เทคนิคการวิเคราะห์หาปริมาณโพรลีนในพืชอาหารสัตว์

ณุทนาถ โคตรพรหม[1] จริยา บุญจรัชชะ[1] ศศิพร ช่อลำไย[1]

บทคัดย่อ

การศึกษาเทคนิคและวิธีการการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารโพรลีนในหญ้ารูซี่สด ใช้หลักการและเทคนิคคัลเลอรีเมทรีที่ดัดแปลงและปรับปรุงจากเอกสารอ้างอิง ซึ่งรีเอเจนต์ (reagent) ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์โพรลีน คือ สารละลายนินไฮดริน (acid ninhydrin) โดยทำการศึกษาค่าความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ความเป็นเส้นตรง ปริมาณของรีเอเจนต์ที่ใช้ และระยะเวลาการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม ทดสอบวิธีวิเคราะห์หาปริมาณโพรลีนกับตัวอย่างพืชอาหารสัตว์

ผลการศึกษา พบว่า เทคนิคการวิเคราะห์หาปริมาณโพรลีนในพืชอาหารสัตว์ที่เหมาะสม คือ การทำปฏิกิริยากับ acid ninhydrin จำนวน 1 มิลลิลิตร เร่งปฏิกิริยาโดยการต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 30 นาที ปฏิกิริยาจะเกิดสมบูรณ์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เทียบความเข้มข้นกับกราฟมาตรฐาน ที่ได้จากการทำ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานในช่วง 0.1 - 10.0 mg/l (R^2 = 0.9929) ค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนได้ของโพรลีนในช่วง 0.5 – 5.0 mg/100 g มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 98.23 - 98.34 เปอร์เซ็นต์ ค่าต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจพบได้ คือ 0.58 mg/100 g และค่าต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ คือ 1.00 mg/100 g สามารถใช้เป็นวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารโพรลีนในหญ้ารูซี่สดได้

คำสำคัญ : วิธีวิเคราะห์โพรลีน พืชอาหารสัตว์

เลขทะเบียนผลงานทางวิชาการ 52 (2) – 0214 - 032

[1]กลุ่มวิเคราะห์อาหารสัตว์และพืชอาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000

Technique of Proline Determination in the Forage

Nuttanart Khotprom[1] Jariya Booncharatcha[1] Sasiporn Cholumyai[1]

Abstract

The technique of proline determination in ruzi grass by using colorimetry was studied. For the quantitative determination of proline, numerous methods are available. The reagent, herein, was acid ninhydrin and the other parameters that were suitable for the quantitative determination of proline such as maximum absorbance, linearity, amount of reagent and optimum boiling time were showed.

The results showed that the optimal condition for determination technique of proline in ruzi grass were using sample solution 5 ml, applied acid ninhydrin reagent 1 ml and boil at 100 °C for 30 minutes to complete the reaction. The proline concentration was determinated by UV-VIS Spectrophotometer at 515 nm and compared with standard calibration curve of proline in the range of 0.1 – 10.0 mg/l (R^2 = 0.9929). The mean recovery of proline in ruzi grass in the range of 0.5 – 5.0 mg/100g was 98.23 - 98.34 %. The Limit of Detection and Limit of Quantitation were 0.58 and 1.00 mg/100g. The results indicated that this technique were suitable for determination of proline in ruzi grass fresh.

Key words : Proline determination, Forage

Technical Document No 52 (2) – 0214 - 032

[1]Feed and Forage Analysis Section, Animal Nutrition Division, Department of Livestock Development , Tiwanon Rd., Bangkadee, Pathumtani Province 12000

บทนำ

โพรลีน (proline) เป็นกรดอะมิโนในกลุ่ม aromatic ring เป็นสารประกอบไนโตรเจนที่ละลายน้ำได้ (soluble nitrogen compound) ที่ได้จากการสังเคราะห์ glutamate และ arginine โพรลีนจะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนและมีบางส่วนที่เคลื่อนย้ายเข้าสู่ท่อลำเลียงอาหารของพืช โพรลีนจัดเป็นสารชีวโมเลกุลกลุ่ม protective metabolites ที่นิยมนำมาใช้ในเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้ง โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยากับการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลภายในเซลล์พืช เนื่องจากพืชที่ทนต่อความแห้งแล้งจะมีการปรับ osmotic ภายในเซลล์ให้ต่ำลง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการดูดน้ำมาใช้ในการดำรงชีวิต ทำให้มีการสร้างและสะสมสารกลุ่ม protective metabolites เพื่อปรับค่าชลศักย์ (water potential) ของน้ำในเซลล์ (ลิลลี่ และคณะ, 2549) ซึ่งพืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการปรับตัวและทนต่อการสูญเสียน้ำที่แตกต่างกัน

