

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์พืช

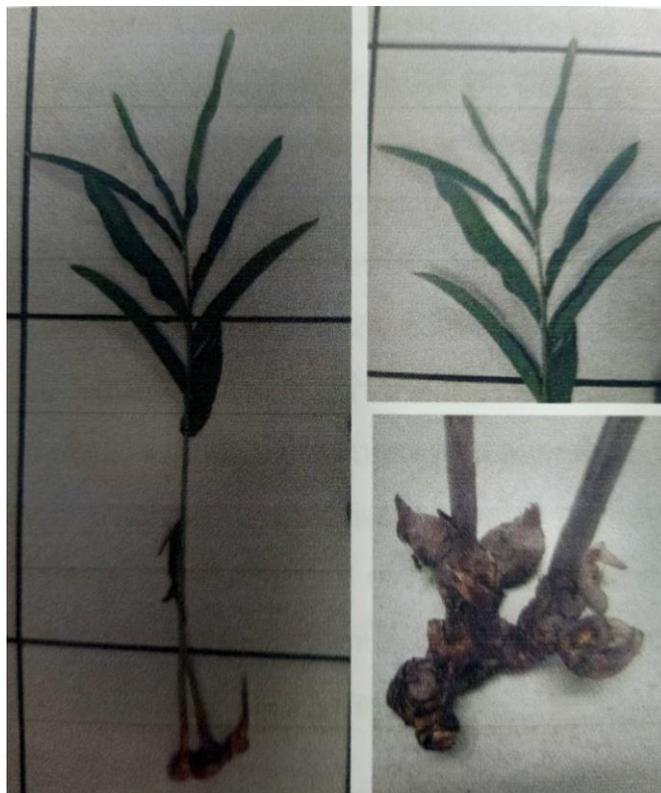
เก็บตัวอย่างพืชทั้ง 4 ส่วน ได้แก่ เหง้า ใบ ดอก ลำต้น นำมาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์จากสำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์ สำนักงานหอพรรณไม้ ฝ่ายอนุกรมวิธานพืช ลักษณะชำบ้านดัง ภาพที่ 3.1 ชำเหลืออง ภาพที่ 3.2 และชำน้ำ ภาพที่ 3.3



ภาพที่ 3.1 ลักษณะชำบ้าน จากกลุ่มสมุนไพรรเพื่อชุมชน



ภาพที่ 3.2 ลักษณะข่าเหลือง จากกลุ่มสมุนไพรเพื่อชุมชน



ภาพที่ 3.3 ลักษณะข่าน้ำ จากกลุ่มสมุนไพรเพื่อชุมชน

## 3.2 สารสกัดหยาบ

### 3.2.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

การเตรียมตัวอย่างสด นำส่วนต่าง ๆ ของข่า ได้แก่ เหง้า ลำต้น และใบ มาล้างทำความสะอาด และผึ่งให้แห้ง จากนั้นหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปบดโดยใช้ blender การเตรียมตัวอย่างแห้ง โดยนำส่วนต่าง ๆ ของข่า มาล้างทำความสะอาดและ ผึ่งให้แห้ง จากนั้นผานให้เป็นแผ่นบาง ๆ (หนาประมาณ 1 มิลลิเมตร) นำ ไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างพืชแห้งมาบดด้วย blender

### 3.2.2 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction)

1) นำพืชตัวอย่างทั้งสดและแห้ง ชนิดละ 2 กิโลกรัม (โดยน้ำหนักแห้ง) สกัดด้วยเฮกเซน โดยบรรจุลงในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นเติมเฮกเซน ลงไป 2 ลิตร ให้ท่วมตัวอย่าง ขิง ปิดปาก ขวดรูปชมพู่ให้สนิทด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์และพาราฟิล์ม แข่ทิ้งไว้นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นกรอง เอากากข่าออกโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำกากข่า มาสกัดซ้ำด้วยเฮกเซน ตามวิธีข้างต้น นำสารสกัดข่า ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 รวมกัน นำไประเหยเฮกเซนออกด้วยเครื่อง vacuum rotary evaporator โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส ได้สารสกัดหยาบ (crude extract) ชั่งน้ำหนัก และคำนวณหาปริมาณของสารสกัดที่ได้ (% yield) นำสารสกัดที่ได้บรรจุในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนวิเคราะห์ห้องค้ประกอบทางเคมี

2) นำกากข่าที่ได้จาก 3.3.1 มาทำการสกัดต่อด้วยเอทานอล โดยบรรจุลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นเติมเอทานอลลงไป 2 ลิตร ให้ท่วมตัวอย่างขิง ปิดปาก ขวดรูปชมพู่ให้สนิทด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์และพาราฟิล์ม แข่ทิ้งไว้นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นกรอง เอากากข่าออกโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำกากข่า มาสกัดซ้ำ ด้วยเอทานอลตามวิธีข้างต้น นำสารสกัดข่า ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 รวมกัน นำไประเหยเอทานอลออกด้วยเครื่อง vacuum rotary evaporator โดยใช้อุณหภูมิ ประมาณ 40 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบ (crude extract) นำไปล้างเอา wax ออก ด้วยเอทานอลเย็นจำนวน 7 ครั้ง จากนั้นกรองและระเหยเอทานอลออก สารสกัด ชั่งน้ำหนัก และคำนวณหาปริมาณของสารสกัดที่ได้ (% yield) นำสารสกัดที่ได้บรรจุในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนวิเคราะห์ห้องค้ประกอบทางเคมี

