

ผลของเวลาเก็บเกี่ยวและฤดูกาลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสารฟีนอลิกทั้งหมดในดอกอัญชัน

Effect of Harvest Time and Season on Antioxidant Activity, Anthocyanin and Total Phenolic Content of Butterfly Pea Flower

ธีร์ หะวานนท์¹ และเกียรติสุดา เหลืองวิลัย¹

Tee Havananda¹ and Kietsuda Leungwilai¹

บทคัดย่อ

อัญชัน (*Clitoria ternatea* L.) เป็นพืชที่มีสรรพคุณทางยาและเป็นพืชให้สีที่มีการใช้ประโยชน์ในหลายประเทศ มีการศึกษาศักยภาพและการใช้ประโยชน์ของสารทุติยภูมิที่สกัดได้จากส่วนต่าง ๆ ของอัญชันอย่างกว้างขวาง แต่การพัฒนาพันธุ์ให้มีคุณสมบัติทางพฤกษเคมีที่ดีขึ้นนั้นยังมีอยู่อย่างจำกัด การศึกษาคุณลักษณะทางพฤกษเคมีในเชื้อพันธุกรรมอัญชันจะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานสำหรับการจัดการและใช้ประโยชน์ของเชื้อพันธุกรรมในการพัฒนาพันธุ์ต่อไป คุณสมบัติทางพฤกษเคมีในพืชอาจมีความผันแปรเนื่องจากสภาพแวดล้อม ซึ่งยังมีการศึกษากันน้อยในอัญชัน จึงทำการศึกษามีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบว่าช่วงเวลาของวันและฤดูกาลในการเก็บเกี่ยวมีผลต่อคุณสมบัติทางพฤกษเคมีในดอกอัญชัน โดยศึกษากับเชื้อพันธุกรรมอัญชันจำนวน 14 หมายเลข เก็บเกี่ยวดอกใน 3 ช่วงเวลาของวัน คือ เช้า 8:00-9:00 น. กลางวัน 12:00-13:00 น. และบ่าย 16:00-17:00 น. ใน 2 ฤดู คือฤดูร้อน ระหว่างเดือนเมษายน-พฤษภาคม และฤดูฝน เดือนสิงหาคม 2560 พบว่า ช่วงเวลาของวันมีผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay) โดยดอกที่เก็บเกี่ยวในช่วงเช้ามืดมีค่า FRAP สูงที่สุด ใกล้เคียงกับช่วงบ่าย แต่มากกว่าช่วงกลางวัน พบอิทธิพลร่วมของช่วงเวลาของวันและฤดูกาลต่อฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ (DPPH assay) โดยดอกอัญชันที่เก็บเกี่ยวในช่วงบ่ายในฤดูร้อนมีค่า DPPH สูงที่สุด แตกต่างจากดอกที่เก็บเกี่ยวในช่วงกลางวันในฤดูเดียวกันที่มีค่า DPPH ต่ำที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณสารฟีนอลิกและปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในดอกอัญชันที่เก็บเกี่ยวในฤดูฝนมีมากกว่าที่เก็บเกี่ยวในฤดูร้อน

คำสำคัญ: ดอกไม้สีม่วง ช่วงเวลาของวัน เชื้อพันธุกรรม พฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

Butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.) is known for its medicinal properties and as a natural colorant in several countries. Potential and uses of several secondary metabolites extracted from the plant are widely studied; however, improvement of this species for better phytochemical properties is still limited. Phytochemical characterization of butterfly pea germplasm would provide important information for management and utilization of the germplasm for such breeding purpose. Environment may affect phytochemical properties, the matter of which has not been much studied in the species. This study aimed to investigate whether harvest time in a day and season affect phytochemical properties of butterfly pea flowers. Fourteen accessions of butterfly pea germplasm were studied. Their flowers were collected in three different times of the day, i.e., in the morning (8-9 am), in the midday (12-1 pm), and in the afternoon (4-5 pm), in summer (April and May, 2017) and rainy (August, 2017) seasons. The result showed that time in a day affected the ferric reducing antioxidant power (FRAP assay). Flower harvested in the morning had significantly higher FRAP value than those harvested in the midday. Interaction between harvest time of day and harvest season was found affecting DPPH radical scavenging assay (DPPH). The flowers collected in the afternoon in summer had the highest DPPH value, whereas those harvested in the midday in summer had the lowest value. Flowers harvested in rainy season had higher total phenolic content and total anthocyanin content than those harvested in the summer.

