บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

4.1 การสกัดสารให้สีจากใบครามและใบฮ่อม

วิธีสกัดอินดิโกจากใบครามและใบฮ่อมโดยปกติจะหมักด้วยน้ำจนเกิดการเน่าเปื่อยซึ่งโดยทั่วไปจะหมักเป็นระยะเวลาประมาณ 3 วันแล้วจึงตักกากที่เหลือทิ้งแล้วเติมน้ำปูนใสในน้ำหมักพร้อมกับให้อากาศเพื่อตกตะกอนอินดิโกออกมา การหมักแบบนี้ทำให้น้ำหมักที่ได้มีกลิ่นเหม็นมากและตะกอนครามที่ได้ก็ยังมีกากวัตถุดิบปนอยู่ จากการศึกษาวิธีการสกัดพบว่าการหั่นวัตถุดิบเป็นชิ้นเล็กๆใส่ในถุงผ้าแล้วหมักในถังที่มีฝาปิดมิดชิดเป็นระยะเวลา 1 วันก็ได้น้ำหมักที่เมื่อเติมน้ำปูนใสลงไปแล้วให้อากาศก็เกิดตะกอนอินดิโกขึ้น การกำจัดกากที่เหลือจากการหมักก็ทำได้ง่ายและสะดวกขึ้น ไม่มีกลิ่นเหม็นมากเหมือนวิธีสกัดโดยทั่วไป การที่หมักพืชในน้ำแล้วเกิดกลิ่นเหม็นนั้นอาจเป็นเพราะมีการย่อยสลายองค์ประกอบพวกโปรตีนหรือไขมันในพืชให้เป็นสารประกอบพวกคีโตนที่มีกลิ่นเหม็น ยิ่งใช้เวลาในการหมักนานการย่อยสลายสารพวกนี้ก็มีมากขึ้นกลิ่นเหม็นก็เกิดขึ้นมากตาม เมื่อหมักวัตถุดิบใน 95% เอทานอลพบว่าไม่มีตะกอนอินดิโกเกิดขึ้นหลังจากเติมน้ำปูนใสแล้วให้อากาศเนื่องจากอินดิโกจากใบครามและใบฮ่อมอยู่ในรูปกลูโคไซด์อินดิแคน เมื่อหมักใบครามและใบฮ่อมในน้ำหรือใน95%เอทานอลสารกลูโคไซด์อินดิแคนนี้จะละลายออกมาในน้ำหมัก จากนั้นแบคทีเรียในน้ำหมักจะสร้างเอนไซม์ที่ตัดน้ำตาลออกจากกลูโคไซด์อินดิแคนให้กลายเป็นอินดอกซิลซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นอินดิโกต่อไป การที่หมักใบครามและใบฮ่อมใน 95%เอทานอลแล้วไม่เกิดอินดิโกอาจเป็นเพราะแบคทีเรียไม่สามารถอยู่ในสารละลายเอทานอลได้การหมักวิธีนี้จึงไม่มีเอนไซม์ที่ใช้ตัดน้ำตาลออกจากกลูโคไซด์อินดิแคนให้เป็นอินดอกซิล ซึ่งเคยมีรายงานว่าเมื่อเลี้ยงจุลชีพที่สามารถผลิตเอนไซม์พวก dioxygenases บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี aromatic hydrocarbons อยู่ จุลชีพเหล่านี้จะเปลี่ยน aromatic hydrocarbons ให้เป็น dihydrodiol ซึ่งจะถูก dehydrate ไปเป็น indoxyl และจะจับกันเป็นคู่กลายเป็นอินดิโก[41,42]

