การสกัดสารสีจากใบพืชสำหรับใช้ในการศึกษาทางสรีรวิทยาของพืช
Pigment Extraction from Plant Leaves for Plant Physiology Studies

ศุภชาติ ธรรมนิติเวทย์[1*]
Subhajati Dharmanitivedya[1*]

บทคัดย่อ

สารสีเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พืชสังเคราะห์ขึ้น เพื่อใช้ในหน้าที่ต่าง ๆ รวมถึงนำมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยสารสีหลักที่พบในพืช ได้แก่ คลอโรฟิลล์ (ประกอบด้วย คลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี) แคโรทีนอยด์ และแอนโทไซยานิน คลอโรฟิลล์เป็นสารสีสีเขียว ทำหน้าที่ดูดกลืนพลังงานแสงอาทิตย์แล้วส่งต่อพลังงานให้โมเลกุลตัวรับอื่น จนเปลี่ยนเป็นคาร์โบไฮเดรตและน้ำในที่สุด แคโรทีนอยด์ดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่นที่คลอโรฟิลล์ไม่สามารถดูดกลืนได้ แล้วส่งต่อให้คลอโรฟิลล์เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง และป้องกันคลอโรฟิลล์จากความเข้มแสงที่สูงมากเกินไป กอปรกับแอนโทไซยานินยังช่วยป้องกันคลอฟิลล์จากปริมาณความเข้มสูงที่สูงมากเกินไปเช่นกัน และยังดูดกลืนแสงสีเขียวที่สะท้อนออกจากใบพืชที่ได้รับแดดเต็มที่ แล้วส่งต่อให้คลอโรฟิลล์เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชในร่มหรือพืชที่ทนร่มได้ดี ดังนั้น ทั้งแคโรทีนอยด์และแอนโทไซยานินจึงได้ชื่อว่า “สารสีเสริม” เพราะทำหน้าที่ช่วยส่งเสริมคลอโรฟิลล์ในกระบวนการสังเคราะห์แสงนั่นเอง การใช้สารสะลาย *N*,*N*-dimethylformamide (DMF) เป็นตัวทำละลายในการสกัดคลอโรฟิลล์ มีประสิทธิภาพ ประหยัดเวลาและเครื่องมือ และลดการสูญเสียคลอโรฟิลล์มากกว่าการสกัดด้วยสารละลายอะซีโตน (80% หรือ 100% acetone) เมื่อในตัวอย่างใบมีปริมาณความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ต่ำ การสกัดแอนโทไซยานินใช้สารละลาย 6M HCl:H_2O:MeOH (7:23:70) เป็นตัวทำละลายแอนโทไซยานินและคลอโรฟิลล์ออกจากเนื้อเยื่อใบ หลังจากนั้นแยกคลอโรฟิลล์ออกด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม จะได้แอนโทไซยานินบริสุทธิ์ที่ไม่มีคลอโรฟิลล์ผสมอยู่ หลังจากที่สกัดได้สารสีแล้วนำสารละลายสารสีที่ได้มาวัดการดูดกลืนแสงเพื่อคำนวณหาปริมาณสารสีด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง

คำสำคัญ: การสกัดสารสี, คลอโรฟิลล์, แคโรทีนอยด์, สารสี, แอนโทไซยานิน

Abstract

Pigments are organic compounds that to be synthesized by plants for various functions. Moreover, it uses to photosynthesis. The major pigments founded in plants, such as chlorophyll (including chlorophyll *a* and chlorophyll *b*) , carotenoids, and anthocyanins. Chlorophyll is green pigment which absorbs the sunlight energy and transfer to other receptors. Finally, sunlight energy becomes to carbohydrate and water.

[1]สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 ต.วังทอง อ.วังทอง จ.พิษณุโลก 65130
Office of Agricultural Research and Development Region 2 Wanthong Sub-district, Wanthong District, Phitsanulok Province, 65130
*Corresponding author : sup_th@hotmail.com

Carotenoids absorb other wavelength that chlorophyll can't be absorbed and then transfer to chlorophyll for photosynthesis. Carotenoids can also protect chlorophyll from photooxidation by photoprotection. With anthocyanin can absorb green light that reflected from sun plant leaves. After that, green light transferred to chlorophyll for shade or shade tolerant plant photosynthesis. Therefore, both carotenoids and anthocyanins are called "accessory pigments" because play roles to be promote chlorophyll in photosynthesis. Using the *N,N*-dimethylformamide (DMF) solution is solvent for chlorophyll extraction, it has efficient, save time, and tools, with decreasing chlorophyll loss more than acetone (80% or 100% acetone) extraction when low chlorophyll in leaf samples. Anthocyanin extraction using 6M HCl: H_2O: MeOH (7: 23: 70) solution is solvent anthocyanin and chlorophyll out of leaf tissue. Then separate chlorophyll by chloroform solvent will get pure anthocyanin but mixed chlorophyll. Afterward, extract the pigments; bring the pigment solution to absorbance measurement for pigment content calculation by spectrophotometer.

