บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

(1) การสกัดสารออกฤทธิ์จากพืชตัวอย่าง

- เครื่องชั่งวิเคราะห์
- เตาอบควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องบดตัวอย่าง
- ถังหมัก
- เครื่อง Rotary evaporator
- เครื่อง Freeze-drier
- เครื่องแก้วสำหรับห้องปฏิบัติการเช่น Erlenmeyer flask, Beaker, Separating funnel เป็นต้น
- กระดาษกรอง Whatmann No.1
- เอทานอล (95% Denatured ethanol)
- เมทานอล (Analytical grade; AR)
- คลอโรฟอร์ม (Analytical grade; AR)
- ผงถ่าน (Activated charcoal)

(2) การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัด

- เครื่องชั่งวิเคราะห์
- ปิเปตอัตโนมัติ
- เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer พร้อม cuvette
- เครื่องแก้วสำหรับห้องปฏิบัติการเช่น Volumetric flask, Erlenmeyer flask, Beaker, test tube เป็นต้น

- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- สารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent
- Anhydrous sodium carbonate
- สารมาตรฐาน Gallic acid

(3) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัด

- เครื่องชั่งวิเคราะห์
- ปิเปตอัตโนมัติ
- เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer พร้อม cuvette
- เครื่องแก้วสำหรับห้องปฏิบัติการเช่น Volumetric flask, Erlenmeyer flask, Beaker, test tube เป็นต้น
- 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)
- Potassium persulfate
- สารมาตรฐาน Trolox

(4) การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งกัมมันตภาพเอนไซม์ 5-alpha reductase

- แผ่น Silica gel G60 F254 ชนิดอลูมิเนียม ขนาด 20x20 ซม.
- TLC tank
- ปิเปตอัตโนมัติ
- เครื่องวัด pH (pH meter)
- เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer พร้อม cuvette
- เครื่องแก้วสำหรับห้องปฏิบัติการเช่น Volumetric flask, Erlenmeyer flask, Beaker, test tube เป็นต้น
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง แบบควบคุมอุณหภูมิ

- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- อุปกรณ์ผ่าตัดปลอดเชื้อ
- อุปกรณ์เก็บตัวอย่างเลือด
- เครื่อง Homogenizer
- หนูถีบจักรพันธุ์ Wistar rat อายุ 6-12 เดือน
- Testosterone
- Finasteride
- Trisodium citrate buffer
- Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduce (NADPH)
- 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB)

(5) การพัฒนาตำรับยาบำรุงผมจากสารสกัด

- Almond oil
- Menthol
- Octyldodecanol
- Phenoxyethanol and parabens
- Propylene glycol
- Cyclomethicone
- Phenyltrimethicone
- PEG 7 glyceryl cocoate
- Decyl oleate
- Tocopherol acetate
- DC CB 3021
- Disodium EDTA 5%

- D-panthenol 50%
- Denatured ethanol
- Perfume

2.2 สถานที่ดำเนินการ

1) ห้องปฏิบัติการเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพายัพ
2) ห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3) ศูนย์เครื่องมือวิจัยฯ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.3 วิธีการดำเนินการ

1. การ ศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของพืชท้องถิ่นบนพื้นที่สูง

โดยศึกษาข้อมูลจากการวิจัยที่ผ่านมา และจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องทั้งในและต่างประเทศที่มีการรายงานคุณสมบัติบำรุงผมของพืชธรรมชาติ และคัดเลือกพืชที่มีศักยภาพสำหรับนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์

