3. วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือ

ตู้แช่แข็ง -30 องศาเซลเซียส	ยี่ห้อ Harris Manufacturing Co.
เครื่องทำแห้งที่อุณหภูมิต่ำ (freeze-dryer)	ยี่ห้อ FTS System รุ่น Flexi-Dry
ตู้อบไอร้อน (hot-air oven)	ยี่ห้อ Stuart Scientific
อุปกรณ์วิเคราะห์อิเล็คโตรโฟริซิส MiniProtean II	ยี่ห้อ BioRad
เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer)	ยี่ห้อ Sartorius
เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง	ยี่ห้อ Mettler PB3002
เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง	ยี่ห้อ Sartorius
เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)	ยี่ห้อ Sorvall Super T-21
ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (laminar flow)	ยี่ห้อ Clean Air CA REV 6
ตู้บ่มเลี้ยงเซลล์สัตว์ (CO_2 incubator)	ยี่ห้อ Shel Lab TC2323
ตู้เขย่าบ่มเลี้ยงเชื้อ (shaking incubator)	ยี่ห้อ Gallenkamp
เครื่องนึ่งความดันสูง (autoclave)	ยี่ห้อ ALP MC-30L
เครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบ Microplate Reader	ยี่ห้อ Bio-Rad

วัสดุวิทยาศาสตร์

ถุงไดอะไลซิสชนิดเซลลูโลสอะซิเตต (cellulose acetate dialysis tubing) ค่าคัดเลือกสารผ่านขนาดเล็กกว่า 12 kDa (molecular weight cutoff; MWCO 12 kDa) ยี่ห้อ Sigma

หลอดปั่นเหวี่ยงกรองสารตามขนาดโมเลกุล (molecular filtration) ค่าคัดเลือกสารผ่านขนาด 5 kDa (MWCO 5 kDa) และขนาด 10 kDa (MWCO 10 kDa) ยี่ห้อ Centricon

โถดูดความชื้น (dessicator) ใส่สารซิลิกาเจล (silica gel) ดูดความชื้น

จานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม (96-well culture plate) ยี่ห้อ Nunc

เปลือกรังไหมอีรี่

เปลือกรังไหมอีรี่/รังไหมบ้าน *Bombyx mori* สภาพดีและเปลือกรังเสีย ได้มาจากโรงเลี้ยงของสาขาวิชากีฏวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น สนับสนุนโดย รศ. ดร. ศิวิลัย สิริมังคารัตน์ และได้มาจากเกษตรกรเลี้ยงไหมจังหวัดขอนแก่น เก็บเปลือกรังไหมที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารละลายโปรตีนไฟโบรอินไหมอีรี่

เตรียมเส้นใยไฟโบรอินไหมอีรี่และไหมบ้านโดยนำเปลือกรังไหมมาต้มเดือดกำจัดโปรตีนกาวไหม (หรือ เซอริซิน) ด้วย 0.25% Na_2CO_3 เป็นเวลาอย่างน้อย 90 นาที ให้น้ำหนักแห้งของเปลือกรังไหม หายไปมากกว่า 20% (Nuchadomrong et al., 2008)

นำเส้นใยไฟโบรอินไหมอีรี่ (น้ำหนักแห้ง 5 กรัม) มาละลายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยดัดแปลงจากวิธีการละลายด้วยลิเทียมโบรไมด์ (lithium bromide) ความเข้มข้น 9 โมลาร์ ปริมาตร 100 มล. สารละลายไฟโบรอินที่ได้นำมาทำไดอะไลซิสในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยใช้ ถุงเซลลูโลส MWCO 12 kDa แล้วนำไดอะไลเซต (dialysate) ซึ่งเป็นสารละลายโปรตีนไฟโบรอินในถุง ไปทำให้เป็นผงโปรตีนด้วยวิธี freeze-drying ละลายผงไฟโบรอินไปให้ได้ความเข้มข้น 5 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในกรดเข้มข้นที่อุณภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำสารละลายไฟโบรอินขั้นนี้ไปทำ freeze-drying จึงจะได้ผงไฟโบรอินไหมอีรี่สำหรับการทดลองต่อไป ในการวิเคราะห์แบบแผนของโปรตีนไฟโบรอินไหมอีรี่หรือทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไฟโบรอิน ละลายผงไฟโบรอินไหมอีรี่ในตัวทำละลายน้ำกลั่นแล้วนำไปทำให้มีขนาดโมเลกุลเล็กโดยใช้เครื่อง ultrasonicator (50% duty, output control 6) จะได้สารละลายลักษณะเป็นคอลลอยด์สำหรับใช้ทดสอบ

