

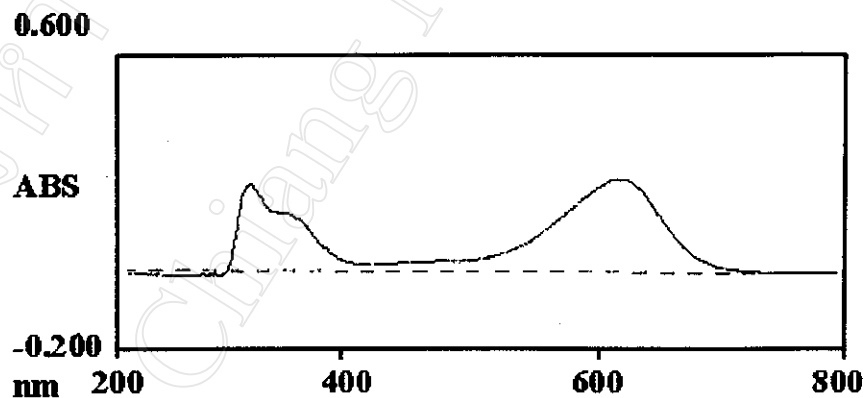
บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ผลการสกัดสารให้สีหลักจากใบครามและใบฮ่อม

3.1.1 ผลการศึกษาวิธีการหาปริมาณอินดิโกในน้ำสกัดครามและฮ่อม

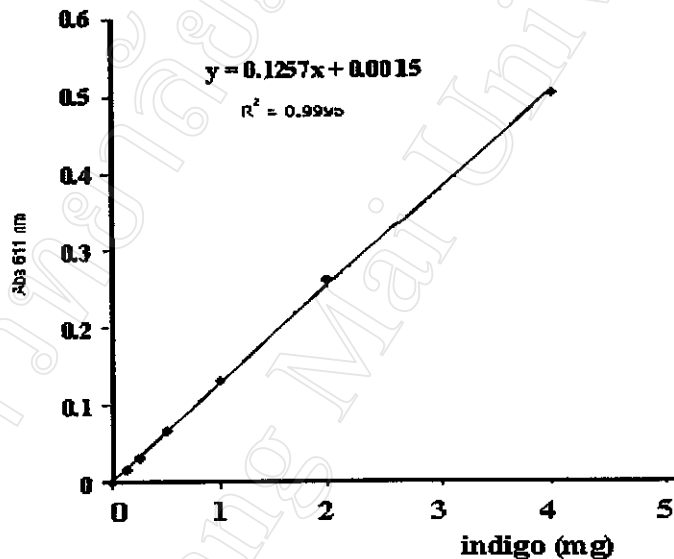
เมื่อตรวจหาความยาวคลื่นสูงสุดของการดูดกลืนแสงของอินดิโกมาตรฐานในช่วงแสงที่มองเห็นได้ พบว่าอินดิโกมาตรฐานที่ละลายในกรดซัลฟูริกเข้มข้นจะดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 611 นาโนเมตร(รูป 3.1) จึงใช้ความยาวคลื่นนี้สำหรับวัดการดูดกลืนแสงสารละลายอินดิโกมาตรฐานปริมาณต่างๆกัน แล้วสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 611 นาโนเมตรกับปริมาณของอินดิโกมาตรฐาน จากนั้นก็จะนำ indigo paste หรือผงอินดิโกที่สกัดได้มาละลายในกรดกำมะถันเข้มข้นแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกันและเทียบหาปริมาณจากกราฟมาตรฐานก็จะทำให้เราทราบปริมาณอินดิโกที่มีในการสกัดจากวัตถุดิบแต่ละครั้ง



รูป 3.1 UV-visible spectrum ของสารมาตรฐานอินดิโกที่ละลายในกรดซัลฟูริกเข้มข้น

การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณอินดิโก

ซึ่ง indigo standard 0.008 กรัม ละลายใน conc.H₂SO₄ 20 มล. เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 500 มล. ในขวดปริมาตร เจือจางด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกในน้ำกลั่น (1:24) ให้เป็นความเข้มข้นต่างๆกันแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 611 นาโนเมตรโดยใช้สารละลายกรดซัลฟูริกในน้ำกลั่น (1:24) เป็น Blank นำค่าการดูดกลืนที่ได้ไปพล็อตกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณอินดิโกจะได้กราฟมาตรฐานดังรูป 3.2 ซึ่งอาจใช้วัดปริมาณสารให้สีหลักที่สกัดได้จากครามและย้อมต่อไป



รูป 3.2 กราฟมาตรฐานการหาปริมาณอินดิโก

3.1.2 ผลการสกัดอินดิโกจากคราม

การสกัดอินดิโกโดยทั่วไปจะทำการหมักวัตถุดิบ เช่น ใบครามและใบฮ่อมในน้ำ วิธีการหมักจะทำโดยมัดวัตถุดิบรวมกันแล้วหมักในน้ำจนกระทั่งวัตถุดิบเน่าเปื่อย ซึ่งมักจะกินเวลานาน โดยทั่วไปจะประมาณ 3 วันแล้วจึงตัดเอากากวัตถุดิบที่เน่าแล้วออกมาทิ้ง จากนั้นจึงเติมน้ำปูนใสลงไป ในน้ำหมักเพื่อตกตะกอนเอาอินดิโกออกมา การหมักแบบนี้ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นมากถึงแม้ว่าจะมีการกำจัดเอากากวัตถุดิบทิ้งแล้วตะกอนครามก็ยังมีกลิ่นเหม็นอยู่เพราะกากวัตถุดิบที่เน่ายังมีปะปนกับตะกอนครามอยู่บ้าง การสกัดโดยการหมักด้วยน้ำจะได้สารตั้งต้นของอินดิโกคือกลูโคไซด์อินดิแคนออกมาในน้ำหมัก แบคทีเรียในน้ำหมักจะสร้างเอนไซม์ที่ตัดน้ำตาลออกจากกลูโคไซด์อินดิแคนให้เป็นอินคอกซิล เมื่อเติมน้ำปูนใสซึ่งเป็นด่าง pH 11.0-12.0 ลงไปแล้วให้อากาศอินคอกซิลจะเกิดการออกซิไดซ์ได้เป็นตะกอนอินดิโกขณะเดียวกันแบคทีเรียเหล่านี้ก็จะย่อยสลายพวกโปรตีนและไขมันที่เป็นองค์ประกอบในวัตถุดิบให้เป็นพวกคีโตนซึ่งมีกลิ่นเหม็น ถ้าใช้เวลาในการหมักนานการย่อยสลายนี้ก็จะมากขึ้นกลิ่นเหม็นก็จะมากขึ้นตามด้วย แต่ต่างจากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ซึ่งการทดลองนี้ใช้ 95% เอทานอลพบว่าไม่เกิดตะกอนอินดิโก อาจเป็นเพราะว่าแอลกอฮอล์นี้สกัดเอากลูโคไซด์อินดิแคนออกจากวัตถุดิบแต่ไม่มีแบคทีเรียที่จะสร้างเอนไซม์ที่จะตัดน้ำตาลออกจากกลูโคไซด์อินดิแคนจึงไม่มีอินคอกซิลที่จะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นอินดิโก

3.1.3 ผลการสกัดอินดิโกจากฮ่อม

3.1.3.1 ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัด

ได้ทำการศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการหมักและความสดของวัตถุดิบ พบว่าการใช้วัตถุดิบที่สดและหมักด้วยน้ำเป็นเวลา 1 วัน จะได้ตะกอนอินดิโกที่มีลักษณะที่ต้องการมากที่สุด (ตาราง 3.1 และ 3.2) และเมื่อตรวจวัดปริมาณของอินดิโกที่ได้จากการหมักด้วยวิธีต่าง ๆ ดังกล่าวโดยใช้เทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นพบว่า paste ที่ได้จากการหมักในฮ่อมสด 1 วัน จะมีเปอร์เซ็นต์อินดิโกมากที่สุดคือประมาณ 3% ของน้ำหนัก paste (ตาราง 3.3)

ตาราง 3.1 ลักษณะตะกอนอินดิโกที่สกัดได้จากข้อมสดและข้อมแห้งโดยใช้เวลาในการหมักต่างกัน

ใบข้อม	ระยะเวลาการหมัก	ลักษณะน้ำหมัก	ลักษณะตะกอน
สด (หมักน้ำ)	1 วัน น้ำใหม่หมักต่อ 1 วัน	สีเขียวเหลืองมีก๊าซ เดิม น้ำค้าง, ให้อากาศเกิดฟอง สีน้ำเงิน สีเขียวเหลืองมีก๊าซ เดิม น้ำค้าง, ให้อากาศเกิดฟอง สีน้ำเงิน	ตะกอนสีน้ำเงิน ได้ตะกอนมาก ตะกอนสีน้ำเงิน ปริมาณน้อยกว่าเดิม ครึ่งหนึ่ง
สด (หมักน้ำ)	3 วัน	สีเขียวเหลืองมีก๊าซ พิเศษ 4.8 เดิม น้ำค้าง พิเศษ 11.3 ให้อากาศเกิดฟองสี น้ำเงิน	ตะกอนสีน้ำเงิน
ไม่สด (ผึ่งไว้ 3-4 วัน) (หมักน้ำ)	1 วัน น้ำใหม่หมักต่อ 1 วัน	สีเขียวออกน้ำตาล เดิม น้ำ ค้างสีเข้มขึ้นขึ้น, ให้ อากาศ 30 นาที เกิดฟองสี น้ำตาลเข้ม สีน้ำตาล เดิม น้ำค้าง, ให้ อากาศ เกิดฟองสีน้ำตาล เข้ม	ตะกอนสีน้ำตาลอม เขียว ตะกอนสีน้ำตาลอ่อน
อบแห้ง (หมักน้ำ)	3 วัน	สีน้ำตาล พิเศษ 6 เดิม น้ำ ค้าง, ให้อากาศ เกิดฟอง เล็กน้อยไม่มีสี	ตะกอนสีน้ำตาลเข้ม
สด (หมักเอทานอล)	3 วัน	สีเขียวออกน้ำตาล	สารสกัดเข้มข้นสี น้ำตาลเข้ม
อบแห้ง (หมักเอทานอล)	3 วัน	สีน้ำตาล	สารสกัดเข้มข้นสี น้ำตาลเข้ม

