บทที่ 4

อภิปรายผลการทดลอง

1.00 ผลการสำรวจดอกไม้

การสำรวจดอกไม้แบ่งออกเป็นสามระยะในเวลาที่แตกต่างกัน เพื่อที่จะทราบว่ามีดอกไม้ในฤดูไหนของประเทศไทยมากที่สุด จากผลของการสำรวจดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 (หน้า 34) สรุปได้ว่าดอกไม้ในประเทศไทยส่วนใหญ่จะมีดอกเกือบตลอดปี แต่จะมีดอกไม้บางชนิดออกดอกเฉพาะบางฤดูเท่านั้น เช่น ตะแบก ศรีตรัง จะออกดอกในฤดูหนาว เป็นต้น และทั้งสามฤดูนี้ ฤดูฝนและฤดูหนาวจะมีดอกไม้มากกว่าฤดูร้อน

2.00 ผลการทดสอบสารอินดิเกเตอร์ในดอกไม้และการคัดเลือก

จากการสำรวจดอกไม้ดังได้กล่าวไว้ในบทที่ 3 ข้อ 1.00 จึงได้คัดเลือกดอกไม้ที่จะเอามาทำการศึกษาในขั้นแรกทั้งหมด 30 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1 (หน้า 34) ซึ่งประกอบด้วยดอกไม้สีขาว สีแดง สีม่วง สีน้ำเงิน และสีเหลือง จากนั้นจึงได้เอาดอกไม้ทั้ง 30 ชนิดนี้มาทดสอบดูสารอินดิเกเตอร์ในดอก โดยมีวิธีการง่าย ๆ คือเอากลีบดอกไม้มาสะกัดด้วย ethanol 95 % B.P. แล้วนำสารละลายที่สะกัดได้ไปทดสอบกับสารละลายของกรด (จะให้สีแดง) และด่าง (จะให้สีม่วง สีเขียว หรือสีเขียวแกมเหลือง) ซึ่งผลการทดสอบดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 (หน้า 39) จากตารางที่ 2 มีข้อที่น่าสังเกตคือ ดอกไม้ที่มีสีขาวหรือสีเหลืองในสารละลายของกรดจะไม่มีสี และในสารละลายของด่าง จะมีสีเหลือง ซีด ดังนั้นถ้าจะใช้ดอกไม้สีขาวหรือสีเหลืองไปสะกัดทำเป็นสารอินดิเกเตอร์ ก็จะไม่ให้ผลดี เพราะการสังเกตการเปลี่ยนสีจากไม่มีสีไปเป็นสีเหลือง - หรือจากสีเหลือง - ไปเป็นไม่มีสี ย่อมทำได้ยาก การที่ดอกไม้สีขาวและสีเหลืองเกิดการเปลี่ยนแปลงสีในสารละลายของกรดและด่าง จากไม่มีสีไปเป็นสีเหลืองซีด นี้เนื่องจากในดอกไม้สีขาวและสีเหลืองมีสารประเภทหนึ่งที่เรียกว่า "Flavones" [1] เป็นองค์ประกอบ

---

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

ส่วนใหญ่ สำหรับดอกไม้ที่มีสีแดง สีม่วง สีน้ำเงิน หรือสีดำ สามารถนำไปใช้เป็นสารอินดิเกเตอร์ได้ เพราะเมื่ออยู่ในสารละลายของกรดจะให้สีแดงและเมื่ออยู่ในสารละลายของด่างจะให้สีน้ำเงินหรือสีเขียว ทั้งนี้เนื่องจากมีสารที่เรียกว่า anthocyanin[2] อยู่ในดอกเป็นจำนวนมาก การที่ anthocyanin เมื่ออยู่ในดอกไม้แล้วให้สีออกมาต่าง ๆ (เช่น สีแดง สีม่วง สีน้ำเงิน หรือสีดำ) นั้น Geissman[3] ได้อธิบายว่า...เนื่องมาจากเหตุผลสามประการ คือ

1. pH ของ cell sap ในกลีบดอกไม้

2. anthocyanin ทำตัวเป็น ligands เข้าไป form complex กับ metal ion ที่มีอยู่ในกลีบดอกไม้ (เช่นดอกข้าวโพด)

3. มีสารอื่นเข้าไปรวมอยู่ด้วยในโมเลกุลของ anthocyanin ซึ่งได้แก่สารพวก colloidal ใน cell และพวก mono - หรือ di- saccharide ชนิดต่าง ๆ

จากผลของการทดลองสารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้ จึงได้คัดเลือกเอาดอกไม้ที่เห็นว่าเหมาะที่จะนำไปใช้เป็นอินดิเกเตอร์ได้ดีไว้ทั้งหมด 8 ชนิด (11 พันธุ์) ดัง แสดงในตารางที่ 3 (หน้า 41) และจะเห็นได้ว่าดอกไม้ที่คัดเลือกไว้นั้นจะมีสีแดง สีม่วง และสีน้ำเงินเท่านั้น การที่เลือกเอาเฉพาะดอกไม้ที่มีสีแดง สีม่วง และสีน้ำเงิน นั้น มีเหตุผล 3 ประการ คือ

1. มีสารอินดิเกเตอร์ชนิดที่เกิดการเปลี่ยนสีแตกต่างกันอย่างแจ่มชัด

2. ส่วนใหญ่ออกดอกเกือบทุกฤดู หาได้ง่าย มีอยู่ทั่วไป และไม่จำเป็นต้องซื้อ

3. ดอกมีสีเข้ม มีปริมาณของสารอินดิเกเตอร์ในดอกมาก

3.00 ผลการสะกัดสีจากกลีบดอกไม้

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสะกัดสีจากกลีบดอกไม้มีหลายชนิดด้วยกัน แต่ส่วนใหญ่มักจะเป็นพวก polar solvent เช่น น้ำ methanol ethanol และในบางครั้งก็ใช้ 1 % hydrochloric acid เป็นส่วนผสมอยู่ด้วย สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ได้แบ่งวิธีการสะกัดออกเป็นสองแบบ คือ

---

2 Tzvyet, M., Ber.deut. botan.Ges., 32, 61-68 (1809).

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

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

1. ถ้าใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย จะได้ผลดีก็ต่อเมื่อกลีบดอกไม้นั้นมีสีม่วง สีน้ำเงิน และสีดำเท่านั้น เช่น ดอกต้อยติ่ง ดอกอัญชัน และดอกช้องนาง เป็นต้น แต่จะให้ผลน้อยถ้ากลีบดอกไม้นั้นมีสีแดง และจะไม่ให้ผลเลยถ้าดอกไม้นั้นมีสีเหลืองหรือสีขาว

2. การใช้ alcohols (ทั้ง methanol และ ethanol) จะสามารถสะกัดสีออกจากกลีบดอกไม้ได้ดีกว่า ใช้น้ำหรือสุรา 40 ดีกรีเป็นตัวทำละลาย และสุรา 40 ดีกรีก็สามารถสะกัดสีจากกลีบดอกไม้สีแดงได้ดีกว่าการใช้น้ำ

3. การสะกัดจะได้ผลดียิ่งขึ้น (กับตัวทำละลายทุกชนิดที่ใช้) ถ้ามี hydrochloric acid ผสมอยู่ด้วย 1 % แต่สารละลายที่สะกัดได้โดยวิธีนี้ไม่สามารถนำไปใช้เป็นอินดิเกเตอร์ได้ทันที (ดูวิธีสะกัดแบบมีประสิทธิภาพ บทที่ 3 ข้อ 3.20 หน้า 42)

4. สารละลายที่สะกัดได้โดยวิธีที่ใช้ตัวทำละลายที่ไม่มีกรดปนอยู่ด้วย สามารถนำไปใช้เป็นอินดิเกเตอร์ในการทดสอบด้านคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ได้ทันที

3.20 <u>วิธีการที่มีประสิทธิภาพ</u> การทดลองในหัวข้อนี้แบ่งออกเป็นสามตอนด้วยกัน ตอนแรกใช้ methanolic hydrogen chloride 1% เป็นตัวทำละลาย ตอนที่สองใช้ ethanolic hydrogen chloride 1% เป็นตัวทำละลาย ทั้งตอนที่หนึ่งและสองการสะกัดใช้วิธีเขย่า ซึ่งมีข้อควรสังเกตและสิ่งที่น่าสนใจดังนี้

1. การสะกัดทั้งสองวิธีนี้ใช้ได้กับดอกไม้ทุกชนิดและทุกสี และสามารถสะกัดสีออกจากกลีบดอกไม้ได้มาก

2. สารละลายที่สะกัดได้ไม่สามารถนำไปใช้เป็นอินดิเกเตอร์ได้ทันที เพราะตัวทำละลายที่ใช้มีกรดผสมอยู่ด้วย

3. สารละลายที่สะกัดได้เหมาะแก่การนำไปศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับสารอินดิเกเตอร์ ในดอกไม้ เพราะเป็นสภาพที่เหมาะที่จะนำไปทดลองอย่างอื่นต่อไป เช่น นำไปทำให้ตกตะกอนโดยใช้ lead acetate หรือนำไปทำ paper chromatography

ตอนที่สาม วิธีการสะกัดใช้ **soxhlet extraction apparatus** และตัวทำละลายที่ใช้คือ ethanol 95 % B.P. ที่นำมากลั่นใหม่ การทดลองในตอนนี้มีข้อควรสังเกตและสิ่งที่น่าสนใจดังนี้

1. การสะกัดโดยวิธีนี้สามารถสะกัดสีออกจากกลีบดอกไม้ได้ดี ดังนั้นจึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในด้านการหาปริมาณของสารอินดิเกเตอร์จากกลีบดอกไม้

2. การสะกัดโดยวิธีนี้เสียค่าใช้จ่ายมาก มีวิธีการมาก และใช้เวลานานถึง 12 ชั่วโมงติดต่อกัน หรือมากกว่า

3. การสะกัดโดยวิธีนี้จะสะกัดออกมาได้เร็วขึ้น ถ้า ethanol ที่ใช้มี hydrochloric acid ผสมอยู่ด้วย 1 % แต่ผลเสียที่ติดตามมาก็คือจะทำให้ anthocyanin บางส่วนถูก hydrolyze กลายเป็น anthocyanidin

