การประเมินคุณภาพเนื้อครามด้วยวิธียูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรีสำหรับการหาปริมาณอินดิโกบลู

Indigo blue determination for quality evaluation by UV-Visible Spectrophotometry method

วิชญ์พล โถสายคำ[1], พรกมล สาฆ้อง[1*]
Witchapol Thosaikham[1], Pornkamon Sakong[1*]

Received: 26 May 2022 ; **Revised**: 21 July 2022 ; **Accepted**: 19 September 2022

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณอินดิโกบลูในเนื้อครามด้วยวิธียูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี โดยทำการเปลี่ยนอินดิโกบลูให้อยู่ในรูปของอินดิโกคาร์มีนด้วยปฏิกิริยาซัลโฟเนชันกับกรดซัลฟิวริก ซึ่งอินดิโกคาร์มีนเป็นอนุพันธ์ของอินดิโกบลูที่เสถียร ละลายน้ำได้และดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 610 nm สำหรับสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมตัวอย่างเนื้อคราม พบว่าอัตราส่วนของน้ำหนักเนื้อครามต่อปริมาตรกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 98% (w/v) และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยา คือ 1: 12 (g:mL) และ 30 นาที ตามลำดับ จากการประยุกต์ใช้วิเคราะห์หาปริมาณอินดิโกบลูในตัวอย่างเนื้อครามจากชุมชนในจังหวัดสกลนคร จำนวน 34 ตัวอย่าง พบปริมาณอินดิโกบลูใน เนื้อครามอยู่ในช่วง 0.09 - 2.23% (w/w) ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ปริมาณอินดิโกบลูด้วยวิธียูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรีที่พัฒนาขึ้นให้ค่าร้อยละได้กลับคืนเท่ากับ 95.86 ± 1.02 - 101.48 ± 5.55 และความแม่นยำของการวิเคราะห์ ในรูปแบบของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 0.29 - 1.83 (%RSD) ดังนั้น วิธีการที่พัฒนาขึ้นจึงสามารถนำมาใช้หาปริมาณอินดิโกบลูในเนื้อครามได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ นอกจากนี้ ข้อมูลการวิเคราะห์นี้สามารถใช้เป็นแนวทางสำหรับการประเมินคุณภาพและราคาของเนื้อครามได้อย่างเหมาะสม

คำสำคัญ: อินดิโกบลู อินดิโกคาร์มีน เนื้อคราม ปฏิกิริยาซัลโฟเนชัน วิธียูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี

Abstract

This research aimed to develop UV-Visble spectrophotometric method for quantitative determination of indigo blue content in indigo paste. The indigo blue was transformed to indigo carmine by a sulfonation reaction with sulfuric acid. Indigo carmine is a stable and water-soluble form of indigo blue, with maximum optical absorbance at the wavelength of 610 nm. For indigo paste sample preparation, it was found that the optimum ratio of amount of indigo paste to volume of concentrated sulfuric acid (98 % (w/v)), and reaction time were 1:12 (g:mL) and 30 min, respectively. The proposed method was applied to determine indigo blue in 34 indigo paste samples from different communities in Sakon Nakhon province. The results showed that the amount of indigo blue in the indigo paste samples were in the range of 0.09 - 2.23 % (w/w). The percentage recovery of the proposed method of indigo blue determination by UV-Visble spectrophotometry method was 101.48 ± 5.55. The precision in terms of relative standard deviation was in the range of 0.29 - 1.83 (%RSD). Therefore, the proposed method could accurately and precisely determine indigo blue content in indigo paste samples. Moreover, this data could be used as a guideline for evaluating the quality and the price of indigo paste.

Keywords: indigo blue, indigo carmine, indigo paste, sulfonation, UV-Visble spectrophotometric method

---

[1] อาจารย์ประจำ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร
[1] Lecturer, Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Sakon Nakhon Rajabhat University 47000
* Corresponding author: Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Sakon Nakhon Rajabhat University, 47000, e-mail; s.sakong@gmail.com

บทนำ

ผ้าย้อมครามเป็นผ้าฝ้ายที่ย้อมด้วยสีครามจากต้นครามเป็นสินค้าอัตลักษณ์ที่สร้างชื่อเสียงให้กับจังหวัดสกลนครอย่างกว้างขวาง สามารถส่งผลิตภัณฑ์ผ้าย้อมครามธรรมชาติออกขายทั้งภายในประเทศ และต่างประเทศ ทำให้ผ้าย้อมครามธรรมชาติของจังหวัดสกลนครมีชื่อเสียงจนได้รับการประเมินจากสภาหัตถศิลป์โลก (World Crafts Council) ให้เป็น "นครหัตถศิลป์โลกเจ้าแห่งครามธรรมชาติ" (World Craft City for Natural Indigo) ผลิตภัณฑ์ครามเป็นสินค้า OTOP ที่สร้างรายได้สูงที่สุดอีกชนิดหนึ่งของจังหวัด ทำให้มีเงินหมุนเวียนในจังหวัดหลายร้อยล้านบาทต่อปี (นิวส์มอนิเตอร์, 2561)

เนื้อครามเป็นวัตถุดิบสำคัญในการเตรียมน้ำย้อมครามเพื่อย้อมผ้า ซึ่งกระบวนการผลิตเนื้อครามจากต้นครามเป็นองค์ความรู้ภูมิปัญญาของแต่ละท้องถิ่น โดยพันธุ์ครามที่นิยมปลูกกันทั่วไปในจังหวัดสกลนครมี 2 พันธุ์ คือ ครามพันธุ์ฝักตรง และ ครามพันธุ์ฝักงอ (อังคณา เทียนกลำ, 2555; จุฑามาส ศรีสำราญ และคณะ, 2558; นฤมล ธนานันต์ และคณะ, 2563) การเก็บเกี่ยวเพื่อทำสีย้อมจะทำในช่วงต้นครามอายุ 3-4 เดือน แล้วนำใบครามสดมาแช่น้ำหรือทำหมักเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (อนุรัตน์ สายทอง, 2543) ซึ่งเอนไซม์บีตากลูโคซิเดส (β-glucosidse) ที่อยู่ในใบครามสดจะสามารถช่วยย่อยสารไกลโคไซด์อินดิแคน (glycoside indican) ในใบครามซึ่งเป็นสารที่ไม่มีสีและไม่ละลายน้ำ (Purnama *et al*., 2017) เมื่อเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) จะทำให้อินดิแคนแตกออกเป็น 2 สาร คือ น้ำตาลกลูโคส และสารอินดอกซิล (indoxyl) ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นสารที่ไม่มีสี ละลายน้ำได้ดี เมื่ออินดอกซิลถูกออกซิไดส์ด้วยออกซิเจนในอากาศเปลี่ยนไปเป็นสีครามหรืออินดิโกบลู (indigo blue) ซึ่งเป็นสารกลุ่มแอนทราควิโนน (anthraquicnone) มีสีน้ำเงินและไม่ละลายน้ำ (Tayade & Adivarekar, 2014)

