

บทที่ 3

วิธีทดลองและข้อมูลที่ไดจากการทดลอง

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. สวนคอกไม้อำเภอบางแคและอำเภอดำรงวิทย์ จังหวัดธนบุรี และอำเภอรังสิต 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	ฤดูที่ออกดอก
ผักบุ้ง	<i>Ipomoea reptans</i> Poir.	หนองน้ำริมถนน ชานเมือง	ม่วงอ่อน	หนาว
ผักตบชวา	<i>Eichhornia crassipes</i> Solms Laub	หนองน้ำริมถนน ชานเมือง	ม่วงอ่อน	หนาว
ทองหลางใบลาย (Coral Tree)	<i>Erythrina variegata</i> Linn. Var. <i>picta</i> Hort.	สวนทุเรียนธนบุรี และนนทบุรี	แดงสด	หนาว
ทองหลางน้ำ	<i>Erythrina fusca</i> Lour	สวนทุเรียนธนบุรี และนนทบุรี	แดงสด	หนาว
คอยติ่ง	<i>Solanum spirale</i> Roxb	ริมถนนชานเมือง	ม่วงอ่อน	ตลอดปี
เฟื่องฟ้า	<i>Bougainvillea specta-</i> <i>bilis</i> Willdenow	บ้านเรือนที่อยู่อาศัย	แดง	ตลอดปี
ตีนทม	<i>Thunbergia erecta</i> T.	สถานที่ราชการ	ขาว	ตลอดปี
(Plumeria)	<i>Ander vai cearulea</i> Hort	และบ้าน		
อัญชัน (Butterfly Pea)	<i>Cliteria ternatea</i> Linnaeus	ริ้วบ้านและป่าละเมาะ	น้ำเงิน	ตลอดปี
เข็ม (Ixora)	<i>Ixora macrothyrsa</i> Teysm- ann and Binnendijk	สถานที่ราชการ และบ้าน	แดงสด	ตลอดปี

¹ ปิยะ บุณนาค ไม้ดอกไม้ประดับ พ.ศ. 2511 563 หน้า.

² เสี่ยม พงษ์บุตร ไม้เทศเมืองไทย พ.ศ. 2508 596 หน้า.

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

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

ตาราง 1. (ต่อ)

ชื่อสามัญ	ชื่อพันธุ์ 1,2,3,4,	แหล่งที่พบ	สีของดอก	ฤดูที่ออกดอก
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 cathorlica</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</i> Sinensis Linn	สถานที่ราชการ, บ้าน	แดง	ตลอดปี
ยี่โถ	<i>Nerium oleander</i> Linn	สถานที่ราชการ, บ้าน	แดง	ฝน-หนาว
เขอริบรา	<i>Gerbera jamesonii</i> Bolus	สวนดอกไม้, ตลาดดอกไม้	แดง	ตลอดปี
กุหลาบ	<i>Rosa</i> spp. <i>canna</i> & <i>iridiflora</i>	ทั่วไป	แดงส้ม	ตลอดปี

ตาราง 1. (ต่อ)

ชื่อสามัญ	ชื่อพันธุ์ 1,2,3,4,	แหล่งที่พบ	สีของดอก	ฤดูที่ออกดอก
พุทธรักษา	Cannaceae, Canna Flacida Linn	ริมน้ำ, ไร่บ้าน	แดงเข้ม	ตลอดปี
ชองนาง (ใหญ่) (Bush Thun- bergia)	Thunbergia erecta T. Anderson vai 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
ศรีตรัง	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 Sambae Solander	ตลาดดอกไม้	ขาว	ตลอดปี
รัก	Calotropis gigantea Linn. Aiton	ตลาดดอกไม้, ป่าละเมาะ	ม่วงอ่อน	ตลอดปี
เถาวัลย์ (ลูก)	Parthenocissus Quinquefolia	ป่าละเมาะ	ม่วงดำ	ฝน-หนาว

2.00 การทดสอบสารอินดิเคเตอร์ในดอกไม้และการคัดเลือกพันธุ์สุดท้าย

2.10 การทดสอบ

นำกลีบดอกไม้สดแต่ละชนิดทั้งที่ได้แสดงไว้ในตาราง 1. มาชนิดละ 15 กรัม บดในครก (mortar) ให้ละเอียด แล้วใช้ช้อนตักใส่ใน conical flask ขนาด 150 ml. เติม ethanol 95 % B.P ลงไป 25 ml. เขย่า 3 นาทีทุก ๆ 10 นาที เป็นเวลา 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. แกว่งเบา ๆ แล้วสังเกตสีของสารละลายใน beaker แต่ละใบ ตั้งทิ้งไว้ 1 นาทีแล้วสังเกตสีอีกครั้ง

ทำการทดลองเช่นนี้จนครบดอกไม้ทั้ง 30 ชนิด และดอกไม้แต่ละชนิดทำการทดลองซ้ำสองครั้ง ผลการทดลองดังแสดงไว้ในตารางที่ 2. (หน้า 39)

2.20 การคัดเลือกพันธุ์สุดท้าย

หลังจากการสำรวจและทดสอบสารอินดิเคเตอร์จากดอกไม้ทั้ง 30 ชนิด ดังได้แสดงไว้ในตาราง 1. และ 2. แล้ว จึงได้ทำการคัดเลือกพันธุ์สุดท้ายเพื่อเลือกเอาดอกไม้ชนิดที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการนำมาทำเป็นอินดิเคเตอร์ 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 โซ่เป็นตัวแทนตัวอย่าง การสกัดวิธีนี้ใช้ได้กับดอกไม้ที่มีสีม่วงและสีน้ำเงิน ได้แก่ ดอกของนางใหญ่ และดอกอัญชัน (สีน้ำเงิน)

เอาเมล็ดของนางใหญ่(หรือดอกอัญชัน) สด 10 กรัม มาบดให้ละเอียดพอสมควร .
(ถ้าละเอียดเกินไปจะยากต่อการกรอง) เอา spatula ตักใส่ conical flask
(หรือคนโทกลม) ขนาด 250 ml. เติมน้ำลงไปให้พอท่วมเมล็ดดอกไม้ (40 ml.) เขย่า
ครั้งละ 5 นาทีทุก ๆ 15 นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองเก็บสารละลาย
(filtrate) ที่ได้เอาไว้ กากที่เหลือเทกลับคืนลงใน flask แล้วเติมน้ำลงไปใหม่
(35 ml.) ทำการสกัดเช่นเดิมอีก ทำซ้ำเช่นนี้ 4 ครั้ง เอาสารละลายที่ได้แต่ละครั้ง
มารวมกัน (140 ml.) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.1.2 ใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย การสกัดวิธีนี้ให้ผลดีกับดอกไม้
ที่มีสีน้ำเงิน และสีม่วง ได้แก่มะกอกอัญชันและดอกของนางใหญ่ วิธีทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ

3.1.1 ใช้ดอกอัญชัน (หรือดอกของนางใหญ่) 10 กรัม สกัดด้วย methanol ครั้งละ
40 ml. สกัดซ้ำสามครั้ง เอาสารละลายที่สกัดได้มารวมกัน (98 ml.) เพื่อนำไป
ใช้ในการทดลองต่อไป

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

ใช้เมล็ดดอกกุหลาบ 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
ผักตบชวา	ม่วงอ่อน	แดงอ่อน	แดงอ่อน	เขียวเหลือง	เหลือง
ทองหลางใบลาย	แดงสดแกมส้ม	แดงสด	แดงสด	เขียว	เหลืองแกมเขียว
ทองหลางน้ำ	แดงสดแกมส้ม	แดงสด	แดงสด	เขียว	เหลืองแกมเขียว
คอกทิ้ง	ม่วงอ่อน	แดงสด	แดงสด	เขียวเหลือง	เหลือง (สีชา)
เฟื่องฟ้า	แดงสด	แดงสด	แดงสด	เขียว	เหลืองแกมเขียว
ต้นทม	ขาว	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เหลือง	เหลือง
อัญชัน	น้ำเงิน	แดงสด	แดงสด	เขียว	เหลืองแกมเขียว
อัญชัน	ขาว	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เหลือง	เหลือง
เข็ม	แดงสด	แดงสด	แดงสด	เขียว	เหลืองแกมเขียว
ดาวเรือง	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
บัวกินสาย	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
เยอร์บีรา	แดงสด	แดงสด	แดงสด	เขียว	เหลืองแกมเขียว

