Research Article

Received: January 19, 2018; Accepted: February 2, 2018

การเปลี่ยนแปลงของสารทุติยภูมิในระหว่างการพัฒนาของกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Changes in Secondary Metabolites of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) During Calyx Development

ภาณุมาศ ฤทธิไชย*, เยาวพา จิระเกียรติกุล และนิชาภา บุญบริวารกุล

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

อรุณพร อิฐรัตน์

สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Panumart Rithichai*, Yaowapha Jirakiattikul and Nichapa Bunborrivankul

Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Arunporn Itharat

Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.) เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่นำกลีบเลี้ยงมาใช้ในการรักษาโรคหลายชนิด ในการหาระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อเก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยงเป็นสมุนไพร จึงได้ศึกษาระยะการพัฒนาของกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงและการเปลี่ยนแปลงของสารทุติยภูมิในระหว่างการพัฒนา โดยปลูกกระเจี๊ยบแดง 2 accession ที่มีกลีบเลี้ยงสีแดงเข้ม (HS005) และกลีบเลี้ยงสีส้มแดง (HS013) ผูกดอกบานทุกวัน เก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยงเมื่ออายุ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 วันหลังดอกบาน พบว่ากลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงทั้ง 2 accession มีพัฒนาการอย่างรวดเร็วในช่วงอายุ 5 ถึง 20 วันหลังดอกบาน หลังจากนั้นมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย สารทุติยภูมิในกระเจี๊ยบแดง HS005 มีปริมาณสูงกว่า HS013 แต่การเปลี่ยนแปลงของสารทุติยภูมิในระหว่างการพัฒนาของกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงทั้ง 2 accession มีรูปแบบคล้ายกัน โดยปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดมีค่าสูงที่อายุ 5 วันหลังดอกบาน หลังจากนั้นปริมาณค่อย ๆ ลดลง สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และสารทุติยภูมิทั้ง 2 ชนิดนี้มีปริมาณสูงสุดที่อายุ 30 วันหลังดอกบาน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** panumartss@hotmail.com

doi: 10.14456/tstj.2019.8

DPPH พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในแต่ละอายุของการเก็บเกี่ยว จากผลการทดลองพบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงเพื่อทำยาสมุนไพร คือ อายุ 30 วันหลังดอกบาน

คำสำคัญ : กลีบเลี้ยง; กระเจี๊ยบแดง; แอนโทไซยานิน; ฟีนอลิก; ฟลาโวนอยด์; ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

Abstract

Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) is one of the medicinal plants in which the calyces are used for the treatment of various diseases. In order to determine the suitable harvesting time for medicinal purposes, calyx development and changes in secondary metabolites of the calyx during development were examined. Two accessions of dark red and orange-red calyx roselle, HS005 and HS013, respectively, were cultivated. The full bloomed flowers were tagged daily and the calyces were harvested at 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 days after flowering (DAF). Results showed that calyx of both accessions rapidly developed during 5 to 20 DAF then only slight changes occurred. The contents of secondary metabolites in HS005 were higher than those in HS013, however, secondary metabolite changes during calyx development exhibited a similar pattern in both accessions. Total anthocyanin content was high at 5 DAF then gradually declined. The contents of total phenolic and total flavonoid continuously increased and the highest contents of both secondary metabolites were obtained at 30 DAF. DPPH radical scavenging capacities were not significantly different among the treatments. Based on these results, the appropriate time to harvest calyx for medicinal used was 30 DAF.

Keywords: calyx; roselle; anthocyanin; phenolic; flavonoid; DPPH radical scavenging capacity

1. บทนำ

กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.) เป็นพืชสมุนไพรในวงศ์ Malvaceae สามารถใช้ประโยชน์ได้ทั้งส่วนของกลีบเลี้ยง เมล็ด และใบ โดยส่วนของกระเจี๊ยบแดงที่มีการนำมาใช้ประโยชน์มากที่สุด คือ กลีบเลี้ยง เพราะมีสมบัติทางยาสูง เช่น ลดไขมันในเลือด ลดเบาหวาน มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ต้านอนุมูลอิสระ [1-3] สารทุติยภูมิสำคัญที่พบในกลีบเลี้ยง คือ แอนโทไซยานิน สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ อีกทั้งยังพบกิจกรรมการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดกลีบเลี้ยงทั้งที่สกัดด้วยเอธานอลและน้ำรวมถึงสารสกัดที่ได้จากเมล็ดและใบด้วย [4-6] การปลูกกระเจี๊ยบแดงมักใช้ส่วนของเมล็ดในการขยายพันธุ์ และยังเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนชื้นหรือเขตอบอุ่น สามารถเก็บเกี่ยวได้ในช่วง 100-160 วันหลังปลูก หรือเมื่อกลีบเลี้ยงมีการเจริญเติบโตเต็มที่อายุประมาณ 15-20 วันหลังดอกบาน หรือเก็บเกี่ยวตามการสุกแก่ของเมล็ด ซึ่งอายุที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวเมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบแดงคือที่อายุ 39 วันหลังดอกบาน [7] การสะสมสารทุติยภูมิในพืช นอกจากจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ สภาพพื้นที่เพาะปลูก การจัดการ การดูแลรักษา และการดูแลรักษาหลังการเก็บเกี่ยวแล้ว

