ความสามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพของฟอสฟอริเลตไคโตซานที่ใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์สำหรับเวชสำอาง

นางสาวศศิวรา คงอ่อน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ ภาควิชาวัสดุศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

BIOCOMPATIBILITY OF PHOSPHORYLATED CHITOSAN AS EMULSIFIER FOR COSMECEUTICALS

Miss Sasiwara Kongon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Applied Polymer Science and Textile Technology

Department of Material Science

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความสามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพของฟอสฟอริเลตไคโตซานที่ใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์สำหรับเวชสำอาง
โดย	นางสาวศศิวรา คงอ่อน
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันเพ็ญ เตชะบุญเกียรติ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	เภสัชกรหญิง ดร.รวิวรรณ มณีรัตนโชติ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริธันว์ เจียมศิริเลิศ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันเพ็ญ เตชะบุญเกียรติ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(เภสัชกรหญิง ดร.รวิวรรณ มณีรัตนโชติ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ อรอุษา สรวารี)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รังรอง ยกส้าน)

ศศิวรา คงอ่อน : ความสามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพของฟอสฟอริเลตไคโตซานที่ใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์สำหรับเวชสำอาง (BIOCOMPATIBILITY OF PHOSPHORYLATED CHITOSAN AS EMULSIFIER FOR COSMECEUTICALS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร.วันเพ็ญ เตชะบุญเกียรติ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ภญ.ดร.รวิวรรณ มณีรัตนโชติ 96 หน้า.

ครีมและโลชันจัดเป็นเวชสำอางชนิดหนึ่งที่มีการเติมสารออกฤทธิ์ เกิดขึ้นจากการเตรียมในรูปแบบอิมัลชัน โดยมีอิมัลซิฟายเออร์หรือสารลดแรงตึงผิว ซึ่งเป็นสารจำเป็นหลักที่ช่วยหลีกเลี่ยงการแยกเฟสระหว่างน้ำและน้ำมัน โดยในรายงานวิจัยที่ผ่านมากล่าวไว้ว่าอิมัลซิฟายเออร์หรือสารลดแรงตึงผิวบางชนิดที่ใช้สำหรับเวชสำอาง ทำให้เกิดการระคายเคืองต่อเซลล์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำโมเลกุลพอลิเมอร์ชีวฐานที่สามารถเป็นอิมัลซิฟายเออร์มาใช้แทนสารลดแรงตึงผิวในเวชสำอาง ไคโตซานถูกดัดแปรโครงสร้างทางเคมีโดยทำปฏิกิริยากับฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ เพื่อเกิดเป็นฟอสฟอริเลตไคโตซาน ซึ่งทำหน้าที่เป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่ละลายน้ำได้ ในการนำฟอสฟอริเลตไคโตซานไปใช้ในงานด้านเวชสำอางนั้น จำเป็นต้องมีการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ผิวหนังมนุษย์ ฟอสฟอสริเลตไคโตซานถูกทดสอบทั้งในรูปแบบสารละลายในน้ำ และอิมัลชันสองขนาดคือ ไมโครอิมัลชันขนาด 1-2 ไมโครเมตร และนาโนอิมัลชันขนาด 150-200 นาโนเมตร เพื่อพิจารณาถึงอิทธิพลของขนาดอิมัลชันต่อความเข้ากันได้ทางชีวภาพ จากผลการทดลองพบว่าสารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซานไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไม่ก่อให้เซลล์สร้างอนุมูลอิสระ และขนาดของอิมัลชันส่งผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ โดยอิมัลชันที่มีขนาดในระดับนาโนทำให้เซลล์มีชีวิตรอดน้อยกว่าระดับไมโคร ทั้งนี้เนื่องจากนาโนอิมัลชันมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับเซลล์มากกว่าไมโครอิมัลชัน ทำให้เพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสทั้งฟอสฟอริเลตไคโตซานซึ่งไม่เป็นพิษ และน้ำมันแร่ซึ่งเป็นพิษมากขึ้น แต่อิมัลชันทั้งสองขนาดไม่เหนี่ยวนำให้เซลล์สร้างสารอนุมูลอิสระ การเพิ่มความเข้มข้นของฟอสฟอริเลตไคโตซาน ทำให้สามารถห้อมล้อมหยดน้ำมันได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ส่งผลให้ได้นาโนอิมัลชันที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดีขึ้น

ภาควิชา วัสดุศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา 2554 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5272556023 : MAJOR APPLIED POLYMER SCIENCE AND TEXTILE TECHNOLOGY
KEYWORDS : CHITOSAN / PHOSPHATE / COSMECEUTICALS / BIOCOMPATIBILITY / EMULSIFIER / KERATINOCYTE

SASIWARA KONGON : BIOCOMPATIBILITY OF PHOSPHORYLATED CHITOSAN AS EMULSIFIER FOR COSMECEUTICALS.
ADVISOR : ASST.PROF.WANPEN TACHABOONYAKIAT ,Ph.D.,
CO-ADVISOR : RAWIWAN MANIRATANACHOTE, Ph.D., 96 pp.

Cream and lotion are cosmeceutical products containing biologically active ingredients that had been made from emulsion system. Emulsifiers or surfactants are the main required substances to help avoid thermodynamical phase separation between water and oil phases. Several researches have reported that some surfactants caused an adverse effect to cells. Therefore, in this research, bio-based polymeric molecules was used as emulsifier instead of surfactant in cosmeceuticals. Phosphorylated chitosan synthesized by the reaction of chitosan with phosphorus pentoxide, was functioned as water soluble emulsifier.In order to use phosphorylated chitosan as emulsifier in cosmeceutical, it was necessary to test for biocompatibility with human skin cells. In this study, we examined the phosphorylated chitosan in forms of emulsifier aqueous solution and emulsion. Emulsions were prepared in two different size, microemulsion (1-2 μm) and nanoemulsion(150-200 nm), in order to study the particle size effect to biocompatility. It was found that phophorylated chitosan was not harm to the cells and did not induced ROS production. The effect of emulsion size showed that nanoemulsion had greater effect to cell viability than microemulsion. Since nanoemulsion had higher contact surface area than microemulsion. Therefore, cell can contact in higher area to biocompatible phosphorylated chitosan and irritated mineral oil. But both two emulsions were not induced ROS production. When increasing concentration of phosphorylated chitosan, it enhanced encapsulation at oil droplet in a consequence of enhancing biocompatibility of nanoemulsion.

Department : Materials Science Student's Signature .....
Field of Study : Applied Polymer Science and Textile Technology Advisor's Signature .....
Academic Year : 2011 Co-advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้เป็นเพราะได้รับคำแนะนำทางด้านวิชาการ ความเอื้อเฟื้อทางสถานที่เครื่องมือ และวัตถุดิบสำหรับการทำวิทยานิพนธ์ ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณบุคคลหลายๆท่าน และหน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งมีรายนามดังต่อไปนี้

1.ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ เตชะบุญเกียรติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์

2.เภสัชกรหญิง ดร.รวิวรรณ มณีรัตนโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้คำปรึกษาในการแก้ไขปัญหา และแนะแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์

3.ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริธันว์ เจียมศิริเลิศ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำด้านวิชาการและช่วยตรวจสอบวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์

4.รองศาสตราจารย์ อรอุษา สรวารี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้คำแนะนำและช่วยตรวจสอบการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์

5.ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รังรอง ยกส้าน กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ภายนอกที่ให้คำแนะนำและช่วยตรวจสอบการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์

6.ศาสตราจารย์ ดร.สุวบุญ จิรชาญชัย ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในงานวิจัย

7.รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.พสุธา ธัญญธกิจไพศาล ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์ผิวหนังในงานวิจัยครั้งนี้

8.ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย รวมทั้งเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกระหว่างการทำงานวิจัย

9.ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย รวมทั้งนักวิจัยทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกระหว่างการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนและให้กำลังใจมาโดยตลอด รวมทั้งอาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาการ จนสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้เป็นผลสำเร็จตามมุ่งหวังอย่างสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญภาพ..... ฎ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 วารสารปริทรรศน์..... 4

2.1 ไคทินและไคโตซาน..... 4

2.1.1 การสกัดแยก..... 6

2.1.1.1 การเตรียมวัตถุดิบ..... 8

2.1.1.2 การขจัดแร่ธาตุที่ปนอยู่..... 8

2.1.1.3 การละลายโปรตีนออกด้วยเบสเจือจาง..... 8

2.1.1.4 การกำจัดสีและไขมัน..... 8

2.1.1.5 การกำจัดหมู่แอซีทิล..... 9

2.1.2 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไคทินและไคโทซาน..... 9

2.1.2.1 ความสามารถในการละลาย..... 9

2.1.2.2 น้ำหนักโมเลกุล..... 9

2.1.2.3 ระดับการกำจัดหมู่แอซีทิล..... 10

2.1.2.4 ความหนืด..... 10

2.1.2.5 ความสามารถในการสร้างและตกตะกอน..... 10

2.1.2.6 การจัดเรียงตัวในระดับโมเลกุล..... 11

2.1.2.7 การเสื่อมสลาย..... 11

2.1.3 ประโยชน์ของไคทินและไคโตซาน..... 12

2.2 ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับอิมัลชัน..... 14

บทที่ หน้า

2.2.1 ส่วนประกอบของอิมัลชัน..... 15
2.2.2 กลไกการเกิดอิมัลชัน..... 15
2.2.3 ชนิดของอิมัลชัน..... 16
2.2.4 อิมัลซิฟายเออร์และสารลดแรงตึงผิว..... 18
2.2.4.1 ประเภทของอิมัลซิฟายเออร์หรือสารลดแรงตึงผิว..... 19
2.2.4.2 หลักการทำงานของอิมัลซิฟายเออร์..... 19
2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์..... 20
2.3.1 ชนิดของการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์..... 21
2.3.1.1 การเพาะเลี้ยงเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิและแหล่งเซลล์..... 21
2.3.1.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์หรือเซลล์ไลน์และแหล่งเซลล์.... 22
2.3.2 ชนิดของเซลล์ที่พบในการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์..... 23
2.3.3 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์..... 23
2.3.4 อาหารเลี้ยงเซลล์..... 25
2.3.4.1 อาหารพื้นฐาน..... 25
2.3.4.2 ซีรัม..... 25
2.3.5 การรักษาเซลล์เพาะเลี้ยง..... 26
2.3.6 ปัจจัยที่ควรพิจารณาเมื่อเปลี่ยนอาหารในเซลล์เพาะเลี้ยง..... 28
2.3.6.1 pH ของสารละลายอาหาร..... 28
2.3.6.2 สารยับยั้งการเจริญ..... 28
2.3.6.3 สารจำเป็นต่อการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยง..... 28
2.3.6.4 ลักษณะรูปร่างของเซลล์..... 28
2.3.7 การถ่ายเลี้ยงเซลล์ไปสู่ภาชนะเลี้ยงใหม่..... 29
2.4 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์..... 30
2.4.1 ความเป็นพิษต่อเซลล์..... 30
2.4.2 ประโยชน์และข้อจำกัด..... 32
2.4.3 วิธีวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์..... 33
2.4.3.1 Short –Term Assay..... 34
2.4.3.2 Long-Term Assay..... 35

บทที่ หน้า

2.4.4 ข้อควรพิจารณาเกี่ยวกับวิธีวิเคราะห์..... 38
2.5 การเกิดสารอนุมูลอิสระ..... 41
2.5.1 สารอนุมูลอิสระ (Intracellular ROS production)..... 41
2.5.2 แหล่งที่มา..... 41
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 42
3 วิธีดำเนินงานวิจัย..... 45
3.1 วัตถุดิบและสารเคมี..... 45
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง..... 45
3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์..... 46
3.4 ขอบเขตการทดลอง..... 47
3.5 วิธีการทดลอง..... 48
3.5.1 การสังเคราะห์ฟอสฟอริเลตไคโตซาน..... 48
3.5.2 การวิเคราะห์และตรวจสอบสมบัติของฟอสฟอริเลตไคโตซาน..... 49
3.5.2.1 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-IR)..... 49
3.5.2.2 การวิเคราะห์ธาตุเชิงปริมาณในโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ชนิดแจกแจงพลังงานรังสี เอกซ์ (Energy Dispersive X-ray Spectrometer, EDX)..... 49
3.5.2.3 การตรวจสอบสมบัติการละลาย..... 50
3.5.3 การเตรียมอิมัลชันของฟอสฟอริเลตไคซาน..... 50
3.5.4 การวัดขนาดอนุภาคของอิมัลชัน..... 52
3.5.5 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเคราติโนไซต์..... 52
3.5.6 การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ..... 53
3.5.6.1 สารตัวอย่าง..... 53
3.5.6.2 การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์..... 54
3.5.6.3 การทดสอบการสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์..... 55
4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง..... 57
4.1 การสังเคราะห์ฟอสฟอริเลตไคโตซาน..... 57

บทที่ หน้า

4.2 การวิเคราะห์และตรวจสอบสมบัติของฟอสฟอริเลตไคโตซาน..... 58
4.2.1 โครงสร้างทางเคมีของฟอสฟอริเลตไคโตซาน..... 58
4.2.2 การหาระดับการแทนที่ของฟอสฟอริเลตไคโตซาน..... 61
4.2.3 การทดสอบความสามารถในการละลาย..... 61
4.3 อิมัลชันของฟอสฟอริเลตไคซาน..... 61
4.4 การตรวจสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility Test)..... 66
4.4.1 การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ (Viability Test)..... 66
4.4.2 การทดสอบการสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Intracellular ROS production : DCF assay)..... 74
5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ..... 79
5.1 สรุปผลการทดลอง..... 79
5.1.1 การสังเคราะห์ฟอสฟอริเลตไคโตซาน การวิเคราะห์และตรวจสอบสมบัติของฟอสฟอริเลตไคโตซาน..... 79
5.1.2 การเตรียมอิมัลชัน..... 79
5.1.3 การตรวจสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ..... 80
5.1.3.1 การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ (Viability Test)..... 80
5.1.3.2 การทดสอบการสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Intracellular ROS production : DCF assay)..... 81
5.2 ข้อเสนอแนะ..... 81
รายการอ้างอิง..... 82
ภาคผนวก..... 86
ภาคผนวก ก..... 87
ภาคผนวก ข..... 90
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 96

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 การใช้ประโยชน์จากไคโทซาน..... 13
ตารางที่ 2.2 ข้อดี-ข้อเสียของการ subculture..... 29
ตารางที่ 4.1 ตำแหน่งพีคที่สำคัญต่างๆ ที่พบในสเปกตัมของโซเดียมฟอสฟอริเลตไคโตซาน..... 60
ตารางที่ 4.2 ความคงตัวและขนาดอนุภาคของการเตรียมอิมัลชันขนาดไมโครด้วยวิธีต่างๆ..... 63

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่	2.1 โครงสร้างโมเลกุลของไคทิน.....	5
ภาพที่	2.2 โครงสร้างโมเลกุลของไคโตซาน.....	5
ภาพที่	2.3 ขั้นตอนกระบวนการเตรียมไคทินและไคโทซาน.....	7
ภาพที่	2.4 การเกิดอิมัลชัน.....	16
ภาพที่	2.5 อิมัลชันประเภทต่างๆ.....	17
ภาพที่	2.6 การเกิดไมเซลล์ของอิมัลซิฟายเออร์.....	19
ภาพที่	2.7 เซลล์ที่มีการเจริญแบบเกาะผิวและเซลล์ที่มีการเจริญแบบแขวนลอย.....	22
ภาพที่	3.1 แผนผังขอบเขตการทดลอง.....	47
ภาพที่	3.2 เครื่อง FT-IR Spectrometer ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Spectrum One.....	49
ภาพที่	3.3 เครื่อง SEM ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5800.....	50
ภาพที่	4.1 ฟอสฟอริเลตไคโตซาน.....	58
ภาพที่	4.2 โครงสร้างของฟอสฟอริเลตไคโตซาน.....	58
ภาพที่	4.3 FT-IR สเปกตรัมของโซเดียมฟอสฟอริเลตไคโตซาน โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลของฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ต่อหนึ่งหน่วยซ้ำของไคโตซานเท่ากับ 2.....	59
ภาพที่	4.4 อิมัลชันที่คงสภาพ.....	65
ภาพที่	4.5 เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทดสอบด้วยสารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซานและโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	67
ภาพที่	4.6 เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทดสอบด้วยน้ำมันที่ปริมาตรต่างๆ.....	69
ภาพที่	4.7 เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทดสอบด้วยไมโครอิมัลชัน และ นาโนอิมัลชันที่ปริมาตรต่างๆ.....	71
ภาพที่	4.8 เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทดสอบด้วยนาโนอิมัลชันโดยใช้ฟอสฟอริเลตไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 1 และร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก เป็นอิมัลซิฟายเออร์ทดสอบที่ปริมาตรอิมัลชันต่างๆ เทียบกับน้ำมันแร่ที่กระจายตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาดอนุภาค 170 นาโนเมตร.....	73
ภาพที่	4.9 การสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์เมื่อทดสอบกับสารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซานและโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	75

ภาพที่ 4.10 การสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์เมื่อทดสอบกับน้ำมันแร่ ไมโครอิมัลชัน นาโนอิมัลชันที่ความเข้มข้นของฟอสฟอริเลตไคโตซานร้อยละ 1และร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ที่ปริมาตรสารตัวอย่างต่างๆ..... 77

บทที่1

บทนำ

1.1 ปัญหาและที่มาของงานวิจัย

เวชสำอาง เป็นการรวมกันของคำว่า เครื่องสำอางและยา จึงหมายถึงผลิตภัณฑ์ที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ช่วยปรับปรุงและฟื้นฟูสภาพผิวหนัง รวมทั้งครีมและโลชันที่มีการเติมสารออกฤทธิ์จัดว่าเป็นเวชสำอางชนิดหนึ่งที่เกิดขึ้นจากการเตรียมในรูปแบบอิมัลชัน โดยมีอิมัลซิฟายเออร์หรือสารลดแรงตึงผิว ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ เป็นสารที่จำเป็นหลักที่ช่วยหลีกเลี่ยงการแยกเฟสระหว่างน้ำและน้ำมัน แต่อย่างไรก็ตาม รายงานวิจัยที่ผ่านมากล่าวไว้ว่า อิมัลซิฟายเออร์หรือสารลดแรงตึงผิวบางชนิดที่ใช้สำหรับเวชสำอาง ได้แก่ เบนซีโทเนียม คลอไรด์ (benzethonium chloride) โซเดียม ลอริลซัลเฟต (sodium lauryl sulphate) ทำให้เกิดการระคายเคืองกับเซลล์ [1] ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีแนวความคิดในการนำโมเลกุลพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างทั้งส่วนไม่ชอบน้ำและชอบน้ำ ซึ่งสามารถพิจารณาเป็นอิมัลซิฟายเออร์แทนการใช้สารลดแรงตึงผิวในเวชสำอาง นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยสนับสนุนว่าโปรตีน [2] พอลิแซคคาไรด์ [3] โปรตีนคอนจูเกตพอลิแซคคาไรด์ [4] ซึ่งเป็นโมเลกุลพอลิเมอร์สามารถทำหน้าที่เป็นอิมัลซิฟายเออร์สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารเป็นจำนวนมาก แต่ยังไม่พบรายงานที่มีการใช้พอลิเมอร์แทนสารลดแรงตึงผิวสำหรับผลิตภัณฑ์เวชสำอาง พอลิเมอร์ที่น่าสนใจ ได้แก่ ไคโตซาน ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่มีความสามารถเข้ากันได้ดีทางชีวภาพ มีความสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และที่สำคัญ ไม่เป็นพิษ อีกทั้งยังมีรายงานกล่าวไว้ว่าไคโตซานสามารถทำหน้าที่เป็นอิมัลซิฟายเออร์ [3,5] และ สเตบิไลเซอร์ (stabilizer) หรือสารคงเสถียรภาพได้ [6,7] แต่อย่างไรก็ตาม ไคโตซานไม่สามารถละลายได้ในน้ำ แต่สามารถละลายได้ในกรด จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในงานด้านเวชสำอาง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจอนุพันธ์ของไคโตซานซึ่งสามารถละลายน้ำได้ โดยการดัดแปรโครงสร้างทางเคมีของไคโตซานด้วยหมู่ฟอสเฟต ได้เป็นฟอสฟอริเลตไคโตซาน เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างพบว่าฟอสฟอริเลตไคโตซาน มีส่วนวงน้ำตาลที่ไม่ชอบน้ำและส่วนของหมู่ฟังก์ชันได้แก่ หมู่ไฮดรอกซิล อะมิโน และฟอสเฟต เป็นหมู่ที่ชอบน้ำ เมื่อนำมาตรวจสอบพบว่าฟอสฟอริเลตไคโตซานสามารถ

กระทำอิมัลชันระหว่างน้ำและน้ำมันได้ [8] อีกทั้งฟอสฟอริเลตไคโตซานยังประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตเหมือนกับเยื่อหุ้มเซลล์อีกด้วย จึงมีแนวความคิดที่จะนำฟอสฟอริเลตไคโตซาน ไปใช้เป็นสารอิมัลซิฟายเออร์ในเวชสำอาง แทนการใช้สารลดแรงตึงผิวซึ่งอาจก่อให้เกิดการระคายเคืองของผิวหนังดังกล่าวข้างต้น ซึ่งการที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในงานเวชสำอางต่อไปนั้น จำเป็นต้องตรวจสอบสภาพเข้ากันได้ทางชีวภาพของอิมัลซิฟายเออร์ใหม่ๆ ก่อนกับเซลล์ผิวหนังมนุษย์

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ดัดแปรโครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน โดยทำปฏิกิริยากับฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ เพื่อให้เกิดเป็นฟอสฟอริเลตไคโตซาน ซึ่งมีความสามารถกระทำอิมัลชันระหว่างน้ำและน้ำมันได้ [8] ก่อนที่จะนำฟอสฟอริเลตไคโตซานไปใช้ในงานด้านเวชสำอางนั้น จำเป็นต้องมีการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ผิวหนัง ซึ่งจะพิจารณาความเข้ากันได้กับเซลล์ของฟอสฟอสริเลตไคโตซานทั้งในรูปแบบสารละลายในน้ำ และอิมัลชัน นอกจากนี้เพื่อพิจารณาถึงอิทธิพลของขนาดอิมัลชันต่อความเข้ากันได้กับเซลล์ ที่เหมาะสำหรับการใช้ในงานด้านเวชสำอาง ในงานวิจัยนี้ได้นำฟอสฟอริเลตไคโตซานมาใช้ในการเตรียมอิมัลชันระหว่างน้ำและน้ำมันแร่ โดยใช้วิธีการเตรียมที่แตกต่างกัน เพื่อให้ได้ขนาดของอนุภาคอิมัลชันที่แตกต่างกัน คือ ไมโครอิมัลชัน และนาโนอิมัลชัน ความเข้ากันได้ทางชีวภาพจะทดสอบถึงการมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อได้รับสารตัวอย่าง รวมถึงการสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ซึ่งคาดว่าฟอสฟอริเลตไคโตซานที่สังเคราะห์ได้นั้น จะสามารถนำมาใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์แทนสารลดแรงตึงผิว เพื่อเตรียมอิมัลชันที่สามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ผิวหนังได้ดี

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของฟอสฟอริเลตไคโตซานในรูปแบบของสารละลายในน้ำและอิมัลชัน โดยการทดสอบกับเซลล์ผิวหนังของมนุษย์

2. ศึกษาอิทธิพลของขนาดอนุภาคอิมัลชันต่อความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ผิวหนัง

3. ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของฟอสฟอริเลตไคโตซานต่อความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ผิวหนัง

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ฟอสฟอริเลตไคโตซานที่ทำหน้าที่เป็นอิมัลซิฟายเออร์ชนิดใหม่ที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพเหมาะสำหรับงานด้านเวชสำอาง

2. ได้อิมัลชันที่หลีกเลี่ยงการใช้สารลดแรงตึงผิวที่เป็นพิษต่อเซลล์ กล่าวคือ ได้อิมัลชันที่ไม่ก่อให้เกิดอาการระคายเคืองกับเซลล์ผิวหนังของมนุษย์

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้นำเสนออิมัลซิฟายเออร์ชนิดใหม่ที่สามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ เริ่มต้นจากการเตรียมฟอสฟอริเลตไคโตซาน โดยการดัดแปรโครงสร้างทางเคมีของไคโตซานด้วยหมู่ฟอสเฟต ซึ่งได้อนุพันธ์ที่สามารถละลายน้ำได้ดี ฟอสฟอริเลตไคโตซานมีสมบัติเป็นอิมัลซิฟายเออร์เนื่องจากมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ อีกทั้งช่วยให้เกิดความเสถียรภาพระหว่างน้ำและน้ำมัน เพื่อนำฟอสฟอริเลตไคโตซานมาใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์แทนสารลดแรงตึงผิวในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง จึงจำเป็นต้องทดสอบความสามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ผิวหนังมนุษย์ ซึ่งจะพิจารณาทั้งในรูปแบบของสารละลายในน้ำและอิมัลชัน รวมทั้งศึกษาอิทธิพลของขนาดอนุภาคอิมัลชันต่อความสามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์มนุษย์ โดยเตรียมอิมัลชันที่มีขนาดแตกต่างกันคือไมโครอิมัลชัน และนาโนอิมัลชัน ความเข้ากันได้ทางชีวภาพจะทดสอบถึงการมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อได้รับสารตัวอย่าง รวมถึงการสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์

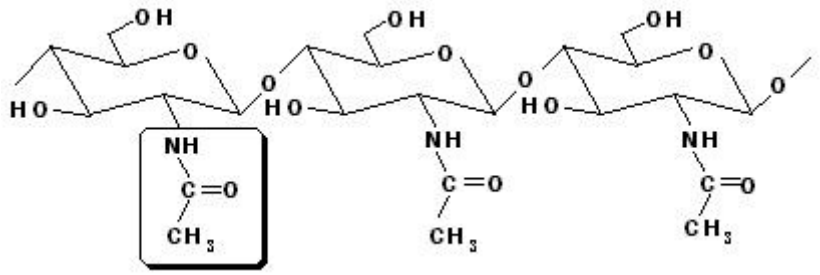
บทที่ 2

วารสารปริทรรศน์

2.1 ไคทินและไคโตซาน

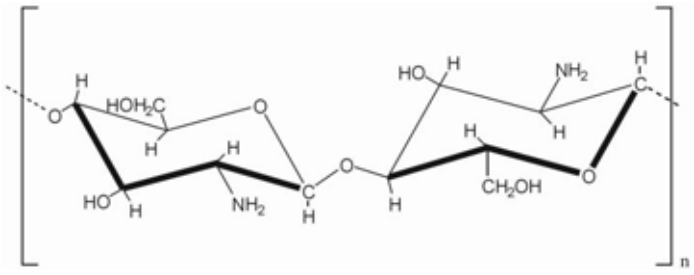
ไคทินและไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติในกลุ่มของคาร์โบไฮเดรตพอลิเมอร์ที่มีมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส [9] ไคทินและไคโตซานมีโครงสร้างคล้ายกับเซลลูโลส ต่างกันเพียงแค่หมู่ฟังก์ชันที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง ซึ่งของเซลลูโลสเป็นหมู่ไฮดรอกซิล ส่วนไคทินเป็นหมู่อะเซทามิโด และไคโตซานเป็นหมู่เอมีน ทำให้มีสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่แตกต่างจากเซลลูโลส

ไคทิน (chitin) เป็นสารประเภทพอลิแซกคาไรด์ ซึ่งมีสมบัติเป็นไบโอพอลิเมอร์ พบได้ในเปลือกของสัตว์ เช่น กุ้ง ปู แกนของปลาหมึก แมงกะพรุน ดาวทะเล แมลง ตัวไหม หอยมุก เปลือกหุ้มของแพลงตอน และผนังเซลล์ของพวกเห็ด รา ยีสต์ รวมทั้งจุลินทรีย์อีกหลายชนิด ไคทินเป็นพอลิเมอร์ที่เป็นเส้นตรง มีสูตรโครงสร้างคล้ายๆ กับเซลลูโลส แตกต่างกันตรงที่การแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซิล ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 โดยมีการแทนที่ด้วยหมู่อะเซทามิโด ($-NHC=OCH_3$) [9] จึงมีชื่อทางเคมีว่า Poly[ß-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose] หรือ Poly N-acetyl-D-glucosamine ไคทินมีสูตรทั่วไป คือ $(C_8H_{13}NO_5)_n$ ซึ่งประกอบด้วยคาร์บอนร้อยละ 47.29 โดยน้ำหนัก ไนโตรเจนร้อยละ 6.89 โดยน้ำหนัก และไฮโดรเจนร้อยละ 6.45 โดยน้ำหนัก เมื่อพิจารณาสูตรโครงสร้างของไคทินพบว่า ไคทินเป็นสารโมเลกุลยาวไร้ประจุ ดังแสดงในภาพที่ 2.1 จึงทำให้ไคทินไม่ละลายในตัวทำละลายทั่วๆไป การใช้ประโยชน์จากไคทินจึงมีข้อจำกัดค่อนข้างมาก จึงได้มีการดัดแปรไคทินเพื่อเพิ่มประโยชน์ในการใช้งานให้มากขึ้น โดยเตรียมเป็นไคโตซาน



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลของไคทิน [9]

ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ของไคทิน ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติ สามารถเตรียมได้จากขบวนการแอลคาไลน์ไฮโดรไลซิสของไคทิน หรืออาจเรียกว่ากระบวนการดีอะเซทิเลชัน เนื่องจากหลังจากที่ไคทินถูกไฮโดรไลซิสแล้ว หมู่อะเซทามิโด ($-NHC=OCH_3$) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 บางส่วนจะถูกเปลี่ยนเป็นหมู่เอมีน ($-NH_2$) ดังแสดงในภาพที่ 2.2 ไคโตซานจึงมีชื่อทางเคมีว่า Poly[β -(1-4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose] หรือ Poly D-glucosamine ไคโตซานมีสูตรทั่วไปคือ $(C_8H_{11}NO_4)_n$ โดยทั่วไปถ้าหมู่แอซีทิลถูกตัดหรือหลุดออกไปประมาณร้อยละ 90-100 จะเรียกว่า Fully deacetylated chitosan ในทางทฤษฎีไคทินจะประกอบด้วยไนโตรเจนร้อยละ 6.89 โดยน้ำหนัก และไคโตซานมีไนโตรเจนประมาณร้อยละ 8.70 โดยน้ำหนัก แต่ทางปฏิบัตินั้นไม่สามารถที่จะแยกหมู่แอซีทิลออกได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นปริมาณไนโตรเจนจะไม่แน่นอน โดยอยู่ในช่วงร้อยละ 6.89-8.70 ซึ่งเมื่อพิจารณาสูตรโครงสร้างพบว่าไคโตซานสามารถแตกตัวเป็นประจุบวกบนหมู่อะมิโนได้ จึงถือได้ว่าไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่เป็นประจุบวก (Cationic polymer)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของไคโตซาน [10]

ไคทินและไคโตซานในธรรมชาติจะอยู่ในรูปของโคพอลิเมอร์ ที่มีการกระจายตัวอย่างอิสระ (random copolymer) ถ้ากระบวนการอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส มีสภาวะที่รุนแรงเกินไปจะสามารถทำลาย β-1,4-linkage ได้ ทำให้น้ำหนักโมเลกุลเล็กลง เพราะฉะนั้นไม่สามารถเตรียมไคโตซานโฮโมพอลิเมอร์ ได้จากการกระบวนการอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิสของไคทินได้

