Agricultural Sci. J. 49 : 4 (Suppl.) : 115-118 (2018) ว. วิทย. กษ. 49 : 4 (พิเศษ) : 115-118 (2561)

ปริมาณสารเดลฟินิดิน ไซยานิดิน และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระในกระเจี๊ยบแดงพันธุ์ใหม่ 6 สายพันธุ์

Delphinidin, Cyanidin Content and Antioxidant Capacity of 6 New Genotypes of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.)

สมนึก พรมแดง[1] อุทัยวรรณ ด้วงเงิน[2] และศิริพรรณ สุขขัง[1]

Somnuk Promdang[1], Uthaiwan Doung-ngern[2] and Siriphan Sukkhaeng[1]

Abstract

This research aimed to compare phenolic compounds and antioxidant activity in calyx and epicalyx part of 6 genotypes originating from 8 generations with phenotypic selection. Analysis of anthocyanins, delphinidin and cyanidin, were performed using HPLC. Total phenolic contents were measured by Folin-ciocalteu method and antioxidant capacities were analysed using 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method. The results revealed that calyx part had phenolic compounds and antioxidant activity higher than in epicalyx part. Dark purple genotypes (HA-O and HA-C) had the highest delphinidin and cyanidin content. The next highest was for purple color genotype (P-J) which had delphinidin and cyanidin content higher than that of the commercial cultivars (SD and LC-KU). The low anthocyanin groups were R-J and Pk-J genotypes. Anthocyanin content had a strongly positive correlation with total phenolic content and antioxidant capacity. Although no anthocyanin was found in white genotype (WT), its phenolic content and antioxidant capacity closed to Pk-J.

Keywords: roselle, anthocyanin, antioxidant activity

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในส่วนกลีบเลี้ยงและริ้วประดับของกระเจี๊ยบแดงลูกผสมเปิดพันธุ์ใหม่ที่ผ่านการคัดเลือกจากรุ่นที่ 8 จำนวน 6 สายพันธุ์ ปริมาณสารแอนโทไซยานินชนิดเดลฟินิดิน และไซยานิดินวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin-ciocalteu และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) พบว่า ในส่วนกลีบเลี้ยงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าส่วนริ้วประดับ สายพันธุ์สีม่วงเข้ม HA-O และ HA-C มีปริมาณเดลฟินิดิน และไซยานิดินในปริมาณสูงที่สุด รองลงมาคือ พันธุ์สีม่วง P-J ซึ่งสูงกว่าพันธุ์การค้า (SD และ LC-KU) ส่วนพันธุ์สีแดง R-J และสีชมพู Pk-J อยู่ในกลุ่มที่มีสารเดลฟินิดิน และไซยานิดินในปริมาณต่ำ ปริมาณแอนโทไซยานินมีความสัมพันธ์ทางบวกกับปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สำหรับพันธุ์สีขาว (WT) ตรวจไม่พบสารแอนโทไซยานิน แต่มีปริมาณสารฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับพันธุ์สีชมพู

คำสำคัญ: กระเจี๊ยบแดง, แอนโทไซยานิน, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

คำนำ

กระเจี๊ยบแดงเป็นพืชสมุนไพรที่มีการใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง เป็นแหล่งของแอนโทไซยานิน ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ให้สีแดงและม่วงจากธรรมชาติ ประกอบด้วยสาร delphinidin-3-sambubioside เป็นองค์ประกอบหลัก ร้อยละ 71.4 และ cyanidin-3-sambubioside ร้อยละ 26.6 (Wong *et al*., 2002) ปัจจุบันมีการสกัดแอนโทไซยานิน เพื่อใช้เป็นสีผสมอาหาร ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม เนื่องจากสามารถช่วยส่งเสริมการทำงานของเม็ดเลือดแดง ช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในผู้ป่วยเบาหวาน ช่วยชะลอการเกิดไขมันอุดตันในหลอดเลือด ช่วยลดโอกาสการเกิดมะเร็งและยับยั้งเนื้องอก ลดภาวะเสี่ยงในการเป็นโรคหัวใจ เสริมภูมิคุ้มกันในร่างกายให้ดีขึ้น และชะลอความเสื่อมของเซลล์ เป็นต้น (Shipp and Abdel-Aal, 2010) ปัจจุบันสายพันธุ์ที่นิยมปลูกคือพันธุ์ซูดาน และพันธุ์กลีบยาว ในประเทศไทยยังไม่มีการคัดเลือกสายพันธุ์อย่าง

