รายงานโครงการวิจัยวิจัย

โครงการวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติจากพืช
Research on Natural Toxic substance from Plants

หัวหน้าโครงการวิจัย

นางธนิตา ค่ำอำนวย
Thanita Kham-amnouy

ปี พ.ศ. 2561

รายงานโครงการวิจัย

โครงการวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติจากพืช
Research on Natural Toxic substance from Plants

หัวหน้าโครงการวิจัย

นางธนิตา ค่ำอำนวย
Thanita Kham-amnouy

ปี พ.ศ. 2561

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	1
ผู้วิจัย	2
บทนำ	3
บทคัดย่อ	7
กิจกรรมที่	
กิจกรรมที่ 1. วิจัยผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืชจากน้อยหน่า	12
กิจกรรมที่ 2. วิจัยผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืชจากแมงลักป่า	46
กิจกรรมที่ 3. ศึกษาการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง(HPTLC) เพื่อทำมาตรฐานเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในพืช	83
กิจกรรมที่ 4. วิจัยการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในพืชสมุนไพรป้องกันกำจัดศัตรูพืช	148
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	162
บรรณานุกรม	166
ภาคผนวก	175

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณท่านอธิบดีกรมวิชาการเกษตร คณะกรรมการบริหารงานวิจัยและพัฒนากรม คณะกรรมการที่ปรึกษาด้านวิชาการกรมและคณะกรรมการที่ปรึกษาด้านวิชาการของกองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ผู้อำนวยการกองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่ให้การสนับสนุน ให้คำแนะนำปรึกษาในด้านวิชาการแก่นักวิจัย กำกับดูแลแผนงานและโครงการขอหน่วยงานให้การดำเนินงานเป็นไปตามวัตถุประสงค์

ขอขอบพระคุณกองแผนงานและวิชาการ ในการอำนวยความสะดวกและประสานงานระหว่างหน่วยงาน/ส่วนบริหารหารโครงการ

โครงการนี้สำเร็จลงได้ เนื่องจากความร่วมมือร่วมใจของนักวิจัย และผู้ร่วมงานทุกท่านจากหน่วยงานต่าง ๆ ของกรมวิชาการเกษตร จึงต้องขอขอบคุณทุกท่าน มา ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้วิจัย

พรรณีกา อัตตนนท์ ธนิตา ค่ำอำนวย ภัควรินทร์ ศานติธีรโรจน์ ธิติยาภรณ์ อุดมศิลป์
ศิริพร สอนท่าโก ณัฐพร ฉันทศักดา อัณศยา พรมมา พจนีย์ หน่อฝั้น สุภานันทน์ จันทร์ประอบ
คมสัน นครศรี ภัทร์พิชชา รุจิระพงศ์ชัย ธัญชนก จงรักไทย พจมาลย์ แก้ววิมล สุวลักษมิ์ ไชยทอง
สาธิดา โพธิ์น้อย เสาวภาคย์ สุขประเสริฐ

Panneeka Attanon Thanita Kham-amnouy Pukwarin Santiterarot Thitiyaporn Udomsil
Siriporn Sonthako Nattaporn Chanthasakda Ansaya Promma Pochanee Norfun
Supanun Junpra-ob Komsan Nakornsri Phatphitcha Rujirapongchai
Tanchanok Jongrukthai Pojjamarn Keawvimol Suwaluck Chaitong
Sathida Phonoy Saowapak Sukprasert

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติในพืช เป็นโครงการที่ขานรับนโยบายของรัฐบาลเรื่องวางกรอบแนวทางการปฏิรูปภาคเกษตร 7 ส่วน ส่งเสริมการลดต้นทุนการผลิต พร้อมพัฒนาโครงสร้างพื้นฐานทางการเกษตรเพื่อให้ชาวนามีชีวิตที่ดีขึ้น โดยการลดการใช้สารเคมี ซึ่งโครงการนี้สนับสนุนการลดการใช้สารเคมีในการผลิตพืชอาหารปลอดภัย เป็นโครงการวิจัยเพื่อหาสารธรรมชาติเพื่อลดหรือทดแทนสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช อีกทั้งเป็นแนวทางที่รวมถึงการใช้ปัจจัยการผลิตที่ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมคือ การผลิตสารธรรมชาติ โดยการใช้สารสกัดจากพืชเพื่อทดแทนสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นทางเลือกในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ซึ่งจะทำให้ผลผลิตทางการเกษตรมีคุณภาพ ปลอดภัยต่อการบริโภคและสิ่งแวดล้อมและเป็นการสนับสนุนให้เกษตรกรใช้เป็นทางเลือกที่ดีและปลอดภัย ซึ่งเป็นไปตามยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 11 (พ.ศ.2555-2559) ยุทธศาสตร์ที่ 3 ความเข้มแข็งภาคเกษตร ความมั่นคงของอาหารและพลังงาน ในหัวข้อการพัฒนาทรัพยากรธรรมชาติที่เป็นฐานการผลิตภาคเกษตรให้เข้มแข็งและยั่งยืน และ สอดคล้องกับนโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ (พ.ศ.2555-2559) ยุทธศาสตร์ที่ 2 การสร้างศักยภาพและความสามารถเพื่อพัฒนาทางเศรษฐกิจ กลยุทธการวิจัยที่ 1 สร้างมูลค่าผลผลิตทางการเกษตร และพัฒนาศักยภาพในการแข่งขันและพึ่งพาตนเองของสินค้าเกษตร แผนงานวิจัยที่ 1.6 การวิจัยเกี่ยวกับการผลิตอาหารปลอดภัยในประเด็นการบริหารสิ่งแวดล้อมและการพัฒนาคุณค่าของทรัพยากรธรรมชาติ การใช้ประโยชน์ทรัพยากรธรรมชาติอย่างเหมาะสมและยั่งยืน และการเชื่อมต่อภูมิปัญญาท้องถิ่นกับองค์ความรู้ใหม่ให้เกิดประโยชน์เชิงพาณิชย์และสาธารณะนอกจากนั้นจากผลการประชุมสุดยอดอาเซียน-ญี่ปุ่น สมัยพิเศษ ระหว่างวันที่ 13-15 ธ.ค.2556 ได้มีถ้อยแถลงวิสัยทัศน์ว่าด้วยมิตรภาพและความร่วมมืออาเซียน-ญี่ปุ่น มีประเด็นที่เป็นหุ้นส่วนเพื่อความมั่งคั่งส่งเสริมความร่วมมือในด้านความปลอดภัยทางอาหาร

ปัญหาจากการเร่งผลผลิตทางการเกษตรโดยการขยายพื้นที่การเกษตร และการใช้สารเคมีอย่างไม่ถูกต้องและเกินความจำเป็นของเกษตรกร ทำให้มีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในปริมาณมากขึ้น ดังจะเห็นได้จากปริมาณการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่สูงขึ้น ในปี พ.ศ. 2551 มีปริมาณการนำเข้า109,969 ตันและในปี 2555 มีการนำเข้า**สารกำจัดศัตรูพืช**ปริมาณ 134,480 ตัน คิดเป็นมูลค่า 19,379 ล้านบาท ซึ่งมีปริมาณสารกำจัดวัชพืชสูงถึง 106,860 ตัน คิดเป็นมูลค่า 11,293 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2557)และในปี 2555 มีรายงานผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษจากสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชจากการทำงานและสิ่งแวดล้อมจำนวน 1,509 ราย อัตราป่วย 2.35 ต่อประชากรแสนคนนอกจากนี้ภาครัฐได้ส่งเสริมให้เกษตรกรหันมาทำเกษตรอินทรีย์หลังจากที่กลุ่มประเทศผู้นำเข้าสินค้าเกษตรของไทยเริ่มตรวจสอบคุณภาพสินค้าอย่างเข้มงวด เนื่องจากพบว่ามีสารเคมีปนเปื้อนซึ่งสร้างความเสียหายให้กับภาคเกษตรเป็นอย่างมากเมื่อเร็วๆนี้ สหภาพยุโรปได้มีการแจ้งระเบียบการคณะกรรมการ (EU) ตามหมายเลข 212/2010 ของวันที่ 12 มีนาคม 2553 ให้มีการแก้ไขเพิ่มเติมในระเบียบการ (EC) หมายเลข 882/2004 มีการเพิ่มมาตรฐานความเข้มงวดในการควบคุมสินค้านำเข้าประเภทอาหารและอาหารสัตว์ที่ไม่ได้ทำจากเนื้อสัตว์ (พืช) รวมไปถึงการแจ้งเตือนในระบบการแจ้งเตือนเร่งด่วน (Rapid Alert System) สำหรับอาหารและอาหารสัตว์พบว่า ประเทศไทยยังคงมีการฝ่าฝืนกฎระเบียบอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่องของสารพิษตกค้างในผัก อาทิ ถั่วฝักยาว มะเขือยาว ผักในตระกูลกะหล่ำ เช่น ผักกาดขาว ที่ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกนั้นได้เพิ่มระดับการ

ควบคุมอย่างเข้มงวดอีก 50% ทั้งการตรวจสอบลักษณะ (identity check) และทางกายภาพ (physical check).

จากสภาพปัญหาของการใช้สารเคมีทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคและการตกค้างของสารพิษในสิ่งแวดล้อม ส่งผลกระทบต่อภาคการส่งออกมากขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นมาแล้วในอดีต กำลังเกิดอยู่ในขณะนี้ และคาดว่าจะเกิดต่อไปในอนาคต จึงเป็นปัญหาเร่งด่วนที่มีความจำเป็นต้องวิจัยหาสารธรรมชาติจากพืชเพื่อทดแทนหรือลดการใช้สารเคมี เพราะถ้าไม่ทำวิจัยปัญหานี้ก็จะขยายตัวและเกิดความรุนแรงมากยิ่งขึ้นซึ่งการไม่ได้แก้ไขให้เป็นระบบอย่างจริงจัง ทำให้ประเทศไทยสูญเสียงบประมาณทางสาธารณสุข สถิติการเจ็บป่วยจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืช มีการประเมินว่าอาจมีจำนวนผู้ป่วยที่แท้จริงมากถึง 200,000-400,000 คนต่อปี และมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับปริมาณการนำเข้าสารเคมีในประเทศ นอกจากนี้ยังกระทบต่อเศรษฐกิจด้านการลงทุนและส่งออก ซึ่งปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยการใช้ความหลากหลายทางชีวภาพของพืชในประเทศ

ประเทศไทยมีพืชหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชและวัชพืช เช่น สะเดา หางไหล หรือ โล่ติ๊น หนอนตายหยาก สาบเสือ ซึ่งนักวิจัยสาขาเกษตร และสาขาอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องได้ทำการทดลองค้นคว้าหาสารทดแทนสารเคมีการเกษตร พบว่า สามารถนำเอาส่วนที่สำคัญต่างๆ เช่น ต้น ราก ใบ ดอก และผล มาสกัดเพื่อให้ได้สารสำคัญจากพืชนั้นๆ มาใช้ควบคุมศัตรูพืชแทนสารเคมีได้ดี โดยไม่มีพิษตกค้าง เนื่องจากสารธรรมชาติส่วนใหญ่จะสลายตัวได้เร็ว นอกจากนี้สารสกัดจากพืชยังมีสารที่เป็นองค์ประกอบอยู่มากมาย ซึ่งแมลงจะต้องใช้เวลานานมากในการสร้างความต้านทานต่อองค์ประกอบต่างๆในสารสกัดเหล่านั้น นอกจากพืชต่างๆเหล่านี้แล้วยังมีพืชและสมุนไพรอีกหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชและวัชพืชได้ เช่น **น้อยหน่า** (*Annona. squamosa*L.) เป็นพืชผลไม้ในกลุ่ม custard apple family ในประเทศไทยเพาะปลูกน้อยหน่าสายพันธุ์ *Annoana squamosa* สารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยเอทานอลและเมทานอลมีฤทธิ์กำจัดด้วง pulse (*Callosobruchus chinensis*) ได้ถึง 100% (Al-Lawati *et al*., 2002) และสามารถกำจัดด้วง khapra (*Trogoderma granarium*) ได้ (Rao, Sharma and Sharma, 2005) สารสกัดใบและเมล็ดน้อยหน่ายังสามารถควบคุมแมลงได้อีกหลายชนิดเช่น เพลี้ย หนอนฝ้าย ตั๊กแตน มด แมลงหวี่ จากรายงานสารเคมีในผลน้อยหน่าประกอบด้วย diterpenoid compound kaur-16-en-18-oic acid, α-pinene, sabinene และ limonene (Andrade *et al*., 2001) **แมงลักป่า**หรือแมงลักคาหรือกะเพราผี (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) เป็นวัชพืชชนิดหนึ่งที่มีแนวโน้มว่ามีศักยภาพในการควบคุมวัชพืช สารสกัด essential oil จากแมงลักคามีสารประกอบหลักคือ 1,8-cineole, β-pinene, sabinene, β- caryophyllene, α-pinene, 4-terpinenol, α-berganmotene, limonene,biclyclogermacrene, β- phellandrene and, α-copaene, β-elemene, and eugenol

น้อยหน่า แมงลักป่า เป็นพืชที่มีแนวโน้มในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชและวัชพืช จากการศึกษาค้นคว้าจากเอกสารงานวิจัยต่างๆ พบว่าพืชทั้ง 2 ชนิดมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ควบคุมและกำจัดแมลงต่างๆได้ อีกทั้งแมงลักป่ายังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของวัชพืชบางชนิดได้ ข้อมูลส่วนใหญ่ของงานวิจัยน้อยหน่าและแมงลักป่าจะเป็นการศึกษาทางด้านประสิทธิภาพและสารสำคัญ มีส่วนน้อยที่ทำการศึกษาและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป จึงได้นำพืชทั้ง 2 ชนิดนี้มาทำการวิจัยและพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อทดแทนหรือลดการใช้สารเคมี

นอกจากนี้ยังให้ความสำคัญในการศึกษาเอกลักษณ์ทางโครมาโทกราฟีของสารสำคัญในพืชต่างๆ เพื่อการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ และศึกษาการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในสมุนไพร เนื่องจากสารสำคัญในสมุนไพรทั่วไปมีปริมาณน้อย เช่น สะเดา เมื่อเทียบสายพันธุ์สะเดาไทยและสะเดาอินเดีย โดยการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณธาตุอาหารกับการเพิ่มปริมาณสารสำคัญของพืชสมุนไพรเพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มสารสำคัญในพืช

จะเห็นว่าโครงการวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยที่สนับสนุนนโยบายของรัฐบาลในการลดการใช้สารเคมีการเกษตร และส่งเสริมให้มีการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังส่งเสริมการใช้พืชท้องถิ่นของไทยซึ่งมีจำนวนมากและหลากหลายมาทำให้เป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชท้องถิ่นของไทย และสามารถแข่งขันทางด้านพัฒนาวิจัยสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมกับประเทศในอาเซียนสำหรับการเข้าสู่เออีซี(ASEAN Economic Community: AEC)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาสูตรและผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืชจากน้อยหน่า
2. เพื่อพัฒนาสูตรและผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืชจากแมงลักป่า
3. เพื่อศึกษาข้อมูลเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในพืชสำหรับการทำเป็นมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพสารสำคัญ เช่น สะเดา หางไหล หนอนตายหยาก ว่านน้ำ สาบเสือ เป็นต้น
4. เพื่อศึกษาวิธีการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในพืชโดยการใช้ธาตุอาหารพืช เช่นการเพิ่มปริมาณสารอาซาดิแรคตินในสะเดาเป็นต้น

วิธีการวิจัย

ดำเนินการ 4 กิจกรรประกอบด้วย

1. วิจัยผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืชจากน้อยหน่า
   - 1.1 วิจัยประสิทธิภาพของสารสกัดจากน้อยหน่าในการควบคุมหนอนใยผัก
   - 1.2 วิจัยหากลุ่มสาระสำคัญในสารสกัดน้อยหน่าที่มีฤทธิ์ในการควบคุมหนอนใยผัก
   - 1.3 วิจัยสูตรและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าเพื่อการป้องกันกำจัดศัตรูพืช
   - 1.4 วิจัยความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าต่อลูกปลานิล
2. วิจัยผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืชจากแมงลักป่า
   - 2.1 วิจัยประสิทธิภาพของสารสกัดจากแมงลักป่าในการควบคุมวัชพืช
   - 2.2 วิจัยหากลุ่มสารสำคัญในสารสกัดจากแมงลักป่าในการควบคุมวัชพืช
   - 2.3 วิจัยสูตรและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดจากแมงลักป่าเพื่อการควบคุมวัชพืช
   - 2.4 วิจัยความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์แมงลักป่าต่อลูกปลานิล
3. ศึกษาการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง(HPTLC)เพื่อทำมาตรฐานเอกลักษณ์ โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในพืช
   - 3.1 วิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญ ในสะเดา
   - 3.2 วิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญ ในหางไหล

3.3 วิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในหนอนตายหยาก

3.4 วิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในว่านน้ำ

3.5 วิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในสาบเสือ

4. วิจัยการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในพืชสมุนไพรป้องกันกำจัดศัตรูพืช

4.1 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างธาตุอาหารและปริมาณสารอะซาดิแรคตินในสะเดา

4.2 วิจัยการใช้ธาตุอาหารในการเพิ่มปริมาณสารสำคัญอะซาดิแรคตินในสะเดา

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติในพืช เป็นโครงการวิจัยเพื่อที่จะนำสารสกัดจากพืชที่มีศักยภาพมาใช้ลดหรือทดแทนสารเคมีป้องกันกำจัด ประกอบด้วย 4 กิจกรรม ได้แก่ **กิจกรรมวิจัยผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืชจากน้อยหน่า** ดำเนินการโดยทำการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดน้อยหน่าในการควบคุมหนอนใยผัก พบว่า สารสกัดจากน้อยหน่าด้วยเมทานอลมีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผัก จึงนำมาสกัดและตรวจสอบหาสารหรือกลุ่มสารออกฤทธิ์ พบว่าเป็นสารกลุ่มแอลคาลอยด์ ทำการศึกษาวิธีการสกัดและตรวจหาตำแหน่งของสารสำคัญดังกล่าวโดยการวิเคราะห์หาเอกลักษณ์ทางโครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ของสารสกัดจากเมล็ดน้อยหน่าด้วยวิธี HPTLC และทำการสกัดแยกต่อเพื่อให้ได้เป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ เพื่อใช้เป็นสารอ้างอิงในการวัดปริมาณสารสำคัญในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ จากนั้นนำสารสกัดจากเมล็ดน้อยหน่ามาทำเป็นผลิตภัณฑ์สูตรเข้มข้น วิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในสารสกัดและผลิตภัณฑ์ วิเคราะห์คุณภาพและทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสูตรผลิตภัณฑ์ต่อหนอนใยผัก ซึ่งจากการวิจัยสูตรผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ พบว่าสูตรที่เหมาะสมในการทำผลิตภัณฑ์มี 2 สูตรคือ EC (emulsifiable concentrates) และ EW (emulsion in water) เมื่อนำมาศึกษาความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าที่ต่อลูกปลานิล (LC_{50}) ที่ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.123 มิลลิกรัม/ลิตร สูตรผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถนำไปต่อยอดศึกษาประสิทธิภาพต่อแมลงศัตรูพืชชนิดอื่นๆได้ในอนาคต **กิจกรรมวิจัยผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืชจากแมงลักป่า** นำแมงลักป่ามาสกัดน้ำมันหอมระเหย กลั่นด้วยวิธี Hydro Distillation ทำการศึกษาประสิทธิภาพและศึกษาหากลุ่มสารสำคัญของที่มีฤทธิ์ในการควบคุมวัชพืช โดยทดสอบกับไมยราบยักษ์ หญ้าข้าวนก ผักโขมหนาม ถั่วผี และไมยราบเลื้อย พบว่า มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโต เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS กลุ่มสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยที่ได้เป็นสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ สารที่พบมากและเป็นองค์หลักในน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่า ได้แก่ Sabinene, β-pinene, 1,8-cineole, trans-caryophyllene, caryophyllene oxide, abietatriene เป็นต้น จากนั้นนำน้ำมันหอมระเหยของแมงลักป่ามาวิจัยเป็นสูตรผลิตภัณฑ์ ทำการทดสอบประสิทธิภาพและคุณภาพของผลิตภัณฑ์สูตร โดยพิจารณาผลการยับยั้งการงอกและการไมยราบยักษ์(ใบกว้าง)และเมล็ดหญ้าข้าวนก(ใบแคบ) และการวิเคราะห์หาปริมาณสาร Sabinene, 1,8-cineol, trans-caryophyllene ได้สูตรผลิตภัณฑ์เป็นสูตรสารละลายน้ำมันเข้มข้น (Emulsifiable concentrate : EC) 2 สูตร คือ ผลิตภัณฑ์สูตร A 40%EC และ ผลิตภัณฑ์สูตร B 40%EC มีอัตราที่ 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน (LC_{50}) ต่อลูกปลานิลที่ 96 ชั่วโมง พบว่า ผลิตภัณฑ์สูตร A 40%EC เท่ากับ 27.277 มิลลิกรัมต่อลิตร และผลิตภัณฑ์สูตร B 40%EC เท่ากับ 0.6584 มิลลิกรัมต่อลิตร

นอกจากนี้ยังให้ความสำคัญในการศึกษาเอกลักษณ์ทางโครมาโทกราฟีของสารสำคัญในพืชต่างๆจึงมี**กิจกรรมศึกษาการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง(HPTLC)เพื่อทำมาตรฐานเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในพืช** ดำเนินการวิจัยในพืช 5 ชนิด คือ **สะเดา** ส่วนของเมล็ดมีสารสำคัญเป็นกลุ่ม azadirachtin มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุด เมื่อทำการสารสกัดให้เป็นสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์และหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารมีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก ด้วยเทคนิค HPTLC ได้ HPTLC fingerprint และเมื่อนำมาทดสอบด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ toluene/methanol/ ethyl acetate (10/1.2/3) พบสารสำคัญคือ azadirachtin a ที่ Rf 0.30 ส่วนของน้ำมันสะเดาและสารสกัดน้ำจากใบสะเดาพบว่ามีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักด้วย ในน้ำมันพบสารสำคัญเทอร์ปีนอยด์ที่ Rf 0.51 (วัฏภาคเคลื่อนที่

hexane/ethyl acetate (90/10)) ส่วนสารสกัดน้ำจากใบสะเดาสารสำคัญที่ Rf 0.30 และ 0.38 (วัฏภาคเคลื่อนที่ butanol/ethanol/water/acetic acid (114/42/32/0.2)) เมื่อนำสารสกัดสะเดาไทย สะเดาอินเดีย สะเดาช้างและผลิตภัณฑ์สะเดา มาตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ด้วยวิธี HPTLC แล้วเปรียบเทียบข้อมูล HPTLC fingerprint ของสารออกฤทธิ์ ผลพบว่า สามารถตรวจสารบ่งชี้ได้ถูกต้องชัดเจน สามารถประเมินปริมาณสารออกฤทธิ์โดยรวมได้ **หางไหล** เมื่อสกัดสารจากรากหางไหลและทดสอบฤทธิ์ในหนอนใยผัก สารกลุ่ม Flavonoids ทำการแยกโดยสกัดต่อให้เป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ทดสอบฤทธิ์และตรวจวิเคราะห์หาเอกลักษณ์ทางโครมาโทรกราฟี (Fingerprint) ของสาร ด้วยวิธี HPTLC พบสาร tephrosin ที่ R_f 0.35, Rotenone ที่ R_f 0.51 และ deguelinที่ R_f 0.52 และจากการสารกึ่งบริสุทธิ์ที่แยกได้ (DP5) วิเคราะห์ปริมาณ Rotenone ด้วยเครื่อง HPLC พบว่ามีความบริสุทธิ์สูงถึง 92.9% สามารถใช้พัฒนาต่อยอดเป็นสารมาตรฐาน หรือผลิตภัณฑ์สูตรเข้มข้นต่อไป ส่วน**หนอนตายหยาก** ทำการสกัดสารและทำการทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก พบว่า ส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนมีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักสูง เมื่อทำการทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมี พบว่าเป็นสารกลุ่มแอลคาลอยด์ ศึกษาหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารด้วยเทคนิค HPTLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ดังนี้ Dichloromethane : Ethyl acetate : Methanol : Ammonium hydroxide (50:45:4:0.1) ในหนอนตายหยาก 3 ชนิดพบสารแอลคาลอยด์ในหนอนตายหยากจาก อ.จอมบึง จ.ราชบุรี (ชนิด *Stemona phyllantha* Gagnep) ที่ Rf 0.41 และ 0.69 ส่วนหนอนตายหยากจาก อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี(ชนิด *Stemona* spp.#1) พบที่ Rf 0.34 และนำผลิตภัณฑ์หนอนตายหยากทดสอบและเปรียบเทียบผล สามารถตรวจพบสารแอลคาลอยด์ แต่ให้เอกลักษณ์โครมาโทกราฟีแอลคาลอยด์ในตำแหน่ง Rf ที่แตกต่างออกไป แสดงว่าเป็นหนอนตายหยากคนละชนิด เนื่องจากหนอนตายหยากในประเทศไทยมีมากถึง 8 ชนิด สำหรับ **ว่านน้ำ** ทำการสกัดว่านน้ำด้วยเมทานอลและทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก นำส่วนที่มีฤทธิ์มาหาชนิดของสารหรือกลุ่มสารทางพฤกษเคมี แล้วทำการสกัดแยกให้ได้สารกึ่งบริสุทธิ์ ศึกษาระบบวัฏภาคของเหลวพบว่า Dichloromethane/ethylacetate (96/4) มีความเหมาะสมในการแยกสารสำคัญที่สุด เมื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารกึ่งบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเบต้าอะซาโรนด้วยเทคนิค HPTLC พบว่าข้อมูลเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีเหมือนกัน **สาบเสือ** ศึกษาการสกัดและทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก พบว่านสารสกัดหยาบจากปิโตรเลี่ยมอีเทอร์ และไดคลอโรมีเทน ส่วนที่มีฤทธิ์ในการควบคุมหนอนใยผัก เมื่อทำการทดสอบทางพฤกษเคมี พบเป็นสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ และฟีนอล เมื่อศึกษาการหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของกลุ่มสารทั้ง 2 ชนิดจากสารสกัดหยาบสาบเสือ สารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ตรวจสอบด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ ethyl acetate : hexane (1:9, v/v) ที่ 0.16, 0.33 และ 0.63 สำหรับสารกลุ่มฟีนอลตรวจสอบด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (79:20:1, v/v/v)ที่ R_f 0.55 เมื่อนำสารมาตรฐาน lupeol และ trans-caryophyllene มาทดสอบด้วยวิธีที่ได้มาพบว่ามี R_f 0.16 และ 0.33 ตามลำดับ จะเห็นว่าตำแหน่ง R_f ของสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ในสาบเสือเป็นตำแหน่งเดียวกับสารมาตรฐาน แต่อย่างไรก็ตาม ควรพิสูจน์ความถูกต้องด้วยเทคนิค GC/MS และ HPLC เพื่อยืนยันชนิดสาร และทดสอบผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด พบว่าในผลิตภัณฑ์มีสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ 3 ตำแหน่ง ที่ R_f แตกต่างจากสารสกัดสาบเสือ เป็นไปได้ว่าเป็นสารเทอร์ปีนอยด์ต่างชนิดกัน

สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณธาตุอาหารและปริมาณสารอะซาดิแรคตินในสะเดาไทยเพื่อให้ทราบถึงชนิดธาตุอาหารที่มีผลต่อปริมาณสาร โดยดำเนินการทดลองในสะเดาไทย

แปลงพื้นที่อำเภอศรีประจันต์ จังหวัดสุพรรณบุรี ผลวิเคราะห์ธาตุอาหารและปริมาณสารอะซาดิแรคตินในเมล็ดสะเดาไทย พบว่า เมื่อมีปริมาณของธาตุแคลเซียมและแมกนีเซียมในเมล็ดสูงจะพบปริมาณของสารสำคัญน้อย แต่สำหรับปริมาณของธาตุทองแดงจะเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับปริมาณสารอะซาดิแรคติน และศึกษาผลของธาตุอาหารหลักและปริมาณสารอะซาดิแรคติน โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block (RCB) 3 ซ้ำ โดยใช้การใส่ปุ๋ยเป็นกรรมวิธี 8 กรรมวิธี และวิเคราะห์ปริมาณสารอะซาดิแรคตินในเมล็ดสะเดา พบว่า ปริมาณสารสำคัญอะซาดิแรคตินในแต่ละกรรมวิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้การดำเนินการในกิจกรรมนี้เป็นงานวิจัยเบื้องต้นและสะเดามีการให้ผลผลิตปีละครั้ง จึงเป็นการวิจัยเพียงระยะสั้น (1ปี) ซึ่งอาจต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในเรื่องของการใช้ธาตุอาหารเพิ่มปริมาณสารสำคัญ ปริมาณธาตุอาหารหลักที่เหมาะสมกับในการเพิ่มสารสำคัญสะเดา รวมถึงธาตุอาหารรองที่อาจมีส่วนช่วยในการเสริมปริมาณสารสำคัญ

Abstract

Research on natural toxic substances from plants is developing formulated botanical pesticide products from plant extracts for reducing and replacing the synthetic chemical pesticide including finding out the group of active substances of each plant for developing the beneficial research in the future. This project was divided into four mature parts. First, research on formulation of *Annona squamosa* (L.) product for using as insecticide found that methanolic seed extract containing alkaloids group can control *Plutella xylostella* (L.). HPTLC fingerprint of these alkaloids group were created by High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) technique. Then, the active compound of seed extract was isolated to be semi-purified compound for using as reference standard in qualification and quantification process in samples. *Annona squamosa* (L.) extract was formulated into 2 formulas, EC (emulsifiable concentrateds) and EW (emulsion in water) which LC_{50} (96 hr) was 0.123 mg/L. For research on formulation of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. for using as herbicide, extraction method and analysis method of active substances were studied. Essential oil extracted by hydrodistillation shows high inhibitory effect on seed germination and seedling growth of *Mimosa pigra* L., *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv, *Amaranthus spinosus* L., *Phaseolus lathyroides* L. and *Mimosa diplotricha* C. Wright ex Sauvallen. The major compound of essential oil are terpenoids group such as sabinene, β-pinene, 1,8-cineole, trans-caryophyllene, caryophyllene oxide, abietatriene. Moreover, essential oil was also formulated to be 2 formulas, formula A (40% EC) and formula B (40% EC) with concentration 10%. The both formulas were evaluated in acute toxicity testing. The 96h- LC_{50} were 27.277 mg/L and 0.6584 mg/L, respectively.

Furthermore, standard HPTLC fingerprint of active substances of plants were provided by HPTLC technique. Five types of insecticidal plants, Neem, *Derris elliptica* Benth., *Stemona* spp., *Acorus calamus* L. and *Chromolaena odorata* (L.) R.M. King &

H. Robin were studied the active substances and their HPTLC fingerprint. **Neem**, the active compounds of neem extract are group of terpenoids. The major effective substance in neem seeds is azadirachtin group. These terpenoids from semi-purified of seed which were detected by HPTLC with mobile phase toluene : methanol : ethyl acetate (10:1.2:3, v/v/v) repealed azadirachtin a at R_F 0.30. The efficacy of neem oil and neem leaves extract against *Plutella xylostella* (L.) are lesser than the seed extract. The active compounds of neem oil and neem leaves are also terpenoids group which occur at R_F 0.51 with hexane : ethyl acetate (90:10, v/v) from neem oil and at R_F 0.30, 0.38 with butanol : ethanol : water : acetic acid (114:42:32:0.2, v/v/v/v) for neem leaves. These datas and method of HPTLC fingerprint was applied to three species, **Azadirachta indica** var.siamensis, **Azadirachta indica, Azadirachta excelsa and neem products** and showed that terpenoids substance can be indentified and estimated the total amount for control the quality of raw materials of neem products. For ***Derris elliptica* Benth.**, the active substance of *Derris elliptica* Benth. affecting to *Plutella xylostella* (L.) is flavonoid compound which was determined by HPTLC technique. The chromatographic fingerprinting from the substance of *Derris elliptica* Benth. shows tephrosin at R_F 0.35, rotenone at R_F 0.51 and deguelin at R_F 0.52. Then, the methanolic crude was separated to be semi-purified compound which gave high purity, rotenone 92.9%. For ***Stemona* spp.**, hexane and dichloromethane root extract gave the highest effective on *Plutella xylostella* (L.) that presented the alkaloids group. HPTLC fingerprint of these alkaloids was performed with dichloromethane : ethyl acetate : methanol : ammonium hydroxide (50:45:4:0.1, v/v/v/v). HPTLC fingerprint of *Stemona phyllantha* Gagnep. found alkaloids at R_F 0.46, 0.67, *Stemona aphylla* Craib at R_F 0.39, *Stemona* sp. (Ratchaburi) at R_F 0.32 and *Stemona* sp. (Chumphon) at R_F 0.26, 0.30 and 0.67. 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. For ***Acorus calamus* L.**, rhizome was extracted by methanol, evaluated the efficacy against *Plutella xylostella* (L.) and provided the fingerprinting profile. The active substance was indentified in secondary metabolite. Main chemical compositions were also isolated, semi-purifed and identified by HPTLC compared these data with reference fingerprint profile of β-asarone. For *Chromolaena odorata* (L.) R.M. King & H. Robin, petroleum ether and dichloromethane extracts of root gave the highest effective on *Plutella xylostella* (L.) that presented terpenoids and phenol, respectively. HPTLC fingerprint of terpenoids and phenol were performed by ethyl acetate : hexane (1:9, v/v) and dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (79:20:1, v/v/v), respectively as mobile phase. HPTLC fingerprint of Siam weed revealed terpenoids at R_F 0.16, 0.33, 0.63 in leaf, branch and flower parts and phenol at R_F

0.55 in leaf and branch. Commercial products revealed terpenoids at R_F 0.10, 0.43, 0.53.

Investigation on relationships between mineral elements and azadirachtin in **Azadirachta indica** A. Juss var. **siamensis** Valeton was studied for proving types of nutrient on amount of azadirachtin. This experiment conducted at the neem garden on Siprachan district in Suphanburi province. Calcium and magnesium content were correlated with the amount of azadirachtin in Siamese neem seed with correlation in the opposite direction Copper content was significantly correlated with the amount of azadirachtin in Siamese neem. Therefore, it should study the effect of calcium, magnesium and copper content in Siamese neem seed on the amount of azadirachtin in neem seed. To guide Siamese neem seed growers to select suitable planting areas for increasing the amount of azadirachtin in Thai neem seed.

กิจกรรมที่ 1 วิจัยผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืชจากน้อยหน่า

กิจกรรมย่อยที่ 1.1
วิจัยประสิทธิภาพของสารสกัดจากน้อยหน่าในการควบคุมหนอนใยผัก
Efficacy of Crude Extract from *Annona squamosa* in Controlling *Plutella xylostella* L.

ผู้วิจัย

ธิติยาภรณ์ อุดมศิลป์ พรรณีกา อัตตนนท์ ภัควรินทร์ ศานติธีรโรจน์ เสาวภาคย์ สุขประเสริฐ
Thitiyaporn Udomsil Panneeka Attanon Pukwarin Santiteerarod Saowapak Sukprasert

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดน้อยหน่าในการควบคุมหนอนใยผัก โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ พบว่าสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าให้ผลในการฆ่าหนอนใยผักได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่า และสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าที่สกัดด้วยเมทานอล ให้ผลในการฆ่าหนอนใยผักดีที่สุด โดยทำให้หนอนใยผักวัย 2 ตาย 88.54% และสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 5 10 15 20 และ 25% (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า ทุกความเข้มข้นให้ผลในการฆ่าหนอนใยผักไม่แตกต่างกันทางสถิติ จากผลการทดสอบสารพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าด้วยตัวทำละลายเมทานอล พบสารในกลุ่ม เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนยด์ และอัลคาลอยด์ เป็นองค์ประกอบ จากผลการทดลองสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าเป็นสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชต่อไป

คำสำคัญ : น้อยหน่า สารสกัดหยาบ หนอนใยผัก

Abstracts

The efficacy of crude extract from *Annona squamosal* (leaf and seed) was studied in second instar lavae of *Plutella xylostella* L. under laboratory condition by using a leaf dipping method. The crude seed extract against *Plutella xylostella* L. more than crude leaf extract and methanol extraction seed extract showed the highest activity against *Plutella xylostella* L. at mortality 88.54%. Crude methanolic seed extract in concentration 5, 10, 15, 20 and 25% w/v were effective to the lavae of *Plutella xylostella* L. All five concentrations did not differ statistically significant. The preliminary phytochemical analysis showed the presence of terpenoids, flavonoids and alkaloids in methanolic seed extract. The results suggested that *A. squamosal* has a high efficientcy for development as a bio-pesticide products for pest control.

Key words : *Annona squamosa*, *Plutella xylostella* L. , crude extract

บทนำ (Introduction)

การใช้สารเคมีเพื่อการควบคุมและกำจัดแมลงศัตรูพืชอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้แมลงพัฒนาความต้านทานต่อสารกำจัดแมลงแทบทุกกลุ่ม และพิษของสารกำจัดแมลงยังก่อให้เกิดการตกค้างต่อสภาพแวดล้อม เป็นอันตรายต่อผู้ใช้สารและผู้บริโภค ซึ่งเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นมาแล้วในอดีต กำลังเกิดอยู่ในขณะนี้ และคาดว่าจะเกิดต่อไปในอนาคต จึงเป็นปัญหาเร่งด่วน ที่มีความจำเป็นต้องวิจัยหาสารธรรมชาติจากพืชเพื่อทดแทนหรือลดการใช้สารเคมี ในประเทศไทยมีพืชหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชและวัชพืช เช่น สะเดา หางไหล หรือ โล่ติ๊น หนอนตายหยาก สาบเสือ ซึ่งนักวิจัยสาขาเกษตร และสาขาอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องได้ทำการทดลองค้นคว้าหาสารทดแทนสารเคมีการเกษตร พบว่า สามารถนำเอาส่วนที่สำคัญต่างๆ เช่น ต้น ราก ใบ ดอก และผล มาสกัดเพื่อให้ได้สารสำคัญจากพืชนั้นๆ มาใช้ควบคุมศัตรูพืชแทนสารเคมีได้ดี โดยไม่มีพิษตกค้าง เนื่องจากสารธรรมชาติส่วนใหญ่จะสลายตัวได้เร็ว นอกจากนี้สารสกัดจากพืชยังมีสารที่เป็นองค์ประกอบอยู่มากมาย ซึ่งแมลงจะต้องใช้เวลานานมากในการสร้างความต้านทานต่อองค์ประกอบต่างๆในสารสกัดเหล่านั้น นอกจากพืชต่างๆเหล่านี้แล้ว ยังมีพืชและสมุนไพรอีกหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชได้

น้อยหน่า จัดเป็นพืชในวงศ์ Annonaceae ปลูกทั่วไปในประเทศไทย เพื่อการรับประทานผล และยังใช้ประโยชน์เป็นยาสมุนไพรสำหรับรักษาโรคท้องเสีย โรคบิด โรคหิดและโรคท้องผูก (Jamkhande and Wattamwar,2015) และมีรายงานวิจัยแล้วว่ามีฤทธิ์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชได้ สารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยเอทานอลและเมทานอลมีฤทธิ์กำจัด ด้วง pulse (*Callosobruchus chinensis*) ได้ถึง 100% (Al-Lawati *et al*., 2002) และสามารถกำจัดด้วง khapra (*Trogoderma granarium*) ได้ (Rao, Sharma and Sharma, 2005) สารสกัดใบและเมล็ดน้อยหน่ายังสามารถควบคุมแมลงได้อีกหลายชนิด เช่น เพลี้ย หนอนฝ้าย ตั๊กแตน มด แมลงหวี่ จากรายงานสารเคมีในผลน้อยหน่าประกอบด้วย diterpenoid compound kaur-16-en-18-oic acid, α-pinene, sabinene และ limonene (Andrade *et al*., 2001)

สารสกัดเมทานอลจากใบน้อยหน่ามีความเป็นพิษต่อเพลี้ยอ่อนถั่ว โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 2,089.30 µg/mL (สุดารัตน์ หอมหวล และคณะ, 2554) จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อเพลี้ยอ่อน พบว่า สารสกัดจากน้อยหน่า ออกฤทธิ์ดีที่สุดต่อเพลี้ยอ่อน จากรายงานวิจัยพบว่าสารสำคัญในใบน้อยหน่าเป็นสารแอลคาลอยด์ แอนโนเนอีน (anonaine) และเรซิ่น (resin) ในเมล็ดมีน้ำมันอยู่ประมาณ 45% น้ำมันเป็นพิษกับด้วงปีกแข็ง เพลี้ยอ่อน แมลงวัน และมวนปีกแข็ง (สมสุข ศรีจักรวาฬ, 2546)

กรกช (2554) ได้ศึกษาฤทธิ์ต่อการสัมผัสโดยตรง (direct contact) ต่อหนอนแมลงวันทอง โดยการจุ่มหนอน (dipping) ฤทธิ์ของสารผสมระหว่างใบน้อยหน่าและใบแมงลักคา มีค่า LC_{50} 652.80 ± 13.15 ppm และ 683.25 ± 38.08 ppm ตามลำดับ และสารสกัดใบน้อยหน่าด้วยเอทานอลน่าจะเป็นสารเพิ่มฤทธิ์แบบ additive effect ให้แก่สารสกัดใบสะเดาด้วยเอทานอล และฤทธิ์ของสารสกัดต่อการกินของแมลงวันทองตัวเต็มวัย พบว่าสารสกัดใบน้อยหน่าด้วยน้ำมีประสิทธิภาพทำให้แมลงตายได้ ปานกลาง LC_{50} 1,710.91 ± 67.07 ppm ฤทธิ์สารสกัดผสมควบคุมแมลงได้ปานกลางเช่นกัน สารสกัดใบสะเดาผสมใบน้อยหน่าด้วยเอทานอลกำจัดแมลงได้สูงสุด LC_{50} 1,605.87 ± 67.93 ppm

จากการศึกษาของ Khalequzzaman และ Sultana (2006) ทดสอบสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยตัวทำละลายต่างกับตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของมอดแป้ง (Red flour beetle) 4 สายพันธุ์ คือ Raj, CR 1, FSS II และ CTC-12 พบว่าสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยเมทานอลมีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนมอดแป้งสายพันธุ์ FSS II น้อยที่สุด และสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยปิโตรเลียมสปิริท มีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนมอดแป้งสายพันธุ์ Raj สูงที่สุด สำหรับตัวเต็มวัยของมอดแป้ง สารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยปิโตรเลียมสปิริทมีความเป็นพิษกับสายพันธุ์ CTC-12 สูงที่สุด และสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยอะซิโตนมีความเป็นพิษกับสายพันธุ์ CR 1 น้อยที่สุด

สารสกัดหยาบของน้อยหน่าสามารถควบคุมตัวอ่อนผีเสื้อ (Leatemia and Isman, 2004a) ควบคุมแมลงวันผลไม้ ชนิด Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) ในระยะฟักไข่ รบกวนการวางไข่ และ ยืดเวลาพัฒนาการของตัวอ่อน (Epino and Chang, 1993) และควบคุมตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของด้วงแป้งสีแดง *Tribolium castaneum* Herbst ได้ (Khalequzzaman and Sultana, 2006)

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องแก้ว ได้แก่ volumetric flask, pipette, round bottom flask, cylinder, beaker, vial เป็นต้น
2. สารเคมี ได้แก่ methanol, chloroform, petroleum ether, ethanol เป็นต้น
3. เครื่องระเหยแบบลดความดัน (Rotary evaporator)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. การเตรียมสารสกัดจากใบและเมล็ดน้อยหน่า

เตรียมสารสกัดจากใบและเมล็ดน้อยหน่า โดยการสับใบและปั่นเมล็ดน้อยหน่าให้ละเอียด ชั่งใบและผงเมล็ดน้อยหน่าหนัก 20 กรัม นำมาสกัดโดยวิธีแช่ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ได้แก่ เม

ทานอล เอทานอล ปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม อะซิโตน และน้ำ ที่ปริมาตร 200 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง กวนสารสกัดเป็นครั้งคราว ทิ้งไว้ข้ามคืน กรองสารสกัดผ่านกรวยบุคเนอร์ (Buchner funnel) นำกากที่เหลือไปสกัดต่ออีก 2 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดรวมกัน และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator) บันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบทั้ง 5 ชนิดที่ได้ และเก็บสารสกัดหยาบเพื่อรอการทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผักวัย 2 ต่อไป

2. ทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดใบและเมล็ดน้อยหน่า

ทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดใบและเมล็ดน้อยหน่า ต่อหนอนใยผักวัย 2 โดยนำสารที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆมาทดสอบโดยวิธี Leaf dipping method วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ โดยมีสารสกัดใบและเมล็ดน้อยหน่าด้วยตัวทำละลายต่างๆ เป็นกรรมวิธี เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดใบและเมล็ดน้อยหน่า

3. ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าต่อหนอนใยผักในระดับห้องปฏิบัติการ

นำผลที่ได้จาก ข้อ 2 เป็นข้อมูลในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าต่อหนอนใยผักวัย2 โดยวิธี Leaf dipping method วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ โดยมีสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าด้วยตัวทำละลายต่างๆเป็นกรรมวิธี หลังจากนั้นนำผลของสารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด มาทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่า ต่อหนอนใยผักวัย2 วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ โดยมีความเข้มข้นระดับต่างๆของสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าเป็นกรรมวิธี

4. การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

นำสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพต่อหนอนใยผัก มาทดสอบชนิดของกลุ่มสาร ด้วยน้ำยาทดสอบทางพฤกษเคมีชนิดต่างๆ เช่น Dragendroff's reagent, Mayer's reagent, Libermann-Burchard test, Ferric chloride test, Shinoda test, Foam test เป็นต้น

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2558 สิ้นสุด กันยายน 2559
สถานที่ กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ
กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results) และอภิปรายผล (Discussion)

1. การศึกษาการสกัดสารสกัดหยาบใบและเมล็ดน้อยหน่า

จากการศึกษาการสกัดสารสกัดหยาบจากใบและเมล็ดน้อยหน่าด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เมทานอล ปิโตรเลี่ยมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และ อะซีโตน ด้วยวิธีการแช่ในตัวทำละลาย พบว่าได้ปริมาณสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่ามากกว่าสารสกัดหยาบใบน้อยหน่า โดยสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าจากทุกตัวทำละลายได้สารสกัดหยาบเฉลี่ย 167.13-228.70 กรัม/กิโลกรัม และสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าจากทุกตัวทำละลายได้สารสกัดหยาบเฉลี่ย 26-111.5 กรัม/กิโลกรัม (ตารางที่ 1)

2. ทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดใบและเมล็ดน้อยหน่าต่อหนอนใยผักระดับห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดหยาบใบและเมล็ดน้อยหน่าต่อหนอนใยผักวัย 2 โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ซ้ำ โดยมีสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ เป็นกรรมวิธี พบว่า สารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าที่สกัดด้วย คลอโรฟอร์ม อะซิโตน เอทานอล

และเมทานอลให้ผลในการฆ่าหนอนใยผักไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยการวิเคราะห์ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 2) ดังนั้นเราจึงเลือกสารสกัดหยาบที่ให้ผลในการฆ่าหนอนใยผักได้ดี นำมาทำการทดลองต่อไป ในที่นี้ ได้แก่ สารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด

3. ทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าต่อหนอนใยผักระดับห้องปฏิบัติการ

นำสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10% (น้ำหนักต่อปริมาตร) มาทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นต่อหนอนใยผักวัย 2 โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ โดยมีสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ เป็นกรรมวิธี พบว่า สารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าที่ได้จากเมทานอลและเอทานอล ให้ผลในการฆ่าหนอนใยผักเฉลี่ย 88.54 และ 86.11% ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยการวิเคราะห์ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 3) และเนื่องจากสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าที่ได้จากเมทานอลเป็นตัวทำละลายให้ผลในการฆ่าหนอนใยผักดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกมาทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผักวัย 2 เพื่อหาระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยใช้สารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 5 10 15 20 และ 25% (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า ทุกความเข้มข้นให้ผลในการฆ่าหนอนใยผักไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยการวิเคราะห์ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4)

4. ผลการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าด้วยเมทานอล พบสาร 3 กลุ่ม ได้แก่ เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ และอัลคาลอยด์

ผลการทดลองดังกล่าว พบว่า สารสกัดน้อยหน่าทั้งจากใบและเมล็ดมีผลต่อการยับยั้งและกำจัดหนอนใยผักวัย 2 ได้ โดยสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าที่ได้จากเมทานอลสามารถฆ่าหนอนได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Leatemia และ Isman (2004b) ที่กล่าวว่าสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 0.5% w/v มีฤทธิ์ฆ่าหนอนใยผักได้ดี และยับยั้งการกินของหนอนใยผักได้อีกด้วย และยังสอดคล้องกับผลของ De Seffrin และคณะ (2010) ซึ่งรายงานไว้ว่า สารสกัดเมล็ดน้อยหน่าสามารถยับยั้งการกินของหนอนคืบ (*Trichoplusia ni*) ในกำหล่ำปลีได้ อีกทั้งยังมีรายงาน สารสกัดเมล็ดน้อยหน่าจากตัวทำละลายต่างๆ มีผลต่อตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของมอดแป้ง (Red flour beetle) 4 สายพันธุ์ คือ Raj, CR 1, FSS II และ CTC-12 พบว่าสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยเมทานอลมีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนมอดแป้งสายพันธุ์ FSS II น้อยที่สุด และสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยปิโตรเลียมสปิริท มีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนมอดแป้งสายพันธุ์ Raj สูงที่สุด (Khalequzzaman และ Sultana, 2006) และ จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเมทานอลจากใบน้อยหน่าต่อเพลี้ยอ่อนพบว่า สารสกัดจากน้อยหน่า ออกฤทธิ์ดีที่สุดต่อเพลี้ยอ่อน โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 2,089.30 µg/mL (สุดารัตน์ หอมหวล และคณะ, 2554)

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดน้อยหน่าในการควบคุมหนอนใยผัก พบว่าสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าให้ผลในการฆ่าหนอนใยผักได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่า และสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าที่สกัดด้วย เมทานอลและเอทานอล ให้ผลในการฆ่าหนอนใยผักไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยการวิเคราะห์ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยทำให้หนอนใยผักวัย 2 ตาย 88.54 และ 86.11% ตามลำดับ และสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 5 10 15 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า ทุกความเข้มข้นให้ผลในการฆ่าหนอนใยผักไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยการวิเคราะห์ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยทำให้หนอนใยผักวัย 2 ตาย 75.00 76.95 86.67 95.00

และ 85.00% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดในสภาพแปลงทดลอง ผลกระทบของสารสกัดที่มีต่อแมลงศัตรูธรรมชาติของหนอนใยผักและสิ่งแวดล้อมด้วย

กิจกรรมย่อยที่ 1.2
วิจัยหากลุ่มสารสำคัญในสารสกัดน้อยหน่าที่มีฤทธิ์ในการควบคุมหนอนใยผัก
Study on Active Substance Group in *Annona squamosa* (L.) Extract Effecting on *Plutella xylostella* (L.) Control

ผู้วิจัย

ภัควรินทร์ ศานติธีรโรจน์ พรรณีกา อัตตนนท์ ณัฐพร ฉันทศักดา
Pukwarin Santiteerarod Panneeka Attanon Nattaporn Chanthasakda

บทคัดย่อ

การวิจัยสารสกัดน้อยหน่า เพื่อหากลุ่มสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการควบคุมหนอนใยผัก โดยทำการสกัดกลุ่มสารกึ่งบริสุทธิ์ จากใบและเมล็ดน้อยหน่า ด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ hexane, chloroform, methanol และน้ำ พบว่า สารออกฤทธิ์มากที่สุดจากเมล็ดน้อยหน่า มี 2 ส่วน คือ น้ำมันสีเหลือง และสารข้นหนืดสีน้ำตาลแดง ซึ่งให้ผลการตายของหนอนใยผัก 92.3 และ 94.8% ตามลำดับ ส่วนสารออกฤทธิ์มากที่สุดจากใบน้อยหน่า คือ น้ำมันสีเขียว เมื่อทดสอบชนิดของกลุ่มสารทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบต่างๆ พบว่า น้ำมันจากใบและเมล็ดน้อยหน่า มีสารเด่นเป็นสารกลุ่ม terpenoids ส่วนสารข้นหนืดสีน้ำตาลแดงจากเมล็ดน้อยหน่า มีสารเด่นเป็นสารกลุ่ม alkaloids ซึ่งตรวจหาตำแหน่งของสารสำคัญดังกล่าวด้วยวิธี HPTLC ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 215 nm โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) toluene/methanol/ethyl acetate/acetic acid (10/3/10/0.5) เวลาในการ develop 10 นาที แล้วใช้ น้ำยาพ่น anisaldehyde sulfuric acid และน้ำยาพ่น dragendroff ’s reagent พบสาร terpenoids ในน้ำมันจากทั้งใบและเมล็ดน้อยหน่า เด่นที่ Rf 0.81 และพบสาร alkaloids เด่นที่ Rf 0.50 ในสารข้นหนืดสีน้ำตาลแดงจากเมล็ดน้อยหน่า จึงทำการศึกษาและเปรียบเทียบเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ของใบและเมล็ดน้อยหน่า 3 พันธุ์ ได้แก่ น้อยหน่าฝ้าย (เนื้อ) สีเขียว น้อยหน่าญวณ (หนัง) สีเขียว และน้อยหน่าเพชรปากช่อง พบว่าสามารถตรวจพบสารสำคัญที่ตำแหน่ง (Rf) ดังกล่าวได้ และให้ผลเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ของสารสำคัญไม่แตกต่างกัน ทำให้สามารถนำวิธีการดังกล่าวไปใช้ควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและพัฒนาผลิตภัณฑ์น้อยหน่าต่อไป

คำสำคัญ : สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์, เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี, น้อยหน่า, หนอนใยผัก

บทนำ (Introduction)

น้อยหน่า ชื่อวิทยาศาสตร์ *Annona squamosa* Linn. มีชื่อสามัญ Sugar Apple, Sweetsop, Custard Apple องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดมีสาร anonaine alkaloid, isocorydine สารกลุ่ม acetogenin ชื่อ annonacin A จำแนกตามลักษณะเป็น 2 ชนิด ได้แก่ น้อยหน่าพื้นเมืองหรือน้อยหน่าฝ้าย แบ่งออกได้เป็น 2 สายพันธุ์ ตามลักษณะของสีผลคือ น้อยหน่าฝ้ายเขียวซึ่งมีผลสีเขียว กับน้อยหน่าฝ้ายครั่งมีผลสีม่วงเข้ม และน้อยหน่าหนังหรือน้อยหน่าญวน แบ่งได้ 3 สายพันธุ์ คือ น้อยหน่าหนังเขียวมีผลสีเขียว น้อยหน่าหนังทอง และน้อยหน่าหนังครั่ง นอกจากนี้ยังมี น้อยหน่าพันธุ์ลูกผสม 2 สายพันธุ์ คือ พันธุ์เพชรปากช่องและพันธุ์เนื้อทอง สารสกัดเมทานอลจากใบน้อยหน่ามีความเป็นพิษต่อเพลี้ยอ่อนถั่ว โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 2,089.30 µg/mL (สุดารัตน์ และ

คณะ, 2554) จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อเพลี้ยอ่อนพบว่า สารสกัดจากน้อยหน่าออกฤทธิ์ดีที่สุดต่อเพลี้ยอ่อน จากรายงานวิจัยพบว่าสารสำคัญในใบน้อยหน่าเป็นสารแอลคาลอยด์ (alkaloids) แอนโนเนอีน (anonaine) และเรซิน (resin) ในเมล็ดมีน้ำมันอยู่ประมาณ 45% น้ำมันเป็นพิษกับด้วงปีกแข็ง เพลี้ยอ่อน แมลงวัน และมวนปีกแข็ง (สมสุข, 2546) กรกช (2554) ได้ศึกษาฤทธิ์ต่อการสัมผัสโดยตรง (direct contact) ต่อหนอนแมลงวันทองโดยการจุ่มหนอน (dipping) ลงในสารผสมระหว่างใบน้อยหน่าและใบแมงลักคา มีค่า LC_{50} 652.80 ± 13.15 ppm และ 683.25 ± 38.08 ppm ตามลำดับ และสารสกัดใบน้อยหน่าด้วยเอทานอลน่าจะเป็นสารเพิ่มฤทธิ์แบบ additive effect ให้แก่สารสกัดใบสะเดาด้วยเอทานอล และฤทธิ์ของสารสกัดต่อการกินของแมลงวันทองตัวเต็มวัย พบว่าสารสกัดใบน้อยหน่าด้วยน้ำมีประสิทธิภาพทำให้แมลงตายได้ ปานกลาง LC_{50} 1,710.91 ± 67.07 ppm ฤทธิ์สารสกัดผสมควบคุมแมลงได้ปานกลางเช่นกัน สารสกัดใบสะเดาผสมใบน้อยหน่าด้วยเอทานอลกำจัดแมลงได้สูงสุด LC_{50} 1,605.87 ± 67.93 ppm จากการศึกษาของ Khalequzzaman and Sultana (2006) ทดสอบสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยตัวทำละลายต่างๆกับตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของมอดแป้ง (Red flour beetle) 4 สายพันธุ์ คือ Raj, CR 1, FSS II และ CTC-12 พบว่าสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยเมทานอลมีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนมอดแป้งสายพันธุ์ FSS II น้อยที่สุด และสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยปิโตรเลียมสปิริท มีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนมอดแป้งสายพันธุ์ Raj สูงที่สุด สำหรับตัวเต็มวัยของมอดแป้ง สารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยปิโตรเลียมสปิริทมีความเป็นพิษกับสายพันธุ์ CTC-12 สูงที่สุด และสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยอะซิโตนมีความเป็นพิษกับสายพันธุ์ CR 1 น้อยที่สุด สารสกัดหยาบของน้อยหน่าสามารถควบคุมตัวอ่อนผีเสื้อ (Leatemia and Isman, 2004) ควบคุมแมลงวันผลไม้ ชนิด Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) ในระยะฟักไข่ รบกวนการวางไข่ และยืดเวลาพัฒนาการของตัวอ่อน (Epino and Chang, 1993) ควบคุมตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของมอดแป้งสีแดง *Tribolium castaneum* Herbst (Khalequzzaman and Sultana, 2006)

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องแก้ว ได้แก่ volumetric flask, pipette, round bottom flask, cylinder, beaker, vial เป็นต้น
2. สารเคมี ได้แก่ ethyl ether, ethyl acetate, methanol, chloroform, hexane, petroleum ether, น้ำยาพ่น Anisaldehyde-sulfuric acid, น้ำยาพ่นและน้ำยาทดสอบ dragendroff, สารเปรียบเทียบ ได้แก่ capsaicin, indole, nicotine, piperine, piperidine, veratrine, berberine, α-pinene, sabinene, limonine เป็นต้น
3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้า, ultrasonic bath, vacuum pump, เครื่องบดตัวอย่าง, ตู้อบตัวอย่าง, เครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator), เครื่องทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC)

วิธีการ

1. **เตรียมตัวอย่างใบและเมล็ดน้อยหน่า**

   นำใบและเมล็ดน้อยหน่า ล้างทำความสะอาด อบให้แห้ง แล้วบดให้ละเอียด

2. ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารจากใบและเมล็ดน้อยหน่า

นำใบและเมล็ดน้อยหน่าบด สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane, petroleum ether, ethyl ether, chloroform, ethyl acetate, methanol, ethanol, acetone และน้ำ แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPTLC โดยใช้ anisaldehyde-sulfuric acid spray reagent เพื่อทดสอบสารกลุ่ม terpenoids และ dragendroff's spray reagent เพื่อทดสอบสารกลุ่ม alkaloids พบว่าตัวทำละลาย ethyl ether, ethyl acetate, chloroform, methanol, ethanol และ acetone สามารถสกัดสารกลุ่ม alkaloids และ terpenoids ได้ผล HPTLC chromatogram ไม่แตกต่างกัน

3. ศึกษาขั้นตอนการสกัดสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักจากใบและเมล็ดน้อยหน่า

3.1 นำเมล็ดน้อยหน่าในอัตรา 5%w/v แช่ด้วย hexane, methanol และน้ำ แล้วทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น ของสารสกัดต่อหนอนใยผัก โดยวิธี Leaf dipping method วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ โดยมีสารสกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดเป็นกรรมวิธี แล้วนำสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักที่สุดไปทดสอบกลุ่มสารด้วยน้ำยาทดสอบทางพฤกษเคมี และหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี

3.2 นำใบน้อยหน่าแช่ด้วย hexane, methanol และน้ำ ในอัตรา 5%w/v แล้วนำสารสกัดทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผัก โดยวิธี Leaf dipping method วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ โดยมีสารสกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดเป็นกรรมวิธี นำสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักไปทดสอบกลุ่มสารด้วยน้ำยาทดสอบทางพฤกษเคมีและหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี

4. ศึกษาเอกลักษณ์ทางโครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint)

หลังพ่นด้วยน้ำยา anisaldehyde-sulfuric acid และ Dragendroff's spray reagent ของกลุ่มสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก โดยศึกษาสภาวะของเครื่องทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) และน้ำยาพ่น (spray reagent) ที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นวิธีตรวจวัดชนิดและตำแหน่ง (Rf) ของสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก

5. เปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการควบคุมหนอนใยผัก ในใบและเมล็ดน้อยหน่าพันธุ์ต่างๆ

เปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ที่พบในใบและเมล็ดน้อยหน่าพันธุ์ต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเลือกวัตถุดิบเพื่อพัฒนาเป็นสูตรผลิตภัณฑ์ โดยเตรียมสารสกัดใบและเมล็ดน้อยหน่าพันธุ์ต่างๆ ด้วย hexane, methanol และน้ำ ในอัตรา 5%w/v แล้วนำสารสกัดที่ได้ ไปทดสอบด้วยเทคนิค HPTLC

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2558 สิ้นสุด กันยายน 2559
สถานที่ กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ
กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results) และอภิปรายผล (Discussion)

1. ศึกษาขั้นตอนการสกัดสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักจากใบและเมล็ดน้อยหน่า

ผลการสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วย hexane, methanol และน้ำ แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผัก พบว่าหนอนใยผักตาย 75.0%, 87.5% และ 0.0% ตามลำดับ ทำให้ทราบว่า hexane และ methanol สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ในการกำจัดหนอนใยผักจากเมล็ดน้อยหน่าได้ จึงสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วย hexane และ methanol แล้วนำไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ได้น้ำมันสีเหลือง จากสารสกัด hexane และได้สารสกัดหยาบจากสารสกัด methanol จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์ด้วยวิธีการทางเคมี โดยใช้ hexane,

chloroform และ methanol แล้วนำไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ได้สารสำคัญ 4 ส่วน คือ ได้น้ำมันสีเหลือง, ได้สารข้นหนืดสีน้ำตาลแดง, ได้สารข้นหนืดสีน้ำตาลเหลือง และได้เกล็ดน้ำตาลสีขาว ตามลำดับ (รูปที่ 1) เมื่อนำสารทั้ง 4 ส่วนในอัตรา 2%w/v ทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผัก พบว่าหนอนใยผักตาย 92.3, 94.8, 72.5 และ 27.5% ตามลำดับ ทำให้ทราบว่าในเมล็ดน้อยหน่าประกอบด้วยสารที่มีฤทธิ์ในการกำจัดหนอนใยผักได้ดี อยู่ในชั้นน้ำมันสีเหลือง สารข้นหนืดสีน้ำตาลแดง รองลงมาคือ สารข้นหนืดสีน้ำตาลเหลือง เมื่อนำสารข้นหนืดสีน้ำตาลแดงไปสกัดต่อด้วย chloroform และน้ำ ได้สารกึ่งบริสุทธิ์ alkaloids ซึ่งมีปริมาณมาก และเป็นสารสำคัญที่สามารถบ่งชี้เอกลักษณ์ของสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าได้ จากผลที่ได้ทำให้ทราบว่าสารจากเมล็ดน้อยหน่าที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก เป็นสารประเภทที่มีสภาพขั้วน้อยถึงขั้วปานกลาง จึงนำน้ำมันสีเหลือง และสารข้นหนืดสีน้ำตาลแดงไปทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมี และหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี

ผลการสกัดใบน้อยหน่าโดยการแช่ ใน hexane, methanol และ น้ำ ในอัตรา 5%w/v แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผัก พบว่าทำให้หนอนตาย 50.0%, 10.0% และ 14.0% ตามลำดับ จากผลทำให้ทราบว่าสารจากใบน้อยหน่าที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักสามารถละลายได้ใน hexane จึงสกัดใบน้อยหน่าด้วย hexane แล้วนำไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ได้น้ำมันสีเขียว 8.53%w/w จึงนำน้ำมันสีเขียว ไปทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมี และหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี

2. การวิเคราะห์เอกลักษณ์ทางโครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ด้วยเครื่องทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ของใบและเมล็ดน้อยหน่าเนื้อ น้อยหน่าหนัง น้อยหน่าเพชรปากช่อง และสารกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก

ได้สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High performance thin layer chromatography (HPTLC) เพื่อหาชนิดและตำแหน่ง Rf ของสารสำคัญ ดังนี้คือ ใช้แผ่น TLC ชนิด HPTLC plate silica gel 60F254 size 20x10cm ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) toluene/methanol/ethyl acetate/acetic acid (10/3/10/0.5) ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 215 nm ใช้เวลาในการ develop 10 นาที ตรวจสอบภายใต้แสง UV 254, UV 366 และ white light ก่อนและหลังใช้น้ำยาพ่น dragendroff 's reagent สำหรับทดสอบสารกลุ่ม alkaloids และน้ำยาพ่น anisaldehyde sulfuric acid สำหรับทดสอบสารกลุ่ม terpenoids

ผลการทดสอบสารกลุ่ม alkaloids ในใบ และเมล็ดน้อยหน่า และสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ พบว่าตำแหน่ง (Rf) ของสารกลุ่ม alkaloids ในสารสกัดใบและเมล็ดน้อยหน่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ของเมล็ดน้อยหน่าทั้ง 3 พันธุ์ พบพีคจาก HPTLC chromatogram เด่นที่ Rf 0.50 และ 0.81 และในใบน้อยหน่าทั้ง 3 พันธุ์ พบพีคเด่นที่ Rf 0.81 ผลจาก HPTLC fingerprint ไม่พบ alkaloids ในใบน้อยหน่า แต่พบ alkaloids หลายชนิดในเมล็ด ได้แก่ ที่ Rf 0.20, 0.38, 0.50 และ 0.59 เมื่อทดสอบสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก ได้แก่ สารข้นหนืดสีน้ำตาลแดง (จากเมล็ด) พบว่ามีสาร alkaloids ที่เด่นที่ Rf 0.50 ซึ่งเป็นสารบ่งชี้ที่พบเฉพาะในเมล็ดน้อยหน่า เมื่อตรวจวัด spectrum ที่ความยาวคลื่น 190-600 nm ของสารที่ตำแหน่ง Rf 0.50 ได้ spectrum ดังรูปที่ 2 จากการทดสอบด้วยน้ำยาพ่น dragendroff's reagent ปรากฏแถบสีส้มภายใต้แสงธรรมชาติ

ผลการทดสอบสารกลุ่ม terpenoids ในใบน้อยหน่า เมล็ดน้อยหน่า และสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ พบว่าตำแหน่ง (Rf) ของสารกลุ่ม terpenoids ในสารสกัดใบและเมล็ดน้อยหน่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ จาก HPLC fingerprint พบ terpenoids ทั้งในใบเมล็ดและเมล็ดน้อยหน่าหลายชนิด ได้แก่ ที่ Rf

0.28, 0.65 และ 0.81 โดยในใบน้อยหน่ามีเพิ่มเติมที่ Rf 0.60 เมื่อนำสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก ทำให้ทราบว่า น้ำมันสีเหลือง (จากเมล็ด) และ และ น้ำมันสีเขียว (จากใบ) มีสารกลุ่ม terpenoids เด่นที่ Rf 0.81 เมื่อตรวจวัด spectrum ที่ความยาวคลื่น 190-600 nm ของสารที่ตำแหน่ง Rf 0.81 ได้เป็น spectrum ดังรูปที่ 2 จากการทดสอบด้วยน้ำยาพ่น anisaldehyde sulfuric acid แล้วให้ความร้อน ปรากฏแถบสีม่วงภายใต้แสงธรรมชาติ ซึ่งได้ HPTLC fingerprint รูปที่ 3 และ HPTLC chromatogram รูปที่ 4 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ terpenoid ที่พบในเมล็ดและใบน้อยหน่า พบว่าเมล็ดน้อยหน่ามีปริมาณ terpenoids มากกว่าในใบ

ผลการเปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ที่พบในใบและเมล็ดน้อยหน่าพันธุ์ต่างๆ ทำให้ทราบว่าในใบและเมล็ดน้อยหน่าทั้ง 3 พันธุ์มีปริมาณ alkaloids และ terpenoids ใกล้เคียงกัน สามารถเลือกใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อพัฒนาเป็นสูตรผลิตภัณฑ์ต่อไป

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

จากการสกัดกลุ่มสารกึ่งบริสุทธิ์ จากใบและเมล็ดน้อยหน่า ด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ hexane, chloroform, methanol และน้ำ พบว่า ในเมล็ดน้อยหน่ามีสารออกฤทธิ์มากที่สุด 2 ส่วน คือ น้ำมันสีเหลือง และสารข้นหนืดสีน้ำตาลแดง ซึ่งให้ผลการตายของหนอนใยผัก 92.3 และ 94.8% ตามลำดับ ส่วนสารออกฤทธิ์มากที่สุดในใบน้อยหน่า คือน้ำมันสีเขียว เมื่อทดสอบชนิดของกลุ่มสารทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบต่างๆ พบว่า น้ำมันน้อยหน่า มีสารเด่นเป็นสารกลุ่ม terpenoids ส่วนสารข้นหนืดสีน้ำตาลแดง มีสารเด่นเป็นสารกลุ่ม alkaloids จึงตรวจหาตำแหน่งของสารสำคัญดังกล่าวด้วยวิธี HPTLC ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 215 nm โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) toluene/methanol/ethyl acetate/acetic acid (10/3/10/0.5) เวลาในการ develop 10 นาที แล้วใช้ น้ำยาพ่น anisaldehyde sulfuric acid และน้ำยาพ่น dragendroff ’s reagent พบสาร terpenoids ในน้ำมันจากทั้งใบและเมล็ดน้อยหน่า ที่ Rf 0.81 และ สาร alkaloids ในสารข้นหนืดสีน้ำตาลแดงจากเมล็ดน้อยหน่าที่ Rf 0.50 จึงทำการศึกษาและเปรียบเทียบเอกลักษณ์ทางโครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ของใบและเมล็ดน้อยหน่า 3 พันธุ์ ได้แก่ น้อยหน่าฝ้าย (เนื้อ) สีเขียว น้อยหน่าญวณ (หนัง) สีเขียว และน้อยหน่าเพชรปากช่อง พบว่าสามารถตรวจสารสำคัญที่ตำแหน่ง (Rf) ดังกล่าวได้ และให้ผลเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ของสารสำคัญไม่แตกต่างกัน ทำให้สามารถนำวิธีการดังกล่าวไปใช้ควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและพัฒนาผลิตภัณฑ์น้อยหน่าต่อไป

กิจกรรมย่อยที่ 1.3

วิจัยสูตรและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าเพื่อการป้องกันกำจัดศัตรูพืช

Formulation and Efficacy of *Annona squamosal* L. Product for Using as Insecticide

ผู้วิจัย

ภัควรินทร์ ศานติธีรโรจน์ Pukwarin Santiteerarod

พรรณีกา อัตตนนท์ Panneeka Attanon

ณัฐพร ฉันทศักดา Nattaporn Chanthasakda

บทคัดย่อ

การวิจัยสูตรและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าเพื่อการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เนื่องจากน้อยหน่าจัดเป็นพืชที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยแต่ละส่วนได้แก่ ใบ เปลือกผล เมล็ด เปลือกต้น และราก ให้สารที่มีฤทธิ์แตกต่างกัน ในที่นี้เป็นการทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผัก (*Plutella xylostella* L.)โดยการสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยเมทานอล ได้สารสกัดหยาบแล้วนำไปสกัดด้วยเฮกเซน เมทานอล ไดคลอโรมีเทน และน้ำ แยกเป็น 4 ส่วน ได้ crude1, crude2, crude3 และ crude4 เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนใยผักพบว่า crude2 มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก จึงได้นำ crude2 ไปศึกษาสภาวะ (condition) ที่เหมาะสมสำหรับเครื่อง HPTLC ในการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ, สกัดต่อเป็นสารกึ่งบริสุทธิ์และเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์เข้มข้นสูตรต่างๆ จากการศึกษาสภาวะ โดยใช้ HPTLC glass plate silica gel60 F_{254} ได้สารตัวพา EtOAc/MTBE/MeOH (93/5/2) ส่องภายใต้แสง UV 254, 366 nm และแสงธรรมชาติ แล้วสเปรย์ด้วยน้ำยา dragendorff's spray reagent พบว่าสามารถแยกอัลคาลอยด์ต่างๆ ออกจากกันได้ จึงใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่สกัดได้จาก crude2 โดยแยกได้เป็น 5 ส่วน คือ F1, F2, F3, F4 และ F5 พบอัลคาลอยด์ 8 ชนิด จากการทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก พบว่า F1และ F2 ให้เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักสูง ทำให้ทราบว่า อัลคาลอยด์2 (Rf 0.57) คือสารที่ออกฤทธิ์สูงสุด จึงใช้เป็นสารอ้างอิง ในการวัดปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ ซึ่งจากการวิจัยสูตรผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ พบว่า สูตรที่เหมาะสมในการทำผลิตภัณฑ์มี 2 สูตรคือ EC (emulsifiable concentrates) และ EW (emulsion in water) เมื่อทดสอบความคงสภาพหลังให้ความร้อนเป็นตัวเร่งที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส 14 วัน พบว่าผลิตภัณฑ์ยังคงสภาพไม่เปลี่ยนแปลงทั้ง 2 สูตร เมื่อทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผัก ของผลิตภัณฑ์สูตร EC ที่อัตรา 0.33%w/v และสูตร EW ที่อัตรา 2.67%w/v พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การตายหนอนหนอนใยผักเกิน 80% ไม่แตกต่างทางสถิติทั้งก่อนและหลังอบที่อัตราเดียวกัน สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย HPTLC และ HPLC ซึ่งให้ chromatogram ของ alkaloid2 คงที่เมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ ในช่วงเวลา 0-14 วัน ผลิตภัณฑ์เหล่านี้สามารถนำไปต่อยอดศึกษาประสิทธิภาพต่อแมลงศัตรูพืชชนิดอื่นๆได้ในอนาคต เพื่อเพิ่มมูลค่าและสนองนโยบายการลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช

คำสำคัญ : สารสกัดน้อยหน่า, สูตรผลิตภัณฑ์, หนอนใยผัก, ทีแอลซีสมรรถนะสูง, อัลคาลอยด์

Abstract

The development and efficacy of the formulate products of(*Annona squamosa* L.) extract for controlling insects were studies. Crude extracts form seeds, leaves, barks and roots of sugar apple have been extensively tasted for insecticidal activity. In this study the efectiveness of sugar apple extract was tested against *Plutella xylostella* L. Seeds of sugar apple were extracted with methanol and then the extract was separated into 4 fractions by hexane, methanol, dichloromethane and water and collected crude1, crude2, crude3 and crude4, respectively. The efficacy for killing *Plutella xylostella* L.was tested. It was found that crude2 had the highest efficiency against *Plutella xylostella* L.The extract was then subjected to qualitative chemical analysis, quantitative analysis and semi-purification using high performance thin layer chromatography (HTPLC) method. The optimum conditions were studied on HTPLC glass plate silica gel 60 F_{254}. EtoAc/MTBE/MeOH (93/5/2) was used as mobile phase. The developed plates were visualized under visible, UV254 and 366 nm light. As post derivatization the plates were sprayed with Dragendoff's reagent, the results showed that the crude extract2 can be identified. There were 5 bands observed including F1, F2, F3,F4 and F5 with 8 types of alkaloids. The insecticidal activity of 5 bands against *Plutella xylostella* L.were studied. The results indicated that F1 and F2 caused the highest mortality and alkaloid2 (Rf 0.57) was the active compound that was used as reference standard for quantitative study. *Annona squamosa* L. extract was formulated into 2 formulas including formulation EC (emulsifiable concentrates) and formulation EW (emulsion in water). The stability test of the formulations were also studied at 54 $^{\circ}$C for 14 days, the result indicated that the products still be stable. Two formulations were evaluated against *Plutella xylostella* L. treatment with formulaion EC at 0.33% w/v and formulation EW at 2.67 %w/v gave more than 88% mortality and the results of two formulations were not significantly different before and after oven. The result was absolutely related with HTPLC and HPLC analyzing. The chromatograms of alkaloid2 were still constant. The results from this study represent helpful information. Efficacy of the formulations against others insect pests should be further evaluated in order to assess their potential uses as natural insecticide.