ตาราง 2 . (ต่อ)

ชื่อดอกไม้	สีของดอก	สีเมื่ออยู่ในกรก		สีเมื่ออยู่ในต่าง	
		ตั้งเกดครั้งแรก	ตั้งเกดครั้งหลัง	ตั้งเกดครั้งแรก	ตั้งเกดครั้งหลัง
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	เมื่อกะปราง	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
เดากัน (ลูก)	ม่วงดำ	แดง	แดง	ม่วง - เขียว	เขียวเหลือง

ตาราง 3. แสดงผลการคัดเลือกดอกไม้ชั้นสุดท้าย

ชื่อดอกไม้ (ชื่อสามัญ)	ชื่อพันธุ์	สีของดอก	เหตุผล
ทองหลางใบลาย (Coral Tree)	<i>Erythrina variegata</i> Linn. Var <i>picta</i> Hort	แดงส้ม	มีสารอินดิเกเตอร์ในดอกมาก หาได้ง่าย ไม่ต้องซื้อ มีปริมาณมาก
ทองหลางน้ำ	<i>Erythrina fusca</i> Lour	แดงส้ม	มีสารอินดิเกเตอร์ในดอกมาก หาได้ง่าย ไม่ต้องซื้อ มีปริมาณมาก
อัญชัน (Butterfly Poa)	<i>Clitoria ternatea</i> Linn.	น้ำเงิน	มีสารอินดิเกเตอร์ในดอกมาก หาได้ง่าย มีปริมาณมาก
พระโขนง (Chinese Hibiscus)	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> Linn.	แดง	มีสารอินดิเกเตอร์มาก หาได้ง่าย มีปริมาณมาก
ทิว	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> Linn.	แดง	มีสารอินดิเกเตอร์ในดอกมาก หาได้ง่าย มีปริมาณมาก
พุดริ้ว (Cannaceae)	<i>Canna Flaccida</i> Linn.	แดง	มีสารอินดิเกเตอร์ในดอกมาก หาได้ง่าย มีปริมาณมาก
ทองนางใหญ่ (Bush Thunbergia)	<i>Thunbergia erecta</i> T. Anderson var <i>caerulea</i> Hort.	ม่วงดำ	มีสารอินดิเกเตอร์ในดอกมาก นิยมปลูกตามบ้าน
เฟื่องฟ้า 1 (Bougainvilleas)	<i>Bougainvillea spectabilis</i> Willdenow	แดงส้ม	มีสารอินดิเกเตอร์ในดอกมาก หาง่าย มีปริมาณมาก
เฟื่องฟ้า 2 (Bougainvilleas)	<i>Bougainvillea spectabilis</i> Willdenow	แดง	มีสารอินดิเกเตอร์ในดอกมาก หาได้ง่าย มีปริมาณมาก
กุหลาบ 1 (Fusilier)	<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 ใช้สุรา 40 ดีกรี เป็นตัวทำละลาย วิธีนี้ใช้ได้กับดอกไม้ทุกชนิดที่มีสีแดง 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.) มากด้นใหม่เก็บเฉพาะ fraction ที่เดือดที่ 61 - 65 °C เอา methanol ที่กลั่นใหม่ 124 ml. ผสมกับ hydrochloric acid 37 % (I.P.) 2 ml. จะได้ methanolic hydrogen chloride 1% (w/w) สำหรับดอกไม้ทุกชนิดมีวิธีการสกัดเหมือนกันดังนี้ เอากลีบดอกไม้สดล้างน้ำให้สะอาด นำไปอบใน oven ที่อุณหภูมิ 80 - 90 °C เป็นเวลา 4 - 5 ชั่วโมง นำเอาออกมาบด ให้ละเอียดพอสมควร (ละเอียดมากไปจะยากต่อการกรอง) ชั่งกลีบดอกไม้ที่บดแล้ว 10 กรัม ใส่ในคอนโทกลสมขนาด 200 ml. เติมน 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 (1934).

2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองเอา filtrate เก็บไว้ กากที่เหลือเทคืนลงคนโท
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
เหมือนกันกับข้อ 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
นำถุงไปตากให้แห้งสนิท นำกลีบดอกไม้แห้งที่จะทำการสกัด (การหากลีบดอกไม้ให้แห้งทำตามวิธีการ
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.) เติมน้ำ ethanol 95 %
(นำกลั่นใหม่ 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 ในหยุดการสกัด (ประมาณ

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

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

4.00 การทำให้บริสุทธิ์

4.10 การทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการแบบง่าย

การทดลองนี้ใช้ได้กับสารละลายที่สกัดได้จากดอกไม้ทุกชนิดที่อยู่ในขอบข่ายของการศึกษาครั้งนี้ และใช้ได้กับสารละลายที่สกัดจากทุก 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 จะได้สารละลายที่มีสีแดง ทำให้เป็นกลางโดยเติม 4 M sodium hydroxide ทีละหยด แก้วเบา ๆ จนสารละลายมีสีเขียว ทำกลับให้เป็นกรดอีกครั้งโดยการเติม 4 M hydrochloric acid ทีละหยดจนกระทั่งสารละลายมีสีม่วงแดง หรือสีแดง 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 ไล่ทันที ต่อจากนั้นทำกลับมาให้สารละลายมีฤทธิ์เป็นกรดอีกครั้งโดยการเติม 4 M hydrochloric acid และในตอนที่ทำการทำให้สารละลายเข้มข้นเช่นเดียวกันกับตอนแรก

4.1.2 การเตรียม adsorbent

Adsorbent ที่ใช้ในการทดลองนี้มี 2 ชนิดคือ calcium sulfate จาก native gypsum และแป้งมันสำปะหลัง (cassava or starch powder) หนักดี

สีชาวนิรสีฐิที่ ทิวางขายตามทองตลาด

การเตรียม calcium sulfate

เอา native gypsum (powder) มา 500 กรัมใส่ใน beaker ขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปจนระดับน้ำอยู่ที่ 750 ml. กวนด้วยแท่งแก้วหมุนเป็นวงกลม ในทิศทางเดียวกัน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง เติมน้ำและหินหรือสิ่งอื่นที่หนักกว่า calcium sulfate จะนอนก้นส่วน calcium sulfate ซึ่งเบากว่าจะอยู่บนสุด (สีชาวกว่าชั้นอื่น) และจะมี impurities บางชนิดละลายอยู่ในน้ำ (สีคล้ำ) เติมน้ำออก เติมน้ำกลั่นลงไปใหม่ กวนตั้งทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง กระทำซ้ำเช่นเดิม เปลี่ยนน้ำกลั่น 4 ครั้ง ครั้งสุดท้าย (ครั้งที่ 4) ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 8 ชั่วโมง (หรือค้างคืน) เติมน้ำกลั่นออกให้มากที่สุดโดยไม่ให้ calcium sulfate ที่ติดอยู่ผิวหน้าไหลตามออกมา เอาช้อนตัก calcium sulfate ออกมาได้ beaker ที่สะอาดเพื่อนำไปใช้ในการเตรียม column ต่อไป

สำหรับแบ่งมันสำปะหลังไม่ต้องมีการเตรียมอีกแต่อย่างใด เมื่อซื้อมาจากตลาดนำไปใช้ได้ทันที

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 ที่เตรียม ได้จากข้อ 4.1.2 มาละลายในน้ำกลั่นจนจุนแล้วเติมลงใน column ตั้งทิ้งค้างคืนเพื่อให้ calcium sulfate ตกตะกอนโดยมีน้ำกลั่นหล่อเลี้ยงอยู่ตลอดเวลา calcium sulfate ใน column เมื่อปล่อยให้ตกตะกอนแล้ว 12 ชั่วโมงควรมีความสูงประมาณ 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 กอยสังเกต band ของอินดิเกเตอร์ที่ผ่าน column ออกมา 2 ml. แรกทิ้งไป แต่จากนั้น ให้เก็บเอาไว้ 5 ml. นำไปทำให้เข้มข้นโดยการลดความดันจนปริมาตรเหลือ 2.5 ml.

