บทที่ 3

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

1. กลุ่มตัวอย่าง

1.1 เกณฑ์การคัดเลือกเข้าศึกษา (Inclusion criteria) เป็นนักเรียนโรงเรียนมัธยมศึกษาวัดหัวลำโพง อายุ 14-18 ปี แบ่งกลุ่มตามลำดับขั้นความรุนแรงของสิว โดยวิธีของ Allen และ Smith(1982) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลำดับขั้นความรุนแรงของสิว

ลำดับขั้นที่	ลักษณะทางคลินิก
0	ผิวหน้าไม่มีสิวเลย หรือเมื่อตรวจใกล้ๆจะพบสิวเม็ดเล็กกระจายอยู่เล็กน้อย
2	มีสิวเม็ดเล็กประมาณ 1ใน4 ของหน้า อาจมีสิวหนองหรือสิวเม็ดใหญ่บ้าง
4	มีสิวเม็ดเล็กประมาณ 1ใน2 ของหน้า มักพบสิวหนองและสิวเม็ดใหญ่ (หรือพบแต่สิวเม็ดใหญ่ ถึงแม้บริเวณที่เป็นจะน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของหน้า)
6	มีสิวเม็ดเล็กหรือสิวหัวเปิดเม็ดใหญ่ประมาณ 3ใน4 ของหน้า พบสิวหนองเม็ดเล็กจำนวนมาก หรืออาจพบเม็ดใหญ่ได้บ้าง (หรือเป็นสิวอับเสบเม็ดใหญ่มาก ถึงแม้บริเวณที่เป็นจะน้อยกว่า 3ใน4 ของหน้า)
8	เป็นสิวทั่วทั้งหน้า มีสิวหนองเม็ดใหญ่จำนวนมาก และมีการอับเสบมาก อาจพบสิวแบบที่เป็นถุงน้ำ และโพรงหนอง เช่นใน acne conglobata

1.2 เกณฑ์การคัดออกจากการศึกษา (Exclusion criteria) ดังนี้

1.2.1 กินหรือเคยกิน ยาที่ทำให้อัตราการขับถ่ายสารจากต่อมไขมันเปลี่ยนแปลงและหยุดยาไม่ถึง 1 ปี ได้แก่ 13-cis retinoic acid, estrogen เช่น ในยาคุมกำเนิด, antiandrogen เช่น Diane, Minovler เป็นต้น, steroid, spironolactone

1.2.2 ใช้ยาทารักษาสิวที่บริเวณใบหน้าอยู่ หรือหยุดใช้ยาไม่เกิน 2 สัปดาห์

1.2.3 รักษาสิวด้วยวิธีกินยาแก้อับเสบอยู่ เช่น tetracycline, erythromycin ซึ่งยาเหล่านี้ไม่มีผลต่อต่ออัตราการขับถ่ายสารจากต่อมไขมัน แต่มีผลต่อส่วนประกอบของไขมันบนผิวหนังได้ (Cunliffe, 1987)

2. Sebu-test strip (CuDerm Corp Dallas, Texas) ซึ่งเป็นแผ่นเทปขนาด 1.8x2 ตารางเซนติเมตร เคลือบด้วยสารที่มีความสามารถในการดูดซึมไขมันได้ดี

3. หลอดแก้วที่มีฝาแก้วปิดสนิท (Quick-fit tube)

4. เครื่อง Multitube vortexer(Scientific Manufactoring Industries, Model 2601)

5. อุปกรณ์ในการทำ Thin-layer chromatography ได้แก่

5.1 ไมโครปิเปตต์ขนาด 5 และ 200 ไมโครลิตร

5.2 Silica gel-TLC plate ขนาด 10*20 ตารางเซนติเมตร หนา 200 ไมโครเมตร

5.3 แทงค์โครมาโตกราฟฟี่ 3 แทงค์

5.4 ตู้อบ (Oven)

5.5 เครื่อง Photodensitometer รุ่น LKB 2400 Gelscan XL^{tm} software package

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างก่อนเก็บสารไขมัน

1.1 เลือกนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 4-6 อายุ 14-18 ปี โดยวิธีกำหนดจำนวน (Quota sampling) 98 คน

1.2 แจกแบบสอบถามแก่กลุ่มตัวอย่างให้ไปตอบที่บ้าน แล้วนำมาคืนในวันรุ่งขึ้น

1.3 กลุ่มตัวอย่างได้รับคำแนะนำให้งดใช้เครื่องสำอางที่หน้า เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนทำการศึกษา

2. การเก็บตัวอย่างสารไขมัน

ใช้ Sebu-test strip (CuDerm Corp Dallas, Texas) โดยผู้เก็บตัวอย่างต้องสวมถุงมือ ใช้ forceps ในการหยิบเครื่องมือที่ใช้ทุกชนิด และเครื่องมือเหล่านี้ต้องเช็ดทำความสะอาดด้วย hexane ก่อนเพื่อขจัดสารไขมัน

2.1 ให้กลุ่มตัวอย่างล้างหน้าด้วยน้ำสะอาดและสบู่อ่อน แล้วเช็ดบริเวณหน้าผากด้วย hexane ที่อิ่มตัว เพื่อขจัดสารไขมันที่บริเวณผิวหนัง

2.2 เมื่อผิวหน้าแห้งใช้ Sebu-test strip ติดบนกลางหน้าผากของกลุ่มตัวอย่าง

2.3 ให้กลุ่มตัวอย่างนั่งเรียนในห้องเรียนตามปกติ ตั้งแต่เวลา 9.00 จนถึงเวลา 12.00 น. ซึ่งเป็นช่วงที่มีอัตราการขับถ่ายสารจากต่อมไขมันสูงสุด (Burton,et al.,1970)

2.4 เมื่อครบ 3 ชั่วโมง แกะ Sebu-test strip ออกใส่ลงในหลอดทดลองที่มีฝาปิด เก็บไว้เพื่อนำไปสกัดสารไขมันในห้องปฏิบัติการต่อไป

3. การสกัดสารไขมัน

3.1 เท hexane 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มี Sebu-test strip ใส่อยู่ก่อนแล้ว เขย่าด้วยเครื่อง vortexer 3 นาที เทสารละลายเก็บไว้อีกหลอดทดลองหนึ่ง ทำเช่นนี้ซ้ำอีกครั้ง โดยเก็บสารละลายไว้ในหลอดทดลองเดียวกันกับครั้งแรก

3.2 นำสารละลายที่ได้ มาทำให้ระเหยด้วยไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะได้สารไขมันที่สกัดได้เหลืออยู่

3.3 เก็บสารไขมันที่ได้ใน Freezer (-20 องศาเซลเซียส) รอทำ Thin-layer chromatography

4. การทำ Thin-layer chromatography

4.1 ละลายไขมันตัวอย่างด้วย hexane 0.2 มิลลิลิตร

4.2 ใช้ปิเปตต์ตวงสารที่ละลายแล้ว 5 ไมโครลิตร หยดลงบน silica gel-TLC plate ขนาด 10 x 20 ตารางเซนติเมตร หนา 200 ไมโครเมตร ที่ถูกกระตุ้นก่อนแล้วด้วยความร้อน 60 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง

4.3 สารละลายมาตรฐานใช้ cholesterol, cholesterol oleate, oleic acid, methyl oleate, triolein, olely palmitate, squalene (Sigma Co., St. Louis, Missouri) ปริมาณแต่ละชนิดเท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรของ hexane แล้วหยดสารละลายมาตรฐานจำนวน 10 ไมโครลิตรลงบน plate (1 plate สกัดแยกสารได้ 6 ตำแหน่ง)

4.4 วาง plate ลงในแทงค์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายของ Downing (1969) คือ

แทงค์ที่ 1 ใช้ hexane 200 มิลลิลิตร ให้ตัวทำละลายเคลื่อนไป 18 เซนติเมตร

แทงค์ที่ 2 ใช้ benzene 200 มิลลิลิตร ให้ตัวทำละลายเคลื่อนไป 18 เซนติเมตร

แทงค์ที่ 3 ใช้ hexane : ether : acetic acid (สัดส่วนโดยปริมาตรเท่ากับ 70 : 30 : 1) รวม 202 มิลลิลิตร ให้ตัวทำลายเคลื่อนที่ไป 16 เซนติเมตร และplate จะถูกวางให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ก่อนใส่ลงในแทงค์ถัดไป

4.5 เมื่อนำ plate ออกจากแทงค์ที่ 3 รอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วย้อมสีด้วยสารละลาย 7% phosphomolibdic acid และทำให้ร้อนในตู้อบอุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อให้เห็นแถบของส่วนประกอบต่างๆ ของสารไขมันชัดขึ้น

4.6 ใช้เครื่อง photodensitometer วัดความเข้มของแถบไขมัน นำค่าที่ได้จากไขมันตัวอย่างเทียบกับไขมันมาตรฐานซึ่งทราบค่าอยู่แล้ว เพื่อให้ทราบถึงปริมาณของสารที่แยกได้

4.7 คำนวนหาค่าอัตราการขับถ่ายสารจากต่อมไขมัน โดยนำปริมาณ cholesterol, free fatty acids, triglycerides, wax esters, cholesterol esters, และ squalene มารวมกัน แล้วหารด้วยพื้นที่ของ Sebu-test strip และเวลาที่ใช้ (180 นาที)

