

การประยุกต์ใช้สีย้อมธรรมชาติจากสารสกัดแก่นฝาง (*Biancaea sappan* (L.) Tod.)
สำหรับย้อมสีโครโมโซม

Application of a Natural Dye Extracted from Heartwood of Sappan Tree
(*Biancaea sappan* (L.) Tod.) for Chromosome Staining

ลัดดาวัลย์ กองพลี

Laddawan Kongplee

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ปทุมธานี

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage, Pathum Thani

Corresponding author, e-mail: Laddawan.kong@vru.ac.th

(Received: Jun 23, 2022; Revised: Sep 13, 2022; Accepted: Sep 16, 2022)

บทคัดย่อ

วิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดสีย้อมธรรมชาติจากแก่นฝางสำหรับย้อมสีโครโมโซมเพื่อใช้ทดแทนสีย้อมสังเคราะห์อะซิโตคาร์มีนที่มีจำหน่ายในราคาสูง โดยนำแก่นฝางมาบดละเอียดและสกัดด้วยวิธีการแช่ในตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ น้ำกลั่น เมทานอลเข้มข้น 95% เมทานอลเข้มข้น 70% เอทานอลเข้มข้น 95% และเอทานอลเข้มข้น 70% ในอัตราส่วนผงแก่นฝาง 1 กรัม ต่อตัวทำละลาย 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และแยกกลุ่มเดิมสารช่วยให้ติดสี 2 ชนิดคือโซเดียมคลอไรด์และคอปเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้สีย้อม 15 สีชุดทดสอบ ศึกษาคุณภาพทางกายภาพ ทางเคมี การติดสีย้อมของโครโมโซมและการเก็บรักษา พบว่าสีย้อมแก่นฝางสกัดด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาณผลผลิตสารสกัดมากที่สุดเท่ากับ $62.80 \pm 0.37\%$ สีย้อมทั้งหมดมีความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 3.30-5.95 การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดในช่วง 454-520 นาโนเมตร วัดค่าสีใช้ระบบสี CIE วัดค่า $L^* a^* b^*$ และเทียบสีโดยใช้ระบบสีมินเซลให้สีเฉดเหลืองแดงถึงแดง การติดสีย้อมของโครโมโซมพบว่าสีย้อมแก่นฝางที่สกัดด้วยเมทานอลเข้มข้น 70% เดิมคอปเปอร์ซัลเฟต มีคุณภาพการติดสีย้อมของโครโมโซมที่ดีที่สุดเนื่องจากสามารถมองเห็นระยะการแบ่งตัวของเซลล์และขอบเขตเซลล์ในระยะเมทาเฟสได้อย่างชัดเจนเทียบเท่ากับสีย้อมอะซิโตคาร์มีนและสามารถคงคุณภาพของสีย้อมโดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส ได้อย่างน้อย 4 สัปดาห์

คำสำคัญ : แก่นฝาง สีย้อมโครโมโซม อะซิโตคาร์มีน แอนโทไซยานิน

Abstract

The aim of this research was to extract natural dyes from the heartwood of the Sappan tree (*Biancaea sappan* (L.) Tod.) used for chromosome staining to replace acetocarmine synthetic dyes is available at a high price. The processing is by bringing Sappan tree for grinding, then extracted by maceration method into 5 types of solvents, which are distillation water, 95% methanol, 70% methanol, 95% ethanol and 70% ethanol. The ratio of 1:20 g/ml for 24 hours at room temperature. Then filter to extract natural dyes with No. 1 filter paper and then separated into groups to add 2 types of mordant, which are Sodium chloride and Copper sulfate at a concentration of 10% by weight per volume with a total of 15 dyes for example. From the result, highest of yield (% yield) was Sappan tree extracted with distillation water ($62.80 \pm 0.37\%$). Chemical and physical properties were studied, it was found that all 15 dyes that were tested had acid-base status in the range of 3.30-5.95, the maximum absorption spectrum is in the range 454-520 nm. The appearance of color was measured using CIE color system to measure $L^* a^* b^*$ and color comparisons using the Muncel color system provided shades of yellow-red to red. The study on chromosome staining showed that the Sappan tree extracted 70% methanol and had Copper sulfate

mordant. It has the best quality in chromosome staining, obviously suitable for cell division and the cell region in the metaphase is clearly visible and is the same as Acetocarmine dye. The dye quality can be maintained at 4 ± 1 °C for at least 4 weeks.

Keywords: Sappan tree, Chromosome staining dye, Acetocarmine, Anthocyanin

บทนำ

โครโมโซม (Chromosome) คือ โครงสร้างทางพันธุกรรมมีรูปร่างคล้ายเส้นด้าย เป็นที่อยู่ของยีน ทำหน้าที่เก็บรักษา ถ่ายทอดและแสดงออกของลักษณะทางพันธุกรรม (Hoefnagels, 2022) โครโมโซมเป็นสิ่งที่ใช้จำแนกสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ แบ่งสิ่งมีชีวิตออกเป็นสิ่งมีชีวิตชั้นสูงและสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ โดยศึกษาจากโครงสร้าง หน้าที่ ข้อมูลทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอ (DNA) จำนวนและลักษณะของโครโมโซม เป็นต้น (Tanomtong *et al.*, 2019) การศึกษาเรื่องโครโมโซมในทางชีววิทยาจะศึกษาระยะการแบ่งเซลล์ โดยมีการเรียนการสอนทั้งภาคทฤษฎีและภาคปฏิบัติเพื่อให้ผู้เรียนได้รับความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับพฤติกรรมขององค์ประกอบภายในเซลล์ที่เกิดขึ้นในแต่ละระยะ ทั้งนี้การศึกษาดังกล่าวมีวิธีการศึกษาในเบื้องต้นคือการใช้ปลายรากหอมเพื่อศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสแต่เนื่องจากโครงสร้างเซลล์มีลักษณะใสทำให้มองเห็นลักษณะเซลล์ไม่ชัดเจนจึงต้องมีการย้อมสีของเซลล์ ดังนั้นเทคนิคการย้อมสีจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญในทางชีววิทยาปัจจุบันนิยมใช้สีย้อมสังเคราะห์ เช่น สีย้อมอะซิโตคาร์มิน (Acetocarmine) สีย้อมออร์ซีน (Orcein) ซึ่งมีราคาแพงและการซื้อแต่ละครั้งต้องซื้อเต็มจำนวนบรรจุภัณฑ์ไม่แบ่งขาย (Thongsrisuk *et al.*, 2019) นอกจากนี้ยังพบรายงานความเป็นพิษจากสีย้อมอะซิโตคาร์มินต่อร่างกายที่ทำให้เกิดการแพ้ของผิวหนังจากการสัมผัสสีย้อม การอักเสบของเยื่อบุโพรงจมูกผ่านการสูดดมและเกิดการระคายเคืองต่อเยื่อปอดได้ (Ginesiska & Herda, 2018)