Keywords: purple flower, time of day, germplasm, phytochemistry, free radical scavenging activity

¹ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

*Corresponding author, Email: tee.h@ku.ac.th

คำนำ

อัญชัน (*Clitoria ternatea* L.) เป็นพืชที่ทุกส่วนถูกนำมาใช้ประโยชน์ในเชิงสมุนไพรอย่างหลากหลาย ปรากฏอยู่ในตำรายาอายุรเวท (Ayurvedic medicine) เช่น ช่วยกระตุ้นการเรียนรู้และความจำ เป็นยาคลายเครียด คลายกล้ามเนื้อ ต้านเบาหวาน ฯลฯ นอกจากนั้นยังใช้เป็นสีธรรมชาติสำหรับผสมอาหาร ให้สีน้ำเงินอมม่วงจากดอก (Mukherjee et al., 2008) ในประเทศไทย มีการใช้ประโยชน์จากดอกเป็นหลัก ทั้งเพื่อใช้สี และสกัดเป็นส่วนผสมของเครื่องสำอางต่าง ๆ และปลูกเป็นไม้ประดับด้วย ความเป็นประโยชน์ทางยาของอัญชันทำให้มีการศึกษาถึงศักยภาพ ประสิทธิภาพ และการนำไปใช้ประโยชน์ของอัญชันและสารสกัดจากอัญชันอย่างกว้างขวาง (Kamkaen and Wilkinson, 2009; Nair et al., 2015; Chusak et al., 2018) กระนั้นก็ตาม การปรับปรุงพันธุ์อัญชันเพื่อให้มีสารสำคัญสูงยังมีอยู่อย่างจำกัด (จรัญ ดิษฐไชยวงศ์ และคณะ, 2559)

อัญชันมีการกระจายพันธุ์ไปเป็นเขตร้อนทั่วโลก เป็นพืชเลื้อยพัน อายุหลายปี จัดอยู่ในวงศ์ Leguminosae มีใบประกอบแบบขนนกปลายคี่ มี 5-7 ใบย่อย ดอกเดี่ยวหรือออกเป็นคู่ มีทั้งดอกกลาและดอกช้อน ดอกกลาลักษณะแบบดอกถั่ว มี 5 กลีบ เป็นกลีบ standard 1 กลีบ ขนาดใหญ่ที่สุด กลีบ wing 2 กลีบ อยู่ด้านข้างถัดเข้ามาจากกลีบ standard และกลีบ keel 2 กลีบ ขนาดเล็กที่สุด เชื่อมติดกันอยู่ชั้นในติดกับวงเกสรเพศผู้ที่มีเกสรเพศผู้จำนวน 10 อัน 9 อันเชื่อมติดกันที่โคนก้านชู อีก 1 อันอยู่อิสระ ดอกช้อน มี 5 กลีบ เรียงเวียนกัน มีรูปร่างลักษณะคล้ายกลีบ standard ในดอกกลา มีขนาดใกล้เคียงกันทั้ง 5 กลีบ เกสรเพศผู้ 10 อัน ไม่เชื่อมติดกัน อัญชันส่วนใหญ่มีกลีบดอกสีม่วงเข้มหรือน้ำเงินเข้มอมม่วง และพบที่มีดอกสีม่วง สีม่วงอ่อน สีฟ้า และสีขาวด้วย ผลอัญชันเป็นฝักแบน สีเขียว เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนหรือเข้ม แห้ง แตกดีดเมล็ดออก มีประมาณ 8-11 เมล็ด/ฝัก (Fantz, 1977; Cook et al., 2005)

ส่วนต่าง ๆ ของอัญชันมีสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) อยู่หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารในกลุ่มฟีนอล เช่น แอนโทไซยานิน ที่พบในดอกอัญชัน ยกเว้นที่มีกลีบดอกสีขาว (Terahara et al., 1996; Kazuma et al., 2003) แอนโทไซยานินเป็นสารที่ให้สีแดง น้ำเงิน หรือม่วงกับส่วนกลีบดอก ผล และลำต้นพืช อีกทั้งยังมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Mlodzinska, 2009) นอกจากนี้ยังมีสารในกลุ่มฟีนอลิกอีกหลายชนิด ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเช่นกัน (Mukherjee et al., 2008) สารประกอบฟีนอลิกในพืชมักจะเกิดขึ้นเพื่อตอบสนองต่อความเครียดทางสภาพแวดล้อมต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิต่ำ ความเข้มแสงสูง สภาพขาดธาตุอาหารในดิน เป็นต้น (Lattanzio, 2013) การที่อัญชันมีการสะสมสารประกอบฟีนอลิกที่แตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ (Kazuma et al., 2003; Makasana et al., 2016) อาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้อัญชันสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน และมีการกระจายพันธุ์อาศัยในพื้นที่ต่าง ๆ กันทั่วโลก