## 3.3 สารสกัดน้ำมันหอมระเหย

### 1) การสกัดด้วยการต้มกลั่น (hydro distillation)

นำพืชตัวอย่างทั้งสดและแห้ง มาชนิดละ 5 กิโลกรัม (โดยน้ำหนักแห้ง) สกัดด้วยวิธีการต้มกลั่น โดยใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 900 มิลลิลิตร จากนั้นประกอบชุดกลั่น กลั่นเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จนกระทั่งได้น้ำมันหอมระเหย ชั่งน้ำหนัก และคำนวณหาปริมาณของ

สารสกัดที่ได้ (% yield) นำสารสกัดที่ได้บรรจุในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

### 3.4 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหย

#### 3.4.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียสร้างกลิ่น

นำสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียสร้างกลิ่น ดังนี้

##### 1) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเบื้องต้นด้วยวิธี agar

well diffusion

ทำการทดสอบตามวิธีของ NCCLS (Peterson & Shanholtzer, 1992)

##### 1.1) การเตรียมสารสกัดเพื่อใช้ในการทดสอบ

สารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคผิวหนังมาเตรียมไว้ในรูป stock solution ให้ได้ความเข้มข้น 100 mg/mL

##### 1.2) การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

เชื้อโคโลนิของเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เพาะเลี้ยงไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอายุประมาณ 24 h มา 1 ลูบใส่ในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในหลอดทดสอบปริมาตรหลอดละ 5 mL นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 h หลังจากนั้นนำมาเจือจางให้ได้จำนวนแบคทีเรีย  $10^7 - 10^8$  CFU/mL โดยเทียบความขุ่นให้ได้เทียบกับความขุ่นของ McFarland Standard No.5 ในการเจือจางนี้ทำโดยการใช้ micropipette ที่ปราศจากเชื้อแล้วหยดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ที่ละหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ จนได้ความขุ่นที่ต้องการ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด และต้องไม่ประกอบด้วยสารที่ขัดขวางประสิทธิภาพของสารที่ต้องการทดสอบ ดังนั้นจึงใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน (ดังตารางที่ 3.1)

**ตารางที่ 3.1** อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของข้าป่า

Bacteria	Gram	Comments	Medium
<i>Corynebacterium xerosis</i> 2637	+	Skin flora, causes body odour	Trypticase soy media
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	+	Skin flora, causes body odour	Trypticase soy media
<i>Propionibacterium acnes</i> DMST 14916	+	Causative organisms of acne	Trypticase soy media
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	Skin flora; can cause skin infections	Trypticase soy media

### 1.3) การทดสอบบริเวณยับยั้ง (inhibition zone)

เทอาหารที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิดลงบนจานเพาะเชื้อ รोजน้วนแข็ง เมื่ออาหารแข็งเจาะหลุมให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 mm ด้วย Cork borer No. 3 จำนวน 3 หลุมต่อจานเพาะเชื้อ ประกอบด้วย สารสกัดหยาบ 2 หลุม และหลุมควบคุม (10% DMSO) 1 หลุม ดูดเชื้อสำหรับทดสอบมา 0.1 ml ใส่ลงในจานเพาะเชื้อโดยใช้ไม้ swab ที่ปราศจากเชื้อทำการ swab เชื้อเริ่มต้นบนผิวหน้าอาหารให้ทั่วแบบ three-way ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้ง เติมสารสกัดหยาบความเข้มข้น 100 mg/mL ปริมาตร 100  $\mu$ L ลงในหลุม นำไปบ่มที่ 37 °C นาน 24 h ตรวจวัดผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางฤทธิ์ยับยั้ง (Inhibition zone) การทดลองแต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด และต้องไม่ประกอบด้วยสารที่ขัดขวางประสิทธิภาพของสารที่ต้องการทดสอบ

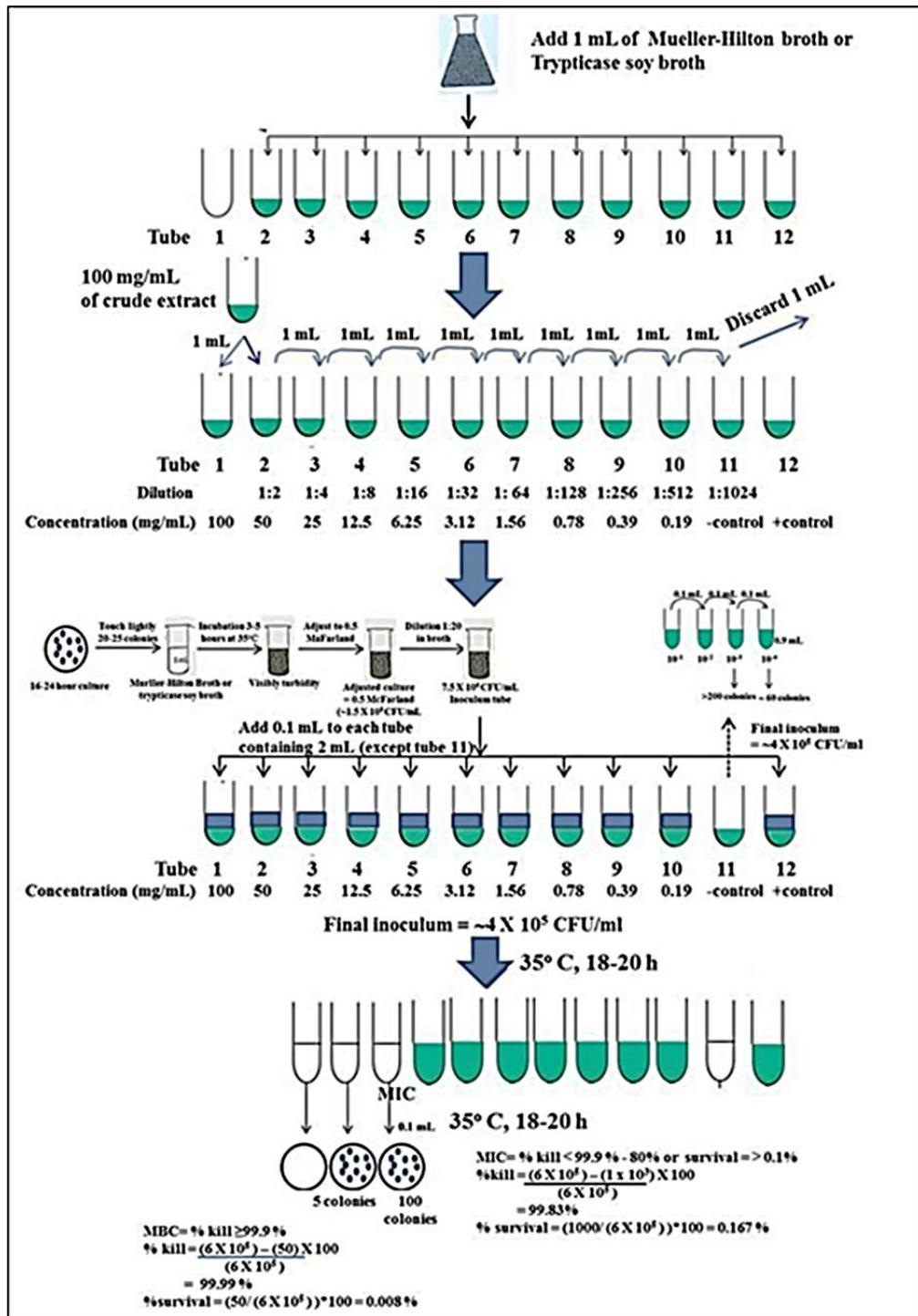
### 1.4) การหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบต่อการเจริญของ

