Agricultural Sci. J. 50 : 3 (Suppl.) : 79-82 (2019) ว. วิทย. กษ. 50 : 3 (พิเศษ) : 79-82(2562)

รูปแบบของแอนโทไซยานินและกรดอินทรีย์ในกระเจี๊ยบแดงพันธุ์ใหม่ 13 สายพันธุ์

Anthocyanin and Organic Acid Profiles in 13 New Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Genotypes

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 study anthocyanin and organic acid contents and their profiles in roselle calyx and epicalyx of 13 genotypes originated from 8 generations with phenotypic selection. Analysis of chemical profiles was performed by using HPLC. The results revealed that the patterns of anthocyanins in all genotypes were similar. Anthocyanins mainly consist of delphinidin and cyanidin. Calyx extract in dark purple genotypes (HA-O and HA-C) and purple genotypes (P-J, P-J-O, P-J-C and P-5) contained 573.48–846.66 and 85.18–195.33 mg/100 gDW delphinidin and cyanidin contents, respectively, which were higher than commercial varieties (SD and LC-KU). Besides, in epicalyx, the content of delphinidin and cyanidin in each genotype tend to be similar to the calyx but the content was less than in the calyx. However, no anthocyanin was found in the white genotype (WT). Hydroxycitric acid and garcinia acid were the main organic acid in all genotypes but the contents were different in each. Hydroxycitric acid ranged 135.720–221.417 mg/gDW while garcinia acid ranged 87.157–138.310 mg/gDW in both calyx and epicalyx. These indicated that new genotypes of roselle contain different amounts of delphinidin, related to the color appearance and higher amounts of hydroxycitric acid.

Keywords: Delphinidin, Cyanidin, HPLC

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบและปริมาณของแอนโทไซยานินและกรดอินทรีย์ ในส่วนกลีบเลี้ยงและริ้วประดับของกระเจี๊ยบแดงลูกผสมเปิดพันธุ์ใหม่ที่ผ่านการคัดเลือกจากรุ่นที่ 8 จำนวน 13 สายพันธุ์ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าแอนโทไซยานินในกระเจี๊ยบแดงทุกสายพันธุ์มีรูปแบบเดียวกันที่ประกอบด้วยเดลฟินิดิน และไซยานิดินเป็นโครงสร้างหลัก ในส่วนกลีบเลี้ยงของสายพันธุ์สีม่วงเข้ม (HA-O และ HA-C) และสายพันธุ์สีม่วง (P-J, P-J-O, P-J-C และ P-5) มีปริมาณเดลฟินิดิน และไซยานิดิน อยู่ในช่วง 573.48–846.66 และ 85.18–195.33 mg/100 gDW ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าพันธุ์ทางการค้า (SD และ LC-KU) นอกจากนั้นในริ้วประดับปริมาณเดลฟินิดินและไซยานิดินในแต่ละสายพันธุ์มีแนวโน้มคล้ายคลึงกับในส่วนกลีบเลี้ยง แต่มีปริมาณสารสำคัญน้อยกว่าในกลีบเลี้ยง สำหรับสายพันธุ์สีขาว (WT) ไม่พบสารแอนโทไซยานิน และกระเจี๊ยบแดงลูกผสมทุกสายพันธุ์มีกรดอินทรีย์ hydroxycitric acid และ garcinia acid เป็นชนิดหลักเช่นเดียวกัน แต่มีปริมาณแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ โดยปริมาณ hydroxycitric acid อยู่ในช่วง 135.720–221.417 mg/gDW ขณะที่ปริมาณ garcinia acid อยู่ในช่วง 87.157–138.310 mg/gDW ทั้งในส่วนกลีบเลี้ยงและริ้วประดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากระเจี๊ยบแดงสายพันธุ์ใหม่มีเดลฟินิดินในปริมาณแตกต่างกันสอดคล้องกับสีที่ปรากฏ และมีกรดอินทรีย์ชนิด hydroxycitric acid ในปริมาณค่อนข้างสูง