Keywords: Pigment extraction, Chlorophyll, Carotenoids, Pigments, Anthocyanins

บทนำ

สารสีในพืช (plant pigments) ได้แก่ คลอโรฟิลล์ (ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี) แคโรทีนอยด์ และแอนโทไซยานิน (สารสีเสริม) มีบทบาทสำคัญในชีวภาค (biosphere) ของโลก ตลอดจนปฏิกิริยาดูดกลืนแสงของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) การหลีกเลี่ยงความเค้น (stress avoidance) และการป้องกันตัว (defense) นอกจากนี้ สารสียังเป็นตัวชี้บอกสุขภาพของพืช และสถานะของธาตุอาหารภายในระบบนิเวศบนบก (terrestrial ecosystems) อีกด้วย (Croft and Chen, 2017) โดยคลอโรฟิลล์เป็นสารสีที่มีความสำคัญมากในโลก เนื่องจากเป็นสารที่ช่วยดูดกลืนแสงอาทิตย์เมื่อพืชอยู่ในสภาวะที่ได้รับความเข้มแสงสูง กล่าวคือ คลอโรฟิลล์ดูดกลืนพลังงานมากเกินไปก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์พืช (phototoxin) จนเกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระจากออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) ขึ้น (Hörtensteiner and Kräutler, 2011) ดังนั้น ในสภาวะดังกล่าวสารสีอีกชนิดที่จะเข้ามาช่วยการทำงานของคลอโรฟิลล์คือแคโรทีนอยด์ คือยับยั้งการเกิดอันตรายจากสารอนุมูลอิสระจากออกซิเจน (ROS) ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า photooxidation (Bartley and Scolnik, 1995) นอกจากนี้แคโรทีนอยด์ยังช่วยดูดกลืนแสงในช่วงความคลื่นที่คลอโรฟิลล์ไม่สามารถดูดกลืนได้ แล้วส่งให้คลอโรฟิลล์เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Taiz *et al*., 2015) ด้วยเหตุนี้จึงกล่าวได้ว่า แคโรทีนอยด์เป็น "สารสีเสริม" (accessory pigments) ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Bartley and Scolnik, 1995) และแอนโทไซยานินช่วยป้องกันคลอโรพลาสต์จากอันตรายของโฟตอน (อนุภาคแสง) ที่มีมากเกินไป (Gould *et al*., 2018) ยิ่งกว่านั้น แอนโทไซยานินสามารถดูดกลืนแสงสีเขียว (ศุภชาติ และคณะ, 2553; Hatier and Gould, 2009) และแสงสีเหลือง แล้วส่งต่อให้คลอโรฟิลล์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสงต่อไป ซึ่งมีประโยชน์ต่อพืชที่อยู่ใต้ร่มเงา หรือพืชในที่ร่ม (Hatier and Gould, 2009) รวมถึงไม้ประดับที่ทนร่มได้ดี ทำให้ทนอยู่ในสภาวะร่มเงาได้นานพอสมควร (ศุภชาติ และคณะ, 2553)

ในบทความนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อให้นิสิต นักศึกษา ครู อาจารย์ รวมถึงผู้ที่สนใจทั่วไป ได้เข้าใจเกี่ยวกับสารสีที่มีความสำคัญกับพืชในบทบาทของการสังเคราะห์ด้วย ซึ่งถือว่าเรื่องเป็นพื้นฐานที่สำคัญเรื่องหนึ่งสำหรับการศึกษาทางด้านสรีรวิทยาของพืช เพื่อพัฒนาไปสู่ความรู้ที่ลึกซึ้งได้ต่อไปในอนาคต

