บทที่ 4
ผลการวิจัย

การศึกษารงควัตถุของใบหูกวางเรื่อง การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมสกัดรงควัตถุ, การแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีทินแลร์โครมาโทกราฟี, การศึกษาสมบัติความเป็นอินดิเคเตอร์ของแอนโทไซยานิน และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงรงควัตถุ ; ผู้วิจัยได้นำความรู้จากการศึกษาดังกล่าวมาเป็นสื่อการสอนวิชาวิทยาศาสตร์ 1 รหัสวิชา 20001401 หลักสูตรประกาศนียบัตรวิชาชีพ (ปวช.) โดยจัดทำคู่มือครู, หนังสือปฏิบัติการสำหรับนักเรียนนักศึกษา สื่อสไลด์และแผ่นใส ใช้สอน ณ วิทยาลัยเทคนิคพัทลุง

ผลจากการศึกษารงควัตถุของใบหูกวางและการศึกษาประสิทธิภาพของสื่อ ได้ผลจากการวิเคราะห์ ข้อมูลดังนี้

1. การสกัดรงควัตถุจากใบหูกวาง

ใบหูกวางใบสีเขียว, สีแดง, สีเหลืองและสีน้ำตาล สกัดด้วยตัวทำละลาย 9 ชนิด คือ เมทานอล, เอทานอล, อะซิโตน, เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, คาร์บอนเตตระคลอไรด์, ไซลีน, โทลูอีน และ 1 M HCl ตัวทำละลาย 8 ชนิดแรกเป็นตัวทำละลายอินทรีย์, เมทานอลและเอทานอลและกรดไฮโดรคลอริกใช้เป็นตัวทำละลายที่สกัดสารอนินทรีย์ซึ่งละลายน้ำ

รงควัตถุของใบหูกวางประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ (สีเขียว), คาโรทีนอย (สีแดง-ส้ม-เหลือง) ฟลาโวนอยด์ (สีเหลืองของฟลาโวและฟลาโวนอล, สีแดง-ม่วง-ส้มของแอนโทไซยานิน) คลอโรฟิลล์และคาโรทีนอยด์ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ส่วนฟลาโวนอยด์เป็นสารที่ละลายน้ำ (สีแดง-ม่วง-น้ำเงินของแอนโทไซยานินเกิดจากเกลือที่เป็นประจุบวกของ benzopyrylium และสีเหลืองเกิดจาก benzo-2- และ -4-pyrone)

ตัวทำละลายที่มีสภาพขั้ว (polar) ต่ำ เช่น เฮกเซน ไซลีน โทลูอีน และคาร์บอนเตตระคลอไรด์ จะสกัดสารอินทรีย์ที่มีสภาพขั้วต่ำ ซึ่งไม่ละลายน้ำ ส่วนเมทานอล เอทานอล อะซิโตน และคลอโรฟอร์ม มีสภาพขั้วสูงกว่า จึงสกัดรงควัตถุของพืชที่เป็นสารอินทรีย์ได้ดีกว่า รงควัตถุของใบ หูกวางที่เป็นสารอินทรีย์จึงถูกสกัดได้ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ส่วนเกลืออนินทรีย์ส่วนใหญ่ละลาย น้ำได้และเป็นส่วนประกอบของแอนโทไซยานินซึ่งทำให้เกิดสีแดง-ม่วง-น้ำเงิน นั้นจะละลายในตัว ทำละลายที่มีสภาพขั้วสูง, แตกตัวเป็นไอออนละลายน้ำได้ เช่น เมทานอล เอทานอล และกรดไฮโดรคลอริก

ในการสกัดรงควัตถุของใบหูกวาง สีเขียวของคลอโรฟิลล์ถูกสกัดได้ด้วยเมทานอล เอทานอล อะซิโตน คลอโรฟอร์ม เฮกเซน คาร์บอนเตตระคลอไรด์ ไซลีน และโทลูอีน โดยตัวทำละลาย 4 ชนิดแรกจะสกัดคลอโรฟิลล์ได้ดีที่สุด สีของรงควัตถุเข้มที่สุด

สีเหลืองของคาโรตินอยด์ถูกสกัดได้ด้วยตัวทำละลายทั้ง 8 ชนิด และสีเหลืองของฟลาโวนอยด์ ถูกสกัดได้ด้วยเมทานอล เอทานอล และ 1 M HCl

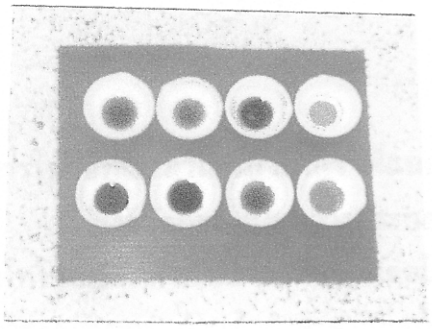
สีแดง-ส้มของคาโรตินอยด์ถูกสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ส่วนสีแดง – ม่วง - ส้มของแอนโทไซยานินถูกสกัดได้ด้วยเมทานอล เอทานอล และ 1 M HCl แต่สีแดง - ส้มของทั้งคาโรตินอยด์และแอนโทไซยานินไม่ถูกสกัดด้วยเฮกเซน คาร์บอนเตตระคลอไรด์ ไซลีน และโทลูอีน

เนื่องจากคลอโรฟิลล์และคาโรตินอยด์เป็นรงควัตถุที่ไม่ละลายน้ำ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) จึงไม่สามารถสกัดคลอโรฟิลล์และคาโรตินอยด์

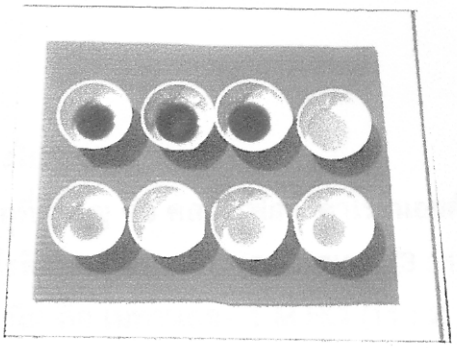
ผลจากการสกัดรงควัตถุของใบหูกวางด้วยตัวทำละลายดังกล่าว แสดงในตารางที่ 4.1

ตาราง 4.1 รงควัตถุของใบหูกวางสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