3.30 <u>เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างวิธีการแบบง่ายกับวิธีการที่มีประสิทธิภาพ</u>

1. สารละลายที่สะกัดได้โดยวิธีการแบบง่ายสามารถนำไปใช้เป็นอินดิเกเตอร์ในการทดสอบด้านคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์อย่างหยาบ ๆ ได้ ดูผลการทดลองในตารางที่ 5 – 9 หน้า 57 ส่วนสารละลายที่สะกัดได้จากวิธีการที่มีประสิทธิภาพ ไม่สามารถนำไปใช้ได้ทันที เพราะตัวทำละลายที่ใช้มีฤทธิ์เป็นกรด

2. วิธีการสะกัดแบบง่ายนั้นโรงเรียนที่ขาดอุปกรณ์ก็สามารถเตรียมสารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้ขึ้นใช้เองได้ เช่น อาจจะใช้แก้วน้ำแทน beaker ใช้น้ำฝนที่สะอาดแทนน้ำกลั่น และกลีบดอกไม้ที่ใช้ก็ใช้กลีบดอกที่มีสีม่วง เช่น ดอกอัญชัน ดอกช้องนาง หรือจะใช้ลูกเถาคัน (สีดำ) แทนกลีบดอกไม้สีแดงได้ เพราะดอกไม้สีม่วงสะกัดด้วยน้ำธรรมดาได้ ส่วนวิธีการที่มีประสิทธิภาพนั้นเหมาะสำหรับใช้ในการศึกษาถึงรายละเอียดเกี่ยวกับสารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้

ดังนั้นโรงเรียนหรือสถาบันที่จะทำการทดลองเกี่ยวกับเรื่องนี้จะต้องมีอุปกรณ์และเคมีภัณฑ์อย่างพอเพียง

3. วิธีการที่มีประสิทธิภาพสามารถสะกัดสารอินดิเกเตอร์ออกจากกลีบดอกไม้ได้ง่ายและดีกว่าวิธีการแบบง่าย

4.00 ผลการทำให้บริสุทธิ์

สารละลายที่จะนำมาทำให้บริสุทธิ์นั้นได้มาจากสารละลายที่สะกัดได้จากการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 3.00 ทั้งวิธีสะกัดแบบง่ายและแบบมีประสิทธิภาพ มีข้อควรสังเกตอยู่ว่า ถ้าสารละลายที่สะกัดได้ไม่มีฤทธิ์เป็นกรด จะต้องทำให้มีฤทธิ์เป็นกรดก่อน โดยการเติม hydrochloric acid 4 M ลงไป 1 – 2 หยด ต่อจากนั้นจะต้องนำไปทำลาย acyl linkage [4] ให้หมดไปก่อน ทั้งนี้เนื่องจากว่าสารอินดิเคเตอร์จากกลีบดอกไม้นั้นคือสารจำพวก anthocyanin แต่ส่วนใหญ่เมื่ออยู่ในธรรมชาติมักจะมีกรดอินทรีย์ เช่น p-coumaric acid [5] เข้ามาต่ออยู่ด้วย ซึ่งจะต้องทำลายให้หมดเสียก่อน มิฉะนั้นจะมีผลกระทบกระเทือนต่อการทำให้บริสุทธิ์ และการพิสูจน์[6] (identify) กล่าวคือ ในด้านของการทำให้บริสุทธิ์ acylated anthocyanin จะไปทำให้แถบ (band) ที่เกิดขึ้นใน column chromatography ไม่สม่ำเสมอ ส่วนในด้านการพิสูจน์ จะไปทำให้จุดใน paper chromatogram มีหางยาวหรือว่าเกิดขึ้นเป็นสองจุด ทั้ง ๆ ที่เป็น anthocyanin ชนิดเดียวกัน [7] สำหรับการทดลองในตอนนี้แบ่งออกเป็นสองหมวด

4.10 วิธีการแบบง่าย การทดลองแบ่งออกเป็นสองตอน ตอนแรกให้สารละลายจากกลีบดอกไม้ผ่าน column ของ calcium sulfate ที่ได้มาจาก native gypsum และตอนที่สองเอาไปผ่าน column แป้งมันสัมปะหลัง การที่ใช้ calcium sulfate จาก native gypsum นี้ ได้แนวความคิดมาจากการทดลองของ Karrer กับ Strong [8]

---

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

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

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

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

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

และ Karrer กับ Weber[9] ซึ่งเขาได้ใช้ calcium sulfate (R.P.) เป็น adsorbent ในการแยก anthocyanin ดังนั้นจึงได้ความคิดว่า โรงเรียนที่ขาดเคมีภัณฑ์ก็อาจจะใช้ calcium sulfate จาก native gypsum ที่มีคุณภาพต่ำเอามาปรับปรุงคุณภาพให้ดีขึ้นกว่าเดิมโดยวิธีการง่าย ๆ ก็อาจจะนำไปใช้เป็น adsorbent ได้เช่นเดียวกัน และผลที่ได้รับจากการทดลองก็เป็นที่พอใจ การใช้แป้งมันสำปะหลังเป็น adsorbent ก็เช่นเดียวกัน คือได้แนวความคิดมาจากการทดลองของ Endo[10] เขาได้ใช้ cellulose powder ในการแยก anthocyanin 6 ชนิด ออกจากกันได้สำเร็จ แต่ cellulose powder นี้ไม่มีจำหน่ายตามร้านเคมีภัณฑ์ ดังนั้นจึงหันมาลองใช้แป้งมันสำปะหลังแทน แม้ว่าการทดลองโดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็น adsorbent จะไม่สามารถแยก anthocyanins 2 ชนิดออกจากดอกกุหลาบ 1 ได้ก็ตาม แต่ก็ยังมีประสิทธิภาพพอที่จะแยก anthocyanins ออกจาก impurity (ที่ไม่ใช่ anthocyanin) ได้ ซึ่งจากการทดลองจะเห็นได้ชัดว่ามี 2 bands เกิดขึ้นใน column band แรกมีสีแดง คือ anthocyanin band ที่สองมีสีเหลืองดำ ซึ่งเป็น band ของ impurity การทดลองในตอนนี้มีข้อควรสังเกต 4 ประการ คือ

1. ในการเตรียม calcium sulfate จาก native gypsum นั้น จะต้องเปลี่ยนน้ำหลาย ๆ ครั้ง (อย่างน้อย 3 ครั้ง) เพราะจากการทดลองได้พบว่าการเปลี่ยนน้ำหลาย ๆ ครั้งจะทำให้ calcium sulfate ขาวสะอาดมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า band ของอินดิเกเตอร์ที่เกิดใน column ของ calcium sulfate นั้นจะเรียบสม่ำเสมอถ้าใช้ calcium sulfate ที่ได้จากการเปลี่ยนน้ำหลาย ๆ ครั้ง (5 ครั้ง) และปล่อยให้ calcium sulfate ตกตะกอนใน column อย่างช้า ๆ (12 ชั่วโมง)

2. อัตราการไหล (flow rate) ของน้ำ (eluent) ที่ไหลออกจาก column จะมีผลกระทบกระเทือนถึง band ของอินดิเกเตอร์ใน column กล่าวคือ ถ้าอัตราการไหลของน้ำเร็วมาก (ประมาณ 2 ml. ต่อนาที) ความกว้างของ band ของ

---

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

[10] Endo, T., Nature, 179, 378 (1957).

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

3. การทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2 โดยใช้แป้งมันสัมปะหลังเป็น adsorbent จากการทดลองพบว่า แป้งมันที่วางขายตามท้องตลาดชนิดดีสีขาวบริสุทธิ์จะให้ผลดีพอสมควร และจะไม่ได้ผล ถ้าใช้แป้งมันที่มีสีคล้ำราคาถูก

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

4.20 <u>วิธีการทำให้บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพ</u> มีสามวิธี คือ

4.2.1 <u>วิธีทำให้ตกตะกอน</u> วิธีทดลองอันนี้ได้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Reynolds, Robinson และ Scott - Moncrieff[11] ซึ่งเขาได้ใช้วิธีนี้ในการแยก Delphin ออกจากกลีบดอก Salvia การทดลองโดยวิธีนี้มีข้อที่ควรสังเกตและสิ่งที่น่าสนใจดังนี้

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

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

---

[11] Reynolds, T.M., Robinson, R., and Scott-Moncrieff, R., <u>J.Chem. Soc.</u>, 1235-1243 (1934).

ถ้าใช้มากเกินไป ปริมาณของ ether ที่ใช้ในการทำให้ตกตะกอนก็มากด้วย แต่ถ้าน้อยเกินไป anthocyanin จะละลายออกมาไม่หมด

3. ความบริสุทธิ์ของสารที่ได้จากการทดลองโดยวิธีนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนครั้งที่กระทำซ้ำ ถ้าทำซ้ำหลายครั้งจะได้สารบริสุทธิ์มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม การทำซ้ำหลาย ๆ ครั้งจะทำให้ yield ที่ได้ลดต่ำลง

4. การทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีนี้จะให้ผลดี ถ้าใช้กับดอกไม้ที่มีสีม่วง สีน้ำเงินและสีดำ

5. จากผลการตรวจความบริสุทธิ์ของสารที่ได้จากการทดลองโดยวิธีนี้ พบว่ายังมี impurity ส่วนน้อย ๆ เหลืออยู่บ้าง (ดูผลการตรวจความบริสุทธิ์ของสารจากตารางที่ 32 หน้า 88 และรูปของ paper chromatogram ในภาคผนวก จ หน้า 173 แต่ไม่มีผลกระทบกระเทือนถึง Rf value ที่ได้จาก paper chromatography สารละลายที่ได้รับจากการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีนี้มีคุณภาพดีเหมือนกับสารละลายที่ได้จากการทดลองโดยวิธีใช้ column chromatography ในข้อ 4.2.2 และ ion-exchange ในข้อ 4.2.3 คือสามารถนำไปใช้ได้ดีทั้งในด้านปริมาณวิเคราะห์และคุณภาพวิเคราะห์

6. การทดลองโดยวิธีนี้ไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในโรงเรียนที่ขาดอุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ เพราะเป็นการทดลองที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายมาก อย่างไรก็ตามการทดลองวิธีนี้ก็เหมาะที่จะนำไปใช้ในการทำสารให้บริสุทธิ์ขั้นต้นสำหรับการทดลองที่ต้องการสารที่มีความบริสุทธิ์สูง

