

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีทดลอง

2.1 วัสดุและสารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
แป้งมัน	-
สารส้ม	-
Calcium hydroxide	MERCK
Chloroform	MERCK
Citric acid powder	BDH
Copper sulfate	MERCK
Ethanol, 95%	MERCK
Ethylacetate	CARLO ERBA
Ferrus sulfate	MERCK
Hexane	MERCK
Hydrochloric acid	BDH
Indigo standard	FLUKA
Lactose	-
Magnesium chloride	MERCK
Methanol	MERCK
Silica gel, 60 GF ₂₅₄	MERCK
Sodium hydroxide	AKZO NOBLE
Sulfuric acid	LAB-SCAN, MERCK
TLC aluminum sheets (silica gel 60F ₂₅₄)	MERCK

2.2 เครื่องมือ

เครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องบด	-
ตะแกรงเบอร์ 9	-
ตู้อบ	MEMMERT
ถังแช่दनเลสมีฝาปิด	ไทยเสตนเลสตีล
Air pump	SIGMA
Analytical balance	SATORIUS
Centrifuge J2-Mc	BECKMAN
Column แก้วขนาด 45x3 cm.	-
Infrared spectrophotometer (Model A200)	JASCO
pH Meter 25	RADIOMETER
Rotatory evaporator	BUCHI
Spectronic 21	MILTON ROY
Spectrophotometer UV-VIS (Model U2000)	HITACHI

2.3 วัตถุดิบ

ใบครามสดและใบส้มสดจากจังหวัดต่างๆ ในภาคเหนือตอนบน

2.4 วิธีการทดลอง

2.4.1 การสกัดสารให้สีหลักจากครามและส้ม

2.4.1.1 การศึกษาวิธีการหาปริมาณอินดิโกในน้ำสกัดครามและส้ม

ในการพัฒนาการสกัดอินดิโกจากครามและส้มเพื่อแปรรูปและใช้เป็นสีข้อมในอุตสาหกรรมนั้นสิ่งที่จำเป็นต้องทราบคือปริมาณของอินดิโกที่สกัดได้ในน้ำหมักแต่ละครั้งเพื่อให้มีสัดส่วนของน้ำสีที่แน่นอนในการข้อม จึงได้ทำการศึกษาวิธีการหาปริมาณอินดิโกในน้ำหมักโดยวิธีทาง UV-Vis spectroscopy กล่าวคือ ทำการตรวจหาความยาวคลื่นสูงสุดของการดูดกลืนแสงของอินดิโกมาตรฐานในช่วงแสงที่มองเห็นได้ แล้วใช้ความยาวคลื่นนี้สำหรับวัดการดูดกลืนแสงสารละลายอินดิโกมาตรฐานปริมาณต่างๆกัน แล้วสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นนี้กับปริมาณของอินดิโกมาตรฐาน

2.4.1.2 การสกัดอินดิโกจากคราม

แบ่งใบครามเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกใช้ในรูปแบบใบครามสด อีกส่วนนำไปผึ่งให้แห้ง 3 วัน แล้วแช่ในเอทานอลที่อุณหภูมิห้องโดยมีรายละเอียดดังนี้

ใบครามสด 134.45 กรัม แช่เอทานอล 95% ปริมาตร 200 มล.

ใบครามสด 57.87 กรัม ผึ่งแห้ง 3 วัน เหลือน้ำหนัก 16.7 กรัม แช่เอทานอล 95% ปริมาตร 25 มล.

นำน้ำสกัดใบครามที่ได้ทั้งสดและแห้งที่แช่เอทานอล 3 วัน มาแยกดูองค์ประกอบของสารให้สี เปรียบเทียบกับอินดิโกมาตรฐานด้วยโครมาโทกราฟีผิวบาง และหาตัวชะที่เหมาะสม