Key words : *Annona squamosa* L. extract, formulation, HPTLC, alkaloids

บทนำ

ประเทศไทยมีพืชหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชและวัชพืช เช่น สะเดา หางไหล หรือ โล่ติ๊น หนอนตายหยาก สาบเสือ ซึ่งนักวิจัยสาขาเกษตร และสาขาอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องได้ทำการทดลองค้นคว้าหาสารทดแทนสารเคมีการเกษตร พบว่า สามารถนำเอาส่วนที่สำคัญต่างๆ เช่น ต้น ราก ใบ ดอก และผล มาสกัดเพื่อให้ได้สารสำคัญจากพืชนั้นๆ มาใช้ควบคุมศัตรูพืชแทนสารเคมีได้ดี โดยไม่มีพิษตกค้าง เนื่องจากสารธรรมชาติส่วนใหญ่จะสลายตัวได้เร็ว นอกจากนี้สารสกัดจากพืชยังมีสารที่เป็นองค์ประกอบอยู่มากมาย ซึ่งแมลงจะต้องใช้เวลานานมากในการสร้างความต้านทานต่อองค์ประกอบต่างๆในสารสกัดเหล่านั้น นอกจากพืชต่างๆเหล่านี้แล้ว ยังมีพืชและสมุนไพรอีกหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชและวัชพืชได้ เช่น น้อยหน่า (*Annona. Squamosa* L.) เป็นพืชผลไม้ในกลุ่ม custard apple family ในประเทศไทยเพาะปลูกน้อยหน่าสายพันธุ์ *Annoana squamosa* L. สารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยเอทานอลและเมทานอลมีฤทธิ์กำจัด ด้วง pulse (*Callosobruchus chinensis*) ได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Al-Lawati *et al.*, 2002) และสามารถกำจัดด้วง khapra (*Trogoderma granarium*) ได้ สารสกัดใบและเมล็ดน้อยหน่ายังสามารถควบคุมแมลงได้อีกหลายชนิด เช่น เพลี้ย หนอนฝ้าย ตั๊กแตน มด แมลงหวี่ จากรายงานสารเคมีในผลน้อยหน่าประกอบด้วย diterpenoid compound เช่น kaur-16-en-18-oic acid, α-pinene, sabinene และ limonene (Andrade *et al.*, 2001)

น้อยหน่า เป็นพืชที่มีแนวโน้มในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช จากการศึกษาค้นคว้าจากเอกสารงานวิจัยต่างๆ พบว่ามีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ควบคุมและกำจัดแมลงต่างๆได้ ข้อมูลส่วนใหญ่ของงานวิจัยน้อยหน่า จะเป็นการศึกษาทางด้านประสิทธิภาพและสารสำคัญ มีส่วนน้อยที่ทำการศึกษาและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป จึงได้นำมาทำการวิจัยและพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อทดแทนหรือลดการใช้สารเคมี นอกจากนี้ยังให้ความสำคัญในการศึกษาเอกลักษณ์ทางโครมาโทกราฟีของสารสำคัญในพืชต่างๆ เพื่อการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ

การนำพืชมาใช้เป็นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเข้าใจถึงคุณภาพทางเคมีของส่วนต่างๆของพืช เช่น ต้องทราบว่าสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในพืชนั้นเป็นประเภทใด และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างไร จึงจำเป็นต้องศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสม ซึ่งขึ้นอยู่กับพืชและประเภทของสารออกฤทธิ์ในพืชนั้นๆ และใช้สารเหล่านี้เป็นตัวบ่งชี้ในการวิเคราะห์คุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ทำจากพืชชนิดนั้น ๆ การศึกษาสารสำคัญในพืช และการทดสอบประสิทธิภาพสารสำคัญจากพืชเพื่อใช้ในการควบคุมศัตรูพืชเป็นสิ่งสำคัญในการเป็นแนวทางการวิจัยสูตรและผลิตภัณฑ์สารสกัดจากพืชสำเร็จรูปพร้อมใช้ที่มีคุณภาพ

น้อยหน่า ชื่อวิทยาศาสตร์ *Annona squamosa* Linn. มีชื่อสามัญ Sugar Apple, Sweetsop, Custard Apple องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดมีสาร anonaine alkaloid, isocorydine สารกลุ่ม acetogenin ชื่อ annonacin A จำแนกตามลักษณะเป็น 2 ชนิด ได้แก่ น้อยหน่าพื้นเมืองหรือน้อยหน่าฝ้าย แบ่งออกได้เป็น 2 สายพันธุ์ ตามลักษณะของสีผลคือ น้อยหน่าฝ้ายเขียวซึ่งมีผลสีเขียว กับน้อยหน่าฝ้ายครั่งมีผลสีม่วงเข้ม และน้อยหน่าหนังหรือน้อยหน่าญวน แบ่งได้ 3 สายพันธุ์ คือ น้อยหน่าหนังเขียวมีผลสีเขียว น้อยหน่าหนังทอง และน้อยหน่าหนังครั่ง นอกจากนี้ยังมี น้อยหน่าพันธุ์ลูกผสม 2 สายพันธุ์ คือ พันธุ์เพชรปากช่องและพันธุ์เนื้อทอง

สารสกัดเมทานอลจากใบน้อยหน่ามีความเป็นพิษต่อเพลี้ยอ่อนถั่ว โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 2,089.30μg/mL (สุดารัตน์และคณะ, 2554) จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อเพลี้ยอ่อน

พบว่า สารสกัดจากน้อยหน่า ออกฤทธิ์ดีที่สุดต่อเพลี้ยอ่อน จากรายงานวิจัยพบว่าสารสำคัญในใบน้อยหน่าเป็นสารแอลคาลอยด์(alkaloids) แอนโนเนอีน (anonaine) และเรซิน (resin) ในเมล็ดมีน้ำมันอยู่ประมาณ 45% น้ำมันเป็นพิษกับด้วงปีกแข็ง เพลี้ยอ่อน แมลงวัน และมวนปีกแข็ง (สมสุข, 2546) กรกช (2554) ได้ศึกษาฤทธิ์ต่อการสัมผัสโดยตรง (direct contact) ต่อหนอนแมลงวันทองโดยการจุ่มหนอน (dipping) ลงในสารผสมระหว่างใบน้อยหน่าและใบแมงลักคา มีค่า LC_{50} 652.80 ± 13.15 ppm และ 683.25 ± 38.08 ppm ตามลำดับ และสารสกัดใบน้อยหน่าด้วยเอทานอลน่าจะเป็นสารเพิ่มฤทธิ์แบบ additive effect ให้แก่สารสกัดใบสะเดาด้วยเอทานอล และฤทธิ์ของสารสกัดต่อการกินของแมลงวันทองตัวเต็มวัย พบว่าสารสกัดใบน้อยหน่าด้วยน้ำมีประสิทธิภาพทำให้แมลงตายได้ ปานกลาง LC_{50} 1,710.91 ± 67.07 ppm ฤทธิ์สารสกัดผสมควบคุมแมลงได้ปานกลางเช่นกัน สารสกัดใบสะเดาผสมใบน้อยหน่าด้วยเอทานอลกำจัดแมลงได้สูงสุด LC_{50} 1,605.87 ± 67.93 ppm จากการศึกษาของ Khalequzzaman andSultana (2006) ทดสอบสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยตัวทำละลายต่างๆกับตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของมอดแป้ง (Red flour beetle) 4 สายพันธุ์ คือ Raj, CR 1, FSS II และ CTC-12 พบว่า สารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยเมทานอลมีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนมอดแป้งสายพันธุ์ FSS II น้อยที่สุด และสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยปิโตรเลียมสปิริท มีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนมอดแป้งสายพันธุ์ Raj สูงที่สุด สำหรับตัวเต็มวัยของมอดแป้ง สารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยปิโตรเลียมสปิริทมีความเป็นพิษกับสายพันธุ์ CTC-12 สูงที่สุด และสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยอะซิโตนมีความเป็นพิษกับสายพันธุ์ CR 1 น้อยที่สุด สารสกัดหยาบของน้อยหน่าสามารถควบคุมตัวอ่อนผีเสื้อ (Leatemia and Isman, 2004) ควบคุมแมลงวันผลไม้ ชนิด Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) ในระยะฟักไข่ รบกวนการวางไข่และยืดเวลาพัฒนาการของตัวอ่อน (Epino and Chang, 1993) ควบคุมตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของมอดแป้งสีแดง *Tribolium castaneum* Herbst (Khalequzzaman and Sultana, 2006)

ทีแอลซีสมรรถนะสูง (High Performance Thin Layer Chromatography : HPTLC) คือวิธีการแยกสารบนแผ่นที่เคลือบด้วยตัวดูดซับ เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมสูงในห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพสมุนไพร ที่สามารถแยกสารได้ดีกว่าวิธีทีแอลซี (Thin Layer Chromatography: TLC) เดิม มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรและการตรวจเอกลักษณ์ของวัตถุดิบสมุนไพร เนื่องจากเป็นวิธีทดสอบเชิงปริมาณที่สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิดในเวลาเดียวกันจึงประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายและเมื่อนำไปผนวกกับเครื่องวัดความหนาแน่น (Densitometer) ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับสารเพิ่มขึ้นช่วยในการพิสูจน์เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (Fingerprint) และวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ ซึ่งมีเทคนิคต่างๆ ช่วยในการตรวจสารที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเอชพีแอลซี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) ทำให้สามารถควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพรในทัศนะระดับชาติและระดับสากล อีกทั้งมีความถูกต้อง (accuracy) มีความแม่นยำ (precision) มีสภาพไว (sensitivity) และมีความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำ (Reproducibility)

มีงานวิจัยเกี่ยวกับการสร้างเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีในพืชสมุนไพรหลายชนิด ด้วยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง จากการศึกษารากยาสูบ ลักษณะภายนอก และคุณสมบัติทางพฤกษเคมี การวิเคราะห์ทางพฤกษเคมี และเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีโดยทีแอลซีสมรรถนะสูง ผลทางพฤกษวิทยาพบสารฟลาโวนอยด์ ไฟโตสเตอรอล ไตรเทอร์ปินอยด์ และแทนนิน โดยการสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) เมื่อตรวจค่า Rf ที่ 400nm พบว่าเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี โดยเครื่อง HPTLC-densitometer สามารถใช้บ่งชี้ข้อมูลในการพิจารณารับรองสารสกัดหยาบได้ (Suni*et al.*,

2011) การสร้างเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสาหร่ายสีน้ำตาล (*Lobophora variegate*) โดยวิธีทีแอลซีสมรรถนะสูง สกัดด้วยสารละลายเมทานอลิค (methanolic) พบ 9 พีค ให้ค่า Rf อยู่ในช่วง 0.18-0.86 ซึ่งสรุปได้ว่าการวิเคราะห์เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี ด้วยทีแอลซีสมรรถนะสูงของสารสกัดเมทานอลิคสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาหร่าย และเป็นประโยชน์ในการบ่งชี้ทางพฤกษเคมีของสายพันธุ์ต่างๆ ได้ (Thennarasan *et al.*,2014) นอกจากนี้ Manikandan and Doss (2010) ศึกษาส่วนประกอบทางชีวเคมี คุณค่าทางโภชนาการ ตรวจวัดขนาดโมเลกุลของโปรตีนและตรวจทางพฤกษเคมีโดยวิธีทีแอลซีสมรรถนะสูง และสารสกัดใบต้อยติ่ง และจ๊าหอมด้วย 50% เมทานอลิคพบสารฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ ฟีนอล ซาโปนิน และธาตุอาหารปริมาณเล็กน้อย ได้แก่ ฟีโนลิค คาโรทีนอยด์ จากการศึกษาทีแอลซีสมรรถนะสูงของพืชสมุนไพรกาง (*Albizia lebbeck*) ตามวิธี Harborneและ Wagner *et al*.โดยใช้เอทิลอะซิเตต : เมทานอล : น้ำ (100:13.5:10) เป็น mobile phase และ สเปรย์ด้วย Dragendorff's reagent ตามด้วย 10%Sodium nitrile reagent และอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ส่องภายใต้แสง uv 366 nm และ แสงธรรมชาติ พบ อัลคาลอยด์ สเตียรอยด์ เทอร์ปินอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน และ ไกลโคไซด์ สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ พบอัลคาลอยด์ 10 ชนิดที่ค่า Rf ระหว่าง 0.02-0.85 สารสกัดเอทิลอะซิเตต พบอัลคาลอยด์ที่แตกต่างกัน 5 ชนิดที่ค่า Rf ระหว่าง 0.09-0.84 และสารสกัดเมทานอลิคพบอัลคาลอยด์ที่ต่างกัน 4 ชนิดที่ค่า Rf ระหว่าง 0.02-0.79 (Nazneen *et al.*,2012) และ (Sachin *et al.*, 2009) วิเคราะห์สาร quercetin ในบัวเผื่อน (*Nymphaea stellata* willd) โดยสกัดบัวเผื่อนด้วยกรดไฮโดรคลอริค(hydrochloric) และใช้ mobile phase คือ โทลูอีน(toluene) : เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) : กรดฟอร์มิค(formic acid) (5:4:0.2 v/v/v) แล้วตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง densitometer ที่ 380 nm ใช้หลอดดิวเทอเรี่ยม สามารถแยกสาร quercetin ออกจากส่วนประกอบอื่นๆ ในสารสกัดได้ดี ให้ค่าเฉลี่ยของ %recovery เป็น 99.33% ซึ่งการใช้วิธีทีแอลซีสมรรถนะสูง และสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณของ quercetin ได้ และเป็นวิธีที่ถูกต้องและรวดเร็ว จากการตรวจสอบทางพฤกษเคมีของว่านหางจระเข้ (*A. vera*) เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการทำมาตรฐาน โดยการวิเคราะห์ทางพฤกษเคมี การทดสอบการละลายโลหะหนัก ศึกษาการต้านจุลชีพ และหาปริมาณของ gallic acid และ berberine โดยวิธีทีแอลซีสมรรถนะสูง ผลที่ได้คือ การทดสอบทางพฤกษเคมีเผยให้เห็นถึง อัลคาลอยด์ คาร์โบไฮเดรต แทนนิน สเตียรอยด์ ไตรเทอปินอยด์ และ ไกลโคลไซด์ โดยพบฟลาโวนอยด์และฟีนอล 1.9% และ 13.11% ตามลำดับ พบ berberine และ gallic acid 2.74% และ 0.543% ตามลำดับ (Patel *et al.*, 2012)

ผลการวิจัย (Results) และอภิปรายผล (Discussion)

1. การเก็บตัวอย่างเมล็ดน้อยหน่า และเตรียมเป็นสารสกัดน้อยหน่า

เตรียมตัวอย่างเมล็ดน้อยหน่าบด (รูปที่ 1)

รูปที่ 1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเมล็ดน้อยหน่าบด

สกัดสารสกัดหยาบจากเมล็ดน้อยหน่าด้วยเมทานอล แล้วนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (รูปที่ 2) แล้วนำ crude ที่ได้ ไปแยกเป็น 4 ส่วนตามสภาพขั้วน้อยไปมาก (เฮกเซน เมทานอล ไดคลอโรมีเทน และน้ำ) ได้ crude1, crude2, crude3 และ crude4 นำไปทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก ได้เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ย 27.5, 90.0, 0.0, 0.0% ตามลำดับทำให้ทราบว่าสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักอยู่ใน crude2 จึงนำ crude2 ไปศึกษาสภาวะ(condition) ที่เหมาะสมสำหรับเครื่อง HPTLC ในการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ, สกัดต่อเป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ และเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์เข้มข้นสูตรต่างๆ

รูปที่ 2 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบจากเมล็ดน้อยหน่า

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในสารสกัดและสูตรผลิตภัณฑ์น้อยหน่า

การศึกษาสภาวะ (condition) ที่เหมาะสม (ทดสอบตัวอย่าง crude2) ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ด้วยแผ่น TLC aluminium sheets silica gel60 F_{254} ส่องภายใต้แสง UV366 nm และสเปรย์ด้วยน้ำยา dragendorff s spray reagent แล้วส่องภายใต้แสงธรรมชาติ เพื่อทดสอบการแยกของ alkaloids ชนิดต่างๆ

- การหาสภาวะสารตัวพา (mobile phase) ด้วยตัวทำละลาย 1 ชนิด ได้แก่ diethyl ether, petroleum ether, tert-butyl methyl ether, methanol, ethanol, butanol, propanol,

propane1,2diol, emyl alcohol, tetrahydrofuran, formaldehyde, acetic acid, dichloromethane, ethyl acetate, dioxane acetone, acetonitrile, benzene, toluene, xylene, chloroform, hexane, water ตามลำดับ พบว่าไม่สามารถแยก alkaloids แต่ละตัวออกจากกันได้

- การหาสภาวะสารตัวพา(mobile phase) ด้วยตัวทำละลายผสม 2 ชนิด ได้แก่ EtOAc/MeOH(9/1), EtOAc/MeOH(8/2), EtOAc/Hexane(1/1), EtOAc/MeOH/AcOH(7/2/1), EtOAc/AcOH(5/5), EtOAc/MTBE(5/5), EtOAc/propanol(8/2), MeOH/$CHCl_3$(5/5), (MeOH /ACN(5/5) ตามลำดับ พบว่าไม่สามารถแยกได้ดีเท่าที่ควร

- การหาสภาวะสารตัวพา (mobile phase) ด้วย ตัวทำละลายผสม 3-4 ชนิด (ทดสอบตัวอย่าง crude1-4) ได้แก่

(1) toluene/ MeOH/ EtOAc/AcOH (20/12/20/1)

(2) toluene/ MeOH/ EtOAc/AcOH (20/12/20/1)

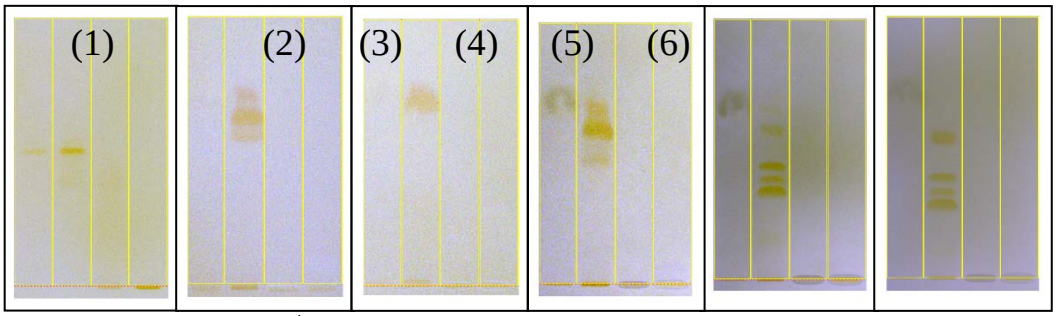
(3) EtOAc/ MeOH/ $CHCl_3$ (5/4/1)

(4) EtOAc/ MeOH/ $CHCl_3$ (7/1.5/1.5)

(5) EtOAc/ MTBE/ MeOH (93/5/2)

(6) EtOAc/ MTBE/ AcOH (95/4/1)

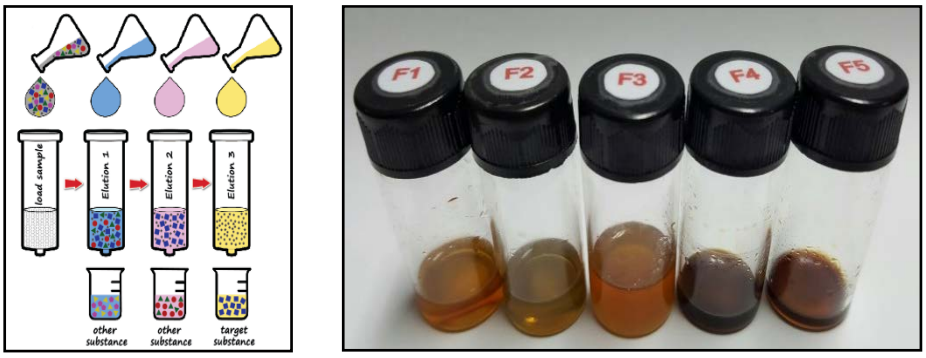
พบว่าการใช้ EtOAc/MTBE/MeOH (93/5/2) สามารถแยก alkaloids ต่างๆ ออกจากกันได้ดีกว่า จึงเลือกใช้เป็นสารตัวพาสำหรับทดสอบสารกึ่งบริสุทธ์ที่สกัดได้ต่อไป (รูปที่ 3)



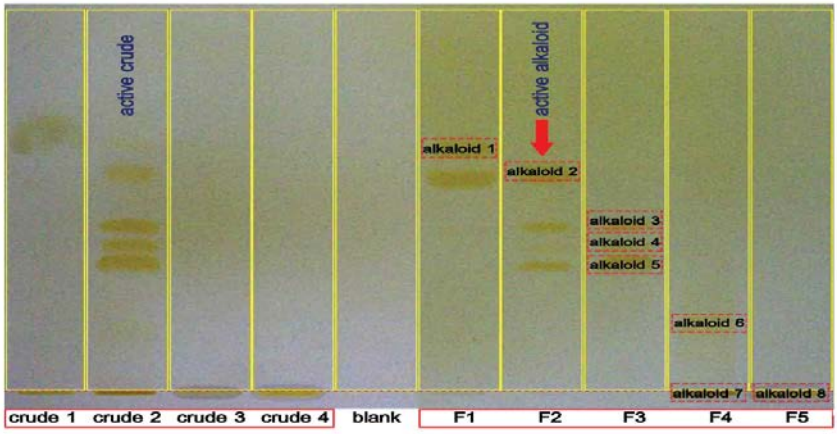
รูปที่ 3 การหาสภาวะสารตัวพา ด้วยตัวทำละลาย 3-4 ชนิด

3. การสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์เพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก

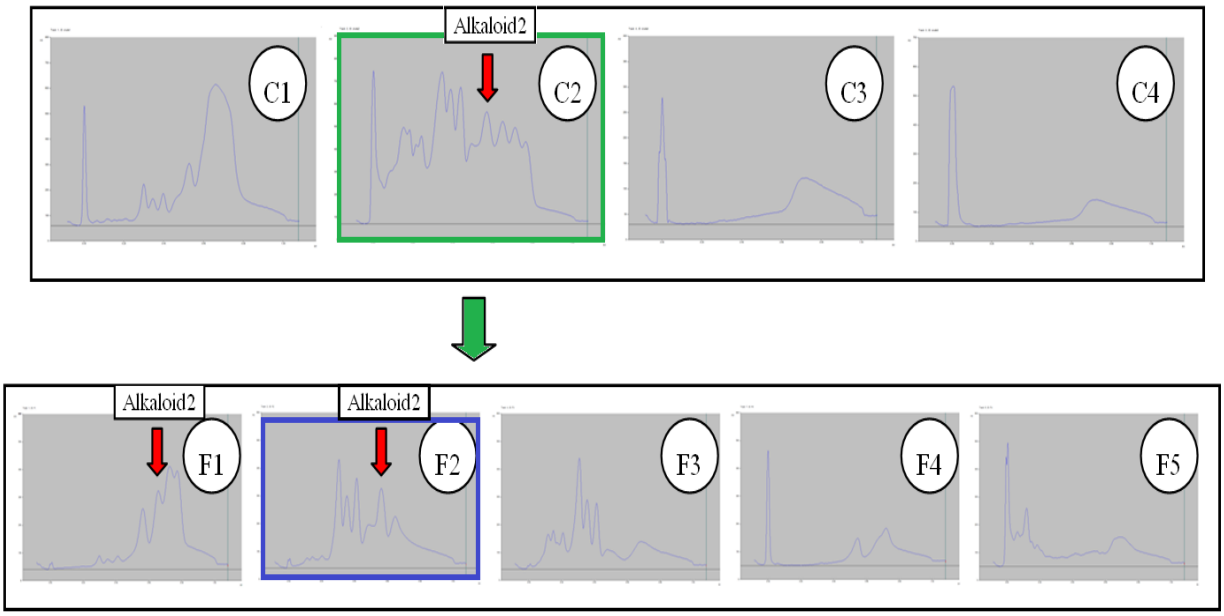
นำcrude2 ซึ่งมีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุด มาสกัดต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารกึ่งบริสุทธิ์ F1, F2, F3, F4 และ F5 (รูปที่ 4) แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก ได้เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ย 67, 97, 30, 30 และ13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทำให้ทราบว่า F2 มี alkaloid ชนิดที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุด คือ alkaloid2 (รูปที่ 5-6) และจาก spectrum ทำให้ทราบว่าความยาวคลื่นสูงสุด (λmax) ที่ใช้วัด alkaloid2 คือ 215 nm (รูปที่ 7)



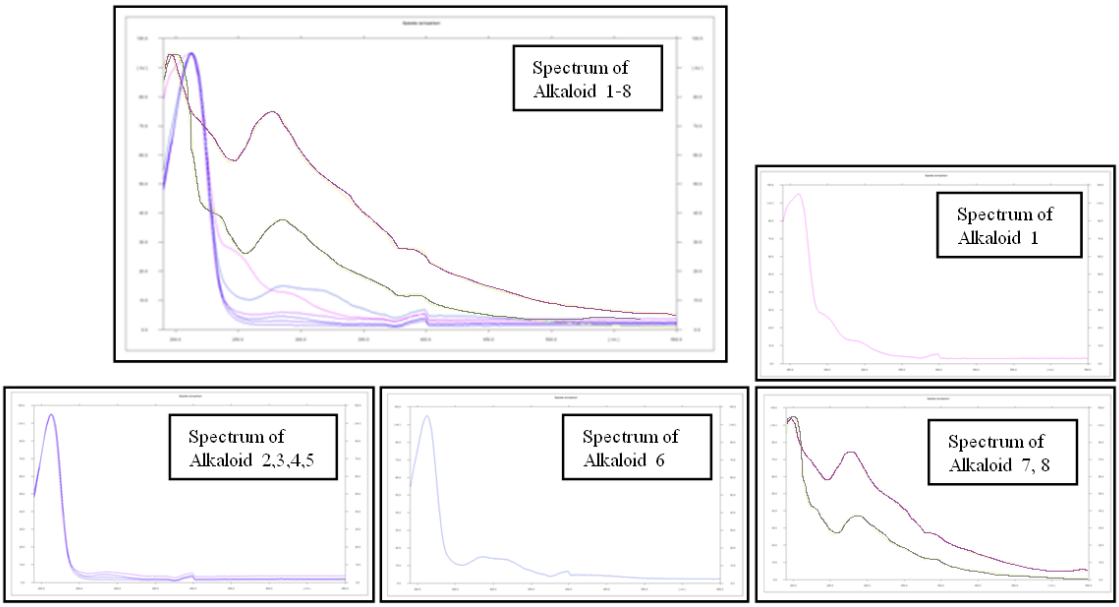
รูปที่ 4 การใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีเพื่อแยกสารกึ่งบริสุทธิ์



รูปที่ 5 Fingerprintของ crude 1-4 และ F1-5



รูปที่ 6 HPTLC chromatogram ของ crude 1-4 และ F1-5



รูปที่ 7 Spectrum ของสารalkaloids ต่างๆ ที่พบใน crude2

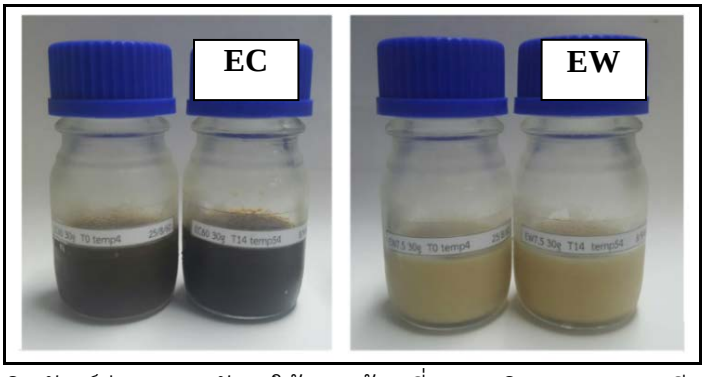
4. การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์จากสารสกัดน้อยหน่า

เตรียมเป็นผลิตภัณฑ์เข้มข้นสูตรต่างๆ โดยนำ crude2 มาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สูตร EC (emulsifiable concentrates) และ EW (emulsion in water) โดยผสมตัวทำละลาย สารอิมัลซิไฟเออร์ สารลดแรงตึงผิว และสารเติมแต่งในอัตราส่วนต่างๆ และทดสอบการคงสภาพเบื้องต้น จนได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมในสูตรEC และ EW อย่างละ 1 สูตร (รูปที่ 8)เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผัก

รูปที่ 8 ผลิตภัณฑ์จากสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าสูตร EWและ EC

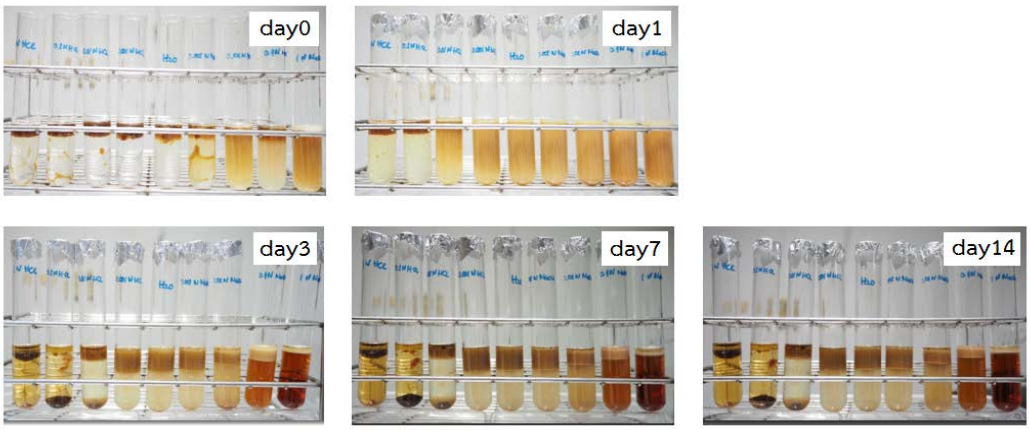
5. การทดสอบการคงสภาพ (stability) ของสูตรผลิตภัณฑ์สารสกัดเมล็ดน้อยหน่า

- การคงสภาพของผลิตภัณฑ์ก่อนและหลังใช้ความร้อนเป็นตัวเร่ง โดยอบที่อุณหภูมิ 54องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน พบว่าลักษณะทางกายภาพไม่เปลี่ยนแปลงทั้ง สูตร EW และสูตร EC (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 ผลิตภัณฑ์ก่อนและหลังอบให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส 14 วัน

- การคงสภาพของสารสกัดน้อยหน่าcrude2 เมื่อละลายในตัวทำละลายที่มีสภาพกรด-ด่าง ได้แก่ 1N HCl, 0.1N HCl, 0.01N HCl, 0.001N HCl, H2O, 0.001N NaOH, 0.01N NaOH, 0.1N NaOHและ 1N NaOHเรียงจากซ้ายไปขวาตามลำดับ (รูปที่ 10) สังเกตการเปลี่ยนแปลงในระยะเวลา 0, 1, 3, 7 และ 14 วันโดยชั่งสารสกัดน้อยหน่า 1กรัม ละลายด้วยตัวสารละลายกรด-ด่าง 4 มิลลิลิตร พบว่า ในสภาวะด่าง crude2 ละลายในตัวทำละลายได้ดีและคงสภาพมากกว่าในสภาวะกรด

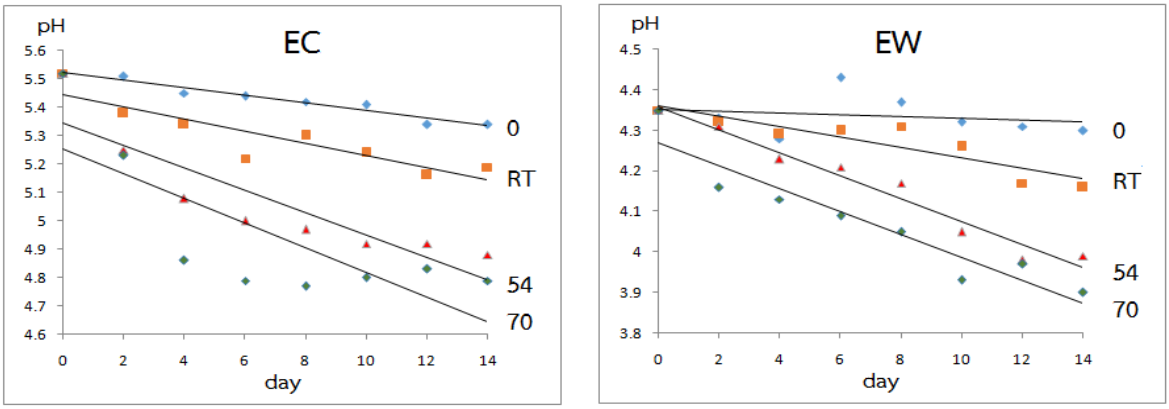


รูปที่ 10 สารสกัด Crude2 ในตัวทำละลายกรด-ด่างที่เวลาต่างๆ

- การคงสภาพของลักษณะทางกายภาพของใบคะน้า (phytotoxicity) หลังฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์สูตร EC และ สูตร EW หลังฉีดพ่น 3 วัน พบว่าใบคะน้ามีสภาพปกติ (รูปที่ 11)

รูปที่ 11 ใบคะน้า ก่อนและหลังฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์สูตร EC และ EW

■ การคงตัวของpH ของสารสกัดน้อยหน่าสูตร EC และ EW โดยแบ่งใส่ภาชนะขนาดเล็กแล้วแยกเก็บ ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 0องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง(RT), 45องศาเซลเซียสและ 70องศาเซลเซียส โดยวิเคราะห์ทุก 2 วัน จนครบ 14 วันจากการวัดค่า pH พบว่า ทั้งสูตร EC และ EW มีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น และมีอัตราการลดมากขึ้นเมื่อเก็บที่อุณหภูมิสูงขึ้น (รูปที่ 12)



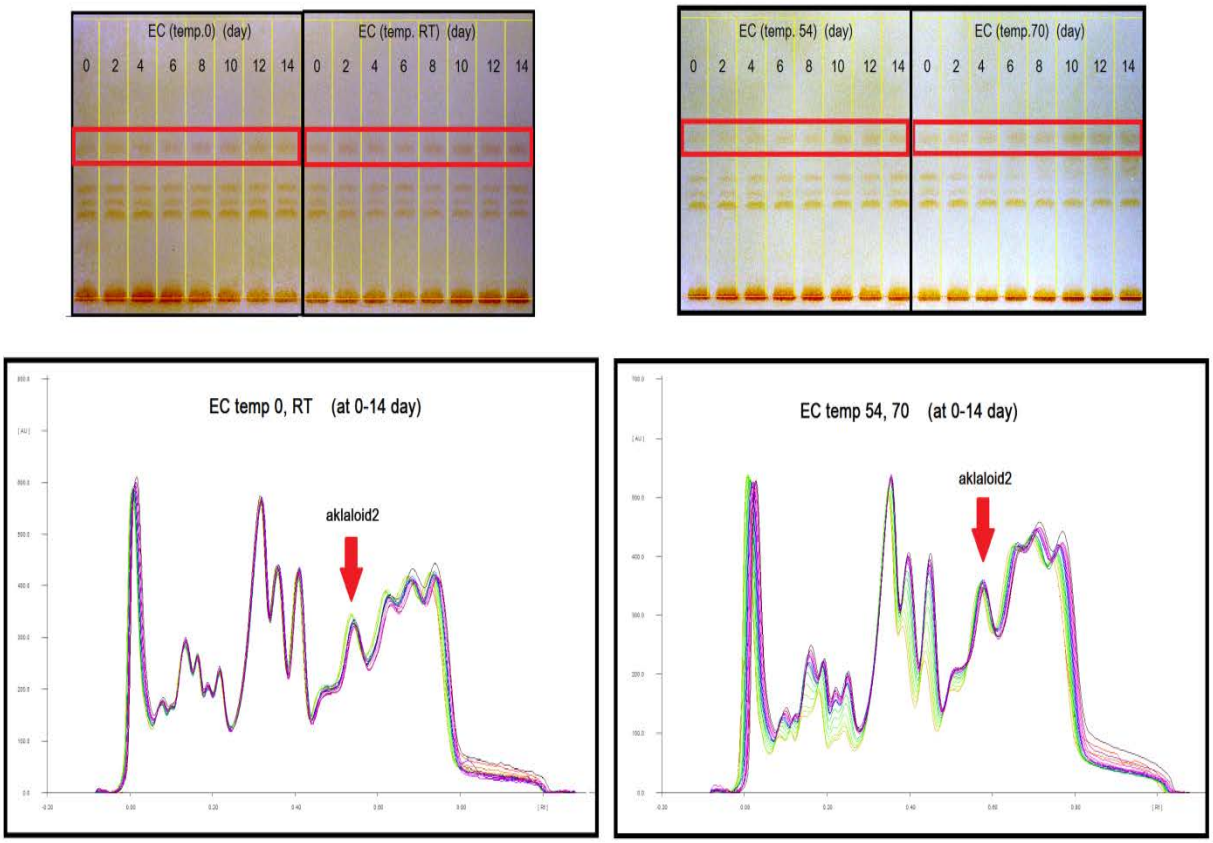
รูปที่ 12 แนวโน้มของค่า pH เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์สูตร EC และ EW ที่อุณหภูมิต่างๆ

EC				
day	0	RT	54	70
0	5.52	5.52	5.52	5.52
2	5.51	5.38	5.25	5.23
4	5.45	5.34	5.08	4.86
6	5.44	5.22	5.00	4.79
8	5.42	5.30	4.97	4.77
10	5.41	5.24	4.92	4.80
12	5.34	5.16	4.92	4.83
14	5.34	5.19	4.88	4.79

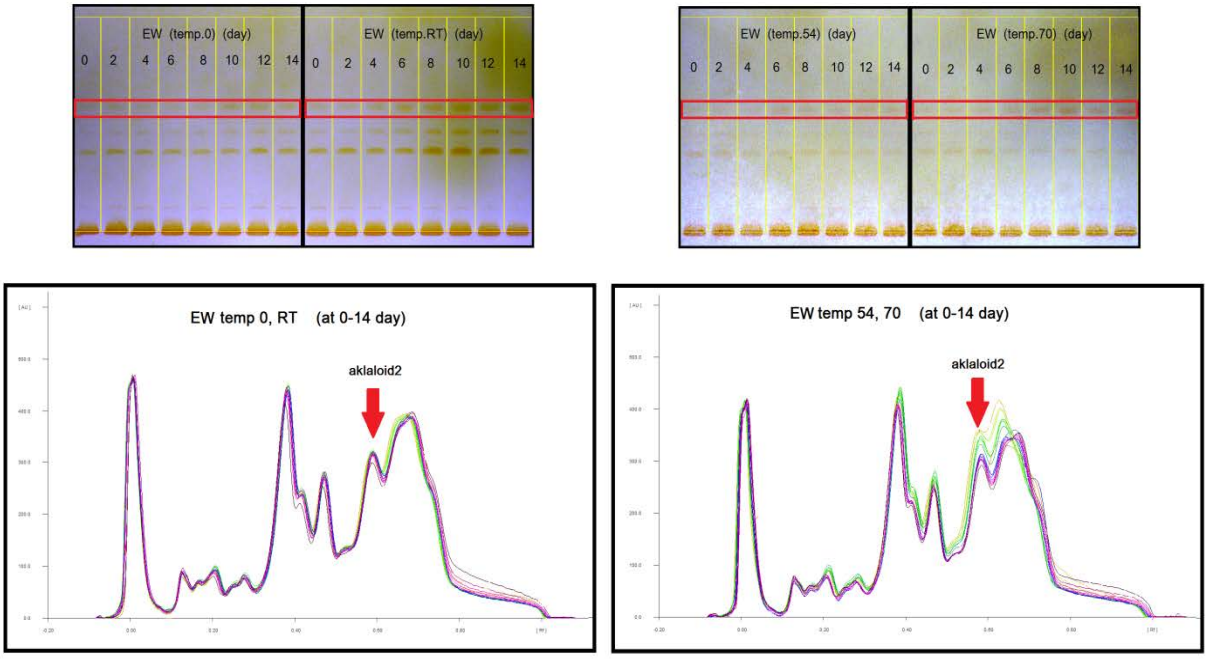
EW				
day	0	RT	54	70
0	4.35	4.35	4.35	4.35
2	4.33	4.32	4.31	4.16
4	4.28	4.29	4.23	4.13
6	4.43	4.30	4.21	4.09
8	4.37	4.31	4.17	4.05
10	4.32	4.26	4.05	3.93
12	4.31	4.17	3.98	3.97
14	4.30	4.16	3.99	3.90

ตารางที่ 1 ค่า pH จากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์สูตร EC และ EW ที่อุณหภูมิต่างๆ

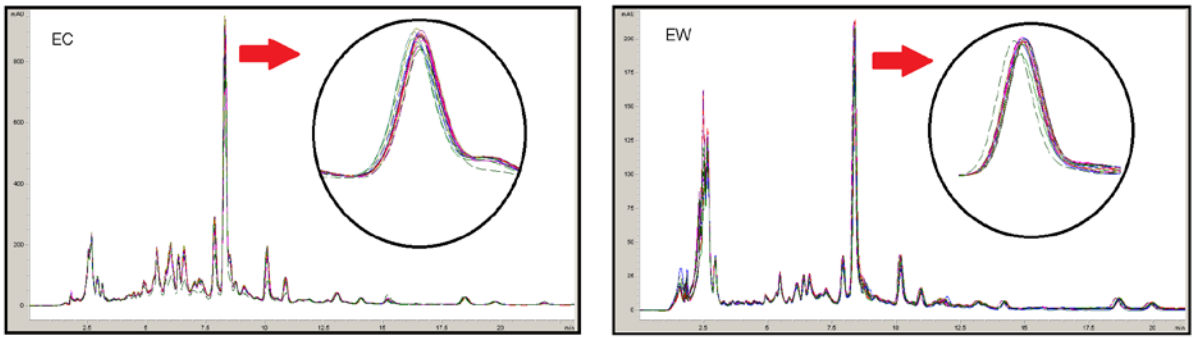
■ การคงตัวของสารออกฤทธิ์ในสารสกัดน้อยหน่าสูตร EC และ EW โดยแบ่งใส่ภาชนะขนาดเล็กแล้วแยกเก็บ ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 0องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง(RT),45องศาเซลเซียส และ 70องศาเซลเซียส โดยวิเคราะห์ทุก 2 วัน จนครบ 14 วันจากการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ alkaloid2ในผลิตภัณฑ์น้อยหน่าสูตร EC และ EW ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0, RT, 54 และ 70 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องHPTLC ในระยะเวลา 0, 2, 6, 8, 10, 12 และ 14 วัน ผลการเปรียบเทียบ HPTLC chromatogramและ HPTLC fingerprint ไม่พบความแตกต่างหรือลดลงของ alkaloid2 ในทั้ง 2สูตรผลิตภัณฑ์ (รูปที่ 13-14) จึงนำตัวอย่างดังกล่าว ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องHPLC ซึ่งมีความละเอียดในการแยกที่ดีกว่า โดยใช้ column ODS3, สารตัวพา water/methanol/acetonitrile(15/50/35)ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 215nm ผลการเปรียบเทียบ HPLC chromatogram (รูปที่ 15) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสารสำคัญเพียงเล็กน้อยเท่านั้น



รูปที่ 13 HPTLC fingerprintและ HPTLC chromatogramของผลิตภัณฑ์สูตร EC
เก็บที่อุณหภูมิ 0, RT, 54 และ 70 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 0, 2, 6, 8, 10, 12 และ 14 วัน



รูปที่ 14 HPTLC fingerprintและ HPTLC chromatogram ของผลิตภัณฑ์สูตร EW
เก็บที่อุณหภูมิ 0, RT, 54 และ 70 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 0, 2, 6, 8, 10, 12 และ 14 วัน



รูปที่ 15 HPLC chromatogram ของผลิตภัณฑ์สูตร EC และ EW
เก็บที่อุณหภูมิ 0, RT, 54 และ 70 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 0, 2, 6, 8, 10, 12 และ 14 วัน

- การคงตัวของคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ก่อนอบและหลังอบอุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส 14 วัน ผลการสดสอบความเป็นกรด-ด่าง พบว่าก่อนและหลังอบมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย และ ผลิตภัณฑ์หลังอบทั้ง 2 สูตร มีค่า pH ลดลง ค่าต่างๆ แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ EC, EW ก่อนและหลังอบ

สูตร EW	ก่อนอบ	หลังอบ	วิธีทดสอบ
กรด-ด่าง	as H_2SO_4 0.008%	as H_2SO_4 0.010%	MT191 CIPAC L
การไหลเท	3.44%	-	MT148.1 CIPAC J
pH	4.38	3.91	MT75.3 CIPAC J
ฟอง	1min=4ml, 12min=0ml	-	MT47.1 CIPAC O

สูตร EC	ก่อนอบ	หลังอบ	วิธีทดสอบ
กรด-ด่าง	as H_2SO_4 0.008%	as H_2SO_4 0.009%	MT191 CIPAC L
ปริมาณน้ำ	2.356	2.156	MT30.5 CIPAC J
pH	5.10	4.88	MT75.3 CIPAC J
ฟอง	1min=4ml, 12min=4ml	-	MT47.1 CIPAC O

6. การทดสอบประสิทธิภาพ (efficacy) เบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สารสกัดเมล็ดน้อยหน่าสูตร EC และสูตร EW

ผลการทดสอบผลิตภัณฑ์สูตร EC ต่อหนอนใยผักวัย2-3 โดยวิธี Leaf dipping method วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ โดยมี 6 ระดับความเข้มข้นเป็นกรรมวิธีที่อัตรา 0.00, 0.33, 0.50, 0.67, 0.83 และ 1.00%w/v พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผัก 17, 93, 100, 93, 100 และ 97% ตามลำดับ จากผลที่ไม่แตกต่างกันทุกความเข้มข้น จึงลดความเข้มข้นลง ที่อัตรา 0.00, 0.02, 0.08, 0.17, 0.25 และ 0.33%w/vพบว่าให้เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผัก 12.5, 40.0, 50.0, 60.0, 62.5 และ 85.0% ตามลำดับจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า การใช้อัตรา 0.17, 0.25 และ 0.33% ให้ผลการตายของหนอนใยผักไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตาราง 3, รูปที่ 16)

ผลการทดสอบผลิตภัณฑ์สูตร EW ต่อหนอนใยผักวัย2-3 โดยวิธี Leaf dipping method วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ โดยมี 6 ระดับความเข้มข้นเป็นกรรมวิธีที่อัตรา 0.00, 2.67, 4.00, 5.33, 6.67และ 8.00%w/vให้ %การตายของหนอนใยผัก 33, 90, 70, 100, 97 และ 93% ตามลำดับ จากผลที่ไม่แตกต่างกันทุกความเข้มข้น จึงลดความเข้มข้นลง ที่อัตรา 0.00, 0.13, 0.67, 1.33, 2.00 และ 2.67%w/vพบว่าให้%การตายของหนอนใยผัก 12.5, 22.5, 32.5, 55.0, 72.5 และ 77.5% ตามลำดับจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า การใช้อัตรา 2.00 และ 2.67 % ให้ผลการตายของหนอนใยผักไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%(ตาราง 3, รูปที่ 16)

รูปที่ 16 หนอนใยผักที่ตายหลังได้รับผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่า

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักวัย2 ในการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์น้อยหน่า สูตร EC และ สูตร EW

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักวัย2 (%corrected mortality)
1. EC formulation 0.00%w/v (additive)	12.5 f
2. EC formulation 0.02%w/v	40.0 c-f
3. EC formulation 0.08%w/v	50.0 b-e
4. EC formulation 0.17%w/v	60.0 a-d
5. EC formulation 0.25%w/v	62.5 abc
6. EC formulation 0.33%w/v	85.0 a
7. EW formulation 0.00%w/v (additive)	12.5 f
8. EW formulation 0.13%w/v	22.5 ef
9. EW formulation 0.67%w/v	32.5 def
10. EW formulation 1.33%w/v	55.0 bcd
11. EW formulation 2.00%w/v	72.5 ab
12. EW formulation 2.67%w/v	77.5ab
13. น้ำ (กรรมวิธีควบคุม)	-
CV(%)	**37.80**

หมายเหตุ ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

7. การทดสอบประสิทธิภาพ (efficacy) ของผลิตภัณฑ์สารสกัดเมล็ดน้อยหน่าสูตร EC และ EW ก่อน-หลังให้ความร้อนเป็นตัวเร่งที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

ผลการทดสอบผลิตภัณฑ์สูตร EC ต่อหนอนใยผักวัย2-3 โดยวิธี Leaf dipping method วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ โดยมี 6 ระดับความเข้มข้นเป็นกรรมวิธีที่อัตรา 0.00, 0.02, 0.08, 0.17, 0.25 และ 0.33%w/v ผลิตภัณฑ์ก่อนอบให้%การตายของหนอนใยผัก 3, 8, 40, 53, 65 และ88% ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์หลังอบให้%การตายของหนอนใยผัก 3, 13, 30, 70, 60และ85% ตามลำดับจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าที่อัตราเดียวกัน ทั้งก่อนและหลังอบให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4)

ผลการทดสอบผลิตภัณฑ์สูตร EW ต่อหนอนใยผักวัย2-3 โดยวิธี Leaf dipping method วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ โดยมี 6 ระดับความเข้มข้นเป็นกรรมวิธีที่อัตรา 0.00, 0.13, 0.67, 1.33, 2.00 และ 2.67%w/vผลิตภัณฑ์ก่อนอบให้ %การตายของหนอนใยผัก 5, 18, 38, 68, 70 และ 88% ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์หลังอบให้%การตายของหนอนใยผัก 3, 13, 48, 70, 80และ83% ตามลำดับจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าที่อัตราเดียวกัน ทั้งก่อนและหลังอบให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักวัย2 ในการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์น้อยหน่า สูตร EC ก่อนและหลังอบที่ อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส 14 วัน

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักวัย2 (%corrected mortality)
1. EC formulation 0.00%w/v (additive) ก่อนอบ	2.5 f
2. EC formulation 0.02%w/v ก่อนอบ	7.5 f
3. EC formulation 0.08%w/v ก่อนอบ	40.0 cd
4. EC formulation 0.17%w/v ก่อนอบ	52.5 bc
5. EC formulation 0.25%w/v ก่อนอบ	65.0 ab
6. EC formulation 0.33%w/v ก่อนอบ	87.5 a
7. EC formulation 0.00%w/v (additive) หลังอบ	2.5 f
8. EC formulation 0.02%w/vหลังอบ	12.5 ef
9. EC formulation 0.0.08%w/vหลังอบ	30.0 de
10. EC formulation 0.17%w/vหลังอบ	70.0 ab
11. EC formulation 0.25%w/vหลังอบ	60.0 bc
12. EC formulation 0.33%w/vหลังอบ	85.0 a
13. น้ำ (กรรมวิธีควบคุม)	-
CV(%)	**34.0**

หมายเหตุ ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมัน 95%

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักวัย2 ในการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์น้อยหน่า สูตร EW ก่อนและหลังอบที่ อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส 14 วัน

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักวัย2 (%corrected mortality)
1. EW formulation 0.00%w/v (additive) ก่อนอบ	5.0 e
2. EW formulation 0.13%w/vก่อนอบ	17.5 de
3. EW formulation 0.67%w/vก่อนอบ	37.5 cd
4. EW formulation 1.33%w/vก่อนอบ	67.5 ab
5. EW formulation 2.00%w/vก่อนอบ	70.0 ab
6. EW formulation 2.67%w/vก่อนอบ	87.5 a
7. EW formulation 0.00%w/v (additive) หลังอบ	5.0 e
8. EW formulation 0.13%w/vหลังอบ	5.0 e
9. EW formulation 0.67%w/vหลังอบ	47.5 bc
10. EW formulation 1.33%w/vหลังอบ	70.0 ab
11. EW formulation 2.00%w/vหลังอบ	80.0 a
12. EW formulation 2.67%w/vหลังอบ	82.5 a
13. น้ำ (กรรมวิธีควบคุม)	-
CV(%)	**38.7**

หมายเหตุ ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การวิจัยสูตรและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าเพื่อการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เนื่องจากน้อยหน่าจัดเป็นพืชที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยแต่ละส่วนได้แก่ ใบ เปลือกผล เมล็ด เปลือกต้น และราก ให้สารที่มีฤทธิ์แตกต่างกัน ในที่นี้เป็นการทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผัก (*Plutella xylostella* L.) โดยการสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วย methanol ได้สารสกัดหยาบแล้วนำไปแยกเป็น 4 ส่วน ได้ crude1, crude2, crude3 และ crude4 เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนใยผักพบว่า crude 2 มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก จึงได้นำ crude2 ไปศึกษาสภาวะ (condition) ที่เหมาะสมสำหรับเครื่อง HPTLC ในการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ, สกัดต่อเป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ และเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์เข้มข้นสูตรต่างๆ จากการศึกษาสภาวะ โดยใช้ HPTLC glass plate silica gel 60 F254 ได้สารตัวพา EtOAc/MTBE/MeOH (93/5/2) ส่องภายใต้แสง UV254, 366nm และแสงธรรมชาติ แล้วสเปรย์ด้วยน้ำยา dragendorff s spray reagent พบว่าสามารถแยก alkaloid ต่างๆ ออกจากกันได้ จึงใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่สกัดได้จาก crude 2 โดยแยกได้เป็น 5 ส่วน คือ F1, F2, F3, F4 และ F5 พบ alkaloids 8 ชนิด จากการทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก พบว่า F1และ F2 ให้%การตายของหนอนสูง ทำให้ทราบว่า alkaloid2 (Rf 0.57) คือสารที่ออกฤทธิ์สูงสุด จึงใช้เป็นสารอ้างอิง ในการวัดปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ ซึ่งจากการวิจัยสูตรผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ พบว่า สูตรที่เหมาะสมในการทำผลิตภัณฑ์มี 2 สูตรคือ EC (emulsifiable concentrates) และ EW (emulsion in water) เมื่อทดสอบความคงตัวหลังให้ความร้อนเป็นตัวเร่งที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส 14 วัน พบว่าผลิตภัณฑ์ยังคงลักษณะทางกายภาพไม่เปลี่ยนแปลงทั้ง 2 สูตร เมื่อทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผัก ของผลิตภัณฑ์สูตร EC ที่อัตรา

0.33%w/v และสูตร EW ที่อัตรา 2.67%w/v พบว่าให้%การตายหนอนหนอนใยผักเกิน 80% ไม่แตกต่างทางสถิติทั้งก่อนและหลังอบที่อัตราเดียวกันสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย HPTLC และ HPLC ซึ่งให้ chromatogram ของ alkaloid2 คงที่เมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ ในช่วงเวลา 0-14วันแต่ค่า pH มีแนวโน้มลดลง และมีอัตราการลดมากขึ้นเมื่อเก็บที่อุณหภูมิสูงขึ้นการทดลองนี้ควรต่อยอดเพื่อหาสูตรโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ alkaloid2 ด้วยเครื่องมือแมสสเปกโตรมิเตอร์ จะทำให้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ที่แน่นอนได้ สำหรับผลิตภัณฑ์สูตร EC และ EW ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปต่อยอดศึกษาประสิทธิภาพต่อแมลงศัตรูพืชชนิดอื่นๆได้ในอนาคต เพื่อเพิ่มมูลค่าและสนองนโยบายการลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช

การทดลองที่ 1.4

วิจัยความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าต่อลูกปลานิล

Study on acute Toxicity of *Annona squamosa* L. extracted formulation on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ผู้วิจัย

นางธิติยาภรณ์ อุดมศิลป์ Thitiyaporn Udomsil

นางธนิตา ค่ำอำนวย Thanita Kham-amnouy

นางสาวณัฐพร ฉันทศักดา Nattaporn Chanthasakda

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าที่ทำให้ลูกปลานิลตายร้อยละ 50 (LC_{50}) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม โดยทำการทดลองกลุ่มละ 4 ซ้ำ ใช้ลูกปลานิลซ้ำละ 10 ตัว เพื่อทำการทดสอบแบบหยาบ (Preliminary test) โดยใช้ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าความเข้มข้นสูงสุดของผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าที่ทำให้ลูกปลานิลมีชีวิตรอด 100% และความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ลูกปลานิลตาย 100% อยู่ในช่วง 0.01-2 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ จึงนำมาทดสอบแบบละเอียด (Definitive test) โดยแบ่งความเข้มข้นออกเป็น 7 ช่วง คือ 0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 1.0. มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าที่ทำให้ปลาตายจำนวนครึ่งหนึ่งในเวลา 96 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Probit analysis มีค่าเท่ากับ 0.123 มิลลิกรัม/ลิตร

คำสำคัญ : สารสกัดน้อยหน่า ผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่า ลูกปลานิล

Abstract

This research aims to study the median lethal concentration (LC_{50}) of *Annona squamosa* L. extracted formulation on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). It was found that the experiment was divided into 2 groups as treatment group and control group. Ten fish per group were used and four replicates were tested. Preliminary test was done at concention of 10, 20, 30, 40, 50, 100 and 200 mg/L. The ranged for survived and dead fish were 0.01-2 mg/L. Then, concentrations of 0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 and 1.0 mg/L were used as definitive tested. It was found that LC50 (96 hr) was 0.123 mg/L performed by probit analysis program.

Key words : *Annona squamosa* L. extract, formulation, median lethal concentration (LC_{50}), alkaloids

บทนำ

ประเทศไทยมีพืชหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชและวัชพืช เช่น สะเดา หางไหล หรือ โล่ติ๊น หนอนตายหยาก สาบเสือ ซึ่งนักวิจัยสาขาเกษตร และสาขาอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องได้ทำการทดลองค้นคว้าหาสารทดแทนสารเคมีการเกษตร พบว่า สามารถนำเอาส่วนที่สำคัญต่างๆ เช่น ต้น ราก ใบ ดอก และผล มาสกัดเพื่อให้ได้สารสำคัญจากพืชนั้นๆ มาใช้ควบคุมศัตรูพืชแทนสารเคมีได้ดี โดยไม่มีพิษตกค้าง เนื่องจากสารธรรมชาติส่วนใหญ่จะสลายตัวได้เร็ว นอกจากนี้สารสกัดจากพืชยังมีสารที่เป็นองค์ประกอบอยู่มากมาย ซึ่งแมลงจะต้องใช้เวลานานมากในการสร้างความต้านทานต่อองค์ประกอบต่างๆในสารสกัดเหล่านั้น นอกจากพืชต่างๆเหล่านี้แล้ว ยังมีพืชและสมุนไพรอีกหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชและวัชพืชได้ เช่น น้อยหน่า (*Annona. Squamosa* L.) เป็นพืชผลไม้ในกลุ่ม custard apple family ในประเทศไทยเพาะปลูกน้อยหน่าสายพันธุ์ *Annoana squamosa* L.

น้อยหน่า เป็นพืชที่มีแนวโน้มในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช จากการศึกษาค้นคว้าจากเอกสารงานวิจัยต่างๆ พบว่ามีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ควบคุมและกำจัดแมลงต่างๆได้ สารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยเอทานอลและเมทานอลมีฤทธิ์กำจัด ด้วง pulse (*Callosobruchus chinensis*) ได้ถึง 100% (Al-Lawati *et al.*, 2002) และสามารถกำจัดด้วง khapra (*Trogoderma granarium*) ได้ สารสกัดใบและเมล็ดน้อยหน่ายังสามารถควบคุมแมลงได้อีกหลายชนิด เช่น เพลี้ย หนอนฝ้าย ตั๊กแตน มด แมลงหวี่ จากรายงานสารเคมีในผลน้อยหน่าประกอบด้วย diterpenoid compound เช่น kaur-16-en-18-oic acid, α-pinene, sabinene และ limonene (Andrade *et al.*, 2001) ซึ่งข้อมูลส่วนใหญ่ของงานวิจัยน้อยหน่า จะเป็นการศึกษาทางด้านประสิทธิภาพและสารสำคัญ มีส่วนน้อยที่ทำการศึกษาและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป จึงได้นำมาทำการวิจัยและพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อทดแทนหรือลดการใช้สารเคมี

น้อยหน่า ชื่อวิทยาศาสตร์ *Annona squamosa* Linn. มีชื่อสามัญ Sugar Apple, Sweetsop, Custard Apple องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดมีสาร anonaine alkaloid, isocorydine สารกลุ่ม acetogenin ชื่อ annonacin A จำแนกตามลักษณะเป็น 2 ชนิด ได้แก่ น้อยหน่าพื้นเมืองหรือน้อยหน่าฝ้าย แบ่งออกได้เป็น 2 สายพันธุ์ ตามลักษณะของสีผลคือ น้อยหน่าฝ้ายเขียวซึ่งมีผลสีเขียว กับน้อยหน่าฝ้ายครั่งมีผลสีม่วงเข้ม และน้อยหน่าหนังหรือน้อยหน่าญวน แบ่งได้ 3 สายพันธุ์ คือ น้อยหน่าหนังเขียวมีผลสีเขียว น้อยหน่าหนังทอง และน้อยหน่าหนังครั่ง นอกจากนี้ยังมี น้อยหน่าพันธุ์ลูกผสม 2 สายพันธุ์ คือ พันธุ์เพชรปากช่องและพันธุ์เนื้อทอง

สารสกัดเมทานอลจากใบน้อยหน่ามีความเป็นพิษต่อเพลี้ยอ่อนถั่ว โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 2,089.30μg/mL (สุดารัตน์และคณะ, 2554) จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อเพลี้ยอ่อน พบว่า สารสกัดจากน้อยหน่า ออกฤทธิ์ดีที่สุดต่อเพลี้ยอ่อน จากรายงานวิจัยพบว่าสารสำคัญในใบน้อยหน่าเป็นสารแอลคาลอยด์(alkaloids) แอนโนเนอีน (anonaine) และเรซิน (resin) ในเมล็ดมีน้ำมันอยู่ประมาณ 45% น้ำมันเป็นพิษกับด้วงปีกแข็ง เพลี้ยอ่อน แมลงวัน และมวนปีกแข็ง (สมสุข, 2546)

กรกช (2554) ได้ศึกษาฤทธิ์ต่อการสัมผัสโดยตรง (direct contact) ต่อหนอนแมลงวันทอง โดยการจุ่มหนอน (dipping) ลงในสารผสมระหว่างใบน้อยหน่าและใบแมงลักคา มีค่า LC_{50} 652.80 ± 13.15 ppm และ 683.25 ± 38.08 ppm ตามลำดับ และสารสกัดใบน้อยหน่าด้วยเอทานอลน่าจะเป็นสารเพิ่มฤทธิ์แบบ additive effect ให้แก่สารสกัดใบสะเดาด้วยเอทานอล และฤทธิ์ของสารสกัดต่อการ

กินของแมลงวันทองตัวเต็มวัย พบว่าสารสกัดใบน้อยหน่าด้วยน้ำมีประสิทธิภาพทำให้แมลงตายได้ ปานกลาง LC_{50} 1,710.91 ± 67.07 ppm ฤทธิ์สารสกัดผสมควบคุมแมลงได้ปานกลางเช่นกัน สารสกัดใบสะเดาผสมใบน้อยหน่าด้วยเอทานอลกำจัดแมลงได้สูงสุด LC_{50} 1,605.87 ± 67.93 ppm

จากการศึกษาของ Khalequzzaman andSultana (2006) ทดสอบสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยตัวทำละลายต่างๆกับตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของมอดแป้ง (Red flour beetle) 4 สายพันธุ์ คือ Raj, CR 1, FSS II และ CTC-12 พบว่าสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยเมทานอลมีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนมอดแป้งสายพันธุ์ FSS II น้อยที่สุด และสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยปิโตรเลียมสปิริท มีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนมอดแป้งสายพันธุ์ Raj สูงที่สุด สำหรับตัวเต็มวัยของมอดแป้ง สารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยปิโตรเลียมสปิริทมีความเป็นพิษกับสายพันธุ์ CTC-12 สูงที่สุด และสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยอะซิโตนมีความเป็นพิษกับสายพันธุ์ CR 1 น้อยที่สุด สารสกัดหยาบของน้อยหน่าสามารถควบคุมตัวอ่อนผีเสื้อ (Leatemia and Isman, 2004) ควบคุมแมลงวันผลไม้ ชนิด Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) ในระยะฟักไข่ รบกวนการวางไข่ และ ยืดเวลาพัฒนาการของตัวอ่อน (Epino and Chang, 1993) ควบคุมตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของมอดแป้งสีแดง *Tribolium castaneum* Herbst (Khalequzzaman and Sultana, 2006)

ภัควรินทร์ (2560) ได้ทำวิจัยสูตรและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าเพื่อการป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยการสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วย methanol ได้สารสกัดหยาบ แล้วนำไปแยกเป็น 4 ส่วน ได้ crude1, crude2, crude3 และ crude4 เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนใยผักพบว่า crude2 มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก จึงได้นำ crude2 ไปเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์เข้มข้นสูตรต่างๆ ซึ่งจากการวิจัยสูตรผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ พบว่า สูตรที่เหมาะสมในการทำผลิตภัณฑ์มี 2 สูตรคือ EC (emulsifiable concentrates) และ EW (emulsion in water) เมื่อทดสอบความคงสภาพหลังให้ความร้อนเป็นตัวเร่งที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส 14 วัน พบว่าผลิตภัณฑ์ยังคงสภาพไม่เปลี่ยนแปลงทั้ง 2 สูตร เมื่อทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผัก ของผลิตภัณฑ์สูตร EC ที่อัตรา 0.33%w/v และสูตร EW ที่อัตรา 2.67%w/v พบว่าให้%การตายหนอนหนอนใยผักเกิน 80% ไม่แตกต่างทางสถิติทั้งก่อนและหลังอบที่อัตราเดียวกันสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย HPTLC และ HPLC ซึ่งให้ chromatogram ของ alkaloid2 คงที่เมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ ในช่วงเวลา 0-14วัน ผลิตภัณฑ์เหล่านี้สามารถนำไปต่อยอดศึกษาประสิทธิภาพต่อแมลงศัตรูพืชชนิดอื่นๆได้ในอนาคต เพื่อเพิ่มมูลค่าและสนองนโยบายการลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช

การนำพืชมาใช้เป็นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเข้าใจถึงคุณภาพทางเคมีของส่วนต่างๆของพืช เช่น ต้องทราบว่าสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในพืชนั้นเป็นประเภทใด และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างไร จึงจำเป็นต้องศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสม ซึ่งขึ้นอยู่กับพืชและประเภทของสารออกฤทธิ์ในพืชนั้นๆ และใช้สารเหล่านี้เป็นตัวบ่งชี้ในการวิเคราะห์คุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ทำจากพืชชนิดนั้น ๆ การศึกษาสารสำคัญในพืช และการทดสอบประสิทธิภาพสารสำคัญจากพืชเพื่อใช้ในการควบคุมศัตรูพืชเป็นสิ่งสำคัญในการเป็นแนวทางการวิจัยสูตรและผลิตภัณฑ์สารสกัดจากพืชสำเร็จรูปพร้อมใช้ที่มีคุณภาพ นอกจากนี้การวิจัยความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์สารสกัดจากพืชก็เป็นสิ่งจำเป็นเพื่อบ่งบอก ความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม โดยทำการศึกษาความเป็นพิษต่อลูกปลานิล เนื่องจากปลานิลเป็นตัวแทนประชากรของปลาที่มีปริมาณมากในพื้นที่การเกษตรส่วนใหญ่

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
2. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ เช่น บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดวัดปริมาตร ปิเปต เป็นต้น
3. เครื่อง HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography)
4. อุปกรณ์สำหรับเลี้ยงปลานิล เช่น โหลแก้วกลม อ่างเลี้ยงปลา ชุดอุปกรณ์สำหรับให้ออกซิเจนในน้ำ สวิงตักปลา
5. เทอร์โมมิเตอร์
6. กระดาษวัด pH, Cl_2, NO_2^-, NO_3^-
7. ไม้บรรทัดและเวอร์เนียสำหรับวัดขนาดตัวปลา
8. อาหารอัดเม็ดแห้งสำหรับเลี้ยงปลา

วิธีการ

1. เตรียมผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าสูตร EC โดยนำมาเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้น ตามที่ต้องการ เพื่อรอวิเคราะห์ต่อไป

2. การเตรียมลูกปลานิล

นำลูกปลานิล มาเลี้ยงปรับสภาพในห้องปฏิบัติการอย่างน้อย 2 สัปดาห์ ก่อนการทดสอบ แล้วคัดลูกปลาที่สุขภาพดีมาทำการทดสอบ โดยแยกเลี้ยงไว้ในตู้กระจกที่มีสภาพคล้ายภาชนะทดลอง 1-2 วันและงดการให้อาหาร 24 ชั่วโมงก่อนการทดสอบปลาที่ใช้ในการทดลองจะมีการชั่งน้ำหนักและวัดความยาวของลำตัวก่อนทำการทดลอง

3. ทดสอบความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าต่อลูกปลานิล

วางแผนการทดลองแบบ CRD มีระดับความเข้มข้นเป็นกรรมวิธี6 กรรมวิธี ดังนี้ โดยกรรมวิธีเป็นชนิดของผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าความเข้มข้นแตกต่างกัน 6 ระดับ

- การทดลองขั้นต้น (range finding test) เพื่อหาระดับความเข้มข้นช่วงกว้างๆคือระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ปลานิลตาย 100 เปอร์เซ็นต์และระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ทำให้ปลานิลมีชีวิตรอด 100 เปอร์เซ็นต์สังเกตและบันทึกผลจำนวนสัตว์ทดลองที่ตายภายใน 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงและนำค่าความเข้มข้นที่ได้ไปจัดระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองอย่างละเอียดต่อไป

- การทดลองอย่างละเอียด (definitive test) เป็นการทดลองเพื่อจัดระดับความเข้มข้นหาระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าที่ทำให้ปลานิลตายครึ่งหนึ่ง โดยการนำผลจากการทดลองขั้นต้นมาจัดระดับความเข้มข้นออกเป็น 5 ระดับแต่ละระดับทำการทดลอง 3 ซ้ำตลอดการทดลองจะให้อากาศเพื่อป้องกันการขาดออกซิเจนสังเกตลักษณะอาการและบันทึกจำนวนสัตว์ทดลองที่ตายภายใน 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เมื่อเสร็จสิ้นการทดลองนำเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของสัตว์ทดลองในแต่ละระดับความเข้มข้นไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) ตามวิธีของ Litchfield and Wilcoxon (1949).

4. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปและรายงานผล

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2560 สิ้นสุด กันยายน 2561

สถานที่ กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ
กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลอง

1. เตรียมสารละลายผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าสูตร EC

ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของผลิตภัณฑ์ต่อลูกปลานิลเบื้องต้น

2. ทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน (LC_{50}) ของผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าต่อลูกปลานิล

ลูกปลานิลที่ใช้ทดสอบได้จากบ่อปลา อ.บ้านโพธิ์ จ.ฉะเชิงเทรา มีความยาวเฉลี่ย 4.28 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 1.03 กรัม จากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของผลิตภัณฑ์เบื้องต้น (range finding test) พบว่า จากการนับจำนวนลูกปลานิลที่ตายที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากการทดลอง พบว่า ลูกปลานิลที่ทดลองจะตายเพิ่มขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นของสารละลายผลิตภัณฑ์น้อยหน่าเพิ่มขึ้นในทุกช่วงเวลาที่ศึกษา และระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่ทำให้ปลานิลตาย และระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ปลานิลตาย 100% ที่ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.01-2 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ

จากการทดสอบอย่างละเอียด (definitive test) หาระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าที่ทำให้ปลานิลตายครึ่งหนึ่ง กำหนดระดับความเข้มข้นให้ละเอียดยิ่งขึ้น ดังนี้ คือ 0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 1.0. มิลลิกรัม/ลิตร และการทดลองชุดควบคุม พบว่าระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ลูกปลานิลตาย 3, 17, 57, 70,87 และ 97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ลูกปลานิลตาย 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง (ตารางที่ 1)

จากการนำค่าจำนวนสัตว์ทดลองที่ตายในแต่ละความเข้มข้นที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงมาคำนวณเพื่อหาค่า LC_{50} ด้วยการวิเคราะห์โพรบิท พบว่าค่า LC_{50} ของผลิตภัณฑ์สารสกัดจากเมล็ดน้อยหน่า มีค่าเท่ากับ 0.123 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งจากการศึกษาผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าสูตร EC พบว่าสารออกฤทธิ์เป็นสารกลุ่มแอลคาลอยด์ (ภัควรินทร์, 2560) นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์สารสกัดจากน้อยหน่าสูตร EC ยังมีความเป็นพิษต่อลูกปลานิลมากกว่าผลิตภัณฑ์สารสกัดจากพืชอื่นที่มีสารออกฤทธิ์เป็นกลุ่มแอลคาลอยด์เหมือนกัน เช่น ผลิตภัณฑ์สารสกัดหนอนตายหยากที่ผลิตในห้องปฏิบัติการให้ค่า LC_{50} ลูกปลานิล 765 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลา 96 ชม. และผลิตภัณฑ์หนอนตายหยากที่ผลิตในโรงงานต้นแบบให้ค่า LC_{50} ลูกปลานิล 225 มิลลิกรัม/ลิตร ในเวลา 96 ชม. (อุดมลักษณ์, 2553) และเมื่อเทียบกับสารสกัดจากกลอยที่มีสารไดออสคอรีนและไดออสจีนิน อยู่ในกลุ่มแอลคาลอยด์ ให้ค่า LC_{50} ลูกปลานิล 204.54 กรัมต่อลิตร (ประสงค์, 2014) ซึ่งมีความเป็นพิษน้อยกว่าผลิตภัณฑ์สารสกัดจากน้อยหน่าสูตร EC

ในการทดสอบความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์สารสกัดจากเมล็ดน้อยหน่าสูตร EC ต่อลูกปลานิลนั้น ส่งผลทำให้ปลาตาย ซึ่งจากการวิเคราะห์คุณภาพของน้ำก่อนการทดลองและตลอดการทดลองที่ 96 ชั่วโมง พบว่ามีค่า pH อยู่ในช่วง 7-8 ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการดารงชีวิตของสัตว์น้ำ อุณหภูมิน้ำอยู่ในช่วง 25-28 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าการตายของปลาไม่ได้เกิดจากปัญหาของคุณภาพน้ำ เนื่องจากค่าดังกล่าวเป็นค่าอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลา (สานักงานมาตรฐานสินคาเกษตรและอาหารแห่งชาติกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2553)

ตารางที่ 1 ตารางแสดงจำนวนลูกปลานิลที่ตาย และเปอร์เซ็นต์การตาย ของการทำ definitive test ที่เวลา 96 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่า (ppm)	จำนวนปลาทั้งหมด (ตัว)	จำนวนปลาที่ตาย (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตาย (%)
กลุ่มควบคุม	30	0	0
0.01	30	1	3
0.1	30	5	17
0.2	30	17	57
0.3	30	21	70
0.4	30	26	87
0.5	30	29	97
1.0	30	30	100

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน (LC_{50}) ของผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าสูตร EC ให้ค่าความเป็นพิษ 0.123 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าสูตร EC มีความเป็นพิษสูงต่อปลา ดังนั้นการใช้ผลิตภัณฑ์จึงต้องมีความระมัดระวัง และไม่ใช้ในพื้นที่ใกล้แหล่งน้ำ

กิจกรรมที่ 2 กิจกรรมวิจัยผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืชจากแมงลักป่า

กิจกรรมย่อยที่ 2.1
วิจัยประสิทธิภาพของสารสกัดจากแมงลักป่าในการควบคุมวัชพืช
Efficiency of Essential Oil from *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. on Weed Control

ผู้วิจัย

อัณศยา พรมมา คมสัน นครศรี ภัทร์พิชชา รุจิระพงศ์ชัย
ธัญชนก จงรักไทย ศิริพร สอนท่าโก

Ansaya Promma Komsan Nakornsri Phatphitcha Rujirapongchai
Tanchanok Jongrukthai Siriporn Sonthako

บทคัดย่อ

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากแมงลักป่าในการควบคุมวัชพืช ทำการทดลองระหว่าง ตุลาคม 2558 - กันยายน 2559 ณ ห้องปฏิบัติการ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร และห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร โดยใช้น้ำมันหอมระเหยเทียบเท่าสกัดได้จากใบสดหรือใบแห้งของแมงลักป่าอัตรา 25, 50, 75 และ 100 กรัม เปรียบเทียบกับไม่ใส่น้ำมันหอมระเหย ทดสอบกับไมยราบยักษ์ (*Mimosa pigra* L.) พบว่า น้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากใบสดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกและการเจริญสูงสุด เมื่อทดสอบกับวัชพืชอื่นอีก 4 ชนิด ได้แก่ หญ้าข้าวนก (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv) ผักโขมหนาม (*Amaranthus spinosus* L.) ถั่วผี (*Phaseolus lathyroides* L.) และไมยราบเลื้อย (*Mimosa diplotricha* C. Wright ex Sauvallen) พบว่า น้ำมันหอมระเหยเทียบเท่าสกัดจากแมงลักป่าอัตรา 100 กรัม สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญของพืชทดสอบส่วนใหญ่ได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการงอก การเจริญของรากและลำต้นหญ้าข้าวนกได้ 94.96, 98.19 และ 96.92 เปอร์เซ็นต์ ถั่วผีได้ 95.24, 87.75 และ 90.54 เปอร์เซ็นต์ และไมยราบเลื้อยได้ 30.92, 90.24 และ 86.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนผักโขมหนามถูกยับยั้ง 100 เปอร์เซ็นต์ ทุกอัตรา สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลจาก ใบสด ใบแห้ง กิ่งและลำต้นสด และ กิ่งและลำต้นแห้ง เทียบเท่าสกัดจากแมงลักป่าอัตรา 0.1, 0.5 และ 1 กรัม ปรากฏว่า สารสกัดหยาบจาก ใบสด สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญของไมยราบยักษ์ได้ดีที่สุดเช่นกัน

เมื่อพ่นน้ำมันหอมระเหยเทียบเท่าสกัดจากแมงลักป่าอัตรา 100 และ 200 กรัม ผสมสารจับใบ ให้วัชพืช 5 ชนิด ได้แก่ หญ้าข้าวนก หญ้าปากควาย (*Dactyloctenium aegyptium* (L.) Willd) ผักโขมหนาม ถั่วผี และไมยราบเลื้อย ปรากฏว่า แมงลักป่าอัตรา 200 กรัม มีประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืชดีที่สุด โดยหลังพ่น 7, 15 และ 30 วัน หญ้าข้าวนก หญ้าปากควาย ผักโขมหนาม ถั่วผี และไมยราบเลื้อย มีการตายสูงที่สุด และความสูง จำนวนใบ และน้ำหนักแห้งต่อกระถาง ของถั่วผี และไมยราบเลื้อย น้อยกว่าพืชชนิดเดียวกันที่ไม่ได้รับน้ำมันหอมระเหยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการพ่นสารจับใบ และน้ำ ใบของวัชพืชทั้ง 5 ชนิด ที่ได้รับน้ำมันหอมระเหย มีอาการฉ่ำน้ำ ใบและลำต้นเปลี่ยนเป็นสีขาว หรือน้ำตาล และแห้งตายในที่สุด

คำสำคัญ : แมงลักป่า

Abstract

Efficacy test of extract from pignt, *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., on weed control was conducted at Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok, during October, 2015 – September 2016. *Mimosa pigra* L. was used as bioassay weed for preliminary test. The essential oil from fresh leaves shows the highest inhibitory effect on seed germination and seedling growth. The other four weeds; *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv, *Amaranthus spinosus* L., *Phaseolus lathyroides* L. and *Mimosa diplotricha* C. Wright ex Sauvallen were maximum inhibited at 100 g of essential oil on germination, root and shoot growth, of *E. crus-galli* (L.) P. Beauv 94.96, 98.19 and 96.92%, *P. lathyroides* L. 95.24, 87.75 and 90.54% and *M. diplotricha* C. Wright ex Sauvallen 30.92, 90.24 and 86.85% respectively, while *A. spinosus* L. was completely inhibited at all tested concentration. The methanalic crude extract of fresh leaves yield the highest inhibitory on *M. pigra* L.