การตกตะกอนเนื้อครามจะใช้ปูนขาวเป็นวัตถุดิบที่เติมลงในน้ำครามเพื่อให้เกิดการจับตัวของสีคราม แล้วปล่อยให้ตกตะกอน จึงแยกน้ำและตะกอนออกจากกัน ตะกอนของเนื้อครามที่เตรียมได้ด้วยวิธีนี้ เรียกว่า ครามเปียก (indigo paste) และบรรจุใส่ภาชนะขายเพื่อเป็นสีย้อมครามธรรมชาติสำหรับใช้ในการเตรียมน้ำย้อมคราม เพื่อย้อมเส้นใยฝ้ายต่อไป (จุฑามาส ศรีสำราญ และคณะ, 2558) อย่างไรก็ตาม เนื้อครามที่ผลิตในแต่ละชุมชนมีคุณภาพที่แตกต่างกัน ตามกระบวนการผลิต การเก็บรักษาและภูมิปัญญาของแต่ละพื้นที่ชุมชน ดังนั้น คุณภาพของเนื้อครามจึงไม่คงที่ จนเป็นประเด็นระหว่างผู้ขายและผู้ซื้อ เนื่องจากคุณภาพเนื้อครามมีผลโดยตรงต่อการเตรียมน้ำย้อมคราม และการติดสีของผ้าคราม (รัตนพล มงคลรัตนาสิทธิ์, 2560) ดังนั้น การวิเคราะห์อินดิโกบลูที่มีอยู่ในเนื้อครามด้วยวิธีการวิเคราะห์ที่ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ จะช่วยประเมินคุณภาพของเนื้อครามจากผู้ผลิตให้กับผู้ซื้อได้ นอกจากนี้ หากผู้ซื้อทราบปริมาณที่แน่นอนของอินดิโกบลูในเนื้อครามก็สามารถเตรียมน้ำย้อมครามได้อย่างเหมาะสมด้วย

การวิเคราะห์ปริมาณอินดิโกบลูสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การไทเทรตแบบรีดอกซ์ด้วยโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต (potassium hexacyanoferrate, $K_2(FeCN)_6$ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และวิธียูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโต เมตรี ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง (Ann & Kwannan, 1984; Gilbert *et al*., 2000; Valentina *et al*., 2014) โดยจะต้องสกัดอินดิโกบลูในเนื้อครามด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์สามารถละลายอินดิโกบลูได้ ได้แก่ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide) คลอโรฟอร์ม (chloroform) ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) (พัชนีย์ ด้วงนิล, 2554; Nittaya *et al*., 2002; Novotná *et al*., 2003; Valentina *et al*., 2014) ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์เหล่านี้ระเหยได้ง่ายและต้องใช้ปริมาณมากในการสกัดอินดิโกบลูจากเนื้อคราม นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์อินดิโกบลูโดยเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของสารลิวโกอินดิโก (leugo indigo) ซึ่งเป็นสารละลายที่มีสีเหลืองและละลายน้ำได้ (Sunhwa *et al*., 2012) เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัดอินดิโกบลูจากเนื้อครามเป็นสารระเหยง่าย และจะต้องทำการกรองส่วนของตะกอนออกจากสารละลายก่อนทำการวิเคราะห์ ทำให้มีค่าใช้จ่ายและเกิดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์สูง

งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณอินดิโกบลูในเนื้อครามด้วยวิธีการที่ต่างออกไปโดยเปลี่ยนอินดิโกบลูซึ่งไม่สามารถที่ละลายน้ำให้กลายเป็นสารอินดิโกคาร์มีนที่มีสมบัติละลายในน้ำได้ดีกว่า โดยใช้ปฏิกิริยาซัลโฟเนชัน (sulfonation) ให้อินดิโกบลูทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริกเข้มข้น โดยให้ความร้อนในการเกิดปฏิกิริยา (Δ) ก็จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นอินดิโกคาร์มีน ดังแสดงใน Figure 1 (Iqbal *et al*., 2004; Lívia *et al*., 2014) แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์เพื่อคำนวณหาปริมาณอินดิโกบลูในเนื้อครามจากชุมชนในจังหวัดสกลนคร เพื่อเป็นแนวทางในวิเคราะห์คุณภาพเนื้อครามจากแต่ละแหล่งผลิตและประเมินราคาให้เหมาะสมสำหรับการจำหน่ายเพื่อนำไปใช้ผลิตผ้าย้อมครามธรรมชาติต่อไป

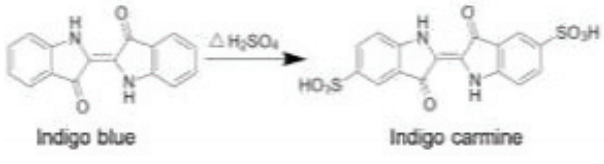

Figure 1 Indigo carmine synthesis with sulfonation

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมีและเครื่องมือวิเคราะห์

1) สารอินดิโกบลู (indigo blue) ชนิด AR grade ยี่ห้อ Acros Organics ประเทศเบลเยียม

2) กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 98.0 % (w/v) (sulfuric acid, H_2SO_4, 98% (w/v)) ชนิด AR grade ยี่ห้อ Caro Erba ประเทศอิตาลี

3) เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer) รุ่น UV-1601 ยี่ห้อ Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

2. วัตถุดิบ

ตัวอย่างเนื้อครามที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้เป็นตัวอย่างเนื้อครามที่เตรียมตามวิธีภูมิปัญญาในท้องถิ่นในจังหวัดสกลนคร ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มผู้ประกอบการผ้าย้อมครามธรรมชาติ จังหวัดสกลนคร จำนวน 34 ตัวอย่าง ซึ่งทำการเก็บเนื้อครามในระหว่างเดือน เมษายน - กันยายน 2564 โดยมีการแบ่งกลุ่มตัวอย่างตามความชำนาญของและประสบการณ์ของผู้ผลิตเนื้อคราม ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างเนื้อครามจากกลุ่มผู้ผลิตที่มีประสบการณ์ในการผลิตเนื้อคราม มีการผลิตเนื้อครามเพื่อจำหนายโดยตรง จำนวน 5 ตัวอย่าง

กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างเนื้อครามจากกลุ่มผู้ผลิตเนื้อครามและมีการผลิตผ้าครามด้วย จำนวน 14 ตัวอย่าง

กลุ่มที่ 3 ตัวอย่างเนื้อครามจากกลุ่มผู้ผลิตเนื้อครามรุ่นใหม่ จำนวน 15 ตัวอย่าง

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ปริมาณอินดิโกบลูในเนื้อคราม

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ปริมาณอินดิโกบลูในวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์อินดิโบลูที่ถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของอินดิโกคาร์มีนด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการเตรียมตัวอย่างเนื้อครามด้วยปฏิกิริยาซัลโฟเนชัน ซึ่งมีกระบวนการดังต่อไปนี้

3.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์อินดิโกบลูด้วยวิธียูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมตรี

เตรียมสารละลายมาตรฐานอินดิคาร์มีน (stock standard solution) ที่ความเข้มข้น 200 mg L^{-1} ด้วยทำปฏิกิริยาซัลโฟเนชันกับกรดซัลฟิวริกเพื่อให้กลายเป็นอินดิโกคาร์มีน (Iqbal *et al*., 2004) โดยชั่งสารมาตรฐานอินดิโกบลู 0.10 g ใส่ในบีกเกอร์ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 98.0% (w/v) ปริมาตร 5 mL และคนให้สารผสมกันเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 mL จากนั้น เตรียมสารละลายมาตรฐานอินดิโกคาร์มีนความเข้มข้นเท่ากับ 0.0, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 mg L^{-1} โดยการเจือจางสารละลายมาตรฐานอินดิโกบลูเข้มข้น 200 mg L^{-1} ซึ่งจะมีการเตรียมโดยปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 และ 12.5 % (w/v) จากนั้น นำสารละลายมาตรฐานอินดิโกคาร์มีนแต่ละความเข้มข้นไปวิเคราะห์ค่าดูดกลืนแสง (absorbance) **ที่**ความยาวคลื่น 610 nm ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ เพื่อวิเคราะห์ผลของความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกที่ต่อการดูดกลืนแสงของอินดิโกคาร์มีน สำหรับเลือกใช้เป็นสารละลายสำหรับเตรียมสารละลายมาตรฐานอินดิโกคาร์มีน (working standard solution) และสารละลายตัวอย่างต่อไป