2. การจัดหาพืชที่คัดเลือก และทำการเตรียมสารสกัดพืชตัวอย่าง

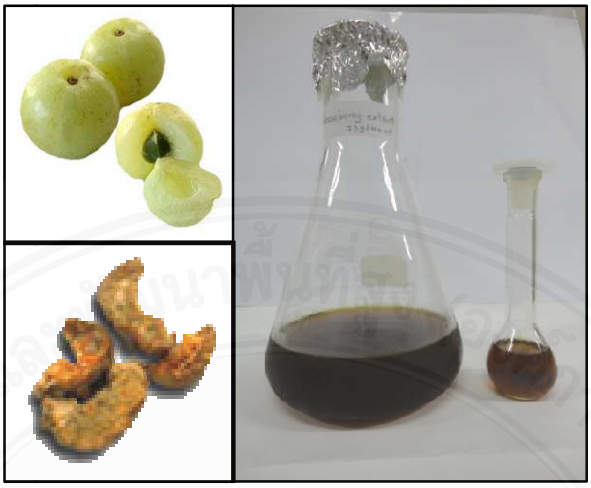
ขิง นำเหง้ามาล้างให้สะอาด ฝานให้บาง นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจนแห้งสนิท จากนั้นนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและป้องกันจากแสงสว่าง ทำการสกัดสองครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมง รวบรวมส่วนสกัดทั้งสองครั้ง แยกกากออกจากสารละลายด้วยการกรองผ่านตะแกรง ส่วนสารละลายที่ได้นำมากรองหยาบด้วยการผ่านสำลี กรองละเอียดซ้ำด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 และนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator

ส่วนสกัดที่ได้ ทำการละลายกลับด้วย 95% ethanol ให้เป็นสารละลายส่วนสกัดขิงเข้มข้นในอัตราส่วนที่เหมาะสม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในขวดปิดแน่นกันแสง

รูปที่ 1 ลักษณะเหง้าขิงสด ขิงอบแห้ง และสารสกัดขิงที่เตรียมได้

มะขามป้อม นำผลสดมาล้างให้สะอาด แกะแยกเมล็ด เก็บส่วนเนื้อผลไว้ในช่องแช่แข็ง เมื่อเริ่มกระบวนการสกัด นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจนแห้งสนิท จากนั้นนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและป้องกันจากแสงสว่าง ทำการสกัดสองครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมง รวบรวมส่วนสกัดทั้งสองครั้ง แยกกากออกจากสารละลายด้วยการกรองผ่านตะแกรง ส่วนสารละลายที่ได้นำมากรองหยาบด้วยการผ่านสำลี กรองละเอียดซ้ำด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 และนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator

ส่วนสกัดที่ได้ ทำการละลายกลับด้วย 95% ethanol ให้เป็นสารละลายส่วนสกัดมะขามป้อมเข้มข้นในอัตราส่วนที่เหมาะสมเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในขวดปิดแน่นกันแสง



รูปที่ 2 ลักษณะผลมะขามป้อมสด มะขามป้อมอบแห้ง และสารสกัดมะขามป้อมที่เตรียมได้

หญ้าถอดบ้อง หรือหญ้าถอดปล้อง นำส่วนลำต้นมาผึ่งลมให้แห้งเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นสกัดโดยนำต้นหญ้าถอดบ้องที่แล้วบดให้เละเอียด แช่ในตัวทำละลาย 95% เอทานอล เป็นเวลา 48 ชั่วโมง รวบรวมส่วนสกัด แยกกากออกจากสารละลายด้วยการกรองผ่านตะแกรง ส่วนสารละลายที่ได้นำมากรองหยาบด้วยการผ่านสำลี กรองละเอียดซ้ำด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 และนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator

ส่วนสกัดที่ได้ ทำการละลายกลับด้วย 95% ethanol ให้เป็นสารละลายส่วนสกัดหญ้าถอดบ้องเข้มข้นในอัตราส่วนที่เหมาะสม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในขวดปิดแน่นกันแสง

เนื่องจากส่วนสกัดหญ้าถอดบ้องที่ได้มีสีเขียวเข้มของคลอโรฟิลล์ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุรบกวนการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพของการสกัด รวมถึงการมีสีและกลิ่นไม่พึงประสงค์ในการเตรียมเป็นตำรับผลิตภัณฑ์บำรุงผม จึงต้องนำส่วนสกัดหญ้าถอดบ้องที่ได้มาทำการสกัดแยกคลอโรฟิลล์ออก โดยเทคนิคการสกัดแยกด้วยของเหลว (Liquid-liquid extraction) ด้วยสารละลายผสม Chloroform: Methanol: Water (4:1:1 v/v/v) ทำการผสมสารละลายผสมกับสารสกัดหญ้าถอดบ้องในอัตราส่วน 5:1 ภายในกรวยแยก (seperating funnel) และตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ดัง**รูปที่ 4** จะได้ชั้นของสารละลายอินทรีย์ซึ่งมีส่วนของคลอโรฟิลล์สีเขียว แยกออกมาจากชั้นน้ำซึ่งมีสารออกฤทธิ์ที่ต้องการ