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดพบว่าวัตถุดิบที่สดเมื่อนำมาหมัก 24 ชม.จะให้น้ำหมักที่มีสีเขียวเหลือง pH 4.8 และสีสกัดในลักษณะ paste สีน้ำเงินเข้มซึ่งมีปริมาณอินดิโกมากที่สุดเมื่อเทียบกับ paste ที่ได้จากการหมักวิธีอื่นๆ นอกจากนี้ปริมาณอินดิโกยังแปรตามความสดของวัตถุดิบ คือถ้าวัตถุดิบมีความสดน้อยลงปริมาณอินดิโกก็จะน้อยลงตามอาจเป็นเพราะแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ที่ตัดน้ำตาลออกจากสารกลูโคไซด์อินดิแคนให้เป็นอินดอกซิลที่ติดมากับวัตถุดิบมีจำนวนน้อยลงโดยความร้อนและแสงหรือสารที่เป็นสารตั้งต้นถูกทำลายหรืออาจถูกเปลี่ยนเป็นสารอื่นโดยสาเหตุเดียวกันนี้ก็เป็นได้เพราะการทิ้งวัตถุดิบไว้นานก่อนการหมักจะทำให้ปริมาณอินดิโกในสีสกัดน้อยลง ซึ่งจากงานวิจัยของ Kokubun T et al[25] พบว่า Isatan B ที่เป็นสารตั้งต้นตัวหนึ่งของอินดิโกที่พบในพืชชื่อ

Isatis tinctoria ไม่ทนต่อความร้อนและการอบแห้งและ Marero L.M. et al.[43] ได้รายงานว่า indican ที่มีใน *Polygonum tinctorium* มีความเข้มข้นมากในใบสด การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักพบว่าระยะเวลาที่ดีที่สุดคือ 24 ชม.จะได้อินดิโก 3% และยังสามารถใช้วัตถุดิบเดิมหมักต่อในน้ำใหม่อีกจะได้ปริมาณสีเพิ่มขึ้นอีกครึ่งหนึ่งของครั้งแรก วิธีนี้ทำให้ประหยัดเวลาในการสกัดและทำให้ได้สีสกัดที่มีสีน้ำเงินเข้มและมีปริมาณอินดิโกมาก ในกระบวนการหมักไม่จำเป็นต้องใช้น้ำหมักเก่ามาเติมเพราะปริมาณอินดิโกในสีสกัดที่ได้จากการหมักวัตถุดิบด้วยน้ำใหม่ยังมีมากกว่าในสีสกัดที่ได้จากการหมักวัตถุดิบโดยใช้น้ำหมักเก่าผสมน้ำใหม่ ดังแสดงในตาราง 3.3

จากการเปรียบเทียบปริมาณอินดิโกในสีสกัดที่ได้จากการหมักใบครามสดและใบฮ่อมสดในน้ำหนักที่เท่ากัน(ตาราง3.4) พบว่าในใบฮ่อมสดจะให้อินดิโกปริมาณมากกว่าใบครามสดประมาณ 4:3 นอกจากนี้ผลการศึกษาผลของกรดและแบคทีเรียในการไฮโดรไลซ์น้ำตาลออกจากอินดิโกพบว่าเมื่อเติมกรดลงไปในกระบวนการหมักทำให้ได้สีสกัดปริมาณน้อยลงอาจเป็นเพราะว่าสภาพการตกตะกอนของสีสกัดต้องอาศัยสภาพที่เป็นด่าง[37]และกรดเองอาจไปทำลายแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ที่ช่วยไฮโดรไลซ์น้ำตาลออกจากอินดิโกด้วย ซึ่งผลการทดลองนี้สนับสนุนผลการทดลองขั้นต้นที่มีการใช้แอลกอฮอล์หมักวัตถุดิบและสีสกัดที่ได้ไม่มีรงควัตถุใดเลยที่มีค่า R_f ตรงกับอินดิโกมาตรฐานเนื่องจากแอลกอฮอล์อาจไปทำลายแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ที่ช่วยในการไฮโดรไลซ์น้ำตาลออกจากกลูโคไซด์อินดิแคนให้เป็นอินดอกซิลซึ่งเป็นสารตั้งต้นของอินดิโกและการเติมแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำหมักครั้งก่อนๆลงไปในกระบวนการหมักพบว่าปริมาณสีสกัดที่ได้ไม่แตกต่างจากการที่ไม่เติมแบคทีเรียลงไปเพิ่มซึ่งน่าจะเป็นเพราะว่าแบคทีเรียในอากาศและที่ติดมากับใบพืชมีมากเพียงพอแล้วก็ได้

