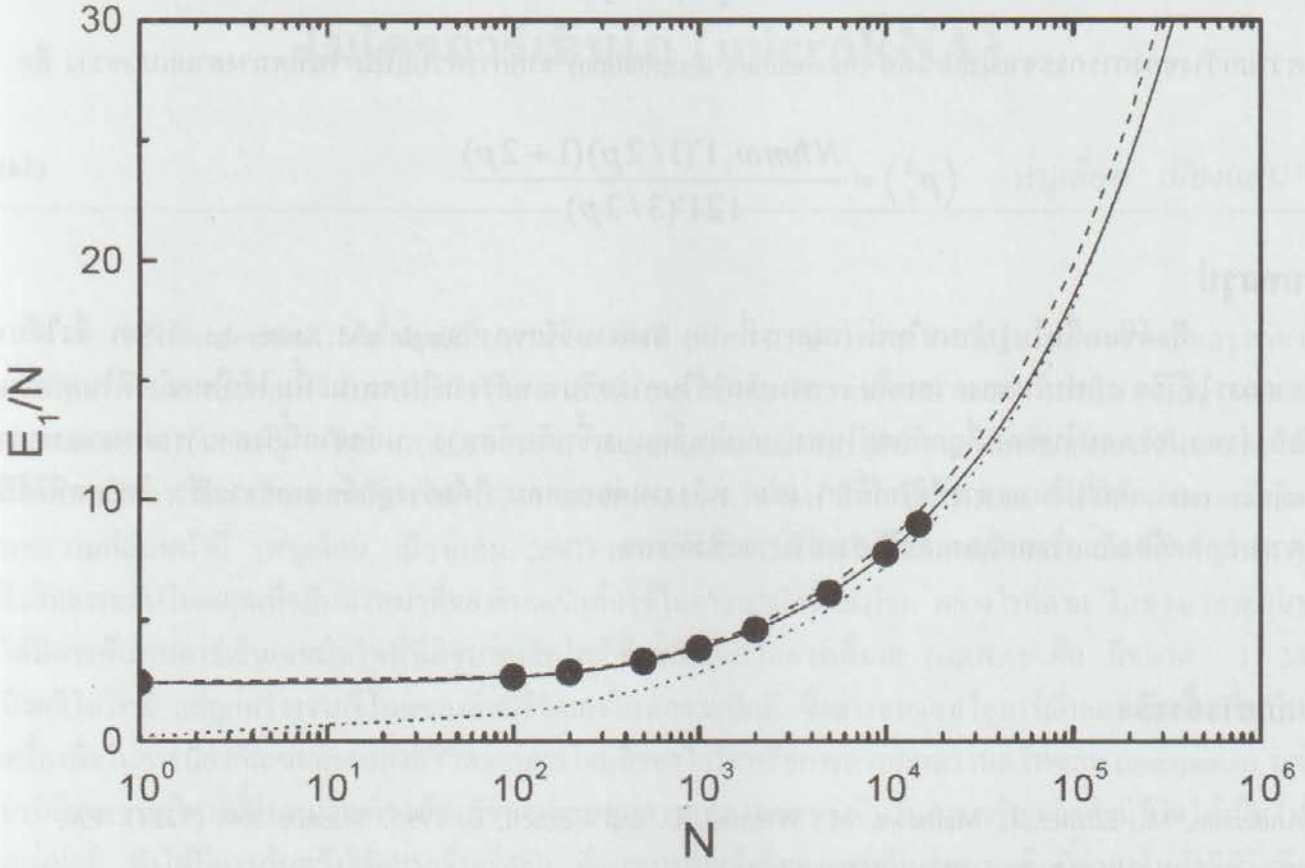
- อะตอมเกิดอันตรกิริยาแบบดึงดูด (attraction interaction) ในกรณีนี้ฟังก์ชันคลื่นในสมการที่ (10) สามารถลดรูปแบบไปเป็นฟังก์ชันคลื่นจากการประมาณแบบโทมัส-เฟรมี (Thomas Fermi approximation) ได้ โดยให้ค่า $p < 1$

- อะตอมเกิดอันตรกิริยาแบบผลัก (repulsive interaction) ในกรณีนี้ฟังก์ชันคลื่นในสมการที่ (10) สามารถลดรูปแบบไปเป็นฟังก์ชันคลื่นจากการประมาณแบบโทมัส-เฟรมี (Thomas Fermi approximation) ได้ โดยให้ค่า $p > 1$

พลังงานของสถานะพื้น E_{1} ในเทอมของพารามิเตอร์การแปรผัน λ , $\omega_{\perp}$ และ p หาได้จากการมินิไมซ์ฟังก์ชันนอลพลังงาน จากสมการ (6) จะได้

$$E_{1} = \frac{1}{12}\frac{\omega_{\perp}}{\omega_{\perp}^{0}}(1+\lambda/2)\frac{\Gamma(1/2p)}{\Gamma(3/2p)}(1+2p) + \frac{1}{3}\frac{\omega_{\perp}^{0}}{\omega_{\perp}}\lambda(1+\lambda_{0}^{2}/2\lambda)\frac{\Gamma(5/2p)}{\Gamma(3/2p)} + N\frac{a}{a_{\perp}}\left(\frac{\omega_{\perp}}{\omega_{\perp}^{0}}\right)^{3/2}\frac{\lambda^{1/2}p}{\Gamma(3/2p)}\left(\frac{1}{2}\right)^{3/2p} \quad (11)$$

ค่า N และพารามิเตอร์ λ , $\omega_\perp$ และ p หาได้จากการมินิไมซ์พลังงานในสมการที่ (11) โดยใช้วิธีการเชิงตัวเลข ผลการคำนวณของค่าพลังงาน E_1 ต่อจำนวนอะตอม N กับจำนวนอะตอมต่างๆ กัน ของรูบีเดียม-87 แสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพลังงานที่สถานะพื้นต่อจำนวนอะตอมกับจำนวนอะตอม ของรูบีเดียม-87 โดยเส้นตรงได้จากวิธีการคำนวณการแปรผันของ Singh and Satheesha (1999) เส้นประยาว มาจากการใช้ฟังก์ชันคลื่นแบบเกาส์เซียน เส้นประสั้น มาจากการใช้การประมาณแบบโทมัส-เฟร์มี จุดวงกลมทึบเป็นผลของ Dalfovo and Stringari (1996) (ที่มาของภาพ Singh and Satheesha, 1999)

จากรูปที่ 1 จะเห็นได้ว่า เมื่อจำนวนอะตอมมีค่าน้อย ทำให้ค่าพลังงานต่อจำนวนอะตอม N มีค่าน้อย และเมื่อจำนวนอะตอมมีค่ามากกว่า 1000 อะตอม จะทำให้ ค่าพลังงานต่อจำนวนอะตอม N มีค่าเพิ่มขึ้นแบบเอ็กโพเนนเชียล (exponential) โดยจะเห็นได้ว่า วิธีการคำนวณการแปรผันของ Singh and Satheesha (1999) มีผลที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Dalfovo and Stringari (1996) ซึ่งใช้วิธีการประมาณแบบโทมัส-เฟรมี และให้ผลดีกว่าการใช้ฟังก์ชันคลื่นแบบเกาส์เซียน เมื่อจำนวนอะตอมมีค่ามาก

จากฟังก์ชันคลื่นในสมการที่ (10) เราสามารถหาค่าเฉลี่ยของตำแหน่ง $\langle x_1^2 \rangle$ และค่าเฉลี่ยของโมเมนตัม $\langle p_x^2 \rangle$ ซึ่งจะนำไปสู่ปริมาณที่สำคัญทางฟิสิกส์ คือ ค่า aspect ratio ซึ่งบอกถึงลักษณะการกระจายตัวของความเร็ว (หรือโมเมนตัม) ของแต่ละทิศทาง ซึ่งเป็นตัวบอกคุณสมบัติของการควบแน่น จะได้ค่า aspect ratio คือ

$$\text{aspect ratio} = \sqrt{\frac{\langle p_z^2 \rangle}{\langle p_x^2 \rangle}} = \sqrt{\frac{\langle x_1^2 \rangle}{\langle z_1^2 \rangle}} = \sqrt{\lambda} \qquad (12)$$

โดยที่ระยะความกว้างของการควบแน่น ในทิศทางตามแนวขวาง (ซึ่งตั้งฉากกับทิศทาง z) คือ

$$\left\langle x_1^2 \right\rangle = \frac{\omega_\perp^0 \Gamma(5/2p)}{3\omega_\perp \Gamma(3/2p)} \tag{13}$$

ความกว้างของการกระจายโมเมนตัม (momentum distribution) จากการควบแน่น ในทิศทางตามแนวขวาง คือ

$$\left\langle p_x^2 \right\rangle = \frac{N\hbar m\omega_\perp \Gamma(1/2p)(1+2p)}{12\Gamma(3/2p)} \tag{14}$$

บทสรุป

ฟังก์ชันคลื่นในรูปแบบใหม่ (สมการที่ 10) จากงานวิจัยของ Singh and Satheesha (1999) ซึ่งได้มาจากการใช้วิธีการแปรผันทางควอนตัม สามารถใช้ในการอธิบายพลังงานในสถานะพื้นได้เป็นอย่างดีในทุกช่วงของจำนวนอะตอมโบซอนที่ถูกกักอยู่ในสนามแม่เหล็กแบบขึ้นกับทิศทาง นอกจากนี้ยังสามารถคำนวณหาค่า aspect ratio และปริมาณทางฟิสิกส์อื่นๆ เช่น พลังงานต่ออะตอม ได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว โดยผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการทดลองและวิธีการคำนวณเชิงตัวเลข

เอกสารอ้างอิง

Anderson, M., Ensher, J., Methews, M., Wieman, C. and Cornell, E. 1995. Science 269, (5221): 198

Pitaevskii, L.P. 1961. Sov. Phys. JETP. 13: 451.

Baym, G. and Patrick C. 1996. Phys. Rev. Lett. 76: 6.

Bohm, J., Esry, B. and Greene, C. 1998. Phys. Rev. A 58: 584.

Bradley, C. 1995. Phys. Rev. Lett. 75: 1687.

Dalfovo, F. and Stringari, S. 1996. Phys. Rev. A 53: 2477.

Davis, K.B. 1995. Phys. Rev. Lett. 75: 3969.

Gross, E.P. 1961. Nuovo Cimento. 20: 454.

Gross, E.P. 1963. J. Math. Phys. 4: 195.

Perez-Garcia, V.M. 1996. Phys. Rev. Lett. 77: 5320.

Singh, M.P. and Satheesha, A.L. 1999. Eur. Phys. J. D. 7: 391.

❑❑❑❑❑

ว.วิทย. มข. 35(1) 67-72 (2550) KKU Sci. J.35(1) 67-72 (2007)

ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA)

หนูเดือน เมืองแสน[1]

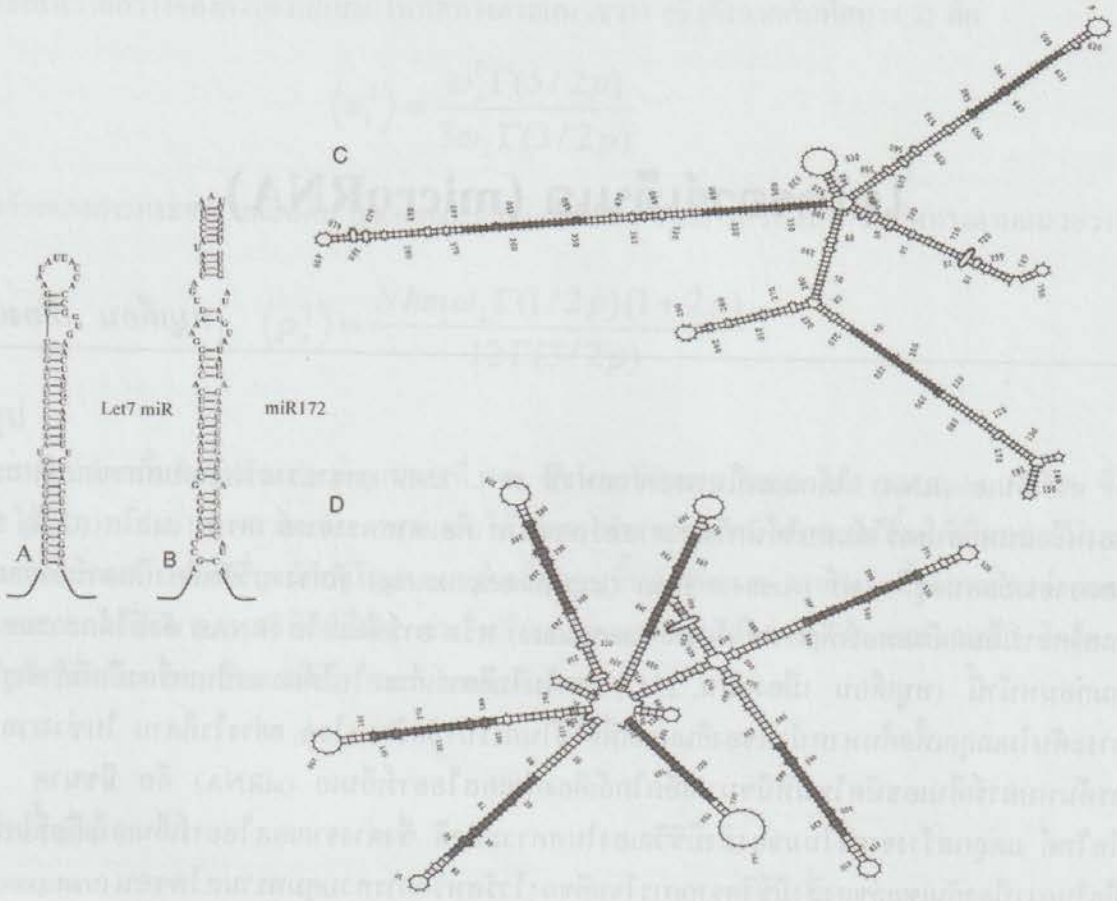
อาร์เอ็นเอ (RNA) ได้กลายเป็นพระเอกแห่งปี พ.ศ. 2549 เพราะรางวัลโนเบลสาขาเคมีและสาขาสรีรวิทยาหรือแพทยศาสตร์ได้มอบให้นักวิทยาศาสตร์สองท่าน คือ ศาสตราจารย์ เครก เมลโล (Craig Mello) และศาสตราจารย์แอนดรู ไฟร์ (Andrew Fire) (http://nobelprize.org) ที่ทำงานวิจัยเกี่ยวกับอาร์เอ็นเอและได้ค้นพบกลไกอาร์เอ็นเออินเทอร์เฟียเรนซ์ (RNA interference) หรือ อาร์เอ็นเอไอ (RNAi) ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในบทความก่อนหน้านี้ (หนูเดือน เมืองแสน, 2547) เทคโนโลยีอาร์เอ็นเอไอได้กลายเป็นเครื่องมือที่สำคัญในทางชีววิทยาระดับโมเลกุลเพื่อค้นหาหน้าที่ของยีนและเพื่อใช้ในการบำบัดรักษาโรค อย่างไรก็ตาม ในช่วงเวลาต่อมาได้มีการค้นพบอาร์เอ็นเอชนิดใหม่ที่มีขนาดเล็กใกล้เคียงกับเอสไออาร์เอ็นเอ (siRNA) คือ มีขนาด 17-24 นิวคลีโอไทด์ แต่ถูกสร้างจากจีโนมของสิ่งมีชีวิตเองในสภาวะปกติ ซึ่งต่างจากเอสไออาร์เอ็นเอที่เกิดขึ้นเพื่อเป็นเครื่องมือในการป้องกันเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจากการโจมตีของไวรัสหรือการควบคุมทรานสโพซอน (transposon) แต่อาร์เอ็นเอชนิดใหม่นี้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนในการเจริญของสิ่งมีชีวิตให้เป็นไปตามปกติ ทำให้มีการค้นคว้าวิจัยมากขึ้นเรื่อยๆ ถึงบทบาทหน้าที่ของอาร์เอ็นเอขนาดเล็กนี้ว่าทำไมสิ่งมีชีวิตจึงต้องสร้างขึ้นมา

ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA) คือ อะไร

ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA) หรือ เอ็มไออาร์เอ็นเอ (miRNA) เป็นโมเลกุลอาร์เอ็นเอสายสั้นๆ ขนาด 17-24 นิวคลีโอไทด์ มีโครงสร้างเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (รูปที่ 1) สร้างจากจีโนมบริเวณที่ไม่กำหนดการสร้างโปรตีน (non-coding region) มีการอนุรักษ์สูง มีหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนโดยจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย (target mRNA) แบบจำเพาะเจาะจง ส่งผลให้มีการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (Grosshans and Slack, 2002; Llave, 2004)

การค้นพบไมโครอาร์เอ็นเอเกิดขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1993 (Lee et al., 1993) ปัจจุบันพบไมโครอาร์เอ็นเอจำนวนมากกว่า 700 ชนิดในสิ่งมีชีวิตพวกยูแคริโอต เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของยีนจำนวนมาก มีบทบาทในพัฒนาการ การเพิ่มจำนวนเซลล์ การตายของเซลล์ เมแทบอลิซึมของไขมัน การแปรสภาพของเซลล์ นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของสมอง โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวและการติดเชื้อไวรัส (Costa, 2007) (ตารางที่ 1)

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002



รูปที่ 1 โครงสร้างและรูปร่างของไมโครอาร์เอ็นเอที่พบในพืชและสัตว์ A. pre-miRNA Let7 ในหนอนตัวกลม B. pre-miRNA-172 ในอแรบบิดอบซิส (Arabidopsis) C. กลุ่ม pre-miRNA ในข้าว D. กลุ่ม pre-miRNA ในหนอนตัวกลม (Millar and Waterhouse, 2005)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างไมโครอาร์เอ็นเอที่พบในสิ่งมีชีวิต (Costa, 2007)

ตัวอย่าง	หน้าที่
miR-21	ขัดขวางการทำงานของยีนที่เกี่ยวกับการตายของเซลล์
miR-134	ควบคุมพัฒนาการของกระดูกสันหลัง
miR-124a	การแปรสภาพของเซลล์ประสาท
miR-181	การแปรสภาพของเซลล์ไมโอบลาสต์ (myoblast) ไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อ
miR-156	พัฒนาการของดอกและเวลาในการออกดอก
miR-159	พัฒนาการของใบและการเจริญของต้นอ่อน
miR-160	ระบบสัญญาณออกซิน และพัฒนาการของราก
miR-398	ความเครียดออกซิเดชัน
miR-399	การตอบสนองต่อการขาดฟอสเฟต

วิถีการสังเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอ

ไมโครอาร์เอ็นเอหลายร้อยชนิดที่สร้างจากจีโนมของสิ่งมีชีวิต ไม่ว่าจะเป็นหนู มนุษย์ แมลงหวี่ หนอนตัวกลมและอแรบบิดอบซิสถูกนำมาโคลนและหาลำดับเบส ประมาณกันว่ามีไมโครอาร์เอ็นเอ 200-300 ชนิดที่จำเพาะในจีโนมของมนุษย์และหนู โดยลำดับเบสของไมโครอาร์เอ็นเอมีความคล้ายคลึงกันระหว่างสิ่งมีชีวิต แสดงให้เห็นว่าไมโครอาร์เอ็นเอเป็นโมเลกุลยุคโบราณ และมีบทบาทในการควบคุมยีนที่สำคัญ บริเวณบนจีโนมที่กำหนดการสร้างไมโครอาร์เอ็นเอจะเป็นบริเวณที่ไม่เกี่ยวกับยีน โดยมีการถอดรหัสเป็นแบบอิสระและมีทิศทางเดียวกันกับเอ็มอาร์เอ็นเอ แสดงว่า การแสดงออกของกลุ่มยีนไมโครอาร์เอ็นเอถูกควบคุมโดยโปรโมเทอร์ (promoter) เดียวกับเอ็มอาร์เอ็นเอและอาศัยการทำงานของเอนไซม์ชนิดเดียวกัน คือ อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส II (RNA polymerase II) (Grosshans and Slack, 2002) กระบวนการสร้างไมโครอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว เป็นกระบวนการที่ซับซ้อน (รูปที่ 2) (Grosshans and Slack, 2002; Bartel, 2004; www.ambion.com) มีขั้นตอนดังนี้

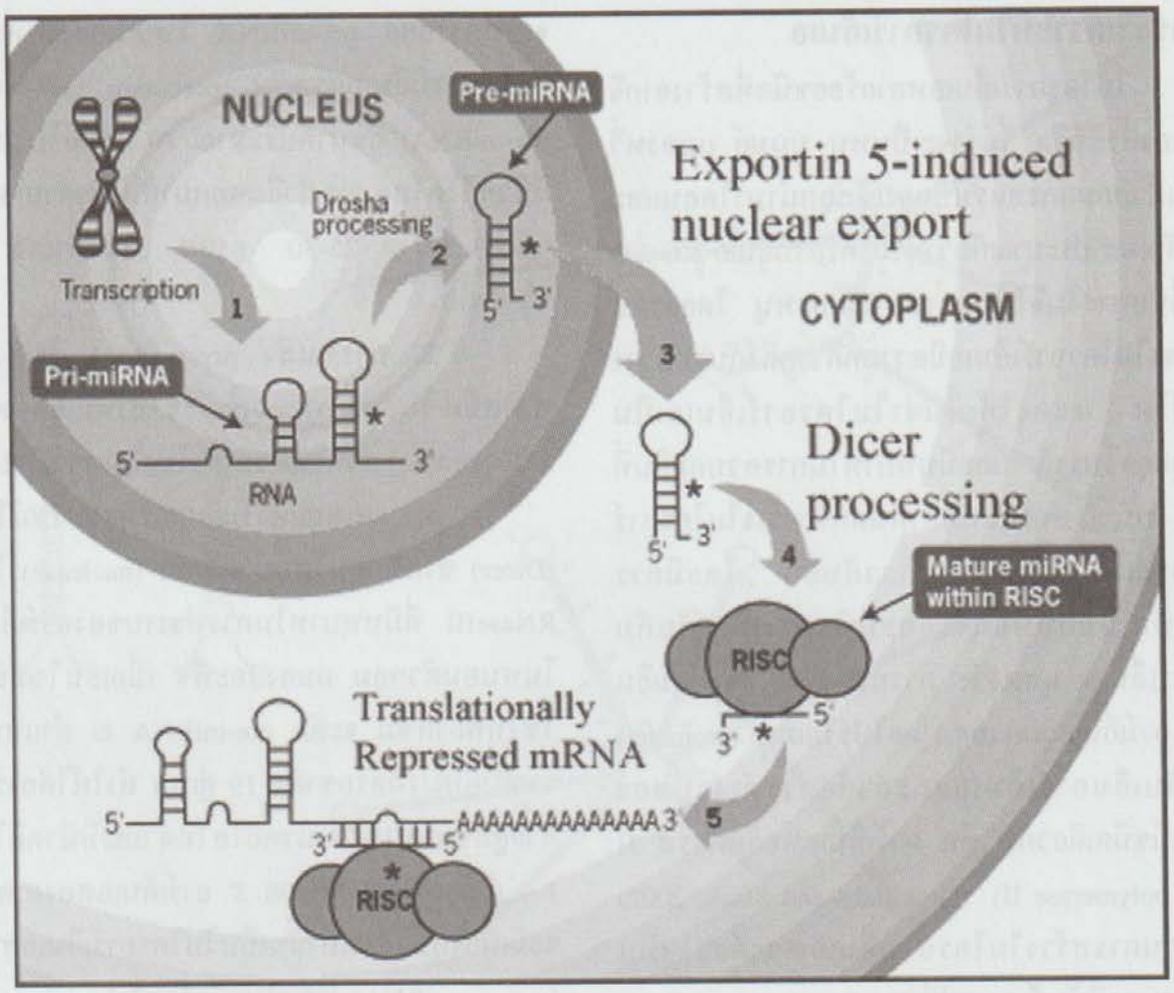
1. การถอดรหัสเพื่อสร้างไมโครอาร์เอ็นเอตั้งต้นเรียก primary miRNA (pri-miRNA) โดยใช้เอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส II และมีการเติมแคบเข้าที่ปลายด้าน 5' (5'Cap) และเติมพอลีเอ (Poly A) ที่ปลายด้าน 3' ของโมเลกุล จากนั้นส่วนของไมโครอาร์เอ็นเอจะมีการโค้งเป็นรูปก็บหนีบผมหรือแฮร์พิน (hairpin)

2. การปลดปล่อยแฮร์พินในนิวเคลียส โดยเอนไซม์ดรอชา (Drosha) ซึ่งเป็นไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease) ที่จำเพาะต่ออาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA) จะทำการย่อย pri-miRNA ในนิวเคลียสเพื่อให้ได้ไมโครอาร์เอ็นเอแรกเริ่ม (precursor miRNA หรือ pre-miRNA) มีขนาดประมาณ 70 นิวคลีโอไทด์ โดยมีนิวคลีโอไทด์ 1-4 ตัวยื่นออกมาที่ปลายด้าน 3' มีก้าน (stem) ขนาด 25-30 คู่เบส และมีห่วง (loop) ขนาดเล็ก

3. การขนส่ง pre-miRNA ไปยังไซโทพลาสซึม ในสัตว์ การขนส่งนี้ใช้โปรตีนเอกซพอร์ทิน 5 (Exportin-5) ส่วนในพืชอาศัยโปรตีนเฮซที (HASTY)

4. การตบแต่งโมเลกุลด้วยเอนไซม์ไดเซอร์ (Dicer) ซึ่งเป็นเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease) ในกลุ่ม RNaseIII ที่มีบทบาทในการทำงานของอาร์เอ็นเอไอในหนอนตัวกลม แมลงและพืช เมื่อเอนไซม์นี้อยู่ในไซโทพลาสซึม จะตัด pre-miRNA ณ ตำแหน่งห่างจากตำแหน่งที่ดรอชาตัด 19 คู่เบส ทำให้ได้อาร์เอ็นเอสายคู่มีขนาด 19-24 นิวคลีโอไทด์ และมีนิวคลีโอไทด์ 1-4 ตัวยื่นออกมาที่ปลาย 3' อาร์เอ็นเอสองสายที่ได้นี้จะมีเพียงหนึ่งสายเท่านั้นเป็นไมโครอาร์เอ็นเอสมบูรณ์ (mature miRNA) ที่จะทำหน้าที่ต่อไป

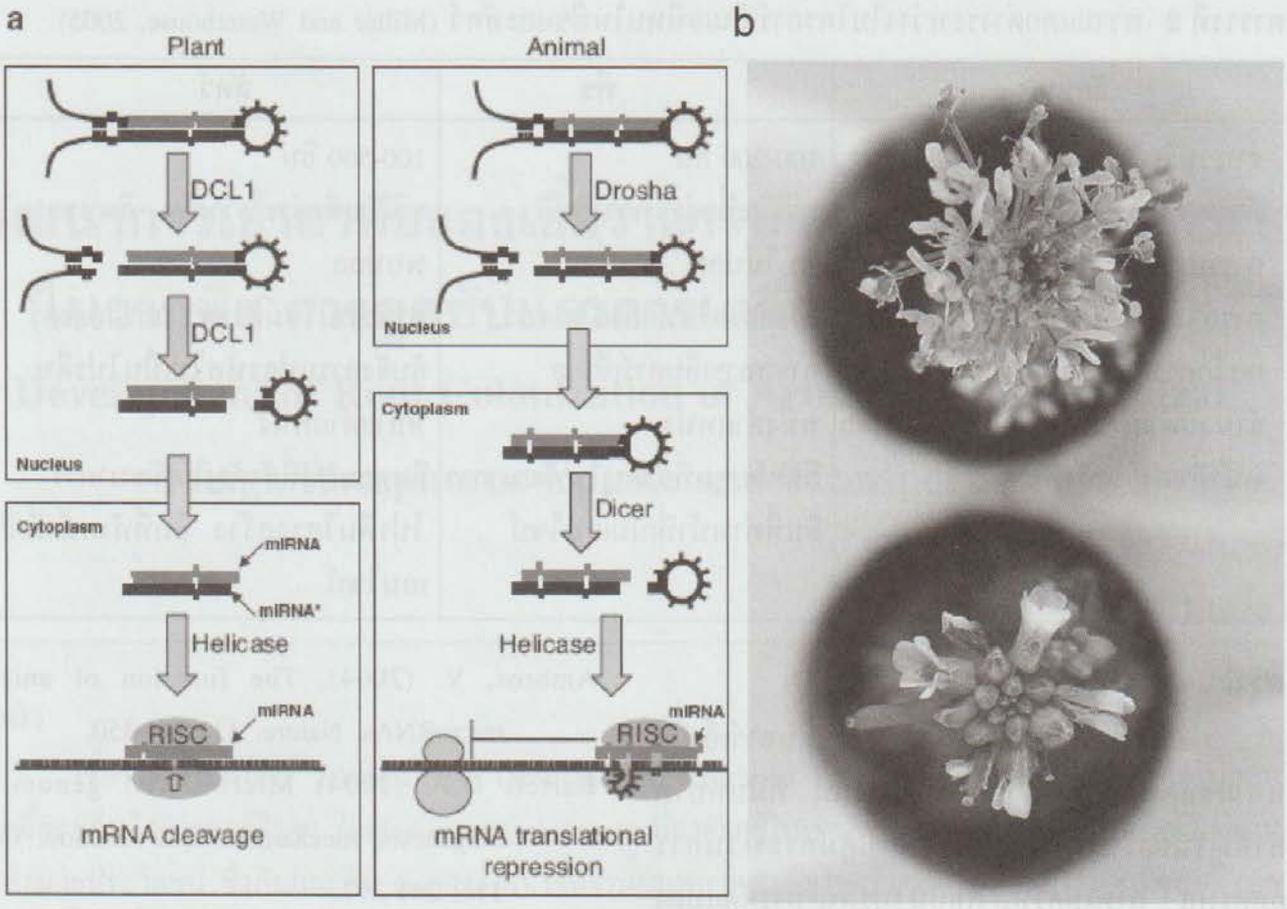
5. การควบคุมการแปลรหัสของเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย อาร์เอ็นเอสายคู่ที่ถูกสร้างโดยไดเซอร์จะต้องแยกออกจากกันและปลายด้าน 5' ของไมโครอาร์เอ็นเอต้องจับกับกลุ่มโปรตีนเชิงซ้อนขนาดใหญ่เรียกว่า RISC (RNA- induced silencing complex) เท่านั้น การคัดเลือกสายใดสายหนึ่งในอาร์เอ็นเอสายคู่ให้ทำงานขึ้นกับความเสถียรของปลายทั้งสอง โดยสายที่มีความเสถียรของปลายด้าน 5' ต่ำมักชอบจับกับ RISC และสายนี้จะเป็นสายที่จะทำงานต่อไปในกระบวนการรบกวนการทำงานของยีนเป้าหมาย



รูปที่ 2 วิถีการสังเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอและการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (http://www.ambion.com)

กลไกการทำงานของไมโครอาร์เอ็นเอ

การทำงานของไมโครอาร์เอ็นเอมี 2 กลไกหลัก คือ การสลายเอ็มอาร์เอ็นเอและการระงับการแปลรหัสไปเป็นโปรตีน จะเป็นวิธีใดนั้นขึ้นกับความสามารถในการเข้าคู่กันระหว่างไมโครอาร์เอ็นเอและเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายที่จับกัน ถ้าไมโครอาร์เอ็นเอมีเบสคู่สมกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายมาก หรือจับกันสมบูรณ์จะทำให้เอ็มอาร์เอ็นเอสลายตัว แต่ถ้ามีเบสคู่สมกันน้อย หรือจับกันได้บางส่วน จะส่งผลให้เกิดการระงับการแปลรหัสไปเป็นโปรตีนโดยไม่มีการสลายเอ็มอาร์เอ็นเอ ไมโครอาร์เอ็นเอที่พบในสัตว์ส่วนใหญ่จับแบบไม่สมบูรณ์กับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย ดังนั้น กลไกการระงับการแปลรหัสไปเป็นโปรตีนจะเป็นกลไกเด่นในสัตว์ ส่วนไมโครอาร์เอ็นเอในพืชมักมีการเข้าคู่กันได้สมบูรณ์จึงควบคุมการแสดงออกของโปรตีนโดยกลไกการสลายเอ็มอาร์เอ็นเอ (รูปที่ 3a)



รูปที่ 3 เปรียบเทียบกลไกการสังเคราะห์และการทำงานของไมโครอาร์เอ็นเอในพืชและในสัตว์ a. ยีนดรอชาทำหน้าที่ตัด pri-miRNA ให้เป็น pre-miRNA ในสัตว์ แต่ไม่พบโปรตีนที่คล้ายกันนี้ในพืช พืชจะมีเอนไซม์คล้ายไดเซอร์ (DCL1) ทำหน้าที่แทน การควบคุมการแสดงออกของยีนในสัตว์อาศัยกลไกการระงับกระบวนการแปลรหัสเพื่อสร้างโปรตีน แต่พืชอาศัยกลไกการสลายเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย b. อแรบบิดอบซิสกลายพันธุ์ที่เกิดจากการกลายของยีนคล้ายไดเซอร์ ทำให้พืชสร้างไมโครอาร์เอ็นเอได้น้อยหรือไม่มีเลย พืชนี้จะมีดอกที่ผิดปกติ โดยกลีบดอกบิดเบี้ยว มีจำนวนคาร์เพล (carpel) ต่อดอกจำนวนมาก (ภาพบน) เมื่อเทียบกับดอกปกติ (ภาพล่าง) แสดงให้เห็นว่าพืชต้องการไมโครอาร์เอ็นเอเพื่อควบคุมการเจริญและพัฒนาให้เป็นปกติ (Millar and Waterhouse, 2005)

เมื่อพืชและสัตว์ต่างกัน

ไมโครอาร์เอ็นเอที่พบในพืชและสัตว์มีความเหมือนกันหลายประการได้แก่ เป็นโมเลกุลยุคโบราณ มีขนาด 19-24 นิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการสลายของโมเลกุลตั้งต้นขนาดใหญ่และมีบทบาทในการควบคุมการแปลรหัสเพื่อสร้างโปรตีนโดยทำงานร่วมกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย (Ambrose, 2004; Yang et al., 2007) ทั้งที่มีความเหมือนกัน แต่ก็มีความแตกต่างในกลไกการควบคุมโดยไมโครอาร์เอ็นเอพืชมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายแบบสมบูรณ์ (perfect homology) และทำงานโดยอาศัยกระบวนการเหมือนอาร์เอ็นเอไอ ทำให้เกิดการสลายตัวของเอ็มอาร์เอ็นเออย่างเฉพาะเจาะจง (รูปที่ 3a) อย่างไรก็ตามไมโครอาร์เอ็นเอในพืชบางครั้งอาจจับแบบไม่สมบูรณ์กับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย (Millar and Waterhouse, 2005) ซึ่งหากเป็นแบบนี้ กลไกทำงานในพืชคล้ายกับวิถีทางที่พบในสัตว์ เอ็มอาร์เอ็นเอในสัตว์มีตำแหน่งให้ไมโครอาร์เอ็นเอมาจับหลายตัว ไม่ทับซ้อนกัน ความแตกต่างระหว่างไมโครอาร์เอ็นเอพืชและสัตว์แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความแตกต่างระหว่างไมโครอาร์เอ็นเอที่พบในพืชและสัตว์ (Millar and Waterhouse, 2005)

ลักษณะ	พืช	สัตว์
จำนวนยีนไมโครอาร์เอ็นเอ	100-200 ยีน	100-500 ยีน
ตำแหน่งในจีโนม	บริเวณที่อยู่ระหว่างยีน	บริเวณที่อยู่ระหว่างยีน อินทรอน
การพบกลุ่มไมโครอาร์เอ็นเอ	พบไม่บ่อย	พบบ่อย
การสังเคราะห์	อาศัยเอนไซม์คล้ายไดเซอร์	อาศัยเอนไซม์ดรอชา และไดเซอร์
กลไกการควบคุมยีน	การสลายเอ็มอาร์เอ็นเอ	ยับยั้งการแปลรหัสไปเป็นโปรตีน
จำนวนตำแหน่งจับบนเอ็มอาร์เอ็นเอ	หนึ่งตำแหน่ง	หลายตำแหน่ง
หน้าที่ของยีนเป้าหมาย	ยีนควบคุมที่สำคัญในพัฒนาการ ยีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์	ยีนควบคุมที่สำคัญในพัฒนาการ โปรตีนโครงสร้าง ยีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์

สรุป

ในช่วงสิบปีที่ผ่านมา มีการพบอาร์เอ็นเอหลายชนิดที่ไม่กำหนดการสร้างโปรตีน ที่มีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมกระบวนการถอดรหัส การแปลรหัสไปเป็นโปรตีน การดัดแปลงอาร์เอ็นเอหรือความเสถียรของเอ็มอาร์เอ็นเอ ไมโครอาร์เอ็นเอเป็นหนึ่งในโมเลกุลอาร์เอ็นเอเหล่านี้ที่มีบทบาทในสิ่งมีชีวิต ทำงานโดยการเข้าคู่กับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย เกิดการกำจัดเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจง หรือขัดขวางการแปลรหัสไปเป็นโปรตีน ปัจจุบันพบไมโครอาร์เอ็นเอทั้งในพืชและในสัตว์ มีบทบาทสำคัญในการควบคุมพัฒนาการในพืชและสัตว์ให้เจริญปกติ หากเข้าใจบทบาทหน้าที่ของไมโครอาร์เอ็นเอมากขึ้น อาจเป็นไปได้ว่าจะมีการนำไมโครอาร์เอ็นเอสังเคราะห์มาใช้เป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์ในการควบคุมการแสดงออกของยีนในพืชและสัตว์ได้ หรือใช้ในการต้านการเกิดมะเร็งหรือการกลายพันธุ์ของไวรัส

เอกสารอ้างอิง

หนูเดือน เมืองแสน. (2547). RNA interference: เครื่องมือในการหาหน้าที่ของยีนและแนวทางใหม่ในการบำบัดรักษาโรค ว.วิทย.มข. 32(3), 150-157.

