

### บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีวิจัย

#### 3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 เครื่องอบแห้งแบบถาด (Tray dryer)	FNB Machinery and Solution
3.1.2 เครื่องบดสมุนไพร	XCL HK-04B
3.1.3 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง	Ohaus Adventurer
3.1.4 Sieve Shaker	Retsch รุ่น AS-200
3.1.5 Compound light microscope	Novel
3.1.6 Autoclave	Study industrial
3.1.7 Laminar air flow	Clean Model V.6
3.1.8 Incubator	FOC 225I VELD Scientifica
3.1.9 pH meter	Consort C830
3.1.10 Viscometer	Brook field DV-III ULTRA
3.1.11 Colorimeter CIE	Hunter Lab Miniscan XE plus
3.1.12 Spectrophotometer	Biochrom 3 รุ่น Libra S 22
3.1.13 Homogenizer	WiseTis HG-15D&HG-15A
3.1.14 Auto pipette	Biohit PLC.
3.1.15 Centrifuge	Hettich zentrifugen Universal 32R
3.1.16 ตระแกรง	
3.1.17 ถังมือปลอดเชื้อ	
3.1.18 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ	
3.1.19 เข็มเขี่ยเชื้อ	
3.1.20 ตะเกียงแอลกอฮอล์	
3.1.21 บีกเกอร์	
3.1.22 กระจกตวง	
3.1.23 บีเปด	
3.1.24 Micropipette tip	
3.1.25 กากสับปรวด	

## 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- 3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ
- 3.2.2 Ethyl alcohol 98 %
- 3.2.3 Ethyl alcohol 70 %
- 3.2.4 Glycerin
- 3.2.5 Clay
- 3.2.6 Titanium dioxide
- 3.2.7 Talcum
- 3.2.8 Kaolin
- 3.2.9 Phenonip
- 3.2.10 PEG 400
- 3.2.11 Dipropylene glycol
- 3.2.12 Essential oil
- 3.2.13 Methanol 95%
- 3.2.14 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
- 3.2.15 Acetic acid
- 3.2.16 Cysteine-HCl
- 3.2.17 EDTA
- 3.2.18 Folin-Ciocalteu
- 3.2.19 Sodium carbonate
- 3.2.20 Gallic acid
- 3.2.21 Ascorbic acid
- 3.2.22 N-benzoyl-Larginine-4-nitroanilide
- 3.2.23 Potassium Iodide

### 3.3 วิธีวิจัย

#### 3.3.1 การเตรียมสารสกัดผิวจากกากไยสับปะรดและศึกษาสมบัติกายภาพและเคมี ดังนี้

3.3.1.1 อบแห้งกากไยสับปะรดโดยนำกากไยสับปะรดที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำสับปะรดบรรจุกระป๋องมาล้างทำความสะอาด นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้ง นำมาซึ่งเจ้าหน้าที่ของกากสับปะรดคงที่ จากนั้นนำกากสับปะรดที่อบแห้งแล้วไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพรร

3.3.1.2 บด/ร่งกากไยสับปะรดขนาดต่าง ๆ โดยนำกากสับปะรดที่บดแล้วไปร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาดต่าง ๆ บรรจุในถุง ปิดผนึกแบบสุญญากาศ เก็บไว้เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.1.3 ตรวจสอบสมบัติกายภาพกากไยสับปะรดที่ผ่านการร่งขนาดต่าง ๆ โดยนำกากสับปะรดมาส่องดูลักษณะรูปร่างของกากไยที่บดละเอียดด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่าง ๆ

3.3.1.4 ตรวจสอบสมบัติการให้อิเลคตรอน (reducing property) โดยวิธี Total phenols assay ดัดแปลงวิธีของ คิมและลี (Kim & Lee, 2002) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm เทียบกับกราฟมาตรฐาน ความเข้มข้นของ Gallic acid และรายงานค่าเป็นมิลลิกรัม Gallic acid ต่อน้ำหนัก 100 กรัม (mg GAE/100 g FW)

3.3.1.5 การวิเคราะห์หาความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน (Total Antioxidant Capacity, TAC) ด้วยวิธี Diphenyl-1-picrylhydrazyl assay (DPPH) ในการศึกษานี้จะใช้วิธี DPPH โดยอนุมูล DPPH เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัวมีสีม่วงอยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้วโดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลการวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์การวัดทำโดยใช้เครื่องสเปคโตรวัดการลดลงของสีเมื่อเติมสารต้านอนุมูลลงไปโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร (Dasgupta N, 2005)