ฤดูกาลและช่วงเวลาของวันอาจส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติทางพฤกษเคมีในพืช สารสกัดจากส่วนเหนือดินของ clary sage (*Salvia sclarea*) ที่ถูกเก็บเกี่ยวจากช่วงเวลาของวันและปีที่ต่างกัน มีปริมาณฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน (Tulukcu et al., 2009) ปริมาณโพลีฟีนอลรวมและแอนโทไซยานินของกลีบกุหลาบสดที่เก็บเกี่ยวต่างฤดูกาล (ปี) กัน มีค่าแตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นเพราะความแตกต่างของสภาพแวดล้อมในการปลูกและการเจริญเติบโตของกุหลาบและระยะสุ่มบูรณ์ของกลีบดอก (Cendrowski et al., 2009) ในลาเวนเดอร์ ช่วงเวลาของวันที่ทำการเก็บเกี่ยว มีผลต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในดอก และมีผลต่อกิจกรรมและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของทั้งใบ ต้น และดอก (Yalcin et al., 2017) ดังนั้นนอกเหนือจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว ความหลากหลายและความผันแปรของคุณสมบัติทางพฤกษเคมีเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับการศึกษาและประเมินเชื้อพันธุกรรม เพื่อการจัดการ การเลือกใช้ประโยชน์ และการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์อัญชัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาพันธุ์เพื่อให้มีคุณสมบัติทางพฤกษเคมีที่ดีขึ้น จึงทำการศึกษาโดยใช้วิธีอุปประสงค์เพื่อให้ทราบช่วงเวลาของวันและฤดูกาลในการเก็บเกี่ยวอัญชันมีผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในดอกอัญชันของเชื้อพันธุกรรมอัญชันที่รวบรวมไว้อย่างไร

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชทดลอง

อัญชันที่ใช้ในการศึกษานี้ จำนวน 14 หมายเลข จาก 9 ประเทศ (Table 1) เป็นส่วนหนึ่งของชุดเชื้อพันธุกรรมอัญชันรวบรวมของ USDA-Agricultural Research Service (ARS) National Plant Germplasm System (NPGS) ที่ถูกเก็บรักษาและฟื้นฟูที่ Plant Genetic Resources Conservation Unit, Griffin, Georgia, USA (PGRCU) นำเมล็ดที่ได้รับจาก PGRCU มาขัดด้วยกระดาษทราย แล้วแช่น้ำไว้ประมาณ 24 ชม. ก่อนเพาะในถาดหลุมโดยใช้พีทมอสเป็นวัสดุเพาะกล้า หลังจากเพาะเมล็ด 1-3 สัปดาห์ ย้ายกล้าปลูกลงในกระถางขนาด 15 ซม. โดยใช้ดินผสมกับ แกลบดิบ และถ่านแกลบ ในอัตราส่วนเท่า ๆ กัน เป็นวัสดุปลูก รดน้ำทุกวันเว้นวัน หลังจากนั้น 2 เดือน ย้ายต้นอัญชันลงปลูกในวงซีเมนต์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 80 ซม. ลึก 50 ซม. มีดินร่วนเป็นวัสดุปลูก ให้น้ำสัปดาห์ละ 3 ครั้ง ปลูกและดูแลรักษา ณ แปลงทดลอง 1 ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม เก็บดอกอัญชันสำหรับวิเคราะห์ลักษณะทางพฤกษเคมี 3 ช่วงเวลาของวัน คือ 1) ช่วงเช้า 8:00-9:00 น. 2) ช่วงกลางวัน 12:00-13:00 น. และ 3) ช่วงบ่าย 16:00-17:00 น.

ใน 2 ฤดูกาล คือ 1) ฤดูร้อน อุณหภูมิเฉลี่ย สูงสุด/ต่ำสุด 35.1/25.7°C เก็บเกี่ยวระหว่างเดือน เมษายน-พฤษภาคม 2560 และ 2) ฤดูฝน อุณหภูมิเฉลี่ย สูงสุด/ต่ำสุด 34.3/24.9°C เก็บเกี่ยวในเดือนสิงหาคม 2560

Table 1 Butterfly pea germplasm and their origin and petal color included in this study.

