ศึกษาสารออกฤทธิ์ในสารสกัดพืชที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* และสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์เพื่อควบคุมคุณภาพในการพัฒนาผลิตภัณฑ์

Study on the efficacy of plant extracts on *Cercospora kikuchii* and isolation of fungicidal substance for controlling the quality of the formulated product.

ณัฐพร ฉันทศักดา สุมนา จำปา [1] พจนีย์ หน่อฝั้น ศิริพร สอนท่าโก ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต [2]

Nattaporn Chanthasakda Sumana Jumpa [1] Poachanee Norfun Siriporn sonthako Supalak Sattayasmithstid [2]

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ABSTRACT

The present project was carried out to search the plant and its active chemical which had fungicidal activity against *Cercospora kikuchii*, a causal agent of purple seed stain on soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), formulate the finished product as botanical fungicide and isolate the active compound for controlling the quality of the finished product. Twenty selected plants extracted by ethanol were assessed their effectiveness against *Cercospora kikuchii* in vitro on PDA media. Crude extraction from *Eugenia caryophyllus* and *Alpinia galangal* showed a high effect on inhibition of growth to 100%. Both plant extracts were tested by Contact bioautography method and found that the chemical being on R_F 0.17-0.42 showed antifungal activity and were terpenoid group. The extract of *Eugenia caryophyllus* which consisted of eugenol as active compound was chosen to formulate to be finished product because %yield of crude extract was more than *Alpinia galangal.*

Five extract methods of oil clove (maceration with hexane, maceration with ethanol, ultrasonic with hexane, ultrasonic with ethanol and hydro-distillation) were compared. The results showed that hydro-distillation method was the most effective. Three finished products of clove oil in the form of emulsifiable concentrate (EC) were formulated – A 20% W/W clove oil, B 40% W/W clove oil and C 60% W/W clove oil. Formula B (rate 2-2.5 g/kg PDA) and C (rate 1-2.5 g/kg PDA) could inhibit the growth of *Cercospora kikuchii* in range 93.60-93.72% which were not significantly different from carbendazim (rate 2 g/kg PDA).

Eugenol being an active compound was isolated from the clove oil by Flash chromatograph technique with hexane and 10% ethyl acetate/hexane as mobile phase, flow rate 35 mL/min. The eugenol ratio in fractions is more than 99%. For eugenol analysis method of finished product, High performance - thin layer chromatography (HPTLC) was verified with HPTLC plate silica gel 60 F254 size 20x10 cm. The mobile phase consisted of toluene : ethyl acetate : acetic acid (9:1:0.12, v/v/v) and the

1 ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290

1 Chiang Mai Seed Research and Development Center, Sansai, Chiangmai 50290

2 ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก อ.วังทอง จ.พิษณุโลก 65130

2 Phitsanulok Seed Research and Development Center, Wang Thong, Phitsanulok, 65130

densitometric scanning was performed in the absorbance mode 282 nm. The results were found that the working concentration range and linearity range of eugenol were 200-800 mg/L with the correlation coefficient (r) of 0.9992. The detection limit and quantitation limit were determined to be 60 and 200 mg/L, respectively for HPLTC method. The eugenol content of the formula B was 36.87% W/W. This method is simple, precision and accurate for analysis of eugenol in this formulation.

Keywords : purple seed stain on soybean, *Cercospora kikuchii*, clove, *Glycine max* (L.) Merr., formulation, eugenol

บทคัดย่อ

การศึกษาสารออกฤทธิ์ในสารสกัดพืชที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากสารสกัด และสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์เพื่อควบคุมคุณภาพในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป ดำเนินการสกัดพืช 20 ชนิด ด้วยเอทานอล ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่า สารสกัดหยาบกานพลู และข่า สามารถยับยั้งได้ 100% เมื่อสกัดให้บริสุทธิ์ขึ้น นำไปทดสอบด้วยวิธี Contact bioautography พบว่าน้ำมันข่า และน้ำมันกานพลูมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนแผ่น TLC ที่ตำแหน่ง R_F 0.17-0.42 ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเป็นสารกลุ่ม terpenoids กานพลูจึงเป็นพืชที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* โดยมี eugenol เป็นสารออกฤทธิ์

จากการเปรียบเทียบวิธีสกัดน้ำมันกานพลู พบว่าวิธีการสกัดน้ำมันกานพลูที่ดีที่สุด คือ การกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) และจากการวิจัยผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู จำนวน 3 สูตร ได้แก่ สูตร A น้ำมันกานพลู 20% w/w EC, สูตร B น้ำมันกานพลู 40% w/w EC และสูตร C น้ำมันกานพลู 60% w/w EC พบว่า สูตร B น้ำมันกานพลู 40% w/w EC ที่อัตรา 2-2.5 g/kg PDA สามารถยับยั้งการเจริญเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้ถึง 93.72% เช่นเดียวกับสูตร C (น้ำมันกานพลู 60% w/w EC) ที่อัตรา 1-2.5 g/kg PDA ซึ่งไม่แตกต่างจากคาร์เบนดาซิม ที่ความเข้มข้น 2.0 g/kg PDA

การแยกสารออกฤทธิ์ eugenol ในน้ำมันกานพลู โดยเครื่อง Flash chromatograph พบว่าการแยกด้วยตัวทำละลาย hexane และ 10% ethyl acetate/hexane ที่อัตราการไหล 35 mL/min ได้ eugenol อัตราส่วนมากกว่า 99% ใน fraction ที่ได้จากการแยก และจากทวนสอบวิธีวิเคราะห์ปริมาณ eugenol ในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู ด้วยเทคนิค HPTLC ของ Inam *et al*., 2014 โดยใช้แผ่น TLC ชนิด HPTLC plate silica gel 60F254 ขนาด 20x10 cm ที่ความยาวคลื่น 282 nm ใช้ toluene : ethyl acetate : acetic acid (9:1:0.12, v/v/v) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าช่วงของการวัด (Working range) และค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) อยู่ในช่วงความเข้มข้น 200-800 mg/L มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.9992 ให้ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ) เท่ากับ 60 และ 200 mg/L ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ปริมาณ eugenol ในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูสูตร B ที่ถูกพัฒนาขึ้นได้ พบสารสำคัญ eugenol เท่ากับ 36.87% W/W

คำหลัก : โรคเมล็ดสีม่วง เชื้อรา *Cercospora kikuchii* กานพลู ถั่วเหลือง ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป eugenol

คำนำ

ถั่วเหลืองหรือถั่วแระ เป็นพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าต่อมนุษย์เป็นอย่างมาก นอกจากจะอุดมไปด้วยโปรตีนที่สามารถทดแทนเนื้อสัตว์ได้แล้ว ยังสามารถนำมาใช้ในด้านอุตสาหกรรมได้หลายอย่างด้วย ในเรื่องการผลิตนั้น โรคจัดว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญมากอย่างหนึ่งในการกำหนดให้ผลผลิตเป็นไปอย่างจำกัดหรือผลผลิตเพิ่มขึ้น สันนิษฐานว่าเกิดจากสาเหตุหนึ่ง คือ โรคที่ติดมากับเมล็ด (seed-borne disease) โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคเมล็ดสีม่วง (purple seed stain : *Cercospora kikuchii*) เป็นโรคที่พบอยู่ทั่วไปในพื้นที่ปลูกถั่วเหลือง ซึ่งโรคนี้จะไม่ทำให้ผลผลิตลดลงโดยตรง แต่จะทำให้คุณภาพของเมล็ดต่ำกว่ามาตรฐานและสูญเสียเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดไปเป็นผลทำให้เกิดความเสียหายกับผลผลิตและยังเป็นอุปสรรคต่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ วิธีป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืชดังกล่าว โดยทั่วไปเกษตรกรมักใช้สารเคมี (fungicide) ซึ่งมีการใช้กันมานาน และมีปริมาณการใช้สูงเพิ่มขึ้นทุกปี เนื่องจากสารเคมีส่วนมากจะมีผลในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดี และเห็นผลรวดเร็ว แต่การใช้สารเคมีติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน อาจมีพิษตกค้างอยู่ในผลิตผลทางการเกษตร ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ใช้และยังเป็นมลพิษในสภาพแวดล้อม อาจมีผลต่อการดื้อยาของเชื้อสาเหตุ การใช้สารสกัดจากพืชในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เป็นทางเลือกหนึ่งในการสนับสนุนการลดการใช้สารเคมีในภาคการเกษตร สารสกัดจากพืชสามารถสลายตัวได้ง่ายในธรรมชาติ ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