การทดลองย้อมผ้าโดยใช้สีสกัดจากการหมักใบฮ่อม 24 ชม. และ 72 ชม. พบว่าด้ายฝ้ายที่ทำความสะอาดโดยการซักด้วยผงซักฟอกแล้วล้างด้วยน้ำเปล่าให้สะอาดเพื่อทำฝ้ายให้เป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์คือ กำจัดเอาสิ่งเจือปนพวกขี้ผึ้ง เศษผิวเมล็ดฝ้าย แป้งและไขมันที่ติดเนื้อฝ้ายออกให้หมด เมื่อนำมาย้อมด้วยสีสกัดอินดิโกจะติดสีน้ำเงินเข้มและสม่ำเสมอเมื่อเทียบกับฝ้ายที่ไม่ได้ทำความสะอาดดังรูป 3.3 เพราะฝ้ายที่ทำความสะอาดแล้วสีจะสามารถซึมผ่านเข้าไปติดเส้นใยได้โดยตลอด สีบางตัวสามารถทำปฏิกิริยากับเส้นใยโดยตรงได้ และจะติดฝ้ายได้นานและสวยงามยิ่งขึ้น สีที่จำเป็นต้องใช้สารอื่นช่วยติดสีสารนั้นก็จะทำปฏิกิริยาได้ดีขึ้น ผลผลิตที่ได้จะคงทนและสวยงาม[44] ฝ้ายที่ย้อมด้วยสีที่สกัดได้จากการหมักใบฮ่อมสดเป็นระยะเวลา 24 ชม.จะติดสีน้ำเงินเข้มกว่าฝ้ายที่ย้อมด้วยสีที่สกัดได้จากการหมักใบฮ่อมสดเป็นระยะเวลา 72 ชม. แสดงว่าการหมักใบฮ่อมเพียง 24 ชม.ก็เพียงพอแล้วสำหรับการหมักฮ่อมและครามเพื่อสกัดเอาสี ปริมาณอินดิโกที่ได้ก็มากกว่าการหมักใบฮ่อม 72 ชม. ซึ่งอาจมีการย่อยสลายสารอื่นปนออกมาด้วย เมื่อนำสีสกัดที่ได้มาย้อมผ้าจึงมีสีจางกว่าผ้าที่ย้อมด้วยสีสกัดที่ได้จากการหมักใบฮ่อม 24 ชม. ดังรูป 3.4 นอกจากนี้ยังพบว่าการสกัดสีจากวัตถุดิบที่มีความสดมากจะได้ปริมาณอินดิโกมากกว่าสกัดจากวัตถุดิบที่แห้ง เพราะในวัตถุดิบที่สดสารตั้งต้นยังไม่ถูกทำลายด้วยแสงและความร้อนและแบคทีเรียที่ติดมากับวัตถุดิบก็ยังไม่ถูกทำลายด้วยสาเหตุดังกล่าวเช่นกัน จากรูป 3.5 พบว่า

ฝ้ายที่ย้อมด้วยสารสีสกัดจากใบฮ่อมสดจะติดสีน้ำเงินเข้มกว่าเมื่อเทียบกับฝ้ายที่ย้อมด้วยสารสีสกัดจากใบฮ่อมที่นำมาผึ่งลม 72 ชม.และใบฮ่อมแห้งตามลำดับ

