บทที่ 2
การดำเนินการวิจัย

ก. พืชสมุนไพร

พืชสมุนไพรที่ใช้ในการทดลองนี้คือ ข่า (*Alpinia galanga*) ที่ปลูกในจังหวัดเชียงใหม่ โดยเลือกเก็บเหง้า (rhizome) ของข่าที่มีอายุไม่อ่อนหรือแก่เกิน (โดยเฉลี่ยอายุประมาณ 1 ปี) นำต้นข่าที่เก็บเหง้ามาตรวจสอบเอกลักษณ์ให้แน่ใจว่าเป็นข่าที่ต้องการ พร้อมถ่ายรูปทุกส่วนไว้เป็นหลักฐาน

ข. เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์การวิจัย

1. Balance (Sartorious Model BP110, AG Gottingen Co. Ltd., Germany)
2. GC-MS (Hewlett-Packard model 6890 (GC) / HP 5973 MS)
3. Hot air oven (Thelco. Model 27 GCA. Co., Ltd., USA.)
4. Incubator (National Appliance Co., Model 332, USA.)
5. Sieve apparatus (Retch, model AS 200 Basic, Haan, Germany)
6. Friability tester (Pharma Test, model PTF 20E, Hainberg, Germany)
7. Differential scanning calorimeter (DSC-7, Perkin Elmer, UK)
8. Q-1000 Differential scanning calorimeter (TA Instruments, NewCastle, Delaware,USA)
9. Scanning Electron Microscope (JSM-840A, Japan)
10. Multiple-Point Stirrer (Thermo scientific, McQueen Labs, USA)
11. pH meter (Hanna pH 211 microprocessor, USA)
12. Refrigerator (SANYO, Japan)
13. Steam distillation / Clevenger apparatus
14. Surface Tensiometer (FACE-CBVP-A3, Japan)
15. Vortex Mixer (Model 1291, LAB-LINE Instrument, Inc., USA)
16. Water bath with shaker (Memmert, GMBH Co., Ltd., Germany)

ค. วัสดุเคมี / สารช่วยทางเภสัชกรรม

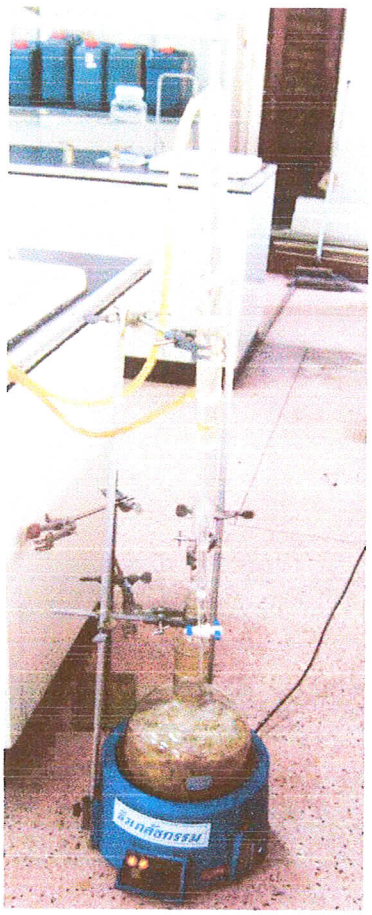
1. Ethanol (Analytical reagent grade) (LAB–SCAN Analytical Sciences)
2. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (LAB–SCAN Analytical Sciences)
3. Hexane (Analytical reagent grade) (LAB–SCAN Analytical Sciences)
4. Methanol (Analytical reagent grade) (LAB–SCAN Analytical Sciences)
5. Polyethylene glycol 400 (Fluka, Switzerland)
6. Propylene glycol (บริษัทวิทยาศรมจำกัด)
7. Isopropyl myristate (Fluka, Switzerland)
8. Mineral oil (บริษัทวิทยาศรมจำกัด)
9. Polyvinyl pyrrolidone (PVP) K30 (Fluka, Switzerland)
10. Polyvinyl pyrrolidone (PVP) K90 (Fluka, Switzerland)
11. Corn starch (บริษัท เฟรนด์ชิพ คอร์น สตาร์ช จำกัด สมุทรปราการ)
12. แป้งสาลี (บริษัท สยามฟลาวค้าแป้ง จำกัด กรุงเทพฯ)
13. แป้งมันสำปะหลัง (บริษัท ไทยวาฟูดโปรดักส์ จำกัด นครปฐม)
14. แป้งข้าวโพด ตราต้นสน (บริษัท ไทยเมซโปรดักส์ จำกัด กรุงเทพฯ)

