

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1. วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1. การเตรียมตัวอย่างพืช

นำตัวอย่างพืชให้สี 7 ชนิด ได้แก่ ข้าวเหนียวดำ มะเกลือ แกแล ประดู่ สมอพิเภก ฝรั่ง และขมิ้นชัน ที่ซื้อจากตลาด มาทำการบดโดยใช้เครื่องบด และนำไปร่อนด้วย sieve ขนาด 100 เมช นำตัวอย่างที่เตรียมได้เก็บในที่แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.1.2. การเตรียมตัวอย่างเส้นผม

นำตัวอย่างผมดำที่ซื้อจากร้านขายวิกผมมาล้างด้วยแชมพูและเป่าให้แห้ง หลังจากนั้นนำตัวอย่างผมดำมาฟอกสีผมให้อ่อนลงด้วยสารผสมของ 9%(v/v) hydrogen peroxide และ 42%(w/w) potassium persulfate เป็นเวลา 30 นาที นำผมไปล้างออกด้วยน้ำจนสะอาด ผมที่ได้จะมีสีน้ำตาลทองจนถึงสีทอง นำตัวอย่างผมที่เตรียมได้เก็บในที่แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.1.3. สารเคมี

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ acetone, ethanol และ methanol (analytical grade) จาก Sigma Chemicals (NJ, USA) ส่วน silica gel 60 (70-230 mesh ASTM) จาก Merck (Germany) ใช้สำหรับการแยกส่วนของสารให้สีธรรมชาติด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี สาร mixture pigment standards จาก DHI LAB products (Denmark) ใช้สำหรับเปรียบเทียบกับสารให้สีจากพืช 7 ชนิดด้วยการวิเคราะห์โดย high-performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD) สาร hydrogen peroxide (QReC, New Zealand), ascorbic acid (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain) และ lime juice (local market in Thailand) ใช้เป็น oxidizing agents ส่วน ferric sulphate, alum, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Ajex Finechem, NSW, Australia) และสารสกัดจากชา ใช้เป็น mordant agent

3.2. วิธีการดำเนินการวิจัย

3.2.1. การสกัดสารให้สีธรรมชาติจากพืช

ศึกษาตัวอย่างพืชที่ให้สี 7 ชนิด ได้แก่ ข้าวเหนียวดำ มะเกลือ แกแล ประคู้ สมอพิเภก ฝาง และขมิ้นชัน โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ acetone, ethanol และ methanol ใช้ปริมาณวัตถุดิบต่อตัวทำละลายคือ 1:4 แช่นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ ใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 และนำสารละลายไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator (Büchi Rotavapor R200, Büchi Labortechnik AG, Switzerland) ได้ crude นำไปล้าง wax ออกด้วย petroleum ether เหลือที่เป็น petroleum ether ออก (Saito, 2000) และนำไประเหยตัวทำละลายออกอีกครั้ง ได้สารให้สีธรรมชาติเก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 °C นำไปวัดหาปริมาณสารให้สีที่ได้ ค่าสี ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง วิเคราะห์หาสารสำคัญด้วย HPLC-DAD และนำไปแยกส่วนของสารให้สีธรรมชาติโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

3.2.1.1. การวัดปริมาณสารให้สีธรรมชาติ

นำสารสกัดที่ได้มาชั่งน้ำหนัก และคำนวณตามสูตร ดังนี้

$$\text{yield (\% w/w dry basis)} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช (กรัม)}} \times 100$$

3.2.1.2. การวัดค่าสี

วัดค่าสีของสารให้สีธรรมชาติจากพืชโดยใช้เครื่อง Miniscan EZ (Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, USA) ด้วยระบบ CIELAB color system ค่า L* หมายถึงค่าความสว่าง (ค่า L* ต่ำ คือ สว่างน้อย, ค่า L* สูง คือ สว่างมาก) ค่า a* หมายถึงค่าสีช่วงสีแดง (ค่า +) ถึงสีเขียว (ค่า -) และค่า b* หมายถึงค่าสีช่วงสีเหลือง (ค่า +) ถึงน้ำเงิน (ค่า -) ส่วนค่า hue angle (h°) คำนวณโดยใช้สูตร ดังนี้

$$h^\circ = \arctan (b^*/a^*), \text{ if } a^* > 0 \text{ and}$$

$$h^\circ = 180 + \arctan (b^*/a^*), \text{ if } a^* < 0$$

$$h^\circ = 360 + \arctan (b^*/a^*), \text{ if } a^* > 0 \text{ and } b^* < 0$$

ค่า Hue angle (h°) แสดงค่ามุม 0° ถึง 360° โดยที่ค่ามุมจาก 0° ถึง 90° แสดงสีแดง ส้ม และเหลือง ค่ามุมจาก 90° ถึง 180° แสดงสีเหลือง เหลืองเขียว และเขียว ค่ามุมจาก 180° ถึง 270° แสดงสีเขียว น้ำ

