รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด ปีงบประมาณ 2560

....

1. **แผนงานวิจัย** -
2. **โครงการวิจัย** วิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติจากพืช

   กิจกรรมที่ 3 ศึกษาการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) เพื่อทำมาตรฐานเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในพืช
3. **ชื่อการทดลอง** วิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในหนอนตายหยาก

   Study on HPTLC technique for providing fingerprint of active substances in *Stemona spp.*
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง นางสาวณัฐพร ฉันทศักดา สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผู้ร่วมงาน นางพรรณีกา อัตตนนท์ สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

นางสาวภัควรินทร์ ศานติธีรโรจน์ สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. **บทคัดย่อ**

วิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในหนอนตายหยากซึ่งเป็นพืชที่มีศักยภาพในการกำจัดศัตรูพืช ดำเนินการเก็บตัวอย่างรากหนอนตายหยาก *Stemona phyllantha* Gagnep. จาก อ.จอมบึง จ.ราชบุรี สกัดรากหนอนตายหยากด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ คือ hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ 50% ethanol ทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผักโดยวิธี Leaf dipping method พบว่าสารสกัดหยาบรากจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ มีผลทำให้หนอนใยผักวัย 2 ตายที่ 4 วัน เท่ากับ 89.20, 81.10, 49.30 และ 2.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยที่สารสกัดหยาบ hexane และ dichloromethane ทำให้หนอนใยผักตายสูงสุดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาชนิดต่างๆ พบว่าสารสกัดหยาบ hexane และ dichloromethane มีสารออกฤทธิ์กลุ่ม alkaloids และศึกษาหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารกลุ่ม alkaloids ด้วยเทคนิค HPTLC บนแผ่น HPTLC plate silica gel 60 F_{254} ขนาด 20x10 ซม. ผลพบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ วัฏภาคเคลื่อนที่: Dichloromethane : Ethyl acetate : Methanol : Ammonium hydroxide (50:45:4:0.1); ตัวตรวจสอบ: UV 254 nm, UV 366 nm และ white light; สแกนกลุ่มสารที่ความยาวคลื่น 226 nm; น้ำยาพ่น dragendorff's reagent พบสารกลุ่ม alkaloids ในหนอนตายหยากชนิด *Stemona phyllantha* Gagnep. ที่ Rf 2 ตำแหน่ง คือ 0.41, 0.69 และชนิด *Stemona* spp.#1 ที่ Rf 1 ตำแหน่ง คือ 0.34 และเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์หนอนตายหยาก พบว่า ผลิตภัณฑ์ให้เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี alkaloids ในตำแหน่ง Rf ที่แตกต่างจากทั้ง 2 ชนิด ดังนั้นหนอนตายหยากต่างชนิด จะ

มี alkaloids ในตำแหน่ง Rf ที่แตกต่างกัน และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ได้จากรูปแบบ HPTLC fingerprint ในแต่ละชนิด เพื่อควบคุมคุณภาพได้เบื้องต้น ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็ว ไม่ยุ่งยาก และไม่สิ้นเปลืองสารละลาย
คำหลัก : เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี, หนอนตายหยาก, หนอนใยผัก

Abstract

The present study was conducted to provide HPTLC fingerprint of active substances from insecticidal useful roots of Non-Tai-Yak (*Stemona phyllantha* Gagnep.) from Ratchaburi province using High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) technique. Crude extracts of *Stemona* roots was obtained by extraction with hexane, dichloromethane, ethyl acetate and 50%ethanol. The effectiveness of each crude extracts was determined by diamondback moth (*Plutella xylostell* L.) death rate by Leaf dipping method in Laboratory 2^{nd} instars. Results showed that efficacy of each crude extracts was 89.20, 81.10, 49.30 and 2.65%, respectively. The efficacy of hexane crude insignificantly differences against efficacy of dichloromethane crude Preliminary phytochemical screening of crude extracts with high effective on diamondback moth death presented the alkaloids group. HPTLC fingerprint of alkaloids was performed by HPTLC plate silica gel 60 F_{254} size 20x10 cm using a mixture of Dichloromethane : Ethyl acetate : Methanol : Ammonium hydroxide (50:45:4:0.1) as mobile phase. Post-derivatization was employed by spraying with Dragendorff's reagent to visualize the spots. The alkaloids were detected at wavelength 226 nm. HPTLC fingerprint of *Stemona phyllantha* Gagnep. revealed two peaks of alkaloids with Rf values of 0.41, 0.69 and *Stemona* spp.#1 revealed one peak of alkaloids with Rf values of 0.34, respectively. This method was applied to indentified alkaloids group of the commercial products and the method was used for preliminary the quality control of raw materials and *Stemona* products. Moreover, this method was fast, easy and inexpensive.
Key words : HPTLC fingerprint, *Stemona* spp., *Plutella xylostella* L.

6. คำนำ

จากปัญหาการระบาดของแมลงศัตรูพืชในผลผลิตทางการเกษตรเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกษตรกรนิยมใช้สารเคมีทางการเกษตรจำนวนมาก เกิดการตกค้างของสารพิษในผลผลิตการเกษตร และสิ่งแวดล้อม จนส่งผลกระทบต่อภาคการส่งออกเพิ่มมากขึ้น จึงมีการส่งเสริมให้เกิดการใช้สารธรรมชาติทดแทน หรือลดการใช้สารเคมีโดยการหันมาใช้สารสกัดจากพืชชนิดต่างๆ ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชทางการเกษตร เช่น สะเดา หางไหล หนอนตายหยาก สาบเสือ ว่านน้ำ เป็นต้น โดยสารสกัดพืชเหล่านี้สามารถสลายตัวได้ง่ายในธรรมชาติ และมีองค์ประกอบอยู่หลายชนิด ซึ่งแมลงจะต้องใช้เวลานานในการสร้างความต้านทาน

หนอนตายหยาก เป็นพืชในสกุล Stemona วงศ์ Stemonaceae เป็นพืชที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดศัตรูพืช ซึ่งจากรายงานทางวิชาการของ ณัฐกานต์ และคณะ (2551) พบว่าสารสกัดรากหนอนตายหยากชนิด *S. burkillii* สามารถควบคุมหนอนกระทู้ผักได้ และ Phattharaphan *et al*. (2010) พบว่าสารสกัดจากชนิด *S. collinsae* มีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนใยผัก และได้ทำการแยกสารออกฤทธิ์ hydroxyl stemofoline เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์สารสำคัญ โดยสารออกฤทธิ์ในรากหนอนตายหยากคือสารกลุ่ม alkaloids (Ye *et al*., 1994) ซึ่งต่อมาได้มีงานวิจัยได้ศึกษาการสกัดแยกสารออกฤทธิ์มาทดสอบประสิทธิภาพ

Kalteneggar *et al.* (2003) พบสาร alkaloids ใหม่ 8 ชนิด ได้แก่ pyrido[1,2-a]azepines stemokerrin, methoxystemokerrin-N-oxide, oxystemokerrin, oxystemokerrin-Noxide, pyridostemin, pyrrolo[1 ,2 -a]azepines dehydroprotostemonine, oxyprotostemonine, และ stemocochinin รวมถึง alkaloids ที่เคยพบ คือ protostemonine, stemofoline, 20-hydroxystemofoline และ parvistemonine โดยสารออกฤทธิ์ในการกำจัดศัตรูพืช ได้แก่ stemofoline, oxystemokerrin และ dehydroprotostemonine

Jiwajinda *et al*. (2001) พบ alkaloids 3 ชนิดจากรากหนอนตายหยากชนิด *S. collinsae* ได้แก่ 16,17-didehydro-16(E)-stemofoline, 16,17-didehydro-4(E)-16(E)-stemofoline และ stemofoline พบว่า 16,17-didehydro-4(E)-16(E)-stemofoline มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากกว่า stemofoline