4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของสารสีจากครามและฮ่อม

จาการทดสอบเคมีเบื้องต้นของสารสีสกัดจากใบครามและฮ่อมพบว่าเป็นสารประกอบพวกอัลคาลอยด์ เพราะให้ผลบวกกับ Mayer's reagent และ Dragendroff's reagent ได้เป็นตะกอนสีขาวและสีส้มน้ำตาล ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบางพบว่าระบบตัวชะที่ดีที่สุดในการแยกองค์ประกอบของสีเป็น chloroform:hexane:methanol ในอัตราส่วน 7:4:1 สีสกัดที่ได้จากใบฮ่อมสด ใบฮ่อมผึ่งลมและใบฮ่อมแห้งจะให้แถบสีที่เหมือนกันคือน้ำเงินและแดงแต่จะมีความเข้มข้นของสีลดลงตามลำดับ สีสกัดที่ได้จากการหมักใบครามก็ให้แถบสีน้ำเงินและแดงเหมือนกัน ดังรูป 3.4 สรุปได้ว่าสารสกัดจากครามและฮ่อมมีสารสีน้ำเงินและแดงเป็นองค์ประกอบหลักเหมือนกันหมด แต่ปริมาณของสารสีที่มีในสารสกัดขึ้นอยู่กับความสดของวัตถุดิบและวิธีการสกัด ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าสารตั้งต้นของอินดิโกถูกทำลายได้โดยแสงและความร้อน[25,43] แถบของสีน้ำเงินที่เห็นบนแผ่น TLC จะตรงกับแถบสีน้ำเงินของอินดิโกมาตรฐานมีค่า R_f 0.49 แสดงว่าสารสีน้ำเงินที่มีสีในสารสีสกัดหยาบน่าจะเป็นอินดิโกและจากการแยกองค์ประกอบหลักสีน้ำเงินและสีแดงโดยโครมาโทกราฟีคอลัมน์ สารสีน้ำเงินถูกชะออกมาจากคอลัมน์ด้วย chloroform:hexane ในอัตราส่วน 8:2 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นค่าเดียวกับอินดิโกมาตรฐานคือ 603 นาโนเมตรและจากการวิเคราะห์ทางเคมีพบว่า Infrared spectrum ของสารสีน้ำเงินมี pattern ของ peak เหมือนกับสารอินดิโกมาตรฐาน ดังรูป 3.8 และ 3.9 ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวจึงสรุปได้ว่าสารสีน้ำเงินน่าจะเป็นอินดิโก ซึ่งเคยมีรายงานว่าสามารถแยกอินดิโกนี้ได้จากพืชชื่อ *Isatis tinctiria* และ *Polygonum tinctirium*[25,28,45] ส่วนสารสีแดงถูกชะออกมาจากคอลัมน์ด้วย chloroform:hexane:methanol ในอัตราส่วน 7:4:1 แต่ไม่มีสารมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบจึงได้ทำการวิเคราะห์สารสีแดงที่สกัดได้จากฮ่อม โดยทำ mass spectrometry และ ^{13}C NMR โดยผลของ mass spectrum แสดงว่า molecular ion ที่ m/e เท่ากับ 262 และเมื่อเปรียบเทียบค่า chemical shift ของอะตอม ^{13}C NMR ของสารประกอบอินดิรูบินจากการประมวลผลด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์เห็นได้ว่ามีความสัมพันธ์และใกล้เคียงกัน (รูป 3.10, 3.11 และ 3.12 ตามลำดับ) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารสีแดงที่แยกได้นี้คือสารประกอบเคมีที่มีชื่อเรียกว่าอินดิรูบิน จึงใช้อินดิรูบินนี้เป็นสารมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบกับสารสีแดงที่สกัดได้จากใบคราม พบว่าสารสีแดงจากใบครามมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นค่าเดียวกับอินดิรูบินมาตรฐานคือ 535 นาโนเมตรและ Infrared spectrum ของสารสีแดงมี pattern ของpeak เหมือนกับสารอินดิรูบินมาตรฐาน แสดงว่าสารสีแดงที่สกัดจากใบครามและใบฮ่อม คือ อินดิรูบินเหมือนกัน ซึ่งตรงกับที่เคยมีรายงานว่าแยกออกมาได้จากพืชชื่อ *Baphicacanthus cusia* Brem. S หรือต้นฮ่อมโดย Tang Y[39]และBen BL[40] ยังมีรายงานว่าสารอินดิรูบิน

