

บทที่ 3

วิธีวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

สารเคมี

- 1.DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals)
- 2.Hexane AR
- 3.Chloroform AR
- 4.Ethanol AR
- 5.Methanol AR
- 6.Ethyl acetate AR
- 7.Ether AR
- 8.Toluene AR
- 9.Acetone AR
- 10.Glacial acetic acid AR
- 11.AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride)
- 12.Linoleic acid (C₁₈H₃₂O₂)
- 14.NaOH
- 15.KOH
- 16.Na₂S₂O₃
- 17.Ferrous chloride (FeCl₂.6H₂O)
- 18.Ammonium thiocyanate ((NH₄)₂SO₄)
- 19.Hydrochloric acid
- 20.Iodine
- 21.Liquid bromine
- 22.KI
- 23.Phenolphthalein TS
- 24.Soluble starch
- 25.น้ำมันเมล็ดชา
- 26.Butanol
27. Tween 80

28. Span 80
29. Purified water
30. Hydroxy Ethyl Cellulose (HEC)
31. Propylene Glycol
32. Sodium metabisulfite
33. Paraben Concentrate
34. Ethanol
35. กลิ่น Nourish rice

เครื่องมือ

1. UV – visible spectrophotometer
2. Cuvette (quartz)
3. TLC tank และ TLC plates (silica gel G₂₅₄)
4. DTX-880 Multimode Detector
5. 96-well (flat) Microplate
6. Erlenmeyer flasks
7. Volumetric flasks
8. Beakers
9. Watch glass
10. Stirring rod
11. Pipette and Micropipette
12. pH Meter
13. Water bath
14. Burets
15. Vortex Mixer
16. เครื่อง Homogenizer
17. เครื่อง Magnetic Bar
18. เครื่อง Brookfield R/S CPS Rheometer
19. pH meter
20. เครื่องวัดขนาดอนุภาค (Zeta Sizer Nano Series)
21. เครื่องวัดค่า Dielectric constant
22. เครื่อง Comeometer

23. ตู้เย็น
24. ตู้อบ
25. ภาชนะสำหรับบรรจุ

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาข้อมูลและจัดหาน้ำมันเมล็ดชาจากแหล่งต่างๆ ได้ตัวอย่างน้ำมันเมล็ดชา 3 ชนิด ได้แก่ น้ำมันเมล็ดชาชนิดหีบเย็น (cold-pressed Camellia seed oil) จากแหล่งจังหวัดฉะเชิงเทรา น้ำมันเมล็ดชา จาก จังหวัดเชียงใหม่ และห้างสรรพสินค้า
2. ควบคุมคุณภาพโดยการตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของน้ำมันเมล็ดชาตามวิธีในเภสัชตำรับ เช่น Acid Value, Saponification Value และ Iodine Value เป็นต้น
3. ตรวจสอบสารองค์ประกอบเบื้องต้นด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง
4. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันเมล็ดชาจากแหล่งต่างๆ อย่างน้อย 2 วิธี ได้แก่ วิธี DPPH และ Lipid peroxidation assay เป็นต้น
5. พัฒนาเครื่องสำอางที่ผสมน้ำมันเมล็ดชาที่มีคุณสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ในรูปแบบครีม และ/ หรือ โลชั่น โดยพัฒนาสูตรตำรับต่างๆ เลือกชนิดของผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมกับคุณสมบัติของน้ำมันเมล็ดชา และผสมในตำรับ ประเมินผลด้านสมบัติทางกายภาพต่างๆ เช่น สี กลิ่น พิเศษ ความหนืด
6. ทดสอบการระคายเคืองเบื้องต้นของน้ำมันเมล็ดชาในกระต่าย
7. ประเมินประสิทธิภาพการใช้และความพึงพอใจในอาสาสมัคร

1. การตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันเมล็ดชา

1.1 Acid value

ชั่งน้ำมันเมล็ดชา 10 กรัม จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน ละลายใน erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ที่มีตัวทำละลายผสมของ ethanol 25 ml และ ether 25 ml เขย่าจนได้สารละลาย จากนั้นเติม phenolphthalein TS จำนวน 1 ml นำไปไทเทรตกับ 0.1 N NaOH จนกระทั่งเกิดสีชมพูเป็นเวลานานอย่างน้อย 30 วินาที นำปริมาตรที่จุดยุติไปคำนวณหาค่า Acid value