ระยะการสุกแก่หรือในระหว่างการพัฒนาของดอกหรือผล ยังมีผลต่อปริมาณสารทุติยภูมิอีกด้วย เช่น การเก็บเกี่ยวดอกพระจันทร์ที่ขนาดต่าง ๆ ในระยะก่อนดอกบาน พบว่าดอกตูมที่มีความยาว 12 และ 14 ซม. มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าดอกตูมที่มีขนาดเล็ก [8] กล้วยเล็บมือนางในระยะสุกงอม มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์สูงกว่าในระยะสุกและระยะดิบ [9] สำหรับกระเจี๊ยบแดงพันธุ์ที่มีกลีบเลี้ยงสีแดง มีแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลิกสูงในระยะดอกบานและอายุ 3 วันหลังดอกบาน แต่มีปริมาณลดลงเมื่อกลีบเลี้ยงมีอายุมากขึ้น ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่าเพิ่มมากขึ้นตามการแก่ของกลีบเลี้ยง [10] อย่างไรก็ตาม รายงานเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารทุติยภูมิของกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงในระหว่างการพัฒนายังมีข้อมูลค่อนข้างน้อย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมีการศึกษาพัฒนาการของกลีบเลี้ยง การเปลี่ยนแปลงของสารทุติยภูมิและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกลีบเลี้ยงที่อายุต่าง ๆ หลังดอกบาน โดยศึกษาในกระเจี๊ยบแดงที่มีกลีบเลี้ยงสีแดงเข้มและกลีบเลี้ยงสีส้มแดง เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงสำหรับทำเป็นสมุนไพรต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

ปลูกกระเจี๊ยบแดง 2 accession คือ HS005 กลีบเลี้ยงสีแดงเข้ม และ HS013 กลีบเลี้ยงสีส้มแดง โดยเพาะเมล็ดในวันที่ 15 สิงหาคม พ.ศ. 2558 ในถาดเพาะที่มีวัสดุปลูกเป็นดินผสมและขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร เมื่อต้นกล้าอายุ 7 วันหลังเพาะเมล็ด ย้ายปลูกในแปลงที่คลุมด้วย poly ethylene film แปลงขนาดกว้าง 0.8 เมตร ยาว 9 เมตร ในแต่ละแปลงปลูก 1 แถว ระยะห่างระหว่างต้น 0.8 เมตร ปลูกแปลงละ 10 ต้น ให้น้ำทุกวัน และลดการให้น้ำในช่วงหลังจากติดฝัก โดยให้วันเว้นวัน การให้ปุ๋ย ใส่ปุ๋ยคอกรองพื้นอัตรา 100 กิโลกรัมต่อแปลง เมื่ออายุ 7 วันหลังย้ายปลูก ให้ปุ๋ยยูเรียอัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ปริมาณ 0.5 ลิตรต่อต้น เมื่ออายุ 30 วันหลังย้ายปลูก ให้ปุ๋ยสูตร 16-16-16 อัตรา 10 กรัมต่อต้น รอบทรงพุ่ม และหลังจากนั้นทุก ๆ 30 วัน จนถึงอายุ 120 วันหลังย้ายปลูก กำจัดวัชพืชทุกครั้งหลังใส่ปุ๋ย ป้องกันและกำจัดศัตรูพืชตามการระบาดของโรคและแมลง และเก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยงที่อายุ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 วันหลังดอกบาน

การบันทึกข้อมูล

2.1 พัฒนาการของกลีบเลี้ยง บันทึกความกว้าง ความยาว และความหนากลีบเลี้ยง โดยเฉลี่ย 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ตัวอย่าง รวมทั้งบันทึกน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของกลีบเลี้ยง โดยเฉลี่ย 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัวอย่าง การบันทึกน้ำหนักแห้ง นำกลีบเลี้ยงไปอบที่อุณหภูมิ 50 ˚C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารทุติยภูมิจากกลีบเลี้ยงในแต่ละระยะ โดยมีวิธีการดังนี้

การเตรียมสารสกัดตัวอย่างจากกลีบเลี้ยง ดัดแปลงจากวิธีของ Chumsri และคณะ [11] โดยนำกลีบเลี้ยงอบแห้งมาจำนวน 10 g เติมน้ำกลั่นอัตราส่วน 1 : 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำมาต้มที่อุณหภูมิ 60 ˚C นาน 30 นาที จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง สกัดซ้ำอีกครั้งโดยใช้ตัวทำละลายและปริมาตรเหมือนเดิม นำสารสกัดที่ได้มาต้มระเหยตัวทำละลายออกนาน 30 นาที และทำให้แห้งด้วยวิธี vacuum dry เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะแห้ง จากนั้นนำมาบดเป็นผงด้วยโกร่งบดยา นำสารสกัดที่ได้มาหาปริมาณสารทุติยภูมิ ดังนี้

2.2.1 แอนโทไซยานินทั้งหมด วิเคราะห์ด้วยวิธี pH differential โดยดัดแปลงจากวิธีของ Lee

