



Research Article

The influence of growth stages on the antioxidant properties and phenolic compounds of *Piper betle* L. leaves

อิทธิพลของระยะการเจริญเติบโตต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกในใบพลู

วิสิทธิ์ มันทอง¹, ชลดา วรณภงา¹, เนาวรัตน์ กองคำ^{1*}

Wisit Monthong¹, Chonlada Wanphunga¹, Naowarat Kongkum^{1*}

¹คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์ 186 หมู่ 1 ถนนสุรินทร์-ปราสาท ต.นอกเมือง อ.เมือง จ.สุรินทร์ 32000

¹Faculty of Science and Technology, Surindra Rajabhat University, 186 Moo 1, Surin-Prasart Road, Nokmuang, Surin, 32000

Article Info

Received 28 August 2025

Revised 25 December 2025

Accepted 26 December 2025

Abstract

This study aimed to evaluate the effect of different growth stages on the total phenolic content (TPC) and antioxidant activities of *Piper betle* L. leaves. Leaf samples were categorized into young, mature, and old stages. The crude 95% ethanolic extracts were analyzed for TPC (Folin-Ciocalteu) and antioxidant activities (DPPH and ABTS). The results showed that young leaves exhibited the highest TPC (437.67 ± 8.98 mg GAE/g extract) and the lowest half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values in both DPPH (15.73 ± 0.39 mg/L) and ABTS (13.42 ± 0.24 mg/L) assays, indicating stronger antioxidant potential compared to mature and old leaves. A strong negative correlation was observed between TPC and IC_{50} values, with high coefficients of determination ($R^2 = 1.000$ for DPPH and $R^2 = 0.999$ for ABTS), suggesting that higher phenolic content is closely associated with lower IC_{50} values. These findings indicate that young *P. betle* leaves have the highest potential as a natural source of antioxidants.

Keywords: *Piper betle* leaves, phenolic compound, antioxidant activity, growth stages

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลของระยะการเจริญเติบโตต่อปริมาณสารฟีนอลิกรวม (TPC) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบพลู (*Piper betle* L.) โดยจำแนกตัวอย่างเป็นใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ สารสกัดหยาบเอทานอล 95% ถูกนำมาวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (Folin-Ciocalteu) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH และ ABTS) ผลการทดลองพบว่าใบอ่อนมีค่า TPC สูงที่สุด (437.67 ± 8.98 mg GAE/g extract) และมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ต่ำที่สุด ทั้งในวิธี DPPH (15.73 ± 0.39 mg/L) และ ABTS (13.42 ± 0.24 mg/L) แสดงถึงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าใบเพสลาดและใบแก่ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า TPC และค่า IC_{50} พบความสัมพันธ์เชิงลบที่มีค่าสัมประสิทธิ์การกำหนดสูง ($R^2 = 1.000$ สำหรับ DPPH และ $R^2 = 0.999$)

สำหรับ ABTS) บ่งชี้ว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณฟีนอลิกมีความสัมพันธ์กับการลดลงของค่า IC_{50} อย่างชัดเจน ผลการศึกษานี้ชี้ว่าใบพลูในระยะอ่อนมีศักยภาพสูงสุดในการใช้เป็นแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ

คำสำคัญ: ใบพลู, สารประกอบฟีนอลิก,ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ระยะการเจริญเติบโต

1. บทนำ

พืชในสกุล *Piper* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Piperaceae เป็นกลุ่มพืชที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง โดยมีรายงานการค้นพบมากกว่า 1,000 ชนิดทั่วโลก และพบมากในภูมิภาคเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนของเอเชีย อเมริกาใต้ และแอฟริกา [1] พืชในสกุลนี้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและการแพทย์แผนโบราณมาอย่างยาวนาน เนื่องจากมีองค์ประกอบทางเคมีเฉพาะที่ให้สรรพคุณทางยาหลากหลาย ตัวอย่างเช่น *Piper nigrum* (พริกไทย) ที่เป็นเครื่องเทศเศรษฐกิจสำคัญระดับโลก, *Piper sarmentosum* (ชะพลู) ที่นิยมนำมาประกอบอาหารและมีสารต้านอนุมูลอิสระสูง, *Piper auritum* (พลูเม็กซีกัน) ใช้บรรเทาอาการโรคตับ และ *Piper betle* (พลู) มีการใช้ในตำรับยาและการบริโภคเพื่อสุขภาพ [2] บทความรีวิวของ Salehi et al. (2019) [2] รายงานว่าพืชในสกุล *Piper* มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ด้านการอักเสบ สมานแผล ด้านเชื้อจุลินทรีย์ ด้านเชื้อรา และออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท ซึ่งปัจจุบันศักยภาพเหล่านี้ได้ถูกนำไปต่อยอดในเชิงพาณิชย์อย่างกว้างขวาง ทั้งในอุตสาหกรรมยา ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และสารสกัดกำจัดศัตรูพืชจากธรรมชาติ

