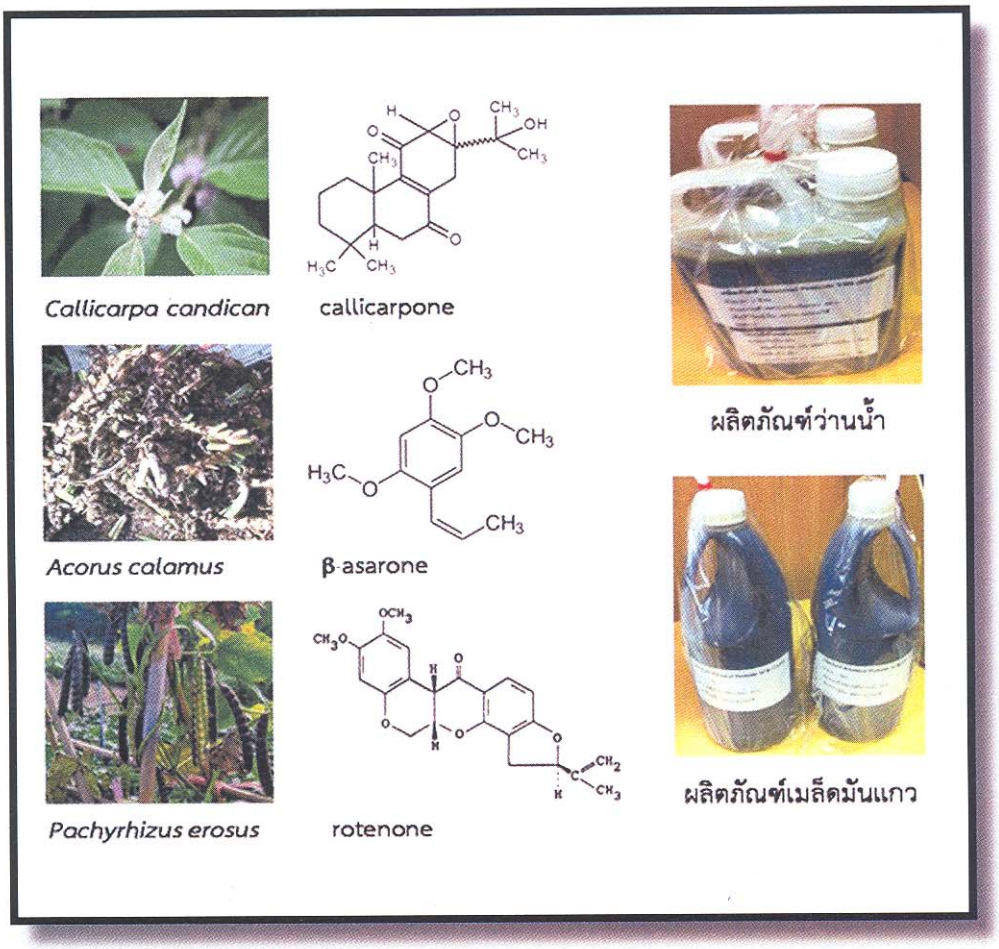
วว.TISTR

โครงการวิจัยที่ ภ. 52-03 / ย. 2 / รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)

วิจัยพัฒนาวิธีการผลิตสารสกัดสมุนไพรมาตรฐานสำหรับป้องกันกำจัดศัตรูพืช



สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

โครงการวิจัยที่ ภ.52-03
วิจัยพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชจากพืช
เพื่อการป้องกันกำจัดศัตรูพืชในระบบเกษตรอินทรีย์

โครงการย่อยที่ 2
วิจัยพัฒนาวิธีการผลิตสารสกัดสมุนไพรมาตรฐานสำหรับ
ป้องกันกำจัดศัตรูพืช

รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)
วิจัยพัฒนาวิธีการผลิตสารสกัดสมุนไพรมาตรฐานสำหรับ ป้องกันกำจัดศัตรูพืช

โดย

ศิริเพ็ญ จริเกษม	**อุบล ฤกษ์อ่ำ**
เตือนตา เสมาทอง	**สรียา เรืองพัฒนพงศ์**
ศรัญญา เหล่าวิทยางค์กูร	**ศรินทิพย์ หมื่นแสน**
จุรีย์ ตั้งฤทัยวานิชย์	**สิน ตั้งสถิรภักดี**
ไสว นาคาแก้ว	**สายันต์ ตันพานิช**

บรรณาธิการ
นฤมล รื่นไวย์
บุญเรียม น้อยชุมแพ
ศิริสุข ศรีสุข

วว., ปทุมธานี 2557

สงวนลิขสิทธิ์

รายงานฉบับนี้ได้รับการอนุมัติให้พิมพ์โดย
ผู้ว่าการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

(นางลักษมี ปลั่งแสงมาศ)
ผู้ว่าการ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ อาจารย์ ดร.จรัล ลีรติวงศ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์จำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ ตัวอย่างสมุนไพรใบขี้อ้น-ดอน และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์เกี่ยวกับพืชสกุล *Callicarpa* ที่พบในประเทศไทย.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญตาราง	ค
สารบัญรูป	ง
ABSTRACT	1
บทคัดย่อ	3
1. บทนำ	5
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	10
3. ผลการทดลองและวิจารณ์	23
4. สรุปผลการทดลอง	43
5. สรุปผลทางด้านตลาดและผลกระทบโครงการ	45
6. เอกสารอ้างอิง	47
ภาคผนวก ก	49
ภาคผนวก ข	50

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1.	NMR data correlation of compound 1, oleanolic acid ($CDCl_3$)	24
ตารางที่ 2.	NMR data correlation of compound 2, callicarpone ($CDCl_3$)	26
ตารางที่ 3.	ผลการวิเคราะห์ค่า m-factor เมื่อใช้ β-asarone เป็นสารมาตรฐาน และ thymol เป็น internal standard	33
ตารางที่ 4.	ผลการเตรียมสารสกัด และการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์	33
ตารางที่ 5.	อัตราการตายของหนูทดลอง และผลการตรวจชันสูตรอวัยวะภายในของหนูทดลองในกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดสอบเมื่อสิ้นสุดการทดสอบสารสกัดขี้อ้นดอน	35
ตารางที่ 6.	น้ำหนักตัวของหนูทดลองบันทึกในระหว่างการทดสอบ และสิ้นสุดการทดสอบพร้อมกับอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนูทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบสารสกัดขี้อ้นดอน	36
ตารางที่ 7.	อัตราการตายของหนูทดลอง และผลการตรวจชันสูตรอวัยวะภายในของหนูทดลองในกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดสอบเมื่อสิ้นสุดการทดสอบสารสกัดว่านน้ำ	37
ตารางที่ 8.	น้ำหนักตัวของหนูทดลองบันทึกในระหว่างการทดสอบ และเมื่อสิ้นสุดการทดสอบพร้อมกับอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนูทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบสารสกัดว่านน้ำ	37
ตารางที่ 9.	อัตราการตายของหนูทดลอง และผลการตรวจชันสูตรอวัยวะภายในของหนูทดลองในกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดสอบเมื่อสิ้นสุดการทดสอบสารสกัดเมล็ดมันแกว	38
ตารางที่ 10.	น้ำหนักตัวของหนูทดลองบันทึกในระหว่างการทดสอบ และเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ พร้อมกับอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนูทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบสารสกัดเมล็ดมันแกว	39
ตารางที่ 11.	ผลการพัฒนาผลิตภัณฑ์สะดวกใช้	41
ตารางที่ 12.	ผลการทดสอบความคงสภาพของสารสกัดว่านน้ำและผลิตภัณฑ์	42

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.	พืชสมุนไพรและโครงสร้างสารออกฤทธิ์	7
รูปที่ 2.	แผนผังการแยกสารจากขี้อ้นดอน	15
รูปที่ 3.	^{1}H-, ^{13}C-NMR spectral of compound 1, oleanolic acid	25
รูปที่ 4.	^{1}H-, ^{13}C-NMR spectral of compound 2, callicarpone	27
รูปที่ 5.	ESI-MS spectral ของสารโอลิโนลิกแอซิด ($C_{30}H_{48}O_3$, *m/z* เท่ากับ 456)	28
รูปที่ 6.	ESI-MS spectral ของสารคาลิคาโปน ($C_{20}H_{28}O_4$, *m/z* เท่ากับ 332)	29
รูปที่ 7.	TLC-chromatogram ของใบขี้อ้นดอนจากแหล่งต่างๆ	31
รูปที่ 8.	HPLC- chromatogram ของสารที่แยก สารมาตรฐาน เปรียบเทียบกับใบขี้อ้นดอนจากแหล่งต่างๆ ที่พบในประเทศไทย	32
รูปที่ 9.	กราฟมาตรฐานของสารโรติโนน	34
รูปที่ 10.	ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์สะดวกใช้	40

RESEARCH AND DEVELOPMENT ON PRODUCTION OF STANDARDIZED BOTAINCAL EXTRACT FOR PLANT'S PEST CONTROL

Siripen Jarikasem, Ubon Rerk-am, Tuanta Sematong,
Sareeya Reungpatthanaphong, Sarunya Laovitthayanggoon,
Sarinthip Muensaen, Juree Tuangrithaiwanich, Sinn Tangstirapakdee,
Sawai Nakakaew and Sayan Tanpanich

ABSTRACT

Three plant species with plant pest control potential namely *Callicarpa candicans*, Cc (leaves), *Acorus calamus*, Ac (rhizomes) and *Pachyrhizus erosus*, Pe (seeds) were chemically investigated and prepared for standardized extracts. Bioactive compounds callicarpone (0.0016 %yield) and oleanolic acid (0.0091 %yield) were isolated from Cc leave and confirmed structure by spectroscopic methods (NMR, MS). TLC and HPLC fingerprint analysis of Cc were also performed. HPLC chromatogram of Cc extract under UV 266 nm showed sharp and well isolated peak corresponding to callicarpone at retention time (R_t) 21.9 min, oleanolic acid at 36.5, this condition could be used for quantitative analysis.

Standardized extract from Ac and Pe were separately prepared by cold maceration using ethanol as solvent, powder drug: solvent ratio of 1:5, twice. Percentage yield and content of active compound in extract from Ac and Pe were 8.36 (28.57% β-asarone, GC) and 11.70 (0.59% rotenone, HPLC), respectively. Cc yield 23.33% of crude ethanolic extract. Acute oral toxicity (LD_{50}) of extracts from Cc and Ac were more than 5,000 mg/kg body weight while that of extract from Ps was 1,239 mg/kg body weight.

Ready to use products from Ac and Ps extracts were separately formulated, using propylene glycol and polysorbate as solvent and 30% of extract could be incorporated. Preparation from Ac contained 14.18% of β-asarone while preparation from Ps contained 0.15% of rotenone. Amount of β-asarone in extract and product from Ac seemed to be stable during the stability study at three conditions which were at room temperature, in the refrigerator and in an incubator (45 ^{O}C) monitored at days 0, 30, 90, 180, 270 and 360 respectively.

วิจัยพัฒนาวิธีการผลิตสารสกัดสมุนไพรมาตรฐาน สำหรับป้องกันกำจัดศัตรูพืช

ศิริเพ็ญ จริเกษม[1], อุบล ฤกษ์อ่ำ[1], เตือนตา เสมาทอง[1], สรียา เรืองพัฒนพงศ์[1], ศรัญญา เหล่าวิทยางค์กูร[1], ศรินทิพย์ หมื่นแสน[1], จุรีย์ ตั้งฤทัยวานิชย์[1], สิน ตั้งสถิรภักดี[1], ไสว นาคาแก้ว[1] และสายันต์ ตันพานิช[2]

บทคัดย่อ

นำพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช 3 ชนิด มาทำการศึกษาทางเคมีและเตรียมสารสกัดมาตรฐาน ได้แก่ ใบขี้อ้นดอน, เหง้าว่านน้ำ และเมล็ดมันแกว ใบขี้อ้นดอนทำการศึกษาในแง่ของการแยกสารออกฤทธิ์คาลิคาโปน พร้อมยืนยันโครงสร้างทางเคมีโดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี (NMR, MS) เพื่อนำมาใช้เป็นสารเทียบในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ และทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารกลุ่มไดและไตรเทอร์พีนส์ โดย TLC, HPLC fingerprint analysis สามารถแยกสารคาลิคาโปน และสารโอลิโนลิกแอซิด ได้ร้อยละ 0.0016 และ 0.0091 ของผงใบแห้ง ตามลำดับ. สารทั้ง 2 ชนิด สามารถนำมาใช้เป็นสารเทียบในการควบคุมคุณภาพเชิงปริมาณของสมุนไพรขี้อ้นดอนได้ HPLC fingerprint ที่ตรวจสอบสารโดยรังสียูวีที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร ได้พีกของสารคาลิคาโปนที่ retention time (R_t) 21.9, สารโอลิโนลิกแอซิด ที่ 36.5 สารทั้ง 2 ชนิด มีการแยกออกจากองค์ประกอบอื่นๆ ได้ดี สภาวะการแยกนี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้.

เตรียมสารสกัดมาตรฐานของว่านน้ำและเมล็ดมันแกวโดยวิธีหมักเย็นพร้อมเพิ่มความสามารถในการสกัดโดยการหมุนเวียนตัวทำละลาย อัตราส่วนของผงยาต่อตัวทำละลาย 1 ต่อ 5 สกัด 2 ครั้ง พร้อมวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ ได้ร้อยละของผลผลิตและปริมาณสารออกฤทธิ์ของสารสกัดว่านน้ำและมันแกว เท่ากับ 8.36 (28.57% β-asarone, GC) และ 11.70 (0.59% rotenone, HPLC) ตามลำดับ และเตรียมสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของใบขี้อ้นดอนโดยวิธีเดียวกัน ได้ผลผลิตเท่ากับร้อยละ 23.33 ทำการประเมินความเป็นพิษเบื้องต้นในหนูขาวของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด พบว่า สารสกัดขี้อ้นดอนและว่านน้ำมีขนาดของสารสกัดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่งเมื่อป้อนยาทางปากครั้งเดียว (acute oral LD_{50}) มากกว่า 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว, ส่วนสารสกัดมันแกวมีค่าดังกล่าวเป็น 1,239 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว.

---

[1]ฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

[2]ฝ่ายเทคโนโลยีการเกษตร, (วว.)

เตรียมผลิตภัณฑ์สะดวกใช้ที่ละลายน้ำได้ดีจากสารสกัดว่านน้ำและสารสกัดมันแกวแยกกัน โดยใช้ตัวทำละลายโพพิลีนไกลคอลผสมพอลิซอร์เบต สามารถเตรียมได้โดยมีความเข้มข้นของสารสกัดเป็นร้อยละ 30 น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์ว่านน้ำและมันแกวเท่ากับร้อยละ 14.18 และ 0.15 น้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ศึกษาความคงสภาพของสารสกัดว่านน้ำและผลิตภัณฑ์ในสภาวะการเก็บในตู้เย็น, อุณหภูมิห้อง และตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส โดยตรวจสาร β-asarone ที่ช่วง 0, 30, 90, 180, 270 และ 360 วัน พบว่า ทั้งสารสกัดและผลิตภัณฑ์มีแนวโน้มของความคงตัวที่ดี.

1. บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีรายได้หลักจากผลผลิตทางการเกษตร เพื่อป้องกันความสูญเสียของผลผลิตทางการเกษตร เกษตรกรจึงมีความจำเป็นในการใช้สารป้องกันกำจัด ศัตรูพืช โดยสถิติ พ.ศ. 2549 ประเทศไทยมีการนำเข้าสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช จำนวน 101,786 ตัน คิดเป็นมูลค่า 13,018 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร 2550) ซึ่งสารกำจัดแมลง (insecticide) และสารป้องกันกำจัดราโรคพืช (fungicide) จัดเป็นกลุ่มสำคัญ.

สารกำจัดแมลง (insecticide)

พ.ศ. 2549 ปริมาณนำเข้า 20,487 ตัน มูลค่า 3,856 ล้านบาท.

พ.ศ. 2552 นำเข้า 24,680 ตัน มูลค่า 3,972 ล้านบาท.

สารป้องกันกำจัดราโรคพืช (fungicide).

พ.ศ. 2549 ปริมาณนำเข้า 9,383 ตัน มูลค่า 1,722 ล้านบาท.