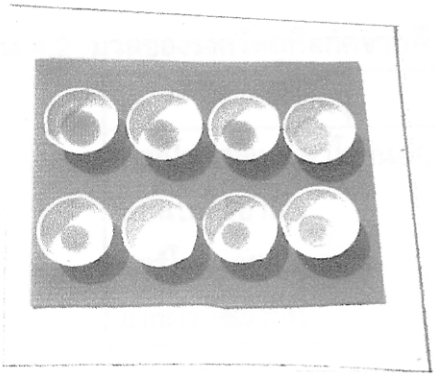
ตัวทำละลาย	รงควัตถุของใบหูกวาง			
	ใบสีเขียว	ใบสีแดง	ใบสีเหลือง	ใบสีน้ำตาล
เมทานอล	เขียว-เหลือง-น้ำตาลเข้ม	แดง-เหลือง-น้ำตาล	เหลือง-น้ำตาล	เหลือง-น้ำตาล
เอทานอล	เขียว, เหลือง น้ำตาลเข้ม	แดง-เหลือง-น้ำตาล	เหลือง-น้ำตาล	เหลือง-น้ำตาล
อะซิโตน	เขียว-เหลือง-น้ำตาล	แดง-เหลือง-น้ำตาล	เหลือง-น้ำตาล	เหลือง-น้ำตาล
เฮกเซน	เขียวอ่อน-เหลือง	เหลือง	เหลือง	เหลือง
คลอโรฟอร์ม	เขียว-เหลือง-น้ำตาลเข้ม	เหลือง-ส้ม	เหลือง	เหลือง
คาร์บอนเตตระคลอไรด์	เขียวอ่อน-เหลือง	เหลือง	เหลือง	เหลือง
ไซลีน	เขียว-เหลือง	เหลือง	เหลือง	เหลือง
โทลูอีน	เขียว-เหลือง	เหลือง	เหลือง	เหลือง
1 M HCl	เหลืองอ่อน	ส้ม-แดงม่วง	เหลือง	เหลือง



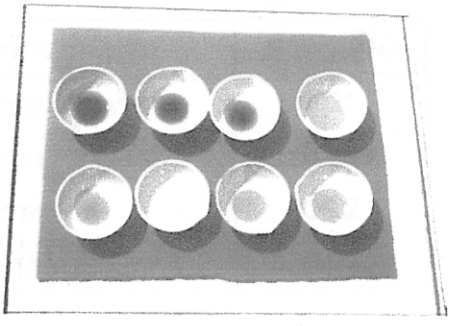
รูป 4.1 รงควัตถุของใบหูกวางสีเขียวสกัดด้วย (บนจากซ้าย) เมทานอล, เอทานอล, อะซิโตน, เฮกเซน (ล่างจากซ้าย) คลอโรฟอร์ม, คาร์บอนเตตระ-คลอไรด์, ไซลีน, โทลูอีน



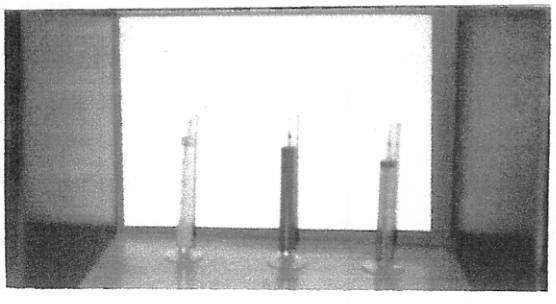
รูป 4.2 รงควัตถุของใบหูกวางสีแดงสกัดด้วย (บนจากซ้าย) เมทานอล, เอทานอล, อะซิโตน, เฮกเซน (ล่างจากซ้าย) คลอโรฟอร์ม, คาร์บอนเตตระ-คลอไรด์, ไซลีน, โทลูอีน



รูป 4.3 รงควัตถุของใบหูกวางสีเหลืองสกัดด้วย (บนจากซ้าย) เมทานอล, เอทานอล, อะซิโตน, เฮกเซน (ล่างจากซ้าย) คลอโรฟอร์ม, คาร์บอนเตตระคลอไรด์, ไซลีน, โทลูอีน



รูป 4.4 รงควัตถุของใบหูกวางสีน้ำตาลสกัดด้วย (บนจากซ้าย) เมทานอล, เอทานอล, อะซิโตน, เฮกเซน (ล่างจากซ้าย) คลอโรฟอร์ม, คาร์บอน-เตตระคลอไรด์, ไซลีน, โทลูอีน



4.5 รงควัตถุของใบหูกวาง (จากซ้าย) ใบสีเขียว, สีแดง, สีเหลืองสกัดด้วย 1 M Hcl

2. การใช้วิธีทินแลร์โครมาโทกราฟีแยกรงควัตถุของใบหูกวาง

รงควัตถุของใบหูกวางประกอบด้วยรงควัตถุที่สำคัญ คือ คลอโรฟิลล์, คาโรทินอยด์ และแอนโทไซยานิน ตัวทำละลายที่สกัดคลอโรฟิลล์และคาโรทินอยด์ คือ เมทานอล-เฮกเซน (3 : 1, ปริมาตร/ปริมาตร) ส่วนตัวทำละลายที่สกัดแอนโทไซยานิน คือ เมทานอล - 1 M HCl (11 : 2, ปริมาตร/ปริมาตร)

วิธีทินแลร์โครมาโทกราฟีเพื่อแยกรงควัตถุของใบหูกวางให้บริสุทธิ์และเพื่อระบุรงควัตถุที่เป็นองค์ประกอบนั้น การหาค่า R_f ของรงควัตถุแต่ละชนิดคือ ค่า R_f ของคลอโรฟิลล์ a, เบต้า-คาโรทีน, แซนโทฟิลล์และแอนโทไซยานินได้เปรียบเทียบกับคลอโรฟิลล์ a มาตรฐาน, เบต้า-คาโรทีนสังเคราะห์, แซนโทฟิลล์จากหัวแครอทและแอนโทไซยานินจากกลีบดอกกุหลาบแดง

ตาราง 4.2 มวลของรงควัตถุที่สกัดจากพืชที่มีมวล 1 กรัม

รงควัตถุ	สกัดจาก (กรัม)	มวล (กรัม)
คลอโรฟิลล์และคาโรทินอยด์	ใบหูกวาง (สด,เขียว)	0.21
แอนโทไซยานิน	ใบหูกวาง (สด,แดง)	0.25
คาร์โรทินอยด์	หัวแครอท	0.02
แอนโทไซยานิน	กลีบดอกกุหลาบแดง	0.22

ข้อปฏิบัติในการแยกรงควัตถุของใบหูกวางด้วยวิธีทินแลร์โครมาโทกราฟี

1. มวลของรงควัตถุ/ปริมาตรตัวทำละลาย = 0.01 กรัม/ 1 ลบ.ซม. (OD = 1%)
2. แผ่นดูดซับ : แผ่นแก้วขนาด 5.1x5.1 ซม^2 ผนึกกระดาษกรอง Whatman No.1093 125 เคลือบซิลิคา เจล (1 : 1)