เตรียมเส้นใยไฟโบรอินไหมบ้าน โดยต้มเดือดเปลือกรังไหมบ้านด้วย 0.25% Na_2CO_3 ตามวิธีข้างต้น แล้วละลายเส้นใยไหมให้ได้ความเข้มข้น 5% ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ในน้ำผสมกับเอทานอลอัตราส่วนโดยโมล (molar ratio) เป็น 1 : 8 : 2 (Ajisawa, 1998)

2. การวิเคราะห์การออกฤทธิ์ชีวภาพในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

2.1 การเตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพื่อใช้ในการทดลอง

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ใช้ในการทดสอบ คือ mouse fibroblast cells NIH/3T3 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์มาในสภาพเซลล์เก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) เมื่อจะเริ่มเลี้ยงเซลล์จึงนำหลอดเก็บเซลล์มาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กู้ชีวิตเซลล์ทันทีโดยย้ายลงเลี้ยงในขวด 50 cm^2 culture flask ด้วยอาหารสูตร RPMI 1640 (ยี่ห้อ Gibco) เสริมด้วยส่วนประกอบต่อไปนี้ 10% fetal bovine serum (ยี่ห้อ Gibco) ยาเพนนิซิลิน100 หน่วย/ มล. (ยี่ห้อ Gibco) และยาสเตรปโตมัยซิน 100 ไมโครกรัม/มล. (ยี่ห้อ Gibco) เลี้ยงเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์สัตว์ ซึ่งตั้งค่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% CO_2/ความชื้นสัมพัทธ์ 98% เลี้ยงเซลล์ต่อเนื่อง (subculture) เพื่อเพิ่มปริมาณให้เพียงพอสำหรับการทดสอบ โดยเมื่อเซลล์เจริญเพิ่มจำนวนแผ่เต็มพื้นผิวขวดเลี้ยง (100% confluence ซึ่งใช้เวลาเลี้ยงอย่างน้อย 24 ชั่วโมง) จึงทำ trypsinization ด้วย

เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) 0.25% (ยี่ห้อ Gibco) เพื่อแยกเซลล์ออกจากกันและให้หลุดออกจากผิวขวดเลี้ยง แบ่งเซลล์เป็นหลายส่วน เลี้ยงในอาหารขวดใหม่ ตามวิธีข้างต้น

2.2 การประเมินจำนวนเซลล์มีชีวิตสมบูรณ์ (active cell)

