

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการหาปริมาณอินดิโกใน ครามหมัก
ผู้เขียน	นางสาวพัชนีย์ ด้วงนิล
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมีอุตสาหกรรม)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. อนันต์เสวก เห่วซึ่งเจริญ

### บทคัดย่อ

ในการพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการหาปริมาณอินดิโกในครามหมักนี้ ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี 3 วิธี และการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวิร์สเฟส 3 วิธี โดยใช้อินดิโกสังเคราะห์เป็นสารมาตรฐาน และใช้ผลการหาร้อยละกลับคืนในการประเมินประสิทธิภาพของวิธีการ การหาปริมาณด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรีใช้คลอโรฟอร์มและกรดซัลฟูริกเป็นตัวทำละลายและรีดิวซ์อินดิโกด้วยโซเดียมไดไทโอไนท์ก่อนทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง ส่วนการหาปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงนั้น ใช้เฟสเคลื่อนที่ 2 แบบ คือ แบบแรกเป็นเมทานอลกับน้ำที่อัตราส่วนคงที่โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายสกัด แบบที่สองเป็นน้ำที่มีกรดไตรฟลูออโรอะซิติก 0.005% กับอะซิโตไนไตรล์ที่มีกรดไตรฟลูออโรอะซิติก 0.005% ที่อัตราส่วนไม่คงที่โดยใช้เมทานอลและอะซิโตไนไตรล์เป็นตัวทำละลายสกัดอินดิโก และได้ทำการหาปริมาณอินดิโกในครามหมัก ทั้งจากแหล่งต่างๆ และจากแหล่งเดียวกันแต่ต่างเวลากันรวม 10 ตัวอย่างๆ ละ 3 ซ้ำต่อวิธี โดยใช้ทุกวิธีการข้างต้น

ผลการศึกษาด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรีพบว่าสารละลายอินดิโกในตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม กรดซัลฟูริก และที่รีดิวซ์ด้วยโซเดียมไดไทโอไนท์ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 603, 612 และ 399 นาโนเมตร มีค่าโมลาร์แอฟซอพติวิตีเท่ากับ 20,150, 19,712 และ 22,725  $\text{cm}^{-1}$  โมลาร์<sup>-1</sup> ตามลำดับ ผลการหาร้อยละกลับคืนจากการทดลอง 10 ซ้ำในแต่ละวิธี พบว่าทั้ง 3 วิธีให้ผลใกล้เคียง

กัน โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $97.5 \pm 3.4$ ,  $98.6 \pm 2.2$  และ  $99.3 \pm 4.8$  ตามลำดับ ความแม่นยำของการวิเคราะห์ขึ้นอยู่กับข้อจำกัดที่อินดิโกมีการละลายต่ำ ผลการหาปริมาณอินดิโกในครามหมักตัวอย่าง พบว่ามีปริมาณอินดิโกแตกต่างกันค่อนข้างมาก แต่ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีการทั้ง 3 นี้ใกล้เคียงกัน ผลการทดลองสรุปได้ว่าการใช้กรดซัลฟูริกเป็นตัวทำละลายเป็นวิธีการเหมาะสมที่สุด เนื่องจากรวดเร็ว ไม่ยุ่งยากซับซ้อน และต้นทุนการวิเคราะห์ต่ำ

ในการศึกษาด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวิร์สเฟสนั้น ได้ทำการตรวจวัดสัญญาณที่ 286 และ 284 นาโนเมตร สำหรับการใส่เฟสเคลื่อนที่แบบแรกและแบบที่สองตามลำดับ การห่าร้อยละกลับคืนจากการทดลอง 6 ชั่วโมงแต่ละวิธี พบว่าทั้ง 3 วิธีให้ผลใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $99.2 \pm 0.4$ ,  $99.7 \pm 0.4$  และ  $99.9 \pm 0.5$  ตามลำดับ ความแม่นยำของการวิเคราะห์ขึ้นอยู่กับข้อจำกัดของการละลายของอินดิโกเช่นเดียวกัน ผลการหาปริมาณอินดิโกในครามหมักพบว่าทั้ง 3 วิธีให้ผลใกล้เคียงกันเช่นเดียวกันกับวิธีการสเปกโทรโฟโตเมตรี ผลการทดลองสรุปได้ว่าการใส่เฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอลกับน้ำอัตราส่วน 95:5 อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตร/นาที เป็นวิธีการเหมาะสมที่สุด เนื่องจากการเตรียมและการควบคุมง่ายกว่า ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยที่สุด

