

การพิจารณาวิธีแก้ไขข้อบกพร่องในบางวิชา
เพื่อใช้ในการสอนวิชาเคมี

ปฏิญานี้
ของ
ธานี พันธ์โค

THE LIBRARY
COLLEGE OF EDUCATION
BANGKOK, THAILAND

แผนกวิชาชีววิทยาการศึกษา
เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาของนักศึกษา
ปริญญาการศึกษาบัณฑิต
24 กุมภาพันธ์ 2514

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิตได้พิจารณาปัญหานี้อย่างถี่ถ้วน เห็น
สมควรรับเป็นงานหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต ของวิทยาลัย
วิชาการศึกษาได้

.....พินิจ อภิบาล.....ประธาน

.....ผศ. ศ. เสริม.....กรรมการ

.....สุชาติ พลดี.....กรรมการ

24 กุมภาพันธ์ 2514

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ก็ด้วยความช่วยเหลือจากอาจารย์
หลายท่าน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ รัชผลเกษ ประธานคณะกรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุนทรี พริยะกิจ และอาจารย์ ดร.นิตา สะเพียรชัย กรรมการที่ปรึกษา
ซึ่งได้ให้คำแนะนำในการศึกษาค้นคว้า นับตั้งแต่การกำหนดเรื่อง การวางแผนการทดลอง
การตีความหมาย ตลอดจนการตรวจแก้ไขสำนวนที่ใช้ในการเขียนปริญญานิพนธ์ ซึ่งถ้าปราศจาก
ความเมตตากรุณาและความเอาใจใส่จากท่านอาจารย์คงกล่าวแล้ว ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้คงไม่อาจ
สำเร็จลงได้ ผู้เขียนจึงขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านซึ่งได้กล่าวนามมาแล้วข้างต้นอย่างสูง
บุคคลอีกคนหนึ่งที่คุณเขียนมีอาวจะล้นที่จะนำมากล่าวไว้ในที่นี้ไว้คือ บรรดาเรภิน
และเจ้าหน้าที่ในแผนกห้องสมุด กรมวิทยาศาสตร์ กระทรวงอุตสาหกรรม ที่ได้อำนวยความสะดวก
นาน ๆ ประการในด้านการค้นคว้าเอกสารต่าง ๆ ผู้เขียนจึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย.

ธานี หับหิมโก

สารบัญ

บทที่ 1	บทนำ	1
1.00	คำนำ	1
2.00	ที่มาของปัญหา	1
3.00	จุดมุ่งหมายในการศึกษาครั้งนี้	3
4.00	ความสำคัญของการศึกษาครั้งนี้	4
5.00	ขอบเขตของการศึกษาครั้งนี้	4
6.00	คำนิยามและศัพท์เฉพาะ	5
บทที่ 2	ประวัติและทฤษฎีเกี่ยวกับสารอินทิเกรเตอร์	7
1.00	ประวัติ	7
2.00	ทฤษฎีเกี่ยวกับสารอินทิเกรเตอร์	10
3.00	สรุป	31
บทที่ 3	วิธีทดลองและผลการทดลอง	33
1.00	การสำรวจดอกไม้	33
2.00	การทดสอบสารอินทิเกรเตอร์ในดอกไม้และการคัดเลือกครั้งสุดท้าย	37
3.00	วิธีสกัดสีจากกลีบดอกไม้	37
4.00	การแยกและทำให้บริสุทธิ์	44
5.00	การนำไปใช้และการเก็บรักษา	54
6.00	การศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับสารอินทิเกรเตอร์จากดอกไม้	75

บทที่ 4.	อภิปรายผลการทดลอง	98
1.00	ผลการสำรวจดอกไม้	98
2.00	ผลการทดสอบสารอินดิเคเตอร์ในดอกไม้และการคัดเลือก	98
3.00	ผลการสกัดสีจากกลีบดอกไม้	99
4.00	ผลการแยกและการทำให้บริสุทธิ์	102
5.00	ผลการนำไปใช้และการเก็บรักษา	109
6.00	ผลการศึกษารายละเอียดสารอินดิเคเตอร์จากดอกไม้	119
บทที่ 5.	สรุปและข้อเสนอแนะ	135
บรรณานุกรม		142
ภาคผนวก		147
	ภาคผนวก ก. แสดง maximum absorption และ Rf value ของ anthocyanin และ anthocyanidin ที่ค้นพบแล้ว	148
	ภาคผนวก ข. แสดง absorption spectra และ graph ของ anthocyanin จากดอกไม้	151
	ภาคผนวก ค. แสดงข้อมูลและ graph ที่ได้จากการหาค่า pKa ของ อินดิเคเตอร์จากดอกไม้	158
	ภาคผนวก ง. แสดง paper chromatogram ของ anthocyanin และ anthocyanidin จากดอกไม้ชนิดต่าง ๆ	166
	ภาคผนวก จ. แสดง paper chromatogram ในการตรวจความบริสุทธิ์ของสารอินดิเคเตอร์	173

บัญชีตาราง

ตาราง 1.	แสดงรายชื่อดอกไม้ที่ไ้จากการสำรวจและคัดเลือกในขั้นแรก	34
ตาราง 2.	แสดงผลการทดสอบสารอินดิเคเตอร์จากดอกไม้	39
ตาราง 3.	แสดงผลการคัดเลือกดอกไม้ชั้นสุดท้าย	41
ตาราง 4.	แสดงผลการเปลี่ยนสีของ indicator paper	56
ตาราง 5.	แสดงผลการเปลี่ยนสีของสารละลายอินดิเคเตอร์	57
ตาราง 6.	แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.1 M hydrochloric acid กับ 0.1 M sodium hydroxide โดยใช้อินดิเคเตอร์ไมบรีสุทธี	59
ตาราง 7	แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.1 M hydrochloric acid กับ 0.1 M aqueous ammonia solution โดยใช้อินดิเคเตอร์ไมบรีสุทธี	60
ตาราง 8.	แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.1 M acetic acid กับ 0.1 M sodium hydroxide โดยใช้อินดิเคเตอร์ไมบรีสุทธี	61
ตาราง 9.	แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.1 M acetic acid กับ 0.1 M aqueous ammonia solution โดยใช้อินดิเคเตอร์ไมบรีสุทธี	62
ตาราง 10.	แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.1 M hydrochloric acid กับ 0.1 M sodium hydroxide โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่ทำไมบรีสุทธีแบบง่าย	63

- ตาราง 11. แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.1 M hydrochloric acid กับ 0.1 M aqueous ammonia solution โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่ทำให้ปริสัทธ์แบบง่าย 64
- ตาราง 12. แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.1 M acetic acid กับ 0.1 M sodium hydroxide โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่ทำให้ปริสัทธ์แบบง่าย 65
- ตาราง 13. แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.1 M acetic acid กับ 0.1 M aqueous ammonia solution โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่ทำให้ปริสัทธ์แบบง่าย 66
- ตาราง 14. แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.1 M hydrochloric acid กับ 0.1 M sodium hydroxide โดยใช้อินดิเคเตอร์ปริสัทธ์ 67
- ตาราง 15. แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.1 M hydrochloric acid กับ 0.1 M aqueous ammonia solution โดยใช้อินดิเคเตอร์ปริสัทธ์ 68
- ตาราง 16. แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.1 M acetic acid กับ 0.1 M sodium hydroxide โดยใช้อินดิเคเตอร์ปริสัทธ์ 69
- ตาราง 17. แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.1 M acetic acid กับ 0.1 M aqueous ammonia solution โดยใช้อินดิเคเตอร์ปริสัทธ์ 70
- ตาราง 18. แสดงผลการสังเกตการเปลี่ยนสีของสารอินดิเคเตอร์โมโนปริสัทธ์ของดอกกุหลาบ เมื่อเก็บไว้ในช่วงเวลาต่างกัน และในคว่ำหลายคว่ำกัน 71

ตาราง 19.	แสดงผลการสังเกตการ เปลี่ยนสีของสารอินดิเคเตอร์ที่ทำให้ บรีสุทธีแบบง่ายของคอกกุดหลาย 2 เมื่อเก็บไว้ในช่วงเวลา ต่างกัน และในตัวอย่างละลายต่างกัน	72
ตาราง 20	แสดงผลการสังเกตการ เปลี่ยนสีของสารอินดิเคเตอร์บรีสุทธี ของคอกกุดหลาย เมื่อเก็บไว้ในช่วงเวลาต่างกัน และใน ตัวอย่างละลายต่างกัน	73
ตาราง 21.	แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.1 M hydrochloric acid กับ 0.1 M sodium hydroxide โดยใช้ อินดิเคเตอร์ที่เก็บไว้ในตัวอย่างละลายต่างชนิด และช่วง เวลาต่างกัน	74
ตาราง 22.	แสดงปริมาณของสารอินดิเคเตอร์ที่มีอยู่ในกลีบดอกไม้	76
ตาราง 23.	แสดง maximum absorption ของ anthocyanins จากดอกไม้	77
ตาราง 24.	แสดงอัตราส่วนผสมของ solvent ในแต่ละ solvent system	80
ตาราง 25.	แสดง Rf value ของ anthocyanin จากดอกไม้ใน BAW solvent	81
ตาราง 26.	แสดง Rf value ของ anthocyanin จากดอกไม้ใน BuHCl solvent	82
ตาราง 27.	แสดง Rf value ของ anthocyanin จากดอกไม้ใน 1 % HCl solvent	83
ตาราง 28.	แสดง Rf value ของ anthocyanin จากดอกไม้ใน HAc-HCl solvent	84

ตาราง 29. แสดง Rf value ของ anthocyanidin จากดอกไม้ใน Forestal solvent	85
ตาราง 30. แสดง Rf value ของ anthocyanidin จากดอกไม้ใน Formic solvent	86
ตาราง 31. แสดง Rf value ของ anthocyanidin จากดอกไม้ใน BAW solvent	87
ตาราง 32. แสดง Rf value สีของ anthocyanin และสีของ impurities ที่ได้จากดอกชองนาง เมื่อทำไฮบริดดิซึ่ โดยวิธีการต่าง ๆ ใน BAW solvent	88 88
ตาราง 33. แสดงผลการหาค่า pKa ของอินดิเกเตอร์จากดอกไม้โดยวิธี การแบบงาย	91
ตาราง 34. แสดงค่า pKa ของสารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้ชนิดต่าง ๆ	94
ตาราง 35. แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของ anthocyanin และ anthocyanidin จากดอกไม้ชนิดต่าง ๆ และการ ตีความหมาย	96
ตาราง 36. เปรียบเทียบปริมาณของ sodium hydroxide ที่ คลาดเคลื่อนในการ titrate ระหว่างกรดแก่กับด่างแก่ เมื่อใช้อินดิเกเตอร์ที่มีคุณภาพต่างกัน	113
ตาราง 37. เปรียบเทียบปริมาณของ ammonia ที่คลาดเคลื่อนในการ titrate ระหว่างกรดแก่กับด่างอ่อน เมื่อใช้อินดิเกเตอร์ ที่มีคุณภาพต่างกัน	114

ตาราง 38. เปรียบเทียบปริมาณของ sodium hydroxide ที่คลาดเคลื่อนในการ titrate ระหว่างกรดอินทรีย์กับด่างแก่ เมื่อใช้อินดิเคเตอร์ที่มีคุณภาพต่างกัน	115
ตาราง 39. เปรียบเทียบปริมาณของ ammonia ที่คลาดเคลื่อนในการ titrate ระหว่างกรดอินทรีย์กับด่างอ่อน เมื่อใช้อินดิเคเตอร์ที่มีคุณภาพต่างกัน	116
ตาราง 40. แสดงการเปรียบเทียบค่า maximum absorption และ Rf value ระหว่าง anthocyanin และ anthocyanidin จากดอกไม้นับกับ anthocyanin และ anthocyanidin ที่คนพบแล้ว	124
ตาราง 41. แสดง Rf value และ maximum absorption ของ anthocyanin และ anthocyanidin ที่คนพบแล้ว	148
ตาราง 42. แสดง absorption coefficient ของ anthocyanin จากดอกไม้	151
ตาราง 43. แสดง absorption coefficient ที่ pH ต่าง ๆ ของ anthocyanin จากดอกไม้	158

บัญชีภาพ

รูปที่ 1 - 12	แสดง Absorption Spectra ของ Anthocyanin จากดอกไม	152 - 157
รูปที่ 13 - 24	Graph แสดงวิธีการหาค่า pK_a ของ Anthocyanin จากดอกไม	160 - 165
รูปที่ 25 - 28	Paper Chromatogram ของ Anthocyanin จากดอกไม	166 - 169
รูปที่ 29 - 31	Paper Chromatogram ของ Anthocyanidin จากดอกไม	170 - 172
รูปที่ 32	Paper Chromatogram แสดงความบริสุทธิ์ของ ดอกของนาง	173

1.00 คำนำ

เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่า การที่มนุษย์มีความเป็นอยู่ที่ดีขึ้นกว่าสมัยก่อนนั้นเป็นผลสืบเนื่องมาจากการศึกษาวิทยาศาสตร์ ตัวอย่างเช่น การสื่อสารในสมัยก่อน มนุษย์อาศัยม้าหรือช้างเป็นเครื่องมือซึ่งต้องเสียเวลาในการเดินทางมาก แต่ในปัจจุบันนี้มนุษย์สามารถสื่อสารโดยผ่านดาวเทียมไปยังอีกซีกโลกหนึ่งได้ในระยะเวลาชั่วพริบตา นอกจากนี้วิทยาศาสตร์ยังได้เผยแพร่วิทยาการใหม่ๆ เพื่ออำนวยความสะดวกออกมาสู่สายตามนุษย์มากมาย เช่น โทรศัพท์เคลื่อนที่ เครื่องคำนวณอิเล็กทรอนิกส์ ฯลฯ โดยเหตุนี้เองมนุษย์จึงต้องมีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับสิ่งเหล่านี้เพื่อที่จะสามารถใช้และควบคุมเครื่องมือต่าง ๆ ได้ และจะต้องมีความรู้ทางวิทยาศาสตร์อย่างทั่วไป เพื่อเป็นพื้นฐานสำหรับใช้ความรู้เหล่านี้ช่วยในการดำรงชีวิตอยู่ด้วยความสุขสบาย โดยเหตุที่วิทยาศาสตร์ก้าวหน้าอยู่ตลอดเวลาทั้งนี้เพราะว่า วิทยาศาสตร์นอกจากจะเป็นวิชาความรู้ วิชาการแล้วยังเป็นกระบวนการหาความรู้และการปรับปรุงความรู้ที่มีอยู่ให้ถูกต้องยิ่งขึ้น ดังนั้นลักษณะอันสำคัญของวิทยาศาสตร์ก็คือความไม่หยุดนิ่ง โดยเหตุนี้เองมนุษย์จึงต้องเพิ่มพูนความรู้ทางวิทยาศาสตร์อยู่เรื่อยไป และผลรับจากการที่มีความรู้ทางวิทยาศาสตร์ คือช่วยให้สามารถตัดสินใจได้ดี ทั้งยังเป็นเครื่องมือในการทำงานเพื่อที่จะได้เข้าไปหาความจริงต่าง ๆ ซึ่งคุณประโยชน์อันนี้ไม่อาจจะหาได้จากวิชาศิลปะหรือวิชาประเภทอื่นได้เลย

2.00 ที่มาของปัญหา

ปัจจุบันนี้เป็นที่ยอมรับ มองเห็นความสำคัญ และความจำเป็นที่จะต้องศึกษาวิทยาศาสตร์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทย ซึ่งเป็นประเทศที่กำลังพัฒนา จะเห็นได้ว่าในระยะ 10 ปีที่ผ่านมาเศรษฐกิจของประเทศได้ขยายตัวเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว แต่ก็ต้องมาประสบกับปัญหามันนักวิชาการไม่พอเพียงกับความต้องการ เฉพาะอย่างยิ่งนักวิทยาศาสตร์ ทั้งวิทยาศาสตร์บริสุทธิ์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ ซึ่งปัญหานี้ปรากฏเห็นได้ชัด เป็นที่ยอมรับ และกล่าวอ้างกันโดยทั่วไป¹ สาเหตุหนึ่งในหลาย ๆ สาเหตุของปัญหานี้ คือการขาดความสนับสนุนทางการศึกษาวิทยาศาสตร์

¹ ประชุมสุข อาชวอรุณ "วิทยาศาสตร์เสรี" วิทยาศาสตร์ 7 : 565 กรกฎาคม 2511

ความหวังนี้จะเห็นได้ชัดในโรงเรียนต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรงเรียนเน่าร้างจังหวัด และโรงเรียนราษฎร² ซึ่งไม่อาจหาการสอนวิทยาศาสตร์ได้เต็มที่ เพราะขาดอุปกรณ์และ งบประมาณ นอกจากนี้ยังปรากฏว่าครูที่สอนวิทยาศาสตร์นั้นไม่มีความชำนาญพอที่จะสอนภาค ปฏิบัติการให้แก่ักเรียนได้ ทั้งนี้เพราะครูวิทยาศาสตร์มักจะได้รับกรอบบทเรียนวิชาสาร โดยการฟังปาฐกถาเป็นส่วนใหญ่

ในสาขาวิชาเคมีก็เช่นเดียวกัน การเรียนการสอนวิชาเคมีไม่ดำเนินการศึกษา ต่าง ๆ จะพบกับอุปสรรคมากมาย เช่น การขาดงบประมาณ อุปกรณ์ เหมันท์ และครูที่จะ มาสอนวิชาเคมีภาคปฏิบัติการ ในด้านเคมีภัณฑ์ส่วนใหญ่จะราคาแพง หายาก และการสั่งซื้อ ใช้เวลานาน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อินดิเกเตอร์ ซึ่งเป็นสารจำเป็นอย่างมากที่สุดสำหรับการ เรียนการสอนวิชาเคมีในเรื่องคุณภาพวิเคราะห์ และปริมาณวิเคราะห์ ปกติสารอินดิเกเตอร์ จะบ่งชี้ราคาแพง ดังตัวอย่างที่ยกมานี้

methyl orange	25	กรัม	85	บาท
congo red	25	กรัม	98	บาท
methylene blue	25	กรัม	140	บาท
phenol red	25	กรัม	240	บาท
bromphenol blue	25	กรัม	425	บาท

เพื่อที่จะขจัดปัญหาเกี่ยวกับสารอินดิเกเตอร์ จึงได้เลือกหาการแก้ไขเรื่องนี้ โดยตั้งชื่อว่า "การสกัดสารอินดิเกเตอร์จากดอกใบยางชนิด เพื่อใช้ในการสอนวิชาเคมี" สาเหตุที่ทำการศึกษานี้มี 3 ประการคือ

2.1 กองการจะช่วยเหลือโรงเรียนที่ขาดงบประมาณ อุปกรณ์ และเหมันท์ โดยการศึกษานี้ได้ใช้เครื่องมือแบบง่าย ลงทุนในราคาถูก แต่ให้ได้เหมันท์ที่มีคุณภาพดี พอที่จะนำไปใช้ประโยชน์ได้

2.2 อินดิเกเตอร์เป็นสารที่หาได้ไม่ถ่านักตามท้องตลาดและราคาแพง แม้จาก การศึกษาค้นคว้าได้ทราบว่าดอกใบชนิดต่าง ๆ มีสารอินดิเกเตอร์เป็นองค์ประกอบอยู่

² ชูดี ชัยพิพัฒน์ "ครูวิทยาศาสตร์กับการสอนวิทยาศาสตร์ภาคปฏิบัติการในโรงเรียนมัธยม" วิทยาศาสตร์ 3 : 233 - 235 มีนาคม 2508

ดังนั้นถ้าสามารถสกัดเอามาใช้ได้โดยลงทุนในราคาถูกลงกว่าทองคำ ก็จะเป็นการช่วยเหลือในค่านงงบประมาณได้

2.5 ในการศึกษาครั้งนี้แม้ว่าสกุลของไม้กอกบางชนิดอาจจะไปเข้ากับต่างประเทศที่ได้เคยทำไปแล้ว แต่ยังถือว่าได้ประโยชน์เพราะการศึกษาครั้งนี้มุ่งเอาผลไปใช้ในการเรียนการสอนและใช้ไม้กอกในประเทศไทย ดังนั้นจึงเป็นการแตกต่างกันในเรื่องเวลาดินฟ้าอากาศ สถานที่ เทคนิค และประโยชน์ที่จะได้รับ

3.00 จุดมุ่งหมายในการศึกษาค้นคว้า

3.10 เพื่อศึกษาคว้ามักอกไม้ชนิดใดบ้างที่มีสารอินดิเกเตอร์เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย โดยเลือกศึกษาจากดอกไม้ชนิดต่าง ๆ ที่หาได้ง่าย พบเห็นอยู่บ่อย ๆ หรือถ้าจำเป็นต้องซื้ออีกก็ต้องมีราคาถูก

3.20 เพื่อศึกษาดังวิธีสกัด วิธีแยกสารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้ และวิธีการทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้เครื่องมือหรือวิธีที่มีประสิทธิภาพ

3.30 เพื่อศึกษาดังวิธีสกัด วิธีแยกสารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้ และวิธีการทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้เครื่องมือหรือวิธีการแบบง่าย ลงทุนในราคาถูก โดยคำนึงว่าโรงเรียนที่ขาดงบประมาณ อุปกรณ์ และเคมีภัณฑ์ ก็สามารถที่จะสกัดสารอินดิเกเตอร์ได้เองได้

3.40 เพื่อเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างข้อ 3.20 กับ 3.30 ในด้านต่าง ๆ ดังนี้

3.4.1 ในด้านคุณภาพของสารอินดิเกเตอร์ที่ได้ออกมา โดยเฉพาะในด้านคุณภาพวิเคราะห์ และปริมาณวิเคราะห์ (การนำไปใช้)

3.4.2 ในด้านวิธีทดลอง และเครื่องมือที่ใช้

3.4.3 ในด้านราคาของการลงทุน

3.50 เพื่อศึกษาว่าสารอินดิเกเตอร์ที่ได้จากบานนั้นคืออะไร มีสมบัติอย่างไร

3.60 เพื่อเน้นให้เห็นว่าสถาบันที่ขาดงบประมาณ และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ สามารถที่จะสกัดสารอินดิเกเตอร์จากธรรมชาติขึ้นใช้เองได้ โดยวิธีการแบบง่าย

4.00 ความสำคัญของการศึกษากันคว้า

4.10 ผลของการศึกษากันคว้าในเรื่องนี้ จะทำให้ครูและอาจารย์ผู้สอนวิชาเกมในสถาบันการศึกษาทุกระดับ ได้ทราบว่ามีการออกแบบชนิดใจหรือลักษณะใดบ้างที่มีสารอินดิเกเตอร์ที่เหมาะสมมาใช้ในการเรียบเรียงเกม และอินดิเกเตอร์ที่อยู่ในเกมเหล่านั้นก็อะไร มีสูตรทางเกมอย่างไร และมีคุณสมบัติอะไรบ้าง

4.20 ผลของการศึกษากันคว้าในเรื่องนี้ ทำให้ทราบถึงวิธีสังเกต วิธีแยก วิธีทำให้บริสุทธิ์ และวิธีนำเอาสารอินดิเกเตอร์ดังกล่าวนี้ไปใช้เป็นตัวบอกถึงการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของสาร* ซึ่งครูและอาจารย์ผู้สอนวิชาเกมจะสามารถสังเกตขึ้นเอง และนำไปใช้ให้เป็นประโยชน์ได้

4.30 เทคนิคและวิธีทดลองต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษากันคว้าในเรื่องนี้สามารถนำไปใช้ในการเรียนการสอนวิชาเกมภาคปฏิบัติการในระดับมัธยมศึกษาตอนปลายและระดับอุดมศึกษาได้

4.40 ผลของการศึกษากันคว้าจะสามารถช่วยเหลือสถาบันการศึกษาต่าง ๆ ที่ขาดงบประมาณ เครื่องมือ และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

5.00 ขอบเขตของการค้นคว้า

5.10 ออกใบที่อยู่ในขอบข่ายที่จะทำการศึกษามีทั้งหมด 30 ชนิด (ดูรายชื่อในการร่างที่ 1 หน้า 34) แต่จะคัดเลือกศึกษาเพียงบางชนิดโดยยึดหลักการคัดเลือกดังนี้

- 5.1.1 หาได้ง่ายในทุกภาคของประเทศไทย
- 5.1.2 นิยมปลูกตามบ้านหรือขึ้นอยู่ทั่วไป
- 5.1.3 ถ้าจำเป็นต้องซื้อก็ต้องมีราคาถูก
- 5.1.4 มีปริมาณของอินดิเกเตอร์ในดอกมากพอควร

5.20 วิธีการที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าแบ่งออกเป็นสองประเภทคือ

* ตาม concept เกมเรียกว่า "การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสาร" แต่ปัจจุบันนี้ไม่สามารถแบ่งแยกออกไปได้ว่า อะไรเป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมี อะไรเป็นการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ดังนั้นจึงขอใช้คำว่า "การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของสาร" แทน

5.2.1 วิธีการที่ประสิทธิภาพ ใช้เครื่องมือและเคมีภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพสูง เพื่อให้ผลลัพธ์จากการทดลองเป็นที่เชื่อถือได้

5.2.2 วิธีการแบบง่าย ใช้เครื่องมือและเคมีภัณฑ์แบบง่ายราคาถูก โดยคำนึงว่าโรงเรียนที่ขาดอุปกรณ์ และเคมีภัณฑ์ก็สามารถทำการทดลองได้

5.30 มุ่งเอาผลของการศึกษาค้นคว้าไปใช้ในด้านคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative analysis) และปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analysis) ในการเรียนการสอนวิชาเคมี

5.40 การศึกษาว่าสารอินดิเคเตอร์ที่ได้ออกมานั้นก็อะไรจะขึ้นอยู่กับเครื่องมือและเทคนิค 3 ประเภทคือ

5.4.1 ข้อมูลจาก Spectronic 20

5.4.2 ข้อมูลจาก paper chromatography

5.4.3 ข้อมูลจาก color reaction test

6.00 คำนิยามและศัพท์เฉพาะ

วิทยาศาสตร์³ (Science) หมายถึงวิชาความรู้เกี่ยวกับธรรมชาติและปรากฏการณ์ในธรรมชาติที่มนุษย์ได้สะสมกันมาตั้งแต่อดีต ปัจจุบัน ไปจนอนาคตอย่างไม่มีที่สิ้นสุด เป็นการศึกษาที่ว่าด้วยสิ่งต่าง ๆ ในธรรมชาติที่เล็กที่สุดไปจนถึงสิ่งที่ใหญ่ที่สุดว่ามีความเป็นมาอย่างไร มีพฤติกรรมอย่างไร มีระเบียบแบบแผนหรือไม่ เป็นความรู้และข้อเท็จจริงที่สามารถทดสอบได้ เมื่อใดเห็นว่าหลักเกณฑ์ใดไม่เป็นจริง หลักเกณฑ์ข้อนั้นก็ถูกยกเลิกไป หรือถูกใช้อยู่ในวงจำกัด ข้อเท็จจริงหรือหลักเกณฑ์ต่าง ๆ ทางวิทยาศาสตร์จะเป็นจริงชั่วระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น (relative truth) และจะไม่เป็นจริงตลอดไป (absolute truth)

เคมี⁴ (Chemistry) เป็นวิทยาศาสตร์แขนงหนึ่งที่กล่าวถึงเรื่องราวและ

³ สิบปนนท์ เกตุทัต "วิทยาศาสตร์" วิทยาศาสตร์ 11 : 918 พฤศจิกายน 2511

⁴ ทองสุข พงศ์ทัต เคมีชั้นเตรียมอุดมศึกษา หน้า 1 พ.ศ. 2503

พฤติกรรมของสารทุกชนิด ว่าสารประกอบขึ้นเป็นตัวใดอย่างไร มุ่งประกอบอะไรบ้าง และยังกล่าวถึงปรากฏการณ์ทั้งหลายที่เกิดขึ้นเมื่อสารทุกชนิดทำปฏิกิริยาซึ่งกันและกัน

อินดิเคเตอร์⁵ (Indicator) คือสารประกอบชนิดหนึ่งซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารประกอบอินทรีย์ (organic compound) ที่มีฤทธิ์เป็นกรด เป็นกลาง หรือเป็นด่างอ่อน และสารประกอบชนิดนี้สามารถเปลี่ยนสีได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่ต่างกัน

Acid-Base Indicator⁶ คือสารอินดิเคเตอร์ชนิดที่ใช้บอกถึงปริมาณของกรด (หรือด่าง) ที่ถูกทำให้สะท้อนด้วยด่าง (หรือกรด) โดยการเปลี่ยนสี

วิธีการที่มีประสิทธิภาพ คือวิธีทดลองที่ทำให้ผลการทดลองที่ได้รับแน่นอนใกล้เคียงกับความเป็นจริงและเชื่อถือได้ โดยใช้เครื่องมือที่มีประสิทธิภาพและเคมีภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง

วิธีการแบบง่าย คือวิธีทดลองแบบง่ายโดยใช้เครื่องมือและเคมีภัณฑ์แบบง่ายซึ่งสามารถจัดหาได้ในราคาถูก หรือเป็นวัสดุที่ใกล้เปลา

⁵ Rose, Arthur, and Rose, Alizabeth, "The Condensed Chemical Dictionary," p. 589, 1962.

⁶ "International Encyclopedia of Chemical Science," p. 581, 1964.

ประวัติ และทฤษฎีเกี่ยวกับอินดิเคเตอร์

1.00 ประวัติ

อินดิเคเตอร์เป็นสารที่รู้จักกันมานานแล้ว เริ่มตั้งแต่ ค.ศ. 1664 Robert Boyle¹ ได้รายงานว่า เมื่อเอาน้ำเชื่อมสีม่วงที่สกัดได้จากกลีบดอกไม้หยดลงไปบนกระดาษสีขาว 1 หยด จากนั้นให้หยดน้ำส้มหรือกรดอื่น ๆ ลงไปบนจุดนี้อีก 2 - 3 หยด จะพบว่าน้ำเชื่อมดังกล่าวนี้เปลี่ยนเป็นสีแดง ในทางตรงข้ามถ้าหยดสารพวก่างางไปจะก่อให้เกิดเฉียว จากการทดลองดังกล่าวนี้เองจึงทำให้นักเคมีในยุคนั้นและยุคต่อมาได้ใช้น้ำเชื่อมจากกลีบดอกไม้เป็นเครื่องชี้ถึงความเป็นกรดเป็นด่างของสารต่าง ๆ "นอกจากนี้ยังได้พบว่าอินดิเคเตอร์จากดอกไม้วดังกล่าวนี้เมื่ออยู่ในสารละลายที่เป็นกรดจะให้สีแดงใน สารละลายที่เป็นกลางจะให้สีม่วง และในสารละลายที่เป็นด่างจะให้สีม่วงหรือเฉียว"² จากคุณค่าของสารอินดิเคเตอร์ดังกล่าวนี้เองจึงทำให้นักเคมีในระยนั้นหันมาสนใจและค้นคว้าหาสารอินดิเคเตอร์มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามก็ยังไม่สามารถที่จะบอกรายละเอียดต่าง ๆ เกี่ยวกับพฤติกรรมของสารอินดิเคเตอร์ได้มากนักเพราะยังขาดพื้นฐานของความรู้ทางเคมีอีกมาก ต่อมาในปี ค.ศ. 1887 S. Arrhenius³ ได้ตั้งทฤษฎีเกี่ยวกับการแตกตัวเป็นประจุไฟฟ้าของสารต่าง ๆ (Theory of Electrolytic Dissociation) ซึ่งทำให้สามารถอธิบายถึงพฤติกรรมของสารเมื่ออยู่ในรูปของสารละลายได้ อีก 7 ปีต่อมา (1894) Oswald⁴ ได้ตั้งทฤษฎีเกี่ยวกับการไอออนไนส์ของสารอินดิเคเตอร์ (Ionic Theory of Indicator) เขากล่าวว่า acid-base indicator คือสารประกอบอินทรีย์ที่มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน เป็นกลาง หรือเป็นด่างอ่อน ซึ่งสีของโมเลกุลที่ไม่แตกตัว (undissociated molecule) จะแตกต่างกับสีของ ions ของมัน ผลของทฤษฎีนี้ทำให้นักเคมีได้เข้าใจถึงพฤติกรรมและลักษณะของสารอินดิเคเตอร์ได้มากขึ้น จึงได้เริ่มทำการศึกษากันอย่างกว้างขวางได้ค้นพบ

¹ "Encyclopedia Britannica," vol.2, p.24, 1964.

² "Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology," vol.11, p.548, 1966.

³ Alexyev, V., "Quantitative Analysis," p.217-223, 1963.

⁴ Ibid.

และสังเคราะห์สารอินดิเกเตอร์ต่าง ๆ ขึ้นมากมาย เช่น litmus, methyl orange, phenolphthalein, thymolblue เป็นต้น ปัจจุบันนี้เราพบสารอินดิเกเตอร์ที่มีอยู่ในธรรมชาติและที่สังเคราะห์ขึ้นเองมากมาย

สารอินดิเกเตอร์ที่ได้จากสิ่งต่าง ๆ ของพืชเริ่มค้นจากการสังเคราะห์ของ Robert Boyle (1664) และ Neneiah Gräv⁵ (1750) หลังจากนั้นก็ยังมีนักเคมีอีกหลายคนได้กระทำกันมา เช่น Berzelius⁶ (1837), Morot⁷ (1850), Hies⁸ (1889), Glan⁹ (1892) และ Griffiths¹⁰ (1902) ซึ่งบุคคลเหล่านี้ได้ประสบความสำเร็จในการแยกและนำสารสีจากดอกไม้ให้บริสุทธิ์ได้ความวิธีต่าง ๆ กัน จากผลงานของ Fies กับ Glan นี้ได้แสดงให้เห็นว่า anthocyanins ซึ่งเป็นสารที่สีจากดอกไม้ชนิดนี้ glucosides ที่ปราศจาก nitrogen เข้ามาคอยู่ด้วย ทั้งความจริงอันนี้ได้รับการสนับสนุนอย่างเด่นชัดจากการทดลองของ Molisch¹¹ (1905) นอกจากนั้น Molisch ยังได้แสดงให้เห็นว่า anthocyanins ที่อยู่ในกลีบดอกไม้ชนิดนี้อยู่ในรูปของเกลือ และมีอยู่ทั้งที่กลีบดอกไม้จะออกมาเกาะอยู่ที่ผิวของกลีบดอกไม้ภายนอกได้ การทดลองดังกล่าวดังของ Molisch ได้ถูกนักเคมีหลายคนนำไปทดลองซ้ำก็ให้ผลออกมาเช่นเดียวกัน นอกจากนั้นยังได้มีการปรับปรุงวิธีการของ Molisch ให้ดียิ่งขึ้นอีกด้วย

ในระหว่างปี 1913 - 1917 Richard Willstätter¹² กับเพื่อนร่วมงานได้ทำการศึกษาให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ถึงสมบัติของ anthocyanins จากกลุ่ม -

⁵ Encyclopedia Britannica, 9th ed., p.24.

⁶ Robinson, L., Endeavour, 1, 92(1942)

⁷ Ibid.

⁸ Ibid.

⁹ Ibid.

¹⁰ Ibid.

¹¹ Robinson, R., Nature, 135, 732 (1935)

¹² Willstätter, R., Naturwiss., 20, 601(1932).

ดอกไม้หลายชนิด ซึ่งเทคนิคที่ใช้นั้นแตกต่างกันออกไปตามลักษณะของดอกไม้แต่ละชนิด แต่อย่างไรก็ตามขบวนการทดลองส่วนใหญ่ก็หลักอันเดียวกันคือสารมีสีที่แยกออกมาให้นั้นอยู่ในรูปของเกลือของกรดในสารละลายนั้น กลีบดอกไม้ที่เขานำมาสกัดนั้นต้องทำให้แห้งจากนั้นนำไปสกัดด้วย methanolic หรือ ethanolic hydrogen chloride 1% หรืออาจจะใช้ acetic acid crude pigment ที่ได้ทำให้ตกตะกอนด้วยการเติม ether ให้มีปริมาณมากหลาย ๆ เท่า กระทำขบวนการนี้ซ้ำหลาย ๆ ครั้ง จากนั้นนำ anthocyanin chloride ที่ได้ไปตกผลึกใน aqueous หรือ alcoholic hydrogen chloride 1% ในบางโอกาสอาจจะใช้ picrate หรือ derivative อื่น ๆ มาช่วยในการแยกและเป็น intermediate stage ของการทำให้บริสุทธิ์ได้อีกด้วย โดยวิธีนี้เราสามารถแยก anthocyanin จากดอกข้าวโพดสีม่วงดำ ดอกกุหลาบสีแดง และดอกรักเร่สีแดง ออกมาในลักษณะบริสุทธิ์ได้ และจากการทดลองต่อไปเขาพบว่าดอกไม้ทั้งสามชนิดนี้มี antnocyannin ชนิดเดียวกันคือ cyanin chloride ซึ่งเป็นสารที่ละลายใน aqueous hydrochloric acid 0.5% ได้น้อยมาก เมื่อทำให้ตกผลึกจะได้ออกมาเป็นรูป "rhombic leaflets" หรือ "microscopic needles"^{13,14}

ต่อมาในระหว่างปี 1926 - 1940 Robinson¹⁵ กับเพื่อนร่วมงานหลายคน ได้ทำการสังเคราะห์ anthocyanin โดยอาศัยปฏิกิริยา condensation reaction ในครั้งแรกเขาได้ทำการสังเคราะห์ anthocyanidins ก่อน (1926-1932) ต่อจากนั้นจึงหันมาทำการสังเคราะห์ anthocyanins จากผลของการศึกษาค้นคว้าของเขาทำให้ได้รายละเอียดเกี่ยวกับลักษณะและโครงสร้างของ anthocyanins มากขึ้น ในระยะนี้ประโยชน์ของสาร anthocyanin ในด้านอินดิเคเตอร์ได้ลดน้อยลงไปเพราะได้มีการสังเคราะห์อินดิเคเตอร์ชนิดอื่น ๆ ที่ให้ผลดีกว่ามาใช้แทน และต่อมาการใช้สารอินดิเคเตอร์เริ่มลดลงเพราะหันมาใช้เครื่องมือแทนเช่น pH-meter เป็นต้น

¹³ Pummerer, R., Naturwiss, 20, 602(1932).

¹⁴ Robinson, R., Naturwiss, 20, 608(1932).

¹⁵ Robinson, R., loc. cit.

ในปี 1948 Bate-Smith¹⁶ ได้นำเอา chromatography เข้ามาใช้ในการแยก (separation) การทำใหบริสุทธิ์ (purification) และการพิสูจน์ (identification) สาร anthocyanin จึงได้มีการหาเทคนิคต่าง ๆ เกี่ยวกับ chromatography ที่จะทำให้การ ศึกษาเกี่ยวกับสาร anthocyanins ได้เหมาะสม รวดเร็ว และเชื่อถือได้มากยิ่งขึ้น

3.00 ทฤษฎีเกี่ยวกับสารอินดิเคเตอร์

2.10 คำนำ

เป็นที่ทราบโดยทั่วกันว่าจุดที่สารสีบางชนิดทำปฏิกิริยากันพอดีนั้นมักจะมองไม่เห็น การเปลี่ยนแปลงใด ๆ เกิดขึ้น ตัวอย่างเช่น การ titrate ทาปริมาตรของกรดโดยใช้ด่าง ซึ่งนิยมใช้สารอินดิเคเตอร์ใส่ลงใน system เพื่อใช้เป็นตัวบอกถึงจุดที่สารทำปฏิกิริยากันพอดี โดยสังเกตจากการเปลี่ยนสี อินดิเคเตอร์แต่ละชนิดจะมีช่วง pH ของการเปลี่ยนแปลงสีแตกต่างกันออกไป ซึ่งสิ่งนี้เป็นสมบัติเฉพาะตัวของอินดิเคเตอร์และนอกจากนี้ ยังขึ้นอยู่กับธรรมชาติของความเป็นกรด-ด่าง ของมันอีกด้วย ถ้าจะคิดกันให้ละเอียดจริง ๆ แล้วจะพบว่าจุดที่อินดิเคเตอร์เปลี่ยนสี (end point) กับจุดที่สารทำปฏิกิริยากันพอดี (equivalent point) นั้นไม่ตรงกัน และช่องว่างระหว่างจุดทั้งสองนี้มีผลทำให้

- ๐ ขบวนการหาปริมาตรของสาร เกิดความคลาดเคลื่อน สำหรับอินดิเคเตอร์ชนิดหนึ่งกับ titrant คู่หนึ่ง ๆ ความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นนี้จะคงที่¹⁷ (constant error) ซึ่งนิยมเรียกกันว่า "Indicator error"¹⁸ ถ้าอินดิเคเตอร์ที่เลือกมานั้นเมื่อตรวจความคลาดเคลื่อนแล้วปรากฏว่ามีมากจนเกินขอบเขตที่น่าเชื่อถือในงานคำนวณวิเคราะห์ได้ ตัวอย่างเช่น methyl orange¹⁹ เมื่ออยู่ในกรดจะให้สีส้มและในด่างจะให้สีเหลือง ถ้านำไปใช้ในการ titrate ระหว่าง 0.1 N sodium hydroxide กับ 0.1 N acetic acid โดยใช้ sodium hydroxide เป็น titrant เมื่อ titrate จนกระทั่ง methyl orange

¹⁶ Bate-Smith, E.C., Nature, 161, 835 (1948).

¹⁷ Chem Study, "Laboratory Manual for Chemistry," p.114, 1964.

¹⁸ Alexyev, A., op. cit., p.215-216.

¹⁹ Rose, Arthur, and Rose, Elizabeth, "The Condensed Chemical Dictionary," p.723, 1953.

เปลี่ยนเป็นสีเหลืองแล้วลองตรวจความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นจะพบว่า acetic acid เพียง
จะถูก neutralized ไปได้เพียง 15% เท่านั้น และ indicator error มีถึง 85%
นอกจากนี้ ยังพบกับปัญหายิ่งยากเกี่ยวกับช่วงของการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์อีกด้วย
คือใน system เดียวกันนี้จะต้องใช้ sodium hydroxide ถึง 4.0 ml. ในการที่จะ
ให้สีของ methyl orange เปลี่ยนจากสีส้มไปเป็นสีเหลือง ผลก็คือทำให้ค่าที่ได้จากการหา
ปริมาณแต่ละครั้งแตกต่างกันมาก จากตัวอย่างที่ยกมานี้แสดงให้เห็นว่าการเลือกใช้อินดิเคเตอร์
ชนิดที่ไม่เหมาะสมย่อมทำให้การทดลองเกิดข้อผิดพลาดได้ ในทางตรงข้ามถ้าเลือก
อินดิเคเตอร์ได้เหมาะสมก็จะทำให้การทดลองได้ผลดียิ่งขึ้น เช่นใน system เดียวกันนี้ถ้า
กล่าวนี้แก้ไข phenolphthalein²⁰ เป็นอินดิเคเตอร์ จะพบว่าเพียง 1 หยดของ 0.1M
ของ sodium hydroxide ก็สามารถทำให้สีของ phenolphthalein เปลี่ยนอย่างรวดเร็ว
เร็ว และจากการคำนวณ พบว่า indicator error ที่เกิดขึ้นมีเพียง 0.02% เท่านั้น

2.20 ความหมายและชนิดของสารอินดิเคเตอร์

อินดิเคเตอร์²¹ คือสารประกอบชนิดหนึ่งซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีสี
และสีของมันจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่ต่างกัน การเปลี่ยนแปลงสีของมัน
ช่วยบอกพฤติกรรมของสารบางชนิดได้ จากพฤติกรรมและหน้าที่ของอินดิเคเตอร์แบ่งออกได้
เป็น 9 ชนิด คือ²²

2.2.1 Acidometric Indicator เป็นอินดิเคเตอร์ที่ได้จากการเอา
อินดิเคเตอร์หลาย ๆ ชนิดมาผสมกันเพื่อใช้ในการหาปริมาณของสารใน system ที่มีสีเมื่อถึง
end point acidometric indicator มันจะให้สีที่แตกต่างไปจากสีของสารละลายใน system

2.2.2. Adsorption Indicator เป็นอินดิเคเตอร์ที่ใช้ในการ titrate

²⁰ Ibid., p.1094.

²¹ Ibid., p.589.

²² "International Encyclopedia of Chemical Science," p.580-581, 1964.

ที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลง colloidal condition ของ system ส่วนใหญ่จะใช้กับ precipitation titration กล่าวคือเมื่อถึงจุดที่มีตะกอนเริ่มเกิดครั้งแรกนั้นจะน้อยมาก ไม่อาจจะสังเกตได้ชัด เมื่อเติมอินดิเคเตอร์ชนิดนี้ลงไปตะกอนที่เกิดขึ้นนั้นจะดูดเอา อินดิเคเตอร์ซึ่งเป็นสารที่มีสีเข้าไว้ในตัวมัน ผลก็คือทำให้เกิดตะกอนมีสีเกิดขึ้น ซึ่งง่ายต่อการสังเกต

2.2.3. External Indicator (outside indicator) เป็นอินดิเคเตอร์ที่ใช้อยู่นอก system เช่นใส่ไว้ใน spot plate เพื่อจะหา end point ถิ่นสารละลายจาก system มาหยกใน spot plate ที่มีอินดิเคเตอร์ แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงสี

2.2.4 Fluorescence Indicator เป็นอินดิเคเตอร์ที่ใช้แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ system โดยการแสดงออกในรูปของการเพิ่มเต็มหรือลดการเรืองแสง

2.2.5 Neutralisation Indicator (acid-base indicator) คืออินดิเคเตอร์ที่ใช้ในการ titrate ระหว่าง กรด - ด่าง เมื่อถึง end point อินดิเคเตอร์ที่ใส่ลงไปจะเกิดการเปลี่ยนสี

2.2.6 Oxidation-Reduction Indicator คือสารที่ใส่ลงไปใน system ของการ titrate เกี่ยวกับ redox reaction เมื่อถึงจุดที่มีการเปลี่ยนแปลง oxidation potential บาง ๆ อินดิเคเตอร์ที่ใส่ลงไปนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสี

2.2.7 Turbidity Indicator เป็นอินดิเคเตอร์ที่ใส่ลงไปเพื่อแสดงจุด end point โดยการทำให้ความขุ่นของสารละลายใน system หมกไป หรือทำให้ความขุ่นในสารละลายนั้นเกิดการรวมตัวกันแล้วเกิดเป็นตะกอน อินดิเคเตอร์ประเภทนี้เรามักใช้กับสารพวก colloid

2.2.8 Universal Indicator เป็นสารผสมของอินดิเคเตอร์หลายชนิดที่ pH ต่าง ๆ อินดิเคเตอร์ชนิดนี้จะให้สีที่แตกต่างกันออกไป

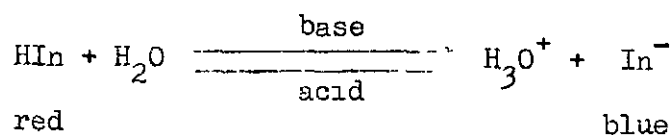
2.30 พฤติกรรมของสารอินดิเคเตอร์

2.3.1 Ionic Theory of Indicator²³

²³Alexyev, V., op.cit., p.217-223.

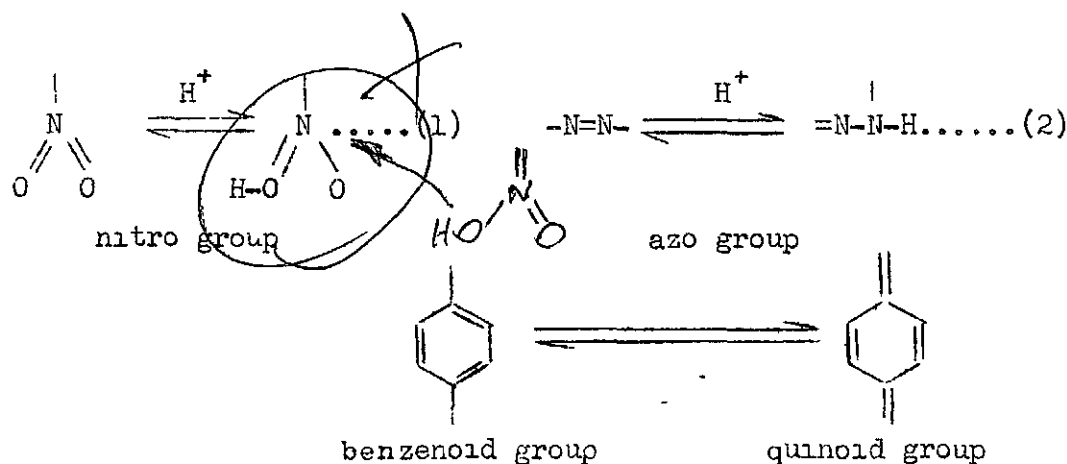
เท่าที่กล่าวมาแล้วจะเห็นได้ว่าสารอินดิเคเตอร์มีความสำคัญอย่างมากกับ volumetric analysis แต่อย่างไรก็ตามจนปลายคริสต์ศตวรรษที่ 19 การกำหนดและการสังเคราะห์สารอินดิเคเตอร์ก็ยังคงเป็นของใหม่และเป็นเพียงการเริ่มต้นเท่านั้น ทั้งนี้เพราะว่าทฤษฎีทางเคมีของอินดิเคเตอร์ในสมัยนั้นขาดช่วงไม่ต่อเนื่องกัน และยังขาดพื้นฐานทางทฤษฎีของอินดิเคเตอร์ที่จะมาช่วยอธิบายพฤติกรรมของมันได้

Electrolysis Dissociation Theory ได้เริ่มขึ้นเมื่อปี ค.ศ. 1887 โดย S. Arrhenius หลังจากนั้นอีก 7 ปี Oswald ก็ได้เสนอ Ionic Theory of Indicator ซึ่งทฤษฎีนี้ มีใจความว่า acid-base indicator เป็นสารอินทรีย์ที่มีฤทธิ์เป็นกรดหรือด่างอ่อน ๆ ซึ่งสีของโมเลกุลที่ไม่แตกตัวจะต่างกับสีของ ion ของมัน ตัวอย่างเช่น litmus ในกรดจะมีโมเลกุลที่ไม่แตกตัวอยู่เป็นจำนวนมาก โมเลกุลนี้มีสีแดง และในขณะที่มีมันอยู่ในรูปของ ions มันจะมีสีน้ำเงิน ถ้าในสภาวะที่มีตัวทำละลายเป็นน้ำสามารถเขียนแทนด้วยสมการได้ดังนี้



เมื่อเอา litmus ละลายในน้ำ (pH 7) จะมีปริมาณของโมเลกุลที่ไม่แตกตัวเท่ากับจำนวน ions ของมัน จะได้มีการละลายเป็นสีม่วง (แดง + น้ำเงิน) ถ้าหยดกรดลงไปก็จะทำให้สมดุล (equilibrium) เคลื่อนมาทางซ้าย ผลก็คือทำให้มีโมเลกุลที่ไม่แตกตัว (สีแดง) ของ litmus มากขึ้น ในทางตรงข้ามถ้าเติมด่างลงไป hydroxyl ion จากด่างจะไปรวมกับ hydronium ion (H_3O^+) กลายเป็นน้ำซึ่งเป็นการทำลายสมดุล ดังนั้นโมเลกุลที่ไม่แตกตัวของ litmus จะต้องแตกตัวเป็น ions มากขึ้นทั้งนี้เพื่อให้สมดุล (equilibrium) คงที่อยู่เสมอ ผลก็คือทำให้มี ions (สีน้ำเงิน) ของ litmus มากขึ้น อินดิเคเตอร์บางชนิดมีเพียง form เดียวที่มีสี เช่น phenolphthalein พฤติกรรมแบบนี้ใช้ Ionic Theory of Indicator อธิบายได้ในทำนองเดียวกัน

2.3.2 Chromophore Theory²⁴ การนำเอา Ionic Theory of Indicator มาใช้อธิบายถึงพฤติกรรมของอินดิเคเตอร์ สำหรับเหตุการณ์ในปัจจุบันนี้ยังเห็นว่าเป็นเหตุผลที่อ่อนบาง เพราะ Ionic Theory of Indicator นั้นกล่าวอย่างกว้างและผิวเผินเกินไป เพื่อที่จะให้เข้าใจเกี่ยวกับพฤติกรรมของสารอินดิเคเตอร์อย่างลึกซึ้ง ดังนั้นต่อมาจึงได้มีหลักฐานจากการทดลองมายืนยันว่า Ionic Theory of Indicator กำลังจะมาแคว้ง ดังนั้นจะนำมาอธิบายถึงการเปลี่ยนสีของสารอินดิเคเตอร์ยังไม่ถูกต้องทั้งหมด ทั้งนี้เพราะการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์เป็นผลสืบเนื่องมาจากบางส่วนของ structure ของมันเกิดการจัดเรียงตัวภายในกันใหม่ การค้นพบอันนี้ทำให้ความเข้าใจได้มากยิ่งขึ้น ชื่อของ Chromophore Theory ได้มาจากชื่อของสีของสารอินทรีย์ชนิดที่มี group ที่ติดอยู่กับโมเลกุลของมันเป็น group ที่มี double bond อยู่ด้วย เรียกว่า "Chromophores"²⁵ ได้แก่ nitro group และ azo group ซึ่งสามารถอยู่ได้ 2 forms นอกจากนี้ quinoid group ยังถือว่าเป็นส่วนสำคัญของ chromophores อีกด้วย



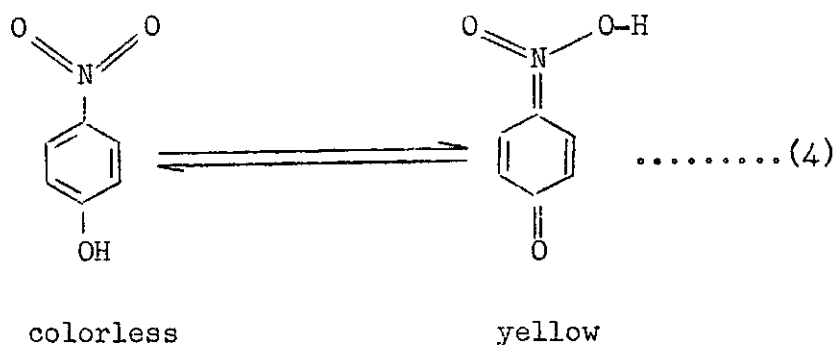
นอกจากนี้อาจจะกล่าวได้อีกว่าสีของสารอินทรีย์นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของ groups ต่าง ๆ ในโมเลกุลของมันอีกด้วย ซึ่ง groups เหล่านี้ไม่จำเป็นต้องมี double bond ซึ่งเรียกว่า "Auxochromes"²⁶ group ที่สำคัญของ auxochrome ที่จะทำให้เกิดสีคือ

²⁴ Ibid.

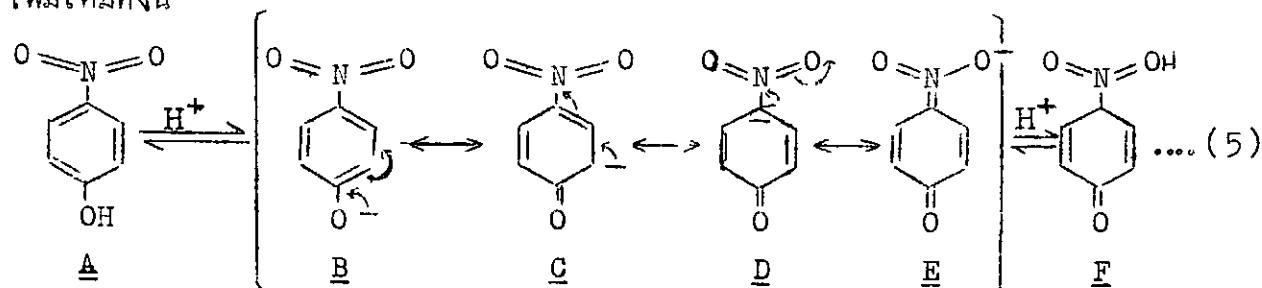
²⁵ Ibid.