นี้สามารถใช้รักษาโรค Chronic myelocytic leukemia ได้ในมนุษย์[46,47] และสามารถยับยั้งการเกิดของเซลล์มะเร็ง lewis lung carcinoma และ Walker carcinoma 256 ในหนูได้[48]

4.3 การแปรรูปสีย้อมที่สกัดจากใบครามและใบฮ่อมสด

จากการแปรรูปสีย้อมจากสีสกัดหยาบในลักษณะ paste เป็นผงสีและเม็ดแกรนูลพบว่าองค์ประกอบหลักในสีไม่เปลี่ยนแปลง ดังตาราง 3.11 เป็นการเปรียบเทียบองค์ประกอบของสารให้สีในสีสกัดในลักษณะ paste ผงสีและเม็ดแกรนูลของสารสกัดจากใบครามและใบฮ่อมด้วยเทคนิค TLC โดยมี chloroform:hexane:methanol ในอัตราส่วน 7:4:1 เป็นน้ำยาชะ พบว่าทุกตัวอย่างมีองค์ประกอบสีแดงและน้ำเงินเหมือนกันหมดและสีน้ำเงินมีค่า R_f เท่ากับสารอินดิโกมาตรฐานคือ 0.69 สีน้ำเงินนี้จึงน่าจะเป็นอินดิโก แสดงว่าคุณสมบัติในการเป็นสีย้อมก็ไม่น่าจะเปลี่ยนแปลงมากนักและยังสามารถเก็บรักษาได้ง่ายขึ้นและลดเนื้อที่ในการเก็บ การแปรรูปสารสีสกัดที่มีลักษณะตะกอนเปียกไปเป็นผงสีแห้ง พบว่าผงสีชื้นง่าย จึงได้ปรับปรุงโดยการแปรรูปเป็นเม็ดแกรนูลโดยตรงจากสีสกัดในลักษณะ paste ทำให้ใช้แลคโตสหรือแป้งมันปริมาณมากเพราะในสีสกัดในลักษณะ paste มีน้ำด่างเป็นส่วนประกอบมากทำให้ปริมาณอินดิโกต่อเม็ดแกรนูลมีน้อย จึงได้ปรับปรุงสูตรโดยใช้ paste ที่อบ 60 °C 72 ชม.และ paste ที่อบ 60 °Cจนแห้งสนิทเพื่อจะได้ปริมาณอินดิโกต่อเม็ดแกรนูลเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังทำการปรับปรุงสูตรสำเร็จของเม็ดแกรนูลโดยอาศัยข้อมูลที่เคยรายงานเกี่ยวกับสารช่วยย้อมที่ต้องเติมในการเตรียมน้ำย้อมสีอินดิโกนี้มาผสมลงไปเป็นส่วนประกอบของเม็ดแกรนูลในอัตราส่วนต่างๆ และใช้แป้งมันแทนน้ำตาลแลคโตสในการช่วยให้สารสีสกัดจับตัวกันเป็นก้อนเพื่อจะได้อัดเป็นเม็ดแกรนูลได้ เพราะแป้งมันมีราคาถูกกว่าและหาได้ง่าย ส่วรสารที่ช่วยย้อมพวกกรดซิตริก ครีมออฟตาร์ตาที่มีกรดทาร์ทาริค สารส้ม คอปเปอร์ซัลเฟต และ wetting agent จะเติมลงไปพร้อมกันด้วยในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อหาสูตรสำเร็จที่เหมาะสมที่จะนำไปย้อมผ้าโดยไม่ต้องเติมสารอะไรอีกในขั้นตอนการเตรียมน้ำย้อม สารช่วยย้อมเหล่านี้มีฤทธิ์เป็น reducing agent และใช้แป้งมันแทนแลคโตส เพราะราคาถูกกว่าและหาง่าย นอกจากนี้ยังมีการเติมสารอื่นๆที่ช่วยในการย้อมสีลงไปเช่น กรดซิตริก สารส้ม คอปเปอร์ซัลเฟตและ wetting agent ซึ่งสารเหล่านี้เป็น reducing agent อย่างอ่อนช่วยเปลี่ยนอินดิโกจากรูป oxidize form ซึ่งไม่ละลายน้ำมาเป็น reduce form ซึ่งละลายน้ำได้ นอกจากนี้ยังเป็น mordant และ wetting agent ช่วยทำให้สีกระจายตัวในน้ำย้อมได้ดีและยังทำให้เม็ดแกรนูลไม่แข็งช่วยในขั้นตอนการอัดเป็นเม็ดแกรนูลให้ง่ายขึ้น