ง. วิธีวิจัย

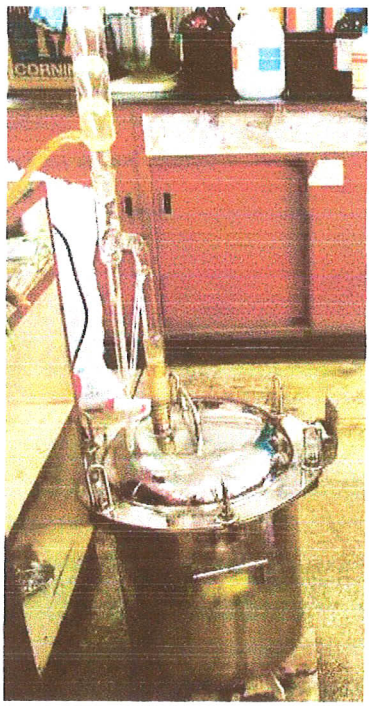
การสกัดน้ำมันหอมระเหย

ทำการทดลองโดยเลือกเก็บเหง้าสด (fresh rhizome) ของข่าที่ไม่อ่อนหรือแก่เกินไป (อายุประมาณ 1 ปี) นำมาล้างน้ำสะอาด แล้วสะเด็ดน้ำออกให้มากที่สุด จากนั้นชั่งหง้าสดเหล่านั้นเพื่อให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำมาบดผสมกับน้ำกลั่นแล้วทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี hydrodistillation ใช้เครื่องกลั่นขนาด 1 ลิตร และ 10 ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 2-1 และ รูปที่ 2-2 ทำการจดบันทึกปริมาตรน้ำมันหอมระเหยภายหลังจากทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง รองรับปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้ด้วย cleventure apparatus สำหรับน้ำมันชนิดเบากว่าน้ำ ดังแสดงในรูปที่ 2-3 จะได้จำนวนน้ำมันหอมระเหยตามชนิดของพืชสมุนไพรที่ศึกษา ค่าปริมาตรที่ได้นำมาคำนวณหาร้อยละของผลที่ได้ และเก็บในภาชนะปิดสนิท ป้องกันแสง และในตู้เย็น เพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

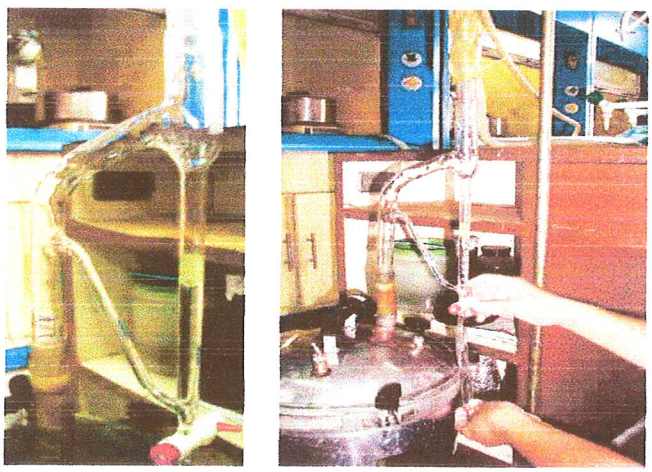
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



