บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. หลักสูตรระดับประกาศนียบัตรวิชาชีพ (ปวช.) พุทธศักราช 2538 รหัสวิชา 20001401

มีคำอธิบายรายวิชาส่วนหนึ่ง คือ "ศึกษาค้นคว้า อภิปรายและทดลองเกี่ยวกับระบบนิเวศ การจำแนกสาร กรดและเบส"

การจำแนกสาร ได้แก่ การสกัดด้วยตัวทำละลาย, โครมาโทกราฟี, กรดและเบสศึกษาเรื่อง บัฟเฟอร์และอินดิเคเตอร์ (Supervisory Unit, 1995, p.3.)

2. พระราชบัญญัติการศึกษาแห่งชาติ พ.ศ. 2542

หมวด 4 แนวการจัดการศึกษา มาตรา 23 (2) การจัดการศึกษาเน้นความรู้ด้านทักษะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี รวมทั้งความรู้ความเข้าใจในประสบการณ์เรื่อง การจัดการบำรุงรักษาและการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมอย่างสมบูรณ์ยั่งยืน 'มาตรา 24 (5) ส่งเสริมสนับสนุนให้ผู้สอนสามารถจัดบรรยากาศ สภาพแวดล้อม สื่อการสอนและอำนวยความสะดวกเพื่อให้ผู้เรียนเกิดการเรียนรู้และมีความรอบรู้ รวมทั้งมีความสามารถใช้การวิจัยเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการเรียนรู้ ทั้งนี้ผู้สอนและผู้เรียนอาจเรียนรู้ได้พร้อมกัน (A Nation Educational act of legislation 2542 B.E., p.12-14)

3. คู่มือครูเรื่องสื่อการสอนจากรงควัตถุของใบหูกวาง

คู่มือครูประกอบด้วยแผนการสอน สาระสำคัญ จุดประสงค์การเรียนรู้ เนื้อหา การจัดกิจกรรมการเรียนการสอน (1. นำเข้าสู่บทเรียน, 2. ขั้นยกตัวอย่างและสาธิตการทดลอง 3. ขั้นฝึกหัด 4. ขั้นสรุป 5. ขั้นฝึกจนเกิดความชำนาญ 6. ขั้นประเมินผล) กิจกรรม, สื่อ (อุปกรณ์และสารเคมี), การวัดผลและประเมินผล (1. แบบทดสอบก่อนเรียนและ หลังสอน 2. คะแนนระหว่างเรียน-การทดลอง, แบบฝึกหัด) ; แผนการสอนละ 2 คาบ จำนวน 7 แผนการสอน

1. การสกัดรงควัตถุของใบหูกวางด้วยตัวทำละลาย
2. เปรียบเทียบความสามารถของตัวทำละลายในการสกัดรงควัตถุของใบหูกวาง
3. การแยกรงควัตถุของใบหูกวางด้วยทินแลร์โครมาโทกราฟี (การเตรียมแผ่นแก้วเคลือบตัวดูดซับ)
4. การหาค่า R_f ของรงควัตถุของใบหูกวาง
5. การทดสอบสมบัติอินดิเคเตอร์ของแอนโทไซยานินของใบหูกวาง
6. การทดสอบสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นกรด-เบสด้วยแอนโทไซยานินของใบหูกวาง
7. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงรงควัตถุของใบหูกวาง

4. หนังสือปฏิบัติการเรื่องรงควัตถุของใบหูกวาง ประกอบด้วย คำนำ, คำแนะนำในการเข้าห้องปฏิบัติการ, การทดลอง/กิจกรรม (การทดลอง 6 การทดลอง และ 1 กิจกรรม) วัตถุประสงค์การเรียนรู้, เนื้อหา, วิธีทำ และคำถามท้ายบท

การทดลองประกอบด้วย 6 การทดลองและกิจกรรม 1 กิจกรรม คือ

การทดลองที่ 1 การสกัดรงควัตถุของใบหูกวางด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ

การทดลองที่ 2 เปรียบเทียบความสามารถของตัวทำละลายในการสกัดรงควัตถุของใบหูกวาง

การทดลองที่ 3 การเตรียมแผ่นแก้วเคลือบตัวดูดซับ (ใช้ในทินแลร์โครมาโทกราฟี)

การทดลองที่ 4 การหาค่า R_f ของรงควัตถุของใบหูกวาง

การทดลองที่ 5 การทดสอบสมบัติอินดิเคเตอร์ของแอนโทไซยานินของใบหูกวาง

การทดลองที่ 6 การทดสอบสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นกรด-เบสด้วยแอนโทไซยานินของใบหูกวาง

กิจกรรมที่ 7 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงรงควัตถุของใบหูกวาง

5. ต้นหูกวาง (Tem Smitinand, 1975, p.210)

ชื่อพฤกษศาสตร์ *Terminalia catappa* Linn

วงศ์ Combretaceae

ต้นหูกวางเป็นไม้ต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ปกติเป็นไม้ชอบขึ้นตามป่าชายหาดและโขดหินริมทะเล ใบเป็นชนิดใบเดี่ยวเรียงเวียนเป็นกลุ่มอยู่ที่ปลายกิ่ง ดอกออกเป็นช่อที่ปลายกิ่ง ยาวประมาณ 12 ซม. ดอกมีทั้งดอกเพศผู้และดอกสมบูรณ์เพศ ผลแข็งกลมรี ยาว 4 ซม. กว้าง 3 ซม. ออกดอกเดือนมกราคม - กุมภาพันธ์ ครั้งหนึ่ง และเดือนกรกฎาคม - สิงหาคม อีกครั้งหนึ่ง

6. เมเปิล Maple (Encyclopedia Americana, 18, 1978, p.259)

เมเปิลเป็นต้นไม้อยู่ในสกุล (genus) Acer วงศ์ Aceraceae มีประมาณ 100 ชนิด ที่ปลูกในเขตอบอุ่น เช่น ในประเทศจีน ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และแคนาดา เป็นต้น ในอเมริกา เมเปิลชนิดที่เป็นที่รู้จักอย่างกว้างขวางและมีความสำคัญมาก คือ เมเปิลน้ำตาล (sugar maple : *A. saccharum*) เป็นต้นไม้ที่ปลูกตั้งแต่รัฐเมน ถึง มิชิแกน และทางใต้ของภูเขาจนถึงรัฐจอร์เจีย เมเปิลชนิดนี้ใบมีสีหลากหลาย (rich colors of its leaves) ในฤดูใบไม้ร่วง

7. รงควัตถุของใบไม้ ใบไม้ที่เห็นอยู่ทั่วไปส่วนใหญ่จะเป็นสีเขียว นอกเหนือจากสีเขียวสีที่อาจจะเห็นได้ก็คือ การเปลี่ยนสีของใบก่อนที่ใบไม้นั้นจะร่วง โดยเฉพาะพวกไม้ผลัดใบ ต้นไม้ใหญ่หลายชนิดเปลี่ยนสีเป็นสีเหลือง, สีแดง, สีม่วง, สีน้ำเงินและสีอื่น ๆ

ใบไม้มีสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญอยู่ 3 กลุ่ม คือ สีเขียวของคลอโรฟิลล์ สีเหลือง ส้ม แดง ของคาโรตินอยด์ สีเหลืองของฟลาโวนอยด์ สีแดง, ม่วงและน้ำเงินของแอนโทไซยานินซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) เป็นสารประกอบในกลุ่มพอร์ฟิรินมีสีเขียว มีหน้าที่สำคัญ คือ การสังเคราะห์แสง เปลี่ยนน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นคาร์โบไฮเดรท มีแสงสว่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา คลอโรฟิลล์เป็นสารที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทานอล เอทิลอีเทอร์ อะซิโตนและคลอโรฟอร์ม เป็นต้น คลอโรฟิลล์มีหลายชนิด เช่น คลอโรฟิลล์ a, b, c และ d คลอโรฟิลล์ a เป็นคลอโรฟิลล์ที่มีสีเขียวแกมน้ำเงิน คลอโรฟิลล์ b มีสีเขียวแกมเหลือง คลอโรฟิลล์ a เป็นคลอโรฟิลล์ที่พบในพืชชั้นสูง คลอโรฟิลล์ b, c และ d อาจเกิดจากคลอโรฟิลล์ a หรือเกิดจากสารที่จะเปลี่ยนไปเป็นคลอโรฟิลล์ a ก็ได้

