

ประวัติ และทฤษฎีเกี่ยวกับอินดิเคเตอร์

1.00 ประวัติ

อินดิเคเตอร์เป็นสารที่รู้จักกันมานานแล้ว เริ่มตั้งแต่ ค.ศ. 1664 Robert Boyle¹ ได้รายงานไว้ว่า เมื่อเอาน้ำเชื่อมสีม่วงที่สกัดได้จากกลีบดอกไม้น้ำตาลไปบนกระดาษสีขาว 1 หยด จากนั้นให้หยดน้ำส้มหรือกรดอื่น ๆ ลงไปบนจุดนั้นอีก 2 - 3 หยด จะพบว่าน้ำเชื่อมดังกล่าวนี้เปลี่ยนเป็นสีแดง ในทางตรงข้ามถ้าหยดสารพวกด่างลงไปจะได้สีเขียว จากการทดลองดังกล่าวนี้เองจึงทำให้นักเคมีในยุคนั้นและยุคต่อมาได้ใช้น้ำเชื่อมจากกลีบดอกไม้เป็นเครื่องชี้ถึงความเป็นกรดเป็นด่างของสารต่าง ๆ "นอกจากนี้ยังได้พบว่าอินดิเคเตอร์จากดอกไม้ดังกล่าวนี้เมื่ออยู่ในสารละลายที่เป็นกรดจะให้สีแดงใน สารละลายที่เป็นกลางจะให้สีม่วง และในสารละลายที่เป็นด่างจะให้สีม่วงหรือเขียว"² จากคุณค่าของสารอินดิเคเตอร์ดังกล่าวนี้เองจึงทำให้นักเคมีในยุคนั้นหันมาสนใจและค้นคว้าหาสารอินดิเคเตอร์มากขึ้น 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. sci ref, TP9 K57, 1978

³ Alexyev, V., "Quantitative Analysis," p.217-223, 1963. 330 SCI TP9 E56, 1968

⁴ Ibid.

และสังเคราะห์สารอินดิเคเตอร์ต่าง ๆ ขึ้นมากมาย เช่น litmus, methyl orange phenolphthalein, thymolblue เป็นต้น ปัจจุบันนี้เราพบสารอินดิเคเตอร์ที่มีอยู่ในธรรมชาติและที่สังเคราะห์ขึ้นเองมากมาย

สารอินดิเคเตอร์ที่ได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืชนั้นเริ่มต้นจากการสังเกตของ Robert Boyle (1664) และ Nehemiah Grew⁵ (1750) หลังจากนั้นก็มีนักเคมีอีกหลายคนได้กระทำกันต่อ ๆ มา เช่น Berzelius⁶ (1837), Morot⁷ (1850), Hies⁸ (1889), Glan⁹ (1892) และ Griffiths¹⁰ (1903) ซึ่งบุคคลเหล่านี้ได้ประสบความสำเร็จในการแยกและหาสารที่มีสีจากดอกไม้ให้บริสุทธิ์โดยวิธีต่าง ๆ กัน จากผลงานของ Heis กับ Glan นั้น ได้แสดงให้เห็นว่า anthocyanins ซึ่งเป็นสารที่มีสีในกลีบดอกไม้นั้นมี glucosides ที่ปราศจาก nitrogen เข้ามาคอยอยู่ด้วย ซึ่งความจริงอันนี้ได้รับการสนับสนุนอย่างหนักแน่น จากการทดลองของ Molisch¹¹ (1905) นอกจากนี้ Molisch ยังได้แสดงให้เห็นว่า anthocyanins ที่อยู่ในกลีบดอกไม้ขึ้นอยู่กับรูปของผลึก และบ่อยๆ ครั้งผลึกเหล่านี้อาจจะออกมาเกาะอยู่ที่ผิวของดอกไม้ภายนอกได้ การทดลองดังกล่าวของ Molisch ได้ถูกนักเคมีหลายคนนำไปทดลองซ้ำก็ได้ผลออกมาเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังได้มีการปรับปรุงวิธีการของ Molisch ให้ดียิ่งขึ้นอีกด้วย

ในระหว่างปี 1913 - 1917 Richard Willstatter¹² กับเพื่อนร่วมงาน ได้ทำการสกัดหาให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์ถึงสมบัติของ anthocyanins จากกลีบ -

⁵ Encyclopedia Britannica, op.cit., p.24.

⁶ Robinson, R., ENDEAVOUR, 1., 92(1942) *Sci*

⁷ Ibid.

⁸ Ibid.

⁹ Ibid.

¹⁰ Ibid.

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

¹² Willstatter, R., Naturwiss., 20, 501(1932).

ดอกไม้หลายชนิด ซึ่งเทคนิคที่ใช้นั้นแตกต่างกันออกไปตามลักษณะของดอกไม้แต่ละชนิด แต่อย่างไรก็ตามขบวนการทดลองส่วนใหญ่ยึดหลักอันเดียวกันคือสารมีสีที่แยกออกมาให้นั้นอยู่ในรูปของเกลือของกรดในสารละลายนั้น กลีบดอกไม้ที่เขานำมาสะกัดนั้นต้องทำให้แห้งจากนั้นนำไปสะกัดด้วย 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 จากดอกขาวโพกลีม่วงดำ ดอกกุหลาบสีแดง และดอกกรักรักรสีแดง ออกมาในลักษณะบริสุทธิ์ได้ และจากการทดลองต่อไปเขาพบว่าดอกไม้ทั้งสามชนิดนี้มี anthocyanin 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) การทำให้บริสุทธิ์ (purification) และการพิสูจน์ (identification) สาร anthocyanin จึงได้มีการหาเทคนิคต่าง ๆ เกี่ยวกับ chromatography ที่จะทำการ ศึกษาเกี่ยวกับสาร anthocyanins ได้เหมาะสม รวดเร็ว และเชื่อถือได้มากยิ่งขึ้น