The essential oil was further tested with *E. crus-galli* (L.) P. Beauv, *Dactyloctenium aegyptium* (L.) Willd, *A. spinosus* L., *P. lathyroides* L. and *M. diplotricha* C. Wright ex Sauvallen in the pot. 200 g of essential oil shows the highest efficacy at 7, 15 and 30 days after applied. The height, number of leaves and dry weight of *P. lathyroides* L. and *M. diplotricha* C. Wright ex Sauvallen were significantly lower than untreated of the same species. In addition, leaves and stem of weeds of treated weed were turned into white or brown and died.

Key words : *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.,

บทนำ

วัชพืชจัดเป็นศัตรูพืชที่สำคัญของการเพาะปลูกพืชทั่วไป ซึ่งทำให้พืชปลูกได้รับความเสียหายทั้งทางตรงและทางอ้อมมากมาย เนื่องจากวัชพืชเป็นตัวแก่งแย่งแข่งขันปัจจัยที่จำเป็น ได้แก่ ธาตุอาหาร น้ำ และแสงแดด นอกจากทำความเสียหายต่อพืชปลูกแล้ว ยังทำให้เกิดความเสียหายต่อการชลประทาน การประมง ป่าไม้ การเลี้ยงสัตว์ การคมนาคม ฯลฯ (พรชัย, 2540) อย่างไรก็ตามพืชที่เป็นวัชพืชบางชนิดสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น ป้องกันการชะล้างพังทลายของดิน เพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน ใช้เป็นวัสดุคลุมดิน (พรชัย, 2540) รวมถึงการสกัดสารจากวัชพืชชนิดต่างๆ เพื่อใช้ประโยชน์ในการควบคุมวัชพืช เป็นต้น

ปัจจุบันการกำจัดวัชพืชส่วนใหญ่ใช้ด้วยสารกำจัดวัชพืช และมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น โดยสะท้อนจากปริมาณการนำเข้าสารกำจัดวัชพืช เช่น ในปี 2557 มีการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชปริมาณ 147,375 ตัน มูลค่า 22,812 ล้านบาท เป็นสารกำจัดวัชพืชสูงถึง 117,645 ตัน คิดเป็นมูลค่า 13,435 ล้านบาท ในปี 2558 มีการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชปริมาณ 149,546 ตัน มูลค่า 19,326 ล้านบาท เป็นสารกำจัดวัชพืชสูงถึง 119,971 ตัน คิดเป็นมูลค่า 11,016 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) ซึ่งในปี 2555 มีรายงานผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษจากสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชจากการทำงานและสิ่งแวดล้อม จำนวน 1,509 ราย อัตราป่วย 2.35 ต่อประชากรแสนคน (แสงโฉม และ

สุชาดา, 2555) นอกจากนี้การใช้สารกำจัดวัชพืชชนิดใดชนิดหนึ่งต่อเนื่องเป็นเวลานาน ส่งผลให้วัชพืชหลายชนิดต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช ซึ่งจากการสังเกตของนักวิชาการ และเกษตรกร พบว่าสารกำจัดวัชพืช atrazine เริ่มไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืชบางชนิด เช่น ผักโขม (*Amaranthus gracilis* L.) และหญ้ายาง (*Euphorbia heterophylla* L.) (Suwannagul and Suwanaketnikom, 2001) และ Heap (1997) รายงานว่าพบวัชพืชที่มีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช atrazine ทั่วโลก ถึง 60 ชนิด เป็นวัชพืชประเภทใบกว้างใบ 19 ชนิด และวัชพืชประเภทใบแคบ 41 ชนิด

แมงลักป่า หรือกะเพราผี (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) เป็นวัชพืชที่มีศักยภาพในการควบคุมวัชพืช โดย ชอุ่ม และ ศิริพร (2550) รายงานว่าสารสกัดจากแมงลักป่าด้วยน้ำสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของหญ้าข้าวนกได้ และการพ่นสารสกัดแมงลักป่าก่อนวัชพืชงอก 7 วัน ทำให้ผักโขมหนามมีความสูงลดลง 10% และที่ 4 สัปดาห์หลังพ่นสารฯ ผักเบี้ยหินมีน้ำหนักแห้งลดลง 15% (ชอุ่ม และ ศิริพร, 2551) และศิริกันยา (2544) รายงานว่าสารสกัดกระเพราผีเทียบเท่าน้ำหนักแห้ง 10.00 กรัม สามารถควบคุมแห้วหมูก่อนและหลังงอกได้ใกล้เคียงกับ อิมาเซทาไพร์ อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลการใช้สารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่าเพื่อใช้ควบคุมวัชพืช ดังนั้นจึงควรศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่าในการควบคุมวัชพืช เพื่อนำไปพัฒนาใช้ควบคุมวัชพืช เพื่อเป็นทางเลือกและลดการใช้สารสังเคราะห์ต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เมล็ดวัชพืชจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ หญ้าข้าวนก หญ้าปากควาย ผักโขมหนาม ถั่วผี ไมยราบเลื้อย และไมยราบยักษ์
2. แมงลักป่า (จังหวัดกาญจนบุรี)
3. จานแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
4. ตาชั่งไฟฟ้า
5. เมทานอล 100%
6. วุ้น
7. กระถางพลาสติก ขนาด 6 นิ้ว
8. ดิน

วิธีการ

1. การเตรียมเมล็ดวัชพืช

วัชพืชที่ใช้ในการทดสอบมี 6 ชนิด ได้แก่

- หญ้าข้าวนก (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.)
- หญ้าปากควาย (*Dactyloctenium aegyptium* (L.) Willd)
- ผักโขมหนาม (*Amaranthus spinosus* L.)
- ถั่วผี (*Phaseolus lathyroides* L.)
- ไมยราบเลื้อย (*Mimosa diplotricha* C. Wright ex Sauvallen) และ
- ไมยราบยักษ์ (*Mimosa pigra* L.)

เก็บเมล็ดผึ่งในร่มจนแห้ง ทำความสะอาด เลือกเฉพาะเมล็ดที่สมบูรณ์เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

2. การสกัดสารจากแมงลักป่า

2.1) การสกัดน้ำมันหอมระเหย เก็บตัวอย่างแมงลักป่า แยกออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่ 1) ใบสด 2) ใบแห้ง 3) กิ่งและลำต้นสด และ 4) กิ่งและลำต้นแห้ง นำแต่ละส่วนน้ำหนัก 500 กรัม ใส่ในน้ำ 1 ลิตร นำไปสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการกลั่น แบบ Hydro-stream Distillation

2.2) การสกัดหยาบ นำส่วนต่างๆ ของแมงลักป่าเช่นเดียวกับข้อ 2.1 มาสกัดด้วยเมทานอล 100% เป็นตัวทำละลาย อัตราส่วน 1:10 (แมงลักป่า 1 กรัม ต่อ เมทานอล 10 มิลลิลิตร) แช่ไว้ประมาณ 7 วัน แล้วนำมากรอง และกลั่นระเหยแห้ง เพื่อลดปริมาตร และนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะใช้

3. **ผลของสารที่สกัดจากแมงลักป่าต่อการงอกและการเจริญเติบโตในห้องปฏิบัติการ**

3.1) ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> การตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อหาอัตราที่เหมาะสมในการทดสอบ วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ ส่วนกรรมวิธี คือ น้ำมันหอมระเหยอัตราต่างๆ นำน้ำมันหอมระเหยเทียบเท่าสกัดได้จากใบสดของแมงลักป่าอัตรา 0.01, 0.10, 1, 10 และ 100 กรัม ใส่ในจานแก้วที่บรรจุสารละลายวุ้น 0.3% ปริมาตร 3 มิลลิลิตร อัตราละ 4 จาน และอีก 4 จาน ไม่ใส่น้ำมันหอมระเหย (ชุดควบคุม) รวมทั้งสิ้น 24 จาน ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

นำเมล็ดไมยราบยักษ์ที่ผ่านการแช่ในน้ำร้อน และปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นาน 12 ชั่วโมง เลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ไม่มีร่องรอยถูกทำลาย จำนวน 50 เมล็ด ใส่ในจานแก้วที่บรรจุสารละลายวุ้นและน้ำมันหอมระเหย ข้างต้น เติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร ปิดฝา วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน บันทึกจำนวนเมล็ดงอก สุ่มวัดความยาวรากและต้น จำนวนซ้ำละ 10 ต้น นำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่าเฉลี่ย และนำค่าเฉลี่ยไปคำนวณประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกและการเจริญ ดังนี้

- การยับยั้งการงอก (%) = [(A-B)/A] x 100
  - A = ค่าเฉลี่ย (จาก 4 ซ้ำ) จำนวนเมล็ดงอกในชุดควบคุม
  - B = ค่าเฉลี่ย (จาก 4 ซ้ำ) จำนวนเมล็ดงอกในชุดที่ได้รับสาร
- การยับยั้งการเจริญ (%) = [(A-B)/A] x 100
  - A = ค่าเฉลี่ย (จาก 4 ซ้ำ) ความยาวราก/ต้นวัชพืชในชุดควบคุม
  - B = ค่าเฉลี่ย (จาก 4 ซ้ำ) ความยาวราก/ต้นวัชพืชในชุดที่ได้รับสาร

เลือกน้ำมันหอมระเหยเทียบเท่าสกัดได้จากใบสดของแมงลักป่าอัตราที่ให้ผลยับยั้งการงอกและการเจริญสูงสุดไปศึกษาต่อในขั้นตอนที่ 2

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> หาอัตราที่เหมาะสมในการทดสอบ นำช่วงอัตราที่ให้ผลยับยั้งการงอกและการเจริญสูงสุด มาศึกษาเพิ่มเติม โดยมีการกระจายอัตรามากขึ้น และดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 1 เลือกอัตราต่ำสุดที่ให้ผลการยับยั้งการงอกและการเจริญของพืชทดสอบสูงสุด สำหรับการทดสอบในขั้นตอนที่ 3

<u>ขั้นตอนที่ 3</u> เปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากส่วนต่างๆ ของแมงลักป่า นำน้ำมันหอมระเหยจากส่วนต่างๆ ของแมงลักป่า ได้แก่ ใบสด ใบแห้ง กิ่งและลำต้นสด และกิ่งและลำต้นแห้ง โดยใช้อัตราต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญของไมยราบยักษ์สูงสุด ในขั้นตอนที่ 2 และดำเนินการเช่นทดสอบเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 1 เลือกน้ำมันหอมระเหยจากส่วนของพืชที่ให้ผลการยับยั้งการงอกและการเจริญของไมยราบยักษ์ ไปศึกษาต่อในขั้นตอนที่ 4

ขั้นตอนที่ 4 ผลต่อการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชบางชนิด นำน้ำมันหอมระเหยจากส่วนของแมงลักป่าที่ให้ผลการยับยั้งการงอกและการเจริญของไมยราบยักษ์สูงสุดในขั้นตอนที่ 3 มาทดสอบกับวัชพืช 4 ชนิด ได้แก่ หญ้าข้าวนก ถั่วผี ผักโขมหนาม และไมยราบเลื้อย และดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 1

3.2 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบที่สกัดจากส่วนต่างๆ ของแมงลักป่า ได้แก่ ใบสด ใบแห้ง กิ่งและลำต้นสด และ กิ่งและลำต้นแห้ง นำไปทดสอบกับเมล็ดไมยราบยักษ์ วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ ส่วนกรรมวิธี คือ สารสกัดหยาบอัตราต่างๆ โดยใช้สารสกัดหยาบเทียบเท่าสกัดจากแมงลักป่าอัตรา 0.1, 0.5 และ 1 กรัม นำไปละลายในเมทานอล 100% จากนั้นดูดสารละลายใส่จานแก้ว จานละ 3 มิลลิลิตร อัตราละ 4 จาน และอีก 4 จาน ใส่น้ำกลั่น จานละ 3 มิลลิลิตร นำไปตั้งที่อุณหภูมิห้อง เปิดฝาจานแก้วเล็กน้อย ทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อให้เมทานอลและน้ำกลั่นระเหย จากนั้นจึงนำเมล็ดไมยราบยักษ์ที่ผ่านการแช่น้ำร้อนแล้วเหมือนขั้นตอนที่ 1 ใส่ในจานแก้ว จานละ 50 เมล็ด เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปิดฝา วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบ 7 วัน บันทึกจำนวนเมล็ดงอก สุ่มวัดความยาวรากและต้น จำนวนซ้ำละ 10 ต้น นำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่าเฉลี่ย และคำนวณประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโต เช่นเดียวกับการทดสอบในขั้นตอนที่ 1

4. ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่าในการควบคุมวัชพืชในสภาพเรือนทดลอง

นำน้ำมันหอมระเหยจากส่วนของแมงลักป่าและอัตราที่ให้ผลยับยั้งการงอกและการเจริญของพืชทดสอบ ในข้อ 3) มาทดสอบต่อในกระถางสภาพเรือนทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ มี 4 กรรมวิธี ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 น้ำมันหอมระเหยอัตราที่ให้ผลดีที่สุดในการทดลองที่ 3) + สารจับใบ

กรรมวิธีที่ 2 แมงลักป่าอัตรา 2 เท่าของกรรมวิธีที่ 1+ สารจับใบ

กรรมวิธีที่ 3 สารจับใบ

กรรมวิธีที่ 4 น้ำเปล่า

เตรียมน้ำมันหอมระเหยที่ใช้พ่นในกรรมวิธีที่ 1 และ 2 โดยคำนวณปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ใช้พ่นต่อพื้นที่ 1 ตารางเมตร (คำนวณจากพื้นที่ของจานแก้วที่ใช้ทดสอบในข้อ 3) กรรมวิธีที่ 1, 2 และ 3 หยดสารจับใบกรรมวิธีละ 1 หยด และทุกกรรมวิธีใส่น้ำอัตรา 80 ลิตร/ไร่ จากนั้นคนให้น้ำมันหอมระเหยและสารจับใบละลาย เตรียมสำหรับใช้พ่นในกระถาง

เตรียมกระถางขนาด 6 นิ้ว ใส่ดินร่วนเป็นวัสดุปลูก จากนั้นหว่านเมล็ดวัชพืช 100 เมล็ดต่อกระถาง เมื่อวัชพืชงอก ทำการถอนต้นที่ไม่ต้องการออก ให้เหลือเฉพาะต้นวัชพืชที่ สมบูรณ์ แข็งแรง มีขนาดและความสูงใกล้เคียงกัน 20 ต้นต่อกระถาง เมื่อต้นวัชพืชมีใบจำนวน 2-3 ใบ พ่นน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่า ตามกรรมวิธีที่กำหนด และบันทึกข้อมูลดังนี้

การบันทึกข้อมูล

1. ลักษณะอาการที่ปรากฏบนต้นวัชพืชหลังพ่นน้ำมันหอมระเหย

2. จำนวนต้นที่มีชีวิตรอด (ต้นวัชพืชที่ยังมีสีเขียว) หลังพ่น 7, 15 และ 30 วัน นำไปคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การตายของวัชพืช ดังนี้

$$\text{การตายของวัชพืช (\%)} = [(A-B)/A] \times 100$$

A = จำนวนต้นในกรรมวิธีควบคุม

B = จำนวนต้นที่มีชีวิตรอดหลังพ่นสาร

3. บันทึกความสูง และจำนวนใบของวัชพืช หลังพ่น 30 วัน

4. บันทึกน้ำหนักแห้งของวัชพืช โดยดึงต้นวัชพืชออกจากกระถาง หลังพ่น 30 วัน ล้างทำความสะอาดราก จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2558 สิ้นสุด กันยายน 2559
สถานที่ ห้องปฏิบัติการ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลอง

1. ผลของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบแมงลักป่าต่อการงอกและการเจริญเติบโตในห้องปฏิบัติการ

เก็บตัวอย่างแมงลักป่าจากจังหวัดกาญจนบุรี นำมาแยกเป็นส่วนต่างๆ ได้แก่ 1) ใบสด 2) ใบแห้ง 3) กิ่งและลำต้นสด และ 4) กิ่งและลำต้นแห้ง นำไปสกัดน้ำมันหอมระเหย พบว่าส่วนของแมงลักป่าที่ให้น้ำมันหอมระเหยมากที่สุด คือ ใบ ส่วนของกิ่งและลำต้น มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงเลือกน้ำมันหอมระเหยจากส่วนของใบใช้สำหรับการทดลองเบื้องต้น ได้ผลการทดลองดังนี้

1.1 ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย

ขั้นตอนที่ 1 การตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อหาอัตราที่เหมาะสมในการทดสอบ โดยใช้น้ำมันหอมระเหยเทียบเท่าสกัดจากใบสดของแมงลักป่าอัตรา 0, 0.01, 0.1, 1, 10 และ 100 กรัม พบว่า อัตรา 100 กรัม สามารถยับยั้งการงอก การเจริญเติบโตของราก และลำต้นของไมยราบยักษ์ได้สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากอัตราอื่นๆ (Table 1)

ขั้นตอนที่ 2 จากผลการทดลองในขั้นตอนที่ 1 แบ่งอัตราแมงลักป่าระหว่าง 10-100 กรัม ออกเป็น 0, 25, 50, 75 และ 100 กรัม เมื่อนำไปทดสอบกับไมยราบยักษ์ พบว่า อัตรา 25-100 กรัม สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของรากและลำต้นได้ โดยที่อัตรา 100 กรัม สามารถยับยั้งการงอกได้สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากอัตราอื่นๆ และที่อัตรา 75 และ 100 กรัม สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้สูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากอัตราอื่นๆ โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากได้ 96.62 และ 100 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งการเจริญเติบโตของลำต้นได้ 95.49 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 2 และ Figure 1)

ขั้นตอนที่ 3 เนื่องจากปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากส่วนกิ่งและต้นทั้งสดและแห้ง มีปริมาณน้อยมาก ไม่สามารถนำมาใช้ทดสอบได้ จึงใช้น้ำมันหอมระเหยจากใบสดและแห้งในการศึกษาในขั้นตอนนี้ พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบสดสามารถยับยั้งการงอก การเจริญของราก และลำต้นไมยราบยักษ์ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบแห้งที่อัตราที่เท่ากัน (Table 3) ดังนั้นจึงเลือกน้ำมันหอมระเหยจากส่วนของใบสดสำหรับนำไปทดสอบกับเมล็ดวัชพืช ในขั้นตอนที่ 4

ขั้นตอนที่ 4 การศึกษาผลต่อการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืช จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ หญ้าข้าวนก ผักโขมหนาม ถั่วผี และไมยราบเลื้อย พบว่า ที่อัตรา 100 กรัม สามารถยับยั้งการงอก การเจริญของรากและลำต้นของหญ้าข้าวนก ถั่วผี และไมยราบเลื้อย ได้ดีที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากอัตราอื่นๆ โดยในหญ้าข้าวนกยับยั้งได้ 94.96, 98.19 และ 96.92 เปอร์เซ็นต์ ถั่วผีได้ 95.24, 87.75 และ 90.54 เปอร์เซ็นต์ และไมยราบเลื้อยเท่ากับ 30.92, 90.24 และ 86.85

เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ทุกอัตราของแมงลักป่าสามารถยับยั้งการงอก การเจริญของรากและลำต้นในผักโขมหนามได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (Table 4 และ Figure 2)

1.2 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆ ของแมงลักป่า ได้แก่ ใบสด ใบแห้ง กิ่งและลำต้นสด และ กิ่งและลำต้นแห้ง ที่สกัดด้วยด้วยเมทานอล ทดสอบกับไมยราบยักษ์ อัตรา 0, 0.1, 0.5 และ 1 กรัม พบว่า ใบสดสามารถยับยั้งการงอก การเจริญของรากและลำต้นไมยราบยักษ์ได้ดีกว่าส่วนอื่นๆ โดยที่อัตรา 1 กรัม ในน้ำกลั่นและ เมทานอลสามารถยับยั้งการงอกได้ 18.92 และ 23.08 เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งการเจริญของรากได้ 56.85 และ 57.62 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งการเจริญของลำต้นได้ 73.06 และ 73.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 5)

จากผลการทดลอง พบว่า น้ำมันหอมระเหย และสารสกัดหยาบ ที่สกัดได้จากแมงลักป่าในอัตราที่ต่ำจะส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของไมยราบยักษ์ ในขณะที่สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญได้เพิ่มขึ้น เมื่อมีอัตราแมงลักป่าเพิ่มขึ้น แสดงว่าสารสกัดที่ได้จากแมงลักป่ามีคุณสมบัติเป็น hormone -like-herbicide เมื่อใช้ในปริมาณที่น้อยจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต แต่หากใช้ในปริมาณมากจะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโต เช่นเดียวกับ 2, 4-ดี ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่สามารถใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชได้หากใช้ในปริมาณที่สูง โดยทำให้พืชมีการเจริญเติบโตผิดปกติ โดยเฉพาะส่วนยอดที่กำลังพัฒนา ทำให้ต้นแคระแกร็น ใบ ลำต้นบิดเป็นเกลียวหรือแตก ไม่เจริญเติบโตหรืออาจถึงตายได้ (กลุ่มวิจัยวัชพืช, 2555) นอกจากนี้ยังพบว่า อัตราแมงลักป่าที่สูง มีเมล็ดวัชพืชบางชนิดสามารถงอกได้จำนวนมากจึงทำให้การยับยั้งการงอกต่ำ แต่เมื่องอกมาแล้ว ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ จึงทำให้มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของรากและลำต้นสูงกว่าการงอก

2. ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่าในการควบคุมวัชพืชในสภาพเรือนทดลอง

นำน้ำมันหอมระเหยเทียบเท่าสกัดจากแมงลักป่าอัตราที่ให้ผลดีที่สุดในห้องปฏิบัติการ (อัตรา 100 กรัม) และเพิ่มเป็นสองเท่า (อัตรา 200 กรัม) นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืชจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ หญ้าข้าวนก หญ้าปากควาย ผักโขมหนาม ถั่วผี และไมยราบเลื้อย ได้ผลการทดลองดังนี้

หญ้าข้าวนก ผลการทดลองพบว่า หลังพ่น 7 และ 15 วัน กรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 200 กรัม มีการตายของหญ้าข้าวนกสูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีอื่น โดยมีการตาย 45.00 และ 52.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่หลังพ่น 30 วัน กรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 100 และ 200 กรัม มีการตายของหญ้าข้าวนกสูงกว่าการไม่ใช้น้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีการตายของหญ้าข้าวนก26.25 และ 53.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังพ่นน้ำมันหอมระเหยในกรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 100 และ 200 กรัม ประมาณ 2 ชั่วโมง พบอาการฉ่ำน้ำเป็นจุดๆ บริเวณใบด้านบนของหญ้าข้าวนก หลังพ่น 1 วัน บริเวณใบ และลำต้น มีสีซีดลง เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล และแห้งตายหลังพ่น 7 วัน บางต้นใบแห้งตายบางส่วน และสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ (Table 6 และ Figure 3)

ส่วนความสูง จำนวนใบ และน้ำหนักแห้งต่อกระถาง ของต้นที่เหลืออยู่ทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความสูงอยู่ระหว่าง 26.25-32.13 เซนติเมตร/ต้น มีจำนวนใบอยู่ระหว่าง 3.03-3.40 ใบ/ต้น และมีน้ำหนักแห้งอยู่ระหว่าง 0.89-1.14 กรัม/กระถาง ส่วนน้ำหนักแห้งต่อต้นกรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 100 กรัม สารจับใบ และน้ำ มีน้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมี

น้ำหนักแห้งอยู่ระหว่าง 0.05-0.08 กรัม/ต้น ในขณะที่กรรมวิธีพ่นด้วยน้ำมีน้ำหนักแห้งน้อยกว่ากรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 200 กรัม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 6)

หญ้าปากควาย ผลการทดลองพบว่า หลังพ่น 7, 15 และ 30 วัน กรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 200 กรัม มีการตายของหญ้าปากควายสูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีอื่น โดยมีการตาย 88.75, 90.00 และ 90.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังพ่นน้ำมันหอมระเหยในกรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 100 และ 200 กรัม ประมาณ 2 ชั่วโมง พบอาการฉ่ำน้ำเป็นจุดๆ บริเวณใบด้านบนของหญ้าปากควาย หลังพ่น 1 วัน บริเวณใบ และลำต้น มีสีซีดลง เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีขาว และแห้งตายหลังพ่น 7 วัน บางต้นใบแห้งตายบางส่วน และสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ (Table 7 และ Figure 4)

ส่วนความสูง จำนวนใบ และน้ำหนักแห้งต่อกระถาง ทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยมีความสูงอยู่ระหว่าง 14.38-16.08 เซนติเมตร/ต้น มีจำนวนใบอยู่ระหว่าง 5.38-11.75 ใบ/ต้น และมีน้ำหนักแห้งอยู่ระหว่าง 0.92-1.73 กรัม/กระถาง ส่วนน้ำหนักแห้งต่อต้น กรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 100 กรัม สารจับใบ และน้ำ มีน้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีน้ำหนักแห้งอยู่ระหว่าง 0.09-0.16 กรัม/ต้น ในขณะที่กรรมวิธีพ่นสารจับใบ และน้ำ มีน้ำหนักแห้งน้อยกว่ากรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 200 กรัม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 7)

ผักโขมหนาม ผลการทดลองพบว่า หลังพ่น 7, 15 และ 30 วัน กรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 200 กรัม มีการตายของผักโขมหนามสูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีอื่น โดยมีการตาย 98.75, 98.75 และ 100.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังพ่นน้ำมันหอมระเหยในกรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 100 และ 200 กรัม ประมาณ 2 ชั่วโมง พบอาการฉ่ำน้ำเป็นจุดๆ บริเวณใบด้านบนของผักโขมหนาม หลังพ่น 1 วัน บริเวณใบ และลำต้น มีสีซีดลง เปลี่ยนจากสีเขียว-แดง เป็นสีขาว และตายหลังพ่น 7 วัน บางต้นใบแห้งตาย แต่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ในขณะที่หากน้ำมันหอมระเหยพ่นถูกบริเวณยอดซึ่งเป็นจุดเจริญ ต้นชะงักการเจริญเติบโต แคระแกร็น และตายในที่สุด (Table 8 และ Figure 5)

ส่วนความสูง และจำนวนใบ กรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 200 กรัม มีความสูง และจำนวนใบน้อยที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีความสูง 0.00 เซนติเมตร/ต้น และมีจำนวนใบ 0.00 ใบ/ต้น ตามลำดับ ส่วนน้ำหนักแห้งต่อต้นพบว่า กรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 200 กรัม และน้ำ มีน้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกันทางสถิติแต่น้อยกว่ากรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 100 กรัม โดยมีน้ำหนักแห้งอยู่ระหว่าง 0.00-0.04 กรัม/ต้น ในขณะที่น้ำหนักแห้งต่อกระถางทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีน้ำหนักแห้งอยู่ระหว่าง 0.00-0.96 กรัม/กระถาง (Table 8)

ถั่วผี ผลการทดลองพบว่า หลังพ่น 7, 15 และ 30 วัน กรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 200 กรัม มีการตายของถั่วผีสูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีอื่น โดยมีการตาย 51.25, 62.50 และ 70.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยหลังพ่นน้ำมันหอมระเหยในกรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 100 และ 200 กรัม ประมาณ 2 ชั่วโมง พบอาการฉ่ำน้ำเป็นจุดๆ บริเวณใบด้านบนของถั่วผี ใบเริ่มแห้งและตายหลังพ่น 7 วัน บางต้นใบแห้งตาย แต่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ในขณะที่หากน้ำมันหอมระเหยพ่นถูกบริเวณยอดซึ่งเป็นจุดเจริญ ต้นชะงักการเจริญเติบโต แคระแกร็น และตายในที่สุด (Table 9 และ Figure 6)

ส่วนความสูง จำนวนใบ และน้ำหนักแห้งต่อกระถาง กรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 200 กรัม มีความสูง จำนวนใบ และน้ำหนักแห้งน้อยที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีความสูง 6.58

เซนติเมตร/ต้น มีจำนวนใบ 3.75 ใบ/ต้น และมีน้ำหนักแห้ง 0.14 กรัม/กระถาง ตามลำดับ ส่วนน้ำหนักแห้งต่อต้น กรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 200 กรัม และ สารจับใบ มีน้ำหนักแห้งต่อต้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีน้ำหนักแห้งอยู่ระหว่าง 0.02-0.08 กรัม/ต้น ในขณะที่กรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 200 กรัม มีน้ำหนักแห้งต่อต้นน้อยกว่ากรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 100 กรัม และน้ำ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 9)

ไมยราบเลื้อย ผลการทดลองพบว่า หลังพ่น 7, 15 และ 30 วัน กรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 100 และ 200 กรัม มีการตายของไมยราบเลื้อยสูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีอื่น โดยมีการตาย 98.75 และ 100.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งหลังพ่น 7, 15 และ 30 วัน หลังพ่นน้ำมันหอมระเหยในกรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 100 และ 200 กรัม ประมาณ 2 ชั่วโมง พบอาการฉ่ำน้ำเป็นจุดๆ บริเวณใบด้านบนของไมยราบเลื้อย ใบเริ่มแห้งและตายหลังพ่น 7 วัน (Table 10 และ Figure 7)

ส่วนความสูง จำนวนใบ และน้ำหนักแห้งต่อกระถาง กรรมวิธีแมงลักป่าอัตรา 100 และ 200 กรัม มีความสูง จำนวนใบ และน้ำหนักแห้งต่อกระถาง ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่น้อยกว่ากรรมวิธีพ่นสารจับใบ และน้ำแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีความสูงอยู่ระหว่าง 0.00-2.50 เซนติเมตร/ต้น มีจำนวนใบอยู่ระหว่าง 0.00-2.00 ใบ/ต้น และมีน้ำหนักแห้งอยู่ระหว่าง 0.00-0.04 กรัม/กระถาง ตามลำดับ ในขณะที่น้ำหนักแห้งต่อต้นทุกกรรมวิธีมีน้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 10)

จากผลการทดลอง พบว่า น้ำมันหอมระเหยแมงลักป่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยหลังพ่นทำให้ใบวัชพืชฉ่ำน้ำ ใบและลำต้นเปลี่ยนเป็นสีขาว หรือน้ำตาล และแห้งตาย สอดคล้องกับ จรัญญา และคมสัน (2553) ที่รายงานว่า การพ่นสารสกัดแมงลักป่าทุกอัตราบน ผักเสี้ยนผี หญ้ายาง หญ้าตีนติด และหญ้าปากควาย แสดงอาการเป็นพิษ ใบหงิกและเหี่ยว และหลังจากนั้นใบมีสีน้ำตาลหรือใบแห้ง ซึ่งในการทดลองหากวัชพืชถูกน้ำมันหอมระเหยบริเวณใบ บางต้นยังสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ เพราะยังมีจุดเจริญที่ไม่ถูกทำลาย และเนื่องจากหลังพ่นน้ำมันหอมระเหยแมงลักป่าอัตรา 100 และ 200 กรัม มีจำนวนต้นวัชพืชต่อกระถางน้อยลง มีการแข่งขันกันน้อย จึงสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่า กรรมวิธีพ่นสารจับใบ และน้ำ ทำให้ หญ้าข้าวนก หญ้าปากควาย และผักโขมหนาม มีน้ำหนักแห้งต่อต้นมากกว่า กรรมวิธีพ่นสารจับใบ และน้ำ จึงทำให้น้ำหนักแห้งต่อกระถางทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับ ชอุ่ม และศิริพร (2551) ที่พบว่าสารสกัดแมงลักป่าที่พ่นแบบหลังวัชพืชงอกมีผลต่อความสูงของพืชและวัชพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน และผลกระทบที่มีต่อพืชบางชนิดนานถึง 4 สัปดาห์ แต่พืชบางชนิดได้รับผลกระทบในระยะ 1-2 สัปดาห์หลังพ่นสารฯ หลังจากนั้นการเจริญเติบโตจะดีขึ้น

Table 1 Inhibitory effect of essential oil from *H. suaveolens* (L.) Poit. on germination and seedling growth of *M. pigra* L. (Laboratory test)

H. suaveolens (L.) Poit. (gE)	Inhibition (%)		
	germination	root length	shoot height
0	0.00 c[1/]	0.00 c	0.00 cd
0.01	-6.20 c	9.35 bc	-0.67 cd
0.1	-6.80 c	1.84 c	-3.46 d
1	14.80 b	16.37 b	5.88 c
10	12.40 b	19.89 b	21.96 b
100	100.00 a	100.00 a	100.00 a
C.V. (%)	30.85	34.11	28.25

[1/]Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by LSD

Table 2 Inhibitory effect of essential oil from *H. suaveolens* (L.) Poit. on germination and seedling growth of *M. pigra* L. (Laboratory test)

H. suaveolens (L.) Poit. (gE)	Inhibition (%)		
	germination	Root length	Shoot height
0	0.00 d[1/]	0.00 c	0.00 c
25	29.28 c	57.18 b	76.00 b
50	22.65 c	58.53 b	75.86 b
75	71.27 b	96.62 a	95.49 a
100	100.00 a	100.00 a	100.00 a
C.V. (%)	23.08	10.5	8.51

[1/]Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by LSD

Table 3 inhibitory effect of essential oil from fresh and dry leaves of *H. suaveolens* (L.) Poit. on germination and seedling growth of *M. pigra* L. (Laboratory test)

Materials	*H. suaveolens* (L.) Poit. (gE)	Inhibition (%)		
		germination	Root length	Shoot height
Fresh leaves	0	0.00 b[1/]	0.00 d	0.00 e
	25	5.43 b	7.58 cd	41.35 d
	50	4.50 b	22.91 c	62.98 c
	75	26.03 ab	63.09 b	80.66 b
	100	47.56 a	94.22 a	95.28 a
	C.V. (%)	115.28	29.10	11.05
Dry leaves	0	0.00 a[1/]	0.00 c	0.00 d
	25	8.24 a	21.02 bc	50.43 c
	50	12.92 a	43.37 ab	65.10 b
	75	0.75 a	47.39 a	69.87 b
	100	21.35 a	59.82 a	79.57 a
	C.V. (%)	265.18	43.70	11.69

[1/]Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by LSD

Table 4 Inhibitory effect of essential oil from fresh leaves of *H. suaveolens* (L.) Poit. on germination and seedling growth of some weeds. (Laboratory test)

Weed species	*H. suaveolens* (L.) Poit. (gE)	Inhibition (%)		
		germination	Root length	Shoot height
E. crus-galli (L.) P. Beauv.	0	0.00 c[1/]	0.00 d	0.00 d
	25	1.68 c	-4.71 d	84.52 c
	50	3.57 c	25.18 c	88.80 bc
	75	44.54 b	72.74 b	90.41 b
	100	94.96 a	98.19 a	96.92 a
	C.V. (%)	24.71	38.08	4.51
A. spinosus L.	0	0.00	0.00	0.00
	25	100.00	100.00	100.00
	50	100.00	100.00	100.00
	75	100.00	100.00	100.00
	100	100.00	100.00	100.00
	C.V. (%)	0.00	0.00	0.00
P. lathyroides L.	0	0.00 d[1/]	0.00 c	0.00 d
	25	2.38 cd	-37.48 d	41.34 c
	50	28.57 bc	5.08 c	71.78 b
	75	33.33 b	47.31 b	61.31 b
	100	95.24 a	87.75 a	90.54 a
	C.V. (%)	55.18	103.85	13.43
M. diplotricha C. Wright ex Sauvalle	0	0.00 b[1/]	0.00 e	0.00 e
	25	1.32 b	14.73 d	32.19 d
	50	3.95 b	25.73 c	60.78 c
	75	26.32 a	66.20 b	72.91 b
	100	30.92 a	90.24 a	86.85 a
	C.V. (%)	82.58	10.24	6.69

[1/]Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by LSD

Table 5 Inhibotory effect of crude extract from various part of *H. suaveolens* (L.) Poit. on germination and seedling growth of *M. pigra* L. (Laboratory test)

Part of plants	*H.suaveolens* (L.) Poit. (gE)	Inhibition (%)					
		germination		Root length		Shoot height	
		Water	Methanol	Water	Methanol	Water	Methanol
Fresh leaves	0	0.00 b[1/]	0.00 b	0.00 b	0.00 c	0.00 c	0.00 c
	0.1	31.47 a	34.98 a	24.84 b	26.17 bc	27.93 b	30.42 b
	0.5	5.41 ab	10.26 ab	28.84 ab	30.10 ab	46.77 b	48.60 b
	1	18.92 ab	23.08 ab	56.85 a	57.62 a	73.06 a	73.99 a
	C.V. (%)	128.79	99.78	70.06	66.8	38.04	35.48
Dry leaves	0	0.00 a[1/]	0.00 a	0.00 b	0.00 ab	0.00 d	0.00 d
	0.1	15.05 a	14.22 a	20.13 ab	-3.61 ab	18.21 c	13.45 c
	0.5	0.49 a	-0.49 a	1.87 b	-27.30 b	36.81 b	33.13 b
	1	8.58 a	7.68 a	35.89 a	16.84 a	54.09 a	51.41 a
	C.V. (%)	227.89	259.28	96.07	-512.54	21.27	25.06
Fresh stem	0	0.00 b[1/]	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 c	0.00 c
	0.1	-15.83 c	-9.89 b	-20.31 c	-18.18 c	14.82 b	17.76 b
	0.5	16.99 a	21.25 a	33.22 a	34.40 a	46.29 a	48.15 a
	1	-43.83 d	-36.45 c	2.83 b	4.54 b	41.43 a	43.45 a
	C.V. (%)	-82.10	-132.47	300.15	223.47	24.90	22.55
Dry stem	0	0.00 a[1/]	0.00 a	0.00 bc	0.00 c	0.00 c	0.00 c
	0.1	-10.04 a	-4.40 a	-4.81 c	-2.95 c	20.26 b	23.01 b
	0.5	0.58 a	5.68 a	20.59 b	21.99 b	60.21 a	61.58 a
	1	1.55 a	6.60 a	53.10 a	53.93 a	68.11 a	69.20 a
	C.V. (%)	-1,099.40	1,047.78	79.28	73.52	22.94	21.39

[1/]Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by LSD

Table 6 Inhibitory efficacy of essential oil from *H. suaveolens* (L.) Poit. on *E. crus-galli* (L.) P. Beauv.

H.suaveolens (L.) Poit (gE)	Number of died plant (%)			height (cm.)	Number of leaves	dry weight/pl (g)	Dry weight / plot (g)
	7 DAA	15 DAA	30 DAA				
100 gE + surfactant	20.00 b[1/]	21.25 b	26.25 ab	29.65 a	3.03 a	0.08 ab	1.14 a
200 gE + surfactant	45.00 a	52.50 a	53.75 a	32.13 a	3.40 a	0.13 b	0.89 a
Surfactant (check)	0.00 b	0.00 b	0.00 b	26.25 a	3.20 a	0.06 ab	1.13 a
Water (control)r	0.00 b	0.00 b	0.00 b	31.63 a	3.15 a	0.05 a	0.91 a
C.V. (%)	89.71	90.54	95.06	18.03	7.97	66.21	49.10

[1/]Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by LSD

DAA = Days after application

Table 7 Inhibitory efficacy of essential oil from *H. suaveolens* (L.) Poit. on *D. aegyptium* (L.) Willd.

H.suaveolens (L.) Poit (gE)	Number of died plant (%)			height (cm.)	Number of leaves	dry weight/pl (g)	Dry weight / plot (g)
	7 DAA	15 DAA	30 DAA				
100 gE + surfactant	56.25 b[1/]	56.25 b	57.50 b	14.38 a	6.80 a	0.16 ab	1.28 a
200 gE + surfactant	88.75 a	90.00 a	90.00 a	16.08 a	11.75 a	0.36 b	0.92 a
Surfactant (check)	0.00 c	0.00 c	0.00 c	15.68 a	5.55 a	0.09 a	1.70 a
Water (control)r	0.00 c	0.00 c	0.00 c	15.13 a	5.38 a	0.09 a	1.73 a
C.V. (%)	18.46	17.09	20.34	43.98	78.15	96.21	52.03

[1/]Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by LSD

DAA = Days after application

Table 8 Inhibitory efficacy of essential oil from *H. suaveolens* (L.) Poit. on *A. spinosus* L.

H.suaveolens (L.) Poit (gE)	Number of died plant (%)			height (cm.)	Number of leaves	dry weight/pl (g)	Dry weight / plot (g)
	7 DAA	15 DAA	30 DAA				
100 gE + surfactant	68.75 b[1/]	70.00 b	72.50 b	5.73 b	8.65 c	0.14 c	0.64 a
200 gE + surfactant	98.75 a	98.75 a	100.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
Surfactant (check)	0.00 c	0.00 c	0.00 c	4.80 b	6.55 b	0.05 b	0.96 a
Water (control)r	0.00 c	0.00 c	0.00 c	4.85 b	6.95 b	0.04 ab	0.81 a
C.V. (%)	26.14	24.37	20.36	20.15	12.28	52.65	47.97

[1/]Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by LSD

DAA = Days after application

Table 9 Inhibitory efficacy of essential oil from *H. suaveolens* (L.) Poit. on *P. lathyroides* L.

H.suaveolens (L.) Poit (gE)	Number of died plant (%)			height (cm.)	Number of leaves	Average dry weight/pl (g)	Dry weight / plot (g)
	7 DAA	15 DAA	30 DAA				
100 gE + surfactant	13.75 b[1/]	35.00 b	36.25 b	9.58 b	5.43 b	0.06 b	0.79 b
200 gE + surfactant	51.25 a	62.50 a	70.00 a	6.58 a	3.75 a	0.02 a	0.14 a
Surfactant (check)	0.00 b	0.00 b	0.00 b	16.43 c	6.40 c	0.08 ab	1.64 c
Water (control)r	0.00 b	0.00 b	0.00 b	17.43 c	6.95 c	0.10 c	1.88 c
C.V. (%)	83.09	57.72	54.54	11.54	10.57	33.38	35.02

[1/]Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by LSD

DAA = Days after application

Table 10 Inhibitory efficacy of essential oil from *H. suaveolens* (L.) Poit. on *M. diplotricha* C. Wright ex Sauvalle

H.suaveolens (L.) Poit (gE)	Number of died plant (%)			height (cm.)	Number of leaves dry weight/pl ())		Dry weight / plot (g)
	7 DAA	15 DAA	30 DAA				
100 gE + surfactant	98.75 a[1/]	98.75 a	98.75 a	2.50 a	2.00 a	0.04 a	0.04 a
200 gE + surfactant	100.00 a	100.00 a	100.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
Surfactant (check)	0.00 b	0.00 b	0.00 b	8.55 b	5.75 b	0.04 a	0.88 b
Water (control)r	0.00 b	0.00 b	0.00 b	9.03 b	5.35 b	0.05 a	1.07 b
C.V. (%)	2.52	2.52	2.52	52.44	61.74	120.81	29.14

[1/]Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by LSD

DAA = Days after application

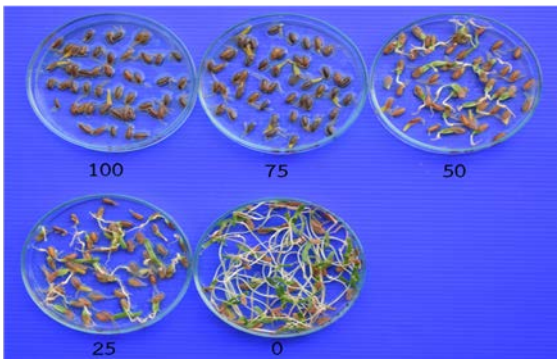


Figure 1 Germination of *M. pigra* L. in 0, 25, 50, 75 and 100 gE of essential oil from *H. suaveolens* (L.) Poit.

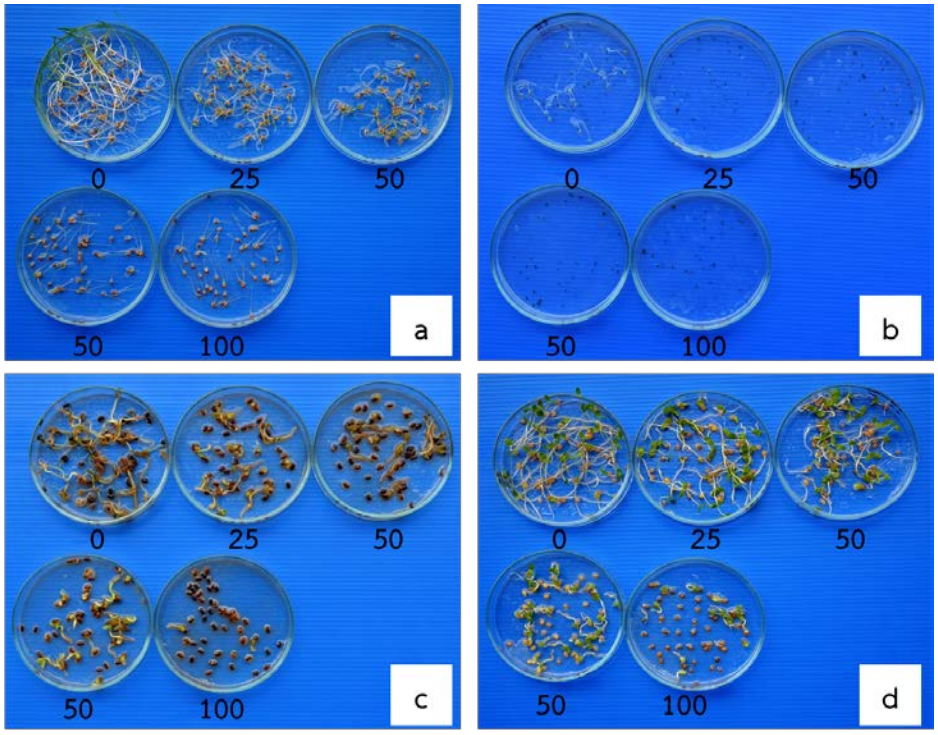


Figure 2 Germination of some weeds in 0, 25, 50, 75 and 100 gE of essential oil from *H. suaveolens* (L.) Poit.
(a) *E. crus-galli* (L.) P. Beauv. (b) *A. spinosus* L.
(c) *P. lathyroides* L. (d) *M. diplotricha* C. Wright ex Sauvalle.

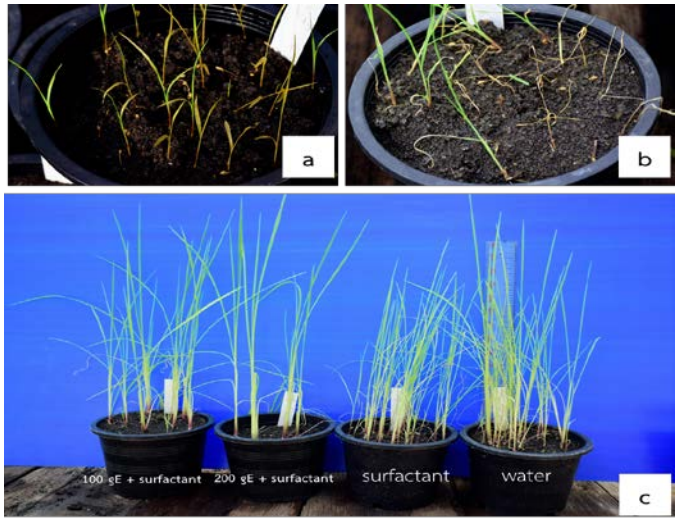


Figure 3 Symptom of *E. crus-galli* (L.) P. Beauv. after application with essential oil from *H. suaveolens* (L.) Poit.
(a) 1 DAA (b) 7 DAA (c) 30 DAA

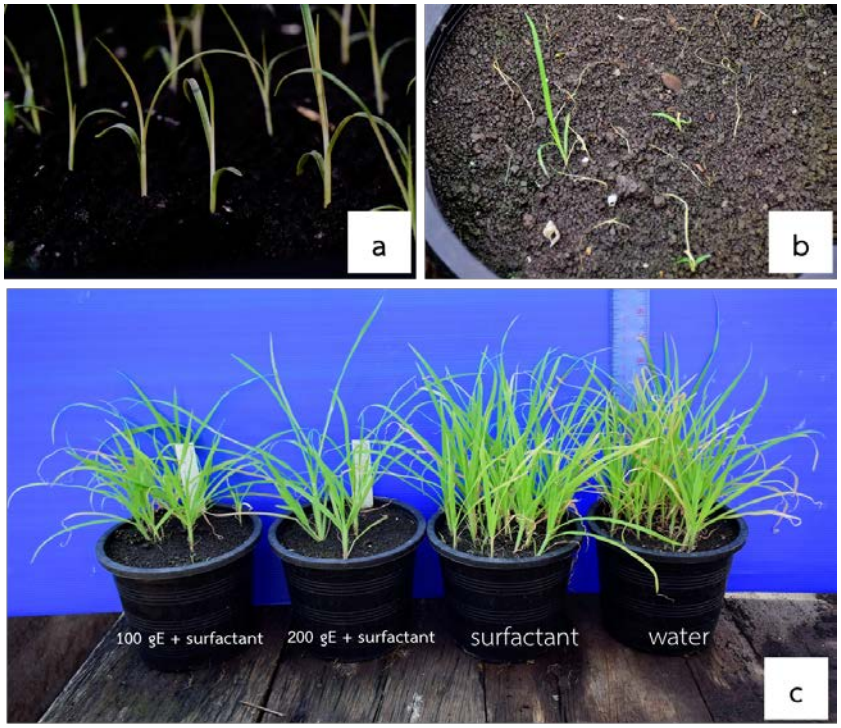


Figure 4 Symptom of *D. aegyptium* (L.) Willd after application with essential oil from *H. suaveolens* (L.) Poit.
(a) 1 DAA (b) 7 DAA (c) 30 DAA

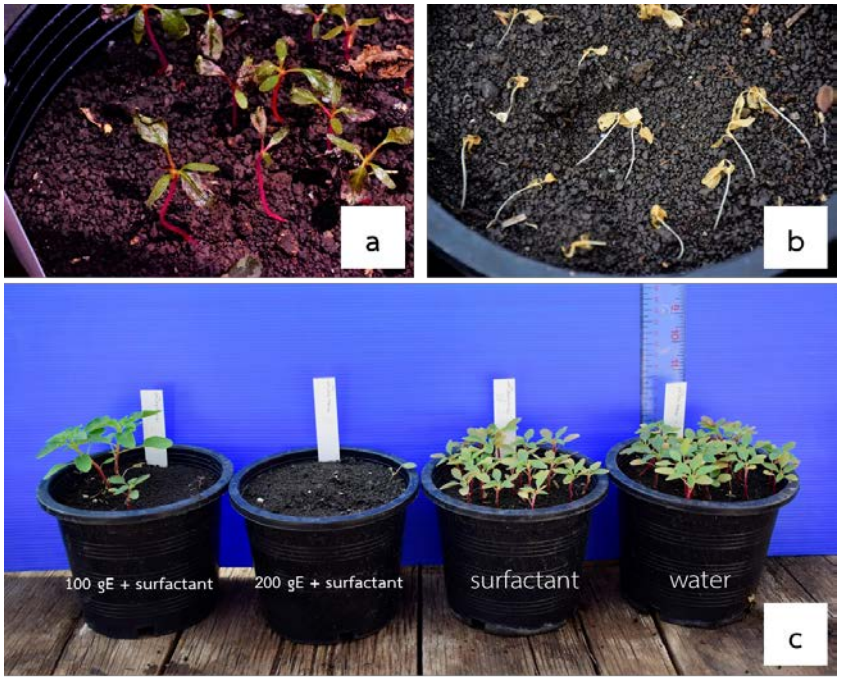


Figure 5 Symptom of *A. spinosus* L. after application with essential oil from *H. suaveolens* (L.) Poit.
(a) 1 DAA (b) 7 DAA (c) 30 DAA

Figure 6 Symptom of *P. lathyroides* L. after application with essential oil from *H. suaveolens* (L.) Poit.
(a) 7 DAA (b) 15 DAA (regrowth) (c) 30 DAA

Figure 7 Symptom of *M. diplotricha* C. Wright ex Sauvalle after application with essential oil from *H. suaveolens* (L.) Poit.
(a) 0 DAA (b) 7 DAA (c) 30 DAA

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลอง พบว่า ในห้องปฏิบัติการ น้ำมันหอมระเหยแมงลักป่าทุกอัตรามีผลต่อการงอกและการเจริญของไมยราบยักษ์ โดยที่อัตรา 100 กรัม สามารถยับยั้งการงอก การเจริญของรากและลำต้น ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีที่สุดคือ น้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากใบสด เมื่อนำไปทดสอบกับวัชพืช 4 ชนิด ได้แก่ หญ้าข้าวนก ผักโขมหนาม ถั่วผี และไมยราบเลื้อย พบว่า ที่อัตรา 100 กรัม สามารถยับยั้งการงอก และการเจริญเติบโตของพืชทดสอบส่วนใหญ่ได้ดีที่สุดเช่นกันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากอัตราอื่นๆ โดยในหญ้าข้าวนกยับยั้ง 94.96, 98.19 และ 96.92 เปอร์เซ็นต์ ถั่วผี 95.24, 87.75 และ 90.54 เปอร์เซ็นต์ และไมยราบเลื้อย 30.92, 90.24 และ 86.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ทุกอัตราของแมงลักป่าสามารถยับยั้งการงอก การเจริญของรากและลำต้นในผักโขมหนามได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดหยาบ พบว่า ใบสดสามารถยับยั้งการงอก และการเจริญของไมยราบยักษ์ได้ดีที่สุดเช่นกัน

การทดสอบประสิทธิภาพน้ำมันหอมระเหยแมงลักป่าในการควบคุมวัชพืช 5 ชนิด ได้แก่ หญ้าข้าวนก หญ้าปากควาย ผักโขมหนาม ถั่วผี และไมยราบเลื้อย ในกระถางสภาพเรือนทดลอง พบว่า หลังพ่นน้ำมันหอมระเหยเทียบเท่าสกัดจากแมงลักป่าอัตรา 100 กรัม และ 200 กรัม ใบพืชทดสอบส่วนใหญ่ที่ได้รับน้ำมันหอมระเหย มีอาการฉ่ำน้ำ ใบและลำต้นเปลี่ยนเป็นสีขาว หรือน้ำตาล และแห้งตายในที่สุด น้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่าอัตรา 200 กรัม มีประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืชดีที่สุด โดยเริ่มพบวัชพืชแห้งตาย 7 วันหลังพ่น และที่ 30 วันหลังพ่น พบการตายของหญ้าข้าวนก หญ้าปากควาย ผักโขมหนาม ถั่วผี และไมยราบเลื้อย 53.75, 90.00, 100.00, 70.00 และ 100.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีผลให้ ถั่วผี และไมยราบเลื้อย มีความสูง จำนวนใบ และน้ำหนักแห้งต่อกระถาง ลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีพ่นสารจับใบ และน้ำ

การทดสอบประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการ น้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตในพืชทดสอบได้ทุกชนิด แต่สามารถยั้งยับการงอกและการเจริญเติบโตในผักโขมหนามได้ดีที่สุด ซึ่งควรนำผลการทดลองดังกล่าวไปศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในสภาพเรือนทดลอง โดยพ่นน้ำมันหอมระเหยก่อนวัชพืชงอก เพื่อศึกษาว่าสามารถควบคุมวัชพืชในสภาพเรือนทดลองได้หรือไม่ ส่วนการพ่นน้ำมันหอมระเหยหลังวัชพืชงอก 2-3 ใบ ในสภาพเรือนทดลอง สามารถใช้ควบคุมพืชทดสอบได้ทุกชนิด โดยควบคุมได้ดีที่สุดในไมยราบเลื้อย แต่เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยเมื่อผสมกับน้ำทำให้เกิดการแยกตัวเป็นชั้น จึงใส่สารจับใบลงไปเพื่อให้น้ำมันหอมระเหยสามารถละลายได้ในน้ำ อย่างไรก็ตาม พบว่าน้ำมันหอมระเหยยังละลายได้ไม่ดี ดังนั้นเมื่อพ่นจึงทำให้น้ำมันหอมระเหยถูกใบพืชทดสอบเพียงบางส่วน แต่ไม่ถูกจุดเจริญ ทำให้ใบแห้งตาย แต่ใบที่เกิดใหม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ปกติ ดังนั้นจึงควรศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาให้สามารถใช้น้ำมันหอมระเหยให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืชสูงสุด

กิจกรรมย่อยที่ 2.2
วิจัยหากลุ่มสารสำคัญในสารสกัดจากแมงลักป่าในการควบคุมวัชพืช
Study on active substance group in *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. on Weed Control

ผู้วิจัย

ศิริพร สอนท่าโก พรรณีกา อัตตนนท์ ธนิตา ค่ำอำนวย อัณศยา พรมมา
Siriporn Sonthako Panneeka Attanon Thanita Kham-amnouy Ansaya Promma

บทคัดย่อ

การวิจัยหากลุ่มสารสำคัญในสารสกัดจากแมงลักป่าในการควบคุมวัชพืช ทำการศึกษาเก็บตัวอย่างแมงลักป่าจากจังหวัดกาญจนบุรี ช่วงเดือนพฤศจิกายน 2558– ธันวาคม 2559 นำมาแยกส่วนแบ่งตัวอย่างพืชเป็นแบบพืชสด แบบพืชตากแห้ง และพืชแบบต้นแห้ง การสกัดแมงลักป่าโดยใช้ต้นแห้งให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากที่สุด คือ 3.76 กรัมต่อกิโลกรัมพืช พบกลุ่มเทอร์พีนอยด์เป็นกลุ่มสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการสกัดจากส่วนต่างๆของแมงลักป่า สารที่พบมากและเป็นองค์หลักในน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่า คิดเป็นสัดส่วนร้อยละพื้นที่ที่ได้จากโครมาโทแกรม ได้แก่ Sabinene(1.58-18.32 เปอเซ็นต์), β-pinene(0.76-5.83 เปอเซ็นต์) 1,8-cineole(4.63-24.44 เปอเซ็นต์), trans-caryophyllene(8.45-30.64 เปอเซ็นต์), caryophyllene oxide(0-8.37 เปอเซ็นต์), abietatriene (2.15-9.83 เปอเซ็นต์) เป็นต้น เมื่อนำสาร Sabinene, 1,8-cineol, trans-caryophyllene ที่พบมาศึกษาการยับยั้งการงอกของวัชพืชเบื้องต้น พบว่าสาร 1,8-cineol สามารถยับยั้งการงอก ยับยั้งเจริญของราก และยับยั้งการเจริญของลำต้นของเมล็ดไมยราบยักษ์ ได้มากที่สุด เมื่อศึกษาผลของมันหอมระเหยที่ได้จากการสกัดใบดอกแมงลักป่าที่มีต่อการยับยั้งการงอก การเจริญของราก และลำต้นไมยราบยักษ์ในเบื้องต้น ควบคู่กับการวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของสาร Sabinene, 1,8-cineol, trans-caryophyllene พบว่าปริมาณความเข้มข้น Sabinene และ 1,8-cineol มีผลต่อการยับยั้งการงอก การเจริญของราก และลำต้นไมยราบยักษ์ อย่างไรก็ตามอาจมีสารสำคัญตัวอื่นๆที่อยู่ในน้ำมันหอมระเหยที่มีส่วนช่วยทำให้สามารถยับยั้งการงอกของวัชพืชได้เช่นกัน

คำสำคัญ : แมงลักป่า

บทนำ

โครงการวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติในพืช เป็นโครงการที่ขานรับนโยบายของรัฐบาล เรื่องวางกรอบแนวทางการปฏิรูปภาคเกษตร 7 ส่วน ส่งเสริมการลดต้นทุนการผลิต พร้อมพัฒนาโครงสร้างพื้นฐานทางการเกษตรเพื่อให้ชาวนามีชีวิตที่ดีขึ้น โดยการลดการใช้สารเคมี ซึ่งโครงการนี้สนับสนุนการลดการใช้สารเคมีในการผลิตพืชอาหารปลอดภัย เป็นโครงการวิจัยเพื่อหาสารธรรมชาติเพื่อลดหรือทดแทนสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช อีกทั้งเป็นแนวทางที่รวมถึงการใช้ปัจจัยการผลิตที่ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมคือ การผลิตสารธรรมชาติ โดยการใช้สารสกัดจากพืชเพื่อทดแทนสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นทางเลือกในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ซึ่งจะทำให้ผลผลิตทางการเกษตรมีคุณภาพ ปลอดภัยต่อการบริโภคและสิ่งแวดล้อมและเป็นการสนับสนุนให้

เกษตรกรใช้เป็นทางเลือกที่ดีและปลอดภัย ซึ่งเป็นไปตามยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 11 (พ.ศ.2555-2559) ยุทธศาสตร์ที่ 3 ความเข้มแข็งภาคเกษตร ความมั่นคงของอาหารและพลังงาน ในหัวข้อการพัฒนาทรัพยากรธรรมชาติที่เป็นฐานการผลิตภาคเกษตรให้เข้มแข็งและยั่งยืน และสอดคล้องกับนโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ (พ.ศ.2555-2559) ยุทธศาสตร์ที่ 2 การสร้างศักยภาพและความสามารถเพื่อพัฒนาทางเศรษฐกิจ กลยุทธการวิจัยที่ 1 สร้างมูลค่าผลผลิตทางการเกษตร และพัฒนาศักยภาพในการแข่งขันและพึ่งพาตนเองของสินค้าเกษตร แผนงานวิจัยที่ 1.6 การวิจัยเกี่ยวกับการผลิตอาหารปลอดภัยในประเด็นการบริหารสิ่งแวดล้อมและการพัฒนาคุณค่าของทรัพยากรธรรมชาติ การใช้ประโยชน์ทรัพยากรธรรมชาติอย่างเหมาะสมและยั่งยืน และการเชื่อมต่อภูมิปัญญาท้องถิ่นกับองค์ความรู้ใหม่ให้เกิดประโยชน์เชิงพาณิชย์และสาธารณะ นอกจากนั้นจากผลการประชุมสุดยอดอาเซียน-ญี่ปุ่น สมัยพิเศษ ระหว่างวันที่ 13-15 ธ.ค.2556 ได้มีถ้อยแถลงวิสัยทัศน์ว่าด้วยมิตรภาพและความร่วมมืออาเซียน-ญี่ปุ่น มีประเด็นที่เป็นหุ้นส่วนเพื่อความมั่งคั่งส่งเสริมความร่วมมือในด้านความปลอดภัยทางอาหาร

ปัญหาจากการเร่งผลผลิตทางการเกษตรโดยการขยายพื้นที่การเกษตร และการใช้สารเคมีอย่างไม่ถูกต้องและเกินความจำเป็นของเกษตรกร ทำให้มีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในปริมาณมากขึ้น ดังจะเห็นได้จากปริมาณการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่สูงขึ้น ในปี พ.ศ. 2551 มีปริมาณการนำเข้า109,969 ตันและในปี 2555 มีการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชปริมาณ 134,480 ตัน คิดเป็นมูลค่า 19,379 ล้านบาท ซึ่งมีปริมาณสารกำจัดวัชพืชสูงถึง 106,860 ตัน คิดเป็นมูลค่า 11,293 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2557) และในปี 2555 มีรายงานผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษจากสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชจากการทำงานและสิ่งแวดล้อม จำนวน 1,509 ราย อัตราป่วย 2.35 ต่อประชากรแสนคน นอกจากนี้ภาครัฐได้ส่งเสริมให้เกษตรกรหันมาทำเกษตรอินทรีย์หลังจากที่กลุ่มประเทศผู้นำเข้าสินค้าเกษตรของไทยเริ่มตรวจสอบคุณภาพสินค้าอย่างเข้มงวด เนื่องจากพบว่ามีสารเคมีปนเปื้อนซึ่งสร้างความเสียหายให้กับภาคเกษตรเป็นอย่างมาก เมื่อเร็วๆนี้ สหภาพยุโรปได้มีการแจ้งระเบียบการคณะกรรมการ (EU) ตามหมายเลข 212/2010 ของวันที่ 12 มีนาคม 2553 ให้มีการแก้ไขเพิ่มเติมในระเบียบการ (EC) หมายเลข 882/2004 มีการเพิ่มมาตรฐานความเข้มงวดในการควบคุมสินค้านำเข้าประเภทอาหารและอาหารสัตว์ที่ไม่ได้ทำจากเนื้อสัตว์ (พืช) รวมไปถึงการแจ้งเตือนในระบบการแจ้งเตือนเร่งด่วน (Rapid Alert System) สำหรับอาหารและอาหารสัตว์พบว่า ประเทศไทยยังคงมีการฝ่าฝืนกฎระเบียบอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่องของสารพิษตกค้างในผัก อาทิ ถั่วฝักยาว มะเขือยาว ผักในตระกูลกะหล่ำ เช่น ผักกาดขาว ที่ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกนั้นได้เพิ่มระดับการควบคุมอย่างเข้มงวดอีก 50% ทั้งการตรวจสอบลักษณะ (identity check) และทางกายภาพ (physical check).