นำสารละลายชั้นน้ำ (ประกอบด้วย methanol, ethanol และน้ำ) ทำการดูดสีส่วนเกินที่เหลือด้วยผงถ่าน (activated charcoal) 1% ทำการกรองเอาผงถ่านออกแล้วนำสารละลายที่ได้ไปแยกส่วนแอลกอฮอล์ออกด้วยเครื่องมือ rotary evaporator จากนั้นนำสารละลายที่เหลือไปชั่งน้ำหนักเพื่อหา % yield และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในขวดปิดแน่นกันแสง

รูปที่ 3 ลักษณะหญ้าถอดบ้องสด หญ้าถอดบ้องตากแห้ง และสารสกัดหญ้าถอดบ้องที่เตรียมได้

รูปที่ 4 การสกัดแยกคลอโรฟิลล์ออกจากสารสกัดหญ้าถอดบ้อง และลักษณะสารสกัดหญ้าถอดบ้องที่เตรียมได้

3. การทดสอบคุณสมบัติและ/หรือประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการหลุดร่วงของผมโดยตรวจวัดกัมมันตภาพของเอนไซม์ 5-alpha reductase

หลักการ

สารละลายเอนไซม์ 5-alpha reductase ที่มีอยู่ในส่วนไมโครโซมของเซลล์เป้าหมายมีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนฮอร์โมน testosterone เป็น dihydrotestosterone ซึ่งออกฤทธิ์รุนแรงกว่าแล้วส่งผลทำให้การทำลายเซลล์เส้นผมและทำให้เกิดผมร่วงตามมา สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5-alpha reductase จะสามารถหยุดยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ได้และช่วยป้องกันผมร่วงหรือศรียะล้านได้

การศึกษาในหลอดทดลองครั้งนี้จะใช้เอนไซม์ 5-alpha reductase บริสุทธิ์เร่งการเปลี่ยนฮอร์โมน testosterone ในสภาวะที่มี NADPH เป็นโคเอนไซม์ให้กลายเป็นสารผลิตภัณฑ์ dihydrotestosterone สารทดสอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์นี้ ทำให้การสร้าง dihydrotestosterone ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

3.1 วิธีวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ 5-alpha reductase [8] ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟฟีผิวบาง

ขั้นตอนการเร่งปฏิกิริยา

เติมสารละลายเอนไซม์ 5-alpha reductase (20 ไมโครลิตร) ลงไปในสารละลายสับเตรท (50 ไมโครลิตร) ที่ประกอบด้วย 1 mM testosterone เติมสารสกัดพืชที่ต้องการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ 5-alpha reductase ลงไป 100 ไมโครลิตร เริ่มปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลาย 5 mM NADPH/40 mM trisodium citrate buffer, pH 5.0-5.5 (สำหรับเอนไซม์ 5-alpha R2) 180 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการนำสารละลายไปจุ่มในถังไนโตรเจนเหลวหรืออ่างน้ำแข็งแห้งนาน 5 นาที

ทำการสกัดสารละลายสเตียรอยด์ (^{3}H-testosterone และ ^{3}H-dihydroxytestosterone) ด้วยสารละลายอีเธอร์ (1 มิลลิลิตร) 2 ครั้ง นำส่วนสกัดอีเธอร์ที่ได้ไปทำการระเหยให้แห้งภายใต้ไอก๊าซไนโตรเจน แล้วเตรียมเป็นสารละลายในเมทธานอลเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี thin-layer chromatography (TLC) ต่อไป

ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC

นำสารละลายสเตียรอยด์ (^{3}H-testosterone และ ^{3}H-dihydroxytestosterone) มาวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC โดยใช้ silica plate และ mobile solvent คือ chloroform, toluene, ethanol, diethyl ether mixture นำเพลทวิเคราะห์ที่ได้ไปส่องดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร สังเกตแถบดำของ testosterone และ dihydroxytestosterone ที่ปรากฏบนแผ่น TLC แล้วเปรียบเทียบกับผลจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมสารทดสอบ

นำแผ่น TLC ที่ได้ไปอบด้วยไอไอโอดีนอิ่มตัว ค่าความเข้มของแถบสีน้ำตาลบนแผ่นโครมาโตรกราฟฟีผิวบางที่อบด้วยไอไอดีน ถูกนำไปอ่านด้วยเครื่องมืออ่านความเข้มสี (Gel Doc: Gel system) เพื่อเปรียบเทียบปริมาณ Dihydrotestosterone รายงานผลค่าการยับยั้งกัมมันตภาพเอนไซม์ 5-alpha reductase ในรูป % inhibition เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม (Positive control)

3.2 วิธีวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ 5-alpha reductase จากพลาสมาด้วยเทคนิคสเปคโตรโฟโตเมทรี

ทำการปั่นแยกพลาสมาออกจากเลือดของอาสาสมัคร โดยใช้เครื่องปั่นแหวี่ยงความเร็วสูง ที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นแหล่งของเอนไซม์ 5-alpha reductase

ส่วนพลาสมาที่แยกได้ 100 ไมโครลิตร นำมาทำปฏิกิริยากับสารสกัดพืชที่ต้องการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ 5-alpha reductase ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ร่วมกับสารละลายสับสเตรท (25 ไมโครลิตร) ที่ประกอบด้วย 1 mM testosterone ใน 40 mM trisodium citrate buffer, pH 5.5 (สำหรับเอนไซม์ 5-alpha R2) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เมื่อรบเวลานำไปปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาการทดสอบค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ 5-alpha reductase ในหลอดทดลองที่มีการเติมสารสกัดพืช เปรียบเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่มีสารสกัด โดยการวัดการเปลี่ยนแปลงระดับ 1.28 µmol NADPH ด้วยการทำปฏิกิริยากับสารละลายทดสอบ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ของ 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) [DTNB] ในฟอตเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.5 ติดตามระดับ NADPH ที่

เปลี่ยนแปลงโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร

กัมมันตภาพของเอนไซม์ 5-alpha reductase แปรผกผันกับระดับของ NADPH ที่ลดลง รายงานค่าความสามารถของการยับยั้งกัมมันตภาพเอนไซม์ 5-alpha reductase ของสารสกัดพืชในรูป % Inhibition โดยเปรียบเทียบกับค่าระดับ NADPH จากหลอดควบคุมเป็น 100%

3.3 วิธีวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ 5-alpha reductase จากไมโครโซมของตับด้วยเทคนิคสเปคโตรโฟโตเมทรี

เอนไซม์ 5-alpha reductase เป็นเอนไซม์ที่มีมากในส่วนไมโครโซมของเซลล์ ดังนั้นจึงได้ทำการสกัดแยกไมโครโซมจากชิ้นส่วนตับของหนูทดลองพันธุ์ Wistar rat เพศผู้ อายุ 6-12 เดือน

หนูทดลองถูกนำมาทำการุณฆาตโดยการดมสลบด้วยสารละลายอีเทอร์ ทำการตัดชิ้นตับ ล้างด้วยฟอตเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ภายในความเย็น ตับที่ล้างเรียบร้อยแล้วนำมาตัดเป็นชิ้นละเอียด และย่อยด้วยเครื่อง homogenizer ในสารละลายผสม 0.32 M sucrose และ 1 mM dithiothreitol ใน 0.02 M phosphate buffer (pH6.5) ทำการปั่นแยกส่วนไมโครโซมโดยใช้เครื่องปั่นแหวี่ยงความเร็วสูง ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บชั้นสารละลายซึ่งมีไมโครโซมเป็นส่วนประกอบที่อุณหภูมิ -20 องศาสเซลเซียส เพื่อเป็นแหล่งของเอนไซม์ 5-alpha reductase สำหรับใช้ทดสอบกัมมันตภาพเอนไซม์ต่อไป โดยใช้วิธีการทดสอบเช่นเดียวกับในข้อ 3.2

กัมมันตภาพของเอนไซม์ 5-alpha reductase แปรผกผันกับระดับของ NADPH ที่ลดลง รายงานค่าความสามารถของการยับยั้งกัมมันตภาพเอนไซม์ 5-alpha reductase ของสารสกัดพืชในรูป % Inhibition โดยเปรียบเทียบกับค่าระดับ NADPH จากหลอดควบคุมเป็น 100% และรายงานเทียบเท่ากับความสามารถของยา Finasteride ในการยับยั้งกัมมันตภาพเอนไซม์ 5-alpha reductase (mg Finasteride equivalent [FNE]/ g extract)

4. การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญที่จะใช้เป็นตัวบ่งชี้เอกลักษณ์ของสารสำคัญในผลิตภัณฑ์บำรุงผม

4.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu Phenol Assay (10)

เพื่อควบคุมมาตรฐานของการเตรียมสารสกัดตลอดการทำการทดลอง และทดสอบความคงตัวของสารสกัดเพื่อเตรียมในรูปตำรับยาบำรุงผม สารสกัดพืชที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกโดยวิธี Folin-Ciocalteu method เทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid โดย สารสกัด 20 ไมโครลิตร (เข้มข้น 1 mg/ml) จะถูกนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu reagent 100 ไมโครลิตร และ 7.5% Na_2CO_3 2 มิลลิลิตร ทำการบ่มที่ 40 °C เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นที่ 765 nm โดยความเข้มของสีจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่าง นำค่าที่ได้มาคำนวณปริมาณฟีนอลิกรวมโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid ที่ความเข้มข้น 0.1-1.0 mg/ml ปริมาณฟีนอลิกรวมรายงานในหน่วย milligrams of gallic acid equivalent per gram of dry weight (mg GAE/g) of extracts

4.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติต้านออกซิเดชันโดยวิธี ABTS Cation Decolorization Assay (11)

สารทดสอบ ได้แก่ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) ถูกเตรียมให้อยู่ในรูป อนุมูล $ABTS^{\cdot+}$ โดยการทำปฏิกิริยาของ 14 mM ABTS กับสารละลาย 4.95 mM potassium persulfate อัตราส่วน 1:1 (v/v) ตั้งในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลอง นำสารละลายอนุมูล $ABTS^{\cdot+}$ ที่เตรียมได้มาเตรียมให้อยู่ในรูป working solution ที่มีความเข้มข้นพอเหมาะโดยการเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm เท่ากับ 0.70 ± 0.02

สารละลาย working solution ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร นำมาทำปฏิกิริยากับสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม (ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ ให้ค่า % Inhibition อยู่ระหว่าง 5-80%) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Trolox (water soluble vitamin E derivative) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ 734 โนเมตร คำนวณ % inhibition และหาค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชัน เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Trolox โดยรายงาน TEAC value (Trolx Equivalent Antioxidant Capacity) ในหน่วย

เทียบเท่า milligrams of trolox equivalent antioxidant capacity per gram of dry weight (mg TEAC/g) of extracts

5. การเตรียมและพัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์บำรุงผม (hair tonic)

ทำการเลือกสารสกัดจากพืชท้องถิ่นพื้นที่สูงที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งกัมมันตภาพเอนไซม์ 5-alpha reductase เพื่อพัฒนาเป็นตำรับผลิตภัณฑ์บำรุงผมที่เหมาะสม มีคุณลักษณะและความคงสภาพที่ดี

ขั้นตอนการเตรียมตำรับ hair tonic เริ่มโดยนำ menthol มาละลายใน de-ethanol แล้วส่วนผสมอื่นๆตามลำดับ คนผสมให้เข้ากันก่อนเติมสารสกัด ส่วนประกอบของ hair tonic ที่ใช้ในแต่ละตำรับ แสดงใน **ตารางที่ 3- ตารางที่ 6**

6. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในการยับยั้งการหลุดร่วงของผมโดยตรวจวัดกัมมันตภาพของเอนไซม์ 5-alpha reductase

ตำรับผลิตภัณฑ์ที่คัดเลือกจากระเบียบวิธีวิจัยหัวข้อที่ 5 นำมาทดสอบหาประสิทธิภาพของตำรับผลิตภัณฑ์ โดยการวิเคราะห์หาความสามารถในการยับยั้งกัมมันตภาพเอนไซม์ 5-alpha reductase ด้วยวิธีวิเคราะห์เช่นเดียวกับระเบียบวิธีวิจัยหัวข้อที่ 3

