1490

ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี
ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

เรื่อง

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดคลอโรฟิลจากพืช
Comparative Study of Extraction Methods for Chlorophyll Determination

โดย

นางสาวเพลินพิศ พงษ์ประยูร

ได้รับพิจารณาเห็นชอบจาก

.....

(ผศ. ดร. วิรัตน์ ภูวิวัฒน์)
อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(ผศ. ดร. ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์)
หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
วันที่ 18 เดือน ม.ค. พ.ศ. 38

ฝพ.
พ 925 ก
2537

1466/

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดคลอโรฟิลจากพืช

Comparative Study of Extraction Methods for Chlorophyll Determination

โดย

นางสาวเพลินพิศ พงษ์ประยูร

T100269

อาจารย์ที่ปรึกษา
ผศ.ดร. วิรัตน์ ภูวิวัฒน์

เสนอ
ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปพ.
พ925ก
2537

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต(เกษตรศาสตร์)
พุทธศักราช 2537

หมายเลข 100269
18 JUN 2009

เรื่อง	การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดคลอโรฟิลจากพืช Comparative Study of Extraction Methods for Chlorophyll Determination
โดย	นางสาวเพลินพิศ พงษ์ประยูร
สาขา	พืชสวน ภาควิชา เทคโนโลยีการผลิตพืช
คณะ	เทคโนโลยีการเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. วิรัตน์ ภูวิวัฒน์

บทคัดย่อ

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดคลอโรฟิลจากพืช โดยการนำเนื้อเยื่อพืชมาสกัดด้วย DMSO (Dimethyl sulfoxide) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ตามวิธีการของ Hiscox and Israelstam (1979) และ DMF (N,N-Dimethylformamid) ที่อุณหภูมิห้อง ตามวิธีการของ Moran and Porath (1980) และวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิล โดยวิธี Spectrophotometry จากนั้นคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลตามวิธีการของ Arnon (1949) สำหรับการสกัดคลอโรฟิลด้วย DMSO และ สมการของ Moran (1982) สำหรับการสกัดคลอโรฟิลด้วย DMF พบว่าปริมาณคลอโรฟิลที่สกัดได้ในแต่ละพืชตัวอย่างทั้ง 2 วิธีการไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดคลอโรฟิลด้วย DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จะสั้นกว่าระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดด้วย DMF ที่อุณหภูมิห้อง ในการทดลองสกัดคลอโรฟิลด้วย DMF ที่อุณหภูมิห้อง, 30 , 50 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณคลอโรฟิลที่สกัดได้ในแต่ละพืชตัวอย่างทั้ง 4 วิธีการไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดคลอโรฟิลจะลดลงเมื่อระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดเพิ่มสูงขึ้น โดยการสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จะใช้เวลาสั้นที่สุด และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการสกัดลดลงเป็น 50, 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ตามลำดับ สำหรับการเปรียบเทียบการสกัดคลอโรฟิลด้วย DMSO และ DMF ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พบว่าความสามารถและประสิทธิภาพในการสกัดคลอโรฟิลของทั้ง 2 วิธีการไม่แตกต่างกัน เพราะปริมาณคลอโรฟิลที่สกัดได้จากทั้ง 2 วิธีการไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติและใช้ระยะเวลาในการสกัดเท่ากัน

Abstract

Comparative study of extraction methods for chlorophyll determination was investigated. The chlorophyll from the leaf tissues were extracted by DMSO(Dimethyl sulfoxide) at 65°C, as described by Hiscox and Israelstam (1979), and by DMF (Dimethylformamid) at room temperature, as described by Moran and Porath (1980). Total chlorophyll content from both extraction methods were determined by spectrophotometric method. Calculation was performed by using Arnon's equation (1949) for DMSO extraction while Moran's equation (1982) was used for DMF extraction. It was found that the total chlorophyll content from both extraction methods were not significantly different. However, DMF extraction method spent longer time than DMSO extraction method. In the second experiment, four temperature regimes; room temperature, 30°C, 50°C, and 70°C were used in DMF extraction method. No significant differences in total chlorophyll content among four temperature regimes were observed. The extraction time, however, was decreased as extraction temperature increased. The shortest extraction time was observed at 70°C. The comparison between DMSO and DMF extractions at 65°C showed non-significant difference between these two extraction methods, both in the total chlorophyll content and the extraction time.

คำนิยม

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. วิรัตน์ ภูวิวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยแก้ไขปัญหาและอุปสรรคต่าง ๆ ตั้งแต่เริ่มแรก จนสำเร็จเรียบร้อยสมบูรณ์ รวมทั้งอาจารย์และเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการภาควิชาปฐพีวิทยา ที่ให้ความกรุณาในการใช้อุปกรณ์ จึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

นอกจากนี้ข้าพเจ้าขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกท่านที่ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้ด้วยดีมาตลอด

ขอขอบคุณ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งเป็นสถานศึกษาและมีส่วนช่วยให้ปัญหาพิเศษนี้สำเร็จได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และทุกคนในครอบครัว ที่เป็นกำลังใจและให้ทุนทรัพย์ในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้

เพลินพิศ พงษ์ประยูร

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญตาราง	(ข)
สารบัญภาคผนวก	(ค)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	7
ผลการทดลอง	11
วิจารณ์ผลการทดลอง	14
สรุปผลการทดลอง	15
เอกสารอ้างอิง	16

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงปริมาณคลอโรฟิลในเนื้อเยื่อพืชและเวลาที่ใช้ในการสกัด โดยการใช้ DMSO และ DMF เป็นสารสกัด จากพืชตัวอย่าง 8 ชนิด.....	12
2. แสดงปริมาณคลอโรฟิลในเนื้อเยื่อพืชและเวลาที่ใช้ในการสกัด โดยใช้ DMF เป็นสารสกัดที่อุณหภูมิต่าง ๆ จากพืชตัวอย่าง 2 ชนิด.....	13
3. แสดงปริมาณคลอโรฟิลในเนื้อเยื่อพืชและเวลาที่ใช้ในการสกัด โดยใช้ DMSO และ DMF เป็นสารสกัดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส.....	13

