

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์

- 3.1.1 ปีกเกอร์ (Beaker)
- 3.1.2 หลอดทดสอบ (Test tubes)
- 3.1.3 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- 3.1.4 ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask)
- 3.1.5 กระจกตวง (Graduated cylinder)
- 3.1.6 กรวยกรอง (Funnel)
- 3.1.7 กระดาษกรอง (Filter paper) เบอร์ 1
- 3.1.8 โถดูดความชื้น (Desiccator)
- 3.1.9 ตู้อบความร้อน (Hot oven)
- 3.1.10 เครื่องชั่งทศนิยมสี่ตำแหน่ง (Analytical balance) ยี่ห้อ Ohaus รุ่น Adventure
- 3.1.11 เครื่องชั่งทศนิยมสองตำแหน่ง (Analytical balance) ยี่ห้อ ADAM รุ่น PGL 2002ae
- 3.1.12 เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ Gemmy Industrial Corp
- 3.1.13 เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV-2401PC UV-VIS RECORDING SPECTROPHOTOMETER
- 3.1.14 เครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary evaporator)
- 3.1.15 ปิเปตอัตโนมัติ (Auto pipette) ยี่ห้อ Brand รุ่น Transferpette® S
- 3.1.16 เดสซิเคเตอร์
- 3.1.17 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- 3.1.18 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
- 3.1.19 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave), Tommy Seico Co., Ltd.
- 3.1.20 ขวดกั้นกลม
- 3.1.21 Melanoma B16-F1 (ATCC® CRL-6323™)
- 3.1.22 37 °C Humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>
- 3.1.23 Laminar flow hood
- 3.1.24 ชุดรีฟลักซ์
- 3.1.25 เครื่อง Microplate Reader

### 3.1.26 96 Well Plate

## 3.2 สารเคมี

### 3.2.1 Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

### 3.2.2 95% Ethanol จากบริษัททีทีเค ชายน์จำกัด

### 3.2.3 H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### 3.2.4 NaOH

### 3.2.5 ถ่านเปลือกมังคุด

### 3.2.6 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid Ferric chloride

### 3.2.7 K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (Dipotassium peroxodisulphate

### 3.2.8 2,2 -Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Fluka, Germany

### 3.2.9 Methanol, RCI Labscan, Thailand

### 3.2.10 NaCl

## 3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

### 3.3.1 Agar powder

### 3.3.2 Potato dextrose agar (PDA)

### 3.3.3 Tryptic Soy Broth (TSB)

## 3.4 ผลิตภัณฑ์มาร์กหน้าซาร์โคลต้านเชื้อก่อโรคและมลภาวะ

### 3.4.1 การเตรียมถ่านกัมมันต์

ชั่งผงถ่านเปลือกมังคุด 10 g ใส่ลงไปในบีกเกอร์ แล้วนำมาเทใส่ขวดก้นกลมของชุดรีฟลักซ์ จากนั้นเติมสารที่ใช้ในการก่อกำมันต์ มี 2 ชนิด ได้แก่ เติมกรดฟอสฟอริก และ NaOH ที่มีอัตราส่วนของผงถ่านเปลือกมังคุดต่อกรดฟอสฟอริก และ NaOH ในอัตราส่วน 1:2 1:3 1:4 และ 1:5 ให้ความร้อนด้วยวิธีการรีฟลักซ์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างถ่านกัมมันต์ที่เตรียมได้โดยวิธีการกรองแบบลดความดันด้วยน้ำสะอาดจนมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6-7 อบถ่านกัมมันต์ที่เตรียมได้ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

**3.4.2 การศึกษาประสิทธิภาพถ่านกัมมันต์ในการดูดซับเชื้อก่อโรคสิวและผิวหนัง** (Naka et al., 2000)

เตรียมความเข้มข้นของแบคทีเรียก่อโรคสิวและผิวหนัง 3 ชนิด ได้แก่ Propionibacterium acnes DMST 14916 Staphylococcus aureus TISTR 1466 และ Staphylococcus epidermidis TISTR 518 ให้ได้เซลล์  $10^6$ - $10^8$  CFU/mL ในอาหาร Trypticase soy broth (TSB) โดยเปรียบเทียบกับ Macfarland No 5.0 ทำการนับจำนวนแบคทีเรียโดยการ Spread plate ในอาหาร Trypticase soy agar (TSA) จากนั้นนำเชื้อที่เตรียมไว้มา 1 mL และเติมถ่านกัมมันต์ปริมาณ 0.01 g ผสมเข้ากับน้ำเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ใน Incubator shaker นาน 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 600 X g นาน 5 นาที เพื่อเคลื่อนย้ายเอาถ่านกัมมันต์ออก จากนั้นนำส่วนใสไปทำการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่หลีกเลี่ยงการดูดซับด้วยวิธี Spread plate ในอาหาร TSA

**3.4.3 การตั้งตำรับสูตรและศึกษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์มาร์กหน้าซาร์โคลต้านเชื้อก่อโรคสิวและผิวหนังและมลภาวะ**

#### 3.4.3.1 การตั้งตำรับสูตรผลิตภัณฑ์

ในการตั้งตำรับสูตรนี้จะใช้สูตรพื้นฐาน โดยมีเปรียบเทียบกับสูตร ที่เติม Activated charcoal ที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0.05 และ 1 % เลือกสูตรที่ให้ลักษณะทางกายภาพที่ดี ความคงตัวของสูตร โดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่ 4°C นาน 3-6 เดือน และในที่มืดแสง ดังตารางที่ 3.1

