รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด

.....

1. ชุดโครงการวิจัย -

2. โครงการวิจัย วิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติจากพืช

3. กิจกรรมที่ 1 วิจัยผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืชจากน้อยหน่า ระยะเวลาดำเนินการ 2559-2561 (3ปี)

ชื่อการทดลอง การทดลองที่ 1.2

(ภาษาไทย) วิจัยหากลุ่มสารสำคัญในสารสกัดน้อยหน่า ที่มีฤทธิ์ในการควบคุมหนอนใยผัก

(ภาษาอังกฤษ) Study on active substance group in *Annona squamosa* L.extract effecting on *Plutella xylostella* L. control

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	ภัควรินทร์ ศานติธีรโรจน์	สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	นางพรรณีกา อัตตนนท์	สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาวณัฐพร ฉันทศักดา	สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

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

คำหลัก : สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์, เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี, น้อยหน่า หนอนใยผัก

Abstract

Research of *Annona squamosa* L. extraction was conducted for finding the substance that are effective to *Plutella xylostella* L. by extraction the semi-purified substance from leaves and seeds of *Annona squamosa* L. with hexane, chloroform, methanol and water. It was found that the most active ingredients are semi-purified substances, which are yellow oil and brown viscous substance from seed. The effective yield on the death of *Plutella xylostella* L. were 92.3 and 94.8% respectively. Another semi-puirified substance is green oil from leaves. Phytochemical compounds group testing with different testing reagent was tested. It was found that the main substance of both oil from the leaves and seeds of *Annona squamosa* L. were terpenoids and brown viscous substance was alkaloids. These substances were detected by HPTLC at wavelength 215 nm, mobile phase toluene/methanol/ethyl acetate/acetic acid (10/3/10/0.5), developing time 10 minutes. Then, anisaldehyde sulfuric acid and dragendroff 's reagent were sprayed to detect terpenoids and alkaloids. The dominant band of terpenoids is at Rf 0.81 in *Annona squamosa* L. oil and alkaloids at Rf 0.50 in brown viscous substance. Then the leaves of 3 species *Annona squamosa* L. were identified the HPTLC fingerprint. Which showed that testing method was possibility to use for controlling raw material and *Annona squamosa* L. product development in the future.

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

6. **คำนำ**

โครงการวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติในพืช เป็นโครงการที่ขานรับนโยบายของรัฐบาล เรื่อง วางกรอบแนวทางการปฏิรูปภาคเกษตร 7 ส่วน ส่งเสริมการลดต้นทุนการผลิต พร้อมพัฒนาโครงสร้างพื้นฐานทางการเกษตรเพื่อให้ชาวนามีชีวิตที่ดีขึ้น โดยการลดการใช้สารเคมี ซึ่งโครงการนี้สนับสนุนการลดการใช้สารเคมีในการผลิตพืชอาหารปลอดภัย เป็นโครงการวิจัยเพื่อหาสารธรรมชาติเพื่อลดหรือทดแทนสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช อีกทั้งเป็นแนวทางที่รวมถึงการใช้ปัจจัยการผลิตที่ไม่เป็นอันตรายต่อสุขรูปและสิ่งแวดล้อมคือ การผลิตสารธรรมชาติ โดยการใช้สารสกัดจากพืชเพื่อทดแทนสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นทางเลือกในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ซึ่งจะทำให้ผลผลิตทางการเกษตรมีคุณรูป ปลอดภัยต่อการบริโภคและสิ่งแวดล้อมและเป็นการสนับสนุนให้เกษตรกรใช้เป็นทางเลือกที่ดีและปลอดภัย ซึ่งเป็นไปตามยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 11 (พ.ศ.2555-2559) ยุทธศาสตร์ที่ 3 ความเข้มแข็งภาคเกษตร ความมั่นคงของอาหารและพลังงาน ในหัวข้อการพัฒนาทรัพยากรธรรมชาติที่เป็นฐานการผลิตภาคเกษตรให้เข้มแข็งและยั่งยืน และ สอดคล้องกับนโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ (พ.ศ.2555-2559) ยุทธศาสตร์ที่ 2 การสร้างศักยรูปและความสามารถเพื่อพัฒนาทางเศรษฐกิจ กลยุทธการวิจัยที่ 1 สร้างมูลค่าผลผลิตทางการเกษตร และพัฒนาศักยรูปในการแข่งขันและพึ่งพาตนเองของสินค้าเกษตร แผนงานวิจัยที่ 1.6 การวิจัยเกี่ยวกับการผลิตอาหารปลอดภัย

ในประเด็นการบริหารสิ่งแวดล้อมและการพัฒนาคุณค่าของทรัพยากรธรรมชาติ การใช้ประโยชน์ทรัพยากรธรรมชาติอย่างเหมาะสมและยั่งยืน และการเชื่อมต่อภูมิปัญญาท้องถิ่นกับองค์ความรู้ใหม่ให้เกิดประโยชน์เชิงพาณิชย์และสาธารณะ นอกจากนั้นจากผลการประชุมสุดยอดอาเซียน-ญี่ปุ่น สมัยพิเศษ ระหว่างวันที่ 13-15 ธ.ค.2556 ได้มีถ้อยแถลงวิสัยทัศน์ว่าด้วยมิตรรูปและความร่วมมืออาเซียน-ญี่ปุ่น มีประเด็นที่เป็นหุ้นส่วนเพื่อความมั่งคั่งส่งเสริมความร่วมมือในด้านความปลอดภัยทางอาหาร

จากสรูปปัญหาของการใช้สารเคมีทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขรูปของผู้บริโภคและการตกค้างของสารพิษในสิ่งแวดล้อม ส่งผลกระทบต่อภาคการส่งออกมากขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นมาแล้วในอดีต กำลังเกิดอยู่ในขณะนี้ และคาดว่าจะเกิดต่อไปในอนาคต จึงเป็นปัญหาเร่งด่วน ที่มีความจำเป็นต้องวิจัยหาสารธรรมชาติจากพืชเพื่อทดแทนหรือลดการใช้สารเคมี เพราะถ้าไม่ทำวิจัยปัญหานี้ก็จะขยายตัวและเกิดความรุนแรงมากยิ่งขึ้น ซึ่งการไม่ได้แก้ไขให้เป็นระบบอย่างจริงจัง ทำให้ประเทศไทยสูญเสียงบประมาณทางสาธารณสุข สถิติการเจ็บป่วยจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืช มีการประเมินว่าอาจมีจำนวนผู้ป่วยที่แท้จริงมากถึง 200,000-400,000 คนต่อปี และมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับปริมาณการนำเข้าสารเคมีในประเทศ นอกจากนี้ยังกระทบต่อเศรษฐกิจด้านการลงทุนและส่งออก ซึ่งปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยการใช้ความหลากหลายทางชีวรูปของพืชในประเทศ