Accession no. ^{1/}	Collection location	Petal color
PI 164250	Brazil, Sao Paulo	Dark purplish blue
PI 209315	Virgin Islands (U.S.)	Dark purplish blue
PI 209592	Cuba	Dark blue
PI 226265	Kenya	Light purplish blue
PI 227163	Sudan	Dark purplish blue
PI 258379	Taiwan	Purple
PI 283232	Sierra Leone	Dark purplish blue
PI 283235	Kenya	Dark purplish blue
PI 283236	Cuba	Dark purplish blue
PI 311506	Brazil, Ceara	Dark purplish blue
PI 322365	Brazil, Sao Paulo	Dark purplish blue
PI 322366	Brazil, Sao Paulo	Dark purplish blue
PI 451721	Mexico, Baja Norte	Dark purplish blue
PI 538311	Dominican Republic	Dark blue

^{1/} PI number and collection location are according to ARS-USDA NPGS (<https://npgsweb.arsgrin.gov/gringlobal/search.aspx>).

การวิเคราะห์ลักษณะทางพฤกษเคมี

กิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม

วิเคราะห์กิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม โดยวิธีการ The Ferric-Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay (Benzie and Strain, 1996) ซึ่งดัดแปลงจาก Benzie and Strain (1996) ดังนี้ เตรียม stock solution 300 mM acetate buffer ($3.1 \text{ g C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ และ $16 \text{ ml C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) ปรับ pH เท่ากับ 3.6 ต่อมารวมสารละลาย TPTZ (2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine) ความเข้มข้น 10 mM ใน HCl ความเข้มข้น 40 mM และสารละลาย $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 20 mM โดยเตรียม working solution (Ferric Reducing Ability of Plasma; FRAP) ใช้ acetate buffer ปริมาตร 25 ml สารละลาย TPTZ ปริมาตร 2.5 ml และสารละลาย $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ปริมาตร 2.5 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C โดยใช้เครื่อง incubator (polar 1000C, Contherm, New Zealand) เริ่มการวิเคราะห์โดยใช้น้ำคั้นอัญชันปริมาตร 100 μl ทำปฏิกิริยากับสารละลาย 2,700 μl ของสาร FRAP ที่มีเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตัวอย่างจะเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำเงินเข้ม นำไปวัดสารสี (ferrous tripyridyltriazine complex) ที่เกิดขึ้นโดยใช้ spectrophotometer (Spectronic 20 Genesys, Spectronic Instruments, U.S.A.) ที่ความยาวคลื่น 593 nm เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้ Trolox ที่ความเข้มข้น 0.08-2.5 mg mL^{-1} หรือ 0.3125-10.00 mM ในหน่วย Trolox equivalent antioxidant capacity หรือ TEAC; $\text{mg TEAC g}^{-1} \text{FW}$

การทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH)

โดยดัดแปลงวิธีการของ Brand-Williams et al. (1995) ดังนี้ เตรียมน้ำคั้นดอกอัญชัน ปริมาตร 100 μL ผสมกับสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) เข้มข้น 0.004% ในเมทานอล ปริมาตร 1900 μL ผสม และนำไปเก็บในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer (Spectronic 20 Genesys, Spectronic Instruments, USA) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ blank (ซึ่งไม่เติมสารละลาย DPPH) และค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุมที่ไม่เติมน้ำคั้นดอกอัญชัน ซึ่งทำการทดลองในทำนองเดียวกัน สำหรับสารมาตรฐานเตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้ Trolox ที่ความเข้มข้น 0.08-2.5 mg mL^{-1} หรือ 0.3125-10.00 mM ในหน่วย Trolox Equivalent Antioxidant Capacity หรือ TEAC; $\text{mg TEAC g}^{-1} \text{FW}$

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด

โดยดัดแปลงวิธีของ Wrolstad (1976) และ Lee et al. (2005) ดังนี้ นำน้ำคั้นดอกอัญชันแบ่งเป็น 2 หลอด ปริมาตรหลอดละ 1,000 μl โดยหลอดแรกนำไปผสมกับสารละลายเจือจาง 5 เท่า ด้วยบัฟเฟอร์ pH 1.0 ของ 0.2 N KCl และ 0.2 N HCl ปริมาตร 2,900 μl ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที ส่วนหลอดที่สองนำไปผสมกับบัฟเฟอร์ pH 4.5 ที่ประกอบด้วย 1 M CH_3COONa ใน 1 N HCl ปริมาตร 2,900 μl ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่า pH 2 ระดับคือ pH 1.0 และ 4.5 โดยวัดการดูดกลืนแสง (A) ที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 นาโนเมตร แล้วคำนวณปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดจากสูตร

$$\text{การดูดกลืนแสง (A)} = [(A_{520} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}4.5}]$$

$$\text{ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (mg L}^{-1}\text{)} = A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 10^3 / \epsilon \times L$$