เมื่อพิจารณาเฉพาะใบพลู (*P. betle*) มีรายงานวิจัยระบุว่าเป็นหนึ่งในพืชสกุล *Piper* ที่มีความโดดเด่นด้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากอุดมด้วยสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์หลากหลายชนิด ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการป้องกันความเสียหายของเซลล์จากกระบวนการออกซิเดชัน ลดความเสี่ยงของโรคเรื้อรังที่เกี่ยวข้องกับภาวะความเครียดออกซิเดชัน เช่น มะเร็ง โรคหัวใจ โรคเบาหวาน และโรคหลอดเลือดสมอง [3-4] ด้วยคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่โดดเด่นนี้ ปัจจุบันใบพลูจึงไม่ได้จำกัดอยู่เพียงการใช้ในครัวเรือน แต่ได้ก้าวสู่อุตสาหกรรมสุขภาพและความงามเชิงพาณิชย์ โดยมีการนำสารสกัดไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าสูงหลากหลายรูปแบบ เช่น ยาสีฟัน สมุนไพรลดกลิ่นปาก สบู่ยับยั้งแบคทีเรีย เวชสำอางชะลอวัย และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ซึ่งกำลังเป็นที่ต้องการของตลาดผู้บริโภคที่ใส่ใจสุขภาพ [5] ความต้องการผลิตภัณฑ์เหล่านี้ เป็นผลมาจากความตื่นตัวเรื่องอันตรายของอนุมูลอิสระ ซึ่งในทางทฤษฎีนั้น อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนที่โดดเดี่ยว (unpaired electron) อยู่ในวงจรรอบนอก ทำให้โครงสร้างโมเลกุลไม่เสถียร และเกิดปฏิกิริยาทางเคมีง่าย

เมื่อสะสมในร่างกายมากเกินไปจะสามารถทำลายโครงสร้างชีวโมเลกุลที่สำคัญ เช่น โปรตีน ลิพิด และดีเอ็นเอ ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของเซลล์และเนื้อเยื่อ และนำไปสู่การเกิดโรคเรื้อรังหลายชนิด แม้ว่าร่างกายจะสามารถสร้างสารต้านอนุมูลอิสระภายใน (endogenous antioxidants) เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (SOD) แคทาเลส (CAT) และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GSHPx) ได้แต่ปัจจัยกระตุ้นจากภายนอก เช่น มลภาวะ สิ่งแวดล้อม ความเครียดเรื้อรัง และอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการต่ำ อาจทำให้สมดุลของระบบต้านอนุมูลอิสระเสียไป [6] ดังนั้น การได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอก (exogenous antioxidants) โดยเฉพาะจากพืชสมุนไพรที่มีสารฟีนอลิกสูง จึงมีความสำคัญต่อการเสริมสร้างกลไกป้องกันของร่างกาย

การศึกษาทางเคมีพบว่าใบพลูเป็นแหล่งสำคัญของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด โดยเฉพาะสารในกลุ่มฟีนอลิก เช่น eugenol, hydroxychavicol, chavicol และ allyl pyrocatechol ซึ่งมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ด้านการอักเสบ และต้านอนุมูลอิสระที่โดดเด่น [7-9] กลไกการออกฤทธิ์ของสารฟีนอลิกเหล่านี้เกี่ยวข้องกับความสามารถในการบริจาคอะตอมไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอน เพื่อทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียร ลดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดออกซิเดชันในเซลล์ และยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอนุมูลอิสระและกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต้านออกซิเดชันภายในร่างกาย [8] คุณสมบัติเหล่านี้สะท้อนให้เห็นถึงศักยภาพสูงของใบพลูในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและยาสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพ

อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพร รวมถึงใบพลู อาจแปรผันตามปัจจัยหลายประการ เช่น ความแตกต่างของสายพันธุ์ วิธีการเพาะปลูก และสภาพแวดล้อมการเจริญเติบโต รวมถึงวิธีการสกัดที่ใช้ในการเตรียมสารสกัด [10-11] นอกจากนี้ ปัจจัยทางสรีรวิทยาของพืชเอง เช่น การเปลี่ยนแปลงตามระยะการพัฒนาและการเจริญเติบโตของใบ อาจมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์และการสะสมของสารฟีนอลิก ซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด [12] งานวิจัยในพืชสมุนไพรชนิดอื่นยังชี้ให้เห็นว่าความแตกต่างของอายุใบสามารถทำให้ปริมาณสารฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเปลี่ยนแปลงไปอย่างมี

นัยสำคัญ [13] แต่สำหรับใบพลูยังขาดข้อมูลการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่ชัดเจนและเป็นระบบ

ดังนั้น จึงมีความจำเป็นในการศึกษาเชิงลึกเพื่อทำความเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างระยะการเจริญเติบโตของใบพลู กับปริมาณสารฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ข้อมูลดังกล่าวจะช่วยระบุช่วงเวลาเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมซึ่งให้คุณภาพสารออกฤทธิ์สูงสุด และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากใบพลูที่มีคุณภาพและประสิทธิภาพสูงขึ้น