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

4.1.4 การเตรียม column แอมโมเนียมสำหรับต่อไป และการทำให้บริสุทธิ์

ทำ column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 - 3.0 cm. สูง 20 - 30 cm. (ใช้เครื่องควมแน่นที่แตกมาแต่งปลายทั้งสองให้เรียบแทนได้) ปลายด้านล่างรองด้วยสำลี แล้วหุ้มด้วยผ้าขาวบางที่สะอาด เอาแอมโมเนียมสำหรับ (จากข้อ 4.1.2) มาละลายในน้ำกลั่นเทลงใน column ตั้งทิ้งค้างคืน (แอมโมเนียมสำหรับใน column เมื่อปล่อยให้เกิดตะกอน 12 ชั่วโมง ควรมีความสูง 15 - 17 cm.) เมื่อน้ำจวนแห้งถึงผิวหน้าเอา pipet ดูดสารละลายอินดิเกเตอร์เข้มข้นที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.1.3 มา 2.0 ml. เติมลงใน column ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายอินดิเกเตอร์ซึมผ่านลงไปหมด จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไป 4.0 ml. รอจนกระทั่งน้ำกลั่นซึมผ่าน column ลงไปเกือบหมดให้เติมน้ำกลั่นลงไปใหม่คราวนี้เติมจนเต็ม column สารอินดิเกเตอร์จะซึมผ่าน column ลงมาอย่างช้า ๆ (ประมาณ 12 ชั่วโมง สำหรับ column ที่มีความสูงของแอมโมเนียมสำหรับ 17 cm.) เมื่อสารอินดิเกเตอร์ซึมผ่าน ออกมาจาก column 2 ml. แรกทิ้งไป ต่อจากนั้นรองเก็บเอาไว้ประมาณ 12 ml. นำไปทำให้เข้มข้นโดยการลดความดันจนเหลือปริมาตร 2.0 ml.

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

เก็บสารละลายเข้มข้นเอาไว้เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป.

4.20 การทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีที่มีประสิทธิภาพ

4.2.1 วิธีทำให้ตกตะกอน⁸

การทดลองนี้ใช้ได้กับดอกไม้ที่มีสีม่วง และสีน้ำเงิน ได้แก่ออกของนาง และดอกอัญชัน การทดลองทำตามลำดับดังนี้

1. เอาสารละลายของดอกของนางที่สกัดได้จากการทดลองในข้อ 3.2.1 (หน้า 42) มา 400 ml. (จากน้ำหนักของดอกของนางสด 50 กรัม) ทำให้เข้มข้นโดยลดความเข้มข้นเหลือปริมาตร 100 ml.
2. เอาสารละลายเข้มข้นจากข้อ 1. มาอุ่นให้ร้อนที่ $50 - 70^{\circ}\text{C}$ เติมผลึกของ lead acetate ลงไปที่เล็กน้อย 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. ที่เหลือเติมผลึก lead acetate ต่อไปอีก กวนตลอดเวลาจนกระทั่งตะกอนที่เกิดขึ้นมีสีน้ำเงินหรือน้ำเงินแกมเขียว (สีเขียวที่เกิดขึ้นเนื่องมาจาก anthoxanthins) จึงหยุดเติม lead acetate เอา filtrate ที่เก็บไว้ในตอนแรก 2 ml. เติมลงไปเพื่อละลายตะกอนสีเขียวให้หมดไป กวนต่อไปอีก 30 นาที แล้วตั้งทิ้งค้างคืน
4. วันต่อมาจะเห็นตะกอนสีน้ำเงินหรือสีน้ำเงินแกมเขียวนอนก้นรินสารละลายข้างบนออก ล้างตะกอนสองครั้งด้วย methanol (ก่อนใช้ครั้งใหม่ 2 ครั้ง) เอาตะกอนสีน้ำเงิน (หรือสีน้ำเงินแกมเขียว) มาเติม glacial acetic acid กับน้ำ (29 : 1 v/v) 20 ml. คนติดต่อกัน 1 ชั่วโมง ต่อกวนนั้นคน 10 นาทีทุก ๆ 1 ชั่วโมงเป็นเวลา 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 ที่เหลื้อยู่จะติดไปกับ ether (สีน้ำตาลอ่อนและขุ่น) ปล่อยให้ตะกอนนอนก้น (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) ลงไปครึ่งละ 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 ๗. เติม 1-propanol :

methanolic hydrogen chloride 25 % (w/w) = ๑ : 1 v/v (จากข้อ ๘.) ลงไปครั้งละ 1 ml. เขย่าจนตะกอนสีแดงละลายหมด กรองเอาตะกอนสีขาว (lead chloride) ออก เก็บ filtrate สีแดงเข้มไว้ ประมาณ 10 ml. แล้วนำไปตกตะกอนด้วย dry peroxide - free ether ตามวิธีในข้อ ๕. จะได้ตะกอนสีแดงเข้ม

10. 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 ๕. จะได้ตะกอนสีแดงเข้มที่มันแสง

11. เอาตะกอนสีแดงเข้มที่มันแสงจากข้อ 10. เติม

methanol B.P. (ที่กลั่นใหม่ ๒ ครั้ง) ลงไปที่ละน้อย จนตะกอนสีแดงเข้มละลายหมด กรองเอา filtrate เก็บไว้ประมาณ 10 ml. แล้วนำ filtrate ไปตกตะกอนด้วย dry peroxide - free ether ตามวิธีในข้อ ๕. จะได้ตะกอนสีแดงเข้มที่มันแสง ทำการทดลองในข้อนี้ซ้ำ ๒ ครั้ง ครั้งสุดท้ายจะได้ตะกอนสีแดงเข้มที่มันแสงหนัก 0.3 กรัม จากกลีบสก 50 กรัม (yield ประมาณ 0.6 %)

4.2.2 ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Column Chromatography

การทดลองแบ่งเป็นสองตอน ตอนแรกใช้ column ของ calcium sulfate^๙ ตอนที่สองใช้ column ของ alumina¹⁰ การทดลองนี้ใช้ได้กับดอกไม้นานาชนิดที่ทำการศึกษานี้ และใช้ได้กับสารละลายอินดิเกเตอร์ที่ได้จากการสกัด

^๙ Karrer, P., and Weber, H.M., Helv. Chim. Acta, 19, 1025 (1936).

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

ทุกวิธี การทดลองทำตามลำดับดังนี้

1. เอา calcium sulfate (R.P.) มาบดให้ละเอียด
อีกครึ่งถ้วย motar (ถ้า calcium sulfate ที่เอามาในตอนแรกเกาะตัวเป็นก้อน)
นำไปละลายใน ethanol B.P. ที่กลั่นใหม่ 2 ครั้ง (เดือดที่ 78°C) กวนให้เข้ากัน
แล้วเทลงใน column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 cm. สูง 20. cm. ปล่อยให้ตกตะกอน
6 ชั่วโมง (calcium sulfate ใน column ควรมีความสูงประมาณ 11 - 13 cm.)
ตัดกระดาษกรองเป็นวงกลมให้มีความเล็กกว่า column เล็กน้อย ใส่ลงไปในผิวหน้าของ
calcium sulfate ใน column

2. เมื่อ ethanol ใน column แท้งจนเกือบถึง
ผิวหน้าของ calcium sulfate ใช้ pipet ดูดสารละลายที่ได้จากการทดลองในข้อ
4.1.1 (หน้า 44) มา 1.0 ml. ใส่บน column แล้วปล่อยให้ซึมผ่านลงไป
calcium sulfate develop column ด้วย ethanol สารอินดิเคเตอร์
(anthocyanin) จะผ่าน column ลงมาช้า ๆ ในลักษณะวงแหวนสีม่วงแดง โดยมี
impurities บางส่วนวิ่งนำหน้า (สีน้ำตาลอ่อน) และบางส่วนจะติดอยู่ส่วนบนของ
column (สีน้ำตาลแก่)

3. เมื่อ anthocyanin เริ่มไหลออกจาก column
(สีม่วงแดง) 2.0 ml. แรกทิ้งไป ต่อจากนั้นรองเก็บเอาไว้นจนกระทั่งสีที่ผ่านออกมาจาก
column เริ่มจาง (8.0 ml.) ก็ไม่ต้องรองรับอีกต่อไป นำสารละลายที่ได้ไปทำให้เข้มข้น
โดยลดความเข้มข้นเหลือปริมาณ 2.0 ml.