3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการเตรียมเนื้อครามด้วยปฏิกิริยาซัลโฟเนชัน

งานวิจัยนี้ได้สุ่มเลือกตัวอย่างเนื้อคราม จำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีปริมาณอินดิโกบลู จากตัวอย่างเนื้อครามชุมชนที่เก็บมาทั้งหมด 34 ตัวอย่าง เพื่อเป็นตัวแทนสำหรับการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมตัวอย่างเนื้อคราม ได้แก่ อัตราส่วนเนื้อครามต่อปริมาตรกรดซัลฟิวริก และระยะเวลาการต่อการเตรียมตัวอย่างเนื้อครามก่อนที่จะนำไปประยุกต์ในการเตรียมตัวอย่างอื่นๆ ต่อไป โดยวิเคราะห์คุณสมบัติเบื้องต้นของตัวอย่างเนื้อคราม ได้แก่ ความชื้นและปริมาณของแข็งที่ไม่ระเหยในเนื้อคราม ตามวิธี AOAC (2005) ซึ่งพบว่าตัวอย่างเนื้อครามทั้งหมดมีความชื้น 20.00 - 41.00 % (w/v) และปริมาณของแข็งที่ไม่ระเหยในเนื้อคราม เช่น ปูนขาว และสารอื่นๆ ที่ไม่ระเหยมีปริมาณเท่ากับ 56.00 - 80.00 % (w/v) และได้เลือกตัวอย่างที่มีปริมาณของแข็งที่ไม่ระเหยปริมาณสูงสุด เพื่อใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างเนื้อครามด้วยปฏิกิริยาซัลโฟเนชัน ก่อนจะนำวิธีการที่พัฒนาขึ้นไปใช้ในการประยุกต์ใช้วิเคราะห์ตัวอย่างอื่นต่อไป โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

3.2.1 การศึกษาผลของอัตราส่วนของน้ำหนักเนื้อครามต่อปริมาตรกรดซัลฟิวริก

การศึกษาผลของอัตราส่วนเนื้อครามต่อปริมาตรกรดซัลฟิวริกนั้น ออกแบบการทดลองเป็นแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ซึ่งกำหนด

ทรีตเมนต์ จำนวน 10 ทรีตเมนต์ ได้แก่ T1 = 1:2, T2 = 1:4, T3 = 1:6, T4 = 1:8, T5 = 1:10, T6 = 1:12, T7 = 1:14, T8 = 1:16, T9 = 1:18 และ T10 = 1:20 (g:mL) ทำการทดลองทรีตเมนต์ละ 3 ซ้ำ (n = 3) โดยชั่งตัวอย่างเนื้อคราม 1.00 g ใส่ในบีกเกอร์ จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 98 % (w/v) ใส่ลงในบีกเกอร์ตามอัตราส่วนของน้ำหนักเนื้อครามต่อปริมาตรกรดซัลฟิวริกที่ศึกษาเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 50.00 mL ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 % (w/v) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 610 nm แล้วคำนวณหาปริมาณของอินดิโกบลูในตัวอย่างเนื้อคราม และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณของอินดิโกบลูในตัวอย่างเนื้อครามของแต่ละทรีตเมนต์ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) โดยใช้ Duncan's multiple comparison ที่ $p < 0.01$ ด้วยโปรแกรม SPSS Version 16

3.2.2 การศึกษาระยะเวลาการต่อการเตรียมตัวอย่างเนื้อคราม

ระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาซัลโฟเนชันเป็นปัจจัยที่มีผลการเปลี่ยนอินดิโกบลูในเนื้อครามให้เป็นอินดิโกคาร์มีนอย่างสมบูรณ์ ดังนั้นการทดลองนี้จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบระยะเวลาที่เหมาะในการเตรียมตัวอย่างเนื้อคราม โดยออกแบบการทดลองเป็นแบบสุ่มสมบูรณ์ กำหนดทรีตเมนต์เป็นระยะเวลาแตกต่างกัน จำนวน 9 ทรีตเมนต์ ได้แก่ T1 = 10, T2 = 20, T3 = 30, T4 = 40, T5 = 50, T6 = 60, T7 = 70, T8 = 80 และT9 = 90 นาที ทำการทดลองทรีตเมนต์ละ 3 ซ้ำ (n = 3) โดยชั่งตัวอย่างเนื้อคราม 1.00 g ใส่ในบีกเกอร์ จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกปริมาตร 12 mL ตั้งไว้ให้ครบเวลาของแต่ละกลุ่มทดลอง จากนั้นเทใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50.00 mL และปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5% (w/v) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 610 nm และคำนวณหาปริมาณของอินดิโกบลูในตัวอย่างเนื้อคราม และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณของอินดิโกบลูในตัวอย่างเนื้อครามของแต่ละทรีตเมนต์ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) โดยใช้ Duncan's multiple comparison ที่ $p < 0.01$ ด้วยโปรแกรม SPSS Version 16

จากนั้นประยุกต์สภาวะที่เหมาะสมของวิธีการเตรียมตัวอย่างเนื้อครามและวิธีการวิเคราะห์อินดิโกบลูที่พัฒนาขึ้น เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณอินดิโกบลูในตัวอย่างเนื้อครามจากชุมชนผู้ผลิตเนื้อครามจำนวน 34 ตัวอย่าง

4. การหาความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์

4.1 ช่วงความเป็นเส้นตรงและความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานอินดิโกบลูที่ความเข้มข้น 0.00 - 24.00 mg L^{-1} ปริมาตร 100 mL โดยเจือจางสารละลายมาตรฐานอินดิโกบลู 200 mg L^{-1} ซึ่งเตรียมให้อยู่รูปของอินดิโกคาร์มีน และปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 % (w/v) จากนั้น นำสารละลายมาตรฐานอินดิโกบลูไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 610 nm และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอินดิโกบลู (แกน x) และค่าดูดกลืนแสง (แกน y) เพื่อหาช่วงความเป็นเส้นตรง สมการเส้นตรง และค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient, R^2) ที่ค่า $p > 0.01$ โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel Version 365

4.2 ความไวของการวิเคราะห์

การศึกษาความไวในการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้ ได้ทำตามวิธีของ Miller & Miller, 1988 โดยเตรียมสารละลายแบลงค์ คือ สารละลายกรดซัลฟิวริก 5 % (w/v) จำนวน 10 ขวด (n = 10) นำไปวิเคราะห์ค่าดูดกลืนแสงด้วยวิธียูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมตรีที่ความยาวคลื่น 610 nm แล้วนำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากนั้น คำนวณหาค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด (Limit of detection ; LOD) และขีดจำกัดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of quantitation) โดยใช้สมการที่ (1) และ (2) ตามลำดับ

$$LOD = \frac{(Yblank + 3SD) - C}{m} \quad (1)$$

$$LOQ = \frac{(Yblank + 10SD) - C}{m} \quad (2)$$

เมื่อ

Y_{blank} คือ ค่าดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสารละลายแบลงค์ (n = 10)

SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าดูดกลืนแสงของสารละลายแบลงค์ (n = 10)

C คือ ค่าจุดตัดแกน y ของกราฟมาตรฐานอินดิโกบลู

m คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐานอินดิโกบลู

4.3 ความแม่นยำของการวิเคราะห์

การหาความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์อินดิโกบลูด้วยวิธียูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี ประเมินด้วยวิธีการหาความความสามารถในการทวนซ้ำ (repeatability) ในรูปแบบวิเคราะห์ภายในวันเดียว (intra-day analysis) โดย

เตรียมสารละลายมมาตรฐานอินดิโกบลูที่ความเข้มข้น 10.0 mg L^{-1} จำนวน 10 ซ้ำ และทำการวิเคราะห์หาค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 nm ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ และคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) สำหรับการหาความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ในรูปแบบวิเคราะห์ระหว่างวัน (inter-day analysis) โดยเตรียมและวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานอินดิโกคาร์มีนที่ความเข้มข้น 10.0 mg L^{-1} วันละ 5 ซ้ำ เป็นเวลา 3 วัน และคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

ความแม่นยำของวิธีการเตรียมตัวอย่างเนื้อครามด้วยปฏิกิริยาซัลโฟเนชัน ประเมินด้วยวิธีการหาความสามารถของการทวนซ้ำในรูปแบบวิเคราะห์ภายในวันเดียว ซึ่งเตรียมและวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อครามด้วยสภาวะที่เหมาะสมจำนวน 10 ซ้ำ (n = 10) แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณอินดิโกบลูด้วยวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น และคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ สำหรับการหาความแม่นยำของการทำซ้ำในรูปแบบวิเคราะห์ระหว่างวัน โดยเตรียมและวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อครามด้วยสภาวะที่เหมาะสมวันละ 5 ซ้ำ เป็นเวลา 3 วัน และคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

4.4 การหาค่าร้อยละได้กลับคืน

การหาค่าร้อยละได้กลับคืน (percentage recovery) ของการวิเคราะห์หาปริมาณอินดิโกบลูที่พัฒนาขึ้น แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ การหาค่าร้อยละได้กลับคืนของวิธีการวิเคราะห์อินดิโกบลูด้วยวิธียูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี และวิธีการเตรียมตัวอย่างเนื้อครามด้วยปฏิกิริยาซัลโฟเนชัน

วิธีการหาค่าร้อยละได้กลับคืนของวิธีการวิเคราะห์อินดิโกบลูด้วยวิธียูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี ทำได้โดยแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างเพียงอย่างเดียว (n = 5) โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1.00 mL ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10.00 mL และปรับปริมาตรด้วย กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 % (w/v) สำหรับกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานอินดิโกบลู (n = 5) โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1.00 mL และสารละลายมาตรฐานอินดิโกบลู (200 mg L^{-1}) ปริมาตร 1.00 mL ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10.00 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 % (w/v) นำสารละลายทั้ง 2 กลุ่ม ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 610 nm แล้วคำนวณหาความเข้มข้นอินดิโกบลูในสารละลายตัวอย่างเนื้อครามทั้ง 2 กลุ่มทดลอง เพื่อหาค่าร้อยละได้กลับคืนของการวิเคราะห์

การหาค่าร้อยละได้กลับคืนของวิธีการเตรียมตัวอย่างเนื้อครามด้วยปฏิกิริยาซัลโฟเนชัน ดำเนินการโดยแบ่งกลุ่มทดลองเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อครามเพียงอย่างเดียว โดยชั่งตัวอย่างเนื้อคราม 1.00 g ใส่บีกเกอร์ จำนวน 5 ใบ สำหรับกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่วิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อครามที่มีการเติมสารมารฐานอินดิโกบลูด้วย (n = 5) โดยชั่งเนื้อคราม 1.00 g และ อินดิโกบลู 0.010 g ใส่บีกเกอร์ จำนวน 5 ใบ จากนั้น เติมกรดซัลฟิวริกปริมาตร 12.00 mL ใส่ในบีกเกอร์ขวด และตั้งไว้ 50 นาที จนตัวอย่างเนื้อครามเกิดปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริกอย่างสมบูรณ์ แล้วปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 50.0 mL ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 % (w/v) และเจือจางสารละลาย 20 เท่า ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์**ที่**ความยาวคลื่น 610 nm แล้วคำนวณหาปริมาณอินดิโกบลูในตัวอย่างเนื้อครามทั้ง 2 กลุ่มทดลอง เพื่อคำนวณค่าร้อยละได้กลับคืน

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์อินดิโกบลูด้วยวิธียูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมตรี

เนื่องจากอินดิโกบลูเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำจึงต้องเตรียมให้อยู่ในรูปของอินดิโกคาร์มีน (indigo carmine) ก่อน โดยนำอินดิโกบลูทำปฏิกิริยาซัลโฟเนชัน (sulfonation reaction) กับกรดซัลฟิวริกจะได้สารละลายอินดิโกคาร์มีนที่สามารถละลายในสารละลายที่เป็นกรด (Iqbal *et al*., 2004; Lívia *et al*., 2014) แล้วจึงวิเคราะห์สเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานอินดิโกคาร์มีนด้วยวิธียูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรีที่ค่าความยาวคลื่นที่มีค่าดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) เท่ากับ 610 nm ซึ่งเป็นความยาวคลื่นสูงสุดที่อินดิโกคาร์มีนดูดกลืนได้ (Abdelhadi *et al*., 2010) จากการหาสภาวะที่เหมาะสมวัดค่าดูดกลืนแสงของอินดิโกคาร์มีนที่เตรียมในสารละลายกรดซัลฟิวริกที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกในสารละลายสูงขึ้นจาก 2.5 - 5.0% (w/v) มีผลให้ค่าดูดกลืนแสงของอินดิโกคาร์มีนสูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกตั้งแต่ 5.0 % (w/w) ให้ค่าดูดกลืนแสงมีแนวโน้มคงที่ (Figure 2) ดังนั้น ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกที่เหมาะสมสำหรับใช้เตรียมสารละลายมาตรฐานอินดิโกบลู และสารละลายตัวอย่างเนื้อครามควรมีความเข้มข้นอย่างน้อย 5.0 % (w/v) ซึ่งสอดคล้องกับ VWR international (2020) ที่แนะนำให้เตรียมสารละลายมาตรฐานอินดิโกคาร์มีนด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก เพื่อรักษาสภาพความเป็นกรดของสารละลาย เนื่องจากอินดิ-โกคาร์มีนจะมีความเสถียรและมีสีน้ำเงินอมฟ้าในสภาวะกรด นอกจากนี้ หากค่า pH ของสารละลายเปลี่ยนแปลงก็จะมีผลให้สีของอินดิโกคาร์มีนเปลี่ยนแปลงได้ (Railson *et al*., 2020)