คลอโรฟิลล์

คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) เป็นสารสีที่ทำให้พืชมีสีเขียว (Willows, 2004) และมีปริมาณมากที่สุดในโลก (Hörtensteiner and Kräutler, 2011) โดยคลอโรฟิลล์จัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบที่มีวงไพร์โรล 4 วง (tetrapyrroles) (Willows, 2004) คลอโรฟิลล์ยังเป็นองค์ประกอบสำคัญของการสังเคราะห์ด้วยแสง เพราะทำหน้าที่ในการดูดกลืนแสงอาทิตย์ (Hörtensteiner and Kräutler, 2011) และส่งผ่านพลังงานแสงอาทิตย์ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ในพืชพบ คลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll *a*) และคลอโรฟิลล์ บี (chlorophyll *b*) เป็นส่วนใหญ่ (Willows, 2004) ซึ่งคลอโรฟิลล์และฮีม (heme) (สังเคราะห์ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Ajioka *et al*., 2006)) ทั้งคู่มีวงไพร์โรล 4 วง (พอร์ไฟริน (porphyrin)) แต่กึ่งกลางของอะตอมมีแม็กนีเซียม (Mg) และเหล็ก (Fe) เป็นองค์ประกอบตามลำดับ (Willey, 2016)

แคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์ (carotenoids) เป็นกลุ่มของสารสีประเภท tetraterpenoids ธรรมชาติ มีบทบาทในระบบดูดกลืนพลังงานแสงในคลอโรพลาสต์ (Koley *et al*., 2018) และส่งผ่านพลังงานแสงให้คลอโรฟิลล์สำหรับใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Taiz *et al*., 2015) และการป้องกันอันตรายจากแสงแดด (photoprotection) (Sun *et al*., 2018) จึงได้เรียกแคโรทีนอยด์ว่าเป็น “สารสีเสริม” (Taiz *et al*., 2015) รวมทั้งเป็นสารตั้งต้นสำหรับชีวสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชทั้งกรดแอบไซซิก (abscisic acid; ABA) และสไตรโกแลคโตน (strigolactones; SLs) และทำหน้าที่โมเลกุลส่งสัญญาณ (signaling molecules) เพื่อเป็นสื่อกลางการเจริญของพืชและตอบสนองต่อปัจจัยด้านสภาพแวดล้อม (Sun *et al*., 2018) สามารถพบแคโรทีนอยด์ตามส่วนต่าง ๆ ของพืช ได้แก่ ใบ ลำต้น ดอก และผล โดยปรากฏเป็นสีที่แตกต่างกัน อาทิ เหลือง ส้ม และแดง ซึ่งแคโรทีนอยด์จัดแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ 1) แคโรทีน (carotenes) ได้แก่ เบต้า-แคโรทีน (β-carotene) แอลฟา-แคโรทีน (α-carotene) และไลโคปีน (lycopene) เป็นสารสีสีเหลือง/ส้ม และ 2) แซนโทฟิลล์ (xanthophylls) ได้แก่ นีโอแซนทิน (neoxanthin) ไวโอลาแซนทิน (violaxanthin) ฟลาโวแซนทิน (flavoxanthin) เบต้า- และแอลฟา-คริปโทแซนทิน (β- and α-cryptoxanthin) เป็นสารสีสีเหลือง (Koley *et al*., 2018)

การสกัดคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์

1. ดูดสารละลาย *N,N*-dimethylformamide (DMF) [ ] ปริมาตร 3 มิลลิลิตร หรือแล้วแต่ความหนาของแผ่นใบหรือความเข้มของสีแผ่นใบหรือน้ำหนักใบหรือของตัวอย่างที่จะใช้สกัด (ในหน่วยกรัมหรือมิลลิกรัม) ใส่ในหลอดทดลอง

2. ดูดสารละลาย DMF ใส่หลอดทดลองไว้อีก 1 หลอด นอกเหนือจากหลอดทดลองที่จะใช้ในการทดลองทั้งหมด เพราะจะใช้เป็น blank สำหรับวัดการดูดกลืนแสง และเขียนฉลากติดข้างหลอดไว้ด้วยว่า “DMF” เพื่อป้องกันการหลงลืมชื่อสารละลาย

3. ใส่ตัวอย่างที่เจาะหรือชั่งน้ำหมักมาในหลอดทดลอง จากนั้นรีบเก็บหลอดทดลองในที่มืดทันที แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าสีเขียวของตัวอย่างจะละลายออกมาหมด ซึ่งสังเกตจากแผ่นเนื้อเยื่อมีสีซีดลงเมื่อเปรียบเทียบก่อนการสกัด