2.วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 เครื่องมือและสารเคมี

เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer (Perkin Elmer Lambda 365) สารเคมีที่สำคัญ ได้แก่ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma-Aldrich,USA), ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline -6-sulphonic acid) (SRL, India), Folin-Ciocalteu (SRL, India), Gallic acid (Sigma-Aldrich, USA), Ascorbic acid (Loba, India)

2.2 การสกัดและการเตรียมตัวอย่าง

ใบพลู (*P. betle*) ในสามระยะช่วงการเจริญเติบโต คือ ใบอ่อน (ใบลำดับที่ 1-3 จากยอดและมีสีเขียวอ่อน) ใบเพสลาด (ใบลำดับที่ 4-5 จากยอดและมีสีเขียวเข้มขึ้น) และใบแก่ (ใบลำดับที่ 6 เป็นต้นไป จากปลายยอดและมีสีเขียวเข้ม) เก็บจากตำบลทุ่งศรีเมือง อำเภอสุวรรณภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2566 หลังจากล้างทำความสะอาด ใบพลูจะถูกทำให้แห้งในที่ร่มมีลมโกรก จากนั้นบดละเอียดและนำตัวอย่างละ 20 กรัม ไปหมักด้วยเอทานอล 95% (v/v) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ของเหลวที่สกัดได้ถูกกรองออกจากกากและระเหยตัวทำละลายเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator) ส่วนกากที่เหลือทำการสกัดซ้ำอีกสองครั้ง สารสกัดที่ได้แต่ละครั้งถูกรวมกัน และทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) ภายใต้อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะได้สารสกัดหยาบซึ่งถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ในภาชนะปิดสนิทป้องกันแสงจนกว่าจะใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2.3 วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content, TPC) ใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric assay [14] โดยเตรียมสารสกัดใบพลู ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาชนิดละ

1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu (เจือจาง 10 เท่า) 5 มิลลิลิตร และสารละลาย Sodium carbonate (เข้มข้น 7.5%) 4 มิลลิลิตร ผสมและเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ในการทดลองนี้ใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน (กรดแกลลิกเตรียมที่ความเข้มข้น 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 และ 200 mg/L) จากนั้นคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวม จากสมการเส้นตรง $y=0.0049x-0.0799$ ($r^2=0.9938$) และคำนวณให้อยู่ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก ต่อน้ำหนักกรัมสารสกัด (mgGAE/g extract) การทดลองทั้งหมดทำซ้ำ 3 ครั้ง

2.4 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.4.1 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH [15] เตรียมสารสกัดหยาบจากใบพลูและสารมาตรฐาน Ascorbic acid ใน 4 ระดับความเข้มข้น (25, 12.5, 6.25 และ 3.125 mg/L) เจือจางในเอทานอล นำสารสกัดแต่ละระดับความเข้มข้นมาอย่างละ 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH (เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์) 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีในที่มืด วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร การทดลองทั้งหมดทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (% DPPH Radical Scavenging) ได้จากสมการ 1 และคำนวณค่า IC_{50} ซึ่งได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นกับเปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

$$\% \text{ DPPH Radical scavenging} = (A_{\text{DPPH}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{DPPH}} \times 100 \dots (1)$$

เมื่อ A_{DPPH} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีตัวอย่าง และ A_{test} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH หลังทำปฏิกิริยากับตัวอย่าง

2.4.2 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS [15] เตรียมสารละลายอนุมูล ABTS โดยใช้สารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ความเข้มข้น 2.4 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร บ่มไว้ในที่มืด 12-16 ชั่วโมง ก่อนทำการทดสอบเจือจางด้วยเอทานอลให้ได้ค่าการดูดกลืนของสารละลายอนุมูล ABTS เท่ากับ 0.700 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร สารสกัดหยาบจากใบพลูและสารมาตรฐาน Ascorbic acid เตรียม 4 ระดับความเข้มข้น (25, 12.5, 6.25 และ 3.125 มิลลิกรัมต่อลิตร) นำสารสกัด

แต่ละระดับความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายอนุมูล ABTS 0.9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร การทดลองทั้งหมดทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS (% ABTS radical scavenging) ด้วยสมการที่ 2 และคำนวณหา IC_{50} ซึ่งได้จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นกับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ

$$\% \text{ ABTS radical scavenging} = (A_{\text{ABTS}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{ABTS}} \times 100 \dots (2)$$

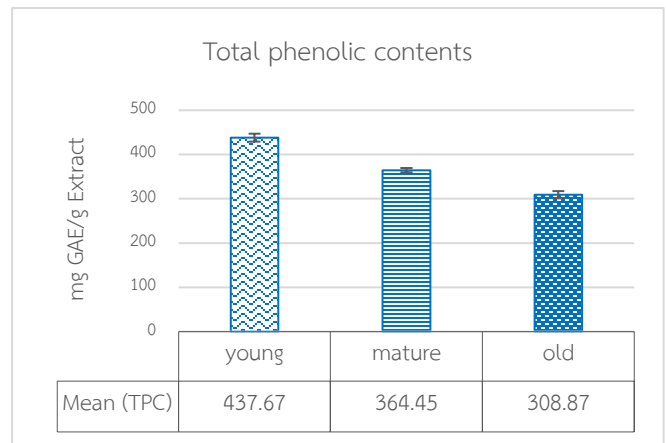
เมื่อ A_{ABTS} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุมูล ABTS ที่ไม่มีตัวอย่าง และ A_{test} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุมูล ABTS หลังทำปฏิกิริยากับตัวอย่าง