แบคทีเรีย ด้วยวิธี macro broth dilution technique (Hanphakphoom *et al.*, 2016)

ทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียสร้างกลีนาได้ โดยใช้แบคทีเรียมาตรฐานทดสอบตาม Pharmacopoea Europaea เลือกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ไปใช้ในการพัฒนาสูตรต่อไปโดยเลือกผลที่ให้ค่าการยับยั้งแบคทีเรียสร้างกลีนาอยู่ในช่วง 0.02-0.05 mg/mL (2-5%) แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบตาม ดังตารางที่ 4 นำ stock solution ของสารสกัด ที่เตรียมไว้ที่มีความเข้มข้น 100 mg/mL ซึ่งในการทดสอบจะใช้ working solution ของสารสกัด เป็นสารตั้งต้นในการทำ serial dilution แบบ two-fold dilution ดูดอาหารเหลวใส่ลงในหลอดที่ 2 - 12 ที่ฆ่าเชื้อแล้วหลอดละ 1 mL จากนั้นดูสารทดสอบลงในหลอดที่

1 และ 2 หลอดละ 1 mL ผสมสารในหลอดที่ 2 ให้เข้ากัน ดูดสารในหลอดที่ 2 หลอด จำนวน 1 mL ใส่ลงในหลอดที่ 3 ดูดแบบต่อเนื่องแบบ two-fold dilution จนถึงหลอดที่ 11 ดังแผนภาพที่ 2 เมื่อผสมสารละลายในหลอดที่ 11 ให้เข้ากันได้ดีแล้วดูดสารละลายทิ้งไป 1 mL สำหรับหลอดที่ 12 จะมีแต่อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวไม่มีสารทดสอบ จึงใช้เป็น positive control หลอดที่ใช้เป็น negative control มี 2 หลอดได้แก่ negative control หลอดที่ 1 เตรียมโดยเตรียมหลอดที่ 2 เพิ่ม 1 หลอดโดยไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบลงไป negative control หลอดที่ 2 เตรียมโดยดูดอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 0.1 mL ลงในหลอดทดสอบซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ และทำการบ่มเชื้อพร้อมกับหลอดอื่นๆ เติมน้ำเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ลงไปในทุกหลอด จำนวนหลอดละ 0.1 mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 16 – 18 หรือ 24 h ขึ้นกับจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ การอ่านผล การหา MIC เมื่อบ่มเชื้อจนครบเวลาที่ต้องการแล้ว ให้สังเกตหลอดสุดท้ายที่ไม่มีจุลินทรีย์เจริญหรืออาหารเลี้ยงเชื้อใน หลอดไม่ขุ่น อ่านปริมาณของสารทดสอบของหลอดนี้เป็นค่า MIC ของ บันทึกหน่วยเป็น mg/mL

การหา Minimum Bactericidal Concentration (MBC) จากการทดสอบหาค่า MIC ในการทดลองข้างต้น สามารถนำมาหาค่า MBC โดยให้นำหลอดที่ไม่ขุ่นทุกหลอดไปเพาะเชื้อบนอาหารที่ไม่มีสารต้านจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ทดสอบที่ไม่ตายจะกลับเจริญได้ใหม่เมื่อปราศจากสารต้านจุลินทรีย์ อ่านค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่น้อยที่สุดที่ฆ่าเชื้อจะได้ 99.9 % การหา MBC ทำได้โดยดูดอาหารเหลว จากหลอดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไปทำการเจือจางเพิ่มขึ้นทีละ 10 เท่า ที่  $10^{-1}$ - $10^{-3}$  จากนั้นดูดสารละลายเชื้อที่เจือจางปริมาตร 0.1 mL ใส่ลงในอาหาร และทำการ spread plate และทิ้งจนผิวหน้าอาหารแห้ง จึงนำไปบ่มที่ 35 – 37 °C นาน 18 - 24 h จากนั้นจึงนำมานับจำนวนโคโลนี ดังภาพที่ 3.4



ภาพที่ 3.4 แผนภูมิสรุบบนขั้นตอนการปฏิบัติสำหรับ Macro broth dilution technique MBC โดยวิธี Macro broth dilution technique