พ.ศ. 2552 นำเข้า 10,367 ตัน มูลค่า 2, 968 ล้านบาท.

สารเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ ซึ่งมีอันตรายและก่อมลภาวะต่อสภาพแวดล้อม ปัจจุบันสินค้าเกษตรส่งออก พืชผัก, ผลไม้ และสมุนไพร มีข้อกำหนดมาตรฐานในด้านยาฆ่าแมลงตกค้าง ด้วยเกรงพิษภัยจากเคมีสังเคราะห์ ทำให้มีระบบการปลูกพืชแบบธรรมชาติเรียกว่า เกษตรอินทรีย์ เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีเกษตรสังเคราะห์ ทำให้เกิดสินค้าประเภทออร์แกนิก ซึ่งได้รับความนิยมและมีราคาแพง ผู้บริโภคมั่นใจในความปลอดภัยจากสารพิษตกค้าง สินค้าดังกล่าวมีปรากฏในกลุ่มผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ ยาสมุนไพร, ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร, เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ, เครื่องสำอาง, สารธรรมชาติจากพืชสมุนไพรเพื่อการป้องกันกำจัดแมลง และราศัตรูพืช จัดเป็นสารกลุ่มสำคัญที่ได้รับความสนใจในกลุ่มผู้ประกอบการดังกล่าว.

ในสมัยโบราณ ก่อนที่จะมีการใช้เคมีสังเคราะห์เพื่อการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ได้มีการนำสมุนไพรที่มีฤทธิ์ฆ่าแมลง (insecticide), เบื่อปลา (piscicicide) และฆ่าหอย (molussicide) มาใช้เพื่อการอารักขาพืชอยู่แล้ว โดยสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชที่รู้จักกันดี ได้แก่ โรติโนนจากรากหางไหล, นิโคติน จากใบยาสูบ และอาซาไดแรกตินจากเมล็ดสะเดา ซึ่งปริมาณการใช้ยังอยู่ในระดับเกษตรกรรมรายย่อย.

ปัจจัยสำคัญในการส่งเสริมให้เกิดอุตสาหกรรมการผลิตและการใช้สารจากพืชสมุนไพรเพื่อป้องกันกำจัดศัตรูพืช ได้แก่ ความพร้อมในด้านปริมาณของวัตถุดิบ, คุณภาพของวัตถุดิบ, วิธีการสกัดให้ได้สารสกัดที่มีปริมาณสารออกฤทธิ์สูงและมีความคงที่ในทุกรุ่นการผลิต รวมทั้งความคงตัวของสารสกัด เนื่องจากปริมาณสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพรสามารถผันแปรไปได้จากปัจจัยต่างๆ เช่น สายพันธุ์และสภาวะแวดล้อม ได้แก่ สภาพดิน, อายุการเก็บเกี่ยว, ฤดูกาล และวิธีการแปรรูปเป็นสมุนไพรแห้งเป็นต้น.

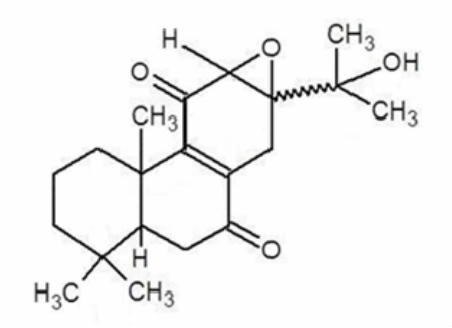
การแปรรูปสมุนไพรดิบ (crude drug) เป็นสารสกัดที่มีการควบคุมปริมาณสารออกฤทธิ์หรือสารสำคัญให้คงที่ ซึ่งเรียกว่า สารสกัดมาตรฐาน (standardized botanical extract) นับเป็นแนวทางสำคัญในการแก้ปัญหาความไม่สม่ำเสมอในด้านคุณภาพทางเคมีของพืชสมุนไพร และทำให้เกิดความสะดวกในการนำไปใช้โดยตรง หรือนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ สารสกัดในรูปแบบดังกล่าวกำลังเป็นที่นิยมใช้ทั้งในด้านยาจากสมุนไพร, ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร, เวชสำอางและสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช.

ทางคณะผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดในการนำพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปสารสกัดมาตรฐาน และเตรียมให้อยู่ในรูปผลิตภัณฑ์สะดวกใช้ ที่สามารถละลายน้ำได้ดี เพื่อให้เกษตรกรและผู้ประกอบการเกิดทางเลือกในการใช้สารธรรมชาติทดแทนเคมีสังเคราะห์ พืชสมุนไพรที่คัดเลือกมาศึกษา ได้แก่ ใบขี้อ้นดอน (*Callicarpa candicans*), เหง้าว่านน้ำ (*Acorus calamus*) และเมล็ดมันแกว (*Pachyrhizus erosus)* โดยมีขอบเขตการศึกษาดังนี้:

ขี้อ้นดอน: เป็นสมุนไพรที่ยังไม่เป็นที่รู้จักกันโดยแพร่หลาย แต่มีศักยภาพในการกำจัดแมลงสูง และส่วนประโยชน์ คือ ใบ มีสารออกฤทธิ์ ได้แก่ diterpene callicarpone มีรายงานความเป็นพิษต่อปลาแรงเป็น 10 เท่า ของสารโรติโนน สารนี้ยังไม่มีจำหน่าย เป้าหมายของโครงการ คือ ทำการแยกสารออกฤทธิ์ callicarpone พร้อมยืนยันโครงสร้างทางเคมี เพื่อนำสารดังกล่าวมาใช้เป็นสารเทียบในการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดย HPLC พร้อมศึกษา TLC/HPLC fingerprint ของใบขี้อ้นดอนที่เก็บจากแหล่งต่างๆ พร้อมประเมินความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ.

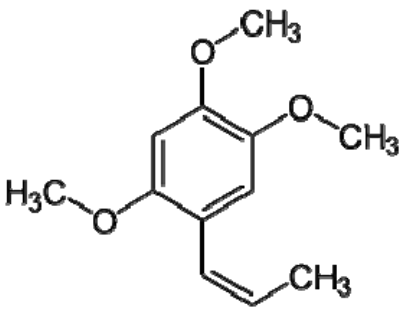
ว่านน้ำ: ศึกษาวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ β-asarone โดยวิธี GC และศึกษาวิธีสกัดที่เหมาะสม ประเมินความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดมาตรฐาน พัฒนาผลิตภัณฑ์สะดวกใช้ พร้อมศึกษาความคงสภาพของสารสกัด และผลิตภัณฑ์.

มันแกว: ศึกษาวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ rotenone โดยวิธี HPLC และศึกษาวิธีสกัดที่เหมาะสม ประเมินความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดมาตรฐาน พัฒนาผลิตภัณฑ์สะดวกใช้ พร้อมศึกษาความคงสภาพของสารสกัด และผลิตภัณฑ์.



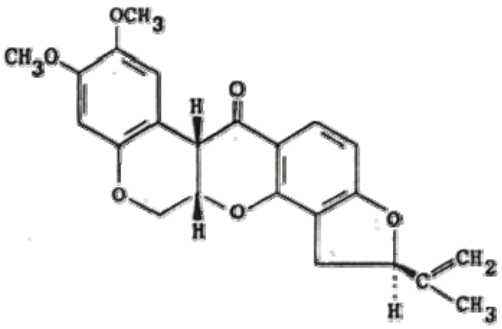
Callicarpa candican

callicarpone



Acorus calamus

β-asarone



Pachyrhizus erosus

rotenone

รูปที่ 1. พืชสมุนไพรและโครงสร้างสารออกฤทธิ์.

ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันกำจัดศัตรูพืชของพืชสมุนไพรที่นำมาศึกษาวิจัย

1. ขี้อ้นดอน (*Callicarpa candicans*, Lamiaceae)

เป็นไม้พุ่ม พบมากในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ใช้ประโยชน์ได้ทั้งด้านยารักษาโรค และการเบื่อปลา ใบใช้เบื่อปลา สารออกฤทธิ์ คือ ไดเทอร์พีนส์ ชื่อ callicarpone ซึ่งมีความเป็นพิษต่อปลาแรงเป็น 10 เท่า ของโรติโนนจึงนับเป็นพืชที่น่าจะมีศักยภาพในการกำจัดแมลง ได้มีการศึกษาเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมี และการออกฤทธิ์ พบว่า สารอนุพันธ์ของ callicarpone มีฤทธิ์ฆ่าแมลง และต้านเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งนี้หมู่อิพอกไซด์ และหมู่คีโตนมีบทบาทสำคัญในการออกฤทธิ์ สารสกัดด้วยเบนซินจากพืชสกุลเดียวกัน ได้แก่ *Callicarpa japonica* แสดงฤทธิ์ยับยั้งการกินอาหารของตัวอ่อนแมลง *Spodoptera litura* (van Valkenburg and Bunyapraphatsara 2002).

การใช้ตามวิธีพื้นบ้านในการเบื่อปลา ใช้ใบแห้งบดเป็นผง, โรยน้ำ และใส่บ่อปลา.

2. ว่านน้ำ (*Acorus calamus*, Araceae)

ไม้ล้มลุกลำต้นเป็นเหง้าใต้ดิน ใบแข็งตั้งตรงรูปร่างแบนเรียวยาว ใบ เหง้าและรากมีกลิ่นฉุน

สารสกัดเอทิลแอซีเทตจากเหง้าว่านน้ำ แสดงฤทธิ์ต้าน anthracnose fungus ได้ดี ได้มีการนำสารสกัดดังกล่าวไปทำการศึกษาฤทธิ์ป้องกันการเน่าเสียของพริก จากการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า สารสกัดว่านน้ำในความเข้มข้น 2,500 ppm มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคได้เท่ายาฆ่าเชื้อรา carbendazim ที่ความเข้มข้น 500 ppm (Charikapakorn 2000).

สารสกัดว่านน้ำโดยใช้ไดคลอโรมีเทน สามารถควบคุมโรคแอนแทรกโนส ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวในมะม่วง (Jariyanusorn 2002).

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของว่านน้ำ ต่อเชื้อรา 6 ชนิด ได้แก่ *Alternaria brassicicola*, *Colletotrichum gloeosporioides, Fusarium oxysporum, Phytophthora palmivora*, *Pythium* sp. *และ Sclerotium* sp. พบว่า ว่านน้ำแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโรคพืชทั้ง 6 ชนิด ได้มากกว่าร้อยละ 61 โดยแสดงฤทธิ์ยับยั้ง *P. palmivora.* ได้ดีที่สุด การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดว่านน้ำด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอล ที่ความเข้มข้น 10,000 ppm พบว่า สารสกัดไดคลอโรมีเทน สามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้ง 6 ชนิด ได้ทั้งหมดในขณะที่สารสกัดว่านน้ำด้วยเมทานอลไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสาร

สกัดไดคลอโรมีเทนของว่านน้ำ พบสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคพืช 3 ชนิด ได้แก่ β-asarone, α-asarone และ 2,4,5-trimethoxybenzaldehyde (Sawasdee *et al*. 2005).

เหง้าและใบของว่านน้ำที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของหนอนแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera carambolae* ในมังคุดได้ (จำเริญมา 2546).

สารสำคัญที่พบในว่านน้ำ คือ β-asarone นอกจากนี้ ยังพบสารอาโคแรงเจอร์มาโครน และอาซาริลอัลดีไฮด์ น้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากรากของว่านน้ำเป็นสารฆ่าแมลง โดยเป็นพิษต่อระบบประสาทของแมลง รวมทั้งยับยั้งการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์และการออกจากไข่ของตัวอ่อน. นอกจากนี้ยังยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรียได้ด้วย จึงนำไปใช้ควบคุมแมลงวันแตง, แมลงวันผลไม้, ด้วงหมัดผัก, หนอนกระทู้ผักและแมลงศัตรูในโรงเก็บ.

วิธีการใช้ คือ นำผงว่านน้ำ 1 กิโลกรัม มาคลุกกับเมล็ดพืช 50 กิโลกรัม ก็สามารถใช้ควบคุมแมลงในโรงเก็บได้ หรือจะใช้เหง้านำมาบดเป็นผงจำนวน 150 กรัม ผสมน้ำ 20 ลิตร แช่น้ำทิ้ง 24 ชั่วโมง หรือนำมาต้ม 45 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น กรองแล้วทำการฉีดพ่นได้เหมือนกัน (จดหมายข่าวผลิใบ 2549).

3. มันแกว (*Pachyrhizus erosus*, Leguminosae)

ไม้เลื้อยพัน มีหัวใต้ดินเป็นราก ใบและเมล็ดมีพิษใช้เบื่อปลา เมล็ดประกอบด้วยน้ำมันที่กินได้ร้อยละ 20.5-28.4 เมล็ดแก่มีพิษ เนื่องจากประกอบด้วยสารโรติโนน ร้อยละ 0.12-0.43 เมล็ดมันแกวยังมีคุณสมบัติฆ่าแมลง, ต้านเชื้อแบคทีเรีย, คลายกล้ามเนื้อและกดการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง (Abid *et al*. 2006) สารที่มีฤทธิ์ฆ่าแมลงในเมล็ดมันแกวมีหลายชนิด ได้แก่:

กลุ่ม โรทีนอยด์ ได้แก่ rotenone, pachyrrhizone, erosone, dolineone

กลุ่ม furanocoumarin ได้แก่ pachyrrhizin, erosnin

กลุ่มซาโพนิน ได้แก่ pachysaponin A&B

ในเมล็ดมันแกวมีรายงานพบเพปไทด์ SPE10 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Song *et al*. 2004), นอกจากนี้ยังพบสารไอโซฟลาโวน dehydroneotenone และไอโซฟลาโวโนน neotenone.

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 วัสดุ

2.1.1 พืชสมุนไพร

1. ใบขี้อ้นดอน

ใบขี้อ้นดอน จากบ้านแหลมสัก อำเภออ่าวลึก จังหวัดกระบี่ เก็บเมื่อกรกฎาคม 2554 ตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์โดย ดร.จรัล ลีรติวงศ์ นักพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อบแห้งโดยตู้อบไฟฟ้าอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส.

2. เหง้าว่านน้ำ

เหง้าว่านน้ำ จากอำเภอบึงกาฬ จังหวัดหนองคาย เก็บเมื่อกุมภาพันธ์ 2554 อบแห้งโดยตู้อบไฟฟ้าอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส.

3. เมล็ดมันแกว

เมล็ดมันแกว จากอำเภอบ้านหมอ จังหวัดสระบุรี เก็บเมื่อมกราคม 2556 อบแห้งโดยตู้อบไฟฟ้าอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส.

2.1.2 สัตว์ทดลอง และอาหาร

1. สัตว์ทดลอง

หนูขาวเพศผู้และเพศเมีย พันธุ์ Wistar ซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม.

2. อาหารสัตว์

บริษัท โภคภัณฑ์อาหารสัตว์ ประเทศไทย จำกัด.

2.2 สารเคมี และอุปกรณ์

2.2.1 สารเคมี

Acetone, AR grade บริษัท Lab-Scan, ประเทศไทย.

Acetonitrile, HPLC grade, บริษัท Lab-Scan, ประเทศไทย.

Butan-1-ol, AR grade บริษัท Lab-Scan, ประเทศไทย.

Chloroform, AR grade บริษัท Lab-Scan, ประเทศไทย.

Dichloromethane, AR grade บริษัท Lab-Scan, ประเทศไทย.

Diethyl ether, AR grade บริษัท Lab-Scan, ประเทศไทย.

Ethanol 95%, commercial grade, องค์การสุรา กรมสรรพสามิตร, ประเทศไทย.

Ethyl acetate, AR grade บริษัท Lab-Scan, ประเทศไทย.

Hexanes, AR grade บริษัท Lab-Scan, ประเทศไทย.

Methanol, AR grade, บริษัท Lab-Scan, ประเทศไทย.

Methanol, HPLC grade, บริษัท Lab-Scan, ประเทศไทย.

Trifluoroacetic acid; TFA, บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี.

Water, HPLC grade, บริษัท Lab-Scan, ประเทศไทย.

Absolute Alcohol บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี.

Sodium Chloride บริษัท Lab-Scan analytical sciences ประเทศไอร์แลนด์.