ตาราง 4.3 ค่า R_f ของรงควัตถุของใบหูกวางบนทินแลร์โครมาโทกราฟี

รงควัตถุ	Rf (x 100)	สีที่ปรากฏ
ฟีโอไฟติน a	92	เทา
ฟีโอไฟติน b	88	เหลือง-น้ำตาล
คลอโรฟิลล์ a	61	น้ำเงิน-เขียว
คลอโรฟิลล์ b	57	เหลือง-เขียว
ฟีโอฟอร์ไบด์ a	19	เทา
ฟีโอฟอร์ไบด์ b	13	เหลือง-น้ำตาล
คลอโรฟิลลไลด์ a	11	น้ำเงิน-เขียว
คลอโรฟิลลไลด์ b	2	เหลือง-เขียว

ตัวทำละลาย เฮกเซน-อะซิโตน-โพรพานอล (90:10:0.45) ที่อุณหภูมิห้อง (30°C)
เวลา 5 นาที

ตาราง 4.4 เปรียบเทียบค่า R_f ของคลอโรฟิลล์ a ของใบหูกวางกับคลอโรฟิลล์ a มาตรฐาน

รงควัตถุ	ค่า R_f (x100)
คลอโรฟิลล์ a ของใบหูกวาง	61
คลอโรฟิลล์ a มาตรฐาน	59

ตาราง 4.5 ค่า R_f ของคาโรตินอยด์ของใบหูกวางบนทินแลร์โครมาโทกราฟี

รงควัตถุ	ค่า R_f (x 100) ในระบบ	
	1	2
คาโรทีน-ไลโคปีน		
1. สีเหลือง-ส้ม	85	
2. สีเหลือง	44	
แซนโทฟิลล์		
1. สีเหลือง-ส้ม		90
2. สีส้ม		61
3. สีเหลือง		72
4. สีน้ำตาล		72

ระบบที่ 1 ตัวทำละลาย เฮกเซน หาค่า R_f ของคาโรทีนและไลโคปีน
ระบบที่ 2 ตัวทำละลายเฮกเซน-อะซิโตน (4:1) หาค่า R_f ของแซนโทฟิลล์
ระบบที่ 1 เวลา $2^1/_2$ นาที
ระบบที่ 2 เวลา 2 นาที
อุณหภูมิ 30°C

ตาราง 4.6 เปรียบเทียบค่า R_f ของเบต้า-คาโรทีนของใบหูกวางกับเบต้า-คาโรทีนมาตรฐาน (ระบบที่ 1) และค่า R_f ของแซนโทฟิลล์ของใบหูกวางกับแซนโทฟิลล์ของหัวแครอท (ระบบที่ 2)

รงควัตถุ	ค่า R_f (x 100) ในระบบ	
	ระบบที่ 1	ระบบที่ 2
เบต้า-คาโรทีนของใบหูกวาง	85	
เบต้า-คาโรทีนมาตรฐาน	83	
แซนโทฟิลล์ของใบหูกวาง		90
แซนโทฟิลล์ของหัวแครอท		90

ระบบที่ 1 ตัวทำละลาย เฮกเซน เวลา $2^1/_2$ นาที

ระบบที่ 2 ตัวทำละลายเฮกเซน-อะซิโตน (4:1) เวลา 2 นาที

หมายเหตุ แซนโทฟิลล์มาตรฐานไม่มีจำหน่าย จึงเปรียบเทียบค่า R_f กับค่า R_f ของหัวแครอท เพราะแซนโทฟิลล์มีมากในหัวแครอท (Moore, Clark, Stern and Wodopich, 1995, p.142)

ตาราง 4.7 ค่า R_f ของแอนโทไซยานินของใบหูกวางบนทินแลร์โครมาโทกราฟี

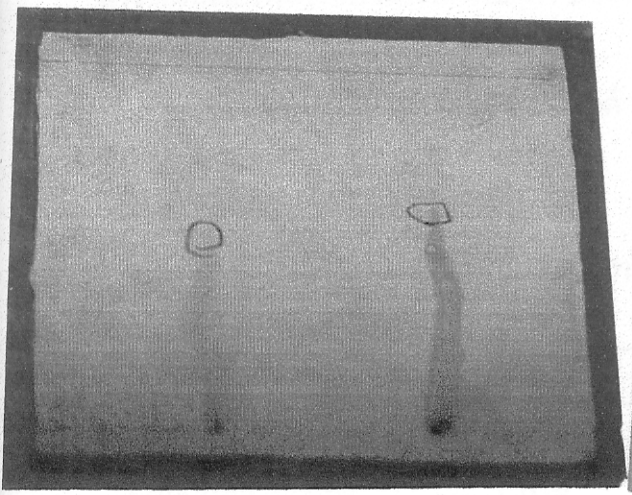
รงควัตถุ	ค่า Rf (x 100) ใน	สี
	เมทานอล	
Pelargonidin glycoside	54	แดงส้ม
Cyanidin glycoside	69	แดงม่วง
Delphinidin glycoside	30	ม่วง

ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบค่า R_f ของ Cyanidin 3,5-diglucoside ของใบหูกวาง (สีแดง) และของกลีบดอกกุหลาบแดง

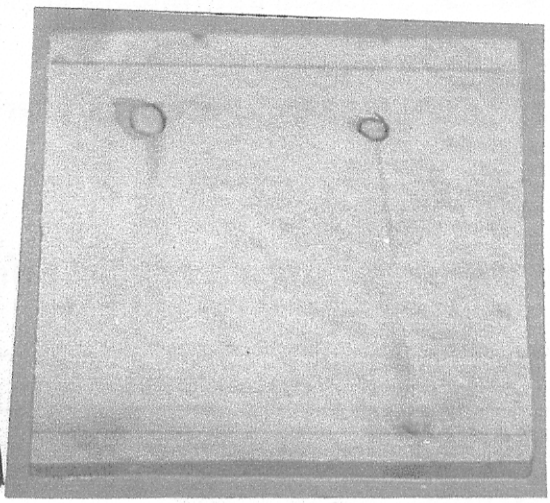
Cyanidin 3,5-diglucoside	ค่า Rf (x 100) ใน เมทานอล	สี
ใบหูกวางสีแดง	69	แดงม่วง
กลีบดอกกุหลาบแดง	67	แดงม่วง

หมายเหตุ เนื่องจากแอนโทไซยานินมาตรฐานไม่มีจำหน่าย จึงศึกษาเปรียบเทียบกับแอนโทไซยานินของกลีบดอกกุหลาบแดงซึ่งมี Cyanidin 3,5-diglucoside มากที่สุด (Harborne, 1973, p.65)