จากสภาพปัญหาของการใช้สารเคมีทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคและการตกค้างของสารพิษในสิ่งแวดล้อม ส่งผลกระทบต่อภาคการส่งออกมากขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นมาแล้วในอดีต กำลังเกิดอยู่ในขณะนี้ และคาดว่าจะเกิดต่อไปในอนาคต จึงเป็นปัญหาเร่งด่วน ที่มีความจำเป็นต้องวิจัยหาสารธรรมชาติจากพืชเพื่อทดแทนหรือลดการใช้สารเคมี เพราะถ้าไม่ทำวิจัยปัญหานี้ก็จะขยายตัวและเกิดความรุนแรงมากยิ่งขึ้น ซึ่งการไม่ได้แก้ไขให้เป็นระบบอย่างจริงจัง ทำให้ประเทศไทยสูญเสียงบประมาณทางสาธารณสุข สถิติการเจ็บป่วยจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืช มีการประเมินว่าอาจมีจำนวนผู้ป่วยที่แท้จริงมากถึง 200,000-400,000 คนต่อปี และมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับปริมาณการนำเข้าสารเคมีในประเทศ นอกจากนี้ยังกระทบต่อ

เศรษฐกิจด้านการลงทุนและส่งออก ซึ่งปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยการใช้ความหลากหลายทางชีวภาพของพืชในประเทศ

ประเทศไทยมีพืชหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชและวัชพืช เช่น สะเดา หางไหล หรือ โล่ติ๊น หนอนตายหยาก สาบเสือ ซึ่งนักวิจัยสาขาเกษตร และสาขาอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องได้ทำการทดลองค้นคว้าหาสารทดแทนสารเคมีการเกษตร พบว่า สามารถนำเอาส่วนที่สำคัญต่างๆ เช่น ต้น ราก ใบ ดอก และผล มาสกัดเพื่อให้ได้สารสำคัญจากพืชนั้นๆ มาใช้ควบคุมศัตรูพืชแทนสารเคมีได้ดี โดยไม่มีพิษตกค้าง เนื่องจากสารธรรมชาติส่วนใหญ่จะสลายตัวได้เร็ว นอกจากนี้สารสกัดจากพืชยังมีสารที่เป็นองค์ประกอบอยู่มากมาย ซึ่งแมลงจะต้องใช้เวลานานมากในการสร้างความต้านทานต่อองค์ประกอบต่างๆในสารสกัดเหล่านั้น นอกจากพืชต่างๆเหล่านี้แล้ว ยังมีพืชและสมุนไพรอีกหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชและวัชพืชได้ แมงลักป่าหรือแมงลักคาหรือกะเพราผี (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) (กลุ่มวิจัยวัชพืช, 2555) เป็นวัชพืชชนิดหนึ่งที่มีแนวโน้มว่ามีศักยภาพในการควบคุมวัชพืช โดยชอุ่มและศิริพร(2550) รายงานว่าการสกัดสารจากแมงลักป่าด้วยน้ำมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของหญ้าข้าวนกได้ และการพ่นสารสกัดแมงลักป่าก่อนวัชพืชงอก 7 วัน ทำให้ผักโขมหนามมีความสูงลดลง 10 เปอเซ็นต์ และที่ 4 สัปดาห์หลังพ่นสารฯ ผักเบี้ยหินมีน้ำหนักแห้งลดลง 15 เปอเซ็นต์ (ชอุ่มและศิริพร, 2551) นอกจากนี้ศิริกันยา (2544) พบว่าสารสกัดกระเพราผีเทียบเท่าน้ำหนักแห้ง 10.00 กรัม มีประสิทธิภาพในการควบคุมแห้วหมูก่อนงอกและแห้วหมูที่งอกแล้วใกล้เคียงกับอิมาเซทาไพร์ 90 เปอเซ็นต์ แมงลักคาเป็นพืชสมุนไพร ใช้รักษาอาการติดเชื้อในทางเดินอาหาร เกร็งปวด และ อาการผิวหนังติดเชื้อ แมงลักคามีฤทธิ์แรงต่อเชื้อราในโรงเก็บอาหาร (Mishra and Dubey, 1994) มีฤทธิ์ต้าน bacteria ทั้ง gram-negative และ gram-positive (Asekun et al.,1999; Nantitanon et al., 2007) ควบคุม เพลี้ย *Aphis gossypil* Glov. และ *Orthaga* sp. (กนก อุไรสกุล, 2540) ควบคุม American ballworms (*Heliothis armigera* Hubn.) (รัชดาภรณ์ พิทักษ์ธรรม, 2544) แมลงในโรงเก็บผลิตผล (Palsson and Jaeson, 1999) สารสกัดจากแมงลักคาด้วยไอน้ำและปิโตรเลียมอีเธอร์มีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าแมลงชนิดเพลี้ยอ่อนของพริกและหนอนห่อใบมะม่วง (ทวีศักดิ์และคณะ, 2540) ประชาชนพื้นเมืองในหลายพื้นที่ของโลกใช้ใบแมงลักคารมไฟให้เกิดควันไล่แมลง (Aycard et al., 1993) ใน essential oil สกัดจากแมงลักคามีสารประกอบหลักคือ 1,8-cineole, β-pinene, sabinene, β-caryophyllene, α-pinene, 4-terpinenol, α-berganmotene, limonene, bicyclogermacrene, β-phellandrene and, α-copaene, β-elemene, and eugenol จากการศึกษาค้นคว้าจากเอกสารงานวิจัยต่างๆ พบว่าพืชมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ควบคุมและกำจัดแมลงต่างๆได้ อีกทั้งแมงลักป่ายังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของวัชพืชบางชนิดได้

โครงการวิจัยนี้จึงเป็นโครงการวิจัยที่สนับสนุนนโยบายของรัฐบาลในการลดการใช้ สารเคมีการเกษตรและส่งเสริมให้มีการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังส่งเสริมการใช้พืชท้องถิ่นของไทยซึ่งมีจำนวนมากและหลากหลายมาทำให้เป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชท้องถิ่นของไทย และสามารถแข่งขันทางด้านพัฒนาวิจัยสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่

เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมกับประเทศในอาเซียนสำหรับการเข้าสู่เออีซี(ASEAN Economic Community : AEC)

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องแก้ว ได้แก่ Volumetric flask, Pipette, Flat bottom flask, Glass cylinder และ Beaker
2. สารเคมี ได้แก่ Methanol(LC grade), Hexane(AR grade), Ethanol(AR grade), Anhydrous sodium sulfate(AR grade)
3. สารมาตรฐาน ได้แก่ 1,8-cineol, trans-caryophyllene, Sabinene
4. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่อง Ultrasonic bath, เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 และ 2 ตำแหน่ง, เครื่องลดปริมาตร Rotary Evaporator และเครื่อง Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

วิธีการ

1. สำรวจ เก็บตัวอย่างพืชแมงลักป่า และการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่า โดยวิธีการกลั่นแบบHydro-stream Distillation

สำรวจตัวอย่างแมงลักป่าที่จังหวัดกาญจนบุรี และเก็บตัวอย่างพืชเพื่อใช้สำหรับสกัดน้ำมันหอมระเหย โดยทำการเก็บตัวอย่างทั้งต้น นำตัวอย่างมาทำการแยกแต่ละส่วนของพืชโดยแบ่งเป็น 1) ใบและดอก 2) ใบ 3) กิ่งและลำต้น และแบ่งตัวอย่างพืชเป็นแบบพืชสด แบบพืชตากแห้ง และพืชแบบต้นแห้ง เพื่อศึกษาปริมาณน้ำมันแต่ละส่วน ทำการสับตัวอย่างพอละเอียด ชั่งตัวอย่างและบันทึกน้ำหนัก นำมากลั่นแบบ Hydro-stream Distillation เป็นเวลา 3 ชั่วโมง บันทึกปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ แล้วนำน้ำมันหอมระเหยมากรอง ทำให้บริสุทธิ์ กรองผ่าน Anhydrous Sodium sulfate เก็บข้อมูลปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ได้

2. ศึกษาสารสำคัญในสารสกัดจากแมงลักป่านำสารสกัดจากแมงลักป่ามาศึกษาหากลุ่มสารสำคัญและวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเครื่อง GC-MS

เตรียมสารมาตรฐาน Sabinene,1,8-cineol, trans-caryophyllene, ที่มีระดับความเข้มข้น 50, 100, 250, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เจือจางด้วยเมทานอล และเตรียมตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่า ให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐาน แล้วเจือจางด้วยตัวทำลายเมทานอล กรองด้วย filter membrance ขนาด 0.22 ไมครอน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้สำหรับศึกษาหาสารกลุ่มสารสำคัญ

3. ศึกษาสาร Sabinene, 1,8-cineol, trans-caryophyllene, ที่พบในน้ำมันหอมระเหย ที่มีต่อการยับยั้งการงอกเมล็ดวัชพืช

3.1 เตรียมตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบดอกแบบสด ตากแห้ง และต้นแห้ง ให้มีปริมาณน้ำมัน 25, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัม

3.2 เตรียมสารสำคัญ ได้แก่ 1,8-cineol, trans-caryophyllene, Sabinene ให้มีปริมาณน้ำมันสารละ 25, 50, 75 และ 100 กรัม

3.3 เตรียมเมล็ดไมยราบยักษ์ นำเมล็ดแช่ในน้ำร้อน และปล่อยให้เย็นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 12 ชั่วโมง เลือกเมล็ดพองเต่ง ไม่มีร่องรอยแมลงกัดกิน จำนวน 50 เมล็ด ใส่ในจานแก้วที่ใส่สารสกัดจาก

ส่วนต่างๆ จากข้อ 3.1 และ 3.2 ของแมงลักป่าที่เตรียมไว้ เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปิดฝา วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกจำนวนเมล็ดงอก สุ่มวัดความยาวรากและต้น จำนวนซ้ำละ 10 ต้น หลังเริ่มทดลอง 7 วัน นำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่าเฉลี่ย และนำค่าเฉลี่ยไปคำนวณประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกและการเจริญ

ระยะเวลา ตุลาคม 2558 ถึง กันยายน 2559
สถานที่ กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ
กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลอง

1. สำรวจ เก็บตัวอย่างพืชแมงลักป่า และการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่า โดยวิธีการกลั่นแบบ Hydro-Distillation

สำรวจตัวอย่างและเก็บตัวอย่างแมงลักป่าที่จังหวัดกาญจนบุรี ช่วงเดือน พฤศจิกายน 2258-สิงหาคม 2559 นำมาแยกแต่ละส่วนของพืชโดยแบ่งเป็น 1) ใบและดอก 2) ใบ 3) กิ่งและลำต้น และแบ่งตัวอย่างพืชเป็นแบบพืชสด แบบพืชตากแห้ง และพืชแบบต้นแห้ง นำตัวอย่างมาสับ แล้วทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการกลั่นแบบ Hydro-Distillation จากตารางที่ 1 พบว่าปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากส่วนของใบและดอก ให้ปริมาณมากที่สุดคือพืชสด 1.60 กรัมต่อกิโลกรัม พืชตากแห้ง 1.32 กรัมต่อกิโลกรัม พืชต้นแห้ง 3.76 กรัมต่อกิโลกรัม และส่วนของพืชจากกิ่งและลำต้น มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยน้อยที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันหอมระเหยเฉพาะส่วนของใบและดอก วิธีการสกัดพืชโดยใช้พืชแบบต้นแห้งให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยเฉลี่ยมากที่สุดคือ 3.76 กรัมต่อกิโลกรัม เห็นได้ว่าการสกัดน้ำมันหอมระเหยแต่ละส่วนให้ปริมาณที่แตกต่างกัน รวมทั้งขั้นตอนการสกัดแบบสดและแห้งมีผลต่อปริมาณน้ำมันที่ได้เช่นกัน

2. ศึกษาสารสำคัญในสารสกัดจากแมงลักป่านำสารสกัดจากแมงลักป่ามาศึกษาหากลุ่มสารสำคัญและวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเครื่อง GC-MS

จากการศึกษาสภาวะสำหรับการหาสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหย โดยการเก็บตัวอย่างพืชแมงลักป่ามาจากแหล่งที่เดียวกัน คือบริเวณจังหวัดกาญจนบุรี มาศึกษาปริมาณสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหย โดยแยกเป็นส่วนของดอกใบ(เนื่องจากดอกไม่สามารถแยกจากใบได้) และส่วนใบ(ซึ่งเป็นระยะที่พืชยังไม่ออกดอก)ของพืชแมงลักป่า นำพืชทั้งแบบสด ตากแห้ง และต้นแห้ง มาศึกษาชนิดและปริมาณสารประกอบในน้ำมันหอมระเหย ทำให้ได้สภาวะเหมาะสมที่ใช้ในการหาสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่าโดยใช้เครื่องGC-MS ได้สภาวะที่เหมาะสมในการศึกษา คือ

Column : Optima-5MS-0.25 um, 30 m x 0.25 mm ID
Carrier gas : Helium (1.0 ml/min)
Injector temperature : 280°C
Detector temperature : 280°C
Programming : 50°C – 250°C ที่ 5°C/min, hold 15 min

จากสภาวะดังกล่าวเมื่อนำตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยมาวิเคราะห์ทำให้ได้โครมาโทแกรมตามรูปที่ 1-5 และจากตารางที่ 2 ได้ศึกษาการสกัดน้ำมันส่วนดอกใบแบบสด แบบแห้ง แบบต้นแห้ง และส่วนของใบแบบสด แบบแห้ง พบกลุ่มสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยของแมงลักป่า 30-40 ชนิด เป็นกลุ่มเทอร์พีนอยด์ ได้แก่ เทอร์พีนอยด์ชนิด monoterpenes, sesquitterpenes, diterpenes

และกลุ่มอื่นๆ เป็นองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยของแมงลักป่า กลุ่มสารเทอร์พีนอยด์ (terpenoids) หรือ terpenes เป็นสารที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ เทอร์พีนอยด์ ประกอบด้วยหน่วยที่เล็กที่สุด เรียกว่า isoprene unit ซึ่งเป็น branch chain ของคาร์บอน 5 อะตอม และมีพันธะคู่ 2 ตำแหน่ง ชนิดของเทอร์พีนอยด์แบ่งตาม isoprene unit ที่มาประกอบเป็นเทอร์พีนอยด์ (นพมาศ, 2544) สำหรับชนิดของเทอร์พีนอยด์ที่พบมากและเป็นองค์ประกอบหลักมีปริมาณสูงในน้ำมันหอมระเหยแมงลักป่าคือ เทอร์พีนอยด์ชนิด monoterpenes, sesquitterpenes และditerpenes ซึ่งสารที่พบปริมาณมากจากส่วนต่างของแมงลักป่า คิดเป็นสัดส่วนร้อยละพื้นที่ที่ได้จากโครมาโทแกรม จัดเป็นกลุ่ม monoterpenes ได้แก่ Sabinene(1.58-18.32 เปอเซ็นต์), β-pinene(0.76-5.83 เปอเซ็นต์) และ 1,8-cineole(4.63-24.44 เปอเซ็นต์) เป็นต้น กลุ่ม sesquitterpenes ได้แก่ trans-caryophyllene(8.45-30.64 เปอเซ็นต์), caryophyllene oxide(0-8.37 เปอเซ็นต์) เป็นต้น และกลุ่ม diterpenes ได้แก่ abietatriene (2.15-9.83 เปอเซ็นต์) เป็นต้น

3. ศึกษาสาร Sabinene,1,8-cineol, trans-caryophyllene, ที่พบในน้ำมันหอมระเหย ที่มีต่อการยับยั้งการงอกเมล็ดวัชพืช

เมื่อนำสาร Sabinene,1,8-cineol, trans-caryophyllene ที่พบในน้ำมันหอมระเหยซึ่งเป็นองค์ประกอบ และคาดว่าจะมีผลต่อการยับยั้งการงอกของวัชพืช มาทดสอบเบื้องต้นกับเมล็ดไมยราบยักษ์ ได้แก่สาร sabinene, 1,8-cinole และ trans-caryophyllene จากตารางที่ 3 เห็นได้ว่าสารทั้ง 3 ชนิดมีผลต่อการยับยั้งการงอกของเมล็ดไมยราบยักษ์ แต่ให้ผลการยับยั้งมากน้อยที่ต่างกัน ซึ่งสารที่สามารถยับยั้งการงอกมากที่สุดคือ 1,8-cineole ร้อยละ 80.81 ที่ปริมาณสาร 100 กรัม สารที่สามารถยับยั้งการเจริญของรากที่สุด คือ 1,8-cineole ร้อยละ 69.19 ที่ปริมาณสาร 100 กรัม และสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของลำต้นมากที่สุด คือ 1,8-cineole ร้อยละ 73.25 ที่ปริมาณสาร 100 กรัม

จากตารางที่ 4 ทดสอบน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการสกัดใบดอก โดยใช้พืชสด ตากแห้ง และต้นแห้ง ของแมงลักป่า ที่มีผลต่อการยับยั้งการงอก การเจริญของราก และลำต้นไมยราบยักษ์ในเบื้องต้น ซึ่งใบดอกแบบต้นแห้งสามารถยับยั้งการงอกมากที่สุดคือ ร้อยละ 96.25 ที่ปริมาณน้ำมัน 100 มิลลิกรัม ใบดอกแบบต้นแห้งสามารถยับยั้งการเจริญของรากมากที่สุดคือ ร้อยละ 100.00 ที่ปริมาณน้ำมัน 100 มิลลิกรัม ใบดอกแบบต้นแห้งสามารถยับยั้งการเจริญของลำต้นมากที่สุดคือ ร้อยละ 100.00 ที่ปริมาณน้ำมัน 100 มิลลิกรัม

เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการสกัดดอกใบ(พืชสด ตากแห้ง และตากแห้ง) มาวิเคราะห์หาปริมาณที่แน่นอนของสาร จากการวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของสารในตารางที่ 5 พบ sabinene, 1,8-cineole และ trans-caryophyllene ส่วนใบดอกของแมงลักป่า (สด) ได้ปริมาณความเข้มข้นร้อยละ 10.35, 15.20, 9.19 ตามลำดับ ใบดอก(ตากแห้ง) ร้อยละ 2.27, 5.40, 22.80 ตามลำดับ และใบดอก(ต้นแห้ง) ร้อยละ 21.03, 25.21, 3.22 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาตารางที่ 4 พร้อมกับผลที่ได้จากตารางที่ 5 น้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการสกัดใบดอก โดยใช้พืชสด ตากแห้ง และต้นแห้ง ของแมงลักป่า ที่มีผลต่อการยับยั้งการงอก การเจริญของราก และลำต้นไมยราบยักษ์ในเบื้องต้นกับผลการวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของ sabinene, 1,8-cineole และ trans-caryophyllene จะเห็นได้ว่าเมื่อมีปริมาณความเข้มข้นของ sabinene และ 1,8-cineole ในน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการสกัดส่วนใบดอกมีปริมาณที่สูง จะมีผลต่อการยับยั้งการงอก การเจริญของรากและลำต้นไมยราบยักษ์เพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณความเข้มข้นของ trans-caryophyllene ให้ผลการยับยั้ง

การงอก การเจริญของราก และลำต้นของไมยราบยักษ์ในลักษณะตรงข้ามกัน เมื่อความเข้มข้นของ trans-caryophyllene สูง ให้ผลการยับยั้งการงอกต่ำ แสดงว่า sabinene และ 1,8-cineole ที่อยู่ในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ขนิด monoterpenes มีผลต่อการยับยั้งการงอก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kordali et al. (2007) ที่พบว่ากลุ่ม monoterpenes มีต่อผลการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้า และสอดคล้องกับงานวิจัย Qui et al. (2010) รายงานว่าอัตราการงอกของเมล็ดลดลงเมื่อความเข้มข้นของ 1,8-cineole เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ในน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่ายังมีสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์หลายชนิด ซึ่งสารเหล่านั้นอาจส่งต่อการยับยั้งการงอกของวัชพืช

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การวิจัยหากลุ่มสารสำคัญในสารสกัดจากแมงลักป่าในการควบคุมวัชพืช โดยเก็บตัวอย่างแมงลักป่านำมาแยกส่วนแบ่งตัวอย่างพืชเป็นแบบพืชสด แบบพืชตากแห้ง และพืชแบบต้นแห้ง สกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการกลั่นแบบ Hydro-stream Distillation การเก็บตัวอย่างแมงลักป่าแบบต้นแห้งจะให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากที่สุด เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยของส่วนต่างๆของแมงลักป่ามาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS พบสารสำคัญในกลุ่มของเทอร์พีนอยด์ 30-40 ชนิด ซึ่งสารที่พบมากและเป็นองค์หลักในน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่า คิดเป็นสัดส่วนร้อยละพื้นที่ที่ได้จากโครมาโทแกรม ได้แก่ Sabinene(1.58-18.32 เปอเซ็นต์), β-pinene(0.76-5.83 เปอเซ็นต์) 1,8-cineole(4.63-24.44 เปอเซ็นต์), trans-caryophyllene(8.45-30.64 เปอเซ็นต์), caryophyllene oxide(0-8.37 เปอเซ็นต์), abietatriene (2.15-9.83 เปอเซ็นต์) เป็นต้น เมื่อนำสาร Sabinene, 1,8-cineol, trans-caryophyllene ที่คาดว่ามีผลต่อการยับยั้งการงอกของวัชพืชในเบื้องต้น พบว่าสาร 1,8-cineol สามารถยับยั้งการงอก ยับยั้งเจริญของราก และยับยั้งการเจริญของลำต้นไมยราบยักษ์ ได้มากที่สุด เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการสกัดใบดอก มาศึกษาผลต่อการยับยั้งการงอก การเจริญของรากและลำต้นไมยราบยักษ์ในเบื้องต้นเช่นกัน และวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของสาร Sabinene, 1,8-cineol, trans-caryophyllene ผลการยับยั้งการงอก การเจริญของราก และลำต้นไมยราบยักษ์สูง เมื่อมีปริมาณความเข้มข้น Sabinene และ 1,8-cineol มาก ซึ่งผลการยับยั้งการงอกของวัชพืชนี้อาจมีสารเทอร์พีนอยด์ชนิดอื่นๆในน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่าที่มีส่วนช่วยในการยับยั้งการงอกของวัชพืช ซึ่งอาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

กิจกรรมย่อยที่ 2.3

วิจัยสูตรและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดจากแมงลักป่าเพื่อการควบคุมวัชพืช

Formulation and Efficacy of Extract from *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. on Weed Control

ผู้วิจัย

ศิริพร สอนท่าโก พรรณีกา อัตตนนท์ ธนิตา ค่ำอำนวย

อัณศยา พรมมา ธัญชนก จงรักไทย

Siriporn Sonthako Panneeka Attanon Thanita Kham-amnouy

Ansaya Promma Tanchanok Jongrukthai

บทคัดย่อ

การวิจัยสูตรและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดจากแมงลักป่าเพื่อการควบคุมวัชพืช เก็บแมงลักป่า จากจังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดราชบุรี ใช้ดอกและใบ สกัดด้วยวิธี Hydrodistillation นำน้ำมันหอมระเหยที่ได้มาทดลองผสมตัวทำละลาย สารอิมัลซิไฟเออร์ สารลดแรงตึงผิว และสารเติมแต่งชนิดต่างๆ ปรับอัตราส่วนของสารต่างๆให้เหมาะสม โดยทำเป็นสูตรสารละลายน้ำมันเข้มข้น (Emulsifiable concentrate : EC) ซึ่งเป็นรูปแบบที่ใช้ผสมน้ำ ได้สูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันหอมระเหยจากแมงลัก 4 สูตร ดังนี้ สูตร A, B, C และ D โดยสูตร A, B และ D เป็นสูตรผลิตภัณฑ์ 40 %EC และสูตร C เป็นสูตรผลิตภัณฑ์ 20%EC แต่ละสูตรที่ละลายน้ำให้สารละลายสีขาวขุ่น ทดสอบความคงสภาพของปริมาณสารหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหยโดยการอบที่อุณหภูมิที่ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าความร้อนมีผลต่อสาร sabinene, 1,8-cineole และ trans-caryophyllene ทำให้ปริมาณสารลดลง จากการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ สูตรที่เหมาะสม คือ สูตร A และ B ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้ยับยั้งการงอก การเจริญของรากและลำต้นได้ทั้งเมล็ดไมยราบยักษ์(ใบกว้าง)และเมล็ดหญ้าข้าวนก(ใบแคบ)ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ คือควรใช้ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ : แมงลักป่า สารสกัด

Abstract

The research of formulation and efficacy of essential oil from *Hyptis suaveolens*(L.) Poit. on weed control. The sample collected from Kanchanaburi and Ratchaburi province. Essential oil from flowers and leave of *Hyptis suaveolens*(L.) Poit were extracted by Hydrodistillation method. Essential oil mixed by solvent, emulsifier, surfactant and additive solvent and adjust suitable ratio. The formulation has four product were A B C and D formulation which were emulsifiable concentrate formulation can be dissolved with water. The formulation were A B and D concentrated 40%EC but formulation C concentrated 20%EC. The stability of the main constituents found in the essential oils by baking at 54 $^{\circ}$C for 2 weeks showed

that the heat affected sabinene, 1,8-cineole and trans-caryophyllene. Reduce the amount of substance. The efficiency effect of the products were also tested on germinate inhibition, shoot length inhibition and root length inhibition of giant mimosa (*Mimosa pigra* L.) and barnyard grass *(Echinochloa crus-galli* (L.)) in lab condition and the optimum concentration was evaluated. The results show that formulation A and B at concentration of 10% can inhibit germination, seedling growth and stem length.

Key words : *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., Plant extract

บทนำ

การเร่งผลผลิตทางการเกษตรโดยการขยายพื้นที่การเกษตร และการใช้สารเคมีอย่างไม่ถูกต้องและเกินความจำเป็นของเกษตรกร ทำให้มีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในปริมาณมากขึ้น เห็นได้จากปริมาณการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่สูงขึ้น ในปี พ.ศ. 2551 มีปริมาณการนำเข้า109,969 ตันและในปี 2555 มีการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชปริมาณ 134,480 ตัน คิดเป็นมูลค่า 19,379 ล้านบาท ซึ่งมีปริมาณสารกำจัดวัชพืชสูงถึง 106,860 ตัน คิดเป็นมูลค่า 11,293 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) และในปี 2555 มีรายงานผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษจากสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชจากการทำงานและสิ่งแวดล้อม จำนวน 1,509 ราย อัตราป่วย 2.35 ต่อประชากรแสนคน นอกจากนี้ภาครัฐได้ส่งเสริมให้เกษตรกรหันมาทำเกษตรอินทรีย์หลังจากที่กลุ่มประเทศผู้นำเข้าสินค้าเกษตรของไทยเริ่มตรวจสอบคุณภาพสินค้าอย่างเข้มงวด เนื่องจากพบว่ามีสารเคมีปนเปื้อนซึ่งสร้างความเสียหายให้กับภาคเกษตรเป็นอย่างมาก สหภาพยุโรปได้มีการแจ้งระเบียบการคณะกรรมการ (EU) ตามหมายเลข 212/2010 ของวันที่ 12 มีนาคม 2553 ให้มีการแก้ไขเพิ่มเติมในระเบียบการ (EC) หมายเลข 882/2004 มีการเพิ่มมาตรฐานความเข้มงวดในการควบคุมสินค้านำเข้าประเภทอาหารและอาหารสัตว์ที่ไม่ได้ทำจากเนื้อสัตว์ (พืช) รวมไปถึงการแจ้งเตือนในระบบการแจ้งเตือนเร่งด่วน (Rapid Alert System) สำหรับอาหารและอาหารสัตว์พบว่า ประเทศไทยยังคงมีการฝ่าฝืนกฎระเบียบอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่องของสารพิษตกค้างในผัก อาทิ ถั่วฝักยาว มะเขือยาว ผักในตระกูลกะหล่ำ เช่น ผักกาดขาว ที่ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกนั้นได้เพิ่มระดับการควบคุมอย่างเข้มงวดอีก 50 เปอร์เซ็นต์ ทั้งการตรวจสอบลักษณะ (identity check) และทางกายภาพ (physical check). สถิติการเจ็บป่วยจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืช มีการประเมินว่าอาจมีจำนวนผู้ป่วยที่แท้จริงมากถึง 200,000-400,000 คนต่อปี และมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับปริมาณการนำเข้าสารเคมีในประเทศ นอกจากนี้ยังกระทบต่อเศรษฐกิจด้านการลงทุนและส่งออก ซึ่งปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยการใช้ความหลากหลายทางชีวภาพของพืชในประเทศ

พืชและสมุนไพรหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชและวัชพืชได้ แมงลักป่าหรือแมงลักคาหรือกะเพราผี (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) (กลุ่มวิจัยวัชพืช, 2555) เป็นวัชพืชชนิดหนึ่งที่มีแนวโน้มว่ามีศักยภาพในการควบคุมวัชพืช โดย ชอุ่มและศิริพร (2550) รายงานว่าการสกัดสารจากแมงลักป่าด้วยน้ำมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของหญ้าข้าวนกได้ และการพ่นสารสกัดแมงลักป่าก่อนวัชพืชงอก 7 วัน ทำให้ผักโขมหนามมีความสูงลดลง 10 เปอร์เซ็นต์ และที่ 4 สัปดาห์หลังพ่นสารฯ ผักเบี้ยหินมีน้ำหนักแห้งลดลง 15 เปอร์เซ็นต์ (ชอุ่มและศิริพร, 2551)

นอกจากนี้ ศิริกันยา (2544) พบว่าสารสกัดกระเพราผีเทียบเท่าน้ำหนักแห้ง 10.00 กรัม มีประสิทธิภาพในการควบคุมแห้วหมูก่อนงอกและแห้วหมูที่งอกแล้วใกล้เคียงกับอิมาเซทาไพร์ 90 เปอร์เซ็นต์ แมงลักคา เป็นพืชสมุนไพร ใช้รักษาอาการติดเชื้อในทางเดินอาหาร เกร็งปวด และอาการผิวหนังติดเชื้อ แมงลักคามีฤทธิ์แรงต่อเชื้อราในโรงเก็บอาหาร (Mishra and Dubey, 1994) มีฤทธิ์ต้าน bacteria ทั้ง gram-negative และ gram-positive (Asekun *et al.*,1999; Nantitanon *et al*., 2007) ควบคุม เพลี้ย *Aphis gossypil* Glov. และ *Orthaga* sp. (กนก, 2540) ควบคุม American ballworms (*Heliothis armigera* Hubn.) (รัชดาภรณ์, 2544) แมลงในโรงเก็บผลิตผล (Palsson and Jaeson, 1999) สารสกัดจากแมงลักคาด้วยไอน้ำและปิโตรเลียมอีเธอร์มีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าแมลงชนิดเพลี้ยอ่อนของพริกและหนอนห่อใบมะม่วง (ทวีศักดิ์และคณะ, 2540) ประชาชนพื้นเมืองในหลายพื้นที่ของโลกใช้ใบแมงลักคารมไฟให้เกิดควันไล่แมลง (Aycard *et al*., 1993) ใน essential oil สกัดจากแมงลักคามีสารประกอบหลักคือ 1,8-cineole, β-pinene, sabinene, β-caryophyllene, α-pinene, 4-terpinenol, α-berganmotene, limonene, biclyclogermacrene, β - phellandrene, α-copaene, β -elemene, และ eugenol

จากการศึกษาค้นคว้าจากเอกสารงานวิจัยต่างๆ พบว่าพืชมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ควบคุมและกำจัดแมลงต่างๆได้ อีกทั้งแมงลักป่ายังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของวัชพืชบางชนิดได้ งานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยที่สนับสนุนการลดการใช้ สารเคมีการเกษตร และส่งเสริมให้มีการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชและวัชพืชที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งเป็นการส่งเสริมการใช้พืชท้องถิ่นของไทยซึ่งมีจำนวนมากและหลากหลายมาทำให้เป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชท้องถิ่นของไทย

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องแก้ว ได้แก่ Volumetric flask, Pipette, Flat bottom flask, Glass cylinder, Beaker และ จานแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เป็นต้น
2. สารเคมี ได้แก่ Methanol (LC grade), Anhydrous sodium sulfate (AR grade) และวุ้น เป็นต้น
3. สารมาตรฐาน ได้แก่ 1,8-cineol, trans-caryophyllene, sabinene
4. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Satorius รุ่น AC211S, เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Satorius รุ่น CP3202S และเครื่อง Gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) ยี่ห้อ Agilent รุ่น 6890N

วิธีการ

1. การเตรียมสารสกัดจากแมงลักป่า

ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างแมงลักป่า บริเวณจังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดราชบุรี โดยเก็บตัวอย่างทั้งต้น นำพืชมาแยกส่วน โดยใช้ส่วนดอกและใบ เนื่องจากให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากที่สุด นำส่วนของพืชมาทำการสับตัวอย่างพอละเอียด นำมากลั่นแบบ Hydrodistillation เป็นเวลา 3

ชั่วโมง นำน้ำมันหอมระเหยที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยกรองผ่าน Anhydrous Sodium sulfate นำมาวิเคราะห์สารหลักที่พบมากในน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่า

2. วิจัยสูตรผลิตภัณฑ์สารสกัดแมงลักป่า

นำน้ำมันหอมระเหยที่ได้มาทดลองผสมตัวทำละลาย สารอิมัลซิไฟเออร์ สารลดแรงตึงผิว และสารเติมแต่งชนิดต่างๆ ปรับอัตราส่วนของสารต่างๆให้เหมาะสม โดยทำเป็นสูตรสารละลายน้ำมันเข้มข้น (Emulsifiable concentrate : EC) ซึ่งเป็นรูปแบบที่เป็นสารละลายสำหรับผสมน้ำ เมื่อได้สูตรผลิตภัณฑ์ แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญของตัวอย่างสูตรผลิตภัณฑ์จากแมงลักป่าและทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นต่อการงอกของวัชพืชในห้องปฏิบัติการ

3. ทดสอบการคงสภาพของสูตรผลิตภัณฑ์แมงลักป่า

เตรียมตัวอย่างสูตรผลิตภัณฑ์แมงลักป่า วิเคราะห์หาปริมาณของกลุ่มสารสำคัญและคุณสมบัติทางกายภาพ ทำการทดสอบการคงสภาพผลิตภัณฑ์โดยความร้อนเป็นตัวเร่ง นำตัวอย่างสูตรผลิตภัณฑ์เก็บในตู้อบที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญก่อนและภายหลังใช้ความร้อนเป็นตัวเร่ง ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกการเจริญของรากและลำต้นของวัชพืช(เมล็ดไมยราบยักษ์)ก่อนและหลังอบ

4. ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสูตรผลิตภัณฑ์ต่อประสิทธิภาพการงอกของวัชพืชในห้องปฏิบัติการ

เตรียมตัวอย่างสูตรผลิตภัณฑ์แมงลักป่า แล้วนำมาทำการทดสอบผลต่อการงอกของวัชพืช โดยทดสอบ 2 วัชพืช ได้แก่ หญ้าข้าวนกและไมยราบยักษ์ ในห้องปฏิบัติการ และวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) โดยแต่ละสูตรมี จำนวน 4 ซ้ำ ประกอบด้วย 6 กรรมวิธี โดยใช้ความเข้มข้นเป็นกรรมวิธี ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 ความเข้มข้นของสูตรผลิตภัณฑ์ 0.5 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 2 ความเข้มข้นของสูตรผลิตภัณฑ์ 1 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 3 ความเข้มข้นของสูตรผลิตภัณฑ์ 5 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 4 ความเข้มข้นของสูตรผลิตภัณฑ์ 10 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 5 ความเข้มข้นของสูตรผลิตภัณฑ์ 15 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 6 น้ำกลั่น(Control)

นำสารละลายที่เตรียมไว้ใส่ในจานแก้วบรรจุกระดาษกรอง 1 แผ่น จานละ 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำเมล็ดวัชพืชแช่ในน้ำร้อน และปล่อยให้เย็นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 12 ชั่วโมง เลือกเมล็ดพองเต่ง ไม่มีร่องรอยแมลงกัดกิน จำนวน 50 เมล็ด ใส่ในจานแก้วที่ใส่สารละลายแมงลักป่าที่เตรียมไว้ ปิดฝา วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกจำนวนเมล็ดงอก สุ่มวัดความยาวรากและต้น จำนวนซ้ำละ 10 ต้น หลังเริ่มทดลอง 7 วัน นำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่าเฉลี่ย และนำค่าเฉลี่ยไปคำนวณประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกและการเจริญ ดังนี้ -

การยับยั้งการงอก (%) = [(A-B)/A] x 100

A = ค่าเฉลี่ย (จาก 4 ซ้ำ) จำนวนเมล็ดงอกในชุดควบคุม
B = ค่าเฉลี่ย (จาก 4 ซ้ำ) จำนวนเมล็ดงอกในชุดที่ได้รับสาร

การยับยั้งการเจริญ (%) = [(A-B)/A] x 100

A = ค่าเฉลี่ย (จาก 4 ซ้ำ) ความยาวราก/ต้นวัชพืชในชุดควบคุม

B = ค่าเฉลี่ย (จาก 4 ซ้ำ) ความยาวราก/ต้นวัชพืชในชุดที่ได้รับสาร

5. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปและรายงานผล

ระยะเวลา ระยะเริ่มต้น ตุลาคม 2559 ถึง ระยะสิ้นสุดกันยายน 2560

สถานที่ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลอง

1. การสำรวจ เก็บตัวอย่างพืชแมงลักป่าและเตรียมน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่า

เก็บตัวอย่างแมงลักป่า บริเวณจังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดราชบุรี นำมาสกัดน้ำมันหอมระเหยได้น้ำมันหอมระเหย จากรายงาน ศิริพร และคณะ (2560) สารที่พบมากและเป็นองค์หลักในน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่า คิดเป็นสัดส่วนร้อยละพื้นที่ที่ได้จากโครมาโทแกรม ได้แก่ sabinene (1.58-18.32 เปอร์เซ็นต์), β-pinene (0.76-5.83 เปอร์เซ็นต์), 1,8-cineole (4.63-24.44 เปอร์เซ็นต์), trans-caryophyllene (8.45-30.64 เปอร์เซ็นต์), caryophyllene oxide (0-8.37 เปอร์เซ็นต์), abietatriene (2.15-9.83 เปอร์เซ็นต์) จึงนำน้ำมันหอมระเหยที่ได้วิเคราะห์หาปริมาณสารหลักด้วยเครื่อง GC-MS ได้แก่ sabinene, 1,8-cineole และ trans-caryophyllene เฉลี่ยคือ 24.39, 17.61 และ 16.48 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

2. การผสมปรุงแต่งสูตรผลิตภัณฑ์

จากการทดลองผสมปรุงแต่งสูตรผลิตภัณฑ์ ได้สูตรผลิตภัณฑ์ ดังนี้ FE1, FH2, FP2, FHP1 และ F6 ผลิตภัณฑ์ทุกสูตรมีสีเหลือง เมื่อละลายในน้ำกลั่นให้สีขาวขุ่น นำมาทดสอบเบื้องต้นกับเมล็ดไมยราบยักษ์ โดยใช้สูตรต่อน้ำที่อัตราส่วน 1 ต่อ 5 และ 1 ต่อ 100 จากผลการทดลองเบื้องต้น จากตารางที่ 1 พบว่า สูตร FE1(1:5) และสูตร FP2 (1:5) สามารถการยับยั้งการงอก การยับยั้งการเจริญของรากและลำต้นได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ โดยสูตร FE1 (1:5) ยับยั้งได้ 80.43, 91.14 และ 94.07 เปอร์เซ็นต์ และสูตร FP2 (1:5) ยับยั้งได้ 98.91, 97.58 และ 97.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากนั้นนำสูตรที่ได้มาปรับปรุงสูตร และทดสอบประสิทธิภาพของการยับยั้งการงอก การเจริญเของรากและลำต้น ของเมล็ดไมยราบยักษ์ โดยใช้สูตรต่อน้ำที่อัตราส่วน 1 ต่อ 5 จากตารางที่ 2 พบว่าปริมาณสารหลักในสูตรเข้มข้น ได้แก่ sabinene อยู่ในช่วง 4.40-14.01 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก 1,8-cineole อยู่ในช่วง 2.69-7.91 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก trans-caryophyllene อยู่ในช่วง 2.73-8.62 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณสารที่อยู่ในช่วงเหล่านี้สามารถยับยั้งการงอก การเจริญของรากและลำต้นได้ 100 เปอร์เซ็นต์

นำสูตรที่ได้มาทำการปรับปรุงสูตรอีกครั้ง คัดเลือกสูตรได้ทั้งหมด 4 สูตร ดังนี้ สูตร A, B, C และ D โดยทั้ง 4 เป็นสูตร EC เหมือนกัน แต่มีความแตกต่างของสารผสมปรุงแต่ง ซึ่งสูตร A, B และ D เป็นสูตรผลิตภัณฑ์ 40 %EC และสูตร C เป็นสูตรผลิตภัณฑ์ 20%EC ซึ่งแต่ละสูตรที่ได้มีลักษณะเป็นสูตรเข้มข้นมี สีเหลืองใส เมื่อนำมา ละลายน้ำได้ดีที่อัตรา 1 ต่อ 10 ให้สารละลายสีขาวขุ่น วัดค่า pH (1 เปอร์เซ็นต์) สูตร A B C และ D 3.9, 3.5, 3.7 และ 3.6 ตามลำดับ ดังตารางที่ 3 เห็นได้ว่าแต่ละสูตรมีคุณสมบัติทางกายภาพใกล้เคียงกัน

3. ความคงสภาพของสูตรผลิตภัณฑ์แมงลักป่า

นำแต่สูตรทั้ง 4 ทดสอบประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการงอก การเจริญของรากและลำต้นเมล็ดไมยราบยักษ์ โดยการทดสอบนี้ใช้ความเข้มข้นของแต่ละสูตรที่ 10 เปอร์เซ็นต์ จากตารางที่ 4 พบว่าแต่ละสูตรมีผลการยับยั้งการงอก การเจริญของรากและลำต้น ต่อเมล็ดไมยราบยักษ์ได้แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยสูตร A, B และ C มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีกว่าสูตร D ทดสอบความคงสภาพของปริมาณสารหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหยโดยการอบที่อุณหภูมิที่ 54 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าปริมาณสารหลัก ได้แก่ sabinene, 1,8-cineole และ trans-caryophyllene ในสูตร A มีปริมาณสารลดลงร้อยละ 15.51, 15.00 และ 24.06 ตามลำดับหลังจากอบ สูตร B มีปริมาณสารลดลงร้อยละ 10.30, 5.48 และ 15.52 ตามลำดับหลังจากอบ สูตร C มีปริมาณสารลดลงร้อยละ 2.11, 0.94 และ 8.64 ตามลำดับหลังจากอบ และสูตร D มีปริมาณสารลดลงร้อยละ 5.25, 2.79 และ 11.93 ตามลำดับหลังจากอบ ดังตารางที่ 5 เห็นได้ว่าหลังจากผ่านการอบ สูตร C และ D ค่อนข้างมีความคงสภาพได้ดี เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารสำคัญน้อย เมื่อนำสูตรที่ผ่านการอบ มาทดสอบประสิทธิการยับยั้งการงอก การเจริญของรากและลำต้น กับเมล็ดไมยราบยักษ์ โดยใช้ความเข้มข้นของแต่ละสูตรที่ 10 เปอร์เซ็นต์ จากผลการศึกษาสูตรทั้ง 4 หลังอบ จากตารางที่ 6 พบว่าสูตร C และ D มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณสารหลักน้อยกว่าสูตร A และ B ซึ่งค่อนข้างมีความคงสภาพกว่าสูตร A และ B แต่เมื่อพิจารณาประสิทธิการของสูตรต่อยับยั้งการงอก การเจริญของรากและลำต้น ที่มีต่อเมล็ดไมยราบยักษ์ทั้งก่อนอบและหลังจากอบ สูตร A และ B ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอก การเจริญของรากและลำต้น 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สูตร C และ D มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของรากและลำต้นได้ดี แต่ยับยั้งการงอกน้อยกว่าสูตร A และ B ถึงแม้ว่าสูตร A หลังอบมีปริมาณสาร sabinene คือ 6.43 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณสาร 1,8-cineole คือ 4.76 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณสาร trans-caryophyllene คือ 3.22 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และสูตร B หลังอบมีปริมาณสาร sabinene คือ 8.62 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณสาร 1,8-cineole คือ 6.56 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณสาร trans-caryophyllene คือ 4.41 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก มีปริมาณสารที่ลดลงหลังผ่านการอบแต่ว่ายังคงอยู่ในช่วงการลดลงที่ยอมรับได้ เนื่องจากปริมาณสารที่ลดลงยังคงอยู่ในช่วงตามตารางที่ 2 ซึ่งช่วงดังกล่าวยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอก การเจริญของรากและลำต้นได้ ทั้งนี้มีปัจจัยหลายชนิดที่ทำให้มีความคงสภาพและปริมาณสารที่แตกต่างกันทั้งในเรื่องของสารเติมแต่ง สัดส่วนของน้ำมันในสูตรเป็นต้น

4. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสูตรผลิตภัณฑ์ต่อการยับยั้งการงอกของวัชพืชในห้องปฏิบัติการ

จากการศึกษาประสิทธิของผลิตภัณฑ์แมงลักป่าต่อการยับยั้งการงอก การเจริญเของรากและลำต้นของเมล็ดไมยราบยักษ์ซึ่งเป็นตัวแทนของวัชพืชใบกว้าง ที่ความเข้มข้นต่างๆในห้องปฏิบัติการสามารถสรุปผลได้ดังตารางที่ 7 จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นต่างๆของสูตร A B C และ D มีผลต่อการยับยั้งการงอก การยับยั้งการเจริญของรากและลำต้นของเมล็ดไมยราบยักษ์ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสูตร A ใช้ความเข้มข้นที่ 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ สูตร B ใช้ความเข้มข้นที่ 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ สูตร C ใช้ความเข้มข้นที่ 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ และสูตร D ใช้ความเข้มข้น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ จึงสามารถยับยั้งการงอกการเจริญของรากและลำต้นได้ของเมล็ดไมยราบยักษ์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์แมงลักป่าต่อการยับยั้งการงอก การเจริญเของรากและลำต้นของเมล็ดหญ้าข้าวนกซึ่งเป็นตัวแทนของวัชพืชใบแคบ ที่ความเข้มข้นต่างๆใน

ห้องปฏิบัติการ สามารถสรุปผลได้ดังตารางที่ 8 จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นที่แตกต่างกันของสูตร A B C และ D มีผลต่อการยับยั้งการงอก การยับยั้งการเจริญของรากและลำต้นของหญ้าข้าวนกได้แตกต่างกัน โดยสูตร A ใช้ความเข้มข้นที่ 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ สูตร B ใช้ความเข้มข้นที่ 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ สูตร C ใช้ความเข้มข้นที่ 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ และสูตร D ใช้ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวสามารถยับยั้งการงอกการเจริญของรากและลำต้นได้ของเมล็ดไมยราบยักษ์ 100 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสูตรผลิตภัณฑ์ต่อการยับยั้งการงอกของวัชพืชในห้องปฏิบัติการ พบว่าสามารถใช้สูตร A, B และ D ได้ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป จึงสามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดไมยราบยักษ์ได้ ส่วนในหญ้าข้าวนกทุกสูตร สามารถใช้ได้ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป พิจารณาสูตรผลิตภัณฑ์จากแมงลักป่าทั้ง 4 สูตร สูตรที่เหมาะสมคือ สูตร A และ B เพราะสามารถยับยั้งการงอก การเจริญของรากและลำต้นได้ทั้งเมล็ดไมยราบยักษ์และหญ้าข้าวนกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ความเข้มข้นที่ 10 เปอร์เซ็นต์

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การวิจัยสูตรและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดจากแมงลักป่าเพื่อการควบคุมวัชพืช โดยเก็บตัวอย่างแมงลักป่า จากจังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดราชบุรี นำส่วนดอกและใบมากลั่นด้วยวิธี Hydrodistillation นำน้ำมันหอมระเหยที่ได้มาทดลองผสมตัวทำละลาย สารอิมัลซิไฟเออร์ สารลดแรงตึงผิว และสารเติมแต่งชนิดต่างๆ ปรับอัตราส่วนของสารต่างๆให้เหมาะสม โดยทำเป็นสูตรสารละลายน้ำมันเข้มข้น (Emulsifiable concentrate : EC) ซึ่งเป็นรูปแบบที่ใช้ผสมน้ำ ได้สูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันหอมระเหยจากแมงลัก 4 สูตร ดังนี้ สูตร A, B, C และ D โดยสูตร A, B และ D เป็นสูตรผลิตภัณฑ์ 40 %EC และสูตร C เป็นสูตรผลิตภัณฑ์ 20%EC เมื่อละลายน้ำให้สารละลายสีขาวขุ่น ทดสอบความคงสภาพของปริมาณสารหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหยโดยการอบที่อุณหภูมิที่ 54 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 สัปดาห์ สูตร A และ B มีปริมาณสารหลัก sabinene, 1,8-cineole และ trans-caryophyllene หลังอบลดลงแต่ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสูตร A และ B ในระดับห้องปฏิบัติการในการใช้ยับยั้งการงอก การเจริญของรากและลำต้นได้ทั้งเมล็ดไมยราบยักษ์(ใบกว้าง)และหญ้าข้าวนก(ใบแคบ)ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ คือควรใช้ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้การใช้งานในระดับแปลง อาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

กิจกรรมย่อยที่ 2.4
วิจัยความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์แมงลักป่าต่อลูกปลานิล
Study on Acute Toxicity of Wild Spikenard Formulation in *Nile Tilapia*

ผู้วิจัย

ธนิตา ค่ำอำนวย Thanita Kham-amnouy

พรรณีกา อัตตนนท์ Panneeka Attanon

ศิริพร สอนท่าโก Siriporn Sonthako

บทคัดย่อ

การวิจัยความเป็นพิษเฉียบพลันของผลิตภัณฑ์สารสกัดจากแมงลักป่าต่อลูกปลานิล โดยทำเป็นสูตรสารละลายน้ำมันเข้มข้น (Emulsifiable concentrate : EC) ซึ่งเป็นรูปแบบที่ใช้ผสมน้ำจำนวน 2 สูตร คือ ผลิตภัณฑ์สูตร A 40%EC และ ผลิตภัณฑ์สูตร B 40%EC โดยเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์สูตรจากน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากแมงลักป่าที่เก็บในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารและทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันด้วยวิธีชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง(static technique) เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสูตรผลิตภัณฑ์ที่ทำให้ลูกปลานิลตายครึ่งหนึ่งในเวลา 96 ชั่วโมง(96h-LC_{50}) พบว่า ผลิตภัณฑ์สูตร A 40%EC มีปริมาณสาร sabinene เท่ากับ 7.61%w/w มี 1,8-cineole เท่ากับ 5.60%w/w และมี *trans*-caryophyllene เท่ากับ 4.24%w/w มีค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน (LC_{50}) ที่ 96 เป็น 27.277 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนผลิตภัณฑ์สูตร B 40%EC มีปริมาณสาร sabinene เท่ากับ 9.61%w/w มี 1,8-cineole เท่ากับ 6.94%w/w และมี *trans*-caryophyllene เท่ากับ 5.22%w/w มีค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน (LC_{50}) ที่ 96 เป็น 0.6584 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน (LC_{50}) ที่ 96 ชั่วโมง ของผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 สูตร จะเห็นว่าผลิตภัณฑ์สูตร B 40%EC มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อลูกปลานิลสูงกว่าผลิตภัณฑ์สูตร A 40%EC การใช้จึงต้องมีความระมัดระวัง ไม่ควรใช้ใกล้แหล่งน้ำ

คำสำคัญ : ความเป็นพิษเฉียบพลัน แมงลักป่า

Abstract

The present study was conducted to provide the acute toxicity of wild spikenard formulation on Nile Tilapia. Wild spikenard was collected from Kanchanaburi province. Then, volatile oil was extracted from wild spikenard and formulated into 2 formulas of 40% emulsifiable concentrate (EC) including formula A and formula B. Wild spikenard formulation was analyzed for quantifying sabinene, 1,8-cineole and trans-caryophyllene. The results showed that sabinene 7.61%w/w, 1,8-cineole 5.60%w/w and trans-caryophyllene 4.24%w/w were found in formula A ,sabinene 9.61%w/w, 1,8-cineole 6.94%w/w and trans-caryophyllene 5.22%w/w were found in formula B. Acute toxicity testing with static technique of bioassay was assigned to determine their median lethal concentration within 96 hours (96h-LC_{50}). The 96h- LC_{50} were 27.277 mg/L and 0.6584 mg/L for formula A and formula B, respectively which indicated that formula B was more toxic for *Nile Tilapia* than

formula A. Therefore, it is important to be careful when using the products and do not use these products near water resource.

Key words : acute toxicity wild spikenard *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.

บทนำ

แมงลักป่า หรือ แมงลักคา หรือ กะเพราผี (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) (กลุ่มวิจัยวัชพืช , 2555) เป็นวัชพืชชนิดหนึ่งที่มีแนวโน้มว่ามีศักยภาพในการควบคุมวัชพืช โดย ชอุ่มและศิริพร (2550) รายงานว่าการสกัดสารจากแมงลักป่าด้วยน้ำมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของหญ้าข้าวนกได้ และการพ่นสารสกัดแมงลักป่าก่อนวัชพืชงอก 7 วัน ทำให้ผักโขมหนามมีความสูงลดลง 10 เปอร์เซ็นต์ และที่ 4 สัปดาห์หลังพ่นสารฯ ผักเบี้ยหินมีน้ำหนักแห้งลดลง 15 เปอร์เซ็นต์ (ชอุ่มและศิริพร, 2551) และสารสกัดกระเพราผีเทียบเท่าน้ำหนักแห้ง 10.00 กรัม มีประสิทธิภาพในการควบคุมแห้วหมูก่อนงอกและแห้วหมูที่งอกแล้วใกล้เคียงกับอิมาเซทาไพร์ 90 เปอร์เซ็นต์ (ศิริกันยา , 2544) อัณศยาและคณะ (2560) ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยต่อวัชพืช 4 ชนิด ได้แก่ หญ้าข้าวนก (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv) ผักโขมหนาม (*Amaranthus spinosus* L.) ถั่วผี (*Phaseolus lathyroides* L.) และไมยราบเลื้อย (*Mimosa diplotricha* C. Wright ex Sauvallen) ในห้องปฏิบัติการพบว่า อัตราเทียบเท่าสกัดจากแมงลักป่า 100 กรัม (gE) สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญของพืชทดสอบได้สูงสุดมากกว่า 70 แมงลักคาเป็นพืชสมุนไพรใช้รักษาอาการติดเชื้อในทางเดินอาหาร เกร็งปวดและ อาการผิวหนังติดเชื้อ แมงลักคามีฤทธิ์แรงต่อเชื้อราในโรงเก็บอาหาร (Mishra and Dubey, 1994) มีฤทธิ์ต้าน bacteria ทั้ง gram-negative และ gram-positive (Asekun *et al.*,1999; Nantitanon *et al*., 2007) ควบคุม เพลี้ย *Aphis gossypil* Glov. และ *Orthaga* sp. (กนก, 2540) ควบคุม American ballworms (*Heliothis armigera* Hubn.) (รัชดาภรณ์, 2544) แมลงในโรงเก็บผลิตผล (Palsson and Jaeson, 1999) สารสกัดจากแมงลักคาด้วยไอน้ำและปิโตรเลียมอีเธอร์มีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าแมลงชนิดเพลี้ยอ่อนของพริกและหนอนห่อใบมะม่วง (ทวีศักดิ์และคณะ, 2540) ประชาชนพื้นเมืองในหลายพื้นที่ของโลกใช้ใบแมงลักคารมไฟให้เกิดควันไล่แมลง (Aycard *et al*., 1993) ศิริพรและคณะ (2559) ได้วิจัยหากลุ่มสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่าที่สำรวจเก็บตัวอย่างจากจังหวัดกาญจนบุรี พบว่า สารที่พบมากและเป็นองค์หลักในน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่า ได้แก่ Sabinene, β-pinene, 1,8-cineole, trans-caryophyllene, caryophyllene oxide, abietatriene เป็นต้น และพบว่าสาร 1,8-cineol สามารถยับยั้งการงอก ยับยั้งเจริญของราก และยับยั้งการเจริญของลำต้นของเมล็ดไมยราบยักษ์ ได้มากที่สุด

พืชสมุนไพรของไทยมีการนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชหลายชนิด เช่น สะเดา หางไหล เป็นต้น อาจนำมาใช้ในรูปแบบอย่างง่าย เช่น การแช่น้ำแล้วนำสารสกัดนั้นไปใช้พ่น หรือการนำพืชมาเตรียมเป็นสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ แล้วนำไปใช้ หรือการวิจัยพัฒนาเพื่อทำในรูปแบบผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปของสารสกัดพืชนั้นๆ เพื่อใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชทั้ง แมลงศัตรูพืช โรคพืช หรือวัชพืช สำหรับนำมาใช้ทดแทนสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ในการทำผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจำเป็นต้องมีข้อมูลของผลิตภัณฑ์นั้นๆ ทั้งข้อมูลด้านคุณภาพ ประสิทธิภาพ รวมทั้งข้อมูลด้านความ

ปลอดภัย การศึกษาความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์เพื่อดูผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆที่ไม่ใช่กลุ่มเป้าหมาย เพื่อพัฒนาให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
2. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ เช่น บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดวัดปริมาตร ปิเปต เป็นต้น
3. เครื่อง Gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) ยี่ห้อ Agilent รุ่น 6890N
4. เครื่องระเหยแบบลดความดัน(Rotary evaporator)
5. เครื่องกลั่น Hydro-distillation
6. อุปกรณ์สำหรับเลี้ยงปลานิล ได้แก่
   - อ่างเลี้ยงปลาขนาดความกว้าง 10 นิ้ว ความยาว 10 นิ้ว และสูง 10 นิ้ว
   - อ่างสำหรับพักปลาขนาดความกว้าง 34 นิ้ว ความยาว 53 นิ้ว สูง 16 นิ้วและ ขนาดความกว้าง 20 นิ้ว ความยาว 42 นิ้ว สูง 20 นิ้ว
   - ชุดอุปกรณ์สำหรับให้ออกซิเจนในน้ำขณะทำการทดลอง ซึ่งประกอบด้วย เครื่องอัดอากาศ ท่อยางและลูกหินอากาศ
   - ชุดอุปกรณ์สำหรับการเปลี่ยนถ่ายน้ำที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งประกอบด้วย เครื่องดูดน้ำและ สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 นิ้ว
   - สวิงตักปลาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3, 5 และ 12 นิ้ว
7. อุปกรณ์สำหรับวัดคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำในอ่างเลี้ยงปลา ได้แก่
   - กระดาษวัด pH, Cl_2, NO_2^-, NO_3^-
   - เทอร์โมมิเตอร์วัดอุณหภูมิ
8. สารมาตรฐาน ได้แก่ sabinene, 1,8-cineole และ *trans*-caryophyllene
9. ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล เอทานอล เป็นต้น
10. อาหารอัดเม็ดแห้งสำหรับเลี้ยงปลา

วิธีการ

1. เตรียมผลิตภัณฑ์สารสกัดจากแมงลักป่า สูตร A และ สูตร B

สำรวจและเก็บตัวอย่างแมงลักป่า บริเวณจังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดราชบุรี สับตัวอย่างพอละเอียด นำมากลั่นแบบ Hydrodistillation เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำน้ำมันหอมระเหยที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ และนำมาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์สารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่า (สูตรผลิตภัณฑ์จากการทดลองวิจัยสูตรและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดจากแมงลักป่าเพื่อการควบคุมวัชพืช)

2. ศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน (LC_{50}) ของผลิตภัณฑ์สูตรผสมรวมพืชต่อลูกปลานิล

แผนการทดลอง แบบสุ่มตลอด(Completely Randomized Design : CRD) มีระดับความเข้มข้นเป็นกรรมวิธีๆละ 3 ซ้ำ

2.1 การเตรียมลูกปลานิล

นำลูกปลานิล อายุ 60 วัน มาเลี้ยงปรับสภาพในห้องปฏิบัติการอย่างน้อย 2 สัปดาห์ ก่อนการทดสอบ แล้วคัดลูกปลาที่สุขภาพดีมาทำการทดสอบ โดยแยกเลี้ยงไว้ในตู้กระจกที่มีสภาพคล้าย

ภาชนะทดลอง 1-2 วันและงดการให้อาหาร 24 ชั่วโมงก่อนการทดสอบปลาที่ใช้ในการทดลองจะมีการชั่งน้ำหนักและวัดความยาวของลำตัวก่อนทำการทดลอง

2.2 ทดสอบความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์สารสกัดแมงลักป่าต่อลูกปลานิล

- การทดลองขั้นต้น (range finding test) เพื่อหาระดับความเข้มข้นช่วงกว้างๆคือระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ปลานิลตาย 100 เปอร์เซ็นต์และระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ทำให้ปลานิลมีชีวิตรอด 100 เปอร์เซ็นต์ และนำค่าความเข้มข้นที่ได้ไปจัดระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองอย่างละเอียดต่อไป

- การทดลองอย่างละเอียด (definitive test) เป็นการทดลองเพื่อหาระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์สารสกัดแมงลักป่าที่ทำให้ลูกปลานิลตายครึ่งหนึ่ง โดยการนำผลจากการทดลองขั้นต้นมาจัดระดับความเข้มข้นออกเป็น 6 ระดับ แต่ละระดับทำ 4 ซ้ำโดยตลอดการทดลองจะให้อากาศเพื่อป้องกันการขาดออกซิเจน สังเกตลักษณะอาการและบันทึกจำนวนลูกปลานิลตายที่ 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง เมื่อเสร็จสิ้นการทดลองนำเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของสัตว์ทดลองในแต่ละระดับความเข้มข้นไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) ที่ 96 ชั่วโมงต่อไป

3. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปและรายงานผล

ระยะเวลา ระยะเริ่มต้น ตุลาคม 2560 ถึง ระยะสิ้นสุดกันยายน 2561

สถานที่ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ
กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลอง

1. เตรียมผลิตภัณฑ์สารสกัดจากแมงลักป่า สูตรผลิตภัณฑ์ A 40 %EC และ สูตรผลิตภัณฑ์ B 40 %EC

เก็บตัวอย่างแมงลักป่าบริเวณจังหวัดกาญจนบุรี นำมาสกัดน้ำมันหอมระเหย และนำน้ำมันหอมระเหยมาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์สูตร โดยทำเป็นสูตรสารละลายน้ำมันเข้มข้น (Emulsifiable concentrate : EC) จำนวน 2 สูตร คือ ผลิตภัณฑ์สูตร A 40 %EC และ ผลิตภัณฑ์สูตร B 40 %EC ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร sabinene, 1,8-cineole และ *trans*-caryophyllene พบว่า ผลิตภัณฑ์สูตร A มีปริมาณสาร sabinene เท่ากับ 7.61%w/w มี 1,8-cineole เท่ากับ 5.60%w/w และมี *trans*-caryophyllene เท่ากับ 4.24%w/w ส่วนผลิตภัณฑ์สูตร B มีปริมาณสาร sabinene เท่ากับ 9.61%w/w มี 1,8-cineole เท่ากับ 6.94%w/w และมี *trans*-caryophyllene เท่ากับ 5.22%w/w

2. ความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์สารสกัดแมงลักป่าสูตร A 40 %EC ต่อลูกปลานิล

2.1 ลูกปลานิลที่ใช้ทดสอบจากอำเภอเมือง จังหวัดฉะเชิงเทรา อายุ 80 วัน มีขนาดเฉลี่ย 4.71 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 1.66 กรัม

2.2 จากการศึกษาความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์สูตร A 40 %EC ด้วยวิธีชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง (static bioassay) ในห้องปฏิบัติการ ภายในเวลา 96 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองขั้นต้น (range finding test) ในผลิตภัณฑ์สูตร A 40 %EC ที่ 0-100 มิลลิกรัมต่อลิตร และผลการทดลองขั้นละเอียดของสูตรผลิตภัณฑ์สูตร A 40 %EC เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน

(LC_{50}) ที่ 96 ชั่วโมง โดยวิธี Probit analysis(Finney,1971) พบว่า ผลิตภัณฑ์สูตร A 40 %EC มีค่า LC_{50} เป็น 27.277 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 1)

3. ความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์สารสกัดแมงลักป่าสูตร B 40 %EC ต่อลูกปลานิล

3.1 ลูกปลานิลที่ใช้ทดสอบจากอำเภอเมือง จังหวัดฉะเชิงเทรา อายุ 70 วัน มีขนาดเฉลี่ย 3.40 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 1.32 กรัม

3.2 จากการศึกษาความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์สูตร B 40 %EC ด้วยวิธีชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง (static bioassay) ในห้องปฏิบัติการ ภายในเวลา 96 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองขั้นต้น (range finding test) ในสูตรผลิตภัณฑ์ B 40 %EC ที่ 0-10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการทดลองขั้นละเอียดของสูตรผลิตภัณฑ์สูตร B 40 %EC นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน (LC_{50}) ที่ 96 ชั่วโมง โดยวิธี Probit analysis(Finney,1971) ในแต่ละสูตรผลิตภัณฑ์พบว่าผลิตภัณฑ์สูตร B 40 %EC มีค่า LC_{50} เป็น 0.6584 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 1)

เมื่อพิจารณาค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน (LC_{50}) ที่ 96 ชั่วโมง ของผลิตภัณฑ์สูตรทั้ง 2 สูตร จะเห็นว่าผลิตภัณฑ์สูตร A 40 %EC มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อลูกปลานิลน้อยกว่าผลิตภัณฑ์สูตร B 40 %EC

ตารางที่ 1 ค่าความเป็นพิษเฉียบพลันต่อลูกปลานิล(LC_{50}) ที่ 96 ชั่วโมง ของผลิตภัณฑ์สารสกัดจากแมงลักป่า

สูตรผลิตภัณฑ์	ค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน (LC_{50}) mg/l (ที่ 96 ชั่วโมง)
ผลิตภัณฑ์สูตร A 40 %EC	27.277
ผลิตภัณฑ์สูตร B 40 %EC	0.6584

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน (LC_{50}) ของผลิตภัณฑ์สารสกัดจากแมงลักป่าต่อลูกปลานิล ทั้ง 2 สูตรผลิตภัณฑ์ คือ ผลิตภัณฑ์สูตร A 40 %EC และผลิตภัณฑ์สูตร B 40 %EC มีค่า LC_{50} (96 ชั่วโมง) 27.277 และ 0.6584 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลที่ได้ผลิตภัณฑ์สูตร A ที่มีความเป็นพิษต่อลูกปลานิลมากกว่าผลิตภัณฑ์สูตร B เนื่องจากมีความแตกต่างกันของส่วนผสมในแต่ละผลิตภัณฑ์ ดังนั้นควรมีการวิจัยและพัฒนาเพิ่มเติม หรือวิจัยสูตรในรูปแบบอื่นๆ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สูตรที่มีทั้งคุณภาพ ประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยต่อไป

กิจกรรมที่ 3 ศึกษาการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) เพื่อทำมาตรฐานเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในพืช

กิจกรรมย่อยที่ 3.1
วิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในสะเดา
Study on HPTLC technique for providing fingerprint of active substances in Neem

ผู้วิจัย

ภัควรินทร์ ศานติธีรโรจน์	พรรณีกา อัตตนนท์	ณัฐพร ฉันทศักดา
Pukwarin Santiteerarod	Panneeka Attanon	Nattaporn Chanthasakda

บทคัดย่อ

การวิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในพืชที่มีศักยภาพสูงในการกำจัดศัตรูพืช เช่น สะเดา ได้ดำเนินการสกัดใบและเมล็ดสะเดาด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ เช่น hexane, chloroform, methanol และ น้ำ ทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนใยผักโดยวิธี Leaf dipping method และทดสอบกลุ่มสารด้วยน้ำยาทดสอบทางพฤกษเคมีชนิดต่างๆ แล้วหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ของสารสกัดสะเดาที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก ผลการวิจัยพบว่า สารสกัดสะเดา มีสารออกฤทธิ์กลุ่ม terpenoids เป็นจำนวนมาก โดยพบว่าในเมล็ดสะเดา มีสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุดคือ สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ผงสีน้ำตาล ซึ่งมีสารสำคัญเป็นกลุ่ม azadirachtin รองลงมาคือ สารสกัด hexane (น้ำมันสะเดา) ส่วนในใบสะเดา พบสารออกฤทธิ์น้อยกว่าในเมล็ด โดยพบสารออกฤทธิ์มากที่สุดอยู่ในสารสกัดน้ำ ผลจากการทดสอบชนิดของกลุ่มสารทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบต่างๆ พบว่า น้ำมันสะเดา และสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ผงสีน้ำตาลจากเมล็ดสะเดา และสารสกัดน้ำจากใบสะเดา เป็นสารกลุ่ม terpenoids สำหรับการหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี ของสารสกัดสะเดากึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก ด้วยเทคนิค HPTLC ที่ความยาวคลื่น 214 nm และตรวจสอบภายใต้แสง uv 254, uv366 และ white light ได้ HPTLC fingerprint หลังพ่นด้วยน้ำยา anisaldehyde-sulfuric acid ผลการทดสอบสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ผงสีน้ำตาล ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ toluene/methanol/ ethyl acetate (10/1.2/3) พบสารสำคัญคือ azadirachtin a ที่ Rf 0.30 ผลทดสอบน้ำมันสะเดาด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ hexane/ethyl acetate (90/10) พบสารสำคัญ terpenoids ที่ Rf 0.51 และผลการทดสอบสารสกัดน้ำจากใบสะเดา ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ butanol/ethanol/water/acetic acid (114/42/32/0.2) พบสารสำคัญที่ Rf 0.30 และ 0.38 เมื่อได้ข้อมูลสารออกฤทธิ์และวิธีการตรวจสอบแล้ว จึงได้นำสารสกัดสะเดาไทย สะเดาอินเดีย และสะเดาช้างมาตรวจวิเคราะห์คุณภาพด้วยวิธี HPTLC เปรียบเทียบกับ HPTLC fingerprint ของผลิตภัณฑ์สะเดา ผลพบว่า สามารถตรวจสารบ่งชี้ได้ถูกต้องชัดเจน สามารถประเมินปริมาณสาร terpenoids ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์โดยรวมได้ ทำให้สามารถนำวิธีการดังกล่าว ไปใช้ควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สะเดา ซึ่งเป็นวิธีการที่รวดเร็ว ไม่สิ้นเปลืองสารละลาย และได้ข้อมูลสาระสำคัญของผลิตภัณฑ์มากขึ้น

คำสำคัญ : สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี สะเดา หนอนใยผัก

Abstract

This research is about to figure out HPTLC fingerprint by using HPTLC technique in plants that have high potential as pesticides such as Neem. Leaves and seeds of neem were extracted by hexane, chloroform, methanol and water. Efficiency testing to *Plutella xylostella* L. was carried out by leaves dipping method. Phytochemical compounds group testing was tested with different testing reagents. After that the effective substance's fingerprint was evaluated by HPTLC. The results showed that the active substance of neem extract are many terpenoids. The major effective substance in neem seeds is the semi-purified brown powder which is the main compounds in azadirachtin group and a minor effective substance in neem oil. For the neem leaves, the most effective substance is in water extract which is lesser effective than substance form seed extract. Testing on groups of phytochemical compounds with different testing reagents found that the main substance in oil, semi-purified brown powder from seed and water extract of leaves were terpenoids. These terpenoids are detected by HPTLC at wavelength 214 nm with different mobile phases namely toluene/methanol/ethyl acetate (10/1.2/3) for the extraction of semi-purified brown powder. As a result, azadirachtin A was found at Rf 0.30. Moreover, hexane/ethyl acetate (90/10) was used as the mobile phase for neem oil. From the study, the main terpenoids substance was found at Rf 0.51. Finally, butanol/ethanol/water/acetic acid (114/42/32/0.2) was used in order to extract leaves sample. An extract with water found the main terpenoids substance at Rf 0.30 and 0.38. These data and method of HPTLC fingerprint were applied to 3 species of neem and neem products. As a re sult, terpenoids substance can be identified. After that, the amount of the active ingredient in total was estimated and used for control the quality of raw materials of neem products.

Key word : semi-purified, HPTLC HPTLC fingerprint, Neem, *Plutella xylostella* L.

บทนำ

โครงการวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติในพืช เป็นโครงการที่ขานรับนโยบายของรัฐบาล เรื่องการวางกรอบแนวทางการปฏิรูปภาคเกษตร 7 ส่วน ส่งเสริมการลดต้นทุนการผลิต พร้อมทั้งพัฒนาโครงสร้างพื้นฐานทางการเกษตรเพื่อให้ชาวนามีชีวิตที่ดีขึ้น โดยการลดการใช้สารเคมี ซึ่งโครงการนี้สนับสนุนการลดการใช้สารเคมีในการผลิตพืชอาหารปลอดภัย เป็นโครงการวิจัยเพื่อหาสารธรรมชาติเพื่อลดหรือทดแทนสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช อีกทั้งเป็นแนวทางที่รวมถึงการใช้ปัจจัยการผลิตที่ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมคือ การผลิตสารธรรมชาติ โดยการใช้สารสกัดจากพืชเพื่อทดแทนสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นทางเลือกในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ซึ่งจะทำให้ผลผลิตทางการเกษตรมีคุณภาพ ปลอดภัยต่อการบริโภคและสิ่งแวดล้อมทั้งยังเป็นการสนับสนุนให้เกษตรกรใช้เป็นทางเลือกที่ดีและปลอดภัย ซึ่งเป็นไปตามยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 11 (พ.ศ.2555-2559) ยุทธศาสตร์ที่ 3 ความเข้มแข็ง

ภาคเกษตร ความมั่นคงของอาหารและพลังงาน ในหัวข้อการพัฒนาทรัพยากรธรรมชาติที่เป็นฐานการผลิตภาคเกษตรให้เข้มแข็งและยั่งยืน และสอดคล้องกับนโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ (พ.ศ.2555-2559) ยุทธศาสตร์ที่ 2 การสร้างศักยภาพและความสามารถเพื่อการพัฒนาทางเศรษฐกิจ กลยุทธ์การวิจัยที่ 1 สร้างมูลค่าผลผลิตทางการเกษตร และพัฒนาศักยภาพในการแข่งขันและพึ่งพาตนเองของสินค้าเกษตร แผนงานวิจัยที่ 1.6 การวิจัยที่เกี่ยวกับการผลิตอาหารปลอดภัยในประเด็นการบริหารจัดการสิ่งแวดล้อมและการพัฒนาคุณค่าของทรัพยากรธรรมชาติ เพื่อการใช้ประโยชน์ทรัพยากรธรรมชาติอย่างเหมาะสมและยั่งยืน และการเชื่อมต่อภูมิปัญญาท้องถิ่นกับองค์ความรู้ใหม่ให้เกิดประโยชน์เชิงพาณิชย์และสาธารณะ นอกจากนี้จากผลการประชุมสุดยอดอาเซียน-ญี่ปุ่น สมัยพิเศษ ระหว่างวันที่ 13-15 ธ.ค. 2556 ได้มีถ้อยแถลงวิสัยทัศน์ว่าด้วยมิตรภาพและความร่วมมืออาเซียน-ญี่ปุ่น มีประเด็นที่เป็นหุ้นส่วนเพื่อความมั่งคั่งส่งเสริมความร่วมมือในด้านความปลอดภัยทางอาหาร

จากสภาพปัญหาของการใช้สารเคมีทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคและการตกค้างของสารพิษในสิ่งแวดล้อม ส่งผลกระทบต่อภาคการส่งออกมากขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นมาแล้วในอดีต กำลังเกิดอยู่ในปัจจุบัน และคาดว่าจะเกิดต่อไปในอนาคต จึงเป็นปัญหาเร่งด่วน ที่มีความจำเป็นต้องวิจัยหาสารธรรมชาติจากพืชเพื่อทดแทนหรือลดการใช้สารเคมี เพราะถ้าไม่ทำวิจัยปัญหานี้ก็จะขยายตัวและเกิดความรุนแรงมากยิ่งขึ้น ซึ่งการไม่ได้แก้ไขให้เป็นระบบอย่างจริงจัง ทำให้ประเทศไทยสูญเสียงบประมาณทางสาธารณสุข จากสถิติการเจ็บป่วยจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืช มีการประเมินว่าอาจมีจำนวนผู้ป่วยที่แท้จริงมากถึง 200,000-400,000 คนต่อปี และมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับปริมาณการนำเข้าสารเคมีในประเทศ นอกจากนี้ยังกระทบต่อเศรษฐกิจด้านการลงทุนและส่งออก ซึ่งปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยการใช้ความหลากหลายทางชีวภาพของพืชในประเทศ

ประเทศไทยมีพืชหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชและวัชพืช เช่น สะเดา หางไหล หรือ โล่ติ๊น หนอนตายหยาก สาบเสือ ซึ่งนักวิจัยสาขาเกษตร และสาขาอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องได้ทำการทดลองค้นคว้าหาสารทดแทนสารเคมีการเกษตร พบว่า สามารถนำเอาส่วนที่สำคัญต่างๆ เช่น ต้น ราก ใบ ดอก และผล มาสกัดเพื่อให้ได้สารสำคัญจากพืชนั้นๆ มาใช้ควบคุมศัตรูพืชแทนสารเคมีได้ดี โดยไม่มีพิษตกค้าง เนื่องจากสารธรรมชาติส่วนใหญ่จะสลายตัวได้เร็ว นอกจากนี้สารสกัดจากพืชยังมีสารที่เป็นองค์ประกอบอยู่มากมาย ซึ่งแมลงจะต้องใช้เวลานานมากในการสร้างความต้านทานต่อองค์ประกอบต่างๆในสารสกัดเหล่านั้น นอกจากพืชต่างๆเหล่านี้แล้ว ยังมีพืชและสมุนไพรอีกหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชและวัชพืชได้

โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยที่สนับสนุนนโยบายของรัฐบาลในการลดการใช้สารเคมีการเกษตร และส่งเสริมให้มีการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังส่งเสริมการใช้พืชท้องถิ่นของไทยซึ่งมีจำนวนมากและหลากหลายมาทำให้เป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืช เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชท้องถิ่นของไทย และสามารถแข่งขันทางด้านการพัฒนาวิจัยสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมกับประเทศในอาเซียนสำหรับการเข้าสู่เออีซี (ASEAN Economic Community: AEC)

ปัจจุบันประเทศไทยมีการศึกษาและพัฒนาสารสกัดจากพืชสมุนไพรหลายชนิด ทั้งในทางเภสัชวิทยาและทางการเกษตร ซึ่งสมุนไพรที่ใช้ในการเกษตรที่นิยมนำมาทำสารสกัดเพื่อป้องกันและกำจัดศัตรูพืช เช่น สะเดา หางไหล หนอนตายหยาก ว่านน้ำ สาบเสือ น้อยหน่า และแมงลักป่า สมุนไพรแต่

ละชนิดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก มีการศึกษาองค์ประกอบของสารเคมีและการออกฤทธิ์อย่างกว้างขวาง แต่ยังขาดข้อมูลทางด้านพฤกษเคมีซึ่งจะทำให้ทราบว่าสายพันธุ์ใดที่ให้สารสำคัญปริมาณเท่าใด สำหรับสมุนไพรที่ทราบสารสำคัญเป็นส่วนประกอบหลักจะทำการทดสอบหาปริมาณสารสำคัญของสมุนไพร ถ้าสมุนไพรที่ไม่ทราบสารสำคัญจะใช้การทดสอบหาสารสำคัญโดยรวมแทน เช่น การหากลุ่มสารประเภทน้ำมันหอมระเหย หรือการหากลุ่มสารในสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ซึ่งเทคนิคการทดสอบที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือ Chromatographic HPTLC fingerprints เนื่องจากสามารถทดสอบสารสำคัญได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน

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)

มีงานวิจัยเกี่ยวกับการสร้างเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีในพืชสมุนไพรหลายชนิด ด้วยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง จากการศึกษารากยาสูบ ลักษณะทางภายนอก และคุณสมบัติทางพฤกษเคมี การวิเคราะห์ทางพฤกษเคมี และเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีโดยทีแอลซีสมรรถนะสูง ผลทางพฤกษวิทยาพบสารฟลาโวนอยด์ ไฟโตสเตอรอล ไตรเทอร์ปินอยด์ และแทนนิน โดยการสกัดด้วยปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether) เมื่อตรวจค่า Rf ที่ 400nm พบว่าเอกลักษณ์ โครมาโทกราฟีโดยเครื่อง HPTLC-densitometer สามารถใช้บ่งชี้ข้อมูลในการพิจารณารับรองสารสกัดหยาบได้ (Sunil *et al.*, 2011) การสร้างเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสาหร่ายสีน้ำตาล (*Lobophora variegate*) โดยวิธีทีแอลซีสมรรถนะสูง สกัดด้วยสารละลายเมทานอลิค (methanolic) พบ 9 พีค ให้ค่า Rf อยู่ในช่วง 0.18-0.86 ซึ่งสรุปได้ว่าการวิเคราะห์เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี ด้วยทีแอลซีสมรรถนะสูง ของสารสกัดเมทานอลิคสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาหร่าย และเป็นประโยชน์ในการบ่งชี้ทางพฤกษเคมีของสายพันธุ์ต่างๆ ได้ (Thennarasan *et al.*, 2014) นอกจากนี้ Manikandan and Doss (2010) ยังศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมี คุณค่าทางโภชนาการ ตรวจวัดขนาดโมเลกุลของโปรตีน และตรวจทางพฤกษเคมีโดยวิธีทีแอลซีสมรรถนะสูง และทำการสกัดใบต้อยติ่งและจ้าหอมด้วย 50% เมทานอลิค พบสาร ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ ฟีนอล ซาโปนิน และธาตุอาหารปริมาณเล็กน้อย ได้แก่ ฟีโนลิค คาโรทีนอยด์ จากการศึกษาทีแอลซีสมรรถนะสูงของพืชสมุนไพรกาง (*Albizia lebbeck*) ตามวิธี Harborne และ Wagner *et al*. โดยใช้เอทิลอะซิเตต : เมทานอล : น้ำ (100:13.5:10) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และ สเปรย์ด้วย Dragendorff's reagent ตามด้วย 10%Sodium nitrite reagent และอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตรวจสอบภายใต้แสง uv 366 nm และแสงธรรมชาติ พบ อัลคาลอยด์ สเตียรอยด์ เทอร์ปินอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน และไกลโคไซด์ สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ พบอัลคาลอยด์ 10 ชนิดที่ค่า Rf ระหว่าง 0.02-0.85 สารสกัด

เอทิลอะซิเตต พบอัลคาลอยด์ที่แตกต่างกัน 5 ชนิดที่ค่า Rf ระหว่าง 0.09-0.84 และสารสกัดเมทานอลิคพบอัลคาลอยด์ที่ต่างกัน 4 ชนิดที่ค่า Rf ระหว่าง 0.02-0.79 (Nazneen *et al.*, 2012) และ(Sachin *et al.*, 2009) วิเคราะห์สาร quercetin ในบัวเผื่อน (*Nymphaea stellata* willd) โดยสกัดบัวเผื่อนด้วยกรดไฮโดรคลอริค (hydrochloric) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ โทลูอีน(toluene) : เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) : กรดฟอร์มิค (formic acid) (5:4:0.2 v/v/v) แล้วตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง densitometer ที่ 380 nm ใช้หลอดดิวเทอเรี่ยม สามารถแยกสาร quercetin ออกจากส่วนประกอบอื่นๆ ในสารสกัดได้ดี ให้ค่าเฉลี่ยของ %recovery เป็น 99.33% ซึ่งการใช้วิธีทีแอลซีสมรรถนะสูงสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณของ quercetin ได้ ซึ่งเป็นวิธีที่ถูกต้องและรวดเร็ว จากการตรวจสอบทางพฤกษเคมีของว่านหางจระเข้ (*A. vera*) เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการทำมาตรฐาน ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์ทางพฤกษเคมี การทดสอบการละลายโลหะหนัก ศึกษาการต้านจุลชีพ และหาปริมาณของ gallic acid และ berberine โดยวิธีทีแอลซีสมรรถนะสูง ผลที่ได้คือ การทดสอบทางพฤกษเคมีเผยให้เห็นถึง อัลคาลอยด์ คาร์โบไฮเดรต แทนนิน สเตียรอยด์ ไตรเทอปินอยด์ และไกลโคลไซด์ โดยพบฟลาโวนอยด์และฟีนอล 1.9% และ 13.11% ตามลำดับ พบ berberine และ gallic acid 2.74% และ 0.543% ตามลำดับ (Patel *et al.*, 2012)

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องแก้ว ได้แก่ volumetric flask, pipette, round bottom flask, cylinder, beaker, vial เป็นต้น
2. สารเคมี ได้แก่ methanol, chloroform, hexane, petroleum ether, น้ำยาพ่น Anisaldehyde-sulfuric acid, น้ำยาพ่นและน้ำยาทดสอบ dragendorff, สารเปรียบเทียบ ได้แก่ azadirachtin A, azadirachtin B, nimbin, salanin, cadinene, caryophyllene, copaene, cubebene, humulene, valencene, phytol
3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้า, ultrasonic bath, vacuum pump, เครื่องบดตัวอย่าง, ตู้อบตัวอย่าง, เครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator), เครื่องทีแอลซีสมรรถนะสูง (High performance thin layer chromatography, HPTLC) และแผ่น HPTLC plate silica gel 60F254 size 20x10cm
4. สิ่งทดลอง ได้แก่ ใบและเมล็ดสะเดาพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ สะเดาไทย สะเดาอินเดีย และสะเดาช้าง จาก จ. สุพรรณบุรี และ จ. ระนอง

วิธีการ

1. เตรียมตัวอย่างใบและเมล็ดสะเดา

นำใบและเมล็ดสะเดาไทย สะเดาอินเดีย และสะเดาช้าง ทำความสะอาดแล้วบดให้ละเอียด (รูปที่ 1) ศึกษาตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักจากใบและเมล็ดสะเดา

2. ศึกษาวิธีการสกัดสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักจากใบและเมล็ดสะเดา

2.1 ศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักจากเมล็ดสะเดา โดยศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญจากเมล็ดสะเดา โดยนำเมล็ดสะเดามาบด และสกัดด้วยตัวทำละลาย petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, ethanol, methanol, acetone และน้ำ แล้วนำไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ได้สารสกัดหยาบ 39.9, 55.5, 41.8, 35.8, 28.8, 34.0