รูปที่ 2-1 แสดงการกลั่นน้ำมันหอมระเหยในภาชนะกลั่นแบบ 1 ลิตร



รูปที่ 2-2 แสดงการกลั่นน้ำมันหอมระเหยในภาชนะกลั่นแบบ 10 ลิตร



รูปที่ 2-3 แสดงการการเก็บน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้

การศึกษาสมบัติเคมีกายภาพของน้ำมันหอมระเหยข่า

1. ลักษณะภายนอกและความเป็นกรดด่าง

การศึกษาลักษณะภายนอกของน้ำมันหอมระเหยของข่าทำโดยการสังเกตด้วยประสาทสัมผัส ได้แก่ลักษณะทั่วไป เช่นความใส สี โดยสังเกตจากตามเปล่า และจากการดมกลิ่น วัดความเป็นกรดด่างด้วยเครื่อง pH meter

2. สมบัติการละลาย

ในการศึกษาสมบัติการละลายของน้ำมันหอมระเหยข่า จะใช้ตัวทำละลายต่าง ๆ ที่นิยมใช้ทางเภสัชกรรมมาทำการศึกษา การทดลองทำโดยชั่งน้ำมันหอมระเหยข่าให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นค่อย ๆ เติมตัวทำละลายทีละน้อย แต่ละครั้งที่เติมตัวทำละลายให้ทำการผสมให้เข้ากันโดยเครื่องคนผสม หากใช้ตัวทำละลายน้อยจะผสมใน test tube โดยใช้เครื่อง Vortex mixer หากต้องใช้ปริมาณตัวทำละลายมากจะผสมใน beaker และใช้เครื่อง Multipoint stirrer ดังแสดงในรูปที่ 2-4 ทำเช่นนี้เรื่อย ๆ จนกระทั่งน้ำมันหอมระเหยละลายหมด โดยสังเกตด้วยตาเปล่า บันทึกปริมาณน้อยที่สุดของตัวทำละลายที่ทำให้น้ำมันหอมระเหย จำนวนดังกล่าวละลายหมด

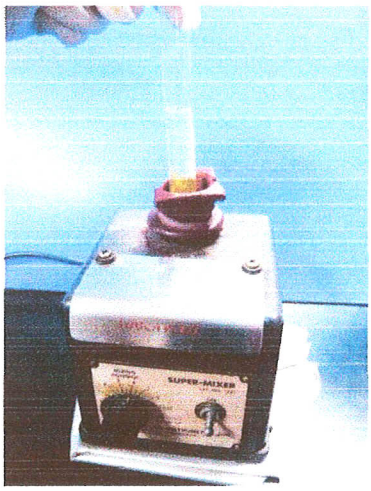
ค่าการละลายที่วัดได้ จะบอกเป็นค่าส่วนของตัวทำละลายที่น้อยที่สุดเพื่อใช้ละลายน้ำมันหอมระเหยจำนวน 1 ส่วน ดังนั้นหากตัวทำละลายใดมีค่าตัวเลขที่แสดงส่วนที่ต้องใช้น้อย แสดงว่าตัวทำละลายนั้นสามารถละลายน้ำมันหอมระเหย ได้ดี ในทางกลับกันหากตัวทำละลายใดมีค่าตัวเลขที่แสดงส่วนที่ต้องใช้มาก แสดงว่าตัวทำละลายนั้นสามารถละลายน้ำมันหอมระเหย ได้ไม่ดี

3. ความหนาแน่น

การหาความหนาแน่นของน้ำมันหอมระเหยข่าในขั้นตอนนี้ ทำโดยดูดน้ำมันหอมระเหยข่าด้วย Micropipette ทำให้ทราบปริมาตรแน่นอน (ml) จากนั้นนำน้ำมันหอมระเหยข่าที่ดูดได้ไปชั่งหาน้ำหนัก (g) แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าความหนาแน่น โดยใช้สูตร D =

M/V เมื่อ D หมายถึงความหนาแน่น M หมายถึงน้ำหนัก และ V หมายถึงปริมาตรของน้ำมัน ทำการทดลองซ้ำ เพื่อนำผลการทดลองมาหาค่าเฉลี่ย

(A)



(B)