และคณะ [12] นำสารสกัดกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงมาละลายด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml แบ่งสารละลายเป็น 2 หลอด หลอดทดลองที่ 1 ปิเปตสารละลายมา 2 ml เติมสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 (0.025 M potassium chloride) ปริมาตร 10 ml และหลอดที่ 2 ปิเปตสารละลายมา 2 ml เติมสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 (0.4 M sodium acetate) ปริมาตร 10 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 nm ตามลำดับ ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer รุ่น TCC-240A, Shimadzu คำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด จากสมการ ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด = (A x MW x DF x 103) ÷ (ε x l) โดยที่ A = (A_{520} - A_{700}) pH 1.0 - (A_{520} - A_{700}) pH 4.5; MW = น้ำหนักโมเลกุลของ cyanidin-3-glucoside (cyd-3-glu) เท่ากับ 449.2 g/mol; DF = dilution factor ของสารละลายตัวอย่าง (ปริมาตรสารละลายทั้งหมด ÷ ปริมาตรสารสกัด); l = ความกว้างของคิวเวต (1 cm); ε = ค่าสัมประสิทธิ์ cyd-3-glu ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 เท่ากับ 26,900 L/mol/cm; รายงานผลในหน่วยของ mg cyd-3-glu /l

2.2.2 ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด วิเคราะห์โดยดัดแปลงจากวิธีของ Zhu และคณะ [13] นำสารสกัดกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงมาละลายด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml จากนั้นปิเปตสารละลายใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 500 µl เติม 5 % $NaNO_2$ ปริมาตร 75 µl ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 6 นาที และเติม 10 % $AlCl_3$ปริมาตร 150 µl ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเติม 1 M NaOH ปริมาตร 500 µl สุดท้ายเติมน้ำกลั่นปริมาตร 275 µl บ่มไว้นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปิเปตสารละลายลงใน 96 well-microplates ปริมาตร 200 µl นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader รุ่น PowerWave XS ยี่ห้อ Biotek คำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน catechin

2.2.3 สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด วิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Folin และ Ciocalteu [14] นำสารสกัดกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงมาละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml จากนั้นปิเปตสารละลายปริมาตร 20 µl ใส่ใน 96 well-microplates เติม 2 M Folin-Ciocalteu's reagent เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 100 µl และเติมสารละลาย 7.5 % $Na2CO_3$ ปริมาตร 80 µl บ่มไว้ในที่มืด 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน gallic acid

2.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging activity ดัดแปลงจากวิธีของ Yamasaki และคณะ [15] นำสารสกัดกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงมาละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 200, 100, 20 และ 2 µg/ml ปิเปตสารละลายแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 µl ลงใน 96 well-microplates เติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 µl บ่มไว้ในที่มืด 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหา % inhibition โดยใช้สูตร % inhibition = [(Abs control - Abs sample) ÷ Abs control] x 100 เมื่อ Abs control = ค่าการดูดกลืนแสงของ control; Abs sample = ค่าการดูดกลืนแสงของ sample; รายงานผลเป็นค่า EC_{50} (ค่าความสามารถของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ที่ 50 %)

2.4 ค่าสีของสารสกัดกลีบเลี้ยง ดัดแปลงจากวิธีของสุภางค์ [16] โดยนำสารสกัดกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงมา 10 mg ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 ml จากนั้นนำไปวัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสียี่ห้อ Color Flex รุ่น CX2687

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ตามวิธี 2 x 8 factorial in CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรม SAS

รูปที่ 1 ลักษณะกลีบเลี้ยงของกระเจี๊ยบแดง กลีบเลี้ยงสีแดงเข้ม HS005 (ซ้าย) และกลีบเลี้ยงสีส้มแดง HS013 (ขวา) เมื่อเก็บเกี่ยวที่อายุ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 วันหลังดอกบาน (DAF) ขีดสีขาวในทุกภาพมีความยาว 5 เซนติเมตร

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 พัฒนาการของกลีบเลี้ยง

การเก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยงสีแดงเข้ม (HS005) และสีส้มแดง (HS013) ที่อายุ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 วันหลังดอกบาน (รูปที่ 1) พบว่าความกว้าง ความยาว ความหนา น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งกลีบเลี้ยง ไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่าง accession และอายุเก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยง (ตารางที่ 1) โดย HS013 กลีบเลี้ยงมีลักษณะบาง ยาว และมีน้ำหนักสดสูงกว่า HS005 อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนความกว้างและน้ำหนักแห้งของทั้งสอง accession ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ กลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงมีพัฒนาการอย่างรวดเร็วในช่วงอายุ 5 ถึง 20 วันหลังดอกบาน แต่หลังจากนั้นมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของน้ำหนักแห้งกลีบเลี้ยง ที่มีค่าอยู่ในช่วง 1.04 ± 0.21 ถึง 1.27 ± 0.19 กรัม/กลีบเลี้ยง ดังนั้นหากจะเก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยงจึงสามารถเก็บเกี่ยวได้หลังจากอายุ 20 วันหลังดอกบาน และการเก็บเกี่ยวล่าช้าไปจนถึงอายุ 40 วันหลังดอกบาน จะไม่มีผลต่อปริมาณผลผลิตกลีบเลี้ยง ซึ่งสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตกลีบเลี้ยงไปพร้อม ๆ กันกับการเก็บเกี่ยวผลผลิตเมล็ดพันธุ์ โดยชนันดา และคณะ [7] รายงานว่าอายุที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวเมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบแดง คือ 39 วันหลังดอกบาน

