การสกัดสีธรรมชาติจากพืชกลุ่มแอนโทไซยานิน เพื่อใช้ในการย้อมสีโครโมโซมจากปลายรากหอม

Anthocyanin Extract from Natural Plants for Staining Chromosome

จิดาภา บุญพันธ์[1] อิสรีย์ ปั้นก้อง[1] และธีรารัตน์ แช่มชัยพร[1*]

[1]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม

[*]teerarat_61@hotmail.com.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสกัดสีธรรมชาติจากพืชกลุ่มแอนโทไซยานินในท้องถิ่นบางชนิด เพื่อนำมาใช้ในการย้อมสีโครโมโซมจากปลายรากหอม และทดแทนการใช้สีสังเคราะห์ที่มีราคาแพงและเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม โดยคัดเลือกพืชในท้องถิ่นที่หาได้ง่ายทั้งแบบสดและแบบแห้งมา 4 ชนิด ได้แก่ เปลือกมังคุด อัญชัน กะหล่ำปลีสีม่วง และมะม่วงหาวมะนาวโห่ โดยใช้ตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ น้ำกลั่น กรดอะซิติก 20% กรดไฮโดรคลอริก 20% แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70% และแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% ในอัตราส่วน 1:1 (น้ำหนัก(กรัม)):ปริมาตรสารละลาย (มิลลิลิตร)) นำไปทดสอบประสิทธิภาพของการย้อมสีโครโมโซมจากปลายรากหอม พบว่า สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ทั้งแบบสดและแบบแห้งที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% มีค่าเฉลี่ยรวมของความพึงพอใจสูงที่สุดโดยมีระดับค่าความพึงพอใจเท่ากับ 42 เมื่อนำสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่แบบสดมาสกัดด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% และนำไปเก็บรักษาสีย้อมด้วยกระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dryer) และกระบวนการทำให้แห้งด้วยเครื่องอบลมร้อน (hot air oven) และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วัน พบว่า เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสีย้อมในการย้อมสีโครโมโซมของปลายรากหอม พบว่ายังคงสามารถย้อมติดสีโครโมโซมและมองเห็นระยะต่าง ๆ ของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสได้อย่างชัดเจน

คำสำคัญ : สีย้อมธรรมชาติ แอนโทไซยานิน โครโมโซม

Abstract

The aim of this study is to extract anthocyanin dye from local plants that can be replaced the chemical dyes which are expensive and can be environmental pollution. Four available plants in local area, both fresh and dried, which were mangosteen shell (Garcinia mangostana L.*), butterfly pea flower (Clitoria ternatea* L.*), purple cabbage (Brassica oleraceae* var. *rubra), and karonda fruit (Carissa carandas* L.*) were selected and extracted pigments by using five solvents—distilled water, 20% acetic acid, 20% hydrochloric acid, 70% alcohol, and 95% alcohol with the ratio of 1:1 (weight/volume).The results showed that karonda fruit was extracted with 95% alcohol produced the most effective in chromosome staining and the average satisfaction was 42. The extract was also selected for freeze-drying and hot air drying and stored at 4 °C for 45 days. The efficiency of dyes in chromosome staining of mitotic cell division was compared. The result showed that the staining dye obtained from karonda fruit of 95% alcohol can stain plant cells and show its mitotic cell division.*

Keywords: natural dyes, anthocyanin, chromosome

1. บทนำ

ในการจัดการเรียนการสอนทางชีววิทยาจำเป็นต้องศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซม สารสีกลุ่มแอนโทไซยานินจึงเป็นกลุ่มสีกลุ่มหนึ่งที่น่าสนใจและมีรายงานว่าสามารถนำมาย้อมสีเพื่อศึกษาโครโมโซมได้ โดยสารกลุ่มแอนโทไซยานินเป็นสารประเภท flavonoid phenolic compounds จะให้สีแดง พบมากในเฉพาะพืช ผัก ผลไม้ ที่มีสีแดงเข้ม (Cooper Driver, 2001) ตัวอย่างเช่น ดอกกระเจี๊ยบแดง เปลือกแก้วมังกร และแบล็คเบอร์รี่ เป็นต้น ในการจัดการเรียนการสอนทางชีววิทยาได้มีรายงานการนำสีกลุ่มแอนโทไซยานินมาใช้ประโยชน์ในการย้อมสีโครโมโซม ตัวอย่างเช่น การสกัดสีย้อมจากแบล็คเบอร์รี่สามารถนำมาใช้ในการย้อมสีโครโมโซมของปลายรากหอมได้ ซึ่งสีย้อมจากแบล็คเบอร์รี่นั้นมีคุณภาพใกล้เคียงกับสีสังเคราะห์จากสารเคมี (หัทยา การีวงศ์, 2546) นอกจากนี้ยังมีการนำเมล็ดข้าวโพดหวานสีม่วง (รุจิรา ทองศรีสุข และคณะ, 2560) ข้าวเหนียวดำ และผลหม่อน (วีรนุช วอนเก่าน้อย และคณะ, 2551) มาใช้ย้อมสีโครโมโซมจากปลายรากหอมได้เช่นกัน