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองนำเสนอในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD) จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อแสดงค่าปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC) และค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ของตัวอย่างแต่ละระยะการเจริญเติบโต การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทำโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ ส่วนการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า TPC และค่า IC_{50} จากการทดสอบ DPPH และ ABTS ใช้วิธีการถดถอยเชิงเส้น (Linear Regression) และรายงานในรูปสมการเส้นตรงและ ค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (R^2)

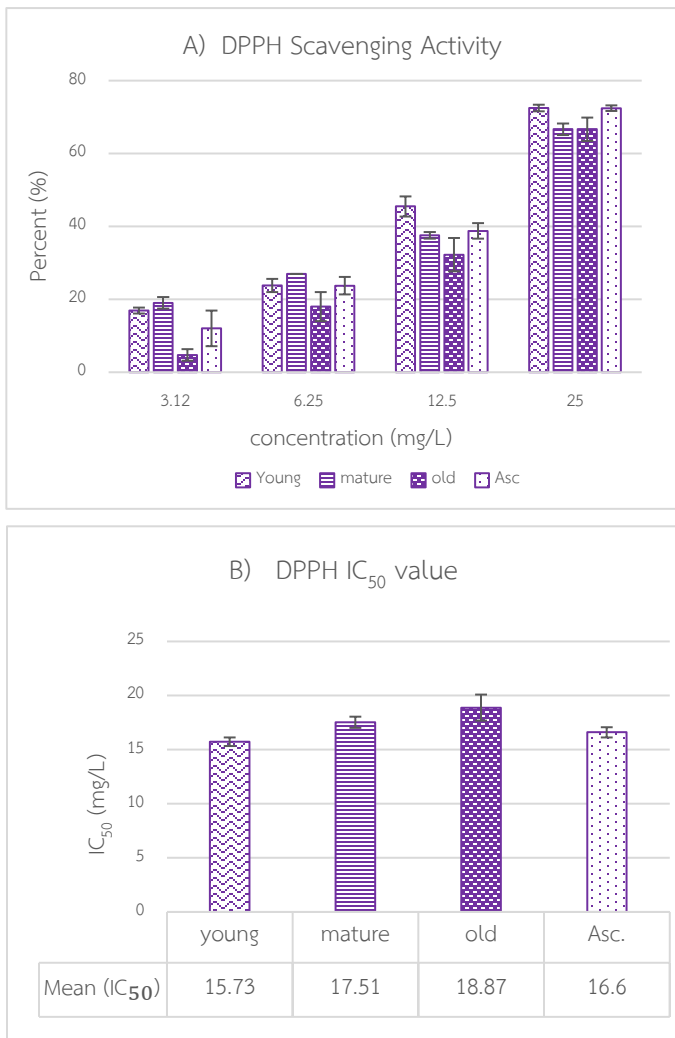
3. ผลการวิจัย

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวม (TPC) ในสารสกัดใบพลูในแต่ละระยะการเจริญเติบโตพบว่า มีแนวโน้มลดลงเมื่ออายุใบเพิ่มขึ้น (แสดงในภาพที่ 1) โดยใบอ่อนมีปริมาณ TPC สูงที่สุด (437.67 ± 8.98 mg GAE/g extract) รองลงมาคือใบเพสลาด (364.45 ± 4.66 mg GAE/g extract) และต่ำสุดในใบแก่ (308.87 ± 8.13 mg GAE/g extract) ผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One-way ANOVA พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ระหว่างกลุ่มตัวอย่างทั้งสาม แสดงให้เห็นว่าใบอ่อนมีปริมาณสารฟีนอลิกสูงกว่าใบระยะอื่นอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพที่ 1 ปริมาณสารฟีนอลิกรวม (TPC) ของสารสกัดใบในระยะต่าง ๆ (อ่อน เพสลาด และแก่) แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=3$) ในหน่วย มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อน้ำหนักแห้งของสารสกัด (mg GAE/g extract) ผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One-way ANOVA พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$)