ใช้ปฏิกิริยาของสาร MTT (Qiang et al., 2005) โดยใช้ Vybrant MTT cell proliferation assay kit (ยี่ห้อ Invitrogen) เตรียมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 12 มิลลิโมลาร์ ตามวิธีการที่ผู้ผลิตกำหนด โดยละลาย MTT (5 มิลลิกรัม) ด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (พีเอช 7.4) ปลอดเชื้อ 1 มล. เก็บในขวดป้องกันแสง ที่ 4 องศาเซลเซียส ไว้ได้นาน 1 เดือน นำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH/3T3 ที่เลี้ยงถึงระยะแผ่เต็มขวดเลี้ยง มาทำ trypsinization ย้อมเซลล์ด้วยสี trypan blue 0.4% (ยี่ห้อ Gibco) แล้วนับจำนวนเซลล์ซึ่งเจือจางด้วยอาหารสูตร RPMI 1640 ที่เสริมส่วนประกอบครบ ให้ได้จำนวนเซลล์ $1x10^3$, $1x10^4$, $2x10^4$, $4x10^4$, $5x10^4$, $1x10^5$, $3x10^5$, $6x10^5$ และ $1x10^6$ เซลล์/100 ไมโครลิตร ใส่ในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม วางตั้งไว้ 2-3 ชั่วโมงให้เซลล์เกาะผิวหลุม ในการทดสอบมีหลุม blank ซึ่งเติมเฉพาะอาหารที่เสริมส่วนประกอบครบปริมาตร 100 ไมโครลิตร เมื่อครบเวลาดูดอาหารออกจากทุกหลุม แล้วเติมอาหารที่เสริมส่วน ประกอบครบปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไปใหม่ทุกหลุม หลังจากนั้นเติมสารละลาย MTT (12 มิลลิโมลาร์) 10 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์สัตว์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดสารละลายทิ้ง เติม สาร DMSO 50 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อทำให้เซลล์แตก แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (A_{550}) ด้วยเครื่อง Microplate Reader สร้างกราฟมาตรฐานหาปริมาณเซลล์ด้วยปฏิกิริยาของ MTT ระหว่างจำนวนเซลล์กับ ค่าเฉลี่ย A_{550} จากการทดลอง 3 ซ้ำ

2.3 การทดสอบการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ fibroblast cells NIH/3T3

ใส่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH/3T3 ($1x10^4$ เซลล์/หลุม) ในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม ให้ได้จำนวนหลุมที่เลี้ยงเซลล์ตามต้องการ ในการทดสอบมีหลุม blank ซึ่งเติมเฉพาะอาหาร RPMI 1640 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ส่วนหลุมทดสอบเติมสารละลายโปรตีนไฟโบรอินไหมอีรี่ หรือไฟโบรอินไหมบ้าน หรือไฟโบรอินไหมอีรี่ผสมกับไฟโบรอินไหมบ้าน หรือ BSA ปริมาตร 10 ไมโครลิตรให้มีความเข้มข้นในช่วง 0.1-200 นาโนกรัม/มล. แล้วเติมอาหารที่เสริมส่วนประกอบครบ ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ไมโครลิตร/หลุม นำจานหลุมทดสอบเข้าบ่มในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์สัตว์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อครบ 24 ชั่วโมง หาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วยปฏิกิริยาของ MTT ดังนี้ ดูดสารละลายอาหารออกจากทุกหลุม เติมอาหารที่เสริมส่วนประกอบครบปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไปใหม่ทุกหลุม หลังจากนั้นเติมสารละลาย MTT (12 มิลลิโมลาร์) 10 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์สัตว์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูดสารละลายทิ้ง แล้วเติมสาร DMSO 50 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเพื่อทำให้เซลล์แตกเป็นเวลา 10 นาที

แล้วนำไปวัดค่า A_{550} ด้วยเครื่อง Microplate Reader แล้วคำนวณจำนวนเซลล์มีชีวิตเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ข้อ 2.2) ให้จำนวนเซลล์ในหลุม blank ซึ่งไม่ได้รับผลของโปรตีนเป็นค่าควบคุม (Y) ส่วนจำนวนเซลล์ในหลุมใดใดที่ได้รับผลของโปรตีนเป็นค่าทดสอบ (X) วิเคราะห์ผลของโปรตีนชนิดต่างๆ และที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วยค่าร้อยละของเซลล์มีชีวิต (% cell viability) จากสูตร [(X/Y) × 100] และวิเคราะห์ค่าสถิติแบบ One Way ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS 11.5 สำหรับ Windows® software ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ (n = 4)

3. การวิเคราะห์การย่อยผงโปรตีนไฟโบรอิน

3.1 การย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน

โปรตีนที่ใช้ทดลองเป็นสับสเตรต (substrate) สำหรับเอนไซม์ทริปซินควบคู่กับโปรตีนไฟโบรอินไหมอีรี่ ได้แก่ โปรตีนเคซีน (casein) ซึ่งเป็นโปรตีนน้ำนม และไฟโบรอินไหมบ้าน ละลายโปรตีนชนิดต่างๆ ให้มีความเข้มข้น 1% ด้วยโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิ-โมลาร์ พีเอช 7.4 เตรียมให้เป็นสับสเตรตด้วยเงื่อนไข 4 แบบ ดังนี้