และ 15.3 %w/w ตามลำดับ นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผักในอัตรา 2%w/v ได้ผลการตายเฉลี่ยของหนอนใยผัก 35.0, 72.5, 75.0, 77.5, 70.0, 70.0 และ 45.0% ตามลำดับ ทำให้ทราบว่าตัวทำละลาย chloroform, ethyl acetate, ethanol, methanol และ acetone สามารถสกัดสารออกฤทธิ์ต่อหนอนใยผักได้ไม่ต่างกัน และสารสกัดที่มีสภาพขั้วปานกลางสามารถสกัดสารออกฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุด โดยมีผล HPTLC fingerprint แสดงในรูปที่ 2 จึงนำเมล็ดสะเดาสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก ด้วย hexane, methanol และน้ำ แล้วนำไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ได้สารสกัดหยาบ 37.9, 25.0 และ 15.4 %w/w ตามลำดับ นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผักในอัตรา 2%w/v ผลทดสอบพบว่า สารสกัด hexane และ methanol ทำให้หนอนใยผักตายมากกว่าสารสกัดน้ำ จึงนำสารสกัดหยาบ methanol ไปสกัดต่อด้วย hexane, chloroform และ methanol ได้สารสกัดหยาบ น้ำมันสีเขียว 4.7%w/w สารข้นหนืดสีเขียวเข้ม 24.0%w/w และสารข้นหนืดสีน้ำตาลแดง 67.4%w/w ตามลำดับ ผลทดสอบหนอนใยผักพบว่า สารข้นหนืดสีเขียวเข้ม ทำให้หนอนใยผักตายมากที่สุด จึงนำไปสกัดต่อเป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ ด้วย chloroform และน้ำ ได้ผงสีน้ำตาล และของเหลวหนืดสีน้ำตาล ตามลำดับ จึงนำสารกึ่งบริสุทธิ์ที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก และหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก

2.2 ศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักจากใบสะเดา โดยนำใบสะเดามาบด สกัดด้วย hexane, methanol และน้ำ แล้วนำไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ได้สารสกัดหยาบ 5.5, 16.9 และ 24.2%w/w ตามลำดับ นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผักในอัตรา 2%w/v ผลทดสอบหนอนใยผักพบว่า สารสกัดน้ำ ทำให้หนอนใยผักตายมากกว่าสารสกัด hexane และ methanol จึงนำสารสกัดหยาบ methanol ไปสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์ต่อด้วย chloroform และน้ำ แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก และหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก

3. ทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก ด้วยน้ำยาทดสอบต่างๆ ดังนี้

3.1 ทดสอบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloids) ด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น Dragendorff's reagent, Hager's reagent, Marme's reagent เป็นต้น

3.2 ทดสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) กลุ่มฟีนอลและแทนนิน (phenol and tannin) ด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น ferric chloride, lead acetate เป็นต้น

3.3 ทดสอบสารกลุ่มซาโปนิน (saponin) ด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น foam test, olive oil test เป็นต้น

3.4 ทดสอบสารกลุ่มเทอร์ปินอยด์ เสตียรอยด์ และไฟโตสเตอรอล (terpenoids, steroids and phytosterol) ด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น Salkowski’s test, terpenoids test, steroids test เป็นต้น

3.5 ทดสอบสารกลุ่มโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) ด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น Benedict’s reagent, Fehling’s reagent เป็นต้น

4. ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint)

ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) หลังพ่นด้วยน้ำยา anisaldehyde-sulfuric acid ของสารสกัดใบและเมล็ดสะเดาด้วยตัวทำละลายต่างๆ เปรียบเทียบกับ HPTLC fingerprint ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์สะเดา และสารมาตรฐานต่างๆ

4.1 ศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)

ศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่ สำหรับวิเคราะห์สารสกัด hexane (น้ำมันสะเดา) โดยเปรียบเทียบผลการใช้ hexane/dichloromethane/95%ethanol (41/49/10) และ hexane/ethyl acetate (90/10) พบว่าการใช้ hexane/ethyl acetate (90/10) สามารถแยกสารได้ดีกว่า จึงเลือกใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในการทดสอบสารสกัด hexane

ศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่ สำหรับวิเคราะห์สารสกัด chloroform และ สารสกัด methanol โดยเปรียบเทียบผลการใช้ toluene/methanol/ethyl acetate (10/25/10), toluene/methanol/ethyl acetate (10/1.2/1) และ toluene/methanol/ethyl acetate (10/1.2/3) พบว่าการใช้ toluene/methanol/ethyl acetate (10/1.2/3) สามารถแยกสารได้ดีกว่า จึงเลือกใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในการทดสอบสารสกัด chloroform และ สารสกัด methanol

ศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่ สำหรับวิเคราะห์สารสกัดน้ำ โดยเปรียบเทียบผลการใช้ butanol/ethanol/water/acetic acid (108/36/27/2 และ butanol/ethanol/water/acetic acid (114/42/32/0.2) พบว่าการใช้ butanol/ethanol/water/acetic acid (114/42/32/0.2) สามารถแยกสารได้ดีกว่า จึงเลือกใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในการทดสอบสารสกัดน้ำ

4.2 เตรียมสารสกัดใบและเมล็ดสะเดาพันธุ์ต่างๆ ด้วย hexane, methanol และน้ำ ในอัตรา 5%w/v

4.3 เตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์สะเดา 15 ตัวอย่าง โดยปิเปตผลิตภัณฑ์สะเดา 5 มิลลิลิตร เจือจางด้วย methanol 5 มิลลิลิตร แล้วสกัดด้วย hexane 3 ครั้ง ครั้งละ 5 มิลลิลิตร แล้วกรองชั้น methanol และชั้น hexane ด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 µm ก่อนนำไปทดสอบด้วยเครื่อง HPTLC

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2558 สิ้นสุด กันยายน 2559
สถานที่ทดลอง กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ
กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลอง

1. การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักจากใบและเมล็ดสะเดา

ผลการใช้กระบวนการทางเคมี สกัดเมล็ดสะเดา ด้วย hexane, methanol และน้ำ แล้วนำสารสกัดหยาบไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผัก พบว่าหนอนใยผักตายเฉลี่ย 47.5, 55.0 และ 12.5% ตามลำดับ ทำให้ทราบว่า ในสารสกัด hexane (น้ำมันสะเดา) และ ในสารสกัดหยาบ methanol มีสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก เพื่อสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก จึงนำสารสกัดหยาบ methanol ไปสกัดต่อด้วย hexane, chloroform และ methanol ได้ น้ำมันสีเขียว สารข้นหนืดสีเขียวเข้ม และสารข้นหนืดสีน้ำตาลแดง ตามลำดับ เมื่อทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผัก พบว่าหนอนใยผักตายเฉลี่ย 57.5, 95.0 และ 55.0% ตามลำดับ ทำให้ทราบว่า สารข้นหนืดสีเขียวเข้ม มีสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุด จึงเลือกสารสกัด สารข้นหนืดสีเขียวเข้ม ไปสกัดต่อเป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ด้วย chloroform และน้ำ ได้ผงสีน้ำตาล และของเหลวหนืดสีน้ำตาล เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผัก พบว่าหนอนใยผักตาย 80.0 และ 60.0% ตามลำดับ ทำให้ทราบว่า สารสกัดเมล็ดสะเดาที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุดคือ สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ผงสีน้ำตาล รองลงมาคือ สารสกัด hexane (น้ำมันสะเดา) (สารสกัดที่ได้ (รูปที่ 3), HPTLC chromatogram (รูปที่ 4) และ HPTLC fingerprint (รูปที่ 5))

ผลการสกัดใบสะเดา ด้วย hexane, methanol และน้ำ แล้วนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผัก พบว่าหนอนใยผักตาย 60.0, 65.0 และ 82.5% ตามลำดับ ทำให้ทราบว่าในสารสกัดน้ำ มีสารมีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุด เพื่อยืนยันผล จึงเลือกสารสกัดหยาบ methanol ไปสกัดต่อด้วย chloroform และน้ำ เมื่อทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผัก พบว่าหนอนใยผักตายเฉลี่ย 77.5 และ 82.5% ตามลำดับ ทำให้ทราบว่า สารสกัดใบสะเดาที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุดคือ สารสกัดน้ำ (HPTLC chromatogram (รูปที่ 6) และ HPTLC fingerprint (รูปที่ 7))

2. การทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก ด้วยน้ำยาทดสอบต่างๆ

ผลการทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีของน้ำมันสะเดา สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ผงสีน้ำตาล และสารสกัดน้ำจากใบสะเดา ตรวจพบสารหลักเป็นกลุ่ม terpenoids (ตารางที่ 1)

3. การวิเคราะห์เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ด้วยเครื่องทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ของกลุ่มสารที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลายต่างๆ (จากวิธีการข้อ 4.2)

3.1 ผลการศึกษาสภาวะ (condition) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมาะสมในการหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ในสารสกัดใบและเมล็ดสะเดาด้วย hexane, chloroform, methanol และน้ำ

- ได้สภาวะเครื่อง HPTLC ที่เหมาะสมบนแผ่น TLC ชนิด HPTLC Plate silica gel $60F_{254}$ ขนาด 20x10cm ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 214 nm โดยใช้น้ำยาพ่น (spray reagent) น้ำยา anisaldehyde sulfuric acid เพื่อทดสอบสารกลุ่ม terpenoids (แสดง HPTLC fingerprint และ spectrum ของสารสำคัญในสะเดาใน รูปที่ 8)
- ได้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) สำหรับวิเคราะห์สารสกัด hexane คือ hexane/ethyl acetate (90/10) โดยใช้เวลาในการ develop 5 นาที, วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) สำหรับวิเคราะห์สารสกัด chloroform และ สารสกัด methanol คือ toluene/methanol/ethyl acetate (10/1.2/3) โดยใช้เวลาในการ develop 10 นาที และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) สำหรับวิเคราะห์สารสกัดน้ำ คือ butanol/ethanol/water/acetic acid (114/42/32/0.2) โดยใช้เวลาในการ develop 55 นาที

3.2 ผลการศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) โดยตรวจสอบภายใต้แสง uv254, uv366 และ white light หลังพ่นด้วยน้ำยา anisaldehyde-sulfuric acid ของสารสกัดใบและเมล็ดสะเดาด้วยตัวทำละลายต่างๆ เปรียบเทียบกับ HPTLC fingerprint ของสารมาตรฐาน azadirachtin A, azadirachtin B, nimbin, salannin, cadinene, copaene, caryophyllene, cubebene, humulene, valencene และ phytol

- ได้เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ของสารสกัด methanol ในใบและเมล็ดสะเดาไทย สะเดาอินเดีย และสะเดาช้าง โดยใช้ วัฏภาคเคลื่อนที่ toluene/methanol/ethyl acetate (10/1.2/3) พบพีคจาก HPTLC chromatogram เด่นที่ Rf 0.0, 0.58 และ 0.79 ผลของ HPTLC fingerprint พบแถบสีม่วงที่เห็นชัดเจนของสารสกัดใบสะเดาทั้ง 3 พันธุ์ ที่ Rf 0.50, 0.58 และ 0.79 และของสารสกัดเมล็ดสะเดาทั้ง 3 พันธุ์ ที่ Rf 0.50, 0.58, 0.72 และ 0.79 เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานซึ่งใช้ วัฏภาคเคลื่อนที่ เดียวกัน พบว่า cadinene,

copaene, caryophyllene, cubebene, humulene, valencene, phytol, salannin, nimbin, azadirachtin B ปรากฏที่ Rf 0.72, 0.72, 0.66, 0.72, 0.72, 0.72 0.65, 0.55, 0.65, 0.45 ตามลำดับ และสารมาตรฐาน azadirachtin A ปรากฏ ที่ Rf 0.30 (รูปที่ 9 และ 10) จากผลที่ได้พบว่า แถบสีม่วงที่มองเห็นได้ชัด ไม่ใช่สารชนิดเดียวกับสารมาตรฐานที่นำมาเปรียบเทียบ ยกเว้นแถบสีม่วงเข้มที่ Rf 0.72 จากสารสกัดเมล็ดสะเดาด้วย methanol (ซึ่งสารที่ Rf 0.72 เป็นสารที่พบในปริมาณมากเมื่อสกัดด้วย hexane (น้ำมันสะเดา) จึงใช้สารสกัด hexane ในการทดสอบ) เป็นสารให้ค่า Rf 0.72 ตรงกับสารมาตรฐาน cadinene, copaene, cubebene, humulene, valencene เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นสารใด จึงต้องใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ สำหรับสารสกัด hexane ซึ่งใช้ทดสอบสารที่สภาพขั้วน้อยในการทดสอบ ซึ่งจากผลทดสอบพบว่า แถบสีม่วงของสาร terpenoids ที่ตำแหน่ง Rf 0.72 ไม่ใช่สารชนิดเดียวกับสารมาตรฐานที่นำมาเปรียบเทียบ

ผลการทดสอบเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ของสารสกัด hexane (น้ำมันสะเดา) ทั้งในเมล็ดสะเดาไทย เมล็ดสะเดาอินเดีย และเมล็ดสะเดาช้าง โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ hexane/ethyl acetate (90/10) พบพีค HPTLC chromatogram เด่นที่ Rf 0.51 ผลของ HPTLC fingerprint พบแถบสีม่วงที่ Rf 0.05 และ 0.51 ซึ่งพบเฉพาะในน้ำมันเมล็ดสะเดาทั้ง 3 พันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบกับ สารมาตรฐานซึ่งใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ เดียวกัน พบว่า cadinene, copaene, caryophyllene, cubebene, humulene, valencene และ phytol ปรากฏที่ Rf 0.67, 0.67, 0.33, 0.67, 0.66, 0.66, 0.16 ตามลำดับ และสารมาตรฐาน azadirachtin A ปรากฏ ที่ Rf 0.00 (รูปที่ 11 และ 12) จากผลที่ได้พบว่า แถบสีม่วงที่ Rf 0.51 สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของน้ำมันสะเดาได้

สำหรับใบสะเดา ซึ่งมีสารออกฤทธิ์มากที่สุดเมื่อสกัดด้วยน้ำ ได้เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ของสารสกัดน้ำ ในเมล็ดสะเดาไทย เมล็ดสะเดาอินเดีย ใบสะเดาไทย ใบสะเดาอินเดีย และใบสะเดาช้าง โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ butanol/ethanol/water/acetic acid (114/42/32/0.2) พบพีค HPTLC chromatogram เด่นของใบสะเดาทั้ง 3 พันธุ์ที่ Rf 0.00, 0.42 และ 0.80 และใบสะเดาช้างมีเพิ่มเติมที่ Rf 0.65 สำหรับเมล็ดสะเดาทั้ง 3 พันธุ์ พบที่ Rf 0.00, 0.16, 0.42 และ 0.80 ส่วนผลของ HPTLC fingerprint (การตรวจสอบภายใต้แสง white light ทำให้แยกสีได้ไม่ดีเท่าที่ควร จึงแสดงรูปที่ uv366 ร่วมด้วย) พบแถบสีเขียวของสารสกัดใบสะเดาทั้ง 3 พันธุ์ และของสารสกัดเมล็ดสะเดาทั้ง 3 พันธุ์ ที่ Rf 0.00, 0.30, 0.38, และ 0.55 และใบสะเดาช้างมีเพิ่มเติมที่ Rf 0.65 ส่วนสารมาตรฐาน azadirachtin A ปรากฏที่ Rf 0.68 (รูปที่ 13 และ 14) จากผลที่ได้จาก HPTLC fingerprint ของใบและเมล็ดสะเดา เมื่อเปรียบเทียบกับผลทดสอบหนอนใยผักของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ด้วยน้ำจากใบสะเดา(จากวิธีการข้อ 3.2) ทำให้ทราบว่า สารที่ออกฤทธิ์เมื่อนำเมล็ดสะเดาแช่ด้วยน้ำอาจจะเป็น สารที่ Rf 0.00, 0.30, 0.38 และ 0.55 มากกว่าสารกลุ่ม azadirachtin ซึ่งละลายน้ำได้น้อย

3.3 ผลการศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ของผลิตภัณฑ์สะเดา 15 ตัวอย่าง โดยตรวจสอบภายใต้แสง uv254, uv366 และ white light หลังพ่นด้วยน้ำยา anisaldehyde-sulfuric acid เปรียบ เทียบกับสารสกัดใบและเมล็ดสะเดาด้วยตัวทำละลายต่างๆ และสารมาตรฐาน azadirachtin A, azadirachtin B, nimbin, salannin, cadinene, copaene, caryophyllene, cubebene, humulene, valencene และ phytol

ผลการทดสอบเพื่อควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ โดยนำ HPTLC fingerprint ที่ Rf ต่างๆ ของสารสกัดสะเดาใน hexane methanol และน้ำ เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์สะเดา 15 ตัวอย่าง (ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เสื่อมสภาพ ถูกเปิดใช้แล้วและเก็บมานานหลายปี จึงตรวจไม่พบสารสำคัญ azadiractin A ซึ่งเป็นสารบ่งชี้ของสะเดา) พบว่าสามารถพิสูจน์ได้ว่า ผลิตภัณฑ์ 13 ตัวอย่าง เป็นผลิตภัณฑ์สะเดา โดยผลิตภัณฑ์ A, B, C, D, F, G และ K มีส่วนผสมของน้ำมันสะเดาซึ่งได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์, ผลิตภัณฑ์ H, I, J, และ L อาจจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่หมักหรือสกัดด้วยน้ำ, ผลิตภัณฑ์ O ซึ่งเป็นแชมพูก็สามารถตรวจสอบได้ ส่วนผลิตภัณฑ์ E และ M ไม่พบสารบ่งชี้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์สะเดา เนื่องจากทดสอบที่ความเข้มข้นที่น้อยเกินไป จากผลที่ได้ พบว่าวิธีนี้สามารถตรวจวัดคุณภาพวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ทุกรูปแบบ (รูปที่ 15-21)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สะเดา มีสารออกฤทธิ์กลุ่ม terpenoids เป็นจำนวนมาก การสกัดกลุ่มสารทุติยภูมิ จากใบและเมล็ดสะเดา ด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ hexane, chloroform, methanol และน้ำ จึงพบสาร terpenoids หลายชนิดอยู่ในตัวทำละลายต่างๆ โดยพบว่าในเมล็ดสะเดา มีสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุดคือ สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ผงสีน้ำตาล ซึ่งมีสารสำคัญเป็นกลุ่ม azadirachtin รองลงมาคือ น้ำมันสะเดาซึ่งสกัดด้วย hexane ส่วนในใบสะเดา มีสารออกฤทธิ์น้อยกว่าในเมล็ด โดยพบสารออกฤทธิ์มากที่สุดอยู่ในสารสกัดน้ำ เมื่อทดสอบชนิดของกลุ่มสารทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบต่างๆ พบว่า สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ผงสีน้ำตาล น้ำมันสะเดา และสารสกัดน้ำจากใบสะเดา เป็นสารกลุ่ม terpenoids เมื่อตรวจหาตำแหน่งของสารสำคัญ ด้วยวิธี HPTLC ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 214 nm และตรวจสอบภายใต้แสง uv 254, uv 366 และ white light ได้เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) หลังพ่นด้วยน้ำยา anisaldehyde-sulfuric acid ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ผงสีน้ำตาล เมื่อทดสอบด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ toluene/methanol/ethyl acetate (10/1.2/3) พบสารหลักคือ azadirachtin A ที่ Rf 0.30 เมื่อทดสอบน้ำมันสะเดา ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ hexane/ethyl acetate (90/10) พบสารหลักคือสาร terpenoids ที่ Rf 0.51 และเมื่อทดสอบสารสกัดน้ำจากใบสะเดา ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ butanol/ethanol/water/acetic acid (114/42/32/0.2) พบสารหลักที่ Rf 0.30 และ 0.38 จากการศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ของใบและเมล็ดสะเดาพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ สะเดาไทย สะเดาอินเดีย และสะเดาช้าง เพื่อตรวจวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์สะเดา พบว่าการเปรียบเทียบ HPTLC fingerprint สามารถตรวจสารบ่งชี้ได้ถูกต้องชัดเจน สามารถประเมินปริมาณสาร terpenoids ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์โดยรวมได้ ทำให้สามารถนำวิธีการดังกล่าวไปใช้ควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สะเดาต่อไป

ผลจากงานวิจัย ทำให้ทราบว่าสารออกฤทธิ์ในเมล็ดสะเดา ส่วนใหญ่เป็นสารประเภทขั้วน้อย-ปานกลาง จึงควรใช้สารสกัดที่เหมาะสมที่หาได้ง่าย เช่น ethanol หรือ ethanol ผสมน้ำ เพราะการนำเมล็ดสะเดาไปแช่น้ำซึ่งมีขั้วมาก อาจทำให้ได้สารออกฤทธิ์ไม่เต็มที่จนใช้ไม่ได้ผลเท่าที่ควร หากจำเป็นต้องแช่น้ำ ก็ควรให้ความสำคัญกับการบดเมล็ดสะเดาให้ละเอียดและใช้สารลดแรงตึงผิว เช่น น้ำยาล้างจานทั่วไปร่วมด้วย ซึ่งจะช่วยดึงสารออกฤทธิ์ออกจากเมล็ดสะเดาได้มากกว่าการแช่น้ำธรรมดา (รูปที่ 22)

กิจกรรมที่ 3.2

วิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในหางไหล

Study on HPTLC technique for providing fingerprint of active substances in *Derris elliptica* Benth.

ผู้วิจัย

ภัควรินทร์ ศานติธีรโรจน์ Pukwarin Santiteerarod

พรรณีกา อัตตนนท์ Panneeka Attanon

ณัฐพร ฉันทศักดา Nattaporn Chanthasakda

บทคัดย่อ

การวิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในหางไหล โดยนำตัวอย่างหางไหลจังหวัดชลบุรีมาสกัดเป็นสารสกัดหยาบ และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPTLC โดยใช้ HPTLC glass plate silica gel60 F_{254} ด้วยสารตัวพา chloroform/hexane(8.5/1.5)ส่องภายใต้แสง UV 254และ 366 nm ซึ่งสามารถบ่งชี้เอกลักษณ์ทางโครมาโทรกราฟี (Fingerprint) ของสารสำคัญในสารสกัดหางไหล โดยพบ tephrosin ที่ Rf 0.35, Rotenone ที่ Rf 0.51และ deguelinที่ Rf 0.52ผลการทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีของสารสกัดหางไหลด้วยตัวทำละลายต่างๆ พบว่าสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักเป็นสารกลุ่ม Flavonoids ผลทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดโดยวิธี Leaf dipping method โดยการแช่หางไหล 5%w/v ด้วย hexane, methanol และน้ำ พบว่าทำให้หนอนใยผักตาย 87.5, 82.5 และ 17.5% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดหางไหลที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ต่อหนอนใยผัก พบว่าการสกัดด้วย dichloromethane, chloroform, ethyl acetate, acetone, ethanol และ methanol มีฤทธิ์ทำให้หนอนใยผักตายมากที่สุด(80-100%) รองลงมาคือ petroleum ether และ hexane (70-73.3%) ส่วนการสกัดด้วยน้ำ มีฤทธิ์น้อยที่สุด (33.3%) เมื่อนำสารสกัดหยาบจากการสกัดด้วย methanol มาสกัดต่อเป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ด้วย hexane และ methanol ในอัตราส่วนต่างๆ พบว่า สามารถแยกสาร flavonoids ที่มีสีต่างๆ ได้แก่ DP1, DP2, DP3, DP4, DP5 และ DP6 ออกจากกันได้ จากผลการทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผักที่อัตรา 0.2%w/v พบว่า DP2, DP3, DP5 และ DP6 ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทำให้ทราบว่า นอกจาก Rotenone แล้ว ยังมีสาร flavonoids อื่นๆ เช่น deguelinที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก และจากการวิเคราะห์ปริมาณ Rotenone ใน DP5 ด้วยเครื่อง HPLC พบว่ามีความบริสุทธิ์สูงถึง 92.9% สามารถพัฒนาต่อยอดเป็นสารมาตรฐาน หรือผลิตภัณฑ์สูตรเข้มข้นต่อไป

คำสำคัญ : เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี, หางไหล, หนอนใยผัก, โรตีโนน

Abstract

The substance from *Derris elliptica*Benth. was used to determine chromatographic fingerprinting by using HPTLC. The plant samples from Chonburi province were extracted to be crude extract. The optimum condition for HPLC was studied by using HPTLC glass plate silica gel60 F254, chloroform/hexane (8.5/1.5) as mobile phase under UV 254 and 366nm. The chromatographic fingerprinting from the

substance of *Derris elliptica*Benth. foundtephrosin at Rf 0.35, rotenone at Rf 0.31 and deguelin at Rf 0.52. The phytochemical screening of various solvent extract of *Derris elliptica*Benth. showed that the active substance affecting to *Plutellaxylostella*L. is flavonoid. The biological testing of 5% W/V sample with hexane, methanol and water on *Plutellaxylostella*L. was done by Leaf dipping method. It made *Plutellaxylostella* L. died in 87.5, 82.5 and 17.5%, respectively.The efficacy of each solvent extract was compared and found that the extract of dichloromethane, chloroform, ethyl acetate, acetone, ethanol and methanol were the most mortal on *Plutellaxylostella* L. (80-100%). Second is petroleum ether, hexane (70-73.3%) and water (33.3%). However, the crude extract from methanol was isolated again to semi-purified compounds with hexane and methanol in different ratio. Flavonoids were found with different colours and were isolated as follows DP1, DP2, DP3, DP4, DP5 and DP6. The efficacy on *Plutellaxylostella* L. at 0.2%w/v found that efficacy of DP2, DP3, DP5 and DP6 are not significantly different at 95% confidence interval. The active substance in *Derris elliptica*Benth. Was not only rotenone but also other Flavonoids such as Deguelin. Moreover, quantitative analysis of Rotenone in DP5 by HPLC gave the highest purity was 92.9%. It can be developed as a standard or concentrated formula in the future.

Key word : HPTLC fingerprint, *Derris elliptica*Benth., *Plutellaxylostella* L., rotenone

บทนำ

ประเทศไทยมีการศึกษาและพัฒนาสารสกัดจากพืชสมุนไพรหลายชนิด ทั้งในทางเภสัชวิทยาและทางการเกษตร ซึ่งสมุนไพรที่ใช้ในการเกษตรที่นิยมนำมาทำสารสกัดเพื่อป้องกันและกำจัดศัตรูพืช เช่น สะเดา หางไหล หนอนตายหยาก ว่านน้ำ สาบเสือ น้อยหน่า และแมงลักป่า สมุนไพรแต่ละชนิดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก มีการศึกษาองค์ประกอบของสารเคมีและการออกฤทธิ์อย่างกว้างขวาง แต่ยังขาดข้อมูลทางด้านพฤกษเคมีซึ่งจะทำให้ทราบว่าสายพันธุ์ใดที่ให้สารสำคัญปริมาณเท่าใด สำหรับสมุนไพรที่ทราบสารสำคัญเป็นส่วนประกอบหลักจะทำการทดสอบหาปริมาณสารสำคัญของสมุนไพร ถ้าสมุนไพรที่ไม่ทราบสารสำคัญจะใช้การทดสอบหาสารสำคัญโดยรวมแทน เช่น การหากลุ่มสารประเภทน้ำมันหอมระเหย หรือการหากลุ่มสารในสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ซึ่งเทคนิคการทดสอบที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือ Chromatographic HPTLC fingerprints เนื่องจากสามารถทดสอบสารสำคัญได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน

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) ทำให้สามารถควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพรในระดับชาติและระดับสากล อีกทั้งมีความถูกต้อง (accuracy) มีความแม่นยำ (precision) มีสภาพไว (sensitivity) และมีความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำ (Reproducibility)

มีงานวิจัยเกี่ยวกับการสร้างเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีในพืชสมุนไพรหลายชนิด ด้วยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง จากการศึกษารากยาสูบ ลักษณะทางภายนอก และคุณสมบัติทางพฤกษเคมี การวิเคราะห์ทางพฤกษเคมี และเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีโดยทีแอลซีสมรรถนะสูง ผลทางพฤกษวิทยาพบสารฟลาโวนอยด์ ไฟโตสเตอรอล ไตรเทอร์ปินอยด์ และแทนนิน โดยการสกัดด้วยปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether) เมื่อตรวจค่า Rfที่ 400nm พบว่าเอกลักษณ์ โครมาโทกราฟีโดยเครื่อง HPTLC-densitometer สามารถใช้บ่งชี้ข้อมูลในการพิจารณารับรองสารสกัดหยาบได้ (Suni*et al.*, 2011) การสร้างเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสาหร่ายสีน้ำตาล (*Lobophora variegate*) โดยวิธีทีแอลซีสมรรถนะสูง สกัดด้วยสารละลายเมทานอลิค (methanolic) พบ 9 พีค ให้ค่า Rfอยู่ในช่วง 0.18-0.86 ซึ่งสรุปได้ว่าการวิเคราะห์เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี ด้วยทีแอลซีสมรรถนะสูง ของสารสกัดเมทานอลิคสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาหร่าย และเป็นประโยชน์ในการบ่งชี้ทางพฤกษเคมีของสายพันธุ์ต่างๆ ได้ (Thennarasan*et al.*,2014) นอกจากนี้ Manikandan and Doss (2010) ยังศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมี คุณค่าทางโภชนาการ ตรวจวัดขนาดโมเลกุลของโปรตีน และตรวจทางพฤกษเคมีโดยวิธีทีแอลซีสมรรถนะสูง และทำการสกัดใบต้อยติ่งและจ๊าหอมด้วย 50% เมทานอลิค พบสาร ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ ฟีนอล ซาโปนิน และธาตุอาหารปริมาณเล็กน้อย ได้แก่ ฟีโนลิค คาโรทีนอยด์ จากการศึกษาทีแอลซีสมรรถนะสูงของพืชสมุนไพรกาง (*Albizialebbeck*) ตามวิธี Harborneและ Wagner *et al*. โดยใช้เอทิลอะซิเตต : เมทานอล : น้ำ (100:13.5:10) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่และ สเปรย์ด้วย Dragendorff's reagent ตามด้วย 10%Sodium nitrile reagent และอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตรวจสอบภายใต้แสง uv366 nm และแสงธรรมชาติ พบ อัลคาลอยด์ สเตียรอยด์ เทอร์ปินอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน และไกลโคไซด์ สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ พบอัลคาลอยด์ 10 ชนิดที่ค่า Rfระหว่าง 0.02-0.85 สารสกัดเอทิลอะซิเตต พบอัลคาลอยด์ที่แตกต่างกัน 5 ชนิดที่ค่า Rfระหว่าง 0.09-0.84 และสารสกัดเมทานอลิค พบอัลคาลอยด์ที่ต่างกัน 4 ชนิดที่ค่า Rfระหว่าง 0.02-0.79 (Nazneen*et al.*,2012) และ(Sachin*et al.*, 2009)วิเคราะห์สาร quercetinในบัวเผื่อน (*Nymphaeastellata*willd) โดยสกัดบัวเผื่อนด้วยกรดไฮโดรคลอริค(hydrochloric) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ โทลูอีน(toluene) : เอทิลอะซิเตต(ethyl acetate) : กรดฟอร์มิค(formic acid) (5:4:0.2 v/v/v) แล้วตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง densitometer ที่ 380 nm ใช้หลอดดิวเทอเรี่ยม สามารถแยกสาร quercetinออกจากส่วนประกอบอื่นๆ ในสารสกัดได้ดี ให้ค่าเฉลี่ยของ %recovery เป็น 99.33% ซึ่งการใช้วิธีทีแอลซีสมรรถนะสูงสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณของ quercetinได้ ซึ่งเป็นวิธีที่ถูกต้องและรวดเร็ว จากการตรวจสอบทางพฤกษเคมีของว่านหางจระเข้ (*A. vera*) เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการทำมาตรฐาน ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์ทางพฤกษเคมี การทดสอบการละลายโลหะหนัก ศึกษาการต้านจุลชีพ และหาปริมาณของ gallic acid และ berberineโดยวิธีทีแอลซีสมรรถนะสูง ผลที่ได้คือ การทดสอบทางพฤกษเคมีเผยให้เห็นถึง อัลคาลอยด์ คาร์โบไฮเดรต แทนนิน สเตียรอยด์ ไตรเทอปินอยด์ และไกลโคลไซด์

โดยพบฟลาโวนอยด์และฟีนอล 1.9% และ 13.11% ตามลำดับ พบ berberineและ gallic acid 2.74% และ 0.543% ตามลำดับ (Patel *et al.*, 2012)

หางไหล มีถิ่นกำเนิดจากประเทศจีน เป็นพืชพื้นเมืองของมาเลเซีย พม่า ไทย และเขตร้อนของแอฟริกา ในไทยมีชื่อเรียกตามท้องถิ่น เช่น โล่ติ้น อวดน้ำ ไหลน้ำ กะลำเพาะ และโพตะโกซ่า ในเมืองไทยพบพืชสกุลเดียวกันประมาณ 21ชนิด แต่มีเพียง 2ชนิดเท่านั้นที่พบว่ามีสารโรติโนนปริมาณมากและนิยมปลูกเป็นการค้า คือหางไหลแดง (*Derris elliptica*Benth.) และหางไหลขาว (*D. malaccensis*) โดยพบมากตามบริเวณแม่น้ำปิง จังหวัดเชียงใหม่ ส่วนภาคกลางพบมากแถวจังหวัดปราจีนบุรี ชลบุรี จันทบุรี และท้องที่ใกล้เคียง (ศิริพันธุ์ และไพโรจน์, 2548)โดยการปลูกโล่ติ้นสามารถเก็บเกี่ยวได้ในช่วงอายุ 22-27 เดือน จะได้สารโรตีโนนในรากสูงสุด แต่โดยทั่วไปจะแนะนำให้เก็บเกี่ยวหางไหลในช่วงอายุ 24เดือน (2ปี) (สมสุข และคณะ, 2531; Moore, 1943; White, 1945 และ White et al., 1948)

หางไหลแดง จัดอยู่ในวงศ์ Leguminoceaeอนุวงศ์ Papilionaceaeมีลักษณะเป็นไม้เถาเลื้อย เจริญงอกงามตามป่าชื้น และชายแม่น้ำ ลำคลองทั่วไป เจริญเติบโตได้เร็ว (เสงี่ยม, 2522)เป็นพืชในตระกูลถั่ว โดยทั่วไปแล้วจะปลูกกันเป็นแปลงใหญ่สามารถใช้เป็นพืชคลุมดิน ป้องกันการสูญเสียความชื้นจากดินและป้องกันการชะล้างหน้าดินได้ สามารถขึ้นได้ดีในสภาพดินหลายชนิดตั้งแต่ดินทรายหยาบไปจนถึงดินเหนียวจัด แต่ไม่เหมาะนำมาปลูกในสภาพดินที่มีน้ำท่วมขังมีการนำหางไหลแดงมาใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น เป็นส่วนประกอบในตำรับยาสมุนไพรรักษาโรค เป็นยาเบื่อปลาใช้เป็นยาฆ่าแมลง หรือไล่แมลง โดยนำรากหรือเถาแก่สดแช่ลงในน้ำ ได้น้ำสีขาวเหมือนน้ำซาวข้าว จากนั้นให้กรองเอารากออก แล้วเอาน้ำที่ได้มาใช้เป็นยาฆ่าแมลงโดยสารพิษที่อยู่ในหางไหลแดงเรียกว่า “โรตีโนน” (rotenone) (Worsley, 1938; สมจิตและสุภาพ, 2515)ซึ่งไม่เป็นพิษต่อสัตว์เลือดอุ่น แต่สลายตัวได้ง่ายเมื่อโดนความร้อนหรือแสงแดด โดยโรตีโนนเป็นอนุพันธ์ของสารจำพวก isoflavoneโดยมีสารที่มีโครงสร้างสัมพันธ์กับโรตีโนน เรียกว่า โรตีนอยส์ (เสงี่ยม, 2522และ Ejercito, 1954)

โรตีโนน (rotenone) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า 1,2,12,12a-Tetrahydro-8,9-dimethoxy-2-(1-methylethenyl)-[1] benzopyrano[3,4-b] furo[2,3-h][1] benzopyran-6(6aH)-one มีสูตรโมเลกุลว่า $C_{23}H_{22}O_6$น้ำหนักโมเลกุล 394.41 โดยสารโรตีนอยส์ มีหลายชนิด เช่น deguelin, elliptone, tephrosin, taxicarol, malaccolและ sumatrolเป็นต้น (รัตรนาพร และคณะ, 2550) จากการศึกษาของนักชีวเคมีพบว่า โรตีโนนจะออกฤทธิ์โดยขัดขวางการส่งผ่านของอิเลคตรอนในไมโตรคอนเดรีย ทำให้แมลงเคลื่อนที่ได้ช้าลง เพราะขาดพลังงานและตายในที่สุด (Matsumaru, 1985 ; Wang et al., 1997)

การตรวจสอบสารเบื้องต้นของสารสกัดหยาบหางไหลโดย Thin layer chromatography (TLC) โดยใช้ ethyl acetate : hexane (1:1) โดยมี silica gel เป็น absorbantพบว่า รากหางไหลมีสารที่เห็นด้วย uv viewing cabinet ที่ λ254 ซึ่งให้ spot สีฟ้าที่Rf 0.76 และ 0.70 ทั้งก่อนและหลัง spray ด้วย anisaldehyde-sulfuric reagent สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโรตีโนน ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ columnSpherisorb S5 ODS-2 5um, 4.6x250mm (water), mobile phase 75%methanol in water, flow rate 1ml/min, column oven 30°C, Detector uv-vis ที่ λ290nm พบโรตีโนนที่ Retention time 7.023

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องแก้ว ได้แก่ volumetric flask, pipette, round bottom flask, cylinder, beaker, vial เป็นต้น
2. สารเคมี ได้แก่diethyl ether, petroleum ether, tert-butyl methyl ether, methanol, ethanol, butanol, propanol, propane1,2diol, emyl alcohol, tetrahydrofuran, formaldehyde, acetic acid, dichloromethane, ethyl acetate, dioxane, acetone, acetonitrile, benzene, toluene, xylene, chloroform, hexane และ waterน้ำยาทดสอบ ได้แก่Dragendorff's reagent, Mayer's reagent, ferric chloride, lead acetate, Salkowski's test, Benedict's reagent, Fehling's reagent, Barfoed's reagent เป็นต้นและสารเปรียบเทียบ ได้แก่ rotenone, deguelin, tephrosin
3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้า, ultrasonic bath, vacuum pump, เครื่องบดตัวอย่าง, ตู้อบตัวอย่าง, เครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator), เครื่องทีแอลซีสมรรถนะสูง(HPTLC,High performance thin layer chromatography) และแผ่น HPTLC plate silica gel 60F254 size 20x10cm
4. สิ่งทดลอง ได้แก่ รากหางไหล และหนอนใยผัก

วิธีการ

1. จัดซื้อตัวทำละลายเครื่องแก้วน้ำยาทดสอบต่างๆ และสารเปรียบเทียบ

จากการศึกษาข้อมูลพบว่า สาร flavonoids ในหางไหล มีอย่างน้อย 6 ชนิด คือ deguelin, elliptnol, maackiain(+/-), rotenone และtephrosin แต่สามารถหาซื้อได้ 3 ชนิดคือ deguelin, rotenone และtephrosin

2. เตรียมหนอนสำหรับทดสอบ

เก็บหนอนใยผัก ในแปลงคะน้า และแปลงกะหล่ำดอก จาก จ.นครราชสีมา และ จ.กาญจนบุรี สำหรับเลี้ยงเพื่อทดสอบ

3. เตรียมตัวอย่างหางไหล

โดยเก็บตัวอย่างหางไหลจากจากจังหวัดราชบุรีและชลบุรีล้างจนสะอาด สับเป็นท่อน ผึ่งแห้ง บดเป็นชิ้นเล็กๆแล้วเก็บในภาชนะทึบแสง

4. ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดหางไหลที่มีฤทธิ์ในการควบคุมหนอนใยผัก

ทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบหางไหลต่อหนอนใยผักโดยนำตัวอย่างหางไหลในอัตรา 5% w/v แช่หางไหลด้วยตัวทำละลายpetroleum ether, hexane, dichloromethane, chloroform, ethyl acetate, acetone, ethanol, methanol, waterตามลำดับ แล้วกรองหยาบด้วยผ้าคอตตอนดิบจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปลดปริมาตรด้วยเครื่องลดปริมาตรสารแบบสูญญากาศ (rotary evaporator) แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผักวัย 2 โดยนับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผัก ที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

5. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารต่างๆ ที่มีในสารสกัดหางไหล ด้วยวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPTLC

นำสารสกัดหางไหลมา develop ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ต่างๆ ได้แก่ diethyl ether, petroleum ether, tert-butyl methyl ether, methanol, ethanol, butanol, propanol,

propane1,2diol, emyl alcohol, tetrahydrofuran, formaldehyde, acetic acid, dichloromethane, ethyl acetate, dioxane, acetone, acetonitrile, benzene, toluene, xylene, chloroform, hexane, waterในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อทดสอบการแยกของสารเปรียบเทียบ deguelin, rotenone และtephrosin

6. ศึกษาวิธีการสกัดสารในหางไหลที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก

สกัดหางไหลด้วย hexane, methanol และ น้ำ นำไปลดปริมาตรด้วยเครื่องลดปริมาตรสารแบบสูญญากาศ (rotary evaporator) แล้วนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผัก เลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายต่างๆ จนได้สารกึ่งบริสุทธิ์

7. ทดสอบชนิดของกลุ่มสารในสารสกัดหางไหลโดยวิธีการทดสอบทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบชนิดต่างๆ

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

8. ตรวจวิเคราะห์เอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสกัดหางไหลด้วยเครื่อง HPTLC-densitometer

จากการศึกษาสภาวะในการวิเคราะห์สารสกัดหางไหลทำให้ได้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)ในการตรวจวิเคราะห์เอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสกัดหางไหลด้วยเครื่อง HPTLC

9. บันทึกและรวบรวมข้อมูล

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2560
สถานที่ทดลอง กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ
กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลอง

1. การสำรวจ เก็บตัวอย่างหางไหล และเตรียมเป็นสารสกัดหยาบ

ได้ตัวอย่างหางไหล ที่สับเป็นท่อน ผึ่งแห้ง บดเป็นชิ้นเล็กๆแล้วเก็บในภาชนะทึบแสง(รูปที่ 1)

รูปที่ 1ก) รากหางไหลสด ข) สับเป็นท่อน ค) บดและผึ่งแห้ง

จากการศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดหางไหล ที่มีฤทธิ์ในการควบคุมหนอนใยผักพบว่า การแช่หางไหลในอัตรา 5%w/v ด้วยpetroleum ether, hexane, dichloromethane, chloroform, ethyl acetate, acetone, ethanol, methanol และ น้ำ เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อหนอนใยผัก ให้ %การตาย 70, 73.3, 96.7, 93.3, 90.0, 100, 80, 100และ 33.3%ตามลำดับ ทำให้ทราบว่า การใช้สาร dichloromethane, chloroform, ethyl acetate, acetone, ethanol, methanol มีฤทธิ์ทำให้หนอนใยผักตายได้มากที่สุด รองลงมาคือ petroleum ether, hexane และสารสกัดน้ำ มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักน้อยที่สุด

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในสารสกัดหางไหล

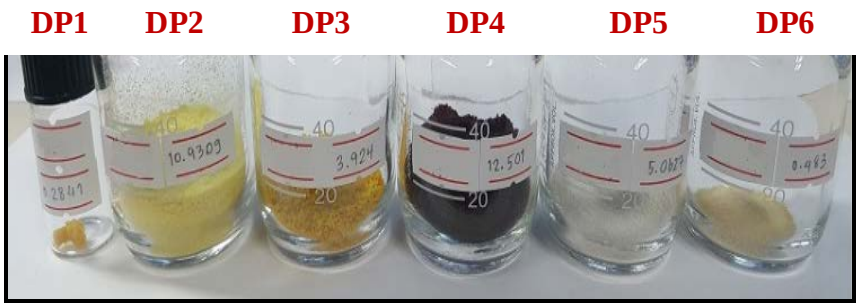
หาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารต่างๆ ด้วยเครื่อง HPTLC-densitometerโดยใช้สารมาตรฐานdeguelin, rotenone, tephrosin และสารสกัดหยาบในตัวทำละลาย 4 ชนิดได้แก่hexane, chloroform, methanol และน้ำ เป็นตัวอย่างในการทดสอบ

- การแยกโดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียว โดยนำสารสกัดหางไหลและสารเปรียบเทียบไปdevelop ด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ diethyl ether, petroleum ether, tert-butyl methyl ether, methanol, ethanol, butanol, propanol, propane1,2diol, emyl alcohol, tetrahydrofuran, formaldehyde, acetic acid, dichloromethane, ethyl acetate, dioxane, acetone, acetonitrile, benzene, toluene, xylene, chloroform, hexane, water ตามลำดับ พบว่าตัวทำละลายชนิดเดียวไม่สามารถแยกสารต่างๆ ในสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆออกจากกันได้
- การแยกด้วยตัวทำละลายผสม โดยนำสารสกัดหางไหลและสารเปรียบเทียบไปdevelopในวัฏภาคเคลื่อนที่ผสม 2-3 ชนิดในอัตราส่วนต่างๆพบว่า การใช้ chloroform/hexane (8.5/1.5) สามารถแยกสารสำคัญได้ดีที่สุด
- จากผลการศึกษาจึงได้สภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของกลุ่มสารสำคัญจากหางไหล ดังนี้

วัฏภาคคงที่ : แผ่น TLC ชนิด HPTLC plate silica gel 60 F254 size 20x10 cm
วัฏภาคของเหลว (mobile phase) : chloroform/hexane (8.5/1.5)
ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 290 nm
ส่องภายใต้แสง UV 254 และ 366nm

3. การสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์เพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก

การสกัดสารสกัดหยาบในหางไหลที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก ด้วย hexane, methanol และ น้ำ พบว่า ทำให้หนอนใยผักตายเฉลี่ย 87.5, 82.5 และ 17.5% ตามลำดับ จึงนำสารสกัดหยาบ hexane, methanol ไปสกัดต่อด้วย hexane และ methanol ในอัตราส่วนต่างๆพบว่า สามารถแยกสาร flavonoids ที่มีสีต่างๆ ออกจากกัน ได้แก่ DP1, DP2, DP3, DP4, DP5 และ DP6 (รูปที่ 2) (ตารางที่ 1)



รูปที่ 2 สารสกัดหางไหลด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและเมทานอลในอัตราส่วนต่างๆ

ตารางที่ 1แสดงลักษณะทางกายภาพของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากการสกัดตัวอย่างหางไหล 200 กรัม

สารกึ่งบริสุทธิ์	ลักษณะทางกายภาพ	ปริมาณที่ได้คิดเป็น %w/w
DP1	ขี้ผึ้งเหนียวสีเหลืองขุ่น	0.142
DP2	เกล็ดของแข็งสีเหลือง	5.465
DP3	เกล็ดของแข็งสีส้ม	1.962
DP4	เกล็ดของแข็งสีน้ำตาลแดง	6.250
DP5	ผงละเอียดคล้ายแป้งสีขาวขุ่น	2.534
DP6	ผงละเอียดคล้ายแป้งสีเหลืองซีด	0.246

4. การทดสอบประสิทธิภาพ (efficacy) ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์

การทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผักวัย2 โดยวิธี Leaf dipping method วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ ที่อัตราความเข้มข้น 0.2%w/v โดยมี 6 สารกึ่งบริสุทธิ์ DP1, DP2, DP3, DP4, DP5 และ DP6 เป็นกรรมวิธี ผลทดสอบพบว่าหนอนใยผักตาย 35.0, 85.0, 95.0, 57.5, 85.0 และ 80.3% ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า DP2, DP3, DP5 และ DP6 มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักวัย2 ในการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดหางไหลกึ่งบริสุทธิ์ที่อัตรา 0.2%w/v

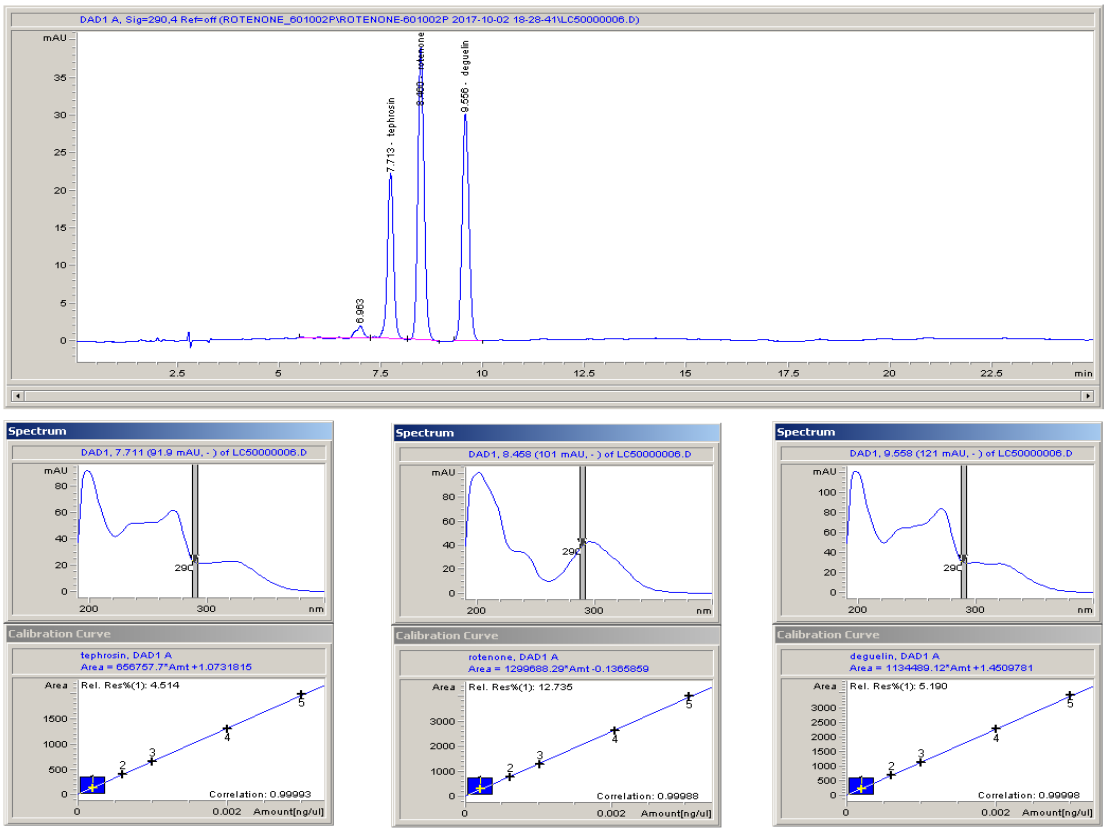
กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักวัย2 (%corrected mortality)
1. DP1	35.0 c
2. DP2	85.0 a
3. DP3	95.0 a
4. DP4	57.5 b
5. DP5	85.0 a
6. DP6	80.3 a
7. ตัวทำละลาย	7.5 d
8. น้ำ (กรรมวิธีควบคุม)	-
CV(%)	**15.9**

หมายเหตุ ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

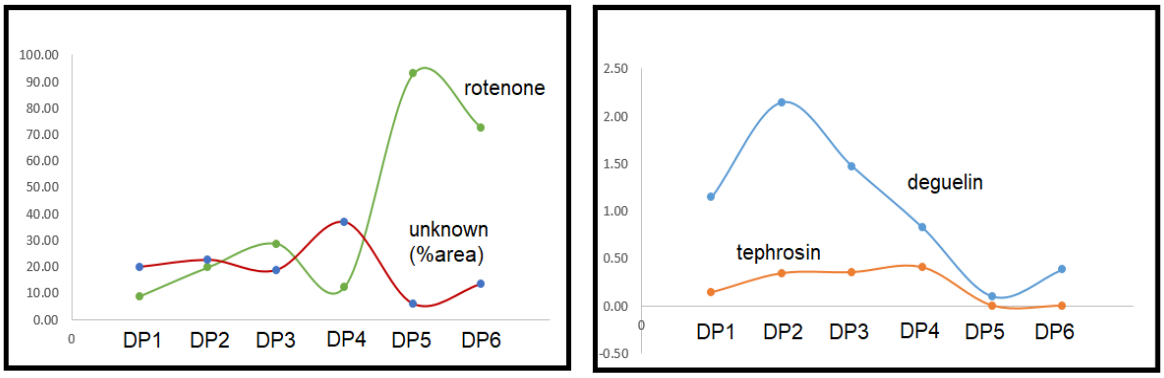
เนื่องจากสารสำคัญในหางไหล สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้ด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งมีความละเอียดสูงกว่า HPTLC จึงนำ สารกึ่งบริสุทธิ์ DP1, DP2, DP3, DP4, DP5 และ DP6 ไปหาปริมาณที่แน่นอนของสารสำคัญต่างๆ โดยใช้ column C18 250x4.6nm, สารตัวพา(mobile phase) Methanol/water (75/25), ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 290 nm เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารในตัวอย่างด้วย retention time และ calibration ของสารมาตรฐาน ดังรูปที่ 3 เมื่อนำผลจากตารางที่ 3 ไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ได้ดังรูปที่ 4 และจากกราฟเมื่อนำปริมาณสาร rotenone, deguelin, tephrosinและสารอื่นๆ ที่พบในสารกึ่งบริสุทธิ์ DP1-DP6 มาเปรียบเทียบ%corrected mortality ของสารกึ่งบริสุทธิ์ DP1- DP6 ทำให้ทราบว่านอกจาก Rotenone แล้ว deguelin น่าจะเป็นสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักเช่นกัน และผลจาก fingerprint ทำให้ทราบว่า deguelinมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ rotenone มาก จึงยากที่จะแยกสารทั้ง 2 ออกจากกันด้วยเครื่อง HPTLC

จากการแช่ 5%w/v ตัวอย่างหางไหลด้วยตัวทำละลายต่างๆ สามารถวัดปริมาณสาร rotenone, deguelinและ tephrosinได้ดังตารางที่ 4 ซึ่งพบว่าค่าที่ได้สอดคล้องกับ %mortality ของหนอนใยผัก

จากผลวิเคราะห์สารกึ่งบริสุทธิ์ DP5 พบว่ามี %rotenone สูงถึง 92.87% ซึ่งใกล้เคียงกับสารมารตฐานที่ใช้ โดยเปรียบเทียบ chromatogram และความบริสุทธิ์ดังรูปที่ 5-6 ทำให้สามารถใช้เป็นสารมาตรฐาน (secondary standard) ในห้องปฏิบัติการ และเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สูตรเข้มข้นได้ในอนาคต



รูปที่ 3 HPLC chromatogram แสดง retention time และ calibration curve ของสารมาตรฐาน



รูปที่ 4 กราฟแสดงปริมาณของสารแต่ละชนิดที่ตรวจพบในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ DP1-DP6
(เส้นกราฟ unknown (%area) เป็น%area รวมของ unknown ทุกตัว)

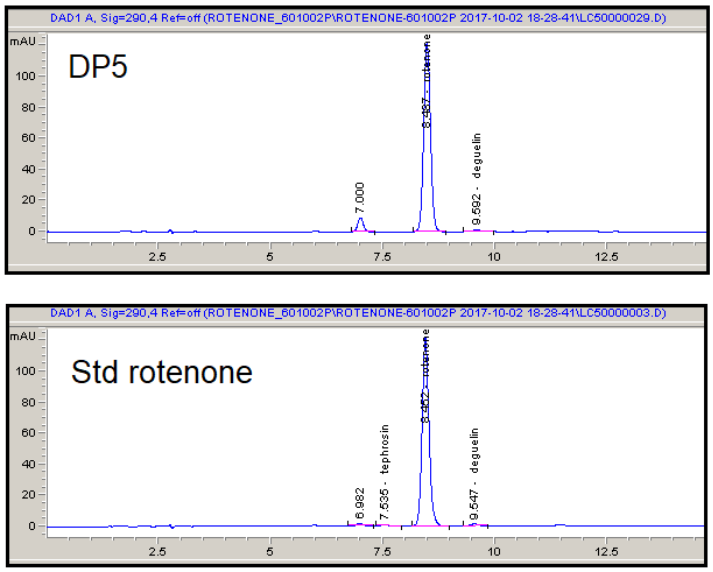
ตารางที่ 3 ปริมาณสารแต่ละชนิดที่ตรวจพบในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ DP1-DP6

	RT 4.0	RT 5.0	RT 5.9	RT 6.4	RT 7.0	Rotenone %w/w	Deguelin %w/w	Tephrosin %w/w	RT 13.5	RT 18.3	%mortality
DP1	-	-	3.58	2.37	4.20	8.50	1.14	0.14	6.23	3.52	35.00
DP2	-	1.53	5.66	4.53	6.01	19.51	2.14	0.34	4.85	-	85.00
DP3	-	1.11	3.72	2.88	7.73 13.9	28.57	1.47	0.36	3.17	-	95.00
DP4	4.87	3.31	5.97	5.06	4	12.19	0.82	0.41	-	-	57.50
DP5	-	-	-	-	5.97 12.1	92.87	0.10	-	-	-	85.00
DP6	-	-	1.23	-	6	72.46	0.38	-	-	-	80.30

หมายเหตุ ตัวเลขในตารางคือ %area ของ unknown ที่ RT ต่างๆ ยกเว้น Degulein, Rotenone และ Tephrosin เป็น %w/w เนื่องจากคำนวนเทียบกับสารมาตรฐานแล้ว

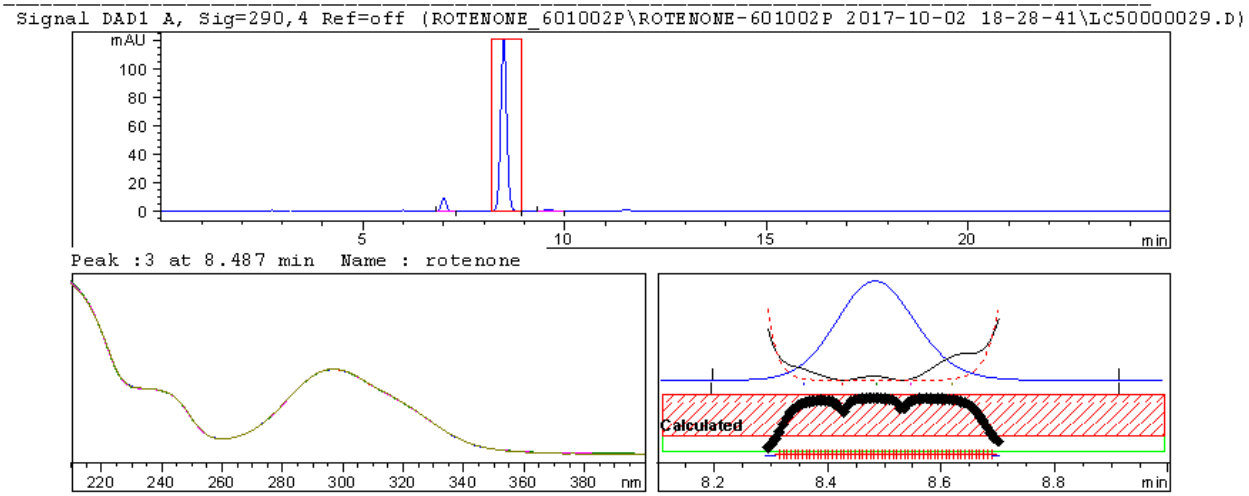
ตารางที่ 4 ปริมาณสารที่ตรวจพบจากการแช่ 5%w/v หางไหลด้วยตัวทำละลายต่างๆ

solvent	rotenone (%w/w)	deguelin (%w/w)	tephrosin (%w/w)	mortality (%)
petroleum ether	0.20	0.30	0.04	70.0
hexane	0.57	0.51	0.06	73.0
dichloromethane	3.70	1.59	0.19	96.7
chloroform	3.49	1.50	0.18	93.3
ethyl acetate	3.31	1.42	0.20	90.0
ethanol	3.36	1.46	0.33	100.0
methanol	3.10	1.29	0.67	80.0
acetone	3.46	1.49	0.27	100.0
water	0.00	0.00	0.00	33.0



รูปที่ 5 เปรียบเทียบ chromatogram ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ DP5 กับสารมาตรฐาน

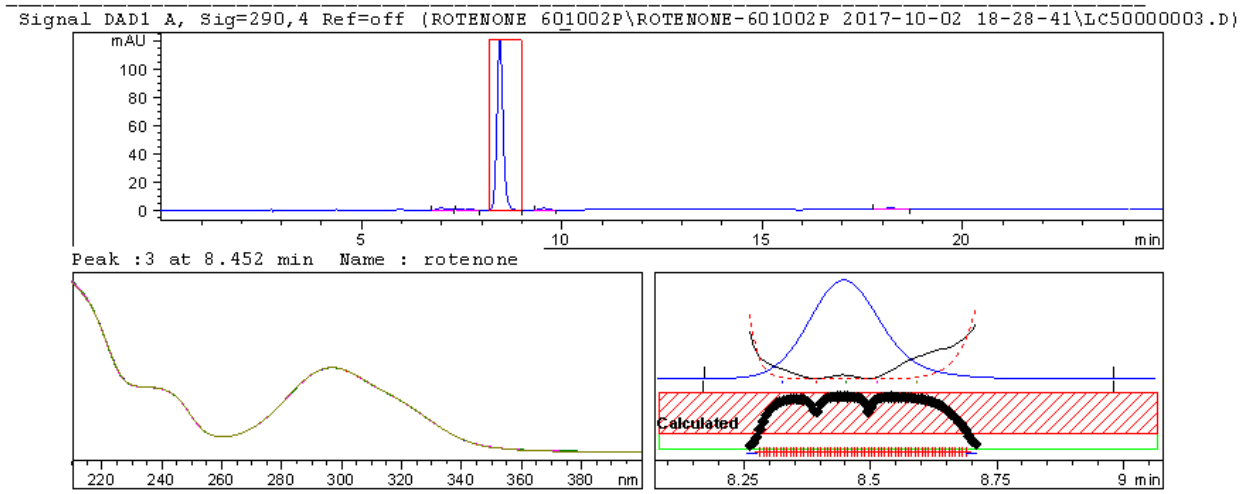
สารกึ่งบริสุทธ์ DP5



-> The purity factor exceeds the calculated threshold limit. <-

Purity factor : 999.951 (57 of 62 spectra exceed the calculated threshold limit.)
Threshold : 999.984 (Calculated with 57 of 62 spectra)
Reference : Peak start and end spectra (integrated) (8.194 / 8.914)
Spectra : 5 (Selection automatic, 5)
Noise Threshol: 0.027 (12 spectra, St.Dev 0.013 + 3 * 0.0046)

สารมาตรฐาน Rotenone




```
-> The purity factor exceeds the calculated threshold limit. <-

Purity factor : 999.940 (62 of 68 spectra exceed the calculated threshold limit.)
Threshold     : 999.979  (Calculated with 62 of 68 spectra)
Reference     : Peak start and end spectra (integrated) (8.168 / 8.981)
Spectra       : 5  (Selection automatic, 5)
Noise Threshol: 0.028  (12 spectra, St.Dev 0.0132 + 3 * 0.0049)
```

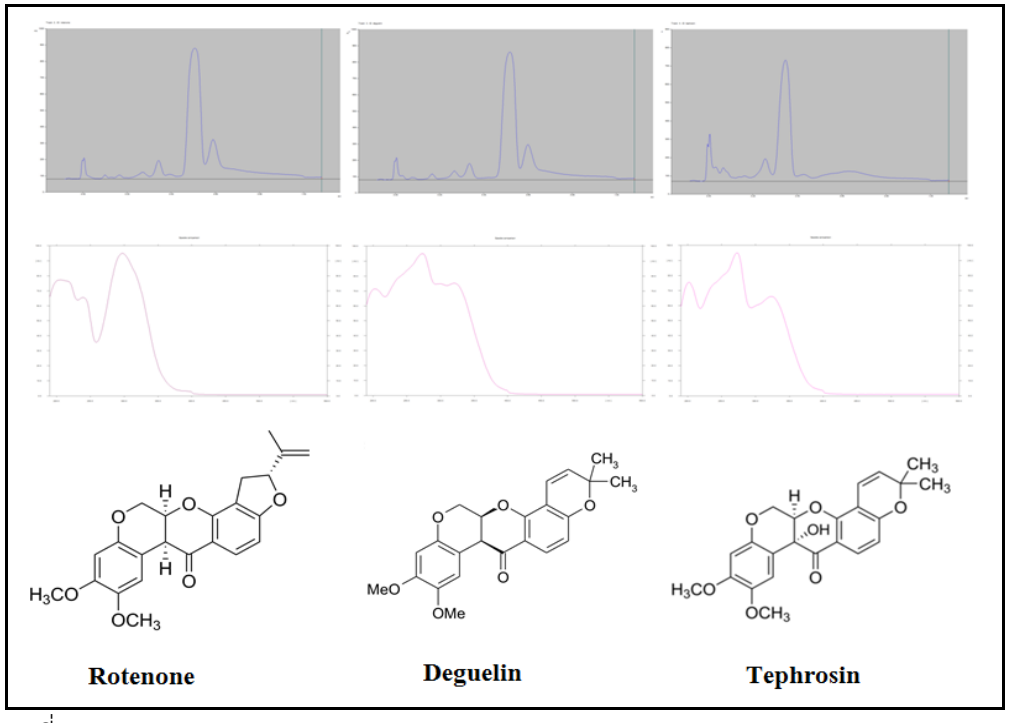
รูปที่ 6 เปรียบเทียบ %purity ของสารกึ่งบริสุทธิ์ DP5 และสารมาตรฐาน rotenone

5. ศึกษาชนิดของกลุ่มสารในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ด้วยน้ำยาทดสอบทางพฤกษเคมี

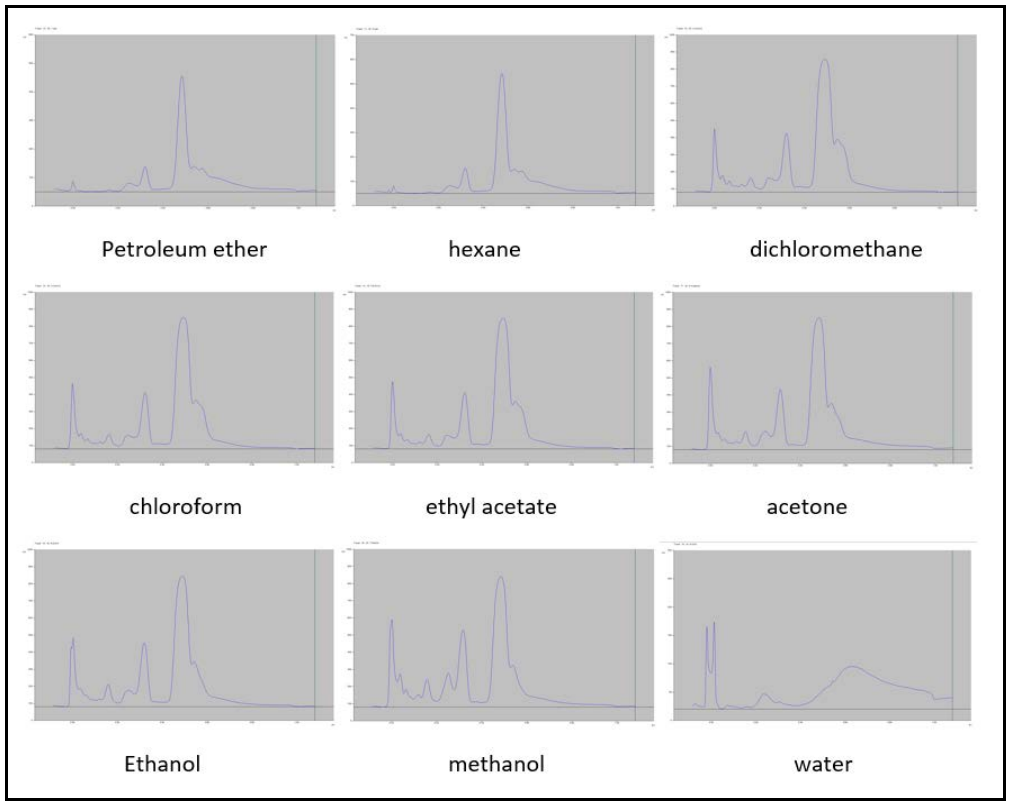
จากการทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีของสารสกัดหางไหลด้วยน้ำยาทดสอบต่างๆ พบว่าสาร DP1, DP2, DP3, DP4, DP5 และ DP6เป็นสารกลุ่ม Flavonoids

6. ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของกลุ่มสาร flavonoidsจากหางไหลด้วยเครื่อง HPTLC

จากการวิเคราะห์เอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสกัดหางไหลด้วยเครื่อง HPTLC-densitometerโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Rotenone, Deguelinและ Tephrosinได้ผลของ chromatogram และ spectrum ดังรูปที่ 7ซึ่งพบ Rotenone ที่ Rf0.51, Deguelinที่ Rf0.52 และ Tephrosinที่ Rf0.35สำหรับ HPTLC chromatogram และในรูปที่ 8 แสดงให้เห็นถึงปริมาณสารสำคัญที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลายต่างๆ ซึ่งพบว่าสอดคล้องกับผลทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น คือสามารถแบ่งกลุ่มสารสกัดตามฤทธิ์ต่อหนอนใยผักได้ เป็น3 กลุ่ม ได้แก่ chloroform, dichloromethane, ethyl acetate, acetone, ethanol, methanol มีฤทธิ์ทำให้หนอนใยผักตายได้มากที่สุด รองลงมาคือ petroleum ether, hexane และสารสกัดน้ำ มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักน้อยที่สุด

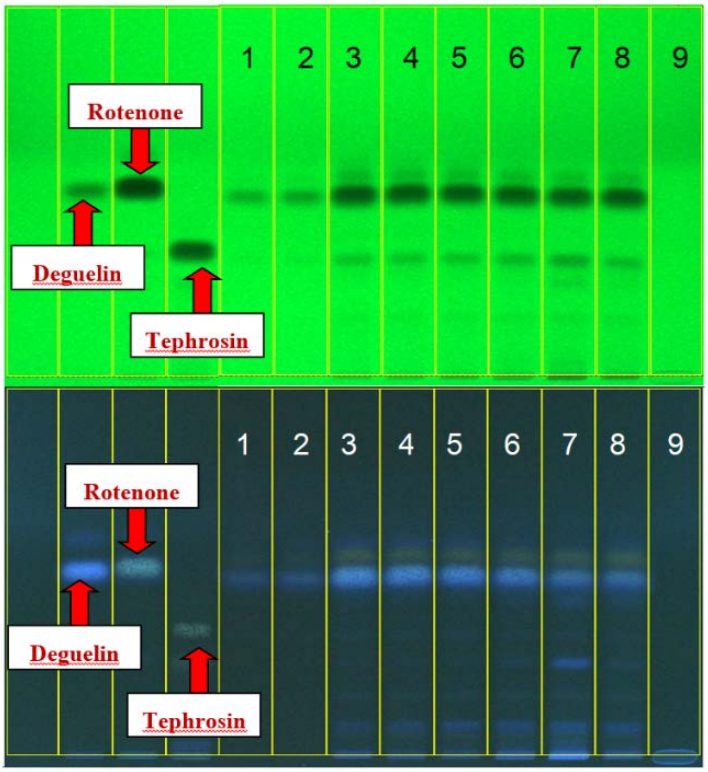


รูปที่ 7 Chromatogram, spectrum ของสารมาตรฐานRotenone, Deguelin และTephrosin



รูปที่ 8 HPTLC Chromatogramของสารสกัดหางไหลในตัวทำละลายต่างๆ

เอกลักษณ์ทางโครมาโทกราฟี (fingerprint) ของสารมาตรฐาน rotenone, deguelin, tephrosin และสารสกัดหางไหลด้วยตัวทำละลายต่างๆ ที่ 254 และ 366 nm (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 fingerprint ของสารมาตรฐาน rotenone, deguelin, tephrosin และสารสกัดหางไหลในตัวทำละลายต่างๆ

1=petroleum ether 2=hexane
3=dichloromethane 4=chloroform
5=ethyl acetate 6=acetone
7=ethanol 8=methanol และ
9=น้ำ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การวิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในหางไหล โดยนำตัวอย่างหางไหลจังหวัดชลบุรีมาสกัดเป็นสารสกัดหยาบ และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPTLC โดยใช้ HPTLC glass plate silica gel60 F_{254} ด้วยสารตัวพา chloroform/hexane (8.5/1.5) ส่องภายใต้แสง uv254 และ 366 nm ซึ่งสามารถบ่งชี้เอกลักษณ์ทางโครมาโทรกราฟี (Fingerprint) ของสารสำคัญในสารสกัดหางไหล โดยพบ Tephrosin ที่ Rf 0.35, Rotenone ที่ Rf 0.51 และ Deguelin ที่ Rf 0.52 ผลการทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีของสารสกัดหางไหลด้วยตัวทำละลายต่างๆ พบว่าสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักเป็นสารกลุ่ม Flavonoids ผลทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดโดยวิธี Leaf dipping method โดยการแช่หางไหล 5%w/v ด้วย hexane, methanol และน้ำ พบว่าทำให้หนอนใยผักตาย 87.5, 82.5 และ 17.5% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดหางไหลที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ต่อหนอนใยผัก พบว่าการสกัดด้วย dichloromethane, chloroform, ethyl acetate, acetone, ethanol และ methanol มีฤทธิ์ทำให้หนอนใยผักตายมากที่สุด (80-100%) รองลงมาคือ petroleum ether และ hexane (70-73.3%) ส่วนการสกัดด้วยน้ำ มีฤทธิ์น้อยที่สุด (33.3%) เมื่อนำสารสกัดหยาบจากการสกัดด้วย

methanol มาสกัดต่อเป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ด้วย hexane และ methanol ในอัตราส่วนต่างๆ พบว่าสามารถแยกสาร flavonoids ที่มีสีต่างๆ ได้แก่ DP1, DP2, DP3, DP4, DP5 และ DP6 ออกจากกันได้ จากผลการทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผักที่อัตรา 0.2%w/v พบว่า DP2, DP3, DP5 และ DP6 ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบ %corrected mortality ทำให้ทราบว่านอกจาก Rotenone แล้ว deguelin น่าจะเป็นสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักเช่นกัน และผลจาก fingerprint ทำให้ทราบว่า deguelinมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ rotenone มากจึงยากที่จะแยกสารทั้ง 2 ออกจากกันด้วยเครื่อง HPTLC และจากการวิเคราะห์ปริมาณ Rotenone ใน DP5 ด้วยเครื่อง HPLC พบว่ามีความบริสุทธิ์สูงถึง 92.9% สามารถพัฒนาต่อยอดเป็นสารมาตรฐาน หรือผลิตภัณฑ์สูตรเข้มข้นต่อไป

กิจกรรมย่อยที่ 3.3

วิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในหนอนตายหยาก

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

ผู้วิจัย

ณัฐพร ฉันทศักดา Nattaporn Chanthasakda

พรรณีกา อัตตนนท์ Panneeka Attanon

ภัควรินทร์ ศานติธีรโรจน์ Pukwarin Santiteerarod

บทคัดย่อ

วิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในหนอนตายหยากซึ่งเป็นพืชที่มีศักยภาพในการกำจัดศัตรูพืช ดำเนินการเก็บตัวอย่างรากหนอนตายหยาก *Stemona phyllantha* Gagnep. จาก อำเภอจอมบึง จังหวัดราชบุรี สกัดรากหนอนตายหยากด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ คือ hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ 50% ethanol ทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผักโดยวิธี Leaf dipping method พบว่าสารสกัดหยาบรากจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ มีผลทำให้หนอนใยผักวัย2 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 gel60 F_{254} ขนาด 20x10 ซม. ผลพบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ วัฏภาคเคลื่อนที่ : Dichloromethane : Ethyl acetate : Methanol : Ammonium hydroxide (50:45:4:0.1); ตัวตรวจสอบ: UV254 nm, UV366 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 ดังนั้นหนอนตายหยากต่างชนิดจะมี alkaloids ในตำแหน่ง Rf ที่แตกต่างกัน และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ได้จากรูปแบบ HPTLC fingerprint ในแต่ละชนิด เพื่อควบคุมคุณภาพได้เบื้องต้น ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็ว ไม่ยุ่งยาก และไม่สิ้นเปลืองสารละลาย

คำสำคัญ : 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 2nd 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 word : HPTLC fingerprint, *Stemona* spp., *Plutella xylostella* L.