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

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

ได้ดีกว่า calcium sulfate (R.P.) ของบริษัท Carlo Erba

2. จากการทดลองพบว่า ไม่อาจแยก anthocyanins สองชนิดออกจากกุหลาบ 1 (สีแดงส้ม) โดยการใช้ calcium sulfate (R.P.)column ผลการทดลองอันนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Li กับ Wagenknecht[12]

3. การผ่าน column ครั้งที่สองโดยใช้ alumina เป็น adsorbent ปรากฏว่า alumina จะดูดกลืน anthocyanin (สารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้) ไว้ได้ดีมาก การชะ (elute) column ด้วยตัวทำละลายธรรมดา (เช่น น้ำ หรือ alcohol) จะไม่สามารถพา anthocyanin ออกมาจาก column ได้ ปรากฏว่าอันนี้ตรงกับผลการทดลองของ Harborne[13] จากคุณสมบัติของ alumina ดังกล่าวนี้เอง จึงนำมาใช้ในการ purify สาร anthocyanin จากธรรมชาติได้ กล่าวคือ เมื่อผ่าน anthocyanin (crude product) ลงไปใน column ของ alumina แล้ว elute column ด้วยน้ำหรือ alcohol เพื่อให้ impurities ที่เหลืออยู่จากการ purify ครั้งแรก (calcium sulfate column) ไหลออกมาจาก column จากนั้นจึงค่อย ๆ เพิ่ม polarity ของตัวทำละลาย โดยการใช้ส่วนผสมระหว่าง ethanol กับ glacial acetic acid โดยวิธีนี้ จึงสามารถ elute anthocyanin ออกมาจาก column ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าวิธีทดลองดังกล่าวนี้สามารถแยก anthocyanins 2 ชนิด ที่ผสมกันอยู่ในกุหลาบ 1 (สีส้มแดง) ออกจากกันได้ โดย anthocyanin ชนิดแรก (F^1) จะไหลออกมาจาก column เมื่อชะ (elute) ด้วย ethanol:glacial acetic acid = 90:10 v/v และ anthocyanin ชนิดที่สอง (F^2) จะไหลตามออกมาอีกเมื่อชะ (elute) column ด้วย ethanol : glacial acetic acid = 60 : 40 v/v

---

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

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

4. สาร anthocyamin ที่ได้ออกมาจากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีนี้มีความบริสุทธิ์สูง จากการตรวจความบริสุทธิ์ของสารโดยใช้ paper chromatography ปรากฏว่า ไม่มีจุดของ impurity ปรากฏออกมาให้เห็นเลย และ Rf value ที่ได้จากการทดลองก็ใกล้เคียงกับความเป็นจริง ดูผลการทดลองดังแสดงไว้ในตารางที่ 32 หน้า 88 และภาพของ paper chromatography ดังแสดงไว้ในภาคผนวก จ. หน้า 173

5. การทดลองตามวิธีดังกล่าวนี้ ไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในโรงเรียนที่ขาดอุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ เพราะเป็นการทดลองที่ต้องใช้เคมีภัณฑ์ที่มีคุณภาพสูง ราคาแพง แต่การทดลองตามวิธีนี้เหมาะสมอย่างยิ่งกับการใช้ในการศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับสารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้ และการทดลองนี้สามารถนำไปประยุกต์กับการเรียนวิชาเคมีภาคปฏิบัติการในระดับอุดมศึกษาได้

4.2.3 <u>Ion - exchange chromatography</u> resin ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ amberlite resin IRC - 50 (weak cation exchanger) ซึ่งเป็น resin ที่มีคุณภาพขนาดปานกลาง[14] (commercial grade) ถ้าจะใช้ resin ที่มีคุณภาพสูง (analytical grade) จะต้องใช้ amberlite resin IRC - 50(H) แต่ปรากฏว่าไม่มีจำหน่าย การทดลองอันนี้มีข้อควรสังเกตดังนี้

1. สารละลายอินดิเกเตอร์ (crude extract) ที่จะผ่านลงไปใน column ของ amberlite resin IRC - 50 นั้นจะต้องไม่มีฤทธิ์เป็นกรดหรือด่าง ทั้งนี้เพราะถ้าสารละลายมีฤทธิ์เป็นด่างแทนที่จะเกิดการ exchange ระหว่าง anthocyanin กับ resin ก็จะกลายเป็นเกิดการ exchange ระหว่าง cation จากด่างกับ resin หรือถ้าสารละลายมีฤทธิ์เป็นกรด ก็จะไม่เกิดการ exchange ระหว่าง anthocyanin กับ resin แต่อย่างใด เพราะ pH ของสารละลายต่ำกว่า pH ที่จะเกิดการ exchange ขึ้นได้ (pH $\sim$7)[15] ดังนั้นการทำสารให้บริสุทธิ์โดยใช้ ion-exchange นั้นจึงเหมาะที่จะใช้กับการสะกัดสารชนิดที่ใช้ตัวทำละลายไม่มีฤทธิ์เป็นกรดหรือด่าง

---

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

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

2. Mechanism ของการเกิดการ exchange นี้ ในปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จากการทดลองของ John D. Guthrie[16] เขาจึงได้เสนอสมมุติฐานว่า anthocyanins และสารพวก flavonoid compounds เหล่านี้เมื่ออยู่ในกลีบดอกไม้จะมีโลหะเข้ามา form complex ดังนั้นมันจึงสามารถละลายออกจากกลีบดอกไม้ได้เมื่อใช้ polar solventต่อมาเมื่อนำไปผ่าน column resin จะจับ metal ion เอาไว้ และเมื่อชะ (elute) column ด้วย solvent ที่ polar มากกว่าเดิม จะทำให้ complex bond แตกออก สารพวก flavonoid เมื่อหลุดออกในรูปอิสระมันจะไม่ละลายใน polar solvent จึงตกตะกอนออกมาเป็นสีน้ำตาล ส่วนสาร anthocyanin ก็ยังคงละลายอยู่ในสารละลายตามเดิม และจากการทดลองของ Johnson, Mayer กับ Johnson[17] และ Morris, Gage กับ Wender[18] ก็ได้ผลการทดลองที่สนับสนุนสมมุติฐานอันนี้

3. จากการตรวจความบริสุทธิ์ของสาร anthocyanin ที่ได้จาก ion exchange column ปรากฏว่ายังมีคราบดำ ๆ ปะปนมาอยู่เล็กน้อย impurity อันนี้สันนิษฐานได้ว่า ไม่ได้มาจาก impurity ที่มีอยู่ในกลีบดอกไม้ เพราะถ้าเป็น impurity ที่มาจากกลีบดอกไม้แล้วจะต้องมีสีเหลืองซีดหรือสีเหลืองซึ่งเปรียบเทียบได้กับ impurity ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์แบบง่าย (ดูตารางที่ 32 หน้า 88) และภาพ chromatogram ในภาคผนวก จ. (หน้า 173) ดังนั้น impurity สีดำดังกล่าวนี้อาจมาจาก resin เพราะ resin ที่ใช้คือ amberlite resin IRC-50 ซึ่งเป็น resin ที่มีคุณภาพขนาดกลาง (commercial grade)

---

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

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

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

4. การทดลองโดยวิธีนี้ไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในโรงเรียนที่ขาดอุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ เพราะ resin มีราคาแพง และ mechanism ของการเกิดการ exchange ก็ยากที่จะทำให้นักเรียนในระดับมัธยมศึกษาเข้าใจได้ง่าย แต่อย่างไรก็ตามการทดลองโดยวิธีดังกล่าวนี้สามารถนำไปใช้ได้ดีสำหรับการทดลองที่ต้องการความบริสุทธิ์สูง และเป็นวิธีที่เหมาะสม ที่จะใช้แยกสารพวก anthocyanins ออกจาก impurities ที่ปนกันอยู่ในธรรมชาติ นอกจากนี้วิธีดังกล่าวนี้สามารถประยุกต์ไปใช้กับการเรียนวิชาเคมีภาคปฏิบัติการในสถาบันระดับอุดมศึกษาได้

5.00 <u>ผลการนำไปใช้และการเก็บรักษา</u>

5.10 <u>ผลการนำไปใช้ในด้านคุณภาพวิเคราะห์</u>

5.1.1 <u>การทำ indicator paper (anthocyanin paper)</u>

จุดมุ่งหมายสำคัญของการทำ anthocyanin indicator paper ก็เพื่อที่จะนำไปใช้แทนกระดาษลิตมัส แม้ว่ากระดาษลิตมัสราคาจะไม่แพงและหาง่ายก็ตาม แต่ถ้าสามารถทำขึ้นเองได้โดยไม่ต้องมีการลงทุนด้วยเงิน ก็จะเป็นการช่วยประหยัดรายจ่ายไปได้อีกทางหนึ่งด้วย การทดลองในข้อนี้มีข้อที่ควรจะนำมาอภิปรายดังนี้

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

2. การทำ indicator paper จากดอกไม้ชนิดที่มีสีแดง ก็จะได้ indicator paper ที่มีสีแดงด้วย ทั้งนี้เนื่องจาก pH ใน cell sap[19] ในกลีบของดอกไม้ต่ำกว่า 7 แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำ indicator paper (สีแดง) ที่ได้นี้ไปทดสอบกับ

---

[19] Geissmann, T.A., <u>loc.cit</u>.