2.4.1.3 การสกัดอินดิโกจากช่อม

ในการศึกษาการสกัดอินดิโกจากใบช่อมนั้นแบ่งการทดลองเป็นการหมักใบช่อมสดและใบช่อมแห้งด้วยน้ำและแอลกอฮอล์เปรียบเทียบกัน ซึ่งขั้นตอนต้นๆจะเหมือนกันคือนำใบช่อมสดหรือแห้งที่จะใช้สกัดมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆบรรจุลงในถุงผ้าแล้วมัดปากให้แน่นชั่งน้ำหนักแล้วใส่ลงในถังหมักสเตนเลส ถ้าหมักด้วยน้ำก็ใส่น้ำจนท่วมถุงแล้วปิดฝาทิ้งไว้ ถ้าสกัดด้วยแอลกอฮอล์ก็แช่ด้วยเอทานอล 95% จนท่วมถุงเช่นกันปิดฝาทิ้งไว้ตามเวลาที่กำหนดแล้วจึงไขน้ำสกัดออกมา ถ้าสกัดด้วยน้ำก็ไขน้ำหมักออกมาใส่ถังแล้วเติมน้ำค้างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ซึ่งเตรียมโดยละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ในน้ำอัตราส่วน 1:3 โดยปริมาตรแล้วทิ้งให้ตกตะกอน คูดน้ำใสข้างบนมาใช้ ซึ่งจะมี pH ประมาณ 11.0 – 12.0 จะเติมในปริมาตร 2 ส่วนต่อน้ำสกัด 1 ส่วน ให้อากาศด้วยเครื่องให้อากาศในอ่างเลี้ยงปลาประมาณ 30 นาที จนฟองสีน้ำเงินขึ้นเต็ม ตั้งทิ้งไว้ค้างคืนตะกอนอินดิโกจะตกลงด้านล่าง คูดน้ำด้านบนซึ่งมีสีออกน้ำตาลทิ้งไป ถ้างตะกอนโดยการเติมน้ำค้างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไปใหม่คนให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนแล้วคูดน้ำทิ้ง จากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำด้านบนทิ้งให้หมดจะได้ indigo paste

ถ้าสกัดด้วยแอลกอฮอล์ นำน้ำสกัดที่ได้ไปเตรียมน้ำสกัดเข้มข้นโดยการระเหยแอลกอฮอล์ออกด้วยเครื่อง Rotatory evaporator

2.4.1.3.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัด

การศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการหมักและความสดของวัตถุดิบทำได้โดยทำการหมักวัตถุดิบที่มีความสดต่าง ๆ กัน (สด ผึ่งลม 72 ชั่วโมง แห้ง) ในน้ำเป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน เปรียบเทียบลักษณะของน้ำหมักและ paste ที่ได้ แล้วตรวจวัดปริมาณอินดิโกที่อยู่ใน paste ที่ได้จากหมักวิธีต่างๆ โดยนำ paste มาปั่นที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที คูดสารละลายออกให้หมดแล้วนำ paste มา 100 มก. ละลายในกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มล. เติมน้ำกลั่นจนมี

ปริมาตร 500 มล. แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 611 นาโนเมตร หาปริมาณอินดิโกเทียบกับกราฟมาตรฐานอินดิโก

2.4.1.3.2 การศึกษาผลของกรดและเบสที่เรียในการไฮโดรไลสน้ำตาลออกจากอินดิโก

ได้ทำการแยกเบสที่เรียที่ช่วยหมักครามได้ 3 ชนิดและได้ทดลองเติมลงในน้ำหมักที่ได้จากการหมักส้อมสดในน้ำใหม่ 24 ชั่วโมง ปริมาตร 200 มล. เทียบกับที่เติมกรดซิตริก 6 โมลาร์ 20 มล. กรดเกลือ 6 โมลาร์ 20 มล. และไม่เติมตามลำดับแล้วหมักทิ้งไว้ 1 วัน แล้วเติมน้ำค้างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ pH 11.4 ให้อากาศและทิ้งให้ตกตะกอนนำมาปั่นที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วหาปริมาณ paste ที่ได้