Ambros, V. (2004). The function of animal microRNAs. Nature. 431:244-350.

Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 116: 281-297.

Costa, F. (2007). Non-coding RNAs: Lost in translation? Gene. 386:1-10.

Grosshans, H. and Slack, F. (2002). Micro-RNAs: Small is plentiful. J. Cell Biol. 156: 17-21.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell. 75: 843-854.

Llave, C. (2004). MicroRNAs: More than a role in plant development? Mol. Plant Pathology. 5(4):361-366.

Millar, A., and Waterhouse, P. (2005). Plant and animal microRNAs: similarities and differences. Funct Integr. Genomics. 5: 129-135.

Yang, T. Xue, L. and An, L. (2007). Functional diversity of miRNA in plants. Plant Science. 172:423-432.

http://www.ambion.com

http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/

ว.วิทย. มข. 35(1) 73-81 (2550) KKU Sci. J.35(1) 73-81 (2007)

พัฒนาการเข้าอาศัยของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซา ในรากพืช การดูดซับและการเคลื่อนย้ายฟอสฟอรัส

Development of Root Colonization of Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Phosphorus Uptake and Transportation

โสภณ บุญลือ[1]

บทนำ

เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซา (arbuscular mycorrhizal fungi) เป็นเชื้อราชนิดหนึ่งที่อยู่ในกลุ่มของเชื้อราเอ็นโดมายคอร์ไรซา (endomycorrhizal fungi) ที่อาศัยอยู่ในเซลล์ของรากพืชโดยมีความสัมพันธ์แบบเอื้ออำนวยประโยชน์ ซึ่งกันและกัน (symbiosis) เชื้อรานี้มีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศน์ในธรรมชาติของพืชบก โดยพบเชื้อรานี้ ดำรงชีวิตอาศัยอยู่ร่วมกับพืชบกมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (Newman and Reddell, 1987) บทบาทสำคัญของเชื้อรานี้ต่อพืชอาศัยมีหลายประการ ได้แก่ ช่วยพืชในการดูดซับธาตุอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งธาตุฟอสฟอรัส ซึ่งเป็นธาตุอาหารหลักที่จำเป็นต่อการเจริญของพืช และมักอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble phosphorus) เนื่องจากลักษณะทางเคมีของดินทำให้ฟอสฟอรัสถูกตรึงและเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของเกลือฟอสเฟต ได้แก่ แคลเซี่ยม ฟอสเฟต ไดไฮเดรต (calcium phosphate dihydrate) ออกตะ-แคลเซี่ยม ฟอสเฟต (octa-calcium phosphate) และไฮดรอกซี่ อะพาไทท์ (hydroxyl apatite) เป็นต้น โดยเชื้อรามายคอร์ไรซาแสดงกิจกรรมในการเปลี่ยนรูปของเกลือฟอสเฟตนี้ให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำ และพืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ทันที และไม่เพียงแต่ธาตุฟอสฟอรัสเท่านั้นที่เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซา ช่วยในการดูดซับให้กับพืชอาศัย แต่เชื้อรานี้ยังช่วยดูดซับธาตุอาหารอื่นๆให้แก่พืชอาศัยด้วย ได้แก่ ไนโตรเจน โปแทสเซี่ยม และจุลธาตุ นอกจากนี้เชื้อรามายคอร์ไรซายังช่วยให้พืชมีชีวิตรอดในสภาพดินแห้งแล้งหรือมีโลหะหนักและยังช่วยลดการเป็นโรคทางรากของพืช เป็นต้น

แม้ว่าปัจจุบันมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อราอาร์บัสคูลาร์เป็นจำนวนมากมาย ทั้งในแง่การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของโครงสร้างเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซา ลักษณะทางด้านสรีรวิทยา และแม้แต่การนำเชื้อรานี้ไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ ได้แก่ การนำไปลดความเป็นพิษของโลหะหนัก ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เพิ่มผลผลิตของพืชไร่ และไม้ผล รวมทั้งนำไปใช้ในการควบคุมโรคพืช เป็นต้น อย่างไรก็ตามงานวิจัยในด้านต่างๆเหล่านี้ยังมีการศึกษาเพิ่มเติมอยู่ตลอดเวลา แม้กระทั้งการศึกษาลักษณะของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซาทางสัณฐานวิทยาก็ยังคงมีการศึกษาเพิ่มเติมขึ้น ดังนั้น บทความนี้ได้รวบรวมความรู้เพิ่มเติม เกี่ยวกับการพัฒนาการ

[1] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

เข้าอยู่อาศัยของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซา ในรากพืช ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลุ่มยีนบางชนิดของพืชอาศัยที่มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันกับเชื้อรามายคอร์ไรซา ที่ตรวจพบได้ในแต่ละขั้นตอนของการเจริญของเชื้อรา รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางชีวเคมีในบางขั้นตอน นอกจากนี้ยังได้อธิบายกลไกการดูดซับ และการแลกเปลี่ยนธาตุฟอสฟอรัสระหว่างเชื้อรากับพืชอาศัย

พัฒนาการเข้าสู่รากพืชของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซา

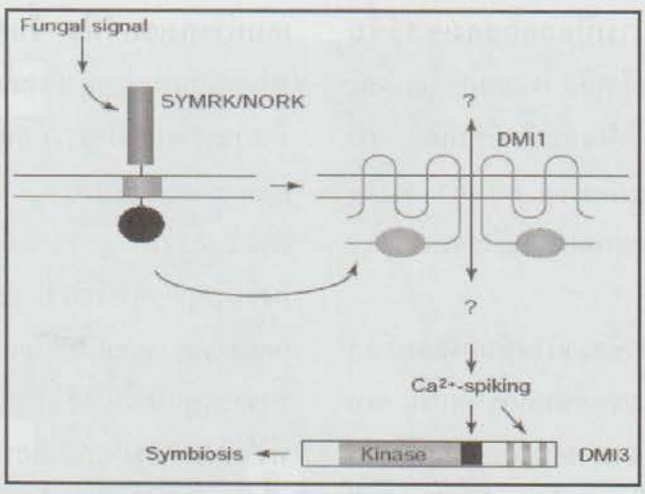
ระยะพัฒนาการเข้าสู่รากพืชของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซา ประกอบด้วยระยะที่สำคัญ 2 ระยะ คือ ระยะที่หนึ่ง เป็นระยะที่เชื้อราเจริญอยู่ภายนอกรากพืช ซึ่งประกอบด้วยเส้นใยที่เจริญอยู่ในดินรอบๆ รากพืช (extrametrical hyphae) เวสสิเคิลที่เกิดในดิน (soil born vesicle) และสปอร์ที่เจริญอยู่ภายในดินรอบๆ รากพืช ระยะที่สอง เป็นระยะที่เชื้อรามายคอร์ไรซา มีการเจริญอยู่ภายในเซลล์รากพืชในบริเวณชั้นคอร์เท็ค (corticle cell) ซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างที่สำคัญ ได้แก่ เส้นใยของเชื้อราที่มีลักษณะตรง ซึ่งเจริญอยู่ภายในและ/หรือระหว่างเซลล์ของรากพืช เส้นใยที่เจริญ อยู่ภายในเซลล์ของรากพืชมีลักษณะแตกกิ่งก้านแบบไดโคโตมัส (dichotomous branching) คล้ายพุ่มไม้เล็กๆ เรียกว่า อาร์บัสคูล (arbuscule) และโครงสร้างที่มีลักษณะกลม หรือกลมรีคล้ายรูปไข่ ซึ่งเรียกว่าเวสสิเคิล (vesicle) สามารถพบโครงสร้าง เวสสิเคิลเจริญอยู่ภายในและ/หรือระหว่างเซลล์รากพืช และเนื่องจากลักษณะของโครงสร้างเชื้อราที่พบในรากพืช จึงเป็นที่มาของเชื้อราที่ก่อให้เกิดความสัมพันธ์แบบมายคอร์ไรซาชนิดนี้ว่า เวสสิคูลาร์ อาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซา (vesicular arbuscular mycorrhiza) หรือ อาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซา (arbuscular mycorrhiza) สำหรับรายละเอียดของขั้นตอนพัฒนาการเข้าสู่รากพืชของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซา นั้นมักเกี่ยวข้อง กับชุดของยีน ***SYM*** ของพืชอาศัย ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันภายในรากพืช (endosymbiosis) โดยพบยีนนี้ได้ในทุกขั้นตอนของการเจริญและการพัฒนาของเชื้อรา ทั้งก่อนที่เชื้อราจะเข้าอยู่อาศัยในรากพืช และภายหลังจากที่เชื้อราได้เข้าสู่รากพืชแล้ว ซึ่งอาจสรุปได้โดยสังเขป ดังนี้

ระยะการเจริญของเชื้อราภายนอกรากพืช

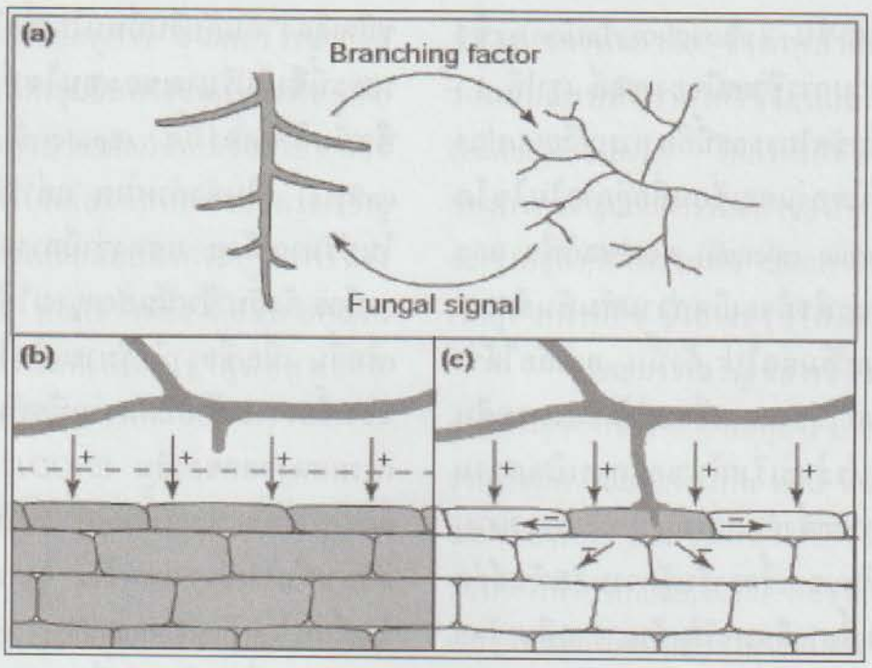
การเจริญของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซา ภายนอกรากพืชมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ชนิดของดิน และชนิดของเชื้อราที่อยู่ในดินบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) กล่าวคือในสภาพดินชนิดเดียวกัน เส้นใยของเชื้อราบางชนิดเจริญได้เพียงเล็กน้อย แต่บางชนิด เจริญได้โดยมีความยาวของเส้นใยได้มากกว่า 80-134 เท่า เป็นต้น (Bonfante-Fasolo, 1984) การเจริญของเชื้อราภายนอกรากพืชเริ่มจากเส้นใยของเชื้อราที่จริญมาจากสปอร์ที่อยู่ในระยะพักตัวซึ่งสร้างขึ้นภายหลังจากที่เชื้อราเข้าอยู่อาศัยในรากพืชระยะหนึ่ง หรือมาจากชิ้นส่วนของรากที่มีเชื้อรามายคอร์ไรซาอาศัยอยู่ภายใน ภายหลังจากที่เส้นใยเชื้อราเจริญอยู่ในดินได้ช่วงระยะเวลาหนึ่ง โดยประมาณ 2-3 วัน ถึงหลายสัปดาห์ เชื้อราจะต้องรีบเข้าอยู่อาศัยในรากพืชโดยเร็ว มิเช่นนั้นจะทำให้ศักยภาพในการแทงเส้นใยเข้าสู่รากพืชหมดไป (Bowen, 1987; Harrison, 1997) โดยเส้นใยของเชื้อรามายคอร์ไรซาจะส่งสัญญาณไปให้พืชอาศัยเพื่อที่จะพัฒนาความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันกับพืช จากนั้นยีน ***SYM*** ที่อยู่ในรากขนของพืชจะสร้างตัวรับสัญญาณที่เรียกว่า รีเซ็พเตอร์ ไคเนส (receptor kinase) ได้แก่ SYMRK หรือ NORK และส่งสัญญาณต่อไปให้ยีน DMI1 (DOES NOT INFECTIONS 1) ซึ่งเป็นยีนที่ทำให้เกิดช่องทางเดินของอิออน (ion channel) ต่อมาแคลเซี่ยมจะเดินทาง ผ่านช่องทางเดินของอิออนนี้ เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวนำพาสัญญาณของเชื้อรานั้นไปกระจายสู่บริเวณที่สร้างเอนไซม์ไคเนส (kinase) ในเซลล์รากพืช โดยมีโปรตีน DMI3 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่จับแคลเซี่ยม และแคลโมดูลิน (calmodulin) เพื่อนำไปสร้างในกระ

บวนการฟอสโฟริเลชั่น (phosphorylation) ซึ่งเกี่ยวข้องกับ กระบวนการชีวเคมีของเซลล์ (รูปที่ 1.) ดังนั้น จุดสำคัญที่เด่นชัดในระยะนี้คือ การเปลี่ยนแปลงปริมาณความเข้มข้นของแคลเซี่ยมที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึม (cytoplasmic calcium) ของเซลล์พืช และต่อจากนั้นเชื้อราและพืชก็จะเกิดความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันต่อไป ดังนั้น อาจถือได้ว่าระยะที่มีการเคลื่อนตัวของแคลเซี่ยมผ่านช่องทางเดินของอิออนนี้ เป็นระยะเริ่มต้นของการเกิดความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (Parniske, 2004)

หลังจากพืชและเชื้อรารับรู้ความสัมพันธ์ต่อกันแล้ว เส้นใยของเชื้อราก็จะเจริญเข้าหารากพืช โดยรากพืช จะปล่อยสารบรานชิ่ง แฟคเตอร์ (branching factor) ซึ่งเป็นสารเคมีอย่างหนึ่ง เหนี่ยวนำให้เส้นใยของเชื้อราเกิด การแตกกิ่งก้านสาขาคล้ายพัด ในขณะที่เชื้อราส่งสัญญาณที่พืชรับรู้ได้และไปกระตุ้นการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกัน (*SYM* gene) (รูปที่ 2.a) จากนั้นเส้นใยของเชื้อราจะเจริญ เข้ามาใกล้รากพืชอาศัย (รูปที่ 2.b) และปล่อยสัญญาณที่สามารถแพร่ผ่านได้ (diffusible signal) ไปที่เซลล์ รากพืช และเหนี่ยวนำให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับระยะเริ่มต้นของการเกิดปมที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์เบต้า-กลูคูโรนิเดส (*EARLY NODULATION 11*(*ENOD 11*)-promotor:: β-glucuronidase(GUS)) ยีน *ENOD11* นี้เป็นยีนชนิดเดียว กันกับยีนที่พบในเชื้อไรโซเบี่ยม ดังนั้นในระยะนี้จึงมีปริมาณของเอนไซม์ GUS ในเซลล์รากพืชชั้นอิพิเดอร์มิส (epidermis) และชั้นคอร์เท็ค (cortex) เป็นตัวกำหนด กล่าวคือหากพบเอนไซม์นี้ในปริมาณน้อย แสดงว่ามีการแตกกิ่งของเส้นใยเชื้อราน้อย ดังนั้น จึงเป็นสัญญาณให้เชื้อราเกิดการแตกกิ่งเพิ่มขึ้น เมื่อเชื้อรามีปริมาณเส้นใยเพียงพอแล้ว เส้นใยของเชื้อราจะเข้าสัมผัสรากพืชทันที ซึ่งในระยะนี้พบการแสดงออกของยีน *ENOD11* และเอนไซม์ GUS เฉพาะบริเวณเซลล์พืชที่มีเชื้อราสัมผัสเท่านั้น (รูปที่ 2.c) ต่อมาเส้นใยเชื้อราจะสร้าง โครงสร้างคล้ายแอพเพรสซอเรี่ยม (appressorium-like structure) ที่บริเวณผิวรากพืช เพื่อเตรียมตัวที่จะแทงเส้นใยผ่านผนังเซลล์รากพืช การแทงเส้นใยของเชื้อราเข้าสู่รากพืชสามารถพบได้หลายบริเวณขึ้นอยู่กับฤดูกาลและอายุของรากพืช ได้แก่ แทงเส้นใยผ่านผนังเซลล์รากขน หรือเซลล์ชั้นอิพิเดอร์มิส หรือเอ็คโซเดอร์มิส (exodermis) ที่แก่ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่เชื้อราสร้างขึ้น นอกจากนี้เชื้อรายังสามารถแทงเส้นใยเข้าสู่รากพืชในบริเวณช่องว่างระหว่างแผลของเซลล์รากพืชชั้นนอก หรือแทงเส้นใยเข้าไประหว่างเซลล์ชั้นอิพิเดอร์มิส จากนั้นเส้นใยเชื้อราจะแพร่กระจายเข้าไปเจริญในเซลล์รากพืช โดยจะเจริญอยู่เฉพาะเซลล์ในบริเวณชั้นคอร์เท็คเท่านั้น (Bonfante-Fasolo, 1984; Kendrick, 1985)



รูปที่ 1 การส่งสัญญาณของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซา และการตอบสนองต่อสัญญาณของพืชอาศัยเพื่อเกิดความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (Parniske, 2004)



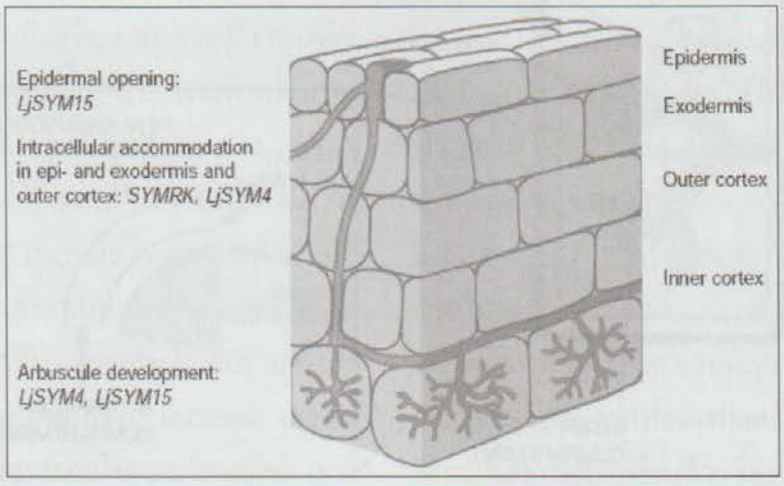
รูปที่ 2 การแลกเปลี่ยนสัญญาณระหว่างรากพืช และเส้นใยของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซา ก่อนการเข้าสู่รากพืช (Parniske, 2004)

ระยะการเจริญของเชื้อราภายในเซลล์รากพืช

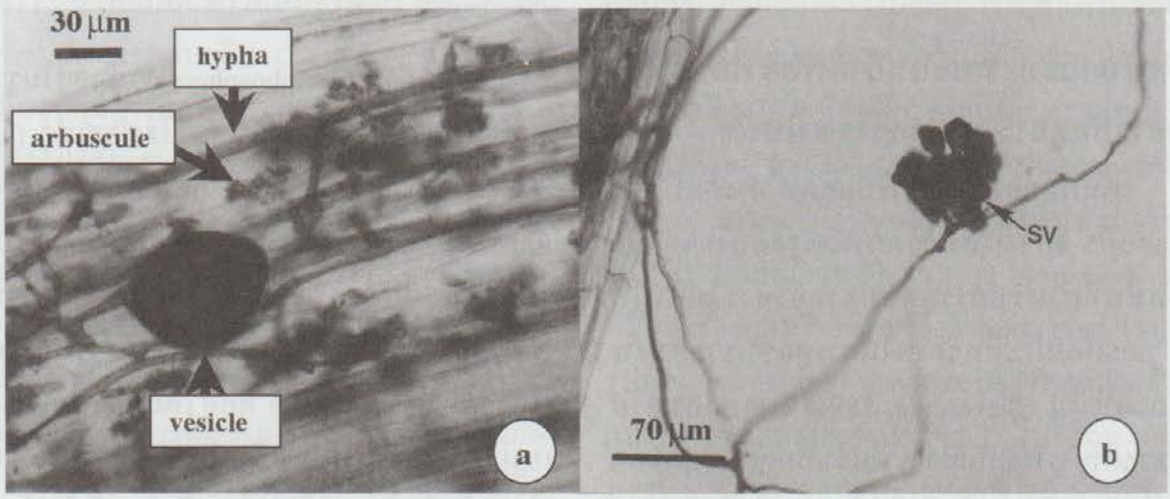
การเจริญของเชื้อราในเซลล์รากนั้นเริ่มขึ้นภายหลังจากที่เชื้อราเข้าสัมผัสรากพืช โดยสร้างโครงสร้างคล้ายแอพเพรสซอเรี่ยมและแทงเส้นใยเข้าสู่เซลล์รากพืช พบว่า ในขั้นตอนที่เส้นใยเชื้อราแทงผ่านช่องระหว่างเซลล์ ชั้นอิพิเดอร์มิสของรากพืชที่อยู่ติดกันนั้น มีผลมาจากยีน *LjSYM15* เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย (รูปที่ 3.) ซึ่งจะทำให้เซลล์พืชเปิดช่องขยายใหญ่ขึ้น และพบว่าเส้นใยของ เชื้อราจะมีการเจริญอย่างต่อเนื่องอยู่บนผิวของเซลล์ชั้นอิพิเดอร์มิส การเปิดออกของเซลล์ชั้นอิพิเดอร์มิสนี้จะยาวไปถึงชั้นมิดเดิล ลาเมลลา (middle lamella) และอาจมีส่วนทำให้เซลล์ชั้นอิพิเดอร์มิสนี้ผลิตเอนไซม์เพ็คติเนส (pectinase) ออกมา ทำให้ผนังเซลล์พืชอ่อนแอ และง่ายต่อการเจริญของเชื้อราภายในเซลล์รากพืช

การเจริญของเส้นใยเชื้อราผ่านชั้นอิพิเดอร์มิส เอ็คโซเดอร์มิส และเข้ามาในเซลล์ชั้นคอร์เท็คนั้น พบว่ามียีน *LjSYM4* และ *SYMRK* ของพืชอาศัยเป็นตัวควบคุม (รูปที่ 3.) กล่าวคือถ้าหากพืชขาดยีนทั้งสองนี้จะทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญเข้ามาภายในเซลล์ชั้นอื่นๆของรากพืชได้ และพบว่ายีน *LjSYM4* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์พืชและเซลล์ที่ปลายเส้นใยของเชื้อรา (Bonfante et al., 2000) หลังจากเชื้อรา เจริญเข้ามาถึงเซลล์ชั้นคอร์เท็คแล้ว เชื้อราจะแทงเส้นใยผ่านผนังเซลล์ชั้นนี้แต่ไม่ทะลุผ่านชั้นพลาสมาเลมม่า (plasmalemma) และพัฒนาโครงสร้างที่มีลักษณะแตกกิ่งแบบไดโคมัส คือ แตกเป็นคู่ๆ จนมีลักษณะคล้ายพุ่มไม้ เรียกโครงสร้างนี้ว่า อาร์บัสคูล (arbuscule) (รูปที่ 4.a) ซึ่งถูกล้อมรอบด้วยพลาสมาเลมม่าของเซลล์พืช ชั้นคอร์เท็คนั่นเอง และอาจเรียกพลาสมาเลมม่าของเซลล์พืชตรงบริเวณที่ล้อมรอบอาร์บัสคูลนี้ว่า เพอริ-อาร์บัสคูลาร์เมมเบรน (peri-arbuscular membrane) (รูปที่ 5.) โดยมีช่องว่างที่อยู่ระหว่างชั้นเพอริ-อาร์บัสคูลาร์เมมเบรน และผนังเซลล์ของอาร์บัสคูล ซึ่งเรียกว่า อินเตอร์เฟส คอมพาร์ทเมนต์ (interface compartment) (Harrison, 1997) เนื่องจากอาร์บัสคูลมีพื้นที่สัมผัสเป็นจำนวนมาก ดังนั้น จึงทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนสารอาหารกันระหว่างเซลล์เชื้อราและรากพืช โดยผ่านบริเวณอินเตอร์เฟสคอมพาร์ทเมนต์นี้ (Sieverding, 1991; Harrison, 1997) การ

พัฒนาของอาร์บัสคูลนี้มีความเกี่ยวข้องกับยีน *LjSYM15* และ *LjSYM4* (รูปที่ 3.) ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมตั้งแต่การเปิดผนังเซลล์ชั้นอิพิเดอร์มิสของพืช การแทรกเส้นใยเข้าอาศัยในระหว่างเซลล์ชั้นอิพิเดอร์มิส เอ็คโซเดอร์มิส และคอร์เท็คด้านนอกของพืช ตลอดทั้งการพัฒนาโครงสร้างอาร์บัสคูลในเซลล์ชั้นคอร์เท็คด้วย โดยพบว่าถ้าพืชขาดยีนนี้จะไม่พบการพัฒนาของอาร์บัสคูลในรากพืชเลย นอกจากนี้ยังพบว่าในเซลล์พืชที่มีอาร์บัสคูล จะมีการผลิตเอนไซม์ เซอรีน คาร์บ็อคซี่เป็ปติเดสทู (serine carboxypeptidaseII) และ เอนไซม์เบต้า-กลูคูโรนิเดสเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามอาร์บัสคูลนี้มีอายุสั้นๆ ประมาณ 4-15 วัน เท่านั้น หลังจากนั้นโครงสร้างนี้ จะถูกย่อยสลายไปโดยเซลล์ของรากพืช โดยเซลล์ของรากพืชยังคงทำงานได้ตามปกติ ในขณะที่เกิดอาร์บัสคูล หรือหลังจากที่เกิด อาร์บัสคูลไม่นาน เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซา บางชนิดจะสร้างเวสสิเคิลในระหว่าง และ/หรือภายในเซลล์รากพืช เวสสิเคิลนี้จะอยู่ที่ปลายหรืออยู่ระหว่างเส้นใยที่พองออก ภายในจะมีไขมัน ซึ่งเป็นอาหารเก็บสะสม ในระหว่างที่มีสภาวะเครียด คือ พืชอาศัยให้สารเมทตาบอไลท์ (metabolite) ต่ำ เชื้อราจะนำอาหารสะสมเหล่านี้มาใช้ ซึ่งจะทำให้เวสสิเคิลสลายไป นอกจากนี้เชื้อราบางจีนัสเช่น *Gigaspora* และ *Scutellospora* จะสร้างเวสสิเคิลอยู่ในดินภายนอกรากซึ่งเรียกว่า เวสสิเคิลที่เกิดในดิน (soil-born vesicle) หรือ อ็อกซิเลียรี่ เซลล์ (auxiliary cell) (รูปที่ 4 b)

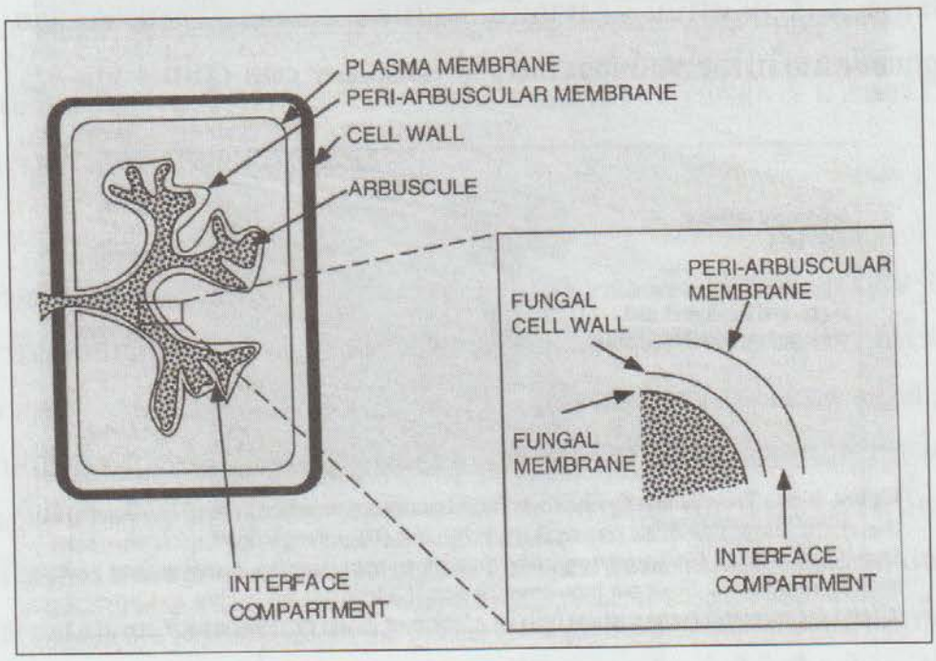


รูปที่ 3 พัฒนาการเข้าสู่เซลล์รากพืชของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซา (Parniske, 2004)



รูปที่ 4 โครงสร้างของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซาในรากข้าวโพด

การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซา ไม่ทำให้ลักษณะภายนอกของรากเปลี่ยนแปลงไป (Phillips and Hayman, 1970) นอกจากรากพืชบางชนิดที่อาจจะพบการเปลี่ยนสี เป็นสีเหลืองอ่อน และไม่มีรากขน ซึ่งสีเหลืองนี้จะจางหายไปเมื่อถูกแสงสว่าง และความเข้มของสีขึ้นอยู่กับปริมาณการเข้าอยู่อาศัยในรากพืชของเชื้อรา ตัวอย่างพืชที่พบการเปลี่ยนแปลงในลักษณะนี้ ได้แก่ หอมหัวใหญ่ ข้าวโพด ถั่ว และมะเขือเทศ เป็นต้น (Harley and Smith, 1983) อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซาในรากพืช ต้องอาศัยการสังเกตภายใต้ กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา และใช้แสงฟลูโอเรสเซนที่กำลังขยาย 100-400 เท่า (Ames et al., 1982; Arias et al.,1987) แต่เนื่องจากโครงสร้างของเชื้อราในรากพืช ได้แก่ เส้นใย อาร์บัสคูล และ เวสสิเคิล มีลักษณะใส (hyaline) หรือสีขาว ซึ่งยากต่อการตรวจสอบ ดังนั้น จึงต้องนำรากพืชไปย้อมสีโครงร้างก่อนที่จะนำมาตรวจสอบ โดยสีย้อมที่นิยมในปัจจุบันคือ สีทริพแพนบลู (trypan blue) แอซิด ฟุชซิน (acid fuchsin) หรือคลอราโซล แบลค อี (chlorazole black E) (Dickson and Smith, 1998)



รูปที่ 5 แสดงตำแหน่งและขอบเขตของอาร์บัสคูลในเซลล์ชั้นคอร์เท็คของรากพืช (Harrison, 1997)

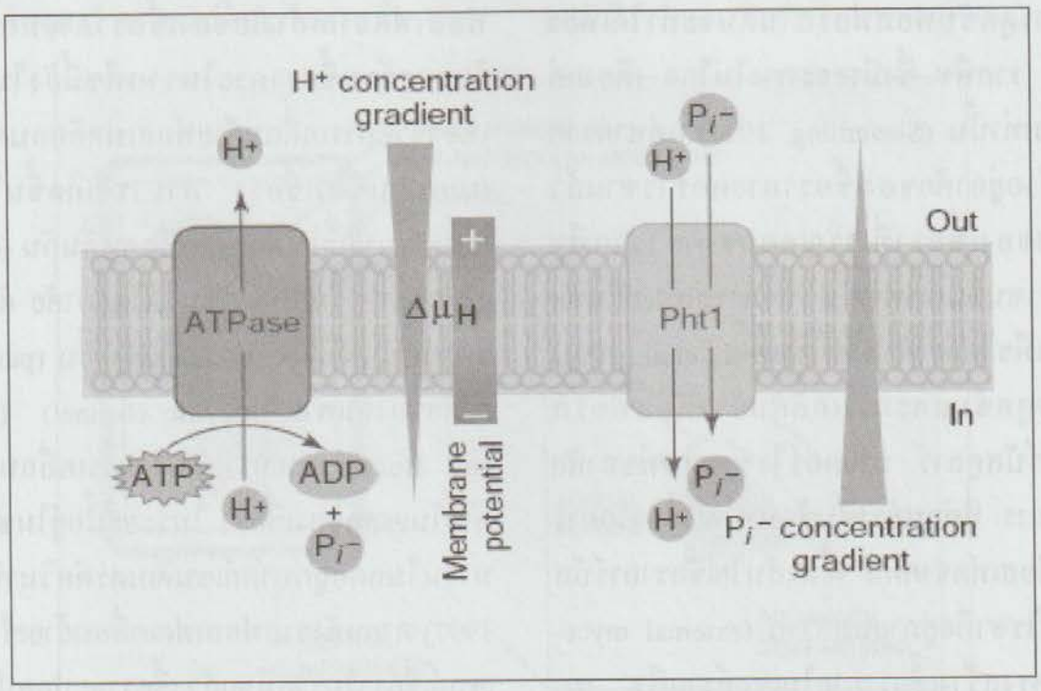
การดูดซับและการเคลื่อนย้ายฟอสฟอรัสของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซาในพืช

บทบาทของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซาที่สำคัญต่อพืช คือ การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยเพิ่มพื้นที่สำหรับการดูดซับธาตุอาหารในดินให้กับพืช และเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซับธาตุอาหารในสารละลายดิน (Sieverding, 1991) ธาตุฟอสฟอรัสจัดเป็นธาตุอาหารหลักและมีความจำเป็นต่อพืชทุกชนิด โดยพบว่าการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นของพืชมีสาเหตุมาจากการเพิ่มปริมาณการดูดซับธาตุฟอสฟอรัสในรูปที่ละลายน้ำ (soluble phosphorus) ซึ่งอยู่ในรูปอิออนฟอสเฟต เช่น โมโนเบสิค ออร์โธฟอสเฟต (monobasic orthophosphate) หรือ ไดเบสิค ออร์โธฟอสเฟต (dibasic orthophosphate) (Marschner and Dell, 1994) ทั้งนี้ เนื่องจากฟอสฟอรัสทำหน้าที่สำคัญหลายประการ เช่น เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างหลักของกรดนิวคลีอิค (nucleic acid) ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) เอนไซม์ และโคเอนไซม์หลายชนิด นอกจากนี้ ฟอสฟอรัสยัง เกี่ยวข้องกับการให้พลังงานในกระบวนการเมทตาบอลิซึม หรือกระตุ้นสารตัวกลาง

ในกระบวนการ เมทตาบอลิ-ซึมอีกด้วย (Karandashov and Bucher, 2005) อย่างไรก็ตาม ปริมาณฟอสฟอรัสในรูปที่ละลายน้ำของดินในเขตร้อนนั้นมีปริมาณน้อย เนื่องจากคุณสมบัติทางเคมีของดิน ประกอบกับการใช้ปุ๋ยเคมีติดต่อกันเป็นเวลานานจึงทำให้ฟอสฟอรัสส่วนใหญ่ถูกตรึงอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble form) ดังนั้น จึงทำให้พืชนำฟอสฟอรัสในรูปที่ละลายน้ำนี้ไปใช้อย่างรวดเร็ว จากการศึกษาบทบาทของเชื้อรามายคอร์ไรซาต่อการดูดซับธาตุฟอสฟอรัสของพืชอาศัย พบว่าพืชที่ไม่มีเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซาอาศัยอยู่ การดูดซับฟอสฟอรัสในดินจะทำได้เพียงบริเวณรอบๆ รากพืช ซึ่งมีระยะทางไม่ไกล เพียงแค่ 2-3 มิลลิเมตรเท่านั้น (Sieverding, 1994) แต่หากรากพืชที่มีการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรามายคอร์ไรซาแล้ว พบว่าเส้นใยของเชื้อราที่เจริญออกจากผิวรากพืชเพียงแค่ 10 เซนติเมตรเท่านั้น สามารถเพิ่มปริมาณฟอสฟอรัสในพืชได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (Li et al., 1991)

การดูดซับและการเคลื่อนย้ายฟอสฟอรัสของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซา ในพืชอาศัยเป็นกระบวนการ ที่ค่อนข้างซับซ้อน โดยเริ่มจากการดูดซับออโธฟอสเฟตจากดิน ด้วยเส้นใยเชื้อราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาที่อยู่ภายนอกราก (external mycelium) เข้าสู่โครงสร้างเชื้อราภายในเซลล์รากพืช พบว่าในระยะนี้ มียีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการสร้างโปรตีน ที่ทำหน้าที่จำเพาะในการนำพาฟอสเฟตเข้าสู่เซลล์เชื้อรา คือ เฟสเฟต ทรานสปอร์เตอร์ (phosphate transporter) ตัวอย่างเช่น ยีน *GvPT* และ *GiPT* ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ เฟสเฟต ทรานสปอร์เตอร์โปรตีน *GvPT* และ *GiPT* ของเชื้อรา *Glomus versiforme* และ *Gl. intraradices* ตามลำดับ โปรตีนทั้งสองชนิดนี้เป็นโปรตีนที่พบโดยทั่วไปในเชื้อรา ที่จัดอยู่ในดิวิชัน เบสิดิโอมายโคต้า (Basidiomycota) และแอสโคมายโคต้า (Ascomycota) การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง กับการดูดซับฟอสเฟตเหล่านี้อาจเกิดขึ้นได้ตลอดเวลา (constitutive expression) หรือเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่ขาดแคลนปริมาณฟอสฟอรัสหรือในสรูปที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราในรากพืช หลังจากฟอสเฟตเคลื่อนเข้ามาในเซลล์เชื้อราแล้วจะถูกเปลี่ยนรูป โดยนำไปใช้ในการสร้างสารประกอบต่างๆ เช่น กรดนิวคิลอิค (nucleic acid) ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) สารอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับ กระบวนการฟอสโฟริเลชั่น (phosphorylation) หรือเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของโพลีฟอสเฟต (polyphosphate) เป็นต้น ต่อมาสารประกอบ ฟอสเฟตเหล่านี้จะเคลื่อนย้ายเข้าไปสู่เส้นใยที่อยู่ภายในรากพืช (intraradical mycelium) โดยกลไกการเคลื่อนย้ายฟอสเฟตจากเส้นใยของเชื้อราภายนอกราก เข้าสู่โครงสร้างเชื้อราภายในรากพืชนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด เนื่องจากการเคลื่อนย้ายฟอสเฟตอิออนผ่านผนังเซลล์เมมเบรนของเชื้อรา สามารถเกิดขึ้นได้ตามระดับความเข้มข้นของฟอสเฟตที่ลดหลั่นกัน (concentration gradient) หรืออาจเกิดขึ้นได้โดยอาศัย ตัวนำพาอิออนที่จำเพาะ (ion-specific carrier) ปั๊ม (pump) หรือโดยอาศัยช่องจำเพาะ (specific channel) (Karandashov and Bucher, 2005) อัตราการเคลื่อนย้ายฟอสเฟตภายในเซลล์ของเชื้อรา ในระยะนี้อยู่ในช่วง 0.1 - 2.0 นาโนโมลต่อลูกบาศก์เซนติเมตรต่อวินาที (Harrison, 1997) ภายหลังจากฟอสเฟตเคลื่อนย้ายเข้ามาอยู่ภายในเซลล์เชื้อราในรากพืชแล้ว เชื้อราจะปลดปล่อยฟอสเฟตออกจากเส้นใย โดยผ่านออกมาจากอาร์บัสคูล และส่งต่อไปสู่พืช โดยผ่านทางเพอริ-อาร์บัสคูลาร์เมมเบรน ก่อนที่จะเคลื่อนย้ายเข้าไปสู่เซลล์รากพืช การเคลื่อนย้ายฟอสเฟตเข้าสู่เซลล์รากพืชนั้นเกี่ยวข้องกับการควบของโปรตีน 2 ชนิด คือ เฟสเฟต ทรานสปอร์เตอร์ (phosphate transporter) และโปรตอน-เอทีพีเอส (proton-ATPase) โดยมักพบโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ในบริเวณชั้นเซลล์เมมเบรน (cell membrane) ของพืชที่มีการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรามายคอร์ไรซา (รูปที่ 6) รูปที่ 6 แสดงกลไก การเคลื่อนย้ายฟอสเฟตข้ามผ่านผนังเซลล์เมมเบรนของพืช พบว่า โปรตอน-เอทีพีเอส ทำหน้าที่ขับโปรตอน (H+) ออกมาโดยใช้ เอทีพี (ATP) เป็นตัวรับ ทำให้ความเข้มข้นของโปรตอนค่อยๆ เพิ่ม

ขึ้น และเป็นผลให้ผนังเซลล์เมมเบรนของพืชมีศักย์เคมีไฟฟ้า (electrochemical potential) ที่สามารถนำพาโปรตอนผ่านข้ามผนังเซลล์เมมเบรนเข้าไปในเซลล์พืช การเคลื่อนย้ายของโปรตอนนี้จะทำให้ง่ายต่อการบรรจุฟอสเฟต (Pi^-) ลงในฟอสเฟต ทรานสปอร์เตอร์ เพื่อนำพาฟอสเฟตเข้ามาในเซลล์พืช ทำให้ความเข้มข้นของฟอสเฟตภายในเซลล์พืชสูงขึ้น (Karandashov and Bucher, 2005) สำหรับอัตราการเคลื่อนย้ายฟอสเฟตจากภายในเส้นใยของเชื้อราสู่ เซลล์รากพืชมีอัตราอยู่ในช่วง $1\text{-}2x10^{-9}$ โมลต่อความยาวรากพืช (ซม.) ต่อวินาที (Sieverding, 1991) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซาต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโต และการดูดซับธาตุฟอสฟอรัสของพืชมีความแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด ความแตกต่างที่เกิดขึ้นนี้ไม่ได้เกี่ยวข้องกับอัตราการเข้าอยู่อาศัย หรือการพัฒนาของเส้นใยเชื้อรามายคอร์ไรซาในรากพืชโดยตรง แต่เกี่ยวข้องกับอัตราการเคลื่อนย้ายของฟอสเฟตในเซลล์รากพืช (Karandashov and Bucher, 2005)



รูปที่ 6 การเคลื่อนย้ายฟอสเฟตในรากพืชที่มีการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซา (Karandashov and Bucher, 2005)

สรุป

การศึกษาพัฒนาการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ มายคอร์ไรซาในรากพืชอาศัย แต่เดิมนั้นไม่ได้กล่าวถึงบทบาทของยีนที่อยู่ภายในพืชอาศัยนั้น ปัจจุบันได้มีการศึกษากรณีความเกี่ยวข้องของยีนของพืชอาศัย ต่อขั้นตอนต่างๆ ของพัฒนาการของเชื้อราในรากพืชอาศัย โดยยีนดังกล่าวเป็นกลุ่มของยีนที่ชื่อว่า ***SYM*** ซึ่งตอบ สนองต่อการรับส่งสัญญาณต่างๆ ระหว่างเชื้อราและรากพืช ควบคุมการพัฒนาของเส้นใยและโครงสร้างอาร์บัสคูลในเซลล์รากพืชอาศัย ตลอดจนควบคุมการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในเซลล์พืชอาศัยเมื่อเชื้อราอาร์บัส-คูลาร์ มายคอร์ไรซา เข้าอยู่อาศัยในรากพืชแล้วพบว่า เชื้อราแสดงบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืชอาศัยด้วยการเพิ่มการดูดซับธาตุฟอสฟอรัส โดยอาศัยเส้นใยของเชื้อราที่เจริญอยู่ภายนอกราก และส่งผ่านฟอสฟอรัสนี้เข้าไปสู่เส้นใยเชื้อราที่อยู่ภายในรากพืช จากนั้นถ่ายเทฟอสฟอรัสออกไปสู่เซลล์รากพืชที่ บริเวณเพอริ-อาร์บัสคูลาร์เมมเบรน และผ่านเข้าสู่เซลล์รากพืชโดย

อาศัยโปรตีนจำเพาะที่อยู่ในผนังเซลล์เมมเบรนของพืชที่เรียกว่า เฟสเฟต ทรานสปอร์เตอร์ ซึ่งพืชจะนำฟอสฟอรัสนี้ไปใช้ในกระบวนการต่างๆของเซลล์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Bonfante P., Genre A., Faccio A., Martini I, Schauser L., Stougaard J. Webb J. and Parniske M. (2000). The Lotus japonicus LjSym4 gene is required for the successful symbiotic infection of root epidermal cells. Mol. Plant Microbe. Interact. 13:1109-1120.

Bonfante-Fasolo, P. (1984). Anatomy and morphology of VA mycorrhizae, pp.5-33. In Powell, C.L. and D.J. Bagyaraj (eds.). VA Mycorrhiza. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Bowen, G.D. (1987). The biology and physiology of infection and its development, pp.25-57. In G.R. Safir (ed.) Ecophysiology of VA mycorrhizal plant. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Dickson, S. and Smith, S.E. (1998). Evaluation of vesicular-arbuscular mycorhizal colonization by staining, pp77-83. In Varma, A. (ed.) Mycorrhiza manual. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.

Harley, J.L. and Smith, S.E. (1983). Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, London. 483 p.

Harrison, M.J. (1997). The arbuscular mycorrhizal symbiosis, pp.1-34. In G. Stacey and N.T. Keen (eds.) Plant-microbe interactions Volume 3. Chapman and Hall, United States of America.

Karandashov, V. and Bucher, M. (2005). Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. TREND in plant Science 10(1): 22-29.

Kendick, B. 1985. The Fifth Kingdom. Stan Brown Printers Limited, Canada. 363 p.

Li X-L, George, E. and Marschner, H. (1991). Extension of the phosphorus depletion zone in VA-mycorrhizal white clover in calcareous soil. Plant and Soil 136:41-48.

Marschner, H. and Dell, B. (1994). Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. Plant and Soil 159: 89-102.

Newman, E.I., and Reddell, P. (1987). The distribution of mycorrhizas among families of vascular plants. New phytol 106: 745-751.

Parniske, M. (2004). Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Curr. Opin. Plant Biol.7: 414-421.

Phillips, J.M. and Hayman, D.S. (1970). Improved procedures for clearing root and staining parasitic and vescular-arbuscular mycorrhiz al fungi for rapid assessment of infection. Trans. Brit. Mycol. Soc. 55(1): 158-161.

Sieverding, E. (1991). Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza management in Tropical Agrosystem. GTZ GmbH, Germany. 371p.

❑❑❑❑❑

Further Studies of Bioactive Flavonoids from *Kaempferia parviflora*

Chavi Yenjai[1], *Khaetthareeya Sutthanut*[2], *Bungon Sripanidkulchai*[2], *Nate Mungkhun*[1], *Chalayut Wongma*[1], *Siriboon Mukdasai*[1], *Teeraporn Kongkaew*[1]

Abstract

Five flavonoids (1-5) have been isolated from the rhizomes of *Kaempferia parviflora* and their structures were identified on the basis of spectral data. Among these, 5,7-dimethoxyflavone (1) exhibited antifungal activity against *Candida albicans* with an IC_{50} value of 19.98 μg/ml and antimycobacterial activity with a MIC value of 50 μg/ml. However, none of the isolated compounds showed antiplasmodial activity and cytotoxicity against KB, BC and NCI-H187 cell lines. This is the first report of the isolation of compounds 3-5 from this plant.

Key Words : *Kaempferia parviflora*, Flavonoids, Antiplasmodial activity, Antifungal activity, Antimycobacterial activity, Cytotoxicity

[1] Department of Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

[2] Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

Introduction

Kaempferia parviflora (Zingiberaceae), known in Thai as "Kra-Chai-Dam" and formerly known as *Boesenbergia pandurata* black rhizome, has been widely used as a health-promoting herb and for the treatment of anti-gastrointestinal disorders. In Thailand, a commercial tonic drink made from *K. parviflora* rhizomes has been believed to relieve impotent symptoms. In our previous report on this plant, nine flavonoids were isolated and evaluated for their biological activities (Yenjai et al., 2004). In continuation of our research on this plant, we now report the isolation, identification and some biological evaluation of five additional flavonoids.

Materials and Methods

General Experimental Procedures

Column chromatography was carried out on silica gel 60 (0.040-0.063 mm). NMR spectra were recorded in $CDCl_3$/DMSO-d_6 on a Varian Mercury Plus 400 spectrometer, using residual $CHCl_3$ (δ 7.26) and DMSO (δ 2.50) as an internal standard. IR spectra were carried out on a Tensor 27 Bruker (OPUS version 4) or Perkin-Elmer Spectrum One spectrophotometers. ESI-TOF mass spectra were obtained from a Micromass LCT mass spectrometer, and the lock mass calibration was applied for the determination of the accurate mass. Melting points were determined using a Gallenkamp melting point apparatus and were uncorrected.

Plant material

Fresh rhizomes of *K. parviflora* were collected from Loei province, Thailand in May 2003. Plant specimen was verified by Dr. Varima Wongpanich, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University. A voucher specimen (CY 4303) has been deposited at the herbarium of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University.

Extraction and isolation

Dried rhizome powder of *K. parviflora* (1 kg) was macerated twice with CH_2Cl_2 (3 L) at room temperature for three days and the solvent was removed in vacuo to give a CH_2Cl_2 extract (54 g). Then, a portion of this extract (30 g) was subjected to column chromatography on silica gel (300 g) and subsequently eluted with gradient of three solvents (hexane, CH_2Cl_2 and MeOH) by gradually increasing the polarity of eluting solvent system. The eluates were collected and examined by TLC resulting in 35 groups of eluting fractions. Further chromatographic separation of fractions 28, 30 and 31 eluting with hexane-EtOAc gradient yielded 5,7-dimethoxyflavone (**1**, 123 mg), 3,5,7,3′, 4′-pentamethoxyflavone (**2**, 38 mg), and 5,3′-dihydroxy-3,7,4′-trimethoxyflavone (**3**, 15 mg), respectively. Similarly, fraction 33 was chromatographed using EtOAc-MeOH as eluting solvent to give 5 subfractions. Subfractions 2 and 5 were separately rechromatographed using EtOAc-MeOH and CH_2Cl_2-CH_3CN as eluting solvents to afford 5,4′-dihydroxy-7-methoxyflavone (**4**, 7 mg) and 4′-hydroxy-5,7-dimethoxyflavone (**5**, 4 mg), respectively.

Compound 1: colorless crystals (CH_2Cl_2-hexane): m.p. 150.8-151.0 °C; IR(KBr) ν_{max} 1644, 1605, 1351, 1164 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 3.90 (3H, s, OCH_3), 3.94 (3H, s, OCH_3), 6.37

(1H, d, J = 2.2 Hz, H-6), 6.56 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-8), 6.67 (1H, s, H-3), 7.49 (3H, m, Ar-H), 7.86 (2H, m, Ar-H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 55.7 (OCH_3), 56.3 (OCH_3), 92.9 (C-8), 96.2 (C-6), 109.1 (C-3), 109.4 (C-10), 125.9 (C-2′), 128.9 (C-3′), 131.1 (C-4′), 131.6 (C-1′), 159.9 (C-9), 160.7 (C-2), 161.0 (C-5), 164.1 (C-7), 177.5 (C-4); ESI-TOF MS *m/z* 283 $[M+1]^+$.

Compound 2: colorless crystals (CH_2Cl_2-hexane): m.p. 156.0-156.5 °C; IR(KBr) ν_{max} 1625, 1604, 1163 cm^{-1}; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 3.86 (3H, s, OCH_3), 3.89 (3H, s, OCH_3), 3.95 (9H, s, OCH_3), 6.33 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-6), 6.49 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-8), 6.97 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-5'), 7.73 (2H, m, H-2',6'); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 55.7 (OCH_3), 55.9 (OCH_3), 56.0 (OCH_3), 56.4 (OCH_3), 59.9 (OCH_3), 92.4 (C-8), 95.7 (C-6), 109.5 (C-10), 110.8 (C-5′), 111.3 (C-2′), 121.6 (C-6′), 123.4 (C-1′), 141.2 (C-3), 148.7 (C-3′), 150.8 (C-4′), 152.6 (C-2), 158.8 (C-9), 161.0 (C-5), 163.9 (C-7), 174.0 (C-4); ESI-TOF MS *m/z* 373 $[M+1]^+$.

Compound 3: colorless crystals (CH_2Cl_2-MeOH): m.p. 175.0-176.0 °C; IR(KBr) ν_{max} 3399, 1650, 1593, 1497, 1159 cm^{-1}; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 3.80 (3H, s, OCH_3), 3.82 (3H, s, OCH_3), 3.90 (3H, s, OCH_3), 6.23 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-6), 6.41 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-8), 6.92 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-5'), 7.56 (1H, dd, J = 8.7, 2.2 Hz, H-6'), 7.61 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-2'); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz) (55.5 (2xOCH_3), 59.7 (OCH_3), 91.7 (C-8), 97.4 (C-6), 105.4 (C-10), 110.9 (C-5′), 115.0 (C-2′), 120.4 (C-6′), 122.4 (C-1′), 138.3 (C-3), 146.1 (C-3′), 149.9 (C-4′), 155.7 (C-2), 156.3 (C-9), 161.3 (C-5), 165.0 (C-7), 178.3 (C-4); ESI-TOF MS *m/z* 345 $[M+1]^+$.

Compound 4: colorless crystals (CH_2Cl_2-MeOH): m.p. 293.0-294.0 °C; IR(KBr) ν_{max} 3277, 1667, 1605, 1590, 1501, 1377 cm^{-1}; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 3.89 (3H, s, OCH_3), 6.33 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-6), 6.55 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-8), 6.60 (1H, s, H-3), 6.94 (2H, d, J = 9.0 Hz, H-3',5'), 7.81 (2H, d, J = 9.0 Hz, H-2',6'); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz) δ 55.9 (OCH_3), 92.5 (C-8), 98.1 (C-6), 103.4 (C-3), 105.3 (C-10), 116.3 (C-3(,5′), 121.6 (C-1′), 128.4 (C-2′,6′), 157.7 (C-9), 161.6 (C-4′), 161.8 (C-5), 164.6 (C-2), 165.4 (C-7), 182.3 (C-4); ESI-TOF MS *m/z* 285 $[M+1]^+$.

Compound 5: colorless crystals (CH_2Cl_2-MeOH): m.p. 289.0-290.0 °C; IR(KBr) ν_{max} 3435, 2920, 1608, 1414, 1384 cm^{-1}; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 3.79 (3H, s, OCH_3), 3.86 (3H, s, OCH_3), 6.46 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.52 (1H, s, H-3), 6.81 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.87 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-3',5'), 7.82 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-2',6'); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz) δ 61.1 (OCH_3), 61.2 (OCH_3), 98.5 (C-8), 101.3 (C-6), 110.9 (C-3), 113.4 (C-10), 121.3 (C-3′,5′), 125.6 (C-1′), 133.0 (C-2′, 6′), 164.3 (C-5), 165.4 (C-4′), 165.6 (C-2), 166.9 (C-9), 168.8 (C-7), 180.9 (C-4); ESI-TOF MS *m/z* 321.0737 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{17}H_{14}O_5$+Na, 321.0739).

Bioassay

Antimalarial Assay. Antimalarial activity was performed against *Plasmodium falciparum* (K1, multidrug resistant strain) which was cultured continuously according to the method of Trager and Jensen (1976). Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* was determined by means of the microdilution radioisotope technique based on the method described by Desjardins et al. (1979).

The inhibitory concentration (IC_{50}) represents the concentration that causes 50% reduction in parasite growth as indicated by the *in vitro* uptake of [^{3}H] hypoxanthine by *P. falciparum*. The standard compound was artemisinin.

Antifungal Assay. The antifungal activity was assessed against *Candida albicans* using method modified from the soluble formazan assay (Scudiero et al., 1988). The number of living cells was determined by measuring the absorbance of 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) formazan at 450 nm. The standard drug was amphotericin B.

Antimycobacterial Assay. The antimycobacterial activity was assessed against *Mycobacterium tuberculosis* $H_{37}Ra$ using the Microplate Alamar Blue Assay (MABA) (Collins and Franzblau, 1997). The standard drugs, isoniazid and kanamycin sulfate, were used as the reference compounds.

Cytotoxicity Assay. Cytotoxicity assay against human epidermoid carcinoma (KB), human breast cancer cells (BC) and human small cell lung cancer (NCI-H187) cell lines were performed employing the colorimetric method (Skehan et al., 1990). Ellipticine was included as a reference substance.

Results and Discussion

Chromatographic separation of the CH_2Cl_2 extract of the rhizomes of *K. parviflora* gave five flavonoids, 5,7-dimethoxyflavone (**1**) (Jaipetch et al., 1983), 3,5,7,3′,4′-pentamethoxyflavone (**2**) (Herunsalee et al., 1987), 5,3′-dihydroxy-3,7,4′-trimethoxyflavone (**3**) (Guerrero et al., 2002; Matsuda et al., 2002), 5,4′-dihydroxy-7-methoxyflavone (**4**) (Jamzad et al., 2003; Skoula et al., 2005) and 4′-hydroxy-5,7-dimethoxyflavone (**5**) (Lin et al., 2002). Their structures were identified on the basis of spectral data. Compounds 3-5 were isolated from this plant for the first time.

Biological activity testing of the isolated compounds may help to establish a scientific basis for the utilization of *K. parviflora*. Our work focused on antiplasmodial, antifungal, antimycobacterial and cytotoxic activity tests of all isolates, and the results are shown in Table 1. Compound **1** showed antifungal activity against *Candida albicans* with an IC_{50} value of 19.98 μg/ml and antimycobacterial activity with a MIC value of 50 μg/ml. In our point of view, the mono-substitution at the aromatic ring B is likely essential for antimycobacterial and antifungal activities. All of the isolated compounds (**1-5**) possessed no antiplasmodial activity and cytotoxicity against KB, BC and NCI-H187 cell lines.

Acknowledgements

We are indebted to the Biodiversity Research and Training Program (BRT) for financial support. Bioassay Research Facility of BIOTEC is gratefully acknowledged for biological activity tests. We are grateful to the National Research Council of Thailand (NRCT) for the partial support.

References

Collins, L.A. and Franzblau, S.G. (1997). Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. Antimicrob. Agents Chemother. 41:1004-1009.

Desjardins, R.E., Canfield, C.J., Haynes, J.D. and Chulay, J.D. (1979). Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. Antimicrob. Agents Chemother. 16:710-718.

Guerrero, M.F., Puebla, P., Martin, M.L., Carron, R., Roman, L.S., Reguero, M.T. and Arteaga, L. (2002). Inhibitory effcect of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester on the anti-adrenergic response elicited by ayanin in the pithed rat. Planta Med. 68:322-325.

Herunsalee, A., Pancharoen, O. and Tuntiwachwuttikul, P. (1987). Further studies of flavonoids of the black rhizomes *Boesenbergia pandurata*. J. Sci. Soc. Thailand. 13:119-122.

Jaipetch, T., Reutrakul, V., Tuntiwachwuttikul, P. and Santisuk, T. (1983). Flavonoids in the black rhizomes of *Boesenbergia pandurata*. Phytochemistry. 22:625-626.

Jamzad, Z., Grayer, R.J., Kite, G.C., Simmonds, M.S.J., Ingrouille, M. and Jalili, A. (2003). Leaf surface flavonoids in Iranian species of Nepeta (Lamiaceae) and some related genera. Biochem. Sys. Eco. 31:587-600.

Lin, Y.M., Zhou, Y., Flavin, M.T., Zhou, L.M., Nie, W. and Chen, F.C. (2002). Chalcones and flavonoids as antituberculosis agents. Bioorg. Med. Chem. 10:2795-2802.

Matsuda, H., Morikawa, T., Toguchida, I. and Yoshikawa, M. (2002). Structural requirements of flavonoids and related compounds for aldose reductase inhibitory activity. Chem. Pharm. Bull. 50:788-795.

Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D. and Boyd, M.R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res. 48(17):4827-4833.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenny, S. and Boyd, M.R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. J. Natl. Cancer Inst. 82:1107-1112.

Skoula, M., Grayer, R.J. and Kite, G.C. (2005). Surface flavonoids in *Satureja thymbra* and *Satureja spinosa* (Lamiaceae). Biochem. Sys. Eco. 33:541-544.

Trager, W. and Jensen, J.B. (1976). Human malaria parasite in continuous culture. Science. 193:673-675.

Yenjai, C., Prasanphen, K., Daodee, S., Wongpanich, V. and Kittakoop, P. (2004). Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. Fitoterapia. 75:89-91.

Table 1 Biological activities of flavonoids **1-5***

Compound	Antiplasmodial IC_{50} (μg/ml)	Antifungal IC_{50} (μg/ml)	Antimycobacterial MIC (μg/ml)	Cytotoxicity IC_{50} (μg/ml)
1	inactive[a]	19.98	50	inactive[d]
2	inactive[a]	inactive[b]	inactive[c]	inactive[d]
3	inactive[a]	inactive[b]	inactive[c]	inactive[d]
4	inactive[a]	inactive[b]	inactive[c]	inactive[d]
5	inactive[a]	inactive[b]	inactive[c]	inactive[d]
Artimisinin	0.001	-	-	-
Amphotericin B	-	0.01-0.02	-	-
Isoniazid	-	-	0.04-0.09	-
Kanamycin sulfate	-	-	2.0-5.0	-
Ellipticin	-	-	-	0.1-0.3

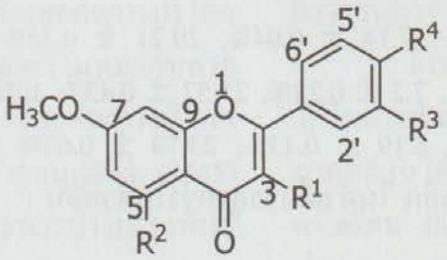
* Data shown are typical values from replicate experiments.

[a] inactive at > 20 μg/ml.

[b] inactive at > 50 μg/ml.

[c] inactive at > 200 μg/ml.

[d] inactive at > 20 μg/ml.



Compound	R^1	R^2	R^3	R^4
1	H	OCH_3	H	H
2	OCH_3	OCH_3	OCH_3	OCH_3
3	OCH_3	OH	OH	OCH_3
4	H	OH	H	OH
5	H	OCH_3	H	OH

Figure 1 Chemical structures of flavonoids **1-5**

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน และกรดไขมันของจิ้งหรีดทองลาย (*Gryllus* sp.) ที่เลี้ยงเพื่อการค้า

บรรจง เชื้อเมืองพาน[1] วิรัช ว่องพัฒนากุล[2] และ ปวีณา พงษ์ดนตรี [1]

บทคัดย่อ

จิ้งหรีดทองลาย (*Gryllus* sp.) เป็นจิ้งหรีดที่ได้รับการพัฒนาให้มีการเพาะเลี้ยงเพื่อการค้าในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เพื่อการบริโภค และใช้เลี้ยงสัตว์ที่ชอบกินแมลง การศึกษาปริมาณน้ำมัน ชนิดและปริมาณกรดไขมัน โดยเฉพาะกรดไขมันจำเป็นที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการต่างๆ ภายในร่างกาย ที่จะได้รับจากการบริโภคแมลง จึงมีความสำคัญต่อผู้บริโภค งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาปริมาณน้ำมัน ชนิดและปริมาณกรดไขมันในจิ้งหรีดทองลาย โดยแยกศึกษาทั้งในจิ้งหรีดทองลายในระยะตัวอ่อน และตัวเต็มวัย ทั้งเพศเมียและเพศผู้ ซึ่งจากการศึกษาปริมาณน้ำมันโดยวิธี Soxhlet extraction เพื่อหาปริมาณน้ำมันต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม พบว่า จิ้งหรีดในระยะตัวอ่อน มีปริมาณน้ำมันมากกว่า ตัวเต็มวัยเพศเมีย และตัวเต็มวัยเพศผู้ ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 24.11 ± 0.37%, 17.32 0.09% และ13.13 ± 0.42% ตามลำดับ การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันด้วยวิธี ก๊าซโครมาโตกราฟี พบกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักในจิ้งหรีดทองลายในระยะตัวอ่อน ตัวเต็มวัยเพศเมีย และตัวเต็มวัยเพศผู้ 4 ชนิด คือ กรดปาล์มิติก กรดสเตียริก กรดโอเลอิก และ กรดลิโนเลอิก ซึ่งพบในระยะตัวอ่อน 34.01 ± 0.35%, 7.14 ± 0.04%, 29.21 ± 0.35% และ29.65 ± 0.03% ตามลำดับ พบในตัวเต็มวัยเพศเมีย 32.25 ± 0.30%, 7.2 ± 0.22%, 25.57 ± 0.43%, และ 35.99 ± 0.09% ตามลำดับ และพบในตัวเต็มวัยเพศผู้ 33.32 ± 2.10%, 8.19 ± 0.13%, 23.79 ± 0.62% และ 34.71 ± 1.61% ตามลำดับ โดยพบกรดไขมันจำเป็น คือ กรดลิโนเลอิก ในตัวเต็มวัยสูงกว่าในตัวอ่อน

Abstract

Thonglai cricket (*Gryllus* sp.) is kept for commercial purpose in the Northeast of Thailand, as domestic cuisine and animal feeds. Study of lipid content and fatty acid composition of the cricket, especially for essential fatty acids that play vital roles in several biological mechanisms, is, therefore, important. This research was focused on analysis of lipid content and fatty acid composition of the Thonglai cricket in nymph and adult both female and male. Soxhlet extraction was used to analyze lipid content which expressed in gram of lipid per 100 gram dry weight cricket. Nymph contained more lipid than female adult

[1]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002
[2]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

and male adult; i.e. 24.11 ± 0.37%, 17.32 ± 0.09%, 13.13 ± 0.42%, respectively. Analysis of fatty acid composition using gas chromatography showed the cricket mainly composed of 4 fatty acids; palmitic acid, stearic acid, oleic acid and linoleic acid. Nymphs contained 34.01 ± 0.35%, 7.14 ± 0.04%, 29.21 ± 0.35% and 29.65 ± 0.03% of the fatty acids respectively. Female adults consisted of 32.25 ± 0.30%, 7.2 ± 0.22%, 25.57 ± 0.43% and 35.99 ± 0.09% of the fatty acids, respectively. Whereas, male adults consisted of 33.32 ± 2.10%, 8.19 ± 0.13%, 23.79 ± 0.62% and 34.71 ± 1.61% of the fatty acids, respectively. Adult crickets exhibited higher content of essential fatty acid, linoleic, than nymph.