การสกัดสีย้อมจากธรรมชาติเพื่อใช้สำหรับการย้อมเซลล์หรือโครโมโซมเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถลดปัญหาด้านต้นทุนในการจัดซื้อผลิตภัณฑ์สีย้อมสังเคราะห์และปลอดภัยกับผู้ใช้งานมากกว่า อีกทั้งยังสามารถละลายน้ำได้ดีกว่าจึงช่วยลดความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย (Kunirat *et al.*, 2018) ในการสกัดสีย้อมโครโมโซมนั้นพบว่า สารสีที่ได้จากพืชธรรมชาติที่สามารถย้อมติดสีโครโมโซมได้นั้นคือกลุ่มแอนโทไซยานิน (Anthocyanins) สามารถพบได้ในพืช ผัก ผลไม้และดอกไม้หลายชนิด เช่น การสกัดจากข้าวเหนียวดำ (Phakpaknam *et al.*, 2021) สารสกัดจากข้าวโพดหวานสีม่วงให้สีม่วง (Thongsrisuk *et al.*, 2017) สารสกัดจากดอกกระเจียวแดงให้สีแดง ดอกอัญชันให้สีม่วง เปลือกแก้วมังกรให้สีแดง เปลือกมังคุดให้สีน้ำตาล (Kaewpuk, 2018) เป็นต้น แต่ทั้งนี้การใช้สีย้อมจากธรรมชาติยังมีข้อจำกัดอยู่มากในเรื่องของปริมาณการใช้ การเก็บรักษา การทำให้สีย้อมธรรมชาติสามารถติดโครงสร้างเซลล์ของตัวอย่างที่ศึกษาได้อย่างชัดเจนคงทนและใกล้เคียงกับสีย้อมสังเคราะห์ รวมทั้งการใช้พืชตัวอย่างที่ส่วนใหญ่ที่เคยมีการศึกษาแล้วมาจากดอกไม้ ผักและผลไม้ซึ่งยากต่อการหาวัตถุดิบและการเก็บรักษาวัตถุดิบสำหรับการสกัดสีย้อมธรรมชาติให้พร้อมใช้งาน

ผู้วิจัยจึงสนใจนำแก่นฝาง (*Biancaea sappan* (L.) Tod.) มาสกัดเป็นสีย้อมธรรมชาติเนื่องจากแก่นฝางเป็นพืชที่มีสารอยู่ในกลุ่มแอนโทไซยานิน (Anthocyanins) และจะให้สีแดงในสภาวะเป็นกรด ($\text{pH} < 7$) (Kongplee & Pangsi, 2022) นอกจากนี้การใช้แก่นฝางเป็นพืชวัตถุดิบในการสกัดสีย้อมธรรมชาติยังสามารถแก้ไขปัญหาด้านการเตรียมพืชวัตถุดิบสำหรับการสกัดสีย้อมธรรมชาติได้เพราะแก่นฝางสามารถหาได้ทั่วไปตามท้องตลาด มีราคาถูกและจัดเก็บในรูปแบบของพืชแห้งได้เป็นระยะเวลานาน สะดวกต่อการนำมาสกัดสารสีเพื่อใช้สำหรับการทำสีย้อมธรรมชาติได้ตามต้องการและการใช้แก่นฝางเป็นวัตถุดิบในการสกัดสีย้อมธรรมชาติจะให้สีแดงที่โดดเด่นแม้ใช้แก่นฝางในปริมาณเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงสามารถลดต้นทุนในการผลิตสีย้อมสังเคราะห์เชิงอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาตัวทำละลาย (Solvent) และสารช่วยติดสี (Mordant) ที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสีย้อมจากแก่นฝางเพื่อย้อมสีโครโมโซม
2. เพื่อศึกษาคุณภาพการติดสีของโครโมโซมจากสีย้อมแก่นฝางเทียบกับสีย้อมอะซิโตคาร์มิน
3. เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาที่เหมาะสมในการคงคุณภาพของสีย้อมแก่นฝาง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมแก่นฝาง

นำแก่นฝาง (*Biancaea sappan* (L.) Tod.) มาล้างทำความสะอาดซับน้ำให้แห้งพอหมาดจากนั้นนำไปอบแห้งด้วยตู้อบแห้งแบบถาดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และนำมาบดละเอียดด้วยเครื่องบดผงละเอียดใช้เวลา 2 นาที ด้วยความเร็ว 32,000 รอบต่อนาที

2. การสกัดสีจากแก่นฝาง การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมี

นำผงแก่นฝางจากข้อ 1 มาสกัดโดยการแช่แบบหมักในตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ น้ำกลั่น เมทานอลเข้มข้น 95% เมทานอลเข้มข้น 70% เอทานอลเข้มข้น 95% และเอทานอลเข้มข้น 70% ในอัตราส่วนผงแก่นฝาง 1 กรัม ต่อตัวทำละลาย 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และแยกเติมสารช่วยให้ติดสี 2 ชนิด ได้แก่ โซเดียมคลอไรด์และคอปเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะได้สีย้อมทั้งหมด 15 สีชุดทดสอบ จากนั้นนำชุดสีย้อมไประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน คำนวณร้อยละผลผลิตสารสกัด (% Yield) จากสูตร

$$\text{ร้อยละผลผลิตสารสกัด (\% Yield)} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัด}}{\text{น้ำหนักแห้งของพืชสมุนไพร}} \times 100$$

ทดสอบคุณสมบัติทางเคมีของสีย้อมโดยวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ตรวจวัดเฉดสีด้วยเครื่องวัดสี (Colorimeter) ด้วยระบบสี International Commission on Illumination (CIE) วัดค่า $L^* a^* b^*$ และเทียบสีโดยใช้ระบบสีมันเซล (Munsell Color Chart) และวัดค่าความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงได้สูงสุด ($\lambda_{\max}$) โดยใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer) ในช่วงความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร (Chaithada, 2019)

3. การเตรียมรากหอม

ขั้นตอนการเตรียมรากหอมสำหรับใช้ศึกษาการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของโครโมโซมจะใช้หัวหอมแดง (*Allium ascalonicum* L.) มาตัดบริเวณโคนออกและนำไปแช่น้ำ 3 วัน รากหอมจะงอกยาวประมาณ 2-4 เซนติเมตร ตัดรากหอมเฉพาะส่วนปลายรากสีขาวขุ่น ยาวประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร แช่ในน้ำยาคงสภาพ (Farmer's solution) ซึ่งเตรียมจากเอทิลแอลกอฮอล์ 3 ส่วนและกรดอะซิติกเข้มข้น 1 ส่วน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำรากหอมมาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง และแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70% เพื่อเก็บรักษาสภาพในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การย้อมสีโครโมโซมปลายรากหอมและการศึกษาคุณภาพการติดสีของโครโมโซม

นำปลายรากหอมจากข้อ 3 วางบนสไลด์ ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง หยดสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 10% จำนวน 1-2 หยด ทิ้งไว้ 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ซับน้ำออกด้วยกระดาษทิชชู จากนั้นหยดสีย้อมทดสอบที่เตรียมไว้ลงบนรากหอม (สีย้อม 1 สีทดสอบต่อ 1 สไลด์) นำสไลด์ไปปั่นเปลาไฟ 1-2 รอบ พออุ่นใช้ปลายเข็มเขี่ยแยกเซลล์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ใช้กระดาษทิชชูรองและนิ้วมือกด (Squash technique) บนกระจกปิดสไลด์ ศึกษาการติดสีของโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) ที่กำลังขยาย 40 เท่า (40X) สังเกตโครโมโซมในระยะเมทาเฟสเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของสีย้อมชุดทดสอบกับสีย้อมสังเคราะห์อะซิโตคาร์มิน

5. การศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาสีย้อม

ผลจากการคัดเลือกสีย้อมที่มีคุณภาพดีที่สุดในข้อ 4 นำมาศึกษาสภาวะเก็บรักษาสีย้อม โดยเก็บสีย้อมในขวดสีชา จากนั้นแยกศึกษาการเก็บรักษาเป็น 2 กลุ่ม คือ การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส โดยทำการบันทึกคุณภาพสีย้อมในระยะ 1 2 3 และ 4 สัปดาห์ ตามลำดับ

ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของสีสกัดจากแก่นฝาง

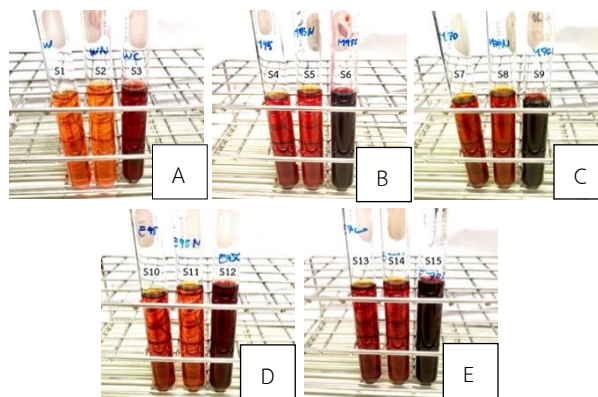
จากการศึกษาลักษณะสีย้อมแก่นฝางทั้งหมด 15 สีชุดทดสอบ (ภาพที่ 1 และตารางที่ 1) โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ได้ผลการทดสอบ ดังนี้

1.1 ผลการศึกษาผลผลิตสารสกัด (% Yield) พบว่า ตัวทำละลายแต่ละชนิดสามารถสกัดสารสีจากแก่นฝางได้แตกต่างกันโดยปริมาณค่าเฉลี่ยผลผลิตสารสกัดของสีย้อมแก่นฝางสกัดด้วยน้ำกลั่น (S1) ให้ปริมาณผลผลิตมากที่สุด รองลงมาคือสกัดด้วยน้ำกลั่นเติมคอปเปอร์ซัลเฟต (S3) และสกัดด้วยน้ำกลั่นเติมโซเดียมคลอไรด์ (S2) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยผลผลิต

สารสกัดคือ $62.80 \pm 0.37\%$ $59.42 \pm 0.89\%$ และ $59.12 \pm 0.42\%$ ตามลำดับ (ตารางที่ 2) และเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มของชนิดตัวทำละลายที่ทำให้ได้ปริมาณผลผลิตสารสกัดพบว่าแก่นฝางสามารถละลายได้ดีที่สุดในน้ำกลั่นรองลงมาคือ เมทานอล และเอทานอล ตามลำดับ