สารละลายที่เป็นกรด (hydrochloric acid 0.01 M) ปรากฏว่าจะได้สีแดงซึ่งแตกต่างกับสีแดงเริ่มต้น

3. จากผลของการทดลองเกี่ยวกับการเปลี่ยนสีของ indicator paper ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4(หน้า 56) จะเห็นได้ว่า indicator paper ที่ได้จากการสะกัด การแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการที่มีประสิทธิภาพนั้น เมื่อทดสอบกับกรดจะให้สีแดงและกับด่างจะให้สีน้ำเงินกับทุก ๆ ชนิดของดอกไม้ ซึ่งเป็นการเปลี่ยนสีที่แตกต่างกันมาก และง่ายต่อการสังเกต ดังนั้น indicator paper ที่ทำขึ้นโดยวิธีนี้จึงมีคุณภาพดี แต่สำหรับ indicator paper ที่ได้จากการสะกัดการแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการแบบง่ายนั้น เมื่อนำไปทดสอบในด่างจะให้สีเขียวหรือเขียวแก่ อันนี้เราอธิบายได้ว่า เนื่องจากมีสารประกอบจำพวก flavone ผสมอยู่ด้วย ซึ่งสารประกอบพวกนี้เมื่ออยู่ในด่างจะให้สีเหลือง ดังนั้นเมื่อ anthocyanin ในด่างมีสีน้ำเงินมาผสมกับ flavone ในด่างมีสีเหลือง ผลที่ได้ออกมาจึงเป็นสีเขียว หรือสีเขียวแก่ (ถ้าปริมาณของ flavone มีน้อย) แต่ในการทดลองที่ใช้อินดิเกเตอร์ จากวิธีการที่มีประสิทธิภาพจะไม่พบปรากฏการอันนี้ ทั้งนี้เพราะวิธีการที่มีประสิทธิภาพสามารถแยก anthocyanin ออกจาก flavone ได้อย่างดี

4. Indicator paper ที่ทำจากสารละลายที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ทั้งที่สะกัดได้โดยวิธีแบบง่าย และวิธีที่มีประสิทธิภาพ ในสารละลายของกรดจะให้สีแดงและในสารละลายของด่างจะให้สีเขียวเหมือนกันทั้งหมด (ดูตารางที่ 4 หน้า 56) อันนี้ก็เนื่องมาจากผลของการที่มีสารประกอบพวก flavone ผสมอยู่ด้วยดังได้กล่าวไปแล้วในข้อ 3 มีข้อสังเกตอยู่ว่า indicator paper ที่ได้มาจากวิธีการทุกแบบเมื่ออยู่ในสารละลายของกรดจะให้สีแดงเหมือนกันหมด ปรากฏการณ์อันนี้อธิบายได้ว่า ผลของการที่มี flavone ผสมอยู่ด้วยนั้นจะแสดงออกเฉพาะเมื่ออยู่ในสารละลายของด่างเท่านั้น ทั้งนี้เพราะว่า flavone ในสารละลายของกรดจะไม่มีสี ดังนั้นสีแดงของ anthocyanin ในสารละลายของกรดจึงไม่ถูกกระทบกระเทือนแต่อย่างใด

5. Anthocyanin indicator paper นี้ เหมาะสมอย่างมากที่จะนำไปใช้ในสถาบันการศึกษาทุกแห่งที่มีการเรียนการสอนวิชาเคมี เพราะมีวิธีการทำแบบง่าย ๆ

ไม่มีการลงทุน เตรียมจากวัสดุได้เปล่าทั้งสิ้น เช่น กลีบดอกไม้ เศษกระดาษ เป็นต้น

5.1.2 การนำไปใช้ในรูปของสารละลาย

ในการทดลองบางครั้งการเตรียม anthocyanin indicator paper อาจจะไม่ทันต่อเหตุการณ์ ดังนั้นจำเป็นต้องใช้อินดิเกเตอร์ในรูปสารละลายมาทดสอบ ซึ่งวิธีทดสอบได้แสดงไว้ในบทที่ 3 ข้อ 2.10 (หน้า 37) และข้อ 5.1.2 (.หน้า 55) จากผลของการทดลองเกี่ยวกับเรื่องนี้ ดังได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 (หน้า 39) และตารางที่ 5(หน้า57) จะเห็นได้ว่าผลของการเปลี่ยนสีของสารอินดิเกเตอร์ในรูปสารละลายเหมือนกับผลการเปลี่ยนสีของ anthocyanin indicator paper ทุกประการดังได้กล่าวไว้แล้วในบทที่ 4 ข้อ 5.1.1 (หน้า109) ดังนั้นจึงจะไม่นำมาอภิปรายอีก สำหรับการทดลองในตอนนี้มีข้อควรอภิปรายเพิ่มเติมดังนี้

1. การเปลี่ยนสีของสารอินดิเกเตอร์ใช้เป็นเครื่องมือบอกถึงความบริสุทธิ์ (อย่างหยาบ ๆ) ของอินดิเกเตอร์ชนิดนั้นได้ กล่าวคือถ้าสารบริสุทธิ์มาก เมื่ออยู่ในสารละลายของด่างจะมีสีน้ำเงิน และจะไม่เปลี่ยนเป็นสีเขียว เมื่อตั้งทิ้งไว้นาน ๆ หรือเขย่าหลาย ๆ ครั้ง สีน้ำเงินที่เห็นจะค่อย ๆ ซีดลง ๆ จนในที่สุดจะไม่มีสีทั้งนี้เนื่องจากเกิดการ form pseudo base[20] แต่ถ้าเป็นสารอินดิเกเตอร์ที่ไม่บริสุทธิ์เมื่ออยู่ในด่างจะเป็นสีเหลือง สีเขียว หรือสีเขียวแก่ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของ flavone ที่เป็น impurity ผสมอยู่จากมากไปน้อยตามลำดับ และเมื่อตั้งทิ้งไว้นาน ๆ ก็จะค่อย ๆ กลายเป็นสีเหลืองหรือสีชาอ่อน

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

5.2 อภิปรายผลการนำไปใช้ในด้านปริมาณวิเคราะห์

การทดลองในตอนนี้เน้นในเรื่องการนำสารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้ไปใช้ในด้านปริมาณวิเคราะห์ในขบวนการ titration แบ่งออกเป็น 4 หมวด คือ

---

[20] Reynolds, T.M., Robinson, R., and Scott-Moncrieff, R., *Loc.cit.*

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

ทั้ง 4 หมวดนี้ใช้สารอินดิเกเตอร์ 3 ประเภท คือ

1. อินดิเกเตอร์ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์
2. อินดิเกเตอร์ที่ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการแบบง่าย
3. อินดิเกเตอร์ที่ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการที่มีประสิทธิภาพ

ผลการทดลองดังแสดงไว้ในตารางที่ 6 – 17 (หน้า 59)เมื่อเอาความเข้มข้นร้อยละของ sodium hydroxide ที่คลาดเคลื่อนมาแจกแจงตามประเภทของปฏิกริยาที่ใช้ในการ titrate ได้ ดังแสดงในตารางที่ 36 – 39 (หน้า 113)

ตาราง 36 เปรียบเทียบปริมาณของ sodium hydroxide ที่คลาดเคลื่อนในการ titrate ระหว่าง 0.1 M hydrochloric acid กับ 0.1 M sodium hydroxide เมื่อใช้อินดิเคเตอร์ที่มีคุณภาพต่างกัน

สารอินดิเคเตอร์จากดอกไม้ที่ใช้	% ของความเข้มข้นของ sodium hydroxide ที่คลาดเคลื่อน		
	อินดิเคเตอร์ไม่บริสุทธิ์	อินดิเคเตอร์ที่ทำให้บริสุทธิ์แบบง่าย	อินดิเคเตอร์บริสุทธิ์
ทองหลางใบลาย	+ 1.50	+ 1.17	+ 1.21
ทองหลางน้ำ	+ 1.58	+ 1.13	+ 1.21
อัญชัน	+ 2.17	+ 1.50	+ 1.54
พู่ระโหง	+ 1.67	+ 1.26	+ 1.26
ชบา	+ 1.46	+ 1.26	+ 1.26
พุทธรักษา	+ 2.04	+ 1.34	+ 1.38
ช้องนางใหญ่	+ 2.20	+ 1.46	+ 1.42
เฟื่องฟ้า 1	+ 1.58	+ 1.09	+ 1.17
เฟื่องฟ้า 2	+ 1.83	+ 1.01	+ 1.17
กุหลาบ 1	+ 1.91	+ 0.93	+ 0.97
กุหลาบ 2	+ 1.58	+ 0.97	+ 0.97
เฉลี่ย	+ 1.78	+ 1.19	+ 1.23
Bromthymol Blue	- 0.60		

หมายเหตุ + แสดงว่าความเข้มข้นของ sodium hydroxide มากกว่าความเป็นจริง
− แสดงว่าความเข้มข้นของ sodium hydroxide น้อยกว่าความเป็นจริง

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

สารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้ที่ใช้	% ของความเข้มข้นของ ammonia solution ที่คลาดเคลื่อน		
	อินดิเกเตอร์ไม่บริสุทธิ์	อินดิเกเตอร์ที่ทำให้บริสุทธิ์แบบง่าย	อินดิเกเตอร์บริสุทธิ์
ทองหลางใบลาย	− 0.64	− 0.36	− 0.20
ทองหลางน้ำ	− 0.48	− 0.40	− 0.16
อัญชัน	− 0.20	− 0.20	− 0.04
พู่ระโหง	− 0.40	− 0.44	− 0.36
ชบา	− 0.71	− 0.40	− 0.40
พุทธรักษา	− 0.64	− 0.36	− 0.32
ข้องนางใหญ่	− 0.04	− 0.16	− 0.08
เฟื่องฟ้า 1.	− 0.71	− 0.98	− 0.44
เฟื่องฟ้า 2.	− 0.83	− 0.48	− 0.44
กุหลาบ 1.	− 0.52	− 0.40	− 0.36
กุหลาบ 2.	− 0.48	− 0.32	− 0.36
เฉลี่ย	− 0.51	− 0.41	− 0.29
Congo Red		+ 0.16	

หมายเหตุ + แสดงว่าความเข้มข้นของ ammonia มากกว่าความเป็นจริง

− แสดงว่าความเข้มข้นของ ammonia น้อยกว่าความเป็นจริง

ตาราง 38 เปรียบเทียบปริมาณของ sodium hydroxide ที่คลาดเคลื่อน ในการ titate ระหว่าง 0.1 M acetic acid กับ 0.1 M sodium hydroxide เมื่อใช้อินดิเกเตอร์ที่มีคุณภาพต่างกัน