2.4.1.3.3 การทดลองย้อมผ้าฝ้ายด้วยสีอินดิโกที่สกัดได้

นำผ้าฝ้ายที่จะย้อมสีมาทำความสะอาดโดยทำความสะอาดด้วยผงซักฟอกหรือสบู่หรือสารส้ม 8 เปอร์เซ็นต์รวมกับโซดาแอช 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักผ้าและเส้นฝ้าย ละลายในน้ำต้มใส่เส้นฝ้ายลงไปต้มด้วย 1 ชั่วโมง ยกทิ้งไว้ให้เย็นแช่ต่อไปอีก 1 คืน ซักในน้ำเปล่าให้สะอาด บิดให้หมาด กระตุกให้ตึง 2-3 ครั้งเตรียมนำไปย้อม ถ้ายังไม่ย้อมให้นำไปผึ่งให้แห้งเก็บไว้โดยไม่ให้โดนฝุ่น

การย้อมจะใช้สีอินดิโกที่สกัดได้จากวิธีต่างๆคือ สีที่ได้จากการหมักวัตถุดิบ 3 วัน สีที่ได้จากการหมักวัตถุดิบ 1 วัน สีที่ได้จากการหมักวัตถุดิบสด วัตถุดิบที่นำไปผึ่งลมแล้ว 72 ชั่วโมง วัตถุดิบที่แห้งแล้วและเปรียบเทียบระหว่างฝ้ายที่ไม่ได้ทำความสะอาดกับฝ้ายที่ทำความสะอาดแล้ว การเตรียมน้ำย้อมทำโดยใช้สี 100 กรัม น้ำค้าง 1 ลิตร ละลายให้เข้ากันทำการย้อม 3 ครั้งแล้วผึ่งให้แห้ง จากนั้นแช่ในน้ำยา fixing agent (quaternary ammonium) 20 นาที ผึ่งให้แห้งแล้วซักด้วยผงซักฟอกและน้ำยาปรับผ้านุ่ม

2.4.2 การทดสอบเคมีเบื้องต้นของสารสกัดอินดิโก

2.4.2.1 การทดสอบสารให้สีกลุ่มแคโรทีนอยด์

นำผงสีสกัดที่แห้งแล้วมาละลายในอะซีโตนหยดด้วยกรดกำมะถัน เข้มข้นถ้ามีสารแคโรทีนอยด์จะปรากฏเป็นสีน้ำตาลแดง หรือสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม กรองเก็บน้ำยาสกัดมาหยดด้วยกรดกำมะถันเข้มข้น ถ้ามีสารประกอบแคโรทีนอยด์จะปรากฏเป็นสีน้ำเงินหรือสีเขียวแกมน้ำเงิน

2.4.2.2 การทดสอบกลุ่มฟลาโวนอยด์

นำผงสีสกัดที่แห้งสกัดด้วยเมทานอลแยกสารสกัดที่ได้มาต้มกับกรดแมกนีเซียมพร้อมหยดด้วยกรดเกลือเข้มข้น ถ้าในน้ำยาสกัดมีสารประกอบฟลาโวนอยด์ชนิดที่มีโครงสร้าง Benzo- γ -pyrone เป็นนิวเคลียสจะปรากฏเป็นสีแดงอมส้มหรือสีแดงเข้มหรือสีแดงม่วง

2.4.2.3 การทดสอบกลุ่มอัลคาลอยด์

นำผงสีสกัดที่แห้งสกัดด้วยโซเดียมคาร์บอเนตและสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม กรองเก็บสารสกัดคลอโรฟอร์มนำมาระเหยแห้งแล้วนำมาละลายในกรดเกลือเข้มข้น 2 % ทำเป็นน้ำยาสกัดตัวอย่างนำไปทดสอบกับ Mayer's reagent และ Dragendorff's reagent ถ้ามีสารประกอบอัลคาลอยด์จะปรากฏเป็นตะกอนขาวหรือตะกอนสีส้มน้ำตาลตามลำดับ

2.4.2.4 การทดสอบกลุ่มแอนทราควิโนน

สกัดด้วยเมทานอล นำน้ำยาสกัดที่ได้มาต้มกับสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ เติมน้ำยาไฮโครเจนเปอร์ออกไซด์เจือจางลงไป กรองเก็บน้ำยาสกัดที่ได้แล้วเติมกรดน้ำส้มจนเป็นกรด สกัดน้ำยานี้ด้วยเบนซีน ถ้ามีสารประกอบแอนทราควิโนนจะปรากฏสีเหลืองในชั้นเบนซีน และเมื่อแยกชั้นเบนซีนมาเขย่ากับน้ำยาแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เจือจางจะปรากฏสีชมพูหรือแดงขึ้นในชั้นแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์