คลอโรฟิลล์มีสีเขียวเพราะดูดกลืนแถบสี (visible spectrum) ของแสงสีน้ำเงินและแสงสีแดงเป็นส่วนใหญ่ และให้มีการส่องผ่าน (transmit) หรือสะท้อน (reflect) แสงสีน้ำเงิน-เขียว, เขียว และเหลือง (Arthur Cronquist, 1973, p.83)

ค.ศ. 1905 F.F. Blackman นักสรีรพืชศาสตร์ชาวอังกฤษ ได้ทำการทดลองการสังเคราะห์แสงของพืชโดยควบคุมแสงสว่าง พบว่าอัตราการสังเคราะห์แสงจะเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับแสงสว่างมากขึ้นแต่ปริมาณแสงสว่างที่มากเกินไปไม่มีผลต่อการสังเคราะห์แสง เขาจึงได้ทดลองควบคู่ระหว่างแสงสว่างและอุณหภูมิ Blackman ได้วัดอัตราการสังเคราะห์แสงของพืชในที่มีความสว่างน้อยโดยการเพิ่มอุณหภูมิก็พบว่าอุณหภูมิไม่มีผลต่อการสังเคราะห์แสง แต่ถ้าเพิ่มทั้งความสว่างและอุณหภูมิพืชจะมีการสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้น จกระทั่งอุณหภูมิสูงกว่า 30°C การสังเคราะห์แสงจะช้าลงและยุติการสังเคราะห์แสงลง (Peter H. Ravin and Helena Curtis. 1970, p. 219)

คาโรตินอยด์ (Carotenoids) มีสีแดง - ส้ม หรือเหลือง และละลายในตัวทำละลายไขมัน (fat soluble) คาโรตินอยด์ แบ่งออกเป็น 2 พวกใหญ่ ๆ คือ 1) คาโรทีน (carotene) มีทั้ง 3 รูป คือ แอลฟา, เบต้า และแกมม่า และไลโคพีน (lycopene) มีสูตร $C_{40}H_{56}$, 2) แซนโทฟิลล์ (xanthophyll) มีสูตร $C_{40}H_{56}O_2$ มีมากในใบของพืช แดรอท และสาหร่ายหลายชนิด (Moore, Clark, Stern, and Vodopich, 1995, p.142)

คาโรตินอยด์เป็นรงควัตถุช่วยสังเคราะห์แสง (accessory pigments) คือ ช่วยดูดกลืนพลังงานแสงแล้วส่งต่อให้คลอโรฟิลล์

คาโรทีนและแซนโทฟิลล์เกิดร่วมกับคลอโรฟิลล์ โดยเฉพาะเบต้า-คาโรทีนเป็นคาโรตินอยด์ชนิดแรกที่เกิดร่วมกับคลอโรฟิลล์ในกระบวนการสังเคราะห์แสง (Arthur Cronquist, 1973, p.85) คาโรตินอยด์เกิดขึ้นทั้งในพืชและสัตว์ สัตว์ไม่สามารถจะสร้างคาโรตินอยด์ด้วยตนเอง แต่จะใช้คาโรตินอยด์จากพืชและจากกระบวนการ metabolism เช่น คาโรตินอยด์ในไข่แดง, ขนนกฟลามิงโกและปีกแมลง เป็นต้น (Moore, Clark, Stern and Vodopich, 1995, p. 142)

ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) หรือ แอนโทแซนทีน (anthoxanthins) เป็นรงควัตถุที่มีสีเหลืองอ่อน, เหลือง, ส้ม, ส้มแดง, แดง, ม่วงและน้ำเงิน (Arthur Cronquist, 1973, p.49) ฟลาโวนอยด์ละลายน้ำได้, แบ่งเป็น 3 ประเภท คือ ฟลาโวน (flavone) และฟลาโวนอล (flavonoir) เป็นรงควัตถุสีเหลือง พบในใบพืชบางชนิดและในกลีบของดอกไม้ แอนโทไซยานิน (anthocyanin) เป็นรงควัตถุที่มีสีแดง-ม่วง-น้ำเงิน มีในแวคิวโอล (vacuolar sap) มีมากในผัก (หัวผักกาด, บีท , กะหล่ำปลีฯ), ผลไม้ (องุ่น, พลัม, เชอรี่ฯ) ดอกไม้ (cornflower, geraniums, delphinium, ดอกกุหลาบแดงและ peonies) (Peter H. Raven and Helena Curtis, 1970, p.59-60)

แอนโทไซยานิน ส่วนใหญ่ให้สีแดง สีม่วง และสีน้ำเงินในพืชชั้นสูง เนื่องจากพืชเหล่านี้มีน้ำตาลอยู่ด้วย การเกิดแอนโทไซยานินในพืชสัมพันธ์กับการเกิดคาร์โบไฮเดรท ในบางกรณีปริมาณของแสงก็มีอิทธิพลต่อการเกิดแอนโทไซยานิน เช่น ผลของสตรอเบอรี่ ด้านที่ได้รับแสงแดดจะเกิดสีแดงเร็วกว่าด้านที่ไม่ได้รับแสง แต่บางกรณีแสงก็อาจมีความสัมพันธ์น้อย เช่น หัวผักกาด อากาศที่เย็นดูเหมือนจะทำให้ปริมาณของแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจจะเป็นผลจากการเพิ่มขึ้นของน้ำตาล (Alkema J. and Seager S.L., 1982, p.185)

สีของแอนโทไซยานินยังขึ้นกับ pH ของตัวกลางที่แอนโทไซยานินละลายอยู่

แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin) เกิดจาก hydrolized แอนโทไซยานินในกรดไฮโดรคลอริกเจือจางที่อุณหภูมิ 100°C ได้สารที่มีสีแตกต่างไปจากเดิม แอนโทไซยานิดินเป็นเกลือ pyrylium ซึ่งให้สารละลายสีแดงเข้มที่ pH 3, เมื่อทำปฏิกิริยากับโซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) จะเปลี่ยนสีเป็นสีม่วง (pH 8)สีจะซีดลงอย่างช้า ๆ ; เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำสีจะจางหายไป ; และทำปฏิกิริยากับโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ได้สารสีน้ำเงิน (pH 11) การเปลี่ยนสีเมื่อ pH เปลี่ยนแปลงนี้เป็นสมบัติของแอนโทไซยานินด้วย

แอนโทไซยานินให้สารสีแดง, น้ำเงินและม่วง ซึ่งเกิดจาก benzopyrylium cation, สารที่มีสีเหลืองเกิดจาก benzo - 2 - และ - 4 - pyrones

แอนโทไซยานินและแอนโทไซยานิดินทำปฏิกิริยากับเฟอริกคลอไรด์ให้สารสีน้ำเงินเข้มใน pH ที่เป็นกรด (Acheson, 1967, p. 285, 287; G. M. Badger, 1961, p. 452)

แอนโทไซยานินของต้นเมเปิลมีสมบัติเป็นกรด (acidic sap) ใบเมเปิลจึงมีสีแดงในฤดูใบไม้ร่วง, ส่วนต้นแอช (Ashes) มีแอนโทไซยานินที่มีสมบัติเป็นเบส (alkaline sap) ใบของแอชจึงเป็นสีม่วง (Alkema J. and Seager S. L., 1982, p.185)

แอนโทไซยานินประกอบด้วยอนุพันธ์ 3 ชนิด คือ pelargonidin glycoside สีส้ม-แดง, cyanidin glycoside และอนุพันธ์ย่อย peonidin glycoside สีแดงม่วง, delphinidin glycoside สีม่วง (Harborne, 1973, p.63) cyanidin 3, 5 diglucosides มีมากในดอกกุหลาบสีแดง (Harborne, 1973, p.65)