²⁶ Ibid.

hydroxyl group ($-\text{OH}$) amino group ($-\text{NH}_2$) diethyl amino group ($-\text{N}(\text{CH}_3)_2$) diethyl amino group ($-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$) ทั้ง auxochrome และ chromophore นั้นก็ต่างช่วยให้สารอินทรีย์มีสีเกิดขึ้น ถ้าโมเลกุลของสารอินทรีย์มีการเข้ามาเกาะหรือหลุดออกไปของ auxochrome หรือ chromophore ก็จะทำให้เกิดการเปลี่ยนสี ขบวนการเปลี่ยนกลับไปกลับมาเรียกว่า "Tautomerism"²⁷ ตัวอย่างเช่น tautomerisation ของ p-nitrophenol(4) ดังนี้



2.3.3 Resonance Theory²⁸ จากสภการที่ 4 แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนจาก benzene nucleus ไปเป็น quinoid nucleus มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนสี แต่อย่างไรก็ตามการเขียนสมการดังกล่าวยังไม่มีเหตุผลสนับสนุนเพียงพอ ดังนั้นจึงต้องนำเอา resonance concept เข้ามาช่วยอธิบายเพื่อให้เข้าใจถึง mechanism ของการเกิด tautomerism ดังกล่าวนี้ด้วย ซึ่งอธิบายโดยวิธีการเขียน resonance hybrid เพิ่มเติมดังนี้



²⁷ Ibid.

²⁸ Sykes, P., "A Guidebook to Mechanism in Organic Chemistry," p.1-37. 1964.

จากสมการที่ 5 แสดงรายละเอียดของ tautomerism ของ p-nitrophenol structure A เป็นคาร์ที nitro group และ hydroxyl group มาต่อกับ benzene nucleus nitro group เป็น group ที่มี electronegativity สูงมาก ทั้งนี้เนื่องจาก oxygen 2 atom ที่ต่อกับ benzene nucleus จะดึง electron เข้าหาตัวได้มาก ผลก็คือ electron density ภายใน benzene nucleus ไปหนาแน่นอยู่ที่ nitro group ทั้งนี้เนื่องจาก mesomeric effect²⁹ และทำให้ electron density ที่ hydroxyl group น้อยลง ผลก็คือทำให้ hydroxyl group เป็น negative น้อยลง ซึ่งจะช่วยให้ proton (H^+) จาก hydroxyl group หลุดออกได้ง่าย จึงทำให้เกิดการแตกตัวของประจุ หลังจากนั้นจะเกิด delocalisation ของ negative charge โดยผ่าน benzene nucleus ไปสู่ nitro group (structure B, C, D) ในที่สุดจะได้ structure E ซึ่งจะเห็นได้ว่า nitro group นั้นมี negative charge บวกอยู่มาก ผลก็คือมันมีความสามารถที่จะรับ proton (H^+) ได้ง่าย ซึ่งจะได้ structure F เมื่อพิจารณาารวบรวมทั้งหมดจะเห็นได้ง่ายกว่าเกิดการเคลื่อนที่ของ proton (H^+) จาก hydroxyl group ไปสู่ nitro group

การนำเอา resonance concept มาช่วยอธิบายในการเกิด tautomerism ของสารนี้จะช่วยให้เกิดความเข้าใจอย่างลึกซึ้งและทำให้ Chromophore Theory มีน้ำหนักมากขึ้น

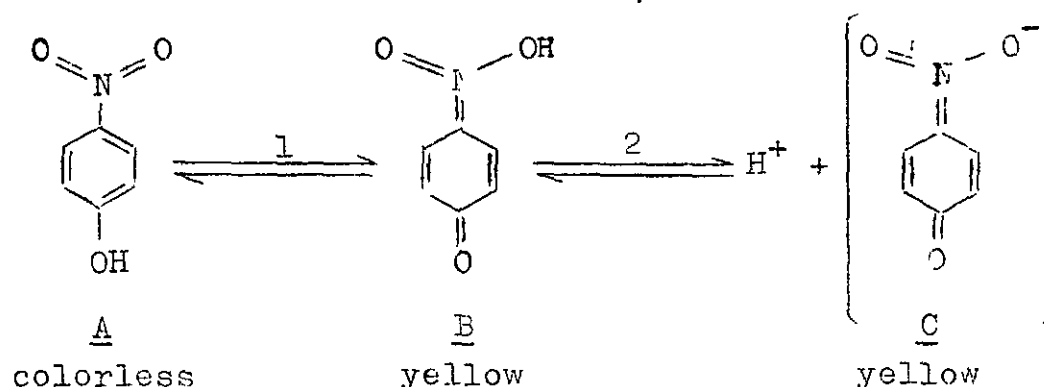
2.3.4 ความสัมพันธ์ระหว่าง Ionic Theory กับ Chromophore Theory

การอธิบายในตอนก่อนเกี่ยวกับการเกิดสีของอินดิเกเตอร์โดย Ionic Theory กับ Chromophore Theory นั้นไม่เหมือนกัน แต่ก็ไม่มีข้อมูลอะไรที่จะมาลบล้างทฤษฎีอันหนึ่งอันใดออกไปได้ และในทางตรงข้ามทฤษฎีทั้งสองนี้ต่างก็สนับสนุนซึ่งกันและกันอีกด้วย

ถ้ายอมรับว่าการที่อินดิเกเตอร์เกิดการเปลี่ยนสีนั้นเนื่องมาจากการเปลี่ยนโครงสร้างภายใน ดังนั้นปัญหาที่ติดตามากก็คือ ทำไมจึงเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง คำตอบที่สำคัญสำหรับคำถามอันนี้จะต้องเอา Ionic Theory เข้ามาเกี่ยวข้องคือ

²⁹ Ibid.

หนึ่งหรือทั้งสอง tautomeric forms ของ acid-base indicator เป็น weak organic acid หรือ weak organic base ย่อมที่จะเกิดการ ionization ได้ เช่น p-nitrophenol ในสารละลายของกรดจะมี tautomer เป็นสีเหลืองซึ่งมี hydroxyl group (-OH) เป็นส่วนหนึ่งของ nitro group ($O=N-OH$) ซึ่งเป็นส่วนที่เป็น oxidised nitrogen atom คล้ายกับ nitric acid ($O=N(O)H$) หรือ nitrous acid ($O=N-OH$) ดังนั้น p-nitrophenol จึงมีสมบัติเป็นกรด ก็สามารถให้ proton (H^+) ใน aqueous solution ได้ ดังนั้นมันจึงมี equilibrium ได้ 2 จุดคือ



สมดุล 1 ระหว่าง tautomers

สมดุล 2 ระหว่าง dissociation

ลักษณะของสมดุลดังกล่าวนี้ทำให้ง่ายต่อการอธิบายถึงการเกิดปฏิกิริยาเคมีของมันเป็น ถ้าสารละลายเป็นสีเหลืองแสดงว่า p-nitrophenol จะคงอยู่ใน form C และที่สมดุลก็ต้องมีโมเลกุลที่ไม่แตกตัว (form B) อยู่น้อยด้วย เมื่อเติมกรดลงไปก็จะเป็นการดึงเอาสมดุล 2 ให้ไปอยู่ทางซ้ายมือเพราะ anion C จะรวมตัวกับ proton (H^+) ที่ได้จากกรดกลายเป็นโมเลกุลที่ไม่แตกตัวการเปลี่ยนในขั้นนี้จะไม่มีการเปลี่ยนสีแต่อย่างใด แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่ม form B ก็ย่อมจะทำให้สมดุล 1 เปลี่ยนไปด้วยก็อย่างบางส่วน form B จะกลับมามีอยู่ใน form A ซึ่งเป็น tautomer ที่ไม่มีสี ดังนั้นปรากฏการณ์ที่สังเกตเห็นได้ก็คือสีเหลืองจะหายไป และปรากฏการณ์นี้จะเกิดในทางตรงข้ามถ้าเติบด่างลงไปใน system

จะเห็นได้ว่าทั้งสองทฤษฎีนี้มีความสัมพันธ์กันอย่างแน่นแฟ้น ดังนั้นต่อไปจึงได้รวมสองทฤษฎีนี้เข้าด้วยกันเรียกว่า "Ionic-chromophore Theory of Indicator"³⁰ จากผลอันนี้ทำให้ได้ข้อคิดที่ว่า ไม่ว่า dissociation จะเกิดขึ้นเมื่อไรก็ตาม tautomerism ย่อมจะเกิดขึ้นควบเสมอ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้การเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ไม่เป็นไปอย่างรวดเร็ว

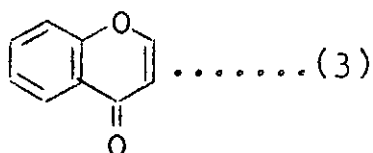
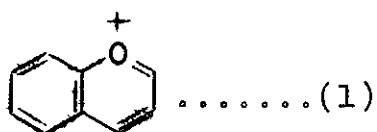
2.40 อินดิเคเตอร์จากสารธรรมชาติ

2.4.1 กาน้ำ ในประเทศที่เจริญก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์สารอินดิเคเตอร์ส่วนใหญ่ได้มาจากสารสังเคราะห์เพราะทำได้ง่าย ราคาถูก และบริสุทธิ์พร้อม แต่ในประเทศไทยสารอินดิเคเตอร์ที่ราคาถูกจนสูงทั้งนี้เพราะต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ และการสังเคราะห์ขึ้นใช้เองก็ทำได้ยากเพราะยังขาดวัตถุดิบและอุปกรณ์หลายอย่าง ตลอดจนราคาค่าการลงทุนที่สูง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องเปลี่ยนความสนใจจากอินดิเคเตอร์สังเคราะห์มาสู่อินดิเคเตอร์ที่ได้จากธรรมชาติ เพราะส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ดอก ใบ ราก ฯลฯ ที่มีสีมักจะมีสารอินดิเคเตอร์ จากการศึกษามาก่อนนักเคมีโบราณคนคริสต์ศตวรรษที่ 20 พบว่าสารอินดิเคเตอร์ทั้งกล่าวนี้จัดอยู่ในพวก Benzopyrylium salts³¹ ซึ่งมีสารประกอบอินทรีย์หลายชนิดที่เราจัดอยู่ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ได้แก่สารที่อยู่ในอาณาจักรของพืช derivative ที่สำคัญของ Benzopyrylium cation (1) ก็คือสีแดง สีม่วง สีนํ้าเงิน ที่อยู่ในส่วนต่าง ๆ ของพืช ได้แก่ Anthocyanin³² ส่วนสีเหลืองที่มีอยู่ในพืชนั้นเป็น derivative ของ Benzo-2-pyrone (2) และ Benzo-4-pyrone (3) ส่วน Benzopyran (4) ไร้เป็นสารเริ่มต้นในการสังเคราะห์สารต่าง ๆ ที่อยู่ในกลุ่มนี้

³⁰ Alexyev, V., loc.cit.

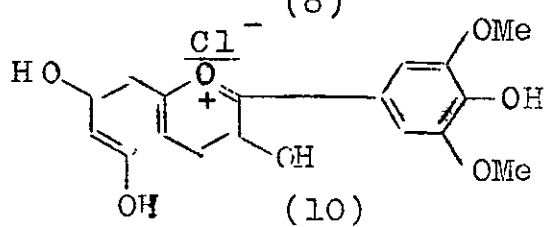
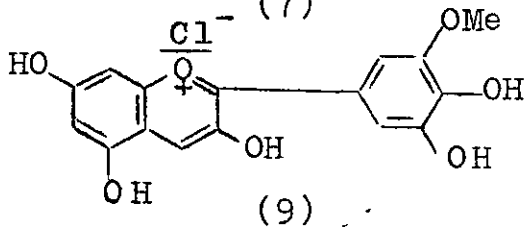
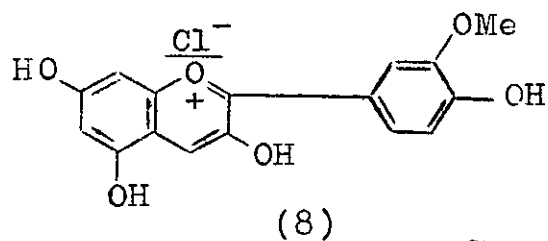
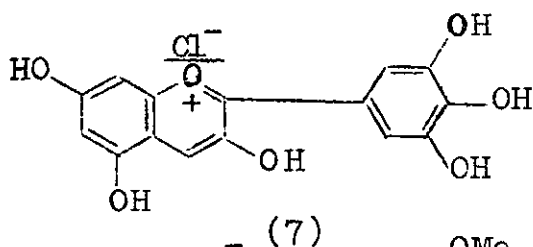
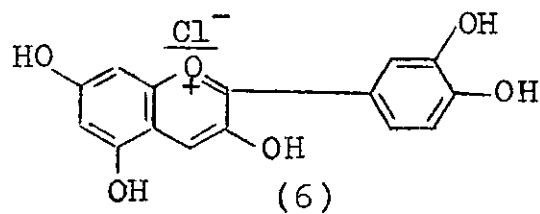
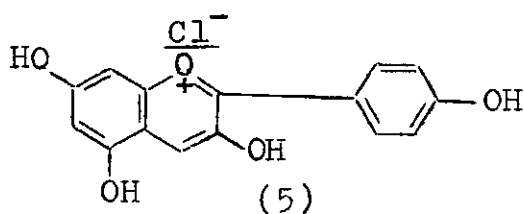
³¹ Acheson, R.M., "An Introduction to the Chemistry of Heterocyclic Compounds," p.285-299, 1967.

³² Ibid.



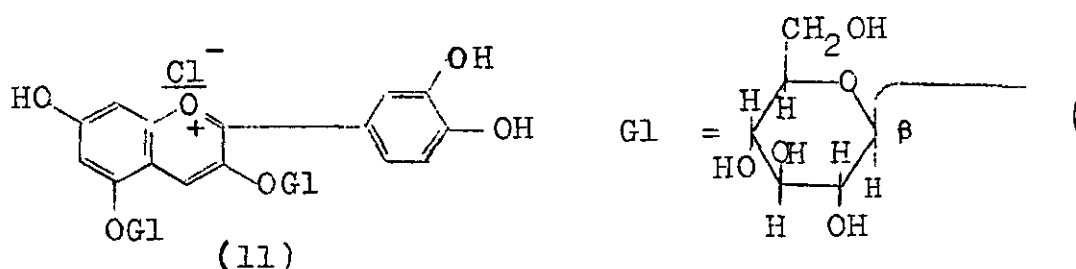
* 2.4.2. The Anthocyanins.

Anthocyanidins³³ ทุกตัวเป็น hydroxy derivatives ของ 2 - phenyl benzopyrylium cation (หรือ flavylium) และในบางครั้ง อาจจะมี methoxy group แทน hydroxy group ก็ได้ สารในกลุ่มนี้ที่พบบ่อย ๆ คือ Pelargonidin (5) Cyanidin (6) Delphinidin (7) Peonidin (8) และ Malvidin (10) ส่วนตัวที่มีอยู่น้อยและไม่ค่อยจะพบคือ Petunidin (9)



³³ Girdichian, V., "Organic Synthesis," Vol. 2. p.1286, 1957.

แต่จากสีของกลีบดอกไม้ในธรรมชาติจะไม่พบ anthocyanidins ดังกล่าวนี้เลย เพราะในธรรมชาติจะอยู่ในรูป glucosides ซึ่งมีชื่อว่า "Anthocyanin"³⁴ glucosidation ที่เกิดในธรรมชาตินั้นส่วนใหญ่จะเกิดในตำแหน่ง 3 - hydroxyl และ น้ำตาลที่เข้ามาแทนที่นั้นส่วนมากจะเป็น glucose รองลงมาอีกคือ galactose และ rhamnose ในกรณีของ cyanin (11) จะมี glucose 2 groups เกาะอยู่ที่ตำแหน่ง 3 และ 5 ของ hydroxyl group



anthocyanins ในธรรมชาติส่วนใหญ่จะอยู่ในรูป acylated derivatives³⁵ ของกรด 2 ชนิดคือ p-hydroxy benzoic acid กับ malonic acid ซึ่งอนุมูลกรด ดังกล่าวนี้อาจจะต่อกับ phenolic hydroxyl group ของ flavylium nucleus หรืออาจต่อกับ hydroxyl group ของ sugar residue ก็ได้

2.4.3 Chemistry of Anthocyanins

การศึกษาถึงสมบัติทางเคมีของ anthocyanins ได้กระทำกัน เรื่อยมาตั้งแต่ปี 1905 - 1940 ซึ่งส่วนใหญ่ศึกษา anthocyanidin ซึ่งเป็นผลที่ได้จากการ hydrolyse anthocyanin ด้วยกรดหรือเอนไซม์ แล้วแยก hydrolysis product ด้วย amyl (pentyl) alcohol³⁶

³⁴ Paech, K., and Tracey, M.V., "Modern Method of Plant Analysis," Vol. 3, p.464, 1955.

³⁵ Swain, T., Biochem. J., 53, 200(1953).

³⁶ Paech, K., and Tracey, M.V., loc.cit.

ในปี 1937 Robinson³⁷ กับเพื่อนร่วมงานได้รวบรวมผลการศึกษาค้นคว้าของเขาที่ได้ทำการทดลองมาแล้ว สรุปได้ดังนี้

1. Anthocyanidin สามารถแยกออกจาก aqueous solution ได้ด้วย amyl alcohol เมื่อเติม sodium acetate ที่มี ferric chloride จำนวนน้อย ๆ ผสมอยู่ด้วย cyanidin จะให้สีน้ำเงิน delphinidin จะให้สีน้ำเงินอ่อน ส่วน anthocyanidin ชนิดอื่นอาจจะให้สีน้ำเงินที่จางมากหรือไม่มีสีเกิดขึ้นเลย

2. ถ้าเอาสารละลายเจือจางของ sodium hydroxide เติมลงไปแล้ว เขย่าให้ผสมกับอากาศ delphinidin กับ petunidin สีจะหมดไป ส่วน anthocyanidin ชนิดอื่น ๆ สียังคงเดิม

3. Absorption spectra ของ anthocyanins จะอยู่ในช่วงระหว่าง 5000 - 5500 Å.³⁸ แต่ต่อมาในปี 1953 Geissman³⁹ กับเพื่อนร่วมงานได้แสดงให้เห็นว่า ถ้าเติม aluminum chloride ลงไปในสารละลายของ anthocyanin ตัวใดตัวหนึ่งที่มี hydroxyl group อิสระในตำแหน่ง 3' และ 4' maximum absorption จะเปลี่ยนไป

สมบัติทางเคมีของ anthocyanin ต่าง ๆ เหล่านี้ ในสมัยก่อนนิยมใช้ประโยชน์ในการพิสูจน์ (identify) ต่อมาเมื่อมีการค้นพบเกี่ยวกับ chromatography จึงได้นำเอา

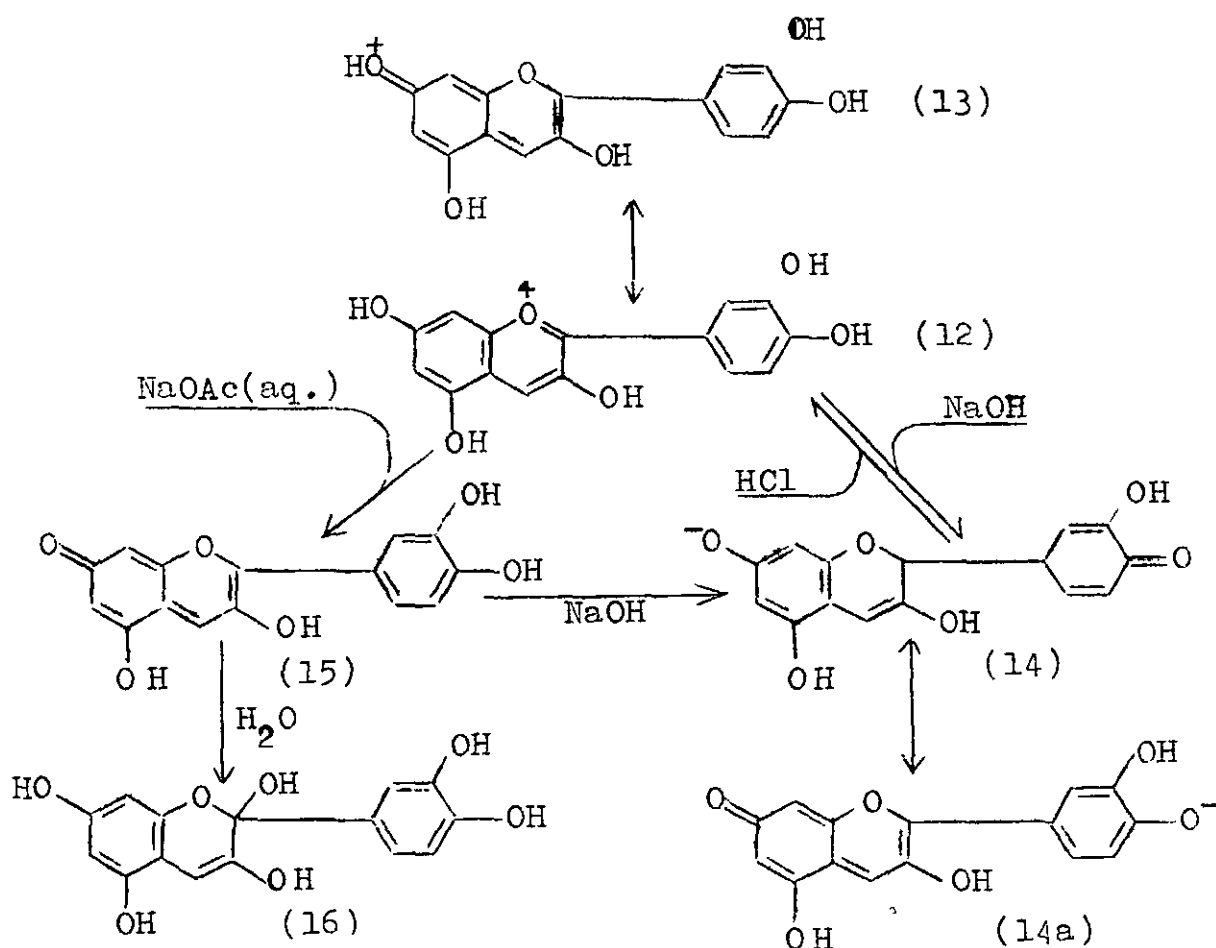
³⁷ Robinson, R., and others, J. Chem. Soc., 1934.

³⁸ Gillam, A.E., and Stern, E.S., "An Introduction to Electronic Absorption Spectroscopy in Organic Chemistry," p.181, 1962.

³⁹ Geissman, T.A., Harborne, J.B., and Seikel, M.K., J. Am. Chem. Soc., 78, 825(1956).

chromatography เข้ามาใช้ในงานด้านนี้ จึงทำให้ผลการวิเคราะห์ได้แม่นยำขึ้น โดยทั่วไป anthocyanin และ anthocyanidin จะมีสมบัติทางเคมีคล้ายกัน จะแตกต่างกันบ้างก็เกี่ยวกับเรื่องสมบัติเฉพาะตัว ดังนั้นการพิสูจน์ anthocyanin โดย color reaction จึงมักใช้ known กับ unknown เปรียบเทียบกันเสมอ ได้มีผู้นิยามเกี่ยวกับ mechanism เกี่ยวกับการเปลี่ยนสีของ anthocyanin แต่ละชนิดไว้มากมาย ที่เห็นว่าเชื่อถือได้มากที่สุดได้แสดงไว้ในผังข้างล่างนี้⁴⁰

Cation ของ cyanidin (12) สามารถเกิด resonance hybrid ได้เป็น (13) ซึ่งเป็นสารที่มีสีแดงทั้งสอง forms (pH 3) ถ้าเอาสารละลายนี้มาทำปฏิกิริยากับ sodium acetate จะเปลี่ยนเป็นสีม่วง (pH 8) และจะค่อย ๆ บิดลง ๆ จนไม่มีสี การเกิดสีม่วงนั้นอธิบายได้ว่าการ form quinoid base (15)

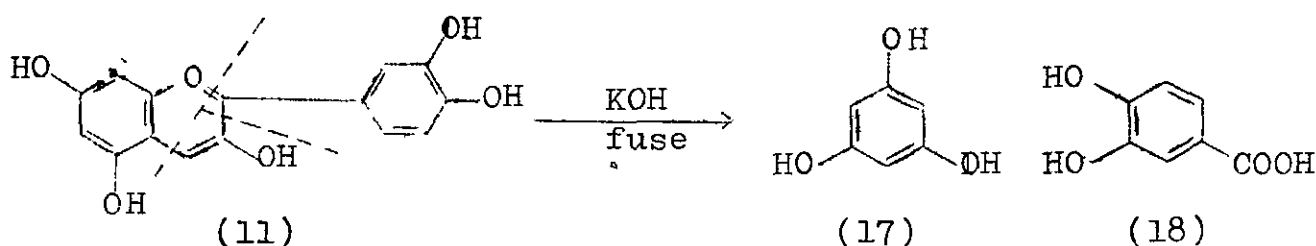


แล้วรวมตัวกับน้ำใน system จะให้ conjugated carbinol (16) ซึ่งไม่มีสีผลิตภัณฑ์คือ quinoid base (15) จะลดลง จนในที่สุดสีจะจางหายไป cyanidin (11) กับ sodium hydroxide (pH 11) จะทำให้สีน้ำเงินเข้มขึ้น อธิบายได้ว่ามันเกิดการ form resonance anion ซึ่งอาจจะเป็นได้ทั้ง (14) และ (14a) ถ้านำมา acidified จะได้ cyanidin กลับคืนมาใหม่

สำหรับ mechanism เกี่ยวกับการเปลี่ยนสีของ anthocyanidins ชนิดอื่นก็สามารถอธิบายได้ในทำนองเดียวกันนี้

2.4.4 โครงสร้างของ Anthocyanidins.

ตั้งเฝ้ากลาวมาในตอนต้นแล้วว่า anthocyanidin นั้นได้จากการนำ anthocyanin ไป hydrolysed ด้วยกรดที่ร้อน (ต้มจนเดือด) แล้วแยกออกมาได้ด้วย amyl alcohol ในปี 1915 Willstatter⁴¹ กับเพื่อนร่วมงานได้ทำการวิเคราะห์หาโครงสร้างของ anthocyanidin โดยการนำไปหลอมกับ potassium hydroxide เขาพบว่าถ้าใช้ cyanidin chloride จะให้ phloroglucinol (17) กับ protocatechnic acid (18)



วิธีนี้ไม่ทำให้ทราบโครงสร้างโดยละเอียดของ anthocyanidin ได้ทั้งนี้เพราะว่า anthocyanidin ที่มี methoxyl group เช่น (8), (9), (10) จะถูกทำลายด้วยในขณะ ที่ anthocyanidin เกิด degradation ดังนั้นจึงไม่ทราบตำแหน่งของ methoxy group ของสารเริ่มต้น แต่ปัญหาดังกล่าวนี้ได้หมดไป จากผลงานของ

⁴¹ Willstatter, R., *Ann.*, 412, 189(1916).

การทดลองทั้งสามวิธีที่กล่าวมานี้เมื่อนำมารวมกันก็พอจะเป็นเครื่องทำนายได้ว่า
ค่าคงที่เกาะอยู่กับ anthocyanidin นั้นอยู่ในตำแหน่งใด อย่างไรก็ดีตามเพื่อที่จะให้การ
ทดลองเป็นที่เชื่อถือได้มากขึ้น การจะนับสมมูลการทดลองนี้โดยการดึงเคราะห์
anthocyanin แล้วนำมาทำการทดลองในแบบเดียวกันนี้เพื่อเปรียบเทียบกัน

2.4.5 Chromatographic Purification and Identification of Anthocyanin Pigments.

ในระยะแรกเริ่มของการศึกษาเกี่ยวกับสาร anthocyanin จาก
ธรรมชาติ การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ส่วนใหญ่ได้มาจากวิธีทำให้ตกตะกอนในรูปของ
เกลือของตะกั่ว หรือการแยกออกจากกันโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ แล้วมาทำให้ตก
ตะกอนด้วย ether วิธีการดังกล่าวนี้จะทำให้ได้สาร anthocyanin ที่มี impurity ปนอยู่
บ้าง ดังนั้นข้อมูลต่าง ๆ เช่น absorption spectra, colour reaction เกี่ยวกับ
สารเหล่านี้จึงยุ่งยากสับสนกันบ่อย ๆ จนกระทั่งในปี 1948 Bate-Smith^{46,47} ได้
ประสบความสำเร็จในการใช้ paper partition chromatography แยกสารพวก
anthocyanin ที่ได้จากธรรมชาติได้ นับแต่นั้นมา Rf value ที่ได้จาก paper chromatography
จึงได้นำมาใช้เป็นเครื่องมือพิสูจน์สาร anthocyanin และได้มีการเก็บรวบรวม Rf value
ของ anthocyanins ชนิดต่าง ๆ ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ก. (หน้า 148) มีข้อที่น่า
สังเกตอยู่ว่า Rf value เหล่านี้มีส่วนสัมพันธ์กับโครงสร้างของมันอย่างใกล้ชิด บ่งชี้ให้เห็น
หลายท่านได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้เช่น Bate-Smith กับ Westall⁴⁸ Abe กับ
Hayashi⁴⁹

⁴⁶ Bate-Smith, E.C., loc.cit.

⁴⁷ Bate-Smith, E.C., Biochem. Soc. Symposia, 3, 62(1949).

⁴⁸ Bate-Smith, E.C., and Westall, P.G., Biochim. Biophys. Acta, 4, 427(1950).

⁴⁹ Abe, Y., and Hayashi, K., Botan. Mag. (Tokyo), 69, 577(1956).

และ Wood⁵⁰ จึงได้สรุปความสัมพันธ์ไว้ดังนี้

1. Anthocyanidin ที่มีจำนวน hydroxyl group มากจะมี Rf value ต่ำทั้งใน solvent system ของ Bu-HCl, BAW, 1% HCl และ HAc-HCl (ดูสัญญาบัตรของ solvent system ในตารางที่ 24 หน้า 80) ดังนั้น Rf value ของ pelargonidin จึงมากที่สุดและน้อยลงไปตามลำดับคือ cyanidin และ delphinidin

2. Anthocyanidin ที่มี methoxyl group มากจะมี Rf value สูงกว่าพวกที่มี methoxyl group น้อยกว่า หรือไม่มีเลย ทั้งใน alcohol solvent (Bu-HCl และ BAW) และ aqueous solvent (1% HCl และ HAc-HCl) ผลอันนี้ตรงข้ามกับ hydroxyl group (ข้อ 1) การทดลองในเรื่องนี้ไม่ได้ศึกษาเฉพาะแต่ methoxyl group ที่มีอยู่ในตำแหน่ง 3'- และ 5'- ของ anthocyanidin เท่านั้นแต่ยังทำการศึกษาในตำแหน่ง 7 - ด้วย เช่น hirsutin⁵¹ และ rosinin⁵² เป็นต้น

3. Anthocyanidin ชนิดเดียวกันและมี sugar residue เกาะอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกัน triglucoside จะมี Rf value มากกว่า di- และ monoglucoside ตามลำดับใน aqueous solvent system (1% HCl และ HAc-HCl) ส่วนใน BAW และ BuHCl เป็นในทางตรงข้าม การทดลองอันนี้ได้มาจากการศึกษา anthocyanin ที่ได้จาก *primula sinensis*⁵³

4. Anthocyanidin ที่มี acyl linkage (ดูข้อ 2.4.6. หน้า 30) Rf value ของมันจะเพิ่มขึ้นใน 1-butanol solvent system และจะลดลงใน

⁵⁰ Roberts, E.A.H., Cartwright, R.M., and Wood, D.I., *J. Sci. Food. Agr.*, **7**, 637(1956).

⁵¹ Bate-Smith, E.C., and Westall, R.G., *loc.cit.*

⁵² Harborne, J.B., *Nature*, **181**, 26(1958).

⁵³ Harborne, J.B., and Sherratt, H.S., *Experimentia*, **13**, 486(1957).

aqueous solvent system^{54, 55, 56, 57.}

การแยกและการทำให้บริสุทธิ์โดย chromatography นี้ ได้มีผู้พยายามใช้ paper chromatography ทำการแยก anthocyanin ที่สกัดได้จากธรรมชาติหลายคนด้วยกัน แต่ที่น่าสนใจอยู่ 3 กลุ่มด้วยกันคือ Geissman, Harborne กับ Seikel⁵⁸ Nordstrom กับ Swain⁵⁹ Harborne กับ Sherratt⁶⁰ ซึ่งได้ใช้ methanolic hydrochloric acid สกัดสารจากธรรมชาติ นำมาทำให้เข้มข้นแล้วนำไปแยกด้วย whatman No.3 หรือ 3MM โดยใช้ BAW, BuHCl และ 1% HCl เป็น solvents จากนั้นตัดเอา spot ของ anthocyanin ไปละลายใน methanol ที่มี hydrochloric acid หรือ acetic acid ผสมอยู่ วิธีดังกล่าวนี้ให้ผลดีกว่าหากว่าต้องการปริมาณเพียงเล็กน้อย แต่ในกรณีที่ต้องการสารเป็นปริมาณมาก ต้องใช้ column chromatography แม้ว่า column chromatography จะสามารถแยก anthocyanin ออกมาได้ในปริมาณมากก็ตามแต่การที่จะแยกเอา anthocyanins ชนิดต่าง ๆ ออกจากกันได้นั้นจึงมีประสิทธิภาพสู้ paper chromatography

⁵⁴ Bate-Smith, E.C., Chem. & Ind.(London), 1457(1954).

⁵⁵ Williams, A.H., Chem. & Ind.(London), 120(1955)

⁵⁶ Swain, T., Biochem. J., 53, 200(1953).

⁵⁷ Geissman, T.A., Harborne, J.B., and Seikel, M.K., loc.cit.

⁵⁸ Nordstrom, C.G., and Swain, T., J. Chem. Soc., 2764(1953).

⁵⁹ Harborne, J.B., and Sherratt, H.S.A., loc.cit.

⁶⁰ Karrer, P., and Strong, F.M., Helv. Chim. Acta, 19, 25(1963).

ไม่ได้⁶¹, 62, 63, 64 เพราะ column chromatography จะใช้แยก mixture ของ anthocyanin ออกจากกันได้ไม่เกิน 3 ชนิด⁶⁵ นอกจากนี้ยังมีปัญหายากเกี่ยวกับการเลือก adsorbent อีกด้วย เพราะ anthocyanin มักจะถูกดูดเอาไว้อย่างเหนียวแน่นใน column ของ basic salt เช่น alumina และยากต่อการให้ solvent ไป elute ออกมาได้ Karrer กับ Strong⁶⁶ และ Karrer กับ Weber⁶⁷ ได้ใช้ calcium sulfate แยก mixture ของ anthocyanins 2 ชนิดออกจากกันได้ แต่อย่างไรก็ตาม Li กับ Wagenknecht⁶⁸ กล่าวว่าไม่เหมาะที่จะใช้ calcium sulfate เป็น adsorbent เพราะมันขึ้นอยู่กับคุณภาพและโรงงานที่ผลิต ซึ่งต่อมาเขาก็ได้ประสบความสำเร็จในการแยก 3-rhamnogluco-side กับ 3-diglucoside ของ cyanidin ออกจากกันได้โดยใช้ column ของ salicyc acid และใช้ B&W เป็น eluent

Endo⁶⁹ ได้ประสบความสำเร็จในการแยก anthocyanins 6 ชนิดออกจากกันได้โดยใช้ cellulose powder แต่เขาพบว่าการทำงานที่จะแยกออกจากกันได้นั้นก็หวั่น

⁶¹ Karrer, P., and Strong, F.M., Helv. Chim. Acta, 19, 25 (1963).

⁶² Li, K.C., and Wagenknecht, A.C., J. Am. Chem. Soc., 78, 979 (1956).

⁶³ Karrer, P., and Weber, H.M., Helv. Chim. Acta, 19, 1025 (1936).

⁶⁴ Forsyth, F.G.C., Biochem. J., 51, 511 (1952).

⁶⁵ Chandler, B.W., and Harper, K.A., Nature, 181, 131 (1958).

⁶⁶ Karrer, P., and Strong, F.M., loc.cit.

⁶⁷ Karrer, P., and Weber, H.M., loc.cit.

⁶⁸ Li, K.C. and Wagenknecht, A.C., loc.cit.

⁶⁹ Endo, T., Nature, 179, 378 (1957).

ขึ้นอยู่กับคุณภาพ (grade) ของ cellulose powder และวิธีการ pack column อย่างไรก็ตาม Chandler กับ Harper⁷⁰ ได้เสนอแนะว่าก่อนที่จะทำการ purified anthocyanin โดย cellulose column ก็ควรจะทำการ purified โดย lead precipitation เสียก่อน จึงจะปลอดภัย จะเห็นได้ว่าการใช้ column chromatography ในการแยก anthocyanins นั้น ใช้ได้ดีพอสมควรแต่ก็น่าจะยังอยู่ในวงจำกัดเพราะมันเป็นสารที่ถูกดูดไว้อย่างเหนียวแน่นใน basic salts column ดังนั้นสิ่งสำคัญอีกประการหนึ่งก็คือ การเลือก eluents ที่เหมาะสม โดยทั่วไปแล้วใช้น้ำเป็นตัว remove impurities ออกจาก column หลังจากนั้นจึง remove ตัวมันออกด้วย methanolic hydrochloric acid หรือ B&W นอกจาก adsorbents ดังกล่ามาแล้วอาจจะใช้ adsorbents อื่น ๆ ได้อีกเช่น lead hydroxide⁷¹ และ magnesol : celite (5:1) mixture⁷² เป็นต้น

2.4.6. Acylated Anthocyanins

ในการ Identify สาร anthocyanins จากธรรมชาตินั้น จะต้องทราบเสียก่อนว่าสารที่นำมาใช้ในการทดลองมี acyl linkage หรือไม่ ทั้งนี้ เพราะ acyl linkage จะมีผลทำให้ Rf value ที่ได้รับผิดจากความเป็นจริง วิธีตรวจ acyl linkage คือ เอาสาร anthocyanins ที่สกัดจากธรรมชาติมาทำ paper chromatography ครั้งแรกใช้ Bu-HCl เป็น solvent ถ้าสารตัวอย่างมี acyl linkage จะมีจุด 2 จุดเกิดขึ้น จุดที่เป็น major spot จะมี Rf value สูงกว่า minor spot แม้จะตัดเอาเฉพาะ major spot ไปทำ paper chromatography ซ้ำอีกครั้งก็จะได้ออกมา 2 จุดอีกเช่นเดียวกัน พฤติกรรมนี้พบโดย Dodds กับ Long⁷³ ซึ่งต่อมาเขาได้ทราบความจริงว่ามันเนื่องมาจาก acyl linkage

⁷⁰ Chandler, B.V., and Harper, K.M., loc.cit.

⁷¹ Roach, W.A., Ann. Botany. (London), 22, 127 (1958).

⁷² Harborne, J.B., and Sherratt, H.S.M., loc.cit.

⁷³ Dodds, K.S., and Long, H.S., J. Gen., 53, 136 (1955).

ที่เกิดกับ anthocyanin นั้นมีมากกว่าของ sugar linkages Acylation ของ anthocyanin ที่เกิดในธรรมชาตินั้น เนื่องมาจากว่ามีกรดบางชนิด (ส่วนมากได้แก่ p-coumaric acid) มา acylated กับ anthocyanins ซึ่งอาจจะทำ deacylation ได้ โดยการนำสารที่สกัดได้เติม alkali จนสารละลายเป็นด่างหลังจากนั้นจึง reacidified แล้วนำไปทำ paper chromatography ซ้ำอีกครั้งจะปรากฏว่า spot ที่ได้จะมีเพียง จุดเดียวเพื่อความแน่ใจ หลังจากทำ deacylation แล้วควรทำ paper chromatography หลาย ๆ ครั้งในหลาย ๆ solvent systems จะเห็นว่าในแต่ละ solvent system Rf value ไม่เปลี่ยนแปลง แสดงว่า deacylation ได้เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ และ Rf value ที่ได้นั้นเป็นที่เชื่อถือได้^{74, 75, 76}

3.00 สรุป

Anthocyanin เป็นสียที่ได้จากดอกไม้ซึ่งใช้เป็น indicator นั้น พบครั้งแรกในกลางคริสต์ศตวรรษที่ 17 แรก ๆ นิยมใช้เป็น indicator สำหรับการบอกถึงความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย ต่อมาเริ่มมาทำการจำแนกว่าสารจะแยกกันมากขึ้น ในราวปลายคริสต์ศตวรรษที่ 19 ถึงต้นคริสต์ศตวรรษที่ 20 คุณค่าในด้านของการใช้เป็นอินดิเคเตอร์ได้ลดลงเพราะได้มีการสังเคราะห์ indicator ตัวอื่นที่ให้ผลดีกว่า และนอกจากนี้ในระยะนั้นได้เริ่มหันความสนใจจากสารอินดิเคเตอร์มาใช้เครื่องมือเป็นเครื่องวัดถึงความเป็นกรด-ด่างของสารละลายแทน เช่น pH-meter

ผู้ที่ถือว่าเป็นบิดาของสาร anthocyanin จากธรรมชาติก็คือ Willstater และผู้ที่ถือว่าเป็นบิดาของสาร anthocyanin โดยการสังเคราะห์ก็คือ Robinson หลังจากนั้นได้มีการนำเอา chromatographic technique เข้ามาใช้ในการทำให้บริสุทธิ์และการพิสูจน์สาร anthocyanins จากธรรมชาติ ทำให้ผลของการทดลองเป็นที่เชื่อถือได้มากขึ้น

⁷⁴ Geissman, F., and Harborne, J.B., loc.cit

⁷⁵ Bate-Smith, E.C., loc.cit.

⁷⁶ William, A.H., loc.cit.

จนปัจจุบันนี้ก็ได้ความรู้เกี่ยวกับสาร anthocyanins จากธรรมชาตินี้มากพอสมควร

มีข้อน่าสังเกตอยู่ว่าสาร anthocyanins ที่ได้จากดอกไม้เป็นส่วนใหญ่นำมาทำการ
กันเกี่ยวกับดอกไม้ในประเทศหนาวทั้งสิ้น

พื้ 3

วิธีทดลองและข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

1.00 การสำรวจคอกไม้

การสำรวจแบ่งออกเป็น 3 ระยะคือ

1. ระยะแรกเริ่มตั้งแต่วันที่ 5 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2511 ถึง 5 มีนาคม พ.ศ. 2512
2. ระยะที่สองเริ่มตั้งแต่วันที่ 10 กรกฎาคม พ.ศ. 2512 ถึง 10 สิงหาคม พ.ศ. 2512
3. ระยะที่สามเริ่มตั้งแต่วันที่ 8 พฤศจิกายน พ.ศ. 2512 ถึง 8 ธันวาคม พ.ศ. 2512

แหล่งที่ทำการสำรวจมี 6 แหล่งคือ

1. ตลาดนัดสนามหลวง วันเสาร์-วันอาทิตย์ เวลาเช้าและบ่าย (ริมคลองหลอด)
2. ตลาดคอกไม้ปากคลองตลาด เวลาเช้า
3. สวนคอกไม้อำเภอบางแคและอำเภอดำรงชัย จังหวัดธนบุรี และอำเภอวังสราญ จังหวัดปทุมธานี
4. ริมถนนในย่านชานเมืองและในชนบท (พระนคร ธนบุรี นครปฐม สมุทรปราการ พระนครศรีอยุธยา สระบุรี นครนายก)
5. บ้านชนิดที่มีบริเวณเป็นสนามในย่านอำเภอพระโขนง บางนา และบางเขน จังหวัดพระนคร
6. สวนทุเรียนจังหวัดธนบุรีและนนทบุรี

จากผลของการสำรวจได้รวบรวมและคัดเลือกคอกไม้ไว้ 30 ชนิด ดังแสดงในตาราง 1.

ตาราง 1. แสดงรายชื่อดอกไม้ที่ได้จากการสำรวจและคัดเลือกในขั้นแรก

ชื่อสามัญ	ชื่อพันธุ์ 1,2,3,4.	แหล่งที่พบ	สีของดอก	ฤดูที่งอก
ผักบุ้ง	<i>Ipomoea reptans</i> Poir.	หนองน้ำริมถนน ชานเมือง	ม่วงอ่อน	หนาว
ผักตบชวา	<i>Eichhornia crassipes</i> <i>Solms Leub</i>	หนองน้ำริมถนน ชานเมือง	ม่วงอ่อน	หนาว
ทองหลางใบลาย (Coral Tree)	<i>Erythrina variegata</i> <i>lian. Var. picta</i> Hort.	สวนทุเรียนชนบุรี และถนนบุรี	แดงสด	หนาว
ทองหลางน้ำ	<i>Erythrina fusca</i> Lour	สวนทุเรียนชนบุรี และถนนบุรี	แดงสด	หนาว
คอกกิ้ง เผือกฟ้า	<i>Solanum spirale</i> Roxb <i>Bougainvillea specta-</i> <i>bilis</i> Willdenow	ริมถนนชานเมือง บ้านเรือนที่อยู่อาศัย	ม่วงอ่อน แดง	ตลอดปี
ลิ้นทม (Plumeria)	<i>Thunbergia erecta</i> T. <i>Ander var cearulea</i> Hort	สถานที่ราชการ และบ้าน	ขาว	ตลอดปี
อัญชัน (Butterfly Poa)	<i>Cliteria ternatea</i> <i>Linnaeas</i>	ริ้วบ้านและป่าละเมาะ	น้ำเงิน	ตลอดปี
เข็ม (Ixora)	<i>Ixora macrothyrsa</i> Teysm- ann and Binnendijk	สถานที่ราชการ และบ้าน	แดงสด	ตลอดปี

¹ ปิฎฐะ อนุภาค ไม้ดอกไม้ประดับ พ.ศ. 2511 563 หน้า.

² เส็งขม พงษ์อรุณ ไม้เทศเมืองไทย พ.ศ. 2508 596 หน้า.

³ Kuck, L.E., and Tongg, R.C., *Hawaiian Flowers and Flowering Trees*, 1958, 158p.

⁴ วินิจฉัตร, พระยา ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย พ.ศ. 2503 871 หน้า.

ตาราง 1. (ต่อ)

ชื่อสามัญ	ชื่อพันธุ์ 1,2,3,4,	แหล่งที่พบ	สีของดอก	ฤดูที่พบดอก
ดาวเรือง	<i>Tagetes erecta</i> Linn	สวนดอกไม้, ตลาดดอกไม้	เหลือง	ฝน-หนาว
หงอนไก่	<i>Celosia argentea</i> Linnaeus	สวนดอกไม้, ตลาดดอกไม้	แดง	ฝน-หนาว
บานไม่รู้โรย	<i>Cromphrema globosa</i> Linn	สวนดอกไม้, ตลาดดอกไม้	แดง	ฝน-หนาว
บานบุรี	<i>Allamanda cathartica</i> Linn	สถานที่ราชการ และบ้าน	เหลือง	ตลอดปี
บัวกินสาย	<i>Nymphaea lotus</i> Linn	หนองน้ำริมทาง	แดง	ตลอดปี
บานชื่น	<i>Zinnia elegans</i> Macq	สวนดอกไม้, บ้าน	แดง	ฝน-หนาว
พระโขนง	<i>Hibiscus rosa-</i> <i>sinensis</i> Linn	ริ้วบ้าน, สวนทุเรียน	แดง	ฝน-หนาว
ชบา	<i>Hibiscus rosa Sinensis</i> Linn	สถานที่ราชการ, บ้าน	แดง	ตลอดปี
ยี่โถ	<i>Nerium oleander</i> Linn	สถานที่ราชการ, บ้าน	แดง	ฝน-หนาว
เขว้าเขว้า	<i>Gerbera jamesonii</i> Bolus	สวนดอกไม้, ตลาดดอกไม้	แดง	ตลอดปี
กุหลาบ	<i>Rosa spp. canna</i> <i>iridiflora</i>	ทั่วไป	แดงเข้ม	ตลอดปี

ตาราง 1. (ต่อ)

ชื่อสามัญ	ชื่อพันธุ์ 1,2,3,4,	แหล่งที่พบ	สีของดอก	ฤดูที่ออก
พุดรักษา	Cannaceae, Conna Flaccida Linn	ริมน้ำ, ไร่บ้าน	แดงเข้ม	ตลอดปี
ช้องนาง(ใหญ่) (Bush Thun- bergia)	Thunbergia erecta T. Anderson var caerulea Hort	บ้าน	ม่วงดำ	ตลอดปี
โป๊ยเซียน	Euphorbia splendens Bojer	บ้าน	แดง	ตลอดปี
หางนกยูงใหญ่	Delonix regia (Bojer) Rafinesque	ริมถนน, บ้าน	แดงสด	หนาว
ตะแบก	Lagerstroemia speciosa Persoon	ริมถนน, บ้าน, ไร่	เมื่อกะปราย	หนาว
กรักรัง	Jacaranda ovalifolia R. Brown	ริมถนน, บ้าน, ไร่	ม่วงอ่อน	หนาว
รำเพย (Yellow- Oleander)	Thevetia nereifolia Jussieu or T.persuviana (Persoon K.-Schumann)	สถานที่ราชการ, บ้าน	เหลืองส้ม	ตลอดปี
มะลิ	Jasminum Sambac Solander	ตลาดคอกไม้	ขาว	ตลอดปี
รัก	Calotropis gigantea Linn. Aiton	ตลาดคอกไม้, ป่าละเมาะ	ม่วงอ่อน	ตลอดปี
เกาคัน(ลูก)	Parthenocissus Quinquefolia	ป่าละเมาะ	ม่วงดำ	ฝน-หนาว

2.00 การทดสอบสารอินดิเคเตอร์ในดอกไม้และการคัดเลือกชั้นสุดท้าย

2.10 การทดสอบ

นำกลีบดอกไม้สดแต่ละชนิดทั้งได้แสดงไว้ในตาราง 1. มาชนิดละ 15 กลีบ บดในกรก (motor) ให้ละเอียด แล้วใช้ช้อนตักใส่ใน conical flask ขนาด 150 ml. เติม ethanol 95 % R.P ลงไป 25 ml. เขย่า 3 นาทีทุก ๆ 10 นาที ระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอา filtrate เก็บไว้เพื่อนำไปทดสอบสารอินดิเคเตอร์ต่อไป

นำ beaker ขนาด 50 ml. มาสองใบ ใบแรกใส่ 0.1 M hydrochloric acid 10 ml. ใบที่สองใส่ 0.1 M sodium hydroxide 10 ml.

นำ beaker ทั้งสองไปวางบนกระดาษขาว beaker แต่ละใบเติมสารละลายอินดิเคเตอร์ที่สกัดได้ (filtrate ที่กรองได้) ลงไป beaker ละ 1 ml. เขย่าเบา ๆ แล้วสังเกตสีของสารละลายใน beaker แต่ละใบ ตั้งทิ้งไว้ 1 นาทีแล้วสังเกตสีอีกครั้ง

ทำการทดลองเช่นนี้จนครบดอกไม้ทั้ง 30 ชนิด และดอกไม้แต่ละชนิดทำการทดลองซ้ำสองครั้ง ผลการทดลองทั้งแสดงไว้ในตารางที่ 2. (หน้า 39)

2.20 การคัดเลือกชั้นสุดท้าย

หลังจากการสำรวจและทดสอบสารอินดิเคเตอร์จากดอกไม้ทั้ง 30 ชนิด ทั้งได้แสดงไว้ในตาราง 1. และ 2. แล้ว จึงได้ทำการคัดเลือกชั้นสุดท้ายเพื่อเลือกเอาดอกไม้ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการนำมาทำเป็นอินดิเคเตอร์ การคัดเลือกได้อาศัยหลักการดังได้กล่าวไว้แล้วในบทที่ 1 ข้อ 5.10 (หน้า 4)

ผลของการคัดเลือกจึงได้ดอกไม้ที่จะมาทำการศึกษาโดยละเอียด 8 ชนิด (11 พันธุ์) ดังแสดงไว้ในตาราง 3. (หน้า 41)

3.00 วิธีสกัดสีจากกลีบดอกไม้

3.10 วิธีการแบบง่าย

3.1.1 ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย การสกัดวิธีนี้ใช้ได้กับดอกไม้ที่มีสีม่วงและสีน้ำเงิน ได้แก่ ดอกชงนางใหญ่ และดอกอัญชัน (สีน้ำเงิน)

เอากลีบดอกช่อกนางใหญ่(หรือดอกอัญชัน) สก 10 กรัม มาบดให้ละเอียดพอสมควร (ถ้าละเอียดเกินไปจะยากต่อการกรอง) เอา spatula ตักใส่ conical flask (หรือก้นโหลกลม) ขนาด 250 ml. เติมน้ำลงไปให้พอท่วมกลีบดอกไม้ (40 ml.) เขย่า กรองละ 5 นาทีทุก ๆ 15 นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองเก็บสารละลาย (filtrate) ที่ได้เอาไว้ หากที่เหลือเหลือน้อยลงใน flask แล้วเติมน้ำลงไปให้ (35 ml.) ทำการสกัดเช่นเดิมอีก ทำซ้ำเช่นนี้ 4 ครั้ง เอาสารละลายที่ได้แต่ละครั้ง มารวมกัน (140 ml.) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.1.2 ใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย การสกัดวิธีนี้ให้ผลดีกับดอกไม้ที่มีสีน้ำเงิน และสีม่วง ได้แก่ออกอัญชันและดอกช่อกนางใหญ่ วิธีทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ

3.1.1 ใช้ดอกอัญชัน (หรือดอกช่อกนางใหญ่) 10 กรัม สกัดด้วย methanol กรองละ 40 ml. สกัดซ้ำสามครั้ง เอาสารละลายที่สกัดได้มารวมกัน (98 ml.) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.1.3 ใช้ ethanol 95 % (B.P) เป็นตัวทำละลาย การสกัดวิธีนี้ใช้ได้กับดอกไม้ทุกชนิดที่มีสีแดง สีม่วง และสีน้ำเงินดังตัวอย่างการสกัดดอกกุหลาบ 2. (Earl of Dufferin)

ใช้กลีบดอกกุหลาบ 2. มา 10 กรัมบดให้ละเอียดพอสมควรนำไปสกัดด้วย ethanol 5 ครั้ง ๆ ละ 40 ml. เอาสารละลายที่สกัดได้แต่ละครั้งมารวมกัน (170 ml.) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

ตาราง 2. แสดงผลการทดสอบสารอินดิเคเตอร์จากดอกไม้

ชื่อดอกไม้	สีของดอก	สีเมื่ออยู่ในกรด		สีเมื่ออยู่ในด่าง	
		สังเกตครั้งแรก	สังเกตครั้งหลัง	สังเกตครั้งแรก	สังเกตครั้งหลัง
ผักบุ้ง	ม่วงอ่อน	แดงอ่อน	แดงอ่อน	เขียวเหลือง	เหลือง
ผักขมขาว	ม่วงอ่อน	แดงอ่อน	แดงอ่อน	เขียวเหลือง	เหลือง
ทองแดงใบลาย	แดงสดแกมส้ม	แดงสด	แดงสด	เขียว	เหลืองแกมเขียว
ทองแดงน้ำ	แดงสดแกมส้ม	แดงสด	แดงสด	เขียว	เหลืองแกมเขียว
คอยติ่ง	ม่วงอ่อน	แดงสด	แดงสด	เขียวเหลือง	เหลือง (สีชา)
เฟื่องฟ้า	แดงสด	แดงสด	แดงสด	เขียว	เหลืองแกมเขียว
ต้นทบ	ขาว	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เหลือง	เหลือง
อัญชัน	น้ำเงิน	แดงสด	แดงสด	เขียว	เหลืองแกมเขียว
อัญชัน	ขาว	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เหลือง	เหลือง
เข็ม	แดงสด	แดงสด	แดงสด	เขียว	เหลืองแกมเขียว
กาบเรือง	เหลืองสด	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เหลือง	เหลือง
หงอนไก่	แดงสด	แดงสด (จาง)	แดงสด	เขียวเหลือง	เหลือง
บานไม่รู้โรย	แดงสด	แดงสด (จาง)	แดงสด	เขียวเหลือง	เหลือง
บานบุรี	เหลืองสด	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เหลือง	เหลือง
บัวกียา	แดงสด	แดงสด	แดงสด	เขียว	เหลืองแกมเขียว
บัวหลวง	ชมพู	แดงสด	แดงสด	เขียวเหลือง	เหลือง
บานชื่น	แดงคล้ำ	แดงสด	แดงสด	เขียว	เหลืองแกมเขียว
พระโขนง	แดงสด	แดงสด	แดงสด	เขียว	เหลืองแกมเขียว
ชบา	แดงสด	แดงสด	แดงสด	เขียว	เหลืองแกมเขียว
ยี่โถ	แดงสด	แดงสด	แดงสด	เขียว	เหลืองแกมเขียว
เขอรั้ว	แดงสด	แดงสด	แดงสด	เขียว	เหลืองแกมเขียว

ตาราง 2. (ต่อ)

ชื่อดอกไม้	สีของดอก	สีเมื่ออยู่ในกรก		สีเมื่ออยู่ในคาง	
		สังเกตครั้งแรก	สังเกตครั้งหลัง	สังเกตครั้งแรก	สังเกตครั้งหลัง
กุหลาบ	แดงสดแกมส้ม	แดง	แดง	ม่วง เขียว	เขียวเหลือง
พุทธรักษา	แดงสด	แดง	แดง	ม่วง เขียว	เขียวเหลือง
ของนางใหญ่	ม่วงดำ	แดง	แดง	ม่วง — เขียว	เขียวเหลือง
โป๊ยเซียน	แดงสด	แดง	แดง	ม่วง — เขียว	เขียวเหลือง
หางนกยูงใหญ่	แดงมีจุดเหลือง	แดง	แดง	เขียว	เหลืองแกมเขียว
ตะแบก	เม็กมะปราง	แดงอ่อน ๆ	แดงอ่อน ๆ	เขียวเหลือง	เหลือง
ศรีตรัง	ม่วงอ่อน	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เหลืองแกมเขียว	เหลือง
รำเพย	เหลืองแกมส้ม	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เหลืองแกมเขียว	เหลือง
มะลิ	ขาว	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เหลืองแกมเขียว	เหลือง
รัก	ม่วงอ่อน	แดงอ่อน ๆ	แดงอ่อน ๆ	เขียวเหลือง	เหลือง
รัก	ขาว	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เหลืองแกมเขียว	เหลือง
เดกคัน (ตุ๊ก)	ม่วงดำ	แดง	แดง	ม่วง — เขียว	เขียวเหลือง

ตาราง 3. แสดงผลการคัดเลือกดอกไม้ชั้นสุดท้าย

ชื่อดอกไม้ (ชื่อสามัญ)	ชื่อพันธุ์	สีของดอก	เหตุผล
ทองหลางใบลาย (Coral Tree)	<i>Erythrina variegata</i> Linn. Var picta Hort	แดงส้ม	มีสารอินดิเกเตอร์ในดอกมาก หาได้ง่าย ไม่ต้องซื้อ มีปริมาณมาก
ทองหลางน้ำ	<i>Erythrina fusca</i> Lour	แดงส้ม	มีสารอินดิเกเตอร์ในดอกมาก หาได้ง่าย ไม่ต้องซื้อ มีปริมาณมาก
อัญชัน (Butt- terfly Pea)	<i>Clitoria ternatea</i> Linn.	น้ำเงิน	มีสารอินดิเกเตอร์ในดอกมาก หาได้ง่าย มีปริมาณมาก
พุทธรักษา (Chinese Hibiscus)	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> Linn.	แดง	มีสารอินดิเกเตอร์มาก หาได้ง่าย มีปริมาณมาก
ชบา	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> Linn.	แดง	มีสารอินดิเกเตอร์ในดอกมาก หาได้ง่าย มีปริมาณมาก
พุทธรักษา (Cannaceae)	<i>Canna Flaccida</i> Linn.	แดง	มีสารอินดิเกเตอร์ในดอกมาก หาได้ง่าย มีปริมาณมาก
ทองนางใหญ่ (Bush Thunbergia)	<i>Thunbergia erecta</i> T. Anderson var caerulea Hort.	ม่วงดำ	มีสารอินดิเกเตอร์ในดอกมาก นิยมปลูกตามบ้าน
เฟื่องฟ้า 1 (Bougainvilleas)	<i>Bougainvillea specta-</i> bills Willdenow	แดงส้ม	มีสารอินดิเกเตอร์ในดอกมาก หาได้ง่าย มีปริมาณมาก
เฟื่องฟ้า 2 (Bougainvilleas)	<i>Bougainvillea specta-</i> bills Willdenow	แดง	มีสารอินดิเกเตอร์ในดอกมาก หาได้ง่าย มีปริมาณมาก
กุหลาบ 1 (Fusillier)	<i>Rosa Fleribunda</i>	แดงส้ม	มีสารอินดิเกเตอร์ในดอกมาก หาได้ง่าย มีปริมาณมาก

ตาราง 3. (ต่อ)

ชื่อดอกไม้ (ชื่อสามัญ)	ชื่อพันธุ์	สีของดอก	เหตุผล
กุหลาบ 2 (Earl of Dufferin)	Rosa elinensis Jacq. var Semperflorens Kochne	แดง	มีสารอินดิเกเตอร์ในดอกมาก หาได้ง่าย มีปริมาณมาก

3.1.4 ใช้สุร่า 40 ดีกรี เป็นตัวทำละลาย วิธีนี้ใช้กับดอกไม้ทุกชนิดที่มีสีแดง
สีม่วง และสีน้ำเงิน การทดลองมีวิธีการเช่นเดียวกันกับข้อ 3.1.3

3.20 วิธีการที่มีประสิทธิภาพ

การสกัดสีจากกลีบดอกไม้โดยวิธีนี้ใช้ได้กับดอกไม้ทุกชนิด ทุกสี วิธีการสกัดมี

3 วิธีคือ

3.2.1 ใช้ methanolic hydrogen chloride 1 % ⁵ เป็นตัวทำละลาย

เอา methanol (B.P.) มากล้นใหม่เก็บเฉพาะ fraction
ที่เดือดที่ 61 - 65° C เอา methanol ที่กลั่นใหม่ 124 ml. ผสมกับ hydrochloric
acid 37 % (R.F.) 2 ml. จะได้ methanolic hydrogen chloride 1% (w/w)
สำหรับดอกไม้ทุกชนิด มีวิธีการสกัดเหมือนกันดังนี้ เอากลีบดอกไม้สดล้างน้ำให้สะอาด
นำไปอบใน oven ที่อุณหภูมิ 80 - 90° C เป็นเวลา 4 - 5 ชั่วโมง นำเอาออกมาบด
ให้ละเอียดพอสมควร (ด. อียคมากไปจะยากต่อการกรอง) ชั่งกลีบดอกไม้ที่บดแล้ว 10 กรัม
ใส่ในภาชนะขนาด 200 ml. เติม methanolic hydrogen chloride 1%
(methanol 124 ml. ใน HCl 37 % 2 ml.) 40 ml. เขย่า 10 นาที ทุก ๆ

5

Reynolds, T.M., Robinson, R., and Scott-Moncrieff, R., J. Chem. Soc., 1235 (1954).