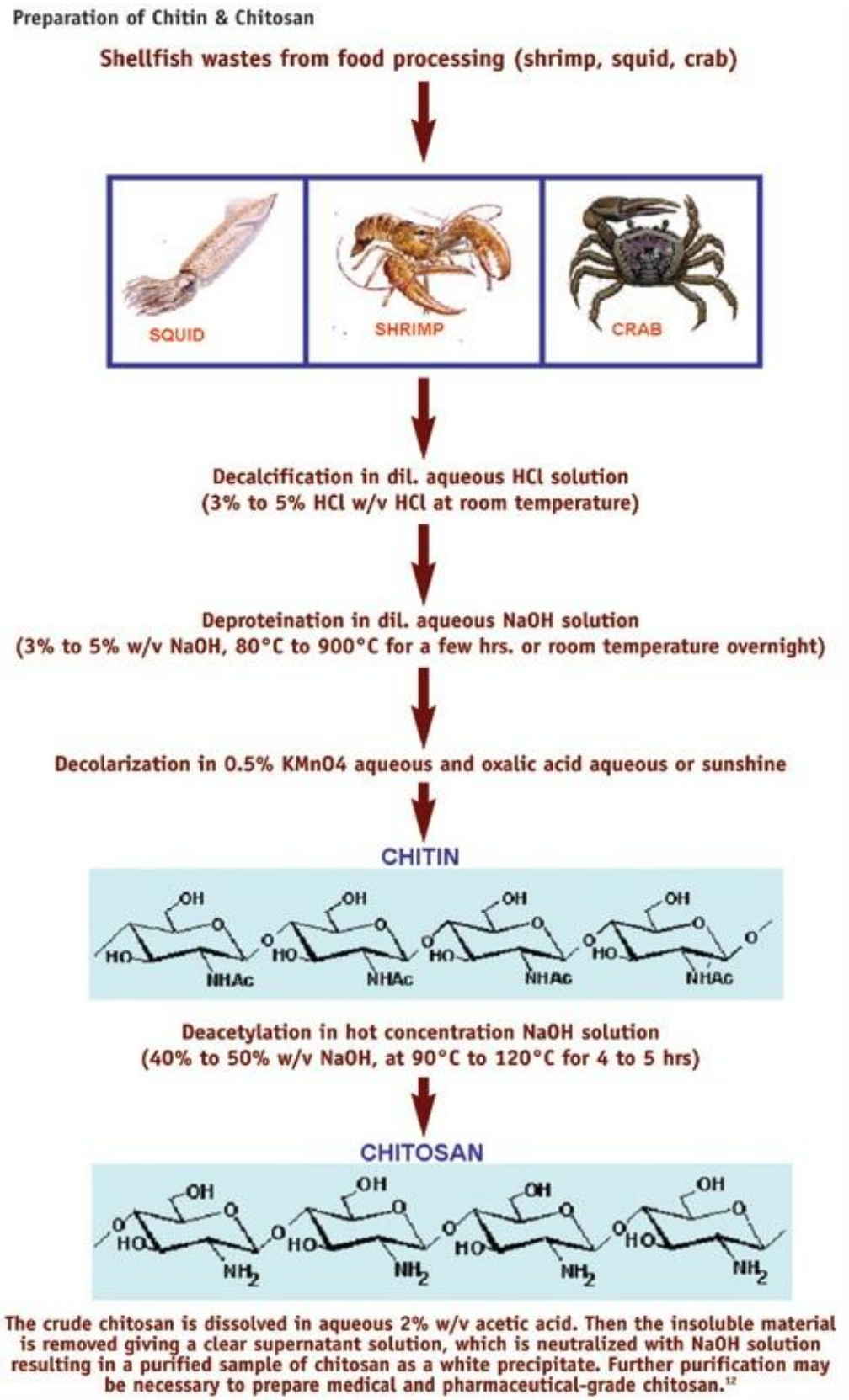
ไคทินและไคโตซานมีโครงสร้าง 3 รูปแบบ คือ α-, β-, γ- ขึ้นอยู่กับการจัดเรียงตัวในโครงสร้างของผลึก ไคทินที่สกัดได้จากโครงสร้างของกุ้งและปู จะมีโครงสร้างเป็น α- ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เหมาะสำหรับนำมาดัดแปรโครงสร้างทางเคมีได้ง่ายกว่าโครงสร้างแบบอื่นๆ

2.1.1 **การสกัดแยก** (Isolation)

ไคทินและไคโตซานสามารถสกัดได้จากเปลือกกุ้งและเปลือกปูที่เหลือทิ้ง ซึ่งไคทินจะอยู่ในรูปของเส้นใยแทรกตัวอยู่ในเมทริกซ์ของโปรตีน และปะปนอยู่ร่วมกับแร่ธาตุบางชนิด เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต นอกจากนี้จะมีพวกสีและไขมันต่างๆ ซึ่งโปรตีนนั้นสามารถกำจัดออกได้โดยการต้มกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ส่วนแคลเซียมคาร์บอเนตสามารถกำจัดออกได้โดยการต้มกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกหรือกรดไนตริก ส่วนรงควัตถุพวกสีต่างๆสามารถแยกออกได้โดยการใช้สารฟอกสี ดังนั้นการสกัดไคทินออกจากเปลือกกุ้งหรือปูจะมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

กระบวนการเตรียมไคทิน [11] แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนที่สำคัญ คือ ขั้นตอนการขจัดแร่ธาตุที่ปนอยู่ออก (Demineralization) ขั้นตอนการละลายโปรตีนออกด้วยเบสเจือจาง (Deproteinization) และขั้นตอนการกำจัดไขมันและเม็ดสี (Elimination of liquid and pigments)

กระบวนการเตรียมไคโตซาน จะเพิ่มอีก 1 กระบวนการหลังจากที่สกัดเอาไคทินออกมาแล้วคือ ขั้นตอนการกำจัดหมู่แอซีทิลของไคทิน (Deacetylation) ด้วยเบสเข้มข้นพร้อมกับให้ความร้อน ดังแสดงในภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 ขั้นตอนกระบวนการเตรียมไคทินและไคโตซาน [11]

2.1.1.1 **การเตรียมวัตถุดิบ**

การเตรียมวัตถุดิบเริ่มจากการนำวัตถุดิบ ได้แก่ เปลือกกุ้ง เปลือกปู และแกนปลาหมึก มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง ในกรณีที่ต้องสะสมวัตถุดิบเป็นระยะเวลานาน ควรจะล้างวัตถุดิบให้สะอาดแล้วนำไปต้มและล้างด้วย Antioxidant solution หลังจากนั้นอาจจะลดขนาดของวัตถุดิบลง เช่น นำไปบดละเอียด

2.1.1.2 **การขจัดแร่ธาตุที่ปนอยู่**

ขั้นตอนการขจัดแร่ธาตุที่ปนอยู่ออก มักนิยมใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอกริกเจือจางเป็นตัวทำละลายแร่ธาตุ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเกลือแคลเซียมคาร์บอเนต แต่ในระดับอุตสาหกรรมมักนิยมใช้กรดซัลฟิวรัสในการขจัดแร่ธาตุ ซึ่งมีข้อดีตรงที่ ช่วยลดปฏิกิริยาการสูญเสียสภาพของไคทิน เนื่องจากกรดซัลฟิวรัสเป็นกรดอ่อน อีกทั้งยังสามารถนำกรดนั้นกลับมาใช้ใหม่ได้อีก ตลอดจนได้ผลิตผลพลอยได้ เช่น แคลเซียมซัลไฟต์ แคลเซียมซัลเฟต และแคลเซียมออกไซด์ ซึ่งสามารถนำไปขายได้เพื่อสร้างรายได้อีกทางหนึ่งด้วย

2.1.1.3 **การละลายโปรตีนออกด้วยเบสเจือจาง**

ขั้นตอนการละลายโปรตีนออกด้วยเบสเจือจาง ส่วนมากนิยมใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง นอกจากนี้มีการลดขนาดของวัตถุดิบ เพื่อช่วยลดเวลาของการละลายโปรตีนอีกด้วย นอกจากการใช้สารละลายด่างในการกำจัดโปรตีนแล้ว อาจจะใช้เอนไซม์ในการกำจัดโปรตีนก็ได้ ซึ่งจะทำให้ความหนืดของสารละลายไคทินลดลงอีกด้วย

2.1.1.4 **การกำจัดสีและไขมัน**

ขั้นตอนการกำจัดสีและไขมัน โดยมากนิยมใช้ตัวทำละลายต่างๆที่มีความสามารถในการละลายรงควัตถุต่างๆ เช่น แอลกอฮอล์ แอซีโตน และอีเทอร์ หรือสารละลายเพอร์แมงกาเนต ซึ่งขั้นตอนนี้อาจทำในระหว่างขั้นตอนการขจัดแร่ธาตุที่ปนอยู่และขั้นตอนการละลายโปรตีน หรือภายหลังจากการขจัดแร่ธาตุและละลายโปรตีนแล้วก็ได้ ซึ่งขั้นตอนนี้ไม่จำเป็นต้องทำก็ได้

2.1.1.5 **การกำจัดหมู่แอซีทิล**

ขั้นตอนการกำจัดหมู่แอซีทิล นิยมใช้สารละลายเบสเข้มข้นพร้อมทั้งให้ความร้อน โดยสารละลายที่นิยมใช้ คือสารละลายโซเดียมไฮดรอกซ์ไซด์เข้มข้น เนื่องจากมีราคาถูกกว่าสารละลายชนิดอื่น

2.1.2 **สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไคทินและไคโตซาน** [12]

2.1.2.1 **ความสามารถในการละลาย** (Solubility)

ไคทิน สามารถละลายได้ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น กรดฟอสฟอริก กรดฟอร์มิก โดยต้องปราศจากน้ำ แต่ไม่ละลายในน้ำ กรดเจือจาง ด่างทั้งเจือจางและเข้มข้น แอลกอฮอล์ และตัวทำละลายอินทรีย์ อื่นๆ

ส่วนไคโตซาน สามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นกรดอินทรีย์เกือบทุกชนิดซึ่งมีค่า pH น้อยกว่า 6 เช่น กรดแอซีติก และกรดฟอร์มิก เป็นกรดที่นิยมใช้ในการละลายไคโตซาน กรดอินทรีย์บางชนิด เช่น กรดไฮโดรคลอริก กรดไนตริก กรดฟอสฟอริก และกรดเปอร์คลอริก ก็สามารถละลาย ไคโตซานได้เช่นกันแต่ต้องอยู่ภายใต้การคนที่อุณหภูมิสูงปานกลาง [13] แต่ไคโตซานมีข้อจำกัดตรงที่ไม่สามารถละลายได้ในน้ำ ด่าง และตัวทำละลายอินทรีย์ เมื่อละลายแล้วสารละลายไคโตซานจะมีความเหนียวใส อีกทั้งในการละลายบางครั้งอาจเกิดตะกอนสีขาวลักษณะคล้ายเจลเกิดขึ้น

2.1.2.2 **น้ำหนักโมเลกุล** (Molecular Weight)

ไคทินในธรรมชาติจะมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 1×10^{6} ในขณะที่ไคโตซานจะมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าโดยจะอยู่ในช่วง 1×10^{5} ถึง 1.2×10^{6} ขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิต

2.1.2.3 **ระดับการกำจัดหมู่แอซีทิล** (Degree of Deacetylaion)

ปัจจัยสำคัญในการแบ่งประเภทว่าเป็นไคทินหรือไคโตซาน คือ ระดับของการกำจัดหมู่แอซีทิล (Degree of N-acetylation : DA) หรือระดับการแทนที่ของเอมีน (Degree of deacetylation : DD) เนื่องจากไคทินและไคโตซานเป็นโคพอลิเมอร์ ระหว่าง เอน-แอซีทิล-กลูโคซามีน และ ดี-กลูโคซามีน ถ้าสัดส่วนที่อยู่ร่วมกันของเอน-แอซีทิล-กลูโคซามีนมากกว่า แสดงว่าระดับของการกำจัดหมู่แอซีทิลนั้นต่ำ จึงแสดงสมบัติเด่นของไคทิน แต่ถ้าสัดส่วนของดี-กลูโคซามีนมากกว่า แสดงว่าระดับของการกำจัดหมู่แอซีทิลสูงจึงแสดงสมบัติเด่นของไคโตซานออกมา โดยถ้าระดับของการกำจัดหมู่แอซีทิลมีค่าประมาณ 50 % ขึ้นไปจะเรียกว่า “ไคโตซาน” [12] ซึ่งโดยทั่วไปแล้วไคโตซานจะมีระดับของการกำจัดหมู่แอซีทิล ประมาณ 70-95 % ซึ่งถ้าค่าระดับของการกำจัดหมู่แอซีทิลมีค่าเป็น 90-100% จะเรียกว่า การกำจัดหมู่แอซีทิลอย่างสมบูรณ์ ซึ่งเทคนิคที่ใช้ในการหาระดับของการกำจัดหมู่แอซีทิล ได้แก่ อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี [14] ไทเทรชัน [15] และโครมาโทกราฟี [16] เป็นต้น

2.1.2.4 **ความหนืด** (viscosity)

ความหนืดของสารละลายไคโตซานขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ระดับของการกำจัดหมู่แอซีทิล ความเป็นกรด-เบส (pH) และอุณหภูมิของสารละลายนั้น ซึ่งโดยทั่วไปความหนืดของสารละลายพอลิเมอร์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่ชนิดของกรดที่ใช้และการเปลี่ยนแปลง pH ของสารละลายพอลิเมอร์จะส่งผลให้มีค่าความหนืดที่แตกต่างกันด้วย [17] เช่น ความหนืดของไคโตซานในกรดแอซีติกจะเพิ่มขึ้นเมื่อสารละลายมีค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายลดลง ในขณะที่ความหนืดของไคโตซานในกรดไฮโดรคลอริกจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเป็นกรด-เบสของสารละลายเพิ่มขึ้น

2.1.2.5 **ความสามารถในการสร้างและตกตะกอน** (Flocculant and Coagulating Ability)

ไคโตซานเป็นตัวสร้างตะกอนที่ดี เนื่องจากภายในโครงสร้างมีหมู่อะมิโนจำนวนมากที่สามารถแตกตัวเป็นประจุบวก และจับกับสารที่มีประจุลบได้ เช่น สีย้อมผ้า โปรตีนและพอลิ

เมอร์อื่นๆ นอกจากนี้ไคโตซานยังสามารถจับกับโลหะหนักได้อีกด้วย [18] เนื่องจากไนโตรเจนของหมู่อะมิโนจะเป็นตัวให้อิเล็กตรอน ทำให้ไอออนของโลหะเกิดพันธะเชิงซ้อนขึ้นกับหมู่อะมิโนนั้นได้ โดยเมื่อเปรียบเทียบกันแล้วที่หมู่อะมิโนของไคโตซานมีประสิทธิภาพในการจับไอออนของโลหะได้ดีกว่าหมู่แอซีทิลในไคทิน

2.1.2.6 **การจัดเรียงตัวในระดับโมเลกุล** (Molecular Conformation)

ไคทินมีโครงสร้างของผลึกที่แข็งแรง และมีระดับของผลึกสูง (high degree of crystallinity) รูปแบบผลึกของไคทินมี 3 รูปแบบ คือ อัลฟา-ไคทิน, เบต้า-ไคทิน, แกมมา-ไคทิน แต่ละลักษณะแตกต่างกันที่ลักษณะการเกิดโครงร่างผลึก และปัจจัยการเกิดโครงร่างผลึกของหน่วยเซลล์ เพราะฉะนั้นความแตกต่างนั้นจึงเป็นผลมาจากรูปแบบการเรียงตัวของโมเลกุลในโครงผลึกนั่นเอง

2.1.2.7 **การเสื่อมสลาย** (Degradation)

ไคทินและไคโตซานจะเหมือนกับพอลิเมอร์หรือพอลิแซกคาไรด์อื่นๆทั่วไป คือ เมื่อเกิดการเสื่อมสลายจะให้สายโซ่โมเลกุลที่สั้นลงเป็นโอลิโกแซกคาไรด์ (oligosaccharide) หรือ โอลิโกเมอร์ (oligomer) และเป็นหน่วยย่อยที่เล็กที่สุดที่เรียกว่า มอนอเมอร์ (monomer) หรือ โมโนแซกคาไรด์ (monosaccharide) [19]

การเสื่อมสลายของไคทินและไคโตซาน เกิดขึ้นได้ด้วยปัจจัยต่างๆ ดังนี้

1. การเสื่อมสลายโดยกรด
2. การเสื่อมสลายโดยด่าง
3. การเสื่อมสลายโดยการสั่นด้วยคลื่นเสียง
4. การเสื่อมสลายโดยเอนไซม์
5. การเสื่อมสลายโดยความร้อน

2.1.3 ประโยชน์ของไคทินและไคโตซาน

ไคทินและไคโตซานเป็นสารที่มีความโดดเด่นเฉพาะตัว คือ เป็นวัสดุชีวภาพ (biomaterial) ที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) อีกทั้งย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradable) ดังนั้น จึงปลอดภัยในการนำมาใช้งานกับมนุษย์ อีกทั้งไม่เกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม แต่ทั้งนี้มักนิยมใช้ไคโตซานมากกว่า เนื่องจากไคโตซานสามารถผลิตให้มีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันได้ อีกทั้งสามารถแตกตัวให้ประจุบวกได้ในภาวะที่เป็นกรดอ่อนและสามารถหาตัวทำละลายได้ง่ายกว่าไคทิน นอกจากนี้ไคโตซานยังสามารถขึ้นรูปได้หลากหลายรูปแบบ เช่น เจล บีด เมมเบรน อนุภาค ฟิล์ม เป็นต้น ปัจจุบันจึงได้มีผู้ทำการศึกษาค้นคว้าวิจัย และนำไคโตซานไปใช้ประโยชน์กันอย่างมากมายและแพร่หลาย ยกตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การใช้ประโยชน์จากไคโตซาน [20]

ประเภท	ตัวอย่างการใช้ประโยชน์
ด้านการเกษตรกรรมและอาหาร	ไคโตซานสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเกษตรได้ เนื่องจากไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่มีอยู่ในธรรมชาติและสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ จึงไม่เกิดมลพิษทางธรรมชาติ จึงได้มีการนำไคโตซานไปใช้เป็นสารเคลือบผลไม้ เนื่องจากสามารถป้องกันแบคทีเรีย ช่วยยืดอายุของผลไม้ให้ได้นานขึ้น อีกทั้งไคโทซานใช้ลดปริมาณคลอเรสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือด จึงมีการนำไคโตซานมาผสมกับอาหารอาทิประเทศญี่ปุ่น ได้แก่ คุกกี้ ก๋วยเตี๋ยว และน้ำส้ม
ด้านการบำบัดน้ำทิ้ง	จากโครงสร้างของไคโตซานซึ่งมีหมู่เอมีน ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน จึงทำให้ไคโตซานสามารถเกิดปฏิกิริยากับสารจำพวกโปรตีน สีย้อมผ้า และไอออนของโลหะได้ จึงมีการประยุกต์นำไคโตซานไปใช้ดูดซับสีย้อมผ้าในน้ำทิ้ง และดูดซับไอออนของโลหะในกระบวนการบำบัดน้ำทิ้ง
ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม	ไคโตซานถูกนำมาใช้ทางเภสัชกรรม โดยใช้ไคโตซานเป็นตัวนำส่งยา (drug carrier) เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึมและปลดปล่อยยา ส่วนในทางการแพทย์นั้นได้มีการนำไคโตซานไปประยุกต์ใช้เป็นวัสดุปิดแผล โดยทำให้แผลหายเร็วขึ้นหรือทำให้เลือดจับเป็นก้อน นอกจากนี้ยังมีการตีพิมพ์ผลงานวิจัยที่เกี่ยวกับการใช้ไคโตซานลดปริมาณคลอเรสเตอรอลและไขมันในสัตว์อีกด้วย

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) การใช้ประโยชน์จากโคโทซาน [20]

ประเภท	ตัวอย่างการใช้ประโยชน์
ด้านสุขภาพและเครื่องสำอาง	ในประเทศญี่ปุ่นได้มีการนำไคโตซานมาเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ดูแลผม ได้แก่ แชมพู และครีมนวด อีกทั้งยังมีการใช้ในผลิตภัณฑ์ดูแลผิวหนังจำพวก ครีมอาบน้ำ โลชันอีกด้วย
ด้านเทคโนโลยีนิวเคลียร์	มีการนำไคโตซานไปใช้เป็นสารดูดซับยูเรเนียม เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของธาตุยูเรเนียมในปริมาณน้อยๆ ในน้ำประปาและน้ำทะเล

จากที่ได้กล่าวมานั้นจะเห็นได้ว่าประโยชน์ของไคโตซานนั้นมีมากมาย แต่ไคโตซานนั้นมีน้ำหนักโมเลกุลสูงอีกทั้งยังมีความสามารถในการละลายได้ในตัวทำละลายต่างๆ ได้น้อย ทำให้มีข้อจำกัดของการนำไปใช้ประโยชน์ จึงมีการปรับปรุงสมบัติบางประการเพื่อให้เหมาะสมกับการนำไปใช้ให้ได้มากขึ้น โดยการเพิ่มความสามารถในการละลายได้ของไคโตซาน ซึ่งสามารถทำได้โดยการลดน้ำหนักโมเลกุลลงด้วยวิธีการต่าง ๆ ได้แก่ การใช้วิธีทางเคมี วิธีทางรังสี และวิธีการใช้เอนไซม์

2.2 **ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับอิมัลชัน** [21]

อิมัลชัน (Emulsion) หมายถึง สารละลายที่ประกอบด้วยของเหลวอย่างน้อย 2 ชนิด ซึ่งไม่เข้ากันหรือไม่ละลายในกันและกัน เช่น น้ำและน้ำมัน เมื่อต้องการให้สารทั้งสองชนิดผสมผสานเข้าเป็นเนื้อเดียวกันจำเป็นต้องใช้ตัวกระทำอิมัลชัน (Emulsifier) เป็นตัวผสานทั้งสองเข้าด้วยกัน เมื่อมองด้วยตาเปล่าจะเห็นลักษณะเป็นสารเนื้อเดียวกัน แต่ถ้ามองด้วยกล้องจุลทรรศน์ก็จะเห็นเป็น 2 วัฏภาค คือ เห็นเป็นหยดเล็กๆ ของของเหลวชนิดหนึ่งเรียกว่า “วัฏภาคภายใน”(internal or dispersed phase) กระจายตัวแทรกอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่งที่เรียกว่า “วัฏภาคภายนอก”(External or continuous phaes) โดยทั่วไปหยดของวัฏภาคภายในจะมีขนาด

ที่แตกต่างๆกัน ตั้งแต่ขนาดที่เล็กกว่า 0.05 ไมครอน จนถึง 25 ไมครอน ซึ่งขนาดอนุภาคของวัฏภาคภายในจะมีผลต่อการกระจายแสงได้ต่างกัน จึงทำให้อิมัลชันปรากฏลักษณะภายนอกที่มองเห็นได้แตกต่างกัน

2.2.1 **ส่วนประกอบของอิมัลชัน**

ผลิตภัณฑ์รูปแบบอิมัลชัน มีส่วนประกอบหลักสำคัญ 3 ส่วน คือ

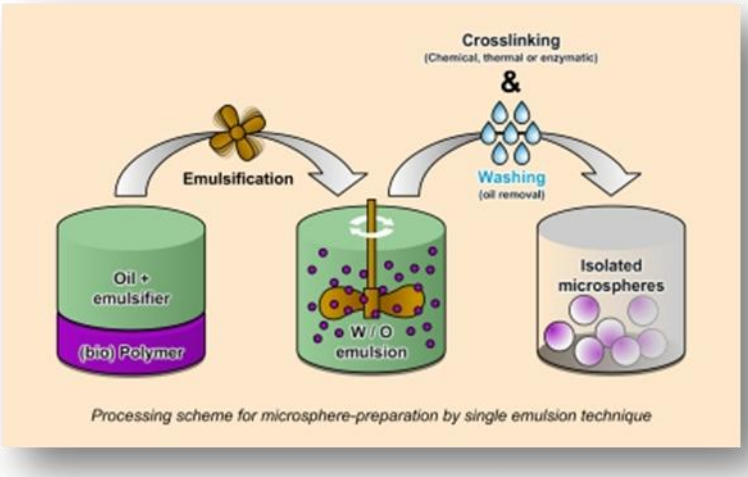
1. วัฏภาคน้ำ (Water phaes) ได้แก่ น้ำและสารต่างๆ ซึ่งอาจเป็นของแข็งหรือของเหลวที่ละลายได้ในน้ำ อาจเป็นสารเพิ่มความหนืด สารกันเสีย สารลดแรงตึงผิว สีที่ละลายน้ำ สารต้านออกซิเดชัน นอกจากนี้อาจเป็นสารออกฤทธิ์อื่นที่ละลายน้ำได้ เป็นต้น สารต่างๆ เหล่านี้อาจเติมลงในวัฏภาคน้ำได้ทั้งสิ้น แล้วแต่ส่วนประกอบของสูตรในผลิตภัณฑ์แต่ละประเภท

2. วัฏภาคน้ำมัน (Oil phase) ได้แก่ น้ำมันต่างๆ ไขมัน ไขแข็ง สีที่ละลายในน้ำมัน น้ำหอมต่างๆ สารกันหืน สารลดแรงตึงผิว หรือสารออกฤทธิ์ต่างๆ เป็นต้น แล้วแต่ส่วนประกอบในสูตรของผลิตภัณฑ์แต่ละประเภทเช่นกัน

3. ตัวกระทำอิมัลชัน (Emulsifier) ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวเช่น Tween, Span, Sodium lauryl sulfate คอลลอยด์ที่ชอบน้ำ เช่น Acacia, Gelatin ของแข็งอนุภาคละเอียด เช่น Bentonite, Colloidal magnesium aluminium silicate เป็นต้น ตัวทำอิมัลชันเป็นตัวสำคัญในการผสมผสานให้วัฏภาคน้ำและน้ำมันเข้าเป็นเนื้อเดียวกันได้

2.2.2 **กลไกการเกิดอิมัลชัน**

เมื่อมีการผสมกันระหว่างของเหลวสองชนิดซึ่งไม่เข้ากัน จะพบว่าของเหลวจะแยกกันอยู่เป็น 2 ชั้น เนื่องจากเกิดแรงตึงระหว่างผิวนั้น แต่เมื่อเพิ่มพลังงานและเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างของเหลวทั้งสอง โดยการเขย่า จะทำให้ของเหลวนั้นกระจายตัวเป็นหยดเล็กๆ และมีลักษณะของอิมัลชันเกิดขึ้น แต่เกิดขึ้นแค่ชั่วคราวเท่านั้น ในทางเทอร์โมไดนามิกส์อธิบายได้ว่า การเขย่าเป็นการเพิ่มพลังอิสระที่พื้นผิว (Surface free energy) ของเหลวจึงเข้ากันได้ชั่วคราวเท่านั้น เพราะเมื่อหยุดเขย่าหรือหยุดกวน ของเหลวก็จะกลับมารวมตัวกันและแยกชั้นดังเดิม เนื่องจากมีการปรับสภาวะให้เข้าจุดคงสภาพโดยลดพื้นที่ผิวการสัมผัสระหว่างกันน้อยที่สุด ซึ่งสามารถทำให้ของเหลวนั้นเข้ากันอย่างถาวรได้โดยการการเติมตัวทำอิมัลชันลงไปก่อนการเขย่า เพื่อให้เกิดการกระจายตัวเป็นหยดเล็กๆ ในกันและกันของของเหลวทั้งสองชนิดโดยที่ยังคงสภาพอยู่ ซึ่งไม่กลับมาแยกชั้น



ภาพที่ 2.4 การเกิดอิมัลชัน [21]

2.2.3 ชนิดของอิมัลชัน

ก. ผลิตภัณฑ์อิมัลชันที่พบโดยทั่วไปมักมีลักษณะขาวขุ่นคล้ายน้ำนม ซึ่งในความจริงแล้วอิมัลชันอาจจะโปร่งใสก็ได้ จึงสามารถแบ่งชนิดของอิมัลชันตามลักษณะภายนอกที่มองเห็น ได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. ไมโครอิมัลชัน (Microemulsion) คือ อิมัลชันจะมีลักษณะขุ่นขาว ซึ่งขนาดของอนุภาคของวัฏภาคภายในของอิมัลชัน จะมีขนาดตั้งแต่ 0.25 – 10 ไมครอน (โดยทั่วไปจะใหญ่กว่า 1 ไมครอน) จึงทำให้มีความแตกต่างของค่าดัชนีการหักเหของแสงของวัฏภาคทั้งสอง และเกิดการกระจายแสง จึงมองเห็นเป็นสารที่มีลักษณะขุ่นขาว อิมัลชันชนิดนี้อาจแบ่งย่อยได้เป็นอิมัลชันเนื้อหยาบ ซึ่งมีอนุภาคค่อนข้างใหญ่ ส่วนอิมัลชันเนื้อละเอียด จะมีขนาดอนุภาคค่อนข้างเล็กโดยขนาดจะเล็กกว่า 5 ไมครอนลงไป ไมโครอิมัลชันเป็นอิมัลชันที่พบมากที่สุด ทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา และอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เป็นต้น

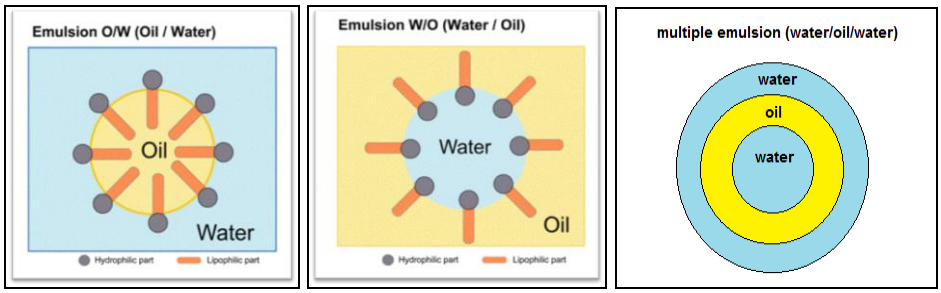
2. นาโนอิมัลชัน (Nanoemulsion) จะมีลักษณะโปร่งใส เนื่องจากอนุภาคของวัฏภาคภายในเล็กมาก (ประมาณ 10 –75 นาโนเมตร) ซึ่งมีค่าน้อยกว่าหนึ่งในสี่ของความยาวคลื่นแสงที่มองเห็นได้ (Visible light) จึงไม่หักเหหรือกระจายแสง แสงจึงสามารถทะลุผ่านได้จึงดูโปร่งใส หยดของวัฏภาคภายในมีลักษณะกลมถูกล้อมลอบด้วยฟิล์มของตัวกระทำอิมัลชัน มีทั้งชนิดน้ำมันในน้ำ(O/W) และน้ำในน้ำมัน(W/O)

ข. แบ่งตามชนิดของของเหลวที่เป็นวัฏภาคภายในและวัฏภาคภายนอก ได้เป็น 3 ชนิด คือ

1. อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O Emulsion) อิมัลชันชนิดนี้จะมีวัฏภาคภายในเป็นน้ำ วัฏภาคภายนอกเป็นน้ำมัน มักพบในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เช่น ครีมล้างหน้า (Cleansing cream) ครีมทากลางคืน (Night cream) ครีมนวดหน้า (Massage cream) และครีมฮอร์โมน (Hormone cream) เป็นต้น อิมัลชันชนิดนี้จะค่อนข้างข้น และเหนียวเหนอะหนะ

2. อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W emulsion) อิมัลชันชนิดนี้จะมีวัฏภาคภายในเป็นน้ำมัน ส่วนวัฏภาคภายนอกเป็นน้ำ จึงมีความเหนอะหนะค่อนข้างน้อย มีการกระจายตัวที่ดี เป็นที่นิยมมากในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เช่น ครีมและโลชันทาผิว (Body cream and lotion) ครีมทาหน้า (Vanishing cream) ครีมกันแดด (Sun screen cream) ครีมรองพื้น (Foundation cream) เป็นต้น

3. อิมัลชันเชิงซ้อน (Multiple emulsion) เป็นอิมัลชันที่มีวัฏภาคภายในซ้อนกันอยู่ ซึ่งเป็นของเหลวต่างชนิดกัน เช่น อนุภาคของน้ำ/น้ำมัน/น้ำ (W/O/W) หรืออนุภาคของน้ำมัน/น้ำ/น้ำมัน (O/W/O) ซึ่งอิมัลชันเชิงซ้อนเหล่านี้สามารถเปลี่ยนเป็นอิมัลชันชนิดธรรมดาได้ เช่น อนุภาคของน้ำ/น้ำมัน/น้ำ (W/O/W) ซึ่งมีน้ำเป็นวัฏภาคภายนอก และวัฏภาคภายในเป็นน้ำมัน ซึ่งจะมีหยดเล็กๆของหยดน้ำซ้อนอยู่อีกที เมื่อกลับกลายเป็นอิมัลชันธรรมดาจะกลายเป็นชนิดอนุภาคน้ำมันในน้ำ (O/W) ซึ่งจะพบอิมัลชันชนิดนี้บ้างในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบางประเภท



ภาพที่ 2.5 อิมัลชันประเภทต่างๆ [22]

ค. แบ่งตามความหนืดของอิมัลชัน ได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. โลชัน (Lotion) เป็นอิมัลชันที่มีความหนืดต่ำ เพราะมีปริมาณของวัฏภาคภายในน้อย ซึ่งมักมีไม่เกิน 35% โลชันอาจเป็นได้ทั้งสองชนิด พบมากในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ทาผิว โดยเฉพาะผิวหนังที่มีบริเวณกว้าง เนื่องจากโลชันประเภทนี้ทาแล้วชุ่มชื้น ไม่เหนอะหนะ ดูดซึมได้ดี ให้ความรู้สึกสบาย และสามารถล้างออกได้ง่าย เช่น โลชันทาผิว โลชันป้องกันแสดงแดด เป็นต้น โลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O) จะไม่ค่อยนิยมนัก เนื่องจากเมื่อทาแล้ว จะรู้สึกเหนอะหนะผิว เช่น โลชันป้องกันแดดชนิดที่มีคุณสมบัติกันน้ำ ที่ใช้ทาก่อนลงเล่นน้ำ เป็นต้น เพราะฉะนั้นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) จะไม่สามารถทำได้เนื่องจากจะถูกน้ำชะล้างออกไปหมด

2. ครีม (Cream) เป็นอิมัลชันที่มีความหนืดสูงมาก (ลักษณะกึ่งแข็ง) เพราะมีส่วนประกอบของสารพวกไขแข็ง (Waxes) และไขมัน (Fatty acid or fatty alcohol) ซึ่งช่วยเพิ่มความหนืดและเนื้อครีมที่ผสมอยู่กับน้ำมัน (Oils) ในวัฏภาคน้ำมัน ครีมจะมีความหนืดมากกว่าโลชัน เนื่องจากมีปริมาณวัฏภาคภายในประมาณ 35 – 75 % ซึ่งสูงกว่าโลชัน แล้วแต่ความหนืดที่ต้องการโดยมีการใช้สารเพิ่มเนื้อครีม (Bodying or stiffening agent) เช่นไขมันและไขแข็งดังที่ได้กล่าวมา เครื่องสำอางที่เป็นครีมชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) ได้แก่ ครีมทาผิว ครีมบำรุงถนอมผิว ครีมแต่งผม ครีมโกนหนวด ครีมทากันแดด ครีมระงับเหงื่อและกลิ่นตัว ครีมทาแก้สิว ครีมทาแก้ฝ้า เป็นต้น ครีมชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O) ได้แก่ครีม ฮอร์โมน ครีมล้างหน้า ครีมนวดหน้า ครีมแต่งผม เป็นต้น