[1]ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง ศูนย์วิจัยและบริการวิชาการ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[1] Central Laboratory and Greenhouse Complex, Research and Academic Service Center, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kampheang Sean Campus, Nakhon Pathom 73140

[2]ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[2] Tropical Vegetable Research Center, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kampheang Sean Campus, Nakhon Pathom 73140

จริงจัง ดังนั้นศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน ได้คัดเลือกและพัฒนาสายพันธุ์จากพ่อแม่พันธุ์ซูดานและพันธุ์กลีบยาว ได้พันธุ์ที่มีสีและลักษณะกลีบเลี้ยงที่แตกต่างกัน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณแอนโทไซยานินชนิดเดลฟินิดิน (delphinidin-3-O-sambubioside) และไซยานิดิน (cyanidin-3-O-sambubioside) สารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในส่วนกลีบเลี้ยงและริ้วประดับของกระเจี๊ยบแดงลูกผสมเปิด 6 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับพันธุ์การค้า เพื่อประเมินศักยภาพของสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านอาหารเพื่อสุขภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

กระเจี๊ยบแดงที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์สีม่วง (P-J) สีแดง (R-J) สีชมพู (Pk-J) สีขาว (WT) สีม่วงเข้ม (HA-C และ HA-O) และพันธุ์การค้า คือ พันธุ์ซูดาน (SD) และกลีบยาว (LC-KU) (Figure 1) ปลูกที่แปลงทดลองของศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 เก็บผลกระเจี๊ยบที่อายุ 110 วันหลังปลูก กระทุ้งส่วนฝักออกจากส่วนกลีบเลี้ยง แยกส่วนกลีบเลี้ยงและริ้วประดับออกจากกัน หั่นให้ละเอียด จุ่มลงในไนโตรเจนเหลวเพื่อรักษาสภาพ และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์

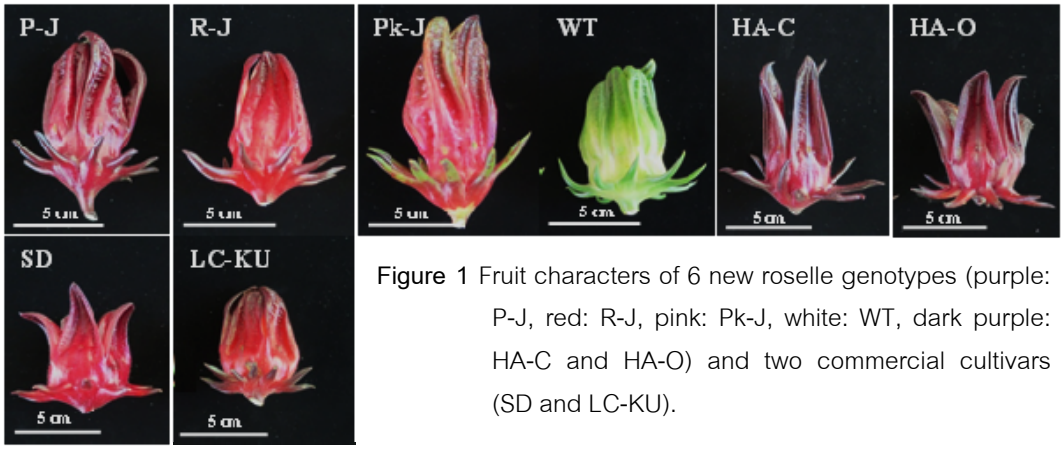

Figure 1 Fruit characters of 6 new roselle genotypes (purple: P-J, red: R-J, pink: Pk-J, white: WT, dark purple: HA-C and HA-O) and two commercial cultivars (SD and LC-KU).