เมื่อ A = absorbance, MW = molecular weight of delphinidin-3-glucoside equivalent = 500.8 g mol^{-1} , DF = dilution factor, ϵ = molar extinction coefficient of delphinidin-3-glucoside = 29,000 $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$, L = length path of the cuvette (cm)

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดโดยใช้ Folin-Ciocalteu method (Swain and Hillis, 1959) ซึ่งดัดแปลงของ Swain and Hillis (1959) และ Kaisoon et al. (2011) ดังนี้ ใช้น้ำคั้นดอกอัญชันปริมาตร 100 μl เติม Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 0.17 M (ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า) ปริมาตร 2,250 μl ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex (Vortex-2 genie, U.S.A.) ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 5 นาที จากนั้นเติม Na_2CO_3 ความเข้มข้น 0.12 M ปริมาตร 2,250 μl ผสมให้เข้ากัน นำสารละลายวางไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง โดยเขย่าทุก ๆ 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 nm โดยใช้เครื่อง spectrophotometer (Spectronic 20 Genesys, Spectronic Instruments, U.S.A.) ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจะแสดงเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid ในหน่วย mg 100 g^{-1} ของน้ำหนักสด

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Randomized Complete Block Design (Factorial in RCBD) มี 2 ปัจจัย คือ ช่วงเวลาของวัน มี 3 ช่วงเวลา และฤดูกาล มี 2 ฤดูกาล ในหน่วยทดลอง 14 บล็อก (accession) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey's HSD test ที่ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

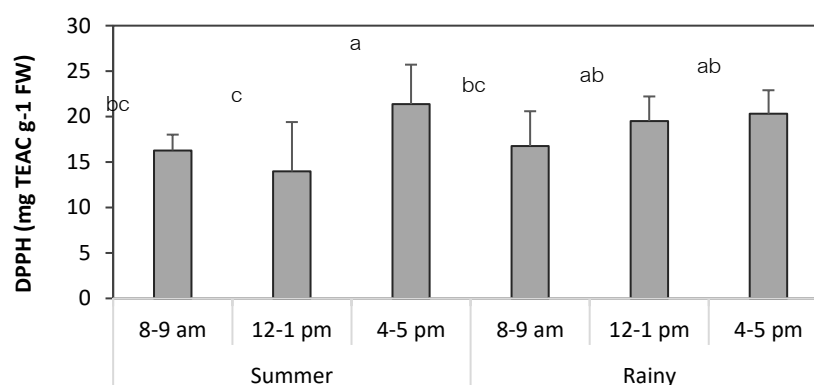
ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการวิเคราะห์ลักษณะทางพฤกษเคมีของดอกอัญชันจากเชื้อพันธุ์กรรม 14 หมายเลข พบว่า กิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวมที่ศึกษาด้วยวิธี FRAP ในดอกอัญชันที่เก็บเกี่ยวในทั้ง 2 ฤดูกาล มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ดอกที่เก็บเกี่ยวต่างช่วงเวลาของวัน มีค่า FRAP ที่แตกต่างกัน โดยการเก็บเกี่ยวในช่วงเช้าให้ค่า FRAP สูงที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการเก็บเกี่ยวในช่วงกลางวัน และใกล้เคียงกับช่วงบ่าย (Table 2) ในขณะเดียวกันพบว่า ดอกอัญชันของเชื้อพันธุ์กรรมที่ศึกษา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยรวมที่ศึกษาด้วยวิธี DPPH ที่แตกต่างกัน เป็นผลร่วมจากช่วงเวลาของวันและฤดูกาลที่เก็บเกี่ยว (Table 2) โดยดอกที่เก็บเกี่ยวในช่วงบ่ายในฤดูร้อน มีค่า DPPH เฉลี่ยสูงที่สุด คือ 21.37 $\text{mg TEAC g}^{-1} \text{FW}$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากค่า DPPH เฉลี่ย ในดอกที่เก็บเกี่ยวในช่วงกลางวัน ในฤดูร้อน ที่มีค่าน้อยที่สุด และดอกที่เก็บเกี่ยวในช่วงเช้าของทั้งฤดูร้อนและฤดูฝน มีค่า 13.97, 16.28 และ 16.25 $\text{mg TEAC g}^{-1} \text{FW}$ ตามลำดับ ดอกที่เก็บเกี่ยวในช่วงกลางวันและบ่าย ในฤดูฝน มีค่า DPPH เฉลี่ย 19.50 และ 20.31 $\text{mg TEAC g}^{-1} \text{FW}$ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าในดอกที่เก็บเกี่ยวในช่วงกลางวัน ในฤดูร้อน อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน (Figure 1) ปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของพืชอาจมาจากพันธุ์กรรม สภาพแวดล้อม การเก็บรักษาหลังเก็บเกี่ยว ซึ่งมีผลต่อการสร้าง สะสม หรือการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Lachman et al., 2009; Li et al., 2012) ความผันแปรของเชื้อพันธุ์กรรมที่ไม่มีนัยสำคัญต่อค่า FRAP และ DPPH ในการศึกษาครั้งนี้ อาจชี้ให้เห็นว่าพันธุ์กรรมไม่ใช่ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ แม้ว่าเชื้อพันธุ์กรรมจะมีที่มาจากหลายประเทศ ด้วยการปลูกดูแลรักษาและการปฏิบัติหลังเก็บเกี่ยวที่เหมือนกัน ปัจจัยที่มีผลต่อค่า FRAP และ DPPH จึงน่าจะเป็นที่สภาพแวดล้อมในช่วงเวลาหรือฤดูกาลเก็บเกี่ยวที่ต่างกัน