สารบัญตารางภาคผนวก

ตารางที่	หน้า
1. วิเคราะห์ทางสถิติปริมาณคลอโรฟิล จากการสกัดใบแสงจันทร์ ด้วย DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ DMF ที่อุณหภูมิห้อง.....	18
2. วิเคราะห์ทางสถิติปริมาณคลอโรฟิล จากการสกัดใบแคแสด ด้วย DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ DMF ที่อุณหภูมิห้อง.....	18
3. วิเคราะห์ทางสถิติปริมาณคลอโรฟิล จากการสกัดใบเฟื่องฟ้า ด้วย DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ DMF ที่อุณหภูมิห้อง.....	19
4. วิเคราะห์ทางสถิติปริมาณคลอโรฟิล จากการสกัดใบสุพรรณิการ์ ด้วย DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ DMF ที่อุณหภูมิห้อง.....	19
5. วิเคราะห์ทางสถิติปริมาณคลอโรฟิล จากการสกัดใบผักบุ้ง ด้วย DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ DMF ที่อุณหภูมิห้อง.....	20
6. วิเคราะห์ทางสถิติปริมาณคลอโรฟิล จากการสกัดใบหญ้าขน ด้วย DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ DMF ที่อุณหภูมิห้อง.....	20
7. วิเคราะห์ทางสถิติปริมาณคลอโรฟิล จากการสกัดใบตะไคร้ ด้วย DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ DMF ที่อุณหภูมิห้อง.....	21
8. วิเคราะห์ทางสถิติปริมาณคลอโรฟิล จากการสกัดใบหญ้ามาเลเซีย ด้วย DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ DMF ที่อุณหภูมิห้อง.....	21
9. วิเคราะห์ทางสถิติปริมาณคลอโรฟิล จากการสกัดใบเฟื่องฟ้า ด้วย DMF ที่อุณหภูมิห้อง, 30, 50 และ 70 องศาเซลเซียส	22
10. วิเคราะห์ทางสถิติปริมาณคลอโรฟิล จากการสกัดใบแสงจันทร์ ด้วย DMF ที่อุณหภูมิห้อง, 30, 50 และ 70 องศาเซลเซียส	22
11. วิเคราะห์ทางสถิติปริมาณคลอโรฟิล จากการสกัดใบแสงจันทร์ ด้วย DMSO และ DMF ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส	23

คำนำ

คลอโรฟิล (Chlorophyll) เป็นรงควัตถุที่สำคัญชนิดหนึ่งซึ่งอยู่ในคลอโรพลาสต์ (Chloroplast)ของเซลพืช คลอโรฟิลมีบทบาทและหน้าที่สำคัญในการดูดซับพลังงานแสง-อาทิตย์ เพื่อนำไปใช้ในขบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งเป็นการผลิตอาหารของพืช โดยเปลี่ยนพลังงานแสงให้เป็นพลังงานเคมี ดั้งนั้นปริมาณความเข้มข้นของคลอโรฟิลในเนื้อเยื่อพืชจึงสามารถเป็นตัวบ่งบอกถึงปริมาณการสังเคราะห์อาหารของพืช อัตราการเจริญเติบโตของพืช และคุณภาพหรือความเสียหายของพืชได้ ในการสกัดคลอโรฟิลจากพืชโดยทั่วไปนิยมใช้สารเคมีประเภทสารอินทรีย์เป็นสารสกัด เช่น Acetone, Methanol และ Diethyl ether เป็นต้น อย่างไรก็ตามในการใช้สารเคมีเหล่านี้เป็นสารสกัด จำเป็นต้องมีการนำเนื้อเยื่อพืชไปบดแล้วจึงนำไปปั่นหรือกรอง เพื่อแยกคลอโรฟิลออกจากเนื้อเยื่อพืช ซึ่งการสกัดโดยวิธีดังกล่าวจะทำให้เซลแตกไม่สมบูรณ์ เกิดการสูญเสียคลอโรฟิล เป็นผลทำให้การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลมีความผิดพลาดได้ง่าย อีกทั้งยังเป็นวิธีการสกัดที่ยุ่งยากและใช้ระยะเวลาในการสกัดนาน Hiscox and Israelstam (1979) ได้พัฒนาวิธีการสกัดคลอโรฟิลโดยเปลี่ยนมาใช้ Dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นสารสกัด ซึ่งทำการสกัดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ Moran and Porath (1980) ได้พัฒนาวิธีการสกัดคลอโรฟิลโดยใช้ N,N-Dimethylformamid (DMF) เป็นสารสกัด โดยทำการสกัดที่อุณหภูมิห้อง การสกัดคลอโรฟิลโดยใช้สารเคมีทั้ง 2 ชนิดนี้ทำให้วิธีการสกัดคลอโรฟิลง่ายและรวดเร็วยิ่งขึ้น เนื่องจากในการสกัดไม่ต้องมีการนำเนื้อเยื่อพืชไปบดหรือปั่นจึงไม่เป็นการทำลายเซลพืชให้เกิดความเสียหาย ทำให้คลอโรฟิลมีเสถียรภาพมากยิ่งขึ้น และสามารถเก็บรักษาสารละลายคลอโรฟิลได้เป็นเวลานานหลายวันก่อนนำสารละลายมาวัดหาปริมาณคลอโรฟิลโดยไม่มีการสูญเสียคลอโรฟิล อย่างไรก็ตามการสกัดคลอโรฟิลโดยใช้สารเคมีทั้ง 2 ชนิดนี้มีข้อแตกต่างในด้านการปฏิบัติและวิเคราะห์ ซึ่งยังไม่เคยมีผู้ใดทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลโดยวิธีทั้ง 2 นี้มาก่อน

ดั้งนั้นการทดลองครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดและวิเคราะห์สารคลอโรฟิลจากพืช โดยใช้สารเคมีทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว รวมทั้งศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิระดับต่างๆ ต่อการสกัดคลอโรฟิลโดยใช้ DMF เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาและนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการศึกษาและวิจัยต่อไป

การตรวจเอกสาร

ในพืชสีเขียวซึ่งสังเคราะห์แสงได้จะประกอบด้วยรงควัตถุจำพวกคลอโรฟิล (Chlorophyll) ซึ่งอยู่ในคลอโรพลาสต์ (Chloroplast) คลอโรฟิลเป็นรงควัตถุที่มีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis) ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญที่พืชสีเขียวนำพลังงานแสงมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในการสร้างอาหารจากโมเลกุลของคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ไปเป็นคาร์โบไฮเดรทคือน้ำตาลหรือแป้ง รวมทั้งการปลดปล่อยออกซิเจนออกมา ซึ่งสิ่งมีชีวิตทั้งหลายจะนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม เพื่อสร้างสารประกอบอื่นๆที่จำเป็นต่อการดำรงชีพ (สมบุญ,2536) คลอโรฟิลเป็นอนุพันธ์ของ Porphyrin ซึ่งมีโครงสร้างแบบ Cyclic tetrapyrole ring โดยมีแมกนีเซียม (Magnesium; Mg^{2+}) เป็นศูนย์กลางของวง (Ring) คลอโรฟิลมีอยู่ด้วยกัน 4 ชนิดคือ คลอโรฟิล a, b, c และ d โดยที่แต่ละชนิดจะแตกต่างกันที่ Side chain เท่านั้น ความแตกต่างของโครงสร้างของคลอโรฟิลเป็นสาเหตุที่ทำให้ความสามารถในการดูดซับแสงในช่วงคลื่นต่างๆของคลอโรฟิลแต่ละชนิดไม่เท่ากัน คลอโรฟิลเป็นสารเคมีที่ไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อะซีโตน, ปิโตรเลียมอีเธอร์, ทูโลอิน และ แอลกอฮอล์ เป็นต้น อย่างไรก็ตามคลอโรฟิลแต่ละชนิดก็สามารถละลายในตัวทำละลายเหล่านี้ได้แตกต่างกัน (สัมพันธ์, 2526)

ในพืชแต่ละชนิดจะมีปริมาณคลอโรฟิลแตกต่างกันไป (Sheeler and Bianchi,1980) และแม้แต่ในพืชชนิดเดียวกันก็อาจมีปริมาณคลอโรฟิลที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆหลายปัจจัย แสงนับเป็นปัจจัยที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์คลอโรฟิลของพืชแทบทุกชนิด ยกเว้นพืชจำพวก สน เฟิร์น และสาหร่าย ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้ในที่มืด นอกจากแสงแล้วธาตุอาหารก็เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการสังเคราะห์คลอโรฟิล เพราะเป็นส่วนประกอบในโครงสร้างของคลอโรฟิล (สัมพันธ์,2526)

ปริมาณคลอโรฟิลเป็นตัวบ่งบอกถึงปริมาณอาหารในพืช ความแก่ คุณภาพและการเปลี่ยนแปลงของผักและผลไม้ในระหว่างการปรุงอาหาร และคุณภาพของผักและผลไม้ในการเก็บรักษาหลังการเก็บเกี่ยว (Vernon and Seely,1966) Sweeney and Martin (1961) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณคลอโรฟิลในผักสีเขียวซึ่งสามารถใช้เป็นมาตรฐานในการวัดคุณภาพของผักสีเขียวในการเก็บรักษาหลังการเก็บเกี่ยว Kundson et al.(1977) พบว่าการวัดปริมาณคลอโรฟิลในเนื้อเยื่อพืช สามารถใช้เป็นตัวแสดงถึงคุณภาพของพืชจากการเก็บรักษาหลังการเก็บเกี่ยวได้ดีกว่าการสังเกตสีของพืชด้วยตาเปล่า Shewfelt et al. (1983) ใช้

ปริมาณคลอโรฟิลในเนื้อเยื่อพืชเป็นเครื่องวัดการเปลี่ยนสีเพื่อวัดคุณภาพของบรอคโคลี (Broccoli) จากการเก็บรักษาหลังการเก็บเกี่ยว Stobart et al. (1967) ใช้ปริมาณคลอโรฟิล เป็นเครื่องวัดอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการสังเคราะห์คลอโรฟิลของแคลลัส (Callus) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Kalanchoe crenata* เมื่อได้รับแสง ซึ่งภายใต้แสงแคลลัสจะมีการสังเคราะห์คลอโรฟิลขึ้นอย่างรวดเร็ว Tenga and Ormrod (1990) พบว่าปริมาณคลอโรฟิลในเนื้อเยื่อของมะเขือเทศสามารถใช้เป็นตัววัดอัตราการเจริญเติบโตหรือความเสียหายที่เกิดจากโอโซน (Ozone; O_3) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และ Dai (1990) ใช้ปริมาณคลอโรฟิลเป็นดัชนีตัวหนึ่งที่ใช้วัดอัตราการเจริญเติบโตของข้าว(*Oryza sativa* L.)ที่ตอบสนองต่อแสงอุลตราไวโอเลต-บี (Ultraviolet-B; UV-B)

การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิล

การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลสามารถทำได้โดยการวัดปริมาณคลอโรฟิลโดยตรง หรือวัดจากปริมาณอนุพันธ์ของคลอโรฟิล เช่น Chlorophyllides, Pheophytins และ Pheophorbides ซึ่งอนุพันธ์ของคลอโรฟิลเหล่านี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในของคลอโรฟิล (White et al.,1963) เช่น Vernon (1960) และ Wilson and Nutting (1963)ได้ทำการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิล โดยทำการวัดจากปริมาณของ Pheophytins ซึ่งเป็นอนุพันธ์ตัวหนึ่งของคลอโรฟิลที่เกิดจากโครงสร้างของคลอโรฟิลมีการสูญเสียแมกนีเซียม

การสกัดคลอโรฟิล

วิธีการสกัดคลอโรฟิลที่ดีควรให้มีการเปลี่ยนแปลงของคลอโรฟิลเพียงเล็กน้อยหรือไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเลย คลอโรฟิลมีความไวต่อแสง ความร้อน และออกซิเจน ดังนั้นในการสกัดควรหลีกเลี่ยงสิ่งเหล่านี้ โดยทำการสกัดในที่มืดหรือในที่มีแสงเพียงเล็กน้อย หลีกเลี่ยงความร้อน ขบวนการออกซิเดชัน (Oxidation) (Gross,1987) และป้องกันปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Enzyme) Chlorophyllase ซึ่งจะทำให้คลอโรฟิลเปลี่ยนกลับไปเป็น Pheophytins (Holden,1961) ในบางครั้งก่อนทำการสกัดมีการนำเนื้อเยื่อพืชไปต้มในน้ำเดือดหรือนำไปจุ่มในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แต่การปฏิบัติเช่นนี้ควรหลีกเลี่ยงเพราะจะทำให้คลอโรฟิลเกิดการเปลี่ยนแปลง (Goodwin,1976) วิธีการสกัดคลอโรฟิลสามารถทำได้หลายวิธี และสารเคมีที่ใช้เป็นสารสกัดมีหลายชนิดตัวอย่างเช่น Acetone, Alcohol, Methanol, Ethanol, Diethyl ether, Pyridine และ Acetone+Ethyl acetone เป็นต้น (Vernon and Seely, 1966) ซึ่งสารสกัดจะเป็นตัวไปทำลายโครงสร้างของรงควัตถุที่เชื่อมต่อกันกับ