รงควัตถุของใบไม้ ประกอบด้วยสารเคมี 3 กลุ่มดังกล่าวคือ สีเขียวของคลอโรฟิลล์ สีเหลืองของคาโรตินอยด์ และฟลาโวนอยด์บางกลุ่ม และสีแดง - ม่วง - น้ำเงินของแอนโทไซยานิน คลอโรฟิลล์ที่มีจำนวนมากทำให้สีเขียวบดบังสีอื่นจนหมด (Peter H. Raven and Helena Curtis, 1970, p.58)

อย่างไรก็ตามจะสังเกตเห็นรงควัตถุสีอื่น ๆ ของใบนอกจากสีเขียวได้อย่างน้อย 3 กรณี คือ 1. ใบอ่อนของพืชบางชนิดบริเวณขอบใบหรือทั้งใบจะปรากฏสีแดงอ่อน 2. พืชบางชนิดใบมีสีอื่นที่ไม่ใช่สีเขียว 3. ในฤดูใบไม้ร่วง ใบสีเขียวจะเปลี่ยนเป็นสีอื่นก่อนที่ใบจะร่วง

โดยทั่วไปแล้วสีของแอนโทไซยานินจะบดบังสีเหลืองได้ดี ดังนั้นใบสีเหลืองมักจะมีปริมาณแอนโทไซยานินต่ำ (Alkema J. and Seager S.L., 1982, p.185)

ในฤดูใบไม้ร่วง ใบที่มีสีเขียวจะเปลี่ยนสีเป็นสีเหลือง หรือสีแดงก่อนที่ใบจะร่วงนั้น เนื่องมาจากมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของคลอโรฟิลล์ คาโรตินอยด์และแอนโทไซยานิน อีกทั้งเมื่อเริ่มฤดูใบไม้ร่วงปริมาณแสงแดดจะลดลง ทำให้อัตราการสร้างคลอโรฟิลล์ลดลง แต่อัตราการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ยังไม่ลด ทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง สีเหลืองของคาโรตินอยด์เด่นขึ้น ถ้าไม่ถูกบดบังด้วยสีแดงของแอนโทไซยานินใบก็จะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง (Moor, Clark, Stern and Vodopich, 1995, p.142-143) ต้นเมเปิลในประเทศนอรเว เป็นตัวอย่างที่เห็นได้ชัดเจน สีแดงสดใสของแอนโทไซยานินในใบเมเปิลจะบดบังสีเขียวของคลอโรฟิลล์ไว้ (Peter H. Raven and Helena Curtis, 1970, p. 60)

สำหรับประเทศไทย ทางภาคเหนือในช่วงฤดูใบไม้ร่วง จะเห็นใบของต้นไม้ใหญ่มีทั้งสีเหลือง, แดง, ส้ม และสีม่วง ส่วนภาคต่าง ๆ มีต้นหูกวางซึ่งนิยมปลูกเป็นไม้ประดับ ในฤดูใบไม้ร่วงใบหูกวางจะเปลี่ยนสีเป็นสีแดงแสดก่อนที่ใบจะร่วง

8. การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent Extraction)

การสกัดด้วยตัวทำละลายมีประโยชน์มาก สำหรับแยกสารและทำให้สารบริสุทธิ์ เช่น การแยกสารประกอบออกจากของผสมที่เกิดในธรรมชาติ เช่น การสกัดแอลคาลอยด์ (alkoloids) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ควิโนน (quinones) และเทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids) ออกจากใบไม้และเปลือกไม้ ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น หรือไฮโดรลิซิส จากเอนไซม์ในพืชคือแอลกอฮอล์ (หรือเอทานอล) การสกัดสารอย่างต่อเนื่องใช้อีเทอร์ปิโตรเลียม และคลอโรฟอร์มสำหรับแยกไขมันและเทอร์ปีนอยด์ ใช้แอลกอฮอล์และเอทิลอะซิเตตสำหรับสารประกอบที่มีขั้ว (polar) สูงกว่า (Harborne, 1973, p.6)

การสกัดแอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำ สีที่เป็นองค์ประกอบ คือ สีแดง-ม่วง-น้ำเงิน การสกัดแอนโทไซยานินจากใบหรือดอกของพืช ใช้ตัวทำละลายคือ เมทานอลหรือเอทานอล - 1% HCl (Harborne, 1973, p.62 ; Acheson R.M. 1967, p. 286)

การสกัดคลอโรฟิลล์และคาโรตินอยด์ออกจากใบของพืช

สกัดด้วยอะซิโตน-ปิโตรเลียม (จุดเดือด 60-80°C) อัตราส่วน 1:2 โดยปริมาตร/ปริมาตร (Harborne, 1973, p.127)

ตาราง 2.1 สมบัติบางประการของตัวทำละลายบางชนิด

ชื่อ	สูตร	FW	d g cm^3	m.p C	b.p C	n_D	p 10^{-30} cm
เฮกเซน	$CH_3(CH_2)_4\ CH_3$	86.2	0.655	-95.3	68.7	1.372	0
โทลูอีน	$C_6H_5CH_3$	82.1	0.862	-95.0	110.6	10494	1.2
คลอโรฟอร์ม	$CHCl_3$	119.4	1.480	-63.5	61.7	1.443	3.4
คาร์บอนเตตระคลอไรด์	CCl_4	153.8	1.584	-23.0	76.5	1.457	0
ortho - ไซลีน	$C_6H_4(CH_3)_2$	106.2	0.876	-25.2	144.4	1.503	2.1
เมทานอล	CH_3OH	32.0	0.787	-97.7	64.5	1.327	5.7
เอทานอล	CH_3CH_2OH	46.1	0.785	- 114.1	78.3	1.359	5.6
อะซิโตน	CH_3COCH_3	58.1	0.785	-94.7	56.1	1.356	9.6
กรดอะซิติก	CH_3COOH	60.1	1.044	16.7	117.9	1.370	5.8
บิวทานอล	$CH_3(CH_2)_3OH$	74.1	0.806	-89.3	117.7	1.397	5.5
เพนทานอล	$CH_3(CH_2)_4OH$	88.2	0.811	-78.2	138.0	1.408	-
กรดไฮโดรคลอริก	HCl	36.5	1.2 (l)	-114	-85	-	-

FW = formular weight

d, g cm = density, for the state at 25°C unless otherwise indicate

m.p., °C = melting point

b.p., °C = boiling point

n_D = refractive index at 25°C unless otherwise indicate

p = electric dipole moment for molecules in the gas phase

(Aylward, G.H. and Findlay, T. J. V., 1971, p. 20, 38, 40-45, 48-49, 52-53, 58-59)

9. Thin - Layer Chromatography

โครมาโทกราฟี เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากสำหรับทำสารให้บริสุทธิ์ แยกสารออกจากกัน และระบุสารที่เป็นองค์ประกอบได้

ทินแลร์โครมาโทกราฟี (Thin - Layer Chromatography) เป็นวิธีการแยกสารให้บริสุทธิ์โดยใช้สารดูดซับบนแผ่นแก้ว สารดูดซับที่นิยมทั่วไปคือ ซิลิคา เจล สารอื่นที่ใช้ดูดซับ ได้แก่ อะลูมิเนียมออกไซด์, ซีไลต์, แคลเซียมไฮดรอกไซด์, แมกเนเซียมฟอสเฟต, โพลิอะไมด์, เซลลูโลส และสารผสมอื่น ๆ

แผ่นดูดซับต้องสะอาดโดยใช้อะซิโตนกำจัดคราบไขมัน สารดูดซับใช้ซิลิคา เจล (หรือสารอื่น ๆ) คนกับน้ำจนเข้าด้วยกันแล้วทำให้กระจายบนแผ่นแก้ว (อาจใช้แผ่นไมโครสไลด์ก็ได้) ให้ทั่วถึงก่อนที่จะเคลือบแผ่นดูดซับ อาจจะใช้แคลเซียมซัลเฟต (15 %) ผสมในสารดูดซับในน้ำ ซึ่งจะช่วยยึดติดบนแผ่นแก้วได้ดีขึ้น แล้วนำแผ่นดูดซับที่เคลือบแล้วไปก่อกัมมันต์ (activate) โดยทำให้ร้อนในเตาอบที่อุณหภูมิ 100-110°C เป็นเวลา 30 นาที (Harborne, 1973, p.11)

ตัวดูดซับซึ่งเป็นชั้นบาง หนาประมาณ 0.10 - 0.25 มม.