Propylene glycol (DOW) บริษัท ไทยสงวนวัฒน์ เคมีภัณฑ์ จำกัด.

Polysorbate (Tween 20) บริษัท วันรัต (หน่ำเซียน) จำกัด.

2.2.2 สารมาตรฐานสำหรับเป็นสารเทียบในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

Rotenone, Sigma-Aldrich™, HPLC grade ประเทศสหรัฐอเมริกา (สำหรับวิเคราะห์เมล็ดมันแกว).

Abietic acid, HPLC grade บริษัท Chromadex, ประเทศสหรัฐอเมริกา (สำหรับเทียบสารกลุ่มไดเทอร์พีนส์).

α-asarone บริษัท Extrasynthese ประเทศฝรั่งเศส (สำหรับวิเคราะห์เหง้าว่านน้ำ).

β-asarone บริษัท Extrasynthese ประเทศฝรั่งเศส (สำหรับวิเคราะห์เหง้าว่านน้ำ).

Thymol, บริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา (สำหรับวิเคราะห์เหง้าว่านน้ำ).

2.2.3 Spray reagents

Ferric chloride in ethanol ร้อยละ 1.

Sulfuric acid in ethanol ร้อยละ 10.

2.2.4 Solvent systems for thin – layer chromatography

Normal Phase TLC

- Hexane+Ethyl acetate, 7+3.
- Dichloromethane+Methanol, 99+1, 97+3.

Reversed Phase TLC

- Methanol+ Water, 70+30.

2.2.5 Adsorbent for thin – layer chromatography (TLC)

Silica gel 60 $F_{254,}$ pre–coated on TLC aluminium sheets 20 × 20 cm, layer thickness 0.25 mm, Merck, ประเทศเยอรมนี.

Silica gel 60 RP-18 $F_{254s,}$ pre–coated on TLC glassplate 5 × 10 cm, layer thickness 0.25 mm, Merck, ประเทศเยอรมนี.

2.2.6 อุปกรณ์/เครื่องมือ

2.2.6.1 อุปกรณ์สำหรับการเตรียมวัตถุดิบเพื่อป้อนการสกัด และอุปกรณ์สกัด

ตู้อบไฟฟ้า ความจุ 100 กิโลกรัม.

เครื่องบดสมุนไพร แบบลูกกลิ้ง.

เครื่องบดสมุนไพรแบบปั่นละเอียด.

ถังหมักสเตนเลส ความจุ 50-100 ลิตร.

เครื่องระเหยไล่ตัวทำละลายภายใต้ระบบลดความดัน ขนาดความจุ 2 ลิตร และ 50 ลิตร. Buchi, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.

2.2.6.2 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์และแยกสาร

HPLC Waters 600 Controller, 2996 Photodiode Array Detector, 717 plus Autosampler.

GC-MS (Gas chromatography-mass spectrometor): Agilent Technologies รุ่น 6890 N, Quadrupole mass selective detector รุ่น 5973 ประเทศสหรัฐอเมริกา.

คอลัมน์ XBridge Shield RP18, 4.6×150 mm i.d (Analytical).

เครื่องแยกสารด้วยระบบความดันต่ำ (LPLC) FOXY200, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

คอลัมน์ Lobar RP-18, 2.5cm i.d.x31 cm L, Merck, Germany.

Fraction Collector ISCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

Syringe Filters: PTFE 0.45 µm.

VideoScan Camag, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.

เครื่องชั่ง OHAUS รุ่น E 02140, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.

Ultrasonic bath บริษัท Astrason, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

Magnetic stirrer, Steroglass ประเทศอิตาลี.

SPME holder และ Fiber: 100 μm polydimethylsiloxane (PDMS), Supelco ประเทศสหรัฐอเมริกา.

ตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสำหรับทดสอบความคงสภาพของผลิตภัณฑ์.

ตู้เย็น.

เครื่องแก้ว เช่น บีกเกอร์, ขวดรูปชมพู่ และขวดปรับปริมาตร.

ขวด Vial ขนาด 12 มิลลิลิตร พร้อมฝาเกลียว และ septum บริษัท National Scienctific Company ประเทศสหรัฐอเมริกา.

กรรไกรผ่าตัด, สำลี และแอลกอฮอล์.

กระบอกฉีดยาขนาด 1 - 5 มิลลิลิตร.

หลอดป้อนสเตนเลส.

2.3 วิธีการ

2.3.1 การแยกสารสำคัญ ยืนยันโครงสร้างทางเคมี และตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของขี้อ้นดอน

2.3.1.1 การแยกสารสำคัญจากใบขี้อ้นดอน ดังแสดงในรูปที่ 1

***การเตรียมสารสกัดหยาบ*:** ชั่งผงใบขี้อ้นดอน จำนวน 1.6 กิโลกรัม สกัดโดยการหมักเย็น (maceration) ด้วยไดคลอโรมีเทน 16 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโดยการหมุนเวียนตัวทำละลาย ด้วยการกรองสุญญากาศ (suction) 1 ครั้ง, แล้วกรองแยกน้ำยาสกัด นำกากมาสกัดซ้ำโดยวิธีเดียวกันอีก 2 ครั้ง รวมน้ำยาสกัดที่ได้ แล้วนำไประเหยไล่ตัวทำละลายภายใต้ระบบลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบ DCM จำนวน 129.59 กรัม.

***การแยกส่วนที่เป็นไขมัน*:** แบ่งสารสกัด DCM มาจำนวน 50 กรัม ทำเป็นสารแขวนตะกอนในเมทานอล ร้อยละ 10 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร เขย่าแยกส่วนที่เป็นไขมันด้วยเฮกเซน 300 มิลลิลิตร รวม 3 ครั้ง นำส่วนที่เหลือไประเหยไล่ตัวทำละลาย ทำ 2 ซ้ำ ได้สารสกัดที่แยกไขมัน จำนวน 30.26 กรัม (Defatted DCM).

การแยกสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

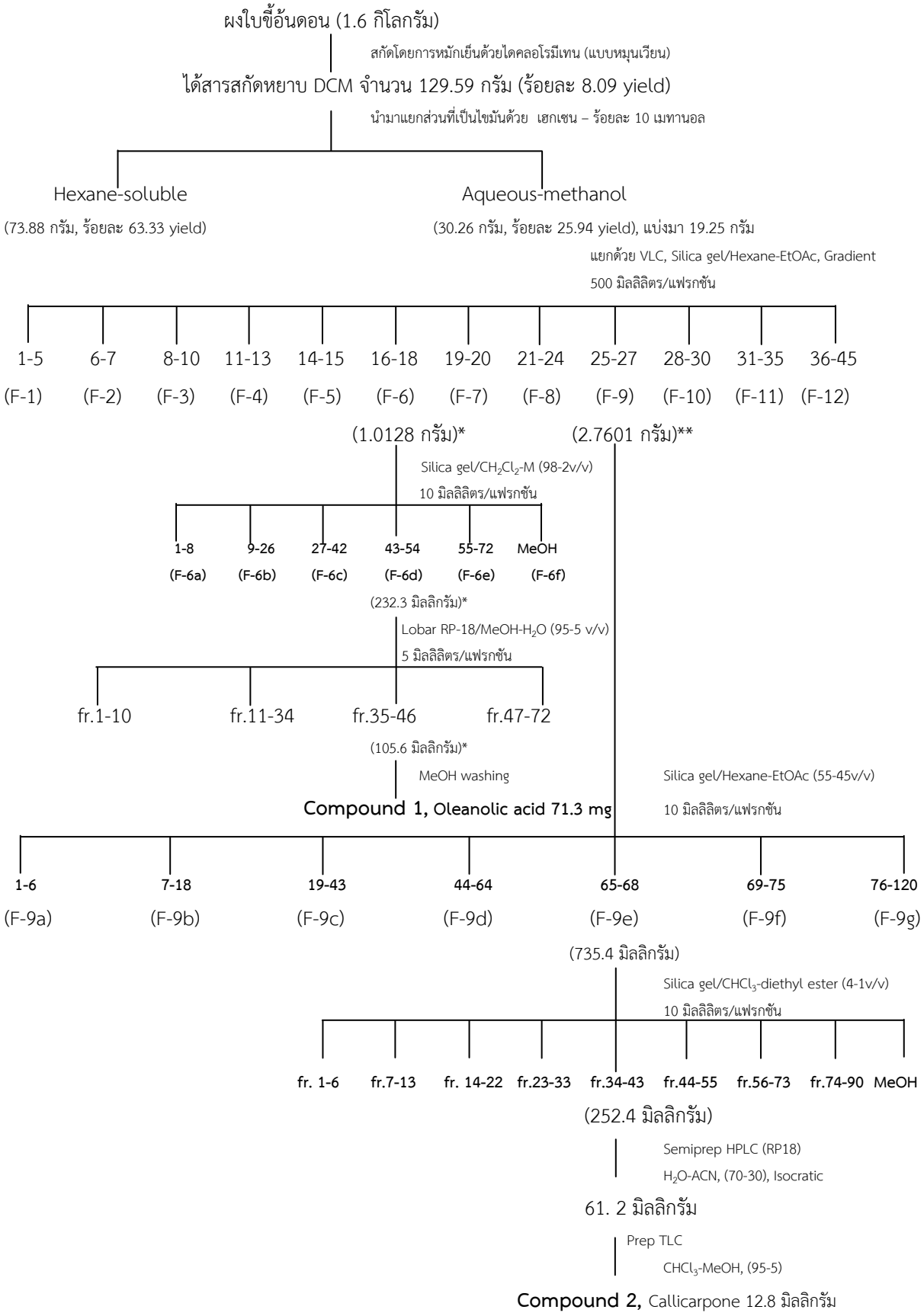
นำสาร DCM หลังแยกไขมัน จำนวน 19.25 กรัม แยกด้วย VLC (Silica gel 220 กรัม/ Hexane: Ethyl acetate 10: 0-5.5: 4.5 ครั้งละ 500 มิลลิลิตร ติดตามการแยกโดย TLC แยกได้รวม 12 แฟรกชัน (F1-F12), นำแฟรกชัน F6 (1.0128 กรัม) แยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ความดันปกติ (Silica gel 100 g dichloromethane: methanol 98+2, หลอดละ 10 มิลลิลิตร ติดตามการแยกโดย TLC) แยกได้ 6 แฟรกชัน (F6a-F6f) นำ F6d 232.3 มิลลิกรัม มาแยกต่อโดยโครมาโทกราฟีแรงดันต่ำ (Lobar RP-18, methanol-water 95+5) ได้สารกึ่งบริสุทธิ์ 105.6 มิลลิกรัม นำมาทำให้บริสุทธิ์ โดยการล้างตะกอนด้วยเมทานอล ได้สารหนัก 71.3 มิลลิกรัม (Compound 1, Oleanolic acid).

นำแฟรกชัน F9 (2.7601 กรัม แยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีความดันปกติ (Silica gel 100 กรัม/Chloroform: Diethyl ether 4: 1 หลอดละ 10 มิลลิลิตร, 120 หลอด ติดตามการแยกโดย TLC) แยกได้ 7 แฟรกชัน (F9a-F9g) นำแฟรกชัน F9e (735.4 มิลลิกรัม) แยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีปกติ Chloroform: Diethyl ether 4: 1 หลอดละ 10 มิลลิลิตร, 90 หลอด ติดตามการแยกโดย TLC) ได้แฟรกชันที่มีสารคาลิคาโปนสูง 252.4 มิลลิกรัม นำมาแยกต่อโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแรงดันสูง (Semiprep HPLC: คอลัมน์ RP 18, water acetonitrile 70: 30 เก็บตามพีกและตามปริมาตร ติดตามโดย TLC) ได้สาร 61.2 มิลลิกรัม ที่ retention volume /R_t นำไปแยกต่อโดย Preparative TLC (Silica gel/ DCM+MeOH, 95+5 ที่ R_f 0.39, Detect โดยร้อยละ 10 Sulfuric acid) ได้สารหนัก 12.8 มิลลิกรัม (compound 2, callicarpone).

2.3.1.2 การยืนยันโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญ

ใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ ^{1}H- and ^{13}C-NMR, ESI-MS, ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.



รูปที่ 2. แผนผังการแยกสารจากขี้อ้นดอน.

2.3.1.3 การตรวจวิเคราะห์ทางเคมีของตัวอย่างใบขี้อ้นดอนโดย TLC, HPLC

- การตรวจวิเคราะห์โดย TLC

การเตรียมตัวอย่าง: นำตัวอย่างที่บดละเอียดจำนวน 5 กรัม มาสกัดด้วยเมทานอล 50 มิลลิลิตร โดยการ sonicate เป็นเวลา 30 นาที แล้วกรอง ทำการสกัดซ้ำรวม 3 ครั้ง ระเหยไล่ตัวทำละลาย ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล.

วัฏภาคนิ่ง ได้แก่ TLC aluminium plate, Silica gel GF 254

ระบบนำพาสาร : Chloroform + Diethyl ether, 4 + 1

น้ำยาพ่น : ร้อยละ 10 H_2SO_4 in Ethanol spraying reagent

- การตรวจวิเคราะห์โดย HPLC

การเตรียมสารตัวอย่าง: นำตัวอย่างที่บดละเอียดจำนวน 5 กรัม มาสกัดด้วยเมทา-นอล 50 มิลลิลิตร โดยการ sonicate เป็นเวลา 30 นาที แล้วกรอง ทำการสกัดซ้ำรวม 3 ครั้ง ระเหยไล่ตัวทำละลายออก ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล ทำการเจือจางโดย 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล, กรองผ่านแผ่นกรอง 0.45 ไมโครเมตร PTFE แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC 10 ไมโครลิตร.

นำตัวอย่างไปวิเคราะห์โดย HPLC ตามสภาวะ ดังต่อไปนี้

คอลัมน์: XBridge Shield RP18 5 ไมโครเมตร, 4.6 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร

ตัวทำละลาย: ร้อยละ 0.005 TFA in Water (A) ร้อยละ 0.005 TFA in Acetonitrile (B)

อัตราการไหล: 1 มิลลิลิตร /นาที

อุณหภูมิ: 30 องศาเซลเซียส

ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น: 266 นาโนเมตร

ปริมาณสารที่ฉีด 10 ไมโครลิตร

Gradient program:

Time (นาที)	Profile (ร้อยละ A)	Profile (ร้อยละ B)
0.00	90.0	10.0
30.0	5.0	95.0
35.0	5.0	95.0
40.0	90.0	10.0
45.0	90.0	10.0

2.3.2 การเตรียมสารสกัดหยาบ/สารสกัดมาตรฐานและการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์

2.3.2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ/สารสกัดมาตรฐาน

2.3.2.1.1 ใบขี้อ้นดอน

ชั่งผงใบขี้อ้นดอนจำนวน 300 กรัม นำสกัดด้วยเอทานอล ร้อยละ 95 จำนวน 1.5 ลิตร โดยการ sonicate เป็นเวลา 30 นาที กรองแยกน้ำยาสกัดด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ (vacuum suction) สกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง รวมน้ำยาสกัดนำไประเหยไล่ตัวทำละลายภายใต้ระบบลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบ ร้อยละ 95 ของเอทานอล ชั่งและจดบันทึกน้ำหนัก เก็บสารสกัดไว้ในขวดสีชาปิดฝาสนิท เก็บไว้ในตู้เย็น.

2.3.2.1.2 เหง้าว่านน้ำ

ชั่งผงเหง้าว่านน้ำจำนวน 30 กิโลกรัม นำสกัดแบบหมักด้วย ร้อยละ 95 เอทานอล จำนวน 150 ลิตร ในถังหมัก มีการหมุนเวียนตัวทำละลาย 1 ครั้ง ภายใน 24 ชั่วโมง แล้วไขตัวทำละลายออก เติมตัวทำละลายใหม่ทำแบบเดิมอีก 1 ซ้ำ (สีจาง) นำน้ำยาสกัดมารวมกัน แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ภายใต้ระบบสุญญากาศ แล้วนำไประเหยไล่ตัวทำลาย ภายใต้ระบบลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบ ร้อยละ 95 ของเอทานอล ชั่งและจดบันทึกน้ำหนัก เก็บสารสกัดไว้ในขวดสีชาปิดฝาสนิท เก็บไว้ในตู้เย็น.