2.2.4 **อิมัลซิฟายเออร์และสารลดแรงตึงผิว** [23]

อิมัลซิฟายเออร์และสารลดแรงตึงผิว คือโมเลกุลที่มีส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ เป็นสารที่จำเป็นหลักที่ช่วยหลีกเลี่ยงการแยกเฟสระหว่างน้ำและน้ำมัน ทำให้อิมัลชันคงตัวโดยอาศัยคุณสมบัติการลดแรงตึงระหว่างผิว ประกอบด้วยส่วนหัวเป็นส่วนที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) จึงสามารถละลายได้ในน้ำหรือสารที่มีขั้ว และส่วนหางเป็นส่วนของโซ่ไฮโดรคาร์บอน (long hydrocarbon) ซึ่งสามารถละลายได้ดีสาหรับสารประเภทไฮโดรคาร์บอนและสารที่ไม่มีขั้ว (non-polar)

2.2.4.1 ประเภทของอิมัลซิฟายเออร์หรือสารลดแรงตึงผิว

อิมัลซิฟายเออร์หรือสารลดแรงตึงผิวสามารถแบ่งออกได้เป็นหลายประเภท ดังนี้

1. แบ่งตามประจุ

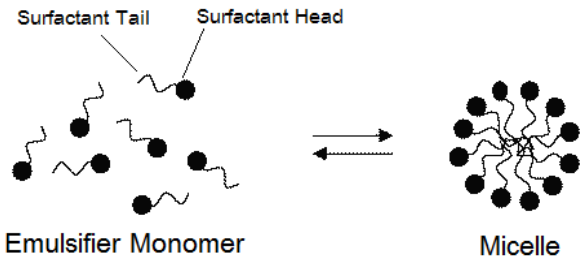
- Anionic - อิมัลซิฟายเออร์ที่มีประจุลบบนส่วนที่เป็น active portion ของโมเลกุล
- cationic - อิมัลซิฟายเออร์ที่มีประจุบวกบนส่วนที่เป็น active portion ของโมเลกุล
- non-ionic - อิมัลซิฟายเออร์ที่โมเลกุลไม่แสดงประจุ
- amphoteric - แสดงได้ทั้งประจุบวกและประจุลบขึ้นกับ pH
- zwitter ionic - แสดงทั้งประจุบวกและประจุลบที่ surface active portion

2. แบ่งตามสัดส่วนระหว่างส่วนที่ชอบน้ำกับส่วนที่ชอบน้ำมัน (hydrophilic–lipophilic balance : HLB)

Hydrophile-lipophile balance (HLB) หมายถึงสัดส่วนระหว่างส่วนที่ชอบน้ำกับส่วนที่ชอบน้ำมัน โดยปกติ HLB มีค่า 0-20 ถ้าค่า HLB เท่ากับ 0 คือสารที่ในโมเลกุลมีแต่ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ทั้งหมดจึงไม่ละลายน้ำ เมื่อค่า HBL สูงขึ้น โมเลกุลจะมีส่วนที่ชอบน้ำมากขึ้น กระจายในน้ำได้ดีขึ้น และอิมัลซิไฟเออร์ที่ชอบน้ำและน้ำมันเท่า ๆ กันจะมีค่า HLB = 10

2.2.4.2 หลักการทำงานของอิมัลซิฟายเออร์ [24]

หลักการทำงานของสารลดแรงตึงผิวคือ ส่วนที่ชอบน้ำจะจับกับน้ำ และส่วนที่ชอบน้ำมันจะจับสิ่งสกปรกพวกไขมันที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ ทำให้สิ่งสกปรกหลุดออกไปแล้วแขวนลอยอยู่ในน้ำ



ภาพที่ 2.6 การเกิดไมเซลล์ของอิมัลซิฟายเออร์

CMC (critical micelle concentration) คือความเข้มข้นต่ำสุดของสารลดแรงตึงผิวที่ทำให้เกิดไมเซลล์โดยไมเซลล์เกิดจากสารประเภทที่มีขั้ว 2 แบบในโมเลกุลเดียวกัน คือมีทั้งส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้ว กรณีที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวต่ำๆ มันจะอยู่เป็นโมเลกุลเดี่ยวๆ แต่เมื่อความเข้มข้นมากขึ้นถึงค่าๆหนึ่ง โมเลกุลเหล่านี้จะเริ่มเกาะกันเองโดยใช้ส่วนที่ไม่มีขั้วหันเข้าหากันและหันส่วนที่มีขั้วออกข้างนอกเพื่อยึดเกาะกับโมเลกุลของสารละลายที่มีขั้ว เกิดเป็นไมเซลล์ขึ้น

เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว สมบัติต่างๆ จะมีการเปลี่ยนแปลง เช่น แรงตึงผิว ค่าการนำไฟฟ้า ความดันออสโมซิส เป็นต้น เมื่อถึงจุด CMC สมบัติดังกล่าว จะมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย โดยในทางที่เพิ่มขึ้นหรือลดลง ขึ้นกับสมบัตินั้นๆ เช่น แรงตึงผิวและค่าการนำไฟฟ้าจะมีค่าลดลง ส่วนค่าความดันออสโมซิสจะมีค่าเพิ่มขึ้น

2.3 **การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์** [25]

เซลล์เพาะเลี้ยงของสัตว์ เป็นเซลล์ที่มาจากเนื้อเยื่อของสัตว์หรือจากเซลล์ไลน์ที่นำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะนอกร่างกายให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนในภาชนะเลี้ยงที่เป็นแก้วหรือพลาสติก ซึ่งบรรจุอาหารที่กระตุ้นให้เซลล์อยู่รอดเจริญเพิ่มจำนวน เซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้อาจให้กลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน (homogeneous population) หรือแตกต่างกัน (heterogeneous population) การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์แต่เดิมแบ่งเป็น organ culture, explants culture และ cell culture ซึ่ง cell culture จะเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ที่นิยมที่สุด โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ เนื่องจากเซลล์มีคุณสมบัติสม่ำเสมอ และสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ให้เกิดความสำเร็จดีต้องอาศัยเทคนิคต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการรักษาความมีชีวิตของเซลล์ ให้เซลล์ปลอดการปนเปื้อน ขณะที่ให้สภาพแวดล้อมและสารอาหารเหมาะสมต่อการเจริญการพัฒนาของเซลล์ได้อย่างต่อเนื่อง เป็นหลายๆ รุ่นของการถ่ายเลี้ยง ซึ่งมีผลให้สามารถใช้เซลล์เพาะเลี้ยงของสัตว์เป็นเครื่องมือไปประยุกต์กับเทคโนโลยีเซลล์สัตว์อีกมากมายทั้งทางชีววิทยา และอณูชีววิทยา ด้วยการให้เซลล์เป็นแหล่งผลิตผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่มีประโยชน์ หรืออาจเป็นเครื่องมือในการค้นพบและทดสอบทางการแพทย์ กสิกรรม และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์จึงเป็นส่วนหนึ่งของเทคโนโลยีชีวภาพ ที่มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายเพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ต่อไป

2.3.1 ชนิดของการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์

จากทฤษฎีเซลล์ (cell theory) ที่กล่าวว่าสิ่งมีชีวิตทุกชนิดจะประกอบด้วยเซลล์หนึ่งเซลล์หรือมากกว่า และเซลล์เป็นหน่วยโครงสร้างพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด โดยทฤษฎีเซลล์ข้อสุดท้ายกล่าวว่าเซลล์ทุกๆ เซลล์จะเกิดขึ้นจากการแบ่งตัวของเซลล์ตั้งต้นที่เกิดมาก่อนแล้ว ทฤษฎีเซลล์ข้อนี้ทำให้เกิดการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ขึ้น โดยการนำเซลล์สัตว์มาเพาะเลี้ยงนอกร่างกายในสภาพแวดล้อมที่ดี และมีอาหารที่สมบูรณ์ เพื่อให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนในภาชนะเลี้ยง เรียกว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์เดิม นิยมทำเพื่อให้สามารถศึกษาพฤติกรรมของเซลล์สัตว์อย่างอิสระได้ ในสภาวะที่หลีกเลี่ยงผลกระทบที่อาจเกิดจากสัตว์ทั้งในภาวะปกติ (normal homeostasis) และภาวะเครียดจากการทดลอง การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ในระยะแรกๆ จะเป็นการนำเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะที่แยกได้จากสัตว์มาบ่มเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง ทำให้เกิดการเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิแบบต่างๆ คือ organ culture, explants culture และ cell culture แต่ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์มักเป็นการนำเซลล์จากแหล่งเก็บหรือธนาคารเซลล์มาใช้ เนื่องจากเป็นเซลล์สายพันธ์บริสุทธิ์สามารถรู้ลักษณะเฉพาะ เช่นชนิดเซลล์ แหล่งของเซลล์ การเจริญ และพันธุกรรมได้ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์จึงแบ่งเป็นการเพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิ (primary culture) และ การเพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์หรือเซลล์ไลน์ (cell line)

2.3.1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิและแหล่งเซลล์

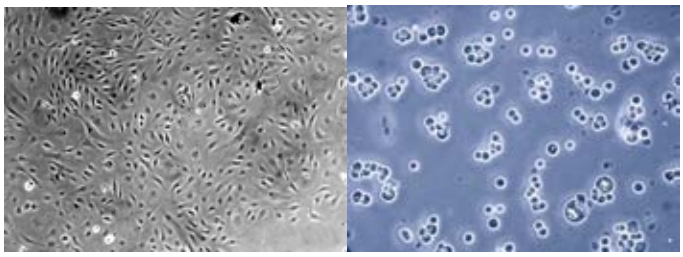
การเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มแรกที่นำมาจากสัตว์ เนื่องจากสัตว์เป็นสิ่งมีชีวิตที่ประกอบด้วยเซลล์หลากหลายชนิด เซลล์ในเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะจึงประกอบด้วยเซลล์หลายชนิด แต่ละชนิดจะมีบทบาท หน้าที่ รูปร่างและโครงสร้างที่มีลักษณะเฉพาะให้เกิดการทำงานร่วมกันของเซลล์ในอวัยวะ ซึ่งการทำงานอย่างสัมพันธ์กันของอวัยวะต่างๆจะทำให้สัตว์มีชีวิตอยู่รอด

Organ culture เป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ยังคงสภาพเดิม หรือมีบางส่วนของเนื้อเยื่อที่อยู่ในสภาพเดิมของร่างกายสัตว์ในลักษณะที่ยังคงเป็นเนื้อเยื่อสามมิติทั้งชิ้นอยู่ ชิ้นเนื้อเยื่อนั้นจะถูกเลี้ยงในสภาวะที่ทำให้คงรูปร่างสามมิติ

Explant culture เป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากสิ่งมีชีวิต ในลักษณะที่ให้ชิ้นเนื้อเยื่อมีการสัมผัสกับผิวภาชนะที่เป็นแก้ว หรือพลาสติกและล้อมรอบด้วยอาหาร (glass/plastic-liquid

interface) ซึ่งการทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อยึดติดบนผิวภาชนะอาจเกิดขึ้นได้เอง หรืออาจใช้ plasma clot หรือ extracellular matrix เช่น collagen มาตรึงชิ้นเนื้อให้ติดกับผิวภาชนะ

Cell culture เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยวๆ ด้วยการใช้เอนไซม์หรือแรงกลมาแยกให้ได้เซลล์จากชิ้นเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยง จะเป็นวิธีที่ให้ปริมาณเซลล์มากและรวดเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงแบบ explants culture โดยเซลล์แขวนลอยเดี่ยวๆที่ได้จากการแยก เมื่อนำไปเลี้ยงในภาชนะที่สภาวะเหมาะสม ในลักษณะให้สัมผัสผิวภาชนะที่เป็นแก้ว หรือพลาสติกและล้อมรอบด้วยอาหาร (glass/plastic-liquid interface) จะทำให้เซลล์มีการเจริญได้สองรูปแบบขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์และอาหาร (รูปที่ 2.7) เซลล์อาจเกาะและเจริญเต็มพื้นผิวภาชนะ (adherent monolayer) หรือแขวนลอย (suspended) อยู่ในสารละลายอาหาร ทำให้สามารถจำแนกเซลล์เป็น 2 ประเภทตามลักษณะการเจริญคือ 1) anchorage dependent cells, adherent cell หรือ attached cell คือเซลล์ที่มีการเจริญแบบเกาะผิว และ 2) anchorage independent cells หรือ suspended cell คือเซลล์ที่มีการเจริญแบบแขวนลอยในอาหาร



ภาพที่ 2.7 เซลล์ที่มีการเจริญแบบเกาะผิว (a) และเซลล์ที่มีการเจริญแบบแขวนลอย (b) [26]

2.3.1.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์หรือเซลล์ไลน์และแหล่งเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์ เช่น cell line หรือ cell strain เป็นที่นิยมมากกว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิ เนื่องจากเป็นเซลล์บริสุทธิ์ มีรูปแบบของความต้องการเจริญที่เหมือนกันในทุกครั้งที่ถ่ายเลี้ยง ทำให้สามารถศึกษาปริมาณ ลักษณะ และให้ผลซ้ำของการทดลองได้ดี เซลล์ไลน์อาจมาจากถ่ายเลี้ยงจากเซลล์ปฐมภูมิ หรือมาจากแหล่งเก็บเซลล์หรือธนาคารเซลล์โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ที่เก็บแช่แข็งจะผ่านการตรวจสอบการปนเปื้อน มีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ มีการระบุลักษณะของเซลล์มาอย่างถูกต้อง อีกทั้งมีประวัติเกี่ยวกับเซลล์และข้อมูลต่างๆ

เก็บไว้เป็นอย่างดีแล้ว เซลล์ไลน์จากธนาคารเซลล์จะมีเซลล์หลากหลายชนิดให้เลือกใช้ และนักวิจัยสามารถสั่งซื้อและขนส่งมาใช้ได้จากแหล่งเก็บเซลล์แช่แข็งต่างๆ ซึ่งมีอยู่ทั่วไปตามแหล่งต่างๆ

2.3.2 ชนิดของเซลล์ที่พบในการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์

เซลล์สัตว์มักถูกกำหนดด้วยแหล่งของเนื้อเยื่อที่นำเซลล์มา ซึ่งจะให้เซลล์มีรูปร่างลักษณะแตกต่างกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเซลล์ที่มักพบในการเพาะเลี้ยงเซลล์มีอยู่ 5 ชนิด คือ fibroblast, epithelial cells, muscle cells, nerve cells และ suspension cells

Epithelial-like (epitheloid) เซลล์ที่มาจากเนื้อเยื่อบุผิวซึ่งหุ้มท่อหรืออวัยวะ เซลล์ประเภทนี้เมื่อเกาะบนพื้นผิว จะมีลักษณะเป็นเหลี่ยมๆ คล้ายกระเบื้องปูพื้น เซลล์จะมีการเกาะเรียงตัวชิดกันมาก ซึ่งเรียกว่า tight junction การแยกเซลล์ออกจากกันอาจทำลายเซลล์ได้ โดยการต่อชิดกันของเซลล์จะมี demosomes ซึ่งเชื่อมต่อเซลล์หนึ่งต่อกับอีกเซลล์หนึ่ง และ demosomes จะเป็นช่องผ่านระหว่างเซลล์ที่ติดกัน ทำให้มีการแลกเปลี่ยนสารอาหารระหว่างเซลล์ได้ เซลล์ประเภทนี้จะมีลักษณะด้านบนและด้านล่างของเซลล์ต่างกัน และมักเป็นเซลล์ที่หลั่งสารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่นเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนเป็นต้น ทั้งเซลล์ Fibroblast และ Epithelial cells มักมีอัตราการเจริญหรือ doubling time อยู่ในช่วงเวลา 18-24 ชั่วโมง

2.3.3 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์

เทคโนโลยีการเลี้ยงเซลล์สัตว์ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้กันมากในงานทางด้านชีววิทยา ทางการแพทย์และอณูชีววิทยา (molecular biology) โดยโปลิโอไวรัส (poliomyelitis virus) และวัคซีนเป็นผลิตภัณฑ์แรกที่มาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ ซึ่งเซลล์เพาะเลี้ยงช่วงแรกๆจะเป็นเซลล์ปฐมภูมิ human embryonic cells ที่ให้อนุภาคไวรัส ซึ่งเมื่อทำให้หมดฤทธิ์ก่อโรคก็สามารถใช้เป็นวัคซีนได้ ต่อมามีการใช้เซลล์ไลน์ (continuous cell line) แทนเซลล์ปฐมภูมิ ซึ่งมีข้อดีกว่าคือสามารถควบคุมสภาวะการเลี้ยงเซลล์ได้ดีกว่า เซลล์เพิ่มจำนวนได้ง่ายและมากกว่า อีกทั้งสามารถเก็บแช่แข่งเป็นธนาคารเซลล์ได้ ปัจจุบันมีไวรัสวัคซีนหลายชนิดที่ผลิตจากการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ถูกประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ มากมาย สรุปได้ดังนี้

1) ใช้ศึกษาหาความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับชีววิทยา และชีวเคมีของเซลล์ เช่น ศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ ศึกษากลไกการควบคุมภายในเซลล์ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงและการทำงานของเซลล์ เป็นต้น

2) ใช้ในการวิเคราะห์หาความปลอดภัยของสารแทนการทดลองทดลองในสัตว์ทดลอง เช่น ยารักษาโรค ยาฆ่าแมลง สารปรุงแต่งอาหาร สารเคมี และเครื่องสำอาง ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไว (sensitive) และตรวจได้ในห้องปฏิบัติการ ให้ผลรวดเร็วและใกล้เคียงกับการทดลองในสัตว์ทดลอง ในขณะที่สามารถลดการใช้ชีวิตสัตว์ทดลองลง

3) ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ โดยการทำพันธุวิศวกรรมใส่ยีน (gene) ที่ต้องการเข้าสู่เซลล์ให้เซลล์ผลิตสารที่ต้องการได้ หรือใช้เซลล์ในการผลิตไวรัส ให้ได้ผลิตภัณฑ์มากๆ ด้วยการเลี้ยงเซลล์ในถังปฏิกรณ์ เช่น การผลิต tissue plasminogen activator (tPA), insulin, human growth hormone วัคซีน หรือโมโนโคลนัลแอนติบอดี เป็นต้น นอกจากนี้ยังได้ใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมและการโคลนนิ่งสัตว์มาสร้างสัตว์ เพื่อให้สามารถผลิตโปรตีนและเภสัชภัณฑ์ที่ต้องการในน้ำนมหรือเนื้อเยื่อของสัตว์ ทำให้ลดต้นทุนการผลิตลงได้

4) ใช้ในการรักษาโรคพันธุกรรมโดยการนำเซลล์ออกจากคนไข้มาเพาะเลี้ยง แล้วนำยีนมาปรับปรุงแก้ไขความบกพร่องของโรค ก่อนใส่กลับคืนเซลล์ จากนั้นจึงถ่ายเซลล์ที่ผ่านการแก้ไขแล้วนั้นเข้าสู้คนไข้ต่อไป การรักษาโรควิธีนี้สามารถใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน heamophilia Parkinson's disease และโรคที่มีความบกพร่องต่อการสร้างเอนไซม์ได้

5) ใช้ในการตรวจหาความผิดปกติของทารกในครรภ์ โดยนำเซลล์จากน้ำคร่ำมาเลี้ยงแล้วตรวจสอบโครโมโซม หรือสารพันธุกรรมเทียบกับเซลล์จากพ่อ-แม่

6) ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์หรือรักษาพันธุ์สัตว์โดยการทำโคลนนิ่ง

7) ใช้ในการสร้างเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อเทียมในการถ่ายรักษาผู้ป่วย

2.3.4 อาหารเลี้ยงเซลล์

การเลี้ยงเซลล์นอกร่างกายสิ่งมีชีวิตให้มีชีวิตรอดและเจริญได้ สารละลายอาหารจะต้องมีคุณสมบัติที่สำคัญคือ รักษาระดับ pH และ osmolarity ที่จำเป็นต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ อีกทั้งให้สารอาหารและพลังงานที่จำเป็นต่อการเจริญแบ่งตัวของเซลล์ โดยองค์ประกอบของอาหารควรมีสัดส่วนของสารต่างๆอย่างเหมาะสม สมดุล และไม่มีองค์ประกอบของสารที่เป็นพิษหรือยับยั้งการเจริญของเซลล์ นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเซลล์ในสภาวะการบ่มเลี้ยง ควรสามารถควบคุมอุณหภูมิ ปริมาณ O_2 และ CO_2 ได้อย่างเหมาะสมต่อการอยู่รอดและเจริญของเซลล์ โดยทั่วไปสารละลายที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ สามารถจัดแบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามวัตถุประสงค์การใช้งานคือ 1) สารละลายที่ช่วยให้เซลล์อยู่รอดโดยไม่มีการเจริญ เช่น balance salt solution และ 2) สารละลายที่ช่วยให้เซลล์อยู่รอดและเจริญได้หรืออาหารเลี้ยงเซลล์ เช่น basal medium และ complete medium ซึ่งอาจเป็นอาหารที่ปราศจากซีรัม หรือมีซีรัม

2.3.4.1 อาหารพื้นฐาน

อาหารเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดปัจจัยหนึ่งในการเลี้ยงเซลล์สัตว์ โดยให้สภาพแวดล้อมที่ให้เซลล์อยู่รอด และให้สารที่เซลล์ต้องการซึ่งเซลล์เองไม่สามารถผลิตเองได้ อาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในช่วงแรกๆ มีองค์ประกอบของสารหลายชนิด แปรตามวัตถุดิบที่ใช้ เช่น พลาสมา (plasma), lymph ซีรัม(serum) และสารสกัดจากเนื้อเยื่อ แต่อาหารที่นิยมใช้เลี้ยงเซลล์ในปัจจุบันเป็นอาหารที่รู้ส่วนประกอบทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณหรือ defined medium ซึ่งสามารถเตรียมได้ตามหลักมาตรฐานทางวิทยาศาสตร์ อาหารที่มีองค์ประกอบของสารต่างๆน้อยที่สุด และมีเท่าที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์เท่านั้นจึงจัดเป็นอาหารพื้นฐาน ซึ่งบางชนิดเป็นอาหารที่ไม่ต้องเติมซีรัม แต่ส่วนใหญ่เป็นอาหารที่ต้องเติมซีรัม และมักเรียกอาหารที่เติมซีรัมแล้วว่า complete media

2.3.4.2 ซีรัม

ซีรัมเป็นของเหลวที่ได้จากการแข็งตัวของเลือดสัตว์ มีองค์ประกอบหลายๆชนิด ที่เป็นชีวโมเลกุลซับซ้อนทั้งขนาดใหญ่และเล็กที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน เช่น เป็นสารอาหาร ฮอร์โมน growth factors, attachment factor, spreading factor, binding proteins ที่นำฮอร์โมน วิตามิน ไขมันและแร่ธาตุเข้าเซลล์ นอกจากนี้ยังมีสารให้ความหนืดป้องกันเซลล์ สารยับยั้งการทำงานของโปรติเอส (protease inhibitor) และ pH buffer จึงนิยมใส่ซีรัมในอาหารสำหรับเลี้ยง

เซลล์เพราะมีสารเร่งการเจริญ (growth factors) ในปริมาณสูงและมีแกมม่าโกบูลินในปริมาณที่ต่ำ โดยซีรัมที่เป็นตัวมาตรฐานที่นิยมใช้ก็คือ fetal bovine serium (FBS) และมักใช้ที่ความเข้มข้น 5-20% โดยซีรัมมีประโยชน์ดังนี้ คือ

1) ซีรัมมีปัจจัยต่างๆมากที่สุดที่เซลล์ต้องการ เพื่อช่วยรักษาสภาพแวดล้อมและให้เซลล์เจริญได้เป็นอย่างดี

2) ซีรัมเป็นสารส่งเสริมการเจริญที่เป็นสากล (universal growth supplement) ซึ่งมีประสิทธิภาพกับเซลล์หลายๆชนิด จึงสามารถใช้อาหารที่มีซีรัมในการเลี้ยงเซลล์เพื่อช่วยให้ประหยัดเวลาในการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์

3) ซีรัมเป็นบัฟเฟอร์ (buffer) ต่อการเกิดการเปลี่ยนแปลงจากผลกระทบของสารพิษ เช่น การเปลี่ยน pH การมีไอออนของโลหะหนักเจือปน การมีสารย่อยโปรตีน (proteolytic activity) หรือ endotoxin เป็นต้น

การใช้ซีรัมก่อให้เกิดปัญหาที่ควรต้องคำนึงถึง เช่น ความปลอดภัย ความสามารถในการทำซ้ำได้ (reproducibility) และราคาของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากเซลล์สัตว์ ปัญหาเหล่านี้อาจลดลงได้โดยเลือกใช้และหาแหล่งของซีรัมที่ไว้ใจได้ หรือใช้อาหารที่ปราศจากซีรัมในการเลี้ยงเซลล์

2.3.5 การรักษาเซลล์เพาะเลี้ยง

การรักษาเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถทำได้โดย 1) การเปลี่ยนถ่ายอาหาร 2) การถ่ายเลี้ยงเซลล์ไปสู่ภาชนะเลี้ยงใหม่ (subculture) และ 3) การเก็บเซลล์แช่แข็ง

- การเปลี่ยนถ่ายอาหารและปัจจัยที่ควรพิจารณาเมื่อเปลี่ยนอาหารในเซลล์เพาะเลี้ยง

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสามารถส่งเสริมให้เซลล์เกิดการเจริญ มีเมตาโบลิซึมและเกิด differentiation สารอาหารที่เพาะเลี้ยงเซลล์ จะถูกใช้ไปหรือเสื่อมไปตามระยะเวลาการบ่มเลี้ยง ขณะเดียวกันก็ให้ metabolities สะสมอยู่ในสารละลายอาหาร จึงควรมีการเปลี่ยนอาหารเพื่อให้มีสภาพแวดล้อมเหมาะสม โดยทั่วไปการเปลี่ยนอาหารมีจุดประสงค์อยู่ 3 ประการคือ

1) เพื่อใส่สารอาหารที่จำเป็น หรือสารอาหารที่มีปริมาณขาดแคลนและจำเป็นต่อการกำลังเจริญและการผลิตสารของเซลล์

2) เพื่อกำจัดหรือเจือจาง metabolites ที่มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ หรือสารยับยั้งการเจริญของเซลล์ออกไป

3) เพื่อช่วยปรับระดับ pH ในสารละลายอาหารไม่ให้เป็นกรดมากไป

การเปลี่ยนอาหารควรมีความถี่ในการเปลี่ยนมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ อัตราการเจริญเติบโตและเมตาโบลิซึมของเซลล์ ความหนาแน่นของเซลล์ ชนิดของอาหาร และปริมาณแก๊สในสภาวะการเลี้ยง เช่น เซลล์ปกติสามารถอยู่ในช่วง GI ของวงจรเซลล์เมื่อสารให้การเจริญหมดและมีชีวิตรอดเป็นระยะเวลานาน 2-3 อาทิตย์ได้ โดยไม่มีผลเสียต่อเซลล์ ขณะที่ transformed cells, continuous cell lines และ embryonic cells บางชนิด จะถูกทำลายอย่างรวดเร็ว จึงต้องรีบเปลี่ยนอาหารเพื่อให้เซลล์อยู่รอด มีอัตราการเติบโต และเมตาโบลิซึมดังเดิม เช่น PS 388 เป็นเซลล์ที่เมตาโบลิซึมสูงกว่า HeLa cell และมีความต้องการอาหารใหม่ หลังจากการ subculture แล้ว 3 วัน ขณะที่เวลาการเปลี่ยนอาหารของ HeLa cell ควรทำหลังจาก subculture แล้ว 5-7 วัน นอกจากนี้ความหนาแน่นของเซลล์ที่จำนวนเซลล์สูงๆ มีความต้องการให้เปลี่ยนอาหารบ่อยกว่าที่ความหนาแน่นเซลล์น้อยๆ โดยทั่วไปการเปลี่ยนถ่ายอาหารในการเลี้ยงเซลล์เกาะผิวสามารถทำได้ง่ายๆ โดยดูดอาการเก่าออกแล้วแทนที่ด้วยอาหารใหม่ ส่วนการเปลี่ยนถ่ายอาหารแก่เซลล์แขวนลอย ต้องปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ เทอาหารเก่าทิ้ง แล้วใส่อาหารใหม่ ซึ่งการเปลี่ยนอาหารอาจทำโดย เปลี่ยนอาหารทั้งหมด หรือเปลี่ยนอาหารเป็นบางส่วน แต่การเปลี่ยนอาหารเป็นบางส่วนจะให้ผลที่ดีกว่า เนื่องจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงจะไม่ได้รับผลกระทบจากค่าที่เปลี่ยนแปลงไปมากจากความเข้มข้นของสารอาหารและpH โดยทั่วไปนิยมเปลี่ยนอาหารประมาณ 50% ของปริมาตรทั้งหมดในระยะเวลาทุกๆ 3-5 วัน วิธีการเปลี่ยนอาหารเช่นนี้เหมาะสมกับระบบเลี้ยงเซลล์ขนาดเล็กประมาณ 3-5 × 10^6 เซลล์/มล. แต่กรณีที่เซลล์มีการเติบโตรวดเร็ว อาจจำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารบ่อยๆ หรือเปลี่ยนอาหารทั้งหมดแทน ซึ่งการเปลี่ยนที่ต้องการความบ่อยครั้งมากเช่นนี้ ควรใช้ระบบการเปลี่ยนอาหารแบบต่อเนื่อง (continuous) แทน

อาหารใหม่ที่ใส่ในเซลล์เพาะเลี้ยงควรมีอุณหภูมิ pH และ osmolarity เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ อย่างไรก็ตามหากเซลล์มีความหนาแน่นสูง สารอาหารบางอย่างอาจลดลงได้ เช่น ซีรัม non-essential amino acids และ nucleosides นอกจากนี้อาหารที่เปลี่ยนเพื่อให้เซลล์มีการเจริญมักเป็นอาหารที่มีซีรัม 5-10% แต่อาหารที่เปลี่ยนเพื่อให้เซลล์มีเมตาโบลิซึม

และแสดงคุณสมบัติ differentiation มากขึ้น ควรเป็น maintenance medium ที่มีความเข้มข้มของซีรัมลดลงเหลือ 0.5-2% หรือ 0%

2.3.6 ปัจจัยที่ควรพิจารณาเมื่อเปลี่ยนอาหารในเซลล์เพาะเลี้ยง

2.3.6.1 pH ของสารละลายอาหาร การพิจารณาการเปลี่ยนแปลงโดยดูค่า pH เป็นวิธีที่นิยมมาก โดย pH ของอาหารเป็นค่าที่ขึ้นกับปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และกรดแลคติค ซึ่งมีผลให้ pH ลดลงเมื่อบ่มเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลานาน การเปลี่ยนอาหารควรเปลี่ยนเมื่อ pH ของสารละลายมีค่า 6.8 ซึ่งให้สีเหลือง-ส้ม โดยก่อนเปลี่ยนควรสังเกตดูปริมาณเซลล์ใต้กล้องด้วย เนื่องจากการฉีดให้ก๊าซคาร์บอนได้ออกไซด์ในตู้บ่มมากไปสามารถทำให้อาหารเป็นกรดได้ จึงควรตรวจดูให้แน่ใจว่าการทดลองของ pH เป็นผลจากเมตาโบลิซึมของเซลล์ที่เกิดจากการเจริญ เพื่อไม่ให้สิ้นเปลืองการเปลี่ยนอาหารโดยไม่จำเป็น

2.3.6.2 สารยับยั้งการเจริญ เมตาโบลิซึมของเซลล์เพาะเลี้ยง ทำให้เกิดสารที่มีพิษต่อเซลล์ เช่น กรดแลคติก และแอมโมเนีย สะสมอยู่ในสารละลายอาหาร เซลล์แต่ละชนิดมีเมตาโบลิซึมแล้วเกิดสารพิษในปริมาณที่แตกต่างกัน การเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดควรหาสารยับยั้งที่เซลล์มีความไวมากที่สุด และความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดการยับยั้งในแต่ละชนิดอาหารและสภาวะการเลี้ยง เพื่อหลีกเลี่ยงการสะสมของสารพิษถึงจุดที่อาจเป็นอันตรายต่อเซลล์ โดยการเปลี่ยนอาหารเพื่อเจือจางสารยับยั้งนั้นๆให้มีปริมาณลดลง

2.3.6.3 สารจำเป็นต่อการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยง สารที่จำเป็นต่อการเติบโตและการเกิดเมตาโบลิซึมของเซลล์มีหลายอย่าง การขาดแคลนสารอาหารชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะกรดอะมิโน ทำให้เซลล์ขาดการนำสารอาหารเข้าเซลล์อย่างเหมาะสม และเกิดเมตาโบลิซึมได้ไม่ดี ทั้งๆที่สารอาหารอื่น เช่น กลูโคสยังมีปริมาณเพียงพอ ดังนั้นเพื่อให้เกิดการเจริญและการมีเมตาโบลิซึมที่ดี จึงควรเติมอาหารเฉพาะสารที่ขาดแคลน เพื่อหลีกเลี่ยงการเปลี่ยนอาหารอย่างสิ้นเปลือง