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

น้อยหน่า เป็นพืชที่มีแนวโน้มในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช จากการศึกษาค้นคว้าจากเอกสารงานวิจัยต่างๆ พบว่ามีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ควบคุมและกำจัดแมลงต่างๆได้ ข้อมูลส่วนใหญ่ของงานวิจัยน้อยหน่า จะเป็นการศึกษาทางด้านประสิทธิรูปและสารสำคัญ มีส่วนน้อยที่ทำการศึกษาและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป จึงได้นำมาทำการวิจัยและพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อทดแทนหรือลดการใช้สารเคมี นอกจากนี้

ยังให้ความสำคัญในการศึกษาเอกลักษณ์ทางโครมาโทกราฟีของสารสำคัญในพืชต่างๆ เพื่อการควบคุมคุณรูปของผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ

โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยที่สนับสนุนนโยบายของรัฐบาลในการลดการใช้ สารเคมีการเกษตร และส่งเสริมให้มีการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังส่งเสริมการใช้พืชท้องถิ่นของไทยซึ่งมีจำนวนมากและหลากหลายมาทำให้เป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชท้องถิ่นของไทย และสามารถแข่งขันทางด้านพัฒนาวิจัยสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมกับประเทศในอาเซียนสำหรับการเข้าสู่เออีซี (ASEAN Economic Community : AEC)

การนำพืชมาใช้เป็นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเข้าใจถึงคุณรูปทางเคมีของส่วนต่างๆของพืช เช่น ต้องทราบว่าสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในพืชนั้นเป็นประเภทใด และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างไร จึงจำเป็นต้องศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสม ซึ่งขึ้นอยู่กับพืชและประเภทของสารออกฤทธิ์ในพืชนั้นๆ และใช้สารเหล่านี้เป็นตัวบ่งชี้ในการวิเคราะห์คุณรูปของผลิตภัณฑ์ที่ทำจากพืชชนิดนั้น ๆ การศึกษาสารสำคัญในพืชและการทดสอบประสิทธิรูปสารสำคัญจากพืชเพื่อใช้ในการควบคุมศัตรูพืชเป็นสิ่งสำคัญในการเป็นแนวทางการวิจัยสูตรและผลิตภัณฑ์สารสกัดจากพืชสำเร็จรูปพร้อมใช้ที่มีคุณรูป

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

สารสกัดเมทานอลจากใบน้อยหน่ามีความเป็นพิษต่อเพลี้ยอ่อนถั่ว โดยมีค่า LC50 เท่ากับ 2,089.30 µg/mL (สุดารัตน์ หอมหวล, ยุวดี ชูประภาวรรณ และวิรัตน์ จันทร์ตรี, 2554) จากการทดสอบประสิทธิรูปของสารสกัดต่อเพลี้ยอ่อนพบว่า สารสกัดจากน้อยหน่า ออกฤทธิ์ดีที่สุดต่อเพลี้ยอ่อน จากรายงานวิจัยพบว่าสารสำคัญในใบน้อยหน่าเป็นสารแอลคาลอยด์ แอนโนเนอีน (anonaine) และเรซิ่น (resin) ในเมล็ดมีน้ำมันอยู่ประมาณ 45% น้ำมันเป็นพิษกับด้วงปีกแข็ง เพลี้ยอ่อน แมลงวัน และมวนปีกแข็ง (สมสุข ศรีจักรวาฬ, 2546) กรกช อินทราพิเชฐ, (2554) ได้ศึกษาฤทธิ์ต่อการสัมผัสโดยตรง (direct contact) ต่อหนอนแมลงวันทองโดยการจุ่มหนอน (dipping) ฤทธิ์ของสารผสมระหว่างใบน้อยหน่าและใบแมงลักคา มีค่า LC50 652.80 ± 13.15 ppm และ 683.25 ± 38.08 ppm ตามลำดับ และสารสกัดใบน้อยหน่าด้วยเอทานอลน่าจะเป็นสารเพิ่มฤทธิ์แบบ additive effect ให้แก่สารสกัดใบสะเดาด้วยเอทานอล และฤทธิ์ของสารสกัดต่อการกินของแมลงวันทองตัวเต็มวัย พบว่าสารสกัดใบน้อยหน่าด้วยน้ำมีประสิทธิรูปทำให้แมลงตายได้ ปานกลาง LC50 1,710.91 ± 67.07 ppm ฤทธิ์สารสกัดผสมควบคุมแมลงได้ปานกลางเช่นกัน สารสกัดใบสะเดาผสมใบน้อยหน่าด้วยเอทานอลกำจัดแมลงได้สูงสุด LC50 1,605.87 ± 67.93 ppm จากการศึกษาของ Khalequzzaman & Sultana (2006) ทดสอบสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยตัวทำละลายต่างกับตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของมอดแป้ง (Red flour beetle) 4 สายพันธุ์ คือ Raj, CR 1, FSS II และ CTC-12 พบว่าสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยเมทานอลมีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนมอดแป้งสายพันธุ์ FSS II น้อยที่สุด และสาร

สกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยปิโตรเลียมสปิริท มีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนมอดแป้งสายพันธุ์ Raj สูงที่สุด สำหรับตัวเต็มวัยของมอดแป้ง สารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยปิโตรเลียมสปิริทมีความเป็นพิษกับสายพันธุ์ CTC-12 สูงที่สุด และสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยอะซิโตนมีความเป็นพิษกับสายพันธุ์ CR 1 น้อยที่สุด สารสกัดหยาบของน้อยหน่าสามารถควบคุมตัวอ่อนผีเสื้อ (Leatemia & Isman, 2004) ควบคุม แมลงวันผลไม้ ชนิด Mediterranean fruit fly (Ceratitis capitata) ในระยะฟักไข่ รบกวนการวางไข่ และ ยืดเวลาพัฒนาการของตัวอ่อน (Epino and Chang, 1993) ควบคุมตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของด้วงแป้งสีแดง Tribolium castaneum Herbst (Khalequzzaman and Sultana, 2006)