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินด้วยเทคนิค HPLC

ดัดแปลงจากวิธีของ Sindi *et al*. (2014) ตัวอย่างสด 1 กรัม ปั่นให้ละเอียดในตัวสกัด (1% formic acid in 50% methanol (v/v)) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สกัดด้วยเครื่อง ultrasonic นาน 15 นาที แยกน้ำสกัดเก็บไว้ กากที่เหลือสกัดอีกครั้ง เทน้ำสกัดรวมกัน และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บส่วนใส ปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตร กรองผ่านไนลอนเมมเบรนขนาด 0.22 ไมครอน ฉีดเข้าเครื่อง HPLC (Waters, USA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แยกสารด้วยคอลัมน์ Gemini® 5 μm NX-C18: 250 x 4.6 mm (Phenomenex, USA) ตรวจวัดแบบ photodiode array detector ที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่ คือ A: 0.2% formic acid in water (v/v) และ B: 0.2% formic acid in water (v/v): acetonitrile (อัตราส่วน 1:1 (v/v)) สภาวะของเครื่อง เริ่มจาก B 10% เพิ่มเป็น 30% ใน 3 นาที และคงที่ไว้ 7 นาที เพิ่มเป็น 70% ใน 2 นาที คงที่ 4 นาที เปลี่ยนเป็น 10% ในเวลา 4 นาที และคงที่ 10 นาที อัตราเร็วของการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที คำนวณปริมาณแอนโทไซยานินชนิดเดลฟินิดิน และไซยานิดินโดยเทียบกับสารมาตรฐาน delphinidin-3-O-sambubioside (DS) และ cyanidin-3-O-sambubioside (CS) คำนวณปริมาณสารเดลฟินิดิน และไซยานิดิน ในหน่วยมิลลิกรัมต่อหนึ่งร้อยกรัมน้ำหนักแห้ง (mg/100 gDW)

การวิเคราะห์คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ

ตัวอย่างสด 1 กรัม สกัดด้วยเมทานอลความเข้มข้น 80% (v/v) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer เก็บไว้ในตู้เย็น 3 ชั่วโมง เขย่าทุก 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทเก็บส่วนใส และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด: ทำโดยวิธี Folin-Ciocalteu reagent ตามวิธีของ Mohd-Esa *et al*. (2010) คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิคต่อหนึ่งร้อยกรัมน้ำหนักแห้ง (mgGAE/100 gDW)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH: วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay ตามวิธีของ González-Mendoza *et al.* (2010) คำนวณค่า % DPPH radical scarvenging activity

ผล

กระเจี๊ยบแดงทั้ง 6 สายพันธุ์ มีปริมาณแอนโทไซยานินชนิดเดลฟินิดิน (delphinidin-3-O-sambubioside) และไซยานิดิน (cyanidin-3-O-sambubioside) วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC แตกต่างกัน สูงสุดในพันธุ์สีม่วงเข้ม (HA-C และ HA-O) และสีม่วง (P-J) ซึ่งปริมาณเดลฟินิดินมีค่า 573.48-846.66 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนปริมาณไซยานิดินมีค่า 116.98-147.18 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งมากกว่าในพันธุ์การค้า คือ ซูดาน (SD) และกลีบยาว (LC-KU) ปริมาณแอนโทไซยานินในส่วนกลีบเลี้ยงมากกว่าส่วนริ้วประดับ พันธุ์สีขาว (WT) ไม่สามารถตรวจพบทั้งเดลฟินิดิน และไซยานิดิน (Figure 2 A-B) สำหรับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) มีปริมาณสูงในพันธุ์สีม่วงเข้ม และพันธุ์สีม่วงเช่นเดียวกัน (Figure 2 C-D) ทั้งปริมาณแอนโทไซยานิน ฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์ทางบวกซึ่งกันและกัน ดัง Table 1