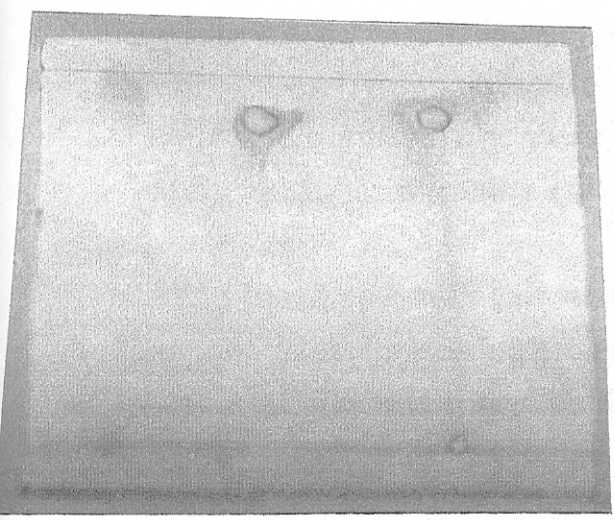
รูปที่ 4.6-4.9 แสดงทินแลร์โครมาโทกราฟีแยกรงควัตถุของใบหูกวางและสารที่เปรียบเทียบค่า R_f



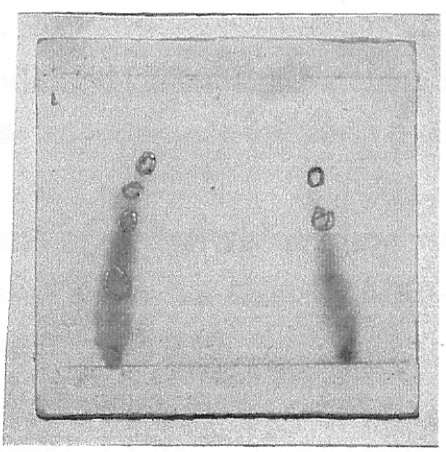
รูป 4.6 (ซ้าย) คลอโรฟิลล์ a มาตรฐาน
(ขวา) คลอโรฟิลล์ a ของใบหูกวาง



รูป 4.7 (ซ้าย) เบต้า-คาโรทีนมาตรฐาน
(ขวา) เบต้า-คาโรทีนของใบหูกวาง



รูป 4.8 (ซ้าย) แซนโทฟิลล์ของหัวแครอท
(ขวา) แซนโทฟิลล์ของใบหูกวาง



รูป 4.9 (ขวา) แอนโทไซยานินของกุหลาบแดง
(ซ้าย) แอนโทไซยานินของใบหูกวาง,

3. การทดสอบสมบัติอินดิเคเตอร์ของแอนโทไซยานินของใบหูกวาง

เนื่องจากอินดิเคเตอร์เป็นสารอินทรีย์ที่มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อนหรือเบสอ่อน ซึ่งจะให้สีแตกต่างกันที่ช่วง pH หนึ่ง ๆ ส่วนแอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุของพืชที่มีสีแดง-ม่วง-น้ำเงิน สีของแอนโทไซยานินขึ้นกับ pH ของตัวกลางที่แอนโทไซยานินละลาย (Acheson, 1967, p.287 : Badger, 1961, p.452)

แอนโทไซยานินของพืชสกัดด้วยสารละลายผสมเมทานอล- 1 M HCl (11 : 2) ดังตาราง 4.9

ตาราง 4.9 เปรียบเทียบมวลและสีของแอนโทไซยานินที่สกัดจากใบหูกวางสีแดงและดอกกุหลาบสีแดง

แอนโทไซยานิน	มวลก่อนสกัด	มวลหลังการสกัด (กรัม)	สี
ใบหูกวางสีแดง	1 กรัม	0.25	แดง-ม่วง-ส้ม
ดอกกุหลาบสีแดง	1 กรัม	0.22	แดงม่วง

หมายเหตุ 1. ใบหูกวางและกลีบดอกกุหลาบแดงใช้ชนิดสด

2. มวล/ตัวทำละลายก่อนสกัด = 1 : 20 (กรัม : ลบ.ซม.)

3. สารละลายที่สกัดได้ระเหยให้แห้งในถ้วยกระเบื้องเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 ซม. ที่อุณหภูมิห้อง (และในที่มืด) แล้วนำมาอบที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนจะชั่งมวลที่สกัดได้

4. เนื่องจากแอนโทไซยานินมาตรฐานไม่มีจำหน่าย จึงศึกษาเปรียบเทียบกับแอนโทไซยานินของกลีบดอกกุหลาบแดง ซึ่งมี cyanidin 3,5 -diglucoside จำนวนมาก (Haborne, 1973, p.65)

ในการทดสอบสมบัติอินดิเคเตอร์ของแอนโทไซยานินที่จะสกัดจากใบหูกวางสีแดงและกลีบดอกกุหลาบแดงได้ทดสอบกับสารละลายบัฟเฟอร์ pH 0.8, 2.9, 3.8, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0 และ 11.7 แอนโทไซยานินของพืชแต่ละชนิดได้กำหนดความเข้มข้น 0.1%

ตาราง 4.10 เปรียบเทียบการเปลี่ยนสีของแอนโทไซยานินของใบหูกวางสีแดงและของกลีบดอกกุหลาบแดงในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 0.8-11.7

แอนโทไซยานินของ	การเปลี่ยนแปลงของสี			
	pH 0.8-6.5	pH 7.0	pH 8.0-9.0	pH 11.7
ใบหูกวางสีแดง	แดง-ส้ม-ม่วง	สีจางลง	ม่วง-เหลือง	น้ำเงิน-เหลือง-เขียว
กลีบดอกกุหลาบแดง	แดงม่วง	สีจางลง	ม่วง	น้ำเงิน-เหลือง-เขียว

ข้อสังเกต 1. ในช่วง pH ที่เป็นกรด (pH 0.8-6.5) แอนโทไซยานินของพืชเป็นสีแดง ซึ่งเกิดจาก benzopyrylium cation และสีเหลืองเกิดจาก benzo-2- และ-4-pyrone (pH 8.0-11.7) (Acheson, 1967, p.285)

2. การเปลี่ยนสีในช่วง pH ของเบส คือ pH 8.0-9.0 = สีม่วง , pH 11.7 = สีน้ำเงิน นั้นเป็นสมบัติทางชีวเคมีของแอนโทไซยานิน และสีเขียวที่เกิดขึ้นที่ pH 11.7 เกิดจากสีน้ำเงินผสมกับสีเหลือง ของ benzo-2- และ-4-pyrone

3. การเปลี่ยนสีของแอนโทไซยานินของใบหูกวางสีแดงและของกลีบดอกกุหลาบแดง จึงเป็นสมบัติของอินดิเคเตอร์