4. เทสารสกัดที่ได้จากข้อ 3. ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในคิวเวตเพื่อนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 647 และ 664 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสง โดยการบันทึกค่าควรกดปุ่มการดูดกลืนแสง 2 ครั้ง

5. นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์จากสูตร Wellburn (1994) ดังนี้

Chlorophyll *a* = (12 A_{664} – 3.11 A_{647})

Chlorophyll *b* = (20.78 A_{647} – 4.88 A_{664})

Total chlorophyll = Chlorophyll *a* + Chlorophyll *b*

และคำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์ตามสูตรของ Wellburn (1994) ดังนี้

C_{x+c} = (1000 A_{480} – 1.12 Chl *a* – 34.07 Chl *b*)/245

(เมื่อ C_{x+c} = Total carotenoids = xanthophylls + carotenes)

คำนวณค่า 2 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยเป็น 1 ค่า สำหรับ 1 เนื้อเยื่อ ตามข้อ 4.

6. ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ที่คำนวณได้อยู่ในหน่วยต่าง ๆ อาทิ มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง มิลลิกรัมต่อตารางเมตร หรือ มิลลิกรัมต่อตารางเซนติเมตร ทั้งนี้การใช้หน่วยขึ้นอยู่กับว่าตัวอย่างของเราที่นำมาใช้ในการสกัดนั้นชั่งเป็นน้ำหนัก (น้ำหนักสด หรือ น้ำหนักแห้ง) หรือเจาะเป็นพื้นที่ (ตารางเมตร หรือตารางเซนติเมตร)

สามารถสรุปการสกัดคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์จากข้อ 1. ถึง 6. เป็นแผนภาพเพื่อความเข้าใจอย่างง่าย (Figure 1)

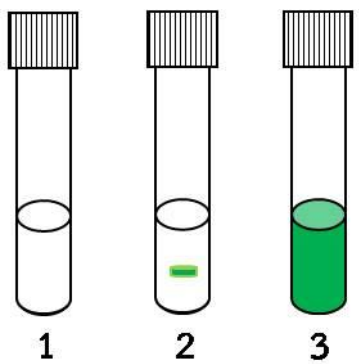

Figure 1 Steps of chlorophyll and carotenoids extraction

คำแนะนำในการสกัดคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์

Moran and Porath (1980) แนะนำให้เก็บหลอดทดลองสำหรับการสกัดคลอโรฟิลล์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดย Inskeep and Bloom (1985) กล่าวว่า คลอโรฟิลล์สลายตัวในที่ที่มีอุณหภูมิสูง ดังนั้นจึงควรเก็บเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิต่ำ (5 องศาเซลเซียส) จนกว่าจะสกัดเสร็จ ซึ่ง Moran and Porath (1980) ยังได้แนะนำเพิ่มเติมอีกว่า ตัวอย่างที่เก็บในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คลอโรฟิลล์สามารถคงตัวอยู่ได้นานถึง 20 วัน ส่วน Hughes and Smith (2007) แนะนำให้เก็บหลอดทดลองสำหรับ

การสกัดคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง และ Minocha *et al*. (2009) ยังแนะนำให้เก็บหลอดทดลองสำหรับการสกัดคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เช่นเดียวกันกับ Hughes and Smith (2007) และจากการสังเกตของผู้เขียนที่เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง สามารถสกัดคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ได้มากกว่ากว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลาอีกประมาณ 2 สัปดาห์ หลังจากวัดปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ครั้งแรก แล้วนำมาวัดการดูดกลืนแสงใหม่อีกครั้งหนึ่ง (ครั้งที่ 2) พบว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ลดลงจากที่วัดในครั้งแรก ถ้าในครั้งแรกมีการสกัดคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ออกหมดแล้ว แต่ถ้าคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ยังสกัดออกไม่หมดในครั้งแรก การวัดการดูดกลืนแสงในครั้งที่ 2 ค่าจะเพิ่มขึ้น