2.3.2.1.3 เมล็ดมันแกว

ชั่งผงเมล็ดมันแกวจำนวน 30 กิโลกรัม นำสกัดแบบหมักด้วยเอทานอล ร้อยละ 95 จำนวน 150 ลิตร ในถังหมัก สกัดตามวิธีเดียวกับว่านน้ำ.

2.3.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์

2.3.2.2.1 วิเคราะห์ปริมาณสาร β-asarone ในสารสกัดเหง้าว่านน้ำ

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน และการสร้างกราฟมาตรฐาน

1. การเตรียม Internal standard นำสารมาตรฐาน thymol ปริมาณ 42.2 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอลชนิดไร้น้ำ 10 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายหมด.

2. เตรียม stock solution ของสารมาตรฐาน β-asarone โดยชั่งสารมาตรฐาน β-asarone ปริมาณ 12.8 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอล ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร.

3. การเตรียม calibration standard สารมาตรฐาน β-asarone จาก stock solution ปริมาณ 0.2, 0.4, 0.6 มิลลิลิตร ใน vial ขนาด 12 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเติม internal standard 50 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และโซเดียมคลอไรด์เติม 20 มิลลิกรัม แล้ว

นำไปสกัดโดยใช้เทคนิค Headspace-Solid-Phase Microextraction (HS-SPME) โดยใช้ไฟเบอร์ 100 ไมโครเมตร polydimethylsiloxane (PDMS) โดยควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที พร้อมกับปั่นกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก จากนั้นนำไฟเบอร์ไป insert เข้าช่องฉีดสารตัวอย่างของ GC-MS นาน 2 นาที เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณ.

4. เปรียบเทียบอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีกของสาร β-asarone กับพื้นที่ใต้พีกของสารมาตรฐาน thymol ได้โดย หาค่า m-factor ดังสมการ (1).

$$\text{m-factor} = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีก } \beta\text{-asarone} \times \text{น้ำหนัก thymol}}{\text{พื้นที่ใต้พีกของ thymol} \times \text{น้ำหนัก } \beta\text{-asarone}} \quad \text{--------(1)}$$

การเตรียมสารตัวอย่าง

1. ชั่งสารตัวอย่างสารสกัดว่านน้ำ ปริมาณ 5 มิลลิกรัม เติม Internal standard 50 ไมโครลิตร ลงใน vial ขนาด 12 มิลลิลิตร, น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และเติมโซเดียมคลอไรด์ 20 มิลลิกรัม แล้วนำไปสกัดโดยใช้เทคนิค Headspace-Solid-Phase Microextraction (HS-SPME) โดยใช้ไฟเบอร์ 100 ไมโครเมตร polydimethylsiloxane (PDMS) โดยควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที พร้อมกับปั่นกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก จากนั้นนำไฟเบอร์ไป insert เข้าช่องฉีดสารตัวอย่างของ GC-MS นาน 2 นาที เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณ.

2. ชั่งสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ว่านน้ำ ปริมาณ 15 มิลลิกรัม เติม Internal standard 50 ไมโครลิตร ลงใน vial ขนาด 12 มิลลิลิตร, น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และเติมโซเดียมคลอไรด์ 20 มิลลิกรัม แล้วนำไปสกัดโดยใช้เทคนิค Headspace-Solid-Phase Microextraction (HS-SPME) โดยใช้ไฟเบอร์ 100 ไมโครเมตร polydimethylsiloxane (PDMS) โดยควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที พร้อมกับปั่นกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก จากนั้นนำไฟเบอร์ไป insert เข้าช่องฉีดสารตัวอย่างของ GC-MS นาน 2 นาที เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณ.

3. คำนวณหา ร้อยละ สาร asarone ในผลิตภัณฑ์ ได้ดังสมการที่ 2.

$$\text{ร้อยละ สาร } \beta\text{-asarone} = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีก } \beta\text{-asarone ในผลิตภัณฑ์} \times \text{น้ำหนัก thymol}}{\text{พื้นที่ใต้พีกของ thymol} \times \text{น้ำหนักผลิตภัณฑ์} \times \text{m-factor}} \times 100 \quad \text{--------(2)}$$

นำตัวอย่างไปวิเคราะห์โดย GC-MS ตามสภาวะดังต่อไปนี้

GC-MS (Gas chromatography-mass spectrometor): Agilent Technologies รุ่น 6890 N, Quadrupole mass seclective detector รุ่น 5973 innert

Capillary column: HP-INNOWAX (30 เมตร x 0.25 มิลลิเมตร, ความหนาของฟิล์มเคลือบ 0.25 ไมโครเมตร)

Column temperature: 50-220 องศาเซลเซียส, 4 องศาเซลเซียส/นาที

Injector: pulse split 20:1, 230 องศาเซลเซียส

Detector: MSD, EI 70 eV

Carrier gas: Helium 10 psi, flow 1.2 มิลลิลิตร/นาที

Library: Wiley7n and Adams, R.P. 2001

2.3.2.2.2 เมล็ดมันแกว

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน และการสร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน ของสาร Rotenone โดยมีความเข้มข้น ดังนี้:

Rotenone: 5, 10, 25, 50, 75 และ 100 ppm

นำสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดไปวิเคราะห์โดย HPLC แล้วนำพื้นที่ใต้พีก และความเข้มข้นไปสร้างกราฟมาตรฐาน พร้อมหาค่าสัมประสิทธิ์สัมพันธ์ (correlation coefficient, r^2).

2. การเตรียมสารตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่บดละเอียดจำนวน 5 กรัม มาสกัดด้วยเมทานอล 50 มิลลิลิตร โดยการ sonicate เป็นเวลา 30 นาที แล้วกรอง ทำการสกัดซ้ำรวม 3 ครั้ง ระเหยไล่ตัวทำละลายออก ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล ทำการเจือจางโดย 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล กรองผ่านแผ่นกรอง 0.45 ไมโครเมตร PTFE แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC 10 ไมโครลิตร.

นำตัวอย่างไปวิเคราะห์โดย HPLC ตามสภาวะดังต่อไปนี้

คอลัมน์: XBridge Shield RP18 5 ไมโครเมตร, 4.6 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร

ตัวทำละลาย: Water (A) Acetonitrile (B)

อัตราการไหล: 1 มิลลิลิตร /นาที

อุณหภูมิ: 30 องศาเซลเซียส

ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น: 290 นาโนเมตร

ปริมาณสารที่ฉีด 10 ไมโครลิตร (ฉีดซ้ำ 3 ครั้ง)

Isocratic Program:

Time (นาที)	Profile (ร้อยละ A)	Profile (ร้อยละ B)
60.0	60.0	40.0

2.3.3 การประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัด (Acute oral LD_{50})

ดำเนินการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน ดัดแปลงวิธีทดสอบหมายเลข 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method of OECD Guidelines for Testing of Chemicals (OECD 2001).

2.3.3.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้หนูทดลอง 30 ตัว เป็นเพศผู้และเพศเมียเพศละ 15 ตัว ก่อนทำการทดสอบ 1 สัปดาห์ นำหนูทดลองมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ที่ ร้อยละ 50 - 70 เพื่อให้หนูทดลองปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการก่อนวันทดสอบแบ่งกลุ่มหนูทดลองโดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่ายเป็นกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม และกลุ่มทดสอบจำนวน 2 กลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วยหนูเพศผู้และเพศเมียเพศละ 5 ตัว หนูทดลองแต่ละตัวได้รับการทำสัญลักษณ์ประจำตัวโดยการแต้มเบอร์ที่หาง และอดอาหารหนูทดลอง 16 ชั่วโมง ก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ แต่ให้น้ำดื่มตามปกติ.

2.3.3.2 การเตรียมตัวอย่างทดสอบและวิธีทดสอบ

ในวันทดสอบชั่งน้ำหนักหนูทดลองทุกตัว โดยเตรียมสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 กรัมในน้ำ โดยใช้ tragacanth ร้อยละ 3 เป็นสารแขวนตะกอน เพื่อป้อนตัวอย่างทดสอบทางปากให้หนูกลุ่มทดสอบทั้ง 2 กลุ่ม ในขนาด 2,000 และ 5,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวตามลำดับ และป้อน tragacanth ร้อยละ 3 แก่หนูกลุ่มควบคุมด้วยปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดสอบ ภายหลังป้อนตัวอย่างทดสอบครบ 4 ชั่วโมง ให้อาหารแก่หนูทดลองทุกกลุ่ม.

2.3.3.3 การสังเกตผลการทดสอบ

สังเกตและบันทึกอาการผิดปกติของหนูทดลองที่เวลา 0.5, 1 และ 3 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตอาการอย่างน้อยวันละครั้งทุกวันติดต่อกันเป็นเวลานาน 14 วัน.

2.3.3.4 บันทึกน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง

ชั่งน้ำหนักหนูทดลองแต่ละตัวในวันที่ 1, 8 และ 15 (วันสิ้นสุดการทดสอบ) คำนวณค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบน้ำหนักตัวหนูแต่ละกลุ่มทดสอบเทียบกับกลุ่มควบคุม และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของข้อมูลเพื่อประเมินผลของตัวอย่างทดสอบต่ออัตราการเจริญเติบโตของหนูทดลอง.

2.3.3.5 บันทึกความผิดปกติของอวัยวะภายใน (Gross pathology)

หนูทดลองที่แสดงอาการผิดปกติอย่างรุนแรง หรือหนูทดลองที่มีชีวิตรอดจนถึงวันสิ้นสุดการทดสอบครบ 15 วัน ทำการฆ่าโดยการให้สูดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และทำการผ่าตัดชันสูตรซากเพื่อตรวจสอบดูความผิดปกติของอวัยวะภายใน.

2.3.3.6 การคำนวณ Lethal Dose 50 (LD_{50})

การหาค่า LD_{50} ดัดแปลงวิธีของ Litchfield and Wilcoxon (1949) โดยนำปริมาณสัตว์ทดลองที่ตายในแต่ละกลุ่มมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการตายของสัตว์ทดลอง (บนแกน Y) กับขนาดของตัวอย่างทดสอบที่ให้แก่สัตว์ทดลองในค่า Log (บนแกน X) โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel.

2.3.4 การเตรียมผลิตภัณฑ์สะดวกใช้

การพัฒนาสูตรตำรับผลิตภัณฑ์สมุนไพรกำจัดแมลง

เนื่องจากสารสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ประเภทเอทานอล จะข้นเหนียวเป็นชันยาง ละลายน้ำได้ไม่ดี จึงต้องมีสารช่วยในการละลาย ได้แก่ surfactant ที่มีรายงานการนำมาใช้ ได้แก่ polysorbate, sodium lauryl sulfate ผลิตภัณฑ์จากโครงการจึงมี 2 ชนิด ได้แก่ สารสกัดที่ได้โดยตรงจากกระบวนการสกัด (native extract) และสารสกัดที่เตรียมให้อยู่ในรูปผลิตภัณฑ์สะดวกใช้ (ready to use product) โดยพัฒนาในรูปแบบของสารละลายที่สามารถละลายน้ำได้ดี.

วิธีการทดลอง

1. ชั่งสารสกัดสมุนไพร และตัวทำละลายในอัตราส่วนต่างๆ.

สารสกัดสมุนไพร	1	ส่วน
สารโพรพิลีนไกลคอล	2	ส่วน
Tween 20	0.5 1.0 1.5 และ 2	ส่วน

2. นำสารสกัดและ Tween 20 มาบดในโกร่งให้มีการกระจายตัวของสารสกัด.

3. เติมสารละลายโพรพิลีนไกลคอล ผสมให้สารทั้ง 3 ชนิดเข้ากัน.

4. นำมาใส่หลอดแก้ว ตั้งทิ้งไว้สังเกตการแยกตัวที่อุณหภูมิห้อง ในเวลาที่ระยะเวลาต่างๆ ภายใน 24 ชั่วโมง พร้อมทั้งทดสอบการละลายน้ำของผลิตภัณฑ์ ในอัตราส่วน 1:10 -1:100.

2.3.5 การทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ ทำตามวิธีทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร

1. นำตัวอย่างสารสกัดและผลิตภัณฑ์สะดวกใช้ แบ่งใส่ภาชนะบรรจุชนิดขวดแก้วสีชาปิดฝาสนิท ขนาดบรรจุ 10 กรัม สำหรับผลิตภัณฑ์ และขนาดบรรจุ 5 กรัม สำหรับสารสกัด.

2. เก็บตัวอย่างไว้ที่ 3 อุณหภูมิ ได้แก่:

- ที่เย็น 4 องศาเซลเซียส ตรวจถึง T24 (24 เดือน) รหัส LT (Low Temperature).
- ในตู้อบ 45 องศาเซลเซียส ตรวจถึง T6 (6 เดือน) รหัส HT (High Temperature).
- ที่อุณหภูมิห้องตรวจถึง T24 (24 เดือน) รหัส RT (Room Temperature).
- ทำการสุ่มตรวจที่เวลา T0 T1 T3 T6 T9 T12 T18 และ T24.

3. ทำการตรวจสอบคุณภาพ

- ทางกายภาพ, สี, กลิ่น, การตกตะกอน และความหนืด (ใช้วิธีตรวจพินิจ).
- องค์ประกอบทางเคมี ตรวจปริมาณสารสำคัญตามชนิดของสมุนไพรแต่ละชนิด ได้แก่ ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ สาร β-asarone ในว่านน้ำ โดย GC.

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การแยกสารสำคัญ ยืนยันโครงสร้างทางเคมี และตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของขี้อ้นดอน

3.1.1 การแยกสารสำคัญ ดังแสดงในรูปที่ 1

แยกสารไตรเทอร์พีนส์โอลิโนลิกแอซิด, Compound 1 (oleanolic acid, OA) บริสุทธิ์ ได้จำนวน 71.30 มิลลิกรัม ลักษณะเป็นของแข็งไม่เป็นรูปผลึกสีขาว (white amorphous solid) ปริมาณผลผลิต (ร้อยละ yield) เท่ากับ ร้อยละ 0.11 และ 0.0091 เมื่อเทียบกับสารสกัดไดคลอโร-มีเทน และใบขี้อ้นดอนแห้ง ตามลำดับ.

แยกสารไดเทอร์พีนส์คาลิคาโปน, Compound 2 (callicarpone, CP) บริสุทธิ์ ได้จำนวน 12.80 มิลลิกรัม ลักษณะเป็นของแข็งไม่เป็นรูปผลึกสีเหลืองอ่อน (yellow amorphous solid) ปริมาณผลผลิต (ร้อยละ yield) เท่ากับ ร้อยละ 0.02 และ 0.0016 เมื่อเทียบกับสารสกัดไดคลอโร-มีเทน และใบขี้อ้นดอนแห้งตามลำดับ.

ปริมาณสารคาลิคาโปนที่แยกได้มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับสารโอลิโนลิกแอซิด อาจเนื่องจากสารมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหมู่อิพอกไซด์ หรืออาจเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับโมเลกุลอื่นๆ จากการติดตามการแยก พบว่า สารดังกล่าวไม่แยกจากสารอื่นๆ ได้สมบูรณ์ มีแถบสารที่ Rf ใกล้เคียงกันปนมา ในขณะโอลิโนลิกแอซิด มีการแยกจากสารอื่นๆ ได้ค่อนข้างสมบูรณ์ แฟรกชันที่มีสารโอลิโนลิกแอซิดเข้มข้น มีสารอื่นๆ ปนมาน้อยมาก.

OA เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพหลายอย่าง เช่น แก้อักเสบ, ลดไขมัน (Wang *et al*. 2013), ลดน้ำตาล, ต้านออกซิเดชัน (Gao *et al*. 2009) และต้านกระดูกพรุน (Bian *et al*. 2012) ถือเป็นสารพฤกษเคมีสำคัญในพืชวงศ์กะเพรา (Lamiaceae) ในกรณีที่ไม่มีการเจาะจงใช้ CP เป็นสารเทียบ (chemical marker) ในการวิเคราะห์ปริมาณเพื่อการควบคุมคุณภาพ อาจใช้สาร OA เป็นสารเทียบแทนได้ หรือควบคุมคุณภาพทางเคมีโดยใช้ทั้ง 2 สาร เป็นสารเทียบซึ่งจะทำให้การควบคุมคุณภาพมีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น.