2.3.6.4 ลักษณะรูปร่างของเซลล์ ลักษณะที่ผิดปกติของเซลล์ เช่น การมีแกรนนูล (granule) รอบๆนิวเคลียส การมีอากาศในไซโตพลาสซึม (vacuolation) การเปลี่ยนรูปร่างเซลล์เป็นทรงกลมและไม่เกาะผิว เป็นลักษณะที่ใช้บ่งบอกความต้องการการเปลี่ยนอาหารได้เช่นกัน

ซึ่งลักษณะดังกล่าวอาจเกิดจากการมีสารอาหารไม่เพียงพอ การมีสารพิษสะสม หรือมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในเซลล์ การเปลี่ยนถ่ายอาหารอย่างสิ้นเปลือง

2.3.7 การถ่ายเลี้ยงเซลล์ไปสู่ภาชนะเลี้ยงใหม่

เป็นวิธีการรักษาเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีทั้งข้อดีและข้อเสีย โดยเซลล์เริ่มต้นที่ถ่ายสู่ภาชนะเลี้ยงใหม่ อาจมีการนับเซลล์ให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นแน่นอน เช่น กรณีการถ่ายเลี้ยงเซลล์ไปสู่ภาชนะเลี้ยงจำนวน 2-3 ภาชนะ ซึ่งจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ควรมีความหนาแน่นเซลล์น้อยๆ ที่กระตุ้นให้เซลล์เกิดการเจริญแบ่งตัวโดยมี lag phase สั้นๆ และเข้าสู่ช่วง log phase ได้เร็ว (มี population doubling time สั้นๆ) และเข้าสู่ช่วงสูงสุดของ log phase ในช่วงเวลาเหมาะสมต่อการเลี้ยงเซลล์ (subculture) ครั้งต่อไปได้ นั่นคือ ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นของเซลล์ประเภท finite line ควรเป็น 1×10^{4}-5×10^{4} เซลล์/มล. และกรณีเป็นเซลล์ที่บอบบาง ควรมีความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นเป็น 10^{5} เซลล์/มล.เป็นต้น หรืออาจถ่ายเลี้ยงเซลล์โดยวิธีใช้เซลล์เริ่มต้นจากหนึ่งภาชนะ (โดยไม่ได้นับเซลล์) ไปกระจายสู่ภาชนะเลี้ยงหลายๆภาชนะ ด้วยอัตราส่วนของเซลล์เริ่มต้นเท่าๆกัน (split ratio) ซึ่งเป็นวิธีการเพาะเลี้ยงที่ต้องการให้มีเซลล์ในแต่ละภาชนะเลี้ยงเหมือนๆกัน ซึ่งเหมาะกับการทดลองที่ต้องการ replicate sample การเจือจางเซลล์เริ่มต้นให้สามารถถ่ายเลี้ยงสู่ภาชนะใหม่เป็น 2, 4, 8 หรือ 16 ภาชนะ (หรือจำนวนเท่า) มีประโยชน์ต่อการหาอายุของเซลล์

ตารางที่ 2.2 ข้อดี-ข้อเสียของการ subculture

ข้อดี	ข้อเสีย
-เซลล์มีการเจริญได้จำนวนเซลล์มากขึ้น -เซลล์มีชนิดเดียวเป็นhomogeneity เมื่อทำโคลนนิ่ง -การกระจายเซลล์ให้ได้เซลล์ที่เป็น replicate sample	-เกิดการคัดเลือกเซลล์ที่เจริญรวดเร็วและสูญเสียคุณสมบัติ differentiation -เซลล์มีพันธุกรรมไม่คงที่ และเกิดความเสียหายจากการ subculture -เซลล์มีอายุหรือความสามารถในการถ่ายเลี้ยงลดลง

2.4 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นวิธีการใช้เซลล์หลายๆชนิดไปทดสอบกับสาร แล้ววัดความมีชีวิตหลายๆวิธีเพื่อการประเมินความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ ซึ่งมักนำไปประยุกต์ใช้ในงานคัดกรอง (screening) หาสารที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งจากสารตัวอย่างหลายๆชนิด หรือประเมินความปลอดภัยของสารที่เป็นองค์ประกอบต่างๆในยา เครื่องสำอาง สารปรุงแต่งอาหาร ยาฆ่าแมลง สารเคมีทางอุตสาหกรรม และสารเคมีปนเปื้อนในสภาพแวดล้อมได้ เดิมการตรวจสอบความเป็นพิษของสารเหล่านั้นสามารถทำกับสิ่งมีชีวิตหรือเซลล์สัตว์ แต่ปัจจุบันเซลล์สัตว์เป็นแบบจำลองที่เริ่มเป็นที่นิยมใช้มากขึ้นแทนสัตว์ทดลอง ทำให้การประเมินความเป็นพิษของสารทำได้รวดเร็วและสูญเสียค่าใช้จ่ายในการพัฒนายาหรือผลิตภัณฑ์ลดลง การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์จึงมีการใช้กันมากในงานทดสอบการรักษาโรคมะเร็งทางเคมี หรือมะเร็งเคมีบำบัด (cancer chemotherapy) และใช้ในงานวิเคราะห์ความปลอดภัยของสารเคมีต่างๆต่อเซลล์หรือสารในสภาพแวดล้อม รวมทั้งใช้ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารเคมีในด้านการเกิดการกลายพันธุ์ (mutagenicity) การเกิดมะเร็ง (carcinogenicity) การเกิดความเป็นพิษเรื้อรัง (chronic toxicity) และการเกิดความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) ได้

2.4.1 ความเป็นพิษต่อเซลล์

ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) เป็นเหตุการณ์ที่ซับซ้อน และมีหลายปัจจัยเกี่ยวข้อง ดังนั้นในการวิเคราะห์ความเป็นพิษด้วยเซลล์สัตว์ จึงต้องทราบข้อมูลพื้นฐาน เช่น คุณสมบัติของสารขณะสัมผัสกับเซลล์ทดสอบ กลไกการเปลี่ยนแปลงของสารในร่างกาย หรือกลไกการออกฤทธิ์ของสารพิษ ชนิดและปริมาณของเซลล์ที่เป็นเซลล์เป้าหมาย ความเข้มข้นของสารและระยะเวลาสัมผัสจริงในธรรมชาติ ทั้งนี้เพื่อให้การวิเคราะห์ใกล้เคียงสภาวะความเป็นจริงในสิ่งมีชีวิต และได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความน่าเชื่อถือ และเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ได้ โดยวิธีวิเคราะห์ควรมีลักษณะดังนี้คือ

1) ระบบวิธีวิเคราะห์ต้องให้กราฟความสัมพันธ์ของการตอบสนองต่อปริมาณสารทดสอบ (dose response curve) ที่เป็นผลซ้ำของการวิเคราะห์ (reproducible) โดยข้อมูลจากผลซ้ำควรมีความแตกต่างกันน้อยมากในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา

2) ช่วงวิกฤติที่เลือกต่อการตอบสนอง (selected response criterion)ต้องมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับจำนวนเซลล์

3) ข้อมูลที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์ของการตอบสนองต่อปริมาณสารทดสอบ ต้องมีความสอดคล้อง และสามารถทำนายผลของสารทดสอบชนิดเดียวกันในสัตว์ทดลองได้

ด้วยเหตุนี้ การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงต้องเลือกชนิดเซลล์ไลน์ที่นำมาทดสอบให้เหมาะสมและควรเป็นเซลล์เป้าหมายที่แท้จริง เนื่องจากเซลล์ต่างชนิดกันอาจตอบสนองแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ไม่เหมือนกัน อีกทั้งระดับความเป็นพิษอาจแตกต่างกัน เช่น เซลล์อาจถูกทำให้ตายหรือถูกทำให้มีเมตาโบลิซึมเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นในการวิเคราะห์หายาต้านมะเร็งเป็นการหายาที่ทำลายเซลล์มะเร็งให้ตาย โดยไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ ส่วนการวิเคราะห์สารอื่นๆอาจต้องการผลให้มีการเปลี่ยนแปลงเมตาโบลิซึมของเซลล์เท่านั้น ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์จึงต้องเป็นวิธีที่สะท้อนให้ผลที่ต้องการได้อย่างถูกต้อง อย่างไรก็ตาม ลักษณะความเป็นพิษที่แตกต่างกัน อาจมีกลไกการออกฤทธิ์และให้ผลของฤทธิ์ยาแตกต่างกัน จึงต้องมีวิธีที่แตกต่างกันในการศึกษา โดยจุดยุติ (end point) ของแต่ละวิธีเป็นค่าที่บอกระดับความเสียหายที่เกิดกับเซลล์หลังการบ่มกับสารทดสอบ และวิธีการวัดที่จุดยุติในการตรวจสอบความเป็นพิษของเซลล์มีหลายวิธี เช่น 1)การวัดสีเคมีด้วย crystal violets หรือ sulphorhodamine ที่จะจับจำเพาะกับองค์ประกอบของเซลล์ ด้วยการวัดองค์ประกอบที่เหลือของเซลล์หลังการบ่มกับสารทดสอบ 2)การวัดองค์ประกอบของเซลล์ที่หลั่งออกมาหลังการบ่มกับสารทดสอบ เช่นการตรวจหาปริมาณเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) 3)การวัดกิจกรรมเมตาโบลิซึมของเซลล์ ด้วยการวัดการลดลงของสีจากการใช้เกลือ tetrazolium เช่น [4,5-dimethyl(thiazol-2-yl)-3,5-diphenyl] tetrazolium bromide (MTT); 3-(4,5-dimethylthaizol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-*2H*-tetrazolium,inner salt (MTS) และ sodium [2,3-bis [2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide, inner salt (XTT) 4)วัดการหลั่งให้สารรังสีที่ใส่ให้เซลล์ก่อนบ่มกับสารทดสอบ ซึ่งมีการหลั่งเนื่องจากการแตกของเซล์ 5)การวัดดีเอนเอที่เสียหายหลังการบ่มกับสารทดสอบที่มีผลต่อพันธุกรรมด้วยวิธี micronucleus assay หรือใช้ flow cytometer เป็นต้น โดยทั่วไป วิธีวัดการแบ่งตัวของเซลล์ เป็นวิธีที่มีความไวในการตรวจความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าวิธีการวัดเมตาโบลิซึม และวิธีการวัดการสูญเสียหน้าที่ของเมมเบรนตามลำดับ ตัวอย่างเช่น ค่าการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอนเอของเซลล์ fibroblast ที่ 50% จะมีค่าต่ำกว่าค่าการหลั่งให้ LDH ที่ 50% เป็นต้น

ดังนั้น จุดยุติจึงใช้บอกสถานะของเซลล์ที่ศึกษาแต่ค่าจึงมีความหมายหรือผลกระทบต่อเซลล์ไม่เหมือนกัน ซึ่งควรพิจารณาเลือกใช้ให้เหมาะสมในการระบุบอกความเป็นพิษของสารนั้นๆได้ถูกต้อง

ความสำเร็จของการวิเคราะห์ที่ใช้เซลล์ นอกจากต้องคำนึงถึงจุดยุติแล้ว วิธีการทดสอบควรได้มาตรฐาน คือเซลล์ควรมีคุณภาพดี มีหลากหลายชนิดและเป็นเซลล์ที่อยู่ในช่วงการเจริญดี สามารถตอบสนองต่อสารให้จุดยุติอย่างเหมาะสม นอกจากนี้ ภาชนะเลี้ยงและอาหารควรไม่มีสารที่ก่อให้เกิดความแตกต่างกันได้ และควรให้เซลล์เจริญได้ดีเหมือนกัน โดยไม่รบกวนผลหรือความไวในวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้ และอาหารควรเป็นชนิดปราศจากซีรัม เพื่อไม่ให้ความแตกต่างของซีรัมมารบกวนการทดสอบได้ นอกจากนี้ วิธีการจัดการกับข้อมูลก็ควรเป็นมาตรฐานเช่นกัน อย่างไรก็ตาม สารก่อความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxins) อาจให้ผลแบบผันกลับ (reversible) หรือไม่ผันกลับ (irreversible effect) และการออกฤทธิ์ให้ได้ผลดังกล่าวอาจเกิดขึ้นทันที หรือใช้ระยะเวลานานเป็นสัปดาห์ ดังนั้น ระดับความเป็นพิษต่อเซลล์จึงแบ่งออกได้เป็น 3 รูปแบบใหญ่ๆ คือ 1)ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่เกิดจากการทำลายทางกายภาพเคมี (physical-chemical damage) ที่มีผลให้เซลล์ตายทันที 2)ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ออกฤทธิ์ต่อเมตาโบลิซึมของเซลล์ และมักออกฤทธิ์ในช่วงเวลา 2-3 ชั่วโมงหรือเป็นวัน และ 3)ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถแบ่งตัว เช่น การเกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งไม่ปรากฏให้เห็นการลดความมีชีวิตของเซลล์ได้อย่างชัดเจน

2.4.2 ประโยชน์และข้อจำกัด

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงมีประโยชน์ คือ ทำให้สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมที่ทำการวิเคราะห์ได้ เช่น ความเข้มข้นของสารพิษและระยะเวลาที่สัมผัสกับสารพิษ ซึ่งในเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถควบคุมได้แม่นยำมากกว่าในสัตว์ทดลอง (แม้ว่าสารทดสอบบางตัวอาจจะมีความไม่เสถียร) เนื่องจากในสัตว์ทดลองมีระบบหมุนเวียนระบบขับถ่าย กำจัดสารพิษหรือสารทดสอบจึงทำให้การควบคุมปัจจัยที่ศึกษาได้ยาก นอกจากนี้การใช้เซลล์เพาะเลี้ยงยังเอื้อประโยชน์ต่อการเก็บตัวอย่างได้สม่ำเสมอ และให้ผลทดลองเหมือนเดิมได้เมื่อทำซ้ำ ส่วนการเก็บตัวอย่างจากสัตว์เพื่อศึกษาไม่สามารถทำได้สม่ำเสมอ เช่น ปริมาณเลือดอาจไม่เพียงพอ หรือสภาวะทางกายภาพของสัตว์ทดลองไม่เหมาะสมกับการเก็บตัวอย่าง โดยการตรวจสอบความเป็นพิษด้วยเซลล์สัตว์ยังมีประโยชน์อื่นอีก คือ 1)เกิดความคุ้มทุนจากการทดสอบ

เมื่อใช้เซลล์สัตว์ ซึ่งมีความประหยัดกว่าการใช้สัตว์ทดลอง 2) การทดลองความเป็นพิษในสัตว์ทดลองมีข้อจำกัด อันเนื่องมาจากเมตาโบลิซึมในคนและสัตว์ทดลองมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันน้อย และในสัตว์แต่ละสายพันธ์ (species) ก็ยังมีความแตกต่างกันมาก ทำให้ข้อมูลผลการวิเคราะห์ที่ได้จากสัตว์ทดลองมีความแตกต่างจากในคน และไม่สามารถนำผลข้อมูลไปประยุกต์ใช้ได้ดี และ 3) ทำให้การใช้สัตว์ทดลองลดลง ดังนั้นการใช้ระบบเซลล์เพาะเลี้ยงในการทดสอบความเป็นพิษ จึงสามารถใช้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ชัดเจน ใช้สารทดสอบและเวลาน้อย สามารถทำได้ง่าย ประหยัดสารและเวลา และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานทดสอบสารปริมาณมากๆ หรือสารหลายๆชนิดได้ (large scale screening)

อย่างไรก็ตาม เซลล์เพาะเลี้ยงไม่ได้อยู่ในสภาพแวดล้อมจริงตามธรรมชาติ แต่สภาวะการทดลองที่มีเซลล์ชนิดเดียว ทำให้ไม่สามารถศึกษากลไกของยา (pharmacokinetics) ตั้งแต่การรับยา ระยะเวลาและความเข้มข้นของยาที่ออกฤทธิ์ การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของยา เมตาโบลิซึม การแทรกซึมในเนื้อเยื่อ การกำจัดยาออกจากเนื้อเยื่อ และการขับยาออกจากร่างกาย นอกจากนี้เซลล์เพาะเลี้ยงยังขาดปฏิสัมพันธ์กันกับเซลล์ชนิดอื่นที่มีในระบบอวัยวะ หรือในร่างกายของสัตว์ ซึ่งอาจให้ผลการศึกษาต่างกัน เช่น สารบางชนิดอาจไม่เป็นพิษในสัตว์ทดลอง หรือ สารที่ไม่เป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยง อาจก่อความเป็นพิษหลังจากการเกิดเมตตาโบลิซึมในตับได้ ดังนั้นข้อจำกัดของการใช้เซลล์สัตว์ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงควรใช้เซลล์ทดสอบที่มีคุณสมบัติเหมือนเซลล์ในร่างกาย ซึ่งอาจแก้ไขได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับ activated hepatocytes หรือใช้เซลล์ปฐมภูมิ

2.4.3 **วิธีวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์**

การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ จะเกี่ยวข้องกับวิธีการที่เซลล์สัมผัสสารทดสอบ ระยะเวลาการสัมผัสสาร และความเสถียรของสารทดสอบซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ใช้กำหนดจุดยุติในการทดสอบ โดยความเป็นพิษจะระบุจากการวัดค่าจุดยุติเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จาก positive control และ negative control วิธีการวิเคราะห์ความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยงแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ 1) ประเภทที่ให้ผลกับสารทดสอบอย่างฉับพลัน หรือมีการตอบสนองต่อสารทดสอบภายในระยะเวลาสั้นๆ เช่น มีการตอบสนองภายในระยะเวลา 5 นาที – 48 ชม. (immediate or short term response) การวิเคราะห์ความเป็นพิษประเภทนี้ มักนิยมใช้วิธีการตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์หลังการบ่มในการระบุถึงความเป็นพิษ หรือใช้ความมีชีวิต/ไม่มีชีวิตที่เกี่ยวข้องกับ

เมมเบรนของเซลล์เป็นจุดยุติ อาจวัดจากการหลั่งออกของ neutral red หรือการตายของเซลล์ด้วย trypan blue และ 2) ประเภทที่ให้ผลการตอบสนองกับสารทดสอบภายในระยะเวลานานกว่า เช่น ระยะเวลานาน 4-7 วัน (long term assay) การวิเคราะห์นี้สามารถทำโดยวัดความสามารถเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์ หรือวัดเมตาโบลิซึมของเซลล์เป็นจุดยุติได้ อย่างไรก็ตาม ระยะการสัมผัสสารทดสอบในสิ่งมีชีวิตมักจะสั้นน้อยกว่า 30 นาที เช่นตาจะหลั่งน้ำตาเพื่อขับสารทดสอบออกในระยะสั้นๆ ดังนั้น การตรวจสอบความเป็นพิษของเซลล์ตา หรือ เซลล์เยื่อบุควรใช้เวลาสัมผัสสารนานน้อยกว่า 30 นาที เป็นต้น

2.4.3.1 **Short –Term Assay** เป็นวิธีที่นิยมใช้วัดสัดส่วนความมีชีวิตของเซลล์หลังผ่านกระบวนการซึ่งอาจก่อการบาดเจ็บกับเซลล์ เช่น การบดแยกเซลล์ในการทำเซลล์ปฐมภูมิ และการละลายเซลล์แช่แข็ง วิธีนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับเซลล์ได้ทุกชนิดในการวิเคราะห์หาตัวยาที่ออกฤทธิ์ เช่น เซลล์จากเนื้อเยื่อมะเร็งที่ผ่าตัดออกจากคนไข้ ก็สามารถใช้วิธีนี้ในการวิเคราะห์ได้เช่นกัน เนื่องจากการทดสอบโดยวิธีนี้ ไม่ต้องการการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้เกิดการเจริญ ดังนั้นความสามารถเจริญของเซลล์จึงไม่ใช่ข้อจำกัด และปัญหาการเกิดการคัดเลือกโคลน (clone) ก็ลดลง วิธีการทดสอบนี้จึงสะดวก ทำได้ง่ายและให้ผลรวดเร็ว โดยการตรวจดูผลของสารทดสอบที่ทำลายเซลล์เมมเบรนซึ่งใช้ในการบ่งบอกความเป็นพิษต่อเซลล์

วิธีวิเคราะห์ที่ใช้ตรวจสภาพการเป็นเนื้อเดียว (integrity) ของเซลล์เมมเบรน มีทั้ง dye inclusion และ dye exclusion ที่นิยมใช้กันมากในการทำ dye exclusion test คือ trypan blue ซึ่งเซลล์มีชีวิตสามารถป้องกันไม่ให้สีเข้าไปภายในเซลล์ เซลล์ตายจึงติดสีฟ้าของ trypan blue วิธีนี้สามารถบอกความมีชีวิตของเซลล์ในขณะที่ทำการวิเคราะห์อยู่เท่านั้น เพราะเป็นการตรวจสอบดูความสมบูรณ์ของเมมเบรน ซึ่งอาจทำให้ผลการประเมินความมีชีวิตผิดพลาดได้ เนื่องจากอาจมีการทำลายที่ทำให้เซลล์ตายเกิดขึ้นภายหลังกับเซลล์ที่ผ่านการตรวจว่า “มีชีวิต” แล้วได้ นอกจากนี้ยังไม่สามารถตรวจสอบผลของสารทดสอบ ที่ออกฤทธิ์ช้าหรือใช้เวลานาน (delayed cytotoxicity)

1) **Dye exclusion** เป็นวิธีวัดการติดสีและไม่ติดสีของเซลล์ที่แขวนลอยในสารละลายสีย้อม ซึ่งอาจเป็น trypan blue, eosin y, nigrosin (green), erythrosine B, fast green หรือ naphthalene black สีย้อมประเภทนี้จะมีผลให้เซลล์มีชีวิตไม่ติดสี และเมื่อนำมาคำนวณค่าความมีชีวิตของเซลล์เทียบกับเซลล์ทั้งหมดเปอร์เซ็นต์ จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ที่เป็นผลมาจากสารทดสอบได้

2) Dye inclusion เป็นวิธีที่ตรงกันข้ามกับ dye exclusion นั่นคือ เซลล์มีชีวิตมีการนำสีเข้าเซลล์ได้ในขณะที่เซลล์ตายไม่นำสีเข้า เช่น neutral red และ diacetyl fluorescein ดังนั้นในการตรวจสอบความเป็นพิษ จะต้องหาปริมาณสีที่เซลล์นำเข้าก่อนการบ่มกับสารทดสอบ เพื่อให้ได้ข้อมูลของเซลล์ที่สภาวะปกติ และเมื่อบ่มเซลล์กับตัวอย่าง จะตรวจเซลล์ที่เหลือรอดโดยดูการทำลายเซลล์เมมเบรนที่ให้สีออกมาจากเซลล์มีชีวิต เพื่อประเมินผลของความเป็นพิษของสารทดสอบได้ อย่างไรก็ตาม neutral red เป็นพิษต่อเซลล์หลายชนิด จึงต้องตรวจหาระดับความทนทานของเซลล์แต่ละชนิดต่อ neutral red ก่อน ซึ่ง neutral red เป็นสีที่วัดความมีชีวิตของเซลล์โดยสีจะมีประจุน้อยๆที่ pH ประมาณ 7 จึงสามารถผ่านเมมเบรนเข้าสู่เซลล์ได้ แต่ lysosome จะมี pH ต่ำกว่าไซโตพลาสซึมมาก ทำให้เกิด pH gradient และทำให้ neutral red ที่เข้า lysosome มีประจุแล้วไม่เคลื่อนที่อิสระออกสู่ไซโทพลาสซึม ดังนั้น การสูญเสีย pH gradient ที่มาจากการตายของเซลล์จะทำให้มีการหลั่ง neutral red ออกมา ด้วยเหตุนี้ การวัดการรับเข้า neutral red จะเป็นการวัดความมีชีวิตของเซลล์ ในขณะที่การหลั่ง neutral เป็นการวัดการตายของเซลล์ได้

ส่วนสีย้อม diacetyl fluorescein สามารถนำมาใช้ในวิธี dye inclusion ได้เช่นกัน โดยเซลล์มีชีวิตสามารถนำ diacetyl fluorescein เข้าเซลล์ แล้ว esterase จะตัดหน่วย acetate ให้ได้ fluorescein ที่ไม่แพร่ออกนอกเซลล์ ทำให้เห็นเซลล์มีชีวิตเรืองแสงสีเขียวขณะที่เซลล์ตายไม่ติดสี หรืออาจประยุกต์ใช้สีย้อมเซลล์ตาย เช่น propidium iodine ร่วมด้วย ซึ่งทำให้เซลล์เป็น-เซลล์ตาย ติดสีต่างกัน นั่นคือใช้สีผสมระหว่าง propidium iodine และ diacetyl flurescein จะทำให้เซลล์มีชีวิตติดสีเขียวเรืองแสง ส่วนเซลล์ตายจะติดสีแดงเรืองแสง

2.4.3.2 Long-Term Assay สารพิษหรือสารทดสอบบางชนิดไม่ได้มีฤทธิ์ทำให้เซลล์ตาย แต่อาจเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของเซลล์ หรือรบกวนวงจรเซลล์ (cell cycle) ซึ่งไปมีผลให้รูปแบบการเจริญของเซลล์ผิดไป ผลที่เกิดเช่นนี้สามารถบ่งบอกได้ โดยดูการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับการหายใจ (respiration) การเกิดไกลโคไลซิส (glycolysis) การออกฤทธิ์ของเอนไซม์ (enzyme activity) วงจรเซลล์ (cell cycle) ความสามารถสร้างโคโลนี และผลของ DNA หรือพันธุกรรม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสิ่งเหล่านี้ในเซลล์ สามารถใช้บ่งบอกการตอบสนองของเซลล์ต่อสารพิษได้ การตรวจความอยู่รอดของเซลล์ (cell survival) มักทำได้ค่อนข้างยาก แต่ถ้าหากเปรียบเทียบความอยู่รอดเป็นความสามารถสร้างโคโลนีของเซลล์ ก็อาจใช้วิธี colony efficiency เป็นวิธีวิเคราะห์ได้ โดยเฉพาะเมื่อเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นสามารถแบ่งตัวต่อได้อีกอย่างน้อย 2-3 ครั้ง หลังจากที่นำสารทดสอบออกไป ดังนั้น long-term assay จึงเป็นวิธีที่วัดผลของสารพิษในระยะ

ยาว ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถวิเคราะห์การออกฤทธิ์ของสารแบบผันกลับ และใช้บ่งบอกถึงความสามารถฟื้นกลับคืนได้ของเซลล์ โดยการวัดความสามารถเจริญและการเกิดเมตาโบลิซึมของประชากรเซลล์ทั้งหมด

2.4.3.2.1 Plating efficiency

เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการบอกความสามารถอยู่รอดและการเจริญของเซลล์ หากเซลล์มีประสิทธิภาพในการเกาะเจริญได้เป็นโคโลนี (plating efficiency) อย่างไรก็ตาม เซลล์ส่วนใหญ่มี plating efficiency ต่ำ โดยเฉพาะ normal cell นอกจากนี้เซลล์มักให้จำนวนโคโลนีลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารพิษมากขึ้น จึงต้องชดเชยโดยใส่เซลล์เริ่มต้นให้มากขึ้น เพื่อให้จำนวนโคโลนีที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นมีจำนวนใกล้เคียงกัน ทั้งนี้เพื่อลดอิทธิพลความเสี่ยงจากความหนาแน่นเซลล์ต่อการอยู่รอด และเพื่อให้ได้ค่าทางสถิติที่เชื่อถือได้ นอกจากนี้ อาจเลี้ยงเซลล์ในที่มี feeder layer (ที่ความหนาแน่น 5×10^3 เซลล์/ซม^2) เพื่อให้เกิดโคโลนี หากเซลล์มี plating efficiency น้อยกว่า 100%

2.4.3.2.2 Microtitration Assay

การใช้ถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ทำให้ได้ตัวอย่างซ้ำ ๆ (replicate sample) ในเซลล์เพาะเลี้ยง วิธีนี้เป็นวิธีประหยัด ทำให้ใช้เครื่องมืออัตโนมัติและให้ผลที่เชื่อถือได้ ถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) เป็นวิธีที่นิยมที่สุด เนื่องจากมีพื้นที่การเจริญของเซลล์ในแต่ละหลุม เป็น 28-32 ตารางมิลลิเมตร มีความจุปริมาตรอาหารในแต่ละหลุมเป็น 0.1-0.2 มล. และสามารถให้เซลล์ถึง 10^5 เซลล์ต่อหลุม

วิธีนี้สามารถใช้หาจำนวนโคโลนี ปริมาณแอนติบอดี ปริมาณไวรัสและยา รวมทั้งสามารถประยุกต์ใช้วิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารพิษได้ ในที่นี้ทำโดยบ่มเซลล์ที่มีการเจริญในช่วง log phase กับสารที่มีความเข้มข้นต่างๆ และตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์โดยวัดการนำเข้าของ [^{35}S]-methionine หรือการลดลงของสี MTT ซึ่ง MTT assay เป็นวิธีที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบันในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ โดย MTT (tetradizolium) เป็นสีย้อมสีเหลืองที่ละลายน้ำได้และสามารถเปลี่ยนเป็นตะกอนสีม่วง formazan โดยเซลล์มีชีวิต

หลักการ MTT-Base Cytotoxicity Assay

เซลล์ที่มีการเจริญในช่วงการแบ่งตัวทวีคูณ มีความเหมาะสมในการตรวจสอบฤทธิ์ของสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ช่วงระยะเวลาที่เซลล์สัมผัสสารพิษ คือ เวลาที่ทำให้เกิดการ

ทำลายสูงสุด ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความเสถียรของสาร หลังจากนำสารทดสอบออกจะปล่อยให้เซลล์มีการเจริญ แล้ววัดความมีชีวิตของเซลล์โดยใส่อาหารที่มี MTT ในแต่ละหลุมแล้วบ่มในที่มืดเพื่อให้เกิดความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ยังคงมีชีวิตและมีความสามารถเจริญ กับเซลล์ที่ยังคงมีชีวิตและไม่สามารถเจริญ จำนวนเซลล์ที่รอดสามารถบอกโดยวิธีอ้อมจากการลดลงของ MTT ซึ่งคือปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้น และเมื่อละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น DMSO ก็จะสามารถวัดปริมาณสีได้โดย spectrometer อย่างไรก็ตาม สารทดสอบใดที่มีผลให้มีเอนไซม์ succinate dehydrogenase หรือ mitochondria dehydrogenase มีฤทธิ์มากจะทำให้มีสีเกิดขึ้นมากเช่นกัน ดังนั้น สารทดสอบบางตัว หากมีคุณสมบัติเป็น surfactant อาจทำให้สารตั้งต้นเข้าสู่เซลล์มากโดยเซลล์ไม่แตก ซึ่งจะมีผลให้ค่าความมีชีวิตของเซลล์โดยวิธีวิเคราะห์นี้สูงเกินจริงได้

2.4.3.2.3 Metabolic Test

ความแตกต่างระหว่าง metabolic test และ survival test คือ survival test เป็นการตรวจหาจำนวนเซลล์และกิจกรรมของเซลล์ (cellular activity) ที่ยังหลงเหลือหลังจากการรับสารเป็นช่วงระยะเวลาสั้นหรือระยะเวลานาน แล้วให้เซลล์ฟื้นตัวในที่ไม่มีสารทดสอบเป็นระยะเวลานานพอสมควร สิ่งที่วัดได้จึงเป็นความสามารถอยู่รอดของเซลล์ที่ยังคงความสามารถแบ่งตัวต่อไป ส่วน metabolic test เป็นวิธีตรงที่วัดผลของสารทดสอบต่อวิธีเมตาโบลิซึม ซึ่งควรวัดทันทีหรือภายใน 24 ชั่วโมงแรกที่ทดสอบกับสาร และผลที่ได้จะเป็นเมตาโบลิซึมของเซลล์ต่อสารทดสอบวิธีวิเคราะห์เมตาโบลิซึมมีหลายวิธี ตั้งแต่วิธีง่ายๆโดยการสังเกตการณ์ยับยั้งการลดลงของ pH จนถึงวิธีที่ต้องใช้สารติดตามหรือการตรวจหาฤทธิ์เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ของเซลล์ ซึ่งอาจใช้เวลาทดสอบสั้นๆ (ประมาณ 30 นาทีหรือมากกว่า) หรือระยะเวลาทดสอบเป็นเวลาหลายวัน นอกจากนี้ควรตระหนักว่าหากต้องการวัดผลของฤทธิ์สารต่อเมตาโบลิซึม จะต้องทำการวิเคราะห์ในที่มีสารทดสอบ และหากต้องการศึกษาผลต่อการรอดของเซลล์แบบไม่ผันกลับ (irreversible effect) และผันกลับได้จะต้องทำการวิเคราะห์โดยเลี้ยงเซลล์ต่อในที่ที่ไม่มีสารทดสอบด้วย ซึ่งหากเซลล์มีหน้าที่ปกติหลังการทดสอบนาน 48 ชั่วโมง จะใช้บอกการฟื้นตัวของเซลล์หรือการผันกลับได้ โดยเซลล์ที่ไม่ตาย และฟื้นตัวได้ จะสามารถสร้างเอนไซด์ต่อไป

2.4.4 ข้อควรพิจารณาเกี่ยวกับวิธีวิเคราะห์

ต้องเข้าใจตัวแปรแต่ละตัวในการวิเคราะห์อย่างชัดเจน เพื่อให้ได้ผลที่เชื่อถือได้ ซึ่งมีข้อควรพิจารณาทั่วๆไปที่ต้องคำนึงถึงดังนี้