นำสารละลายเข้มข้น 2.0 ml. ที่ได้กลับไปผ่าน column ของ calcium
sulfate ซ้ำอีกครั้ง (ใช้ column ใหม่) กรวณสารละลายลงใน column
2.0 ml. develop column ด้วย ethanol และเก็บสารละลายสีม่วงแดงที่ไหล
ออกมาจาก column (ได้ 15.0 ml.) นำไปทำให้เข้มข้นโดยการลดความเข้มข้นเหลือ
ปริมาณ 2.0 ml. เก็บสารละลายเข้มข้นที่ได้จากการผ่าน column ครั้งที่สองนี้ไว้เพื่อ
ใช้ในการทดลองต่อไป

4. เอา alumina ใส่ลงใน ethanol ที่กลั่นใหม่

จนให้เข้ากันแล้วเทลงใน column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 cm. สูง 20 cm.

ปล่อยให้ตกตะกอน 4 ชั่วโมง (alumina ใน column ควรมีความสูงประมาณ 11 - 13 cm.) ตักกระดาษกรองให้เป็นวงกลมมีขนาดเล็กกว่า column เล็กน้อยใส่ลงไปใน column ปิดผิวหน้าของ alumina เอาไว้ เมื่อ ethanol ใน column ลดลงจนเกือบถึงผิวหน้าของ alumina เอา pipet หยดสารละลายเข้มข้นที่ได้จากข้อ

3. หยดลงบน column ปล่อยให้มันไหลลงไปใน column จนหมด แล้วเติม ethanol ลงไป 5 ml. เมื่อ ethanol ไหลลงไปใน column เกือบหมด ให้เติม ethanol ตามลงไปอีกจนครบ 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 เวนดอกกุหลาบ 1 สีแดงเข้ม จะได้ anthocyanin ออกมา 2 fraction fraction แรกที่ ethanol : glacial acetic acid = 90 : 10 ได้สารละลายที่เข้มข้น อีก fraction จะออกมาที่ ethanol : glacial acetic acid = 60 : 40 ได้สารละลายที่เจือจางเข้ม

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

เอาสารละลายที่ได้เก็บเอาไว้เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

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. ลงไปในหม้ออีก ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วเทน้ำเก็บไว้

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

¹¹ Osborn, G.H., "Synthetic Ion - Exchanges," p, 16-17, 1955.

rate)

4. นำ column จากข้อ 3. มาล้างให้สะอาด ตั้งให้ตรงในแนวตั้งและบีบสายยางให้แน่น แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปใน column ประมาณ 3/4 ของความสูงของ column ตัก resin ที่เตรียมได้จากข้อ 2. เติมนลงใน column ปล่อยให้ resin ตกลงไปในอนกน column ชั่ว ๆ แล้วจึงค่อยเติมน้ำลงไปใหม่ จนกระทั่ง resin ใน column สูงถึง 20 cm. จึงหยด ค่อย ๆ ปล่อยน้ำไหลออกแล้วปรับอัตราเร็วของน้ำที่ไหลออกให้เป็น 0.5 ml./นาที

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

6. เอลูเอตละลายอินดิเคเตอร์ที่สกัดได้จากข้อ 3.1.1

หน้า 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 flavanoid¹³ elute ออกได้โดยใช้ ethanolic hydrogen chloride 0.5 % w/w (ใช้ ethanol 95% B.P. ที่กลั่นใหม่ 2 ครั้ง 512.0 ml. ผสมกับ hydrochloric acid 37 % 4.5 ml.) ผ่านลงไปใน column 500 ml. จะได้สารละลายไหลออกมาเป็นสีแดง (500 ml.) นำไปทำให้เข้มข้นโดยลดความดันจนเหลือปริมาตร 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. จันทรงขึ้นนำเอาสารละลายมากรองในขณะเย็น (ประมาณ 5°C) ตะกอนสีเหลืองน้ำตาลที่ตกบนกระดาษกรองทิ้งไป เก็บ filtrate สีแดงที่ได้เก็บเอาไว้อย่างเป็นอินดิเคเตอร์ต่อไป

5.00 การนำไปใช้และการเก็บรักษา

5.10 การนำไปใช้ในด้านคุณภาพวิเคราะห์

5.1.1 การทำ Anthocyanin indicator paper

1. เอากระดาษกรอง (หรือกระดาษวาคเซียน หรือกระดาษอัดสำเนา) สีขาวมาตัดให้เป็นริ้วยาวขนาด $0.8 \times 25 - 30 \text{ cm}$. หลาย ๆ อัน
2. เอาสารละลายอินดิเคเตอร์ที่ได้จากการสกัดโดยวิธีที่ง่าย (จากการทดลองในข้อ 3.1.3 หน้า 38) มาทำให้เข้มข้นโดยลดความดันจนปริมาตรลดลงเหลือครึ่งหนึ่ง เอากระดาษจากข้อ 1. จุ่มลงในสารละลายเข้มข้นนี้ เหลือปลายข้างหนึ่งไว้ 3 cm . สำหรับมือจับ แหกระดาษไว้ 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 นำไปแตะที่กระดาษแล้วสังเกตการเปลี่ยนสี ทดลองซ้ำอีกครั้งโดยใช้ 0.01 M sodium hydroxide ผลการทดลองคงแสดงในการางที่ 4
3. เอาสารละลายอินดิเคเตอร์ที่ได้จากการสกัดโดยวิธีที่มีประสิทธิภาพ (จากการทดลองในข้อ 3.2.1 หน้า 42) มาทำให้เป็นกลาง (สารละลายเดิมมีฤทธิ์เป็นกรด โดยใช้ 0.1 M sodium hydroxide หยดลงไปที่ละหยด จนตลอดเวลาจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดงหรือสีม่วง จากนั้นนำไปทำให้เข้มข้นโดยลดความดันจนปริมาตรลดลงเหลือครึ่งหนึ่ง เอากระดาษที่เตรียมได้จากข้อ 1 จุ่มในสารละลายเข้มข้น แหไว้ 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. ทา 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 แล้วเติมสารละลายอินดิเคเตอร์ที่ได้จากการสกัดโดยวิธีการแบบง่าย (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 แล้วเติมสารละลายอินดิเคเตอร์ที่ได้จากการสกัดโดยวิธีที่มีประสิทธิภาพ (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

วิธีการนำเอาสารอินดิเคเตอร์จากดอกไม้มาใช้เป็นเครื่องบอกถึงจุดที่กรดและด่างทำปฏิกิริยากันพอดีในการ 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 3.1.3)		Indicator paper จากการ สกัดแบบมีประสิทธิภาพและไม่บริสุทธิ์ (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
ทองหลางใบด้าย	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
พุทธรักษา	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	น้ำเงิน
ชบา	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	น้ำเงิน
พุทธรักษา	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)	
	สีในกรก	สีในแก้ว	สีในกรก	สีในแก้ว	สีในกรก	สีในแก้ว	สีในกรก	สีในแก้ว
ทองหลางใบลาย	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	น้ำเงิน
ทองหลางน้ำ	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	น้ำเงิน
อัญชัน	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียวแก	แดง	น้ำเงิน
พระโอง	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	น้ำเงิน
ขบา	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	น้ำเงิน
พุทธรักษา	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียวแก	แดง	น้ำเงิน
ของนางใหญ่	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียวแก	แดง	น้ำเงิน
เฟื่องฟ้า 1	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	น้ำเงิน
เฟื่องฟ้า 2	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียวแก	แดง	น้ำเงิน
กุหลาบ 1	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	น้ำเงิน
กุหลาบ 2	แดง	เขียว	แดง	เขียว	แดง	เขียวแก	แดง	น้ำเงิน