3.3.1.6 ตรวจวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในกากไยสับปะรดอบแห้งบดละเอียด ด้วยวิธีการไทเทรตแบบ Direct titration เป็นการไทเทรตตรงระหว่างสารละลายตัวอย่างซึ่งมีไอโอดีน, I<sup>-</sup> (จากโพแทสเซียมไอโอดีน, KI) มากเกินพอ กับสารละลายโพแทสเซียมไอโอดेट (KIO<sup>3</sup>) โดยใช้ KIO<sup>3</sup> เป็นตัวไทเทรต อาศัยปฏิกิริยาระหว่างไอโอดेट, IO<sup>3</sup> กับ I<sup>-</sup> มากเกินพอในสภาวะกรด จากปฏิกิริยาดังกล่าว ทำให้เกิด I<sup>2</sup> และ I<sup>2</sup> ที่เกิดขึ้นนี้จะทำปฏิกิริยาทันทีกับวิตามิน

ซี โดยกรดแอสคอร์บิกเป็นตัวรีดิวซ์ให้อิเล็กตรอนแก่ I<sup>2</sup> ซึ่งเป็นตัวออกซิไดซ์ เมื่อกรดแอสคอร์บิกถูก I<sup>2</sup> ออกซิไดซ์แล้ว จะได้เป็นกรดดีไฮดรอกซีแอสคอร์บิก หลังจากวิตามินซีหมดแล้ว ไอโอดีนที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ I<sup>-</sup> เกิดเป็นไตรไอโอไดด์, I<sup>3</sup> ซึ่งสามารถรวมตัวกับน้ำแป้ง (อินดิเคเตอร์) เกิดสารเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ซึ่งเป็นจุดยุติของการไทเทรต (จากไม่มีสีเป็นสีน้ำเงิน)

การคำนวณหาปริมาณวิตามินซีในตัวอย่าง ใช้ความสัมพันธ์จากปฏิกิริยา ดังนี้  
 จำนวนโมลของวิตามินซี = 3 เท่าของจำนวนโมลของ KIO<sub>3</sub> ที่ใช้ในการไทเทรต  
 โดยที่ จำนวนโมลของสารใดๆ = (ความเข้มข้นเป็น M ของสารนั้น x ปริมาตรเป็น ml ของสารนั้น)/1000

และสามารถหา ร้อยละโดยมวลของวิตามินซีได้จาก  
 ร้อยละโดยมวลของวิตามินซี = (มวลของวิตามินซี/มวลตัวอย่าง) x 100

3.3.2 การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์พอกผิวกาย (Body mask) ด้วยกากใยสับปะรดอบแห้ง บดละเอียดที่ขนาดอนุภาค/ความเข้มข้นตามสูตรดัดแปลงตำรับสูตร Non-drying Cleansing Mask (อรัญญา, 2532) และศึกษาสมบัติผลิตภัณฑ์ ดังนี้

3.3.2.1 การเตรียมสูตรผลิตภัณฑ์โดยเลือกใช้ Pineapple meal ขนาด 80/100 mesh และปรับอัตราส่วนของ Pineapple meal ให้ได้อัตราส่วนร้อยละ 0,3, 5,7 และ10 โดยปรับตามความเหมาะสม และกำหนดจากผลการทดสอบสมบัติทางเคมีของกากใยสับปะรด ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สูตรผลิตภัณฑ์สครับพอกผิวกายผสมกากใยสับประรด 0, 3, 5, 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์

ชื่อสาร	ปริมาณ(%w/w)	หน้าที่ของสาร
Phase A		
Pineapple meal 80/100 mesh	0.0	Exfoliating agent
(starch)	3.0	
	5.0	
	7.0	
	10.0	
Phase B		
Dipropylene glycol	5.0	Humectants
PEG 400	8.0	
Glycerine	10.0	
Clay	2.0	Preservative
Ethyl alcohol	1.0	
Titanium dioxide	5.0	
Kaolin	10.0	
Talcum	5.0	
Phenonip	0.5	
Water DI	0.4	
Essential oil	0.3	Aromatic scent

### 3.3.2.2 การตรวจสอบสมบัติต่างๆของผลิตภัณฑ์

1. ลักษณะปรากฏ (Appearance) โดยใช้สายตา (Visual test) อธิบายลักษณะผลิตภัณฑ์ สำเร็จเปรียบเทียบแต่ละสูตรของแต่ละผลิตภัณฑ์
2. กลิ่น (Odor) โดยวิธี Sniff test คือตรวจสอบโดยการดมกลิ่นผลิตภัณฑ์
3. สี (Color) วัดค่าสีโดยใช้เครื่องมือวัดค่าสี ระบบ CIE Hunter L\*a\*b\*
4. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้ pH meter ทุกสูตรของผลิตภัณฑ์
5. ความหนืด (Viscosity) โดยใช้เครื่อง Brookfield viscometer ทุกสูตรของผลิตภัณฑ์

6. ทดสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ (Total aerobic plate count) โดยนำทุกสูตรของผลิตภัณฑ์มาหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Total aerobic plate count ตามมาตรฐานเครื่องสำอาง ทั่วไป มอก. 152-2539

7. ตรวจสอบสมบัติการให้อิเล็กตรอน (reducing property) โดยวิธี Total phenols assay ดัดแปลงวิธีของ Kim & Lee (2002) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm เทียบกับกราฟมาตรฐาน ความเข้มข้นของ Gallic acid และรายงานค่าเป็นมิลลิกรัม Gallic acid ต่อน้ำหนัก 100 กรัม (mg GAE/ 100 g FW)

8. ตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ORAC (Oxygen radical absorbance capacity Assay) ดัดแปลงจากวิธีของ Prior et al (2003) วัด Hydrophilic ORAC (H-ORAC) และ Lipophilic ORAC (L-ORAC) เทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ Trolox ORAC ผลรวมของ H-ORAC และ L-ORAC คือ Total Antioxidant Capacity (TAC) และ รายงานค่าเป็น  $\mu\text{mol Trolox Equivalents}$  ต่อน้ำหนัก 100 กรัม ( $\mu\text{molTE}/100\text{gFW}$ )

9. ตรวจวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในผลิตภัณฑ์พอกผิวกาย ด้วยวิธีการไทเทรตแบบ Direct titration เป็นการไทเทรตตรงระหว่างสารละลายตัวอย่างซึ่งมีไอโอดีน,  $\text{I}^-$  (จากโพแทสเซียมไอโอดีน, KI) มากเกินพอ กับสารละลายโพแทสเซียมไอโอดेट ( $\text{KIO}_3$ ) โดยใช้  $\text{KIO}_3$  เป็นตัวไทเทรต อาศัยปฏิกิริยาระหว่างไอโอดेट,  $\text{IO}_3^-$  กับ  $\text{I}^-$  มากเกินพอในสภาวะกรด จากปฏิกิริยาดังกล่าว ทำให้เกิด  $\text{I}_2$  และ  $\text{I}_2$  ที่เกิดขึ้นนี้จะทำปฏิกิริยาทันทีกับวิตามินซี โดยกรดแอสคอร์บิกเป็นตัวรีดิวซ์ให้อิเล็กตรอนแก่  $\text{I}_2$  ซึ่งเป็นตัวออกซิไดซ์ เมื่อกรดแอสคอร์บิกถูก  $\text{I}_2$  ออกซิไดซ์แล้ว จะได้เป็นกรดดีไฮดรอกซีแอสคอร์บิก หลังจากวิตามินซีหมดแล้ว ไอโอดีนที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ  $\text{I}^-$  เกิดเป็นไตรไอโอดีน,  $\text{I}_3^-$  ซึ่งสามารถรวมตัวกับน้ำแป้ง (อินดิเคเตอร์) เกิดสารเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ซึ่งเป็นจุดยุติของการไทเทรต (จากไม่มีสีเป็นสีน้ำเงิน)

การคำนวณหาปริมาณวิตามินซีในตัวอย่าง ใช้ความสัมพันธ์จากปฏิกิริยา ดังนี้  
จำนวนโมลของวิตามินซี = 3 เท่าของจำนวนโมลของ  $\text{KIO}_3$  ที่ใช้ในการไทเทรต  
โดยที่ จำนวนโมลของสารใดๆ = (ความเข้มข้นเป็น M ของสารนั้น x ปริมาตรเป็น ml ของสารนั้น)/1000

และสามารถหา ร้อยละโดยมวลของวิตามินซีได้จาก

ร้อยละโดยมวลของวิตามินซี = (มวลของวิตามินซี/มวลตัวอย่าง) x 100

3.3.2.3 การทดสอบความคงตัวทางกายภาพ (Stability test) ทุกสูตรของผลิตภัณฑ์พอกผิวกาย โดยทำการทดสอบโดยวิธีทดสอบ แบบ Heat Cooling Cycle โดยนำ

ผลิตภัณฑ์ทุกสูตรมาเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ทำสลับไปมาจำนวน 4 รอบ (อรัญญา มโนสร้อย และ จีรเดช มโนสร้อย, 2537)

3.3.2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ T-Test และวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95