Table 2 Antioxidant activities (FRAP and DPPH), total anthocyanin content, total phenolic content in butterfly pea flowers harvested at different times of day and seasons.

Factor	Treatment	FRAP ^{1/}	DPPH	TAC ^{1/}	TPC ^{1/}
		(mg TEAC g ⁻¹ FW)	(mg TEAC g ⁻¹ FW)	(mg 100 g ⁻¹ FW)	(mg GAE g ⁻¹ FW)
Harvest time of the day	8-9 am	28.29a	16.51	17.89a	41.79a
	12-1 pm	18.47b	17.89	22.87a	40.37a
	4-5 pm	23.32ab	20.84	19.77a	43.48a
Season	Summer	21.67a	17.20	11.69b	30.26b
	Rainy	24.85a	18.85	28.12a	55.00a
Source of variation		P-value			
Germplasm (block)		0.070	0.394	0.000	0.106
Harvest time of the day (A)		0.017	0.000	0.532	0.710
Season (B)		0.261	0.041	0.000	0.000
A x B		0.736	0.003	0.292	0.131

^{1/} Means in the same column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Tukey's HSD test.

**Figure 1** The DPPH scavenging activity (DPPH assay) in butterfly pea flowers harvested at different times of day and seasons. DPPH values with the same letter above the bars are not significantly different at 5% level by Tukey's HSD test.

สำหรับปริมาณแอนโทไซยานินรวม ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่ให้สีแดง น้ำเงิน หรือม่วงกับส่วนกลีบดอก ผล และลำต้นพืช (Mlodzinska, 2009) รวมทั้งในดอกอัญชัน (Terahara et al., 1996; Kazuma et al., 2003) พบว่าดอกอัญชันของเชื้อพันธุกรรมที่ศึกษาที่เก็บเกี่ยวในฤดูฝน มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงกว่าดอกที่เก็บเกี่ยวในฤดูแล้งอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างดอกที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาของวันที่ต่างกัน และไม่พบอิทธิพลร่วมของช่วงเวลาของวันและฤดูกาลที่เก็บเกี่ยว (Table 2) มีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืช ความแตกต่างของสภาพภูมิอากาศ เช่น อุณหภูมิ อาจมีผลต่อปริมาณแอนโทไซยานิน (Mlodzinska, 2009) ในช่วงเดือนพฤษภาคมและเดือนสิงหาคม 2560 อุณหภูมิเฉลี่ย สูงสุด/ต่ำสุด วัดได้ที่สถานีตรวจอากาศ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน เท่ากับ 35.1/25.7°C และ 34.3/24.9°C ตามลำดับ ปริมาณแอนโทไซยานิน (cyanidin และ pelargonidin) ในดอก morning glory มีมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิ 3 วันก่อนดอกบาน และความเข้มของแสง ultraviolet 5 วันก่อนดอกบานมากขึ้น (Lu et al., 2009) ในเนื้อหุ้มเมล็ดของทับทิม การสะสมของแอนโทไซยานินต่างชนิดกัน ตอบสนองต่ออุณหภูมิตามธรรมชาติต่างกัน โดยทั่วไป cyanidins จะเป็นแอนโทไซยานินที่มีปริมาณมากที่สุด แต่ในช่วงฤดูหนาวกลับพบว่า เนื้อหุ้มเมล็ดของทับทิมจะมีอัตราการผลิต delphinidins สูงกว่า cyanidins (Borochoy-Neori et al., 2011) แอนโทไซยานินที่พบในดอกอัญชัน ได้แก่ ternatins ซึ่งเป็นแอนโทไซยานินหลักที่ให้สีน้ำเงินในดอกอัญชัน และ delphinidins ซึ่งพบในดอกสีฟ้าอ่อน (Kazuma et al., 2003) ยังไม่ทราบแน่ชัดว่า ternatins ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิหรือไม่ อย่างไร ปริมาณแอนโทไซยานินรวมในดอกอัญชัน ซึ่งประกอบด้วยชนิดต่าง ๆ ของ

