

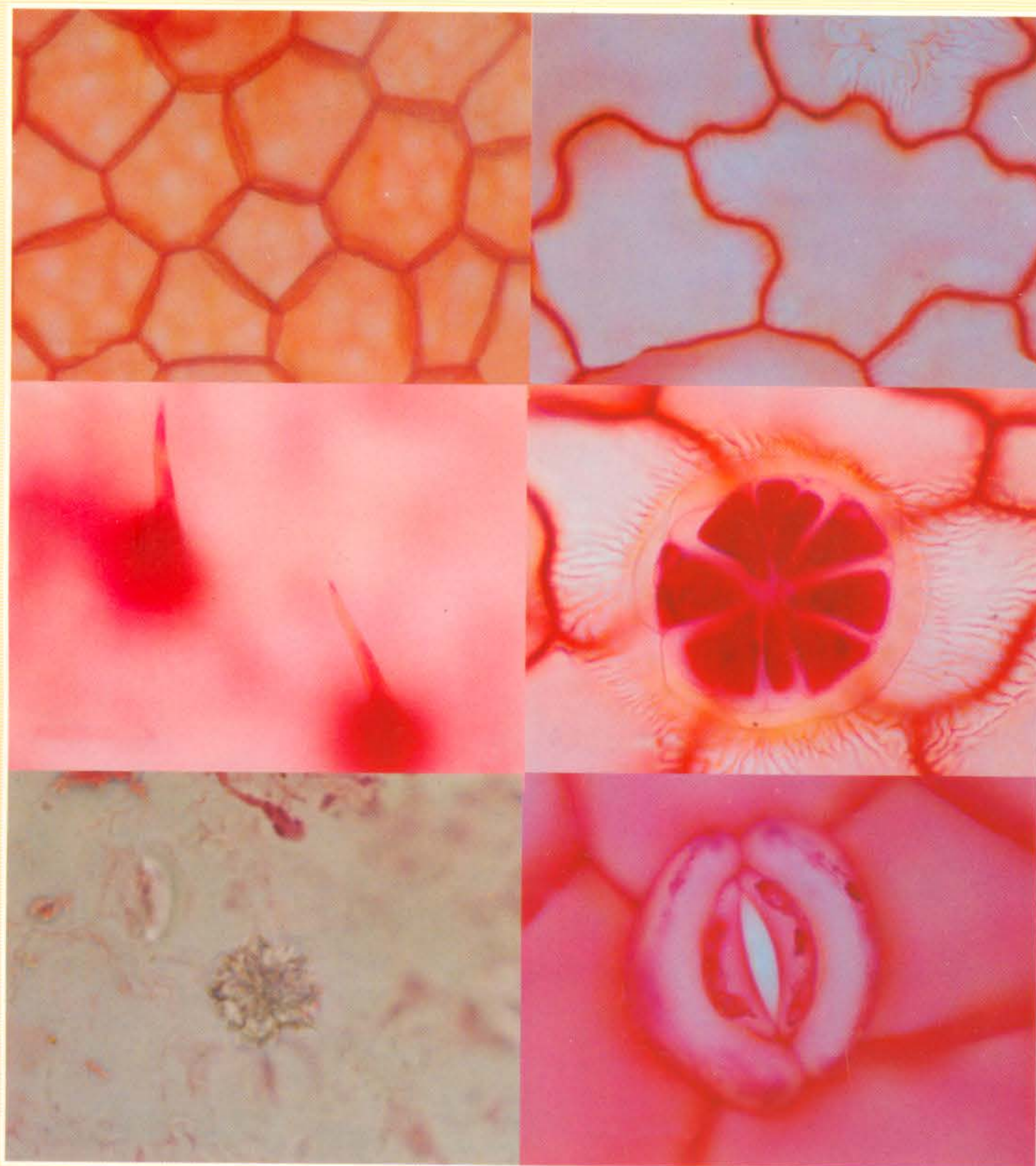


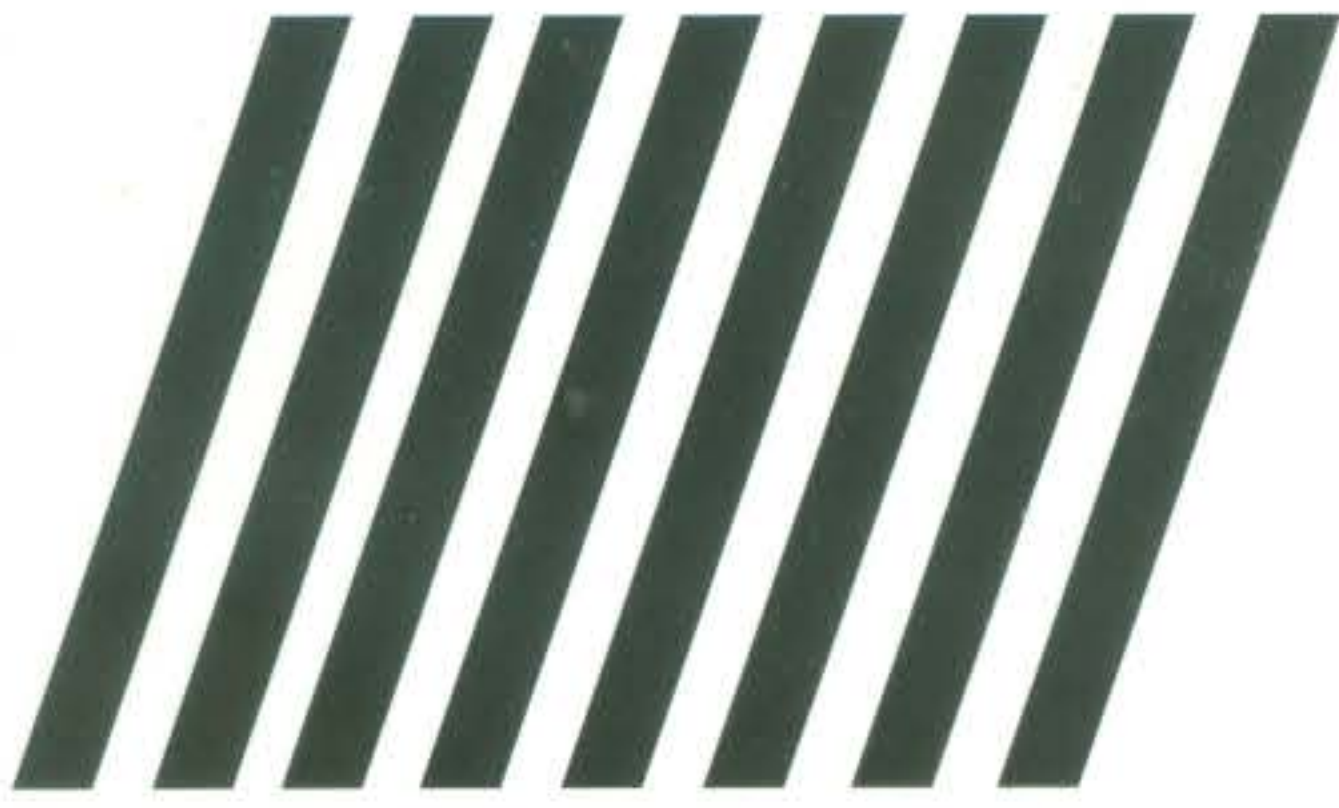
วารสาร

วิทยาศาสตร์มข.

KKU SCIENCE JOURNAL

ปีที่ 32 ฉบับที่ 2 (เม.ย. - มิ.ย. 47) Vol. 32 No. 2 (Apr. - Jun. '04)





วารสาร

วิทยาศาสตร์ปู. ISSN 0125 - 2364

KKU SCIENCE JOURNAL

เจ้าของ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สำนักงาน

คณะวิทยาศาสตร์ ตึก 6

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วัตถุประสงค์

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

กำหนดออก

ปีละ 4 ฉบับ

ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม

ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน

ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน

ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม

ค่าบำรุง ปีละ 75 บาท ข่ายปลีกเล่มละ 20 บาท

การบอกรับเป็นสมาชิก

แจ้งความจำนงค์เป็นจดหมาย หรือกรอกใบสมัครเป็นสมาชิก พร้อมค่าบำรุงเป็นธนาคัติ หรือเช็ค ไปรษณีย์ในนามของนางบุญคุ้ม เหลือล้น ฝ่ายจัดการส่งจ่าย ป.ท.มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

ที่ปรึกษา

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

รองคณบดีฝ่ายวิชาการ

บรรณาธิการ

มานิตย์

โหมิตตระกุล

กองบรรณาธิการ

เฉลิม

เรืองวิริยะชัย

สมเดช

กนกเมธากุล

ศักดิ์สิทธิ์

จันทร์ไทย

บำรุง

สมสวัสดิ์

วิทยา

อมรกิจบำรุง

ประนอม

จันทร์โหมทัย

นฤมล

แสงประดับ

เสาวนิต

ทองพิมพ์

พิสิฐ

เจริญสุขใจ

เที่ยง

ภูมิสะอาด

อำนวยการ

มณีศรีวงศ์กุล

บุญทรัพย์

ไวคำ

ฝ่ายศิลป์และภาพ

กิลน

ดินนรเศรษฐ์

บุญส่ง

ทองสุข

ฝ่ายเศรษฐกิจ

บุญคุ้ม

เหลือล้น

ฝ่ายจัดการและ

ทัศนีย์

จิตตะกวี

เลขานุการ

สมศักดิ์

อุ้นจันท์

สุคนธ์

กลิ่นพกา

บทความและงานวิจัย
ได้รับการกลั่นกรอง
จากผู้ทรงคุณวุฒิ

บทความหรือข้อคิดเห็นใด ๆ ในวารสารนี้เป็นของผู้เขียน ไม่จำเป็นต้องสอดคล้องกับทัศนะของกองบรรณาธิการ

วารสาร

วิทยาศาสตร์ชุมชน

KKU SCIENCE JOURNAL

ปีที่ 32 ฉบับที่ 2

Volume 32 Number 2

บรรณาธิการแถลง

บทความ

- การแปลงภาพสามมิติแบบผูกพันกันด้วย
OpenGL API
อรรฉัตร โคแก้ว..... 71
- การตรวจวัดความสำเร็จสมบูรณ์ของปุ๋ยหมัก
นันทวัน ฤทธิเดช..... 80
- เทคนิค Real Time RT-PCR กับการศึกษา
การแสดงออกของยีน
สินีนานู ศิริ..... 86

งานวิจัย

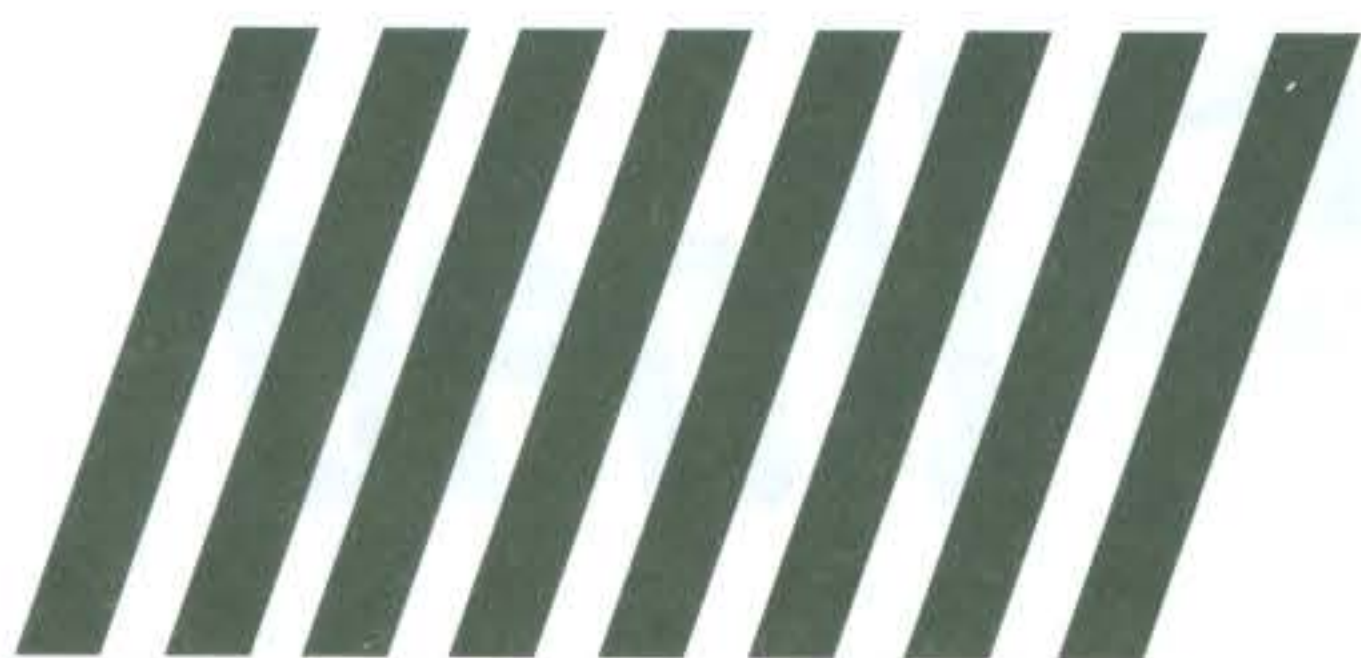
- ❑ การออกแบบและพัฒนาส่วนควบคุม
เครื่องสร้างภาพกำทอนแม่เหล็ก
ผ่านทางพอร์ตขนานของคอมพิวเตอร์
วิวัฒน์ ยงค์.....

93
- ❑ การศึกษาอิทธิพลของพอลิเมอร์ต่อค่าสัมประสิทธิ์
การแบ่งอัตราในตำรับเจลต้านการอักเสบ
มานิตา หาญพานิชเจริญ.....

100
- ❑ ผลของสารเสริมชีวภาพต่อการหมักไข่แดงจากกาก
เบียร์และผลผลิต และองค์ประกอบน้ำมันในโคนม
สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, อาภา สุเวชวัฒนกุล,
ภัทรกร นภาพรรณ และจิระชัย กาญจนพุดผิงค์.....

111
- ❑ กายวิภาคเปรียบเทียบผิวใบของพืชวงศ์ผักนึ่ง
บางชนิด
ปิยะพร แสนสุข, สุรพล แสนสุข
และสิริวรรณ ศิริหาล้า.....

122



ISSN 0125 - 2364
วิทยาจารย์
KKU SCIENCE JOURNAL

Publisher

Faculty of Science, Khon Kaen University,
Thailand.

Office

Faculty of Science, Building 6, Khon Kaen
University.

Objectives

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

Publishing frequency

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

Number 1 January - March

Number 2 April - June

Number 3 July - September

Number 4 October - December

Subscription rate

75 baht per annum. Single issue price 20 baht.

Membership

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

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

Editor Manit Kosittrakun

Editorial Board

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

Artists

Kilen	Tinnoraset
Boonsong	Koungsook

Treasurer Boonkoom Lualon

Managing Staff Tassanee Jittakhawee

and Secretary Somsak Unjantee
Sukhon Klinpaka

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

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

บรรณานุกรม **แถลง**

เรียน ท่านสมาชิกวารสารฯ และท่านผู้อ่านที่รัก

วารสารวิทยาศาสตร์ มข. ปีที่ 32 ฉบับที่ 2 (เมษายน - มิถุนายน 2547) แล้วเสร็จล่าช้ากว่ากำหนด 3 เดือน สาเหตุหนึ่งเป็นเพราะว่าผู้ทรงคุณวุฒิซึ่งส่วนใหญ่เป็นคณาจารย์ของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ติดภาระงานสอนในภาคฤดูร้อน งานบริการวิชาการ และงานวิจัย ทำให้ไม่มีเวลาสำหรับการพิจารณาบทความที่ส่งมาตีพิมพ์ในวารสารฯ

กองบรรณาธิการฯ จะพยายามอย่างเต็มความสามารถ ทั้งนี้เพื่อให้วารสารฯ ปีที่ 32 ฉบับที่ 3 (กรกฎาคม - กันยายน 2547) ซึ่งเป็นฉบับพิเศษเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ เนื่องในโอกาสพระราชพิธีมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 6 รอบ 12 สิงหาคม 2547 แล้วเสร็จตามกำหนด

บรรณาธิการ

การแปลงภาพสามมิติแบบผูกพันกันด้วย OpenGL API

อรรณิตร โคแก้ว¹

บทนำ

นักเขียนโปรแกรมกราฟิกสามมิติต้องเกี่ยวข้องกับการคำนวณหรือประมวลผลข้อมูลภาพจำนวนมากซึ่งต้องใช้ความสามารถของอุปกรณ์ฮาร์ดแวร์ซึ่งได้แก่ ชิพ (chip) อุปกรณ์ด้านกราฟิก อินเทอร์เน็ตต่างๆ และการ์ดภาพสามมิติ (3D accelerator) ที่ช่วยแสดงผลภาพได้รวดเร็วยิ่งขึ้นเพื่อให้ภาพซับซ้อนมีความสมจริงเหมือนธรรมชาติ ปัจจุบันมี OpenGL API (Open Graphics Library Application Programming Interface) เป็นมาตรฐานหนึ่งที่เชื่อถือได้และสามารถทำงานร่วมกับ API อื่นๆ ช่วยนักเขียนโปรแกรมกราฟิกมีทางเลือกอีกในการลดความยุ่งยากด้านการเขียนโปรแกรมลงทางหนึ่ง การใช้ API มีข้อดีคือเป็นมาตรฐานที่นักเขียนโปรแกรมรู้จักซึ่งการพัฒนาแก้ไขปรับปรุงจะมีข่าวสารให้ติดตามได้จากแหล่งพัฒนา API นั้นๆ ในบทความนี้จะอ้างอิง OpenGL API ตามมาตรฐานอุตสาหกรรมกราฟิกที่บริษัท Silicon Graphics, Inc. เป็นผู้พัฒนาขึ้นร่วมกับบริษัท Microsoft, DEC, IBM และ Intel โดยจะกล่าวถึงส่วนการเขียนโปรแกรมเพื่อแปลงภาพสามมิติแบบผูกพันกัน

หลักการของการแปลงภาพสามมิติ

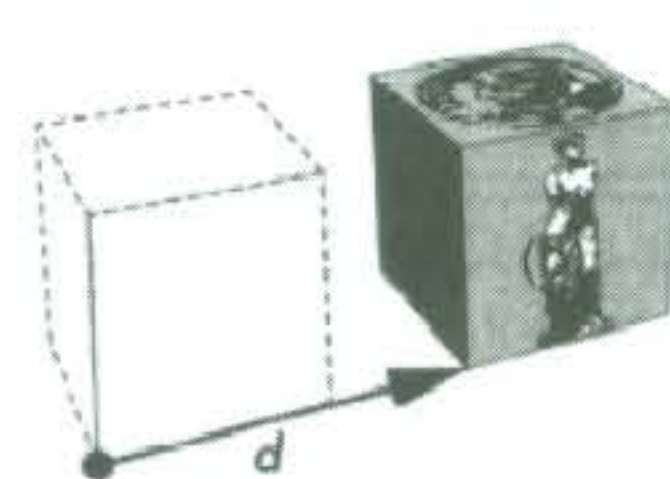
การแปลงภาพสามมิติมักแสดงในรูปสมการและเมทริกซ์การแปลง(transformation matrix) แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

1. การแปลงภาพแบบผูกพันกัน (Affine transformations) คือการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งภาพ

ด้วยการคำนวณจากค่าที่เปลี่ยนแปลงไปเหมือนกันทุกตำแหน่งของภาพโดยภาพที่ได้จากการแปลงยังคงมีรูปร่างคล้ายเดิม เช่น การย้ายตำแหน่งของภาพ (translation) การย่อขยายขนาดของภาพ (scaling) และการหมุนภาพ (rotation) เป็นต้น

1.1 การย้ายตำแหน่งของภาพ

การย้ายตำแหน่งคือการเปลี่ยนแปลงที่วัตถุจะไม่มีรูปร่างผิดไปจากเดิม แต่ภาพที่ได้จะมีตำแหน่งเปลี่ยนเป็นระยะเท่ากันเช่น d หน่วยสำหรับทุกจุดของภาพดังตัวอย่างในรูปที่ 1 ส่วนการคำนวณนั้นจะกำหนดให้ m_x , m_y และ m_z คือระยะทางที่ย้ายตำแหน่งในแกน X, Y และ Z ตามลำดับ ซึ่งระยะทางจะมีเครื่องหมายเป็นบวกหากการย้ายไปในทิศทางเดียวกับแกนอ้างอิงหรือเป็นลบเมื่อย้ายตำแหน่งวัตถุไปในทิศทางตรงกันข้ามกับแกนที่อ้างอิง ตำแหน่งใหม่ของภาพจะมีสมการคือ $x_{\text{ใหม่}} = x_{\text{เดิม}} + m_x$, $y_{\text{ใหม่}} = y_{\text{เดิม}} + m_y$, $z_{\text{ใหม่}} = z_{\text{เดิม}} + m_z$ และเมทริกซ์ของการย้ายตำแหน่งดังเมทริกซ์ T



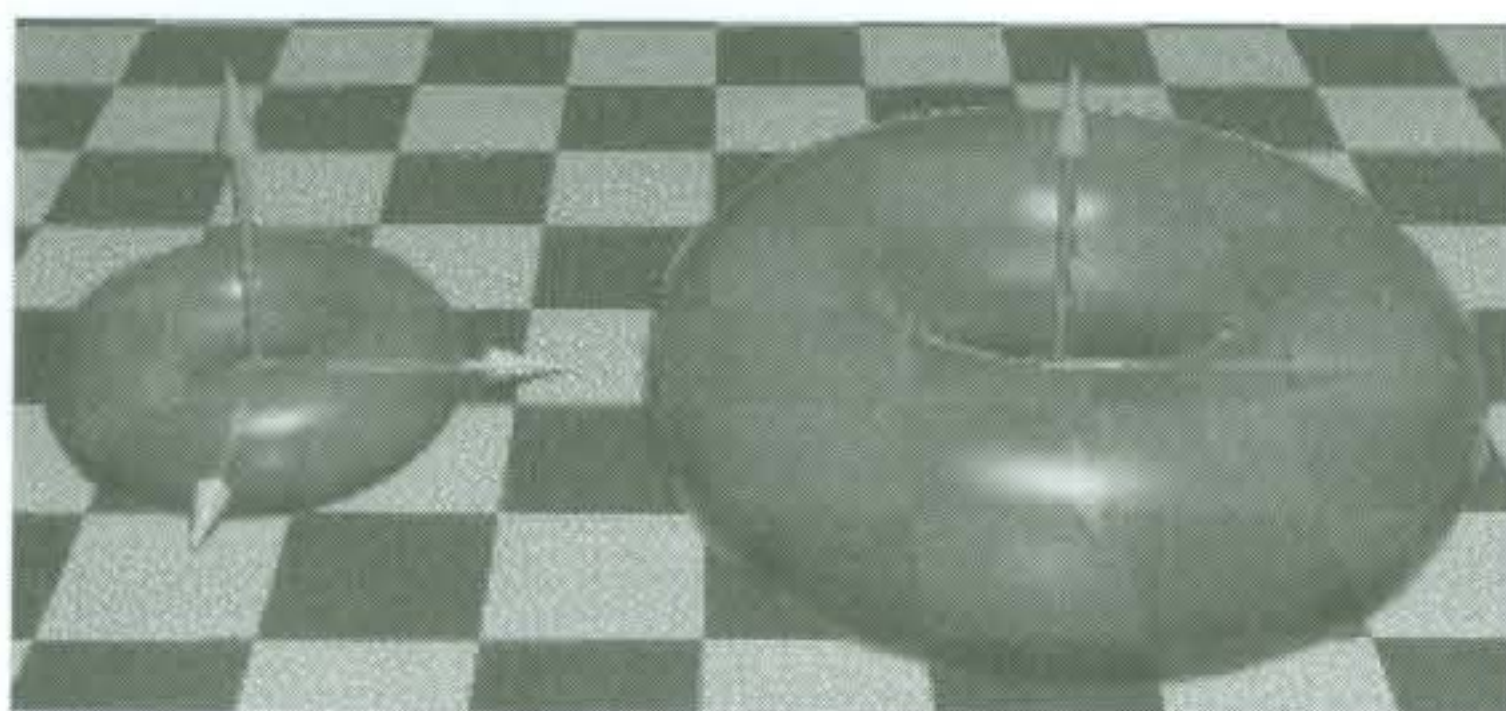
$$T = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & m_x \\ 0 & 1 & 0 & m_y \\ 0 & 0 & 1 & m_z \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

รูปที่ 1 การย้ายตำแหน่งของวัตถุจากตำแหน่งเดิมของวัตถุไประยะทาง d หน่วย

¹ ภาควิชาวิทยาการคอมพิวเตอร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

1.2 การย่อขยายขนาดของภาพ

เป็นการปรับขนาดภาพโดยการเพิ่ม (หากเป็นการขยาย) หรือลด (หากเป็นการย่อ) ระยะทางจากทุกจุดภาพไปยังจุดอ้างอิงของการย่อขยายที่เรียกว่าจุดประจำ (fixed point) ดังตัวอย่างรูปที่ 2 เมื่อจุดประจำอยู่ที่จุด (0,0,0) ภาพที่มีขนาดใหญ่กว่าจะมีระยะทางวัดจากจุด (0,0,0) ไปยังภาพยาวมากกว่าภาพเล็ก การคำนวณจะมี S_x , S_y และ S_z เป็นตัวแปรสำหรับปรับขนาดของวัตถุภาพในแนวแกน X, Y และ Z ตามลำดับ ดังนั้นการย่อขยายจะมีสมการคือ $x_{\text{ใหม่}} = x_{\text{เดิม}} \times S_x$, $y_{\text{ใหม่}} = y_{\text{เดิม}} \times S_y$, $z_{\text{ใหม่}} = z_{\text{เดิม}} \times S_z$ และแสดงอยู่ในรูปเมทริกซ์ S ดังนี้



$$S = \begin{pmatrix} S_x & 0 & 0 & 0 \\ 0 & S_y & 0 & 0 \\ 0 & 0 & S_z & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

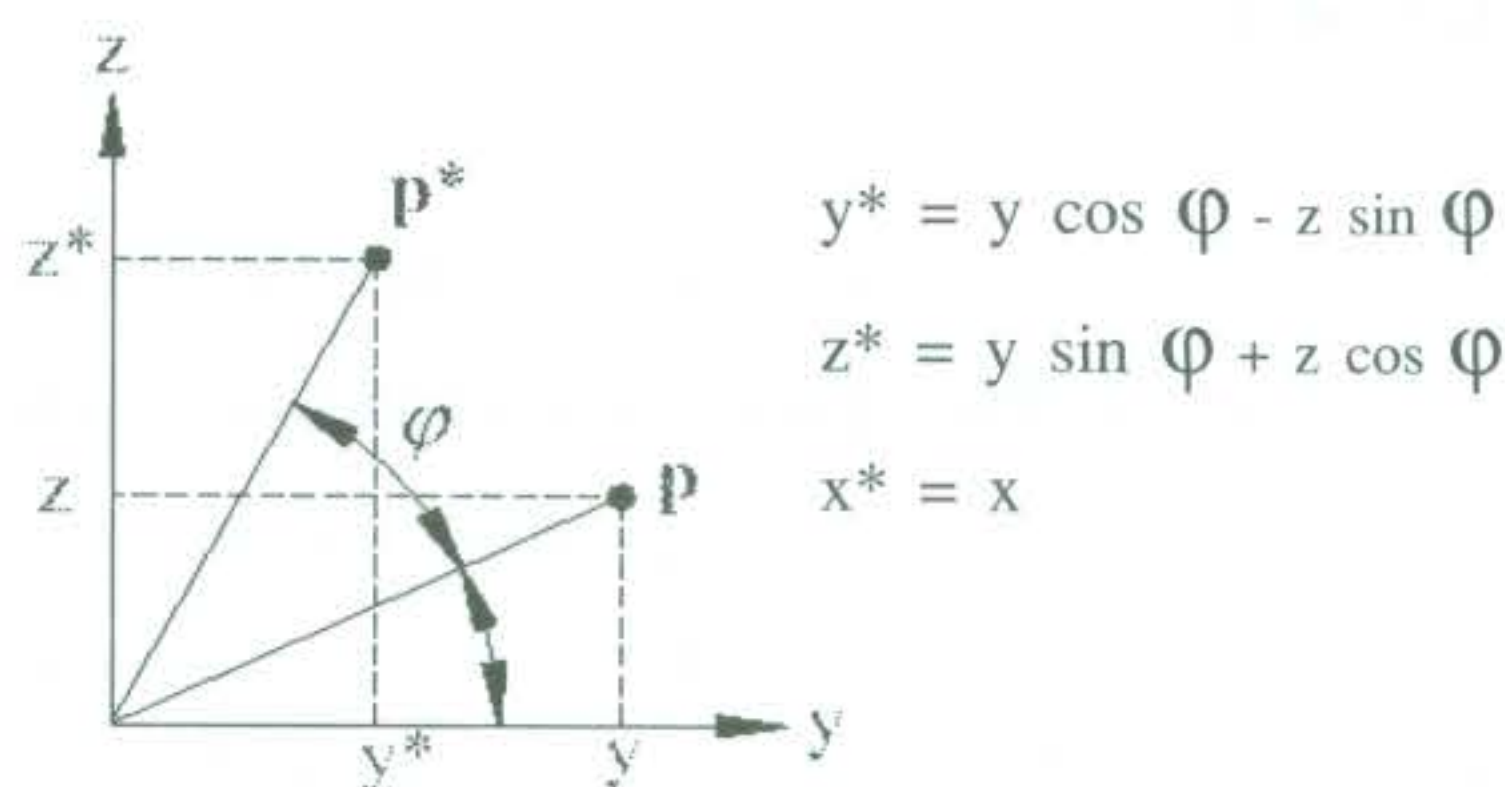
รูปที่ 2 การเปรียบเทียบระยะจากจุดประจำ (0,0,0) ไปยังขนาดภาพที่ต่างกัน

1.3 การหมุนวัตถุ

การหมุนวัตถุแบ่งเป็นการหมุนรอบแกนต่างๆ โดยกำหนดให้มีจุดหมุน (pivot point) อยู่กับที่คือจุด (0,0,0) ซึ่งจุดหมุนนี้คือจุดอ้างอิงระยะภาพกับระยะวัตถุที่ต้องรักษาระยะให้คงที่เสมอ และเมื่อมุมสำหรับการหมุนที่ใช้ในสมการตัวอย่างคือมุมที่หมุนรอบแกน X, Y และ Z ในทิศทางทวนเข็มนาฬิกา หากต้องการหมุนภาพในทิศทางตามเข็มนาฬิกาจะต้องเปลี่ยนเครื่องหมายของมุมในฟังก์ชัน sine ให้เป็นเครื่องหมายลบคือ $\sin(-\theta) = -\sin(\theta)$ ตัวอย่างการคำนวณเพื่อหมุนภาพกำหนดให้ p คือจุดภาพที่

ต้องการหมุนมีพิกัด (x, y, z) ทำมุมกับแกนที่ต้องการอ้างอิงในการหมุนวัดได้ α องศา

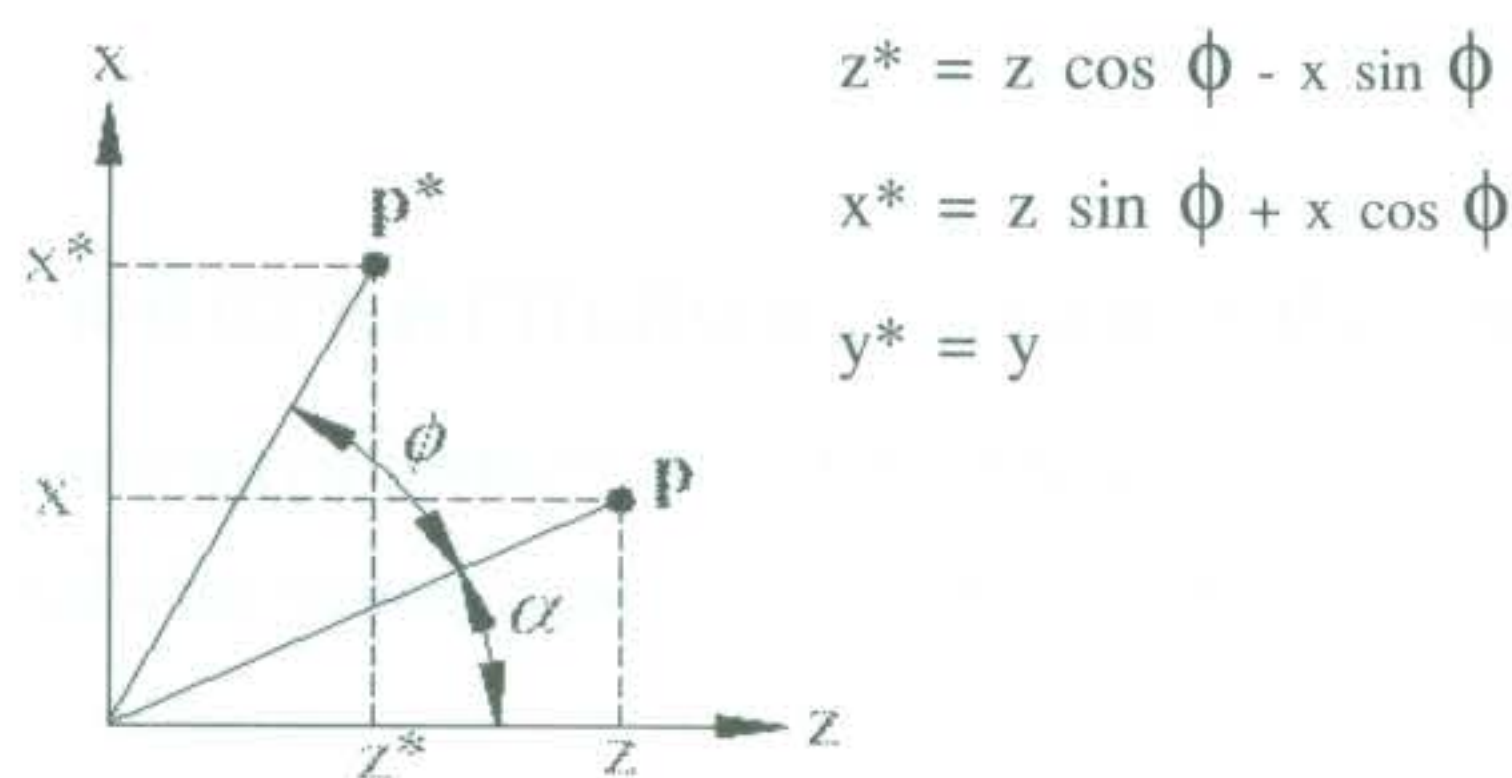
- การหมุนวัตถุรอบแกน X แสดงในระนาบ YZ ดังรูปที่ 3 เป็นการหมุนจุด p รอบแกน x ในทิศทางทวนเข็มนาฬิกา ϕ องศา ทำให้ได้ตำแหน่งใหม่ที่ $p^* = (x^*, y^*, z^*)$ จากการคำนวณดังสมการ



รูปที่ 3 การหมุนจุดภาพรอบแกน X แสดงในระนาบ YZ สามารถคำนวณในรูปเมทริกซ์ได้ดังนี้

$$\begin{bmatrix} x^* & y^* & z^* & 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x & y & z & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos \phi & \sin \phi & 0 \\ 0 & -\sin \phi & \cos \phi & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

- การหมุนวัตถุรอบแกน Y แสดงในระนาบ XZ ดังรูปที่ 4 เป็นการหมุนจุด p รอบแกน y ในทิศทางทวนเข็มนาฬิกาไป ϕ องศา ทำให้ได้ตำแหน่งใหม่อยู่ที่ $p^* = (x^*, y^*, z^*)$ ด้วยการคำนวณดังสมการ

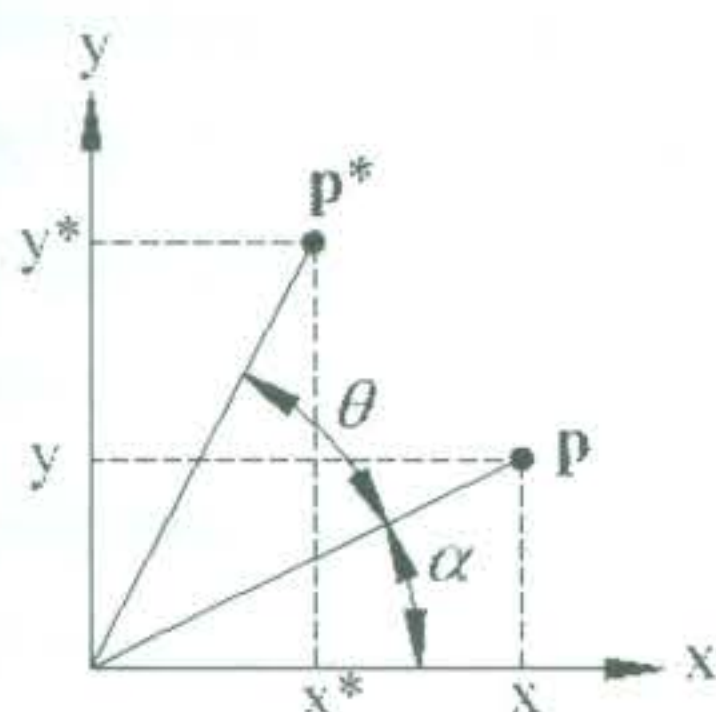


รูปที่ 4 การหมุนจุดภาพรอบแกน Y แสดงในระนาบ XZ

สามารถคำนวณในรูปเมทริกซ์ได้ดังนี้

$$\begin{bmatrix} x^* & y^* & z^* & 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x & y & z & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \cos \phi & 0 & -\sin \phi & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ \sin \phi & 0 & \cos \phi & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

- หมุนวัตถุรอบแกน Z แสดงในระนาบ YZ ดังรูปที่ 5 เป็นการหมุนจุด p รอบแกน z ในทิศทางทวนเข็มนาฬิกาไป θ องศา ทำให้ได้ตำแหน่งใหม่ที่ $p^* = (x^*, y^*, z^*)$ ด้วยการคำนวณดังสมการ



$$\begin{aligned} x^* &= x \cos \theta - y \sin \theta \\ y^* &= x \sin \theta + y \cos \theta \\ z^* &= z \end{aligned}$$

รูปที่ 5 การหมุนจุดรอบแกน Z แสดงในระนาบ XY

สามารถคำนวณในรูปเมทริกซ์ได้ดังนี้

$$\begin{bmatrix} x^* & y^* & z^* & 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x & y & z & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \cos \theta & \sin \theta & 0 & 0 \\ -\sin \theta & \cos \theta & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

2. การแปลงภาพแบบผิดรูปร่าง (Structure-deforming transformations) คือการแปลงภาพที่ทำให้ภาพมีลักษณะผิดแปลกไปจากเดิมมากเช่น การบิดเป็นเกลียว (twisting) การทำให้ภาพแคบลง (tapering) และการทำให้ภาพโค้งงอ (bending)

2.1 การบิดเป็นเกลียว

การบิดเป็นเกลียวพัฒนามาจากการแปลงแบบการหมุนโดยเปลี่ยนให้มุมที่ใช้หมุนภาพนั้นแตกต่างกันในการคำนวณกับแต่ละจุดภาพเดิม (x, y, z) จะได้ภาพใหม่ลักษณะบิดเป็นเกลียวรอบแกนต่างๆ โดยมีจุดภาพใหม่คือ (x', y', z') มีสมการการบิดรอบแกน z โดยที่ $\theta(z)$ คืออัตราของการบิดเป็นเกลียวต่อความยาวหนึ่งหน่วยตามแนวแกน z

$$x' = x \cos (\theta(z)) - y \sin (\theta(z))$$

$$y' = x \sin (\theta(z)) + y \cos (\theta(z))$$

$$z' = z$$

การบิดรอบแกน x โดยที่ $\theta(x)$ คืออัตราของการบิดเป็นเกลียวต่อความยาวหนึ่งหน่วยตามแนวแกน x

$$x' = x$$

$$y' = y \cos (\theta(x)) - z \sin (\theta(x))$$

$$z' = y \sin (\theta(x)) + z \cos (\theta(x))$$

การบิดรอบแกน y โดยที่ $\theta(y)$ คืออัตราของการบิดเป็นเกลียวต่อความยาวหนึ่งหน่วยตามแนวแกน y

$$x' = z \sin (\theta(y)) + x \cos (\theta(y))$$

$$y' = y$$

$$z' = z \cos (\theta(y)) - x \sin (\theta(y))$$

ตัวอย่างการคำนวณด้วยเมทริกซ์ของการบิดรอบแกน y คือ

$$\begin{bmatrix} x' \\ y' \\ z' \\ 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos(\theta(y)) & 0 & \sin(\theta(y)) & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ -\sin(\theta(y)) & 0 & \cos(\theta(y)) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x \\ y \\ z \\ 1 \end{bmatrix}$$



รูปที่ 6 ภาพเดิมก่อนบิดเกลียว (บน) และภาพแสดงการบิดเป็นเกลียว (ล่าง)

2.2 การทำให้ภาพแคบลง

การทำภาพให้แคบลงพัฒนามาจากการย่อขยายของภาพแต่กำหนดให้การปรับขนาดมีอัตราส่วนแตกต่างกันในการคำนวณกับทุกจุดภาพ และต้องกำหนดแกนของการทำภาพให้แคบลงด้วย ดังสมการ เมื่อกำหนดภาพให้แคบลงในแนวแกน z จะมีสมการ ดังนี้ $x' = f(z)x$

$$y' = f(z)y$$

$$z' = z$$

แนวแกน y จะมีสมการ ดังนี้

$$x' = f(y)x$$

$$y' = y$$

$$z' = f(y)z$$

แนวแกน x จะมีสมการ ดังนี้

$$x' = x$$

$$y' = f(x)y$$

$$z' = f(x)z$$

เมื่อ $f(x)$, $f(y)$ และ $f(z)$ คือฟังก์ชันสำหรับการทำภาพให้แคบลงใดๆ และตัวอย่างการคำนวณในรูปเมทริกซ์เมื่อกำหนดให้ภาพแคบลงในแนวแกน x คือ

$$\begin{bmatrix} x' \\ y' \\ z' \\ 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & f(x) & 0 & 0 \\ 0 & 0 & f(x) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x \\ y \\ z \\ 1 \end{bmatrix}$$



รูปที่ 7 ภาพเดิมก่อนการกระทำ (บน) และภาพที่ปรับให้มีลักษณะแคบลง (ล่าง)