3.1.1 ชุดควบคุม โปรตีนสับสเตรตไม่ถูกทำให้เสียสภาพด้วยความร้อน

3.1.2 นึ่งโปรตีนสับสเตรตด้วยหม้อนึ่ง autoclave (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

3.1.3 ต้มเดือดโปรตีนสับสเตรตเป็นเวลา 15 นาที

3.1.4 ต้มเดือดโปรตีนสับสเตรตเป็นเวลา 30 นาที

ทำการทดลองโดยดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธี Krejpcio and Wójciak (2002) ใช้โปรตีนสับสเตรตชุดควบคุมหรือโปรตีนสับสเตรตที่เสียสภาพด้วยความร้อนวิธีใดวิธีหนึ่ง ปริมาตร 1 มล. เติมน้ำกลั่น 2 มล. และเอนไซม์ทริปซินเข้มข้น 0.1% หรือ 5% ปริมาตร 1 มล. (ละลายเอนไซม์ทริปซินในกรดไฮโดรคลอริก 0.001 โมลาร์) ตามลำดับ ผสมสารละลายปฏิกิริยา (reaction mixture) ให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลา เติม trichloroacetic acid ความเข้มข้น 5% ปริมาตร 2 มล. แช่หลอดในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาและตกตะกอนโปรตีนสับสเตรตที่ไม่เกิดปฏิกิริยาการย่อย แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนระหว่างตะกอนโปรตีนสับสเตรตที่ไม่ถูกย่อยและสารละลายใสซึ่งมีโมเลกุลเปปไทด์ (peptides) ขนาดเล็กที่เป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาการย่อยของทริปซิน แบ่งส่วนสารละลายใสปริมาตร 1 มล. มาวัดปริมาณผลิตภัณฑ์สมมูลย์กับกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) โดยเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 5 มล. และ Folin-ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 1 มล. (สาร Folin-ciocateu phenol reagent ก่อนใช้ให้นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 5 โดยปริมาตร) ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว

นำไปบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร (A_{625})

คำนวณค่า proteolytic activity unit (PAU) ของสับสเตรตในปฏิกิริยาการย่อย 4 มล. โดยเอนไซม์ทริปซิน จากสูตรที่รายงานไว้โดย Namoto and Narahashi (1959) ดังนี้

$$PAU/min = [AV] / [A^{tyr}T]$$

A คือ ค่า A_{625} จากการทดลอง

A^{tyr} คือ ค่า A_{625} ของไทโรซีนสมมูลย์ 1 mEq ซึ่งมีค่าเท่ากับ1620

V คือ ปริมาตรของปฏิกิริยา (4 มล.)

T คือ เวลาที่ใช้บ่มปฏิกิริยา (60 นาที)

ในการทดลองยังทำการทดลองในทำนองเดียวกัน โดยใช้กรดไฮโดรคลอริคความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ เพื่อเป็นการทดลองควบคุม เนื่องจากเป็นตัวทำละลายเอนไซม์ทริปซิน

ทุกการทดลองทำซ้ำ 4 ครั้ง วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วย ANOVA test

3.2 การย่อยด้วยกรดซิตริก (citric acid)

เตรียมสารละลายไฟโบรอินจากไหมอีรี่และไหมบ้าน *B. mori* ความเข้มข้น 1% ในกรดซิตริกความเข้มข้น 1, 2, 5, 10, 20 และ 30% จากนั้นนำไปย่อยที่อุณหภูมิสูงในสภาวะหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที วิเคราะห์ผลการย่อยโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษ (paper chromatography) เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นส่วนผสมของ n-butanol, glacial acetic acid และน้ำ ในอัตราส่วน 16 ต่อ 5 ต่อ 14 โดยปริมาตร ตรวจสอบโครมาโตแกรม (chromatogram) หลังการทำโครมาโตกราฟีด้วยสารละลาย ปฏิกิริยา ninhydrin โดยอบที่ 80 องศาเซลเซียสจนแห้งหรือสีโครมาโตแกรมปรากฏบนกระดาษชัดเจน