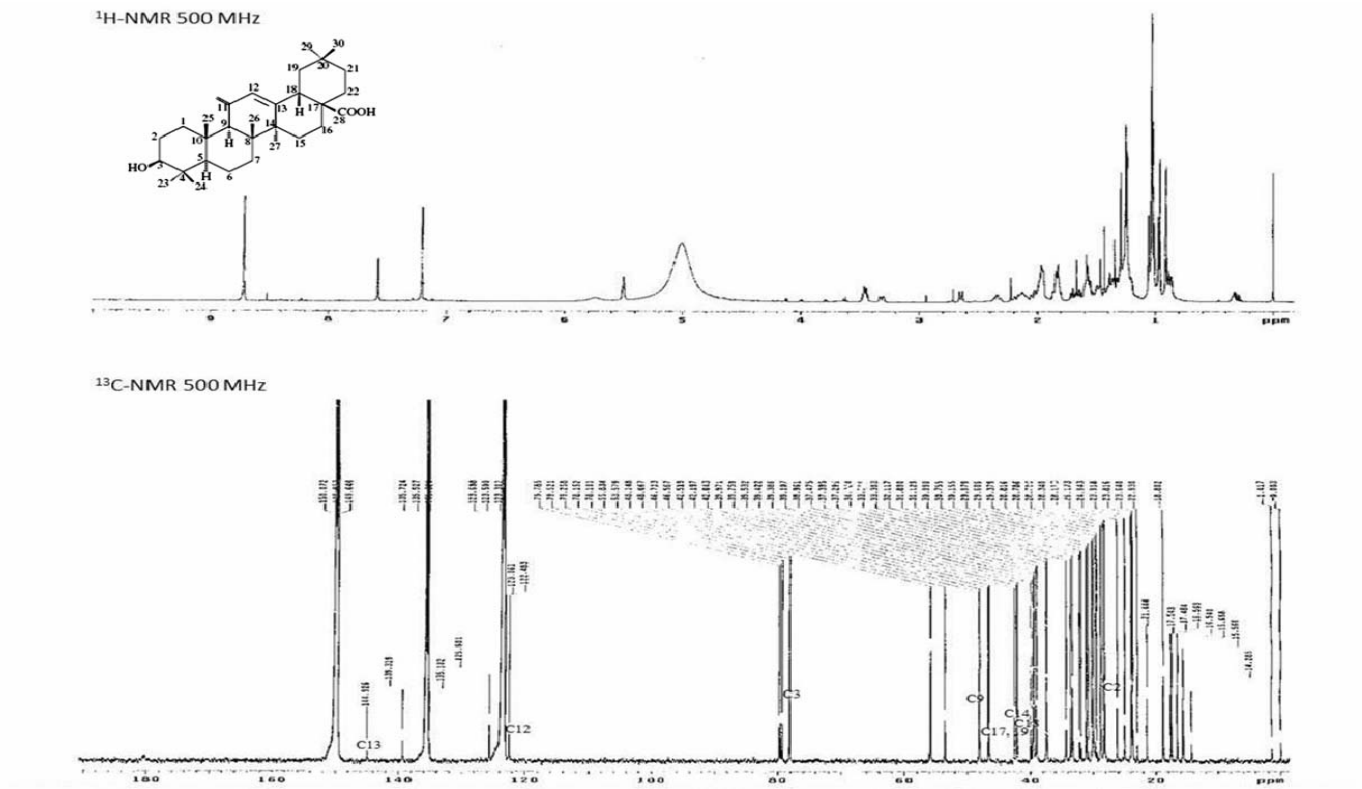
3.1.2 การยืนยันโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญ

โครงสร้างทางเคมีของ OA และ CP ยืนยันได้จากผลของ ^{1}H- and ^{13}C-NMR Data ดังแสดงในตารางที่ 1 และตารางที่ 2 ตามลำดับ ESI-MS ของ OA พบค่ามวลต่อประจุ ที่ 479.31 เท่ากับ [M+Na] สอดคล้องกับมวลโมเลกุลของ OA ($C_{30}H_{48}O_3$, MW 456.71) ดังแสดงในรูปที่ 5 และ ESI-MS ของ CP พบค่ามวลต่อประจุ ที่ 333.17 เท่ากับ [M+1] สอดคล้องกับมวลโมเลกุลของ CP ($C_{20}H_{28}O_4$, MW 332.1) ดังแสดงในรูปที่ 6.

ตารางที่ 1. NMR data correlation of compound 1, oleanolic acid ($CDCl_3$)

C	^{13}C δ[ppm]	^{1}H δ[ppm]	Lit [ppm] *	
			^{13}C δ[ppm]	^{1}H δ[ppm]
1	38.90	1.033	39.0	α1.02
		1.585		β1.57
2	28.11	1.825	28.1	1.82
		1.825		1.82
3	78.15	3.469	78.2	α3.44, *dd*
4	39.42	-	39.4	-
5	55.83	0.887	55.9	α0.88, *d*
6	18.80	1.585	18.8	α1.58
		1.388		β1.39
7	33.30	1.560	33.4	α1.53
		1.577		β1.56
8	39.76	-	39.8	-
9	48.15	1.700	48.2	α1.71, *tr*
10	37. 48	-	37.4	-
11	23.82	1.965	23.8	1.96
		1.965		1.96
12	122.48	5.499	122.6	5.49
13	144.93	-	144.8	-
14	42.19	-	42.2	-
15	28.34	1.253	28.4	α1.22
		2.230		β2.19
16	23.92	2.127	23.8	α2.12, *tr*
		1.965		β1.96
17	46.71	-	46.7	-
18	42.04	3.308	42.1	β3.30, *dd*
19	46.57	1.825	46.6	α1.83
		1.349		β1.32
20	30.99	-	31.0	-
21	34.28	1.469	34.3	α1.46
		1.253		β1.23
22	33.59	1.825	33.2	α1.82
		2.029		β2.04
23	28.82	1..240	28.8	α1.24, *s*
24	16.54	1.033	16.5	β1.02, *s*
25	15.57	0.908	15.6	β0.93, *s*
26	17.54	1.058	17.5	β1.04, *s*
27	26.17	1.349	26.2	α1.30, *s*
28	180.23	-	180.0	-
29	33.30	0.963	33.4	α0.97, *s*
30	23.81	1.033	23.8	β1.02, *s*

หมายเหตุ: * Seebacher *et al*. 2003

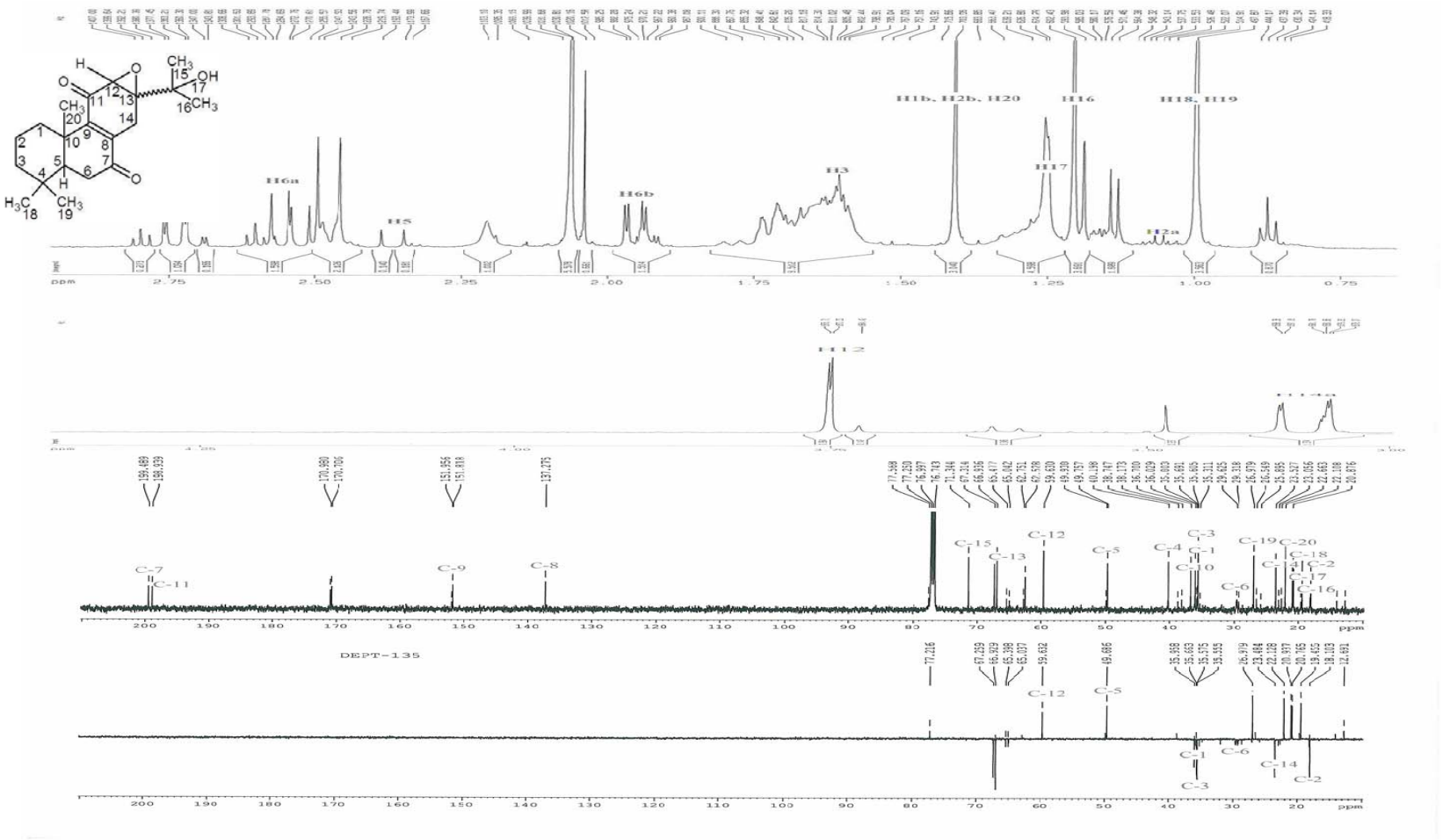


รูปที่ 3. ^{1}H-, ^{13}C-NMR spectral of compound 1, oleanolic acid.

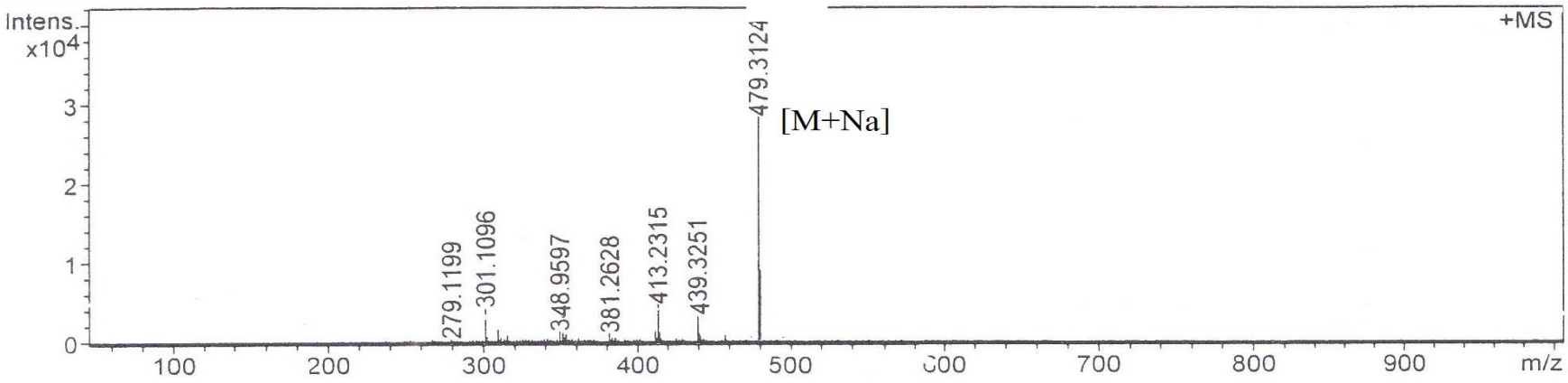
ตารางที่ 2. NMR data correlation of compound 2, callicarpone ($CDCl_3$)

C/H	^{1}H δ [ppm]	Multiplets	J [Hz]	^{13}C δ[ppm]	Lit [ppm] **
1(2H)	2.152	*m*	4.156	35.73	-
	1.387	*m*	2.931	-	-
2(2H)	1.429	*m*	2.687	18.26	
	1.387	*m*	2.931	-	-
3(2H)	1.644	*m*	3.419	36.12	-
	-	-	-	-	-
4	-	-	-	40.32	-
5(1H)	2.333	*t*	7.571	49.84	-
6(**1**H)	2.557	*dd*	2.198, 15.142	67.41	-
	1.949	*dd*	2.931, 14.899	-	-
7	-	-	-	199.71	-
8	-	-	-	171.22	-
9	-	-	-	151.99	-
10	-	-	-	36.82	-
11	-	-	-	199.16	-
12(1H)	3.731	*s*	1.221	59.78	3.71 (1H, J=1.2)
13	-	-	-	137.36	-
14(2H)	3.378	*dd*	1.222, 19.295	23.64	3.41 (1H, J=1.2, 19.5)
	2.478	*dd*	3.175, 19.051	-	2.43 (1H, J=19.5)
15	-	-	-	29.84	-
16(3H)	1.188	*s*	8.548	20.92	1.18 (3H)
17(3H)	1.232	*s*	11.232	21.09	1.29 (3H)
18(3H)	0.978	*s*	5.129	19.61	0.92 (3H)
1**9**(3H)	0.978	*s*	5.129	27.13	0.90 (3H)
20(3H)	1.387	*s*	2.931, 5.374	22.29	1.39 (3H)

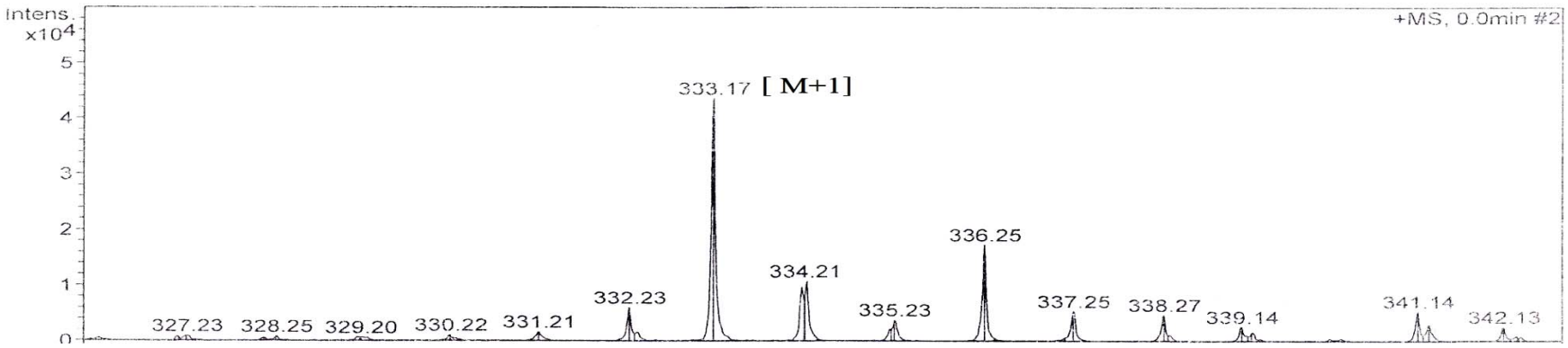
หมายเหตุ: ** Kawazu, Inaba and Mitsui (1967)



รูปที่ 4. ^{1}H-, ^{13}C-NMR spectral of compound 2, callicarpone.



รูปที่ 5. ESI-MS spectral ของสารโอลิโนลิกแอซิด ($C_{30}H_{48}O_3$, *m/z* เท่ากับ 456).