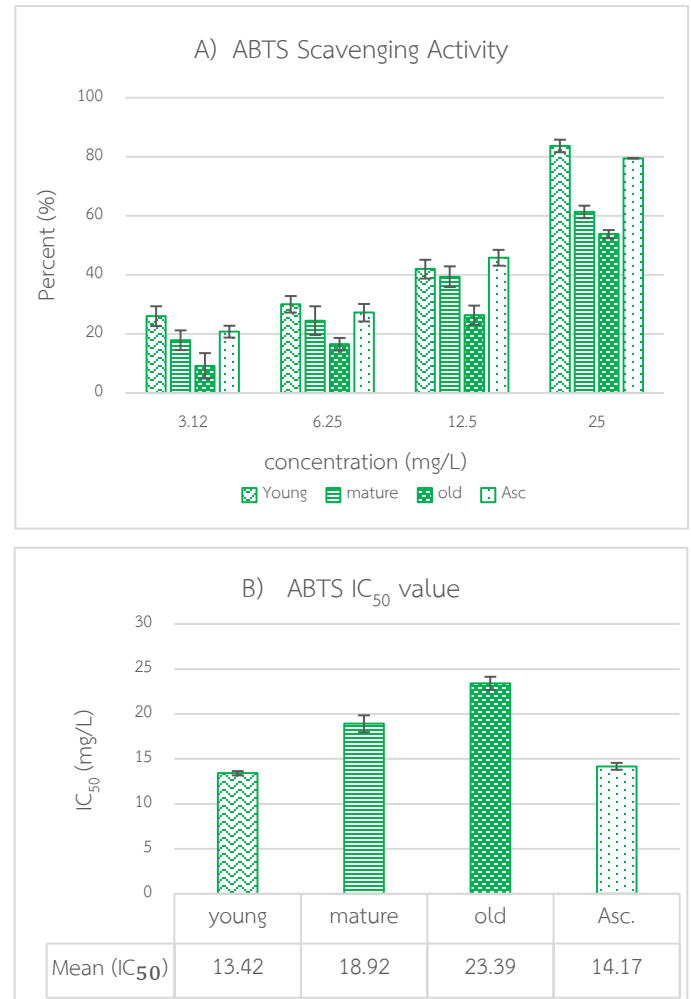
ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (ภาพที่ 2 (A)) พบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดใบพลูเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามความเข้มข้นของสารสกัด (3.12–25 mg/L) ในทุกกลุ่มตัวอย่างทั้งนี้ ใบอ่อน แสดงค่า %inhibition สูงกว่ากลุ่มใบเพสลาดและใบแก่ ในทุกระดับความเข้มข้น โดยที่ Ascorbic acid (สารมาตรฐาน) มีประสิทธิภาพสูงสุดหรือใกล้เคียงกับใบอ่อนในทุกช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ ที่ความเข้มข้น 25 mg/L ใบอ่อนมีค่า %inhibition สูงสุด $72.49 \pm 0.92\%$ ใกล้เคียงกับ Ascorbic acid ($72.45 \pm 0.78\%$) ใบเพสลาดและใบแก่มีค่า %inhibition ต่ำกว่า ($66.67 \pm 1.59\%$ และ $66.67 \pm 3.18\%$ ตามลำดับ) จากภาพที่ 2 (B) พบว่าใบอ่อนมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด (15.73 ± 0.39 mg/L) แสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด รองลงมาคือ Ascorbic acid (16.60 ± 0.48 mg/L), ใบเพสลาด (17.51 ± 0.52 mg/L) และใบแก่ (18.87 ± 1.21 mg/L) ตามลำดับ การวิเคราะห์ทางสถิติ (one-way ANOVA) ชี้ให้เห็นว่าค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ยืนยันว่าระยะการเจริญเติบโตของใบมีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใบอ่อนมีสารออกฤทธิ์ที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีกว่าใบแก่



ภาพที่ 2 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดใบพลูในระหว่างการเจริญเติบโตต่าง ๆ เทียบกับสารมาตรฐานแอสคอร์บิกแอซิด
(A) ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (3.12–25 mg/L) แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n = 3$)
(B) ค่า IC₅₀ (mg/L) ของสารสกัดและสารมาตรฐาน

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบพลูด้วยวิธี ABTS (ภาพ A) พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดในทุกกลุ่มตัวอย่าง (3.12–25 mg/L) โดย ใบอ่อน แสดงเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระสูงกว่ากลุ่มใบเพสลาดและใบแก่ ทุกระดับความเข้มข้น และใกล้เคียงกับ สารมาตรฐาน Ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 25 mg/L ใบอ่อนมีค่า %inhibition สูงสุด $83.68 \pm 2.13\%$ รองลงมาคือ Ascorbic acid ($79.53 \pm 0.08\%$) ขณะที่ใบเพสลาดและใบแก่มีค่า $61.31 \pm 2.14\%$ และ $53.85 \pm 1.40\%$ ตามลำดับจากกราฟ B ใบอ่อนมีค่า IC₅₀ ต่ำที่สุด (13.42 ± 0.24 mg/L) แสดงถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมาคือ Ascorbic acid (14.17 ± 0.38 mg/L), ใบเพสลาด (18.92 ± 0.94 mg/L) และใบแก่ (23.39 ± 0.73 mg/L) ตามลำดับการวิเคราะห์