โปรตีน ในขั้นตอนการสกัดโดยทั่วไปจะนำเนื้อเยื่อพืชมาบดหรือปั่นในสารสกัดให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อน จากนั้นทำการแยกสารละลายคลอโรฟิลออกจากกากพืชที่เหลือโดยการนำไปกรองหรือปั่น (Gross,1991) ในการสกัดอาจมีการเติมสาร $CaCO_3$, $MgCO_3$, $NaHCO_3$, $NaCO_3$, Sodium chloride หรือ Dimethylaniline ลงไปขณะที่สกัดเล็กน้อย เพื่อช่วยให้คลอโรฟิลมีเสถียรภาพไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงกลับไปเป็น Pheophytin เมื่อทำการสกัดเสร็จแล้วหากยังไม่ได้นำไปวัดปริมาณคลอโรฟิลทันที ควรนำสารละลายคลอโรฟิลที่สกัดได้เก็บในที่มืดและเย็น (Goodwin, 1976)

การวัดปริมาณคลอโรฟิล

การวัดปริมาณคลอโรฟิลสามารถทำได้ 2 วิธีคือ วิธี Spectrophotometry และ วิธี Spectrofluorometry

1. วิธี Spectrophotometry

เป็นการวัดปริมาณสีของคลอโรฟิลโดยอาศัยกฎของ Lambert-Beer ซึ่งกล่าวถึงความสำคัญระหว่างความเข้มข้นของเนื้อวัตถุและความหนาแน่นของสีวัตถุ โดยทำการวัดค่าการดูด-ซับแสงของสารละลายคลอโรฟิลที่ช่วงคลื่นแสงซึ่งคลอโรฟิลมีค่าการดูดซับแสงสูงที่สุด โดยช่วงคลื่นแสงที่ทำการวัดจะแตกต่างกันแต่ละสารเคมีและความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการสกัด และสัมประสิทธิ์ของค่าการดูดซับแสงก็จะแตกต่างตามช่วงคลื่นแสงที่ทำการวัดด้วย ทำให้ได้สมการมากมายในการคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิล ซึ่งสมการต่างๆที่ใช้คำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลขึ้นอยู่กับสารเคมีและความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการสกัด

2. วิธี Spectrofluorometry

เป็นวิธีการสกัดคลอโรฟิลอีกวิธีหนึ่ง แต่โดยทั่วไปไม่นิยมใช้กว้างขวางเหมือนกับวิธี Spectrophotometry วิธีการวัดคลอโรฟิลวิธีนี้เป็นวิธีที่มีการตอบสนองอย่างรวดเร็ว (Sensitive) ซึ่งเหมาะสำหรับใช้กับงานเล็กๆ และใช้วัดอัตราของคลอโรฟิล a:b เมื่อคลอโรฟิล b มีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณของคลอโรฟิล a แต่วิธีการนี้ไม่สามารถวัดปริมาณคลอโรฟิลในเนื้อเยื่อพืชที่มีน้อยมากๆได้ เช่น พืชที่เจริญเติบโตในที่มืด (Etiolate)

นอกจากนี้การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลสามารถทำการวัดโดยไม่มีการทำลายเนื้อเยื่อพืช ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้สายตาสังเกตสีและนำไปเทียบกับแผ่นเทียบสี หรือใช้เครื่องมือวัดสีที่ประกอบขึ้นง่ายๆ โดยอาศัยหลักของปริมาณแสงที่สะท้อนออกจากวัตถุหรือปริมาณแสงที่สามารถส่องผ่านวัตถุได้ การวัดปริมาณคลอโรฟิลด้วยวิธีนี้จะเป็นการวัดปริมาณคลอโรฟิลเพียงคร่าวๆและไม่ต้องการความละเอียด ซึ่งจะเกิดความผิดพลาดได้มาก(Gross,1991)

การสกัดคลอโรฟิลจากเนื้อเยื่อพืชซึ่งวิธีการสกัดจำเป็นต้องมีการบดหรือปั่นและใช้สารสกัดที่มีขั้ว เช่น 80% Acetone ในการสกัดพืชชั้นสูง หรือMethanol สำหรับสกัดแบคทีเรียและสาหร่าย จะทำให้เกิดการทำลายเซล ทำให้เซลแตกและไม่มีความสมบูรณ์ เกิดการสูญเสียคลอโรฟิลได้ง่าย(Goodwin,1988) Hiscox and Israelstam(1979) จึงได้พัฒนาวิธีการสกัดคลอโรฟิลโดยเปลี่ยนมาใช้ Dimethyl sulfoxide(DMSO) เป็นสารสกัดแทนการใช้สารสกัดเดิม เนื่องจากวิธีการสกัดคลอโรฟิลที่มีการใช้ Methanol, Ethanol, Acetone, Pyridine และ Acetone+Ethyl acetate เป็นสารสกัด ต้องนำเนื้อเยื่อพืชไปบดหรือปั่นในสารสกัดเพื่อแยกสารละลายคลอโรฟิลออกจากเนื้อเยื่อพืชซึ่งถ้าตัวอย่างพืชที่นำมาสกัดมีขนาดใหญ่จะทำให้วิธีในการสกัดยุ่งยากและเสียเวลานาน ยิ่งกว่านั้นได้พบว่าคลอโรฟิลไม่มีเสถียรภาพจึงเกิดการสูญเสียคลอโรฟิลได้ง่าย วิธีการสกัดคลอโรฟิลที่มีการใช้สาร DMSO เป็นสารสกัด เป็นวิธีการสกัดที่ง่ายและรวดเร็ว คือนำเนื้อเยื่อพืชจุ่มลงในสาร DMSO และให้ความร้อนในการสกัดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส คลอโรฟิลที่ได้จะมีเสถียรภาพมากยิ่งขึ้น สามารถเก็บสารละลายคลอโรฟิลไว้ได้นานถึง 5 วัน โดยไม่มีการสูญเสียคลอโรฟิล โดยทำการเก็บภายใต้ความเย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ในที่มืด และวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลโดยวิธี Spectrophotometry จากนั้นคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลตามสมการของ Arnon (1949) เช่นเดียวกับการสกัดคลอโรฟิลด้วย 80% Acetone ดังนี้

ปริมาณคลอโรฟิลทั้งหมด = $20.2\ D_{645} + 8.02\ D_{663}$

เมื่อ ปริมาณคลอโรฟิลทั้งหมด มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด

D_{645}, D_{663} คือค่าการดูดซับแสงของสารละลายคลอโรฟิลที่ช่วงคลื่นแสง 645 และ 663 นาโนเมตร ตามลำดับ

ต่อมา Moran and Porath (1980) ได้รายงานการใช้ N,N-Dimethylformamid (DMF) เป็นสารสกัดคลอโรฟิลซึ่งมีประสิทธิภาพในการสกัดดีกว่า Acetone การใช้ DMF เป็นสารสกัดจะทำให้วิธีการสกัดง่ายและรวดเร็วยิ่งขึ้นคือเพียงจุ่มเนื้อเยื่อพืชในสารสกัด ทำการสกัดที่อุณหภูมิ-ห้อง DMF สามารถสกัดคลอโรฟิลในพืชที่เจริญเติบโตในที่มืด ซึ่งมีปริมาณคลอโรฟิลในเนื้อเยื่อพืชน้อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ และ Moran(1982) ได้คำนวณหาสมการเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลซึ่งได้จากการใช้ DMF เป็นสารสกัด โดยได้สมการดังนี้

ปริมาณคลอโรฟิลทั้งหมด = $20.27\ D_{647} + 7.04\ D_{664}$

เมื่อ ปริมาณคลอโรฟิลทั้งหมด มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำหนักสด

D_{647}, D_{664} คือค่าการดูดซับแสงของสารละลายคลอโรฟิลที่ช่วงคลื่นแสง 647 และ 664 นาโนเมตร ตามลำดับ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ใบพืช เลือกใบที่ 2-3 จากยอด ที่มีลักษณะและการได้รับแสงเหมือนกัน ตัวอย่างพืชที่ใช้มีดังต่อไปนี้

แสงจันทร์	*Pisonia grandis* R.Br.
แคแสด	*Spathodea campanulata* Beauv.
เฟื่องฟ้า	*Bougainvillea glabra* 'Sanderiana variegata'
สุพรรณิการ์	*Cochlospermum regium* (Mart. Schrank) Pilg.
ผักบุ้ง	*Ipomoea aquatica* Forsk.
หญ้าขน	*Brachiaria mutica* (Forsk) Stapf.
ตะไคร้	*Cymbopogon citratus* Stapf.
หญ้ามาเลเซีย	*Axonopus compressus* (Swartz.) Beauv.

2. สารเคมีที่ใช้เป็นสารสกัด ได้แก่ Dimethyl sulfoxide (DMSO) และ N,N-Dimethylformamid (DMF)

3. เครื่องชั่ง

4. อุปกรณ์สำหรับการสกัดคลอโรฟิล ได้แก่ หลอดทดลอง หม้อ เตา และเทอร์โมมิเตอร์

5. เครื่อง Spectronic 21 (Baush & Lomb)

6 อุปกรณ์สำหรับการบันทึกผล ได้แก่ นาฬิกา สมุดและปากกา

วิธีการ แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองคือ

การทดลองที่ 1 การเปรียบเทียบวิธีการสกัดคลอโรฟิลจากพืชโดยใช้ DMSO และ DMF

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 2 วิธีการๆ ละ 8 ซ้ำ และทำการศึกษากับตัวอย่างพืชจำนวน 8 ชนิด คือ แสงจันทร์ แคแสด เฟื่องฟ้า สุพรรณิการ์ ผักบุ้ง หญ้าขน ตะไคร้ และหญ้ามาเลเซีย

นำใบพืชมาทำความสะอาด แล้วตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ปริมาณ 100 มิลลิกรัม โดยหลีกเลี่ยงการใช้เนื้อเยื่อบริเวณเส้นใบและขอบใบ นำเนื้อเยื่อพืชมาสกัดคลอโรฟิลในหลอดทดลอง โดยใช้ 7 มิลลิลิตร DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ตามวิธีการของ Hiscox and Israelstam (1979) และ 7 มิลลิลิตร DMF ที่อุณหภูมิห้อง ตามวิธีการของ Moran and Porath (1980) ทำการสกัดจนกระทั่งเนื้อเยื่อพืชเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีขาว บันทึกเวลาที่ใช้ในการสกัด ทำการแยกส่วนของกากพืชออกจากสารละลาย ปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 10 มิลลิลิตร โดยการเติมสารสกัด นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลด้วยวิธี Spectrophotometry โดยใช้เครื่อง Spectronic 21 ของบริษัท Bausch and Lomb ซึ่งมีรายละเอียดในการวิเคราะห์ดังนี้

นำสารละลายคลอโรฟิลที่สกัดได้จากการใช้สาร DMSO เป็นสารสกัด วัดค่าการดูดซับแสงที่ช่วงคลื่นแสง 645 และ 663 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลจากสมการของ Arnon (1949) คือ

ปริมาณคลอโรฟิลทั้งหมด = $20.2\ D_{645} + 8.02\ D_{663}$

เมื่อ ปริมาณคลอโรฟิลทั้งหมด มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักสด

D_{645} .D_{663} คือค่าการดูดซับแสงของสารละลายคลอโรฟิลที่ช่วงแสง 645 และ 663 นาโนเมตร ตามลำดับ

นำสารละลายคลอโรฟิลที่สกัดได้จากการใช้สาร DMF เป็นสารสกัด วัดค่าการดูดซับแสง ที่ช่วงคลื่นแสง 647 และ 664 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลจากสมการของ Moran (1982) คือ

ปริมาณคลอโรฟิลทั้งหมด = $20.27\ D_{647} + 7.04\ D_{664}$

เมื่อ ปริมาณคลอโรฟิลทั้งหมด มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของน้ำหนักสด หรือมิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักสด

D_{647} .D_{664} คือค่าการดูดซับแสงของสารละลายคลอโรฟิลที่ช่วงแสง 647 และ 664 นาโนเมตร ตามลำดับ

การทดลองที่ 2 ผลของอุณหภูมิต่อการสกัดคลอโรฟิลด้วย DMF

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 4 วิธีการๆ ละ 5 ซ้ำ และทำการศึกษาทดลองกับตัวอย่างพืช 2 ชนิด คือ เฟื่องฟ้า และ แสงจันทร์