2.00 ทฤษฎีเกี่ยวกับสารอินดิเคเตอร์

2.10 คำนำ

เป็นที่ทราบโดยทั่วกันแล้วว่าจุดที่สารสองชนิดทำปฏิกิริยากันพอดีนั้นมักจะมองไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงใด ๆ เกิดขึ้น ตัวอย่างเช่นการ titrate หาปริมาณของกรดโดยใช้ด่าง ซึ่งนิยมใช้สารอินดิเคเตอร์ใส่ลงใน system เพื่อใช้เป็นตัวบอกถึงจุดที่สารทำปฏิกิริยากันพอดี โดยสังเกตจากการเปลี่ยนสี อินดิเคเตอร์แต่ละชนิดจะมีช่วง pH ของการเปลี่ยนแปลงสีแตกต่างกันออกไปซึ่งสิ่งนี้เป็นสมบัติเฉพาะตัวของอินดิเคเตอร์และนอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับธรรมชาติของความเป็นกรดด่างของมันอีกด้วย ถ้าจะคิดกันให้ละเอียดจริง ๆ แล้วจะพบว่าจุดที่อินดิเคเตอร์เปลี่ยนสี (end point) กับจุดที่สารทำปฏิกิริยากันพอดี (equivalent point) นั้นไม่ใช่จุดเดียวกัน และช่องว่างระหว่างจุดทั้งสองนี้มีผลทำให้ขอบเขตการหาปริมาณของสารเกิดความคลาดเคลื่อน สำหรับอินดิเคเตอร์ชนิดหนึ่งกับ titrant หนึ่ง ๆ ความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นนี้จะคงที่¹⁷ (constant error) ซึ่งนิยมเรียกกันว่า "Indicator error"¹⁸ ถ้าอินดิเคเตอร์ที่เลือกมานั้นเมื่อตรวจความคลาดเคลื่อนแล้วปรากฏว่ามีมากจนเกินขอบเขตที่นำมาใช้ในงานคำนวณวิเคราะห์ไม่ได้ ตัวอย่างเช่น methyl orange¹⁹ เมื่ออยู่ในกรดจะให้สีแดงและในด่างจะให้สีเหลือง ถ้านำไปใช้ในการ titrate ระหว่าง 0.1 M sodium hydroxide กับ 0.1 M 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, V., 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 ยังพบกับปัญหายุ่งยากเกี่ยวกับช่วงของการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์อีกด้วย
คือใน system เดียวกันนี้จะต้องใช้ sodium hydroxide ถึง 4.0 ml. ในการที่จะ
ให้สีของ methyl orange เปลี่ยนจากสีส้มไปเป็นสีเหลือง ผลก็คือทำให้ค่าที่ได้จากการหา
ปริมาณแต่ละครั้งแตกต่างกันมาก จากตัวอย่างที่ยกมานี้แสดงให้เห็นว่าการเลือกใช้อินดิเคเตอร์
ชนิดที่ไม่เหมาะสมย่อมทำให้การทดลองเกิดข้อผิดพลาดได้ ในทางตรงข้ามถ้าเลือก
อินดิเคเตอร์ได้เหมาะสมก็จะทำให้การทดลองได้ผลดียิ่งขึ้น เช่นใน system เดียวกันดัง
กล่าวนั้นแต่ใช้ phenolphthalein²⁰ เป็นอินดิเคเตอร์ จะพบว่าเพียง 1 หยดของ 0.1M
ของ sodium hydroxide ก็สามารถทำให้สีของ phenolphthalein เปลี่ยนอย่างรวดเร็ว
และจากการคำนวณ พบว่า indicator error ที่เกิดขึ้นมีเพียง 0.02% เท่านั้น

2.20 ความหมายและชนิดของสารอินดิเคเตอร์

อินดิเคเตอร์²¹ คือสารประกอบชนิดหนึ่งซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีสี
และสีของมันจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่ต่างกัน การเปลี่ยนแปลงสีของมัน
ช่วยบอกพฤติกรรมของสารบางชนิดได้ จากพฤติกรรมและหน้าที่ของอินดิเคเตอร์แบ่งออกได้
เป็น 9 ชนิด คือ²²

2.2.1 Achromatic Indicator เป็นอินดิเคเตอร์ที่ได้จากการเอา
อินดิเคเตอร์หลาย ๆ ชนิดมาผสมกันเพื่อใช้ในการหาปริมาณของสารใน system ที่มีสีเมื่อถึง
end point and point-achromatic 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 เมื่อเติมอินดิเคเตอร์ชนิดนี้ลงไปตะกอนที่เกิดขึ้นนั้นจะตกเอา อินดิเคเตอร์ซึ่งเป็นสารที่มีสีเข้าไว้ในตัวมัน ผลก็คือทำให้เกิดตะกอนมีสีเกิดขึ้น ซึ่งง่ายต่อการสังเกต

2.2.3. External Indicator (outside indicator) เป็น อินดิเคเตอร์ที่ใช้อยู่นอก system เช่นใส่ไว้ใน spot plate เมื่อจะหา end point ก็นำ สารละลายจาก system มาหยดใน spot plate ที่มีอินดิเคเตอร์ แล้วสังเกตการเปลี่ยนสี

2.2.4 Fluorescence Indicator เป็นอินดิเคเตอร์ที่ใช้แสดงถึงการ เปลี่ยนแปลงทางเคมีของ system โดยการแสดงออกในรูปของการเพิ่มเติมหรือลดการเรืองแสง

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 มาก ๆ อินดิเคเตอร์ที่ใส่ลงไปนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสี

2.2.7 Turbidity Indicator เป็นอินดิเคเตอร์ที่ใส่ลงไปเพื่อแสดงจุด end point โดยการทำให้ความขุ่นของสารละลายใน system หมกไป หรือทำให้ความ ขุ่นในสารละลายนั้นเกิดการรวมตัวกันแล้วเกิดเป็นตะกอน อินดิเคเตอร์ประเภทนี้เรามัก ใช้กับสารพวก colloid

2.2.8 Universal Indicator เป็นสารผสมของอินดิเคเตอร์ หลายชนิดที่ pH ต่าง ๆ อินดิเคเตอร์ชนิดนี้จะให้สีที่แตกต่างกันออกไป

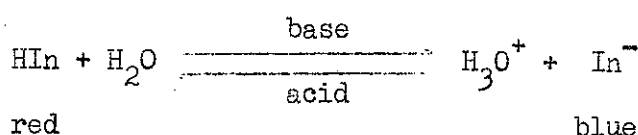
2.30 พฤติกรรมของสารอินดิเคเตอร์

2.3.1 Ionic Theory of Indicator²³

²³Alexyev, V., op.cit., p.217-223.

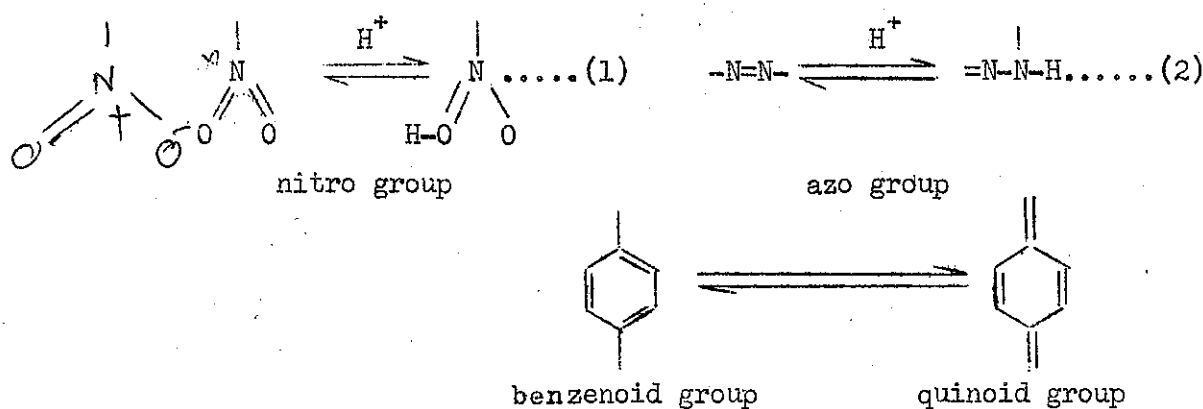
เท่าที่กล่าวมาแล้วจะเห็นได้ว่าสารอินดิเคเตอร์มีความสำคัญอย่างมากกับ volumetric analysis แต่อย่างไรก็ตาม จากหลายศตวรรษที่ 19 การค้นพบและการสังเคราะห์สารอินดิเคเตอร์ก็ยังคงเป็นของใหม่และเป็นเพียงการเริ่มต้นเท่านั้น ทั้งนี้เพราะว่าทฤษฎีทางเคมีของอินดิเคเตอร์ในสมัยนั้นขาดช่วงไม่ต่อเนื่องกัน และยังขาดพื้นฐานทางทฤษฎีของอินดิเคเตอร์ที่จะมาช่วยอธิบายพฤติกรรมของมันได้