ตาราง 3.2 ผลของระยะเวลาที่ใช้หมักและความสดของวัตถุดิบ

ชนิดวัตถุดิบ	ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ผลที่ได้
ใบส้มสด	1	น้ำหมักมีสีเขียวเหลือง pH 4.8 paste ที่ได้มีสีน้ำตาลเข้ม
ใบส้มสด	3	น้ำหมักมีสีเขียว pH 4.8 paste ที่ได้มีสีน้ำตาลเขียว
ใบส้มฝัลงม	1	น้ำหมักมีสีเขียวน้ำตาล pH 5.0 paste ที่ได้มีสีออกน้ำตาล
ใบส้มฝัลงม	3	น้ำหมักมีสีน้ำตาล pH 5.0 paste ที่ได้มีสีน้ำตาล
ใบส้มแห้ง	1	น้ำหมักมีสีน้ำตาล pH 6.0 paste ที่ได้มีสีน้ำตาล
ใบครามสด	1	น้ำหมักมีสีเขียวเหลือง pH 4.8 paste ที่ได้มีสีน้ำตาลเข้ม

ตาราง 3.3 การตรวจวัด(ปริมาณอินดิโกใน paste ที่ได้จากการหมักวิธีต่างๆ)โดยนำ paste มาปั่นที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดสารละลายออกให้หมดแล้วนำมา 100 มก. ละลายในกรดซัลฟริกเข้มข้น 20 มล. เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 500 มล.แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 611 นาโนเมตรเทียบกับกราฟมาตรฐานการหาปริมาณอินดิโก(รูป 3.2)

paste	Abs.ครั้งที่1	Abs.ครั้งที่2	Indigo(mg)
ใบส้มสดหมักน้ำใหม่ 1 วัน	0.375	0.380	3.01
ใบส้มสดหมักน้ำเก่า 1 วัน	0.250	0.255	2.02
ใบส้ม(ที่ผ่านการหมักน้ำใหม่ 1 วัน)หมักน้ำใหม่ต่อ 1 วัน	0.250	0.255	2.02
ใบส้ม(ที่ผ่านการหมักน้ำหมักเก่า 1 วัน)หมักน้ำใหม่ 1 วัน	0.250	0.250	1.98
ใบส้มสดหมักน้ำใหม่ 3 วัน	0.285	0.285	2.26
ใบส้มฝัลงมหมักน้ำใหม่ 1 วัน	0.035	0.035	0.27
ใบส้มแห้งหมักน้ำใหม่ 1 วัน	0.011	0.011	0.08
ใบครามสดหมักน้ำใหม่ 1 วัน	0.155	0.155	1.22

เมื่อเทียบปริมาณอินดิโกที่ได้จากการหมักใบครามสดและใบส้มสดในน้ำหมักที่เท่ากันพบว่าใบส้มสดจะให้อินดิโกมากกว่าใบครามสด(ตาราง 3.4)

ตาราง 3.4 การเปรียบเทียบปริมาณอินดิโกใน paste ที่ได้จากการหมักใบส้มสดและใบครามสด
อย่างละ 100 กรัม ในน้ำ 24 ชั่วโมง

วัตถุดิบ	Paste(กรัม)	อินดิโก(มก.)	อินดิโก(มก./กรัมใบสด)
ใบส้มสด	15.69	472.27	4.72
ใบส้มฝั้งลม	11.62	31.37	0.31
ใบส้มแห้ง	9.86	7.89	0.08
ใบครามสด	26.83	327.33	3.27

3.1.3.2 ผลการศึกษาผลของกรดและแบคทีเรียในการไฮโดรไลสน้ำตาลออกจากอินดิโก

พบว่า การเติมแบคทีเรียไม่มีผลต่อการเกิด paste ของอินดิโก เนื่องจากแบคทีเรียในอากาศมีเพียงพอแล้วและการเติมกรดไม่ช่วยให้ได้ paste มากขึ้นแต่อย่างใด แต่ไปทำให้ได้ paste น้อยลงอาจเป็นเพราะสภาพการตกตะกอนของ paste ต้องอาศัยสภาพที่เป็นด่างและกรดเองอาจจะไปทำลายแบคทีเรียในอากาศที่ช่วยไฮโดรไลสน้ำตาลออกจากอินดิโกด้วย(ตาราง 3.5)

ตาราง 3.5 ผลของกรดและแบคทีเรียที่เติมลงในน้ำหมักต่อปริมาณสารสีสกัดลักษณะตะกอนเปียกที่ได้

ถังหมัก	การหมัก	ปริมาณ paste ที่ได้(กรัม)
1	น้ำหมัก 200 มล.	4.9
2	น้ำหมัก 200 มล.+ กรดซิตริก 6 โมลาร์ 20 มล.	1.9
3	น้ำหมัก 200 มล.+ กรดเกลือ 6 โมลาร์ 20 มล.	1.9
4	น้ำหมัก 200 มล.+ แบคทีเรียชนิดที่ 1	4.7
5	น้ำหมัก 200 มล.+ แบคทีเรียชนิดที่ 2	4.8
6	น้ำหมัก 200 มล.+ แบคทีเรียชนิดที่ 3	4.6

3.1.3.3 ผลการย้อมด้วยสีที่สกัดได้



รูป 3.3 ฝ้ายที่ทำความสะอาด(1)และฝ้ายที่ไม่ได้ทำความสะอาด(2) ย้อมด้วยสีที่สกัดจากการหมักใบช่อมสตในน้ำ 24 ชม.



รูป 3.4 ฝ้ายที่ย้อมด้วยสีที่สกัดจากการหมักใบช่อมสตในน้ำ 24 ชม.(1)และ 72 ชม.(2)



รูป 3.5 ฝ้ายที่ย้อมด้วยสีที่สกัดจากการหมักใบช่อมสต(1) ใบช่อมฝิ่งลม(2) และใบช่อมแห้ง(3)

จากรูป 3.3 ค่ายฝ้ายที่ทำความสะอาดด้วยผงซักฟอกแล้วจะดูดซับสีได้ดีกว่าค่ายฝ้ายที่ไม่ได้ทำความสะอาดซึ่งอาจเป็นเพราะในขั้นตอนการทำความสะอาดค่ายฝ้ายได้กำจัดเอาพวกแป้งและไขมันที่เคลือบค่ายฝ้ายออกหมดแล้ว จากรูป 3.4 ฝ้ายที่ย้อมด้วยสีที่สกัดจากการหมักใบช่อมสตในน้ำ 24 ชั่วโมงจะติดสีน้ำเงินเข้มกว่าฝ้ายที่ย้อมด้วยสีที่สกัดจากการหมักใบช่อมสตในน้ำ 72 ชั่วโมง จากรูป 3.5 ทดลองย้อมค่ายฝ้ายด้วยสีที่สกัดจากการหมักใบช่อมสต ใบช่อมฝิ่งลม ใบช่อมแห้ง พบว่า

ด้วยฝ้ายที่ข้อมด้วยสีสกัดจากการหมักใบส้มสดจะติดสีน้ำเงินมากที่สุดซึ่งน่าจะสรุปได้ว่าสีสกัดจากใบส้มสดมีปริมาณอินดิโกมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับใบส้มฝงลมและใบส้มแห้ง

3.2 ผลการทดสอบเคมีเบื้องต้นของสารสกัดอินดิโก

ผลการตรวจสอบหากกลุ่มองค์ประกอบหลักของสารสกัดอินดิโกด้วยวิธีทางเคมีพบว่าสารสีสกัดดังกล่าวไม่มีองค์ประกอบหลักทางเคมีเป็นแคโรทีนอยด์เพราะไม่มีสีน้ำตาลแดงเกิดขึ้นเมื่อหยดกรดกำมะถันเข้มข้นลงไปบนสารละลายสีในอะซิโตน นอกจากนี้สารสีสกัดนี้ก็ไม่มีองค์ประกอบหลักทางเคมีเป็นฟลาโวนอยด์และแอนทราควิโนนเช่นกันเพราะเมื่อหยดกรดเกลือเข้มข้นลงไปบนสารละลายสีในเมทานอลที่ต้มกับกลูตเมกนีเซียมไม่มีสีแดงเกิดขึ้นและไม่ปรากฏสีชมพูหรือแดงขึ้นในชั้นแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ตามลำดับ แต่สารสีสกัดนี้กลับให้ผลบวกกับ Mayer's reagent และ Dragendorff's reagent ได้เป็นตะกอนขาวและตะกอนสีส้มน้ำตาลตามลำดับ แสดงว่าสารสีสกัดนี้มีองค์ประกอบหลักทางเคมีเป็นสารเคมีกลุ่มอัลคาลอยด์

3.3 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของสารสีจากครามและส้ม

3.3.1 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีฝิวบาง

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีฝิวบางโดยใช้แผ่นโครมาโทกราฟีฝิวบางที่มีซิลิกาเจล จี เป็นตัวดูดซับและทดลองหาน้ำยาชะที่เหมาะสมในการแยกองค์ประกอบของสีสกัดโดยใช้อินดิโกมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบ เพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบหลักของสารสีจากครามและส้ม พบว่าระบบตัวชะที่ดีที่สุดในการแยกองค์ประกอบของสีเป็น chloroform : methanol : hexane ในอัตราส่วน 7:1:4 เพราะสามารถแยกองค์ประกอบของสารสีออกมาได้มากที่สุดและแยกกันอย่างชัดเจน ส้อมที่หมักด้วยเอทานอล 95% จะให้แถบสีมากที่สุด คือ ม่วง เขียว แดง เหลือง และมีแถบสีแดงที่มีสีเข้มที่สุดและสีค่อนข้างคงตัว ในขณะที่สารสกัดจากส้มสดหมักด้วยน้ำจะให้ 3 แถบ คือ ม่วง น้ำเงิน และแดง ส้อมไม่สดที่หมักด้วยน้ำก็ให้ผลแบบเดียวกัน ส่วนส้มแห้งสกัดด้วยน้ำจะให้แถบสี 2 แถบคือ น้ำเงิน และแดง แต่ความเข้มข้นของแถบสีน้อยกว่ามาก แต่จะเหมือนกับสารสกัดจากครามที่เป็นตัวอย่าง paste ที่ได้จากอำเภอมะเข่ ครั้งที่ 1 และ 2 และจากกิ่งอำเภอยะหริ่ง จังหวัดลำพูน สรุปได้ว่าสารสกัดจากส้มและครามจะมีสารสีน้ำเงินและสารสีแดงเป็นองค์ประกอบหลักเหมือนกันหมดแต่ปริมาณของสารสีที่มีในสารสกัดขึ้นอยู่กับความสดของวัตถุดิบและวิธีการสกัด แถบของสีน้ำเงินที่ปรากฏบนแผ่น TLC จะตรงกับแถบสีน้ำเงินของอินดิโกมาตรฐานที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.46 เท่ากันหมด แสดงว่าสารสีน้ำเงินที่มีในสารสกัดน่าจะเป็นอินดิโก ส่วนสารสกัดที่ผ่านการทำฉีดยาแห้ง แล้วทำ TLC จะให้ 2 แถบ คือ น้ำเงิน และแดง เช่นกันเป็น