นำใบพืชมาทำความสะอาด แล้วตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ปริมาณ 100 มิลลิกรัม โดยหลีกเลี่ยงการใช้เนื้อเยื่อบริเวณเส้นใบและขอบใบ นำเนื้อเยื่อพืชมาสกัดคลอโรฟิลในหลอดทดลองด้วย 7 มิลลิลิตร DMF ที่อุณหภูมิห้อง, 30, 50, และ 70 องศาเซลเซียส ทำการสกัดจนกระทั่งเนื้อเยื่อพืชเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีขาว บันทึกผลเวลาที่ใช้ในการสกัด ทำการแยกส่วนของกากพืชออกจากสารละลาย ปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 10 มิลลิลิตร โดยการเติมสารสกัด DMF และนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิล โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับการ วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลจากการสกัดด้วย DMF ในการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 3 การเปรียบเทียบวิธีการสกัดคลอโรฟิลจากพืชโดยใช้ DMSO และ DMF ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 2 วิธีการๆ ละ 8 ซ้ำ และทำการศึกษาทดลองกับตัวอย่างพืช 1 ชนิด คือแสงจันทร์

นำใบพืชมาทำความสะอาด แล้วตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ปริมาณ 100 มิลลิกรัม โดยหลีกเลี่ยงการใช้เนื้อเยื่อบริเวณเส้นใบและขอบใบ นำเนื้อเยื่อพืชมาสกัดคลอโรฟิลในหลอดทดลองด้วย 7 มิลลิลิตร DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ 7 มิลลิลิตร DMF ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ทำการสกัดจนกระทั่งเนื้อเยื่อพืชเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีขาว บันทึกเวลาที่ใช้ในการสกัด ทำการแยกส่วนของกากพืชออกจากสารละลาย ปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 10 มิลลิลิตร โดยการเติมสารสกัด นำสารละลายคลอโรฟิลที่สกัดได้จากการใช้ DMSO และ DMF เป็นสารสกัด ไปวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิล โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลจากการสกัดด้วย DMSO และ DMF ในการทดลองที่ 1 ตามลำดับ

เวลาและสถานที่

เวลา เริ่มการทดลอง เดือนกรกฎาคม 2537
สิ้นสุดการทดลอง เดือนกุมภาพันธ์ 2538

สถานที่ ห้องปฏิบัติการพืชสวน ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า-เจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การเปรียบเทียบวิธีการสกัดคลอโรฟิลจากพืชโดยใช้ DMSO และ DMF

จากการทดลองปรากฏผลว่าปริมาณคลอโรฟิลที่สกัดได้จากใบแสงจันทร์, แคแสด, เฟื่องฟ้า, สุพรรณิการ์, ผักบุ้ง, หญ้าขน, ตะไคร้ และหญ้ามาเลเซีย โดยใช้สาร DMSO สกัดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณคลอโรฟิลที่สกัดได้จากการใช้สาร DMF สกัดที่อุณหภูมิห้อง (ตารางที่ 1) และเมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ปริมาณคลอโรฟิลที่สกัดได้ในแต่ละพืชตัวอย่าง ทั้ง 2 วิธีการ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางภาคผนวกที่ 1-8) ส่วนเวลาที่ใช้ในการสกัดในทุก ๆ ตัวอย่างพืชปรากฏว่า วิธีการสกัดโดยใช้ DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จะใช้ระยะเวลาในการสกัดสั้นกว่าวิธีการสกัดโดยใช้ DMF ที่อุณหภูมิห้อง

การทดลองที่ 2 ผลของอุณหภูมิต่อการสกัดคลอโรฟิลด้วย DMF

จากการทดลองปรากฏผลว่า ปริมาณคลอโรฟิลที่สกัดได้จากใบเฟื่องฟ้า และแสง-จันทร์ โดยใช้สาร DMF สกัดที่อุณหภูมิห้อง, 30, 50 และ 70 องศาเซลเซียส มีค่าใกล้เคียงกัน(ตารางที่ 2) และเมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ปริมาณคลอโรฟิลที่สกัดได้ในแต่ละพืชตัวอย่างทั้ง 4 วิธีการ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางภาคผนวกที่ 9-10) ส่วนระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดในทุก ๆ ตัวอย่างพืชปรากฏผลว่า การสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จะใช้เวลาสั้นที่สุด และเวลาที่ใช้ในการสกัดจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิที่ใช้สกัดลดลง ซึ่งวิธีการสกัดที่อุณหภูมิห้องจะใช้ระยะเวลาในการสกัดนานที่สุด

การทดลองที่ 3 การเปรียบเทียบวิธีสกัดคลอโรฟิลโดยใช้ DMSO และ DMF ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

จากการทดลองปรากฏผลว่า ปริมาณคลอโรฟิลที่สกัดได้จากใบแสงจันทร์ โดยใช้สาร DMSO สกัดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณคลอโรฟิลทีสกัดจากการใช้สาร DMF ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 3) และเมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณคลอโรฟิลที่สกัดได้ในทั้ง 2 วิธีการ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางภาคผนวกที่ 11) สำหรับระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดทั้ง 2 วิธีการปรากฏว่า ใช้เวลาเท่ากัน

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณคลอโรฟิลในเนื้อเยื่อพืช และเวลาที่ใช้ในการสกัด โดยการใช้ DMSO และ DMF เป็นสารสกัด จากพืชตัวอย่าง 8 ชนิด

พืชทดลอง	สกัดด้วย DMSO		สกัดด้วย DMF	
	ปริมาณคลอโรฟิล (มก./ก.น้ำหนักสด) ± SD	เวลา (ชม.)	ปริมาณคลอโรฟิล (มก./ก.น้ำหนักสด) ± SD	เวลา (ชม.)
แสงจันทร์	12.54 ± 1.34	3.00	12.54 ± 1.64	4.10
แคแสด	13.10 ± 1.50	4.00	13.06 ± 1.55	6.40
เฟื่องฟ้า	17.96 ± 1.19	1.35	17.02 ± 1.37	2.15
สุพรรณิการ์	24.91 ± 2.58	1.15	25.19 ± 1.75	1.45
ผักบุ้ง	18.68 ± 1.64	1.25	19.38 ± 1.46	1.50
หญ้าขน	25.63 ± 1.64	1.15	25.28 ± 1.40	2.45
ตะไคร้	13.12 ± 1.38	1.40	13.18 ± 1.22	3.10
หญ้ามาเลเซีย	18.21 ± 1.02	2.20	17.96 ± 0.94	4.00

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณคลอโรฟิลในเนื้อเยื่อพืช และเวลาที่ใช้ในการสกัด โดยใช้ DMF เป็นสารสกัดที่อุณหภูมิต่าง ๆ จากพืชตัวอย่าง 2 ชนิด

ระดับอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณคลอโรฟิล (มก./ก. น้ำหนักสด) ±SD	เวลา (ชม.)
เฟื่องฟ้า		
อุณหภูมิห้อง	15.56 ± 1.47	3.40
30	15.72 ± 1.91	2.40
50	16.17 ± 1.10	1.30
70	15.31 ± 1.20	1.00
แสงจันทร์		
อุณหภูมิห้อง	11.64 ± 0.94	5.20
30	12.12 ± 0.50	4.40
50	12.10 ± 0.63	3.10
70	11.46 ± 1.18	1.30

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณคลอโรฟิลในเนื้อเยื่อพืชและเวลาที่ใช้ในการสกัด โดยใช้ DMSO และ DMF เป็นสารสกัดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

พืชทดลอง	สกัดด้วย DMSO		สกัดด้วย DMF	
	ปริมาณคลอโรฟิล (มก./ก. น้ำหนักสด) ±SD	เวลา (ชม.)	ปริมาณคลอโรฟิล (มก./ก. น้ำหนักสด) ±SD	เวลา (ชม.)
แสงจันทร์	6.5859 ± 0.5126	0.40	7.1583 ± 0.3319	0.40

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองที่ 1 แม้ว่าปริมาณคลอโรฟิลที่สกัดได้จากการใช้ DMSO และ DMF ในการสกัดจะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่การสกัดคลอโรฟิลด้วย DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จะใช้ระยะเวลาในการสกัดสั้นกว่าการสกัดด้วย DMF ที่อุณหภูมิห้อง การใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกันในการสกัดมีผลทำให้เวลาที่ใช้ในการสกัดแตกต่างกันด้วย โดยการสกัดที่อุณหภูมิสูงจะทำให้การสกัดใช้ระยะเวลาสั้นลง (Vernon and Seely, 1966) ด้วยเหตุนี้จึงได้ทำการทดลองที่ 2 เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการสกัดคลอโรฟิลด้วย DMF ซึ่งผลปรากฏว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จะใช้ระยะเวลาในการสกัดสั้นที่สุด และเวลาที่ใช้ในการสกัดจะเพิ่มขึ้นตามลำดับเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดลดลง สำหรับการสกัดที่อุณหภูมิห้องจะใช้ระยะเวลาในการสกัดนานที่สุด ซึ่งแสดงว่าอุณหภูมิมีผลต่อการสกัดคลอโรฟิล โดยการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นจะช่วยเร่งปฏิกิริยาในการสกัดให้เร็วยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดไม่ควรสูงเกินไปเพราะจะทำให้เกิดการสูญเสียคลอโรฟิล (Goodwin, 1976; Vernon and Seely, 1966) ซึ่งมีผลทำให้การวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลผิดพลาดได้ และจากผลการทดลองที่ 3 พบว่าวิธีการใช้ DMSO และ DMF ในการสกัดคลอโรฟิล ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จะมีความสามารถในการสกัดเท่ากัน เพราะปริมาณคลอโรฟิลที่สกัดได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ รวมทั้งระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากัน

สรุปผลการทดลอง

จากการเปรียบเทียบวิธีการสกัดคลอโรฟิลจากพืชโดยใช้ DMSO และ DMF พบว่า ปริมาณคลอโรฟิลที่สกัดได้จากการสกัดด้วย DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ DMF ที่อุณหภูมิห้อง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดด้วย DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จะสั้นกว่าการสกัดด้วย DMF ที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นจึงได้ทดลองสกัดคลอโรฟิลด้วย DMF โดยใช้ระดับอุณหภูมิต่างๆ ซึ่งปรากฏผลว่าปริมาณคลอโรฟิลที่สกัดได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดจะลดลงเมื่อระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดเพิ่มสูงขึ้นโดยการสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จะใช้ระยะเวลาสั้นที่สุด และการสกัดที่อุณหภูมิห้องจะใช้เวลานานที่สุด สำหรับการเปรียบเทียบวิธีการสกัดคลอโรฟิลจากพืชโดยใช้ DMSO และ DMF ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พบว่า ปริมาณคลอโรฟิลที่สกัดได้ทั้ง 2 วิธีการ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และการสกัดทั้ง 2 วิธีการใช้เวลาเท่ากัน

เอกสารอ้างอิง

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2535. สรีรวิทยาของพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

สัมพันธ์ คัมภิรานนท์. 2526. หลักสรีรวิทยาของพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chlorophyll polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24:1-14.

Dai, Q. 1990. Responses of Rice (*Oryza sative* L.) to Enhanced Ultraviolet-B (UV-B) Radiation at Seedling Stage under Glasshouse Condition. Ph.D. Thesis UPLB. Philippines.

Goodwin, T.W. 1976. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments vol.2. Academic press.New York.

Goodwin,T.W. 1988. Plant Pigments. Academic press. New York.

Gross, J. 1987. Pigments in Fruits. Academic press. New York.

Gross, J. 1991. Pigments in Vegetables : Chlorophylls and Carotenoids. Van Nostrand Reinhold. New York.

Hiscox, J.D. and G.F. Israelstam. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. Can. J. Bot. 57:1332-1334.

Holden, M. 1961. The breakdown of chlorophyll by chlorophyllase. Biochem. J.78 :359-364.

Knudson, L.L.,T.W. Tibbitts and G.E. Edwards. 1977. Measurement of ozone injury by determination of leaf chlorophyll concentration. Plant Physiol. 60:606-608.

Moran, R. and D. Porath. 1980. Chlorophyll determination in intact tissue using N,N-Dimethylformamide. Plant Physiol. 65:478-479.

Moran, R. 1982. Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N,N-Dimethylformamide. Plant Physiol. 69:1376-1381.

Sheeler, P. and D.E. Bianchi. 1980. Cell Biology:Structure, Biochemistry, and Function. John Wiley & Sons Inc. New York.

Shewfelt, R.L., K.M. Batal and E.K. Heaton. 1983. Broccoli storage : Effect of N^6-benzyladenine, packaging, and icing on color of fresh broccoli. J. Food Sci. 48:1594-1597.

Stobart, A.K. , I. Mclaren and D.R. Thomas. 1967. Chlorophylls and carotenoids of colourless callus, green callus and leaves of *Kalanchoe crenata*. Phytochemistry. 6:1467-1474.

Sweeney, J.P. and M.E. Martin. 1961. Stability of chlorophyll in vegetables as affected by pH. Food Technol. 17:263-266.

Tenga, A.Z. and D.P. Ormrod. 1990. Diminished greenness of tomato leaves exposed to ozone and post-exposure recovery of greenness. Environmental-Pollution. 64(1):29-41.