บทนำ

จากปัญหาการระบาดของแมลงศัตรูพืชในผลผลิตทางการเกษตรเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกษตรกรนิยมใช้สารเคมีทางการเกษตรจำนวนมาก เกิดการตกค้างของสารพิษในผลผลิตการเกษตรและสิ่งแวดล้อม จนส่งผลกระทบต่อภาคการส่งออกเพิ่มมากขึ้น จึงมีการส่งเสริมให้เกิดการใช้สารธรรมชาติทดแทน หรือลดการใช้สารเคมี โดยการหันมาใช้สารสกัดจากพืชชนิดต่างๆ 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 ชนิดได้แก่ 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 ดังนั้น เทคนิค HPTLC จึงเป็นเทคนิคที่น่าสนใจที่จะมาแก้ปัญหานี้ โดยเทคนิค HPTLC สามารถตรวจเอกลักษณ์ของสารสำคัญของวัตถุดิบสมุนไพรได้โดยไม่ใช้สารมาตรฐาน แต่อาศัยการเปรียบเทียบกับเอกลักษณ์มาตรฐาน

ทีแอลซีสมรรถนะสูง (High Performance Thin Layer Chromatography : HPTLC) คือ วิธีการแยกสารบนแผ่นที่เคลือบด้วยตัวดูดซับ เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมสูงในห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพสมุนไพร ที่สามารถแยกสารได้ดีกว่าวิธีทีแอลซี (Thin Layer Chromatography: TLC) เดิม มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรและการตรวจเอกลักษณ์ของวัตถุดิบสมุนไพร เนื่องจากเป็นวิธีทดสอบเชิงปริมาณที่สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิดในเวลาเดียวกันจึงประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย และเมื่อนำไปผนวกกับเครื่องวัดความหนาแน่น (Densitometer) ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับสารเพิ่มขึ้น ช่วยในการพิสูจน์เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) และวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ ซึ่งมีเทคนิคต่างๆ ช่วยในการตรวจหาสารที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเอชพีแอลซี (High Performance Liquid Chromatography:HPLC) ทำให้สามารถควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพรในทัศนะระดับชาติและระดับสากล อีกทั้งมีความ

ถูกต้อง (accuracy) มีความแม่นยำ (precision) มีสภาพไว (sensitivity) และมีความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำ (Reproducibility)

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์และสารเคมี

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. ลักษณะทางกายภาพของหนอนตายหยาก

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 นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นต่อหนอนใยผักวัย2 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 บันทึกผลการทดลองโดยตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผัก ที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง หลังการทดลองตามลำดับ

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 4ชนิด 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 บันทึกผลการทดลองโดยตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผัก ที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง หลังการทดลองตามลำดับ

3. ศึกษาชนิดของกลุ่มสารในสารสกัดชนิดต่างๆ โดยวิธีการทดสอบทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบ

นำสารสกัดรากหนอนตายหยากที่ได้จาก 2.1 และ 2.2 มาทดสอบกลุ่มสารต่างๆ โดยวิธีทางพฤกษเคมี นพมาศและคณะ (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 แล้วนำสารสกัดไป ทดสอบด้วยเทคนิค HPTLC

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2560
สถานที่ทดลอง กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ
กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลอง

1. 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

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) ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบhexane 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)

3. 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 คือ สารกลุ่ม alkaloids

4. 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

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. ความยาวคลื่นที่เหมาะสม

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

3. น้ำยาพ่นที่เหมาะสม

ทำการสเปรย์น้ำยาทดสอบ Dragendorff's spray reagent ซึ่งใช้ตรวจสารกลุ่ม alkaloids และได้ผลบวก คือ ให้สีส้มเมื่อตรวจสอบภายใต้แสง white light ดังรูปที่ 6 ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูล

งานวิจัยของ 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 ที่เห็น

ชัดเจนที่ 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

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

กิจกรรมย่อยที่ 3.4

วิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในว่านน้ำ

Study on HPTLC technique for providing fingerprint of active substances in *Acorus calamus* L.

ผู้วิจัย

พจนีย์ หน่อฟั่น Pochanee Norfun

พรรณีกา อัตตนนท์ Panneeka Attanon

ณัฐพร ฉันทศักดา Nattaporn Chanthasakda

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในว่านน้ำ โดยนำตัวอย่างเหง้าว่านน้ำแห้งสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เมทานอล เอทานอล เอทิลอะซิเตท ปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เฮกเซน อะซิโตน และน้ำ และทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อหนอนใยผัก เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบว่านน้ำ 5% w/v ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ต่อหนอนใยผัก พบว่าการสกัดด้วยเมทานอล มีฤทธิ์ทำให้หนอนใยผักตายมากที่สุด 96.33 % ผลการทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีของสารสกัดว่านน้ำด้วยตัวทำละลายต่างๆ พบว่าประกอบด้วยสารกลุ่ม อัลคาลอยด์, ฟลาโวนอยด์, เทอร์ปีนอยด์, ฟีนอลิก, แทนนินและ ไกลโคไซด์ ส่วนการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (HPTLC) ของสารสกัดว่านน้ำด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ พบว่ามีอัตราการเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับ (Rf) ตรงกัน เมื่อทำการแยกสารกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีและนำสารกึ่งบริสุทธิ์มาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค HPTLC เปรียบเทียบข้อมูลกับสารอ้างอิง พบว่าสารสำคัญที่พบในว่านน้ำคือ เบต้าอะซาโรน และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารกึ่งบริสุทธิ์ต่อหนอนใยผักที่อัตรา 0.5 %w/v พบว่าหนอนใยผักมีอัตราการตาย 92.5 % เทคนิค HPTLC สามารถใช้เป็นเครื่องมือวิเคราะห์เชิงคุณภาพรวมทั้งการวิเคราะห์สารสำคัญในพืชและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาและควบคุมผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติในระดับอุตสาหกรรม

คำสำคัญ : เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี, ว่านน้ำ, หนอนใยผัก, อะซาโรน

Abstract

The present communication attempts to evaluate the efficacy and the fingerprinting profile of *Acorus calamus* L. Dried powders of the rhizome as well as their extracts in different solvents such as methanol, ethanol, ethyl acetate, petroleum ether, chloroform, hexane, acetone and water were evaluated as bio-insecticides against *Plutella xylostella* L. The results showed that 2 %w/v crude methanol extract of A. calamus caused 96.33 % mortality. Phytochemical screening of the *Acorus calamus* L. showed revealed the presence of various secondary metabolise such as alkaloids, flavonoids, terpenoids, phenolic compounds, tannins, and glycosides. A high performance thin layer chromatography (HPTLC) method was

developed to compare the extract through a fingerprint profile of their chemical compounds. The HPTLC fingerprint patterns of various sovent extracts of *Acorus calamus* L. resembled each other in some zones and Rf values. Main chemical compositions were also isolated, semi-purified and identified by HPTLC compared these data with reference fingerprint profile of β-asarone. The results confirm about the presence of the main chemical component of semi-purified compound might be β-asarone. The insecticidal activity of semi-purified compound was examined against *Plutella xylostella* L. and found that semi-purified compound caused 92.5 % mortality with 0.5 % w/v. The study revealed specific qualitative HPTLC data can be used as a diagnostic tool for the correct identification of the plant and it is useful as a phytochemical marker and also a good estimator for the plant for future standardization work.

Key word : HPTLC fingerprint, *Acorus calamus* L.*, Plutella xylostella* L., asarone

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม สามารถปลูกพืชได้ตลอดปี เนื่องจากภูมิประเทศตั้งอยู่ในเขตอบอุ่นสภาพอากาศโดยทั่วไปจึงเอื้อต่อการเจริญเติบโตและแพร่ระบาดของศัตรูพืชทำให้เกิดปัญหาด้านศัตรูพืชรุนแรงสร้างความเสียหายต่อผลผลิต ทำให้เกษตรกรต้องพึ่งสารเคมีป้องกันและกำจัดศัตรูพืช อันได้แก่ยาฆ่าแมลงต่าง ๆ ซึ่งเป็นวิธีปฏิบัติที่ง่ายไม่ต้องใช้เทคโนโลยีซับซ้อน เห็นผลรวดเร็ว เกษตรกรจึงใช้สารเคมีป้องกันและกำจัดศัตรูพืชมากเกินความจำเป็น แม้ว่าการใช้สารเคมีในการควบคุมศัตรูพืชในระยะแรกพบว่ามีประสิทธิภาพสูงมาก แต่ก็ก่อให้เกิดปัญหาหลายอย่างตามมา เช่นสารพิษที่ตกค้างในดินและน้ำบริเวณพื้นที่เกษตร ซึ่งส่งผลกระทบต่อการใช้น้ำเพื่อบริโภคของเกษตรกรเป็นอันตรายต่อสุขภาพได้ สัตว์และสิ่งมีชีวิตที่มีประโยชน์ตาย ลดความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ และที่สำคัญคือ แมลงพัฒนาสร้างความต้านทานต่อสารเคมี (Sarwar and Salman, 2015) จากรายงานวิจัยของ Pérez *et al.* (2000) พบว่าแมลงศัตรูศัตรูพืชสามารถสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลง โดยค่าความเป็นพิษ (LC_{50}) มีค่าสูงกว่ากลุ่มชุดทดลองเปรียบเทียบ ยิ่งไปกว่านั้นปัญหาการตกค้างของสารเคมีในผลิตผลเกษตรยังเป็นปัญหาสำคัญในการส่งออกซึ่งนับวันยิ่งทวีความรุนแรงมากขึ้นเรื่อยๆ และส่งผลกระทบโดยตรงต่อผู้บริโภค รวมไปถึงสภาวะสินค้าเกษตรเพื่อการแข่งขันในตลาดโลก ซึ่งมีมาตรการกีดกันสินค้าเกษตรที่ผลิตในกระบวนการที่ไม่ได้มาตรฐานตลอดจนปัญหาสิ่งแวดล้อมและระบบนิเวศน์วิทยาที่สูญเสียไป เพื่อเป็นแนวทางลดการใช้สารเคมีและเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาสิ่งที่ทดแทนการใช้สารเคมี ทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่ง คือ การใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรหรือสารธรรมชาติมาใช้ในการป้องกันและกำจัดศัตรูพืช เนื่องจากมีความปลอดภัยสูงกว่าการใช้สารเคมีสังเคราะห์และสลายตัวได้ง่าย จึงไม่มีพิษตกค้างในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร (Campos *et al.*, 2018]

การใช้สารสกัดจากธรรมชาติในการควบคุมแมลงศัตรูพืชนั้นเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้รับการสนใจและเป็นวิธีหนึ่งในหลาย ๆ วิธีที่ถูกนำมาใช้ในกระบวนการบริหารศัตรูพืชแบบบูรณาการ จากการศึกษาวิจัยพบพืชหลายชนิดมีฤทธิ์ฆ่าแมลงเช่น หางไหลใช้ในการกำจัดเพลี้ย สารสกัดจากสะเดาใช้กำจัดหนอนใยผัก หนอนกระทู้ผัก และดอกไพรีทรัมใช้ไล่ยุง (Siegwart *et al*., 2015) พืชที่ใช้กำจัด

ศัตรูพืชส่วนใหญ่เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Annonaceae, Asteraceae, Cannellacceae, Libiatae และ Rutaceae ว่านน้ำ (*Acorus calamus* L.) เป็นไม้ล้มลุกเนื้ออ่อนสูง 1-2 เมตร อยู่ในวงศ์ Araceae ว่านน้ำมีลำต้นเป็นเหง้าอยู่ใต้ดินลักษณะเป็นแท่งค่อนข้างแบน มีใบแข็งตั้งตรง รูปร่างแบนเรียวยาว ปลายใบแหลม แตกใบเรียงสลับซ้ายขวาเป็นแผง ใบค่อนข้างฉ่ำน้ำ ดอกมีสีเขียว มีขนาดเล็ก ออกเป็นช่อ มีจำนวนมากอัดกันแน่นเป็นแท่งรูปทรงกระบอก มีก้านช่อดอกลักษณะคล้ายใบ ทั้งใบ เหง้า และรากมีกลิ่นหอมฉุน ชอบขึ้นตามที่น้ำขังหรือที่ชื้นแฉะ เหง้าของว่านน้ำให้น้ำมันหอมระเหยได้ดีและมีปริมาณมาก เป็นพืชที่มีการนำไปใช้ประโยชน์ในการจัดการกับโรคและแมลงศัตรูพืชทางการเกษตร (มงคล, 2547)

มีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเหง้าของว่านน้ำมีสารที่มีความเป็นพิษต่อแมลงหลายชนิดหลายชนิดโดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลง มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ การวางไข่และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลง และยับยั้งการกินอาหารของแมลง เช่น รายงานวิจัยของ Tewary *et al*. (2005) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำสามารถกำจัดเพลี้ยไฟ (*A. craccivora*) โดยมีสมบัติการเป็นสารฆ่า สารยับยั้งการกิน และสารยับยั้งการเจริญเติบโต Bhonde *et al*. (2002) ทดสอบน้ำมันสกัดจากว่านน้ำกับหนอนกระทู้ผัก Spodoptera litura ด้วยวิธี leaf disk bioassays พบว่า สารสกัดสามารถลดการกินอาหารของหนอนกระทู้ผักได้ อีกทั้งงานวิจัยของ Yoa *et al*. (2008) พบว่าสารสกัดเอธานอลของว่านน้ำมีฤทธิ์ในการขับไล่ด้วงข้าวโพด (*S. zeamais*) ว่านน้ำสามารถผลิตน้ำมันหอมระเหยจากกระบวนการ secondary metabolism และสารสำคัญที่พบในน้ำมันหอมระเหยของว่านน้ำคือ β-asarone (Bjornstad *et al*., 2009) สารดังกล่าวเป็นสารหลักที่ทำให้สารสกัดจากว่านน้ำมีฤทธิ์ควบคุมโรคพืชและมีพิษร้ายแรงต่อแมลงบางชนิด Koul *et al*. (1990) รายงานว่าสาร β-asarone สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและมีฤทธิ์เป็นสารขับไล่เมื่อทดสอบกับหนอนผีเสื้อกลางคืน (*Peridroma soucia*) Jacobson *et al*. (1976) ทดสอบนำสาร β-asarone acorangermacrone และ asarylaldehyde ที่สกัดออกมาในรูปน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำ นำมาทดสอบกับแมลงวันผลไม้เพศเมีย 2 ชนิด คือ *Ceratitis capitata* และ *Dacus cucurbita* ส่วน *D. dorsalis* ใช้เพศผู้มาทดสอบ พบว่า สาร β-asarone ทำให้ Ceratitis capitata ตายได้ ส่วนสาร asarylaldehyde มีผลทำให้ตัวผู้ และเมียของ *D. dorsalis* ตายได้เช่นกัน Rao *et al*. (2002) รายงานว่าเมื่อนำว่านน้ำ สะเดา และโลติ๊น มาผสมในอัตราส่วนต่างๆกัน พบว่าอัตราส่วน 1:1:1 มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการกินอาหารของตัวอ่อนผีเสื้อกลางคืน (*Earias vittella* (Fab)) ได้ถึง 80% ของกลุ่มควบคุม Wafaa *et al.* (2017) อธิบายว่าสารสกัดจากพืชส่งผลต่อกระบวนการในการลอกคราบของแมลง (molting) โดยจะไปยับยั้งการสังเคราะห์การสร้างชั้นคิวติเคิล (cuticle) ใหม่ของแมลง ในการเป็นสารฆ่าของสารสกัดจากพืช พิษของสารสกัดจากพืชจะเข้าสู่แมลงทางรูหายใจ (spiracle) ข้อต่อ (joint) รอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อ (membrane)

วงการวิทยาศาสตร์สมัยใหม่เชื่อว่าในพืชสมุนไพร ประกอบด้วยสารทางเคมีหลายชนิดแต่ละส่วนของพืชสมุนไพรมีสารประกอบที่แตกต่างกันไป สารเหล่านี้เป็นตัวกำหนดสรรพคุณของพืชชนิดและปริมาณของสารจะแปรตามชนิดของพันธุ์พืชและสภาพแวดล้อม (Isman, 2000; Miresmailli and Isman, 2013) ในสภาพปัจจุบันการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรของประเทศไทยยังมีปัญหาในเรื่องการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรในเภสัชตำรับหรือในผลิตภัณฑ์เพื่อการกำจัดศัตรูพืช ซึ่งมีพืชเพียงไม่กี่ชนิดที่มีการกำหนดสารบ่งชี้ ส่วนใหญ่มีเพียงหนึ่งหรือสองชนิดซึ่งในพืชสมุนไพรไม่ได้มีเพียงสารบ่งชี้ดังกล่าว แต่จะประกอบด้วยสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) อีกหลายชนิด ซึ่งสาร

เหล่านี้ก็มีส่วนร่วมในการออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพรดังกล่าว (Rattan, 2010; Jiang *et al*., 2010) นักวิจัยได้พยายามแก้ปัญหาดังกล่าว โดยการทำลายพิมพ์ขององค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) เป็นการตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อหากลุ่มสารสำคัญในพืชสมุนไพรโดยอาศัยหลักการที่ว่าไม่มีพืชสมุนไพรใดที่มีองค์ประกอบและปริมาณสารที่เหมือนกันทุกอย่าง ผลการตรวจสอบจะเป็นลักษณะเฉพาะตัวเปรียบเสมือนลายพิมพ์นิ้วมือ (Fingerprint) ของสมุนไพรนั้นๆ เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการพิสูจน์เอกลักษณ์ และควบคุมคุณภาพของสารสกัดพืชสมุนไพร (Gocan and Cimpan , 2004; Sidney *et al*., 2010; Toniolo *et al*., 2014; Nicoletti *et al*., 2012) เนื่องจากยังมีพืชอีกมากมายหลายชนิดที่ยังขาดข้อมูลด้านการศึกษาหาสารออกฤทธิ์ต่อต้านแมลง หากสามารถศึกษาและรู้ถึงสารออกฤทธิ์ และนำมาควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและปริมาณสารสำคัญเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลงจะเป็นการเพิ่มมูลค่าการใช้ประโยชน์ของพืชในประเทศ รวมถึงกระตุ้นให้เกษตรไทยหันมาใช้สารสกัดจากธรรมชาติอย่างแพร่หลายต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องแก้ว ได้แก่ volumetric flask, pipette, round bottom flask, cylinder, beaker, vial เป็นต้น
2. สารเคมี ได้แก่ diethyl ether, petroleum ether, tert-butyl methyl ether, methanol, ethanol, butanol, propanol, propane1,2diol, emyl alcohol, tetrahydrofuran, formaldehyde, acetic acid, dichloromethane, ethyl acetate, dioxane, acetone, acetonitrile, benzene, toluene, xylene, chloroform, hexane และ waterน้ำยาทดสอบ ได้แก่ Dragendorff's reagent, Mayer's reagent, ferric chloride, lead acetate, Salkowski's test, Benedict's reagent, Fehling's reagent, Barfoed's reagent เป็นต้นและสารมาตรฐาน ได้แก่ β-asarone
3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้า, ultrasonic bath, vacuum pump, เครื่องบดตัวอย่าง, ตู้อบตัวอย่าง, เครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator), เครื่องทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC,High performance thin layer chromatography) และแผ่น HPTLC plate silica gel 60F254 size 20x10cm
4. สิ่งทดลอง ได้แก่ ว่านน้ำ และหนอนใยผัก

วิธีการ

1. การเตรียมสารสกัดว่านน้ำ

เตรียมตัวอย่างว่านน้ำโดยเก็บตัวอย่างจากจังหวัดนนทบุรีล้างจนสะอาด สับเป็นท่อน ผึ่งแห้งบดเป็นผง และสกัดด้วยตัวทำละลาย petroleum ether, hexane, dichloromethane, chloroform, ethyl acetate, acetone, ethanol, methanol, water ตามลำดับ แล้วกรองหยาบด้วยผ้าคอตตอนดิบจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปลดปริมาตรด้วยเครื่องลดปริมาตรสารแบบสูญญากาศ (rotary evaporator)

2. ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดว่านน้ำที่มีฤทธิ์ในการควบคุมหนอนใยผัก

2.1 ทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบว่านน้ำต่อหนอนใยผักโดยนำสารสกัดหยาบว่านน้ำในอัตรา 2 % w/v ที่สกัดด้วยตัวทำละลายตามข้อ 1. มาละลายตัวทำละลาย acetone นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผักวัย 2 โดยนับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผัก ที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง วางแผนการทดลอง CRD จำนวน 4 ซ้ำ 9 กรรมวิธี ดังนี้

1. สารสกัดหยาบ dichloromethane
2. สารสกัดหยาบ methanol
3. สารสกัดหยาบ ethanol
4. สารสกัดหยาบ ethyl acetate
5. สารสกัดหยาบ acetone
6. สารสกัดหยาบ petroleum ether
7. สารสกัดหยาบ hexane
8. สารสกัดหยาบ chloroform
9. ตัวทำละลาย acetone

3. ทดสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening Test) โดยวิธีการทดสอบทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบชนิดต่างๆ

นำสารสกัดว่านน้ำด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ มาทำการทดสอบทางเคมีเบื้องต้นโดยการทำให้เกิดสีหรือการเกิดตะกอน ซึ่งประกอบด้วยการทดสอบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloids) ด้วยน้ำยาทดสอบ Dragendorff's reagent, Mayer's reagent, ทดสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ด้วยน้ำยาทดสอบ Shinoda'sreagent, Ferric chloride, Lead acetate, ทดสอบสารกลุ่มฟีนอลและแทนนิน (Phenol and Tannin) ด้วยน้ำยาทดสอบ Ferric chloride, Lead acetate, ทดสอบสารกลุ่มซาโปนิน (Saponin) ด้วยน้ำยาทดสอบ Olive oil test, ทดสอบสารกลุ่มเทอร์ปินอยด์ และเสตียรอยด์ ด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น salkowski's test, ทดสอบสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น Benedict's reagent, Fehling's reagent, Barfoed's reagent

4. การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีเบื้องต้นของว่านน้ำด้วยเทคนิค HPTLC

4.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารต่างๆ ที่มีในสารสกัดว่านน้ำด้วยวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPTLC

หาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารต่างๆ ด้วยเครื่อง HPTLC-densitometerโดยใช้สารสกัดหยาบในตัวทำละลาย methanol เป็นตัวอย่างในการทดสอบ หยดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 ไมโครลิตร ด้วยเครื่อง Nanomat4 (บริษัท Camag) ลงบนแผ่นโครมาโทกราฟีชนิดแผ่นบางชนิดอลูมิเนียมที่เคลือบด้วย silica gel 60 F_{254} (Merck 5554) สำหรับวัฏภาคเคลื่อนที่ใช้ตัวทำละลายชนิดเดียว ได้แก่ diethyl ether, petroleum ether, tert-butyl methyl ether, methanol, ethanol, butanol, propanol, propane1,2diol, emyl alcohol, tetrahydrofuran, formaldehyde, acetic acid, dichloromethane, ethyl acetate, dioxane, acetone, acetonitrile, benzene, toluene, xylene, chloroform, hexane, water ตามลำดับ การแยกด้วยตัวทำละลายผสม โดยนำสารสกัดว่านน้ำไป develop ในวัฏภาคเคลื่อนที่ผสม 2 ชนิดโดยการผสมตัวทำละลายไม่มีขั้วกับตัวทำละลายมีขั้วในอัตราส่วนต่างๆ 5 ระบบ ดังแสดงในตารางที่ 2 แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตรและพ่นด้วยน้ำยาพ่น

Dragendoff's reagent ให้สารเกิดปฏิกิริยาแสดงเป็นแถบสีชัดเจนตรวจสอบภายใต้แสงธรรมชาติและแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

ตารางที่ 1 แสดงระบบระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ในการแยกสารสกัดด้วยเทคนิค HPTLC

ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่	อัตราส่วน
Dichloromethane : Ethylacetate	96 : 4
Dichloromethane : Methanol	97 : 3
Hexane : Ethylacetate	90 : 10
Petroleum ether : Ethylacetate	97 : 3
Tolunene : Ethylacetate	97 : 3

4.2 การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบว่านน้ำ

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสม นำสารสกัดว่านน้ำด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ มาทำการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีเบื้องต้นด้วยเทคนิค HPTLC เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน β- asarone และนำสารสกัดว่านน้ำและสารมาตรฐานมา develop ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่ได้ตามวิธีการทดลองข้อ 4.1

5. การสกัดแยกสารกึ่งบริสุทธิ์

เลือกสารสกัดหยาบที่ได้ทำการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผักและมีฤทธิ์มากที่สุด 5 กรัม มาสกัดแยกด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ silica gel 60 ขนาดอนุภาค 0.040-0.063 มิลลิเมตร เป็นวัฏภาคคงที่ ชะด้วยระบบตัวทำละลายแบบ gradient elution ของเอทิลอะซิเตทต่อไดคลอโรมีเทน โดยเริ่มชะด้วยไดคลอโรมีเทน จากนั้นเพิ่มความมีขั้วขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงเอทิลอะซิเตท (0% - 100% เอทิลอะซิเตทต่อไดคลอโรมีเทน) เก็บสารสกัดเป็นส่วนส่วนละ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำ ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนจนแห้ง นำแต่ละ fraction มา spot ลงบนแผ่นโครมาโทกราฟีชนิดแผ่นบางชนิดอลูมิเนียมที่เคลือบด้วย silica gel 60 F_{254} นำไปดูลักษณะการแยกของสารด้วยเทคนิค HPTLC โดยตรวจสอบภายใต้หลอดกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตรและพ่นด้วยน้ำยาพ่น Dragendoff's reagent แล้วทำการรวม fraction แต่ละ fraction โดยอาศัยลักษณะการแยกของสารที่เหมือนกันนำมารวมเป็น fraction เดียวกัน แล้วไปทดสอบหนอนใยผักเพื่อหาสารกึ่งบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์

6. บันทึกและรวบรวมข้อมูล

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2560 สิ้นสุด กันยายน 2561
สถานที่ทดลอง กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ
กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลอง

1. การสำรวจ เก็บตัวอย่างว่านน้ำ และเตรียมเป็นสารสกัดหยาบ

ได้ตัวอย่างว่านน้ำ ที่สับเป็นท่อน ผึ่งแห้ง บดแล้วเก็บในภาชนะทึบแสง (รูปที่ 1)

ก) ข) ค)

รูปที่ 1ก) เหง้าว่านน้ำสด ข) สับเป็นท่อน ค) ว่านน้ำบดละเอียด

2. ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดว่านน้ำ ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผัก

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบว่านน้ำเข้มข้น 2 % ต่อเปอร์เซนต์การตายของหนอนใยผัก ดังตารางที่ 2 พบว่าสารสกัดหยาบ methanol มีประสิทธิภาพทำให้หนอนตายมากที่สุด 96.33 % รองลงมาคือสารสกัดหยาบเอทานอล 88.33% และสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน 86.67 % ตามลำดับ ซึ่งทั้งสามตัวทำละลายให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ รองลงมาคือ สารสกัดหยาบว่านน้ำในเอธิลอะซิเตท 83.33 %, hexane 78.33 %, acetone 76.67%, petroleum ether 61.67% และ chloroform 61.67% ตามลำดับ ในการทดลองนี้ตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดว่านน้ำมี 3 ชนิด คือ methanol, ethanol และ dichloromethane ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Matharu *et al*. (2017) ที่รายงานว่าสารสกัดหยาบจากว่านน้ำที่สกัดด้วยเมทานอล มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผักได้ดีที่สุด โดยทดสอบพบว่าสารสกัดเมทานอลของว่านน้ำเข้มข้น 5 % สามารถยับยั้งการกินของหนอนใยผักได้ 87.96% หลังการทดสอบสาร 3 วัน

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผัก วัย 2 ที่ใช้สารสกัดหยาบว่านน้ำจากตัวทำละลายต่างๆ ในการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นต่อหนอนใยผัก

กรรมวิธี	% Mortality
สารสกัดหยาบ dichloromethane	86.67 b
สารสกัดหยาบ methanol	96.33 a
สารสกัดหยาบ ethanol	88.33 b
สารสกัดหยาบ ethyl acetate	83.33 bc
สารสกัดหยาบ acetone	76.67 d
สารสกัดหยาบ petroleum ether	61.67 e
สารสกัดหยาบ hexane	78.33 cd
สารสกัดหยาบ chloroform	61.67 e
acetone (กรรมวิธีควบคุม)	9.67 f
CV(%)	**5.0**

หมายเหตุ : ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3. ผลการทดสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น โดยวิธีการทดสอบทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบ

ผลการทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบว่านน้ำ พบว่าประกอบด้วยสารกลุ่ม อัลคาลอยด์, ฟลาโวนอยด์, เทอร์ปีนอยด์, ฟีนอลิก, แทนนินและ ไกลโคไซด์ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีในสารสกัดว่านน้ำ ด้วยน้ำยาทดสอบชนิดต่างๆ

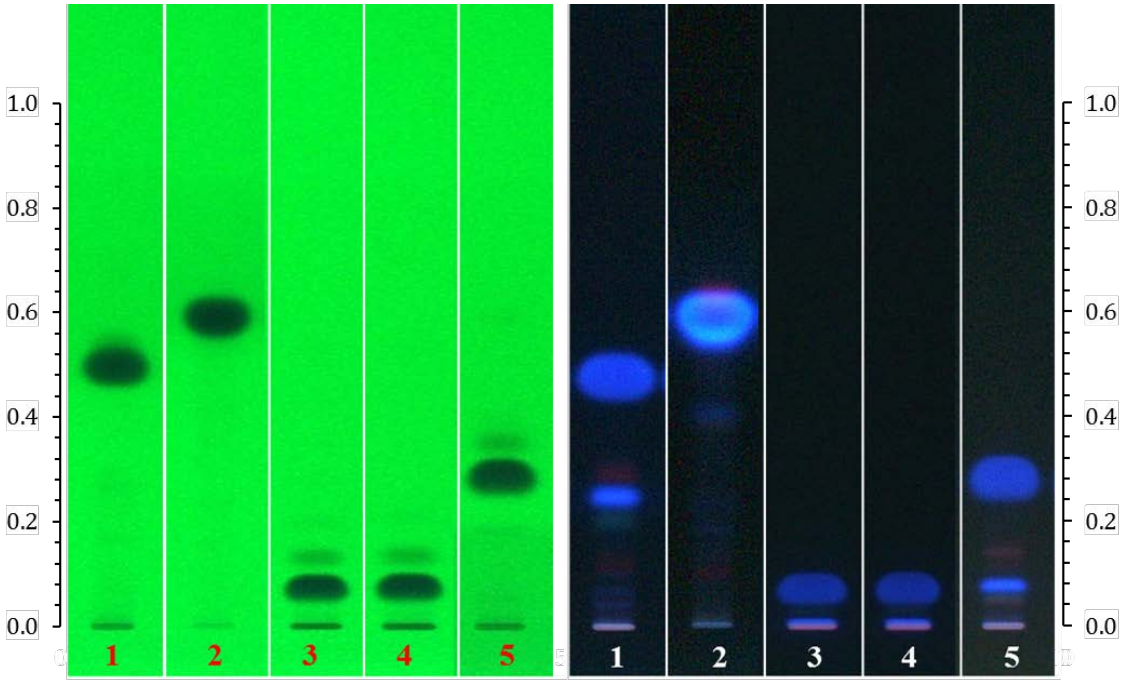
กลุ่มสารพฤกษเคมี	น้ำยาทดสอบ	สารสกัดว่านน้ำด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ								
		Acetone	Hexane	Chloroform	Petroleum ether	Dichloromethane	Ethyl acetate	Ethanol	Methanol	น้ำ
alkaloids	Dragendorff's reagent	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mayer's reagent	+	+	+	-	+	-	+	+	-
flavonoids	Shinoda's reagent	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	Ferric chloride	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Lead acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phenols and tannins	Ferric chloride	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
saponin	Olive oil test	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Terpenoids, steroids	Salkowski's test	+	+	+	+	+	+	+	+	-
carbohydrate	Benedict's reagent	-	-	+	-	+	+	+	+	+
	Fehling's reagent	-	+	-	-	+	+	+	+	+
	Barfoed's reagent	-	-	-	-	-	-	+	+	+

หมายเหตุ – หมายถึง ตรวจสอบไม่พบ, + หมายถึง ตรวจสอบพบ

4. ผลการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีเบื้องต้นของว่านน้ำด้วยเทคนิค HPTLC

4.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารต่างๆ ที่มีในสารสกัดว่านน้ำด้วยวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPTLC

ผลการศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการแยกสารสกัดว่านน้ำโดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียว พบว่าตัวทำละลายชนิดเดียวไม่สามารถแยกสารต่างๆ ในสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ออกจากกันได้แต่เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่โดยตัวทำละลายผสม 2 ชนิด 5 ระบบพิจารณาจากทีแอลซีโครมาโทแกรม (รูปที่ 2) พบว่าระบบวัฏภาคของเหลว ระบบที่ 1, 2 และ 5 เกิดการแยกที่ชัดเจน แต่ระบบที่ 2 พบว่ามีแถบสารที่ Rf ประมาณ 0.6 สารไม่สามารถแยกออกจากกันได้ และเมื่อเปรียบเทียบระบบที่ 1 กับระบบที่ 5 พบว่า ระบบที่ 1 (Dichloromethane/ethylacetate (96/4)) สามารถแยกสารสำคัญได้ดีที่สุดจึงเป็นระบบวัฏภาคของเหลวที่เหมาะสมที่สุด



(ก) (ข)

รูปที่ 2 เปรียบเทียบทีแอลซีโครมาโทแกรมของสารสกัดว่านน้ำ ด้วยวัฏภาคของเหลวทั้ง 5 ระบบ (ก) ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (ข) ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

ระบบที่ 1 Dichloromethane : Ethylacetate (96:4)
ระบบที่ 2 Dichloromethane : Methanol (97:3)
ระบบที่ 3 Hexane : Ethylacetate (90:10)
ระบบที่ 4 Petroleum ether : Ethylacetate (97 : 3)
ระบบที่ 5 Tolunene : Ethylacetate (97 : 3)

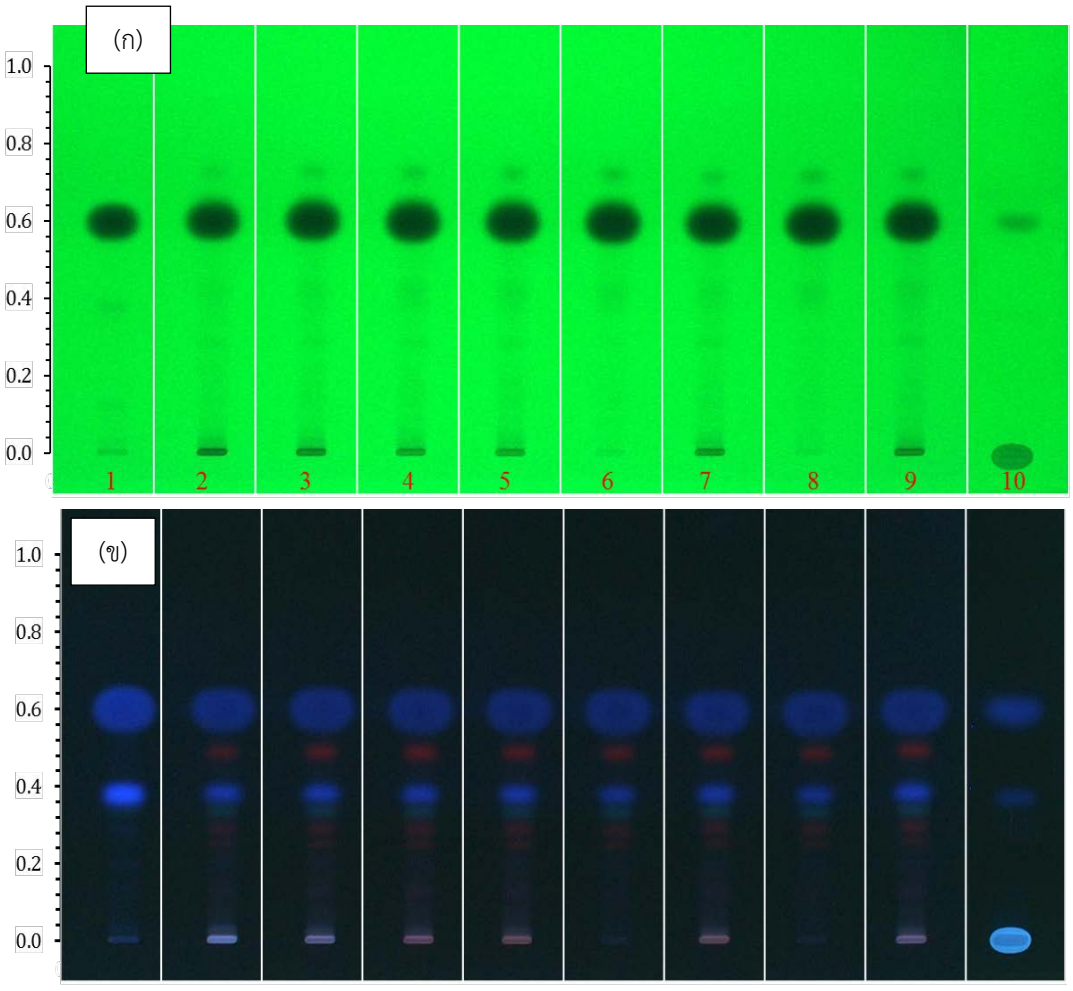
จากผลการศึกษาจึงได้สภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของกลุ่มสารสำคัญจากว่านน้ำ ดังนี้

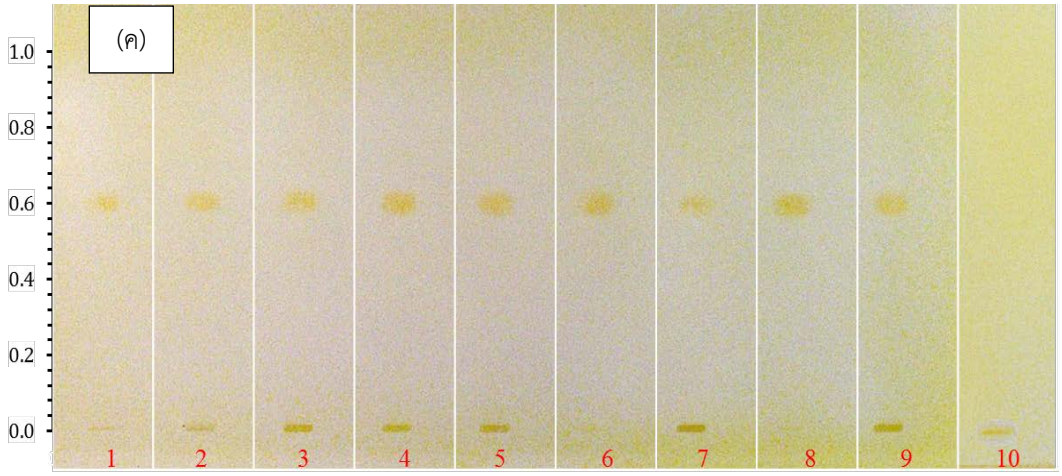
วัฏภาคคงที่ : แผ่น TLC ชนิด HPTLC plate silica gel 60 F254 size 20x10 cm
วัฏภาคของเหลว (mobile phase) : Dichloromethane/ethylacetate (96/4)
ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 298 nm
ส่องภายใต้แสง UV 254 และ 366nm

4.2 ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของว่านน้ำด้วยเทคนิค High Performance Thin Layer (HPTLC)

ผลการศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทรกราฟีพบว่าในสารสกัดว่านน้ำด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ พิจารณาจากทีแอลซีโครมาโทแกรม (รูปที่ 3) แถวที่ 2-9 ปรากฏตำแหน่งการเคลื่อนที่ของสารต่างชนิดกันที่ตำแหน่งแตกต่างกัน อย่างชัดเจน โดยสารที่แยกได้มีจำนวน 9 แถบ มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับ (Rf) 0.13, 0.21, 0.31, 0.37, 0.42, 0.53, 0.62 และ 0.78 โดยพบแถบสารที่เด่นชัดมีค่า Rf 0.62 และตรงกับค่า Rf ของสารมาตรฐาน β-asarone สามารถตรวจสอบได้ชัดเจนภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรจะพบเป็นจุดสีดำ และเป็นจุดเรืองแสงสีฟ้า เมื่อ

ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร จากการยืนยันด้วยการสเปรย์ด้วย Dragendroff' s reagent พบว่าทุกแถบสารที่ Rf 0.62 เปลี่ยนเป็นสีเหลืองเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน เมื่อศึกษา ultraviolet spectrum ของสารสกัดว่านน้ำจากจุด Rf 0.62 พบว่าจุดดังกล่าวมี maximum absorption ที่ 298 นาโนเมตร และตรงกันกับสารมาตรฐาน (รูปที่ 4) และระยะการเคลื่อนที่ของสารที่ปรากฏบน ทีแอลซีโครมาโทแกรมแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากว่านน้ำถึงแม้จะสกัดด้วยตัวทำละลายคนละชนิดก็สามารถสกัดได้สารชนิดเดียวกัน ในทางตรงกันข้ามกับสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำ เมื่อพิจารณาจาก ทีแอลซีโครมาโทแกรมแถวที่ 10 ปรากฏแถบสารที่เด่นชัดเพียง 2 จุด แสดงให้เห็นว่ายังมีสารบางชนิดสกัดออกมาไม่หมด ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากความมีขั้วของน้ำไม่สามารถสกัดสารที่ไม่มีขั้วในว่านน้ำได้ แต่เมื่อพิจารณา 2 แถบสารพบว่ามีค่า Rf ตรงกับสารมาตรฐาน แสดงว่าน้ำสามารถสกัดแยกสารสำคัญออกมาได้เช่นเดียวกันกับตัวทำละลายอื่นแต่สกัดออกมาได้ไม่ดี ดังนั้นน้ำจึงไม่เหมาะสมที่จะใช้สกัดว่านน้ำ

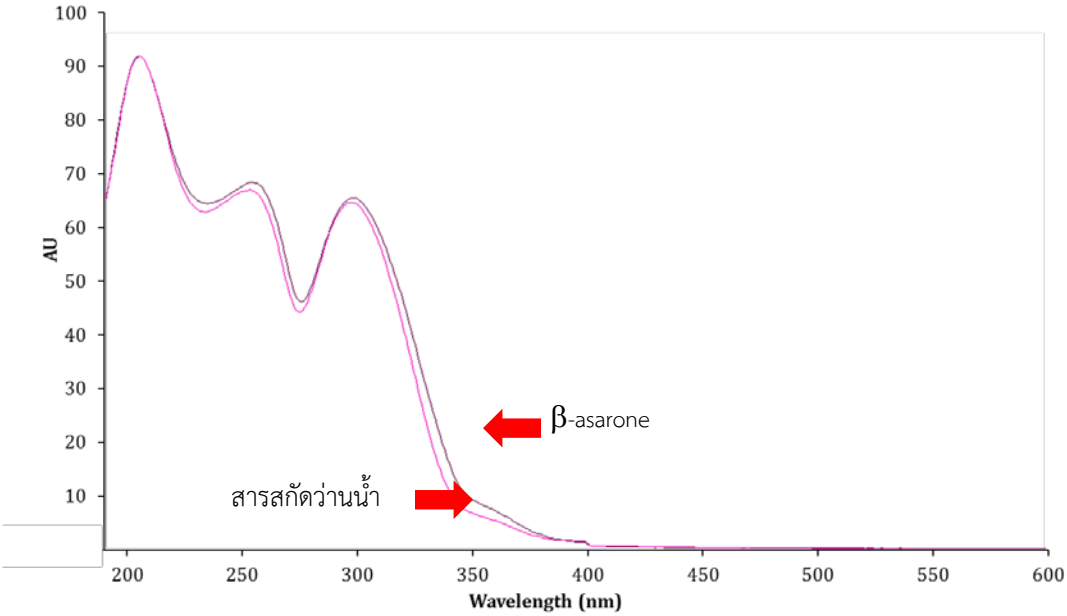




รูปที่ 3 ทีแอลซีโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน β-asarone และสารสกัดว่านน้ำในตัวทำละลายต่างๆ

1= β-asarone 2=methanol 3=ethanol
4= ethyl acetate, 6= petroleum ether 7=chloroform
8= hexane, 9=acetone 10=น้ำ

(ก) ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร
(ข) ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร
(ค) ตรวจสอบด้วยน้ำยาพ่น Dragendorff's reagent

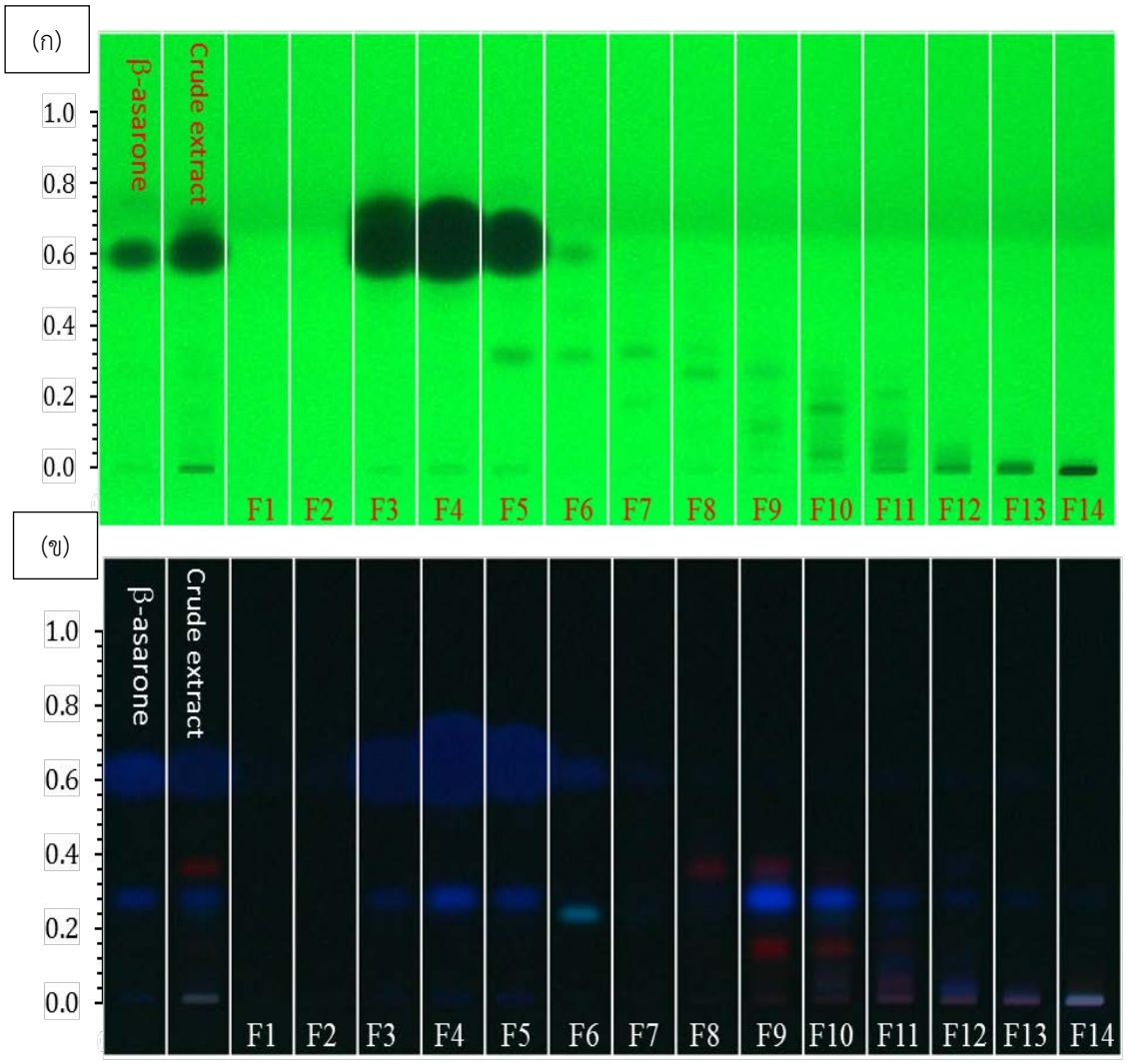


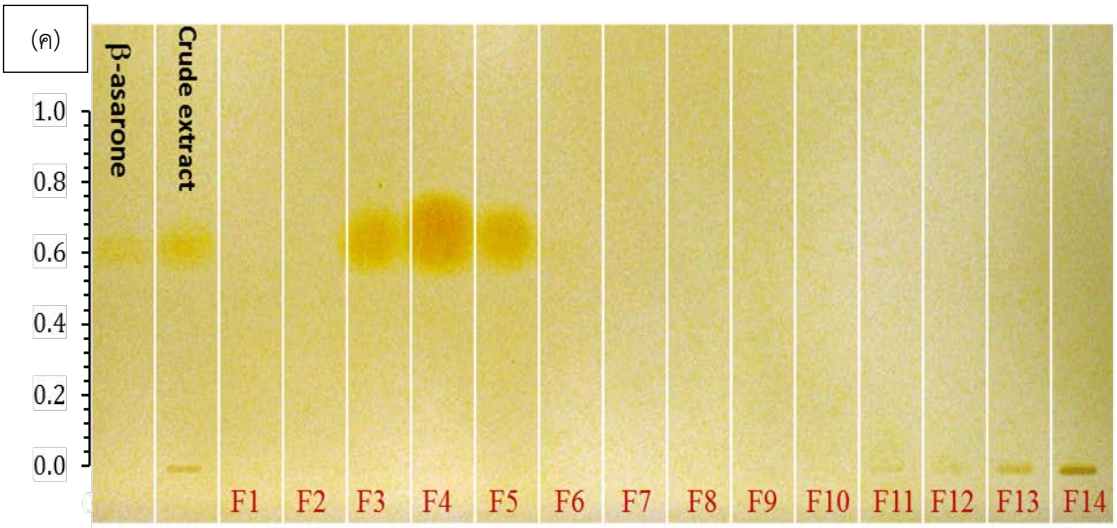
รูปที่ 4 เปรียบเทียบ Ultraviolet spectrum ระหว่าง β-asarone และสารสกัดว่านน้ำจาก spot ที่ Rf 0.62

5. การสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์เพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก

นำสารสกัดหยาบ methanol ไปสกัดแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ silica gel 60 ขนาดอนุภาค 0.040-0.063 มิลลิเมตร เป็นวัฏภาคคงที่ ชะด้วยระบบตัวทำละลายแบบ gradient elution ของเอทิลอะซิเตทต่อไดคลอโรมีเทน โดยเริ่มชะด้วยได

คลอโรมีเทน จากนั้นเพิ่มความมีขั้วขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงเอทิลอะซิเตท (0 - 100% เอทิลอะซิเตทต่อไดคลอโรมีเทน) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนจนแห้ง และทำการเปรียบเทียบส่วนสกัดย่อยด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดแผ่นบาง โดยตรวจสอบภายใต้หลอดกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต สารที่แยกได้มีทั้งหมด 14 fraction (F1-F14) นำแต่ละ fraction มา spot บน TLC plate นำไปดูลักษณะ fingerprint ของสารด้วยเครื่อง UV ผลจากทีแอลซีโครมาโทแกรม (รูปที่ 5) พบว่า fraction F3, F4 และ F5 มีลักษณะ Band ที่มีค่า Rf ตรงกับสารมาตรฐาน β-asarone เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรพบว่าเป็นจุดสีดำและเป็นจุดเรืองแสงสีฟ้า เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร จากการยืนยันด้วยการสเปรย์ด้วยน้ำยาพ่น Dragendorff's reagent พบว่าเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน ดังนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่ามีการตรวจพบสารสำคัญ β-asarone ในสารสกัดว่านน้ำ จากนั้นทำการรวม fraction แต่ละ fraction โดยอาศัยลักษณะการแยกของสารที่เหมือนกันนำมารวมเป็น fraction เดียวกัน โดยใช้อักษรสองตัวหน้าของ Acorus Calamus Linn เป็นชื่อของ fractions ต่าง ๆ ได้สารทั้งหมด 4 ชุด คือ AC1 (F1-F2), AC2 (F3-F7), AC3 (F8-F11) และ AC4 (F12-F14)





รูปที่ 5 ทีแอลซีโครมาโทแกรมของแต่ละ fraction ของสารสกัดว่านน้ำที่แยกโดยเทคนิค column chromatography (ก) ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (ข) ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร (ค) ตรวจสอบด้วยน้ำยาพ่น Dragendorff's reagent

6. ผลการทดสอบประสิทธิภาพ (efficacy) ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์

การทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผักวัย 2 โดยวิธี Leaf dipping method วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ ที่อัตราความเข้มข้น 0.5 %w/v โดยมี 4 สารกึ่งบริสุทธิ์ AC1, AC2, AC3, AC4 และตัวทำละลาย acetone เป็นกรรมวิธี ผลทดสอบพบว่าหนอนใยผักตาย 8.75, 92.5, 72.5, และ 42.5% ตามลำดับ (ตารางที่ 4) จากการวิเคราะห์ทีแอลซีโครมาโทแกรมของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่แยกได้นั้น สาร AC2 เกิดจากการรวม fraction F3-F7 ซึ่งมีลักษณะตรงกับสารมาตรฐาน β-asarone จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ของว่านน้ำคือ β-asarone ข้อมูลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลอง Yao *et al*. (2008) และคณะได้ศึกษาพบว่าสารสกัดว่านน้ำมีคุณสมบัติในการเป็นสารขับไล่ด้วงงวงขาว (*Sitophillus zeamais*) และเมื่อทำการแยกสารให้บริสุทธิ์พบว่าในสารสกัดว่านน้ำมีองค์ประกอบสำคัญคือ β-asarone และพบว่า β-asarone เข้มข้น 40.89 $\mu g/cm^2$ ทำให้ด้วงงวงขาวตาย 100 % Park *et al*. (2003) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ asarone พบว่า β-asarone มีความเป็นพิษต่อแมลงมากกว่า α-asarone Koul *et al*. (1990) ทดสอบสาร asarones ที่สกัดจากเหง้าว่านน้ำกับหนอนผีเสื้อกลางคืน (*Peridrama saucia*) พบว่า สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการกินอาหารของหนอนผีเสื้อกลางคืนได้ โดยมีสารที่ออกฤทธิ์คือ β-asarone Schmidt *et al*. (1994) ทดสอบประสิทธิภาพของ β-asarone ที่สกัดจากว่านน้ำต่อการกินอาหารของด้วง (*Prostephanus truncates*) เป็นเวลา 21 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าสารสกัดมีผลทำให้อัตราการกินอาหารของด้วงลดลง 50% และยังพบว่าช่วงอุณหภูมิมีผลต่อการออกฤทธิ์ของสาร หากอุณหภูมิสูงขึ้นประมาณ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกินอาหารของด้วงลดลงถึง 80% นอกจากนี้ Lee *et al.* (2002) ได้ทดสอบความเป็นพิษของ β-asarone ต่อหนอนใยผักโดยวิธี leaf dip method พบว่า β-asarone ความเข้มข้น 1000 ppm มีผลต่อการตายของหนอนใยผัก 83 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม Sharma *et al.* (2008) อธิบายว่า β-asarone เป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อแมลง โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลง มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ ยับยั้งการวางไข่และการ

เปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลง และยับยั้งการกินอาหารของแมลงโดยเข้าทำลายเซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร ทำให้ระบบการย่อยอาหารและระบบทางเดินอาหารถูกทำลาย ทำให้แมลงไม่สามารถกินอาหารได้ Chanatda *et al*. (2008) ยังอธิบายว่าสาร β-asarone เมื่อถูกดูดซึมเข้าในร่างกายของแมลงจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูธาไทโอน เอส ทรานเฟอเรส (glutathione S-transferases) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการกำจัดสารพิษของแมลง ซึ่งจะทำให้เกิดการสะสมสารพิษมากขึ้น แมลงเคลื่อนไหวช้าลงส่งผลทำให้ตายในที่สุด

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักวัย2 ในการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดว่านน้ำกึ่งบริสุทธิ์ที่อัตรา 0.5 %w/v

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักวัย2 (%corrected mortality)
1. AC1	8.75 d
2. AC2	92.50 a
3. AC3	72.50 b
4. AC4	42.50 c
7. acetone (กรรมวิธีควบคุม)	8.75 d
CV(%)	**17.5**

หมายเหตุ ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การวิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในว่านน้ำ โดยนำตัวอย่างว่านน้ำมาสกัดเป็นสารสกัดหยาบ และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPTLC โดยใช้ HPTLC glass plate silica gel60 F_{254} ด้วยสารตัวพา dichloromethane/ethyl acetate (96/4) ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm ซึ่งสามารถบ่งชี้เอกลักษณ์ทางโครมาโทรกราฟี (Fingerprint) ของสารสำคัญในสารสกัดว่านน้ำ โดยพบ β-asarone ที่ Rf 0.62 ผลทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดโดยวิธี Leaf dipping method โดยการใช้สารสกัดหยาบว่านน้ำ 2 % w/v ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ต่อหนอนใยผัก พบว่าการสกัดด้วย methanol, ethanol, dichloromethane และ ethyl acetate มีฤทธิ์ทำให้หนอนใยผักตายมากที่สุด 96.33%, 88.33%, 86.67% และ 83.33% ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติให้ผลไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อนำสารสกัดหยาบจากการสกัดด้วย methanol มาแยกต่อเป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography พบว่า สามารถแยกสารต่างๆ ได้แก่ AC1, AC2, AC3 และ AC4 ออกจากกันได้ จากผลการทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผักที่อัตรา 0.2 %w/v พบว่า AC2 มีผลต่ออัตราการตายของหนอนใยผักมากที่สุด 92.5 %w/v และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารกึ่งบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน β-asarone พบว่า AC2 มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับตรงกับสารมาตรฐาน จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในการกำจัดแมลงในว่านน้ำคือ β-asarone

กิจกรรมย่อยที่ 3.5

วิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในสาบเสือ

Study on HPTLC technique for providing fingerprint of active substances in *Chromolaena odorata* (L.) R.M. King & H. Robin

ผู้วิจัย

ณัฐพร ฉันทศักดา Nattaporn Chanthasakda

พรรณีกา อัตตนนท์ Panneeka Attanon

ภัควรินทร์ ศานติธีรโรจน์ Pukwarin Santiteerarod

บทคัดย่อ

วิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในสาบเสือ ซึ่งเป็นพืชที่มีศักยภาพในการกำจัดศัตรูพืช ดำเนินการเก็บตัวอย่างพืชสาบเสือจาก ต.หนองบัว อ.พัฒนานิคม จ.ลพบุรี สกัดใบสาบเสือด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ คือ petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, methanol และ acetronitrile ทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผักโดยวิธี leaf dipping method พบว่าสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ มีผลทำให้หนอนใยผักวัย 2 ตายที่ 4 วัน เท่ากับ 63.33, 66.67, 40.00, 36.67 และ 40.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยที่สารสกัดหยาบ petroleum ether และ dichloromethane ทำให้หนอนใยผักตายสูงสุดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาชนิดต่างๆ พบว่าสารสกัดหยาบ petroleum ether และ dichloromethane มีสารออกฤทธิ์กลุ่ม terpenoids และ phenol ตามลำดับ และศึกษาหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารกลุ่ม terpenoids และ phenol ด้วยเทคนิค HPTLC บนแผ่น HPTLC plate silica gel 60 F_{254} ขนาด 20x10 ซม. ผลพบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ วัฏภาคเคลื่อนที่: ethyl acetate : hexane (1:9, v/v) และ dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (79:20:1, v/v/v) ตามลำดับ; ตัวตรวจสอบ: UV 254 nm, UV 366 nm และ white light; สแกนสาร กลุ่ม terpenoids ที่ความยาวคลื่น 202 และ 263 nm สารกลุ่ม phenol ที่ความยาวคลื่น 290 nm ; น้ำยาพ่น p-anisaldehyde/sulfuric acid reagent และ Fast Blue B reagent ตามลำดับ พบสารกลุ่ม terpenoids ในใบ ดอก และก้านสาบเสือ ที่ R_F 3 ตำแหน่ง คือ 0.16, 0.33 และ 0.63 และพบสารกลุ่ม phenol ในใบและดอกสาบเสือที่ R_F 1 ตำแหน่ง คือ 0.55 และเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์สาบเสือ พบว่า ผลิตภัณฑ์ให้เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี terpenoids ในตำแหน่ง R_F 0.10, 0.43 และ 0.53 และไม่พบสารกลุ่ม phenol ในผลิตภัณฑ์สาบเสือ

คำสำคัญ : เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี, สาบเสือ, หนอนใยผัก

Abstract

Siam weed is locally used in Thailand as botanical pesticide. A high performance thin-layer chromatography (HPTLC) method was developed for a fast analysis of HPTLC fingerprint of active substances in Siam weed from Lopburi province. Siam weed's leaves were sequentially extracted with petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, methanol and acetronitrile. These extracts were

tested against 2nd star diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) by leaf dipping method. Results showed the mortality were 63.33, 66.67, 40.00, 36.67 and 40.00%, respectively. The highest insecticidal activity was observed from petroleum ether and dichloromethane extract of Siam weed. Preliminary phytochemical screening of the effective crude extracts showed the presence of terpenoids and phenol group. HPTLC fingerprint of terpenoids and phenol were performed by ethyl acetate : hexane (1:9, v/v) and dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (79:20:1, v/v/v), respectively as mobile phase. The terpenoids were detected at wavelength 202 and 263 nm also 209 nm for phenol. HPTLC fingerprint of Siam weed revealed three peaks of terpenoids (R_F 0.16, 0.33, 0.63) in leaf, branch and flower parts and one peak of phenol (R_F 0.55) in leaf and branch. Commercial products revealed three peaks of terpenoids (R_F 0.10, 0.43, 0.53).

Key word : HPTLC fingerprint, Siam weed, *Plutella xylostella* L.

บทนำ

การใช้สารสกัดจากพืชในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เป็นทางเลือกหนึ่งในการสนับสนุนการลดการใช้สารเคมีในภาคการเกษตร เพื่อแก้ไขปัญหาสารพิษตกค้างในผลผลิตทางการเกษตร และสิ่งแวดล้อม จนส่งผลกระทบต่อภาคการส่งออก และระบบนิเวศ รวมถึงการสร้างความต้านทานต่อสารเคมีของแมลงศัตรูพืช สารสกัดจากพืชสามารถสลายตัวได้ง่ายในธรรมชาติ ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม สารสกัดจากพืชยังมีองค์ประกอบหลายชนิด แมลงจึงต้องใช้ระยะเวลาในการสร้างความต้านทาน สารสกัดจากพืชที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เช่น สะเดา หางไหล หนอนตายหยาก ว่านน้ำ รวมถึง สาบเสือ สาบเสือเป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยมจากเกษตรกร เนื่องจากหาง่าย และขึ้นได้เองตามธรรมชาติ

สาบเสือ (Siam weed, bitter bush) เป็นพืชในสกุล Chromolaena จัดอยู่ในวงศ์ทานตะวัน COMPOSITAE (ASTERACEAE) จัดเป็นวัชพืชที่มีถิ่นกำเนิดในแถบอเมริกากลาง และระบาดทั่วไปในเขตร้อนทั่วทุกทวีป สารสกัดสาบเสือมีศักยภาพในการควบคุมวัชพืช จากการศึกษาของ ชอุ่ม และคณะ (2550) ซึ่งทำการทดสอบประสิทธิภาพสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำ ต่อพืชปลูก ที่อัตราการสกัด 1 กิโลกรัมสาบเสือสดต่อน้ำ 3 ลิตร พ่นให้แก่พืชปลูกอายุสั้นที่นิยมบริโภคสด และวัชพืชที่เป็นปัญหาในสภาพไร่ พบว่าการพ่นแบบก่อนพืช และวัชพืชงอก (pre-emergence) และหลังพืชและวัชพืชงอก (post-emergence) มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช และวัชพืช คือ วัชพืชจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตมากกว่าพืชปลูก และ ธนิตา และคณะ (2558) ได้ศึกษาประสิทธิภาพเบื้องต้นของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบจากสาบเสือต่อการงอกของวัชพืช พบว่า ทั้งสองมีผลต่อการงอก ความยาวราก ความยาวยอดของต้นไมยราบยักษ์ และสารสกัดหยาบให้ผลการยับยั้งการงอกของไมยราบยักษ์สูงกว่าน้ำมันหอมระเหย

สาบเสือยังมีฤทธิ์ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช โดยจากการศึกษาของ วันวิสา (2549) พบว่า สารสกัดหยาบจากสาบเสือแห้งที่สกัดด้วยวิธี Moving bed ด้วยตัวทำละลาย n-hexane มีแนวโน้มออกฤทธิ์ต่อหนอนกระทู้ผักดีที่สุด โดยจะทำให้หนอนกระทู้ผักมีอัตราการตาย 50% ส่วนการสกัดสารจากสาบเสือแห้งโดยวิธี Fixed bed พบว่าสารสกัด dichloromethane มีแนวโน้มออกฤทธิ์ต่อ

หนอนกระทู้ผักดีที่สุด และจากการทดสอบสมบัติการยับยั้งการกินอาหารของหนอนกระทู้ผัก พบว่า สารสกัดหยาบจากสาบเสือแห้งที่สกัดด้วยตัวทำละลาย dichloromethane โดยวิธี Moving bed มีผลในการยับยั้งการกินอาหารดีที่สุด มี %AFI เท่ากับ 28.49 และงานวิจัยของ Nathapong (2560) พบว่าสารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล สามารถไล่ ฆ่า และยับยั้งการกินของเพลี้ยอ่อนถั่วโดยวิธีจุ่มใบพืช ในห้องปฏิบัติการได้ Bouda *et al.* (2001) ได้ศึกษาประสิทธิภาพความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากสาบเสือต่อด้วงงวงข้าวโพด พบว่ามีค่า LC_{50} เท่ากับ 6.78% w/v ที่เวลา 24 ชั่งโมง Ezena (2016) ได้ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดสาบเสือต่อแมลงศัตรู และผลกระทบต่อศัตรูธรรมชาติในแปลงกะหล่ำปลี พบว่า สารสกัดสาบเสือที่ความเข้มข้น 10-30 g/L w/v สามารถควบคุมเพลี้ยอ่อนและหนอนใยผัก โดยที่ความเข้มข้น 10-20 g/L w/v พบจำนวนศัตรูธรรมชาติสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และกรรมวิธีสารเคมี เช่นเดียวกับงานวิจัยของธนิตาและคณะ (2558) พบว่าสารสกัดหยาบจากสาบเสือมีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผักได้สูงกว่าน้ำมันหอมระเหยจากสาบเสือ

นอกจากผลการศึกษาเชิงประสิทธิภาพแล้ว ธนิตาและคณะ (2558) ได้ศึกษากลุ่มสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากส่วนต่างๆของสาบเสือด้วยเครื่อง GC/MS พบว่ากลุ่มสารสำคัญที่พบได้แก่ germacrene D, trans-caryophyllene, pregeijerene, Geyrene, α-pinene, β-pinene, delta-cadinene, α-copaen, α-caryophyllene เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Lawal และคณะ (2015) ได้วิเคราะห์สารประกอบระเหยง่ายในสารสกัดใบสาบเสือ ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด คือ hexane, chloroform, ethyl acetate และ methanol พบว่าสารสกัดใบสาบเสือจาก hexane มีองค์ประกอบหลักคือ phytol, caryophyllene oxide, germacrene D และ β-caryophyllene สำหรับสารสกัดจาก chloroform ประกอบด้วย dodecyl acetate, oleic acid methyl ester, di-n-octyl phthalate และ hexadecanoic acid methyl ester สารสกัดจาก ethyl acetate พบว่ามี phytol, caryophyllene oxide, γ-muurolene, hexadecanoic acid และองค์ประกอบหลักของสารสกัดเมทานอล ได้แก่ hexadecanoic acid, caryophyllene oxide, α-terpineol และ α-cubebene

ทีแอลซีสมรรถนะสูง (High Performance Thin Layer Chromatography : HPTLC) คือเป็นเทคนิคหนึ่งที่ได้รับความนิยมสูงในการควบคุมคุณภาพสมุนไพร ซึ่งพัฒนามาจากเทคนิคทีแอลซี (Thin Layer Chromatography: TLC) โดยอาศัยหลักการการแยกสารบนแผ่นที่เคลือบด้วยตัวดูดซับ เทคนิค HPTLC สามารถตรวจสอบได้ทั้งเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ โดยอาศัยเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี และการตรวจวัดความเข้มข้นด้วยอุปกรณ์ Densitometer ซึ่งมีความถูกต้อง (accuracy) มีความแม่นยำ (precision) มีสภาพไว (sensitivity) และมีความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำ (reproducibility) เทคนิค HPTLC สามารถควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพรในทัศนะระดับชาติและระดับสากล นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน จึงเป็นเทคนิคที่ประหยัดเวลา และค่าใช้จ่าย

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยข้างต้นยังขาดวิธีการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สาบเสือสำหรับกำจัดศัตรูพืช เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวเทคนิค HPTLC จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากเทคนิคนี้สามารถตรวจเอกลักษณ์สารสำคัญของตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับเอกลักษณ์มาตรฐาน ทำให้สามารถใช้ควบคุณคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพรได้เบื้องต้น โดยงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาข้อมูลเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในสาบเสือที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช สำหรับการทำเป็นมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพสารสำคัญในสาบเสือ

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์และสารเคมี

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
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 xylostella* Linnaeus.

