วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

ความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และการต้านอนุมูลอิสระระหว่างการแปรผันชีพลักษณ์ในใบพลับ 2 ชนิด

Relationship of phenolic, flavonoid contents and antioxidant during phenological variation in leaves of two *Diospyros* species

สุทธิดา มั่นเหมาะ[1], สุรินทร์ นิลสำราญจิต[1] และ สุริยา ตาเที่ยง[1]*

Sutthida Munmoh[1], Surin Nilsamranchit[1] and Suriya Tatiang[1]*

[1] *ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200*
[1] *Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200*

บทคัดย่อ: การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และการต้านอนุมูลอิสระในใบพลับระหว่างการเจริญเติบโตของ *Diospyros kaki* จำนวน 2 พันธุ์ และกล้วยฤาษี (*Diospyros glandulosa*) โดยเก็บใบเพสลาดจากช่วงเวลาที่กำหนดตามชีพลักษณ์การเจริญเติบโตในระบบ BBCH-scale จำนวน 6 ระยะ (35, 71, 75, 85, 87, 93) ระหว่างเดือนมีนาคมถึงพฤศจิกายน พ.ศ. 2562 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และการต้านอนุมูลอิสระของใบในแต่ละระยะการเจริญเติบโตและศึกษาความแตกต่างระหว่างพลับพันธุ์ชิชู พันธุ์ฟูยู และกล้วยฤาษีสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์จากใบ ผลการศึกษาพบว่า ใบของพลับพันธุ์ชิชูและพันธุ์ฟูยูมีขนาดใหญ่กว่าใบของกล้วยฤาษีที่มีรูปร่างเรียวยาว จากผลการวิเคราะห์ใบกล้วยฤาษีมีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าของพันธุ์ชิชูและพันธุ์ฟูยูตั้งแต่ระยะ 71 - 93 ซึ่งอยู่ในช่วงเริ่มติดผลถึงก่อนสภาพพักตัวของต้น โดยการเติบโตของใบในรอบปีมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และการต้านอนุมูลอิสระที่สัมพันธ์กัน ซึ่งมีค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์แบบเชิงบวก ขณะที่แสดงผลแบบเชิงลบระหว่างค่า IC_{50} กับปริมาณฟีนอลิกเช่นเดียวกับค่า IC_{50} กับฟลาโวนอยด์ ดังนั้น การเพิ่มขึ้นของปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในใบส่งผลประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระได้ดี จึงควรพิจารณาเลือกเก็บใบตามชนิดพันธุ์และช่วงเวลาการเจริญเติบโตเพื่อนำมาใช้ประโยชน์เป็นผลิตภัณฑ์ด้านสุขภาพ

คำสำคัญ: ชีพลักษณ์; ปริมาณฟีนอลิก; ปริมาณฟลาโวนอยด์; การต้านอนุมูลอิสระ; สหสัมพันธ์

ABSTRACT: Study on phenolic, flavonoid, and antioxidant changes in leaves of *Diospyros* spp. during the growth and development of *Diospyros kaki* two cultivars and Kluai ruesee (*Diospyros glandulosa*) were determined. Mature leaves were collected from the period of phenological growth stages in the BBCH-scale total 6 stages (35, 71, 75, 85, 87, 93) during March to November 2019. The morphological characteristics and changes of phenolic, flavonoid, and antioxidant of leaves were analyzed in each growth and developmental stages to comparing between *Diospyros kaki* 'Xichu', 'Fuyu', and *Diospyros glandulosa* for the suitable utilized leaf products. Results showed that the leaf size of *Diospyros kaki* 'Xichu' and 'Fuyu' was bigger than the leaf of Kluai ruesee which had a slender shape. The analyzed leaf of Kluai ruesee had an efficiency of antioxidant activity better than 'Xichu' and 'Fuyu' from stage 73 - 91 which a period of fruit set to the onset of dormancy tree. The changes of phenolic, flavonoid, and antioxidant were found to relate a year-around growth of leaves. Correlations between phenolic and flavonoid contents were positive, whereas showed the negative relationship was recorded for between IC_{50} : phenolic content and IC_{50} : flavonoid content. Therefore, increasing of phenolic and flavonoid contents in leaves followed to the high antioxidant. The decisions on persimmon species, and growth stage for leaf harvesting affect the benefits of health products.

* Corresponding author: Email: suriya.t@cmu.ac.th

Received: date; June 8, 2020 Accepted: date; October 12, 2020 Published: date April 15, 2021

Keywords: phenology; phenolic content; flavonoid content; antioxidant; correlation

บทนำ

พลับ (*Diospyros kaki*) เป็นพืชที่ปลูกกันหลายประเทศและพบอยู่บนพื้นที่สูงทางภาคเหนือของไทย (สุรินทร์, 2543) โดยพลับมีหลายพันธุ์ทั้งพลับฝาดและพลับหวาน รวมถึงกล้วยฤาษี (*Diospyros glandulosa*) ที่พบกระจายอยู่ตามธรรมชาติมีการนำเมล็ดมาเพาะเป็นต้นตอสำหรับการปลูกพลับทางการค้า (วสันต์, 2558) ผลพลับมีการนำมาใช้ประโยชน์บริโภคเป็นผลไม้และใบสามารถนำมาทำเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพในรูปแบบชาใบพลับ (kakinoha-cha) ในประเทศญี่ปุ่นที่ได้รับความนิยมเหมือนกับชาเขียว เนื่องจากมีสารประกอบชีวภาพที่ช่วยส่งเสริมสุขภาพและป้องกันรักษาโรคได้ (Sakanaka et al., 2005) และยังมีการนำไปใช้เป็นส่วนประกอบทางยา เครื่องสำอาง และการถนอมอาหาร (Xie et al., 2015) การพิจารณาเลือกใช้ใบเป็นส่วนของพืชที่มีการสะสมสารภายในพืชในปริมาณมากกว่าส่วนของเมล็ด ตามรายงานของสุรินทร์ และสุริยา (2558) ได้วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกในเมล็ดลำไย จำนวน 17 พันธุ์ มีอยู่เพียง 0.33 - 1.21 mg GAE/g DW ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าในใบพลับถึง 100 เท่า ตามรายงานของ Hossain et al. (2017) ได้วิเคราะห์ใบพลับพันธุ์ Gabjubaekmok มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากถึง 84.72 - 112.00 mg GAE/g DW เนื่องจากใบพลับมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพประเภทโพลีฟีนอลิกและมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ การนำใบมาใช้ประโยชน์จึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งนอกเหนือจากการปลูกเพื่อเก็บผลมาจำหน่าย อย่างไรก็ตาม การเก็บใบของพืชจำเป็นต้องพิจารณาในหลายปัจจัย เช่น ชนิดพันธุ์พืช ช่วงเวลา ระยะการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อม เป็นต้น (Pérez-Burillo et al., 2018) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาสารประกอบในใบพลับถึงความสัมพันธ์ระหว่างฟีนอลิกกับคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระอยู่บ้าง เช่น ในรายงานของ Deetae et al. (2012) กล่าวว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งงานของ Chang et al. (2019) ได้ศึกษากับพลับ จำนวน 8 พันธุ์ พบว่าในใบมีความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกกับการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟลาโวนอยด์กับการต้านอนุมูลอิสระมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.7604 และ 0.9423 ตามลำดับ ที่ระดับ $P < 0.001$ ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และการต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในใบในแต่ละช่วงชีพลักษณ์การเจริญเติบโตในรอบปีของพลับ เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาแนวทางการนำใบพลับมาใช้ประโยชน์และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ

วิธีการศึกษา

ในการศึกษานี้ใช้ใบพลับ (*D. kaki*) พันธุ์ซิชูที่จัดเป็นพลับฝาดและพันธุ์ฟูยูที่จัดเป็นพลับหวาน ซึ่งทั้งสองพันธุ์ถูกนำมาปลูกเป็นการค้าทางภาคเหนือของประเทศไทย โดยเก็บใบจากแปลงปลูกที่ระดับความสูงประมาณ 1,400 เมตร ในพิกัดพื้นที่ 19°54'52.3"N 99°02'28.8"E ส่วนพลับป่าหรือกล้วยฤาษี (*D. glandulosa*) ที่พบขึ้นกระจายอยู่ตามธรรมชาติตั้งแต่ระดับสูงประมาณ 750 - 1,500 เมตร (องค์ความรู้เพื่อการพัฒนาพื้นที่สูง, 2559) ได้เก็บใบมาจากพิกัดพื้นที่ 19°54'13.1"N 99°02'31.1"E พื้นที่ศึกษาอยู่ในอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ โดยสุ่มเก็บใบเพสลาดในตำแหน่งที่ 3 - 6 นับจากปลายยอดของกิ่งที่มีการติดผลบนต้นมาใส่ในถุงพลาสติกเพื่อเก็บรักษาความชื้น นำใบมาล้างน้ำให้สะอาดและวางไว้ให้แห้ง ช่วงเวลาที่เก็บใบในแต่ละระยะมาศึกษาแยกตามชีพลักษณ์การเจริญเติบโตโดยใช้ BBCH-scale (Garcia-carbonell et al., 2002) จำนวน 6 ระยะ ได้แก่ 35: กิ่งเจริญได้ 50% ของความยาวกิ่งทั้งหมด 71: ติดผล กลีบดอกแห้งติดอยู่กับรังไข่ที่กำลังขยายตัว 75: ระยะผลกำลังเติบโตมีผิวสีเขียว 85: ระยะผลแก่เริ่มเปลี่ยนสี 87: ระยะผลสุก และ 93: ระยะใบร่วงก่อนสภาพพักตัวของต้น นำมาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของใบ ก่อนนำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง จากนั้นบดตัวอย่างใบแห้งให้ละเอียด ก่อนนำมาวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ตามวิธีการของ Hossain et al. (2018)

การสกัดตัวอย่างจากใบที่บดละเอียดใช้น้ำหนัก 0.1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองเติมด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นตัวทำละลาย เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ก่อนนำมากรองด้วยกระดาษ Whatman No. 1 นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's assay จากสารสกัดที่ได้นำมาปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมด้วย 10%Folin-Ciocalteu's reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 7.5%sodium carbonate ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร เขย่าสารให้เข้ากันและนำไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น GENESYS 10S Vis, USA) โดยใช้กรดแกลลิก (100%Gallic acid, Analytical grade, Sigma-aldrich Co, Ltd.) เป็นสารละลายมาตรฐาน คำนวณค่าเป็นมิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg GAE/g DW)

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ จากสารสกัดที่ได้ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมด้วย 5%sodium nitrite ปริมาตร 0.075 มิลลิลิตร เขย่าสารให้เข้ากัน วางไว้ 6 นาที เติม 10%aluminium chloride ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร เขย่าสารให้เข้ากันแล้ววางไว้นาน 5 นาที จากนั้นจึงเติม 1M sodium hydroxide ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าสารให้เข้ากันและนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร โดยใช้เควอซิติน (95%Quercetin, HPLC grade, Sigma-aldrich Co, Ltd.) เป็นสารละลายมาตรฐาน คำนวณค่าเป็นมิลลิกรัมสมมูลเควอซิตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg QE/g DW)

การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay นำสารสกัดตัวอย่างที่ได้เจือจางที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 20, 40, 60, 80 และ 100% ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติมด้วยสารละลาย 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และนำไปวางในสภาพมืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น นำสารละลายไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารละลายมาตรฐานและคำนวณการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50% (IC_{50}) หน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/mL)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple rang test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี Pearson's correlation ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การศึกษาลักษณะใบพลับพันธุ์ซิชูและพันธุ์ฟูยูจัดเป็นใบเดี่ยว (simple) ที่มีการจัดเรียงตัวแบบสลับ (alternate) โคนใบป้าน (obtuse) ปลายใบเรียวแหลม (acuminate) และขอบใบเรียบ (entire) ใบมีลักษณะค่อนข้างกลมถึงรูปไข่ (ovate - obovate) สอดคล้องกับงานของ Xie et al. (2015) ที่ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของใบ *Diospyros kaki* มีลักษณะเป็นใบเดี่ยว ใบรูปร่าง obovate ปลายใบแบบ acuminate ขอบใบเรียบ ส่วนใบของกล้วยฤาษีมีลักษณะสัณฐานวิทยาของใบแตกต่างจากใบพลับพันธุ์ซิชูและพันธุ์ฟูยู เป็นใบเดี่ยว จัดเรียงตัวแบบสลับ ใบเป็นรูปรี (elliptic) แผ่นใบมีความกว้างมากที่สุดตรงกลางแผ่น ปลายใบเรียวแหลม (acuminate) แผ่นใบมีขน (pubescent) ซึ่งแสดงให้เห็นลักษณะที่แตกต่างกันของใบกล้วยฤาษีกับใบพลับพันธุ์ซิชูและพันธุ์ฟูยู