1.2 ผลการศึกษาความเป็นกรด-ด่าง (pH) และเฉดสีของสีย้อมแก่นฝาง พบว่าสีย้อมแก่นฝางทุกชุดทดสอบมีค่า pH อยู่ในช่วง 3.30 – 5.95 ซึ่งสีย้อมแก่นฝางที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 95% เติมคอปเปอร์ซัลเฟต (S12) มีค่า pH ต่ำสุดคือ 3.30 และสีย้อมแก่นฝางที่สกัดด้วยน้ำกลั่น มีค่า pH สูงสุด คือ 5.59 และเมื่อนำสีย้อมทั้ง 15 ชุดทดสอบ มาวัดเฉดสีด้วยเครื่องวัดสีใช้ระบบสี CIE วัดค่า L^* a^* b^* และเทียบสีโดยใช้ระบบสีมันเซลพบว่าสีย้อมจากแก่นฝางทั้ง 15 สีชุดทดสอบอยู่ในเฉดสีเหลืองแดงถึงแดง โดยสีย้อมแก่นฝางสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 95% เติมคอปเปอร์ซัลเฟต (S12) ให้เฉดสีแดงสูงสุด คือความสว่าง $L^* = 20.51$ สีแดง $a^* = 7.41$ สีเหลือง $b^* = 4.18$ Munsell Color Chart ให้สีแดงที่ระดับ 7.5R5/8 รองลงมาคือสกัดด้วยเมทานอลเข้มข้น 95% เติมคอปเปอร์ซัลเฟต (S6) ความสว่าง $L^* = 19.65$ สีแดง $a^* = 5.48$ สีเหลือง $b^* = 2.38$ Munsell Color Chart ให้สีแดงที่ระดับ 5R4/8 และสกัดด้วยเมทานอลเข้มข้น 70% เติมคอปเปอร์ซัลเฟต (S9) ความสว่าง $L^* = 19.54$ สีแดง $a^* = 5.05$ สีเหลือง $b^* = 2.19$ Munsell Color Chart ให้สีแดงที่ระดับ 5R4/6 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

1.3 การศึกษาการดูดกลืนแสงโดยวัดค่าความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงได้สูงสุด (λ_{max}) พบว่า สีย้อมแก่นฝาง 15 สีชุดทดสอบ สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ในช่วง 454 – 520 นาโนเมตร โดยสกัดด้วยเมทานอลเข้มข้น 70% เติมคอปเปอร์ซัลเฟต (S9) สกัดด้วยเมทานอลเข้มข้น 95% เติมคอปเปอร์ซัลเฟต (S6) และสกัดด้วยสกัดเมทานอลเข้มข้น 95% (S4) มีค่าการดูดกลืนแสงได้สูงสุด คือ 520 515 และ 500 นาโนเมตร (ตารางที่ 2)



ภาพที่ 1 ลักษณะสีย้อมแก่นฝางสกัดจากตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ น้ำกลั่น (A) เมทานอลเข้มข้น 95% (B) เมทานอลเข้มข้น 70% (C) เอทานอลเข้มข้น 95% (D) และเอทานอลเข้มข้น 70% (E)

ตารางที่ 1 การกำหนดสัญลักษณ์ของสีย้อมสกัดจากแก่นฝาง

สารสกัดแก่นฝางในตัวทำละลายและสารช่วยให้ติดสี	สัญลักษณ์
สกัดด้วยน้ำกลั่น	S1
สกัดด้วยน้ำกลั่นเติมโซเดียมคลอไรด์	S2
สกัดด้วยน้ำกลั่นเติมคอปเปอร์ซัลเฟต	S3
สกัดด้วยเมทานอลเข้มข้น 95%	S4
สกัดด้วยเมทานอลเข้มข้น 95% เติมโซเดียมคลอไรด์	S5
สกัดด้วยเมทานอลเข้มข้น 95% เติมคอปเปอร์ซัลเฟต	S6
สกัดด้วยเมทานอลเข้มข้น 70%	S7
สกัดด้วยเมทานอลเข้มข้น 70% เติมโซเดียมคลอไรด์	S8
สกัดด้วยเมทานอลเข้มข้น 70% เติมคอปเปอร์ซัลเฟต	S9
สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 95%	S10

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สารสกัดแก่นฝางในตัวอย่างและสารช่วยให้ติดสี	สัญลักษณ์
สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 95% เติมน้ำเค็มคลอรีน	S11
สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 95% เติมน้ำเค็มคลอรีน	S12
สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 70%	S13
สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 70% เติมน้ำเค็มคลอรีน	S14
สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 70% เติมน้ำเค็มคลอรีน	S15

ตารางที่ 2 ปริมาณ คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของสารสกัดจากแก่นฝาง

ชนิดสีย้อม	ค่าเฉลี่ย ปริมาณสาร สกัด (% Yield)	ค่าเฉลี่ย กรด- ด่าง (pH)	ระบบสี CIE			ระบบสี Munsell Color Chart	เฉดสี	การดูดกลืน แสงสูงสุด (nm)
			L*	a*	b*			
S1	62.80±0.37	5.95	24.60	6.48	9.75	7.5YR6/8	แดงเหลือง	454
S2	59.12±0.42	5.68	24.54	5.87	10.48	7.5YR6/8	แดงเหลือง	458
S3	59.42±0.89	3.73	19.76	3.80	2.34	2.5YR5/8	แดง	496
S4	56.71±0.06	5.17	23.10	5.70	8.27	5YR6/8	แดงเหลือง	500
S5	54.41±0.21	5.72	24.03	4.64	9.84	5YR6/8	แดงเหลือง	492
S6	52.45±0.19	3.50	19.65	5.48	2.38	5R4/8	แดง	515
S7	54.25±1.02	5.61	23.07	6.04	8.27	2.5YR5/8	เหลืองแดง	497
S8	53.82±1.89	5.72	22.48	6.41	7.23	2.5YR5/8	เหลืองแดง	496
S9	52.14±0.21	3.42	19.54	5.05	2.19	5R4/6	แดง	520
S10	44.46±0.09	5.91	23.29	5.94	8.98	2.5YR6/8	แดงสว่าง	490
S11	42.87±0.25	5.47	23.43	5.75	9.22	2.5YR6/8	แดงสว่าง	489
S12	45.91±1.90	3.30	20.51	7.41	4.18	7.5R5/8	แดง	480
S13	48.73±1.68	5.50	23.64	5.52	9.56	5YR6/8	แดงเหลือง	490
S14	41.24±0.49	5.62	23.58	5.64	9.42	5YR6/8	แดงเหลือง	484
S15	47.71±0.54	3.90	19.45	5.34	2.36	7.5R4/8	แดง	499