ปัจจุบันประเทศไทยมีการศึกษาและพัฒนาสารสกัดจากพืชสมุนไพรหลายชนิด ทั้งในทางเภสัชวิทยาและทางการเกษตร ซึ่งสมุนไพรที่ใช้ในการเกษตรนิยมนำมาทำสารสกัดเพื่อป้องกันและกำจัดศัตรูพืช เช่น สะเดา หางไหล หนอนตายหยาก ว่านน้ำ สาบเสือ น้อยหน่า และแมงลักป่า สมุนไพรแต่ละชนิดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก มีการศึกษาองค์ประกอบของสารเคมีและการออกฤทธ์อย่างกว้างขวาง แต่ยังขาดข้อมูลทางด้านพฤกษเคมีซึ่งจะทำให้ทราบว่าสายพันธุ์ใดที่ให้สารสำคัญปริมาณเท่าใด สำหรับสมุนไพรที่ทราบสารสำคัญเป็นส่วนประกอบหลักจะทำการทดสอบหาปริมาณสารสำคัญของสมุนไพร ถ้าสมุนไพรที่ไม่ทราบสารสำคัญจะใช้การทดสอบหาสารสำคัญโดยรวมแทน เช่น การหากลุ่มสารน้ำมันหอมระเหย หรือการหากลุ่มสารในสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ซึ่งเทคนิคการทดสอบที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือ Chromatographic fingerprints เนื่องจากสามารถทดสอบสารสำคัญได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน

ทีแอลซีสมรรถนะสูง (High Performance Thin Layer Chromatography : HPTLC) คือวิธีการแยกสารบนแผ่นที่เคลือบด้วยตัวดูดซับ เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมสูงในห้องปฏิบัติการควบคุมคุณรูปสมุนไพร ที่สามารถแยกสารได้ดีกว่าวิธีทีแอลซี (Thin Layer Chromatography: TLC) เดิม มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการควบคุมคุณรูปของสมุนไพรและการตรวจเอกลักษณ์ของวัตถุดิบสมุนไพร เนื่องจากเป็นวิธีทดสอบเชิงปริมาณที่สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิดในเวลาเดียวกันจึงประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายและเมื่อนำไปผนวกกับเครื่องวัดความหนาแน่น (Densitometer) ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับสารเพิ่มขึ้นช่วยในการพิสูจน์เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (Fingerprint) และวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ ซึ่งมีเทคนิคต่างๆ ช่วยในการตรวจสารที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเอชพีแอลซี (High Performance Liquid Chromatography:HPLC) ทำให้สามารถควบคุมคุณรูปผลิตภัณฑ์สมุนไพรในทัศนะระดับชาติและระดับสากล อีกทั้งมีความถูกต้อง (accuracy) มีความแม่นยำ (precision) มีสรูปไว (sensitivity) และมีความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำ นอกจากนั้นยังนำไปใช้ในการวิจัยเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญในสมุนไพร การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยว พื้นที่ที่เหมาะสมในการเพาะปลูก วิธีการสกัดและการเก็บรักษาที่ดีได้อีกด้วย

มีงานวิจัยเกี่ยวกับการสร้างเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีในพืชสมุนไพรหลายชนิด ด้วยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง จากการศึกษารากยาสูบ ลักษณะทางภายนอก และคุณสมบัติทางพฤกษเคมี การวิเคราะห์ทางพฤกษเคมี และเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีโดยทีแอลซีสมรรถนะสูง ผลทางพฤกษวิทยาพบสาร ฟลาโวนอยด์ ไฟโตสเตอรอล ไตรเทอร์ปินอยด์ และแทนนิน โดยการสกัดด้วยปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether) เมื่อตรวจค่า Rf ที่ 400nm พบว่าเอกลักษณ์ โครมาโทกราฟี โดยเครื่อง HPTLC-densitometer สามารถใช้บ่งชี้ข้อมูลในการ

พิจารณารับรองสารสกัดหยาบได้ (Sunil, Sayeed & Sharma, 2011) การสร้างเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสาหร่ายสีน้ำตาล (Lobophora variegate) โดยวิธีทีแอลซีสมรรถนะสูง สกัดด้วยสารละลายเมทานอลิค (methanolic) พบ 9 พีค ให้ค่า Rf อยู่ในช่วง 0.18-0.86 ซึ่งสรุปได้ว่าการวิเคราะห์เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี ด้วยทีแอลซีสมรรถนะสูง ของสารสกัดเมทานอลิคสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาหร่าย และเป็นประโยชน์ในการบ่งชี้ทางพฤกษเคมีของสายพันธุ์ต่างๆ ได้ (Thennarasan, Murugesan & Subha, 2014) นอกจากนี้ Manikandan & Doss (2010) ศึกษาส่วนประกอบทางชีวเคมี คุณค่าทางโภชนาการ ตรวจวัดขนาดโมเลกุลของโปรตีน และตรวจทางพฤกษเคมีโดยวิธีทีแอลซีสมรรถนะสูง และ 50% เมทานอลิคในสารสกัดใบต้อยติ่งและจ๊าหอม พบสาร ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ ฟีนอล ซาโปนิน และธาตุอาหารปริมาณเล็กน้อย ได้แก่ ฟีโนลิค คาโรทีนอยด์ จากการศึกษาทีแอลซีสมรรถนะสูงของพืชสมุนไพรกาง (Albizia lebbeck) ตามวิธี Harborne และ Wagner et al โดยใช้เอทิลอะซิเตต : เมทานอล : น้ำ (100:13.5:10) เป็น mobile phase และ สเปรย์ด้วย Dragendorff's reagent ตามด้วย 10%Sodium nitrile reagent และอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ส่องภายใต้แสง uv 366 nm และ แสงธรรมชาติ พบ อัลคาลอยด์ สเตียรอยด์ เทอร์ปินอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน และ ไกลโคไซด์ สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ พบอัลคาลอยด์ 10 ชนิดที่ค่า Rf ระหว่าง 0.02-0.85 สารสกัดเอทิลอะซิเตต พบอัลคาลอยด์ที่แตกต่างกัน 5 ชนิดที่ค่า Rf ระหว่าง 0.09-0.84 และสารสกัดเมทานอลิคพบอัลคาลอยด์ที่ต่างกัน 4 ชนิดที่ค่า Rf ระหว่าง 0.02-0.79 (Nazneen, Wesely & Johnson, 2012) และ (Sachin, Patil, Salunkhe, Dhabale & Burade, 2009) วิเคราะห์สาร quercetin ในบัวเผื่อน (Nymphaea stellata willd) โดยสกัดบัวเผื่อนด้วยไฮโดรคลอริค(hydroalcoholic) และใช้ mobile phase คือ โทลูอีน(toluene) : เอทิลอะซิเตต: กรดฟอร์มิค(formic acid) (5:4:0.2 v/v/v) แล้วตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง densitometer ที่ 380 nm ใช้หลอดดิวเทอเรี่ยม สามารถแยกสาร quercetin ออกจากส่วนประกอบอื่นๆ ในสารสกัดได้ดี ให้ค่าเฉลี่ยของ %recovery เป็น 99.33% ซึ่งการใช้วิธีทีแอลซีสมรรถนะสูง และสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณของ quercetin ได้และเป็นวิธีที่ถูกต้องและรวดเร็ว จากการตรวจสอบทางพฤกษเคมีของว่านหางจระเข้ (A. vera) เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการทำมาตรฐาน โดยการวิเคราะห์ทางพฤกษเคมี การทดสอบการละลายโลหะหนัก ศึกษาการต้านจุลชีพ และหาปริมาณของ gallic acid และ berberine โดยวิธีทีแอลซีสมรรถนะสูง ผลที่ได้คือ การทดสอบทางพฤกษเคมีเผยให้เห็นถึง อัลคาลอยด์ คาร์โบไฮเดรต แทนนิน สเตียรอยด์ ไตรเทอปินอยด์ และ ไกลโคลไซด์ โดยพบฟลาโวนอยด์และฟีนอล 1.9% และ 13.11% ตามลำดับ พบ berberine และ gallic acid 2.74% และ 0.543% ตามลำดับ (Patel,D.K., Patel,K. & Dhanabal, 2012)