รูปที่ 2-4 แสดงการทดสอบสมบัติการละลายของน้ำมันหอมระเหย

(A) = โดยใช้ Vortex

(B) = โดยใช้ Multi-stirrer

4. ค่า Refractive index

การศึกษาหา Refractive index ของน้ำมันหอมระเหยข่า ทำโดยใช้เครื่อง Refractometer (ATAGO รุ่น 3T จากบริษัท Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan) ดังแสดงในรูปที่ 2-5 และรูปที่ 2-6

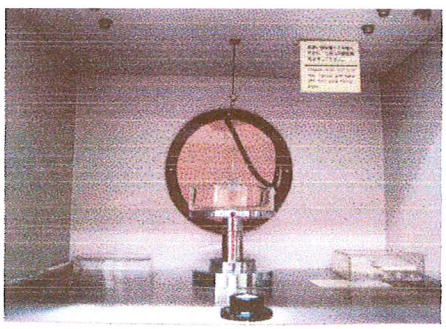
รูปที่ 2-5 แสดงลักษณะภายนอกของเครื่อง Refractometer

รูปที่ 2-6 แสดงลักษณะการใช้งานโดยเครื่อง Refractometer

5. ค่าแรงตึงผิว

ในการศึกษาหาค่าแรงตึงผิวของน้ำมันหอมระเหยข่า ทำโดยใช้เครื่อง Plate Tensiometer (Automatic Surface Tensiometer รุ่น CBVP-A3 บริษัท Kyowa Scientific Co., Ltd., Tokyo, Japan) ดังแสดงในรูปที่ 2-7 และรูปที่ 2-8 ตามลำดับ

รูปที่ 2-7 แสดงลักษณะภายนอกของเครื่อง Plate Tensiometer



รูปที่ 2-8 แสดงลักษณะภายในของเครื่อง Plate Tensiometer

การศึกษาองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยข่า

การศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยข่า ทำโดยใช้เครื่อง GC-MS ชนิด Agilent 6890 gas chromatography ต่อกับ electron impact (EI, 70 eV) โดยมี HP 5973 mass selective detector และต่อเข้ากับ silica capillary column (HP-5MS) ของ (Hewlett Packard® ประเทศสหรัฐอเมริกา) ขนาด 30.0 เมตร × 250 ไมครอน มีเส้นผ่านศูนย์กลางด้านในเท่ากับ 0.25 ไมครอน สภาวะที่ใช้ในการศึกษาคือใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาในอัตราเร็วประมาณ 1.0 มิลลิลิตร/นาที มี injector temperature เท่ากับ 260 องศาเซลเซียส ให้มี oven temperature เท่ากับ 100 องศาเซลเซียส ค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 3 องศาเซลเซียส/นาที ไปถึง 188 องศาเซลเซียส แล้วเพิ่มเป็นอัตรา 20 องศาเซลเซียส/นาที ไปถึง 280 องศาเซลเซียส และมี detector temperature เท่ากับ: 280 องศาเซลเซียส ผลการทดลองประเมินโดยใช้โปรแกรมจากเครื่อง GC-MS ซึ่งคำนวณจากการเปรียบเทียบกับ mass spectra database (WILEY&NIST) และ spectroscopic data

การเตรียมแกรนูล

การศึกษาหาปริมาณสารยึดเกาะ

การเตรียมแกรนูลในโครงการนี้ เตรียมโดย Wet granulation การหาปริมาณที่เหมาะสมของสารยึดเกาะ ซึ่งในโครงการนี้ใช้ PVP ทำโดยใช้ของเหลวผสม ตามสูตรที่ 1 ถึง สูตรที่ 4 จำนวน 18 กรัม ผสมกับ Corn starch (เป็นแป้งข้าวโพดที่สกัดโปรตีนออกแล้ว) จำนวน 82 กรัม นำ wet mass ที่ได้ไปกดผ่านแร่ง mesh no 8 แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วนำมาผ่านแร่ง mesh no 12 รองรับด้วยแร่ง mesh no 14 และ pan จากนั้นเก็บแกรนนูลที่ค้างบนแร่ง mesh no 14 เพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป โดยในที่นี้จะนำไปหาความกร่อน และเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมของ PVP ต่อไป