5. <u>การหาค่าการค้นพบของวิธีการทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ (Recovery)</u>

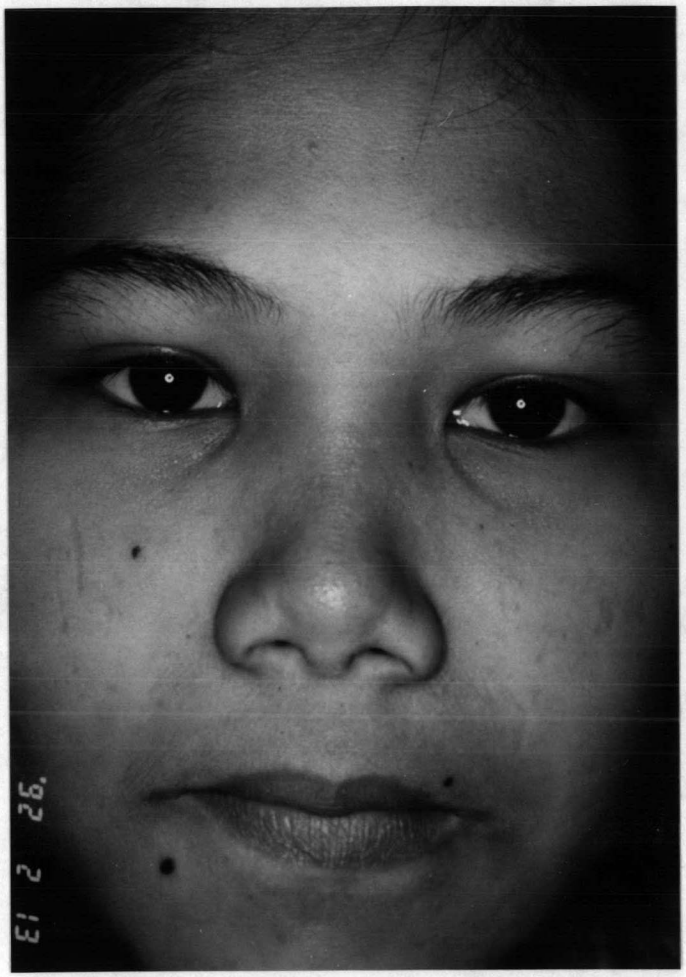
5.1 นำสารละลายมาตรฐาน (cholesterol, cholesterol oleate, oleic acid, methyl oleate, triolin, olely palmitate, squalene) หยดลงบน Sebu-test strip 10 แผ่น ให้ปริมาณของสารแต่ละชนิดใน 1 แผ่น เท่ากับ 40 ไมโครกรัม

5.2 นำไปสกัดโดยวิธีเดียวกับการสกัดสารไขมันตัวอย่าง (ดูข้อ 3)

5.3 นำสารไขมันที่สกัดได้ไปทำ Thin-layer chromatography เพื่อหาส่วนประกอบของสารละลายมาตรฐาน โดยใช้วิธีเดียวกับสารไขมันตัวอย่าง (ดูข้อ 4) และวัดค่าโดยใช้เครื่อง photodensitometer

5.4 คำนวนหาปริมาณของสารแต่ละชนิดที่ได้จากการทำThin-layer chromatography แล้วนำมาเทียบกับปริมาณของสารที่ใส่ไปก่อนสกัดสารไขมัน