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 และในขณะที่มันอยู่ในรูปของ ions มันจะมีสีน้ำเงิน ถ้าในสภาวะที่มีตัวทำละลายเป็นน้ำสามารถเขียนแทนด้วยสมการได้ดังนี้



เมื่อเอา litmus ละลายในน้ำ (pH 7) จะมีปริมาณของโมเลกุลที่ไม่แตกตัวเท่ากับจำนวน ions ของมัน จะได้สารละลายเป็นสีม่วง (แดง + น้ำเงิน) ถ้าหยดกรดลงไปก็จะทำให้สมดุล (equilibrium) เคลื่อนมาทางซ้าย ผลก็คือทำให้มีโมเลกุลที่ไม่แตกตัว (สีแดง) ของ litmus มากขึ้น ในทางตรงข้ามถ้าเติมด่างลงไป hydroxyl ion จากด่างจะไปรวมตัวกับ 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 สำหรับเหตุการณ์ในปัจจุบันนี้ยังเห็นว่าเป็นเหตุผลที่อ่อนมาก เพราะ Ionic Theory of Indicator นั้นกล่าวอย่างกว้างและผิวเผินเกินไป เพื่อที่จะให้มีความเข้าใจเกี่ยวกับพฤติกรรมของสารอินดิเคเตอร์อย่างลึกซึ้ง ดังนั้นต่อมาจึงได้มีหลักฐานจากการทดลองมายืนยันว่า Ionic Theory of Indicator ดังกล่าวมาแล้วข้างต้นนั้นจะนำมาอธิบายถึงการเปลี่ยนสีของสารอินดิเคเตอร์ยังไม่ถูกต้องทั้งหมด ทั้งนี้เพราะการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์เป็นผลสืบเนื่องมาจากบางส่วนของ structure ของมันเกิดการจัดเรียงตัวภายในกันใหม่ การค้นพบอันนี้ทำให้มีความเชื่อถือได้มากยิ่งขึ้น ข้อของ Chromophore Theory ได้มาจากข้อของสีของสารอินทรีย์ชนิดที่มี 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



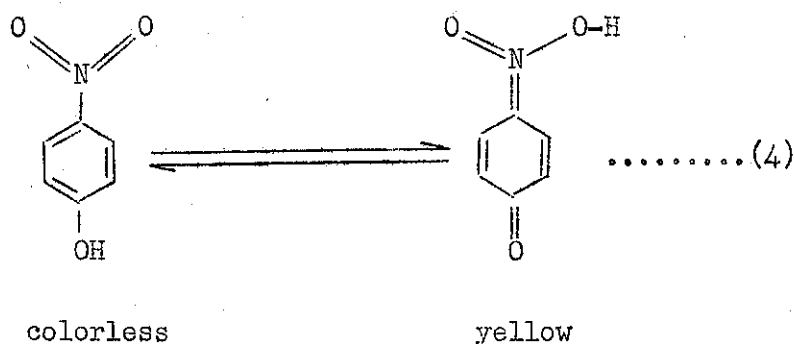
นอกจากนี้อาจจะกล่าวได้อีกว่าสีของสารอินทรีย์นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของ groups ต่าง ๆ ในโมเลกุลของมันอีกด้วย ซึ่ง groups เหล่านี้ไม่จำเป็นต้องมี double bond ซึ่งเรียกว่า "Auxochromes"²⁶ group ที่สำคัญของ auxochrome จะทำให้เกิดสีคือ

²⁴ Ibid.

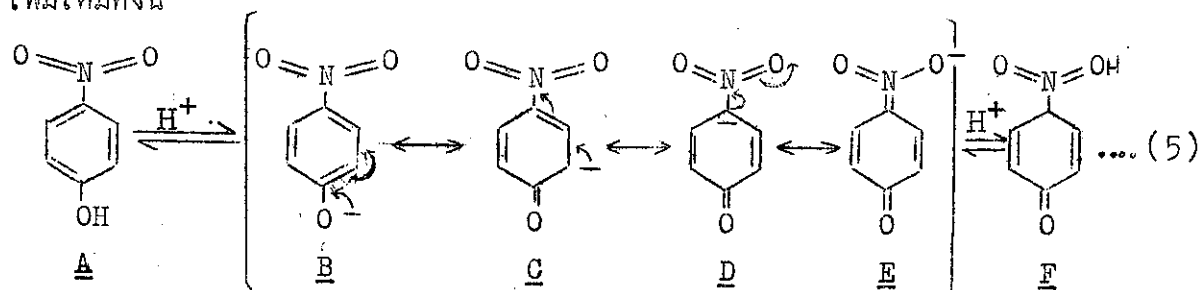
²⁵ Ibid.

²⁶ Ibid.

hydroxyl group (-OH) amino group (-NH₂) dimethyl amino group (-N(CH₃)₂) diethyl amino group (-N(C₂H₅)₂) ทั้ง auxochrome และ chromophore นั้นก็ต่างช่วยทำให้สารอินทรีย์มีสีเกิดขึ้น ถ้าโมเลกุลของสารอินทรีย์มีการเข้ามาเกาะหรือหลุดออกไปของ auxochrome หรือ chromophore ก็จะทำให้เกิดการเปลี่ยนสี ขบวนการเปลี่ยนกลับไปกลับมาอันนี้เรียกว่า "Tautomerism"²⁷ ตัวอย่างเช่น tautomerisation ของ p-nitrophenol(4) ดังนี้