สำหรับการศึกษาครั้งนี้ได้มีแนวคิดที่จะนำสีที่สกัดได้จากพืชธรรมชาติหลาย ๆ ชนิดในท้องถิ่น มาสกัดสีเพื่อนำมาย้อมสีโครโมโซมจากปลายรากหอม เนื่องจากสีสังเคราะห์ที่ใช้ย้อมโครโมโซมมีราคาค่อนข้างสูง และยังต้องสั่งซื้อมาจากต่างประเทศ เพื่อช่วยลดค่าใช้จ่ายในการซื้อสีสังเคราะห์และเพื่อให้เห็นคุณค่าจากการใช้ประโยชน์จากพืชท้องถิ่นในการนำมาใช้เป็นสีย้อมโครโมโซม ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการนำตัวอย่างพืชกลุ่มแอนโทไซยานินในท้องถิ่นที่หาได้ง่ายมาพัฒนาเป็นสีย้อมโครโมโซม โดยหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารสีจากพืช พร้อมทั้งศึกษาประสิทธิภาพของสีย้อมภายหลังการเก็บรักษาสีย้อมด้วยกระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dryer) และกระบวนการทำให้แห้งด้วยเครื่องอบลมร้อน (hot air oven)

2. วัตถุประสงค์ในการศึกษา

1. เพื่อเปรียบเทียบสีที่สกัดจากพืชชนิดต่าง ๆ ทั้งแบบสดและแบบแห้ง จากตัวทำละลายต่างชนิดกัน ที่มีผลต่อการย้อมติดสีโครโมโซม
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสีที่สกัดจากพืชตัวอย่างชนิดต่าง ๆ ต่อการย้อมติดสีโครโมโซม เพื่อนำมาทดแทนสีสังเคราะห์
3. เพื่อคัดเลือกสารสีที่สกัดจากพืชในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในการนำไปพัฒนาเป็นสีย้อมโครโมโซมพืช
4. หาวิธีเก็บรักษาสีย้อมและทดสอบประสิทธิภาพการติดสีย้อมโครโมโซมภายหลังการผ่านกระบวนการการเก็บรักษาสภาพสีย้อม

3. วิธีดำเนินการศึกษา

งานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาการสกัดสีย้อมจากพืช 4 ชนิด ได้แก่ เปลือกมังคุด ดอกอัญชัน กะหล่ำปลีสีม่วง และผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ ด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ น้ำกลั่น กรดอะซิติก 20% กรดไฮโดรคลอริก 20% แอลกอฮอล์ 70% และแอลกอฮอล์ 95% นำมาย้อมสีโครโมโซมจากปลายรากหอม โดยวิธีการดำเนินวิจัยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง คือ

3.1 การทดลองที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพของสีจากสารสกัดของตัวอย่างพืช 4 ชนิด ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ต่อการติดสีของโครโมโซมจากปลายรากหอม

แบ่งขั้นตอนการทดลองย่อยออกเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

1.วิธีการสกัดสีจากพืช

นำตัวอย่างพืชทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ เปลือกมังคุด ดอกอัญชัน กะหล่ำปลีสีม่วง และผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ ทั้งแบบสดและแบบแห้งมาปั่นให้ละเอียด จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก และบรรจุลงบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร และนำตัวทำละลายแต่ละชนิดใส่ลงไปในบีกเกอร์ โดยใช้อัตราส่วน 1:1 [น้ำหนักพืช (กรัม) : ตัวทำละลาย (มิลลิลิตร)] นำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง และกรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 เก็บใส่ขวดสีชาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ยกเว้นสารสกัดที่ได้จากน้ำกลั่นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำไปทดสอบการย้อมสีโครโมโซม