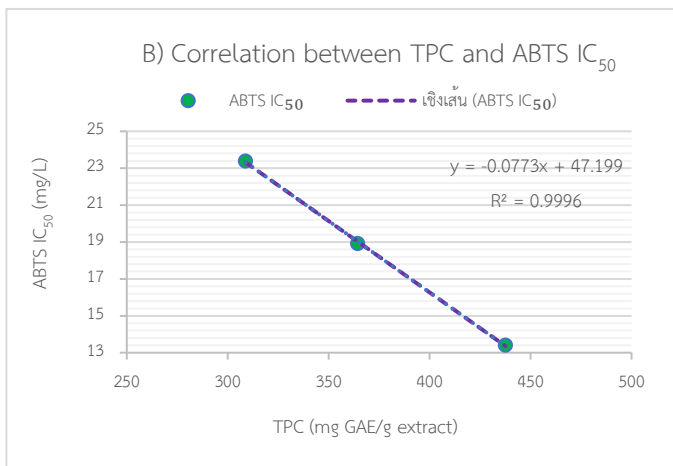
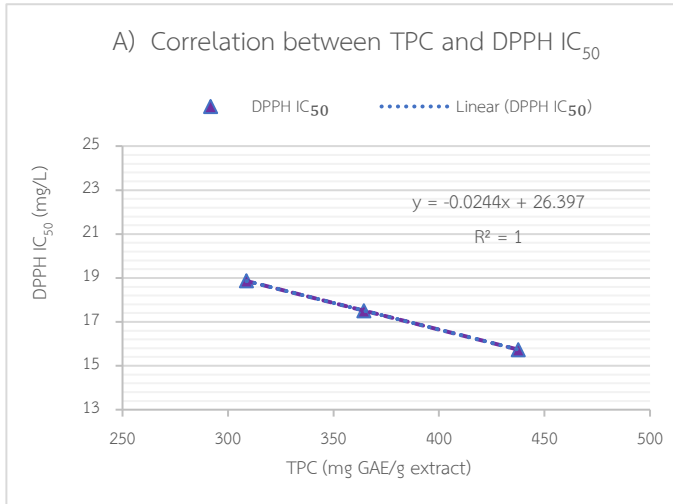
ทางสถิติ (one-way ANOVA) แสดงให้เห็นว่าค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ยืนยันว่า ระยะการเจริญเติบโตของใบพลู มีผลชัดเจนต่อความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS โดยใบอ่อนมีฤทธิ์สูงสุด และใบแก่มีฤทธิ์ต่ำที่สุด



ภาพที่ 3 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดใบพลูในระหว่างการเจริญเติบโตต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแอสคอร์บิกแอซิด
(A) ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (3.12–25 mg/L) แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n = 3$)
(B) ค่า IC₅₀ (mg/L) ของสารสกัดและสารมาตรฐาน

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่าปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC) ของสารสกัดใบพลูมีความสัมพันธ์เชิงลบกับค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง (IC₅₀) จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS (ภาพที่ 4) โดยสมการถดถอยเชิงเส้นของการทดสอบ DPPH มีค่า $y = -0.0244x + 26.397$ ($R^2 = 1.0$) ส่วนการทดสอบ ABTS มีค่า $y = -0.0773x + 47.199$ ($R^2 = 0.9996$) ผลดังกล่าวแสดงแนวโน้มค่า IC₅₀ ลดลง

เมื่อปริมาณฟีนอลิกเพิ่มขึ้น โดยสารสกัดจากใบอ่อนมีค่า TPC สูงสุดให้ค่า IC_{50} ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากใบผลสดและใบแก่



ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบพลูในระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ (ใบอ่อน ใบผลสด และ ใบแก่) จุดข้อมูลแทนระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ($n = 3$)
(A) การวิเคราะห์ถดถอยเชิงเส้นระหว่าง TPC และค่า IC_{50} จากการทดสอบ DPPH
(B) การวิเคราะห์ถดถอยเชิงเส้นระหว่าง TPC และค่า IC_{50} จากการทดสอบ ABTS

4. อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาพบว่า ระยะการเจริญเติบโตของใบพลู (*P. betle*) มีผลต่อปริมาณสารฟีนอลิกรวม (TPC) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใบอ่อนมีค่า TPC สูงที่สุด (437.67 ± 8.98 mg GAE/g extract) และแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} จากการทดสอบ DPPH และ ABTS เท่ากับ 15.73 ± 0.39 และ 13.42 ± 0.24 mg/L ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับใบผลสดและใบแก่พบว่าสารสกัดจากใบอ่อนใช้ความเข้มข้นต่ำกว่าสำหรับการยับยั้งอนุมูลอิสระ 50%

เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid (IC_{50} จาก DPPH = 16.60 ± 0.48 mg/L, ABTS = 14.17 ± 0.38 mg/L) พบว่าสารสกัดจากใบอ่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน โดยเฉพาะผลการทดสอบ ABTS ที่ค่า IC_{50} ของสารสกัดใบอ่อนต่ำกว่าเล็กน้อย แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของใบพลูในระยะอ่อนที่จะใช้เป็นแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติทดแทนสารสังเคราะห์ได้

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า TPC และค่า IC_{50} พบความสัมพันธ์เชิงลบอย่างชัดเจน โดยจากสมการถดถอยเชิงเส้นค่า IC_{50} ลดลงตามการเพิ่มขึ้นของปริมาณฟีนอลิก (DPPH: $y = -0.0244x + 26.397$, $R^2 = 1.0$; ABTS: $y = -0.0773x + 47.199$, $R^2 = 0.9996$) แสดงให้เห็นว่าการมีปริมาณฟีนอลิกสูงในสารสกัดช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับกลไกของสารฟีนอลิกที่สามารถบริจาคอะตอมหรืออิเล็กตรอนจากหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เพื่อลดปฏิกิริยาถูกโจมตีของการเกิดออกซิเดชันและจำกัดความเสียหายต่อเซลล์ [6] ผลลัพธ์นี้ยังสอดคล้องกับแนวคิดที่ว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งธรรมชาติมีบทบาทสำคัญต่อการปกป้องโครงสร้างชีวโมเลกุล เช่น ลิพิดและโปรตีน ช่วยลดความเสี่ยงของโรคเรื้อรังที่เกี่ยวข้องกับภาวะเครียดออกซิเดชัน [16]

แม้ว่าผลการทดลองนี้จะได้เพียงค่าปริมาณฟีนอลิกรวม โดยยังไม่สามารถจำแนกชนิดของสารที่แน่ชัด แต่ก็สะท้อนให้เห็นว่าใบพลูมีศักยภาพด้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่น่าสนใจ รายงานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสามารถแยกสารฟีนอลิกที่มีโครงสร้างทราบแล้ว ได้แก่ eugenol, hydroxychavicol, chavibetol และ methyl eugenol ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นตัวดักจับอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง [8,11] นอกจากนี้ หลักฐานจากการศึกษาที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่า eugenol และ hydroxychavicol มีความสามารถในการบริจาคอิเล็กตรอนเพื่อลดการเกิด reactive oxygen species (ROS) และยับยั้งปฏิกิริยา lipid peroxidation ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่นำไปสู่ความเสียหายต่อเซลล์และการเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ [13,10]

ข้อมูลที่ได้ยังชี้ให้เห็นว่าใบอ่อนมีศักยภาพสูงกว่าระยะการเจริญเติบโตอื่นๆ ซึ่งอาจเนื่องมาจากกลไกการป้องกันทางธรรมชาติที่กระตุ้นการสังเคราะห์สารฟีนอลิกในช่วงที่เนื้อเยื่อยังอ่อนไหวต่อปัจจัยแวดล้อม งานวิจัยหลายฉบับยืนยันว่าพืชสามารถเพิ่มการผลิตสารฟีนอลิกเพื่อตอบสนองต่อสภาวะเครียด เช่น แสง UV ความร้อน ความเค็ม และการคุกคามจากจุลชีพ [17-18] สอดคล้องกับการศึกษาของ Karageorgou และ Manetas (2006) [19] ที่รายงานว่าใบอ่อนของ *Quercus coccifera* มีการสะสมแอนโทไซยานินในระดับสูง

เพื่อป้องกันความเสียหายจากสิ่งแวดล้อม และยังสอดคล้องกับข้อมูลจากพืชสมุนไพรอื่นๆ เช่น ใบชา (*Camellia sinensis*), ใบมะรุม (*Moringa oleifera*) และใบหม่อน (*Morus alba*) ที่รายงานว่าใบอ่อนมีปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าในใบแก่ [20–22] ข้อมูลเหล่านี้สนับสนุนข้อสันนิษฐานว่าการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในระยะใบอ่อนเป็นกลไกการป้องกันตามธรรมชาติที่พบได้ทั่วไปในพืชเพื่อรับมือกับสิ่งกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อม

ดังนั้น ผลการศึกษานี้ชี้ชัดว่า ระยะการเจริญเติบโตมีผลโดยตรงต่อคุณสมบัติทางชีวภาพของใบพลู โดยเฉพาะใบอ่อนซึ่งเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติที่มีศักยภาพสูง และเหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรมเพื่อสุขภาพ อย่างไรก็ตาม ในแง่การจัดการวัตถุดิบเพื่อความยั่งยืน (Sustainability) การเก็บเกี่ยวเฉพาะใบอ่อนในปริมาณมากอาจส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจและการเจริญเติบโตของทรงพุ่มพืชในระยะยาว จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการจัดการแปลงปลูกและกำหนดรอบการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม เพื่อรักษาสสมดุลระหว่างปริมาณผลผลิตและคุณภาพสารออกฤทธิ์ อีกทั้งงานวิจัยนี้ยังมีข้อจำกัดด้านจำนวนแหล่งเก็บตัวอย่างและการควบคุมปัจจัยสิ่งแวดล้อม จึงควรมีการศึกษาต่อยอดเพื่อเพิ่มความหลากหลายของตัวอย่าง รวมถึงการศึกษาอิทธิพลของความแปรปรวนตามฤดูกาล (Seasonal variation) ซึ่งอาจส่งผลต่อการสะสมสารทุติยภูมิ และขยายขอบเขตการประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น ต้านการอักเสบ ต้านจุลชีพ และต้านเซลล์มะเร็ง เพื่อสร้างองค์ความรู้ที่ครอบคลุมและสนับสนุนการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากใบพลูได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์ สำหรับการสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณสาขาวิชาเคมีและศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์ ที่เอื้อเฟื้อสารเคมี ห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Quijano-Abril MA, Callejas-Posada R, Miranda-Esquivel DR. Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical species of *Piper* (Piperaceae). *Journal of Biogeography*, 2006;33(7):1266–1278.