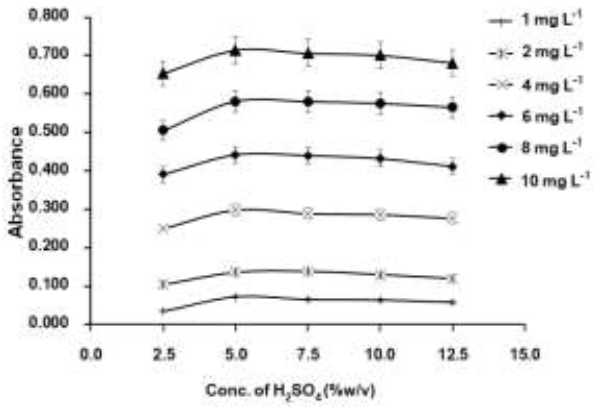

Figure 2 Effect of H_2SO_4 concentrations on the deter-mination of indigo blue by UV-Vis spectrophotometric method

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมตัวอย่างเนื้อคราม

การเตรียมตัวอย่างเนื้อครามด้วยปฏิกิริยาซัลโฟเนชันด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 98% (w/v) เพื่อเปลี่ยนอินดิโกบลูในเนื้อครามให้เป็นอินดิโกคาร์มีนให้สมบูรณ์ จากการศึกษาผลของอัตราส่วนเนื้อครามต่อปริมาตรกรดซัลฟิวริก พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาตรของกรดซัลฟิวริกเพิ่มขึ้นมีผลให้ปริมาณอินดิโกบลูที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างเนื้อครามเพิ่มขึ้น เนื่องจากปริมาตรกรดซัลฟิวริกที่มากพอจะมีผลให้การเกิดปฏิกิริยาซัลโฟเนชันของอินดิโกบลูในเนื้อครามให้เกิดเป็นอินดิโกคาร์มีนได้ดียิ่งขึ้น ดังแสดงใน Figure 3 แต่เมื่ออัตราส่วนของเนื้อครามต่อกรดซัลฟิวริกเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 1:10 ถึง 1:20 (g:mL) พบว่าให้ปริมาณอินดิโกบลูที่วิเคราะห์ได้ในเนื้อครามไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.01$)

นอกจากเนื้อครามจะมีอินดิโกบลูเป็นสารสำคัญแล้ว ยังมีแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) และสารอื่นๆ รวมอยู่ด้วย โดยในขั้นตอนการเตรียมเนื้อครามจะใช้ปูนขาวไปละลายในน้ำคราม ทำให้แคลเซียมออกไซด์ (CaO) ในปูนขาวละลายน้ำได้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($Ca(OH)_2$) เมื่อทำการเติมอากาศให้น้ำครามในถังแช่ใบครามด้วยวิธีการกระทุ้งด้วยไม้ไผ่สาน เพื่อให้อินดิโกไวต์ในน้ำแช่ใบครามสัมผัสกับอากาศแล้วเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนกลายเป็นอินดิโกบลู (อนุรัตน์ สายทอง, 2543) นอกจากนี้ คาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศจะทำปฏิกิริยากับแคลเซียมไฮดรอกไซด์ในน้ำแช่ใบคราม เกิดเป็นแคลเซียมคาร์บอเนต ตกตะกอนร่วมกับอินดิโกบลูได้เป็นเนื้อคราม (Zhang *et al*., 2013; Shan *et al*., 2019) ดังนั้น ในขั้นตอนการเตรียมสารละลายตัวอย่างเนื้อครามด้วยปฏิกิริยาซัลโฟเนชัน เมื่อแคลเซียมคาร์บอเนตในเนื้อครามทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริกจะเกิดฟองแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นพร้อมทั้งคายความร้อนออกมาด้วย จึงต้องใช้ปริมาตรกรดซัลฟิวริก 98% (w/w) ในปริมาตรมากเกินพอเพื่อให้เกิดปฏิกิริยากับอินดิโกบลูได้เป็นอินดิโกคาร์มีนโดยสมบูรณ์ และสามารถทำปฏิกิริยากับแคลเซียมคาร์บอเนต และสารอื่นๆ ในเนื้อครามด้วย ทั้งนี้การเตรียมตัวอย่างเนื้อคราม 0.10 g ควรใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 98% (w/v) ไม่น้อยกว่า 10 mL ซึ่งขึ้นอยู่กับลักษณะของตัวอย่างเนื้อคราม ซึ่งอัตราส่วนที่เหมาะสมของเนื้อครามต่อปริมาตรกรดซัลฟิวริก 98% (w/w) ที่เหมาะสมคือ 1:12 (g:mL)

จากการศึกษาเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง พบว่าสารละลายทั้งสองชนิดให้สเปกตรัมคล้ายกัน และให้ค่าดูดกลืนแสงสูงสุด เท่ากับ 610 nm เช่นเดียวกัน จึงสามารถยืนยันได้ว่า กรดซัลฟิวริกสามารถเกิดปฏิกิริยาซัลโฟเนชันกับเนื้อครามได้ และสารที่ตรวจวัดได้ด้วยวิธียูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี คือ อินดิโกคาร์มีน เช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐานอินดิโกคาร์มีนที่ความเข้มข้น 5 mg L^{-1} (Figure 4) (Abdelhadi *et al*., 2010)

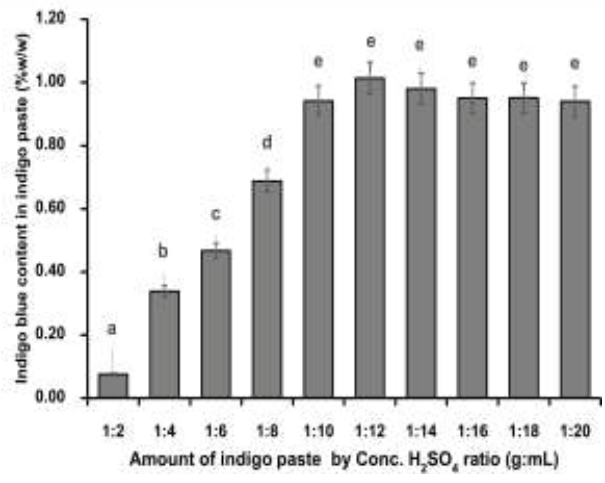

Figure 3 The effect of the amount of indigo paste by Conc. H_2SO_4 ratio for indigo paste sample preparation with sulfonation reaction. Different letters mean statistically significant differences at $p < 0.01$.

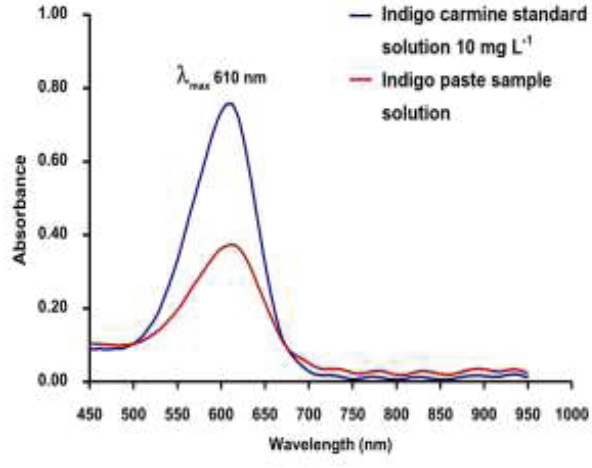

Figure 4 Spectrum of indigo carmine in standard solution and sample solution

จากการศึกษาผลของระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเนื้อครามกับกรดซัลฟิวริก พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาจาก 10 - 30 นาที มีผลให้ปริมาณอินดิโกบลูที่ตรวจพบในเนื้อครามมีปริมาณสูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาจาก 30 - 90 นาที ปริมาณอินดิโกบลูที่ตรวจพบในเนื้อครามไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p > 0.01) (Figure 5) ดังนั้น ระยะเวลาของการเกิดปฏิกิริยาจึงมีผลต่อการเปลี่ยนอินดิโกบลูให้เป็นอินดิโกคาร์มีนอย่างสมบูรณ์ (Lívia *et al*., 2014) อย่างไรก็ตาม การใช้ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 30 นาที ขึ้นไปจะทำให้สารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้มีลักษณะใสไม่มีตะกอน เนื่องจากกรดซัลฟูริกจะทำปฏิกิริยาย่อยสลายแคลเซียมคาร์บอเนตและสารอื่นๆ ในเนื้อครามจนหมด ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมของการเตรียมตัวอย่างเนื้อครามด้วยกรดซัลฟิวริก คือ 30 นาที

3. ความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์อินดิโกบลูที่พัฒนาขึ้น

เมื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์อินดิโกบลูด้วยวิธียูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรีที่พัฒนาขึ้นแล้ว จากนั้นทำการหาความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ซึ่งแสดงผลใน Table 1 พบว่าวิธีนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ที่ 0.25 - 17.50 mg L^{-1} และให้สเปกตรัมและค่าดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 610 nm (Figure 6) และเมื่อนำช่วงความเป็นเส้นตรงดังกล่าวมาสร้างกราฟมาตรฐานอินดิโกบลู ให้สมการเส้นตรง คือ y = 0.054x + 0.0131 และค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (R^2) คือ 0.9991 (p > 0.01) นอกจากนี้วิธีการนี้ให้ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (molar absorptivity) เท่ากับ 26100 L mol^{-1} cm^{-1} ดังนั้น วิธีการวิเคราะห์อินดิโกบลูที่พัฒนาขึ้นจึงให้สมการเส้นตรงที่มีความน่าเชื่อถือสำหรับคำนวณหาปริมาณอินดิโกบลูในตัวอย่างเนื้อครามได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สำหรับผลการศึกษาความไวของการวิเคราะห์ (sensitivity) วิธีการวิเคราะห์อินดิโกบลูด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรีที่พัฒนาขึ้นให้ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด ขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณ เท่ากับ 0.051 และ 0.27 mg L^{-1} ตามลำดับ วิธีการนี้ให้ความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำภายในวันเดียว และความแม่นยำของการทำซ้ำระหว่างวันเท่ากับ 0.29 และ 0.51 (%RSD) ตามลำดับ นอกจากนี้ วิธีการเตรียมตัวอย่างเนื้อครามด้วยปฏิกิริยาซัลโฟเนชันที่พัฒนาขึ้น ให้ความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำภายในวันเดียว และความแม่นยำของการทำซ้ำระหว่างวันเท่ากับ 1.83 และ 1.01 (%RSD) ตาม ลำดับ ดังนั้น วิธีการวิเคราะห์อินดิโกบลูด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรีและวิธีการเตรียมตัวอย่างเนื้อครามด้วยปฏิกิริยาซัลโฟเนชันที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธีที่ให้ความแม่นยำของการวิเคราะห์สูง

ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องในรูปแบบค่าร้อยละได้กลับคืนของวิธีการวิเคราะห์อินดิโกบลูด้วยวิธียูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี และวิธีการเตรียมตัวอย่างเนื้อครามด้วยปฏิกิริยาซัลโฟเนชันให้ค่าร้อยละได้กลับคืน เท่ากับ 95.86 ± 1.02 และ 101.48 ± 5.55 ตามลำดับ ดังนั้น สารอินดิโกบลูในเนื้อครามสามารถเกิดปฏิกิริยากับ กรดซัลฟิวริกกลายเป็นอินดิโกคาร์มีนได้สมบูรณ์ และไม่เกิดการสลายตัวในระหว่างขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเนื้อครามและการวิเคราะห์ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์อินดิโกบลูที่พัฒนาขึ้นจึงสามารถวิเคราะห์อินดิโกบลูในเนื้อครามได้อย่างถูกต้องแม่นยำ

4. ผลการวิเคราะห์อินดิโกบลูในเนื้อครามจากแหล่งผลิตจังหวัดสกลนคร

จากการวิเคราะห์หาปริมาณอินดิโกบลูในตัวอย่างเนื้อครามที่เก็บจากชุมชน จำนวน 34 ตัวอย่าง ด้วยด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น พบว่าปริมาณอินดิโกบลูในตัวอย่างเนื้อครามอยู่ในช่วง 0.09 - 2.23 % (w/w) (Figure 7) ทั้งนี้ ปริมาณอินดิโกบลูที่ตรวจพบในเนื้อครามแต่ละแหล่งผลิตนั้น มีปริมาณอินดิโกบลูในตัวอย่างเนื้อครามที่แตกต่างกัน อาจเป็นผลมาจากตัววัตถุดิบคือต้นคราม และมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ดินที่ปลูก ปริมาณน้ำ ชนิดและปริมาณของปุ๋ย อายุเก็บเกี่ยวของต้นคราม ช่วงเวลาของวันในการเก็บเกี่ยว (อังคณา เทียนกล่ำ, 2555; นัฐวุธ บุตรดี และ สุรกิจ พันธ์รัก, 2562) ซึ่งศักยภาพในการทำงานของเอนไซม์ในใบครามอาจลดลงเมื่อใบครามเหี่ยวจากการเก็บเกี่ยวต้นครามในปริมาณมาก นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการเตรียมเนื้อครามของแต่ละชุมชนด้วย (อนุรัตน์ สายทอง, 2543; Purnama *et al*., 2017)

จากผลการวิเคราะห์อินดิโกบลูในตัวอย่างเนื้อครามในจังหวัดสกลนครจำนวน 34 ตัวอย่าง สามารถจำแนกตามระดับของอินดิโกบลูได้เป็น 3 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มที่มีระดับอินดิโกบลูมาก (ปริมาณอินดิโกบลูในเนื้อคราม 2.00 % (w/w) คิดเป็นร้อยละ 14.70 ของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 2) กลุ่มที่มีระดับอินดิโกบลูปานกลาง (ปริมาณอินดิโกบลูในเนื้อคราม 1.00 - 1.99% (w/w)) คิดเป็นร้อยละ 41.18 ของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด และ 3) กลุ่มที่มีระดับอินดิโกบลูน้อย (ปริมาณอินดิโกบลูในเนื้อคราม < 1.00 % (w/w)) คิดเป็นร้อยละ 44.12 ของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด ดังแสดงใน Table 2 ซึ่งตัวอย่างเนื้อครามที่วิเคราะห์นี้ส่วนใหญ่มีระดับอินดิโกลบลูน้อยกว่า 2% (w/w) โดยพบว่าตัวอย่างเนื้อครามที่มีระดับอินดิโกบลู มากกว่า 2% (w/w) เป็นกลุ่มผู้ผลิตที่มีแม่ครูครามเป็นที่ปรึกษาซึ่งสามารถถ่ายทอดความเชี่ยวชาญให้กับคนรุ่นใหม่ และกลุ่มที่มีปริมาณอินดิโกบลูน้อยเป็นกลุ่มที่มีประสบการณ์ในการผลิตเนื้อครามน้อยกว่า 5 ปี

