

การเปรียบเทียบวิธีการสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในพืช

ไพลิน เหล็กคง¹

บทคัดย่อ

ได้ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณคาร์โบไฮเดรตในรูปสารละลายน้ำตาลในพืชที่มีการเตรียมตัวอย่าง ก่อน นำมาวิเคราะห์ต่างกัน 3 วิธี คือ เตรียมตัวอย่างสด เตรียมตัวอย่างด้วยวิธีทำให้แห้งขณะเย็น และเตรียมตัวอย่าง ด้วยการอบแห้งโดยใช้ความร้อน ใช้ข้าวเป็นพืชทดลอง 3 พันธุ์ คือ พันธุ์ IR 42, FR-13 A และ Kurkarappan ปลุกในสารละลายธาตุอาหาร ในถังพลาสติกขนาด 3 ลิตร เป็นเวลา 20 และ 24 วัน เตรียมตัวอย่างทั้ง 3 วิธี ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรต ผลการศึกษาพบว่า ตัวอย่างสดและตัวอย่างที่ทำให้แห้งขณะเย็น วิเคราะห์ได้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมโดยอบแห้งด้วยความร้อนทันที ผลการทดลอง เป็นไปในทำนองเดียวกันในข้าวทั้ง 3 พันธุ์ และทั้งส่วนใบ ต้น และรากของพืช ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่วิเคราะห์ ได้จากตัวอย่างที่อบแห้งโดยใช้ความร้อนลดลง 28—60% เมื่อเทียบกับวิธีวิเคราะห์จากตัวอย่างสด

การวิเคราะห์พืชให้ได้ผลถูกต้องใกล้เคียงที่สุด และสามารถนำผลจากการวิเคราะห์ไปแปลความหมายได้อย่าง ถูกต้อง จำเป็นจะต้องมีการศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างพืช ก่อนนำมาวิเคราะห์ให้ถูกวิธี ทั้งนี้ขึ้นกับจุดประสงค์ว่าต้องการ จะศึกษาองค์ประกอบด้านใดในตัวอย่างพืช ทางสรีรวิทยา ของพืช มีการศึกษาองค์ประกอบทางด้านอินทรีย์ เช่น หา ปริมาณคาร์โบไฮเดรต อะมิโนแอซิด แป้ง และคลอโรฟิลล์ เป็นต้น ซึ่งการวิเคราะห์หาปริมาณสารเหล่านี้จะต้องคำนึงถึง การหยุดปฏิกิริยาของเซลล์พืชทันทีที่มีการเก็บตัวอย่าง เนื่องจากเซลล์พืชเป็นสิ่งมีชีวิตที่ต้องดำเนินกระบวนการต่าง ๆ ต่อไปเรื่อย ๆ ตรวจจับที่เซลล์ยังไม่ตาย (สุพจน์ และคณะ, 2524) และเมื่อเซลล์พืชยังทำงาน ปริมาณสารประกอบอินทรีย์ ที่รวมหรือเกี่ยวข้องในกระบวนการหรือกิจกรรมต่าง ๆ ของ เซลล์จะต้องแปรเปลี่ยนไปเรื่อย ๆ (ศรีโรจน์ และคณะ, 2515) ในการเก็บตัวอย่างพืชเพื่อศึกษาองค์ประกอบชนิดใดชนิดหนึ่ง มีหลายวิธีการด้วยกัน ดังนั้น เพื่อให้ได้วิธีการที่ให้ค่าถูกต้อง ใกล้เคียงความจริงตามที่พืชมีอยู่ในขณะนั้น ๆ จึงได้มีการศึกษา ทดลอง เปรียบเทียบวิธีการเก็บตัวอย่างและเตรียมตัวอย่าง เพื่อการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันออกไป เพื่อให้ได้ข้อมูลนำมา เป็นหลักในการปฏิบัติ หรือนำมาวิเคราะห์เตรียมตัวอย่างที่ ถูกวิธีเพื่อหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในพืชต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การปลูกและเก็บตัวอย่างพืช

ได้ใช้ข้าว 3 พันธุ์ IR 42, FR-13 A และ Kurkarappan เป็นพืชทดลอง ปลุกในสารละลายธาตุอาหาร (nutrient solution) ที่เหมาะสมสำหรับปลูกข้าว (Yoshida et al., 1972) ในถังพลาสติกขนาด 3 ลิตร ในเรือนกระจก เปลี่ยนสารละลาย ธาตุอาหารตามความจำเป็น ปลูกพืชจนได้น้ำหนัก แยกส่วนใบ ต้น และราก พอสำหรับใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบ- ไฮเดรตได้ เก็บตัวอย่างในช่วงเวลา 10.00—14.00 น. หลังจาก ชั่งน้ำหนักสดแล้ว เก็บตัวอย่างในถังใส่ไนโตรเจนเหลวทันที

การเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์

มี 3 วิธี คือ

1. วิธีเตรียมตัวอย่างสด (fresh extraction) ย้ายตัวอย่าง ที่เก็บเกี่ยวในเรือนทดลองมาเก็บในตู้แช่เย็นจัด (freezer) วิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตขณะที่ตัวอย่างยังสดอยู่
2. วิธีทำให้แห้งขณะเย็น (freeze drying method) ย้าย ตัวอย่างจากเรือนทดลองมารวมเก็บใน freezer จนครบทุก ตัวอย่าง แล้วนำไปเข้าเครื่องทำให้แห้งขณะเย็น (freeze drier) นาน 48—72 ชม. เมื่อแห้งแล้วอบต่อในตู้อบใช้ลมร้อน (hot air oven) อุณหภูมิ 70°ซ นาน 2—3 ชม. เก็บของบรรจุตัวอย่าง ใน desiccator เมื่อตัวอย่างเย็นแล้วจึงนำไปชั่งเพื่อทำการ วิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรต

¹กลุ่มงานวิเคราะห์พืชและผลิตผล กองเกษตรเคมี กรมวิชา- การเกษตร บางเขน กรุงเทพฯ 10900

3. วิธีทำตัวอย่างให้แห้งด้วยความร้อน (oven drying method) ย้ายตัวอย่างจากเรือนทดลองมาอบในตู้อบอุณหภูมิ 70°ซ. นาน 24-48 ชม. ทำให้เย็นใน desiccator เมื่อตัวอย่างเย็นแล้วจึงนำไปชั่งเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตต่อไป

การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในพืช

ทำโดยวิธีสกัดตัวอย่างพืชด้วย 80% ethanol และทำให้เกิดสีเพื่อวัดปริมาณด้วยวิธี Modified anthrone reagent (Morris, 1948) ชิ้นส่วนของพืชที่เลือกจากการสกัด นำไปอบที่อุณหภูมิ 70°ซ. เมื่อแห้งแล้วชั่งน้ำหนักแห้ง น้ำหนักที่ได้ เรียกว่า Ethanol Insoluble Dry Weight (EIDW)

ผลการทดลองและวิจารณ์

วิธีการเตรียมตัวอย่างพืช ก่อนนำมาวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้ง 3 วิธี ให้ผลการวิเคราะห์แตกต่างกันออกไป

(ตารางที่ 1) กล่าวคือ วิธีเตรียมตัวอย่างสดเมื่อเก็บเกี่ยวพืชอายุ 20 วัน ให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่วิเคราะห์ได้จากส่วนใบ ต้น และราก ในข้าว 3 พันธุ์ มีความแตกต่างกัน พันธุ์ Kurkarappan ให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตมากกว่าพันธุ์ IR 42 และ FR-13 A แต่เมื่อเก็บเกี่ยวพืชอายุ 24 วัน ได้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในส่วนใบ ต้น และรากของข้าว 3 พันธุ์ลดน้อยลง โดยพันธุ์ FR-13 A ให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าพันธุ์ IR 42 และ Kurkarappan

วิธีเตรียมตัวอย่างให้แห้งขณะเย็นเมื่อเก็บเกี่ยวพืชอายุ 20 วัน ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่วิเคราะห์ได้ในส่วนใบ ต้น และราก พันธุ์ Kurkarappan ให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าพันธุ์ IR 42 และ FR-13 A แต่เมื่อเก็บเกี่ยวพืชอายุ 24 วัน พบว่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตในส่วนใบ ต้น และราก ของข้าวพันธุ์ FR-13 A ได้ 628.79, 348.78 และ 214.24 u mole/g

ตารางที่ 1 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในข้าวพันธุ์ 3 พันธุ์ จากวิธีเตรียมตัวอย่างต่าง ๆ กัน