2.4.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของสารสีจากครามและฮ้อม

2.4.3.1 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง

นำน้ำสีฮ้อมที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีผิวบาง โดยใช้ซิลิกาเจล จี เป็นตัวดูดซับ และทดลองหาน้ำยาชะที่เหมาะสมในการแยกองค์ประกอบของสี โดยใช้อินดิโกมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบ เมื่อได้น้ำยาชะที่เหมาะสมแล้วก็ทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารสีโดยเตรียมน้ำยาชะที่เหมาะสม จากนั้นใส่น้ำยาชะลงในแท่งกักลม ปิดฝาแท่งให้มิดชิดประมาณ 30 นาที ก่อนการใช้งานเพื่อให้ไอสารละลายกระจายได้ทั่วแท่ง

นำน้ำสีฮ้อมที่ได้มาละลายด้วยคลอโรฟอร์มปริมาณเล็กน้อย ใช้หลอดคาปิลารีดูดสารละลายขึ้นมาแล้วหยดสารละลายที่ได้ลงบนแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบาง นำไปวางในแท่งที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้ เมื่อระดับของสารละลายถึงระดับ solvent front ที่เตรียมไว้ นำแผ่นโครมาโทแกรมออกมาทิ้งให้แห้งแล้วดูโครมาโทแกรมด้วยตาเปล่า

2.4.3.2 การแยกหาองค์ประกอบหลักโดยวิธีโครมาโทกราฟีคอลัมน์

ทำการแยกหาองค์ประกอบหลักสีแดงโดยการนำผงแห้งของน้ำสีย้อมเข้มข้นจำนวน 2.0 กรัม มาดำเนินการ ดังต่อไปนี้

- ก. นำผงแห้งของน้ำสีย้อมเข้มข้นจำนวน 2.0 กรัม มาสกัดด้วยคลอโรฟอร์มโดยใช้กรวยแยกจนสารสีออกมาจนหมด
- ข. นำน้ำยาสกัดคลอโรฟอร์มมาระเหยแห้ง
- ค. เติมน้ำมันอลเพื่อไปละลายสารสีออกมาให้หมด แล้วนำมาระเหยแห้งเพื่อไปแยกหาองค์ประกอบหลักด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีคอลัมน์ต่อไป
- ง. เติมคลอโรฟอร์มเพื่อไปละลายสารสีที่เหลือออกมาให้หมด แล้วนำมาระเหยแห้งเพื่อนำไปแยกหาองค์ประกอบหลักด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีคอลัมน์ต่อไป
- จ. การแยกหาองค์ประกอบหลักด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีคอลัมน์

รายละเอียดคือ ชั่งซิลิกาเจล 60 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มล. เติมหะเสนจนท่วม ซิลิกาเจลจนจนไม่มีฟองเกิดขึ้น ใช้คอลัมน์กระบอกแก้วขนาด 45 x 3 เซนติเมตรล้างคอลัมน์ ด้วยอะซิโตนแล้วหมุนปิดก๊อกด้านล่างใส่สารสีลงไปทีละน้อยโดยใช้แท่งแก้วยาวช่วย เพื่อป้องกันไม่ให้ซิลิกาเจลไหลออก จากนั้นเติมหะเสนลงไปเล็กน้อยและใช้แท่งแก้วคนไล่ฟองอากาศในลำโถงให้หมดหรือให้เหลือน้อยที่สุดเทซิลิกาเจลที่เตรียมไว้ข้างต้นลงในคอลัมน์ พร้อมทั้งเปิดก๊อกด้านล่างเพื่อให้ตัวทำละลายไหลออก ระวังไม่ให้ระดับของสารละลายต่ำกว่าระดับซิลิกาเจลเพื่อกันอากาศเข้า เมื่อระดับของซิลิกาเจลสูงจนถึงระดับที่ต้องการให้ปิดหน้าด้วยกระดาษกรอง นำน้ำยาสกัดเมทานอลจากข้อ ค. และ ง. มาแยกผ่านคอลัมน์ ชะด้วย chloroform / hexane (4/1), chloroform / hexane / methanol (7/4/1) ตามลำดับ จากนั้นเก็บสารมีสีที่ผ่านคอลัมน์ตามสีที่ลงมาเป็นส่วนๆ แล้วนำสารมีสีแต่ละส่วนที่แยกได้ไปทำโครมาโทกราฟีผิวบาง เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์