Munkornasawakul *et al*. (2009) ได้แยกสาร alkaloids จากหนอนตายหยากชนิด *S. apylla* พบสาร 5 ชนิด คือ stemofoline, (2′S)-hydroxystemofoline, (11Z)-1′,2′-didehydrostemofoline stemaphylline และ stemaphylline-N-oxide

Sastraruji *et al.* (2011) สามารถแยก alkaloids ได้ (2′S)-hydroxy-(11S,12R)-dihydrostemofoline, stemofurans E,J,M–R, stemofoline, (2′S)-hydroxystemofoline และ stilbostemin F

Chanmahasathien *et al*. (2011) ได้แยก alkaloids จากชนิด *S. apylla* ได้สาร stemocurtisine และ oxystemokerrine และจากชนิด *S. burkillii* ได้สาร stemofoline ซึ่งทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

นอกจากนี้ มีงานวิจัยด้านการวิเคราะห์สาร alkaloids ในรากหนอนตายหยากจาก รัตนาภรณ์ และคณะ (2553) ได้ตรวจหาปริมาณ Total alkaloids จากแหล่งต่างๆ ชนิด *S. burkillii, S. curtisii, S. phyllantha, S. spp* นอกจากนี้ Kongkiatpaiboon *et al*. (2012) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร dihydrostemofoline และ stemofoline จากชนิด *S. collinsiae* ซึ่งนักวิจัยได้สกัดสารดังกล่าวใช้เป็นสารมาตรฐานขึ้นเอง นอกจากนี้ Kongkiatpaiboon *et al*. (2013) ได้วิเคราะห์ปริมาณ alkaloids กลุ่ม Non-chromophoric turberostemonine จากชนิด *S. tuberosa* ได้แก่ tuberostemonine, tuberostemonine N, และ neotuberostemonine และจาก *S. phyllantha* ได้แก่ tuberostemonine และ tuberostemonine A ด้วยเทคนิค HPTLC จากงานวิจัยข้างต้น ได้มีการสกัดแยกสารสำคัญ alkaloids มาทดสอบประสิทธิภาพ แต่ยังขาดงานวิจัยด้านการวิเคราะห์สารสำคัญ สาเหตุหลักเกิดจากขาดสารมาตรฐาน และไม่สามารถหาซื้อได้ ดังนั้นเทคนิค HPTLC จึงเป็นเทคนิคที่น่าสนใจที่จะมาแก้ปัญหานี้ โดยเทคนิค HPTLC สามารถตรวจเอกลักษณ์ของสารสำคัญของวัตถุดิบสมุนไพรได้โดยไม่ใช้สารมาตรฐาน แต่อาศัยการเปรียบเทียบกับเอกลักษณ์มาตรฐาน

ทีแอลซีสมรรถนะสูง (High Performance Thin Layer Chromatography : HPTLC) คือวิธีการแยกสารบนแผ่นที่เคลือบด้วยตัวดูดซับ เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมสูงในห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพสมุนไพร ที่สามารถแยกสารได้ดีกว่าวิธีทีแอลซี (Thin Layer Chromatography: TLC) เดิม มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรและการตรวจเอกลักษณ์ของวัตถุดิบสมุนไพร เนื่องจากเป็นวิธีทดสอบเชิงปริมาณที่สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิดในเวลาเดียวกันจึงประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย และเมื่อนำไปผนวกกับเครื่องวัดความหนาแน่น (Densitometer) ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับสารเพิ่มขึ้น ช่วยในการพิสูจน์เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) และวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ ซึ่งมีเทคนิคต่างๆ ช่วยในการตรวจหาสารที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเอชพีแอลซี (High Performance Liquid Chromatography:HPLC) ทำให้สามารถควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพรในทัศนะระดับชาติและระดับสากล อีกทั้งมีความถูกต้อง (accuracy) มีความแม่นยำ (precision) มีสภาพไว (sensitivity) และมีความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำ (Reproducibility)

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ เครื่องมือ เครื่องแก้ว และสารเคมี

1. เครื่องบดตัวอย่างพืช
2. ตู้อบตัวอย่าง : POL-EKO-APARATURA รุ่น SL 53
3. เครื่องชั่งทศนิยมสองตำแหน่ง : Sartorius รุ่น CP 3202 S
4. เครื่องชั่งทศนิยมสี่ตำแหน่ง : Sartorius รุ่น AC 211 S
5. ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump)
6. เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) : BUCHI รุ่น R-124
7. เครื่องทีแอลซีสมรรถนะสูง (High performance thin layer chromatography, HPTLC)
8. เครื่องแก้ว ได้แก่ กรวยแยก กรวยกรองบูชเนอร์ ขวดกำหนดปริมาตร กรวยกรองแก้ว บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต ขวดก้นกลม หลอดทดลอง หลอดหยดสาร
9. TLC Tank (20 x 10 เซนติเมตร)
10. แผ่น HPTLC plate silica gel 60F254 size 20x10 เซนติเมตร บริษัท Merck จำกัด
11. สารเคมี ได้แก่ ethyl acetate, ethanol, methanol, chloroform, hexane, petroleum ether, Dragendorff’s reagent, Mayer’s reagent, ferric chloride, lead acetate, Salkowski’s test, Benedict’s reagent, Fehling’s reagent, Barfoed’s reagent เป็นต้น
12. สิ่งทดลอง : หนอนใยผัก Plutella xylostell (L.)

วิธีการ

1. ศึกษาลักษณะทางกายภาพของหนอนตายหยาก

เก็บตัวอย่างพืชหนอนตายหยากจาก อ.จอมบึง และอ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี และจ.ปราจีนบุรี แบ่งรากออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกแบ่งไว้ปลูกเพื่อดูลักษณะของดอกเพื่อจำแนกชนิด อีกส่วนนำไปศึกษาหาสารสำคัญ เตรียมตัวอย่าง โดยล้างรากให้สะอาด หั่นและอบแห้ง บดให้เป็นผงละเอียด และเก็บในภาชนะทึกแสง

2. ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดรากหนอนตายหยาก ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผัก

2.1 แช่ผงรากหนอนตายหยากด้วยตัวทำละลาย petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, methanol, ethanol, และ น้ำ ในอัตราส่วน 10% w/v แล้วกรองหยาบด้วยผ้าคอตตอนดิบ นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นต่อหนอนใยผักวัย 2 โดย วางแผนการทดลอง CRD จำนวน 4 ซ้ำ 12 กรรมวิธี ดังนี้

1. สารสกัดรากหนอนตายหยากใน petroleum ether
2. สารสกัดรากหนอนตายหยากใน dichloromethane
3. สารสกัดรากหนอนตายหยากใน ethyl acetate
4. สารสกัดรากหนอนตายหยากใน methanol
5. สารสกัดรากหนอนตายหยากใน ethanol
6. สารสกัดรากหนอนตายหยากในน้ำ
7. petroleum ether
8. dichloromethane
9. ethyl acetate
10. methanol
11. ethanol
12. น้ำ

ดำเนินการทดสอบโดยวิธี Leaf dipping method โดยการจุ่มลงในสารทดสอบเป็นเวลา 5 วินาที สำหรับ Control ใช้ใบคะน้าจุ่มด้วยตัวทำละลาย 6 ชนิด ผึ่งใบผักคะน้าให้แห้ง จากนั้นนำไปใส่ในกล่องเลี้ยงหนอนสำหรับทดสอบ ทำการปล่อยหนอนใยผักกล่องละ 10 ตัว บันทึกผลการทดลอง โดยตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผัก ที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง หลังการทดลอง ตามลำดับ

2.2 ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากที่มีฤทธิ์ในการควบคุมหนอนใยผัก