7. การทดสอบการระคายเคืองผิวของผลิตภัณฑ์บำรุงผมในอาสาสมัคร จำนวน 20 คน

ทำการทดสอบการระคายเคืองผิวของผลิตภัณฑ์บำรุงผมในอาสาสมัครสุขภาพดี จำนวน 20 คนโดยให้อาสาสมัครทดลองใช้ผลิตภัณฑ์ สังเกตุผลการระคายเคืองในบริเวณที่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์หลังจากการใช้ โดยหยด hair tonic ลงบนแผ่นสำลีแล้วนำมาแปะผิวบริเวณแขนด้านในระหว่างข้อมือถึงข้อศอกและปิดทับด้วยพลาสติกป้องกันการระเหยของ hair tonic ทิ้งไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบ 4 ชั่วโมงดึงแผ่นสำลีที่แปะออก ประเมินผล 4 ครั้งดังนี้ ประเมินทันที ประเมิน 24, 48, และ 72 ชั่วโมงหลังแผ่นสำลีออก โดยมีเกณฑ์การประเมินดังนี้

0 ไม่เกิดปฏิกิริยาการระคายเคืองใดๆ

\+ เกิดอาการระคายเคืองเล็กน้อย
(ผิวแดงเล็กน้อย หรือผิวบริเวณที่ปิดแผ่นสำลีที่มีhair tonic แห้งกว่าเดิม)

++ เกิดอาการระคายเคืองปานกลาง
(ผิวแดงเป็นบริเวณกว้างกว่าบริเวณที่ปิดแผ่นสำลีที่มี hair tonic)

+++ เกิดอาการระคายเคืองรุนแรง (ผิวแดงเป็นบริเวณกว้าง และมีตุ่มน้ำเล็กๆเกิดขึ้น)

8. การศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์

ทำการศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ hair tonic ใน 2 สภาพ ได้แก่

1) เก็บที่อุณหภูมิร้อนสลับเย็น โดยเก็บ hair tonic ไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ สลับกับอุณหภูมิ 45° ซ เก็บที่แต่ละอุณหภูมินาน 48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทำการทดลอง 4 รอบ

2) เก็บที่อุณหภูมิห้องปกติ โดยเก็บ hair tonic ไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 ° ซ) เป็นเวลา 3 สัปดาห์

เมื่อครบเวลาตามที่กำหนด แบ่งตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม (total phenolic compound) วัด antioxidant capacity และฤทธิ์การยับยั้ง 5-α-reductase โดยเปรียบเทียบก่อนและหลังการทดสอบความคงสภาพ และประเมินลักษณะที่ปรากฏ ได้แก่ กลิ่น สี และความเป็นกรดด่างของ hair tonic

9. การทดสอบความพึงพอใจผลิตภัณฑ์บำรุงผมในอาสาสมัคร

การประเมินความพึงพอใจด้านประสาทสัมผัสต่อผลิตภัณฑ์ ทำโดยให้อาสาสมัครชาย-หญิง จำนวน 20 คน ทดลองใช้ hair tonic โดยให้อาสาสมัครสเปรย์ hair tonic บริเวณแขนด้านในระหว่างข้อมือถึงข้อศอกทิ้งไว้ประมาณ 20 วินาที จึงประเมินผลความพึงพอใจตามแบบสอบถามในภาคผนวก โดยให้คะแนน ดีมาก = 4 ดี = 3 พอใช้ = 2 และควรปรับปรุง = 1

การประเมินความพึงพอใจด้านประสาทสัมผัสต่อผลิตภัณฑ์อีกวิธี ทำโดยสเปรย์ hair tonic ลงบนเส้นผม แล้วให้อาสาสมัครประเมินความพึงพอใจเปรียบเทียบก่อนและหลังสเปรย์ hair tonic โดยตอบแบบสอบถาม

10. ฝึกอบรมกระบวนการเตรียมวัตถุดิบและฝึกปฏิบัติการผลิตผลิตภัณฑ์บำรุงผม แก่เจ้าหน้าที่และผู้ที่เกี่ยวข้อง

ตำรับผลิตภัณฑ์บำรุงผมที่ได้รับการทดสอบ และคัดเลือกเป็นสูตรที่ดีที่สุดแล้ว จะได้นำมาฝึกอบรมกระบวนการเตรียมวัตถุดิบและฝึกปฏิบัติการผลิตผลิตภัณฑ์บำรุงผม แก่เจ้าหน้าที่ของสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูงและผู้ที่เกี่ยวข้อง โดยรูปแบบและแนวทางการฝึกอบรมจะได้แสดงในเอกสารแนบ เอกสารประกอบการฝึกอบรม "กระบวนการเตรียมวัตถุดิบ และตั้งสูตรตำรับ"