บทนำ

จิ้งหรีดเป็นแมลงชนิดหนึ่งที่ชาวบ้านในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือนิยมนำมาบริโภคเช่นเดียวกับแมลงอีกหลายๆ ชนิด อาทิ ตั๊กแตน แมลงกินูน แมลงดานา แมลงกุดจี่ ฯลฯ โดยจิ้งหรีดสามารถนำมาปรุงเป็นอาหารได้หลายประเภท อาทิ กี่ หรือจี่ (ภาษาอีสาน: เผาไฟ) คั่ว ทอด ยำ หมก ป่น ลาบ เสียบไม้ย่าง (กัณฑ์วีร์ วิวัฒน์พาณิชย์, 2542) หรือใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์ทุกชนิดที่ชอบกินแมลง ทั้งให้กินสดและใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ แต่อย่างไรก็ตามการจับแมลงเพื่อนำมาบริโภคตามวิธีของชาวบ้าน เช่น การล่อแมลงโดยใช้ไฟสีม่วง ทำให้ได้แมลงหลายชนิด แต่ส่งผลให้แมลงบางชนิดลดจำนวนลงจนใกล้สูญพันธุ์และไม่เพียงพอต่อการบริโภค ดังนั้น เพื่อเป็นการลดการทำลายความหลากหลายของแมลง และเพิ่มปริมาณ ให้เพียงพอต่อการบริโภค ทัศนีย์ แจ่มจรรยา และชาญชัย ถาวรอนุกูลกิจ, (2545) จึงได้ทำการวิจัยการเพาะเลี้ยงและการปรับปรุงพันธุ์แมลงที่เป็นอาหารของมนุษย์ โดยมีความสนใจการเพาะเลี้ยงและการปรับปรุงพันธุ์จิ้งหรีด

จิ้งหรีด (Cricket) เป็นแมลงที่อยู่ใน Class Insecta, Order Orthoptera, family Gryllidae ถ้าแบ่งจิ้งหรีดตามภูมิประเทศที่อาศัยอยู่ สามารถแบ่งจิ้งหรีดได้นับร้อยชนิด แต่ที่พบในประเทศไทยและที่นิยมนำมาบริโภคกันนั้น เป็นจิ้งหรีดที่มีขนาดแตกต่างกัน ได้แก่ จิ้งโกร่ง หรือจิโปม (*Brachytrupes portentosus* Lichtenstein) เป็นจิ้งหรีดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด สีน้ำตาล ลำตัวกว้างประมาณ 1 ซม. ยาวประมาณ 3.5 ซม. มีหัวกลมโต สีเหลืองเข้ม, สีน้ำตาลแดง หรือสีแดงเข้ม นอกจากนั้นยังมีจิ้งหรีดทองดำ (*Gryllus bimaculatus* Degeer) เป็นจิ้งหรีดขนาดกลาง มีลักษณะเด่น คือ ลำตัว ขา หัว มีสีดำสนิท ลำตัวกว้างประมาณ 0.7 ซม. ยาวประมาณ 3 ซม. และยังนิยมบริโภค จิ้งหรีดทองแดง (*Teleogryllus testaceus* Walker) ที่เป็นจิ้งหรีดขนาดกลางเช่นเดียวกัน โดยมีลำตัวกว้างประมาณ 0.6 ซม. ยาวประมาณ 2.73 ซม. ลักษณะเด่น คือ ลำตัว หัว ขา มีสีน้ำตาล น้ำตาลเข้ม หรือน้ำตาลแดงเข้ม และจิ้งหรีดทองลาย (*Gryllus* sp.) เป็นจิ้งหรีดขนาดเล็ก ลำตัวกว้างประมาณ 0.55 ซม. ยาวประมาณ 2.5 ซม. ลำตัวมีสีน้ำตาลลาย เพศผู้มีสีเข้มกว่าเพศเมีย เพศเมียมีอวัยวะวางไข่ยาวประมาณ 1.5 ซม. (ทัศนีย์ แจ่มจรรยา และชาญชัย ถาวรอนุกูลกิจ, 2545)

จิ้งหรีดทองลาย (*Gryllus* sp.) เป็นจิ้งหรีดที่ได้รับการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยง จนปัจจุบันเกษตรกรภาคอีสานได้มีการเลี้ยงจิ้งหรีดเป็นอาชีพเสริมหลายครัวเรือน และมีผู้นิยมบริโภคเป็นจำนวนมาก สาเหตุที่มีผู้นิยมบริโภคและมีการเพาะเลี้ยงจิ้งหรีดทองลายกันเป็นจำนวนมากนั้น เนื่องจาก มีวงจรชีวิตที่สั้นประมาณ 40-60 วัน ขั้นตอนการเลี้ยงไม่ยุ่งยาก มีรสชาติอร่อย ทั้งนี้ส่วนหนึ่งที่ทำให้แมลงมีรสชาติอร่อยเนื่องจากมีไขมันเป็นตัวผสานให้องค์ประกอบอื่นของอาหารเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน และในปัจจุบันไขมันจากอาหารได้รับการศึกษาบทบาทที่มีผลต่อสุขภาพของผู้บริโภคมากขึ้น เนื่องจากชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในไขมันและน้ำมันในอาหารที่บริโภคจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการต่างๆ ภายในร่างกาย กรดไขมันสามารถจำแนกออกเป็น

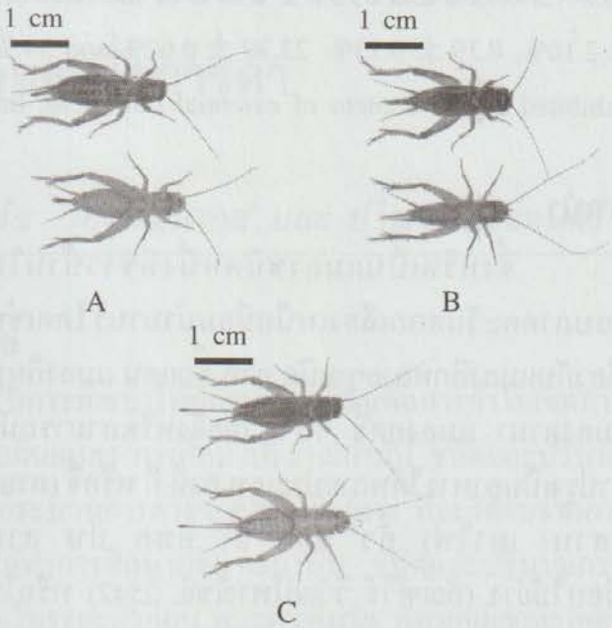
กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid : SFA) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่ไม่มีพันธะคู่, กรดไขมันที่มีพันธะคู่หนึ่งตำแหน่ง (Monounsaturated fatty acid : MUFA) และกรดไขมันที่มีพันธะคู่ตั้งแต่ 2 ตำแหน่งขึ้นไป (Polyunsaturated fatty acid : PUFA) กรดไขมันแต่ละชนิดมีบทบาทต่อผู้บริโภคทั้งประโยชน์และโทษแตกต่างกัน อาทิ การได้รับกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว คือ กรดปาล์มิติก (C16:0), กรดไมริสติก (C14:0) และกรดลอริก (C12:0) ในสัดส่วนที่มากว่ากรดไขมันชนิดอื่น ส่งผลให้ระดับคอเลสเตอรอล ในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น ซึ่งตรงกันข้ามกับ กรดสเตียริก (C18:0) ที่ไม่มีผลต่อระดับคอเลสเตอรอล ในกระแสเลือด (Lauer and Clarke, 1990; Knip and Nuutinen, 1993; Guo et al., 1994) การได้รับกรดไขมันไม่อิ่มตัว คือ กรดโอเลอิก (C18:1) และกรดลิโนเลอิก (C18:2) ในสัดส่วนที่มากว่ากรดไขมันชนิดอื่น ส่งผลให้ระดับคอเลสเตอรอล ใน LDL (คอเลสเตอรอล ที่เป็นอันตราย) ในกระแสเลือดลดลง แต่ไม่ทำให้ระดับคอเลสเตอรอล ใน HDL (คอเลสเตอรอล ที่เป็นประโยชน์) ลดลง (Lifshitz and Tarim, 1992; Niklas et al., 1992; Rowland and Freedson, 1994) นอกจากนั้นกรดลิโนเลอิก (C18:2) และ กรดลิโนเลนิก (C18:3) ยังมีบทบาทที่สำคัญโดยเป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย (Essential fatty acid) เป็นต้น

ดังนั้น ในการศึกษาปริมาณน้ำมัน ชนิดและปริมาณกรดไขมันในจิ้งหรีดทองลาย ที่สามารถบ่งถึงคุณค่าทางโภชนาการ ที่ผู้บริโภคจะได้รับจากการบริโภคจึงมีความสำคัญ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาปริมาณน้ำมัน ชนิดและปริมาณกรดไขมันในจิ้งหรีดทองลาย โดยแยกศึกษาทั้งในจิ้งหรีดทองลายในระยะตัวอ่อน และตัวเต็มวัยทั้งเพศเมียและเพศผู้

วิธีการวิจัย

1. ตัวอย่างจิ้งหรีดทองลาย

จิ้งหรีดทองลาย (*Gryllus* sp.) ได้รับความอนุเคราะห์จาก นายประยุทธ เนื่องมหา เกษตรผู้เพาะเลี้ยงจิ้งหรีดทองลาย บ้านเหล่าโพนทอง ต.บ้านหว้า อ.เมือง จ.ขอนแก่น นำมาคัดแยกเป็น 3 กลุ่ม คือ ระยะตัวอ่อน (Nymph) ตัวเต็มวัยเพศเมีย (Female Adult) และตัวเต็มวัยเพศผู้ (Male Adult) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 จิ้งหรีดทองลาย (*Gryllus* sp.)
A = ระยะตัวอ่อน (Nymph)
B = ตัวเต็มวัยเพศเมีย (Female Adult)
C = ตัวเต็มวัยเพศผู้ (Male Adult)

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน

นำตัวอย่างจิ้งหรีดทองลายที่คัดแยกเป็น 3 กลุ่ม คือ ระยะตัวอ่อน ตัวเต็มวัยเพศเมีย และตัวเต็มวัยเพศผู้ โดยนำตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม อบไล่ความชื้นที่ 70 °C จนน้ำหนักคงที่ จากนั้นจึงนำตัวอย่างที่อบแห้ง 2 กรัม ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันด้วยวิธี Soxhlet extraction (Baker, 1984) โดยใช้ Pretroleum ether เป็นตัวสกัด ผ่าน Soxhlet HT system เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รายงานปริมาณน้ำมันในหน่วยเปอร์เซ็นต์น้ำมันต่อน้ำหนักแห้ง

3. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมัน

นำตัวอย่างน้ำมันที่สกัดได้ในข้อ 2 มาทำการไฮโดรไลซ์กรดไขมันและเติมหมู่เมธิล (Methylation) ด้วยวิธีของ Ruiz et al. (2003) ให้กรดไขมัน

อยู่ในรูปของ Fatty acid methyl ester เพื่อนำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันด้วยเทคนิค Gas liquid chromatography (GC) โดยชั่งตัวอย่างน้ำมัน 0.01 กรัม ใส่ใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายที่ประกอบด้วย Methanol:Toluene:Dimethoxypropane (DMP): H_2SO_4 อัตราส่วน 39:20:5:2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่มี heptadecanoic acid (17:0) ปริมาณ 3 มิลลิกรัม เป็น Internal standard เขย่าประมาณ 10 วินาที นำไปบ่มในตู้อบ ที่ 80°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม 0.9% NaCl 200 ไมโครลิตร เติม heptane 200 ไมโครลิตร เขย่าประมาณ 10 วินาที และทิ้งไว้ข้ามคืนที่ -20°C เพื่อให้เกิดการแยกชั้นที่สมบูรณ์ (ชั้นบน คือ ชั้นของ Fatty acid methylester) ก่อนนำสารละลายชั้นบนไปวิเคราะห์กรดไขมันด้วยเครื่อง Gas Chromatography (Shimadzu 14B, Japan) ชนิดของกรดไขมันวิเคราะห์ได้จากการเปรียบเทียบ Retention time กับกรดไขมันเอสเทอร์มาตรฐาน (SIGMA, USA) กรดไขมันแต่ละชนิดรายงานผลในรูปของเปอร์เซ็นต์กรดไขมันต่อกรดไขมันทั้งหมด

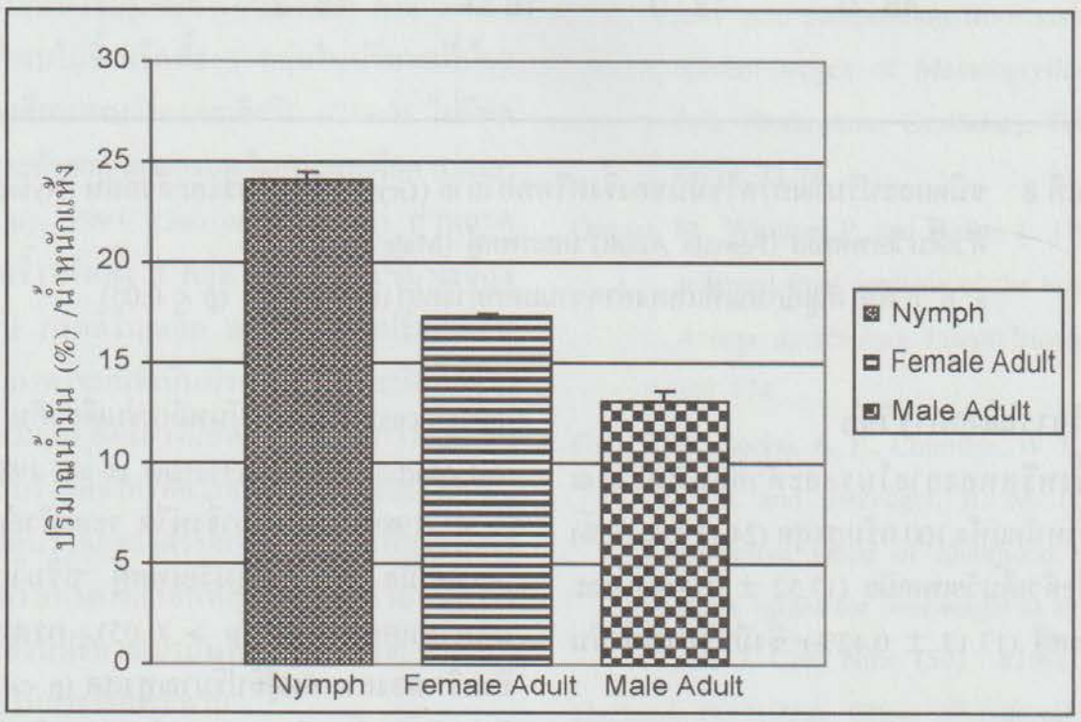
4. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ข้อมูลจากการวิจัยทั้งปริมาณน้ำมัน และชนิดและปริมาณกรดไขมันถูกนำมาวิเคราะห์หาค่าความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี One-Way ANOVA ในโปรแกรม SPSS Version 13.0 สัญลักษณ์ที่แตกต่างกันแสดงข้อมูลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ผลการวิจัย

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน

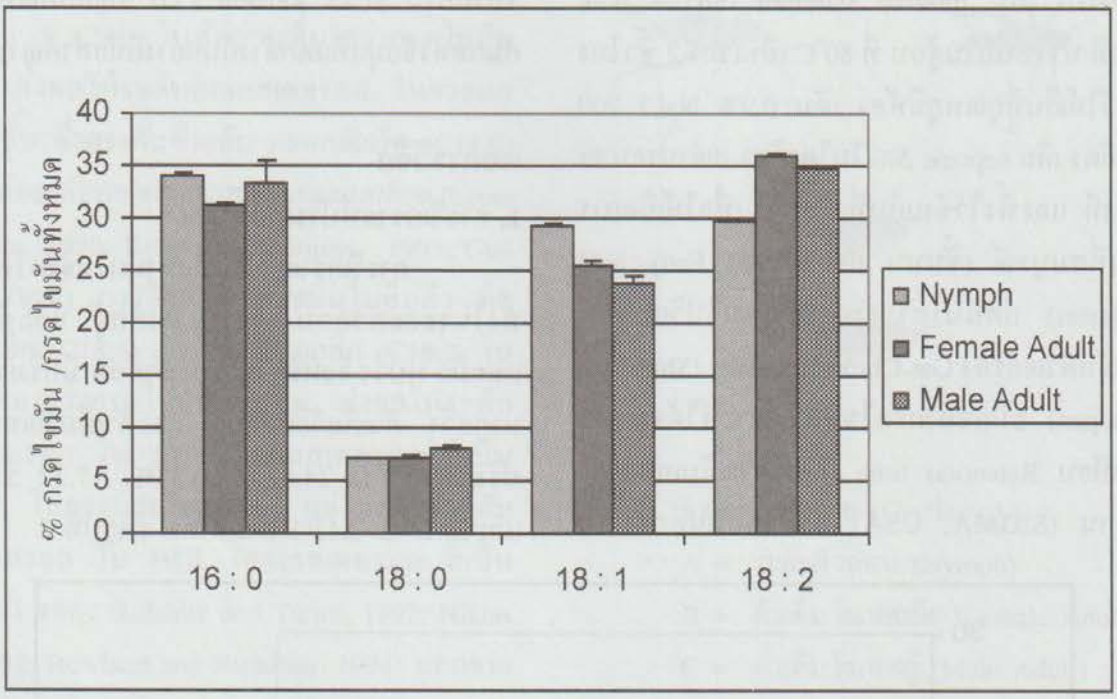
การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันในจิ้งหรีดทองลายทั้งในระยะตัวอ่อน ตัวเต็มวัยเพศผู้ และตัวเต็มวัยเพศเมีย พบว่า จิ้งหรีดในระยะตัวอ่อน มีปริมาณน้ำมันมากกว่า ตัวเต็มวัยเพศเมีย และตัวเต็มวัยเพศผู้ ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 24.11 ± 0.37%, 17.32 ± 0.09% และ13.13 ± 0.42% ตามลำดับ ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ปริมาณน้ำมันในจิ้งหรีดทองลาย (*Gryllus* sp.) ในระยะตัวอ่อน (Nymph) ตัวเต็มวัยเพศเมีย (Female Adult) และเพศผู้ (Male Adult) a, b, c คือ สัญลักษณ์ที่แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

2. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมัน

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันในจิ้งหรีดทองลาย ด้วยวิธี Gas liquid chromatography (GLC) พบกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักในจิ้งหรีดทองลายในระยะตัวอ่อน ตัวเต็มวัยเพศเมีย และตัวเต็มวัยเพศผู้ 4 ชนิด คือ กรดปาล์มิติก (16 : 0) กรดสเตียริก (18 : 0) กรดโอเลอิก (18 : 1) และกรดลิโนเลอิก (18 : 2) ซึ่งพบในระยะตัวอ่อน 34.01 ± 0.35%, 7.14 ± 0.04%, 29.21 ± 0.35% และ 29.65 ± 0.03% ตามลำดับ พบในตัวเต็มวัยเพศเมีย 32.25 ± 0.30%, 7.2 ± 0.22%, 25.57 ± 0.43%, และ 35.99 ± 0.09% ตามลำดับ และพบในตัวเต็มวัยเพศผู้ 33.32 ± 2.10%, 8.19 ± 0.13%, 23.79 ± 0.62%และ 34.71 ± 1.61% ตามลำดับ ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 ชนิดและปริมาณกรดไขมันของจิ้งหรีดทองลาย (*Gryllus* sp.) ในระยะตัวอ่อน (Nymph) ตัวเต็มวัยเพศเมีย (Female Adult) และเพศผู้ (Male adult)
a, b, c คือ สัญลักษณ์ที่แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จิ้งหรีดทองลายในระยะตัวอ่อนมีปริมาณน้ำมันต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัมสูงสุด (24.11 ± 0.37%) รองลงมาคือตัวเต็มวัยเพศเมีย (17.32 ± 0.09%) และตัวเต็มวัยเพศผู้ (13.13 ± 0.42%) ซึ่งมีปริมาณน้ำมันต่ำที่สุด

ในส่วนการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมัน พบกรดไขมันหลักในจิ้งหรีด ทั้งในตัวอ่อน ตัวเต็มวัยเพศเมีย และตัวเต็มวัยเพศผู้ 4 ชนิด คือ กรดปาล์มิติก กรดสเตียริก กรดโอเลอิก และกรดลิโนเลอิก ซึ่งพบว่าจิ้งหรีดบ้าน (house cricket : Acheta domesticus) มีกรดไขมันหลักเช่นเดียวกัน (Hutchins and Martin, 1968; McFarlane et al., 1984; Grapes et al., 1989) และพบว่าจิ้งหรีด ระยะตัวอ่อน ตัวเต็มวัยเพศเมีย และตัวเต็มวัยเพศผู้ ปริมาณกรดปาล์มิติกไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$), กรดสเตียริกในจิ้งหรีดทองลายเพศผู้มีปริมาณสูงสุด ($p < 0.05$), กรดโอเลอิกในจิ้งหรีดทองลายในระยะตัวอ่อนสูงสุด ($p < 0.05$) และพบกรดลิโนเลอิก ในตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมียสูงกว่าในตัวระยะอ่อน ($p < 0.05$) ซึ่งมีปริมาณของกรดลิโนเลอิกใกล้เคียงกับจิ้งหรีดดำ (Black cricket : Melanogryllus desertus Pall) (Bozkus,

2002) ที่ได้ทำการวิเคราะห์ใน จากการศึกษาทั้งหมด จึงอาจกล่าวได้ว่าการบริโภคจิ้งหรีดทองลายเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคในแง่ชนิดและปริมาณกรดไขมัน เนื่องจากในจิ้งหรีดทั้ง 3 กลุ่มพบกรดไขมันที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย 2 ชนิด คือ กรดลิโนเลอิก ซึ่งเป็นกรดไขมันจำเป็น (essential fatty acids) และกรดโอเลอิกในปริมาณที่สูง โดยพบว่ากรดไขมันทั้ง 2 ชนิด สามารถส่งผลให้ระดับ คอเลสเตอรอล จาก LDL ที่ถูกจัดว่าเป็นไขมันตัวร้าย ในกระแสเลือดลดลง แต่ไม่ทำให้ระดับ คอเลสเตอรอล ใน HDL ที่ถูกจัดว่าเป็นไขมันตัวดีลดลง (Lifshitz and Tarim, 1992; Niklas et al., 1992; Rowland and Freedson, 1994) และยังพบว่ากรดไขมันทั้ง 2 ชนิด มีบทบาทต่อการยับยั้งการเกิดโรคหัวใจ โรคความดันเลือดสูง และโรคเบาหวาน (Haglund, 1998) กรดโอเลิกยังมีบทบาทในการลดระดับโปรตีนที่ทำหน้าขนส่ง คอเลสเตอรอลเอสเทอร์ ซึ่งเกี่ยงข้องกับ atherogenic factor (Marotti et al., 1993; Tato et al., 1995) ส่วนกรดสเตียริกถึงแม้จะเป็นกรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid : SFA) แต่ก็พบในจิ้งหรีดทั้ง 3 กลุ่มในปริมาณที่น้อย และจากการศึกษาพบว่ากรดสเตียริก (C18:0) ไม่มีผลต่อการเพิ่มระดับคอเลสเตอรอล ในกระแสเลือด (Lauer, 1990 ; Knip, 1993; Guo et al., 1994) ส่วนกรดปาล์มิติกในจิ้งหรีดทั้ง 3 กลุ่ม ถึงแม้จะมีปริมาณที่สูงเทียบเท่ากับ กรดลิโนเลอิก แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบสัดส่วนกับกรดไขมันที่เป็นประโยชน์ 2 ชนิดที่กล่าวไว้ข้างต้นรวมกัน ยังถือว่ามีสัดส่วนที่น้อยกว่ามาก อีกนัยหนึ่งการบริโภคจิ้งหรีดควรจะบริโภคคละเคล้ากันทั้ง 3 กลุ่ม ซึ่งผู้บริโภคจะได้รับกรดลิโนเลอิกที่สูงจากตัวเต็มวัย ได้รับกรดโอเลอิกที่สูงในระยะตัวอ่อน อีกทั้งตัวอ่อนยังมีปริมาณน้ำมันที่สูงสุด ซึ่งจะช่วยเพิ่มความอร่อยในการรับประทาน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัยในครั้งนี้ นายประยุทธ เนื่องมหา ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างจิ้งหรีดทองลาย และบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ได้ให้การสนับสนุนในการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กัณฑ์วีร์ วิวัฒน์พานิชย์. (2542). แมลงอาหารมนุษย์ในอนาคต. (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: บริษัทสามเจริญพาณิชย์ จำกัด. 45-53.

ทัศนีย์ แจ่มจรรยา และ ชาญชัย ถาวรอนุกูลกิจ. (2545). รายงานการวิจัยการเพาะเลี้ยงและการปรับปรุงพันธุ์แมลงที่เป็นอาหารของมนุษย์. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

Baker, D. (1984). Fat in flour, acid hydrolysis method. In : Official method of analysis of the AOAC (William S. ed., 14 th ed.) Virginia : The William Byrd Press. Inc. 251-252.

Bozkus, K. (2002). Phospholipid and triacylglycerol fatty acid composition from various development stages of *Melanogryllus Desertus* Pall. (Orthoptera: Gryllidae). Turk J. Biol. (27) : 73-78.

Grapes, M., Whiting, P. and Dinan, L. (1989). Fatty acid and lipid analysis of the house cricket, *Acheta domesticus*. Insect Biochem. (19) : 767-774.

Guo, S. S., Roche, A. F., Chumlea, W. C., Gardner, J. D. and Siervogel, R. M. (1994). The predictive value of childhood body mass index values for overweight at age 35 years. Am. J. Clin. Nutr. (59) : 810-819.

Haglund, O. (1998). Effect of fish oil alone and combined with long chain (n-6) fatty acid on some coronary risk factor in male subject. Nutrition Biochem. (9) : 629 - 625.

Hutchins, R. F. N. and Martin, M. N. (1968). Lipids of the common house cricket, *Acheta domesticus*, Lipid classes and fatty acid distribution. Lipids. (3) : 247- 249.

Knip, M. and Nuutien, O. (1993). Long-term effects of weight reduction on serum lipids and plasma insulin in obese children. Am. J. Clin. Nutr. (57) : 490-493.

Lauer, R. M. and Clarke, W. R. (1990). Use of cholesterol measurement in childhood for the prediction of adult hypercholesterolemia. JAMA. (264) : 3034.

Lifshitz, F. and Tarim, O. (1993). Nutritional dwarfing. Curr. Prob. Pediatr. (8) : 322-336.

Marotti, K. R., Castle C. K., Boyle, T. P., Lin, A. H., Murry, R. W. and Melchior, G. W. (1993). Severe Atherosclerosis in Transgenic Mice Expressing Simian Cholesteryl Eater Transfer Protein. Nature. (364) : 73 - 75.

McFarlane, J. E., Alli, I. and Steeves, E. (1984). Studies on the group effect in *Acheta domesticus* (L.) using artificial diets. J. Insect Physiol. (30) : 103-107.

Nicklas, T. A., Webber, L. S., Koschak, M. and Berenson, G. S. (1992). Nutrient adequacy of low fat intakes for children : the Bogalusa heart study. Pediatrics. (2) : 221-228.

Rowland, T. W. and Freedson, P. S. (1994). Physical activity, fitness and health in children : a close look. Pediatrics. (93) : 669-672.

Ruiz, L. N., Martinez, F. E. and Garces, R. (2003). Sequential one-step extraction and analysis of triacylglycerols and fatty acids in plant tissues. Analytical Biochemistry. (317) : 247-254.

Tato, F., Vega,G.L., Tall, A. R. and Grundy S. M. (1995). Relation between cholesterol ester transfer protein activities and lipoprotein cholesterol in patient with hypercholesterolemia and combined hyperlipidemia. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology. (15) : 112 - 120.

❑❑❑❑❑

ว.วิทย. มข. 35(1) 95-107 (2550) KKU Sci. J.35(1) 95-107 (2007)

Chiral Separation of Some β-blocker Drugs by Capillary Electrophoresis

การแยกสารไครอลของตัวยาเบต้า-บลอคเกอร์บางชนิด โดยเทคนิคแค็บพิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส

Janpen Intaraprasert[1]

Abstract

In this study, capillary electrophoresis technique for the enantiomeric separation of propranolol, metoprolol and selected synthetic precursors and metabolites was undertaken in order to understand the chiral separation mechanism by using β-CD as a chiral selector and to measure enantiomeric excess. Native β-cyclodextrin (β-CD) was used as chiral selector to provide enantio-differentitation through host-guest interaction differences. It was found that enantiomeric resolution and separation were achieved for all selected synthetic precursors and metabolites, except propranolol and metoprolol, using borate-acetate buffer comprising 80 mM β-CD.

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้ได้ใช้ เทคนิคทางแค็บพิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อแยกสารที่เป็นไอโซเมอร์ของโปรพราโนลอล เมโทโปรลอล สารตั้งต้นในการสังเคราะห์และเมตาบอไลท์เพื่อให้เกิดความเข้าใจกลไกการแยกสารไครอลและวัดค่า enantiomeric excess โดยใช้เบต้า-ไซโคลเด็กทริน เป็นตัวแยกแบบ host-guest interaction สำหรับแยกสารที่เป็นไอโซเมอร์ พบว่าสามารถแยกสารตั้งต้นในการสังเคราะห์และเมตาบอไลท์ให้อยู่ในรูปของแต่ละไอโซเมอร์ได้โดยใช้บอเรต-อะซีเตตบัฟเฟอร์ และเบต้า-ไซโคลเด็กทริน เข้มข้น 80 มิลลิโมลาร์ แต่ไม่สามารถแยกโปรพราโนลอล และเมโทโปรลอลได้

Keywords: capillary electrophoresis, enantiomer separation, β-blocker drugs, propranolol, metoprolol, synthetic precursors

[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Rajathanee University, 34190

Introduction

Propranolol and metoprolol are prescribed drugs belonging to a class of compounds known as beta-blockers, which are used to treat hypertension, aggression, migraine, angina pectoris, dysfunctional labour, and arrhythmia. Figure 1 shows the chemical structures of these pharmaceuticals and their common structural functionality. They are commercially manufactured as racemic mixtures, and are extensively metabolised in men and animals (Walle et al., 1985). In many countries, for example in Australia, there have been reported cases at which propranolol has been used illegally in horse and greyhound racing competitions to reduce the heart rate of the animals, consequently, inhibiting performance (Vine et al., 1992).

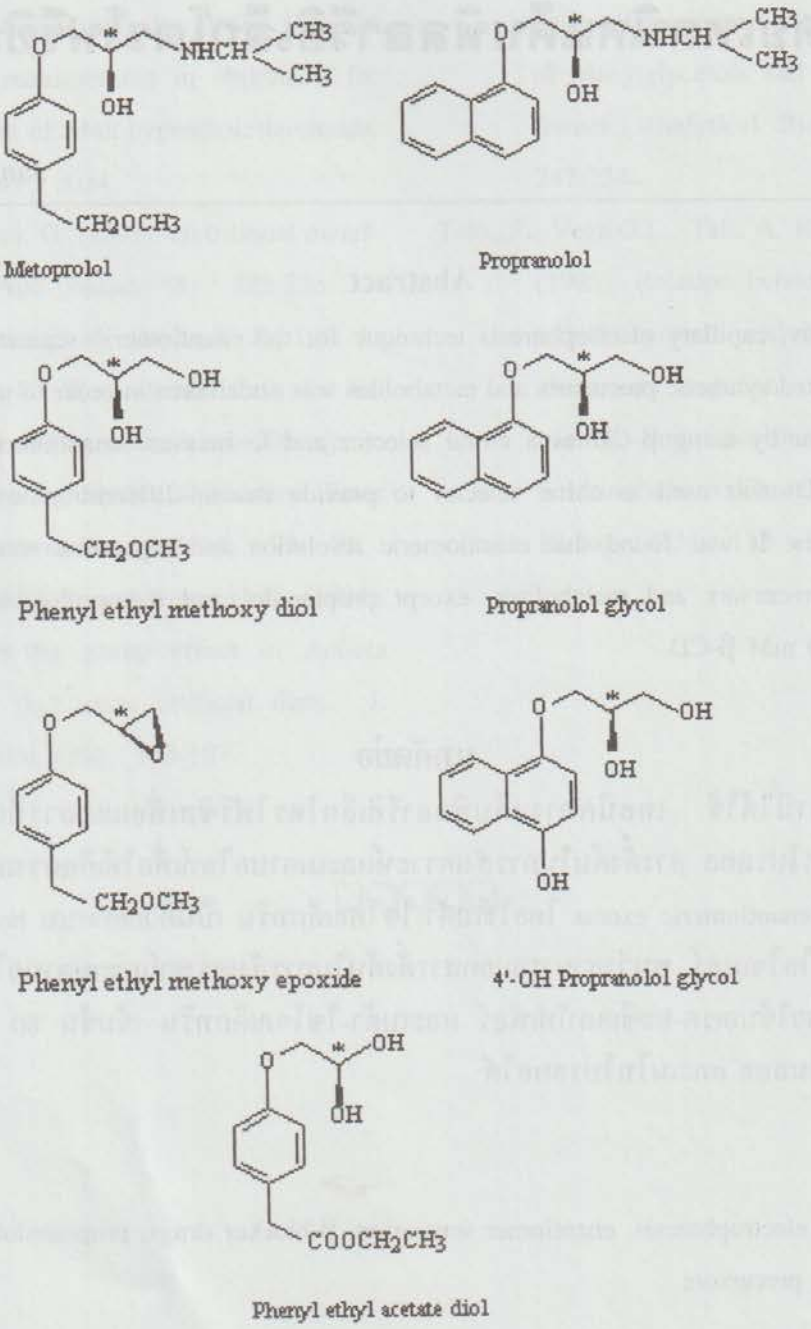


Figure 1 The structures of selected β-blocker pharmaceuticals and their precursors and their common structural functionality (Pak et al. 1998)

Recent pharmacological research has that the (-)-(S)-form of these pharmaceuticals is significantly more potent than the (+)-R-form (Marathe et al., 1994). Therefore, it becomes necessary to enhance the resolution and isolation techniques for the racemate, or to perform enantioselective syntheses and subsequent rapid and sensitive analysis to provide pure isomeric standards of the drug metabolites.

The U.S. Food and Drug Administration have strict regulations for the purity of substances used in the drug industry. Thus, the pure enantiomeric standard preparation should be used in further research to determine the individual metabolism of each enantiomer and for the detection of their unlawful doping usage in animal racing industries (Kintz et al., 2000).

Enantioseparations using a range of chiral selector approaches are successful in the field of HPLC and CE (Schmid et al., 1998, Barger et al., 1983, Fanali, 1991). Enantioselective inclusion of chiral analytes in the cavity of cyclodextrins (CDs) is a well known separation principle, and has been applied to the separation of a broad spectrum of compounds by capillary electrophoresis (Schmid et al., 1997). Measurement of the enantiomeric excesses (% e.e) is achieved by enantioselective capillary electrophoresis via β-cyclodextrin and glycol complexation, and can be calculated using the following formula:

$$\% \text{ e.e} = \frac{\text{Area of major isomer peak - Area of minor isomer peak}}{\text{Area of major isomer peak + Area of minor isomer peak}} \times 100\%$$

The first publications on drug analysis in CE appeared in 1986 (Altria and Simpson, 1986). Fujuwara and Honda (1986) have used CE to separate cinnamic acid and its analogues. They have applied the method to the analysis of drug metabolites in body fluid.

Lin et al. (1997) have used micellar electrokinetic chromatography (MEKC) to separate β-blocker drugs using cationic surfactants, tetradecyl- and hexadecyltrimethylammonium bromides (TTAB and HTAB). Both the pH and surfactant concentration were found to have significant influence on the migration time and selectivity of β-blockers. Complete separation was obtained with either HTAB or TTAB at concentration ranges of 15-20 m*M* and 12-15 m*M* respectively at pH = 7.0 or with HTAB at concentration range of 27-30 m*M* at pH = 6.5. Pierre and Sentell (1994) have used different β-CDs, i.e. β-CD, HP-β-CD, Me-β-CD, in the chiral separation of basic pharmaceuticals, i.e. propranolol, metoprolol, terbutaline, atropine, and chloropheniramine. The effect of pH, CD types and concentration on resolution was studied. They have found that optimisation of chiral resolution not only depends on pH, CD types, and concentration but also on the degree of binding between the CD and solute.

Borate has been employed as a buffer component for the separation of carbohydrates and biologically active compounds (El Rassi et al., 1994, Brown and Grushka, 1994). It has been suggested that the role of borate in complexation for cis-diol molecules is to impart a modified charge to the product through a complexation mechanism.