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว ได้แก่ volumetric flask, pipette, round bottom flask, cylinder, beaker, vial เป็นต้น
2. สารเคมี ได้แก่ ethyl ether, ethyl acetate, methanol, chloroform, hexane, petroleum ether, น้ำยาพ่น Anisaldehyde-sulfuric acid, น้ำยาพ่นและน้ำยาทดสอบ dragendroff เป็นต้น
3. สารเปรียบเทียบ ได้แก่ capsaicin, indole, nicotine, piperine, piperidine, rotenone, veratrine, berberine, α-pinene, sabinene, limonine เป็นต้น

4. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้า, ultrasonic bath, vacuum pump, เครื่องบดตัวอย่าง, ตู้อบตัวอย่าง, เครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) เป็นต้น
5. เครื่องทีแอลซีสมรรถนะสูง (High performance Thin layer chromatography, HPTLC) และแผ่น HPTLC plate silica gel 60F254 size 20x10cm
6. สิ่งทดลอง ได้แก่ ใบและเมล็ดน้อยหน่าฝ้ายสีเขียว(น้อยหน่าเนื้อ) น้อยหน่าญวนสีเขียว(น้อยหน่าหนัง) และน้อยหน่าเพชรปากช่อง ทดสอบกับหนอนใยผักที่เก็บจากแปลงคะน้าและแปลงกะหล่ำดอก จาก จ. นครราชสีมา และ จ.กาญจนบุรี

วิธีการ

1. เตรียมตัวอย่างใบและเมล็ดน้อยหน่า

นำใบและเมล็ดน้อยหน่าฝ้ายสีเขียว(น้อยหน่าเนื้อ) น้อยหน่าญวนสีเขียว(น้อยหน่าหนัง) และน้อยหน่าเพชรปากช่อง ล้างทำความสะอาด อบให้แห้ง แล้วบดให้ละเอียด

2. ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารจากใบและเมล็ดน้อยหน่า

ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญจากใบและเมล็ดน้อยหน่า โดยนำใบและเมล็ดน้อยหน่าบดให้ละเอียด แล้วสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane, petroleum ether, ethyl ether, chloroform, ethyl acetate, methanol, ethanol, acetone และน้ำ แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPTLC และ โดยใช้ spray reagent anisaldehyde-sulfuric acid เพื่อทดสอบสารกลุ่ม terpenoids และ dragendroff's spray reagent เพื่อทดสอบสารกลุ่ม alkaloids พบว่า ตัวทำละลาย ethyl ether, ethyl acetate, chloroform, methanol, ethanol และ acetone สามารถสกัดสารกลุ่ม alkaloids และ terpenoids ได้ผล HPTLC chromatogram ไม่แตกต่างกัน ดังแสดง ในรูปที่ 1,2 และ HPLC fingerprint ในรูปที่ 3

3. ศึกษาขั้นตอนการสกัดสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักจากใบและเมล็ดน้อยหน่า

3.1 นำเมล็ดน้อยหน่าในอัตรา 5%w/v แช่ด้วย hexane, methanol และ น้ำ แล้วทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดต่อหนอนใยผัก โดยวิธี Leaf dipping method วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ โดยมีสารสกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดเป็นกรรมวิธี จากผลการทดสอบพบว่า hexane และ methanol สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ในการกำจัดหนอนใยผักจากเมล็ดน้อยหน่าได้ จึงสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วย hexane และ methanol แล้วนำไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ได้น้ำมันจากสารสกัด hexane และได้สารสกัดหยาบจากสารสกัด methanol จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์ด้วยวิธีการทางเคมี โดยใช้ hexane, chloroform และ methanol แล้วนำไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดันได้สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ นำสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผัก แล้วนำสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักที่สุดไปทดสอบกลุ่มสารด้วยน้ำยาทดสอบทางพฤกษเคมี และหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี

3.2 นำใบน้อยหน่าในอัตรา 5%w/v แช่ด้วย hexane, methanol และ น้ำ แล้วนำสารสกัดทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผัก โดยวิธี Leaf dipping method วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ โดยมีสารสกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดเป็นกรรมวิธี จากผลการทดสอบพบว่า hexane สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักได้มากกว่า methanol และ น้ำ จึงสกัดใบน้อยหน่าด้วย hexane แล้วนำไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ได้น้ำมันสีเขียว นำไปทดสอบกลุ่มสารด้วยน้ำยาทดสอบทางพฤกษเคมีและหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี

4. ทดสอบชนิดของกลุ่มสารสำคัญทางพฤกษเคมีของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก

นำสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักทดสอบกลุ่มสารทุติยภูมิทางพฤกษเคมี โดย

4.1 ทดสอบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloids) ด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น Dragendroff ‘s reagent, Hager ‘s reagent, Marme ‘s reagent เป็นต้น

4.2 ทดสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น Ferric chloride, Lead acetate เป็นต้น

4.3 ทดสอบสารกลุ่มฟีนอลและแทนนิน (Phenol and Tannin) ด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น Ferric chloride, Lead acetate เป็นต้น

4.4 ทดสอบสารกลุ่มซาโปนิน (Saponin) ด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น Foam test, Olive oil test เป็นต้น

4.5 ทดสอบสารกลุ่มเทอร์ปินอยด์ เสตียรอยด์ และไฟโตสเตอรอล (Terpenoids, Stearoids and Phytosterol) ด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น salkowski ‘s test, Terpenoids test, Steroids test เป็นต้น

4.6 ทดสอบสารกลุ่มโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) ด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น Benedict ‘s reagent, Fehling ‘s reagent เป็นต้น

5. ศึกษาเอกลักษณ์ทางโครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) หลังพ่นด้วยน้ำยา anisaldehyde-sulfuric acid และ dragendroff’s spray reagent ของกลุ่มสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก

ศึกษาสภาวะของเครื่องทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) และ น้ำยาพ่น (spray reagent) ที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นวิธีตรวจวัดชนิดและตำแหน่ง (Rf) ของสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก

6. เปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการควบคุมหนอนใยผัก ในใบและเมล็ดน้อยหน่าพันธุ์ต่างๆ

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

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2558 สิ้นสุด กันยายน 2559

สถานที่ทดลอง กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 ศึกษาขั้นตอนการสกัดสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักจากใบและเมล็ดน้อยหน่า

ผลการสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วย hexane, methanol และ น้ำ แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผัก พบว่าหนอนใยผักตาย 75.0%, 87.5% และ 0.0% ตามลำดับ ทำให้ทราบว่า hexane และ methanol สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ในการกำจัดหนอนใยผักจากเมล็ดน้อยหน่าได้ จึงสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วย hexane และ methanol แล้วนำไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ได้น้ำมันสีเหลือง จากสารสกัด hexane และได้สารสกัดหยาบจากสารสกัด methanol จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์ด้วยวิธีการทางเคมี โดยใช้ hexane, chloroform และ methanol แล้วนำไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ได้สารสำคัญ 4 ส่วน คือ ได้น้ำมันสีเหลือง, ได้สารข้นหนืดสีน้ำตาลแดง, ได้สารข้นหนืดสีน้ำตาลเหลือง และ ได้เกล็ดน้ำตาลสีขาว ตามลำดับ (รูปที่ 4) เมื่อนำสารทั้ง 4 ส่วนในอัตรา 2%w/v ทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผัก พบว่าหนอนใยผักตาย 92.3, 94.8, 72.5 และ 27.5% ตามลำดับ ทำให้ทราบว่าในเมล็ดน้อยหน่า ประกอบด้วยสารที่มีฤทธิ์ในการกำจัดหนอนใยผักได้ดี อยู่ในชั้นน้ำมันสีเหลือง สารข้นหนืดสีน้ำตาลแดง รองลงมาคือ สารข้นหนืดสีน้ำตาลเหลือง เมื่อนำสารข้นหนืดสีน้ำตาลแดงไปสกัดต่อด้วย chloroform และน้ำ ได้สารกึ่งบริสุทธิ์ alkaloids ซึ่งมีปริมาณมาก และเป็นสารสารสำคัญที่สามารถบ่งชี้เอกลักษณ์ของสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าได้ จากผลที่ได้ทำให้ทราบว่าสารจากเมล็ดน้อยหน่าที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก เป็นสารประเภทที่มีสรูปขั้วน้อยถึงขั้วปานกลาง จึงนำน้ำมันสีเหลืองและสารข้นหนืดสีน้ำตาลแดงไปทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมี และหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี

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

8.2 การทดสอบชนิดของกลุ่มสารสำคัญทางพฤกษเคมีของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก

ผลการทดสอบกลุ่มสารด้วยน้ำยาทดสอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักทั้ง 3 ส่วน พบว่า น้ำมันสีเหลือง(จากเมล็ด) เป็นสารกลุ่ม terpenoids สารข้นหนืดสีน้ำตาลแดง(จากเมล็ด) เป็นสารกลุ่ม alkaloids และ terpenoids และ น้ำมันสีเขียว (จากใบ) เป็นสารกลุ่ม terpenoids

8.3 การวิเคราะห์เอกลักษณ์ทางโครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ด้วยเครื่องทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ของใบและเมล็ดน้อยหน่าเนื้อ น้อยหน่าหนัง น้อยหน่าเพชรปากช่อง และสารกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก

ได้สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High performance thin layer chromatography (HPTLC) เพื่อหาชนิดและตำแหน่ง Rf ของสารสำคัญ ดังนี้คือ ใช้แผ่น TLC ชนิด HPTLC plate silica gel 60F254 size 20x10cm ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) toluene/methanol/ ethyl acetate/acetic acid (10/3/10/0.5) ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 215 nm ใช้เวลาในการ develop 10 นาที ตรวจสอบภายใต้แสง uv254, uv366 และ white light ก่อนและหลังใช้น้ำยาพ่น dragendroff 's reagent สำหรับทดสอบสารกลุ่ม alkaloids และน้ำยาพ่น anisaldehyde sulfuric acid สำหรับทดสอบสารกลุ่ม terpenoids