2.4.3.3 การทดสอบความบริสุทธิ์โดย TLC ที่มีตัวชะชนิดต่างๆแล้วได้ spot เดียว

นำสารละลายสีที่ได้จากการแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีคอลัมน์มาทดสอบความบริสุทธิ์โดยทำโครมาโทกราฟีผิวบางที่มีซิลิกาเจล จี เป็นตัวดูดซับและใช้น้ำยาชะหลายๆชนิดในการแยกองค์ประกอบของสีแล้วทำการทดสอบเหมือนข้อ 2.4.3.1 จากนั้นก็ตรวจดูแผ่นโครมาโทแกรมด้วยตาเปล่า ถ้าผลของโครมาโทแกรมได้ spot เดียวแม้ว่าจะใช้น้ำยาชะชนิดใดก็ตามแสดงว่าสารสีนั้นบริสุทธิ์ แต่ถ้าผลของโครมาโทแกรมที่ได้มากกว่า 1 spot แสดงว่าไม่บริสุทธิ์มีองค์ประกอบ

อื่นเจือปน ต้องนำไปทำโครมาโทกราฟีคอลัมน์ซ้ำอีกเรื่อยๆจนได้สารที่บริสุทธิ์ ทำการตกผลึกเพื่อนำไปวิเคราะห์ทางสเปกโตรสโกปีต่อไป

2.4.3.3 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารสีที่แยกออกมาได้

การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารสีที่แยกได้จากใบห้อม กระทำการวิเคราะห์หาคุณสมบัติทาง spectroscopy ดังนี้

ก. การวิเคราะห์ด้วย ultraviolet-visible spectroscopy

นำสารมีสีที่แยกได้บริสุทธิ์จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีมาหาความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด โดยนำสารมีสีที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV-VIS spectrophotometer และใช้น้ำยาจะเป็นสารอ้างอิงจะได้สเปกตรัมออกมา

ข. การวิเคราะห์ด้วย infrared spectroscopy

นำสารมีสีที่แยกได้บริสุทธิ์จากโครมาโทกราฟีคอลัมน์มาวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชัน โดยนำมาละลายในคลอโรฟอร์มเล็กน้อยแล้วหยดสารลงบนโซเดียมคลอไรด์เซลล์ แล้วปล่อยให้คลอโรฟอร์มระเหยจนแห้ง หยดสารซ้ำอีกเรื่อยๆเพื่อให้สารที่ต้องการวิเคราะห์เคลือบเป็นแผ่นฟิล์มและมีความเข้มข้นพอที่จะวิเคราะห์ได้ อาจทดสอบโดยการนำไปวิเคราะห์ดูก่อนหากต้องการให้สารเข้มข้นขึ้นอีกจึงค่อยหยดสารเพิ่มไปบนเซลล์ และนำไปวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโกปีจะได้อินฟราเรดสเปกตรัม

ค. การวิเคราะห์ด้วย mass-spectrometry

ง. การวิเคราะห์ด้วย C^{13} Nuclear magnetic resonance

จ. การวิเคราะห์ค่า chemical shift ของ C^{13} ในโครงสร้าง indirubin ด้วยการประมวลผลจากเครื่องคอมพิวเตอร์เปรียบเทียบกับค่า chemical shift ของ C^{13} ของสารสีที่แยกได้

2.4.4 การแปรรูปสีข้อมจากใบครามและใบห้อมสด

การแปรรูปสีข้อมจากใบห้อมนั้นได้กำหนดการแปรรูปสารให้สีอยู่ในสภาพของการแปรรูปเป็นเม็ดแกรนูลโดยการแปรรูปจากน้ำสีข้อมเข้มข้น(paste)สกัดจากใบสด (เนื่องจากผลการทดลองการแปรรูปจากใบห้อมแห้งที่บดละเอียดและผงแห้งชนิดฉุดพันไม่ประสบความสำเร็จในการให้สีข้อมเป็นสีน้ำเงินแต่กลับปรากฏว่าให้เจดของสีข้อมออกมาเป็นสีเขียวคล้ำ)