2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองเอา filtrate เก็บไว้ หากที่เหลือเทขึ้นลงบนใบ
เพื่อทำการสกัดใหม่ สกัดซ้ำ 4 ครั้ง เอา filtrate ที่ได้มารวมกัน (145 ml.)
เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.2 ใช้ ethanolic hydrogen chloride 1 %⁶ เป็นตัวทำละลาย

เอา ethanol 95 % (B.P.) ที่กลั่นใหม่มา 126 ml. ผสมกับ
hydrochloric acid 37 % (R.P.) 2 ml. จะได้ ethanolic hydrogen
chloride 1 % (w/w)

การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายดังกล่าวนี้ใช้ได้กับดอกไม้ทุกชนิด และมีวิธีการทดลอง
เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 เพียงแต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็น ethanolic hydrogen
chloride 1 % (ethanol 95 % 126 ml. ใน hydrochloric acid 37 %
2 ml.) เท่านั้น

3.2.3 การสกัดโดยใช้ Soxhlet Extraction Apparatus

เอาผ้าฝ้ายชนิดตาละเอียดมาเย็บให้เป็นถุงมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 cm.
สูง 15 cm. แล้วนำไปต้มใน 0.5 M sodium hydroxide 3 ชั่วโมง นำออกมาซักด้วย
น้ำสะอาดหลาย ๆ ครั้ง (3 ครั้ง) นำกลับไปที่ต้มในน้ำกลั่นอีก 3 ชั่วโมง เปลี่ยนน้ำทุก ๆ ครั้งชั่วโมง
นำลงไปวางให้แห้งสนิท นำกลีบดอกไม้แห้งที่จะทำการสกัด (การทำกลีบดอกไม้ให้แห้งทำตามวิธีกา
ในข้อ 3.2.1) มาบดให้ละเอียด กรอกใส่ในถุงผ้าฝ้ายที่สะอาดและแห้งให้มีความสูง 10 cm.
มัดปากให้แน่น นำถุงผ้านี้ใส่ใน soxhlet tube ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 cm. สูง 12 cm.
แล้วนำไปใส่ใน column ของ soxhlet (ขนาด 200 ml.) เติม ethanol 95 %
(น้ำกลั่นใหม่ 2 ครั้ง ที่ 78°C) ลงใน column จนท่วมถุงผ้า (ประมาณ 70 ml.)
และอีกประมาณ 300 ml. ใส่ไว้ในคอนโทกลมส่วนที่อยู่ข้างล่างของเครื่องมือ นำไปต้มบนน้ำ
เดือด ปล่อยให้ไอน้ำไหลผ่าน condenser ตลอดเวลา จนเห็นว่าสารละลายที่ถูกดูดออกจาก
column ไม่มีสีของกลีบดอกไม้ (แดงหรือม่วง) ไหลออกมา ให้หยุดการสกัด (ประมาณ

⁶ Acheson, R.M., "An Introduction to the Chemistry of
Heterocyclic Compounds," p. 285-299, 1967.

12 ชั่วโมง) เอาสารละลายสีแดง (หรือม่วง) ที่อยู่ในคนโทกลมออกมารองอีกครึ่ง เก็บสารละลายที่กรองได้ (292 ml.) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

4.00 การทำให้บริสุทธิ์

4.10 การทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการแบบง่าย

การทดลองนี้จะได้กับสารละลายที่สกัดได้จากดอกไม้ทุกชนิดที่อยู่ในขอบข่ายของการศึกษาครั้งนี้ และใช้กับสารละลายที่สกัดจากทุก ๆ วิธีดังได้กล่าวมาแล้วในข้อ 3.00 วิธีการทดลองทำตามลำดับขั้นดังนี้

7

4.1.1 การทำลาย acylated anthocyanin

เอาสารละลายที่สกัดได้ (crude extract) จากการทดลองในข้อ

3.1.1 (หรือ 3.1.2 หรือ 3.1.3 หรือ 3.1.4 หรือ 3.2.3) มา 50ml. เติม 4 M hydrochloric acid 3 - 4 หยด แก้วเบา ๆ จะได้สารละลายที่สีแดง ทำให้เป็นกลางโดยเติม 4 M sodium hydroxide ที่ละหยด แก้วเบา ๆ จนสารละลายมีสีเขียว ทำกลับให้เป็นกรดอีกครั้งโดยการเติม 4 M hydrochloric acid ที่ละหยดจนกระทั่งสารละลายมีสีม่วงเข้มหรือสีแดง นำสารละลายนี้ไปทำให้เข้มข้นโดยการลดความดันจนปริมาตรลดลงเหลือ 20ml. นำสารละลายนี้ไปผ่าน column ต่อไป

สำหรับสารละลายที่สกัดได้ (crude extract) จากการทดลองในข้อ 3.2.1

(หรือ 3.2.2) เป็นสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นกรดอยู่แล้ว ดังนั้นการทำลาย acylated anthocyanin จึงเติม 4 M sodium hydroxide ได้ทันที ที่ว่าจากนั้นทำกลับให้เป็นกลางมีฤทธิ์เป็นกรดอีกครั้งโดยการเติม 4 M hydrochloric acid และในตอนต้นก็ทำได้ สารละลายเข้มข้นเช่นเดียวกับขั้นตอนแรก

4.1.2 การเตรียม adsorbent

Adsorbent ที่ใช้ในการทดลองนี้ 2 ชนิดคือ calcium sulfate จาก native gypsum และแป้งมันสำปะหลัง (cassava or starch powder) 2 มิลลิ

7

Williams, A.H., Chem. & Ind., (London), 120 (1955)

สีขาวบริสุทธิ์ ที่วางขายตามท้องตลาด

การเตรียม calcium sulfate

เอา native gypsum (powder) มา 500 กรัมใส่ใน beaker ขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปจนระดับน้ำอยู่ที่ 750 ml. กวนด้วยแท่งแก้วหมุนเป็นวงกลม ในทิศทางเดียวกัน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง เศษดินและหินหรือสิ่งอื่นที่หนักกว่า calcium sulfate จะนอนก้น ส่วน calcium sulfate ซึ่งเบากว่าจะอยู่บนผิวน้ำ (สีขาวกว่าชั้นอื่น) และจะมี impurities บางชนิดละลายอยู่ในน้ำ (สีคล้ำ) เทน้ำออก เติมน้ำกลั่นลงไปใหม่ กวนตั้งทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง กระทำซ้ำเช่นเดิม เปลี่ยนน้ำกลั่น 4 ครั้ง ครั้งสุดท้าย (ครั้งที่ 4) ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 8 ชั่วโมง (หรือค้างคืน) เทน้ำกลั่นออกให้มากที่สุดโดยไม่ให้ calcium sulfate ที่ติดอยู่ผิวหน้าไหลตามออกมา เอาช้อนตัก calcium sulfate ออกมาใส่ beaker ที่สะอาดเพื่อนำไปใช้ในการเตรียม column ต่อไป

สำหรับแบ่งมันสำปะหลังไม่ต้องมีการเตรียมอีกแต่อย่างใด เมื่อซื้อมาจากตลาดนำไปใช้ได้เลย

4.1.3 การเตรียม column calcium sulfate และการทำให้บริสุทธิ์

ทำ column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 cm. สูง 20 - 25 cm. (ใช้ buret แทนได้) อุดปลายล่างด้วยสำลีบาง ๆ เอา calcium sulfate ที่เตรียมได้จากข้อ 4.1.2 มาละลายในน้ำกลั่นจนจวนแล้วเติมลงใน column ตั้งทิ้งค้างคืนเพื่อให้ calcium sulfate ตกตะกอนโดยมีน้ำกลั่นไหลอยู่ตลอดเวลา calcium sulfate ใน column เมื่อปล่อยให้ตกตะกอนแล้ว 12 ชั่วโมง (ความสูงประมาณ 12 - 14 cm.) ตัดกระดาษกรองให้เป็นวงกลมที่มีขนาดเล็กกว่า column เล็กน้อยใส่ลงใน column ปิดผิวหน้าของ calcium sulfate วันต่อมาเมื่อน้ำจวนแห้งถึงผิวหน้าของ calcium sulfate ใช้ pipet ดูดสารละลายอินดิเกเตอร์เข้มข้นที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.1.1 มา 1.0 ml. ค่อย ๆ เติมน้ำลงใน column ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายขึ้นผ่าน column จนหมด แล้วเติมน้ำกลั่นลงไป 2 ml. รอจนกระทั่งน้ำกลั่นไหลผ่าน

column ลงไปเกือบหมด เติมน้ำกลั่นลงไปอีกคราวนี้เติมจนเต็ม column คอยสังเกต band ของอินดิเกเตอร์ที่ผ่าน column ออกมา 2 ml. แรกทิ้งไป แต่จากนั้น ให้เก็บเอาไว้ 5 ml. นำไปทำให้เข้มข้นโดยการลดความเข้มข้นปริมาตรเหลือ 2.5 ml.

เอาสารละลายเข้มข้นที่ได้จากการผ่าน column ครั้งแรก 2.5 ml. มาผ่าน column calcium sulfate ซ้ำอีกครั้ง (เตรียม column ใหม่) คราวนี้เติม สารละลายลงใน column ทั้งหมด 2.5 ml. และได้สารละลายที่ผ่าน column ออกมา ครั้งที่สอง 10 ml. นำไปทำให้เข้มข้นโดยลดความเข้มข้นเหลือปริมาตร 2.0 ml. เอาสารละลาย ที่ได้ครั้งสุดท้าย 2.0 ml. นี้ไปผ่าน column ของแป้งมันสำปะหลังต่อไป

4.1.4 การเตรียม column แป้งมันสำปะหลัง และการทำให้บริสุทธิ์

หา column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 – 3.0 cm. สูง 20 – 30 cm. (ใช้เครื่องกวนแน่นที่แตกมาแต่งปลายทั้งสองให้เรียบแทนได้) ปลายด้านล่างรองด้วยสำลี แล้วหุบด้วยผ้าขาวบางที่สะอาด เอาแป้งมันสำปะหลัง (จากข้อ 4.1.2) มาละลายในน้ำกลั่นเหลว ใน column ตั้งทิ้งค้างคืน (แป้งมันสำปะหลังใน column เมื่อปล่อยให้ตกตะกอน 12 ชั่วโมง การมีความสูง 15 – 17 cm.) เมื่อน้ำจวนแห้งถึงผิวหน้าเอา pipet ดูดสารละลายอินดิเกเตอร์เข้มข้นที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.1.3 มา 2.0 ml. เทลงใน column ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายอินดิเกเตอร์ซึมผ่านลงไปหมด จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไป 4.0 ml. รอจนกระทั่งน้ำกลั่นซึมผ่าน column ลงไปเกือบหมดให้เติมน้ำกลั่นลงไปใหม่คราวนี้เติมจนเต็ม column สารอินดิเกเตอร์จะซึมผ่าน column ลงมาอย่างช้า ๆ (ประมาณ 12 ชั่วโมง สำหรับ column ที่มีความสูงของแป้งมันสำปะหลัง 17 cm.) เมื่อสารอินดิเกเตอร์ซึมผ่าน ออกมาจาก column 2 ml. แรกทิ้งไป ต่อจากนั้นรองเก็บเอาไว้ประมาณ 12 ml. นำไปทำให้เข้มข้นโดยการลดความเข้มข้นเหลือปริมาตร 2.0 ml.

เอาสารละลายเข้มข้นที่ได้จากการผ่าน column ครั้งแรก 2.0 ml. มาผ่าน column ซ้ำอีกครั้ง (เตรียม column แป้งมันสำปะหลังใหม่) เติมน้ำกลั่นลงใน column 2.0 ml. elute ด้วยน้ำกลั่น 50.0 ml. ได้สารละลายผ่านออกมาจาก column ประมาณ 12 ml. และทำให้เข้มข้นเหลือปริมาตร 2.0 ml. (เท่าเดิม)

เก็บสารละลายเข้มข้นเอาไว้เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป.

4.20 การทำใบวิสุทธิโดยวิธีที่มีประสิทธิภาพ

4.2.1 วิธีทำใบตกตะกอน⁸

การทดลองนี้ใช้ได้กับดอกไม้ที่มีสีม่วง และสีน้ำเงิน ได้แก่ออกของนาง และดอกอัญชัน การทดลองทำตามลำดับ ดังนี้

1. เอาสารละลายของดอกชองนางที่สกัดได้จากการทดลอง ในข้อ 3.2.1 (หน้า 42) มา 400 ml. (จากน้ำหนักของดอกชองนางสด 50 กรัม) ทำให้เข้มข้นโดยลดความเข้มข้นเหลือปริมาตร 100 ml.

2. เอาสารละลายเข้มข้นจากข้อ 1. มาอุ่นให้ร้อนที่ $50 - 70^{\circ}\text{C}$ เติมผลึกของ lead acetate ลงไปทีละน้อย กวนตลอดเวลาจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง (purple) เติม 6 M hydrochloric acid 2 หยด ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที lead chloride จะนอนก้น กรองเอา lead chloride ออก เก็บ filtrate ได้ 100 ml.

3. แบ่ง filtrate ที่ได้จากข้อ 2. ไว้ 2 ml. ที่เหลือ เติมผลึก lead acetate ต่อไปอีก กวนตลอดเวลาจนกระทั่งตะกอนที่เกิดขึ้นมีสีน้ำเงิน หรือน้ำเงินแกมเขียว (สีเขียวที่เกิดขึ้นเนื่องมาจาก anthoxanthins) จึงหยุดเติม lead acetate . เอา filtrate ที่เก็บไว้ในตอนแรก 2 ml. เติมลงไปเพื่อละลายตะกอนสีเขียวให้หมดไป กวนต่อไปอีก 30 นาที แล้วตั้งทิ้งค้างคืน

4. วันต่อมาจะเห็นตะกอนสีน้ำเงินหรือน้ำเงินแกมเขียวนอนก้น รินสารละลายข้างบนออก ล้างตะกอนสองครั้งด้วย methanol (ก่อนใช้ครั้งใหม่ 2 ครั้ง) เอาตะกอนสีน้ำเงิน (หรือสีน้ำเงินแกมเขียว) มาเติม glacial acetic acid กับน้ำ (29 : 1 v/v) 20 ml. คนติดต่อกัน 1 ชั่วโมง จากนั้นคน 10 นาทีทุก ๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ถ้าตะกอนสีน้ำเงินยังละลายไม่หมดให้เติม glacial acetic acid กับน้ำ (29 : 1 v/v) ลงไปอีก 5 ml. แล้วกวน 10 นาทีทุก ๆ 1 ชั่วโมงเป็นเวลาอีก

⁸ Reynolds, T.M., Robinson, R., and Scott-Moncrieff, R., loc.cit.

5 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอาตะกอนสีเทาทิ้งไป เก็บ filtrate สีแดงเข้ม 20 ml. เอาไว้

5. เอา filtrate จากข้อ 4. มา 20 ml. ทำให้เย็น (10°C) แล้วเติม dry peroxide - free ether ลงไปมาก ๆ (600 ml.) จะได้ตะกอนสีน้ำเงินเกิดขึ้น impurities ที่เหลืออยู่จะติดไปกับ ether (สีน้ำตาลอ่อนและขุ่น) ปล่อยให้ตะกอนนอนกัน (1 ชั่วโมง) ริน ether ออกแล้วเติม dry peroxide - free ether ลงไปใหม่ ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ริน ether ออก กรองเอาตะกอนที่ได้เก็บไว้

6. เตรียมสารละลาย 1-propanol : methanolic hydrogen chloride 25 % (methanol 9 ml. ผสมกับ hydrochloric acid 37 % 6 ml.) = 9 : 1 (v/v) โดยเอา 1-propanol 18 ml. ผสมกับ methanolic hydrogen chloride 25 % (w/w) 2 ml. จะได้สารละลาย 1-propanol : methanolic hydrogen chloride 25 % (w/w) = 9 : 1 (v/v) จำนวน 20 ml.

7. เอาตะกอนที่ได้จากข้อ 5. เติม 1 propanol : methanolic hydrogen chloride 25 % (9 : 1 v/v) ลงไปครั้งละ 1 ml. เขย่าจนกระทั่งตะกอนสีน้ำเงินละลายหมด กรองเอา lead chloride (ตะกอนสีขาว) ออก เก็บ filtrate สีแดงเข้มไว้ประมาณ 10 ml. แล้วนำไปตกตะกอนด้วย dry peroxide free ether ตามวิธีในข้อ 5. จะได้ตะกอนสีแดง

8. เตรียมสารละลาย 1-propanol : methanolic hydrogen chloride 10 % w/w (methanol 11 ml. ผสมกับ hydrochloric acid 37 % 2 ml.) = 9 : 1 v/v โดยเอา 1-propanol มา 18 ml. ผสมกับ methanolic hydrogen chloride 10% (w/w) 2 ml. จะได้สารละลาย 1-propanol : methanolic hydrogen chloride 10 % (w/w) = 9 : 1 v/v จำนวน 20 ml.

๑. เอาตะกอนสีแดงจากข้อ 7. เติม 1-propanol :

methanolic hydrogen chloride 25 % (w/w) = ๑ : 1 v/v (จากข้อ 8.) ลงไปครั้งละ 1 ml. เขย่าจนตะกอนสีแดงละลายหมด กรองเอาตะกอนสีขาว (lead chloride) ออก เก็บ filtrate สีแดงเข้าไว้ ประมาณ 10 ml. แล้วนำไปตกตะกอนด้วย dry peroxide - free ether ตามวิธีในข้อ 5. จะได้ตะกอนสีแดงเข้ม

1๐. เอาตะกอนสีแดงเข้มจากข้อ ๑. เติม 1-propanol :

methanolic hydrogen chloride 1 % w/w (จากข้อ 3.2.1 (หน้า 42) = ๑ : 1 (v/v) ลงไปครั้งละ 1 ml. จนตะกอนสีแดงเข้มละลายหมด นำไปกรองเอา filtrate สีแดงเข้มเก็บไว้ประมาณ 10 ml. แล้วนำ filtrate ที่ได้ไปตกตะกอนด้วย dry peroxide free ether ตามวิธีในข้อ 5. จะได้ตะกอนสีแดงเข้มทึบแสง

11. เอาตะกอนสีแดงเข้มทึบแสงจากข้อ 1๐. เติม

methanol B.P. (ที่กลั่นใหม่ 2 ครั้ง) ลงไปที่ละน้อย จนตะกอนสีแดงเข้มละลายหมด กรองเอา filtrate เก็บไว้ประมาณ 10 ml. แล้วนำ filtrate ไปตกตะกอนด้วย dry peroxide - free ether ตามวิธีในข้อ 5. จะได้ตะกอนสีแดงเข้มทึบแสง ทำการทดลองในข้อนี้ซ้ำ 2 ครั้ง ครั้งสุดท้ายจะได้ตะกอนสีแดงเข้มทึบแสงหนัก 0.3 กรัม จากกลีบสด 50 กรัม (yield ประมาณ 0.6 %)

4.2.2 ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Column Chromatography

การทดลองแบ่งเป็นสองตอน ตอนแรกใช้ column ของ calcium sulfate⁹ ตอนที่สองใช้ column ของ alumina¹⁰ การทดลองนี้ใช้ได้กับดอกไม้นานาชนิดที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ และใช้ได้กับสารละลายอินดิเกเตอร์ที่ได้จากการสกัด

⁹ Karrer, P., and Weber, H.M., Helv. Chim. Acta, 19, 1025 (1936).

¹⁰ Harborne, J.B., Nature, 179, 429. (1957).

ทุกวิธี การทดลองทำตามลำดับขั้นดังนี้

1. เติ calcium sulfate (R.P.) มาบดให้ละเอียด
 วิกครั้งด้วย mortar (ถ้า calcium sulfate ที่เอามาในตอนแรกเกาะตัวเป็นก้อน)
 นำไปละลายใน ethanol B.P. ที่กลั่นใหม่ 2 ครั้ง (เดือดที่ 78°C) กวนให้เข้ากัน
 แล้วเทลงใน column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 cr. สูง 20. cm. ปล่อยให้ตกตะกอน
 6 ชั่วโมง (calcium sulfate ใน column ควรมีความสูงประมาณ 11 - 13 cm.)
 ตักกระดาษกรองเป็นวงกลบให้ขนาดเล็กกว่า column เล็กน้อย ใส่ลงไปที่ผิวหน้าของ
 calcium sulfate ใน column

2. เติ ethanol ใน column แล้ววนเกือบถึง
 ผิวหน้าของ calcium sulfate ใช้ pipet หยดสารละลายที่ได้จากการทดลองไว้
 4.1.1 (หน้า 44) ประมาณ 1.0 ml. ใส่บน column แล้วปล่อยให้ซึมผ่านลงไป
 calcium sulfate develop column ด้วย ethanol สารอินดิเกเตอร์
 (anthocyanin) จะผ่าน column ลงมาในลักษณะวงแหวนสีม่วงแดง โดย
 impurities บางส่วนวิ่งนำหน้า (สีน้ำวาลอน) และบางส่วนจะติดอยู่ส่วนบนของ
 column (สีน้ำตาลแก่)

3. เมื่อ anthocyanin เริ่มไหลออกจาก column
 (สีม่วงแดง) 2.0 ml. แรกทิ้งไป ต่อจากนั้นรองเก็บเอาไว้จนกระทั่งสีที่ผ่านออกมาจาก
 column เริ่มจาง (8.0 ml.) ก็ไม่ต้องรองรับอีกต่อไป นำสารละลายที่ได้ไปทำให้เข้มข้น
 โดยเอากว่า ครึ่งจนเหลือปริมาตร 2.0 ml.

นำสารละลายเข้มข้น 2.0 ml. ที่ได้กลั่นไปผ่าน column ของ calcium
 sulfate อีกครั้ง (ใช้ column ใหม่) กรวณผ่านสารละลายลงไปบน column
 2.0 ml. develop column ด้วย ethanol และเก็บสารละลายสีม่วงแดงที่ไหล
 ออกจาก column (ได้ 15.0 ml.) นำไปทำให้เข้มข้นโดยการลดความเข้มข้นเหลือ
 ปริมาตร 2.0 ml. เก็บสารละลายเข้มข้นที่ได้จากการผ่าน column ครั้งที่สองนี้ไว้เพื่อ
 ใช้ในการทดลองต่อไป

4. เอา alumina ใส่ลงใน ethanol ที่กลั่นใหม่
 คนให้เข้ากันแล้วเทลงใน column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 cm. สูง 20 cm.
 ปล่อยให้ตกตะกอน 4 ชั่วโมง (alumina ใน column ควรมีความสูงประมาณ
 11 – 13 cm.) ตักกระดาษกรองให้เป็นวงกลมมีขนาดเล็กกว่า column เล็กน้อยใส่ลงไป
 ใน column ปิดผิวหน้าของ alumina เอาไว้ เมื่อ ethanol ใน column
 ลดลงจนเกือบถึงผิวหน้าของ alumina เอา pipet ดูดสารละลายเข้มข้นที่ไล่จากข้อ
 3. หยดลงบน column ปล่อยให้ซึมผ่านลงไป ใน column จนหมด แล้วเติม ethanol
 ลงไป 5 ml. เมื่อ ethanol ผ่านลงไป ใน column เกือบหมด ให้เติม ethanol
 ความคงไปอีกจนครบ 100 ml. ติดต่อกัน เพื่อ elute impurities บางตัวออกไปก่อน

5. เตรียมสารละลายที่มีอัตราส่วนผสมดังต่อไปนี้

อันดับที่	ethanol (ml.)	glacial acetic acid (ml.)	total volume (ml.)
1	95	5	100
2	90	10	100
3	80	20	100
4	70	30	100
5	60	40	100
6	50	50	100
7	40	60	100

6. หลังจากผ่าน ethanol 100 ml. ลงไปใน column
 หมดเรียบร้อยแล้ว (การทดลองในข้อ 4.) ให้เอาสารละลายที่เตรียมได้จากการทดลองในข้อ
 5. เติมลงใน column ให้หมด 100 ml. ตามลำดับจาก 1 – 7 anthocyanin
 จากกลีบดอกไม้จะไหลผ่าน column ออกมาใน fraction ต่าง ๆ กัน เช่นคอลูกหลาว 1
 สีแดงเข้ม จะได้ anthocyanin ออกมา 2 fraction fraction แรกที่
 ethanol : glacial acetic acid = 90 : 10 ได้สารละลายที่ขุ่น อีก fraction
 จะออกมาที่ ethanol . glacial acetic acid = 60 : 40 ได้สารละลาย
 ที่มีสีแดงเข้ม

7. เมื่อ anthocyanin เริ่มไหลออกมาจาก column (สีแดง) 2 ml. แรกไม่ต้องเก็บเอาไว้เพราะอาจจะมี impurities ผสมอยู่ด้วย หลังจาก 2 ml. แรกผ่านไปแล้วให้เริ่มรองสารละลายเก็บเอาไว้ จนกระทั่งสีแดงของ อินดิเกเตอร์ที่ผ่านออกมาจาก column เริ่มเป็นสีแสดจาง ๆ (8 ml.) ก็ไม่ต้องรองรับ อีกต่อไป

เอาสารละลายที่ได้สีเก็บเอาไว้เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

4.2.3 การทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ion exchange chromatography.

การทดลองนี้ใช้ได้กับดอกไม้ทุกชนิดที่ทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่ไม่ มีฤทธิ์เป็นกรดหรือด่าง (คือการสกัดในข้อ 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3 และ 3.2.3) resin ที่ใช้คือ amberlite resin IRC- 50¹¹ ซึ่งเป็น weak cation exchange วิธีการทดลองมีดังนี้

1. ชั่ง amberlite resin IRC - 50 มา 20 กรัม ใส่ใน beaker ขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 500 ml. คนด้วยแท่งแก้วเบา ๆ เอา แผ่นแก้วปิดปาก beaker แล้วตั้งทิ้งค้างคืน

2. วันรุ่งขึ้นเทน้ำออกแล้วเติม 0.5 M hydrochloric acid ลงไป 200 ml. คนด้วยแท่งแก้วเบา ๆ ตั้งทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง เทน้ำออกแล้วล้าง resin ด้วยน้ำกลั่น 400 ml. 2 ครั้ง เติม 0.5 M sodium hydroxide 200 ml. คนด้วยแท่งแก้วเบา ๆ ตั้งทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง เทน้ำออกแล้วล้าง resin ด้วยน้ำกลั่น 400 ml. 2 ครั้ง เติม 0.5 M hydrochloric acid 200 ml. ลงไปใหม่อีก ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วแช่น้ำเก็บไว้

3. นำ column หรือ condenser ที่แตกแล้วมา แต่งปลายให้เรียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 - 3.0 cm. สูง 30 cm. เอาผ้าขาวที่สะอาด หุ้มจุกยางนำไปอุดปลายด้านล่างของ column ที่จุกยางเสียบหลอดแก้วที่ติดอยู่กับสายยาง ยาวประมาณ 10 cm. และมีเครื่องหนีบสายยางเพื่อปรับอัตราการไหลของตัวทำละลาย (flow

rate)

4. นำ column จากข้อ 3. มาล้างให้สะอาด ตั้งให้ทรงโขนแนวตั้งและบีบสายยางให้แน่น แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปใน column ประมาณ 3/4 ของความสูงของ column ตัก resin ที่เตรียมได้จากข้อ 2. เติมลงใน column ปลดบีบให้ resin ตกกลงไปนอนก้น column ชั่ว ๆ แล้วจึงค่อยเติมลงไปใหม่ จนกระทั่ง resin ใน column สูงถึง 20 cm. จึงหยุด ค่อย ๆ ปลดสายยางออกแล้วปรับอัตราเร็วของน้ำที่ไหลออกให้เป็น 0.5 ml./นาที

5. เมื่อน้ำจวนแห้งถึงผิวบนของ resin เติม 0.5 M hydrochloric acid ลงไปไหลผ่าน column จนหมด 100 ml. แล้วจึงเติมน้ำกลั่นตามลงไปอีกประมาณ 2 ลิตร จนน้ำที่ไหลออกมาไม่มีกรดเหลืออยู่เลย (วัดความเป็นกรดของน้ำด้วย pH-meter)

6. เอาสารละลายอินดิเกเตอร์ที่สกัดได้จากข้อ 3.1.1

เข้า 37 (หรือ 3.1.2 หรือ 3.1.3 หรือ 3.2.3) ผ่านลงไปใน column 25 ml. (flow rate เท่าเดิมคือ 0.5 ml./นาที) ตามด้วยน้ำกลั่นอีกประมาณ 2 ลิตร จนกระทั่งน้ำที่ผ่านออกจาก column ไม่มีสี สารที่ถูก resin คุมเอาไว้คือ anthocyanin¹² และ flavenoid¹³ elute ออกได้โดยใช้ ethanolic hydrogen chloride 0.5 % w/w (ใช้ ethanol 95% B.G. ที่กลั่นใหม่ 2 กรัง 512.0 ml. ผสมกับ hydrochloric acid 37 % 4.5 ml.) ผ่านลงไปใน column 500 ml. จะได้สารละลายไหลออกมาเป็นสีแดง (500 ml.) นำไปทำให้เข้มข้นโดยลดความดันลงเหลือปริมาตร 25 ml. ขณะลดความดันจะมีตะกอนสีเหลืองเกิดขึ้น กรองแล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 25 ml. ตะกอนทิ้งไปเก็บ filtrate สีแดง 50 ml. เอาไว้ในตู้เย็นที่ 0°C

¹² Johnson, G., Mayer, M.M., and Johnson, D.K., Food Research, 16, 169 (1951).

¹³ Morris, Q.L., Gage, T.B., and Wender, S.H., J. Am. Chem. Soc., 73, 3340 (1951).

7. วันรุ่งขึ้นนำเอาสารละลายมากรองในขณะเย็น ประมาณที่ 5°C) กระวนสีเหลืองน้ำตาลที่ติดบนกระดาษกรองทิ้งไป เก็บ filtrate สีแดงที่ได้เก็บเอาไว้ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ต่อไป

5.00 การนำไปใช้และการเก็บรักษา

5.10 การนำไปใช้ในด้านคุณภาพวิเคราะห์

5.1.1 การทำ Anthocyanin indicator paper

1. เอากระดาษกรอง (หรือกระดาษวาคเชียน หรือกระดาษอัดสำเนา) สีขาวมาตัดให้เป็นรียาวขนาด $0.8 \times 25 - 30 \text{ cm}$. หลาย ๆ อัน
2. เอาสารละลายอินดิเคเตอร์ที่ได้จากการสกัดโดยวิธีการแบบง่าย (จากการทดลองในข้อ 3.1.3 หน้า 38) มาทำให้เข้มข้นโดยลดความเข้มข้นปริมาตรลงเหลือครึ่งหนึ่ง เอากระดาษจากข้อ 1. จุ่มลงในสารละลายเข้มข้นนี้ เพื่อปลายข้างหนึ่งไว้ 2 cm . สำหรับมือจับ แล้กระดาษไว้ 5 นาที แล้วนำเอากระดาษไปอบใน oven ที่ $80 - 90^{\circ}\text{C}$ จนแห้ง (ประมาณ 10 นาที) แล้วนำมาตัดเป็นแผ่นเล็ก ๆ ขนาด $0.8 \times 4 \text{ cm}$. เก็บใส่ขวดรูปทรงกระบอกปิดจุกให้แน่นเพื่อกันความชื้น เอา indicator paper ที่ทำเสร็จแล้วมาทดสอบ โดยใช้ stirrer จุ่มใน 0.01 M hydrochloric acid นำไปแช่ที่กระดาษแล้วสังเกตการเปลี่ยนสี ทดลองซ้ำอีกครั้งโดยใช้ 0.01 M sodium hydroxide ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4
3. เอาสารละลายอินดิเคเตอร์ที่ได้จากการสกัดโดยวิธีที่มีประสิทธิภาพ (จากการทดลองในข้อ 3.2.1 หน้า 42) มาทำให้เป็นกลาง (สารละลายเดิมมีฤทธิ์เป็นกรด โดยใช้ 0.1 M sodium hydroxide หยดลงไปทีละหยด จนตลอดเวลาจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดงหรือสีม่วง จากนั้นนำไปทำให้เข้มข้นโดยลดความเข้มข้นปริมาตรลงเหลือครึ่งหนึ่ง เอากระดาษที่เตรียมไว้จากข้อ 1 จุ่มในสารละลายเข้มข้น แล้ไว้ 5 นาที แล้วนำไปอบใน oven ที่ $80 - 90^{\circ}\text{C}$ จนแห้ง (ประมาณ 10 นาที) ตัดกระดาษออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด $0.8 \times 4 \text{ cm}$. นำไปเก็บไว้ในขวดรูปทรงกระบอกปิดจุกให้แน่นเพื่อกันความชื้น จากนั้นนำ

indicator paper ออกมาทดสอบกับ 0.01 M hydrochloric acid และ 0.01 M sodium hydroxide ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4

4. ทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3. แต่ใช้สารละลายอินดิเคเตอร์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์แบบง่าย (ข้อ 4.1.4 หน้า 46) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.

5.1.2 การนำไปใช้ในรูปแบบสารละลาย

1. หา beaker ขนาด 10 ml. มา 2 ใบ ใบแรกใส่ 0.01 M hydrochloric acid 5.0 ml. ใบสองใส่ 0.01 M sodium hydroxide 5.0 ml.

นำ beaker ทั้งสองไปวางบนกระดาษสีขาว แล้วเติมสารละลายอินดิเคเตอร์ที่ได้จากการสะกัดโดยวิธีการแบบง่าย (ข้อ 3.1.3) ลงไป beaker ละ 0.5 ml. แล้วสังเกตการเปลี่ยนสี

2. เอา beaker ขนาด 10 ml. มา 1 ใบใส่ 0.01 M sodium hydroxide 7.0 ml. นำไปวางบนกระดาษสีขาว แล้วเติมสารละลายอินดิเคเตอร์ที่ได้จากการสะกัดโดยวิธีที่มีประสิทธิภาพ (ข้อ 3.2.1) ลงไป 0.5 ml. สังเกตการเปลี่ยนสี

3. ทดลองเหมือนข้อ 1. แต่ใช้อินดิเคเตอร์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการแบบง่าย (ข้อ 4.1.4)

4. ทดลองเหมือนข้อ 1. แต่ใช้อินดิเคเตอร์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีที่มีประสิทธิภาพ (ข้อ 4.2.2)

ผลการสังเกตสีได้แสดงไว้ในตาราง 5.

5.20 การนำไปใช้ในด้านปริมาณวิเคราะห์

วิธีการนำเอาสารอินดิเคเตอร์จากดอกไม้มาทำเป็นเครื่องบอกถึงจุดที่กรดและด่างทำปฏิกิริยากันพอดีในการ titration แบ่งออกเป็น 4 หมวด คือ

1. การ titrate ระหว่างกรดแก่กับด่างแก่ ในที่นี้ได้แก่ 0.1 M hydrochloric acid กับ 0.1 M sodium hydroxide

2. การ titrate ระหว่างกรดแก่กับด่างอ่อน ในที่นี้ได้แก่ 0.1 M hydrochloric acid กับ 0.1 M aqueous ammonia solution

ตาราง 4. แสดงผลการเปลี่ยนสีของ indicator paper จากดอกไม้ชนิดต่าง ๆ
เมื่อทดสอบกับ 0.01 M hydrochloric acid และ 0.01 M
sodium hydroxide

ชื่อดอกไม้	Indicator paper จากการ สกัดแบบง่ายและ ไม่บริสุทธิ์ (จากข้อ 3.2.1)		Indicator paper จากการ สกัดแบบมีประสิทธิ ภาพและไม่บริสุทธิ์ (จากข้อ 3.2.1)		Indicator paper จากการ ทำให้บริสุทธิ์แบบ ง่าย (จากข้อ 4.1.4)		Indicator paper จากการ ทำให้บริสุทธิ์แบบ มีประสิทธิภาพ (จากข้อ 4.2.2)	
	สีในกรด	สีในด่าง	สีในกรด	สีในด่าง	สีในกรด	สีในด่าง	สีในกรด	สีในด่าง
ทองหลางใบลาย	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	น้ำเงิน
ทองหลางน้ำ	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	น้ำเงิน
อัญชัน	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียวแก่	แดง	น้ำเงิน
พู่ระหง	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	น้ำเงิน
ชบา	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	น้ำเงิน
พุดริ้ว	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียวแก่	แดง	น้ำเงิน
ชองนางใหญ่	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียวแก่	แดง	น้ำเงิน
เฟื่องฟ้า 1	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	น้ำเงิน
เฟื่องฟ้า 2	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียวแก่	แดง	น้ำเงิน
กุหลาบ 1	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	น้ำเงิน
กุหลาบ 2	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียวแก่	แดง	น้ำเงิน

ตาราง 5. แสดงผลการสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายอินดิเคเตอร์

ชื่อดอกไม้	Indicator จากการสกัดแบบ ง่าย และไม่บริสุทธิ์ (จากข้อ 3.1.3)		Indicator จากการสกัดแบบ มีประสิทธิภาพ และไม่บริสุทธิ์ (จากข้อ 3.2.1)		Indicator จากการทำให้ บริสุทธิ์แบบง่าย (จากข้อ 4.1.4)		Indicator จากการทำให้ บริสุทธิ์แบบมี ประสิทธิภาพ (จากข้อ 4.2.2)	
	สีในกรด	สีในด่าง	สีในกรด	สีในด่าง	สีในกรด	สีในด่าง	สีในกรด	สีในด่าง
ทองหลางใบดอย	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	น้ำเงิน
ทองหลางน้ำ	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	น้ำเงิน
อัญชัน	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียวแก่	แดง	น้ำเงิน
พระโขนง	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	น้ำเงิน
ชบา	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	น้ำเงิน
พุดธิรักษา	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียวแก่	แดง	น้ำเงิน
ทองนางใหญ่	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียวแก่	แดง	น้ำเงิน
เฟื่องฟ้า 1	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	น้ำเงิน
เฟื่องฟ้า 2	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียวแก่	แดง	น้ำเงิน
กุหลาบ 1	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	น้ำเงิน
กุหลาบ 2	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียวแก่	แดง	น้ำเงิน

3. การ titrate ระหว่างกรดอ่อนกับด่างแก่ในฟีนอล์ฟไทลีน 0.1 M acetic acid กับ 0.1 M sodium hydroxide.

4. การ titrate ระหว่างกรดอ่อนกับด่างอ่อนในฟีนอล์ฟไทลีน 0.1 M acetic acid กับ 0.1 M aqueous ammonia solution

สารละลายอินดิเคเตอร์ที่ใช้แบ่งเป็น 3 ประเภทคือ

1. สารละลายอินดิเคเตอร์ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ (จากข้อ 3.1.3)
2. สารละลายอินดิเคเตอร์ที่ได้จากการกระทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการบางอย่าง (จากข้อ 4.1.4)
3. สารละลายอินดิเคเตอร์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีที่มีประสิทธิภาพ (จากข้อ 4.2.2)

ผลจากการทดลองดังแสดงในตาราง 6. - 17.

5.30 การเก็บรักษา

การทดลองในเรื่องนี้ใช้ดอกกุหลาบ 2. (Earl of Dufferin) วิธีทดลองแบ่งออกเป็น 4 ตอน ดังนี้

5.3.1 นำสารละลายของดอกกุหลาบ 2. ที่สกัดได้ตามวิธีการในข้อ 3.1.3 (หน้า 38) มากระเหยให้แห้งโดยลดความดัน และเอา crude extract ที่แห้งนี้ออกมา 5 ส่วน แต่ละส่วนหนัก 0.1 กรัม นำไปละลายใน น้ำกลั่น ethanol 95 % 0.1 M sodium hydroxide 0.1 M hydrochloric acid และ ethanolic hydrogen chloride 1 % อย่างละ 20 ml. ตามลำดับ นำสารละลายทั้ง 5 ชนิดใส่ขวดที่สะอาดปิดจุกให้แน่นแล้วเก็บเอาไว้ เมื่อครบ 7 วัน 30 วัน และ 90 วัน เอา pipet ดูดสารละลายแต่ละอย่างออกมามักรังละ 1.0 ml. มาทดสอบการเปลี่ยนสีในสารละลายของกรด (ใช้ 0.1 M hydrochloric acid) และในสารละลายของด่าง (ใช้ 0.1 M sodium hydroxide) ตามวิธีการทดสอบในข้อ 5.1.2 (หน้า 55) ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 18.

ตาราง 6 แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.10 M hydrochloric acid กับ 0.10 M sodium hydroxide โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่ยังไม่ได้นำไปปรับสี (จากข้อ 3.1.3)

อินดิเคเตอร์ ที่ใช้	สีที่เปลี่ยน	ปริมาตร ของอินดิ เคเตอร์ ที่ใช้ (ml.)	ปริมาตร ของ .10 M HCl ที่ใช้ ละครั้ง (ml.)	ปริมาตรของ .10 M NaOH ที่ใช้ (ml.)				%ของภาวะ เปลี่ยนของ NaOH ที่คลาด เคลื่อน
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
Bromthymol blue	เหลือง←น้ำเงิน	2 หยด	25.00	25.15	25.05	25.25	25.15	-0.60
ทองหลางใบลาย	แดง←เขียวเหลือง	1.00	25.00	24.62	24.65	24.62	24.63	+1.50
ทองหลางน้ำ	แดง←เขียวเหลือง	1.00	25.00	24.60	24.60	24.62	24.61	+1.58
อัญชัน	แดง←เขียวน้ำเงิน	1.00	25.00	24.47	24.47	24.47	24.47	+2.17
พระโขนง	แดง←เขียวเข้ม	1.00	25.00	24.60	24.55	24.62	24.59	+1.67
ชบา	แดง←เขียวเข้ม	1.00	25.00	24.65	24.62	24.65	24.64	+1.46
พุทธรักษา	แดง←เขียวอ่อน	1.00	25.00	24.45	24.55	24.50	24.50	+2.04
ชองนางใหญ่	แดง←เขียวน้ำเงิน	1.00	25.00	24.42	24.47	24.50	24.46	+2.21
เฟื่องฟ้า 1	แดง←เขียว	1.00	25.00	24.60	24.62	24.62	24.61	+1.58
เฟื่องฟ้า 2	แดง←เขียว	1.00	25.00	24.57	24.55	24.52	24.55	+1.83
กุหลาบ 1	แดง←เขียวเหลือง	1.00	25.00	24.52	24.52	24.55	24.53	+1.92
กุหลาบ 2	แดง←เขียวเหลือง	1.00	25.00	24.55	24.60	24.67	24.61	+1.58

ตาราง 7 แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.10 M hydrochloric acid กับ 0.10 M aqueous ammonia solution โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่ยังไม่ได้นำไปปรับสี (จากข้อ 3.)