Significant changes in the charge-to-mass ratio of the cis-diol compound are the result due to the complexation of these compounds to the freely ionised hydroxyl group of the borate. Borate complexation with the compounds that contain cis-diol groups result in differences in mobility. Therefore, cis-diol compounds can be separated from non cis-diol-containing molecules that only differ slightly in structure but have identical net charge (Landers, 1994).

Aqueous borate solutions contain tetrahydroxyborate anion, B(OH)-4, which is formed according to the following equilibrium (Mechref, 1995):

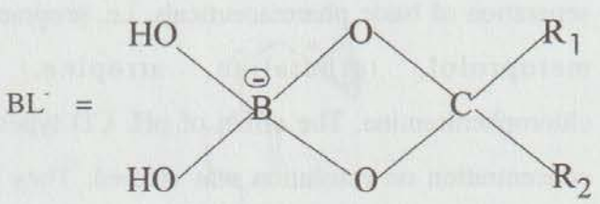
$$B(OH)_3 + OH^- \leftrightarrow B(OH)^-_4$$

The complexation of borate with compounds is given in the following equations [Pak, 1998]:

$$B^- + L \leftrightarrow BL^- + 2H_2O$$

$$BL^- + L \leftrightarrow BL^-_2 + 2H_2O$$

where L is the diol compound and B^- is the tetrahydroxyborate, $B(OH)^-_4$ anion.



In CE, a combination of borate with CDs in the buffer has allowed the chiral resolution of compounds containing cis-diol functionality, such as phenyl-1,2-ethanediol and 3-benzyloxy-1,2-propanediol (Schmid, 1997). Jira et al. (1997) showed that various diol compounds, including some quinazoline derivatives of potential pharmaceutical interest and containing diol groups in the side chain, could be resolved as borate complexes with CD chiral selectors in the buffer. A dual chiral recognition mechanism is proposed based on inclusion of the aromatic substitute of the diol-borate complex into the cavity of the CD and interaction of the borate with the hydroxyl groups at C-2 and C-3 at the mouth of the CD. These interactions can simply due to the hydrogen bonds.

The native CD used as chiral selectors are neutral cyclic oligosaccharides containing 6-8 glucopyranose rings (Fanali, 1996). Shown in Figure 2 is the structure of β-CD. It has a shape of a truncated cylindrical cone as shown in Figure 3. The cavity of the molecule is lined with hydrogen atoms and glycosidic oxygen bridges. Native β-CD became the most popular electrophoretic chiral selector (Koppenhoefer et al, 1996). Separation occurs via formation of a complex between the solute and CD cavity. Dalgliesh proposed a three-point rule for successful enantiomeric separations, where three types of interaction must occur between the solute and CD (Ahuja, 2000) as shown hypothetically in Figure 4.

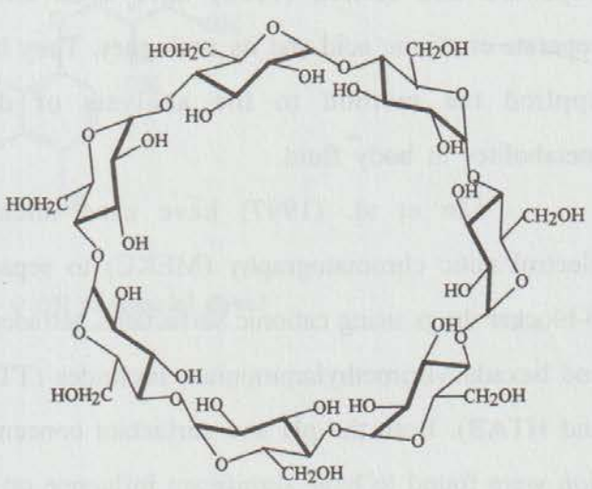


Figure 2 Structure of β-CD
(Pak et al. 1998)

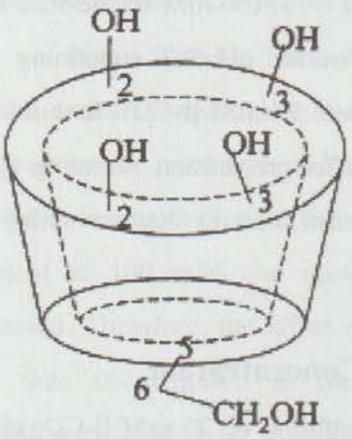


Figure 3 Model of β-CD as a truncated cone (Pak et al. 1998)

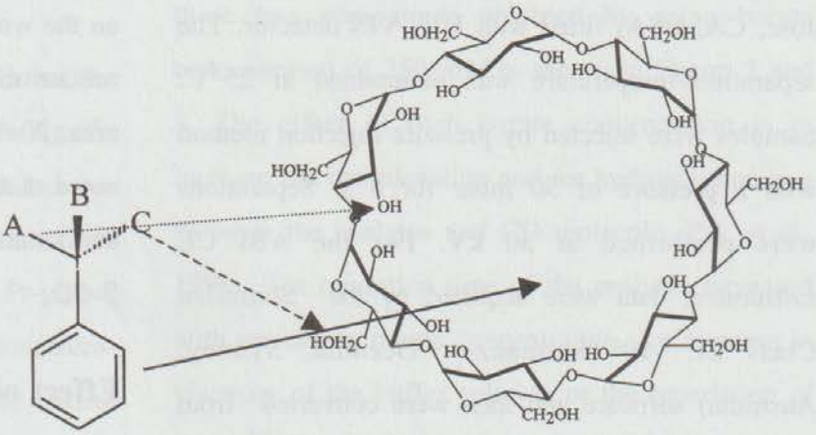


Figure 4 Illustration of the Dalgliesh "3-point rule" interaction model (Pak et al. 1998)

When regular CDs are employed, the affinity of the analyte for the CD is due to hydrophobic interactions between the analyte and the CD-cavity and hydrogen bonding of the analyte to hydroxyl groups or other introduced functionalities on the CD-ring. The other types of interaction can include electrostatic, dipole-dipole, attractive and repulsive interactions (Ahuja, 2000, Schmitt and Engelhardt, 1993). It is important to realise that for successful chiral resolution, the two enantiomers will necessarily have different energies for association with the host chiral selector. The Dalgliesh model illustrates that should one stereoisomer have a geometry suited to good interaction with the chiral selector, then the other stereoisomer geometry will not produce the same net interactions with the selector. Hence chiral differentiation occurs.

Peterson (1993) reported the success of resolution of propranolol enantiomers using Tris-phosphate buffer containing either hydroxyethyl-β-CD (HE-β-CD) or hydroxypropyl-β-CD (HP-β-CD) at pH 2.4. Juvancz et al. (1997) described the use of α, β, γ phosphated CDs for the chiral separation of metoprolol by CE. They found when 6.7 m*M* α-CD phosphate additive was added to borate-phosphate buffer, the racemic metoprolol produced a resolution value of 1.4.

In this study, chiral separation of some β-blocker drugs was carried out in order to understand the chiral separation mechanism by using β-CD as a chiral selector and to measure enantiomeric excess. The effect of borate concentration and concentration of (-CD on resolution of some newly synthetic drug isomers was undertaken in particular, some enantioselective synthesis products were of interest. Two β-blockers, propranolol glycol (Pr-glycol) and 4′-hydroxy propranolol glycol (4′-OH Pr-glycol), were chosen as the model compounds studied at the first step. In the second step, the optimum conditions were applied to the other β-blockers metabolites and intermediates.

Experimental Procedure and Methods

The separations were carried out using the Applied Biosystem Inc. (model ABI 270 HT, San

Jose, CA, USA) fitted with UV -VIS detector. The separation temperature was maintained at 25 °C. Samples were injected by pressure injection method with a pressure of 50 mbar for 5 s. Separations were performed at 30 kV. For the ABI CE instrument, data were acquired by the Shimadzu Class LC -10 (Shimadzu Oceania, Sydney, Australia) software and then were converted from Class LC -10 nito Microsoft Excel for windows as text files and then imported into Origin to create single layered or stacked chromatograms as required. The response scale of the data is given in mV, where 1mV=1mAu.

100 ml Borate-acetate buffer was prepared by dissolving sodium acetate and borate in a small amount of Milli-Q water. Once the salts were dissolved, 20 ml methanol was then added, followed by urea and β-cyclodextrin, with the solution made up to the mark (100 ml) with Milli-Q water. The pH of the running buffer was adjusted with glacial acetic acid.

Stock sample solutions (0.1 mg/mL) were prepare in 100 % methanol and diluted with running buffer. All solutions were filtered with 0.45 μm syringe filters.

Results and Discussion

The laboratory synthesis of chiral β-blocker drugs, their synthetic precursors (as shown in Fig 9 and 10) and selected metabolites likely to be formed in mammals, was undertaken. Cyclodextrins are used here as chiral selectors. The study was directed towards reliable enantiomeric excess measurements of enantioselective synthesis.

Experiments were initially carried out by using borate with β-CD in the buffer system. The choice of this buffer and buffer additives was based on the work of Pak [1998] (50 mM borate-12.5 m*M* acetate-acetic acid buffer pH 9.3 containing 4*M* urea, 20 % MeOH and 20 m*M* β-CD). It should be noted that during buffer preparation, warming up of the solution is needed due to low solubility of β-CD.

Effect of β-CD Concentration

With the addition of 20 m*M* β-CD, chiral separation of Pr-glycol was also achieved whilst no resolution was seen for 4′-OH Pr-glycol. Better resolution of both compounds was found upon increasing the concentration of β-CD (as shown in Figure 5). However, the baseline resolution for 4′-OH Pr-glycol could not be achieved; levels of β-CD beyond 80 m*M* were not considered (usually CD additives are used in lower concentrations due to its low solubility).

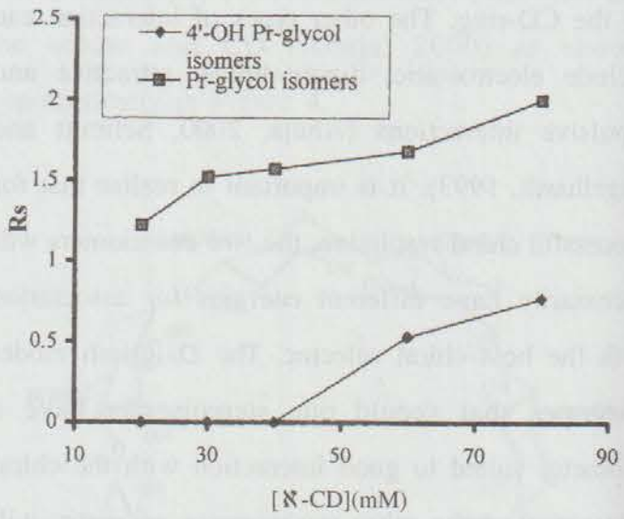


Figure 5 Effect of β-CD concentration on the resolution of Pr-glycol and 4′-OH Pr-glycol isomers. Conditions used: buffer composition; 50 m*M* borate-12.5 m*M* acetate-acetic acid buffer pH 9.3 containing 4 *M* urea, 20 % MeOH and various concentration of β-CD, separation voltage +30 kV, 210 nm, L = 64.5/56 effective length

Effect of Borate Concentration

It was found in Pak's work (1998) that the sodium acetate concentration did not play a significant role on the resolution of Pr-glycol, but increasing borate concentration in the buffer system from 30 m*M* to 100 m*M*, the resolution of Pr-glycol increased. Therefore, the effect of borate concentration was investigated in this work by using the buffer containing 80 m*M* β-CD. Figure 6 shows the effect of borate concentration on resolution of Pr-glycol and 4′-OH Pr-glycol. The resolution for these two compounds obtained by using borate concentration of 250 m*M* is shown in Figure 7 and 8. The effect of high borate concentration is to increase the complexation and /or hydrogen bonding between the analytes and CD molecule (Pak et al., 1998). The migration time of the analytes increased with increasing borate concentration. An increase in viscosity of the buffer solution or the retardation of the movement of the borate-Pr-glycol, and borate -4′-OH Pr-glycol complex towards the anode may have resulted in increased migration time.

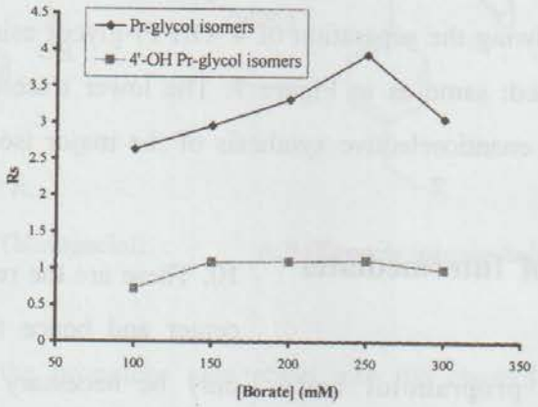


Figure 6 Effect of borate concentration on the resolution of Pr-glycol and 4′-OH Pr-glycol isomers. Conditions used: buffer composition; various concentration of borate-12.5 m*M* acetate-acetic acid buffer pH 9.3 containing 4 *M* urea, 20 % MeOH and 80 m*M* β-CD, separation voltage +30 kV, 210 nm, L = 64.5/56 effective length

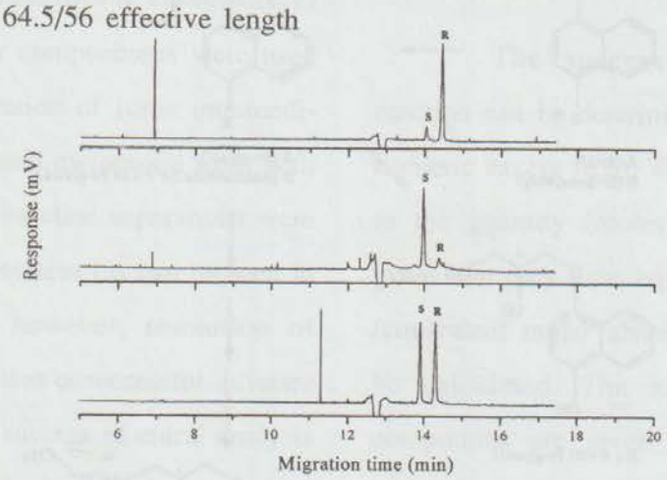


Figure 7 Electropherogram showing the separation of Pr-glycol using the optimum concentration of borate. Conditions used: buffer composition; 250 m*M* borate-12.5 m*M* acetate-acetic acid buffer pH 9.3 containing 4 *M* urea, 20 % MeOH and 80 m*M* β-CD, separation voltage 30 kV, 210 nm, L=64.5/56 effective length. The lower trace is a racemic mixture whilst the other two arise from enantioselective synthesis of the major isomer shown.

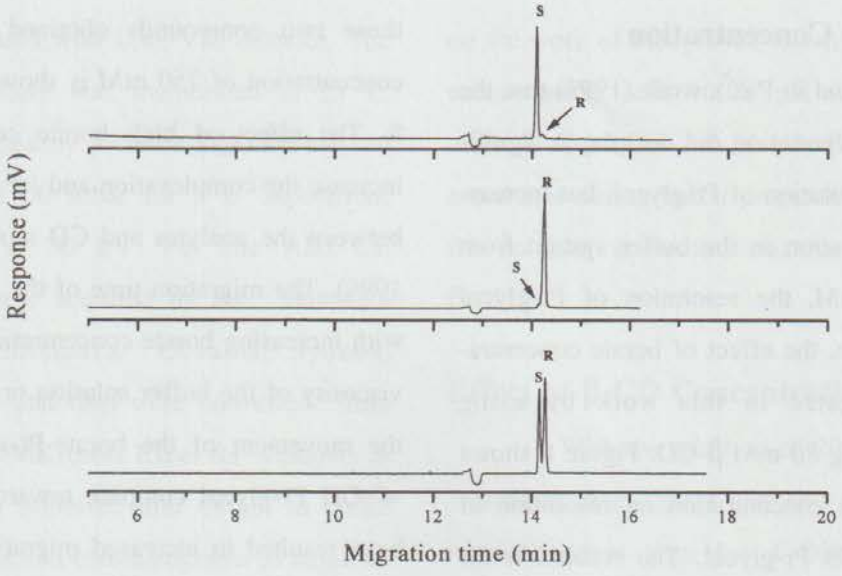


Figure 8 Electropherogram showing the separation of 4′-OH Pr-glycol using the optimum concentration of borate. Conditions used: same as in Figure 7. The lower trace is a racemic mixture, whilst the other two arise from enantioselective synthesis of the major isomer shown.

Enantiomeric Separation of Intermediates of Synthesis Pathways

In the synthesis of propranolol and metoprolol standards, the propylene side chain is converted into the cis-diol as shown in Figure 9 and 10. These are the reaction steps producing the chiral center and hence the R and S isomers. It should only be necessary to determine the enantiomeric excess of the diol since the stereoselectivity of the subsequent products should be retained.

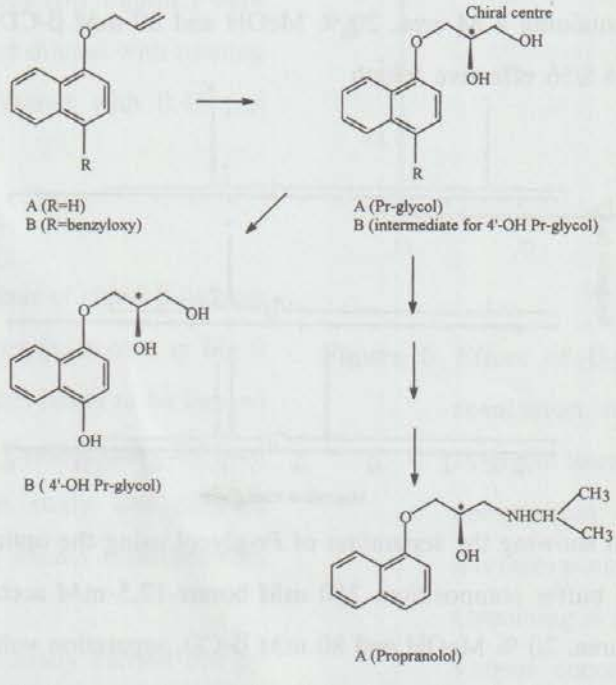


Figure 9 The conversion of the propylene side chain into the cis-diol in the synthesis of Pr-glycol, 4′-OH Pr-glycol and Propranolol (* denoted as chiral centre)

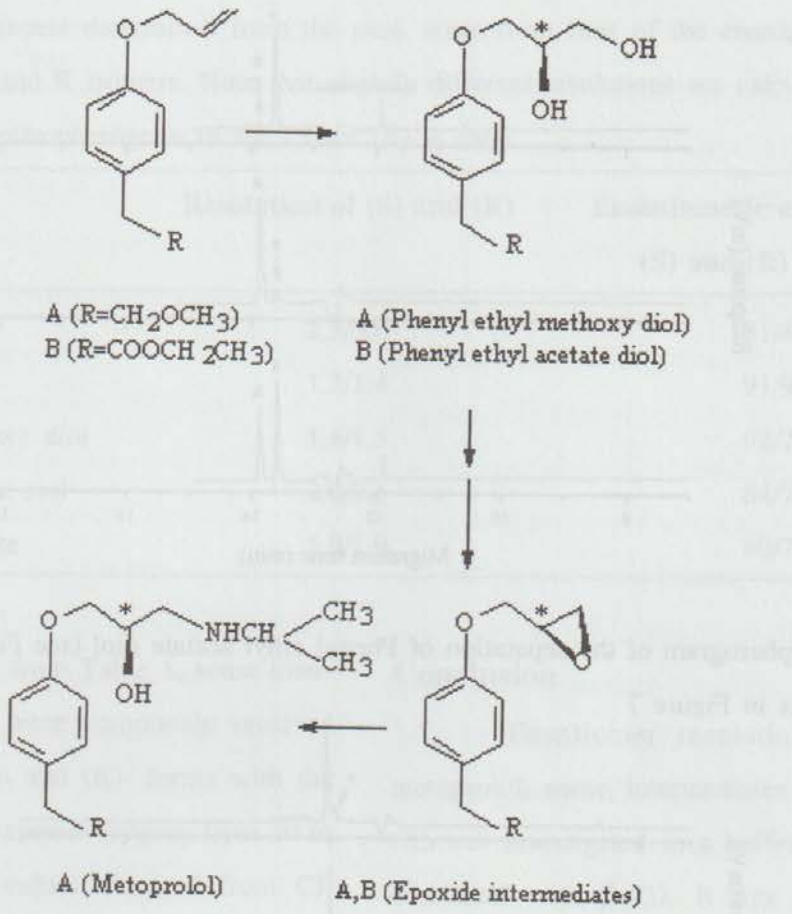


Figure 10 The conversion of the propylene side chain into the cis-diol in the synthesis of Metoprolol (* denoted as chiral centre)

Determination of Enantiomeric Excess (e.e)

The above buffer compositions were used for the enantiomeric separation of some intermediates including propranolol and metoprolol from both reaction schemes. Almost baseline separations were achieved using this buffer system (as can be seen in Figure 11, 12 and 13); however, resolution of propranolol and metoprolol was unsuccessful. Juvancz et al. [1999] described the success of chiral analysis of metoprolol and its by-products by CE using charged selectors, such as carboxy methyl-α-CD (CM-α-CD) and phosphate-(-CD (pho-(-CD).

The success of the enantioselective reaction can be determined by measuring the enantiomeric excess (e.e). The peak areas are equivalent to the quantity (moles) of each isomer produced given that they have equal detector response factors (equivalent molar absorptivity), hence, the e.e can be calculated. The e.e. values of investigated compounds are given in Table 1. Note that no correction is applied for the different migrations of the enantiomers.

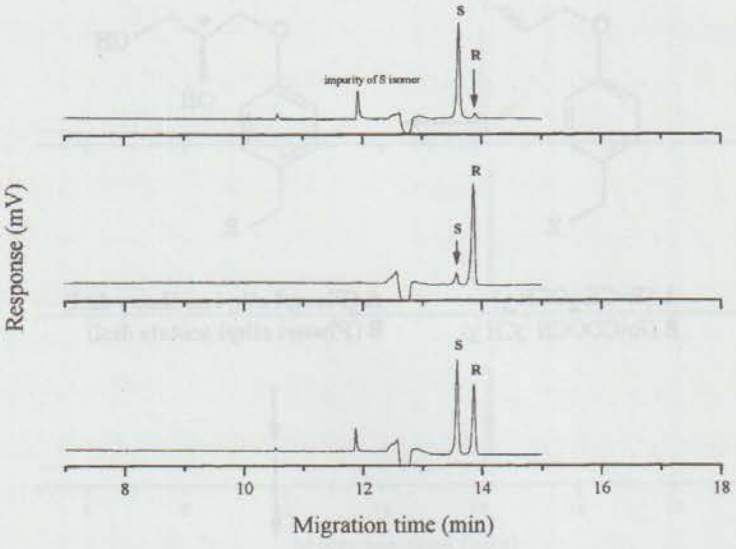


Figure 11 Electropherogram of the separation of Phenyl ethyl acetate diol (see Figure 10). Conditionsused: same as in Figure 7

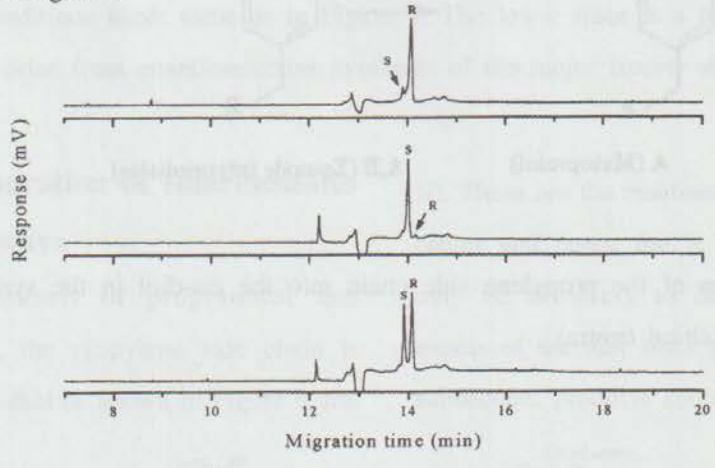


Figure 12 Electropherogram of the separation of Phenyl ethyl methoxy diol (see Figure 10). Conditions used: same as in Figure 7

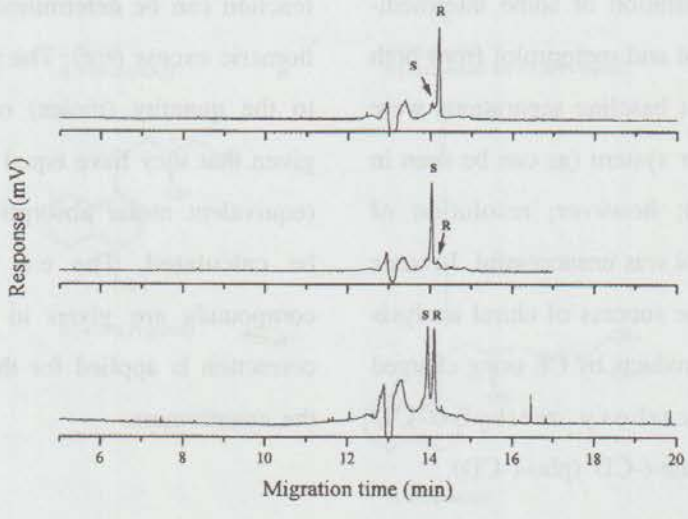


Figure 13 Electropherogram of the separation of Epoxide intermediate (A) (see Figure 10). Conditions used: same as in Figure 7

Table 1 Enantiomeric excess determined from the peak areas from runs of the enantioselective synthesis products of S and R isomers. Note that slightly different resolutions are calculated depending on whether the electropherogram of the (S) or (R) is used.

Compound	Resolution of (S) and (R)	Enantiomeric excess (% e.e) (S) and (R) products
Pr-glycol	2.5/3.0	81/80
4′-OH Pr-glycol	1.3/1.4	91/98
Phenyl ethyl methoxy diol	1.4/1.5	92/74
Phenyl ethyl acetate diol	2.0/2.5	84/79
Epoxide intermediate	1.9/1.9	80/70

As can be seen from Table 1, some intermediate glycol samples were completely resolved into their constituent (S)- and (R)- forms with the calculated enantiomeric excesses ranging from 70 to 98% e.e. The low e.e values obtained from CE analysis may be due to the following reasons: the physical state of the intermediates, i.e. being oil, slow racemisation of the analyte molecules in stock solution prepared for the analytical study, lack of purification, or incomplete enantioselective synthesis.

To increase the % e.e of these compounds, purification prior to CE analysis is suggested. Once the % e.e is improved, the next step of the reaction in the production of optically pure isomeric forms of propranolol and metoprolol can proceed. The sampling and analysis should be carried out immediately after the synthesis step (i.e. real time analysis) and the sample solution should be prepared just prior to introduction to the CE instrument to avoid the occurrence of epimerisation.

Conclusion

Enantiomer resolution of propranolol, metoprolol, some intermediates and metabolite by CE was investigated in a buffer comprising borate combined with β-CD. It was found that a high concentration of β-CD (80 m*M*) and borate (250 m*M*) is required for separation of all investigated compounds, except propranolol and metoprolol.

Several types of chiral selectors are required instead of just β-CD for further study of the chiral separation of these compounds in order to obtain a better resolution of all analytes in a single run for each synthesis process.

Acknowledgement

The author would like to thank Dr. Gary Amiet and Dr. Magaret Lewis for providing beta-blocker standards and Professor Philip Marriott (Department of Applied Chemistry, RMIT, Australia) for his help in editing.

References

Walle, T., Walle, U.K. and Olanoff, L.S. (1985). Quantitative account of propranolol metabolism in urine of normal man. Drug Metab. Dispos. 13: 204-209.

Vine, J.H., Wynne, P.M., Jenkins, M.A., Lind, K.L. and Dyke, T.M. (1992). The pharmacokinetics and metabolism of beta-adrenergic agents in greyhounds. Procceeding of the 9th International Conference of Racings Analysts and Veterinarians. 149-157.

Marathe, P., Shen, D. and Nelson, W. (1994). Metabolic kinetics of pseudoracemic propranolol in human liver microsomes. Enantioselectivity and quinidine inhibition. Drug Metab. Dispos. 22:237-247.

Kintz, P., Dumestre-Toulet, V., Jamey, C., Cirimele, V. and Ludes, B. (2000). Doping control for ?-adrenergic compounds through hair analysis. J. Forensic Sci., 45:170-174.

Schmid, M.G., Harringer, B. and Gubitz, G. (1998). Chiral resolution of RR,SS-hydrobenzoin by liquid chromatography using borate-cyclodextrin complexation. J. High Resol. Chromatogr. 21(7):414-416.

Barger, E.M., Walle, U.K., Bai, S.A. and Walle, T. (1983). Quantitative metabolic fate of propranolol in the dog, rat, and hamster using radiotracer, high performance liquid chromatography, and gas chromatography-mass spectrometry techniques. Drug Metab. Dispos. 11:266-272.

Fanali, S. (1991). Use of cyclodextrin in capillary zone electrophoresis/ Resolution of terbutaline and propranolol enantiomers. J. Chromatogr. 545:437-444.

Schmid, M.G., Wirnsberger, K., Jira, T., Bunke, A. and Gubitz, G. (1997). Capillary electrophoresis chiral resolution of vicinal diols by complexation with borate and cyclodextrin: Comparative studies on different cyclodextrin derivatives. Chirality, 9(2):153-156.

Altria, K.D. and Simpson, C.F. (1986). Measurement of electroendosmotic flows in high voltage capillary zone electrophoresis. Anal. Proc. 23:453-454.

Fujiwara, S. and Honda, S. (1986). Determination of cinnamic acid and its analogues by electrophoresis in fused silica capillary tube. Anal. Chem. 58:1811-1814.

Lin, C.-E., Chen, Y.-C., Chang, C.-C. and Wang, D.-Z. (1997). Migration behavior and selectivity of (-blockers in micellar electrokinetic chromatography: Influence of micelle concentration of cationic surfactants. J. Chromatogr. A. 775:349-357.

St Pierre, L. and Sentell, K.B. (1994). Cyclodextrins as enantioselective mobile phase modifiers for chiral capillary electrophoresis: Effect of pH and cyclodextrin concentration. J. Chromatogr. B. 657:291-300.

Pak, C., Marriott, P.J., Carpenter, P.D. and Amiet, R.G. (1998). Enantiomeric separation of propranolol and selected metabolites by using capillary electrophoresis with hydroxypropyl-?-cyclodextrin as chiral selector. J. Chromatogr. A. 793:357-364.

El Rassi, Z.i.B., P.R., Grushka, E. (Eds.) (1994). Advances in Chromatography. Marcel Dekker, New York, USA. 34:177-250.

Brown, P.R. and Grushka, E. (1994). Advances in Chromatography. Marcel Dekker Inc., New York. 34.

Landers, J.P. (1994). Handbook of Capillary Electrophoresis. USA, CRC Press Inc.

Mechref, Y., Ostrander, G.K. and El Rassi, Z. (1995). Capillary electrophoresis of carboxylated carbohydrates. I. Selective precolumn derivatization of gangliosides with UV absorbing and fluorescent tags. J. Chromatogr. A. 695(1):83-95.

Jira, T., Bunke, A., Schmid, M.G. and Gubitz, G. (1997). Chiral resolution of diols by capillary electrophoresis using borate-cyclodextrin complexation. J. Chromatogr. A. 761: 269-275.

Fanali, S. (1996). Identification of chiral drug isomers by capillary electrophoresis. J. Chromatogr. A. 735:77-121.

Koppenhoefer, B., Epperlein, U., Christian, B., Lin, B., Ji, Y. and Chen, Y. (1996). Separation of enantiomers of drugs by capillary electrophoresis III. ?-cyclodextrin as chiral solvating agent. J. Chromatogr. A. 735:333-343.

Ahuja, S. (2000). Chiral Separation by Chromatography. American Chemical Society, Washington, D.C. 112.

Peterson, T.E. (1993). Separation of drug stereoisomers by capillary electrophoresis with cyclodextrins. J. Chromatogr. 630:353-361.

Juvancz, Z., Jicsinszky, L. and Markides, K.E. (1997). Phosphated cyclodextrins as new acidic chiral additives for capillary electrophoresis. J. Microcol. Separations. 9(8):581-589

Schmitt, T. and Engelhardt, H. (1993). Charged and uncharged cyclodextrin as chiral selectors in capillary electrophoresis. Chromatographia. 37(9/10):475-481.

Juvancz, Z., Markides, K.E. and Jicsinszky, L. (1999). Chiral analysis of metoprolol and its by-products by capillary electrophoresis. J. Microcol. Separations. 11(10):716-722.

❑❑❑❑❑

ว.วิทย. มข. 35(1) 108-112 (2550) KKU Sci. J.35(1) 108-112 (2007)

การศึกษาเปรียบเทียบการใช้สารละลายเดกแทรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการแยกเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลในกระต่าย

The comparative study of dextran solution concentration on neutrophil isolation in rabbits

ปรานอม ภูชฎาภิรมย์[1] วิภาวรรณ ชูเผือก[2] และอนุชัย นิเวศน์ปฐมวัฒน์[3]*

Pranom Puchadapirom[1] Wipawan Choopauk[2] and Anuchai Niwetpathomwat[3]*

บทคัดย่อ

มีการนำเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลในกระต่ายมาใช้ศึกษาอิมมูโนวิทยา ซึ่งในแต่ละงานการทดลองมักใช้วิธีที่ซับซ้อนหรือใช้ผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่มีราคาแพง การใช้สารละลายเดกแทรนในการแยกนิวโทรฟิลเป็นวิธีที่ง่ายและประหยัด การทดลองครั้งนี้เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายเดกแทรนที่เหมาะสมในการแยกนิวโทรฟิลจากเลือดของกระต่าย เพื่อนำไปใช้ประโยชน์อื่นๆ ต่อไป ในการศึกษาตัวอย่างเลือดจากกระต่าย จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยใช้ความเข้มข้นของเดกแทรน 3%, 5% และ 7% พบว่าค่าความถ่วงจำเพาะของสารละลายเดกแทรนที่ 3%, 5% และ 7% มีค่าเท่ากับ 1.015, 1.021 และ 1.027 ตามลำดับ ส่วนค่าเฉลี่ยความถ่วงจำเพาะของพลาสมากระต่าย ก่อนผสมเดกแทรนมีค่าเท่ากับ 1.038 (±0.002) หลังจากผสมกับเดกแทรนที่ 3%, 5% และ 7% มีค่าเท่ากับ 1.025 (±0.001), 1.028 (±0.001) และ 1.032 (±0.001) ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยคิดเป็นร้อยละของนิวโทรฟิลในเลือดกระต่ายก่อนผสมกับเดกแทรนเท่ากับ 60.0 (±11.6) น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ผสมด้วย 3%, 5% และ 7% เดกแทรน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 65.9 (±11.1), 67.4 (±10.2) และ 73.2 (±13.4) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มทดลอง พบว่า เดกแทรนที่ความเข้มข้น 7% ให้ค่าร้อยละของนิวโทรฟิลสูงที่สุด ($p<0.05$) ทำให้สรุปได้ว่าสารละลายเดกแทรนสามารถใช้แยกนิวโทรฟิลในเลือดกระต่ายได้ โดยเดกแทรนที่ความเข้มข้น 7% ให้ผลดีที่สุด แต่อย่างไรก็ดียังได้ความบริสุทธิ์ค่อนข้างต่ำ ฉะนั้น หากงานวิจัยที่ต้องการความบริสุทธิ์ของนิวโทรฟิลสูง จึงควรใช้สารละลายเดกแทรนร่วมกับวิธีการอื่น ๆ

คำสำคัญ: เดกแทรน นิวโทรฟิล กระต่าย

[1] ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร 10400

[2] ฝ่ายจุลชีววิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย กรุงเทพมหานคร 10330

[3] ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330

[1] Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400.