สารอินเดเกเตอร์จากดอกไม้ที่ใช้	% ของความเข้มข้นของ sodium hydroxide ที่คลาดเคลื่อน		
	อินดิเกเตอร์ไม่บริสุทธิ์	อินดิเกเตอร์ที่ทำให้บริสุทธิ์แบบง่าย	อินดิเกเตอร์บริสุทธิ์
ทองหลางใบลาย	+ 3.91	+ 3.60	+ 3.60
ทองหลางน้ำ	+ 4.17	+ 3.73	+ 3.78
อัญชัน	+ 3.78	+ 4.12	+ 4.12
พู่ระโหง	+ 4.04	+ 3.91	+ 3.95
ชะบา	+ 3.78	+ 3.82	+ 3.91
พุทธรักษา	+ 4.21	+ 4.08	+ 4.12
ช้องนางใหญ่	+ 4.38	+ 4.21	+ 4.21
เฟื่องฟ้า 1.	+ 3.73	+ 3.78	+ 3.82
เฟื่องฟ้า 2.	+ 3.77	+ 3.82	+ 3.78
กุหลาบ 1.	+ 3.95	+ 3.73	+ 3.69
กุหลาบ 2.	+ 3.91	+ 3.78	+ 3.78
เฉลี่ย	+ 3.97	+ 3.88	+ 3.90
Phenolphthalein		– 0.04	

หมายเหตุ + แสดงว่าความเข้มข้นของ sodium hydroxide มากกว่าความเป็นจริง

– แสดงว่าความเข้มข้นของ sodium hydroxide น้อยกว่าความเป็นจริง

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

สารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้ที่ใช้	% ของความเข้มข้นของ ammonia solution ที่คลาดเคลื่อน		
	อินดิเกเตอร์ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์	อินดิเกเตอร์ที่ทำให้บริสุทธิ์แบบง่าย	อินดิเกเตอร์บริสุทธิ์
ทองหลางใบลาย	+ 1.79	+ 1.58	+ 1.58
ทองหลางน้ำ	+ 1.58	+ 1.67	+ 1.58
อัญชัน	+ 2.42	+ 1.79	+ 1.71
พู่ระโหง	+ 2.00	+ 1.46	+ 1.42
ชบา	+ 2.00	+ 1.42	+ 1.46
พุทธรักษา	+ 2.12	+ 1.67	+ 1.63
ซ่องนางใหญ่	+ 2.29	+ 1.92	+ 1.79
เฟื่องฟ้า 1.	+ 1.79	+ 1.58	+ 1.54
เฟื่องฟ้า 2.	+ 1.75	+ 1.58	+ 1.58
กุหลาบ 1.	+ 1.92	+ 1.54	+ 1.54
กุหลาบ 2.	+ 1.83	+ 1.58	+ 1.54
เฉลี่ย	+ 1.95	+ 1.62	+ 1.58
Bromthymol Blue	0.00		

หมายเหตุ + แสดงว่าความเข้มข้นของ ammonia มากกว่าความเป็นจริง

— แสดงว่าความเข้มข้นของ ammonia น้อยกว่าความเป็นจริง

จากตารางที่ 36 เป็นการ titrate ของปฏิกริยาระหว่างกรดแก่กับด่างแก่ จะเห็นได้ว่าความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นเมื่อใช้อินดิเกเตอร์ทั้งสามแบบจะทำให้ค่าของความเข้มข้นของ sodium hydroxide มากกว่าความเป็นจริง และจะแตกต่างกันเล็กน้อย โดยอินดิเกเตอร์ที่ไม่บริสุทธิ์จะเกิดความคลาดเคลื่อนมากที่สุด (+ 1.78 %) มีข้อสังเกตอยู่ว่าอินดิเกเตอร์บริสุทธิ์ (+ 1.23 %) เกิดความคลาดเคลื่อนมากกว่าอินดิเกเตอร์ที่ทำให้บริสุทธิ์แบบง่าย (+ 1.19 %) ความคลาดเคลื่อนอันนี้น่าจะมาจากการทดลองมากกว่าความคลาดเคลื่อนของอินดิเกเตอร์ อย่างไรก็ตาม ทำให้สามารถอธิบายได้อีกทางหนึ่งว่า การมี impurities ผสมอยู่เพียงเล็กน้อย จะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนสีของอินดิเกเตอร์ในปฏิกริยาระหว่างกรดแก่กับด่างแก่

จากตารางที่ 37 เป็นการ titrate ของปฏิกริยาระหว่างกรดแก่กับด่างอ่อน จะเห็นได้ว่าความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นเมื่อใช้อินดิเกเตอร์ทั้งสามแบบจะทำให้ค่าของความเข้มข้นของ ammonia น้อยกว่าความเป็นจริง แต่เกิดขึ้นได้น้อยมาก (– 0.51 %, – 0.41 % และ – 0.29 %) ซึ่งสรุปได้ว่าอินดิเกเตอร์จากดอกไม้สามารถนำไปใช้ในปฏิกริยาระหว่างกรดแก่กับด่างอ่อนได้ดี

จากตารางที่ 38 เป็นการ titrate ของปฏิกริยาระหว่างกรดอ่อนกับด่างแก่ จะเห็นได้ว่าอินดิเกเตอร์ทั้งสามแบบจะเกิดความคลาดเคลื่อนใกล้เคียงกันและมากพอสมควร (+ 3.97 %, + 3.88 % และ + 3.90 %) ซึ่งสรุปได้ว่า จะนำอินดิเกเตอร์ไปใช้ในปฏิกริยาดังกล่าวนี้ได้ก็ต่อเมื่อการทดลองนั้นไม่ต้องการความละเอียดในการหาปริมาณมากนัก

จากตารางที่ 39 เป็นการ titrate ของปฏิกริยาระหว่างกรดอ่อนกับด่างอ่อน จะเห็นได้ว่าความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นมีน้อย (+ 1.95 %, + 1.62 % และ + 1.58 %) และอินดิเกเตอร์ทั้งสามแบบเกิดความคลาดเคลื่อนต่างกันเพียงเล็กน้อย โดยอินดิเกเตอร์ไม่บริสุทธิ์จะเกิดความคลาดเคลื่อนมากที่สุด

จากการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่า ความบริสุทธิ์ของสารอินดิเกเตอร์จะมีผลน้อยมากสำหรับการทดลองในด้านปริมาณวิเคราะห์ และอินดิเกเตอร์จากดอกไม้เหมาะที่จะนำไปใช้ในการ titrate ของปฏิกริยาระหว่างกรดแก่กับด่างแก่ กรดแก่กับด่างอ่อน และกรดอ่อนกับด่างแก่ สำหรับปฏิกริยาระหว่างกรดอ่อนกับด่างแก่ก็ใช้ได้เช่นกัน แต่ความคลาดเคลื่อนมีมากกว่าปฏิกริยาอื่น ๆ

5.30 <u>อภิปรายผลการเก็บรักษาสารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้</u>

จุดมุ่งหมายสำคัญของการทดลองในข้อนี้ก็เพื่อที่จะหาวิธีเก็บสารอินดิเกเตอร์ในรูปของสารละลายไว้ใช้ในโอกาสต่าง ๆ โดยอินดิเกเตอร์ที่เก็บไว้นั้นต้องไม่เสื่อมคุณภาพ จากการทดลองมีข้อที่ควรนำมาอภิปรายดังนี้

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

2. สารอินดิเกเตอร์จะมีคุณภาพคงเดิมเมื่อเก็บไว้ในสารละลายของethanolic hydrogen chloride 1% แต่ในสารละลายของ 0.1 M hydrochloric acid เมื่อเก็บไว้นาน ๆ จะเกิดเป็นวุ้นสีแดง ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากเชื้อราที่มีอยู่ในสารละลาย

3. จากผลในข้อ 1 และ 2 จึงสรุปได้ว่า ไม่ควรเก็บสารละลายอินดิเกเตอร์ไว้ใช้ในงานด้านปริมาณวิเคราะห์ เพราะตัวทำละลายที่ใช้เก็บสารอินดิเกเตอร์นั้นมีฤทธิ์เป็นกรด ซึ่งจะมีผลทำให้งานด้านปริมาณวิเคราะห์เกิดความผิดพลาดได้ อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาสารอินดิเกเตอร์ไว้ในสารละลายของกรดนี้ย่อมนำไปใช้ได้กับการทดลองที่ต้องการจะศึกษาถึงรายละเอียดเกี่ยวกับสารอินดิเกเตอร์ชนิดนั้น ๆ เพราะการเริ่มต้นจากการสะกัดใหม่ทำให้บริสุทธิ์ใหม่อยู่เรื่อย ๆ ไปย่อมไม่ช่วยให้งานวิจัยก้าวหน้าไปได้

4. สำหรับโรงเรียนที่ขาดอุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ ไม่ควรมีการเก็บสารอินดิเกเตอร์เอาไว้ เมื่อใช้สารละลายอินดิเกเตอร์แล้วที่เหลือให้ทิ้งไป ถ้าต้องการใช้ใหม่ก็ให้เตรียมใหม่ ซึ่งวิธีเตรียมนั้นง่ายมาก ตัวอย่างเช่น เอาลูกเถาคัน (สีม่วงดำ) มา 2 – 3 ลูก เอาช้อนกดให้แตก เติมน้ำลงไป 20 ml. เขย่า 5 นาที กรองเอาสารละลายที่ได้ไปใช้เป็นสารละลายอินดิเกเตอร์ได้ทันที

5. สาเหตุประการหนึ่งของที่มีของการทดลองนี้ ก็เนื่องมาจากไม่ประสพผลสำเร็จในการที่จะเก็บสารอินดิเกเตอร์ในรูปของผลึก ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่า ความเข้มข้น pH ของสารละลาย และตัวทำละลายที่ใช้ในการตกผลึก ยังไม่ใช่สภาวะที่เหมาะสม ซึ่งควรจะได้มีการศึกษาค้นคว้าในเรื่องนี้กันต่อไป

6. การเก็บรักษาสารอินดิเกเตอร์ในรูปของของแข็งโดยการระเหยเอาตัวทำละลายออกให้หมดโดยวิธีลดความดัน หรือวิธีทำให้ตกตะกอนโดยใช้ ether[21] มีขอบเขตจำกัดมาก เพราะเป็นการลงทุนที่สูง โรงเรียนที่ขาดอุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ย่อมไม่อาจจะกระทำได้ แม้โรงเรียนที่มีอุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ครบก็ไม่กล้าที่จะกระทำเพราะต้นทุนในการทำสูงกว่าการที่จะไปซื้ออินดิเกเตอร์จากท้องตลาด