การศึกษาการเจริญเติบโตของต้นพลับพันธุ์ซิชูและพันธุ์ฟูยูได้มาจากพื้นที่ปลูกในตำแหน่งพิกัดเดียวกัน โดยมีการเจริญเติบโตของต้นหลังจากพ้นสภาพพักตัวในพลับพันธุ์ซิชูเกิดขึ้นเร็วกว่าพันธุ์ฟูยูประมาณหนึ่งสัปดาห์ ส่วนต้นกล้วยฤาษีพบขึ้นอยู่ในสภาพธรรมชาติในพื้นที่ใกล้เคียงกัน ต้นเริ่มพ้นสภาพพักตัวได้ช้ากว่าประมาณหนึ่งเดือน ซึ่งการแปรผันของชีพลักษณ์การเจริญเติบโตของพลับที่ศึกษาขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพืช จากรายงานของ Toplu et al. (2009) ที่ศึกษาชีพลักษณ์ของพลับ (*Diospyros kaki*) จำนวน 10 พันธุ์ พบว่าพลับแต่ละพันธุ์เริ่มออกดอกในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน 1 ถึง 2 สัปดาห์ การเจริญของใบใหม่เกิดขึ้นในเดือนมีนาคมพร้อมกับกิ่งมีความยาวเพิ่มขึ้นจนกระทั่งคงที่ในเดือนพฤษภาคม ซึ่งเป็นช่วงระยะที่ผลเริ่มมีการเจริญเติบโตขยายขนาด จากการวัดการเจริญเติบโตด้านความยาวกิ่งของพลับพันธุ์ซิชูและพันธุ์ฟูยูมีค่าเฉลี่ย 21.36 และ 28.55 เซนติเมตรต่อปี ตามลำดับ และมีจำนวนใบอยู่ระหว่าง 7 - 11 ใบต่อกิ่ง ส่วนกล้วยฤาษีมีความยาวกิ่งเฉลี่ย 16.00 เซนติเมตรต่อปี ซึ่งกิ่งสั้นกว่าอีกสองพันธุ์ และมีจำนวนใบประมาณ 4 - 6 ใบต่อกิ่ง

การศึกษาขนาดใบพลับในระยะ 35 ที่กิ่งเจริญได้ครึ่งหนึ่งของความยาวกิ่งทั้งหมดนั้น เป็นช่วงที่ใบยังมีการเพิ่มขึ้นของพื้นที่ใบได้จนถึงระยะ 71 ที่มีการติดผลอ่อน จนกระทั่งเข้าสู่เดือนพฤษภาคมแล้วขนาดของใบพลับเริ่มคงที่ ส่วนลักษณะใบที่เก็บมาวัดขนาดและชั่งน้ำหนักในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของต้น พบว่าขนาดและน้ำหนักของใบมีการเพิ่มขึ้นในช่วงสองเดือนแรก โดยความยาวใบของพันธุ์ชิชูและพันธุ์ฟูยูอยู่ระหว่าง 12.41 - 14.88 เซนติเมตร ความกว้างใบของทั้งสองพันธุ์มีค่าใกล้เคียงกัน หากต้องการเก็บใบของพลับมาใช้ประโยชน์ในระยะที่มีการพัฒนาของผล อาจต้องพิจารณาถึงสัดส่วนพื้นที่ใบที่จำเป็นสำหรับการส่งอาหารมาเลี้ยงผลนั้นด้วย การเหลือจำนวนใบและพื้นที่ใบไว้ให้เพียงพอกับสมดุลย์ในการสะสมอาหารแล้ว อาจพิจารณานำใบมาใช้ประโยชน์เพิ่มมูลค่าจากผลิตภัณฑ์ของใบได้ เมื่อพิจารณาขนาดของใบกล้วยฤาษีมีลักษณะเรียวยาวและแคบ แต่ทรงพุ่มต้นของกล้วยฤาษีมีขนาดใหญ่และเป็นพืชที่พบขึ้นกระจายตัวอยู่บนพื้นที่สูง จึงอาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำใบมาใช้ประโยชน์ได้จากธรรมชาติโดยไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของผล นอกเหนือจากการเก็บเมล็ดมาเพาะใช้เป็นต้นตอในปลูกพลับทางการค้า **(Figure 1)**