##### วิธีทำ

1. นำส่วน A ผสมกัน
2. เติมส่วน B ลงในส่วน A โดยค่อยๆ เติมน้ำ Carbopol silk 100 polymer ให้เจลพองตัวจนเข้ากัน
3. จากนั้นตามด้วยส่วน C และ D
4. ตามด้วยส่วน E คนให้เข้ากัน

#### 3.4.3.2 การศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ (Das et al., 2012)

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

#### 3.4.3.3 ค่า pH

ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ 5 g ละลายในน้ำ 45 ml นำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่องวัด pH

ตารางที่ 3.1 สูตรมาตรฐานผลิตภัณฑ์มาส์กหน้าชาโรโคลด้านเชื้อก่อโรคผิวหนังและผลภาวะ

Part	Ingredients	w/w
A	Water	71.33
	Dissolvine NA2	0.10
	Sunpu allantoin	0.20
	Propylene glycol	4.00
	Butylene glycol	3.00
B	Hyaluronic acid	0.06
	Carbopol silk 100 polymer	0.50
C	Water	1.00
	Triethanolamine	0.50
D	Water	10
	Niacinimide	4.00
	Tranexamic acid	1.00
F	Polysorbate 20	0.50
	Microcare PHC	0.80

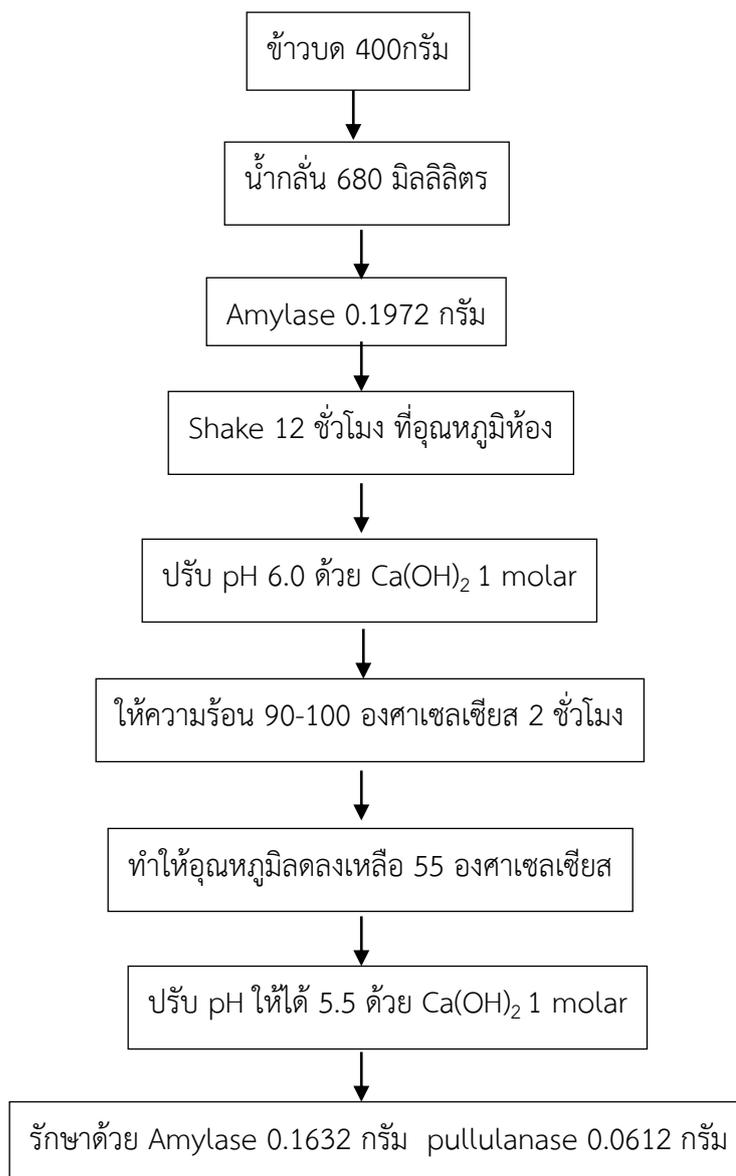
#### 3.4.3.4 ตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์

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

### 3.5 ผลิตภัณฑ์เซรั่มฟื้นฟูสภาพผิวจากสารสกัดข้าวและกรดแลคติกจากข้าวหมัก

#### 3.5.1 การผลิตกรดแลคติกด้วยการหมักแบบ Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) จากข้าว

กระบวนการทำ saccharification ของแป้งข้าว เมื่อได้น้ำข้าวแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ดังภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 กระบวนการทำ saccharification ของแป้งข้าว ทั้ง 3 ชนิด

ผลิตกรดแลคติกด้วยเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 2356 โดยเตรียมหัวเชื้อเหลว MRS เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นทำการล้างเซลล์และเตรียมหัวเชื้อด้วยเจือจางให้ได้ OD600 เท่ากับ 0.5 และเติม 1% ของหัวเชื้อลงในอาหาร Basal medium สำหรับผลิตกรดแลคติก ซึ่งจะคำนวณปริมาณน้ำตาลจากข้าว 3 ชนิด ใส่ในสูตร Basal medium ให้เท่ากับกลูโคสในสูตร โดยเติมน้ำตาลจากข้าวสากัดที่ความเข้มข้น 10 20 40 60 และ 80 g/L นำไปเลี้ยงในโถบ่มเชื้อไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 วัน วัดค่าการเจริญโดยวัดความขุ่นของเซลล์ที่ OD600 ด้วยเครื่อง