[2] Department of Microbiology, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok 10330.

[3] Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330.

* Corresponding author: Tel: 02 201 5564; Fax: 02 354 7158; E-mail: Scppq@mahidol.ac.th

Abstract

Rabbit neutrophils are prominently used for several immunological researches. However, the recent isolation methods are either complicated or expensive. The separation method using dextran gradient solution is easy and cheap. The objective of this study was to evaluate the appropriate dextran concentration for rabbit neutrophil isolation. Thirty blood samples form healthy rabbits were mixed with 3%, 5% and 7% dextran solution. The specific gravity of 3%, 5% and 7% dextran solution were 1.015, 1.021 and 1.027, respectively. The specific gravity of rabbit plasma before and after mixed with 3%, 5% and 7% dextran solution were 1.038 (±0.002), 1.025 (±0.001), 1.028 (±0.001) and 1.032 (±0.001), respectively. The mean of neutrophil percentage were 60.0 (±11.6) and significantly increased ($p<0.05$) after mixed with 3%, 5% and 7% dextran solution [65.9 (±11.1), 67.4 (±10.2) and 73.2 (+13.4) respectively]. Dextran solution at 7% had the highest percentage of neutrophils ($P<0.05$). In conclusion, dextran solution can be used for rabbit neutrophil isolation, and the best condition is 7% dextran that gives the highest percentage of neutrophil. However, the neutrophil purity of this technique is quite low. Therefore, the combination with other neutrophil isolation methods should be recommended for higher purification.

Keywords: dextran, neutrophils, rabbit

บทนำ

นิวโทรฟิลเป็นเม็ดเลือดขาวชนิดโพลีมอร์โฟนิวเคลียส (polymorphonucleus) มีแกรนูล (granule) ติดสีน้ำเงินปนแดง มีหน้าที่สำคัญในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมจากร่างกาย และเป็นปราการด่านแรกในการกำจัดเชื้อก่อโรคต่างๆ มีการวิจัยโดยการนำนิวโทรฟิลของกระต่ายมาใช้ในทางอิมมูโนวิทยา เช่น การศึกษาผลกระทบของการสร้างซุปเปอร์ออกไซด์ต่อปฏิกิริยาคอมพลีเมนท์ฟิกเซชั่นของนิวโทรฟิล (Alves et al., 2004) การทดสอบการตอบสนองทางอิมมูโนวิทยา (Zarember et al., 2002) การศึกษาการแสดง ออกของยีนต่างๆ ในการต่อต้านเชื้อจุลชีพ (Chen et al., 2001) มีหลายวิธีที่สามารถใช้แยกเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลจากเลือดมนุษย์ได้ เช่น การใช้ Cell preparation tube (CPT) (De et al., 2005), Ficoll-hypaque gradient (Sheth et al., 2001) และ Polymorphoprep (Behzad-Behbahani et al., 2005) ถึงแม้ว่าวิธีที่กล่าวมาข้างต้นจะได้ผลดีในการแยกนิวโทรฟิล แต่มีราคาแพงและอาจจะให้ผลที่แตกต่างเมื่อใช้ในเลือดจากสัตว์ชนิดอื่น การใช้สารละลายเดกแทรนสำหรับการแยกนิวโทรฟิลจากเลือดของมนุษย์สามารถทำได้และได้ความเข้มข้นของนิวโทรฟิลจำนวนมาก (Graham, 2002) อย่างไรก็ดีการศึกษาการใช้สารละลายเดกแทรนมาใช้ในการแยกนิวโทรฟิลในกระต่ายยังมีค่อนข้างน้อย การศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์ในการศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายเดกแทรนที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการแยกนิวโทรฟิลจากเลือดของกระต่าย เพื่อสามารถนำเม็ดเลือดดังกล่าวไปใช้ในการศึกษาอื่นๆ ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สัตว์ทดลอง และการเก็บตัวอย่างเลือดจากสัตว์ทดลอง

ใช้กระต่ายพันธุ์ New Zealand White ที่ทำการตรวจสุขภาพเบื้องต้นแล้วไม่พบความผิดปกติทางโลหิตวิทยาจำนวน 30 ตัว โดยมีการเก็บเลือดจากกระต่ายทางเส้นเลือดแดงที่ใบหู จำนวน 5 มล. ด้วยวิธีการปราศจากเชื้อ จากนั้นนำเลือดผสมลงในหลอดเก็บเลือดสูญญากาศที่ผสมสารป้องกันเลือดแข็งตัวชนิด EDTA พลิกหลอดเก็บเลือดจนเลือดผสมเข้ากันดี นำตัวอย่างเลือดหนึ่งหยดมาทำฟิล์มเลือดบางและย้อมด้วยสีไรท์เสตน (Wright's stain) สำหรับเป็นตัวอย่างควบคุมเลือดที่เหลือนำไปเก็บไว้ที่ 4°เซลเซียส (ไม่เกิน 1 ชั่วโมง)

การแยกนิวโทรฟิล ด้วยสารละลายเดกแทรน

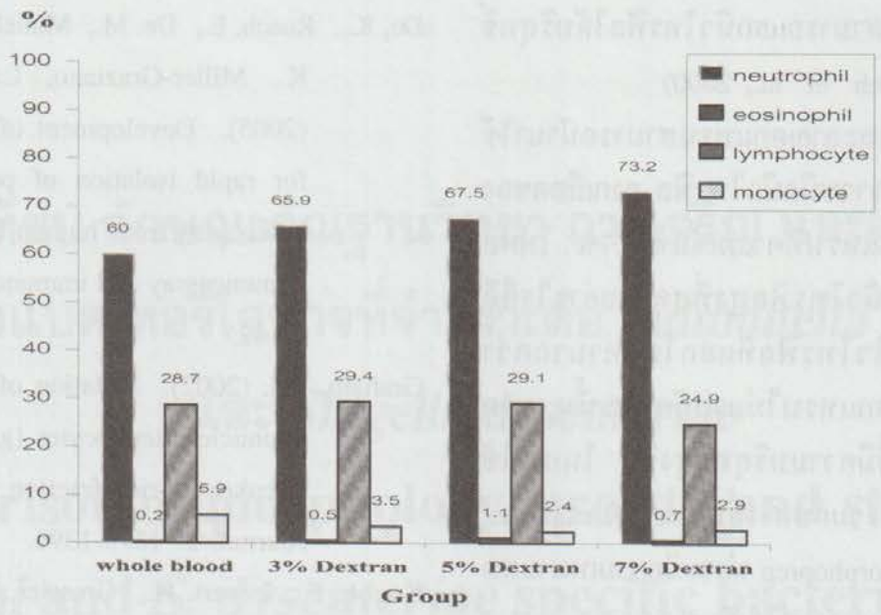
นำเดกแทรน (Dextran MW. 200,000 to 275,000 Da.; BDH Chemicals Ltd) มาผสมกับ 0.89% โซเดียมคลอไรด์ จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายเดกแทรน 3%, 5% และ 7% w/v จากนั้นนำเลือดที่ผสมสารกันเลือดแข็งตัวข้างต้น มาผสมกับสารละลายเดกแทรนอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาครึ่งชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายด้านบนนำไปปั่นที่ความเร็ว 2000 x G เป็นเวลา 5 นาที นำมาวัดค่าความถ่วงจำเพาะและล้างด้วย 0.89% โซเดียมคลอไรด์อีก 3 ครั้ง แล้วนำมาทำฟิล์มแผ่นเลือดบาง ย้อมด้วยสีไรท์เสตน ก่อนนำไปหาค่าร้อยละของเม็ดเลือดขาว

การวิเคราะห์ทางสถิติ

หาค่าเฉลี่ยร้อยละของนิวโทรฟิลในเลือดที่ผสมกับสารละลายเดกแทรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับเลือดปกติก่อนทำการผสมสารละลายเดกแทรนด้วยวิธี One-way ANOVA (Student-Newman-Keuls Method; Sigma Stat version 2.0) ที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$

ผลการทดลอง

ค่าความถ่วงจำเพาะของสารละลายเดกทรนที่ 3%, 5% และ 7% มีค่าเท่ากับ 1.015, 1.021 และ 1.027 ตามลำดับ ส่วนค่าเฉลี่ยความถ่วงจำเพาะของพลาสมากระต่ายก่อนผสมเดกแทรน มีค่าเท่ากับ 1.038 (±0.002) หลังจากผสมกับเดกแทรนที่ 3%, 5% และ 7% มีค่าเท่ากับ 1.025 (±0.001), 1.028 (±0.001) และ 1.032 (±0.001) ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของนิวโทรฟิลในเลือดกระต่ายก่อนผสมกับเดกแทรนคิดเป็นร้อยละเท่ากับ 60.0 (±11.6) น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ผสมด้วยเดกแทรนที่ความเข้มข้น 3%, 5% และ 7% มีค่าเท่ากับ 65.9 (±11.1), 67.4 (±10.2) และ 73.2 (±13.4) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง พบว่าเดกแทรนที่มีความเข้มข้น 7% ให้ผลค่าเฉลี่ยของร้อยละนิวโทรฟิลสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ค่าเฉลี่ยร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิดอีโอซิโนฟิลในเลือดกระต่ายก่อนการทดลองเท่ากับ 0.2 (±0.6) กลุ่มที่ผสมด้วย เดกแทรนที่ความเข้มข้น 3%, 5% และ 7% มีค่าเท่ากับ 0.5 (±1.0), 1.1 (±1.7) และ 0.7 (±1.1) ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ในเลือดกระต่ายก่อนการทดลองเท่ากับ 28.7 (±10.7) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ผสมด้วยเดกแทรน 3%, 5% และ 7% ซึ่งมีค่าเท่ากับ 29.4 (±10.3), 29.1 (±10.3) และ 24.9 (±13.6) ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ในเลือดกระต่ายก่อนการทดลองเท่ากับ 5.9 (±5.0) มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ผสมด้วย 3%, 5% และ 7% เดกแทรน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.5 (±4.0), 24 (±3.5) และ 2.9 (±3.9) ตามลำดับ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 กราฟแสดงค่าร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิด นิวโทรฟิล อีโอซิโนฟิล ลิมโฟไซต์ และโมโนไซต์ ในเลือดกระต่าย ก่อนผสมกับสารเดกแทรน และหลังผสมกับสารเดกแทรนที่ความเข้มข้น 3%, 5% และ 7% โดยค่าร้อยละของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล ในเลือดของกระต่ายหลังผสมด้วยเดกแทรนมีค่ามากกว่าก่อนผสมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

วิจารณ์ และสรุป

จากการทดลองพบว่าการแยกนิวโทรฟิลจากเลือดของกระต่ายด้วยสารละลายเดกแทรนสามารถทำได้และให้ผลดี โดยเดกแทรนที่ 7% ให้ผลค่าเฉลี่ยของร้อยละนิวโทรฟิลสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Behzad-Behbahani et al. (2005) ที่ทำการทดลองแยกเม็ดเลือดขาวในเลือดมนุษย์ด้วยเดกแทรนที่ความเข้มข้น 5%, 6%, 7%, 8%, 9% และ 10% w/v ในนอร์มอลซาไลด์ (normal saline) พบว่าที่ความเข้มข้น 6-7% ให้ผลดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของนิวโทรฟิลจากการแยกด้วยวิธีต่างๆ ให้ผลไม่แตกต่างจากการแยกด้วยเดกแทรน เช่น ในรายงานการเปรียบการแยกเม็ดเลือดขาวชนิดโพลีมอร์โฟนิวเคลียสและโมโนนิวเคลียสด้วยสาร Lymphoprep และ Polymorphoprep (Nycomed, The Netherlands) สาร Ficall-ammonium chloride และสารเดกแทรนพบว่าปริมาณของเม็ดเลือดขาวที่แยกได้ไม่แตกต่างกัน แต่สาร Ficall-ammonium chloride และสารเดกแทรนสามารถจำกัดการปนเปื้อนของเม็ดเลือดแดงได้ดีกว่าการใช้สาร Lymhoprep และ Polymorphoprep (Behzad-Behbahani et al., 2005) การเปรียบเทียบการใช้หลอด commercial cell preparation tube (CPT) ซึ่งภายในบรรจุด้วย lipopolysaccharide ของ Escherichia coli 0111:B4 เปรียบเทียบกับการใช้สารเดกแทรนพบว่า CPT สามารถแยกนิวโทรฟิลได้ดีกว่าการใช้สารเดกแทรน 3-4 เท่า (De et al., 2005) การแยกนิวโทรฟิลในสัตว์ชนิดอื่นสามารถใช้สารอื่นๆ ได้ เช่น การแยกนิวโทรฟิลจากไตของปลา flathead minnow ด้วยสาร Hank's balanced salt solution พบว่าสามารถแยกนิวโทรฟิลได้บริสุทธิ์ถึง 72% และมีนิวโทรฟิลเหลือมากกว่า 38% จากเซลล์ก่อนเริ่มทำการแยก (Palic et al., 2005) นอกจากนี้การใช้สารละลายเดกแทรนร่วมกับสารอื่นๆ สามารถแยกนิวโทรฟิลได้ดีขึ้น เช่น ในรายงานการแยกเม็ดเลือดขาวชนิดโพลีมอร์โฟนิวเคลียสในกระต่ายด้วยสารละลายเดกแทรนร่วมกับ Histopaque

หรือ Percoll พบว่าสามารถแยกนิวโทรฟิลได้บริสุทธิ์ 90% ถึง 97% (Kouoh et al., 2000)

สรุป สารละลายเดกแทรนสามารถนำมาใช้ในการแยกเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล จากเลือดของกระต่ายได้ โดยเดกแทรนที่ความเข้มข้น 7% ให้ผลค่าเฉลี่ยของร้อยละนิวโทรฟิลสูงที่สุด อย่างไรก็ดี ความบริสุทธิ์ของนิวโทรฟิลที่แยกได้มีค่ามากกว่าก่อนใช้สารละลายเดกแทรนไม่มากนัก ฉะนั้น หากต้องการนิวโทรฟิลที่มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น ในการใช้สารละลายเดกแทรนร่วมกับสารอื่นๆ เช่น Histopaque, Percoll หรือ Polymorphoprep น่าจะมีความเหมาะสมกว่าการใช้เฉพาะเดกแทรนชนิดเดียว

เอกสารอ้างอิง

Alves, M., Marzocchi-Machado, M., Azzolini, E. and Lucisano-Valim, M. (2004). The complement-fixing activity of immune complexes containing IgG antibodies of different functional affinities: effects on superoxide production by rabbit neutrophils. Immunological investigations. 33(1): 39-50.

Behzad-Behbahani, A., Yaghobi, R., Sabahi, F., Rostaei, H. and Alborzi, A. (2005). Improvement in isolation of human peripheral blood leukocyte subpopulations: application in diagnosing human cytomegalovirus infection in bone marrow transplant patients. Experimental and clinical transplantation. 3(1): 316-319.

Chen, Y., Wang, Y., Sun, Y., Zhang, L. and Li, W. (2001). Highly efficient expression of rabbit neutrophil peptide-1 gene in Chlorella ellipsoides cells. Current genetics. 39(5-6): 365-370.

De, K.., Roach, E., De, M., Minielly, C., Laudanski, K., Miller-Graziano, L. and Bankey, E. (2005). Development of a simple method for rapid isolation of polymorphonuclear leukocytes from human blood. Journal of immunoassay and immunochemistry. 26 (1): 35-42.

Graham, M. (2002). Isolation of human polymorphonuclear leukocytes (granulocytes) from a leukocyte-rich fraction. Scientific World Journal. 2: 1393-1396.

Kouoh, F., Levert, H., Gressier, B., Luyckx, M., Brunet, C., Dine, T., Ballester, L., Cazin, M. and Cazin, C. (2000). Reduced ammonium chloride haemolysis time enhances the number of isolated functional rabbit polymorphonuclear neutrophils. Acta pathologica, microbiologica, *et* immunologica Scandinavica. 108 (6): 417-421.

Palic, D., Andreasen, B., Menzel, W. and Roth, A. (2005). A rapid, direct assay to measure degranulation of primary granules in neutrophils from kidney of flathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). Fish and shellfish Immunology. 19 (3): 217.227.

Sheth, K., De, A., Nolan, B., Friel, J., Duffy, A., Ricciardi, R., Miller-graziano, C. and Bankey, P. (2001). Heat shock protein 27 inhibits apoptosis in human neutrophils. The Journal Surgical Research. 99 (1): 129-133.

Zarember, A., Katz, S., Tack, F., Doukhan, L., Weiss, J. and Elsbach, P. (2002). Host defense functions of proteolytically processed and parent (unprocessed) cathelicidins of rabbit granulocytes. Infection and immunity. 70 (2): 569-576.

ว.วิทย. มข. 35(1) 113-122 (2550) KKU Sci. J.35(1) 113-122 (2007)

เปรียบเทียบ ลักษณะสัณฐานวิทยา การเจริญ และความคงตัวของแบคเทอริโอฟาจที่จำเพาะต่อ *Salmonella typhi* และ *Shigella dysenteriae*

Comparison of morphology, growth and stability of *S. typhi* and *S. dysenteriae* specific bacteriophages

กัญญ์จนา นึกดี[1]

บทคัดย่อ

แบคเทอริโอฟาจสองชนิดที่จำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella typhi* (STP) และ *Shigella dysenteriae* (SDP) แยกได้จากน้ำเสีย สถานีบ่อสูบน้ำเสีย เทศบาล จังหวัดอุบลราชธานี เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าแบคเทอริโอฟาจ STP มีขนาดเล็กกว่า SDP และส่วนหัวมีรูปร่างเป็น แบบ icosahedral ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 40-45 nm แบคเทอริโอฟาจ SDP ส่วนหัวมีรูปร่างเป็น แบบ icosahedral ยาวขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 65-70 nm ส่วนหางมีส่วน sheath ที่ยืดและหดได้ ขนาดความยาวประมาณ 20-22 x 67-70 nm ศึกษากราฟการเจริญ แบคเทอริโอฟาจทั้งสองมีไตเตอร์สูงสุด 7.5 x 10^9 PFU/ml หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 150 นาที ยังคงตรวจพบแบคเทอริโอฟาจทั้งสองในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypicase soy broth เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องนานกว่า 2 เดือน และแบคเทอริโอฟาจสามารถทนอุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และ pH ในช่วงที่กว้าง (pH 4-11)

คำสำคัญ: แบคเทอริโอฟาจ, ฟาจ

[1] ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190
e-mail: kanjana@sci.ubu.ac.th

Abstract

Two specific bacteriophage, *Salmonella typhi* (STP) and *Shigella dysenteriae* (SDP) were isolated from a local sewage treatment plant at Ubon Rajathanee province. Transmission electron microscopy showed that phage particles of STP were smaller than those of SDP and had an icosahedral head approximately 40-45 nm in diameter. The SDP showed phage particles consisting of an elongated icosahedral head diameter approximately 65-70 nm a complex contractile tail 20-22 nm x 67-70 nm in length. The growth pattern of both bacteriophage showed the highest titer of the virus was 7.5 x 10^9 PFU/ml in 150 minutes post-infection. Phages were stable in Trypicase soy broth for over 2 months at room temperature. They also tolerated high temperature (60°C) for up to 3 hrs and a broad range of pH (4-11) after overnight exposure.

Key words: Salmonella typhi, Shigella dysenteriae , bacteriophage, phage

บทนำ

Shigella dysenteriae และ *Salmonella typhi* เป็นจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุสำคัญของการก่อโรคในระบบทางเดินอาหารในสัตว์และมนุษย์ เนื่องจากการรับประทานเชื้อแบคทีเรียที่ปะปนอยู่กับอาหารและน้ำเข้าไป ซึ่งอาหารที่เป็นแหล่งของการติดเชื้อที่พบบ่อยได้แก่ นมและผลิตภัณฑ์นม อาหารสดต่างๆ เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ รวมถึงสัตว์เลี้ยงต่างๆ (Faruque et al., 2002; Goode et al., 2003)

ไวรัสแบคทีเรีย หรือเรียกทั่วไปว่า แบคเทอริโอฟาจ (bacteriophage) หรือเรียกสั้นๆว่า ฟาจ (phage) หมายถึงไวรัสที่ใช้แบคทีเรียเป็นโฮสต์ในการเพิ่มจำนวน ถูกค้นพบโดย Frederick Twort และ Felix d' Hérelle (Campbell, 2001) แบคเทอริโอฟาจแบ่งตามลักษณะการติดเชื้อในแบคทีเรียได้ 2 ชนิด คือ 1) virulent phages หรือ lytic phages หมายถึง ฟาจที่มีการติดเชื้อเกิดขึ้นภายในเซลล์มีการเพิ่มจำนวนและทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกสลาย 2) temperate phages หรือ lysogenic phages หมายถึง ฟาจที่ก่อการติดเชื้อในแบคทีเรียแล้วสามารถแทรกยีโนมเข้าสู่โครโมโซมของเซลล์แบคทีเรียได้ (Madigan and Martinko, 1997) แบคเทอริโอฟาจมีความจำเพาะต่อชนิดของแบคทีเรียสูง ความรู้พื้นฐานที่เกี่ยวกับการติดเชื้อแบคเทอริโอฟาจในเซลล์แบคทีเรียได้นำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ โดยทำให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของแบคทีเรีย ระบาดวิทยาของเชื้อและยังเป็นรากฐานของการศึกษาด้านพันธุวิศวกรรมได้ด้วย (พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ, 2540) ได้มีการใช้แบคเทอริโอฟาจเป็นตัวแทนในการศึกษาไวรัสในระบบทางเดินอาหาร (enteric virus) ของมนุษย์ เนื่องจากทำได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ รวดเร็วและมีราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาไวรัสของมนุษย์หรือสัตว์โดยตรง (Pelczar et al., 1988; Grabow, 2001) แบคเทอริโอฟาจสามารถติดเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกของเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ รวมถึงสามารถเพิ่มจำนวนภายในร่างกายของมนุษย์และสัตว์ได้ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะในการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอฟาจเหล่านี้เท่ากับอุณหภูมิของร่างกาย คือ 37 °C (Havelaar and Pot-Hogeboom, 1988) ไวรัสมากกว่า 100 สายพันธุ์สามารถแยกได้จากน้ำเสีย (Gerba et al., 1975) พบแบคเทอริโอฟาจหลายชนิดใช้แหล่งน้ำตามธรรมชาติเป็นแหล่งอาศัย (Seeley and Primrose, 1980) ปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของแบคเทอริโอฟาจในแหล่งน้ำ

ตามธรรมชาตินั้นประกอบด้วยหลายปัจจัย ได้แก่ ความหนาแน่นของประชากรโฮสต์ (แบคทีเรีย) อุณหภูมิ และ pH เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการอยู่รอดของแบคเทอริฟาจอย่างไรนั้น ข้อมูลที่ใช้ในการอธิบายยังมีอยู่น้อย (Goyal et al., 1987) พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการอยู่รอดของ ฟาจ T7 ที่อาศัยอยู่ในแม่น้ำ ทะเลสาบ และน้ำใต้ดิน (Niemi, 1976) จากปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการอยู่รอดและการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอฟาจในธรรมชาติที่กล่าวมาแล้วนั้นยากแก่การที่จะคาดเดาได้ ดังนั้นจึงนำไปสู่การศึกษาครั้งนี้

วัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยา การเจริญ และความคงตัวของแบคเทอริโอฟาที่จำเพาะต่อ *S. typhi* กับ *S. dysenteriae* เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำแบคเทอริโอฟาจมาใช้ควบคุมการระบาดของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้ต่อไป

วิธีดำเนินการ

ตัวอย่างน้ำเสีย

เนื่องจากน้ำเสียที่มาจากชุมชนจะมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ ดังนั้น บริเวณที่แบคทีเรียปนเปื้อนอยู่ส่วนใหญ่จะพบว่ามีแบคเทอริโอฟาจที่จำเพาะกับแบคทีเรียเหล่านี้เจริญอยู่ด้วย (Lasobras et al., 1999; Schwartzbrod and Mathieu, 1986) และนอกจากนี้แบคเทอริโอฟาจบางชนิดยังสามารถเพิ่มจำนวนในกระเพาะอาหารและลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่นบางชนิดได้ด้วย (Grabow, 2001) ตัวอย่างน้ำเสียที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคเทอริอฟาจมาจากสถานีบ่อสูบน้ำเสีย เทศบาลจังหวัดอุบลราชธานี โดยเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากบริเวณรอบๆบ่อ 5 จุด โดยใช้ตัวอย่างแต่ละจุดปริมาตร 10 ml เป็นจำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 2 เดือน

สายพันธุ์แบคทีเรีย

แบคทีเรีย *S. dysenteriae* DMS2137 และ *Salmonella typhi* DMS5784

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypicase soy broth (Hardy diagnostics, USA) 1 ลิตรประกอบด้วย casein peptone 17 g, soy peptone 3 g, dextrose 2.5 g, sodium chloride 5 g, dipotassium phosphate 2.5 g และใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml

อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypicase soy agar (Hardy diagnostics, USA) 1 ลิตรประกอบด้วย casein peptone 15 g, soy peptone 5 g, sodium chloride 5 g, agar 15 g และใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml

อาหารเลี้ยงเชื้อ Soft agar เตรียมโดยใช้ Trypicase soy broth ผสม 0.7% agar (Difco)

การแยกเชื้อแบคเทอริโอฟาจจากตัวอย่างน้ำเสีย

นำตัวอย่างน้ำเสียมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่อง Universal 30 RF (Hettich, Tuttilngen, Germany) เพื่อแยกเศษตะกอนออก จากนั้นนำเชื้อ S. dysenteriae (โฮสต์สำหรับเชื้อแบคเทอริโอฟาจ) ในระยะ log phase ปริมาตร 0.5 ml (1 x 10^7 CFU /ml) มาผสมน้ำตัวอย่างปริมาตร 4.5 ml เพื่อทำการแยกแบคเทอริโอฟาจที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 10X Trypicase soy broth ปริมาตร 0.5 ml นำไปบ่มเขย่าด้วยความเร็ว 180 rpm ที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำตัวอย่ามาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมากรองผ่าน membrane filter ที่ปลอดเชื้อขนาดรูที่ membrane 0.22 ไมโครเมตร(Millipore Corporation, Bedford, Mass.) เก็บส่วนที่กรองได้ในหลอดปลอดเชื้อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4˚C เป็น stock ไวรัสเพื่อศึกษาต่อไป ส่วนการแยกแบคเทอริโอฟาจที่จำเพาะต่อ *S. typhi* นั้นทำการทดลองในทำนองเดียวกันแต่เปลี่ยนโฮสต์สำหรับแบคเทอริโอฟาจจาก *S. dysenteriae* เป็น *S. typhi*

การหาปริมาณแบคเทอริโอฟาจ

การหาปริมาณแบคเทอริโอฟาจใช้วิธี double-agar-layer plaque assay (Adams,1959) นำเชื้อ *S. dysenteriae/S. typhi* ที่ไว้เลี้ยงข้ามคืนปริมาตร 0.2 ml มาเติมด้วย stock ไวรัสที่แยกได้ปริมาตร 0.1 ml (ที่ทำการเจือจางให้มีความเจือจางที่เหมาะสม) เท Soft agar ปริมาตร 2.5 ml (แช่อยู่ใน water bath 55˚C) หมุนหลอดไปมาระหว่างอุ้งมืออย่างรวดเร็วแล้วเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypicase soy agar แล้วเอียงจานเลี้ยงเชื้อไปมาเพื่อให้ Soft agar กระจายทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว นำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 ˚C การตรวจผลหากมีเชื้อแบคเทอริโอฟาจที่ จำเพาะกับแบคทีเรียที่นำมาทดสอบจะเกิดบริเวณใสเรียกว่า plaque ซึ่งเกิดจากแบคเทอริโอฟาจทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก

การเพิ่มจำนวนแบคเทอริโอฟาจ

การเพิ่มจำนวนแบคเทอริโอฟาจทำได้โดยใช้สารละลายไวรัส ปริมาตร 10 ml (1 x 10^7 PFU/ml) เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypicase Soy broth ที่มี *S. dysenteriae* (1 x 10^5 CFU /ml) เลี้ยงไว้ข้ามคืน ปริมาตร 500 ml นำไปบ่มเขย่าด้วยความเร็ว 180 rpm ที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม chloroform ปริมาตร 10 ml เพื่อทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกและปลดปล่อยอนุภาคไวรัสออกมานอกเซลล์ บ่มเขย่าต่อด้วยความเร็ว 180 rpm ที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายไวรัสไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำการแยกเศษเซลล์ที่แตกสลายแล้วออกไป แล้วนำส่วนใสมากรองผ่านด้วย membrane filter ที่ปลอดเชื้อขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บส่วนที่กรองได้เก็บในหลอดปลอดเชื้อ ไว้ที่ 4˚C เป็น stock ไวรัสเพื่อศึกษาต่อไป สำหรับการเพิ่มจำนวนแบคเทอริโอฟาจที่จำเพาะต่อ *S. typhi* ทำการทดลองทำนองเดียวกันแต่เปลี่ยนโฮสต์สำหรับแบคเทอริโอฟาจจาก *S. dysenteriae* เป็น *S. typhi*

การศึกษาการเจริญของแบคเทอริโอฟาจ

ศึกษาการเจริญของแบคเทอริโอฟาจโดยใช้สารละลายไวรัสปริมาตร 2.0 ml (1 x 10^7 PFU/ml) ผสมกับเชื้อแบคทีเรียในระยะ log phase ปริมาตร 2.0 ml (1 x 10^5 CFU /ml) นำไปบ่มเขย่าด้วยความเร็ว 180 rpm ที่อุณหภูมิ 37˚C เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที โดยเก็บตัวอย่างที่เวลาละ 0.1 ml เพื่อหาปริมาณแบคเทอริโอฟาจโดยใช้วิธี double-agar-layer plaque assay ทำการนับจำนวน plaque ที่เกิดขึ้นและคำนวณค่าออกมามีหน่วยเป็น plaque forming unit ต่อ มิลลิลิตร (PFU/ml)

ทดสอบความคงตัวของแบคเทอริโอฟาจ

การทดสอบความคงตัวของแบคเทอริโอฟาจในอุณหภูมิและ pH ต่างๆ ใช้ วิธี double-agar-layer plaque assay ในการนับจำนวน plaque ที่เกิดขึ้น การทดสอบ ผลของอุณหภูมิทำโดยใช้สารละลายไวรัสปริมาตร 2.0 ml (1 x 10^8 PFU / ml) นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37, 42, 50, 60 และ 70˚C เก็บตัวอย่างทุก 30 นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ส่วนการทดสอบความคงตัวของแบคเทอริโอฟาจที่อุณหภูมิห้องเก็บตัวอย่างทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 2 เดือน การทดสอบผลของ pH ทำโดยใช้สารละลายไวรัสปริมาตร 0.1 ml (1 x 10^8 PFU / ml) ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypicase soy broth ปริมาตร 0.9 ml (ไม่มีแบคทีเรียเจริญอยู่) ซึ่งปรับ pH เป็น 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 และ 11 นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37˚C ทิ้งไว้ข้ามคืนเก็บตัวอย่างมาตรวจนับจำนวน plaque

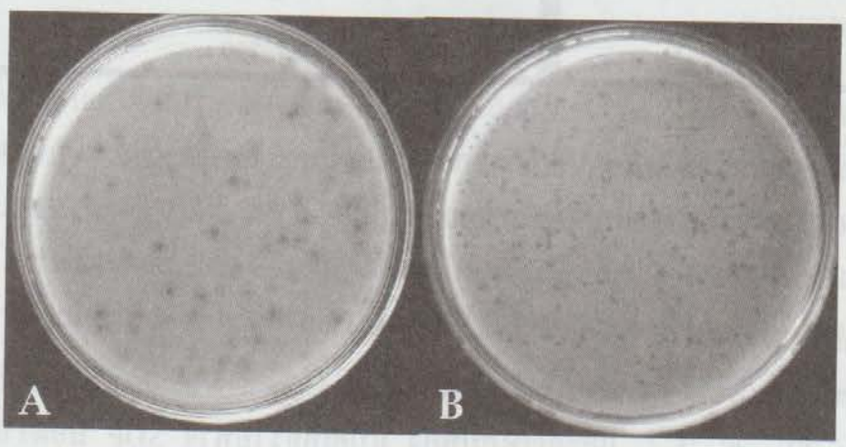
การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคเทริโอฟาจ

ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคเทอริโอฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน ด้วยการคงสภาพ (Fixative) ด้วย 2.5 % glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer (pH 7.3) โดยเติมน้ำยา Fixative ลงในตัวอย่างนาน 1-3 ชั่วโมง ทำการปั่น

เหวี่ยงสารละลายด้วย ความเร็ว 35,000 rpm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บตะกอนมาเติม phosphate buffer เพื่อล้าง Fixative ส่วนเกินออก หยดสารละลายไวรัสที่ทำการคงสภาพแล้วลงบน grid แล้วทำการย้อมสีโดยหยด 2 % Uranyl acetate จำนวน 1 หยดลงบน grid ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที (Hayat, 2000) แล้วใช้กระดาษกรอง (Whatman No. 1) ซับหรือแตะบริเวณขอบ ๆ ของ grid สารละลายจะถูกดูดซับออกไป ผึ่ง grid ให้แห้งในอากาศ ประมาณ 3-5 นาที นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (Jeol, model JEM-1010)

ผลการศึกษา

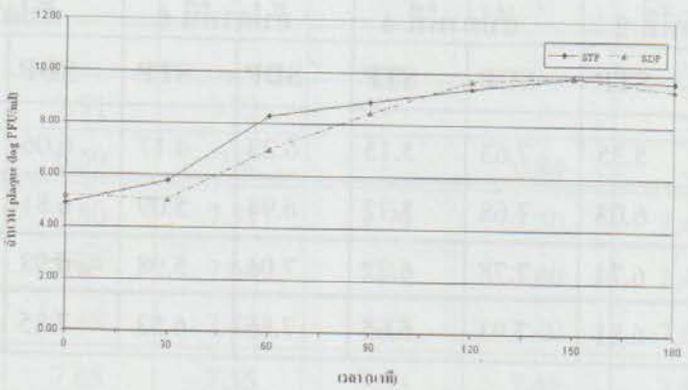
ไวรัสจำเพาะต่อแบคทีเรียสองชนิด คือ *S. dysenteriae* และ *S. typhi* แยกได้จากน้ำเสีย สถานีบ่อสูบน้ำเสียเทศบาลจังหวัดอุบลราชธานี ให้ชื่อว่า SDP และ STP ตามลำดับ ได้ใช้วิธี plaque assay ในการตรวจสอบ พบว่า plaque ที่เกิดจาก STP ให้ขนาดที่ใหญ่กว่า SDP คือ ประมาณ 5 ml ขณะที่ SDP มีขนาดประมาณ 1.5 ml (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงลักษณะ plaque ที่เกิดจากแบคเทอริโอฟาจ STP เมื่อใช้ *S. typhi* เป็นโฮสต์ (A) และ SDP เมื่อใช้เชื้อ *S. dysenteriae* เป็นโฮสต์ (B)