1.2 Iodine value

ชั่งน้ำมันเมล็ดชา 0.2 กรัม จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน ลงใน iodine flask ขนาด 500 ml ละลายใน chloroform 10 ml จนได้สารละลายแล้วเติม iodobromide 25.0 ml จากนั้นปิดฝาให้แน่น แล้วนำไปตั้งไว้ในที่มืด ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น เติม KI 30.0 ml และน้ำ 100 ml นำไปไทเทรตกับ 0.1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ โดยเขย่าตลอดเวลาที่ทำการไทเทรต จนกระทั่งสีของสารละลายใน iodine flask

เริ่มจากเป็นสีเหลืองฟางข้าว ให้เติมน้ำแข็ง 3 ml แล้วทำการไทเทรตต่อ จนกระทั่งสีน้ำเงินหายไป จุดยุติได้เป็นสารละลายใส ไม่มีสี ทำ blank ควบคู่ไปด้วย กำหนดค่า Iodine value จากสมการ

$$\frac{[126.9(V_B - V_S)N]}{10W}$$

V_B คือ ปริมาตร $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ที่ใช้ในการไทเทรต Blank (ml)

V_S คือ ปริมาตร $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ที่ใช้ในการไทเทรต Sample (ml)

N คือ ความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (normal)

W คือ น้ำหนักของน้ำมันตัวอย่างที่ชั่ง (g)

1.3 Saponification value

ชั่งน้ำมันเมล็ดชาประมาณ 2 g จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 250 ml เติม 0.5 N alcoholic KOH ปริมาตร 25.0 ml จากนั้นนำ flask ไปตั้งบน water bath และติดตั้ง condenser ทำการ reflux เป็นเวลา 30 นาที เติม Phenolphthalein 1 ml แล้วนำไปไทเทรตกับ 0.5 N. HCl จนกระทั่งได้จุดยุติเป็นสารละลายสีเหลืองอำพัน ทำ blank ควบคู่ไปด้วย กำหนดค่า Saponification value จากสมการ

$$\frac{[56.1(V_B - V_S)N]}{W}$$

V_B คือ ปริมาตร HCl ที่ใช้ในการไทเทรต Blank (ml)

V_S คือ ปริมาตร HCl ที่ใช้ในการไทเทรต Sample (ml)

N คือ ความเข้มข้นของ HCl (normal)

W คือ น้ำหนักของน้ำมันตัวอย่างที่ชั่ง (g)

2. การตรวจสอบสารองค์ประกอบเบื้องต้นด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง

ตัวอย่างน้ำมันเมล็ดชาจากแหล่งต่างๆ (จากจังหวัดฉะเชิงเทรา จังหวัดเชียงใหม่ และห้างสรรพสินค้า) แหล่งละ 3 ตัวอย่าง นำมาตรวจสอบสารองค์ประกอบเบื้องต้นด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Vitamin E acetate, Linoleic acid และน้ำมันรำข้าว ใช้ตัวทำละลายแยก (DVS) 3 ชนิด ดังตารางที่ 1 และใช้ Anisaldehyde spraying agent เป็น spraying reagent กำหนดค่า R_f โครมาโทแกรม

ตารางที่ 3.1: ชนิดและอัตราส่วนของDVS ที่ใช้ในการตรวจสอบสารองค์ประกอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค TLC

ชนิดที่	ตัวทำละลายแยก (DVS)	อัตราส่วน
1	Toluene : Ethyl acetate	93:7
2	Hexane : Acetone	6:4
3	Hexane : Ethyl acetate	1:1



3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง

3.1 ความสามารถในการขจัด 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) assay

ปีเปตสารละลายน้ำมันตัวอย่างใน acetone ที่ความเข้มข้น 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 750, 900 $\mu\text{l/ml}$ จำนวน 20 μl ผสมกับสารละลาย 167 μM DPPH ใน acetone จำนวน 180 μl ใน 96-well (flat) microplate ทิ้งให้ทำปฏิกิริยากันเป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm ด้วย DTX-880 Multimode Detector โดยกลุ่มควบคุม (control) ใช้ 167 μM DPPH ใน acetone และ blank ใช้สารละลายน้ำมันตัวอย่างใน acetone ที่ความเข้มข้นต่างๆ คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งและหาค่า IC_{50} จากกราฟที่พลอตระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง กับ ความเข้มข้นของน้ำมันตัวอย่าง เปรียบเทียบกับน้ำมันรำข้าว โดยใช้สมการ