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

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

สารละลายอินดิเคเตอร์ที่ใช้อย่างเป็น 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) มาระเหยให้แห้งโดยลดความดัน แะเอา 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 ชนิดนี้ใส่ขวดที่สะอาดปิดจุกให้แน่นแล้วเก็บเอาไว้ เมื่อครบ 7 วัน 30 วัน และ 90 วัน เอา pipet ดูดสารละลายแต่ละอย่างออกมาครั้งละ 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 ที่ใช้แต่ละ ครั้ง (ml.)	ปริมาตรของ .10 M NaOH ที่ใช้ (ml.)				%ของความ เข้มข้นของ NaOH ที่คลาก 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
ทองเหลืองใบลาย	แดง—เขียวเหลือง	1.00	25.00	24.62	24.65	24.62	24.63	+1.50
ทองเหลืองน้ำ	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
พู่ระหง	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 โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่ยังไม่ได้ทำหับริสทธิ์ (จากข้อ 3.1)

อินดิเคเตอร์ ที่ใช้	สีที่เปลี่ยน	ปริมาตร ของอินดิ เคเตอร์ ที่ใช้ (ml.)	ปริมาตร ของ .10 M HCl ที่ใช้แต่ละ ครั้ง (ml.)	ปริมาตรของ .10 M $\text{NH}_3\text{aq.}$ ที่ใช้ (ml.)				%ของความ เข้มข้นของ $\text{NH}_3\text{aq.}$ 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
พระโขนง	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
ของนางใหญ่	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
พุทธรักษา	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	+3.78
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 โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่ยังไม่ได้นำไปปรับสี (จากข้อ 3.1.3)

อินดิเคเตอร์ ที่ใช้	สีที่เปลี่ยน	ปริมาตร ของอินดิ เคเตอร์ ที่ใช้ (ml.)	ปริมาตร ของ .10 M HAc ที่ใช้แต่ละ ครั้ง (ml.)	ปริมาตรของ .10 M $\text{NH}_3\text{aq.}$ ที่ใช้ (ml.)				%ของความ เข้มข้นของ $\text{NH}_3\text{aq.}$ ที่คลำ 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
ของนางใหญ่	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 โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่หาได้โดยวิธีแบบง่าย (จากข้อ 4.1.4)

อินดิเคเตอร์	การเปลี่ยนสี	ปริมาตร ของอินดิ เคเตอร์ (ml.)	ปริมาตร ของ .10 M HCl (ml.)	ปริมาตรของ NaOH (ml.)				%ของควา วาม เข้มข้นของ NaOH ที่คลาด 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	24.72	24.72	+1.13
อัญชัน	แดง-น้ำเงินเขียว	1.00	25.00	24.62	24.65	24.62	24.63	+1.50
พระโอง	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 โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่หาได้พบวิธีที่ง่าย
(จากข้อ 4.1.4)

อินดิเคเตอร์	การเปลี่ยนสี	ปริมาตร ของอินดิ เคเตอร์ (ml.)	ปริมาตร ของ .10 M HCl (ml.)	ปริมาตรของ .10 M $\text{NH}_3 \text{aq.}$ (ml.)				%ของความ เข้มข้นของ $\text{NH}_3 \text{aq.}$ ที่คลำ เคลื่อน
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
ทองหลางใบด้าย	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
พุทรา	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	-0.40
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 โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่ทำไห้พบสีที่แม่นยำ (จากข้อ 4.1.4)

อินดิเคเตอร์	การเปลี่ยนสี	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-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
ของนางใหญ่	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 โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่ทำใหม่วิธีแบบง่าย (จากขอ 4.1.4)

อินดิเคเตอร์	การเปลี่ยนสี	ปริมาตร ของอินดิ เคเตอร์ (ml.)	ปริมาตร ของ .10 M HAc (ml.)	ปริมาตรของ .10 M NH ₃ aq.(ml.)				%ของความ เข้มข้นของ NH ₃ aq. ที่คลาด เคลื่อน
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
ทองหลางใบลาย	แดง-เขียว	1.00	25.00	24.62	24.60	24.60	24.61	+1.58
ทองหลางน้ำ	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
พระโขนง	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	+1.42
พุทธรักษา	แดง-เขียวน้ำเงิน	1.00	25.00	24.58	24.58	24.60	24.59	+1.67
ชองนางใหญ่	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 โดยใช้อินดิเคเตอร์บรียูทรี (จากข้อ 4.2.2)

อินดิเคเตอร์	การเปลี่ยนสี	ปริมาตร ของอินดิ เคเตอร์ (ml.)	ปริมาตร ของ .10 M HCl (ml.)	ปริมาตรของ .10 M NaOH (ml.)				%ของความ เข้มข้นของ NaOH ที่คลาด เคลื่อน
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
ทองเหลืองในลาย	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.70	24.70	24.70	24.70	+1.21
ทองเหลืองน้ำ	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.68	24.70	24.72	24.70	+1.21
อัญชัน	แดง-ม่วงน้ำเงิน	1.00	25.00	24.62	24.62	24.62	24.62	+1.54
พระโขนง	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.70	24.70	24.68	24.69	+1.26
ชมพู	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
ของนางใหญ่	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 โดยใช้อินดิเคเตอร์บรลิทธี (จากข้อ 4.2.2)

อินดิเคเตอร์	การ เปลี่ยนสี	ปริมาตร ของอินดิ เคเตอร์	ปริมาตร ของ .10 M	ปริมาตรของ .10 M NH ₃ aq. (ml.)				%ของความ เข้มข้นของ NH ₃ aq. ที่คลาก เคลื่อน
		(ml.)	HCl (ml.)	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
พระโขนง	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
ของนางใหญ่	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 โดยใช้อินดิเคเตอร์บรียูทธี (จากข้อ 4.2.2)

อินดิเคเตอร์	การเปลี่ยนสี	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
ทุเรียน	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
ของนางใหญ่	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 โดยใช้อินดิเคเตอร์บรสิสุทธิ (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. ที่คลาด เคลื่อน
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
ทองเหลืองใบด้าย	แดง-น้ำเงิน	1.00	25.00	24.62	24.62	24.60	24.61	+1.58
ทองเหลืองน้ำ	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
พู่ระหง	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
ของนางใหญ่	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. แสดงผลการสังเกตการเปลี่ยนสีของสารอินดิเคเตอร์โมบิไลต์ของ
คอกกู่หลาบ 2. เมื่อเก็บไว้ในช่วงเวลาต่างกัน และในตัวทำละลาย
ต่างกัน

ตัวทำละลาย	สีเมื่อเก็บไว้ 7 วัน			สีเมื่อเก็บไว้ 30 วัน			สีเมื่อเก็บไว้ 90 วัน		
	สีในขวด	สีในกรก	สีในค่าง	สีในขวด	สีในกรก	สีในค่าง	สีในขวด	สีในกรก	สีในค่าง
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 (ขุ่น)	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
คอกกู่หลาบ 2. ที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.1.4 (บริสุทธิ์แบบง่าย) ผลการทดลองดังแสดง
ในตาราง 19.