4. ที่ pH 11.7 การเปลี่ยนสีของแอนโทไซยานินจากกุหลาบแดงสดใสกว่าการเปลี่ยนสีของแอนโทไซยานินจากใบหูกวางสีแดง

4. การทดลองสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นกรด-เบส ด้วยแอนโทไซยานินของใบหูกวางและกลีบดอกกุหลาบแดง

สารละลายกรดแก่และกรดอ่อนมีความแตกต่างในการให้ไฮโดรเนียมไอออน (H_3O^+) เมื่อละลายน้ำกรดแก่จะให้ไฮโดรเนียมไอออนได้มาก ส่วนกรดอ่อนให้ไฮโดรเนียมไอออนน้อย

สารละลายเบสแก่เมื่อละลายน้ำจะแตกตัวให้ไฮดรอกไซด์ไอออน (OH^-) ได้มากกว่าเบสอ่อน

ในการนำอินดิเคเตอร์ทดสอบสารที่มีฤทธิ์เป็นกรดและเบสนั้น เนื่องจากสมบัติการแตกตัวที่แตกต่างกัน จึงทำให้การเปลี่ยนสีของกรดอ่อนและกรดแก่ เมื่อทดสอบด้วยอินดิเคเตอร์จึงแตกต่างกันด้วย ในทำนองเดียวกันการทดสอบเบสอ่อนและเบสแก่ด้วยอินดิเคเตอร์ก็แตกต่างกันด้วยเช่นเดียวกัน

ตาราง 4.11 เปรียบเทียบช่วง pH ของแอนโทไซยานินของใบหูกวางสีแดง, กลีบดอกกุหลาบแดงและอินดิเคเตอร์สามัญบางชนิด

อินดิเคเตอร์	รูปกรดเด่น	ช่วงการเปลี่ยน pH	รูปเบสเด่น
แอนโทไซยานินของใบหูกวาง	แดง	6.5-11.7	ม่วง-น้ำเงิน-เหลือง
เมทิลออเร้นจ์	แดง	3.1-4.4	เหลือง
โบรโมไทมอลบลู	เหลือง	6.0-7.6	น้ำเงิน
ฟีนอล์ฟทาลีน	ไม่มีสี	8.1-9.6	แดง
อะลิซาริน เยลโล่ R	เหลือง	10.1-12.0	ม่วง
แอนโทไซยานินของกลีบดอกกุหลาบแดง	แดง	6.5-11.7	ม่วง-น้ำเงิน-เหลือง

ข้อสังเกต แอนโทไซยานินของใบหูกวางสีแดงและของกลีบดอกกุหลาบแดงมีช่วงการเปลี่ยนแปลงสีเมื่ออยู่ในรูปเบส คือ pH 8-11.7 นั้นเกิดจากการเปลี่ยนโครงสร้างดังกล่าวช่วง pH ของเบสกว้างกว่าของอินดิเคเตอร์สามัญ

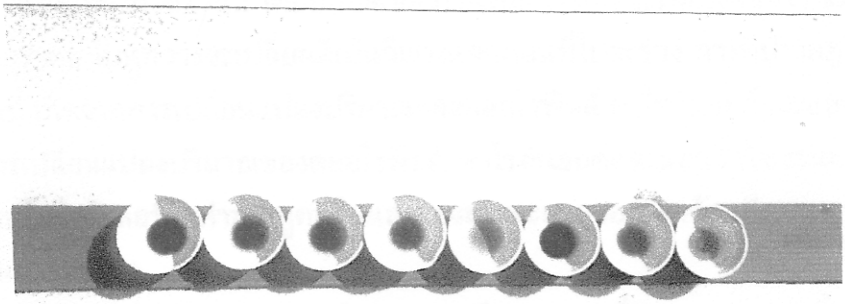
ตาราง 4.12 เปรียบเทียบสีของแอนโทไซยานินของใบหูกวางและของกลีบดอกกุหลาบแดงในสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นกรด-เบสและเกลือ

สารละลาย (เข้มข้น 0.1 โมล/ลิตร)	การเปลี่ยนสีของแอนโทไซยานินจาก	
	ใบหูกวางสีแดง	กลีบดอกกุหลาบแดง
1. กรดไฮโดรคลอริก	แดง-ส้ม	แดงม่วง
2. น้ำมะนาว	แดง-ส้ม	แดงชมพู
3. กรดอะซิติก	แดงส้ม	แดงชมพู
4. แอมโมเนียมคลอไรด์	แดงส้ม	แดงชมพู
5. โซเดียมซัลเฟต	แดง-ม่วง-ส้ม (สีจาง)	แดงชมพู (สีจางลง)
6. โซเดียมอะซิเตต	ม่วง-เหลือง	ม่วง
7. แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์	ม่วง-เหลือง	ม่วง
8. โซเดียมไฮดรอกไซด์	น้ำเงิน-เหลือง-เขียว	น้ำเงิน-เหลือง-เขียว

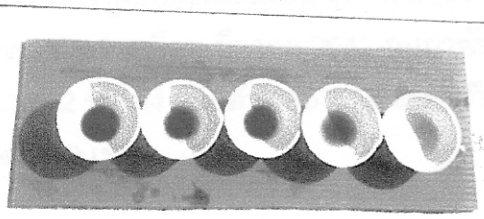
กระดาษ pH จากแอนโทไซยานินของใบหูกวาง

ในการหาค่า pH ของสารละลายด้วยอินดิเคเตอร์โดยนำกระดาษกรอง Whatman No.1093 125 จุ่มแช่ในอินดิเคเตอร์แล้วนำไปทดสอบการเปลี่ยนสีของสารละลาย

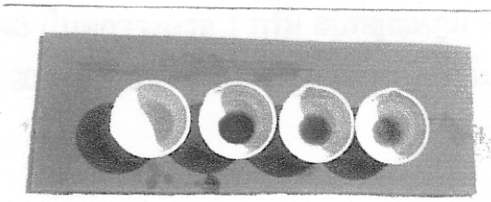
กระดาษ pH จุ่มแช่ด้วยสารละลายแอนโทไซยานินของใบหูกวาง อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40°C ได้กระดาษ pH สีชมพู ทดสอบการเปลี่ยนสีด้วยสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นกรด-เบส โดยใช้แท่งแก้วจุ่มในสารที่ต้องการทราบ pH แล้วนำมาแตะกับกระดาษ pH สีที่เปลี่ยนบนกระดาษ pH นั้นจะเปลี่ยนที่ช่วง pH ของเบส



รูป 4.10 แอนโทไซยานินของใบหูกวางในสารละลายบัฟเฟอร์
จากซ้าย pH 0.8, 2.9, 3.8, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0, 11.7