2.3.3 Resonance Theory²⁸ จากสมการที่ 4 แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนจาก benzene nucleus ไปเป็น quinoid nucleus มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนสี แต่อย่างไรก็ตามการเขียนสมการดังกล่าวยังไม่มีเหตุผลสนับสนุนเพียงพอ ดังนั้นจึงต้องนำเอา resonance concept เข้ามาช่วยอธิบายเพื่อให้เข้าใจถึง mechanism ของการเกิด tautomerism ดังกล่าวนี้ด้วย ซึ่งอธิบายโดยการใช้เขียน 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 เป็นสารที่มี nitro group และ hydroxyl group มาติดอยู่กับ benzene nucleus nitro group เป็น group ที่มี electronegativity สูงมาก ทั้งนี้เนื่องมาจาก oxygen 2 atom ที่ติดอยู่กับ benzene nucleus จะดึง electron เข้าหาตัวไ้มาก ผลก็คือ electron density ภายใน benzene nucleus ไปหนาแน่นอยู่ที่ nitro group ทั้งนี้เนื่องมาจาก mesomeric effect²⁹ และทำให้ electron density ที่ hydroxyl group น้อยลง ผลก็คือทำให้ hydroxyl group เป็น negative น้อยลง ซึ่งจะทำให้ proton (H^+) จาก hydroxyl group หลุดออกไปได้ง่าย จึงทำให้เกิดการแตกตัวของประจุ หลังจากนั้นจะเกิด delocalisation ของ negative charge โดยผ่าน benzene nucleus ไปสู่ nitro group (structure B,C,D) ในที่สุดจะได้ structure E ซึ่งจะเห็นได้ว่าที่ nitro group นั้นมี negative charge มากอยู่มาก ผลก็คือมันมีความสามารถที่จะรับ proton (H^+) ได้ง่าย ซึ่งจะได้ structure F เมื่อพิจารณาารวมทั้งหมดจะเห็นคล้ายกับว่าเกิดการเคลื่อนที่ของ proton (H^+) จาก hydroxyl group ไปสู่ nitro group

การนำเอา resonance concept มาช่วยอธิบายในการเกิด tautomerism ของสารนี้จะช่วยทำให้เกิดความเข้าใจอย่างลึกซึ้งและทำให้ Chromophore Theory มีน้ำหนักมากขึ้น

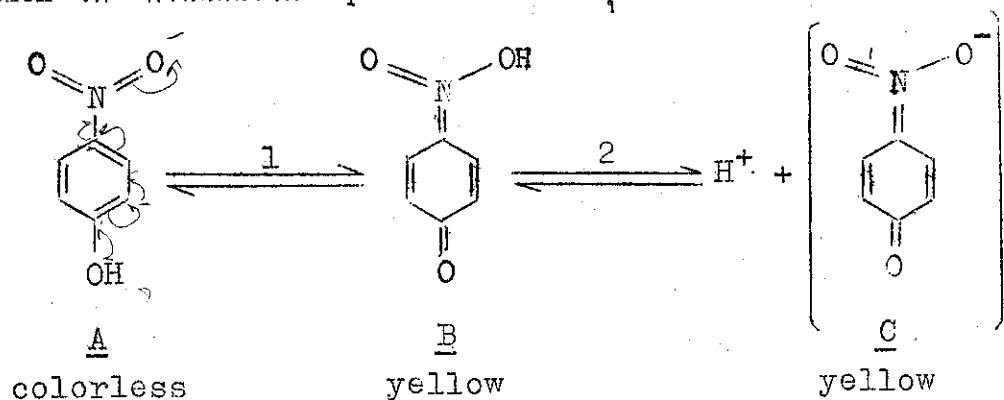
2.3.4 ความสัมพันธ์ระหว่าง Ionic Theory กับ Chromophore Theory

การอธิบายในตอนก่อนเกี่ยวกับการเกิดสีของอินดิเกเตอร์โดย Ionic Theory กับ Chromophore Theory นั้นไม่เหมือนกัน แต่ก็ไม่มีข้อมูลอะไรที่จะมาลบล้างทฤษฎีอันหนึ่งอันใดออกไปได้ และในทางตรงข้ามทฤษฎีทั้งสองนี้ต่างก็สนับสนุนซึ่งกันและกันอีกด้วย

ถ้ายอมรับว่าการที่อินดิเกเตอร์เกิดการเปลี่ยนสีนั้นเนื่องมาจากมีการเปลี่ยนโครงสร้างภายใน ดังนั้นปัญหาที่คิดตามมาก็คือ ทำไมจึงเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง คำตอบที่สำหรับคำถามอันนี้จะคงเอา 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 ($O=N-OH$) หรือ nitrous acid ($O=N-OH$) ดังนั้น p-nitrophenol จึงมีสมบัติเป็นกรด คือสามารถให้ proton (H^+) ใน aqueous solution ได้ ดังนั้นมันจึงมี equilibrium ได้ 2 จุดคือ



สมดุล 1 ระหว่าง tautomers

สมดุล 2 ระหว่าง dissociation

ลักษณะของสมดุลดังกล่าวนี้ทำให้ง่ายต่อการอธิบายถึงการเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องของมัน ถ้าสารละลายเป็นสีเหลืองแสดงว่า p-nitrophenol จะต้องอยู่ใน form C และที่สมดุลก็จะต้องมีโมเลกุลที่ไม่แตกตัว (form B) รวมอยู่ด้วย เมื่อเติมกรดลงไปก็จะเป็นการดึงเอาสมดุล 2 ให้ไปอยู่ทางซ้ายมือเพราะ anion C จะรวมตัวกับ proton (H^+) ที่ได้จากกรดกลายเป็นโมเลกุลที่ไม่แตกตัวการเปลี่ยนในขั้นนี้จะไม่มีการเปลี่ยนสีแต่อย่างใด แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่ม form B ก็ย่อมจะทำให้สมดุล 1 เปลี่ยนไปด้วยคือบางส่วนของ form B จะกลับมามีอยู่ใน form A ซึ่งเป็น tautomer ที่ไม่มีสี ดังนั้นปรากฏการณ์ที่สังเกตได้ก็คือสีเหลืองจะหายไป และปรากฏการณ์นี้จะเกิดในทางตรงข้ามถ้าเติมด่างลงไป ใน system

จะเห็นได้ว่าทั้งสองทฤษฎีนี้มีความสัมพันธ์กันอย่างแนบแน่น ดังนั้นต่อมาจึงได้รวมสองทฤษฎีนี้เข้าด้วยกันเรียกว่า "Ionic-chromophore Theory of Indicator"³⁰ จากผลอันนี้ทำให้ได้ข้อคิดที่ว่า ไม่ว่า dissociation จะเกิดขึ้นเมื่อไรก็ตาม tautomerism ย่อมจะเกิดขึ้นควบเสมอ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้การเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ไม่เป็นไปอย่างรวดเร็ว

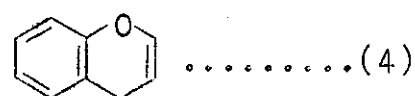
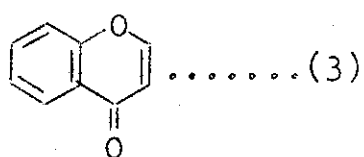
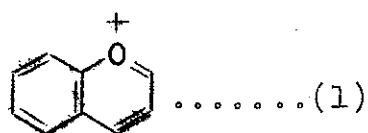
2.40 อินดิเคเตอร์จากสารธรรมชาติ