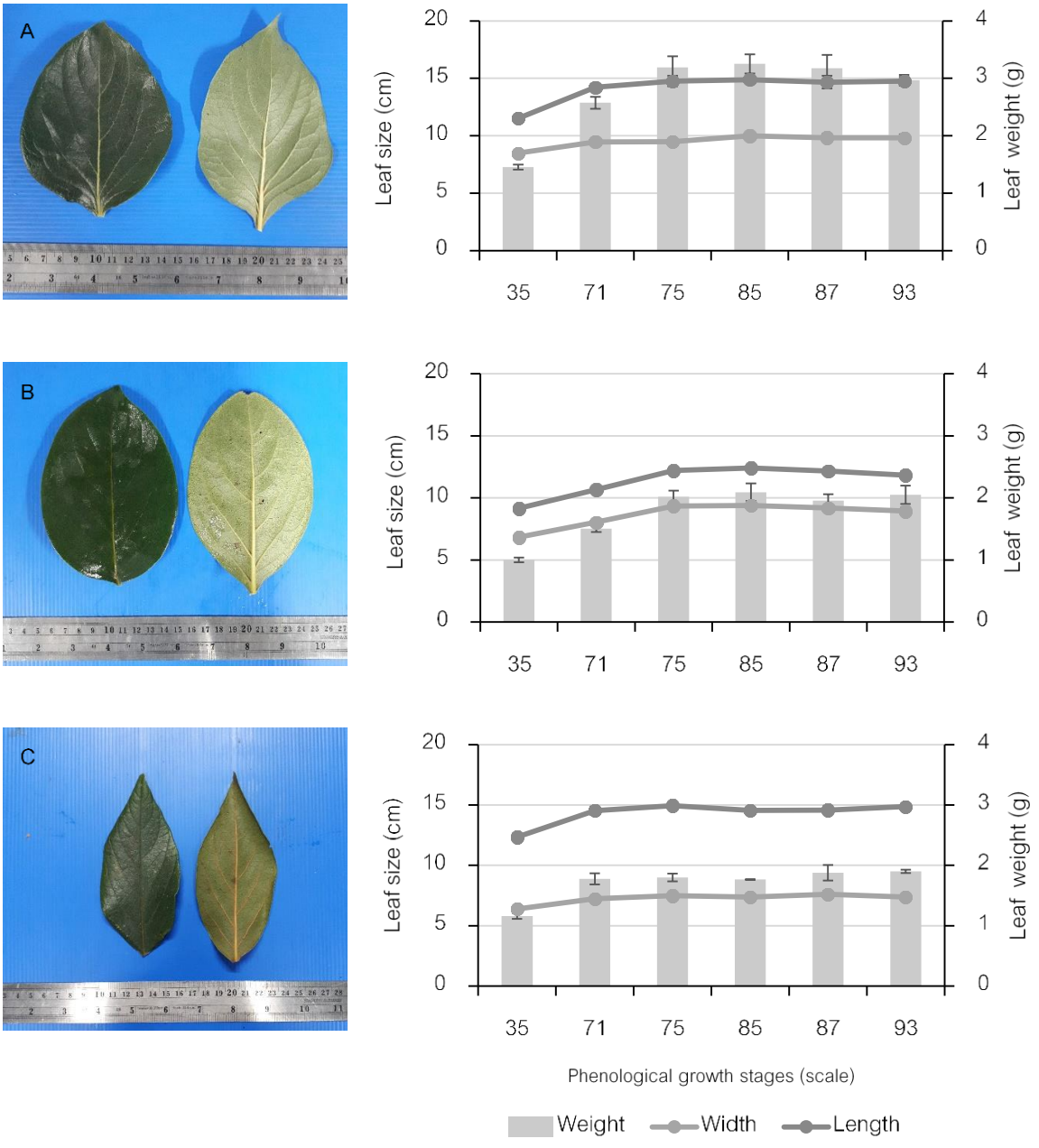

Figure 1 Leaf characteristical changes in 2 cultivars of *D. kaki* and *D. glandulosa* during phenological growth stages (A: 'Xichu', B: 'Fuyu' and C: Kluai ruesee)

* The BBCH-scale is used in code as followed: 35 = shoots about 50% of final length, 71 = fruit set: beginning of ovary growth, 75 = fruit about half of final size, 85 = fruit ripe for commercial picking, 87 = advanced ripening; has variety-specific color, 93 = beginning of leaf fall

การเก็บใบพลับในรอบปีตามชีพลักษณ์การเจริญเติบโตจากระยะพ้นสภาพพักตัวจนถึงระยะใบร่วงก่อนสภาพพักตัวของต้น พบว่าตั้งแต่ระยะ 35 - 71 เป็นช่วงที่ใบมีการขยายขนาดใบและเป็นระยะที่มีการออกดอกติดผล ต่อมาเข้าสู่ระยะ 75 เป็นช่วงที่ใบเจริญเติบโตขยายขนาดเต็มที่แล้วส่งอาหารไปสะสมให้กับผลจึงพบการร่วงของผลได้ไม่มากแล้ว ส่วนในระยะ 85 ใบแก่ที่อยู่บนต้นส่งอาหารไปให้ผลระยะแก่เต็มที่เริ่มมีการเปลี่ยนสีผลจนถึงระยะ 87 เป็นช่วงที่ผลสุกแก่ สีผลเปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้มพร้อมบริโภค ส่วนระยะ 93 ใบที่อยู่บนต้นหลังจากเก็บผลไปแล้วในช่วงก่อนผลัดใบเข้าสู่สภาพพักตัวของต้น ใบพลับทั้ง 6 ระยะที่ศึกษานี้ถูกเก็บมาวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และการต้านอนุมูลอิสระภายในใบของแต่ละระยะพบว่า ใบของพันธุ์ซิชูและพันธุ์ฟูยูมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดในระยะ 35 โดยพบได้ในใบพันธุ์ซิชูมากกว่าใบพันธุ์ฟูยูและกล้วยฤาษีซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ปริมาณฟีนอลิกในใบพลับพันธุ์ซิชูและพันธุ์ฟูยูลดลงตามระยะการเจริญเติบโตของต้นที่มากขึ้น แสดงค่าน้อยสุดในช่วงที่ตรงกับระยะผลแก่เริ่มเปลี่ยนสีในระยะ 85 มีค่าเท่ากับ 39.75 และ 38.33 mg GAE/g DW ตามลำดับ แต่ปริมาณฟีนอลิกเพิ่มขึ้นในใบระยะ 87 และ 93 ตรงกับช่วงที่ผลเข้าสู่ระยะสุกและเก็บผลไปแล้ว ในทางตรงกันข้ามกับใบของกล้วยฤาษีมีปริมาณฟีนอลิกเพิ่มขึ้นตามระยะการเจริญเติบโตของต้น โดยในระยะ 35 มีปริมาณฟีนอลิกน้อยที่สุดและมีค่าเพิ่มขึ้นถึงระยะ 85 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 142.13 mg GAE/g DW ซึ่งมีปริมาณมากกว่าในใบของพันธุ์ซิชูและพันธุ์ฟูยู แต่อย่างไรก็ตามในใบกล้วยฤาษีระยะผลสุกและเก็บผลแล้วมีปริมาณฟีนอลิกลดลง แต่ยังแสดงปริมาณที่พบได้มากกว่าในใบของพันธุ์ซิชูและพันธุ์ฟูยูแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญด้วย **(Figure 2)** ทั้งนี้ การเจริญของผลพลับพันธุ์ซิชูและพันธุ์ฟูยูอาจต้องนำอาหารที่สร้างจากใบไปไว้ที่ผลมากกว่าการเก็บสะสมไว้ในรูปของสารทุติยภูมิที่พบในใบก็ได้ นอกจากนี้ ยังเป็นไปได้ว่าในใบพลับฝาดมีการสะสมปริมาณฟีนอลิกไว้ในใบมากกว่าที่พบในใบพลับหวานอีกด้วย ตามที่ Chang et al. (2019) ได้รายงานผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกและการต้านอนุมูลอิสระของใบพลับ จำนวน 8 พันธุ์ พบว่าใบของกลุ่มพลับฝาดประเภทสีเนื้อคงที่หลังการผสมเกสรแล้ว มีปริมาณฟีนอลิกมากกว่าใบของกลุ่มพลับหวานและได้ส่งผลให้มีการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าด้วย สอดคล้องกับในการศึกษานี้ที่พบในใบพลับพันธุ์ซิชูและกล้วยฤาษีที่ผลมีความฝาดมีปริมาณฟีนอลิกและการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าพันธุ์ฟูยูที่จัดเป็นใบพลับหวาน นอกจากนี้ รายงานของ Zou et al. (2012) พบปริมาณฟีนอลิกในใบหม่อนมีความแตกต่างกันระหว่างพันธุ์และช่วงระยะเวลาการเก็บใบด้วยเช่นเดียวกับใบพลับที่ศึกษา เมื่อเปรียบเทียบกับใบชา (*Camellia sinensis*) จำนวน 4 ชนิด พบมีปริมาณฟีนอลิกอยู่ระหว่าง 19 - 33 mg GAE/g DW (Al-Obaid and Sahib, 2015) ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าที่วิเคราะห์ได้ในใบที่ศึกษาทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช

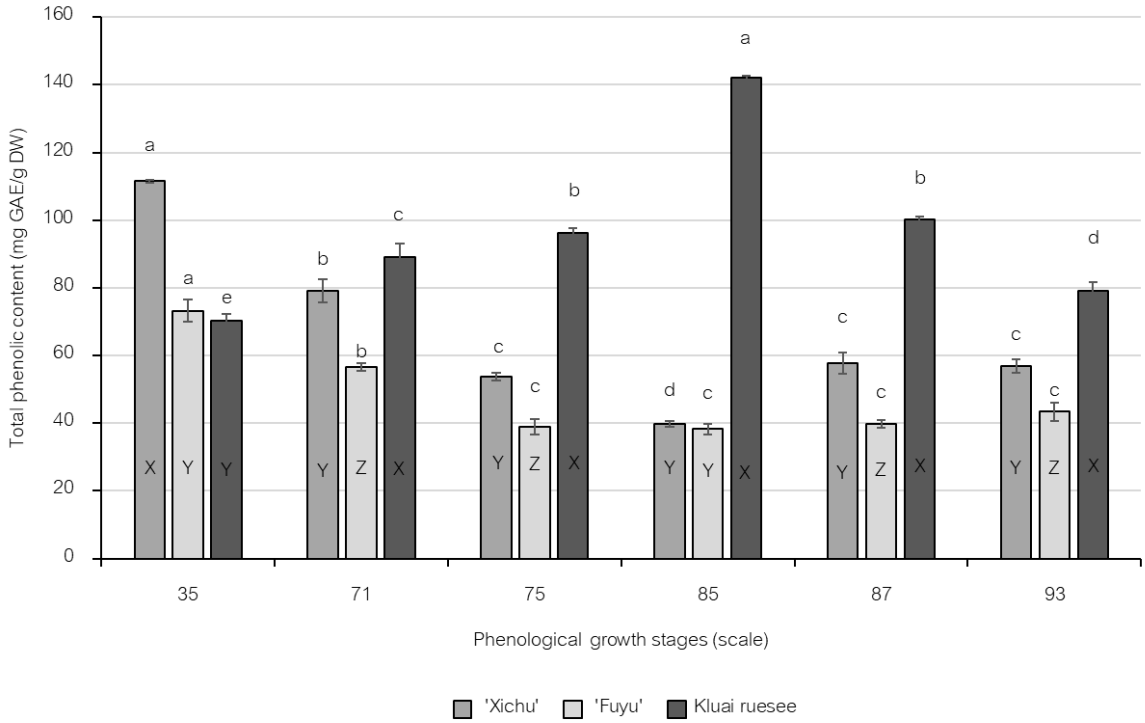

Figure 2 Total phenolic content in 2 cultivars of *D. kaki* and *D. glandulosa* leaves during phenological growth stages were studied. Little alphabet letters (a-e) within bars of the same cultivar with different stages, and capital alphabet letters (X–Z) within bars of the same stages with different cultivars are significantly different at P < 0.05

* The BBCH-scale is used in code as followed: 35 = shoots about 50% of final length, 71 = fruit set: beginning of ovary growth, 75 = fruit about half of final size, 85 = fruit ripe for commercial picking, 87 = advanced ripening; has variety-specific color, 93 = beginning of leaf fall

ปริมาณฟลาโวนอยด์ในใบพลับมีแนวโน้มเปลี่ยนแปลงไปในทำนองเดียวกับปริมาณฟีนอลิก ซึ่งเป็นไปตามที่ Hossain et al. (2018) กล่าวว่าการเพิ่มขึ้นและลดลงของปริมาณฟลาโวนอยด์มีแนวโน้มเหมือนกับฟีนอลิกที่พบในใบพลับที่ศึกษาในครั้งนี้ด้วย นอกจากนั้น ปริมาณฟลาโวนอยด์ในใบของพันธุ์ชิชูและพันธุ์ฟูยูมีปริมาณสูงในช่วงระยะ 35 - 71 เมื่อการเจริญเติบโตของต้นเพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณฟลาโวนอยด์ในใบแสดงค่าลดลง แต่ขณะที่พันธุ์ฟูยูมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นในใบระยะ 93 เป็นช่วงที่เก็บผลจากต้นไปแล้ว ส่วนผลการวิเคราะห์ในใบของกล้วยฤๅษีแสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละช่วงของการเจริญเติบโต โดยมีปริมาณฟลาโวนอยด์ในใบที่แตกต่างกัน ซึ่งมีปริมาณสูงสุดในระยะ 85 และ 87 มีค่าเท่ากับ 270.61 และ 286.12 mg QE/g DW ตามลำดับ **(Figure 3)** เมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ในใบของมะเดื่อฝรั่ง (*Ficus carica*) จำนวน 10 พันธุ์แล้วพบปริมาณฟลาโวนอยด์อยู่ระหว่าง 11.67 – 16.21 mg QE/g DW ซึ่งให้ค่าน้อยกว่าที่พบในใบของกล้วยฤๅษีถึง 20 เท่า (Mahmoudi et al. 2016)

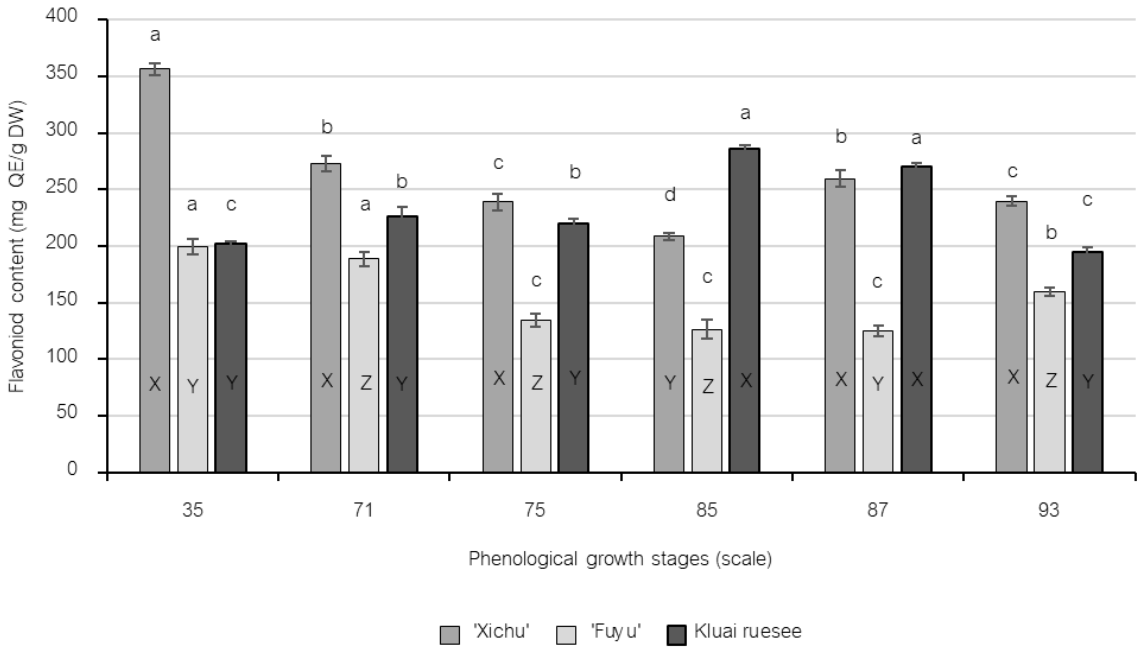

Figure 3 Flavonoid content in 2 cultivars of *D. kaki* and *D. glandulosa* leaves during phenological growth stages were studied. Little alphabet letters (a-d) within bars of the same cultivar with different stages, and capital alphabet letters (X–Z) within bars of the same stages with different cultivars are significantly different at $P < 0.05$