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารโพรลีนที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง คือ เทคนิคทางสเปกโทรสโคปี (spectroscopy) หรือเทคนิคคัลเลอริเมทรี (colorimetry) หลักการ คือ ทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์เกิดสี โดยการทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ (reagents) แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่มีสีนั้น โดย reagents สำหรับการวิเคราะห์โพรลีน ที่นิยมใช้ คือ acid ninhydrin Schweet (1953) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณโพรลีนในปัสสาวะและเลือดของผู้ป่วย โดยการทำให้โพรลีนทำปฏิกิริยากับ ninhydrin ในสภาวะที่เป็นกรดและเร่งปฏิกิริยาโดยการให้ความร้อน ผลิตภัณฑ์ (product) ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาจะอยู่ในรูปสารประกอบสีแดง แต่เนื่องจากตัวอย่างทางชีวโมเลกุลมีกรดอะมิโนปฐมภูมิอื่นๆ ที่สามารถเกิดผลการรบกวน (interfere) ได้ เช่น ornithine, lysine, hydroxylysine และ cysteine ซึ่งได้แก้ไขโดยการทำ nitrozation Wren and Wiggall (1964) พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถกำจัดการรบกวนจากกรดอะมิโนปฐมภูมิพื้นฐานเท่านั้น จึงได้เพิ่มขั้นตอนการ cleaning ตัวอย่างโดยใช้ cation-exchange resin และสกัดสารสี (pigment) ที่เกิดขึ้นโดยใช้โทลูอีน (toluene) สำหรับการวิเคราะห์หาโพรลีนในพืชนั้น Bates และคณะ (1973) ได้นำเทคนิคการวิเคราะห์มาปรับใช้ เพื่อหาปริมาณ โพรลีนในพืชโดยการสกัดด้วย sulfosalicylic acid และให้ทำปฏิกิริยากับ acid ninhydrin ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาในพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปริมาณโพรลีนที่มีอยู่ในพืชนั้นๆ

เนื่องจากกองอาหารสัตว์มีชุดโครงการวิจัยปรับปรุงพืชอาหารสัตว์ทนแล้ง ซึ่งพืชที่ศึกษาคือหญ้ารูซี่ โดยใช้ปริมาณการสะสมของโพรลีนเป็นตัวประเมิน หรือตัวชี้วัดอย่างหนึ่งในการประเมินความสามารถในการทนแล้งของพืชแต่ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิเคราะห์อาหารสัตว์และพืชอาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ ยังไม่มีวิธีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารโพรลีน จึงจำเป็นต้องศึกษาเทคนิคและวิธีการการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารโพรลีนในพืชอาหารสัตว์โดยใช้หลักการและเทคนิคทาง colorimetry ที่ดัดแปลง และปรับปรุง เพื่อให้ได้วิธีการและเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโพรลีนในพืชอาหารสัตว์ที่ถูกต้องตามหลักการ สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง UV-VIS Spectrophotometer, Model Cintral 101 Perkin Elmer
2. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
3. อ่างน้ำเย็น (ice bath)
4. เครื่อง Vortex mixer
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า (analytical balance) ชนิดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
6. Volumetric pipette ขนาด 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 ml
7. Micropipette ขนาด 20 - 2000 µl

สารเคมี

1. โพรลีน (L - proline, $C_5H_9NO_2$) ชนิด AR grade
2. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid, HCl) ชนิด AR grade
3. กรดฟอสฟอริก (ortho - phosphoric acid, H_3PO_4) ชนิด AR grade
4. นินไฮดริน (ninhydrin, $C_9H_6O_4$) ชนิด AR grade
5. กรดซัลโฟซาลิไซลิก (5 - sulfosalicylic acid dihydrate, $C_7H_6O_6S \cdot 2\ H_2O$) ชนิด AR grade
6. โทลูอีน (toluene, $C_6H_5CH_3$) ชนิด AR grade