Vernon, L.P. and G.R. Seely. 1966. The Chlorophylls. Academic press. New York.

Vernon, L.P. 1960. Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts. Anal. Chem. 32(9):1144-1150.

White, D.C., I.D. Jones, and E. Gibbs. 1963. Determination of chlorophylls, chlorophyllides, pheophytins, and pheophorbides in plant material. J. Food Sci. 28:431-436.

Wilson, J.R. and M.D. Nutting. 1963. Use of ion exchange resin for conversion, separation, and determination of chlorophylls as pheophytins. Anal. Chem. 35(2) :144-146.

100269

ตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 วิเคราะห์ทางสถิติปริมาณคลอโรฟิล จากการสกัดใบแสงจันทร์ด้วย DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ DMF ที่อุณหภูมิห้อง

SOURCE	df	SS	MS	F-ratio	F 0.05	F 0.01
Treatment	1	0.0204	0.0204	7.9706×10^{-3} NS	4.60	8.86
Ex.Error	14	35.8309	2.5594			
Total	15	35.8513	2.3901			

Grand Mean = 12.5020 CV = 12.7965%

NS ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 2 วิเคราะห์ทางสถิติปริมาณคลอโรฟิล จากการสกัดใบแคแสดด้วย DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ DMF ที่ อุณหภูมิห้อง

SOURCE	df	SS	MS	F-ratio	F 0.05	F 0.01
Treatment	1	7.1626×10^{-3}	7.126×10^{-3}	2.6995×10^{-3} NS	4.60	8.86
Ex.Error	14	37.1468	2.6533			
Total	15	37.1639	2.4769			

Grand Mean = 13.0832 CV = 12.4503%

NS ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 3 วิเคราะห์ทางสถิติปริมาณคลอโรฟิล จากการสกัดใบเฟื่องฟ้าด้วย DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ DMF ที่อุณหภูมิห้อง

SOURCE	df	SS	MS	F-ratio	F 0.05	F 0.01
Treatment	1	0.0137	0.0137	7.3129×10^{-3} NS	4.60	8.86
Ex.Error	14	26.2272	1.8734			
Total	15	26.2409	1.7494			

Grand Mean = 17.9918 CV = 7.6075%

NS ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 4 วิเคราะห์ทางสถิติปริมาณคลอโรฟิล จากการสกัดใบสุพรรณิการ์ด้วย DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ DMF ที่อุณหภูมิห้อง

SOURCE	df	SS	MS	F-ratio	F 0.05	F 0.01
Treatment	1	11.1498	11.1498	2.3344 NS	4.60	8.86
Ex.Error	14	66.8702	4.7764			
Total	15	78.0200	5.2013			

Grand Mean = 25.0221 CV = 8.7343%

NS ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 5 วิเคราะห์ทางสถิติปริมาณคลอโรฟิล จากการสกัดใบผักบุ้งด้วย DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ DMF ที่อุณหภูมิห้อง

SOURCE	df	SS	MS	F-ratio	F 0.05	F 0.01
Treatment	1	1.9400	1.9400	0.3625^{NS}	4.60	8.86
Ex.Error	14	38.6203	2.7586			
Total	15	40.5603	2.7040			

Grand Mean = 19.0303 CV = 8.7277%

NS ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 6 วิเคราะห์ทางสถิติปริมาณคลอโรฟิล จากการสกัดใบหญ้าขนด้วย DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ DMF ที่อุณหภูมิห้อง

SOURCE	df	SS	MS	F-ratio	F 0.05	F 0.01
Treatment	1	0.4825	0.4825	0.1814^{NS}	4.60	8.86
Ex.Error	14	37.2437	37.2437			
Total	15	37.7262	2.5151			

Grand Mean = 25.4534 CV = 6.4080%

NS ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 7 วิเคราะห์ทางสถิติปริมาณคลอโรฟิล จากการสกัดใบตะไคร้ด้วย DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ DMF ที่อุณหภูมิห้อง

SOURCE	df	SS	MS	F-ratio	F 0.05	F 0.01
Treatment	1	0.0135	0.0135	6.952×10^{-3} NS	4.60	8.86
Ex.Error	14	27.1348	1.9382			
Total	15	27.1483	1.8099			

Grand Mean = 13.1485 CV = 10.5882%

NS ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 8 วิเคราะห์ทางสถิติปริมาณคลอโรฟิล จากการสกัดใบหญ้ามาเลเซียด้วย DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ DMF ที่อุณหภูมิห้อง

SOURCE	df	SS	MS	F-ratio	F 0.05	F 0.01
Treatment	1	0.2361	0.2361	0.2153 NS	4.60	8.86
Ex.Error	14	15.3522	1.0966			
Total	15	15.5883	1.0392			

Grand Mean = 18.0861 CV = 5.7900%

NS ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ห้องสมุด... เกษตร
สถาบันเทคโนโลยี... ล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางภาคผนวกที่ 9 วิเคราะห์ทางสถิติปริมาณคลอโรฟิล จากการสกัดใบเฟื่องฟ้าด้วย DMF ที่อุณหภูมิห้อง, 30, 50 และ 70 องศาเซลเซียส

SOURCE	df	SS	MS	F-ratio	F 0.05	F 0.01
Treatment	3	1.9646	0.6549	0.2313^{NS}	3.24	5.29
Ex.Error	16	45.2920	2.8308			
Total	19	47.2566	2.4872			

Grand Mean = 15.6946 CV = 10.7202%

NS ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 10 วิเคราะห์ทางสถิติปริมาณคลอโรฟิล จากการสกัดใบแสงจันทร์ด้วย DMF ที่อุณหภูมิห้อง, 30, 50 และ 70 องศาเซลเซียส

SOURCE	df	SS	MS	F-ratio	F 0.05	F 0.01
Treatment	3	2.8539	0.9513	1.1340^{NS}	3.24	5.29
Ex.Error	16	13.4203	0.8388			
Total	19	16.2742	0.8565			

Grand Mean = 11.8339 CV = 7.7393%

NS ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 11 วิเคราะห์ทางสถิติปริมาณคลอโรฟิล จากการสกัดใบแสงจันทร์ด้วย DMSO และ DMF ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

SOURCE	df	SS	MS	F-ratio	F 0.05	F 0.01
Treatment	1	1.3103	1.3103	3.8561 ^{NS}	4.60	8.86
Ex.Error	14	4.7575	0.3398			
Total	15	6.0678	0.4045			

Grand Mean = 6.8721 CV = 8.4825%

NS ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