ในการแยกรงควัตถุของพืชให้บริสุทธิ์ นิยมใช้เซลลูโลสเป็นสารดูดซับ ดังนั้น วิธีทินแลร์โครมาโทกราฟี จึงสามารถใช้กระดาษกรองผนึกบนแผ่นแก้วนำไปจุ่มในสารผสมของซิลิคา เจล (หรือสารอื่น) ให้ซิลิคา เจล (หรือสารอื่น) ซึมซับ (impregnated) กระดาษกรองอย่างสม่ำเสมอ เมื่อแห้งสนิทแล้วจึงนำมาใช้แยกรงควัตถุได้ (Harborne, 1973, p. 64, 124, 207)

ในการใช้สารละลายเพื่อแยกสาร ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสารที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์ และขึ้นกับชนิดของตัวทำละลาย (Solvent) ที่สามารถละลายสารที่ต้องการแยก เช่น ใช้อีเทอร์, ปิโตรเลียมและคลอโรฟอร์ม แยกไขมันและ terpenoids, ใช้แอลกอฮอล์และเอทิลอะซิเตต แยกสารที่มีขั้ว (polar) สูงกว่า

ค่า R_f คือ อัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ โดยวัดระยะทางจากจุดศูนย์กลางที่แต้ม (spot) สารไปถึงจุดสูงสุดที่สารเคลื่อนที่ และระยะสูงสุดที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่จากจุดศูนย์กลางที่แต้มสาร อัตราส่วนดังกล่าวมีค่าระหว่าง 0.01 - 0.99 ซึ่งนิยมคูณด้วย 100 และเขียนเป็น R_f (x 100) (Harborne, 1973, p. 9-11)

ตาราง 2.2 ค่า R_f ของแอนโทไซยานินของพืชบางชนิด

Anthocyanin	Rf(x100)in BAW	BuHCl	1%HCl	Petal source
Monoglycosides				
Pelargonidin 3-glucoside	44	38	14	Chinese Aster
Cyanidin 3-glucoside	38	25	07	Chrysanthemum
Malvidin 3-glucoside	38	15	06	Primula polyanthus
Diglycosides				
Pelargonidin 3,5-diglucoside	31	14	23	Pelargonium
Cyanidin 3-rhamnosylglucoside	37	25	19	Snapdragon
Peonidin 3,5-diglucoside	31	10	17	Peony
Delphinidin 3,5-diglucoside	15	03	08	Verbena
Triglycosides				
Cyanidin 3-rhamnosylglucoside-5-glucoside	25	08	36	Cape Primrose
Cyanidin 3-(2- glucosylrhamnosylglucoside)	26	11	61	Begonia coccincus
Acylated Diglucoside				
Pelargonidin 3-(p-coumaryl-glucoside)-5-glucoside	40	46	19	Monarda didyma

Solvent key : BAW = n-BuOH-HOAc-H_2O (4 : 1 : 5); BuHCl = n-BuOH-2M HCl (1 : 1, top layer); 1% HCl = conc. HCl- H_2O (3 : 97)

สีที่ปรากฏ คือ pelargonidin glycoside สีแดงส้ม, cyanidin glycoside และ peonidin glycoside สีแดงม่วง, delphinidin glycoside สีม่วง (Harborne, 1973, p. 63)

การแยกแอนโทไซยานินด้วยวิธีทินแลร์โครมาโทกราฟีบนเซลลูโลส หรือสารผสมเซลลูโลส-ซิลิคา เจล ตัวทำละลายใช้ amyl alcohol-acetic acid - H_2O (2 : 1 : 1) ก็ได้ (Harborne, 1973, p.64)

ตาราง 2.3 ทินแลร์โครมาโทกราฟี ของคาโรทีน และแซนโทฟิลล์

Pigments	R_f (x100) in system 1	2	3
Hydrocarbons			
α-Carotene	66	80	88
β-Carotene	49	74	84
y-Carotene	11	41	45
e-Carotene	70	84	-
Lycopene	01	13	15
	R_f(x100)in system 4	5	6
Xanthophylls			
Lutein	10	35	56
Zeaxanthin	05	24	55
Violaxanthin	05	21	84
Cryptoxanthin	54	75	07
Capsanthin	06	16	-
Neoxanthin	-	-	95

Key to systems:

1. activated MgO, petroleum (b.p. 90-110°) -C_6H_6 (1 : 1)
2. activated MgO, petroleum (b.p. 90-110°) -C_6H_6 (1 : 9)
3. silica gel-Ca $(OH)_2$ (1:6). petroleum-C_6H_6 (49 : 1)
4. sec magnesium phosphate, petroleum (b.p. 40-60°)- C_6H_6 (9 : 1)
5. silica gel, CH_2Cl_2-EtOAc (4 : 1)
6. Kieselguhr G impregnated with 8% solution of triglyceride, acetone-MeOH- H_2O (3 : 15 : 2)

(Harborne, 1973, p.123)

วิธีทินแลร์โครมาโทกราฟีใช้แยกคาโรทีนอยด์บนแผ่นดูดซับผนึกกระดาษกรอง Whatman แยกแอลฟ่า, เบต้า และแกมม่า-คาโรทีน และไลโคพีน (Rfs 45, 35, 20 และ 10) บน SG 81 ใน n-เฮกเซน และแยกไวโอลาแซนทีน (violaxanthin), โรโดแซนทีน (rhodoxanthin), ลูทีน (lutein), ซีแซนทีน (zeaxanthin) และนีโอแซนทีน (neoxanthin) (Rfs 32, 62, 60, 54 และ 00) บน AH 81 ใน n-เฮกเซน-อะซิโตน (4:1) (Harborne, 1973, p.124)

ตาราง 2.4 ค่า R_f และสีของคลอโรฟิลล์ a และ b บนทินแลร์โครมาโทกราฟี

Pigment	Rf	Colour in daylight	Nature of artifact
Pheophytin a	93	grey	magnesium-free
Pheophytin b	80	yellow-brown	chlorophylls
Chlorophyll a	60	blue-green	
Chlorophyll b	35	yellow-green	
Pheophorbide a	18	grey	magnesium-free
Pheophorbide b	07	yellow-brown	chlorophyllides
Chlorophyllide a	03	bule-green	chlorophylls without
Chlorophyllide b	02	yellow-green	phytyl side chains

TLC on MN 300 cellulose in petroleum (b.p. 60-80°) -acetone-n-propanol (90 :10 : 0-45) for 30 min run on 20 x 20 cm plate. Separation can be also achieved on a microscope slide (5 min run).