แอนโทไซยานิน 2 กลุ่มข้างต้น เป็นสัดส่วนกับเจดสีของกลีบดอกที่แตกต่างกันในอัญชันสายพันธุ์ต่าง ๆ (Kazuma et al., 2003) เชื้อพันธุ์กรรมอัญชันที่ศึกษา ส่วนใหญ่มีดอกสีน้ำเงินเข้มอมม่วง แต่มีบางหมายเลขที่มีเจดสีต่างไป เช่น สีฟ้าอ่อนอมม่วง และสีม่วง (Table 1) จึงทำให้พบความผันแปรของเชื้อพันธุ์กรรมที่ศึกษาในการวิเคราะห์ความแปรปรวน

นอกจากฤดูกาลในการเก็บเกี่ยวจะมีผลต่อปริมาณแอนโทไซยานินในดอกอัญชันที่ศึกษาแล้ว ยังมีผลต่อปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดด้วย โดยพบว่าดอกอัญชันที่เก็บเกี่ยวในฤดูฝน มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเฉลี่ยสูงกว่าที่พบในดอกที่เก็บเกี่ยวในฤดูร้อนอย่างมีนัยสำคัญ โดยไม่พบความแตกต่างระหว่างดอกที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาของวันที่ต่างกัน และไม่พบอิทธิพลร่วมของช่วงเวลาของวันและฤดูกาลที่เก็บเกี่ยว (Table 2) ปัจจัยที่มีผลต่อความผันแปรของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่พบนี้ อาจจะเป็นไปในทำนองเดียวกับปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

สรุปผลการศึกษา

ลักษณะทางพฤกษเคมีต่าง ๆ ในดอกของเชื้อพันธุ์กรรมอัญชันที่ศึกษา มีความผันแปรได้จากปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับเวลาเก็บเกี่ยว ช่วงเวลาของวันมีผลต่อกิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (FRAP) ในขณะที่ฤดูกาลมีผลต่อปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในดอกอัญชัน และทั้งสองปัจจัยมีอิทธิพลร่วมต่อฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ (DPPH) โดยรวมดอกอัญชันที่ศึกษามีคุณสมบัติทางพฤกษเคมีต่าง ๆ เหล่านี้ที่ดีในช่วงบ่ายของวันในฤดูฝน การประเมินลักษณะเหล่านี้เพื่อเป็นข้อมูลของเชื้อพันธุ์กรรมอัญชัน จึงควรทำในช่วงเวลาเดียวกันเพื่อลดความผันแปรที่อาจจะเกิดจากปัจจัยข้างต้นนี้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณกมลวรรณ แสงสร้อย คุณปัทมวรรณ อนุสรพรพงศ์ และคุณศุภพจี จันทร์เมือง สำหรับความช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการ และขอขอบคุณ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน สำหรับสถานที่ดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- จรัญ ดิษฐไวยวงศ์, เสริม แฉ่มจำรูญ, สุภาภรณ์ สาขาคี, ศรีสุดา ใหทอง และมัลลิกา รักธรรม. 2559. การคัดเลือกและเปรียบเทียบพันธุ์อัญชัน. กรมวิชาการเกษตร. <http://www.doa.go.th/research/showthread.php?tid=2361> (28 พฤศจิกายน 2561).
- Benzie, I.F.F. and J.J. Strain. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem* 239: 70-76.
- Borochov-Neori, H., Judeinstein, S., Harari, M., Bar-Ya'akov, I., Patil, B.S., Lurie, S., and D. Holland. 2011. Climate effects on anthocyanin accumulation and composition in the pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit arils. *J. Agric. Food Chem* 59: 5325-5334.
- Brand-Williams, W., Cuvelier M.E.m and C. Berset. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28: 25-30.
- Cendrowski, A., Scibisz, I., Mitek, M., Kieliszek, M., and J. Kolniak-Ostek. 2017. Profile of the phenolic compounds of *Rosa rugosa* Petals. *J. of Food Qual.* <https://doi.org/10.1155/2017/7941347> (September 26, 2018).
- Chusak, C., Thilavech, T., Henry, C.J., and S. Adisakwattana. 2018. Acute effect of *Clitoria ternatea* flower beverage on glycemic response and antioxidant capacity in healthy subjects: a randomized crossover trial. *BMC Complement Altern. Med.* 18: 6.
- Cook, B.G., Pengelly, B.C., Brown, S.D., Donnelly, J.L., Eagles, D.A., Franco, M.A., Hanson, J., Mullen, B.F., Partridge, I.J., Peters, M., and R. Schultze-Kraft. 2005. Tropical Forages: an interactive selection tool, [CD-ROM], CSIRO, DPI&F(Qld), CIAT and ILRI, Brisbane, Australia. <http://www.tropicalforages.info>. (September 26, 2018).
- Fantz, P.R. 1977. A monograph of the genus *Clitoria* (Leguminosae: Glycineae) (Doctoral dissertation). <https://archive.org/stream/monographofgenus00fant#page/n0/mode/2up> (September 26, 2018).
- Kaisoon, O., Siriamornpun, S., Weerapreeyakul, N., and N. Meeso. 2011. Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand. *J. Funct. Foods* 3: 88-99.
- Kamkaen, N., and J.M. Wilkinson. 2009. The Antioxidant activity of *Clitoria ternatea* flower petal extracts and eye gel. *Phytother. Res.* 23: 1624-1625.
- Kazuma K., Noda, N., and M. Suzuki. 2003. Flavonoid composition related to petal color in different lines of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry* 64: 1133-1139.
- Lachman, J., Šulc, M., Faitová, K., and V. Pivec. 2009. Major factors influencing antioxidant contents and antioxidant activity in grapes and wines. *Int. J. Wine Res.* 1: 101-121.