อินดิเคเตอร์ ที่ใช้	สีที่เปลี่ยน	ปริมาตร ของอินดิ เคเตอร์ ที่ใช้ (ml.)	ปริมาตร ของ 0.10 M HCl ที่ใช้แต่ละ ครั้ง (ml.)	ปริมาตรของ 0.10 M NH_3 c. ที่ใช้ (ml.)				%ของความ เข้มข้นของ NH_3 aq. ที่คลาด เคลื่อน
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
Congo red	น้ำเงิน-แดง	2 หยด	25.00	24.92	25.00	24.95	24.95	+0.16
ทองหลางใบลาย	แดง-ม่วงน้ำเงิน	1.00	25.00	25.17	25.15	25.17	25.16	-0.64
ทองหลางน้ำ	แดง-ม่วงน้ำเงิน	1.00	25.00	25.12	25.12	25.12	25.12	-0.48
อัญชัน	แดง-ม่วงน้ำเงิน	1.00	25.00	25.05	25.05	25.05	25.05	-0.20
พุระหลง	แดง-น้ำเงินเขียว	1.00	25.00	25.12	25.07	25.10	25.10	-0.40
ชบา	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	25.20	25.20	25.15	25.18	-0.71
พุทธรักษา	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	25.17	25.15	25.15	25.16	-0.64
ทองนางใหญ่	แดง-ม่วงน้ำเงิน	1.00	25.00	25.05	24.97	25.02	25.01	-0.04
เฟื่องฟ้า 1	แดง-น้ำเงินคล้ำ	1.00	25.00	25.17	25.17	25.20	25.18	-0.71
เฟื่องฟ้า 2	แดง-น้ำเงินคล้ำ	1.00	25.00	25.20	25.20	25.22	25.21	-0.83
กุหลาบ 1	แดง-น้ำเงินเขียว	1.00	25.00	25.15	25.15	25.10	25.13	-0.52
กุหลาบ 2	แดง-น้ำเงินเขียว	1.00	25.00	25.10	25.12	25.15	25.12	-0.48

ตาราง 8 แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.10 M acetic acid กับ 0.10 M Sodium hydroxide โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่ยังไม่ได้นำมาใช้ (จากข้อ 3.1.3)

อินดิเคเตอร์ ที่ใช้	สีที่เปลี่ยน	ปริมาตร ของอินดิ เคเตอร์ ที่ใช้ (ml.)	ปริมาตร ของ 0.10 M HAc ที่ใช้แ ละครั้ง (ml.)	ปริมาตรของ 0.10 M NaOH ที่ใช้ (ml.)				%ของความ เข้มข้นของ NaOH ที่คลาด เคลื่อน
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
Phenolphth- -alein	ไม่มีสี-สีบานเย็น	2 หยด	25.00	24.98	25.02	25.02	25.01	-0.04
ทองหลางใบลาย	แดง-เขียวเหลือง	1.00	25.00	24.02	24.10	24.05	24.06	+3.91
ทองหลางน้ำ	แดง-เขียวเหลือง	1.00	25.00	23.98	24.00	24.02	24.00	+4.17
อัญชัน	แดง-เขียว	1.00	25.00	24.12	24.08	24.08	24.09	+3.78
พุระหง	แดง-เขียวคล้ำ	1.00	25.00	24.02	24.05	24.02	24.03	+4.04
ชบา	แดง-เขียวคล้ำ	1.00	25.00	24.12	24.10	24.05	24.09	+3.78
พุทธรักษา	แดง-เขียว	1.00	25.00	23.98	23.98	24.00	23.99	+4.21
ของนางใหญ่	แดง-เขียวคล้ำ	1.00	25.00	23.95	23.95	23.95	23.95	+4.38
เฟื่องฟ้า 1	แดง-เขียว	1.00	25.00	24.10	24.10	24.10	24.10	+3.73
เฟื่องฟ้า 2	แดง-เขียว	1.00	25.00	24.08	24.10	24.08	24.09	+3.76
กุหลาบ 1	แดง-เขียวเหลือง	1.00	25.00	24.05	24.02	24.08	24.05	+3.95
กุหลาบ 2	แดง-เขียวเหลือง	1.00	25.00	24.08	24.05	24.05	24.06	+3.91

ตาราง 9 แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.10 M acetic acid กับ 0.10 M aqueous ammonia solution โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่ยังไม่ไทเทรต (จากข้อ 3.1.3)

อินดิเคเตอร์ ที่ใช้	สีที่เปลี่ยน	ปริมาตร ของอินดิ เคเตอร์ ที่ใช้ (ml.)	ปริมาตร ของ 0.10 M HCl ที่ใช้แต่ละ ครั้ง (ml.)	ปริมาตรของ 0.10 M $\text{NH}_3\text{aq.}$ ที่ใช้ (ml.)				%ของความ เข้มข้นของ $\text{NH}_3\text{aq.}$ ที่ตก เคลื่อน
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
Bromthymol- blue	เหลือง-น้ำเงิน	2 หยด	25.00	25.02	24.98	25.00	25.00	0.00
ทองหลางใบลาย	แดง-เขียวเหลือง	1.00	25.00	24.52	24.60	24.55	24.56	+1.79
ทองหลางน้ำ	แดง-เขียวเหลือง	1.00	25.00	24.62	24.62	24.60	24.61	+1.58
อัญชัน	แดง-เขียวคล้ำ	1.00	25.00	24.40	24.42	24.40	24.41	+2.42
พระโขนง	แดง-เขียว	1.00	25.00	24.52	24.52	24.50	24.51	+2.00
ชบา	แดง-เขียว	1.00	25.00	24.50	24.52	24.50	24.51	+2.00
พุทธรักษา	แดง-เขียวคล้ำ	1.00	25.00	24.48	24.45	24.50	24.48	+2.12
ชองนางใหญ่	แดง-เขียวคล้ำ	1.00	25.00	24.45	24.45	24.42	24.44	+2.29
เฟื่องฟ้า 1	แดง-เขียว	1.00	25.00	24.55	24.55	24.58	24.56	+1.79
เฟื่องฟ้า 2	แดง-เขียว	1.00	25.00	24.58	24.55	24.58	24.57	+1.75
กุหลาบ 1	แดง-เขียว	1.00	25.00	24.50	24.55	24.55	24.53	+1.92
กุหลาบ 2	แดง-เขียว	1.00	25.00	24.55	24.55	24.55	24.55	+1.83

ตาราง 10 แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.10 M hydrochloric acid กับ 0.10 M sodium hydroxide โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่ทำให้ปริสทธิ์เบี่ยงง่าย (จากข้อ 1.1.4)

อินดิเคเตอร์	การ เปลี่ยนสี	ปริมาตร ของอินดิ เคเตอร์ (ml.)	ปริมาตร ของ .10 M HCl (ml.)	ปริมาตรของ NaOH (ml.)				%ของควา เข้มข้นขอ NaOH ที่หัก เคลื่อน
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
ทองหลางใบลาย	แดง-น้ำเงินเขียว	1.00	25.00	24.72	24.70	24.70	24.71	+1.17
ทองหลางน้ำ	แดง-น้ำเงินเขียว	1.00	25.00	24.70	24.75	24.70	24.72	+1.13
อัญชัน	แดง-น้ำเงินเขียว	1.00	25.00	24.62	24.65	24.62	24.63	+1.50
พุระหง	แดง-น้ำเงินเขียว	1.00	25.00	24.70	24.68	24.68	24.69	+1.26
ชบา	แดง-น้ำเงินเขียว	1.00	25.00	24.70	24.70	24.68	24.69	+1.26
พุทธรักษา	แดง-น้ำเงินเขียว	1.00	25.00	24.68	24.65	24.68	24.67	+1.54
ของนางใหญ่	แดง-น้ำเงินเขียว	1.00	25.00	24.65	24.65	24.62	24.64	+1.46
เฟื่องฟ้า 1	แดง-น้ำเงินเขียว	1.00	25.00	24.75	24.72	24.72	24.73	+1.09
เฟื่องฟ้า 2	แดง-น้ำเงินเขียว	1.00	25.00	24.72	24.75	24.78	24.75	+1.01
กุหลาบ 1	แดง-น้ำเงินเขียว	1.00	25.00	24.78	24.78	24.75	24.77	+0.93
กุหลาบ 2	แดง-น้ำเงินเขียว	1.00	25.00	24.78	24.75	24.75	24.76	+0.97

ตาราง 11 แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.10 M hydrochloric acid กับ 0.10 M aqueous ammonia solution โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่ทำโดยวิธีที่ง่าย
(จากข้อ 4.1.4)

อินดิเคเตอร์	การ เปลี่ยนสี	ปริมาตร ของอินดิ เคเตอร์ (ml.)	ปริมาตร ของ .10 M HCl (ml.)	ปริมาตรของ .10 M $\text{NH}_3 \text{ aq.}$ (ml.)				%ของความ เข้มข้นของ $\text{NH}_3 \text{ aq.}$ ที่คลาด เคลื่อน
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
ทองฟ้างใบลาย	แดง-เขียว	1.00	25.00	25.08	25.10	25.10	25.09	-0.36
ทองหลางน้ำ	แดง-เขียว	1.00	25.00	25.12	25.08	25.10	25.10	-0.40
อัญชัน	แดง-น้ำเงินเขียว	1.00	25.00	25.02	25.06	25.06	25.05	-0.20
พระโอง	แดง-เขียว	1.00	25.00	25.12	25.10	25.12	25.11	-0.44
ชบา	แดง-น้ำเงินเขียว	1.00	25.00	25.10	25.10	25.10	25.10	-0.40
พุทธรักษา	แดง-น้ำเงินเขียว	1.00	25.00	25.08	25.08	25.10	25.09	-0.36
ของนางใหญ่	แดง-น้ำเงินเขียว	1.00	25.00	25.05	25.02	25.05	25.04	-0.16
เฟื่องฟ้า 1	แดง-เขียว	1.00	25.00	25.10	25.10	25.15	25.12	-0.98
เฟื่องฟ้า 2	แดง-เขียว	1.00	25.00	25.12	25.15	25.10	25.12	-0.48
กุหลาบ 1	แดง-น้ำเงินเขียว	1.00	25.00	25.10	25.12	25.07	25.10	-0.10
กุหลาบ 2	แดง-เขียว	1.00	25.00	25.08	25.10	25.07	25.08	-0.32

ตาราง 12 แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.10 M acetic acid, กับ 0.10 M sodium hydroxide โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่ทำให้ปริสทธิ์แบบง่าย (จากขอ 4.1.4)

อินดิเคเตอร์	การเปลี่ยนสี	ปริมาตร ของอินดิ เคเตอร์ (ml.)	ปริมาตร ของ .10 M HAc (ml.)	ปริมาตรของ .10 M NaOH (ml.)				%ของความ เข้มข้นของ NaOH ที่คลาด เคลื่อน
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
ทองหลางใบลาย	แดง-เขียว	1.00	25.00	24.12	24.10	24.10	24.11	+3.69
ทองหลางน้ำ	แดง-เขียว	1.00	25.00	24.08	24.10	24.12	24.10	+3.73
อัญชัน	แดง-เขียวคล้ำ	1.00	25.00	23.98	24.02	24.05	24.01	+4.12
พุระหง	แดง-เขียว	1.00	25.00	24.05	24.05	24.08	24.06	+3.91
ชบา	แดง-เขียว	1.00	25.00	24.05	24.08	24.10	24.08	+3.82
พุทธรักษา	แดง-เขียวคล้ำ	1.00	25.00	24.02	24.00	24.05	24.02	+4.08
ชองนางใหญ่	แดง-เขียวคล้ำ	1.00	25.00	24.00	23.98	23.98	23.99	+4.21
เฟื่องฟ้า 1	แดง-เขียว	1.00	25.00	24.08	24.10	24.08	24.09	+3.78
เฟื่องฟ้า 2	แดง-เขียว	1.00	25.00	24.08	24.08	24.08	24.08	+3.82
กุหลาบ 1	แดง-เขียว	1.00	25.00	24.10	24.10	24.10	24.10	+3.73
กุหลาบ 2	แดง-เขียว	1.00	25.00	24.08	24.10	24.08	24.09	+3.78

ตาราง 13 แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.10 M acetic acid กับ 0.10 M aqueous ammonia solution โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่หาได้โดยวิธีที่แบบง่าย (จากข้อ 4.1.4)

อินดิเคเตอร์	การเปลี่ยนสี	ปริมาตร ของอินดิ เคเตอร์ (ml.)	ปริมาตร ของ .10 M HAc (ml.)	ปริมาตรของ .10 M NH ₃ aq. (ml.)				%ของควา เข้มข้นขอ NH ₃ aq. ที่คลาด เคลื่อน
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
ทองเหลืองใบลาย	แดง—เขียว	1.00	25.00	24.62	24.60	24.60	24.61	+1.58
ทองเหลืองน้ำ	แดง—เขียว	1.00	25.00	24.60	24.60	24.58	24.59	+1.67
อัญชัน	แดง—เขียวน้ำเงิน	1.00	25.00	24.55	24.55	24.58	24.56	+1.79
พุรสีโห่ง	แดง—เขียว	1.00	25.00	24.65	24.62	24.65	24.64	+1.46
ชบา	แดง—เขียว	1.00	25.00	24.65	24.65	24.65	24.65	+1.12
พุทธรักษา	แดง—เขียวน้ำเงิน	1.00	25.00	24.58	24.58	24.60	24.59	+1.67
ของนางใหญ่	แดง—เขียวน้ำเงิน	1.00	25.00	24.55	24.52	24.52	24.53	+1.92
เฟื่องฟ้า 1	แดง—เขียว	1.00	25.00	24.62	24.62	24.60	24.61	+1.58
เฟื่องฟ้า 2	แดง—เขียว	1.00	25.00	24.60	24.62	24.60	24.61	+1.58
กุหลาบ 1	แดง—เขียว	1.00	25.00	24.62	24.62	24.62	24.62	+1.54
กุหลาบ 2	แดง—เขียว	1.00	25.00	24.60	24.62	24.62	24.61	+1.58

ตาราง 14 แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.10 M hydrochloric acid กับ 0.10 M sodium hydroxide โดยใช้อินดิเคเตอร์บริสทรี (จากข้อ 4.2.2)

อินดิเคเตอร์	การเปลี่ยนสี	ปริมาตร ของอินดิ เคเตอร์ (ml.)	ปริมาตร ของ .10 M HCl (ml.)	ปริมาตรของ .10 M NaOH (ml.)				%ของความ เข้มข้นของ NaOH ที่คาด เคลื่อน
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
ทองหลางใบลาย	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	21.70	24.70	24.70	21.70	+1.21
ทองหลางน้ำ	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.68	24.70	24.72	24.70	+1.21
อัญชัน	แดง-ม่วงน้ำเงิน	1.00	25.00	21.62	21.62	21.62	21.62	+1.54
พุระหง	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	21.70	24.70	24.68	24.69	+1.26
ขมา	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.68	24.70	24.70	24.69	+1.26
พุทธรักษา	แดง-น้ำเงินเข้ม	1.00	25.00	24.67	24.67	24.65	24.66	+1.38
ของบางใหญ่	แดง-ม่วงน้ำเงิน	1.00	25.00	24.65	24.65	24.65	24.65	+1.42
เฟื่องฟ้า 1	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.72	24.70	24.72	24.71	+1.17
เฟื่องฟ้า 2	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.72	24.70	24.70	24.71	+1.17
กุหลาบ 1	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.75	24.75	24.77	24.76	+0.97
กุหลาบ 2	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.75	24.77	24.77	24.76	+0.97

ตาราง 15 แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.10 M hydrochloric acid กับ 0.10 M aqueous ammonia solution โดยใช้อินดิเคเตอร์บรียูธรี (จากข้อ 4.2.2)

อินดิเคเตอร์	การเปลี่ยนสี	ปริมาตร ของอินดิ เคเตอร์ (ml.)	ปริมาตร ของ .10 M HCl (ml.)	ปริมาตรของ .10 M $\text{NH}_3\text{aq.}$ (ml.)				%ของความ เข้มข้นของ $\text{NH}_3\text{aq.}$ ที่คลาก เคลื่อน
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
ทองหลางใบลาย	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	25.05	25.05	25.05	25.05	-0.20
ทองหลางน้ำ	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	25.05	25.05	25.02	25.05	-0.16
อัญชัน	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	25.00	25.02	25.02	25.01	-0.04
พระโอง	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	25.08	25.08	25.10	25.09	-0.36
ชบา	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	25.10	25.10	25.10	25.10	-0.40
พุทธรักษา	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	25.08	25.08	25.08	25.08	-0.32
ชองนางใหญ่	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	25.02	25.02	25.02	25.02	-0.09
เฟื่องฟ้า 1	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	25.10	25.10	25.12	25.11	-0.44
เฟื่องฟ้า 2	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	25.12	25.10	25.12	25.11	-0.44
กุหลาบ 1	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	25.08	25.10	25.08	25.09	-0.36
กุหลาบ 2	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	25.10	25.08	25.10	25.09	-0.36

ตาราง 16 แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.10 M acetic acid กับ 0.10 M sodium hydroxide โดยใช้อินดิเคเตอร์บรียูธรี (จากข้อ 4.2.2)

อินดิเคเตอร์	การ เปลี่ยนสี	ปริมาตร ของอินดิ เคเตอร์ (ml.)	ปริมาตร ของ .10 M HAc (ml.)	ปริมาตรของ .10 M NaOH (ml.)				%ของความ เข้มข้นของ NaOH ที่คลาก เคลื่อน
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
ทองหลางใบลาย	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.10	24.12	24.10	24.11	+3.69
ทองหลางน้ำ	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.10	24.10	24.08	24.09	+3.78
อัญชัน	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.00	24.02	24.00	24.01	+4.12
พุทระเือง	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.05	24.05	24.05	24.05	+3.95
ชบา	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.05	24.07	24.05	24.06	+3.91
พุทธรักษา	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.00	24.02	24.00	24.01	+4.12
ชองนางใหญ่	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.00	24.00	23.98	23.99	+4.21
เฟื่องฟ้า 1	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.08	24.08	24.08	24.08	+3.82
เฟื่องฟ้า 2	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.08	24.08	24.10	24.09	+3.78
กุหลาบ 1	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.10	24.10	24.12	24.11	+3.69
กุหลาบ 2	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.10	24.08	24.08	24.09	+3.78

ตาราง 17 แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.10 M acetic acid กับ 0.10 M aqueous ammonia solution โดยใช้อินดิเคเตอร์บรียูทธี (จากข้อ 4.2.2)

อินดิเคเตอร์	การเปลี่ยนสี	ปริมาตร ของอินดิ เคเตอร์ (ml.)	ปริมาตร ของ .10 M HAc (ml.)	ปริมาตรของ .10-M NH ₃ aq. (ml.)				%ของความ เข้มข้นของ NH ₃ aq. ที่คลาก เคลื่อน
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
ทองหลางใบลาย	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.62	24.62	24.60	24.61	+1.58
ทองหลางน้ำ	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.62	24.60	24.62	24.61	+1.58
อัญชัน	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.58	24.58	24.58	24.58	+1.71
พุระหง	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.65	24.65	24.65	24.65	+1.42
ชบา	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.65	24.62	24.65	24.64	+1.46
พุทธรักษา	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.60	24.60	24.60	24.60	+1.63
ทองนางใหญ่	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.55	24.58	24.55	24.56	+1.79
เฟื่องฟ้า 1	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.62	24.62	24.62	24.62	+1.54
เฟื่องฟ้า 2	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.60	24.62	24.60	24.61	+1.58
กุหลาบ 1	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.62	24.62	24.62	24.62	+1.54
กุหลาบ 2	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.62	24.62	24.62	24.62	+1.54

ตาราง 18. แสดงผลที่ปรากฏจากการเปลี่ยนสีของสารอินดิเคเตอร์โมบิรียูทรีของ
คอกกุธลาบ 2. เมื่อเก็บไว้ในช่วงเวลาต่างกัน และในแก้วทำละลาย
ต่างกัน

แก้วทำละลาย	สีเมื่อเก็บไว้ 7 วัน			สีเมื่อเก็บไว้ 30 วัน			สีเมื่อเก็บไว้ 90 วัน		
	สีในขวด	สีในกรก	สีในแก้ว	สีในขวด	สีในกรก	สีในแก้ว	สีในขวด	สีในกรก	สีในแก้ว
Water	ไม่มีสี	แดงจาง	เหลือง จาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	—	—	—
Ethanol 95 %	ม่วงจาง	แดงจาง	เหลือง จาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	—	—	—
NaOH 0.1M	เหลือง ซีด	แดงจาง	เหลือง จาง	ขุ่นดำ	ไม่มีสี	ไม่มีสี	—	—	—
HCl 0.1 M	แดง	แดง	เขียว เหลือง	แดง	แดง	เขียว เหลือง	แดง (ขุ่น)	แดง	เขียว เหลือง
EtOH+HCl 1 %	แดง	แดง	เขียว เหลือง	แดง	แดง	เขียว เหลือง	แดง	แดง	เขียว เหลือง

5.3.2 ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 5.3.1 แต่ใช้สารละลายของ
คอกกุธลาบ 2. ที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.1.4 (บิริสุทรีแบบง่าย) ผลการทดลองดังแสดง
ในตาราง 19.

ตาราง 19. แสดงผลการสังเกตการเปลี่ยนสีของสารอินดิเคเตอร์ที่ทำให้บริสุทธิ์
แบบง่ายของคอกกูดลาย 2. เมื่อเก็บไว้ในช่วงเวลาต่างกัน และ
ในตัวทำละลายต่างกัน

ตัวทำละลาย	สีเมื่อเก็บไว้ 7 วัน			สีเมื่อเก็บไว้ 30 วัน			สีเมื่อเก็บไว้ 90 วัน		
	สีในขวด	สีในกรก	สีในคาง	สีในขวด	สีในกรก	สีในคาง	สีในขวด	สีในกรก	สีในคาง
Water	ม่วงจาง	แดงจาง	เขียว จาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	—	—	—
EtOH 95%	ม่วงจาง	แดงจาง	น้ำเงิน จาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	—	—	—
NaOH 0.1 M	เขียว จาง	แดงจาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	—	—	—
HCl 0.1 M	แดง	แดง	น้ำเงิน เขียว	แดง (วุ่น)	แดง	เขียว	แดง (วุ่น)	แดง	เขียว
EtOH+HCl 1 %	แดง	แดง	น้ำเงิน เขียว	แดง	แดง	เขียว	แดง	แดง	เขียว

5.3.3 ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 5.3.1 แต่ใช้สารละลายของ
คอกกูดลาย 2. ที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.2.2 ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 20.

ตาราง 20. แสดงผลการสังเกตการเปลี่ยนสีของสารอินดิเคเตอร์บิสฟุทรี ของ
ดอกกุหลาบ 2. เมื่อเก็บไว้ในช่วงเวลาดังกัน และในตัวทำละลาย
ต่างกัน

ตัวทำละลาย	สีเมื่อเก็บไว้ 7 วัน			สีเมื่อเก็บไว้ 30 วัน			สีเมื่อเก็บไว้ 90 วัน		
	สีในขวด	สีในกรก	สีในอ่าง	สีในขวด	สีในกรก	สีในอ่าง	สีในขวด	สีในกรก	สีในอ่าง
Water	ม่วงจาง	แดงจาง	น้ำเงิน	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	—	—	—
EtOH 95%	ม่วงจาง	แดงจาง	น้ำเงิน	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	—	—	—
NaOH 0.1 M	น้ำเงิน	แดงจาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	—	—	—
HCl 0.1 M	แดง	แดง	น้ำเงิน	แดง	แดง	น้ำเงิน	แดง	แดง	น้ำเงิน
EtOH+HCl 1 %	แดง	แดง	น้ำเงิน	แดง	แดง	น้ำเงิน	แดง	แดง	น้ำเงิน

5.3.4 นำสารละลายอินดิเคเตอร์ที่เก็บรักษามาใช้ในด้านปริมาณวิเคราะห์

1. เอาสารละลายอินดิเคเตอร์ที่เก็บไว้ 7 วัน 30 วัน และ 90 วัน
จากการทดลองในข้อ 5.3.1 (ตาราง 18.) ข้อ 5.3.2 (ตาราง 19.) ข้อ 5.3.3
(ตาราง 20.) เฉพาะส่วนที่เก็บไว้ใน 0.1 M hydrochloric acid และ ethanolic
hydrogen chloride 1 % เอามาอย่างละ 10 ml. นำไป neutralise ด้วย 0.1 M
sodium hydroxide จนได้สารละลายเป็นสีม่วงแดง

2. เอาสารละลายสีม่วงแดงที่ได้จากข้อ 1. ไปใช้เป็นตัวอินดิเคเตอร์
ในการ titrate ระหว่าง 0.1 M hydrochloric acid กับ 0.1 M sodium

hydroxide (ครึ่งละ 2 ml.) ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 21.

74

ตาราง 21. แสดงผลการ titrate ระหว่าง 0.10 M hydrochloric acid กับ 0.10 M sodium hydroxide โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่เก็บไว้ในตัวทำละลายต่างชนิด และช่วงเวลาต่างกัน.

คุณภาพของอินดิเคเตอร์	ตัวทำละลายที่ใช้ในการเก็บรักษา	7 วัน			30 วัน			90 วัน		
		ปริมาตรของอินดิเคเตอร์ที่ใช้ (ml.)	ปริมาตรของ 0.10M HCl ที่ใช้ (ml.)	ปริมาตรของ 0.10M NaOH ที่ใช้ (ml.)	ปริมาตรของอินดิเคเตอร์ที่ใช้ (ml.)	ปริมาตรของ 0.10M HCl ที่ใช้ (ml.)	ปริมาตรของ 0.10M NaOH ที่ใช้ (ml.)	ปริมาตรของอินดิเคเตอร์ที่ใช้ (ml.)	ปริมาตรของ 0.10M HCl ที่ใช้ (ml.)	ปริมาตรของ 0.10M NaOH ที่ใช้ (ml.)
ไม่บริสุทธิ์	0.1M HCl(aq)	2.00	25.00	24.50	2.00	25.00	24.50	2.00	25.00	24.48
	EtOH+HCl 1/	2.00	25.00	24.50	2.00	25.00	24.52	2.00	25.00	24.52
บริสุทธิ์	0.1M HCl(aq)	2.00	25.00	24.80	2.00	25.00	24.62	2.00	25.00	24.65
	EtOH+HCl 1/	2.00	25.00	24.78	2.00	25.00	24.75	2.00	25.00	24.80
บริสุทธิ์	0.1M HCl(aq)	2.00	25.00	24.78	2.00	25.00	24.75	2.00	25.00	24.75
	EtOH+HCl 1/	2.00	25.00	24.78	2.00	25.00	24.80	2.00	25.00	24.80

6.00 การศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับอินดิเกเตอร์จากดอกไม้

6.10 การหาปริมาณของ anthocyanin ในดอกไม้

การทดลองทำตามลำดับขั้นดังนี้

1. ชั่งกลีบดอกทองหลางใบลาย (สด) มา 13.05 กรัม นำไปสกัดโดย methanolic hydrogen chloride 1 % (ตามวิธีในข้อ 3.2.1 หน้า 42) ได้สารละลาย 500.0 ml. นำไปทำให้เข้มข้นโดยลดความดันจนเหลือปริมาตร 57.1 ml.

2. นำสารละลายจากข้อ 1. มา 20.0 ml. ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ column chromatography โดยมี calcium sulfate และ alumina เป็น adsorbents ตามวิธีในข้อ 4.2.2 หน้า 49 (ใช้ทั้งหมด 20 columns column ละ 1.0 ml.) นำสารละลายอินดิเกเตอร์บริสุทธิ์ที่ไหลออกมาทั้ง 20 columns รวมกันได้สารละลาย 200.0 ml. นำไประเหยเอาตัวทำละลายออกให้หมด โดยการลดความดัน

3. เมื่อเห็นว่าแห้งดีแล้วจึงนำไปชั่งได้ 0.2561 กรัม นำกลับไปลดความดันอีก 1 ชั่วโมง แล้วนำไปชั่งอีก (0.2566 กรัม) กระทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง (0.2559 กรัม) กระทำซ้ำ 3 ครั้ง (หรือมากกว่า) จนได้น้ำหนักคงที่ (หรือใกล้เคียง) นำน้ำหนักที่ชั่งได้ ไปคำนวณหาน้ำหนักร้อยละของ anthocyanin ที่มีอยู่ในกลีบดอกทองหลางใบลาย ดังแสดงในตาราง 22.

4. สำหรับดอกทองหลางน้ำ คอกอัญชัน ดอกพู่ระหง — — — ดอกกุหลาบ 2. ทดลองตามวิธีเดียวกันนี้ (ข้อ 1 — 3) ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 22

6.20 Absorption spectra ของ Anthocyanin

เอา anthocyanin บริสุทธิ์จากกลีบดอกไม้ที่ได้จากการทดลองในข้อ 6.10 มาชั่ง 0.05 กรัม ละลายใน methanolic hydrogen chloride 1 % (w/w) 25 ml. นำไป run ใน spectronic 20 โดยปรับช่วงคลื่น (λ) ตั้งแต่ 400 — 600 m μ (4,000 — 6,000 Å) บันทึก absorption coefficient (A) ที่ได้แต่ละช่วงคลื่นแล้วนำไป plot graph เพื่อหา maximum absorption (λ_{max} .)

ตาราง 22. แสดงปริมาณของสารอินดิเกเตอร์ที่มีอยู่ในกลีบดอกไม้

ชื่อดอกไม้	น้ำหนัก กลีบดอก ไม้ดอก (กรัม)	ปริมาณ ของสาร ละลายที่ สะกักโค ml..	น้ำหนักของอินดิเกเตอร์เมื่อเอามาหาปริมาณ เพียง 20.0 ml. (กรัม)				น้ำหนักของ อินดิเกเตอร์ ในกลีบดอก ไม้ (กรัม)	น้ำหนัก รวม
			ซึ่งครั้งที่ 1	ซึ่งครั้งที่ 2	ซึ่งครั้งที่ 3	เฉลี่ย		
ทองหลาง	31.05	57.1	0.2561	0.2566	0.2569	0.2562	0.7315	2.36
ใบดาม								
ทองหลางน้ำ	26.73	51.4	0.2313	0.2317	0.2303	0.2311	0.5945	2.22
ถั่วงอก	19.36	36.2	0.3171	0.3186	0.3177	0.3178	0.5761	2.93
พุทธรักษา	28.14	62.2	0.3129	0.3122	0.3124	0.3125	0.9719	3.45
ชบา	29.56	59.8	0.3147	0.3440	0.3448	0.3445	0.0298	3.48
พุทธรักษา	24.03	49.1	0.2984	0.2980	0.2979	0.2983	0.7323	3.05
ชองนาง	25.12	44.8	0.3815	0.3815	0.3821	0.3817	0.8559	3.11
ใหญ่								
เผือกฟ้า 1	27.33	49.1	0.3188	0.3179	0.3191	0.3186	0.7837	2.87
เผือกฟ้า 2	29.05	55.7	0.3601	0.3608	0.3600	0.3603	1.0040	3.46
กุหลาบ 1	33.42	61.4	0.4810	0.4815	0.4817	0.4814	1.1871	3.55
กุหลาบ 2	29.58	50.7	0.3955	0.3957	0.3956	0.3956	1.1608	3.92

หมายเหตุ เนื่องจากดอกกุหลาบ 1. มีสารอินดิเกเตอร์ 2 ชนิดรวมกัน แต่ในการหาปริมาณ
ได้เอาทั้ง 2 ส่วนรวมกัน.

ตาราง 23. แสดง maximum absorption ของ anthocyanin จากกลีบดอกไม้
แต่ละชนิด

ชื่อดอกไม้	maximum absorption (Å)	ชื่อดอกไม้	maximum absorption (Å)
ทองหลางใบลาย	5162	ช่อฝรั่งใหญ่	5400
ทองหลางน้ำ	5168	เฟื่องฟ้า 1	5030
อัญชัน	5400	เฟื่องฟ้า 2	5210
พระโอง	5400	กุหลาบ 1 F ¹	5035
ชบา	5400	กุหลาบ 1 F ²	5270
พุทธรักษา	5270	กุหลาบ 2	5210

หมายเหตุ กุหลาบ 1. มี anthocyanin 2 ชนิด ชนิดแรกคือกุหลาบ 1 F¹ ชนิดที่ 2
คือกุหลาบ 1 F²

6.30 Paper Chromatography ของ Anthocyanins และ Anthocyanidins จากกลีบดอกไม้ชนิดต่าง ๆ

6.3.1 Solvent system

1. B/W system ใช้ 1 - butanol 40.0 ml. glacial
acetic acid 10.0 ml. และน้ำกลั่น 50.0 ml. ผสมกันใน tank นำไปเก็บไว้
3 วัน เพื่อใช้ในการหา Rf value ของ anthocyanin¹⁴

สำหรับ anthocyanidin เมื่อเตรียม solvent เสร็จแล้วให้ใช้ทันที แต่กระดาด

¹⁴ Bate-Smith, E.C., Biochem. Soc. Symposia, 3, 62(1949).

ที่ไซตองนำไปอาบด้วย 0.2 M hydrochloric acid ก่อน ¹⁵

2. BuHCl system ใช้ 1 butanol และ 2 M hydrochloric acid อย่างละ 50 ml. ผสมกันใน tank นำไปเก็บไว้ 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้กับ anthocyanin และกระดาษที่จุด anthocyanin แล้วตองนำไปแขวนไว้ในบรรยากาศภายใน tank ที่มี solvent ชั้นล่างของ BuHCl เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำไป run ใน BuHCl เช่นกัน

3. 1 % HCl system ใช้ 12 M hydrochloric acid 3 ml. กับน้ำกลั่น 97 ml. ผสมกันใน tank

4. HAc-HCl system ใช้ 12 M hydrochloric acid 3 ml. glacial acetic acid 15 ml. และน้ำกลั่น 82 ml. ผสมกันใน tank

5. Forestal system ใช้ 12 M hydrochloric acid 6 ml. glacial acetic acid 60 ml. และน้ำกลั่น 20 ml. ผสมกันใน tank

6. Formic system ใช้ 12 M hydrochloric acid 20 ml. formic acid 50 ml. และน้ำกลั่น 30 ml. ผสมกันใน tank

อัตราส่วนผสมดังแสดงในตารางที่ 24

6.3.2 การจุด anthocyanin และ anthocyanidin ลงบนกระดาษ และการ run paper chromatogram แบบ ascending method

1. นำ tank รูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 - 18 cm. สูง 25 - 30 cm. และฉาบกระดาษให้สะอาดนำไปอบใน oven 120° C จนแห้งสนิท (ประมาณ 40 นาที) นำออกมาตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิของห้อง

2. ตัดกระดาษ whatman No.1 ให้มีขนาด 21 - 22 X 28 - 30 cm. ห่างจากริมด้านยาวเข้ามา 2 cm. ชีดด้วยดินสอเบา ๆ เพื่อใช้เป็นเส้นเริ่มต้นแล้วแบ่งเส้นนี้ออกเป็น 10 ช่วง (11 จุด) แต่ละช่วงห่างกัน 2 cm. ทั้ง 11 จุด ที่ได้มานั้นใช้เป็นจุดที่จะ spot anthocyanin (หรือ anthocyanidin)

3. ชั่ง anthocyanin (solid) บริสุทธิ์แต่ละชนิดที่ได้จากการทดลอง ในข้อ 6.1.0 (หน้า 75) บ้างละ 0.1 กรัมละลายใน ethanol 95 % B.P. 5 ml. ใช้ capillary tube จุ่มลงในสารละลายที่เตรียมได้ชนิดละ 1 อัน จากนั้นนำไปจุดบน กระดาษที่เตรียมไว้จากข้อ 2. การจุดให้จุดทีละน้อย ๆ แล้วปล่อยให้แห้งแล้วจุดซ้ำลงไปใหม่ (จุดซ้ำ 7 ครั้ง สำหรับ anthocyanin จากดอกไม้ 1 ชนิด) ขนาดของจุดควรมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 cm และไม่เกิน 0.7 cm. เมื่อจุดเรียบร้อยแล้วทิ้งไว้ให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิของห้อง สารละลายที่เหลือจากการใช้ให้เก็บเอาไว้ใช้ในการทดลอง ข้อ 6

4. เอากระดาษ (จากข้อ 3) ด้านสันมาจกกันให้เป็นรูปทรงกระบอกกวาง แล้วเย็บเข้ากันด้วยเครื่องเย็บกระดาษ (staple) ให้ริมกระดาษทั้งสองห่างกันประมาณ 0.5 cm นำไปแขวนใน tank ที่มี solvent ให้ปลายกระดาษด้านล่างจุ่มลงใน solvent ประมาณ 1 cm. ในกรณีของ BAW และ BuHCl systems ให้ปลายกระดาษจุ่มอยู่เฉพาะ ชั้นบนของ solvent เท่านั้น

5. ปล่อยให้ solvent วิ่งขึ้นบนกระดาษจนมีความสูงประมาณ $\frac{3}{4}$ ของ ความสูงของกระดาษ (12 - 15 cm) ยกกระดาษออกทำเครื่องหมายของ solvent front แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง เอาดินสอจุดลงบนจุดตรงบริเวณที่เข้มข้นที่สุด วัดระยะทางที่ solvent และจุดสารเคลื่อนที่แล้วนำไปคำนวณหา Rf value

6. เอาสารละลาย anthocyanin (11 ชนิด) ที่เหลือจากข้อ 3. มาเก็บ 12 M hydrochloric acid ลงไปชนิดละ 5 ml. นำไปต้มในน้ำเดือด 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติม 1 pentanol ลงไป ชนิดละ 3 ml. คนแรง ๆ 30 นาทีแล้วแยกเอา organic layer (anthocyanidin solution) ออก นำเอาไปจุดบนกระดาษแล้วทำการ ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4 - 5

7. เอาผลที่ได้จากการทดลองในข้อ 5. และ 6. มาคำนวณหา Rf value ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 25 - 31

ตาราง 24. แสดงอัตราส่วนผสมของ solvent ในแต่ละ solvent system.

ตัวย่อ	solvent ที่ใช้ผสม	อัตราส่วนผสม v/v
BAW	1-butanol + glacial acetic acid + water	4:1:5
BuHCl	1-butanol + 2 M hydrochloric acid	1:1
1% HCl	water + 12 M hydrochloric acid	97:3
HAcHCl	water + glacial acetic acid + 12 M hydrochloric acid	82:15:3
Forestal	glacial acetic acid + 12 M hydrochloric acid + water	30:3:10
Formic.	formic acid + 12 M hydrochloric acid + water	5:2:3

6.3.3 การใช้ paper chromatography ตรวจหาความบริสุทธิ์ของ anthocyanin จากดอกของนางไม้ที่ได้จากวิธีการต่าง ๆ

นำเอาสารละลาย anthocyanin จากดอกของนางไม้ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดย

1. วิธีการแบบง่ายตามการทดลองในข้อ 4.10 (หน้า 44)
2. วิธีการที่มีประสิทธิภาพตามการทดลองในข้อ 1.2.1 (หน้า 47)
3. วิธีการที่มีประสิทธิภาพตามการทดลองในข้อ 4.2.2 (หน้า 49)
4. วิธีการที่มีประสิทธิภาพตามการทดลองในข้อ 4.2.3 (หน้า 52)

เอาสารละลายแต่ละอย่างมาจุด (spot) บนกระดาษ แล้วนำไป run ใน tank ที่มี BAW เป็น solvent ตามรายละเอียดของการทดลองในข้อ 6.3.1 และ ข้อ 6.3.2 เมื่อ solvent เคลื่อนขึ้นบนกระดาษจนมีความสูงประมาณ $\frac{3}{4}$ ของความสูงของกระดาษ ยกเอากระดาษออกทำเครื่องหมาย solvent front แล้วตั้งทิ้งไว้จนแห้ง วัดระยะทางที่ anthocyanin และ solvent เคลื่อนที่นำมาคำนวณหา Rf value และสังเกตกลิ่นของ impurity ที่แยกตัวออกจาก anthocyanin บนกระดาษ ปริมาณของ impurity

ตารางที่ 25 แสดง Rf value ของ Anthocyanins จากดอกไม้ใน BAW solvent

ชื่อดอกไม้	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			ครั้งที่ 4			สีของจุด	Rf โดยเฉลี่ย
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			ครั้งที่ 4				
	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf		
ทองหลางใบดก	4.08	14.02	.291	3.68	12.87	.286	3.94	13.65	.289	3.92	13.60	.288	ชมพูแกมส้ม	.289
ทองหลางน้ำ	4.06	14.05	.289	3.76	12.87	.292	3.97	13.65	.291	3.94	13.58	.290	ชมพูแกมส้ม	.291
อัญชัน	2.15	14.05	.153	1.90	12.85	.148	1.99	13.62	.146	2.03	13.60	.149	ม่วงแดง	.149
พระโศภน	4.91	14.03	.350	4.56	12.85	.355	4.78	13.62	.351	4.81	13.60	.354	ม่วงแดง	.353
บาน	4.90	14.04	.349	4.55	12.85	.354	4.83	13.64	.354	4.77	13.58	.351	ม่วงแดง	.352
พุดรักษา	5.30	14.06	.377	4.83	12.87	.375	5.20	13.64	.381	5.07	13.58	.373	แดงสด	.377
ของนางใหญ่	3.28	14.06	.233	3.08	12.87	.239	3.15	13.62	.231	3.17	13.60	.233	ม่วงแดง	.234
เฟื่องฟ้า 1	5.02	14.02	.358	4.55	12.85	.354	4.88	13.62	.358	4.86	13.60	.357	ส้มแดง	.357
เฟื่องฟ้า 2	3.98	14.02	.284	3.68	12.85	.286	3.85	13.65	.282	3.84	13.58	.283	แดงสด	.284
กุหลาบ 1 F 1	4.97	14.05	.354	4.59	12.85	.357	4.86	13.65	.356	4.82	13.55	.356	ส้มแดง	.356
กุหลาบ 1 F 2	3.51	14.05	.250	3.23	12.85	.251	3.43	13.65	.251	3.43	13.55	.253	แดงสด	.251
กุหลาบ 2	3.95	14.05	.281	3.64	12.85	.283	3.84	13.65	.281	3.83	13.58	.282	แดงสด	.282

หมายเหตุ A = ระยะทางที่ anthocyanins เคลื่อนที่ (cm.)

B = ระยะทางที่ solvent เคลื่อนที่ (cm.)

ตารางที่ 26 แสดง Rf value ของ Anthocyanins จากดอกไม้มัน Bu HCl solvent

ชื่อดอกไม้	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			ครั้งที่ 4			Rf เฉลี่ย	สีของจุด
	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf		
ทองหลางใบลาย	1.58	13.47	.117	1.45	12.70	.114	1.73	14.08	.123	1.58	13.26	.119	.118	ชมพูแกมส้ม
ทองหลางน้ำ	1.63	13.45	.121	1.48	12.72	.116	1.75	14.08	.124	1.60	13.26	.121	.121	ชมพูแกมส้ม
อัญชัน	0.42	13.47	.031	0.48	12.75	.038	0.55	14.05	.039	0.41	13.24	.031	.035	ม่วงแดง
พระโศภน	1.86	13.45	.138	1.72	12.73	.135	1.94	14.05	.138	1.79	13.25	.135	.137	ม่วงแดง
ขมิ้น	1.86	13.45	.138	1.72	12.73	.135	1.94	14.05	.138	1.80	13.25	.136	.137	ม่วงแดง
พุดรักษา	3.51	13.45	.261	3.36	12.73	.264	3.62	14.05	.258	3.38	13.27	.255	.260	แดงสด
ชองนางใหญ่	0.50	13.45	.037	0.56	12.73	.044	0.66	14.05	.047	0.52	13.27	.039	.042	ม่วงแดง
เฟื่องฟ้า 1	3.50	13.42	.261	3.39	12.70	.267	3.62	14.08	.257	3.52	13.25	.266	.263	แดงส้ม
เฟื่องฟ้า 2	0.76	13.42	.057	0.75	12.70	.059	0.84	14.08	.060	0.76	13.25	.057	.058	แดงสด
กุหลาบ 1 F 1	3.47	13.44	.258	3.36	12.71	.264	3.78	14.10	.268	3.47	13.25	.262	.263	แดงส้ม
กุหลาบ 1 F 2	1.03	13.44	.077	1.07	12.71	.084	1.14	14.10	.081	1.14	13.25	.086	.082	แดงสด
กุหลาบ 2	0.79	13.47	.059	0.79	12.75	.062	0.86	14.10	.061	0.84	13.27	.063	.061	แดงสด

หมายเหตุ A = ระยะทางที่ anthocyanins เคลื่อนที่ (cm.)

B = ระยะทางที่ solvent เคลื่อนที่ (cm.)

ตารางที่ 27 แสดง Rf value ของ Anthocyanins จากดอกไม้ใน 1% HCl solvent

ชื่อดอกไม้	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			ครั้งที่ 4			สีของจุด	Rf เฉลี่ย
	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf		
ทองหลางใบลาย	4.77	12.48	.382	5.32	14.12	.377	5.00	12.82	.390	4.63	12.48	.371	.380	ชมพูแกมส้ม
ทองหลางน้ำ	4.72	12.45	.379	5.24	14.12	.371	4.93	12.85	.384	4.55	12.50	.364	.375	ชมพูแกมส้ม
อัญชัน	1.13	12.45	.091	1.18	14.10	.084	1.04	12.85	.081	1.06	12.48	.065	.065	แดงสด
พระโขนง	0.37	12.45	.030	0.58	14.10	.041	0.46	12.85	.036	0.39	12.50	.031	.035	แดงสด
ชบา	0.39	12.45	.031	0.54	14.12	.038	0.46	12.83	.036	0.41	12.50	.033	.035	ม่วงแดง
พุดรดรักษา	0.90	12.46	.072	1.04	14.12	.074	0.95	12.85	.074	0.91	12.48	.073	.074	แดงสด
ชองนางใหญ่	1.00	12.47	.080	1.22	14.15	.086	1.04	12.82	.081	1.06	12.50	.085	.083	ม่วงแดง
เฟื่องฟ้า 1	6.01	12.47	.482	7.24	14.15	.512	6.76	12.80	.528	6.24	12.50	.499	.505	แดงส้ม
เฟื่องฟ้า 2	2.25	12.45	.181	2.43	14.15	.172	2.15	12.82	.168	2.21	12.50	.177	.175	แดงสด
กุหลาบ 1	5.89	12.47	.472	7.07	14.17	.499	6.67	12.80	.521	6.05	12.50	.484	.494	แดงส้ม
กุหลาบ 1	4.79	12.47	.384	5.40	14.17	.381	4.83	12.80	.377	4.60	12.50	.368	.377	แดงสด
กุหลาบ 2	1.97	12.47	.158	2.35	14.17	.166	2.15	12.80	.168	2.08	12.50	.166	.165	แดงสด

หมายเหตุ A = ระยะทางที่ anthocyanins เคลื่อนที่ (cm.)

B = ระยะทางที่ solvent เคลื่อนที่ (cm.)

ตารางที่ 26 แสดง Rf value ของ Anthocyanins จากดอกไม้นี้ HAc - HCl solvent

ชื่อ ดอกไม้นี้	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			ครั้งที่ 4			Rf เฉลี่ย	สีของจุด
	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf		
ทองกลางใบลาย	8.17	13.85	.590	7.98	13.55	.589	7.69	12.90	.596	8.14	13.77	.591	.592	ชมพูแกมส้ม
ทองกลางน้ำ	8.17	13.83	.591	7.95	13.55	.587	7.67	12.92	.594	8.12	13.77	.590	.591	ชมพูแกมส้ม
อัญชัน	4.38	13.83	.317	4.37	13.52	.323	4.15	12.92	.321	4.41	13.75	.321	.321	ม่วงแดง
พระโขนง	3.07	13.85	.222	3.07	13.52	.227	2.83	12.92	.219	3.10	13.73	.226	.224	แดงสด
ชบา	3.02	13.87	.218	3.02	13.55	.223	2.84	12.95	.219	3.09	13.73	.225	.222	แดงสด
พุดธิรักษา	3.50	13.88	.252	3.47	13.52	.257	3.28	12.96	.253	3.45	13.73	.251	.254	แดงสด
ชองนางใหญ่	4.64	13.88	.334	4.49	13.55	.331	4.26	12.98	.328	4.52	13.75	.329	.331	ม่วงแดง
เฟื่องฟ้า 1	8.30	13.88	.598	8.16	13.57	.601	7.71	12.95	.595	8.22	13.73	.599	.598	แดงส้ม
เฟื่องฟ้า 2	5.54	13.85	.400	5.50	13.57	.405	5.21	12.95	.402	5.63	13.73	.410	.405	แดงสด
กุหลาบ 1 F 1	8.61	13.87	.621	8.37	13.57	.617	8.02	12.95	.619	8.47	13.70	.618	.619	แดงส้ม
กุหลาบ 1 F 2	8.25	13.87	.595	8.07	13.57	.595	7.80	12.95	.602	8.23	13.70	.601	.598	แดงสด
กุหลาบ 2	5.46	13.87	.394	5.43	13.55	.401	5.23	12.97	.403	5.51	13.75	.401	.400	แดงสด

หมายเหตุ A = ระยะทางที่ anthocyanins เคลื่อนที่ (cm)
B = ระยะทางที่ solvent เคลื่อนที่ (cm)

ตารางที่ 29 แสดง Rf value ของ Anthocyanidins จากดอกไม้ใน Forestal solvent

ชื่อดอกไม้	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			ครั้งที่ 4			สีของจุด
	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf	
ทองเหลืองใบดอย	8.46	13.45	.629	8.98	14.27	.629	8.54	13.60	.628	8.09	12.88	.628	ชมพูแดง
ทองเหลืองน้ำ	8.43	13.42	.628	8.93	14.27	.626	8.59	13.62	.631	8.10	12.85	.630	ชมพูแดง
อัญชัน	4.25	13.42	.317	4.62	14.29	.323	4.36	13.62	.320	4.10	12.85	.319	ม่วงคล้ำ
พระโขนง	6.11	13.45	.454	6.48	14.30	.453	6.16	13.60	.453	5.87	12.87	.456	ม่วงแดง
บานา	6.11	13.45	.454	6.49	14.30	.454	6.18	13.58	.455	5.88	12.90	.456	ม่วงแดง
พุดชรัก	6.73	13.43	.501	7.11	14.28	.498	6.74	13.58	.496	6.41	12.90	.497	แดงสด
ทองนางใหญ่	6.15	13.43	.458	6.51	14.28	.456	6.14	13.58	.452	5.86	12.88	.455	ม่วงแดง
เฟื่องฟ้า 1	9.29	13.43	.692	9.84	14.30	.688	9.33	13.60	.686	8.87	12.88	.669	แดงสด
เฟื่องฟ้า 2	6.55	13.42	.488	7.04	14.30	.492	6.62	13.60	.487	6.29	12.88	.488	แดงสด
กุหลาบ 1 F 1	9.07	13.42	.676	9.61	14.30	.672	9.26	13.60	.681	8.72	12.88	.677	แดงสด
กุหลาบ 1 F 2	6.62	13.42	.493	7.08	14.30	.495	6.65	13.60	.489	6.38	12.88	.495	แดงสด
กุหลาบ 2	6.58	13.40	.491	7.07	14.28	.495	6.69	13.62	.491	6.34	12.88	.492	แดงสด

หมายเหตุ A = ระยะทางที่ anthocyanidins เคลื่อนที่ (cm)

B = ระยะทางที่ solvent เคลื่อนที่ (cm)

ตารางที่ 30 แสดง Rf value ของ Anthocyanidins จากคอลัมน์ใน Formic solvent

ชื่อดอกไม้	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			ครั้งที่ 4			สีของจุด	Rf เฉลี่ย
	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf		
ทองเหลืองใบลาย	4.41	14.55	.303	3.97	13.32	.298	3.91	12.98	.301	3.93	12.80	.307	แดงสด	.302
ทองเหลืองน้ำ	4.45	14.55	.306	4.02	13.30	.302	3.91	12.95	.302	3.89	12.85	.303	แดงสด	.304
อัญชัน	1.84	14.52	.127	1.74	13.30	.131	1.64	12.95	.127	1.62	12.82	.126	ม่วงแดง	.128
พระโขนง	2.90	14.50	.193	2.62	13.32	.197	2.56	12.98	.197	2.51	12.82	.196	ม่วงแดง	.196
ชมพู	2.83	14.50	.195	2.70	13.35	.202	2.59	13.00	.199	2.57	12.80	.201	ม่วงแดง	.199
พุดชุกษา	3.06	14.50	.211	2.88	13.35	.216	2.80	13.02	.215	2.79	12.78	.218	แดงสด	.215
ทองนางใหญ่	3.00	14.48	.207	2.79	13.33	.209	2.75	13.02	.211	2.61	12.78	.204	ม่วงแดง	.208
เฟื่องฟ้า 1	4.68	14.46	.323	4.42	13.35	.331	4.27	13.01	.328	4.22	12.78	.330	แดงสด	.328
เฟื่องฟ้า 2	3.18	14.50	.219	2.95	13.35	.221	2.86	13.00	.220	2.80	12.80	.219	แดงสด	.220
กุหลาบ 1	1.74	14.50	.327	4.44	13.33	.333	4.37	13.02	.336	4.24	12.80	.331	แดงสด	.332
กุหลาบ 1	3.16	14.50	.218	2.92	13.33	.219	2.84	13.02	.218	2.80	12.80	.219	แดงสด	.219
กุหลาบ 2	3.19	14.48	.220	2.91	13.30	.219	2.88	13.02	.221	2.86	12.78	.224	แดงสด	.221

หมายเหตุ A = ระยะทางที่ anthocyanidins เคลื่อนที่ (cm.)

B = ระยะทางที่ solvent เคลื่อนที่ (cm.)

ตารางที่ 31 แสดง Rf value ของ Anthocyanidins จากคอลัมน์ใน BAW solvent

ชื่อคอลัมน์	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			ครั้งที่ 4			Rf เดี่ยว	สีของจุด
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			ครั้งที่ 4				
	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf		
ทองเหลืองใบลาย	9.81	14.10	.696	8.30	11.88	.699	9.98	14.02	.712	9.83	13.90	.707	.704	แดงสด
ทองเหลืองหน้า	9.87	14.08	.701	8.43	11.85	.711	9.81	14.05	.698	9.86	13.92	.708	.705	แดงสด
อัญชัน	6.07	14.08	.431	5.13	11.87	.432	6.04	14.05	.430	5.98	13.88	.431	.431	ม่วงแดง
พุทธรักษา	7.01	14.05	.499	6.20	11.90	.521	7.17	14.01	.512	7.19	13.88	.518	.513	ม่วงแดง
ขมิ้น	7.18	14.05	.511	6.16	11.92	.517	7.16	13.98	.514	7.16	13.90	.515	.514	ม่วงแดง
พริกไทย	9.41	14.02	.671	7.95	11.90	.668	9.39	13.98	.672	9.31	13.90	.670	.670	แดงสด
ของนางใหญ่	7.25	14.02	.517	6.13	11.88	.516	7.17	14.00	.512	7.21	13.92	.518	.516	ม่วงแดง
เฟื่องฟ้า 1	10.91	14.02	.778	9.28	11.88	.781	11.00	14.00	.786	10.90	13.92	.783	.782	แดงสด
เฟื่องฟ้า 2	9.48	14.05	.675	7.92	11.85	.668	9.41	14.03	.671	9.35	13.92	.672	.672	แดงสด
กุหลาบ 1 F1	10.96	14.05	.780	9.27	11.85	.782	11.07	14.05	.788	10.94	13.95	.784	.784	แดงสด
กุหลาบ 1 F2	9.46	14.05	.673	7.94	11.85	.670	9.44	14.05	.672	9.40	13.95	.674	.672	แดงสด
กุหลาบ 2	9.53	14.07	.677	7.95	11.85	.671	9.43	14.07	.670	9.42	14.00	.673	.673	แดงสด

หมายเหตุ A = ระยะทางที่ anthocyanidins เคลื่อนที่ (cm)

B = ระยะทางที่ solvent เคลื่อนที่ (cm)

จะมากหรือน้อยสังเกตได้จากขนาดและความเข้มของจุดของ impurity ที่ปรากฏบนกระดาษ
ทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง ภาพของ paper chromatogram สำหรับการทดลองนี้ ได้แสดง
ไว้ในภาคผนวก จ. (หน้า 173) และ Rf value ที่ได้จากการทดลองนี้ได้แสดงไว้ในตาราง 32
ตาราง 32 แสดง Rf value สีของ anthocyanin และสีของ impurity ที่ได้จากดอก
ของนางใหญ่ เมื่อทำโหมรีสุทธี ด้วยวิธีการต่างๆ ใน BAW solvent

ครั้งที่	anthocyanin ที่ได้จากวิธีการแบบ ง่าย			anthocyanin ที่ได้จากวิธีทำห กตกตะกอน			anthocyanin ที่ได้จาก column chromatography			anthocyanin ที่ได้จาก ion-exchange		
	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf
1	3.09	13.45	.230	3.13	13.42	.233	3.15	13.42	.235	3.10	13.44	.231
2	2.88	12.70	.229	2.97	12.68	.234	3.01	12.70	.237	2.98	12.70	.235
3	2.98	13.12	.227	3.01	13.10	.230	3.05	13.11	.233	3.06	13.10	.234
4	3.08	13.28	.232	3.08	13.27	.232	3.11	13.27	.234	3.08	13.27	.232
	Rf เฉลี่ย		.229	Rf เฉลี่ย		.232	Rf เฉลี่ย		.235	Rf เฉลี่ย		.233
สีของ antho- cyanin	ม่วงแดง			ม่วงแดง			ม่วงแดง			ม่วงแดง		
สีของ impu- rity	เหลืองคล้ำ			เหลืองซีด			—			ครามดำ		

A = ระยะทางที่ anthocyanin เคลื่อนที่ (cm.)
B = ระยะทางที่ solvent เคลื่อนที่ (cm.)

6.40 การหาค่า pK_a ของอินดิเกเตอร์จากดอกไม้

6.4.1 ¹⁶ วิธีการแบบง่าย (วิธีเห็บสี) ทำตามลำดับขั้นดังนี้

1. หาลอดทดลองขนาด 15 – 20 ml จำนวน 18 หลอด จัดเรียงเป็น 2 แถว แถวละ 9 หลอด แถวแรกเติมสารละลายมาตรฐาน 0.1 M sodium hydroxide ลงไปหลอดละ 10 ml. จนครบทุกหลอด แล้วหยด 1 % สารละลายอินดิเกเตอร์จากดอกไม้ (บริสุทธิ์) ชนิดที่จะหาค่า pK_a ลงไป 1,2,3, — — — 9 หยดลงในหลอดที่ 1,2,3, — — — 9 ตามลำดับ

2. แถวที่สองเติมสารละลายมาตรฐาน 0.1 M hydrochloric acid ลงไปหลอดละ 10 ml. จนครบทุกหลอด แล้วหยด 1 % สารละลายอินดิเกเตอร์จากดอกไม้ (บริสุทธิ์) ชนิดที่จะหาค่า pK_a ลงไป 9,8,7, — — — 1 หยดลงในหลอดที่ 1,2,3, — — — 9 ตามลำดับ

3. นำหลอดทดลองทั้งสองแถวที่ได้จากข้อ 1. และ 2. มาตั้งเข้าคู่กันเพื่อใช้ในการเทียบสีต่อไป

4. เตรียมสารละลายมาตรฐาน buffer ที่ pH 2,3,4,5, และ 6
 ดังนี้ ¹⁷ pH 2.00 ใช้สารละลายมาตรฐาน 0.2 M hydrochloric acid 5.3 ml.

ผสมกับสารละลายมาตรฐาน 0.2 M potassium chloride (A.R.) 25.0 ml.

แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นลงไปทำให้สารละลายเป็น 100 ml.

pH 3.00 ใช้สารละลายมาตรฐาน 0.1 M hydrochloric acid 20.3 ml.

ผสมกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 M potassium acid phthalate (A.R.), $KHC_8H_4O_4$ 50.0 ml. แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้สารละลายเป็น 100 ml.

pH 4.00 ใช้สารละลายมาตรฐาน 0.1 M sodium hydroxide (A.R.) 0.4 ml.

ผสมกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 M potassium acid phthalate (A.R.), $KHC_8H_4O_4$ (50.0 ml.) แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้สารละลายเป็น 100 ml.

¹⁶ UNESCO Pilot Project, "Chemical Equilibria," pp. 3.15-3.21, 1968.

¹⁷ Lange, N.f., (ed.), "Handbook of Chemistry," p. 971-972, 1967.

pH 5.00 ใช้สารละลายมาตรฐาน 0.1 M sodium hydroxide (A.R.), 23.6 ml. ผสมกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 M potassium acid phthalate (A.R.), $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ 50.0 ml. แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้สารละลายเป็น 100 ml.

pH 6.00 ใช้สารละลายมาตรฐาน 0.1 M sodium hydroxide (A.R.), 45.1 ml. ผสมกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 M potassium acid phthalate (A.R.), $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ 50.0 ml. แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้สารละลายเป็น 100 ml.

5. เอา pipet ขนาด 10.0 ml. ดูดสารละลายมาตรฐาน buffer ที่เตรียมไว้จากการทดลองในข้อ 4 ใส่ในหลอดทดลอง (ขนาดเดียวกันกับข้อ 1 และ 2) หยด 1 % สารละลายอินดิเคเตอร์จากดอกไม้นี้ (บรืสุทรี) ชนิดที่จะหาค่า pKa ลงไป 10 หยด แล้วนำไป เติมน้ำกับแก้วของหลอดทดลองที่เตรียมไว้ในข้อ 5 ว่าถ้าไหนของหลอดทดลองจากข้อ 3 บรืสุทรี เติมน้ำกับสีของอินดิเคเตอร์ในสารละลาย buffer มากที่สุด สำหรับอินดิเคเตอร์จากดอกไม้ แต่ละชนิดให้ทดลองทั้งใน buffer 2,3,4,5, และ 6 ทุกอัน

6. นำเอาผลที่ได้จากการทดลองในข้อ 5. มาคำนวณหาค่า pKa ของ อินดิเคเตอร์จากดอกไม้โดยใช้สูตรดังนี้ (ดูที่มาของสูตรในบทที่ 4 ข้อ 6.40 หน้า 128 - 129)

$$\text{pKa ของอินดิเคเตอร์จากดอกไม้} = \text{buffer's pH} - \log \frac{b}{a}$$

ในเมื่อ a = จำนวนหยดของอินดิเคเตอร์ในกรด (acid form)

b = จำนวนหยดของอินดิเคเตอร์ในด่าง (basic form)

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 33.