ด้วยเหตุนี้จึงมีผู้หันมาสนใจแนวทางเลือกใหม่ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยการใช้ประโยชน์จากสารสกัดพืชสมุนไพรเพื่อทดแทนสารเคมี ลดปริมาณของสารเคมีสังเคราะห์ที่เป็นอันตรายลง เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่มีภูมิอากาศเขตร้อน มีความหลากหลายทางชีวิภาพ จึงน่าสนใจที่จะศึกษาพืชหลากหลายชนิดนี้เพื่อใช้ประโยชน์ แต่อย่างไรก็ตาม การสกัดพืชสมุนไพรมาใช้จริงในแปลงเกษตรกรนั้นไม่ค่อยสะดวกนัก โดยเฉพาะแปลงขนาดใหญ่ ที่มีพื้นที่มากจึงต้องใช้สารสกัดจำนวนมากตามไปด้วย ซึ่งจะสร้างความยุ่งยากในการจัดหาและเตรียมสารสกัดพืช ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากสารสกัดพืชจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจให้กับเกษตรกร เนื่องจากใช้งานง่าย และรวดเร็ว แต่ปัญหาที่พบคือ ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากสารสกัดพืชเพื่อใช้ทางการเกษตรยังมีน้อย และบางผลิตภัณฑ์ยังขาดการรับรองคุณภาพ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะวิจัยหาชนิดพืชที่มีฤทธิ์ควบคุมเชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุของโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลือง และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากสารสกัดพืชที่มีฤทธิ์ รวมถึงสกัดแยก และศึกษาวิธีวิเคราะห์สารสำคัญจากพืชดังกล่าว เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยมสี่ตำแหนง รุน AC211S (Sartorius)
2. ปมสุญญากาศ (vacuum pump)
3. เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใตสุญญากาศ (Rotary evaporator) รุน R-124 (BUCHI)
4. เครื่อง Flash Chromatograph รุ่น reveleris prep (BUCHI)
5. เครื่องอัลตราโซนิค รุ่น Elmasonic S (Elma)
6. เครื่อง High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) (CAMAG)
7. เครื่อง Gas Chromatograph-Mass spectrometer (GC-MS) รุ่น 6890N Mass Spectrometry รุ่น 5973 (Agilent Technologies)
8. เครื่องแกว ได้แก กรวยแยก, กรวยกรองบูชเนอร ขวดกำหนดปริมาตร, กรวยกรองแกว, บีกเกอร หลอดทดลอง, ปเปต, ขวดกนกลม, ชุดกรองน้ำมันหอมระเหย (Clevenger Apparatus)
9. สารเคมี ไดแก chloroform, ethyl acetate, ethanol, hexane, petroleum ether, methanol, eugenol, acetyl eugenol, sodium sulfate anhydrous, carbendazim, p-anisaldehyde, sulfuric acid เป็นต้น

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 การสกัดหยาบจากพืชและส่วนต่างๆของพืชในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* (2562)

1.1 ศึกษาสารสกัดหยาบจากพืชและส่วนต่างๆของพืชที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

แบบและวิธีการทดลอง

ในขั้นตอนการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ 23 กรรมวิธี ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมด้วยสารสกัดหยาบจากพืช 20 ชนิด ความเข้มข้น 6.25 mg/mL, carbendazim (positive control), ethanol (blank) และน้ำกลั่น (negative control)

1. เตรียมสารสกัดหยาบจากตัวอย่างพืช 20 ชนิด ได้แก่ กระชายขาว กระเทียม กานพลู ขมิ้นชัน ข่า ขิง ชะเอมเทศ ชะเอมไทย ช้าพลู ตะไคร้หอม ใบน้อยหน่า ใบบัวตอง ใบแมงลักป่า ใบสะเดา เปลือกมังคุด ไพล ว่านน้ำ หางไหลอบเชยไทย อบเชยเทศ อบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส บดและชั่งน้ำหนักตัวอย่าง สกัดตัวอย่างพืชด้วยตัวทำละลาย ethanol ในอัตรา 20% w/v จำนวน 3 ครั้ง ด้วยเครื่องอัลตราโซนิค กรอง แล้วนำสารละลายที่ได้ไปลดปริมาตรด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator)

2. ทดสอบสารสกัดหยาบจากพืช 20 ชนิดในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

2.1 เตรียมเชื้อ โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมาตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธี Blotter method เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมาตรวจหาเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ภายใต้กล้อง Steromicroscope ทำการแยกให้บริสุทธิ์ เลี้ยงบนอาหาร PDA และเก็บเป็น stock culture เพื่อใช้ในการทดลอง

2.2 นำสารสกัดหยาบของพืชทั้ง 20 ชนิด จากข้อ 1. ในอัตรา 6.25 mg/mL ทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยเมื่อเชื้อราอายุได้ 7 วัน ตัดเจาะชิ้นวุ้นโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร นำมาวางบนจุดกึ่งกลางจานอาหารที่เติมสารสกัดพืชป้องกันกำจัดเชื้อราตามกรรมวิธี คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii*

2.3 เลือกสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์มากที่สุด 3 ชนิด คือ การพลู ข่า และช้าพลู ไปสกัดต่อด้วย วิธี Column chromatography ชะด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ hexane, chloroform, methanol ตามลำดับ แล้วเก็บสารที่ได้จากการชะ (fraction) ทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในอัตรา 2.50 mg/mL ตามวิธีการข้อ 2.2

2.4 นำสารสกัดส่วนที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ได้แก่ ข่า (hexane), กานพลู (hexane), กานพลู (chloroform1), กานพลู (chloroform2) มาแยกสารโดยเทคนิคทีแอลซี โดยใช้แผ่น TLC silica gel 60 F254 แยกสารด้วยวัฏภาคของเหลว (mobile phase) hexane : ethyl acetate (9:1,v/v) เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 แผ่น นำแผ่นดังกล่าว ไปทดสอบบนเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ด้วยวิธี Contact bioautography (Dewanjee *et al*., 2015) เพื่อหาตำแหน่ง (R_F) ของสารออกฤทธิ์ (active substance) และอีกแผ่นหนึ่งสเปรย์น้ำยาทดสอบ p-anisaldehyde/sulfuric acid

1.2 ศึกษาชนิดของกลุ่มสารออกฤทธิ์โดยวิธีการทดสอบทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบ (นพมาศและคณะ, 2554)

นำสารสกัดส่วนที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ได้แก่ ข่า (hexane), กานพลู (hexane), กานพลู (chloroform1), กานพลู (chloroform2) จาก 2.3 มาทดสอบกลุ่มสารต่าง ๆ ด้วยน้ำยาทดสอบทางพฤกษเคมี นพมาศและคณะ (2554) ได้แก่ Dragendorff's reagent, Mayer's reagent, Shinoda's reagent, Ferric chloride, Lead acetate, Gelatin, Foam test, Salkowski's test, Lieberman Burchard, Benedict's reagent, Fehling's reagent และ Barfoed's reagent

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาวิธีการสกัดสารสกัดหยาบพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ และทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์เพื่อกำหนดอัตราการใช้ (2563)

2.1 ศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันกานพลู

ศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันกานพลู จำนวน 5 กรรมวิธี ดังนี้

1. การแช่ (maceration) อัตรา 10% (w/v) ใน hexane เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
2. การแช่ (maceration) อัตรา 10% (w/v) ใน ethanol เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
3. การสั่นสะเทือนด้วยคลื่น ultrasonic อัตรา 10% (w/v) ใน hexane เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
4. การสั่นสะเทือนด้วยคลื่น ultrasonic อัตรา 10% (w/v) ใน ethanol เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
5. การกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) อัตรา 10% (w/v) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator) บันทึกน้ำหนักสารสกัดหยาบ และวิเคราะห์ปริมาณ Eugenol ในสารสกัดหยาบ ด้วย GC-MS (Athar *et al*, 2013)

2.2 ศึกษาประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อกำหนดอัตราการใช้

แบบและวิธีการทดลอง

ในขั้นตอนการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ 18 กรรมวิธี ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีการผสมสูตรผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูชนิด A, B และ C ชนิดละ 5 ความเข้มข้น (0.50, 1.00, 1.50, 2.00 และ 2.50 mg/mL) ส่วนผสมสูตรที่ไม่มีน้ำมันกานพลู (blank), carbendazim (positive control) และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ไม่เติมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา (negative control)