### 3.4.2 การทดสอบหาเวลาในการฆ่าแบคทีเรีย (Time-Kill Assay)

นำค่า MIC ที่ได้จากการยับยั้งเชื้อสร้างกลืนได้ดี ได้แก่ *Corynebacterium xerosis* 2637 และ *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 เพื่อมาคำนวณหาความเข้มข้นในการโดยเตรียมอาหาร TSB ปริมาตร 1.5 mL ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายสารสกัดฆ่าที่คัดเลือกได้ ปริมาตร 0.5 mL เพื่อปรับความเข้มข้นของสารตามค่า MIC ที่ได้ จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียสร้างกลืน ปริมาตร 0.2 mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $35 \pm 2$  °C และทำการตรวจนับการเจริญของแบคทีเรียสร้างกลืน ที่เวลา 0 12 24 36 48 60 และ 72 นาที โดยดูดสาร 100 ไมโครลิตร มาทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียกับสารละลายเกลือ 0.85% และนำไป Spread plate ในอาหาร TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $35 \pm 2$  °C และนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญในอาหาร รายงานในหน่วย CFU/mL

### 3.4.2 วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging assay เตรียมสารละลายตัวอย่างของสารสกัดฆ่า ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมเอทานอลปริมาตร 950 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย 0.1 mM DPPH ปริมาตร 2 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่มืด 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer เตรียมสารละลาย blank เพื่อวิเคราะห์สีของตัวอย่าง โดยนำน้ำมันหอมระเหยและ absolute จากขิงปริมาณ 50 ไมโครลิตร เติมเอทานอล ปริมาตร 950 ไมโครลิตร และเติมเอทานอลอีก 2 มิลลิตร เพื่อให้มีปริมาตรเท่ากัน ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยหาความยาวคลื่นสูงสุด แล้ววัดค่าการดูดกลืนคลีนแสง และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหา % Radical scavenging activity จากสูตร

$$\% \text{ Radical scavenging activity} = \frac{(\text{Control absorbance} - \text{Sample absorbance}) \times 100}{\text{Control absorbance}}$$

### 3.4.3 วิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ Tyrosinase

เติมสารละลาย L-DOPA (3,4-dihydroxy-L-phenylalanine) ความเข้มข้น 2.5 mM ปริมาตร 80  $\mu$ l เติมตัวอย่าง 80  $\mu$ l เติม phosphate buffer (0.1 mM, pH 6.8) ปริมาตร 160  $\mu$ l และเติมเอนไซม์ไทโรซิเนส ความเข้มข้น 31 U/ml ปริมาตร 80  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $37$  °C 10 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ใช้ Kojic เป็น สารมาตรฐาน โดยเตรียมสารมาตรฐาน Kojic acid ดังต่อไปนี้ ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 การเตรียมความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Kojic acid

หลอด	ปริมาตร kojic (1,g/ml) (μl)	ปริมาตรน้ำ (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย (μl/ml)
1	200	0	1000
2	160	40	800
3	120	80	600
4	80	120	400
5	40	160	200
6	20	180	100
7	0	200	0

นำมาคำนวณหาค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ Tyrosinase inhibition} = \frac{(A-B) - (C-D)}{(A-B)} \times 100$$

A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Blank + enzyme

B = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Blank ไม่เติม enzyme

C = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย sample + enzyme

D = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย sample ไม่เติม enzyme

### 3.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารจากข้าว

นำทั้งสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดีมาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารจากข้าว

#### 3.5.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยใช้ Folin-Ciocalteu colorimetric method อาศัยหลักการที่สารประกอบฟีนอลิกจะทำปฏิกิริยาเชิงซ้อนกับกรดฟอสโฟทังสติก (phosphotungstic acid) และกรดฟอสโฟโมลิบดีก (phosphomolybdic acid) เกิดเป็นสารประกอบที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน

### 3.5.2 ปริมาณ Quercetin

การศึกษาหาปริมาณ Quercetin ในสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของข้า 3 ชนิด

#### 1) เตรียมสาร

1.1) เตรียมสารมาตรฐาน Quercetin ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25  $\mu\text{g/mL}$

1.2) เตรียมสาร Anisaldehyde reagent (Anisaldehyde +  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + Acetic acid + Methanol)

#### 2) วิธีทำ

2.1) นำสารละลายมาตรฐานและสารสกัดข้าผสมกับ Anisaldehyde reagent ในอัตราส่วน 1:1 ปิดฝา แล้วนำไปต้มที่  $70^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 375 nm

2.2) นำค่าการดูดกลืนแสงที่พล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Quercetin กับค่าการดูดกลืนแสง

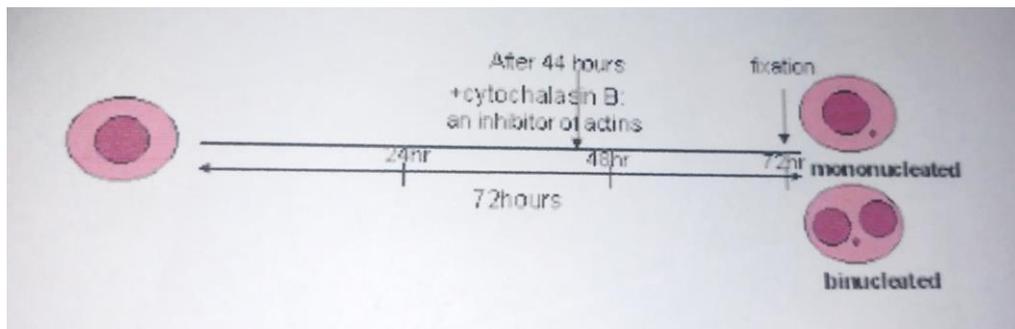
### 3.6 การทดสอบความปลอดภัยของสารจากข้าป่าระดับเซลล์