6.42 วิธีการที่ประสิทธิภาพ ¹⁸ (ใช้ spectronic 20)

1. ดู 0.5 M hydrochloric acid มา 10.0 ml. ใส่ใน beaker ขนาด 25 ml. เติมน้ำกับอินดิเคเตอร์ที่จะหาค่า pKa ลงไป 1.0 ml. คนให้รวมเป็นเนื้อ แล้ววัดค่าไปวัด pH ด้วย pH meter บันทึกค่า pH ที่อ่านได้

ตารางที่ 33 แสดงผลการหาค่า pKa ของอินดิเคเตอร์จากดอกไม้โดยวิธีการแบบง่าย

ชื่อดอกไม้	buffer's pH	$\log \frac{b}{a}$	$pK_a = pH - \log \frac{b}{a}$	pKa range
ทองหลาง ใบลาย	2.00	$\log 1/9 = -0.95$	$2.00 - (-0.95) = 2.95$	4.00 ± 1.05
	3.00	$\log 1/9 = -0.95$	$3.00 - (-0.95) = 3.95$	
	4.00	$\log 6/4 = 0.18$	$4.00 - 0.18 = 3.82$	
	5.00	$\log 9/1 = 0.95$	$5.00 - 0.95 = 4.05$	
	6.00	$\log 9/1 = 0.95$	$6.00 - 0.95 = 5.05$	
ทองหลาง น้ำ	2.00	$\log 1/9 = -0.95$	$2.00 - (-0.95) = 2.95$	4.00 ± 1.05
	3.00	$\log 1/9 = -0.95$	$3.00 - (-0.95) = 3.95$	
	4.00	$\log 6/4 = 0.18$	$4.00 - 0.18 = 3.82$	
	5.00	$\log 9/1 = 0.95$	$5.00 - 0.95 = 4.05$	
	6.00	$\log 9/1 = 0.95$	$6.00 - 0.95 = 5.05$	
อัญชัน	2.00	$\log 1/9 = -0.95$	$2.00 - (-0.95) = 2.95$	4.00 ± 1.05
	3.00	$\log 1/9 = -0.95$	$3.00 - (-0.95) = 3.95$	
	4.00	$\log 3/7 = -0.36$	$4.00 - (-0.36) = 4.36$	
	5.00	$\log 7/3 = 0.36$	$5.00 - 0.36 = 4.64$	
	6.00	$\log 9/1 = 0.95$	$6.00 - 0.95 = 5.05$	
พระโขนง	2.00	$\log 1/9 = -0.95$	$2.00 - (-0.95) = 2.95$	4.00 ± 1.05
	3.00	$\log 1/9 = -0.95$	$3.00 - (-0.95) = 3.95$	
	4.00	$\log 5/5 = 0.00$	$4.00 - 0.00 = 4.00$	
	5.00	$\log 9/1 = 0.95$	$5.00 - 0.95 = 4.05$	
	6.00	$\log 9/1 = 0.95$	$6.00 - 0.95 = 5.05$	

ตารางที่ ๕๓ (ต่อ)

ข้อคอกไม้	buffer's pH	$\log \frac{b}{a}$	$pK_a = pH - \log \frac{b}{a}$	pKa range
ชบา	2.00	$\log 1/9 = -0.95$	$2.00 - (-0.95) = 2.95$	4.00 ± 1.05
	3.00	$\log 1/9 = -0.95$	$3.00 - (-0.95) = 3.95$	
	4.00	$\log 5/5 = 0.00$	$4.00 - 0.00 = 4.00$	
	5.00	$\log 9/1 = 0.95$	$5.00 - 0.95 = 4.05$	
	6.00	$\log 9/1 = 0.95$	$6.00 - 0.95 = 5.05$	
พุทธรักษา	2.00	$\log 1/9 = -0.95$	$2.00 - (-0.95) = 2.95$	4.00 ± 1.05
	3.00	$\log 1/9 = -0.95$	$3.00 - (-0.95) = 3.95$	
	4.00	$\log 4/6 = -0.18$	$4.00 - (-0.18) = 4.18$	
	5.00	$\log 8/2 = 0.60$	$5.00 - 0.60 = 4.40$	
	6.00	$\log 9/1 = 0.95$	$6.00 - 0.95 = 5.05$	
ชองนาง ใหญ่	2.00	$\log 1/9 = -0.95$	$2.00 - (-0.95) = 2.95$	4.00 ± 1.05
	3.00	$\log 1/9 = -0.95$	$3.00 - (-0.95) = 3.95$	
	4.00	$\log 5/5 = 0.00$	$4.00 - 0.00 = 4.00$	
	5.00	$\log 9/1 = 0.95$	$5.00 - 0.95 = 4.05$	
	6.00	$\log 9/1 = 0.95$	$6.00 - 0.95 = 5.05$	
เฟื่องฟ้า	2.00	$\log 1/9 = -0.95$	$2.00 - (-0.95) = 2.95$	4.00 ± 1.05
	3.00	$\log 1/9 = -0.95$	$3.00 - (-0.95) = 3.95$	
	4.00	$\log 4/6 = -0.18$	$4.00 - (-0.18) = 4.18$	
	5.00	$\log 9/1 = 0.95$	$5.00 - 0.95 = 4.05$	
	6.00	$\log 9/1 = 0.95$	$6.00 - 0.95 = 5.05$	

ตารางที่ 23 (ต่อ)

ชื่อคอกไม้	buffer's pH	$\log \frac{b}{a}$	$pK_a = pH - \log \frac{b}{a}$	pKa range
เฟื่องฟ้า 2	2.00	$\log 1/9 = -0.95$	$2.00 - (-0.95) = 2.95$	4.00 ± 1.05
	3.00	$\log 1/9 = -0.95$	$3.00 - (-0.95) = 3.95$	
	4.00	$\log 3/7 = -0.36$	$4.00 - (-0.36) = 4.36$	
	5.00	$\log 8/2 = 0.60$	$5.00 - 0.60 = 4.40$	
	6.00	$\log 9/1 = 0.95$	$6.00 - 0.95 = 5.05$	
กุหลาบ 1 F ¹	2.00	$\log 1/9 = -0.95$	$2.00 - (-0.95) = 2.95$	4.00 ± 1.05
	3.00	$\log 1/9 = -0.95$	$3.00 - (-0.95) = 3.95$	
	4.00	$\log 4/6 = -0.18$	$4.00 - (-0.18) = 4.18$	
	5.00	$\log 9/1 = 0.95$	$5.00 - 0.95 = 4.05$	
	6.00	$\log 9/1 = 0.95$	$6.00 - 0.95 = 5.05$	
กุหลาบ 1 F ²	2.00	$\log 1/9 = -0.95$	$2.00 - (-0.95) = 2.95$	4.00 ± 1.05
	3.00	$\log 1/9 = -0.95$	$3.00 - (-0.95) = 3.95$	
	4.00	$\log 4/6 = -0.18$	$4.00 - (-0.18) = 4.18$	
	5.00	$\log 9/1 = 0.95$	$5.00 - 0.95 = 4.05$	
	6.00	$\log 9/1 = 0.95$	$6.00 - 0.95 = 5.05$	
กุหลาบ 2	2.00	$\log 1/9 = -0.95$	$2.00 - (-0.95) = 2.95$	4.00 ± 1.05
	3.00	$\log 1/9 = -0.95$	$3.00 - (-0.95) = 3.95$	
	4.00	$\log 4/6 = -0.18$	$4.00 - (-0.18) = 4.18$	
	5.00	$\log 8/2 = 0.60$	$5.00 - 0.60 = 4.40$	
	6.00	$\log 9/1 = 0.95$	$6.00 - 0.95 = 5.05$	

2. เอาสารละลายจากข้อ 1. ไปวัดหาค่า absorption coefficient (ที่ช่วงคลื่นเท่ากับ maximum absorption ของสารอินดิเกเตอร์ชนิดนั้น (ตามที่แสดงไว้ในตารางที่ 23. หน้า 77) ที่ช่วงคลื่นดังกล่าวนี้ให้คงที่ตลอดการทดลองสำหรับอินดิเกเตอร์แต่ละชนิด

3. เอาสารละลาย 0.5 M hydrochloric acid ที่เหลือจากการทดลองในข้อ 1 มาทำให้สะเทินด้วย 2.0 M sodium hydroxide จะมี pH เพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 0.5 - 1.0 หน่วย pH จากนั้นนำไปทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 2.

4. ทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3. โดยแปรผัน pH ให้เพิ่มขึ้นครั้งละ 0.5 - 1.0 หน่วย pH แต่ละช่วง pH นำไปวัดหาค่า absorption coefficient (ตามข้อ 2.)

5. นำค่า absorption coefficient ที่ได้จากการทดลองไป plot graph กับค่า pH ที่อ่านได้ (ดังแสดงในภาคผนวก ค. หน้า 158-165) จาก graph อ่านค่า pKa ของอินดิเกเตอร์จากดอกไม้แต่ละชนิดที่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 31.

ตาราง 34. แสดงค่า pKa ของสารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้ชนิดต่าง ๆ

ชื่อดอกไม้	pKa	ชื่อดอกไม้	pKa
ทองหลางใบลาย	3.90	ช้องนางใหญ่	4.00
ทองหลางเ็น	3.90	เฟื่องฟ้า 1	4.10
อัญมณี	4.45	เฟื่องฟ้า 2	4.24
พุทธรักษา	4.00	กุหลาบ 1 F 1	4.10
ชบา	4.06	กุหลาบ 1 F 2	4.11
พุทธรักษา	4.20	กุหลาบ 2	4.20

6.50 Colour Reaction of Anthocyanins and Anthocyanidins

6.5.1 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของ anthocyanin กับสารละลาย ferric chloride

เอาสารละลาย anthocyanin ที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.2.2 (หน้า 49) มา 1 ml. เติม 0.1 M hydrochloric acid ลงไป 1 ml. แล้วหยด 5 % ferric chloride solution ลงไป 3 - 4 หยด เขย่า ดูการเปลี่ยนสี ผลการสังเกตดังแสดงในตาราง 35

6.5.2 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของ anthocyanidin กับสารละลาย ferric chloride

เอาสารละลาย anthocyanin ที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.2.2 มา 5 ml. ใส่ใน beaker ขนาด 50 ml. เติม 37 % hydrochloric acid ลงไป 5 ml. นำไปต้มบนเปลวไฟอ่อนให้เดือด 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติม 1-pentanol ลงไป 5 ml. เขย่า 5 นาที แยกเอา organic layer ออกมา 2 ml. เติม 5 % ferric chloride solution ลงไป 1 ml. เขย่า ดูการเปลี่ยนสี ผลการสังเกตดังแสดงในตารางที่ 35.

ตาราง 35. แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของ anthocyanin และ anthocyanidin จากดอกไม้ชนิดต่าง ๆ และการตีความหมาย

ชื่อดอกไม้	สีของสารละลาย เริ่มต้น (ในกรด)	สีของสารละลายเมื่อเติม 5% FeCl ₃		การตีความหมาย ²⁰
		anthocyanin	anthocyanidin	
ทองหลางใบลาย	แดง	ไม่เปลี่ยนสี	ไม่เปลี่ยนสี	ไม่ใช่ cyanidin delphinidin และ petunidin
ทองหลางน้ำ	แดง	ไม่เปลี่ยนสี	ไม่เปลี่ยนสี	ไม่ใช่ cyanidin delphinidin และ petunidin
อัญชัน	แดง	น้ำเงิน	น้ำเงิน	cyanidin หรือ delphinidin หรือ petunidin
พุทธรักษา	แดง	ม่วงน้ำเงิน	ม่วงน้ำเงิน	cyanidin หรือ delphinidin หรือ petunidin
ชบา	แดง	ม่วงน้ำเงิน	ม่วงน้ำเงิน	cyanidin หรือ delphinidin หรือ petunidin

ตาราง 35. (ต่อ)

ชื่อดอกไม้	สีของสารละลาย เริ่มต้น (ในกรด)	สีของสารละลายเมื่อเติม 5% FeCl ₃		การตีความหมาย
		anthocyanin	anthocyanidin	
พุทธรักษา	แดง	ม่วงน้ำเงิน	ม่วงน้ำเงิน	cyanidin หรือ delphinidin
ชองนางใหญ่	แดง	ม่วงน้ำเงิน	น้ำเงิน	หรือ petunidin cyanidin หรือ delphinidin
เฟื่องฟ้า 1	แดง	ไม่เปลี่ยนสี	ไม่เปลี่ยนสี	หรือ petunidin ไม่ใช่ cyanidin delphinidin และ petunidin
เฟื่องฟ้า 2	แดง	ม่วงน้ำเงิน	ม่วงน้ำเงิน	cyanidin หรือ delphinidin
กุหลาบ 1 F ¹	แดง	ไม่เปลี่ยนสี	ไม่เปลี่ยนสี	หรือ petunidin ไม่ใช่ cyanidin delphinidin และ petunidin
กุหลาบ 1 F ²	แดง	ม่วงน้ำเงิน	ม่วงน้ำเงิน	cyanidin หรือ delphinidin
กุหลาบ 2	แดง	ม่วงน้ำเงิน	ม่วงน้ำเงิน	หรือ petunidin cyanidin หรือ delphinidin หรือ petunidin

ฉบบปรายผลการทดลอง

1.00 ผลการสำรวจดอกไม้

การสำรวจดอกไม้แบ่งออกเป็นสามระยะในเวลาที่แตกต่างกัน เพื่อที่จะทราบว่าปีดอกไม้
ในฤดูไหนของประเทศไทยมากที่สุด จากผลของการสำรวจดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 (หน้า 34)
สรุปได้ว่าดอกไม้ในประเทศไทยส่วนใหญ่จะมีดอกเกือบตลอดปี แต่จะมีดอกไม้บางชนิดออกดอกเฉพาะ
บางฤดูเท่านั้น เช่น ตะแบก ศรีตรัง จะออกดอกในฤดูหนาว เป็นต้น และทั้งสามฤดู
ฤดูฝนและฤดูหนาวจะมีดอกไม้มากกว่าฤดูร้อน

2.00 ผลการทดสอบสารอินดิเคเตอร์ในดอกไม้และการคัดเลือก

จากการสำรวจดอกไม้ดังได้กล่าวไว้ในบทที่ 3 ข้อ 1.00 จึงได้คัดเลือกดอกไม้ที่จะเอามา
ทำการศึกษาในขั้นแรกทั้งหมด 30 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1 (หน้า 34) ซึ่งประกอบด้วย
ดอกไม้สีขาว สีแดง สีม่วง สีน้ำเงิน และสีเหลือง จากนั้นจึงได้เอาดอกไม้ทั้ง 30 ชนิดนี้มา
ทดสอบสารอินดิเคเตอร์ในดอกไม้ โดยมีวิธีการง่าย ๆ คือเอากลีบดอกไม้มาสกัดด้วย ethanol
95 % B.P. แล้วนำสารละลายที่สกัดได้ไปทดสอบกับสารละลายของกรด (จะให้สีแดง) และด่าง
(จะให้สีม่วง สีเขียว หรือสีเขียวแกมเหลือง) ซึ่งผลการทดสอบดังแสดงไว้ในตารางที่ 2
(หน้า 39) จากตารางที่ 2 มีข้อที่น่าสังเกตคือ ดอกไม้ที่มีสีขาวหรือสีเหลืองในสารละลายของ
กรดจะไม่เปลี่ยนสี และในสารละลายของด่าง จะมีสีเหลือง ชัด ดังนั้นถ้าจะใช้ดอกไม้สีขาวหรือ
สีเหลืองไปสกัดทำเป็นสารอินดิเคเตอร์ ก็จะไม่ให้ผลดี เพราะการสังเกตการเปลี่ยนสีจากใบไม้สี
ไปเป็นสีเหลือง หรือจากสีเหลือง ไปเป็นไม่มีสี ย่อมทำได้ยาก การที่ดอกไม้สีขาว
และสีเหลืองเกิดการเปลี่ยนแปลงสีในสารละลายของกรดและด่าง จากไม่มีสีไปเป็นสีเหลืองชัด นี้
เนื่องจากในดอกไม้สีขาวและสีเหลืองมีสารประเภทหนึ่งที่เรียกว่า "Flavones"¹ เป็นองค์ประกอบ

¹ Paech, K., and Tracey, M.V. (eds), "Modern Methods of Plant Analysis," Vol.3, p. 450 - 498, 1955.

ส่วนใหญ่ สำหรับดอกไม้ที่มีสีแดง สีม่วง สีส้ม หรือสีส้ม สามารถนำไปใช้เป็นสารอินดิเกเตอร์ได้ เพราะเมื่ออยู่ในสารละลายของกรดจะให้สีแดงและเมื่ออยู่ในสารละลายของด่างจะให้สีน้ำเงินหรือสีเขียว ทั้งนี้เนื่องจากมีสารที่เรียกว่า anthocyanin² อยู่ในดอกเป็นจำนวนมาก การที่ anthocyanin เมื่ออยู่ในดอกไม้แล้วให้สีออกมาต่าง ๆ (เช่น สีแดง สีม่วง สีส้ม หรือสีส้ม) นั้น Geissman³ ได้อธิบายว่า...เนื่องมาจากเหตุผลสามประการ คือ

1. pH ของ cell sap ในกลีบดอกไม้
 2. anthocyanin ทำตัวเป็น ligands เข้าไป form complex กับ metal ion ที่มีอยู่ในกลีบดอกไม้ (เช่น ดอกข้าวโพด)
 3. มีสารอื่นเข้าไปรวมอยู่ด้วยในโมเลกุลของ anthocyanin ซึ่งได้แก่สารพวก colloidal ใน cell และพวก mono - หรือ di- saccharido ชนิดต่าง ๆ
- จากผลของการทดลองสารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้ จึงได้คัดเลือกเอาดอกไม้ที่เห็นว่าเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นอินดิเกเตอร์ได้ดีไว้ทั้งหมด 8 ชนิด (11 พันธุ์) ดัง แสดงในตารางที่ 3 (หน้า 41) และจะเห็นได้ว่าดอกไม้ที่คัดเลือกไว้นั้นจะมีสีแดง สีม่วง และสีน้ำเงินเท่านั้น การที่เลือกเอาเฉพาะดอกไม้ที่มีสีแดง สีม่วง และสีน้ำเงิน นั้น มีเหตุผล 3 ประการ คือ

1. มีสารอินดิเกเตอร์ชนิดที่เกิดการเปลี่ยนสีแตกต่างกันอย่างแจ่มชัด
2. ส่วนใหญ่ดอกออกเกือบทุกฤดู หาได้ง่าย มีอยู่ทั่วไป และไม่จำเป็นต้องซื้อ
3. ดอกมีสีเข้ม มีปริมาณของสารอินดิเกเตอร์ในดอกมาก

3.00 ผลการสกัดสีจากกลีบดอกไม้

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสีจากกลีบดอกไม้มีหลายชนิดด้วยกัน แต่ส่วนใหญ่มักจะเป็นพวก polar solvent เช่น น้ำ methanol ethanol และในบางครั้งก็ใช้ 1 % hydrochloric acid เป็นส่วนผสมอยู่ด้วย สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ได้แบ่งวิธีการสกัดออกเป็นสองแบบ คือ

² Tzvyet, M., Ber.deut. botan.Ges., 32, 61-68 (1899).

³ Geissman, T.A., "Principles of Organic Chemistry," p.562, 1959.

3.10 วิธีการแบบง่าย ตัวทำละลายที่ใช้ คือ น้ำ methanol B.P. ethanol 95 % B.P. และสุรา 40 ดีกรี ดังได้กล่าวไว้แล้วในบทที่ 3 ข้อ 3.10 สำหรับการทดลองในหัวข้อนี้มีข้อควรสังเกตและสิ่งที่น่าสนใจดังนี้

1. ถ้าใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย จะได้ผลก็คือเมื่อกลีบดอกไม้นั้นมีสีม่วง สีน้ำเงิน และสีค่าเท่านั้น เช่น ดอกท้อตึง ดอกอัญชัน และดอกชองนาง เป็นต้น แต่จะให้ผลน้อย ถ้ากลีบดอกไม้มีสีแดง และจะไม่ให้ผลเลยถ้าดอกไม้มีสีเหลืองหรือสีขาว

2. การใช้ alcohols (ทั้ง methanol และ ethanol) จะสามารถสกัดสีออกจากกลีบดอกไม้ได้ดีกว่า ใช้น้ำหรือสุรา 40 ดีกรีเป็นตัวทำละลาย และสุรา 40 ดีกรีก็สามารถสกัดสีจากกลีบดอกไม้สีแดงได้ดีกว่าการใช้น้ำ

3. การสกัดจะได้ผลดียิ่งขึ้น (กับตัวทำละลายทุกชนิดที่ใช้) ถ้ามี hydrochloric acid ผสมอยู่ด้วย 1 % แต่สารละลายที่สกัดได้โดยวิธีนี้ไม่สามารถนำไปใช้เป็นอินดิเคเตอร์ได้ทันที (ดูวิธีสกัดแบบมีประสิทธิภาพ บทที่ 3 ข้อ 3.20 หน้า 42)

4. สารละลายที่สกัดได้โดยวิธีที่ใช้ตัวทำละลายที่ไม่มีกรดผสมอยู่ด้วย สามารถนำไปใช้เป็นอินดิเคเตอร์ในการทดสอบค่าคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ได้ทันที

3.20 วิธีการที่มีประสิทธิภาพ การทดลองในหัวข้อนี้แบ่งออกเป็นสามตอนด้วยกัน ตอนแรกใช้ methanolic hydrogen chloride 1% เป็นตัวทำละลาย ตอนที่สองใช้ ethanolic hydrogen chloride 1% เป็นตัวทำละลาย ทั้งตอนที่หนึ่งและ สองการสกัดใช้วิธีเขย่า ซึ่งมีข้อควรสังเกตและสิ่งที่น่าสนใจดังนี้

1. การสกัดทั้งสองวิธีนี้ใช้ได้กับดอกไม้ทุกชนิดและทุกสี และสามารถสกัดสีออกจากกลีบดอกไม้ได้มาก

2. สารละลายที่สกัดได้ไม่สามารถนำไปใช้เป็นอินดิเคเตอร์ได้ทันที เพราะตัวทำละลายที่ใช้มีกรดผสมอยู่ด้วย

3. สารละลายที่สกัดได้เหมาะแก่การนำไปศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับสารอินดิเคเตอร์ ในดอกไม้ เพราะเป็นสภาพที่เหมาะสมที่จะนำไปทดลองอย่างอื่นต่อไป เช่น นำไปทำให้ตกตะกอนโดยใช้ lead acetate หรือนำไปทำ paper chromatography

ตอนที่สาม วิธีการสกัดให้ *soxhlet extraction apparatus* และตัวทำละลายที่ใช้คือ ethanol 95 % B.i. ที่นำมาลั่นใหม่ การทดลองในตอนนี้มีข้อควรสังเกตและสิ่งที่น่าสนใจดังนี้

1. การสกัดโดยวิธีนี้สามารถสกัดสีออกจากกลีบดอกไม้ได้ก็ ดังนั้นจึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในการหาปริมาณของสารอินดิเกเตอร์จากกลีบดอกไม้นี้

2. การสกัดโดยวิธีนี้เสียค่าใช้จ่ายมาก มีวิธีการมาก และใช้เวลานานถึง 12 ชั่วโมงติดต่อกัน หรือมากกว่า

3. การสกัดโดยวิธีนี้จะสกัดออกมาได้เร็วขึ้น ถ้า ethanol ที่ใช้มี hydrochloric acid ผสมอยู่ด้วย 1 % แต่ผลเสียที่คิดตามมาก็จะทำให้ anthocyanin บางส่วนถูก hydrolyze กลายเป็น anthocyanidin

3.30 เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างวิธีการแบบง่ายกับวิธีการที่มีประสิทธิภาพ

1. สารละลายที่สกัดได้โดยวิธีการแบบง่ายสามารถนำไปใช้เป็นอินดิเกเตอร์ในการทดสอบด้านคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์อย่างหยาบ ๆ ได้ คู่มือการทดลองในการวางที่ 5 - 9 หน้า 57 ส่วนสารละลายที่สกัดได้จากวิธีการที่มีประสิทธิภาพ ไม่สามารถนำไปใช้ได้ทันที เพราะตัวทำละลายที่ใช้มีฤทธิ์เป็นกรด

2. วิธีการสกัดแบบง่ายนั้นโรงเรียนที่ขาดอุปกรณ์ก็สามารถเตรียมสารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้ขึ้นใช้เองได้ เช่น อาจจะใช้แก้วน้ำแทน beaker ใช้ผ้าฝ้ายที่สะอาดแทนผ้าดึ้น และกลีบดอกไม้ที่ใช้ก็ใช้กลีบดอกไม้สีม่วง เช่น ดอกอัญชัน ดอกชองนาง หรือจะใช้ลูกเดือย (สีคำ) แทนกลีบดอกไม้สีแดงก็ได้ เพราะดอกไม้สีม่วงสกัดด้วยน้ำธรรมดาได้ ส่วนวิธีการที่มีประสิทธิภาพนั้นเหมาะสำหรับใช้ในการศึกษาถึงรายละเอียดเกี่ยวกับสารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้

ดังนั้นโรงเรียนหรือสถาบันที่จะทำการทดลองเกี่ยวกับเรื่องนี้จะต้องมีอุปกรณ์และเคมีภัณฑ์อย่างพอเพียง

3. วิธีการที่มีประสิทธิภาพสามารถสกัดสารอินดิเกเตอร์ออกจากกลีบดอกไม้ได้ง่าย และดีกว่าวิธีการแบบง่าย

4.00 ผลการทำให้บริสุทธิ์

สารละลายที่จะนำมาทำให้บริสุทธิ์นั้นได้มาจากสารละลายที่สกัดได้จากการทดลองใน
บทที่ 3 ข้อ 3.00 ทั้งวิธีสกัดแบบง่ายและแบบมีประสิทธิภาพ มีข้อควรสังเกตอยู่ว่า ถ้าสาร
ละลายที่สกัดได้ไม่มีฤทธิ์เป็นกรด จะต้องทำให้มีฤทธิ์เป็นกรดก่อน โดยการเติม hydrochloric
acid 4 M ลงไป 1 - 2 หยด ต่อจากนั้นจะต้องนำไปทำลาย acyl linkage⁴ ให้หมด
ไปก่อน ทั้งนี้เนื่องจากว่าสารอินดิเกเตอร์จากกลีบดอกไม้ในนี้คือสารจำพวก anthocyanin
แต่ส่วนใหญ่เมื่ออยู่ในธรรมชาติมักจะมีกรดอินทรีย์ เช่น p-coumaric acid⁵ เข้ามาติดอยู่
ด้วย ซึ่งจะก่อทำให้หมดเสียก่อน มิฉะนั้นจะมีผลกระทบกระเทือนต่อการทำให้บริสุทธิ์ และ
การพิสูจน์⁶ (identify) กล่าวคือ ในขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์ acylated anthocyanin
จะไปทำให้แถบ (band) ที่เกิดขึ้นใน column chromatography ไม่สม่ำเสมอ ส่วน
ในการพิสูจน์ จะไปทำให้จุดใน paper chromatogram มีหางยาวหรือว่าเกิดขึ้นเป็น
สองจุด ทั้ง ๆ ที่เป็น anthocyanin ชนิดเดียวกัน⁷ สำหรับการทดลองในตอนนี้เป็นอัน
เป็นสองหมวก

4.10 วิธีการแบบง่าย การทดลองแบ่งออกเป็นสองตอน ตอนแรกให้สารละลาย
จากกลีบดอกไม้ผ่าน column ของ calcium sulfate ที่ได้จาก native gypsum
และตอนที่สองเอาไปผ่าน column แป้งมันสำปะหลัง การที่ได้ calcium sulfate จาก
native gypsum นี้ ได้แนวความคิดมาจากการทดลองของ Karrer กับ Strong⁸

⁴ Dodds, K.S., and Long, H.S., J. Gent., 53, 136 (1955).

⁵ Geissman, T.A., and Harborne, J.B., Arch. Biochem. Biophys., 55, 447 (1955).

⁶ Bate - Smith, E.C., Chem & Ind. (London), 1457 (1954).

⁷ Swain, T., Biochem. J., 53, 200 (1953).

⁸ Karrer, P., and Strong, F.M., Helv. Chim. Acta., 19, 25 (1936).

และ Karrer กับ Weber⁹ ซึ่งเขาได้ใช้ calcium sulfate (R.P.) เป็น adsorbent ในการแยก anthocyanin ดังนั้นจึงได้ความคิดว่า โรงเรียนที่ซาคเคมัทท์ ก็อาจจะใช้ calcium sulfate จาก native gypsum ที่มีคุณภาพต่ำเอามาปรับปรุง คุณภาพให้ดีขึ้นกว่าเดิมโดยวิธีการง่าย ๆ ก็อาจจะนำไปใช้เป็น adsorbent ได้เช่นเดียวกัน และผลที่ได้รับจากการทดลองก็เป็นที่น่าพอใจ การใช้แป้งมันสำปะหลังเป็น adsorbent¹⁰ ก็เช่นเดียวกัน คือได้แนวความคิดมาจากการทดลองของ Endo¹⁰ เขาได้ใช้ cellulose powder ในการแยก anthocyanin 6 ชนิด ออกจากกันได้สำเร็จ แต่ cellulose powder นี้ ไม่มีว่าหน่ายตามร้านเคมีภัณฑ์ ดังนั้นจึงหันมาลองใช้แป้งมันสำปะหลังแทน แม้ว่าการทดลองโดยใช้ แป้งมันสำปะหลังเป็น adsorbent จะไม่สามารถแยก anthocyanins 2 ชนิดออกจาก คอลกอลวาม 1 ได้ก็ตาม แต่ก็ยังมีประสิทธิภาพพอที่จะแยก anthocyanins ออกจาก impurity (ที่ไม่ใช่ anthocyanin) ได้ ซึ่งจากการทดลองจะเห็นได้ชัดว่ามี 2 bands เกิดขึ้นใน column band แรกมีสีแดง คือ anthocyanin band ที่สองมีสีเหลืองดำ ings เป็น band ของ impurity การทดลองในตอนนี้มีข้อควรสังเกตุ 4 ประการ คือ

1. ในการเตรียม calcium sulfate จาก native gypsum นี้ จะต้องเปลี่ยนน้ำหลาย ๆ ครั้ง (อย่างน้อย 3 ครั้ง) เพราะจากการทดลองได้พบว่าการเปลี่ยน น้ำหลาย ๆ ครั้งจะทำให้ calcium sulfate ขาวสะอาดมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า band ของอินดิเคเตอร์ที่เกิดใน column ของ calcium sulfate นั้นจะเรียบสม่ำเสมอถ้าใช้ calcium sulfate ที่ได้จากการเปลี่ยนน้ำหลาย ๆ ครั้ง (5 ครั้ง) และปล่อยให้ calcium sulfate ตกตะกอนใน column อย่างช้า ๆ (12 ชั่วโมง)
2. อัตราการไหล (flow rate) ของน้ำ (eluent) ที่ไหลออกจาก column จะมีผลกระทบกระเทือนถึง band ของอินดิเคเตอร์ใน column กล่าวคือ ถ้าอัตราการไหลของน้ำเร็วมาก (ประมาณ 2 ml. ต่อ นาที) ความกว้างของ band ของ

⁹ Karrer, P., and Weber, H.M., *Helv. Chim. Acta.*, **19**, 1025(1936).

¹⁰ Endo, T., *Nature*, **179**, 378 (1957).

อินดิเกเตอร์จะไม่สม่ำเสมอ และถ้าไหลช้าเกินไปก็จะเสียเวลาในการทดลองมาก
จากการทดลองพบว่าอัตราการไหลของน้ำที่เหมาะสมกับ column ขนาด 1.5×25 cm.
และ adsorbent สูง 12 cm. คือ 4 - 5 หยดต่อนาที

3. การทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2 โดยวิธีแบ่งมันส์มาหลังเป็น adsorbent
จากการทดลองพบว่า แบ่งมันส์วางขายตามท้องตลาดชนิดสีชาวยุโรปจะให้ผลดีพอสมควร และจะ
ไม่ไถ่ผล ถ้าใช้แบ่งมันส์ที่มีสีคล้ำราคาถูก

4. แม้ว่าการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีนี้จะไม่ให้ผลดีก็ตาม (ดูผลการตรวจความบริสุทธิ์
ของสาร anthocyanin จากตารางที่ 32 หน้า 88) และรูป paper chromatogram
ในภาคผนวก จ. หน้า 173 แต่สารละลายอินดิเกเตอร์ที่ได้รับก็มีคุณภาพดีพอที่จะนำไปใช้ในงาน
คุณภาพวิเคราะห์ ดูตารางที่ 5 หน้า 57 และปริมาณวิเคราะห์ได้ ดูตารางที่ 6 - 9
หน้า 59 และตารางแสดงผลการเปรียบเทียบในตารางที่ 36 - 39 หน้า 113 - 116

4.20 วิธีการทำให้บริสุทธิ์ที่ประสิทธิภาพ มีสามวิธี คือ

4.2.1 วิธีทำให้ตกตะกอน วิธีทดลองอันนี้ได้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ
Reynolds, Robinson และ Scott - Moncrieff¹¹ ซึ่งเขาได้ใช้วิธีนี้ในการแยก
Delphin ออกจากกลีบดอก Salvia การทดลองโดยวิธีนี้มีข้อที่ควรสังเกตและสิ่งที่น่าสนใจ
ดังนี้

1. ก่อนที่จะนำ crude extract ไปตกตะกอนด้วย lead acetate
นั้น จะต้องทำสารละลายให้เข้มข้นเสียก่อน ทั้งนี้เพื่อประหยัดปริมาณของ lead acetate ที่
จะใช้ เพราะ lead acetate ละลายได้ดีใน polar solvent ดังนั้นถ้า crude extract
เจือจางมากก็ต้องใช้ lead acetate มาก นอกจากนี้ lead complex ที่เกิดขึ้นบางส่วน
สามารถละลายใน polar solvent ได้ ซึ่งจะมีผลทำให้ yield ลดต่ำลง

2. การใช้ glacial acetic acid หรือ mixture ของ
1 - propanol กับ methanolic hydrogen chloride จะต้องใช้ในปริมาณที่เหมาะสม

¹¹ Reynolds, T.M., Robinson, R., and Scott-Moncrieff, R., J. Chem. Soc., 1235-1243 (1934).

ถ้าใช้มากเกินไป ปริมาณของ ether ที่ใช้ในการทำให้ตกตะกอนก็มากด้วย แต่ถ้าใช้น้อยเกินไป anthocyanin จะละลายออกมาไม่หมด

3. ความบริสุทธิ์ของสารที่ได้จากการทดลองโดยวิธีนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนครั้งที่กระทำซ้ำ ถ้าทำซ้ำหลายครั้งจะได้สารบริสุทธิ์มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม การทำซ้ำหลาย ๆ ครั้งจะทำให้ yield ที่ได้น้อยลง

4. การทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีนี้จะให้ผลดี ถ้าใช้กับดอกไม้ที่มีสีม่วง สีน้ำเงิน และสีดำ

5. จากผลการตรวจความบริสุทธิ์ของสารที่ได้จากการทดลองโดยวิธีนี้ พบว่า ยังมี Impurity ส่วนน้อย ๆ เหลืออยู่บ้าง (ผลการตรวจความบริสุทธิ์ของสาร จากตารางที่ 32 หน้า 88 และรูปของ paper chromatogram ในภาคผนวก จ หน้า 17 แต่ไม่แสดงผลกระทบกระเทือนถึง Rf value ที่ได้จาก paper chromatography สารละลาย ที่ได้รับจากการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีนี้มีคุณภาพดีเหมือนกับสารละลายที่ได้จากการทดลองโดยวิธีใช้ column chromatography ในข้อ 4.2.2 และ ion-exchange ในข้อ 4.2.3 ถือว่า สามารถนำไปใช้ได้ทั้งในด้านปริมาณวิเคราะห์และคุณภาพวิเคราะห์

6. การทดลองโดยวิธีนี้ไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในโรงเรียนที่ขาดอุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ เพราะเป็นการทดลองที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายมาก อย่างไรก็ตามการทดลองวิธีนี้ก็เหมาะที่จะนำไปใช้ในการทำสารให้บริสุทธิ์ขั้นต้นสำหรับการทดลองที่ต้องการสารที่มีความบริสุทธิ์สูง

4.2.2 Column Chromatography การทดลองในข้อนี้แบ่งออกเป็นสองตอน คือ ตอนแรกใช้ calcium sulfate (R.P) เป็น adsorbent และตอนที่สองใช้ alumina เป็น adsorbent มีข้อควรสังเกตดังนี้

1. การใช้ calcium sulfate (R.P) column ในตอนแรกนั้นก็เพื่อจะแยกเอา impurities บางส่วนออก ซึ่งถือว่าเป็นการทำให้บริสุทธิ์ขั้นต้น จากการทดลองได้พบว่า การผ่านสารละลายอินดิเกเตอร์ ลงใน calcium sulfate (R.P.) column หลาย ๆ ครั้ง จะทำให้ปริมาณของ impurities ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า calcium sulfate (R.P) ของบริษัท J.T. Baker Chemical Co. มีประสิทธิภาพในการแยก impurities

ได้ชื่อว่า calcium sulfate (R.F.) ของบริษัท Carlo Erba

2. จากการทดลองพบว่า ไม่อาจแยก anthocyanins สองชนิดออกจากกันด้วยวิธีนี้ โดยการใช้ calcium sulfate (R.F.) column ผลการทดลอง¹² ยังสอดคล้องกับการทดลองของ Li กับ Wagenknecht

3. การผ่าน column ครั้งที่สองโดยใช้ alumina เป็น adsorbent ปรากฏว่า alumina จะดูดซับ anthocyanin (สารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้ม้า) ไว้ได้ดีมาก การชะ (elute) column ด้วยตัวทำละลายธรรมดา (เช่น น้ำ หรือ alcohol) จะไม่สามารถพา anthocyanin ออกจาก column ได้¹³ ปรากฏว่าอันนี้ตรงกับผลการทดลองของ Harborne จากคุณสมบัติของ alumina ดังกล่าวนี้เอง จึงนำมาใช้ในการ purify สาร anthocyanin จากธรรมชาติได้ กล่าวคือ เมื่อผ่าน anthocyanin (crude product) ลงไปใน column ของ alumina แล้ว elute column ด้วยน้ำหรือ alcohol เพื่อให้ impurities ที่เหลืออยู่จากการ purify ครั้งแรก (calcium sulfate column) ไหลออกจาก column จากนั้นจึงค่อย ๆ เพิ่ม polarity ของตัวทำละลาย โดยใช้ส่วนผสมระหว่าง ethanol กับ glacial acetic acid โดยวิธีนี้ จึงสามารถ elute anthocyanin ออกจาก column ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าวิธีทดลองดังกล่าวนี้สามารถแยก anthocyanins 2 ชนิด ที่ผสมกันอยู่ในหลอด 1 (สีส้มแดง) ออกจากกันได้ โดย anthocyanin ชนิดแรก (F^1) จะไหลออกจาก column เมื่อชะ (elute) ด้วย ethanol:glacial acetic acid = 90:10 v/v และ anthocyanin ชนิดที่สอง (F^2) จะไหลตามออกมาอีกเมื่อชะ (elute) column ด้วย ethanol : glacial acetic acid = 60 : 40 v/v

¹² Li, K.C., and Wagenknecht, M.C., J. Am. Chem. Soc., **78**, 979 (1956).

¹³ Harborne, J.B., and Sherratt, H.S.A., Biochem. J., **65**, 24 (1957).

4. สาร anthocyanin ที่ได้ออกมาจากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีนี้
ความบริสุทธิ์สูง จากการตรวจความบริสุทธิ์ของสารโดยวิธี paper chromatography
ปรากฏว่า ไม่มีจุดของ impurity ปรากฏออกมาให้เห็นเลย และ Rf value ที่ได้อาก
การทดลองก็ใกล้เคียงกับความเป็นจริง คุณผลการทดลองทั้งแสดงไว้ในตารางที่ 32 หน้า 88
และภาพของ paper chromatography ทั้งแสดงไว้ในภาคผนวก จ. หน้า 173

5. การทดลองตามวิธีดังกล่าวนี้ ไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในโรงเรียนที่ขาด
อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ เพราะเป็นการทดลองที่ต้องใช้เคมีภัณฑ์ที่มีคุณภาพสูง ราคาแพง แต่การ
ทดลองตามวิธีนี้เหมาะสมอย่างยิ่งกับการใช้ในการศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับสารอินดิเคเตอร์จาก
ดอกไม้ และการทดลองนี้สามารถนำไปประยุกต์กับการเรียนวิชาเคมีภาคปฏิบัติการในระดับอุดมศึกษาได้

4.2.3 Ion - exchange chromatography resin ที่ใช้ในการทดลอง
ครั้งนี้คือ amberlite resin IRC - 50 (weak cation exchanger) ซึ่งเป็น resin
ที่มีคุณภาพขนาดปานกลาง (commercial grade) ¹⁴ ถ้าจะใช้ resin ที่มีคุณภาพสูง
(analytical grade) จะต้องใช้ amberlite resin IRC - 50(H) แต่ปรากฏว่าไม่มี
จำหน่าย การทดลองอันนี้มีข้อควรสังเกตดังนี้

1. สารละลายอินดิเคเตอร์ (crude extract) ที่จะผ่านลงไป
column ของ amberlite resin IRC - 50 นั้นจะต้องไม่มีฤทธิ์เป็นกรดหรือด่าง ทั้งนี้
เพราะถ้าสารละลายมีฤทธิ์เป็นด่างแทนที่จะเกิดการ exchange ระหว่าง anthocyanin
กับ resin ก็จะกลายเป็นเกิดการ exchange ระหว่าง cation จากด่างกับ resin
หรือถ้าสารละลายมีฤทธิ์เป็นกรด ก็จะไม่เกิดการ exchange ระหว่าง anthocyanin
กับ resin แต่อย่างใด เพราะ pH ของสารละลายต่ำกว่า pH ที่จะเกิดการ exchange
ขึ้นได้ (pH $\sim$ 7) ¹⁵ ดังนั้นการทำให้สารให้บริสุทธิ์โดยวิธี ion-exchange นั้นจึงเหมาะที่จะ
ใช้กับการสกัดสารชนิดที่ใช้ตัวทำละลายไม่มีฤทธิ์เป็นกรดหรือด่าง

¹⁴ Osborn, G.H., "Synthetic Ion - Exchangers", p.16-17, 1955.

¹⁵ Inezedy, J., "Analytical Applications of Ion-Exchangers",
p. 81-83, 1966.

2. Mechanism ของการเกิดการ exchange นี้ ในปัจจุบันยัง
 ไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จากการทดลองของ John D. Guthrie¹⁶ เขาจึงได้เสนอสมมุติฐาน
 ว่า anthocyanins และสารพวก flavonoid compounds เหล่านี้เมื่ออยู่ในกลีบดอกไม้
 จะมีโลหะเข้ามา form complex ดังนั้นมันจึงสามารถละลายออกจากกลีบดอกไม้ได้เมื่อใช้
 polar solvent ต่อมาเมื่อนำไปผ่าน column resin จะจับ metal ion เอาไว้
 และเมื่อจะ (elute) column ด้วย solvent ที่ polar มากกว่าเดิม จะทำให้
 complex bond แตกออก สารพวก flavonoid เมื่อหลุดออกในรูปอิสระมันจะไม่ละลาย
 ใน polar solvent จึงตกตะกอนออกมาเป็นสีน้ำตาล ส่วนสาร anthocyanin ก็ยังคง
 ละลายอยู่ในสารละลายตามเดิม และจากการทดลองของ Johnson, Mayer กับ Johnson¹⁷
 และ Morris, Gage กับ Wender¹⁸ ก็ได้ผลการทดลองที่สนับสนุนสมมุติฐานอันนี้

3. จากการตรวจความบริสุทธิ์ของสาร anthocyanin ที่ได้จาก ion
 exchange column ปรากฏว่ายังมีคราบดำ ๆ ปะปนมาอยู่เล็กน้อย impurity อันนี้สันนิษฐาน
 ได้ว่า ไม่ได้มาจาก impurity ที่มีอยู่ในกลีบดอกไม้ เพราะถ้าเป็น impurity ที่มาจาก
 กลีบดอกไม้แล้วจะต้องมีสีเหลืองซีดหรือสีเหลืองซึ่งเปรียบเทียบกับ impurity ที่ได้จากการทำ
 โหมรีสุกซ์แบบง่าย (ดูตารางที่ 32 หน้า 88) และภาพ chromatogram ในภาคผนวก ๗.
 (หน้า 175) ดังนั้น impurity สีดำดังกล่าวนี้อาจมาจาก resin เพราะ resin ที่ใช้
 คือ amberlite resin IRC-50 ซึ่งเป็น resin ที่มีคุณภาพขนาดกลาง (commercial
 grade)

¹⁶ Calmon, C., and Kressman, T.R. (eds), "Ion-Exchangers in Organic and Biochemistry," p. 567 - 568, 1957.

¹⁷ Johnson, G., Mayer, M.M., and Johnson, D.K., Food Research, 16, 169 (1951).

¹⁸ Morris, Q.L., Gage, T.B., and Wender, S.H., J. Am. Chem. Soc., 73, 3340 (1951).

4. การทดลองโดยวิธีนี้ไปเหมาะที่จะนำไปใช้ในโรงเรียนที่ขาดอุปกรณ์ และเคมีภัณฑ์ เพราะ resin มีราคาถูก และ mechanism ของการเกิดการ exchange ก็ยากที่จะทำให้นักเรียนในระดับมัธยมศึกษาเข้าใจได้ง่าย แต่อย่างไรก็ตามการทดลองโดยวิธีดังกล่าวนี้สามารถนำไปใช้ได้สำหรับการทดลองที่ต้องการความบริสุทธิ์สูง และเป็นวิธีที่เหมาะสม ที่จะใช้แยกสารพวก anthocyanins ออกจาก impurities ที่ปนกันอยู่ในธรรมชาติ นอกจากนี้วิธีดังกล่าวนี้อาจประยุกต์ไปกับการเรียนวิชาเคมีภาคปฏิบัติการในสถาบันระดับอุดมศึกษาได้

5.00 ผลการนำไปใช้และการเก็บรักษา

5.10 ผลการนำไปใช้ในด้านคุณภาพวิเคราะห์

5.1.1 การทำ indicator paper (anthocyanin paper)

จุดมุ่งหมายสำคัญของการทำ anthocyanin indicator paper ก็เพื่อที่จะนำไปใช้แทนกระดาษลิตมัส แม้ว่ากระดาษลิตมัสราคาจะไม่แพงและหาง่ายก็ตาม แต่หาสามารถทำขึ้นเองได้โดยไม่ต้องมีการลงทุนด้วยเงิน ก็จะเป็นการช่วยประหยัดรายจ่ายไปได้อีกทางหนึ่งกับการทดลองในห้องนี้มีข้อที่ควรจะนำมาอภิปรายดังนี้

1. กระดาษที่จะใช้ทำ anthocyanin indicator paper นั้น จะใช้กระดาษอะไรก็ได้ที่มีสีขาว หรือสีค่อนข้างขาว เช่นกระดาษกรอง กระดาษวาดเขียน กระดาษอัดสำเนา แต่จากการทดลองพบว่ากระดาษที่จะใช้ทำเป็น indicator paper ได้ดีนั้น จะต้องเป็นกระดาษที่มีความหนาพอสมควร (เช่นกระดาษกรองและกระดาษวาดเขียน) และจะต้องดูดซับสารละลายได้ดี

2. การทำ indicator paper จากดอกไม้ชนิดที่มีสีแดง ก็จะได้ indicator paper ที่มีสีแดงด้วย ทั้งนี้เนื่องจาก pH ใน cell sap¹⁹ ในก้านของดอกไม้นี้ต่ำกว่า 7 แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำ indicator paper (สีแดง) ที่ได้นี้ไปทดสอบกับ

¹⁹ Geissmann, T.A., loc.cit.

สารละลายที่เป็นกรด (hydrochloric acid 0.01 M) ปรากฏว่าจะได้สีแดงซึ่งแตกต่างกับสีแดงเริ่มต้น

3. จากผลของการทดลองเกี่ยวกับการเปลี่ยนสีของ indicator paper ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4 (หน้า 56) จะเห็นได้ว่า indicator paper ที่ได้จากการสะกิด การแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการที่มีประสิทธิภาพนั้น เมื่อทดสอบกับกรดจะให้สีแดงและกับด่างจะให้สีน้ำเงินกับทุก ๆ ชนิดของดอกไม้ ซึ่งเป็นการเปลี่ยนสีที่แตกต่างกันมาก และง่ายต่อการสังเกต ดังนั้น indicator paper ที่ทำขึ้นโดยวิธีนี้จึงมีคุณภาพดี แก่สำหรับ indicator paper ที่ได้จากการสะกิดการแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการแบบง่ายนั้น เมื่อนำไปทดสอบในด่างจะให้สีเขียวหรือเขียวแก่ อันนี้เราอธิบายได้ว่า เนื่องจากมีสารประกอบจำพวก flavone ผสมอยู่ด้วย ซึ่งสารประกอบพวกนี้เมื่ออยู่ในด่างจะให้สีเหลือง ดังนั้นเมื่อ anthocyanin ในด่างมีสีน้ำเงินมาผสมกับ flavone ในด่างมีสีเหลือง ผลที่ได้ออกมาจึงเป็นสีเขียว หรือสีเขียวแก่ (ถ้าปริมาณของ flavone มีน้อย) แต่ในการทดลองที่ใช้อินดิเคเตอร์ จากวิธีการที่มีประสิทธิภาพ จะไม่พบปรากฏการณ์นี้ ทั้งนี้เพราะวิธีการที่มีประสิทธิภาพสามารถแยก anthocyanin ออกจาก flavone ได้อย่างดี

4. Indicator paper ที่ทำจากสารละลายที่ยังไปไล่ทำให้บริสุทธิ์ทั้งที่ สะกิดได้โดยวิธีแบบง่าย และวิธีที่มีประสิทธิภาพ ในสารละลายของกรดจะให้สีแดงและในสารละลายของด่างจะให้สีเขียวเหมือนกันทั้งคู่ (ดูตารางที่ 4 หน้า 56) อันนี้ก็เนื่องมาจากผลของการที่มี สารประกอบพวก flavone ผสมอยู่ด้วยดังได้กล่าวไปแล้วในข้อ 3 มีข้อสังเกตอยู่ว่า indicator paper ที่ได้มาจากวิธีการทุกแบบเมื่ออยู่ในสารละลายของกรดจะให้สีแดงเหมือนกันหมด ปรากฏการณ์นี้อธิบายได้ว่า ผลของการที่มี flavone ผสมอยู่ด้วยนั้นจะแสดงออก เฉพาะเมื่ออยู่ในสารละลายของด่างเท่านั้น ทั้งนี้เพราะว่า flavone ในสารละลายของกรด จะไม่มีสี ดังนั้นสีแดงของ anthocyanin ในสารละลายของกรดจึงไม่ถูกกระทบกระเทือนแต่อย่างใด

5. Anthocyanin indicator paper นี้ เหมาะสมอย่างมากที่จะนำไปใช้ในสถาบันการศึกษาทุกแห่งที่มีการเรียนการสอนวิชาเคมี เพราะมีวิธีการทำแบบง่าย ๆ

ไว้เพื่อการลงทุน เติบโตมาจากวัสดุได้เปล่าทั้งสิ้น เช่น กลิ่นดอกไม้ เพชรกระดาก เป็นต้น

5.1.2 การนำไปใช้ในรูปแบบของสารละลาย

ในการทดลองบางครั้งการเตรียม anthocyanin indicator paper อาจจะไม่ทันต่อเหตุการณ์ ดังนั้นจำเป็นต้องใช้อินดิเคเตอร์ในรูปแบบสารละลายมาทดสอบ ซึ่งวิธีทดลองได้แสดงไว้ในบทที่ 3 ข้อ 2.10 (หน้า 37) และข้อ 5.1.2 (หน้า 55) จากผลของการทดลองเกี่ยวกับเรื่องนี้ ดังได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 (หน้า 39) และตารางที่ 5 (หน้า 57) จะเห็นได้ว่าผลของการเปลี่ยนสีของสารอินดิเคเตอร์ในรูปแบบสารละลายเหมือนกับผลการเปลี่ยนสีของ anthocyanin indicator paper ทุกประการดังได้กล่าวไว้แล้วในบทที่ 4 ข้อ 5.1.1 (หน้า 109) ดังนั้นจึงจะไม่นำรายละเอียดอีก สำหรับการทดลองในตอนนี้มีข้อควรอธิบายเพิ่มเติมดังนี้

1. การเปลี่ยนสีของสารอินดิเคเตอร์ใช้เป็นเครื่องมือจนถึงความบริสุทธิ์ (อย่างหยาบ ๆ) ของอินดิเคเตอร์ชนิดนั้นได้ กล่าวคือถ้าสารบริสุทธิ์มาก เมื่ออยู่ในสารละลายของกรดจะมีสีน้ำเงิน และจะไปเปลี่ยนเป็นสีเขียว เบื่อตั้งทิ้งไว้นาน ๆ หรือเขย่าหลาย ๆ ครั้ง สีน้ำเงินที่เห็นจะค่อย ๆ ซีดลง ๆ จนในที่สุดจะไม่มีสีทั้งนี้เนื่องจากเกิดการ form pseudo²⁰ base ถ้าเป็นสารอินดิเคเตอร์ที่บริสุทธิ์เมื่ออยู่ในกรดจะเป็นสีเหลือง สีเขียว หรือ สีเขียวแก่ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของ flavone ที่เป็น impurity ผสมอยู่จากมากไปน้อยตามลำดับ และเมื่อตั้งทิ้งไว้นาน ๆ ก็จะค่อย ๆ กลายเป็นสีเหลืองหรือสีขาวอ่อน

2. ในการทดลองเกี่ยวกับการเปลี่ยนสีนี้ ถ้ามี acetate ion ผสมอยู่ด้วย มันจะไปทำให้การเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินไปเป็นไม่มีสีได้เร็วขึ้น แต่เมื่ออยู่ในสารละลายของกรด acetate ion จะไม่มีผลแต่อย่างใด mechanism ของบทบาทของ acetate ion ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงสีนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

5.20 อธิบายผลการนำไปใช้ในด้านปริมาณวิเคราะห์

การทดลองในตอนนี้นั้นในเรื่องการนำสารอินดิเคเตอร์จากดอกไม้ไปใช้ในค่าปริมาณวิเคราะห์ในขบวนการ titration แบ่งออกเป็น 4 หมวด คือ

²⁰ Reynolds, T.M., Robinson, R., and Scott-Moncrieff, R., loc.cit.