ตัวอย่างพืช			IR 42			FR - 13 A			Kurkarappan		
			Fresh	Freeze dry	Oven dry	Fresh	Freeze dry	Oven dry	Fresh	Freeze dry	Oven dry
Soluble sugars (μ mole/g EIDW)											
เก็บอายุ 20 วัน	ใบ	mean ¹	684.16	573.64	369.36	782.95	829.88	530.85	892.20	920.76	591.61
		SE ²	± 19.82	± 24.79	± 48.77	± 22.97	± 24.90	± 95.23	± 26.74	± 24.77	± 26.34
		%	100	83.85	53.99	100	105.99	67.80	100	103.20	66.31
	ต้น	mean	487.78	404.02	329.94	565.59	583.76	348.52	795.41	726.54	575.16
		SE	± 31.16	± 17.96	± 19.16	± 54.60	± 7.46	± 38.69	± 32.49	± 19.58	± 30.96
		%	100	82.83	67.64	100	103.21	61.62	100	91.34	72.31
	ราก	mean	233.50	232.97	138.17	260.50	311.22	156.06	493.57	444.93	237.48
		SE	± 10.88	± 16.81	± 8.32	± 17.62	± 13.96	± 16.69	± 19.78	± 10.38	± 13.84
		%	100	99.77	59.17	100	119.47	59.90	100	90.15	48.11
เก็บอายุ 24 วัน	ใบ	mean	411.37	441.69	223.84	672.53	628.79	388.30	541.29	525.24	328.34
		SE	± 15.45	± 17.24	± 14.32	± 25.96	± 12.72	± 27.48	± 39.74	± 12.34	± 25.68
		%	100	107.37	54.41	100	93.50	57.74	100	97.03	60.66
	ต้น	mean	218.74	211.56	116.94	338.27	348.78	239.96	328.82	324.40	212.36
		SE	± 22.10	± 10.64	± 6.75	± 16.00	± 17.46	± 20.84	± 13.82	± 14.64	± 23.10
		%	100	96.72	53.46	100	103.11	70.94	100	98.66	64.58
	ราก	mean	100.74	103.94	72.76	205.50	214.24	85.82	246.29	228.68	102.98
		SE	± 9.15	± 7.86	± 3.80	± 3.19	± 11.22	± 12.72	± 10.18	± 11.35	± 9.96
		%	100	103.18	72.22	100	104.25	41.76	100	92.85	41.81

¹เป็นค่าเฉลี่ยของ 4 ซ้ำ

²Standard error

EIDW ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าข้าวอีกสองพันธุ์

วิธีเตรียมตัวอย่างทำให้แห้งด้วยความร้อนเมื่อเก็บเกี่ยวพืชอายุ 20 วัน และ 24 วัน ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่วิเคราะห์ได้ในส่วนใบ ต้น และรากของข้าว 3 พันธุ์ให้ผลเช่นเดียวกับ 2 วิธีแรก แต่ได้ปริมาณของคาร์โบไฮเดรตลดน้อยลง พันธุ์ Kurkarappan ให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่สูงกว่าข้าวอีก 2 พันธุ์

จากการวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตของพืชเมื่อมีอายุ 20 และ 24 วัน มีปริมาณแตกต่างกันไม่มากนัก แต่ถึงอย่างไร ผลการวิเคราะห์ทั้ง 2 ครั้งนี้สามารถเป็นข้อมูลยืนยันว่าการวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรต โดยวิธีสกัดจากตัวอย่างพืชสด และที่ทำให้แห้งขณะเย็น ให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างทำให้แห้งด้วยความร้อน

เมื่อเปรียบเทียบคาร์โบไฮเดรตที่สกัดได้จากตัวอย่างสดเป็น 100% เพราะถือว่าเป็นปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่มีอยู่ในพืชขณะเก็บเกี่ยวจริง ๆ ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่วิเคราะห์ได้โดยการเตรียมตัวอย่างให้แห้งขณะเย็น ส่วนใหญ่มีค่าใกล้เคียงกับ 100% คือ มีค่าตั้งแต่ 82.83–107.37% ค่าคลาดเคลื่อนนี้มีไม่เกิน 10% นอกจากในส่วนใบและต้นของพันธุ์ IR 42 และส่วนรากของพันธุ์ FR-13 A การเก็บเกี่ยวครั้งแรกที่การเตรียมตัวอย่าง 2 วิธีแรก ให้ค่าแตกต่างไปประมาณ 20% ทั้งนี้เป็นเพราะความแปรปรวนของเนื้อเยื่อพืชมากกว่าที่จะเป็นการเกี่ยวข้องกับวิธีการเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่วิเคราะห์โดยการเตรียมตัวอย่าง โดยอบด้วยความร้อนทันที ให้ค่าวิเคราะห์ต่ำกว่าวิธีแรกอย่างเห็นได้ชัดคือ ลดลงประมาณ 28–60% ที่เป็นเช่นนี้เพราะว่า ในขณะที่พืชถูกอบทำให้แห้ง เซลล์ของพืชยังไม่ตายทันที ยังมีกระบวนการหายใจและใช้พลังงานอยู่ กระบวนการดังกล่าวนี้ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์โบไฮเดรต ซึ่งนับว่าเป็นสารสำคัญมากที่พืชนำมาใช้ในการหายใจ และเป็นแหล่งพลังงานในระยะหนึ่ง ก่อนที่น้ำในเซลล์ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการร่วมทำปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ ในพืชจะระเหยไปหมด (ศรีโรจน์ และคณะ, 2515; เซาว์น และคณะ, 2517; สุพจน์ และคณะ, 2524; สัมพันธ์, 2526) จึงทำให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่เหลืออยู่ลดลงไป