คำสำคัญ: เดลฟินิดิน ไซยานิดิน HPLC

คำนำ

กระเจี๊ยบแดงเป็นพืชสมุนไพรที่เป็นแหล่งของสารแอนโทไซยานิน ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ให้สีแดงและม่วงจากธรรมชาติ ประกอบด้วยสาร delphinidin-3-O-sambubioside เป็นองค์ประกอบหลักร้อยละ 71.4 และ cyanidin-3-O-sambubioside ร้อยละ 26.6 (Wong *et al*., 2002) สารแอนโทไซยานินสามารถนำมาสกัดเพื่อใช้เป็นสีผสมอาหาร ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม เนื่องจากสามารถช่วยส่งเสริมการทำงานของเม็ดเลือดแดง ช่วยควบคุมระดับน้ำตาลใน

[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

ผู้ป่วยเบาหวาน ชะลอการเกิดไขมันอุดตันในหลอดเลือด ลดโอกาสการเกิดมะเร็งและยับยั้งเนื้องอก เสริมภูมิคุ้มกันในร่างกาย ลดภาวะเสี่ยงในการเป็นโรคหัวใจ ชะลอความเสื่อมของดวงตา และชะลอความเสื่อมของเซลล์ เป็นต้น (Shipp and Abdel-Aal, 2010) นอกจากนี้กระเจี๊ยบแดงยังมีรสเปรี้ยวช่วยให้ชุ่มคอ มีรายงานว่าสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงมีกรดอินทรีย์สูงประกอบด้วย citric acid, hydroxycitric acid, hibiscus acid, malic acid และ tartaric acid เป็นองค์ประกอบหลัก มี oxalic acid และ ascorbic acid ในปริมาณน้อย (Da-Costa-Rocha *et al*., 2014) สำหรับกรดอินทรีย์ hydroxycitric acid (HCA) ได้รับความสนใจในด้านสุขภาพ เนื่องจากเป็นสารช่วยลดน้ำหนัก ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมัน (Carvajal-Zarrabal *et al*., 2009) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบและปริมาณของสารแอนโทไซยานินชนิดเดลฟินิดิน (delphinidin-3-O-sambubioside) และไซยานิดิน (cyanidin-3-O-sambubioside) รวมทั้งกรดอินทรีย์ในส่วนกลีบเลี้ยงและริ้วประดับของกระเจี๊ยบแดงลูกผสมเปิด 13 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับพันธุ์การค้า เพื่อประเมินศักยภาพของสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านอาหารเพื่อสุขภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

กระเจี๊ยบแดงที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 13 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์สีม่วง (P-J, P-J-O, P-J-C และ P-5) สีแดง (R-J, R-J-O และ R-J-C) สีชมพู (Pk-J, Pk-J-O และ Pk-J-C) 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 กระทุ้งส่วนฝัก แยกส่วนกลีบเลี้ยงและริ้วประดับออกจากกัน หั่นให้ละเอียด จุ่มลงในไนโตรเจนเหลวเพื่อรักษาสภาพ และเก็บที่อุณหภูมิ -20 ºC

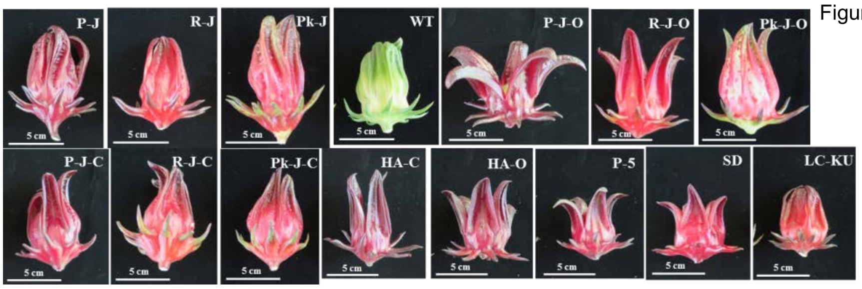

Figure 1 Fruit characters of 13 new roselle genotypes (Purple: P-J, P-J-O, P-J-C, P-5; Red: R-J, R-J-O, R-J-C; Pink: Pk-J, Pk-J-O, Pk-J-C; White: WT; Dark purple: HA-C and HA-O) and two commercial cultivars (SD and LC-KU).