เงิน-เขียว น้ำเงิน และค่ามุมจาก 270° ถึง 360° แสดงสีน้ำเงิน ม่วง และกลับไปสีสีแดงอีกครั้ง (Pek และคณะ, 2010)

3.2.1.3. การวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง และวิเคราะห์หาสารสำคัญด้วย high-performance liquid chromatography - diode array detection (HPLC-DAD)

วิเคราะห์สารให้สีธรรมชาติจากพืชด้วย HPLC-DAD (1200 Series, Agilent Technologies) และ Eclipse XDB-C18 column (4.6 mm ID x 250 mm, 5 μ m) โดยใช้ injection volume ปริมาณ 20 μ L และใช้ flow rate เท่ากับ 1 mL/min ตั้งค่า wavelength ของ DAD detector ที่ 450 nm ใช้ gradient systems ของ mobile phase เป็น solvent A (70:30 of methanol/28mM TBA) และ solvent B (methanol) โดยเริ่มจาก 5% B ที่เวลา 0-22 min, 95% B ที่ 22-29 min และ 5% B ที่ 29-36 min (Van Heukelem และ Thomas, 2001) วิเคราะห์หาสารสำคัญโดยทำการเปรียบเทียบกับ mixture pigment standard และวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารให้สีธรรมชาติโดยการ scan ระหว่าง 400 และ 700 nm ที่ rate 12 spectra/min

3.2.1.4. การแยกส่วนของสารให้สีธรรมชาติโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

เตรียมคอลัมน์แก้ว ขนาด 280x25 mm i.d. โดยบรรจุ silica gel (70-230 mesh) ที่แช่ใน 60% methanol ในน้ำ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลอิ่มตัวจึงบรรจุลงในคอลัมน์ หลังจากนั้นนำสารให้สีธรรมชาติที่สกัดได้จากข้อ 1 มา 0.3 g โดยละลายใน methanol ปริมาตร 2 ml ใส่ลงในคอลัมน์เพื่อทำการแยกส่วนของสารให้สีธรรมชาติ เติมสารละลายผสม 60% methanol ในน้ำ ซึ่งใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยควบคุมอัตราการไหลเป็น 1 มิลลิลิตร/นาที และเก็บสารทุกๆ 5 ml จนกระทั่งสารออกมาหมด เก็บสารแต่ละส่วนในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4°C (Lee และคณะ, 2007) และนำสารที่แยกได้ในแต่ละส่วนมาสแกนหาการดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุด โดยใส่สารละลายลงใน quartz cuvette แล้ววัดในช่วง 190-800 nm ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer (UV-1601, Shimadzu Corporation, Japan)

3.2.2. ศึกษาประสิทธิภาพของสารให้สีธรรมชาติต่อการติดสีผม

3.2.2.1. ศึกษาประสิทธิภาพของสารให้สีธรรมชาติต่อการติดสีผมเบื้องต้น

นำสารให้สีธรรมชาติจากพืชทั้ง 7 ชนิด (0.2 g) ที่เลือกจากการสกัดด้วยตัวทำละลายที่ดีที่สุด มาผสมด้วย 6%(v/v) hydrogen peroxide (oxidizing agents) ปริมาตร 4 mL หลังจากนั้นเติม ferrous sulphate ปริมาตร 2 mL เป็น mordant agents นำสารผสมใส่ลงบนตัวอย่างผมที่ผ่านการฟอกสีผมแล้วเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำตัวอย่างผมมาล้างด้วยน้ำจนน้ำล้างไม่มีสีปนออกมา เป่าให้แห้ง เก็บตัวอย่างผมที่ผ่านการทำสีในถุงซิปล็อค (Pushpangadan และคณะ 2006) นำตัวอย่างผมที่ผ่านการทำสีมาวัดค่าสี และเปรียบเทียบกับผมดำธรรมชาติ และผมที่ผ่านการฟอกสีผม ผลของการศึกษานี้เลือกพืชที่สามารถติดสีได้ดีที่สุดในการย้อมสีผม และนำไปศึกษาผลของ oxidizing agent และ mordant agent ต่อการย้อมสีผมโดยใช้สารให้สีธรรมชาติจากพืชต่อไป