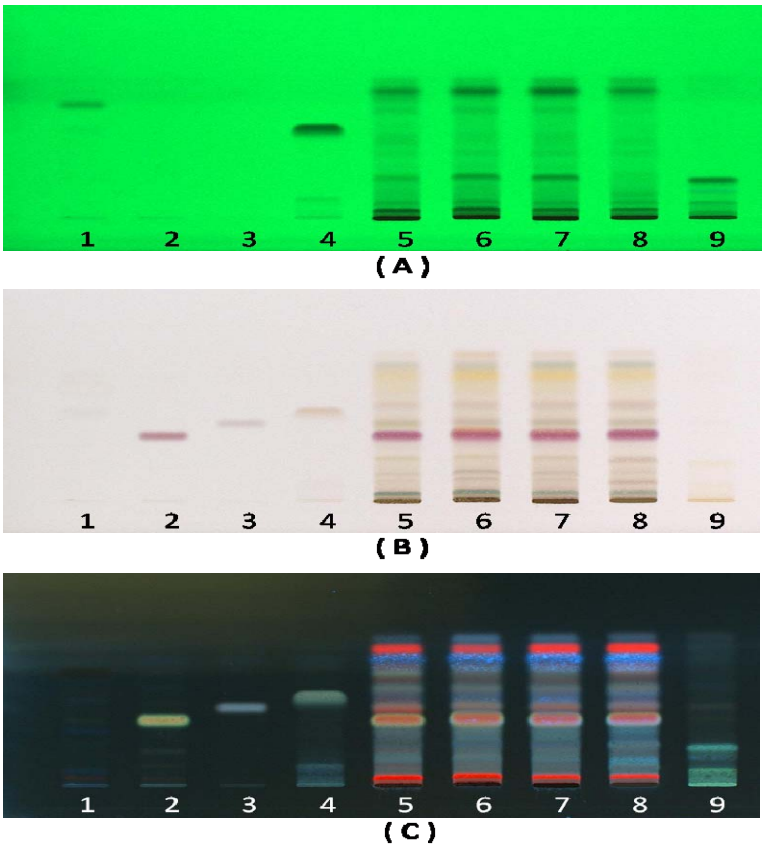


รูปที่ 6. ESI-MS spectral ของสารคาลิคาโปน ($C_{20}H_{28}O_4$, *m/z* เท่ากับ 332).

3.1.3 การตรวจวิเคราะห์ทางเคมีของตัวอย่างใบขี้อ้นดอนโดย TLC และ HPLC

TLC chromatogram ของขี้อ้นดอนจากแหล่งต่างๆ โดยเน้นองค์ประกอบเคมีในกลุ่มได- และไทรเทอร์พีนส์ พบรูปแบบที่คล้ายคลึงกัน จะเห็นได้ว่าแถบสารสีม่วงที่มีค่า Rf ตรงกับสารมาตรฐาน oleanolic acid เป็นแถบสารที่เด่นในทุกๆ แหล่ง ถือเป็นสารหลักในพืชชนิดนี้. อย่างไรก็ตาม แถบสารที่คาดว่าเป็นคาลิคาโปนยังไม่ปรากฏชัดเจน ในขณะที่ HPLC chromatogram มีพีกที่เป็นสารคาลิคาโปนชัดเจน ที่ retention time 21.9 และสารโอลิโนลิกแอซิด ที่ retention time 36.5 ซึ่งได้ยืนยันด้วยค่าแมส จะเห็นได้ว่า HPLC มีความสามารถในการแยกสารได้ดีกว่า TLC ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีการแยกโดย pressure chromatography ดังแสดงในรูปที่ 8 จะเห็นได้ว่าตัวอย่างที่เก็บจากสงขลา และกระบี่พบพีกของสารคาลิคาโปนเด่นชัด ในขณะที่ตัวอย่างจากเลย มีพีกที่ตำแหน่งดังกล่าวแต่ไม่เด่น สอดคล้องกับข้อมูลที่ได้กล่าวมาข้างต้น.

TLC-chromatogram ของใบขี้อ้นดอนจากแหล่งต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 7 และ HPLC-chromatogram ของใบขี้อ้นดอนจากแหล่งต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 8.



รูปที่ 7. TLC-chromatogram ของใบขี้อ้นดอนจากแหล่งต่างๆ.

Adsorbent : TLC Aluminium sheets Silica gel 60 F_{254}

Solvent system : Chloroform + Diethyl ether, 4 + 1

Detection : 10% H_2SO_4 in Ethanol spraying reagent

: A= white light, B=UV 366

Track 1 Rotenone

Track 2 Oleanolic acid

Track 3 β-Sitosterol

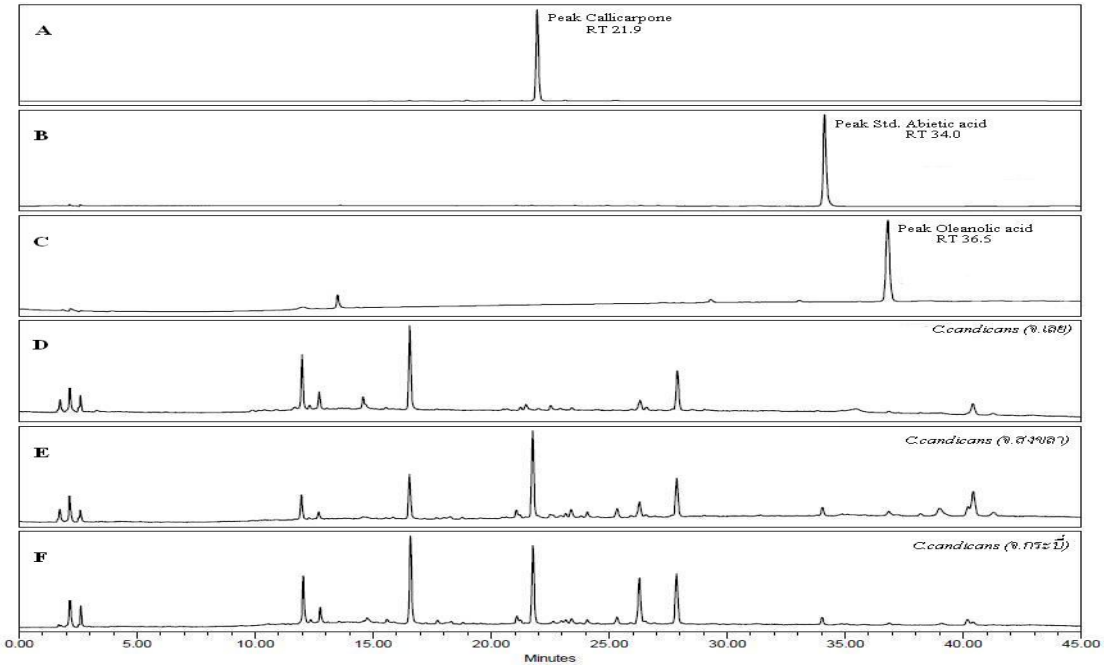
Track 4 Std Abietic acid

Track 5 *C.candicans* (จ.สงขลา)

Track 6 *C.candicans* (จ.กระบี่)

Track 7 *C.candicans* (จ.สตูล)

Track 8 *C.candicans* (จ.เลย)



รูปที่ 8. HPLC- chromatogram ของสารที่แยก สารมาตรฐาน เปรียบเทียบกับใบขี้อ้นดอน จากแหล่งต่างๆ ที่พบในประเทศไทย (A) สารคาลิคาโปน (B) Abietic acid (C) สารโอลิโนลิกแอซิด และใบขี้อ้นดอนจากสงขลา (D) กระบี่ (E) และเลย (F).

3.2 การเตรียมสารสกัดมาตรฐาน และการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์

การวิเคราะห์ปริมาณสาร β-asarone ในสารสกัดว่านน้ำ ใช้วิธี GC-MS ด้วยเทคนิค Headspace-Solid Phase Microextraction (HS-SPME) โดยใช้ thymol เป็น internal standard ค่าตัวเลข การเปรียบเทียบอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีกของสาร β-asarone ต่อพื้นที่ใต้พีกของสาร thymol (m factor) ดังแสดงในตารางที่ 3.

การวิเคราะห์สารโรติโนนโดย HPLC ดังแสดงในรูปที่ 9 โดยกราฟมาตรฐาน มีค่าสัมประสิทธิ์สัมพันธ์ (correlation coefficient, r^2) เท่ากับ 0.9999 และมีความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้นของสารโรติโนนที่ช่วง 100-2000 ppm ดังแสดงในรูปที่ 9A, โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานโรติโนน ดังแสดงในรูปที่ 9B และโครมาโทแกรมของสารสกัดเมล็ดมันแกว ดังแสดงในรูปที่ 9C.

ผลการสกัดและการวิเคราะห์สารสำคัญในตัวอย่างสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4 สารสกัดว่านน้ำมีลักษณะเป็นของเหลวเนื้อเดียวกัน, ส่วนของมันแกวจะมีสารคล้ายเรซินแยกออกมาจากของเหลว ในขณะที่สารสกัดจากขี้อ้นดอนเป็นของแข็งกึ่งเหลว เนื่องจากยังไม่ได้สารออกฤทธิ์

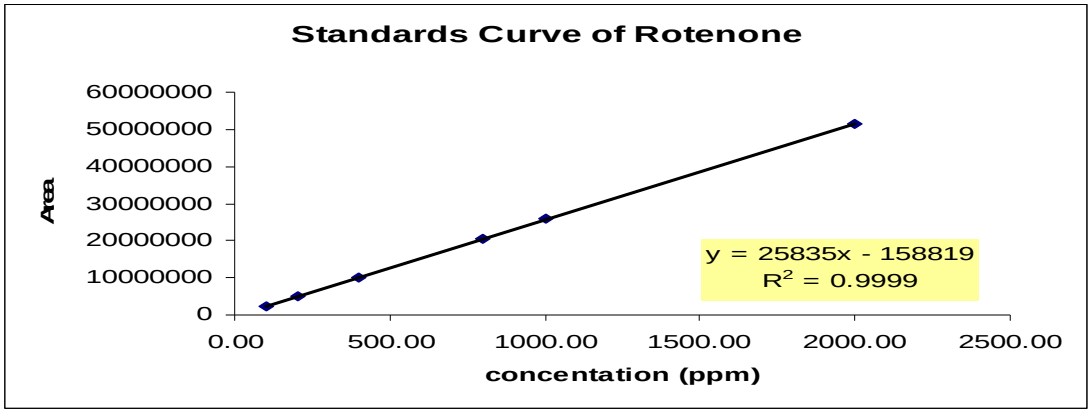
คาลิคาโปนเพียงพอ ซึ่งต้องใช้ราว 50 มิลลิกรัม เพื่อศึกษาวิธีวิเคราะห์พร้อมทดสอบความถูกต้องของวิธี (method validation) ทำให้ยังไม่ได้วิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ ซึ่งจะทำเพิ่มเติมในภายหลัง.

ตารางที่ 3. ผลการวิเคราะห์ค่า m-factor เมื่อใช้ β-asarone เป็นสารมาตรฐาน และ thymol เป็น internal standard

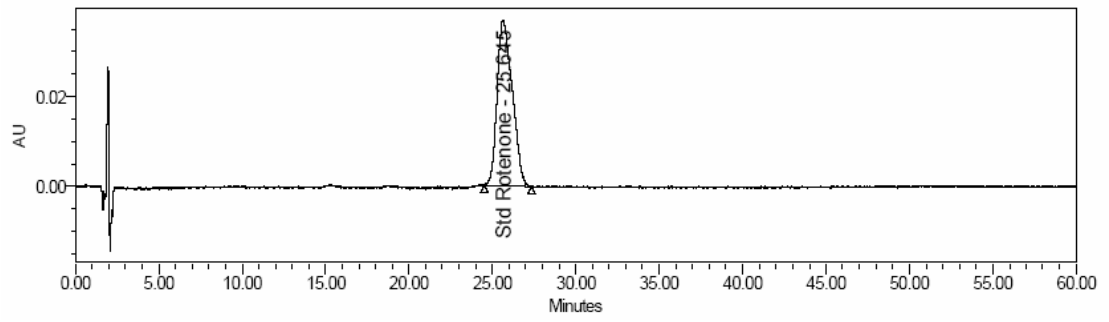
น้ำหนัก Internal standard (thymol) (มิลลิกรัม)	ปริมาณ β-asarone (มิลลิกรัม)	พื้นที่ใต้พีกของ thymol	พื้นที่ใต้พีก β-asarone	m-factor
84.4	112	174153018	33194784	0.1436
84.4	224	134930240	51512524	0.1438
84.4	448	100403982	76032515	0.1427
	เฉลี่ย			0.1434

ตารางที่ 4. ผลการเตรียมสารสกัด และการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์

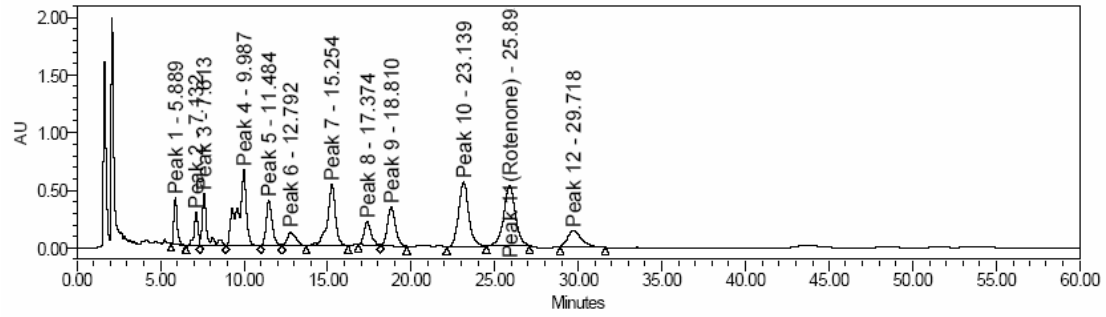
ตัวอย่าง	วิธีการสกัด		ผลผลิตปริมาณสารออกฤทธิ์ และลักษณะทางกายภาพของสารสกัด		
	ตัวทำละลาย	อัตราส่วนผงยา/ตัวทำละลาย	ผลผลิต	ร้อยละสารออกฤทธิ์	ลักษณะทางกายภาพ
ใบขี้อ้นดอน	เอทานอล ร้อยละ 95	1:5, 2 ครั้ง	23.33	ไม่ได้วิเคราะห์	ชันยางสีเขียวเข้ม กลิ่นเฉพาะตัว
เหง้าว่านน้ำ	เอทานอล ร้อยละ 95	1:5, 2 ครั้ง	8.36	28.57 (β-asarone)	ของเหลวข้น สีเขียวเข้ม กลิ่นเฉพาะ
เมล็ดมันแกว	เอทานอล ร้อยละ 95	1:5, 2 ครั้ง	11.70	0.59 (rotenone)	ของเหลวข้น น้ำตาลแดง ชันยางแยกเป็นตะกอน กลิ่นเฉพาะ



A



B



C

รูปที่ 9. กราฟมาตรฐานของสารโรติโนน (A) โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานโรติโนน (B) โครมาโทแกรมของสารสกัดเมล็ดมันแกว (C).

3.3 การประเมินความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัด (Acute oral LD_{50})

3.3.1 ขี้อ้นดอน

สารสกัดขี้อ้นดอน ได้ค่าขนาดของสารสกัดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง มีค่ามากกว่า 5,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ถือว่าอยู่ในขั้นปลอดภัยสูง ตัวเลขแสดงอัตราการตายและการตรวจสอบ อวัยวะสำคัญภายใน ดังแสดงในตารางที่ 5 ค่าน้ำหนักของสัตว์ทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 6.