4. การศึกษาผลของไฟโบรอินไหมอีรี่ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

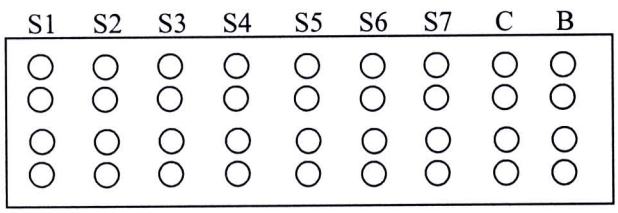
4.1 การเลี้ยงเชื้อและการเตรียมเชื้อสำหรับทดสอบ

ใช้อาหารเหลวสูตร nutrient broth (NB) หรืออาหารแข็งสูตร nutrient agar (NA) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* ใช้อาหารเหลวหรืออาหารแข็งสูตร MRS สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* TISTR 1463 เชื้อทั้งหมดนี้ได้มาจาก MIRCEN Culture Collection (TISTR – สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) กระตุ้นสภาพมีชีวิตของเชื้อในสภาพผงแห้งด้วยการย้ายผงเชื้อใส่ในอาหารเหลว 10 มล. เลี้ยงเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสในเครื่องเขย่านาน 16-18 ชั่วโมง แล้วแยกเชื้อให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็งเพื่อคัดเลือกเชื้อบริสุทธิ์ เขี่ยเชื้อจาก 1โคโลนี กระจายเลี้ยงให้เต็มผิวหน้าอาหารแข็งในหลอด slant เก็บเชื้อในหลอดนี้ได้นานประมาณ 1 เดือน จึงย้ายเลี้ยงในหลอดใหม่

เมื่อจะทำการทดลอง ใช้ห่วง (loop) เขี่ยเชื้อ 1 ห่วงจากหลอด slant ย้ายเชื้อเลี้ยงในอาหารเหลวชนิด NB หรือ MRS 20 มล. ที่ 37 องศาเซลเซียสในเครื่องเขย่าเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เชื้อจะอยู่ในระยะการเจริญทวีคูณ (exponential phase) อ่านค่าความขุ่นของเชื้อด้วยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร (OD600) เทียบให้เป็นค่าความขุ่นตามหน่วย McFarland (http://en.wikipedia.org/wiki/McFarland_standards) เจือจางเชื้อด้วยอาหารเหลว NB หรือ MRS ให้ได้ค่า McFarland เท่ากับ 0.5 ซึ่งประเมินความหนาแน่นของเชื้อได้ $1.5x10^8$ CFU/ มล.

4.2 การทดสอบผลของไฟโบรอินต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ผสมเชื้อที่มีค่าความขุ่น McFarland 5.0 ปริมาตร 90 ไมโครลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ 96 หลุม กลุ่มตัวอย่างเป็นการทดลองที่เติมสารละลายไฟโบรอินที่ความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 0.156 (S1), 0.313 (S2), 0.625 (S3), 2.5 (S4), 5 (S5), 7.5 (S6) และ 10 (S7) ไมโครกรัม/มล. กลุ่มควบคุมการเจริญ (C) เป็นหลุมที่ไม่เติมสารละลายไฟโบรอินแต่เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตร และกลุ่ม blank (B) เป็นหลุมที่เติมอาหารเหลวซึ่งไม่มีเชื้อ จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็ว 100 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ติดตามผลโดยการวัดค่าความขุ่น (OD 600) แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วย ANOVA test



5. การประยุกต์ใช้ไฟโบรอินกับเครื่องสำอาง

5.1 การทำสบู่ (เพ็ญจันทร์ กรุณามัยวงศ์, 2547)

บดเม็ดสบู่สำเร็จรูป 50 กรัมให้ละเอียดใส่ลงในภาชนะฝาปิด อุ่นในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส จนเนื้อสบู่ละลายใส แล้วจึงเติม propylene glycol ปริมาณ 20 กรัม lanolin ปริมาณ 2 กรัม glycerin ปริมาณ 5 กรัม จะได้สารละลายส่วนผสมปริมาตรรวม 60 มล.