ผลการวิเคราะห์นี้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงกระบวนการผลิตเนื้อคราม รวมทั้งการใช้เป็นแนวทางในกำหนดเกณฑ์มาตรฐานของผลิตภัณฑ์เนื้อครามที่ผลิตในจังหวัดสกลนคร ซึ่งปัจจุบันการซื้อขายเนื้อครามนั้นกำหนดในหน่วยของน้ำหนักต่อราคา (งานส่งเสริมอุตสาหกรรมครัวเรือน ศูนย์ศึกษาการพัฒนาภูพานอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดสกลนคร, 2555) โดยราคาของเนื้อครามจะอยู่ที่ประมาณกิโลกรัมละ 100 - 150 บาท ซึ่งยังไม่มีการใช้ค่าปริมาณอินดิโกบลูในเนื้อครามเป็นตัวกำหนดคุณภาพและราคาของเนื้อครามด้วย เนื่องจากอินดิโกในเนื้อครามเป็นสารสำคัญที่ทำให้ใช้ในการย้อมผ้า หากเนื้อครามมีปริมาณอินดิโกบลูสูงก็จะส่งผลต่อคุณภาพการย้อม และต้นทุนของการผลิตผ้าครามด้วยเช่นกัน ดังนั้น จึงควรมีการกำหนดมาตรฐานคุณภาพและราคาของเนื้อครามร่วมกันของผู้ผลิตผ้าคราม โดยมีการใช้ผลการวิเคราะห์อินดิโกในเนื้อครามเป็นเกณฑ์พิจารณาด้วย

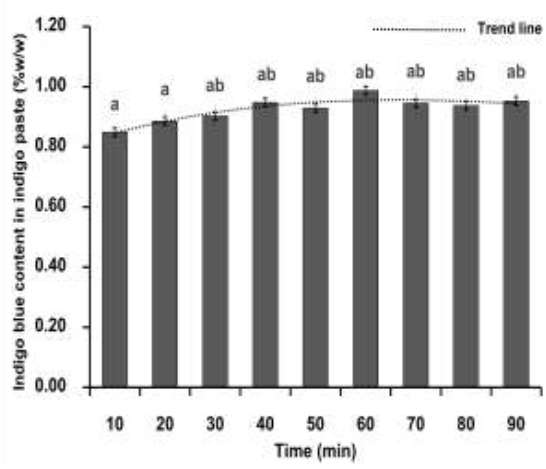

Figure 5 The effect reaction time on indigo paste sample preparation with sulfonate reaction. Different letters mean statistically significant differences at $p < 0.01$.

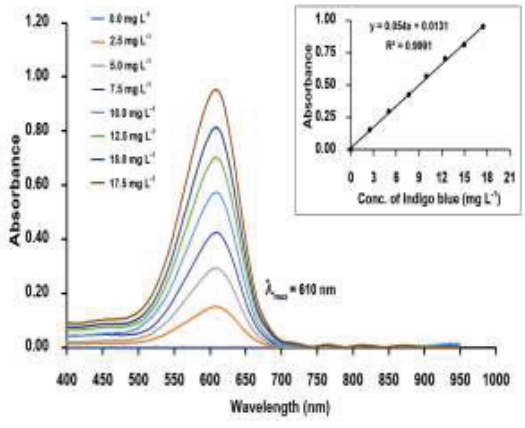

Figure 6 UV-Visible spectrum of indigo blue standard solution and calibration curve of the indigo blue standard solution.

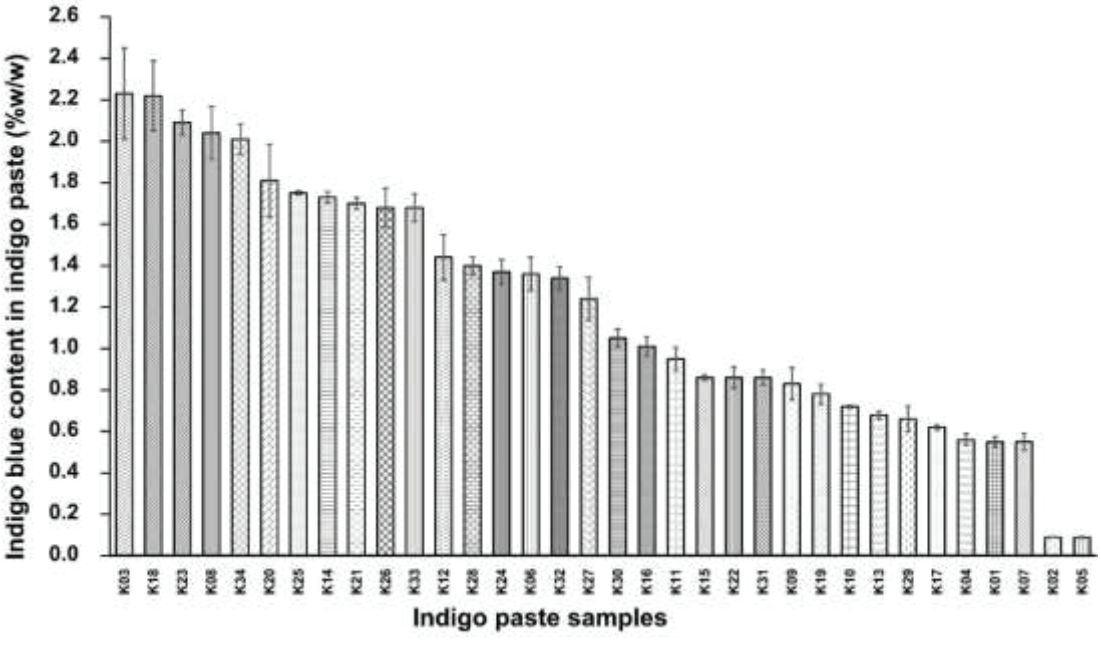

Figure 7 Indigo blue content in indigo paste collected from Sakon Nakhon Province

Table 2 Validation of indigo blue determination by UV-Vis spectrophotometric method

Method characteristics	Value
1. linear range (mg L^{-1})	0.25 - 17.50
2. Linear equation	y = 0.054x + 0.013
- Slope	0.054 ± 0.0050
- Intercept	0.013 ± 0.0011
3. Regression coefficient (R^2, $p > 0.01$)	0.9991
4. Molar absorptivity (L mol^{-1} cm^{-1})	26100
5. Sensitivity	
- Limit of detection (mg L^{-1})	0.051
- Limit of quantitation (mg L^{-1})	0.27
6. Precision (%RSD)	
6.1 Indigo blue determination with UV-Vis spectrophotometric method	
- Intra-day	0.29
- Inter-day	0.51
6.2 Indigo paste preparation with sulfonation	
- Intra-day	1.83
- Inter-day	1.01
7. Recovery (%)	
- Indigo blue determination with the UV-Vis spectrophotometric method	95.86 ± 1.02
- Indigo paste preparation with the sulfonation method	101.48 ± 5.55

Table 2 Indigo blue content in indigo paste collected from Sakon Nakhon Province

Classification group	Range of IB content in IP samples (% (w/w))	Number of samples (N)	Percentage (%)
High IB level content in IP	≥ 2.00	5	14.70
Middle IB level content in IP	1.0 - 1.99	14	41.18
Low IB level content in IP	< 1.00	15	44.12
Total	-	34	100.00