การสกัดคลอโรฟิลล์ด้วยสารละลาย DMF มีข้อดี กล่าวคือ สารละลาย DMF เป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพเมื่อคลอโรฟิลล์ในตัวอย่างมีความเข้มข้นต่ำ ประหยัดเวลาและเครื่องมือ และลดการสูญเสียคลอโรฟิลล์มากกว่าการสกัดด้วยสารละลายอะซีโตน (80% หรือ 100% acetone) เพราะต้องบดตัวอย่างกับสารละลายอะซีโตนและต้องนำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อเอาเฉพาะส่วนสารละลายใสด้านบน (supernatant) มาใช้ในการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer อีกทั้งยังป้องกันไม่ให้คลอโรฟิลล์ถูกทำลายจากการโดนอากาศในเวลาสกัดอีกประการหนึ่ง นอกจากนั้นแล้ว สารละลาย DMF ยังสกัดสารสีอื่น ๆ ได้ดีกว่าสารละลายอะซีโตน (Moran and Porath, 1980)

เหตุที่สารละลายอะซีโตนมีความสามารถในการละลายคลอโรฟิลล์ออกมาได้ไม่ดีเท่ากับสารละลาย DMF เนื่องด้วยสารละลายอะซีโตนมีความดันไอ (vapor pressure) สูง ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้สารละลายอะซีโตนระเหยได้ง่ายในระหว่างและหลังการสกัด ดังนั้นจึงทำให้สารสกัดที่ได้มีความผันแปรของชุดข้อมูลสูงมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ในปริมาตรเพียงเล็กน้อยในการสกัด (Stiegler *et al*., 2004)

แอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานิน (anthocyanins) เป็นสารสีน้ำเงิน แดง หรือม่วง (Khoo *et al*., 2017) จัดอยู่ในกลุ่มย่อยของฟลาโวนอยด์ (Kammerer, 2016) ที่อยู่ในรูปของไกลโคไซด์ (Khoo *et al*., 2017) โดยคำว่า “แอนโทไซยานิน” มีที่มาจากรากศัพท์ภาษากรีก 2 คำ คือ “Anthos” หมายถึง ดอกไม้ และ “Kianos” หมายถึง สีน้ำเงิน (Koley *et al*., 2018) สามารถพบแอนโทไซยานินในพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งในดอก ผล (Khoo *et al*., 2017) ใบ ลำต้น ราก (Koley *et al*., 2018) และหัวแบบมันฝรั่ง (tubers) (แท้จริงจัดเป็นลำต้นใต้ดินประเภทหนึ่ง) โดยในสภาวะที่เป็นกรดแอนโทไซยานินปรากฏเป็นสารสีแดง ในขณะที่ในสภาวะที่เป็นด่างแอนโทไซยานินปรากฏเป็นสีน้ำเงิน เสถียรภาพ (stability) ของแอนโทไซยานินขึ้นอยู่กับความเป็นกรด-ด่าง (pH) แสง อุณหภูมิ และโครงสร้างของแอนโทไซยานินเอง (Khoo *et al*., 2017) นอกจากนี้ ในเนื้อเยื่อที่มีกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง แอนโทไซยานินทำหน้าที่เป็นสารป้องกันแสงแดด (sunscreen) ให้กับเนื้อเยื่อจากอันตรายที่เกิดจากการได้รับความเข้มแสงที่มากเกินไป (photoinhibition) (Gould *et al*., 2018)

การสกัดแอนโทไซยานิน

การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl)

เนื่องจากสารละลาย HCl มีความเข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 12M (โมลาร์)

โจทย์ ต้องการเตรียมสารละลาย HCl ความเข้มข้น 6M จากสารละลาย HCl ความเข้มข้น 12M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (เตรียม 6M HCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จาก 12M HCl)

1. $C_1V_1 = C_2V_2$

$12M \times V_1 = 6M \times 10$ ml

$V_1 = 5$ ml

ดูดสารละลาย 12M HCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมน้ำปริมาตร 5 มิลลิลิตร รวมปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2. ดูดสาระลาย 6M HCl ใส่บีกเกอร์ ตามด้วยน้ำและสารละลาย MeOH (Table 1) การดูดสารละลายในอัตราส่วนเท่าใดนั้นขึ้นอยู่กับว่าเราต้องการเตรียมปริมาตรเท่าใด

3. ดูดสารละลายผสมใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร แล้วปิดฝาหลอดทดลอง ควรติดฉลากเป็นสัญลักษณ์ไว้ที่หลอดทดลองด้วย เพื่อป้องกันการสับสนว่าเราสกัดแอนโทไซยานินจากการทดลองชุดใดหรือจากส่วนใดของพืช