- Salehi B, Zakaria ZA, Gyawali R, Ibrahim SA, Rajkovic J, Shinwari ZK, Khan T, Sharifi-Rad J, Ozleyen A, Turkdonmez E, et al. Piper Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications. *Molecules*. 2019;24(7):1364. <https://doi.org/10.3390/molecules24071364>
- Singh T, Singh P, Pandey VK, Singh R, Dar AH. A literature review on bioactive properties of betel leaf (*Piper betel* L.) and its applications in food industry. *Food Chemistry Advances*. 2023;3:100536. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100536>.
- Carsono N, Tumilaar SG, Kurnia D, Latipudin D, Satari MH. A Review of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity Properties of Piper Species. *Molecules*. 2022;27(19):6774. <https://doi.org/10.3390/molecules27196774>
- Madhumita M, Guha P, Nag A. Bio-actives of betel leaf (*Piper betel* L.): A comprehensive review on extraction, isolation, characterization, and biological activity. *Phytother Res*. 2020;34(10):2609–27. doi: 10.1002/ptr.6715.
- Poprac P, Jomova K, Simunkova, M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol. Sci*. 2017; 38:592–607.
- Rai MP, Thilakchand KR, Palatty PL, Rao P, Rao S, Bhat HP, et al. Piper betel Linn (betel vine), the maligned Southeast Asian medicinal plant possesses cancer-preventive effects: Time to reconsider the wrong opinion. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*. 2011;12(9):2149–2156.
- Singh D, Narayanamoorthy S, Gamre S, Majumdar AG, Goswami M, Gami U, et al. Hydroxychavicol, a key ingredient of Piper betel induces bacterial cell death by DNA damage and inhibition of cell division. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018;120:62–71. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.021>

9. Patra B, Deep SK, Rosalin R, Pradhan SN. Flavored food additives on the leaves of piper betle L.: A human health perspective. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2022;194(10), 4439–4461.
<https://doi.org/10.1007/s12010-022-03912-w>
10. Uddin, M.F.; Uddin, S.A.; Hossain, M.D.; Manchur, M.A. Antioxidant, cytotoxic and phytochemical properties of the ethanol extract of Piper betle leaf. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2015;6:4252–4258.
11. Jaiswal S, Patel M, Saxena D, Naik S. Antioxidant properties of Piper betel (L.) leaf extracts from six different geographical domain of India. *J. Bioresour. Eng. Technol.* 2014;1:18–26.
12. Subramani K, Shanmugam BK, Rangaraj S, Murugan V, Srinivasan S, Awitor OK, et al. Functional and antimicrobial properties of herbal nanocomposites from Piper betle plant leaves for enhanced cotton fabrics. *Journal of Coatings Technology and Research*. 2020;17:1363–1375.
13. Baliga MS, Dsouza JJ. Piper betle L. (Betel leaf): A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *International Journal of Applied Research in Natural Products*. 2011;4(4):1-15.
14. Yingngam B, Monschein M, Brantner A. “Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Cratoxylum formosum* ssp. *formosum* leaves using central composite design and evaluation of its protective ability against H₂O₂-induced cell death.” *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2014;7(1): S497-S505.
15. Veeru P, Kishor, MP, Meenakshi M. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2009;3(8): 608-12.
16. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Science*. 1997;2(4):152-159,
[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2).
17. Salunke P, Koche D. Role of Phenolic compounds in plant defense mechanism: An updated review *Indian J. Applied & Pure Bio.* 2023;38(3);1199-1215.
18. Zagorskina NV, Zubova MY, Nechaeva TL, Kazantseva VV, Goncharuk EA, Katanskaya VM, Baranova EN, Aksenova MA. Polyphenols in Plants: Structure, Biosynthesis, Abiotic Stress Regulation, and Practical Applications (Review). *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(18):13874.
<https://doi.org/10.3390/ijms241813874>
19. Karageorgou P, Manetas Y. The importance of being red when young: anthocyanins and the protection of young leaves of *Quercus coccifera* from insect herbivory and excess light. *Tree Physiol.* 2006;26(5):613-21.
doi: 10.1093/treephys/26.5.613. PMID: 16452075.
20. Wang SY, Lin HS. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J Agric Food Chem.* 2000;48(2):140-6.
doi: 10.1021/jf9908345. PMID: 10691606.
21. Sreelatha S, Padma PR. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Moringa oleifera* Leaves in Two Stages of Maturity. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2009;64;303-311. <http://dx.doi.org/10.1007/s11130-009-0141-0>
22. Chen C, Mokhtar RAM, Sani MSA, Noor NQIM. The Effect of Maturity and Extraction Solvents on Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Mulberry (*Morus alba*) Fruits and Leaves. *Molecules*. 2022;27: 2406. <https://doi.org/10.3390/molecules27082406>