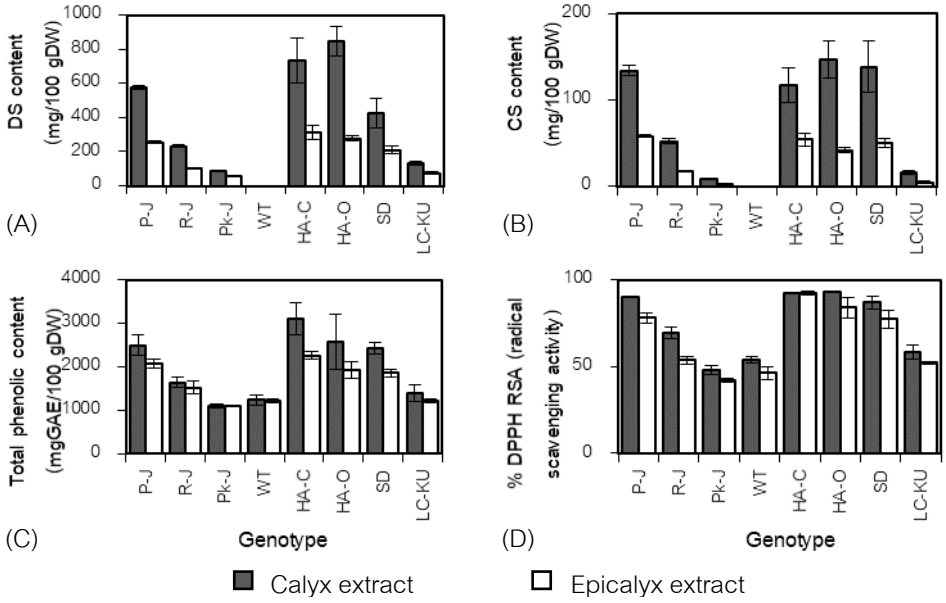

Figure 2 Delphinidin-3-O-sambubioside (DS) (A), cyanidin-3-O-sambubioside (CS) (B), and total phenolic contents (C) and radical scavenging activity (D) of roselle calyx and epicalyx extract. Results are triplicates (±SD).

Table 1 Pearson's correlation coefficients for the relationship between delphinidin-3-O-sambubioside content, cyanidin-3-O-sambubioside content, total phenolic content and % DPPH radical scavenging activity of calyx extracts and epicalyx extract (in parenthesis) from different roselle genotypes.

	DS	CS	TPC	DPPH
DS	1			
CS	0.912** (0.946**)	1		
TPC	0.847** (0.939**)	0.825** (0.946**)	1	
DPPH	0.913** (0.959**)	0.941** (0.925**)	0.912** (0.965**)	1

Note: ** $P \leq 0.01$

DS = delphinidin-3-O-sambubioside content CS = cyanidin-3-O-sambubioside content

TPC = total phenolic content DPPH = % DPPH RSA (radical scavenging activity)