6.00 <u>อภิปรายผลเกี่ยวกับการศึกษารายละเอียดสารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้</u>

6.10 <u>ผลเกี่ยวกับปริมาณของ anthocyanin ในดอกไม้</u>

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

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

2. ดอกไม้ที่มีพื้นที่ผิวที่มีสีมากจะมีปริมาณ anthocyanin มากกว่าดอกไม้ที่มีพื้นที่ผิวที่มีสีของดอกติดอยู่น้อย (เมื่อคิดเต็มทั้งกลีบดอกและมีความเข้มของสีเท่า ๆ กัน) เช่น ดอกกุหลาบ 2 สีแดงเข้มเต็มทั้งกลีบดอก มี anthocyanin 3.92 % ดอกอัญชันสีน้ำเงินเข้มมีสีประมาณ $\frac{3}{4}$ ของกลีบดอก มี anthocyanin 2.98 %

3. ดอกไม้ที่มีกลีบดอกหนาจะมีปริมาณของ anthocyanin น้อยกว่าดอกไม้ที่มีกลีบดอกบาง (เมื่อเทียบกับดอกที่มีความเข้มของสีเท่า ๆ กัน) เช่น ดอกทองหลางใบลายกลีบหนาสีแดงสด มี anthocyanin 2.36 % ดอกกุหลาบ 1 กลีบบางสีแดงสดมี anthocyanin 3.55 %

ข้อควรสังเกตอีกประการหนึ่งคือน้ำหนักร้อยละของ anthocyanin ที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 22 นั้น ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดย column chromatography ทั้งสิ้น

---

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

(ตามวิธีการในบทที่ 3 ข้อ 4.2.2) ซึ่งเป็นตัวเลขที่มากพอสมควร เช่น ดอกช้องนางมี anthocyanin ในกลีบดอกถึง 3.41 % เมื่อนำไปเทียบกับปริมาณของดอกช้องนางที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีตกตะกอน ตามการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 4.2.1 ได้ปริมาณของ anthocyanin ในดอกช้องนางเพียง 0.6 % เท่านั้น ซึ่งเป็นตัวเลขที่แตกต่างกันมาก ทำให้สรุปได้ว่า วิธีการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนนั้น จะเสีย yield มากกว่าการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ column chromatography การสรุปดังกล่าวนี้สามารถยืนยันได้โดยการทดลองของ Willstatter กับ Nolan[22] เขาทดลองหาปริมาณของ anthocyanin ในดอกกุหลาบ (ไม่ได้บอกชื่อพันธุ์) โดยวิธีทำให้ตกตะกอนด้วย ether ได้ yield ออกมาเพียง 0.65 % เท่านั้น ซึ่งถ้านำไปเทียบกับดอกกุหลาบ 1 หรือดอกกุหลาบ 2 ดังแสดงในตารางที่ 22 จะเห็นได้ว่าแตกต่างกันมาก

6.20 <u>อภิปรายเกี่ยวกับ absorption spectra ของ anthocyanins</u>

ผลการทดลอง (primary data และ graph) ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ข. หน้า 151 ซึ่งทำให้ได้ค่า maximum absorption ของ anthocyanins ที่ช่วงคลื่นต่าง ๆ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 23 (หน้า 77) จากการทดลองมีสิ่งที่ควรนำมาอภิปรายดังนี้

1. ข้อควรระวังในการใช้ spectronic 20 ก็คือการใช้ cuvette จะต้องใช้อันเดิมตลอดและตำแหน่งของ cuvette ที่เสียบลงในช่องควรอยู่ในตำแหน่งเดิมทุกครั้ง มิฉะนั้นจะทำให้ค่า absorption coefficient ผิดไปได้ ผลอันนี้จะเกิดขึ้นอย่างมากที่ช่วงคลื่นใกล้จุด maximum absorption

2. สารละลายที่ไหลออกจาก column ใหม่ ๆ ใช้หา maximum absorption ได้ แต่มีข้อระวังอยู่ว่า ตัวทำละลายที่ใช้ทำ blank นั้น จะต้องให้ถูกต้องกับตัวทำละลายในสารละลายอินดิเกเตอร์ชนิดนั้น ๆ ด้วย

3. ในกรณีของกุหลาบ 1 (Rosa Floribunda) มี anthocyanin 2 ชนิด ใช้ anthocyanin ในรูปของแข็งมาละลายใน methanolic hydrogen chloride 1 % ไม่ได้ จะต้องเอาไปผ่าน alumina column ก่อนเพื่อให้แยกออกจากกัน (ตามข้อ 4.2.2) แล้วจึงนำไปหาค่า maximum absorption

---

[22] Willstatter, R., and Nolan, T. J., <u>Chem.Abs.</u>, <u>9</u>, 1302(1915).

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

5. จากตารางที่ 23 จะเห็นได้ว่า maximum absorption ของ anthocyanin จะอยู่ในช่วงระหว่าง 5000 - 5500 A° ซึ่งตรงกับการสรุปของ Gillam กับ Stern[23]

6. ค่า maximum absorption นี้ใช้เป็นส่วนหนึ่งในการ identify สาร anthocyanin ดังแสดงในตารางที่ 40 (หน้า 124)

6.30 การ Identify อินดิเกเตอร์โดย Paper Chromatography ทั้งในรูป Anthocyanins และ Anthocyanidins

จุดมุ่งหมายสำคัญของการทดลองในข้อนี้ก็เพื่อที่จะพิสูจน์ว่าอินดิเกเตอร์ที่มีอยู่ในดอกไม้นั้นคือสารอะไร จากผลของการทดลองมีข้อควรสังเกตและสิ่งที่ควรนำมาอภิปรายดังนี้

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

2. การเตรียม solvent เก็บเอาไว้ใช้ในเวลาต่างกัน จะมีผลต่อ Rf value เช่น ใน BAW system ที่จะใช้กับ anthocyanins จะให้ Rf value คงที่เมื่อเตรียม solvent เก็บไว้ 3 วัน[24] แล้วจึงนำไปใช้สำหรับ BuHCl system ต้องเก็บไว้ 24 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้ และกระดาษที่จะใช้ต้องนำไปเก็บไว้ในบรรยากาศภายใน tank ที่มี solvent ชั้นล่าง (lower aqueous phase) ของ BuHCl เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน[25]

---

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

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

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

โดยวิธีนี้จะทำให้ Rf value เกือบคงที่

3. BAW system ที่จะใช้กับ anthocyanidins เมื่อเตรียมเสร็จแล้วให้ใช้ทันที และกระดาษที่จะใช้ ก่อนจุด anthocyanidins ลงบนกระดาษ ให้นำกระดาษจุ่มลงใน 0.2 M hydrochloric acid แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งสนิทเสียก่อน ทั้งนี้เพื่อป้องกันการจางหายไปของจุดในขณะ run ใน tank[26]

4. BAW และ BuHCl systems solvents จะไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน[27] ปลายกระดาษที่จุ่มลงใน solvent ให้จุ่มอยู่เฉพาะส่วนบนเท่านั้น (upper organic phase) ถ้าหากปลายกระดาษจุ่มลงไปถึง phase ชั้นล่างแล้วจะทำให้ Rf value ผิดไป เพราะ aqueous phase (ชั้นล่าง) จะวิ่งนำ organic phase ขึ้นมาบนกระดาษ ผลก็คือทำให้ Rf value มากกว่าความเป็นจริง

5. สารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้ทุกชนิดเมื่อผ่านออกมาจาก column chromatography จะต้องตรวจความบริสุทธิ์ชั้นต้นก่อน โดยใช้ spectronic 20 กล่าวคือ

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

ข. ถ้า maximum absorption(λ max) ของสารที่ผ่านออกมาจาก column แต่ละ fraction (fraction ละ 3 ml) ยังเคลื่อนที่ ก็แสดงว่าสารยังไม่บริสุทธิ์ ตัวอย่างเช่นในการทำดอกอัญชัน (ม่วง) ให้บริสุทธิ์ fraction แรก ๆ ของสารที่ผ่านออกมาจาก column อาจจะมี maximum absorption มาก (หรือน้อยกว่า) 5400 Å ส่วนนี้ให้ทิ้งไปได้ เพราะมี impurity อยู่มาก เก็บเอาเฉพาะส่วนที่มีสีเข้มข้นที่ไหลออกมาจาก column เมื่อนำไปวัดหาค่า maximum absorption ถ้าปรากฏว่าอยู่ที่ 5400 Å ทุก ๆ fraction ก็แสดงว่าสารที่ได้บริสุทธิ์ แต่ถ้าแต่ละ fraction ยังมีค่า maximum absorptio เบี่ยงเบน (มากขึ้นหรือน้อยลง) แสดงว่าสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ ต้องนำไปผ่าน column ซ้ำอีก

---

26 Bate-Smith, E.C., <u>Biochem. J.</u>, <u>58</u>, 122 (1954).

27 Harborn, J.B., <u>Nature</u>, <u>179</u>, 429 (1957).

จนได้ค่า maximum absorption ที่ 5400 Å ดังที่จึงจะแสดงว่าสารนั้นบริสุทธิ์

6. Anthocyanins จากดอกไม้ทุกชนิดก่อนนำมาทำให้บริสุทธิ์ ต้องนำไปทำลาย acylated link ก่อน[28] โดยการเติมด่างลงไปจนกระทั่งสารละลายมีสีเขียว จากนั้นทำให้เป็นกรดอีกครั้ง โดยการเติม hydrochloric acid จนได้สารละลายที่มีสีม่วงแดง

7. Anthocyanins ชนิดที่เป็น diglucoside เมื่อทำให้บริสุทธิ์ได้ใหม่ ๆ ต้องนำไป identify โดย paper chromatography ทันที ถ้าเก็บไว้นาน ๆ (ประมาณ 10 วัน) เมื่อนำไปทำ paper chromatogram จะได้ออกมา 2 จุด หรือมากกว่า ปรากฏการอันนี้อธิบายได้ว่าในสารละลายของกรดเจือจาง anthocyanins diglucoside จะถูก hydrolysed ได้ช้า ๆ กลายเป็น anthocyanins monoglucoside และเมื่อ hydrolysed ขั้นต่อไปก็จะกลายเป็น anthocyanidins จากการทดลองพบว่าปรากฏการอันนี้เกิดขึ้นน้อยมาก แต่ก็สามารถสังเกตได้จาก chromatogram