* The BBCH-scale is used in code as followed: 35 = shoots about 50% of final length, 71 = fruit set: beginning of ovary growth, 75 = fruit about half of final size, 85 = fruit ripe for commercial picking, 87 = advanced ripening; has variety-specific color, 93 = beginning of leaf fall

สำหรับการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระในใบพลับแสดงในรูปของค่า IC_{50} (The half-maximal inhibitory concentration) ของพันธุ์ซิชูและพันธุ์ฟูยูในช่วงระยะ 35 มีค่าเท่ากับ 35.23 และ 57.54 µg/mL ตามลำดับ กล่าวคือในระดับความเข้มข้นน้อยมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้ดี จึงมีประสิทธิภาพมากกว่าใบในระยะอื่น ๆ ที่มีค่า IC_{50} สูงสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้น้อยลง พบว่าใบของพันธุ์ซิชูในช่วงแรกสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีเมื่อเทียบกับใบของพันธุ์ฟูยูและกล้วยฤาษี หลังจากนั้นค่า IC_{50} สูงขึ้นจึงต้านอนุมูลอิสระได้ลดลงตามระยะการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น ในทางตรงกันข้ามกับใบกล้วยฤาษีมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระน้อยในช่วงแรก หลังจากนั้นเพิ่มขึ้นจนกระทั่งสูงสุดในผลแก่เริ่มเปลี่ยนสีของระยะ 85 เท่ากับ 23.64 µg/mL **(Figure 4)** ยังพบว่าใบกล้วยฤาษีมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าในใบของพันธุ์ซิชูและพันธุ์ฟูยูตั้งแต่ระยะที่มีการออกดอกติดผลจนถึงเก็บผลจากต้นแล้ว ทั้งนี้ กล้วยฤาษีเป็นพืชที่พบขึ้นอยู่ตามธรรมชาติมีทรงต้นขนาดใหญ่ ผลมีรสฝาดและติดผลขนาดเล็ก จึงอาจจะนำอาหารสะสมไปใช้ในการสร้างสารทุติยภูมิในใบพบได้มากกว่าพันธุ์ซิชูและพันธุ์ฟูยู ซึ่งในงานของ รัตติยา และศศิวิมล (2552) ได้วิเคราะห์ในใบมะรุม (*Moringa oleifera*) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 179.22 µg/mL ซึ่งมีค่ามากกว่าที่พบในการศึกษานี้ แสดงถึงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของใบพลับสูงกว่าใบมะรุม

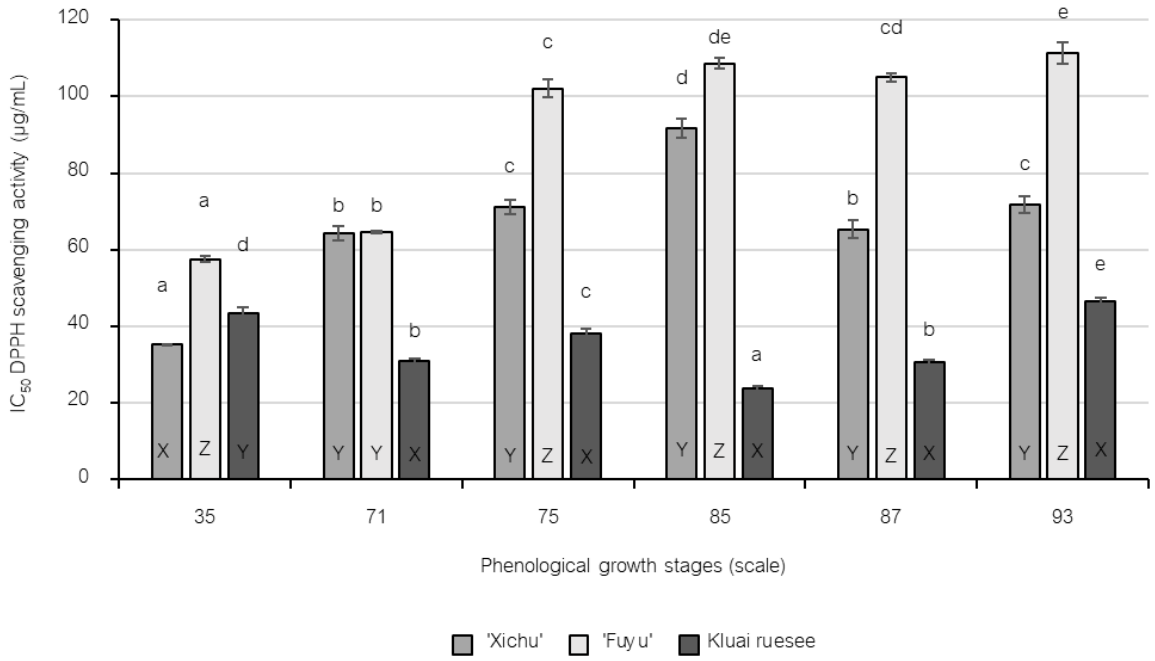

Figure 4 Antioxidant activities by DPPH in 2 cultivars of *D. kaki* and *D. glandulosa* leaves during phenological growth stages. Little alphabet letters (a-d) within bars of the same cultivar with different stages, and capital alphabet letters (X–Z) within bars of the same stages with different cultivars are significantly different at $P < 0.05$

* The BBCH-scale is used in code as followed: 35 = shoots about 50% of final length, 71 = fruit set: beginning of ovary growth, 75 = fruit about half of final size, 85 = fruit ripe for commercial picking, 87 = advanced ripening; has variety-specific color, 93 = beginning of leaf fall