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 ºC 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) ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 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 คำนวณปริมาณสารแอนโทไซยานินชนิดเดลฟินิดิน และไซยานิดินโดยเทียบกับสารมาตรฐาน delphinidin-3-O-sambubioside และ cyanidin-3-O-sambubioside

การวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ด้วยเทคนิค HPLC

ตัวอย่างสด 1 กรัม ปั่นให้ละเอียดในตัวสกัด (0.005N H_2SO_4) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สกัดด้วยเครื่อง ultrasonic นาน 15 นาที แยกน้ำสกัดเก็บไว้ กากที่เหลือสกัดอีกครั้ง เทน้ำสกัดรวมกัน และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 ºC นาน 20 นาที เก็บส่วนใส ปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตร กรองผ่านไนลอนเมมเบรนขนาด 0.22 ไมครอน ฉีดเข้าเครื่อง HPLC (Waters, USA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แยกสารด้วยคอลัมน์ Rezex™ ROA-Organic Acid H^+(8%): 300 x 7.8 mm (Phenomenex, USA) ตรวจวัดแบบ photodiode array detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่ คือ 0.005N H_2SO_4 คำนวณปริมาณกรดอินทรีย์แต่ละชนิดโดยเทียบกับสารมาตรฐาน oxalic acid (OA), garcinia acid (GA), hydroxycitric acid (HCA) และ succinic acid (SA)

ผล

กระเจี๊ยบแดงทุกสายพันธุ์มีแอนโทไซยานินในรูปแบบเดียวกันประกอบด้วยเดลฟินิดิน และไซยานิดินเป็นโครงสร้างหลัก ในส่วนกลีบเลี้ยงของสายพันธุ์สีม่วงเข้ม (HA-O และ HA-C) และสายพันธุ์สีม่วง (P-J, P-J-O, P-J-C และ P-5) มีปริมาณเดลฟินิดิน และไซยานิดิน อยู่ในช่วง 573.48–846.66 และ 85.18–195.33 mg/100 gDW ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าพันธุ์ทางการค้า (SD และ LC-KU) นอกจากนั้นในริ้วประดับปริมาณเดลฟินิดินและไซยานิดินในแต่ละสายพันธุ์มีแนวโน้มคล้ายคลึงกับในส่วนกลีบเลี้ยง แต่มีปริมาณสารสำคัญน้อยกว่า สำหรับสายพันธุ์สีขาว (WT) ไม่พบสารแอนโทไซยานิน (Figure 2)

กระเจี๊ยบแดงลูกผสมทุกสายพันธุ์มีกรดอินทรีย์ hydroxycitric acid และ garcinia acid เป็นชนิดหลักเช่นเดียวกันแต่มีปริมาณแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ โดยปริมาณ hydroxycitric acid อยู่ในช่วง 135.720–221.417 mg/gDW ขณะที่ปริมาณ garcinia acid อยู่ในช่วง 87.157–138.310 mg/gDW ทั้งในส่วนกลีบเลี้ยงและริ้วประดับ สำหรับ oxalic acid มีปริมาณต่ำ และตรวจไม่พบ succinic acid (Table 1)