(Harborne, 1973, p.207)

10. ธรรมชาติของแสงอาทิตย์ (The Nature of Sunlight)

แสงสว่างเป็นพลังงานซึ่ง เรียกว่า พลังงานแม่เหล็กไฟฟ้า ระยะห่างระหว่างสันคลื่น เรียกว่า **ความยาวคลื่น** (wavelenght) ช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่น้อยกว่านาโนเมตร (nm) คือ รังสีแกมม่า (gamma ray) จนถึงความยาวคลื่นมากกว่ากิโลเมตร รังสีที่แผ่กระจายรวมเรียกว่า **สเปกตรัมของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า** (electromagnetic spectrum) ช่วงความยาวคลื่นที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตมาก คือ ช่วงความยาวคลื่นประมาณ 380 ถึง 750 nm รังสีในช่วงนี้คือ แสงสี (visible light) ซึ่งประกอบด้วยแสงสีต่าง ๆ ที่ช่วยให้มนุษย์มองเห็น

การแผ่รังสีของดวงอาทิตย์มีแสงสีที่พืชใช้ในการสังเคราะห์แสง ความยาวคลื่นของแสงสีแดงและน้ำเงิน เป็นช่วงความยาวคลื่นที่มีประโยชน์ต่อการดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์ (Neil A. Campbell, 1996, p.187)

Photosynthetic Pigments : The Light Receptors

เมื่อแสงสว่างตกกระทบวัตถุจะเกิดการสะท้อน (reflected), การทะลุผ่าน (transmitted) และการดูดกลืน (absorped) สารซึ่งมีการดูดกลืนแสงสี (visible light) นั้นเรียกว่ารงควัตถุ (pigments) รงควัตถุชนิดต่าง ๆ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแตกต่างกัน เมื่อรงควัตถุถูกส่องผ่านด้วยแสงสีขาว สีที่ปรากฏ คือ สีที่เกิดจากการส่องผ่านหรือการสะท้อน (ถ้ารงควัตถุดูดกลืนแสงทุกความยาวคลื่น ก็จะปรากฏสีดำ) เมื่อเรามองดูใบไม้-เนื่องจากคลอโรฟิลล์ดูดกลืนแสงสีแดงและน้ำเงินในขณะเดียวกันก็จะทะลุผ่านและสะท้อนแสงสีเขียวเราจึงเห็นใบไม้เป็นสีเขียว ความสามารถของรงควัตถุในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ วัดด้วยเครื่องมือวัดสารละลายของรงควัตถุซึ่งบรรจุในภาชนะ เครื่องมือที่ใช้วัดการดูดกลืนแสงของรงควัตถุซึ่งเรียกว่า **สเปกโทรโฟโตมิเตอร์** (spectrophotometer) กราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของรงควัตถุกับความยาวคลื่น เรียกว่า **absorption spectrum** (Neil A. Campbell, 1996, p.188)

11. สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแสงกับโมเลกุลในสารละลายโดยให้แสงผ่านสารละลายที่บรรจุอยู่ในภาชนะแก้วใส วัดความเข้มของแสงที่ถูกสารนั้นดูดไว้ (absorbance) หรือวัดความเข้มของแสงที่ผ่านออกมา (transmittance) เนื่องจากแสงมีสมบัติเป็นอนุภาค (photon) และเป็นคลื่น (wave) การหาปริมาณสารในสารละลายโดยใช้สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ วัดการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสีในช่วงความยาวคลื่น 380 - 700 นาโนเมตร

ส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ มี 5 ส่วน คือ 1) แหล่งกำเนิดแสง (Light source) 2) ระบบมอโนโครเมเตอร์ (Monochromator) 3) ภาชนะบรรจุสาร (Absorption Cell) 4) เครื่องตรวจหา (Detector) 5) เครื่องวัดหรือเครื่องบันทึกผล (Meter or Recorder)

รูป 2.1 แผนผังของสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

สเปกโทรโฟโตมิเตอร์เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดความเข้มของแสง และวัดค่าการดูดกลืนของแสงที่มีความไวมากที่สุด มีระบบมอโนโครเมเตอร์สำหรับแยกแสงที่เป็นลำแสงเดียวที่มีประสิทธิภาพสูง และระบบโฟโตทิวบ์ที่ใช้วัดความเข้มของแสงได้ทั้งช่วงอัลตราไวโอเลตและแถบสี (visible) สามารถอ่านค่าการดูดกลืนแสงจากเครื่องบันทึกผลโดยอัตโนมัติ (Neil A Campbell, 1996, p.189 ; Pecsok, Shields, Cairns and McWilliam, 1976, p.147-150)

กฎของเบียร์และแลมเบอร์ต (Beer - Lambert's Law)

เป็นกฎที่มาจากการอนุมานว่า 1) ลำแสงตกกระทบต้องเป็นลำแสงเดียว 2) สารตัวอย่างที่ดูดกลืนแสงต้องเป็นอิสระจากการดูดกลืนแสงชนิดอื่น 3) การดูดกลืนแสงจะต้องเกิดขึ้นในภาชนะที่มีปริมาตรและพื้นที่หน้าตัดเท่ากันตลอด 4) พลังงานที่คายออกต้องไม่มีแสงฟลูออเรสเซนต์ 5) ดัชนีหักเหของสารไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสาร (ไม่ใช่สารที่มีความเข้มข้นสูง)

Ultraviolet และ Visible Spectroscopy

ในการวัดการดูดกลืนแสงของรงควัตถุของพืช ใช้สารละลายของรงควัตถุที่เจือจางเทียบกับตัวทำละลาย (solvent blank) บรรจุในภาชนะ และถูกบันทึกในสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ สารละลายที่ไม่มีสีวัดที่ความยาวคลื่น 200 - 400 nm (นาโนเมตร) สารละลายที่มีสีวัดที่ความยาวคลื่น 200-700 nm

ตัวทำละลายที่นิยมใช้โดยทั่วไป คือ 95% ethanol, น้ำ, methanol, hexane, ปิโตรเลียม และอีเทอร์ เป็นต้น

จากกฎของเบียร์และแลมเบอร์ต ซึ่งมาจากสมการ

$$A = \log \frac{100}{T} = -\log \%T = \varepsilon bc$$

หรือ $\varepsilon = A/Cl$

(A = ค่าการดูดกลืนแสง, C = ความเข้มข้นหน่วยเป็นกรัมโมล/ลิตร, l = ความหนาของเซลล์หน่วยเป็นเซนติเมตร, ค่าการดูดกลืนแสงคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การส่องผ่านแสงตำแหน่งสูงสุด (most intent peak)

การวัดค่าการดูดกลืนแสงของรงควัตถุของพืชมีความยาวคลื่นต่าง ๆ ในช่วงอัลตราไวโอเลตและช่วงแถบสี (Visible) โดยความยาวคลื่นหน่วยเป็นนาโนเมตร (nm) ดังตาราง 2.5 (Harborne, 1973, p.18)

ตาราง 2.5 Spectral properties of the different Classes of Plant Pigment

Pigment class	Visible spectral range (nm)*	Ultraviolet range (nm)
Chlorophylls (green)	640-660 and 430-470	
Phycobilins (red and blue)	615-650 or 540-570	intense short UV absorption due to protein attachment
Cytochromes (yellow)	545-605 (minor band sometimes at 415-440)	
Anthocyanins (mauve to red)	475-550	ca. 275
Betacyanins (mauve)	530-554	250-270
Carotenoids (yellow to orange)	400-500 (a major peak with two minor peaks or inflections)	-
Anthraquinones (yellow)	420-460	3-4 intense peaks between 220 and 290
Chalcones and Aurones (yellow)	365-430	240-260
Yellow flavonols (yellow)	365-390	250-270

* All values are approximate; actual values vary according to the solvent used, the pH and the physical state of the pigment.

12. สารละลายกรด-เบส การให้คำนิยามกรดและเบส ได้มีทฤษฎีหลายทฤษฎีที่ใช้เพื่ออธิบายความหมายของกรดและเบส ได้แก่ ทฤษฎีของอาร์เรเนียส, เบรินสเตด-ลาวรี และทฤษฎีของลิวอิส ดังตาราง 2.6 (Pecsok, Shields, Cairns and McWilliam, 1976, p. 413-425)

ตาราง 2.6 คำนิยามบางคำของกรดและเบส

ทฤษฎีของ	กรด	เบส	การสะเทิน
อาร์เรเนียส	ให้ H^+ ในน้ำ	ให้ OH^- ในน้ำ	$H^+ + OH^- \rightarrow H_2O$
เบรินสเตท-ลาวรี	ให้ H^+	รับ H^+	ย้ายโปรตอน
ลิวอิส	รับคู่อิเล็กตรอน	ให้คู่อิเล็กตรอน	มีพันธะโคออดิเนท-โควาเลนท์