สกัดสารตามวิธีของ รัตนาภรณ์ และคณะ (2554) นำผงรากหนอนตายหยากมาสกัดด้วย 95% ethanol 3 ครั้ง กรองและระเหยแห้งได้สารสกัดหยาบนำมาละลายใน 50% น้ำ/ethanol แล้วสกัดโดยวิธีแยกสารด้วยการแบ่งส่วน (partition) ด้วย hexane 3 ครั้ง โดยรวมส่วน hexane เข้าด้วยกัน นำส่วนที่เป็นน้ำสกัดต่อด้วย dichloromethane อีก 3 ครั้ง รวมส่วน dichloromethane เข้าด้วยกัน นำส่วนที่เป็นน้ำสกัดต่อด้วย ethyl acetate 3 ครั้ง รวมส่วน ethyl acetate เข้าด้วยกัน ระเหยส่วนที่ได้จากการสกัด นำสารสกัดหยาบที่ได้ทั้ง 4

ชนิด มาทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนใยผักวัย 2 ในอัตราส่วน 2% (w/v) โดยวางแผนการทดลอง CRD จำนวน 4 ซ้ำ 8 กรรมวิธี ดังนี้

1. สารสกัดหยาบ hexane
2. สารสกัดหยาบ dichloromethane
3. สารสกัดหยาบ ethyl acetate
4. สารสกัดหยาบ 50% ethanol
5. hexane
6. dichloromethane
7. ethyl acetate
8. 50% ethanol

ดำเนินการทดสอบโดยวิธี Leaf dipping method โดยการจุ่มลงในสารทดสอบเป็นเวลา 5 วินาที สำหรับ Control ใช้ใบคะน้าจุ่มด้วยตัวทำละลาย 6 ชนิด ผึ่งใบผักคะน้าให้แห้ง จากนั้นนำไปใส่ในกล่องเลี้ยงหนอนสำหรับทดสอบ ทำการปล่อยหนอนใยผักกล่องละ 10 ตัว บันทึกผลการทดลอง โดยตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผัก ที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง หลังการทดลอง ตามลำดับ

3. ศึกษาชนิดของกลุ่มสารในสารสกัดชนิดต่างๆ โดยวิธีการทดสอบทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบ

นำสารสกัดรากหนอนตายหยากที่ได้จาก 2.1 และ 2.2 มาทดสอบกลุ่มสารต่างๆ โดยวิธีทางพฤกษเคมี นพมาศ และคณะ (2554)

- ทดสอบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloids) ด้วยน้ำยาทดสอบ Dragendorff's reagent, Mayer's reagent
- ทดสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ด้วยน้ำยาทดสอบ Shinoda's reagent, Ferric chloride, Lead acetate
- ทดสอบสารกลุ่มฟีนอลและแทนนิน (Phenol and Tannin) ด้วยน้ำยาทดสอบ Ferric chloride, Lead acetate
- ทดสอบสารกลุ่มซาโปนิน (Saponin) ด้วยน้ำยาทดสอบ Olive oil test
- ทดสอบสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ และเสตียรอยด์ ด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น salkowski's test
- ทดสอบสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น Benedict's reagent, Fehling's reagent, Barfoed's reagent

ผลจากการทดสอบตารางที่ 5 พบว่าสารสกัดหยาบ dichloromethane มีสารกลุ่ม alkaloids เป็นสารหลัก จึงทำการศึกษาสารกลุ่ม alkaloids ด้วย HPTLC ในขั้นตอนต่อไป

4. ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของกลุ่มสาร alkaloids จากหนอนตายหยากด้วยเครื่อง High Performance Thin Layer (HPTLC)

หาสภาวะของเครื่อง HPTLC ในการทดสอบสารสกัดหนอนตายหยาก โดยนำข้อมูลกลุ่ม alkaloids ที่ได้จากข้อ 3. หา วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) และน้ำยาพ่น (spray reagent) ที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นวิธีตรวจวัดชนิดและตำแหน่ง (Rf) ของสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก

เตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ 8 ระบบ ดังนี้

1. Chloroform : Methanol (9:1)
2. Chloroform : Methanol (7:3)
3. Chloroform : Methanol (7:1)
4. Toluene : Chloroform : Methanol (6:3:1)
5. Chloroform : Acetone : Diethylamine (25:20:5)
6. Dichloromethane : Ethyl acetate : Methanol : Ammonium hydroxide (70:25:5:1)
7. Dichloromethane : Ethyl acetate : Methanol : Ammonium hydroxide (50:45:4:0.1)
8. Dichloromethane : Ethyl acetate : Methanol (50:45:4)

ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของกลุ่มสารสำคัญจากหนอนตายหยากชนิดต่างๆ และตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด โดยสกัดรากหนอนตายหยากด้วย ethanol อัตราส่วน 10% w/v แล้วนำสารสกัดไปทดสอบด้วยเทคนิค HPTLC

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2560

สถานที่ทดลอง กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ศึกษาลักษณะทางกายภาพของหนอนตายหยาก

ผลของการศึกษาพบว่าหนอนตายหยากจาก อ.จอมบึง จ.ราชบุรี ใบมีลักษณะเป็นรูปไข่กล้าง ยาว 11 ซม. โคนเว้าตื้น เส้นใบ 11 เส้น ช่อออกดอกตามซอกใบ ดอกมีสีเขียวอ่อน มีเส้นกลีบสีม่วงอมแดง รากรูปกระสวยอวบ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะชนิดกับสารานุกรมพืชในประเทศไทย สามารถระบุได้ว่าเป็นชนิด *Stemona phyllantha* Gagnep.

หนอนตายหยากจาก อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี ใบมีลักษณะรูปไข่กว้าง เส้นใบ 12 เส้น รากผอมเล็กยาวประมาณ 15 ซม. ไม่มีข้อมูลดอกเนื่องจากปลูกแล้วไม่ออกดอก จึงไม่สามารถเปรียบเทียบกับสารานุกรมพืชได้ ในการทดลองนี้จึงกำหนดให้ชื่อว่า *Stemona* spp.#1

หนอนตายหยากจาก จ.ปราจีนบุรี ใบมีลักษณะรูปหัวใจ เส้นใบ 8 เส้น ดอกสีน้ำตาลอมเขียว รากผอมเล็กยาวประมาณ 18 ซม. เมื่อเปรียบเทียบกับสารานุกรมพืชไม่สามารถระบุชนิดได้เนื่องจากมีลักษณะใกล้เคียงกับหลายชนิด ในการทดลองนี้จึงกำหนดให้ชื่อว่า *Stemona* spp.#2

ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดรากหนอนตายหยาก ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผัก

ผลการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดทุกตัวทำละลาย เท่ากับ 10.00 – 61.54% โดยสารสกัดรากหนอนตายหยากใน methanol, ethanol และน้ำ มีผลทำให้หนอนตายมากที่สุด 57.70, 45.00 และ 61.54% ตามลำดับ ซึ่งทั้งสามตัวทำละลายให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ รองลงมาคือ สารสกัดรากหนอนตายหยากใน ethyl acetate 28.21% dichloromethane 12.50% และ petroleum ether 10.00% ตามลำดับ (ตารางที่ 2) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ตัวทำละลายที่เหมาะสมมี 3 ชนิด คือ methanol, ethanol และน้ำ

ผลจากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ 4 ชนิด สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากจากทุกตัวทำละลายได้สารสกัดหยาบ 0.81-33.68% w/w (ตารางที่ 3) ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบ hexane มีลักษณะเป็นน้ำมันสีน้ำตาล มีตะกอนสีน้ำตาล สารสกัดหยาบ dichloromethane มีลักษณะเป็นน้ำมันสีน้ำตาลเข้มหนืด สารสกัดหยาบ ethyl acetate มีลักษณะเป็นน้ำมันสีน้ำตาล ไม่มีตะกอน สารสกัดหยาบ 50% ethanol มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลอ่อนใส (รูปที่ 1) ผลการทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผัก พบว่า สารสกัดหยาบ hexane และสารสกัดหยาบ dichloromethane มีผลทำให้หนอนตายมากที่สุด คือ 89.20% และ 81.10% ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองตัวทำละลายให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ รองลงมาคือ สารสกัดหยาบ ethyl acetate 49.30% และสารสกัดหยาบ 50% ethanol ตาย 2.65% (ตารางที่ 4)