ตาราง 19. แสดงผลการสังเกตการเปลี่ยนสีของสารอินดิเคเตอร์ที่ทำให้บริสุทธิ์
แบบง่ายของคอกกู่หลาบ 2. เมื่อเก็บไว้ในช่วงเวลาต่างกัน และ
ในตัวทำละลายต่างกัน

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

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

ตาราง 20. แสดงผลการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารอินดิเคเตอร์บริสุทธิ์ ของ
ดอกกุหลาบ 2. เมื่อเก็บไว้ในช่วงเวลาต่างกัน และในตัวทำละลาย
ต่างกัน

ตัวทำละลาย	สีเมื่อเก็บไว้ 7 วัน			สีเมื่อเก็บไว้ 30 วัน			สีเมื่อเก็บไว้ 90 วัน		
	สีในขวด	สีในกรก	สีในค่าง	สีในขวด	สีในกรก	สีในค่าง	สีในขวด	สีในกรก	สีในค่าง
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. ไปใช้เป็นอินดิเคเตอร์
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 โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่เก็บไว้ในตัวทำละลายทางชนิด 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
บริสุทธิ์แบบง่าย	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. ชั่งกลีบดอกของหลวงเฒ่า (สด) มา 13.05 กรัม นำไปสกัดด้วย 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. เมื่อเห็นว่าแห้งแล้วจึงนำไปชั่งได้ 0.2561 กรัม นำกลับไปลดความดันอีก 1 ชั่วโมง แล้วนำไปชั่งอีก (0.2566 กรัม) กระทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง (0.2559 กรัม) กระทำซ้ำ 3 ครั้ง (หรือมากกว่า) จนได้น้ำหนักคงที่ (หรือใกล้เคียง) นำน้ำหนักที่ชั่งได้ไปคำนวณหาปริมาณร้อยละของ anthocyanin ที่มีอยู่ในกลีบดอกของหลวงเฒ่า ดังแสดงในตาราง 22.

4. สำหรับดอกของหลวงเฒ่า ดอกอัญชัน ดอกพุทธรักษา — — — ดอกกุหลาบ 2. ทดลองตามวิธีเดียวกันนี้ (ข้อ 1 - 3) ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 22

6.20 Absorption spectra ของ Anthocyanin

เอา anthocyanin บริสุทธิ์จากกลีบดอกไม้ที่ได้จากการทดลองในข้อ 6.10 มาชั่งได้ 0.05 กรัม ละลายใน methanolic hydrogen chloride 1 % (w/w) 25 ml. นำไป run ใน spectronic 20 โดยแปรผันช่วงคลื่น (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 ไม้สด (กรัม)	ปริมาตร ของสาร ละลายที่ สะกักได้ ml..	น้ำหนักของอินดิเกเตอร์เมื่อเอามาหาปริมาณ เพียง 20.0 ml. (กรัม)				น้ำหนักของ อินดิเกเตอร์ ในกลีบดอก ไม้ (กรัม)	น้ำหนัก ร้อยละ
			ซึ่งครั้งที่ 1	ซึ่งครั้งที่ 2	ซึ่งครั้งที่ 3	เฉลี่ย		
ทองหลาง	31.05	57.1	0.2561	0.2566	0.2559	0.2562	0.7315	2.36
ใบดาบ								
ทองหลางน้ำ	26.73	51.4	0.2313	0.2317	0.2303	0.2311	0.5945	2.22
อัญชัน	19.36	36.2	0.3171	0.3186	0.3177	0.3178	0.5761	2.98
พระโขนง	28.14	62.2	0.3129	0.3122	0.3124	0.3125	0.9719	3.45
ชบา	29.56	59.8	0.3447	0.3440	0.3448	0.3445	0.0298	3.48
พุทธรักษา	24.03	49.1	0.2984	0.2986	0.2979	0.2983	0.7323	3.05
ของนาง	25.12	44.8	0.3815	0.3815	0.3821	0.3817	0.8559	3.41
ใหญ่								
เฟื่องฟ้า 1	27.33	49.1	0.3188	0.3179	0.3191	0.3186	0.7837	2.87
เฟื่องฟ้า 2	29.05	55.7	0.3601	0.3608	0.3600	0.3603	1.0046	3.46
กุหลาบ 1	33.42	61.4	0.4810	0.4815	0.4817	0.4814	1.1874	3.55
กุหลาบ 2	29.58	58.7	0.3955	0.3957	0.3956	0.3956	1.1608	3.92

หมายเหตุ เนื่องจากดอกกุหลาบ 1. มีสารอินดิเกเตอร์ 2 ชนิดรวมกัน แต่ในการหาปริมาณได้เอาทั้ง 2 ส่วนรวมกัน.

ตาราง 23. แสดง maximum absorption ของ anthocyanin จากกลีบดอกไม้
แต่ละชนิด

ชื่อดอกไม้	maximum absorption (Å)	ชื่อดอกไม้	maximum absorption (Å)
ทองหลางใบด้าย	5162	ชองนางใหญ่	5400
ทองหลางน้ำ	5168	เฟื่องฟ้า 1	5030
อัญชัน	5400	เฟื่องฟ้า 2	5210
พระโขนง	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 จากกลีบดอกไม้นิตต่าง ๆ

6.3.1 Solvent system

1. BAW 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 แต่กระดาศ

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 และกระดาษที่จุ่ม 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 การจุ่ม anthocyanin และ anthocyanidin ลงบนกระดาษ และการ run paper chromatogram ด้วย ascending method

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

2. ตัดกระดาษ whatman No.1 ให้มีขนาด 21 - 22 X 28 - 30 cm. ห่างจากริมด้านยาวเข้ามา 2 cm. ขีดด้วยดินสอเบา 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) มาอย่างละ 0.1 กรัม ละลายใน ethanol 95 % B.P. 5 mL. ใช้ capillary tube จุ่มลงในสารละลายที่เตรียมได้ชนิดละ 1 อัน จากนั้นนำไปจุดบน กระดาษที่เตรียมได้จากข้อ 2. การจุดให้จุดที่ละน้อย ๆ แล้วปล่อยให้แห้ง แล้วจุดซ้ำลงไปใหม่ (จุดซ้ำ 7 ครั้ง สำหรับ anthocyanin จากดอกไม้น้ำเงิน 1 ชนิด) ขนาดของจุดควรมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 cm และไม่เกิน 0.7 cm. เมื่อจุดเรียบร้อยแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิของห้อง สารละลายที่เหลือจากการใช้ให้เก็บเอาไว้ใช้ในการทดลอง ข้อ 6

4. เอากระดาษ (จากข้อ 3) ด้านสันมาจกกันให้เป็นรูปทรงกระบอกกลวง แล้วเย็บติดกันด้วยเครื่องเย็บกระดาษ (staple) ให้ริมกระดาษทั้งสองห่างกันประมาณ 0.5 cm นำไปแขวนใน tank ที่มี solvent ให้ปลายกระดาษด้านล่างจุ่มลงใน solvent ประมาณ 1 cm. ในกรณีของ B/W และ BuHCl systems ให้ปลายกระดาษจุ่มอยู่เฉพาะ ชั้นบนของ solvent เท่านั้น

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

6. เอาสารละลาย anthocyanin (11 ชนิด) ที่ได้จากข้อ 3. มาเติม 12 M hydrochloric acid ลงไปชนิดละ 5 mL. นำไปต้มในน้ำเดือด 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติม 1 pentanol ลงไป ชนิดละ 3 mL. คนแรง ๆ 30 นาที แล้วแยกเอา 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.