#### 3.6.1 Mutagenicity assay โดยวิธี Micronucleus test ทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดหยาบจากข้าป่าในเซลล์ลิมโฟไซต์

Cytokinesis-blocked micronucleus (CBMN) เป็นวิธีหนึ่ง ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อประเมินผลของสารเคมี โมเลกุล หรือยาที่มีต่อความเสียหายของโครโมโซมโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์

การตรวจสอบไมโครนิวเคลียส (Micronucleus Assay : MN) เป็นระบบการทดสอบการกลายพันธุ์เพื่อตรวจสอบสารเคมีที่ก่อให้เกิดการก่อตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเยื่อหุ้มเซลล์ขนาดเล็ก เช่น ไมโครนิวเคลียสในไซโตรพลาซึมของเซลล์ระหว่างยีน

MN คือนิวเคลียสขนาดเล็กที่แยกตัวออกมาจากนิวเคลียสหลัก (Main nucleus) ของเซลล์โดยจะปรากฏขึ้นในเซลล์ที่อยู่ในระยะเทโลเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสและไมโอซิสเมื่อโครโมโซมมีความเสียหาย เช่น เกิดการแตกตัวเป็นชิ้นสั้นๆ แบบ Acentric fragment หรืออาจเป็นโครโมโซม ทั้งแห่งที่ไม่ถูกต้องไปรวมที่ขั้วใดขั้วหนึ่งของเซลล์ในระยะแอนาเฟส เมื่อเข้าสู่ระยะเทโลเฟส จะมีการสร้างเยื่อหุ้มนิวเคลียส รวมทั้งสร้างเยื่อหุ้มรอบชิ้นส่วนที่หักและโครโมโซมที่แยกออกไป ปรากฏเป็นก้อนนิวเคลียสขนาดเล็ก (Aardema & Volders, 2001) ดังภาพที่ 3.5



ภาพที่ 3.5 แสดงการเกิดไมโครนิวเคลียส

ที่มา: Anonymous (2019)

### วิธีการ Micronucleus Assay

- 1) เก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัคร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Heparin tube ป้องกันไม่ให้เลือดแข็งตัวและไม่ให้เลือดจับตัวเป็นก้อน
- 2) แบ่งเลือดใส่ในหลอด 15 มิลลิลิตร หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร
- 3) เติมสารสกัดตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 10, 15, 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- 4) นำหลอดเลือดที่ฉายรังสีแล้ว มาเติม 4.5 มิลลิลิตร RPMI-1640 Completed medium (20% FBS, 2% L-glutamine, 1% antibiotics)
- 5) เติม 120 ไมโครลิตร Phytohaemagglutinin (PHA) เข้าให้เซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ
- 6) นำเซลล์ตัวอย่างไปเลี้ยงต่อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส, 5% CO<sub>2</sub> (ภาพที่ 3.3)
- 7) เติม 20 ไมโครลิตร Cytochalasin-B (หลักจากเติม PHA ครบ 44 ชั่วโมง) เข้าให้เซลล์กระจายตัว
- 8) เมื่อครบ 72 ชั่วโมง นำเซลล์ที่ได้มาเข้าให้กระจายตัว แล้วนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใส่ด้านบนออก
- 9) เตรียมสารละลาย KCl ความเข้มข้น 0.75 โมลาร์ (แช่แข็ง) ค่อยๆเติมทีละหยดใส่เซลล์เลือด พร้อมเขย่า (ใช้ Vortex) เติมจนครบ 7 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 10) นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนออกดังภาพที่ 3.6



ภาพที่ 3.6 การบ่มเลี้ยงเซลล์เลือดในตัว CO<sub>2</sub> incubator

11) เตรียมสารละลาย Fixative solution (ผสม เมทานอล : กรดอะซิติก ในอัตราส่วนเท่ากับ 10 : 1 ผสมในอัตราส่วน 1 : 1 กับสารละลาย Ringer's solution (ซึ่ง NaCl 4.5 กรัม KCl 0.21 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร) ค่อยๆหยดสารละลายที่เตรียมไว้ใส่เซลล์เม็ดเลือด พร้อมเขย่า (ใช้ Vortex) เติมจนครบ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

12) นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลาย ส่วนใสด้านบนออก

13) เติมสารละลาย Fixative solution ผสม เมทานอล : กรดอะซิติก ในอัตราส่วนเท่ากับ 10 : 1 ค่อยๆหยดสารละลายที่เตรียมไว้ใส่เซลล์เม็ดเลือด พร้อมเขย่า (ใช้ Vortex) เติมจนครบ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

14) นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลาย ส่วนใสด้านบนออก

15) ทำซ้ำข้อ 13 - 14 ซ้ำอีก 2-3 รอบ หรือจนกว่าจะได้ตะกอนสีขาว ดังภาพที่ 3.7



ภาพที่ 3.7 ขั้นตอนการสกัดเซลล์เม็ดเลือดขาว

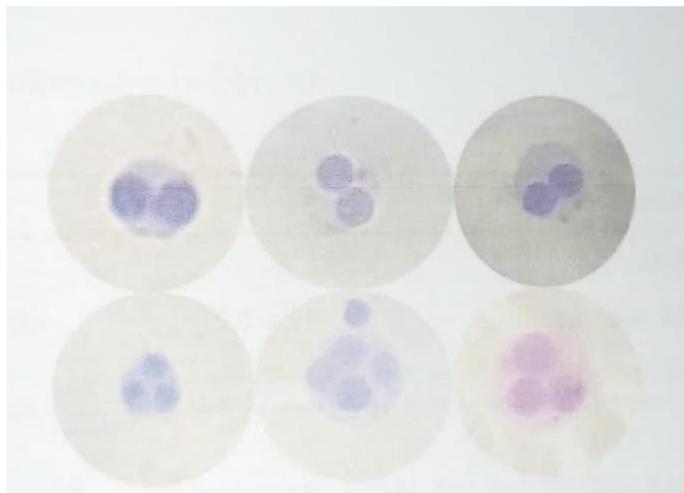
#### การสกัดเซลล์เม็ดเลือดขาว

- 1) เติม KCl ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์
- 2) เติม Fixative solution ผสมกับ Ringer's solution ในอัตราส่วน 1:1
- 3) เติม Fixative solution
- 4) ล้างจนได้ตะกอนสีขาว
- 5) เมื่อได้ตะกอนสีขาวแล้ว ให้ดูดสารละลายด้านบนจนเหลือประมาณ 1 cm (หรือน้อยกว่านั้นตามปริมาณตะกอน) จากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปหยดลงบนสไลด์สะอาด แล้วปล่อยให้แห้ง
- 6) ทำการย้อมสไลด์ด้วย 5% Giemsa (เจือจางด้วย PBS buffer กรองสีย้อมก่อนใช้งาน) แช่ทิ้งไว้ 15 นาที ล้างสีที่เกินด้วยน้ำกลั่น ปล่อยให้แห้ง (ภาพที่ 3.8)



ภาพที่ 3.8 ขั้นตอนการย้อมสไลด์ (ซ้าย) กรองสีย้อม 5% Giemsa (ขวา) ย้อมสไลด์ทิ้งไว้ 15 นาที

- 7) นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อทำการศึกษาความผิดปกติของเซลล์ที่เกิดขึ้น เช่น ไมโครนิวเคลียส และ อื่น ๆ ดังภาพที่ 3.9



ภาพที่ 3.9 ตัวอย่างเซลล์ที่เกิดความผิดปกติของโครโมโซม (เกิดไมโครนิวเคลียส)

### 3.6.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยวิธี Phototoxicity test (อ้างอิงจาก OECD 432)

เครื่องสำอางหรือสิ่งที่มีมนุษย์ใช้เพื่อการทำมาค้าขายเพื่อความสวยงาม เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์เพื่อความงามเป็นสินค้าที่ถูกควบคุมโดย กฎหมายควบคุมเครื่องสำอางของสหภาพยุโรป (76/768/EEC) ได้กำหนดแนวทางการควบคุมไว้อย่างเข้มงวดสำหรับเจ้าหน้าที่ภาครัฐแต่ละประเทศ โดยสหรัฐอเมริกาได้มีการออกกฎหมายว่าด้วยความปลอดภัยของเครื่องสำอาง ปีที่ 2011 (รู้จักในนาม HR 2539) เพื่อเป็นการตอบสนองต่อความกังวลของความปลอดภัยของส่วนประกอบต่าง ๆ เพื่อประเมินความปลอดภัย

การทดสอบ OECD 432 Phototoxicity test เป็นการทดสอบความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์สารสกัดในระดับหลอดทดลอง โดยใช้เซลล์ไลน์ Balb/3T3 CLONE A31 (ATCC-CCL-163) ในการทดสอบซึ่งถ้าทดสอบสารสกัด พบว่ามีค่าความเป็นพิษต่ำ สามารถนำไปใช้อ้างอิงในการผลิตและจำหน่ายเครื่องสำอางได้ โดยดูจากตารางแสดงความเป็นพิษของสารโดยใช้ค่า PIF เป็นตัวกำหนด (ดังตารางที่ 3.3 โดยพบว่าถ้าสารทดสอบมีค่า PIF > 5.0 หรือมีค่า MPF > 0.15 แสดงว่าสารทดสอบมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง ไม่เหมาะนำไปใช้ทำเครื่องสำอาง)

ตารางที่ 3.3 ค่าความเป็นพิษของสาร โดยใช้ค่า PIF

MPE	PIF	Prediction
< 0.1	< 2.0	Non phototoxic
0.1 < MPE < 0.15	2.0 < PIF < 5.0	Probable phototoxicity
MPE > 0.150	PIF > 5.0	phototoxicity

1) การเพาะเลี้ยงเซลล์ Balb/3T3 CLONE A31 (ATCC-CCL-163)

เซลล์ Balb/3T3 (บริษัท ATCC) เพาะเลี้ยงด้วยอาหารชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium โดย D-MEM ผสมกับ 100% (V/V) Fetal bovine serum (FBS) 4mM Glutamine Penicillin 100 U/ml และ Streptomycin 100 µg/ml ในสภาวะที่ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (V/V) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 3 วัน และ ทำการ Subculture ต่อเมื่อเซลล์มีปริมาณ Confluence เท่ากับ 85%

2) การตรวจความเป็นพิษของสารสกัด ด้วย Neutral red assay

เซลล์ Balb/3T3 นำมาเพาะเลี้ยงใน 96-well plates จำนวน  $10^5$  เซลล์/หลุม และเพาะเลี้ยงจนกว่าเซลล์จะมีปริมาณ Confluence เท่ากับ 85% ก่อนทำการทดลองเป็นเวลา 24 ชม. สารมาตรฐานทำลายด้วยตัวทำละลาย Dimethyl sulfoxide โดยทดสอบในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 10-10000 มคก./มล. เป็นระยะเวลา 1 ชม. หลังจากนั้นนำไปฉายแสง UVA (320 nm) จากนั้นนำเซลล์ไปล้างด้วยสารละลาย PBS และบ่มในที่มืดทิ้งไว้นาน 24 ชม. ตรวจสอบเซลล์ด้วยกล้องเฟสคอนทราสต์ จากนั้นเติมสาร Neutral red เป็นระยะเวลา 3 ชม. ในสภาวะที่ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเทสาร Neutral red ที่ทำการล้าง Neutral red ด้วย PBS 2 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย DMSO และวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์ด้วยสูตร