2.3 การทำให้ภาพโค้ง

การทำภาพให้โค้งจะนำการเปลี่ยนสัดส่วนของภาพแบบการหมุนและการย้ายบางตำแหน่งของวัตถุมาคำนวณกับภาพเดิมให้ได้ภาพใหม่ที่มีลักษณะโค้งโดยยึดแกนใดแกนหนึ่งเป็นหลัก ดังตัวอย่างภาพที่โค้งในแนวแกน Y ในรูปที่ 8 การเปลี่ยนแปลงภาพจะมีส่วนประกอบที่ประกอบไปด้วยบริเวณที่โค้งและบริเวณที่นอกเหนือจากส่วนโค้ง ซึ่งบริเวณที่โค้งจะมีการเปลี่ยนแปลงด้วยการหมุนและการย้ายตำแหน่งของวัตถุภาพ



รูปที่ 8 ภาพเดิมก่อนการกระทำ (บน) และภาพที่ปรับให้มีลักษณะโค้ง (ล่าง)

ตัวอย่างการคำนวณสำหรับการทำภาพให้โค้งของภาพในแนวแกน Y เมื่อภาพเดิมก่อนการกระทำอยู่ที่ (x, y, z) และภาพใหม่อยู่ที่ (X, Y, Z) และกำหนดขอบเขตของการทำภาพให้โค้งตามแกน y คือ $y_{\min} \leq y \leq y_{\max}$ โดยที่รัศมีความโค้งคือ $1/k$ และจุดศูนย์กลางของการโค้งอยู่ที่ $y = y_0$ ซึ่งมุมของการทำภาพให้โค้งคือ $\theta = k(y' - y_0)$ เมื่อ

$$y' = \begin{cases} y_{\min} & y \leq y_{\min} \\ y & y_{\min} < y < y_{\max} \\ y_{\max} & y \geq y_{\max} \end{cases}$$

สมการการแปลงภาพโค้งคือ

$$X = x$$

$$Y = \begin{cases} -\sin \theta (z - 1/k) + y_0 & y_{\min} \leq y \leq y_{\max} \\ -\sin \theta (z - 1/k) + y_0 + \cos \theta (y - y_{\min}) & y < y_{\min} \\ -\sin \theta (z - 1/k) + y_0 + \cos \theta (y - y_{\max}) & y > y_{\max} \end{cases}$$

$$Z = \begin{cases} \cos \theta (z - 1/k) + 1/k & y_{\min} \leq y \leq y_{\max} \\ \cos \theta (z - 1/k) + 1/k + \sin \theta (y - y_{\min}) & y < y_{\min} \\ \cos \theta (z - 1/k) + 1/k + \sin \theta (y - y_{\max}) & y > y_{\max} \end{cases}$$

เมื่อทราบถึงหลักการของการแปลงภาพสามมิติว่ามีการคำนวณแต่ละจุดภาพตามทฤษฎีแล้ว ต่อไปคือควรจะทราบลักษณะและการใช้ OpenGL API ที่ช่วยให้นักเขียนโปรแกรมลดความยุ่งยากเรื่องการคำนวณได้อย่างไร

ลักษณะของ OpenGL API

OpenGL API ถูกนำเสนอตั้งแต่ปีค.ศ.1992 ในปัจจุบันยังคงพัฒนาเพิ่มความสามารถและจำนวนชุดคำสั่งมีมากขึ้นเรื่อยๆ ประกอบด้วยคำสั่งประมาณ 250 คำสั่ง ที่ทำหน้าที่ติดต่อกับฮาร์ดแวร์ด้านการแสดงผล การแสดงค่าของตำแหน่งวัตถุ รายละเอียดพื้นผิวของวัตถุ การแปลงภาพทั้งระบบสองมิติและสามมิติ รวมถึงเร่งความเร็วการประมวลผลสามมิติ เนื่องจาก ชุดคำสั่งของ OpenGL จะถูกรวมเข้ากับระบบปฏิบัติการ Windows, MacOS, Linux และ Unix แล้วจึงสามารถใช้ได้กับเครื่องคอมพิวเตอร์หลายชนิด รวมถึงซูเปอร์คอมพิวเตอร์ (supercomputer) และหลายระบบปฏิบัติการ ทำงานได้กับ 8 กลุ่มภาษาโปรแกรม ได้แก่ Ada, Visual Basic, C/C++ (VC++, Borland C++, C++ Builder, C compiler on UNIX), Delphi, Fortran, Java, Perl และ Python จึงอำนวยความสะดวกให้นักเขียนโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่เลือกใช้กับภาษาโปรแกรมให้เหมาะสมกับลักษณะงานตามที่ต้องการ สำหรับการใช้งาน OpenGL API คือการเรียกใช้ชุดคำสั่งหรือฟังก์ชันซึ่งต้องศึกษาในรายละเอียดของแต่ละภาษาและตัวแปลภาษาต่อไป

ตัวอย่างการแปลงภาพสามมิติแบบผูกพันกันด้วย OpenGL ในภาษา C

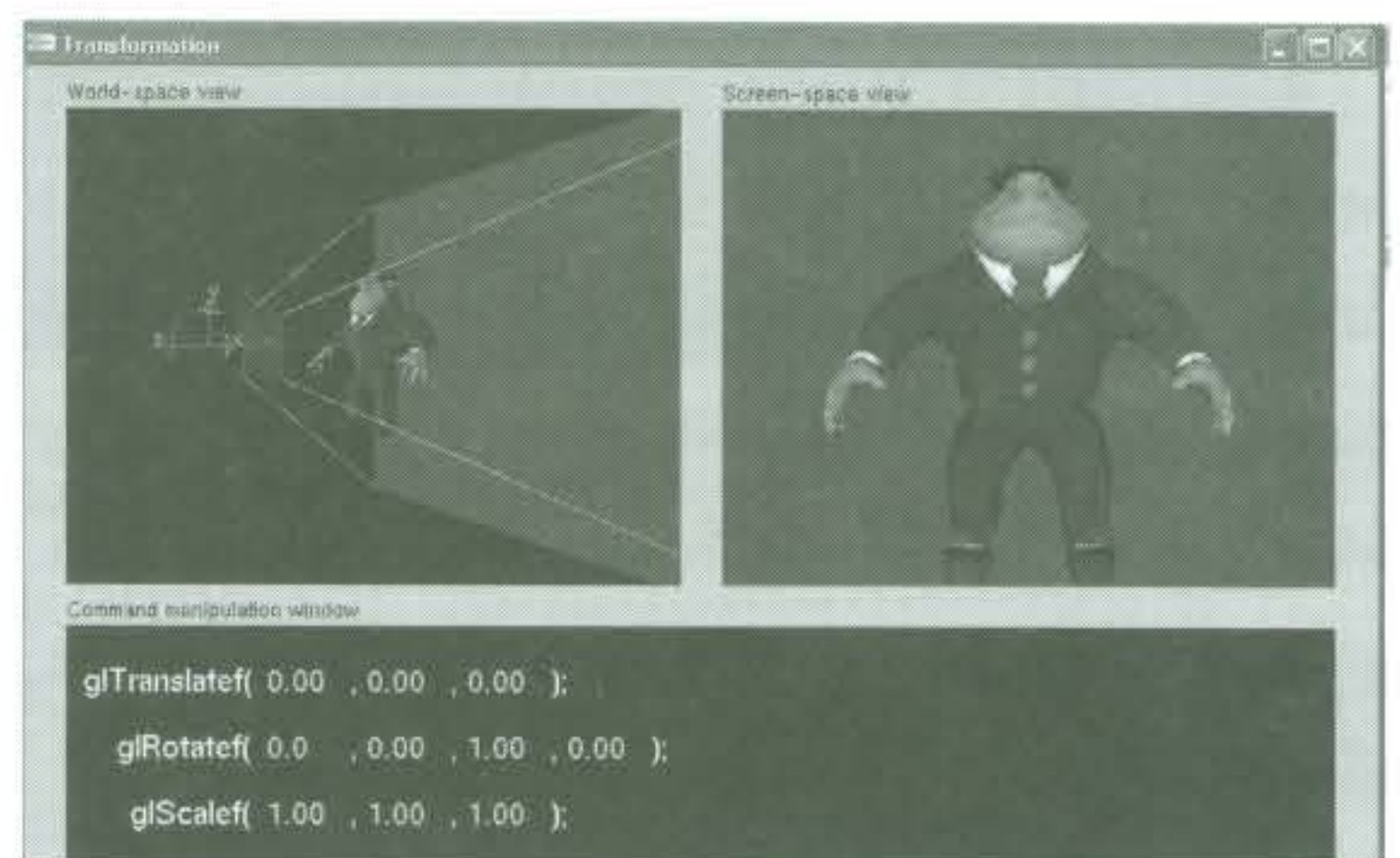
การเรียกใช้ชุดคำสั่งของ OpenGL จะลดความยุ่งยากในการเขียนโปรแกรมลงได้โดยนักเขียนโปรแกรมไม่ต้องเขียนสมการคำนวณจุดภาพเองเหลือเพียงเรียนรู้ว่าจะเรียกใช้คำสั่งหรือฟังก์ชันอย่างไร ดังตัวอย่างในรูปที่ 9

การย้ายภาพ คือการย้ายจุดใดๆของวัตถุไปยังจุดใหม่ โดยฟังก์ชันที่ใช้ในการย้ายภาพคือ `void glTranslatef (TYPE x, TYPE y, TYPE z)` สำหรับการย้ายเวกเตอร์ (x, y, z)

การหมุนภาพ เมื่อแกน (x, y, z) คือแกนอ้างอิงที่ให้วัตถุหมุนรอบ ค่าที่ใช้ระบุแกนจะมีค่าเป็น

หนึ่งสำหรับการอ้างอิงการหมุนรอบแกนนั้นๆ คือ x (1, 0, 0), y (0, 1, 0), z (0, 0, 1) ในทิศทางการหมุนทวนเข็มนาฬิกาการรอบแกนอ้างอิงและใช้ฟังก์ชัน `void glRotatef (TYPE angle, TYPE x, TYPE y, TYPE z)` ตัวอย่างการหมุนภาพไป 70 องศารอบแกน y ในทิศทางการตามเข็มนาฬิกาจะต้องเปลี่ยนเครื่องหมายของมุมเป็นลบดังฟังก์ชัน `glRotatef (-70, 0, 1, 0)` เป็นต้น

การปรับขนาดภาพ หรือการย่อขยาย (a, b, c) ใช้ฟังก์ชัน `void glScalef (a, b, c)` เช่นหากขยายภาพเป็น 2 เท่า ของภาพเดิมทั้งแนวแกน X, Y, Z คือ `glScalef (2.0, 2.0, 2.0)` แต่ถ้าย่อขนาดก็จะใช้ค่าที่น้อยกว่าหนึ่งในทุกสัดส่วนเป็นค่าที่ส่งให้ฟังก์ชันนี้แทน เช่นย่อขนาดลงครึ่งหนึ่งทุกแกนของภาพเดิมคือ `glScalef (0.5, 0.5, 0.5)`



รูปที่ 9 ตัวอย่างโปรแกรมแปลงภาพด้วย OpenGL

การใช้งาน OpenGL API

แม้ว่าการใช้งาน OpenGL จะสะดวกในการเรียกใช้คำสั่งสำหรับการจัดการกับภาพแต่เนื่องจากความสามารถที่ใช้ได้กับหลายแพลตฟอร์ม (platform) ทำให้ OpenGL มีหลากหลายรุ่น ดังนั้นนักเขียนโปรแกรมต้องเลือกใช้ OpenGL ให้เหมาะสมกับงาน และศึกษาวิธีการตั้งค่าตัวแปลภาษาให้เรียกใช้ได้ โดยค้นคว้าข้อมูลเพิ่มเติมได้จากข้อมูลบนอินเทอร์เน็ตที่อยู่คือ <http://www.opengl.org> ในบทความนี้ยกตัวอย่าง ภาษา C, C++ และ C# ที่ใช้บนระบบปฏิบัติการ

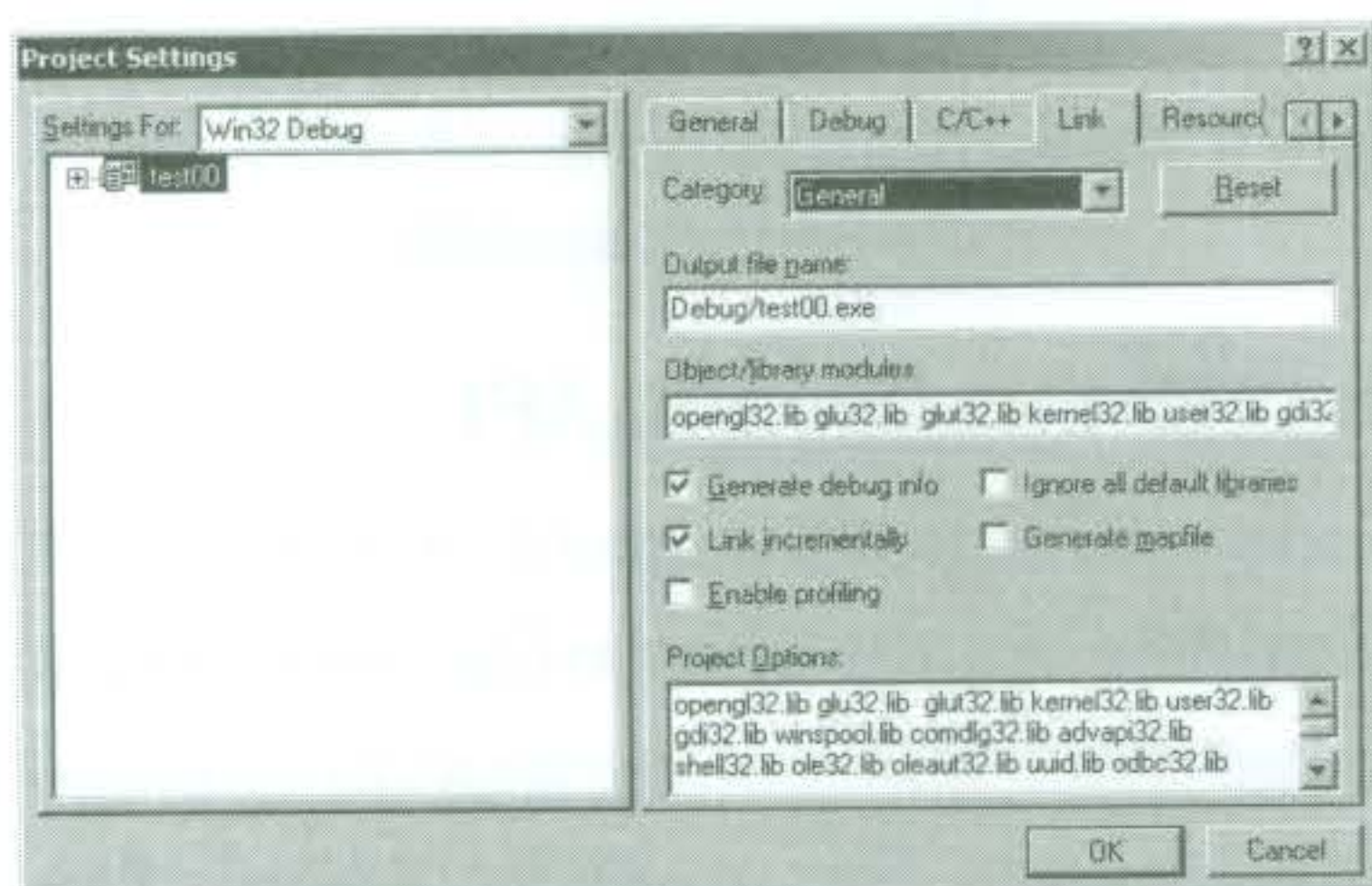
Windows ตามที่มีผู้นิยมใช้ในประเทศไทยปัจจุบัน
วิธีตั้งค่าตัวแปลภาษา Microsoft Visual
Studio 6.0 สำหรับภาษา C และ C++

โปรแกรม Microsoft Visual C++ 6.0 รองรับ
ไลบรารีของ OpenGL บางส่วนอยู่แล้วจึงไม่ต้องติด
ตั้งบางส่วนแต่ที่ต้องติดตั้งเพิ่มคือไลบรารีชนิด GLUT
เท่านั้น สำหรับการเรียกใช้ฟังก์ชันที่อยู่ในไลบรารีของ
OpenGL จะต้องประกาศการใช้ไลบรารีไว้ในส่วนหัว
ของโปรแกรมภาษา C และ C++ เช่น #include<GL/
GLUT.H> หรือ #include<GLUT.H>

ขั้นตอนการตั้งค่าตัวแปลภาษา Microsoft
Visual Studio 6.0 สำหรับภาษา C และ C++ มีดังนี้

1. หลังจากดาวน์โหลดไลบรารี Glut จาก
<http://www.math.tau.ac.il/~shulyl/courses/TAU/CG03/>
ให้บันทึกไฟล์ glut.h ที่ส่วนโฟลเดอร์ include ของภาษา
เช่น F:\Microsoft Visual Studio\VC98\Include\GL

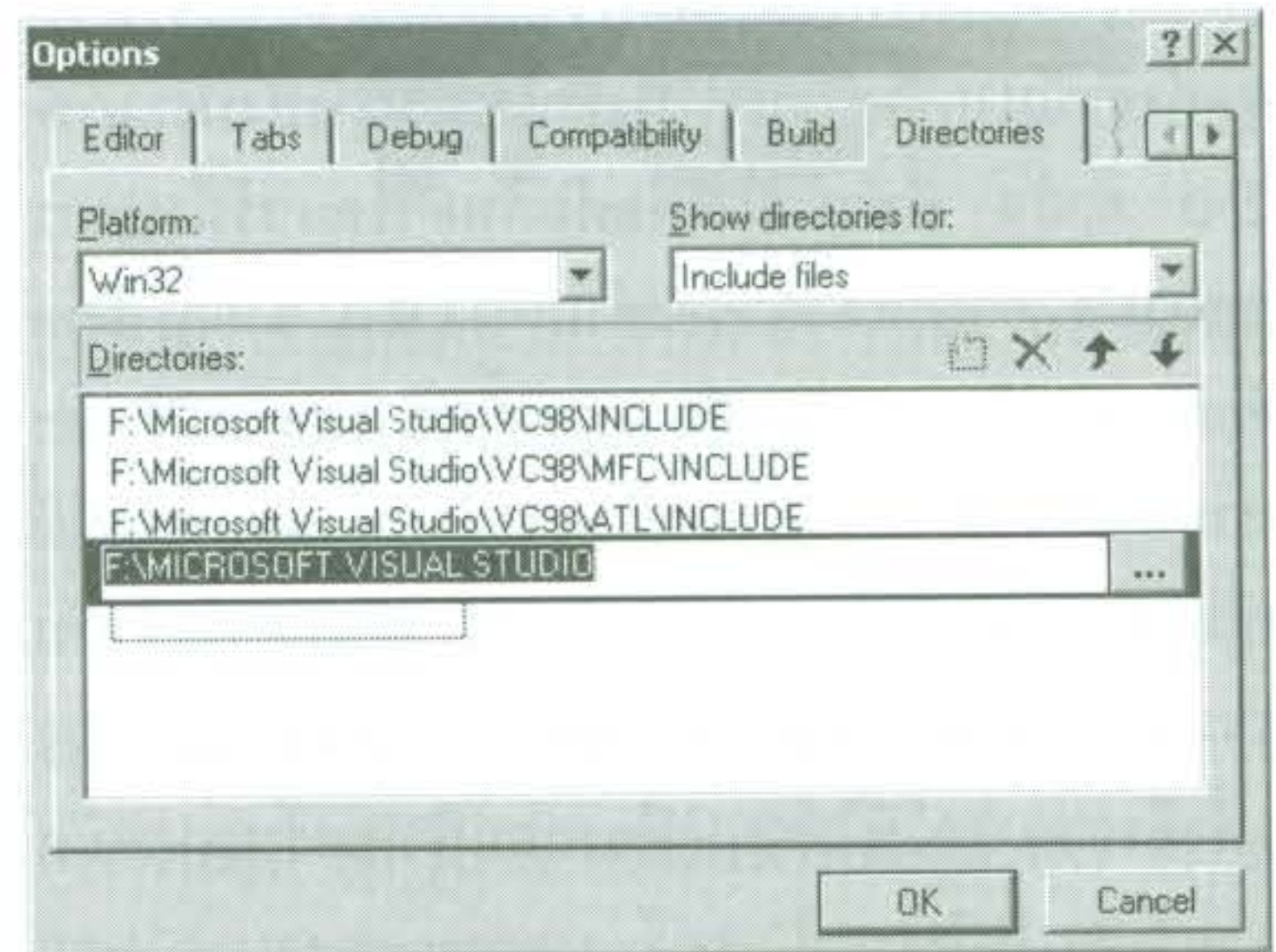
2. สร้าง Win32 Console Application ใน
Microsoft Visual C++ 6.0 หลังจากนั้นเชื่อมโยง
ไลบรารี OpenGL โดยเลือกเมนู Project และเมนูย่อย
Settings ตามด้วยแท็บ LINK ในช่อง Object/Library
Modules ให้พิมพ์ชื่อไฟล์เพิ่มได้แก่ opengl32.lib,
glu32.lib และ glut32.lib (ก่อน kernel32.lib) และ
เลือกปุ่ม OK ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 วิธีเชื่อมโยงไลบรารี OpenGL เข้ากับ
Microsoft Visual C++ 6.0

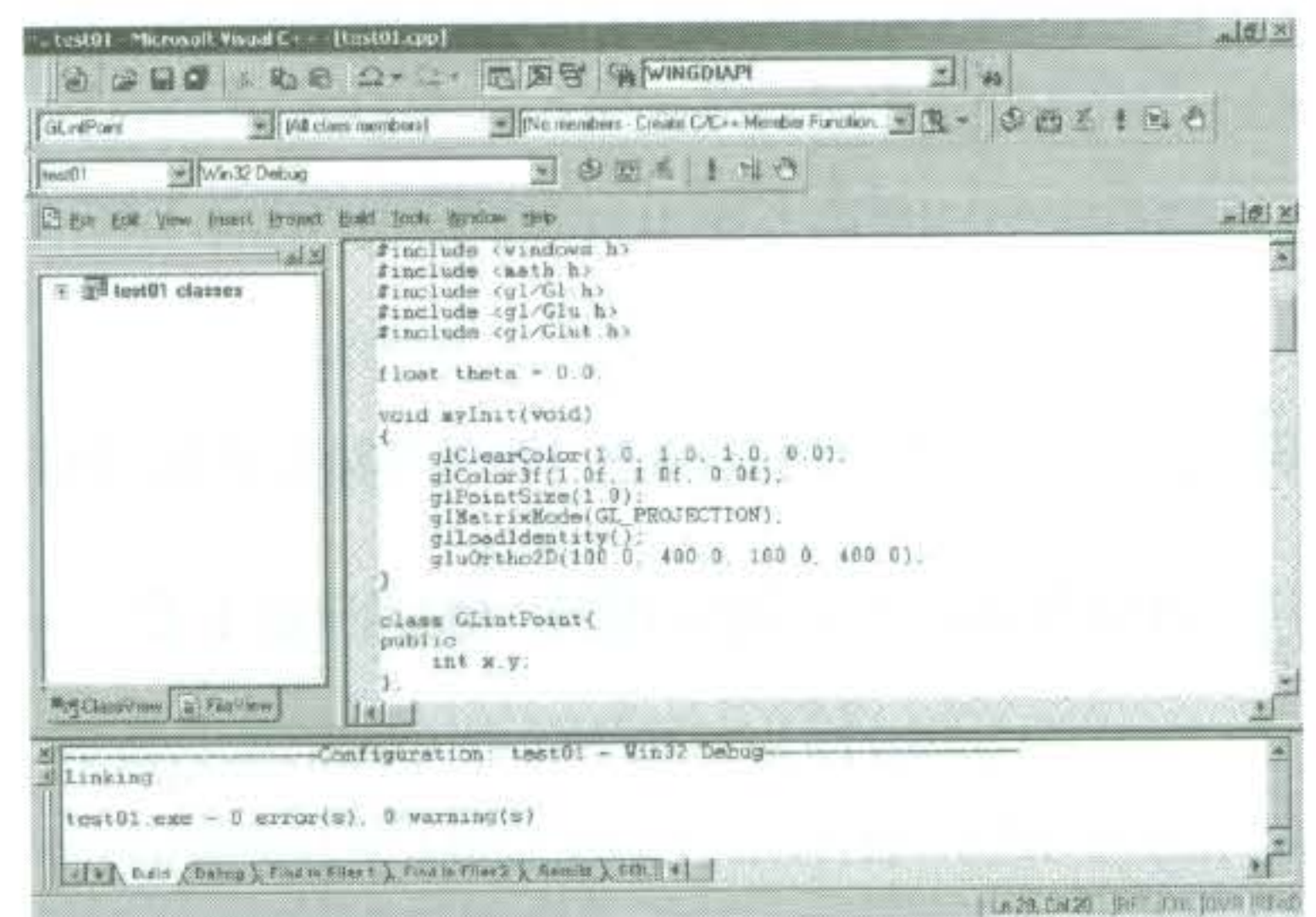
3. เพิ่มไฟล์และไลบรารีโดยเลือกเมนู Tool
เมนูย่อย Options เลือกแท็บ Directories แล้วเพิ่มชื่อ

โฟลเดอร์ที่เก็บไฟล์ชื่อ glut32.dll เช่นเก็บไว้ใน
โฟลเดอร์ชื่อ F:\MICROSOFT VISUAL STUDIO
ดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 การเพิ่มไฟล์และไลบรารี

4. หลังจากตั้งค่าต่างๆ เสร็จแล้ว ทดสอบ
การตั้งค่าโดยลองเขียนโปรแกรมติดต่อไลบรารีของ
OpenGL ได้ ดังตัวอย่างในรูปที่ 12 จากนั้นประมวล
ผลและแสดงผลลัพธ์ต่อไป



รูปที่ 12 การทดลองเขียนโปรแกรมด้วย Microsoft
Visual C++ 6.0

วิธีตั้งค่าตัวแปลภาษา Microsoft Visual Studio
.NET สำหรับภาษา C# มีขั้นตอนดังนี้

ใน Microsoft Visual Studio .NET สำหรับ
ภาษา C# ใช้ CsGL (C sharp graphic library) เป็น
ไลบรารีที่พัฒนามาจาก ไลบรารี OpenGL ของภาษา

C ที่สามารถใช้งานได้กับภาษา .NET ทุกภาษาก่อนที่จะติดตั้ง CsGL ต้องมีสิ่งต่อไปนี้

1. ไฟล์ CsGL (มักอยู่รูปแบบของไฟล์ที่ถูกบีบอัด) .zip ที่ประกอบด้วย ตัวติดตั้งที่เป็นไฟล์ระบบกลุ่ม (batch file)

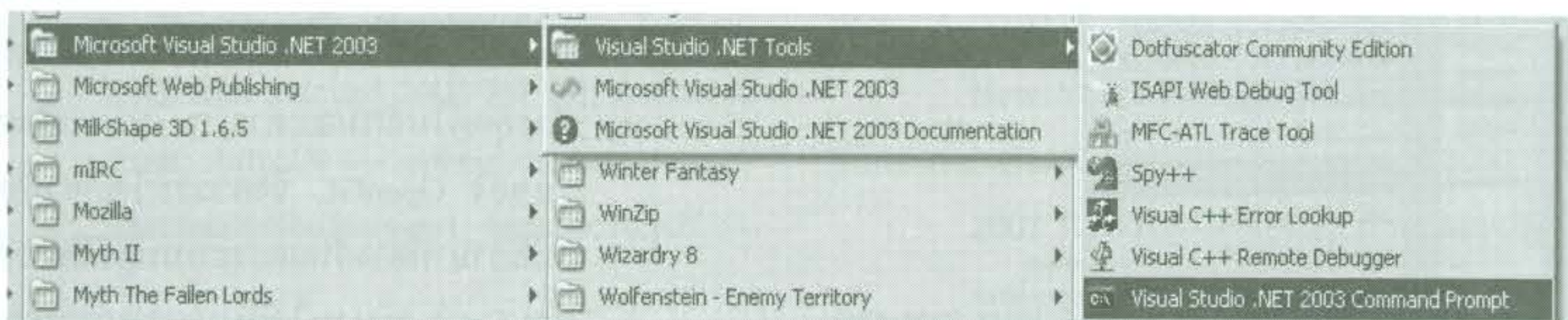
2. ไฟล์ Runtime ของ OpenGL ส่วนใหญ่จะถูกติดตั้งอยู่ในระบบปฏิบัติการอยู่แล้ว

3. ต้องมีการติดตั้ง .NET Framework ขั้นตอนการตั้งค่าตัวแปลภาษา Microsoft Visual Studio .NET สำหรับภาษา C# มีดังนี้

1. ติดตั้ง CsGL.dll

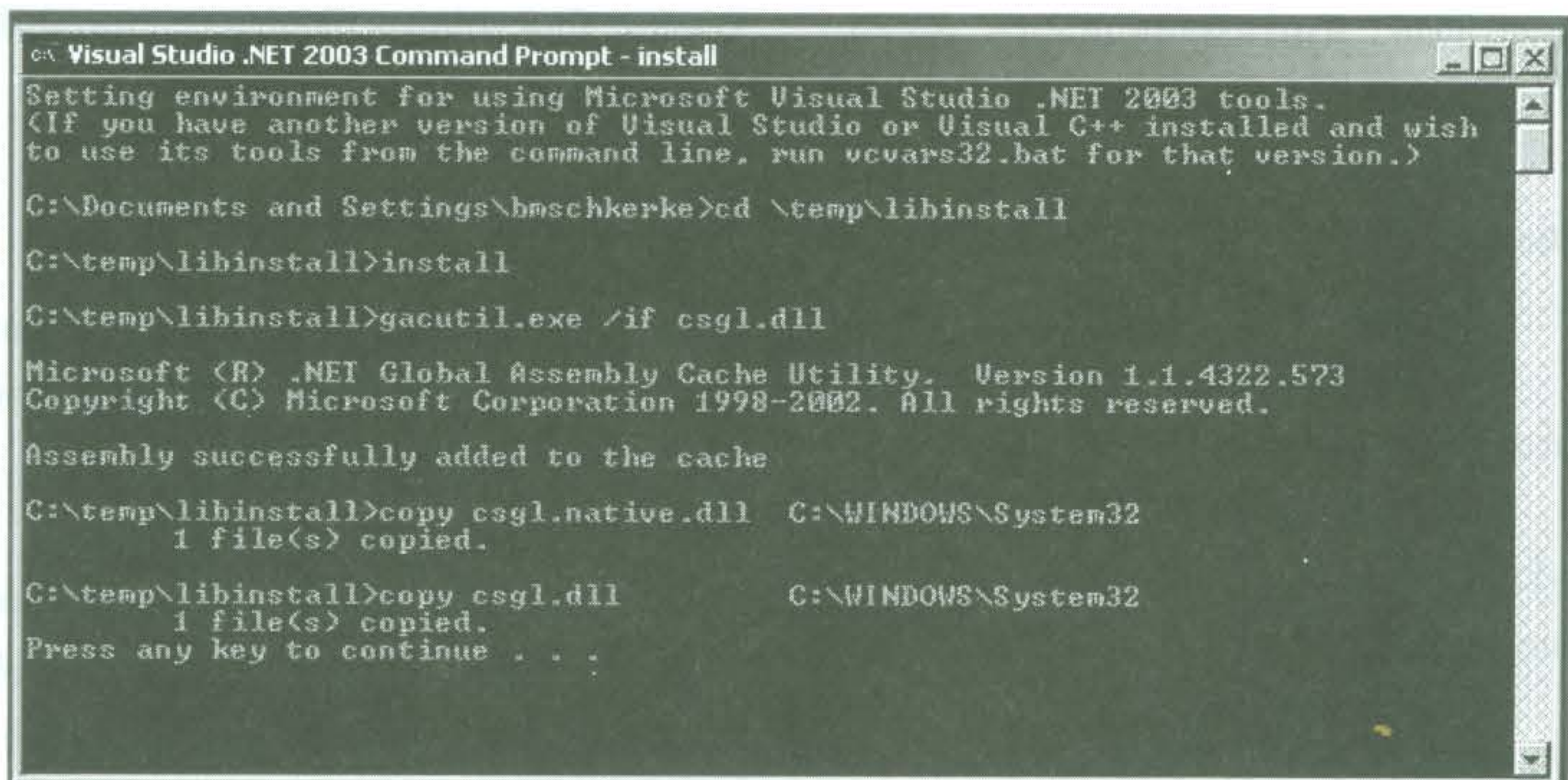
หลังจากดาวน์โหลดไฟล์ CsGL จาก <http://prdownloads.sourceforge.net/csgl/> แล้ว

จากนั้นขยายการบีบอัดไฟล์ซึ่งประกอบด้วย 2 โฟลเดอร์ คือ lib และ libinstall ภายในโฟลเดอร์ libinstall ประกอบด้วยไฟล์ .dll 2 ไฟล์ได้แก่ CsGL.dll และ CsGL.native.dll ไฟล์ CsGL.dll เป็น assembly หรือไลบรารีของ .NET ที่สนับสนุนคลาสและเครื่องมือต่าง ๆ ของ OpenGL เป็นไฟล์ที่จะต้องมีการติดตั้งจาก install.bat ที่อยู่ภายในโฟลเดอร์ libinstall และต้องบันทึกไว้ที่โฟลเดอร์ของโปรแกรมประยุกต์นั้นๆ ด้วย ส่วนไฟล์ CsGL.native.dll เป็นไฟล์ที่ไม่ใช่ assembly เป็นเพียงไฟล์ .dll ธรรมดาที่ช่วยการทำงานบางประการของ CsGL และต้องบันทึกไว้ในโฟลเดอร์เดียวกับ CsGL.dll ทำการติดตั้งโดยผ่าน Visual Studio .NET 2003 Command Prompt ดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 การเลือกเมนูย่อยเพื่อเข้าถึงโปรแกรม Visual Studio .NET 2003 Command Prompt

พิมพ์ใน Command Prompt เพื่อเรียกไฟล์ install.bat ในโฟลเดอร์ที่เก็บไฟล์ดังตัวอย่างรูปที่ 14 มีไฟล์อยู่ที่ C:\temp\libinstall



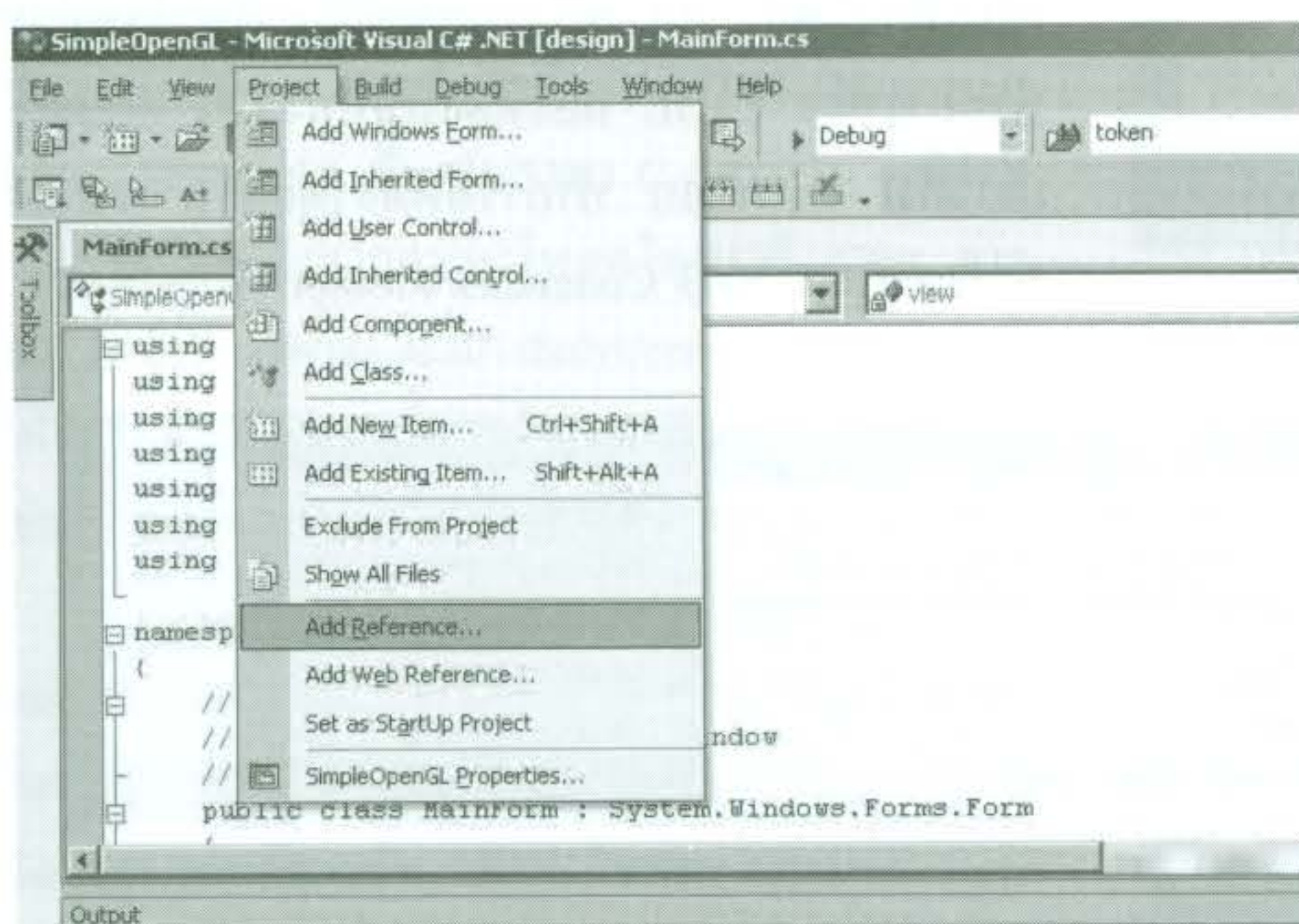
รูปที่ 14 ผลจากโปรแกรม Visual Studio .NET 2003 Command Prompt

แล้วหลังจากนี้ไฟล์ทั้ง 2 คือ CsGL.native.dll และ CsGL.dll จะถูกคัดลอกไปเก็บที่ C:\windows\system32 พร้อมทั้งจะใช้งาน

2. การเพิ่มแหล่งอ้างอิง (Add Reference) ของ CsGL.dll

ในการประมวลผลโปรแกรมที่มีการเรียกใช้งาน CsGL จะต้องเพิ่มการอ้างอิงดังขั้นตอนต่อไปนี้

1. เลือกเมนูโปรเจกต์ (Project) แล้วเลือกเมนูย่อยเพิ่มแหล่งอ้างอิง (Add Reference)



รูปที่ 15 การเพิ่มแหล่งอ้างอิงของ Microsoft Visual.NET

2. ค้นผ่านไปยังโฟลเดอร์ที่ได้บันทึกไฟล์ CsGL.dll ไว้แล้ว สำหรับระบบปฏิบัติการ Windows อยู่ที่โฟลเดอร์ C:\windows\system32

การแสดงผลลัพธ์โปรแกรมด้วย Visual Studio 6.0 และ .NET มีขั้นตอนเหมือนกันดังนี้

1. เลือกเมนูสร้าง (Build) โปรแกรม
2. เลือกเมนูย่อยสร้างผลลัพธ์ (Build Solution) เพื่อทำการประมวลผลทั้งโปรแกรม
3. จากนั้นเลือกเมนูสร้าง (Build) และเมนูย่อยเริ่มต้น (Start) เพื่อแสดงผลการทำงานของโปรแกรม

สรุป

โดยสรุปแล้ว OpenGL สามารถสนับสนุนการทำงานทางด้านกราฟิกในการแปลงภาพแบบสุกกันซึ่งได้แก่ การย้ายตำแหน่งภาพ การหมุนภาพรอบแกน การย่อขยายภาพ และสามารถกำหนดคุณสมบัติของภาพกราฟิก เช่น ขนาด สี ลักษณะพื้นผิวของภาพได้ดี ทำให้นักเขียนโปรแกรมไม่ต้องเขียนสมการในการคำนวณภาพเองตั้งแต่แรกเริ่มทั้งหมด จึงช่วยลดเวลาการเขียนโปรแกรมลงได้ส่วนหนึ่ง นักเขียนโปรแกรม

สามารถประยุกต์ใช้ OpenGL กับภาษาคอมพิวเตอร์อื่นๆ นอกจาก ภาษา C, C++, C# ได้ เนื่องจาก OpenGL สามารถใช้ได้กับหลายระบบปฏิบัติการและหลายภาษาซึ่งในแต่ละภาษาต่างก็มีลักษณะเฉพาะของภาษานั้นๆ เพื่อสร้างโปรแกรมประยุกต์ในลักษณะต่าง ๆ ในการเลือกใช้รุ่นของ OpenGL จึงควรระวังเกี่ยวกับตัวแปลภาษาที่ต่างกันและระบบปฏิบัติการด้วย เช่น CsGL ทำงานได้ดีบนระบบปฏิบัติการ Windows 2000, Windows NT หรือ Linux แต่ทำงานบน Windows XP อาจทำให้

การประมวลผลมีจุดบกพร่อง (debug) ขึ้นได้ ดังนั้นนักเขียนโปรแกรมจึงควรศึกษาความสามารถของ OpenGL กับตัวแปลภาษาที่เลือกและระบบปฏิบัติการที่จะใช้ด้วย

บรรณานุกรม

- มงคล อัสวโกวิทกรณ์. (2535). การเขียนโปรแกรมกราฟิกส์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ หจก.ออฟเซตโปรดักชั่น.
- Angle, E. (1990). Computer Graphics. 1st ed. New York: Addison-Wesley Publishers.
- Angle, E. (2000). Interactive Computer Graphics. 2nd ed. New York: Addison-Wesley Publishers.