ตารางที่ 5. อัตราการตายของหนูทดลอง และผลการตรวจชันสูตรอวัยวะภายในของหนูทดลองในกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดสอบเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ

ตัวอย่างทดสอบ	[a]อัตราการตาย			ผลการชันสูตรอวัยวะภายใน (gross pathology)	
	เพศผู้	เพศเมีย	รวมสองเพศ	เพศผู้	เพศเมีย
กลุ่มควบคุม ร้อยละ 3 Tragacanth	0/5	0/5	0/10	ปกติ	ปกติ
กลุ่มทดสอบ สารสกัดขี้อ้นดอน 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	0/5	0/5	0/10	ปกติ	ปกติ
กลุ่มทดสอบ สารสกัดขี้อ้นดอน 5,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	0/5	0/5	0/10	ปกติ	ปกติ

หมายเหตุ: a จำนวนสัตว์ทดลองที่ตาย/จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ทดสอบ

ตารางที่ 6. น้ำหนักตัวของหนูทดลองบันทึกในระหว่างการทดสอบ และสิ้นสุดการทดสอบ พร้อมกับอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนูทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ

ตัวอย่างทดสอบ	น้ำหนักตัวเริ่มต้น (กรัม)		ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัว (Mean ± SEM กรัม)			
	[a]วันที่ 1		วันที่ 8		วันที่ 15	
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย
กลุ่มควบคุม ร้อยละ 3 Tragacanth	244.4 ± 7.2	191.6 ± 4.03	296.6±3.77 [52.20±2.72]	216.8±22.81 [25.20±0.58]	328.2±28.78 [83.80 ±3.59]	229.8±21.61 [38.20±1.56]
กลุ่มทดสอบ “สารสกัดขี้อ้นดอน” 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	242.2±6.43	205.8±13.70	291±4.52 [48.80±2.95]	225.6±7.49 [19.80±2.70]	321.4±14.35 [79.20±7.28]	230.6±5.67 [*24.80±3.62]
กลุ่มทดสอบ “สารสกัดขี้อ้นดอน” 5,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	249.6±9.35	211.4±21.62	301±24.26 [51.40±2.76]	227±24.12 *15.60 ±1.50]	327.6±22.46 [78.00±5.31]	235.2±9.48 [*23.80 ±3.59]

หมายเหตุ: a น้ำหนักตัวเริ่มต้นของหนูทดลองภายหลังอดอาหาร 16 ชั่วโมง ก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ
* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95
ตัวเลขในวงเล็บ = ค่าน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นของหนูทดลองเมื่อเทียบกับวันที่ 1

3.3.2 ว่านน้ำ

สารสกัดว่านน้ำ ได้ค่าขนาดของสารสกัดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง มีค่ามากกว่า 5,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ถือว่าอยู่ในขั้นปลอดภัยสูง ตัวเลขแสดงอัตราการตายและการตรวจสอบอวัยวะสำคัญภายใน ดังแสดงในตารางที่ 7 ค่าน้ำหนักของสัตว์ทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 8.

ตารางที่ 7. อัตราการตายของหนูทดลอง และผลการตรวจชันสูตรอวัยวะภายในของหนูทดลองในกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดสอบเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ

ตัวอย่างทดสอบ	[a]อัตราการตาย			ผลการชันสูตรอวัยวะภายใน (gross pathology)	
	เพศผู้	เพศเมีย	รวมสองเพศ	เพศผู้	เพศเมีย
กลุ่มควบคุม ร้อยละ 3 Tragacanth	0/5	0/5	0/10	ปกติ	ปกติ
กลุ่มทดสอบ สารสกัดว่านน้ำ 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	0/5	0/5	0/10	ปกติ	ปกติ
กลุ่มทดสอบ สารสกัดว่านน้ำ 5,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	0/5	0/5	0/10	ปกติ	ปกติ

หมายเหตุ: a จำนวนสัตว์ทดลองที่ตาย/จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ทดสอบ

a น้ำหนักตัวเริ่มต้นของหนูทดลองภายหลังอดอาหาร 16 ชั่วโมง ก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ

ตารางที่ 8. น้ำหนักตัวของหนูทดลองบันทึกในระหว่างการทดสอบ และเมื่อสิ้นสุดการทดสอบพร้อมกับอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนูทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ

ตัวอย่างทดสอบ	น้ำหนักตัวเริ่มต้น (กรัม)		ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัว (Mean ± SEM กรัม)			
	[a]วันที่ 1		วันที่ 8		วันที่ 15	
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย
กลุ่มควบคุม ร้อยละ 3 Tragacanth	257.4±10.87	199.6±6.28	328±18.15 [70.60 ±11.12]	222±6.41 [22.40±2.65]	325±26.39 [67.60±12.47]	240.6±6.11 [41.00±4.61]
กลุ่มทดสอบ “สารสกัดว่านน้ำ” 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	256.8±6.31	205.8±18.50	308.8±27.35 [52.00 ±4.83]	220.4±27.54 [*14.60±1.63]	346.6±22.39 [89.80 ±9.48]	228.6±6.11 [*22.80 ±3.81]
กลุ่มทดสอบ “สารสกัดว่านน้ำ” 5,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	261.2±10.63	202±30.18	283.8±34.97 [*22.60 ±7.03]	212.6±32.51 [*10.60 ±4.45]	318±21.14 [56.80 ±12.86]	226.8±9.44 [*24.80±4.74]

หมายเหตุ: a น้ำหนักตัวเริ่มต้นของหนูทดลองภายหลังอดอาหาร 16 ชั่วโมง ก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ตัวเลขในวงเล็บ = ค่าน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นของหนูทดลองเมื่อเทียบกับวันที่ 1

3.3.3 สารสกัดเมล็ดมันแกว

สารสกัดเมล็ดมันแกว ได้ค่าขนาดของสารสกัดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง มีค่า 1,239 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ถือว่าอยู่ในขั้นมีพิษ ตัวเลขแสดงอัตราการตายและการตรวจสอบอวัยวะสำคัญภายใน ดังแสดงในตารางที่ 9 ค่าน้ำหนักของสัตว์ทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 10.

ตารางที่ 9. อัตราการตายของหนูทดลอง และผลการตรวจชันสูตรอวัยวะภายในของหนูทดลอง ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดสอบเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ

ตัวอย่างทดสอบ	[a]อัตราการตาย			ผลการชันสูตรอวัยวะภายใน (gross pathology)	
	เพศผู้	เพศเมีย	รวมสองเพศ	เพศผู้	เพศเมีย
กลุ่มควบคุม ร้อยละ 3 Tragacanth	0/5	0/5	0/10	ปกติ	ปกติ
กลุ่มทดสอบ “สารสกัดเมล็ดมันแกว” 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	0/5	0/5	0/10	ปกติ	ปกติ
กลุ่มทดสอบ “สารสกัดเมล็ดมันแกว”1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	2/5	3/5	3/10	NE:ปกติ 2:3	NE:ปกติ 3:2
กลุ่มทดสอบ “สารสกัดเมล็ดมันแกว”2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	2/5	4/5	6/10	NE:ปกติ 2:3	NE:ปกติ 4:1

หมายเหตุ: a จำนวนสัตว์ทดลองที่ตาย/จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ทดสอบ

NE = Not examined ไม่ได้ตรวจผลเนื่องจากหนูทดลองตายภายใน 24-48 ชั่วโมง หลังป้อนตัวอย่างทดสอบ

ตารางที่ 10. น้ำหนักตัวของหนูทดลองบันทึกในระหว่างการทดสอบ และเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ พร้อมกับอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนูทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ

ตัวอย่างทดสอบ	น้ำหนักตัวเริ่มต้น (กรัม)		ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัว (Mean ± SEM กรัม)			
	[a]วันที่ 1		วันที่ 8		วันที่ 15	
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย
กลุ่มควบคุม ร้อยละ 3 Tragacanth	244.4±7.2	191.6±21.03	296.6±27.49 [52.20±2.72]	216.8±27.81 [25.20±0.58]	328.2±25.81 [83.80±3.59]	229.8±4.03 [38.20±1.56]
กลุ่มทดสอบ สารสกัดเมล็ดมันแกว 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	226.6±3.88	184.2±15.94	280.4±19.16 [53.80±2.67]	211.6±19.56 [27.40±1.29]	312.6±18.33 [86.00±4.91]	230.2±5.46 [46.00±4.88]
กลุ่มทดสอบ สารสกัดเมล็ดมันแกว 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	250.4±4.92	207.2±12.80	277.3±4.11 [*28.67±2.19]	206±5.00 [3.50±12.50]	305±3.27 [*56.33±10.17]	237.5±11.50 [35.00±6.00]
กลุ่มทดสอบ สารสกัดเมล็ดมันแกว 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	240±6.90	250±19.17	188.2±27.04 [*14.33±4.06]	295±0 [NC]	148±14.97 [59.33±10.17]	193±0 [NC]

หมายเหตุ: a น้ำหนักตัวเริ่มต้นของหนูทดลองภายหลังอดอาหาร 16 ชั่วโมง ก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ND = Not determined ไม่ได้บันทึกเนื่องจากหนูทดลองตายภายใน 24 - 48 ชั่วโมง หลังป้อนตัวอย่างทดสอบ

NC = Not calculated ไม่ได้คำนวณเนื่องจากหนูทดลองตายภายใน 24 – 48 ชั่วโมง หลังป้อนตัวอย่างทดสอบ

ตัวเลขในวงเล็บ = ค่าน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นของหนูทดลองเมื่อเทียบกับวันที่ 1

3.4 การเตรียมผลิตภัณฑ์

การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดว่านน้ำและมันแกว ได้ทดลองใช้ตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอลผสมกับสารลดแรงตึงผิวประเภทพอลิซอร์เบต (Tween 20) เพื่อช่วยให้ผลิตภัณฑ์ละลายน้ำได้ดี พบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสม ได้แก่ สารสกัด: โพรพิลีนไกลคอล: พอลิซอร์เบต (Tween 20) เท่ากับ 1:2:0.5 ดังแสดงในตารางที่ 11 ทั้งนี้สามารถเตรียมผลิตภัณฑ์สะดวกใช้ให้มีความเข้มข้นของสารสกัดได้ เท่ากับ ร้อยละ 30 น้ำหนักต่อปริมาตร ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ได้ทดลองสูตรที่ใช้เอทานอลกับสารลดแรงตึงผิวประเภทโซเดียมลอเรียลซัลเฟตด้วย แต่ได้ผลไม่ดีเท่าสูตรที่ใส่โพรพิลีนไกลคอลผสมพอลิซอร์เบต ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในรูปที่ 10.

A

Botanical Pesticide

ขนาดบรรจุ : 1 ลิตร

ความเข้มข้นของสารสกัด ร้อยละ 30 น้ำหนัก/ปริมาตร

ปริมาณสารออกฤทธิ์ (สารบีตา-อะซาโรน) : ร้อยละ 14.18 น้ำหนัก/ปริมาตร

B

Botanical Pesticide

ขนาดบรรจุ : 1 ลิตร

ความเข้มข้นของสารสกัด ร้อยละ 30 น้ำหนัก/ปริมาตร

ปริมาณสารออกฤทธิ์ (สารโรติโนน) : ร้อยละ 0.19 น้ำหนัก/ปริมาตร

รูปที่ 10. ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์สะดวกใช้ (A) ว่านน้ำ และ (B) เมล็ดมันแกว.

ตารางที่ 11. ผลการพัฒนาผลิตภัณฑ์สะดวกใช้

สารสกัด	ลักษณะผลิตภัณฑ์และความสามารถในการละลายน้ำที่อัตราส่วน 1:100 ของผลิตภัณฑ์ที่มีอัตราส่วนของสารสกัด :โพรพิลีนไกลคอล:พอลิซอร์เบต สัดส่วนต่างๆ				
	1:2:0	1:2:0.5	1:2:1	1:2:1.5	1:2:2
ว่านน้ำ	ไม่แยกชั้น ละลายน้ำไม่ดี	ไม่แยกชั้น ละลายน้ำได้ดี	ไม่แยกชั้น ละลายน้ำได้ดี	-	-
มันแกว	แยกชั้นชัดเจน ละลายน้ำได้ไม่ดี	แยกชั้นเล็กน้อย ละลายน้ำได้เป็นเนื้อเดียวกัน	เกิดตะกอนชันยางสีส้มละลายน้ำได้ดี	เกิดตะกอนชันยางสีส้มละลายน้ำได้ดี	มีความเป็นเนื้อเดียวกันและละลายน้ำได้ดี

3.5 การทดสอบความคงสภาพของสารสกัดและผลิตภัณฑ์

การทดสอบความคงสภาพ ในที่นี้เลือกสารสกัดว่านน้ำมาศึกษาก่อน เนื่องจากผลการศึกษาฤทธิ์ป้องกันกำจัดแมลง และราโรคพืช พบว่า สารสกัดดังกล่าวมีศักยภาพที่ดี โดยนำสารสกัดและผลิตภัณฑ์ใส่ขวดสีชาที่ฝาปิดสนิท ขนาดความจุราว 5 กรัม นำไปเก็บไว้ที่ 3 สภาวะของอุณหภูมิ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง, ในตู้เย็น และตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส ตรวจปริมาณสารบีตา-อาซาโรน ในช่วงเวลาต่างๆ เป็นระยะเวลา 24 เดือน สำหรับตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง ผลจากการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 12 ที่ช่วง 30, 90, 180, 270 และ 360 วัน พบว่า สารสกัดที่เก็บในที่ร้อน (ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส) มีปริมาณสารเพิ่มขึ้นทุกช่วงเวลา อาจเนื่องจากสารมีการกระจายตัวได้ดี ในสภาพที่ค่อนข้างร้อน ทำให้การสุ่มตัวอย่างทดสอบซึ่งมีปริมาณน้อย (5 มิลลิกรัม) มีความสม่ำเสมอของสารสำคัญ ในขณะที่ตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิห้องหรือตู้เย็นเมื่อเวลาผ่านไปนานๆ จะมีการแยกชั้นของเรซิน ทำให้การสุ่มตัวอย่างไม่เป็นตัวแทนที่ดีได้. อย่างไรก็ตาม ในส่วนของผลิตภัณฑ์ไม่เกิดปัญหาดังกล่าว โดยสรุปพบว่า สารสกัดและผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องมีแนวโน้มของความคงตัวที่ดี ซึ่ง ถ้าได้ศึกษาต่อไปจนครบระยะวาลา 24 เดือน จะสามารถยืนยันผลได้ โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์ที่จะนำสู่เชิงพาณิชย์ ควรต้องมีความคงสภาพนานเพียงพอ คือ มีความคงสภาพไม่น้อยกว่า 2 ปี.

ตารางที่ 12. ผลการทดสอบความคงสภาพของสารสกัดว่านน้ำและผลิตภัณฑ์

วันที่	% β-asarone					
	สารสกัด			ผลิตภัณฑ์		
	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	45 °ซ.	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	45 °ซ.
0	28.57	28.57	28.57	14.48	14.48	14.48
30	31.07	30.93	42.77	15.86	7.63	10.09
90	46.58	30.51	42.18	21.62	13.33	12.26
180	34.41	32.21	41.46	13.09	13.32	13.15
270	31.88	30.51	40.53	10.68	9.38	9.94
360	40.50	34.76	41.61	15.32	11.99	10.08

4. สรุปผลการทดลอง

นำพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช 3 ชนิด ได้แก่ ใบขี้อ้นดอน, เหง้าว่านน้ำ และเมล็ดมันแกว มาทำการศึกษาทางเคมีในด้านการแยกสารออกฤทธิ์และ/หรือการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ และเตรียมสารสกัดมาตรฐาน พัฒนาผลิตภัณฑ์สะดวกใช้ที่ละลายน้ำได้ดี ประเมินความเป็นพิษของสารสกัด พร้อมทดสอบความคงสภาพของสารสกัดและผลิตภัณฑ์ ได้ผลการศึกษา ดังนี้:

4.1 ใบขี้อ้นดอน

4.1.1 การศึกษาในแง่ของการแยกสารออกฤทธิ์คาลิคาโปน พร้อมยืนยันโครงสร้างทางเคมีโดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี (NMR, MS) เพื่อนำมาใช้เป็นสารเทียบในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ สามารถแยกสารคาลิคาโปน และสารโอลิโนลิกแอซิด ได้ร้อยละ 0.0016, 0.0091 ของผงใบแห้ง ตามลำดับ ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิด สามารถนำมาใช้เป็นสารเทียบในการควบคุมคุณภาพเชิงปริมาณได้ ประโยชน์ที่ได้ คือ องค์ความรู้ในด้านเทคนิคการแยกสาร.