คู่เบสของกรดจะเป็นตัวรับโปรตรอน ซึ่งเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับไปยังกรด, ในทำนองเดียวกันเบสทุกชนิดจะมีคู่กรด

$$\text{Acid} \longrightarrow H^+ + \text{Base}$$

$$HCl \longrightarrow H^+ + Cl^-$$

$$NH_4^+ \rightleftharpoons H^+ + NH_3$$

กรดและเบสเมื่อละลายในน้ำจะแตกตัวได้มากน้อยไม่เท่ากัน ค่าคงที่สมดุลของกรด คือ K_a (the acid dissociation หรือ "acidity" constant) สำหรับเบสค่า K_b คือค่าคงที่สมดุล (base dissociation หรือ "basidity" constant) ค่าคงที่สมดุลของกรดและเบสจะเป็นค่าที่บอกความแรง (strength) ของกรดและเบส

$$HCl + H_2O \longrightarrow H_3O^+ + Cl^- \; ; \; K_a = \frac{[H^+][Cl^-]}{[HCl]} >> 1$$

$$HOAc + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + OAc^-$$

$$HOAc \rightarrow H^+ + OAc^- \; ; \; K_a = \frac{[H^+][OAc^-]}{[HOAc]} = 1.75 \times 10^{-3}$$

$$NH_3 + H_2O \rightleftharpoons NH_4^+ + OH^- \; ; \; K_b = \frac{[NH_4^+][OH^-]}{[NH_3]} = 1.78 \times 10^{-5}$$

$$C_6H_5NH_2 + H_2O \rightleftharpoons C_6H_5NH_3^+ + OH^- \; ; \; K_b = \frac{[C_2H_6NH_3^+][OH^-]}{[C_6H_5NH_2]} = 1.5 \times 10^{-9}$$

ค่าแสดงความสัมพันธ์ของ K_a และ ของ K_b แสดงว่ากรดไฮโดรคลอริก (HCl) แรง (stronger) กว่ากรดอะซิติก (HOAc) และแอมโมเนีย (NH_3) เป็นเบสที่แรงกว่าอะนีลีน ($C_6H_5NH_2$)

กรดแก่ กรดอ่อน เบสแก่ เบสอ่อน เนื่องจากกรดและเบสเมื่อละลายในน้ำจะแตกตัวได้ไม่เท่ากัน กรดแตกตัวได้มาก เรียกว่า กรดแก่ กรดที่แตกตัวได้น้อยเป็นกรดอ่อน เบสที่แตกตัวได้มากเป็นเบสแก่ เบสที่แตกตัวได้น้อยเป็นเบสอ่อน เช่น

HCl	+	H_2O	$\longrightarrow$	H_3O^+	+	Cl^-	กรดแก่
HNO_3	+	H_2O	$\longrightarrow$	H_3O^+	+	NO_3^-	กรดแก่
HNO_3	+	$HCOOH$	$\rightleftharpoons$	$HCOOH_2^+$	+	NO_3^-	กรดอ่อน
$NaOH$	+	H_2O	$\longrightarrow$	Na^+	+	OH^-	เบสแก่
NH_3	+	H_2O	$\rightleftharpoons$	NH_4^+	+	OH^-	เบสอ่อน

pH เป็นค่ากำหนดความเป็นกรดหรือเบส โดยคำนวณจากความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน $pH = -\log [H^+]$; $pOH = -[\log OH^-]$; $pK_w = -\log K_w$

ดังนั้น $pH + pOH = pK_w = 14.0$ ที่ $25^\circ C$

13. สารละลายบัฟเฟอร์ ในปฏิกิริยาเคมีจะมีไฮโดรเจนไอออนหรือไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่จะมีผลต่อการเปลี่ยน pH สารละลายบัฟเฟอร์จะต้านการเปลี่ยน pH ที่เกิดจากกรดหรือเบสที่เติมลงไป ทำให้ pH ของสารนั้นไม่เปลี่ยนมากนัก

สารละลายบัฟเฟอร์ประกอบด้วยกรดอ่อนและเกลือของกรดอ่อนนั้น หรือเบสอ่อนและเกลือของเบสอ่อนนั้น

สารละลายกรดอ่อนและเกลือของกรดอ่อน, HB + NaB, บัฟเฟอร์

$$[H^+] = K_a \frac{C_{HB}}{C_{B^-}}$$

หรือ $$pH = pK_a + \log \frac{C_{B^-}}{C_{HB}}$$

สารละลายเบสอ่อนและเกลือของเบสอ่อน, BOH + BX , บัฟเฟอร์

$$[OH^-] = K_b \frac{C_{BOH}}{C_{BX}}$$

หรือ $$pOH = pK_b + \log \frac{C_{BX}}{C_{BOH}}$$

(Pecsok, Shields, Cairns and McWilliam, 1976, p.413-423)

ตาราง 2.7 ช่วง pH บัฟเฟอร์

Original	pH range
1. Oxalic acid และ Sodiam oxalate ปรับ pH ด้วย HCl	0.8
2. Acetic acid และ Sodiam acetate ปรับ pH ด้วย HCl	1.9-3.8
3. Na_2SO_4 และ H_2SO_4	6.5
4. NaCl 0.02 mole / litre	7.0
5. Na_2SO_4 0.05 mole / litre in EDTA 0.02 mole / litre tris - base 0.1 mole / litre	8
6. NH_4Clและ NH_4OH ปรับ pH ด้วย HCl	9
7. NH_4Cl และ NH_4OH ปรับ pH ด้วย NaOH	11.7

(Pecsok, Shields, Cairns and McWilliam, 1976, p. 423-427)

14. อินดิเคเตอร์ เป็นกรดอ่อนหรือเบสอ่อน ซึ่งจะเปลี่ยนสี เมื่ออยู่ในคู่เบสหรือคู่กรด อินดิเคเตอร์มีประโยชน์ในการหาจุดยุติ (end point) ของการไตเตรตระหว่างกรดและเบส

อินดิเคเตอร์เป็นสารที่ให้หรือรับโปรตอนในปฏิกิริยาไตเตรตและจะเปลี่ยนสีโดยแตกตัวในตัวทำละลาย SH ดังสมการ

$$HIN + SH \rightleftharpoons SH^{2+}_2 + In^-$$

สี A สี B

สมบัติของอินดิเคเตอร์ขึ้นกับความเป็นกรดหรือเบสของตัวทำละลายชนิดนั้น อินดิเคเตอร์บางชนิดมีช่วงการเปลี่ยนสีกว้าง เช่น crystal violet มีการเพิ่มโปรตอนในกรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid), จะเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นน้ำเงิน-เขียว → เขียว → เหลือง ; เมทิลไวโอเลตก็เกิดการเปลี่ยนแปลงแบบเดียวกัน

ตาราง 2.8 อินดิเคเตอร์บางชนิดที่ใช้ในการไตเตรต

Indicator	Constituent Titrated	Sovent
Crystal violet	Weak bases	Acetic acid;
Or Methyl violet		Acetonitrile
Methyl red	Weak bases	Dioxane; glycol-isopropanol
Dibenzalacetone	Weak bases	Nitromethane
Azo-violet	Weak acids	Dimethylformamide
or Thymol blue		
or o-Nitroaniline		

(Pecsok, Shields, Cairns and McWilliam, 1976, p.436

Central Library
Prince of Songkla University

ตาราง 2.9 กรด-เบส อินดิเคเตอร์สามัญ

Trade Name	Concentration	Colour (low pH-high pH)	pH Range	pK_a
Cresol red	0.1% in water	red-yellow	0.2-1.8	-
Thymol blue	0.1% in water	red-yellow	1.2-2.8	1.7
Methyl yellow	0.1% in 90% alcohol	red-yellow	2.4-4.0	3.1
Methyl orange	0.1% in water	red-yellow	3.1-4.4	3.7
Bromophenol blue	0.1% in water	yellow-blue	3.0-4.6	4.2
Bromocresol green	0.1% in water	yellow-blue	3.8-5.4	4.7
Methyl red	0.1% in water	pink-yellow	4.4-6.2	5.1
Bromocresol purple	0.1% in water	yellow-purple	5.2-6.8	6.3
Azolitmin (litmus)	0.5% in water	red-blue	5.0-8.0	-
Bromothymol bule	0.1% in water	yellow-blue	6.0-7.6	7.0
Phenol red	0.1% in water	yellow-red	6.8-8.4	7.9
Cresol red	0.1% in water	yellow-red	7.2-8.8	8.3
Thymol blue	0.1% in water	yellow-blue	8.0-9.6	8.9
Phenolphthalein	0.1% in 70% alcohol	colourless-red	8.3-10.0	9.6
Thymolphthalein	0.1% in 70% alcohol	colourless-blue	9.0-10.5	9.2
Alizarin yellow	0.1% in water	yellow-lilac	10.1-12.0	-