- Exhedra Solutions. Setup OpenGL for Window [online] 1997 [cited 2003 Jul 12]. Available from: <http://www.planet-source-code.com/vb/scripts/showcode.asp>
- Guillermo, V. Installing OpenGL & GLUT Windows 98, NT and Win 2K [online] 2000 Jun 12 [cited 2003 Jul 12]. Available from: <http://www.cs.csustan.edu/~rsc/CS3600F01/InstallOpenGL.html>
- Harrington, S. (1987). Computer Graphics: A Programming Approach. Singapore: McGraw-Hill.
- Hill, Jr., F.S. (2001). Computer Graphics Using OpenGL. 2nd ed. New Jersey: Prentice-Hall.
- Jeremy, K. The OpenGL Graphic System [online] 2003 Mar 5 [cited 2003 Jul 10]. Available from: http://www.opengl.org/developers/documentation/version1_4/glspec14.pdf
- Jim, D. Sierpinski Gasket Animation [online] 2002 [cited 2003 Jul 19]. Available from: <http://www.jimdrewes.com/code.php>
- Open Source Development Network. Project: OpenGL C++ Library: Summary [online] 2002 [cited 2003 July 12]. Available from: <http://sourceforge.net/projects/ogclib/>
- Savchenko, S. (2000). 3D Graphics Programming Games and Beyond. 1st ed. Indiana: Sams Publishing.
- Vienna University of Technology. Glt openGL toolkit [online] 2003 [cited 2003 July 20]. Available from: <http://gd.tuwien.ac.at/hci/nigels.com/glt/>
- Watt, A. (1993). 3D Computer Graphics. 2nd ed. New York: Addison-Wesley Publishers.
- Xmission. GLUT for Win32 [online] 2000 [cited 2003 July 20]. Available from <http://www.xmission.com/~nate/glut.html>



การตรวจวัดความสำเร็จสมบูรณ์ของปุ๋ยหมัก

นันทวัน ฤทธิเดช¹

การทำปุ๋ยหมักเป็นแนวทางในการนำขยะซึ่งมีปริมาณมาก กลับมาใช้ใหม่ในรูปของปุ๋ย ซึ่งเป็นประโยชน์ทางด้านเกษตรกรรม แต่อย่างไรก็ตามก่อนนำเอาปุ๋ยหมักมาใช้ เราจำเป็นต้องทำการตรวจสอบความสำเร็จสมบูรณ์ของปุ๋ยหมัก วิธีการตรวจสอบความสำเร็จสมบูรณ์ของปุ๋ยหมักสามารถทำได้หลายวิธี แต่ในครั้งนี้ได้กล่าวถึงรูปแบบการใช้แหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ [community level physiological profiles (CLPPs)] และ การทดสอบการงอกของเมล็ดพันธุ์พืช (seed germination test) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจสอบ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว

ปุ๋ยหมักคืออะไร

ปุ๋ยหมักคือ ปุ๋ยอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ทำขึ้นโดยการนำเอาวัสดุเหลือทิ้งเช่นใบไม้ ฟางข้าว เศษหญ้า หรือ ขยะตามบ้านเรือนมากองรวมกัน แล้วปรับความชื้นให้เหมาะสม เพื่อให้เกิดกระบวนการหมักจากจุลินทรีย์หลายชนิดที่ปะปนและอาศัยอยู่ในกองปุ๋ยช่วยกันแปรสภาพของเศษพืชหรือวัสดุต่างๆ ให้กลายเป็นวัสดุชนิดใหม่ที่มีสีดำ ลักษณะพรุน ร่วนซุย

จุลินทรีย์ในกองปุ๋ยหมัก

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการหมักคือ แบคทีเรีย เชื้อรา และแอคติโนมัยซีตีส ([http://www.weblife.org\(humanure/chapter3_10.html\)](http://www.weblife.org(humanure/chapter3_10.html))) โดยจะตรวจพบจุลินทรีย์เหล่านี้ในระหว่างกระบวนการหมัก แบคทีเรียและแอคติโนมัยซีตีสจะทำหน้าที่ใน

การย่อยสลายสารอินทรีย์ในขณะที่เชื้อราจะทำหน้าที่ย่อยสลายขยะที่สลายยาก กระบวนการในการผลิตปุ๋ยหมัก แบ่งออกเป็น 3 ช่วง ของการหมัก (Hassen et al., 2001)

1. ระยะอุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic phase, 40-50 องศาเซลเซียส) ที่ระยะ 0-25 วันของกระบวนการหมักนี้ จุลินทรีย์พวกเจริญที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophilic) และที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) แบคทีเรีย และเชื้อรา ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในระยะนี้เช่น *Caulobacter* spp., *Erythrobacter longus*, *Escherichia coli* เป็นต้น โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะทำหน้าที่ย่อยสลายที่สามารถย่อยได้ง่าย เช่น มอโนแซ็กคาไรด์ เป็นต้น (Tuomela, 2000)

2. ระยะอุณหภูมิสูง (Thermophilic phase, 65 องศาเซลเซียส) ในระยะ 30 - 110 วันของกระบวนการหมัก จุลินทรีย์พวกเจริญที่อุณหภูมิสูง (thermophilic) แบคทีเรีย ได้แก่ *Nitrosomonas europaea*, *Bacillus thermodenitrificans* และ *Streptomyces thermovulgaris* เป็นต้น จะเจริญโดยมีบทบาทสำคัญ ในการย่อยสลายโปรตีน นอกจากนี้ยังย่อยสลายวัตถุติดิบ เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งอยู่ในกองปุ๋ยหมัก (Tuomela, 2000)

3. ระยะอุณหภูมิต่ำ (Cooling phase, 30 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิจะลดลงหลังจากการหมักเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ จุลินทรีย์ที่อาจตรวจพบ ได้แก่ spore forming bacteria, faecal coliform และ *Salmonella* (Sidhu et al., 2001) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มักพบในระยะสุดท้ายของการหมักปุ๋ย

¹ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

วิธีการตรวจวัดความสำเร็จสมบูรณ์ของปุ๋ยหมัก

วิธีการตรวจหาความสำเร็จสมบูรณ์มีหลายวิธี โดยแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันออกไป ดังรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. Community level physiological profiles (CLPPs) เป็นวิธีการตรวจหากลุ่มประชากร จุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมอย่างง่าย โดยใช้ Biolog microplate เป็นเครื่องมือสำหรับการตรวจวิเคราะห์ และตรวจผลการทดลองโดยดูที่ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ที่นิยมมี 2 แบบคือ

ตารางที่ 1 แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ใน GN microplate (ที่มา: GN MicroPlate instructions for use)

GN MicroPlate™

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
water	α-cyclodextrin	dextrin	glycogen	tween 40	tween 80	N-acetyl-D-galactosamine	N-acetyl-D-glucosamine	adonitol	L-arabinose	D-arabitol	cellobiose
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
D-erythritol	D-fructose	L-fucose	D-galactose	gentiobiose	α-D-glucose	m-inositol	α-D-lactose	lactulose	maltose	D-mannitol	D-mannose
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D-melibiose	β-methyl D-glucoside	D-psicose	D-raffinose	L-rhamnose	D-sorbitol	sucrose	D-trehalose	turanose	xylitol	methyl pyruvate	mono-methyl succinate
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
acetic acid	cis-aconitic acid	citric acid	formic acid	D-galactonic acid lactone	D-galacturonic acid	D-gluconic acid	D-glucosaminic acid	D-glucuronic acid	α-hydroxybutyric acid	β-hydroxybutyric acid	γ-hydroxybutyric acid
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
p-hydroxy phenylacetic acid	itaconic acid	α-keto butyric acid	α-keto glutaric acid	α-keto valeric acid	D,L-lactic acid	malonic acid	propionic acid	quinic acid	D-saccharic acid	sebacic acid	succinic acid
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
bromo succinic acid	succinamic acid	glucuronamide	alaninamide	D-alanine	L-alanine	L-alanyl-glycine	L-asparagine	L-aspartic acid	L-glutamic acid	glycyl-L-aspartic acid	glycyl-L-glutamic acid
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
L-histidine	hydroxy L-proline	L-leucine	L-ornithine	L-phenylalanine	L-proline	L-pyroglutamic acid	D-serine	L-serine	L-threonine	D,L-carnitine	γ-amino butyric acid
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
urocanic acid	inosine	uridine	thymidine	phenyl ethylamine	putrescine	2-amino ethanol	2,3-butanediol	glycerol	D,L-α-glycerol phosphate	glucose-1-phosphate	glucose-6-phosphate

1.2 Biolog Eco microplate มีลักษณะเป็นจานหลุมเช่นเดียวกับ Biolog GN microplate แต่ละหลุมประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันจำนวน 30 ชนิด ซึ่งมีทั้งหมด 3 ซ้ำและหลุมควบคุม (น้ำ) จำนวน 1 หลุม คาร์บอนเหล่านี้จัดแบ่งเป็น

1.1 Biolog GN microplate มีลักษณะเป็นจานหลุมโดยแต่ละหลุมประกอบด้วย แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันจำนวน 95 ชนิด และหลุมควบคุม (น้ำ) จำนวน 1 หลุม แหล่งคาร์บอนเหล่านี้จัดแบ่งเป็น 11 กลุ่มคือ alcohols, amino acid, carbohydrates, carboxylic acids, amides, amines, aromatic chemicals, brominated chemicals, esters, polymers และ phosphorylated chemicals (ตารางที่ 1) ในแต่ละหลุมของmicroplate จะถูกบรรจุด้วย สี tetrazolium ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าจุลินทรีย์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ โดยจุลินทรีย์จะรีดิวซ์จากสารละลายสีไม่มีสีให้กลายเป็นสีม่วงของ formazan

6 กลุ่ม คือ amines, amino acid, carbohydrates, carboxylic acids, polymers, phenolic compounds (ตารางที่ 2) แต่ละหลุมถูกบรรจุด้วยสี tetrazolium ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

ตารางที่ 2 แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ใน Eco microplate (ที่มา: Eco MicroPlate instructions for use)

BIOLOG
EcoPlate™

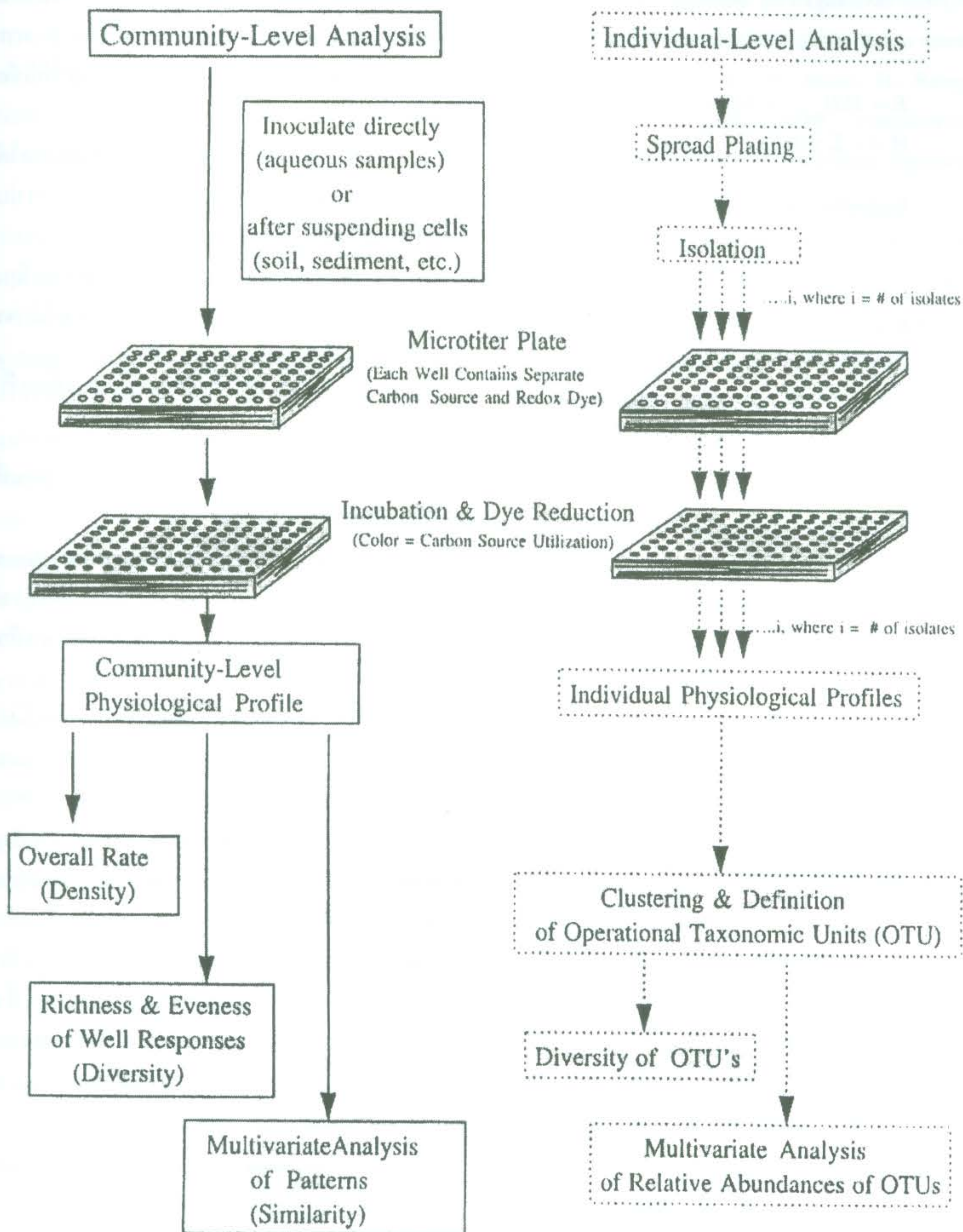
Microbial Community Analysis

A1 Water	A2 β-Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine
B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine
C1 Tween 40	C2 l-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzolc Acid	C4 L-Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 l-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzolc Acid	C4 L-Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 l-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzolc Acid	C4 L-Phenylalanine
D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzolc Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzolc Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzolc Acid	D4 L-Serine
E1 α-Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ-Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α-Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ-Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α-Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ-Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine
F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid
G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl-amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl-amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl-amine
H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine

วิธีการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยวิธี community level physiological profiles (CLPPs) สามารถทำได้ดังรูปที่ 1 (Garland, 1996) สารละลายตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม เช่น ปุ๋ยหมัก จะถูกนำมาบ่มใน Biolog microplate ถ้าจุลินทรีย์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่บรรจุอยู่ในหลุม Biolog microplate ได้ สารละลายในแต่ละหลุมจะเปลี่ยนจากใสไม่มีสีเป็นสีม่วง นำมาวัดค่าความขุ่น (optical density, OD) ซึ่งค่าความขุ่นที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS ซึ่งมี 3 วิธี

1. อัตราการเกิดสีโดยรวม [Overall rate (density)] หรือ ค่าการเกิดสีในหลุมโดยเฉลี่ย (average well color development, AWCD) คืออัตราการเปลี่ยนแปลงสีภายในหลุม โดยคำนวณจาก Σ (ค่าความขุ่นจากแต่ละหลุม - ค่าความขุ่นจากหลุมควบคุม)/ 95 แล้วนำมาวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ตามวิธีของ (Garland, 1997)

CARBON SOURCE PROFILING OF MICROBIAL COMMUNITIES



รูปที่ 1 Community level physiological profile (CLPP) (Garland, 1996)

2. ความหลากหลายของจุลินทรีย์ (microbial functional diversity) เช่น richness และ evenness richness (Zak et al., 1994) คำนวณได้จากสมการ

$$E = H/H_{\max} = H/\log S$$

แต่ $H = - \sum p_i (\ln p_i)$

Richness (S) คือจำนวนแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์สามารถใช้และเจริญได้

Evenness (E) คือความสามารถในการใช้ซับสเตรททั้งหมด ซึ่งหาได้จากสมการที่กล่าวข้างต้น

H คือ substrate diversity ประกอบด้วย substrate richness และ substrate evenness

p_i คืออัตราส่วนของค่าความชุกในแต่ละหลุมต่อค่าความชุกเฉลี่ย

3. Multivariate analysis of patterns (similarity) คือการนำเอาค่าความชุกมาวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยใช้โปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์ เช่นการวิเคราะห์ความเหมือน(similarity) จากการวิเคราะห์ดังกล่าวข้างต้น ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้รูปแบบการใช้แหล่งคาร์บอนของประชากรจุลินทรีย์ ซึ่งทำให้เราสามารถนำมาประเมินความสำเร็จสมบูรณ์ของปุ๋ยหมักได้ Insam (1997) ใช้ Biolog microplate ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักปุ๋ย พบว่าเมื่ออายุของปุ๋ยหมักเพิ่มขึ้นการใช้แหล่งคาร์บอนจำพวกคาร์โบไฮเดรต และสารประกอบฟอสโฟริเลต จะลดลง ในขณะที่ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนจำพวกพอลิเมอร์ คาร์บอกซิลิก และกรดอะมิโน จะเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Laine et al. (1997) พบว่า CLPPs สามารถแยกกลุ่มประชากรจุลินทรีย์จากปุ๋ยหมักที่หมักโดยใช้ซับสเตรทต่างชนิดกัน Hill et al. (2000)

รายงานว่ารูปแบบการใช้ซับสเตรทของแต่ละตัวอย่างจะไม่เหมือนกัน ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้เปรียบเทียบกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ได้ อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์กลุ่มประชากรของจุลินทรีย์ด้วยวิธีนี้ก็ยังมีข้อเสียดังต่อไปนี้

1. การแปรผลการทดลองอาจจะผิดพลาดได้ถ้าอ่านผลการทดลองในช่วงเวลาสั้นหลังจากการบ่มเชื้อใน Biolog microplate

2. การรีดิวซ์สี tetrazolium ในแต่ละหลุมเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อประชากรของจุลินทรีย์บางส่วนที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่อยู่ใน Biolog microplate เท่านั้น

3. แหล่งคาร์บอนที่บรรจุอยู่ใน Biolog microplate อาจจะไม่สอดคล้องกับแหล่งคาร์บอนที่พบได้ในตัวอย่างสิ่งแวดล้อม

2. การทดสอบความงอกของเมล็ด (Seed germination test) ปุ๋ยหมักที่หมักยังไม่เสร็จสมบูรณ์จะมีการสะสมของสารประกอบที่เป็นพิษต่อพืช (phytotoxic compounds) เช่น โลหะหนัก (heavy metals) สารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) เอทิลีน(ethylene) และแอมโมเนีย(ammonia) กรดอินทรีย์ (organic acid) (Tiquia et al., 1996) สารเหล่านี้จะมีผลต่อการงอกของเมล็ด และการเจริญเติบโตของพืช ทำให้ผลผลิตของพืชลดลง การงอกของเมล็ดพันธุ์เป็นหนึ่งในวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็วที่ใช้ในการตรวจสอบความสำเร็จสมบูรณ์ของปุ๋ยหมัก โดยการนำเมล็ดมาเพาะและนับจำนวนเมล็ดพันธุ์พืชที่เจริญเติบโตและการวัดความยาวของรากที่งอกค่าที่ได้นำมาคำนวณหาค่า ดัชนีความงอก (germination index, GI) (Wong et al., 2001)

$$\text{Germination index (\%)} = \frac{\text{Seed germination (\%)} \times \text{Root length of treatment} \times 100\%}{\text{Seed germination (\%)} \times \text{Root length of control}}$$

จากการคำนวณถ้าได้ค่า GI = 50% แสดงว่าปุ๋ยหมักนั้นปลอดสารประกอบที่เป็นพิษต่อพืช Tiquia et al. (1996) ตรวจสอบความสำเร็จสมบูรณ์ของปุ๋ยชีวผสมขี้เลื่อย โดยใช้ seed germination และ

พบว่า ผักกาดขาว (*Brassica parachinensis*) และผัก
โคมจีน (*Amaranthus espinosus*) เป็นเมล็ดพันธุ์ที่มี
ความไวต่อการทดสอบครั้งนี้ และค่า GI ของพืชมี
มากกว่า 80% ที่ 60 วันของการบ่มปุ๋ยหมัก นั้น
แสดงว่าปุ๋ยหมักเสร็จสมบูรณ์ใน วันที่ 60 วันของ
การหมัก

เนื่องจาก CLPPs และการทดสอบการงอก
ของเมล็ดเป็นวิธีที่ง่าย สะดวกในการตรวจสอบความ
เสร็จสมบูรณ์ของปุ๋ยหมัก ดังนั้นจึงเป็นที่นิยมใช้กัน
อย่างแพร่หลาย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผศ.วรรณดี ปัญญศิริรัชต์ และ
อาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ
และเป็นกำลังใจในการเขียนบทความครั้งนี้ ขอขอบคุณ
Associate Professor Dr. Heribert Insam ที่ให้
ความรู้ด้านปุ๋ยหมัก Dr. Lulu Belete ที่ให้ความรู้ด้าน
Biolog assay

บรรณานุกรม

Garland, J. L. (1996). Patterns of potential C source
utilization by rhizosphere communities.
Soil Biol. Biochem. 28:223-230.

Garland, J. L. (1997). Analysis and interpretation of
community-level physiological profiles
in microbial ecology. FEMS Microbiol.
Ecol. 24:289-300.

Hassen, A, Belguith, K., Jedidi, N., Cherif, A., Cherif,
M. and Boudabous, A. (2001). Microbial
characterization during composting of
municipal solid waste. Biores. Technol.
80:217-225.

Hill, G.T., Mitkowski, N.A., Aldrich-Wolfe, L., Emele,
L.R., Jurkonie, D.D. and Ficke, A. (2000).
Methods for assessing the composition and
diversity of soil microbial communities.
Appl. Soil. Ecol. 15:25-36.

[http://www.weblife.org\(humanure/chapter3_10.html\)](http://www.weblife.org(humanure/chapter3_10.html))

Insam, H. (1997). A new set of substrates proposed
for community characterisation in environ-
mental samples. In: Insam, H., Rangger,
A. (eds.) Microbial communities:
functional versus structural approaches.
Berlin: Springer. p.259-260.

Laine, M.M., Haario, H. and Jørgensen, K.S. (1997).
Microbial functional activity during
composting of chlorophenol-contaminated
sawmill soil. J. Microbiol. Meth. 30:21-32.

Sidhu, J., Gibbs, R.A., Ho, G.E. and Unkovich, I.
(2001). The role of indigenous micro
organisms in suppression of *Salmonella*
regrowth in composted biosolids. Wat.
Res. 35:913-920.

Tiquia, S.M., Tam, N.F.Y. and Hodgkiss, I.J. (1996).
Effects of composting on phytotoxicity of
spent pig manure sawdust litter. Environ.
Pollut. 93:249-256.

Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. and Itävaara,
M. (2000). Biodegradation of lignin
in a compost environment: a review. Bio.
Res. Technol. 72:169-183.

Wong, J.W.C., Mak, K.F., Chan, N.W., Lam, A.,
Fang, M., Zhou, L. X., Wu, O.T. and
Liao, X.D. (2001). Co-compost of soybean
residues and leaves in Hong Kong. Biores.
Technol. 76:99-106.

Zak, J.C., Willing, M.R., Moorhead, D.L. and
Wildman, H.G. (1994). Functional
diversity of microbial communities: a
quantitative approach. Soil Biol. Biochem.
26: 1101-1108.



เทคนิค Real Time RT-PCR กับการศึกษาการแสดงออกของยีน

สินีนาฏ ศิริ¹

บทนำ

เซลล์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยปัจจัยต่างๆ จะมีการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นในระดับโมเลกุล เช่น การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน ปริมาณโปรตีน และระดับการแสดงออกของยีน เป็นต้น ซึ่งผลของการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลนี้ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์ที่สังเกตและวัดได้ง่าย เช่น การเปลี่ยนแปลงขนาด รูปร่าง และการเจริญเติบโต เป็นต้น แต่การวัดความเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลยุ่งยากและจำเป็นต้องใช้เทคนิคที่ซับซ้อนกว่า ในปัจจุบันความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีชีววิทยามีผลให้การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในระดับโมเลกุลทำได้ง่ายขึ้นโดยเฉพาะการศึกษาการแสดงออกของยีน โดยเทคนิคหนึ่งที่นิยมใช้ในการศึกษาคือ เทคนิค RT-PCR (reverse transcription - polymerase chain reaction) ซึ่งวัดการแสดงออกของยีนจากปริมาณ mRNA ในเซลล์ โดยมีสองขั้นตอนหลักคือ ขั้นตอนที่หนึ่ง การถอดรหัสพันกลับ (reverse transcription) เป็นการเปลี่ยน mRNA ที่สกัดได้จากเซลล์เป็น cDNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase และขั้นตอนที่สอง ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (polymerase chain reaction) ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ 1) denaturing step ซึ่งเป็นการใช้ความร้อนที่ 90-96 °ซ. ในการแยกดีเอ็นเอสายคู่ 2) annealing step ซึ่งเป็นการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างไพรเมอร์ (primers) และดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) โดยกรณีนี้คือ cDNA ที่ได้จากการถอดรหัสพันกลับ และ 3) extension step ซึ่งเป็นการสร้างสายดีเอ็นเอจากปลายด้าน 3' ของไพรเมอร์ โดย

ใช้ DNA polymerase (เช่น Taq) ในการเชื่อมนิวคลีโอไทด์ วัตถุประสงค์ของขั้นตอนปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์นั้นเพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณที่สนใจจาก cDNA ให้มากพอที่จะวัดปริมาณได้บนอะกาโรสเจล (agarose gel) โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จะถูกนำมาแยกบนอะกาโรสเจล จากนั้นแช่เจลบนสารละลายเอทีเคียมโบรไมด์ซึ่งเป็นสารเรืองแสงที่สามารถแทรกตัวระหว่างดีเอ็นเอสายคู่ จึงทำให้สามารถสังเกตเห็นแถบดีเอ็นเอได้เมื่อส่องด้วยแสง UV ดังนั้นปริมาณของดีเอ็นเอจึงทราบได้จากค่าความเข้มของแสงเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าความเข้มของแสงและปริมาณของดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่างๆ แม้ว่าวิธี RT-PCR ทำได้ง่ายและเป็นที่ยอมรับในการศึกษาการแสดงออกของยีน แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดที่ใช้เวลานานเนื่องจาก 1) ต้องหาจำนวนรอบ PCR ที่เหมาะสมในการวัดปริมาณของดีเอ็นเอ โดยต้องใช้รอบของ PCR ที่การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบมีความสัมพันธ์กันแบบเส้นตรง (linear relationship) 2) การวัดปริมาณดีเอ็นเอจำเป็นต้องทำบนอะกาโรสเจลทำให้การศึกษาตัวอย่างหรือชนิดยีนจำนวนมากทำได้ลำบาก

เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการพัฒนาเทคนิค RT-PCR ควบคู่ไปกับเครื่อง PCR ชนิดใหม่เพื่อแก้ไขข้อจำกัดดังกล่าว โดยนอกจากจะไม่ต้องหาจำนวนรอบ PCR ที่เหมาะสมเองแล้วยังมีความไวสูง และสะดวกต่อการใช้กับปริมาณตัวอย่างหรือชนิดของยีนจำนวนมากทำให้การวัดการแสดงออกของยีนทำได้ในเวลาที่รวดเร็ว

¹ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

นอกจากนี้ยังสามารถติดตามการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองได้ตลอดกระบวนการ PCR จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงถูกนำไปใช้เป็นชื่อของเทคนิคใหม่นี้ นั่นคือเทคนิค real time RT-PCR เนื่องจากจุดเด่นของเทคนิคดังกล่าวประกอบกับเครื่อง PCR ที่ใช้ร่วมกันมีราคาต่ำลงทำให้การใช้เทคนิคนี้ในการวัดการแสดงออกของยีนได้รับความนิยมแพร่หลายรวมทั้งในห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยาในประเทศถึงแม้ว่าเทคนิคดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพที่สูงแต่การใช้เทคนิคนี้ในงานวิจัยจำเป็นที่ต้องมีความเข้าใจพื้นฐานเพื่อให้สามารถนำไปใช้แล้วได้ผลการทดลองที่ถูกต้อง

พื้นฐานของเทคนิค Real Time RT-PCR

เทคนิค real time RT-PCR อาศัยหลักการเดียวกับหลักการของเทคนิค RT-PCR ที่กล่าวข้างต้น แต่มีการพัฒนาปรับปรุงโดยการสร้างเครื่อง PCR ที่สามารถตรวจวัดปริมาณของสารเรืองแสง (fluorescent chemicals) และการพัฒนาวิธีวัดปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้โดยอาศัยการใช้สารเรืองแสงหรือใช้ดีเอ็นเอโพรบ

สำหรับเครื่องมือที่ใช้ร่วมกับเทคนิค real time RT-PCR ในปัจจุบันมีการผลิตจากอย่างน้อย 3 บริษัทที่เป็นที่รู้จักกันดีคือ 1) เครื่อง ABI Prism จากบริษัท Perkin Elmer Applied Biosystems 2) เครื่อง Lightcycler จากบริษัท Roche Molecular Biochemical และ 3) เครื่อง Icyler จากบริษัท Biorad เครื่องมือดังกล่าวมีสมบัติเหมือนกับเครื่อง PCR โดยทั่วไปที่สามารถเปลี่ยนอุณหภูมิในแต่ละขั้นของ PCR ได้อย่างรวดเร็ว แต่มีการเพิ่มส่วนที่ใช้วัดแสงจากสารเรืองแสงหรือดีเอ็นเอโพรบที่ความยาวคลื่นต่างๆ

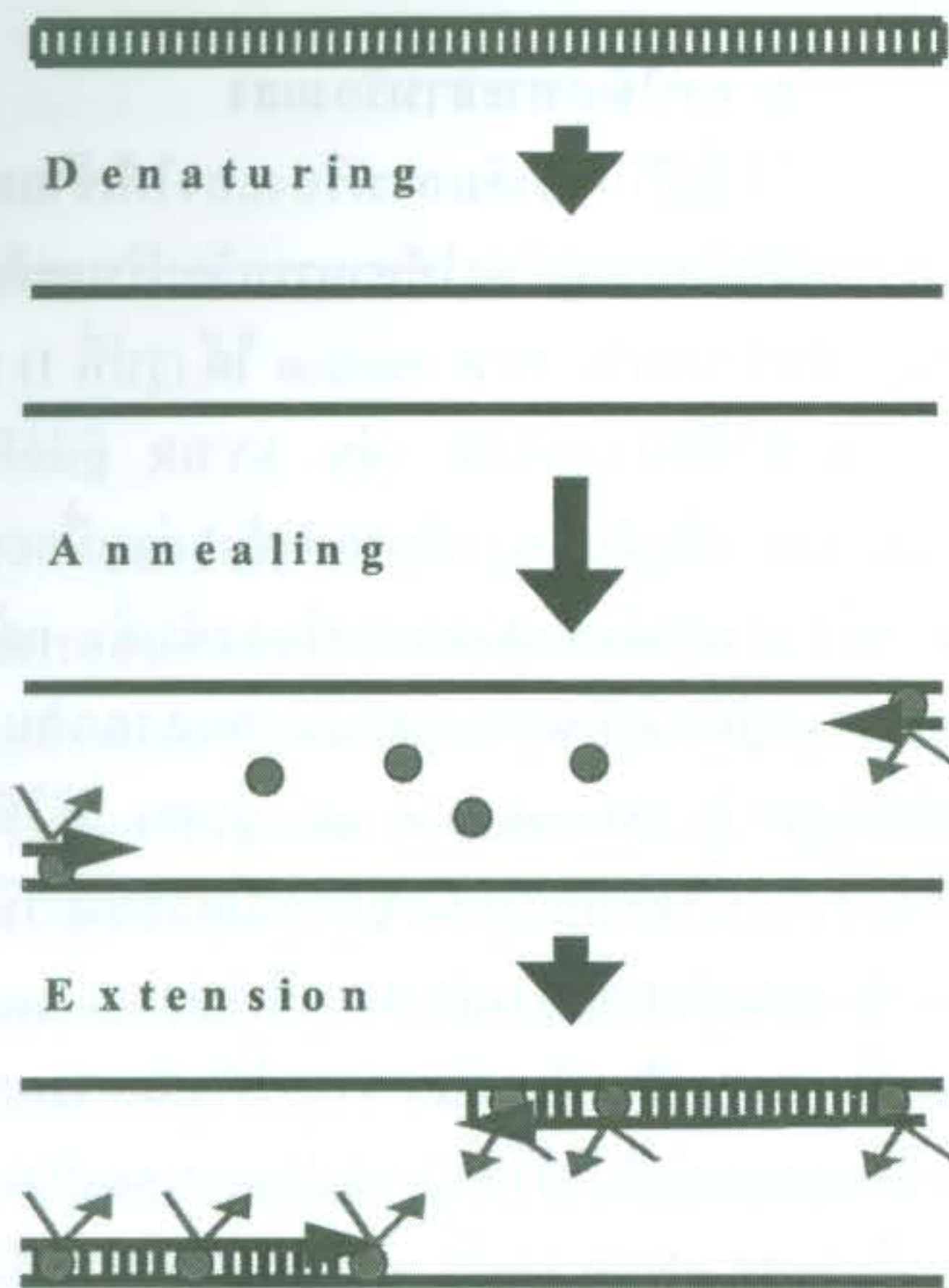
สำหรับการพัฒนาการวัดปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยสารเรืองแสงมีหลายวิธีซึ่งอาจเป็นการใช้สารเรืองแสงเข้าแทรกระหว่างดีเอ็นเอสายคู่ที่ได้จาก PCR หรืออาจใช้ดีเอ็นเอโพรบซึ่งคือดีเอ็นเอสายเดี่ยวขนาดสั้นๆที่มีลำดับเบสคู่สมกับลำดับเบสของยีนที่สนใจและ

มีสารเรืองแสงติดที่ปลาย รายละเอียดของวิธีต่างๆมีดังนี้

1) การใช้เฉพาะสารเรืองแสง

วิธีนี้เป็นการเติมสารเรืองแสงให้เข้าแทรกระหว่างดีเอ็นเอสายคู่ ทำให้สามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มจำนวนใน PCR reaction ได้ (รูปที่ 1) สารเรืองแสงที่ใช้มีหลายชนิด เช่น SYBR green I, Texas red เป็นต้น สารเรืองแสงดังกล่าวเมื่ออยู่ในสภาพอิสระจะปล่อยแสงออกมาในระดับต่ำ แต่เมื่อแทรกตัวอยู่กับดีเอ็นเอสายคู่จะปล่อยแสงออกมาในระดับที่สูงกว่า (Morrison et al., 1998) วิธีใช้สารเรืองแสงวิธีนี้ได้รับความนิยมมากเนื่องจากมีวิธีการที่ไม่ซับซ้อนเพียงเติมสารเรืองแสงเข้าไป PCR reaction และมีราคาถูก ปัจจุบันบริษัทต่างๆได้ผลิตสารละลายที่พร้อมต่อการนำไปใช้โดยมีองค์ประกอบของบัฟเฟอร์ สารเรืองแสง dNTP $MgCl_2$ และเอนไซม์ ในปริมาณที่เหมาะสมทำให้สะดวกและง่ายต่อการใช้แต่มีราคาสูง หากผู้ใช้ซื้อเพียงสารเรืองแสงมาเตรียมเองจะทำให้ได้ราคาต่ำกว่า ข้อจำกัดที่ควรระวังในการใช้วิธีนี้เพื่อตรวจวัดปริมาณของดีเอ็นเอคือความไม่จำเพาะของสารเรืองแสงที่สามารถเข้าแทรกตัวในดีเอ็นเอสายคู่ใดๆ (random intercalation) ทำให้ผลที่ได้อาจผิดพลาด เช่นในการทดลองที่เกิดการจับกันเองของไพรเมอร์ (primer dimerization) หรือมีการเพิ่มจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะต่อดีเอ็นเอต้นแบบที่สนใจ ดังนั้นควรมีการออกแบบไพรเมอร์ที่ดีและมีการตรวจสอบคู่ของไพรเมอร์ที่ใช้ก่อนว่าจำเพาะต่อยีนที่สนใจและสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเฉพาะยีนที่สนใจเท่านั้น นอกจากนี้ควรมีการตรวจสอบปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อ PCR reaction เพื่อลดการจับกันเองของไพรเมอร์และเพิ่มความจำเพาะในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีนที่สนใจเท่านั้น เช่น ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ annealing temperature และความเข้มข้นของสารเรืองแสง เป็นต้น แต่หากต้องการตรวจวัดปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจแบบมีความจำเพาะสูงควรเลือกใช้ดีเอ็นเอโพรบชนิดต่างๆซึ่งถูกพัฒนาให้สามารถจับอย่างจำเพาะต่อดีเอ็นเอต้นแบบในบริเวณ

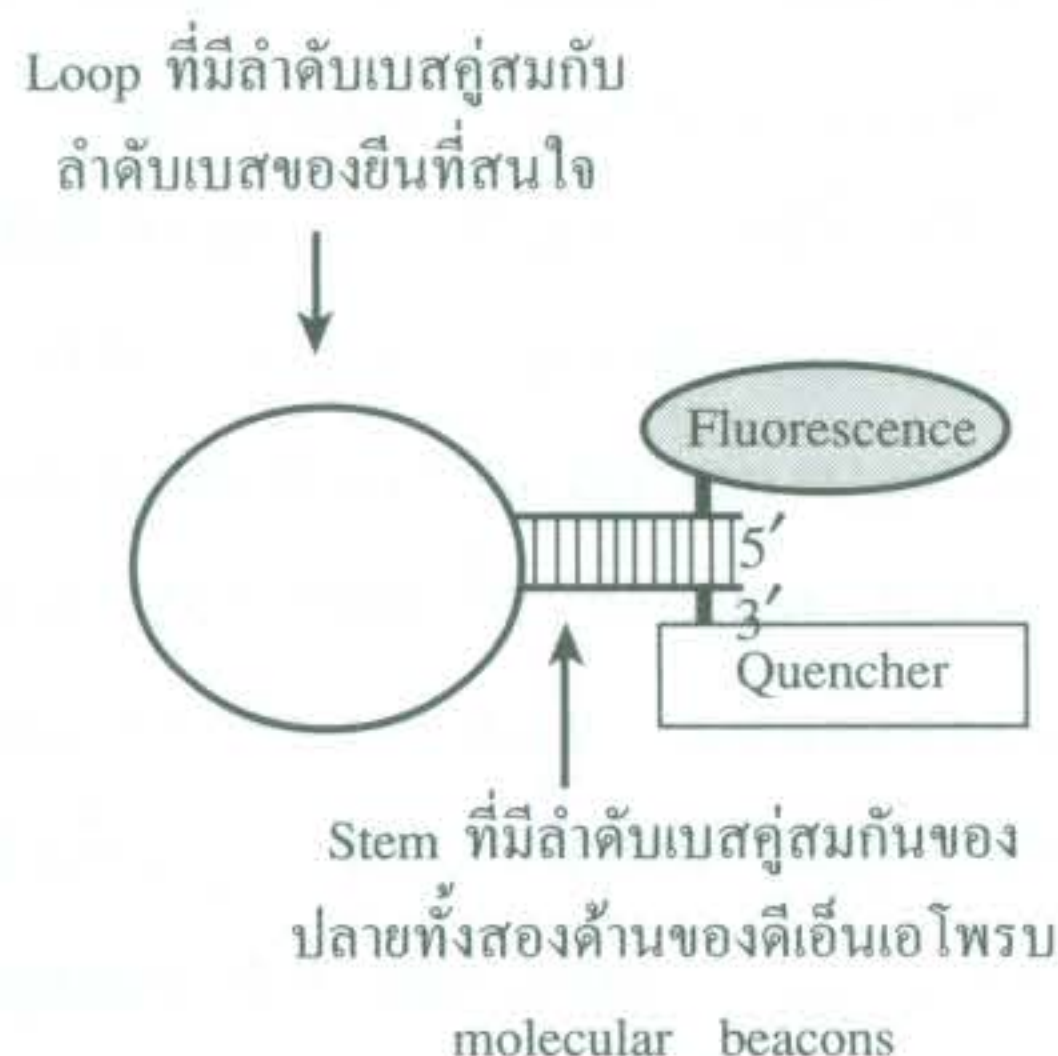
ที่สนใจ ซึ่งจะกล่าวในวิธีถัดไป



รูปที่ 1 หลักการของการใช้สารเรืองแสงในการวัดปริมาณดีเอ็นเอ (ที่มา: คัดแปลงจาก Bustin, 2000)

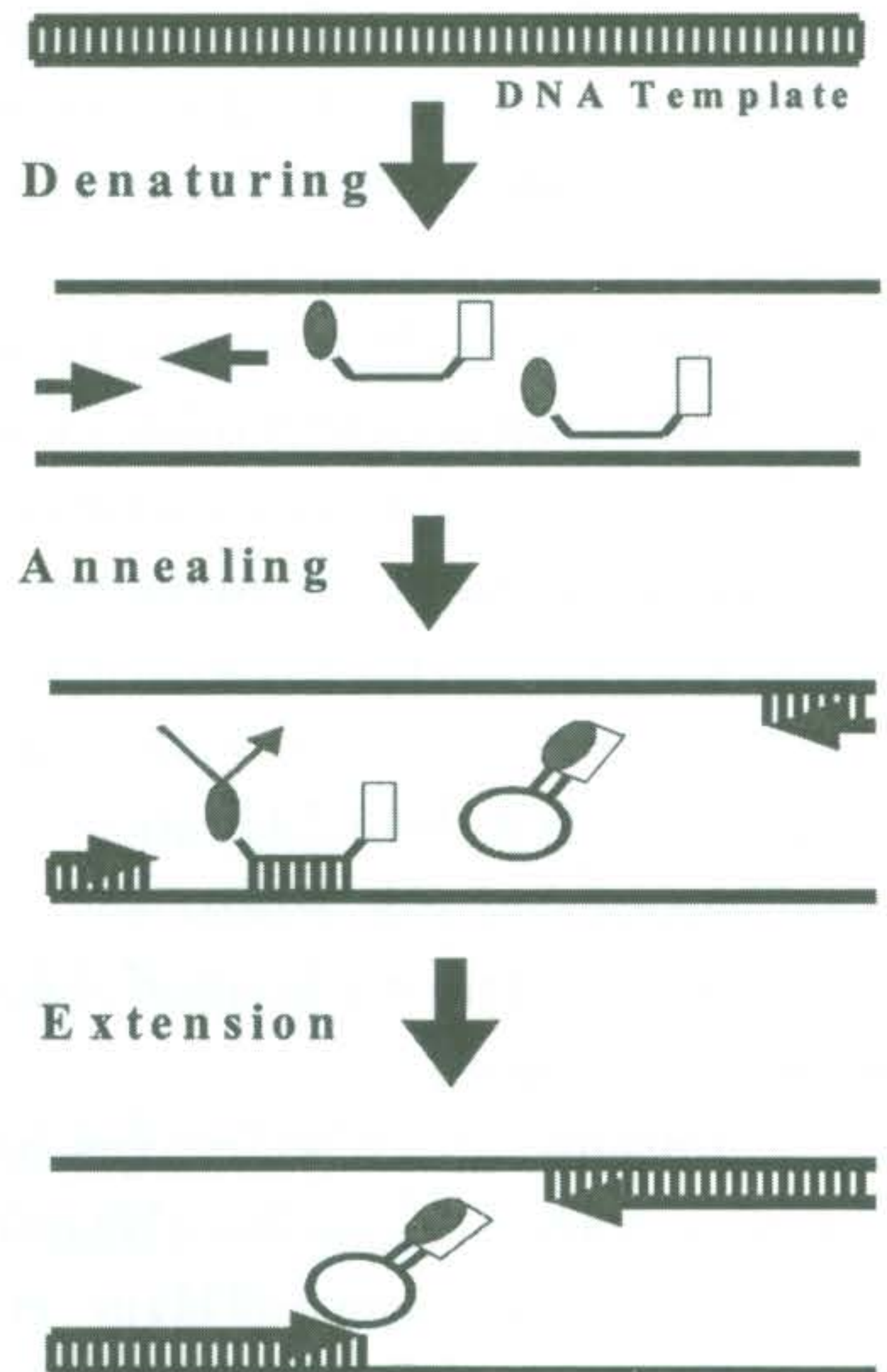
2) การใช้ดีเอ็นเอโพรบที่เรียกว่า molecular beacons (โดยบริษัท Stratagene)