จาก **Figure 5A** แสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยสองอย่างด้วยการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกกับฟลาโวนอยด์ของใบพลับและกล้วยฤาษีที่ศึกษา พบว่าปริมาณสารทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์กันในเชิงบวกด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) เท่ากับ 0.896, 0.873 และ 0.882 ที่ระดับ $P < 0.01$ ในใบของพันธุ์ซิชู พันธุ์ฟูยู และกล้วยฤาษี ตามลำดับ กล่าวคือมีความสัมพันธ์กันมากไปในทิศทางเดียวกันระหว่างสารทั้งสองชนิดนี้ สำหรับ **Figure 5B** แสดงค่าสหสัมพันธ์ของการต้านอนุมูลอิสระจากค่า IC_{50} กับปริมาณฟีนอลิกในใบกล้วยฤาษีแสดงค่า R เท่ากับ -0.831 ($P < 0.01$) เป็นความสัมพันธ์แบบเชิงลบ สอดคล้องกับงานของ Fitriansyah et al. (2017) ที่รายงานในใบ *Sesbania sesban* พบว่ามีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันตรงข้ามกันของปริมาณฟีนอลิกกับการต้านอนุมูลอิสระให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาในใบกล้วยฤาษีมีการสะสมปริมาณฟีนอลิกที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการลดลงของค่า IC_{50} จึงให้ผลแบบแปรผกผันเช่นกัน ทั้งนี้ อาจมีปัจจัยสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (Dahlia et al., 2020) เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิกกับการต้านอนุมูลอิสระในใบพลับพันธุ์ซิชูและพันธุ์ฟูยูมีค่าเท่ากับ -0.913 และ -0.909 ตามลำดับ ที่ระดับ $P < 0.01$ ให้ค่ามากกว่าในใบกล้วยฤาษี อาจเนื่องมาจากอิทธิพลของพันธุกรรมพืชที่แตกต่างกันจึงส่งผลต่อความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิกกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่พบในใบของพลับ เช่นเดียวกับรายงานของ Augusto et al. (2014) ที่พบความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิกกับการต้านอนุมูลอิสระในผล Chilean guava พันธุ์ 14-4 และพันธุ์ป่าที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แตกต่างกันระหว่างพันธุ์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.95 และ 0.99 ตามลำดับ ที่ระดับ $P < 0.05$

จาก **Figure 5C** แสดงความสัมพันธ์ของการต้านอนุมูลอิสระจากค่า IC_{50} กับฟลาโวนอยด์ในใบพลับและกล้วยฤาษีมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน แต่ใบกล้วยฤาษีมีปริมาณฟลาโวนอยด์เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อค่า IC_{50} จึงแสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกกับค่า IC_{50} จะเห็นได้ว่าใบกล้วยฤาษีจึงมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

เป็นไปตามปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ได้ดีกว่าพลับอีกสองพันธุ์ สอดคล้องกับ Pourmorad et al. (2006) ที่กล่าวว่าปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นสารต้านออกซิเดชันให้อะตอมไฮโดรเจนที่สามารถใช้ดักจับอนุมูลอิสระได้ จึงมีผลต่อการต้านอนุมูลอิสระด้วย

ดังนั้น การนำใบของ *Diospyros* spp. มาใช้ประโยชน์เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพนั้น พิจารณาจากชนิด (species) ชีพลักษณ์การเจริญเติบโตของพืช ส่วนช่วงเวลาการเก็บใบที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจ สำหรับพลับพันธุ์ซิชูและพันธุ์ฟูยู โดยเฉพาะกับพันธุ์ซิชูที่มีปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และการต้านอนุมูลอิสระในใบมากกว่าพันธุ์ฟูยู ควรเลือกเก็บใบหลังจากเก็บผลเพื่อจำหน่ายแล้วก่อนเข้าสู่สภาพพักตัวของต้น เนื่องจากการเก็บใบพลับในช่วงแรกของการเจริญเติบโตอาจส่งผลกระทบต่อการผลิตผลพลับเพื่อการจำหน่ายและบริโภค ส่วนการนำใบกล้วยฤๅษีที่พบตามธรรมชาติมาใช้ประโยชน์ควรเลือกเก็บในช่วงระยะหลังจากการติดผล เนื่องจากมีปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าใบพลับพันธุ์ซิชูและพันธุ์ฟูยู จึงสามารถเลือกเก็บใบได้โดยไม่กระทบต่อการนำเมล็ดมาเพาะเป็นต้นตอ