รูป 4.11 แอนโทไซยานินของใบหูกวาง
จากซ้าย ถ้วยที่ 1 กรดไฮโดรคลอริก
ถ้วยที่ 2 น้ำมะนาว
ถ้วยที่ 3 กรดอะซิติก
ถ้วยที่ 4 แอมโมเนียมคลอไรด์



รูป 4.12 แอนโทไซยานินของใบหูกวาง
จากซ้าย ถ้วยที่ 1 โซเดียมซัลเฟต
ถ้วยที่ 2 โซเดียมอะซิเตต
ถ้วยที่ 3 แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์
ถ้วยที่ 4 โซเดียมไฮดรอกไซด์

5. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงรงควัตถุของใบหูกวาง

รงควัตถุของใบหูกวางประกอบด้วยสารเคมีที่สำคัญเช่นเดียวกับในพืชทั่วไป คือ สีเขียวของคลอโรฟิลล์, สีเหลืองของคาโรตินอยด์และฟลาโวนอยด์บางกลุ่ม สีแดง-ส้มของคาโรตินอยด์และสีแดง-ม่วง-น้ำเงินของแอนโทไซยานิน โดยปกติสีเขียวของคลอโรฟิลล์จะบดบังสีอื่นไว้ แต่ในระหว่างเดือนธันวาคม-มกราคม ใบหูกวางจะเปลี่ยนสีเป็นสีแดงแสดก่อนที่ใบจะร่วง การที่ปรากฏสีแดงเด่นสดใสในช่วงเวลานี้ เกิดจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณของคลอโรฟิลล์ คาโรตินอยด์และแอนโทไซยานิน การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณของคลอโรฟิลล์, คาโรตินอยด์และแอนโทไซยานิน โดยใช้เครื่องวัดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายของรงควัตถุที่ความยาวคลื่นซึ่งมีหน่วยเป็นนาโนเมตร (nm)

การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในช่วงแถบสี (visible) ที่ช่วงความยาวคลื่น (wavelength) โดยใช้ตัวทำละลายต่าง ๆ นั้น ความยาวคลื่นที่กำหนด เช่น ที่ช่วงวามยาวคลื่น 400-500 nm สำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสงของคาโรตินอยด์ซึ่งเป็นรงควัตถุของพืช เป็นต้น

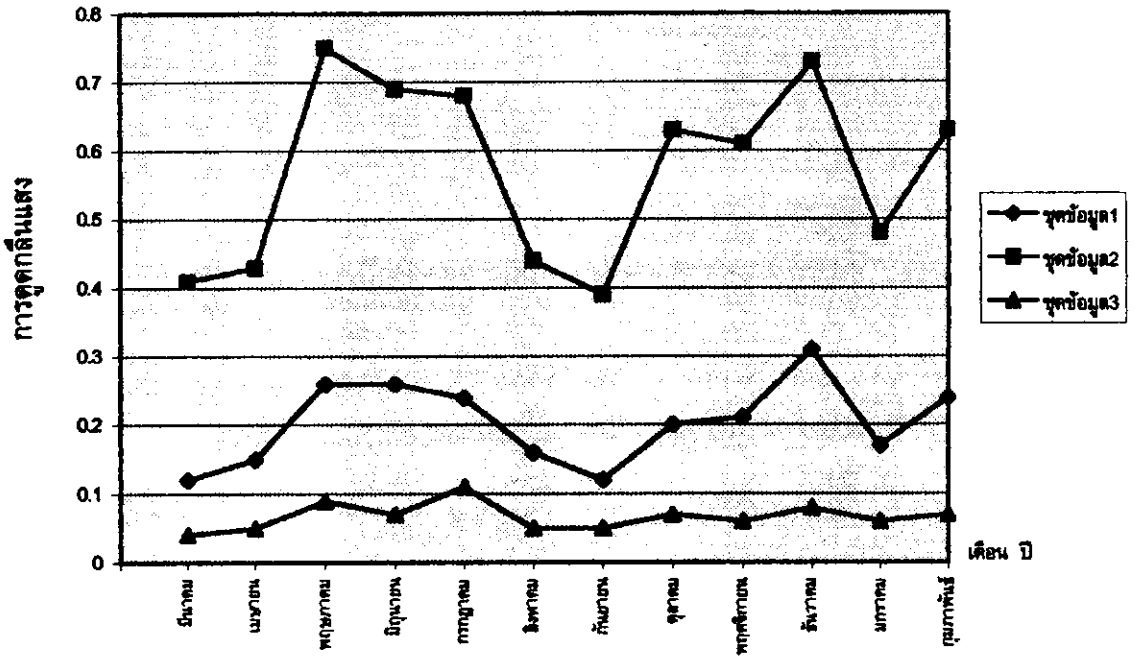
จากกฎของ Beer-Lambert ซึ่งเป็นกฎที่มาจากการอนุมานว่า 1) สำแสงตกกระทบต้องเป็นสำแสงเดียว 2) สารตัวอย่างที่ดูดกลืนแสงต้องเป็นอิสระจากการดูดกลืนแสงชนิดอื่น 3) การดูดกลืนแสงจะต้องเกิดขึ้นในภาชนะที่มีปริมาตรและพื้นที่หน้าตัดเท่ากันตลอด 4) พลังงานแสงที่คายออกมาต้องไม่มีแสงฟลูออเรสเซนต์ 5) ดัชนีหักเหของสารไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสาร (ไม่ใช้สารที่มีความเข้มข้นสูง)

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงรงควัตถุของใบหูกวางที่ช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม ใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ UV - 160 A UV -visible recording spectrophotometer SHIMADZU วัดค่าการดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์ (660 nm) แซนโทฟิลล์ (420 nm) และแอนโทไซยานิน (540 nm) ระหว่างเดือน มีนาคม 2542-กุมภาพันธ์ 2543 (ใบหูกวางมวล 1 กรัม อบที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สกัดด้วย 95% Ethanal ปริมาตร 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วเจือจาง 10 เท่า)

ตาราง 4.13 เปรียบเทียบปริมาณของคลอโรฟิลล์ แซนโทฟิลล์ และแอนโทไซยานินของใบหูกวาง

เดือน ปี	การดูดกลืนแสงของรงควัตถุที่ความยาวคลื่น		
	660 nm	420 nm	540 nm
มีนาคม 2542	0.12	0.41	0.04
เมษายน	0.15	0.43	0.05
พฤษภาคม	0.26	0.75	0.09
มิถุนายน	0.26	0.69	0.07
กรกฎาคม	0.24	0.68	0.11
สิงหาคม	0.16	0.44	0.05
กันยายน	0.12	0.39	0.05
ตุลาคม	0.20	0.63	0.07
พฤศจิกายน	0.21	0.61	0.06
ธันวาคม	0.31	0.73	0.08
มกราคม 2543	0.17	0.48	0.06
กุมภาพันธ์	0.24	0.63	0.07