Spectrophotometer และนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บส่วนใน เก็บตัวอย่างเซลล์ไปวิเคราะห์ค่า pH และปริมาณกรดแลคติก

**3.5.2 วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Total Reducing Sugar) อ้างอิงวิธีของ (Sawangwan et al., 2016)**

**1. วิธีการเตรียมสารเคมี**

1.1 เตรียม NaOH โดยชั่ง NaOH ปริมาณ 8 g ละลายในน้ำ แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml

1.2 Sodium potassium tartrate: ชั่ง Sodium potassium tartrate 150 g ในน้ำ แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 250 ml

1.3 Dinitro salicylic acid reagent (DNS)

2M NaOH 100 ml

Sodium potassium tartrate 250 ml

Dinitro salicylic acid 5 g

H<sub>2</sub>O 500 ml

นำสารทั้งหมดละลายเข้าด้วยกันแล้วใส่ในขวดสีชา

1.4 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (Standard glucose solution): ละลายกลูโคส 0.1 g ในน้ำ แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml

**2. วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์**

2.1 ปิเปตสารสกัด 1 ml เติมสารละลาย DNS 1 ml

2.2 ต้มใน Water bath 100 องศา 5 นาที

2.3 รอให้เย็นเติมน้ำกลั่น 5 ml

2.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

2.4 เทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

**3. การทำกราฟมาตรฐานกลูโคส**

3.1 ปิเปตสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 0 2 4 6 8 10 mg/ml

3.2 เติมสารละลาย DNS 1 ml

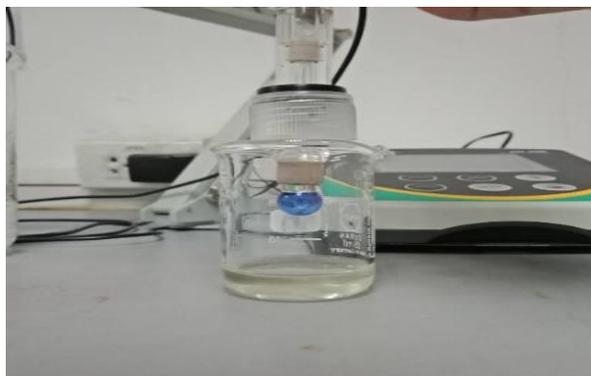
3.3 ต้มใน Water bath 100 องศา 5 นาที

3.4 รอให้เย็นเติมน้ำกลั่น 5 ml

3.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

### 3.5.3 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง

วิเคราะห์ค่าความเป็นกรดเป็นด่างด้วย pH Meter ดังภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.2 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง

### 3.5.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก อ้างอิงวิธีของ Nunes et al. (2017)

โดยเตรียมสารสกัดตัวอย่าง 0.5 mL จากนั้นเติมน้ำกลั่น 12.5 mL หยดฟีนอล์ฟทา ลีน 2-3 หยด แล้วนำไปวัดค่า pH ให้อยู่ในช่วง 8-9 คำนวณหาปริมาณกรดแลคติก จากสูตรคำนวณ ดังนี้ ดังภาพที่ 3.3

$$\% \text{กรดแลคติก} = \frac{N \times \text{ปริมาตร NaOH} \times 90.8 \times 100}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง} \times 1000}$$

N = ความเข้มข้นของสารละลาย NaOH

น้ำหนักโมเลกุลของกรดแลคติก = 90.8



ภาพที่ 3.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก

### 3.5.5 การสกัดข้าวด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

นำข้าวทั้ง 3 ชนิด ชนิดละ 2 กิโลกรัม (โดยน้ำหนักแห้ง) บรรจุลงในขวดปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นเติม 95% Ethanol ลงไป 2 ลิตร ให้ท่วมตัวอย่าง ปิดฝาขวดให้สนิท แช่ทิ้งไว้วัน 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นกรอง เอากากออกโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำกากมาสกัดซ้ำด้วย 95% Ethanol ตามวิธีข้างต้น นำสารสกัด ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 รวมกัน นำไประเหย 95% Ethanol ออกด้วยเครื่อง Vacuum rotary evaporator โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส ได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) ซึ่งน้ำหนัก และคำนวณหาปริมาณของสารสกัดที่ได้ (% Yield) นำสารสกัดที่ได้บรรจุในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพ

$$\% \text{ Yield} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดหยาบ (weight of extract)} \times 100}{\text{น้ำหนักของพืช (weight of ground plant material)}}$$