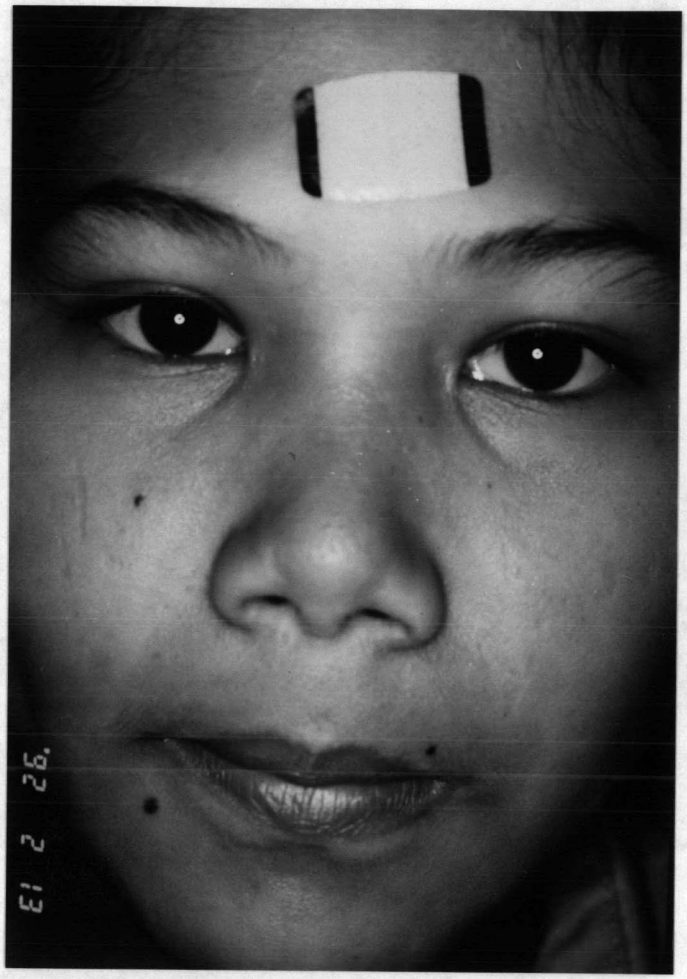
ภาพที่ 1 Sebu-test strip



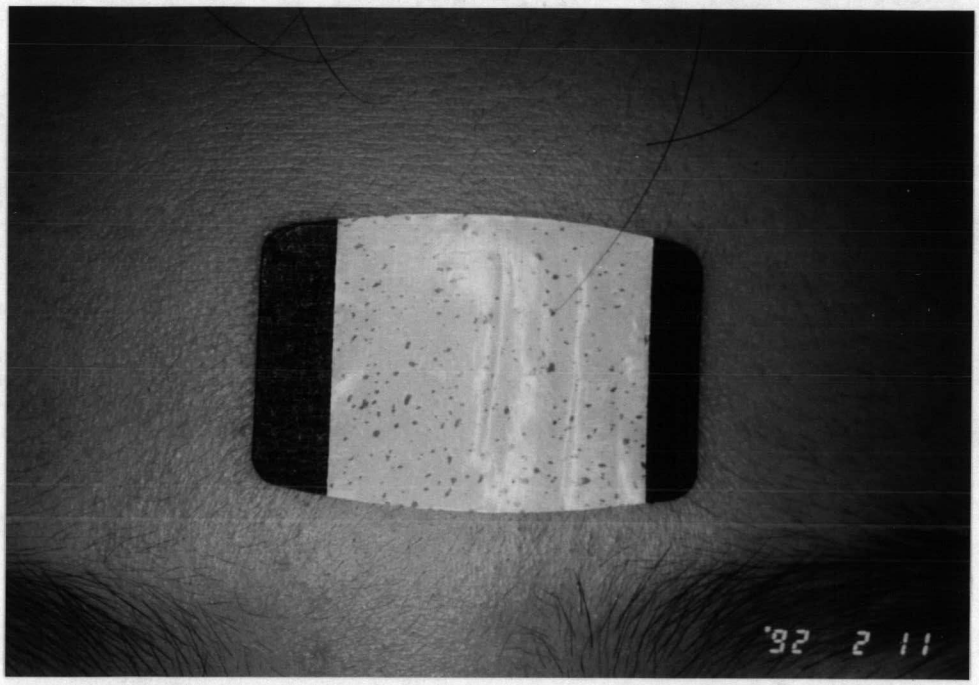
ภาพที่ 2 ตัวอย่างที่ไม่เป็นสิว

018501

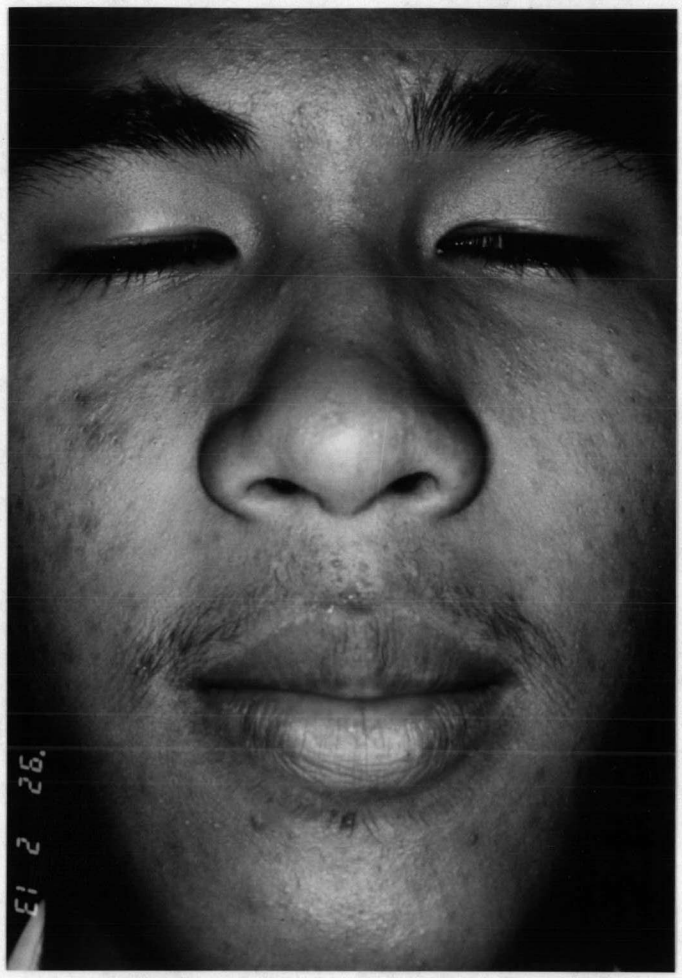
ภาพที่ 3 ตัวอย่างที่ไม่เป็นสิวเมื่อเริ่มติด Sebu-test strip ที่กลางหน้าผาก