วิธีการทดลอง

แบ่งเป็น 2 การทดลอง การทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโพรลีน ซึ่งวิธีการที่ใช้ศึกษาจะปรับจากเอกสารอ้างอิง เพื่อให้มีความเหมาะสมกับวัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ที่มีอยู่ของห้องปฏิบัติการฯ การทดลองที่ 2 เป็นการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่ได้ โดยวิเคราะห์หาปริมาณโพรลีนในพืชอาหารสัตว์ ทำการศึกษาช่วงความเข้มข้นที่ให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง (linear range) ทดสอบความแม่น (accuracy) ของวิธีการวิเคราะห์ โดยประเมินจากค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนได้ (% recovery) ศึกษาค่า Limit of Detection (LOD) และค่า Limit of Quantitation (LOQ) ของวิธีการวิเคราะห์

<u>การทดลองที่ 1</u> การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโพรลีน

1.1 การเตรียม reagents

1.1.1 3% sulfosalicylic acid (w/v) โดยชั่ง 5 - sulfosalicylic acid dihydrate 3 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 100 ml

1.1.2 6 M phosphoric acid โดยตวง phosphoric acid 85% ปริมาตร 344 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 1 L

1.1.3 acid ninhydrin โดยชั่ง ninhydrin 1.25 g เติม glacial acetic acid ปริมาตร 30 ml และ 6 M phosphoric acid ปริมาตร 20 ml อุ่นให้ละลายด้วย water bath ปล่อยให้เย็น นำสารละลายที่ได้ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ ประมาณ 4 °C (สารละลายควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง)

1.1.4 stock standard proline 1000 mg/l ปริมาตร 100 ml โดยชั่ง L- proline 0.1 g ละลายและปรับปริมาตรด้วย 0.1 N HCl ให้มีปริมาตรเป็น 100 ml

1.1.5 working standard proline โดยการเจือจาง stock standard proline 1000 mg/l ปริมาตร 10 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 100 ml จะได้ standard proline ความเข้มข้น 100 mg/l ดูดสารละลาย standard proline ความเข้มข้น 100 mg/l ปริมาตร 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 และ 10.0 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 100 ml จะได้ standard proline ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 2, 5 และ 10 mg/l ตามลำดับ

1.2 วิธีการศึกษา

1.2.1 ศึกษาค่าความยาวคลื่น ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max})

โดยการใช้ standard proline 5 mg/l ปริมาตร 5 ml มาเติม glacial acetic acid 5 ml และ acid ninhydrin 5 ml นำไปต้มบน water bath ที่อุณหภูมิประมาณ 100 °C นานประมาณ 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาทันทีโดยการแช่ใน ice bath เติม toluene 10 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แล้วดูดสารละลายสีส้มเหลือง (colored product) บริเวณที่อยู่เหนือผิวของ toluene ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 400-600 nm โดยใช้ toluene เป็น blank

1.2.2 ศึกษาปริมาณการเติม acid ninhydrin ที่เหมาะสม

ดูดสารละลาย standard proline 5 mg/l ปริมาตร 5 ml ทำการทดลองทำนองเดียวกับข้อ 1.2.1 แต่ทำการปรับเปลี่ยนปริมาตรการเติม acid ninhydrin เป็น 0.5, 1.0, 2.0, 2.0, 4.0 และ 5.0 ml ตามลำดับ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงสูงสุดที่ได้จากข้อ 1.2.1

1.2.3 ศึกษาระยะเวลาการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม

ดูดสารละลาย standard proline 5 mg/l ปริมาตร 5 ml เติม acid ninhydrin ตามปริมาตรที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 1.2.2 ทำการทดลองทำนองเดียวกับข้อ 1.2.1 แต่ทำการปรับเปลี่ยนระยะเวลาการต้มบน water bath ที่อุณหภูมิประมาณ 100 °C เป็น 15, 30, 45, 60 และ 90 นาที ตามลำดับ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงสูงสุดที่ได้จากข้อ 1.2.1

<u>การทดลองที่ 2</u> การทดสอบวิธีวิเคราะห์หาปริมาณโพรลีนในพืชอาหารสัตว์

2.1. การเตรียมตัวอย่าง

นำต้นกล้าหญ้ารูซี่สด มาตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วบดให้ละเอียดด้วยโกร่ง ชั่งตัวอย่างบดละเอียด 0.5 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง สกัดด้วย 3% sulfosalicylic acid จำนวน 10 มิลลิลิตร โดยแช่นาน 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง What man เบอร์ 41