### 3.5.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS Assay (Re et al., 1999)

1. เตรียมสารละลาย ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) โดยผสม 7 mM ABTS กับ 2.45 mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (Dipotassium peroxodisulphate) ให้เข้ากัน (อัตราส่วน ABTS : K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> = 1 : 0.5) เก็บไว้ในที่มืด 12 – 16 ชั่วโมง หรือข้ามวัน
2. เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน ABTS : น้ำ เท่ากับ 3 : 19
3. เตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 15 mg/mL ด้วย DMSO
4. เจือจางตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 200, 1000, 8500 µg/mL โดยปิเปตสารจากข้อ 3 แล้วเจือจางด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ
5. ปิเปตสารจากข้อ 4 มา และเติมสารละลาย ABTS ที่เจือจางแล้ว 150 µL ผสมให้เข้ากันโดยให้ ทิ้งไว้เป็นเวลา 60 นาที ในที่มืด
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm
7. ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ L-ascorbic acid และ Trolox เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ
8. คำนวณหาปริมาณ % inhibition of ABTS\* (% EC) จากกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกับค่า % inhibition of ABTS\*

### 3.5.7 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay

#### 1. การเตรียมสารละลาย DPPH

เตรียมสารละลาย DPPH (2,2 -diphenyl-1-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น 200  $\mu\text{M}$  ในสารละลาย Absolute methanol

#### 2. การเตรียมสารมาตรฐาน Trolox และ Ascorbic acid

2.1 เตรียมสารมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  โดยใช้เอทานอลในการละลายจะได้สารมาตรฐาน (Stock Trolox)

2.2 บีบสารมาตรฐาน Stock Trolox 200  $\mu\text{L}$  เติมเอทานอล 800 ไมโครลิตร จะได้สารมาตรฐาน Trolox 200  $\mu\text{M}$  (Working Trolox)

2.3 บีบสารมาตรฐานจากข้อ 2 ปริมาตร 2, 4, 6, 8, 10, 15 และ 20  $\mu\text{L}$  และเติม DPPH Working 150  $\mu\text{L}$  ทิ้งไว้ 20 นาที

2.4 นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm

2.5 สารมาตรฐาน Ascorbic acid ก็ทำในทำนองเดียวกับสารมาตรฐาน Trolox

#### 3. การเตรียมตัวอย่าง

3.1 เตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 15  $\text{mg}/\text{mL}$  ด้วย DMSO

3.2 เจือจางตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 200, 1000, 8500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  โดยบีบสารจากข้อ 1 แล้วเจือจางด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ

3.3 บีบสารจากข้อ 2 มา และเติม DPPH Working 150  $\mu\text{L}$  ผสมให้เข้ากันโดยให้ ทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที ในที่มืด

3.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm

3.5 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ Trolox และ Ascorbic acid เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ (M.W.Trolox=250.29  $\text{g}/\text{mole}$ , Density<sub>Trolox</sub>=0.95  $\text{g}/\text{cm}^3$ )

3.6 คำนวณหา %IC จากสมการ

$$\%EC = \frac{Abs_{control} - Abs_{sample}}{Abs_{control}} \times 100$$

### 3.5.8 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric Reducing Ability Power (FRAP) Assay การทดสอบด้วยวิธี FRAP assay (Prior et al, 2005)

#### 1 .เตรียมสารละลาย FRAP (Ferric reducing antioxidant power) reagent โดยเตรียม

1.1 300 mM Acetate buffer (pH 3.6) เตรียมโดยชั่ง  $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.15 g ละลายใน  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ปริมาตร 0.8 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 50 mL

1.2 20 mM Ferric chloride solution เตรียมโดยชั่ง  $\text{FeCl}_3$  0.054 g ละลายใน น้ำกลั่น 10 mL

1.3 10 mM (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine)) solution เตรียมโดยชั่ง TPTZ อย่างละเอียด 0.0312 g ละลายใน 40 mM HCl 10 mL

1.4 ผสมสารละลายทั้งสามโดยใช้อัตราส่วน Buffer :  $\text{FeCl}_2$  : TPTZ = 10 : 1 : 1 ผสมให้เข้ากันเก็บในที่มืด

1.5 นำสารสกัดตัวอย่าง 10  $\mu\text{L}$  ผสมกับ FRAP reagent 190  $\mu\text{L}$  ผสมให้เข้ากัน

1.6 ตั้งทิ้งไว้ 4 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm

1.7 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Ferrous sulfate ช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0 – 1000  $\mu\text{M}$  (M.W. ของ  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  = 278.01 g/mole, Density ของ  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  = 1.895 g/cm<sup>3</sup>)

1.8 คำนวณหาปริมาณ Relative antioxidant activity (FRAP value) จากกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับค่า absorbance

### 3.5.9 ฤทธิ์ยับยั้งปริมาณเม็ดสีเมลานินของเซลล์ B16-F1

#### 1 ขั้นตอนการ Thaw cell จากบริษัท ATCC

1.1 เซลล์ที่ขนส่งมาจาก ATCC อเมริกา จะถูกขนส่งโดย DHL ที่แช่ในน้ำแข็งแห้ง (ประมาณ - 79°C)

1.2 เมื่อมาถึงทำการละลายเซลล์ที่ 37 °C นาน 1 นาที

1.3 เติมน้ำอาหาร DMEM ปริมาตร 10 mL จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอน 1800 rpm นาน 10 นาที

1.4 ทิ้งส่วนที่เป็นส่วนใส (Supernatant)

1.5 เติมน้ำอาหาร DMEM ปริมาตร 10 mL ที่มี 10 % serum และ 1 % Antibiotic ลงในหลอด

1.6 จากนั้นปิเปตเซลล์เพื่อดูการมีชีวิตของเซลล์ โดยย้อมด้วย Trypan blue (80%)