เครื่องแสดงว่าอินดิโกในสารสกัดไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อผ่านกระบวนการจัดพื้นที่แห้ง และยังพบว่าสารสีแดงมีความคงตัวในบรรยากาศได้ดีกว่าสารสีน้ำเงิน ฉะนั้นจึงเลือกที่จะใช้สารสีแดงซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำสีข้อมเข้มข้นของข้อมเป็น marker สำหรับใช้เป็นตัวหลักของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณของน้ำสีข้อมเข้มข้นจากใบข้อมและใบครามต่อไป



1 = ข้อมสด 2 = ข้อมไมสด 3 = ข้อมแห้ง 4 = ครามแมนจัม1 5 = ครามแมนจัม2
6 = ครามทุ่งหัวช้าง 7 = ข้อมผ่าน spray dry 8 = Indigoมาตรฐาน 9 = ข้อมหมักเอทานอล

รูป 3.6 สารให้สีในน้ำสกัดจากข้อมและครามด้วยวิธีต่างๆแยกโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง (TLC)

3.3.2 ผลการแยกหองค์ประกอบหลักโดยโครมาโทกราฟีคอลัมน์

เมื่อทราบระบบตัวชะที่เหมาะสมจากการทำโครมาโทกราฟีผิวบางคือ chloroform : methanol : hexane ในอัตราส่วน 1 : 4 จึงนำระบบนี้มาประยุกต์ใช้ในการแยกองค์ประกอบหลักสี น้ำเงินและสีแดงในสารสกัดจากใบส้มให้มีปริมาณมากขึ้นโดยทำโครมาโทกราฟีคอลัมน์ โดยนำผงแห้งของตะกอนเปียกที่ได้จากการหมักใบส้มจำนวน 2.0 กรัม มาสกัดสารสีโดยวิธี solvent extraction แล้วนำสารสีที่ได้มาแยกหองค์ประกอบโดยวิธีโครมาโทกราฟีคอลัมน์ พบว่าสารสีน้ำเงินจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ด้วย chloroform / hexane (8/2) ส่วนสารสีแดงจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ด้วย chloroform / hexane / methanol (7/4/1) นำสารสีที่ได้ไปตรวจความบริสุทธิ์ด้วยการทำโครมาโทกราฟีผิวบาง โดยใช้ระบบตัวชะหลายๆระบบ (ตาราง 3.6 และ 3.7) แล้วนำไปหาค่าความยาวคลื่นสูงสุดของการดูดกลืนแสงโดยใช้น้ำยาชะเป็น blank พบว่าสารสีน้ำเงินดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นค่าเดียวกับอินดิโกมาตรฐานคือ 603 นาโนเมตร ส่วนสารสีแดงดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นค่าเดียวกับอินดิโรบินมาตรฐานคือ 535 นาโนเมตร (รูป 3.7) จากนั้นนำสารละลายสีไประเหยน้ำยาชะออกด้วย Rotatory evaporator พบว่าสารสีน้ำเงินไม่คงตัวได้เป็นผงสีดำ น้ำหนักเท่ากับ 0.005 กรัม คิดเป็นร้อยละ 0.25 ของน้ำหนักผงสกัดแห้งและสารสีแดงได้น้ำหนักเท่ากับ 0.034 กรัม คิดเป็นร้อยละ 1.7 ของน้ำหนักผงสกัดแห้ง

3.3.3 การทดสอบความบริสุทธิ์โดย TLC ที่มีตัวชะชนิดต่างๆแล้วได้ spot เดียว

ตาราง 3.6 การทดสอบความบริสุทธิ์ของสารสีน้ำเงินที่แยกได้ด้วยการทำโครมาโทกราฟีผิวบาง โดยใช้ระบบตัวชะหลายๆระบบ

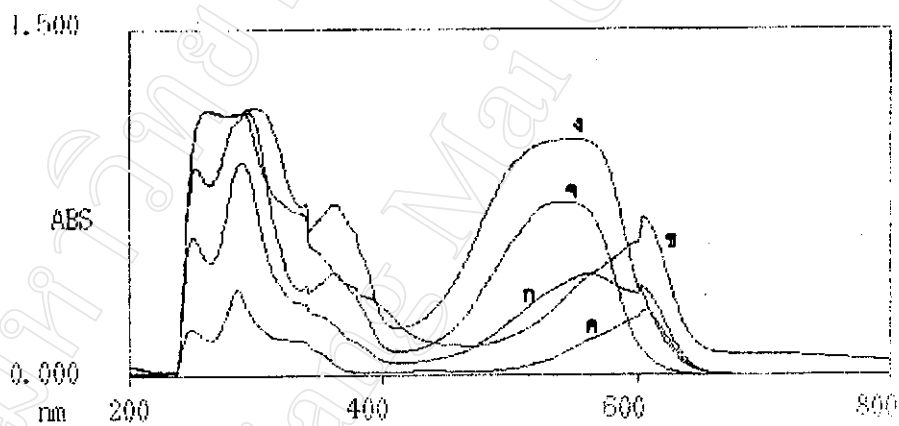
ระบบตัวชะ	สีน้ำเงิน	สีแดง	สีอื่นๆ
chloroform / hexane / methanol (7/4/1)	+	-	-
chloroform / hexane (8/2)	+	-	-
chloroform / methanol (9/1)	+	-	-
chloroform / ethylacetate (9/1)	+	-	-
chloroform / ethylacetate / methanol (7/4/1)	+	-	-

หมายเหตุ : + คือมี, - คือไม่มี

ตาราง 3.7 การทดสอบความบริสุทธิ์ของสารสีแดงที่แยกได้ด้วยการทำโครมาโทกราฟีผิวนางโดยใช้ระบบตัวชะหลายระบบ

ระบบตัวชะ	สีน้ำเงิน	สีแดง	สีอื่นๆ
chloroform / hexane / methanol (7/4/1)	-	+	-
chloroform / hexane (8/2)	-	+	-
chloroform / methanol (9/1)	-	+	-
chloroform / ethylacetate (9/1)	-	+	-
chloroform / ethylacetate / methanol (7/4/1)	-	+	-

หมายเหตุ : + คือมี, - คือไม่มี



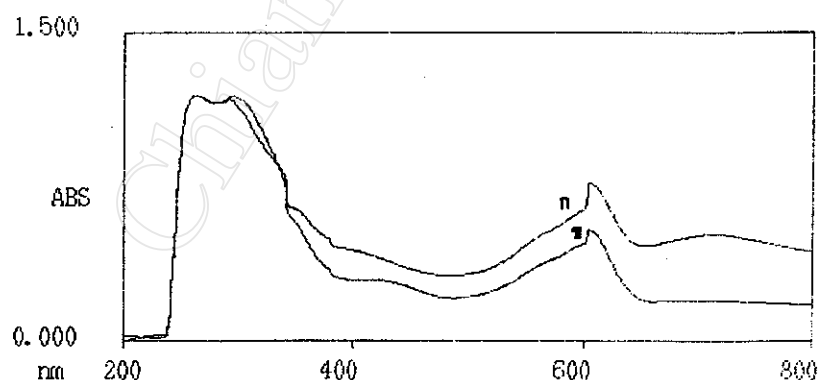
รูป 3.7 UV-visible spectrum ของสารสีที่แยกจากใบส้ม

- ก. ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายสีข้มก่อนการสกัด
- ข. ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของอินดิโกมาตรฐานที่ 603 nm.
- ค. ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารสีน้ำเงินที่ 603 nm.
- ง. ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของอินดิโรบินมาตรฐานที่ 535 nm.
- จ. ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารสีแดงที่ 535 nm.

3.3.4 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารสีที่แยกออกมาได้

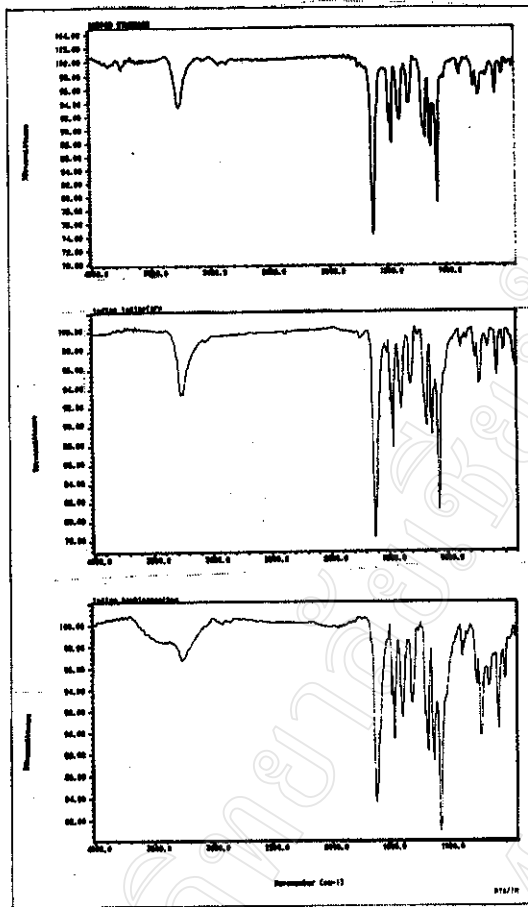
เมื่อนำองค์ประกอบสีน้ำเงินและสีแดงบริสุทธิ์ที่แยกได้จากการทำโครมาโทกราฟีคอลัมน์ มาวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี ผลการวิเคราะห์ของข้อมูลข้างต้นมีดังต่อไปนี้ พร้อมแสดงด้วย spectra ดังแนบ