เมื่อทดลองย้อมสีด้ายฝ้ายที่ทำความสะอาดโดยการซักด้วยผงซักฟอกแล้วล้างด้วยน้ำสะอาดเพื่อทำฝ้ายให้เป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์ คือ กำจัดเอาสิ่งเจือปนพวกขี้ผึ้ง เศษผิวเมล็ดฝ้าย แป้งและไขมันที่ติดเนื้อผ้าออกให้หมดด้วยเม็ดแกรนูลสูตรต่างๆพบว่าฝ้ายที่ย้อมด้วยเม็ดแกรนูลที่มีน้ำตาลแลคโตสเป็นส่วนประกอบจะติดสีสม่ำเสมอ เมื่อเปลี่ยนมาใช้แป้งมันแทนพบว่าฝ้ายจะติดสีเป็นด่างๆไม่สม่ำเสมอ อาจเป็นเพราะแป้งมีโมเลกุลขนาดใหญ่เมื่อเข้าไปเกาะติดเนื้อผ้าจะทำให้สีเข้าไปแทรกซึมในเนื้อผ้าไม่

ได้ แต่ถ้ามี wetting agent เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วยการติดสีของฝ้ายก็จะสม่ำเสมอเหมือนการใช้แลคโตส การเติมสารส้มทำให้ฝ้ายติดสีน้ำเงินออกเทา

ในส่วนของเนื้อสารสีสกัดที่นำมาทำเม็ดแกรนูล พบว่าเนื้อสีสกัดในลักษณะตะกอนเปียกและเนื้อสีสกัดที่ผ่านการอบที่ 60 °C 72 ชั่วโมง เมื่อนำมาทำเม็ดแกรนูลแล้วทดลองย้อมผ้า สีจะติดเนื้อผ้าได้ดีกว่าใช้เนื้อสีสกัดที่อบจนแห้งสนิทมาทำเม็ดแกรนูล ถึงแม้ว่าในเม็ดแกรนูลสูตรหลังนี้จะมีปริมาณอินดิโกมากกว่า ซึ่งเป็นเพราะว่าเม็ดแกรนูลสูตรหลังนี้ละลายได้ยากมากเมื่อเทียบกับสูตรอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตาม การย้อมครั้งนี้เป็นการย้อมแบบใช้ความร้อนเพื่อต้องการให้เม็ดสีละลายได้เร็วขึ้นและให้อินดิโกอยู่ในรูป reduced form ได้ดีขึ้น ซึ่งจริงๆแล้วควรเปรียบเทียบด้วยการย้อมผ้าด้วยสีอินดิโกแบบย้อมเย็นมากกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อสูตรสำเร็จดังกล่าวมีแป้งมันเป็นองค์ประกอบเพราะแป้งมันเวลาได้รับความร้อนระดับหนึ่งจะกลายสภาพเป็นแป้งเปียกเกาะติดผิวด้ายฝ้ายทำให้การย้อมไม่สม่ำเสมอ