1. ผสมปรุงแต่งเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู และศึกษาการคงสภาพของผลิตภัณฑ์
   1.1 เตรียมผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู สูตร Emulsifiable Concentrate (EC) จำนวน 3 สูตร ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปสูตรที่ 1 (A) ความเข้มข้น 20% ของน้ำมันกานพลู, สูตรที่ 2 (B) ความเข้มข้น 40% ของน้ำมันกานพลู และสูตรที่ 3 (C) ความเข้มข้น 60% ของน้ำมันกานพลู
   1.2 ศึกษาการคงสภาพของสูตรผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู
   ศึกษาการคงตัวของ pH ของสูตรผลิตภัณฑ์อุณหภูมิต่างๆ และการคงตัวของสารออกฤทธิ์ Eugenol ในสูตรผลิตภัณฑ์
2. เตรียมเชื้อ เช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 1 ข้อ 2.1
3. นำผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูสูตร A, B และ C ทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยเมื่อเชื้อราอายุได้ 7 วัน ตัดเจาะชิ้นวุ้นโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร นำมาวางบนจุดกึ่งกลางจานอาหารที่เติมสารสกัดพืชป้องกันกำจัดเชื้อราตามกรรมวิธี คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii*

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาวิธีสกัดและวิธีวิเคราะห์สารกึ่งบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพ (2564)

3.1 ศึกษาวิธีแยกสาร eugenol จากน้ำมันกานพลูด้วยเครื่อง Flash Chromatograph

1. เตรียมน้ำมันกานพลูโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) อัตรา 10% (w/v) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
2. ศึกษาระบบตัวทำละลาย ได้แก่ ตัวทำละลาย (mobile phase) และอัตราส่วนตัวทำละลาย ที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบระบบตัวทำละลาย 6 ระบบ ดังตารางที่ 1 โดยปรับสภาวะของเครื่อง Flash Chromatograph ดังตารางที่ 2
3. ศึกษาอัตราการไหลของระบบตัวทำละลาย (flow rate) ที่ 15, 25 และ 35 mL/min ด้วยระบบตัวทำละลาย System IV และจดบันทึกระยะเวลาการสกัด (run time)
4. เก็บ fraction ที่ได้จากการแยกไปพิสูจน์ความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง GC-MS และเครื่อง NMR (BRUKER ADVANCE NANOBAY 400 MHz NMR Spectrometer MADE IN Switzerland) โดยส่งวิเคราะห์ NMR กับภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 ระบบตัวทำละลายในการแยกสาร eugenol จากน้ำมันกานพลูด้วยเครื่อง Flash Chromatograph

Solvent System	Solvent A	Solvent B
System I	Petroleum ether	10% v/v Ethyl acetate in petroleum ether
System II (BUCHI)	Petroleum ether	20% v/v Ethyl acetate in petroleum ether
System III	Petroleum ether	40% v/v Ethyl acetate in petroleum ether
System IV	Hexane	10% v/v Ethyl acetate in hexane
System V	Hexane	20% v/v Ethyl acetate in hexane
System VI	Hexane	40% v/v Ethyl acetate in hexane

ตารางที่ 2 สภาวะของเครื่อง Flash Chromatograph ในการแยกสาร eugenol จากน้ำมันกานพลู

Flash Mode Conditions	
Sample	1% w/v clove oil
Sample volume	10 mL
Column	ECO Flex silica 12 g
Flow rate	25 (mL/min)
Detector	ELSD and UV @ 210, 254, 282 nm
Cartridge equilibrium	4 min
Injection type	liquid

3.2 ศึกษาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ (eugenol) ด้วยเทคนิค High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

1. ทวนสอบวิธีวิเคราะห์ eugenol ในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู ด้วยเทคนิค HPTLC (Inam *et al*., 2014)

วิธี HPTLC ยี่ห้อ CAMAG ซึ่งประกอบด้วย Linomat5, ACD2, TLC scanner 4 และ TLC Visualizer ทดสอบบนแผ่น TLC ชนิด HPTLC plate silica gel 60F254 ขนาด 20x10 cm (Merck) ที่ความยาวคลื่น 282 nm โดยใช้ toluene : ethyl acetate : acetic acid (9:1:0.12, v/v/v) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

1.1 การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and range)

1.2 การทดสอบแม่นยำ (Precision)

1.3 การทดสอบความถูกต้อง (Accuracy)

1.4 การหาค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ)

2. ควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูโดยตรวจสอบความเข้มข้นที่แน่นอนของผลิตภัณฑ์

นำผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู ที่ได้จากการวิจัย ขั้นตอนที่ 2 (2563) มาเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์หาความเข้มข้นที่แน่นอนด้วยสภาวะการทำงานของเครื่อง HPTLC

<u>การบันทึกข้อมูลดังนี้</u>

1. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii*

$$\text{การยับยั้ง (\%)} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีชุดควบคุม} - \text{เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีชุดทดลอง}}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีชุดควบคุม}} \times 100$$

2. ข้อมูลชนิดของกลุ่มสารออกฤทธิ์ทางพฤกษเคมี

3. ปริมาณ eugenol

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2561 สิ้นสุด กันยายน 2564

สถานที่ทำการทดลอง

1. กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่
3. ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

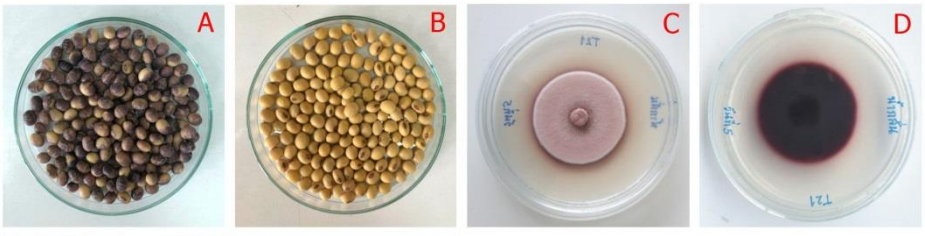
ผลการทดลองและวิจารณ์

ขั้นตอนที่ 1 การสกัดหยาบจากพืชและส่วนต่างๆของพืชในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* (2562)

1.1 ศึกษาสารสกัดหยาบจากพืชและส่วนต่างๆของพืชที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

การสกัดพืช 20 ชนิด ได้แก่ กระชายขาว กระเทียม กานพลู ขมิ้นชัน ข่า ขิง ชะเอมเทศ ชะเอมไทย ช้าพลู ตะไคร้หอม ใบน้อยหน่า ใบบัวตอง ใบแมงลักป่า ใบสะเดา เปลือกมังคุด ไพล ว่านน้ำ หางไหล อบเชยเทศ อบเชยไทย ด้วย ethanol ได้สารสกัดหยาบ 0.96 - 25.45% w/w

จากการเตรียมเชื้อรา *Cercospora kikuchii* จากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง (รูปที่ 1) มาตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธี Blotter method แล้วทำการแยกเชื้อ *Cercospora kikuchii* พบลักษณะโคโลนีค่อนข้างกลม เส้นใยมีการเจริญขึ้นหนาแน่นฝังลงไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และพบรอยบุ๋มหรือรอยยุบตัวของอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณขอบโคโลนีและไม่พบการสร้างสปอร์ สร้างรงควัตถุสีม่วงจนถึงสีแดงรอบๆโคโลนีบนอาหาร PDA (รูปที่ 1) เมื่อนำสารสกัดหยาบพืช 20 ชนิด ไปทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่า เปอร์เซ็นต์การยับยั้งในช่วง 14.5 – 100% ดัง ตารางที่ 1 โดยส่วนใหญ่สารสกัดจากพืชที่มีน้ำมันสามารถยับยั้งเชื้อราได้ดี ได้แก่ กานพลู และข่าสามารถยับยั้งได้มากที่สุด 100% ไม่แตกต่างจากคาร์เบนดาซิม ซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้ควบคุมเชื้อรา รองลองมาคือ ว่านน้ำ ช้าพลู ใบแมงลักป่า และขิง ที่สามารถยับยั้งได้มากกว่า 70% น้ำมันหอมระเหยจากพืชเหล่านี้เป็นสารที่พืชสร้างขึ้นมาเพื่อฆ่าเชื้อราที่ก่อโรค และแบคทีเรีย มักพบสารกลุ่ม terpenes (terpenoids) เป็นองค์ประกอบ (Noriega, 2020) ดังนั้น ข่า กานพลู และช้าพลู จึงถูกเลือกมาสกัดต่อให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธี Column chromatography ได้สารสกัด 12 ส่วน จากพืช 3 ชนิด ได้แก่ ข่า (hexane) ข่า (chloroform) ข่า (methanol1) ข่า (methanol2) กานพลู (hexane) กานพลู (chloroform1) กานพลู (chloroform2) กานพลู (methanol) ช้าพลู (hexane) ช้าพลู (chloroform1) ช้าพลู (chloroform2) ช้าพลู (methanol) เมื่อทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัด 12 ส่วน ในอัตรา 2.50 mg/mL ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA



รูปที่ 1 A) โรคเมล็ดสีม่วงในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง B) เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ไม่เป็นโรค C) โคโลนีของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหาร PDA เชื้อราสร้างเส้นใยฟู สีขาว D) เมื่ออายุมากขึ้นดูด้านใต้เห็นเป็นสีชมพูถึงสีม่วง

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์การยั้บยั้งเชื้อรา *Cercosporl kikuchii* ของสารสกัดสมุนไพร 20 ชนิด

	กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
1	กระชายขาว	36.00± 3.26 g
2	กระเทียม	22.73± 0.32 ij
3	กานพลู	100.00± 1.89 a
4	ขมิ้นชั้น	52.57 ± 3.31 e
5	ข่า	100.00 ± 3.44 a
6	ขิง	74.41 ± 3.55 c
7	ชะเอมเทศ	59.42 ± 0.00 d
8	ชะเอมไทย	27.07 ± 2.47 hi
9	ช้าพลู	79.52 ± 1.78 bc
10	ตะไคร้หอม	14.52± 1.24 k
11	ใบน้อยหน่า	44.85± 0.65 f
12	ใบบัวตอง	48.08± 2.67 ef
13	ใบแมงลักป่า	77.13± 0.56 bc
14	ใบสะเดา	53.09± 2.27 e
15	เปลือกมังคุด	45.14± 2.59 f
16	ไพล	32.83± 0.92 gh
17	ว่านน้ำ	82.00± 4.11 b
18	หางไหล	31.27± 0.00 gh
19	อบเชยเทศ	32.51± 2.04 gh
20	อบเชยไทย	16.62± 0.00 jk
21	คาร์เบนดาซิม	100.00 ± 0.37 a
22	น้ำกลั่น+ ethanol	6.99± 0.00 l
23	น้ำกลั่น	0.00± 2.81 l
	F-test	**
	C.V. (%)	8.86

หมายเหตุ : ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

พบว่าสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* 100% ได้แก่ ข่า (hexane), กานพลู (hexane), กานพลู (chloroform1), กานพลู (chloroform2) ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การยั้บยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ของสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิด จำนวน 12 ส่วน

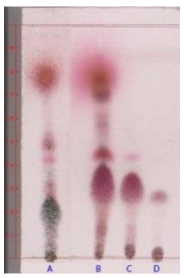
	กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
1	ข่า (hexane)	100.00 ± 0.00 a
2	ข่า (chloroform)	36.64 ± 1.06 b
3	ข่า (methanol1)	-1.71 ±1.68 g
4	ข่า (methanol2)	-7.04 ± 2.14 h
5	กานพลู (hexane)	100.00 ± 0.00 a
6	กานพลู (chloroform1)	100.00 ± 0.00 a
7	กานพลู (chloroform2)	100.00 ± 0.00 a
8	กานพลู (methanol)	2.22 ± 0.84 f
9	ช้าพลู (hexane)	20.24 ± 1.43 c
10	ช้าพลู (chloroform1)	7.79 ± 0.64 e

	กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
11	ข้าพลู (chloroform2)	15.25 ± 0.50 d
12	ข้าพลู (methanol)	9.70 ± 0.95 e
13	คาร์เบนดาซิม	100.00 ± 0.00 a
14	น้ำกลั่น	0.00 ± 0.00 fg
	F-test	**
	C.V. (%)	4.6

หมายเหตุ : ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

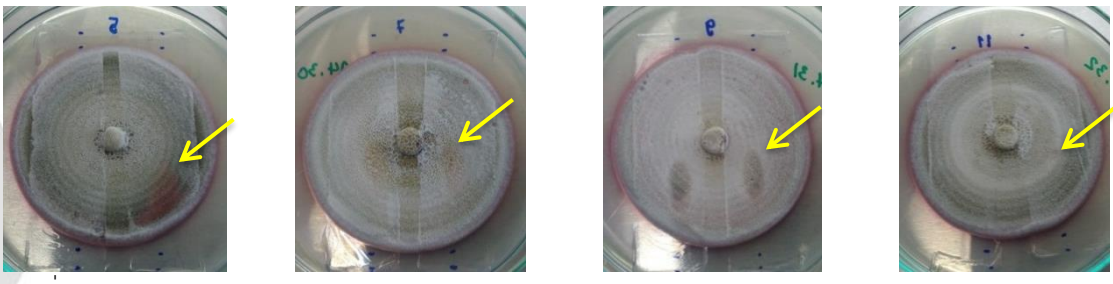
นำสารสกัดส่วนที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercosporl kikuchii* ได้แก่ ข่า (hexane), กานพลู (hexane), กานพลู (chloroform1), กานพลู (chloroform2), มาแยกสารกึ่งบริสุทธิ์โดยเทคนิคทีแอลซี โดยใช้แผ่น TLC silica gel 60 F254 ได้สารกึ่งบริสุทธิ์แต่ละชนิดฉาบอยู่บนแผ่นทีแอลซี ดังรูปที่ 2

เมื่อนำแผ่น TLC ดังกล่าวไปทดสอบบนเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ด้วยวิธี Contact bioautography (Dewanjee *et al*., 2015) พบว่าสารสกัดจากข่า (hexane) พบตำแหน่งสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercosporl kikuchii* ที่ตำแหน่ง R_F 0.17-0.42 กานพลู (hexane) พบที่ตำแหน่ง R_F 0.25-0.42 กานพลู (chloroform1) พบที่ตำแหน่ง R_F 0.25-0.42 และกานพลู (chloroform2) พบที่ตำแหน่ง R_F 0.33-0.42 ดัง ดังรูปที่ 3



รูปที่ 2 เปรียบเทียบ TLC fingerprint ของสารสกัด A. ข่า (hexane) B. กานพลู (hexane), C. กานพลู (chloroform1), D. กานพลู (chloroform2) ด้วยวัฏภาคของเหลว (mobile phase) hexane : ethyl acetate (9:1,v/v) ภายใต้แสง white light หลังจากทำปฏิกิริยากับน้ำยาทดสอบ p-anisaldehyde/sulfuric acid

ซึ่งพบว่าตำแหน่งที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราจากสารสกัดทั้ง 4 ชนิด เป็นสารกลุ่ม terpenoids ซึ่งยืนยันโดยการสเปรย์ด้วยน้ำยาทดสอบ p-anisaldehyde/sulfuric acid



ข่า (hexane), R_F 0.17-0.42 | กานพลู (hexane), R_F 0.25-0.42 | กานพลู (chloroform1), R_F 0.25-0.42 | กานพลู (chloroform2), R_F 0.33-0.42

รูปที่ 3 ตำแหน่งสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii*

1.2 ศึกษาชนิดของกลุ่มสารออกฤทธิ์โดยวิธีการทดสอบทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบ

สารสกัดส่วนที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* จากข่า (hexane), กานพลู (hexane), กานพลู (chloroform1) และกานพลู (chloroform2) เมื่อถูกทดสอบด้วยวิธีการทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบ พบว่าสารกึ่งบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* คือ สารกลุ่ม terpenoids ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีในสารสกัดหยาบข่าและกานพลูด้วยน้ำยาทดสอบชนิดต่างๆ

กลุ่มสารพฤกษเคมี	สารสกัด			
	ข่า (hexane)	กานพลู (hexane)	กานพลู (chloroform1)	กานพลู (chloroform2)
Alkaloids	-	-	-	-
Flavonoids	-	-	-	-
Phenol/ tannin	-	-	-	-
Saponin	-	-	-	-
Terpenoids/steroids	+	+	+	+
Carbohydrate	-	-	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง ให้ผล positive, - หมายถึง ให้ผล negative

ผลการทดสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ด้วยวิธี Contact bioautography บนแผ่น TLC พบว่าตำแหน่งที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราเป็นสารกลุ่ม terpenoids ซึ่งให้ผลการทดลองตรงกับการทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบชนิดต่างๆ (นพมาศและคณะ, 2554) ที่พบสารกลุ่ม terpenoids ในสารสกัดดังกล่าว และเมื่อพิจารณา % yield ของสารสกัดหยาบของกานพลู มีค่าเท่ากับ 24.4 %w/w ซึ่งมากกว่า สารสกัดหยาบของข่า ที่มีค่าเท่ากับ 3.9 %w/w ผู้วิจัยจึงเลือกกานพลูเป็นพืชที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาวิธีการสกัดสารสกัดหยาบพัฒนาเป็นสูตรผลิตภัณฑ์ และทดสอบประสิทธิภาพสูตรผลิตภัณฑ์เพื่อกำหนดอัตราการใช้ (2563)

2.1 ศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันกานพลู

การสกัดดอกกานพลูด้วยวิธี ultrasonic และ maceration โดยใช้ hexane และ ethanol เป็นตัวทำละลายจะได้สารสกัดหยาบสีน้ำตาลข้นเหนียว ในขณะที่การสกัดด้วยวิธีกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) จะได้น้ำมันสีเหลืองอ่อน เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ eugenol ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ในสารสกัดหยาบด้วยเทคนิค Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) (Athar *et al.*, 2013) พบว่าน้ำมันกานพลูที่ได้จากวิธีการกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) มีปริมาณ eugenol มากที่สุด คือ 849.39 g/kg (น้ำมันกานพลู) ดังตารางที่ 4 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณ eugenol ในตัวอย่างกานพลูแห้งที่ได้จากแต่ละวิธีพบว่า ไม่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 4 นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจากกระบวนการผลิตและต้นทุนการผลิตแล้ว วิธีการกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) เป็นวิธีที่ไม่ใช้ตัวทำละลายจึงมีต้นทุนการผลิตต่ำ นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่รวดเร็ว และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ผู้วิจัยจึงเลือกวิธีการกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) ในการสกัดน้ำมันกานพลูเพื่อพัฒนาเป็นสูตรผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปในขั้นตอนต่อไป

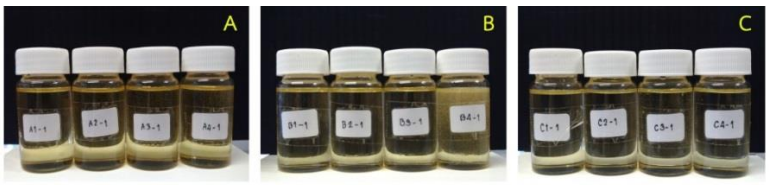
ตารางที่ 4 ปริมาณ eugenol เฉลี่ยในสารสกัดหยาบ (g/kg) และในกานพลูแห้ง (mg/g)

วิธีการสกัด	ปริมาณ eugenol เฉลี่ยใน	
	ในสารสกัดหยาบ (g/kg)	ในกานพลูแห้ง (g/kg)
กรรมวิธีที่ 1 การแช่ (maceration) อัตรา 10% (w/v) ใน hexane	703.89 b	101.72 a
กรรมวิธีที่ 2 การแช่ (maceration) อัตรา 10% (w/v) ใน ethanol	605.78 c	108.60 a
กรรมวิธีที่ 3 การสั่นสะเทือนด้วยคลื่น ultrasonic อัตรา 10% (w/v) ใน hexane	616.58 c	96.25 a
กรรมวิธีที่ 4 การสั่นสะเทือนด้วยคลื่น ultrasonic อัตรา 10% (w/v) ใน ethanol	466.43 d	111.53 a
กรรมวิธีที่ 5 การกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) อัตรา 10% (w/v)	849.39 a	93.03 a

หมายเหตุ : ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

2.2 ศึกษาประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อกำหนดอัตราการใช้

การผสมปรุงแต่งเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู ได้สูตรชนิดน้ำมันเข้มข้น (Emulsifiable Concentrate, EC) จำนวน 3 สูตร ได้แก่ สูตร A น้ำมันกานพลู 20% w/w EC, สูตร B น้ำมันกานพลู 40% w/w EC และสูตร C น้ำมันกานพลู 60% w/w EC ดัง รูปที่ 4 และลักษณะทางกายภาพของสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลู ดัง ตารางที่ 5 โดยผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 สามารถละลายน้ำได้ดี และมีค่า pH อยู่ในช่วงกรดอ่อน ซึ่งเป็นช่วงที่น้ำมันกานพลูคงสภาพมาก

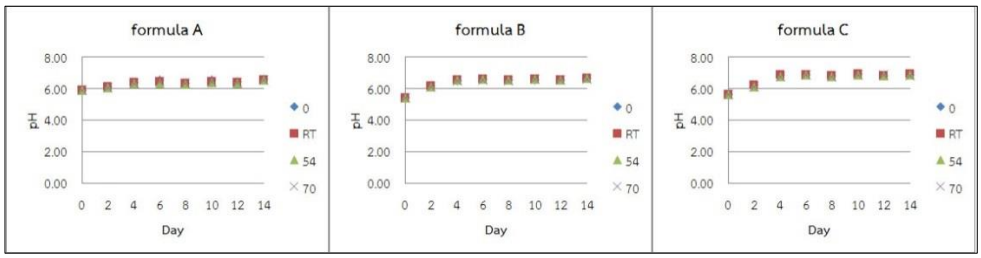


รูปที่ 4 ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู สูตร EC 3 สูตร A 20% w/w, B 40% w/w, C 60% w/w

ตารางที่ 5 ลักษณะทางกายภาพของสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลู

สูตรผลิตภัณฑ์	สีของผลิตภัณฑ์	การละลายน้ำ (1:10)	pH (1%)
A	สีเหลืองใส	ละลายน้ำได้ดี ให้สีขาวขุ่น	5.5
B	สีเหลืองใส	ละลายน้ำได้ดี ให้สีขาวขุ่น	5.1
C	สีเหลืองใส	ละลายน้ำได้ดี ให้สีขาวขุ่น	5.4

การคงตัวของ pH ของสูตรผลิตภัณฑ์ EC (A, B และ C) ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 0 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง (RT), 54 องศาเซลเซียส และ 70 องศาเซลเซียส โดยวิเคราะห์ทุก 2 วัน จนครบ 14 วัน จากการวัดค่า pH ของทั้ง 3 สูตร พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากวันแรกถึงวันที่ 4 และคงที่ ถึงวันที่ 14 และทุกอุณหภูมิมีค่า pH ไม่แตกต่างกัน โดยค่า pH มีค่าในช่วง 5.38-6.91 ซึ่งเป็นช่วงที่น้ำมันกานพลูคงสภาพดี ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 ค่า pH ของผลิตภัณฑ์ A, B และ C ที่ 0-14 วัน ภายใต้อุณหภูมิ 0, RT, 54 และ 70 องศาเซลเซียส

การคงตัวของสารออกฤทธิ์สูตรผลิตภัณฑ์โดยหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Eugenol ก่อนอบ และหลังอบที่อุณหภูมิ 54 ℃ เป็นเวลา 14 วัน เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี HPTLC Inam *et al*., 2014 พบว่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Eugenol ก่อนอบ และหลังอบที่อุณหภูมิ 54 ℃ มีค่าไม่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณ Eugenol (% w/w) ในผลิตภัณฑ์ ก่อนอบ และหลังอบที่อุณหภูมิ 54 °C เป็นเวลา 14 วัน

สูตรผลิตภัณฑ์	ปริมาณ Eugenol ก่อนอบ 54 °C (% w/w)	ปริมาณ Eugenol หลังอบ 54 °C (% w/w)
A	18.2	18.8
B	36.3	36.5
C	54.8	53.9

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพเบื้องต้นของสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลูต่อการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงชื้อ PDA และปริมาณ eugenol ในผลิตภัณฑ์