- ก. สารประกอบหลักสีน้ำเงินนี้ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ค่าความยาวคลื่นเท่ากับ 603 นาโนเมตรในคลอโรฟอร์ม (รูป 3.8)
- ข. การเปรียบเทียบ Infrared(IR) spectrum ของสารอินดิโกมาตรฐาน, สารสีน้ำเงินที่สกัดจากใบช่อม, สารสีน้ำเงินที่สกัดจากใบคราม (รูป 3.9)
- ค. สารประกอบหลักสีแดงแสดงค่าของ mass spectrum ด้วยค่า molecular ion ที่ m/e เท่ากับ 262 เมื่อวัดโดยการเลือกใช้ขบวนการ EI-MS ดังนั้นค่าน้ำหนักโมเลกุลของสารประกอบหลักสีแดงนี้จึงมีค่าเท่ากับ 262 (รูป 3.10)
- ง. สารประกอบหลักสีแดงแสดงค่า chemical shift ของอะตอม C^{13} ในโครงสร้างหลักด้วย peaks ต่างๆ (รูป 3.11)
- จ. สารประกอบหลักสีแดงนี้ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ค่าความยาวคลื่นเท่ากับ 535 นาโนเมตรในเมทานอล (รูป 3.13)
- ฉ. การเปรียบเทียบ Infrared(IR) spectrum ของสารอินดิโรบินมาตรฐาน, สารสีแดงที่สกัดจากใบช่อม, สารสีแดงที่สกัดจากใบคราม (รูป 3.14)



รูป 3.8 UV-visible spectrum ของสารสีน้ำเงินที่แยกบริสุทธิ์จากสารสีช่อม

- ก. สารสีน้ำเงินจากใบช่อม
- ข. สารสีน้ำเงินจากใบคราม

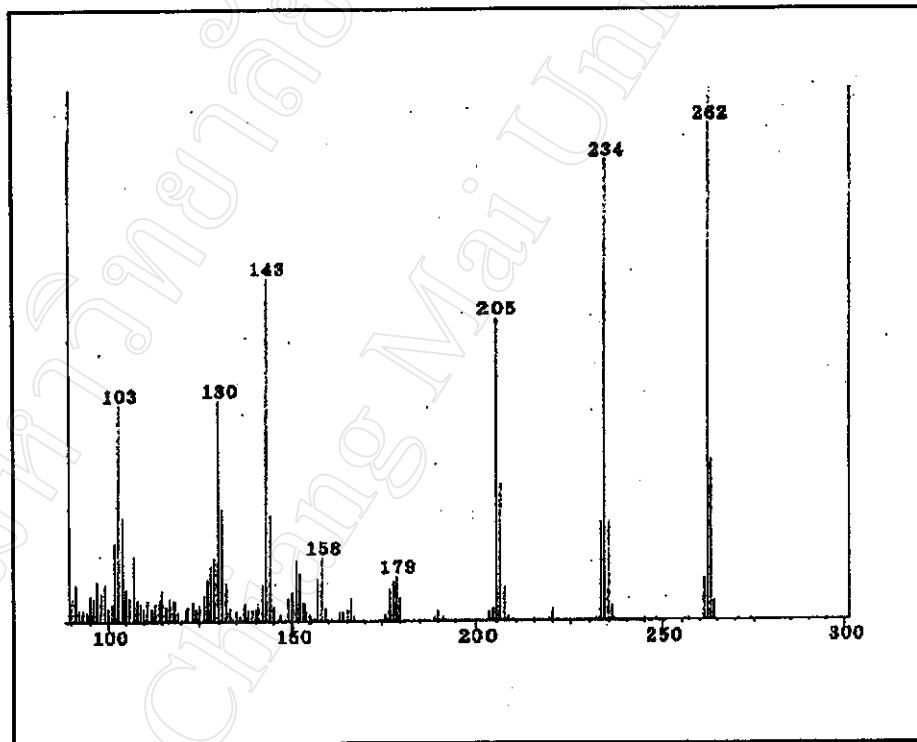


รูป 3.9 Infrared spectrum ของสาร indigo มาตรฐานที่แยกบริสุทธิ์จากสารสีสกัดจากใบฮ่อม(รูปบน) IR spectrum ของสารสีน้ำเงินที่แยกบริสุทธิ์จากสารสกัดจากใบครามซึ่งเหมือนกับ indigo มาตรฐานทุกประการ (รูปกลาง) และ IR spectrum ของสารสีน้ำเงินที่แยกบริสุทธิ์จากสารสีสกัดจากใบฮ่อมซึ่งเหมือนกับ spectrum ของ indigo มาตรฐาน(รูปล่าง) ดังนั้นองค์ประกอบหลักของสารให้สีน้ำเงินจากใบฮ่อมและใบครามเหมือนกันทุกประการ

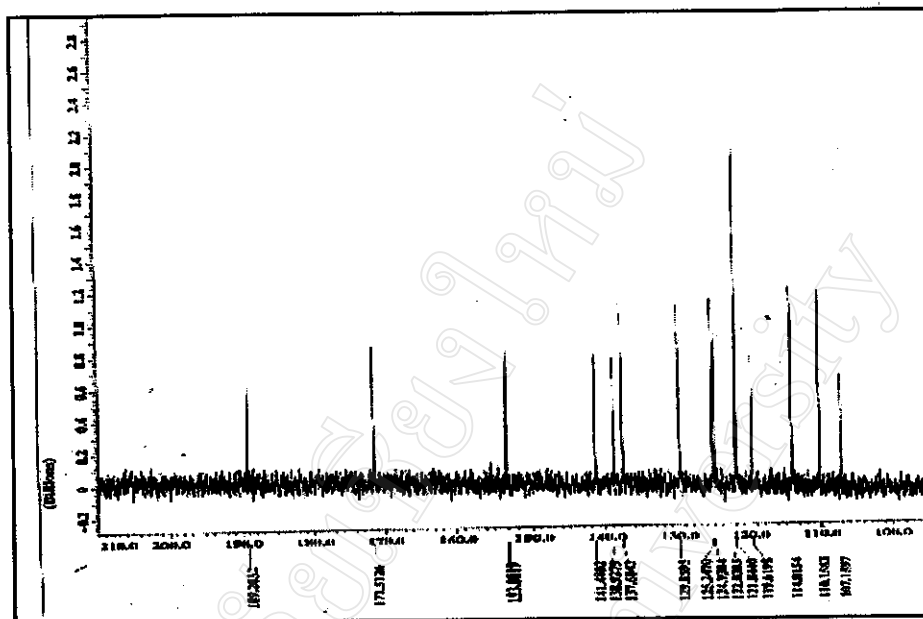
ตาราง 3.8 การแปลความหมาย IR spectrum ของอินดิโก

Wavenumber (cm ⁻¹)	Assignment
3500-3100	N-H Primary and Secondary Amines
1600	C=C Aromatic
1350-1000	C-N Amines
900-690	C-H Aromatic (Out- of plane bending)

การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารสีน้ำเงินจากใบครามและใบส้มพบว่า สารสีน้ำเงินนี้มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 603 นาโนเมตรในคลอโรฟอร์มในรูป 3.8 และมี Infrared spectrum เหมือนกับสารอินดิโกมาตรฐานในรูป 3.9 แสดงว่าสารสีน้ำเงินที่สกัดได้จากใบครามและใบส้มน่าจะเป็นอินดิโกเหมือนกัน ส่วนสารสีแดงที่สกัดได้จากใบครามและใบส้มไม่มีสารมาตรฐานเปรียบเทียบจึงได้สกัดสารสีแดงบริสุทธิ์จากใบส้มแล้วนำไปวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีโดยทำ mass spectroscopy พบว่า mass spectrometry ของสารประกอบสีแดงแสดงค่า molecular ion ที่ m/e เท่ากับ 262 ดังรูป 3.10 เมื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีโดย ^{13}C NMR พบว่ามี spectrum แสดงค่า chemical shift ของอะตอม ^{13}C ณ ตำแหน่งต่างๆดังรูป 3.11



รูป 3.10 Mass spectrum ของสารประกอบสีแดงที่แยกได้จาก ใบส้มแสดงค่า molecular ion ที่ m/e เท่ากับ 262 (EI-MS)

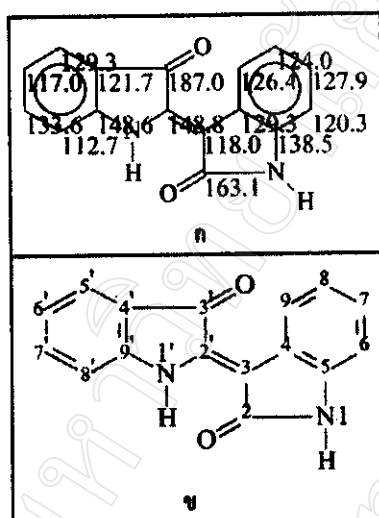


รูป 3.11 ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบสีแดงที่แยกได้จากใบส้ม

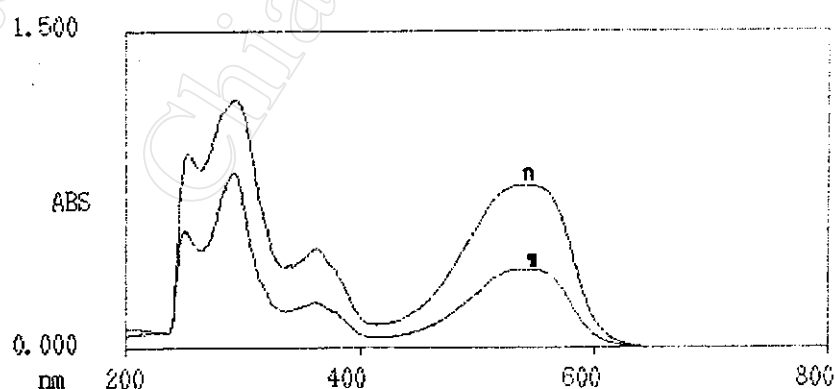
แสดงค่า chemical shift ของอะตอม ^{13}C ณ ตำแหน่งต่างๆ