ตารางที่ 1 ความกว้าง ความยาว ความหนา น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดง HS005 และ HS013 ที่อายุเก็บเกี่ยวต่าง ๆ หลังดอกบาน

ทรีตเมนต์		ความกว้าง (ซม.)	ความยาว (ซม.)	ความหนา (มม.)	น้ำหนักสด (กรัม/กลีบเลี้ยง)	น้ำหนักแห้ง (กรัม/กลีบเลี้ยง)
Accession (ACC)	HS005	3.24±0.55	4.28±0.52^{b}	2.05±0.42^{a}	7.39±2.36^{b}	0.93±0.26
	HS013	3.26±0.52	4.59±0.59^{a}	1.84±0.50^{b}	8.97±3.03^{a}	1.24±0.04
อายุเก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยง (วันหลังดอกบาน : DAF)	5	2.18±0.05^{f}	3.31±0.17^{e}	1.16±0.27^{e}	3.06±0.45^{f}	0.42±0.26^{c}
	10	2.68±0.23^{e}	3.31±0.17^{e}	1.16±0.27^{e}	3.06±0.45^{f}	0.73±0.08^{bc}
	15	3.15±0.08^{d}	4.18±0.23^{d}	1.75±0.57^{d}	5.39±0.75^{e}	1.05±0.13^{bc}
	20	3.42±0.08^{c}	4.18±0.26^{d}	1.81±0.26^{cd}	7.69±1.12^{d}	1.17±0.15^{abc}
	25	3.57±0.07^{b}	4.42±0.25^{c}	2.16±0.38^{b}	8.76±1.14^{c}	1.04±0.21^{bc}
	30	3.68±0.12^{a}	4.87±0.27^{ab}	2.00±0.13^{bc}	9.19±1.49^{c}	1.13±0.16^{bc}
	35	3.64±0.07^{ab}	4.70±0.22^{b}	2.5±0.35^{a}	10.19±1.47^{b}	1.90±2.23^{a}
	40	3.68±0.12^{ab}	4.81±0.36^{b}	2.06±0.13^{b}	10.14±1.34^{b}	1.27±0.19^{ab}
ACC		ns	**	*	**	ns
DAF		**	**	**	**	**
ACC x DAF		ns	ns	ns	ns	ns

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้ง ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี DMRT; * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$); ** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$); ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

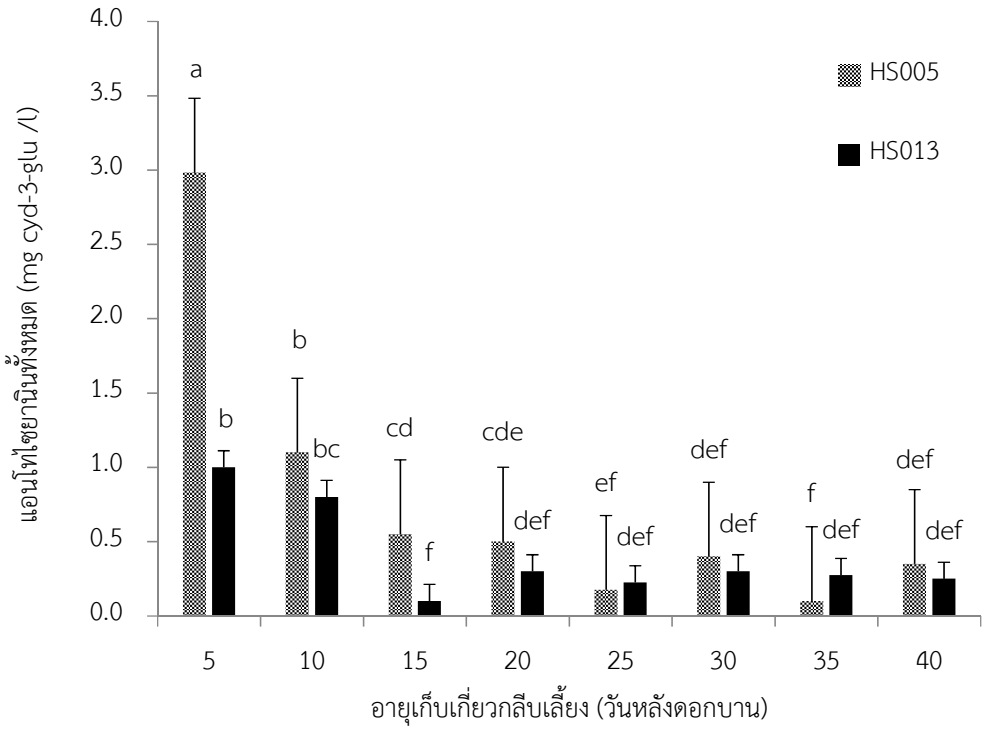
ตารางที่ 2 ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดง HS005 และ HS013 ที่อายุเก็บเกี่ยวต่าง ๆ หลังดอกบาน