วิจารณ์ผลการทดลอง

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแอนโทไซยานินชนิดเดลฟินิดิน (delphinidin-3-O-sambubioside) และไซยานิดิน (cyanidin-3-O-sambubioside) สารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในส่วนกลีบเลี้ยงและริ้วประดับของกระเจี๊ยบแดงลูกผสมเปิด 6 สายพันธุ์ เพื่อประเมินศักยภาพของสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านอาหารเพื่อสุขภาพ จะเห็นได้ว่าปริมาณแอนโทไซยานินทั้งสองชนิด สัมพันธ์กับสีของกลีบเลี้ยงที่ปรากฏตามลำดับ กระเจี๊ยบแดงสายพันธุ์สีม่วงเข้ม และสีม่วง มีปริมาณแอนโทไซยานินชนิดเดลฟินิดินอยู่ในช่วง 573.48–846.66 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง และไซยานิดิน 116.98–147.18 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งสูงกว่าในพันธุ์ซูดานและพันธุ์กลีบยาว และมีปริมาณมากกว่ากระเจี๊ยบแดงจากเม็กซิโก ซึ่งรายงานค่าเท่ากับ 132.6 และ 74.8 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (Salazar-González *et al*., 2012) และมีปริมาณใกล้เคียงกับที่พบในกระเจี๊ยบพันธุ์สีแดงอ่อนจากประเทศไนจีเรีย (Ifie *et al*., 2016) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกับปริมาณแอนโทไซยานินทั้งสองชนิด ยกเว้นในสายพันธุ์สีขาว ซึ่งตรวจไม่พบแอนโทไซยานิน แต่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับพันธุ์สีชมพูและพันธุ์กลีบยาว แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสายพันธุ์สีขาวเป็นผลมาจากสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่นนอกเหนือจากในกลุ่มแอนโทไซยานิน เช่นเดียวกับรายงานของ Ifie *et al*. (2016) ที่พบว่ากระเจี๊ยบแดงพันธุ์สีขาวมีสารประกอบฟีนอลิกบางตัว ในกลุ่ม hydroxybenzoic acid เช่น ไอโซเมอร์ของ chlorogenic acid และกลุ่มฟลาโวนอล เช่น rutin ซึ่งพบมากหรือพบเฉพาะพันธุ์สีขาว ไม่พบหรือพบน้อยในพันธุ์สีแดงอ่อน และสีแดงเข้ม อย่างไรก็ตาม การเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญในตัวอย่างนั้น ขึ้นอยู่กับแหล่งที่ปลูก วิธีการสกัด ตัวทำละลาย เป็นต้น กระเจี๊ยบแดงลูกผสมเปิดที่พัฒนาขึ้นทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่ามี 3 พันธุ์ที่มีศักยภาพในแง่เป็นแหล่งของแอนโทไซยานิน โดยเฉพาะเดลฟินิดินซึ่งเป็นชนิดหลักที่พบในกระเจี๊ยบแดง โดย Xu *et al*. (2017) รายงานว่าเดลฟินิดินมีฤทธิ์ลดการเกิดความเสียหายในเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย ลดภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน และลดน้ำตาลในเลือดโดยปริมาณเดลฟินิดิน 20–40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นการเผาผลาญน้ำตาลและการเพิ่มปริมาณไกลโคเจนในเซลล์ตับได้

สรุปผลการทดลอง

กระเจี๊ยบแดงลูกผสมเปิดที่พัฒนาขึ้นมี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์สีม่วงเข้ม (HA-C และ HA-O) และพันธุ์สีม่วง (P-J) ที่มีศักยภาพใช้เป็นแหล่งของแอนโทไซยานินชนิดเดลฟินิดิน และไซยานิดิน สำหรับพันธุ์สีแดง สีชมพู และสีขาวสามารถใช้เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระได้เช่นเดียวกัน

เอกสารอ้างอิง

González-Mendoza, D., O. Grimaldo-Juárez, R. Soto-Ortiz, F. Escoboza-Garcia and J.F.S. Hernández. 2010. Evaluation of total phenolics, anthocyanins and antioxidant capacity in purple tomatillo (*Physalis ixocarpa*) genotypes. Afr. J. Biotechnol. 9(32): 5173-5176.

Ifie, I., L.J. Marshall, P. Ho and G. Williamson. 2016. *Hibiscus sabdariffa* (roselle) extracts and wine: phytochemical profile, physicochemical properties, and carbohydrase inhibition. J. Agric. Food Chem. 64: 4921-4931.

Mohd-Esa, N., F.S. Hern, A. Ismail and C.L. Yee. 2010. Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. Food Chem. 122: 1055–1060.

Salazar-González, C., F.T. Vergara-Balderas, A.E. Ortega-Regules and J.Á. Guerrero-Beltrán. 2012. Antioxidant properties and color of *Hibiscus sabdariffa* extracts. Cien. Inv. Agr. 39(1): 79-90.

Shipp, J. and E.S.M. Abdel-Aal. 2010. Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients. Open Food Sci. J. 4: 7-22.

Sindi, H.A., L.J. Marshall and M.R.A. Morgan. 2014. Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*. Food Chem. 164: 23–29.

Wong, P.K., S. Yusof, H.M. Ghazali and Y.B. Che Man. 2002. Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). Nutr. Food Sci. 32(2): 68-73.

Xu, Y., D. Hu, T. Bao, J. Xie and W. Chen. 2017. A simple and rapid method for the preparation of pure delphinidin-3-O sambubioside from Roselle and its antioxidant and hypoglycemic activity. J. Funct. Foods 39: 9-17.