Peak ลำดับที่	ตำแหน่งของ ^{13}C	ค่า chemical shift(ppm)
1	C-3	189.2032
2	C-2	171.5126
3	C-2,C-9	153.0819
4	C-5	141.4802
5	C-7	138.9279
6	C-4	137.6842
7	C-5	129.8595
8	C-7	125.2470
9	C-9	124.9304
10	C-8	122.0385
11	C-4	121.8440
12	C-6	119.6198
13	C-3	114.0154
14	C-6	110.1583
15	C-8	107.1597

เมื่อเปรียบเทียบค่า chemical shift ของอะตอม ^{13}C จาก ^{13}C NMR ของสารประกอบหลักสีแดงกับค่า chemical shift ของอะตอม ^{13}C NMR ของสารประกอบอินดิรูบินจากการประมวลผลด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ดังรูป 3.12ก เห็นได้ว่ามีค่าที่สัมพันธ์และใกล้เคียงกัน ฉะนั้นจึงสรุปได้ว่าสารประกอบหลักสีแดงที่แยกออกมาได้จากใบส้มครั้งนี้คือ สารประกอบเคมีที่มีชื่อเรียกว่าอินดิรูบิน ดูคลื่นแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตรในเมทานอล มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 262 มีโครงสร้างทางเคมีคือ $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ และมีโครงสร้างทางเคมีดังรูป 3.12ข จึงใช้สารสีแดงที่สกัดจากใบส้มนี้เป็นสารอินดิรูบินมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบกับสารสีแดงที่สกัดจากใบคราม พบว่าสารสีแดงที่สกัดจากใบส้มและใบครามมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 535 นาโนเมตรในเมทานอลในรูป 3.13 และมี Infrared (IR) spectrum เหมือนกันทุกประการในรูป 3.14 แสดงว่าสารสีแดงที่สกัดได้จากใบครามและใบส้มน่าจะเป็นอินดิรูบินเหมือนกัน



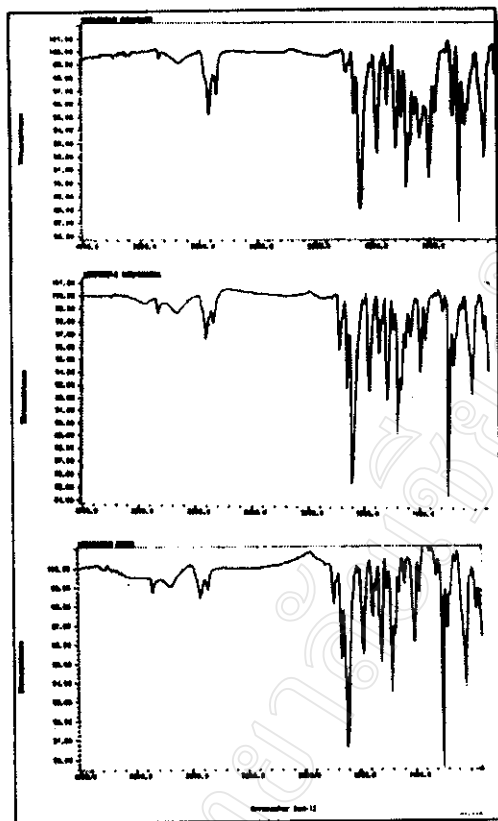
รูป 3.12 ก. ค่า chemical shift ของอะตอม C^{13} ต่างในโครงสร้าง indirubin จากการประมวลผลด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์
ข. โครงสร้างทางเคมีของ indirubin ที่เป็นองค์ประกอบหลักของสารสีแดงจากใบส้ม



รูป 3.13 UV-visible spectrum ของสารสีแดงที่แยกบริสุทธิ์จากสารสีส้ม

ก. สารสีแดงจากใบส้ม

ข. สารสีแดงจากใบคราม



รูป 3.14 Infrared(IR) spectrum ของสาร indirubin มาตรฐานที่แยกบริสุทธิ์จากสารสกัดจากใบส้ม(รูปบน) IR spectrum ของสารสีแดงที่แยกบริสุทธิ์จากสารสกัดจากใบครามซึ่งเหมือนกับ indirubin มาตรฐานทุกประการ (รูปกลาง) และ IR spectrum ของสารสีแดงที่แยกบริสุทธิ์จากสารสกัดจากใบส้มซึ่งเหมือนกับ spectrum ของ indirubin มาตรฐาน (รูปล่าง) ดังนั้นองค์ประกอบหลักของสารให้สีแดงจากใบส้มและใบครามเหมือนกันทุกประการ

ตาราง 3.9 การแปลความหมาย IR spectrum ของอินดิรูบิน

Wavenumber (cm ⁻¹)	Assignment
3500-3100	N-H Primary and Secondary Amines
3200	O-H Bonding
2950,2880	C-H Stretching of Alkyl
1600	C=C Aromatic
1350-1000	C-N Amines
900-690	C-H Aromatic (Out- of plane bending)

3.4 ผลการแปรรูปสีย้อมจากใบครามและใบส้มสด

3.4.1 ผลการผลิตผงสีแห้ง

สารสีที่ได้จากการหมักใบครามและใบส้มจะอยู่ในลักษณะตะกอนเปียก เก็บรักษาได้ยาก มักจะมีเชื้อราขึ้นเมื่อเก็บไว้นานๆ จึงได้แปรรูปสีสกัดนี้ให้เป็นผงแห้งโดยนำสารสีสกัดลักษณะคล้ายตะกอนเปียกที่สกัดได้จากใบส้มทุกวิธีรวมกันและสารสีสกัดลักษณะตะกอนเปียก จากใบครามมาอบให้แห้งที่ 60°C แล้วบดให้เป็นผง พบว่าผงสีที่ได้มีสีออกเขียวน้ำเงิน เก็บรักษาได้ง่ายขึ้นและลดเนื้อที่ในการเก็บ แต่มีข้อเสียตรงที่ง่าย (ตาราง 3.10)

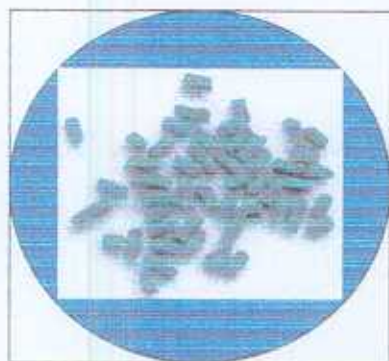
ตาราง 3.10 น้ำหนักผงสีแห้งที่ได้จากสารสีสกัดลักษณะตะกอนเปียกจากครามและส้มอย่างละ 100 กรัม

Paste 100 กรัม	ผงสีแห้ง(กรัม)
จากส้ม	18.77
จากคราม	11.96

จากตาราง 3.10 พบว่าสารสีสกัดลักษณะตะกอนเปียกในน้ำหนักเท่าๆกันที่สกัดได้จากใบครามและใบส้มเมื่ออบเป็นผงแห้งแล้วสีสกัดจากใบส้มจะมีปริมาณมากกว่าสีสกัดจากใบครามสดในปริมาณที่เท่ากัน

3.4.2 ผลการผลิตเม็ดแกรนูล

จากการแปรรูปสารสีสกัดที่อยู่ในลักษณะตะกอนเปียกเป็นผงแห้งเกิดปัญหาตรงขึ้นได้ง่าย จึงได้ทดลองแปรรูปเป็นเม็ดแกรนูลโดยชั่ง paste ของใบส้ม 200 กรัมต้องใช้น้ำตาลแลคโตสถึง 845 กรัมในการผสมให้เนื้อสีมีลักษณะหยาบคล้ายกะปิ เพื่อให้สามารถบดแล้วรีดให้เป็นตัวหนอนอบที่ 60°C 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาบดผ่านตะแกรงเบอร์ 9 ได้เม็ดแกรนูลออกมา ผลการแปรรูปโดยใช้สารสีสกัดที่อยู่ในลักษณะตะกอนเปียกมาทำจะได้อนุสสีน้ำเงินเข้ม สามารถเก็บรักษาและใช้งานได้ง่าย นอกจากนี้ยังทำให้น้ำใช้ขึ้นด้วย



รูป 3.15 เม็ดแกรนูลจากสารสีสกัดลักษณะตะกอนเปียก
ของ ใบส้มสด

3.5 ผลการเปรียบเทียบองค์ประกอบของสารสีใน paste พงสีและเม็ดแกรนูลของสาร สกัดจากครามและส้มโดยเทคนิค TLC

การแปรรูปสารสีสกัดซึ่งมีลักษณะตะกอนเปียกให้เป็นผงสีแห้งและเม็ดแกรนูลนั้นจะต้องตรวจสอบว่าการแปรรูปทำให้องค์ประกอบของสีเปลี่ยนแปลงหรือไม่ ถ้าองค์ประกอบของสีไม่เปลี่ยนแปลงก็สามารถแปรรูปได้ จึงต้องทำการตรวจสอบองค์ประกอบของสีในสีสกัดที่มีลักษณะตะกอนเปียก ผงสีแห้งและเม็ดแกรนูลโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง พบว่าองค์ประกอบของสารสีในสีสกัดลักษณะตะกอนเปียก ผงสีแห้งและเม็ดแกรนูลไม่แตกต่างกัน คือมีสารสีน้ำเงินและสารสีแดงเป็นองค์ประกอบ สารสีน้ำเงินมี R_f ตรงกับสารอินดิโกมาตรฐาน แสดงว่าสารสีน้ำเงินนั้นน่าจะเป็นอินดิโก ดังตาราง 3.11

ตาราง 3.11 การหาองค์ประกอบของสารสีในสารสกัดจากใบส้มและสารสีแปรรูปโดยเทคนิค

TLC						
Sample		ระยะตัวทำละลาย (cm)	ระยะทางแถบสี (cm)		ค่า R _f	
			น้ำเงิน	แดง	น้ำเงิน	แดง
Paste	จากใบส้มสด	5.1	3.50	2.50	0.69	0.49
	จากใบส้มฝั้ลม		3.50	2.45	0.69	0.49
	จากใบครามสด		3.50	2.50	0.69	0.49
Paste	จากใบส้มสด		3.45	2.50	0.68	0.49
	จากใบส้มฝั้ลม		3.50	2.50	0.69	0.49
	จากใบครามสด		3.50	2.45	0.69	0.49
granulated indigo จากใบส้มสด			3.45	2.45	0.68	0.49
indigo standard			3.50	-	0.69	-