8. จากการใช้ crude extract มาทำ paper chromatogram พบว่า ในดอกไม้แต่ละชนิดส่วนใหญ่จะมี impurities ซึ่งได้แก่พวก anthoxanthins[29] และอื่น ๆ ปนอยู่ประมาณ 50 % และอีกครึ่งหนึ่งเป็น anthocyanins นอกจากนี้ยังพบว่า นอกจากจะมี main product anthocyanin แล้ว ยังมีส่วนน้อย ๆ ของ anthocyanins ชนิดอื่นผสมอยู่ด้วย 1 หรือ 2 ชนิด จากการทดลองหา Rf value ของ anthocyanins จาก crude extract ปรากฏว่าแตกต่างกับ Rf value ของ anthocyanins เมื่ออยู่ในรูปบริสุทธิ์มาก ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากผลของการที่มี impurity จำนวนมากผสมอยู่

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

---

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

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

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

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

	maximum absorption A°	Rf value in						colour of spot.
		BAW	BuHCl	1%HCl	HAc-HCl	Forestal	Formic	
<u>ทองหลางใบลาย</u>								
anthocyanidin	-	.704	-	-	-	.628	.302	m
anthocyanin	5162	.289	.118	.380	.592	-	-	p
Peonidin :	-	.71	-	-	-	.63	.30	m
-3-rhamnoglucosido -5- glucoside	-	.29	.12	.37	.60	-	-	p
<u>ทองหลางน้ำ</u>								
anthocyanidin	-	.705	-	-	-	.629	.304	m
anthocyanin	5168	.291	.121	.375	.591	-	-	p
Peonidin :	-	.71	-	-	-	.63	.30	m
-3-rhamnoglucosido -5- glucoside	-	.29	.12	.37	.60	-	-	p

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

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

	maximum absorption A°	Rf value in						Color of spot.
		BAW	BuHCl	1%HCl	HAc-HCl	Forestal	Formic	
กุหลาบ 2 F^2								
anthocyanidin	-	.672	-	-	-	.493	.219	m
anthocyanin	5270	.251	.082	.377	.598	-	-	m
Cyanidin :	-	.68	-	-	-	.49	.22	m
-3-rhamnoglucoside -5-glucoside	-	.25	.08	.36	.59	-	-	m
กุหลาบ 2								
anthocyanidin	-	.673	-	-	-	.492	.221	m
anthocyanin	5210	.282	.061	.165	.400	-	-	m
Cyanidin :	-	.68	-	-	-	.49	.22	m
-3,5-diglucoside	5210	.28	.06	.16	.40	-	-	m

r = red m = magenta

or = orange red p = pink

o = orange pu = purple

oy = orange yellow ma = mauve

จากผลการเปรียบเทียบดังแสดงในตารางที่ 40 สรุปได้ดังนี้

anthocyanin ที่มีอยู่ในกลีบดอกทองหลางใบลายคือ Peonidin-3-rhamnoglucosido-5-glucoside

anthocyanin ที่มีอยู่ในกลีบดอกทองหลางน้ำคือ Peonidin-3-rhamnoglucosido-5-glucoside

anthocyanin ที่มีอยู่ในกลีบดอกอัญชันคือ Delphinidin-3,5-diglucoside

anthocyanin ที่มีอยู่ในกลีบดอกพุระโหงคือ Petunidin-3-monoglucoside

anthocyanin ที่มีอยู่ในกลีบดอกชบาคือ Petunidin-3-monoglucoside

anthocyanin ที่มีอยู่ในกลีบดอกพุทธรักษาคือ Cyanidin-3-monoglucoside

anthocyanin ที่มีอยู่ในกลีบดอกช้องนางใหญ่คือ Petunidin-3,5-diglucoside

anthocyanin ที่มีอยู่ในกลีบดอกเฟื่องฟ้า 1 คือ Pelagonidin-3-diglucoside

anthocyanin ที่มีอยู่ในกลีบดอกเฟื่องฟ้า 2 คือ Cyanidin-3,5-diglucoside

anthocyanin ที่มีอยู่ในกลีบดอกกุหลาบ 1 F^1 คือ Pelagonidin-3-diglucoside

anthocyanin ที่มีอยู่ในกลีบดอกกุหลาบ 1 F^2 คือ Cyanidin-3-rhamnoglucoside-5-glucoside

anthocyanin ที่มีอยู่ในกลีบดอกกุหลาบ 2 คือ Cyanidin-3,5-diglucoside

6.40 <u>อภิปรายเกี่ยวกับค่า pKa ของอินดิเกเตอร์จากดอกไม้</u>

จุดมุ่งหมายสำคัญของการทดลองในข้อนี้ก็เพื่อที่จะทราบว่าอินดิเกเตอร์ที่ได้นี้เหมาะที่จะนำไปใช้ในการทดสอบสารประเภทใด โดยการนำค่า pKa ของอินดิเกเตอร์มาใช้ในการพิจารณา กล่าวคือ

อินดิเกเตอร์คือสารอินทรีย์ที่มีฤทธิ์เป็นกรดหรือด่างอ่อน ๆ สมมุติให้มีสูตรเป็น HIn ดังนั้นเมื่อละลายอยู่ในน้ำมันจะเกิดการ ionise เป็นดังนี้

$$HIn \rightleftharpoons H^+ + In^-$$

$$\therefore \quad Ka = \frac{[H^+][In^-]}{[HIn]}$$

และ

$$-\log Ka = -\log[H^+] - \log\frac{[In^-]}{[HIn]}$$

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

จาก (1) จะเห็นได้ว่า $\frac{[In^-]}{[HIn]}$ ก็คือ $\frac{\text{(basic form)}}{\text{(acid form)}}$ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการที่ทราบ pKa ของอินดิเกเตอร์ ก็สามารถที่จะหาช่วง pH ของการเปลี่ยนสีโดยประมาณของอินดิเกเตอร์ชนิดนั้นได้ โดยกำหนดว่าสายตาสามารถมองเห็นความแตกต่างของสีระหว่าง basic form กับ acid form ของอินดิเกเตอร์ เมื่อทั้งสอง forms นี้ มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 1 : 10[30] กล่าวคือ

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

นำ (2) ไปแทนค่าใน (1) จะได้

$$pKa = pH \pm \log \frac{1}{10}$$

$$= pH \pm 1$$

หรือ

$$pH = pKa \pm 1 \quad ....(3)$$

ช่วงของ pH ที่อ่านได้ตาม (3) นี้ คือช่วง pH ที่จะเกิดการเปลี่ยนสีของอินดิเกเตอร์โดยประมาณ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการที่ทราบ pKa ของอินดิเกเตอร์ ก็สามารถที่จะหาช่วง pH ที่เกิดการเปลี่ยนสีของอินดิเกเตอร์ได้ และการที่ทราบช่วง pH ที่เปลี่ยนสีของอินดิเกเตอร์นี้จะช่วยให้สามารถเลือกใช้อินดิเกเตอร์ให้เหมาะสมกับ system ของการทดลองได้ เช่น ในการ titrate หาปริมาณของสารที่ทราบ equivalent point (จากการคำนวณ) สมมุติว่าอยู่ที่ pH 7 ดังนั้นจึงควรเลือก bromthymolblue เป็นอินดิเกเตอร์ เพราะมีช่วง pH ของการเปลี่ยนสีอยู่ที่ pH 6.0 – 7.0[31] ในบางกรณีอาจจะหา bromthymolblue ไม่ได้ก็อาจจะใช้อินดิเกเตอร์ชนิดอื่น ๆ ที่มีช่วง pH ของการเปลี่ยนสีใกล้เคียงกันนี้ก็ได้เช่นเดียวกัน ความแตกต่างระหว่างจุดที่อินดิเกเตอร์เปลี่ยนสี (end point) กับจุดที่สารทำปฏิกริยากันพอดี (equivalent point) ถ้ามีเพียงเล็กน้อย ความคลาดเคลื่อน (error) ของการทดลองย่อมเกิดไม่มาก

---

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

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

สำหรับการทดลองหาค่า pKa แบ่งออกเป็นสองวิธี คือ วิธีการแบบง่าย และวิธีการที่มีประสิทธิภาพ มีสิ่งที่จะนำมาอภิปรายดังนี้

6.4.1 <u>วิธีการแบบง่าย</u> (วิธีเทียบสี) วิธีการนี้ได้ดัดแปลงมาจากวิธีหา pH ของสารละลายของ UNESCO Pilot Project[31] โดยทราบค่า pKa ของอินดิเกเตอร์ ในทางกลับกัน ถ้าทราบ pH ของสารละลายก็มีทางที่จะทราบ pKa ของอินดิเกเตอร์ได้เช่นเดียวกัน โดยอาศัยสมการ (1) ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น (ข้อ 6.40) ความคลาดเคลื่อนที่จะเกิดขึ้นกับการทดลองโดยวิธีนี้มีหลายกรณี คือ

1. ความบริสุทธิ์ของสารอินดิเกเตอร์ จากการทดลองพบว่า ถ้าใช้อินดิเกเตอร์ที่ทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีการแบบง่ายมาหาค่า pKa สีของอินดิเกเตอร์ในสารละลายของด่างใน blank tube จะมีสีเขียวแล้วค่อย ๆ กลายเป็นสีเหลือง เมื่อนำมาเทียบกับสีแดงของอินดิเกเตอร์ในสารละลายของกรด ย่อมทำให้สีแดงมีลักษณะเด่นมากกว่าความเป็นจริง ผลก็คือทำให้หาค่า pKa ออกมาน้อยกว่าความเป็นจริง จากการทดลองโดยวิธีนี้สามารถหาค่า pKa ออกมาได้ประมาณ 1.5 + 1.0 ซึ่งผลอันนี้ทำให้ขัดกับผลการทดลองในข้อ 5.20 เกี่ยวกับปริมาณวิเคราะห์ กล่าวคือจากการใช้สารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้ในการหาปริมาณของสารตามการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 5.20 ซึ่งสรุปไว้ในข้อ 5.20 (บทที่ 4) ได้ว่า สารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้สามารถนำไปใช้ในการหาปริมาณของสารในขบวนการ titration ได้ดีถึง 3 systems คือ ระหว่างกรดแก่กับด่างแก่ กรดแก่กับด่างอ่อน และกรดอ่อนกับด่างอ่อน แต่ถ้าหากว่าค่าของอินดิเกเตอร์จากดอกไม้เป็น 1.5 ± 1.0 จริงแล้วจะต้องนำไปใช้ในขบวนการ titration ได้เฉพาะการ titrate ระหว่างกรดแก่กับด่างอ่อนเท่านั้น