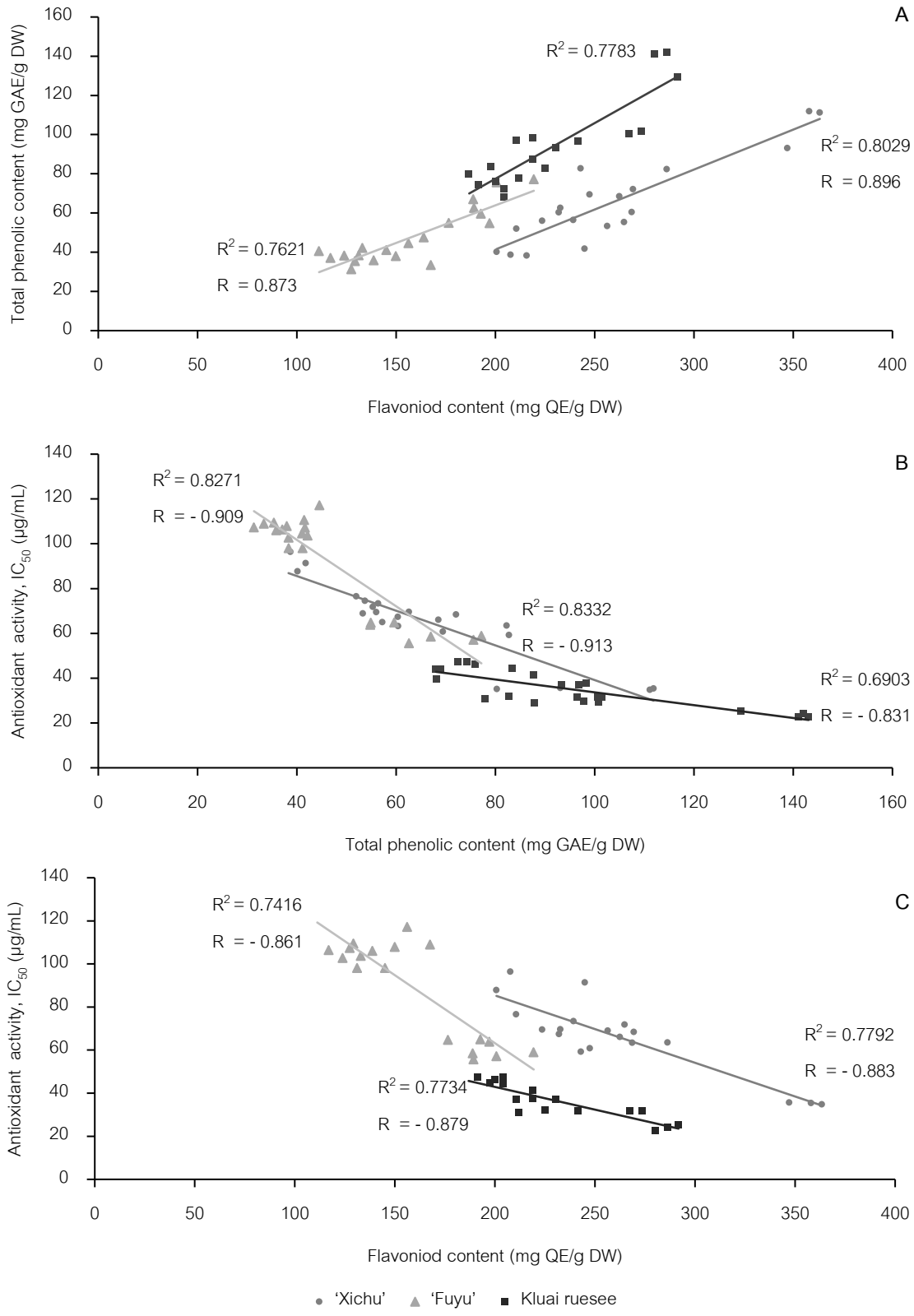

Figure 5 The correlation coefficients between total phenolic with flavonoid contents (A), antioxidant activity (IC_{50}) with total phenolic content (B), and antioxidant activity (IC_{50}) with flavonoid content (C) were calculated on the leaves in 2 cultivars of *D. kaki* and *D. glandulosa*

สรุป

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และการต้านอนุมูลอิสระในใบพลับพันธุ์ซิชู พันธุ์ฟูยู และกล้วยฤาษี ระหว่างการเจริญเติบโตของต้น พบว่าการเปลี่ยนแปลงและปริมาณสารในใบแตกต่างกัน ซึ่งใบกล้วยฤาษีมีปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าพันธุ์ซิชูและพันธุ์ฟูยูในระยะที่มีการออกดอกติดผลจนถึงเก็บผลจากต้นแล้ว นอกจากนี้ ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกกับฟลาโวนอยด์แบบเชิงบวกและความสัมพันธ์ระหว่างการต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นแบบเชิงลบ สำหรับการนำใบของ *Diospyros* spp. มาใช้ประโยชน์เป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพนั้น ใบกล้วยฤาษีควรเลือกเก็บใบได้ตั้งแต่ระยะที่ต้นมีการติดผลจนถึงเข้าสู่สภาพการพักตัว ส่วนพลับพันธุ์ซิชูและพันธุ์ฟูยูสามารถเก็บใบมาใช้ประโยชน์ได้หลังจากเก็บผลแล้ว

เอกสารอ้างอิง

รัตติยา มากทรัพย์ และ ศศิวิมล วิชัยรัมย์. 2552. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของมะรุม. โครงการพิเศษเภสัชศาสตรบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

วสันต์ ชุณห์วิจิตรา. 2558. การปลูกพลับ. ข่าวสารเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 60: 39-46.

สุรินทร์ นิลสำราญจิต. 2543. ไม้ผลเขตหนาว. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

สุรินทร์ นิลสำราญจิต และ สุริยา ตาเที่ยง. 2558. สัณฐานวิทยาเมล็ดและสารประกอบโพลีฟีนอลของลำไย. วารสารเกษตร. 31: 167-175.

องค์ความรู้เพื่อการพัฒนาพื้นที่สูง. 2559. บ่ากล้วยฤาษี (พลับป่า). แหล่งข้อมูล: https://hkm.hrdi.or.th/knowledge /detail/197. ค้นเมื่อ 15 พฤษภาคม 2563.

Al-Obaid, R.S.S. and D.H. Sahib. 2015. Determination of antioxidants activity in tea extract. American Journal of Biochemistry. 5: 49-52.

Augusto, T.R., E.S.S. Salinas, S. M. Alencar, M.A.B.R. Arce, A.C. Camargo, and T.M.F.S. Vieira. 2014. Phenolic compounds and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts of wild and cultivated murtilla (*Ugni molinae* Turcz.). Journal of Food Science and Technology. 34: 667-673.

Chang, Y., J. Lin, H. Lin, P. Liao, P. Wu, and D. Yang. 2019. Phenolic compositions and antioxidant properties of leaves of eight persimmon varieties harvested in different periods. Food Chemistry. 298: 74-83.

Dahlia, F., S. Barouagui, H. Hemida, D. Bousaadia, and B. Rahmoune. 2020. Influence of environment variations on anti-glycaemic, anti-cholesterolemic, antioxidant and antimicrobial activities of natural wild fruits of *Ziziphus lotus* (L.). South African Journal of Botany. 132: 215 – 225.

Deetae, P., P. Parichanon, P. Trakunleewatthana, C. Chanseetis, and S. Lertsiri. 2012. Antioxidant and anti-glycation properties of Thai herbal teas in comparison with conventional teas. Food Chemistry. 133: 953-959.

Fitriansyah, S.N., I. Fidrianny, and K. Ruslan. 2017. Correlation of total phenolic, flavonoid and carotenoid content of *Sesbania sesban* (l. merr) leaves extract with DPPH scavenging activities. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research. 9: 89-94.

Garcia-carbonell, S., B. Yague, H. Bleiholder, H. Hack, U. Meier, and M. Agusti. 2002. Phenological growth stages of the persimmon tree (*Diospyroe kaki*). Annals of Applied Biology. 141: 73-76.

Hossain, H., K. Moon, and J. Kim. 2017. Antioxidant properties of Korean major persimmon (*Diospyros kaki*) leaves. Food Science and Biotechnology. 27: 177-184.

Pérez-Burillo, S., M.J. Oliveras, J. Quesada, J.A. Rufián-Henares, and S. Pastoriza. 2018. Relationship between composition and bioactivity of persimmon and kiwifruit. International Food Research Journal. 105: 461-472.

Pourmorad, F., S.J. Hosseinimehr, and N. Shahabimajd. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology. 5: 1142-1145.

Ramirez, M., M.V. Saenz, A. Vargas, and M. Araya. 2008. Leaf pruning intensities at flowering of banana (*Musa* AAA, cv. Grande Naine) did not influence fruit green and yellow life and quality. Scientia Horticulturae. 115: 319–322.

Sakanaka, S., Y. Tachibana, and Y. Okada. 2005. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). Food Chemistry. 89: 569-575.

Toplu, C., M. Kaplankiran, T.H. Demirkeser, E. Demir, E.E. Çandir, and E. Yildiz. 2009. The performance of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) cultivas under mediterranean coastal conditions in Hatay, Turkey. Journal of the American Pomological Society. 63: 33-41.

Xie, C., Z. Xie, X. Xu, and D. Yang. 2015. Persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves: A review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties. Journal of Ethnopharmacology. 163: 229-240.

Zou, Y., S. Liao, W. Shen, F. Liu, C. Tang, C.Y. Chen, and Y. Sun. 2012. Phenolics and antioxidant activity of mulberry leaves depend on cultivar and harvest month in Southern China. International Journal of Molecular Sciences. 13: 16544-16553.