3.6 ผลการตรวจสอบสมบัติของสารสีย้อม

3.6.1 ผลการทดสอบการละลายของสารสีย้อม

- ก. เมื่อนำอินดิโกมาตรฐาน สารสีสกัดที่มีลักษณะตะกอนเปียก ผงสีแห้งและเม็ดแกรนูลอย่างละ 0.1 กรัมมาทดสอบการละลายในน้ำ 2 มล. ในน้ำค้างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 2 มล. ในสารละลายกรดซัลฟริก 5% โดยน้ำหนัก 1 มล. และในสารละลายกรดอะซิติก 6 โมลาร์ 1 มล. พบว่าสารสีสกัดที่มีลักษณะตะกอนเปียก เม็ดแกรนูล ผงสีแห้งและสารมาตรฐานอินดิโกมีการละลายลดลงตามลำดับ สีของสารละลายเป็นสีน้ำเงิน
- ข. เมื่อนำอินดิโกมาตรฐาน สารสีสกัดที่มีลักษณะตะกอนเปียก ผงสีแห้งและเม็ดแกรนูลอย่างละ 0.1 กรัมมาทดสอบการละลายในเกลือชนิดต่างๆ พบว่าเกลือไม่มีผลต่อการเปลี่ยนสีของสารละลายอินดิโกซึ่งยังคงมีสีน้ำเงิน ยกเว้น FeSO_4 สารละลายจะมีสีเขียวเหลือง แต่สารสีก็ละลายได้ไม่หมดเหมือนกันดังแสดงในตาราง 3.12
- ค. เมื่อนำอินดิโกมาตรฐาน สารสีสกัดที่มีลักษณะตะกอนเปียก ผงสีแห้งและเม็ดแกรนูลอย่างละ 0.1 กรัมมาทดสอบการละลายในเอทานอลที่มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่างๆ กันอย่างละ 1 มล. พบว่าที่เอทานอลเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่ำๆ (50% v/v) สารสีละลายได้น้อยมากได้เป็นสีม่วงอ่อน แต่เมื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของเอทานอล (70% v/v) สารสีละลายได้มากขึ้นได้เป็นสีม่วงเข้ม แต่ก็ยังละลายได้ไม่หมดถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลขึ้นถึง 100% v/v ก็ตาม ดังแสดงในตาราง 3.13

ตาราง 3.12 การละลายของอินดิโกในสารละลายเกลือชนิดต่างๆ

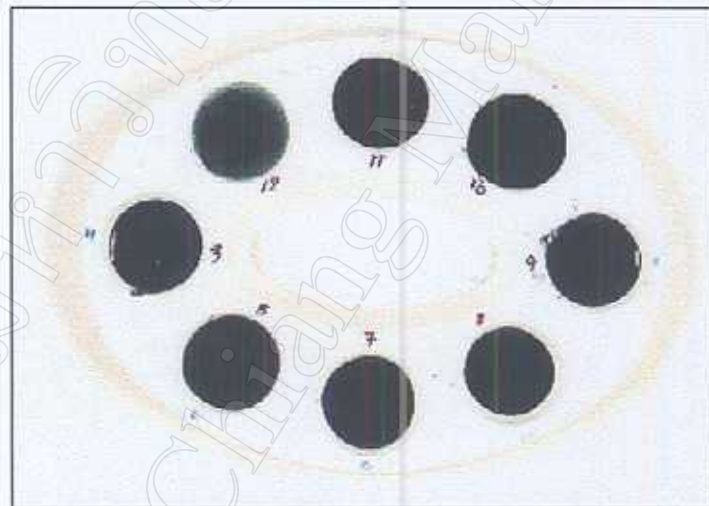
เกลือ	สีที่ได้
MgCl_2	ใส มีตะกอนสีน้ำเงินตกอยู่
สารส้ม (มี Al)	ใส มีตะกอนสีน้ำเงินตกอยู่
FeSO_4	สีเขียวเหลืองใส มีตะกอนสีเขียวตกอยู่
CuSO_4	ใส มีตะกอนสีน้ำเงินตกอยู่
Control (ไม่เติมเกลือ)	น้ำเงินใส

ตาราง 3.13 การละลายของอินดิโกในเอทานอลที่มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่างกัน

ความเข้มข้นของเอทานอล (%V/V)	สีของสารละลาย
100	ม่วง
95	ม่วง
70	ม่วง
50	ม่วงอ่อน

3.6.2 ผลของค่าพีเอชต่อการเปลี่ยนสีของสีย้อม

เมื่อนำสารสีสกัดมาทดสอบผลของค่าพีเอชต่อการเปลี่ยนสีของสีย้อม พบว่าความแตกต่างของค่าพีเอชไม่มีผลต่อการเปลี่ยนสีของสีย้อม ที่ทุกค่าพีเอชสีของสารละลายยังคงเป็นสีน้ำเงิน สารสีละลายได้ไม่หมดเหมือนกัน แต่ที่ค่าพีเอชเป็นค่า (พีเอช 12) จะจับตัวกันเป็นตะกอนมากกว่าหลังจากทิ้งไว้ 5 นาทีเมื่อเทียบกับค่าพีเอชอื่นๆ ดังแสดงในรูป 3.16



รูป 3.16 ลักษณะของสีอินดิโกที่ค่าพีเอชต่างๆ

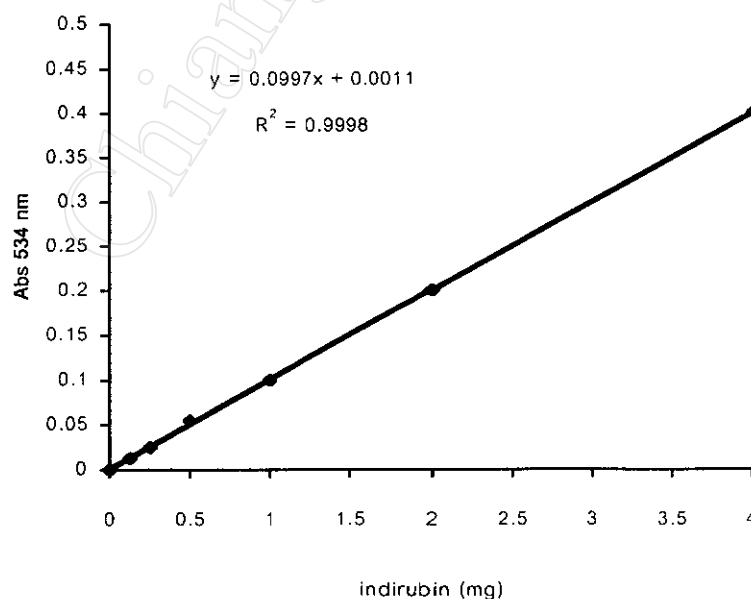
3.7 ผลการหาปริมาณสารสีที่แยกได้ในสารสีแปรรูป

จากการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารสีสกัดจากใบครามและใบส้ม โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบางและเทคนิคโครมาโทกราฟีคอลัมน์ พบว่าองค์ประกอบของสารสีสกัดมีสารสีน้ำเงินและสีแดง ซึ่งสารสีน้ำเงินน่าจะเป็นอินดิโกและสารสีแดงน่าจะเป็นอินดิรูบิน จึงได้หาปริมาณอินดิโกและอินดิรูบินในผงสีแห้งและเม็ดแกรนูล

การหาปริมาณอินดิโกในสารสกัดหาได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 611 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานการหาปริมาณอินดิโกในรูป 3.2 แต่การหาปริมาณอินดิรูบินนั้นไม่มีสารอินดิรูบินมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบ จึงใช้สารสีแดงที่สกัดจากใบส้มที่ผ่านการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีโดยทำ mass spectroscopy และ ^{13}C NMR แล้วได้ว่าสารสีแดงนั้นคืออินดิรูบินเป็นสารมาตรฐานแล้วสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตรกับปริมาณอินดิรูบินมาตรฐาน โดยอาศัยข้อมูลจากการวิเคราะห์การดูดกลืนแสงสูงสุดของอินดิรูบินในข้อ 2.4.3.4 เพื่อหาปริมาณอินดิรูบินที่มีในสารสกัด

การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณอินดิรูบิน

ชั่ง indirubin standard 0.004 กรัม ละลายใน conc. H_2SO_4 10 มล. เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 250 มล. ในขวดปริมาตร เจือจางด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกในน้ำกลั่น (1:24) ให้เป็นความเข้มข้นต่างๆ กันแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตรโดยใช้สารละลายกรดซัลฟูริกในน้ำกลั่น (1:24) เป็น Blank นำค่าการดูดกลืนที่ได้ไปพล็อตกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณอินดิรูบินจะได้กราฟมาตรฐานดังรูปที่ 3.17 ซึ่งอาจใช้วัดปริมาณสารให้สีหลักที่สกัดได้จากครามและส้มต่อไป



รูป 3.17 กราฟมาตรฐานการหาปริมาณอินดิรูบิน

3.7.1 ผลการหาปริมาณสารสีที่แยกได้ในผงสีแห้ง

เมื่อนำผงสีได้มาหาปริมาณอินดิโกและอินดิรูบินโดยละลายผงสีแห้งในกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 20 มล. เติมน้ำกลั่นให้เป็น 500 มล. แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 611 นาโนเมตรและ 535 นาโนเมตร โดยวัดอย่างละ 2 ความเข้มข้นแล้วเทียบกับกราฟมาตรฐานอินดิโกในรูป 3.2 และกราฟมาตรฐานอินดิรูบินในรูป 3.17 ได้ผลดังตาราง 3.14

ตาราง 3.14 ปริมาณอินดิโกและอินดิรูบินในผงสีจากครามและฮ่อม

วัตถุคิ	ผงสีแห้ง (กรัม)	ค่าการดูดกลืน แสงที่ 611 นา โนเมตร	ปริมาณอินดิโก (มก.)	ค่าการดูดกลืน แสงที่ 535 นา โนเมตร	ปริมาณอินดิรูบิน (มก.)
ฮ่อม	0.010	0.100	0.78	0.120	1.19
	0.005	0.050	0.37	0.060	0.59
คราม	0.010	0.130	1.02	0.155	1.54
	0.005	0.070	0.54	0.080	0.79