ผลการทดสอบสารกลุ่ม alkaloids ในใบ และเมล็ดน้อยหน่า และสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ พบว่าตำแหน่ง (Rf) ของสารกลุ่ม alkaloids ในสารสกัดใบและเมล็ดน้อยหน่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ของเมล็ดน้อยหน่าทั้ง 3 พันธุ์ พบพีคจาก HPTLC chromatogram เด่นที่ Rf 0.50 และ 0.81 และในใบน้อยหน่าทั้ง 3 พันธุ์ พบพีคเด่นที่ Rf 0.81 ผลจาก HPTLC fingerprint ไม่พบ alkaloids ในใบน้อยหน่า แต่พบ alkaloids หลายชนิดในเมล็ด ได้แก่ ที่ Rf 0.20, 0.38, 0.50 และ 0.59 เมื่อทดสอบสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก ได้แก่ สารข้นหนืดสีน้ำตาลแดง (จากเมล็ด) พบว่ามีสาร alkaloids ที่เด่นที่ Rf 0.50 ซึ่งเป็นสารบ่งชี้ที่พบเฉพาะในเมล็ดน้อยหน่า เมื่อตรวจวัด spectrum ที่ความยาวคลื่น 190-600 nm ของสารที่ตำแหน่ง Rf 0.50 ได้ spectrum ดังรูปที่ 5 จากการทดสอบด้วยน้ำยาพ่น dragendroff 's reagent ปรากฏแถบสีส้มภายใต้แสงธรรมชาติ ซึ่งได้เอกลักษณ์ทางโครมาโทกราฟี (fingerprint) ดังรูปที่ 6,7 และ ทีแอลซีโครมาโทแกรม ดังรูปที่ 8

ผลการทดสอบสารกลุ่ม terpenoids ในใบน้อยหน่า เมล็ดน้อยหน่า และสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ พบว่าตำแหน่ง (Rf) ของสารกลุ่ม terpenoids ในสารสกัดใบและเมล็ดน้อยหน่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ จาก HPLC fingerprint พบ terpenoids ทั้งในใบเมล็ดและเมล็ดน้อยหน่าหลายชนิด ได้แก่ ที่ Rf 0.28, 0.65 และ 0.81 โดยในใบน้อยหน่ามีเพิ่มเติมที่ Rf 0.60 เมื่อนำสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก ทำให้ทราบว่า น้ำมันสีเหลือง (จากเมล็ด) และและ น้ำมันสีเขียว (จากใบ) มีสารกลุ่ม terpenoids เด่นที่ Rf 0.81 เมื่อตรวจวัด spectrum ที่ความยาวคลื่น 190-600 nm ของสารที่ตำแหน่ง Rf 0.81 ได้เป็น spectrum ดังรูปที่ 5 จากการทดสอบด้วยน้ำยาพ่น anisaldehyde sulfuric acid แล้วให้ความร้อน ปรากฏแถบสีม่วงภายใต้แสงธรรมชาติ ซึ่งได้ HPTLC chromatogram ดังรูปที่ 6,7 และ HPTLC fingerprint รูปที่ 9 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ terpenoid ที่พบในเมล็ดและใบน้อยหน่า พบว่าเมล็ดน้อยหน่ามีปริมาณ Terpenoids มากกว่าในใบ

ผลการเปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ที่พบในใบและเมล็ดน้อยหน่าพันธุ์ต่างๆ จากรูปที่ 10, 11, 12 และ 13 ทำให้ทราบว่า ในใบและเมล็ดน้อยหน่าทั้ง 3 พันธุ์มีปริมาณ alkaloids และ terpenoids ใกล้เคียงกัน สามารถเลือกใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อพัฒนาเป็นสูตรผลิตภัณฑ์ต่อไป

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

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

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลการวิจัยนี้ ทำให้ทราบข้อมูลกลุ่มสารสำคัญ วิธีสกัดและตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักจากใบและเมล็ดน้อยหน่า สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการต่อยอดงานวิจัยเพื่อพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืชจากน้อยหน่า โดยใช้ข้อมูลเอกลักษณ์ทางโครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ในการควบคุมคุณรูปผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่า (งานวิจัยต่อเนื่อง ปี 2560) ซึ่งสามารถใช้เป็นปัจจัยการผลิตที่ช่วยลดการใช้วัตถุมีพิษการเกษตรจากสารเคมี เพิ่มคุณรูปชีวิต ประหยัดค่าใช้จ่าย และเพิ่มมูลค่าให้เกิดประโยชน์สูงสุดจากเมล็ดที่เหลือจากการบริโภค และใบที่ต้องตัดทำลายทั้งหมดหลังเก็บเกี่ยวผลผลิต โดยสามารถถ่ายทอดความรู้ไปยังนักวิจัย ภาครัฐ ภาคเอกชน เกษตรกรและผู้ที่สนใจต่อไป

11. คำขอบคุณ -

12. เอกสารอ้างอิง

กรกช อินทราพิเชฐ. (2554). รายงานการวิจัยการควบคุมโดยชีววิธีแมลงวันผลไม้ด้วยพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี-สุนารี

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

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

Andrade, E., M.,Zoghbi, J.,Maia, H.,Fabricius & F.,Marx. (2001). Chemical characterization of the fruit of *Annona squamosa* L. occurring in the Amazon. *Journal of Food Composition and Analysis, 14*(2), 227-232.

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

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

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

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

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

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

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

Sachin, U.R., P.R.,Patil, V.R., Salunkhe, P.N.,Dhabale & K.B.,Burade.(2009). HPTLC method for quantitative determination of Quercetin in Hydroalcoholic extract of dried flower of Nymphaea stellata willd. Sachin U. Rakesh et al /Int.J. ChemTech Res.,1(4).