ละลายไฟโบรอินไหมอีรี่ที่ความเข้มข้น 5% ในน้ำกลั่น แล้วเติมลงในสารละลายส่วนผสมสบู่ข้างต้น ให้ได้ความเข้มข้นไหมอีรี่ต่างๆกันดังนี้ 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.40 หรือ 0.5% (สำหรับสูตรควบคุมไม่ต้องเติมไฟโบรอิน) จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดไปอุ่นในอ่างน้ำร้อน (อุณหภูมิในสารละลาย 75 องศาเซลเซียส) กวนให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วออกมาวางที่อุณหภูมิห้อง รอจนอุณหภูมิสารละลายลดลงถึง 65 องศาเซลเซียส เทส่วนผสมใส่พิมพ์ที่ทาด้วยวาสลีน บ่มที่อุณหภูมิห้องให้เนื้อสบู่แข็งตัวและปรับสภาพเป็นเวลา 1 เดือนก่อนทำการทดสอบ

5.2 การทำโลชั่นทาผิวตัว (body lotion)

เตรียมโลชั่น 4 สูตร (ตามตารางด้านล่าง) ด้วยอัตราส่วนผสมให้เป็นเนื้อโลชั่น 50 กรัม โดยประเมินเลือกอัตราส่วนผสมจากสูตรที่แพร่หลายใน Internet web sites ส่วนผสมตัวแปร คือ น้ำกลั่นและน้ำสกัดว่านหางจระเข้ (Aloe Vera juice) ซึ่งเป็นส่วนเฟสน้ำ (aqueous phase) ที่มีอัตราส่วนรวมกัน 77% ของเนื้อโลชั่น

ส่วนผสม (กรัม)	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4
1. น้ำกลั่น	19.25	21.5	22.5	23.5
2. aloe vela juice	19.25	17	16	15
3. น้ำมันเมล็ดองุ่น	5	5	5	5
4. Emulsifying wax (AP-wax)	2	2	2	2
5. Strearic acid	2	2	2	2
6. glycerine	1.5	1.5	1.5	1.5
7. preservative (paraben)	0.5	0.5	0.5	0.5
8. fragrance	0.5	0.5	0.5	0.5

เตรียมโลชั่นดังต่อไปนี้ แยกการละลายสารออกเป็น 2 ส่วน

ส่วนที่ 1 เฟสน้ำ ผสมน้ำกลั่นและ Aloe Vera juice อุ่นให้ร้อนพอเป็นไอระเหยในอ่างน้ำอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส

ส่วนที่ 2 เฟสไขมัน (oil phase) ผสมน้ำมันเมล็ดองุ่นรวมกับ AP wax และ stearic acid อุ่นในอ่างน้ำที่ 95 องศาเซลเซียส จนเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน

ผสมสารละลายทั้งสองส่วนเข้าด้วยกันที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส โดยค่อยๆ เติมส่วนที่ 1 ลงในส่วนที่ 2 และกวนอย่างต่อเนื่อง เมื่อกวนจนเป็นเนื้อเดียวกันซึ่งใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมงจึงหยุดให้ความร้อน หลังจากโลชั่นเริ่มเย็นลง คือ อุณหภูมิในโลชั่นเป็น 65 องศาเซลเซียส จึงเติม preservative และสารให้กลิ่น (fragrance) ที่ต้องการ พร้อมกับกวนอย่างต่อเนื่องจนสารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน บ่มเนื้อโลชั่นในช่องเย็นของตู้เย็น (4-10 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้เป็นโลชั่นสำหรับการทดสอบความคงตัวทางกายภาพและทดสอบความพึงพอใจในการใช้ (psychophysics test) ต่อไป