ทรีตเมนต์		แอนโทไซยานินทั้งหมด (mg cyd-3-glu/l)	ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg CE/g dry extract)	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g dry extract)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}: µg/ml)
Accession (ACC)	HS005	0.77±0.93^{a}	4.87±1.90^{a}	63.30±6.66^{a}	17.34±1.92^{b}
	HS013	0.41±0.32^{b}	2.74±1.47^{b}	45.88±5.44^{b}	26.09±3.50^{a}
อายุเก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยง (วันหลังดอกบาน : DAF)	5	2.99±1.12^{a}	2.97±1.17^{de}	50.41±7.01^{c}	19.29±5.21
	10	0.95±0.35^{b}	2.45±0.87^{e}	50.78±9.01^{c}	20.18±3.24
	15	033±0.27^{c}	2.56±1.78^{e}	52.02±11.31^{c}	24.75±8.79
	20	0.40±0.17^{c}	3.11±1.02^{de}	52.54±10.52^{c}	22.04±8.42
	25	0.20±0.09^{c}	4.20±2.11^{bc}	55.84±9.19^{bc}	21.40±6.54
	30	0.35±0.05^{c}	6.47±1.64^{a}	63.22±10.83^{a}	21.01±6.60
	35	0.19±0.16^{c}	3.60±0.50^{dc}	58.33±11.61^{b}	22.60±4.27
	40	0.30±0.11^{c}	4.81±2.35^{b}	53.59±12.78^{bc}	22.43±7.74
ACC		**	**	**	**
DAF		**	**	**	ns
ACC x DAF		**	**	ns	ns

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้ง ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี DMRT; ** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$); ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

3.2 ปริมาณสารทุติยภูมิ

ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดพบว่ามีปฏิสัมพันธ์ระหว่าง accession และอายุเก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยง (ตารางที่ 2) การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารแอนโทไซยานินในกลีบเลี้ยงของทั้งสอง accession มีรูปแบบของการสะสมสารแอนโทไซยานินคล้ายกัน โดยมีปริมาณสูงสุดที่อายุ 5 วันหลังดอกบาน หลังจากนั้นปริมาณสารแอนโทไซยานินเริ่มลดลงและคงที่ตั้งแต่อายุ 15 ถึง 40 วันหลังดอกบาน โดย HS005 และ HS013 มีปริมาณสารแอนโทไซยานิน 0.10±0.08 ถึง 2.98±0.51 และ 0.23±0.10 ถึง 1.00±0.25 mg cyd-3-glu/l ตามลำดับ (รูปที่ 2) เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอายุเก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยงกับปริมาณสารแอนโทไซยานิน พบว่ามีความสัมพันธ์กันทางลบ โดยมีค่า r = -0.609 (ตารางที่ 3) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า HS013 มีการสะสมสารแอนโทไซยานินค่อนข้างต่ำ เนื่องจากมีกลีบเลี้ยงสีส้มแดง ส่วน HS005 กลีบเลี้ยงสีแดงเข้มจึงมีปริมาณสารแอนโทไซยานินสูงกว่า การเปลี่ยนแปลงสารแอนโทไซยานินในการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Christian และ Jackson [10] ที่พบว่ากระเจี๊ยบแดงพันธุ์ที่มีกลีบเลี้ยงสีอ่อนจะมีปริมาณสารแอนโทไซยานินต่ำกว่าพันธุ์ที่มีกลีบเลี้ยงสีเข้ม อีกทั้งสารแอนโทไซยานินจะมีปริมาณลดลงเมื่อกลีบเลี้ยงมีอายุมากขึ้น ซึ่งแตกต่างจากข้าวโพดข้าวเหนียวเมล็ดสีดำที่มีปริมาณสารแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นตามอายุการสุกแก่ของเมล็ด [17]



รูปที่ 2 ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดของกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดง HS005 และ HS013 ที่อายุเก็บเกี่ยวต่าง ๆ หลังดอกบาน

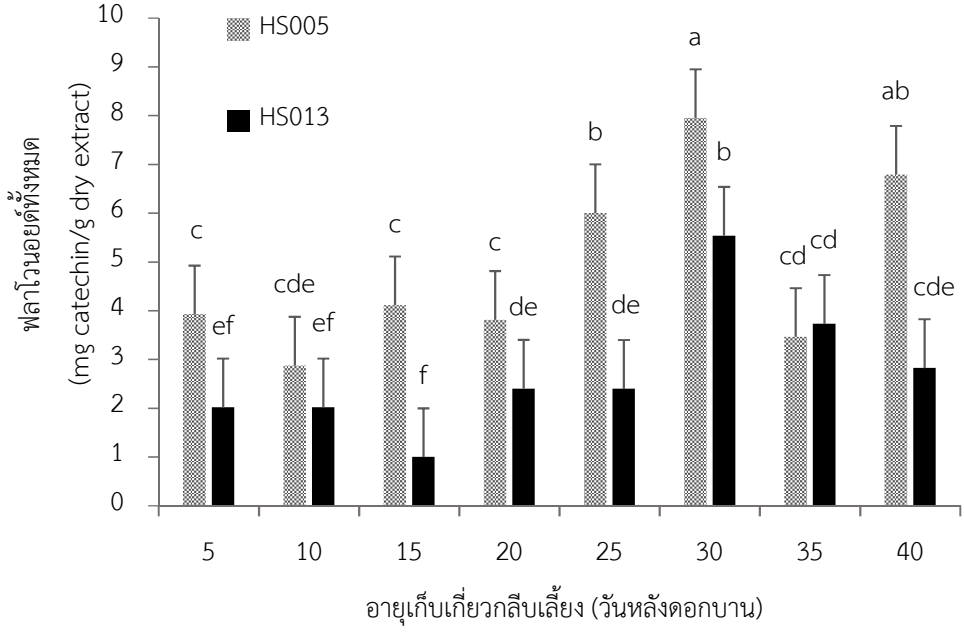
ตารางที่ 3 ค่าสหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ระหว่างสารทุติยภูมิกับอายุเก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และค่าสี (L*, a*, H^0) ของสารสกัดกลีบเลี้ยงในกระเจี๊ยบแดง HS005 และ HS013