การดูดซับของสาร สารประกอบบางชนิดอาจจับบนตัวกรองที่ผ่านการทำไร้เชื้อทั่วๆไป ของ cellulose nitrate หรือ cellulose acetate ดังนั้นการทำไร้เชื้อด้วยตัวกรอง จะต้องทำภายใต้สภาวะควบคุมและตรวจสอบการสูญเสียสารทดสอบจากการกรองด้วย การใช้ตัวกรองที่มีความสามารถจับโปรตีนได้น้อย จึงมักเป็นที่ต้องการ อย่างไรก็ตาม สารประกอบบางชนิดอาจจับกับโปรตีนในซีรัม และทำให้ความเข้มข้นลดลง จึงควรพิจารณาใช้อาหารปราศจากซีรัมในการทดสอบ นอกจากนี้สารประกอบบางชนิดอาจจับบนพลาสติกของภาชนะเลี้ยงได้เช่นกัน

การตกตะกอน การตกตะกอนของสารทดสอบที่เป็นสารตัวอย่าง อาจทำให้การวิเคราะห์ไม่ได้ผล การเกิดตะกอนทำให้เจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) ไม่ได้ค่าถูกต้องและมีค่าลดลง ซึ่งอาจมีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ ดังนั้นจึงควรเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น DMSO, ethanol, propylene glycol และควรใช้ที่ความเข้มข้นที่ไม่ก่อความเป็นพิษกับเซลล์ด้วย

การกระตุ้นฤทธิ์สารเคมี สารหลายชนิดไม่ได้เป็นพิษโดยตัวมันเอง แต่อาจก่อความเป็นพิษเมื่อได้รับการกระตุ้นภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

ความเข้มข้นของสารละลาย ในการตรวจสอบฤทธิ์ของสารทดสอบครั้งแรก ควรใช้ความเข้มข้นสารทดสอบเป็นช่วงกว้าง และมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ เช่น 10^{-6}M, 10^{-5}M, 10^{-4}M, 10^{-3}M และค่อยใช้ความเข้มข้นช่วงแคบๆ จากผลการทดสอบครั้งแรกมาทำการทดสอบครั้งต่อไป

สารทดสอบที่ไม่เปลี่ยนแปลงความเข้มข้น การทดสอบบางสภาวะไม่แปรตามความเข้มข้นได้ เช่น การทดสอบคุณภาพอาหาร น้ำ หรือพลาสติก ในกรณีเช่นนี้ อาจแปรความเข้มข้นของซีรัมแทน เพราะซีรัมอาจปิดบังฤทธิ์ของสารพิษที่มีฤทธิ์น้อยๆได้

ช่วงระยะเวลาการได้รับสารทดสอบ โดยปกติแล้วการบ่มเซลล์กับสารทดสอบ จะต้องทำทันทีหลังการใช้เอนไซม์แยกเซลล์จากชิ้นเนื้อเยื่อ หรือหลังจากการเก็บเกี่ยวเซลล์เกาะผิวโดยการทำ trysinization แต่เซลล์บางชนิดอาจมีความไวต่อสารทดสอบเปลี่ยนไปได้ เช่น หลังผ่านการใช้เอนไซม์ (enzyme treatment) และอาจไม่กลับคืนสู่สภาพเดิมเหมือนก่อนทำ trypsinization

จนกระทั่งเวลาผ่านไปหลังการสัมผัสกับเอนไซม์เป็นเวลานาน 12 ชม. หากเป็นเช่นนี้การทดสอบต้องรวมเวลาดังกล่าวอยู่ในระยะเวลาบ่มด้วย นอกจากนี้ pH ในช่วงเวลาการบ่มมีความสำคัญเช่นกัน เพราะ pH ที่เปลี่ยนแปลงไปสามารถทำให้การเจริญของเซลล์เปลี่ยนไปได้ โดยเฉพาะ pH ที่เป็นด่าง สามารถลดความมีชีวิตของเซลล์ลงอย่างชัดเจน

ระยะเวลาบ่มยังขึ้นกับสมบัติการละลายของสารทดสอบที่ให้สารละลายที่เป็นพิษ หากสารสามารถละลายและออกฤทธิ์เร็ว การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสามารถให้ผลได้ภายในเวลาการบ่มนาน 1 ชั่วโมง แต่หากไม่ทราบสมบัติของสารทดสอบ ผลที่มากเกินไปหรือน้อยเกินไปเกิดขึ้นได้ สารทดสอบบางชนิดอาจออกฤทธิ์เร็ว บางชนิดออกฤทธิ์ช้า เช่น การฉายรังสี ต้องการเวลาสั้นๆ เป็นนาทีที่ให้มีปริมาณยาที่ออกฤทธิ์ได้ ขณะที่สารทดสอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดเมตาโบลิซึม (anti-metabolic drug) อาจต้องการระยะเวลาหลายวันในการให้ผลของฤทธิ์ยา นอกจากนี้อัตราการแทรกซึมสารพิษเข้าไปในเซลล์อาจจะเป็นปัจจัยจำกัด (limiting factor) หากใช้ช่วงระยะเวลาบ่มสั้นๆ ดังนั้นระดับที่จะทำให้เซลล์ตายเมื่อใช้เวลาบ่มสั้นๆ จึงมีความสัมพันธ์กับสภาวะการบ่ม เช่น เซลล์แขวนลอยมีอัตราการตายของเซลล์ได้สูง เมื่อระยะเวลาบ่มกับ alkylating agent นาน 1 ชม. ส่วนเซลล์เกาะผิวต้องการเวลาการบ่มที่นานกว่าในการให้ยาออกฤทธิ์และได้ผลเหมือนกัน นอกจากนี้สารหลายๆ ชนิดสามารถจับกับองค์ประกอบภายในเซลล์แบบไม่ปล่อยกลับคืน (irreversible) ดังนั้นเวลาการสัมผัสจริงอาจนานเกินกว่า 1 ชม. เนื่องจากสารถูกกักเก็บไว้ในเซลล์ ส่วนสารบางชนิดอาจให้สารกลับคืน (reversible) ถ้าเซลล์ไม่อยู่ในช่วงเหมาะสม เช่น สารชนิดที่อาจก่อฤทธิ์เฉพาะบางช่วงของเซลล์ในวงจรเซลล์ อาจนานพอเพียงให้เกิดผลได้ นอกจากนี้ความต้านทานของประชากรเซลล์ส่วนที่รอดได้เมื่อใช้ระยะเวลาบ่มสั้นๆ อาจเป็นผลจากการมี phase ในวงจรเซลล์ไม่เหมาะสมในช่วงระยะเวลาที่เซลล์สัมผัสกับสารนาน อย่างไรก็ตามการใช้ระยะเวลาบ่มนานต้องคำนึงว่าสารอาจหมดฤทธิ์ความเป็นพิษที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และฤทธิ์ของยาที่ลดลงอาจเป็นผลจากความไม่เสถียรของสารทดสอบ ดังนั้นระยะเวลาสัมผัสยา (T) และความเข้มข้นของยา (C) จึงมีความสัมพันธ์กัน แม้ว่าผลคูณของ C และ T (C×T) จะไม่ได้มีค่าคงที่เสมอไป การยืดระยะเวลาสัมผัสนานขึ้น สามารถเพิ่มความไวต่อการทดสอบภายใต้ค่าที่ทำนายจาก C×T ซึ่งเป็นผลมาจากวงจรเซลล์ และการทำลายสะสมได้

ขนาดโคโลนี สารบางชนิดอาจคงสภาพเซลล์ (cytostatic) และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) ทำให้เซลล์อาจมีขนาดเล็กลงเมื่อมีการบ่มอย่างต่อเนื่องแทนที่จะทำให้จำนวนโคโลนี

น้อยลง ในกรณีเช่นนี้ อาจวัดขนาดโคโลนีแทนโดยใช้ densitometrty, image analysis หรือการนับจำนวนเซลล์ต่อโคโลนีแทน

สำหรับการนับโคโลนี จะนับเมื่อโคโลนีมีจำนวนเซลล์ต่อโคโลนีมากกว่า 32 เซลล์ขึ้นไป อย่างไรก็ตาม ควรตระหนักว่าโคโลนีที่มีการเจริญจนกระทั่งมีขนาดใหญ่ (มีประมาณ $>10^4$ เซลล์) จะมีการเจริญช้ากว่า

ตัวทำละลาย สารทดสอบบางชนิดสามารถละลายในอาหารได้น้อยมาก และจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์แทน เช่น ethanol, propylene glycol, และ DMSO แต่ตัวละลายอินทรีย์อาจก่อความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงควรใช้ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของตัวทำละลายในการทำสารละลาย นั่นคือเตรียมสารละลายที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นสูงๆ แล้วค่อยเจือจางด้วย BSS และเจือจางครั้งสุดท้ายด้วยอาหารเมื่อต้องการทำการทดสอบ โดยความเข้มข้นสุดท้ายของตัวทำละลายต้องน้อยกว่า 0.5% และควรมี control ที่มีตัวทำละลายอย่างเดียวกันเป็นตัวเปรียบเทียบด้วย การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์กับอุปกรณ์ประเภทพลาสติกและยาง สิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือควรใช้แก้วกับตัวทำละลายเจือจาง และใช้พลาสติกเมื่อความเข้มข้นของตัวทำละลายมีน้อยกว่า 10%

ช่วงระยะเวลาอ่านผลหลังการบ่มกับสารพิษ มีความสำคัญเนื่องจากเหตุการณ์ 3 ประการ คือ

- เมื่อใช้การยับยั้งเมตาโบลิซึมเป็นดัชนีบอกความเป็นพิษของสาร การอ่านผลที่เกิดจากการรบกวนเมตาโบลิซึมต้องไม่มีความสัมพันธ์กับการตายของเซลล์
- ควรทราบว่าการทำลายเซลล์ในระดับที่เกือบทำให้ตาย (sub lethal) อาจได้รับการแก้ไขกลับคืน
- ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ออกฤทธิ์ช้า อาจเกิดจากสารประกอบบางชนิด ซึ่งอาจไม่ให้ผลในช่วงระยะเวลา 1-2 วงจรเซลล์ ดังนั้นการไม่มีช่วงระยะเวลาอ่านผลอาจประเมินระดับการตายของเซลล์สูงหรือต่ำเกินไปได้ อย่างไรก็ตามในช่วงระยะเวลาอ่านไม่ควรนานเกินไป เพราะการตายของเซลล์อาจถูกปิดบังได้ด้วยเซลล์ที่มีความต้านทาน ซึ่งให้ผลการเจริญของเซลล์มากไป การวิเคราะห์เซลล์เกาะผิวโดยวิธีการนับเซลล์ หรือการตรวจดูการนำสารเข้าเซลล์ เซลล์เหล่านั้นต้องมีการเจริญในช่วง log phase ตลอดระยะเวลาการสัมผัสกับยาและการเก็บ

ผล ส่วนการวิเคราะห์การเกิดโคโลนีช่วงระยะเวลาอ่านผล คือระยะเวลาที่เจริญเป็นโคโลนี หรือระยะเวลาที่เซลล์แบ่งตัวได้อย่างน้อยประมาณ 6 ครั้ง และให้ขนาดโคโลนีที่พอจะนับได้ (32-64 เซลล์/โคโลนี)

แม้วิธีทำ plating efficiency เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการทดสอบการอยู่รอดของเซลล์ แต่วิธีนี้จะใช้ได้เมื่อค่า cloning efficiency ที่ได้เป็นค่าที่แทนเซลล์ประชากรทั้งหมด และมีค่าสูงเพียงพอ นั่นคือ สภาวะที่ไม่มียาหรือสารทดสอบ (control) ควรให้ plating efficiency เป็น 100% อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติค่า plating efficiency ที่ 20% หรือน้อยกว่าของ control ก็เป็นที่ยอมรับได้

2.5 **การเกิดสารอนุมูลอิสระ** (Intracellular ROS production) [27]

Reactive Oxygen Species (ROS) หรือปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ เป็นการรวมตัวของโมเลกุลออกซิเจนในรูปที่เป็นอันตรายต่อผิว ซึ่งเกิดจากรังสี UV ที่ตกกระทบลงบนผิวและมลพิษภายนอกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมี ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะเข้าไปทำลายโมเลกุลในเซลล์ผิวโดยทำให้เซลล์อ่อนแอลง และไม่ใช่แค่เพียงเซลล์ผิวที่ถูกทำลาย อีกทั้งความสามารถในการซ่อมแซมตนเองของผิวลดลงเท่านั้น แต่ยังก่อให้เกิดขบวนการ Cross-linked collagen ที่ทำให้คอลลาเจนและอิลาสตินขาดการยึดเกี่ยวกันเป็นเหตุของการเกิดริ้วรอยลึกต่อไป

2.5.1 สารอนุมูลอิสระ (Free radical) หมายถึง สารซึ่งมีอิเล็กตรอนซึ่งไม่มีคู่อยู่ในวงรอบของอะตอม หรือโมเลกุล โดยจะมีออกซิเจนเป็นศูนย์กลาง เช่น ไฮดรอกซิลแรดิคอล (hydroxyl radical), ซุปเปอร์ออกไซด์(superoxide), เพอร์ออกซิล (peroxyl), แอลโคซิล (alkoxyl) และ ออกไซด์ (oxides) ของไนโตรเจน

2.5.2 แหล่งที่มา

1. อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของร่างกายเอง
2. อนุมูลอิสระจากภายนอกร่างกาย
   - การติดเชื้อ ทั้งจากแบคทีเรียและไวรัส
   - การอักเสบชนิดไม่ทราบสาเหตุ (autoimmune diseses) เช่น ข้ออักเสบ รูมาตอยด์ โรคเก๊าท์
   - รังสี

- สิ่งแวดล้อมที่เป็นมลพิษ เช่น ควันเสียและเขม่าจากเครื่องยนต์ ควันบุหรี่ ยาฆ่าแมลง
- การออกกำลังกายอย่างหักโหม

จากที่กล่าวมาแล้วว่าอนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาทั้งจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกายเอง และในภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรค หรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษ โดยในภาวะที่ผิดปกติจะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจำเป็นที่ร่างกายต้องหาทางป้องกัน การโดนทำลายจากอนุมูลอิสระเหล่านั้น สิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตัวเอง ก็คือระบบแอนติออกซิ-แด๊นท์ (antioxidants) ซึ่งประกอบไปด้วยสารหรือเอนไซม์ต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ก็สามารถจะชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร (substrate) ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยสาร (substrate) เหล่านี้รวมถึงสารเกือบทุกชนิดในร่างกาย เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามมีบางภาวะที่ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินกว่าที่ระบบแอนติออกซิแดนท์จะจัดการได้ จะเกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ขึ้นมาซึ่งจะส่งผลกระทบต่างๆ ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น การทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเกิดการทำลายของกลุ่มโมเลกุลที่มีพันธะ S-H และเยื่อหุ้มเซลล์ ก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์ และการทำลายเซลล์ เป็นสาเหตุของการแก่ (aging) และรุนแรงไปถึงการเกิดโรคภัยไข้เจ็บต่างๆ เช่น เส้นเลือดตีบ โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (autoimmune disease) โรคที่เกิดจากการที่เลือดกลับไปเลี้ยงอวัยวะที่เคยมีการตีบตันของเส้นเลือดในระยะสั้นๆ มาก่อน (reoxygenation injury, reperfusion injury) รวมไปถึงโรคมะเร็งเป็นต้น นอกจากนั้นเมื่อคนเราอายุมากขึ้นเซลล์ในร่างกายทุกเซลล์จะผลิตอนุมูลอิสระมากขึ้น อีกทั้งความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระก็ลดลง จึงทำให้ร่างกายเสื่อมโทรมอย่างรวดเร็ว ถึงแม้ว่าร่างกายจะสร้างเอนไซม์ที่ใช้กำจัดอนุมูลอิสระได้ แต่ก็ยังไม่เพียงพอ ต้องกินอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มเติมด้วย

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Sasaki และคณะ [1] ได้ศึกษาชนิดของตัวกระทำอิมัลชันซึ่งใช้ในงานด้านเวชสำอาง พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ อิมัลซิฟายเออร์ไม่มีประจุ อิมัลซิฟายเออร์ประจุบวก และอิมัลซิฟายเออร์ประจุลบ เมื่อนำมาทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ Balb 3T3,ARLJ301-3 ซึ่งเป็นเซลล์เอ็มบริโอของหนู และเซลล์เคราติโนไซต์ (keratinocyte cells) ที่ได้มาจากเซลล์ผิวหนังของ

หนู โดยเปรียบเทียบกับชุดเซลล์ควบคุม ภายหลังนับจำนวนเซลล์พบว่า อิมัลซิฟายเออร์ประจุบวกมีความเป็นพิษมากที่สุด รองลงมา คือ อิมัลซิฟายเออร์ประจุลบ และอิมัลซิฟายเออร์ไม่มีประจุ ตามลำดับ เนื่องจากเซลล์มีเยื่อหุ้มเซลล์เป็นประจุลบ จึงเกิดปฏิสัมพันธ์ทางไฟฟ้ากับประจุของอิมัลซิฟายเออร์ประจุบวก ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ แตกออกและเซลล์ตาย

Soderberg และคณะ [28] ได้ศึกษาอิทธิพลของโครงสร้างที่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ โดยใช้อนุพันธ์ของเรซินแอซิดจากต้นสน (conifer) มาทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ปฐมภูมิ (primary cell) สองชนิด คือเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts cell) และเซลล์อีพิทีเลียล (epithelial cell) ซึ่งใช้สีย้อม (neutral red) เป็นสารที่ชี้วัดความเป็นพิษ โดยเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ก็จะถูกย้อมสีแดง แล้ววัดจำนวนเซลล์เทียบกับชุดควบคุม ซึ่งพบว่าดีไฮโดรอะไบอีติคแอซิด (dehydroabietic acid : DHAA) เป็นโครงสร้างที่เป็นพิษมากที่สุด เนื่องจาก DHAA มี หมู่ไอโซโพรพิลอยู่ภายในโครงสร้างซึ่งจะส่งผลต่อเซลล์คล้ายกับผงซักฟอก โดยจะละลายชั้นไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์จึงมีผลกระทบต่อการซึมผ่านของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนั้นคณะวิจัยได้ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นที่ส่งผลต่อความเป็นพิษด้วย พบว่ายิ่งความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบมากขึ้นก็จะทำให้ความเป็นพิษต่อเซลล์มีค่ามากขึ้นเช่นกัน

Aranda และ Villalain [29] ได้ศึกษาผลกระทบของอะไบอีติคแอซิด (abietic acid) ต่อเยื่อหุ้มเซลล์ฟอสฟอไลปิดซึ่งสนับสนุนกับแนวความคิดของ Soderberg [2] เนื่องจากอะไบอีติคแอซิดประกอบด้วยส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้ว โดยส่วนที่มีขั้วของหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) จะเกิดปฏิสัมพันธ์ทางไฟฟ้ากับประจุบวกของคอลีน (choline) ในฟอสฟอไลปิดของเยื่อหุ้มเซลล์ด้านส่วนที่ไม่มีขั้วจะแทรกตัวระหว่างกรดไขมันในฟอสฟอไลปิดของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งจากเหตุผลนี้ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แตกออกจากกัน (membranes lysis)

Zanatta และคณะ [30] ศึกษาความเป็นพิษของสารลดแรงตึงผิวชนิดหนึ่ง (Ceteareth-20) โดยแบ่งการทดสอบเป็น 2 รูปแบบคือ สารละลายของสารลดแรงตึงผิว และการนำสารลดแรงตึงผิวไปเตรียมเป็นอิมัลชันในขนาดนาโนและไมโคร การทดสอบในรูปแบบของสารละลาย ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นต่อความเป็นพิษของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT keratinocyte) และ

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (3T3 fibroblast) ซึ่งใช้สีย้อม (neutral red) เป็นสารที่ชี้วัดความเป็นพิษ โดยเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ก็จะถูกย้อมสีแดง พบว่าเมื่อความเข้มข้นมากขึ้นจะทำให้ความเป็นพิษต่อเซลล์เพิ่มมากขึ้น โดยที่เซลล์เคราติโนไซต์ (keratinocyte) จะแสดงผลของความเป็นพิษที่มากกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) เนื่องจากเซลล์เคราติโนไซต์จะไวต่อสิ่งกระตุ้นมากกว่า ส่วนการทดสอบในรูปแบบของอิมัลชัน ได้ศึกษาผลของขนาดต่อความเป็นพิษของเซลล์ที่ความเข้มข้นคงที่หนึ่งๆ โดยที่ความเข้มข้นสูง อนุภาคขนาดนาโนจะเป็นพิษมากกว่าอนุภาคขนาดไมโคร เนื่องจากเมื่ออนุภาคมีขนาดเล็กจึงสามารถที่จะแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ง่ายกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ แต่ที่ความเข้มข้นต่ำความเป็นพิษไม่แตกต่างกัน จากนั้นได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของอนุภาคขนาดนาโนต่อความเป็นพิษของเซลล์ พบว่าที่ความเข้มข้นสูงจะแสดงความเป็นพิษมากกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ ในทางกลับกันถ้าเป็นอนุภาคขนาดไมโครจะไม่แสดงความเป็นพิษถึงแม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้น เมื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษระหว่างสารละลายของสารลดแรงตึงผิวกับการนำสารลดแรงตึงผิวมาเตรียมเป็นอิมัลชัน พบว่าการทดสอบในรูปแบบของสารละลายสารลดแรงตึงผิวเพียงอย่างเดียวก่อให้เกิดความเป็นพิษกับเซลล์มากกว่าการเตรียมให้เป็นอิมัลชัน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

- ไคโตซาน เกรดทางการค้า บริษัท Seafresh industry (Thailand)
- กรดมีเทนซัลโฟนิก บริษัท Acros organic (USA)
- กรดแอซีติก บริษัท Labscan Asia (Thailand)
- ฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ บริษัท Acros organic (USA)
- สารละลายแอซีโตน เกรดทางการค้า บริษัท Zen point (Thailand)
- สารละลายเอทานอล เกรดทางการค้า บริษัท Zen point (Thailand)
- โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต บริษัท Merck (Germany)
- ดูเบคโคไมดิไฟล์อีเกิลมีเดียม (DMEM) บริษัท Sigma-Aldrich(U.K.)
- ยาปฏิชีวนะเพนนิซิลิน บริษัท Sigma-Aldrich(U.K.)
- แอล-กลูตาแมกซ์ บริษัท Sigma-Aldrich(U.K.)
- ฟีตัลโบวายน์ซีรัม บริษัท Sigma-Aldrich(U.K.)
- เตตระโซเลียม โบรไมด์ (MTT) บริษัท Sigma Chemical, Inc. (USA)
- ไดคลอโรฟลูออเรสเซนต์ ไดอะซิเตต (DCFH-DA) บริษัท Sigma Chemical, Inc. (USA)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- เครื่องปั่นกวนเชิงกล (Mechanical stirrer)
- อุปกรณ์เครื่องแก้ว
- ตู้อบสาร
- แท่นให้ความร้อน (hot plate)
- เครื่องอัลตร้าโซนิก
- Cellu Sep T_2 MWCO 6,000-8,000
- เครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง (high-pressure homogenizer) ยี่ห้อ Avestin Inc รุ่น EmulsiFlex C3

- เครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียว (homogenizer) ยี่ห้อ PRO Scientific Inc รุ่น PRO200

3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

- เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (FT-IR) ยี่ห้อ Thermoscientific รุ่น Nicolet 6700 (ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

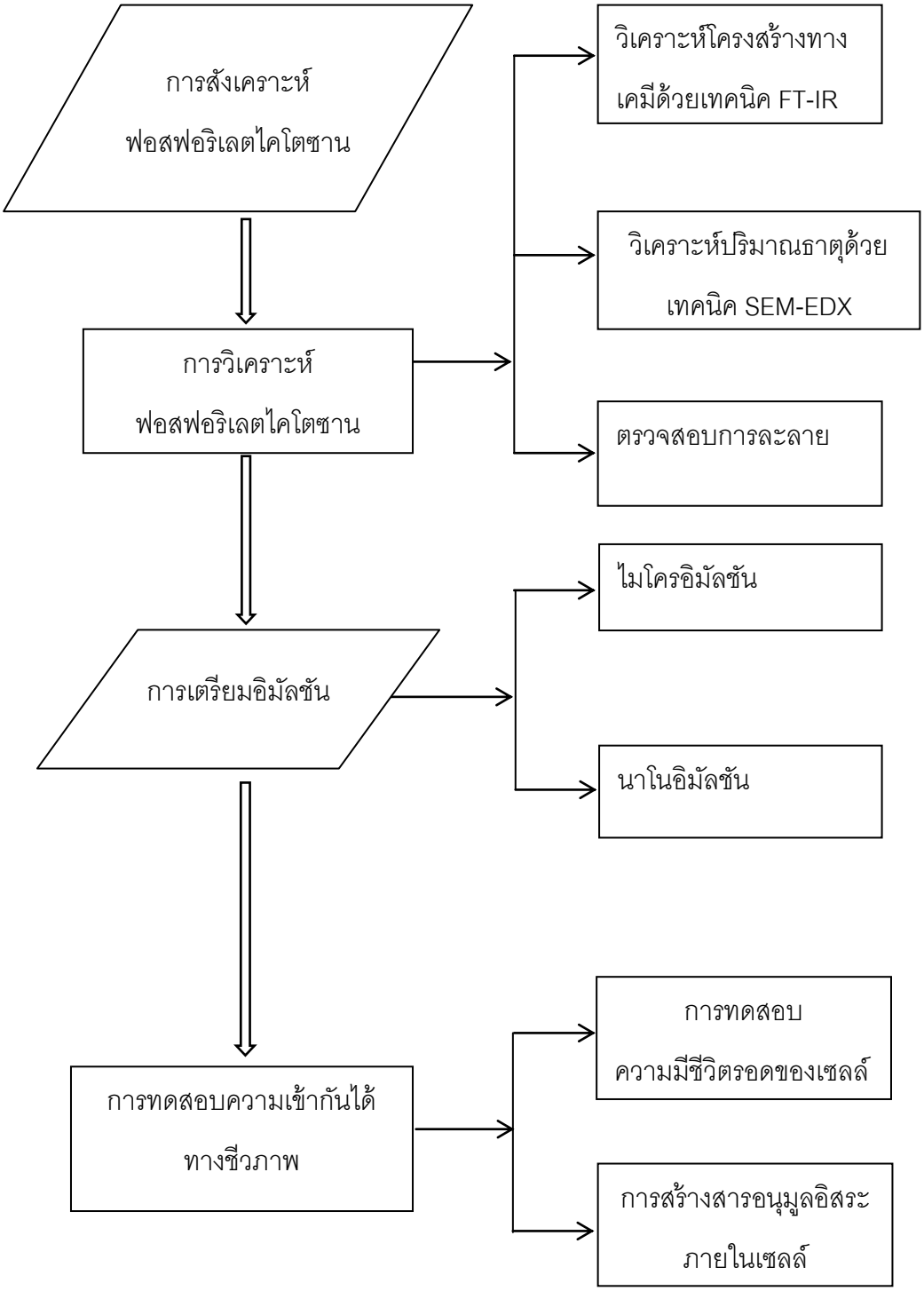
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5800 ชนิดแจกแจงพลังงาน (Energy Dispersive X-ray Spectrometer, EDX) (ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

- เครื่องมือวิเคราะห์ขนาดของอนุภาค (Zetasizer) รุ่น Zetasizer nano series (ได้รับความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์ จาก ศ. ดร. สุวบุญ จิรชาญชัย วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

- เครื่องมือวิเคราะห์การดูดกลืนของแสง (Microplate Reader) ยี่ห้อ BIO Tek รุ่น Powerwarexs2 (ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ)

- เครื่องมือวิเคราะห์การเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (Microplate Reader ชนิด Fluorescence) ยี่ห้อ Molecular Device รุ่น Spectramax M5 (ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ)

3.4 ขอบเขตการทดลอง



ภาพที่ 3.1 แผนผังขอบเขตการทดลอง

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การสังเคราะห์ฟอสฟอริเลตไคโตซาน [31]

1.ชั่งไคโตซาน 4 กรัม มาละลายในกรดมีเทนซัลโฟนิก 28 มิลลิลิตร ปั่นกวนด้วยเครื่องปั่นกวนเชิงกลเป็นเวลา 30 นาที ที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที

2.นำสารละลายแช่ลงในอ่างน้ำแข็ง ที่อุณหภูมิ 0-5 องศาเซลเซียสและค่อยๆเติมฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ (อัตราส่วนโดยโมลของฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ต่อหนึ่งหน่วยซ้ำของไคโตซาน คือ 2) จากนั้นปรับความเร็วเครื่องปั่นเชิงกลเพิ่มขึ้นให้ได้ความเร็ว 550 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3. นำสารละลายที่เกิดปฏิกิริยาไปตกตะกอนในแอซีโตน 250 มิลลิลิตร ประมาณ 2 ครั้ง หลังจากนั้นกำจัดสารอินทรีย์โดยใช้เอทานอลในการกำจัดสารอินทรีย์ประมาณ 4 ครั้ง

4.กรองตะกอนและอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.นำสารที่ได้ไปละลายน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป dialysis ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 3 วัน เพื่อกำจัดสารโมเลกุลเล็กๆที่ไม่เกิดปฏิกิริยาออก แล้วจึง dialysis ต่อด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทำให้อนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้มีความสามารถในการละลายน้ำเพิ่มขึ้น

6.นำสารละลายเกลือโซเดียมของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ข้างต้น ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วยกรดไฮโดรคลอกริก 6 N และ dialysis อีกครั้งด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 3 วัน เพื่อกำจัดเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เกิดขึ้น

7.นำสารละลายที่ได้ไปทำแห้งภายใต้ความดัน ณ จุดเยือกแข็ง และนำสารที่สังเคราะห์ได้ไปตรวจสอบสมบัติการละลายและตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค FT-IR

3.5.2 การวิเคราะห์และตรวจสอบสมบัติของฟอสฟอริเลตไคโตซาน

3.5.2.1 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-IR) [31]

นำอนุพันธ์ไคโตซานที่เตรียมได้ไปอัดแผ่นกับผงโปแตสเซียมโบรไมด์ (KBr) ในอัตราส่วน 1:100 แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (FT-IR) ยี่ห้อ Thermoscientific รุ่น Nicolet 6700 ดังแสดงในภาพที่ 3.2 โดยใช้ resolution 4.0 cm-1 และ number of scan เท่ากับ 16 เพื่อหาแถบดูดกลืนที่เกิดจากหมู่ฟังก์ชันต่างๆ

ภาพที่ 3.2 เครื่อง FT-IR Spectrometer ยี่ห้อ Thermoscientific รุ่น Nicolet 6700

3.5.2.2 การวิเคราะห์ธาตุเชิงปริมาณในโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ชนิดแจกแจงพลังงานรังสีเอกซ์ (Energy Dispersive X-ray Spectrometer, EDX) [31]

การวิเคราะห์ธาตุในโครงสร้างจุลภาคชนิดแจกแจงพลังงานรังสีเอกซ์ (Energy Dispersive X-ray Spectrometer) ทำโดยนำอนุพันธ์ไคโตซานที่ต้องการวิเคราะห์ไปวางบนเทปกาวคาร์บอนที่แปะอยู่บนฐานวางตัวอย่าง เนื่องจากโครงสร้างของอนุพันธ์ไคโตซานมีธาตุคาร์บอนเป็นองค์ประกอบอยู่มากทำให้อิเล็กตรอนสามารถวิ่งผ่านได้โดยไม่จำเป็นต้องเคลือบด้วยผงคาร์บอน ซึ่งการทำงานของเครื่องจะทำภายใต้สุญญากาศจากนั้นจึงตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5800 โดยใช้ศักย์ไฟฟ้า 20 กิโลโวลต์ ที่

กำลังขยาย 2,500 เท่า โดยตั้งระยะห่างระหว่างลำแสงอิเลคตรอนและตัวอย่างให้คงที่ที่ 15 ไมโครเมตร ดังแสดงในภาพที่ 3.3

ภาพที่ 3.3 เครื่อง SEM ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5800

การคำนวณระดับการแทนที่

$$Degree\ of\ substitution = \frac{\%P}{\%N}$$

โดยที่ %P คือ ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นองค์ประกอบจากการแทนที่หมู่ฟอสเฟต

%N คือ ปริมาณไนโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างไคโตซาน

3.5.2.3 **การตรวจสอบสมบัติการละลาย** [31]

การตรวจสอบการละลายของอนุพันธ์ไคโตซานที่สังเคราะห์ได้ สามารถทำได้โดยการนำฟอสฟอริเลตไคโตซานประมาณ 2 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นจึงสังเกตการละลาย

3.5.3 **การเตรียมอิมัลชันของฟอสฟอริเลตไคซาน**

ฟอสฟอริเลตไคโตซานที่สังเคราะห์โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลของฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์เท่ากับ 2 ซึ่งมีระดับการแทนที่หมู่ฟอสเฟตเท่ากับ 0.51 มีค่า zeta potential เท่ากับ -18 จึงมีความ