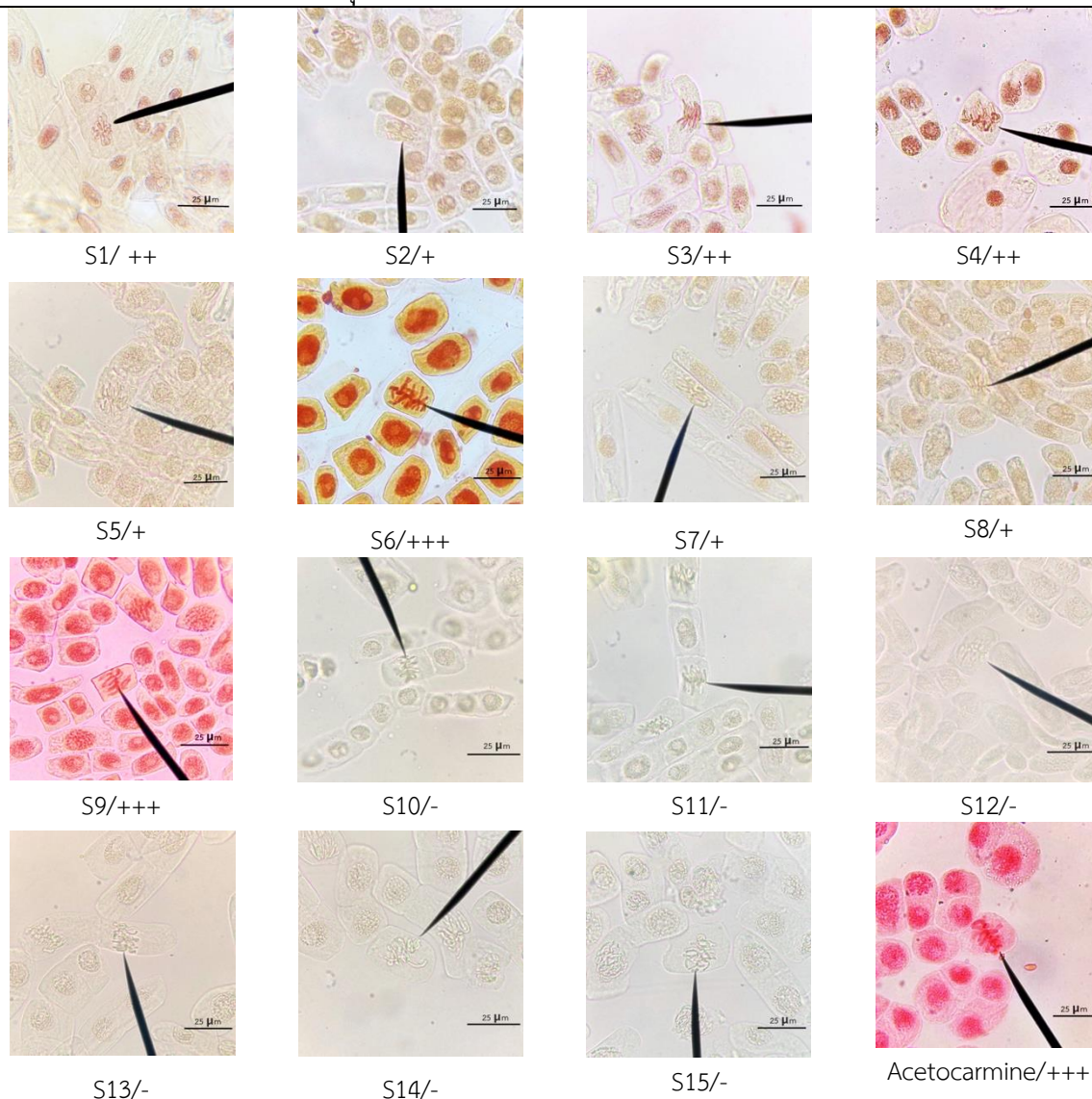
หมายเหตุ: L* คือค่าความมืดความสว่าง L* = 0 สีมืดเป็นสีดำ L* = 100 สีสว่างเป็นสีขาว, a* คือค่าสีแดงหรือสีเขียว a* เป็น + วัตถุมีสีออกแดง a* เป็น - วัตถุมีสีออกเขียว, b* คือค่าสีเหลืองหรือสีน้ำเงิน b* เป็น + วัตถุมีสีออกเหลือง b* เป็น - วัตถุมีสีออกน้ำเงิน

2. ผลการศึกษาคุณภาพการติดสีของโครโมโซมจากปลายรากหอม

จากการศึกษาคุณภาพการติดสีของโครโมโซมจากปลายรากหอมพบว่าสีย้อมแก่นฝาง สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 95% เติมน้ำเค็มคลอรีน (S6) และสีย้อมแก่นฝางสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 70% เติมน้ำเค็มคลอรีน (S9) มีคุณภาพในการติดสีของโครโมโซมดีที่สุด โดยสามารถมองเห็นกระบวนการแบ่งเซลล์ของรากหอมในระยะเมทาเฟสและสามารถมองเห็นขอบเขตเซลล์ได้อย่างชัดเจน (ตารางที่ 3) ทั้งนี้เมื่อสังเกตการณ์ติดสีของโครโมโซมได้กล้องจุลทรรศน์พบว่าสีย้อม S6 โครโมโซมจะติดสีเข้มแดงส่วนสีย้อม S9 โครโมโซมจะติดสีเข้มชมพูแดงซึ่งเฉดสีใกล้เคียงกับสีย้อมอะซิโตคาร์มิน ดังนั้นผู้วิจัยจึงคัดเลือกสีย้อม S9 ในการนำไปศึกษาสภาพการเก็บรักษาสีย้อม