1. ปฏิกริยาระหว่างกรดแก่กับด่างแก่
2. ปฏิกริยาระหว่างกรดแก่กับด่างอ่อน
3. ปฏิกริยาระหว่างกรดอ่อนกับด่างแก่
4. ปฏิกริยาระหว่างกรดอ่อนกับด่างอ่อน

ทั้ง 4 หมวดนี้ใช้สารอินดิเคเตอร์ 3 ประเภท คือ

1. อินดิเคเตอร์ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์
2. อินดิเคเตอร์ที่ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการแบบง่าย
3. อินดิเคเตอร์ที่ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการที่มีประสิทธิภาพ

ผลการทดลองดังแสดงไว้ในตารางที่ 6 – 17 (หน้า 59)เมื่อเอาความเข้มข้น
ร้อยละของ sodium hydroxide ที่คลากเคลื่อนมาแจกแจงตามประเภทของปฏิกิริยาที่ใช้ใน
การ titrate ได้ ดังแสดงในตารางที่ 36 – 39 (หน้า 113)

ตารางที่ 35 เปรียบเทียบปริมาณของ sodium hydroxide ที่คลากเคลื่อนในการ titrate ระหว่าง 0.1 M hydrochloric acid กับ 0.1 M sodium hydroxide เมื่อใช้อินดิเคเตอร์ที่สีคุณภาพต่างกัน

สารอินดิเคเตอร์จากดอกไม้ที่ใช้	% ของความเข้มข้นของ sodium hydroxid ที่คลากเคลื่อน		
	อินดิเคเตอร์ไม่บริสุทธิ์	อินดิเคเตอร์ที่ทำให้อินดิเคเตอร์บริสุทธิ์แบบง่าย	อินดิเคเตอร์บริสุทธิ์
ทองหลางใบลาย	+ 1.50	+ 1.17	+ 1.21
ทองหลางน้ำ	+ 1.58	+ 1.13	+ 1.21
อัญชัน	+ 2.17	+ 1.50	+ 1.54
พระโขนง	+ 1.67	+ 1.26	+ 1.26
ขบาว	+ 1.46	+ 1.26	+ 1.26
พุทธรักษา	+ 2.04	+ 1.34	+ 1.38
ชองนางใหญ่	+ 2.20	+ 1.46	+ 1.42
เฟื่องฟ้า 1	+ 1.58	+ 1.09	+ 1.17
เฟื่องฟ้า 2	+ 1.83	+ 1.01	+ 1.17
กุหลาบ 1	+ 1.91	+ 0.93	+ 0.97
กุหลาบ 2	+ 1.58	+ 0.97	+ 0.97
เฉลี่ย	+ 1.78	+ 1.19	+ 1.23
Bromthylmol Blue	- 0.60		

หมายเหตุ + แสดงว่าความเข้มข้นของ sodium hydroxide มากกว่าความเป็นจริง
 - แสดงว่าความเข้มข้นของ sodium hydroxide น้อยกว่าความเป็นจริง

ตาราง 37 เปรียบเทียบปริมาณของ ammonia solution ที่คลาดเคลื่อน ในการ
titrate ระหว่าง 0.1 M hydrochloric acid กับ 0.1 M
aqueous ammonia solution เพื่อใช้อินดิเคเตอร์ที่มีคุณภาพต่างกัน

สารอินดิเคเตอร์จากดอกไม้ที่ใช้	% ของความเข้มข้นของ ammonia solution ที่คลาดเคลื่อน		
	อินดิเคเตอร์โมบิรสุทรี	อินดิเคเตอร์ที่ทำให้อินดิเคเตอร์แบบ	อินดิเคเตอร์บิรสุทรี
ทองหลางใบลาย	- 0.64	- 0.36	- 0.20
ทองหลางน้ำ	- 0.48	- 0.40	- 0.16
อัญชัน	- 0.20	- 0.20	- 0.04
พุระหง	- 0.40	- 0.44	- 0.36
บานา	- 0.71	- 0.40	- 0.40
พุทธรักษา	- 0.64	- 0.36	- 0.32
รองนางใหญ่	- 0.04	- 0.16	- 0.08
เฟื่องฟ้า 1.	- 0.71	- 0.98	- 0.44
เฟื่องฟ้า 2.	- 0.83	- 0.48	- 0.44
กุหลาบ 1.	- 0.52	- 0.40	- 0.36
กุหลาบ 2.	- 0.48	- 0.32	- 0.36
เฉลี่ย	- 0.51	- 0.41	- 0.29
Congo Red		+ 0.16	

หมายเหตุ + แสดงว่าความเข้มข้นของ ammonia มากกว่าความเป็นจริง
- แสดงว่าความเข้มข้นของ ammonia น้อยกว่าความเป็นจริง

ตาราง 38 เปรียบเทียบปริมาณของ sodium hydroxide ที่คลาดเคลื่อน ในการ titrate ระหว่าง 0.1 M acetic acid กับ 0.1 M sodium hydroxide เพื่อให้อินดิเคเตอร์ที่มีคุณภาพต่างกัน

สารอินดิเคเตอร์จากดอกไม้ที่ใด	% ของความเข้มข้นของ sodium hydroxide ที่คลาดเคลื่อน		
	อินดิเคเตอร์ไม่บริสุทธิ์	อินดิเคเตอร์ที่ทำให้บริสุทธิ์แบบง่าย	อินดิเคเตอร์บริสุทธิ์
ทองหลางใบลาย	+ 3.21	+ 3.62	+ 3.62
ทองหลางน้ำ	+ 4.17	+ 3.73	+ 3.78
อัลชัน	+ 3.78	+ 4.12	+ 4.12
พุระหลง	+ 4.04	+ 3.91	+ 3.95
ชะบา	+ 3.78	+ 3.82	+ 3.91
พุทธรักษา	+ 4.21	+ 4.08	+ 4.12
รองนางใหญ่	+ 4.38	+ 4.21	+ 4.21
เฟื่องฟ้า 1.	+ 3.73	+ 3.78	+ 3.82
เฟื่องฟ้า 2.	+ 3.77	+ 3.82	+ 3.78
กุหลาบ 1.	+ 3.95	+ 3.73	+ 3.69
กุหลาบ 2.	+ 3.91	+ 3.78	+ 3.78
เฉลี่ย	+ 3.97	+ 3.88	+ 3.90
Phenolphthalein	- 0.04		

หมายเหตุ + แสดงว่าความเข้มข้นของ sodium hydroxide มากกว่าความเป็นจริง
 - แสดงว่าความเข้มข้นของ sodium hydroxide น้อยกว่าความเป็นจริง

ตาราง 39 เปรียบเทียบปริมาณของ ammonia solution ที่คลาดเคลื่อน
ในการ titrate ระหว่าง 0.1 M acetic acid กับ 0.1 M
aqueous ammonia solution เมื่อใช้อินดิเคเตอร์ที่มีคุณภาพต่างกัน

สารอินดิเคเตอร์จากดอกไม้ที่ใช้	% ของความเข้มข้นของ ammonia solution ที่คลาดเคลื่อน		
	อินดิเคเตอร์ที่ยังไม่ได้ ทำให้บริสุทธิ์	อินดิเคเตอร์ที่ทำให้ บริสุทธิ์แบบง่าย	อินดิเคเตอร์บริสุทธิ์
ทองหลางใบลาย	+ 1.79	+ 1.58	+ 1.58
ทองหลางน้ำ	+ 1.58	+ 1.67	+ 1.58
อัญชัน	+ 2.42	+ 1.79	+ 1.71
พู่ระหง	+ 2.00	+ 1.46	+ 1.42
ชบา	+ 2.00	+ 1.42	+ 1.46
พุทธรักษา	+ 2.12	+ 1.67	+ 1.63
ชองนางใหญ่	+ 2.29	+ 1.92	+ 1.70
เฟื่องฟ้า 1.	+ 1.79	+ 1.58	+ 1.54
เฟื่องฟ้า 2.	+ 1.75	+ 1.58	+ 1.58
กุหลาบ 1.	+ 1.92	+ 1.54	+ 1.54
กุหลาบ 2.	+ 1.83	+ 1.58	+ 1.54
เฉลี่ย	+ 1.95	+ 1.62	+ 1.58
Bromthymol Blue	0.00		

หมายเหตุ + แสดงว่าความเข้มข้นของ ammonia มากกว่าความเป็นจริง
- แสดงว่าความเข้มข้นของ ammonia น้อยกว่าความเป็นจริง

จากตารางที่ 36 เป็นการ titrate ของปฏิกิริยาระหว่างกรดแก่กับด่างแก่ จะเห็นได้ว่าความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นเมื่อใช้อินดิเกเตอร์ทั้งสามแบบจะทำให้ค่าของความเข้มข้นของ sodium hydroxide มากกว่าความเป็นจริง และจะแตกต่างกันเล็กน้อย โดยอินดิเกเตอร์ที่ไปบริสุทธ์จะเกิดความคลาดเคลื่อนมากที่สุด (+ 1.78 %) มีข้อสังเกตอยู่ว่าอินดิเกเตอร์บริสุทธ์ (+ 1.23 %) เกิดความคลาดเคลื่อนมากกว่าอินดิเกเตอร์ที่ทำให้บริสุทธ์เม่ง่าย (+ 1.19 %) ความคลาดเคลื่อนอันนี้มาจากการทดลองมากกว่าความคลาดเคลื่อนของอินดิเกเตอร์ อย่างไรก็ตาม ทำให้สามารถอธิบายได้อีกทางหนึ่งว่า การมี impurities ผสมอยู่เพียงเล็กน้อย จะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนสีของอินดิเกเตอร์ในปฏิกิริยาระหว่างกรดแก่กับด่างแก่

จากตารางที่ 37 เป็นการ titrate ของปฏิกิริยาระหว่างกรดแก่กับด่างอ่อน จะเห็นได้ว่าความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นเมื่อใช้อินดิเกเตอร์ทั้งสามแบบจะทำให้ค่าของความเข้มข้นของ ammonia น้อยกว่าความเป็นจริง แต่เกิดขึ้นได้น้อยมาก (- 0.51 %, - 0.41 % และ - 0.29 %) ซึ่งสรุปได้ว่าอินดิเกเตอร์จากดอกไม้สามารถนำไปใช้ในปฏิกิริยาระหว่างกรดแก่กับด่างอ่อนได้

จากตารางที่ 38 เป็นการ titrate ของปฏิกิริยาระหว่างกรดอ่อนกับด่างแก่ จะเห็นได้ว่าอินดิเกเตอร์ทั้งสามแบบจะเกิดความคลาดเคลื่อนใกล้เคียงกันและมากพอสมควร (+ 3.97 %, + 3.88 % และ + 3.90 %) ซึ่งสรุปได้ว่า จะนำอินดิเกเตอร์ไปใช้ในปฏิกิริยากังกล่าวนี้ได้ก็ต่อเมื่อการทดลองนั้นไม่ต้องการความละเอียดในการหาปริมาณมากนัก

จากตารางที่ 39 เป็นการ titrate ของปฏิกิริยาระหว่างกรดอ่อนกับด่างอ่อน จะเห็นได้ว่าความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นมีน้อย (+ 1.95 %, + 1.62 % และ + 1.58 %) และอินดิเกเตอร์ทั้งสามแบบเกิดความคลาดเคลื่อนต่างกันเพียงเล็กน้อย โดยอินดิเกเตอร์ไม่บริสุทธ์จะเกิดความคลาดเคลื่อนมากที่สุด

จากการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่า ความบริสุทธ์ของสารอินดิเกเตอร์จะมีผลน้อยมาก สำหรับการทดลองในด้านปริมาณวิเคราะห์ และอินดิเกเตอร์จากดอกไม้เหมาะที่จะนำไปใช้ในการ titrate ของปฏิกิริยาระหว่างกรดแก่กับด่างแก่ กรดแก่กับด่างอ่อน และกรดอ่อนกับด่างแก่ สำหรับปฏิกิริยาระหว่างกรดอ่อนกับด่างแก่ก็ใช้ได้เช่นกัน แต่ความคลาดเคลื่อนมีมากกว่าปฏิกิริยาอื่น ๆ

5.3c อธิบายผลการเก็บรักษาสารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้

จุดมุ่งหมายสำคัญของการทดลองในข้อนี้เพื่อที่จะหาวิธีเก็บรักษาสารอินดิเกเตอร์ในรูปของสารละลายไว้ใช้ในโอกาสต่าง ๆ โดยอินดิเกเตอร์ที่เก็บไว้นั้นต้องไม่เสื่อมคุณภาพ จากการทดลองมีข้อที่ควรนำมาอภิปรายดังนี้

1. ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 18 – 21 (หน้า 71) จะเห็นได้ว่าสารละลายอินดิเกเตอร์ที่มีความบริสุทธิ์ต่างกันทั้ง 3 แบบ จะมีคุณภาพคงเดิมเมื่ออยู่ในสารละลายของกรดและจะไม่อยู่ตัวเมื่ออยู่ในสารละลายของด่าง หรือสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นกลาง

2. สารอินดิเกเตอร์จะมีคุณภาพคงเดิมเมื่อเก็บไว้ในสารละลายของ ethanolic hydrogen chloride 1% แต่ในสารละลายของ 0.1 M hydrochloric acid เมื่อเก็บไว้นาน ๆ จะเกิดเป็นวันสีนวล ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากเชื้อราที่มีอยู่ในสารละลาย

3. จากผลในข้อ 1 และ 2 จึงสรุปได้ว่า ไม่ควรเก็บสารละลายอินดิเกเตอร์ไว้ไว้ในงานด้านปริมาณวิเคราะห์ เพราะตัวทำละลายที่ใช้เก็บรักษาสารอินดิเกเตอร์นั้นมีฤทธิ์เป็นกรด ซึ่งจะมีผลทำให้งานด้านปริมาณวิเคราะห์เกิดความผิดพลาดได้ อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาสารอินดิเกเตอร์ไว้ในสารละลายของกรดนี้ยอมนำไปใช้ได้กับการทดลองที่ต้องการจะศึกษาถึงรายละเอียดเกี่ยวกับสารอินดิเกเตอร์ชนิดนั้น ๆ เพราะการเริ่มต้นจากการสะกิดใหม่ทำให้บริสุทธิ์ใหม่อยู่เรื่อย ๆ ไปเรื่อยไม่ควยให้งานวิจัยก้าวหน้าไปได้

4. สำหรับโรงเรียนที่ขาดอุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ ไม่ควรมีการเก็บรักษาสารอินดิเกเตอร์เอาไว้ เมื่อใช้สารละลายอินดิเกเตอร์แล้วที่เหลือให้ทิ้งไป ถ้าต้องการใช้ใหม่ก็ให้เตรียมใหม่ ซึ่งวิธีเตรียมนั้นง่ายมาก ตัวอย่างเช่น เอาลูกเต๋าคัน (ส้มวงคำ) มา 2 – 3 ลูก เอาช้อนกดให้แตก เคี้ยวลงไป 20 ml. เหย้า 5 นาที กรองเอาสารละลายที่ได้ไปใช้เป็นสารละลายอินดิเกเตอร์ได้ทันที

5. สาเหตุประการหนึ่งของที่มีของการทดลองนี้ ก็เนื่องมาจากไม่ประสบผลสำเร็จในการที่จะเก็บรักษาสารอินดิเกเตอร์ในรูปของผลึก ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่า ความเข้มข้น pH ของสารละลาย และตัวทำละลายที่ใช้ในการตกผลึก ยังไม่ใช่วิธีที่เหมาะสม ซึ่งควรจะได้นำการศึกษากันไว้ในเรื่องนี้กันต่อไป

6. การเก็บรักษาสารอินดิเกเตอร์ในรูปของของแข็งโดยการระเหยเอาตัวทำละลายออกไ้แห้งโดยวิธีลดความดัน หรือวิธีทำให้ตกตะกอนโดยใช้ ether²¹ มีขอบเขตจำกัดมาก เพราะเป็นการลงทุนที่สูง โรงเรียนที่ขาดอุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ย่อมไม่อาจจะกระทำได้ แม้โรงเรียนที่อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ครบก็ไม่ได้ว่าที่จะกระทำเพราะต้นทุนในการทำสูงกว่าการที่จะไปซื้ออินดิเกเตอร์จากท้องตลาด

6.00 ฉบบีรยผลเกี่ยวกับการศึกษาเปรียบเทียบสารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้

6.10 ผลเกี่ยวกับปริมาณของ anthocyanin ในดอกไม้

ผลการหาปริมาณของ anthocyanin ที่มีอยู่ในกลีบดอกไม้ดังแสดงในตารางที่ 22 (หน้า 76) สามารถนำมาตีความหมายถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสี พื้นที่ผิวของกลีบดอกและความหนาของกลีบดอก กับน้ำหนักของ anthocyanin ที่มีอยู่ในกลีบดอกได้ดังนี้

1. ถ้าดอกไม้มีสีเข้ม จะมีปริมาณของ anthocyanin มากกว่าดอกไม้ที่มีสีอ่อน เช่น ดอกเฟื่องฟ้า 1 สีแดงส้ม (กลีบดอกสีอ่อน) มี anthocyanin 2.87% ดอกเฟื่องฟ้า 2 สีแดง (กลีบดอกสีเข้ม) มี anthocyanin 3.46 %

2. ดอกไม้ที่มีพื้นที่ผิวที่สีเข้มจะมีปริมาณ anthocyanin มากกว่าดอกไม้ที่มีพื้นที่ผิวที่สีของดอกติดอยู่น้อย (เมื่อคิดเต็มทั้งกลีบดอกและมีความเข้มข้นของสีเท่า ๆ กัน) เช่น ดอกกุหลาบ 2 สีแดงเข้มเต็มทั้งกลีบดอก มี anthocyanin 3.92 % ดอกอัญชันสีน้ำเงินเข้ม มีสีประมาณ $\frac{3}{4}$ ของกลีบดอก มี anthocyanin 2.98 %

3. ดอกไม้ที่มีกลีบดอกหนาจะมีปริมาณของ anthocyanin น้อยกว่าดอกไม้ที่มีกลีบดอกบาง (เมื่อเทียบกับดอกที่มีความเข้มข้นของสีเท่า ๆ กัน) เช่น ดอกทองหลางใบลาย กลีบหนาสีแดงสด มี anthocyanin 2.36 % ดอกกุหลาบ 1 กลีบบางสีแดงสดมี anthocyanin 3.55 %

ข้อควรสังเกตอีกประการหนึ่งคือน้ำหนักร้อยละของ anthocyanin ที่ได้ทั้งแสงในตารางที่ 22 นั้น ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดย column chromatography ทั้งสิ้น

²¹ Acheson, R.M., An Introduction to the Chemistry of Heterocyclic Compounds," p. 286, 1967.

(ตามวิธีการในบทที่ 3 ข้อ 4.2.2) ซึ่งเป็นตัวเลขที่มากพอสมควร เช่น กอของนางมี anthocyanin ในกลีบดอกถึง 3.41 % เมื่อนำไปเทียบกับปริมาณของกอของนางที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีตกตะกอน ตามการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 4.2.1 ได้ปริมาณของ anthocyanin ในกอของนางเพียง 0.6 % เท่านั้น ซึ่งเป็นตัวเลขที่แตกต่างกันมาก ทำให้สรุปได้ว่า วิธีการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนนั้น จะเสีย yield มากกว่าการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ column chromatography การสรุปดังกล่าวนี้สามารถยืนยันได้โดยการทดลองของ Willstatter กับ Nolan²² เขาทดลองหาปริมาณของ anthocyanin ในดอกกุหลาบ (ไม่ใช่ดอกช่อพันธุ์) โดยวิธีทำให้ตกตะกอนด้วย ether ได้ yield ออกมาเพียง 0.65 % เท่านั้น ซึ่งถ้าเปรียบเทียบกับดอกกุหลาบ 1 หรือดอกกุหลาบ 2 ดังแสดงในตารางที่ 22 จะเห็นได้ชัดว่าแตกต่างกันมาก

6.20 อธิบายเกี่ยวกับ absorption spectra ของ anthocyanins

ผลการทดลอง (primary data และ graph) ดังแสดงไว้ในภาคผนวก .

หน้า 20.1 ซึ่งทำให้ได้ค่า maximum absorption ของ anthocyanins ที่วางกลีบต่าง ๆ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 23 (หน้า 77) จากการทดลองนี้สิ่งที่ควรนำมาอธิบายดังนี้

- ข้อควรระวังในการใช้ spectronic 20 ก็คือการใช้ cuvette จะต้องระวังอันเดิมตลอดและตำแหน่งของ cuvette ที่เขียนลงในช่องควรอยู่ตำแหน่งเดิมทุกครั้ง มิฉะนั้นจะทำให้ค่า absorption coefficient ผิดไปได้ ผลอันนี้จะเกิดขึ้นอย่างมากที่ช่วงใกล้ใกล้จุด maximum absorption
- สารละลายที่ไหลออกจาก column ใหม่ ๆ ใช้น้ำ maximum absorption ได้ แต่มีข้อระวังอยู่ว่า ถ้าวัดสารละลายที่ใช้น้ำ blank นั้น จะต้องให้ถูกต้องกับถ้าวัดละลายในสารละลายอินดิเคเตอร์ชนิดนั้น ๆ ด้วย
- ในกรณีของกุหลาบ 1 (Posa Floribunda) มี anthocyanin 2 ชนิด คือ anthocyanin ในรูปของแข็งมาละลายใน methanolic hydrogen chloride 1 / 100 ไม่ได้ จะต้องเอาไปผ่าน alumina column ก่อนเพื่อแยกออกจากกัน (ตามข้อ 4.2.2) แล้วจึงนำไปหาค่า maximum absorption

²² Willstatter, R., and Nolan, T. J., Chem. Abs., 9, 1302(1915).

4. ในดอกไม้ชนิดอื่นๆ (ยกเว้นกุหลาบ 1) จะมี anthocyanin ชนิดอื่นๆผสมอยู่บ้าง แต่เป็นส่วนน้อยจึงไม่ได้ศึกษาเพิ่มเติม จึงพิจารณาเฉพาะ anthocyanin ชนิดที่มีอยู่เป็นปริมาณมากเท่านั้น

5. จากการร่างที่ 23 จะเห็นได้ว่า maximum absorption ของ anthocyanin จะอยู่ในช่วงระหว่าง 5000 - 5500 Å ซึ่งตรงกับกราฟของ Gillam กับ Stern²³

6. ถ้า maximum absorption นี้ใช้เป็นส่วนหนึ่งในการ identify สาร anthocyanin ก็แสดงในตารางที่ 40 (หน้า 124)

6.30 การ Identify อินดิเกเตอร์โดย Paper Chromatography ทั้งในรูป Anthocyanins และ Anthocyanidins

จุดมุ่งหมายสำคัญของบททดลองในข้อนี้ก็คือเพื่อที่จะพิสูจน์ว่าอินดิเกเตอร์ที่มีอยู่ในดอกไม้ นั้นคืออะไร จากผลของการทดลองมีข้อควรสังเกตและสิ่งที่จะต้องนำมาอภิปรายดังนี้

1. อัตราส่วนผสมของ solvent (ดังแสดงในตารางที่ 24 หน้า 80) จะมีผลอย่างมากต่อ Rf value จากการทดลองพบว่า การวัดปริมาตรของ solvent ด้วยเครื่องมืออย่างหยาบ (เช่น measuring cylinder ขนาด 100 ml. ขึ้นไป) ปรากฏว่าทำให้ Rf value ไม่คงที่ อันนี้แสดงให้เห็นว่าการวัดปริมาตรของ solvent ผิดไปเพียงเล็กน้อยจะมีผลทำให้ Rf value แตกต่างกันไป นอกจากนี้ยังพบว่าถ้า tank และฝาปิดไม่แห้งสนิท (มีน้ำเหลืออยู่) จะทำให้ Rf value ผิดไปด้วย

2. การเตรียม solvent เก็บเอาไว้ใช้ในเวลาที่ต่างกัน จะมีผลต่อ Rf value เช่น ใน BAW system ที่จะใช้กับ anthocyanins จะให้ Rf value คงที่เมื่อเตรียม solvent เก็บไว้ 3 วัน²⁴ แล้วจึงนำไปใช้สำหรับ BuHCl system ต้องเก็บไว้ 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ และกระดาษที่จะใช้ต้องนำไปเก็บไว้ในบรรยากาศภายใน tank ที่มี solvent ชั้นล่าง (lower aqueous phase) ของ BuHCl เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน²⁵

²³Gillam, A.E., and Stern, E.S., "An Introduction to Electronic Absorption Spectroscopy in Organic Chemistry", Edward Arnold, 1962.

²⁴Bate - Smith, E.C., Biochem. Soc. Symposia, 3, 62(1949).

²⁵Harborn, J.B., Nature, 181, 26(1958).

โดยวิธีนี้จะทำให้ Rf value เกือบคงที่

3. BAW system ที่ใช้กับ anthocyanidins เมื่อเตรียมเสร็จแล้วให้ไว้ทันที และกระดาษที่จะใช้ ก่อนจุด anthocyanidins ลงบนกระดาษ ให้นำกระดาษไปจุ่มใน 0.2 M hydrochloric acid แล้วปล่อยให้แห้งสนิทเสียก่อน ทั้งนี้เพื่อป้องกันการจางหายไปของจุดในขณะ run ใน tank

4. DIW และ BAW systems solvents จะไว้มสเป็นเนื้อเดียวกันกับปลายกระดาษที่จุ่มลงใน solvent ให้รวมอยู่เฉพาะส่วนบนเท่านั้น (upper organic phase) ถ้าหากปลายกระดาษจุ่มลงไปถึง phase ขั้ล่างแล้วจะทำให้ Rf value นิดไป เพราะ aqueous phase (ขั้ล่าง) จะวิ่งนำ organic phase ขึ้นมาบนกระดาษ ผลก็คือทำให้ Rf value มากกว่าความเป็นจริง

5. สารอินดิเคเตอร์จากคอลัมโครมาโทกราฟีจะต้งตรวจความบริสุทธิ์ขั้นต้นก่อน โดยใช้ spectronic 20 กล่าวคือ

ก. จากผลของการ plot graph ถ้ามี peak หรือ shoulder อันอื่นเข้ามาแทรก แสดงว่าสารที่ผ่านออกมาจาก column ยังไม่บริสุทธิ์

ข. ถ้า maximum absorption (λ_{max}) ของสารที่ผ่านออกมาจาก column แต่ละ fraction (fraction ละ 3 ml) ยังเปลี่ยนที่ ก็แสดงว่าสารยังไม่บริสุทธิ์ ตัวอย่างเช่นในการทำคอลัมโครมาโทกราฟี ให้บริสุทธิ์ fraction แรก ๆ ของสารที่ผ่านออกมาจาก column อาจจะมี maximum absorption มาก (หรือน้อยกว่า) 5400 Å ส่วนนี้ให้ทิ้งไปได้ เพราะมี impurity อยู่มาก เก็บเอาเฉพาะส่วนที่สีเข้มขึ้นที่ไหลออกมาจาก column เมื่อนำไปวัดหาค่า maximum absorption ถ้าปรากฏว่าอยู่ที่ 5400 Å ทุก ๆ fraction ก็แสดงว่าสารที่ได้บริสุทธิ์ แต่ถาแต่ละ fraction ยังมีค่า maximum absorption เบี่ยงเบน (มากขึ้นหรือน้อยลง) แสดงว่าสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ ต้องนำไปผ่าน column ซ้ำอีก

²⁶ Bate-Smith, E.C., *Biochem. J.*, **58**, 122 (1954).

²⁷ Harborn, J.B., *Nature*, **179**, 429 (1957)

พบค่า maximum absorption ที่ 5400 m. ซึ่งจึงจะแสดงว่าสารนั้นมีสีฟ้า

6. Anthocyanins จากดอกไม้ทุกชนิดก่อนนำมาทำให้บริสุทธิ์ ต้องนำไปทำ acylated link ก่อน โดยการเติมค้างลงไปจนกระทั่งสารละลายที่ใสเขียวย จากนี้ ให้ทำการคัดกรอง โดยการเติม hydrochloric acid จนได้สารละลายที่มีสีม่วงแดง

7. Anthocyanins ชนิดที่เป็น diglucoside เมื่อทำให้บริสุทธิ์ได้ ๆ ต้องนำไป identify โดย paper chromatography ทันที ถ้าเก็บไว้นาน ๆ (ประมาณ 10 วัน) เมื่อนำไปทำ paper chromatogram จะได้ออกมา 2 จุด หรือมากกว่า ปรากฏการณ์อันอธิบายได้ว่าในสารละลายของกรดเจือจาง anthocyanins diglucoside จะถูก hydrolysed ได้ ๆ กลายเป็น anthocyanins monoglucoside และเมื่อ hydrolysed ขึ้นต่อไปก็จะกลายเป็น anthocyanidins จากการทดลองพบว่าปรากฏการณ์นี้เกิดขึ้นบ่อยมาก แม้จะสามารถสังเกตได้จาก chromatogram

8. จากการใช้ crude extract มาทำ paper chromatogram พบว่า ในดอกไม้นี้แต่ละชนิดส่วนใหญ่จะมี impurities ซึ่งได้แก่พวก anthoxanthins และอื่น ๆ ปนอยู่ประมาณ 50 % และอีกครั้งหนึ่งเป็น anthocyanins นอกจากนี้ยังพบว่า นอกจากจะมี main product anthocyanin แล้ว ยังมีส่วนน้อย ๆ ของ anthocyanins ชนิดอื่น ผสมอยู่ด้วย 1 หรือ 2 ชนิด จากการทดลองหา Rf value ของ anthocyanins จาก crude extract ปรากฏว่าแตกต่างกับ Rf value ของ anthocyanins ที่อยู่ในรูปบริสุทธิ์มาก ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากผลของการที่มี impurity จำนวนมากผสมอยู่

9. สำหรับ anthocyanins ที่แยกออกมาจากดอกกุหลาบ 1 (สีส้มแดง) ปรากฏว่ามี anthocyanins 2 ชนิด ผสมกันอยู่อย่างละเท่า ๆ กัน (สังเกตจากความเข้มของสีและขนาดของจุด) ในสารละลายของกรด anthocyanin ชนิดแรก จะมีสีส้มแดง และชนิดที่สองมีสีส้มแดงสด

28 Williams, L.H., Chen. & Ing. (London), 120 (1955).

29 "Encyclopedia Britannica," Vol.2, p.24, 1964.

10. จากผลการทดลองหาค่า maximum absorption (ตารางที่ 23) และ Rf value (ตารางที่ 25 - 31) ของ anthocyanins และ anthocyanidins เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับค่า maximum absorption และ Rf value ของ anthocyanins และ anthocyanidins ที่ค้นพบแล้ว ภาคผนวก ก. หน้า 148) ดังแสดงในตารางที่ 40

ตาราง 40 แสดงการเปรียบเทียบค่า maximum absorption และ Rf value ระหว่าง anthocyanins และ anthocyanidins จากดอกไม้
กับ anthocyanins และ anthocyanidins ที่ค้นพบแล้ว

maximum
absorption
 λ°

ทองหลางใบลาย

anthocyanidin	-	.704	-	-	-	.628	.302	m
anthocyanin	5162	.289	.118	.380	.592	-	-	p
Peonidin :	-	.71	-	-	-	.63	.30	m
-3-rhamnoglucosido -5- glucoside	-	.29	.12	.37	.60	-	-	p

ทองหลางน้ำ

anthocyanidin	-	.705	-	-	-	.629	.304	m
anthocyanin	5168	.291	.121	.375	.591	-	-	p
Peonidin :	-	.71	-	-	-	.63	.30	m
-3-rhamnoglucosido -5- glucoside	-	.29	.12	.37	.60	-	-	p

	maximum absorption λ°	Rf value in						colour of spot.
		BAW	BuHCl	1% HCl	HAc-HCl	Forestal	Formic	
<u>อัลทีน</u>								
anthocyanidin	-	.431	-	-	-	.320	.128	pu
anthocyanin	5400	.149	.035	.085	.321	-	-	pu
Delphinidin :	-	.42	-	-	-	.32	.13	pu
-3,5-diglucoside	5400	.15	.03	.08	.32	-	-	pu
<u>พระโขนง</u>								
anthocyanidin	-	.513	-	-	-	.454	.196	pu
anthocyanin	5400	.353	.137	.035	.224	-	-	pu
Petunidin :	-	.52	-	-	-	.46	.20	pu
-3-monoglucoside	5400	.35	.14	.04	.22	-	-	pu
<u>ขมิ้น</u>								
anthocyanidin	-	.514	-	-	-	.455	.199	pu
anthocyanin	5400	.352	.137	.035	.222	-	-	pu
Petunidin :	-	.52	-	-	-	.46	.20	pu
-3-monoglucoside	5400	.35	.14	.04	.22	-	-	pu
<u>พุดธิกษา</u>								
anthocyanidin	-	.670	-	-	-	.498	.215	m
anthocyanin	5270	.377	.260	.074	.254	-	-	m
Cyanidin	-	.68	-	-	-	.49	.22	m
-3-monoglucoside	5250	.38	.25	.07	.26	-	-	m

	maximum absorption λ°	Rf value in						Colour of spot.
		BAW	BuHCl	1% HCl	HAc-HCl	Forestal	Formic	
<u>ตัวอย่างใหม่</u>								
anthocyanidin	-	.516	-	-	-	.455	.208	pu
anthocyanin	5400	.234	.042	.083	.331	-	-	pu
Petunidin :	-	.52	-	-	-	.46	.20	pu
-3,5-diglucoside	5420	.24	.04	.08	.32	-	-	pu
<u>ตัวอย่าง 1</u>								
anthocyanidin	-	.782	-	-	-	.689	.328	r
anthocyanin	5030	.357	.263	.505	.598	-	-	or
Pelargonidin :	-	.80	-	-	-	.68	.33	r
-3-diglucoside	5030	.36	.26	.50	.62	-	-	or
<u>ตัวอย่าง 2</u>								
anthocyanidin	-	.672	-	-	-	.489	.220	m
anthocyanin	5210	.284	.058	.175	.405	-	-	m
Cyanidin :	-	.68	-	-	-	.49	.22	m
-3-5-diglucoside	5210	.28	.06	.16	.40	-	-	m
<u>ตัวอย่าง 1 Fl</u>								
anthocyanidin	-	.784	-	-	-	.677	.332	r
anthocyanin	5035	.356	.263	.494	.619	-	-	or
Pelargonidin :	-	.80	-	-	-	.68	.33	r
-3-diglucoside I	-	.36	.26	.50	.62	-	-	or

	maximum absorption λ°	Rf value in						Colour of spot.
		B.W	BuHCl	1%HC1	HAc-HCl	Forestal	Formic	
<u>NUMBER 2 F²</u>								
anthocyanidin	-	.672	-	-	-	.493	.219	m
anthocyanin	5270	.251	.082	.377	.598	-	-	m
Cyanidin :	-	.68	-	-	-	.49	.22	m
-3-rhamnogluco- -5-glucoside	-	.25	.08	.36	.59	-	-	m
<u>NUMBER 2</u>								
anthocyanidin	-	.673	-	-	-	.492	.221	m
anthocyanin	5210	.282	.061	.165	.400	-	-	m
Cyanidin :	-	.68	-	-	-	.49	.22	m
-3,5-diglucoside	5210	.28	.06	.16	.40	-	-	m

r = red

m = magenta

or = orange red

p = pink

o = orange

pu = purple

oy = orange yellow

ma = mauve

จากผลการเปรียบเทียบดังแสดงในตารางที่ 40 สรุปได้ดังนี้

anthocyanin	ที่มีอยู่ในกลีบดอกของหลอดใบลายคือ Peonidin-3-rhamnoglucosido-5-glucoside
anthocyanin	ที่มีอยู่ในกลีบดอกของหลอดน้ำคือ Peonidin-3-rhamnoglucosido-5-glucoside
anthocyanin	ที่มีอยู่ในกลีบดอกอัญชันคือ Delphinidin-3,5-diglucoside
anthocyanin	ที่มีอยู่ในกลีบดอกพุทระหงคือ Petunidin-3-monoglucoside
anthocyanin	ที่มีอยู่ในกลีบดอกชบาคือ Petunidin-3-monoglucoside
anthocyanin	ที่มีอยู่ในกลีบดอกพุทธรักษาคือ Cyanidin-3-monoglucoside
anthocyanin	ที่มีอยู่ในกลีบดอกของนางใหญ่คือ Petunidin-3,5-diglucoside
anthocyanin	ที่มีอยู่ในกลีบดอกเฟื่องฟ้า 1 คือ Pelagonidin-3-diglucoside
anthocyanin	ที่มีอยู่ในกลีบดอกเฟื่องฟ้า 2 คือ Cyanidin-3,5-diglucoside
anthocyanin	ที่มีอยู่ในกลีบดอกกุหลาบ 1 F ¹ คือ Pelagonidin-3-diglucoside
anthocyanin	ที่มีอยู่ในกลีบดอกกุหลาบ 1 F ² คือ Cyanidin-3-rhamnoglucosido-5-glucoside
anthocyanin	ที่มีอยู่ในกลีบดอกกุหลาบ 2 คือ Cyanidin-3,5-diglucoside

6.40 อธิบายเกี่ยวกับค่า pKa ของอินดิเกเตอร์จากกลีบใบ

จุดมุ่งหมายสำคัญของการทดลองในข้อนี้คือเพื่อที่จะทราบว่าอินดิเกเตอร์ที่ใดที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการทดสอบสารประเภทใด โดยการนำค่า pKa ของอินดิเกเตอร์มาใช้ในการพิจารณา กล่าวคือ

อินดิเกเตอร์คือสารอินทรีย์ที่มีฤทธิ์เป็นกรดหรือด่างอ่อน ๆ สมมุติให้มีสูตรเป็น HIn ดังนั้นเมื่อละลายอยู่ในน้ำมันจะเกิดการ ionise เป็นดังนี้



$$\therefore K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{In}^-]}{[\text{HIn}]}$$

$$\text{และ} \quad -\log K_a = -\log [\text{H}^+] - \log \frac{[\text{In}^-]}{[\text{HIn}]}$$

$$\therefore \text{pKa} = \text{pH} - \log \frac{[\text{In}^-]}{[\text{HIn}]} = \text{pH} - \log \frac{\text{basic form}}{\text{acid form}}$$

จาก (1) จะเห็นได้ว่า $\frac{[\text{In}^-]}{[\text{HIn}]}$ ก็คือ $\frac{(\text{basic form})}{(\text{acid form})}$ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการ

ที่ทราบ pK_a ของอินดิเคเตอร์ ก็สามารถที่จะหาช่วง pH ของการเปลี่ยนสีโดยประมาณของอินดิเคเตอร์ชนิดนั้นได้ โดยกำหนดว่าสายตาสารสามารถมองเห็นความแตกต่างของสีระหว่าง basic form กับ acid form ของอินดิเคเตอร์ เมื่อทั้งสอง forms นี้ มีความเข้มข้นแตกต่างกัน $1 : 10^{30}$ กล่าวคือ

$$-\log \frac{[\text{In}^-]}{[\text{HIn}]} = \pm \log \frac{1}{10} \dots\dots\dots(2)$$

นำ (2) ไปแทนค่าใน (1) จะได้

$$\text{pK}_a = \text{pH} \pm \log \frac{1}{10}$$

$$= \text{pH} \pm 1$$

$$\text{หรือ} \quad \text{pH} = \text{pK}_a \pm 1 \dots\dots\dots(3)$$

ช่วงของ pH ที่อ่านได้ตาม (3) นี้คือช่วง pH ที่จะเกิดการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์โดยประมาณ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการที่ทราบ pK_a ของอินดิเคเตอร์ ก็สามารถที่จะหาช่วง pH ที่เกิดการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ได้ และการที่ทราบช่วง pH ที่เปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์นี้จะช่วยให้สามารถเลือกใช้อินดิเคเตอร์ให้เหมาะสมกับ system ของการทดลองได้ เช่น ในการ titrate หาปริมาณของสารที่ทราบ equivalent point (จากการคำนวณ) สมมติว่าอยู่ที่ pH 7 ดังนั้นจึงควรเลือก bromthymolblue เป็นอินดิเคเตอร์ เพราะมีช่วง pH ของการเปลี่ยนสีอยู่ที่ pH 6.0 - 7.0³¹ ในบางกรณีอาจจะหา bromthymolblue ไม่ได้ก็อาจจะใช้อินดิเคเตอร์ชนิดอื่น ๆ ที่มีช่วง pH ของการเปลี่ยนสีใกล้เคียงกันนี้ได้เช่นเดียวกัน ความแตกต่างระหว่างจุดที่อินดิเคเตอร์เปลี่ยนสี (end point) กับจุดที่สารทำปฏิกิริยากันพอดี (equivalent point) ถ้ามีเพียงเล็กน้อย ความคลาดเคลื่อน (error) ของการทดลองย่อมเกิดไม่มาก

³⁰ Nordmann, J., "Qualitative Testing and Inorganic Chemistry", p. 123, 1957.

³¹ UNESCO Pilot Project, "Chemical Equilibria", p 3.15-3.21, 1968.

สำหรับการทดลองหาค่า pK_a แบ่งออกเป็นสองวิธี คือ วิธีการแบบง่าย และวิธีการที่มีประสิทธิภาพ มีสิ่งที่จะนำมาอภิปรายดังนี้

6.4.1 วิธีการแบบง่าย (วิธีเทียบสี) วิธีการนี้ได้ดัดแปลงมาจากวิธีหา pH ของสารละลายของ UNESCO Pilot Project³¹ โดยทราบค่า pK_a ของอินดิเคเตอร์ในทางกลับกัน ถ้าทราบ pH ของสารละลายก็ทางที่จะทราบ pK_a ของอินดิเคเตอร์ได้เช่นกัน โดยอาศัยสมการ (1) ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น (ข้อ 6.40) ความคลาดเคลื่อนที่จะเกิดขึ้นกับการทดลองโดยวิธีนี้มีหลายกรณี คือ

1. ความบริสุทธิ์ของสารอินดิเคเตอร์ จากการทดลองพบว่า ถ้าใช้อินดิเคเตอร์ที่ทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีการแบบง่ายมาหาค่า pK_a สีของอินดิเคเตอร์ในสารละลายของค่างใน blank tube จะมีสีเขียวแล้วค่อย ๆ กลายเป็นสีเหลือง เมื่อนำมาเทียบกับสีแดงของอินดิเคเตอร์ในสารละลายของกรด บ่อนทำให้สีแดงมีลักษณะเด่นมากกว่าความเป็นจริง ผลก็คือทำให้หาค่า pK_a ออกมาน้อยกว่าความเป็นจริง จากการทดลองโดยวิธีนี้สามารถหาค่า pK_a ออกมาได้ประมาณ 1.5 ± 1.0 ซึ่งผลอันนี้ทำให้ขัดกับผลการทดลองในข้อ 5.20 เกี่ยวกับปริมาณวิเคราะห์ กล่าวคือจากการใช้สารอินดิเคเตอร์จากดอกไม้ในการหาปริมาณของสารตามการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 5.20 ซึ่งสรุปไว้ในข้อ 5.20 (บทที่ 4) ได้ว่า สารอินดิเคเตอร์จากดอกไม้สามารถนำไปใช้ในการหาปริมาณของสารในขบวนการ titration ได้ถึง 3 systems ก็คือ ระหว่างกรดแก่กับด่างแก่ กรดแก่กับด่างอ่อน และกรดอ่อนกับด่างอ่อน แต่หาหาค่าของอินดิเคเตอร์จากดอกไม้เป็น 1.5 ± 1.0 จริงแล้วจะต้องนำไปใช้ในขบวนการ titration ได้เฉพาะการ titrate ระหว่างกรดแก่กับด่างอ่อนเท่านั้น

ถ้าใช้อินดิเคเตอร์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการที่มีประสิทธิภาพในสารละลายของค่างจะมีสีน้ำเงิน เมื่อนำไปเทียบสีจะทำให้สีแดงถูกเบียดบังได้มาก ผลก็คือทำให้ค่า pK_a มากขึ้น จากการทดลองพบว่าดอกไม้ทุกชนิดจะให้ค่า pK_a เป็น 4.00 ± 1.05 (ดังแสดงในตารางที่ 33 หน้า 91 จากตัวเลขอันนี้เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับผลการทดลองในข้อ 5.20 (เกี่ยวกับการ titration) จะเห็นได้ว่าสอดคล้องกันมากขึ้น อย่างไรก็ตาม การทดลองโดยวิธีนี้ก็มีข้อควรระวังเช่นเดียวกัน กล่าวคือ เมื่อเตรียมสารอินดิเคเตอร์ในสารละลายของค่างที่ใช้

ทำเป็น blank tube ได้แล้วต้องนำไปเทียบสีทันที ถ้าปล่อยทิ้งไว้นาน ๆ สีน้ำเงินจะค่อย ๆ จางหายไปจนในที่สุดจะไม่มีสีทั้งนี้เนื่องจากการ form pseudo base ดังได้กล่าวมาแล้วในตอนต้น

2. ความแม่นยำในการเตรียมสารละลาย buffer ถ้าความเข้มข้นของสารที่จะใช้เตรียม buffer ผิดพลาด ก็จะทำให้ pH ของ buffer ที่เตรียมนั้น ผิดพลาด ผลก็คือทำให้ค่า pKa ที่คำนวณออกมาผิดพลาดด้วย

3. dropper ที่ใช้ จะต้องคงอันเจิมตลอดการทดลอง การใช้ dropper หลายอันกับการทดลองอันหนึ่งย่อมทำให้ขนาดของหยดแตกต่างกัน ทั้งนี้เพราะขนาดของหยดขึ้นอยู่กับ diameter ของ capillary ของ dropper

4. การทดลองวิธีนี้เหมาะสำหรับกรณีที่ต้องการหาค่า pKa อย่างหยาบ สามารถไวได้ทั่วไป แม้กระทั่งสถาบันที่มีอุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ไม่มาก ก็สามารถที่จะทำการทดลองตามวิธีนี้ได้ นอกจากนี้วิธีทดลองดังกล่าวนี้สามารถนำไปใช้ในการเรียนวิชาเคมีภาคปฏิบัติการในสถาบันอุดมศึกษาได้

6.4.2 วิธีการที่มีประสิทธิภาพ (spectrophotometric method)

การทดลองวิธีนี้อาศัยหลักการที่ว่า anthocyanin เมื่ออยู่ในสารละลายของกรด pH ต่ำ) มันจะถูกดูดกลืน (absorb) แสงได้มากที่สุดที่ช่วงคลื่นหนึ่งในช่วงคลื่นของแสงที่มองเห็นได้ (visible light) และที่ช่วงคลื่นเดียวกันนั้นมันจะถูกดูดกลืนได้น้อยเมื่ออยู่ในสารละลายของด่าง pH สูง) ดังนั้นถ้าให้ปริมาณของ anthocyanin และช่วงคลื่น (ที่ maximum absorption) คงที่ แล้วแปรผัน pH ของสารละลายโดยวิธีนี้เราสามารถหา pH ของสารละลายตรงจุดที่มี acid form เท่ากับ basic form ได้ (จุดที่มีการกระโดดของโค้งมากที่สุด) pH ที่อ่านได้ที่จุดนี้ก็คือ pKa ของ anthocyanin (สารอินดิเคเตอร์) เหตุผลคือ

เราทราบว่า

$$pK_a = pH - \log \frac{(\text{basic form})}{(\text{acid form})} \quad (\text{ตามข้อ 6.40 หน้า 128})$$

$$\begin{aligned} \text{แต่ } \text{basic form} &= \text{acid form} \\ \therefore \text{pKa} &= \text{pH} - \log \frac{1}{1} \\ \therefore \text{pKa} &= \text{pH} \end{aligned}$$

นั่นคือ pH ของสารละลายจะเท่ากับ pKa ของอินดิเคเตอร์เมื่อ acid form และ basic form ของอินดิเคเตอร์ในสารละลายเท่ากัน
สำหรับการทดลองในเรื่องนี้มีข้อที่ควรนำมาอภิปรายดังนี้

1. ปริมาตรของสารละลายอินดิเคเตอร์ที่ใช้ (ครั้งละ 1.00 ml. ของสารละลาย 10.00 ml.) จะมีผลต่อค่า absorption coefficient อย่างมาก การวัดปริมาณของสารละลายอินดิเคเตอร์แค่เพียงเล็กน้อย จะทำให้ absorption coefficient ผิดไปด้วย ผลก็คือ ค่า pKa ที่จะได้ย่อมผิดไปด้วยเช่นกัน
2. ความบริสุทธิ์ของสารอินดิเคเตอร์มีความสำคัญมากต่อการทดลอง ทั้งนี้เพราะว่าในขณะที่สารอินดิเคเตอร์ถูกกลั่นแสง impurities ก็ย่อมที่จะถูกกลั่นแสงด้วย ดังนั้นค่า pKa ที่อ่านได้จึงไม่ใช่ค่า pKa ของสารอินดิเคเตอร์ที่แท้จริง นอกจากนั้นจากการทดลองยังพบว่า impurities ที่มีอยู่ในสารละลายมีผลทำให้ absorption coefficient ที่อ่านได้แต่ละช่วงของ pH ไม่เป็นระเบียบซึ่งยากต่อการเขียนเส้นโค้ง (curve) ปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นมากเมื่อสารละลายใกล้จะเป็นกลาง (pH 5 - 7)
3. ที่ pH ของสารละลายใกล้จะเป็นกลาง เมื่อเตรียมสารละลายเสร็จก็ต้องรีบนำไปวัดหาค่า absorption coefficient ทันที ไม่ควรปล่อยทิ้งไว้เกิน 15 วินาที เพราะสารละลายเกิดการ form pseudo base ทำให้สีของสารละลายที่ทดลองจะทำให้ค่า absorption coefficient ผิดไป จากการทดลองพบว่าถ้าสารละลายอินดิเคเตอร์มี impurity ผสมอยู่มาก ค่า absorption coefficient ก็จะมีผิดไปมาก และถ้าในสารละลายมี acetate ion ผสมอยู่ด้วย อัตราเร็วของการ form pseudo base จะมากขึ้น
4. การทดลองนี้ไม่เหมาะที่จะนำไปใช้กับสถานีที่ขาดอุปกรณ์และเครื่องมือวัด เพราะเครื่องมือต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในการทดลองมีราคาแพง แต่วิธีนี้เหมาะสำหรับกรณีที่ต้องการจะ

ก็มาถึงรายละเอียดของสารอินดิเคเตอร์จากดอกไม้เท่านั้น และการทดลองดังกล่าวนี้นำไปใช้ในการเรียนวิชาเคมีภาคปฏิบัติการในระดับอุดมศึกษาได้

6.4.3 เปรียบเทียบค่า pK_a ระหว่างวิธีการแบบง่ายกับวิธีการที่มีประสิทธิภาพ

pK_a ที่ได้จากการทำงานโดยวิธีแบบง่ายดังแสดงในตารางที่ 33 (หน้า 91) จะเห็นได้ว่าดอกไม้ทุกชนิดมีค่า pK_a เท่ากัน คือ 1.00 และมีพิสัย (range) เป็น ± 1.05 เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับค่า pK_a ที่ได้จากวิธีการที่มีประสิทธิภาพดังแสดงในตารางที่ 34 (หน้า 94) จะเห็นได้ว่าค่า pK_a ของดอกไม้แต่ละชนิดแตกต่างกันออกไปเล็กน้อย และเป็นค่าที่เชื่อถือได้เพราะมีวิธีการและเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูง อย่างไรก็ตามค่า pK_a ที่ได้จากวิธีการแบบง่ายก็ยังถือว่ามิใช่ประโยชน์ เพราะจะช่วยให้สามารถนำเอาอินดิเคเตอร์จากดอกไม้ไปใช้ในงานการของ acid - base titration ได้ถูกต้อง

3.50 อธิบายผลเกี่ยวกับปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของ anthocyanin และ anthocyanidin

เนื่องจาก anthocyanins และ anthocyanidins เป็นหมู่สารที่มีโครงสร้างส่วนไหนคล้ายกัน จะแตกต่างกันบ้างก็เฉพาะตำแหน่งและจำนวน hydroxyl groups และตำแหน่ง จำนวน และชนิดของน้ำตาล (ในกรณีของ anthocyanin) ที่มาต่อเป็น functional group เท่านั้น groups ต่าง ๆ เหล่านี้จะบ่งบอกปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของมา ดังนั้นปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีส่วนไหนจึงคล้ายกันและยากที่จะนำไปใช้ในการพิสูจน์สาร anthocyanin และ anthocyanidin ได้ อย่างไรก็ตามยังมีบางปฏิกิริยาที่พอจะนำมาใช้ในการพิสูจน์อย่างพอ ๆ ได้ คือปฏิกิริยาของ Ferric chloride ($FeCl_3$) ในสารละลายที่เป็นกรด กล่าวคือ ถ้า anthocyanin (หรือ anthocyanidin) ผสมกับ ferric chloride ในสารละลายของกรด anthocyanin (หรือ anthocyanidin) ชนิดที่เป็น cyanidins, delphinidins และ petunidins จะให้สีน้ำเงิน ส่วน anthocyanin (หรือ anthocyanidin) ชนิดอื่น ๆ จะไปเปลี่ยนสี

³² Forsyth, F.G.C., and Sammond, N.W., Proc. Roy. Soc. (London), B 142, 549 (1954).

³³ Iacch, K., and Tracey, M.V., (eds), loc. cit.

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าปฏิกิริยาดังกล่าวนี้นี้ก็เป็นวิธีหนึ่งที่จะนำมาใช้ช่วยในการพิสูจน์สาร anthocyanins ได้ ตัวอย่างเช่น คอกอธันจากปฏิกิริยาสีตามการทดลองในข้อ 6.50 (บทที่ 3 หน้า 95) สามารถบอกได้อย่างกว้าง ๆ ว่าต้องเป็น cyanidins หรือ delphinidins หรือ petunidins ชนิดใดชนิดหนึ่ง จากนั้นเมื่อนำ chromatographic technique มาใช้ จึงบอกได้ว่าเป็น delphinidin-3,5-diglycoside (ตามตารางที่ 40 หน้า 124 จะเห็นได้ว่า การทดลองทั้งสองตอนนี้นับสนับกัน ทำให้ผลการทดลองมีน้ำหนักมากขึ้น.

สรุป และข้อเสนอแนะ

1.00 สรุป

1.10 จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1.1.1 เพื่อศึกษาว่าไม้คอกไม้ชนิดใดบ้างที่มีสารอินดิเกเตอร์เป็นองค์ประกอบอยู่ และเพื่อที่จะคัดเลือกเอาบางชนิดมาทำการศึกษา

1.1.2 เพื่อศึกษาวิธีสกัด วิธีแยกสารอินดิเกเตอร์จากคอกไม้ และวิธีการทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้เครื่องมือแบบง่าย

1.1.3 เพื่อศึกษาวิธีสกัด วิธีแยกสารอินดิเกเตอร์จากคอกไม้ และวิธีการทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้เครื่องมือที่มีประสิทธิภาพ

1.1.4 เพื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธีการแบบง่ายกับวิธีการที่มีประสิทธิภาพในทางต่าง ๆ ดังนี้

1. คุณภาพของสารอินดิเกเตอร์ที่ได้รับ เพื่อนำไปใช้ในด้านคุณภาพวิเคราะห์

2. คุณภาพของสารอินดิเกเตอร์ที่ได้รับ เมื่อนำไปใช้ในด้านปริมาณวิเคราะห์

3. วิธีทดลอง เกมมัทธ์ และเครื่องมือที่ใช้

4. ราคาของการลงทุน

1.1.5 เพื่อศึกษาว่าสารอินดิเกเตอร์ที่ได้ออกมานั้นคืออะไร มีสมบัติอย่างไร

1.1.6 เพื่อเน้นให้เห็นว่าสถาบันที่ขาดงบประมาณ และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ก็สามารถที่จะสกัดสารอินดิเกเตอร์จากธรรมชาติขึ้นใช้เองได้ โดยมีวิธีการแบบง่าย ๆ

1.20 วิธีดำเนินการ

ทำการทดลองตามลำดับขั้นดังนี้

1.2.1 การตรวจสอบไม้ชนิดต่าง ๆ ที่มีอยู่ทั่วไปแล้วนำมาทดสอบหาสารอินดิเคเตอร์ในดอก

1.2.2 จากดอกไม้ที่ทำการสำรวจ เลือกเอาเพียงบางชนิดเพื่อศึกษารายละเอียดโดยยึดหลักสำคัญสองประการ คือ หาได้ง่ายน้อยทั่วไป และปริมาณสารอินดิเคเตอร์ในดอกมาก

1.2.3 นำดอกไม้ที่คัดเลือกไว้แล้วมาศึกษาถึงวิธีการสกัด แบ่งออกเป็นสองวิธี คือ วิธีการสกัดแบบง่าย และวิธีการที่มีประสิทธิภาพ

1.2.4 นำสารละลายที่สกัดได้มาทำการแยกและทำให้บริสุทธิ์ แบ่งออกเป็นสองวิธีคือ วิธีการแบบง่ายคือใช้ column chromatography ที่มี active gypsum และแป้งมันสำปะหลังเป็น adsorbents และวิธีที่มีประสิทธิภาพมีสามวิธีคือ วิธีการตกตะกอน วิธีใช้ column chromatography ของ calcium sulphate (R.P.) กับ alumina และวิธี ion-exchange chromatography โดยใช้ amberlite IRC-50 เป็น resin

1.2.5 นำเอาสารอินดิเคเตอร์ที่ได้ไปทดสอบเกี่ยวกับการนำไปใช้และการเก็บรักษา การนำไปใช้ในด้านคุณภาพวิเคราะห์แบ่งออกเป็นสองตอนคือ การนำไปใช้ในรูปของสารละลายและการนำไปใช้ในรูปของ anthocyanin indicator paper การนำไปใช้ในด้านปริมาณวิเคราะห์ได้ไว้กับขบวนการ titration วางปฏิกิริยาสะท้อนระหว่างกรดกับด่างสีชนิด คือ ปฏิกิริยาระหว่าง กรดแก่กับด่างแก่ กรดแก่กับด่างอ่อน กรดอ่อนกับด่างแก่ และกรดอ่อนกับด่างอ่อน ในด้านของการเก็บรักษาได้นำเอาสารอินดิเคเตอร์เก็บไว้ในตัวภาชนะชนิดต่าง ๆ ในระยะเวลาต่างกัน แล้วจึงนำออกมาตรวจสอบคุณภาพ

1.2.6 การทดลองเกี่ยวกับการศึกษารายละเอียดของอินดิเคเตอร์จากดอกไม้แต่ละชนิดแบ่งออกเป็น

1. การหาปริมาณของสารอินดิเคเตอร์ที่มีอยู่ในเกสรดอกไม้
2. Absorption spectra ของสารอินดิเคเตอร์
3. Paper chromatography ของสารอินดิเคเตอร์

4. pKa ของสารอินดิเคเตอร์

5. ปฏิบัติการเปลี่ยนสีของสารอินดิเคเตอร์

1.30 ผลการทดลอง

จากผลการศึกษารูปได้ดังนี้

1.3.1 ดอกไม้ที่เหมาะสมจะนำไปไว้เป็นอินดิเคเตอร์ได้แก่ดอกไม้ที่มีสีแสด สีม่วง สีน้ำเงินและสีขาว และดอกไม้ที่มีสีส้ม พื้นที่ผิวสีแตกต่างกันของกลีบกลีบบางจะมีปริมาณการอินดิเคเตอร์ในกลีบมาก สิ่งใดแก่กลีบ กลีบกลางใบยาว ช่องขวางน้ำ อัญชัน (สีน้ำเงิน) หุ้ระโหง สีขาว พุทธรักษา สีม่วงใหญ่ เฟื่องฟ้า 1 (สีส้มแสด) เฟื่องฟ้า 2 (สีแสดสด) กุหลาบ 1 (สีส้มแสด) และ กุหลาบ 2 (สีแสดสด)

1.3.2 วิธีสกัดสารอินดิเคเตอร์จากดอกไม้แบบง่ายใช้น้ำเป็นตัวแทนทำละลาย (กับดอกไม้ที่มีสีม่วง และน้ำเงิน) และใช้ methanol ethanol หรือสุรา 40 ดีกรีเป็นตัวแทนทำละลาย (กับดอกไม้ที่มีสีแสด)

การทำให้บริสุทธิ์แบบง่ายใช้ column chromatography ที่มี calcium sulfate จาก native gypsum และแป้งมันสำปะหลังเป็น adsorbents

1.3.3 วิธีสกัดสารอินดิเคเตอร์จากดอกไม้แบบมีประสิทธิภาพใช้ methanolic หรือ ethanolic hydrogen chloride 1% เป็นตัวทำละลายหรือใช้ soxhlet extraction apparatus.