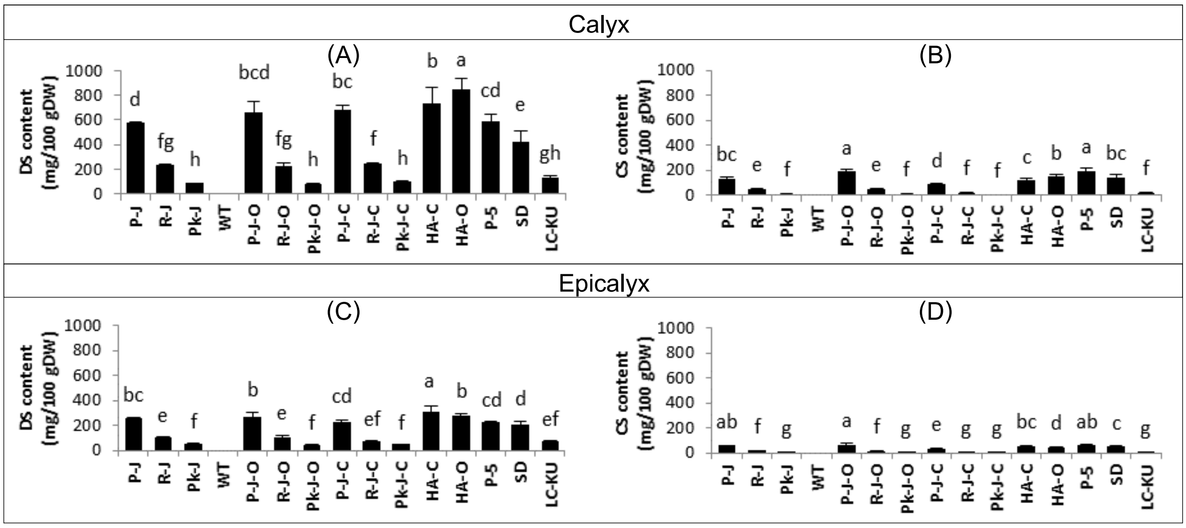

Figure 2 Contents of delphinidin-3-O-sambubioside (DS) and cyanidin-3-O-sambubioside (CS) in calyx (A–B), and epicalyx (C–D). Results are triplicates (±SD). Significant differences at P < 0.05 have been indicated with different letters.

วิจารณ์ผลการทดลอง

ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งสองชนิด สัมพันธ์กับสีของกลีบเลี้ยงที่ปรากฏตามลำดับ กระเจี๊ยบแดงสายพันธุ์สีม่วงเข้มและสีม่วง มีปริมาณสารแอนโทไซยานินชนิดเดลฟินิดินอยู่ในช่วง 573.48–846.66 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง และไซยานิดิน 85.18–195.33 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งสูงกว่าในพันธุ์ซูดานและพันธุ์กลีบยาว และมีปริมาณมากกว่ากระเจี๊ยบแดงจากเม็กซิโก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 132.6 และ 74.8 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (Salazar-González *et al.*, 2012) โดยสารเดลฟินิดินมีฤทธิ์ลดการเกิดความเสียหายในเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย ลดภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชันและลดน้ำตาลในเลือด ปริมาณเดลฟินิดิน 20–40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นการเผาผลาญน้ำตาลและการเพิ่มปริมาณไกลโคเจนในเซลล์ตับได้ (Xu *et al.*, 2017) ชนิดกรดอินทรีย์ที่พบในกระเจี๊ยบแดงแต่ละสายพันธุ์มีรูปแบบเหมือนกันและมีปริมาณใกล้เคียงกัน โดยมีชนิด hydroxycitric acid และ garcinia acid เป็นชนิดหลัก ไม่มีสายพันธุ์ใดที่ให้ความโดดเด่น สำหรับ garcinia acid หรือ (–)-hydroxycitric acid lactone เป็นสารที่สกัดได้จากส้มแขก ช่วยลดน้ำหนัก โดยทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันส่งผลลดการสร้างไขมัน ในกระเจี๊ยบแดงมีรายงานกรดอีกชนิดที่เป็นไอโซเมอร์กันคือ hibiscus acid หรือ (+)-allo-hydroxycitric acid lactone สำหรับกรด hydroxycitric acid ทุกรูปแบบได้รับความสนใจในด้านสุขภาพ เป็นสารช่วยลดน้ำหนัก และช่วยลดความดันเลือด (Carvajal-Zarrabal *et al.*, 2009; Zheoat *et al.*, 2019) โดยกรด garcinia acid ที่สกัดได้จากส้มแขกมีปริมาณ 10–30% ของน้ำหนักแห้ง (Soni *et al.*, 2004) ซึ่งในกระเจี๊ยบแดงจากการทดลองมีประมาณ 8.71–13.83%

Table 1 Contents of organic acids (mg/gDW) i.e. oxalic acid (OA), garcinia acid (GA), hydroxycitric acid (HCA) and succinic acid (SA) in calyx and epicalyx part from different roselle genotypes. Significant differences at P < 0.05 have been indicated with different letters.