** IB = indigo blue, IP = Indigo paste

สรุปผลการวิจัย

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณอินดิโกบลูในเนื้อครามด้วยวิธียูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรีที่พัฒนาขึ้น เป็นวิธีที่มีการเปลี่ยนอินดิโกบลูให้อยู่ในรูปของอินดิโกคาร์มีนด้วยปฏิกิริยาซัลโฟเนชันกับกรดซัลฟิวริก สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณอินดิโกบลูในเนื้อครามได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ และเป็นวิธีที่สามารถประยุกต์ใช้วิเคราะห์หาปริมาณอินดิโกบลูในตัวอย่างเนื้อครามได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อครามจำนวน 34 ตัวอย่าง ที่เก็บจากชุมชนในจังหวัดสกลนคร พบปริมาณอินดิโกบลูในเนื้อครามอยู่ในช่วง 0.09 - 2.23 % (w/w) โดยสามารถจำแนกระดับคุณภาพของเนื้อครามตามปริมาณของอินดิโกบลูในเนื้อครามได้ 3 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มที่มีระดับอินดิโกบลูมาก (ปริมาณอินดิโกบลูในเนื้อคราม ≥ 2.00 % (w/w) 2) กลุ่มที่มีระดับอินดิโกบลูปานกลาง (ปริมาณอินดิโกบลูในเนื้อคราม 1.00 - 1.99 % (w/w)) และ 3) กลุ่มที่มีระดับอินดิโกบลูน้อย (ปริมาณอินดิโกบลูในเนื้อคราม < 1.00 % (w/w) ซึ่งข้อมูลนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการประเมินคุณภาพและราคาของเนื้อครามของชุมชนได้อย่างเหมาะสมยิ่งขึ้น และผู้ผลิตสามารถพัฒนากรรมวิธีผลิตเนื้อครามของชุมชนให้มีปริมาณอินดิโกสูงขึ้นด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกลุ่มผู้ผลิตเนื้อครามและผลิตผ้าคราม ในจังหวัดสกลนคร ที่สนับสนุนตัวอย่างเนื้อครามและให้ข้อมูลการผลิตเนื้อครามสำหรับทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

จุฑามาส ศรีสำราญ. (2558). *โครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตครามพื้นที่จังหวัดสกลนคร*. กรมวิชาการเกษตร.

งานส่งเสริมอุตสาหกรรมครัวเรือน ศูนย์ศึกษาการพัฒนาภูพานอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดสกลนคร. (2555). *คู่มือการผลิตผ้าย้อมคราม* (พิมพ์ครั้งที่ 2). มูฟเม้น เจนทรี.

นฤมล ธนานันต์, ศุภรัตน์ บัวบาน, ธีระชัย ธนานันต์. (2563). การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชครามสกุล *Indigofera* โดยใช้เทคนิค สก๊อต. *Thai Journal of Science and Techno-logy*, *2*, 333-341.

นัฐวุธ บุตรดี และ สุรกิจ พันธ์รัก. (2562). *ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณอินดิโกบลูในต้นคราม* [ปริญญานิพนธ์ วิทยาศาสตรบัณฑิต, มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร].

นิวส์มอนิเตอร์. (2561). *สภาหัตถศิลป์โลกรับรองสกลนครเป็น "World Craft City for Natural Indigo"*. มติชนออนไลน์.

พัชนีย์ ด้วงนิล. (2554). *การพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการหาปริมาณอินดิโกในครามหมัก*.

รัตนพล มงคลรัตนาสิทธิ์, จรูญ คล้ายจ้อย, วาสนา ช้างม่วง, นงนุช ศศิธร และ เกษม มานะรุ่งวิทย์. (2560). *คู่มือองค์ความรู้ การย้อมครามธรรมชาติแบบใหม่บนเส้นด้ายไหมและฝ้ายเชิงพานิชย์. สำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ*. ก-ฮ.

อนุรัตน์ สายทอง. (2543). *การผลิตสีครามจากต้นคราม*. ศูนย์ครามสกลนคร ราชภัฏสกลนคร.

อังคณา เทียนกลำ. (2555). การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ การเพิ่มผลผลิตใบ ปริมาณสี และครามผง (*Indigofera tentoria* Linn.). *แก่นเกษตร*, (40), 44-52.

Abdelhadi, B., Mohand, S.O., Louis-Charles De M. (2010). Photocatalytic Decolourization of Indigo Carmine on 1,10-phenanthrolinium Intercalated Bentonite under UV-B and Solar Irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 212*, 101-106.

Ann, C. & Kwan-nan, Y. (1984). Blue dye identification on cellulosic fibers: indigo, logwood, and Prussian blue. *Journal of the American Institute for Conservation, 24*, 33-39.

AOAC. (2005). *Official methods of analysis* (18th eds). Association of Official Analytical Chemists; Arlington.

Gilbert, K.G., Hill, D.J., Crespo, C., Mas, A., Lewis, M., Rudolph, B. & Cooke, D.T. (2000). Qualitative analysis of indigo precursors from Woad by HPLC and HPLC-MS. *Phytochemical analysis, 11*, 18-20.

Iqbal, T.S., Babur, Z.C., Martin, J.S. and Robert, W. (2004). Analysis of the conversion of indigo into Indigo carmine dye using SERRS. *Chemical Communications*, 1436-1437.

Lívia, F.Z., Ivanise, G., Maria, E.V.S., Patricia, A.M. (2014). Freitas. adsorption of 5.5'-disulfonicindigotin (5.5'-DI) onto green coconut fiber (*Cocosnucifera L.*): Kinetic and isotherms. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences, 4*, 37-52.

Nittaya, C., Sorasak L. & Suree, P. (2002). Pigment Extraction techniques from the leaves of *Indigofera tinctoria Linn.* and *baphicacanthus cusia brem*. and chemical structure analysis of their major components. *Chiangmai University Journal, 1* (2), 149-160.

Novotná, P., Boon, J.J., Van der H.J. and Pacáková V. (2003). Photoegradation of indigo in dichlo-romethane solution. *Coloration Technology, 119* (3), 121-186.

Purnama, H., Hidayati, N., Safitri D. & Rahmawati S. (2017). Effect of initial treatment in the preparation of natural indigo dye from *indigofera tinctorial*. *Proceedings of the 3rd International Conference on Engineering, Technology, and Industrial Application (ICETIA 2016).*

Railson, O.R., Maria, V.C.A., Wilton, S.L., José, T.S., Valderi, D.L. (2020). Degradation of indigo carmine by photo-Fenton, Fenton, H_2O_2/UV-C and direct UV-C: Comparison of pathways, products and kinetics. *Journal of Water Process Engineering, 37*, 101535.

Shan, L., Anthony, B.C., Ruyan, F. & Yuhua, W. (2019). Identity blues: The ethnobotany of the indigo dyeing by Landian Yao (Iu Mien) in Yunnan, Southwest China. *Journal of Ethno- biology and Ethnomedicine, 15*, 1-14.

Sunhwa, P., Ji-Young, R., Jiyoung, S., Hor-Gil, H. (2012). Isolation and characterization of alkaliphilic and thermotolerant bacteria that reduce insoluble indigo to soluble Leuco-indigo from indigo dye vat. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 55*, 83-88.

Tayade, P. & Adivarekar, R. (2014). Extraction of indigo dye from *Couroupita guianensis* and its application on cotton fabric. *Tayade and Adivarekar Fashion and Textiles, 1*, 1-16.

Valentina, B., Martí, C.& Carmen, G-B. (2014). A critical comparison of methods for the analysis of indigo in dyeing liquors and effluents. *Materials, 7*, 6184-6193.

VWR International. (2020). *Indigo carmine solution R1*.

Zhang, D., Lin X., Chen X., Liu J. (2013). Influence of orchard-intercropping mode on plant height and branch growth of *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek. *Journal of Guangzhou University of Traditional, 1* (30), 83-7.