2.4.1 ถั่ว ในประเทศที่เจริญก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์สารอินดิเคเตอร์ส่วนใหญ่ได้มาจากการสังเคราะห์เพราะทำได้ง่าย ราคาถูก และมีวัตถุดิบพร้อม แต่ในประเทศไทยสารอินดิเคเตอร์มีราคาค่อนข้างสูงทั้งนี้เพราะต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ และการสังเคราะห์ขึ้นใช้เองก็ทำได้ยากเพราะยังขาดวัตถุดิบและอุปกรณ์หลายอย่าง ตลอดจนราคาการลงทุนที่สูง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องเปลี่ยนความสนใจจากอินดิเคเตอร์สังเคราะห์มาสู่อินดิเคเตอร์ที่ได้จากธรรมชาติ เพราะส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ดอก ใบ ราก ฯลฯ ที่มีสีมักจะมีสารอินดิเคเตอร์ จากการศึกษานักเคมีในตอนต้นศตวรรษที่ 20 พบว่าสารอินดิเคเตอร์ดังกล่าวนี้จัดอยู่ในพวก Benzopyrylium salts³¹ ซึ่งมีสารประกอบอินทรีย์หลายชนิดที่เราจัดอยู่ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ได้แก่สารที่อยู่ในอาณาจักรของพืช derivative ที่สำคัญของ Benzopyrylium cation (1) ก็คือสีแดง สีม่วง สีส้ม น้ำเงิน ที่มีอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของพืช ได้แก่ Anthocyanin³² ส่วนสีเหลืองที่มีอยู่ในพืชนั้นเป็น derivative ของ Benzo-2-pyrone (2) และ Benzo-4-pyrone (3) ส่วน Benzopyran (4) ใช้เป็นสารเริ่มต้นในการสังเคราะห์สารต่าง ๆ ที่อยู่ในกลุ่มนี้

³⁰ Alexyev, V., loc.cit.

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

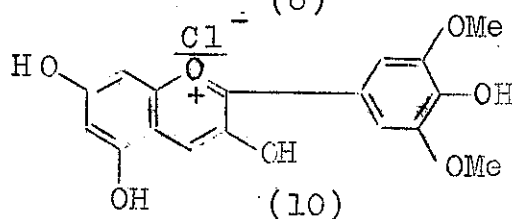
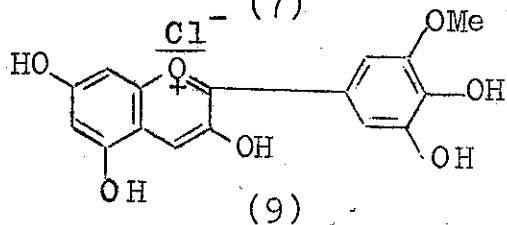
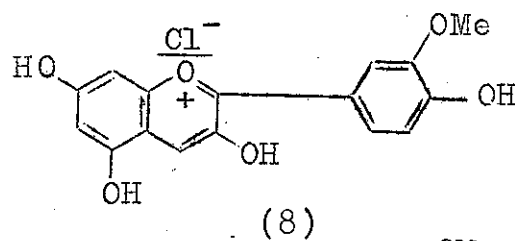
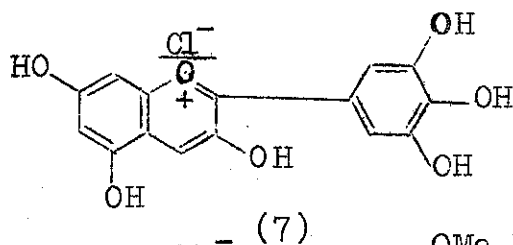
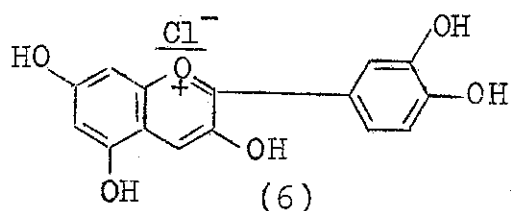
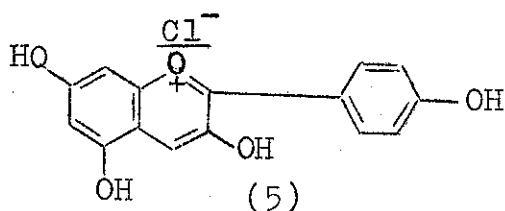
³² Ibid.



2.4.2. The Anthocyanins.

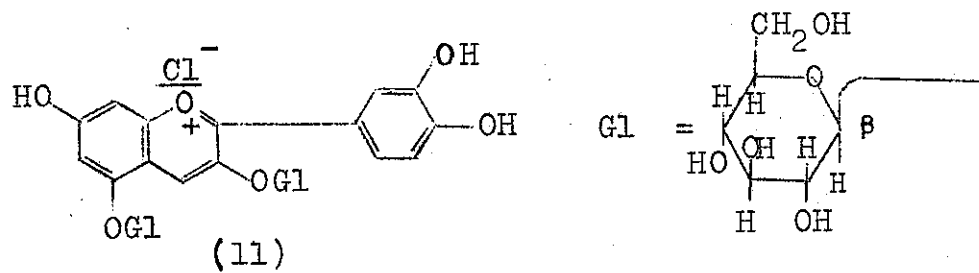
Anthocyanidins³³ ทุกตัวเป็น hydroxy derivatives

ของ 2 - phenyl benzopyrylium cation (หรือ flavylium) และในบางครั้ง
อาจจะมี methoxy group และ 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 ดังกล่าวนี้โดย 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 ดังกล่าวนี้อาจจะติดอยู่กับ phenolic hydroxyl group ของ flavylium nucleus หรืออาจติดอยู่กับ hydroxyl group ของ sugar residue ก็ได้

2.4.3 Chemistry of Anthocyanins

การศึกษาถึงสมบัติทางเคมีของ anthocyanins ได้กระทำกัน เรื่อยมาตั้งแต่ปี 1905 - 1940 ซึ่งส่วนใหญ่ศึกษา anthocyanidin ซึ่งเป็นผลที่ได้ จากการ hydrolyse anthocyanin ด้วยกรดที่ร้อน 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 ชนิดอื่นอาจจะให้สีน้ำเงินที่จางมากหรือไม่ก็สีเกิดขึ้นเลย

2. ถ้าเอาสารละลายเจือจางของ sodium hydroxide เติมลงไปแล้ว เขย่าใหม่ผสมกับอากาศ 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