กรรมวิธี	eugenol (mg/L)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
สูตร A 0.50 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	91	6.07 ± 1.94 h
สูตร A 1.00 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	180	24.18 ± 1.08 f
สูตร A 1.50 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	270	44.01 ± 5.22 d
สูตร A 2.00 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	361	55.35 ± 2.50 c
สูตร A 2.50 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	449	82.55 ± 1.01 b
สูตร B 0.50 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	190	16.45 ± 1.32 g
สูตร B 1.00 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	374	42.25 ± 1.96 d
สูตร B 1.50 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	557	85.35 ± 1.37 b
สูตร B 2.00 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	742	93.60 ± 0.08 a
สูตร B 2.50 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	923	93.72 ± 0.09 a
สูตร C 0.50 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	267	33.99 ± 1.56 e
สูตร C 1.00 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	536	93.72 ± 0.09 a
สูตร C 1.50 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	801	93.72 ± 0.09 a
สูตร C 2.00 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	1069	93.72 ± 0.09 a
สูตร C 2.50 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	1341	93.72 ± 0.09 a
Control	-	2.83 ± 0.27 hi
คาร์เบนดาซิม 2.0g/kg ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	-	93.72 ± 0.09 a
น้ำกลั่น	-	0.00 ± 0.00 i
F-test		**
C.V. (%)		5.71

หมายเหตุ : ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผลการทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ดังแสดงในตารางที่ 7 โดยเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์จำนวน 3 สูตร A, B และ C ที่ความเข้มข้น 5 อัตรา 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 และ 2.50 mg/mL ผลพบว่า สูตร B ที่ความเข้มข้น 2.00 และ 2.50 mg/mL ซึ่งมีปริมาณ eugenol 742 – 923 mg/L สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ได้ถึง 93.72% เช่นเดียวกับสูตร C ที่ความเข้มข้น 1.00, 1.50, 2.00 และ 2.50 mg/mL ซึ่งมีปริมาณ eugenol อยู่ในช่วง 536 – 1341 mg/L (ดังตารางที่ 7) หมายความว่า ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูที่มี eugenol ในช่วงความเข้มข้นนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่อคำนวณเป็นอัตราการใช้เท่ากับ 2.0-2.5 g สูตร B/kg PDA และ 1.0-2.5 g สูตร C/kg PDA ซึ่งไม่แตกต่างจากคาร์เบนดาซิม ที่ความเข้มข้น 2.0 g/kg PDA จึงเป็นช่วงความเข้มข้นพื้นฐานที่จะนำไปเลือกทดสอบกับเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนเมล็ดถั่วเหลือง

และในกระถางปลูกเมล็ดถั่วเหลืองในการทดลองที่ 2 การทดสอบสูตรผลิตภัณฑ์จากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วง โดยศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาวิธีสกัดและวิธีวิเคราะห์สารกึ่งบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพ (2564)

3.1 ศึกษาวิธีแยกสาร eugenol จากน้ำมันกานพลูด้วยเครื่อง Flash Chromatograph

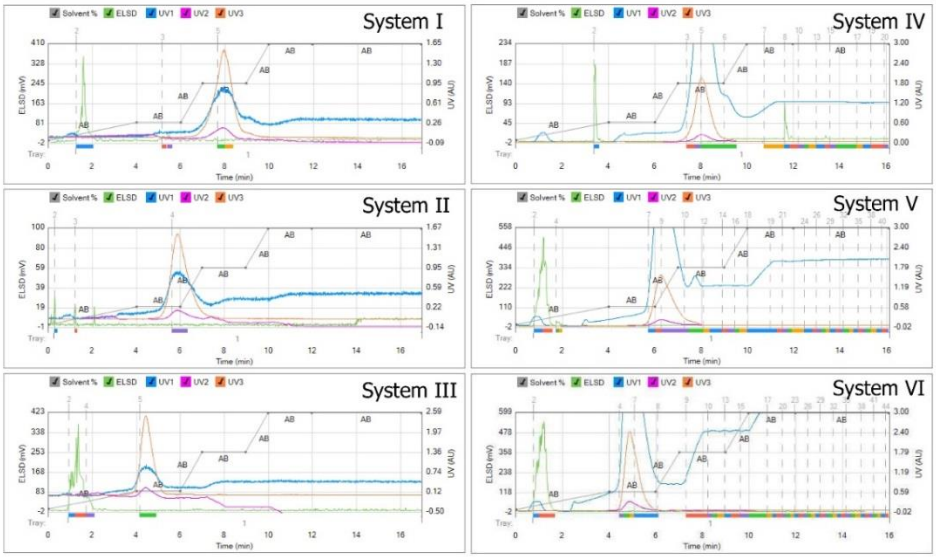
ผลการศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสาร eugenol จากน้ำมันกานพลูด้วยเครื่อง Flash Chromatograph ด้วยตัวทำละลาย 6 ระบบ พบว่า เวลาที่ eugenol ถูกแยกออกแต่ละระบบตัวทำละลายแตกต่างกัน ดังตารางที่ 8 และรูปที่ 6

ตารางที่ 8 เวลาที่ eugenol ถูกแยกและเคลื่อนที่ผ่าน detector

Solvent system	Solvent A	Solvent B	Time
System I	Petroleum ether	10% v/v Ethyl acetate in petroleum ether	7.687 – 8.353
System II (BUCHI)	Petroleum ether	20% v/v Ethyl acetate in petroleum ether	5.611 – 6.310
System III	Petroleum ether	40% v/v Ethyl acetate in petroleum ether	4.164 – 4.879
System IV	Hexane	10% v/v Ethyl acetate in hexane	7.409 – 8.008
System V	Hexane	20% v/v Ethyl acetate in hexane	5.745 – 6.261
System VI	Hexane	40% v/v Ethyl acetate in hexane	4.447 – 5.063

เมื่อเปรียบเทียบตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ petroleum ether และ hexane พบว่า eugenol ถูกแยกออกมาที่เวลาไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 8) แต่ระบบตัวทำละลายของ hexane สามารถแยก eugenol ออกจากสารใกล้เคียงได้ดี เมื่อพิจารณาปริมาณสัดส่วน ethyl acetate ที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้สัญญาณของ eugenol ออกเร็วขึ้น เนื่องจากโครงสร้างของ eugenol ประกอบด้วย hydroxyl group (-OH) จึงมีสภาพขั้วเป็น polar มากกว่า petroleum ether (P'0.1) และ hexane (P'0.1) (Snyder, 1978) eugenol จึงแยกออกมาได้เร็วกับระบบตัวทำละลายที่มีความเป็น polar สูงขึ้นจากสัดส่วนของ ethyl acetate (P'4.4) แต่การแยกเร็วเกินไปก็ทำให้ไม่สามารถแยกจากสารตัวอื่นได้ดีนัก จากตารางที่ 8 system IV – system VI เวลาต่างกันไม่มาก นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่า absorbance ของ UV (AU) พบว่า ระบบที่ VI ให้ค่าสูงสุดคือ 2.40 (AU) รองลงมาคือ ระบบที่ V 1.90 (AU) และระบบที่ IV 1.50 (AU) ตามลำดับ ดังรูปที่ 6 แต่ ระบบที่ VI ไม่สามารถแยก peak ข้างๆออกได้ ดังนั้น system IV (hexane, 10% ethyl acetate/hexane) จึงเหมาะสมที่สุด

และผลการศึกษาอัตราการไหลของระบบตัวทำละลาย โดยนำ system IV มาศึกษาอัตราการไหล 15, 25 และ 35 mL/min พบว่า อัตราการไหล 35 mL/min สารออกเร็วที่สุด ดังตารางที่ 9 และสามารถแยก eugenol ออกจากพีคข้างเคียงได้ดีที่สุด สำหรับผลการวิเคราะห์สัดส่วน (%) eugenol ใน fraction ที่ได้จากการแยกในแต่ละระบบตัวทำละลาย ซึ่งวิเคราะห์ด้วย GC-MS และเปรียบเทียบสเปคตรัมกับ NIST library ได้ผลดังตารางที่ 10 พบว่าระบบตัวทำละลายทั้ง 6 ระบบ สามารถแยก eugenol ได้อัตราส่วนถึง 99% โดย system IV สามารถแยกได้อัตราส่วนถึง 99.984%



Petroleum ether Hexane

รูปที่ 6 การแยก eugenol จากน้ำมันกานพลูด้วยเครื่อง Flash Chromatograph ผ่านคอลัมน์ ECO Flex silica 12 g ด้วยระบบตัวทำละลาย system I (petroleum ether, 10% ethyl acetate/petroleum ether), system II (petroleum ether, 20% ethyl acetate/petroleum ether), system III (petroleum ether, 40% ethyl acetate/petroleum ether), system IV (hexane, 10% ethyl acetate/hexane), system V (hexane, 20% ethyl acetate/hexane), system VI (hexane, 40% ethyl acetate/hexane) อัตราการไหล 25 mL/min ตรวจวัดด้วย ELSD และ UV ที่ความยาวคลื่น 210, 254, 282 nm