Mean of OD = OD(each well) – mean of OD blank

$$\%Cell\ viability = \frac{\text{Mean of OD(sample)} \times 100}{\text{Mean of OD(control)}}$$

จากนั้นนำมาคำนวณค่าหา PIF และ ค่า MPE จากสูตร

The mean photo effect (MPE)

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^n W_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^n W_i}$$

ในแต่ละครั้งจะมีทั้งหมด 2 กลุ่ม คือ เติมสารและผ่านการฉายรังสี UVA จำนวน 3 Plate สำหรับ เติมสารและไม่ผ่านฉายรังสี UVA จำนวน 3 Plate แต่ละกลุ่มทำการทดลอง 3 ซ้ำ (duplicate ในแต่ละซ้ำ)

### 3.7 การตั้งตำหรับสูตรและศึกษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ดับกลิ่นแบบโรออน

#### 3.7.1 การตั้งตำหรับสูตรผลิตภัณฑ์ดับกลิ่นแบบโรออน (roll-on-deodorant formulation)

ในการตั้งตำหรับสูตรนี้จะใช้สูตรพื้นฐานดังตารางที่ 3.4 โดยมีเปรียบเทียบสูตร Positive control คือ ชุดควบคุมที่มีการเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ Triclosan 0.3% และ สารสกัดข่า และสูตร Negative control คือ ชุดควบคุมไม่เติมสารสกัดข่า เลือกสูตรที่ให้ค่าการยับยั้งจุลินทรีย์มากที่สุด สูตรควบคุมจะใช้ทดสอบผลของสารกันเสียด้วย ความคงตัวของสูตรระงับกลิ่นกายจะทดสอบโดยเก็บที่อุณหภูมิห้องและที่ 40 °C นาน 3-6 เดือน

วิธีทำ

- 1) นำส่วน A และ B ไปให้ความร้อนที่ 70-75° C
- 2) เติมส่วน B ลงในส่วน A นำไปผสมโดยใช้เครื่อง Homo นาน 5-10 นาทีจนเขากัน
- 3) ทำให้อุณหภูมิลดลงที่ 50 องศาเซลเซียส
- 4) เติมส่วน C, D, E, F, และ G ปั่นจนเขากัน

#### 3.7.2 การศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ (Das *et al.*, 2012)

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์จะถูกนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 °C และ 40 °C ที่มีความชื้น 75% (RH, relative humidity) สังเกตผลิตภัณฑ์ทุกสัปดาห์นาน 1 เดือน

#### 3.7.3 ค่า pH

ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ 5 g ละลายในน้ำ 45 ml นำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่องวัด pH

#### 3.7.4 ความหนืด (viscosity)

วัดค่าความหนืดด้วยเครื่อง Viscometer (Model-RVTP) ที่อุณหภูมิ 25° C

#### 3.7.5 ตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์

ตรวจนับจำนวน aerobic plate count (ACP) และ ยีสต์และรา (BAM Chapter 23)

ตารางที่ 3.4 สูตรพื้นฐานผลิตภัณฑ์ดับกลิ่นแบบโรออน

Phase	Ingredient	INCI Name	% w/w	Function
A	Distilled-water	Water	82.95	Diluent
	Disodium EDTA	Disodium EDTA	0.10	Chelating agent
	Hydroxyethyl Cellulose	Hydroxyethyl Cellulose	0.30	Thickener
B	Cetearyl alcohol	Cetearyl alcohol	0.50	Viscosity increasing agent
	Vitamin E	Tocopheryl Acetate	0.05	Emollient
C	Cinnogel oil	Glycerin (and) Glyceryl Acrylate/Acrylic Acid	0.50	Imparts an inviting after-feel and slip
D	ACH	Aluminium Chlorohydrate	10.0	Anti-perspirant agent
E	5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol	Tricosan	0.30	Active
F	Di-water	Water	5.00	Diluent
	Alpha-Arbutin	Arbutin	0.30	Skin whitening agent
<b>Total</b>			<b>100</b>	

ดัดแปลงจาก: Water doctor, 2517; Smits et al., 2012; Alzomor et al., 2014

### 3.8 การทดสอบผลิตภัณฑ์ระงับกลิ่นกาย

#### 3.8.1 การทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์ระงับกลิ่นกาย

การทดสอบความไวต่อการยับยั้งแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์ดับกลิ่นกาย (Susceptibility testing) (Egbuobi *et al.*, 2013) ทดสอบโดยใช้ Plate diffusion technique ทำการ swab แบคทีเรียสร้างกลิ่นแต่ละชนิด ( $10^6$  cells/mL) ลงในงานเพาะเชื้อ จากนั้นทำการเจาะรูอาหารโดยใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm หยดผลิตภัณฑ์ดับกลิ่นกายแต่ละสูตรลงในรู นำไปบ่ม

ที่ 37°C นาน 18 h ตรวจผลยับยั้งแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์ดับกลิ่นกาย โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยจะต้องให้ไซนัสที่อยู่รอบ ๆ รุนมากกว่า 2 mm ใช้ผลิตภัณฑ์ทางการค้าเป็นชุด positive control

### 3.8.2 การทดสอบความปลอดภัยทางด้านผิวหนัง (Dermatologically tested)

#### 3.8.2.1 การคัดเลือกอาสาสมัครมนุษย์ให้ตรงกับวัตถุประสงค์ในการประเมินประสิทธิผลของผลิตภัณฑ์

1) เลือกเพศ และช่วงอายุ ให้ได้จำนวนอาสาสมัครตรงตามมาตรฐานในการประเมิน โดยใช้อาสาสมัครจำนวน 30 คน อายุอยู่ในช่วง 24-50 ปี ประกอบด้วยเพศหญิง 15 คน เพศชาย 15 คน