4. รีบเก็บหลอดทดลองในที่<u>*เย็นและมืด*</u>ทันทีหลังจากดูดสารละลายผสมใส่หลอดทดลอง กล่าวคือ เก็บหลอดทดลองใส่ถุงดำและแช่น้ำแข็งไว้ พอถึงเวลาจะใช้แช่เนื้อเยื่อเพื่อสกัดแอนโทไซยานินจริงๆ แล้ว จะได้ไม่เสียเวลาในการเก็บใส่ถุงดำ แต่ข้อสำคัญถ้าไม่ได้เก็บในที่มืดในทันทีเพราะยังไม่ได้สกัดแอนโทไซยานิน ควรเก็บในที่เย็นทันที ทางที่ดีควรเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนที่จะสกัดแอนโทไซยานิน

5. ดูดสารละลายผสมใส่หลอดทดลองไว้อีก 1 หลอด นอกเหนือจากหลอดทดลองที่จะใช้ในการทดลองทั้งหมด เพราะจะใช้เป็น blank สำหรับวัดการดูดกลืนแสง และเขียนฉลากติดข้างหลอดไว้ด้วยว่า “6M HCl:H_2O:MeOH” เพื่อป้องกันการหลงลืมชื่อสารละลาย

6. เจาะชิ้นเนื้อเยื่อด้วย cork borer หรือชั่งน้ำหนักเนื้อเยื่อ (ในหน่วยกรัมหรือมิลลิกรัม) ใส่ในหลอดทดลองที่เราติดฉลากไว้ เขย่าเพื่อให้เนื้อเยื่อได้สัมผัสกับสารละลาย แล้วรีบเก็บในที่เย็น (ในตู้แช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) และมืดนาน 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าแอนโทไซยานินจะละลายออกมาหมด ซึ่งสังเกตจากแผ่นเนื้อเยื่อมีสีซีดลงเมื่อเปรียบเทียบก่อนการสกัด

7. ก่อนดูดสารสกัดแอนโทไซยานินในข้อ 6. ให้เตรียมดูดน้ำปริมาตร 1 มิลลิลิตร และคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองให้เท่ากับจำนวนหลอดทดลองที่ใช้สกัดแอนโทไซยานิน จากนั้นดูดสารสกัดแอนโทไซยานินปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่เราเตรียมไว้ก่อนข้างต้น แล้วรีบเก็บในที่เย็นและมืดทันที ทำเช่นนี้จนครบทุกหลอดทดลอง

8. นำสารละลายที่ได้จากข้อ 7. ไปปั่นเหวี่ยงที่ 2630 *g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

9. ดูดสารใสส่วนบนสารจากสารละลายที่ปั่นเหวี่ยงแล้วในข้อ 8. ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในคิวเวตเพื่อนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 และ 653 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสง โดยการบันทึกค่าควรกดปุ่มการดูดกลืนแสง 2 ครั้ง

10. นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินจากสูตรของ Murray & Hackett (1991) ดังนี้

$$A_{anth} = A_{532} - 0.24\, A_{653}$$

คำนวณค่า 2 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยเป็น 1 ค่า สำหรับ 1 เนื้อเยื่อ ตามข้อ 9.

สามารถสรุปการสกัดแอนโทไซยานินจากข้อ 1. ถึง 10. เป็นแผนภาพเพื่อความเข้าใจอย่างง่าย (ดังแสดงใน Figure 2)

Table 1 Solution formula that use to be solvent in anthocyanin extraction

Formula	6M HCl	H_2O	MeOH	Volume (ml)	Divisor
1	7	23	70	100	1
2	3.5	11.5	35	50	2
3	1.75	5.75	17.5	25	4
4	1.4	4.6	14	20	5
5	0.7	2.3	7	10	10
6	0.35	1.15	3.5	5	20

Source: 6M HCl:H_2O:MeOH (7:23:70) ratio from Hughes and Smith (2007)