	แอนโทไซยานินทั้งหมด	ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด
อายุเก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยง	-0.609**	0.445**	0.250*
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	-0.276*	-0.465**	-0.664**
L*	-0.290*	-0.077	0.081
a*	0.673**	0.123	0.355**
H^0	0.380*	-0.505**	-0.458**

* มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$); ** มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)

ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดพบว่ามีปฏิสัมพันธ์ระหว่าง accession และอายุเก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยง (ตารางที่ 2) ทั้งสอง accession มีการเปลี่ยนแปลงของสารฟลาโวนอยด์คล้ายกัน โดยในระยะแรกของการพัฒนา กลีบเลี้ยงมีการสะสมสารในปริมาณที่น้อยและเพิ่มมากขึ้นตามอายุของกลีบเลี้ยง โดย

HS005 มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงที่สุด 7.17±0.98 mg CE/g dry extract ที่อายุ 30 วันหลังดอกบาน แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับที่อายุ 40 วันหลังดอกบาน (6.79±1.20 mg CE/g dry extract) ส่วน HS013 มีการสะสมสารฟลาโวนอยด์สูงสุดที่อายุ 30 วันหลังดอกบาน (5.54±0.86 mg CE/g dry extract) หลังจากนั้นมีปริมาณลดลง (รูปที่ 3) เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอายุเก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยงกับปริมาณสารฟลาโวนอยด์ พบว่ามีความสัมพันธ์กันทางบวก โดยมีค่า r = 0.445 (ตารางที่ 3) ผลการทดลองนี้ ให้ผลสอดคล้องกับที่พบในกล้วยเล็บมือนาง โดยในระยะสุกงอมจะมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงกว่าในระยะสุกและระยะดิบ [9] เช่นเดียวกับสาร ฟลาโวนอยด์ใน *Amaranthus cruentus* มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามอายุการปลูก โดยมีปริมาณสูงสุดที่อายุ 6 สัปดาห์หลังปลูก แต่ *Celosia argentea* มีปริมาณสารดังกล่าวสูงสุดที่อายุ 5 สัปดาห์หลังปลูกและมีปริมาณลดลงที่อายุ 6 สัปดาห์หลังปลูก [18]



รูปที่ 3 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดง HS005 และ HS013 ที่อายุเก็บเกี่ยวต่าง ๆ หลังดอกบาน

สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในกลีบเลี้ยงของกระเจี๊ยบแดงไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่าง accession และอายุเก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยง ใน HS005 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า HS013 อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีปริมาณ 63.30±6.66 และ 45.88±5.44 mg GAE /g dry extract ตามลำดับ จากตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิกในช่วงแรกของการพัฒนาของกลีบเลี้ยงมีการสะสมสารอยู่ในปริมาณน้อยและค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามอายุกลีบเลี้ยง โดยที่อายุ 30 วันหลังดอกบาน สารประกอบฟีนอลิกมีปริมาณสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ คือ 63.22±10.83 mg GAE/g dry extract และมีปริมาณลดลงที่อายุ 35 และ

40 วันหลังดอกบาน เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอายุเก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิก พบว่ามีความสัมพันธ์กันทางบวก ค่า r = 0.250 (ตารางที่ 3) ซึ่งผลการทดลองนี้ ให้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Hu และ Xu [17] ที่พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในข้าวโพดข้าวเหนียวสีดำมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามอายุการสุกแก่ของเมล็ด เช่นเดียวกับการเก็บเกี่ยวดอกตูมของดอกพระจันทร์ที่มีอายุมากขึ้น ขนาดใหญ่ขึ้นจะมีการสะสมของสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน [8] การเพิ่มขึ้นของสารประกอบฟีนอลิกอาจเป็นเพราะพืชมีอายุมากขึ้นมีการสะสมสารอาหารและสารทุติยภูมิต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้น [19] จึงทำให้กลีบเลี้ยงของกระเจี๊ยบแดงมีการสะสมสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มมากขึ้นตามอายุการพัฒนาของกลีบเลี้ยง