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[(\text{Ab. positive control} - \text{Ab. negative control}) - (\text{Ab. Sample} - \text{Ab. blank})]}{[(\text{Ab. positive control} - \text{Ab. negative control})]} \times 100$$

- เมื่อ
1. Positive control ประกอบด้วย acetone + สารละลาย DPPH
 2. Negative control ประกอบด้วย acetone
 3. Sample ประกอบด้วย สารละลายน้ำมันตัวอย่าง + สารละลาย DPPH
 4. Blank ประกอบด้วย สารละลายน้ำมันตัวอย่าง + acetone

3.2 การยับยั้งการเกิด lipid peroxidation โดยใช้ Ferric Thiocyanate Method(FTC)

ปีเปตสารละลายน้ำมันตัวอย่างใน acetone ที่ความเข้มข้น 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25 $\mu\text{l/ml}$ จำนวน 100 μl ใส่ลงหลอดทดลองที่มีฝาปิด เติม 0.1 M Phosphate buffer pH 7.0 จำนวน 1 ml และ 25 mM Linoleic acid ใน acetone จำนวน 1 ml ปิดฝาหลอดทดลอง ทิ้งให้ทำปฏิกิริยากันเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 60 $^{\circ}\text{C}$ จากนั้นปีเปตสารละลายผสมจำนวน 50 μl ลงในหลอดทดลอง แล้วเติม 75% ethanol จำนวน 3 ml, 30% ammonium thiocyanate จำนวน 20 μl และ 20 mM ferrous chloride ใน 3.5% HCL จำนวน 20 μl ปั่นให้เข้ากัน โดยใช้เครื่อง Vortex เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น

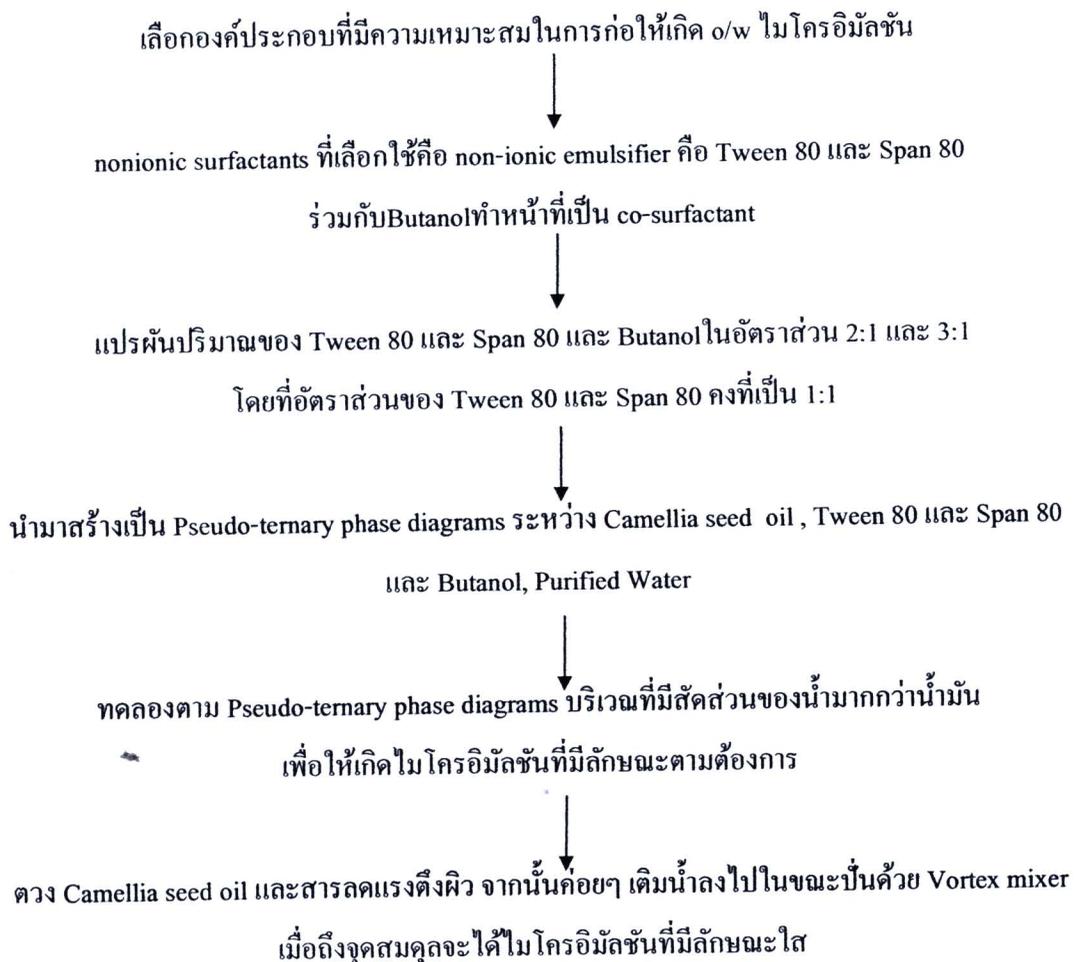
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ	
ห้องสมุดงานวิจัย	
วันที่.....	๒๙ ก.ค. ๒๕๕๕
เลขทะเบียน.....	247625
เลขเรียกหนังสือ.....	