การทำให้บริสุทธิ์แบบมีประสิทธิภาพใช้วิธีการสกัดด้วย lead acetate column chromatography โดยที่ calcium sulfate (R.P.) และ alumina เป็น adsorbents และใช้ ion - exchange chromatography โดยที่ amberlite IRC - 50 เป็น resin

1.3.4 ผลของการเปรียบเทียบวิธีการแบบง่ายกับวิธีการแบบมีประสิทธิภาพ

1. อินดิเกเตอร์ที่ได้จากวิธีการที่มีประสิทธิภาพเปลี่ยนสีในสารละลายของกรดและด่างแตกต่างกันอย่างแจ่มชัดมากกว่าอินดิเกเตอร์ที่ได้จากวิธีการแบบง่าย
2. อินดิเกเตอร์ที่ได้จากวิธีการแบบง่ายและวิธีการที่มีประสิทธิภาพเมื่อนำไปใช้ในค่านปริมาตรวิเคราะห์จะให้ผลแตกต่างกันเล็กน้อย และอินดิเกเตอร์ที่ได้จากวิธีการทั้งสองแบบ ใช้ได้ดีกับปฏิกิริยาสะเทินระหว่าง กรดแก่กับด่างแก่ กรดแก่กับด่างอ่อน และกรดอ่อนกับด่างอ่อน
3. วิธีการที่มีประสิทธิภาพใช้เครื่องมือและมีวิธีการที่ยุ่งยากซับซ้อนมากกว่าวิธีการแบบง่าย
4. วิธีการที่มีประสิทธิภาพต้องเสียค่าใช้จ่าย ในการทดลองมากเพราะเคมีภัณฑ์ที่ใช้ต้องคุณภาพดี ความบริสุทธิ์สูง เช่น calcium sulfate (R.P), alumina, amberlite resin IFG - 50 แต่วิธีการแบบง่ายเสียค่าใช้จ่ายในการทดลองน้อย เช่น ใช้ calcium sulfate จาก native ghpsum และแป้งมันสำปะหลัง
5. สารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้ม (ทั้งชนิดไม้บริสุทธิ์ บริสุทธิ์โดยวิธีแบบง่าย และบริสุทธิ์) เมื่อเก็บรักษาไว้ในรูปของสารละลาย จะมีสมบัติเป็นอินดิเกเตอร์คงเดิมก็ต่อเมื่อตัวทำละลายที่เก็บไว้นั้นมีฤทธิ์เป็นกรด และตัวทำละลายที่เหมาะสมแก่การใช้เก็บรักษาคือ ethanolic hydrogen chloride 1%
6. การหาค่า pKa โดยวิธีการแบบง่าย กับดอกไม้ทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษาได้ค่า pKa ออกมาเท่ากันคือ 4.00 ± 1.05 .

1.3.5 ผลการศึกษาารายละเอียดจากดอกไม้ม

จากการศึกษาพบว่าสารอินดิเกเตอร์ในดอกไม้คือสารที่อยู่ในกลุ่มที่เรียกว่า "Anthocyanin" ซึ่งในดอกไม้แต่ละชนิดคือสารดังต่อไปนี้

ทองหลางใบลาย มี anthocyanin ที่มีชื่อว่า Peonidin -3-5-rhamnoglucosido - 5 - glucoside. Yield = 2.36% (จากน้ำหนักดอกไม้สด), maximum absorption = 5162Å, pKa = 3.90

ทองหลางน้ำ มี anthocyanin ที่มีชื่อว่า Peonidin - 3 - rhamnoglucoside - 5 - glucoside. Yield = 2.22% (จากน้ำหนักดอกไม้สด), maximum absorption = 5168 Å, pKa = 3.90

อัญชัน มี anthocyanin ที่มีชื่อว่า Delphinidin - 3,5 - diglucoside. Yield = 2.98% (จากน้ำหนักดอกไม้สด), maximum absorption = 5400 Å, pKa = 4.45

พระโขนง มี anthocyanin ที่มีชื่อว่า Delphinidin - 3 - diglucoside. Yield = 3.45% (จากน้ำหนักดอกไม้สด), maximum absorption = 5400 Å, pKa = 4.00

ชบา มี anthocyanin ที่มีชื่อว่า Petunidin - 3 - monoglucoside. Yield = 3.48% (จากน้ำหนักดอกไม้สด), maximum absorption = 5400 Å, pKa = 4.06

พุทธรักษา มี anthocyanin ที่มีชื่อว่า Cyanin - 3 - monoglucoside. Yield = 3.05% (จากน้ำหนักดอกไม้สด), maximum absorption = 5270 Å, pKa = 4.20

ขมิ้นนางใหญ่ มี anthocyanin ที่มีชื่อว่า Petunidin - 3,5 - diglucoside. Yield = 3.41% (จากน้ำหนักดอกไม้สด), maximum absorption = 5400 Å, pKa = 4.00

เฟื่องฟ้า 1 มี anthocyanin ที่มีชื่อว่า Pelargonidin - 3 - diglucoside. Yield = 2.87% (จากน้ำหนักดอกไม้สด), maximum absorption = 5030 Å, pKa = 4.10

เฟื่องฟ้า 2 มี anthocyanin ที่มีชื่อว่า Cyanidin - 3,5 - diglucoside. Yield = 3.46% (จากน้ำหนักดอกไม้สด), maximum absorption = 5210 Å, pKa = 4.24

กุหลาบ 1 มี anthocyanin 2 ชนิด yield = 3.55%
(จากน้ำหนักดอกไม้สด)

กุหลาบ 1 F¹ มี anthocyanin ที่มีชื่อว่า Pelagonidin - 3 -
rhamnoglucoside, maximum absorption = 5035 Å, pKa = 4.10

กุหลาบ 1 F² มี anthocyanin ที่มีชื่อว่า Cyanidin - 3 -
rhamnoglucoside - 5 - glucoside, maximum absorption = 5270 Å, pKa 4.11

กุหลาบ 2 มี anthocyanin ที่มีชื่อว่า Cyanidin - 3,5 -
diglucoside, maximum absorption = 5210 Å, pKa = 4.20, yield
= 3.92% (จากน้ำหนักดอกไม้สด)

2.00 ข้อเสนอแนะ

2.10 ข้อเสนอแนะสำหรับการทดลอง

1. ในการพิสูจน์ (identify) สารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้ควรใช้
วิธีการและเครื่องมือให้มากกว่าการศึกษาในครั้งนี้ เช่น นอกจากจะใช้ข้อมูลจาก
spectronic 20 paper chromatography และ color reaction แล้ว
ควรจะได้มีการสังเคราะห์สาร anthocyanin จากห้องปฏิบัติการแล้วนำไปเปรียบเทียบกับ
anthocyanin ที่ได้จากธรรมชาติ นอกจากนี้ควรใช้ infrared spectrophotometer
และ mass spectra เป็นเครื่องมือช่วยในการพิสูจน์อีกด้วย ทั้งนี้เพื่อให้ผลการทดลอง
ที่ได้รับมีน้ำหนักมากขึ้น

2. ควรศึกษารายละเอียดของสารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้แต่ละชนิด
ให้กว้างขวางขึ้น เพื่อให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติม

2.20 ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาค้นคว้าต่อ

1. มีดอกไม้หรือหลายชนิดที่ยังไม่ได้ทำการศึกษา ดังนั้นจึงน่าจะลอง
สำรวจต่อไป

2. นอกจากจะทำการศึกษา anthocyanin จากกลีบดอกไม้แล้ว
ควรจะได้ศึกษา anthocyanin ที่อยู่ตามส่วนต่าง ๆ ของพืชอีกด้วย เช่น ลำต้น ใบ ราก
และ ผล

3. การศึกษาในครั้งนี้ปรากฏว่าไม่ประสบผลสำเร็จในการทำ anthocyanin จากกลีบดอกไม้เกิดผลได้ ดังนั้นควรจะได้ทำการศึกษาถึงรายละเอียด และเทคนิคเกี่ยวกับเรื่องนี้

4. ควรจะได้มีการศึกษาถึงประโยชน์ของสาร anthocyanin ที่นอกเหนือไปจากการนำไปใช้เป็นอินดิเคเตอร์

2.30 ข้อเสนอแนะสำหรับโรงเรียนที่ขาดอุปกรณ์และงบประมาณ

โรงเรียนที่ขาดงบประมาณวิทยาศาสตร์ น่าจะได้มีการสกัดสาร อินดิเคเตอร์จากดอกไม้ขึ้นใช้เอง เพราะมีวิธีการแบบง่าย และวัสดุและเครื่องมือที่ใช้ ตลอดจนเคมีภัณฑ์ก็มีราคาถูก

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

ชูลี ชัยพิพัฒน์ "ครูวิทยาศาสตร์กับการสอนวิทยาศาสตร์ ภาคปฏิบัติการในโรงเรียนมัธยม"

วิทยาศาสตร์ 3 233 - 235 มีนาคม 2506

ทองสุข พงคทัต เคมีชั้นเตรียมอุดมศึกษา ไทยวัฒนาพานิชย์ พระนคร พ.ศ. 2503

ปิฎกระ บุนนาค ไม้ดอกไม้ประดับ โรงพิมพ์ส่งเสริมอาชีพ พระนคร พ.ศ. 2511 563 น

ประทุมสุข อาชาวำรุง "วิทยาศาสตร์เสรี" วิทยาศาสตร์ 7 565 กรกฎาคม 2511

ลีปนันท เกตุทัต "วิทยาศาสตร์" วิทยาศาสตร์ 11 918 พฤศจิกายน 2511

เส่งี่ยม พงษ์บุษรอด ไม้เทศเมืองไทย เกษมบรรณกิจ ชนบุรี พ.ศ. 2508 596 หน้า

วินิจวันนกร, พระยา ข้อพรรณไม้แห่งประเทศไทย กรมป่าไม้ พระนคร พ.ศ. 2503 871 น

Abe, Y., and Hayashi, K., Botan. Mag. (Tokyo), 62, 557(1956).

Acheson, R.M., "An Introduction to the Chemistry of

Heterocyclic Compounds," Interscience, London, 1967.

Alexeyev, V., "Quantitative Analysis," Foreign Language

Publishing House, Moscow, 1963.

Bate-Smith, E.C., Biochem. J., 58, 122(1954).

Bate-Smith, E.C., Biochem. Soc. Symposia, 3, 62,(1949).

Bate-Smith, E.C., Chem. & Ind. (London), 1457(1948).

Bush & Lomb, "Spectrometer Education Manual," Bausch & Lomb

Incorporated, 1967.

Calmon, C., and Krescmann, T.R. (eds.), "Ion-Exchangers in

Organic and Biochemistry," Interscience Publisher,

New York, 1957.

Chandler, B.V., and Harper, K.A., Nature, 181, 131(1958).

CHEM Study, "Laboratory Manual for Chemistry," W.H. Freeman

and Company, London, 1964.

- Dodds, K.S., and Long, H.S., J. Gent., 53, 136(1955).
- "Encyclopedia Britannica," Vol.2, Encyclopedia Britannica Ltd.,
London, 1964.
- Endo, T., Nature, 179, 378(1957).
- Forsyth, F.G.C., Biochem. J., 51, 511, 1952.
- Forsyth, F.G.C., and Simmond, N.W., Proc. Roy. Soc. (London),
B142, 549(1954).
- Geissman, T.A., "Principles of Organic Chemistry," W.H. Freeman
and Company, London, 1959.
- Geissman, T.A., and Harborne, J.B., Arch. Biochem. Biophys.,
55, 447(1955).
- Geissman, T.A., Harborne, J.B., and Seikel, M.K., J. Am. Chem.
Soc., 78, 825(1956).
- Girdichian, V., "Organic Synthesis," Vol.2, Reinhold, New York,
1957.
- Gillan, A.E., and Stern, E.S., "An Introduction to Electronic
Absorption Spectroscopy in Organic Chemistry," Edward
Arnold, London, 1962.
- Hals, M.I., and Macek, K.(eds.), "Paper Chromatography," Academic
Press, New York, 1963.
- Harborne, J.B., Nature, 179, 429(1957).
- Harborne, J.B., Nature, 181, 26(1958).
- Harborne, J.B., and Sherratt, H.S.A., Biochem. J., 65, 23(1957).
- Harborne, J.B., and Sherratt, H.S.A., Experimentia, 13, 468(1957).
- Incze'dy, J., "Analytical Applications of Ion-Exchangers," Pergamon
Press, London, 1966.

"International Encyclopedia of Chemical Science," D. Van Nostand Company, New York, 1964.

Johnson, G., Mayer, M.M., and Johnson, D.K., Food Res., 16 169(1951).

Karrer, P., and Strong, F.M., Helve. Chim. Acta, 19, 25(1936).

Karrer, P., and Weber, H.M., Helve. Chim. Acta, 19, 1025(1936).

Karrer, P., Widmer, R., Hurlimann, W., and Nievergelt, O., Helv. Chim. Acta, 10, 758(1927).

"Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology," Vol.11, Interscience Publisher, London, 1966.

Kuck, L.E., and Tongg, R.C., "Hawaiian Flowers and Flowering Trees," Charles E. Tuttle Company, Tokyo, 1958.

Longe, N.A.(ed.), "Handbook of Chemistry," McGraw-Hill Book Company, New York, 1967.

Ledcorer, M.(ed.), "Chromatographic Reviews," Vol.1, Elsevier Publishing Company, New York, 1959.

Li K.C., and Wagenkencht, L.C., J. Am. Chem. Soc., 78, 979 (1956).

Morris, Q.L., Gage, T.B., and Wender, S.H., J. Am. Chem. Soc., 73, 3340(1951).

Nordmann, J., "Qualitative Testing and Inorganic Chemistry," John Wiley and Sons, New York, 1957.

Nordstrom, C.G., and Swain, T., J. Chem. Soc., 2764(1953).

Osborn, G.H., "Synthetic Ion-Exchangers," Chapman and Hall London, 1955.

Paech, K., and Tracey, M.V.(eds.), "Modern Method of Plant Analysis," Vol. 3, Springer-Verlag, 1955.

- Pummerer, R., Naturwiss, 20, 602(1932).
- Reynolds, T.M., Robinson, R., and Scott-Moncrieff, R., J. Chem. Soc., 1235(1943).
- Roach, W.A., Ann. Botan. (London), 22, 127(1958).
- Robert, E.A.H., Cartwright, R.A., and Wood, D.I., J. Sci. Food Agr., 1, 637(1956).
- Robinson, R., ENDEAVOUR, 1, 92(1942).
- Robinson, R., J. Chem. Soc., 2722(1932).
- Robinson, R., Nature, 135, 732(1935).
- Robinson, R., and others, J. Chem. Soc., part I-XXII(1934).
- Rose, Arthur., and Rose, Elizabeth.(eds.), "The Condensed Chemical Dictionary," Reinhold Publishing Corporation, New York, 1962.
- Swain, T., Biochem. J., 53, 200(1953).
- Sykes, P., "A Guide Book to Mechanism in Organic Chemistry," Longmans, London, 1965.
- Tzvyet, M., Ber. deut. boten. Ges., 32, 61(1809).
- UNESCO Pilot Project, "Chemical Equilibria," The UNESCO Pilot Project for Chemistry Teaching in Asia, Bangkok, 1968.
- Williams, A.H., Chem. & Ind.(London), 120(1955).
- Willstatter, R., Ann., 412, 189(1916).
- Willstatter, R., Naturwiss., 20, 601(1932).
- Willstatter, R., and Nolan, Th. J., Chem. Abstr., 9, 1302(1915).



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. แสดง Rf value และ maximum absorption ของ anthocyanin
anthocyanidin

ตาราง 41 แสดง Rf value λ max ของ anthocyanin และ anthocya
nidin

	λ max Å	Rf value in					color of spot
		BAW	BuHCl	1%HC	HAc- Fores	Form	
<u>Pelagonidin:</u>		0.80			0.68	0.33	r
-3-monoglucoside		0.44	0.38	0.14	0.35		or
-3-monogalactoside	5030	0.39	0.37	0.13	0.33		or
-3-rhamnoglucoside		0.37	0.30	0.22	0.44		or
-3-diglucoside I		0.36	0.26	0.50	0.62		or
-3-diglucoside II		0.30	0.17	0.21	0.47		or
-3-triglucoside		0.25	0.10	0.35	0.52		or
-3,5-diglucoside	5030	0.31	0.14	0.23	0.45		or
-3-rhamnoglucosido		0.29	0.13	0.40	0.58		o
-5-glucoside							
-3-diglucosido(I)-		0.25	0.10	0.60	0.68		o
-5-glucoside							
-3-diglucosido(I)-		0.18	0.04	0.73	0.73		oy
-7-glucoside							
<u>Cyanidin:</u>		0.68			0.19	0.22	m.
-3-monoglucoside	5250	0.38	0.25	0.07	0.26		m
-3-monogalactoside		0.37	0.24	0.07	0.26		m
-3-rhamnoglucoside		0.37	0.25	0.19	0.43		m

¹ Gillan, A.E., and Stern, E.S., "An Introduction to Electronic Absorption Spectroscopy in Organic Chemistry," p.183, 1962.

² Lederer, M.(ed.), "Chromatographic Review," vol.1, p.209, 1959.

³ Hair, M.I., and Macek, K.(eds.), "Paper Chromatography," p.254, 1963.

ตาราง 41 (ต่อ)

	$\lambda_{\max}$ A°	Rf value in					color o spot
		BAW	uHC	%HCl	HAc-Fores	Form	
-3-gentibioside	5300	0.29		0.19			m
-3-xyloglucoside		0.36	0.24	0.24	0.51		m
-3-diglucoside		0.33	0.22	0.31	0.61		m
-3,5-diglucoside	5210	0.28	0.06	0.16	0.40		m
-3-rhamnoglucosido -5-glucoside		0.25	0.08	0.36	0.59		m
<u>Peonidin:</u>		0.71				0.63 0.30	m
-3-monoglucoside		0.41	0.30	0.09	0.33		p
-3,5-diglucoside	5190	0.31	0.10	0.17	0.44		p
-3-rhamnoglucosido -5-glucoside		0.29	0.12	0.37	0.60		p
<u>Delphinidin:</u>		0.42				0.32 0.13	pu
-3-monoglucoside	5410	0.26	0.11	0.03	0.18		pu
-3-rhamnoglucoside		0.30	0.15	0.11	0.37		pu
-3,5-diglucoside	5400	0.15	0.03	0.08	0.32		pu
<u>Petunidin:</u>		0.52				0.16 0.20	pu
-3-monoglucoside	5400	0.35	0.14	0.04	0.22		pu
-3-rhamnoglucoside		0.35	0.16	0.13	0.12		pu
-3,5-diglucoside	5420	0.42	0.04	0.08	0.32		pu
-3-rhamnoglucosido -5-glucoside		0.23	0.06	0.37	0.61		pu
<u>Malvidin:</u>		0.58				0.60 0.27	pu
-3-monoglucoside	5370	0.38	0.15	0.06	0.29		ma
-3,5-diglucoside		0.31	0.03	0.13	0.42		ma

	λ_{max} A°	Rf value in					color of spot
		BAW	BuHCl	1% HCl	c- HCl	Fore Form stal ic	
-3-rhamnoglucosido -5-glucoside		0.30	0.05	0.40	0.63		ma
-3-galactoside	5400	0.40					
-3-xyloside	5200						
<u>Hirsutidin:</u>		0.66					
-3-glucoside		0.61					
-3,5-diglucoside	5300	0.38					

r = red

or = orange-red

o = orange

oy = orange yellow

m = magenta

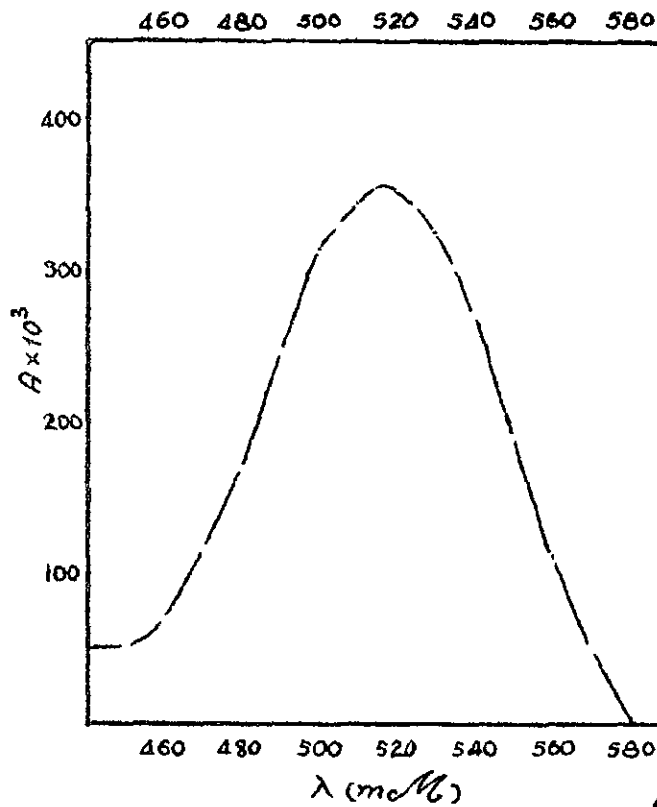
p = pink

pu = purple

ma = mauve

ภาคผนวก ข. แสดง absorption spectra และ graph ของ anthocyanin จากดอก
 ตาราง 42 แสดง absorption coefficient ของ anthocyanin จากกลีบดอกไม้

Wave length	Absorption Coefficient (A) x 1000											
	ทอง กลาง ใบลาย	ทอง กลาง น้ำ	อัญ ชัน	ปุระ โหง	ชบา	พุทธร รักษา	ช่อง นาง ใหญ่	เฟื่อง ฟ้า	เฟื่อง ฟ้า	กุ หลาบ	กุ หลาบ	กุ หลาบ
440	51	81	145	210	240	100	215	115	57	81	193	143
450	52	93	149	212	250	117	225	139	68	110	218	165
460	71	116	150	221	265	144	238	181	106	152	257	200
470	117	166	153	237	284	180	260	266	187	212	320	262
480	171	252	168	269	322	242	292	371	304	275	392	362
490	247	340	205	339	385	345	353	436	430	317	505	481
500	314	392	282	449	480	527	462	461	550	337	665	610
505	331	414	-	-	-	-	-	462	595	340	745	675
510	344	430	422	592	602	657	627	452	634	330	820	721
515	354	438	-	-	670	698	-	440	661	318	870	749
520	352	436	562	698	749	732	748	422	681	302	905	768
525	342	426	622	747	800	755	782	398	673	-	932	757
530	325	410	672	788	835	750	807	356	655	252	927	732
535	302	-	707	815	862	727	828	-	625	-	895	697
540	272	364	730	831	875	697	840	281	586	187	855	651
545	-	-	707	815	865	660	832	-	-	-	790	-
550	190	306	680	783	843	617	812	212	477	133	695	496
560	112	242	595	705	762	475	752	166	335	91	492	342
570	51	161	472	589	609	310	651	122	230	63	310	218
580	-	102	330	425	422	192	460	90	142	44	180	142
590	-	60	205	256	281	96	289	-	67	-	-	95



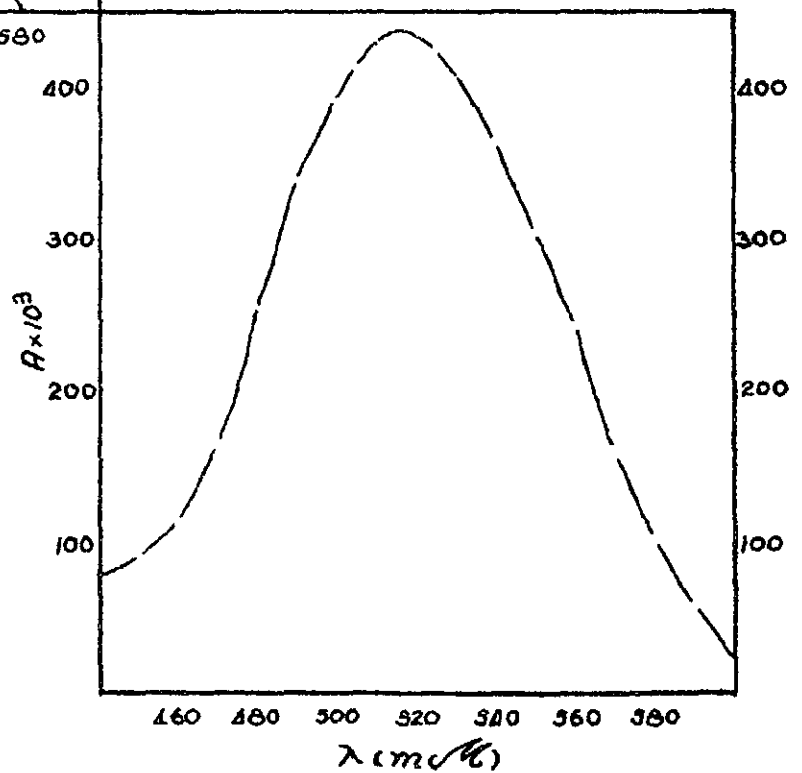
Absorption Spectra ของ
Anthocyanin จากดอกของผลยาง
ในละลาย

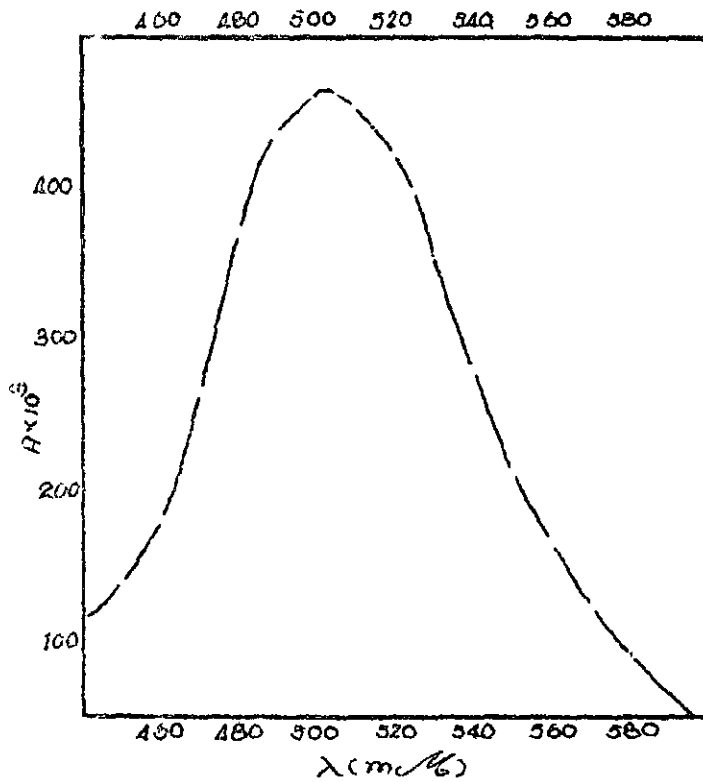
$$\lambda_{\max} = 5162 \text{ Å}$$

460 480 500 520 540 560 580

Absorption Spectra ของ
Anthocyanin จากดอกของ -
ผลยางน้ำ

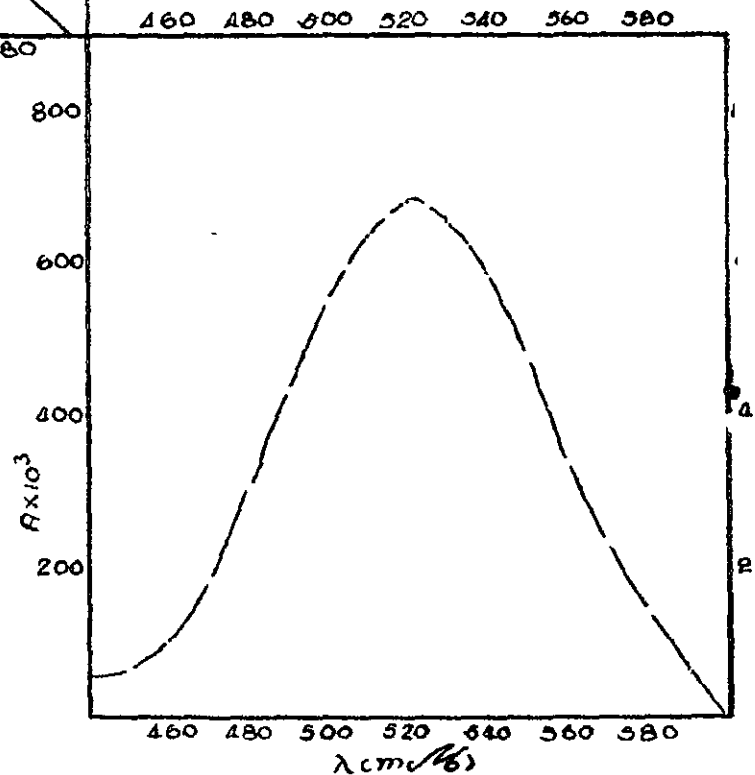
$$\lambda_{\max} = 5168 \text{ Å}$$

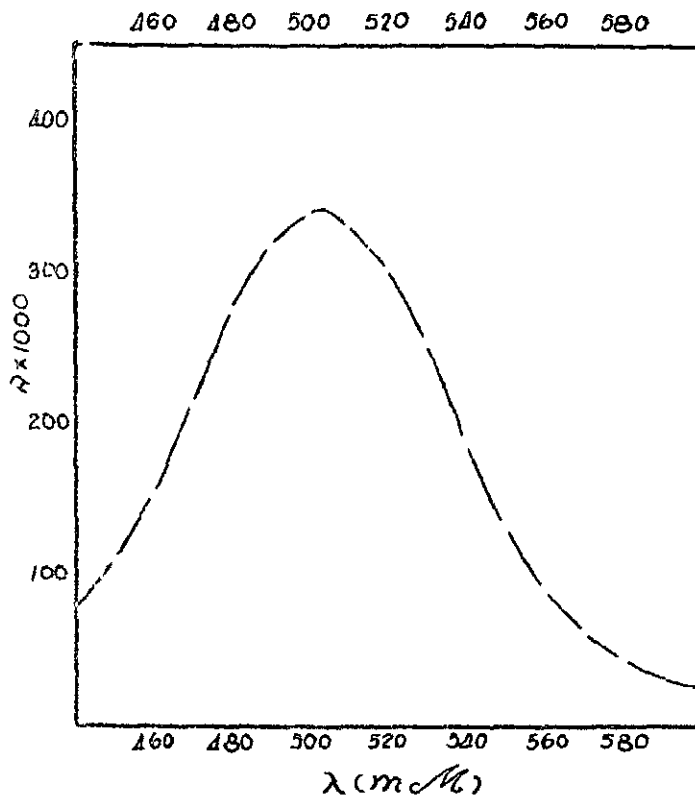




Absorption Spectra, ของ
Anthocyanin จากดอกไฟลางฟ้า 1
(BOUGAINVILLEAE) ดอกสีน้ำเงิน
 $\lambda_{max} = 5030 \text{ \AA}$

Absorption Spectra, ของ
Anthocyanin จากดอกไฟลางฟ้า 2
(BOUGAINVILLEAE) ดอกสีน้ำเงิน.
 $\lambda_{max} = 5210 \text{ \AA}$





Absorption Spectra ของ
Anthocyanin ชนิดที่ 1 จากดอก

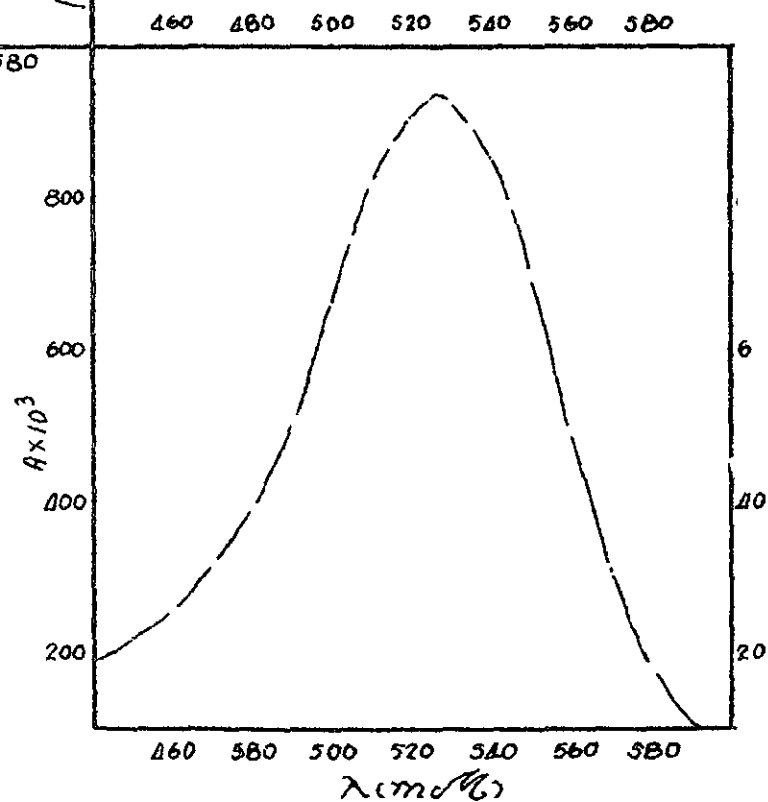
กุหลาบ 1. (ROSA FLORIBUNDA)

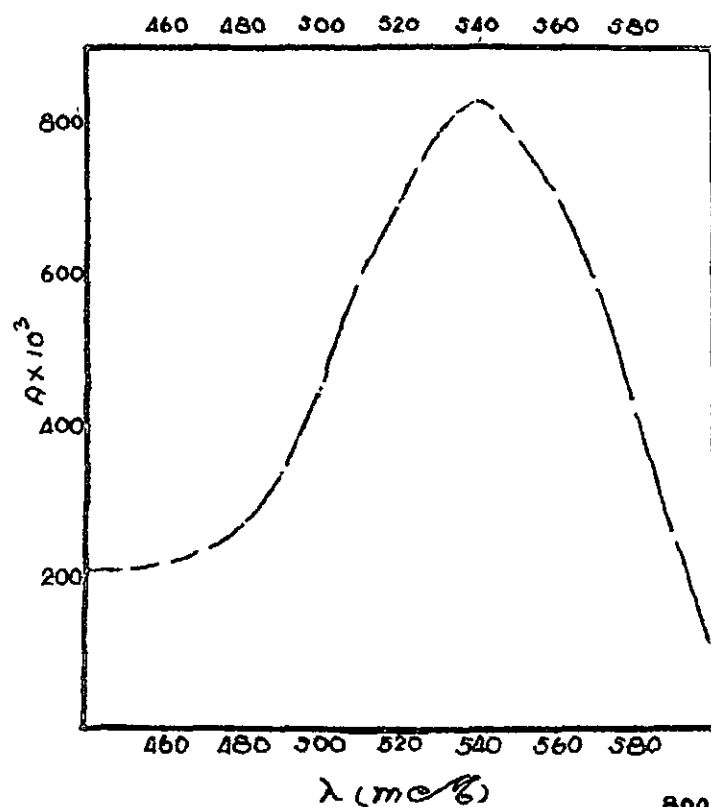
$$\lambda_{max} = 5035 \text{ Å}$$

Absorption Spectra ของ
Anthocyanin ชนิดที่ 2 จากดอก

กุหลาบ 1. (ROSA FLORIBUNDA)

$$\lambda_{max} = 5270 \text{ Å}$$



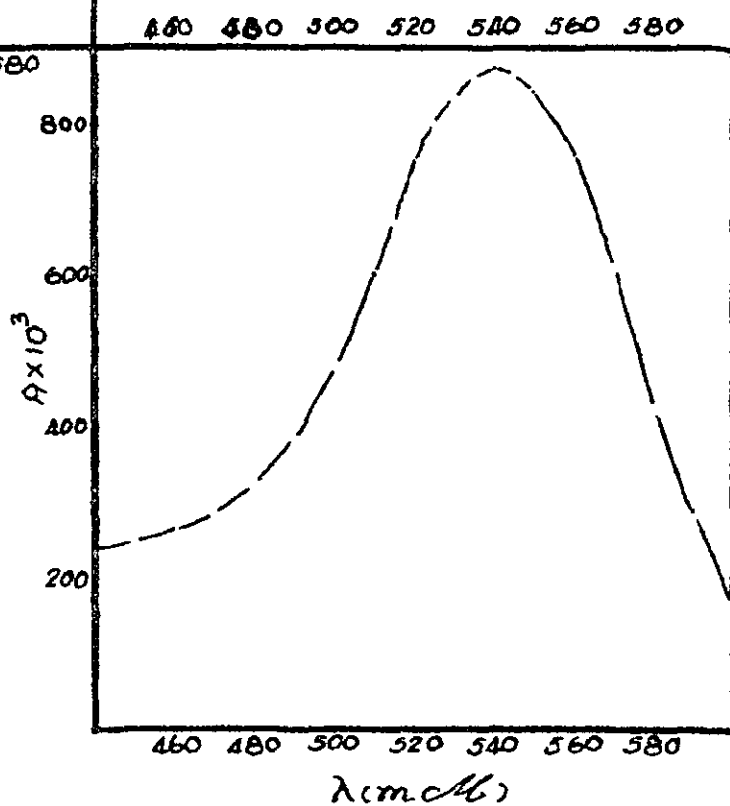


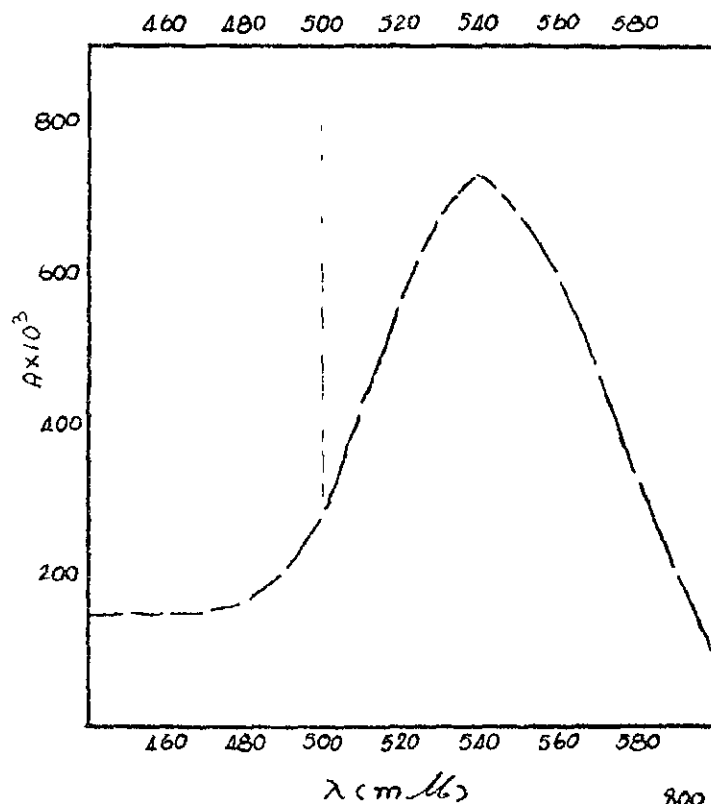
Absorption Spectra ของ
 Anthocyanin จากดอกชบา^{ไม้} (HIBISCUS ROSA-SINENSIS LINN.)
 ดอกสีแดง

$$\lambda_{\max} = 5400 \text{ Å}$$

Absorption Spectra ของ
 Anthocyanin จากดอกชบา^{ไม้}
 (MALVACEAE, HIBISCUS ROSA-
 SINENSIS LINN.) ดอกสีแดง

$$\lambda_{\max} = 5400 \text{ Å}$$



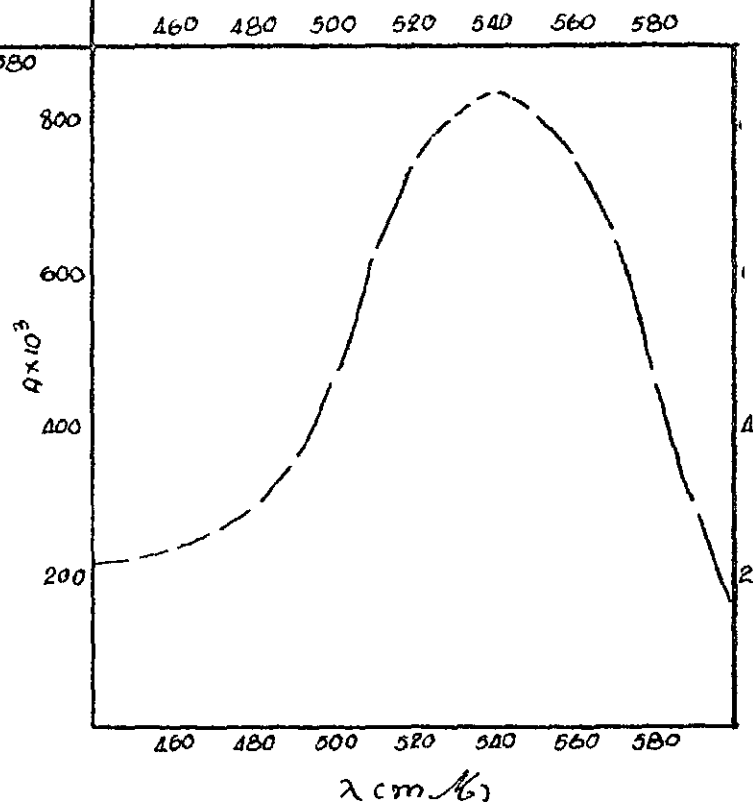


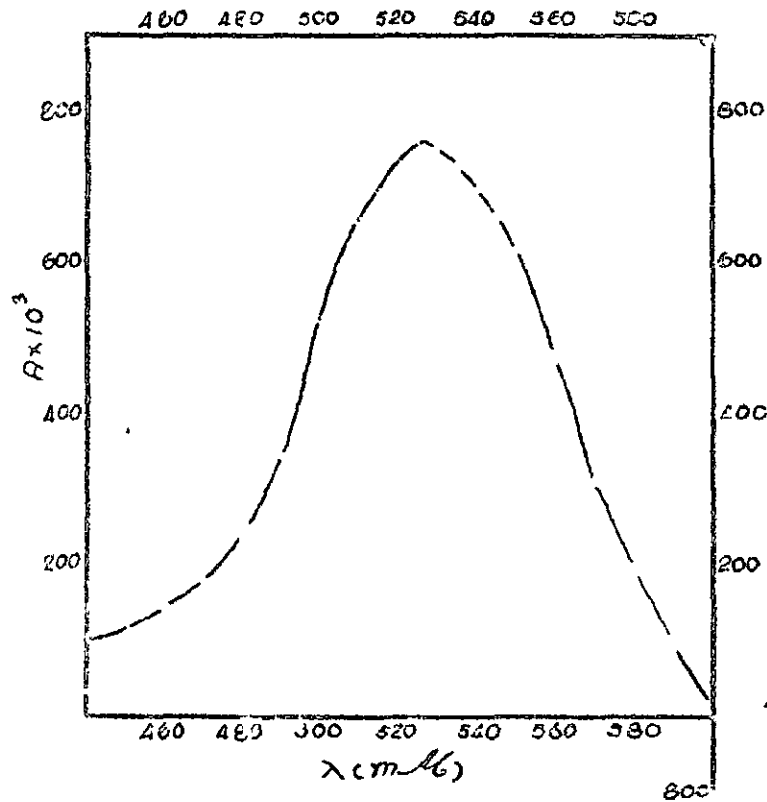
Absorption Spectra ของ
Anthocyanin จากดอกชบา
(CLITORIA TERNATEA LINN.) ดอกสีม่วง
น้ำเงิน

$$\lambda_{\max} = 5400 \text{ Å}^{\circ}$$

Absorption Spectra ของ
Anthocyanin จากดอกชบา
(THUNBERGIA ERECTA T. ANDER-
-SON VAI CAERULEA HORT.)
ดอกสีม่วงดำ

$$\lambda_{\max} = 5400 \text{ Å}^{\circ}$$



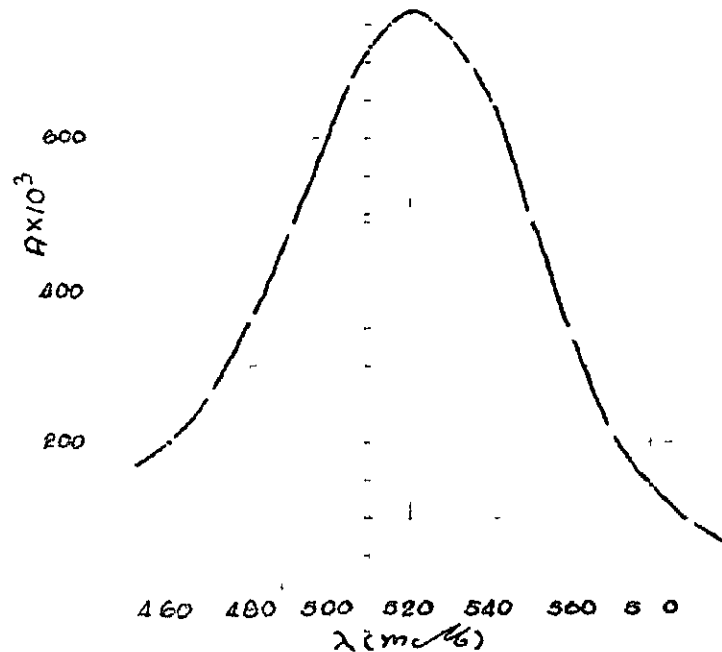


Absorption Spectra ของ
Anilocyathin จากดอกพุดกังหัน
(CANVA FLACCI DA LINN.) ดอกสีม่วง

$$\lambda_{max} = 5270 \text{ Å}$$

Absorption Spectra ของ
Anilocyathin จากดอกพุดกังหัน 2
(ROSA CHINENSIS JACQ., VAR
SEMPERFLORENS KOEHNE.) ดอก
สีม่วง

$$\lambda_{max} = 5210 \text{ Å}$$



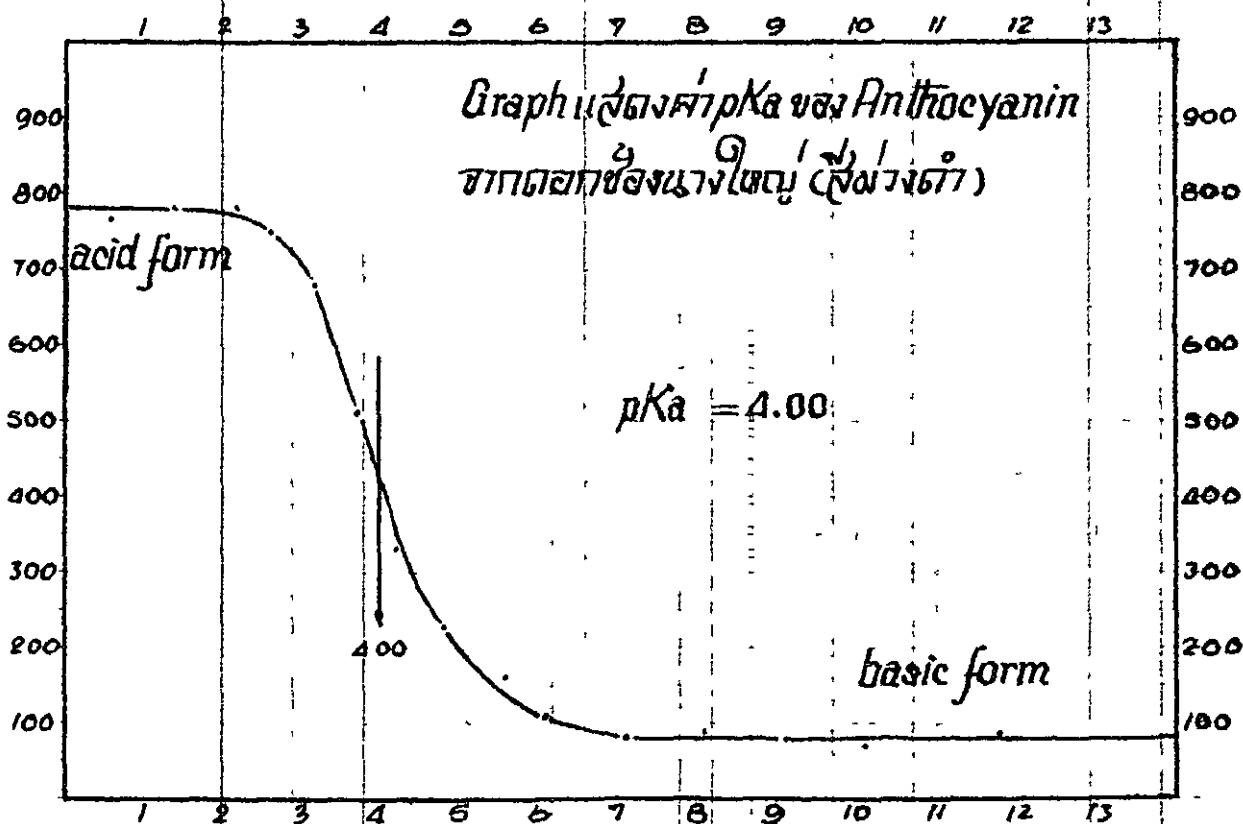
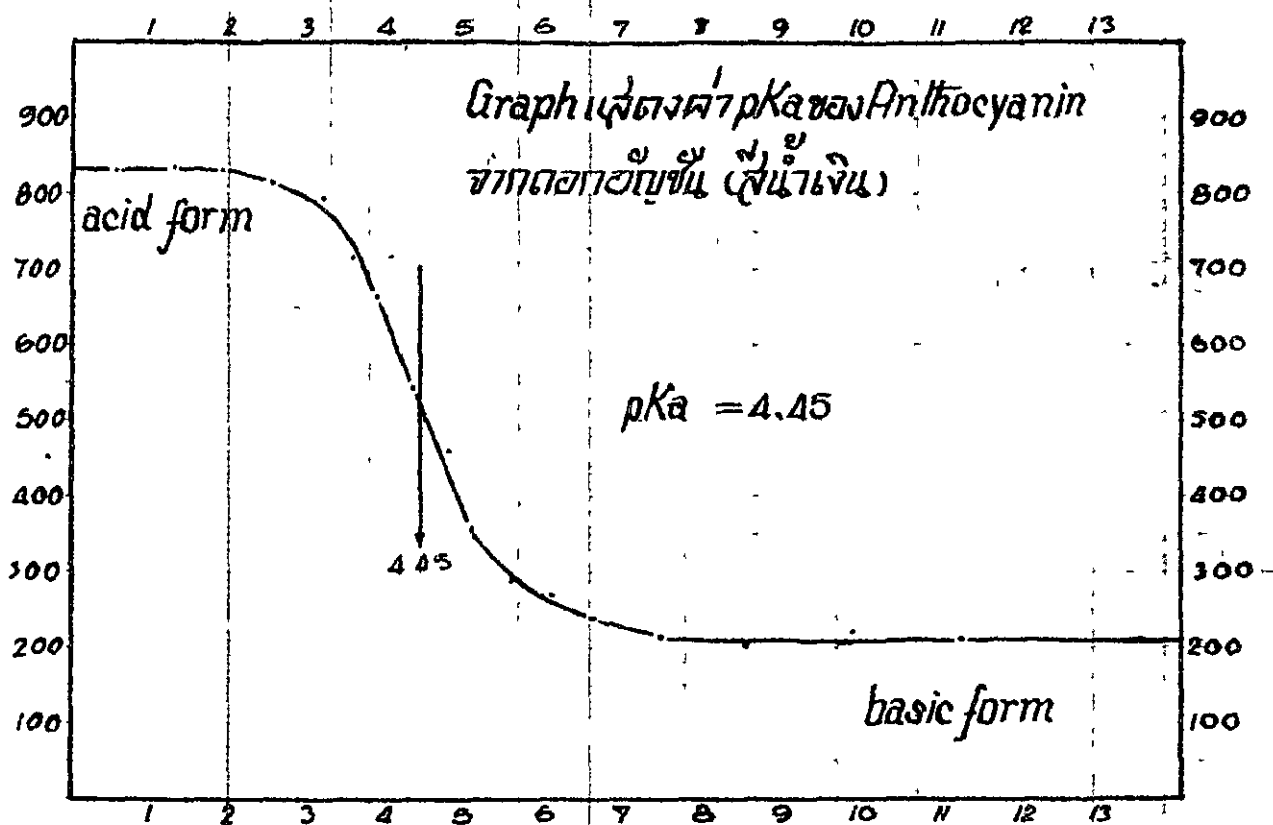
ภาคผนวก ค. แสดงข้อมูลและ graph ที่ได้จากการหาค่า pKa ของอินดิเคเตอร์จากดอกไม

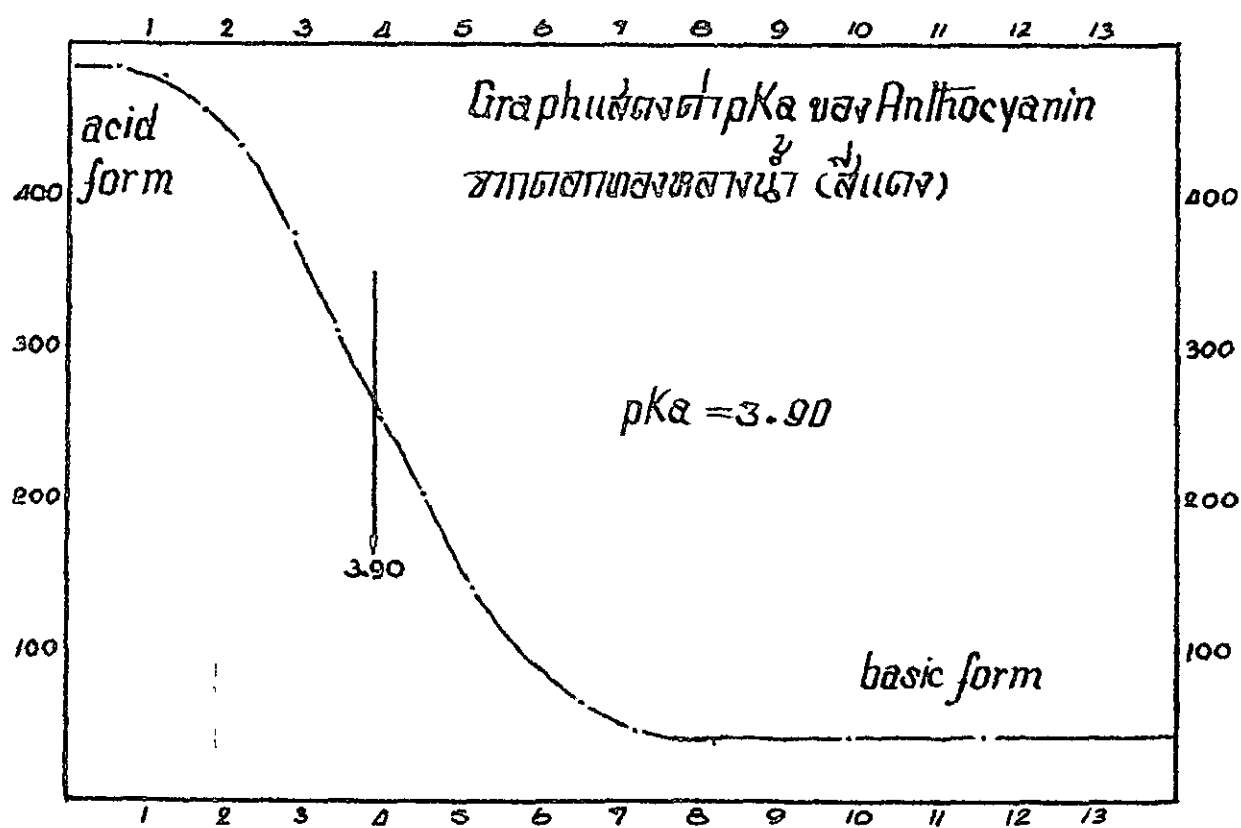
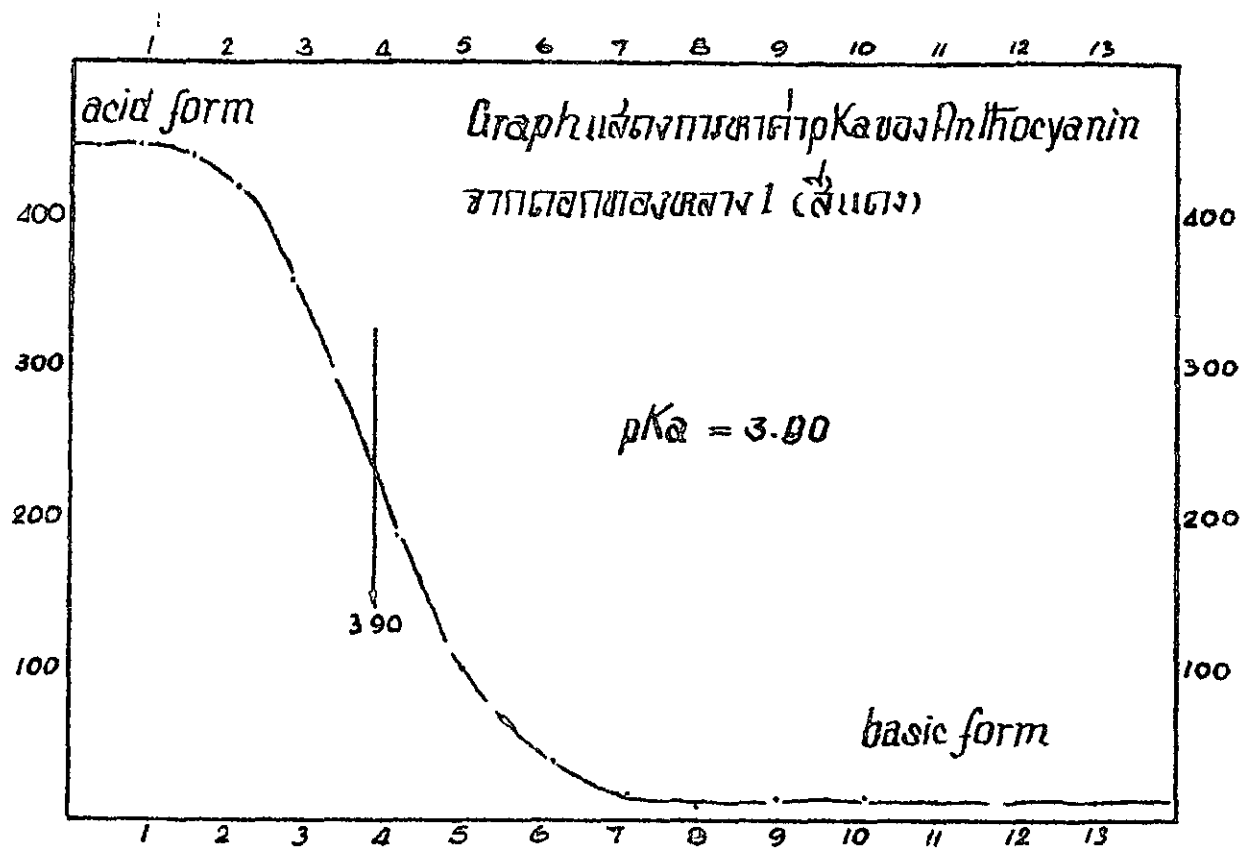
ตาราง 43 แสดง absorption coefficient (Λ .) ที่ pH ต่าง ๆ ของ anthocyanin จากดอกไม้ชนิดต่าง ๆ