ศึกษาชนิดของกลุ่มสารในสารสกัดชนิดต่างๆ โดยวิธีการทดสอบทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบ

จากการทดสอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดเบื้องต้น (วิธีการทดลอง 2.1) พบว่าสารสกัด methanol, ethanol และน้ำ ซึ่งเป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักตรวจพบสารกลุ่ม alkaloids นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่ม terpenoids/steroids and carbohydrate (ตารางที่ 5) ซึ่งแตกต่างจากสารสกัด petroleum ether, dichloromethane และ ethyl acetate ที่พบสารเพียงกลุ่ม terpenoids/steroids

สำหรับการทดสอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบ (วิธีการทดลอง 2.2) พบว่าในสารสกัดหยาบ hexane และ dichloromethane ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก ตรวจพบสาร alkaloids, terpenoids/steroids และ phenols/tannins (ตารางที่ 5) ซึ่งแตกต่างจากสารหยาบ ethyl acetate และ 50%ethanol ที่พบเพียง phenols/tannins และ carbohydrate

ผลการทดสอบชนิดกลุ่มสารด้วยน้ำยาทดสอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบ พบสารกลุ่ม alkaloids นั้น สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา Jiwajinda *et al.* (2001); Kaltenegger *et al.* (2003) ที่พบว่า สารออกฤทธิ์หลักที่มีผลในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในสารสกัดหนอนตายหยาก คือสารกลุ่ม alkaloids

ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของกลุ่มสาร alkaloids จากหนอนตายหยากด้วยเครื่อง High Performance Thin Layer (HPTLC)

ผลการศึกษาสภาวะ (conditions) และวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมบนแผ่น TLC ชนิด HPTLC plate silica gel 60 F_{254} size 20x10 cm ในการหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของกลุ่มสาร alkaloids ในสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากด้วย dichloromethane

2.1.1 วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่จำนวน 8 ระบบ ดังนี้

ระบบ	วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)	ตำแหน่ง alkaloids (Rf)	ที่มา
1	Chloroform : Methanol (9:1)	0.70, 0.62	Svendsen และคณะ (1983)
2	Chloroform : Methanol (7:3)	0.70	-
3	Chloroform : Methanol (7:1)	0.75, 0.68	-
4	Toluene : Chloroform : Methanol (6:3:1)	0.62, 0.50	-
5	Chloroform : Acetone : Diethylamine (25:20:5)	0.71	นพมาศ และคณะ (2554)
6	Dichloromethane : Ethyl acetate : Methanol : Ammonium hydroxide (70:25:5:1)	0.72, 0.65	Kongkiatpaiboon และคณะ (2011)
7	Dichloromethane : Ethyl acetate : Methanol : Ammonium hydroxide (50:45:4:0.1)	0.69, 0.41	Kongkiatpaiboon และคณะ (2013)
8	Dichloromethane : Ethyl acetate : Methanol (50:45:4)	0.68, 0.44	-

จากการศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่เปรียบเทียบ 8 ระบบ โดยพิจารณาจาก HPTLC fingerprint (รูปที่ 2) พบว่า ระบบวัฏภาคของเหลว ระบบที่ 4, 7 และ 8 เกิดการแยกที่จัดเจน แต่เมื่อพิจารณาจาก HPTLC chromatogram (รูปที่ 3) พบว่า ระบบที่ 4 และ 8 เกิดการซ้อนทับกับพีคข้างเคียง ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ชัดเจน ดังนั้น ระบบที่ 7 Dichloromethane : Ethyl acetate : Methanol : Ammonium hydroxide (50:45:4:0.1) สามารถแยกสารกลุ่ม alkaloids ได้โดยไม่ถูกรบกวนจากพีคอื่น ซึ่งใช้เวลาในการ develop 10 นาที จึงเป็นระบบวัฏภาคของเหลวที่เหมาะสมที่สุด

2.1.2 ความยาวคลื่นที่เหมาะสม

ปัจจัยในการเลือกความยาวคลื่น คือ เป็นความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูง และไม่ถูกรบกวนจากสารอื่นที่มีความยาวคลื่นใกล้เคียงกัน โดยทำการตรวจวัดสเปคตรัมที่ความยาวคลื่น 190-600 nm ดังรูปที่ 4 และพบว่า ความยาวคลื่น 226 nm ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูง และไม่ถูกรบกวนจากสารอื่น (รูปที่ 5)

2.1.3 น้ำยาพ่นที่เหมาะสม

ทำการสเปรย์น้ำยาทดสอบ Dragendorff’s spray reagent ซึ่งใช้ตรวจสารกลุ่ม alkaloids และได้ผลบวก คือ ให้สีส้มเมื่อตรวจสอบภายใต้แสง white light ดังรูปที่ 6 ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลงานวิจัยของ Kaltenegger *et al.* (2003) พบว่าสารออกฤทธิ์หลักที่ได้จากหนอนตายหยาก คือสารกลุ่ม alkaloids ดังนั้นจึงเลือก Dragendorff’s เป็นน้ำยาพ่นที่เหมาะสม

จากการศึกษาทั้งหมดจะได้สภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของกลุ่มสารสำคัญจากหนอนตายหยาก ดังนี้

- วัฏภาคคงที่ : แผ่น TLC ชนิด HPTLC plate silica gel 60 F254 size 20x10 cm
- วัฏภาคของเหลว (mobile phase) : Dichloromethane : Ethyl acetate : Methanol : Ammonium hydroxide (50:45:4:0.1)
- ความยาวคลื่นที่เหมาะสม 226 nm
- Spray Reagent ที่เหมาะสม : Dragendorff's spray reagent

ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของกลุ่มสารสำคัญจากหนอนตายหยากชนิดต่างๆ และตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด

ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของกลุ่ม alkaloids ในรากหนอนตายหยาก 3 ชนิด ดังนี้

ST1 = หนอนตายหยากจาก อ.จอมบึง จ.ราชบุรี (Stemona phyllantha Gagnep.)

ST2 = หนอนตายหยากจาก อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี (Stemona spp.)

ST3 = หนอนตายหยากจาก จ.ปราจีนบุรี (Stemona spp.)

ได้เอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสกัด ethanol จากรากหนอนตายหยาก อ.จอมบึง จ.ราชบุรี (ST1) โดยใช้ วัฏภาคเคลื่อนที่ Dichloromethane : Ethyl acetate : Methanol : Ammonium hydroxide (50:45:4:0.1) ผลของ HPTLC fingerprint (รูปที่ 7) พบแถบสีส้ม alkaloids จากการทดสอบด้วยน้ำยา Dragendorff's ที่เห็นชัดเจนที่ Rf 0.41, 0.69 และพบพีคจาก HPTLC chromatogram (รูปที่ 8) เด่นที่ Rf 0.41, 0.69 ซึ่งกำหนดให้เป็น alkaloid A และ B ตามลำดับ

และเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสกัด ethanol จากรากหนอนตายหยาก อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี (ST2) ภายใต้สภาวะเดียวกัน พบแถบสีส้มเด่นชัดที่ Rf 0.34 จาก HPTLC fingerprint (รูปที่ 7) และพีคจาก HPTLC chromatogram (รูปที่ 8) เด่นที่ Rf 0.34 ซึ่งกำหนดให้เป็น alkaloid C

สำหรับเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสกัด ethanol จากรากหนอนตายหยาก จ.ปราจีนบุรี (ST3) ไม่พบแถบสีส้มจาก HPTLC fingerprint (รูปที่ 7) และพีคจาก HPTLC chromatogram (รูปที่ 8) อาจกล่าวได้ว่าไม่พบสารกลุ่ม alkaloids เพราะมีปริมาณตัวอย่างในปริมาณน้อย และก่อนหน้าทำการสกัดได้ปลูกเพื่อให้ออกดอก ทำให้รากเล็กลง เนื่องจากมีการใช้สารอาหารจากรากเพื่อเลี้ยงลำต้น และดอก ดังนั้นสารอาหารและสารสำคัญต่างๆในรากจึงลดลง

ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของกลุ่ม alkaloids ในผลิตภัณฑ์หนอนตายหยาก 2 ตัวอย่าง (รูปที่ 9) ดังนี้

SM1 = ผลิตภัณฑ์ยาแคปซูลสมุนไพรหนอนตายหยาก (*Stemona collinsae* Craib.)

