

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุประสงค์

แก่นมะหาด 5 กิโลกรัม นำไปตากแห้ง แล้วนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (Bleaner) จะได้ผลละเอียดสีเหลือง

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP221S จากบริษัท ไฮแอนติฟิค ประเทศเยอรมัน
- เครื่องวัดความหนืด (Viscometer) ยี่ห้อ BROOKFIELD PROGRAMMABLE รุ่น DV-II ประเทศเยอรมัน
- เครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH-METER) ยี่ห้อ SCHOTT Instrument รุ่น Lab 850 ประเทศเยอรมนี
- เตาความร้อน (Hot plate) รุ่น IKA C-MAG HS7 ประเทศเยอรมนี
- ตู้เย็น (Refrigerator) ยี่ห้อ SUNYO รุ่น SR-S7 ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ IKA[®] รุ่น RW 20 digital ประเทศเยอรมนี
- เครื่อง UV-visible Spectrophotometer ยี่ห้อ HITACHI. รุ่น U-1500 ประเทศญี่ปุ่น
- ตู้อบ (Hot air oven) ยี่ห้อ Memmert ประเทศเยอรมนี
- เครื่องปั่นผสมความเร็วสูง (Homogenizer) ยี่ห้อ IKA รุ่น RW 20 digital ประเทศเยอรมนี
- กรวยกรอง (Funnel)
- ปีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 500 250 50 และ 25 มิลลิตร
- ปิเปต (Pipette)
- แท่งแก้วสำหรับคนสาร (Stirring rod)
- หลอดหยดสารละลาย (Dropper)
- ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)
- ช้อนตักสาร (Spatula)
- หลอดทดสอบ (Test tubes)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- ขวดฝาเกลียว
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- จานเพาะเชื้อ (Steriled preti disc or plate)
- เครื่องอ่างน้ำ (Water bath)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- สารเคมีที่ใช้ในการทดลองในสูตรตำรับ ; Cosmetic grade นำเข้าบริษัท วันรัต (หน้าเขียน) จำกัด
- Wax C (Cetyl alcohol) , เกรดเครื่องสำอาง (cosmetic grade) ,ประเทศเยอรมนี
 - Glycerin เกรดเครื่องสำอาง, ยี่ห้อ ASK ประเทศญี่ปุ่น
 - Triethanolamine, บริษัท Guangzhou Baochu Chemical Co., Ltd. ประเทศจีน
 - Cremophor[®] A6 (Ceteareth-6 and Stearyl Alcohol), ประเทศจีน

- Cremophor[®] A25 (Cetareth-25), ประเทศจีน
- Silicone 345 (Cyclomethicone)
- Vitamin E Acetate (Tocopheryl Acetate)
- Unigerm G-2 (Propylene Glycol and Diazolidinyl Urea and Methylparaben and Propylparaben)
- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH Lot#STBC1252V นำเข้าบริษัท Sigma Aldrich, ประเทศเยอรมันนี
- Ascorbic acid นำเข้าบริษัท Riedel-de Haen, ประเทศเยอรมันนี
- Ethanol AR grade; Merck, ประเทศเยอรมันนี
- 1,1'-Diphenyl-2-picrylhydrazyl; DPPH AR grade; Fluka, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid; Trolox HPLC grade; Fluka, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); ABTS ,AR grade; Fluka, USA, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- DL- α -tocopherol; Vitamin E AR grade; Fluka, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Potassium persulphate; $K_2S_2O_4$ AR grade; BDH; ประเทศเยอรมันนี
- Dextrose
- Yeast extract
- กลูโคส
- Malt extract
- ผงวุ้น (Agar)
- Nutrient broth