ของเหลวผสมสูตรที่ 1

น้ำมันหอมระเหยข่า	22.5 กรัม
PVP K30	5.0 กรัม
Ethanol qs	100.0 กรัม

ของเหลวผสมสูตรที่ 2

น้ำมันหอมระเหยข่า	22.5 กรัม
PVP K30	10.0 กรัม
Ethanol qs	100.0 กรัม

ของเหลวผสมสูตรที่ 3

น้ำมันหอมระเหยข่า	22.5 กรัม
PVP K90	5.0 กรัม
Ethanol qs	100.0 กรัม

ของเหลวผสมสูตรที่ 4

น้ำมันหอมระเหยข่า	22.5 กรัม
PVP K90	10.0 กรัม
Ethanol qs	100.0 กรัม

การศึกษาสารเพิ่มปริมาณ

สารเพิ่มปริมาณที่ใช้ศึกษาในโครงการนี้มี 3 ชนิด ซึ่งเป็นแป้งที่ไม่ได้สกัดเอาโปรตีนออก ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด และ แป้งสาลี การเตรียมแกรนูลในขั้นตอนนี้เตรียมโดย Wet granulation เช่นกัน การศึกษาทำโดยการเตรียม wet mass ที่มีส่วนผสมตามสูตรแกรนูลที่ 1 ถึงสูตรแกรนูลที่ 4 โดยใช้ PVP ชนิดและปริมาณที่เหมาะสมที่สุดจากผลการทดลองข้างต้นเป็นสารยึดเกาะ นำ wet mass ที่ได้ไปกดผ่านแร่ง mesh no 8 แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วนำมาผ่านแร่ง mesh no 12 รองรับด้วยแร่ง mesh no 14 และ pan เก็บแกรนูลที่ค้างบนแร่ง mesh no 14 เพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป การหาปริมาณแกรนูลที่เก็บได้แสดงเป็นค่า yield ซึ่งคิดเป็นร้อยละและคำนวณได้จากสมการดังต่อไปนี้

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักแกรนูลที่ค้างบนแร่ง mesh no 14}}{\text{น้ำหนักแกรนูลหลังอบก่อนผ่านแร่ง}} \text{ X } 100$$

สูตรแกรนูลที่ 1

น้ำมันหอมระเหยข่า	4.1	กรัม
แป้งข้าวโพด	82.0	กรัม
PVP solution		qs

สูตรแกรนูลที่ 2

น้ำมันหอมระเหยข่า	4.3	กรัม
แป้งมันสำปะหลัง	81.0	กรัม
PVP solution		qs

สูตรแกรนูลที่ 3

น้ำมันหอมระเหยข่า	4.2	กรัม
แป้งสาลี	81.0	กรัม
PVP solution		qs

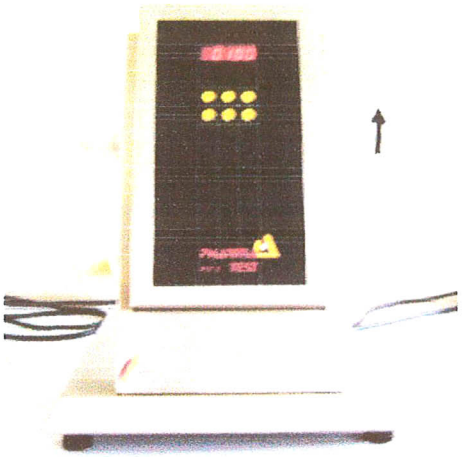
การศึกษาความกร่อนของแกรนูล

การศึกษาหาความกร่อนของแกรนูล ทำโดยอาศัยเครื่อง Friability tester โดยทำการทดลองดังต่อไปนี้