(Aylward G. H. and Findlay T. J. V., 1971, p.114)

15. pH meter

pH meter ใช้วัดความเป็นกรด-เบส ของสารละลาย ประกอบด้วยตัวเครื่องวัด pH และหลอดอิเล็กโทรด (Electrod) เครื่องวัด pH ใช้จุ่มในสารละลายที่ต้องการวัด pH โดยวัดจากค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า มีหน้าปัทม์บอกค่า pH และมีปุ่มสำหรับเปิดให้เครื่องทำงาน หลอดอิเล็กโทรดชนิดหลอดแก้ว (glass electrod) มีลักษณะเป็นหลอดแก้วที่มีกระเปาะเป็นแก้วที่ยอมให้ H^+ ซึมผ่านได้ ภายในบรรจุสารละลาย 0.1 N.HCl ซึ่งมีค่า pH = 1 มีลวดเงินชุบด้วย AgCl ต่อกับโวลต์มิเตอร์ และจุ่มในสารละลาย 0.1 N.HCl Ag/AgCl, HCl (0.1 N)/solution

ค่า pH ที่วัดได้จากเครื่องวัด pH เกิดจากการที่ Ag พยายามละลายใน HCl หรือ เกิดจาก H^+ ของสารละลายพยายามซึมผ่านหลอดแก้ว

ในการวัด pH ของสารละลาย เมื่อวัด pH เสร็จแล้วให้ล้างอิเล็กโทรดในเครื่องวัดด้วยน้ำกลั่นทุกครั้ง

16. การวิเคราะห์ข้อทดสอบในชั้นเรียน (Item Analysis for classroom Test)
(Anthony J. Nitko, 1983, p.284)

การวิเคราะห์ข้อทดสอบ (Item analysis) คือ เทคนิคสำหรับตรวจคุณภาพข้อคำถามเป็นรายข้อ ว่าแต่ละข้อมีคุณลักษณะตรงตามวัตถุประสงค์ที่ครูผู้สอนต้องการหรือไม่และข้อละเท่าใด กับแต่ละข้อมีคุณค่าเด่นด้อยในทางใดบ้าง และเป็นจำนวนเท่าใด

การวิเคราะห์ข้อทดสอบ เพื่อพิจารณาคุณภาพของข้อทดสอบจะทำการวิเคราะห์ **ดัชนีความยาก** (Item Difficulty Index, p) และ**ดัชนีอำนาจจำแนก** (Item Discrimination Index, D)

การวิเคราะห์ข้อทดสอบ นอกจากเพื่อตรวจสอบคุณภาพของข้อทดสอบแต่ละข้อว่ามีคุณภาพเป็นอย่างไรแล้ว ยังใช้เป็นข้อมูลย้อนกลับ (Feedback) ต่อผู้เรียนและครูผู้สอน ผลต่อผู้เรียน คือ ข้อสอบสามารถจำแนกคนเก่ง-คนอ่อน ออกจากกัน ชี้แนะให้ผู้เรียนพบข้อบกพร่องของตนเอง ผลต่อครูผู้สอนคือการพัฒนาการสอนของครู, จุดมุ่งหมายในการสอน แก้ไขปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพ มีเป้าหมาย มีความพยายาม ข้อทดสอบต้องมีความเที่ยง ข้อสอบควรครอบคลุมเนื้อหา
(Anthony J. Nitko, 1983, p.285)

การคำนวณความยากของข้อทดสอบ (Computing the Item Difficulty Index : p.) (Anthony, J. Nitko, 1983, p.288)

ระดับความยากของข้อทดสอบ (p.) หมายถึง จำนวนอัตราส่วนหรือร้อยละที่นักเรียนทั้งหมดตอบคำถามนั้นถูก

$$p = \frac{\text{จำนวนคนที่ตอบข้อทดสอบนั้นถูก}}{\text{จำนวนคนทั้งหมดที่เข้าสอบ}}$$

ระดับความยากที่พอเหมาะควรจะเป็นร้อยละ 50, ระดับความยากตั้งแต่ 0.00 - 0.49 แสดงว่าข้อสอบยาก - ค่อนข้างยาก, ระดับความยากตั้งแต่ 0.51 - 1.00 แสดงว่าข้อสอบค่อนข้างง่าย - ง่ายมาก

ค่าระดับความยากมีตั้งแต่ 0.00 - 1.00

การคำนวณค่าอำนาจจำแนก (Computing the Item Discrimination Index : D)
(Anthony J. Nitko, 1983, p.288 ; Jum C. Nunnally, 1972, p.192)

ค่าอำนาจจำแนก D = เปอร์เซนต์ของกลุ่มคะแนนสูง - เปอร์เซนต์ของกลุ่มคะแนนต่ำ

$$E_1 = \frac{X_1 \times 100}{A_1}$$

E_1 = ประสิทธิภาพของกระบวนการเรียนการสอน

X_1 = คะแนนเฉลี่ยของนักศึกษาในห้องเรียนนั้น ๆ ระหว่างเรียน

A_1 = คะแนนเต็มของแบบทดสอบระหว่างเรียน

85 หลังเป็นร้อยละของคะแนนเฉลี่ยที่นักศึกษาทั้งห้องเรียนทำแบบทดสอบท้ายบทหรือท้ายเรื่องได้ เป็นการประเมินหลังเรียนจบเรื่องแล้ว มีสูตรคือ

$$E_2 = \frac{X_2 \times 100}{A_2}$$

E_2 = ประสิทธิภาพของกระบวนการเรียนการสอน

X_2 = คะแนนเฉลี่ยของนักศึกษาในห้องเรียนนั้น ๆ ทุกท้ายบทเรียน

A_2 = คะแนนเต็มของแบบทดสอบท้ายบท

ถ้าตั้งเกณฑ์มาตรฐานไว้ว่า 85/85 ก็เป็นที่ยอมรับได้ว่าโดยปกติจะยอมให้คลาดเคลื่อนไม่เกินร้อยละ 5

17. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

A simplified procedure for the qualitative analysis of photosynthetic pigments from algal materials.

Katayama, N.; Hirata, T.; Kurashima, A.; Dasai, A.; Yokohama, Y. (Dep. Biol., Tokyo Gakugei Univ., Koganei 184, Japan). Jpn. J. Phycol., 42 (1), 71-7 (Japanese) 1994. CODEN : JJPHDP. ISSN : 0038-1578. DOCUMENT TYPE : Journal

แม้ทินแลร์โครมาโทกราฟีเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์รงควัตถุที่ละลายในไขมัน เช่น คลอโรฟิลล์และคาโรตินอยด์ ในการเตรียมสารตัวอย่างสำหรับการโครมาโทกราฟีค่อนข้างซับซ้อน เริ่มต้นจากการสกัดด้วยเมทานอล หรืออะซิโตน และสกัดซ้ำด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาการสกัดรงควัตถุโดยตรงจากสาหร่ายด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ทั้งนี้วัตถุประสงค์ เพื่อเตรียมสารตัวอย่างโดยวิธีที่ง่าย ๆ ในการทดลองได้ใช้พืช ขนาด 3-4 ตาราง ซม. หรือ 0.1 - 0.2 กรัม ตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ บดผสมกับซิลิคา เจล ที่แห้ง 0.2-0.3 กรัม นำสารผสมที่บดแล้วใส่ในหลอดทดลอง 2 มิลลิลิตร เติมไดเอทิลอีเทอร์ 0.5 มิลลิลิตร ให้สารผสมนี้รวมเข้าด้วยกัน และทิ้งไว้ 2-3 นาที เพื่อให้สารละลายแยกชั้น ดูดชั้นสารที่อยู่ในชั้นบนซึ่งเป็นไดเอทิลอีเทอร์ใช้เป็นสารตัวอย่างสำหรับการทำทินแลร์โครมาโทกราฟี, ใช้แผ่นพลาสติก Merck Silica Gel 60 ขนาด 20 x 20 ซม. ตัดเป็น 40 แผ่น ขนาด 1 x 10 ซม. เป็นแผ่นดูดซับ และใช้หลอดทดลองยาว 13 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลาง 17.5 มม. เป็นแท้งก์ ในการแยกรงควัตถุ จากการทดลองนี้ พบว่า สามารถแยกสีหลัก ๆ ได้ทั้งหมดจากสาหร่ายสีเขียว, สีน้ำตาลและสีแดง เมื่อใช้สารผสมของปิโตรเลียมอีเทอร์ (จุดเดือด 30-60°C) และอะซิโตน (7 : 3 โดยปริมาตร/ปริมาตร) เป็นตัวทำละลาย กรรมวิธีที่กล่าวมานี้เป็นประโยชน์ในการศึกษาสาหร่ายและการปฏิบัติการชีววิทยาในโรงเรียนมัธยมศึกษา