2. การเตรียมโครโมโซมจากปลายรากหอม

นำหัวหอมแดงที่เพาะในน้ำกลั่น 3 วันมาตัดปลายรากให้ได้ความยาวประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ใช้ปากคีบ คีบปลายรากหอม 1-2 ชิ้น ใส่ลงในหลอด eppendrof ที่บรรจุกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 N แล้วแช่หลอด eppendrof ใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที หลังจากนั้นล้างปลายรากหอมด้วยน้ำกลั่น

3. การย้อมสีโครโมโซมด้วยสารสกัด

นำสารที่สกัดได้จากพืชทั้งแบบสดและแบบแห้ง มาย้อมสีโครโมโซมจากปลายรากหอม โดยนำปลายรากหอมวางบนสไลด์ หยดสีที่สกัดจากพืช 1-2 หยด ลงบนเนื้อเยื่อปลายรากหอม แช่ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที บี้เนื้อเยื่อด้วยเข็มเขี่ยปลายแบนเพื่อให้เซลล์กระจายออก ปิดเนื้อเยื่อด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์และบันทึกภาพ

3.2 การทดลองที่ 2 ประสิทธิภาพการติดสีย้อมโครโมโซมภายหลังการผ่านกระบวนการการเก็บรักษาสภาพสีย้อม

ทำการคัดเลือกสีที่สกัดจากพืชทั้งแบบสดและแบบแห้งที่ย้อมติดสีโครโมโซมที่ดีที่สุดมา 1 ชนิด โดยคัดเลือกจากแบบประเมินจำนวน 50 ชุด หลังจากนั้นนำสารสกัดที่คัดเลือกมาหาวิธีการเก็บรักษาสภาพสีของสารสกัดโดยใช้กระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งและกระบวนการทำให้แห้งด้วยเครื่องอบลมร้อน ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้

1. นำสารสกัดมากรองด้วยผ้าขาวบาง และนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) จากนั้นนำสารสกัดไปเก็บที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2. นำสารสกัดที่ได้ผ่านกระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งเป็นระยะเวลา 5 วันและนำไปผ่านกระบวนการทำให้แห้งด้วยเครื่องอบลมร้อน เป็นระยะเวลา 3 วัน ภายหลังสารสกัดแห้งจะนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. นำสารสกัดแห้งมาทดสอบประสิทธิภาพการย้อมติดสีของโครโมโซมจากปลายรากหอมที่ระยะเวลา 1, 15, 30 และ 45 วันตามลำดับ พร้อมกับบันทึกภาพถ่าย

4. ผลการศึกษาและอภิปรายผลการศึกษา

4.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสีจากสารสกัดของตัวอย่างพืช 4 ชนิด ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อการติดสีของโครโมโซมจากปลายรากหอม

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสีจากสารสกัดพืชทั้ง 4 ชนิดทั้งแบบสดและแบบแห้งโดยสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 5 ชนิด พบว่า ค่าเฉลี่ยความพึงพอใจรวมของการติดสีย้อมโครโมโซมของสีที่สกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ทั้งแบบสดและแบบแห้งด้วยแอลกอฮอล์ 95% มีค่าเฉลี่ยรวมของความพึงพอใจสูงที่สุด โดยมีระดับความพึงพอใจเท่ากับ 42 (ตารางที่ 1) สอดคล้องกับรายงานของธิดามาส นาคแป้น และมัตติกาล ขุนณรงค์ (2560) ที่ศึกษาการสกัดสีธรรมชาติจากพืชกลุ่มแอนโทไซ

ยานิน 5 ชนิด ได้แก่ อัญชัน เปลือกมังคุด มันเทศสีม่วง มะม่วงหาวมะนาวโห่และลูกหว้าที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก 20% กรดแอซิติก เอทานอล 95% เมทานอล และน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1 พบว่า สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่สกัดจากเอทานอล 95% จะมีประสิทธิภาพในการย้อมติดสีของโครโมโซมจากปลายรากหอมได้ดีที่สุด นอกจากนี้ประสิทธิภาพของสีของสารสกัดแอนโทไซยานินยังขึ้นอยู่กับอุณหภูมิในการเก็บรักษาอีกด้วย ดังรายงานวิจัยของเกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์ (2553) ที่ศึกษาการสกัดสารแอนโทไซยานินจากดอกอัญชัน พบว่า อุณหภูมิที่ควรเก็บสีของสารสกัดควรอยู่ระหว่าง 4±1 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิระหว่างนี้จะสามารถชะลอการลดลงของปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัดได้