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm ด้วยเครื่อง UV – visible spectrophotometer โดย blank ใช้ 0.1 M Phosphate buffer pH 7.0 และ 25 mM Linoleic acid ใน Acetone จำนวนเปอร์เซ็นต์การยับยั้งและหาค่า IC_{50} จากกราฟที่พลอตระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง กับ ความเข้มข้นของน้ำมันตัวอย่างเปรียบเทียบกับน้ำมันรำข้าว โดยใช้สมการ

$$\%inhibition = [1 - (Ab. sample at 500 nm) / (Ab.blank at 500 nm)] \times 100$$

- เมื่อ
1. Sample ประกอบด้วย สารละลายน้ำมันตัวอย่าง + phosphate buffer pH7.0 + สารละลาย Linoleic acid
 2. Blank ประกอบด้วย acetone + phosphate buffer pH7.0 + สารละลาย Linoleic acid

4. พัฒนาเครื่องสำอางที่ผสมน้ำมันเมล็ดชาที่มีคุณสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีในรูปแบบไมโครอิมัลชัน





การประเมินตำรับ

1. สังเกตลักษณะทางกายภาพของไมโครอิมัลชัน เช่น ความใส ความเนียน สีของเนื้ออิมัลชัน
2. วัดขนาดอนุภาคโดยใช้เครื่องวัดขนาดอนุภาค (Zeta Sizer Nano Series)
3. ทดสอบความคงสภาพของตำรับ โดยนำตำรับไมโครอิมัลชันที่ได้ พร้อมทั้งตำรับที่ได้รับการพัฒนาแล้วมาทดสอบความคงสภาพโดยเก็บไว้ที่ 4 สภาวะ คือ อุณหภูมิห้อง, ในตู้เย็น 45°C, ในตู้เย็น 4°C และที่สภาวะเร่ง (Accelerated Stability Testing) ใช้วิธี Heating and Cooling จำนวน 6 รอบ ที่อุณหภูมิ 45°C และ 4°C โดยที่แต่ละอุณหภูมิต้องไม่น้อยกว่า 48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลง
4. ประเมินชนิดของไมโครอิมัลชันที่ได้ โดยนำตัวอย่างไมโครอิมัลชันที่ได้มาทดสอบค่าการนำไฟฟ้าโดยใช้เครื่องวัดค่า Dielectric constant
5. วัด pH ของตำรับไมโครอิมัลชัน โดยใช้ pH meter
6. วัดความหนืดโดยใช้เครื่อง Brookfield R/S CPS Rheometer