3.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH นั้น ไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่าง accession และอายุเก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยง กลีบเลี้ยง HS005 มีค่า EC_{50} ต่ำกว่า HS013 อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2) โดยมีค่า EC_{50} 17.34± 1.92 และ 26.09±3.50 μg/ml ตามลำดับ แสดงว่า HS005 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่า HS013 เนื่องจาก HS005 มีกลีบเลี้ยงสีแดงเข้ม มีปริมาณสารแอนโทไซยานิน สารฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่า HS013 ที่มีกลีบเลี้ยงสีส้มแดง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Kouakou และคณะ [20] ที่พบว่าเมื่อปริมาณของสารแอนโทไซยานินมาก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH จะดีขึ้น ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในแต่ละช่วงอายุการพัฒนาของกลีบเลี้ยงมีค่า EC_{50} ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่า EC_{50} ตั้งแต่ 19.29±5.21 ถึง 24.75±8.79 μg/ml (ตารางที่ 2) ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Christian และ Jackson [10] ที่พบว่ากระเจี๊ยบแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นตามอายุของกลีบเลี้ยง อีกทั้งกระเจี๊ยบแดงพันธุ์ที่มีกลีบเลี้ยงสีแดงและกลีบเลี้ยงสีขาวยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันทางสถิติอีกด้วย ในการทดลองนี้เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH กับปริมาณสารทุติยภูมิชนิดต่าง ๆ พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีความสัมพันธ์ทางลบกับปริมาณสารแอนโทไซยานิน สารฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลิก โดยมีค่า r= -0.276, -0.465 และ -0.665 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) แสดงว่าสารทุติยภูมิเหล่านี้มีประสิทธิภาพสูงในการขจัดอนุมูลอิสระ DPPH

3.4 ค่าสีของสารสกัดกลีบเลี้ยง

เมื่อวัดสีของสารสกัดกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดง พบว่าค่า L* (ความสว่าง) ค่า a* (สีแดง/เขียว) และค่า Hue angle (H^0) ไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่าง accession และอายุเก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยง (ตารางที่ 4) โดยสารสกัดกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงทั้ง 2 accession มีค่า L* และค่า H^0 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ HS005 มีค่า a* สูงกว่า HS013 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดกลีบเลี้ยง HS005 มีสีเข้มกว่า HS013 การเปลี่ยนแปลงสีของสารสกัดกลีบเลี้ยงมีแนวโน้มอ่อนลงเมื่อกลีบเลี้ยงมีอายุมากขึ้น โดยค่า L* ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามอายุของกลีบเลี้ยง และที่อายุ 35 วันหลังดอกบาน สารสกัดกลีบเลี้ยงมีค่า L* สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ (4.30± 0.70) ส่วนค่า a* และค่า H^0 มีค่าลดลงเมื่อกลีบเลี้ยงมีอายุเพิ่มมากขึ้น โดยที่อายุ 5 วันหลังดอกบาน มีค่า a* และค่า H^0 สูงที่สุด (0.51±0.41 และ 5.44±0.39 ตามลำดับ) จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าสีของสารสกัดกลีบเลี้ยงและปริมาณสารทุติยภูมิ พบว่า a* มีความสัมพันธ์ทางบวกกับสารแอนโทไซยานิน (r= 0.673) และสารประกอบฟีนอลิก (r = 0.355) ดังแสดงในตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่า สารสกัดกลีบเลี้ยงที่มีค่าสี a* สูง หรือมีสีแดงเข้มมาก จะมีปริมาณสารแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลิกสูงตามไปด้วย

ตารางที่ 4 ค่า L*, a* และ Hue angle ของสารสกัดกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดง HS005 และ HS013 ที่อายุเก็บเกี่ยวต่าง ๆ หลังดอกบาน

ทรีตเมนต์		L*	a*	Hue angle (H^0)
Accession (ACC)	HS005	3.41±0.74	0.37±0.29^{a}	2.84±2.47
	HS013	3.40±0.40	0.00±0.16^{b}	4.08±1.73
อายุเก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยง (วันหลังดอกบาน : DAF)	5	3.11±0.30^{b}	0.51±0.41^{a}	5.44±0.39^{a}
	10	3.24±0.45^{b}	0.29±0.30^{b}	5.19±2.19^{ab}
	15	3.38±0.59^{b}	0.15±0.25^{bc}	3.74±2.24^{abc}
	20	3.33±0.57^{b}	0.17±0.27^{bc}	3.43±2.41^{bc}
	25	3.29±0.56^{b}	0.18±0.27^{bc}	3.38±2.36^{bc}
	30	3.33±0.32^{b}	0.06±0.23^{c}	2.45±1.74^{cd}
	35	4.30±0.70^{a}	0.02±0.21^{c}	2.01±1.56^{d}
	40	3.28±0.40^{b}	0.12±0.21^{bc}	2.07±1.79^{d}
ACC		ns	**	Ns
DAF		**	**	**
ACC x DAF		ns	ns	ns

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้ง ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี DMRT; ** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$); ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

4. สรุป

การศึกษาพัฒนาการของกลีบเลี้ยงและการเปลี่ยนแปลงของสารทุติยภูมิในระหว่างการพัฒนาของกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดง 2 accession ที่มีกลีบเลี้ยงสีแดงเข้ม (HS005) และกลีบเลี้ยงสีส้มแดง (HS013) พบว่ากระเจี๊ยบแดงทั้งสอง accession มีการพัฒนาของกลีบเลี้ยงอย่างรวดเร็วในช่วงอายุ 5 ถึง 20 วันหลังดอกบาน แต่หลังจากนั้นมีการเปลี่ยนแปลง เพียงเล็กน้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของน้ำหนักแห้งกลีบเลี้ยง กระเจี๊ยบแดงกลีบเลี้ยงสีแดงเข้มมีปริมาณสารทุติยภูมิสูงกว่าและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่ากลีบเลี้ยงสีส้มแดง การเปลี่ยนแปลงของสารทุติยภูมิมีรูปแบบที่คล้ายกันในกระเจี๊ยบแดงทั้ง 2 accession โดยมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นตามอายุของกลีบเลี้ยง และสารทุติยภูมิทั้งสองชนิดนี้มีปริมาณสูงสุดที่อายุ 30 วันหลังดอกบาน ในขณะที่สารแอนโทไซยานินทั้งหมดมีปริมาณลดลงตามอายุของกลีบเลี้ยง แต่ที่อายุ 15 ถึง 40 วันหลังดอกบาน มีปริมาณสารแอนโทไซยานินไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีค่า EC_{50} ไม่แตกต่างกันทางสถิติในแต่ละอายุของการเก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยง ดังนั้นการเก็บเกี่ยวกลีบ