ตารางที่ 3 คุณภาพการติดสีของโครโมโซมจากปลายรากหอม

คุณภาพการติดสีย้อมแกนฝางของโครโมโซม

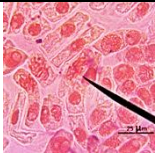
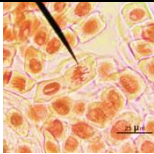
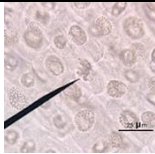
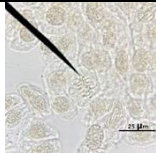
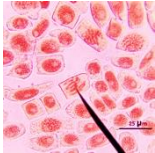
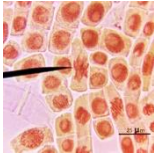
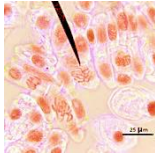
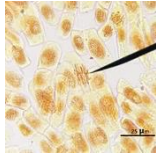


หมายเหตุ: - หมายถึง ไม่ติดสีโครโมโซม + หมายถึง ติดสีโครโมโซมเล็กน้อย ++ หมายถึง ติดสีโครโมโซมปานกลาง +++ หมายถึง ติดสีโครโมโซมชัดเจน

3. ผลการศึกษาสภาวะการเก็บรักษาสีย้อม

จากการนำสีย้อมแกนฝางสกัดด้วยเมทานอลเข้มข้น 70% เติมหอเปอร์ซัลเฟต (S9) มาศึกษาสภาวะการเก็บรักษาสีย้อมใน 2 สภาวะคือการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (ชุด A) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส (ชุด B) เปรียบเทียบคุณภาพสีย้อมในการติดสีโครโมโซมระยะ 1 2 3 และ 4 สัปดาห์ ตามลำดับ พบว่าสีย้อมชุด A เมื่อนำไปย้อมสีโครโมโซมสามารถคงคุณภาพการติดสีได้สูงสุดถึงสัปดาห์ที่ 2 หลังจากนั้นการติดสีย้อมของโครโมโซมจะจางลงและไม่ติดสีในสัปดาห์ที่ 4 โดยมีค่า pH เท่ากับ 3.40 3.10 2.15 และ 2.00 ตามลำดับ ส่วนสีย้อมชุด B เมื่อนำไปย้อมสีโครโมโซมจะสามารถคงคุณภาพการติดสีได้สูงสุดถึงสัปดาห์ที่ 4 โดยคุณภาพการติดสีลดลงเพียงเล็กน้อยโดยมีค่า pH เท่ากับ 3.42 3.31 3.00 และ 2.58 ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 คุณภาพการติดสีย้อมของโครโมโซมจากปลายรากหอมในสภาวะการเก็บรักษา

การเก็บรักษา	การติดสีของโครโมโซมและค่า pH			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
อุณหภูมิต้อง	 3.40	 3.10	 2.15	 2.00
อุณหภูมิตั้ง 4±1 องศาเซลเซียส	 3.42	 3.31	 3.00	 2.58

อภิปรายผลการวิจัย

ผลการศึกษาผลผลิตสารสกัดพบว่า สารสกัดของสีย้อมแก่นฝางสกัดด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาณมากผลผลิตมากที่สุด รองลงมาคือสกัดด้วยน้ำกลั่นเติมคอปเปอร์ซัลเฟต และสกัดด้วยน้ำกลั่นเติมโซเดียมคลอไรด์และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มของชนิดตัวทำละลายที่ทำให้ได้ปริมาณผลผลิตสารสกัดพบว่า แก่นฝางสามารถละลายได้ดีที่สุดในน้ำกลั่น เมทานอลและเอทานอลตามลำดับแสดงให้เห็นถึงสารสีที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของแก่นฝางเป็นสารประเภทมีขั้ว จึงสามารถสกัดในตัวทำละลายที่มีขั้วได้ดี สอดคล้องกับการศึกษาของ Chaithada (2019) ที่ได้ทำการศึกษเกี่ยวกับผลของตัวทำละลายและความเป็นกรด-ด่าง ต่อปริมาณและความคงตัวของสารสีที่สกัดได้จากพืชพบว่า ใบสาบเสือ เปลือกสนทะเล ใบเพกา แก่นขนุน และเปลือกมังคุดที่ใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกันจะให้ปริมาณสีที่แตกต่างกัน โดยตัวทำละลายชนิดมีขั้วจะสามารถให้ปริมาณสารสกัดเรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ ดังนี้ น้ำกลั่น เมทานอล อะซิโตน ไดคลอโรมีน และเฮกเซน ผลการเปรียบเทียบการเติมสารช่วยติดสีหรือมอร์แดนท์ในสีย้อมแก่นฝางพบว่า สีย้อมแก่นฝางที่ไม่เติมมอร์แดนท์จะให้สีที่อ่อนกว่าสีย้อมแก่นฝางที่เติมมอร์แดนท์ เนื่องจากมอร์แดนท์เป็นตัวช่วยเพิ่มประสิทธิภาพสีย้อมในการติดกับเส้นใยในโครโมโซมได้ดีขึ้น โดยมอร์แดนท์จะรวมกับโมเลกุลของสีย้อมเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (Metal dry complexes) ทำให้โมเลกุลของสีย้อมมีขนาดใหญ่ขึ้น (Pimprapon, 2015) จึงทำยืดยาวกับเส้นใยในโครโมโซมได้ดีขึ้น ทั้งนี้จากศึกษาพบว่า การเติมมอร์แดนท์คอปเปอร์ซัลเฟตในสีย้อมแก่นฝางจะให้สีเข้มกว่าการเติมมอร์แดนท์โซเดียมคลอไรด์

ผลการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพพบว่า สีย้อมแก่นฝางทุกชุดทดสอบมีความเป็นกรดและให้เจดสีเหลืองแดงถึงเจดสีแดง โดยสีย้อมที่มีค่าความเป็นกรดแก่ให้ค่าเจดสีแดงมากกว่าสีย้อมแก่นฝางที่มีค่าความเป็นกรดอ่อน Fakgoen & Meerod (2017) กล่าวว่า แก่นฝางเป็นพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มแอนโทไซยานิน มีกลุ่ม Phenolic compounds และกลุ่ม Polyphenol ความแตกต่างกันของเจดสีของพืชในกลุ่มแอนโทไซยานินขึ้นอยู่กับความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งจากการเกิด Resonance ประจุบวกของไอออนฟลาโวลีลโดยพบว่า pH>7 ให้เจดสีน้ำเงินเข้ม pH=7 ให้เจดสีม่วง และ pH<7 ให้เจดสีส้มแดง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kongplee & Pangsi (2022) ที่ทำการศึกษการพัฒนาสีย้อมธรรมชาติจากพืชในกลุ่มแอนโทไซยานินเพื่อใช้สำหรับย้อมเนื้อเยื่อพืชพบว่า สีย้อมแก่นฝางสกัดด้วยน้ำกลั่นเติมคอปเปอร์ซัลเฟต pH 2.98 ซึ่งอยู่ในสภาวะกรดแก่ให้เจดสีแดง

ผลศึกษาการดูดกลืนแสงโดยวัดค่าความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงได้สูงสุด (λ_{max}) พบว่า สีย้อมแก่นฝางทั้ง 15 ชุดทดสอบ สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดได้อยู่ในช่วง 454 – 520 นาโนเมตร โดยค่าดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นอยู่กับความเป็นกรด-ด่างของสีย้อมแก่นฝาง สอดคล้องกับการศึกษาของ Ginesiska & Herda (2018) ที่ทำการศึกษการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากแก้วมังกรพบว่า สีที่เข้มข้นของสารสีมีความสัมพันธ์กับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นผลมาจากปัจจัยของออกโซโครม (Auxochrome) ซึ่งเป็นกลุ่มของธาตุที่ไม่ดูดกลืนแสงแต่สามารถมีผลต่อการดูดกลืนคลื่นแสงของโครโมฟอร์ (Chromophore) ที่มีออกโซโครมเกาะอยู่ทำให้เกิดบาโทโครมิกชิฟต์ (Bathochromic shift) ทำให้สเปกตรัม (Spectrum) เคลื่อนไปทางที่มีความยาวคลื่นมากขึ้น (λ_{max} เพิ่มขึ้น) และจากหนังสือของ Purmendu *et al.* (2013) ได้กล่าวถึงกฎของ Beer-lambert ว่าปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนนั้นเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่มีสมบัติดูดกลืนแสง จึงสรุปได้ว่าการศึกษาสีย้อมแก่นฝางสกัดด้วยเมทานอลเข้มข้น 70% เติมน้ำกลั่นเติมคอปเปอร์ซัลเฟต สามารถดูดกลืนแสงได้สูงจึงมีปริมาณความเข้มข้นของสารสีสูงที่สุด

ผลการศึกษาคุนภาพการติดสีของโครโมโซมจากปลายรากหอมพบว่า สีของแ่งฝางสกัดด้วยเมทานอลเข้มข้น 95% เติมคอปเปอร์ซัลเฟตและสีของแ่งฝางสกัดด้วยเมทานอลเข้มข้น 70% เติมคอปเปอร์ซัลเฟต มีคุณภาพการติดสีของโครโมโซมดีที่สุด ซึ่งมีคุณภาพการติดสีของโครโมโซมใกล้เคียงกับสีของอะซิโตคาร์มิน โดยจากการศึกษาของ Chaithada (2019) ได้อธิบายว่าการติดสีของโครโมโซมจากปลายรากหอมเป็นผลมาจากในเซลล์พืชจะมีเอนไซม์บางชนิดที่มีคุณสมบัติในการจับกับโคแฟกเตอร์ (Co-factor) ที่เป็นไอออนของโลหะและความเป็นกรด-ด่างเป็นอีกปัจจัยที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์

ผลการศึกษาสภาวะการเก็บรักษาสีของแ่งฝางสกัดด้วยเมทานอลเข้มข้น 70% เติมคอปเปอร์ซัลเฟต สีของชุด A เมื่อนำไปย้อมสีโครโมโซมจะสามารถคงคุณภาพการติดสีได้สูงสุดถึงสัปดาห์ที่ 2 หลังจากนั้นการติดสีของโครโมโซมจะจางลงและไม่ติดสีในสัปดาห์ที่ 4 ตามลำดับ ส่วนสีของชุด B เมื่อนำไปย้อมสีโครโมโซมจะสามารถคงคุณภาพการติดสีได้สูงสุดถึงสัปดาห์ที่ 4 โดยคุณภาพในการติดสีลดลงเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการคงตัวของสารสกัดสีของแ่งฝางขึ้นอยู่กับอุณหภูมิในการเก็บรักษา สอดคล้องกับการศึกษาของ Thongsrisuk *et al.* (2017) จากการศึกษาการประยุกต์ใช้สีธรรมชาติจากข้าวโพดหวานสีม่วงในการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของพืช พบว่า ข้าวโพดหวานซึ่งเป็นพืชในกลุ่มแอนโทไซยานินเหมาะกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส และค่า pH ที่เหมาะสมคือ pH 1-2 ให้สีชมแดงอมชมพู และการศึกษาของ Swanty & Abdullah (2019) ที่ทำการศึกษสมบัติของสีและผลการรักษาเสถียรภาพของโลหะไอออนต่อสารแอนโทไซยานินในผลบันรพรีต (*Bntidesma bunius*) พบว่า อุณหภูมิที่ควรเก็บสารสกัดอยู่ที่ 4 ± 1 องศาเซลเซียส ซึ่งจะช่วยให้ชะลอการลดลงของปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัดได้