การเตรียมสารสกัดจากมะหาด

ซึ่งนำหนักผงแก่นมะหาดประมาณ 2 กิโลกรัม จากนั้นนำมาแช่ในตัวทำละลาย คือ โพรพิลีนไกลคอล และเอทานอล โดยแช่ผงแก่นมะหาดให้ท่วมเอทานอลประมาณ 15 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 วัน จากนั้นกรองกากแก่นมะหาดและเอทานอลแยกออกจากกันด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Wharman No.1) แยกส่วนกาก (Residue) นำกากไปสกัดด้วยเอทานอลต่ออีก 3 รอบ จากนั้นนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (Rotary vacuum evaporator) ซึ่งจะได้สารสกัดหยาบจากเอทานอล (Crude ethanol) ในขณะที่สารสกัดแก่นมะหาดที่สกัดด้วยโพรพิลีนไกลคอล ทำเช่นเดียวกับการสกัดแก่นมะหาดด้วยเอทานอล

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH Scavenging method) (โดยดัดแปลงจากวิธีของ Papadimitriou, V. และคณะ, 2006)

1) นำครีมตัวอย่าง 0.10 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำเอทานอล จำนวน 9 มิลลิลิตร ผสมด้วย Vortex mixer จนเป็นเนื้อเดียวกัน

2) เติมน้ำละลายดีพีพีเอช ความเข้มข้น 0.40 mg/mL จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมด้วย Vortex mixer จนเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ในที่มืด 20 นาที

3) นำไปเหวี่ยงที่ 1,100 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ใส

4) ปรับค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ให้เท่ากับศูนย์ ด้วยเมทานอล แล้ววัดค่า absorbance ของสารละลายดีพีพีเอช ซึ่งเตรียมจากสารละลายดีพีพีเอช ความเข้มข้น 0.40 mg/mL จำนวน 1 มิลลิลิตร เติมน้ำเมทานอล 9 มิลลิลิตร ค่าที่วัดได้เรียกว่า A_{DPPH} วัดค่า absorbance ของสารละลายในแต่ ละหลอด ค่าที่วัดได้เรียกว่า $A_{Extract}$

5) คำนวณหาค่า % inhibition ตามสูตร

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A_{DPPH} - A_{Extract}}{A_{DPPH}} \times 100$$

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Compounds) (Durkee, A.B. และคณะ, 1977)

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานแกลลิก (Gallic acid)

เตรียมสารละลายมาตรฐานแกลลิก ที่ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 mg/mL

2) สารเตรียมสารละลายตัวอย่าง

สารเตรียมสารละลายตัวอย่างเพื่อวัดการดูดกลืนแสงใส่สารละลาย Folin - Ciocalteu reagent (1:10) โดยเตรียมใหม่ลงในสารละลายตัวอย่าง ตามด้วยสารละลาย 7.5 % โซเดียมคาร์บอเนต รอจนเกิดสี นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) 765 นาโนเมตร

ศึกษาการตั้งสูตรตำรับจากสารสกัดแก่นมะหาด

ตั้งสูตรตำรับ 3 ตำรับจากสารสกัดแก่นมะหาด ได้แก่ โลชั่นทาผิว สครับขัดผิวและครีมอาบน้ำ

(1) สูตรตำรับ โดยมีขั้นตอนการเตรียมครีม ดังนี้

ก. การเตรียมวัฏภาคน้ำมัน

หลอมองค์ประกอบส่วนที่เป็นไขมันของแข็งบนหม้ออังไอน้ำ เติมน้ำมันส่วนที่เป็นของเหลวอื่น ๆ แล้ว ทำให้อุ่นจนถึงอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

ข. การเตรียมวัฏภาคน้ำ

ละลายสารเพิ่มความหนืดและสารให้ความชุ่มชื้นต่างๆ ในน้ำ เติมน้ำส่วนที่เหลือ ทำให้อุ่นบนหม้ออังไอน้ำ จนถึงอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

ค. การทำให้เกิดอิมัลชัน

เติมน้ำมันลงในวัฏภาคน้ำ พร้อมทั้งคนจนเกิดเนื้อครีมขึ้น

การทดสอบความคงตัวของสูตรตำรับครีม

(1) การทดสอบความคงตัวแบบเร่ง (Accelerated Storage test)