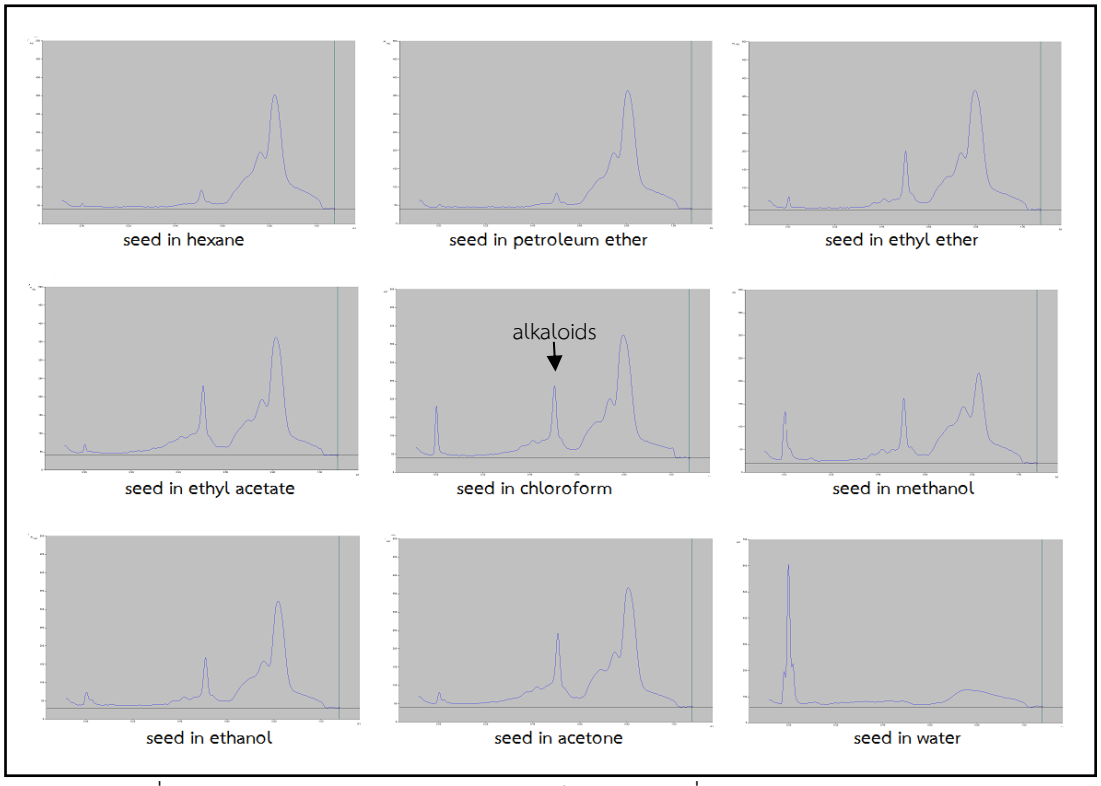
Sunil ,K., A.,Sayeed and P.,Sharma. (2011). Pharmacognostic evaluation and HPTLC fingerprinting of Nicotiana Tabacum stem collected from different geographical regions of India. Der Pharmacia Sinica, 2(5): 1-11.

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

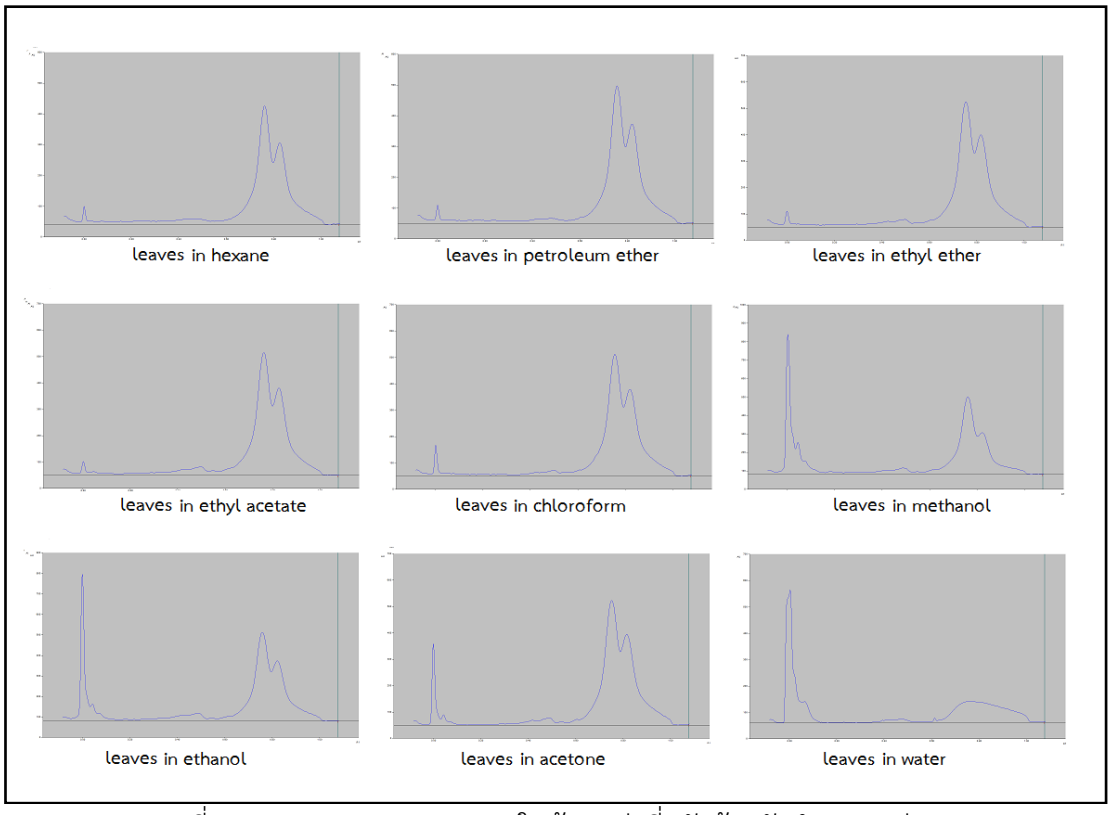
13. ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ ด้วยน้ำยาทดสอบต่างๆ

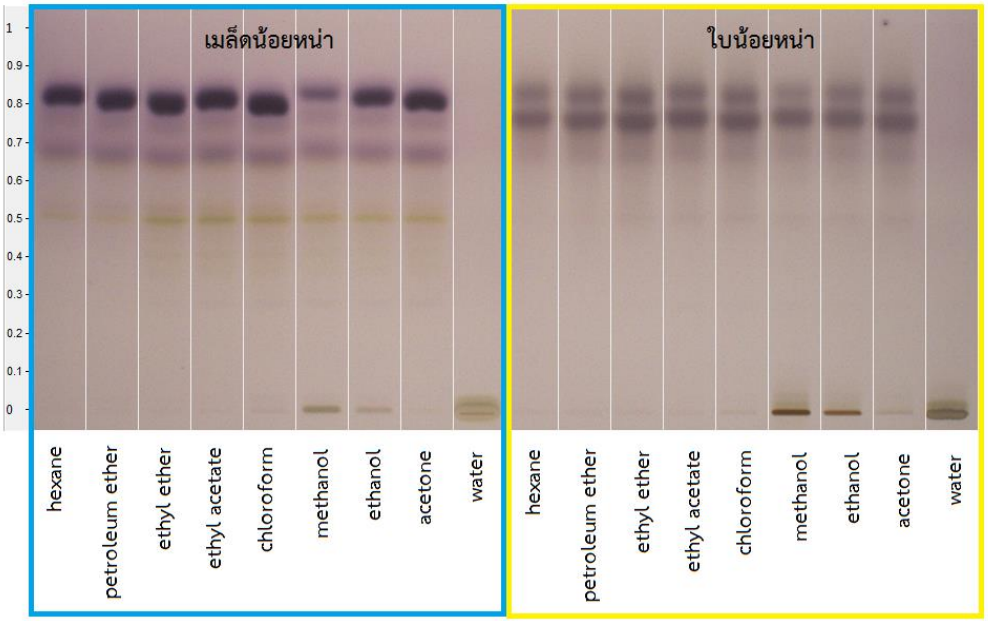
กลุ่มสาร	reagent	น้ำมันเมล็ดน้อยหน่า	สารข้นหนืดสีน้ำตาลแดง	น้ำมันใบน้อยหน่า
alkaloids	Dragendroff's reagent	×	✓	×
	Hager 's reagent	×	✓	×
	Marme 's reagent	×	✓	×
flavonoids	Ferric chloride	×	×	×
	Lead acetate	×	✓	×
Phenol and Tannin	Ferric chloride	×	✓	×
	Lead acetate	✓	✓	×
Saponin	Foam test	×	×	×
	Olive oil test	×	×	×
Terpenoids	salkowski 's test	✓	✓	✓
	Terpenoids test	✓	✓	✓
monosaccharide	Benedict ‘s reagent	×	×	×
	Fehling ‘s reagent	×	×	×