2.2. ศึกษา linearity โดยการทำ calibration curve

ดูดสารละลาย standard proline ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 2, 5 และ 10 mg/l มาอย่างละ 5 ml ทำการทดลองทำนองเดียวกับข้อ 1.2.1 โดยเติม acid ninhydrin ปริมาตรที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.2.2 ใช้เวลาในการต้มใน water bath ที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.2.3 และนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงสูงสุดที่ได้จากข้อ 1.2.1

2.3. ศึกษาความแม่น (accuracy) โดยการหาค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนได้ (% recovery)

นำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากข้อ 2.1 ปริมาตร 5 ml มา spike สารละลาย standard proline ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 mg/l ทำการทดลองทำนองเดียวกับข้อ 1.2.1 โดยเติม acid ninhydrin ปริมาตรที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.2.2 ใช้เวลาในการต้มใน water bath ที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.2.3 และนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงสูงสุดที่ได้จากข้อ 1.2.1 ทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 10 ซ้ำ

2.4. ศึกษาค่า Limit of Detection (LOD) และค่า Limit of Quantitation (LOQ) ของการวิเคราะห์

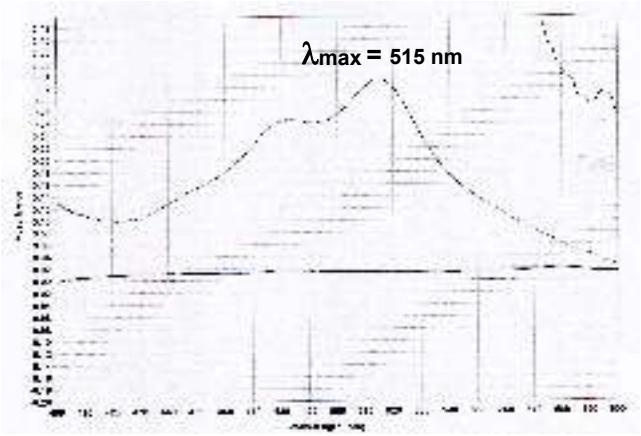
ด้วยการนำ blank reagent มาวัดสัญญาณ จำนวน 10 ซ้ำ หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) คำนวณค่า LOD จากค่าเฉลี่ยของ blank reagent + 3 SD และคำนวณค่า LOQ จากค่าเฉลี่ยของ blank reagent + 10 SD

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโพรลีน

1.1 ผลการศึกษาค่าความยาวคลื่น ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max})

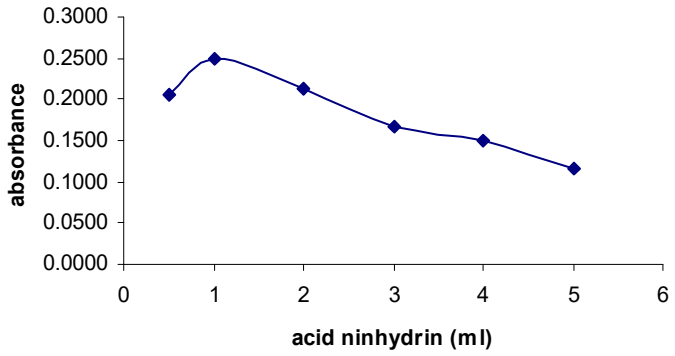
พบว่า สาร colored product ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง standard proline ความเข้มข้น 5 mg/l กับ acid ninhydrin reagent จะให้สเปกตราการดูดกลืน (absorption spectra) และให้ค่า λ_{max} ที่ความยาวคลื่น 515 nm (รูปที่ 1)



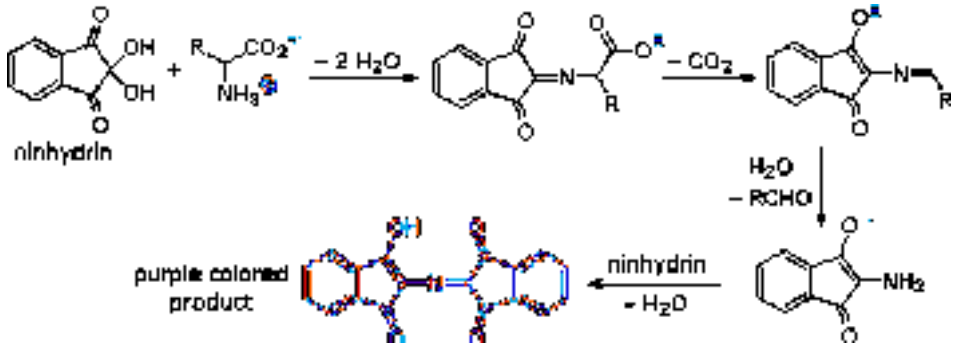
รูปที่ 1 Absorption spectra of proline colored product