เป็น anionic emulsifier มีสมบัติที่ชอบน้ำและชอบน้ำมันในโมเลกุล (hydrophile-lipophile balance; HLB) เท่ากับ 19 [8] แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลของฟอสฟอริเลตไคโตซานประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำมากกว่าชอบน้ำมัน เพราะฉะนั้นเมื่อเตรียมเป็นอิมัลชันโดยใช้อัตราส่วนโดยปริมาตรของเฟสน้ำ (สารละลายฟอสฟอริเลตไตโตซาน) และเฟสน้ำมัน (mineral oil) เท่ากับ 8 ต่อ 2 จะได้อิมัลชันในรูปแบบอนุภาคของน้ำมันในน้ำ (oil in water) และมีค่า critical micelle concentration (CMC) เท่ากับ 0.13 wt% [8] จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าปริมาณของ
ฟอสฟอริเลตไคโตซานที่ทำให้อิมัลชันเกิดความเสถียรคือ 1-3 wt% [8] ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความเสถียรของอิมัลชันที่เตรียมจากฟอสฟอริเลตไคโตซานที่มีระดับการแทนที่หมู่ฟอสเฟตต่างกันหรือสังเคราะห์ที่อัตราส่วนโดยโมล ของฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ต่อหนึ่งหน่วยซ้ำของไคโตซานที่ต่างกัน คือ 0.1, 1 และ 2 พบว่า อิมัลชันที่เตรียมจากฟอสฟอริเลตไคโตซานที่อัตราส่วนโดยโมลของฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ต่อหนึ่งหน่วยซ้ำของไคโตซานเท่ากับ 2 ทำให้อิมัลชันที่เตรียมได้มีความเสถียรภาพมากที่สุดไม่ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม (environment condition) เช่น ความเป็นกรดเป็นเบส (pH), อุณหภูมิ (temperature) และความแรงของประจุ (ionic strength) งานวิจัยนี้จึงเลือกที่จะเตรียมอิมัลชันที่ 1-2 wt% โดยใช้ฟอสฟอริเลตไคโตซานที่อัตราส่วนโดยโมลของฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ต่อหนึ่งหน่วยซ้ำของไคโตซานเท่ากับ 2 เพื่อมาทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ

การเตรียมอิมัลชันในขนาดอนุภาคไมโครและนาโน อิมัลชันเตรียมได้โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซานในน้ำเท่ากับ ร้อยละ 1-2 โดยน้ำหนัก จากนั้นเตรียมอิมัลชันโดยใช้อัตราส่วนโดยปริมาตรของเฟสน้ำ (สารละลายฟอสฟอริเลตไตโตซาน) และเฟสน้ำมัน (mineral oil) เท่ากับ 8 ต่อ 2 [8] การเตรียมไมโครอิมัลชันจะทดลองเตรียมจากหลายวิธีการ คือ เครื่องสั่นสะเทือนคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate bath) เครื่องสั่นสะเทือนคลื่นเสียงความถี่สูงชนิดโพรบ (sonicate probe) เครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียว (homogenizer) เครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง (high pressure homogenizer) ภายใต้ความดัน 500-1,000 บาร์ ผ่านระบบ 1-6 รอบ และวิธีการใช้ปั๊มความดัน 4 บาร์ อัดผ่านหัวฉีดของเครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูงผ่านระบบ 1-6รอบ ของเครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง สำหรับการเตรียมนาโนอิมัลชันจะเตรียมโดยเครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง (high-pressure homogenizer) ภายใต้ความดัน 1,500 บาร์ โดยผ่านระบบทั้งหมด 6 รอบ [8]

3.5.4 **การวัดขนาดอนุภาคของอิมัลชัน** [8]

ขนาดอนุภาคสามารถวัดได้โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ขนาดของอนุภาค Zetasizer รุ่น nano series (Malvern Instrument, Malvern, UK) แต่ละตัวอย่างจะเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10,000 โดยวัดทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นคำนวณขนาดของอนุภาคเฉลี่ยแต่ละครั้งจากสมการ

$$d_{32} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2}$$

โดย d_{32} คือ ขนาดอนุภาคเฉลี่ย

n_i คือ ความถี่ของอนุภาคที่พบที่ขนาดหนึ่ง ๆ

d_i คือ ขนาดของอนุภาค

3.5.5 **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเคราติโนไซต์** (keratinocyte : HaCaT)

เซลล์เคราติโนไซต์เป็นเซลล์จากเนื้อเยื่อของผิวหนังมนุษย์ โดยเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง(flask) ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) pH 7.4 ซึ่งประกอบด้วยฟีตัลโบวายน์ซีรัม (fetal bovine serum) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก และ แอล-กลูตาแมก (L-glutamax) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์และยาปฏิชีวนะเพนนิซิลิน ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มเพาะ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เมื่อเซลล์เจริญจนเต็มพื้นที่ 80 เปอร์เซ็นต์ของจานเพาะเลี้ยง(flask) ต้องแบ่งเนื้อเยื่อไปเพาะในจานเพาะเลี้ยงใหม่โดยใช้ทริปซินลอกเซลล์ออกจากพื้นผิว ซึ่งแบ่งไปเพาะเลี้ยงโดยมีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 5×10^5 เซลล์ต่อจานเพาะเลี้ยง เพื่อให้เซลล์สามารถแบ่งตัวและเจริญต่อไป

3.5.6 **การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ** (Biocompatibility Test)

3.5.6.1 **สารตัวอย่าง**

1. สารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซาน ความเข้มข้น 10 25 50 100 250 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ความเข้มข้น 10 25 50 100 250 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. น้ำมันแร่ที่กระจายตัวในตัวกลาง (อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบความมีชีวิตรอด หรือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ สำหรับการทดสอบการสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์) อัตราส่วนโดยปริมาตรของเฟสน้ำ (สารละลายตัวกลาง) และเฟสน้ำมัน (mineral oil) เท่ากับ 8 ต่อ 2 กระจายตัวโดยเครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง(high-pressure homogenizer) ภายใต้ความดัน 1,500 บาร์ โดยผ่านระบบทั้งหมด 6 รอบ ได้น้ำมันที่กระจายตัวในตัวกลางมีขนาดอนุภาคเท่ากับ 170 นาโนเมตร จากนั้นนำน้ำมันแร่ที่กระจายในตัวกลาง 0.13 0.31 0.63 1.25 3.13 6.25 12.50 ไมโครลิตรมาเจือจางในตัวกลางจนได้ปริมาตรสุทธิ 100 ไมโครลิตร

4. ไมโครอิมัลชัน และ นาโนอิมัลชัน ที่เตรียมจากสารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซานเป็นอิมัลซิฟายเออร์ ความเข้มข้นร้อยละ 1-2 โดยน้ำหนัก อัตราส่วนโดยปริมาตรของเฟสน้ำ (สารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซาน) และเฟสน้ำมัน(mineral oil) เท่ากับ 8 ต่อ 2 จากนั้นนำไมโครอิมัลชัน หรือ นาโนอิมัลชันปริมาตร 0.13 0.31 0.63 1.25 3.13 6.25 12.50 ไมโครลิตรมา เจือจางในตัวกลาง (อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบความมีชีวิตรอด หรือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ สำหรับการทดสอบการสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์) จนได้ปริมาตรสุทธิ 100 ไมโครลิตร

3.5.6.2 การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ (Viability Test)

การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ จะวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MTT โดยอาศัยหลักการในการตรวจวัดระดับเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสที่พบในไมโทคอนเดรีย (mitocondria dehydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจของเซลล์ โดยเอนไซม์นี้จะเปลี่ยนเกลือเททระโซเลียม (tetrazolium salt) ในสาร MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl-)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) เป็นผลึกฟอร์มาซาน (formazan) ซึ่งเป็นตะกอนสีม่วง เมื่อนำไปละลายในสารละลายที่เหมาะสม เช่น DMSO จากนั้นวัดความเข้มแสง (optical density, OD)ได้ด้วยUV spectrometer

การทดลองนี้จะใช้ แพลทแบบ 96 หลุม เพื่อเลี้ยงเซลล์ 5000 เซลล์ต่อหนึ่งหลุม เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มเพาะ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 บ่มเพาะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นปิเปตสารตัวอย่างลงในหลุมที่เพาะเลี้ยงเซลล์แล้ว หลุมละ 100 ไมโครลิตร ในการทดลองนี้จะใช้ DMEM (negative control) เป็นชุดควบคุม บ่มเพาะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี MTT assay เติมสารละลาย MTT 25 ไมโครลิตรต่อหลุมโดยที่ความเข้มข้นของ MTT คือ 5 มิลลิกรัมใน 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำเพลทเพาะเลี้ยงเข้าตู้บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมงในที่มืด เซลล์ที่มีชีวิตจะหลั่งสารมาทำปฏิกิริยาเปลี่ยน MTT ซึ่งเป็นสารที่มีสีเหลืองอ่อน เป็นฟอร์มาซาน (formazan) ซึ่งเป็นตะกอนสีม่วง ดังนั้นหลังจากบ่มเพาะในที่มืดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ดูดเอาสารละลายที่อยู่ในหลุมออก ตะกอนสีม่วงจะเหลืออยู่บริเวณด้านล่างของหลุม จากนั้นเติมสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตรแล้วเขย่า เพื่อละลายตะกอนที่อยู่ด้านล่างให้หมด นำไปวัดความเข้มแสง ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรเทียบกับค่าความยาวคลื่นมาตรฐานที่ 650 นาโนเมตรโดยใช้เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตสามารถคำนวณได้จากความเข้มแสงของหลุมที่มีสารตัวอย่างเทียบกับตัวควบคุมซึ่งเป็นหลุมที่ไม่มีสารตัวอย่าง และการทดลองนี้จะทำการทดสอบ 3 ซ้ำ โดยทำการทดสอบซ้ำละ 3 ค่าเพื่อหาค่าเฉลี่ย จากนั้นนำค่าทั้ง 3 ซ้ำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ย

ผลการทดลองนี้จะเสนอในรูปของเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดยใช้ข้อมูลทางสถิติแบบ ANOVA ควบคุมช่วงสถิติด้วยวิธี Turky ($p<0.05$) เมื่อค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตอยู่นอกช่วง ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติ

$$\%viability = \frac{OD_s}{OD_c} \times 100$$

เมื่อ OD_s คือ ค่าความเข้มแสงของฟอร์มาซานในชุดตัวอย่าง

OD_c คือ ค่าความเข้มแสงของฟอร์มาซานในชุดควบคุม (negative control)

3.5.6.3 การทดสอบการสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Intracellular ROS production : DCF assay)

เนื่องจากสารเคมีหรือสารตัวอย่างอาจกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระ (Reactive Oxygen Species, ROS) ซึ่งเป็นสาเหตุในการเกิดริ้วรอย ดังนั้น ในงานวิจัยส่วนนี้จะวิเคราะห์หาปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ด้วยเทคนิค DCFโดยมีหลักการคือ เมื่อ 2,7-dichlorfluorescein-diacetate (DCFH-DA) ซึ่งเป็นสารที่ไม่เรืองแสงฟลูออเรสเซนต์แพร่ผ่านเข้าสู่เซลล์ ถ้าสารเคมีหรือสารตัวอย่างกระตุ้นให้เซลล์สร้างอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จะเปลี่ยนโครงสร้างของ DCFH-DA ให้เป็นสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (2,7-dichlorfluorescein, DCF)

การทดลองนี้จะใช้ แพลทแบบ 96 หลุม เพื่อเลี้ยงเซลล์ 5000 เซลล์ต่อหนึ่งหลุม เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มเพาะ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 บ่มเพาะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม DCFH-DA ซึ่งละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (phosphate buffer saline, PBS) ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ บ่มเพาะเป็นเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดสารละลาย DCFH-DA ออกแล้วล้างด้วย PBS อีก 2 ครั้ง เพื่อกำจัด DCFH-DA ที่ตกค้างออกให้หมด จากนั้นหยดสารตัวอย่างลงไปในหลุมๆละ 100 ไมโครลิตร ในการทดลองนี้จะใช้ซินวัน(SIN-1) (positive control) และ PBS (negative control) เป็นชุดควบคุม บ่มเพาะต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ถ้าสารเคมีมีการกระตุ้นให้เซลล์สร้างอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์จะเปลี่ยนโครงสร้างของ DCFH-DA ให้เป็นสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ จากนั้นนำไปวัดค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตรเทียบกับค่าความยาวคลื่นมาตรฐานที่ 528 นาโนเมตร ซึ่งผลการทดลองจะนำเสนอในรูปแบบของการเพิ่มขึ้นของค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เทียบกับชุดควบคุม การทดลองนี้จะทดสอบ 3 ซ้ำ โดยทดสอบซ้ำละ 3 ค่าเพื่อหาค่าเฉลี่ย จากนั้นนำค่าเฉลี่ยทั้ง 3 ซ้ำมาคำนวณเป็นอัตราส่วนการเกิดอนุมูลอิสระเฉลี่ยเทียบกับชุดควบคุม (negative control)

ผลการทดลองนี้จะเสนอในรูปของอัตราส่วนการเกิดอนุมูลอิสระระหว่างสารตัวอย่างและชุดควบคุม ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดยใช้ข้อมูลทางสถิติแบบ ANOVA ควบคุมช่วงสถิติด้วยวิธี Turky ($p<0.05$) เมื่ออัตราส่วนการเกิดอนุมูลอิสระระหว่างสารตัวอย่างและชุดควบคุมของเซลล์อยู่นอกช่วง ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติ

$$ROS\ ratio(times) = \frac{FA_s}{FA_c}$$

เมื่อ FA_s คือ ค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของ DCF ในชุดตัวอย่าง

FA_c คือ ค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของ DCF ในชุดควบคุม (negative control)

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

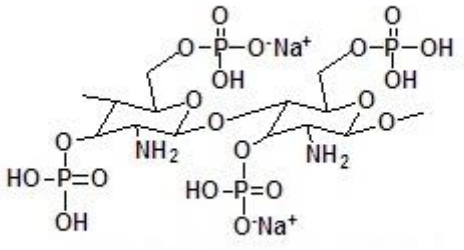
4.1 การสังเคราะห์ฟอสฟอริเลตไคโตซาน

การสังเคราะห์ฟอสฟอริเลตไคโตซาน แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. ปฏิกิริยาฟอสฟอริลเลชัน (Phosphorylation)
2. การก่อเกิดเกลือโซเดียม (Sodium salt formation)
3. การทำให้เป็นกลาง (Neutralization)

เมื่อนำไคโตซานมาทำปฏิกิริยากับฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ด้วยปฏิกิริยาฟอสฟอริลเลชัน (อัตราส่วนโดยโมลของฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ต่อหนึ่งหน่วยไคโตซาน เท่ากับ 2 เท่าโมล) โดยใช้กรดมีเทนซัลโฟนิกเป็นทั้งตัวทำละลายและเป็นสารป้องกันเพื่อไม่ให้หมู่อะมิโนเกิดปฏิกิริยา [31] ภายใต้อุณหภูมิ 0-5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยานำสารละลายที่ได้ไปตกตะกอนในแอซีโตน เกิดเป็นอนุพันธ์ฟอสฟอริเลตไคโตซานที่มีหมู่กรดฟอสฟอริกหรือหมู่ฟอสเฟตแทนที่หมู่ไฮดรอกซิลของคาร์บอนตำแหน่งที่สามและหกของไคโตซาน จากนั้นนำเอาอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ไปละลายในน้ำ พร้อมทั้งไดอะไลซิสด้วยน้ำกลั่นเป็นระยะเวลา 3 วัน เพื่อกำจัดกรดมีเทนซัลโฟนิกและสารที่หลงเหลือจากการทำปฏิกิริยาเคมี เมื่ออนุพันธ์ของฟอสฟอริเลตไคโตซานมีการแทนที่ด้วยหมู่ฟอสเฟตสูง จะทำให้ความสามารถในการละลายน้ำลดลง [31] ดังนั้นจึงต้องปรับปรุงสมบัติในการละลายโดยการทำให้เกิดเป็นเกลือโซเดียม ซึ่งจะใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ไดอะไลซิสต่อเป็นระยะเวลา 1 วัน จากนั้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหลือจะถูกกำจัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เกิดเป็นเกลือโซเดียมคลอไรด์ จากนั้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ก็จะถูกกำจัดออกด้วยการไดอะไลซิสด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งเป็นเวลา 3 วัน จะได้เกลือโซเดียมของอนุพันธ์ฟอสฟอริเลตไคโตซานที่มีลักษณะพองฟูสีขาวและน้ำหนักเบา ดังรูปที่ 4.1 จากการนำไปทำแห้งภายใต้สุญญากาศ ณ จุดเยือกแข็ง รูปที่ 4.2 แสดงโครงสร้างของอนุพันธ์ฟอสฟอริเลตไคโตซาน [30]

ภาพที่ 4.1 ลักษณะภายนอกของฟอสฟอริเลตไคโตซาน

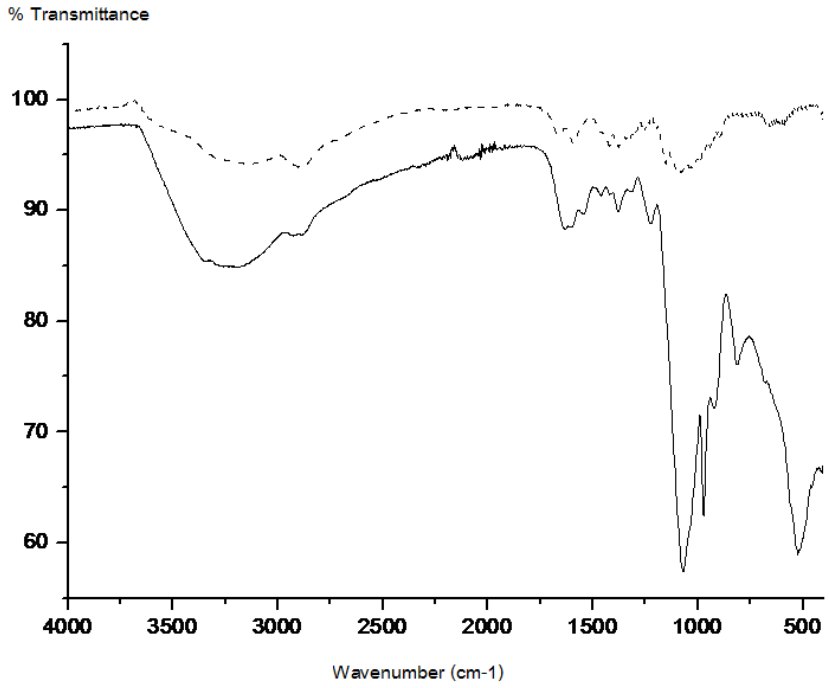


ภาพที่ 4.2 โครงสร้างของฟอสฟอริเลตไคโตซาน [30]

4.2 การวิเคราะห์และตรวจสอบสมบัติของฟอสฟอริเลตไคโตซาน

4.2.1 โครงสร้างทางเคมีของฟอสฟอริเลตไคโตซาน

เมื่อนำฟอสฟอริเลตไคโตซานที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาฟอสฟอริลเลชัน โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลของฟอสฟรัสเพนทอกไซด์ต่อหนึ่งหน่วยซ้ำของไคโตซานเท่ากับ 2 ไปตรวจสอบหาโครงสร้างทางเคมีของสารด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี พบหมู่ฟังก์ชั่นต่างๆ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.3 อีกทั้งพบตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญดังแสดงในตารางที่ 4.1



ภาพที่ 4.3 FT-IR สเปกตรัมของไคโตซาน (เส้นประ) และ ฟอสฟอริเลตไคโตซาน (เส้นทึบ) โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลของฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ต่อหนึ่งหน่วยซ้ำของไคโตซานเท่ากับ 2

ตารางที่ 4.1 ตำแหน่งพีคที่สำคัญต่างๆ ที่พบในสเปกตัมของไคโตซานและฟอสฟอริเลตไคโตซาน

สารตัวอย่าง		**หมู่ฟังก์ชัน**
ไคโตซาน/เลขคลื่น(ซม$^{-1}$)	**ฟอสฟอริเลตไคโตซาน/ เลขคลื่น(ซม$^{-1}$)**	
3400	3400	O-H stretching and N-H stretching
2900	2900	C-H stretching on methyl
1650	1650	C=O stretching
1550	1550	N-H bending
1075	1075	C-O stretching of pyranose ring
	1224	P=O stretching
	971	P-OH bonds
	813	P-O-C bonds

จากภาพที่ 4.3 และตารางที่ 4.1 แสดงตำแหน่งของพีคสำคัญต่างๆ ที่พบในสเปกตรัมของฟอสฟอริเลตไคโตซาน ซึ่งอินฟราเรดสเปกตรัมที่ปรากฏจะแสดงถึงตำแหน่งพีคของไคโตซาน คือ พีคของการดูดกลืนของ O-H stretching และ N-H stretching ที่เลขคลื่นประมาณ 3400 ซม$^{-1}$ พีค C-H stretching ของหมู่เมทิลและวงน้ำตาลที่เลขคลื่นประมาณ 2900 ซม$^{-1}$ และพีคของ C=O stretching และ N-H bending ที่เลขคลื่นประมาณ 1650 ซม$^{-1}$ และ 1550 ซม$^{-1}$ ตามลำดับ รวมทั้งพีค C-O stretching ของวงน้ำตาล (pyranose ring) ที่เลขคลื่น 1075 ซม$^{-1}$ ส่วนพีคที่แสดงให้เห็นถึงการปรับปรุงโครงสร้างของไคโตซานเพื่อให้เป็นฟอสฟอริเลตไคโตซานก็ คือ การปรากฏพีคของหมู่ฟอสเฟต คือ พีค P=O stretching ที่เลขคลื่น 1224 ซม$^{-1}$ และพีคของ

P-OH bonds ที่เลขคลื่น 971 ซม$^{-1}$ รวมทั้งพีค P-O-C bonds ที่เลขคลื่น 813 ซม$^{-1}$ ชี้ให้เห็นว่าได้อนุพันธ์ไคโตซานที่มีหมู่ฟอสเฟตเป็นหมู่แทนที่

4.2.2 การหาระดับการแทนที่ของฟอสฟอริเลตไคโตซาน

เมื่อนำฟอสฟอริเลตไคโตซาน ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของธาตุด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ชนิดแจกแจงพลังงานรังสีเอกซ์ (Energy Dispersive X-ray Spectrometer, EDX) เพื่อหาค่าระดับการแทนที่ของหมู่ฟอสเฟต (Degree of substitution(DS)) พบว่า ฟอสฟอริเลตไคโตซานที่สังเคราะห์ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างไคโตซานและฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ โดยใช้อัตราส่วนของฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ต่อหนึ่งหน่วยซ้ำไคโตซานเท่ากับ 2 มีระดับการแทนที่ เท่ากับ 0.5 (แสดงการคำนวณในภาคผนวก ก)

4.2.3 การทดสอบความสามารถในการละลาย

เพื่อตรวจสอบความสามารถในการละลายน้ำของอนุพันธ์ฟอสฟอริเลตไคโตซาน โดยนำฟอสฟอริเลตไคโตซานที่สังเคราะห์ได้นั้นมาละลายในน้ำกลั่น ซึ่งจะใช้สารตัวอย่าง 2 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ซึ่งจากผลการทดสอบปรากฏว่าฟอสฟอริเลตไคโตซานนั้นมีความสามารถในการละลายน้ำได้เป็นอย่างดี แสดงให้เห็นว่าฟอสฟอริเลตไคโตซานที่สังเคราะห์ได้มีความชอบน้ำมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับไคโตซานที่ไม่ละลายน้ำ จึงสามารถนำฟอสฟอริเลตไคโตซานมาใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่ละลายในเฟสน้ำได้

4.3 อิมัลชันของฟอสฟอริเลตไคซาน

ผลิตภัณฑ์เวชสำอาง เป็นผลิตภัณฑ์ประเภทเครื่องสำอางที่มีส่วนประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อปรับปรุงหรือฟื้นฟูสภาพผิวหนัง ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่อยู่ในรูปแบบของครีม หรือ โลชัน ครีมหรือโลชันในเวชสำอางเป็นอิมัลชันที่มีส่วนประกอบของสารออกฤทธิ์ อิมัลชันเป็นของผสมระหว่างเฟสน้ำและน้ำมันซึ่งสามารถผสมเข้ากันได้เป็นอิมัลชันแต่ไม่เสถียร จำเป็นต้องใช้สารลดแรงตึงผิวหรืออิมัลซิฟายเออร์เพื่อช่วยลดการแยกเฟสระหว่างน้ำและน้ำมันทางเทอร์โมไดนามิกส์

เมื่อพิจารณาถึงโครงสร้างของฟอสฟอริเลตไคโตซาน ในรูปที่ 4.2 จะเห็นว่าฟอสฟอริเลตไคโตซานมีโครงสร้างของวงน้ำตาล(pyranose ring) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) อีกทั้งโครงสร้างของหมู่ฟอสเฟต (phosphate group) หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ที่เหลือซึ่งเป็นหมู่ที่ชอบน้ำ (hydrophilic) เพราะฉะนั้นฟอสฟอริเลตไคโตซานจึงสามารถทำหน้าที่เป็นตัวกระทำอิมัลชันได้ในงานวิจัยนี้จึงสนใจนำอนุพันธ์ที่ละลายน้ำของฟอสฟอริเลต ไคโตซานมาใช้เป็นตัวกระทำอิมัลชันแทนการใช้สารลดแรงตึงผิว เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวมีรายงานว่าเป็นพิษต่อเซลล์ [1] จึงไม่เหมาะสมใช้งานด้านเวชสำอาง

ในงานวิจัยนี้จะเตรียมอิมัลชัน (oil in water) ที่มีขนาดอนุภาคแตกต่างกันสองขนาด ได้แก่ ไมโครอิมัลชัน และ นาโนอิมัลชัน เพื่อศึกษาอิทธิพลของขนาดอนุภาคต่อความเข้ากันได้ทางชีวภาพ การเตรียมไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันจะใช้กระบวนการเตรียมที่แตกต่างกันออกไปเพื่อให้ได้ขนาดที่แตกต่างกัน ด้วยความเข้มข้นของฟอสฟอริเลตไคโตซานที่ร้อยละ1-2 โดยน้ำหนัก อัตราส่วนระหว่างเฟสน้ำและเฟสน้ำมันคงที่ที่ 8 ต่อ 2 อิมัลชันที่ได้จะตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน เพื่อสังเกตถึงความคงตัวของอิมัลชันนั้นๆ ก่อนที่จะนำมาวัดขนาดอนุภาค และทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพต่อไป

การเตรียมนาโนอิมัลชัน เตรียมได้โดยการใช้เครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง (high-pressure homogenizer) โดยผ่านระบบทั้งหมด 6 รอบ [8] พบว่าขนาดอนุภาคของอิมัลชันมีค่า 150-200 นาโนเมตร และมีความคงตัวเมื่อเวลาผ่านพ้นไป 3 วัน

การเตรียมไมโครอิมัลชัน จะเตรียมด้วยวิธีการที่ต่างๆกันออกไป อาทิเช่น เครื่องสั่นสะเทือนคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate bath) เครื่องสั่นสะเทือนคลื่นเสียงความถี่สูงชนิดโพรบ (sonicate probe) เครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียว (homogenizer) เครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง (high pressure homogenizer) ภายใต้ความดัน 500-1,000 บาร์ ผ่านระบบ 1-6 รอบ และวิธีการใช้ปั๊มความดัน 4 บาร์ อัดผ่านหัวฉีดของเครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูงผ่านระบบ 1-6 รอบ ของเครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง ซึ่งผลของความคงตัวและขนาดอนุภาคดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ความคงตัวและขนาดอนุภาคของไมโครอิมัลชันที่เตรียมด้วยวิธีต่าง ๆ

วิธีการเตรียม	ความคงตัวเมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน (Stability)	ขนาดอนุภาค (นาโนเมตร)
1.เครื่องสั่นสะเทือนคลื่นเสียงความถี่สูง(sonicate bath : 45 นาที)	X	-
2.เครื่องสั่นสะเทือนคลื่นเสียงความถี่สูงชนิดโพรบ (sonicate probe: เส้นผ่านศูนย์กลาง 6mm ,130watt , 15 นาที)	X	-
3.เครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียว (homogenizer)		
-1000 rpm (10 นาที)	X	-
-35,000 rpm		
5 นาที	X	-
10 นาที	X	-
15 นาที	X	-
20 นาที	/	1500-2500
25 นาที	/	1500-2000
30 นาที	/	900-1000
4.เครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง (high pressure homogenizer)		
-500 บาร์ / 1 รอบ	X	-
-500 บาร์ / 2 รอบ	X	-
-500 บาร์ / 3 รอบ	/	~260-270
-500 บาร์ / 4 รอบ	/	~230-260
-500 บาร์ / 5 รอบ	/	~230
-500 บาร์ / 6 รอบ	/	~230

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ความคงตัวและขนาดอนุภาคของไมโครอิมัลชันที่เตรียมด้วยวิธีต่าง ๆ

การเตรียม	ความคงตัวเมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน (Stable)	ขนาดของอนุภาค (นาโนเมตร)
4.เครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง (high pressure homogenizer) (ต่อ)		
-1000 บาร์ / 1 รอบ	X	-
-1000 บาร์ / 2 รอบ	X	-
-1000 บาร์ / 3 รอบ	⁄	~240-280
-1000 บาร์ / 4 รอบ	⁄	~230-240
-1000 บาร์ / 5 รอบ	⁄	~220-240
-1000 บาร์ / 6 รอบ	⁄	~180-220
5.วิธีการใช้ปั๊มความดัน 4 บาร์อัดผ่านหัวฉีดของเครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง		
- 1 รอบ	X	-
- 2 รอบ	X	-
- 3 รอบ	X	-
- 4 รอบ	⁄	1000-2000
- 5 รอบ	⁄	700-900
- 6 รอบ	⁄	500-650

เมื่อ X คือ อิมัลชันไม่คงตัว

⁄ คือ อิมัลชันมีความคงตัว

จากผลของการเตรียมไมโครอิมัลชัน โดยใช้วิธีการเตรียมในรูปแบบต่างๆกันพบว่าการใช้เครื่องสั่นสะเทือนคลื่นเสียงความถี่สูง(sonicate bath) เป็นระยะเวลา 45 นาที และเครื่องสั่นสะเทือนคลื่นเสียงความถี่สูงชนิดโพบ (sonicate probe) เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรที่

กำลัง 130 วัตต์ เป็นระยะเวลา 15 นาที จะเกิดอิมัลชันที่ไม่เสถียรขึ้น จึงไม่สามารถนำมาวัดขนาดของอนุภาคได้ นอกจากนี้การเตรียมด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียว (homogenizer) ที่ความถี่และเวลาที่แตกต่างกัน พบว่าเมื่อเตรียมอิมัลชันด้วยความถี่ 1,000 รอบ/นาที ให้อิมัลชันที่ไม่เสถียร อีกทั้งการเตรียมด้วยความถี่ 35,000 รอบ/นาที ที่เวลา 5 10 และ 15 นาที เกิดอิมัลชันที่ไม่เสถียร แต่เมื่อเพิ่มเวลาเป็น 20 และ 25 นาที จะเกิดอิมัลชันที่เสถียรมีขนาดอนุภาคเป็นไมโคร และเมื่อเพิ่มเวลาจนถึง 30 นาทีจะได้อนุภาคขนาดเล็กลงจนเป็นนาโนอิมัลชันแทน ส่วนการเตรียมด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง (high pressure homogenizer) ที่ความถี่และจำนวนรอบที่แตกต่างกัน จะได้อิมัลชันที่มีขนาดนาโนทั้งสิ้น จึงไม่สามารถใช้วิธีนี้ในการเตรียมไมโครอิมัลชันได้ และวิธีสุดท้ายวิธีการใช้ปั๊มความดัน 4 บาร์ อัดผ่านหัวฉีดของเครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูงด้วยจำนวนรอบที่แตกต่างกัน พบว่าเมื่อจำนวนรอบน้อยๆ คือ 1 2 และ 3 รอบ ทำให้อิมัลชันไม่เสถียร แต่เมื่อเพิ่มรอบขึ้นเป็น 4 รอบ จะสามารถเตรียมอิมัลชันในขนาดไมโครได้ตามต้องการ แต่เมื่อเพิ่มรอบของการเตรียมให้มากขึ้นเป็น 5 และ 6 รอบ จะทำให้ขนาดอนุภาคของอิมัลชันมีขนาดเล็กเกินกว่าระดับไมโคร

ในงานวิจัยนี้จะเลือกวิธีเตรียมอิมัลชันขนาดไมโครด้วยวิธีการใช้ปั๊มความดัน 4 บาร์ อัดผ่านหัวฉีดของเครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง จำนวน 4 รอบ ซึ่งได้ไมโครอิมัลชัน ขนาด 1000-2000 นาโนเมตร สำหรับใช้ในการศึกษาอิทธิพลของขนาดอนุภาคต่อความเข้ากันได้ทางชีวภาพต่อไป และเพื่อกำจัดปัจจัยอื่นๆที่ไม่เกี่ยวข้อง เนื่องจากเครื่องมือที่ใช้นั้นเป็นเครื่องมือเดียวกันกับการเตรียมนาโนอิมัลชัน แตกต่างกันเพียงแค่การใช้ความดันสูงในการเตรียมนาโนอิมัลชันและการใช้ปั๊มสูบของผสมฉีดอัดผ่านหัวฉีด

ภาพที่ 4.4 อิมัลชันที่เสถียร

4.4 **การตรวจสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ** (Biocompatibility Test)