4.1.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารกลุ่มไดและไตรเทอร์พีนส์ โดย TLC, HPLC fingerprint analysis HPLC fingerprint ของขี้อ้นดอน โดยใช้คอลัมน์ RP-18, ตัวทำละลาย ร้อยละ 0.005 trifluoroacetic ใน water ร้อยละ 0.005 trifluoroacetic acetonitrile, gradient ได้พีกของสารคาลิคาโปนที RT 21.9, สารโอลิโนลิกแอซิด ที่ 36.5 ตรวจสอบสารโดยใช้ UV detector ที่ 266 นาโนเมตร มีการแยกจากองค์ประกอบอื่นๆ ได้ดี สภาวะการแยกนี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยใช้สาร 2 ชนิด เป็นสารเทียบได้. นอกจากนี้ยังพบว่า วัตถุดิบจากแหล่งชายทะเลภาคใต้ได้แก่ กระบี่ และสงขลา มีพีกของสารคาลิคาโปนสูงกว่าแหล่งจากเลย ประโยชน์ที่ได้ คือ ข้อมูลแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสม.

4.1.3 สารสกัดหยาบด้วยเอทานอลจากใบขี้อ้นดอนได้ผลผลิต เท่ากับ ร้อยละ 23.33 ขนาดของสารสกัดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่งเมื่อป้อนยาทางปากครั้งเดียว (acute oral LD_{50}) มากกว่า 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว.

4.2 เหง้าว่านน้ำ

4.2.1 การเตรียมสารสกัดมาตรฐานของว่านน้ำ ด้วยตัวทำละลาย ร้อยละ 95 เอทานอล อัตราส่วนของผงยาต่อตัวทำละลาย 1 ต่อ 5 สกัด 2 ครั้ง พร้อมวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ได้ ร้อยละของผลผลิตและปริมาณสารออกฤทธิ์ของสารสกัดว่านน้ำ เท่ากับ 8.36 (ร้อยละ 28.57 β-asarone)

ขนาดของสารสกัดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่งเมื่อป้อนยาทางปากครั้งเดียว (acute oral LD_{50}) มากกว่า 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว.

4.2.2 เตรียมผลิตภัณฑ์พร้อมใช้จากสารสกัดมาตรฐานของว่านน้ำ เตรียมโดยใช้ตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอลและพอลิซอร์เบต พบว่า สัดส่วนที่เหมาะสม คือ สารสกัด: โพรพิลีนไกลคอล: พอลิซอร์เบต 1: 2: 0.5 สามารถเตรียมผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นของสารสกัด เท่ากับ ร้อยละ 30 น้ำหนัก ต่อปริมาตร โดยมีปริมาณสาร β-asarone ร้อยละ 14.18 ผลิตภัณฑ์มีความคงสภาพ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ที่ระยะเวลา 120 วัน เปรียบเทียบกับเก็บไว้ในตู้เย็น ซึ่งมีแนวโน้มในการคงตัวที่ดี อย่างไรตามจะต้องมีการศึกษาต่อให้ครบ ตามเวลาที่วางแผนไว้ คือ 24 เดือน.

4.3 เมล็ดมันแกว

4.3.1 เตรียมสารสกัดมาตรฐานของเมล็ดมันแกวโดยวิธีหมักเย็นพร้อมเพิ่มความสามารถในการสกัดโดยการหมุนเวียนตัวทำละลาย อัตราส่วนของผงยาต่อตัวทำละลาย 1 ต่อ 5 สกัด 2 ครั้ง พร้อมวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ ได้ร้อยละของผลผลิตและปริมาณสารออกฤทธิ์ 11.70 (ร้อยละ 0.59 rotenone, HPLC) การประเมินความเป็นพิษเบื้องต้น ในหนูขาวของสารสกัดมันแกวมีขนาดของสารสกัดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่งเมื่อป้อนยาทางปากครั้งเดียว (acute oral LD_{50}) 1,239 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว.

4.3.2 เตรียมผลิตภัณฑ์สะดวกใช้ที่ละลายน้ำได้ดีจากสารสกัดมันแกว โดยใช้ตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอลผสมพอลิซอร์เบต สามารถเตรียมได้โดยมีความเข้มข้นของสารสกัดเป็นร้อยละ 30 น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์มันแกวเท่ากับร้อยละ 0.19 ซึ่งจะได้นำมาศึกษาความคงสภาพต่อไป.

5. สรุปผลทางด้านตลาดและผลกระทบโครงการ

5.1 ข้อมูลจากสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร

ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าเคมีเกษตรของประเทศไทยมีอัตราการเพิ่มมาโดยตลอดในช่วง 10 ปี ที่ผ่านมา (พ.ศ. 2545-2555) ซึ่งสารกำจัดแมลง (Insecticide) และสารป้องกันและกำจัดโรคพืช (fungicide) ถือเป็นกลุ่มเคมีเกษตรที่สำคัญ.

พ.ศ. 2545 มีมูลค่านำเข้าเคมีเกษตรทั้งหมดเท่ากับ 9,116 ล้านบาท เป็นสารกำจัดแมลง 2931 ล้านบาท (ร้อยละ 32.15), สารป้องกันและกำจัดโรคพืช 1,444 ล้านบาท (ร้อยละ 15.84).

พ.ศ. 2554 มีมูลค่านำเข้าเคมีเกษตรทั้งหมดเท่ากับ 22,044 ล้านบาท (เพิ่มเป็น 2.42 เท่า) เป็นสารกำจัดแมลง 5,938 ล้านบาท (ร้อยละ 26.94), สารป้องกันและกำจัดโรคพืช 3,875 ล้านบาท (ร้อยละ 17.58).

พ.ศ. 2555 (ช่วง ม.ค.-ก.ย.) มีมูลค่านำเข้าเคมีเกษตรทั้งหมดเท่ากับ 16,294 ล้านบาท เป็นสารกำจัดแมลง 2,863 ล้านบาท (ร้อยละ 17.57), สารป้องกันและกำจัดโรคพืช 2,295 ล้านบาท (ร้อยละ 14.08) เฉพาะในปี พ.ศ. 2554 มูลค่าการนำเข้าสารกำจัดแมลง และสารป้องกันกำจัดโรคพืชที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ รวมกันมีมูลค่าใกล้เคียงหมื่นล้านบาท (9,813) ถ้าสารจากพืชสมุนไพรสามารถทดแทนได้บ้าง แม้เพียง ร้อยละ 0.1 ก็สามารถลดมูลค่าการนำเข้าได้นับเป็น 10 ล้านบาท ซึ่งนอกจากจะช่วยทางด้านลดการนำเข้าแล้ว ยังช่วยเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ ในแง่ปลอดสารพิษและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม.

5.2 ศักยภาพในกลุ่มอุตสาหกรรม หรือชุมชนใด

ผลิตภัณฑ์จากโครงการนี้ ได้แก่ สารสกัดมาตรฐานสำหรับป้องกันกำจัดศัตรูพืชจากเหง้าว่านน้ำ และเมล็ดมันแกว มีศักยภาพในกลุ่มผู้ประกอบการผลิตสารสกัดจากพืชสมุนไพร สำหรับกำจัดศัตรูพืช กลุ่มผู้ประกอบการด้านเกษตรอินทรีย์.

5.3 ใครเป็นผู้ใช้ประโยชน์

ผู้ใช้ประโยชน์ผลงาน ได้แก่:

- ผู้ประกอบการผลิตสารสกัดจากพืชสมุนไพร.
- หน่วยงานรัฐ หรือเอกชน ที่รับผิดชอบการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในสมุนไพร และผลิตภัณฑ์ขี้อ้นดอน, ว่านน้ำ และเมล็ดมันแกว.

5.4 มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างไร

แนวทางการนำไปใช้ประโยชน์มี ดังนี้:

- นำเทคนิคการสกัดสารสกัดมาตรฐานไปปรับใช้ในการผลิตเชิงพาณิชย์.
- เทคนิคการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ ไปใช้ควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์และวัตถุดิบสมุนไพร.

5.5 หน่วยงานที่จะนำผลงานวิจัยไปต่อยอดให้เกิดมูลค่าเพิ่มหรือไปใช้ได้จริง

หน่วยงานที่สามารถนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ ได้แก่:

- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กระทรวงอุตสาหกรรม.
- กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.
- กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.

6. เอกสารอ้างอิง

จดหมายข่าวผลิใบ. 2549. สารสกัดจากพืชควบคุมศัตรูพืช. กรุงเทพฯ: ส่วนพัฒนาเทคโนโลยีและการเผยแพร่และฝึกอบรม สำนักพัฒนาการถ่ายทอดเทคโนโลยี.

จำเริญมา, เกรียงไกร. 2546. การป้องกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยสารสกัดว่านน้ำ (*Acorus calamus* L.). รายงานผลการปฏิบัติงานวิจัยตามรายกิจกรรมประจำปี 2546. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัย-เกษตรศาสตร์.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร 2550. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.one.go.th, [เข้าถึงเมื่อ 10 มกราคม 255].

Abid M, *et al.*, 2006. Pharmacological evaluation of *Pachyrhizus erosus* seeds for central nervous system depressant activity. *Indian J. Physio Pharmacol*, **50**(2), pp. 143-51.

Auletta, C.S., 1995. Acute, Subchronic and Chronic Toxicity. *In*: Michael J. Derelanko and Mannfred A Holinger,eds, CRC Handbook of Toxicology. Florida: CRC Press, pp. 51-104.

Bian Q, *et al.*, 2012. Oleanolic acid exerts an osteoprotective effect in ovariectomy-induced osteoporotic rats and stimulates the osteoblastic differentiation of bone mesenchymal stem cells in vitro. *Menopause*, **19**(2), pp. 225-33.

Charikapakorn. 2000. Control of Chilli Anthracnose by Different Biofungicides. ACR Training Report The 18th REGIONAL TRANING COURSE 1999.

Donald, J. E., 1997. The Basic of Toxicity Testing. 2nd ed., New York: CRC Press.

Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., 1949. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **96**, pp. 99-113.

Gao, D., *et al.*, 2009. Antidiabetic and antioxidant effects of oleanolic acid from *Ligustrum lucidum* Ait in alloxan-induced diabetic rats. *Phytother Res*., **23**(9), pp. 1257-62.

Jariyanusorn, J., 2002. Formulation development of extract from galangal (*Alpinia galangal* Sw.), sweetflag (*Acorus calamus* L.) and *Rhinacanthus nasutus* Kurz.] for controlling anthracnose posthar rest disease of mango. Thesis (PhD) Chiang Mai University. pp. 1-5.

Kawazu, K., Inaba, M. and Mitsui, T., 1967. Fish-killing components of *Callicarpa candicans*. Part I Isolation of callicarpone and its toxicity to fish. *Agric. Biol. Chem.*, **31**, pp. 494-97.

Kawazu, K., Inaba, M. and Mitsui, T., 1967. Fish-killing components of *Callicarpa candicans*. Part II Structure of callicarpone. *Agric. Biol. Chem*., **31**, pp. 498-06.

Mungkornasawakul, P., *et al.*, 2002. Inhibitory Effect of *Acorus calamus* L. Extract on Some Plant Pathogenic Molds. *Acta Hort*. **576**.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 2001. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Volume 2, Section 4: Health Effects. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Test Guideline No. 423. Paris : OECD.

Park, C., *et al.*, 2002. Insecticidal activity of asarones identified in Acorus gramineus rhizome against three coleopteran stored-product insects. *J. of Stored Products Research*, **39**(3), pp. 333-342.

Phrutivorapongkul, A., *et al*., 2002. Studies on the constituent of seeds of *Pachyrrhizus erosus* and their anti-herpes simplex virus (HSV) activities. *Chem. Pharm. Bull*, **50**(4), pp. 534-7.

Sawasdee, P., *et al.*, 2005. Thai medicinal plant extracts with anti-phytophytopathogenic fungal activity. 31th Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology.

Seebacher Werner *et al.* 2003. Spectral Assignaments and Reference Data. *Magn. Reson. Chem*., **41**, pp. 636-638.

Song, X., *et al.*, 2004. Purification characterization and preliminary crystallographic studies of a novel plant defensin from *Pachyrrhizus erosus* seeds. *Acta Crystallogr D Biol mCrstallogr*, **60**(6), pp. 1121-4.

van Valkenburg, J.L.C.H. and Bunyapraphatsara, N., 2002. Plant Resource of South–East Asia No. 12(2), Medicinal and poisonous plants 2. Leiden: Baukhuys Publishers.

Wang, X., *et al.*, 2013. Oleanolic acid improves hepatic insulin resistance via antioxidant, hypolipidemic and anti-inflammatory effects. *Mol Cell Endocrinol, 5*, **376**(1-2), pp. 70-80.

ภาคผนวก ก

ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืช ปี พ.ศ. 2551-2555

หน่วย : ปริมาณ : ตัน
มูลค่า : ล้านบาท

ปี	สารเคมี																สารชีวภาพ		รวมทั้งหมด		
	สารกำจัดวัชพืช (Herbicide)			สารกำจัดแมลง (Insecticide)			สารป้องกันและกำจัดโรคพืช (Fungicide)			อื่นๆ			รวม			(Fungicide)				
	ปริมาณ	มูลค่า	สารสำคัญ	ปริมาณ	มูลค่า	สารสำคัญ	ปริมาณ	มูลค่า	สารสำคัญ	ปริมาณ	มูลค่า	สารสำคัญ	ปริมาณ	มูลค่า	สารสำคัญ	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	สารสำคัญ
2551	68,825	11,487	44,063	25,332	4,577	9,471	11,255	2,537	7,098	4,497	580	2,238	109,908	19,182	62,870	62	12	109,969	19,194	62,870
2552	97,957	9,338	53,615	24,680	3,972	8,112	10,367	2,968	4,890	4,590	537	2,151	137,594	16,816	68,769	145	21	137,739	16,837	68,769
2553	80,278	8,845	51,903	23,417	4,670	9,995	9,671	3,860	5,972	4,332	550	1,999	117,698	17,924	69,868	117	32	117,816	17,957	69,868
2554	112,177	11,480	67,608	34,672	5,938	10,671	12,179	3,875	6,980	5,355	751	2,360	164,383	22,044	87,619	156	26	164,539	22,070	87,619
2555	106,860	11,294	60,232	16,797	3,686	4,065	6,972	3,883	4,421	3,748	494	1,438	134,377	19,357	70,156	103	21	134,480	19,379	70,156

หมายเหตุ: * ได้แก่ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช สารรมควันพิษ สารกำจัดหอยและหอยทาก สารกำจัดไร สารกำจัดหนูและสารกำจัดไส้เดือนฝอย

ที่มา: กรมวิชาการเกษตร, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร

ภาคผนวก ข

ผลงานเผยแพร่

ผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการในประเทศ

“PHYTOCHEMICAL STUDY ON *CALLICARPA CANDICANS* LEAVES” Siripen Jarikasem, Sarinthip Muensaen and Pongtip Sithisarn ในการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยทางเภสัช-ศาสตร์ 2553 ครั้งที่ 27 วันที่ 3 ธันวาคม 2553 คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการนานาชาติ

“DPPH SCAVENGING ACTIVITY AND TOXICITY TO BRINE SHRIMP OF *CALLICARPA CANDICANS”* Sarinthip Muensaen, Siripen Jarikasem, Pongtip Sithisarn, Nongluck Ruangwises, Sawanya Buranapalin and Sayan Tanpanich ในการประชุม NRCT-JSPS Joint Seminer ครั้งที่ 9 วันที่ 8-9 ธันวาคม 2553 กรุงเทพมหานคร.

“ROTENONE CONTENT IN YAM BEAN SEEDS (*PACHYRHIZUS EROSUS*) IN THAILAND” Siripen Jarikasem, Sarinthip Muensaen, Sayan Tanpanich and Prayut Kavilavas ในการประชุม NRCT-JSPS Joint Seminer ครั้งที่ 9 วันที่ 8-9 ธันวาคม 2553 กรุงเทพมหานคร.

“Chemical constituents from the leaves of *Callicarpa candicans”* Sarinthip Muensaen, Nongluck Ruangwises, Sawanya Buranapalin, Pongtip Sithisarn, Sayan Tanpanich and Siripen Jarikasem ในงานประชุมวิชาการ International Congress on Natural Product ครั้งที่ 1 วันที่ 17-18 ตุลาคม 2554 พังงา.

“STUDIES ON TERPENOID FINGERPRINTINGS OF SELECTED CALLICARPA SPECIES BY HPLC-DAD AND HPLC-ESI-MS” S. Muensaen, S. Jarikasem, S. Tanpanich, P. Sithisarn, S. Buranapalin and N. Ruangwises ในงานประชุม PharmaIndochina ครั้งที่ 7 วันที่ 14-16 ธันวาคม 2554 กรุงเทพมหานคร.