- การเร่งด้วยอุณหภูมิ (heating – cooling cycle)

โดยการเก็บผลิตภัณฑ์ที่เตรียมเสร็จ แบ่งใส่ขวดแก้วทึบแสงแล้วปิดฝาในตู้เย็น 4 °C นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นเข้าตู้อบที่ 45 °C อีก 48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทดสอบ 6 - 8 รอบ ทำการบันทึกผล ความหนืด สี กลิ่น การแยกชั้น และพีเอช

- การเร่งโดยแสง

โดยการนำผลิตภัณฑ์แต่ละตำรับที่เตรียมเสร็จใส่ขวดแก้วใส นำไปวางในสภาพต่างๆ นาน 1 เดือน

- ขวดที่ 1 นำไปตากแดด
 ขวดที่ 2 เก็บในสภาพอุณหภูมิห้องและผันแสง
 ขวดที่ 3 ตั้งไว้ริมหน้าต่าง

(2) การทดสอบความคงตัวของอุณหภูมิคงที่

โดยนำผลิตภัณฑ์ที่เตรียมเสร็จ แบ่งใส่ขวดแก้วปิดฝาตำรับละ 3 ขวด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C - 5 °C และอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 เดือน แล้วบันทึกผล

การตั้งตำรับสูตรเครื่องสำอาง

สูตรครีมตำรับสครับขัดผิว

1. เตรียมครีมสูตรพื้นฐาน
2. ปรับความเข้มข้นของปริมาณผงมะหาดในตำรับครีมเบสที่เตรียมไว้ ตามความเข้มข้น คือ 1%, 2% 3% 4% และ 5% (% น้ำหนัก/น้ำหนัก)
3. ตำรับครีมเบสที่จะใช้คือ

ตาราง 3.1 สูตรครีมตำรับสครับขัดผิว

สาร	ชื่อเคมี (INCI Name)	% w/w
วัฏภาคน้ำ (water phase)		
Aqua	Distilled water	55.0
Glycerin	Glycerin	4.0
สารสกัดมะหาด	-	2.0
วัฏภาคน้ำมัน (oil phase)		
Cremophor [®] A6	Ceteareth-6(and) Stearyl Alcohol	2.0
Cremophor [®] A25	Ceteareth-25	1.0
G.M.S.		3.0
Wax C	Cetyl alcohol	1.0
Lexol EHP	Ethylhexyl Palmitate	14.50
Nikko MM		1.00
Silicone 345	Cyclomethicone	2.0
White oil	Minerol oil	14.50
Unigerm G-2	Propylene Glycol and Diazolidinyl Urea and Methylparaben and Propylparaben	0.3
Fragrance	-	-

ที่มา : ดัดแปลงจาก สูตรตำรับขนาดตัวของ บริษัท วันรัต

การตั้งตำรับสูตรโลชั่น

ตาราง 3.2 สูตรตำรับโลชั่นมะหาด 2% w/w

สาร	ชื่อเคมี (INCI Name)	% w/w
Aqua	Distilled water	Diluent
EDTA 2 Na	Disodium EDTA	0.2
DHDH Hydantoin	DHDH Hydantoin	0.6
Sodium stearyl glutamate	Sodium stearyl glutamate	0.2
สารสกัดมะหาด		5%
วัฏภาคน้ำมัน (oil phase)		
Sodium polycrylate	Sodium polycrylate	1.0
Dicarpryl ether	Dicarpryl ether	3.0
Minerol oil	Minerol oil	4.0
Propylene glycol	Propylene glycol	4.0
Fragrance	-	

การตั้งตำรับสูตรครีมอาบน้ำ

ตารางที่ 3.3 สูตรตำรับครีมอาบน้ำมะหาด 2% w/w

สาร	ชื่อเคมี (INCI Name)	% w/w
Aqua	Distilled water	73.8
SLS	Sodium Laureth Sulfate	15.0
EDTA 2 Na	Disodium EDTA	0.2
DHDH Hydantoin	DHDH Hydantoin	0.5
Lauamind [®] C	Cocamide DEA	2.5
Fiquat [®] CP	Quaternium-75	5.0
Propylene glycol	Propylene glycol	3.0