Molecular beacons เป็นดีเอ็นเอโพรบที่มีลำดับเบสที่ปลาย 5' และ 3' เป็นลำดับเบสคู่สมกัน



รูปที่ 2 ลักษณะและหลักการทำงานของดีเอ็นเอโพรบ molecular beacons (ที่มา : คัดแปลงจาก Bustin, 2000)

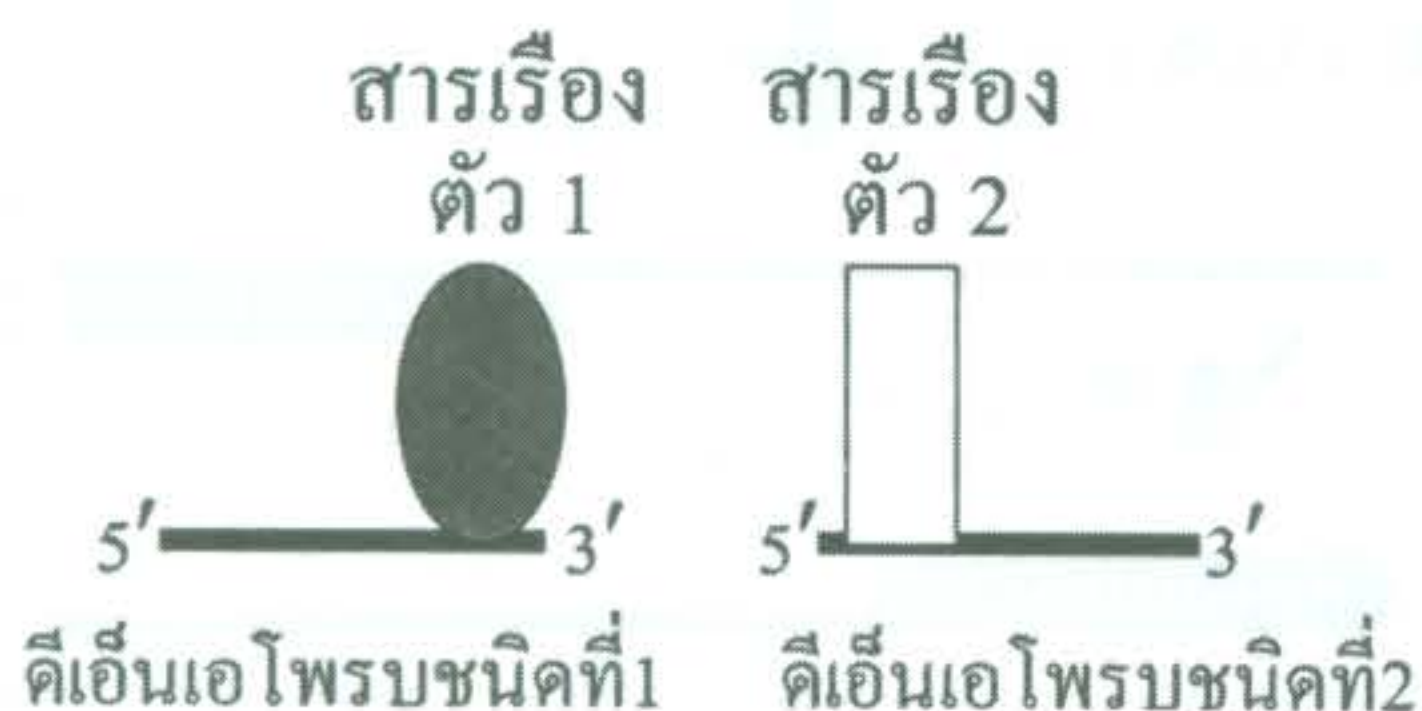
ส่วนตอนกลางมีลำดับเบสคู่สมกับลำดับเบสของอินที่สนใจ นอกจากนี้ยังมีตัวระงับ (quencher) ที่ไม่ใช่สารเรืองแสง และมีสารเรืองแสงเชื่อมที่คนละปลาย (5' และ 3') ของดีเอ็นเอโพรบ จากสมบัติดังกล่าวทำให้ molecular beacons มีลักษณะพิเศษคือเกิดเป็นโครงสร้าง stem-and-loop (รูปที่ 2) ที่เกิดจากการจับกันของเบสคู่สมที่ปลาย 5' และ 3' (Tyagi and Kramer, 1996) การเกิดโครงสร้าง stem-and-loop ทำให้ตัวระงับและสารเรืองแสงที่ปลายทั้งสองด้านของดีเอ็นเอโพรบเข้ามาอยู่ใกล้กันพอที่ตัวระงับสามารถรับแสงที่ปล่อยออกมา (emission light) จากสารเรืองแสงและเปลี่ยนเป็นพลังงานความร้อน ซึ่งโครงสร้าง stem-and-loop จะถูกแยกออกหากใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำลายพันธะไฮโดรเจนที่เกิดระหว่างปลาย 5' และ 3' ดังนั้นดีเอ็นเอโพรบ molecular beacons จึงมีหลักการทำงานดังนี้ ที่ denaturing step อุณหภูมิ 90-96 °ซ. สามารถทำให้โครงสร้าง stem-and-loop ของ molecular



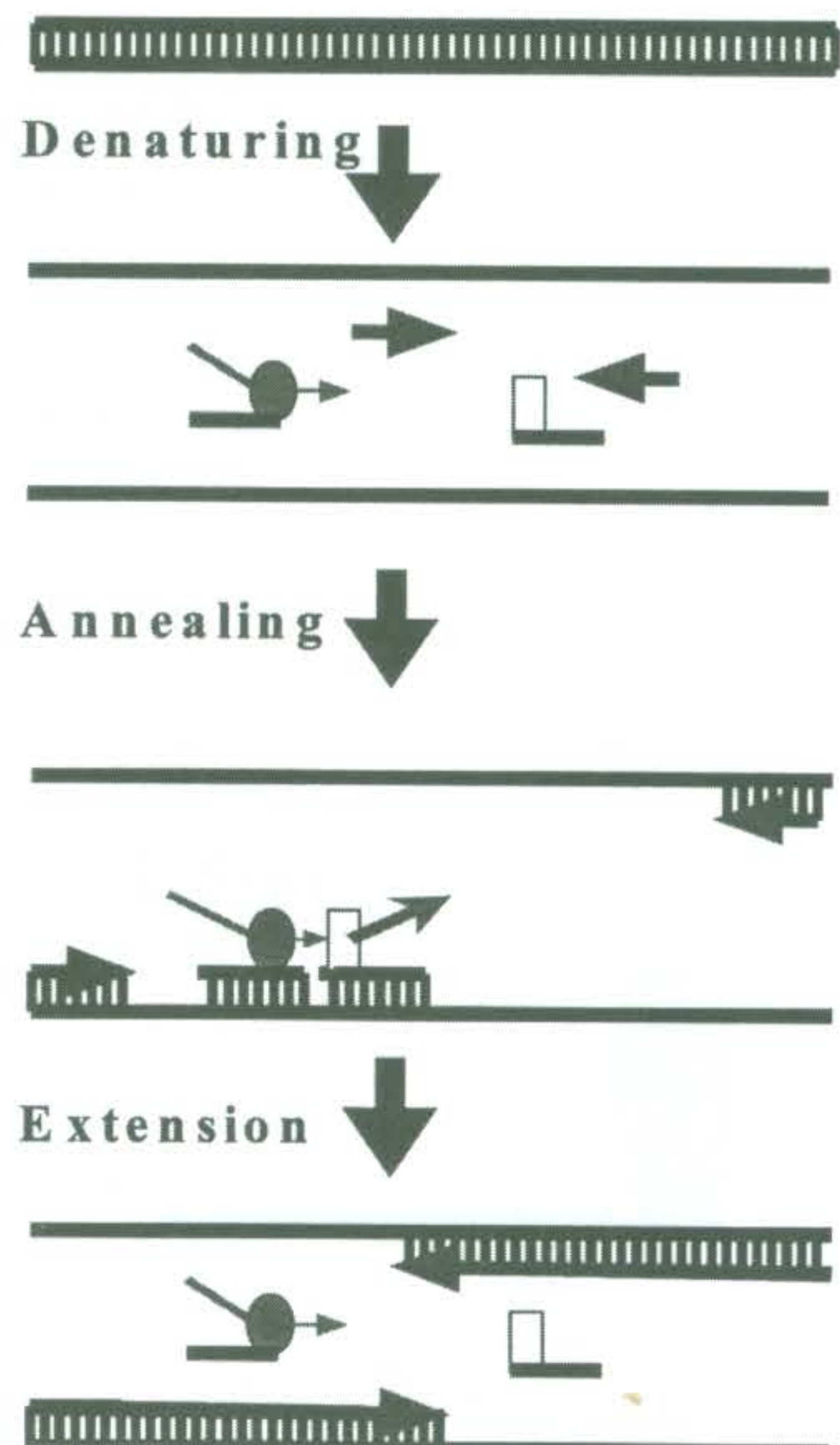
beacons แยกออกเป็นสายตรง (รูปที่ 2) เมื่ออุณหภูมิ ลดลงมาถึง annealing step ลำดับเบสคู่สมตอนกลางของ molecular beacons สามารถจับกับลำดับเบสคู่สม ของดีเอ็นเอต้นแบบได้ การจับกันดังกล่าวทำให้ตัว ระวังอยู่ห่างจากสารเรืองแสง จึงทำให้สามารถวัด แสงที่ปล่อยจากสารเรืองแสงได้ โดยค่าที่วัดได้จะ สะท้อนถึงปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่มีอยู่ หากลำดับ เบสตอนกลางของ molecular beacons ไม่พบลำดับ เบสคู่สมบนสายดีเอ็นเอต้นแบบ molecular beacons จะอยู่ในสภาพโครงสร้าง stem-and-loop ที่ไม่มีการ เรืองแสง และเมื่อเข้าสู่ extension step อุณหภูมิที่ 72°C. สูงพอที่จะแยกดีเอ็นเอโพรบ molecular beacons ออกจากการจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ ทำให้เกิดการ สังเคราะห์ดีเอ็นเออย่างต่อเนื่องจากปลาย 3' ของไพรเมอร์ ดังนั้นการใช้ดีเอ็นเอโพรบ molecular beacons จึงมี จุดเด่นที่มีความจำเพาะสูงในการวัดการแสดงออกของ ยีนที่สนใจ และสามารถนำดีเอ็นเอโพรบ molecular beacons กลับมาใช้ใหม่ได้ แต่มีจุดด้อยที่การออกแบบ โครงสร้าง stem-and-loop ที่เหมาะสมทำได้ยาก

3) การใช้ดีเอ็นเอโพรบ 2 ชนิด

วิธีนี้ใช้ดีเอ็นเอโพรบ 2 ชนิด (รูปที่ 3) โดย ดีเอ็นเอโพรบทั้ง 2 ชนิดมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับ ลำดับเบสของยีนที่สนใจที่บริเวณใกล้เคียงกัน ดีเอ็นเอโพรบ ชนิดที่หนึ่งมีสารเรืองแสงชนิดที่หนึ่งติดที่ปลาย 3' ของดีเอ็นเอโพรบ ส่วนดีเอ็นเอโพรบชนิดที่สองมีสาร เรืองแสงชนิดที่สองติดที่ปลาย 5' ของดีเอ็นเอโพรบ (Witter et al., 1997) ดังนั้นที่ annealing step (รูปที่ 3)



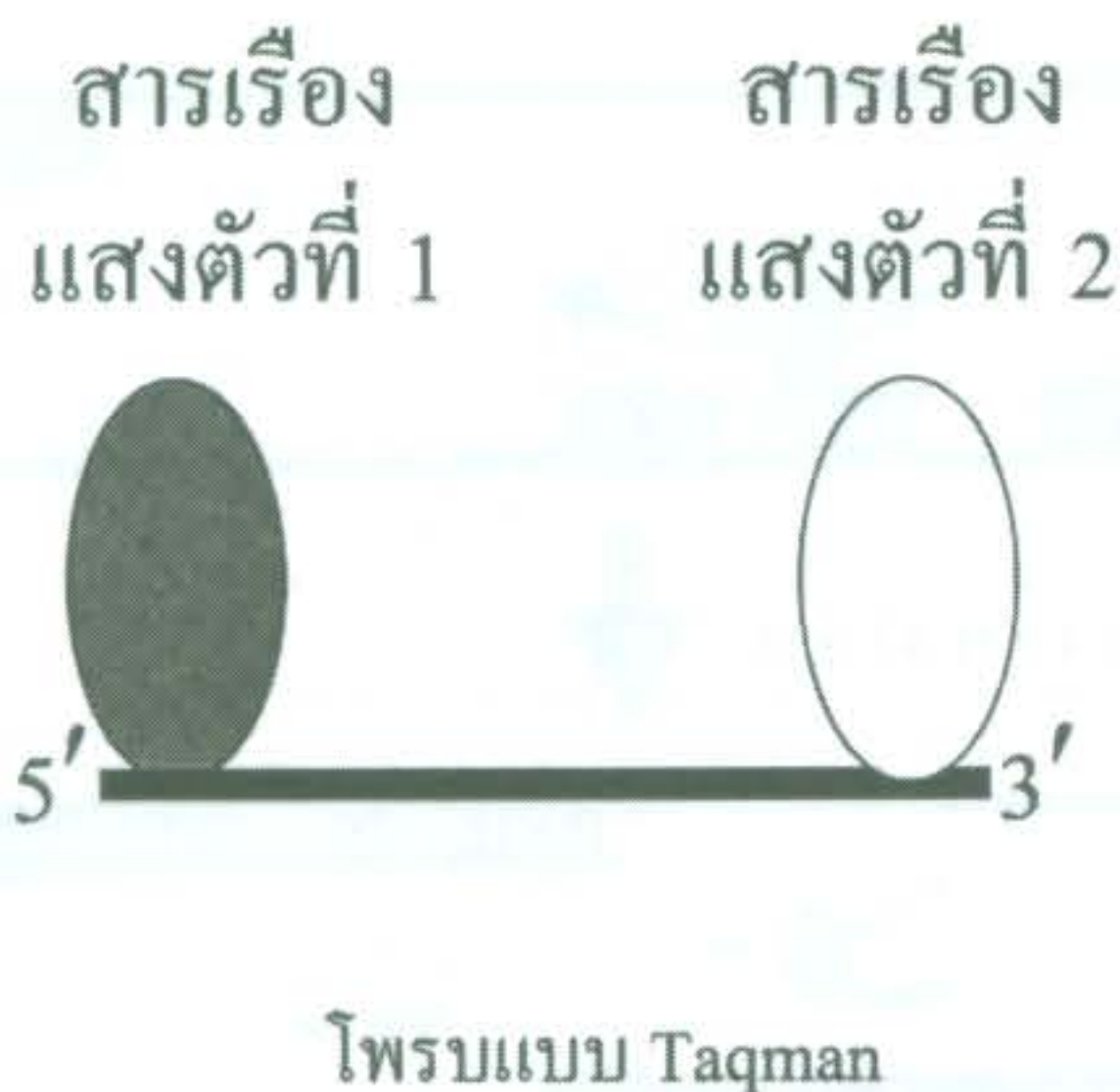
โพรบทั้งสองจะเข้าจับดีเอ็นเอต้นแบบที่ลำดับเบสคู่ สมที่ใกล้เคียงกัน ทำให้แสงที่ปล่อยจากสารเรืองแสงชนิด ที่หนึ่ง ถูกจับโดยสารเรืองแสงชนิดที่สองและกระตุ้น ให้เกิดการเรืองแสงของสารเรืองแสงตัวที่สอง ดังนั้น แสงที่วัดได้จากสารเรืองแสงตัวที่สองจะทำให้ทราบ ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองได้ ต่อมาใน ex- tension step ซึ่งมีอุณหภูมิสูงพอที่จะแยกการจับกัน ระหว่างดีเอ็นเอโพรบทั้งสองชนิดกับดีเอ็นเอต้นแบบ ทำให้สารเรืองแสงทั้งสองชนิดอยู่ห่างกันและมีการ เรืองแสงเฉพาะสารเรืองแสงตัวที่หนึ่งเท่านั้น จุดเด่น ของดีเอ็นเอโพรบชนิดนี้คือมีความจำเพาะสูงต่อดีเอ็น เอต้นแบบ เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอที่วัดได้ขึ้นกับการ จับกันระหว่างดีเอ็นเอต้นแบบและดีเอ็นเอโพรบถึง 2 ชนิด แต่จุดด้อยของการเลือกใช้ดีเอ็นเอโพรบชนิดนี้ ก็คือต้องซื้อดีเอ็นเอโพรบทั้ง 2 ชนิดทำให้เสียค่าใช้จ่าย เป็นสองเท่า



รูปที่ 3 ลักษณะและหลักการทำงานของดีเอ็นเอโพรบ 2 ชนิด (ที่มา : ดัดแปลงจาก Bustin, 2000)

4) ดีเอ็นเอโพรบแบบ Taqman (โดยบริษัท Perkin Elmer Applied Biosystems)

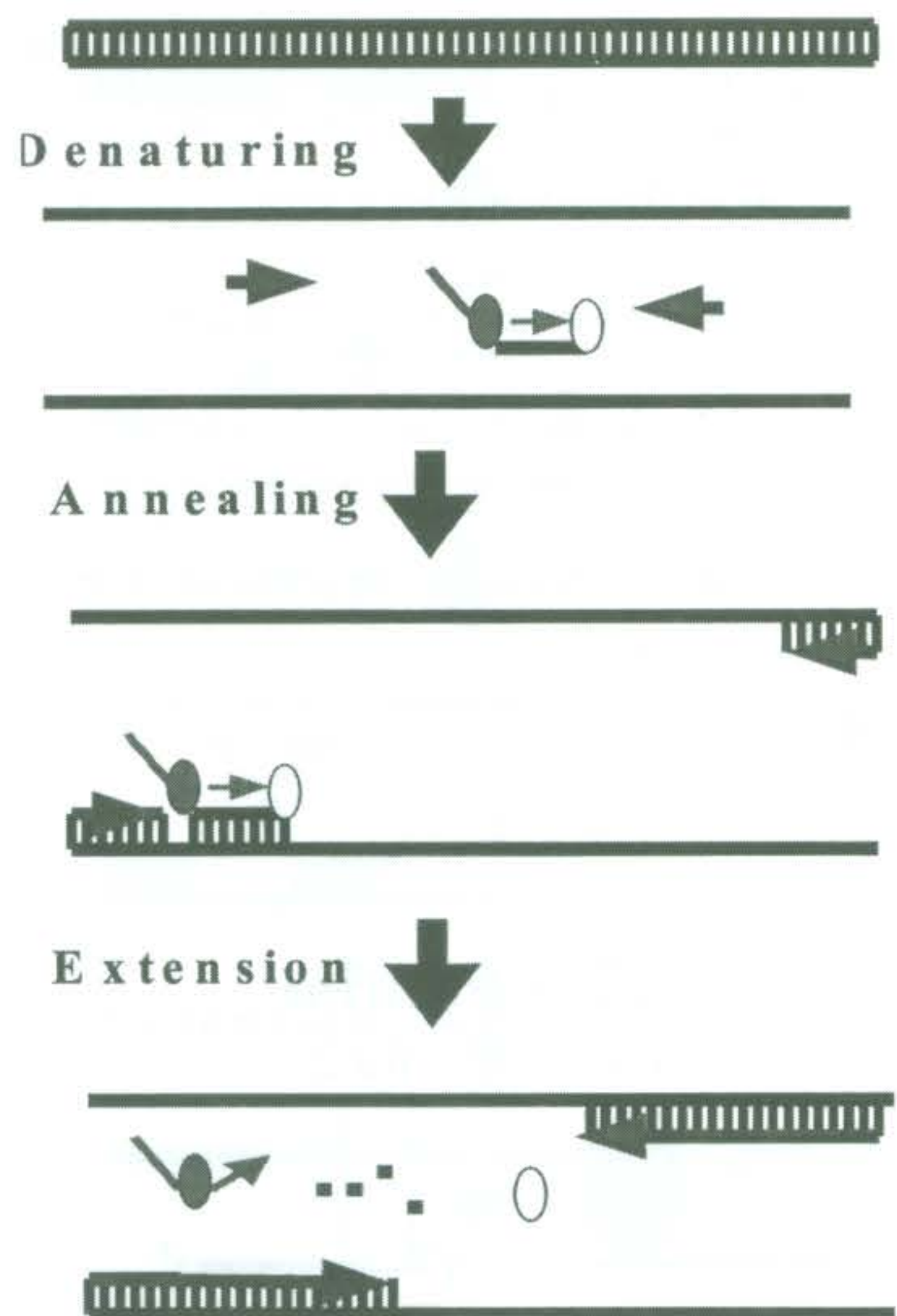
ดีเอ็นเอโพรบแบบ Taqman เป็นดีเอ็นเอโพรบ ที่มีลำดับเบสเป็นเบสคู่สมกับลำดับเบสของยีนที่สนใจ โดยปลายด้าน 5' เชื่อมกับสารเรืองแสงตัวที่หนึ่ง ซึ่งแสงที่ปล่อยออกมาจะถูกรับโดยสารเรืองแสงตัวที่สองที่เชื่อมที่ปลาย 3' ของดีเอ็นเอโพรบ (รูปที่ 4) นอกจากนี้การใช้ดีเอ็นเอโพรบแบบ Taqman ยังอาศัยสมบัติของ Taq หรือ Tth DNA polymerase (Gut et al., 1999) ที่นอกจากจะสามารถเติมนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' ของดีเอ็นเอได้ ยังมีสมบัติในการย่อยดีเอ็นเอจากด้าน 5' ไป 3' ได้ ($5' \rightarrow 3'$ nuclease activity) ดังนั้นที่ annealing step (รูปที่ 4) ดีเอ็นเอโพรบแบบ Taqman จะจับกับเบสคู่สมบนดีเอ็นเอต้นแบบ เนื่องจากสารเรืองแสงทั้งสองตัวอยู่ใกล้กัน ดังนั้นแสงที่ปล่อยจากสารเรืองแสงตัวที่หนึ่งจะถูกรับโดยสารเรืองแสงตัวที่สอง แต่ใน extension step เมื่อ Taq หรือ Tth DNA polymerase ทำหน้าที่เติมนิวคลีโอไทด์มาถึงตำแหน่งของดีเอ็นเอโพรบ Taq หรือ Tth DNA polymerase จะตัดดีเอ็นเอโพรบจากปลายด้าน 5' ทำให้สารเรืองแสงทั้งสองตัวแยกจากดีเอ็นเอโพรบ จึงสามารถวัดแสงที่ปล่อยออกจากสารเรือง



แสงตัวที่หนึ่งได้ ทำให้ทราบปริมาณของดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลอง จุดเด่นของการใช้ดีเอ็นเอโพรบแบบ Taqman คือความจำเพาะต่อการวัดการแสดงออกของยีนที่สนใจ แต่มีข้อจำกัดที่ต้องระวังคือ ดีเอ็นเอโพรบจะต้องออกแบบให้สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบอย่างสมบูรณ์ใน extension step เนื่องจาก Taq หรือ Tth DNA polymerase จะสามารถตัดดีเอ็นเอโพรบได้เฉพาะเมื่อดีเอ็นเอโพรบยังจับกับดีเอ็นเอต้นแบบเท่านั้น

การวัดการแสดงออกของยีนเชิงเปรียบเทียบและเชิงสุทธิ

ค่าแสงที่วัดได้จากเครื่อง real-time RT-PCR จะนำไปใช้ในการคำนวณปริมาณของดีเอ็นเอที่เพิ่ม



รูปที่ 4 ลักษณะและหลักการทำงานของดีเอ็นเอโพรบแบบ Taqman (ที่มา : ดัดแปลงจาก Bustin, 2000)

จำนวนได้จากการใช้ cDNA ต้นแบบ ซึ่งสะท้อนถึง การแสดงออกของยีนในตัวอย่างนั้นๆ การวัดปริมาณ ดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนนี้มี 2 แบบคือ การวัดปริมาณ เชิงเปรียบเทียบ (relative quantification) และการวัด ปริมาณเชิงสุทธิ (absolute quantification) สำหรับการ วัดปริมาณดีเอ็นเอเชิงเปรียบเทียบทำได้โดยการ คำนวณจากค่า threshold cycle (C_t) ของตัวอย่างแต่ละคู่ จากสมการคือ ค่าความแตกต่างของปริมาณดีเอ็นเอ (fold difference) = $2^{-\Delta(\Delta C_t)}$ โดยค่า C_t คือค่ารอบ PCR ซึ่งให้ค่าแสงที่วัดได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากค่าแสงพื้นหลังที่กำหนด ค่านี้อยู่ในช่วงที่ดีเอ็นเอ มีการเพิ่มจำนวนแบบ exponential (Gibson et al., 1996) ค่า ΔC_t = ค่า C_t ของยีนตัวอย่าง - ค่า C_t ของ house-keeping gene และค่า $\Delta(\Delta C_t)$ = ค่า ΔC_t ของ ตัวอย่างที่หนึ่ง - ค่า ΔC_t ของตัวอย่างควบคุม สำหรับการวัดปริมาณดีเอ็นเอเชิงสุทธิทำได้โดยการสร้าง กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่ ทราบค่าและค่าแสงที่วัดได้ ดังนั้นปริมาณดีเอ็นเอ จึงทราบจากการเปรียบเทียบค่าแสงที่วัดได้กับกราฟ มาตรฐาน การศึกษาการแสดงออกของยีนโดยการวัด ปริมาณดีเอ็นเอเชิงเปรียบเทียบหรือเชิงสุทธินี้จำเป็นต้อง มีการปรับค่าที่วัดได้ (normalization) ของตัว อย่างนั้นๆ กับค่าที่วัดได้จากการแสดงออกของ house-keeping gene ของตัวอย่างนั้นๆเสมอ ตัวอย่างของ house-keeping gene ได้แก่ เบต้าแอกติน (β - actin) ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA) เป็นต้น โดยมีสมมติฐานว่าในเซลล์หรือเนื้อเยื่อต่างชนิดกัน การแสดงออกของ house-keeping gene มีค่าคงที่ และการแสดงออกของยีนดังกล่าวจะไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อได้รับการกระตุ้นจากปัจจัยที่ศึกษา ดังนั้นการปรับ ค่าที่วัดได้ด้วยค่าการแสดงออกของ house-keeping gene จึงเป็นการปรับค่าคลาดเคลื่อนอันเนื่องมาจากความ แตกต่างของปริมาณอาร์เอ็นเอและประสิทธิภาพของ ปฏิกริยาถอดรหัสพันกลับของแต่ละตัวอย่าง ทำให้ การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนระหว่างตัวอย่าง มีค่าที่ถูกต้องขึ้น

สรุป

เทคนิค real time RT-PCR มีประสิทธิภาพ และความไวสูงในการใช้ตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอเพื่อ ศึกษาการแสดงออกของยีน การเข้าใจพื้นฐานของ เทคนิคดังกล่าวจึงมีความสำคัญที่ทำให้ผู้ใช้ได้ผล การทดลองที่ถูกต้องแม่นยำ ในเอกสารนี้เป็นเพียง หลักการบางส่วนของเทคนิคนี้ หวังว่าจะมีประโยชน์ ต่อผู้อ่านไม่มากนักน้อย หากผู้อ่านสนใจในรายละเอียด เชิงลึกสามารถศึกษาได้จากเอกสารอ้างอิงด้านล่าง หรือเอกสารอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

คุณานุภาพการ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. สุพร นุชดำรงค์ที่ให้ ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์

บรรณานุกรม

- Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*. 25:169-193.
- Gibson, U.E., Heid, C.A. and Williams, P.M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*. 6:995-1001.
- Gut, M., Leutenegger, C.M., Huder, J.B., Pederden, N.C. and Lutz, H. (1999). One-tube fluorescent reverse transcription-polymerase chain reaction for quantitation of feline coronaviruses. *Journal of Virological Method*. 77:37-46.
- Morrison, T.B., Weis, J.J. and Wittwer, C.T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR green I monitoring during amplification. *Biotechniques*. 24:954-962.

Tyagi, S. and Kramer, F.R. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*. 14:303-308.

Witter, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A. and Rasmussen, R.P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*. 22:130-138.



การออกแบบและพัฒนาส่วนควบคุมเครื่องสร้างภาพกำทอนแม่เหล็ก ผ่านทางพอร์ตขนานของคอมพิวเตอร์

วิวัฒน์ ยังดี¹

บทคัดย่อ

เครื่องสร้างภาพกำทอนแม่เหล็กเป็นเครื่องมือที่ซับซ้อน ประกอบด้วยแม่เหล็กหลัก ขนาดใหญ่ ขดลวดเกรเดียนท์แม่เหล็ก 3 ชุด ขดลวดคลื่นวิทยุที่ใช้กระตุ้นและรับสัญญาณจากนิวเคลียสของสารตัวอย่างหรือผู้ป่วย และส่วนที่สำคัญก็คือส่วนควบคุมเพื่อให้ส่วนต่างๆทำงานพร้อมกันตามจังหวะเวลาของลำดับพัลส์ (pulse) ของคลื่นวิทยุและสนามเกรเดียนท์แม่เหล็กเพื่อสร้างภาพส่วนต่างๆ ภายในของสารตัวอย่าง ส่วนควบคุมต้นแบบที่ออกแบบขึ้นในงานวิจัยนี้ทำหน้าที่ปิด-เปิดการส่งสัญญาณคลื่นวิทยุรูป sinc ตามขนาดและเวลาที่กำหนด ปิด-เปิดเกรเดียนท์ 3 ชุดตามขนาดและเวลาที่กำหนดแยกกันอย่างอิสระ โดยการควบคุมผ่านทางพอร์ตขนานของเครื่องคอมพิวเตอร์ และเขียนโปรแกรมคอมพิวเตอร์ส่งข้อมูลผ่านทางพอร์ตขนานไปยังเครื่องควบคุมนี้ จากผลการทดลองในขั้นต้นพบว่า เครื่องควบคุมสามารถผลิตพัลส์สัญญาณรูป sinc ได้ตามขนาดที่กำหนด (0 - 5 โวลต์) และสามารถส่งสัญญาณปิด-เปิดเกรเดียนท์ได้ตามเวลาที่ต้องการที่มีความละเอียดขนาด 1 มิลลิวินาที และควบคุมขนาดได้ 256 ระดับ ระหว่าง -5 โวลต์ถึง 5 โวลต์

Abstract

Magnetic resonance imager is a complex imaging equipment. It consists of a big main magnet, 3 magnetic gradients, a radiofrequency (RF) coil for transmitting and receiving a signal from a sample or a patient and a control unit. The control unit is to control every part working with pulse sequences. The prototype controller in this work is used to turn on-off a sinc-shaped RF signal with duration and amplitude set by the program. It is also used to turn on-off and adjust duration as well as amplitude of the 3 gradients separately. The control can be made using a computer program to send data to the controller via parallel port of the computer. From the preliminary experiment, the control is found to be able to produce a sinc signal with amplitude from 0 to 5 volts. It can also send a signal to control the gradients with a duration step of 1 ms and amplitude of 256 levels from -5 to +5 volts.

¹ ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

บทนำ

เครื่องสร้างภาพกำทอนแม่เหล็ก (magnetic resonance imaging, MRI) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการสร้างภาพส่วนประกอบภายในของร่างกาย โดยไม่ต้องการผ่าตัดไม่เป็นอันตรายกับผู้ป่วยเพราะไม่ใช้รังสีใช้เพียงคลื่นวิทยุเท่านั้น เครื่อง MRI ใช้กันมากตามโรงพยาบาลขนาดใหญ่ในปัจจุบัน เครื่องมือนี้เป็นเครื่องมือที่ซับซ้อนและมีราคาแพงมาก (10 - 100 ล้านบาท) เมื่อเกิดความเสียหายจะต้องรอผู้เชี่ยวชาญจากต่างประเทศมาซ่อมบำรุงซึ่งจะต้องเสียเวลาและค่าใช้จ่ายที่สูงมาก จึงทำให้เกิดแนวคิดที่จะพัฒนาเครื่อง MRI ขึ้นเองเพื่อใช้งานด้านการวิจัยและการศึกษาโดยไม่ต้องพึ่งพาเทคโนโลยีจากต่างประเทศ และจะทำให้ลดต้นทุนจากการซื้อเครื่อง ลดค่าใช้จ่ายจากการซ่อมบำรุงอีกด้วย

เครื่อง MRI มีส่วนประกอบหลายส่วน ส่วนที่สำคัญคือ แม่เหล็กหลักขนาดใหญ่ ขดลวดเกรเดียนท์แม่เหล็ก 3 ชุด (X, Y, Z) ขดลวดคลื่นวิทยุ (radio frequency coil) แหล่งจ่ายไฟสำหรับแม่เหล็กหลัก (กรณีที่เป็นแม่เหล็กไฟฟ้า) แหล่งจ่ายไฟสำหรับขดลวดเกรเดียนท์ และส่วนควบคุมเครื่อง (วิจิตร เสงี่ยมพันธุ์ และคณะ, 2536) ในงานวิจัยนี้ได้ทำการออกแบบส่วนควบคุมเครื่อง MRI วงจรที่ใช้กันทั่วไปเป็นวงจรอิเล็กทรอนิกส์ที่ซับซ้อนซึ่งจะถูกควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์ผ่านทางบอร์ดอินเตอร์เฟซจำนวนหนึ่ง ในงานนี้ได้ออกแบบและสร้างวงจรอิเล็กทรอนิกส์เพื่อควบคุมเครื่อง MRI ให้สามารถทำงานตามลำดับพัลส์ที่กำหนดเพื่อการสร้างภาพและควบคุมการทำงานทั้งหมดผ่านทางพอร์ตขนานของเครื่องคอมพิวเตอร์

ทฤษฎีพื้นฐานของ MRI

MRI เป็นเทคนิคใหม่ในการสร้างภาพที่ถูกพัฒนามาอย่างรวดเร็วในช่วง 30 ปีที่ผ่านมา (Young, 2000) เทคนิคนี้มีพื้นฐานมาจากการสั่นพ้องแม่เหล็กนิวเคลียส (nuclear magnetic resonance, NMR)

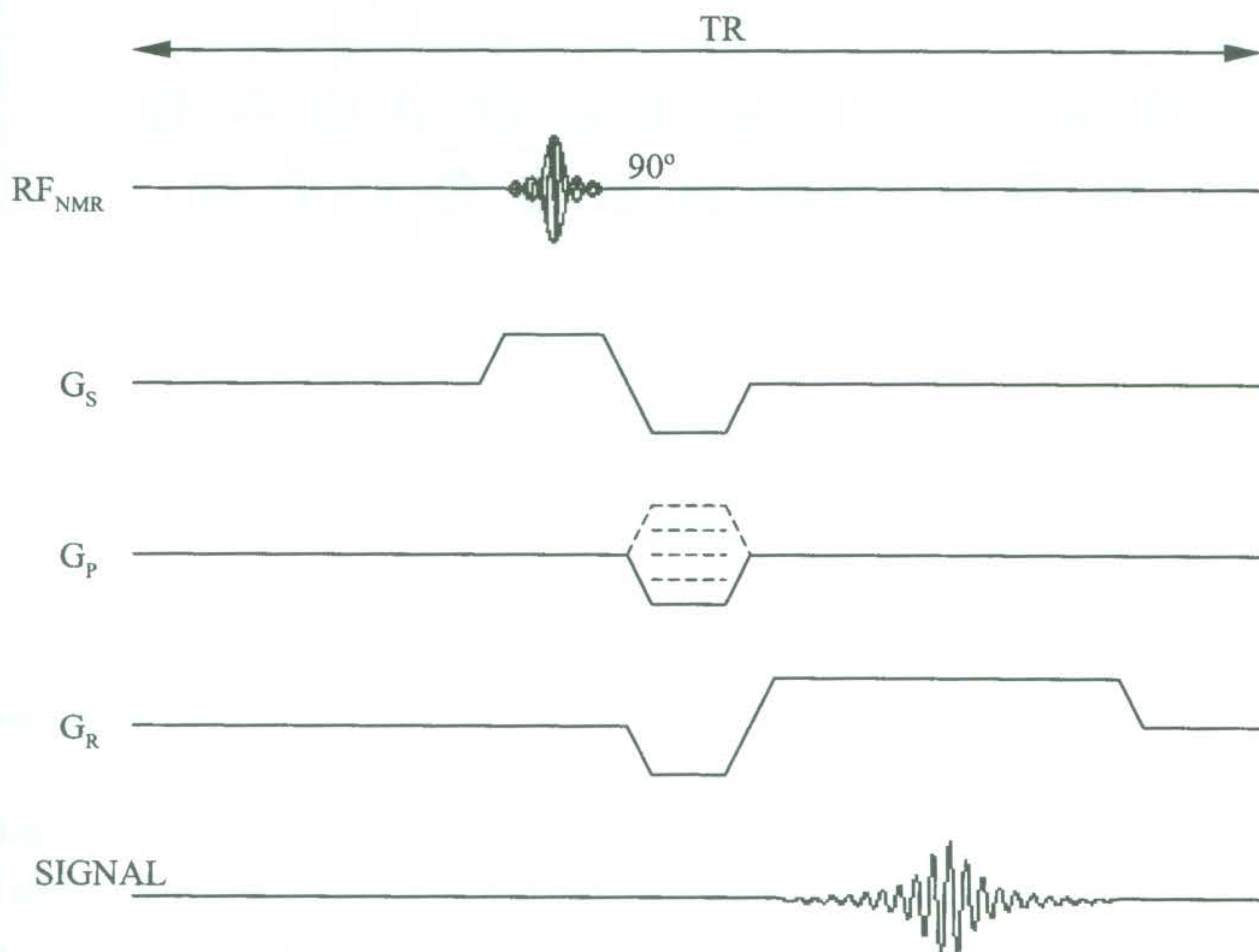
(Dept. of Bio-Medical Physics, Aberdeen, 2000) โดยการนำเอาคุณสมบัติพื้นฐานคือสปิน (spin) ของนิวเคลียสมาใช้ประโยชน์ นิวเคลียสที่มีสปินไม่เป็นศูนย์จะมีพฤติกรรมเป็นแม่เหล็กอ่อนๆ เมื่อวางอยู่ในสนามแม่เหล็กภายนอกนิวเคลียสจะหมุนสายรอบสนามแม่เหล็กด้วยความถี่ค่าหนึ่งซึ่งขึ้นกับชนิดของนิวเคลียสและขนาดของสนามแม่เหล็ก นิวเคลียสที่นิยมใช้ในการสร้างภาพคือนิวเคลียสของธาตุไฮโดรเจนหรือนิยมเรียกว่า โปรตอน เนื่องจากให้สัญญาณสูงที่สุดและยังมีปริมาณมากในสิ่งมีชีวิต สปินของโปรตอนเมื่ออยู่อย่างอิสระจะมีทิศทางไม่แน่นอน แต่เมื่อนำโปรตอนไปวางไว้ในสนามแม่เหล็กสปินจะมีทิศทางชี้ไปในแนวเดียวกันกับทิศของสนามแม่เหล็ก และมีความถี่ในการหมุนสายที่เท่ากันขึ้นอยู่กับขนาดของสนามแม่เหล็กที่ใช้ ความถี่ในการหมุนจะอยู่ในช่วงคลื่นวิทยุ (วิจิตร เสงี่ยมพันธุ์ และคณะ, 2536)

โดยการกระตุ้นสปินด้วยสนามแม่เหล็กในทิศตั้งฉากกับสนามแม่เหล็กหลักด้วยความถี่วิทยุ (radio frequency, RF) ที่เท่ากับอัตราการหมุนสายของสปิน จะทำให้สปินเบนออกไปจากแนวเดิม และเมื่อหยุดกระตุ้นสปินจะพยายามเบนเข้าสู่สมดุลเดิม เราสามารถตรวจวัดสัญญาณของสปินในขณะนี้ได้ โดยสัญญาณที่ได้จะมีความถี่เดียวกันกับความถี่ที่ใช้ในการกระตุ้น การตรวจวัดสัญญาณทำได้โดยใช้ขดลวดคลื่นวิทยุมารับสัญญาณและนำสัญญาณที่ได้ไปขยายเพื่อคำนวณปริมาณต่างๆที่เกี่ยวข้องได้ เช่น ปริมาณของสปิน

การสร้างภาพด้วยเทคนิค NMR หรือที่เรียกว่า magnetic resonance imaging (MRI) นั้นจะต้องมีส่วนประกอบเพิ่มเติมคือเกรเดียนท์แม่เหล็ก 3 ชุด ซึ่งให้สนามแม่เหล็กในแนวเดียวกับสนามแม่เหล็กหลักแต่มีค่าเปลี่ยนแปลงกับตำแหน่งในแนวแกน x, y และ z เรียกว่าเกรเดียนท์ G_x , G_y และ G_z เพื่อบอกตำแหน่งของ สปินในแต่ละแนวแกน และจะต้องมีแหล่งจ่ายกระแสไฟฟ้าสำหรับขดลวดเกรเดียนท์ทั้ง 3 ชุด ซึ่งจะต้องจ่ายกระแสเป็นบวก (+) หรือลบ (-)

ได้ตามลักษณะของลำดับพัลส์ควบคุม สัญญาณที่ใช้ในการควบคุมจะมีความต่างศักย์อยู่ระหว่าง -5 โวลต์ ถึง 5 โวลต์ โดยลำดับพัลส์ที่ใช้ในการควบคุม แสดงไว้ดังในรูปที่ 1 (Edelstein et al., 1980) ซึ่งเป็นลำดับพัลส์พื้นฐานสำหรับการสร้างภาพใน MRI

เกรเดียนท์ G_S , G_P และ G_R คือ slice selection gradient, phase encoding gradient และ readout gradient ตามลำดับ เกรเดียนท์นี้สามารถเลือกให้อยู่ในทิศทางตามที่ต้องการ เช่น ถ้าต้องการเลือกถ่ายภาพตัดขวางตั้งฉากกับแกน z ใช้ G_z เป็น G_S และ G_x (G_y) เป็น G_P (G_R) หรือ G_R (G_P) ได้