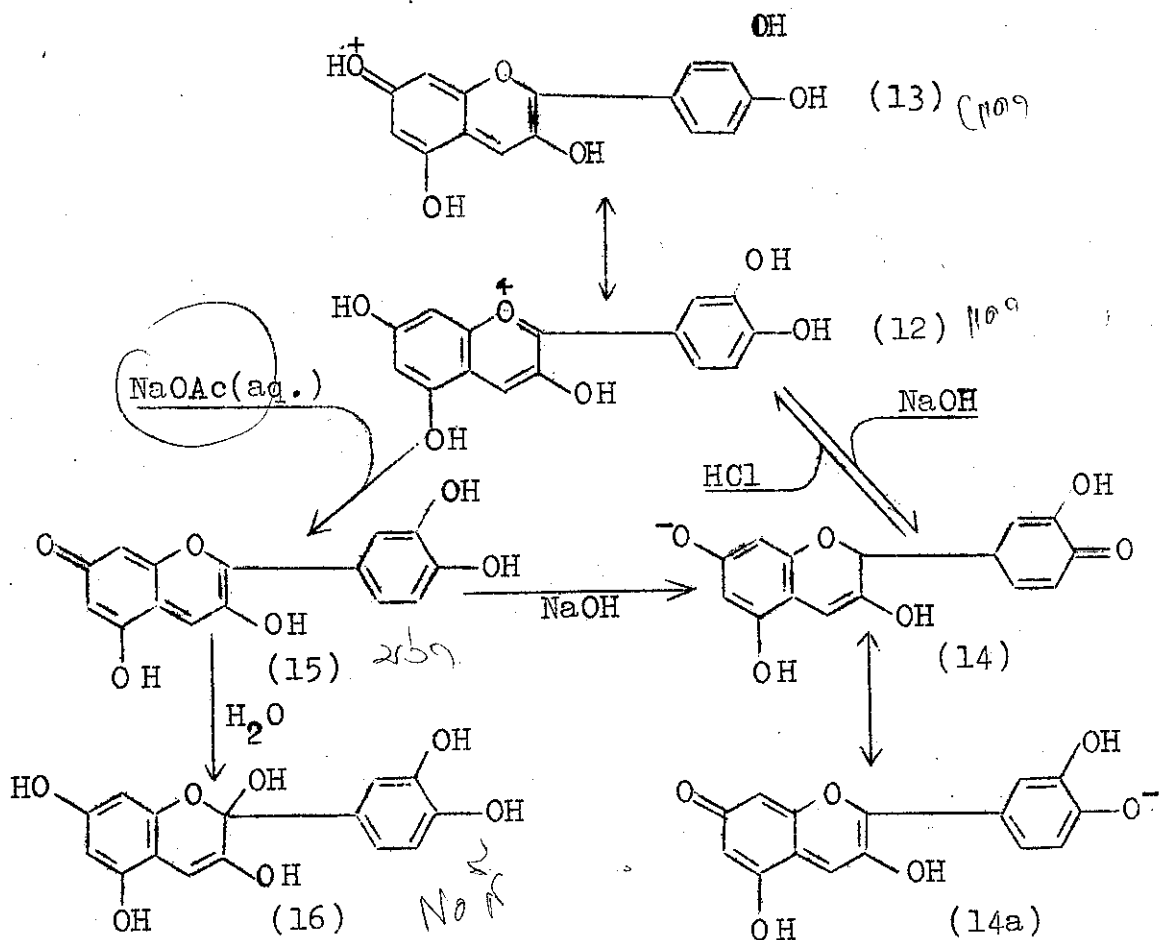
³⁷ Robinson, R., and others., J. Chem. Soc., part I-III (1934).

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 จึงทำให้ผลการวิเคราะห์ได้ผลเป็นที่เชื่อถือมากยิ่งขึ้น โดยทั่วไป anthocyanin และ anthocyanidin จะมีสมบัติทางเคมีคล้ายกัน จะแตกต่างกันบ้างก็เกี่ยวกับเรื่องสมบัติเฉพาะตัว ดังนั้นการพิสูจน์ anthocyanin โดย color reaction จึงมักใช้ known กับ unknown เปรียบเทียบกันเสมอ ได้มีผู้นอธิบายเกี่ยวกับ 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 จืดลง ๆ จนไม่มีสี การเกิดสีม่วงนั้นอธิบายได้ว่าการเกิด form quinoid base (15)

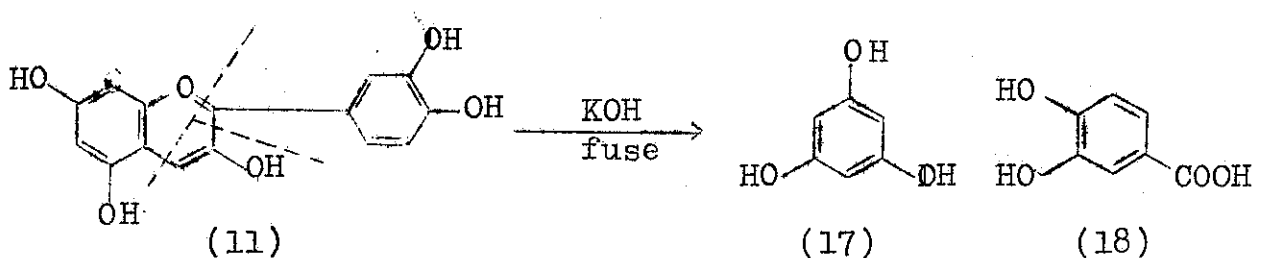


แล้วรวมตัวกับน้ำใน system จะให้ conjugated carbinol (16) ซึ่งไม่มีสีผลก็คือ quinoid base (15) จะลดลง จนในที่สุดสีจะจางหายไป cyanidin (11) กับ sodium hydroxide (pH 11) จะทำให้สีน้ำเงินเข้มขึ้น อธิบายได้ว่ามันเกิดการ form resonance anion ซึ่งอาจจะเป็นได้ทั้ง (14) และ (14a) ถ้านำมา acidified จะได้ cyanidin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

สำหรับ mechanism เกี่ยวกับการเปลี่ยนสีของ anthocyanidins ชนิดอื่นก็สามารถอธิบายได้ในทำนองเดียวกันนี้

2.4.4 โครงสร้างของ Anthocyanidins.