2) พิจารณา และตรวจสอบบริเวณผิวที่ใช้ประเมินประสิทธิผลของผลิตภัณฑ์ในอาสาสมัครแต่ละราย จะต้องไม่มีโรคผิวหนัง หรือมีรอยแผลในบริเวณที่จะทดสอบ Single patch test

3) สอบถามประวัติการใช้ผลิตภัณฑ์ ทำการคัดเลือก และแบ่งกลุ่มอาสาสมัครให้เหมาะสมกับการทดสอบในผลิตภัณฑ์

4) ทำการทดสอบแบบ single blind โดยอาสาสมัครจะไม่ทราบข้อมูลผลิตภัณฑ์ และในการทดสอบจะมีกลุ่มควบคุมที่ใช้สารอื่นเพื่อเป็นการเปรียบเทียบประสิทธิผลของผลิตภัณฑ์

5) ทำความเข้าใจกับอาสาสมัครก่อนการทดสอบ และต้องควบคุมปัจจัยอื่นที่อาจมีผลต่อการทดสอบ เช่น จำกัดการใช้หรือหยุดการใช้ผลิตภัณฑ์ที่อาสาสมัครใช้เป็นประจำ เพื่อป้องกันการประเมินผลที่ผิดพลาด

6) ผู้ประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางตลอดระยะเวลาในการทดสอบคือ นักพิษวิทยา นักจิตวิทยา และแพทย์เฉพาะทางด้านผิวหนัง

7) การประเมินผลการทดสอบจะทำการประเมินโดยเปรียบเทียบผลก่อนและหลังการใช้ผลิตภัณฑ์ในอาสาสมัครแต่ละราย และมีแบบสอบถามให้อาสาสมัครประเมินตนเองเพื่อเปรียบเทียบก่อนและหลังการใช้ผลิตภัณฑ์โดยนำมาเป็นข้อมูลประกอบผลการทดสอบ

8) ดำเนินการทดสอบเป็นไปตามจริยธรรมสำหรับการทดสอบทางคลินิกในอาสาสมัครมนุษย์

#### 3.8.2.3 ระยะเวลาการปรับสภาวะต่าง ๆ ของอาสาสมัคร

อาสาสมัครจะใช้สบู่ที่มีค่า pH เป็นกลางและไม่มีน้ำหอมและไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ระงับกลิ่นจนวนกระทั่งมีกลิ่นตัวคงที่

#### 3.8.2.4 การทดสอบ Sniff test ของผลิตภัณฑ์

ครั้งแรกจะวัดค่า Intensity of sweat odour ที่ได้วงแขนหลังจากปรับสภาวะต่าง ๆ ของอาสาสมัครเป็นเวลา 24 h ค่าที่วัดได้จะเป็น  $t_0$  เป็นค่าเริ่มต้นของอาสาสมัครแต่ละคน

ระยะการทดสอบ อาสาสมัครจะทดสอบผลิตภัณฑ์ได้วงแขน โดยแขนข้างที่ 1 จะเป็นสูตรที่มี active แขนข้างที่ 2 จะเป็นสูตรที่ไม่มี active ใช้เวลาทดสอบนาน 5 วัน โดยทุก ๆ วันอาสาสมัครจะต้องใช้สบู่เหมือนกัน ระหว่างการทดสอบจะวัดค่า Intensity of sweat odour หลังการใช้งาน 12 h 24h และ 48 h ค่าที่วัดได้จะเป็น  $t_1$  ( $t_2$ ) และ ( $t_3$ ) ตามลำดับ

นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาค่า Odour Reduction (%) เปรียบเทียบระหว่างสูตรที่มี active และไม่มี active โดยค่า odour ที่วัดได้ที่เวลา  $t_1$ ,  $t_2$  หรือ  $t_3$  เปรียบเทียบกับค่า odour เวลาเริ่มต้นที่  $t_0$  ตามสูตรที่ 1

$$\text{Odour Reduction [\%]} = ((1 - (t_x / t_0)) \times 100) \text{ สูตรที่ 1}$$

เมื่อ  $t_x$  = ค่า Odour ที่เวลา  $t_1$ ,  $t_2$  หรือ  $t_3$

$t_0$  = ค่า Odour ที่เวลา  $t_0$

### 3.8.2.5 การหาจำนวนแบคทีเรีย (Determination of Bacterial Count)

หาจำนวนแบคทีเรียภายใต้วงแขน โดยทำการ Swab บริเวณใต้วงแขนของอาสาสมัครที่ใต้วงแขนหลังจากปรับสภาวะต่าง ๆ ของอาสาสมัครเป็นเวลา 0 h ( $t_0$ ) และหลังการทดสอบผลิตภัณฑ์ที่เวลา 6 h  $t_2$  ทำโดยใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ (Cotton swabs) จากนั้นนำมาวางในหลอดสารละลายน้ำเกลือ (0.9 % NaCl) ปริมาตร 9 mL จากนั้นผสมในเครื่อง vortex shaker นำมา Spread ลงบนอาหาร TSA เพาะเลี้ยงที่ 32.5°C ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ และภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ 24-48 h นำมานับจำนวน colony forming units [CFU/mL] จากนั้นคำนวณหาค่า % Bacteria reduction จากสูตรที่ 2

$$\text{Bacteria reduction (\%)} = ((N_{At2} / N_{Ct2}) / N_{At2}) \times 100 \text{ สูตรที่ 2}$$

เมื่อ  $N_{At2}$  = จำนวนแบคทีเรีย  $t_0$

$N_{Ct2}$  = จำนวนแบคทีเรียที่  $t_2$