1.7 นำเซลล์ถ่ายลงใน Flask เลี้ยงเซลล์

1.8 จากนั้นนำเข้าตู้เพาะเซลล์ CO<sub>2</sub>-incubator

1.9 เปลี่ยนถ่าย Dmem Medium ทุก 2-3 วัน จนกว่าเซลล์จะเจริญ

2.0 ทำการ Sub-culture ประมาณ 3-4 วันต่อครั้ง

## 2. ขั้นตอนการ sub culture

2.1 เตรียม DMEM medium ที่มี 10% Serum และ 1 % Antibiotic

2.2 เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง จากนั้นเติม PBS จำนวน 1 ml

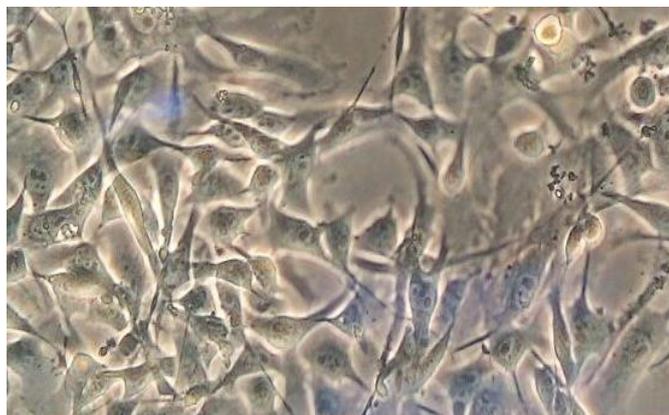
2.3 เท PBS ออก แล้วเติม 1 ถึง 2 mL ของ Trypsin-EDTA solution นำไปไว้ที่ 37 °C

2.4 เติม 10 mL ของอาหาร DMEM ที่มี 10 % Serum และ 1 % Antibiotic ลงในหลอด เพื่อเป็นอาหารให้เซลล์

2.5 นำเซลล์ที่ Sub-culture แล้วเข้าสู่ CO<sub>2</sub>-incubator

2.6 เปลี่ยนอาหาร DMEM

2.7 ส่องดูเซลล์ที่ผ่านการบ่ม 3 วัน ดังภาพที่ 3.4 พบว่าเจริญเติบโตดี ทำการ Sub-culture



ภาพที่ 3.4 ลักษณะเซลล์ Melanoma B16-F1

## 3. การทดสอบสารตัวอย่าง จำนวน 12 ตัวอย่างสำหรับการยับยั้งปริมาณเม็ดสีเมลานิน

การหาปริมาณเม็ดสีเมลานินใช้วิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Zhou et al. (2012) โดยนำเซลล์ ( $1 \times 10^5$  cell/ml) มาบ่มเลี้ยงใน CO<sub>2</sub> incubator เป็น เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารตัวอย่าง ที่ความเข้มข้นต่างๆ และใช้ Ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 20 ug/ml เป็นสารมาตรฐาน

และบ่มเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วย Phosphate buffer pH 7.4 จำนวน สองครั้งเติม 0.25% Trypsin หลุมละ 0.50 ml และบ่มเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน CO<sub>2</sub> incubator เป็นเวลา 5 นาที ดูดเซลล์ลงใน หลอดทดลอง (นับเซลล์) จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 8000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสออก เติม 1 M NaOH หลอดละ 0.1 ml นำไปอุ่นบน Water bath ที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ วัดการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 475 nm คำนวณหา ปริมาณเมลานินในหน่วย % of Control

### 3.5.10 การทดสอบ Cytotoxicity โดยวิธี MTT Assay

1. ทำการเพาะเลี้ยง เซลล์ L 929 ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ และทำการ Sub-culture แล้วเตรียมเซลล์ให้มีความเข้มข้น 10<sup>5</sup> cell/mL แล้วนำไปแบ่งใส่ใน 96-well plate โดยในแต่ละหลุมมีปริมาตรเท่ากับ 1 µL

2. นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 18-24 h

3. เติมสารสกัดตัวอย่าง (Stock) ทั้ง 12 สาร ที่ละลายด้วย DMSO นำไปกรองด้วย ที่กรองไซริงค์ขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร แล้วเจือจางด้วย DMEM medium โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0 10<sup>-8</sup> 10<sup>-7</sup> 10<sup>-6</sup> 10<sup>-5</sup> และ 10<sup>-4</sup> g/mL (การทดลอง 3 ซ้ำ)

4. จากนั้นนำไปบ่มต่อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 48 h

5. เมื่อครบ 48 h ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ลงไป จำนวน 100 µL

6. เติมสารละลาย MTT ที่ละลายด้วย PBS buffer (กรองก่อนใช้) ลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลท ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 mg/mL จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 4 h

7. เมื่อครบ 4 h แล้ว ดูดสารละลายที่อยู่ด้วยบนออกทั้งหมด และละลายตะกอน Formazan ที่เกิดขึ้นด้วย DMSO 100 µL เขย่าเบาๆ เพื่อให้ผลึก Formazan ละลายได้ดีขึ้น และบ่มต่ออีก 10 นาที

8. เมื่อครบเวลาแล้ว นำตัวอย่างไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 560 nm จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์