การเจริญของแบคเทอริโอฟาจ

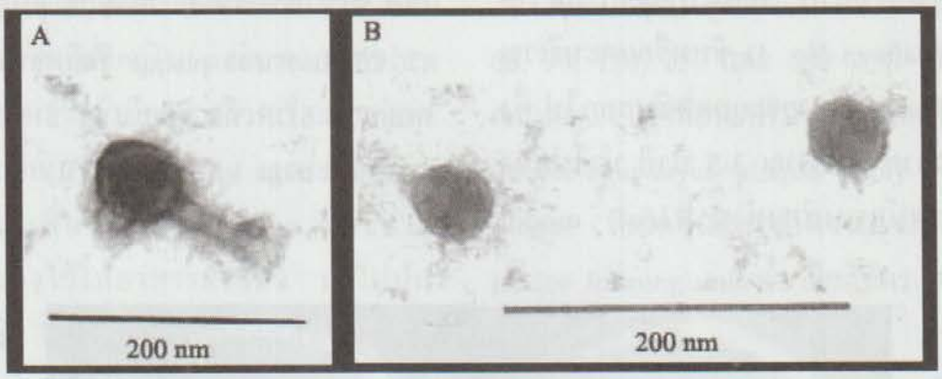
การเจริญของแบคเทอริโอฟาจในเวลา 30 นาทีแรก STP เริ่มมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ขณะที่ SDP ปริมาณยังคงที่ เมื่อเวลาผ่านไป 90 นาที STP เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในปริมาณที่มากกว่า SDP และแบคเทอริโอฟาจทั้งสองสายพันธุ์มีไตเตอร์สูงสุดประมาณ 7.5 x 10^9 PFU/ml เมื่อเวลาผ่านไป 150 นาที (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงกราฟการเจริญของแบคเทอริโอฟาจ SDP และ STP ใน *S. dysenteriae* และ *S. typhi* ตามลำดับ โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย 1 x 10^5 CFU /ml เริ่มต้นด้วย multiplicity of infection (m.o.i.) เท่ากับ 0.01 PFU/เซลล์และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ทำการนับจำนวน plaque ที่เกิดขึ้นที่เวลาต่างๆ

ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคเทริโอฟาจ

เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน พบว่าแบคเทอริโอฟาจทั้งสอง ส่วนหัวมีรูปร่างเป็นแบบ icosahedral โดย STP มีขนาดเล็กกว่า SDP คือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40-45 nm ขณะแบคเทอริโอฟาจ SDP ส่วนหัวเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 65-70 nm ส่วนหางมีส่วน sheath ที่ยืดและหดได้ ขนาดความยาวประมาณ 20-22 x 67-70 nm (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของแบคเทอริโอฟาจ SDP (A) และ STP (B) ด้วยกำลังขยาย 120,000 เท่า: scale bars เท่ากับ 200 nm

ความคงตัวของแบคเทอริโอฟาจ

การเก็บรักษาแบคเทอริโอฟาจในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypicase soy broth พบว่าหลังการเก็บรักษานาน 10 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ -70, -20, 4 °C และอุณหภูมิห้อง แบคเทอริโอฟาจ SDP มีอัตราการรอดชีวิต คิดเป็นร้อยละ 98.1, 86.6, 84.2 และ 73.2 ตามลำดับ สำหรับ STP คิดเป็นร้อยละ 93.8, 85.6, 71.8 และ 50.1 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ปริมาณแบคเทอริโอฟาจ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ โดยใช้ปริมาณแบคเทอริโอฟาจ SDP และSTP เริ่มต้นที่ 8.00 log PFU/ml และ 6.94 log PFU/ml ตามลำดับ

อุณหภูมิ	ปริมาณแบคเทอริโอฟาจ (log PFU/ml)									
	สัปดาห์ที่ 2		สัปดาห์ที่ 4		สัปดาห์ที่ 6		สัปดาห์ที่ 8		สัปดาห์ที่ 10	
	SDP	STP	SDP	STP	SDP	STP	SDP	STP	SDP	STP
อุณหภูมิห้อง	7.73	5.35	7.63	5.15	6.23	4.17	6.06	4.13	5.86	3.89
4°C	7.75	6.03	7.68	5.72	6.94	5.09	6.81	5.02	6.73	4.98
-20°C	7.92	6.74	7.78	6.22	7.06	5.98	6.98	5.92	6.92	5.94
-70°C	7.99	6.81	7.93	6.65	7.86	6.53	7.85	6.50	7.85	6.51

การทดสอบความคงตัวของแบคเทอริโอฟาจ ที่อุณหภูมิ 37, 42, 50, 60 และ 70°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แบคเทอริโอฟาจ SDP มีอัตราการรอดชีวิต คิดเป็นร้อยละ 96.9, 94.5, 88, 85.9 และ 71.4 ตามลำดับ สำหรับ STP คิดเป็นร้อยละ 94.2, 95.1, 95.2, 82.9 และตรวจไม่พบแบคเทอริโอฟาจ ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณแบคเทอริโอฟาจ เมื่อทดสอบความคงทนที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยใช้ปริมาณแบคเทอริโอฟาจ SDP และ STP เริ่มต้นที่ 8.00 log PFU/ml และ 7.90 log PFU/ml ตามลำดับ

	ปริมาณแบคเทอริโอฟาจ (log PFU/ml)					
เวลา (นาที)	60		120		180	
อุณหภูมิ (°C)	SDP	STP	SDP	STP	SDP	STP
37	7.97	7.77	7.86	7.58	7.75	7.44
42	7.93	7.69	7.81	7.58	7.56	7.51
50	7.87	7.7	7.76	7.6	7.04	7.52
60	7.05	7.73	6.9	6.99	6.87	6.55
70	5.89	-	5.89	-	5.71	-

หมายเหตุ - ไม่เกิด plaque

เมื่อทำการทดสอบแบคเทอริโอฟาจที่ pH 2-11 เป็นเวลา 3 วัน วันที่ 1 ระดับ pH 2 และ 3 ไม่สามารถตรวจพบแบคเทอริโอฟาจ SDP และ STP ได้ แต่พบว่า pH 7 แบคเทอริโอฟาจทั้งสองมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดคือ ร้อยละ 97.9 วันที่ 2 ที่ pH 2-5 ไม่สามารถตรวจพบแบคเทอริโอฟาจ SDP แต่ STP ตรวจพบได้ที่ระดับ pH 5-11 โดย SDP และ STP มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดร้อยละ 97.4 ที่ระดับ pH 6 และ 7 ตามลำดับ วันที่ 3 มีลักษณะคล้ายวันที่ 2 คือ ตรวจไม่พบ SDP ที่ pH 2-5 แต่ STP ตรวจพบได้ที่ pH 5-11 โดย SDP มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดร้อยละ 93.5 ระดับ pH อยู่ในช่วง 7-9 และ STP ที่ pH 7 มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดร้อยละ 96.7 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ปริมาณแบคเทอริโอฟาจ เมื่อทดสอบความคงทนที่ pH ต่างๆ เป็นเวลา 3 วัน โดยใช้ปริมาณแบคเทอริโอฟาจ SDP และ STP เริ่มต้นที่ 8.00 log PFU/ml และ 7.80 log PFU/ml ตามลำดับ

pH	ปริมาณแบคเทอริโอฟาจ (log PFU/ml)					
	24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		72 ชั่วโมง	
	SDP	STP	SDP	STP	SDP	STP
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	2.91	3.72	-	-	-	-
5	6.59	7.2	-	6.84	-	6.33
6	7.80	7.51	7.79	7.50	7.40	7.46
7	7.83	7.64	7.51	7.60	7.48	7.54
8	7.68	7.47	7.57	7.40	7.47	7.38
9	7.65	7.55	7.53	7.49	7.48	7.45
10	7.65	7.61	7.62	7.51	7.38	7.50
11	7.53	7.62	6.54	7.55	6.48	7.43

หมายเหตุ - ไม่เกิด plaque

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

แบคเทอริโอฟาจเป็นไวรัสกลุ่มใหญ่ที่สุดกลุ่มหนึ่งของไวรัสที่พบในขณะนี้และมีความหลากหลายกระจายทั่วไปในธรรมชาติ (Ackermann and Dubow, 1987) การแยกและเพาะเลี้ยงแบคเทอริโอฟาจจากธรรมชาติสามารถทำได้ง่ายและมีราคาถูก เชื้อแบคทีเรียจีนัส *Shigella* พบได้ในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ (Hacker et al., 1997) สามารถแยกแบคเทอริโอฟาจที่จำเพาะต่อ *Shigella dysenteriae* type 1 และใช้เป็นเป็นดัชนีบ่งชี้ การปนเปื้อนของ *Shigella dysenteriae* type 1 ในแหล่งน้ำ (Faruque et al., 2003) และพบแบคเทอริโอฟาจที่สามารถทำให้เซลล์ *S. dysenteriae* แตก (Goodridge et al., 2001)

จากการทดลองได้ศึกษาเปรียบเทียบไวรัสจำเพาะต่อเชื้อ *S. dysenteriae* และ *S. typhi* ซึ่งแยกได้จากน้ำเสียในจังหวัดอุบลราชธานี ให้ชื่อว่า SDP และ STP ตามลำดับ ได้ใช้วิธี double-agar-layer plaque assay ในการตรวจสอบ พบว่า plaque ที่เกิดจาก STP ให้ขนาดที่ใหญ่กว่า SDP (รูปที่ 1) STP สามารถเพิ่มจำนวนได้ตั้งแต่ 30 นาทีแรกเมื่อศึกษาการเจริญและแบคเทอริโอฟาจทั้งสองสายพันธุ์มีจำนวนมากที่สุดเวลา150 นาทีโดยมีไตเตอร์เป็น 7.5 x 10^9 PFU/ml (รูปที่ 2) จากภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบคเทอริโอฟาจทั้งสองมีรูปร่างส่วนหัวเป็น แบบ icosahedral โดย STP มีขนาดเล็กกว่า SDP คือขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40-45 nm และ SDP ส่วนหัวเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 65-70 nm ส่วนหางมีส่วน sheath ที่ยืดและหดได้ ขนาดความยาวประมาณ 20-22 x 67-70 nm (รูปที่ 3) สามารถเก็บรักษาไวรัส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องได้นานกว่า 2 เดือน ทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 3 ชั่วโมง สามารถตรวจสอบแบคเทอริโอฟาจ STP และ SDP ได้ที่อุณหภูมิ 60 และ 70 °C ตามลำดับ เมื่อศึกษาข้ามคืนแบคเทอริโอฟาจทนต่อ pH ในช่วงที่ค่อนข้างกว้าง คือ pH 4-11 จากการที่แบคเทอริโอฟาจสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงและ pH ในช่วงที่กว้างนั้นได้มีผู้ศึกษาความคงตัวของแบคเทอริโอฟาจที่จำเพาะต่อ *Escherichia coli* (coliphages) ในน้ำเสีย พบว่าแบคเทอริโอฟาจสามารถทนต่ออุณหภูมิ 60 °C ได้นานกว่า 30 นาที (Mocé-Llivina et al., 2003) นอกจากนี้แบคเทอริโอฟาจ VHS1 ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* สามารถทนต่อ pH ในช่วงกว้าง (3-11) อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และอยู่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่อุณหภูมิห้องได้นานกว่า 1 ปี (Pasharawipasb et al., 2005)

แบคเทอริโอฟาจที่ทำการศึกษาครั้งนี้อาจนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมหรือทำลาย เชื้อที่ปนเปื้อนในอาหารหรือแหล่งน้ำ จัดจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ (phage typing) ตรวจหาแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหาร (Chen et al., 1996; Goode et al., 2003) ควบคุมเชื้อที่ก่อโรคในสัตว์ (Barrow et al., 1998) และมีรายงานว่าการใช้แบคเทอริโอฟาจในการตรวจหาแบคทีเรียนั้นให้ความไวสูงในการตรวจสอบ (Goodridge and Griffiths, 2002)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่ให้การสนับสนุนด้านห้องปฏิบัติการ และหน่วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนช่วยวิเคราะห์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ให้ความอนุเคราะห์ถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน รวมทั้งผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ. (2540). **ไวรัสวิทยา.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: อักษรสมัย.

Ackermann, H.W. and Dubow, M.S. (1987). Viruses of prokaryotes, vol. II. Natural groups of bacteriophages. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

Adams, M.H. (1959). Bacteriophage. New York: Interscience Publishers, Inc.

Barrow P., Lovell, M. and Berchieri, A. Jr. 1998. Use of Lytic Bacteriophage for Control of Experimental *Escherichia coli* Septicemia and Meningitis in Chickens and Calves. Clin Diagn Lab Immunol. 5: 294-298.

Campbell, M.A. (2001). Bacteriophage. In Knipe, D.M., Howley, P.M. and Griffin, D.E. Fields Virology (4^{th} edition), Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 659-682.

Chen, J. and Griffiths, M.W. (1996). *Salmonella* detection in eggs using *lux*$^{+}$ bacteriophages. J Food Prot. 59:908-914.

Faruque, S.M., Chowdhury, N., Khan, R., Hasan, M.R., Nahar, J., Islam, M.J., Yamasaki, S., Ghosh, A.N., Nair, G.B., Sack, D.A. (2003). *Shigella dysenteriae* Type 1-Specific Bacteriophage from Environmental Waters in Bangladesh. Appl Environ microbial. 69: 7028-7031.

Faruque, S.M., Khan, R., Kamruzzaman, M., Yamasaki, S., Ahmad, Q.S., Azim, T., Nair, G.B., Takeda, Y., Sack, D.A. (2002). Isolation of *Shigella dysenteriae* Type 1 and *S. flexneri* Strains from Surface Waters in Bangladesh: Comparative Molecular Analysis of Environmental *Shigella* Isolates versus Clinical Strains. Appl Environ microbial. 68: 3908-3913.

Gerba, C.P., Wallis, C. and Melnick J.L. (1975). Viruses in water: the problem, some solutions. Environ Sci Technol. 9: 1122-1126.

Goode, D., Allen, V.M. and Barrow, P.A. (2003). Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. Appl Environ Microbiol. 69:5032-5036.

Goodridge, L., Gallaccio, A. and Griffiths, W.M. (2001). Morphological, Host Range, and Genetic Characterization of Two Coliphages. Appl Environ microbial. 69: 5364-5371.

Goodridge, L. and Griffiths, M. (2002). Reporter bacteriophage assays as a means to detect foodbornd pathogenic bacteria. Food Res Inter. 35: 863-870

Goyal, S.M., Gerba, C.P. and Bitton, G. (1987). Phage Ecology. New York: John Wiley and Sons.

Grabow, W. (2001).Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water. Water SA. 27: 251-268.

Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I., Tschape, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. Mol Microbiol. 23:1089-1097.

Hayat, M.A. (2000). Principles and Techniques of Electron Microscopy. The Press Syndicate of The University of Cambridge.

Havelaar, A.H. and Pot-Hogeboom, W.M. (1988). F-specific RNA-bacteriophages as model viruses in water hygiene: Ecological aspects. Water Sci Technol. 20: 399-407.

Lasobras, J., Dellund?, J., Jofre, J., Lucena, F. (1999). Occurrence and levels of phages proposed as surrogate indicators of enteric viruses in different types of sludges. J Appl Microbiol. 86:723-729.

Madigan M.T. and Martinko M.J. (1997). Brock Biology of Microorganisms. 8th edition. New York: Prentice-Hall, Inc.

Mocé-Llivina, L., Muniesa, M., Pimenta-Vale, H., Lucena, F., Jofre, J. (2003). Survival of Bacterial Indicator Species and Bacteriophages after Thermal Treatment of Sludge and Sewage. Appl Envir Microbiol. 69: 1452-1456

Niemi, M. (1976). Survival of Escherichia coli phage T7 in different water types. Water Res. 10: 751-755.

Pasharawipasb, T., Thaikuaa, S., Sriurairatanaa, S., Ruangpanc, L., Direkbusarakumd, S., Manopvisetchareana J., Flegela, W.T. (2005). Partial characterization of a novel bacteriophage of Vibrio harveyi isolated from shrimp culture ponds in Thailand. Virus Res. 114:63-69.

Pelczar, M.J. (Jr), Chan, E.C.S., and Krieg, N.R. (1988). Microbiology (5th edition). New York: McGraw-Hill Book Company.

Schwartzbrod, L. and Mathieu, C. (1986). Virus recovery from waste water treatment plant sludges. Water Res. 20:1011-1013.

Seeley, N.D. and Primrose, S.B. (1980). The effect of temperature on the ecology of aquatic bacteriophages. J Gen Virol. 46: 87-95.

❑❑❑❑❑

ว.วิทย. มข. 35(1) 123-133 (2550) KKU Sci. J.35(1) 123-133 (2007)

การศึกษาอิทธิพลของตัวแปรบางประการที่มีผลกระทบต่อสมบัติของไพโอไซยานิน

A study on an influence of some factors affecting on pyocyanin

สันติ ทองธรรมมา[1] ศักดิ์สิทธิ์ จันทร์ไทย[1] วรรณดี บัญญัตรัชต[2] และ เฉลิม เรืองวิริยะชัย[1]*

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* สามารถผลิตไพโอไซยานินสีน้ำเงินประมาณ 1.0 กรัม เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรคิงก์ เอ ปริมาตร 1 ลิตร หลังจากผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ด้วยแอมเบอร์ไลต์ เอ็กซ์ เอ ดี-16 จากนั้นจึงทำบริสุทธิ์ไพโอไซยานินที่ได้ด้วยวิธีการสกัดแบบของเหลว-ของเหลวก่อน แล้วผ่านลงในคอลัมน์ซิลิกา เจล พบว่า เมื่อชะครั้งแรกด้วยไดคลอโรมีเทนจะได้สารสีเหลืองหนัก 10.6 มิลลิกรัม แล้วชะตามด้วย 95% ไดคลอโรมีเทนในเมทานอลโดยปริมาตร จะได้สารสีน้ำเงินหนัก 9.57 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร เมื่อทำการศึกษาอิทธิพลของพีเอช ระยะเวลาในการเก็บแสง และอุณหภูมิที่มีผลกระทบต่อการสลายตัวของไพโอไซยานินที่ได้ พบว่า พีเอชมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายและสเปกตรัมการดูดกลืนแสง โดยทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงที่ความยาวคลื่น 279 และเพิ่มขึ้นที่ 311 นาโนเมตร เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น รวมถึงระยะเวลาในการเก็บต่างก็มีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติของไพโอไซยานินที่พีเอช 11.0 หรือมากกว่า ซึ่งทำให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเลื่อนจาก 311 เป็น 294 นาโนเมตร แสดงให้เห็นว่าในสารละลายเบสแก่ไพโอไซยานินอาจเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็น 1-ไฮดรอกซีฟีนาซีน เมื่อเก็บไพโอไซยานินไว้ในช่องแช่แข็ง -4 องศาเซลเซียส สามารถชะลอการสลายตัวของไพโอไซยานินได้นานกว่าที่อุณหภูมิห้อง อย่างไรก็ตามแสงไม่ส่งผลให้ไพโอไซยานินสลายตัวอย่างมีนัยสำคัญ

[1] ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ.ขอนแก่น 40002

[2] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ.ขอนแก่น 40002

[1*] Corresponding author, e-mail: chal_ru@kku.ac.th

Abstract

In this study, pyocyanin (blue color) can be produced by *Pseudomonas aeruginosa* when incubating with King's A medium. After isolation with Amberlite XAD-16 resins, the crude blue fraction of phenazine product was obtained about 1.0 g/l. In purification step, the pyocyanin fraction was extracted with liquid-liquid extraction and the extracted pyocyanin was passed through the silica gel column. The yellow pigment was eluted first with dichloromethane, yielding approximately 10.6 mg/l. The blue one was eluted with 95% v/v dichloromethane in methanol and yielded about 9.57 mg/l. The effects of pH, storage time, daylight and temperature on some properties of pyocyanin were studied. The results indicated that pH affects on both color change and absorption spectrum of pyocyanin at which the absorbance decrease at 279 nm and increase at 311 nm when increasing of pH. Storage time of solution at pH $\geq$ 11.0 strongly resulted in the absorption wavelength shifted from 311 to 294 nm. This indicates that the pyocyanin may change its structural properties to be 1-hydroxyphenazine under base hydrolysis. The storage of pyocyanin at freeze - 4 °C (in refrigerator) could be retarded the decomposing mechanism of pyocyanin longer than that at room temperature. However, the light is seemed to have no significant effect on pyocyanin degradation.

บทนำ

ฟีนาซีน (phenazine) เป็นสารปฏิชีวนะธรรมชาติอย่างหนึ่งที่ผลิตได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ ทั้งที่อยู่ในดิน เสมหะ และปัสสาวะของผู้ป่วย แบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas* (Delaney et al., 2001) สามารถผลิตสารฟีนาซีนได้เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่างๆ เช่น อาหารเหลวสูตร King's A, KA (Fernández et al., 1997) อาหารเหลวสูตร King's B, KB (Ohfuji et al., 2004) และอาหารเหลวสูตร Luria-Bertani, LB (Hernández et al., 2004) เป็นต้น ซึ่งระยะเวลาในการเลี้ยงจะแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหาร และมีเฉพาะ *Pseudomonas aeruginosa* เท่านั้นที่สามารถผลิตสารไพโอไซยานินได้ โดยสังเกตเห็นเม็ดโคโลนีสีเขียวของเชื้อบนอาหารแข็งสูตร LB และยังสามารถผลิตสารอนุพันธ์อื่น ๆ ของฟีนาซีนได้อย่างน้อย 3 ชนิด ได้แก่ไพโอไซยานิน (pyocyanin) 1-ไฮดรอกซีฟีนาซีน (1-hydroxyphenazine) ฟีนาซีน-1-คาร์บอกซาไมด์ (phenazine-1-carboxamide) และกรดฟีนาซีน-1-คาร์บอกซิลิก (phenazine-1-carboxylic acid) (Chin-A-Woeng et al., 2003) นอกจากนี้ 1-ไฮดรอกซีฟีนาซีนยังสามารถเตรียมได้ง่ายจากการไฮโดรไลซิสไพโอไซยานินด้วยเบสอีกด้วย (Wilson et al., 1987) ไพโอไซยานินเป็นสารที่มีสีน้ำเงินเข้มมีค่าจุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 131-132 °C และให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 279 นาโนเมตร เมื่อละลายในกรดเกลือ เข้มข้น 0.02 โมลาร์ (Fern?ndez et al., 1997) สามารถละลายได้ดีทั้งในคลอโรฟอร์ม และกรดเกลือ ในงานวิจัยที่ผ่านมามีการนำไพโอไซยานินไปประยุกต์ใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น ใช้ลดการเสื่อมสภาพของน้ำมันดิบ ซึ่งมีผลกระทบมาจากจุลินทรีย์บางชนิด (Norman et al, 2004) ใช้เป็นตัวกลางในการผลิตกลูโคสเซนเซอร์ (Ohfuji et al., 2004) เนื่องจากมีโครงสร้างที่เป็นสารรีดอกซ์ (redox cyclic compound) (Mavrodi et al., 2001; Stead et al., 1996) ใช้เป็นตัวบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ (Reyes et al., 1981) นอกจากนี้ยังสามารถนำ

ไพโอไซยานินไปประยุกต์ด้านเกษตรกรรมเนื่องจากเป็นสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและราบางชนิดได้อีกด้วย (Kerr et al., 1999)

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาสมบัติทางกายภาพบางประการของไพโอไซยานินที่ได้ ซึ่งเป็นอนุพันธ์ชนิดหนึ่งของสารฟีนาซีน ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* โดยพิจารณาผลของพีเอช (pH) ระยะเวลาในการเก็บสาร ผลของอุณหภูมิ และแสง ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงและความเสถียรของไพโอไซยานิน อันจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญในการนำไพโอไซยานินไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่นๆ ต่อไป

การทดลอง

1. การผลิต และการแยกสารที่ได้จากแบคทีเรีย *P. aeruginosa*

นำแบคทีเรีย *P. aeruginosa* มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ลอเรีย-เบอร์ตานิ เอการ์ (Luria-Bertani agar; LB) (Hern?ndez et al., 2004) และบ่มเลี้ยงเชื้อนี้ที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นเม็ดโคโลนีเดี่ยวสีเขียวของ *P. aeruginosa* เกิดขึ้น หลังจากนั้นนำโคโลนีเดี่ยว มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร คิงก์ เอ (King's A; KA) (Fernández et al., 1997) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (27-30°C) ในสภาวะที่มีการให้ออกซิเจนบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อสีเขียวแกมน้ำเงินเกิดขึ้น ซึ่งเรียกอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ว่า สารละลายตั้งต้น (starter) ปิเปตสารละลายตั้งต้นที่ได้ลงในอาหารเหลวสูตร คิงก์ เอ ปริมาตร 1 ลิตร ในอัตราส่วน 1 ต่อ 100 เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตไพโอไซยานินให้มากขึ้น และบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องในสภาวะที่มีการให้ออกซิเจนบนเครื่องกวนสารด้วยอัตราเร็ว 1,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เติมเกลือแกงและแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อตกตะกอนโปรตีน แยกตะกอนออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จะได้สารละลายใสสีเขียวแกมน้ำเงิน นำสารละลายที่ได้ผ่านลงในคอลัมน์แอมเบอร์ไลต์ เอ็กซ์ เอ ดี-16 (Amberlite XAD-16; Fluka Co., France) (Stead et al., 1996) ล้างด้วยน้ำกลั่น และชะตามด้วย 70% อะซิโตไนไทรล์-น้ำกลั่น (Acetonitrile; Lab Scan Ltd., Ireland) โดยปริมาตร ตามลำดับ นำสารละลายที่แยกเก็บได้ไปวิเคราะห์เบื้องต้นด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer, Model AGILENT 8453 UV-Visible Spectroscopy System, Germany) (Fernández et al., 1997) ในช่วงความยาวคลื่นที่ 220 ถึง 550 นาโนเมตร เก็บสารละลายที่แยกได้โดยกำจัดตัวทำละลายออก และทำให้แห้งแบบดูดไอน้ำออก (Lyophilization; Freeze-Dryer; FTS System, Stone Ridge, USA.)

2. การทำบริสุทธิ์สารที่แยกได้

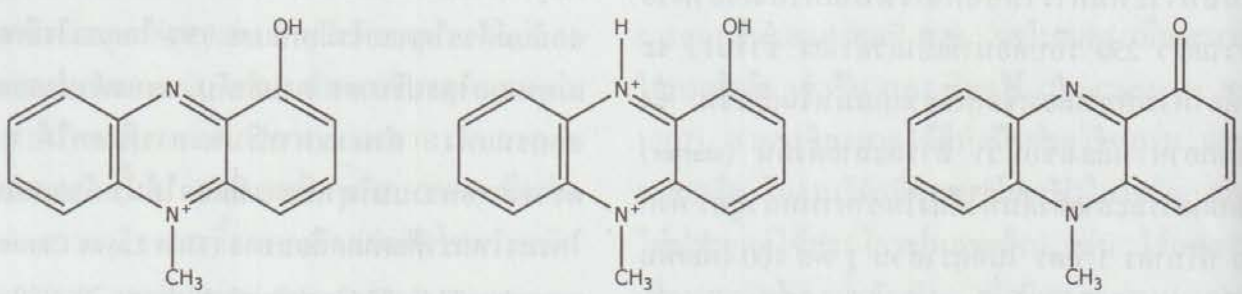
นำไพโอไซยานินที่แยกได้มาละลายน้ำกลั่นแล้วสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane; Carlo Erba, Italy) 3 ครั้ง ๆ ละ 50 มิลลิลิตรในกรวยสกัดขนาด 250 มิลลิลิตร (Stead et al., 1996) นำสารละลายในชั้นสารอินทรีย์ไประเหยตัวทำละลายด้วยการกลั่นแบบลดความดันจนเหลือสารสกัดปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้นี้ ไปผ่านลงในคอลัมน์ซิลิกา เจล (silica gel; Carlo Erba, Italy) (Fernández et al., 1997) และชะสารออกจากคอลัมน์ด้วยไดคลอโรมีเทนและ 95% ไดคลอโรมีเทน-เมทานอลโดยปริมาตร ตามลำดับ ระเหยตัวทำละลายออกจนแห้ง คำนวณหาปริมาณสารที่แยกได้ และตรวจสอบความบริสุทธิ์สารที่แยกได้นั้นด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง (Thin Layer Chromatography, TLC, TLC aluminium sheets 20 x 20 cm silica gel 60 F_{254}, Merck, Germany) และโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบเฟสผันกลับ (Reverse phase High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC; HPLC Instrument; Empower software, Waters 600 HPLC pump, Waters 2996 Photodiode Array detector, Waters, U.S.A.) โดย

ใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม คือ 95% ไดคลอโรมีเทน-เมทานอลโดยปริมาตร เป็นตัวชะของ TLC

สำหรับ RP-HPLC ใช้เฟสนิ่งแบบ C18 (Nucleosil 5 µm, C18 100A (150x4.6 mm, i.d.) Phenomenex, Australia.) ส่วนเฟสเคลื่อนที่นั้นจะใช้ตัวทำละลายที่ปรับเปลี่ยนอัตราส่วนจากตัวทำละลาย เอ (น้ำกลั่น: อะซิโตไนไทรล์: กรดไตรฟลูออโรอะซิติก ในอัตราส่วน 5: 95: 0.01 โดยปริมาตร) ต่อตัวทำละลาย บี (น้ำกลั่น: กรดไตรฟลูออโรอะซิติก ในอัตราส่วน 100: 0.01 โดยปริมาตร) (Fernández et al., 1997) จาก 0% ของตัวทำละลาย เอ ด้วยการปรับเปลี่ยนเชิงเส้นตรงเป็น 55% โดยปริมาตรที่เวลาเริ่มต้น t = 0 ถึง t = 15 นาที และคงที่ในอัตราส่วนนี้ที่เวลา t = 15 นาทีจนถึงเวลาสุดท้าย t = 30 นาที ตามลำดับ โดยใช้อัตราการการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยฉีดสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลต และวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ตรวจวัดด้วยโฟโตไดโอดอาร์เรย์ (photodiode array detector) นอกจากนี้ยังวิเคราะห์โครงสร้างสารที่แยกได้ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรเมทรี (Spectrum one FT-IR spectrometer, Perkin Elmer, Germany) และเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรีอีกด้วย (GC-MS) (Thermo Finnigan Trace GC, Polaris Q, Ion Trap mass spectrometry (Italy) with Zebron capillary (ZB-5) GC column (30 m x 0.25 i.d.) Phenomenex, U.S.A.).