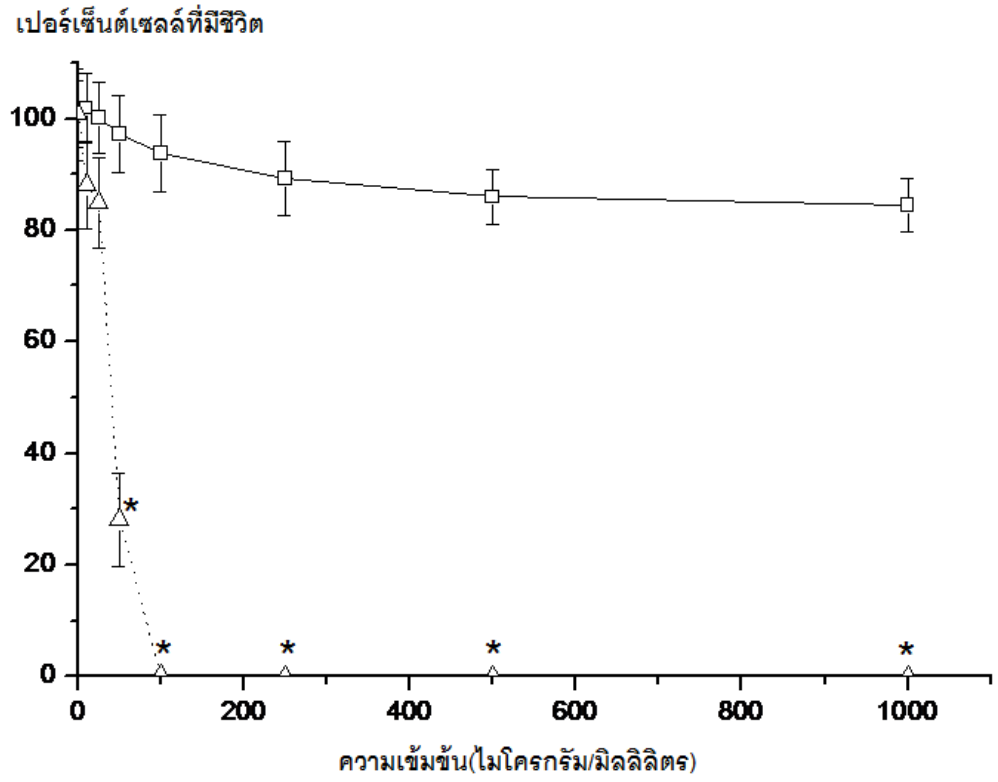
เพื่อที่จะใช้ฟอสฟอริเลตไคโตซานเป็นอิมัลซิฟายเออร์ในงานด้านเวชสำอาง ดังนั้น ครีมหรือ โลชันซึ่งเป็นอิมัลชันที่เตรียมจากการใช้ฟอสฟอริเลตไคโตซานเป็นอิมัลซิฟายเออร์นั้นจะสัมผัสกับผิวหนัง จึงจำเป็นต้องทดสอบสภาพเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ก่อน โดยจะทดสอบกับสารตัวอย่างทั้งในรูปของสารละลายอิมัลซิฟายเออร์ที่ละลายน้ำ คือ สารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซาน และอิมัลชันที่เตรียมโดยใช้ฟอสฟอริเลตไคโตซานเป็นอิมัลซิฟายเออร์ และเพื่อศึกษาอิทธิพลของขนาดอิมัลชันต่อความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ในงานวิจัยนี้จะทดสอบกับอิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคแตกต่างกันสองขนาด ได้แก่ นาโนอิมัลชันและไมโครอิมัลชัน โดยทดสอบเปรียบเทียบกับโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตซึ่งนิยมใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวในเวชสำอาง เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบคือ เซลล์ HaCaT ซึ่งเป็น cell line ของเซลล์ผิวหนังมนุษย์ การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพจะทดสอบเกี่ยวเนื่องกับความมีชีวิตรอดของเซลล์ การสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์

4.4.1 **การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์** (Viability Test)

การทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ ศึกษาเพื่อดูปริมาณของเซลล์ที่ยังคงมีชีวิต ภายหลังจากการได้รับสารตัวอย่าง โดยเริ่มต้นจากการทดสอบสารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซาน (PCTS) ซึ่งเป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่เป็นประจุลบ(zeta potential = -18 mV) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ทั่วไปในเวชสำอางซึ่งเป็นประจุลบ(zeta potential = - 40 mV) เพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของอิมัลซิฟายเออร์หรือสารลดแรงตึงผิวต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์ อีกทั้งทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อสัมผัสกับน้ำมันแร่ที่ปริมาตรต่าง ๆ เนื่องจากน้ำมันแร่ใช้เป็นเฟสน้ำมันในการเตรียมอิมัลชัน จากนั้นทดสอบกับอิมัลชันที่เตรียมโดยใช้ฟอสฟอริเลตไคโตซานเป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่ขนาดแตกต่างกัน เพื่อศึกษาอิทธิพลของขนาดอนุภาคต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์

- **การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของฟอสฟอริเลตไคโตซานต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์**

เนื่องจากการใช้ฟอสฟอริเลตไคโตซานเป็นอิมัลซิฟายเออร์ในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง อาจมีการใช้ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของฟอสฟอริเลตไคโตซานซึ่งเป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่เป็นประจุลบ(zeta potential = -18 mV) ในช่วงระหว่าง 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (zeta potential = - 40 mV) ที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์เวชสำอางทั่วไป บ่มเพาะกับเซลล์ HaCaT ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิต ดังแสดงในภาพที่ 4.5



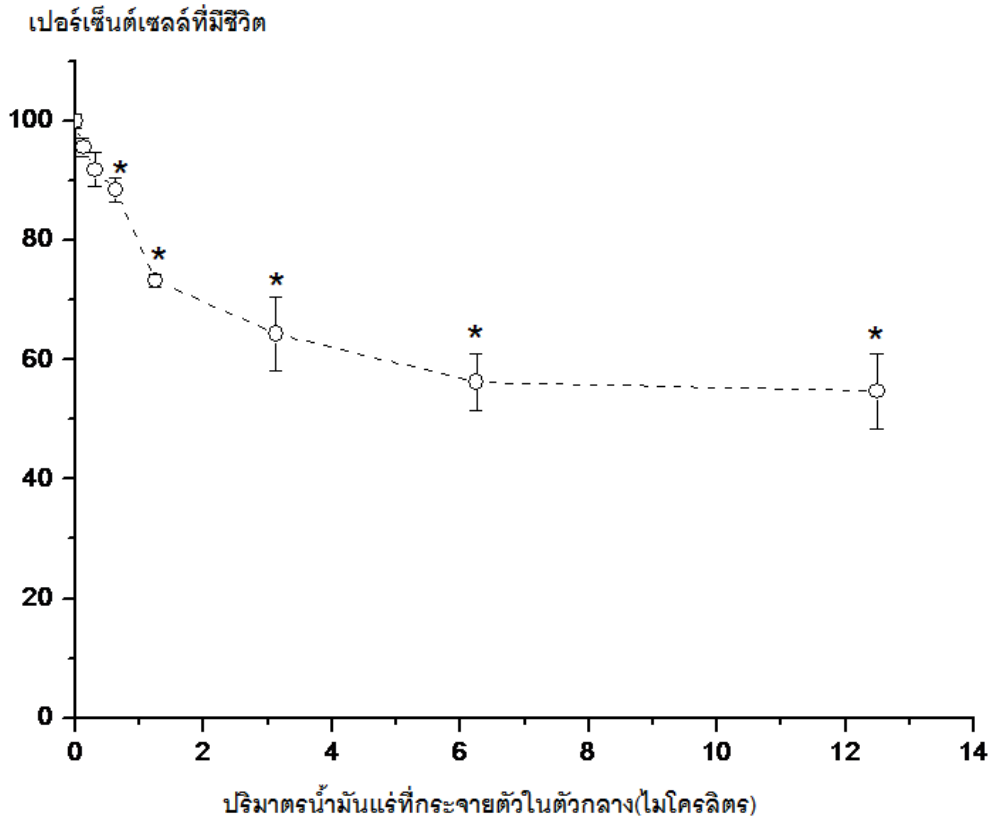
ภาพที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทดสอบด้วยสารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซานและโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ (□ คือ ฟอสฟอริเลตไคโตซาน Δ คือ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต)

* ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติของข้อมูลเทียบกับชุดควบคุม โดยใช้ข้อมูลทางสถิติแบบ ANOVA ควบคุมช่วงสถิติด้วยวิธี Turky ($p<0.05$)

จากภาพเมื่อทดสอบกับสารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซานทำให้เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตลดลงเล็กน้อย ถึงแม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นมากถึง 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตยังมีค่าสูงมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ชี้ให้เห็นว่าฟอสฟอริเลตไคซานนี้ไม่เป็นพิษกับเซลล์ผิวหนัง แตกต่างจากการทดสอบของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต พบว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติตั้งแต่ความเข้มข้นของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเป็น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้นเป็น 100-1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะทำให้ไม่เหลือเซลล์ที่มีชีวิตรอดเลย การที่โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตมีความเป็นพิษที่มากกว่าฟอสฟอริเลตไคโตซาน เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตในฟอสฟอริเลตไคโตซานเป็นหมู่ฟังก์ชันเดียวกับเยื่อหุ้มเซลล์จึงมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพมากกว่าหมู่ซัลเฟตในโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตที่มีความเป็นพิษ [32] เพราะฉะนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า สารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซานที่จะนำมาใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์นั้น ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ แตกต่างจากโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตที่ใช้เป็นสาร ลดแรงตึงผิวในผลิตภัณฑ์เวชสำอางทั่วไป ซึ่งแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์

- **การศึกษาอิทธิพลของปริมาตรของน้ำมันแร่ต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์**

เนื่องจากในการเตรียมอิมัลชันในงานวิจัยนี้ใช้น้ำมันแร่เป็นเฟสน้ำมัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ต่อการสัมผัสกับน้ำมันแร่ ในงานวิจัยนี้จะนำน้ำมันแร่กระจายตัวในตัวกลางคืออาหารเลี้ยงเซลล์ เช่นเดียวกันกับการเตรียมอิมัลชัน โดยใช้อัตราส่วนของเฟสน้ำ (อาหารเลี้ยงเซลล์) ต่อ เฟสน้ำมัน (น้ำมันแร่) เป็น 8 ต่อ 2 แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง (high-pressure homogenizer) โดยผ่านระบบทั้งหมด 6 รอบ ได้ขนาดอนุภาคของน้ำมันแร่ที่กระจายตัวในอาหารเลี้ยงเซลล์มีค่า 170 นาโนเมตร จากนั้นนำน้ำมันแร่ที่กระจายตัวในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปริมาตรต่าง ๆ ตั้งแต่ 0-12.5 ไมโครลิตรไปเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ปริมาตรสุทธิเป็น 100 ไมโครลิตร บ่มเพาะกับเซลล์ HaCaT ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิต ดังแสดงในภาพที่ 4.6



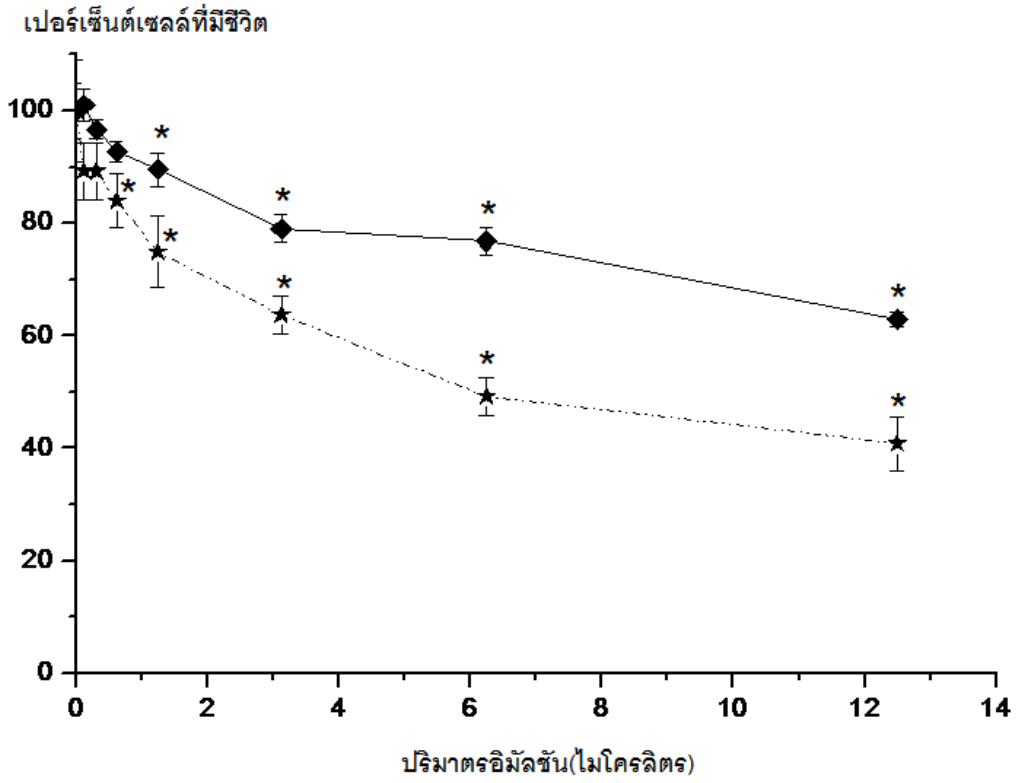
ภาพที่ 4.6 เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทดสอบด้วยน้ำมันที่ปริมาตรต่างๆ

* ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติของข้อมูลเทียบกับชุดควบคุม โดยใช้ข้อมูลทางสถิติแบบ ANOVA ควบคุมช่วงสถิติด้วยวิธี Turky ($p<0.05$)

จากภาพที่ 4.6 พบว่า เมื่อทดสอบกับน้ำมันแร่ที่ปริมาตรต่าง ๆ พบว่า เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติตั้งแต่ปริมาตรของน้ำมันแร่ที่กระจายตัวในอาหารเลี้ยงเซลล์ตั้งแต่ 0.63 ไมโครลิตร และเมื่อเพิ่มปริมาตรมากขึ้นเป็น 1.25-12.5 ไมโครลิตร จะทำให้เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมากถึงประมาณร้อยละ 55 ชี้ให้เห็นว่าน้ำมันแร่ส่งผลเสียต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์

- **การศึกษาอิทธิพลของอิมัลชันที่เตรียมโดยใช้ฟอสฟอริเลตไคโตซานเป็นอิมัลซิฟายเออร์ต่อความมีชีวิติรอดของเซลล์ รวมทั้งศึกษาอิทธิพลของขนาดอนุภาคอิมัลชันต่อความมีชีวิตรอด**

การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ต่ออิมัลชัน ในงานวิจัยนี้จะใช้ฟอสฟอริเลตไคโตซานที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ทำหน้าที่เป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่ละลายน้ำ โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเฟสน้ำ (สารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซาน) และเฟสน้ำมัน (น้ำมันแร่) เท่ากับ 8 ต่อ 2 และเพื่อศึกษาอิทธิพลของขนาดอนุภาคอิมัลชันต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์ ในงานวิจัยนี้เตรียมอิมัลชันสองรูปแบบ คือ ไมโครอิมัลชัน และ นาโนอิมัลชัน จากนั้นนำอิมัลชันที่เตรียมปริมาตรต่างๆ ในช่วง 0-12.5 ไมโครลิตรไปเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์จนได้ปริมาตรสุทธิ 100 ไมโครลิตร ดังนั้น ปริมาณของฟอสฟอริเลตไคโตซาน (ไมโครกรัม) และ ปริมาตรน้ำมันแร่ในอิมัลชันที่เจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อจนปริมาตรสุทธิ 100 ไมโครลิตร เทียบเท่ากับ 10-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (1-100 ไมโครกรัมต่อ100ไมโครลิตร) (รูปที่ 4.5) และ 0.13- 12.5 ไมโครลิตร (รูปที่ 4.6) ตามลำดับ บ่มเพาะกับเซลล์ HaCaT ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิต ดังแสดงในภาพที่ 4.7



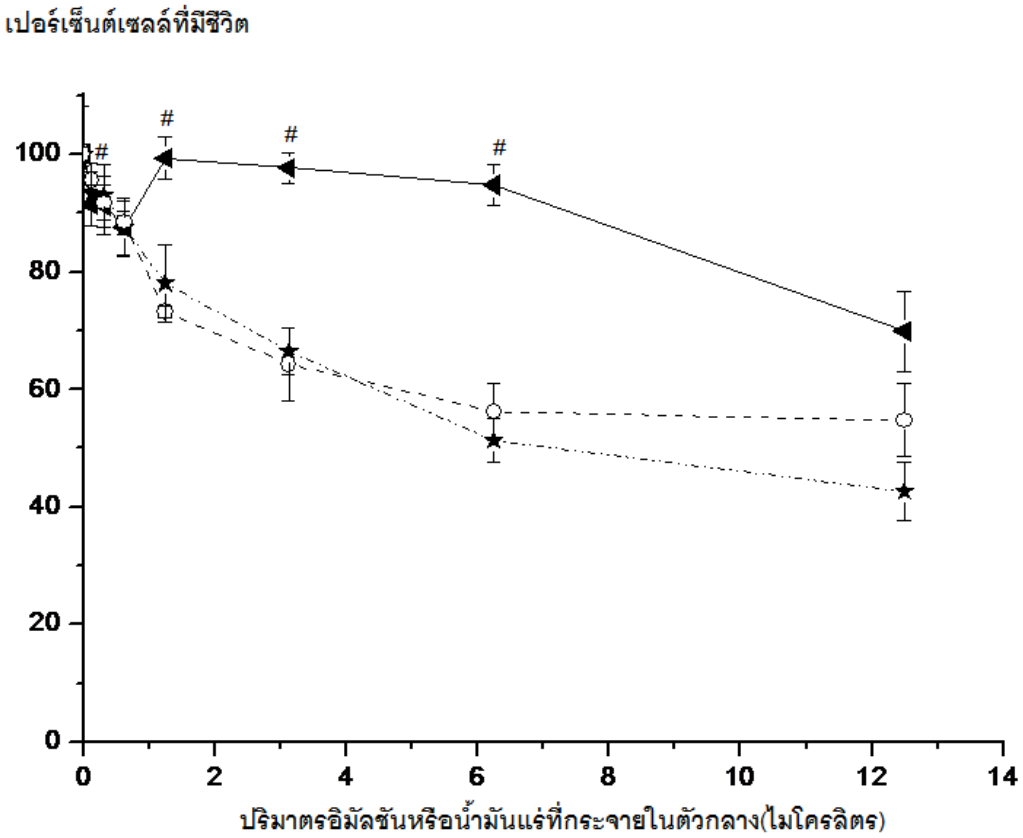
ภาพที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทดสอบด้วยไมโครอิมัลชัน และ นาโนอิมัลชัน ที่ปริมาตรต่างๆ (◆ คือ ไมโครอิมัลชันและ★ คือ นาโนอิมัลชัน)

* ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติของข้อมูลเทียบกับชุดควบคุม โดยใช้ข้อมูลทางสถิติแบบ ANOVA ควบคุมช่วงสถิติด้วยวิธี Turky ($p<0.05$)

จากภาพที่ 4.7 เมื่อทดสอบกับอิมัลชันที่ปริมาตรต่าง ๆ พบว่า เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติตั้งแต่ปริมาตรอิมัลชัน 1.25 ไมโครลิตรสำหรับไมโครอิมัลชัน และตั้งแต่ปริมาตรอิมัลชัน 0.63 ไมโครลิตรสำหรับนาโนอิมัลชัน และเมื่อเพิ่มปริมาตรมากขึ้น จะทำให้เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมากถึงประมาณร้อยละ 65 และ 40 สำหรับไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันตามลำดับ ชี้ให้เห็นว่าขนาดของอิมัลชันส่งผลต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์ โดยขนาดยิ่งเล็ก คือ ระดับนาโนทำให้เซลล์มีชีวิตรอดน้อยกว่าระดับไมโคร ทั้งนี้เนื่องจากนาโนอิมัลชันมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับเซลล์มากกว่าไมโครอิมัลชัน กล่าวอีกนัยหนึ่งคือ เมื่อขนาดอนุภาคอิมัลชันเล็กลงทำให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเซลล์กับฟอสฟอริเลตไคโตซานและน้ำมันแร่ที่มากขึ้น แต่เนื่องจาก

ฟอสฟอริเลตไคซานนี้ไม่เป็นพิษกับเซลล์ผิวหนัง (ภาพที่ 4.5) แต่น้ำมันแร่ที่กระจายตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีขนาดอนุภาคประมาณ 170 นาโนเมตรนั้น ทำให้เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติตั้งแต่ปริมาตรของน้ำมันแร่ที่กระจายตัวในอาหารเลี้ยงเซลล์ตั้งแต่ 0.63 ไมโครลิตร สอดคล้องกับการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติของอิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคเท่ากันในระดับนาโน ชี้ให้เห็นว่า ฟอสฟอริเลตไคโตซานไม่ได้ห้อมล้อมพื้นที่ผิวทั้งหมดของอนุภาคน้ำมันแร่ในการก่อเกิดอิมัลชัน ทำให้เซลล์สัมผัสกับน้ำมันแร่ ส่งผลให้ความมีชีวิตรอดของเซลล์ต่ออิมัลชันที่เตรียมจากฟอสฟอริเลตไคโตซานเป็นอิมัลซิฟายเออร์มีค่าน้อยกว่าสารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซานอย่างมากเมื่อเทียบกับปริมาณของฟอสฟอริเลตไคโตซาน (ไมโครกรัม)ในอิมัลชันที่เท่า ๆ กัน ภายหลังการเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์

ดังนั้นเพื่อลดความเป็นพิษของนาโนอิมัลชัน จำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นของสารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซานที่ทำหน้าที่เป็นอิมัลซิฟายเออร์เพิ่มมากขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการห้อมล้อมอนุภาคน้ำมันได้มากขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงเตรียมนาโนอิมัลชันโดยใช้ฟอสฟอริเลตไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก เป็นเฟสน้ำ และใช้ภาวะในการเตรียมนาโนอิมัลชันเช่นเดียวกันกับนาโนอิมัลชันที่เตรียมจากสารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก จากนั้นทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์เช่นเดียวกัน และวัดเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตดังแสดงในภาพที่ 4.8



ภาพที่ 4.8 เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทดสอบด้วยนาโนอิมัลชันโดยใช้ฟอสฟอริเลตไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 1 และร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก เป็นอิมัลซิฟายเออร์ ทดสอบที่ปริมาตรอิมัลชันต่างๆ เทียบกับน้ำมันแร่ที่กระจายตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาดอนุภาค 170 นาโนเมตร (◀ คือ นาโนอิมัลชันที่ใช้ฟอสฟอริเลตไคโตซานร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ★ คือ นาโนอิมัลชันที่ใช้ฟอสฟอริเลตไคโตซานร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก และ ○ คือ น้ำมันแร่ที่กระจายตัวในตัวกลาง)

* ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างนาโนอิมัลชัน (โดยใช้ฟอสฟอริเลตไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 1 และร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นอิมัลซิฟายเออร์) เทียบกับน้ำมันแร่ที่กระจายตัวในตัวกลางขนาดนาโน โดยใช้ข้อมูลทางสถิติแบบ Paired-Samples-T-Test ควบคุมช่วงสถิติ $p<0.05$

จากภาพที่ 4.8 พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซานซึ่งทำหน้าที่เป็นอิมัลซิฟายเออร์เป็นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ทำให้ลดความเป็นพิษของนาโนอิมัลชันและ

น้ำมันแร่อย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติเกือบทุกปริมาตรที่ใช้ทดสอบ ชี้ให้เห็นว่า ฟอสฟอริเลตไคโตซานที่ความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นสามารถห้อมล้อมหยดน้ำมันได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น และช่วยลดพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างอนุภาคน้ำมันแร่ในนาโนอิมัลชันและเซลล์ ส่งผลให้ได้นาโนอิมัลชันที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดีขึ้น

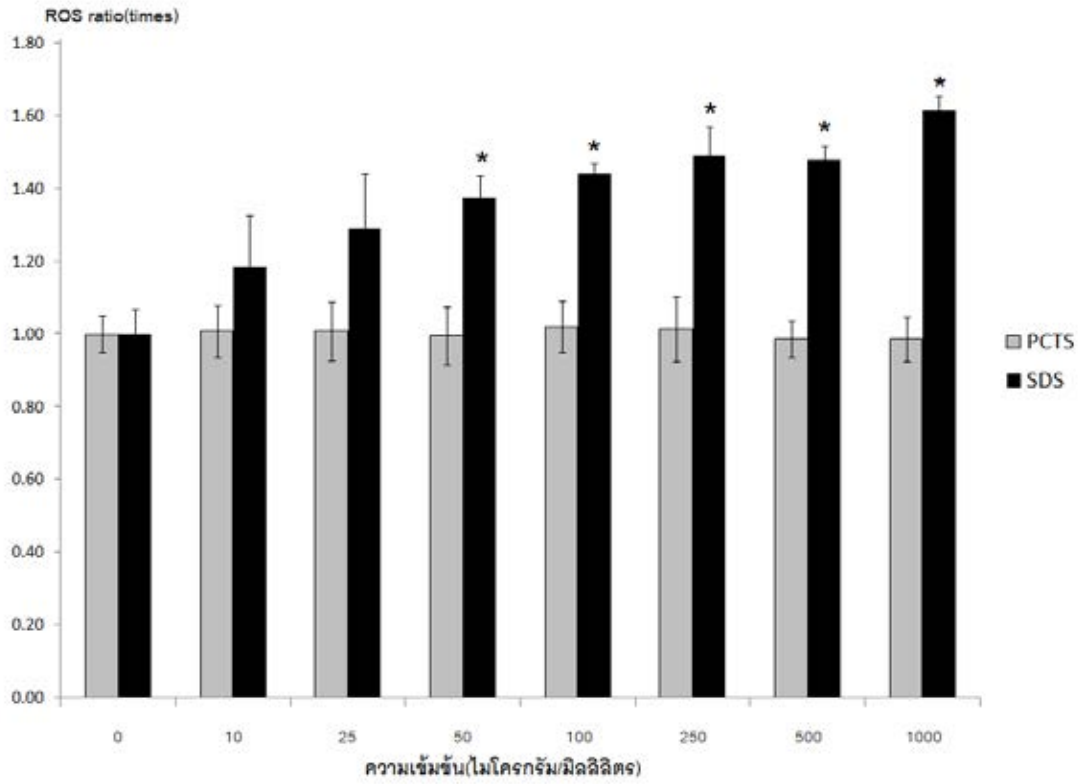
4.4.2 การทดสอบการสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Intracellular ROS production : DCF assay)

เนื่องจากสารเคมีหรือสารตัวอย่างอาจกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระ (Reactive Oxygen Species, ROS) ที่เป็นสาเหตุหนึ่งที่ก่อให้เกิดปัญหาริ้วรอย ดังนั้น ในงานวิจัยส่วนนี้จะวิเคราะห์หาปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยการเติม 2,7-dichlorfluorescein-diacetate (DCFH-DA) ซึ่งเป็นสารที่ไม่เรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ลงไป เมื่อสารแพร่ผ่านเข้าสู่เซลล์ อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จะเปลี่ยนโครงสร้างของ DCFH-DA ให้เป็น DCF ซึ่งเป็นสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยเริ่มต้นจากการทดสอบสารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซาน (PCTS) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) เพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของอิมัลซิฟายเออร์หรือสารลดแรงตึงผิวต่อการสร้างสารอนุมูลอิสระ อีกทั้งทดสอบการสร้างสารอนุมูลอิสระ เมื่อสัมผัสกับน้ำมันแร่ที่ปริมาตรต่าง ๆ เนื่องจากน้ำมันแร่ใช้เป็นเฟสน้ำมันในการเตรียมอิมัลชัน จากนั้นทดสอบกับอิมัลชันที่เตรียมโดยใช้ฟอสฟอริเลตไคโตซานเป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่ขนาดแตกต่างกัน เพื่อศึกษาอิทธิพลของขนาดอนุภาคต่อการสร้างสารอนุมูลอิสระ

- **การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของฟอสฟอริเลตไคโตซานต่อการสร้างสารอนุมูลอิสระ**

สารอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุหนึ่งที่ก่อให้เกิดปัญหาริ้วรอย สารใหม่ ๆ ที่นำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เวชสำอางควรมีการทดสอบการสร้างอนุมูลอิสระ เนื่องจากการใช้ฟอสฟอริเลตไคโตซานเป็นอิมัลซิฟายเออร์ในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง อาจมีการใช้ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของฟอสฟอริเลตไคโตซานในช่วงระหว่าง 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์เวชสำอางทั่วไป บ่มเพาะกับเซลล์ HaCaT ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่สร้างภายในเซลล์

ที่สัมผัสสารตัวอย่างเทียบกับเซลล์ชุดควบคุมที่ไม่มีการสัมผัสกับสารตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 4.9



ภาพที่ 4.9 การสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์เมื่อทดสอบกับสารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซานและโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

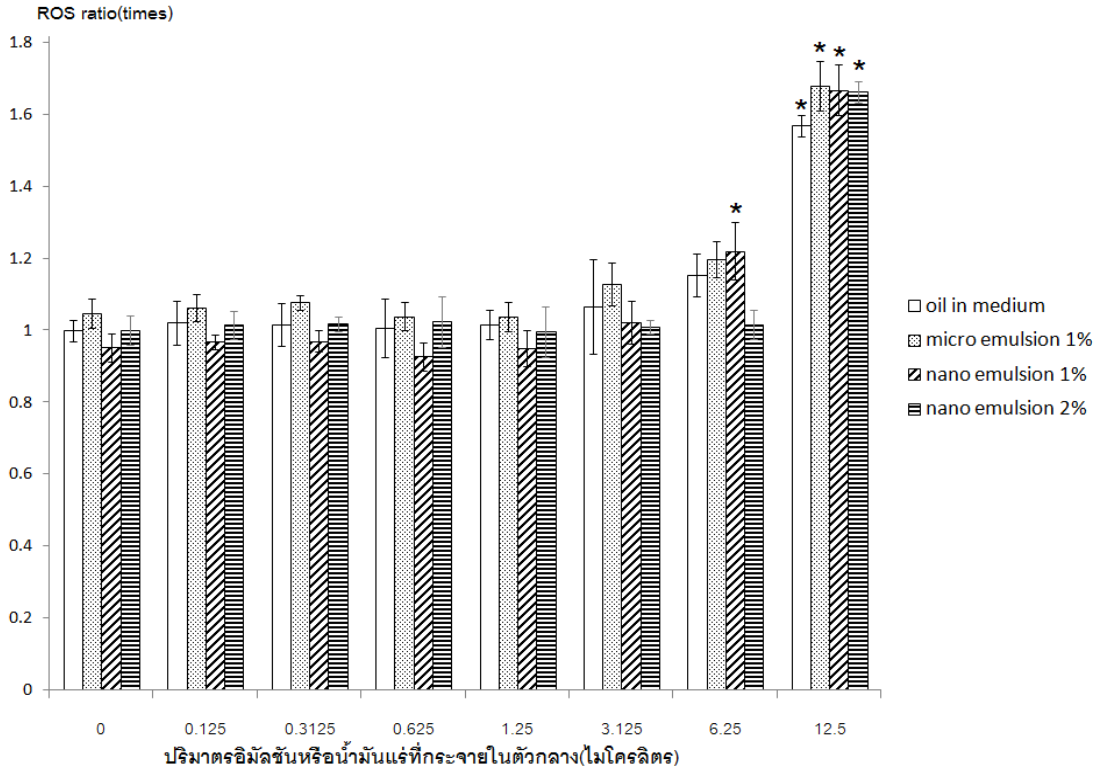
***** ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติของข้อมูลเทียบกับชุดควบคุม โดยใช้ข้อมูลทางสถิติแบบ ANOVA ควบคุมช่วงสถิติด้วยวิธี Turky ($p<0.05$)

จากภาพที่ 4.9 พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซานเปรียบเทียบกับชุดควบคุมก็คือ 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าไม่มีการสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ชี้ให้เห็นว่าสารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซานที่จะนำมาใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์นั้น ไม่ก่อให้เซลล์ผิวหนังสร้างสารอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุของริ้วรอย ซึ่งแตกต่างจากการทดสอบด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตที่เมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้การสร้างสารอนุมูลอิสระภายใน

เซลล์เพิ่มมากขึ้น การสร้างสารอนุมูลอิสระของเซลล์ที่สัมผัสกับโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ความเข้มข้นของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเป็น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เช่นเดียวกับผลการทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ ซึ่งการสร้างสารอนุมูลอิสระเกิดได้จากหลายสาเหตุ อาทิเช่น สร้างจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของร่างกายเอง การติดเชื้อ อุณหภูมิ แวดล้อม ความชื้น แรงเสียดสี ความเครียดภายในจิตใจ และสารเคมีที่เป็นอันตราย เพราะฉะนั้นอาจเป็นไปได้ว่าโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตซึ่งเป็นสารเคมีที่อันตรายและเป็นพิษต่อเซลล์ทำให้ไมโทรคอนเดรียของเซลล์สร้างสารอนุมูลอิสระขึ้น

- **การศึกษาอิทธิพลของน้ำมันแร่ อิมัลชัน และ ขนาดของอนุภาคอิมัลชัน ต่อการสร้างสารอนุมูลอิสระ**

ในงานวิจัยส่วนนี้จะทดสอบการสร้างสารอนุมูลอิสระของเซลล์เมื่อสัมผัสกับน้ำมันแร่ที่กระจายตัวในอาหารเลี้ยงเซลล์ ขนาดอนุภาค 170 นาโนเมตร ไมโครอิมัลชัน (1-2 ไมโครเมตร) และนาโนอิมัลชันที่เตรียมจากฟอสฟอริเลตไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักและ ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก (ขนาดอนุภาค150-200นาโมเมตร) จากนั้นนำสารตัวอย่างที่ปริมาตรต่าง ๆ ตั้งแต่ 0-12.5 ไมโครลิตรไปเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ปริมาตรสุทธิเป็น 100 ไมโครลิตร บ่มเพาะกับเซลล์ HaCaT ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่สร้างภายในเซลล์ที่สัมผัสน้ำมันแร่เทียบกับเซลล์ชุดควบคุมที่ไม่มีการสัมผัสกับสารตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 4.10