ถ้าใช้อินดิเกเตอร์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการที่มีประสิทธิภาพในสารละลายของด่างจะมีสีน้ำเงิน เมื่อนำไปเทียบสีจะทำให้สีแดงถูกเบียดบังได้มาก ผลก็คือทำให้ได้ค่า pKa มากขึ้น จากการทดลองพบว่าดอกไม้ทุกชนิดจะให้ค่า pKa เป็น 4.00 ± 1.05 (ดังแสดงในตารางที่ 33 หน้า 91 จากตัวเลขอันนี้เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับผลการทดลองในข้อ 5.20 (เกี่ยวกับการ titration) จะเห็นได้ว่าสอดคล้องกันมากขึ้น อย่างไรก็ตาม การทดลองโดยวิธีนี้ก็มีข้อควรระวังเช่นเดียวกัน กล่าวคือ เมื่อเตรียมสารอินดิเกเตอร์ในสารละลายของด่างที่ใช้

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

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

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

4. การทดลองวิธีนี้เหมาะสำหรับกรณีที่ต้องการหาค่า pKa อย่างหยาบ สามารถใช้ได้ทั่วไป แม้กระทั่งสถาบันที่มีอุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ไม่มาก ก็สามารถที่จะทำการทดลองตามวิธีนี้ได้ นอกจากนี้วิธีทดลองดังกล่าวนี้สามารถนำไปใช้งานการเรียนวิชาเคมีภาคปฏิบัติการในสถาบันอุดมศึกษาได้

6.4.2 <u>วิธีการที่มีประสิทธิภาพ</u> (spectrophotometric method)

การทดลองวิธีนี้อาศัยหลักการที่ว่า anthocyanin เมื่ออยู่ในสารละลายของกรด pH ต่ำ) มันจะดูดกลืน (absorb) แสงได้ดีที่สุดที่ช่วงคลื่นหนึ่งในช่วงคลื่นของแสงที่มองเห็นได้ (visible light) และที่ช่วงคลื่นเดียวกันนี้มันจะดูดกลืนได้น้อยเมื่ออยู่ในสารละลายของด่าง pH สูง) ดังนั้นถ้าให้ปริมาณของ anthocyanin และช่วงคลื่น (ที่ maximum absorption) คงที่ แล้วแปรผัน pH ของสารละลายโดยวิธีนี้เราสามารถหา pH ของสารละลายตรงจุดที่มี acid form เท่ากับ basic form ได้ (จุดที่มีการกระโดดของโค้งมากที่สุด) pH ที่อ่านได้ที่จุดนี้ก็คือ pKa ของ anthocyanin (สารอินดิเกเตอร์) เหตุผลคือ

เราทราบว่า

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

แต่ basic form = acid form

$\therefore$ pKa = pH - log $\frac{1}{1}$

$\therefore$ pKa = pH

นั่นคือ pH ของสารละลายจะเท่ากับ pKa ของอินดิเกเตอร์เมื่อ acid form และ basic form ของอินดิเกเตอร์ในสารละลายเท่ากัน

สำหรับการทดลองในเรื่องนี้มีข้อที่ควรนำมาอภิปรายดังนี้

1. ปริมาตรของสารละลายอินดิเกเตอร์ที่ใช้ (ครั้งละ 1.00 ml. ต่อสารละลาย 10.00 ml.) จะมีผลต่อค่า absorption coefficient อย่างมาก การวัดปริมาตรของสารละลายอินดิเกเตอร์ผิดเพียงเล็กน้อย จะทำให้ absorption coefficient ผิดไปด้วย ผลก็คือ ค่า pKa ที่จะได้ย่อมผิดไปด้วยเช่นกัน

2. ความบริสุทธิ์ของสารอินดิเกเตอร์มีความสำคัญมากต่อการทดลอง ทั้งนี้เพราะว่าในขณะที่สารอินดิเกเตอร์ดูดกลืนแสง impurities ก็ย่อมที่จะดูดกลืนแสงด้วย ดังนั้นค่า pKa ที่อ่านได้จึงไม่ใช่ค่า pKa ของสารอินดิเกเตอร์ที่แท้จริง นอกจากนี้จากการทดลองยังพบว่า impurities ที่มีอยู่ในสารละลายมีผลทำให้ absorption coefficient ที่อ่านได้แต่ละช่วงของ pH ไม่เป็นระเบียบซึ่งยากต่อการเขียนเส้นโค้ง (curve) ปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นมากเมื่อสารละลายใกล้จะเป็นกลาง (pH 5 - 7)

3. ที่ pH ของสารละลายใกล้จะเป็นกลาง เมื่อเตรียมสารละลายเสร็จต้องรีบนำไปวัดหาค่า absorption coefficient ทันที ไม่ควรปล่อยทิ้งไว้เกิน 15 วินาที เพราะสารละลายเกิดการ form pseudo base ทำให้สีของสารละลายจืดลงจะทำให้ค่า absorption coefficient ผิดไป จากการทดลองพบว่าถ้าสารละลายอินดิเกเตอร์มี impurity ผสมอยู่มาก ค่า absorption coefficient ก็จะผิดไปมาก และถ้าในสารละลายมี acetate ion ผสมอยู่ด้วย อัตราเร็วของการ form pseudo base จะมากขึ้น

4. การทดลองนี้ไม่เหมาะที่จะนำไปใช้กับสถาบันที่ขาดอุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ เพราะเครื่องมือต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในการทดลองมีราคาแพง แต่วิธีนี้เหมาะสำหรับกรณีที่ต้องการจะ

ศึกษาถึงรายละเอียดของสารอินดิเกเตอร์จากดอกไม้เท่านั้น และการทดลองดังกล่าวนี้นำไปใช้ในการเรียนวิชาเคมีภาคปฏิบัติการในระดับอุดมศึกษาได้

6.4.3 <u>เปรียบเทียบค่า pKa ระหว่างวิธีการแบบง่ายกับวิธีการที่มีประสิทธิภาพ</u>

pKa ที่ได้จากการหาโดยวิธีแบบง่ายดังแสดงในตารางที่ 33 (หน้า 91) จะเห็นได้ว่าดอกไม้ทุกชนิดมีค่า pKa เท่ากัน คือ 4.00 และมีพิสัย (range) เป็น ± 1.05 เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับค่า pKa ที่ได้จากวิธีการที่มีประสิทธิภาพดังแสดงในตารางที่ 34 (หน้า 94 จะเห็นได้ว่าค่า pKa ของดอกไม้แต่ละชนิดแตกต่างกันออกไปเล็กน้อย และเป็นค่าที่เชื่อถือได้เพราะมีวิธีการและเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูง อย่างไรก็ตามค่า pKa ที่ได้จากวิธีการแบบง่ายก็ยังถือว่ามีประโยชน์ เพราะจะช่วยให้สามารถนำเอาอินดิเกเตอร์จากดอกไม้ไปใช้ในขบวนการของ acid - base titrationได้ถูกต้อง

6.50 <u>อภิปรายผลเกี่ยวกับปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของ anthocyanin และ anthocyanidin</u>

เนื่องจาก anthocyanins และ anthocyanidins เป็นหมู่สารที่มีโครงสร้างส่วนใหญ่คล้ายกัน จะแตกต่างกันบ้างก็เฉพาะตำแหน่งและจำนวน hydroxyl groups และตำแหน่ง จำนวน และชนิดของน้ำตาล (ในกรณีของ anthocyanin) ที่มาต่อเป็น functional group เท่านั้น groups ต่าง ๆ เหล่านี้จะมีผลต่อปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีน้อยมาก ดังนั้นปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีส่วนใหญ่จึงคล้ายกันและยากที่จะนำไปใช้ในการพิสูจน์สาร anthocyanin และ anthocyanidin ได้ อย่างไรก็ตามยังมีบางปฏิกิริยาที่พอจะนำมาใช้ในการพิสูจน์อย่างหยาบ ๆ ได้ คือปฏิกิริยาของ Ferric chloride[32] ($FeCl_3$) ในสารละลายที่เป็นกรด กล่าวคือ ถ้า anthocyanin (หรือ **anthocyanidin**) ผสมกับ ferric chloride ในสารละลายของกรด anthocyanin (หรือ anthocyanidin) ชนิดที่เป็น cyanidins **delphinidins** และ petunidins จะให้สีน้ำเงิน[33] ส่วน anthocyanin (หรือ anthocyanidin) ชนิดอื่น ๆ จะไม่เปลี่ยนสี

---

[32] Forsyth, F.G.C., and Simmond, N.W., <u>Proc.Roy.Soc.</u>(London), <u>B 142</u>, 549 (1954).

[33] Paech, K., and Tracey, M.V., (eds), <u>loc.cit.</u>

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าปฏิกริยาดังกล่าวนี้ก็เป็นวิธีหนึ่งที่จะนำมาใช้ช่วยในการพิสูจน์สาร anthocyanins ได้ ตัวอย่างเช่น ดอกอัญชันจากปฏิกริยาสีตามการทดลองในข้อ 6.50 (บทที่ 3 หน้า 95) สามารถบอกได้อย่างกว้าง ๆ ว่าต้องเป็น cyanidins หรือ delphinidins หรือ petunidins ชนิดใดชนิดหนึ่ง จากนั้นเมื่อนำ chromatographic technique มาใช้ จึงบอกได้ว่าเป็น delphinidin-3,5-diglucoside (ตามตาราง ที่ 40 หน้า 124) จะเห็นได้ว่า การทดลองทั้งสองตอนนี้สนับสนุนกัน ทำให้ผลการทดลองมีน้ำหนักมากขึ้น.