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient broth

ละลาย Nutrient broth ลงในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งแก้วให้สารอาหารละลายปรับ pH ด้วย 0.1 NaOH หรือ 0.1 N HCl จนได้ประมาณ 6.8 -7 ปรับ ปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรนำไปผสม วุ้นต้มจนละลาย เทอาหารใส่ขวดปริมาณขวดละ 200 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี ปิดทับด้วยกระดาษอีกชั้น นำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

2. Malt Yeast Agar (MYA)

วิธีเตรียม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้มวุ้นให้สุกแล้วนำมาผสมกัน ปรับ ปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร เทใส่ขวดอาหารขวดละประมาณ 150 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดให้สนิทแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

วิธีตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ตามมาตรฐาน หรือ Standard plate count (SPC)

1. การเตรียมตัวอย่าง ตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง 6 ตำรับ

โลชั่นมะหาด (โพรพิลีนไกลคอลเป็นตัวทำละลาย)

โลชั่นมะหาด (เอทานอลเป็นตัวทำละลาย)

ครีมอาบน้ำมะหาด (โพรพิลีนไกลคอลเป็นตัวทำละลาย)

ครีมอาบน้ำมะหาด (เอทานอลเป็นตัวทำละลาย)

สครับมะหาด

ครีมเบสมะหาด

2. การเตรียมและเจือจางตัวอย่าง

1. ทำ Serial dilution โดยใช้ปิเปต (steriled pipet) ขนาด 1 มล. ดูดตัวอย่างออกไป 1 มล. ใส่ ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 9 มล. ผสมให้เข้ากันดี ดังนั้น ตัวอย่างจะถูกทำให้เจือจางลง 10 เท่า เป็น 1: 10 หรือ 10^{-1}

2. จากนั้นเปลี่ยนปิเปตใหม่ (steriled pipet) และปิเปต (steriled pipet) ดูดของ เหลวจากข้อ 1 ออกไป 1 มล. ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 9 มล. ผสมให้เข้ากันดี ดังนั้น ตัวอย่างจะถูกทำให้เจือจางลงอีก 10 เท่า เป็น 1: 100 หรือ 10^{-2}

3. จากนั้นเปลี่ยนปิเปตใหม่ (steriled pipet) และปิเปต (steriled pipet) ดูดของ เหลวจากข้อ 2 ออกไป 1 มล. ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 9 มล. ผสมให้เข้ากันดีดังนั้นตัวอย่างจะถูกทำให้เจือจางลงอีก 10 เท่า เป็น 1: 1,000 หรือ 10^{-3}

3. การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ตามมาตรฐาน

1. ใช้ปิเปต (steriled pipet) ขนาด 1 มล. ดูดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} จำนวน 0.1 มล. ใส่ใน Sterilized Petri dish 1 จานต่อ 1 ความเข้มข้น จากนั้นเท Nutrient broth และ Malt Yeast Agar (MYA) ขณะที่ยังอุ่นๆ ทับลงไปค่อย ๆ ผสมจนเข้ากันดี แล้วทิ้งไว้ รอจนอาหารแห้ง
2. คว่ำจานอาหารที่แห้งแล้วใส่ถุงพลาสติก รัดยางให้แน่น แล้วนำไปป่มในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) 24 ชั่วโมง แล้วนำมานับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ ยีสต์ และรา

$$\text{จำนวนจุลินทรีย์ (CFU/ml)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีบนจานอาหาร} \times \text{ระดับความเจือจาง}}{\text{ปริมาณตัวอย่างที่ใส่ลงใน Petri dish}}$$

การตรวจวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์

การตรวจชนิดของจุลินทรีย์ ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clotridium spp.*, *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* โดยดูว่าตรวจพบจุลินทรีย์ในตัวอย่างแต่ละชนิดหรือไม่