SM2 = ผลิตภัณฑ์กำจัดศัตรูพืชสารสกัดสมุนไพรจากหนอนตายหยาก

ได้เอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสกัด ethanol จากผลิตภัณฑ์ยาแคปซูลสมุนไพรหนอนตายหยาก (*Stemona collinsae* Craib.) (SM1) โดยใช้ วัฏภาคเคลื่อนที่ Dichloromethane : Ethyl acetate : Methanol : Ammonium hydroxide (50:45:4:0.1) ผลของ HPTLC fingerprint (รูปที่ 10) พบแถบสีส้ม

alkaloids จากการทดสอบด้วยน้ำยา Dragendorff's ที่เห็นชัดเจนที่ Rf 0.48 และพบพีคจาก HPTLC chromatogram (รูปที่ 11) เด่นที่ Rf 0.48 ซึ่งกำหนดให้เป็น alkaloid D ซึ่งพบ alkaloids ในตำแหน่งที่แตกต่างจาก หนอนตายหยากที่ศึกษาทั้ง 2 ชนิด จึงสรุปได้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากหนอนตายหยากชนิดอื่น สำหรับผลิตภัณฑ์กำจัดศัตรูพืชสารสกัดสมุนไพรจากหนอนตายหยาก (SM2) ไม่พบแถบสีส้มจาก HPTLC fingerprint และไม่พบพีคจาก HPTLC chromatogram อาจกล่าวได้ว่าไม่พบสารกลุ่ม alkaloids

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

หนอนตายหยาก มีสารออกฤทธิ์กลุ่ม alkaloids การสกัดสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากด้วยตัวทำละลาย hexane และ dichloromethane เป็นตัวทำละลายที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุด เมื่อทดสอบชนิดของกลุ่มสารทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบต่างๆ พบว่า สารสกัดหยาบ dichloromethane มีสารกลุ่ม alkaloids เป็นหลัก ส่วนสารสกัดหยาบ hexane พบว่ามีสาร terpenoids/steroids ซึ่งควรศึกษาต่อไป และเมื่อตรวจหาตำแหน่งของสารกลุ่ม alkaloids ด้วยวิธี HPTLC ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 226 nm และตรวจสอบภายใต้แสง UV 254 nm, UV 366 nm และ white light ได้เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) หลังพ่นด้วยน้ำยา dragendorff's ของสารสกัดหยาบ dichloromethane เมื่อพัฒนาด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ Dichloromethane : Ethyl acetate : Methanol : Ammonium hydroxide (50:45:4:0.1) พบสารกลุ่มหลักคือ alkaloids ที่ Rf 0.41, 0.69 และจากการศึกษา เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ของรากหนอนตายหยาก 3 ชนิด ได้แก่ Stemona phyllantha Gagnep. , Stemona spp.#1 และ Stemona spp.#2 เพื่อใช้เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์หนอนตายหยาก พบว่า ผลิตภัณฑ์ให้เอกลักษณ์โครมาโทกราฟีที่แตกต่างจากทั้ง 3 ชนิด แต่อย่างไรก็ตาม ในผลิตภัณฑ์พบแถบสาร alkaloids ในตำแหน่ง Rf ที่ต่างออกไป แสดงว่าเป็นหนอนตายหยากคนละชนิด เนื่องจากหนอนตายหยากในประเทศไทยมีมากถึง 8 ชนิด จากการศึกษาวิธีการตรวจสอบสารสำคัญจากหนอนตายหยากด้วย HPTLC โดยการเปรียบเทียบเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) สามารถใช้เปรียบเทียบคุณภาพผลิตภัณฑ์หนอนตายหยากได้เบื้องต้น แต่อย่างไรก็ตาม ยังขาดข้อมูลของหนอนตายหยากชนิดอื่นๆ เนื่องจากเวลาที่จำกัดและวัตถุดิบที่หายาก วัตถุดิบจะขึ้นในป่ากระจายทุกภาคของประเทศไทย นอกจากนี้ในอนาคตสามารถศึกษาการสกัดสารบริสุทธิ์เพื่อเป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์คุณภาพต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลงานวิจัยนี้ ทำให้ทราบข้อมูลกลุ่มสารสำคัญ วิธีการสกัดและตรวจสอบสารที่มีฤทธ์ต่อหนอนใยผักจากรากหนอนตายหยาก ได้ข้อมูลเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีเป็นต้นแบบในการทำข้อมูลเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในพืชที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เพื่อเป็นมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพสารสำคัญในพืชทั้งในรูปแบบของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สามารถวิจัยต่อยอดเพื่อสกัดสารบริสุทธิ์ เป็นฐานข้อมูลของสารสกัดในพืชที่มีศักยภาพทางด้านป้องกันกำจัดศัตรูพืช ซึ่งจะเป็นปัจจัยสนับสนุนการผลิตผลิตภัณฑ์การเกษตรจากสารธรรมชาติเพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคสินค้าเกษตร

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นางสาวปาจรีย์ อินทะชุบ นักวิชาการเกษตรชำนาญการ กลุ่มวิจัยพฤกษศาสตร์และพิพิธภัณฑ์พืช สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร และนางสาวกนกอร บุญพร นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ที่ให้คำปรึกษาการระบุชนิดหนอนตายหยาก

12. เอกสารอ้างอิง

ณัฐกานต์ ธิคำ, บงกชรัตน์ ปิติยนต์, สุรพล วิเศษสรรค์. 2551. การแยกสารสกัดบางส่วนจากหนอนตายหยากและผลของสารสกัดต่อหนอนกระทู้หอม. หน้า 253-261. *ใน : รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 สาขาพืช*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, อุทัย โสธนะพันธุ์, ประไพ วงศ์สินคงมั่น. 2554. *ทีแอลซี:วิธีอย่างง่ายในการวิเคราะห์คุณภาพเครื่องยาไทย*. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ. 468 หน้า.

รัตนาภรณ์ พรหมศรัทธา, เสริม สีมา, สมบัติ แผนดี, อิสริยะ สืบพันธุ์ดี, อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ. 2553. วิจัยสูตรผลิตภัณฑ์สารสกัดหนอนตายหยากและว่านน้ำเพื่อป้องกันกำจัดศัตรูพืช. หน้า 209-218. *ใน : ผลการปฏิบัติงาน ประจำปีงบประมาณ 2553*. กรมวิชาการ กรุงเทพฯ.

รัตนาภรณ์ พรหมศรัทธา, พรรณีกา อัตตนนท์, เสริม สีมา, อิสริยะ สืบพันธุ์ดี, มัณฑนา มิลน์ อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนพ, วัชรพงศ์ เมธีทวีพิทักษ์, ถวิล จิมเมือง. 2554. วิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและการใช้สารสกัดจากพืชเพื่อป้องกันกำจัดศัตรูพืช. หน้า 86-97. *ใน : เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการ ประจำปี 2554*. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร 11-13 กรกฎาคม 2554 กรุงเทพฯ.

สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช. 2560. *สารานุกรมพืชในประเทศไทย.* (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://www.dnp.go.th/botany/detail.aspx (29 มกราคม 2560).

Chanmahasathien, W., Ampasavate, C., Greger, H., Limtrakul, P. 2011. Stemona alkaloids, from traditional Thai medicine, increase chemosensitivity via P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Phytomedicine*. 18: 199-204.

Heong, K.L., Tan, K.H., Garcia, C.P.F., Fabellar, L.T., Lu, Z. 2011. *Research methods in toxicology and insecticide resistance monitoring of rice planthoppers.* (Online). Available. http://books.irri.org/9789712202605_content.pdf (January 10, 2017)

Jiwajinda, S., Hirai, N., Watanabe, K., Santisopasri, V., Chuengsamarnyart, N., Koshimizu, K., Ohigashi, H. 2001. Occurrence of insecticidal 16,17-didehydro-16(E)-stemofoline in *Stemona collinsae*. *Phytochemistry.* 56: 693-695.

Kongkiatpaiboon, S., Gritsanapan, Wandee. 2012 . HPLC Quantitative analysis of Insecticidal didehydrostemofoline and stemofoline in stemona collinsiae root extracts. *Phytochemical analysis.* 23: 554-558.

Kongkiatpaiboon, S., Keeratinijakal, V., Gritsanapan, Wandee. 2013. TLC-Image Analysis of Non-Chromophoric Tuberostemonine Alkaloid Derivatives in Stemona Species. *Natural Product Communications.* 8(8): 1065-1068.

Kalteneggar, E., Brem, B., Mereiter, K., Kalchhauser, H., Kahlig, H., Hofer, O., Vajrodaya, S. Greger, H. 2003. Insecticidal pyrido[1,2-a]azepine alkaloids and related derivatives from Stemona species. *Photochemistry*, 63: 803-816.

Mungkornasawakul, P., Chaiyong, S., Sastraruji, T., Jatisatienr, A., Jatisatienr, C., Pyne, S.G., Ung, A.T., Korth, J., Lie, W. 2009. Alkaloids from the roots of *Stemona aphylla. J. Nat. Prod.* 72: 848-851.

Phattharaphan, N., Pitiyont, B., Visetson, S. 2010. Potential of *Stemona sp.* for *Plutella xylostella* control. *Journal of Biopesticides.* 3(1): 279-281.

Sastraruji, T., Chaiyong, S. Jatisatenr, A., Pyne, S.G., Ung, A.T. Lie, W. 2011. Phytochemical studies on Stemona apylla: Isolation of a new stemofoline alkaloid and six new stemofurans. *J. Nat. Prod.* 74: 60-64.

Svendsen, A.B., Verpoorte, R. 1983. Chapter 3 TLC separation and identification of alkaloids in general. *Journal of Chromatography Library*. 23: 19-49.

Ye, Y., Qin, G.W., Xu, R.S. 1994. Alkaloids of Stemona japonica. *Phytochemistry*. 37(4): 1205-1208.

13. ภาคผนวก

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบลักษณะดอก ใบ และรากหนอนตายหยากเพื่อจำแนกชนิด

แหล่งที่มา	ลักษณะดอก	ลักษณะใบ	ลักษณะราก	ชนิด
อ.จอมบึง จ.ราชบุรี				*Stemona phyllantha* Gagnep.

อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	ไม่มีข้อมูล			*Stemona* spp.
จ.ปราจีนบุรี				*Stemona* spp.

<u>ตารางที่ 2</u> ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผัก วัย 2 ในการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดรากหนอนตายหยาก

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักวัย 2 (% Corrected mortality)*
1. สารสกัดรากหนอนตายหยากใน petroleum ether	10.00 c
2. สารสกัดรากหนอนตายหยากใน dichloromethane	12.50 c
3. สารสกัดรากหนอนตายหยากใน ethyl acetate	28.21 bc
4. สารสกัดรากหนอนตายหยากใน methanol	57.70 a
5. สารสกัดรากหนอนตายหยากใน ethanol	45.00 ab
6. สารสกัดรากหนอนตายหยากในน้ำ	61.54 a
CV(%)	**36.90**

หมายเหตุ : ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

<u>ตารางที่ 3</u> แสดงลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากและปริมาณสารสกัดหยาบต่อกรัม

ตัวทำละลาย	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบ	ปริมาณสารสกัด (%w/w)
hexane	น้ำมันสีน้ำตาล มีตะกอนสีน้ำตาล	0.83
dichloromethane	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม หนืด	3.05
ethyl acetate	น้ำมันสีน้ำตาล ไม่มีตะกอน	0.81
ethanol 50%	ของเหลวสีน้ำตาลอ่อนใส	33.68

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผัก วัย 2 ที่ใช้สารสกัดหนอนตายหยากจากตัวทำละลายต่างๆ ในการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นต่อหนอนใยผัก

กรรมวิธี		เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักวัย 2 (% Corrected mortality)*
สารสกัดหยาบ hexane		89.20 a
สารสกัดหยาบ dichloromethane		81.10 ab
สารสกัดหยาบ ethyl acetate		49.30 b
สารสกัดหยาบ 50% ethanol		2.65 c
	CV(%)	**37.80**

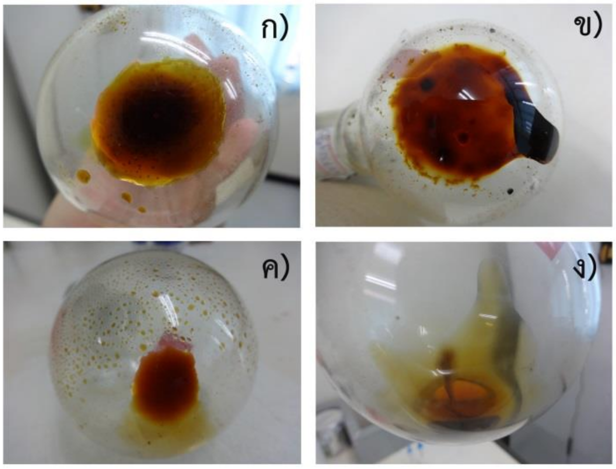
หมายเหตุ : ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

* **Corrected Mortality** - Heong, K.L. *et al.* (2011)

$$\%\text{Corrected Mortality} = \frac{\%\text{ test mortality} - \%\text{ control mortaily}}{100 - \%\text{ control mortality}} \times 100$$

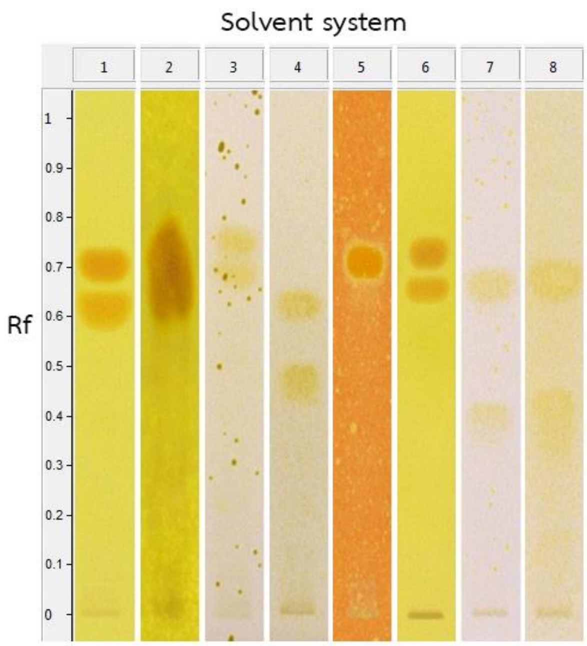
<u>ตารางที่ 5</u> ผลการทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีในสารสกัดตัวทำละลายอินทรีย์ ด้วยน้ำยาทดสอบชนิดต่างๆ