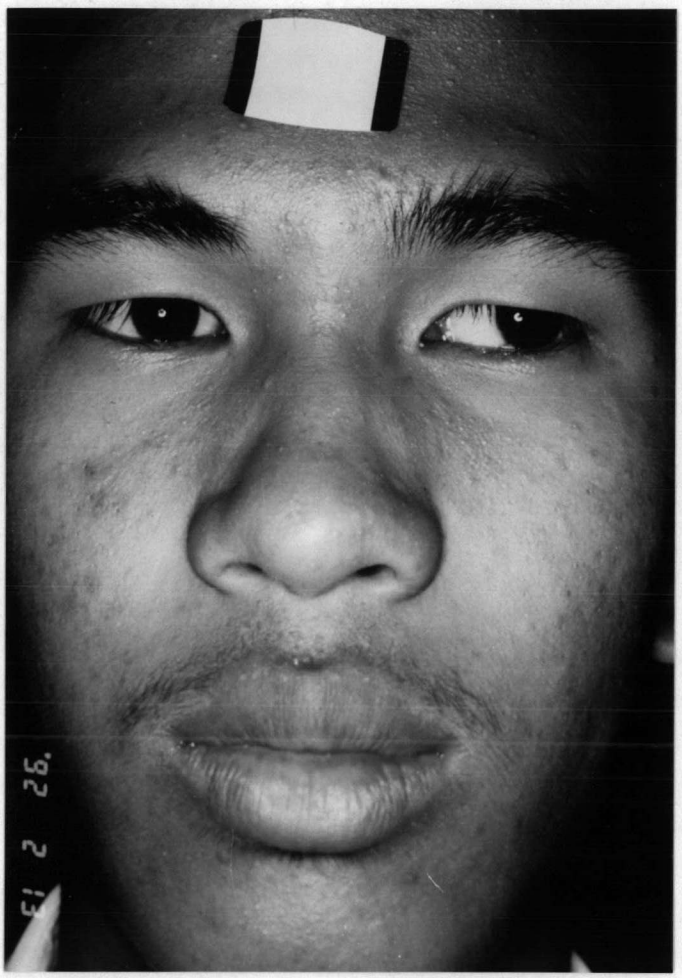
ภาพที่ 4 ตัวอย่างที่ไม่เป็นสิวหลังติด Sebu-test strip ไว้ 3 ชั่วโมง



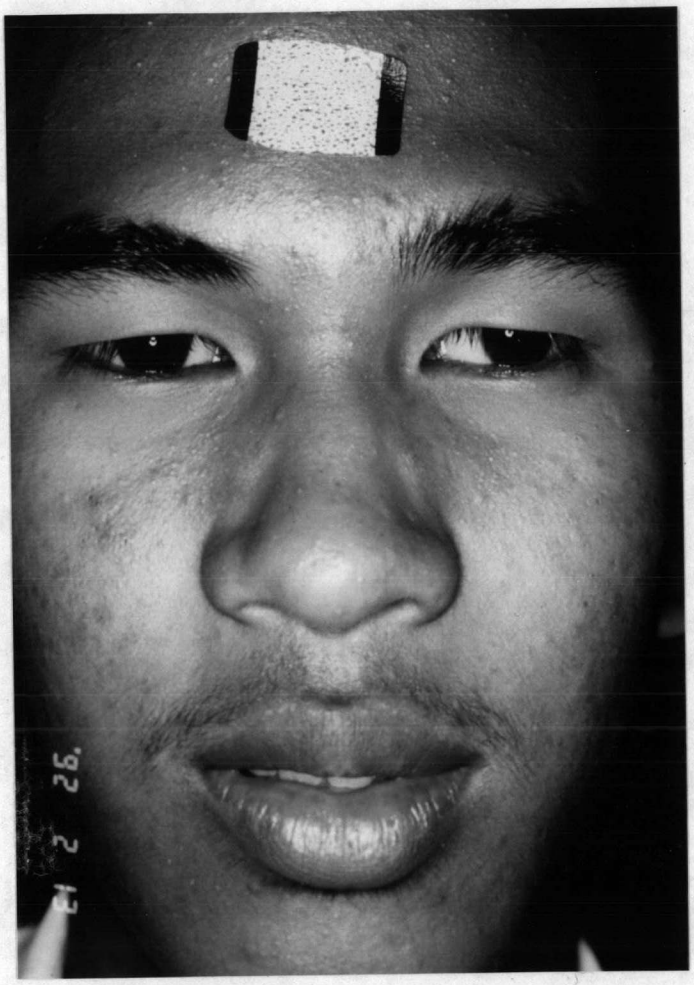
ภาพที่ 5 ภาพถ่ายระยะใกล้ชิดของ sebu-test strip ของตัวอย่างที่ไม่เป็นสิว หลังติดที่หน้าผาก 3 ชั่วโมง