1. ชั่งแกรนูลที่มีขนาดระหว่างแร่ง mesh no 12/14 มาจำนวน 5.000 กรัม
2. นำลงใส่ในภาชนะสำหรับทดสอบซึ่งอยู่ด้านซ้ายหรือขวาของเครื่องวัดความกร่อน ปิดภาชนะให้สนิท แล้วเปิดเครื่องให้หมุนไป 100 รอบ ดังแสดงในรูปที่ 2-9
3. นำแกรนูลที่ทั้งหมดไปผ่านแร่ง mesh no 14 อีกครั้งหนึ่ง
4. ชั่งหาน้ำหนักแกรนูลเฉพาะที่ค้างบนแร่ง mesh no 14
5. บันทึกผลการทดลองที่ได้ และคำนวณหาความกร่อนของแกรนูลจากสมการต่อไปนี้

% ความกร่อน = (น้ำหนักที่หายไป / น้ำหนักก่อนทดสอบ) ×100

6. ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย



รูปที่ 2-9 แสดงการทดสอบความกร่อนของแกรนูลโดยเครื่อง Friability tester

การศึกษาพฤติกรรมเมื่อได้รับความร้อนของแกรนูล

การศึกษาพฤติกรรมเมื่อได้รับความร้อนของแกรนูล ทำโดยอาศัยเครื่อง Differential scanning calorimeter (DSC) และเครื่อง Thermo gravimetric analysis (TGA)

สำหรับเครื่อง DSC ทำโดยชั่งแกรนูลปริมาณแน่นอน ประมาณ 1-3 มิลลิกรัม ใส่ในจานรับตัวอย่างที่ทำด้วย aluminium ปิดจานด้วยฝาปิดที่ทำจากวัสดุอย่างเดียวกัน แล้วนำไป run ในเครื่อง DSC โดยใช้จานเปล่าปิดฝาทำนองเดียวกันเป็น reference เปิดเครื่องให้ทำการทดลองที่อุณหภูมิตั้งแต่ 50 องศาเซลเซียสเป็นต้นไป จนถึงอุณหภูมิไม่เกิน 300 องศาเซลเซียส โดยเพิ่มความร้อนในอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และใช้ Nitrogen gas เป็น purging gas ในอัตราการไหล 20 มิลลิลิตรต่อนาที

สำหรับเครื่อง TGA ใช้แกรนูลประมาณ 10-20 มิลลิกรัม ใส่ในจานรับตัวอย่าง ทำการทดลองที่อุณหภูมิตั้งแต่ 25 องศาเซลเซียสไปจนถึงอุณหภูมิไม่เกิน 250 องศาเซลเซียส โดยเพิ่มความร้อนในอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที

การศึกษาสมบัติการไหลของแกรนูล

การศึกษาสมบัติการไหลของแกรนูล ทำโดยการหาค่า compressibility ซึ่งหาได้จากการคำนวณค่าสัดส่วนของความหนาแน่น 2 ชนิด คือ Bulk density (Db) และ Tapped density (Dt) ดังนั้นในบางครั้งจึงอาจเรียกค่าที่ได้ว่า compressibility ratio ค่าที่ได้คำนวณให้อยู่ในรูปร้อยละ ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{Compressibility (\%)} = \frac{Dt - Db}{Dt} \times 100$$

การหาค่าความหนาแน่นทั้งสอง (Db และ Dt) ทำการทดลองดังต่อไปนี้

- ชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอนของผงแกรนูลทดสอบที่มีปริมาตรประมาณ 50 มิลลิลิตร
- เทผงแกรนูลลงในกระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร
- เคาะกระบอกตวง 3 ครั้งและอ่านปริมาตรตามที่ปรากฏที่ขีดกระบอกตวง
- นำค่าน้ำหนักและปริมาตรที่อ่านได้ไปคำนวณหาความหนาแน่น ค่าความหนาแน่นที่ได้คือ Db
- เคาะกระบอกตวงต่ออีก ประมาณ 500 ครั้ง หรือจนไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาตรของแกรนูลในกระบอกตวง โดยใช้เครื่อง Joilting volumeter ดังแสดงในรูปที่ 2-10
- อ่านปริมาตรตามที่ปรากฏที่ขีดกระบอกตวงอีกครั้ง
- นำค่าน้ำหนักและปริมาตรที่อ่านได้ไปคำนวณหาความหนาแน่น ค่าความหนาแน่นที่ได้คือ Dt