Changes in color during aging of Cabernet Sauvignon and Muscat Bailey A red wines. II. Some properties of polymeric pigments remaining in aqueous layers after extraction of red wines with isoamyl alcohol.

Yokotsuka, Koki (Inst. Enol. Vitic., Yamanashi Univ., Kofu 400, Japan). Nippon Jozo Kyokaishi, 90(6), 485-91 (Japanese) 1995. CODEN : NJKYES. ISSN : 0914 - 7314.
DOCUMENT TYPE : Journal

เหล้าองุ่น 17 Cavernet Sauvignon และ 17 Muscat Bailey เป็นเหล้าองุ่นที่ผลิตระหว่างปี 1968-1993 เก็บที่อุณหภูมิ 15°C เป็นเวลา 8 เดือน - 25 ปี สีของเหล้าองุ่นที่ผลิตก่อนปี 1987 ไม่กลมกลืนกัน ซึ่งเกิดจากรงควัตถุ, เหล้าองุ่นที่ผลิตหลังปี 1986 เป็นสารผสมของแอนโทไซยานิน ชนิด monomeric และ oligomeric และหรือสารโมเลกุลใหญ่วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารชั้นที่ละลายน้ำของเหล้าองุ่นที่ถูกสกัดด้วย isoamyl alcohol พบว่า เหล้าองุ่นที่มีอายุการผลิตใหม่เมื่อถูกสกัดแยก, ชั้นที่ละลายน้ำถูกฟอกสีด้วยไบซัลไฟต์ หรือมีสีแดงเข้มขึ้นเมื่อ pH ลดลงที่ 0.25 เกิดจาก oligomeric anthocyanin เหล้าองุ่นที่ผลิตในปี 1992 และ 1983 ซึ่งได้สกัดด้วย isoamyl alcohol นั้น, ส่วนของชั้นบนและชั้นล่างถูกแยกด้วยวิธีทินแลร์โครมาโทกราฟีบนแผ่นเซลลูโลส-ซิลิคา เจล สารจากชั้นบนปรากฏจุดของสาร monomeric anthocyanin หลายสี ส่วนสารที่สกัดแยกในชั้นล่างไม่มีสาร monomeric และปรากฏจุดของสารที่มีค่า R_f ต่ำ

Thin-layer chromatographic detection of the adulteration of Burgundy wine with other grape varieties.

Holbach, B.; Wilken, R. (Chem. Untersuchungsamt Trier, Trier, Germany). Lebesmittelchemie. 48(1), 4-5(German) 1994. CODEN : LEBEE 2. ISSN : 0937-1478.
DOCUMENT TYPE : Journal

ได้ใช้วิธีทินแลร์โครมาโทกราฟี (TLC) ของ A. Wurzinger และ F. Bandion (1988) เพื่อตรวจสอบสารเจือปนในเหล้าองุ่น Burgundy ซึ่งผลิตจากองุ่นแดงชนิดต่าง ๆ (เช่น Domfelder, Dunkelfelder, Domina) ซึ่งไม่ได้เป็นของกลุ่ม Burgundy (ซึ่งใช้สายพันธุ์Deckrot, Blaure, Fruehburgunder และ Spaetburgunder และ Schwarzriesing) สิ่งที่ตรวจพบเป็นจุดของ acylate anthocyanin ซึ่งไม่ได้เป็นผลผลิตของเหล้าองุ่น Burgundy สามารถมองเห็นได้ในปริมาณ 5%

A study on pigments from Rhodopila globiformis by acetone extraction : stability of red pigments.

Kim, Yong Hwan; Lee, Sang Seob (Dep. Food Technol., Kyonggi Univ., Suwon 442-760, S. Korea). Han' guk Yongyang Sikyong Hakhoechi, 23(1), 125-9 (Korean) 1994. CODEN : HYSHDL. ISSN : 0253-3154 . DOCUMENT TYPE: Journal

ในการใช้อะซิโตนสกัดรงควัตถุจากเนื้อเยื่อเซลล์ของ Rhodopila globiformis DSM 161 ได้สารสีแดง, ที่ pH 5-6 รงควัตถุมีสีแดง, ที่ pH 7-9 สีแดงแกมเหลือง รงควัตถุเสถียรที่ ช่วง pH 6.0-11.0 และอุณหภูมิต่ำกว่า 40°C โดยมีทั้งแสงสว่างและออกซิเจน, รงควัตถุจะลดความเสถียรภาพอย่างรวดเร็ว เมื่อทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะ เช่น Fe^{3+} ($1.0x10^{-3}$M), Al^{3+} ($1.0x10^{-2}$M, $1.0x10^{-3}$M) และ Zn^{2+} ($1.0x10^{-2}$M) แต่จะเสถียรมากใน Zn^{2+} ($1.0x10^{-3}$M) การวัดค่าการดูดกลืนแสงช่วง visible พบค่าสูงสุดที่ 358, 385, 494, 680 และ 748 nm และพบ shoulder peak ที่ 410, 466, และ 522 nm ผลการวิเคราะห์ด้วย TLC สรุปว่าเนื้อเยื่อประกอบด้วยสีแยกออกได้มีเจ็ดสี

The structure of red and purple anthocyanins and their production in colored tuber flesh of diploid potatoes, Solanum tuberosum L.

Ishii, Gensho; Mori, Motoyuki; Umemura, Yoshiki; Takigawa, Shigenobu; Tahara, Satoshi (Hokkaido Natl. Agric. Exp. Stn., Sapporo 062, Japan). Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 43(8), 887-895 (Japanese) 1996. CODEN:NSKKEF. ISSN:1314-027X. DOCUMENT TYPE : Journal

ในการศึกษาสมบัติทางชีวภาพและโครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานินในสีของหน่อมันฝรั่ง ซึ่งเพาะจาก Solanum phureja ซึ่งให้ผลผลิตของรงควัตถุค่อนข้างสูงในมันฝรั่งที่เพาะเลี้ยง ปริมาณของแอนโทไซยานินต่อน้ำหนักสด 1 กรัม ตรวจด้วยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดในบัฟเฟอร์ McIlvaine (pH 3) ภายหลังการสกัดด้วยเมทานอล -1% ของกรดไตรฟลูออโรอะซิติก ปริมาณในหน่อลดลงในระหว่างการขยายหน่อในระยะเพาะปลูก สัมประสิทธิ์การแปรผันของจำนวนในพืชแต่ละต้นอยู่ในช่วง 40-58% โดยไม่มีความแตกต่างของจำนวนแอนโทไซยานิน แอนโทไซยานินจากหน่อของมันฝรั่งสีแดงและสีม่วงแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีและ TLC พิสูจน์ได้ว่าแอนโทไซยานินส่วนใหญ่เป็น :-

3-0-(6-0-[4-0[-(E)-p-coumaroyl] -alpha-L-rhamnopyranosyl]-beta-D-Glucopyranosyl) -5-0-(beta-D-glucopyranosyl) pelargonidin and petunidin glycoside by proton NMR, FAB-MS and HPLC, resp.