วิธีการ

1. ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสาบเสือที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผัก

1.1 เก็บและเตรียมตัวอย่างสาบเสือ

เก็บตัวอย่างพืชสาบเสือจาก ต.หนองบัว อ.พัฒนานิคม จ.ลพบุรี (พิกัด 14.846731, 101.086401) และเตรียมตัวอย่างโดยแยกส่วน ดอก ใบ และก้าน หั่นและอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 40°C บดให้เป็นผงละเอียด และเก็บในภาชนะทึบแสง

1.2 แช่ผงใบ ก้าน และดอกสาบเสือด้วยตัวทำละลาย methanol ในอัตราส่วน 5% w/v แล้วกรองหยาบด้วยผ้าคอตตอนดิบ นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นต่อหนอนใยผักวัย 2 วิธี leaf dipping method 3 กรรมวิธี ดังนี้ สารสกัดใบใน methanol, สารสกัดก้านใน methanol และสารสกัดดอกใน methanol พบเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักเท่ากับ 25.64, 6.41 และ 8.33% ตามลำดับ จึงเลือกใบมาศึกษาประสิทธิภาพในขั้นตอน 1.3

1.3 ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบใบสาบเสือที่มีฤทธิ์ในการควบคุมหนอนใยผัก

สกัดใบสาบเสือ 60 g ด้วยเครื่อง Soxhlet Extractor ในตัวทำละลาย petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, methanol และ acetronitrile ตามลำดับ ระเหยส่วนที่ได้จากการสกัด นำสารสกัดหยาบทั้ง 5 ชนิด ในอัตราส่วน 2.5% w/v มาทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนใยผักวัย 2 โดยวางแผนแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ดังนี้ สารสกัดหยาบใบสาบเสือใน petroleum ether, สารสกัดหยาบใบสาบเสือใน dichloromethane, สารสกัดหยาบใบสาบเสือใน ethyl acetate, สารสกัดหยาบใบสาบเสือใน methanol, สารสกัดหยาบใบสาบเสือใน acetronitrile โดยมี methanol เป็นกรรมวิธีควบคุม ดำเนินการทดสอบโดยวิธี leaf dipping method โดยการจุ่มลงในสารทดสอบเป็นเวลา 5 วินาที ผึ่งใบผักคะน้าให้แห้ง จากนั้นนำไปใส่ใน

กล่องเลี้ยงหนอนสำหรับทดสอบ ทำการปล่อยหนอนใยผักกล่องละ 10 ตัว บันทึกผลการทดลอง โดยตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง หลังการทดลอง ตามลำดับ

2. ศึกษาชนิดของกลุ่มสารในสารสกัดชนิดต่างๆ โดยวิธีการทดสอบทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบ

นำสารสกัดใบสาบเสือที่ได้จาก 1.3 มาทดสอบกลุ่มสารต่างๆ โดยวิธีทางพฤกษเคมี นพมาศ และคณะ (2554)

- ทดสอบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloids) ด้วยน้ำยาทดสอบ Dragendorff's reagent, Mayer's reagent, Wagner's reagent, Valser's reagent
- ทดสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ด้วยน้ำยาทดสอบ Shinoda's reagent, Ferric chloride, Lead acetate, Alkaline reagent
- ทดสอบสารกลุ่มฟีนอลและแทนนิน (Phenol and Tannin) ด้วยน้ำยาทดสอบ Ferric chloride, Lead acetate, Gelatin
- ทดสอบสารกลุ่มซาโปนิน (Saponin) ด้วยน้ำยาทดสอบ Foam test
- ทดสอบสารกลุ่มเทอร์ปินอยด์ และเสตียรอยด์ ด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น Salkowski's test, Lieberman Burchard
- ทดสอบสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น Benedict's reagent, Fehling's reagent, Barfoed's reagent, Molisch reagent

ผลจากการทดสอบ ตารางที่ 3 พบว่าสารสกัดหยาบ petroleum ether มีสารกลุ่ม terpenoids เป็นสารหลัก และสารสกัดหยาบ dichloromethane มีสารกลุ่ม phenol เป็นสารหลัก จึงทำการศึกษาสารทั้งสองกลุ่มด้วย HPTLC ในขั้นตอนต่อไป

3. ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสกัดใบสาบเสือด้วยเครื่อง High-Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

3.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีสารกลุ่ม terpenoids ในสารสกัดหยาบ petroleum ether จากใบสาบเสือด้วยเทคนิค High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)

หาสภาวะของเครื่อง HPTLC ในการทดสอบสารสกัดสาบเสือ โดยนำข้อมูลกลุ่ม terpenoids ที่ได้จากข้อ 2. หา วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) และน้ำยาพ่น (spray reagent) ที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นวิธีตรวจวัดชนิดและตำแหน่ง (R_F) ของสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก เตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ 6 ระบบ ได้แก่ ethyl acetate : hexane (1:9, v/v), (2:8, v/v), (3:7, v/v), (5:5, v/v), ethyl acetate : hexane : acetic acid (28:71:1, v/v/v), dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (79:20:1, v/v/v)

3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีสารกลุ่ม phenol ในสารสกัดหยาบ dichloromethane จากใบสาบเสือด้วยเทคนิค High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)

หาสภาวะของเครื่อง HPTLC ในการทดสอบสารสกัดสาบเสือ โดยนำข้อมูลกลุ่ม phenol ที่ได้จากข้อ 2. หา วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) และน้ำยาพ่น (spray reagent) ที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นวิธีตรวจวัดชนิดและตำแหน่ง (R_F) ของสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก เตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ 3

ระบบ ได้แก่ benzene : 1,4-dioxane : acetic acid (90:25:2, v/v/v), dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (91:8:1, v/v/v) และ (79:20:1, v/v/v)

3.3 ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของกลุ่มสารสำคัญจากสาบเสือ ได้แก่ ใบสาบเสือ ก้านสาบเสือ ดอกสาบเสือ และตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด โดยสกัดสาบเสือและผลิตภัณฑ์ด้วย methanol อัตราส่วน 10% w/v แล้วนำสารสกัดไป ทดสอบด้วยเทคนิค HPTLC

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2560 สิ้นสุด กันยายน 2561
สถานที่ กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ
กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลอง

1. ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสาบเสือที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผัก

ผลการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดส่วน ใบ ก้าน และดอกสาบเสือด้วย methanol พบว่า สารสกัดส่วนใบ มีผลทำให้หนอนใยผักตายมากที่สุด 25.64% รองลงมาคือ ดอก 8.33% และก้าน 6.41% จึงเลือกส่วนใบมาศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผัก

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ 5 ชนิด สารสกัดหยาบใบสาบเสือจากทุกตัวทำละลายได้สารสกัด 1.26-11.74% w/w (ตารางที่ 1) ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบ petroleum ether มีลักษณะเป็นสารสีเขียวขี้เม้าเข้ม เหนียวข้น สารสกัดหยาบ dichloromethane มีลักษณะเป็นเกล็ดของแข็งสีดำแวววาว สารสกัดหยาบ ethyl acetate มีลักษณะเป็นของแข็งสีเขียวแก่ ด้าน ไม่แวววาว สารสกัดหยาบ methanol มีลักษณะสีน้ำตาลเข้มหนืด และสารสกัดหยาบ acetronitrile เป็นสารสีน้ำตาลเข้มหนืด (รูปที่ 1) ผลการทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผัก พบว่า สารสกัดหยาบ petroleum ether, dichloromethane มีผลทำให้หนอนใยผักตายสูงสุดเท่ากับ 63.33, 66.67% รองลงมา คือ สารสกัดหยาบ ethyl acetate, acetronitrile และ methanol มีผลทำให้หนอนใยผักตายเท่ากับ 40.00, 40.00 และ 36.67% ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบใบสาบเสือ และปริมาณสารสกัดหยาบต่อกรัม

ตัวทำละลาย	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบ	% (w/w)
petroleum ether	สารสีเขียวขี้ม้าเข้ม เหนียวข้น	6.69
dichloromethane	เกล็ดของแข็งสีดำแวววาว	5.69
ethyl acetate	ของแข็งสีเขียวแก่ถึงดำ ด้าน ไม่แวววาว	3.42
methanol	สารสีน้ำตาลเข้มหนืด	11.74
acetronitrile	สารสีน้ำตาลเข้มหนืด	1.26

รูปที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดใบสาบเสือจากตัวทำละลาย petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, methanol และ acetronitrile

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผัก วัย 2 ที่ใช้สารสกัดสาบเสือจากตัวทำละลายต่างๆ ในการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นต่อหนอนใยผัก

กรรมวิธี	% Mortality
สารสกัดหยาบสาบเสือ 2.5% (w/v) ใน petroleum ether	63.33 ab
สารสกัดหยาบสาบเสือ 2.5% (w/v) ใน dichloromethane	66.67 a
สารสกัดหยาบสาบเสือ 2.5% (w/v) ใน ethyl acetate	40.00 bc
สารสกัดหยาบสาบเสือ 2.5% (w/v) ใน methanol	36.67 cd
สารสกัดหยาบสาบเสือ 2.5% (w/v) ใน acetronitrile	40.00 bc
เมทานอล (กรรมวิธีควบคุม)	13.33 d
CV(%)	30.30

หมายเหตุ : ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2. ศึกษาชนิดของกลุ่มสารในสารสกัดชนิดต่างๆ โดยวิธีการทดสอบทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบ

จากการทดสอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดสาบเสือ (1.3) พบว่าสารสกัด petroleum ether และ dichloromethane ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักตรวจพบสารกลุ่ม terpenoids, flavonoids, phenol/tannin และ alkaloids แตกต่างจากสารสกัด methanol และ acetronitrile ที่พบเพียง flavonoids, phenol/tannin, saponin และ carbohydrate และสารสกัด ethyl acetate ที่พบเพียง flavonoids (ตารางที่ 3) โดยสารกลุ่ม terpenoids พบมากและเป็นสารกลุ่มหลักในสารสกัดหยาบ petroleum ether และสารกลุ่ม phenol พบมากและเป็นสารกลุ่มหลักในสารสกัดหยาบ dichloromethane

ผลการทดสอบชนิดกลุ่มสารด้วยน้ำยาทดสอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบ petroleum ether พบสารกลุ่ม terpenoids และผลการทดสอบของสารสกัดหยาบ dichloromethane พบสาร

กลุ่ม phenol เป็นสารออกฤทธิ์ในการควบคุมหนอนใยผัก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่ระบุว่า terpenoids และ phenol บางชนิดมีคุณสมบัติเป็นพิษต่อแมลง, Carlsen et al (2008)

ตารางที่3 ผลการทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีในสารสกัดหยาบใบสาบเสือด้วยน้ำยาทดสอบชนิดต่างๆ

กลุ่มสารพฤกษเคมี	น้ำยาทดสอบ	สารสกัดหยาบ				
		Petroleum ether	Dichloromethane	Ethyl acetate	Methanol	Acetronitrile
Alkaloids	Dragendorff's reagent	+	+	-	-	-
	Mayer's reagent	+	+	-	-	-
	Wagner’s reagent	+	+	-	-	-
	Valser’s reagent	+	+	-	-	-
Flavonoids	Shinoda's reagent	-	+	+	+	+
	Ferric chloride	-	-	-	-	-
	Lead acetate	+	+	+	+	+
	Alkaline reagent	+	+	+	+	+
Phenol/ tannin	Ferric chloride	+	+	+	+	+
	Lead acetate	+	+	-	+	+
	Gelatin	+	+	-	-	-
Saponin	Foam test	-	-	-	+	+
Terpenoids/steroids	Salkowski's test	+	-	-	-	-
	Lieberman Burchard	+	+	-	-	-
Carbohydrate	Benedict's reagent	-	-	-	+	+
	Fehling's reagent	-	-	-	+	+
	Barfoed's reagent	-	-	-	-	+
	Molisch	-	-	-	+	+

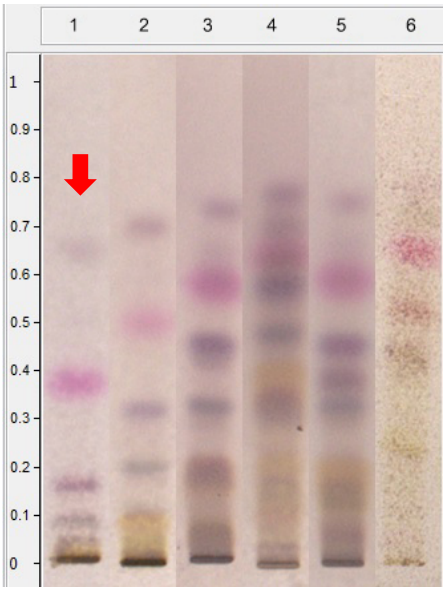
3. ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสกัดใบสาบเสือด้วยเครื่อง High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)

3.1 ผลศึกษาสภาวะ (conditions) เหมาะสมบนแผ่น TLC ชนิด HPTLC plate silica gel 60 F_{254} size 20x10 cm ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีสารกลุ่ม **terpenoids** ในสารสกัดหยาบ petroleum ether ใบสาบเสือ

3.1.1 วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่จำนวน 6 ระบบ ดังนี้

ระบบ	วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)	ตำแหน่ง terpenoids (R_F)
1	ethyl acetate : hexane (1:9, v/v)	0.16, 0.33, 0.63
2	ethyl acetate : hexane (2:8, v/v)	0.22, 0.40, 0.70
3	ethyl acetate : hexane (3:7, v/v)	0.42, 0.53, 0.72
4	ethyl acetate : hexane (5:5, v/v)	0.59, 0.65, 0.77
5	ethyl acetate : hexane : acetic acid (28:71:1, v/v/v)	0.45, 0.60, 0.75
6	dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (79:20:1, v/v/v)	0.52, 0.65, 0.78

จากการศึกษาข้างต้นพบว่า วัฏภาคเคลื่อนที่ ethyl acetate : hexane (1:9, v/v) สามารแยกสารกลุ่ม terpenoids ได้โดยไม่ถูกรบกวนจากพีคอื่น ซึ่งใช้เวลาในการ develop 11.10 นาที (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 HPTLC fingerprint ของสารสกัดหยาบ petroleum ether ใบสาบเสือ 6 ระบบ ภายใต้แสงขาว เมื่อถูก derivertized โดย p-anisaldehyde/sulfuric acid reagent [ระบบ 1-4 EtOAc : hexane (1:9, v/v; 2:8, v/v; 3:7, v/v; 5:5, v/v); ระบบ 5 EtOAc : hexane : acetic acid (28:71:1, v/v/v) และ ระบบ 6 CH_2Cl_2 : EtOAc : acetic acid (79:20:1, v/v/v)

3.1.2 น้ำยาพ่นที่เหมาะสม

ทำการสเปรย์น้ำยาทดสอบ p-anisaldehyde/sulfuric acid reagent ซึ่งใช้สำหรับตรวจสารกลุ่ม terpenoids ผลการทดสอบ ได้ผลบวก คือ ให้สีม่วง, ชมพู เมื่อตรวจสอบภายใต้แสง white light ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลผลการศึกษาชนิดของกลุ่มสารในสารสกัดชนิดต่างๆ โดยวิธีการทดสอบทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบข้างต้นที่พบว่าสารสกัดหยาบ petroleum ether มีสารกลุ่ม terpenoids ดังนั้นจึงเลือก p-anisaldehyde/sulfuric acid reagent เป็นน้ำยาพ่นที่เหมาะสม

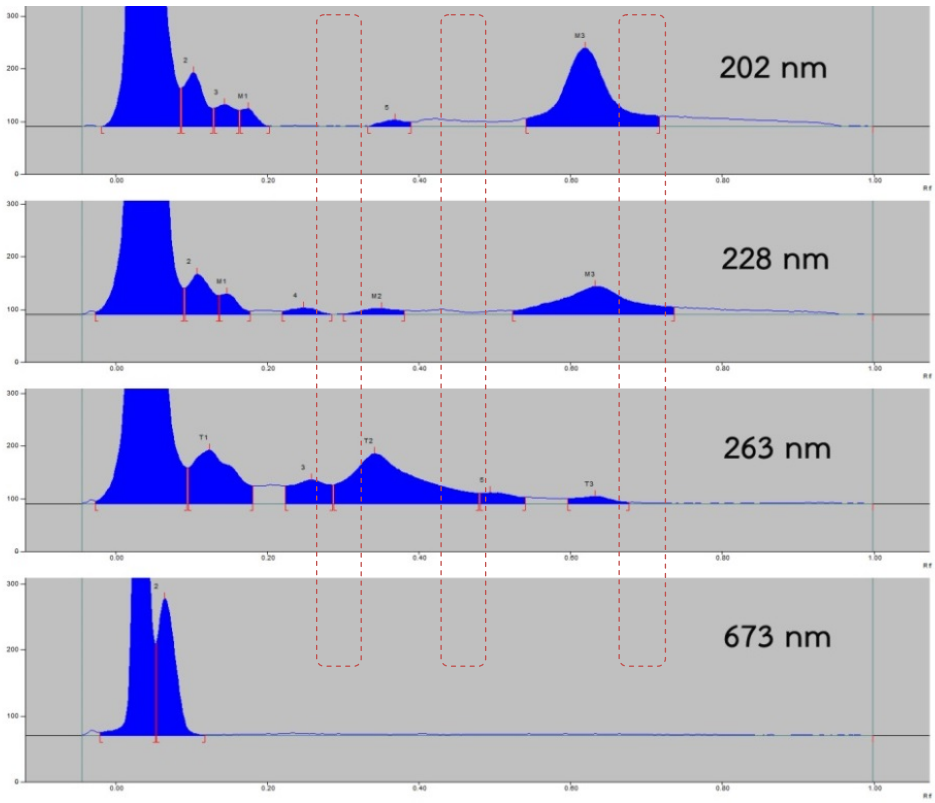
3.1.3 ความยาวคลื่นที่เหมาะสม

ผลการตรวจวัดสารสกัดหยาบ petroleum ether (สารกลุ่ม terpenoids) ที่ความยาวคลื่น 202, 228, 263 และ 673 nm พบว่า HPTLC chromatogram ของสารกลุ่ม terpenoids ให้ค่า absorbance สูง ที่ความยาวคลื่น 202 และ 263 nm เมื่อเทียบกับความยาวคลื่นอื่น ดังรูปที่ 3 จึงเลือกความยาวคลื่น 202 เป็นความยาวคลื่นที่ให้ค่า absorbance สูงสุดของ สารกลุ่ม terpenoids (R_F 0.16 และ 0.63) และ 263 nm เป็นความยาวคลื่นที่ให้ค่า absorbance สูงสุดของ สารกลุ่ม terpenoids (R_F 0.33) เป็นความยาวคลื่นที่เหมาะสมดังรูปที่ 4

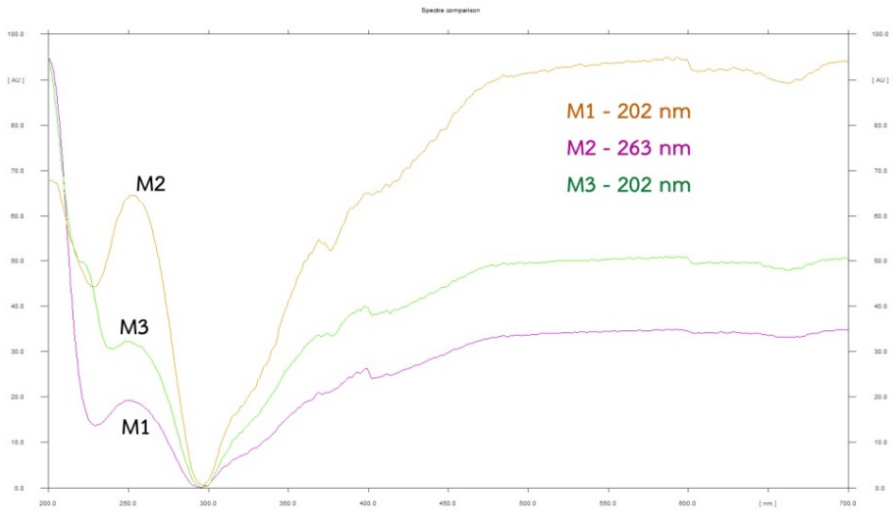
3.2 ผลศึกษาสภาวะ (conditions) เหมาะสมบนแผ่น TLC ชนิด HPTLC plate silica gel 60 F_{254} size 20x10 cm ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีสารกลุ่ม phenol ในสารสกัดหยาบ dichloromethane ใบสาบเสือ

3.2.1 วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่จำนวน 3 ระบบ ดังนี้

ระบบ	วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)	ตำแหน่ง phenol (R_F)
1	benzene : 1,4-dioxane : acetic acid (90:25:2, v/v/v)	0.57
2	dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (91:8:1, v/v/v)	0.33
3	dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (79:20:1, v/v/v)	0.55



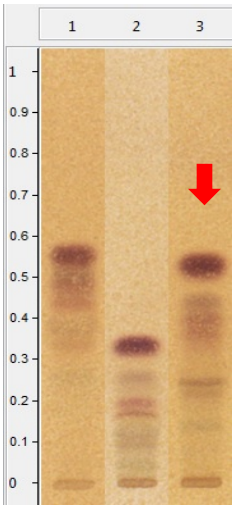
รูปที่ 3 HPTLC chromatogram ของสารสกัดหยาบสาบเสือ ภายใต้ความยาวคลื่น 202, 228, 263 และ 673 nm



รูปที่ 4 สเปคตรัมสาร terpenoids หลัก (M1, M2, M3) ที่พบในสารสกัดสาบเสือ

จากการศึกษาข้างต้นพบว่า วัฏภาคเคลื่อนที่ dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (79:20:1, v/v/v) สามารถแยกสารกลุ่ม phenol ได้โดยไม่ถูกรบกวนจากพืคอื่น ซึ่งใช้เวลาในการ develop 13 นาที (รูปที่ 5)

รูปที่ 5 HPTLC fingerprint ของสารสกัดหยาบ dichloromethane ใบสาบเสือ 3 ระบบ ภายใต้แสงขาว เมื่อ derivertized โดย Fast Blue B reagent [ระบบ 1 benzene : 1,4-dioxane : acetic acid (90:25:2, v/v/v),ระบบ 2-3 dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (91:8:1, v/v/v) และ (79:20:1, v/v/v) ตามลำดับ]

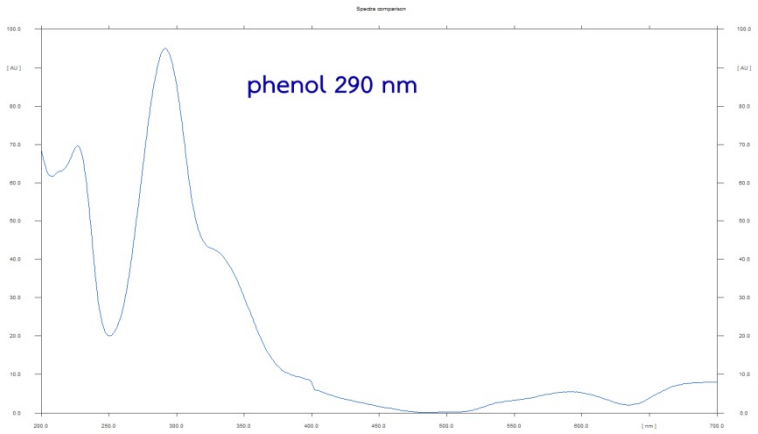


3.2.2 น้ำยาพ่นที่เหมาะสม

ทำการสเปรย์น้ำยาทดสอบ Fast Blue B reagent ซึ่งใช้ตรวจสารกลุ่ม phenol ผลการทดสอบ ได้ผลบวก คือ แถบสีแดง เมื่อตรวจสอบภายใต้แสง white light ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลผลการศึกษาชนิดของกลุ่มสารในสารสกัดชนิดต่างๆ โดยวิธีการทดสอบทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบ ข้อ 2. ที่พบว่าสารสกัดหยาบ dichloromethane มีสารกลุ่ม phenol ดังนั้นจึงเลือก Fast Blue B reagent เป็นน้ำยาพ่นที่เหมาะสม

3.2.3 ความยาวคลื่นที่เหมาะสม

ผลการตรวจวัดสารสกัดหยาบ dichloromethane (สารกลุ่ม phenol) พบว่า HPTLC chromatogram ของสารกลุ่ม dichloromethane ให้ค่า absorbance สูง ที่ความยาวคลื่น 290 nm ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ให้ค่า absorbance สูงสุดของ สารกลุ่ม phenol (R_F 0.55) จึงเลือกให้เป็นความยาวคลื่นที่เหมาะสม ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 สเปคตรัมสาร phenol ที่พบในสารสกัดสาบเสือ

สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของกลุ่มสาร terpenoids ในสารสกัดหยาบ petroleum ether ใบสาบเสือ และสารกลุ่ม phenol ในสารสกัดหยาบ dichloromethane ใบสาบเสือ ดังนี้

สภาวะ	**กลุ่มสาร terpenoids ในสารสกัดหยาบ petroleum ether ใบสาบเสือ**	**สารกลุ่ม phenol ในสารสกัดหยาบ dichloromethane ใบสาบเสือ**
วัฏภาคคงที่	แผ่น TLC ชนิด HPTLC plate silica gel 60 F254 size 20x10 cm	
วัฏภาคของเหลว	ethyl acetate : hexane (1:9, v/v)	dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (79:20:1, v/v/v)
ความยาวคลื่น (nm)	202, 263	290
Spray Reagent	p-anisaldehyde/sulfuric acid reagent	Fast Blue B reagent

3.3 ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสกัดสาบเสือด้วยเครื่อง High performance thin layer chromatography (HPTLC)

3.3.1 ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของกลุ่มสารสำคัญจากสาบเสือ ได้แก่ ใบสาบเสือ ก้านสาบเสือ ดอกสาบเสือ

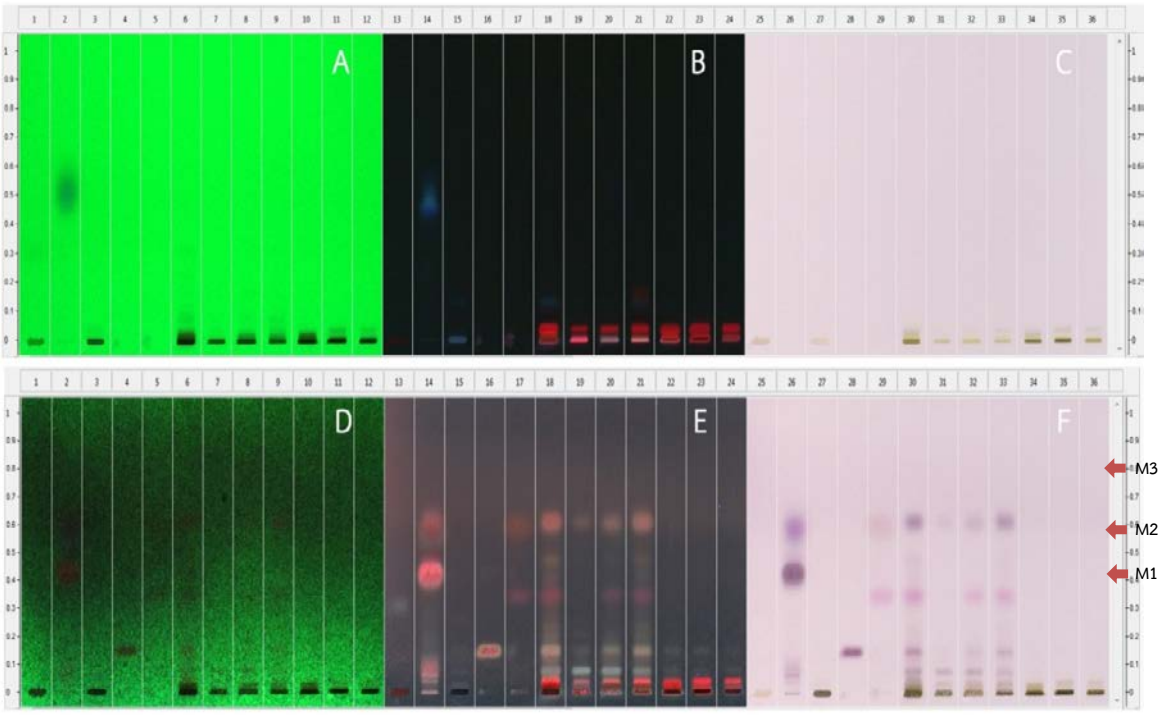
ก. จากการศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารกลุ่ม terpenoids ในใบ ก้าน และดอกสาบเสือ ได้วิเคราะห์สารสกัด methanol จากใบ ก้าน และดอกสาบเสือ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คือใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ ethyl acetate : hexane (1:9, v/v) เมื่อนำเพลทไปตรวจสอบภายใต้แสง UV 244,

UV 366 และ white light จะได้ HPTLC fingerprint ดังรูปที่ 7 (T30-32) หลังใช้น้ำยาพ่น p-anisaldehyde/sulfuric acid reagent พบแถบสีม่วงชมพูของ terpenoids ชัดเจนที่ R_F 0.16, 0.33, 0.63 และพบพีคจาก HPTLC chromatogram ชัดเจนที่ R_F 0.16, 0.33, 0.63 เช่นกัน ในส่วนใบ (T30) และดอก (T32) ส่วนก้าน (T31) พบ terpenoids เพียง 1 ตำแหน่ง R_F 0.63ดังรูปที่ 8 โดย terpenoids ทั้ง 3 ตำแหน่ง มีตำแหน่งใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน lupeol และ trans-caryophyllene แต่อย่างไรก็ตาม ควรพิสูจน์ความถูกต้องของสาร lupeol และ trans-caryophyllene กับสารสกัดสาบเสือโดยยืนยันด้วยเทคนิค GC/MS และ HPLC

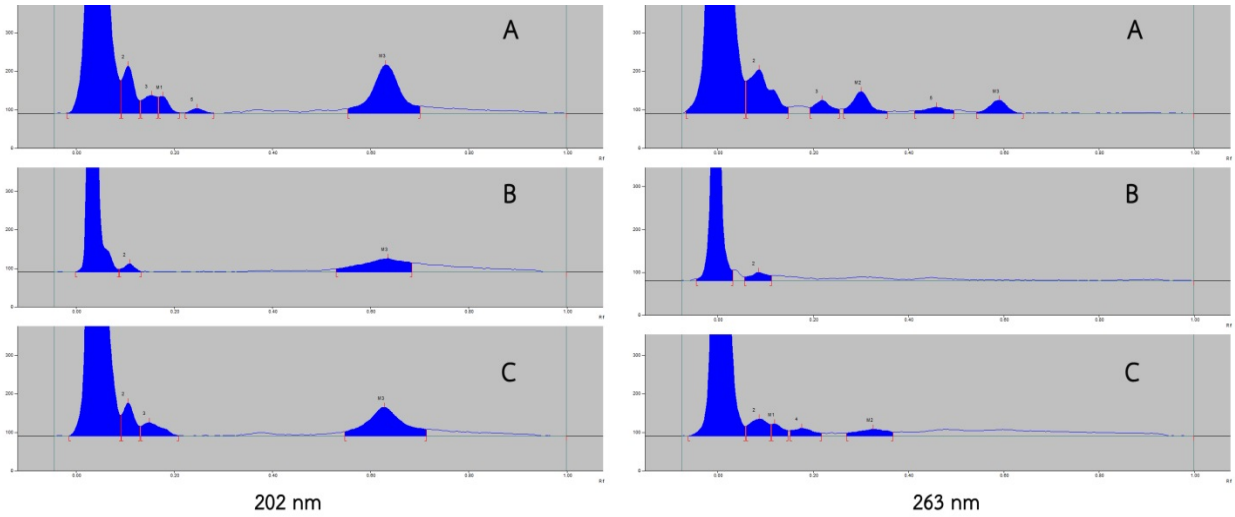
ข. จากการศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารกลุ่ม phenol ในใบ ก้าน และดอกสาบเสือ ได้วิเคราะห์สารสกัด methanol จากใบ ก้าน และดอกสาบเสือภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คือใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (79:20:1, v/v/v) เมื่อนำเพลทไปตรวจสอบภายใต้แสง UV 244, UV 366 และ white light จะได้ HPTLC fingerprint ดังรูปที่ 9 หลังใช้น้ำยาพ่น Fast blue B reagent พบแถบสีแดงของ phenol ชัดเจนที่ R_F 0.55 และพบพีคจาก HPTLC chromatogram ชัดเจนที่ R_F 0.55 เช่นกัน ในใบ ก้าน และดอก ดังรูปที่ 10 (T21-T23) แต่พบน้อยในก้าน (T22)

3.3.2 ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของกลุ่มสารสำคัญจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์สาบเสือในท้องตลาด

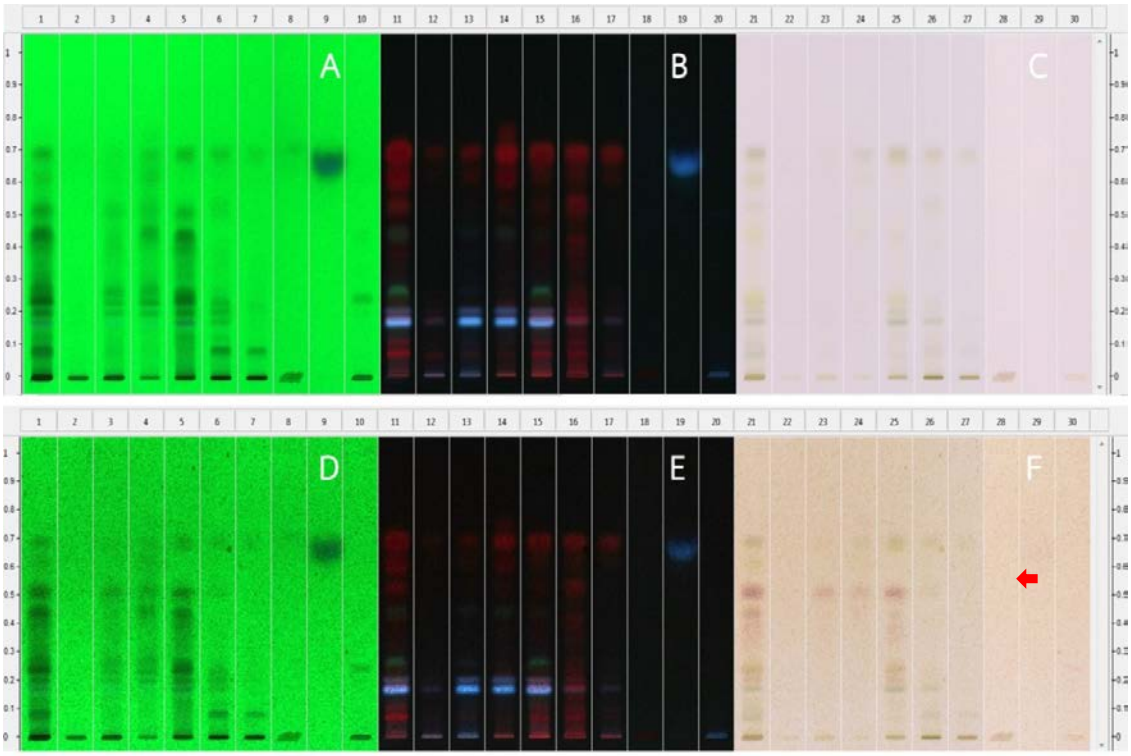
ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารกลุ่ม terpenoids และ phenol ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้เอกลักษณ์โครมาโทกราฟีดังรูป 7, 9 โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ ethyl acetate : hexane (1:9, v/v) และ dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (79:20:1, v/v/v) ตามลำดับ พบสารกลุ่ม terpenoids ในตัวอย่างจำนวน 1 ตัวอย่าง โดยพบสารที่ตำแหน่ง R_F 0.1, 0.43 และ 0.58 ซึ่งแตกต่างจาก ตำแหน่ง R_F ของสารสกัดจากสาบเสือ นอกจากนี้ จากการศึกษาไม่พบสารกลุ่ม phenol ในตัวอย่างทั้ง 3 ตัวอย่าง อาจเป็นเพราะ phenol เป็นกลุ่มสารที่สลายตัวได้ง่ายในสภาวะปกติ อาจเกิดการแปรสภาพ หรือเปลี่ยนโครงสร้างเป็นสารชนิดอื่น จึงตรวจไม่พบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์



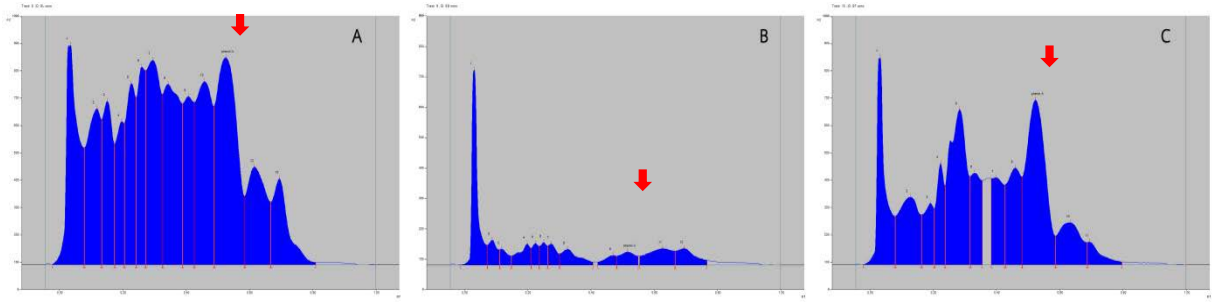
รูปที่ 7 HPTLC fingerprint ของสารกลุ่ม terpenoids ในสารสกัดสาบเสือ : T25 – T 27 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สาบเสือในท้องตลาด; T28 lupeol; T29 trans-caryophyllene; T30 สารสกัดใบสาบเสือ; T31 สารสกัดก้านสาบเสือ; T32 สารสกัดดอกสาบเสือ; T33 สารสกัดหยาบ petroleum ether; T34 สารสกัดหยาบ dichloromethane; T35 สารสกัดหยาบ ethyl acetate; T36 สารสกัดหยาบ methanol ในสภาวะ A-C) ก่อน derivatized และ D-F) หลัง derivatize ภายใต้แสง UV 254 nm, UV 366 nm และ white light ตามลำดับ



รูปที่ 8 HPTLC chromatogram ของสารสกัด A) ใบสาบเสือ B) ก้านสาบเสือ และ C) ดอกสาบเสือ ภายใต้ความยาวคลื่น 202 และ 263 nm (terpenoids)



รูปที่ 9 HPTLC fingerprint ของสารกลุ่ม phenol ในสารสกัดสาบเสือ : T21 สารสกัดใบสาบเสือ; T22 สารสกัดก้านสาบเสือ; T23 สารสกัดดอกสาบเสือ; T24 สารสกัดหยาบ petroleum ether; T25 สารสกัดหยาบ dichloromethane; T26 สารสกัดหยาบ ethyl acetate; T27 สารสกัดหยาบ methanol; T28-30 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สาบเสือในท้องตลาด ในสภาวะ A-C) ก่อน derivatized และ D-F) หลัง derivatized ภายใต้แสง UV 254 nm, UV 366 nm และ white light ตามลำดับ



รูปที่ 10 HPTLC chromatogram ของสารสกัด A) ใบสาบเสือ B) ก้านสาบเสือ และ C) ดอกสาบเสือ สาบเสือ ภายใต้ความยาวคลื่น 290 nm (phenol)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สาบเสือ มีสารออกฤทธิ์กลุ่ม terpenoids และ phenol สารสกัดหยาบจากใบสาบเสือด้วยตัวทำละลาย petroleum ether และ dichloromethane เป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุด เมื่อทดสอบชนิดของกลุ่มสารทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบต่างๆ พบว่า สารสกัดหยาบ petroleum ether มีสารกลุ่ม terpenoids และสารสกัดหยาบ dichloromethane มีสารกลุ่ม phenol เป็นหลัก และเมื่อตรวจหาตำแหน่งของสารกลุ่ม terpenoids ด้วยวิธี HPTLC ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 202 และ 263 nm ส่วน 209 nm สำหรับสารกลุ่ม phenol และตรวจสอบภายใต้แสง UV 254 nm, UV 366 nm และ white light ได้เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) หลังพ่นด้วยน้ำยา p-anisaldehyde/sulfuric acid reagent สำหรับสารสกัด petroleum ether และ Fast Blue B reagent สำหรับสารสกัด dichloromethane เมื่อพัฒนาด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ ethyl acetate : hexane (1:9, v/v) และ dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (79:20:1, v/v/v) พบสารกลุ่มหลักคือ terpenoids ที่ R_F 0.16, 0.33, 0.63 และ phenol ที่ R_F 0.55 ตามลำดับ และจากการศึกษา เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ของสารสกัดใบ ก้าน และดอกสาบเสือที่ R_F 0.16 เป็นตำแหน่งเดียวกับสารมาตรฐาน lupeol และ R_F 0.33 ตำแหน่งเดียวกับสารมาตรฐาน trans-caryophyllene แต่อย่างไรก็ตาม ควรพิสูจน์ความถูกต้องด้วยเทคนิค GC/MS และ HPLC เพิ่มเติม เพื่อยืนยันว่าเป็นสารชนิดนี้ และเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด พบว่าในผลิตภัณฑ์มีสารกลุ่ม terpenoids 3 ตำแหน่ง ที่ R_F แตกต่างจากสารสกัดสาบเสือ เป็นไปได้ว่าเป็นสาร terpenoids ต่างชนิด ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยากันระหว่างสารองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์เมื่ออยู่ในสภาวะที่เปลี่ยนไป เช่น อุณหภูมิ ความชื้น และสารนั้นอาจเปลี่ยนสภาพ ส่งผลต่อการคุณสมบัติที่เปลี่ยนไป นอกจากนี้ในอนาคตสามารถศึกษาการแยกสารออกฤทธิ์ในสารสกัดสาบเสือเป็นสารบริสุทธิ์เพื่อเป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์คุณภาพต่อไป

กิจกรรมที่ 4 วิจัยการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในพืชสมุนไพรป้องกันกำจัดศัตรูพืช

กิจกรรมย่อยที่ 4.1
ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างธาตุอาหารและปริมาณสารอะซาดิแรคตินในสะเดา
Investigation on Relationships between Mineral Elements and Azadirachtin in *Azadirachta indica*

ผู้วิจัย

สุภานันทน์ จันทร์ประอบ ศิริพร สอนท่าโก พจมาลย์ แก้ววิมล
สุวลักษมิ์ ไชยทอง สาธิดา โพธิ์น้อย

Supanun Junpra-ob Siriporn Sonthako Pojjamarn Keawvimol
Suwaluck Chaitong Sathida Phonoy

บทคัดย่อ

สะเดาไทยมีสารอะซาดิแรคติน (azadirachtin) ซึ่งมีฤทธิ์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช แต่สารสกัดจากสะเดาไทยมีสารอะซาดิแรคตินปริมาณน้อย จึงจำเป็นต้องศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณธาตุอาหารและปริมาณสารอะซาดิแรคตินในสะเดาไทย เพื่อให้ทราบถึงชนิดธาตุอาหารที่มีผลต่อปริมาณสารอะซาดิแรคตินในสะเดาไทย ทำการทดลองที่บริเวณสวนสะเดาไทย อ.ศรีประจันต์ จ.สุพรรณบุรี พบว่า ปริมาณธาตุแคลเซียมและแมกนีเซียมมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารอะซาดิแรคตินในเมล็ดสะเดาไทยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 โดยเป็นความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้าม มีค่า สัมประสิทธิสหสัมพันธ์ เท่ากับ -0.468 และ -0.439 ตามลำดับ ปริมาณธาตุทองแดงมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารอะซาดิแรคตินในเมล็ดสะเดาไทยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยเป็นความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกัน ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ-สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.244 ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาถึงผลของปริมาณธาตุแคลเซียม แมกนีเซียม และทองแดง ที่ต้นสะเดาไทยได้รับต่อปริมาณสารอะซาดิแรคตินในเมล็ดสะเดาไทยต่อไป เพื่อเป็นแนวทางแก่ผู้ปลูกสะเดาไทยให้สามารถเลือกพื้นที่ปลูกที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณสารอะซาดิแรคตินในเมล็ดสะเดาไทย

คำสำคัญ : ธาตุอาหาร สารอะซาดิแรคติน สะเดา

Abstract

The main active ingredient of Siamese neem tree (**Azadirachta indica** A. Juss var. **siamensis** Valeton) is azadirachtin. But azadirachtin concentration of the extract from the Siamese neem tree (Azadirachta indica A. Juss var. siamensis Valeton) is low. It is necessary to study the relationship between nutrient and azadiractin in Siamese neem tree. To be informed of types of nutrients that affect the amount azadiractin in Siamese neem tree. This experiment conducted at the neem garden on Siprachan district in Suphanburi province. Calcium and magnesium content were correlated with the amount of azadirachtin in Siamese neem seed at statistically significant level of 0.01, with correlation in the opposite direction with correlation coefficient of -0.468 and -0.439,

respectively. Copper content was significantly correlated with the amount of azadirachtin in Siamese neem at 0.05 significance level. The correlation coefficient is 0.244. Therefore, it should study the effect of calcium, magnesium and copper content in Siamese neem seed on the amount of azadirachtin in neem seed. To guide Siamese neem seed growers to select suitable planting areas for increasing the amount of azadirachtin in Thai neem seed.

Key word : Mineral Elements, Azadirachtin, *Azadirachta indica*

บทนำ

พืชสมุนไพรมีสารสำคัญหรือสารที่มีฤทธิ์ในการควบคุมศัตรูพืช ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้น คุณค่าของสมุนไพรขึ้นอยู่กับปริมาณสารสำคัญในสมุนไพรนั้น น้ำมันหอมระเหย (essential oil) จัดเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติซึ่งเป็นสารทุติยภูมิ จะมีปริมาณแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด หรือฤดูกาล โดยอาจเกิดจากพืชพยายามปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป (นิจศิริ, 2560) สภาพแวดล้อมซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ แสง อุณหภูมิ ความชื้น ความเป็นกรดด่าง และปริมาณธาตุอาหารพืช เป็นต้น ธาตุอาหารพืช ได้แก่ ไนโตรเจน (N), ฟอสฟอรัส (P), โพแทสเซียม (K), แคลเซียม (Ca), แมกนีเซียม (Mg), กำมะถัน (S), เหล็ก (Fe), แมงกานีส (Mn), สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu), คลอรีน (Cl), โบรอน (B) และ โมลิบดินัม (Mo) (จีราภรณ์, 2560) จากงานวิจัยในประเทศตูนีเซียพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบผักชีตูนีเซียเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ 18 และ 43 เปอร์เซ็นต์ เมื่อปลูกในสารละลายที่มีโซเดียมคลอไรด์ 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ (Manel and Brahim, 2008) และใบเสจ (sage) ให้น้ำมันหอมระเหย 0.67 1.02 2.09 และ 1.68 เปอร์เซ็นต์ เมื่อปลูกในสารละลายที่มีโซเดียมคลอไรด์ 25 50 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ (Mouna *et al*. 2010) แสดงว่า คลอรีนซึ่งเป็นธาตุอาหารพืชอาจส่งผลต่อปริมาณน้ำมันหอมระเหยในพืชทั้งสองชนิด สารอะซาดิแรคติน (azadirachtin) เป็นสารสำคัญชนิดหนึ่งที่พบได้ในน้ำมันหอมระเหยจากสะเดา (Vijayalakshmi *et al*., 2016) ซึ่งสารในกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการลอกคราบของแมลง การกิน การเจริญเติบโตของไข่ หนอน ดักแด้ มีผลต่อแมลงโดยเป็นสารไล่แมลง และเป็นสารที่ทำให้แมลงไม่ชอบวางไข่ (คณิต และจารุยา, 2557) โดยเมล็ดสะเดาอินเดียพบสารอะซาดิแรคติน 4.6 มิลลิกรัมต่อกรัม เมล็ดสะเดาไทยพบสารอะซาดิแรคติน 2.4 มิลลิกรัมต่อกรัม สะเดาช้างพบสารอะซาดิแรคติน 0.25-2.0 มิลลิกรัมต่อกรัม (อุดมลักษณ์ และ พรรณีกา, 2548) จะเห็นได้ว่าปริมาณสารอะซาดิแรคตินในเมล็ดสะเดาไทยมีปริมาณน้อย ดังนั้น การปลูกสะเดาให้ได้คุณภาพสามารถเพิ่มปริมาณสารอะซาดิแรคตินได้นั้น จึงต้องมีการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อปริมาณสารอะซาดิแรคติน ซึ่งธาตุอาหารพืชอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อปริมาณสารอะซาดิแรคติน จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณธาตุอาหารพืชและปริมาณสารอะซาดิแรคตินในสะเดาไทย เพื่อให้ทราบถึงชนิดธาตุอาหารพืชที่มีผลต่อปริมาณสารอะซาดิแรคตินในสะเดาไทย เนื่องจากเกษตรนิยมปลูกสะเดาไทย แต่เมล็ดสะเดาไทยมีปริมาณสารอะซาดิแรคตินน้อย ส่งผลให้วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสารสกัดจากสะเดาไทยมีปริมาณสาร อะซาดิแรคตินน้อย

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่อง pH meter

2. เครื่อง Conductance meter
3. เครื่อง Flame photometer
4. เครื่อง UV-Visible spectrophotometer
5. เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS)
6. เครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC)

วิธีการ

1. ศึกษาข้อมูลพื้นฐานเบื้องต้นเกี่ยวกับดินในแปลงทดลอง

สุ่มเก็บตัวอย่างดินโดยการขุดดินที่ความลึก 0 ถึง 15 เซนติเมตร และ 15 ถึง 30 เซนติเมตร จากผิวดิน ทำการขุดทั้งหมด 7 จุด กระจายทั่วแปลงทดลองที่ทำการเก็บตัวอย่างพืช นำดินที่ได้ไปผึ่งในที่ร่มแล้วนำมาบดร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์สมบัติของดิน ได้แก่ ลักษณะเนื้อดิน ค่า pH ค่าการนำไฟฟ้าของดิน (EC) ปริมาณอินทรียวัตถุในดิน (OM) ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (Avail. P) ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน (Exch. K) ปริมาณแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน (Exch. Ca) ปริมาณแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน (Exch. Mg)

2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณธาตุอาหารพืชในใบ

สุ่มเก็บตัวอย่างใบจากต้นสะเดาไทยที่มีสภาพสมบูรณ์ ทั้ง 4 ทิศรอบต้น จำนวน 20 ต้น ในระยะก่อนออกผล ระหว่างออกผล และหลังออกผล ล้างตัวอย่างใบด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล (0.1 N HCl) ตามด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นำมาบดแล้วเก็บไว้ในที่แห้งสำหรับทำการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารพืช ได้แก่ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โปแตสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) กำมะถัน (S) เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) สังกะสี (Zn) และทองแดง (Cu) 3. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณธาตุอาหารพืชกับปริมาณสารอะซาดิแรคตินในเมล็ดสะเดาไทย

เก็บตัวอย่างผลในระยะผลอ่อนและผลแก่ โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทั่วทั้งต้น นำตัวอย่างมาล้างด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล ตามด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง อบที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส สำหรับทำการวิเคราะห์ปริมาณสารอะซาดิแรคตินและปริมาณธาตุอาหารพืชตามลำดับ นำข้อมูลปริมาณสารอะซาดิแรคตินและปริมาณธาตุอาหารพืชมาวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยโปรแกรม SPSS (Statistical Package for the Social Science for Windows) เพื่อหาค่าสัมประสิทธิสหสัมพันธ์ (correlation coefficient (r)) ของปริมาณธาตุอาหารพืชกับปริมาณสารอะซาดิแรคตินในเมล็ดสะเดาไทย

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2558 สิ้นสุด กันยายน 2559

สถานที่ 1. แปลงทดลอง อำเภอศรีประจันต์ จังหวัดสุพรรณบุรี
2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กปผ.
3. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ กปผ.

ผลการทดลอง

1.ลักษณะและสมบัติของดินในแปลงทดลอง

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างธาตุอาหารพืชและปริมาณสารอะซาดิแรคตินในสะเดาบริเวณสวนสะเดาไทย อ.ศรีประจันต์ จ.สุพรรณบุรี เมื่อนำดินที่ระดับความลึก 0 ถึง 15 เซนติเมตร มาวิเคราะห์พบว่า มีลักษณะเป็นดินเหนียว ค่า pH อยู่ในช่วง 5.8 ถึง 7.4 ค่าการนำไฟฟ้าของดินอยู่

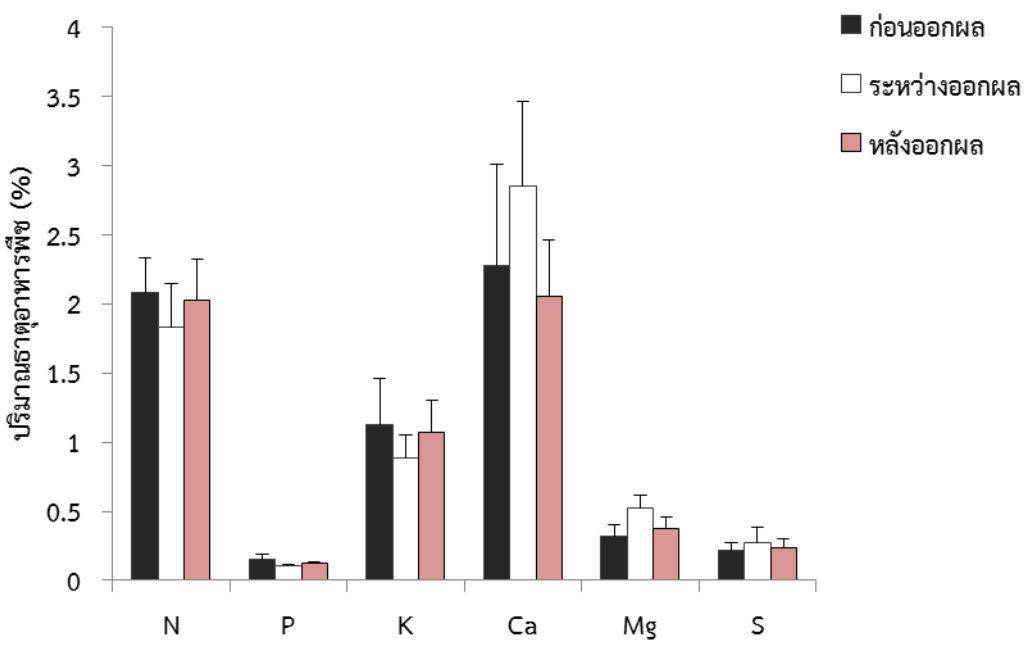
ในช่วง 0.112 ถึง 0.499 dS/m ปริมาณอินทรียวัตถุในดินอยู่ในช่วง 1.39 ถึง 2.46 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์อยู่ในช่วง 17 ถึง 158 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดินอยู่ในช่วง 144 ถึง 238 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน อยู่ในช่วง 2446 ถึง 5582 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดินอยู่ในช่วง 561 ถึง 908 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดินที่ระดับความลึก 15 ถึง 30 เซนติเมตร ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นดินเหนียว ค่า pH อยู่ในช่วง 6.0 ถึง 7.7 ค่าการนำไฟฟ้าของดินอยู่ในช่วง 0.113 ถึง 1.554 dS/m ปริมาณอินทรียวัตถุในดินอยู่ในช่วง 0.92 ถึง 2.02 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์อยู่ในช่วง 13 ถึง 102 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน อยู่ในช่วง 97 ถึง 141 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดินอยู่ในช่วง 2156 ถึง 6887 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดินอยู่ในช่วง 496 ถึง 883 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลวิเคราะห์ดินที่ระดับความลึก 0-15 และ 15-30 เซนติเมตร บริเวณสวนสะเดาไทย อ.ศรีประจันต์ จ.สุพรรณบุรี

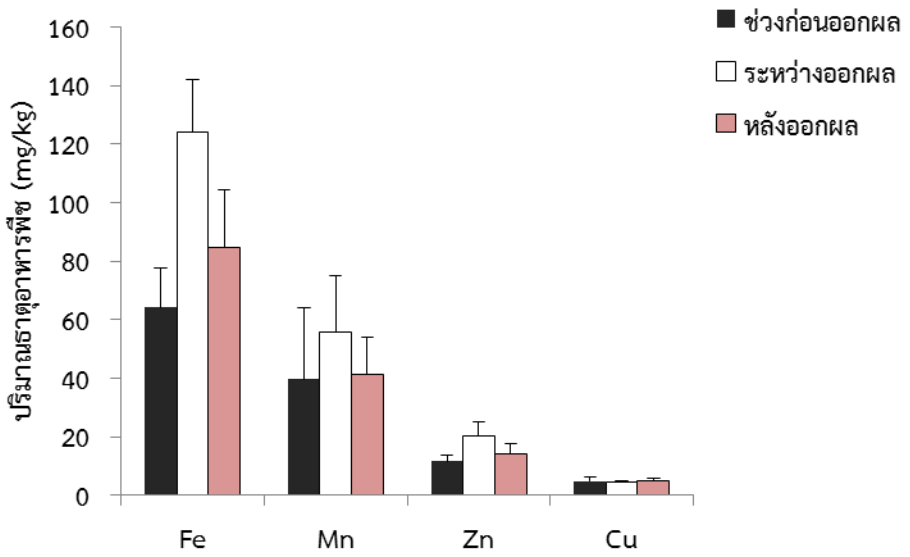
ตำแหน่ง	เนื้อดิน	ที่ระดับความลึก (cm)	pH	EC (dS/m)	OM (%)	Avail. P (mg/kg)	Exch. K (mg/kg)	Exch. Ca (mg/kg)	Exch. Mg (mg/kg)
1	ดินเหนียว	0-15	7.1	0.171	1.40	17	172	2446	597
	ดินเหนียวปนทรายแป้ง	15-30	7.6	0.239	1.07	32	101	3565	628
2	ดินเหนียว	0-15	7.1	0.310	1.72	22	144	3074	647
	ดินเหนียว	15-30	7.4	0.279	1.10	13	104	3029	512
3	ดินเหนียว	0-15	7.1	0.117	1.61	84	238	2717	660
	ดินเหนียว	15-30	7.3	0.113	0.92	79	103	2156	496
4	ดินเหนียว	0-15	7.4	0.159	1.39	46	180	2611	561
	ดินเหนียว	15-30	7.7	0.141	1.18	22	135	3042	630
5	ดินเหนียว	0-15	6.2	0.499	2.46	158	187	4410	755
	ดินเหนียว	15-30	6.6	1.554	1.52	31	97	6887	743
6	ดินเหนียว	0-15	6.4	0.112	2.36	29	191	5582	908
	ดินเหนียว	15-30	6.8	0.205	2.02	102	141	4686	883
7	ดินเหนียว	0-15	5.8	0.162	1.43	38	203	3169	673
	ดินเหนียว	15-30	6.0	0.261	0.99	25	121	3644	626

2. การเปลี่ยนแปลงปริมาณธาตุอาหารพืชในใบสะเดา

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณธาตุอาหารพืชในใบสะเดาไทย จากต้นสะเดา จำนวน 20 ต้น พบว่า ใบสะเดาไทยมีปริมาณธาตุแคลเซียมสูงที่สุด รองลงมาคือ ธาตุไนโตรเจน ซึ่งปริมาณธาตุ แคลเซียม แมกนีเซียม กำมะถัน เหล็ก แมงกานีส และ สังกะสี ช่วงระหว่างออกผลมีปริมาณสูงกว่าช่วงก่อนออกผลและหลังออกผล (ภาพที่ 1 และ 2) ปริมาณธาตุ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ช่วงระหว่างออกผลมีปริมาณต่ำกว่าช่วงก่อนออกผลและหลังออกผล (ภาพที่ 1) ปริมาณธาตุทองแดง ช่วงก่อนออกผล ระหว่างออกผล และหลังออกผล มีปริมาณใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 2)



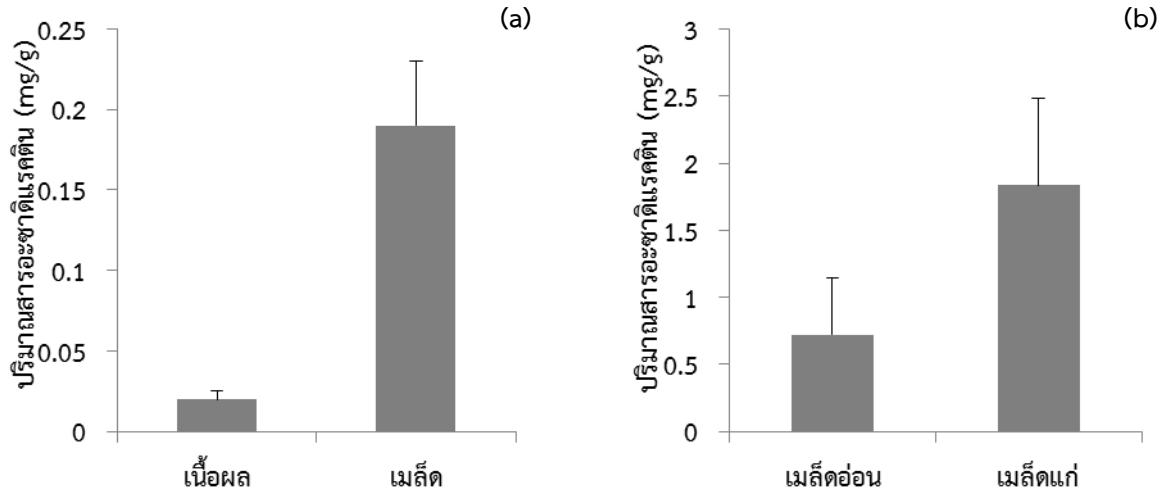
ภาพที่ 1 ปริมาณธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม และ กำมะถัน ในใบสะเดา ช่วงก่อนออกผล ระหว่างออกผล และหลังออกผล



ภาพที่ 2 ปริมาณธาตุ เหล็ก แมงกานีส สังกะสี และทองแดง ในใบสะเดา ช่วงก่อนออกผล ระหว่างออกผล และหลังออกผล

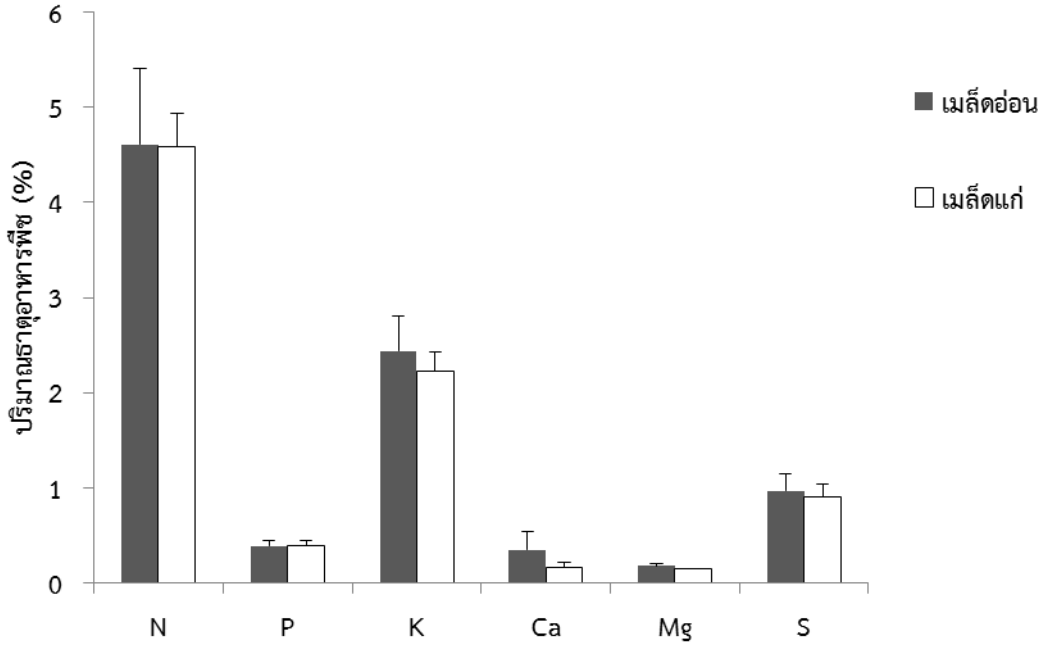
3. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณธาตุอาหารพืชกับปริมาณสารอะซาดิแรคตินในเมล็ดสะเดาไทย

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารอะซาดิแรคตินในผลสะเดาไทยช่วงผลอ่อน พบว่า ปริมาณสารอะซาดิแรคตินในเมล็ดสะเดาไทยมีค่าเฉลี่ยสูงกว่าปริมาณสารอะซาดิแรคตินในเนื้อผลสะเดาไทย (ภาพที่ 3 (a)) ซึ่งสอดคล้องกับอุดมลักษณ์และพรรณีกา (2548) พบว่า การนำผลสะเดาแห้งมาใช้จะมีสารอะซาดิแรคตินน้อยกว่าการใช้เมล็ดสะเดาถึง 50-60 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับความแห้งของผลสะเดาและคุณภาพของผลสะเดาแห้ง ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงนำเมล็ดสะเดาไทยมาวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างธาตุอาหารพืชและปริมาณสารอะซาดิแรคตินในเมล็ดสะเดาไทย

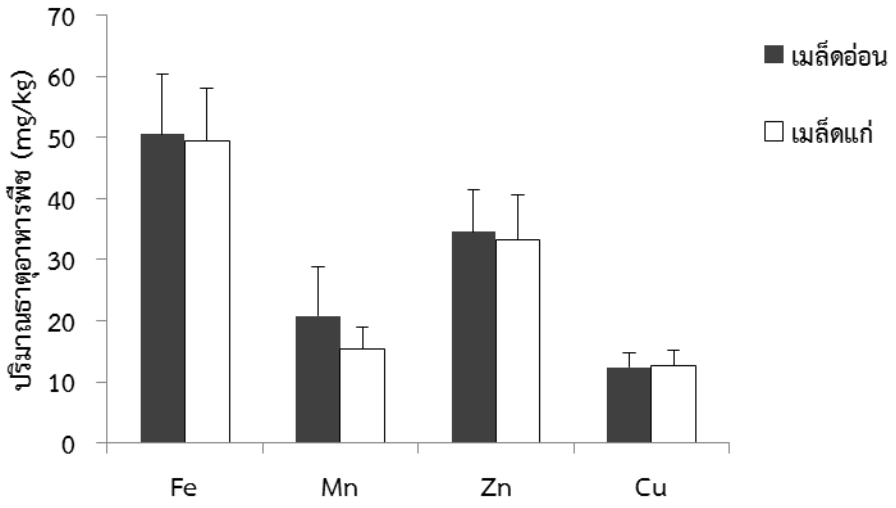


ภาพที่ 3 ปริมาณสารอะซาดิแรคตินในเมล็ดและเนื้อผลในผลสะเดาไทยช่วงผลอ่อน (a) ปริมาณสารอะซาดิแรคตินในเมล็ดอ่อนและเมล็ดแก่ (b)

การวิเคราะห์ปริมาณสารอะซาดิแรคตินและปริมาณธาตุอาหารพืชในเมล็ดจากต้นสะเดาไทย จำนวน 20 ต้น โดยผลอ่อนสะเดามีน้ำหนักผลตั้งแต่ 0.66 - 3.60 กรัมต่อเมล็ด จำนวน 59 ตัวอย่าง และผลแก่สะเดา จำนวน 19 ตัวอย่าง พบว่า เมล็ดจากผลแก่มีปริมาณสารอะซาดิแรคตินปริมาณสูงกว่าเมล็ดจากผลอ่อน โดยเมล็ดจากผลแก่มีปริมาณสารอะซาดิแรคติน 1.79 ± 0.63 มิลลิกรัมต่อกรัม ส่วนเมล็ดจากผลอ่อนมีปริมาณสารอะซาดิแรคตินอยู่ในช่วง 0.76 ± 0.33 มิลลิกรัมต่อกรัม (ภาพที่ 3 (b)) เมล็ดสะเดามีปริมาณธาตุไนโตรเจนมากที่สุด รองลงมาคือ โปแทสเซียม (ภาพที่ 4) **และจุลธาตุ** (micronutrients) ซึ่งมีปริมาณมากที่สุด คือ ธาตุเหล็ก (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 4 ปริมาณธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม กำมะถัน ในเมล็ดอ่อนและเมล็ดแก่



ภาพที่ 5 ปริมาณธาตุ เหล็ก แมงกานีส สังกะสี และทองแดง ในเมล็ดอ่อนและเมล็ดแก่

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณธาตุอาหารพืชกับปริมาณสารอะซาดิแรคตินในเมล็ดสะเดาไทย จากเมล็ดอ่อนและเมล็ดแก่ จำนวน 78 ตัวอย่าง พบว่า ปริมาณธาตุแคลเซียมและแมกนีเซียมมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารอะซาดิแรคตินในเมล็ดสะเดาไทย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 โดยเป็นความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้าม ซึ่งมีค่าสัม-ประสิทธิสหสัมพันธ์ เท่ากับ -0.468 และ -0.439 ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณธาตุทองแดงมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารอะซาดิแรคตินในเมล็ดสะเดาไทย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยเป็นความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกัน ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิสหสัมพันธ์เท่ากับ 0.244 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าสัมประสิทธิสหสัมพันธ์ของปริมาณสารอะซาดิแรคตินกับปริมาณธาตุอาหารพืชในเมล็ดสะเดาไทย

ธาตุอาหารพืช	ค่าสัมประสิทธิสหสัมพันธ์ของปริมาณสารอะซาดิแรคตินกับปริมาณธาตุอาหารพืช
ไนโตรเจน	0.118
ฟอสฟอรัส	0.216
โปแตสเซียม	-0.129
แคลเซียม	-0.468**
แมกนีเซียม	-0.439**
กำมะถัน	-0.164
เหล็ก	0.071
แมงกานีส	-0.203
สังกะสี	0.022
ทองแดง	0.244*

หมายเหตุ : * Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างธาตุอาหารพืชและปริมาณสารอะซาดิแรคตินในสะเดาบริเวณสวนสะเดาไทย อ.ศรีประจันต์ จ.สุพรรณบุรี ลักษณะเป็นดินเหนียว ค่า pH อยู่ในช่วง 5.8 ถึง 7.7 ค่าการนำไฟฟ้าของดินอยู่ในช่วง 0.112 ถึง 1.554 dS/m ปริมาณอินทรียวัตถุในดินอยู่ในช่วง 0.92 ถึง 2.46 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์อยู่ในช่วง 13 ถึง 158 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดินอยู่ในช่วง 97 ถึง 238 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดินอยู่ในช่วง 2156 ถึง 6887 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดินอยู่ในช่วง 496 ถึง 908 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ใบสะเดาไทยมีปริมาณธาตุ แคลเซียม แมกนีเซียม กำมะถัน เหล็ก แมงกานีส และ สังกะสี สูงในช่วงระหว่างออกผล มีปริมาณธาตุ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ต่ำในช่วงระหว่างออกผล แต่มีปริมาณธาตุทองแดงใกล้เคียงกันใน ช่วงก่อนออกผล ระหว่างออกผล และหลังออกผล เมล็ดสะเดาไทยมีปริมาณธาตุไนโตรเจนสูงที่สุด รองลงมาคือ โปแทสเซียม และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างธาตุอาหารพืชและปริมาณสารอะซาดิแรคตินในเมล็ดสะเดาไทยพบว่า ปริมาณธาตุแคลเซียมและแมกนีเซียมมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารอะซาดิแรคตินในเมล็ดสะเดาไทย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 โดยเป็นความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้าม มีค่าสัมประสิทธิสหสัมพันธ์ เท่ากับ -0.468 และ -0.439 ตามลำดับ ปริมาณธาตุทองแดงมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารอะซาดิแรคติน ในเมล็ดสะเดาไทย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยเป็นความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกัน ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิสหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.244

กิจกรรมย่อยที่ 4.2

วิจัยการใช้ธาตุอาหารในการเพิ่มปริมาณสารสำคัญอะซาดิแรคตินในสะเดา

Research on Nutrient Application on Enhancing Azadirachtin Content in Neem (*Azadirachta indica* var *Siamensis* Valenton) Seed

ผู้วิจัย

ศิริพร สอนท่าโก พรรณีกา อัตตนนท์ ธนิตา ค่ำอำนวย

สุภานันทน์ จันทร์ประอบ สาธิดา โพธิ์น้อย

Siriporn Sonthako Panneeka Attanon Thanita Kham-amnoy

Supanun Junpra-ob Sathida Phonoy

บทคัดย่อ

จากวิจัยการใช้ธาตุอาหารในการเพิ่มปริมาณสารสำคัญอะซาดิแรคตินในสะเดาแปลงสะเดาโดยศึกษาที่แปลงสะเดา อำเภอศรีประจันต์ จังหวัดสุพรรณบุรี ทำการให้ปุ๋ยตามกรรมวิธีต่างๆ ก่อนออกดอก 1-2 เดือน วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 3 ซ้ำ 8 กรรมวิธี เมื่อสะเดาเริ่มแก่ สุ่มเก็บเก็บตัวอย่างสะเดา วัดขนาดและน้ำหนักผลสะเดา จำนวน 20 ผลต่อต้น พบว่าพบว่า น้ำหนักผลสะเดาสดอยู่ระหว่าง 2.55-3.02 กรัม มีขนาดความกว้างระหว่าง 1.38-1.52 เซนติเมตร มีขนาดความยาวเฉลี่ยระหว่าง 1.97-2.11 เซนติเมตร วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญอะซาดิแรดตินในเมล็ดสะเดาทุกกรรมวิธี มีปริมาณสาร อยู่ระหว่าง 0.24-0.78 มิลลิกรัมต่อกรัม ทดสอบทางสถิติพบว่าการใช้ปุ๋ยใน 8 กรรมวิธี มีปริมาณสารสำคัญอะซาดิแรดตินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีข้อสังเกต คือ กรรมวิธีที่ 6 ใส่ปุ๋ย 630-130-0 กรัม N-P_0O_5-K_2O ต่อต้น มีปริมาณสารสำคัญอะซาดิแรดตินมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ 8 ไม่ใส่ N P K ซึ่งเป็นกรรมวิธีควบคุม ปริมาณสารสำคัญอะซาดิแรดตินน้อยที่สุด คือ 0.24 มิลลิกรัมต่อกรัม อย่างไรก็ตามจากข้อมูลดังกล่าวเป็นการศึกษาสะเดาในช่วง 1 รอบปี เนื่องจากสะเดาให้ผลผลิตปีละครั้ง จึงเป็นการศึกษาไม้ยืนต้นในช่วงระยะเวลาสั้น อาจต้องศึกษาการใช้ปริมาณธาตุอาหารหลักในปริมาณที่เพิ่มขึ้น หรือการใช้ธาตุอาหารรองร่วมกับการศึกษาธาตุอาหารหลัก จึงจะเป็นการได้ข้อมูลที่ครบถ้วนมากยิ่งขึ้นในการศึกษาการใช้ธาตุอาหารเพื่อเพิ่มปริมาณสารสำคัญในลำดับต่อไป

คำสำคัญ : สะเดา อะซาดิแรคติน

Abstract

The effect of primary nutrient through N P K fertilization on enhancing active ingredient azadirachtin content of neem (*Azadirachta* sp.) seeds was investigated. The study was carried out at neem plots, Si Prachan District, Suphan Buri Province. Fertilizer treatments were given within 1-2 month before flowering stage. A randomized complete block design with 3 replications and 8 treatments was used. Samples of 20 random fruits per tree were collected. The neem fruits thus obtained were weighed and measured length and diameter. The results showed that an

average weight of neem fruits were 2.55-3.02 gram with diameter size between 1.38-1.52 cm and 1.97-2.11 cm long. Azadirachtin content of neem seeds of all treatments were also determined. The results showed that azadirachtin content of neem seeds were between 0.24-0.78 mg/g and results indicated that all treatments had no statistically significant difference on azadirachtin content. The observations indicate that treatment no 6 which was fertilized with 630-130-0 g of N-P_2O_5-K_2O per tree produce a highest azadirachtin content at 0.78 mg/g whereas the control treatment no 8 which was none fertilized with N P and K fertilizer showed lowest content of azadirachtin at 0.24 mg/g. However, this study is a short term research project because flowering and fruiting are seasonal so neem normally produces fruit once a year thus the study of concentrations of primary nutrient together with the use of secondary nutrient on enhancing of active ingredient should be evaluated in further study.

Key words : neem azadirachtin

บทนำ

พืชสมุนไพรมีสารสำคัญหรือสารที่มีฤทธิ์ในการควบคุมศัตรูพืชส่วนใหญ่เป็นสารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้น คุณค่าของสมุนไพรขึ้นอยู่กับปริมาณสารสำคัญในสมุนไพรนั้น การปลูกให้ได้คุณภาพและการเพิ่มปริมาณสารสำคัญจึงต้องมีการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆโดยเฉพาะสัดส่วนการใช้ปุ๋ยและธาตุอาหารเสริมเป็นต้น ปัจจุบันได้มีการนำสารสกัดจากสะเดามาเป็นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยนำมาใช้เป็นสารป้องกันและกำจัดศัตรูพืช สะเดามีสารออกฤทธิ์หลักคือ สารอะซาดิแรคติน (azadirachtin) โดยเมล็ดสะเดาอินเดียพบอะซาดิแรคติน 4.6 mg/g เมล็ดสะเดาไทยพบอะซาดิแรคติน 2.4 mg/g สะเดาช้างหรือเทียมพบอะซาดิแรคติน 0.25-2.0 mg/g (อุดมลักษณ์ และ พรรณีกา, 2548) จะเห็นได้ว่าเมล็ดสะเดาไทยมีปริมาณสารออกฤทธิ์อะซาดิแรคตินน้อยกว่าเมล็ดสะเดาอินเดีย มีรายงานการวิจัยของ Keyur N. Raval และคณะ (2003) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของสะเดา เพื่อผลิต อะซาไดแรคติน พบว่าเมื่อดัดแปลงอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาตรฐาน Murashinge and Skoong (MS) Medium โดยให้ธาตุอาหารหลักไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในปริมาณที่ต่างกันในแต่ละสูตร รวม 3 สูตร พบว่าสามารถให้อะซาดิแรคติน 0.25 mg/g โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับ MS media มาตรฐานซึ่งไม่พบการผลิตอะซาดิแรคติน Muhamad Rafiq และ Muhamad Umar Dahot (2010) ได้ศึกษา Callus และการผลิตอะซาดิแรคตินของสะเดาอินเดีย (Azadirachta indica A. Juss) ในหลอดทดลอง โดยใช้ชิ้นส่วนของสะเดามาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงแขวนลอย ให้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (2,4D, NAA, IAA และ BAP) แบบรวมกันและความเข้มข้นต่างกันใน MS medium จากการศึกษาพบว่าชิ้นส่วนดอกอ่อนจะให้ Callus ได้ 78% สูงที่สุด ใน MS medium ทั่วไปร่วมกับการเติม 1.0 mg/L 2,4D, 1.0 mg/L BAP, 0.2 mg/l NAA และ 3% sucrose และในแต่ละชิ้นส่วนของพืชจากเซลล์จะยังพบอะซาดิแรคติน เมื่อใช้ Sucrose, Glucose, NH_4NO_3, KNO_3 และ Urea ในอาหารเพาะเลี้ยงแขวนลอยส่งผลต่อปริมาณ

อะซาดิแรคติน ทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งและ อะซาดิแรคติน เพิ่มขึ้น 373.1 และ 359.2 ug/50 ml ตามลำดับ เมื่อเพิ่ม NH_4NO_3 0.25 และ 0.5 g/L ใน MS media เหลว แล้วเสริมด้วย 1.0 mg/L 2,4D,1.0 mg/L BAP,0.2 mg/l, NAA และ 3% sucrose จากการศึกษาของ Puri (2001) ผลของธาตุอาหารและการให้น้ำต่อการปลูกสะเดาด้วยเมล็ด พบว่า ธาตุอาหารหลักไนโตรเจน มีผลต่อมวลชีวภาพของการงอกของเมล็ดสะเดา ในขณะที่ฟอสฟอรัสไม่มีผลต่อมวลชีวภาพ นอกจากนี้การให้น้ำในการปลูกยังมีผลต่อการเจริญเติบโตและการรอดของการปลูกสะเดาด้วยเมล็ด นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในพืชอื่นๆเช่นกัน เช่น การศึกษาผลของโพแทสเซียมต่อการเจริญเติบโตและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในผักกาดหอมชนิดคอส (Lactuca sativa L. var. romana) ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโพแทสเซียมในสารละลายธาตุอาหารทำให้การดูดใช้ธาตุโพแทสเซียม จำนวนใบ น้ำหนักแห้งต้น คลอโรฟิลล์เอ วิตามินซี และแคโรทีนอยด์ เพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลต่อธาตุโพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียม ในต้นผักกาดหอม (เอกพงศ์, 2547)

ดังนั้น การพัฒนาวัตถุดิบในการผลิตสารสกัดสะเดาด้วยการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างธาตุอาหารและปริมาณสารอะซาดิแรคตินในสะเดาจึงมีความจำเป็น เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีความต้องการปริมาณและชนิดของธาตุอาหารที่แตกต่างกัน สารอะซาดิแรคติน ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในการป้องกันและกำจัดศัตรูพืช โดยสารอะซาดิแรคตินนี้สามารถพบได้ในเมล็ดสะเดา การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างธาตุอาหารและปริมาณสารอะซาดิแรคตินในสะเดา อาจเป็นแนวทางให้กับเกษตรกรในการส่งเสริมการผลิตสารอะซาแรคตินของต้นสะเดาและเพิ่มคุณภาพของเมล็ดสะเดาให้มีปริมาณสารอะซาดิแรคตินสูงขึ้นได้

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องแก้ว ได้แก่ Volumetric flask, Pipette, Flat bottom flask, Glass cylinder และ Beaker เป็นต้น
2. สารเคมี ได้แก่ Methanol(LC grade), Acetonitrile(LC grade), น้ำกลั่น
3. สารมาตรฐาน Azadirachtin
4. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Satorius รุ่น AC211S, เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Satorius รุ่น CP3202S และเครื่อง Gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) ยี่ห้อ Agilent รุ่น 6890N
5. วัสดุการเกษตร ได้แก่ ยูเรีย (46-0-0) ทริปเปิลซูเปอร์ฟอสเฟต (0-46-0) โพแทสเซียมคลอไรด์ (0-0-60)

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาปริมาณธาตุอาหารในดินของแปลงสะเดา

1. เก็บตัวอย่างดินที่แปลงสะเดา อำเภอศรีประจันต์ จังหวัดสุพรรณบุรี ที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตร และ 15-30 เซนติเมตร นำมาวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร
2. เก็บตัวอย่างผลสะเดา วิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารและวิเคราะห์ปริมาณสารอะซาดิแรคในเมล็ดสะเดา
3.

