

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

สารเคมี

- 1) Methanol AR grade
- 2) Dulbecco's modified Eagle's medium
- 3) Fetal Bovine Serum (FBS)
- 4) Penicillin Streptomycin (5,000 units of penicillin and 5,000 µg of streptomycin /ml)
- 5) 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)
- 6) Dexamethasone (DS)
- 7) Insulin
- 8) Trypsin
- 9) EDTA
- 10) BSA
- 11) Oil-Red O
- 12) สารเคมีเตรียมครีมตามตารางที่ 3.1-3.4

พืช

- 1) กวาวเครือดำ
- 2) ไม้แดง
- 3) มะเขว่น

อุปกรณ์

- 1) เครื่องบดพืช
- 2) Rotary evaporator
- 3) Flask 5, 1, 0.5 L.
- 4) ขวดเลียงเซลล์ ขนาด 75 มิลลิลิตร
- 5) 24 well cell culture plate
- 6) Spectrophotometer
- 7) HPLC
- 8) Homogenizer
- 9) Hot plate

10) Brookfield Viscometer LVDV

11) Incubator

เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ

1) MC3T3-G2/PA6 pre-adipocytes (Riken Bioresource center Cell bank, Japan)



3.2 วิธีการ

3.2.1) การเตรียมสารสกัด

1) การเตรียมสารสกัดกาวเครือดำ

- (1) นำส่วนลำต้นกาวเครือดำมาอบที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำไปบดให้ละเอียด
- (2) นำพืชตัวอย่างมาชั่งน้ำหนัก และเติมเมทานอลลง อัตราส่วน พืช : เมทานอล = 1:2 จากนั้นทิ้งไว้ 72 ชั่วโมง กรองเอาเมทานอลออก และนำเมทานอลใหม่ใส่ลงไปในการสกัดเพื่อสกัดต่ออีก 2 ครั้ง
- (3) นำสารสกัดเมทานอลทั้งหมดมาระเหยเมทานอลออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ระเหยเมทานอลออกจนหมด ได้สารสกัดหยาบเมทานอล

2) การเตรียมสารสกัดไม้แดง

- (1) นำเปลือกไม้แดงมาอบที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำไปบดให้ละเอียด
- (2) นำพืชตัวอย่างมาชั่งน้ำหนัก และเติมเมทานอลลง อัตราส่วน พืช : เมทานอล = 1:2 ทิ้งไว้ 72 ชั่วโมง กรองเอาเมทานอลออก และนำเมทานอลใหม่ใส่ลงไปในการสกัดเพื่อสกัดต่ออีก 2 ครั้ง
- (3) นำสารสกัดเมทานอลทั้งหมดมาระเหยเมทานอลออกจนหมดด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบไม้แดง
- (4) นำสารสกัดหยาบไม้แดงมา 200 กรัมผสมน้ำกลั่น 500 มล. จากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์ XAD-Amberlite ชะออกด้วยสารละลายเมทานอล 80% และนำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ของไม้แดง

3) การเตรียมน้ำมันมะเขว่น

สกัดโดยนำผลมะเขว่นแห้งมาบดบดพอแตก สกัดโดยใช้ชุดกลั่นด้วยน้ำ นำน้ำมันที่ได้มาเติม sodium sulfate, anhydrous ในปริมาณที่มากพอ เพื่อกำจัดน้ำที่ปนอยู่ในน้ำมันหอมระเหย

3.2.2) การทดสอบฤทธิ์ในการลดการสะสมของไขมันของสารสกัดและครีม

1) ทดสอบฤทธิ์ในการลดการสะสมของเซลล์ไขมันใต้ผิวหนัง โดยใช้เซลล์ MC3T3-G2/PA6 pre-adipocytes (5,6)

เซลล์ทดสอบ การเพาะเลี้ยงและการดูแลรักษา เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ คือ MC3T3-G2/PA6 pre-adipocytes (Riken cell bank, Japan) โดยทำการเพาะเลี้ยงใน Dulbecco's modified Eagle's

medium (DMEM) ที่มี 10% FBS และ Penicillin Streptomycin ที่เหมาะสม เพาะเลี้ยงในตู้เพาะเชื้อที่ 37°C, 5% CO₂ โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 5-7 วัน