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



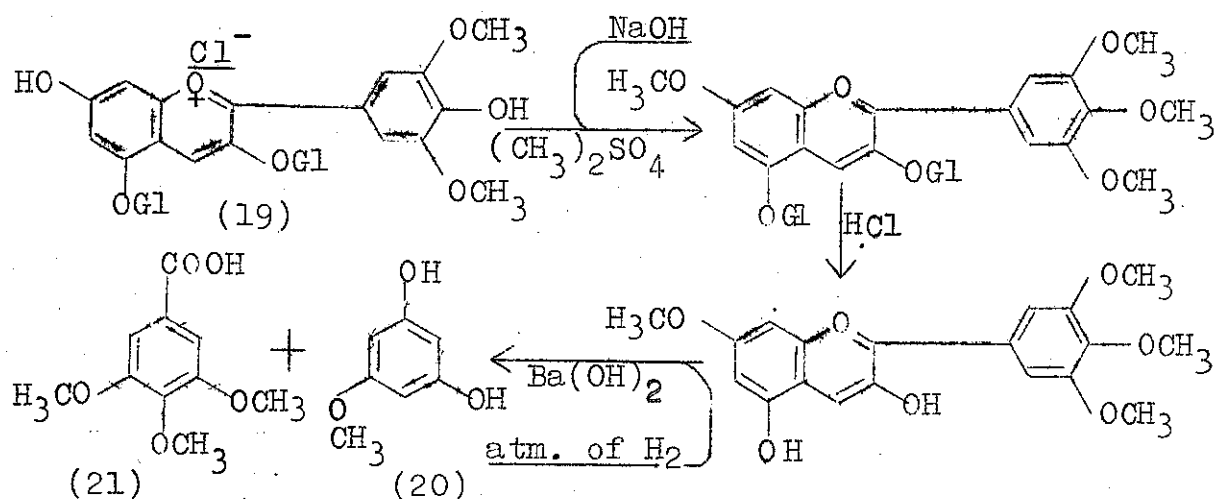
วิธีนี้ไม่ทำให้ทราบโครงสร้างโดยละเอียดของ anthocyanidin ได้ทั้งนี้เพราะว่า anthocyanidin ที่มี methoxyl group เช่น (8), (9), (10) จะถูกทำลายด้วยในขณะที่ anthocyanidin เกิด degradation ดังนั้นจึงไม่ทราบตำแหน่งของ methoxy group ของสารเริ่มต้น แต่ปัญหาดังกล่าวนี้ได้หมดไป จากผลงานของ

⁴¹ Willstater, R., Ann., 412, 189(1916).

Karrer⁴² กับเพื่อนร่วมงาน ได้ทำการทดลองในปี 1927 เขาได้ทำ degradation สาร anthocyanidin ด้วย barium hydroxide 10% หรือใช้ sodium hydroxide ในบรรยากาศของ hydrogen โดยวิธีนี้จะทำให้ methoxyl group คงอยู่ตามเดิม

ปัญหาต่อไปก็คือการหาตำแหน่งของน้ำตาลที่มาเกาะอยู่กับ anthocyanidin ดังตัวอย่างการทดลองต่อไปนี้

1. Karrer⁴³ กับเพื่อนร่วมงานได้ทำการ methylated anthocyanin จากนั้น removed เอน้ำตาลออกโดยการ hydrolyze ด้วย hydrochloric acid และท้ายสุด hydrolyze ด้วย barium hydroxide ในบรรยากาศของ hydrogen ตำแหน่งของ hydroxyl group อิสระที่เกิดขึ้นในครั้งสุดท้ายนี้ก็คือตำแหน่งของน้ำตาลที่อยู่เดิม แต่อย่างไรก็ตามการตีความหมายดังกล่าวนี้จะไม่ให้ผลแน่นอนเสมอไปเพราะการ methylation นั้นปฏิกิริยาอาจจะเกิดไม่สมบูรณ์ก็ได้

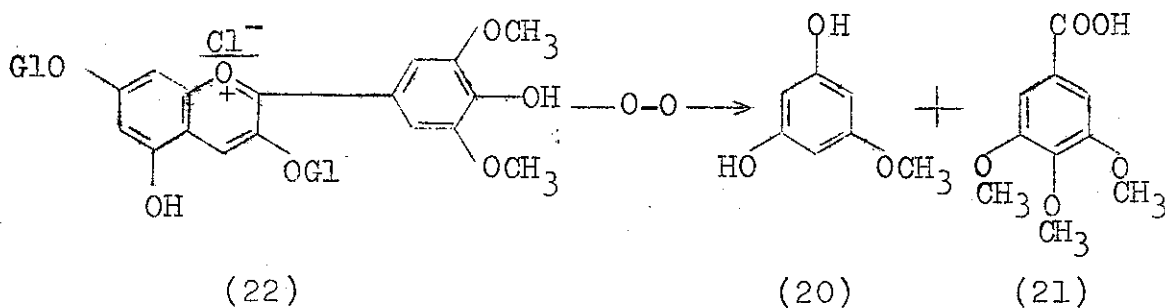
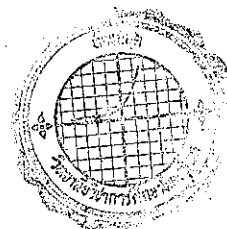


จะเห็นได้ว่าถ้าเริ่มต้นด้วย malvidin-3,5-diglucoside products สุดท้ายที่ได้คือ (20) กับ (21) แต่อย่างไรก็ตามถ้าเริ่มต้นด้วย malvidin-3,7-diglucoside (22) จะได้ products สุดท้ายออกมาแบบเดียวกัน (20,21) นั่นคือข้อเสีย

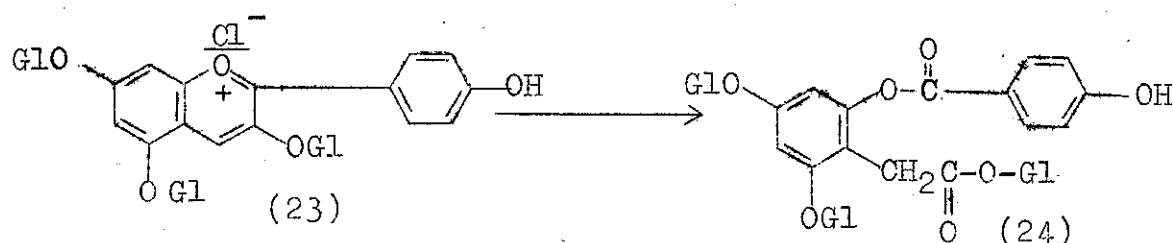
⁴² Karrer, P., Widmer, R., Hiirlimann, W., and Nievegelt, O., *Helv. Chim. Acta.*, 10, 758(1927).

⁴³ *Ibid.*

ของวิธีนี้



2. Karrer⁴⁴ กับเพื่อนร่วมงานได้ใช้ hydrogen peroxide 15% ทำปฏิกิริยากับ anthocyanins ดังแสดงในสมการ



ถ้า anthocyanin มีสูตรเป็น (23) แล้ว จะได้สาร (24) ออกมาซึ่งสามารถ hydrolyze ได้อย่างสมบูรณ์โดยใช้ dilute ammonia solution แต่ถ้า anthocyanin มี glucose อยู่ในตำแหน่งที่ 5 หรือ 7 product ที่ได้จะสามารถ remove glucose ออกจากตัวมันได้ก็ต่อเมื่อใช้ dilute hydrochloric acid ที่เคี่ยวเท่านั้น ดังนั้นการที่มี glucose ในตำแหน่งที่ 3 จึงแตกต่างไปจากการมี glucose ในตำแหน่งที่ 5 และ 7 แต่อย่างไรก็ตาม glucose ในตำแหน่งที่ 5 และ 7 ถ้าทดสอบโดยวิธีนี้จะไม่แตกต่างกัน

3. Robinson⁴⁵ กับเพื่อนร่วมงานได้ทำการศึกษาพบว่า anthocyanins ที่มี hydroxyl group อิสระในตำแหน่งที่ 3 จะถูก oxidised ได้อย่างสมบูรณ์โดย ferric chloride solution และ anthocyanin ดังกล่าวนั้นจะถูก oxidised ทำให้สีหมดไปอย่างรวดเร็ว

⁴⁴ Ibid.