### 3.5.11 การตั้งตำรับเซรั่มฟื้นฟูสภาพผิวจากสารสกัดข้าวและกรดแล็กติกจากข้าวหมัก

ในการตั้งตำรับสูตรนี้จะใช้สูตรพื้นฐาน โดยมีเปรียบเทียบกับสูตร ที่เติมสารสกัดจากข้าวและกรดแล็กติกจากข้าวหมัก เพื่อปรับสูตรเซรั่มให้เหมาะสม เลือกสูตรที่ให้ลักษณะทางกายภาพที่ดีความคงตัวของสูตร โดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่ 4°C นาน 3-6 เดือน และในที่มีแสง ดังตารางที่ 3.2

#### วิธีทำ

1. นำส่วน A ผสมกัน
2. เติมส่วน B ลงในส่วน A โดยค่อยๆ เติมน้ำ Carbopol silk 100 polymer ให้เจลพองตัวจนเข้ากัน
3. จากนั้นตามด้วยส่วน C และ D
4. ตามด้วยส่วน E และ F คนให้เข้ากัน

ตารางที่ 3.2 สูตรมาตรฐานผลิตภัณฑ์เซรั่มฟื้นฟูสภาพผิวจากสารสกัดข้าวและกรดแล็กติกจากข้าวหมัก

Part	Ingredients	Formula 2
A	Water	40.82
	Dissolvine NA2	0.10
	Sunpu allantoin	0.20
	Butylene glycol	5.00
B	Water	5.00
	Hyaluronic acid	0.06
	<b>Carbopol silk 100 polymer</b>	<b>0.50</b>
C	Water	1.00
	Triethanolamine	0.50
D	Butylene glycol	2.00
	LonYung rice extract	<3
	Lactic acid from fermented MaiPraYaThongDam rice	-
E	Water	10
	Niacemide (B3)	4.00
	Alo vera powder	1.00
F	Polysorbate 20	0.50
	Microcare PHC / Phenoxyethanol	0.80

### 3.5.12 การศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ (Das et al., 2012)

เหมือนข้อ 3.4.3.2

### 3.5.13 ค่า pH

เหมือนข้อ 3.4.3.3

### 3.5.14 ตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์

เหมือนข้อ 3.4.3.4

## 3.6 ผลิตภัณฑ์น้ำมันนวดเท้าจากกระวาน

### 3.6.1 สารสกัดน้ำมันหอมระเหย

นำพืชตัวอย่างทั้งสดและแห้ง มาชนิดละ 5 กิโลกรัม (โดยน้ำหนักแห้ง) สกัดด้วยวิธีการต้มกลั่น (Hydro distillation) โดยใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 900 มิลลิลิตร จากนั้นประกอบชุดกลั่น กลั่นเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จนกระทั่งได้น้ำมันหอมระเหย ชั่งน้ำหนัก และคำนวณหาปริมาณของสารสกัดที่ได้ (% Yield) นำสารสกัดที่ได้บรรจุในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °C ก่อนวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

### 3.6.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยใช้วิธี วิเคราะห์ Anti-hyaluronidase assay ตามวิธีของ Sahasrabudhe & Dedhar (2010) เป็นการวิเคราะห์ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Hyaluronidase โดยวัดปริมาณ N-acetylglucosamine ที่ปลดปล่อยออกมาจาก Sodium hyaluronate

#### 1. ชุดตัวอย่าง

ตัวอย่างจะถูกละลายใน 5 % DMSO และเจือจางใน Acetate buffer (100 mM, pH 3.6) โดยใช้สารละลายตัวอย่าง 50  $\mu$ L ผสมกับ 50  $\mu$ L ของ type-1-S bovine นำไปบ่มที่ 37°C นาน 20 min จากนั้นเติม 50  $\mu$ L ของ Calcium chloride (12.5 mM) นำไปบ่มที่ 37°C นาน 20 min จากนั้นเติม 250  $\mu$ L Sodium hyaluronate (1.2 mg/mL) นำไปบ่มที่ 37°C นาน 40 min หลังจากนั้นเติม 50  $\mu$ L ของ Sodium hydroxide (0.9 M) และเติม Sodium borate (0.2 M) 100  $\mu$ L นำไปบ่มที่ 100°C นาน 3 min ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิ จากนั้นเติม 1.5 mL ของสารละลาย PDMAB (p-Dimethylaminobenzaldehyde) (67 mM) นำไปบ่มที่ 37°C นาน 10 min นำไปวัด

ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 585 nm ซึ่งฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ Hyaluronidase จากสมการข้างล่าง

$$\text{Hyaluronidase inhibition (\%)} = \frac{[(\text{OD of control} - \text{OD of sample}) / \text{OD of control}] \times 100$$

## 2. ชุดควบคุม

จะใช้ 50  $\mu\text{L}$  ของ 5 % DMSO

## 3. ชุดสารมาตรฐาน

ใช้ Tannic acid เป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 50 100 150 200 และ 250  $\mu\text{g/mL}$

### 3.6.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

นำสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ดังนี้

1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเบื้องต้นด้วยวิธี Disk diffusion ทำการทดสอบตามวิธีของ NCCLS (Peterson & Shanholtzer, 1992)