ทดสอบฤทธิ์ในการลดการสะสมของไขมันใน MC3T3-G2/PA6 เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง ทดสอบในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 75 cm² จนเซลล์เจริญเติบโตเต็มที่ (confluence) จากนั้นย้ายเซลล์ดังกล่าว โดยใช้ 0.025% trypsin and 0.01% EDTA จากนั้นนำมาเลี้ยงใน 24 well cell culture cluster ที่ 7,500 เซลล์/ตร.ซม โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสม นำไปเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ 37 °C, 5% CO₂ จนเซลล์เจริญเติบโตเต็มที่อีกครั้ง ประมาณ 2 วัน จากนั้นกระตุ้นการสร้างสะสมไขมันโดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 150 uM IBMX, 1 ug/ml insulin และ 0.3 uM dexamethasone นำไปเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 37 °C, 5% CO₂ อีก 2 วัน จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FBS ใน DMEM และเติม 1 ug/ml insulin นำไปเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 37 °C, 5% CO₂ อีก 1 วัน เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์อีกครั้ง แล้วเติม 1% BSA and Krebs-Ringer phosphate (KRP) buffer ทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเตรียมสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆและบ่มที่เวลาต่างๆในกรณีสารสกัด และบ่มที่ 6 ชั่วโมงในกรณีครีม จากนั้นทำการย้อมเซลล์ทดสอบที่ได้ด้วยสารละลาย Oil-Red O และถ่ายภาพ จากนั้นสกัดออกมาด้วย isopropyl alcohol แล้วจึงนำมาอ่านค่าด้วย สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 540 nm เพื่อเปรียบเทียบเพิ่มขึ้นหรือลดลงของเซลล์ไขมันที่มีอยู่เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

$$\% \text{ การสะสมปริมาณไขมัน} = \frac{\text{ค่า OD 540 ของสารทดสอบ} \times 100}{\text{ค่า OD 540 ของกลุ่มควบคุม}}$$

2) การวิเคราะห์ Quercetin-3-galactoside

การวิเคราะห์สาร quercetin-3-galactoside ในครีมสารสกัดไม้แดงกวาวเครือดำ โดยใช้ HPLC เพื่อใช้เป็น marker ในการศึกษาความคงสภาพของครีม

3) การสกัดสารจากครีมตัวอย่าง

- (1) ชั่งครีมตัวอย่าง 1 กรัม ละลายด้วยเมทานอล 3 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าในเข้ก้น นาน 10 นาที
- (2) นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บสารละลายใสด้านบน 2 มิลลิลิตร นำไปผ่านการกรองด้วย Nylon membrane ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณด้วย HPLC ต่อไป

4) วิธีการตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC

เครื่องมือ : HPLC system, Shimadzu, Japan

Detector : Dioarray

ใช้คอลัมน์ Aqueous C18 (4.6x250 mm), Restex, USA

Solvent A: 2.4% TFA+ 0.25% orthophosphoric acid in water

Solvent B: Methanol

The elution system : 0-4 min, 2-12% B

4-30 min, 12-35% B

30-45 min, 35-60%B

Sample size 20 µl

Flow rate: 1 ml/min

Monitored at 370 nm

3.2.3) การเตรียมครีมνωดสลายไขมันใต้ผิวหนัง

เตรียมครีมชนิดน้ำมันในน้ำ โดยผสมสารในเฟสน้ำรวมกัน และทำให้ร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส ผสมสารในเฟสน้ำมันรวมกัน และทำให้ร้อนที่ 65 องศาเซลเซียส แล้วจึงผสมเฟสน้ำลงในเฟสน้ำมันที่อุณหภูมิดังกล่าว พร้อมทั้งคนอย่างรวดเร็วจนได้อิมัลชัน เมื่ออุณหภูมิลดลงถึงประมาณ 35 องศาเซลเซียส จึงเติมสารสกัดกวาวเครือและ/หรือไม้แดงที่ละลายในเอทานอล และน้ำหอมเพื่อแต่งกลิ่นครีม บรรจุครีมในภาชนะที่เหมาะสม ส่วนประกอบและปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียมครีมดังแสดงในตารางที่

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของครีมตำรับ 1-4

Number	1	2	3	4
Jojoba oil	1.50	1.50	1.50	1.50
Triethylhexanoin	1.50	1.50	1.50	1.50
Squalane	2.30	2.30	2.30	2.30
Shear butter	2.50	2.50	2.50	2.50
Ceteareth -20	1.76	1.76	-	-
Sorbitan Monostearate	1.51	0.91	1.51	0.91
Cetyl alcohol	3.50	3.50	3.50	3.50
Stearyl alcohol	1.50	1.50	1.50	1.50
Tocopherol acetate	2.00	2.00	2.00	2.00
dl-a-tocopherol	0.10	0.10	0.10	0.10
Preservative	0.60	0.60	0.60	0.60
PEG 40 stearate	1.61	2.21	1.61	2.21
Phenyl trimethicone	2.00	2.00	2.00	2.00
Dimethicone	3.00	3.00	3.00	3.00
Stearyl dimethicone	2.00	2.00	2.00	2.00
Vinyl dimethicone and silica	-	-	-	-
Dipotassium glycyrrizinate	0.10	0.10	0.10	0.10
Panthinol 50%	2.00	2.00	2.00	2.00
PEG 40 Hydrogenated castor oil	3.88	3.88	3.88	3.88
Butylene glycol	1.50	1.50	1.50	1.50
Propylene glycol	1.00	1.00	1.00	1.00
Deionized water	64.14	64.14	65.90	65.90
Total	100.00	100.00	100.00	100.00