สัญลักษณ์	solvent ที่ผสม	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 ตรวจสอบบริสุทธิ์ของ
anthocyanin จากดอกของนางไม้ที่ได้จากวิธีการต่าง ๆ

นำเอาสารละลาย anthocyanin จากดอกของนางไม้ที่ไดจากการทำให้
บริสุทธิ์โดย

1. วิธีการแบ่งแยกตามการทดลองในข้อ 4.10 (หน้า 44)
2. วิธีการที่มีประสิทธิภาพตามการทดลองในข้อ 4.2.1 (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 $\frac{3}{4}$ ของความสูงของ
กระดาษ ยกเอากระดาษออกทำเครื่องหมาย solvent front แล้วตวัดวงเส้นวงที่
ที่ anthocyanin และ solvent เคลื่อนที่นำมาคำนวณหา Rf value และสังเกตดูส่วน
ของ 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			Rf เฉลี่ย	สีของจุด
	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf		
ทองหลางใบลาย	4.08	14.02	.291	3.68	12.87	.286	3.94	13.65	.289	3.92	13.60	.288	.289	ชมพูแกมส้ม
ทองหลางน้ำ	4.06	14.05	.289	3.76	12.87	.292	3.97	13.65	.291	3.94	13.58	.290	.291	ชมพูแกมส้ม
อัญชัน	2.15	14.05	.153	1.90	12.85	.148	1.99	13.62	.146	2.03	13.60	.149	.149	ม่วงแดง
พระโขนง	4.91	14.03	.350	4.56	12.85	.355	4.78	13.62	.351	4.81	13.60	.354	.353	ม่วงแดง
ตาบ	4.90	14.04	.349	4.55	12.85	.354	4.83	13.64	.354	4.77	13.58	.351	.352	ม่วงแดง
พุดรรักษา	5.30	14.06	.377	4.83	12.87	.375	5.20	13.64	.381	5.07	13.58	.373	.377	แดงสด
ทองนางใหญ่	3.28	14.06	.233	3.08	12.87	.239	3.15	13.62	.231	3.17	13.60	.233	.234	ม่วงแดง
เฟื่องฟ้า 1	5.02	14.02	.358	4.55	12.85	.354	4.88	13.62	.358	4.86	13.60	.357	.357	ส้มแดง
เฟื่องฟ้า 2	3.98	14.02	.284	3.68	12.85	.286	3.85	13.65	.282	3.84	13.58	.283	.284	แดงสด
กุหลาบ 1 F 1	4.97	14.05	.354	4.59	12.85	.357	4.86	13.65	.356	4.82	13.55	.356	.356	ส้มแดง
กุหลาบ 1 F 2	3.51	14.05	.250	3.23	12.85	.251	3.43	13.65	.251	3.43	13.55	.253	.251	แดงสด
กุหลาบ 2	3.95	14.05	.281	3.64	12.85	.283	3.84	13.65	.281	3.83	13.58	.282	.282	แดงสด

หมายเหตุ A = ระยะทางที่ anthocyanins เคลื่อนที่ (cm.)

B = ระยะทางที่ solvent เคลื่อนที่ (cm.)

ตารางที่ 26 แสดง Rf value ของ Anthocyanins จากคอลัมน์ใน Bu HCl solvent

ชื่อคอลัมน์	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			ครั้งที่ 4			Rf เฉลี่ย	สีของจุด
	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf		
ทองเหลืองใบลาย	1.58	13.47	.117	1.45	12.70	.114	1.73	14.08	.123	1.58	13.26	.119	.118	ชมพูแกมส้ม
ทองเหลืองน้ำ	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
พู่ระหง	1.86	13.45	.138	1.72	12.73	.135	1.94	14.05	.138	1.79	13.25	.135	.137	ม่วงแดง
กล้วย	1.86	13.45	.138	1.72	12.73	.135	1.94	14.05	.138	1.80	13.25	.136	.137	ม่วงแดง
พุดรรักษา	3.51	13.45	.261	3.36	12.73	.264	3.62	14.05	.258	3.38	13.27	.255	.260	แดงสด
ทองนางใหญ่	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			Rf เฉลี่ย	สีของจุด
	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf		
ทองกลางใบลาย	4.77	12.48	.382	5.32	14.12	.377	5.00	12.82	.390	4.63	12.48	.371	.380	ชมพูแกมส้ม
ทองกลางน้ำ	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	.085	.035	แดงสด
พระโศภน	0.37	12.45	.030	0.58	14.10	.041	0.46	12.85	.036	0.39	12.50	.031	.035	แดงสด
กล้วย	0.39	12.45	.031	0.54	14.12	.038	0.46	12.83	.036	0.41	12.50	.033	.035	ม่วงแดง
พุดรรักษา	0.90	12.48	.072	1.04	14.12	.074	0.95	12.85	.074	0.91	12.48	.073	.074	แดงสด
ทองนางใหญ่	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 F 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 F 2	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 28 แสดง Rf value ของ Anthocyanins จากดอกไม้ใน HAc - 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		
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
พุดรรักษา	3.50	13.88	.252	3.47	13.52	.257	3.28	12.96	.253	3.45	13.73	.251	.254	แดงสด
ทองนางใหญ่	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	
ทองหลางใบด้าย	8.46	13.45	.629	8.98	14.27	.629	8.54	13.60	.628	8.09	12.88	.628	ชมพูแกง
ทองหลางน้ำ	8.43	13.42	.628	8.93	14.27	.626	8.59	13.62	.631	8.10	12.85	.630	ชมพูแกง
อัญชัน	4.25	13.42	.317	4.62	14.29	.323	4.36	13.62	.320	4.10	12.85	.319	ม่วงแกง
พระโขนง	6.11	13.45	.454	6.48	14.30	.453	6.16	13.60	.453	5.87	12.87	.456	ม่วงแกง
ชบา	6.11	13.45	.454	6.49	14.30	.454	6.18	13.58	.455	5.88	12.90	.456	ม่วงแกง
พุดทรี	6.73	13.43	.501	7.11	14.28	.498	6.74	13.58	.496	6.41	12.90	.497	แกงสด
ทองนางใหญ่	6.15	13.43	.458	6.51	14.28	.456	6.14	13.58	.452	5.86	12.88	.455	ม่วงแกง
เฟื่องฟ้า 1	9.29	13.43	.692	9.84	14.30	.688	9.33	13.60	.686	8.87	12.88	.689	แกงสด
เฟื่องฟ้า 2	6.55	13.42	.488	7.04	14.30	.492	6.62	13.60	.487	6.29	12.88	.488	แกงสด
กุหลาบ 1 F 1	9.07	13.42	.676	9.61	14.30	.672	9.26	13.60	.681	8.72	12.88	.677	แกงสด
กุหลาบ 1 F 2	6.62	13.42	.493	7.08	14.30	.495	6.65	13.60	.489	6.38	12.88	.495	แกงสด
กุหลาบ 2	6.58	13.40	.491	7.07	14.28	.495	6.69	13.62	.491	6.34	12.88	.492	แกงสด

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			Rf เฉลี่ย	สีของจุด
	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf		
ทองเหลืองใบดอย	4.41	14.55	.303	3.97	13.32	.298	3.91	12.98	.301	3.93	12.80	.307	.302	แดงสด
ทองเหลืองน้ำ	4.45	14.55	.306	4.02	13.30	.302	3.91	12.95	.302	3.89	12.85	.303	.304	แดงสด
อัญชัน	1.84	14.52	.127	1.74	13.30	.131	1.64	12.95	.127	1.62	12.82	.126	.128	ม่วงแดง
พระโศภน	2.80	14.50	.193	2.62	13.32	.197	2.56	12.98	.197	2.51	12.82	.196	.196	ม่วงแดง
ขมิ้น	2.83	14.50	.195	2.70	13.35	.202	2.59	13.00	.199	2.57	12.80	.201	.199	ม่วงแดง
พริกไทย	3.06	14.50	.211	2.88	13.35	.216	2.80	13.02	.215	2.79	12.78	.218	.215	แดงสด
ของนางใหญ่	3.00	14.48	.207	2.79	13.33	.209	2.75	13.02	.211	2.61	12.78	.204	.208	ม่วงแดง
เฟืองฟ้า 1	4.68	14.48	.323	4.42	13.35	.331	4.27	13.01	.328	4.22	12.78	.330	.328	แดงสด
เฟืองฟ้า 2	3.18	14.50	.219	2.95	13.35	.221	2.86	13.00	.220	2.80	12.80	.219	.220	แดงสด
กุหลาบ 1 1	4.74	14.50	.327	4.44	13.33	.333	4.37	13.02	.336	4.24	12.80	.331	.332	แดงสด
กุหลาบ 1 2	3.16	14.50	.218	2.92	13.33	.219	2.84	13.02	.218	2.80	12.80	.219	.219	แดงสด
กุหลาบ 2	3.19	14.48	.220	2.91	13.30	.219	2.88	13.02	.221	2.86	12.78	.224	.221	แดงสด

หมายเหตุ A = ระยะทางที่ anthocyanidins เคลื่อนที่ (cm.)

B = ระยะทางที่ solvent เคลื่อนที่ (cm.)