กลุ่มสารพฤกษเคมี	น้ำยาทดสอบ	สารทดสอบ									
		สารสกัดหนอนตายหยากตัวทำละลายชนิดต่างๆ						สารสกัดหยาบ			
		petroleum ether	dichloromethane	ethyl acetate	methanol	ethanol	น้ำ	hexane	dichloromethane	ethyl acetate	50% ethanol
alkaloids	Dragendorff's reagent	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
	Mayer's reagent	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
flavonoids	Shinoda's reagent	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ferric chloride	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Lead acetate	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
Phenols and tannins	Ferric chloride	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
	Lead acetate	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
saponin	Olive oil test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Terpenoids, steroids	Salkowski's test	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
carbohydrate	Benedict's reagent	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
	Fehling's reagent	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
	Barfoed's reagent	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+



<u>รูปที่ 1</u> ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบหนอนตายหยากจากตัวทำละลาย

ก) hexane ข) dichloromethane ค) ethyl acetate ง) 50% ethanol



<u>รูปที่ 2</u> เปรียบเทียบ HPTLC fingerprint ของสารสกัดรากหนอนตายหยาก ด้วยวัฏภาคของเหลวทั้ง 8 ระบบ ภายใต้แสง white light หลังจากทำปฏิกิริยากับน้ำยาทดสอบ Dragendorff's spray reagent

ระบบที่ 1 Chloroform : Methanol (9:1)

ระบบที่ 2 Chloroform : Methanol (7:3)

ระบบที่ 3 Chloroform : Methanol (7:1)

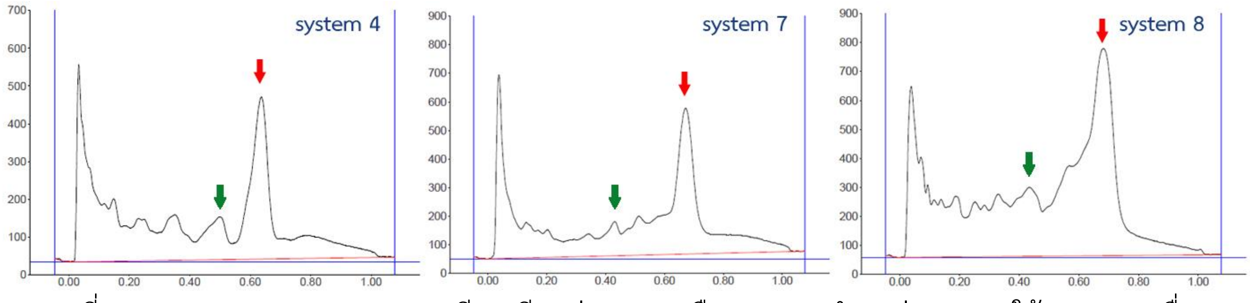
ระบบที่ 4 Toluene : Chloroform : Methanol (6:3:1)

ระบบที่ 5 Chloroform : Acetone : Diethylamine (25:20:5)

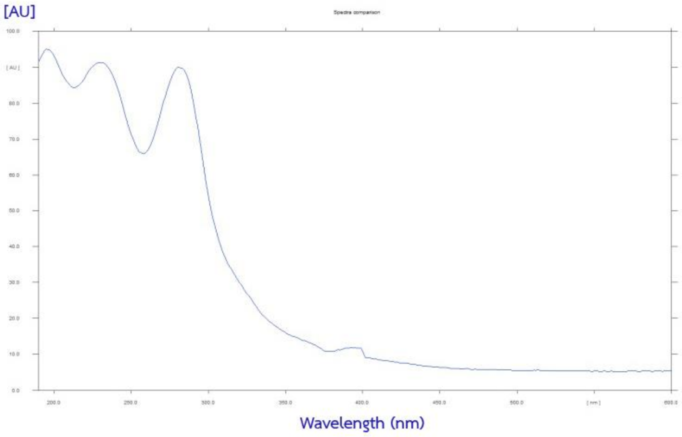
ระบบที่ 6 Dichloromethane : Ethyl acetate : Methanol : Ammonium hydroxide (70:25:5:1)

ระบบที่ 7 Dichloromethane : Ethyl acetate : Methanol : Ammonium hydroxide (50:45:4:0.1)

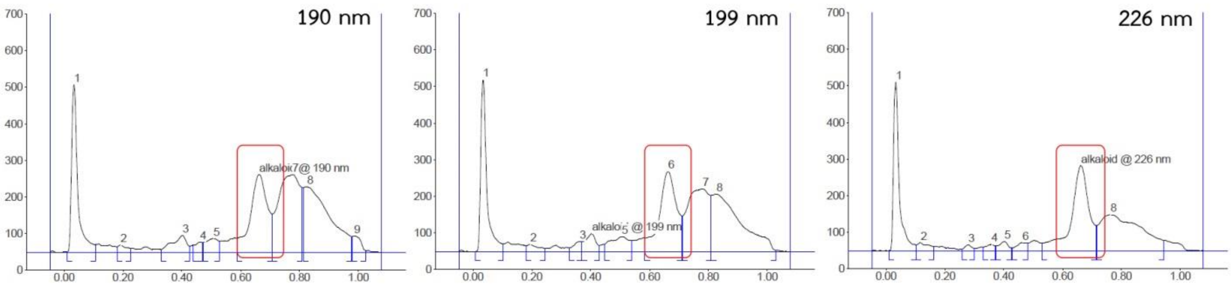
ระบบที่ 8 Dichloromethane : Ethyl acetate : Methanol (50:45:4)



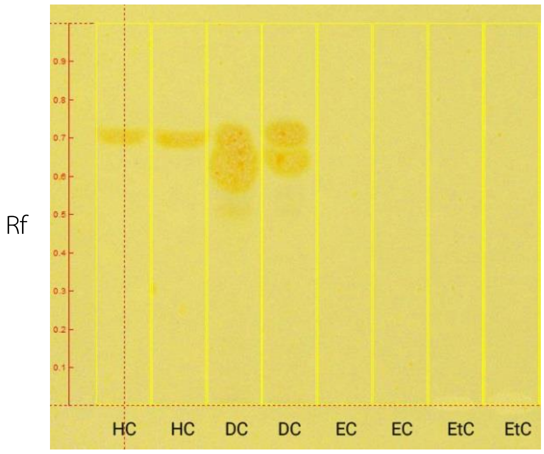
<u>รูปที่ 3</u> HPTLC chromatogram เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสง และตำแหน่ง Rf ภายใต้ความยาวคลื่น 226 nm ของสารสกัดหยาบ dichloromethane ที่ได้จากการ develop ด้วยระบบวัฏภาค 4, 7 และ 8



รูปที่ 4 สเปคตรัมสารสำคัญกลุ่ม alkaloids ที่พบในสารสกัดรากหนอนตายหยาก

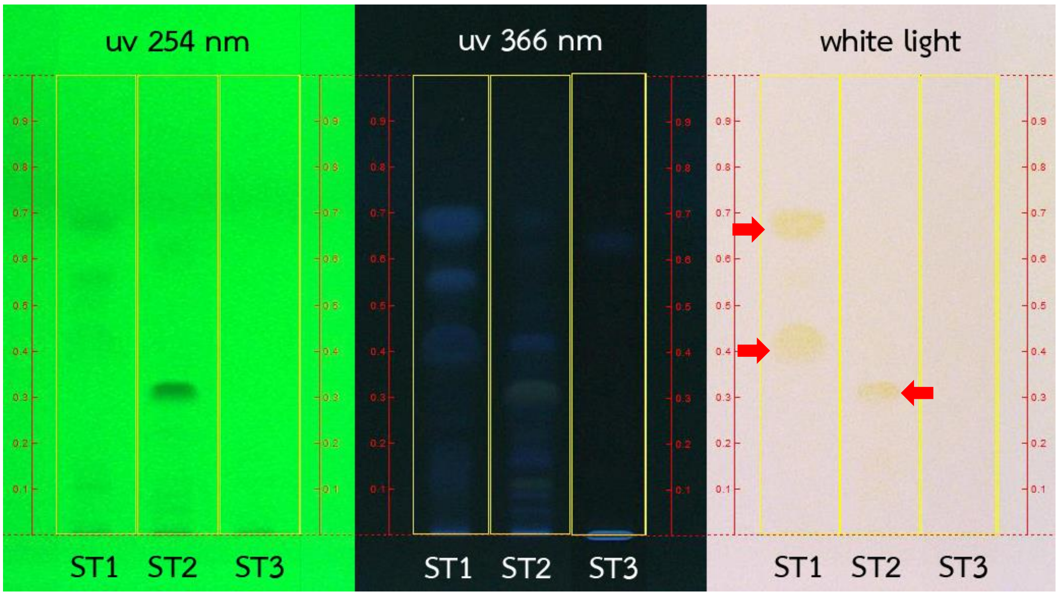


รูปที่ 5 HPTLC Chromatogram ของสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากภายใต้ความยาวคลื่น 190, 199 และ 226 nm