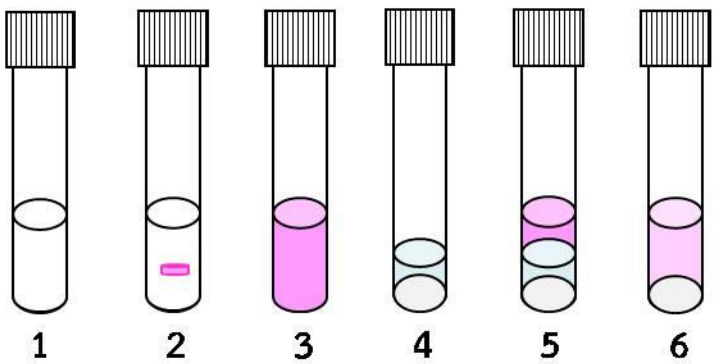

Figure 2 Steps of anthocyanin extraction

คำแนะนำในการสกัดแอนโทไซยานิน

น้ำและคลอโรฟอร์มที่เติมเข้าไปในสารสกัดแอนโทไซยานินเพื่อแยกแอนโทไซยานิน (ไม่ละลายในคลอโรฟอร์ม) จากคลอโรฟิลล์ และเมื่อนำสารผสม (จากข้อ 7.) ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงจะได้สารแยกชั้นเป็น 2 ชั้น กล่าวคือ ชั้นล่างคือคลอโรฟอร์ม ส่วนสารละลายใสชั้นบน (top layer) คือแอนโทไซยานินที่สกัดได้โดยปราศจากคลอโรฟิลล์ (Hughes and Smith, 2007) และจากการสังเกตของผู้เขียน พบว่า เมื่อเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาอีกประมาณ 2 สัปดาห์ หลังจากวัดปริมาณแอนโทไซยานินครั้งแรก แล้วนำมาวัดการดูดกลืนแสงใหม่อีกครั้งหนึ่ง (ครั้งที่ 2) พบว่า ปริมาณแอนโทไซยานินลดลงจากที่วัดในครั้งแรก ถ้าในครั้งแรกมีการสกัดแอนโทไซยานินออกหมดแล้ว แต่ถ้าแอนโทไซยานินยังสกัดออกไม่หมดในครั้งแรก การวัดการดูดกลืนแสงในครั้งที่ 2 ค่าจะเพิ่มขึ้น

สรุป

สารสี (pigments) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พืชสังเคราะห์ขึ้น เพื่อใช้ในกระบวนการทางสรีรวิทยา โดยกระบวนการที่เกิดขึ้นในใบพืชคือ กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงต้องอาศัยสารสี 3 ชนิดหลักๆ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และแอนโทไซยานิน เมื่อใบพืชได้รับแสงอาทิตย์ คลอโรฟิลล์ทำหน้าที่ดูดกลืนพลังงานแสงอาทิตย์และส่งถ่ายพลังงาน เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ในขณะที่ เมื่อพืชได้รับความเข้มแสงสูงมากเกินไป แคโรทีนอยด์และแอนโทไซยานิน สารสีทั้งคู่ทำหน้าป้องกันอันตรายที่เกิดขึ้น ไม่ให้คลอโรฟิลล์ได้รับอันตราย หรือถูกทำลาย ที่

เรียกว่ากระบวนการ photoprotection จึงทำให้ทั้งแคโรทีนอยด์และแอนโทไซยานินได้ชื่อว่า สารสีเสริม เพราะช่วยส่งเสริมการทำหน้าที่ของคลอโรฟิลล์นั่นเอง นอกจากนี้แคโรทีนอยด์และแอนโทไซยานินยังช่วยดูดกลืนช่วงแสงที่คลอโรฟิลล์ไม่สามารถดูดกลืนได้ แล้วส่งต่อให้คลอโรฟิลล์สำหรับใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงต่อไป ซึ่งจะช่วยให้พืชใช้แสงได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในเกือบทุกช่วงความยาวคลื่น และแอนโทไซยานินยังมีประโยชน์กับพืชที่เจริญเติบโตภายใต้สภาวะร่มเงาทั้งในสภาพพื้นป่า รวมถึงไม้ประดับที่นำมาใช้ประดับตกแต่งภายในอาคารอีกด้วย

สำหรับวิธีการสกัดสารสีที่นำมาแสดงในบทความนี้ เป็นวิธีการอย่างง่ายที่สามารถปฏิบัติได้โดยไม่ต้องอาศัยอุปกรณ์ตลอดจนเครื่องมือที่ใช้ในการสกัดมากมายนัก ซึ่งวิธีการสกัดและสูตรที่ใช้คำนวณหาปริมาณสารสี อาจมีความแตกต่างกันในแต่ละเอกสารอ้างอิง ดังนั้น ผู้ที่ปฏิบัติงานในด้านนี้หรือต้องใช้วิธีการดังกล่าว ควรศึกษาให้ละเอียดถ่องแท้ก่อนที่จะนำใช้ในการปฏิบัติงานจริง เพื่อป้องกันการผิดพลาด รวมถึงความคลาดเคลื่อนที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการปฏิบัติงานอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

ศุภชาติ ธรรมนิติเวทย์, พัชรียา บุญกอแก้ว, พูนพิภพ เกษมทรัพย์, และ ประศาสตร์ เกื้อมณี. (2553). การศึกษาประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงและปริมาณรงควัตถุของอโกลนีมาใบหลากสี. *การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 7* (น. 1666-1672). นครปฐม: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

Ajioka, R.S., J.D. Phillips, and J. P. Kushner. (2006). Biosynthesis of heme in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1763*(7), 723-736.