4.2 ประสิทธิภาพการติดสีย้อมโครโมโซมภายหลังการผ่านกระบวนการการเก็บรักษาสภาพสีย้อม

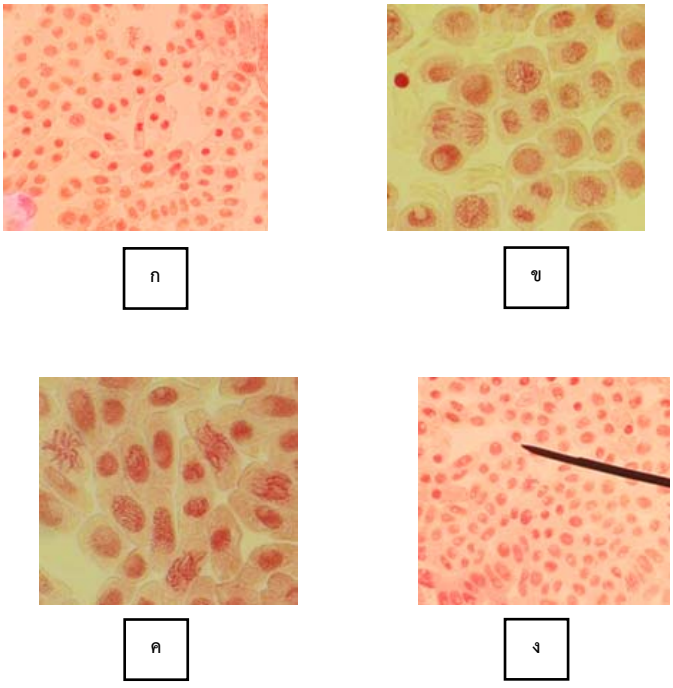
สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% เมื่อผ่านกระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง เพื่อการเก็บรักษานั้น พบว่า มีลักษณะเหนียวหนืด มีสีแดงอมม่วง และเมื่อนำสารสกัดนั้นมาผสมกับน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:3 แล้วนำไปย้อมสีโครโมโซมจากปลายรากหอม พบว่า สารสกัดจากมะม่าวหาวมะนาวโห่ที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนั้น สามารถนำสีย้อมมาใช้ในการย้อมโครโมโซมจากปลายรากหอมได้เหมือนเดิม อีกทั้งยังสามารถมองเห็นรายละเอียดของโครโมโซมและระยะการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสได้ชัดเจน ทุกครั้งตามระยะเวลาที่ทำการทดสอบคือ 1, 15, 30 และ 45 วัน เพียงแต่ว่าสีอาจจะจางลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับสีของสารสกัดในตอนแรกก่อนยังไม่ผ่านกระบวนการเก็บรักษา ดังนั้น สีย้อมจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่สามารถนำมาใช้ทดแทนสีย้อมจากสีสังเคราะห์ได้ นอกจากนี้สารสกัดภายหลังการเก็บรักษาสามารถมีอายุการใช้งานได้นานถึง 45 วันของการทดสอบ และผู้วิจัยมีความเห็นว่าสีย้อมจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ภายหลังการเก็บรักษาอาจมีอายุการเก็บรักษาได้นานมากกว่า 45 วัน ถ้าหากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบค่าความพึงพอใจในการติดสีย้อมของโครโมโซมจากปลายรากหอมด้วยสารสกัดจากพืชแต่ละชนิดทั้งแบบสดและแบบแห้ง โดยใช้สารละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

ชนิดของพืช	ตัวทำละลาย	ค่าเฉลี่ยความพึงพอใจ		ค่าเฉลี่ยรวม
		แบบสด	แบบแห้ง	
เปลือกมังคุด	น้ำกลั่น	25.4	18.8	22
	กรดอะซิติก 20%	26.4	26.2	26.3
	กรดไฮโดรคลอริก 20%	31.4	20.8	26.1
	แอลกอฮอล์ 70%	29	14.2	26.6
	แอลกอฮอล์ 95%	21.2	28	24.6
อัญชัน	น้ำกลั่น	21	24.4	22.7
	กรดอะซิติก 20%	24.4	37.4	30.9
	กรดไฮโดรคลอริก 20%	33.2	36	34.6
	แอลกอฮอล์ 70%	21.2	28.2	24.7
	แอลกอฮอล์ 95%	22	33.4	27.7