เลี้ยงกระเจี๊ยบแดง จึงสามารถเก็บเกี่ยวได้ตั้งแต่อายุ 20 วันหลังดอกบาน ไปจนถึงอายุ 40 วันหลังดอกบาน ซึ่งเป็นระยะเก็บเกี่ยวเมล็ดพันธุ์ด้วย โดยอายุที่เหมาะสมสำหรับเก็บเกี่ยวกลีบเลี้ยงเพื่อนำไปทำเป็นยาสมุนไพร คืออายุ 30 วันหลังดอกบาน

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และได้รับการสนับสนุนการวิจัยบางส่วนจากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

6. รายการอ้างอิง

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

[2] Wisetmuen, E., Pannangpetch, P., Kongyingyoes, B., Kukongviriyapan, U., Yutanawiboonchai, W. and Itharat, A., 2013, Insulin secretion enhancing activity of roselle calyx extract in normal and streptozotocin-induced diabetic rats, Pharm. Res. 5: 65-70.

[3] Sireeratawong, S., Itharat, A., Khonsung, P., Lertprasertsuke, N. and Jaijoy, K., 2013, Toxicity studies of the water extract from the calyces of *Hibiscus sabdariffa* L. in rats, Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med. 10: 122-127.

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

[5] Hussein, R.M., Shahein, Y.E., El Hakim, A.E. and Awad, H.M. 2010, Biochemical and molecular characterization of three colored types of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), J. Am. Sci. 6: 726-733.

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

[7] ชนันดา ศรีบุญไทย, ภาณุมาศ ฤทธิไชย, เยาวพา จิระเกียรติกุล และพรชัย หาระโคตร, 2559, พัฒนาการและการสุกแก่ของเมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบแดง, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 24: 333-341.

[8] ภาณุมาศ ฤทธิไชย, ปิยาภัทร์ เข็มวิชัย และเยาวพา จิระเกียรติกุล, 2558, การพัฒนาของดอกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในดอกพระจันทร์ (*Ipomoea alba* L.), ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 497-506.

[9] อดิศร จำรูญ, พรรณิภา ยั่วยล และบุษรา จ้อยร่อย, 2558, การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกล้วยหินและกล้วยเล็บมือนาง, ว.พืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 2: 38-42.

[10] Christian, K.R. and Jackson, C.J., 2009, Changes in total phenolic and monomeric anthocyanin composition and antioxidant activity of three varieties of sorrel

(*Hibiscus sabdariffa*) during maturity, J. Food Compos. Anal. 22: 663-667.

[11] Chumsri, P., Sirichote, A. and Itharat, A., 2008, Studies on the optimum conditions for the extraction and concentration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extract, Songklanakarin J. Sci. Technol. 30: 133-139.

[12] Lee, J., Durst, R.W. and Wrolstad, R.E., 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.

[13] Zhu, H., Wang, Y., Liu, Y., Xia, Y. and Tang, T., 2010, Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies, Food Anal. Methods. 3: 90-97.

[14] Folin, O. and Ciocalteu, V., 1927, On tyrosine and tryptophane determinations in proteins, J. Biol. Chem. 73: 627-650.

[15] Yamasaki, K., Kashimoto, A., Kokusenya, Y., Miyamoto, T. and Sato, T., 1994, Electrochemical method for estimating the antioxidatice effect of methanol feeding, Enzyme Microb. Tech. 36: 133-138.

[16] สุภางค์ เรืองฉาย, 2552, การพัฒนาน้ำพริกมะขามผสมกระเจี๊ยบ, ว.วิชาการ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย 29: 88-101.

[17] Hu, Q.P. and Xu, J.G., 2011, Profiles of carotenoids, anthocyanins, phenolics, and antioxidant activity of selected color waxy corn grains during maturation, J. Agric. Food Chem. 59: 2026-2033.

[18] Oloyede, F.M., Oloyede, F.A. and Obuotor, E.M., 2013, Effect of plant maturity on the antioxidant profile of *Amaranthus cruentus* L. and *Celosia argentea* L., Bull. Env. Pharmacol. Life Sci. 2: 18-21.

[19] Policegoudra, R.S., Kumar, M.H.S. and Aradhya, M.S., 2007, Accumulation of bioactive compounds during growth and development of mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.) rhizome, J. Agric. Food Chem. 55: 8105-8111.

[20] Kouakou, T.H., Konkon, N.G., Ayolié, K., Obouayeba, A.P., Abeda Z.H. and Koné, M., 2015, Anthocyanin production in calyx and callus of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) and its impact on antioxidant activity, J. Pharmacogn. Phytochem. 4: 9-15.