3.2.2.2. ศึกษาผลของ oxidizing agent ต่อการย้อมสีผมโดยใช้สารให้สีธรรมชาติจากพืช

นำสารให้สีธรรมชาติจากพืช (0.2 g) ที่เลือกจากการสกัดด้วยตัวทำละลายที่ดีที่สุด มาผสมด้วย oxidizing agents 3 ชนิด ได้แก่ 6%(v/v) hydrogen peroxide, lime juice และ 10%(v/v) ascorbic acid ปริมาตร 4 mL หลังจากนั้นเติม ferrous sulphate ปริมาตร 2 mL เป็น mordant agents นำสารผสมใส่ลงบนตัวอย่างผมที่ผ่านการฟอกสีผมแล้วเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำตัวอย่างผมมาล้างด้วยน้ำจนน้ำล้างไม่มีสีปนออกมา เป่าให้แห้ง เก็บตัวอย่างผมที่ผ่านการทำสีในถุงซิปล็อค (Pushpangadan และคณะ 2006) นำตัวอย่างผมที่ผ่านการทำสีมาวัดค่าสี ค่า color strength และศึกษาพื้นผิวของเส้นผมด้วย microscope chromameter ผลของการศึกษานี้จะเลือก oxidizing agent ที่ดีที่สุดในการย้อมสีผม

3.2.2.3. ศึกษาผลของ mordant agent ต่อการย้อมสีผมโดยใช้สารให้สีธรรมชาติจากพืช

นำสารให้สีธรรมชาติจากพืช (0.2 g) ที่เลือกจากการสกัดด้วยตัวทำละลายที่ดีที่สุด มาผสมด้วย oxidizing agents ที่ดีที่สุด คือ 10%(v/v) ascorbic acid ปริมาตร 4 mL หลังจากนั้นเติม mordant agents 4 ชนิด ได้แก่ 2%(w/v) ferrous sulphate, 2%(w/v) alum, 2%(w/v) ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และสารสกัดจากชา ปริมาตร 2 mL นำสารผสมใส่ลงบนตัวอย่างผมที่ผ่านการฟอกสีผมแล้วเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำตัวอย่างผมมาล้างด้วยน้ำ

จนน้ำล้างไม่มีสีปนออกมา เป่าให้แห้ง เก็บตัวอย่างผมที่ผ่านการทำสีในถุงซิปล็อค (Pushpangadan และคณะ 2006) นำตัวอย่างผมที่ผ่านการทำสีมาวัดค่าสี (วิธีการตามข้อ 2.2.2) ค่า color strength และศึกษาพื้นผิวของเส้นผมด้วย scanning electron microscope (SEM)

3.2.3. การวิเคราะห์ผมที่ผ่านการทำสีผมโดยใช้สารให้สีธรรมชาติจากพืช

3.2.3.1. การวัดค่า color strength (K/S value)

วัดค่าสีของผมที่ผ่านการย้อมโดยใช้เครื่อง Miniscan EZ และนำค่าไปคำนวณค่า color strength (K/S value) ตาม Kubelka-Munk equation (Nagia และ EL-Mohamedy, 2007):

$$K/S = (1-R^2) / 2R$$

โดยที่ K คือ the sorption coefficient.

S คือ the scattering coefficient.

R คือ the reflection of the dyed hair.

3.2.3.2. ศึกษาพื้นผิวของเส้นผมที่ผ่านการทำสี

การวิเคราะห์ตัวอย่างผมที่ผ่านการทำสีด้วยเครื่อง Microscope Chromameter

นำตัวอย่างผมที่ผ่านการทำสีความยาวขนาด 1 cm ติดด้วยกระดาษขาว และวางทับด้วย microscope slide ทำการส่องด้วยเครื่อง microscope chromameter โดยการส่องตรวจวัด (Pushpangadan และคณะ, 2006)

การวิเคราะห์ตัวอย่างผมที่ผ่านการทำสีด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscopy (SEM)

นำตัวอย่างผมที่ผ่านการทำสีและไม่ผ่านการทำสีจะถูกเคลือบด้วยทองที่มีความลึก 30 nm และเครื่อง scanning electron microscopy (SEM) จะทำการสแกนตัวอย่างของเส้นผม (Guthrie และคณะ, 1995)