⁴⁵ Robinson, R., *J. Chem. Soc.*, 2722(1931).

การทดลองทั้งสามวิธีที่กล่าวมานี้เมื่อนำมารวมกันก็พอจะเป็นเครื่องทำนายได้ว่า น้ำตาลที่เกาะอยู่กับ anthocyanidin นั้นอยู่ในตำแหน่งใด อย่างไรก็ตามเพื่อให้การทดลองเป็นที่เชื่อถือได้มากขึ้น ควรจะสนับสนุนผลการทดลองนี้โดยการสังเคราะห์ anthocyanin แล้วนำมาทำการทดลองในแบบเดียวกันนี้เพื่อเปรียบเทียบกัน

2.4.5 Chromatographic Purification and Identification of

Anthocyanin Pigments.

ในระยะแรกเริ่มของการศึกษาเกี่ยวกับสาร anthocyanin จากธรรมชาติ การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ส่วนใหญ่ได้มาจากวิธีทำให้ตกตะกอนในรูปของเกลือของตะกั่ว หรือการแยกออกจากกันโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ แล้วมาทำให้ตกตะกอนด้วย ether วิธีการดังกล่าวนี้จะทำให้ได้สาร anthocyanin ที่มี impurity ปนอยู่บ้าง ดังนั้นขอมูลต่าง ๆ เช่น absorption spectra, colour reaction เกี่ยวกับสารเหล่านี้จึงยังยากสืบค้นกันมอย ๆ จนกระทั่งในปี 1948 Bate-Smith^{46,47} ได้ประสบความสำเร็จในการใช้ 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) มีข้อที่น่าสังเกตอยู่ว่า Rf value เหล่านี้มีส่วนสัมพันธ์กับโครงสร้างของมันอย่างใกล้ชิด ซึ่งมีนักเคมีหลายคนได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้เช่น 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, R.G., Biochim. Biophys. Acta, 4, 427(1950).

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

และ Wood⁵⁰ ซึ่งได้สรุปความสัมพันธ์ไว้ดังนี้

1. Anthocyanidin ที่มีจำนวน hydroxyl group มากจะมี Rf value ต่ำ ทั้งใน solvent system ของ Bu-HCl, BAW, 1% HCl และ HAc-HCl (ดูสัญญาลักษณ์ของ 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 - คอย 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.A., 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 แต่ที่น่าสนใจมีอยู่ 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 วิธีดังกล่าวนี้ให้ผลดีกว่าว่าการปริมาณเพียงเล็กน้อย แต่ในกรณีที่ต้องการสารเป็นปริมาณมาก ต้องใช้ column chromatography แม้ว่า column chromatography จะสามารถแยก anthocyanin ออกมาได้เป็นปริมาณมากก็ตามแต่การที่จะแยกเอา anthocyanins ชนิดต่าง ๆ ออกจากกันได้นั้นจึงมีประสิทธิภาพดี 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 นอกจากนี้ยังมีปัญหายุ่งยากเกี่ยวกับการเลือก adsorbent อีกด้วย เพราะ anthocyanin มักจะถูกดูดเอาไว้อย่างเหนียวแน่นใน column ของ basic salt เช่น alumina และยากต่อการใช้ 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-rhamnoglucoside กับ 3-diglucoside ของ cyanidin ออกจากกันได้โดยใช้ column ของ silicic acid และใช้ BAW เป็น eluent

Endo⁶⁹ ได้ประสบความสำเร็จในการแยก anthocyanins 6 ชนิดออกจากกันได้โดยใช้ cellulose powder แต่เขาพบว่าการที่จะแยกออกจากกันได้ ดีหรือไม่

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 จึงจะได้ผลดี จะเห็นได้ว่าการใช้ column chromatography ในการแยก anthocyanins นั้น ใช้ได้พอสมควรแต่ก็นับว่ายังอยู่ในวงจำกัดเพราะมันเป็นสารที่ถูกดูดไว้อย่างเหนียวแน่นใน basic salts column ดังนั้นสิ่งสำคัญอีกประการหนึ่ง ก็คือ การเลือก eluents ที่เหมาะสม โดยทั่วไปแล้วใช้น้ำเป็นตัว remove impurities ออกจาก column หลังจากนั้นจึง remove ตัวมันออกด้วย methanolic hydrochloric acid หรือ BAW นอกจาก adsorbents ดังกล่าวมาแล้วอาจจะใช้ 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 ถ้าสารตัวนั้นมี acyl linkage จะมีจุด 2 จุดเกิดขึ้น จุดที่เป็น major spot จะมี Rf value สูงกว่า minor spot แม้จะคัดเอาเฉพาะ major spot ไปทำ paper chromatography ซ้ำอีกครั้งก็จะได้ออกมา 2 จุดอีกเช่นเดียวกัน พฤติกรรมนี้พบโดย Dodds กับ Long⁷³ ซึ่งต่อมาเขาได้ทราบความจริงว่ามันเนื่องมาจาก acyl linkage

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

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

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

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

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

3.00 สรุป

Anthocyanin เป็นสารที่ได้จากดอกไม้ซึ่งใช้เป็น indicator นั้น พบครั้งแรกในกลางศตวรรษที่ 17 แรก ๆ นิยมใช้เป็น indicator สำหรับการบอกถึงความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย ต่อมาเริ่มมาทำการค้นคว้าหาวิธีละเอียดกันมากขึ้น ในราวปลายศตวรรษที่ 19 ถึงต้นศตวรรษที่ 20 คุณค่าในด้านของการใช้เป็นอินดิเคเตอร์ได้ลดลงเพราะได้มีการสังเคราะห์ indicator ตัวอื่นที่ปลอดภัยกว่า และนอกจากนี้ในระยะนั้นได้เริ่มหันความสนใจจากสารอินดิเคเตอร์มาใช้เครื่องมือเป็นเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่างของสารละลายแทน เช่น pH-meter

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

⁷⁴ Geissman, T.H., and Harborne, J.B., loc.cit

⁷⁵ Bate-Smith, E.C., loc.cit.

⁷⁶ William, A.H., loc.cit.

จนปัจจุบันนี้มีความรู้เกี่ยวกับสาร anthocyanins จากธรรมชาติมีมากพอสมควร

มีข้อสงสัยเกี่ยวกับสาร anthocyanins ที่ได้จากดอกไม้ในส่วนใหญ่ว่าการ
กันความกับดอกไม้ในประเทศหนาวทั้งสิ้น