ดังนั้น จากผลการทดลองนี้พอจะกล่าวได้ว่า การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในพืชให้ถูกต้องใกล้เคียงความเป็น

จริง ควรมีการเตรียมตัวอย่างที่ถูกต้องก่อน กล่าวคือ ถ้าสามารถวิเคราะห์สดได้ควรทำทันที เช่น กรณีจำนวนตัวอย่างไม่มาก มีแรงงานและความสะดวกต่าง ๆ พร้อมอยู่แล้ว ควรทำโดยวิธีสกัดสด แต่ถ้าจำนวนตัวอย่างมีมากไม่สามารถทำได้เสร็จในเร็ววัน ควรเตรียมตัวอย่างโดยวิธีทำให้แห้งขณะเย็น แต่ทั้งนี้ต้องมีเครื่องมือ Freeze drier เพิ่มขึ้นในห้องปฏิบัติการตัวอย่างที่แห้งโดย freeze dry แล้ว เมื่ออบที่อุณหภูมิ 70°ซ. อีก 2–3 ชม. สามารถเก็บไว้ได้หลายวันใน desiccator ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรต และผลการวิเคราะห์ยังคงใกล้เคียงกับวิธีวิเคราะห์จากตัวอย่างสด ส่วนวิธีเตรียมตัวอย่างโดยอบด้วยความร้อนทันที ให้ผลที่แตกต่างกว่าความเป็นจริง คือ ได้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตต่ำกว่า จึงเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้

คำนิยม

ผู้วิจัยขอขอบคุณ Australian Center for International Agricultural Research (ACIAR) ที่ให้ความสนับสนุนทางด้านงบประมาณในการให้ทุนไปฝึกอบรม และทำการวิจัยทางด้านสรีรวิทยาของพืช ณ ประเทศออสเตรเลีย ทำให้ได้รับความรู้และประสบการณ์ต่าง ๆ เพิ่มขึ้น และคุณลัดดา ปกนิทนกะ หัวหน้าสายงานเคมีพืชและผลิตภัณฑ์ กองเกษตรเคมี ที่ได้ช่วยเหลือและให้คำแนะนำงานโครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- เซาว์น ชิโนรักษ์ และพรณี ชิโนรักษ์ 2517. ชีววิทยา เล่ม 3 แผนกวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ หน้า 419–439.
- ศรีโรจน์ ปวนะฤทธิ์ และคณะ 2515. วิชาวิทยาศาสตร์ชีววิทยา วิชาชุดครูประกาศนียบัตร ครูมัธยมของคุรุสภา หน้า 20–45.
- สัมพันธ์ คัมภีรานนท์. 2526. หลักสรีรวิทยาของพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 561 หน้า.
- สุพจน์ ไข่เทียมวงศ์ และคณะ 2524. หลักชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง กรุงเทพฯ 375 หน้า.
- Morris, D.L. 1948. Quantitative determination of carbohydrate with Drywood's anthrone reagent. Science 107 : 254–255.
- Yoshida, S., D.A. Forno, J.H. Cock and K.A. Gomez. 1972. Laboratory manual for physiological studies of rice. (second edition). The International Rice Research Institute. Los Banos, Laguna, Philippines, 70 pp.

Comparison of Different Techniques for Plant Carbohydrate Analysis

By

Pailin Lekkong

Agricultural Chemistry Division, Department of Agriculture, Bangkok, Thailand 10900

ABSTRACT

Three different methods of sample preparation for estimates of carbohydrate content in the form of soluble sugars were compared fresh extraction, freeze drying and oven drying. Three different rice varieties were used in the study, IR 42, FR-13 A and Kurkarappan, each of which was grown in nutrient solution under glasshouse conditions for 20–24 days before harvesting.

When using the fresh material and freeze-drying of samples for analysis, the carbohydrate content of different plant parts-leaf, shoot and root, showed little difference. However, soluble carbohydrate estimates using oven-dried material gave estimates of between 28–60 percent less than those obtained when the analysis was based on fresh vegetative material.