Bartley, G.E., and P.A. Scolnik. (1995). Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell*, *7*(7), 1027-1038.

Croft, H., and J.M. Chen. (2017). Leaf pigment content. In J. M. Chen (Ed.), *Comprehensive Remote Sensing Volume 3* (pp. 117-142). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.

Gould, K.S., C. Jay-Allemand, B. A. Logan, Y. Baissac, and L. P. R. Bidel. (2018). Why are foliar anthocyanins useful to plants? Re-evaluation of the photoprotection hypothesis using *Arabidopsis thaliana* mutants that differ in anthocyanin accumulation. *Environmental and Experimental Botany 154*, 11-22.

Hatier, J.-H.B., and K. S. Gould. (2009). Anthocyanin function in vegetative organ. In K.S. Gould, K. Davies and C. Winefield (Eds.), Anthocyanins: *Biosynthesis, Functions, and Applications* (pp. 1-19). NY: Springer Science+Business Media, LLc.

Hughes, N.M, and W. K. Smith. (2007). Attenuation of incident light in *Galax urceolata* (Diapensiaceae): Concerted influence of adaxial and abaxial anthocyanic layers on photoprotection. *American Journal of Botany*, *94*(5), 784-790.

Hörtensteiner, S. and B. Kräutler. (2011). Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1807*(8), 977-988.

Inskeep, W.P. and P. R. Bloom. (1985). Extinction coefficients of chlorophyll *a* and *b* in *N,N*-dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiology*, *77*(2), 483-485.

Kammerer, D. R. (2016). Anthocyanins. In B. Carle & R.M. Schweiggert (Eds.), *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Color* (pp. 61-80). Duxford, UK: Woodhead Publishing.

Khoo, H. E., A. Azlan, S. T. Tang, and S. M. Lim. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research, 61*(1), doi: 10.1080/16546628.2017.1361779

Koley, T. K., K. Banerjee, A. Maurya, A. Tripathi, and B. Singh. (2018). Bioactive pigments in vegetables. In B. Singh, S. Singh and T.K. Koley (Eds.), *Advances in Postharvest Technologies of Vegetable Crops* (pp. 1-24). Oakville, ON: Apple Academic Press, Inc.

Minocha, R., G. Martinez, B. Lyons, and S. Long. (2009). Development of a standardized methodology for quantifying total chlorophyll and carotenoids from foliage of hardwood and conifer tree species. *Canadian Journal of Forest Research*, *39*(4), 849-861.

Moran, R., and D. Porath. (1980). Chlorophyll determination in intact tissues using *N,N*-dimethylformamide. *Plant Physiology*, *65*(3), 478-479.

Murray, J.R., and W. P. Hackett. (1991). Dihydroflavonol reductase activity in relation to differential anthocyanin accumulation in juvenile and mature phase *Hedera helix* L. *Plant Physiology*, *97*(1), 343-351.

Stiegler, J.C., G. E. Bell, and N. O. Maness. (2004). Comparison of acetone and *N,N*-dimethylformamide for pigment extraction in turfgrass. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *35*(13-14), 1801-1813.

Sun, T., H. Yuan, H. Cao, M. Yazdani, Y. Tadmor, and L. Li. (2018). Carotenoid metabolism in plants: The role of plastids. *Molecular Plant*, *11*(1), 58-74.

Taiz, L., E. Zeiger, I. M. Møller, and A. Murphy. (2015). *Plant Physiology* (6th ed.). Sunderland, MA: Sinauer Asscosiates, Inc.

Wellburn, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, *144*(3), 307-313.

Willey, N. (2016). *Environmental Plant Physiology*. NY: Garland Science.

Willows, R.D. (2004). Chlorophylls. In K.M. Davies (Ed.), *Plant Pigments and their Manipulation* (pp. 23-56). Oxford, UK: Blackwell Publishing.