4.4 สมบัติของสารสีย้อม

จากการทดสอบการละลายของสีสกัดพบว่า สีสกัดละลายได้เล็กน้อยในน้ำปูนใสโดยเฉพาะสีสกัดในลักษณะ paste ที่อบ 60 °C จนแห้งจะละลายได้น้อยมากเมื่อเทียบกับสีสกัดในลักษณะอื่นๆ เมื่อนำเม็ดแกรนูลมาละลายในสารละลายเกลือชนิดต่างๆ พบว่าสามารถละลายได้บ้าง และสารละลายสีที่ได้ยังคงมีสีน้ำเงินในสารละลายเกลือทุกชนิด ดังตาราง 3.12 การทดสอบการละลายของเม็ดแกรนูลในเอทานอลก็ให้ผลคล้ายๆกัน คือ เม็ดแกรนูลละลายได้ไม่หมด สารละลายที่ได้มีสีม่วง ซึ่งอาจเป็นเพราะมีทั้งอินดิโก ซึ่งมีสีน้ำเงิน และ อินดิรูบิน ซึ่งมีสีแดง ละลายออกมาในเอทานอล เมื่อเพิ่มเปอร์เซนต์ความเข้มข้นของเอทานอล เม็ดแกรนูลจะละลายได้มากขึ้นจนถึงที่ความเข้มข้นหนึ่งการละลายก็จะไม่เพิ่มขึ้นอีก ถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นเอทานอลอีกก็ตาม ดังตาราง 3.13

การเปลี่ยนค่าพีเอชก็ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนสีของสีย้อม ที่ทุกค่าพีเอช สีของสารละลายยังคงเป็นสีน้ำเงิน การละลายก็คล้ายกัน คือ ละลายได้บ้าง แต่ที่พีเอชเป็นด่าง (พีเอช 12) สีจะจับตัวกันเป็นตะกอนหลังจากทิ้งไว้ 5 นาที ดังรูป 3.16 ซึ่งสนับสนุนข้อมูลที่ว่า ด่างจะช่วยเปลี่ยนสีอินดิโกจากรูป reduced form ให้เป็น oxidized form เกาะติดเนื้อผ้า[49] จากผลการทดลองดังกล่าว การเตรียมน้ำย้อมของสีอินดิโกนี้ควรให้น้ำย้อมมีพีเอชต่ำกว่า 12 สีจะกระจายตัวในน้ำย้อม ไม่จับกันเป็นก้อน ซึ่งมีข้อมูลสนับสนุนผลการทดลองนี้ โดย อนุรัตน์ สายทอง (2544) เคยรายงานไว้ว่า ค่าพีเอชของน้ำย้อมสีอินดิโกควรจะอยู่ในช่วง 10-12 จึงจะสามารถย้อมผ้าติดสีน้ำเงินได้ดีกว่าน้ำย้อมที่มีค่าพีเอชสูงกว่า 12[50]

4.5 การศึกษาวิธีการแยกสารสีน้ำเงินและแดงเพื่อการแปรรูป

จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่าในสีสกัดจากใบครามและใบฮ่อมมีองค์ประกอบของสารให้สีหลัก 2 ชนิดคือสีแดงและน้ำเงิน โดยเฉพาะสีแดงมีปริมาณมากคงทนในบรรยากาศได้ดีกว่าสีน้ำเงินจึงได้ทดลองสกัดโดยแยกสารสีทั้งสองโดยวิธีง่ายๆเพื่อให้ได้สีย้อมน้ำเงินและแดงเพิ่มอีกเฉดสี