จากตาราง 3.14 อัตราส่วนระหว่างปริมาณอินดิรูบินกับปริมาณอินดิโกเป็น 1.5 เท่าซึ่งแตกต่างจากการหาปริมาณองค์ประกอบของสารสีโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีคอลัมน์ซึ่งได้อัตราส่วนปริมาณอินดิรูบินกับปริมาณอินดิโกเป็น 6.8 เท่าน่าจะเป็นเพราะการหาปริมาณองค์ประกอบของสารสีโดยวิธีนี้เป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสีหลอดเดียวกันแต่วัดที่ค่าความยาวคลื่นต่างกันเท่านั้นทำให้มีการซ้อนทับกันของสารสี ค่าปริมาณสารสีที่ได้จึงต่างจากการหาปริมาณสารสีโดยการแยกด้วยโครมาโทกราฟีคอลัมน์แล้วชั่งออกมาเป็นน้ำหนักอย่างมาก

3.7.2 ผลการหาปริมาณสารสีที่แยกได้ในเม็ดแกรนูล

ในการเตรียมเม็ดแกรนูลจากสารสีสกัดที่มีลักษณะตะกอนเปียกนั้นในสารสีสกัดที่มีลักษณะตะกอนเปียกจะมีน้ำหนักของน้ำค้างปนนอกเหนือจากตะกอนฮ่อมและเมื่อผสมแลคโตสเพื่อทำแกรนูลต้องใช้ปริมาณแลคโตสมากถึง 4 เท่าของสารสีสกัดที่มีลักษณะคล้ายแป้งเปียก ทำให้ได้เนื้อสีในเม็ดแกรนูลน้อยเวลานำไปใช้ฮ่อมต้องใส่ในปริมาณมาก เมื่อนำมาคำนวณหาปริมาณอินดิโกในเม็ดแกรนูลที่เตรียมจากสารสีสกัดที่มีลักษณะตะกอนเปียกของใบฮ่อมสดโดยเทียบจากตาราง 3.10 และ 3.11 พบว่า เม็ดแกรนูล 1045 กรัม มีอินดิโก 2.93 กรัม ดังนั้นเม็ดแกรนูล 1 กรัมจะมีอินดิโกอยู่ 2.80 มก. ดังนั้นถ้าเริ่มจากผงสีแห้งทำเม็ดแกรนูลจะได้ปริมาณอินดิโกในเม็ดแกรนูล 1 กรัมเพิ่มขึ้นมากเช่นถ้าใช้ผงสีแห้งที่สกัดจากฮ่อม 300 กรัม แลคโตส 50 กรัม น้ำร้อนต้มเดือดจัด

300 มล. จะได้เม็ดแกรนูลที่แห้งแล้วประมาณ 350 กรัม จากการหาปริมาณผงสีแห้งที่สกัดจากฮ่อม 100 กรัมมีปริมาณอินดิโก 7.8 กรัม หรือเม็ดแกรนูล 350 กรัม มีปริมาณอินดิโก $7.8 \times 3 = 23.4$ กรัม หรือคิดเป็นเม็ดแกรนูล 1 กรัม มีปริมาณอินดิโกเท่ากับ 66.8 มิลลิกรัม

ในการเตรียมเม็ดแกรนูลจากสารสีสกัดที่มีลักษณะตะกอนเปียกนั้นในสารสีสกัดที่มีลักษณะตะกอนเปียกจะมีน้ำหนักของน้ำค้างปนออกเนื่องจากตะกอนคราและเมื่อผสมแลคโตสเพื่อทำแกรนูลต้องใช้ปริมาณแลคโตสมากถึง 4 เท่าของสารสีสกัดที่มีลักษณะตะกอนเปียก ทำให้ได้เนื้อสีในเม็ดแกรนูลน้อยเวลานำไปใช้ย่อมต้องใส่ในปริมาณมาก เมื่อนำมาคำนวณหาปริมาณอินดิโกในเม็ดแกรนูลที่เตรียมจากสารสีสกัดที่มีลักษณะตะกอนเปียกของใบครามสดโดยเทียบจากตาราง 3.10 และ 3.11 พบว่า เม็ดแกรนูล 1045 กรัม มีอินดิโก 4.47 กรัม ดังนั้นเม็ดแกรนูล 1 กรัมจะมีอินดิโกอยู่ 4.28 มก. ดังนั้นถ้าเริ่มจากผงสีแห้งทำเม็ดแกรนูลจะได้ปริมาณอินดิโกในเม็ดแกรนูล 1 กรัมเพิ่มขึ้นมากเช่นถ้าใช้ผงสีแห้งที่สกัดจากฮ่อม 300 กรัม แลคโตส 50 กรัม น้ำร้อนต้มเคี่ยวจัด 300 มล. จะได้เม็ดแกรนูลที่แห้งแล้วประมาณ 350 กรัม จากการหาปริมาณผงสีแห้งที่สกัดจากฮ่อม 100 กรัมมีปริมาณอินดิโก 11.9 กรัม หรือเม็ดแกรนูล 350 กรัม มีปริมาณอินดิโก $11.9 \times 3 = 35.7$ กรัม หรือคิดเป็นเม็ดแกรนูล 1 กรัม มีปริมาณอินดิโกเท่ากับ 102 มิลลิกรัม

จากเหตุผลดังกล่าวนี้จึงน่าจะเตรียมเม็ดแกรนูลจากผงสีแห้งเพราะปริมาณอินดิโกในเม็ดแกรนูลมีมากกว่า ไม่ต้องใช้เม็ดสีมากในการย้อมแต่ละครั้ง

3.8 ผลการทดลองหาสูตรตำรับที่เหมาะสมในการผลิตอินดิโกในรูปของเม็ดแกรนูลและทดสอบสมบัติการละลายน้ำ

การใช้สีที่สกัดได้ในลักษณะตะกอนเปียกมาทำเม็ดแกรนูลทำให้ปริมาณอินดิโกจริงๆ ในเม็ดแกรนูลมีน้อยมากคือ 2.80 มก.ต่อเม็ดแกรนูล 1 กรัม เมื่อเปลี่ยนจากสารสีสกัดลักษณะตะกอนเปียกมาเป็นผงสีพบว่าปริมาณอินดิโกจริงๆ ในเม็ดแกรนูลเพิ่มมากขึ้นคือ 29.43 มก.ต่อเม็ดแกรนูล 1 กรัม แต่เม็ดแกรนูลที่ได้ละลายน้ำได้ยาก เมื่อผสมสารที่ช่วยในการข้อมสีพวกกรดซิตริก สารสัมน้ำปูนใสและ wetting agent ลงไปเป็นส่วนประกอบในเม็ดแกรนูลพบว่าเม็ดแกรนูลที่ได้ละลายน้ำได้ดีขึ้น นอกจากนี้การเติม wetting agent ยังทำให้เม็ดแกรนูลที่ได้ไม่แข็งสามารถบดเป็นเม็ดได้ง่าย ดังแสดงในตาราง 3.15 เมื่อทดสอบสมบัติการละลายน้ำของเม็ดแกรนูลเหล่านี้พบว่าเม็ดแกรนูลทุกสูตรที่สามารถละลายน้ำได้ดีที่สุดที่ 60°C แต่ก็ละลายได้ไม่หมดถึงแม้ว่าจะเพิ่มอุณหภูมิของน้ำขึ้นอีกก็ตามดังแสดงในตาราง 3.16 ซึ่งในส่วนที่ไม่ละลายนั้นอาจเป็นส่วนผสมต่างๆ ที่ใส่เข้าไปเพื่อช่วยในการอัดเป็นเม็ดแกรนูล เช่น อินดิโกในรูปออกซิไดซ์ แป้งมันและปูนขาว เป็นต้น

ตาราง 3.15 การเตรียมเม็ดแกรนูลสูตรต่างๆ

สูตร เม็ด แกร นูล	ส่วนประกอบ											ค่า พีเอช เมื่อ ละลาย น้ำ	ปริมาณ อินดิโก (mg/g เม็ดแกร นูล)
	Paste เปียก (g)	Paste อบ (g)	ผง สี (g)	Lactose (g)	แป้ง มัน (g)	Citric acid (g)	Wetting agent (g)	น้ำ ปูน ใส (ml)	ครีม ออฟ ตาตาร์ (g)	สาร สัมน้ำ (g)	CuSO ₄ (g)		
1	200	-	-	845	-	-	-	-	-	-	-	8.1	2.80
2	-	120	-	250	-	-	-	-	-	-	-	8.6	11.51
3	-	120	-	-	123	-	-	55	-	-	-	8.8	17.53
4	-	120	-	-	125	50	-	-	-	-	-	3.7	15.49
5	-	-	100	-	115	50	50	-	-	-	-	6.6	29.43
6	-	100	-	-	65	-	-	-	50	-	-	6.7	19.81
7	-	100	-	-	117	-	25	-	50	-	-	6.6	15.95
8	-	100	-	-	139	-	25	-	50	50	-	4.2	12.57
9	-	100	-	-	78	-	25	-	50	-	50	4.7	15.32