1.2 ผลการศึกษาปริมาตรการเติม acid ninhydrin ที่เหมาะสม

พบว่า ปริมาตรการเติม acid ninhydrin ลงในสารละลาย standard proline ความเข้มข้น 5 mg/l จะมีผลต่อค่าการดูดกลืน ซึ่งการเติม acid ninhydrin ปริมาตร 1 ml ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (รูปที่ 2) ทั้งนี้เนื่องจาก โดยทั่วไป ninhydrin สามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนปฐมภูมิ (primary amine) ที่มีหมู่อะมิโนอิสระ (free amino group; $-NH_3^+$) ได้สารสีม่วง (รูปที่ 3) ยกเว้นกรณีของโพรลีน และอนุพันธ์ของโพรลีน ซึ่งเป็น secondary amine ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ จึงให้สารสีส้มเหลืองเกิดขึ้น และจากรายงานของ Troll and Lindsley (1954) สารที่ควบคุมอัตราการเกิดปฏิกิริยา (rate - cotrolling step) คือ ninhydrin's reagent



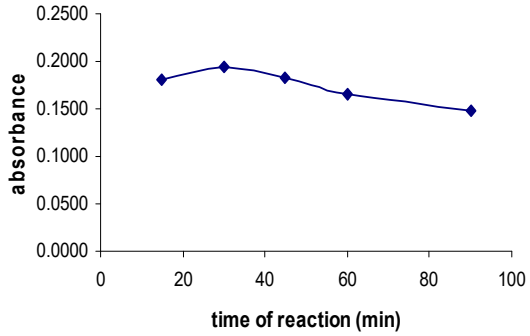
รูปที่ 2 ผลของปริมาตร ninhydrin's reagent ต่อค่าการดูดกลืนของ colored product of proline



<u>รูปที่ 3</u> การเกิด colored product จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง primary amino acid กับ ninhydrin's reagent (Edward et al, 1966)

1.3 ผลการศึกษาระยะเวลาการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม

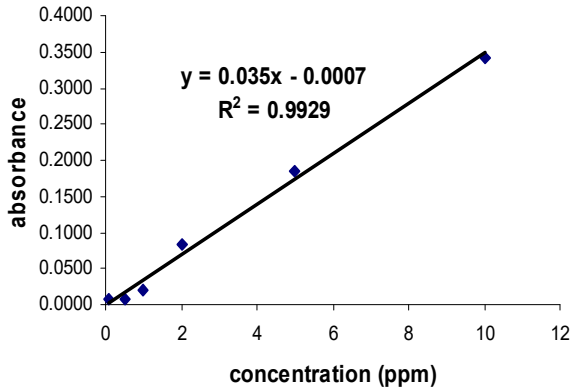
จากการนำสารละลาย standard proline ความเข้มข้น 5 mg/l ทำปฏิกิริยากับ acid ninhydrin เร่งปฏิกิริยาโดยต้มที่อุณหภูมิ 100°C พบว่า ที่เวลา 30 นาที ปฏิกิริยาจะเกิดสมบูรณ์ ซึ่งหลังจากเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้ว ต้องหยุดปฏิกิริยาทันทีโดยการแช่ใน ice bath ถ้าปฏิกิริยายังดำเนินต่อไปสารที่ได้จะค่อยๆ เปลี่ยนจากสีส้มเหลืองไปเป็นสีแดง ทำให้ค่าการดูดกลืนลดลง (รูปที่ 4) ทั้งนี้ เนื่องจากว่า การเกิด colored product ของโพรลีน จะเกิดในขั้นตอน intermediate step



<u>รูปที่ 4</u> ผลของระยะเวลาการทำปฏิกิริยาระหว่าง standard proline กับ acid ninhydrin ที่ 100 °C