รูปที่ 6 เปรียบเทียบ HPTLC fingerprint ของสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยาก ภายใต้แสง white light หลังจากทำปฏิกิริยากับน้ำยาทดสอบ Dragendorff's spray reagent

(HC : Hexane crude, DC : Dichloromethane crude, EC : Ethyl acetate crude, EtC : 50% Ethanol crude)

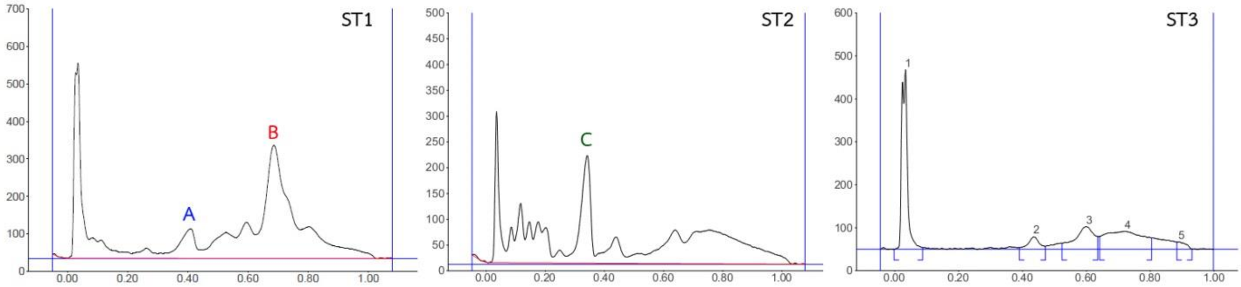


รูปที่ 7 เปรียบเทียบ HPTLC fingerprint ของสารสกัดรากหนอนตายหยากแต่ละชนิด
เมื่อตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 nm, 336 nm และ white light

ST1 = หนอนตายหยากจาก อ.จอมบึง จ.ราชบุรี (Stemona phyllantha Gagnep.)

ST2 = หนอนตายหยากจาก อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี (Stemona spp.)

ST3 = หนอนตายหยากจาก จ.ปราจีนบุรี (Stemona spp.)

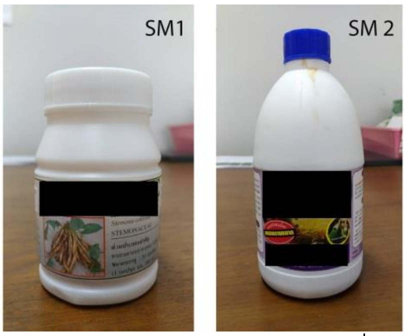


รูปที่ 8 HPTLC Chromatogram ของสารสกัดรากหนอนตายหยากแต่ละชนิด
ภายใต้ความยาวคลื่น 226 nm

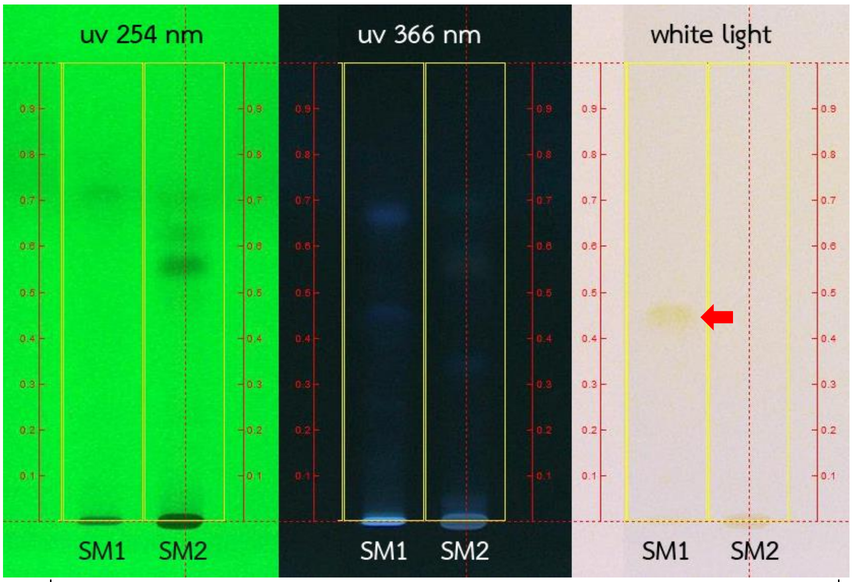
ST1 = หนอนตายหยากจาก อ.จอมบึง จ.ราชบุรี (Stemona phyllantha Gagnep.)

ST2 = หนอนตายหยากจาก อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี (Stemona spp.)

ST3 = หนอนตายหยากจาก จ.ปราจีนบุรี (Stemona spp.)



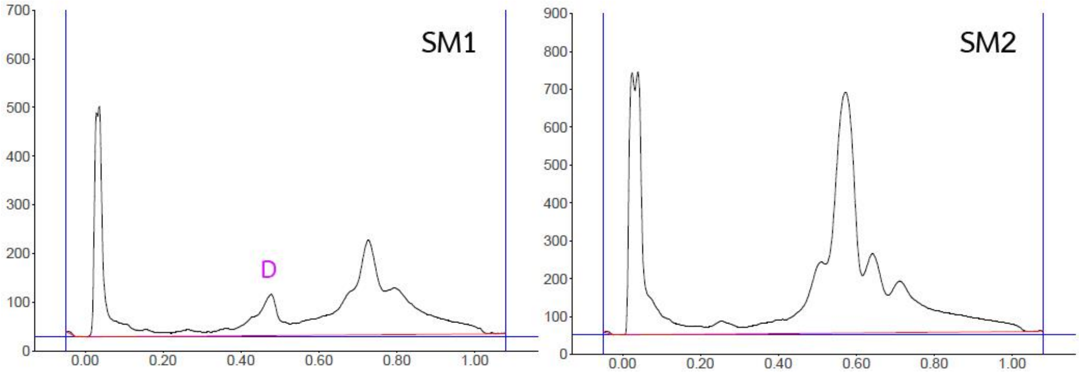
<u>รูปที่ 9</u> ตัวอย่างผลิตภัณฑ์หนอนตายหยากที่นำมาทดสอบ



<u>รูปที่ 10</u> เปรียบเทียบ HPTLC fingerprint ของผลิตภัณฑ์หนอนตายหยากเมื่อ
ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 nm, 336 nm และ white light

SM1 = ผลิตภัณฑ์ยาแคปซูลสมุนไพรหนอนตายหยาก (*Stemona collinsae* Craib.)

SM2 = ผลิตภัณฑ์กำจัดศัตรูพืชสารสกัดสมุนไพรจากหนอนตายหยาก



<u>รูปที่ 11</u> HPTLC Chromatogram ของผลิตภัณฑ์หนอนตายหยาก ภายใต้ความยาวคลื่น 226 nm