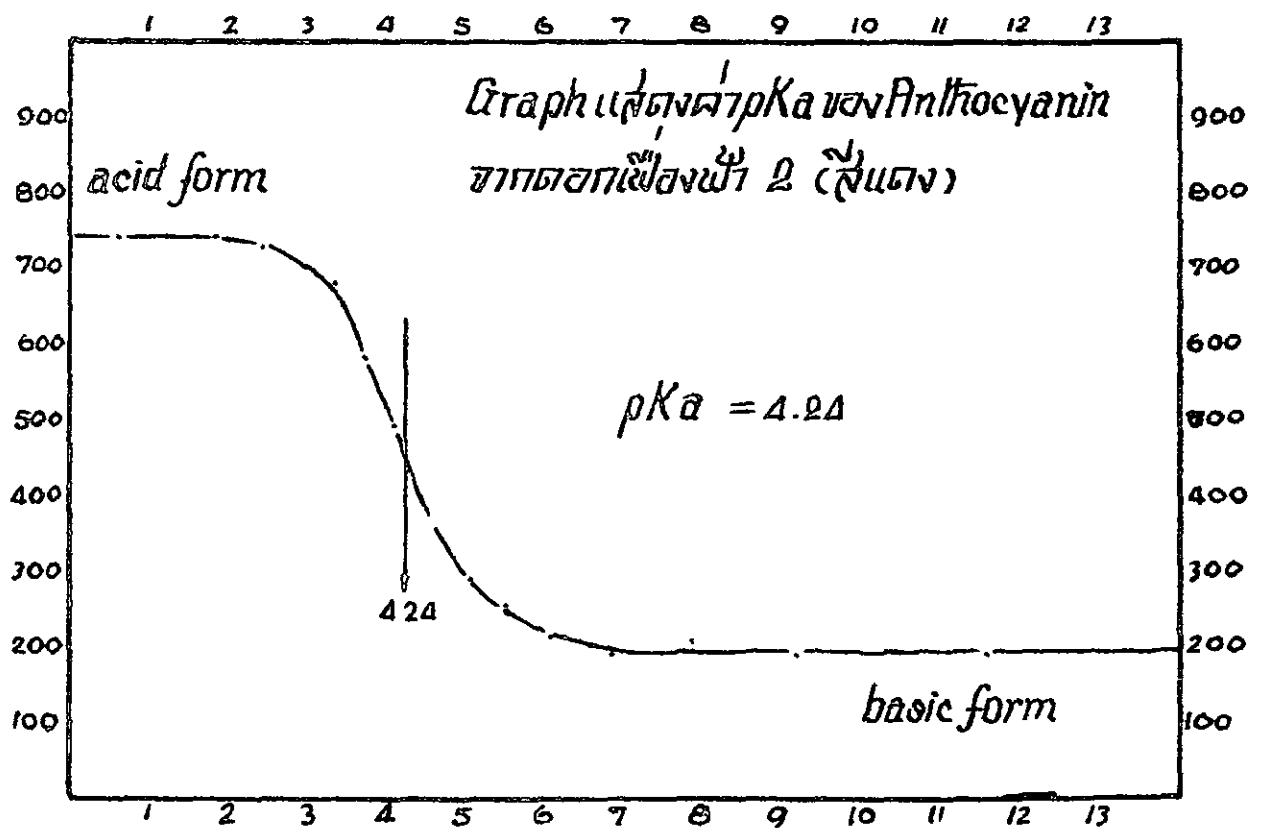
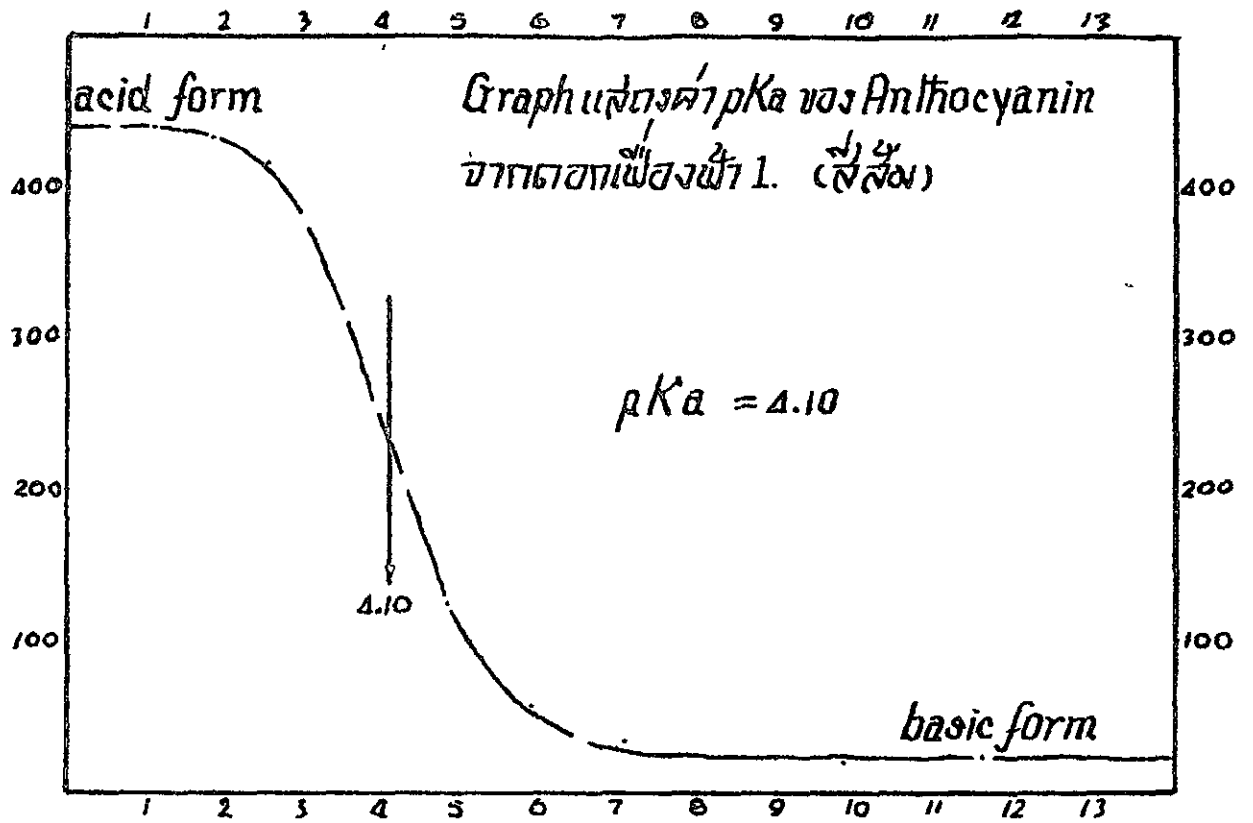
ทองหลาง ใบลาย		ทองหลาง น้ำ		อัญชัน		พุทธรักษา		ชบา		พุทธรักษา	
pH	Λ .at $\lambda=5150$ $\text{\AA}$	pH	Λ .at $\lambda=5150$ $\text{\AA}$	pH	Λ .at $\lambda=5400$ $\text{\AA}$	pH	Λ .at $\lambda=5400$ $\text{\AA}$	pH	Λ .at $\lambda=5400$ $\text{\AA}$	pH	Λ .a $\lambda=52$ $\text{\AA}$
0.34	.445	0.63	.484	0.55	.831	0.54	.739	0.44	.830	0.42	.68
0.89	.447	1.23	.479	1.30	.835	1.04	.730	0.92	.828	1.09	.68
1.58	.438	1.74	.456	1.91	.830	1.56	.736	1.56	.808	1.80	.682
2.16	.418	2.19	.437	2.56	.814	2.09	.718	2.11	.807	2.41	.673
2.86	.357	2.88	.375	3.22	.793	2.73	.672	2.59	.781	3.05	.637
3.43	.296	3.43	.312	3.58	.716	3.20	.610	2.86	.750	3.58	.572
4.18	.188	3.98	.253	3.89	.665	3.88	.418	3.30	.677	4.06	.454
4.84	.114	4.53	.204	4.35	.543	4.30	.320	3.90	.536	4.44	.378
5.39	.075	5.14	.142	4.83	.460	4.78	.193	4.35	.388	4.72	.306
6.28	.039	5.91	.099	5.10	.357	5.23	.144	4.87	.255	5.07	.262
7.13	.018	6.54	.066	5.60	.288	5.83	.092	5.26	.199	5.85	.207
7.99	.009	7.22	.047	6.12	.270	6.21	.085	5.98	.178	7.07	.172
9.01	.014	8.21	.038	6.64	.238	6.92	.074	6.69	.154	7.89	.153
10.11	.016	9.18	.048	7.48	.214	7.89	.069	7.87	.144	9.10	.173
11.78	.012	9.90	.043	8.56	.202	8.89	.078	8.54	.132	10.13	.158
		11.57	.042	9.89	.220	10.11	.068	10.08	.127	11.77	.158
				11.23	.209	11.88	.062	12.17	.127		

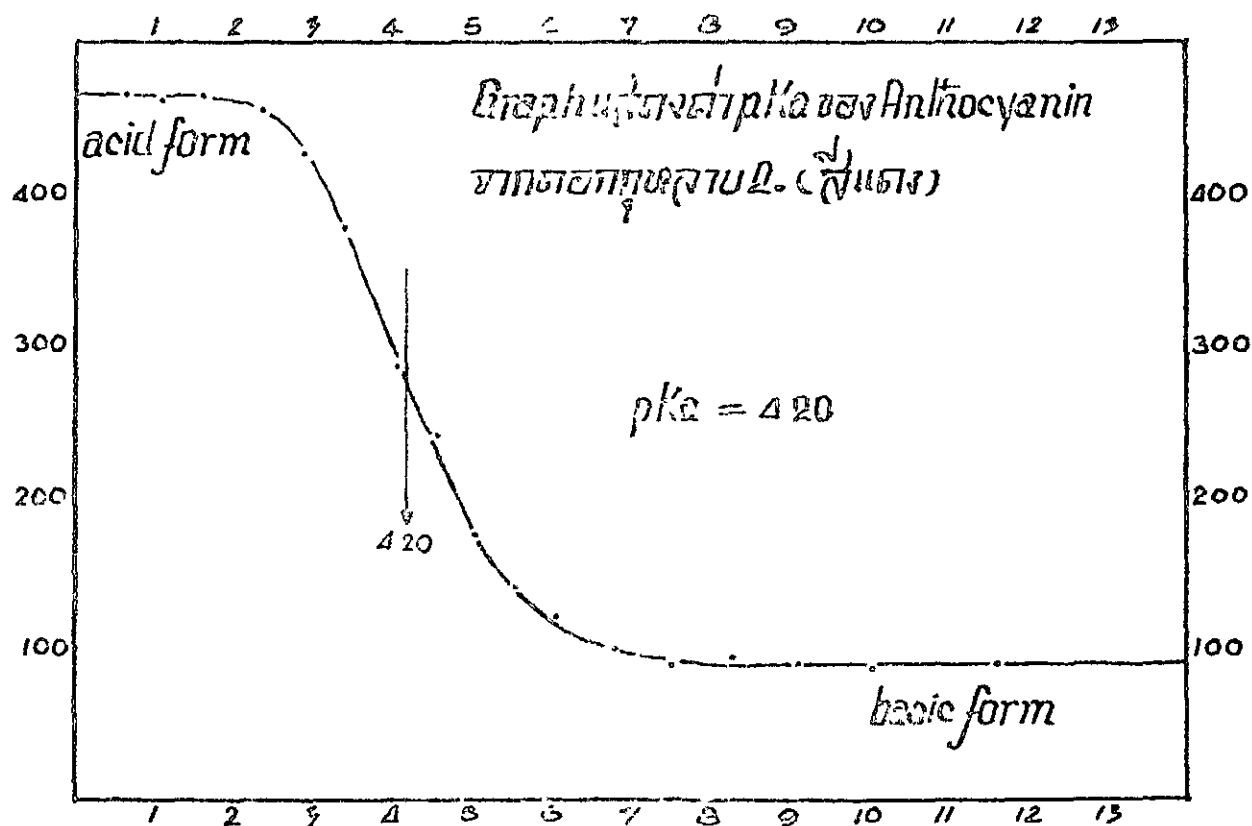
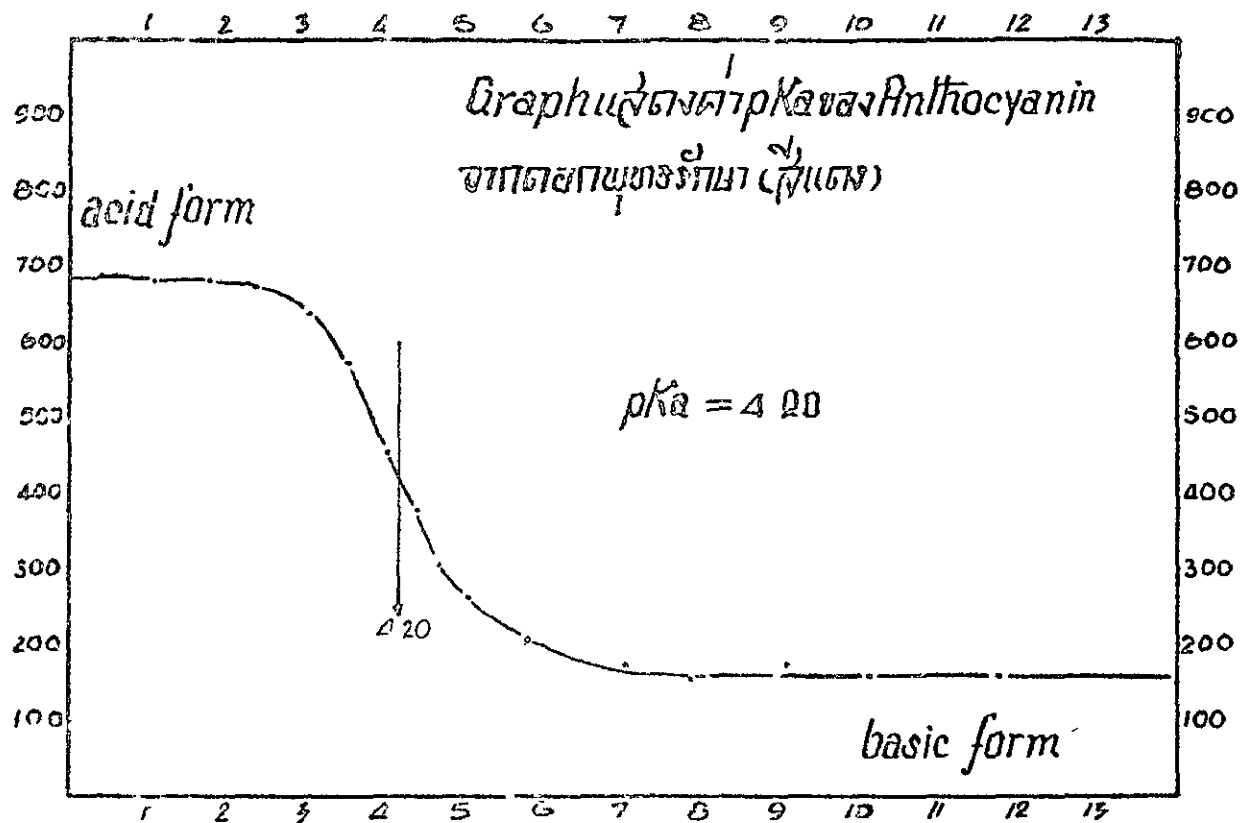
ตาราง 13 (ต่อ)

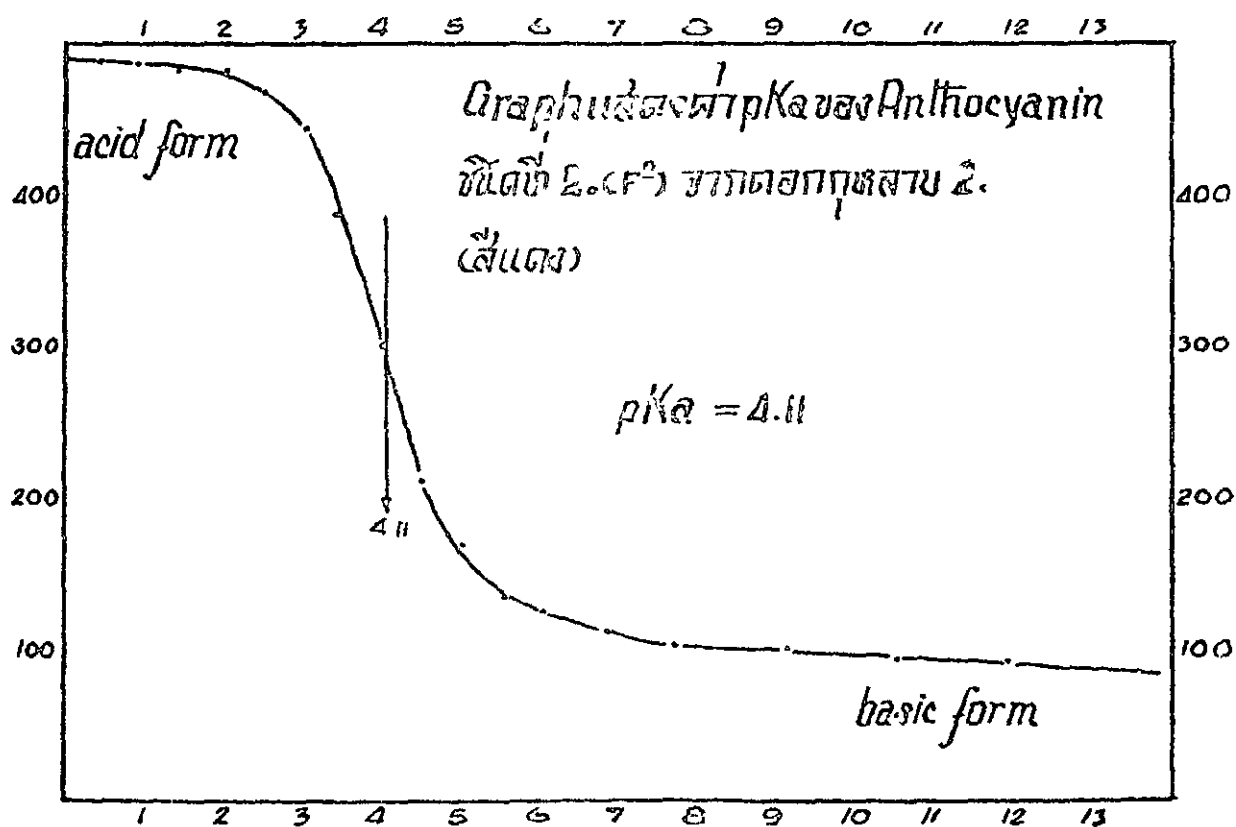
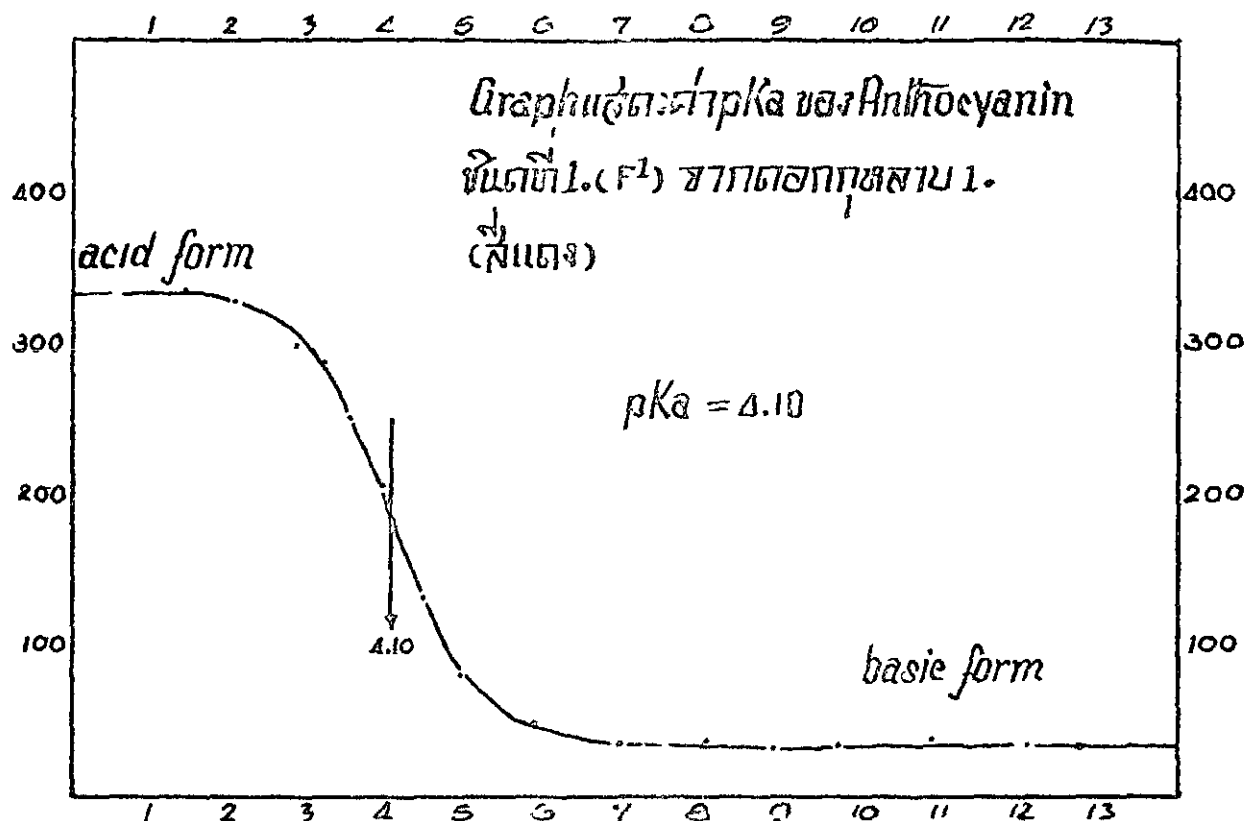
ของนาง ใหญ่		เฟืองฟ้า 1		เฟืองฟ้า 2		กุหลาบ 1 F 1		กุหลาบ 1 F 2		กุหลาบ 2	
pH	$\Delta \cdot \text{at} \lambda$ =5400 $\text{\AA}$	pH	$\Delta \cdot \text{at} \lambda$ =5050 $\text{\AA}$	pH	$\Delta \cdot \text{at} \lambda$ =5200 $\text{\AA}$	pH	$\Delta \cdot \text{at} \lambda$ =5050 $\text{\AA}$	pH	$\Delta \cdot \text{at} \lambda$ =5200 $\text{\AA}$	pH	$\Delta \cdot \text{at} \lambda$ =520 $\text{\AA}$
0.57	.768	0.56	.440	0.59	.740	0.54	.332	0.46	.488	0.62	.46
1.39	.780	1.08	.441	1.09	.732	1.44	.335	0.91	.486	1.08	.46
2.20	.782	1.86	.434	1.84	.741	2.08	.328	1.45	.482	1.61	.46
2.52	.751	2.57	.416	2.45	.728	2.88	.298	2.08	.484	2.38	.455
3.18	.680	3.03	.378	2.93	.717	3.24	.287	2.57	.467	2.93	.427
3.73	.511	3.54	.315	3.38	.679	3.56	.251	3.08	.444	3.44	.377
4.22	.333	3.94	.255	3.76	.582	3.97	.206	3.05	.387	4.07	.287
4.82	.228	4.32	.205	4.13	.493	4.47	.132	4.07	.301	4.59	.242
5.62	.163	4.85	.125	4.60	.363	4.97	.080	4.54	.212	5.07	.175
6.12	.110	5.54	.062	5.07	.288	5.88	.018	5.07	.169	5.58	.141
7.12	.081	5.93	.058	5.53	.256	6.98	.031	5.60	.135	6.08	.122
8.10	.088	6.56	.035	6.11	.212	8.05	.036	6.08	.125	6.83	.101
9.11	.078	7.10	.033	6.88	.189	8.90	.031	6.88	.113	7.54	.088
10.09	.070	7.92	.020	7.89	.208	9.72	.034	7.74	.103	8.31	.093
11.79	.087	9.08	.021	9.19	.190	10.88	.037	9.13	.101	9.13	.090
		9.88	.018	11.60	.188	12.08	.033	10.53	.093	10.07	.086
		11.61	.023					11.94	.093	11.64	.089

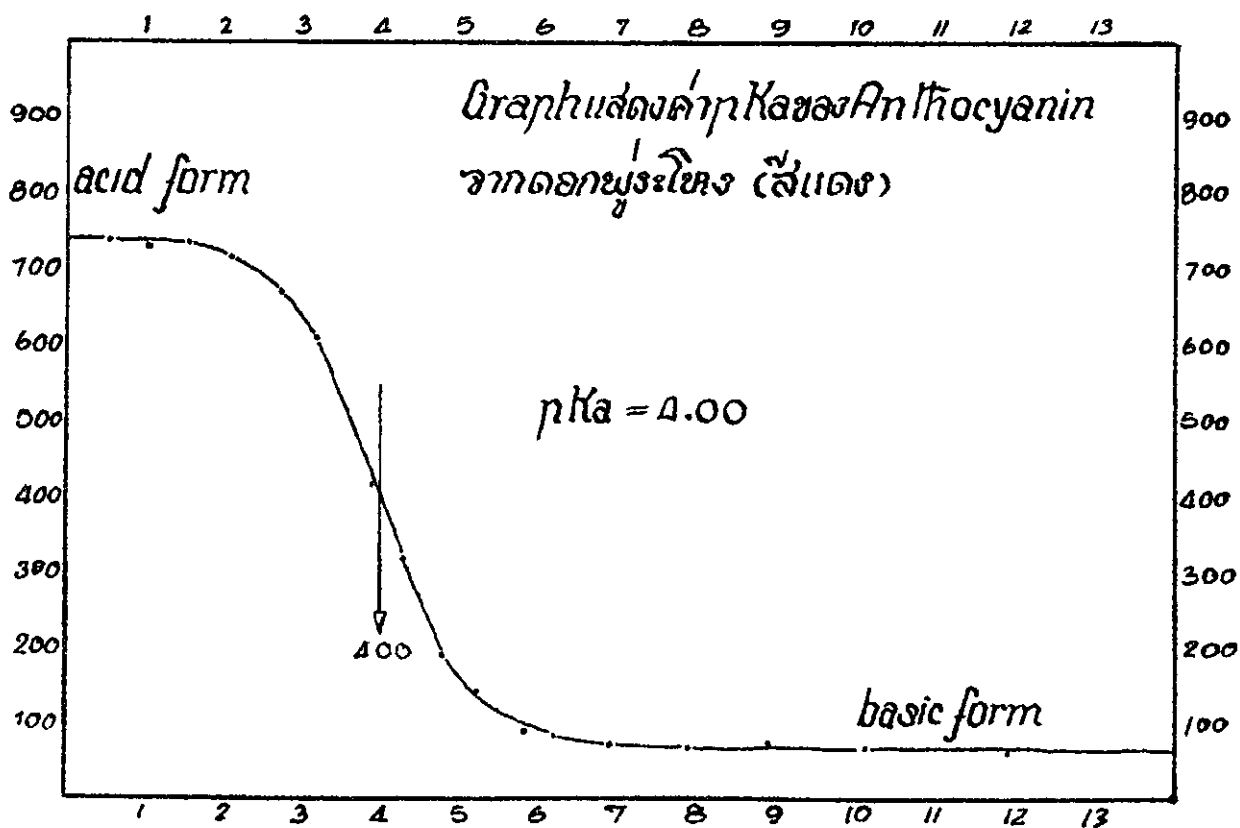
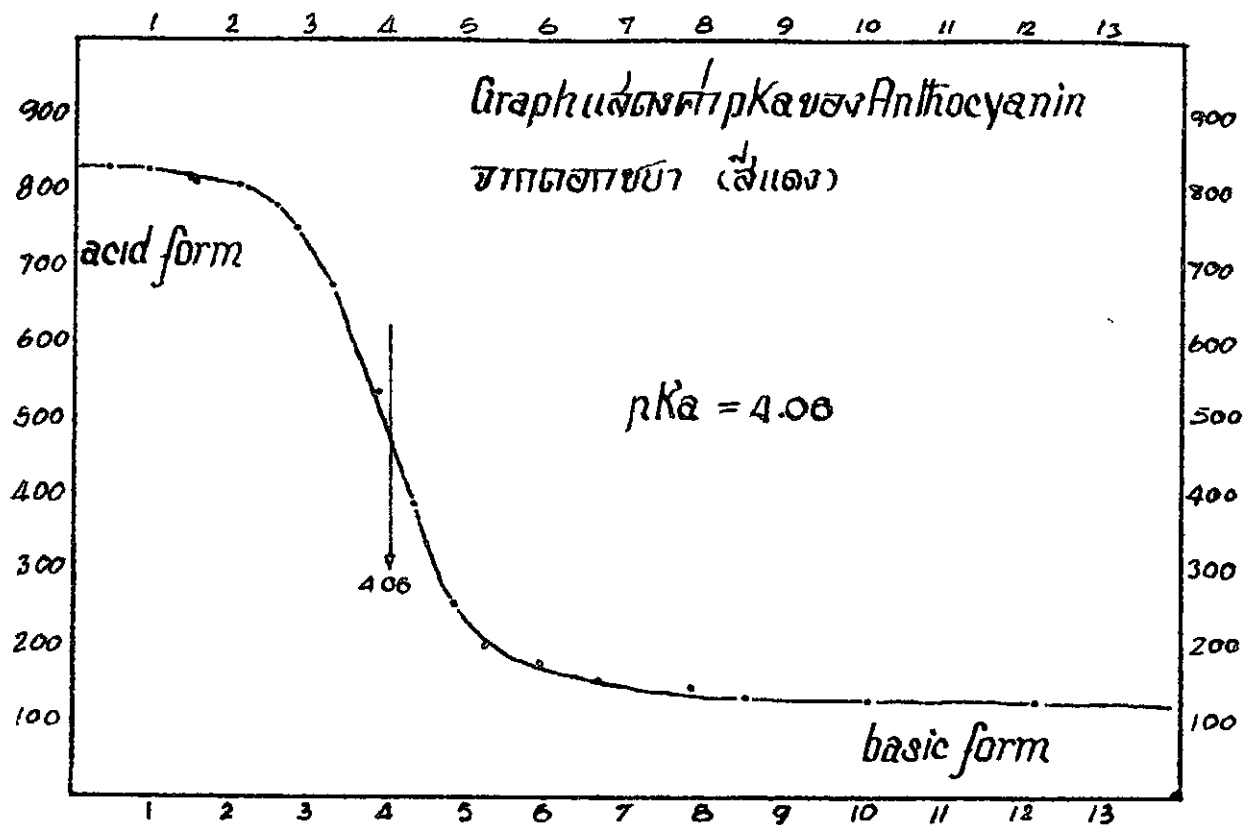












รูปที่ 25 Paper Chromatogram ของ anticyanin จากดอกไม้นานา solvent.

กุหลาบ 2 
 กุหลาบ 1  
 เืองฟ้า 2 
 เืองฟ้า 1 
 ชองนาง 
 พุทธรักษา 
 ชบา 
 พู่ระหง 
 อัญชัน 
 ทองหลางน้ำ 
 ทองหลางใบลาย 

รูปที่ 26 Layer Chromatogram ของ antihypocyanin จากถั่วลิสง ใน solvent.

กุหลาบ 2 
 กุหลาบ 1  
 เพ็ญฟ้า 2 
 เพ็ญฟ้า 1 
 ร่องนาง 
 พุทธรักษา 
 ขบา 
 นูระโหลง 
 อัญชัน 
 ทองหลางน้ำ 
 ทองหลางใบลาย 

รูปที่ 27

การติดต่อของ nucleolus กับ solvent

ทองหลาง ใบยาว



ทองหลาง น้ำ



อัญชัน



หูกะโหลก



ขมิ้น



พุทธรักษา



ขมิ้น



เฟืองฟ้า 1



เฟืองฟ้า 2



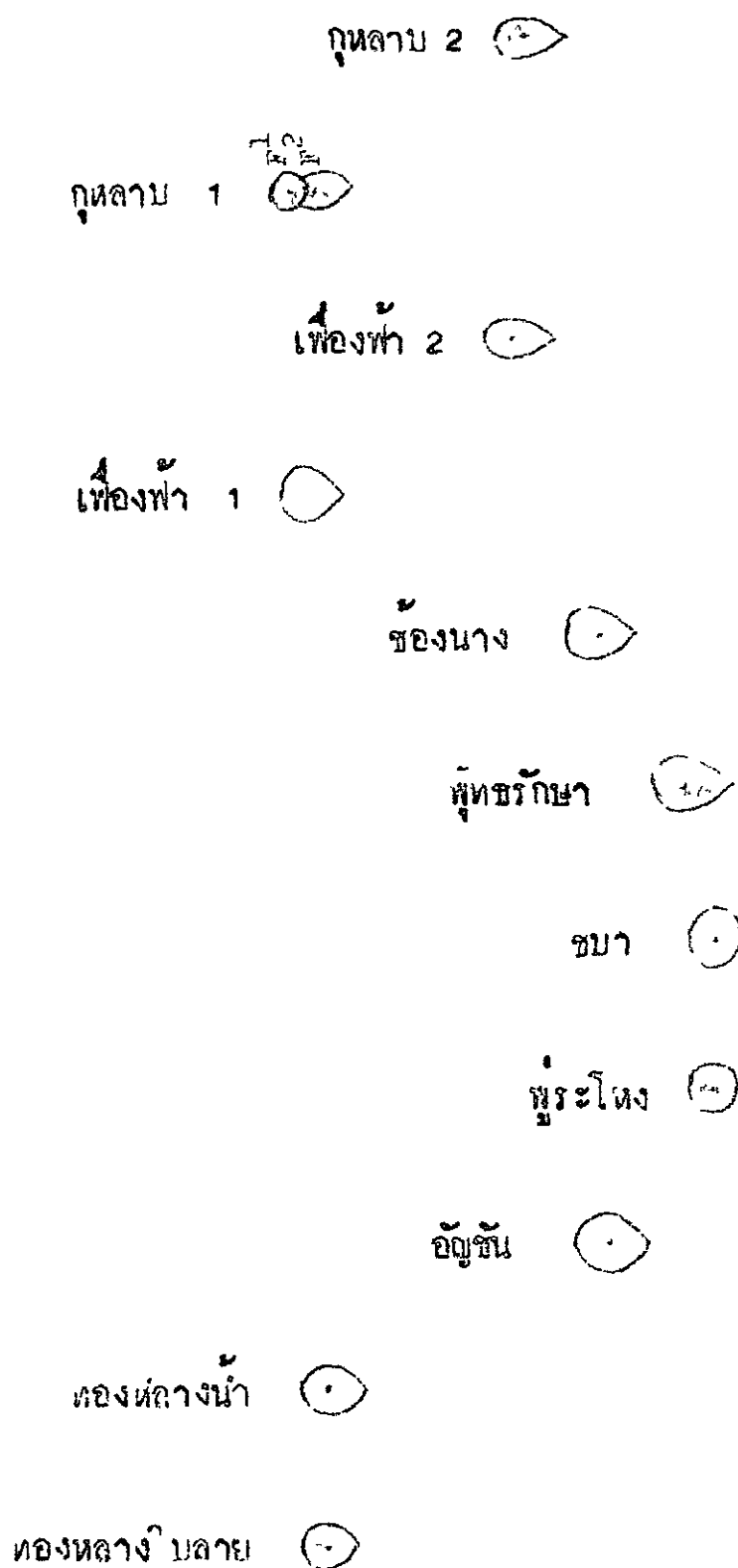
กุหลาบ 1



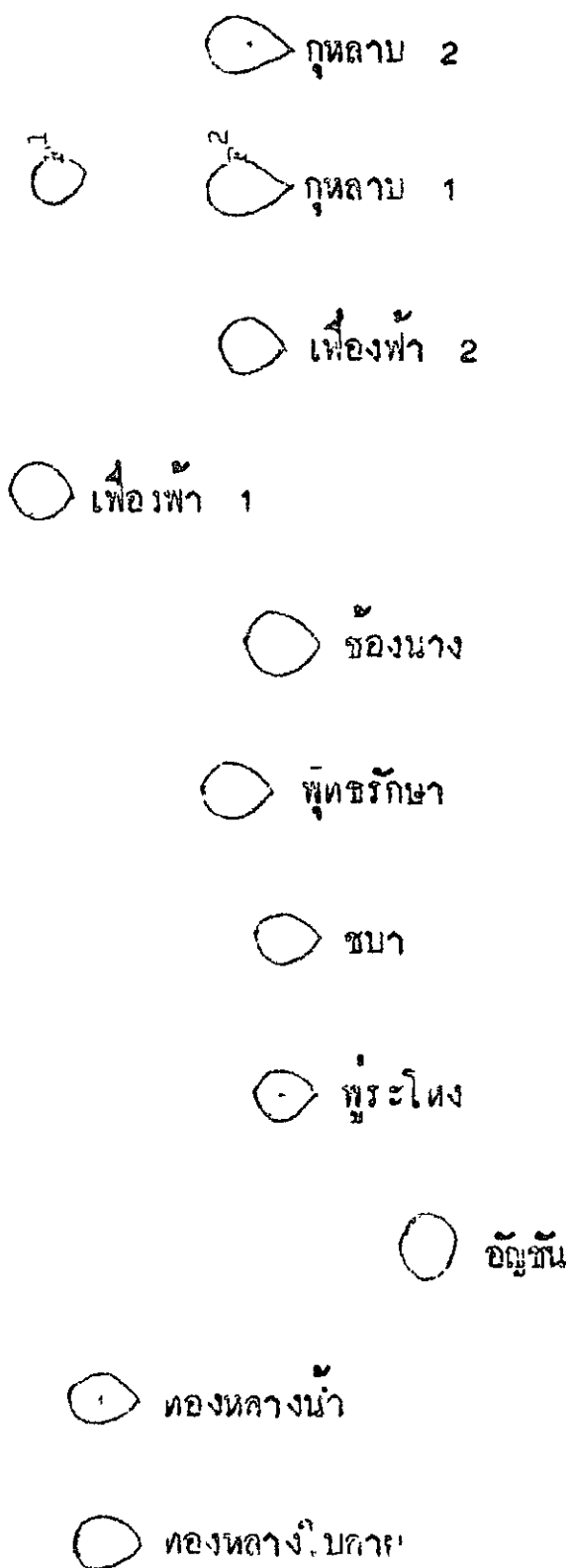
กุหลาบ 2



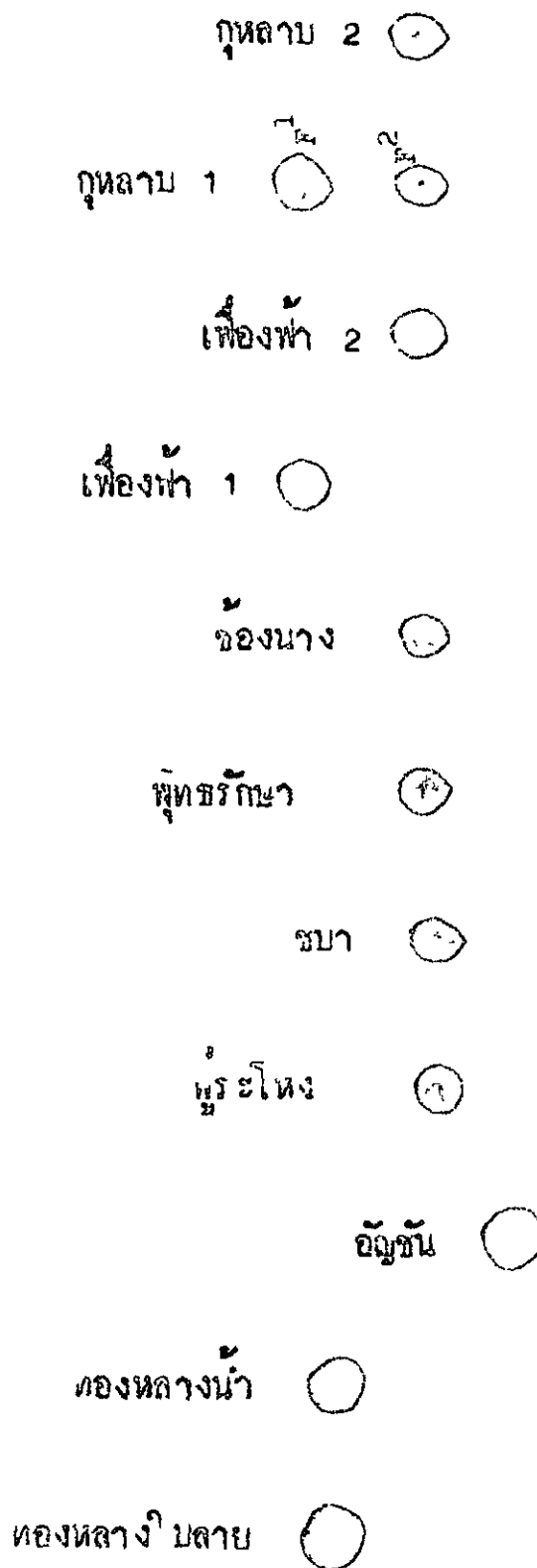
รูปที่ 28 Taper Chromosome ของ methocyanus จากดอกไม้ ใน school jungle.



รูปที่ 29 Paper Chromatogram ของ anthocyanidin จากดอกไม้ ใน Forestal solvent.



รูปที่ 30 Paper Chromatogram ของ Anthocyanidin จากดอกไม้วาน Formly solvent.



รูปที่ 31 เพอร์โครเมตัมแดง ของ m.v. oxyanion จากดอกไม้ "ใน oil solvent."

- ☒ กุหลาบ 2
- ☒¹ ☒² กุหลาบ 1
- ☒ เฟื่องฟ้า 2
- ☐ เฟื่องฟ้า 1
- ☐ ของนาง
- ☒ พุทธรักษา
- ☐ ชบา
- ☐ พุ่มระเริง
- ☐ อัญชัน
- ☐ ทองหลางน้ำ
- ☐ ทองหลางใบลาย

รูปที่ 32

Peper Chomda-Longkai และกิ่งคามบุรีสุตสี ของ Anthocyanin จากดอกชงนาง ผู้ใดจากการ
ที่บุรีสุตสีโดยวิธีทาง ๓ ใน ๖๖ ๘๐ ๖๖๖

A Study of Acid-Base Indicators from Local Flowers for the Teaching of Chemistry

Purposes of the study

1. To find simple methods of preparation of indicators from local flowers.
2. To develop effective methods of preparation of indicators from local flowers, and study properties of these indicators.
3. To compare the two methods in the following:
 - a. Quality of indicators in both qualitative and quantitative analysis.
 - b. Nature of equipments.
 - c. Cost.
4. To identify indicators from various flowers, and to study some characteristic properties.
5. To emphasise simple methods for those schools with inadequate budget.

Procedure

The sequence of study were carried out as follow:

1. A survey of flowering plants were made so that some suitable flowers could be selected for study. The selection of flowers was carried out by two criteria.
 - a. Those flowers should be common and readily available.
 - b. They should contain a reasonable quantity of indicators.
2. Simple and effective methods were designed and carried out for the extraction of indicators from those flowers selected.
3. Methods of separation, purification and identification of indicators were also carried out by both simple and effective means.
4. The indicators obtained from both methods were made into anthocyanin indicator paper and tested for color change in acid-base medium (qualitative analysis), and also in the titration between strong acid and strong base, strong acid and weak base, weak acid and strong base, and weak acid and weak base (quantitative analysis).
5. Duration for storage of indicators from both methods were tested in various solvents.
6. Characteristic properties of reasonably pure indicators obtained from effective method were studied as followed:
 - a. Rf values.
 - b. Absorption spectra.
 - c. pKa values.
 - d. color reaction.

Findings

The results of the study were as follows:

1. Eleven different red, blue and purple flowers were found to be suitable for study.
2. Water methanol (B.R) ethanol (B.R) and 40 degree of local spirit were used as solvents satisfaction for simple method of extraction, and calcium sulfate from native gypsum and cassava powder were used as adsorbents in column chromatography for purification.
3. Methanolic and ethanolic hydrogen chloride 1% were used as solvents and soxhlet extraction apparatus as the equipment for effective method of extraction. Lead precipitation, column chromatography of calcium sulfate (R.P.) and alumina as adsorbents and ion-exchange chromatography of amberlite resin IRC-50 were undertaken for the effective purification of indicators.
4. The color change of indicators from the effective method was better than those from simple method.
5. Percentages of error in titration systems by using indicators from simple method as compared to those from effective method did not differ significantly.
6. The cost in terms of both chemicals and equipments in the effective method was much more than the simple method.
7. All indicators seemed to be stable in acid media, especially in ethanolic hydrogen chloride 1%.
8. The determination of pKa values of indicators by simple method were found to be 4.00-1.05. but effective method gave pKa range from 3.90-4.24.
9. The yields of anthocyanins identified in various flowers were found as follow:
 - a. Coral Tree or Tong-Lang-Bi-Lai (*Erythrina variegata* Linn. Var *picta* Hort.) : Peonidin -3- rhamnoglucosido-5-glucosid, yield 2.36% (fresh petal).
 - b. Tong-Lang-Num (*Erythrina fusca* hour) : Peonidin -3- rhamnoglucosido -5-glucoside, yield 2.22% (fresh petal).
 - c. Butterfly Pea or Un-Chun (*Clitoria ternatea* Linn.) : Delphinidin -3,5-diylucoside, yield 2.98% (fresh petal).
 - d. Chinese Hibiscus or Poo-Ra-Hong (*Hibiscus rosa-sinesis* Linn.) : Delphinidin-3-diylucoside, yield 3.45% (fresh petal).
 - e. Malvaceae or Cha-Ba (*Hibiscus rosa-sinesis* Linn.) : Petunidin-5-monoglucoside, yield 3.48% (fresh petal).
 - f. Cannaceae of Puta-Rug-Sa (*Canna Flaccida* Linn.): Cyanidin-3-monoglucoside, yield 3.05% (fresh petal).

- g. Bush *Thambergia* or Chong - Nang - Yai (*Thambergia erecta* T. Anderson var *caerulea* Hort.) : Petunidin-3,5-diglucoside, yield 3.41% (fresh petal).

h. *Bougainvillea* 1. or Fueng-Fah 1., orange red petal (*Bougainvillea spectabilis* Willdenow) : Pelagonidin-3- diglucoside, yield 3.41 % (fresh petal).

i. *Bougainvillea* 2. or Fueng-Fah 2., magenta petal (*Bougainvillea spectabilis* Willdenow) : Cyanidin-3,5- diglucoside, yield 3.46% (fresh petal).

j. Fusilier or Ku-Larb (*Rosa Fluribunda*) : two kinds of anthocyanin, Pelagonidin-3-rhamnogluco-side and Cyanidin-3-rhamnogluco-side-5-glucose, total yield 3.55% (fresh petal).

k. Earl of Dufferin or Ku-harb (*Rosa elinensis* Jacq. var *Sunperflorens* Kochue) : Cyanidin-3,5 diglucoside, yield 3.92 % (fresh petal).

การสะกิดสารอินดิเคเตอร์จากดอกไม้บางชนิดเพื่อใช้ในการสอน
วิชาเคมี

จุดมุ่งหมายในการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อค้นหาวิธีการแบบง่ายที่จะใช้ในการเตรียมสารอินดิเคเตอร์จากดอกไม้ในธรรมชาติ
2. ปรับปรุงวิธีการที่มีประสิทธิภาพที่ใช้ในการเตรียมสารอินดิเคเตอร์จากดอกไม้ในธรรมชาติ และเพื่อศึกษาสมบัติต่างๆของอินดิเคเตอร์เหล่านั้น
3. เพื่อเปรียบเทียบวิธีการทั้งสองในด้านต่างๆดังนี้
 - ก. คุณภาพของอินดิเคเตอร์ที่นำไปใช้ในด้านปริมาณวิเคราะห์ และคุณภาพวิเคราะห์
 - ข. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง
 - ค. ราคาของการลงทุน
4. เพื่อพิสูจน์ (identification) ว่า อินดิเคเตอร์ที่ได้ออกมานั้นคืออะไร และมีสมบัติอย่างไร
5. เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีการแบบง่ายนั้น โรงเรียนที่ขาดแคลนอุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ก็สามารถที่จะวัดเตรียมขึ้นเองได้

วิธีดำเนินการ

- ทำการทดลองตามลำดับขั้นดังนี้
1. สรรวหาดอกไม้ชนิดต่างๆ เพื่อคัดเลือกเอาดอกไม้ที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการศึกษา เกณฑ์การคัดเลือกมีสองอย่างคือ
 - ก. ต้องเป็นดอกไม้ที่หาง่าย และพบเห็นอยู่บ่อยๆ
 - ข. มีปริมาณสารอินดิเคเตอร์ในดอกมากพอสังเกต
 2. ทำการสะกิดดอกไม้ที่คัดเลือกแล้ว โดยใช้วิธีการแบบง่าย และแบบมีประสิทธิภาพ
 3. ทำการแยก ทำให้บริสุทธิ์ และทำการพิสูจน์สารอินดิเคเตอร์ที่สะกิดได้ โดยใช้วิธีการแบบง่ายและแบบมีประสิทธิภาพ

4. นำสารอินดิเคเตอร์ที่ได้จากวิธีการทั้งสองแบบมาทำ anthocyanin indicator paper แล้วนำไปทำการทดสอบการเปลี่ยนสี จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากวิธีการทั้งสองแบบ ไปใช้ในการ titration ระหว่าง กรดเชกกับด่างเบก กรดเชกกับด่างอ่อน กรดเชกกับด่างแก่ และกรดอ่อนกับด่างอ่อน

5. นำสารอินดิเคเตอร์ที่ได้จากวิธีการทั้งสองแบบไปเก็บรักษาในขวดดำละลายอากาศต่างๆ และในเวลาต่างกัน

6. ศึกษาสมบัติเฉพาะตัวของอินดิเคเตอร์แต่ละชนิดที่ได้จากวิธีการที่มีประสิทธิภาพ โดยศึกษาในเรื่องต่างๆ ดังนี้

- ก. Rf value
- ข. Absorption spectra
- ค. pKa value
- ง. Color reaction

ผลที่ได้จากการศึกษาพบว่า

1. ดอกไม้ที่เหมาะสมจะนำมาเป็นอินดิเคเตอร์ และเหมาะกับการศึกษาในครั้งนี้ โดยยก ดอกไม้ที่มีสีคง ใช้น้ำเงิน และสีม่วง

2. วิธีการแบบง่ายใช้ น้ำ methanol(B.P.) ethanol(B.P.) และ น้ำ 40 ดีกรี เป็นตัวทำละลาย(สำหรับการสกัดสีจากกลีบดอกไม้) ใช้ calcium sulfate จาก native gypsum และแบ่งมันด้วยประหลังเป็น adsorbents ใน column chromatography

3. วิธีการที่มีประสิทธิภาพ การสกัดใช้ methanolic หรือ ethanolic hydrogen chloride 1% เป็นตัวทำละลาย และใช้ soxhlet extraction apparatus เป็นเครื่องมือในการสกัด การทำหัตถวิธีใช้ วิธีทำหัตถตะกอนด้วย lead acetate ใช้ column chromatography โดยมี calcium sulfate(R.P.) และ alumina เป็น adsorbents และใช้ ion-exchange chromatography โดยมี amberlite IRC-50 เป็น resin

4. อินดิเคเตอร์ที่ได้จากวิธีการที่มีประสิทธิภาพจะเปลี่ยนสีอย่างเด่นชัดกว่า อินดิเคเตอร์ที่ได้จากวิธีการแบบง่าย

3. จำนวนร้อยละของความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการ titration เมื่อใช้อินดิเคเตอร์ที่ได้จากวิธีการบ่ง่าย เมื่อเปรียบเทียบกับอินดิเคเตอร์ที่ได้จากวิธีการแบบมีประสิทธิภาพ จะแตกต่างกันเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญ

6. วิธีการที่มีประสิทธิภาพต้องเสียค่าใช้จ่ายในการทดลองมากกว่าวิธีการบ่ง่าย เพราะต้องใช้สารเคมีที่มีราคาแพง วัสดุสูง และเครื่องมือราคาแพง

7. อินดิเคเตอร์ที่สกัดได้จากดอกไม้ทุกชนิดจะสามารถดองกลายเป็นอินดิเคเตอร์อยู่ได้เมื่อเก็บไว้ในสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นกรด และโดยเฉพาะอย่างยิ่งใน ethanolic hydrogen chloride 1%

8. pKa value ของอินดิเคเตอร์จากดอกไม้ทุกชนิดเมื่อใช้วิธีการบ่ง่ายพบว่าแตกต่างกันคือ 4.00-4.05 และแบบมีประสิทธิภาพ pKa มีค่าอยู่ระหว่าง 3.90-4.45

9. Anthocyanin ที่อยู่ในดอกไม้ชนิดต่างๆมีดังต่อไปนี้

-ดอกกลางใจยาย : Peonidin-3-rhamnoglucosido-5-glucoside, yield 2.36% (จากกลีบดอกไม้สด)

-ดอกกลางน้ำ : Peonidin-3-rhamnoglucosido-5-glucoside, yield 2.22% (จากกลีบดอกไม้สด)

-อัญชัน : Delphinidin-3,5-diglucoside, yield 2.98% (จากกลีบดอกไม้สด)

-พระโสม : Delphinidin-3-diglucoside, yield 3.45% (จากกลีบดอกไม้สด)

-ขมิ้น : Petunidin-3-monoglucoside, yield 3.48% (จากกลีบดอกไม้สด)

-พุทธรักษา : Cyanidin-3-monoglucoside, yield 3.05% (จากกลีบดอกไม้สด)

-ชวงนางใหญ่ : Petunidin-3,5-diglucoside, yield 3.41% (จากกลีบดอกไม้สด)

-เฟื่องฟ้า 1. (กลีบสีชมพู) : Pelagonidin-3-diglucoside, yield 3.41% (จากกลีบดอกไม้สด)

- ตัวอย่าง 2. (กลองสีม่วงแดง) : Cyanidin-3,5-diglucoside, yield 3.46%
(จากกลีบดอกไม้มงคล)

- ตัวอย่าง 1. (กลองสีชมพูแดง) anthocyanin 2 ชนิดรวมกัน คือ Pelagonidin-3-rhamnoglucoside และ Cyanidin-3-rhamnoglucosido-5-glucoside, yield 3.55% (จากกลีบดอกไม้มงคล)

- ตัวอย่าง 2. (กลองสีชมพูแดง) : Cyanidin-3,5-diglucoside, yield 3.92%
(จากกลีบดอกไม้มงคล)