Genotype	Calyx				Epicalyx			
	OA	GA	HCA	SA	OA	GA	HCA	SA
P-J	0.996 cd	98.215 e	138.708 de	ND	1.327 cd	100.043 b-e	168.739 b-d	ND
R-J	0.702 e	108.373 b-e	151.901 b-e	ND	ND	102.058 a-e	173.195 bc	ND
Pk-J	0.681 e	109.202 b-e	157.880 bc	ND	ND	90.941 e	152.201 cd	ND
WT	1.256 ab	109.090 b-e	160.300 b	ND	1.237 cd	103.003 a-e	180.449 bc	ND
P-J-O	ND	120.553 b	165.765 b	ND	ND	102.263 a-e	179.107 bc	ND
R-J-O	1.165 bc	111.337 b-d	158.629 bc	ND	1.933 a	118.324 a	221.417 a	ND
Pk-J-O	1.379 ab	116.516 bc	164.178 b	ND	1.716 ab	117.495 ab	216.572 a	ND
P-J-C	1.294 ab	107.759 b-e	141.432 c-e	ND	1.461 bc	87.157 e	140.771 d	ND
R-J-C	1.408 a	118.863 b	162.558 b	ND	0.833 e	110.083 a-d	175.634 bc	ND
Pk-J-C	1.446 a	99.799 de	135.720 e	ND	ND	104.659 a-e	171.573 b-d	ND
HA-C	0.835 de	105.204 c-e	147.950 b-e	ND	ND	92.305 de	153.836 cd	ND
HA-O	ND	117.385 bc	161.982 b	ND	ND	94.754 c-e	153.573 cd	ND
P-5	0.670 e	113.146 bc	162.533 b	ND	ND	99.206 c-e	156.229 cd	ND
SD	0.985 cd	109.989 b-e	155.844 b-d	ND	ND	101.341 a-e	163.370 cd	ND
LC-KU	0.938 d	138.310 a	209.915 a	ND	1.088 de	112.512 a-c	196.974 ab	ND

Note: Identical letters in each column indicate no significant difference ($p \leq 0.05$) according to Duncan's multiple range test.

สรุปผลการทดลอง

กระเจี๊ยบแดงลูกผสมเปิดสายพันธุ์สีม่วงเข้ม (HA-C และ HA-O) และพันธุ์สีม่วง (P-J, P-J-O, P-J-C และ P-5) มีศักยภาพใช้เป็นแหล่งของสารแอนโทไซยานินชนิดเดลฟินิดิน และไซยานิดิน รวมทั้งทุกสายพันธุ์สามารถใช้เป็นแหล่งของกรดอินทรีย์ hydroxycitric acid และ garcinia acid ซึ่งนำไปใช้ประโยชน์ด้านสุขภาพ

เอกสารอ้างอิง

Carvajal-Zarrabal, O., P.M. Hayward-Jones, Z. Orta-Flores, C. Nolasco-Hipolito, D.M. Barradas-Dermitz, M.G. Aguilar-Uscanga, and M.F. Pedroza-Hernandez. 2009. Effect of *Hibiscus sabdariffa* L. dried calyx ethanol extract on fat absorption-excretion, and body weight implication in rats J. Biomed. Biotechnol. 6: 1-5.

Da-Costa-Rocha, I., B. Bonnlaender, H. Sievers, I. Pischel and M. Heinrich. 2014. *Hibiscus sabdariffa* L. – A phytochemical and pharmacological review. Food Chem. 165: 424–443.

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.

Soni, M.G., G.A. Burdock, H.G. Preuss, S.J. Stohs, S.E. Ohia and D. Bagchi. 2004. Safety assessment of (-)-hydroxycitric acid and Super CitriMax®, a novel calcium/potassium salt. Food Chem. Toxicol. 42: 1513–1529.

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.

Zheoat, A.M., A.I. Graya, J.O. Igoli, V.A. Ferro and R.M. Drummond. 2019. Hibiscus acid from *Hibiscus sabdariffa* (Malvaceae) has a vasorelaxant effect on the rat aorta. Fitoterapia 134: 5–13.