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดของพืช	ตัวทำละลาย	ค่าเฉลี่ยความพึงพอใจ		ค่าเฉลี่ยรวม
		แบบสด	แบบแห้ง	
กะหล่ำปลีสีม่วง	น้ำกลั่น	27.2	23	25.1
	กรดอะซิติก 20%	22.4	30.2	26.3
	กรดไฮโดรคลอริก 20%	36.8	33.4	35.1
	แอลกอฮอล์ 70%	17.8	23.6	20.7
	แอลกอฮอล์ 95%	16.6	23	19.8
มะม่วงหาวมะนาวโห่	น้ำกลั่น	33.6	26	29.8
	กรดอะซิติก 20%	45	23	34
	กรดไฮโดรคลอริก 20%	38.4	23.4	30.9
	แอลกอฮอล์ 70%	47.8	21.6	34.7
	แอลกอฮอล์ 95%	49.2	34.8	42



ภาพที่ 1 การย้อมสีโครโมโซมจากปลายรากหอม ที่ย้อมด้วยสารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตามระยะเวลาที่ทำการทดสอบ คือ 1 วัน (ก) 14 วัน (ข) 30 วัน (ค) และ 45 วัน (ง)

5. สรุปผลการศึกษา

สีของสารสกัดจากพืชตัวอย่างที่นำมาศึกษาการติดสีย้อมของโครโมโซมจากปลายรากหอมที่ดีที่สุด คือ สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ทั้งแบบสดและแบบแห้ง และตัวทำละลายที่สกัดสีได้ดีที่สุดคือ แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% เมื่อนำสาร

สกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่มาสกัดด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% และนำไปเก็บรักษาสีย้อมด้วยกระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง และกระบวนการทำให้แห้งด้วยเครื่องอบลมร้อน และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วัน พบว่า สีของสารสกัดมีประสิทธิภาพในการย้อมสีโครโมโซมของปลายรากหอมได้ดีและติดสีของโครโมโซมได้ชัดเจน สามารถมองเห็นระยะต่าง ๆ ของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสได้อย่างชัดเจน จึงสามารถนำสีของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่มาใช้แทนสีสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการได้

6. เอกสารอ้างอิง

เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์. (2553). **การสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชัน (*Clitoria ternatea* L.)**. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธิดามาศ นาคแป้น และมัลติกาล ขุนณรงค์. (2560). **การคัดเลือกสีย้อมจากพืชธรรมชาติ เพื่อใช้เป็นสีย้อมโครโมโซม**. ปริญญาครุศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม.

รุจิรา ทองศรีสุข, ยอดชาย ช่วยเงิน, อลงกลด แทนออมทอง และสายัญ พันธ์สมบูรณ์. (2560). การประยุกต์ใช้สีธรรมชาติจากข้าวโพดหวานสีม่วง (*Zea mays saccharata*) ในการศึกษาการแบ่งเซลล์ไมโทซิสของพืช. **วารสารวิทยาศาสตร์คชสาส์น**, 39 (2), 34-44.

วีรนุช วอนเก่าน้อย, พันธิวา แก้วมาตย์, อลงกลด แทนออมทอง และพรณรงค์ สิริปิยะสิงห์. (2557). การคัดเลือกสารสีสกัดจากธรรมชาติในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยเพื่อใช้เป็นสีย้อมโครโมโซม. **วารสารวิจัยเพื่อพัฒนาสังคมและชุมชน มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม**, 2 (1), 42-52.

หัทยา กาวีวงศ์ และ วิไล ชัยสมภาร. (2546). การเตรียมสีย้อมโครโมโซมสำหรับการเรียนการสอนจากพืชท้องถิ่นไทย. **วารสาร วิทยาศาสตร์**, 50(1), 35-39.

Cooper-Driver, G. A. (2001). Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. **Journal of Phytochemistry**, 56(3): 229-236.