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การศึกษากการสกัดสีของแ่งฝางเพื่อใช้สำหรับย้อมสีโครโมโซมจากปลายรากหอมพบว่า สีของแ่งฝางสกัดด้วยน้ำกลั่นจะให้ปริมาณผลผลิตมากที่สุด การศึกษาคุนสมบัติทางเคมีและกายภาพของทั้ง 15 สีของชุดทดสอบ พบว่า มีความเป็นกรด การดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ในช่วง 454 -520 นาโนเมตร ให้สีเฉดเหลืองแดงถึงแดง ผลศึกษาคุนภาพในการติดสีของโครโมโซม พบว่า สีของแ่งฝางที่สกัดด้วยเมทานอลเข้มข้น 70% เติมคอปเปอร์ซัลเฟตเป็นสารช่วยติดสี มีคุณภาพการติดสีของโครโมโซมได้อย่างชัดเจนเทียบเท่ากับสีของอะซิโตคาร์มินและสามารถคงคุณภาพของสีโดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส ได้อย่างน้อย 4 สัปดาห์ ทั้งนี้สีของแ่งฝางเป็นสีของธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดีจึงไม่มีพิษต่อสิ่งแวดล้อม การใช้แ่งฝางเป็นวัตถุติดในการสกัดสีของธรรมชาติผู้ใช้สามารถหาแ่งฝางได้ง่ายทั่วไปตามท้องตลาด มีตลอดฤดูกาล มีราคาถูก สามารถเก็บแ่งฝางในลักษณะของพืชวัตถุแห้งได้ และมีการใช้แ่งฝางในปริมาณน้อยแต่สามารถให้สารสีในปริมาณมากได้ ซึ่งเป็นการลดต้นทุนในการจัดซื้อสีสังเคราะห์และสามารถลดการผลิตสีสังเคราะห์ในเชิงอุตสาหกรรมได้ในอนาคต ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยขั้นต่อไปคือการหาแนวทางพัฒนาการเก็บรักษาสีของแ่งฝางเพื่อให้คงคุณภาพในการย้อมโครโมโซม

เอกสารอ้างอิง

- Chaithada, P. (2019). Effect of extraction solvents and pH on the amount and stability of crude color extracted from plants. *Wichcha Journal Nakhon Si Thammarat Rajabhat University*, 38(1), 65-78. (in Thai)
- Fakgoen, F. & Meerod, M. (2017). Extraction and separation of anthocyanins from *Carissa carandas* L., *The 4th Research and Development Institute Kamphaeng Phet Rajabhat University National Conference*, 22 December 2017. Kamphaeng Phet: Kamphaeng Phet Rajabhat University.1002-1011. (in Thai)
- Ginesiska, G. & Herda, P. (2018). Extract of dragon fruit pule (*Hylocereus polyrhizus*) potentially stain chromosomes of red onion (*Allium ascalonicum*). *Biogenesis*, 6(2), 93-97.
- Hoefnagels, M. (2022). *Biology: the essentials* (4th ed.). New York: McGraw-Hill companies inc.
- Kaewpuk, W. (2018). Study of the natural dyes from plants for chromosome staining in a biological laboratory, Faculty of Science and Technology, Nakhon Pathom Rajabhat University. *The 7th*



- NPRU National Academic Conference Nakhon Pathom Rajabhat University, 30-31 March 2015. Nakhon Pathom: Nakhon Pathom Rajabhat University. 1434-1422. (in Thai)
- Kongplee, L., & Pangsi, P. (2022). The development of natural dry from plants in anthocyanin group for staining plant tissue. *Journal of Science and Science Education*, 5(1), 1-11. (in Thai)
- Kunirat, M., Dwngkhi, P., Wiriakarun, S., & Hommuan, S. (2018). Extraction and application of natural dyes from indigenous plants for plant histological staining. *Proceedings of 3rd North Eastern Science and Technology Conference*, 24 March 2018. Ubon Ratchathani: Ubon Ratchathani Rajabhat university. (in Thai)
- Phakpaknam, S., Wannasiri, N., & Dechikai, M. (2021). Development of chromosome staining dye extracted from black glutinous rice (*Oryza sativa* ver. Indica). *Burapha Science Journal*, 26(2), 1096-1108. (in Thai)
- Pimpapon, P. (2015). A study of effects of various mordants added to the dye extracted from *Litsea glutinosa* (Lour.) leaves on color shades of dyeing silk thread through exhaustion dyeing process. (Master's thesis). Pathum Thani: Rajamangala University of Technology Thanyaburi. (in Thai)
- Purnendu, K., et al. (2013). *Analytical chemistry* (7th ed.). Manhattan: John Wiley & Sons, Inc.
- Tanomtong, A., Pinthong, K., & Patawang, I. (2019). *Cytogenetics* (1st ed.). Bangkok: Chulalongkorn University Printing House. (in Thai)
- Thongsrisuk, R., Chuaynkern, Y., Tanomtong, A., & Phansoomboon, S. (2017). Application of natural dye from purple sweet corn (*Zea mays saccharate*) for plant cell mitosis studies. *Koch Cha Sam Journal of Science*, 39(2), 34-44. (in Thai)
- Swanty, R.M. & Abdullah, M.M. (2019). Color properties and stabilizing effect of metal ion on anthocyanin from *buni* (*Antidesma bunius*) fruit. *Advances in Engineering Research*, 194(1), 223-225.