#### 1.1 การเตรียมสารสกัดเพื่อใช้ในการทดสอบ

สารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคผิวหนังมาเตรียมไว้ในรูป stock solution ให้ได้ความเข้มข้น 100  $\text{mg/mL}$

#### 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 จนได้ความขุ่นที่ต้องการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด และต้องไม่ประกอบด้วยสารที่ขัดขวางประสิทธิภาพของสารที่ต้องการทดสอบ ดังนั้นจึงใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน ดังตารางที่ 3.3

**ตารางที่ 3.3** อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อและแบคทีเรียก่อโรคผิวหนังและสิว

Bacteria	Gram	Comments	Medium
Staphylococcus epidermidis TISTR 518	+	Skin flora, causes body odour	Trypticase soy media
Propionibacterium acnes DMST 14916	+	Causative organisms of acne	Trypticase soy media
Staphylococcus aureus aureus TISTR 1466	+	Skin flora; can cause skin infections	Trypticase soy media

### 1.3) การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของด้วยวิธี Disk diffusion

ทำการ Swab เชื้อแบคทีเรียก่อโรคปรับความชื้นของเชื้อแล้วลงบนอาหารแข็ง ให้ทั่วแบบ Three-ways จากนั้นนำ Paper disk ขนาด 6 mm วางลงบนอาหารแข็งที่มีการ Swab เชื้อก่อโรคสัลงไปแล้ว และเติมสารสกัดเข้มข้น 100 mg/mL ปริมาณ 20  $\mu$ L บ่มเลี้ยงเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจวัดผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางฤทธิ์ยับยั้ง (Inhibition zone) การทดลองแต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง ผลการยับยั้งจุลินทรีย์วัดได้จากขนาดของบริเวณใส โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส

### 3.6.4 การทดสอบ Cytotoxicity โดยวิธี MTT Assay

ทำเหมือนข้อ 3.5.9

### 3.6.5 การตั้งตำรับสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันนวด

ในการตั้งตำรับสูตรนี้จะใช้สูตรพื้นฐาน โดยมีการปรับสูตรให้มีคุณสมบัติใช้นวดแบบแพทย์แผนไทยได้ และสามารถลดการเจ็บปวดได้ เลือกสูตรที่ผู้บริโภครู้จักและมีความปลอดภัยทางกายภาพที่ดี ความคงตัวของสูตร โดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่ 4°C นาน 3-6 เดือน และในที่ที่มีแสง ดังตารางที่ 3.4

#### วิธีทำ

- ศึกษาสกัดน้ำมันหอมระเหยกระวานที่สกัดร่วมกับ ไพล ขมิ้น และเถาว์เอ็นอ่อน ที่เหมาะสม
- ปรับสัดส่วนของสารต่างๆตามสูตรมาตรฐานจาก ดังตารางที่ 3.4

**ตารางที่ 3.4** การตั้งตำรับสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันนวด

ส่วนผสม	w/w (%)
เมททอล	9
การะบูร	12
น้ำมันระกำ	3
น้ำมันยูคาลิปตัส	6
น้ำมันสนรวม	24
น้ำมันมะพร้าว	13.6
น้ำมันปาล์ม	31.4
น้ำมันหอมระเหยกระวาน	<3

### 3.6.6 ความพึงพอใจต่อลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์

นำผลิตภัณฑ์ไปทดสอบความพึงพอใจโดยผ่านการนวดแผนไทย ในอาสาสมัครจำนวนไม่น้อยกว่า 20 คน โดยใช้แบบสอบถาม

### 3.6.7 การถ่ายทอดเทคโนโลยีของผลิตภัณฑ์

นำผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นมาไปถ่ายทอดให้กับกลุ่ม SME ต่างในเขตจังหวัดภาคตะวันออกเฉียง

## 3.7 ผลิตภัณฑ์สบู่อ่อนและสบู่เหลวจากข้าวลันยั้ง

### 3.7.1 การเตรียมสารสกัดหยาบของข้าวลันยั้งเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์สบู่อ่อนและสบู่เหลว

เหมือนข้อ 3.5.5 การสกัดข้าวด้วยตัวทำละลาย

### 3.7.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของข้าวลันยั้งเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์สบู่อ่อนและสบู่เหลว

เหมือนข้อ 3.5.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS Assay (Re et al., 1999)

เหมือนข้อ 3.5.7 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay

เหมือนข้อ 3.5.8 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric Reducing Ability Power (FRAP) Assay การทดสอบด้วยวิธี FRAP assay (Prior et al, 2005)

เหมือนข้อ 3.5.9 ฤทธิ์ยับยั้งปริมาณเม็ดสีเมลานินของเซลล์ B16-F1

### 3.7.3 การตั้งตำรับสูตรผลิตภัณฑ์ผลิตสบู่ก้อนและสบู่เหลว

#### 1. สบู่ก้อน

วิธีทำ (ตารางที่ 3.5)

- 1.1 นำสารในข้อที่ 1-5 เติลงในบีกเกอร์แล้วกวนให้เข้ากัน
- 1.2 ค่อยๆ เติมน้ำสะอาด กวนช้าๆจนสารและน้ำเข้ากันเป็นเนื้อเดียว
- 1.3 เติมสารในข้อที่ 6 (เพื่อปรับค่า pH )
- 1.4 เติมน้ำหอม สารสกัดและกลี้น ลงในบีกเกอร์ใช้ไม้พายกวนอีกครั้งจนเข้ากัน