รูปที่ 1 ลำดับพัลส์ของสัญญาณควบคุมเครื่อง MRI ที่ใช้ในการสร้างภาพ

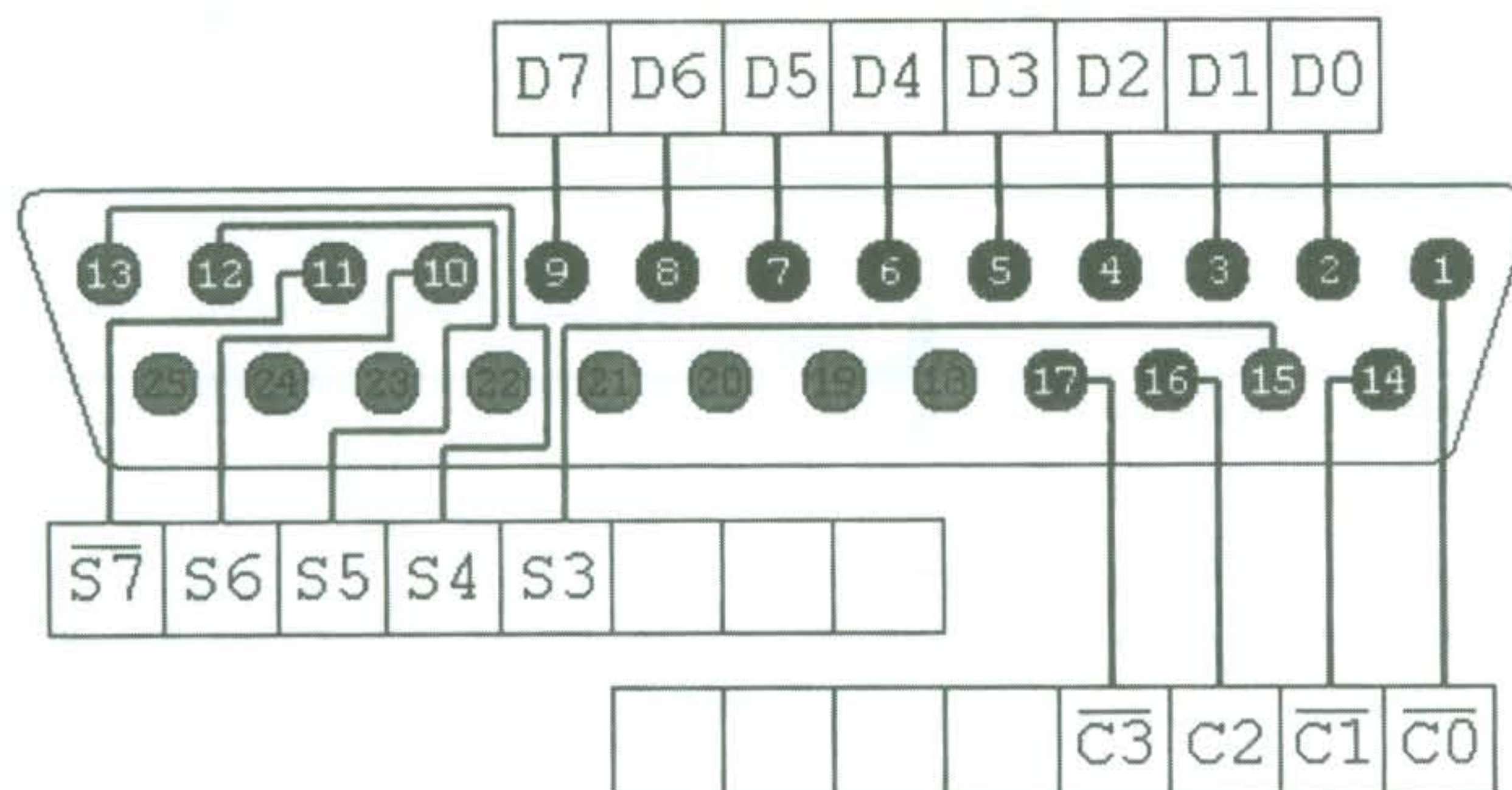
ในช่วงเริ่มต้นของลำดับพัลส์จะต้องให้พัลส์ความถี่วิทยุรูป sinc พร้อมทั้งเปิดเกรเดียนท์ G_S เต็มขนาด 5 โวลต์ ช่วงที่สองให้เกรเดียนท์ G_S และ G_R ขนาด -5 โวลต์ พร้อมกับให้ G_P ในรอบแรกเป็น -5 โวลต์ ค่า G_P ที่ให้เข้าไปจะเปลี่ยนตามจำนวนรอบของการเก็บข้อมูล เช่นถ้าต้องการเก็บข้อมูลขนาดภาพ 64×64 จะต้องแบ่งความแตกต่างของโวลต์ออกจาก -5 ถึง 5 โวลต์ออกเป็น 64 ระดับ ดังนั้น ในการวนรอบที่ 2 ของการเก็บข้อมูลจะต้องให้ G_P ขนาด

$-5 + (10/64) = -4.84$ โวลต์ การวนรอบที่ i จะมีค่าของ G_P เท่ากับ $-5 + (10i/64)$ ซึ่งวงจรอิเล็กทรอนิกส์ที่ออกแบบจะต้องมีความสามารถในส่วนนี้ด้วย ในส่วนที่สามของลำดับพัลส์จะต้องให้ G_R มีค่าเป็นค่าบวกและเริ่มเก็บข้อมูล (ในงานวิจัยนี้ยังดำเนินการไม่ถึงขั้นตอนของการเก็บข้อมูล แต่ได้ออกแบบวงจรการควบคุมสำรองไว้ด้วย) แล้ววนซ้ำจนครบจำนวนขนาดของภาพตามที่ต้องการ (โดยปกติจะเป็น 64×64 หรือ 128×128 จุดภาพ)

พอร์ตขนาน

พอร์ตขนานของเครื่องคอมพิวเตอร์ เป็นพอร์ตที่ติดมากับคอมพิวเตอร์ทุกเครื่อง (ยกเว้นเครื่องรุ่นใหม่ที่ยกเลิกเปลี่ยนมาใช้พอร์ต USB แทน) ใช้งาน

หลักในการต่อกับเครื่องพิมพ์ พอร์ตขนานมีขาสำหรับการเชื่อมต่ออยู่ 25 ขาดังแสดงในรูปที่ 2 สามารถส่งข้อมูลออกและรับข้อมูลเข้ามาได้ (Harries, 2002)



รูปที่ 2 รูปแบบของพอร์ตขนาน

พอร์ตขนานสามารถส่งข้อมูลได้ครั้งละ 8 บิต (ขา D) หรือ 256 ระดับ และสามารถรับข้อมูลเข้าได้ 5 บิต (ขา S) ซึ่งเป็นข้อจำกัดของพอร์ตขนาน แต่มีส่วนที่สะดวกคือมีพอร์ตควบคุมที่รับส่งข้อมูลได้ 2 ทางอีก 4 บิต (ขา C) ควบคุมอุปกรณ์ได้ $2^4 = 16$ อุปกรณ์ ดังนั้นเราจะใช้ประโยชน์จากส่วนนี้ในการควบคุมการส่งข้อมูลให้เพียงพอต่อการใช้งาน

วิธีการดำเนินการ

การติดต่อกับพอร์ตขนาน

การเขียนโปรแกรมเพื่อส่งข้อมูลทางพอร์ตขนาน บนระบบปฏิบัติการ Windows ซึ่งทำงานแบบ multitasking จะมีปัญหามากเนื่องจากไม่สามารถติดต่อกับพอร์ตขนานได้ เพราะ Windows ไม่อนุญาตให้ผู้ใช้ยุ่งเกี่ยวกับฮาร์ดแวร์โดยตรง แต่สามารถทำได้โดยการติดต่อผ่านทางไดรเวอร์ ในโครงงานนี้ใช้ไดรเวอร์ที่เป็น freeware ชื่อ DLPPortIO

[Pappas, 1999) ทำให้สามารถติดต่อกับพอร์ตขนานได้โดยใช้โปรแกรมภาษา Delphi

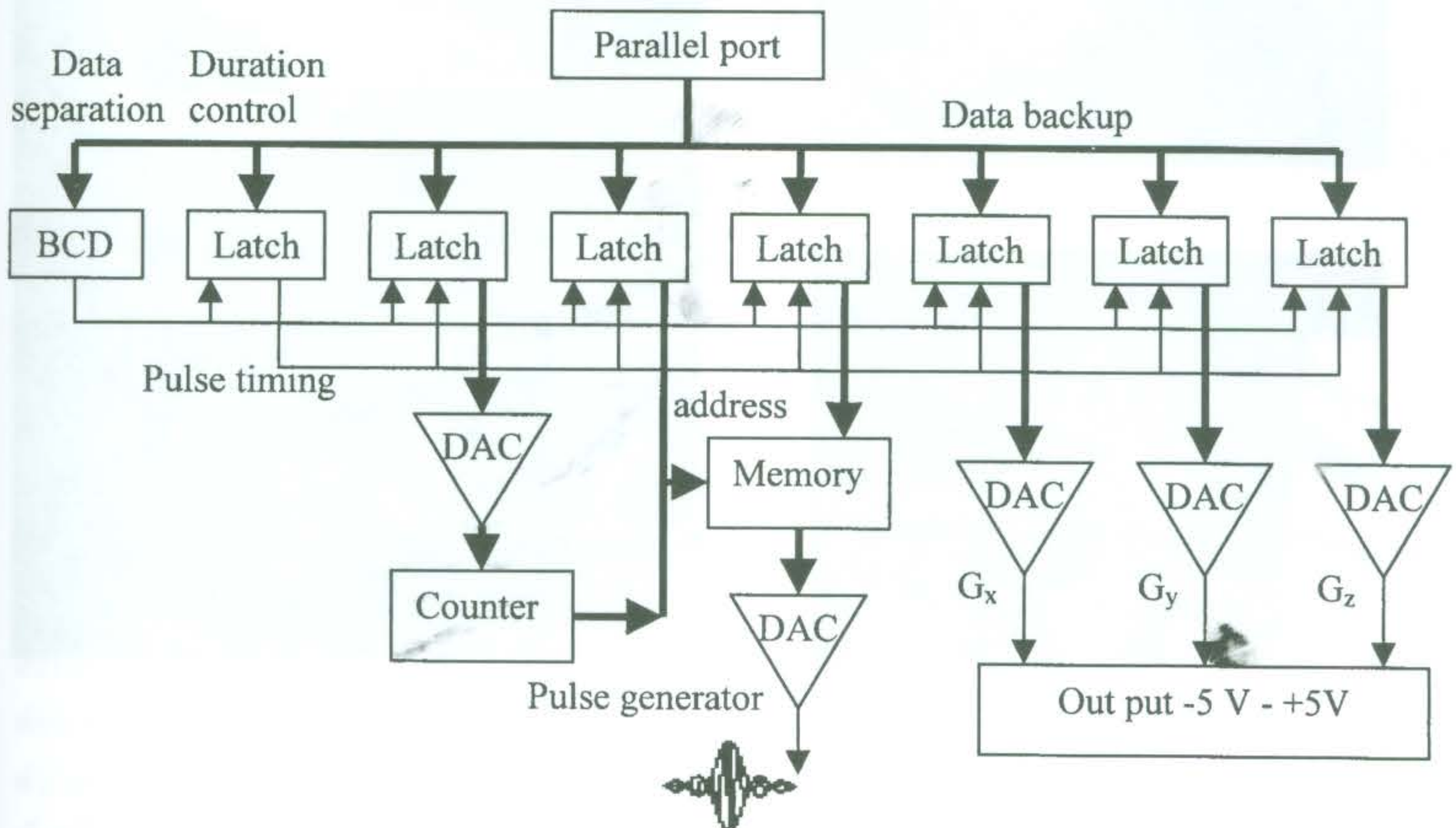
พอร์ตขนานมี address ในการส่งข้อมูลออกคือ H378 มี address ในการรับข้อมูลเข้าคือ H379 และมี address ที่ใช้สำหรับการควบคุมคือ H37A เราสามารถส่งข้อมูลออกได้ตามคำสั่งดังนี้ `Port[$378]:=Data;` และสามารถส่งข้อมูลไปเลือกเก็บไว้ที่ latch ตัวใดตัวหนึ่งในวงจรที่สร้างขึ้นได้โดยเลือกจากการใช้พอร์ตควบคุมผ่าน BCD (binary to decimal converter) ในวงจรโดยใช้คำสั่ง `Port[$37A]:=NoOfLatch;`

การออกแบบวงจร

ในวงจรใช้ BCD (binary to decimal converter, 4-line to 16 line decoder, ไอซีเบอร์ 74LS154) ในการรับการควบคุมการเก็บข้อมูลซึ่งควบคุมผ่านทางพอร์ตควบคุม (Port H37A) ดังนั้น

เราสามารถเลือกได้ว่าจะเก็บข้อมูลขนาด 8 บิต (Port H378) ไว้ที่ latch (ไอซีเบอร์ 74LS373) ตัวที่ต้องการ ต้องใช้ latch 5 ตัวในการสร้างพัลส์สัญญาณ RF รูป

sinc ใช้ latch 6 ตัวในการกำหนดขนาดของสัญญาณ ที่จะควบคุมเกรเดียนท์แต่ละชุด ดังแสดงในรูปที่ 3 และ ใช้ latch อีก 1 ตัวในการเลือกเปิด-ปิดพัลส์ RF และ เกรเดียนท์แต่ละชุด



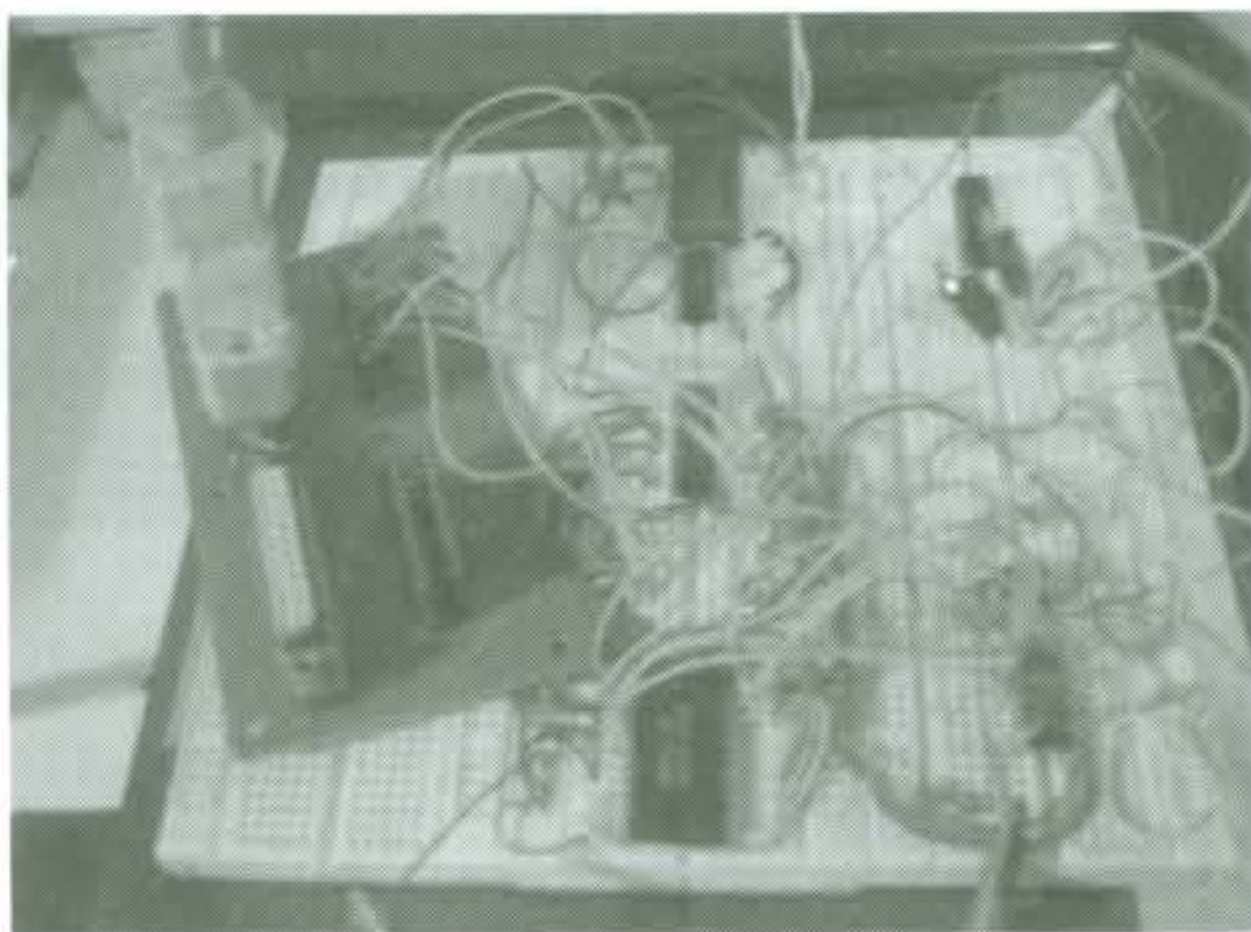
รูปที่ 3 แผนภาพของส่วนต่างๆ ที่ออกแบบ

ในการนำข้อมูลขนาด 8 บิตไปเก็บไว้ที่ latch นั้น จะต้องส่งคำสั่งให้ BCD เลือก latch ตัวนั้นก่อนแล้วจึงส่งข้อมูล 8 บิตออกไป ข้อมูลจะเข้าไปอยู่ที่ latch ซึ่งทำหน้าที่เสมือนเป็นบัฟเฟอร์ในวงจรเพื่อใช้ในการควบคุมและกำหนดค่าต่างๆ ต่อไป

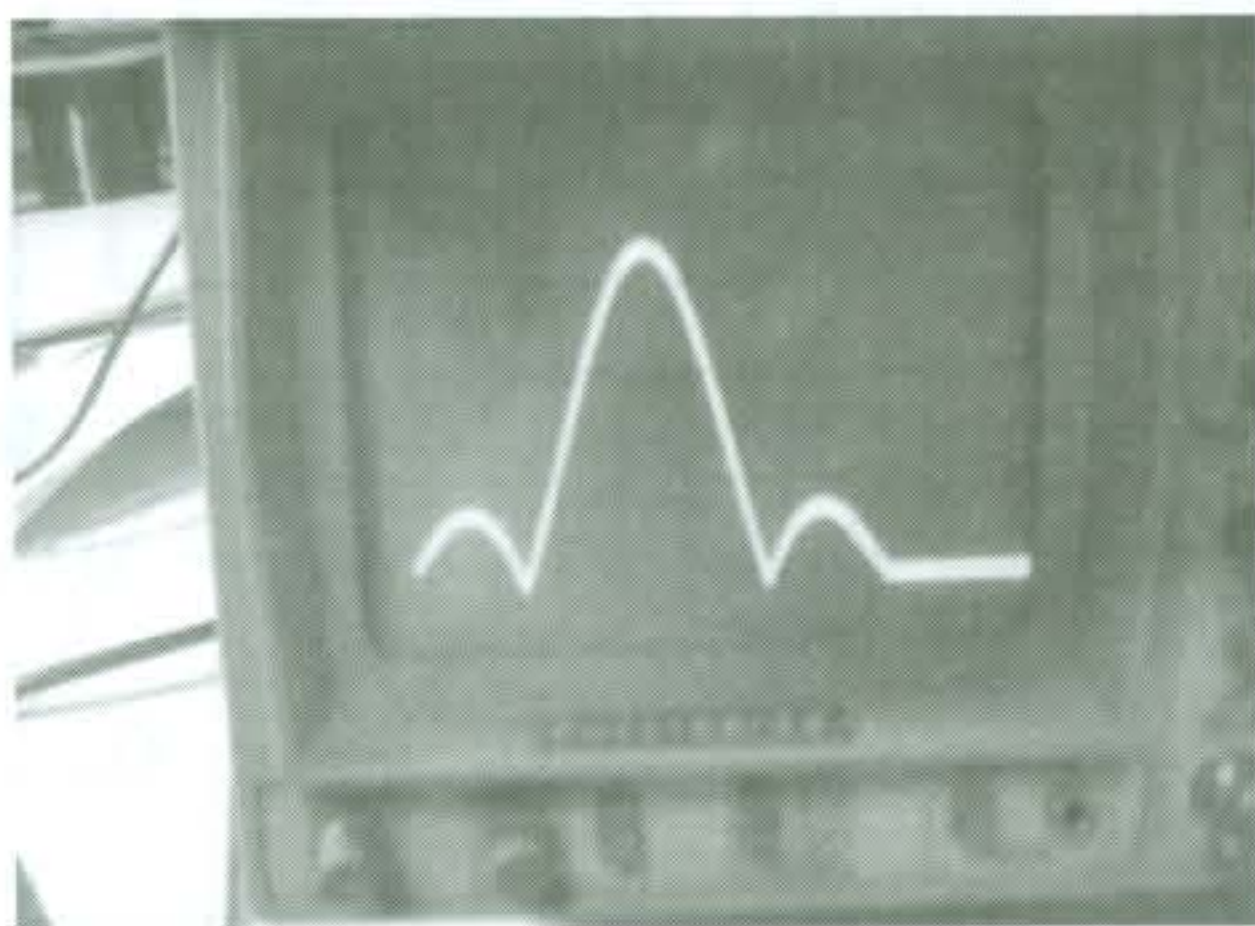
ส่วนผลิตสัญญาณรูป sinc

ในการที่จะผลิตสัญญาณรูป sinc จะต้องเก็บรูปร่างของสัญญาณเอาไว้ในหน่วยความจำ (ไอซีเบอร์ HM6116L) ก่อนโดยการใช้ latch ตัวแรกเป็นตัวส่งขนาดของสัญญาณและตัวที่สองเป็นตัวเลือก

address ของหน่วยความจำซึ่งจะมีตำแหน่งทั้งหมด $28 = 256$ ตำแหน่ง และเมื่อจะใช้งานก็เพียงแต่ส่งค่า address ที่ได้จากตัวนับ (counter, ไอซีเบอร์ 74LS193) ที่ควบคุมจาก latch ตัวที่ 3 ผ่านทาง DAC (digital to analog converter, IC DAC0808) ผลที่ออกจากหน่วยความจำเมื่อผ่าน DAC แล้วได้ออกมาดังแสดงในรูปที่ 4



(ก)



(ข)



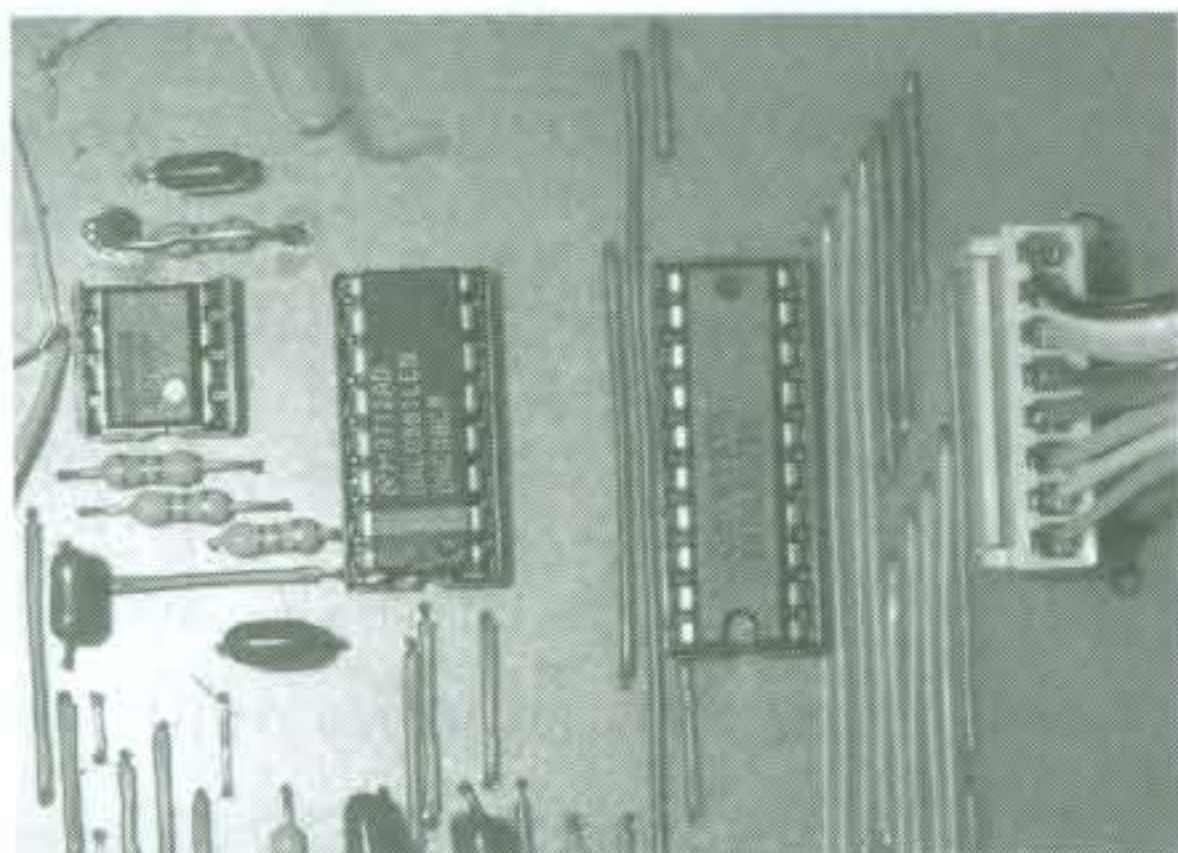
(ค)

รูปที่ 4 (ก) ส่วนผลิตสัญญาณรูป sinc (ข) สัญญาณที่ได้เมื่อวัดจากออสซิลโลสโคป
(ค) รูปร่างของ พัลส์ sinc ที่ส่งออกจากคอมพิวเตอร์

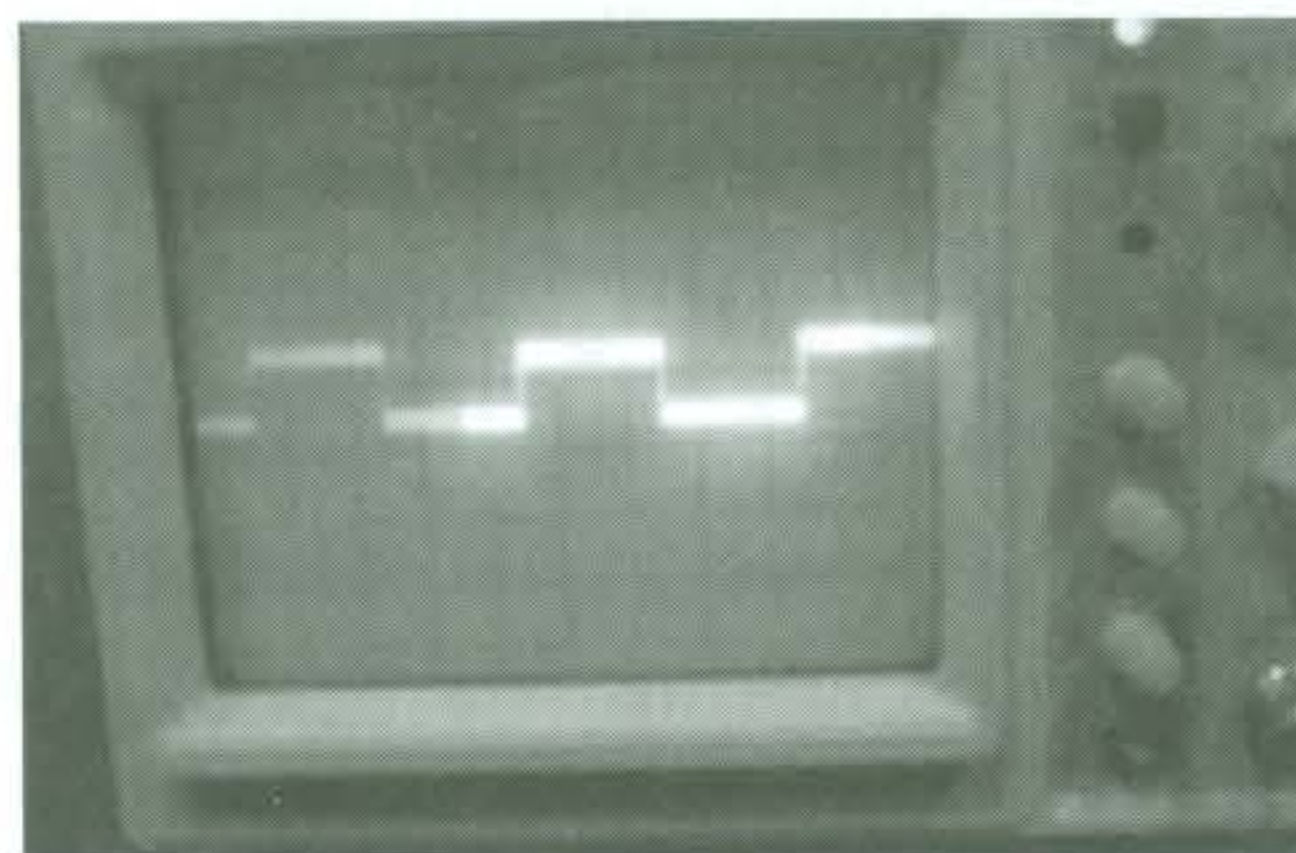
ส่วนผลิตสัญญาณควบคุมเกรเดียนท์

ส่วนควบคุมเกรเดียนท์ทั้งสามชุด มีลักษณะเหมือนกันแต่ทำงานแยกกันโดยอิสระซึ่งจะถูกควบคุมโดย latch ในการเปิด-ปิดอีกทอดหนึ่ง ส่วนควบคุมนี้ประกอบด้วย latch ซึ่งเก็บขนาดของสัญญาณ ถ้าขนาดเป็น 0 จะมี output เท่ากับ -5 โวลต์

และถ้ามีสัญญาณเต็ม 8 บิตหรือ 255 จะมีสัญญาณที่ output เท่ากับ 5 โวลต์ ดังนั้นสัญญาณที่ออกไปสามารถกำหนดได้ในความละเอียด 256 ระดับ ในขั้นตอนของการสร้างวงจร จะใช้เพียง latch และ DAC เท่านั้น เพื่อศึกษาการปิด-เปิดและการควบคุมเวลาของลำดับพัลส์ ดังแสดงในรูปที่ 5



(ก)



(ข)

รูปที่ 5 (ก) แสดงวงจรที่ใช้สร้างพัลส์เกรเดียนท์และ (ข) ผลจากการส่งข้อมูลไปยังส่วนนี้

ในการปิด-เปิดพัลส์จะใช้เวลาน้อยมาก (<1 ms) ขึ้นอยู่กับความไวของ IC ที่นำมาใช้ และจะใช้งานได้ดีเมื่อสนามเกรเดียนท์แม่เหล็กมีขนาดไม่สูงมากนัก ในทางปฏิบัติการปิด-เปิดเกรเดียนท์จะต้องมีการหน่วงเวลาเล็กน้อยเพื่อลดผลที่เกิดจาก Eddy-current ในขดลวด ซึ่งจะได้ศึกษาและออกแบบวงจรในส่วนนี้ต่อไป

ผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่า สามารถผลิตพัลส์สัญญาณวิทยุรูป sinc ได้ตามขนาดที่กำหนด และสามารถควบคุมความยาวของสัญญาณได้จากการกำหนดความเร็วของ counter ผ่านทาง latch สามารถส่งสัญญาณปิด-เปิดเกรเดียนท์ได้ตามขนาดที่ต้องการระหว่าง -5 โวลต์ และ 5 โวลต์ โดยมีระดับความละเอียด 256 ระดับ และกำหนดลำดับของพัลส์ก่อน-หลังของสัญญาณต่างๆได้ตามโปรแกรม โดยมีค่าเวลาของ output ที่ได้ตรงตามช่วงเวลาของลำดับพัลส์ที่กำหนดลงในโปรแกรม ซึ่งใช้ความละเอียดของเวลาในช่วง 10 - 2000 มิลลิวินาที

ในการส่งสัญญาณควบคุมพบว่า ไม่เกิดปัญหาจากการทำงานบนระบบปฏิบัติการ Windows แบบ multitasking เพราะหาความเร็วในเรื่องเวลาที่ต้องการอยู่ในระดับ >1 มิลลิวินาที

สรุปผลและวิจารณ์

สามารถสร้างส่วนควบคุมเครื่อง MRI ดั้งเดิมที่มีราคาไม่แพง ซึ่งสามารถส่งสัญญาณในการควบคุมการทำงานได้ตามที่ต้องการ แต่ยังมีส่วนที่จะต้องพัฒนาเพิ่มอีกหลายส่วนด้วยกัน คือ การปิด-เปิดเกรเดียนท์ จะต้องมีการหน่วงเวลาในการลดหรือเพิ่มของสัญญาณเพื่อลดปัญหาจากสนามแม่เหล็กเกรเดียนท์ที่ไม่คงที่เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว และจะต้องเพิ่มส่วนควบคุมความถี่ของคลื่นวิทยุให้สามารถปรับความถี่ได้จากโปรแกรม

นอกจากนี้ส่วนควบคุมจะต้องสามารถเลือกรูปแบบของสัญญาณ RF (นอกเหนือจากพัลส์รูป sinc) ที่ใช้กระตุ้นสปินได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ สำหรับนักวิจัยใหม่ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี พ.ศ. 2545

เอกสารอ้างอิง

- วิจิตร เสงี่ยมพันธ์, จันทรเพ็ญ ส.โทมัส, Ian Thomas. (2536). การออกแบบและสร้างระบบ NMR imaging ขนาดเล็ก. วารสารวิทยาศาสตร์. 47(5):306-324.
- Department of Bio-medical Physics. (2000). Physical Basis of Magnetic Resonance Imaging. University of Aberdeen, Aberdeen, Scotland, UK.
- Edelstein, W.A., Hutchison, J.M.S., Johnson, G. and Redpath, T. (1980). Spin warp NMR imaging and applications to human whole-body imaging. Phys. Med. Biol. 25:751-756.
- Harries, I.(2002). Interfacing to the IBM-PC Parallel Printer Port. www.doc.ic.ac.uk/~ih/doc/par/ สืบค้นเมื่อวันที่ 13 ตุลาคม พ.ศ. 2545.
- Pappas, J. (1999). DriverLINX Port I/O Driver for Win95 and WinNT. www.diskdude.cjb.net/ สืบค้นเมื่อวันที่ 25 พฤษภาคม พ.ศ. 2546.
- Young, I.R. (2000). Methods in Biomedical Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy. New York: John Wiley & Sons.



การศึกษาอิทธิพลของพอลิเมอร์ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งอัตรา ในตำรับเจลด้านการอักเสบ

มานิตา หาญพานิชเจริญ¹

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของพอลิเมอร์ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งอัตราของยา
ด้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) ในตำรับเจล เปรียบเทียบ
ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งอัตรา (partition coefficient) ของยา diclofenac sodium และ ibuprofen sodium โดยวิธี
octanol-aqueous partitioning model ใช้พอลิเมอร์ 2 กลุ่มเป็นสารก่อกำเนิดเจล คือ กลุ่ม glycosaminoglycans (GAGs)
ซึ่งได้แก่ sodium hyaluronate (low and high molecular weight-sodium hyaluronate, HA), sodium heparin และ
chondroitin sulfate กับกลุ่ม non-glycosaminoglycans (non-GAGs) ซึ่งได้แก่ sodium carboxymethylcellulose,
pectin และ sodium alginate ทำการศึกษาการแบ่งอัตราโดยนำสารละลายยามาเตรียมเป็นเจลด้วยสารก่อกำเนิด
ชนิดต่างๆ ที่ 5 ความเข้มข้น เติม octanol แล้วนำไปแช่ใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 32 ± 1 °ซ.
จนกระทั่งอิ่มตัว เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ibuprofen sodium) หรือ 36 ชั่วโมง (diclofenac sodium) จากนั้น
แยกส่วนของชั้นเจลและนำไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้ววัดหาปริมาณด้วยวิธีที่เหลือน้ำโดย
เครื่อง UV-spectrophotometer โดยวัดที่ความยาวคลื่นสูงสุดของตัวยา แต่ละตัวอย่างทดสอบ 4 ครั้ง (n=4)
ผลการศึกษาพบว่าวิธี octanol-aqueous partitioning model (*in vitro* model) สามารถใช้ศึกษาหาค่า partition
coefficient (K_{part}) ของ diclofenac sodium และ ibuprofen sodium ได้ โดยพอลิเมอร์กลุ่ม GAGs มีผลเพิ่ม
ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งอัตราของตัวยา และพบว่าอิทธิพลดังกล่าวแปรผันตามความเข้มข้นของพอลิเมอร์
ส่วนผลของกลุ่ม non-GAGs ต่อค่า partition coefficient ยังไม่สามารถสรุปผลได้ชัดเจน แต่พบว่ากลุ่ม
non-GAGs มีอิทธิพลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งอัตราน้อยกว่ากลุ่ม GAGs

Abstract

This study was aimed (i) to investigate the partition coefficients of two non-steroidal
anti-inflammatory drugs (NSAIDs), i.e. diclofenac sodium and ibuprofen sodium in polymeric gels, and (ii)
to study the influence that such polymers had on the partition coefficients of such NSAIDs. The *in vitro*
model (octanol-aqueous partitioning model) was used to determine the partition coefficient of the drugs.
The polymers studied were glycosaminoglycans, i.e. sodium hyaluronate (low and high molecular
weight, HA), sodium heparin and chondroitin sulfate, and the other were non-glycosaminoglycans, i.e.
sodium carboxymethylcellulose, pectin and sodium alginate. Gels (aqueous phase) were prepared at five

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ. ขอนแก่น 40002

concentrations of polymers by dispersing the polymer in each drug solution. Octanol was then added into such gels. Both octanol and aqueous phase were mixed using shaking water bath at a controlled temperature of $32\pm1^{\circ}\text{C}$ for 12 hours (ibuprofen sodium) or 36 hours (diclofenac sodium). The gel or aqueous phase was then separated and diluted. Subsequently, the concentration of drug was determined using UV-spectrophotometer at the maximum wavelength of each drug. Determination of each sample was replicated four times ($n = 4$). The results showed that such octanol-aqueous partitioning model (*in vitro* model) could be used to determine the partition coefficient of drugs. Glycosaminoglycans (GAGs) significantly promoted the partition coefficients of drugs ($p<0.05$) and such effect was found to be dependent on concentration of polymers whereas the effect of non-glycosaminoglycans (non-GAGs) could not be clearly concluded. However, the results suggested that such effect of non-GAGs on the partition coefficients was less than that of GAGs.