ตารางที่ 9 เวลาที่ eugenol ถูกแยกและเคลื่อนที่ผ่าน detector ที่อัตราการไหลต่างกัน

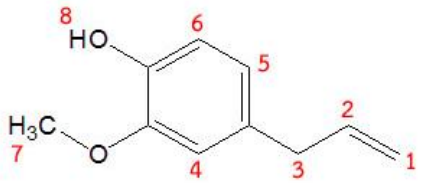
Solvent system	Flow rate (mL/min)	Time
System IV	15	9.488 – 10.371
System IV	25	7.725 – 8.956
System IV	35	5.380 – 6.861

ตารางที่ 10 อัตราส่วน eugenol ใน fractions ที่ได้จากการแยกด้วยระบบตัวทำละลายทั้ง 6 ระบบ

Solvent system	Fraction	% Area		
		eugenol	acetyl eugenol	others
System I	F5	99.978	0.022	-
	F6	99.945	0.037	0.018
System II	F4	99.515	0.297	0.188
System III	F5	92.415	7.569	0.016
System IV	F3	99.984	-	0.016
	F4	99.982	-	0.018
	F5	96.263	3.689	0.048
	F6	11.297	88.612	0.091
System V	F7	99.874	-	0.126
	F8	99.953	0.02	0.027

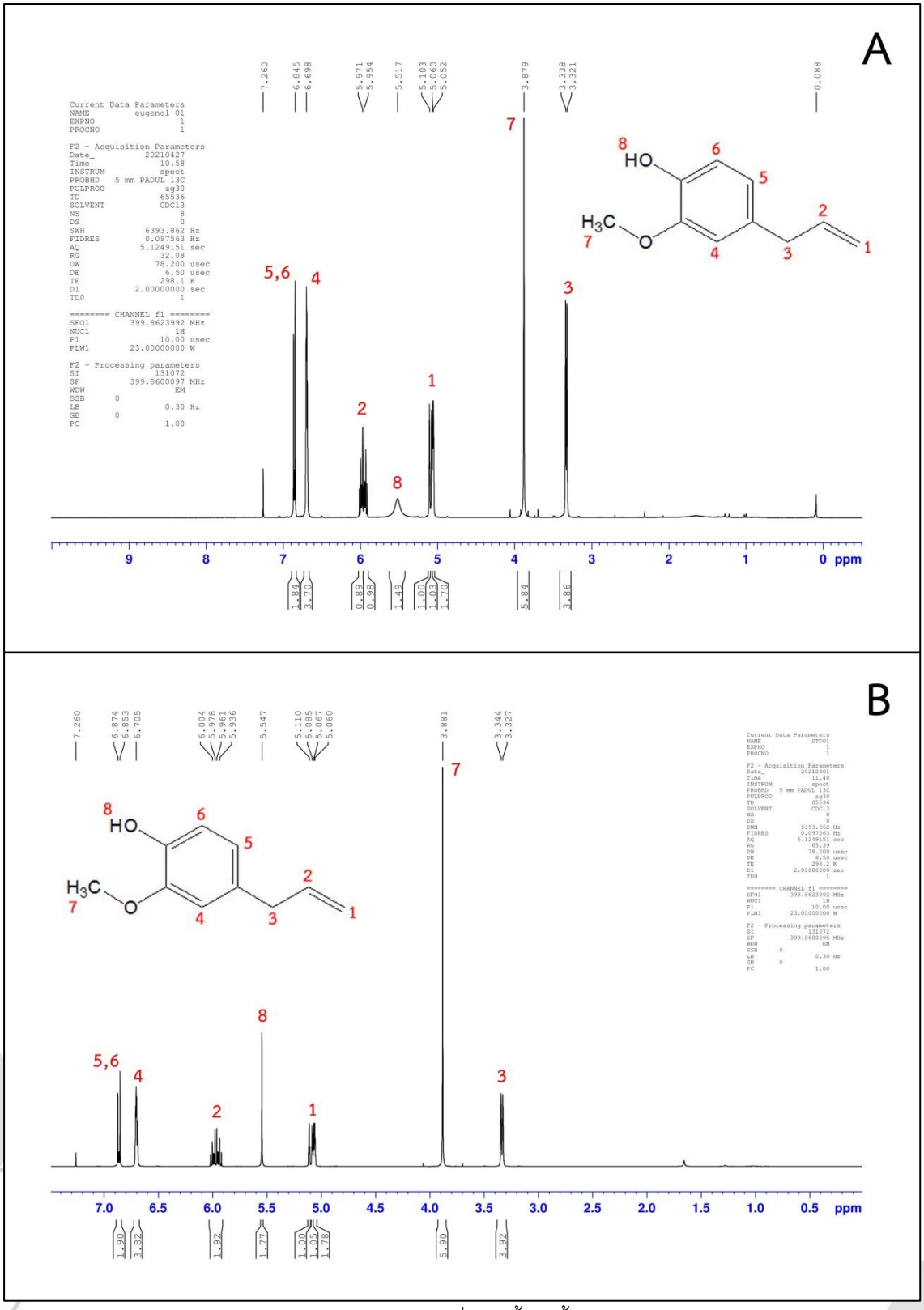
Solvent system	Fraction	% Area		
		eugenol	acetyl eugenol	others
	F9	98.833	1.155	0.012
	F10	85.125	14.875	-
	F11	26.153	73.741	0.106
System VI	F4	99.493	-	0.507
	F5	99.890	0.056	0.054
	F6	99.918	0.079	0.003
	F7	79.287	20.697	0.016
	F8	24.534	75.466	-

นอกจากนี้การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารที่ได้จากการแยกด้วยเทคนิค NMR จะช่วยยืนยันตัวตนสารได้อีกทางหนึ่ง โดย ^{1}H NMR สเปกตรัมของ eugenol (ใน $CDCl_3$) ของสารที่แยกได้จากน้ำมันการพลูด้วยเทคนิค Flash Chromatography มีสเปกตรัมตรงกับสารมาตรฐาน eugenol ดังรูปที่ 7 โดยพิจารณาความถี่ในลักษณะสัมพัทธ์เทียบกับความถี่อ้างอิง ซึ่งเรียกว่า เคมิคอลชิฟต์ (chemical shift) โดยโปรตอนในโครงสร้างจะให้ค่าเคมิคอลชิฟต์แตกต่างกัน ซึ่งเป็นผลมาจากค่า electronegativity, resonance, hybridization ของอะตอมข้างเคียง ดังตารางที่ 11 เมื่อเปรียบเทียบค่าเคมิคอลชิฟต์ของสารมาตรฐาน eugenol และสารที่แยกได้จากน้ำมันกานพลู พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกัน จึงยืนยันได้ว่าสารที่แยกได้จากน้ำมันกานพลูคือ eugenol (Handayani *et al*., 2019)



ตารางที่ 11: ค่าเคมิคอลชิฟต์ของ 1H NMR spectra ของ สารมาตรฐาน eugenol และสารที่แยกได้จากน้ำมันกานพลู

Proton	Multiplicity	Chemical shift, δ (ppm)	
		Standard	Fraction from clove oil
H(3)	doublet (d), 2H	3.34	3.34
H(7)	singlet (s), 3H	3.88	3.88
H(1)	doublet of doublet (dd), 2H	5.06-5.11	5.05-5.10
H(8)	singlet (s), 1H	5.55	5.52
H(2)	multiplet (m), 1H	5.94-6.00	5.95-5.97
H(4)	singlet (s), 1H	6.71	6.70
H(5)	doublet (d), 1H	6.85	6.85
H(6)	doublet (d), 1H	6.87	6.86



รูปที่ 7 ^{1}H NMR สเปกตรัมของ eugenol (ใน $CDCl_3$) A) สารที่แยกได้จากน้ำมันกานพลู และ B) สารมาตรฐาน eugenol

3.2 ศึกษาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ (eugenol) ด้วยเทคนิค High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