2. การทดสอบวิธีวิเคราะห์หาปริมาณโพรลีนในพืชอาหารสัตว์

2.1. ผลการศึกษาช่วงของความเข้มข้นที่ให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง (linear range) จากการวัดค่าการดูดกลืนแสง colored product ของสารมาตรฐานโพรลีน ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 2, 5 และ 10 mg/l ที่ความยาวคลื่น 515 nm จะได้ calibration curve ที่มีค่า correlation (R^2) เท่ากับ 0.9929 ค่า slope เท่ากับ 0.035 และค่า intercept เท่ากับ - 0.0007 (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 Calibration curve of standard proline

2.2. ผลจากการนำเทคนิคการวิเคราะห์ที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาทดสอบวิเคราะห์หาปริมาณโพรลีนในตัวอย่างสารละลายหญ้ารูซี่ ซึ่ง spike สารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 0.5 - 5.0 mg/l พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนได้ของโพรลีน มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 98.23 - 98.34 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่า mean recovery ของโพรลีนที่ spike ลงไปในตัวอย่างหญ้ารูซี่

amount added (mg/100 g)	found (mg/100 g)	mean recovery (%)	RSD (%)
0.5	0.491	98.28	0.657
1.0	0.983	98.34	0.448
2.0	1.985	98.25	0.431
5.0	4.912	98.23	0.596

2.3. ค่าต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of detection, LOD) และค่าต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation, LOQ) ของการวิเคราะห์หาปริมาณโพรลีนในพืชอาหารสัตว์ เท่ากับ 0.58 mg/100 g และ 1.00 mg/100 g (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่า LOD และ LOQ ของการวิเคราะห์ปริมาณโพรลีนในตัวอย่างหญ้ารูซี่

ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ blank reagent 10 ซ้ำ (mg/100 g)										Mean	SD	LOD	LOQ
0.37	0.39	0.37	0.38	0.41	0.57	0.39	0.38	0.37	0.41	0.40	0.06	0.58	1.00

สรุป

เทคนิคการวิเคราะห์หาปริมาณโพรลีนในหญ้าที่เหมาะสม คือ การทำปฏิกิริยากับ acid ninhydrin จำนวน 1 ml เร่งปฏิกิริยาโดยการต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 30 นาที ปฏิกิริยาจะเกิดสมบูรณ์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เทียบความเข้มข้นกับกราฟมาตรฐาน ที่ได้จากการทำ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานในช่วง 0.1 - 10.0 mg/l (R^2 = 0.9929) ได้ค่า % mean recovery ของโพรลีนในช่วง 0.5 – 5.0 mg/100 g มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 98.23 - 98.34 เปอร์เซ็นต์ ค่าต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจพบได้ คือ 0.58 mg/100 g และค่าต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ คือ 1.00 mg/100 g

วิธีการที่ได้จากการศึกษามีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโพรลีนในพืชอาหารสัตว์ เป็นวิธีที่ทำได้รวดเร็วและถูกต้องตามหลักการ สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์หาปริมาณสารโพรลีนในพืชอาหารสัตว์ เพื่อใช้ในการสนับสนุนโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้ง ซึ่งใช้ปริมาณการสะสมของโพรลีนเป็นตัวประเมินหรือตัวชี้วัดความสามารถในการทนแล้งของพืชต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางสาววารุณี พานิชผล ผู้เชี่ยวชาญด้านวิเคราะห์อาหารสัตว์ ที่ให้คำแนะนำและแก้ไขรายงานฉบับนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มวิเคราะห์อาหารสัตว์และพืชอาหารสัตว์ทุกท่าน ที่ได้ช่วยเหลือให้งานทดลองนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ลิลลี่ กาวีต๊ะ มาลี ณ นคร ศรีสม สุวรรณวงศ์ และสุรียา ตันติวิวัฒน์. 2549. สรีรวิทยาของพืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 261 หน้า.

Bates, L.S., R.P. Woldren and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline water stress studies. Plant Soil. 39 : 205-207.

Edward, S.W., R.T. Wilbert, S.M. Howard, and T.V. B. John. 1966. Textbook of biochemistry. 4th ed. The Macmillan company, Collier-Macmillan limited. London. 1595 p.

Schweet, R.S. 1953. The quantitive determination of proline and pipecolic acid with ninhydrin. J. Biol. Chem. 25 : 603-613.

Wren, J.J. and P.H. Wiggall. 1964. An improved colorimetric method for the determination of proline in the presence of other ninhydrin - positive compounds. J. Biochem. 94 : 216-220.