ชื่อสารสกัด	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			ครั้งที่ 4			สีของจุด
	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf	A	B	Rf	
ทองหลางใบลาย	9.81	14.10	.696	8.30	11.88	.699	9.98	14.02	.712	9.83	13.90	.707	แดงสด
ทองหลางน้ำ	9.87	14.08	.701	8.43	11.85	.711	9.81	14.05	.698	9.86	13.92	.708	แดงสด
อัญชัน	6.07	14.08	.431	5.13	11.87	.432	6.04	14.05	.430	5.98	13.88	.431	ม่วงแดง
พุทธรักษา	7.01	14.05	.499	6.20	11.90	.521	7.17	14.01	.512	7.19	13.88	.518	ม่วงแดง
กล้วย	7.18	14.05	.511	6.16	11.92	.517	7.16	13.98	.514	7.16	13.90	.515	ม่วงแดง
พุทธรักษา	9.41	14.02	.671	7.95	11.90	.668	9.39	13.98	.672	9.31	13.90	.670	แดงสด
ทองนางใหญ่	7.25	14.02	.517	6.13	11.88	.516	7.17	14.00	.512	7.21	13.92	.518	ม่วงแดง
เฟืองฟ้า 1	10.91	14.02	.778	9.28	11.88	.781	11.00	14.00	.786	10.90	13.92	.783	แดงสด
เฟืองฟ้า 2	9.48	14.05	.675	7.92	11.85	.668	9.41	14.03	.671	9.35	13.92	.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	แดงสด
กุหลาบ 1 F2	9.46	14.05	.673	7.94	11.85	.670	9.44	14.05	.672	9.40	13.95	.674	แดงสด
กุหลาบ 2	9.53	14.07	.677	7.95	11.85	.671	9.43	14.07	.670	9.42	14.00	.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 ที่ได้จากการทดลอง
ของนางใหญ่ เมื่อทำโพรบด้วยวิธีต่างๆ ใน BAW solvent

ครั้งที่	anthocyanin ที่ได้จากวิธีการแบบ ง่าย			anthocyanin ที่ได้จากวิธีทำให้ ตกตะกอน			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 (วิธีเทียบสี) ทำตามลำดับขั้นดังนี้

1. นำนํ้ากลั่น 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. นำนํ้ากลั่นทั้งสองแถวที่ได้จากข้อ 1. และ 2. มาตั้งเข้าคู่กันเพื่อใช้ในการเทียบสีต่อไป

4. เตรียมสารละลายมาตรฐาน buffer ที่ pH 2,3,4,5, และ 6 ¹⁷ pH 2.00 ใช้สารละลายมาตรฐาน 0.2 M hydrochloric acid 5.3 ml. ผสมกับสารละลายมาตรฐาน 0.2 M potassium chloride (A.R.) 25.0 ml.

แล้วเจือจางด้วยนํ้ากลั่นลงไปทำให้สารละลายเป็น 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. แล้วเจือจางด้วยนํ้ากลั่นให้สารละลายเป็น 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.) แล้วเจือจางด้วยนํ้ากลั่นให้สารละลายเป็น 100 ml.

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

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

pH 5.00 ใช้สารละลายมาตรฐาน 0.1 M sodium hydroxide (A.R.), 23.8 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.), 45.4 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. จุ่มสารละลายมาตรฐาน buffer ที่เตรียมไว้จากการทดลองในข้อ 4 ใส่ในหลอดทดลอง (ขนาดเดียวกันกับข้อ 1 และ 2) หยด 1 % สารละลายอินดิเคเตอร์จากดอกไม้ (บรียูทรี) ชนิดที่จะหาค่า pK_a ลงไป 10 หยด แล้วนำไปเทียบกับแถวของหลอดทดลองที่เตรียมไว้ในข้อ 3 ถูกว่าค่าไหนของหลอดทดลองจากข้อ 3 มีสีใกล้เคียงกับสีของอินดิเคเตอร์ในสารละลาย buffer มากที่สุด สำหรับอินดิเคเตอร์จากดอกไม้ แต่ละชนิดให้ทดลองทั้งใน buffer 2, 3, 4, 5, และ 6 ทุกอัน

6. นำเอาผลที่ได้จากการทดลองในข้อ 5. มาคำนวณหาค่า pK_a ของอินดิเคเตอร์จากดอกไม้โดยใช้สูตรดังนี้ (ดูที่มาของสูตรในบทที่ 4 ข้อ 6.40 หน้า 128 - 129)

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

ในเมื่อ a = จำนวนหยดของอินดิเคเตอร์ในกรด (acid form)

b = จำนวนหยดของอินดิเคเตอร์ในด่าง (basic form)

ผลการทดลองทั้งแสดงในตารางที่ 33.

6.42 วิธีการที่ประสิทธิภาพ ¹⁸ (ใช้ spectronic 20)

1. จุ่ม 0.5 M hydrochloric acid มา 10.0 ml. ใส่ใน beaker ขนาด 25 ml. เติมน้ำกลั่นอินดิเคเตอร์ที่จะหาค่า pK_a ลงไป 1.0 ml. คนให้รวมเป็นเนื้อเดียวกันนำไปวัด 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 23 (ต่อ)

ชนิดดอกไม้	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	$\log 9/1 = 0.95$	$6.00 - 0.95 = 5.05$	
ชองนางใหญ่	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)

ข้อคอกไม้	buffer's pH	$\log \frac{b}{a}$	$pK_a = pH - \log \frac{b}{a}$	pK_a range
เฟืองฟ้า 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 (Δ) ที่ช่วงคลื่นเท่ากับ maximum absorption ของสารอินดิเกเตอร์ชนิดนั้น (ตามที่แสดงไว้ในตารางที่ 23. หน้า 77) ที่ช่วงคลื่นดังกล่าวนี้ให้คงที่ตลอดการทดลองสำหรับอินดิเกเตอร์แต่ละชนิด

3. เอาสารละลาย 0.5 M hydrochloric acid ที่เหลือจากการทดลองในข้อ 1 มาทำให้สละเป็นด่างด้วย 2.0 M sodium hydroxide จนมี 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 34.

ตาราง 34. แสดงค่า pKa ของสารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้ชนิดต่าง ๆ

ชื่อดอกไม้	pKa	ชื่อดอกไม้	pKa
ทองหลางใบลาย	3.90	ช่อนางใหญ่	4.00
ทองหลางน้ำ	3.90	เฟื่องฟ้า 1	4.10
อัญชัน	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 ที่ได้จากทดลองในข้อ 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 การเปลี่ยนสี ผลการสังเกตดังแสดงในตาราง 35

6.5.2 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของ anthocyanidin กับสารละลาย ferric chloride

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

ตาราง 35. แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของ anthocyanin และ anthocyanidin จากดอกไม้ชนิดต่าง ๆ และการตีความหมาย

ชื่อดอกไม้	สีของสารละลาย เริ่มต้น (ในกรด)	สีของสารละลายเมื่อเติม 5% FeCl ₃		การตีความหมาย ²⁰
		anthocyanin	anthocyanidin	
ทองหลางใบด้าย	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 หรือ petunidin
ร่องนางใหญ่	แดง	ม่วงน้ำเงิน	น้ำเงิน	cyanidin หรือ delphinidin หรือ petunidin
เฟื่องฟ้า 1	แดง	ไม่เปลี่ยนสี	ไม่เปลี่ยนสี	ไม่ใช่ cyanidin delphinidin และ petunidin
เฟื่องฟ้า 2	แดง	ม่วงน้ำเงิน	ม่วงน้ำเงิน	cyanidin หรือ delphinidin หรือ petunidin
กุหลาบ 1 F ¹	แดง	ไม่เปลี่ยนสี	ไม่เปลี่ยนสี	ไม่ใช่ cyanidin delphinidin และ petunidin
กุหลาบ 1 F ²	แดง	ม่วงน้ำเงิน	ม่วงน้ำเงิน	cyanidin หรือ delphinidin หรือ petunidin
กุหลาบ 2	แดง	ม่วงน้ำเงิน	ม่วงน้ำเงิน	cyanidin หรือ delphinidin หรือ petunidin