ผลการทวนสอบวิธีวิเคราะห์ eugenol ในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู ด้วยเทคนิค HPTLC ของ Inam *et al*., 2014 ตรวจวัดด้วยเครื่อง HPTLC ยี่ห้อ CAMAG ประกอบด้วย Linomat5, ACD2, TLC scanner 4 และ TLC Visualizer โดยใช้แผ่น TLC ชนิด HPTLC plate silica gel 60F254 ขนาด 20x10 cm (Merck) ที่ความยาวคลื่น 282 nm ใช้ toluene : ethyl acetate : acetic acid (9:1:0.12, v/v/v) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ปริมาตร 1 µL/spot วิธีวิเคราะห์นี้ให้ผลการทดสอบดังนี้

1. ความสัมพันธ์เชิงเส้นและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and range) วิธีวิเคราะห์นี้ให้ผลการทดสอบปริมาณ eugenol ที่มีช่วงการวัด (range) ในช่วงความเข้มข้น 200-800 mg/L ให้ค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity) ที่ correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9992 ซึ่งเกณฑ์การยอมรับค่า correlation coefficient (r) ≥ 0.995
2. ความแม่นยำ (Precision) ผลการตรวจสอบความแม่นยำ (Precision) ให้ค่า HORRAT ของ Repeatability และ Within laboratory reproducibility ที่ความเข้มข้น 280, 500 และ 750 mg/L เท่ากับ 1.16, 0.72, 0.91 และ 0.77, 0.75, 0.59 ตามลำดับ (ตารางที่ 12)
3. ความถูกต้อง (Accuracy) ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ให้ค่า %recovery ที่ความเข้มข้น 100, 300 และ 500 mg/L เท่ากับ 99.65%, 101.49% และ 101.49% ตามลำดับ (ตารางที่ 13)
4. ค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) ให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (limit of detection ; LOD) ที่ความเข้มข้น 60 mg/L และให้ค่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ limit of quantitation (LOQ) ที่ความเข้มข้น 200 mg/L

ตารางที่ 12 ผลทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ eugenol ในสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลูด้วยเทคนิค HPTLC

concentration	Repeatability			Within laboratory reproducibility		
	280 mg/L	500 mg/L	750 mg/L	280 mg/L	500 mg/L	750 mg/L
mean (%W/W)	36.73	36.87	37.03	36.80	36.53	37.00
SD	0.65	0.41	0.51	0.66	0.64	0.51
%RSD	1.78	1.11	1.39	1.80	1.75	1.37
HORRAT	1.16	0.72	0.91	0.77	0.75	0.59

ตารางที่ 13 ผลทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ eugenol ในสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลูด้วยเทคนิค HPTLC

Concentration added	accuracy		
	SD	%RSD	%recovery
100 mg/L	1.1187	1.1226	99.65
300 mg/L	0.6382	0.6288	101.49
500 mg/L	0.6268	0.6176	101.49

ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นที่แน่นอนของ eugenol ในสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลู (B) ด้วยวิธี HPTLC จำนวน 10 ซ้ำ พบว่าปริมาณ eugenol เฉลี่ยเท่ากับ 36.87 %W/W ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.41 ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 1.11

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ/คำแนะนำ

การศึกษาสารออกฤทธิ์ในสารสกัดพืชที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากตัวอย่างพืช 20 ชนิด พบว่า สารสกัดจากกานพลู (น้ำมันกานพลู) ให้ผลดีที่สุด ซึ่งเมื่อทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมี พบว่ามีสารกลุ่ม terpenoids (eugenol ในน้ำมันกานพลู) โดยวิธีการสกัดน้ำมันกานพลูที่ดีที่สุด คือ การกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) และวิจัยผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู จำนวน 3 สูตร A (น้ำมันกานพลู 20% W/W EC), B (น้ำมันกานพลู 40% W/W EC) และ C (น้ำมันกานพลู 60% W/W EC) พบว่า สูตร B ที่ความเข้มข้น 2.00 และ 2.50 mg/mL สามารถยับยั้งการเจริญเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้ถึง 93.72% เช่นเดียวกับสูตร C ที่ความเข้มข้น 1.00, 1.50, 2.00 และ 2.50 mg/mL และไม่แตกต่างจากคาร์เบนดาซิม ที่ความเข้มข้น 2.0 g/kg PDA เมื่อคำนวณเป็นอัตราการใช้เท่ากับ 2-2.5 g สูตร B/kg PDA (742-923 mg/L eugenol) และ 1-2.5 g สูตร C/kg PDA (267-1341 mg/L eugenol) นอกจากนี้การแยกสารออกฤทธิ์ในน้ำมันกานพลู eugenol โดยเครื่อง Flash chromatograph ด้วยตัวทำละลาย hexane และ 10% ethyl acetate/hexane ที่อัตราไหล 35 mL/min เมื่อเปรียบเทียบสเปคตรัม ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS กับ NIST library พบว่าสารที่ได้จากการแยกน้ำมันกานพลูคือ eugenol มีอัตราส่วนใน fraction 99% และการทวนสอบวิธีวิเคราะห์ปริมาณ eugenol ในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู ด้วยเทคนิค HPTLC มีความเหมาะสม สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลถูกต้อง และแม่นยำ ยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล และผลวิเคราะห์ปริมาณ eugenol ในสูตรผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู (B) ได้เท่ากับ 36.87% W/W แต่อย่างไรก็ตาม กานพลูซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักในผลิตภัณฑ์ มีราคาสูง เนื่องจากเป็นพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และนำเข้าจากต่างประเทศ จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจที่จะส่งเสริมการปลูกกานพลูในประเทศไทยให้มากขึ้น นอกจากนี้ การศึกษาพืชชนิดอื่นที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคศัตรูพืช และมีราคาถูก หาได้ง่าย ก็เป็นงานวิจัยในอนาคตที่น่าสนใจเช่นเดียวกัน

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลงานวิจัยนี้ทำให้ได้ข้อมูลสารสกัดพืช และสูตรผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปน้ำมันกานพลูที่สามารถควบคุมเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเมล็ดสีม่วงในเมล็ดถั่วเหลือง โดยเกษตรกรสามารถนำไปปรับใช้คลุกกับเมล็ดพันธุ์ ในกระบวนการผลิตถั่วเหลือง สามารถนำข้อมูลการผลิตสูตรผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปไปพัฒนาผลิตเชิงอุตสาหกรรม เพิ่มรายได้ให้กับชุมชน ซึ่งเป็นการส่งเสริมให้ลดการใช้สารเคมีในภาคการเกษตรเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคและเกษตรกร และยังได้วิธีวิเคราะห์สารสำคัญเพื่อควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้นักวิชาการ นักวิจัย ด้านถั่วเหลือง สามารถนำผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปน้ำมันกานพลูไปวิจัยหาอัตราการใช้ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะปลูกในแปลงทดสอบได้

เอกสารอ้างอิง

นพมาศ สุนทรเจริญนนท, อุทัย โสธนะพันธุ, ประไพ วงศสินคงมั่น. 2554. **ทีแอลซี:วิธีอย่างง่ายในการวิเคราะห์คุณภาพเครื่องยาไทย.** กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร มหาวิทยาลัยมหิดล.

Athar, MD.T., E.T. Tamboli, S.H. Ansari, and S. Ahmad. 2013. Quantification of eugenol in hydro-distilled clove oil (Eugenia caryophyllus) and its marketed products by validated GC-MS method. *Journal of Herbs, **Spices & Medicinal Plant*** 19:365-376.

BUCHI. "Application Note Book Reveleris® Technologies A Full Spectrum of Purification Solutions." (online). https://www.buchi.com/sites/default/files/microsite/downloads/Reveleris_Application_Notebook.pdf (May 4, 2020)

Dewanjee, S., M. Gangopadhyay, N. Bhattacharya, R. Khanra, and T.K. Dua. 2015. Bioautography and its scope in the fields of natural product chemistry. ***Journal of Pharmaceutical Analysis*** 5(2):75-84.

Handayani, D.S., R. Prapti, and M. Firdaus. 2019. Synthesis and characterisation of copoly-(eugenol-n,n'-methylenebis(acrylamide)). ***Journal of Physical Science*** 30(3):87-100.

Inam, F., S. Deo, and N. Narkhede. 2014. Quantification of eugenol in various spices using High Performance Thin Layer Chromatography. ***International Journal of Scientific & Engineering Research*** 5(5):1576-1585.

Noriega, P. 2020. Terpenes in essential oils: bioactivity and applications. ***Intechopen*** 1-13.

Snyder, L.R. 1978. Classification of the Solvent Properties of Common Liquids. ***Journal of Chromatography*** 92: 223-234.