ดังรูป 4.13 เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลา (ตั้งแต่เดือนมีนาคม 2542 - กุมภาพันธ์ 2543)



รูปที่ 7.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง ของรงควัตถุ ของใบหูกวางกับเวลา

(ระหว่างเดือนมีนาคม 2542 – กุมภาพันธ์ 2543)

Curve ชุดที่ 1 คลอโรฟิลล์ ความยาวคลื่น 660 nm

Curve ชุดที่ 2 แซนโทฟิลล์ ความยาวคลื่น 420 nm

Curve ชุดที่ 3 แอนโทไซยานิน ความยาวคลื่น 540 nm

จากตารางที่ 4.13 และกราฟรูป 4.13 แสดงผลของปริมาณของคลอโรฟิลล์ (ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร), แซนโทฟิลล์ (ที่ 420 นาโนเมตร) และแอนโทไซยานิน (ที่540 นาโนเมตร) ดังนี้

1) คลอโรฟิลล์มีปริมาณมากในเดือนพฤษภาคม, มิถุนายน และธันวาคม ; แซนโทฟิลล์มีปริมาณมากที่สุดในเดือนพฤษภาคม และแอนโทไซยานินมีปริมาณมากที่สุดในเดือนกรกฎาคม

2) ปริมาณของแซนโทฟิลล์แปรผันตามปริมาณของคลอโรฟิลล์ (สังเกตจากกราฟรูป 4.13) เพราะแซนโทฟิลล์เป็นรงควัตถุที่ช่วยสังเคราะห์แสง (accessory pigments) คือ ช่วยดูดกลืนแสงแล้วส่งต่อให้คลอโรฟิลล์ แซนโทฟิลล์เป็นสารที่เกิดร่วมกับคลอโรฟิลล์ในกระบวนการสังเคราะห์แสง ปริมาณของแซนโทฟิลล์จึงเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของคลอโนฟิลล์เพิ่มขึ้น และจะลดปริมาณเมื่อคลอโรฟิลล์มีปริมาณลดต่ำลง (Arthur Cronquist, 1995 , p.142)

3) ใบหูกวางจะปรากฏสีแดงในช่วงระยะเวลาสั้นเพียงไม่กี่วันในเดือนกันยายน 2542 และระหว่างเดือนมกราคม 2543 ปรากฏสารสีแดงที่ใบก่อนที่ใบจะร่วง ซึ่งเมื่อพิจารณาจากตาราง 4.13 และกราฟรูป 4.13 พบว่า ปริมาณของแอนโทไซยานินเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก แต่ปริมาณของคลอโรฟิลล์ต่ำลง เพราะรงควัตถุของใบหูกวางหรือใบไม้โดยทั่วไปประกอบด้วยสารเคมี 3 กลุ่ม คือ สีเขียวของคลอโรฟิลล์ สีเหลืองของคาโรตินอยด์ (และฟลาโวนอยด์บางกลุ่ม) และสีแดง – ม่วง ของแอนโทไซยานิน เมื่อคลอโรฟิลล์มีจำนวนมากทำให้สีเขียวบดบังสีอื่น ๆ จนหมด (Peter H. Raven and Helena Curtis, 1970, p. 58) โดยทั่วไปเราจึงมองเห็นใบหูกวางเป็นสีเขียว ในฤดูหนาวปริมาณของคลอโรฟิลล์ลดลง (รวมทั้งเดือนกันยายน 2542) สีเหลืองและสีแดงจะปรากฏขึ้นบดบังสีเขียวของคลอโรฟิลล์ โดยที่สีแดงของแอนโทไซยานินจะบดบังสีเหลืองได้ดีเมื่อแอนโทไซยานินมีปริมาณไม่ต่ำมาก (Alkema , J. and Seager, S.L.,1982, p.185) ใบหูกวางจึงปรากฏเป็นสีแดงก่อนใบร่วง

4) ระหว่างเดือนตุลาคม – ธันวาคม ปริมาณแสงอาทิตย์จะลดลงใบไม้จะสังเคราะห์แสงสร้างคลอโรฟิลล์น้อยลง แต่อัตราการสลายตัวยังไม่ลด ทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง แต่ผลจากตาราง 4.13 และกราฟ 4.13 ปรากฏว่าปริมาณคลอโรฟิลล์และแซนโทฟิลล์เพิ่มขึ้นระหว่างเดือนตุลาคม – ธันวาคม 2542 ทั้งนี้เนื่องจากต้นหูกวางที่ได้ศึกษาถูกตัดใบออกเหลือใบบนกิ่งก้านจำนวนน้อย ใบหูกวางรับแสงสว่างได้เต็มที่จึงมีการสังเคราะห์แสงมากขึ้นสามารถสร้างคลอโรฟิลล์ และแซนโทฟิลล์ได้มากขึ้น

6. จัดทำหนังสือปฏิบัติการสำหรับนักเรียนนักศึกษาและคู่มือครู

การนำความรู้เรื่อง การสกัดรงควัตถุของใบหูกวาง, เปรียบเทียบความสามารถของตัวทำละลายในการสกัดรงควัตถุของใบหูกวาง, ทินแลร์โครมาโทกราฟี, การหาค่า R_f ของรงควัตถุของใบหูกวาง, การทดสอบสมบัติอินดิเคเตอร์ของแอนโทไซยานินของใบหูกวาง การทดสอบสารละลายที่มี

ฤทธิ์เป็นกรด-เบสและเกลือด้วยแอนโทไซยานินของใบหูกวาง และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงรงควัตถุของใบหูกวาง มาเป็นสื่อการสอนโดยจัดทำหนังสือปฏิบัติการและคู่มือครู ; หนังสือปฏิบัติการสำหรับนักเรียนนักศึกษาประกอบด้วยการทดลอง 6 การทดลองและกิจกรรม 1 กิจกรรม, คู่มือประกอบด้วยแผนการสอน 7 แผนการสอน

การศึกษาประสิทธิภาพของสื่อการสอน

1) การรวบรวมข้อมูล ใช้นักศึกษากลุ่มตัวอย่างเป็นกลุ่มทดลองจำนวน 50 คน (โดยวิธีจับฉลาก) รวบรวมข้อมูลจากแบบทดสอบก่อนเรียน แบบฝึกหัดและกิจกรรมระหว่างเรียนและแบบทดสอบหลังสอนเปรียบเทียบผลของข้อมูลก่อนเรียนและหลังสอน