ครามหมักตัวอย่างจากแหล่งและการผลิตที่แตกต่างกัน มีร้อยละของของแข็งต่างกันค่อนข้างมาก ระหว่าง 25 ถึง 53% และพบว่ามีปริมาณอินดิโกค่อนข้างน้อย ผลการวิเคราะห์อินดิโกในครามหมักโดยใช้วิธีการที่เหมาะสมทั้ง 2 เทคนิค พบว่าตัวอย่างครามหมักแรกมีอินดิโกระหว่าง 0.6 ถึง 1.8% โดยน้ำหนัก ทั้งนี้เทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรีให้ผลการวิเคราะห์สูงกว่าเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

<b>Thesis Title</b>	Development of Appropriate Method for Determination of Indigo Content in Fermented Indigo
<b>Author</b>	Miss Patchanee Duangnin
<b>Degree</b>	Master of Science (Industrial Chemistry)
<b>Thesis Advisor</b>	Assoc. Prof. Dr. Anunsawake Haewsungcharern

### ABSTRACT

To develop an appropriate method for determination of indigo content in fermented indigo, a comparative study of three different spectrophotometric methods and three different reverse-phase high performance liquid chromatography methods was performed by using synthetic indigo as standard. A percentage recovery test run was employed to evaluate the efficiency of the methods. The spectrophotometric methods studied were performed by using chloroform and sulfuric acid as solvents and indigo reduction with sodium dithionite prior to light absorption measurement. In the reverse-phase high performance liquid chromatographic methods, two different types of mobile phase systems were tested. The first one was that of isocratic elution with methanol:water (95:5) with chloroform as indigo extracting solvent while the other was that of gradient elution with water containing 0.005 % of trifluoroacetic acid and acetonitrile with 0.005 % of trifluoroacetic acid with methanol and acetonitrile as indigo extracting solvents. All of these methods were tested with 10 local fermented indigo samples from different sources or methods of production.

The results of the spectrophotometric test runs revealed that indigo in chloroform and sulfuric acid, reduced with sodium dithionite, had maximum visible light absorption at 603, 612

and 399 nm with a molar absorptivity of 20,150, 19,712 and 22,725  $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$  respectively. All three methods gave comparable results of the percentage recovery of indigo test runs. The average values, from 10 test runs in each method, were  $97.5 \pm 3.4$ ,  $98.6 \pm 2.2$  and  $99.3 \pm 4.8$  respectively. The precision of the method was limited by the low solubility of indigo. It was found that the indigo content in fermented indigo samples significantly differed but all methods gave comparable results. It was concluded that the appropriate spectrophotometric method for quantitation of indigo is the use of sulfuric acid as extracting solvent due to ease of operation and cost effectiveness.

In reverse-phase high performance liquid chromatographic test runs, signals at 286 and 284 nm were employed for the first and second mobile phase systems respectively. All HPLC methods studied also gave comparable results. The average percentage recoveries of indigo from 6 replica were  $99.2 \pm 0.4$ ,  $99.7 \pm 0.4$  and  $99.9 \pm 0.5$  for those with chloroform, methanol and acetonitrile as extracting solvents respectively and the precision of the methods was limited by the low solubility of indigo. As in the spectrophotometric method, the indigo content in fermented indigo analyzed by these 3 methods was comparable. The reverse-phase HPLC method based on isocratic elution with methanol:water (95:5) and the flow rate of 0.5 ml/min is the appropriate method of choice due to ease of operation and cost effectiveness.

The total solid content of local fermented indigo samples from different sources or methods of production was quite different and ranged from 25 to 53% and it was found that the indigo content was quite low. Indigo content of fermented indigo in as-received samples, determined by the 2 optimal methods, ranged from 0.6 to 1.8 % by weight. The spectrophotometric method gave slightly higher result than that obtained from the HPLC method.