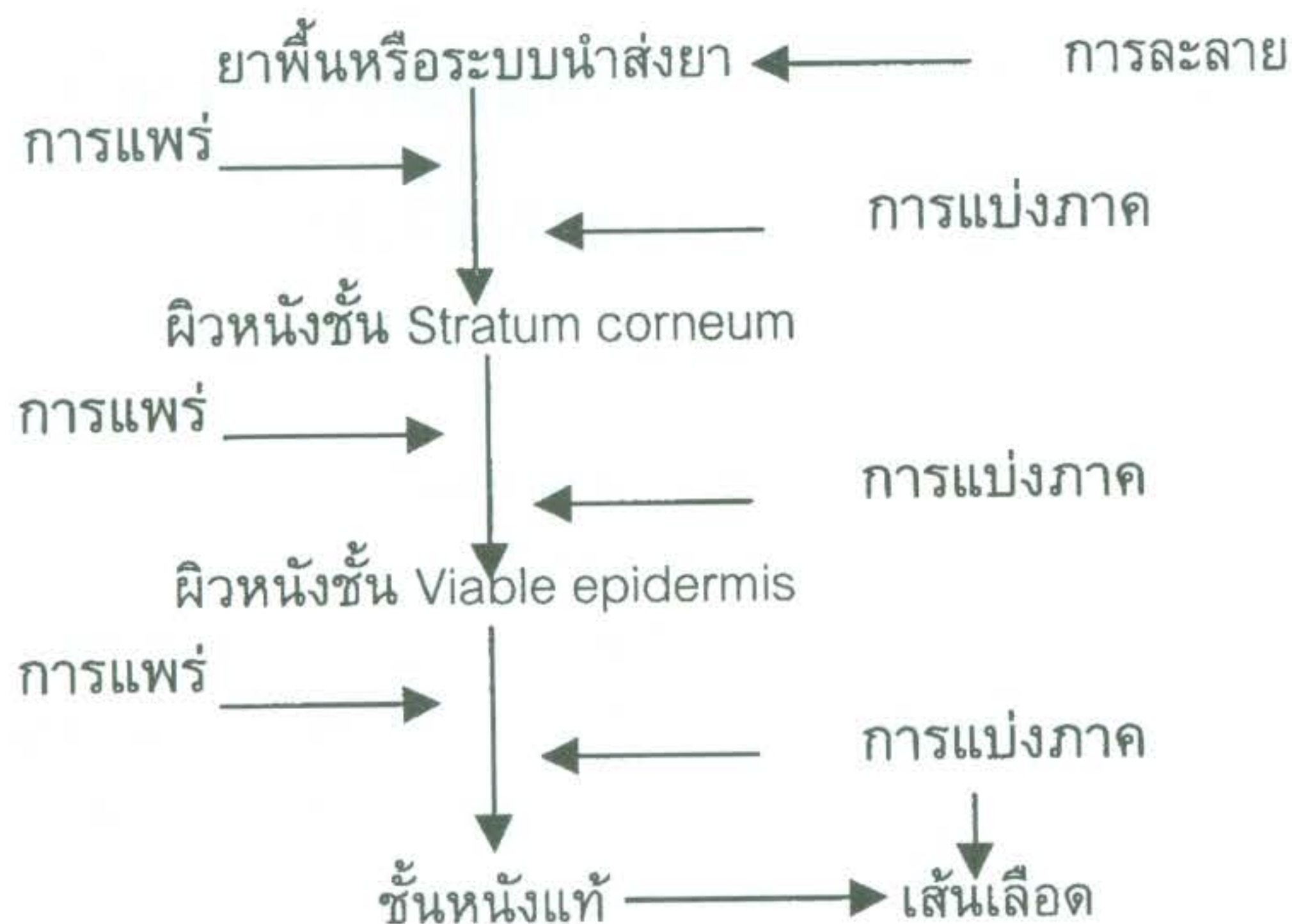
บทนำ

การนำส่งยาทางผิวหนัง เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำส่งยาหรือสารเข้าสู่ร่างกาย ข้อดีของระบบนำส่งทางผิวหนัง คือ หลีกเลี่ยงการที่ตัวยาถูกทำลายที่ตับ (first pass effect) ลดอาการข้างเคียงของยาบางกลุ่ม เช่น ยาในกลุ่ม non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) ที่เมื่อให้โดยการรับประทานจะมีผลต่อกระเพาะอาหารและลำไส้ การนำส่งยาริธีนี้ยังเหมาะสำหรับยาที่รับประทานไม่ได้ เพิ่มความยอมรับในการใช้ของผู้ป่วย และสามารถใช้ได้ง่ายและสะดวก (สมพล ประคองพันธ์, 2533; Berner and Cooper, 1987)

การเคลื่อนทางของยาเข้าสู่ผิวหนัง ดังแสดงในรูปที่ 1 จะเริ่มที่ตัวยาสำคัญละลายในยาพื้น และแพร่มาที่ผิวหนังของยาพื้นที่ดีติดกับผิวหนังชั้นนอกสุด (stratum corneum) จากนั้นยาจะแบ่งภาค (partition) เข้าสู่ชั้น stratum corneum และมีการแพร่ในชั้นนี้ ยาบางส่วนอาจจะถูกจับโดยไขมันและโปรตีนในชั้น stratum corneum เกิดเป็นที่เก็บกักยา (depot site) (Elias, 1990) ส่วนยาที่เหลือจะแบ่งภาคเข้าสู่ชั้นของ viable epidermis ยาอาจถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์หรือทำปฏิกิริยากับ receptor site จากนั้นจะแบ่งภาคเข้าสู่ชั้นหนังแท้ ซึ่งในชั้นนี้ยาจะแบ่งภาคเข้า

สู่เส้นเลือด และถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย นอกจากนี้ยังมียาบางส่วนแบ่งภาคเข้าสู่ไขมันที่ชั้นใต้ผิวหนัง และเป็นแหล่งกักเก็บยาได้ผิวหนังต่อไป (สมพล ประคองพันธ์, 2533)

จะเห็นว่าการที่ยาจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย จะต้องมีการแบ่งภาค หรือแบ่งวัตถุภาค (partition) ในหลาย ๆ ขั้นตอนดังที่กล่าวแล้ว ตั้งแต่ในระบบนำส่งยาจนถึงชั้นของไขมันใต้ผิวหนัง การนำส่งยาทางผิวหนัง นอกจากที่จะต้องคำนึงถึงลักษณะทางกายภาพและสรีรวิทยาของผิวหนังแล้ว จะต้องคำนึงถึงการแบ่งภาคหรือการแบ่งวัตถุภาค และส่วนประกอบอื่นในตำรับอีกด้วย เช่น สารช่วยเพิ่มการดูดซึม (penetration enhancer) เป็นต้น พอลิเมอร์ซึ่งมักใช้เป็นส่วนประกอบหนึ่งในตำรับยาเตรียมอาจจะมีอิทธิพลต่อการผ่านของยา (penetration) เข้าสู่ผิวหนังได้ งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาผลของพอลิเมอร์ที่มีต่อการแบ่งภาคของยา ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยที่เคยมีรายงานมาก่อนซึ่งส่วนใหญ่มักศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อภาพรวมของการดูดซึมยาทางผิวหนัง (permeability) แต่งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเจาะประเด็นเฉพาะทางด้านการแบ่งวัตถุภาคว่าพอลิเมอร์มีผลต่อการแบ่งวัตถุภาคของยาหรือไม่อย่างไร พอลิเมอร์กลุ่มใดบ้างที่มีอิทธิพลดังกล่าว



รูปที่ 1 การเดินทางของยาเข้าสู่ผิวหนัง

พอลิเมอร์ที่ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้จำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ พอลิเมอร์กลุ่ม glycosaminoclycans (GAGs) และกลุ่ม non-glycosaminoglycans (non-GAGs) ไกลโคอะมิโนไกลแคนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ทำหน้าที่โครงสร้างและป้องกันอันตรายมิให้เกิดกับเซลล์ต่าง ๆ ของสัตว์ เป็นสารเมือกที่มักพบอยู่บนผิวเซลล์ของสัตว์ จึงได้ชื่อว่า มิวโคพอลิแซ็กคาไรด์ (mucopolysaccharide) ชนิดที่พบติดอยู่กับโปรตีน เรียกว่า proteoglycan มักพบบริเวณช่องว่างนอกเซลล์ (extracellular matrix) โดยเฉพาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เช่น กระดูกอ่อน เอ็น ผิวหนัง และ ผนังของหลอดเลือด เป็นต้น โครงสร้างของไกลโคอะมิโนไกลแคนประกอบด้วยสายของคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำตาลอะมิโนพวกลิวคอสามีน (hexosamine) และกรดยูโรนิก (uronic acid) ตัวอย่างของไกลโคอะมิโนไกลแคน ได้แก่ hyaluronic acid, chondroitin sulfate, keratan sulfate, dermatan sulfate และ heparin (อาภัสสรฯ ชมิทธ์, 2537) ส่วนพอลิเมอร์กลุ่ม non-GAGs เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มักพบในเซลล์ของพืช ทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง เป็นเส้นใยเนื้อเยื่อของพืช และมีคุณสมบัติที่ขึ้นเหนียวเมื่อนำมากระจายตัวในน้ำ ตัวอย่างเช่น เซลลูโลส, sodium carboxymethylcellulose (SCMC) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ

เซลลูโลส, เพกทิน (pectin) และ sodium alginate เป็นต้น

ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งภาค หรือค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัตถุ (partition coefficient, K_{part}) เป็นการวัดปริมาณสารในวัตถุ 2 ชนิดที่ไม่เข้ากัน ในขณะที่สารเข้าสู่สภาวะสมดุล ค่า K_{part} จะบอกแนวโน้มว่าตัวถูกละลาย ชนิดนั้นชอบที่จะอยู่ในวัตถุที่ไม่มีขั้ว (organic phase) หรือมีขั้ว (aqueous phase) มากกว่ากัน (Malick and Smith, 1982) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัตถุได้จากสมการ

$$K_{part} = \frac{C_o}{C_w}$$

คือ ความเข้มข้นของยาใน organic phase ณ จุดสมดุล

C_w คือ ความเข้มข้นของยาใน aqueous phase ณ จุดสมดุล

Octanol นิยมใช้เป็นตัวแทนของ organic phase ในการหาค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัตถุ เนื่องจากสารนี้สามารถนำไปใช้เปรียบเทียบได้ใกล้เคียงกับลักษณะทางชีววิทยาของผิวหนัง (Chiou and Block, 1986) อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะไม่เหมือนสถานการณ์ทดลองจริงในผิวหนังมนุษย์ แต่ก็เป็น

ประมาณค่า K_{part} ที่มีความใกล้เคียงกับการทดลองจริงมาก

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งอัตราส่วนของยาต้านการอักเสบ (NSAIDs) ซึ่งได้แก่ diclofenac sodium และ ibuprofen sodium โดยใช้ octanol - aqueous partitioning model และเพื่อศึกษาผลของพอลิเมอร์กลุ่ม GAGs และกลุ่ม non-GAGs ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งอัตราส่วนของยาต้านการอักเสบดังกล่าว

อุปกรณ์และวิธีการ

พอลิเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

พอลิเมอร์กลุ่ม GAGs ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ sodium hyaluronate (HA) ที่ใช้มี 3 ชนิด คือ HA-A, HA-B (low molecular weight ซึ่ง HA-A มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า HA-B) และ HA-C (high molecular weight), chondroitin sulfate A, และ heparin sodium ส่วนพอลิเมอร์กลุ่ม non-GAGs ที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ sodium carboxymethylcellulose (SCMC) และ sodium alginate

การเตรียมน้ำ และ octanol ให้อิ่มตัว

เติมน้ำที่ผ่านการกำจัดไอออน (deionized water) และ octanol ในสัดส่วน 1:1 ลงในขวดรูปชมพู่แบบมีฝาปิด คนผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วถ่ายของผสมใส่ในกรวยแยก ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดการแยกชั้นอย่างสมบูรณ์ ทำการแยกเก็บของเหลวแต่ละชั้นโดยชั้นน้ำนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น (2-8 °ซ.) และชั้น octanol เก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้อง (25 °ซ.)

การเตรียมเจล

ในการทดลองนี้ใช้ตัวยา 2 ชนิด คือ diclofenac sodium และ ibuprofen sodium จึงแบ่งการเตรียมเจลดังนี้

1. เจลไดโคลฟีแนค (diclofenac sodium gel)

ชั่งพอลิเมอร์ตามปริมาณที่คำนวณจากเปอร์เซ็นต์ที่ใช้ (0.1, 0.4, 0.8 และ 1.2%) ใส่ในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร แบบมีฝาปิด จากนั้นเติมสารละลายยาไดโคลฟีแนค ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ซึ่งอิ่มตัวด้วย octanol) ให้ครบ 2 กรัม ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง เพื่อให้เจลพองตัวเต็มที่

2. เจลไอบูโพรเฟน (ibuprofen sodium gel)

ชั่งพอลิเมอร์ตามปริมาณที่คำนวณจากเปอร์เซ็นต์ที่ใช้ (0.1, 0.4, 0.8 และ 1.2%) ใส่ในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร แบบมีฝาปิด แล้วเติมสารละลายยาไอบูโพรเฟน ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ที่อิ่มตัวด้วย octanol) ให้ครบ 2 กรัม จากนั้นทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง เพื่อให้เจลพองตัวเต็มที่

การเตรียมกลุ่มควบคุม

กลุ่มควบคุม (control) เป็นสารละลายยาซึ่งไม่มีพอลิเมอร์ (0%) เตรียมโดย ชั่งยา diclofenac sodium หรือ ibuprofen sodium ตามปริมาณที่กำหนด เติมน้ำที่อิ่มตัวด้วย octanol แล้วปรับปริมาตร ให้ได้สารละลายยาไดโคลฟีแนคความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารละลายยาไอบูโพรเฟนความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

การหาเวลาที่สารอิ่มตัว

เติม octanol ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในตำรับเจลที่เตรียมไว้ นำไปเขย่าในเครื่อง shaker bath ที่อุณหภูมิ 32 ± 1 °ซ. แล้วเก็บตัวอย่างครั้งละ 4 หลอด (n=4) ที่ช่วงเวลาต่างๆ ดังนี้ ที่เวลา 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง แล้วนำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นเจล (aqueous) กับชั้น octanol ทำภายใต้อุณหภูมิ 32 °ซ. ด้วยความเร็ว 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแยกชั้น octanol ออกโดยใช้ pasteur pipette แล้วนำชั้นเจล (aqueous phase) ไป

เจือจางและตรวจหาปริมาณด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นสูงสุดของแต่ละตัวยา แล้วสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของยากับเวลา เพื่อหาเวลาที่สารอิ่มตัว (saturated time)

การศึกษาการแบ่งวัฏภาคของตัวยา

นำเจลที่เตรียมไว้แล้ว มาเติม octanol ปริมาณ 1 มิลลิลิตร (ที่อิ่มตัวด้วยน้ำ) แล้วนำขวดแก้วซึ่งมีของผสมดังกล่าวไปเขย่าให้เข้ากันดีในเครื่อง shaker bath ที่อุณหภูมิ $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$. ด้วยความเร็ว 30 รอบ/นาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (เวลาที่อิ่มตัวของเจลไอบูโพรเฟน) หรือ 36 ชั่วโมง (เวลาที่อิ่มตัวของเจลไดโคลฟีแนค) แล้วนำขวดสารตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชั้น aqueous กับชั้น octanol ที่อุณหภูมิ 32°C . ด้วยความเร็ว 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นจึงแยกชั้น octanol ออกโดยใช้ pasteur pipette เก็บตัวอย่างชั้นเจล (aqueous phase) นำไปเจือจางด้วยน้ำ แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม vortex mixer จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อตรวจวิเคราะห์หาความเข้มข้นของยา โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐาน

การคำนวณวิเคราะห์ และแปลผล

สูตรในการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัฏภาค (Malick and Smith, 1982)

$$K_{\text{part}} = \frac{C_0}{C_w}$$

C_0 คือ ความเข้มข้นของยาใน octanol phase ณ จุดสมดุล

C_w คือ ความเข้มข้นของยาใน aqueous phase ณ จุดสมดุล

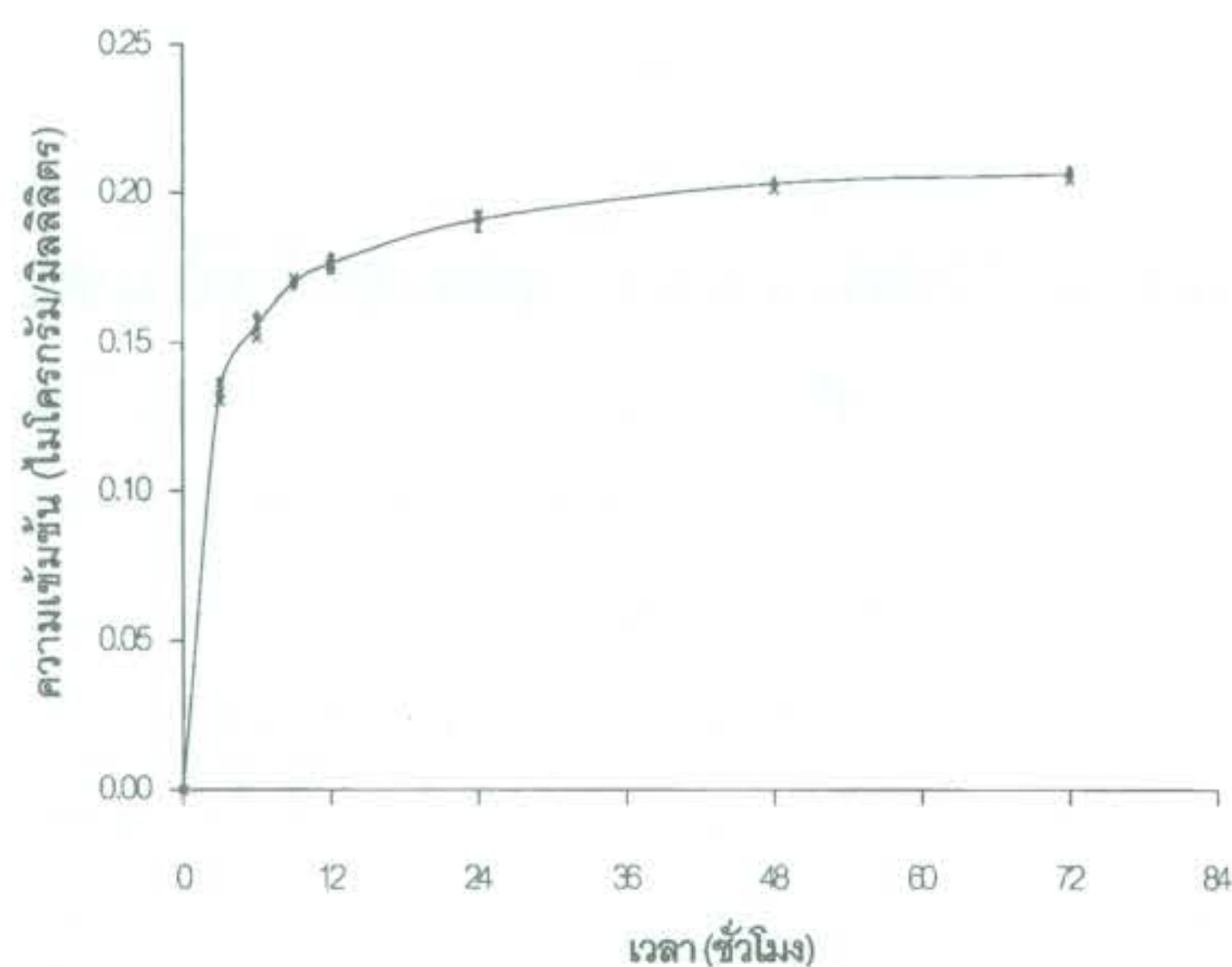
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยเปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุม หรือเปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่มตัวอย่างด้วยกัน โดยทำการตรวจสอบ homogeneity of variance ก่อน แล้วจึงใช้ตัวสถิติทดสอบดังนี้ ถ้าเป็น parametric ใช้ post-hoc

multiple comparison ส่วนกรณี nonparametric ใช้ Kruskal Wallis และ Mann Whitney U test

ผลการทดลอง

การหาเวลาที่สารอิ่มตัว

ในการหาเวลาที่สารอิ่มตัว ได้ใช้ 1.2% SCMC เป็นตัวแทนพอลิเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา เมื่อสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของยา diclofenac sodium ในวัฏภาค octanol กับ เวลา ได้ความสัมพันธ์ดังแสดงในรูปที่ 2 จากกราฟ อธิบายได้ว่า เมื่อเวลาผ่านไป พบว่าปริมาณยา diclofenac sodium ที่มีอยู่ในวัฏภาค octanol เพิ่มขึ้น แต่ที่เวลาประมาณ 36 ชั่วโมง ปริมาณการเพิ่มขึ้นของยาในวัฏภาค octanol เริ่มเข้าสู่สภาวะอิ่มตัว การเพิ่มขึ้นของยาก่อนข้างคงที่ จึงเลือกใช้ที่เวลา 36 ชั่วโมง เป็นเวลาในการศึกษาเปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัฏภาคของยา diclofenac sodium ในพอลิเมอร์เจลตลอดการวิจัยนี้

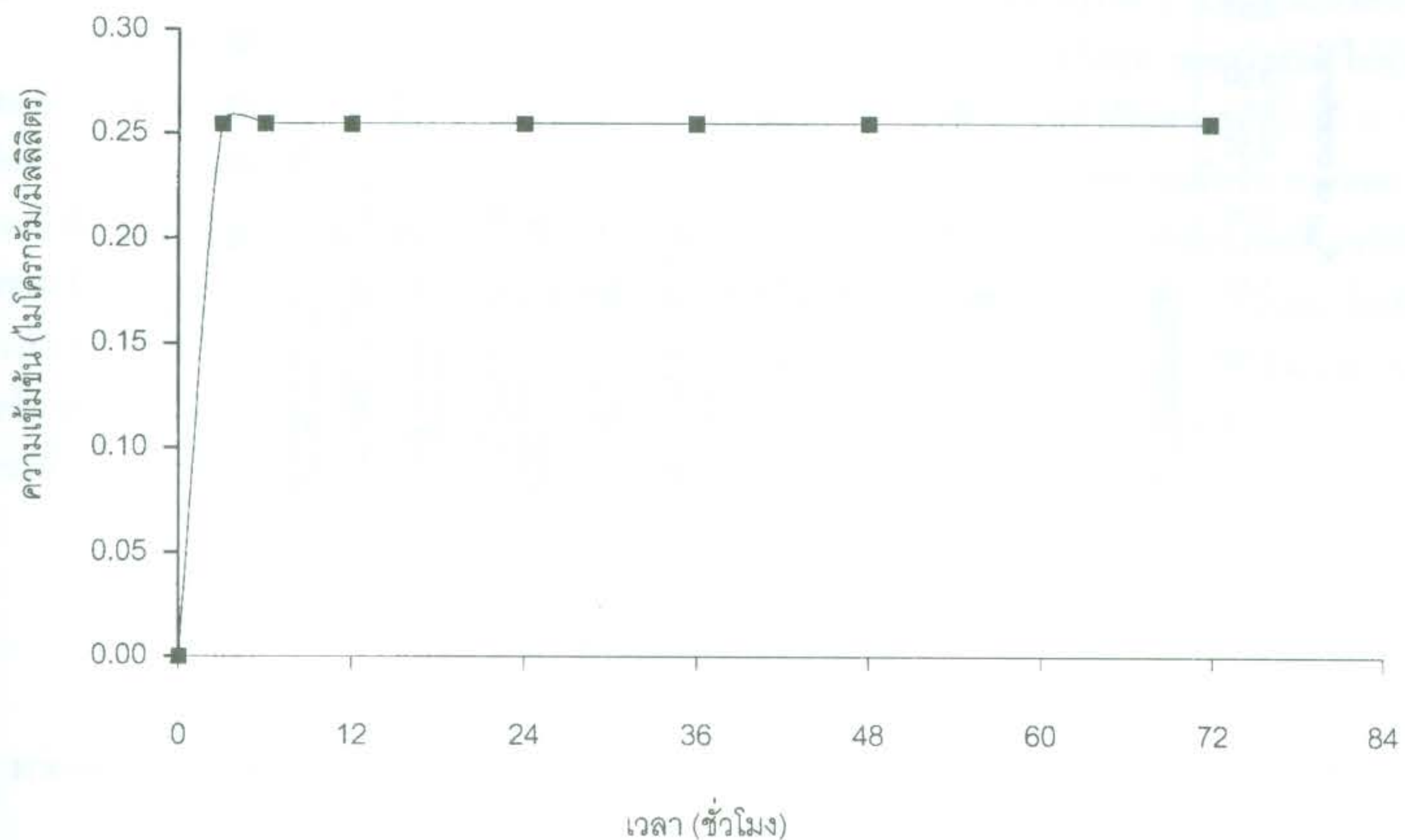


รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของยา diclofenac sodium ในวัฏภาค octanol กับเวลา

ส่วนผลการทดลองหาเวลาที่สารอิ่มตัวของยา ibuprofen sodium ดังแสดงในรูปที่ 3 จากกราฟ จะเห็นได้ว่า เมื่อเวลาผ่านไป พบว่าปริมาณยาที่มีอยู่ในวัฏภาค octanol เพิ่มขึ้น แต่เมื่อที่เวลาประมาณ

12 ชั่วโมง ปริมาณการเพิ่มขึ้นของยาในวัตถุภาค octanol เริ่มเข้าสู่สภาวะการอิ่มตัว การเพิ่มขึ้นของยาค่อนข้าง

คงที่ จึงเลือกใช้เวลาที่ 12 ชั่วโมง เป็นเวลาในการศึกษาเปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัตถุภาคของยา ibuprofen sodium ในพอลิเมอร์เจล ตลอดจนการวิจัย

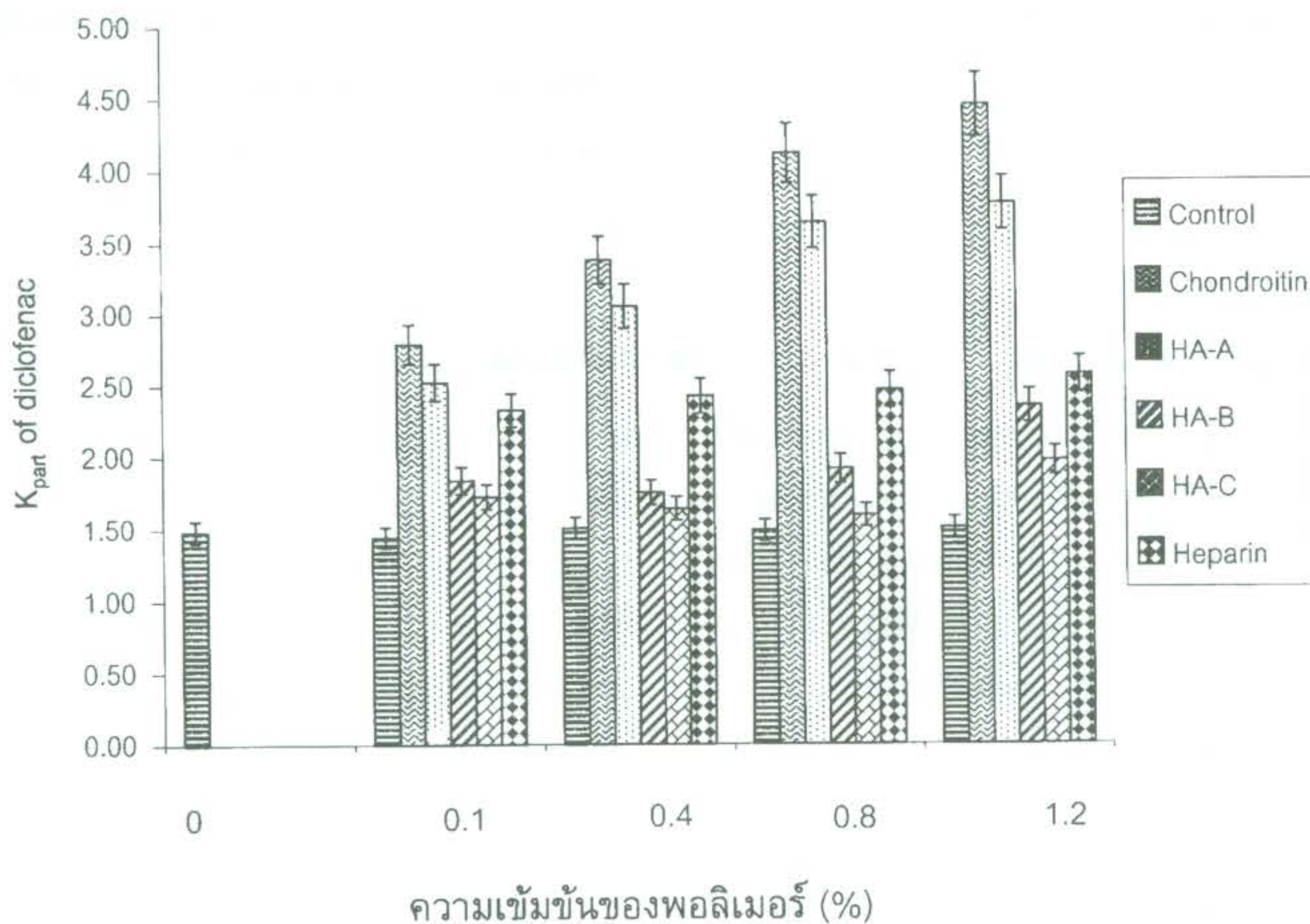


รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของยา ibuprofen sodium ในวัตถุภาค octanol กับเวลา

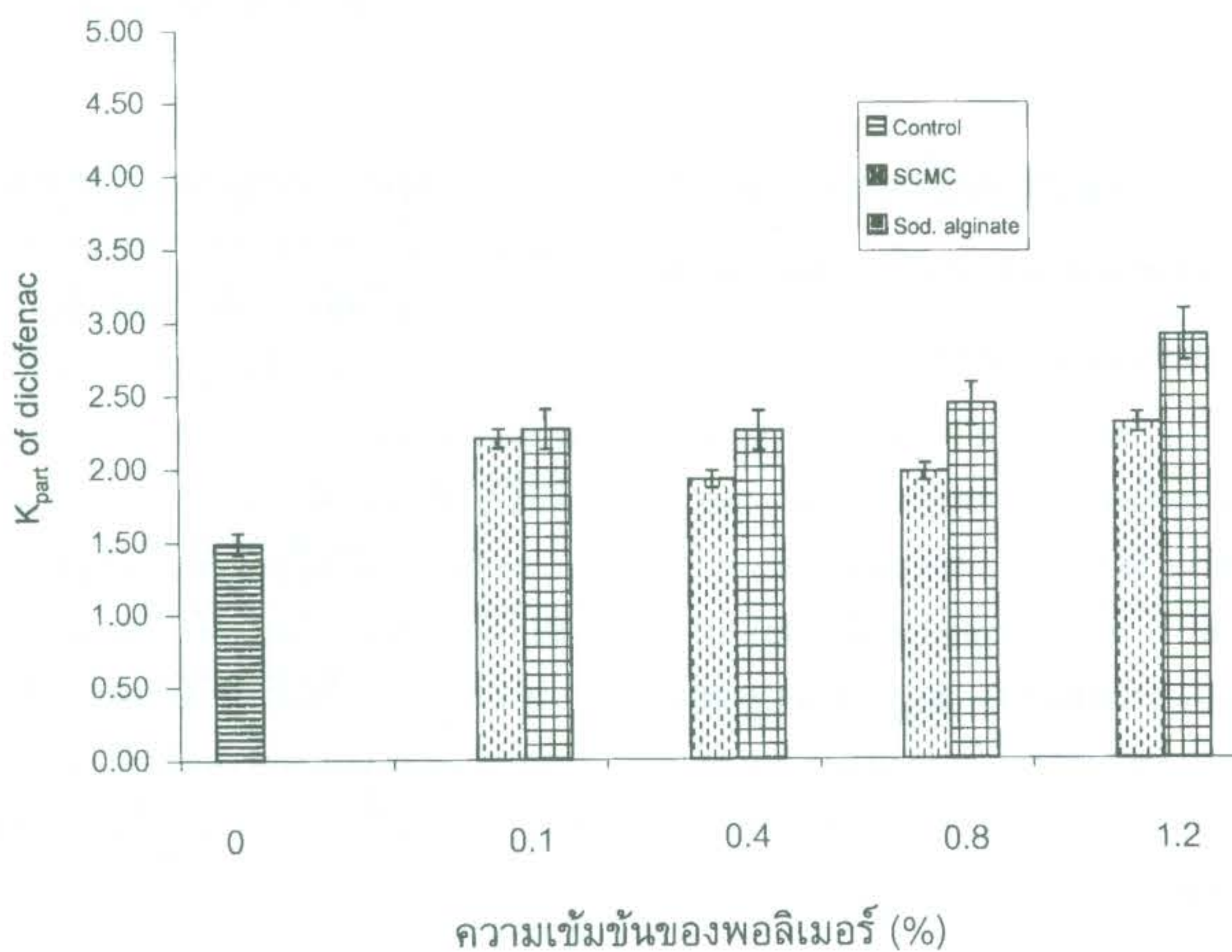
ผลเปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัตถุภาคของยา diclofenac sodium ระหว่าง พอลิเมอร์กลุ่ม GAGs และกลุ่ม non-GAGs

ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัตถุภาคของ diclofenac sodium เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพอลิเมอร์กลุ่ม GAGs ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.4, 0.8 และ 1.2% ดังแสดงในรูปที่ 4 จากรูปจะสังเกตได้ว่าพอลิเมอร์ GAGs ทุกชนิด มีผลเพิ่มค่า K_{part} ต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อความเข้มข้นของพอลิเมอร์เพิ่มขึ้น K_{part} ของกลุ่ม GAGs มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัตถุภาคของ diclofenac sodium เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพอลิเมอร์กลุ่ม non-GAGs ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.4, 0.8 และ 1.2% แสดงได้ดังรูปที่ 5 จากรูปจะเห็นว่าพอลิเมอร์กลุ่ม non-GAGs ก็มีผลเพิ่มค่า K_{part} แต่แนวโน้มของค่า K_{part} น้อยกว่ากลุ่ม GAGs และจะสังเกตได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพอลิเมอร์กลุ่ม non-GAGs (โดยเฉพาะ SCMC) มีการเพิ่มขึ้นของค่า K_{part} อย่างไม่สัมพันธ์กับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ส่วน sodium alginate ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.4 และ 0.8% พบว่าการเพิ่มขึ้นของค่า K_{part} ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)



รูปที่ 4 เปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัดภาคของ diclofenac ตามชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ของพอลิเมอร์กลุ่ม GAGs

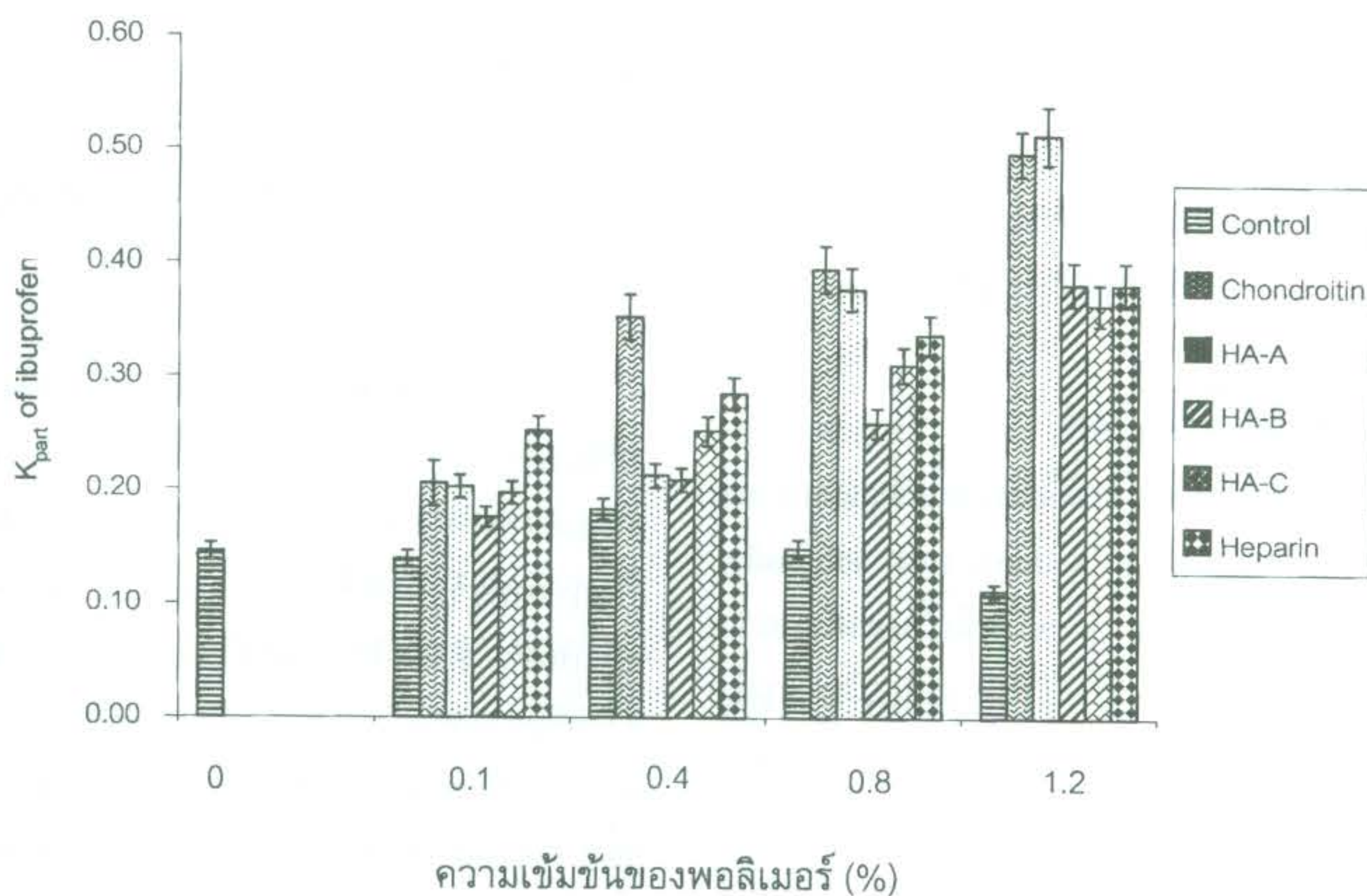


รูปที่ 5 เปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัดภาคของ diclofenac ตามชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ของพอลิเมอร์กลุ่ม non-GAGs

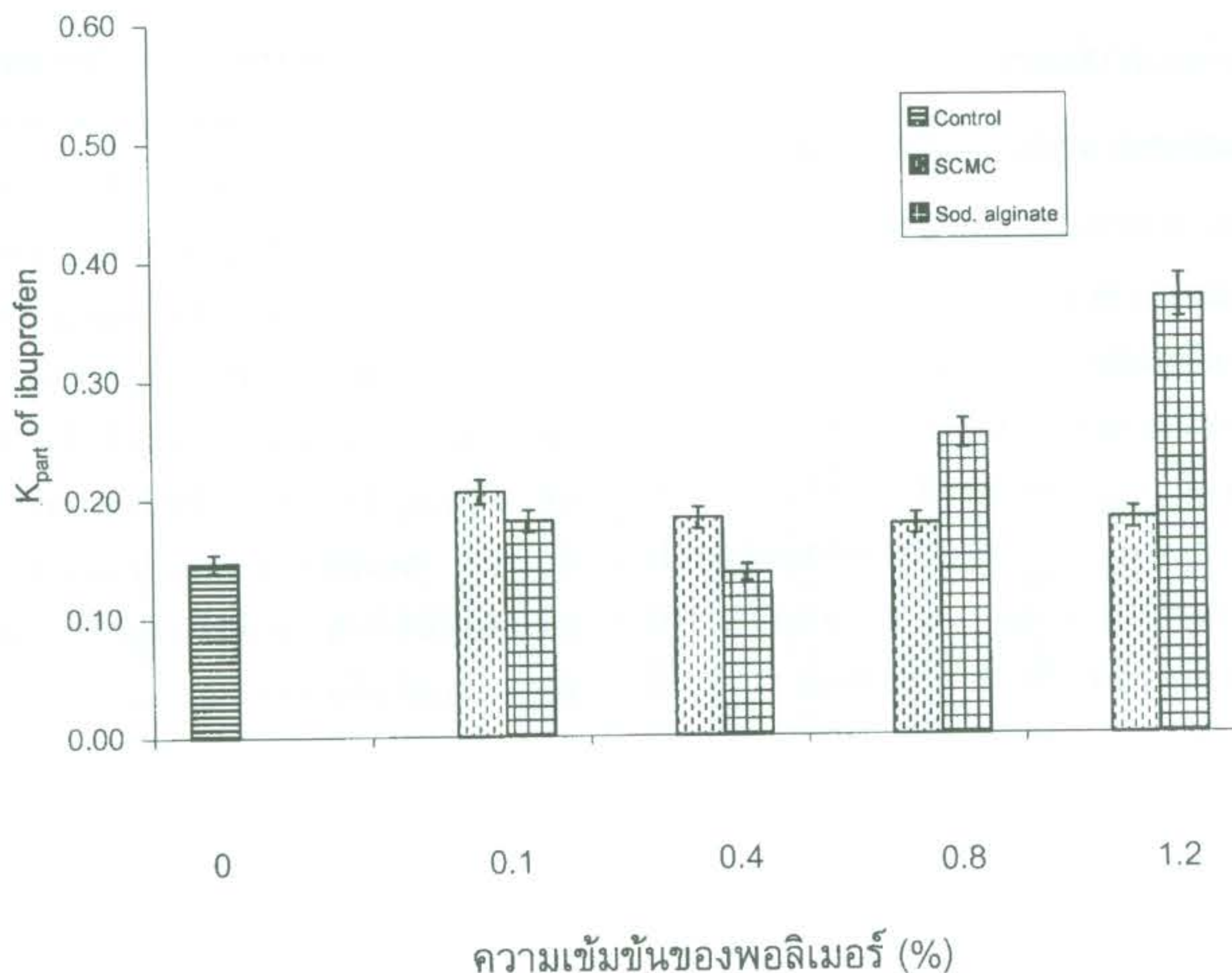
ผลเปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัดภาค ของยา ibuprofen sodium ระหว่างพอลิเมอร์ กลุ่ม GAGs และกลุ่ม non-GAGs

ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัดภาคของ ibuprofen sodium เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพอลิเมอร์กลุ่ม GAGs ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.4, 0.8 และ 1.2% แสดงได้ดังรูปที่ 6 จากรูปจะสังเกตได้ว่า GAGs ทุกชนิดมีผลเพิ่มค่า K_{part} แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อความเข้มข้นของพอลิเมอร์เพิ่มขึ้น K_{part} ของกลุ่ม GAGs มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัดภาคของ ibuprofen sodium เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพอลิเมอร์กลุ่ม non-GAGs ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.4, 0.8 และ 1.2% ดังแสดงในรูปที่ 7 จากรูปจะสังเกตได้ว่า ค่า K_{part} ของพอลิเมอร์กลุ่ม non-GAGs ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ยกเว้น sodium alginate ที่ความเข้มข้น 0.8 และ 1.2% นอกจากนี้พบว่าเมื่อความเข้มข้นของพอลิเมอร์เพิ่มขึ้น ค่า K_{part} ของพอลิเมอร์กลุ่ม non-GAGs ไม่เพิ่มขึ้นอย่างสัมพันธ์กับความเข้มข้น ยกเว้น sodium alginate ที่บางความเข้มข้น (0.8 และ 1.2%)



รูปที่ 6 เปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัดภาคของ ibuprofen ตามชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ของพอลิเมอร์กลุ่ม GAGs



รูปที่ 7 เปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัดภาคของ ibuprofen ตามชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ของพอลิเมอร์กลุ่ม non-GAGs

บทสรุปและวิจารณ์

ในการทดลองครั้งนี้ได้เตรียมเจลของตัวยา 2 ชนิด ได้แก่ diclofenac sodium และ ibuprofen sodium เนื่องจากยาทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ ที่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้รักษาอาการอักเสบ ในการเตรียมเจลควรปล่อยให้เจลเกิดการพองตัวอย่างเต็มที่ ซึ่งจำเป็นต้องเตรียมทิ้งไว้อย่างน้อย 12 ชั่วโมง สำหรับสารก่อเจลเลือกใช้พอลิเมอร์กลุ่ม GAGs และพอลิเมอร์กลุ่ม non-GAGs จุดประสงค์ในการเลือกใช้พอลิเมอร์กลุ่ม GAGs เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ เพราะคุณสมบัติที่สำคัญคือความเข้ากันได้ (biocompatibility) กับเนื้อเยื่อของมนุษย์ ทำให้มีความปลอดภัยในการนำมาใช้เป็นระบบนำส่งยาและทางการแพทย์ (Iwata, 1993; Laurent, 1998; Martindale, 1996) ทั้งนี้เนื่องจาก GAGs เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งพบได้ทั่วไปบริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์โดยเฉพาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของมนุษย์และสัตว์

ในการทดลองจะต้องเตรียมน้ำและ octanol ให้อิ่มตัวก่อนนำมาใช้ ทั้งนี้เนื่องจาก ต้องการป้องกันความผิดพลาดจากการที่ยาใน aqueous phase อาจเกิดการแบ่งวัดภาคเข้าไปยัง octanol phase ได้หากของเหลวทั้งสองไม่อิ่มตัวซึ่งกันและกัน ทำให้เมื่อทำการตรวจหาปริมาณยาแล้ว ได้ค่า K_{part} ที่ไม่มีความถูกต้องตามความเป็นจริงได้ มีรายงานว่าหากน้ำและ octanol ไม่เกิดการอิ่มตัว จะเกิดการละลายของน้ำเข้ามายัง octanol phase (Florence and Attwood, 1998)

การศึกษาวงศาเวลาที่อิ่มตัวของตัวยาทั้งสองชนิดนั้น เพื่อต้องการทราบว่า ณ เวลาใดที่ยาจะเกิดการแบ่งวัดภาคเข้าไปยังชั้น octanol จนอยู่ในสถานะอิ่มตัว เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการศึกษาค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งภาคของตัวยาดต่อไป โดยสถานะที่ใช้ในการหาค่าเวลาที่สถานะสมดุลนี้ ได้ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ $32 \pm 1^\circ\text{C}$. เนื่องจากต้องการทดลองเปรียบเทียบ

เทียบกับสถานะจริงในผิวหนังมนุษย์ ซึ่งมีอุณหภูมิ 32 °ซ. โดยพอลิเมอร์ที่นำมาใช้ในการทดลองคือ 1.2% SCMC เนื่องจากพอลิเมอร์ดังกล่าวเมื่อเตรียมเป็นเจลแล้วจะได้เจลที่มีความหนืดสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ชนิดอื่น ๆ ที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้

รูปแบบของการศึกษาคือ octanol-aqueous partitioning model (*in-vitro* model) ซึ่งนำมาใช้หาค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัดภาคของตัวยาได้ เนื่องมาจากระบบประกอบด้วย ส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ชอบไขมัน โดยใช้ octanol เป็นตัวแทน ซึ่งเหมือนกับชั้นของ lipid bilayer membrane ของผิวหนังมนุษย์ (Chiou and Block, 1986) ส่วนสถานะที่ใช้ควบคุมการศึกษาคือการแบ่งวัดภาคของยาทั้งสองชนิด ซึ่งเป็นการศึกษาภายในหลอดทดลองนั้น ได้ควบคุมสถานะขณะทำการทดลองครั้งนี้คือ การควบคุมอุณหภูมิขณะทำการปั่นเหวี่ยงต้องควบคุมอุณหภูมิให้คล้ายคลึงหรือใกล้เคียงกับผิวหนังมนุษย์จริงมากที่สุดตลอดทำการทดลอง ส่วนความเร็วรอบที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ความเร็วรอบที่ 4,000 รอบ/นาที เนื่องจากเป็นความเร็วที่เหมาะสมในการแยกชั้น octanol และเจลออกจากกันอย่างสมบูรณ์จากการศึกษาพบว่าค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัดภาคของตัวยา diclofenac sodium มีค่ามากกว่าของตัวยา ibuprofen sodium เมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นของพอลิเมอร์เท่ากัน และพบว่าแนวโน้มของค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัดภาคของตัวยาทั้ง 2 ชนิดมีแนวโน้มเพิ่มไปในทิศทางเดียวกันในพอลิเมอร์ชนิด GAGs อธิบายการที่ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัดภาคของ diclofenac sodium สูงกว่า ibuprofen sodium เนื่องจากลักษณะสูตรโครงสร้างของ diclofenac sodium มีส่วนของ benzene ring 2 วง แต่ ibuprofen sodium มี benzene ring เพียง 1 วง จึงทำให้ diclofenac sodium มีส่วนที่ชอบไขมันหรือลิพิดที่สูงกว่า ibuprofen sodium (Gennaro, 1995) จึงทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัดภาคของ diclofenac sodium สูงกว่า ibuprofen sodium

ในการศึกษาอิทธิพลของพอลิเมอร์ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัดภาคสรุปได้ว่ากลุ่ม GAGs มีแนวโน้มเพิ่มค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัดภาค เมื่อความเข้มข้นของพอลิเมอร์เพิ่มขึ้นจาก 0.1, 0.4, 0.8 และ 1.2% ตามลำดับ ส่วนพอลิเมอร์กลุ่ม non-GAGs ยังไม่สามารถสรุปผลการทดลองที่ชัดเจนได้ แต่พบว่ากลุ่ม non-GAGs มีอิทธิพลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัดภาคน้อยกว่ากลุ่ม GAGs ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพอลิเมอร์ทั้งสองกลุ่มนั้นมีแหล่งที่มาแตกต่างกัน โดยกลุ่ม GAGs ได้มาจากสิ่งมีชีวิตพวกสัตว์ และพบว่าเป็นส่วนประกอบที่มีอยู่ทั่วไปภายในร่างกายมนุษย์ (Dumitriu, 1994) จึงทำให้การแบ่งวัดภาคของยาจึงสูงกว่า

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ ประจำปี 2545 มหาวิทยาลัยขอนแก่นและสถาบันวิจัยและพัฒนาที่สนับสนุนทุนวิจัย รศ.ดร. อรุณศรี ปรีเปรม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยนี้ และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนด้านอุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- สมพล ประคองพันธ์. (2533). ผิวหนังและการดูดซึม. ใน: นันทนา พฤษัยคุ้มวงศ์ (บรรณาธิการ). การพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางผิวหนัง. กรุงเทพมหานคร: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. น.1-14, 17-26.
- อภัสสรรา ชมิดท์. (2537). ชีวเคมี. กรุงเทพฯ: ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. น.248-251.
- Berner, B. and Cooper. E.R. (1987). Models of skin permeability. In: Kydonieus, A.F. and Berner, B. (eds.). Transdermal Delivery of Drugs. Vol.II. Boca Raton: CRC Press. p.41- 56.