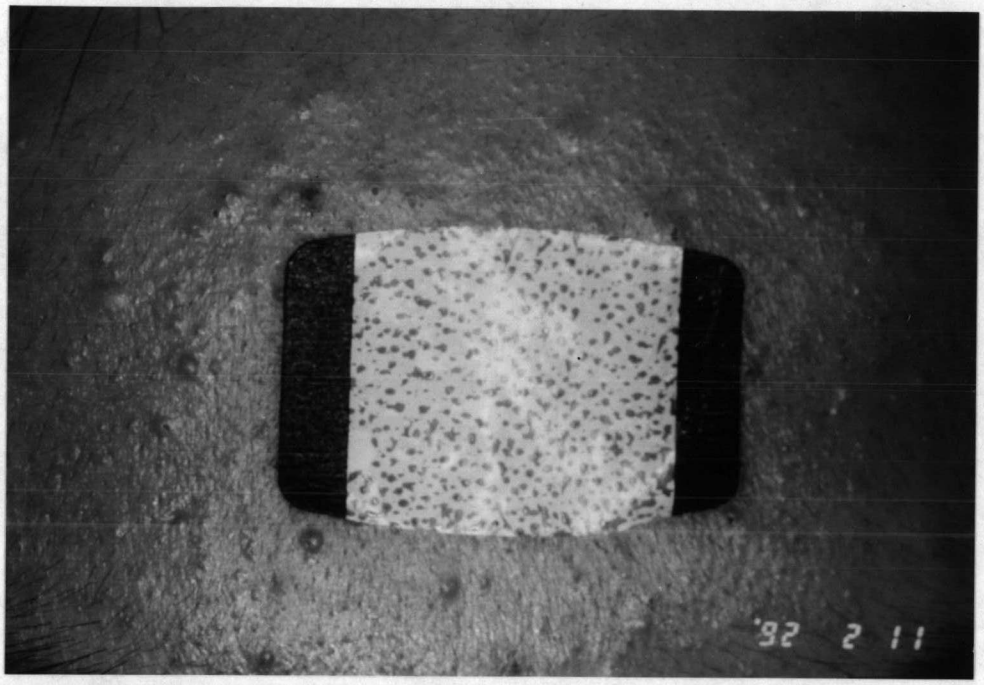
ภาพที่ 6 ตัวอย่างที่เป็นสิว



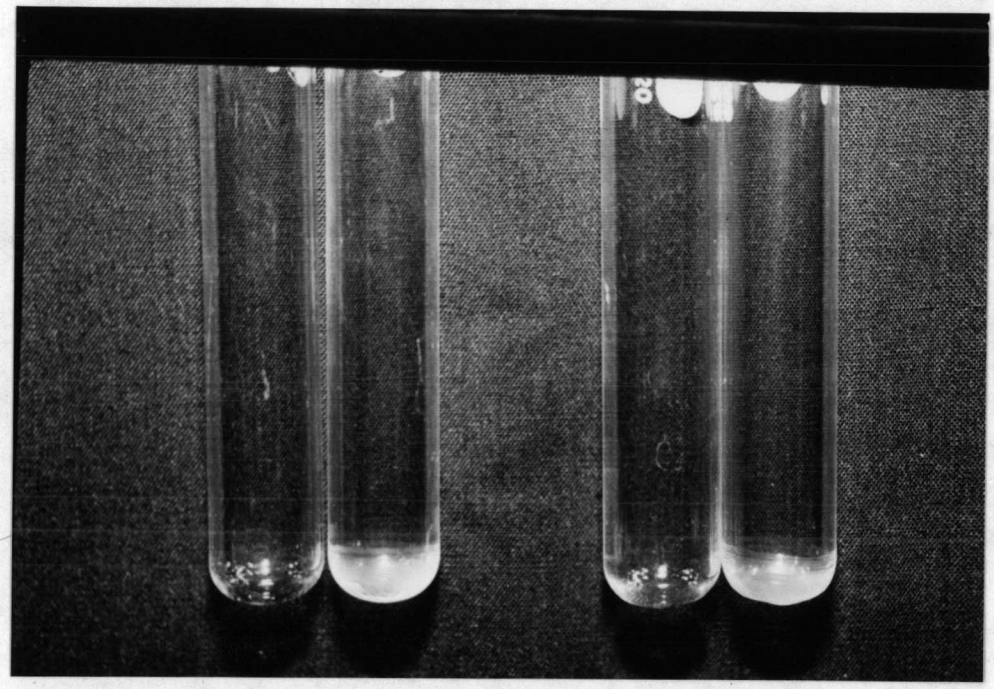
ภาพที่ 7 ตัวอย่างที่เป็นสิวเมื่อเริ่มติด Sebu-test strip ที่กลางหน้าผาก