ขั้นตอนที่ 2 การใช้ธาตุอาหารในการเพิ่มปริมาณสารสำคัญอะซาดิแรคตินในสะเดา

ในระยะก่อนออกดอก 1-2 เดือน ทำการให้ปุ๋ยตามกรรมวิธีต่างๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block (RCB) จำนวน 3 ซ้ำ 8 กรรมวิธี โดยใช้ปุ๋ยเคมีเป็นกรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ใส่ปุ๋ย 0-0-270 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น ตามค่าวิเคราะห์ K
กรรมวิธีที่ 2 ใส่ปุ๋ย 0-130-0 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น ตามค่าวิเคราะห์ P
กรรมวิธีที่ 3 ใส่ปุ๋ย 0-130-270 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น ตามค่าวิเคราะห์ P และ K
กรรมวิธีที่ 4 ใส่ปุ๋ย 630-0-0 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น ตามค่าวิเคราะห์ N
กรรมวิธีที่ 5 ใส่ปุ๋ย 630-0-270 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น ตามค่าวิเคราะห์ N และ K
กรรมวิธีที่ 6 ใส่ปุ๋ย 630-130-0 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น ตามค่าวิเคราะห์ N และ P
กรรมวิธีที่ 7 ใส่ปุ๋ย 630-130-270 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น ตามค่าวิเคราะห์ N P และ K
กรรมวิธีที่ 8 ไม่ใส่ N P และ K

ขั้นตอนที่ 3 วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญอะซาดิแรคติน

1. ช่วงเดือนมีนาคม-พฤษภาคม ผลสะเดาเริ่มสุกสีเหลือง ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างผลและใบสะเดา โดยสุ่มเก็บตัวอย่างทั่วทั้งต้น นำผลสะเดามาสกัดสารสำคัญในเมล็ดสะเดาโดยนำผลสะเดามากะเทาะเปลือก นำเฉพาะส่วนเนื้อในเมล็ดสะเดามาลดความชื้น ด้วยการอบ แล้วนำมาบดเตรียมสารสกัดหยาบของสะเดาด้วยตัวทำละลายอินทรีย์วิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญอะซาดิแรคติน ด้วยเครื่อง HPLC
2. วิเคราะห์และสรุปผลการใช้ธาตุอาหารในการเพิ่มปริมาณสารสำคัญอะซาดิแรคติน ในสะเดา

ระยะเวลา ระยะเริ่มต้น ตุลาคม 2559 ถึง ระยะสิ้นสุด กันยายน 2560

สถานที่ แปลงทดลอง อำเภอศรีประจันต์ จังหวัดสุพรรณบุรี
ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ
กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลอง

ศึกษาการใช้ธาตุอาหารในการเพิ่มปริมาณสารสำคัญอะซาดิแรคตินในสะเดา

จากการเก็บข้อมูลตัวอย่างดิน และเมล็ดสะเดาแล้ววิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร ระหว่างช่วงเดือนมิถุนายน 2558 – กรกฎาคม 2559 บริเวณแปลงสะเดา อำเภอศรีประจันต์ จังหวัดสุพรรณบุรี พบว่าผลดินที่ระดับความลึก 0 -15 เซนติเมตร มีลักษณะเป็นดินเหนียว มีค่า pH เฉลี่ย 6.7±0.6 มีค่าการนำไฟฟ้าของดิน (ค่า EC) เฉลี่ย 0.219±0.140 ds/m มีค่า อินทรียวัตถุในดิน (ค่า OM) เฉลี่ย 1.77±0.46 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณฟอสฟอรัสในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช (Avail P) เฉลี่ย 56±50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน (Avail K) เฉลี่ย 188±29 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีปริมาณแคลเซียม 3,430±1,150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีปริมาณแมกนีเซียม 686±115 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และที่ระดับความลึก 15-30 เซนติเมตร ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นดินเหนียว มีค่า pH เฉลี่ย 7.1±0.6 มี ค่าการนำไฟฟ้าของดิน (ค่า EC) เฉลี่ย 0.399±0.513 ds/m มีค่า อินทรียวัตถุในดิน (ค่า OM) เฉลี่ย 1.26±0.39 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณฟอสฟอรัสในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช (Avail P) เฉลี่ย 43±33 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน (Avail K) เฉลี่ย 115±18 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีปริมาณแคลเซียม 3,858±1,541 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีปริมาณ

แมกนีเซียม 645±134 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีปริมาณธาตุอาหารในเมล็ดสะเดาแก่ คือ ไนโตรเจน 4.08-5.27 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัส 0.31-0.49 เปอร์เซ็นต์ และโพแทสเซียม 2.00-2.74 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณสารสำคัญอะซาดิแรคติน 0.61-2.77 มิลลิกรัมต่อกรัม จากข้อมูลการวิเคราะห์ได้ปริมาณความต้องการไนโตรเจน(N) ฟอสฟอรัส(P) และโพแทสเซียม(K) คือ 630-130-270 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น นำมาใช้เป็นกรรมวิธีในการทดลอง แล้วนำกรรมวิธีต่างๆ มาใช้ทดสอบที่แปลงสะเดาก่อนสะเดาออกดอก 1-2 เดือน

หลังจากทดสอบกรรมวิธีต่างๆ เมื่อผลสะเดาแก่ ทำการเก็บผลสะเดาและสุ่มวัดผลสะเดาจำนวน 20 ผลต่อต้น จากตารางที่ 1 พบว่าขนาดและน้ำหนักเฉลี่ยของผลสะเดาสด ซึ่งการใช้ปุ๋ยทั้ง 8 กรรมวิธีไม่แตกต่างกัน โดยน้ำหนักเฉลี่ยต่อผลอยู่ระหว่าง 2.55-3.02 กรัม มีขนาดความกว้างเฉลี่ยระหว่าง 1.38-1.52 เซนติเมตร มีขนาดความยาวเฉลี่ยระหว่าง 1.97-2.11 เซนติเมตร ในระหว่างเก็บผลผลิต ในระยะผลสะเดาแก่ มีลมกรรโชกแรง ทำให้ผลผลิตร่วง จึงไม่สามารถเก็บข้อมูลด้านผลผลิต (yield) ได้

จากตารางที่ 2 และ 3 ดินก่อนใช้กรรมวิธีทดสอบและดินหลังเก็บผลผลิต พบว่าดินหลังเก็บผลผลิต มีลักษณะเป็นกรดเล็กน้อยถึงกลาง เนื้อดินเป็นดินไม่เค็ม ปริมาณอินทรียวัตถุในดิน ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ ลดลงหลังจากสะเดาออกผลผลิต โดยอินทรียวัตถุในดินลดลง โดยทั้ง 8 กรรมวิธียังมีปริมาณอินทรียวัตถุในดินอยู่ในช่วงปานกลาง (มาตรฐานค่ากลาง 1.5-2.5 เปอร์เซ็นต์) ยกเว้นกรรมวิธีที่ 3 ใส่ปุ๋ย 0-130-270 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น,กรรมวิธีที่ 6 ใส่ปุ๋ย 630-130-0 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น และ กรรมวิธีที่ 7 ใส่ปุ๋ย 630-130-270 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น อยู่ในเกณฑ์ค่อนข้างต่ำ ส่วนฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์หลังเก็บผลผลิตมีปริมาณลดลง แต่ยังอยู่ในปริมาณที่สูง (มาตรฐานค่ากลาง 13-25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ยกเว้น กรรมวิธีที่ 3 ใส่ปุ๋ย 0-130-270 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น มีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ค่อนข้างต่ำ และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้มีปริมาณในทุกกรรมวิธีมีปริมาณลดลงหลังเก็บผลผลิต แต่ยังคงมีปริมาณสูง(มาตรฐานค่ากลาง 31-60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญอะซาดิแรคตินในเมล็ดสะเดาของแต่ละกรรมวิธี จากตารางที่ 1 พบว่า มีปริมาณสารอยู่ระหว่าง 0.24-0.78 มิลลิกรัมต่อกรัม แล้วทดสอบผลทางสถิติพบว่าการใช้ปุ๋ยในอัตราดังกล่าวในแต่ละกรรมวิธี มีปริมาณสารสำคัญอะซาดิแรคตินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามมีข้อสังเกตคือ กรรมวิธีที่ 8 ไม่ใส่ N P และ K ซึ่งเป็นกรรมวิธีควบคุม มีปริมาณสารอะซาดิแรคตินน้อยสุด คือ 0.24 มิลลิกรัมต่อกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ 6 ใส่ปุ๋ย 630-130-0 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น ตามค่าวิเคราะห์ N และ P มีปริมาณสารอะซาดิแรคตินมากสุด คือ 0.78 มิลลิกรัมต่อกรัม

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากศึกษาวิจัยการใช้ธาตุอาหารในการเพิ่มปริมาณสารสำคัญอะซาดิแรคตินในสะเดาแปลงสะเดา อำเภอศรีประจันต์ จังหวัดสุพรรณบุรี โดยในระยะก่อนออกดอก 1-2 เดือน ทำการให้ปุ๋ยตามกรรมวิธีต่างๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 3 ซ้ำ 8 กรรมวิธี โดยใช้ปุ๋ยเคมี คือ ยูเรีย (46-0-0) ทริปเปิลซูเปอร์ฟอสเฟต (0-46-0) โพแทสเซียมคลอไรด์ (0-0-60)เป็นกรรมวิธี ได้แก่ กรรมวิธีที่ 1 ใส่ปุ๋ย 0-0-270 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น ตามค่าวิเคราะห์ K กรรมวิธีที่ 2 ใส่ปุ๋ย 0-130-0 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น ตามค่าวิเคราะห์ P กรรมวิธีที่ 3 ใส่ปุ๋ย 0-130-270 กรัม N-P_2O_5-

K_2O ต่อต้น ตามค่าวิเคราะห์ P และ K กรรมวิธีที่ 4 ใส่ปุ๋ย 630-0-0 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น ตามค่าวิเคราะห์ N กรรมวิธีที่ 5 ใส่ปุ๋ย 630-0-270 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น ตามค่าวิเคราะห์ N และ K กรรมวิธีที่ 6 ใส่ปุ๋ย 630-130-0 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น ตามค่าวิเคราะห์ N และ P กรรมวิธีที่ 7 ใส่ปุ๋ย 630-130-270 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น ตามค่าวิเคราะห์ N P และ K กรรมวิธีที่ 8 ไม่ใส่ N P และ K เป็นกรรมวิธีควบคุม สุ่มเก็บเก็บตัวผลสะเดาทุกกรรมวิธี วัดน้ำหนักผลสะเดาจำนวน 20 ผลต่อต้น พบว่าน้ำหนักผลสะเดาสดอยู่ระหว่าง 2.55-3.02 กรัม มีขนาดความกว้างระหว่าง 1.38-1.52 เซนติเมตร มีขนาดความยาวเฉลี่ยระหว่าง 1.97-2.11 เซนติเมตร วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญอะซาดิแรคตินทุกกรรมวิธี มีปริมาณสารอยู่ระหว่าง 0.24-0.78 มิลลิกรัมต่อกรัม แล้วทดสอบผลทางสถิติพบว่าการใช้ปุ๋ยในอัตราดังกล่าวในแต่ละกรรมวิธี มีปริมาณสารสำคัญอะซาดิแรคตินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีข้อสังเกตคือ กรรมวิธีที่ 8 ไม่ใส่ N P และ K ซึ่งเป็นกรรมวิธีควบคุม มีปริมาณสารอะซาดิแรคตินน้อยสุดคือ 0.24 มิลลิกรัมต่อกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ 6 ใส่ปุ๋ย 630-130-0 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น มีปริมาณสารอะซาดิแรคตินมากสุด คือ 0.78 มิลลิกรัมต่อกรัม อย่างไรก็ตามจากข้อมูลดังกล่าวเป็นการศึกษาสะเดาในช่วง 1 รอบปี เนื่องจากสะเดาผลิตผลปีละครั้ง จึงเป็นการศึกษาไม้ยืนต้นในช่วงระยะเวลาสั้น อาจต้องศึกษาการใช้ปริมาณธาตุอาหารหลักในปริมาณที่เพิ่มขึ้น หรือการใช้ธาตุอาหารรองรวมกับการศึกษาธาตุอาหารหลัก จึงจะเป็นการได้ข้อมูลที่ครบถ้วนมากยิ่งขึ้นในการศึกษาใช้ธาตุอาหารในการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในลำดับต่อไป

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1. ผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืชจากน้อยหน่า

สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยได้ผลิตภัณฑ์จากเมล็ดน้อยหน่า 2 รูปแบบ คือ EC (emulsifiable concentrates) และ EW (emulsion in water) ที่มีคุณภาพและมีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผัก พร้อมทั้งอัตราการใช้และมีข้อมูลความเป็นพิษต่อลูกปลานิล (LC_{50}) ของผลิตภัณฑ์ และพบว่าส่วนของเมล็ดมีฤทธิ์สูงในการควบคุมหนอนใยผัก สารสกัดน้อยหน่าที่มีฤทธิ์มี 2 ส่วน คือ ส่วนของน้ำมันมีสารออกฤทธิ์เป็นสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ และส่วนของสารสกัดหยาบมีสารออกฤทธิ์เป็นสารกลุ่มแอลคาลอยด์ สามารถหาเอกลักษณ์ทางโครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ของกลุ่มสารที่ออกฤทธิ์ ด้วยวิธี HPTLC พบสารเทอร์ปีนอยด์ที่ Rf 0.81 และสารแอลคาลอยด์ที่ Rf 0.50 การสกัดแยกสารสกัดหยาบเมทานอลของเมล็ดให้เป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ ด้วยเฮกเซน เมทานอล ไดคลอโรมีเทน และน้ำ ได้ส่วนที่มีฤทธิ์สูง (crude2) เมื่อวิเคราะห์หาเอกลักษณ์ทางโครมาโทกราฟี สามารถแยกอัลคาลอยด์ต่างๆ ออกจากกันได้ 5 ส่วน พบอัลคาลอยด์ 8 ชนิด อัลคาลอยด์ส่วนที่มีสารออกฤทธิ์สูงสุดและสามารถนำไปใช้เป็นสารอ้างอิงในการวัดปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ได้ และควรมีการวิจัยเพิ่มเติมในการศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ทั้งในแมลงศัตรูพืชอื่นและประสิทธิภาพในพื้นที่ข้อมูลความเป็นพิษ หรือผลิตผลิตภัณฑ์สูตรรูปแบบอื่น

การใช้ประโยน์

1. นำผลิตภัณฑ์สูตรจากเมล็ดน้อยหน่าที่ได้ไปใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เพื่อลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช

2. นำวิธีการและข้อมูลเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี มาใช้ในการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์

3. ถ่ายทอดข้อมูล เทคโนโลยีการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์และวิธีการใช้ให้แก่เกษตรกรและผู้ประกอบการที่สนใจ เพื่อผลิตในระดับอุตสาหกรรม

2. วิจัยผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืชจากแมงลักป่า

สรุปผลการวิจัย

การวิจัยได้สูตรผลิตภัณฑ์แมงลักป่า 2 สูตรคือ ผลิตภัณฑ์สูตร A 40 %EC และผลิตภัณฑ์สูตร B 40 %EC ที่มีประสิทธิภาพในการใช้ยับยั้งการงอก การเจริญของรากและลำต้นได้ทั้งเมล็ดไมยราบยักษ์(ใบกว้าง)และหญ้าข้าวนก(ใบแคบ) ในระดับห้องปฏิบัติการ ที่อัตรา 10 เปอร์เซ็นต์ และข้อมูลความเป็นพิษต่อลูกปลานิล (LC_{50}) ของผลิตภัณฑ์ และพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของพืชที่สดสอบในระดับห้องปฏิบัติการและในกระถางสภาพเรือนทดลอง เมื่อหากลุ่มสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยโดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS พบสารสำคัญในกลุ่มของเทอร์พีนอยด์ 30-40 ชนิด ซึ่งสารที่พบมากและเป็นองค์หลัก ได้แก่ Sabinene, β-pinene, 1,8-cineole, trans-caryophyllene, caryophyllene oxide, abietatriene เป็นต้น การนำน้ำมันหอมระเหยจากพืช วัชพืชหรือสารสกัดอื่นๆมาใช้ในการป้องกันกำจัดวัชพืชมีความน่าสนใจและมีประโยชน์มาก ควรมีการวิจัยและพัฒนาเพิ่มเติม หรือวิจัยสูตรในรูปแบบอื่นๆ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สูตรที่มีทั้งคุณภาพ ประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยต่อไป

การใช้ประโยน์

1. นำผลิตภัณฑ์สูตรจากแมงลักป่าที่ได้ไปใช้ในควบคุมวัช ลดหรือทดแทนการใช้สารเคมี

2. นำวิธีการวิเคราะห์สารหรือกลุ่มสารที่ออกฤทธิ์ มาใช้ในการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ และพัฒนาให้เป็นวิธีมาตรฐานต่อไป

3. ถ่ายทอดข้อมูล เทคโนโลยีการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์และวิธีการใช้ให้แก่เกษตรกรและผู้ประกอบการที่สนใจ เพื่อผลิตในระดับอุตสาหกรรม

3. ศึกษาการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง(HPTLC)เพื่อทำมาตรฐานเอกลักษณ์ โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในพืช

สรุปผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ข้อมูลเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ของสารที่มีฤทธิ์ในพืชทั้ง 5 ชนิด คือ สะเดา หางไหล หนอนตายหยาก ว่านน้ำและสาบเสือ สามารถนำข้อมูลที่ได้มาใช้เพื่อตรวจวิเคราะห์คุณภาพวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ และใช้เปรียบเทียบหรือบ่งชี้ในการจำแนกได้ รวมถึงได้สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ ทราบสภาวะที่เหมาะสมและตำแหน่งของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในแต่ละชนิดพืช โดยใน**สะเดา**พบว่าสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุดเป็นกลุ่ม azadirachtin จากงานวิจัยใน**หางไหล**พบว่า สารโรติโนนและ deguelin มีคุณสมบัติใกล้เคียงกันมากและมีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก การสกัดเป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ ได้สารโรติโนนที่มีความบริสุทธิ์สูงถึง 92.9% ซึ่งสามารถพัฒนาต่อยอดเป็นสารมาตรฐาน หรือผลิตภัณฑ์สูตรเข้มข้นต่อไป ใน**หนอนตายหยาก** พบว่ากลุ่มสารหลักเป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์ จากการศึกษาตำแหน่งของสารกลุ่มอัลคาลอยด์ในหนอนตายหยาก 3 ชนิด และนำข้อมูลเอกลักษณ์โครมาโตกราฟีมาเปรียบเทียบกันพบว่ามีตำแหน่งของกลุ่มสารแอลคาลอยด์ที่แตกต่างกัน เป็นไปได้ที่เป็นหนอนตายหยากคนละชนิดกัน และพบว่าส่วนของสารสกัดหยาบเฮกเซนมีสาร terpenoids/steroids ซึ่งมีความน่าสนใจในการนำมาวิจัยเพิ่มเติม ผลการวิจัยใน**ว่านน้ำ** เมื่อนำมาสกัดและทดสอบส่วนที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก แล้วแยกต่อเป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography แล้วเปรียบข้อมูลเอกลักษณ์โครมาโตกราฟีกับสารมาตรฐาน พบว่าเป็นเบต้าอะซาโรน สำหรับสาบเสือ จากการข้อมูลเอกลักษณ์โครมาโตกราฟีพบว่า มีสารออกฤทธิ์ต่อหนอนใยผักเป็นกลุ่มเทอร์ปีนอยด์และฟีนอล และควรวิจัยเพิ่มเติมในการแยกสารออกฤทธิ์ในสารสกัดสาบเสือเป็นสารบริสุทธิ์ต่อไป

การใช้ประโยน์

1. นำข้อมูลเอกลักษณ์โครมาโตกราฟีของสารออกฤทธิ์ที่ได้ไปใช้ในการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สารสกัดพืช

2. เป็นฐานข้อมูลและเป็นแนวทางในการวิจัยของสารสกัดในพืชที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช

3. นำไปพัฒนาต่อยอดการสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์สำหรับใช้เป็นสารอ้างอิงหรือสารมาตรฐาน

4. วิจัยการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในพืชสมุนไพรป้องกันกำจัดศัตรูพืช

สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยทำให้ทราบว่าในแต่ละช่วงของพืชมีปริมาณธาตุอาหารที่แตกต่างกัน เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณธาตุอาหารพืชและปริมาณสารอะซาดิแรคตินในเมล็ดสะเดาไทยพบว่า

ปริมาณธาตุแคลเซียมและแมกนีเซียมมีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้าม แต่ธาตุทองแดงมีทิศทางเดียวกัน ส่วนการศึกษาผลของธาตุอาหารหลักและปริมาณสารอะซาดิแรคตินในสะเดา จากข้อมูลพบว่าปริมาณสารสำคัญอะซาดิแรคตินในแต่ละกรรมวิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเนื่องข้อมูลดังกล่าวเป็นการศึกษาในระยะเวลาเพียง 1 ปี และสะเดาให้ผลผลิตปีละครั้งจึงเป็นการศึกษาได้เพียงเบื้องต้น จึงมีความน่าสนใจในการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อให้มีข้อมูลที่เพียงพอ

การใช้ประโยน์

1. นำไปใช้เป็นแนวทางหรือวิธีการในการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในพืชสะเดา เพื่อเป็นเทคโนโลยีการเพิ่มสารสำคัญในสะเดาหรือพืชอื่นๆ

บรรณานุกรม

กิจกรรมที่ 1 วิจัยผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืชจากน้อยหน่า

กรกช อินทราพิเชฐ และณัฐวุฒิ ธานี, 2554. การควบคุมโดยชีววิธีแมลงวันผลไม้ด้วยพืช. รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยสุรนารี นครราชสีมา.

ประสงค์ ปามุทา, และสุพรรนี แก่นสาร อะโอกิ. 2014. ผลของเกลือต่อการลดความเป็นพิษในกลอย. **การเกษตรราชภัฏ** RAJABHAT AGRIC. 13 (1) : 63-70.

สมสุข ศรีจักรวาฬ. 2546. “พืชฆ่าแมลง”. ใน:พืชฆ่าแมลง และพืชมีพิษบางชนิดในประเทศไทย. (ไม่ระบุบรรณาธิการ). สำนักงานเกษตร และสหกรณ์จังหวัดอุบลราชธานี: อุบลราชธานี.

สุดารัตน์ หอมหวล, ยุวดี ชูประภาวรรณ และวิรัตน์ จันทร์ตรี. 2554. ฤทธิ์ฆ่าแมลงของพืชต่อเพลี้ยอ่อนถั่ว. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ปี22 ที่ 13 ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม 2554.

อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ, รัตนาภรณ์ พรหมศรัทธา และพรรณี อัตตนนท์. 2553. ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดและผลิตภัณฑ์หนอนตายหยากต่อปลานิล. ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2553. กรมวิชาการเกษตร.

Al-Lawati, H.T., Azam, K.M., and Deadman, M.L. (2002). Insecticidal and repellent properties of subtropical plant extracts against pulse beetle, *Callosobruchus chinensis*. **Agri Sci.** 7(1):37-45.

Andrade, E.H.A., Zoghbi, M.das G.B., Maia, J.G.S., Fabricius, H., and Marx, F. (2001). Chemical characterization of the fruit of *Annona squamosa* L. occurring in the Amazon**. J. Food Compos. Anal.** 14:227-232.

Epino, P.B. and Chang, F. (1993). Insecticidal activity of *Annona squamosa* (L.) seed extracts against the mediterratnean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedenmann) (Diptera:Tephritidae). Philippine Entomologist, v. 9(2):228-238.

Jamkhande, P.G. and A.S. Wattamwar. 2015. *Annona reticulata* Linn. (Bullock’s heart): Plant profile, phytochemistry and pharmacological properties. **JTCM.**5:144-152.

Khalequzzaman, M and Sultana, S. (2006). Insecticidal activity of *Annona squamosa* L. seed extracts against the red flour beetle, *Tribolium castsnrum* (Herbst). **J Biol-Sci**., 14:107-112.

Leatemia, J.A. and Isman, M.B. (2004a). Insecticidal activity of crude seed extracts of *Annona* spp., *Lansium domesticum* and *Sandoricum koetjape* against Lepidopteran Larvae. **Phytoparasitica** 32(1):30-37.

Leatemia JA, Isman MB (2004b) Efficacy of crude seed extracts of *Annona squamosa* against diamondback moth, *Plutella xylostella* L. in the greenhouse. **Int J Pest Manag** 50:129–133

Manikandan, A. and V.A. Doss. 2010. Evaluation of biochemical contents, nutritional value, trace elements, SDS-PAGE and HPTLC profiling in the leaves of *Ruellia tuberosa* L.

and *Dipteracanthus patulus* (Jacq.). ***Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*** 2(3): 295-303.

Nazneen, B., E.G. Wesely and M.,Johnson. 2012. High performance thin layer chromatography profile studies on the alkaloids of *Albizia lebbeck*. ***Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine***: S1-S6.

Patel, D.K., K. Patel and S.P. Dhanabal. 2012. Phytochemical standardization of *Aloe vera* extract byHPTLCtechniques. ***Journal of Acute Disease***: 47-50.

Rao, N.S., Sharma, K., and Sharma, R.K. (2005). Anti-feedant and growth inhibitory effects of seed extracts of custard apple, *Annona squamosa* against Khapra beetle, *Trogoderma granarium*. **J. Agri. Technol.** 1(1):43-54.

Sachin, U.R., P.R. Patil, V.R. Salunkhe, P.N. Dhabale and K.B.,Burade. 2009. HPTLC method for quantitative determination of Quercetin in Hydroalcoholic extract of dried flower of *Nymphaea stellata* wild. Sachin U. Rakesh et al. ***International Journalof ChemTech Research*** 1(4).

Sunil ,K., A. Sayeed and P. Sharma. 2011. Pharmacognostic evaluation and HPTLC fingerprinting of *Nicotiana Tabacum* stem collected from different geographical regions of India. ***Der Pharmacia Sinica*** 2(5): 1-11.

Thennarasan, S., S. Murugesan and T.S. Subha. 2014. HPTLC finger printing profile of brown alga *Lobophora variegate*(J.V. Lamouroux), ***Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*** 6(1): 674-677.

กิจกรรมที่ 2 วิจัยผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืชจากแมงลักป่า

กนก อุไรสกุล. 2540. การทดสอบสารสกัดแมงลักคากับเพลี้ยอ่อนพริก (*Aphis gossypii* Glov) และหนอนรังห่อใบมะม่วง (*Orthaga* sp.). โครงการการศึกษาองค์ประกอบและทดสอบสารสกัดแมงลักคากับเพลี้ยอ่อน (*Aphis gossypii* Glov). สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตพระนครศรีอยุธยา หันตรา : 1-15.

กลุ่มวิจัยวัชพืช. 2555. *คำแนะนำการควบคุมวัชพืชและการใช้สารกำจัดวัชพืช ปี 2554*. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. กรุงเทพฯ. 149 หน้า.

จรัญญา ปิ่นสุภา และ คมสัน นครศรี. 2553. วิจัยและพัฒนาสารจากแมงลักป่าเพื่อการป้องกันกำจัดวัชพืช. *ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์*. 659 หน้า.

ชอุ่ม เปรมัษเฐียร และ ศิริพร ซึงสนธิพร. 2551. ศึกษาอัตราของสารสกัดจากแมงลักป่าที่เหมาะสมในการควบคุมวัชพืชก่อนและหลังพืชและวัชพืช*งอก. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์*. 649 หน้า.

ชอุ่ม เปรมัษเฐียรและศิริพร ซึงสนธิพร. 2550. ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารจากแมงลักป่าเพื่อให้ได้สารที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืชสูงสุด. *ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2550 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์*. 650 หน้า.

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. 2544. เภสัชวินิจฉัยยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม1. ภาควิชาวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ. 178 หน้า

ทวีศักดิ์ สุนทรธนศาสตร์ ศิรินันท์ ทับทิมเทศ และกนก อุไรกุล. 2540. การศึกษาองค์ประกอบและทดสอบผลการป้องกันกำจัดเพลี้ยอ่อนในพริกและหนอนใบห่อมะม่วงของสารสกัดจากต้นแมงลักคา. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 31 หน้า

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2540. *วัชพืชศาสตร์*. รั้วเขียว. กรุงเทพฯ. 585 หน้า.

รัชดาภรณ์ พิทักษ์ธรรม. 2544. ศึกษาความทนเค็ม ทนแล้ง และความเป็นพิษของต้นแมงลักคา (*Hyptis suaveolens* Linn.) ต่อหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน (*Heliothis armigera* Hubn.). ดุษฎีนิพนธ์ สาขาวิชาชีววิทยาสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ISBN 974-533-027-2.

ศิริกันยา ตรีประสิทธิ์ผล. 2544. สารสกัดจากใบกระเพราผีที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของหญ้าแห้วหมู. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://cuir.car.chula.ac.th/handle/123456789/4263 (24 มีนาคม 2557).

ศิริพร สอนท่าโก, พรรณีกา อัตตนนท์, ธนิตา ค่ำอำนวย และอัณศยา พรมมา. 2559. ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2559. กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 308 หน้า

ศิริพร สอนท่าโก, พรรณีกา อัตตนนท์, ธนิตา ค่ำอำนวย และอัณศยา พรมมา. 2560. เอกสารประกอบสัมมนาวิชาการกองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ประจำปี 2560. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 296 หน้า

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2559. ตารางปริมาณและมูลค่าการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืช ปี 2553 -2558. http://www.oae.go.th/ewt_news.php?nid=146. 26 มีนาคม 2560.

แสงโฉม ศิริพานิช และ สุชาดา มีศรี. 2555. *สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค ประจำปี 2555: พิษสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช*. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://boe.moph.go.th/ (26 มีนาคม 2557).

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2559. *ตารางปริมาณและมูลค่าการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืช ปี 2553 -2558*. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.oae.go.th/ewt_news.php?nid=146 (26 มีนาคม 2560).

Asekun, O. T., O. Ekundayo and B. A., Adevini. 1999. Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Hyptis suaveolens* Leaves. *Fitoterapia*. 70:440-442.

Aycard, J. P., F. Kini, B. Kam, E. M. Gaydou and R. Faure. 1993. Isolation and Identification of Spicigera Lactone: Complete H and C Assignments Using Two-Dimensional NMR Experiments. *J. Natl*. Products. 56:1171-1173.

Heap. I. 2000. The occurrence of herbicide-resistant to atrazine. *Journal of Applied Ecology*. 16: 171-177.

Kordali, S., A. Cakir and S. Sutay. 2007. Inhibitory Effects of Monoterpenes on Seed Germination and Seedling Growth. *Z. Naturforsch*. 62c : 207-214.

Mishra, A.K. and N.K. Dubey. 1994. Evaluation of Some Essential Oils for Their Toxicity Against Fungi Causing Deterioration of Stored Food Commodities. *Appl. Envir. Mocrobiol*. 60:1101-1105.

Nantitanon, W., S. Chowwanapoonpohn and S. Okonogi. 2007. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Hyptis suaveolens Essential oil. *Sci. Pharm*. 75:35-46.

Noudogbessi, J.P., P. Agbangnan, B. Yehouenou, E. Adjalian, G. Nonviho, M. Akibou Osseni, V. Wotto, G. Fidueredo, J.C. Chalchat and D. Sohounhloue. 2013. Physico chemical properties of *Hyptis suaveolens* oil. *Int. J. Med. Arom. Plants*, Vol.3, pp 191-199

Palsson, K., and T.G.T. Jaeson. 1999. Plant Products Used as Mosquito Repellents in *Guinea Bissau*, West Africa., *Acta Tropica*. 72:39-57.

Qui X., S. Yu, Y. Wang, B. Fang, C. Cai and S. Liu. 2010. Identification and Allelopathic Effects of 1,8-cineole from *Eucalyptys urophylla* on lettuce. *Allelophathy Journal*. 26(2):255-264.

Suwanagul; D. and R. Suwanaketnikom. 2001. ATRAZINE RESISTANT IM THAILAND. *In: The Proc of the 18th Asian-Pacific Weed Sci.Sco.Conf*. May 28-June2, 2001. Beijing, China, 509-514.

The plant list. 2015. *Hyptis suaveolens (L.) Poit*. (Online). Available. http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-102170 (June 23, 2015).

กิจกรรมที่ 3 ศึกษาการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง(HPTLC)เพื่อทำมาตรฐานเอกลักษณ์ โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในพืช

ชอุ่ม เปรมัษเฐียร, ศิริพร ซึงสนธิพร. 2550. *แบบรายงานเรื่องเต็มผลงานวิจัยสิ้นสุดปีงบประมาณ 2550 วิจัยประสิทธิภาพของสาบเสือในการป้องกันกำจัดวัชพืช : IV. ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสาบเสือแปลงปลูกพืชอายุสั้น*. (ระบบออนไลน์) แหล่งข้อมูล : http://www.kasetloongkim.com/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=564 (14 พฤศจิกายน 2559)

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

ธนิตา ค่ำอำนวย, ธิติยาภรณ์ อุดมศิลป์, พรรณีกา อัตตนนท์, ศิริพร สอนท่าโก. 2558. ศึกษาประสิทธิภาพกลุ่มสารสำคัญของสาบเสือในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช (วัชพืชและหนอนใยผัก). หน้า 111-118. *ใน :เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการ ประจำปี 2558*. กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร 14-16 พฤษภาคม 2558 ชลบุรี.

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

มงคล แก้วเทพ. 2547. ว่านน้ำ สมุนไพรฆ่าแมลง, *จุลสารข้อมูลสมุนไพร*, 21(4), หน้า 8-14.

รัตนาภรณ์ พรหมศรัทธา, มัลฑนา มิลน์, อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ, เสริม สีมา, พรรณีกา อัตตนนท์, อิสริยะ สืบพันธุ์ดี, วัชรพงศ์ เมธีทวีพิทักษ์. 2550. สารสกัดจากหางไหลเพื่อการควบคุมศัตรูพืช. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 45 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.

วันวิสา ริ้วทองชุ่ม. 2549. สารสกัดหยาบจากสาบเสือเพื่อควบคุมหนอนกระทู้ผัก. ปัญหาพิเศษ. คณะศิลปสาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 75 หน้า.

ศิริพันธุ์ ศรีจักวาฬ และไพโรจน์ สุวรรณจินดา. 2548 หางไหลแดง-โล่ติ๊น. ผลงานของกรมวิชาการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 114 หน้า.

สมจิต พงศ์พงัน และสุภาพ ภู่ประเสริฐ. 2515. พืชกินได้ และพืชป่าในเมืองไทย. โรงพิมพ์คุรุสภา กรุงเทพฯ. 172 หน้า.

สมสุข ศรีจักวาฬ, สมพร สุริยันต์, สุพินญา บุญมานพ และปราโมทย์ เกิดศิริ 2545. พืชฆ่าแมลงและพืชมีพิษบางชนิดในประเทศไทย. กองแผนงานและวิชาการ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.70 หน้า.

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

เสงี่ยม พงษ์บุญรอด. 2522. หางไหลแดงและหางไหลขาว. ไม้เทศ-เมืองไทย สรรพคุณยาเทศและยาไทย หน้า 557-558.

Bjornstad K., Helander A., Hulten P., Beck O. 2009. Bioanalytical Investigation of Asarone in Connection with Acorus calamus Oil Intoxications, *Journal of Analytical Toxicology*, 33: 604-609.

Bouda, H., Tapondjou, L.A., Fontem, D.A., Gumedzoe, M.Y. 2001. Effect of essential oils from leaves of Ageratum conyzoides, Lantana camara and *Chromolaena odorata* on the mortality of Sitophilus zeamais (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*. 37: 103-109.

Campos E.V.R., Proença P.L.F., Oliveira J.L., Bakshi M., Abhilash P.C., Fraceto L.F. 2018. Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives, *Ecological Indicators*, In Press.

Chanatda L., Suraphon V., Manthana M. 2008. Effects of Sweet Flag Extracts (*Acorus calamus* L.) on Toxicity and the Levels of Esterase and Glutathione-S-transferase on the Brown Dog Tick (*Rhipicephalus sanguineus* (Latreille)), *Thai Journal of Forestry*, 27(2): 14-20

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.

Ejercito, J.M. 1954. *The culture of Derris. Root Crop*. p.134-141

Ezena, G.N., Akotsen-Mensah, G., Fening, K.O. 2016. Exploiting the insecticidal potential of the invasive Siam weed, *Chromolaena odorata* L. (Asteraceae) in the management of the major pests of cabbage and their natural enemies in Southern Ghana. *Advance in Crop Science and Technology*. 4: 1-6.

Gocan S., Cimpan G. 2004. Review of the Analysis of Medicinal Plants by TLC: Modern Approaches, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 27: 1377–1411

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)

Isman M.B. 2000. Plant essential oils for pestand disease management. *Crop Protection*. 19: 603-608.

Jacobson M., Keiser I., Miyashita D. H., Harris, E. 1976. Indian calamus root oil: attractiveness of the constituents to Oriental fruit flies, melon flies, and Mediterranean fruit flies, *Lloydia*, 39: 412–415.

Jiang Y., David B., Tu P., Barbin Y. 2010. Recent analytical approaches in quality control of traditional Chinese medicines- A review, *Analytica Chimica Acta*, 657: 9-18

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.

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.

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.

Koul O., Smirle M.J., Isman M.B. 1990. Asarones from *Acorus calamus* L. Oil Their effect on feeding behavior and dietary utilization in *Peridroma saucia*, *Journal of Chemical Ecology*, 16: 1911–1920.

Lawal, O.A., Opoku, A.R., Ogunwande, I.A. 2015. Phytoconstituents and insecticidal activity of different solvent leaf extracts of *Chromolaena odorata* L. against Sitophilus zeamais *(Coleoptera: Curculionidae). European Journal of Medicinal Plants.* 5: 237-347.

Lee H.K., Park C., Ahn Y.J. 2002. Insecticidal activities of asarones identified in *Acorus gramineus* rhizome against *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) and *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutoidae), *Applied Entomology and Zoology*, 37(3): 459–464.

Matharu K.S., Mehts P. K. 2017, Field Efficacy of Indigenous Plant Extracts against Diamondback Moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera : Plutellidae), *Environment & Ecology*, 35(4D) : 3217-3221.

Manikandan, A. and V.A. Doss. 2010. Evaluation of biochemical contents, nutritional value, trace elements, SDS-PAGE and HPTLC profiling in the leaves of *Ruellia tuberosa* L. and *Dipteracanthus patulus* (Jacq.). ***Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*** 2(3): 295-303.

Matsumaru, F. 1985. Toxicology of Inssecticides. Pknum Press. New York. 598p.

Miresmailli S., Isman M.B. 2014. Botanical insecticides inspired by plant–herbivore chemical interactions, *Trends in Plant Science*, 19: 29-35.

Moore, R.H. 1943 Derris culture in Pureto Rico (Mayaguez). Agr.Expt.Sta Cir. 24:17 (illus).

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.

Nicoletti M., Petitto V., Francesca R.G., Multari G., Federici E., Palazzino G. 2012. The Modern Analytical Determination of Botanicals and Similar Novel Natural Products by the HPTLC Fingerprint Approach, *Studies in Natural Products Chemistry*, 37: 217-258.

Nathapong Matintarangsan. 2017. Effect of Siam weed leaf extract, *Chromolaena odorata* (L.) R.M. King & H. Rob in controlling cowpea aphid, Apis craccivora Koch (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Science & Technology MSU.* 37: 79-84.

Nazneen, B., E.G. Wesely and M. Johnson. 2012. High performance thin layer chromatography profile studies on the alkaloids of *Albizia lebbeck*. ***Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine***: S1-S6.

Nazneen, B., E.G. Wesely and M. Johnson. 2012. High performance thin layer chromatography profile studies on the alkaloids of *Albizialebbeck*. ***Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine***: S1-S6.

Osariyekemwen, O.U., Benedicta, N.O. 2017. Evaluation of the repellent and insecticidal activities of the leaf, stem and root powders of Siam weed (*Chromolaena odorata*) against the Cowpea beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Applied Sciences and environmental management*. 21: 511-518.

Park C., Kim S., Ahn Y.J. 2003. Insecticidal activity of asarones identified in *Acorus gramineus*
rhizome against three coleopteran stored-product insects, *Journal of Stored Products Research*, 39: 333–342.

Patel, D.K., K. Patel and S.P. Dhanabal. 2012. Phytochemical standardization of *Aloe vera* extract by HPTLC techniques. ***Journal of Acute Disease***: 47-50.

Pérez,C.J., Alvarado P., Narváez C. ,Miranda F., Hernández L., Vanegas H., Hruska A., Shelton, A.M. 2000. Assessment of insecticide resistance in five Insect pests attacking field and vegetable crops in Nicaragua, *Journal of Economic Entomology*, 93: 1779-1787.

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

Rao N.S., Rajendran R., Raguraman S. 2002. Anti-feedant and growth inhibitory effects of neem in combination with sweet-flag and pungam extracts on Okra shoot and fruit borer, *Earias vittella* (Fab.)**,** *Journal of Entomological Research*, 26: 233-238.

Rattan R.S. 2010. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin, *Crop Protection*, 29: 913-920.

Sachin, U.R., P.R. Patil, V.R. Salunkhe, P.N. Dhabale and K.B. Burade. 2009. HPTLC method for quantitative determination of Quercetin in Hydroalcoholic extract of dried flower of *Nymphaea stellata* willd. Sachin U. Rakesh et al. ***International Journal of ChemTech Research***: 1(4).

Sarwar M., Salman M. 2015. Insecticides Resistance in Insect Pests or Vectors and Development of Novel Strategies to Combat Its Evolution. Int. J. Bioinf and Biomed Engineer. 1(3): 344-351

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.

Schmidt G.H., Streloke M. 1994. Effect of *Acorus calamus* (L.) (Araceae) oil and its main compound β-asarone on *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae), *Journal of Stored Products Research*, 30(3): 227–235.

Sharma P.R., Sharma O.P., Saxena B.P. 2008. Effect of sweet flag rhizome oil (*Acorus calamus*) on hemogram and ultrastructure of hemocytes of the tobacco armyworm, Spodoptera litura (Lepidoptera: Noctuidae), *Micron*, 39(5): 544-551.

Siegwart M., Graillot B., Lopez C.B., Besse S., Bardin M., Philippe C.N., Miguel L.F. 2015. Resistance to bio-insecticides or how to enhance their sustainability: a review, *Frontiers in Plant Science.* 6: 1-19.

Sunil ,K., A. Sayeed and P. Sharma. 2011. Pharmacognostic evaluation and HPTLC fingerprinting of *Nicotiana Tabacum* stem collected from different geographical regions of India. ***Der Pharmacia Sinica*** 2(5): 1-11.

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

Thennarasan, S., S. Murugesan and T.S. Subha. 2014. HPTLC finger printing profile of brown alga *Lobophora variegate* (J.V.Lamouroux). ***Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*** 6(1): 674-677.

Toniolo C., Nicoletti M., Maggi F., Venditti A. 2014. HPTLC determination of chemical composition variability in raw materials used in botanicals, *Natural Product Research*, 28: 119-126.

Wang, B.H., Terhai, B. and Polya, G. 1997. Specific inhibition of cyclic AMP-Dependent protein kinase by parangalone and robotic acid. Phytochem. 44(5): 787-796

Wafaa M.H., Rowida S.B., Hussein A.H.S. 2017**.** Botanical insecticide as simple extractives for pest control, *Cogent Biology*, 3: 1-16.

White, D.G. 1945 Progagating Derris by Cuttings. Agr. In the Americas 5 : 154-156. (illus.)

White, D.G.; Pagan, C.; and Jones, M.A. 1948. Production of Derris elliptica in relation to type of cutting and age at harvest. Journal of Agriculture Research, Washington D.C. 77(1) : 13-24

Worsley, R.R. 1938. Rotenone : Part I. The Determination of Rotinone-part II-Evolution of plants Containning Rotenone. *Lingman Science Journal* 17(2) : 317

Yao Y., Cai W., Yang C., Xue D., Huang Y. 2008. Isolation and characterization of insecticidal activity of (*Z*)-asarone from *Acorus calamus* L., *Insect Science*,15: 229-236.

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

กิจกรรมที่ 4 วิจัยการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในพืชสมุนไพรป้องกันกำจัดศัตรูพืช

คณิต ขอพลอยกลาง และ จารุยา ขอพลอยกลาง, 2557. ผลของสารสกัดจากสภาพแห้งของเมล็ดสะเดา (*Azadirachta* sp.) เมล็ดน้อยหน่า (*Annona* sp.) รากหนอนตายหยาก (*Stemona* sp.) และรากหางไหล (*Derris* sp.) ต่อ อัตราการตายของหนอนแมลงวัน แมลงวัน ลูกน้ำยุง ยุง และเห็บโค. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราช มงคลศรีวิชัย 6(1) ; 39-47.

จีราภรณ์ อินทสาร. ธาตุอาหารพืช. แหล่งที่มา http://www.sluse.mju.ac.th/lecturenote/silo/lesson/312_311_JIRAPORN_2557.pdf สืบค้นเมื่อ 17 มิ.ย. 2560.

เอกพงศ์ ศิริงาม. 2547. การศึกษาผลของโพแทสเซียมต่อการเจริญเติบโตและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในผักกาดหอมชนิดคอส (Lactuca sativa L. var. romana) ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร. ปัญหาพิเศษปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ, พรรณีกา อัตตนนท์, 2548. เอกสารวิชาการ สะเดาและการนำไปใช้ประโยชน์ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ.

Keyur N.R., S.H. Wig, G. Prakash, A. Ramos-Plasencia, A. Srivastava and J. Buchs. 2003. Necessity of a two-stage process for the production of Azadirachtin-Related Limonoids in Suspension Cultures of Azadirachta indica. Journal of bioscience and bioengineering. 96:16-22.

Muhamad R. and M.U. Dahot. 2010. Callus and azadirachtin realated limoniods production through in vitro culture of neem(Azadirachta indica A. Juss). African journal of biotechnology. 9: 449-453.

Manel N. and B. Marzouk. 2008 .Changes in essential oil and fatty acid composition in coriander (*Coriandrum sativum* L.) leaves under saline conditions.Industrial crops and products 28; 137–142.

Mouna B.T., K. Msaada, K. Hosni and B. Marzouk. Changes in fatty acid and essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves under NaCl stress. Food Chemistry 119; 951–956.

Puri S., S. L. Swamy. 2001. Growth and biomass production in Azadirachta indica seedlings in response to nutrients (N and P) and moisture stress. Agroforestry system. Vol. 51, issue 1, pp 57-68.

Vijayalakshmi G., S. Sugumar, A. Mukherjee and N. Chandrasekaran. 2016. Essential Oils in Food. Preservation Flavor and Safety; 593–599.

ภาคผนวก ก (กิจกรรมย่อย ที่ 1.1)

ตารางที่ 1 ปริมาณสารสกัดหยาบใบและเมล็ดน้อยหน่าด้วยตัวทำละลายต่างๆ

ตัวทำละลาย	ปริมาณสารสกัดหยาบใบน้อยหน่า (กรัม/กิโลกรัม)	ปริมาณสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่า (กรัม/กิโลกรัม)
Petroleum ether	26	167.13
chloroform	58	228.7
acetone	89.5	195.04
ethanol	111.5	217.54
methanol	90	213.04
water	-	-

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักวัย 2 ในการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดใบและเมล็ดน้อยหน่า

กรรมวิธี	% ตายของหนอนใยผักวัย 2 (% Corrected mortality)
1. สารสกัดใบ/petroleum ether	62.96 bcd
2. สารสกัดใบ/chloroform	51.85 cd
3. สารสกัดใบ/acetone	74.07 abc
4. สารสกัดใบ/ethanol	37.04 d
5. สารสกัดใบ/methanol	33.33 d
6. สารสกัดเมล็ด/petroleum ether	92.59 ab
7. สารสกัดเมล็ด/chloroform	100 a
8. สารสกัดเมล็ด/acetone	100 a
9. สารสกัดเมล็ด/ethanol	100 a
10. สารสกัดเมล็ด/methanol	100 a
11. กรรมวิธีควบคุมน้ำ	-
12. กรรมวิธีควบคุม petroleum ether	-
13. กรรมวิธีควบคุม chloroform	-
14. กรรมวิธีควบคุม acetone	-
15. กรรมวิธีควบคุม ethanol	-
16. กรรมวิธีควบคุม methanol	-
CV = 23.21%	

หมายเหตุ ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยการวิเคราะห์ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักวัย 2 ในการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าด้วยตัวทำละลายต่างๆ

กรรมวิธี	% ตายของหนอนใยผักวัย 2 (% Corrected mortality)
1. สารสกัด petroleum ether	29.17 c
2. สารสกัด chloroform	54.51 bc
3. สารสกัด acetone	69.10 ab
4. สารสกัด ethanol	86.11 a
5. สารสกัด methanol	88.54 a
6. กรรมวิธีควบคุมน้ำ	-
7. กรรมวิธีควบคุม acetone	-
CV = 28.1%	

หมายเหตุ ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยการวิเคราะห์ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักวัย 2 ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่าด้วยตัวทำละลายเมทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

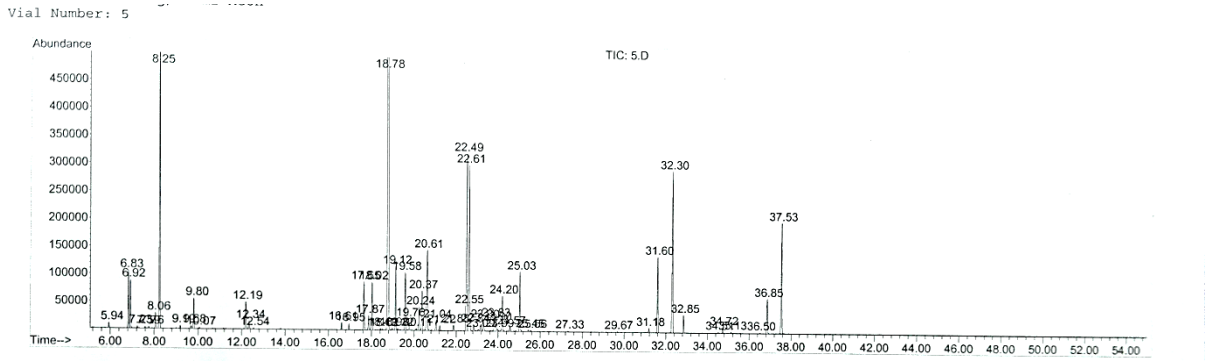
กรรมวิธี	% ตายของหนอนใยผักวัย 2 (% Corrected mortality)
1. สารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5	75.00a
2. สารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10	76.95a
3. สารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 15	86.67a
4. สารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 20	95.00a
5. สารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 25	85.00a
6. กรรมวิธีควบคุมน้ำ	-
CV = 17.9%	

หมายเหตุ ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยการวิเคราะห์ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

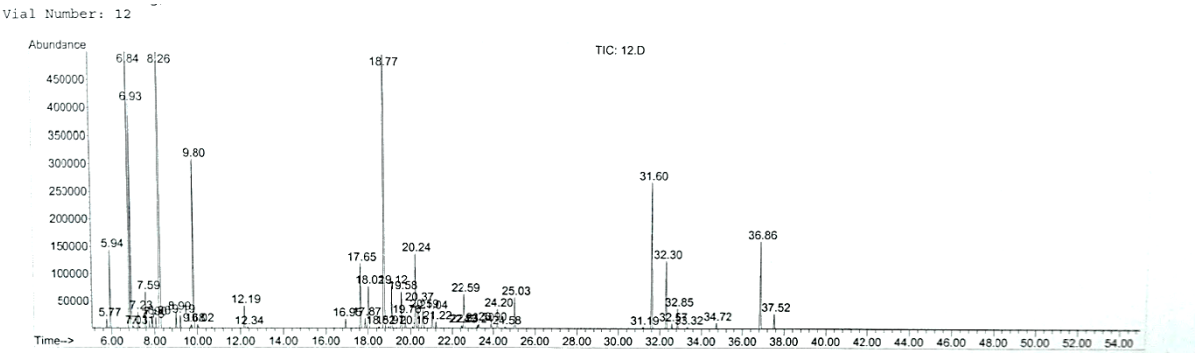
ภาคผนวก ข (กิจกรรมย่อย ที่ 1.2)

รูปที่ 1 สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากเมล็ดน้อยหน่า

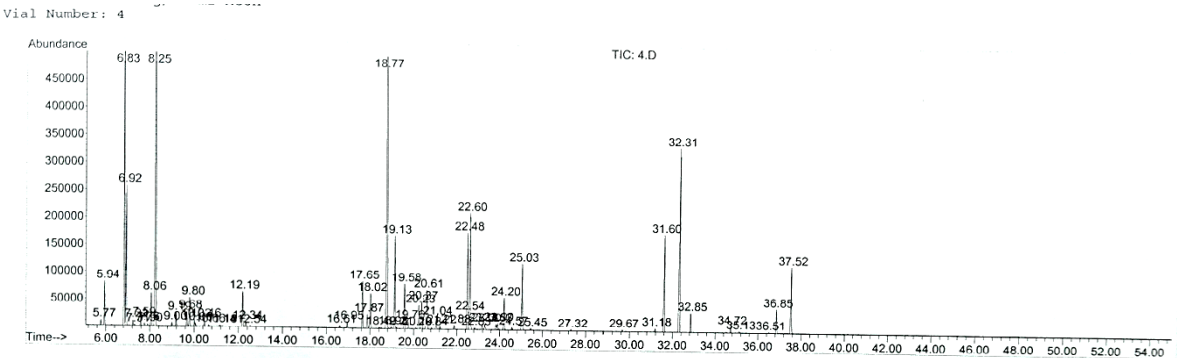
ภาคผนวก ค (กิจกรรมย่อย ที่ 2.2)



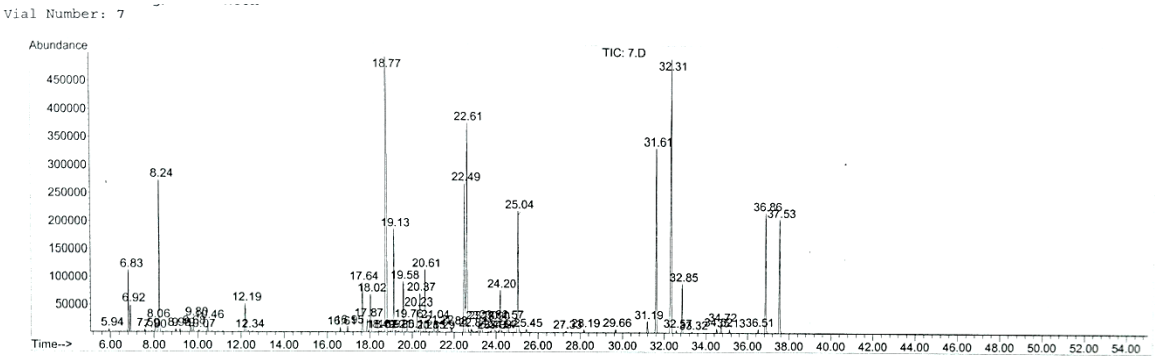
รูปที่ 1 โครมาโทแกรมของน้ำมันหอมระเหยจากส่วนใบ(สด)พืชแมงลักป่า ด้วยเครื่อง GC-MS



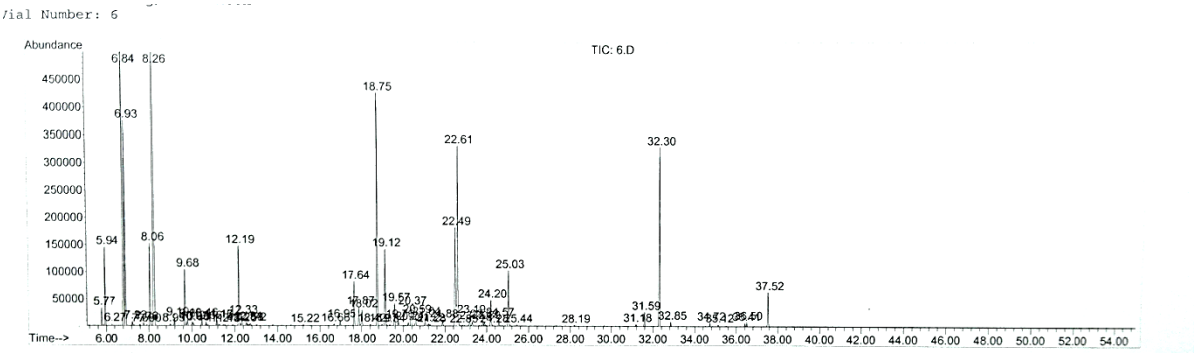
รูปที่ 2 โครมาโทแกรมของน้ำมันหอมระเหยจากส่วนใบ(ตากแห้ง)พืชแมงลักป่า ด้วยเครื่อง GC-MS



รูปที่ 3โครมาโทแกรมของน้ำมันหอมระเหยจากส่วนใบและดอก(สด)พืชแมงลักป่า ด้วยเครื่อง GC-MS



รูปที่ 4 โครมาโทแกรมของน้ำมันหอมระเหยจากส่วนใบและดอก(ตากแห้ง)พืชแมงลักป่า ด้วยเครื่อง GC-MS



รูปที่ 5 โครมาโทแกรมของน้ำมันหอมระเหยจากส่วนใบและดอก(ต้นแห้ง)พืชแมงลักป่า ด้วยเครื่อง GC-MS

ตารางที่ 1 ศึกษาการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักป่า ด้วยวิธีการกลั่นแบบ Hydro-stream ในแต่ละส่วนของพืช

ส่วนของพืชที่ใช้สกัด	ลักษณะพืชที่ใช้สกัด	ความชื้นเฉลี่ยของพืชที่ใช้สกัด (%)	ปริมาณน้ำมันเฉลี่ย (กรัมต่อกิโลกรัมพืชสด)	ปริมาณน้ำมันเฉลี่ย (กรัมต่อกิโลกรัมพืชแห้ง)
ใบ+ดอก	พืชสด	54.66	1.60	-
ใบ		68.17	0.67	-
กิ่ง+ลำต้น		59.56	<0.1	-
ใบ+ดอก	พืชตากแห้ง	14.30	1.32	-
ใบ		14.20	0.22	-
กิ่ง+ลำต้น		18.30	<0.1	-
ใบ+ดอก	พืชแห้ง	15.43	-	3.76
ใบ		*	-	*
กิ่ง+ลำต้น		11.54	-	<0.1

*เนื่องจากพืชแห้ง จึงไม่สามารถแยกส่วนใบได้

ตารางที่ 2 กลุ่มสารสำคัญที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากการสกัดแมงลักป่า โดยเครื่องมือ GC-MS จำแนกตามชนิดของเทอร์พีนอยด์

ชนิดของเทอร์พีนอยด์	RT (min)	Compounds identified	% Area				
			ส่วนดอก+ใบ			ส่วนใบ	
			สด	ตากแห้ง	ต้นแห้ง	สด	ตากแห้ง
Monoterpenes							
	5.77	Alpha-Thujene	0.15	-	0.46	-	0.20
	5.94	alpha-pinene	1.19	0.07	2.09	0.14	1.91
	6.83	sabinene	10.61	1.58	18.32	1.58	13.51
	6.91	beta-pinene	4.16	0.76	5.43	1.71	5.83
	7.23	beta-myrcene	0.16	-	0.12	0.06	0.40
	7.59	1-phellandrene	0.21	0.06	0.03	0.05	0.92
	7.76	delta-3-carene	0.08	-	0.09	0.04	0.18
	7.90	alpha-terpinene	0.05	0.03	0.03	-	0.25
	8.06	o-cymene	1.00	0.30	2.48	0.47	0.30
	8.25	1,8-cineole	16.68	4.63	23.39	10.53	24.44
	8.99	gamma-terpinene	0.09	0.08	0.04	-	0.41
	9.19	cis-sabinenehydrate	0.39	0.07	0.21	0.09	0.75
	9.68	fenchone	0.48	0.15	1.78	0.11	0.11
	9.80	alpha-terpinolene	0.93	0.39	0.21	1.00	4.77
	10.02	gamma-terpinene	0.20	-	0.12	-	0.13
	10.46	alpha-thujone	0.21	0.31	0.21	-	-
	11.18	Camphor	-	-	0.15	-	-
	12.20	terpinen-4-ol	1.18	0.87	2.82	0.95	0.65
	12.34	p-Cymenene	0.17	0.05	0.31	0.27	0.03
	12.54	cyclofenchene	0.03	-	0.11	0.03	-
Sesquiterpenes							
	16.61	Bicycloelemene	0.07	0.13	-	0.22	-
	16.95	alpha-cubebene	0.19	0.16	0.17	0.19	0.26
	17.65	alpha-copaene	1.62	1.58	1.47	1.70	2.04
	17.87	beta-bourbonene	-	0.44	0.65	0.54	0.32
	18.02	beta-elemene	1.34	1.32	0.63	1.81	1.47
	18.77	trans-caryophyllene	19.95	25.10	8.45	30.64	19.07
	19.13	alpha-bergamotene	3.33	3.48	2.60	2.26	1.29
	19.58	alpha-humulene	1.61	1.74	0.76	2.11	1.15
	19.76	Neoalloocimene	0.27	0.39	0.16	-	0.40
	20.24	germacrene-D	0.85	0.81	0.11	0.85	2.42
	20.37	beta-selinene	0.95	1.29	0.64	1.43	0.77
	20.60	alpha-selinene		-	-	-	0.74
	20.61	germacrene-B	1.78	2.60	0.42	3.53	-
	21.04	alpha-copaene	0.44	0.43	0.29	0.41	0.55
	21.22	delta-cadinene	0.13	0.22	0.09	0.18	0.19

	22.48	(+) spathulenol	3.90	5.90	3.96	7.52	-
	22.54	cyclohexane,1,5-diethenyl-3-me	0.38	-	-	0.41	0.07
	22.61	caryophyllene oxide	4.62	8.37	7.36	6.98	-
	22.84	Alloaromadendrene	0.07	0.13	0.03	0.24	-
	23.30	Junipene	0.25	0.44	0.17	0.43	0.17
	23.90	gamma-cadinene	0.26	0.43	0.15	0.39	0.20
	24.20	Eudesma-4(14),11-diene	1.17	1.54	0.97	1.35	0.63
	25.03	z-alpha-trans-beramotol	2.42	4.16	1.92	2.17	0.95
Diterpenes							
	31.61	Rimuen	3.55	6.77	0.45	2.81	4.87
	32.30	Abietatriene	6.86	9.83	6.38	6.13	2.15
	36.41	Abieta-8,11,13-trien-7-one		-	0.09	-	-
	37.53	4-Epidehydroabietol	2.41	4.07	1.25	4.20	0.50
other			3.61	9.32	2.42	4.47	4.99

ตารางที่ 3 ผลของสาร sabinene, 1,8-cinole และ trans-caryophyllene ที่มีต่อการยับยั้งการงอกการเจริญเติบโตของรากและลำต้นของไมยราบยักษ์เบื้องต้น

สารที่พบในน้ำมันหอมระเหยของแมงลักป่า	ปริมาณน้ำมัน (g)	การยับยั้งการงอก (%)	การยับยั้งการเจริญของราก(%)	การยับยั้งการเจริญของลำต้น (%)
Sabinene	25	63.37	50.57	31.64
	50	-32.56	16.98	14.32
	75	11.05	43.30	47.32
	100	38.95	50.10	56.36
1,8-Cineole	25	42.44	27.28	20.42
	50	61.63	32.08	24.59
	75	35.47	32.27	27.02
	100	80.81	69.19	73.25
trans-caryophyllene	25	67.44	33.37	18.80
	50	27.91	31.05	38.74
	75	27.91	19.36	42.96
	100	30.23	54.78	67.49

ตารางที่ 4 ทดสอบน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการสกัดใบดอก โดยใช้พืชสด ตากแห้ง และต้นแห้ง ของแมงลักป่า ที่มีผลต่อการยับยั้งการงอก การเจริญของราก และลำต้นไมยราบยักษ์ในเบื้องต้น

ส่วนของต้นแมงลักป่า	ปริมาณน้ำมัน (mg)	การยับยั้งการงอก(%)	การยับยั้งการเจริญของราก(%)	การยับยั้งการเจริญของลำต้น(%)
ใบ+ดอก (สด)	25	5.43	7.58	41.35
	50	4.49	22.90	62.97
	75	26.03	63.08	80.66
	100	47.57	94.22	95.28
ใบ+ดอก (ตากแห้ง)	25	8.24	21.02	50.43
	50	12.92	43.37	65.10
	75	0.75	47.39	69.87
	100	21.35	59.82	79.57
ใบ+ดอก (ต้นแห้ง)	25	21.35	26.42	49.03
	50	14.79	41.11	69.87
	75	79.40	91.21	94.04
	100	96.25	100.00	100.00

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ปริมาณ Sabinene, 1,8-cineole และ trans-caryophyllene ในน้ำมันหอมระเหยจากส่วนต่างๆของแมงลักป่า ด้วยเครื่อง GC-MS

ส่วนของต้นแมงลักป่า	ปริมาณความเข้มข้น % (w/w)		
	Sabinene	1,8-cineole	trans-caryophyllene
ใบ+ดอก (สด)	10.35	15.20	9.19
ใบ+ดอก (ตากแห้ง)	2.27	5.40	22.80
ใบ+ดอก (ต้นแห้ง)	21.03	25.21	3.22

ภาคผนวก ง (กิจกรรมย่อย ที่ 2.3**)**

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์แมงลักป่าที่มีต่อการยับยั้งการงอก การเจริญเของรากและลำต้น ของเมล็ดไมยราบยักษ์ เบื้องต้นที่อัตราผสมน้ำ 1:5 และ 1:10

สูตร	ลักษณะกายภาพของผลิตภัณฑ์สูตร	อัตราการผสมน้ำใช้ทดสอบ	การยับยั้งการงอก (%)	การยับยั้งการเจริญของราก (%)	การยับยั้งการเจริญของลำต้น (%)
FE1	สีเหลืองใส	1:5	80.43	91.14	94.07
FH2	สีเหลืองใส	1:5	66.30	73.19	88.28
FP2	สีเหลืองขุ่น	1:5	98.91	97.58	97.21
FHP1	สีเหลือง	1:5	61.96	88.82	93.74
F6	สีเหลือง	1:5	41.30	90.10	91.36
FE1	สีเหลืองใส	1:100	27.17	6.49	55.31
FH2	สีเหลืองใส	1:100	-8.70	27.78	51.23
FP2	สีเหลืองขุ่น	1:100	45.65	32.42	56.83
FHP1	สีเหลือง	1:100	47.83	23.19	61.02
F6	สีเหลือง	1:100	20.65	-15.94	66.67

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพเบื้องต้นของสูตรผลิตภัณฑ์แมงลักป่าที่มีต่อการยับยั้งการงอก การเจริญของรากและลำต้น ของเมล็ดไมยราบยักษ์ และปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์

สูตร	อัตราการผสมน้ำใช้ทดสอบ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง			ปริมาณสารหลักในสูตรเข้มข้น(%w/w)		
		การงอก	การเจริญของราก	การเจริญของลำต้น	sabinene	1,8-cineole	trans-caryophyllene
F6E	1:5	100.00	100.00	100.00	7.90	4.54	4.77
FE2	1:5	100.00	100.00	100.00	14.01	7.91	8.62
F6E1	1:5	100.00	100.00	100.00	7.81	4.48	4.72
F6H	1:5	100.00	100.00	100.00	6.44	3.77	4.12
FH1	1:5	100.00	100.00	100.00	9.62	5.38	5.87
F6H1	1:5	100.00	100.00	100.00	8.23	4.42	4.87
F6P	1:5	100.00	100.00	100.00	4.40	2.69	2.73
FP3	1:5	100.00	100.00	100.00	6.56	4.03	4.00
F6P1	1:5	100.00	100.00	100.00	5.51	3.16	2.91
F6HP	1:5	100.00	100.00	100.00	6.87	4.40	4.51
FHP2	1:5	100.00	100.00	100.00	12.57	7.60	7.79
F6HP1	1:5	100.00	100.00	100.00	12.50	7.46	7.62
F4C	1:5	100.00	100.00	100.00	6.04	3.77	4.29

ตารางที่ 3 ลักษณะทางกายภาพของสูตรผลิตภัณฑ์

สูตรผลิตภัณฑ์	สีของผลิตภัณฑ์	การละลายน้ำ(1:10)	pH (1%)
A	สีเหลืองใส	ละลายน้ำได้ดี ให้สีขาวขุ่น	3.9
B	สีเหลืองใส	ละลายน้ำได้ดี ให้สีขาวขุ่น	3.5
C	สีเหลืองใส	ละลายน้ำได้ดี ให้สีขาวขุ่น	3.7
D	สีเหลืองใส	ละลายน้ำได้ดี ให้สีขาวขุ่น	3.6

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์แมงลักป่าในการยับยั้งการงอก การเจริญเของรากและลำต้น ของเมล็ดไมยราบยักษ์

สูตรผลิตภัณฑ์	ความเข้มข้น (%)	ค่าเฉลี่ยการยับยั้งการงอก (%)	ค่าเฉลี่ยการยับยั้งการเจริญของราก (%)	ค่าเฉลี่ยการยับยั้งการเจริญของลำต้น (%)
A	10	100.00 a[1/]	100.00 a	100.00 a
B	10	100.00 a	100.00 a	100.00 a
C	10	75.80 ab	98.80 a	98.80 a
D	10	43.80 b	96.30 b	96.30 b
น้ำกลั่น	10	0.00 c	0.00 c	0.00 c
CV (%)		34.7	1.4	2.1

[1/]ค่าเฉลี่ย (4 ซ้ำ)ในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 5 ปริมาณสารหลักในสูตรผลิตภัณฑ์เข้มข้นแมงลักป่า ก่อนและหลังอบที่ 54 องศสเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

สูตร	ค่าเฉลี่ย(4ซ้ำ)ปริมาณสารหลักในสูตรผลิตภัณฑ์เข้มข้น(%w/w)								
	Sabinene			1,8-cineole			trans-caryophyllene		
	ก่อนอบ	หลังอบ	ลดลง(%)	ก่อนอบ	หลังอบ	ลดลง(%)	ก่อนอบ	หลังอบ	ลดลง(%)
A	7.61	6.43	15.51	5.60	4.76	15.00	4.24	3.22	24.06
B	9.61	8.62	10.30	6.94	6.56	5.48	5.22	4.41	15.52
C	4.27	4.18	2.11	3.18	3.15	0.94	2.20	2.01	8.64
D	10.86	10.29	5.25	7.17	6.97	2.79	6.12	5.39	11.93

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์แมงลักป่าในการยับยั้งการงอก การเจริญเของรากและลำต้น ของเมล็ดไมยราบยักษ์หลังอบที่ 54°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์

สูตรผลิตภัณฑ์	ความเข้มข้น(%)	ค่าเฉลี่ยการยับยั้งการงอก (%)	ค่าเฉลี่ยการยับยั้งการเจริญของราก (%)	ค่าเฉลี่ยการยับยั้งการเจริญของลำต้น (%)
A	10	100.00 a	100.00 a	100.00 a
B	10	100.00 a	100.00 a	100.00 a
C	10	65.40 b	96.60 b	94.70 b
D	10	51.40 b	95.90 b	93.20 b
น้ำกลั่น	10	0.00 c	0.00 c	0.00 c
CV (%)		21.3	1.4	2.4

[1/]ค่าเฉลี่ย (4 ซ้ำ)ในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์แมงลักป่าที่มีผลต่อการยับยั้งการงอก การเจริญเของราก และลำต้น ของเมล็ดไมยราบยักษ์(ใบกว้าง) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สูตรผลิตภัณฑ์	**ความเข้มข้น(%)**	**ค่าเฉลี่ยการยับยั้งการงอก (%)**	**ค่าเฉลี่ยการยับยั้งการเจริญของราก (%)**	**ค่าเฉลี่ยการยับยั้งการเจริญของลำต้น (%)**
ตัวควบคุม (น้ำกลั่น)	100	0.00 d	0.00 d	0.00 d
A	0.5	15.91 b	27.39 c	46.10 c
	1	9.66 c	61.49 b	65.16 b
	5	100.00 a	100.00 a	100.00 a
	10	100.00 a	100.00 a	100.00 a
	15	100.00 a	100.00 a	100.00 a
CV(%)		7.2	9.0	4.2
ตัวควบคุม (น้ำกลั่น)	100	0.00 c	0.00 c	0.00 e
B	0.5	6.25 c	28.85 b	59.33 d
	1	7.96 c	33.53 b	69.85 c
	5	84.09 b	95.17 a	90.06 b
	10	100.00 a	100.00 a	100.00 a
	15	100.00 a	100.00 a	100.00 a
CV(%)		19.7	19.5	8.2
ตัวควบคุม (น้ำกลั่น)	100	0.00 b	0.00 d	0.00 e
C	0.5	6.25 b	33.77 c	35.83 d
	1	7.95 b	41.13 b	47.41 c
	5	27.84 b	83.82 a	86.88 b
	10	100.00 a	100.00 a	100.00 a
	15	100.00 a	100.00 a	100.00 a
CV(%)		44.2	8.9	11.7
ตัวควบคุม (น้ำกลั่น)	100	0.00 c	0.00 d	0.00 d
D	0.5	9.66 c	35.59 c	57.35 c
	1	9.66 c	51.92 b	74.78 b
	5	67.61	92.15 a	94.08 a
	10	100.00 a	100.00 a	100.00 a
	15	100.00 a	100.00 a	100.00 a
CV(%)		32.8	12.6	6.3

[1/]ค่าเฉลี่ย(4 ซ้ำ) ในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์แมงลักป่าที่มีผลต่อการยับยั้งการงอก การเจริญเของราก และลำต้น ของเมล็ดหญ้าข้าวนก(ใบแคบ) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สูตรผลิตภัณฑ์	ความเข้มข้น(%)	ค่าเฉลี่ยการยับยั้งการงอก (%)	ค่าเฉลี่ยการยับยั้งการเจริญของราก (%)	ค่าเฉลี่ยการยับยั้งการเจริญของลำต้น (%)
ตัวควบคุม (น้ำกลั่น)	100	0.00 d	0.00 c	0.00 c
A	0.5	48.05 c	95.05 b	90.30 b
	1	70.13 b	100.00 a	91.46 b
	5	100.00 a	100.00 a	100.00 a
	10	100.00 a	100.00 a	100.00 a
	15	100.00 a	100.00 a	100.00 a
CV(%)		9.4	2.1	1.0
ตัวควบคุม (น้ำกลั่น)	100	0.00 d	0.00 c	0.00 d
B	0.5	44.16 c	87.56 b	86.98 c
	1	79.22 b	100.00 a	90.00 b
	5	100.00 a	100.00 a	100.00 a
	10	100.00 a	100.00 a	100.00 a
	15	100.00 a	100.00 a	100.00 a
CV(%)		11.1	7.3	1.6
ตัวควบคุม (น้ำกลั่น)	100	0.00 c	0.00 c	0.00 d
C	0.5	41.56 b	91.76 b	80.01 c
	1	38.96 b	94.49 ab	88.00 b
	5	97.40 a	100.00 a	95.38 a
	10	100.00 a	100.00 a	100.00 a
	15	100.00 a	100.00 a	100.00 a
CV(%)		17.2	5.3	5.4
ตัวควบคุม (น้ำกลั่น)	100	0.00 d	0.00 c	0.00 c
D	0.5	22.08 c	91.56	88.05 b
	1	63.64 b	100.00 a	89.33 b
	5	100.00 a	100.00 a	100.00 a
	10	100.00 a	100.00 a	100.00 a
	15	100.00 a	100.00 a	100.00 a
CV(%)		8.5	1.9	1.6

[1/] ค่าเฉลี่ย(4 ซ้ำ) ในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ภาคผนวก จ กิจกรรมย่อย ที่ 4.2

ตารางที่ 1 ขนาดและน้ำหนักเฉลี่ยของผลสะเดาสด และปริมาณสาร Azadirachtin ในเนื้อในเมล็ดสะเดาในแต่ละกรรมวิธี

กรรมวิธี	ค่าเฉลี่ยต่อผลสด (20 ผล)			ปริมาณสาร[1/]
	น้ำหนัก(กรัม)	กว้าง(ซม.)	ยาว(ซม.)	Azadirachtin (mg/g)
กรรมวิธีที่ 1 ใส่ปุ๋ย 0-0-270 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น	2.85	1.45	2.02	0.47
กรรมวิธีที่ 2 ใส่ปุ๋ย 0-130-0 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น	2.77	1.44	2.06	0.55
กรรมวิธีที่ 3 ใส่ปุ๋ย 0-130-270 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น	2.59	1.41	1.92	0.61
กรรมวิธีที่ 4 ใส่ปุ๋ย 630-0-0 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น	2.58	1.38	2.03	0.64
กรรมวิธีที่ 5 ใส่ปุ๋ย 630-0-270 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น	2.68	1.44	1.97	0.33
กรรมวิธีที่ 6 ใส่ปุ๋ย 630-130-0 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น	3.02	1.52	2.08	0.78
กรรมวิธีที่ 7 ใส่ปุ๋ย 630-130-270 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น	2.55	1.44	2.11	0.57
กรรมวิธีที่ 8 ไม่ใส่ N P และ K	2.55	1.44	2.11	0.24
CV(%)				62.3

หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ
ต้นสะเดาไม่ออกผลผลิตจำนวน 3 ต้น

ตารางที่ 2 ค่าการนำไฟฟ้าของดิน อินทรียวัตถุในดิน ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ แมกนีเซียมของดินก่อนการทดสอบ

กรรมวิธี	pH (1:1)	ค่าการนำไฟฟ้าของดิน (EC, ds/m)	อินทรียวัตถุในดิน (OM, %)	ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (mg/kg)	โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (mg/kg)	แคลเซียม (mg/kg)	แมกนีเซียม (mg/kg)
1) 0-0-270 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น	6.8	0.263	2.13	122	200	4392	680
2) 0-130-0 กรัม N-P_2O_5-K_2Oต่อต้น	7.0	0.295	1.76	27	202	4730	680
3) 0-130-270 กรัม N-P_2O_5-K_2Oต่อต้น	6.5	0.245	1.82	28	271	3278	568
4) 630-0-0 กรัม N-P_2O_5-K_2Oต่อต้น	6.8	0.263	2.13	122	200	4392	680
5) 630-0-270 กรัม N-P_2O_5-K_2Oต่อต้น	6.6	0.195	2.83	136	281	4704	704
6) 630-130-0 กรัม N-P_2O_5-K_2Oต่อต้น	6.4	0.258	1.76	114	199	3235	591
7) 630-130-270 กรัม N-P_2O_5-K_2Oต่อต้น	6.4	0.258	1.76	114	199	3235	591
8) ไม่ใส่ N P และ K	6.8	0.263	2.13	122	200	4392	680

ตารางที่ 3 ค่าการนำไฟฟ้าของดิน อินทรียวัตถุในดิน ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ แมกนีเซียมของดินหลังเก็บผลผลิต

กรรมวิธี	pH (1:1)	ค่าการนำไฟฟ้าของดิน (EC, ds/m)	อินทรียวัตถุในดิน (OM, %)	ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (mg/kg)	โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (mg/kg)	แคลเซียม (mg/kg)	แมกนีเซียม (mg/kg)
1) 0-0-270 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อต้น	6.4	0.114	2.11	65	175	3368	648
2) 0-130-0 กรัม N-P_2O_5-K_2Oต่อต้น	6.2	0.173	2.3	63	168	3229	606
3) 0-130-270 กรัม N-P_2O_5-K_2Oต่อต้น	5.9	0.182	1.15	16	199	2640	520
4) 630-0-0 กรัม N-P_2O_5-K_2Oต่อต้น	6.4	0.326	1.86	52	142	3262	621
5) 630-0-270 กรัม N-P_2O_5-K_2Oต่อต้น	6.3	0.266	2.10	36	156	3650	611
6) 630-130-0 กรัม N-P_2O_5-K_2Oต่อต้น	6.0	0.186	1.47	35	137	2838	553
7) 630-130-270 กรัม N-P_2O_5-K_2Oต่อต้น	6.4	0.331	1.28	33	139	2919	461
8) ไม่ใส่ N P และ K	6.4	0.266	1.81	33	131	3054	538