5. การทดสอบการระคายเคืองเบื้องต้นของน้ำมันเมล็ดชาในกระต่าย

คัดเลือกกระต่ายที่มีสุขภาพแข็งแรงดี ไม่เคยผ่านการทดสอบ โคนขนที่หลังกระต่ายทั้ง 2 ข้างของแนวกระดูกสันหลังให้เกลี้ยง พักกระต่ายไว้ 24 ชั่วโมง แบ่งพื้นที่หลังกระต่ายให้เท่ากับจำนวนสารสกัดที่ต้องการทดสอบ โดยเหลือพื้นที่ว่างเพื่อเป็นตัวควบคุม แปะด้วยสำลีที่ป้ายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาณ 500 ไมโครลิตร/แผ่น แปะไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแกะสำลีออกแล้วเช็ดด้วยน้ำทิงให้แห้ง ทำการประเมินผลเมื่อครบเวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยให้คะแนนอาการบวมและแดงของแต่ละตำแหน่ง นำคะแนนที่ได้ไปเทียบกับตาราง PDII หลังแกะสำลีออกทำการประเมินให้คะแนนอาการแดง (Erythema) และอาการบวม (Ederma) ของแต่ละตำแหน่ง ที่เวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ดังตารางที่ 3.2

ในการจัดประเภทของการระคายเคือง คะแนนเฉลี่ยของอาการบวมและแดงในกระต่ายทั้ง 3 ตัว ณ เวลาต่างๆ แทนด้วย PDI เมื่อนำผลบวกของค่า PDI ณ เวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หารด้วยจำนวน

ช่วงเวลาที่ประเมินค่าที่ได้เรียกว่า PDI ซึ่งค่านี้นำไปใช้ในการจัดประเภทของการระคายเคืองดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.2: เกณฑ์การประเมินคะแนนอาการระคายเคืองในกระต่าย

อาการ	คะแนน
อาการแดงและการเกิดสะเก็ดแผล	
ไม่แดง	0
แดงเล็กน้อย (เกือบจะไม่แดง)	1
แดงชัดเจน	2
แดงปานกลางถึงแดงมาก	3
แดงมากถึงเริ่มมีสะเก็ดแผล (มีการบาดเจ็บลึกลงไป)	4
อาการบวม	
ไม่บวม	0
บวมเล็กน้อย	1
บวมเล็กน้อย (ขอบเริ่มนูน)	2
บวมปานกลาง (ขอบนูนมากกว่า 1 มิลลิเมตร)	3
บวมมาก (ขอบนูนมากกว่า 1 มิลลิเมตร ขยายวงกว้างกว่าบริเวณที่สัมผัสสาร)	4

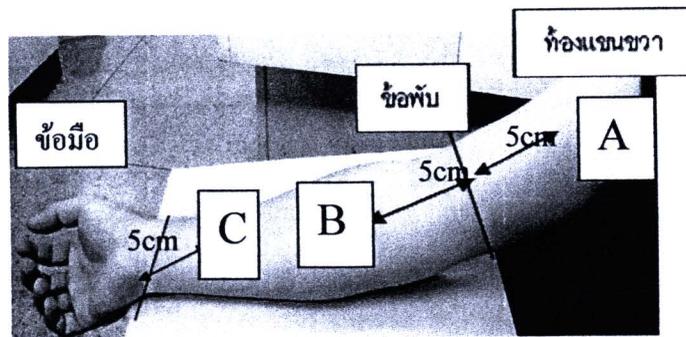
หมายเหตุ ในขณะที่ทำการทดลองมีการให้น้ำและอาหารปกติ

ตารางที่ 3.3: การจัดประเภทของการก่ออาการระคายเคืองผิวหนัง

ค่า Primary Dermal Irritation Index	ประเภทของการก่อระคายเคือง
< 0.5	ไม่ระคายเคือง (non - irritation)
0.5 – 2.0	ระคายเคืองเล็กน้อย (slightly irritation)
2.1 – 5.0	ระคายเคืองปานกลาง (moderately irritation)
> 5.0	ระคายเคืองรุนแรง (severe irritation)

6. ประเมินประสิทธิภาพการใช้และความพึงพอใจจากอาสาสมัคร⁽²⁰⁾

6.1 วัดความชุ่มชื้นของผิวหนังของอาสาสมัคร โดยเครื่องมือ Comeometer ก่อนใช้ผลิตภัณฑ์ และ 14 วันหลังใช้ผลิตภัณฑ์



รูปที่ 3.1: แสดงบริเวณที่ทำผลิตภัณฑ์ในอาสาสมัคร โดยกำหนดให้ บริเวณ A ทำผลิตภัณฑ์ไมโครอิมัลชัน บริเวณ B ทายาพื้นเจล บริเวณ C ไม่ได้ทำอะไรเลย

6.2 ประเมินความพึงพอใจในอาสาสมัคร โดยใช้แบบสอบถาม