- Chiou, C.T. and Block, J. H. (1986). Parameters affecting the partition coefficient of organic compounds in solvent-water and lipid-water systems. In: Dunn, W. J., Block, J. H., and Pearlman, R. S. (eds.). *Partition Coefficient: Determination and Estimation*. Oregon: Pergamon Press, Inc. p.37-60.
- Dumitriu, S. (1994). *Polymeric Biomaterials*. New York: Marcel Dekker. p.161-164.
- Elias, P.M. (1990). The importance of epidermal lipids for the stratum corneum barrier. In: Osborne, D.W. and Amann A.H. (eds.). *Topical Drug Delivery Formulations*. New York: Marcel Dekker. p.13-26.
- Florence, A.T. and Attwood, D. (1998). The solubility of drugs. In: Florence, A.T. and Attwood, D. (eds.) *Physicochemical Principles of Pharmacy*. London: Macmillan Press. p.163-165, 186.
- Gennaro, R. (1995). *Remington: the Science and Practice of Pharmaceutical*. Pennsylvania: Mack Publishing. p.598, 1211-1213, 1663-1664.
- Iwata, H. (1993). Pharmacologic and clinical aspects of intraarticular injection of hyaluronate. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 289:285-291.
- Laurent, T.C. (1998). Introduction. In: Laurent, T.C. (ed.). *The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives*. London: Portland Press. p.1.
- Malick, A.W. and Smith, R.E. (1982). Topical drug-delivery system. In: Banker, G.S. and Chalmers, R.K. (eds.). *Pharmaceutics and Pharmacy Practise*. Philadelphia: Lippincott Company. p.288-289.
- Martindale (1996). *Martindale: the Extra Pharmacopoeia*. London: Royal Pharmaceutical Society. p.36, 50, 74, 881, 985, 1536.



ผลของสารเสริมชีวภาพต่อการหมักไซเลจจากกากเบียร์ และผลผลิตและองค์ประกอบนํ้ามันในโคนม

สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ¹, อาภา สุเวชวัฒนกุล¹,
ภัทรกร นภาพรรณ¹ และจีระชัย กาญจนพฤตพิพงศ์²

บทคัดย่อ

ศึกษาการหมักไซเลจจากกากเบียร์สด ในสภาวะการใส่สารเสริมชีวภาพ เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก สายพันธุ์ KUB-ST10-1 และสภาวะควบคุม (ไม่ใส่เชื้อ) ในระดับห้องปฏิบัติการ 50 กรัม และภาคสนาม 50 กิโลกรัม พบว่าการหมักกากเบียร์สดทั้งสองสภาวะในระดับห้องปฏิบัติการ มีการลดลงของค่าพีเอชเป็น 4.2 และผลิตกรดอะซิติกในช่วง 2.3 - 2.5% ของนํ้าหนักแห้ง หลังการหมัก 21 วัน อย่างไรก็ตามสภาวะการหมักแบบใส่เชื้อ ผลิตกรดแลคติกสูงในช่วง 1.9 - 2.3% ขณะที่สภาวะควบคุมมีค่า 0.33% ของนํ้าหนักแห้ง เมื่อทำการศึกษาในระดับ 50 กิโลกรัม พบว่าสภาวะที่ใส่เชื้อเท่านั้น ที่แสดงการผลิตกรดแลคติกเป็น 2.1% ของนํ้าหนักแห้ง หลังการหมัก 14 วัน หลังจากนั้นปริมาณกรดแลคติกลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบได้ พร้อมการเพิ่มขึ้นของกรดอะซิติกระหว่างการหมัก 13 สัปดาห์ แต่ไม่พบการผลิตกรดบิวทริก ขณะที่ในสภาวะควบคุม พบว่ามีการผลิตกรดอะซิติก และ กรดบิวทริก ปริมาณ 3.6-4.8% และ 1.1-4.5% ของนํ้าหนักแห้ง จากการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการในโคนม เมื่อใช้กากเบียร์แห้ง ไซเลจจากเบียร์ และไซเลจจากเบียร์ใส่สารเสริมชีวภาพในสูตรอาหารผสมเสร็จ พบว่าการใช้ไซเลจจากเบียร์ใส่สารเสริมชีวภาพ สามารถเพิ่มการกินได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ในลักษณะแห้ง และไซเลจจากเบียร์ นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของนํ้ามัน และไขมันในนม เมื่อใช้ไซเลจจากเบียร์ ขณะที่ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลในนมไม่แตกต่างกัน

Abstract

KUB-ST10-1 lactic acid bacteria (LAB) were used as a bio-additive for silage-making employing the brewery spent grain as a raw material. The experiments on LAB treated silage and its control (without LAB application) were carried out at both laboratory (50 g) and pilot scales (50 kg). For the laboratory scale, both conditions showed a low pH of 4.2 and acetic acid concentrations of 2.3 - 2.5% (on a dry weight basis) after 21-day fermentation. However, the LAB treated silage and control were different in lactic acid contents (1.9 - 2.3% and 0.33%, respectively). When silage-making at the pilot scale was performed,

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ถนนพหลโยธิน เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

² ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

only LAB treated silage provided 2.1 % lactic acid after 14-day fermentation. However, lactic acid was decreased and could not be detected during 13 weeks of fermentation while acetic acid was increased. The LAB treated silage had lower acetic acid concentration and no butyric acid was detected while the control had 3.6-4.8% acetic acid and 1.1 - 4.5 % butyric acid. The dry brewery spent grain, control silage and LAB treated silage were offered to 6 cows in a series of 3 x 3 Latin square to study nutritional value of dairy cow. The intake of LAB treated silage was significantly higher ($p < 0.01$) than that of the control and the dry form even caused no significant difference in weight. Cows fed both LAB treated and control silage had significantly higher yields of milk and fat ($p < 0.05$) while they were not different in yields of protein and sugar in milk.

บทนำ

กากเบียร์เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนรวม ไขมันรวม เยื่อใยในรูปผนังเซลล์ เยื่อใยในรูปลิกโนเซลลูโลส ลิกนิน เถ้า แคลเซียม และฟอสฟอรัส ในปริมาณ 21.6, 4.5, 56.7, 26.6, 6.2, 4.5, 1.98 และ 0.64% ของน้ำหนักแห้งโดยเฉลี่ย ตามลำดับ (ผลวิเคราะห์จากภาควิชาสัตวบาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) กากเบียร์เป็นวัตถุดิบอาหารชั้นที่มีคุณค่าทางโภชนาการที่เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม นิยมนำมาใช้เลี้ยงโคนมทั้งในรูปแห้งและสด (จิระชัย กาญจนพถัมพิพงศ์, 2543) เกษตรกรนิยมนำกากเบียร์สดมาเก็บถนอมในถุงพลาสติกในรูปแบบไซเลจ เพื่อเก็บไว้ใช้เป็นเวลา 1-3 เดือน ซึ่งมักพบปัญหาการเน่าเสีย ทั้งนี้เป็นเพราะว่ากากเบียร์มีความชื้นสูงถึงประมาณ 75% ซึ่งเป็นสถานะที่จุลินทรีย์ปนเปื้อนสามารถเจริญได้เป็นอย่างดี เป็นผลทำให้เกิดการเน่าเสียอย่างรวดเร็ว กระบวนการหมักเป็นไซเลจ ต้องการแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) ร่วมในกระบวนการหมักในสถานะปริมาณออกซิเจนต่ำ ส่งผลต่อการลดลงของพีเอช ในระดับซึ่งจุลินทรีย์ที่เป็นผลทำให้เกิดการเน่าเสียและเป็นตัวก่อโรคไม่สามารถเจริญได้ (Muck, 1991)

การเก็บถนอมกากเบียร์ในรูปแห้งต้องอาศัยพลังงานความร้อน ในรูปของแสงอาทิตย์ หรือเครื่องให้ความร้อน และส่งผลต่อการสูญเสียคุณค่า

ทางอาหารได้ ขณะที่การหมักในรูปไซเลจ ต้องมีความรู้เกี่ยวกับกระบวนการหมัก และมีการลงทุนในเบื้องต้นสูง ในการทดลองครั้งนี้เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ เมื่อทำการเก็บรักษากากเบียร์สดโดยการหมักแบบไซเลจ และการใช้สารเสริมทางชีวภาพ แบคทีเรียกรดแลคติก และในลักษณะกากเบียร์แห้ง รวมทั้งผลที่มีต่อลักษณะทางโภชนาการของโคนม และปริมาณรวมทั้งคุณภาพน้ำนมที่ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์

การเตรียมสารเสริมทางชีวภาพในรูปแบบของเชื้อ LAB

ซังเชื้อ LAB สายพันธุ์ KUB-ST10-1 (ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) จำนวน 2 กรัม ใส่ลงในอาหารเหลวปริมาณ 1 ลิตร ซึ่งประกอบด้วยน้ำเหลือทิ้งจากการหมักวุ้นมะพร้าวที่ใส่น้ำตาลกลูโคส 2% และปรับพีเอชเป็น 6 ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 8-9 ชั่วโมง น้ำเลี้ยงเชื้อดังกล่าวพร้อมที่จะเป็นหัวเชื้อในการหมักไซเลจ

กากเบียร์และการเตรียม

กากเบียร์ที่ใช้ในการทดลองเป็นกากเบียร์ใหม่ที่ได้จากโรงงานโดยตรง ทำการแบ่งกากเบียร์

ดังกล่าวเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่ 1 นำมาผึ่งแดดบนลานคอนกรีต เพื่อทำเป็นกากเบียร์แห้ง ส่วนที่ 2 ใช้ในรูปของกากเบียร์สด

การหมักไซเลจในระดับห้องปฏิบัติการ

ชั่งกากเบียร์ 50 กรัม ใส่ลงในถุงในลอนผสมขนาด 17 x 25 เซนติเมตร ใส่สารเสริมทางชีวภาพในรูปหัวเชื้อ ST10-1 ที่เตรียมขึ้นปริมาณ 2 มิลลิลิตร โดยมีถุงที่ไม่ใส่สารเสริมเป็นตัวเปรียบเทียบ (ชุดควบคุม) จากนั้นรีดอากาศออกด้วยมือ ปิดปากถุงด้วยเครื่องปิดผนึก ทำการเก็บตัวอย่างที่ 0, 1, 3, 7, 14 และ 21 วัน โดยทำ 3 ซ้ำในแต่ละสถานะ เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีซึ่งได้แก่ค่าพีเอช ค่าความชื้น ปริมาณกรดอินทรีย์ และศึกษาคุณสมบัติทางจุลินทรีย์

การหมักไซเลจในภาคสนาม

บรรจุกากเบียร์สดลงในถุงดำ ปริมาณ 50 กิโลกรัม โดยแบ่งเป็น 2 สถานะคือ การหมักกากเบียร์สด และการหมักกากเบียร์ใส่สารเสริมทางชีวภาพ โดยบรรจุกากเบียร์สดลงในถุงพลาสติกดำ ที่สอดในถุงปุ๋ยประมาณ 50 กิโลกรัม จากนั้นรีดอากาศออกและมัดปากถุงให้แน่น ในกรณีใส่สารเสริมทางชีวภาพดำเนินการโดยแบ่งใส่เป็น 2 ช่วงดังนี้ บรรจุกากเบียร์ประมาณ 25 กิโลกรัม จากนั้นใส่หัวเชื้อ LAB ที่เตรียมขึ้น โดยใช้หัวเชื้อเจือจางที่อัตราส่วนของ LAB ต่อ น้ำดื่มสะอาด 1:5 ปริมาณ 75 มิลลิลิตร โดยการพ่นหรือเทให้เกิดการกระจายของเชื้อ จากนั้นใส่กากเบียร์ส่วนที่เหลืออีก 25 กิโลกรัม ตามด้วยหัวเชื้อที่เจือจางอีก 75 มิลลิลิตร ทำการรีดอากาศออกด้วยเครื่องรีดอากาศ และปิดผนึกด้วยเชือกในลอนสวมลงในถุงอาหารสัตว์เพื่อป้องกันการกักกินของสัตว์ต่างๆ ทำการเก็บตัวอย่างที่ 0, 14, 21, 28, 35,

42, 49, 56, 63, 70, 77, 84 และ 91 วัน โดยเก็บ 3 ซ้ำในแต่ละสถานะ เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมี ซึ่งได้แก่ พีเอช ความชื้น ปริมาณกรดอินทรีย์ และศึกษาคุณสมบัติทางจุลินทรีย์ นอกจากนั้นใช้ไซเลจที่เตรียมขึ้นทั้งสองสถานะในการเลี้ยงโคนมเพื่อศึกษาโภชนะในสัตว์ต่อไป

2. การศึกษาการใช้ไซเลจกากเบียร์ในอาหารโคนม

สุ่มแม่โครีดนมลูกผสมขาว-ดำ x พื้นเมือง (93.70 x 6.25%) จำนวน 6 ตัว อยู่ระหว่างระยะกลางถึงระยะปลายของรอบการให้นมที่ 2 ซึ่งมีจำนวนวันให้นม 180 ± 8 วัน ตามแผนการทดลองแบบ A double 3x3 Latin square ที่มีระยะเวลาทดลองคาบละ 28 วัน

อาหารทดลองเป็นอาหารผสมเสร็จ 3 สูตรคือ กากเบียร์แห้ง กากเบียร์หมัก และกากเบียร์ใส่สารเร่งทางชีวภาพ LAB ทำการผสมเฉพาะส่วนอาหารขึ้นครั้งละ 500 กิโลกรัม ทำหุ้ยาชนแห้งจากหุ้ยาชนสดที่มีอายุประมาณ 28 วัน สับให้สั้นประมาณ 1-2 นิ้ว และผึ่งแดดให้แห้ง เก็บโดยบรรจุในถุงปุ๋ย (ไม่มัดปากถุง) เพื่อใช้เป็นอาหารหยাবตลอดการทดลอง ทำการผสมหุ้ยาชนแห้ง กากเบียร์ทั้ง 3 รูปแบบ (กากเบียร์ในรูปแบบแห้ง กากเบียร์หมัก และกากเบียร์หมักใส่สารเร่งทางชีวภาพ) และอาหารขึ้นตามสัดส่วนที่แสดงไว้ในตารางที่ 1 โดยผสมตามสัดส่วนดังกล่าววันละ 3 ครั้ง ก่อนให้อาหารอย่างเต็มที่เวลา 07.30, 11.00 และ 17.30 น.

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารทดลองแต่ละสูตรสัปดาห์ละ 1 ครั้ง รวบรวมและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีหลังการทดลอง เก็บตัวอย่างน้ำนมจากแม่โครีดนมทดลองแต่ละตัว หลังรีดนมเวลาเช้าและเวลาบ่าย สัปดาห์ละ 1 วัน โดยเก็บตัวอย่าง

ตารางที่ 1 สูตรอาหารทดลอง

วัตถุดิบอาหารสัตว์	ร้อยละ
หญ้าขนแห้ง	20
กากเบียร์ (น้ำหนักแห้ง)	32
กากถั่วเหลือง	8
มันเส้น	26.4
ปืดยูเรีย	0.6
กากเต้าเจี้ยว	8
ไขวัว	2
แร่ธาตุ	3
รวม	100

น้ำหนักในขวดพลาสติกที่มีสาร 2-bromo-2-nitro-1, 3-propadiol เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบนมต่อไป บันทึกปริมาณนมเข้าและเย็นทุกวัน และชั่งน้ำหนัก แม่นมโคริคนมเข้าสัปดาห์ละ 1 ครั้ง

การวิเคราะห์ค่าพีเอช เพอร์เซ็นต์ความชื้น ปริมาณกรดอินทรีย์ ดำเนินการตามวิธีดัดแปลงของ Nitisinprasert et al. (2000)

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของ อาหารทดลองทำตามวิธีของ AOAC (Helrich,1980) วิเคราะห์เยื่อใยในรูปผนังเซลล์และในรูปลิกโน เซลลูโลส และลิกนินโดยวิธีของ van Soest et al. (1969) วิเคราะห์องค์ประกอบนมด้วย Miko scan (Foss Electric, Denmark)

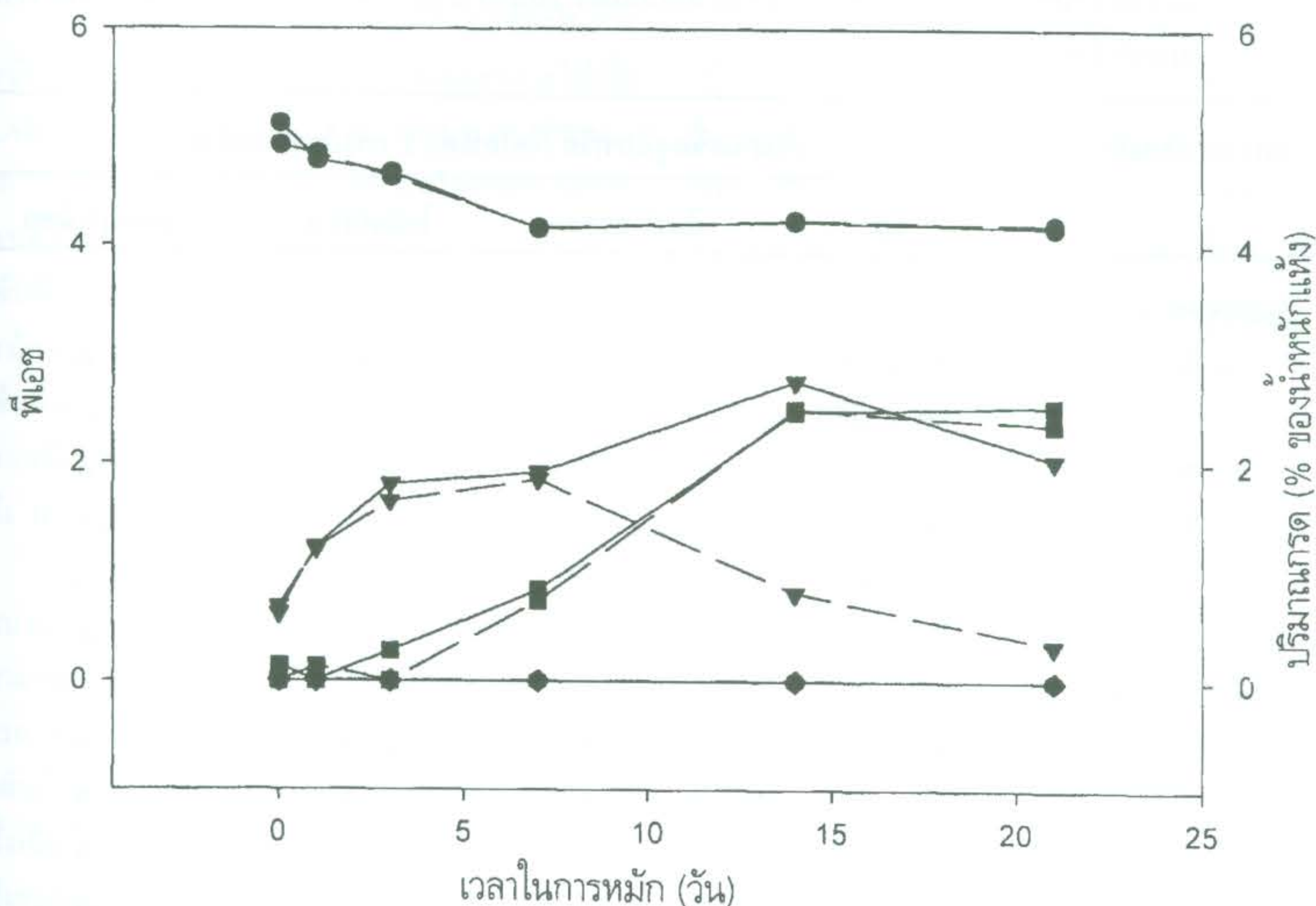
การศึกษาทางคุณภาพ และปริมาณของ จุลินทรีย์ ใช้วิธี standard plate count โดยใช้อาหาร เลี้ยงเชื้อ MRS, VRB, PDA ปรับพีเอชเป็น 3.5 และ sulphite agar ในการวิเคราะห์เชื้อในกลุ่ม LAB, โคลิฟอร์ม, ยีสต์ รา และ คลอสตริเดียมตามลำดับ (Gerhardt et al., 1981)

การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ โดยโปรแกรม SAS (1989) และเปรียบเทียบความ แตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย least squared means

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์ เคมี และจุลินทรีย์ ของการหมักไซเลจในระดับห้องปฏิบัติการ

การหมักไซเลจจากกากเบียร์ในระดับห้อง ปฏิบัติ ทำการทดลองเบื้องต้นด้วยการใส่เชื้อ LAB ผลการหมักไซเลจเป็นเวลา 21 วัน พบว่าทั้งชุดควบคุม และชุดการทดลองใส่ LAB มีการลดลงของค่า พีเอชจากประมาณ 5 เป็น 4.2 ภายใน 5 วัน จากนั้น มีค่าคงที่ ดังแสดงในรูปที่ 1 อย่างไรก็ตามปริมาณ กรดแลกติกที่ผลิตขึ้นในชุดใส่ LAB มีการ เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในช่วง 1.9-2.3% ของน้ำหนัก แห้ง หลังการหมัก 7 วัน ถึงสิ้นสุดการทดลองที่ 21 วัน ขณะที่ชุดควบคุมมีการลดลงของกรดแลกติก เหลือเพียง 0.33% ของน้ำหนักแห้งในวันที่ 21 ทั้งสองการทดลองมีการผลิตกรดอะซีติก ปริมาณ 2.3-2.5% ของน้ำหนักแห้งในวันที่ 21 อย่างไรก็ตาม ไม่พบการผลิตกรดโพรพิโอนิก และบิวทิริกใน ระหว่างการหมัก



รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงของพีเอช และปริมาณกรดระหว่างการหมักไซเลจ ในสภาวะที่ไม่ใส่เชื้อ LAB, - - - - - และในสภาวะใส่ LAB, — — — พีเอช, ● กรดแลกติก, ▼ ; กรดอะซิติก, ■ ; กรดไพโรฟิโอนิก, ◆ ; กรดบิวทีริก ●

เมื่อศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าในการใส่ LAB ส่งผลให้ปริมาณเชื้อ LAB เข้าร่วมในกระบวนการหมักสูงกว่าชุดควบคุมถึง $10 - 10^2$ โคโลนีต่อกรัมไซเลจ อย่างไรก็ตามปริมาณเชื้อยีสต์

ที่พบจากทั้งสองการทดลอง มีในระดับใกล้เคียงกัน $10^4 - 10^5$ โคโลนีต่อกรัมไซเลจ และพบการเจริญของเชื้อโคลิฟอร์ม และคลอสตริเดียมที่ระดับความเข้มข้น < 10 โคโลนีต่อกรัมไซเลจ

ตารางที่ 2 ปริมาณจุลินทรีย์ระหว่างการหมักไซเลจจากกากเบียร์ ในสภาวะใส่ และไม่ใส่สารเร่งทางชีวภาพ LAB (แบคทีเรียกรดแลกติก)

สภาวะการหมัก	ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (โคโลนีต่อ 1 กรัมไซเลจแห้ง)			
	LAB	ยีสต์และรา	โคลิฟอร์ม	คลอสตริเดียม
ไซเลจชุดควบคุม				
0 วัน	5.04×10^5	5.63×10^5	< 10	< 10
1 วัน	2.98×10^6	4.32×10^5	< 10	< 10
3 วัน	4.07×10^6	3.11×10^5	< 10	< 10
7 วัน	5.28×10^6	4.5×10^5	< 10	< 10
14 วัน	1.33×10^6	3.67×10^4	< 10	< 10
21 วัน	5.82×10^6	1.83×10^4	< 10	< 10
ไซเลจใส่สารเสริมชีวภาพ				
0 วัน	3.87×10^7	4.24×10^5	< 10	< 10
1 วัน	5.22×10^7	4.11×10^5	< 10	< 10
3 วัน	5.2×10^8	7×10^5	< 10	< 10
7 วัน	8.95×10^8	5×10^5	< 10	< 10
14 วัน	1.82×10^8	2.5×10^4	< 10	< 10
21 วัน	2.97×10^7	2.17×10^4	< 10	< 10

เห็นได้ว่าการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติก สามารถรักษาระดับการหมัก และส่งผลต่อระดับกรดแลกติกที่ผลิตขึ้นในช่วง ประมาณ 2% ของน้ำหนักแห้ง อย่างไรก็ตามกรดอะซิติกมีปริมาณมากขึ้นหลังจากการหมัก 14 วัน

2. การศึกษาคูณสมบัติทางฟิสิกส์ เคมี และจุลินทรีย์ของการหมักไซเลจในภาคสนาม

ได้ทำการศึกษการเปลี่ยนแปลงทางฟิสิกส์ เคมี และจุลินทรีย์ ของกากเบียร์ที่เก็บรักษาโดยวิธีการตากแห้งที่ระดับความชื้น ประมาณ 16- 17% โดยน้ำหนัก และในลักษณะการหมักไซเลจสภาวะใส่ และไม่ใส่เชื้อ LAB (ชุดควบคุม) โดยทำการหมักไซเลจในภาคสนามขนาด 50 กิโลกรัม พิเศษจากการเก็บรักษาแบบไซเลจ ทั้ง 2 สภาวะ มีค่าค่อนข้างคงที่เป็น 4.2 ตลอดระยะเวลาหมัก 13 สัปดาห์ หรือประมาณ 3 เดือน ขณะที่การเก็บรักษาแบบแห้งมีค่าพีเอชสูง

ในช่วง 5.7 - 6.5 และไม่พบการผลิตกรดอินทรีย์ เมื่อศึกษาการผลิตกรดจากไซเลจทั้ง 2 สภาวะ พบว่าไซเลจจากสภาวะการใช้ LAB มีปริมาณกรดแลกติกสูงสุดหลังการหมัก 2 สัปดาห์เป็น 2.1% ของน้ำหนักแห้ง ขณะที่ตรวจไม่พบการผลิตกรดแลกติกในชุดควบคุม หลังการหมัก 2 สัปดาห์ปริมาณกรดแลกติกลดลงอย่างรวดเร็ว และไม่พบหลังการหมัก 1 เดือน จากการหมักไซเลจทั้งสองสภาวะ พบว่าปริมาณกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นหลังการหมัก 2 สัปดาห์ โดยมีปริมาณ 3.6 - 4.8 % และ 1.2-3.7% ของน้ำหนักแห้ง จากชุดควบคุม และชุดใส่ LAB ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบกรดโพรพิโอนิก ต่ำกว่า 2% ของน้ำหนักแห้ง อย่างไรก็ตามได้ตรวจพบกรดบิวทิริกจากชุดควบคุม ปริมาณ 1.1 - 4.5% ของน้ำหนักแห้ง ขณะที่ไซเลจใส่ LAB ไม่พบการผลิตกรดบิวทิริก การใช้สารเร่งทางชีวภาพ LAB สามารถควบคุมการผลิตกรดบิวทิริกอย่างเห็นได้ชัด

เมื่อศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมัก ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าไซเลจสภาวะใส่เชื้อ LAB ส่งผลให้ปริมาณ LAB สูงกว่าชุดควบคุมประมาณ $10 - 10^2$ โคโลนีต่อกรัมไซเลจ แต่ไม่สามารถตรวจพบทั้งโคลิฟอร์ม และคลอสตริเดียม ที่ระดับความเข้มข้น <10 โคโลนีต่อกรัมไซเลจ ในสภาวะการหมักทั้งสองไม่สามารถตรวจพบยีสต์ที่ระดับความเข้มข้น < 10 โคโลนีต่อกรัมไซเลจเช่นกัน สำหรับกากเปียกแห้งมียีสต์ และเชื้อโคลิฟอร์มในปริมาณสูงถึง $10^4 - 10^7$ โคโลนีต่อกรัมไซเลจ

ผลจากการทดสอบการหมักกากเปียกในภาคสนาม เห็นได้ว่าการใช้เชื้อ LAB เป็นสารเร่งทางชีวภาพสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักในช่วง 2 สัปดาห์แรก จากนั้นปริมาณกรดแลกติกลดลงอย่างเห็นได้ชัด อย่างไรก็ตามผลผลิตที่ได้ไม่พบการผลิตกรดบิวทริก ซึ่งเป็นปัญหาค่อกลิ่นของไซเลจที่ได้ ซึ่งสามารถส่งผลต่อการกินได้ของสัตว์ทดลอง

เป็นที่น่าสังเกตว่า การหมักไซเลจแบบใส่เชื้อ LAB ในระดับห้องปฏิบัติการ มีปริมาณกรดแลกติกลดลงเพียงเล็กน้อยที่ประมาณ 2% หลังการหมัก 3 สัปดาห์ ขณะที่เมื่อทำการหมักในภาคสนามด้วยตารางที่ 3 ปริมาณจุลินทรีย์ LAB และโคลิฟอร์มใส่ และไม่ใส่สารเสริมชีวภาพ LAB

ปริมาณ 50 กิโลกรัม พบการลดลงของกรดแลกติกเป็น 0 หลังการหมักเพียง 2 สัปดาห์ สิ่งที่แตกต่างอย่างเห็นได้ชัด คือถุงพลาสติกที่ใช้ คือ ถุงในลอนผสม และถุงดำโพลีเอทิลีน ในกรณีการหมักในห้องปฏิบัติการ และภาคสนาม ซึ่งมีค่าการซึมผ่านของออกซิเจนเป็น 146 และ 1,536 มิลลิลิตรต่อตารางเมตรต่อวันตามลำดับ เห็นได้ว่าถุงในลอนผสมสามารถป้องกันการซึมผ่านของอากาศได้สูงกว่าถุงโพลีเอทิลีน ถึงประมาณ 10 เท่า ดังนั้นเป็นไปได้ว่าระหว่างการหมักในภาคสนาม ปริมาณออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นหลัง 2 สัปดาห์แรก ส่งผลต่อกระบวนการหมักโดยยีสต์ ซึ่งสามารถใช้กรดแลกติกเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก (Weinberg et al., 1993; Kimoto et al., 1997) นอกจากนั้นยังพบว่า ในสภาวะที่ขาดแหล่งคาร์บอน เชื้อ LAB สามารถใช้กรดแลกติกเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ในกระบวนการเมแทบอลิซึมทำให้เกิดกรดอะซีติก กรดฟอร์มิก กรดซักซินิก และคาร์บอนไดออกไซด์ได้ (Woolford and Pahlow, 1998) ดังนั้นการพิจารณาชนิดของถุงที่ใช้ และปริมาณของแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมัก จึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่ต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

ระหว่างการหมักไซเลจจากกากเปียก ในสภาวะแห้ง

เวลาในการหมัก (สัปดาห์)	ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (โคโลนีต่อ 1 กรัมไซเลจแห้ง)			
	LAB จากไซเลจ ชุดควบคุม	LAB จากไซเลจ ใส่สารเสริมชีวภาพ	LAB จากกากเปียกแห้ง	โคลิฟอร์ม จากกากเปียกแห้ง
0	5.04×10^5	3.87×10^7	-	-
2	2.43×10^7	4.7×10^8	2.83×10^4	1.46×10^7
3	1.67×10^7	1.43×10^8	2.59×10^4	3.5×10^7
4	2.68×10^5	7.33×10^7	4.18×10^3	6.78×10^7
5	5.5×10^5	1.65×10^7	4.0×10^3	5.5×10^7
6	2.75×10^5	2.3×10^7	1.43×10^3	3.18×10^7
7	4.8×10^5	1.88×10^7	1.33×10^3	4.0×10^7
8	8.05×10^5	2.04×10^7	3.5×10^3	2.4×10^7
9	7.88×10^5	1.93×10^7	1.43×10^3	1.68×10^7
10	7.68×10^5	5.65×10^7	1.45×10^3	1.42×10^7
11	1.4×10^5	8.96×10^7	1.35×10^3	1.17×10^7
12	2.27×10^5	6.7×10^7	6.5×10^3	1.07×10^7
13	2.02×10^5	3.78×10^7	1.29×10^3	1.38×10^7

3. ผลของอาหารผสมเสร็จ 3 รูปแบบต่อคุณสมบัติทางโภชนะ

อาหารผสมเสร็จที่มีกากเบียร์แห้ง กากเบียร์หมัก และกากเบียร์ใส่สารเสริมทางชีวภาพ LAB มีผลต่อปริมาณการกินได้ และการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของโครีดนมทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4 แม่โครีดนมที่ได้รับอาหารผสมเสร็จที่มีกากเบียร์หมักใส่สารเสริมทางชีวภาพ LAB แสดงความสามารถในการกินอาหาร โปรตีนรวม เยื่อใยในรูปผนังเซลล์รวม และพลังงานสุทธิได้มากกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารผสมเสร็จที่มีกากเบียร์หมักและกากเบียร์แห้ง อย่างมี

นัยสำคัญ ($p<0.01$) Flynn (1988) พบว่ากระบวนการเก็บถนอมที่ก่อให้เกิดการสะสมของแอมโมเนียและกรดบิวทริก และการเพิ่มขึ้นของพีเอช มีผลทำให้คุณภาพไซเลจลดลง ในการทดลองนี้ไม่ได้วัดค่าความเข้มข้นของแอมโมเนีย แต่ตรวจพบกรดบิวทริกเฉพาะกากเบียร์ที่หมักโดยไม่ใส่เชื้อ LAB ซึ่งส่งผลทำให้แม่โครีดนมที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเสร็จที่มีกากเบียร์หมักไม่เสริม LAB มีความสามารถกินอาหารได้น้อยกว่า แม่โครีดนมที่ได้รับอาหารผสมเสร็จที่มีกากเบียร์หมักเสริมด้วย LAB

ตารางที่ 4 ปริมาณการกินอาหารและการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของโคทดลอง

รายการ	อาหารผสมเสร็จที่มีกากเบียร์ในรูป			
	แห้ง	หมัก	หมักใส่สารเสริม	S.E.
ปริมาณการกินโภชนะ ต่อวัน				
วัตถุดิบแห้ง (กก.)	12.47 ⁿ	12.69 ⁿ	13.53 ^u	0.04
โปรตีนรวม (กก.)	1.99 ⁿ	2.03 ⁿ	2.16 ^u	<0.01
เยื่อใยรูปผนังเซลล์รวม (กก.)	4.37 ⁿ	4.45 ⁿ	4.74 ^u	<0.01
พลังงานสุทธิ (เมกะแคลอรี)	18.95 ⁿ	19.29 ⁿ	20.57 ^u	0.09
น้ำหนักเริ่มต้นการทดลอง (กก.)	411	407	410	54.1
น้ำหนักสิ้นสุดการทดลอง (กก.)	408	416	420	28.4
การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว (กก.ต่อวัน)	-0.089 ¹	0.321 ²	0.357 ²	0.15

1, 2, และก, ข ตัวเลข และอักษรยกกำลังที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ $p<0.05$ และ $p<0.01$ ตามลำดับ

นอกจากนั้นยังพบว่าแม่โครีดนมที่ได้รับอาหารผสมเสร็จที่มีการหมักมีแนวโน้มกินอาหารและโภชนะต่างๆ ได้มากกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารผสมเสร็จที่มีกากเบียร์แห้ง ($P>0.05$) ส่งผลให้แม่โครีดนมที่ได้รับอาหารผสมเสร็จที่มีกากเบียร์หมัก และกากเบียร์หมักใส่สารเสริมทางชีวภาพ LAB แสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น แตกต่างจากน้ำหนักตัวของกลุ่มที่ได้รับกากเบียร์แห้งอย่างมีนัยสำคัญ

($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4 ในกระบวนการทำกากเบียร์แห้ง โดยการผึ่งให้แห้งด้วยแสงอาทิตย์ พบเชื้อโคลิฟอร์มในปริมาณสูงดังแสดงในตารางที่ 3 ส่งผลต่อกลิ่นรสของอาหาร ซึ่งอาจเป็นปัจจัยหลักปัจจัยหนึ่งที่ทำให้แม่โครีดนมที่ได้รับอาหารผสมเสร็จที่มีกากเบียร์แห้ง กินอาหารได้น้อยกว่ากลุ่มที่กินไซเลจเสริม LAB

4. ผลของอาหารผสมเสร็จ 3 รูปแบบต่อคุณสมบัติของน้ำนม

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่าอาหารผสมเสร็จที่มีกากเบียร์แห้ง กากเบียร์หมัก และกากเบียร์หมักใส่สารเสริมทางชีวภาพมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ และองค์ประกอบนมของแม่โครีดนมทดลอง โดยแม่โครีดนมที่ได้รับอาหารผสมเสร็จที่มีกากเบียร์หมัก และกากเบียร์หมักใส่สารเสริมทางชีวภาพ LAB มีผลผลิตนมและไขมันนม ตลอดจนส่วนประกอบของไขมัน และเนื้อมรวมสูงกว่าแม่โครีดนมที่ได้รับอาหารผสมเสร็จที่มีกากเบียร์แห้ง นอกจากนั้นยังพบว่ากากเบียร์หมักใส่สารเสริม LAB มีความเข้มข้นของเนื้อมรวม สูงกว่าอาหารผสมเสร็จที่มีกากเบียร์แห้ง และกากเบียร์หมักอย่างมีนัย

สำคัญอีกด้วย ศักยภาพการผลิตของโคนมที่เลี้ยงในภูมิอากาศร้อนชื้น ถูกจำกัดโดยปริมาณการกินได้ (Fuquay, 1981) การกินอาหารที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้การสังเคราะห์เซลล์จุลินทรีย์ในกระเพาะหมักเพิ่มขึ้น (Chen et al., 1992) ซึ่งส่งผลให้มีโภชนะเพื่อกระบวนการกลั่นสร้างน้ำนมเพิ่มขึ้น แม่โครีดนมที่ได้รับกากเบียร์หมักเสริมด้วย LAB จึงให้ปริมาณและองค์ประกอบน้ำนมสูงกว่าแม่โครีดนมที่เหลืออีกสองกลุ่ม ถึงแม้ปริมาณการกินอาหารของแม่โครีดนมที่ได้รับกากเบียร์แห้งไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับกากเบียร์หมักที่ไม่เสริม LAB แต่ในกากเบียร์แห้งมีจำนวนโคลิฟอร์มสูงมาก ซึ่งน่าจะมีผลในเชิงลบต่อกระบวนการกลั่นสร้างน้ำนม และควรมีการศึกษารายละเอียดต่อไป

ตารางที่ 5 ปริมาณและองค์ประกอบนมของแม่โครีดนมที่ได้รับอาหารผสมเสร็จที่มีกากเบียร์ในรูปแบบต่างๆ

รายการ	อาหารผสมเสร็จที่มีกากเบียร์ในรูปแบบ			
	แห้ง	หมัก	หมักใส่สารเสริม	S.E.
ปริมาณนม (กก./วัน)	12.69 ¹	13.67 ²	13.91 ²	0.54
ปริมาณนมเมื่อปรับไขมันนม 4% (กก./วัน)	11.64 ¹	13.05 ²	13.83 ²	0.84
ไขมันนม (%)	3.45 ¹	3.70 ²	3.96 ²	0.08
ไขมันนม (กก./วัน)	0.44 ¹	0.51 ²	0.55 ²	0.02
โปรตีนนม (%)	3.44	3.49	3.51	0.07
โปรตีนนม (กก./วัน)	0.44	0.48	0.49	0.01
น้ำตาลนม (%)	4.60	4.65	4.64	0.01
น้ำตาลนม (กก./วัน)	0.59	0.64	0.65	0.01
เนื้อมไม่รวมไขมันนม (%)	8.74	8.84	8.85	0.02
เนื้อมไม่รวมไขมันนม (กก./วัน)	1.11	1.21	1.23	0.01
เนื้อมรวม (%)	12.19 ¹	12.54 ²	12.81 ³	0.06
เนื้อมรวม (กก./วัน)	1.55	1.71	1.78	0.01

^{1, 2, 3} ตัวเลขยกกำลังที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ p<0.05

สรุปผลการทดลอง

การใช้สารเสริมทางชีวภาพ ในลักษณะเชื้อ LAB จำเพาะสายพันธุ์ KUB-ST10-1 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการหมัก และคุณภาพของไซเลจ อย่างไรก็ตามเมื่อหมักเป็นเวลามากกว่า 2 สัปดาห์ ในภาคสนาม ส่งผลให้ปริมาณกรดแลกติกลดลง พร้อมการเพิ่มขึ้นของกรดอะซิติก แต่ไม่พบว่าการผลิตกรดบิวทิริก แสดงให้เห็นว่าในระหว่างการหมัก เกิดการเจือปนของออกซิเจน ส่งผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ ทำให้มีการผลิตกรดอะซิติกสูงขึ้น อย่างไรก็ตามระดับพีเอชต่ำที่ 4.2 สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อจำพวกโคลิฟอร์ม และคลอสตริเดียมอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปรียบเทียบกับ การเก็บรักษาในลักษณะแห้ง ในการศึกษาทางโภชนาการในสัตว์ เห็นได้ว่าการกินได้ของสัตว์และการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักโคต่อวัน ต่อไซเลจที่ใส่สารเสริมทางชีวภาพสูงกว่าชุดควบคุม

ในการเปรียบเทียบการเก็บรักษาในรูปของแห้ง และการหมักไซเลจ เห็นได้ว่าการเก็บในลักษณะไซเลจ ส่งผลดีต่อการเพิ่มขึ้นของอัตราการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักโค ปริมาณไขมันนม ปริมาณน้ำนม และความเข้มข้นเนื้อมรวม การเก็บถนอมกากเบียร์ในรูปการหมักที่เสริมด้วย LAB ในระยะเวลา 13 สัปดาห์ มีผลต่อศักยภาพการผลิตของโคนมดีกว่า การเก็บถนอมกากเบียร์ในรูปหมักที่ไม่เสริมด้วย LAB และในรูปแห้ง

เอกสารอ้างอิง

- จิระชัย กาญจนพถุพิพงศ์ (2543). การประยุกต์ใช้มันสำปะหลังเป็นอาหารโค. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์เฟื่องฟ้าพรินต์ติ้งจำกัด.
- Chen, X.B., Chen, Y.K., Franklin, M.F., Orskov, E.R. and Shad, W.J. (1992). The effect of feed intake and weight on purine derivative extraction and microbial protein supply. J. Anim. Sci. 70:1534-1542.
- Flynn, A-V. (1988). Factors affecting the feeding value of silage. In: Haresign, W. and Cole, D.J.A. (eds.). Recent Developments in Ruminant Nutrition 2. Butterworths, London. p.265-273.
- Fuquay, J.W. (1981). Heat stress as it affects animal production. J. Anim. Sci. 52:164-174.
- Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R. and Phillips, G.B. (1981). Manual of Methods for General Bacteriology. Washington: American Society for Microbiology.
- Helrich, K. (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. 5th ed. Virginia: Association of Official Analytical Chemist, Inc.
- Kimoto, H.K., Ohmomo, S., Hasebe, A. and Limura, Y. (1997). Prevention of aerobic deterioration of silage by recombinant killer *Kluyvermyces* strain. In: 8th European Congress on Biotechnology. 70th Event of the European Federation of Biotechnology. Budapest, 17-21 August 1997. The Hungarian Bioengineering of the Hungarian Academy of Science. MO 6305.
- Muck, R.E. (1991). Silage fermentation. In: Zeikus, G. and Johnson, E.A. (eds.). Mixed Cultures in Biotechnology. New York: McGraw-Hill, Inc. p.171 - 204.
- Nitisinprasert, S., Buajum, T., Saelao, S., Tabtong, T., Chatthong, R. and Jareerat, A. (2000). Screening of lactic acid bacteria local strains as biocatalysts for silage fermentation. The Journal of Science Khon Kaen University. 28:31-43.

van Soest, P.J. (1969). Newer knowledge on the composition and methods of analysis of feeding stuffs. *International Encyclopedia of Food and Nutrition*. 10:37-58.