2) การศึกษาประสิทธิภาพของสื่อ ศึกษาจากผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนโดยใช้แบบทดสอบก่อนเรียนและหลังสอน และคะแนนระหว่างเรียน หาค่าดัชนีความยาก (p), ค่าดัชนีอำนาจจำแนก (D), และหาค่าประสิทธิภาพของสื่อตามเกณฑ์มาตรฐาน 85/85 ; แบบทดสอบก่อนเรียน (pre-test) และหลังสอน (post-test) ใช้ชุดเดียวกัน ใช้ข้อสอบแบบปรนัย แผนการสอนละ 8 ข้อ รวม 7 แผนการสอน = 56 ข้อ ตอบถูกได้ 1 คะแนน ตอบผิดได้ 0 คะแนน คะแนนระหว่างเรียน 96 คะแนน (อัตราส่วนคะแนนระหว่างเรียนและหลังสอน = 96 : 56)

ตาราง 4.14 ประสิทธิภาพของสื่อการสอน เรื่องรงควัตถุของใบหูกวาง

คนที่	คะแนนสอบก่อนเรียน (56)	คะแนนระหว่างเรียน (96)	คะแนนสอบหลังสอน (56)
1	11	87	51
2	15	84	52
3	13	83	51
4	12	81	48
5	10	83	51
6	14	82	52
7	9	86	50
8	10	82	53
9	13	83	51
10	11	81	50
11	12	84	52
12	14	84	51
13	12	85	52
14	11	87	48

ตาราง 4.14 (ต่อ)

คนที่	คะแนนสอบก่อนเรียน (56)	คะแนนระหว่างเรียน (96)	คะแนนสอบหลังสอน (56)
15	14	83	50
16	15	82	51
17	13	84	49
18	11	83	52
19	10	84	50
20	9	82	52
21	14	83	51
22	15	84	51
23	13	82	51
24	11	82	51
25	11	85	48
26	13	81	50
27	11	86	51
28	11	85	49
29	10	84	50
30	12	81	50
31	8	86	51
32	13	82	47
33	11	83	49
34	11	84	51
35	13	84	50
36	11	82	49
37	10	86	51
38	10	83	48
39	15	87	50
40	16	83	49
41	14	81	51
42	11	84	50
43	8	86	49
44	9	87	50
45	12	85	47

ตาราง 4.14 (ต่อ)

คนที่	คะแนนสอบก่อนเรียน (56)	คะแนนระหว่างเรียน (96)	คะแนนสอบหลังสอน (56)
46	13	82	49
47	12	83	51
48	15	85	52
49	13	87	49
50	11	82	51
คะแนนรวม	596	4185	2512
คะแนนเฉลี่ย ($\bar{X}$)	11.92	83.70	50.24
ร้อยละ	21.29	87.18	89.71

จากตาราง 4.14 ค่าประสิทธิภาพของสื่อการสอนนำมาหาค่าดัชนีความยากหรือเปอร์เซนต์คะแนนกลุ่ม (Item Difficulty Index, p) คือ ค่าความยากก่อนเรียน (p_{pre}), ค่าความยากหลังสอน (p_{post}) และดัชนีอำนาจจำแนก (Item Discrimination Index, D) ดังผลในตาราง 4.15

ตาราง 4.15 เปรียบเทียบค่าดัชนีความยาก (p) ก่อนเรียนและหลังสอน ค่าดัชนีอำนาจจำแนก (D)

นักศึกษากลุ่มทดลอง	n (คน)	$p_{(pre)}$ %	$p_{(post)}$ %	D (ดัชนีอำนาจจำแนก) $p_{(post)} - p_{(pre)}$
	50	21.29	89.71	68.42

จากค่าดัชนีความยาก (p) ก่อนเรียนและหลังสอนของแบบทดสอบ ได้แสดงค่าดัชนีอำนาจจำแนก (D) ของผลการสอนว่าได้ผลสูงตามจุดประสงค์การเรียนรู้ เมื่อ D = 68.42%

ตาราง 4.16 ประสิทธิภาพของสื่อการสอน (ระหว่างเรียนและหลังการสอน)

นักศึกษากลุ่มทดลอง (50 คน)	คะแนนบทเรียน (% เฉลี่ย)	คะแนนสอบหลังสอน (% เฉลี่ย)
	87.18	89.71

จากตาราง 4.15 และตาราง 4.16 เมื่อเปรียบเทียบคะแนนบทเรียนและคะแนนสอบหลังสอนเป็นค่าร้อยละโดยเฉลี่ย = 87.18/89.71 (เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน 85/85)

7. จัดกิจกรรมโครงงานวิทยาศาสตร์

นักศึกษาได้นำใบหูกวาง, ใบและดอกของพืชที่ปลูกในสถานศึกษามาใช้ในการทำโครงงานวิทยาศาสตร์ได้ผลดังนี้

1) โครงงานวิทยาศาสตร์ เรื่อง " อินดิเคเตอร์จากธรรมชาติ " ศึกษาแอนโทไซยานินของใบหูกวางสีแดง, ใบอ่อนของอโศก, ใบโกสน, ดอกเข็มแดง, ดอกผกากรอง และดอกหางนกยูง ; แอนโทไซยานินสกัดด้วยเมทานอล- 1 M HCl เปรียบเทียบการเปลี่ยนสีในสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นกรดและเบส และเปรียบเทียบการเปลี่ยนสีกับอินดิเคเตอร์มาตรฐาน คือ เมทิลออเร้นจ์ โบรโมไทมอลบลู อะลิซาลีน เยลโล่ R และฟีนอล์ฟทาลีน

2) โครงงานวิทยาศาสตร์ เรื่อง "แอนโทไซยานินในใบอ่อนและใบสีเขียวของพืชบางชนิด" เปรียบเทียบการเกิดแอนโทไซยานินของใบอ่อนและใบสีเขียวของใบหูกวาง, ใบอโศก ใบลายหยุด และใบเข็มแดง สกัดแอนโทไซยานินด้วย 1 M HCl ศึกษาการเปลี่ยนสีในสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นกรด-เบส และการทำปฏิกิริยากับ $FeCl_3$

3) โครงงานวิทยาศาสตร์ เรื่อง "รงควัตถุของพืช" เป็นวิธีการศึกษาการสกัดสีที่ปรากฏของแอนโทไซยานิน, ฟลาโวนอยด์สีเหลือง และคาโรตินอยด์ที่สกัดจากใบหูกวาง, ดอกเข็ม, ดอกบานเที่ยง, ดอกผกากรองและดอกบานบุรี โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม

การทำโครงงานวิทยาศาสตร์เป็นการจัดกิจกรรมเสริมทักษะ และสนับสนุนให้นักศึกษามีความรู้, ความเข้าใจ, เห็นคุณค่าและความงามจากธรรมชาติในระบบนิเวศและนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาเรื่อง อินดิเคเตอร์ได้อย่างจริงจัง