การประเมินการไหล โดยค่า compressibility ที่คำนวณได้ อาศัยเกณฑ์มาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 2-1

รูปที่ 2-10 แสดงการหาค่า compressibility โดย Jolting Volumeter

ตารางที่ 2-1 เกณฑ์สำหรับการประเมินสมบัติการไหลของอนุภาค โดยใช้ค่า Compressibility

Compressibility (%)	สมบัติการไหล (Flowability)
5 – 15	ไหลได้ดีมาก
12 – 16	ไหลได้ดี
17 - 21	ไหลได้พอใช้
22 - 33	ไหลไม่ค่อยดี
33 - 39	ไหลไม่ดี
> 40	ไหลไม่ดีเลย

การศึกษาผลของแกรนูลน้ำมันหอมระเหยข่าต่อการเจริญของสุกร

การศึกษาในขั้นตอนนี้ใช้สุกรของฟาร์มสุกรครบวงจรขนาด 200 แม่ ในอำเภอเมือง จังหวัดลำพูน มีรูปแบบการเลี้ยงแบบระบบเปิด โดยมีการใช้อาหารผสมของบริษัท โดยทำการศึกษาในลูกสุกรพันธุ์ 3 สาย (Large White x Landrace x Doroc) อายุ 28-63 วัน (จำนวนวันหย่านม) โดยเลี้ยงในสภาพแวดล้อมเดียวกัน น้ำหนักไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่สูตรอาหารแตกต่างกันไปตามแบบการทดลอง ระยะเวลาการทดลองตั้งแต่ลูกสุกรเริ่มกินอาหารอนุบาล อายุ 28 วัน จนถึงอายุ 63 วัน

การทดลองเริ่มโดยจัดแบ่งกลุ่มสุกรออกเป็น 4 กลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วยลูกสุกร จำนวน 6 ตัว (ผู้ 3, เมีย 3) ซึ่งมาจากแม่สุกร 3 แม่ (ลำดับท้องที่ 3-5) โดยแม่สุกรแต่ละตัวจะให้ลูกสุกรไม่ต่ำกว่า 10 ตัว โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และกำหนดกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองดังนี้ ทุกกลุ่มให้กินอาหารตามที่จัดให้ตั้งแต่วันแรกจนถึงสิ้นสุดการทดลอง

กลุ่มที่ 1 : กลุ่มควบคุม (negative control) ซึ่งใช้สูตรอาหารอนุบาลที่ไม่มีตัวยาหรือแกรนูลน้ำมันหอมระเหยข่าผสมอยู่

กลุ่มที่ 2 : กลุ่มทดลองที่ 1 ใช้สูตรอาหารอนุบาลที่มี แกรนูลน้ำมันหอมระเหยข่า จำนวน 1 กิโลกรัมต่ออาหาร 1 ตัน

กลุ่มที่ 3 : กลุ่มทดลองที่ 2 ใช้สูตรอาหารอนุบาลที่มี แกรนูลน้ำมันหอมระเหยข่า จำนวน 2 กิโลกรัมต่ออาหาร 1 ตัน

กลุ่มที่ 4 : กลุ่มทดลองที่ 3 ใช้สูตรอาหารอนุบาลที่มียาปฏิชีวนะ (Colistin sulfate) ผสมอยู่ 100 ppm

การบันทึกข้อมูล ทำโดยการชั่งน้ำหนักลูกสุกรที่ก่อนเริ่มการทดลอง (วันที่ 0) และสิ้นสุดการทดลอง และจดบันทึกปริมาณอาหารทั้งหมดที่ใช้ไปทุกวันในแต่ละกลุ่ม จนสิ้นสุดการทดลอง เพื่อใช้ในการคำนวณอัตราการเจริญเติบโต บันทึกการเกิดท้องเสียของลูกสุกรวันละ 2 ครั้ง เวลา 6.00 น. และ 18.00 น.