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของครีมดำรับที่ 5-8

Number	5	6	7	8
Jojoba	1.50	1.50	1.50	1.50
Triethylhexanoin	1.50	1.50	1.50	1.50
Squalane	2.30	2.30	2.30	4.30
Shear butter	2.50	2.50	2.50	1.50
Ceteareth -20	-	-	-	1.76
Sorbitan Monostearate	1.51	1.51	1.51	3.48
Cetyl alcohol	3.50	3.50	3.50	2.50
Stearyl alcohol	1.50	1.50	1.50	2.00
Tocopherol acetate	2.00	2.00	2.00	2.00
Tocopherol	0.10	0.10	0.10	1.00
Phenoxyethanol and parabens	0.60	0.60	0.60	0.60
PEG 40 stearate	1.61	1.61	1.61	-
Phenyl trimethicone	5.00	3.00	1.50	2.00
Cyclomethicone	-	-	2.00	-
Dimethicone	-	-	-	1.50
Cyclopentasiloxane crosspolymer		1.50	1.50	1.00
Vinyl dimethicone and silica	1.50	1.50	1.00	0.50
Dipotassium glycyrrizinate	0.10	0.10	0.10	0.10
Panthinol 50%	2.00	2.00	2.00	2.00
PEG 40 Hydrogenated castor oil	3.88	3.88	3.88	0.94
Butylene glycol	1.50	1.50	1.50	1.50
Propylene glycol	1.00	1.00	1.00	1.50
Sorbitol	-	-	1.00	0.75
Deionized water	66.40	66.90	65.90	66.07
Total	100.00	100.00	100.00	100.00

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของครีมดำรับที่ 9-11

Number	9	10	11
Jojoba oil	1.00	1.00	1.00
Triethylhexanoin	1.00	1.00	1.00
Squalane	3.00	3.00	3.00
Shear butter	1.00	1.00	1.00
Ceteareth -20	0.94	0.94	0.94
Span 60	3.19	3.19	3.19
Cetyl alcohol	5.00	5.00	5.00
Stearyl alcohol	3.00	3.00	3.00
Tocopherol acetate	1.00	1.00	1.00
Tocopherol	0.10	0.10	0.10
Phenoxyethanol and parabens	0.60	0.60	0.60
PEG 40 stearate	0.94	0.94	0.94
Phenyl trimethicone	2.00	2.00	2.00
Dimethicone	1.50	1.50	1.50
Cyclopentasiloxane and crosspolymer	1.00	1.00	1.00
Vinyl dimethicone and silica	0.50	0.50	0.50
Dipotassium glycyrrizinate	0.10	0.10	0.10
Panthinol 50%	2.00	2.00	2.00
PEG 40 Hydrogenated castor oil	1.76	1.76	1.76
Butylene glycol	2.00	2.00	2.00
Propylene glycol	2.00	2.00	2.00
Sorbitol	1.00	1.00	1.00
Disodium EDTA	0.10	0.10	0.10
กาวเครือ extract 10% solution		4.00	2.00
ฟ้าทะลายโจร extract 10% solution	-	-	-
Lipofirm	-	-	-
Deionized water	65.27	61.27	63.27
Total	100.00	100.00	100.00
Perfume	10 dr	10 dr	10 dr

ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบของครีมดำรับที่ 12-14

Number	12	13	14
Jojoba oil	1.00	1.00	1.00
Triethylhexanoin	1.00	1.00	1.00
Squalane	3.00	3.00	3.00
Shear butter	1.00	1.00	1.00
Ceteareth -20	0.94	0.94	0.94
Span 60	3.19	3.19	3.19
Cetyl alcohol	5.00	5.00	5.00
Stearyl alcohol	3.00	3.00	3.00
Tocopherol acetate	1.00	1.00	1.00
Tocopherol	0.10	0.10	0.10
Phenoxyethanol and parabens	0.60	0.60	0.60
PEG 40 stearate	0.94	0.94	0.94
Phenyl trimethicone	2.00	2.00	2.00
Dimethicone	1.50	1.50	1.50
Cyclopentasiloxane crosspolymer	1.00	1.00	1.00
Vinyl dimethicone and silica	0.50	0.50	0.50
Dipotassium glycyrrizinate	0.10	0.10	0.10
Panthinol 50%	2.00	2.00	2.00
PEG 40 Hydrogenated castor oil	1.76	1.76	1.76
Butylene glycol	2.00	2.00	2.00
Propylene glycol	2.00	2.00	2.00
Sorbitol	1.00	1.00	1.00
Disodium EDTA	0.10	0.10	0.10
กาวเครือ extract 10% solution	-	-	2.00
ขมิ้นแดง extract 10% solution	2.00	4.00	2.00
Lipofirm	-	-	5.00
Deionized water	63.27	61.27	56.27
Total	100.00	100.00	100.00
Perfume	10 dr	10 dr	10 dr

3.2.4) การทดสอบการระคายเคืองของผลิตภัณฑ์

อาสาสมัครที่ร่วมทดสอบ เป็นหญิงอายุระหว่าง 21-61 ปี จำนวน 20 คน เช็ดผิวหนังบริเวณที่ต้องการทดสอบด้วยสำลีชุบ 50 % แอลกอฮอล์ ทาครีมนวดสลายไขมันได้ผิวหนังที่ต้องการศึกษาความคงสภาพหน้าประมาณ 0.2 กรัมบริเวณแขนด้านในระหว่างข้อศอกถึงข้อมือ เป็นบริเวณประมาณ 3.2 ตารางเซนติเมตร ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที แล้วปิดทับด้วยฝักออส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบ 4 ชั่วโมง ดึงฝักออสออก ประเมินผลหลังดึงฝักออสออก 4 ครั้งดังนี้ประเมินทันที ประเมิน 24, 48, และ 72 ชั่วโมง หลังดึงฝักออสออก โดยมีเกณฑ์การประเมินดังนี้

- 0 ไม่เกิดปฏิกิริยาการระคายเคืองใดๆ
- 0+ เกิดอาการระคายเคืองเล็กน้อย (ผิวแดงเล็กน้อย หรือผิวหนังบริเวณที่ปิดแผ่นแปะแห้งกว่าเดิม)
- ++ เกิดอาการระคายเคืองปานกลาง (ผิวแดงเป็นบริเวณกว้างกว่าบริเวณที่ปิดแผ่นแปะ)
- +++ เกิดอาการระคายเคืองรุนแรง (ผิวแดงเป็นบริเวณกว้าง และมีตุ่มน้ำเล็กๆ เกิดขึ้น)

3.2.5) การศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์

(1) การทดสอบความคงสภาพที่อุณหภูมิเดียว

นำครีมนวดสลายไขมันได้ผิวหนังที่ต้องการศึกษาความคงสภาพมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้อง และที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน วิเคราะห์ปริมาณสารที่ใช้เป็น marker ในครีม ทดสอบการยับยั้งการสะสมไขมันในเซลล์ วัดความหนืดของครีม คุณลักษณะทางกายภาพของครีม และวัด pH ของครีม ก่อนและหลังเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 1 และ 2 เดือน

(2) การทดสอบความคงสภาพที่อุณหภูมิสลับ

นำครีมไปทดสอบความคงสภาพโดยวิธี การเก็บที่ร้อนสลับเย็น (heating cooling cycle) โดยเก็บครีมตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ (cycle) เมื่อทดสอบความคงสภาพครบ 2 รอบ ประเมินความคงสภาพโดยวิเคราะห์สารที่ใช้เป็น marker ในครีม และเมื่อครบ 6 รอบประเมินความคงสภาพโดยวิเคราะห์ marker ในครีม วัดความหนืด และ pH ของครีม และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์ไขมัน

3.2.6) การประเมินความพึงพอใจผลิตภัณฑ์ในอาสาสมัคร

การประเมินความพึงพอใจด้านประสาทสัมผัสต่อผลิตภัณฑ์ ทำโดยให้อาสาสมัครหญิงอายุ 21-66 ปี จำนวน 20 คน ทดลองใช้ครีมลดไขมันใต้ผิวหนัง โดยให้อาสาสมัครทาครีมบริเวณแขนด้าน ในระหว่างข้อมือถึงข้อศอกทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที จึงประเมินผลความพึงพอใจตามแบบสอบถามใน ภาคผนวก โดยให้คะแนน ดีมาก = 4 ดี = 3 พอใช้ = 2 และควรปรับปรุง = 1