ภาพที่ 4.10 การสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์เมื่อทดสอบกับน้ำมันแร่ ไมโครอิมัลชัน นาโนอิมัลชันที่ความเข้มข้นของฟอสฟอริเลตไคโตซานร้อยละ 1และร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ที่ปริมาตรสารตัวอย่างต่าง ๆ

* ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติของข้อมูลเทียบกับชุดควบคุม โดยใช้ข้อมูลทางสถิติแบบ ANOVA ควบคุมช่วงสถิติด้วยวิธี Turky ($p<0.05$)

จากภาพที่ 4.10 พบว่า การสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์เมื่อทดสอบกับน้ำมันแร่ อิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคระดับไมโครและนาโน หรือ ที่ความเข้มข้นของฟอสฟอริเลตไคโตซานที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ปริมาณสารอนุมูลอิสระของเซลล์ที่สัมผัสสารตัวอย่างมีค่าใกล้เคียงกับเซลล์ที่ไม่ได้สัมผัสสารตัวอย่าง ชี้ให้เห็นว่าไม่ว่าจะเป็นน้ำมันแร่ อิมัลชัน ขนาดอนุภาคของอิมัลชัน และ ความเข้มข้นของฟอสฟอริเลตไคโตซานที่ใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่เพิ่มมากขึ้น ไม่เหนี่ยวนำให้เซลล์สร้างสารอนุมูลอิสระที่ก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์ ถึงแม้ว่าจะเพิ่มปริมาตรสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบถึง 12.5 ไมโครลิตร จะทำให้เซลล์สร้างสารอนุมูลอิสระมากขึ้นแตกต่างจากเซลล์

ชุดควบคุมที่ไม่สัมผัสสารอย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติก็ตาม การสร้างสารอนุมูลอิสระของเซลล์เมื่อทดสอบสารตัวอย่างปริมาตรมาก ๆ เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยประมาณ 1.5-1.6 เท่าตัว

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 การสังเคราะห์ฟอสฟอริเลตไคโตซาน การวิเคราะห์และการตรวจสอบสมบัติของฟอสฟอริเลตไคโตซาน

5.1.1.1 ฟอสฟอริเลตไคโตซานสามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาฟอสฟอริเลชัน (Phosphorylation reaction) และพัฒนาความสามารถละลายน้ำโดยการทำให้เกิดเป็นเกลือโซเดียม (Sodium salt formation) อนุพันธ์ฟอสฟอริเลตไคโตซานที่ได้เป็นสารสีขาวพองฟู และมีน้ำหนักเบา

5.1.1.2 โซเดียมฟอสฟอริเลตไคโตซานแสดงการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของหมู่ฟอสเฟต ที่ความถี่ 1224 ซม$^{-1}$ 971 ซม$^{-1}$ และ 813 ซม$^{-1}$ แสดงถึงพีคของ P=O stretching พีคของ P-OH bonds และพีค P-O-C bonds

5.1.1.3 การสังเคราะห์ฟอสฟอริเลตไคโตซานโดยใช้อัตราส่วนโดยโมลของฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ต่อหนึ่งหน่วยซ้ำของไคโตซานเท่ากับ 2 จะได้อนุพันธ์ฟอสฟอริเลตไคโตซานซึ่งมีระดับแทนที่ประมาณ 0.5

5.1.1.4 ฟอสฟอริเลตไคโตซาน ประกอบด้วยโครงสร้างของวงน้ำตาล (pyranose ring) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และหมู่ฟอสเฟต (Phosphate group) หมู่อะมิโน (amino group) หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ดังนั้นฟอสฟอริเลตไคโตซานจึงมีความสามารถทำหน้าที่เป็นอิมัลซิฟายเออร์ได้

5.1.2 การเตรียมอิมัลชัน

การเตรียมนาโนอิมัลชัน เตรียมได้โดยการใช้เครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง (high-pressure homogenizer) อัดผ่านหัวฉีดภายใต้ความดัน 1,500 บาร์ โดยผ่านระบบทั้งหมด 6 รอบ ได้นาโนอิมัลชันที่มีขนาดอนุภาค 150-200 นาโนเมตร สำหรับการเตรียมไมโครอิมัลชัน

เตรียมได้โดยใช้เครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง (high-pressure homogenizer) และวิธีการใช้ปั๊มความดัน 4 บาร์ อัดผ่านหัวฉีดของเครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง จำนวน 4 รอบ ได้ไมโครอิมัลชันที่มีขนาดอนุภาค 1-2 ไมโครเมตร

5.1.3 การตรวจสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ

5.1.3.1 การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ (Viability Test)

5.1.3.1.1 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของฟอสฟอริเลตไคโตซานต่อความมีชีวิติรอดของเซลล์

สารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซานที่จะนำมาใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์นั้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นส่งผลให้เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตลดลงเพียงเล็กน้อย ชี้ให้เห็นว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ แตกต่างจากโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตที่ใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวในผลิตภัณฑ์เวชสำอางทั่วไป ทำให้เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติตั้งแต่ความเข้มข้นของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเป็น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์

5.1.3.1.2 การศึกษาอิทธิพลของปริมาตรของน้ำมันแร่ต่อความมีชีวิติรอดของเซลล์

น้ำมันแร่ ซึ่งใช้เป็นเฟสน้ำมันในการเตรียมอิมัลชัน ทำให้เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมากถึงประมาณร้อยละ 55 ชี้ให้เห็นว่าน้ำมันแร่ส่งผลเสียต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์

5.1.3.1.3 การศึกษาอิทธิพลของอิมัลชันที่เตรียมโดยใช้ฟอสฟอริเลตไคโตซานเป็นอิมัลซิฟายเออร์ต่อความมีชีวิติรอดของเซลล์ รวมทั้งศึกษาอิทธิพลของขนาดอนุภาคอิมัลชันต่อความมีชีวิตรอด

เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติตั้งแต่ปริมาตรอิมัลชัน 1.25 ไมโครลิตรสำหรับไมโครอิมัลชัน และ ตั้งแต่ปริมาตรอิมัลชัน 0.63 ไมโครลิตรสำหรับนาโนอิมัลชัน และเมื่อเพิ่มปริมาตรมากขึ้น จะทำให้เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมากถึงประมาณร้อยละ 65 และ 40 สำหรับไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชัน

ตามลำดับ ชี้ให้เห็นว่าขนาดของอิมัลชันส่งผลต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์ โดยขนาดยิ่งเล็ก คือ ระดับนาโนทำให้เซลล์มีชีวิตรอดน้อยกว่าระดับไมโคร ทั้งนี้เนื่องจากนาโนอิมัลชันมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับเซลล์มากกว่าไมโครอิมัลชัน ทำให้เพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสทั้งฟอสฟอริเลตไคโตซานซึ่งไม่เป็นพิษ และน้ำมันแร่ซึ่งเป็นพิษมากขึ้น

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซานซึ่งทำหน้าที่เป็นอิมัลซิฟายเออร์เป็นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ทำให้ลดความเป็นพิษของนาโนอิมัลชันและน้ำมันแร่อย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติ ส่งผลให้ได้นาโนอิมัลชันที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดีขึ้น

5.1.3.2 **การทดสอบการสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์** (Intracellular ROS production : DCF assay)

5.1.3.2.1 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของฟอสฟอริเลตไคโตซานต่อการสร้างสารอนุมูลอิสระ

สารละลายฟอสฟอริเลตไคโตซานที่จะนำมาใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ไม่ก่อให้เซลล์ผิวหนังสร้างสารอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุหนึ่งของปัญหาริ้วรอย ซึ่งแตกต่างจากการทดสอบด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตที่เมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้การสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น

5.1.3.2.2 การศึกษาอิทธิพลของน้ำมันแร่ อิมัลชัน และ ขนาดของอนุภาคอิมัลชัน ต่อการสร้างสารอนุมูลอิสระ

การสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์เซลล์เมื่อทดสอบกับน้ำมันแร่ อิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคระดับไมโครและนาโน หรือ ที่ความเข้มข้นของฟอสฟอริเลตไคโตซานที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ปริมาณสารอนุมูลอิสระของเซลล์ที่สัมผัสสารตัวอย่างมีค่าใกล้เคียงกับเซลล์ที่ไม่ได้สัมผัสสารตัวอย่าง ชี้ให้เห็นว่าสารตัวอย่างไม่เหนี่ยวนำให้เซลล์สร้างสารอนุมูลอิสระที่ก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรทดลองกักเก็บสารออกฤทธิ์ และทดสอบการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ผ่านผิวหนังเทียม

รายการอ้างอิง

[1] Sasiki, K.; Tanaka, N.; Watanabe, M.; and Yamada, M. Comparison of cytotoxic of chemical in four difference cells types. Toxic in vitro 5(1991): 403-406.

[2] Nakaum,M.; Funami, T.; Noda, S.; Ishihar, S.; Al-Assaf, S.; Nishinari, K.; and Phillips, G.O. Comparison of sugar beet pectin, soybean soluble polysaccharide,and gum arabic as food emulsifiers. 1. Effect of concentration, pH,and salts on the emulsifying properties. Food Hydrocolloids 22(2008): 1254–1267.

[3] Schulz, P.C.; Rodriguez, M.S.; Del Blanco, L.F.; Pistonesi M.; and Agullo, E. Emulsification properties of chitosan. Colloid Polymer Science 276(1998):1159-1165.

[4] Endreβ, H. U.; and Rentschler, C. Chances and limit for the use of pectin as emulsifier-part 1. The European Food and Drink Review (1999): 49-53.

[5] Rodriguez, M.S.; Albertengo, L.A.; and Agullo, E. Emulsification capacity of chitosan. Carbohydrate Polymer 48(2002): 271-276.

[6] Chuah, A.M..; Kuroiwa, T.; Kobayashi, I.; and Nakajima, M. Effect of chitosan on the stability and properties of modified lecithin stabilized oil-in-water monodisperse emulsion prepared by microchannel emulsification. Food Hydrocolloids 23(2009): 600–610.

[7] Mun, S.; Decker, E.A.; McClements, D.J. Effect of molecular weight and degree of deacetylation of chitosan on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant–chitosan membranes. Journal of Colloid and Interface Science 296(2006): 581–590.

[8] Chongprakobkit, S.Development of anionic chitosan as water soluble emulsifier. Ph.d. Nanoscience and Technology Program. Graduate school, Chulalongkorn University, 2011.

[9] Chitin and Chitosan Biomaterial. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก http://www.material.chula.ac.th/chitosan/CCB.htm. [2011]

[10] Structure of Chitosan. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก http://www.gmp-chitosan.com/en/products-services/chitosan.html [2011]

[11] Preparation of Chitin and Chitosan. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก http://www.drugdeliverytech.com/ [2011]

[12] Rnnaudo, M.; and Domard, A. Solution of properties chitosan. Chitin and chitosan, sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. London and New York: Elsevier (1989): 71-86.

[13] Kumar, M. A review of chitin and chitosan application. Reactive and Functional Polymers 46(2000): 1-27.

[14] Shigemasa, Y.; Matsuura, H.; Sashiwa, H.; and Saimoto, H. Evaluation of different absorbance ratio from infrared spectroscopy for ananlyzing the degree of deacetylation in chitin. International Journal of Biological Macromolecules 18(1996): 237-242.

[15] Balazs, N.; and Sipos, P. Limitations of pH-potentiometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. Carbohydrate Research 342 (2007): 124-130.

[16] Lal, G.S.; and Hayes, E.R. Determination of amine content of chitosan by pyrolysis-gas chromatograpy. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 6(1984): 183-193.

[17] Robert, G.A.; and Domszy, J.G. Determination of the viscometric constants for chitosan. International Journal of Biological Macromolecules 4 (1982): 374-377.

[18] Huang, C.; Chen, S.; and Pan, J.R. Optimal condition for modification of chitosan: a biopolymer for coagulation of colloidal particles. Water Research 34(2000): 1057-1062.

[19] Li,Jin.; and Liang H. Influence of molecular parameters on the degradation of chitosan by a commercial enzyme. Polymer Degradation and Stability 92(2007): 515-524.

[20] ประโยชน์ของไคโตซาน.[ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก http://www.Thailand Institute of Nuclear Technology(TINT).mht [2011]

[21] Preparing emulsion. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก http://www.gate2tech.com/article.php3?id_article=9 [2011]

[22] อิมัลชันประเภทต่างๆ [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก http://www.cargilltexturizing.com/products/functional/emulsifier/ [2011]

[23] อิมัลซิฟายเออร์และสารลดแรงตึงผิว [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก www.dss.go.th/dssweb/starticles/files/cp_7_2548_surfactant.pdf [2011]

[24] รศ.ดร.กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์ และ อ.ดร.นวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ. ความรู้พื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 1.นครปฐม : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์, 2550.

[25] Primary cells. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก http://www.molecularpain.com/content/5/1/43/figure/F1?highres=y

[26] Thomas, K.; and Agnes, G. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. Seminars in Cell & Developmental Biology 16(2005): 474–486.

[27] Sodenberg, T.; Johansson, A.; and Gref, R. Toxic effects of some conifer resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells. Toxicology 107(1996): 99-109.

[28] Aranda, F.; and Villalain, J. The interaction of abietic acid with phospholipid membranes. Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology 1327(1997): 171-180.

[29] Zanatta, C.; Ugartondo, V.; Mitjans M.; Rocha-Filho, P.; and Vinardell, M. Low cytotoxicity of creams and lotions formulate with Buriti oil. Food and Chemical Toxicology 46(2008): 2776–2781.

[30] Tachaboonyakiat, W.; Netswasdi, N.; Netswasdi, V.; and Opaprakasit, M. Elimination of inter- and intramolecular crosslinks of phosphorylted chitosan by sodium salt formation.Polymer Journal 42(2010): 148-156.

[31] Li, Q.L.; Chen, Z.Q.; Darvell, B.W.;Zeng, Q.; Li, G.; Ou, G.M.; and Wu, M.Y. Biomimetric synthesis of composites of hydroxyapatite and chitosanphosphorylated chitosan polyelectrolyte complex. Materials Letter 60(2006): 3533-3536.

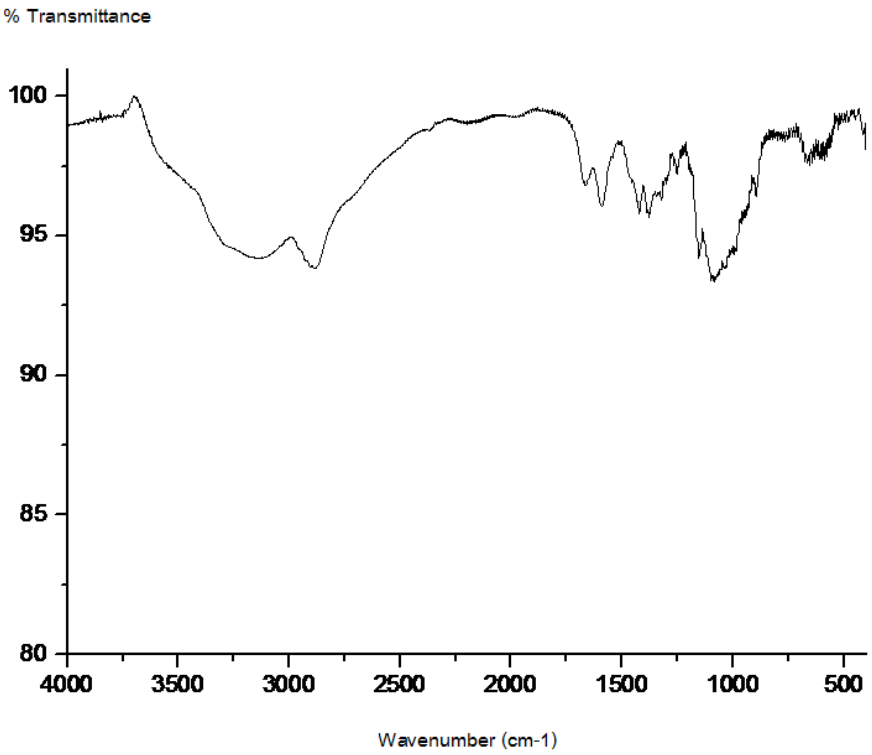
[32] Ni, J.; Chen, S.F.; and Hollander, D. Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. An international journal of gastroenterology and hepatology 39(1996): 234-241.

ภาคผนวก

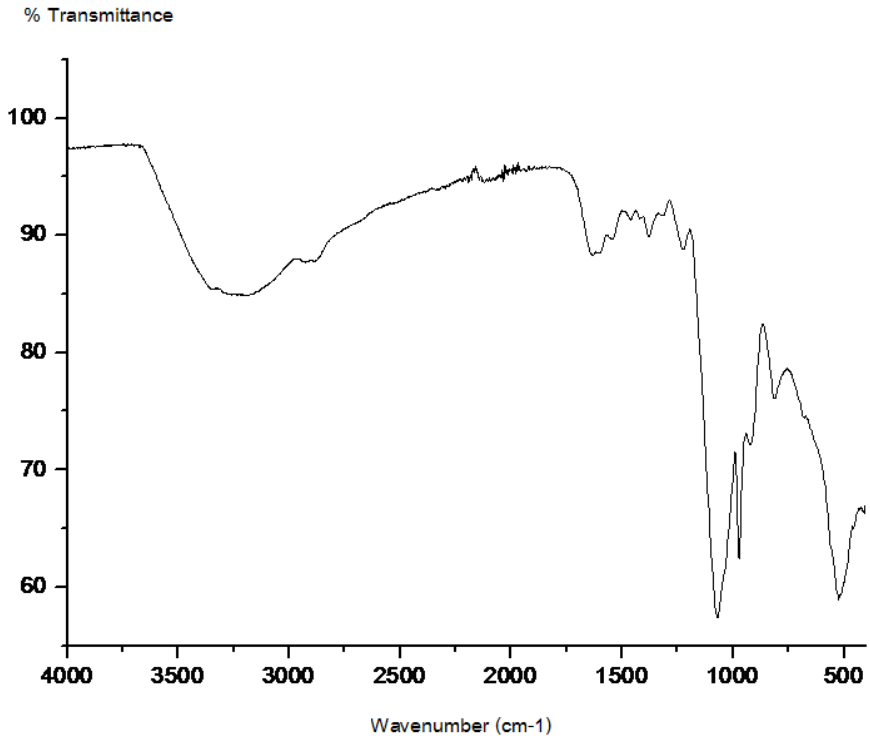
ภาคผนวก ก

1. การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-IR)

- Chitosan



- PCTS


% Transmittance
100
90
80
70
60
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
Wavenumber (cm-1)

2. **การหาระดับการแทนที่ของโซเดียมฟอสฟอริเลตไคโตซาน**

การคำนวณค่าปริมาณการแทนที่

$$Degree\ of\ substitution = \frac{\%P}{\%N}$$

โดยที่ %P คือ ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นองค์ประกอบจากการแทนที่หมู่ฟอสเฟต

%N คือ ปริมาณไนโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างไคโตซาน

ระดับการแทนที่หมู่ฟอสเฟตที่อัตราส่วนโดยโมลของฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ต่อหนึ่งหน่วยซ้ำหนึ่งหน่วยซ้ำไคโตซานเท่ากับ 2

ธาตุองค์ประกอบ	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
%P	8.12	7.48	7.81
%N	15.61	14.36	15.93
%P : %N	0.52	0.52	0.49

ระดับการแทนที่เฉลี่ย เท่ากับ 0.51

ภาคผนวก ข

1. **การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์** (Cytotoxicity assays)

การทดลองที่ 1-3 PCTS : (HaCaT cell / 5000 **เซลล์ / เวลาในการทดสอบ** 24 **ชั่วโมง)**									
PCTS (μg/ml)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย PCTS&SDS รวม 6 ครั้ง	%เซลล์ที่มีชีวิต(1)	%เซลล์ที่มีชีวิต (2)	%เซลล์ที่มีชีวิต (3)	%เซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ย 6 ครั้ง	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0	0.568	0.522	0.614	0.539	105.38	96.84	113.91	100	5.92
10	0.543	0.511	0.593		100.74	94.80	110.01	101.85	6.26
25	0.529	0.504	0.586		98.14	93.50	108.71	100.12	6.37
50	0.497	0.498	0.577		92.20	92.39	107.05	97.21	6.95
100	0.491	0.468	0.557		91.09	86.82	103.33	93.75	7
250	0.472	0.443	0.528		87.56	82.18	97.95	89.23	6.55
500	0.458	0.434	0.498		84.97	80.51	92.39	85.96	4.9
1000	0.451	0.426	0.488		83.67	79.03	90.53	84.41	4.73

การทดลอง 1-3 SDS : (HaCaT cell / 5000 **เซลล์ / เวลาในการทดสอบ** 24**ชั่วโมง**)									
SDS (μg/ml)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย PCTS&SDS รวม 6 ครั้ง	%เซลล์ที่มีชีวิต(1)	%เซลล์ที่มีชีวิต (2)	%เซลล์ที่มีชีวิต (3)	%เซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ย 6 ครั้ง	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0	0.521	0.472	0.561	0.518	100.58	91.12	108.30	100	8.19
10	0.484	0.419	0.522		93.44	80.89	100.77	91.70	7.89
25	0.452	0.408	0.514		87.26	78.76	99.23	88.42	8.07
50	0.102	0.141	0.211		19.69	27.22	40.73	29.21	8.37
100	0.001	0.001	0.001		0.19	0.19	0.19	0.19	0
250	0.000	0.000	0.000		0.00	0.00	0.00	0.00	0
500	0.000	0.000	0.000		0.00	0.00	0.00	0.00	0
1000	0.000	0.000	0.000		0.00	0.00	0.00	0.00	0

การทดลอง 1-3 น้ำมัน (mineral oil) : (HaCaT cell / 5000 **เซลล์ / เวลาในการทดสอบ 24ชั่วโมง**)									
Oil in medium (µl)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย 3 ครั้ง	%เซลล์ที่มีชีวิต(1)	%เซลล์ที่มีชีวิต(2)	%เซลล์ที่มีชีวิต(3)	%เซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ย 3 ครั้ง	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0	0.713	0.716	0.696	0.708	100.71	101.13	98.31	100	1.24
0.125	0.685	0.677	0.668		96.75	95.62	94.35	95.57	1.56
0.3125	0.675	0.65	0.625		95.34	91.81	88.28	91.81	2.88
0.625	0.635	0.637	0.607		89.69	89.97	85.73	88.47	1.94
1.25	0.520	0.527	0.508		73.45	74.44	71.75	73.21	1.11
3.125	0.478	0.394	0.494		67.51	55.65	69.77	64.31	6.19
6.25	0.385	0.401	0.409		54.38	56.64	57.77	56.26	4.86
12.5	0.394	0.393	0.375		55.65	55.51	52.97	54.71	6.19

การทดลอง 1-3 อิมัลชัน (ไมโคร 1%) : (HaCaT cell / 5000 **เซลล์ / เวลาในการทดสอบ 24ชั่วโมง**)									
Micro emulsion 1% (µl)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย micro&nano1% รวม 6 ครั้ง	%เซลล์ที่มีชีวิต(1)	%เซลล์ที่มีชีวิต(2)	%เซลล์ที่มีชีวิต(3)	%เซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ย 6 ครั้ง	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0	0.847	0.843	0.805	0.798	106.14	105.64	100.88	100	4.83
0.125	0.814	0.828	0.775		102.01	103.76	97.12	100.96	2.81
0.3125	0.767	0.791	0.758		96.12	99.12	94.99	96.74	1.75
0.625	0.759	0.739	0.722		95.11	92.61	90.48	92.73	1.89
1.25	0.726	0.737	0.682		90.98	92.36	85.46	89.60	2.98
3.125	0.638	0.651	0.604		79.95	81.58	75.69	79.07	2.48
6.25	0.637	0.614	0.588		79.82	76.94	73.68	76.82	2.51
12.5	0.508	0.510	0.488		63.66	63.91	61.15	62.91	1.24

การทดลอง 1-3 อิมัลชัน (นาโน 1%) : (HaCaT cell / 5000 เซลล์ / เวลาในการทดสอบ 24ชั่วโมง)									
Nano emulsion 1% (µl)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย micro&nano1% รวม 6 ครั้ง	%เซลล์ที่มีชีวิต(1)	%เซลล์ที่มีชีวิต(2)	%เซลล์ที่มีชีวิต(3)	%เซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ย 6 ครั้ง	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0	0.732	0.853	0.708	0.798	91.73	106.93	88.76	100	9
0.125	0.666	0.765	0.707		83.50	95.86	88.64	89.33	5.07
0.3125	0.691	0.769	0.676		86.59	96.37	84.67	89.21	5.12
0.625	0.716	0.673	0.622		89.72	84.34	77.90	83.99	4.83
1.25	0.629	0.637	0.526		78.82	79.87	65.91	74.87	6.35
3.125	0.548	0.506	0.472		68.67	63.37	59.15	63.73	3.4
6.25	0.369	0.377	0.432		46.24	47.24	54.09	49.19	3.49
12.5	0.286	0.315	0.377		35.80	39.47	47.28	40.85	4.79

การทดลอง 1-3 อิมัลชัน (นาโน 2%) : (HaCaT cell / 5000 เซลล์ / เวลาในการทดสอบ 24ชั่วโมง)									
Nano emulsion 2% (µl)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย 3 ครั้ง	%เซลล์ที่มีชีวิต(1)	%เซลล์ที่มีชีวิต(2)	%เซลล์ที่มีชีวิต (3)	%เซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ย 3 ครั้ง	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0	0.600	0.587	0.602	0.596	100.671	98.490	101.007	100	1.930
0.125	0.561	0.536	0.537		94.128	89.933	90.101	91.387	3.360
0.3125	0.568	0.531	0.533		95.302	89.094	89.430	91.275	4.940
0.625	0.508	0.544	0.514		85.235	91.275	86.242	87.584	4.580
1.25	0.577	0.592	0.608		96.812	99.329	102.013	99.385	3.680
3.125	0.570	0.587	0.590		95.638	98.490	98.993	97.707	2.560
6.25	0.569	0.549	0.577		95.470	92.114	96.812	94.799	3.420
12.5	0.418	0.387	0.445		70.134	64.933	74.664	69.911	6.870

2. **การทดสอบการสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์** (Intracellular ROS production : DCF assay)

การทดลองที่ 1-3 PCTS : (HaCaT cell / 5000 **เซลล์ / เวลาในการทดสอบ 3 ชั่วโมง)**									
PCTS (µg/ml)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย PCTS&SDS รวม 6 ครั้ง	%เรืองแสง(1)	%เรืองแสง2)	%เรืองแสง(3)	%เรืองแสงเฉลี่ย 6 ครั้ง	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0	5.963	5.266	5.724	5.649	1.06	0.93	1.01	1.00	0.05
10	5.953	5.166	5.988		1.05	0.91	1.06	1.01	0.07
25	6.064	5.016	6.003		1.07	0.89	1.06	1.01	0.08
50	5.990	4.968	5.929		1.06	0.88	1.05	1.00	0.08
100	6.214	5.227	5.863		1.10	0.93	1.04	1.02	0.07
250	6.197	4.995	5.994		1.10	0.88	1.06	1.01	0.09
500	5.553	5.191	5.997		0.98	0.92	1.06	0.99	0.05
1000	5.815	5.085	5.822		1.03	0.90	1.03	0.99	0.06

การทดลอง 1-3 SDS : (HaCaT cell / 5000 **เซลล์ / เวลาในการทดสอบ 3 ชั่วโมง**)									
SDS (µg/ml)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย PCTS&SDS รวม 6 ครั้ง	%เรืองแสง(1)	%เรืองแสง2)	%เรืองแสง(3)	%เรืองแสงเฉลี่ย 6 ครั้ง	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0	5.957	5.046	5.939	5.649	1.05	0.89	1.05	1.00	0.07
10	6.334	5.951	7.788		1.12	1.05	1.38	1.18	0.14
25	6.084	8.002	7.796		1.08	1.42	1.38	1.29	0.15
50	7.494	8.297	7.525		1.33	1.47	1.33	1.38	0.06
100	7.846	8.249	8.323		1.39	1.46	1.47	1.44	0.03
250	7.850	8.981	8.423		1.39	1.59	1.49	1.49	0.08
500	7.985	8.664	8.396		1.41	1.53	1.49	1.48	0.04
1000	8.743	9.372	9.236		1.55	1.66	1.63	1.61	0.04

การทดลอง 1-3 น้ำมัน (mineral oil) : (HaCaT cell / 5000 **เซลล์ / เวลาในการทดสอบ 3 ชั่วโมง**)									
mineral oil in media volume (µl)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย 3 ครั้ง	%เรืองแสง(1)	%เรืองแสง2)	%เรืองแสง(3)	%เรืองแสงเฉลี่ย 3 ครั้ง	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0	4.743	4.583	4.985	4.770	0.99	0.96	1.05	1.00	0.03
0.125	4.657	4.637	5.321		0.98	0.97	1.12	1.02	0.06
0.3125	4.732	5.231	4.582		0.99	1.10	0.96	1.02	0.06
0.625	4.829	4.829	4.754		1.01	1.01	1.00	1.01	0.08
1.25	4.575	5.039	4.92		0.96	1.06	1.03	1.02	0.04
3.125	5.932	5.003	4.321		1.24	1.05	0.91	1.07	0.13
6.25	5.305	5.892	5.321		1.11	1.24	1.12	1.15	0.06
12.5	7.432	7.321	7.692		1.56	1.53	1.61	1.57	0.03

การทดลอง 1-3 อิมัลชัน (ไมโคร 1%) : (HaCaT cell / 5000 **เซลล์ / เวลาในการทดสอบ 3 ชั่วโมง**)									
Micro emulsion 1% (µl)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย micro&nano1% รวม 6 ครั้ง	%เรืองแสง(1)	%เรืองแสง2)	%เรืองแสง(3)	%เรืองแสงเฉลี่ย 6 ครั้ง	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0	4.702	4.907	4.392	4.457	1.05	1.10	0.99	1.00	0.04
0.125	4.691	4.962	4.551		1.05	1.11	1.02	1.06	0.04
0.3125	4.9	4.82	4.689		1.10	1.08	1.05	1.08	0.02
0.625	4.542	4.927	4.433		1.02	1.11	0.99	1.04	0.04
1.25	4.557	4.898	4.438		1.02	1.10	1.00	1.04	0.04
3.125	5.034	5.139	4.932		1.13	1.15	1.11	1.13	0.06
6.25	5.022	5.429	5.56		1.13	1.22	1.25	1.20	0.05
12.5	7.613	7.001	7.841		1.71	1.57	1.76	1.68	0.07

การทดลอง 1-3 อิมัลชัน (นาโน 1%) : (HaCaT cell / 5000 เซลล์ / เวลาในการทดสอบ 3 ชั่วโมง)									
Nano emulsion 1% (µl)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย micro&nano1% รวม 6 ครั้ง	%เรืองแสง(1)	%เรืองแสง2)	%เรืองแสง(3)	%เรืองแสงเฉลี่ย 6 ครั้ง	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0	3.973	4.319	4.447	4.457	0.89	0.97	1.00	1.00	0.04
0.125	4.185	4.365	4.399		0.94	0.98	0.99	0.97	0.02
0.3125	4.193	4.272	4.512		0.94	0.96	1.01	0.97	0.03
0.625	3.867	4.220	4.314		0.87	0.95	0.97	0.93	0.04
1.25	3.895	4.371	4.425		0.87	0.98	0.99	0.95	0.05
3.125	4.160	4.751	4.772		0.93	1.07	1.07	1.02	0.06
6.25	4.928	5.653	5.745		1.11	1.27	1.29	1.22	0.08
12.5	7.001	7.632	7.668		1.57	1.71	1.72	1.67	0.07

การทดลอง 1-3 อิมัลชัน (นาโน 2%) : (HaCaT cell / 5000 เซลล์ / เวลาในการทดสอบ 3 ชั่วโมง)									
Nano emulsion 2% (µl)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย 3 ครั้ง	%เรืองแสง(1)	%เรืองแสง2)	%เรืองแสง(3)	%เรืองแสงเฉลี่ย 3 ครั้ง	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0	4.602	4.807	4.532	4.647	0.99	1.03	0.98	1.00	0.04
0.125	4.721	4.872	4.562		1.02	1.05	0.98	1.02	0.04
0.3125	4.692	4.82	4.689		1.01	1.04	1.01	1.02	0.02
0.625	4.792	4.981	4.511		1.03	1.07	0.97	1.02	0.07
1.25	4.557	4.898	4.438		0.98	1.05	0.96	1.00	0.07
3.125	4.701	4.78	4.601		1.01	1.03	0.99	1.01	0.02
6.25	4.682	4.891	4.591		1.01	1.05	0.99	1.02	0.04
12.5	7.713	7.634	7.841		1.66	1.64	1.69	1.66	0.03

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศศิวรา คงอ่อน เกิดเมื่อวันที่ 18 มกราคม พ.ศ.2529 ณ จังหวัด อ่างทอง สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิศวกรรมศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาวัสดุศาสตร์ สาขาปิโตรเคมีและวัสดุพอลิเมอร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ ภาควิชาวัสดุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อภาคการศึกษาต้นของปีการศึกษา 2552 และสำเร็จการศึกษาในภาคการศึกษาต้นของปีการศึกษา 2554 รวมระยะเวลาในการศึกษา 2 ปี 1 เทอม