3. การศึกษาตัวแปรบางชนิดที่มีอิทธิพลต่อไพโอไซยานิน

อิทธิพลของพีเอช และความเสถียรที่มีผลต่อสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของไพโอไซยานิน: นำไพโอไซยานินบริสุทธิ์มาละลายในน้ำปราศจากไอออน ที่ความเข้มข้น 0.12 มิลลิโมลาร์ จากนั้นปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 2-11 บันทึกสีสารละลายของแต่ละพีเอช พร้อมบันทึกผลก่อนและหลังของสารตัวอย่างเหล่านี้ด้วยการวัดสเปกตรัมการดูดกลืนแสงโดยเครื่องอัลตราไวโอเลต และวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ในช่วงความยาวคลื่นที่ 220-550 นาโนเมตร จากนั้นเก็บสารละลายไพโอไซยา นินของแต่ละพีเอชไว้ที่อุณหภูมิห้องและในที่มืด ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เวลา 0, 5, 15, 25, 40 และ 50 ชั่วโมง ตามลำดับ ตลอดการทดลองเพื่อตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 279, 294 และ 311 นาโนเมตร



I II III

รูปที่ 1 โครงสร้างของไพโอไซยานินสปีชีส์: I, ไพโอไซยานิน (สีน้ำเงิน), II, Protonated ไพโอไซยานิน (สีแดง), III, Semiquinoid (SQ) form ของไพโอไซยานิน (สีเขียว) (Vukomanovic et al., 1997)

อิทธิพลของแสงที่มีต่อสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของไพโอไซยานิน: นำไพโอไซยานินบริสุทธิ์มาละลายในน้ำปราศจากไอออนที่ความเข้มข้น 4.5 และ 15.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ นำสารละลายทั้งสองมาปรับพีเอช 7.0 แล้วแบ่งสารละลายไพโอไซยานินออกเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กันในแต่ละความเข้มข้น โดยเก็บส่วนแรกไว้ในที่มืดและวางส่วนที่สองไว้ในบริเวณที่มีการให้แสงอย่างต่อเนื่องด้วยหลอดไฟขนาด 100 วัตต์ หลังจากนั้นนำสารละลายตัวอย่างเหล่านี้ไปตรวจวัดสเปกตรัมการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลต และวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ในช่วงความยาวคลื่นที่ 220-550 นาโนเมตร โดยศึกษาอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 14 วัน

อิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของไพโอไซยานิน: เก็บไพโอไซยานินไว้ใน 2 สภาวะการทดลอง คือ ที่อุณหภูมิห้อง และช่องแช่แข็ง - 4°C เพื่อศึกษาความเสถียรของไพโอไซยานิน ตรวจสอบการสลายตัวของไพโอไซยานินด้วย TLC โดยใช้ 95%ไดคลอโรมีเทน-เมทานอลโดยปริมาตรเป็นเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาโดยปรับเปลี่ยนการทดลองจาก Gurusiddaiah และคณะ (Gurusiddaiah et al., 1986)

ผลการทดลอง และวิจารณ์

1. การผลิต และการแยกสารที่ได้จากแบคทีเรีย *P. aeruginosa*

จากการทดลองพบว่า *P. aeruginosa* สามารถผลิตสารฟีนาซีนในอาหารเหลวสูตร คิงก์ เอ ได้มากที่สุดภายในเวลา 36 ชั่วโมง และสามารถแยกสารได้เป็นสองส่วนด้วยคอลัมน์แอมเบอร์ไลต์ เอ็กซ์ เอ ดี 16 และชะตามด้วย 70% อะซิโตไนไทรล์-น้ำ โดยส่วนแรกได้สารละลายสีน้ำตาลแดง และส่วนที่สองเป็นสารละลายสีเขียวแกมน้ำเงิน นำสารในส่วนที่สองไปวิเคราะห์ โดยตรวจวัดสเปกตรัมการดูดกลืนแสง พบว่าเป็นอนุพันธ์ของสารฟีนาซีนชนิดหนึ่ง ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ 279 นาโนเมตรในกรดเกลือเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ซึ่งสอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของไพโอไซยานิน (Fernández et al., 1997) และพบว่า ได้สารสกัดประมาณ 1.0 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร

2. การทำบริสุทธิ์สารที่แยกได้

เมื่อนำสารสกัดที่ได้ไปสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน แล้วผ่านในคอลัมน์ซิลิกา เจล พบว่าสามารถชะสารสีเหลืองออกมาได้ด้วยไดคลอโรมีเทน และชะสารละลายสีน้ำเงินออกมาได้ด้วย 95%ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล โดยปริมาตร นอกจากนี้ยังคงมีแถบสีน้ำตาลติดอยู่ส่วนบนของคอลัมน์ เมื่อระเหยตัวทำละลายออกจนแห้ง พบว่าได้สารรูปเข็มสีเหลืองหนัก 10.6 มิลลิกรัม และสารรูปเข็มสีน้ำเงินหนัก 9.57 มิลลิกรัม ตามลำดับ ซึ่งเป็นน้ำหนักสารที่ผลิตได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร จากนั้นตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารที่แยกได้ด้วย TLC โดยใช้ 95% ไดคลอโรมีเทน-เมทานอลโดยปริมาตรเป็นเฟสเคลื่อนที่ ปรากฏว่ามีเพียงจุดเดียว ซึ่งให้ค่า R_f ที่ 0.78 ± 0.01 สำหรับสารสีเหลืองที่แยกได้ และ ที่ 0.23 ± 0.01 สำหรับสารสีน้ำเงินที่แยกได้ เมื่อนำสารละลายทั้งสองส่วนนี้ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย RP-HPLC พบว่าได้พีกเดียวเช่นเดียวกัน ซึ่งให้ค่าเวลาการคงอยู่ ที่ 12.7 และ 21.0 นาทีสำหรับสารสีน้ำเงิน และสารสีเหลือง ตามลำดับ หลังจากนำไปตรวจวัดสเปกตรัมการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลต และวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 220-550 นาโนเมตร พบว่าสารสีน้ำเงินนั้นให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 279 นาโนเมตร ซึ่งสอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของไพโอไซยานิน ส่วนสารสีเหลืองนั้นให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 263 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของ 1-ไฮดรอกซีฟีนาซีน (Fernández et al., 1997) ดังสรุปผลการทดลองในตารางที่ 1

เมื่อนำสารที่แยกได้ของสารสีเหลือง และสารสีน้ำเงินไปพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางอินฟราเรด สเปกโทรเมตรี พบว่า สารสีน้ำเงิน และ

สารสีเหลืองจะแสดงอินฟราเรด สเปกตรัมที่มีลักษณะเป็นแบนกว้างของหมู่ไฮดรอกซิล ที่มีการสั่นแบบยืดที่เลขคลื่น 3,477 ต่อเซนติเมตร สำหรับสารสีน้ำเงิน และที่เลขคลื่น 3,233 ต่อเซนติเมตร สำหรับสารสีเหลือง ซึ่งเป็นย่านของหมู่ฟังก์ชันที่สามารถบอกได้ว่าสารที่แยกได้ทั้งสองส่วนนี้มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ภายในโมเลกุล เมื่อนำสารที่แยกได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี (GC-MS) พบว่าสารสีเหลืองแสดงค่าแฟรกเมนท์ไอออนหลัก ๆ ที่ m/z 195.98 [$M.^+$] และที่ m/z 168.09 [$M.^+$-CO] จากข้อมูลที่ได้นี้พิสูจน์ได้ว่าสารสีเหลืองที่ได้คือ 1-ไฮดรอกซีฟีนาซีน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wilson และ คณะ (Wilson et al., 1987) ส่วนสารสีน้ำเงินนั้นไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วย GC-MS ได้ เนื่องจากเกิดการสลายตัวได้ง่ายภายใต้อุณหภูมิที่สูงจากเครื่อง GC ดังนั้น จึงสามารถพิสูจน์ได้โดยการตั้งสมมติฐานว่าสารสีน้ำเงินที่ได้นั้นน่าจะเป็นไพโอไซยานิน ซึ่งสามารถสลายตัวไปเป็น 1-ไฮดรอกซีฟีนาซีนได้โดยการไฮโดรไลซีสด้วยเบสแก่ (Wilson et al., 1987, Muller et al., 1995) เมื่อนำสารที่ได้จากการไฮโดรไลซิสไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทาง GC-MS เช่นเดียวกันสารสีเหลืองที่แยกในตอนแรกพบว่าให้แมสสเปกตรัมที่เหมือนกัน ดังนั้นจึงสามารถอ้างได้ว่าสารสีน้ำเงินที่แยกได้นั้น คือไพโอไซยานิน (ไม่แสดงข้อมูลการทดลอง)

3. การศึกษาตัวแปรบางประการที่มีอิทธิพลต่อไพโอไซยานิน

อิทธิพลของพีเอชและความเสถียรที่มีผลต่อสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของไพโอไซยานิน: เนื่องจากไพโอไซยานินมีหมู่ไฮดรอกซี (-OH) อยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 จึงแสดงสมบัติเป็นอนุพันธุ์ของฟีนอล ซึ่งมีค่า pKa 4.8 (Reszka et al., 2004) นอกจากนี้แล้วยังมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวจากหมู่ไนโตรเจนภายในโมเลกุล จึงสามารถรับโปรตอนจากสารละลายที่สามารถแตกตัวให้โปรตอนได้ เช่นในสารละลายกรด เมื่อนำไพโอไซยานินไปทดสอบอิทธิพลของพีเอชในช่วง 2-11 พบว่าที่พีเอช 2-4 เป็นสารละลายสีแดงของไพโอไซยานินที่รับโปรตอน (protonated ไพโอไซยานิน) ดังแสดงในรูปที่ 1 (II) ที่พีเอช 5 ให้สีม่วง ซึ่งเป็นสารผสมระหว่างไพโอไซยานิน (I) กับไพโอไซยานินที่รับโปรตอน (II) และในช่วงพีเอช 6-11 ให้สีน้ำเงินของไพโอไซยานิน (I) ส่วน Semiquinoid (SQ) form ของไพโอไซยานิน (III) นั้นมีรายงานว่าเกิดขึ้นได้น้อยมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา (Vukomanovic et al., 1997, Ohfuji et al., 2004) เมื่อนำสารละลายดังกล่าวนี้ไปตรวจวัดสเปกตรัมการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 2 พบว่าที่พีเอช 2-4 จะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 279 และ 387 นาโนเมตร ที่พีเอช 5 ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 238, 279 และ 311 นาโนเมตร และที่พีเอช 6-11 จะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 238 และ 311 นาโนเมตร ตามลำดับ เมื่อค่าพีเอชของสารละลายเพิ่มสูงขึ้นหมู่ไฮดรอกซีของไพโอไซยานินจะถูกดึงโปรตอนในตำแหน่งดังกล่าวออกจึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง และเลื่อนไปแบบไฮโปโครมิค (hypochromic shift) ที่ความยาวคลื่น 279 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเลื่อนไปแบบไฮเปอร์โครมิค (hyperchromic shift) ที่ความยาวคลื่น 311 นาโนเมตร

นอกจากนี้ที่พีเอช 11 หรือสูงกว่ายังส่งผลให้ไพโอไซยานินสลายตัวไปเป็น 1-ไฮดรอกซีฟีนาซีนได้อีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา (Wilson et al., 1987, Muller et al., 1995) โดยทำให้สีของไพโอไซยานินเปลี่ยนจากสีน้ำเงินไปเป็นสีม่วงแดงในเวลา 50 ชั่วโมง เมื่อตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไพโอไซยานินที่พีเอชต่าง ๆ ในแต่ละช่วงเวลา พบว่าที่พีเอช 11 หรือสูงกว่าส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของไพโอไซยานินที่ความยาวคลื่น 311 นาโนเมตรในสภาวะเบสแก่ลดลง และค่าการดูดกลืนแสงของ 1-ไฮดรอกซีฟีนาซีนที่ความยาวคลื่น 294 นาโนเมตรในสภาวะเบสแก่เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 50

ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 3 ในทางตรงกันข้ามที่พีเอช 10 หรือต่ำกว่า จะไม่ส่งผลกระทบต่อค่าการดูดกลืนแสงของไพโอไซยานินมากนัก

เมื่อปรับพีเอชสารละลายสีม่วงแดงให้เป็นกลาง พบว่าสีของสารละลายยังคงเป็นสีม่วงแดงดังเดิม ซึ่งแตกต่างจากสีของสารละลายไพโอไซยานินที่พีเอช 7 ภายหลังการปรับพีเอชของสารละลายเดียวกันนี้ให้เป็นกรดพบว่าสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงแดงเป็นสีเหลือง เมื่อนำสารละลายที่ได้นี้ไปตรวจวัดสเปกตรัมการดูดกลืนแสง พบว่าได้สเปกตรัมที่มีลักษณะเช่นเดียวกันกับสารสีเหลืองที่แยกได้จากการเลี้ยงแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ในช่วงแรกโดยให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 263 นาโนเมตร ซึ่งภายหลังพิสูจน์โครงสร้างแล้วพบว่าสารสีเหลืองที่ได้นั้น คือ 1-ไฮดรอกซีฟีนาซีน

จากข้อมูลเหล่านี้ทำให้ทราบว่าการเก็บไพโอไซยานินไว้ในสารละลายกรดจะช่วยให้มีความเสถียรมากกว่าการเก็บไว้ในสารละลายเบสแก่ เนื่องจากไพโอไซยานินสลายตัวไปเป็น 1-ไฮดรอกซีฟีนาซีนได้ง่ายเมื่อถูกไฮโดรไลซิสด้วยเบสแก่ เช่น NaOH เป็นต้น

การศึกษาอิทธิพลของแสงที่มีต่อสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของไพโอไซยานิน: จากการศึกษาอิทธิพลของแสงที่มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของไพโอไซยานินบริสุทธิ์ พบว่าแสงไม่ได้ส่งผลให้เกิดความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงของไพโอไซยานินที่ความยาวคลื่น 311 นาโนเมตร อย่างมีนัยสำคัญ (ไม่ได้แสดงข้อมูลการทดลอง)

การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อการสลายตัวของไพโอไซยานิน: ภายหลังการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อไพโอไซยานินบริสุทธิ์ พบว่าสารไพโอไซยานินที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 4 องศาเซลเซียสจะสลายตัวช้ากว่าสารไพโอไซยานินที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยไพโอไซยานินที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 4 องศาเซลเซียสจะเห็นแถบการแยกเพียงจุดเดียวด้วยเทคนิค TLC คือ เห็นจุดสีน้ำเงิน ($R_f = 0.28 \pm 0.03$) เท่านั้น จนถึงวันที่ 4 จึงจะเริ่มมองเห็นแถบการแยกจุดสีเหลือง ($R_f = 0.76 \pm 0.02$) เพิ่มขึ้นมาอีก 1 จุด ส่วนไพโอไซยานินที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง จะเริ่มเห็นแถบการแยกเป็น 2 จุด คือ จุดสีเหลือง และจุดสีน้ำเงินในวันที่ 2 เช่นเดียวกัน ซึ่งเกิดการสลายตัวได้เร็วกว่าการเก็บไพโอไซยานินไว้ที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส

สรุปผลการทดลอง

จากการเลี้ยงแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ในอาหารเหลวสูตร คิงก์ เอ และบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องนาน 36 ชั่วโมง นำสารที่ผลิตได้มาแยกด้วยคอลัมน์แอมเบอร์ไลท์ เอกซ์ เอ ดี-16 แล้วชะด้วย 70% อะซิโตไนไทรล์-น้ำ โดยปริมาตร พบว่าได้สารในส่วนที่สองเป็นสีน้ำเงินประมาณ 1.0 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ต่อมานำไปแยกด้วยคอลัมน์ซิลิกา เจล พบว่าได้สารสีเหลืองออกมาเมื่อชะด้วยไดคลอโรมีเทน และได้สารสีน้ำเงินออกมาเมื่อชะด้วยด้วย 95% ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล เมื่อกำจัดตัวทำละลายแล้ว ได้สารรูปเข็มสีเหลืองหนัก 10.6 มิลลิกรัม และสารรูปเข็มสีน้ำเงินหนัก 9.57 มิลลิกรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร เมื่อพิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้ทั้งสองส่วนพบว่าพบว่า สารสีเหลือง คือ 1-ไฮดรอกซีฟีนาซีน และสารสีน้ำเงิน คือ ไพโอไซยานิน ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 263 และ 279 นาโนเมตร (ในสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 0.02 โมลาร์) ส่วนการศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อสมบัติทางกายภาพของไพโอไซยานินพบว่าในช่วงพีเอช 2-4 จะให้สีสารละลายสีแดง ที่พีเอช 5 ให้สีม่วง และให้สีน้ำเงินในช่วงพีเอช 6-11 นอกจากนี้พีเอชยังมีอิทธิพลต่อการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงแบบไฮโปโครมิคที่ความยาวคลื่น 279 นาโนเมตร และการเพิ่มค่าการดูดกลืนแสงแบบไฮเปอร์โครมิคที่ความยาวคลื่น 311 นาโนเมตรเช่นกัน นอกจากนี้การเก็บไพโอไซยานินไว้ในสารละลายเบสแก่ (พีเอช 11 หรือสูงกว่า) จะทำให้ไพโอไซยานินสลายตัวไปเป็น 1-ไฮดรอกซีฟีนาซีนได้อีกด้วย ซึ่งได้พิสูจน์แล้วว่าสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้เคยศึกษามาแล้ว

จากการศึกษาอิทธิพลของแสงที่มีต่อสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของไพโอไซยานินที่ความยาวคลื่น 311 นาโนเมตร พบว่า แสงไม่ค่อยมีผลกระทบต่อค่าการดูดกลืนแสงของไพโอไซยานินเท่าใดนัก นอกจากนี้ยังพบว่าอุณหภูมิมีอิทธิพลต่อการสลายตัวของไพโอไซยานิน ซึ่งการเก็บไพโอไซยานินไว้ในช่วงอุณหภูมิต่ำ ๆ จะช่วยชะลอการสลายตัวของไพโอไซยานินสีน้ำเงินไปเป็นสารสีเหลืองได้นานกว่าการเก็บไพโอไซยานินไว้ที่อุณหภูมิห้อง

คำขอบคุณ

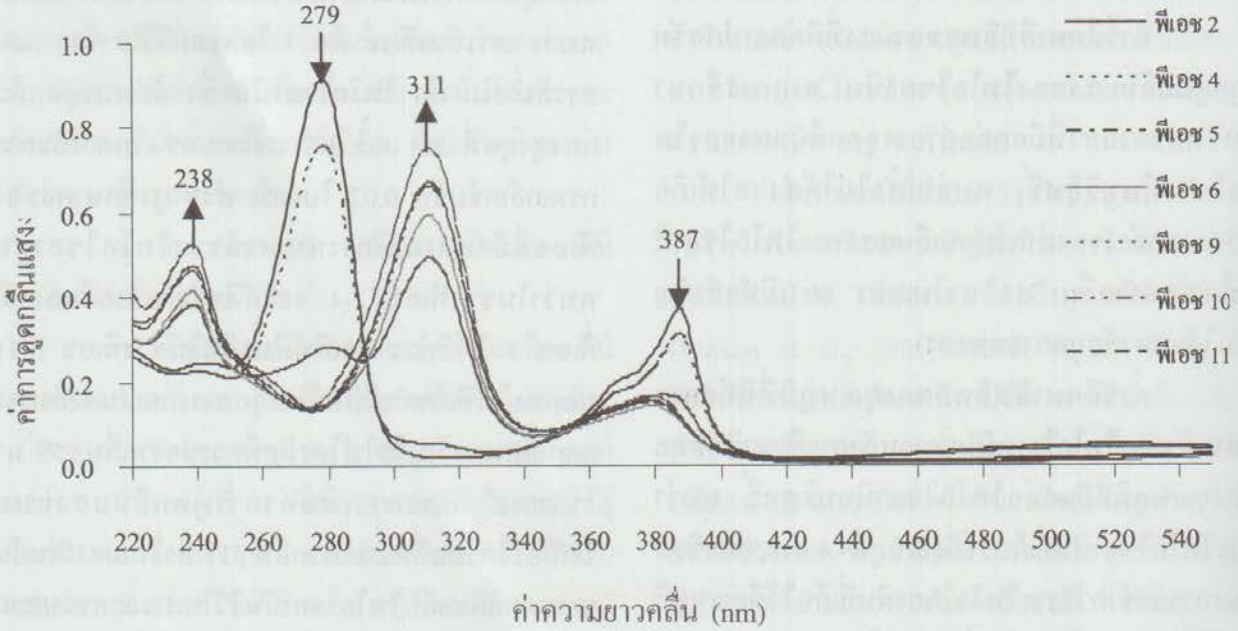
งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์นวัตกรรมทางเคมี: โครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษา และการวิจัยทางเคมี (PERCH-CIC) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และขอขอบคุณกองทุนพัฒนาและส่งเสริมด้านวิชาการของคณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2549 และทุนอุดหนุนวิจัยทั่วไปของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2549 ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านทุนวิจัยในครั้งนี้

ตารางที่ 1 สมบัติบางประการของสารฟีนาซีนที่แยกได้หลังจากผ่านลงในคอลัมน์ซิลิกา เจล และตรวจสอบด้วย TLC

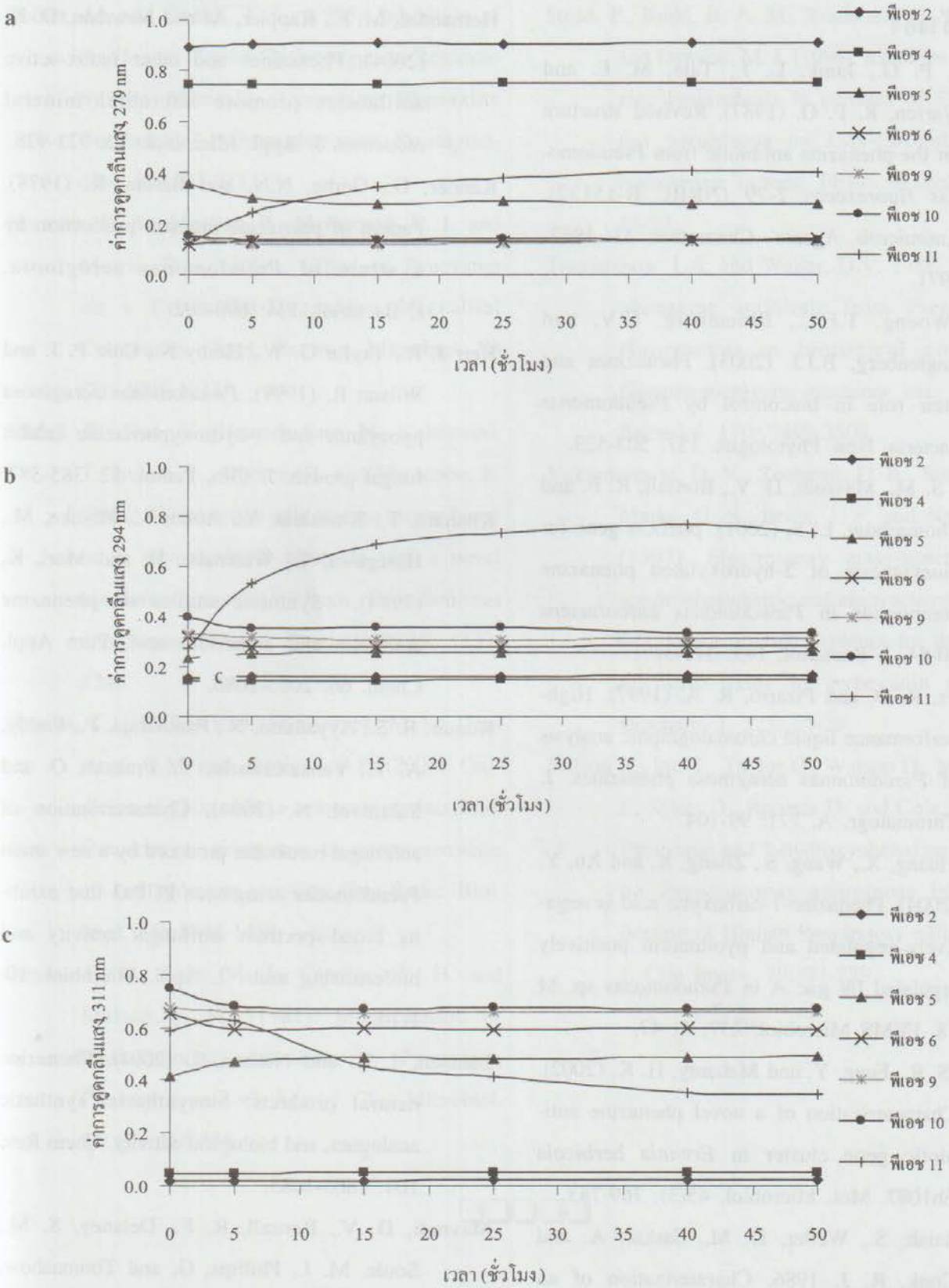
ตัวชะ	สีของสารละลาย	ลักษณะของผลึก	ค่า R_f*	ค่าการดูดกลืนแสง (nm)**
ไดคลอโรมีเทน	สีเหลือง	รูปเข็มสีเหลือง	0.78 ± 0.01	263, 370
95%ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล	สีน้ำเงิน	รูปเข็มสีน้ำเงิน	0.23 ± 0.01	279, 387

* ชะด้วย 95% ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล โดยปริมาตร

** ในกรดเกลือ เข้มข้น 0.02 โมลาร์



รูปที่ 2 อิทธิพลของพีเอชที่มีต่อสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของไพโอไซยานิน



รูปที่ 3 อิทธิพลของเวลาในการเก็บไพโอไซยานินในสารละลาย ณ พีเอชต่าง ๆ ที่มีผลต่อสเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ (a) 279, (b) 294 และ (c) 311 นาโนเมตร

เอกสารอ้างอิง

Brisbane, P. G., Janik, L. J., Tate, M. E. and Warren, R. F. O. (1987). Revised structure for the phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (NRRL B-15132). Antimicrob. Agents Chemother. 31: 1967-1971.

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

Delaney, S. M., Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F. and Thomashow, L. S. (2001). *phzO*, a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. J. Bacteriol. 183: 318-327.

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

Ge, Y., Huang, X., Wang, S., Zhang, X. and Xu, Y. (2004). Phenazine-1-carboxylic acid is negatively regulated and pyoluteorin positively regulated by *gac A* in *Pseudomonas* sp. M 18. FEMS Microbiol. 237: 41-47.

Gidden, S. R., Feng, Y. and Mahanty, H. K. (2002). Characterization of a novel phenazine antibiotic gene cluster in *Erwinia herbicola* Eh1087. Mol. Microbiol. 45(3): 769-783.

Gurusiddaiah, S., Weller, D. M., Sarkar, A. and Cook, R. J. 1986. Charaterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var. *triciti* and *Pythium* spp. Antimicrob. Agents Chemother. 29: 488-495.

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

Kanner, D., Gerbe, N.N. and Bartha, R. (1978). Pattern of phenazine pigment production by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 134: 690-692.

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

Kitahara, T., Kinoshita, Y., Aono, S., Miyake, M., Hasegawa, T., Watanabe, H. and Mori, K. (1994). Synthetic studies on phenazine antibiotic and antheridic acid. Pure Appl. Chem. 66: 2083-2086.

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

Laursen, J. B. and Nielsen, J. (2004). Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. Chem Rev. 104: 1663-1685.

Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. J., Phillips, G. and Thomashow, L. S. (2001). Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J. Bacteriol. 183: 6454-6465.

Muller, M. and Sorrell, T. C. (1995). Inhibition of the Human Platelet Cyclooxygenese Response by the Naturally Occurring Phenazine Derivative, 1-hydroxyphenazine. Prostaglandins, 50: 301-311.

Norman, R. S., Moeller, P., McDonald, T. J. and Morris, P. J. (2004). Effect of Pyocyanin on a Crude-Oil-Degrading Microbial Community. Appl. Environ. Microbiol. 70 (7): 4004-4011.

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

Reszka, K.J., Malley,Y.O., Mccormick, M. L., Denning, G.M. and Britigan, B.E. (2004). Oxidation of pyocyanin, a cytotoxic product from *Pseudomonas aeruginosa*, by microperoxidase 11 and hydrogen peroxide. Free Radic. Biol. Med. 36: 1448-1459.

Reyes, E. A., Bale, M. J., Cannon, W. H. and Matsen, J. M. (1981). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by Pyocyanin Production on Tech Agar. J. Clin. Microbiol. 13 (3): 456-458.

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

Thomashow, L.S. and Weller, D.V. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. J. Bacteriol. 170: 3499-3508.

Vukomanovic, D. V., Zoutman, D. E., Stone, J. A., Marks, G. S., Brien, J. F. and Nakatsu, K. (1997). Electrospray mass-spectrometric, spectrophotometric and electrochemical methods do not provide evidence for the binding of nitric oxide by pyocyanin at pH 7. Biochem. J. 322: 25-29.

Wilson R., Pitt T., Taylor G., Watson D., Macdermot J., Sykes D., Roberts D. and Cole P. (1987). Pyocyanin and 1-hydroxyphenazine produced by *Pseudomonas aeruginosa* inhibit the beating of Human Respiratory cillia in vitro. J. Clin Invest. 79:221-229.

❑❑❑❑❑

ข้อแนะนำในการเขียนบทความลงวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ประเภทของเรื่องที่จะตีพิมพ์

1. รายงานผลการวิจัยและค้นคว้าหรือการสำรวจที่ยังไม่เคยตีพิมพ์ในวารสารหรือหนังสืออื่นมาก่อน

2. บทความปริทัศน์ ได้แก่งานเขียนที่รวบรวมหรือเรียบเรียงจากเอกสารหรือหนังสือต่าง ๆ เพื่อเผยแพร่และฟื้นฟูงานด้านวิชาการระดับต่าง ๆ

3. บทความแสดงข้อคิดเห็นหรือข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในด้านวิชาการ เรื่องแปล ข่าววิชาการ ย่อความจากงานวิจัยหรือหนังสือใหม่ที่น่าสนใจ

รูปแบบของการเขียนและเตรียมต้นฉบับ

1. ต้นฉบับ ต้องเป็นตัวพิมพ์ Angsana New

1.1 ชื่อเรื่อง ขนาดตัวอักษร 20 ตัวเข้ม ตำแหน่งตรงกลาง

1.2 ชื่อผู้เขียน ขนาดตัวอักษร 16 เอน ตำแหน่งขวาสุด และใส่หมายเลขไว้ท้ายนามสกุล เพื่อการระบุที่อยู่ด้านล่าง

1.3 หัวข้อใหญ่ในแต่ละส่วน ขนาดตัวอักษร 16 ตัวเข้ม ตำแหน่งซ้ายสุด ยกเว้น บทคัดย่อ และ Abstract อยู่ตรงกลาง หัวข้อย่อยตามความเหมาะสม

1.4 เนื้อความ ขนาดตัวอักษร 14

1.5 คำว่า รูปที่ x และตารางที่ x ขนาดตัวอักษร 14 ตัวเข้ม ส่วนข้อความบรรยายต่อท้ายตัวปกติ

1.6 ที่อยู่ ขนาดอักษร 12

1.7 ช่องห่างระหว่างบรรทัดตามมาตรฐาน

1.8 พิมพ์ลงในกระดาษขาว A4 (โรเนียวสั้น) โดยใช้กระดาษหน้าเดียว ความยาวไม่เกิน 10 หน้า ส่งต้นฉบับ 2 ชุด (ไม่ต้องส่งแผ่นดิสก์ หรือแผ่นซีดีในขั้นตอนนี้ เมื่อได้รับแจ้งว่าได้ลงพิมพ์แล้ว ผู้เขียนส่งฉบับแก้ไข 1 ชุด พร้อมแผ่นดิสก์ หรือแผ่นซีดี)

2. ต้นฉบับ จะถูกพิจารณาโดยกองบรรณาธิการ และจะตอบรับการได้รับบทความโดยไม่ส่งต้นฉบับคืน ผู้เขียนควรจะอัดสำเนาเก็บไว้เป็นหลักฐานของตัวเอง 1 ฉบับ

3. ต้นฉบับ จะต้องมีความถูกต้องทั้งในด้านเนื้อหา และการใช้ภาษา รวมทั้งมีความสมบูรณ์ในรูปแบบพร้อมที่จะนำลงตีพิมพ์ได้

4. ชื่อเรื่อง ให้ใช้ภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ **ไม่ยาวเกินไป** และหลีกเลี่ยงการใช้คำย่อโดยไม่จำเป็น

5. ชื่อผู้เขียน เขียนชื่อภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษพร้อมทั้งบอกสถานที่ทำงานให้ชัดเจน

6. เนื้อเรื่อง ใช้ได้ทั้งภาษาไทยล้วนและภาษาอังกฤษล้วน ถ้าใช้ภาษาไทย ภาษาอังกฤษที่ใช้ปนกับภาษาไทยนั้นให้พยายามแปลเป็นไทยเท่าที่จะทำได้ และให้เขียนคำเดิมกำกับในวงเล็บ การทับศัพท์ภาษาอังกฤษ ตลอดทั้งการเขียนตัวสะกด การันต์ ในภาษาไทยให้ใช้ตามแบบราชบัณฑิตยสถาน

ข้อแนะนำในการเขียนบทความลงวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

7. ในกรณีของบทความวิจัย **ต้องมีบทคัดย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ** และแบ่งเนื้อหาของบทความเป็นบทนำ วิธีดำเนินงาน ผลการวิเคราะห์ บทสรุปและวิจารณ์

8. เชิงอรรถ (footnote) ใช้เฉพาะที่จำเป็นเพื่อขยายหรือให้รายละเอียดเพิ่มเติมแก่ใจความเฉพาะตอนในบทความ

9. ตารางและภาพประกอบ คำบรรยายประกอบตารางหรือภาพประกอบควรจะสั้นและชัดเจน ถ้าเป็นภาพถ่ายให้ใช้ภาพขาว-ดำ ขนาดโปสการ์ด ภาพเขียนลายเส้นควรเขียนด้วยหมึกดำ ภาพที่เขียนต้องชัดเจนและมีขนาดที่เหมาะสม

10. เอกสารอ้างอิง หรือบรรณานุกรม แนะนำให้เขียนตามแบบที่ทางวารสารกำหนด

ส่งต้นฉบับมาที่

กองบรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์ มข.
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

อภินันทนาการสำหรับผู้เขียน

เรื่องที่ได้รับการตีพิมพ์ ผู้เขียนจะได้รับวารสารฉบับนั้น 2 เล่ม และสำเนาพิมพ์อีก 15 ชุด

ตัวอย่าง

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันและกรดไขมันของจิ้งหรีดทองลาย (*Gryllus* sp.) ที่เลี้ยงเพื่อการค้า

บรรจง เชื้อเมืองพาน[1] วิรัช ว่องพัฒนากุล[2] และ ปวีณา พงษ์ดนตรี [1]*

บทคัดย่อ

Xxxx

การเขียนเอกสารอ้างอิงในวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

เอกสารอ้างอิง (Reference) หมายถึง เอกสารหรือส่วนหนึ่งของเอกสารที่อ้างอิงถึงหรือแปลมาโดยตรง การเขียนเอกสารอ้างอิงในเนื้อหานั้น ให้ใช้ระบบชื่อและปี เช่น Williams (2001) รายงานว่า... หรือ... (Williams, 2001) การเขียนเอกสารอ้างอิงในตอนท้ายบทความนั้น ให้ใส่เฉพาะเล่มที่มีการอ้างไว้แล้วในเนื้อหาเท่านั้น หากอ้างจาก เล่มภาษาไทย ต้องเขียนทั้งชื่อและนามสกุล

บรรณานุกรม (Bibliography) หมายถึง เอกสารที่ใช้อ้างถึงในลักษณะที่สรุปเป็นหลักการหรือทฤษฎีโดยมิได้อ้างอิงหรือแปลมาโดยตรง

การเขียนเอกสารอ้างอิง หรือบรรณานุกรม มีแนวทางการเขียนดังนี้

1. หนังสือ

ก. ภาษาไทย

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

ข. ภาษาอังกฤษ

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

2. เอกสารราชการ

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

3. วารสาร

ก. ภาษาไทย

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

ข. ภาษาอังกฤษ

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

หมายเหตุ

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

หนังสือในโครงการผลิตตำรา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สถิติพื้นฐาน

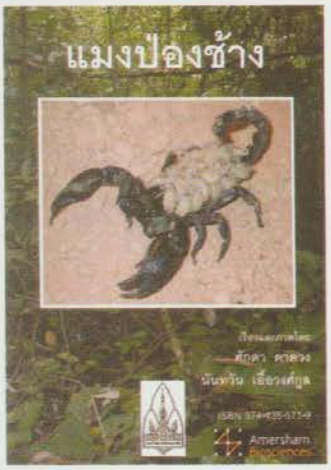
พร้อมตัวอย่างการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MINITAB SPSS และ SAS

รองศาสตราจารย์ชัชวาลย์ เรืองประพันธ์

พิมพ์ครั้งที่ 5 2543 • 510 หน้า

ISBN 974-675-666-4

ราคา 180 บาท



แมงป่องช้าง

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศักดา ดาดวง

นางสาวนันทวัน เอื้อวงศ์กูล

2547 • 64 หน้า

ISBN 974-435-571-9

ราคา 160 บาท

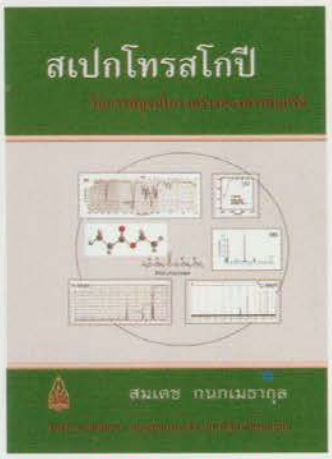
หลักการเบื้องต้นและการประยุกต์ใช้เทคนิคคู่ควบในเคมีวิเคราะห์

รองศาสตราจารย์ ดร. ศักดิ์สิทธิ์ จันทร์ไทย

2543 • 202 หน้า

ISBN 974-678-333-2

ราคา 150 บาท



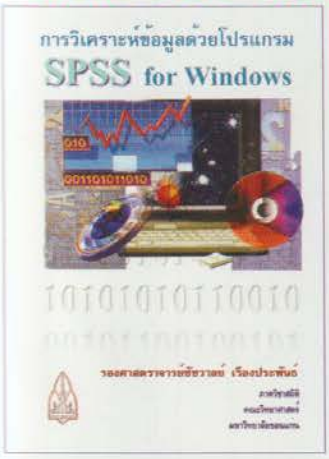
สเปกโทรสโกปี ในการพิสูจน์โครงสร้างของสารอินทรีย์

รองศาสตราจารย์ ดร. สมเดช กนกเมธากุล

2547 • 238 หน้า

ISBN 974-435-348-1

ราคา 150 บาท



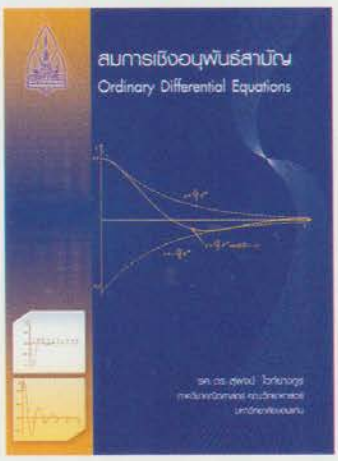
การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS for Windows

รองศาสตราจารย์ชัชวาลย์ เรืองประพันธ์

2544 • 620 หน้า

ISBN 974-654-608-2

ราคา 300 บาท



สมการเชิงอนุพันธ์สามัญ Ordinary Differential Equations

รองศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ ไวท์ยางกูร

2550 • 470 หน้า

ISBN 978-974-7707-55-7

ราคา 240 บาท

การวิเคราะห์ฟังก์ชันนัลขั้นแนะนำ

รองศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ ไวท์ยางกูร

2547 • 344 หน้า

ISBN 974-367-958-8

ราคา 200 บาท

ท่านที่สนใจหนังสือในโครงการผลิตตำรา

ติดต่อสั่งซื้อได้ที่...

รองศาสตราจารย์ชัชวาลย์ เรืองประพันธ์

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

จ.ขอนแก่น 40002

โทรศัพท์/โทรสาร 0 4320-2375

E-mail: chatchav@kku.ac.th