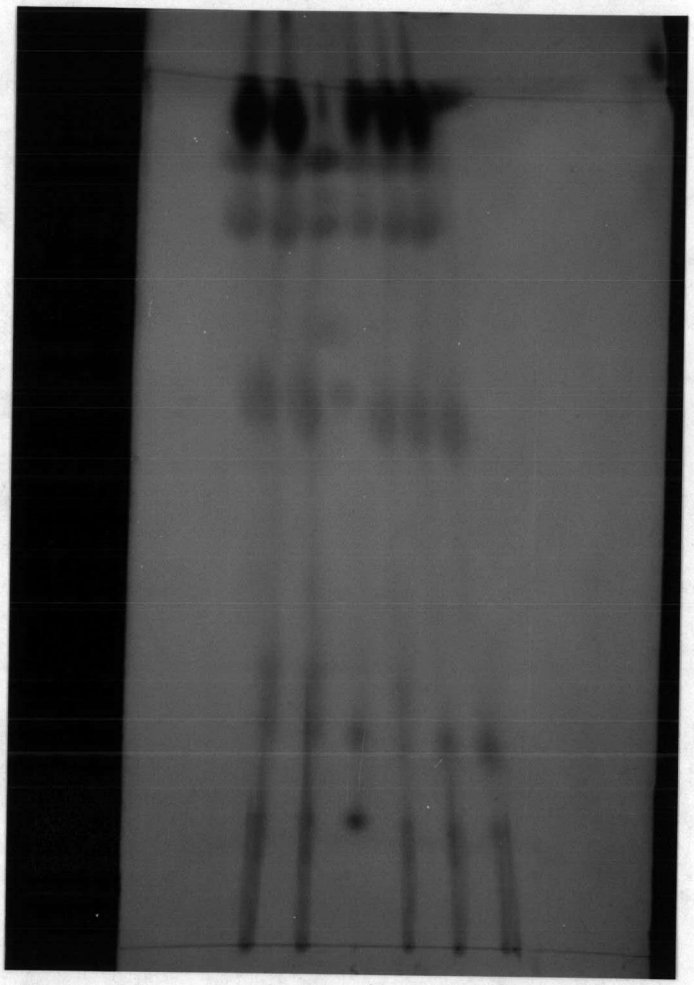
ภาพที่ 8 ตัวอย่างที่เป็นสิวหลังติด Sebu-test strip ไว้ 3 ชั่วโมง แสดงให้เห็นไขมันติดที่แผ่นเทป เมื่อเปรียบเทียบกับภาพที่ 5 จะสังเกตว่าคนที่เป็นสิวมีปริมาณไขมันมากกว่าคนที่ไม่เป็นสิว