โดยประยุกต์จากการแยกสารบริสุทธิ์ที่ทำมาแล้วในข้อ 2.4.3.2 พบว่าสารสีแดงที่สกัดจากผงสีโดยใช้เมทานอลในครั้งแรกจะมีสีน้ำเงินปนออกมาด้วยแต่ก็มีปริมาณน้อยกว่าสีแดงมาก เมื่อนำสารสกัดสีแดงที่ได้มาระเหยแห้งแล้วสกัดด้วยเมทานอลซ้ำอีกครั้งพบว่าจะมีสารสีน้ำเงินปนออกมาน้อยลงเมื่อเทียบกับสารละลายที่สกัดด้วยเมทานอลครั้งแรก เมื่อนำผงสีที่ผ่านการสกัดด้วยเมทานอลทั้งสองครั้งมาตรวจหาองค์ประกอบสีหลักพบว่ามีเฉพาะสารสีน้ำเงินเท่านั้นดังแสดงในรูป 3.19 แสดงว่าวิธีการแยกสารสีแดงและน้ำเงินวิธีนี้น่าจะสามารถพัฒนาไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมเพื่อเพิ่มเฉดสีและแปรรูปให้สะดวกต่อการใช้งานและการเก็บรักษาต่อไป

4.6 สรุปผลการทดลอง

สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดอินดิโกจากใบครามและใบฮ่อม คือ การตัดวัตถุดิบที่สดเป็นชิ้นเล็กๆแล้วใส่ถุงผ้า หมักด้วยน้ำในถังที่มีฝาปิดมิดชิด เป็นระยะเวลา 1 วัน ได้ตะกอนสีประมาณ 0.005 มก.ต่อน้ำหนักใบสด 1 กรัม วิธีนี้ยังสามารถกำจัดกากวัตถุดิบที่เหลือจากการหมักได้ง่าย ลดกลิ่นเหม็นที่เกิดจากการหมักได้ สารสีที่สกัดได้จากใบครามและใบฮ่อมเป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นสารสีน้ำเงินและแดง สารสีน้ำเงินคืออินดิโกและสารสีแดงคืออินดิรูบินซึ่งมีปริมาณเป็น 6.8 เท่าของอินดิโกและมีความคงทนในบรรยากาศมากกว่า

การเตรียมสูตรสำเร็จที่เหมาะสมในการผลิตอินดิโกในรูปของเม็ดแกรนูล พบว่า ควรเตรียมจากสารสีสกัดที่อบที่ 60 °C 72 ชั่วโมง เพราะปริมาณอินดิโกในเม็ดแกรนูลจะมีมากกว่าการเตรียมจากสารสีสกัดลักษณะตะกอนเปียก ส่วนการเตรียมจากสารสีสกัดที่อบจนแห้งมีข้อเสีย คือ ละลายได้ยาก การเตรียมเม็ดแกรนูลจะใส่สารช่วยย้อมพวกกรดซิตริก ครีมออฟตาร์ตา ซึ่งมีกรดทาร์ทาริก สารส้ม คอปเปอร์ซัลเฟต wetting agent ในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อหาสูตรที่เหมาะสม พบว่า การเติม wetting agent ทำให้อัดเป็นเม็ดแกรนูลได้ง่ายขึ้น และทำให้เม็ดแกรนูลแตกตัวในน้ำได้ดีขึ้น

การศึกษาวิธีการแยกสารสีน้ำเงินและแดงเพื่อการแปรรูป พบว่า สารสีแดงสามารถละลายได้ดีในเมทานอล สารสีน้ำเงินละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม เมื่อใช้เมทานอลสกัดสีแดงจากผงสีแห้งครั้งที่ 1 จะมีสีน้ำเงินปนออกมากับสีแดงเพียงเล็กน้อย จากนั้นนำสารละลายนี้ไประเหยแห้งแล้วสกัดด้วยเมทานอลอีกครั้ง พบว่าสีน้ำเงินปนออกมาน้อยลงเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยเมทานอลครั้งแรก สารสีที่เหลือจากการสกัดด้วยเมทานอลครั้งที่ 1 จะนำมาสกัดต่อด้วยคลอโรฟอร์ม ได้สารสีน้ำเงิน ซึ่งมีสีแดงปนออกมาน้อยมาก วิธีการสกัดนี้มีแนวโน้มที่จะนำไปประยุกต์ในระดับอุตสาหกรรมเพื่อการแปรรูปสารสีน้ำเงินและสารสีแดงเป็นสีย้อมสำเร็จรูปต่อไป