ทดสอบความคงตัวทางกายภาพ 3 วิธี ได้แก่ **วิธีที่ 1** ทดสอบโดยใช้สภาวะเร่ง

(accelerated test) ด้วย freeze-thaw cycle ตามวิธีของ Lourith et al. (2009) โดยบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สลับกับบ่มที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำซ้ำจนครบ 6 รอบ **วิธีที่ 2** ทดสอบโดยการบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน และ**วิธีที่ 3** ทดสอบโดยการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน

การทดสอบความพึงพอใจต่อโลชั่นโดยให้อาสาสมัคร 10 คนทาโลชันบริเวณท้องแขนช่วงใต้ข้อพับ 5 จุด ประเมินความพอใจด้วยระดับคะแนนในแบบสอบถาม วิเคราะห์ความถี่ของแต่ละระดับคะแนน เพื่อเลือกสูตรโลชั่น 1 สูตร สำหรับการทดลองเติมโปรตีนไฟโบรอินไหมอีรี่ต่อไป

5.3 การทำโลชั่นที่มีส่วนผสมของไฟโบรอินไหมอีรี่

เตรียมโลชั่นโดยมีอัตราส่วนของส่วนผสมตามสูตรดังนี้

ส่วนผสม (กรัม)	สูตรควบคุม	สูตรทดสอบ
1. น้ำกลั่น	21.5	21.5
2. aloe vela juice	17	17
3. น้ำมันเมล็ดองุ่น	5	5
4. Emulsifying wax (AP-wax)	2	2
5. Strearic acid	2	2
6. glycerine	1.5	1.5
7. preservative (paraben)	0.5	0.5
8. fragrance	0.5	0.5
9. cyclomethicone	2	2
10. ไฟโบรอินไหมอีรี่	-	0.08% (v/v)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

แยกเตรียมสารละลายเฟสน้ำและเฟสไขมัน แล้วนำมาผสมกันที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ตามวิธีข้อ 5.2 เมื่อส่วนผสมเข้ากันดีจึงเติม cyclomethicone และผงไฟโบรอินไหมอีรี่ลงไปจากนั้นกวนจนเป็นเนื้อเดียวกันซึ่งใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมงจึงหยุดให้ความร้อน เมื่ออุณหภูมิของโลชันลดลงถึง 65 องศาเซลเซียส จึงเติม preservative และสารให้กลิ่นที่ต้องการ พร้อมกับกวนอย่างต่อเนื่องจนสารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน บ่มในช่องเย็น (4-10 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปทดสอบความคงตัวทางกายภาพและทดสอบความพึงพอใจต่อโลชั่นตามวิธีในข้อ 5.2

5.4 การทำแชมพูสุนัขที่มีส่วนผสมของไฟโบรอิน

ส่วนประกอบพื้นฐานตามสูตรของผู้ผลิต [บริษัท วันรัต (หน่ำเซียน) จำกัด ,กรุงเทพฯ] มีดังนี้

ส่วนที่ 1

EDTA 4NA	10	กรัม
น้ำ	6.9	กิโลกรัม

ละลายโดยการอุ่นที่ 80 องศาเซลเซียสในอ่างน้ำเดือด

ส่วนที่ 2

Zoharterric D-2	2	กิโลกรัม
ABC 45%	400	กรัม
Texapon N-70	200	กรัม
PEG 6000 di-stearate	80	กรัม
Lanolin PEG 75 Flake	100	กรัม

หลอมละลายรวมกันในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

เติมสารละลายส่วนที่ 1 ลงไปผสมกับสารละลายส่วนที่ 2 เมื่อเข้าเป็นเนื้อเดียวกันแล้วจึงเติม Citric acid 50 กรัม Unigrem G-2 (สารกันเสีย) ปริมาณ 30 กรัม และHerbal SH-6267 ปริมาตร 56.82 มิลลิลิตร เมื่อได้เนื้อสารที่เป็นเนื้อเดียวกันให้กวนต่อประมาณ 30 นาทีจึงหยุดให้ความร้อน แต่ยังกวนสารผสมจนกว่าสารที่ได้จะมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง จากนั้นบรรจุลงภาชนะแล้วแบ่งส่วนหนึ่งไปทดสอบความคงตัวของแชมพูที่ได้