2.4.4.1 การผลิตผงสีย้อม

การแปรรูปสีย้อมจากใบส้มสดและใบครามสดให้เป็นผงแห้งทำได้โดยนำ paste ของใบส้มและใบครามจำนวน 100 กรัม มาอบให้แห้งในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 60 °C เมื่อแห้งสนิทแล้วก็นำมาบดให้เป็นผงและหาน้ำหนักที่ได้

2.4.4.2 การผลิตเม็ดแกรนูล

การผลิตเม็ดแกรนูลจากน้ำสีย้อมเข้มข้นของใบส้มมีรายละเอียดดังนี้

ก. ชั่ง paste ของใบส้มจำนวน 200 กรัม

ข. ผสมด้วยแอลกอฮอล์จนมีลักษณะเป็นเนื้อกะปิ จดปริมาณน้ำตาลที่ใช้

ค. คลุกเคล้าเข้าด้วยกันด้วยเครื่องบดผสมจนเป็นเนื้อเดียวกันแล้วจึงนำไปรีดให้เป็นตัวหนอน

ง. นำตัวหนอนที่ได้ไปอบให้แห้งในตู้อบที่มีอุณหภูมิที่ไม่เกิน 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จ. นำตัวหนอนมาบดผ่านตะแกรงเบอร์ 9 จะได้เม็ดแกรนูลออกมา

2.4.5 การเปรียบเทียบองค์ประกอบของสารให้สีใน paste, ผงสีย้อมและเม็ดแกรนูลของสารสกัดจากครามและส้มโดยเทคนิค TLC

ใช้ chloroform / hexane / methanol ในอัตราส่วน 7:4:1 เป็น developing solvent จากนั้นก็ละลายตัวอย่างในคลอโรฟอร์มและทำโครมาโทกราฟีผิวบางเหมือนข้อ 2.4.3.1 เทียบกับ indigo standard

2.4.6 การตรวจสอบสมบัติของสารสีย้อม

2.4.6.1 การทดสอบการละลายของสารสีย้อม

นำ indigo standard, paste, ผงสีย้อม, เม็ดแกรนูล อย่างละ 0.1 กรัม มาทดสอบการละลายโดย

ก. ทดสอบการละลายในน้ำ 2 มล.

ข. ทดสอบการละลายในน้ำค่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 2 มล.

ค. ทดสอบการละลายในสารละลายกรดซิตริก 5% โดยน้ำหนัก 1 มล.

ง. ทดสอบการละลายในสารละลายกรดอะซิติก 6 โมลาร์ 1 มล.

จ. ทดสอบการละลายในเกลือชนิดต่างๆ โดยนำตัวอย่างมาละลายในน้ำปูนใส 5 มล. เติมเกลือ $MgCl_2$, สารส้ม (มี Al), $FeSO_4$, $CuSO_4$ ปริมาณ 0.25 กรัม ตามลำดับ

ฉ. ทดสอบการละลายในเอทานอลที่มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่างๆ กันอย่างละ 1 มล.

2.4.6.2 การทดสอบผลของค่าพีเอชต่อการเปลี่ยนสีของสีย้อม

นำตัวอย่างมาละลายในสารละลายกรดอะซิติกและน้ำด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่มีพีเอชต่างๆ กัน แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีย้อม

2.4.7 การศึกษาการหาปริมาณสารสีที่แยกได้ในสารสีที่แปรรูป

ทำการทดลองหาปริมาณสารสีที่แยกได้โดยวิธี UV-Vis spectrometry คือวัดการดูดกลืนแสงสารละลายสีที่แยกได้ในกรดกำมะถันเข้มข้นเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

2.4.7.1 การหาปริมาณสารให้สีที่แยกได้ในผงสีแห้ง

ทำได้โดยชั่งผงสีสกัดที่ได้จากใบห่อหมกและใบครามในปริมาณต่างๆ กัน แล้วนำมาหาปริมาณสารให้สีที่แยกได้ดังข้อ 2.4.7