#### 2. ผลิตภัณฑ์สบู่ก้อน

วิธีทำ (ตารางที่ 3.6)

- 2.1 นำเบสสบู่ก้อนมาหลอมด้วยไฟอ่อน ๆ บนเตาจนเบสสบู่ละลายเป็นของเหลวแล้วดับไฟ
- 2.2 เติมสารในข้อ 3 และ 4 ใช้ไม้พายกวนจนเข้ากัน
- 2.3 เติมสารสกัด น้ำหอมและสี กวนจนเข้ากัน นำไปเทลงบนโมสบู่ รอนจนแห้งจึงแกะออก

ตารางที่ 3.5 การตั้งตำรับสูตรผลิตภัณฑ์สบู่ก้อน

ลำดับ	รายชื่อสาร	ปริมาณสาร (w/w)	คุณสมบัติ
1	เบสสบู่	98 g	ใช้ขึ้นเนื้อสบู่
2	น้ำหอม	1 g	กลิ่นตามความต้องการ
3	GLYDANT	0.1 g	สารกันเสีย
4	GLYCERINE THAI	0.9 g	สารให้ความชุ่มชื้น
5	สารสกัดหยาบข้าวลันยู้ง	< 3 g	
รวม		100 g	

ตารางที่ 3.6 การตั้งตำรับสูตรผลิตภัณฑ์สบู่เหลว

ลำดับ	รายชื่อสาร	ปริมาณสาร (w/w)	คุณสมบัติ
1	หัวแชมพู 28% (ชนิดอ่อน) EMAL 28 CT	30 g	สารชำระล้างและสารเป็นสารขึ้นเนื้อ
2	PLANTACARE 1200	5.3 g	สารชำระล้างชนิดอ่อนโยน
3	AMPHITOL 55 AB	5 g	สารชำระล้าง
4	GLYCERINE THAI	3.7 g	สารให้ความชุ่มชื้น
5	AMINON C025	4 g	สารสร้างความเหนียวขึ้น
6	CITRIC ACID	0.3 g	กรดมะนาว
7	น้ำสะอาด	50.5 g	
8	น้ำหอม	1 g	กลิ่นตามความต้องการ
9	GLYDANT	0.1 g	สารกันเสีย
10	สารสกัดข้าวลันยุง	< 3 g	
	รวม	100 g	

### 3.7.4 ความพึงพอใจต่อลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์

นำผลิตภัณฑ์ไปทดสอบความพึงพอใจในอาสาสมัครจำนวนไม่น้อยกว่า 20 คน โดยใช้แบบสอบถาม

### 3.7.5 การถ่ายทอดเทคโนโลยีของผลิตภัณฑ์

นำผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นมาไปถ่ายทอดให้กับกลุ่ม SME ต่างในเขตจังหวัดภาคตะวันออกเฉียง

## 3.8 ผลิตภัณฑ์โลชั่นทาผิวข้าวลันยุง

### 3.8.1 การเตรียมสารสกัดหยาบของข้าวลันยุงเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์โลชั่นทาผิว

เหมือนข้อ 3.5.5 การสกัดข้าวด้วยตัวทำละลาย

### 3.8.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของข้าวลันยุงเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์โลชั่นทาผิว

เหมือนข้อ 3.5.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS Assay (Re et al., 1999)

เหมือนข้อ 3.5.7 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay

เหมือนข้อ 3.5.8 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric Reducing Ability Power (FRAP) Assay การทดสอบด้วยวิธี FRAP assay (Prior et al, 2005)

เหมือนข้อ 3.5.9 ฤทธิ์ยับยั้งปริมาณเม็ดสีเมลานินของเซลล์ B16-F1

### 3.8.3 การตั้งตำรับสูตรผลิตภัณฑ์โลชั่นทาผิว

ตารางที่ 3.7 การตั้งตำรับสูตรผลิตภัณฑ์โลชั่นทาผิว

ลำดับ	รายชื่อสาร	ปริมาณสารขนาด 100 g	คุณสมบัติ
1	HH LOTION CSP (COSMEDIA SP)	1 g	สารสร้างความหนืด ช่วย ประสานน้ำและน้ำมัน
2	HH LOTION COE (CETIOL OE)	3 g	สารทำให้ผิวอ่อนนุ่ม
3	CARNATION 70	4 g	สารทำให้ผิวอ่อนนุ่ม
4	PROPYLENE GLYCOL SHELL	4 g	สารช่วยให้ความชุ่มชื้นผิว
5	น้ำสะอาด	87.4 g	
6	น้ำหอม	0.3 g	กลิ่นตามความต้องการ
7	สารกันเสีย (DMDM)	0.2 g	สารกันเสีย
8	สารสกัดยาบข้าวลันยั้ง	< 3 g	
	รวม	100 g	

### 3.8.4 ความพึงพอใจต่อลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์

นำผลิตภัณฑ์ไปทดสอบความพึงพอใจ ในอาสาสมัครจำนวนไม่น้อยกว่า 20 คน โดยใช้แบบสอบถาม

### 3.8.5 การถ่ายทอดเทคโนโลยีของผลิตภัณฑ์

นำผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นมาไปถ่ายทอดให้กับกลุ่ม SME ต่างในเขตจังหวัดภาคตะวันออก