- Lattanzio, V. 2013. Phenolic compounds: Introduction. pp. 1543-1580. In K.G. Ramawat and J-M. Mérillon, eds. *Natural Products*. Berlin: Springer-Verlag.
- Lee, J., Durst, R.W., and R.E. Wrolstad. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *J. AOAC Int.* 88: 1269-1278.
- Li, H., Tsao, R., and Z. Deng. 2012. Factors affecting the antioxidant potential and health benefits of plant foods. *Can. J. Plant Sci.* 92: 1101-1111.
- Lu, Y., Du, J., Tang, J., Wang, F., Zhang, J., Huang, J., Liang, W., and L. Wang. 2009. Environmental regulation of floral anthocyanin synthesis in *Ipomoea purpurea*. *Molecular Ecology* 18: 3857-3871.
- Makasana, J., Pillai, V., Sharma, A., Dholakiya, B.Z., Gajbhiye, N.A., and R. Saravanan. 2016. Effect of seed treatment on germination and flavonoids diversity in accessions of butterfly pea (*Clitoria ternatea*). *Indian J. Agr. Sci.* 86(12): 1553-1558.
- Mlodzinska, E. 2009. Survey of plant pigments: Molecular and environmental determinants of plant colors. *Acta Biol. Cracov. Bot.* 51: 7-16.
- Mukherjee, P.K., Kumar, V., Kumar, N.S., and M. Heinrich. 2008. The Ayurvedic medicine *Clitoria ternatea* - From traditional use to scientific assessment. *J. Ethnopharmacol.* 120: 291-301.
- Nair, V., Bang, W.Y., Schreckinger, E., Andarwulan, N. and L. Cisneros-Zevallos. 2015. Protective role of ternatin anthocyanins and quercetin glycosides from butterfly pea (*Clitoria ternatea* Leguminosae) blue flower petals against lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in macrophage cells. *J. Agric. Food Chem.* 63: 6355-6365.
- Swain, T. and W.E. Hillis. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. - The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* 10(1): 63-68.
- Terahara, N., Oda, M., Matsui, T., Osajima, Y., Saito, N., Toki, K., and T. Honda. 1996. Five new anthocyanins, ternatins A3, B4, B3, B2, and D2, from *Clitoria ternatea* flowers. *J. Nat. Prod.* 59: 139-144.
- Tulukcu, E., Sagdic, O., Albayrak, S., Ekici, L., and H. Yetim. 2009. Effect of collection time on biological activity of Clary sage (*Salvia sclarea*). *J. Appl. Bot. Food Qual.* 83(1): 44-49.
- Wrolstad, R.E. 1976. *Color and pigment analyses in fruit products*. Stations Bull. pp. 621. Agricultural Experiment Station. Corvallis: Oregon State University.
- Yalcin, H., Kavuncuoğlu, H., Tulukcu, E., and Z. Eroğlu. 2017. The effect of harvest time on the bioactive properties and volatile components of lavender (*Lavandula officinalis*). *Qual. Assur. Saf. Crop.* 9: 275-283.

วันรับบทความ (Received date) : 15 พ.ย. 61

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 28 ม.ค. 62

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 11 มี.ย. 62