2.4.7.2 การหาปริมาณสารสีที่แยกได้ในเม็ดแกรนูล

ในการเตรียมเม็ดแกรนูลจากสาร สีสกัดลักษณะคล้ายแป้งเปียกนั้นจะมีน้ำหนักของน้ำค้างปนนอกเหนือจากตะกอนคราม เมื่อต้องการหาปริมาณอินดิโกและอินดิรูบินในเม็ดแกรนูลจะต้องคิดจากน้ำหนักแห้งของผงสี ย้อมโดยคิดเทียบกับ 2.4.4.1 และ 2.4.7.1

2.4.8 การทดลองหาสูตรสำเร็จที่เหมาะสมในการผลิตอินดิโกในรูปของเม็ดแกรนูลและทดสอบสมบัติการละลายน้ำ

เนื่องจากการย้อมสีอินดิโกนี้ในขั้นตอนการย้อมจะมีการใส่สารที่ช่วยในการทำให้สีติดเนื้อผ้าลงไป ในหม้อย้อมด้วยซึ่งมีอัตราส่วนที่ไม่แน่นอนจึงทำการทดลองหาสูตรสำเร็จที่เหมาะสมในการผลิตอินดิโกในรูปของเม็ดแกรนูล โดยใส่สารตัวช่วยเหล่านี้ในอัตราส่วนต่างๆ กันแล้วทดสอบการละลายน้ำ การทำเม็ดแกรนูลจะทำโดยนำสีอินดิโกที่สกัดได้มาผสมรวมกับแป้งมัน แลคโตส กรดซิตริก ครีมออฟตาตาร์ สารส้ม wetting agent และ $CuSO_4$ ในอัตราส่วนต่างๆ กันแล้วอัดเป็นเม็ดแกรนูลดังที่กล่าวไว้ในข้อ 2.7.2 จากนั้นนำเม็ดแกรนูลที่ได้มาทดสอบหาสมบัติการละลายน้ำ โดยชั่งเม็ดแกรนูลแต่ละสูตรมา 30 มก. ละลายในน้ำ 5 มล. ที่อุณหภูมิต่างๆ สังเกตการละลายเพื่อเปรียบเทียบการละลายและอุณหภูมิของน้ำที่สามารถละลายเม็ดแกรนูลแต่ละสูตรได้หมด

2.4.9 การทดลองย้อมด้วยสีย้อมอินดิโกสำเร็จรูปสูตรต่างๆ

ทำการทดลองเช่น 2.4.1.3.3 แต่สีย้อมอินดิโกที่ใช้จะเป็นสีย้อมอินดิโกที่ทำเป็นสูตรสำเร็จรูปสูตรต่างๆจาก 2.4.8 และฝ้ายที่ใช้ก็ทำความสะอาดแล้ว การเตรียมน้ำสีย้อมทำโดยใช้เม็ดแกรนูล 100 กรัม น้ำค้าง 1 ลิตร ถ้ามีแป้งมันเป็นส่วนประกอบต้องเติมน้ำค้างเรื่อยๆ ละลายให้เข้ากันทำการย้อม 3 ครั้งแล้วผึ่งให้แห้ง จากนั้นแช่ในน้ำยา fixing agent (quaternary ammonium) 20 นาที ผึ่งให้แห้ง แล้วซักด้วยผงซักฟอกและน้ำยาปรับผ้านุ่ม

2.4.10 การศึกษาวิธีการแยกสารสีเพื่อการแปรรูป

ทดลองหาวิธีสกัดแยกสีทั้งสองออกจากกัน โดยวิธีง่ายๆเพื่อให้ได้สีย้อมที่มีสีแดงและสีน้ำเงินอีกเฉดเพิ่มเติมโดยไม่จำเป็นต้องแยกให้บริสุทธิ์แบบการวิเคราะห์โครงสร้างซึ่งใช้หลายขั้นตอน แต่ประยุกต์จากวิธีการแยกสารบริสุทธิ์ที่ได้ทำมาแล้วในหัวข้อ 2.4.3.2 แล้วทำการตรวจสอบสารสีที่สกัดได้เปรียบเทียบกับวิธีโครมาโทกราฟีผิวบาง