Weinberg, Z.G., Ashbell, G. , Hen, Y. and Azrieli, A. (1993). The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silage. *J. Appl. Bacteriol.* 75:512-518.

Woolford, M.K. and Pahlow, G. (1998). The silage fermentation. In: Wood, B.J.B (ed.). *Microbiology of Fermented Foods*. Blackie Academic & Professional. p.70-102.



กายวิภาคเปรียบเทียบผิวใบของพืชวงศ์ผักบุ้งบางชนิด

ปิยะพร แสนสุข¹, สุรพล แสนสุข² และสิริวรรณ สิริหาล³

บทคัดย่อ

จากการศึกษากายวิภาคศาสตร์เนื้อเยื่อชั้นผิวของใบของพืชในวงศ์ผักบุ้งจำนวน 12 ชนิด ซึ่งได้แก่ *Argyreia capitiformis* (Poir.) Ooststr., *Evolvulus nummularius* (L.) L., *Ipomoea batatas* (L.) Lam., *I. cairica* (L.) Sweet, *I. nil* (L.) Roth, *I. obscura* (L.) Ker-Gawl., *I. cf. pes-tigridis* L., *I. pileata* Roxb., *I. triloba* L., *Merremia hederacea* (Burm.f.) Hall.f., *M. hirta* (L.) Merr. และ *M. umbellata* (L.) Hall.f. โดยการลอกผิวใบทั้งด้านบนและด้านล่าง พบว่าลักษณะที่สามารถนำมาใช้ระบุชนิดพืชที่ศึกษาได้คือ รูปร่างของผนังเซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิว ลักษณะของไทรโคม และผลึก

Abstract

A comparative study of leaf epidermis in 12 species of Convolvulaceae including *Argyreia capitiformis* (Poir.) Ooststr., *Evolvulus nummularius* (L.) L., *Ipomoea batatas* (L.) Lam., *I. cairica* (L.) Sweet, *I. nil* (L.) Roth, *I. obscura* (L.) Ker-Gawl., *I. cf. pes-tigridis* L., *I. pileata* Roxb., *I. triloba* L., *Merremia hederacea* (Burm.f.) Hall.f., *M. hirta* (L.) Merr. and *M. umbellata* (L.) Hall.f. by the peeling method. Epidermal cell shape, trichome and crystal are useful for identification of the studied species.

บทนำ

เมื่อก้าวถึงพืชวงศ์ผักบุ้ง (Convolvulaceae) คนไทยส่วนใหญ่จะนึกถึงผักบุ้งที่นิยมนำมาประกอบอาหาร เนื่องจากเป็นผักที่หาง่าย ราคาถูก และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ปัจจุบันในประเทศไทยมีการสำรวจพบพืชวงศ์ผักบุ้งจำนวนมาก และสามารถจำแนกเป็นสกุลต่าง ๆ ได้หลายสกุลด้วยกัน เช่น สกุล *Calystegia*, *Convolvulus*, *Cuscuta*, *Dichondra*, *Evolvulus* และ *Ipomoea* เป็นต้น ซึ่งโดยส่วนมากเป็นการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน เช่น รูปร่างและโครงสร้างของพืช แต่บางครั้งลักษณะทาง

สัณฐานอย่างเดียวยากที่จะใช้ในการแยกพืชบางชนิดออกจากกันอย่างชัดเจน จึงจำเป็นต้องนำลักษณะโครงสร้างภายในของพืชมาช่วยในการพิจารณาจัดจำแนกพืชด้วย บุญญรัตน์ กมลรัตน์ (2522) ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางกายวิภาคของผักบุ้งทะเล (*Ipomoea pes-caprae* Sweet) และผักบุ้งจีน (*I. asarifolia* R. et. Schult) โดยศึกษาจากผักบุ้งทะเลที่อยู่บริเวณชายหาดแสนสุข ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี และผักบุ้งจีนซึ่งขึ้นอยู่ที่ทุ่งนาตรงข้ามที่ว่าการปากท่อ อำเภอปากท่อ จังหวัดราชบุรี พบว่าลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของผักบุ้งทะเลและผักบุ้งจีนมี

^{1,3} ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ต.ขามเรียง อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม 44150

² สาขาวิชาพื้นฐาน วิทยาเขตหนองคาย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ต.หนองกอมเกาะ อ.เมือง จ.หนองคาย 43000

โครงสร้างภายในใบที่แตกต่างกัน เซลล์ของไส้ไม้ในลำต้นและก้านใบของผักบุ้งชันมีการสลายตัวไปเมื่อลำต้นและก้านใบเจริญเต็มที่และรากของผักบุ้งชันในการเจริญระยะที่สองมี เซลล์เส้นใยในไซเล็มมากกว่าผักบุ้งทะเล จำลอง บุญศิริ (2523) ศึกษาปากใบของพืชน้ำบางชนิด พบว่าผิวใบทั้งสองด้านของผักบุ้งมีปากใบชนิดพาราไซติก (paracytic) ผิวใบด้านบนมีจำนวนปากใบต่อหน่วยพื้นที่มากกว่าผิวใบด้านล่างใบอ่อน และใบแก่ มีค่าดัชนีปากใบไม่แตกต่างกัน ส่วนในผักบุ้งผิวใบด้านบนมีค่าดัชนีปากใบน้อยกว่าผิวใบด้านล่าง เทียมใจ คมกฤต (2542) รายงานว่าปากใบของพืชวงศ์ผักบุ้งเป็นแบบพาราไซติก Metcalfe and Chalk (1950) ศึกษากายวิภาคของใบผักบุ้งพบปากใบที่ผิวใบทั้งด้านบนและด้านล่าง ที่ใบมีขนพบทั้งที่เป็นขนต่อมและขนธรรมดา พบผลิกรูปเข็มทั้งที่อยู่เดี่ยว ๆ และอยู่เป็นกลุ่ม และบางครั้งพบผลิกรูปเข็มในชั้นมีโซฟิลล์ ในสกุล *Bonamia*, *Calastegia*, *Ipomoea* และ *Lepistemon* สำหรับในประเทศไทย การศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของพืชวงศ์ผักบุ้งยังมีน้อยมาก และยังไม่เคยนำลักษณะทางกายวิภาคของพืชวงศ์ผักบุ้งมาใช้ในการจำแนกพืช ผู้วิจัยจึงมุ่งศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของผิวใบในพืชวงศ์ผักบุ้งจำนวน 12 ชนิด ในจังหวัดมหาสารคามเพื่อจะได้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางกายวิภาคของผิวใบพืชวงศ์ผักบุ้งและเป็นข้อมูลพื้นฐานทางอนุกรมวิธานต่อไป

วิธีการทดลอง

เก็บตัวอย่างพืชวงศ์ผักบุ้งในเขตจังหวัดมหาสารคาม นำไปดองใน FAA 70% จากนั้นลอกเนื้อเยื่อผิวใบทั้งด้านบนและด้านล่าง โดยใช้ใบมีดโกน ขูดผิวใบทั้งด้านบนและด้านล่าง แล้วใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10% หยอดลงบริเวณที่ขูด หยอดคลอรีน 10% อีกครั้ง นำแผ่นใบที่ขูดจนกระทั่งบางไปล้างในน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที นำไปย้อมด้วยสี ซาฟรานิน 1% ในน้ำเป็นเวลา 10-15 นาที แล้วดึงน้ำออกโดยแช่

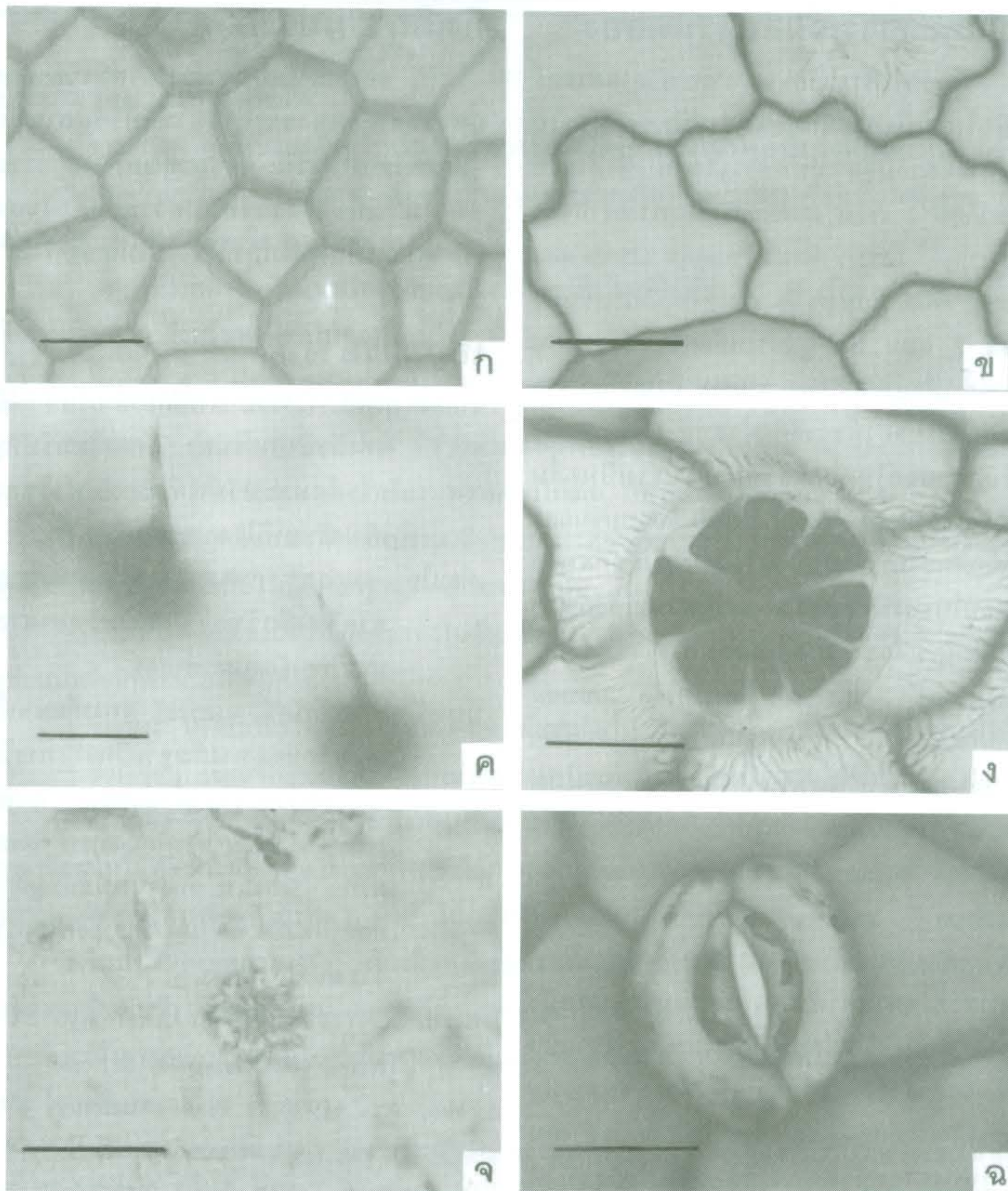
ในเอทานอล 15, 30, 50, 70, 95, และ 100% ตามลำดับ นานขึ้นตอนละ 15-20 นาที แช่ในเอทานอล 100% ผสมกับไซลีนบริสุทธิ์ในอัตราส่วน 1:1 และแช่ในไซลีนบริสุทธิ์ อีกครั้งนาน 15-20 นาที ตามลำดับ นำชิ้นตัวอย่างไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแล้วพ่นกสไลด์ด้วยสารพ่นกสไลด์ (DPX) เพื่อนำไปศึกษาเนื้อเยื่อชั้นผิว

ผลการทดลอง

จากการศึกษาเนื้อเยื่อชั้นผิวโดยวิธีการลอกผิวใบทั้งด้านบนและด้านล่างของพืชวงศ์ผักบุ้ง จำนวน 12 ชนิด พบว่าเนื้อเยื่อชั้นผิวมีรูปร่างไม่แน่นอน บางชนิดมีรูปร่างหลายเหลี่ยม โดยส่วนมากผนังเซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวมีรูปร่างหยักและมีบางส่วนที่ผนังเซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวเรียบหรืออาจโค้งเล็กน้อย ชนิดที่มีผนังเซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวหยักได้แก่ *Evolvulus nummularius* (L.) L., *Ipomoea batatas* (L.) Lam., *I. nil* (L.) Roth, *I. obscura* (L.) Ker-Gawl., *I. triloba* L., *Merremia hederacea* (Burm.f.) Hall.f. และ *M. hirta* (L.) Merr. ชนิดที่มีผนังเซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวเรียบได้แก่ *Argyrea capitiformis* (Poir.) Ooststr., *I. pileata* Roxb. และ *M. umbellata* (L.) Hall.f. นอกจากนี้ *I. cairica* (L.) Sweet และ *I. cf. pes-tigridis* L. อาจมีผนังเซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวเรียบหรือหยักพบไทรโคม 2 แบบ คือไทรโคมแบบขนและแบบต่อม ไทรโคมแบบขนมีเพียงเซลล์เดียว ปลายแหลม พืชที่มีไทรโคมแบบขน ได้แก่ *A. capitiformis*, *I. batatas*, *I. cf. pes-tigridis*, *I. nil*, *I. pileata*, *I. triloba*, *M. hirta* และ *M. umbellata* ส่วนไทรโคมแบบต่อมที่พบประกอบด้วยหลายเซลล์ และทุกชนิดมีไทรโคมแบบต่อมยกเว้น *E. nummularius* และจากการศึกษาพบว่าปากใบของพืชวงศ์ผักบุ้งที่นำมาศึกษาทั้ง 12 ชนิดเป็นแบบพาราไซติก นอกจากนี้ยังพบผลิกรูปดาวที่บริเวณผิวใบด้านล่างของ *I. triloba* แต่ไม่พบผลิกในพืชชนิดอื่นในที่นำมาศึกษา (ตารางที่ 1 และรูปที่ 1)

ตารางที่ 1 สรุปผลการศึกษากายวิภาคศาสตร์ของพืชวงศ์ผักบุ้ง (C = ผลึก, CW = ผนังเซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิว, G = ต่อม, H = ขน, + = มี, - = ไม่มี)

ชื่อวิทยาศาสตร์	ผิวใบด้านบน				ผิวใบด้านล่าง			
	CW	H	G	C	CW	H	G	C
<i>Argyreia capitiformis</i>	เรียบ	+	+	-	เรียบ	+	-	-
<i>Evolvulus nummularius</i>	หยัก	-	-	-	หยัก	+	+	-
<i>Ipomoea batatas</i>	หยัก	+	+	-	หยัก	-	+	-
<i>I. cairica</i>	เรียบ	-	+	-	หยัก	-	+	-
<i>I. cf. pes-tigridis</i>	เรียบ	+	+	-	หยัก	+	+	-
<i>I. nil</i>	หยัก	+	+	-	หยัก	+	+	-
<i>I. obscura</i>	หยัก	-	+	-	หยัก	-	+	-
<i>I. pileata</i>	เรียบ	-	-	-	เรียบ	+	-	-
<i>I. triloba</i>	หยัก	-	+	-	หยัก	-	+	+
<i>Merremia hederacea</i>	หยัก	-	+	-	หยัก	-	+	-
<i>M. hirta</i>	หยัก	+	+	-	หยัก	-	+	-
<i>M. umbellata</i>	เรียบ	+	+	-	เรียบ	+	+	-



รูปที่ 1 ลักษณะเนื้อเยื่อชั้นผิวของพืชวงศ์ผักบุ้งที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

- ก.ผนังเซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวรูปร่างเรียบจากผิวใบด้านบนของ *Argyreia capitiiformis* (สเกล 50 ไมโครเมตร)
 ข.ผนังเซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวรูปร่างหยักจากผิวใบด้านล่างของ *Merremia hederacea* (สเกล 20 ไมโครเมตร)
 ค.ไตรโคมแบบขนจากผิวใบด้านบนของ *I. triloba* (สเกล 50 ไมโครเมตร)
 ง.ไตรโคมแบบต่อมจากผิวใบด้านบนของ *I. cairica* (สเกล 20 ไมโครเมตร)
 จ.ผลิกรูปดาวจากผิวใบด้านล่างของ *I. triloba* (สเกล 20 ไมโครเมตร)
 ฉ.ลักษณะปากใบแบบพาราไซติกจากผิวใบด้านบนของ *M. umbellata* (สเกล 20 ไมโครเมตร)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของผิวใบในพืชวงศ์ผักบุ้งพบว่าชนิดของปากใบเป็นแบบเดียวกันคือ แบบพาราไซติก ซึ่งมีเซลล์ข้างเซลล์คุม 2 เซลล์ สอดคล้องกับการรายงานของจำลอง บุญศิริ (2523) เทียมใจ คมกฤต (2542) และ Fahn (1990) ลักษณะของเซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวที่พบมี 2 แบบ คือ รูปร่างหยักและรูปร่างเรียบ ต่างจากการศึกษาของ Esau (1965) ที่รายงานว่าจากการลอกผิวใบของพืชวงศ์ผักบุ้งสกุล *Convolvulus* พบว่าผนังเซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวมีรูปร่างเป็นคลื่น ไทรโคมของพืชวงศ์ผักบุ้งมี 2 แบบ คือแบบขนและแบบต่อม พบไทรโคมแบบขนในแผ่นใบ เส้นกลางใบและขอบใบของพืชบางชนิด ขนเป็นแบบเซลล์เดี่ยวเรียงเป็นแถวเดี่ยว สอดคล้องกับการรายงานของ Metcalfe and Chalk (1950) ที่พบไทรโคมแบบขนและแบบต่อม จากการศึกษครั้งนี้พบผลึกรูปดาวที่ผิวใบด้านล่างของ *I. triloba* ต่างจากรายงานของ Metcalfe and Chalk (1950) ที่พบผลึกรูปเข็มในเซลล์มีโซฟิลล์ของพืชสกุล *Bonamia*, *Calastegia*, *Ipomoea* และ *Lepistemon*

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการรายงานผลทางกายวิภาคศาสตร์ผิวใบเป็นครั้งแรกในผักบุ้งบางชนิด เพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีความสมบูรณ์มากขึ้น ควรจะศึกษาด้วยกรรมวิธีพาราฟินด้วย เพราะพืชแต่ละชนิดอาจมีลักษณะภายในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน และเป็นประโยชน์ต่อการจำแนกชนิดพืชกลุ่มนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ใช้สถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณอาจารย์ วรรณชัย ชำแท่น ที่ช่วยตรวจสอบความถูกต้องของชื่อวิทยาศาสตร์พืชวงศ์ผักบุ้งที่ใช้ในการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

- จำลอง บุญศิริ. (2523). การศึกษาปากใบ (stomata) ของพืชน้ำบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร.
- เทียมใจ คมกฤต. (2542). กายวิภาคของพฤษภควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- บุญญรัตน์ กมลรัตน์. (2522). การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา กายวิภาค และเซลล์วิทยาของผักบุ้งทะเล (*Ipomoea pescaprae* Sweet) และผักบุ้งจีน (*I. asarifolia* R. et. Schult). วิทยานิพนธ์ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร.
- Esau, K. (1965). Plant Anatomy. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons.
- Fahn, A. (1990). Plant Anatomy. 4th ed. New York: Pergamon Press.
- Metcalfe, C.R. and Chalk, L. (1950). Anatomy of the Dicotyledons. London: Oxford Pergamon Press.



ข้อแนะนำในการเขียนบทความลงวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ประเภทของเรื่องที่จะตีพิมพ์

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

รูปแบบของการเขียนและเตรียมต้นฉบับ

- 1. ต้นฉบับ ต้องเป็นตัวพิมพ์ปกติ มีช่วงห่างระหว่างบรรทัดตามมาตรฐาน พิมพ์ลงในกระดาษขาว A 4 (โรเนียวสัน) โดยใช้กระดาษหน้าเดียว ความยาวไม่เกิน 10 หน้า ส่งต้นฉบับ 2 ชุด
- 2. ต้นฉบับ จะถูกพิจารณาโดยกองบรรณาธิการ และจะตอบรับการได้รับบทความโดยไม่ส่งต้นฉบับคืน ผู้เขียนควรจะทำสำเนาเก็บไว้เป็นหลักฐานของตัวเอง 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
- 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 40002

อภิสิทธิ์สำหรับการตีพิมพ์

เรื่องที่ได้รับการตีพิมพ์ ผู้เขียนจะได้รับวารสารฉบับนั้น 2 เล่ม และสำเนาพิมพ์อีก 15 ชุด

การเขียนเอกสารอ้างอิงในวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

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

บรรณานุกรม (Bibliography) หมายถึง เอกสารที่ใช้อ้างอิงในลักษณะที่สรุปเป็นหลักการหรือทฤษฎีโดยมิได้อ้างอิงหรือแปลมาโดยตรง

การเขียนเอกสารอ้างอิง หรือบรรณานุกรม มีแนวทางการเขียนดังนี้

1. หนังสือ

ก. ภาษาไทย

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

ข. ภาษาอังกฤษ

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

2. เอกสารราชการ

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

3. วารสาร

ก. ภาษาไทย

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

ข. ภาษาอังกฤษ

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

หมายเหตุ

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

ใบส่งลงโฆษณา ในวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

เขียนที่.....

วันที่.....

เรียน บรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ข้าพเจ้า.....เป็นตัวแทนของ (บริษัท, ห้างร้าน,
องค์การ).....ที่อยู่.....

.....โทรศัพท์.....โทรสาร.....

มีความประสงค์จะลงโฆษณาในวารสารวิทยาศาสตร์ มข. ดังรายการต่อไปนี้

- | | | |
|---------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| ☐ ปกหลังด้านใน | ☐ เต็มหน้า | ☐ ครึ่งหน้า |
| ☐ ในฉบับ | ☐ เต็มหน้า | ☐ ครึ่งหน้า |

โดยข้าพเจ้าขอให้ลงโฆษณา จำนวน.....ฉบับ นับตั้งแต่ฉบับแรก ที่จะพิมพ์ใน
ครั้งต่อไปหลังจากที่ท่านได้รับหนังสือนี้แล้ว

พร้อมกับจดหมายฉบับนี้ ข้าพเจ้าได้ส่งต้นฉบับเพื่อลงโฆษณาและเงินค่าโฆษณา
จำนวน.....บาท (.....)

เป็น ☐ ธนาณัติ หรือ ☐ เช็คไปรษณีย์ ในนามของนางบุญคุ้ม เหลือล้น
ส่งจ่าย ป.ท. มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ลงนาม.....

ตำแหน่ง.....

อัตราค่าโฆษณาในวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

		ลง 1 ฉบับ	ลง 4 ฉบับ
ปกหลัง	ด้านในเต็มหน้า	1,000 บาท	3,600 บาท
	ด้านในครึ่งหน้า	500 บาท	1,800 บาท
ในฉบับ	เต็มหน้า	500 บาท	1,600 บาท
	ครึ่งหน้า	250 บาท	800 บาท

หมายเหตุ ถ้าทางวารสารฯ ไม่สามารถลงตีพิมพ์บนปกหลังได้ วารสารฯ จะตีพิมพ์ลงในฉบับแทน
ในวงเงินเท่ากัน



วัตถุประสงค์

1. เพื่อส่งเสริมและเผยแพร่วิทยาการในสาขาวิชาต่าง ๆ ทางด้านวิทยาศาสตร์
2. เพื่อเผยแพร่ผลงานด้านวิจัย และการศึกษา ค้นคว้าของอาจารย์และนักศึกษา
3. เพื่อเป็นสื่อกลางการแลกเปลี่ยนความรู้และแนวความคิดทางวิชาการ ระหว่างอาจารย์ นักศึกษาและผู้สนใจ ทั้งภายในและภายนอกสถาบัน

กำหนดออก

ปีละ 4 ฉบับ

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



ใบสมัครเป็นสมาชิก

"วารสารวิทยาศาสตร์ มข."

☐ สมาชิกใหม่☐ ต่ออายุ

ชื่อ-สกุล.....

ที่อยู่.....

รหัสไปรษณีย์.....หมายเลขสมาชิก.....

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

พร้อมนี้ได้ส่งเงินจำนวน.....บาท มาทาง

อัตราค่าบำรุง

- | | |
|--|----------------------|
| ☐ ธนาคัติสั่งจ่าย ป.ท.มข. | 1 ปี 4 เล่ม 75 บาท |
| ☐ เช็คไปรษณีย์ | 2 ปี 8 เล่ม 150 บาท |
| ☐ เงินสด | 3 ปี 12 เล่ม 200 บาท |

ลายเซ็นผู้สมัคร.....

- หมายเหตุ 1. ส่งเงินทางธนาคัติหรือเช็คไปรษณีย์ ในนามของ นางบุญคุ้ม เหลือล้น คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สั่งจ่าย ป.ท.มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002
2. กรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงที่อยู่ กรุณาแจ้งให้ทราบล่วงหน้า ไม่น้อยกว่า 1 เดือน ก่อนเดือนสุดท้ายของกำหนดวารสารออก เพื่อความสะดวกในการส่งวารสารให้ทุกท่าน

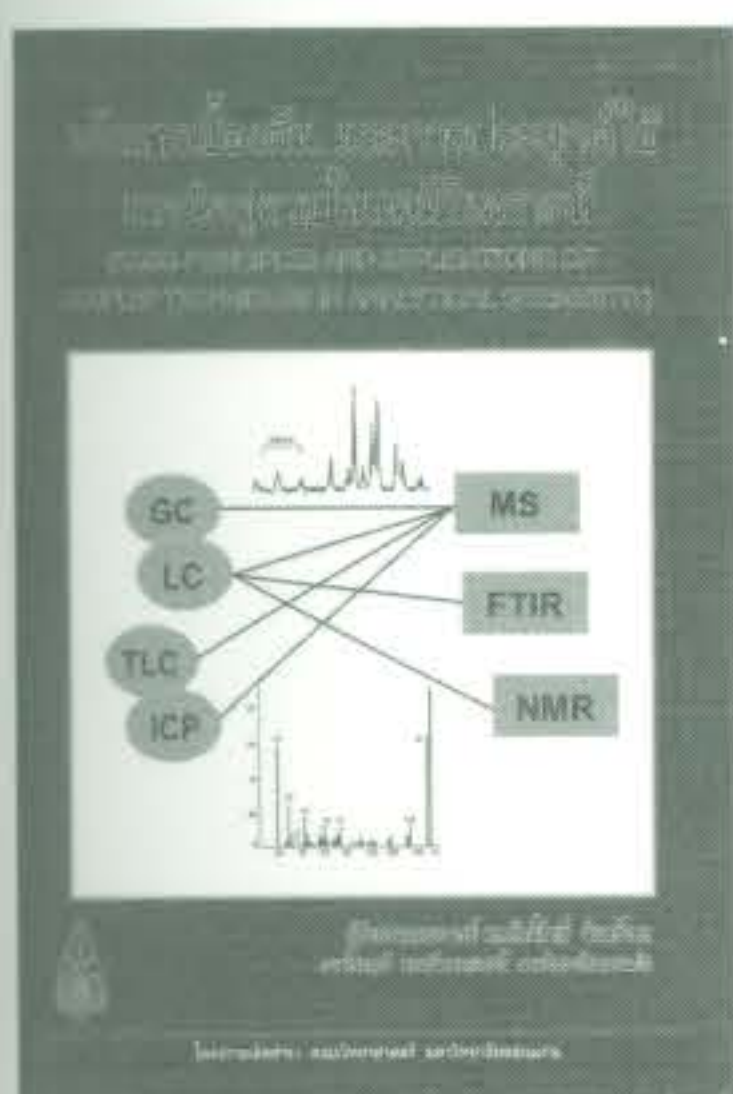
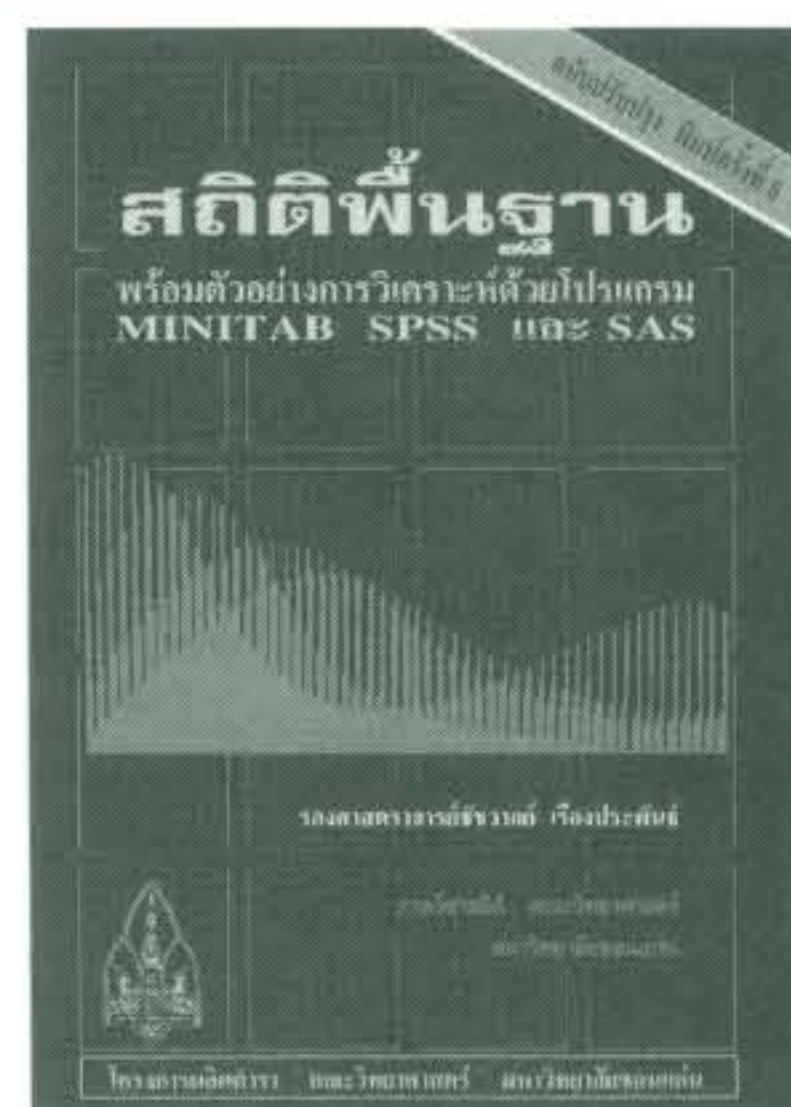
หนังสือในโครงการผลิตตำรา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สถิติพื้นฐาน พร้อมตัวอย่างการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MINITAB SPSS และ SAS

รองศาสตราจารย์ชัชวาลย์ เรืองประพันธ์
พิมพ์ครั้งที่ 5 • 2543 • 510 หน้า

ISBN 974-675-666-4

ราคา 180 บาท



หลักการเบื้องต้นและการประยุกต์ ใช้เทคนิคกลุ่มในเคมีวิเคราะห์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศักดิ์สิทธิ์ จันทน์ไทย
2543 • 202 หน้า

ISBN 974-678-333-2

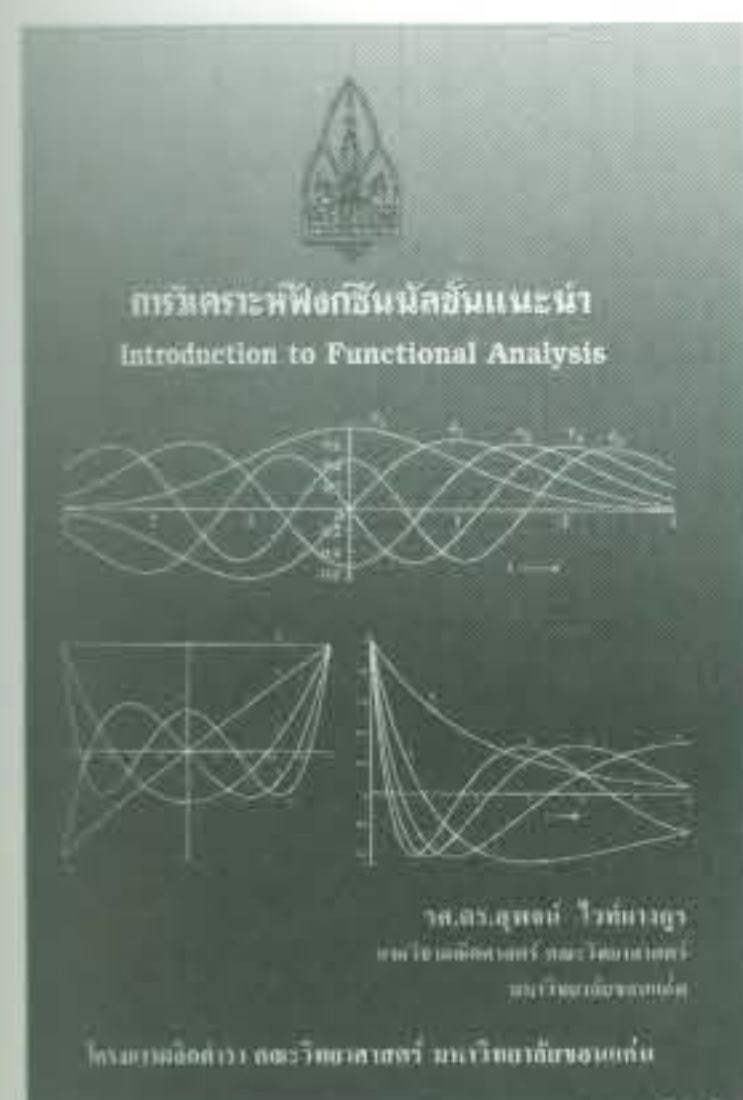
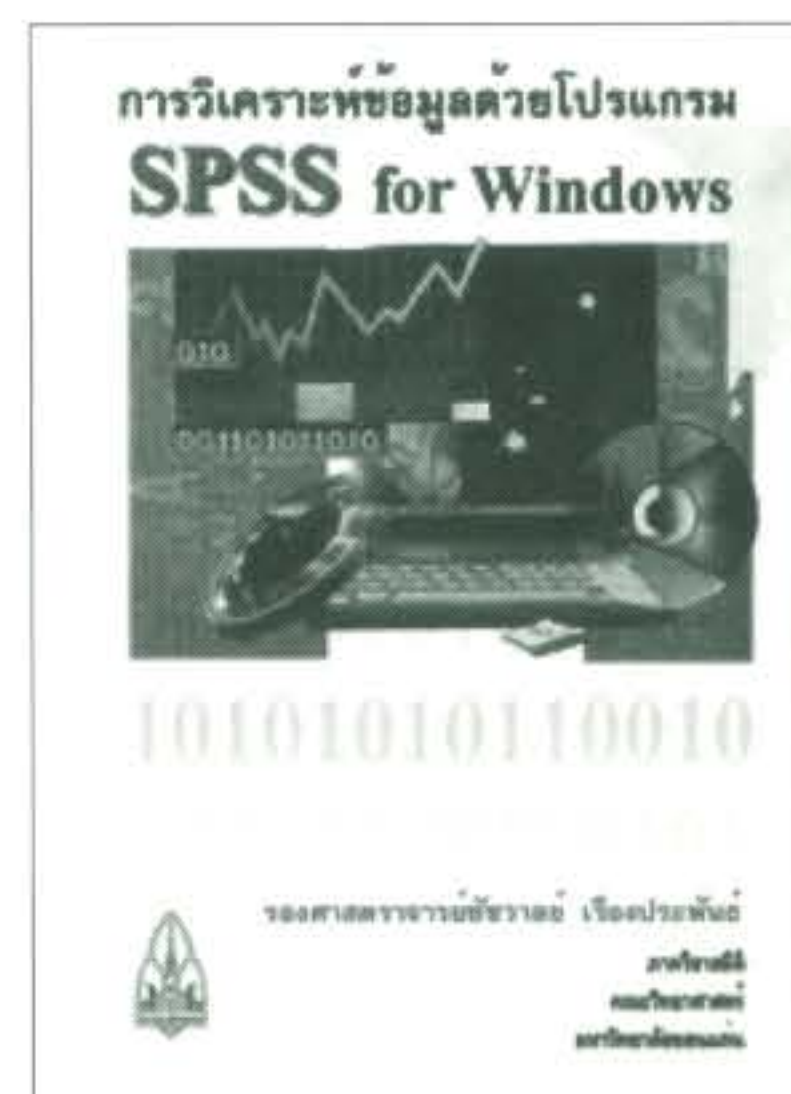
ราคา 150 บาท

การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS for Windows

รองศาสตราจารย์ชัชวาลย์ เรืองประพันธ์
2544 • 620 หน้า

ISBN 974-654-608-2

ราคา 300 บาท



การวิเคราะห์ฟังก์ชันคลื่นขั้นแนะนำ

รองศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ ไวฑูรยางกูร
2547 • 344 หน้า

ISBN 974-367-958-8

ราคา 200 บาท