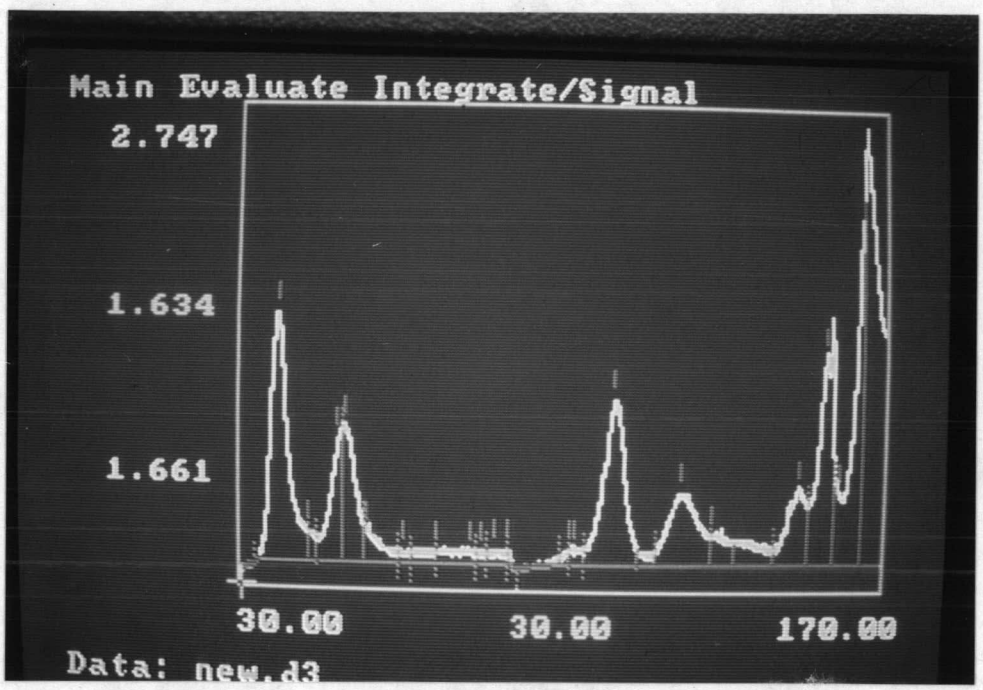
ภาพที่ 9 ภาพถ่ายระยะใกล้ชิดของ sebu-test strip ของตัวอย่างที่เป็นสิว หลังติดที่หน้าผาก 3 ชั่วโมง



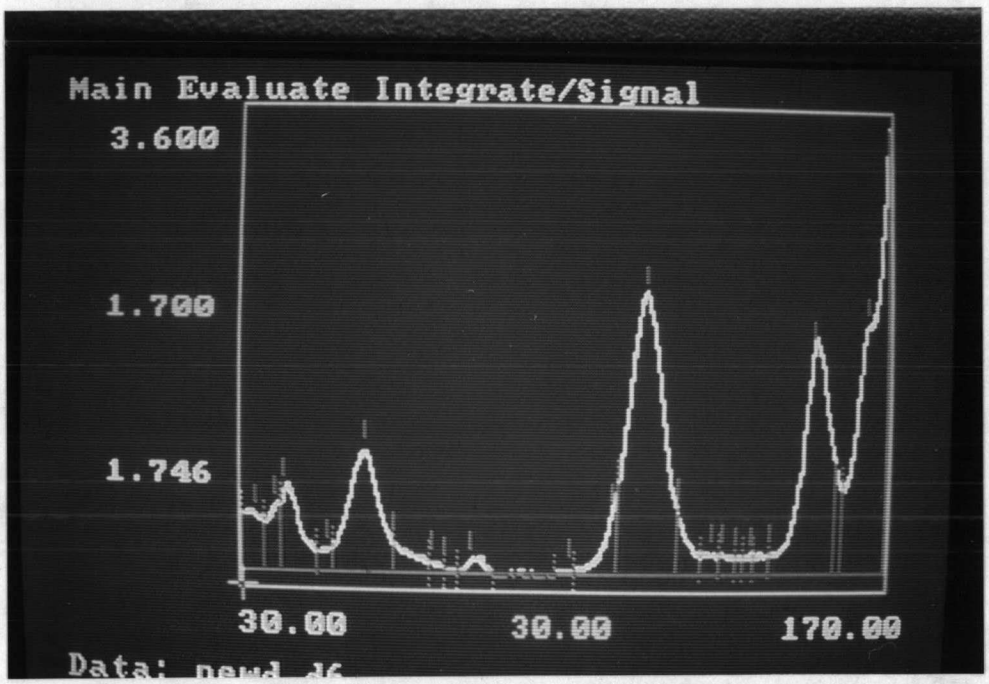
ภาพที่ 10 สารไขมันที่ได้หลังสกัด เปรียบเทียบกับหลอดทดลองเปล่า



ภาพที่ 11 สารไขมันจากตัวอย่าง 5 คน และstandard lipid บนplate ที่ได้จากการทำ Thin-layer chromatography



ภาพที่ 12 กราฟของ stardard lipid
ที่ได้จากการวัดด้วยเครื่อง Densitometer
สารมาตรฐานเรียงลำดับตามยอดกราฟจากซ้ายไปขวาคือ cholesterol, oleic acid, triolein, methyl oleate, olely palmitate, cholesterol oleate, squalene



ภาพที่ 13 กราฟของสารไขมันบนผิวหนังของตัวอย่าง
ที่ได้จากการวัดด้วยเครื่อง Densitometer
สารไขมันเรียงลำดับยอดกราฟจากซ้ายไปขวาคือ cholesterol, FFA, TG, wax & cholesterol esters, squalene