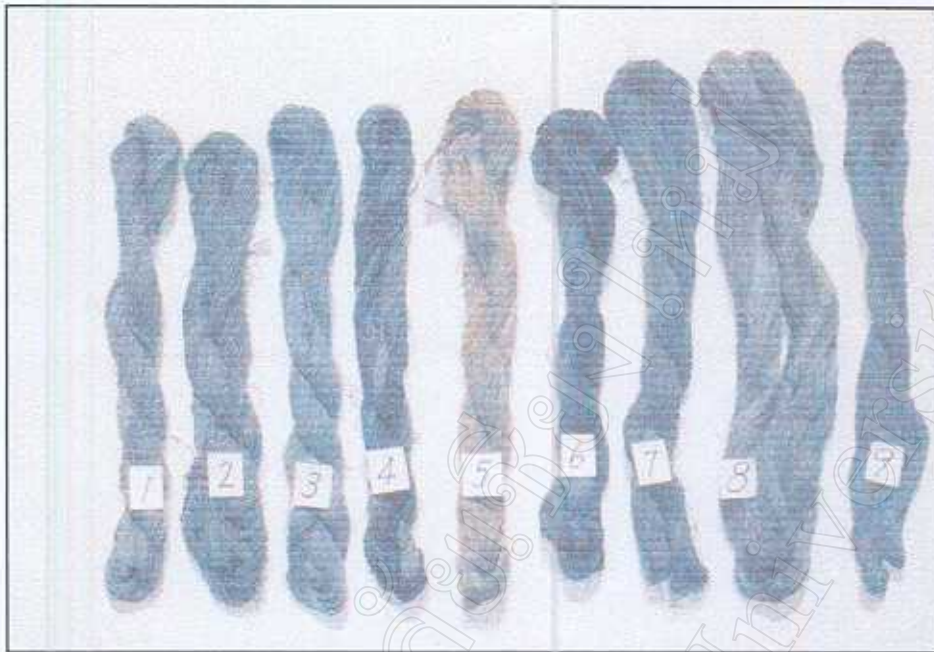
ตาราง 3.16 แสดงลักษณะการละลายของเม็ดแกรนูลในน้ำที่อุณหภูมิต่างๆโดยนำเม็ดแกรนูลแต่ละสูตรมา 30 มก. ละลายน้ำ 5 มล. ที่อุณหภูมิต่างๆกัน

อุณหภูมิของน้ำ (°C)	สูตรเม็ดแกรนูล								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	++	++	++	++	+	++	++	++	++
75	++	++	++	++	+	++	++	++	++
85	++	++	++	++	+	++	++	++	++
100	++	++	++	++	+	++	++	++	++

- คือไม่ละลาย, + คือละลายได้บ้าง, ++ คือละลายได้มากขึ้น

3.9 ผลการทดลองย้อมด้วยสีสำเร็จรูปสูตรต่างๆ

จากรูป 3.18 จะเห็นได้ว่าฝ้ายที่ย้อมด้วยเม็ดแกรนูลที่มี lactose เป็นส่วนประกอบ (มัด 1,2) จะย้อมสีติดได้สม่ำเสมอเมื่อเทียบกับการใช้แป้งจะเห็นเป็นรอยด่าง (มัด 4,6) การที่เป็นรอยด่างอาจเป็นเพราะโมเลกุลของแป้งมีขนาดใหญ่เมื่อเข้าไปเกาะเนื้อฝ้ายจะทำให้สีไม่สามารถเข้าไปแทรกซึมในเนื้อผ้าได้แต่ถ้าใส่ wetting agent ลงไปเป็นส่วนประกอบ (มัด 7,8,9) ก็จะทำให้การกระจายตัวของสีดีขึ้น ไม่เป็นรอยด่าง นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถใช้ครีมออฟทาทาร์ซึ่งมีกรดทาร์ทาริกแทนกรดซิตริกได้ และการเติมสารส้มลงไปเป็นส่วนประกอบทำให้สีที่ย้อมออกมาได้ค่อนข้างเทา (มัด 8) ในส่วนของเนื้อสารสีสกัดที่นำมาทำเม็ดแกรนูลพบว่าเนื้อสีสกัดในลักษณะตะกอนเปียกกับอบที่อุณหภูมิ 60°C 72 ชั่วโมง เมื่อนำมาทำเม็ดแกรนูลแล้วทดลองย้อมฝ้ายสีจะติดเนื้อผ้าได้ดีกว่าใช้เนื้อสีสกัดที่อบจนแห้งสนิทมาทำถึงแม้ว่าในเม็ดแกรนูลที่ใช้เนื้อสีสกัดที่แห้งสนิทจะมีปริมาณอินดิโกมากกว่า (มัด 5) แต่อย่างไรก็ตามการย้อมครั้งนี้เป็นการย้อมแบบใช้ความร้อน เพื่อต้องการให้เม็ดสีละลายได้เร็วขึ้นและอยู่ในรูป reduced form ได้ดีขึ้น ซึ่งจริงๆแล้วการย้อมฝ้ายด้วยสีอินดิโกอาจจะย้อมเย็นได้โดยเฉพาะในกรณีที่เม็ดแกรนูลมีส่วนผสมเป็นแป้งมันเพราะถ้าใช้น้ำย้อมจะมีลักษณะเป็นแป้งเปียกเคลือบบนเส้นด้ายฝ้ายไม่สม่ำเสมอทำให้เกิดเป็นรอยด่าง



รูป 3.18 แสดงลักษณะการติดสีของผ้าเมื่อย้อมด้วยเม็ดแกรนูโลสสูตรต่างๆ

1. ผ้าที่ย้อมด้วยเม็ดแกรนูโลสที่มีเนื้อสีสกัดในลักษณะ paste และ lactose เป็นส่วนประกอบ
2. ผ้าที่ย้อมด้วยเม็ดแกรนูโลสที่มีเนื้อสีสกัดที่อบ 60°C 72 ชั่วโมงและ lactose เป็นส่วนประกอบ
3. ผ้าที่ย้อมด้วยเม็ดแกรนูโลสที่มีเนื้อสีสกัดที่อบ 60°C 72 ชั่วโมง, แป้งมันและน้ำปูนใสเป็นส่วนประกอบ
4. ผ้าที่ย้อมด้วยเม็ดแกรนูโลสที่มีเนื้อสีสกัดที่อบ 60°C 72 ชั่วโมง, แป้งมันและกรดซิตริกเป็นส่วนประกอบ
5. ผ้าที่ย้อมด้วยเม็ดแกรนูโลสที่มีเนื้อสีสกัดที่อบจนแห้งสนิท, แป้งมันและครีมออฟฟาทาร์เป็นส่วนประกอบ
6. ผ้าที่ย้อมด้วยเม็ดแกรนูโลสที่มีเนื้อสีสกัดที่อบ 60°C 72 ชั่วโมง, แป้งมันและครีมออฟฟาทาร์เป็นส่วนประกอบ
7. ผ้าที่ย้อมด้วยเม็ดแกรนูโลสที่มีเนื้อสีสกัดที่อบ 60°C 72 ชั่วโมง, แป้งมัน, ครีมออฟฟาทาร์และ wetting agent เป็นส่วนประกอบ
8. ผ้าที่ย้อมด้วยเม็ดแกรนูโลสที่มีเนื้อสีสกัดที่อบ 60°C 72 ชั่วโมง, แป้งมัน, ครีมออฟฟาทาร์, wetting agent และสารส้มเป็นส่วนประกอบ
9. ผ้าที่ย้อมด้วยเม็ดแกรนูโลสที่มีเนื้อสีสกัดที่อบ 60°C 72 ชั่วโมง, แป้งมัน, ครีมออฟฟาทาร์, wetting agent และ CuSO_4 เป็นส่วนประกอบ

3.10 ผลการศึกษาวิธีการแยกสารสีเพื่อการแปรรูป

นอกเหนือจากการแปรรูปสารสีสกัดที่มีลักษณะตะกอนเปียกที่ได้จากการหมักข่มและครามเป็นเม็ดแกรนูลแล้วข่มได้สีน้ำเงินม่วง จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารให้สีหลักปรากฏว่ามี 2 สี คือสีน้ำเงินและสีแดงให้ค่า R_f เท่ากับ 0.80 และ 0.58 ตามลำดับ โดยเฉพาะสีแดงมีปริมาณมากและมีความคงทนในบรรยากาศได้ดีกว่าสีน้ำเงิน จึงนำที่จะลองหาวิธีสกัดแยกสีทั้งสองออกจากกันโดยวิธีง่ายๆ เพื่อให้ได้สีข่มที่มีสีแดงและสีน้ำเงินอีกชนิดสีเพิ่มเติมโดยไม่จำเป็นต้องแยกให้บริสุทธิ์โดยอาศัยหลักที่ว่าสีน้ำเงินและสีแดงละลายได้ดีในคลอโรฟอร์มแต่เฉพาะสีแดงละลายได้ดีในเมทานอล จึงลองทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายดังกล่าวสกัดสีออกจาก paste หรือผงสีแห้งจากข่มหรือครามดังนี้

Paste หรือผงสีแห้งจากครามและข่ม



สกัดด้วยเมทานอล

⇒ สารละลายสีแดง ⇒ ระเหยแห้ง

(1)



ผงสีที่เหลือ



สกัดอีกครั้งด้วยเมทานอล

⇒ สารละลายสีแดงม่วง ⇒ ระเหยแห้ง

(2)



ผงสีที่เหลือ

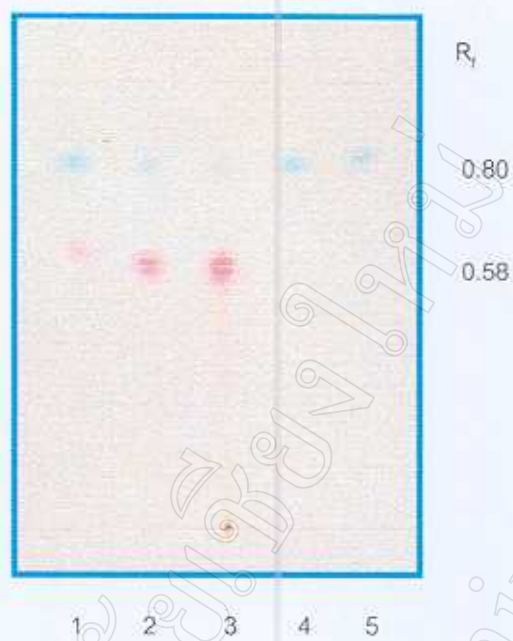


สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

⇒ สารละลายสีน้ำเงิน ⇒ ระเหยแห้ง

(3)

แล้วทำการตรวจสอบสารสีที่สกัดได้ทั้ง 3 ตอนเปรียบเทียบกับกันโดยวิธีและโครมาโทกราฟีผิวบาง



รูป 3.18 TLC แสดงผลการแยกสารสีเพื่อการแปรรูป

1. สารสีจาก paste 2. สกัดด้วยเมทานอลครั้งที่ 1 3. สกัดด้วยเมทานอลครั้งที่ 2
4. สารที่เหลือจากการสกัดด้วยเมทานอลครั้งที่ 2 5. สารมาตรฐานอินดิโก