รูปที่ 1 HPTLC chromatogram ของเมล็ดน้อยหน่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

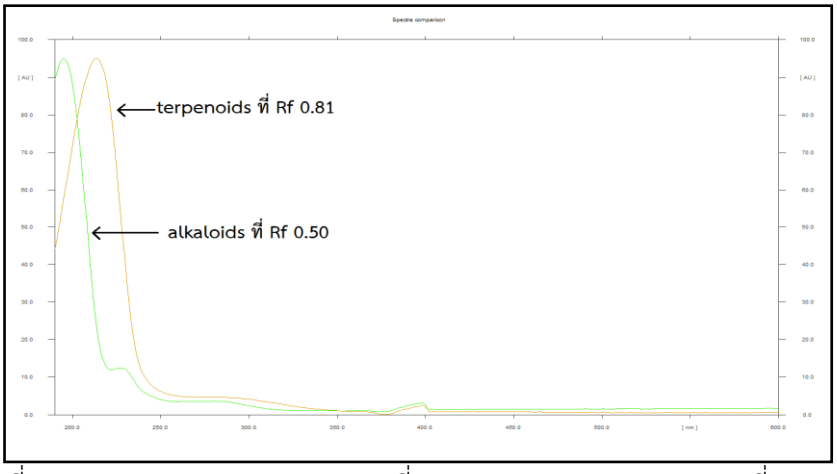


รูปที่ 2 HPTLC chromatogram ใบน้อยหน่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

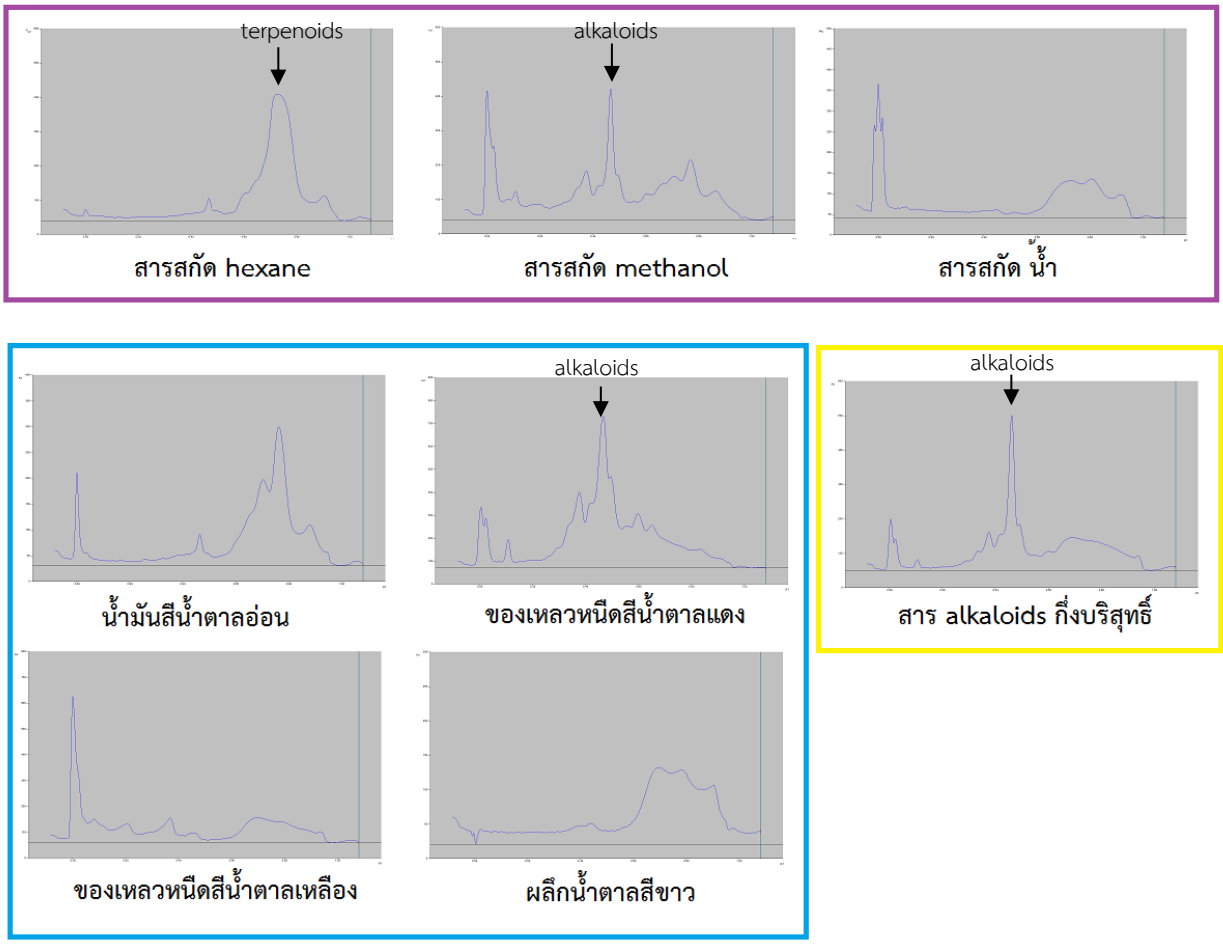


รูปที่ 3 HPTLC fingerprint ของใบและเมล็ดน้อยหน่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

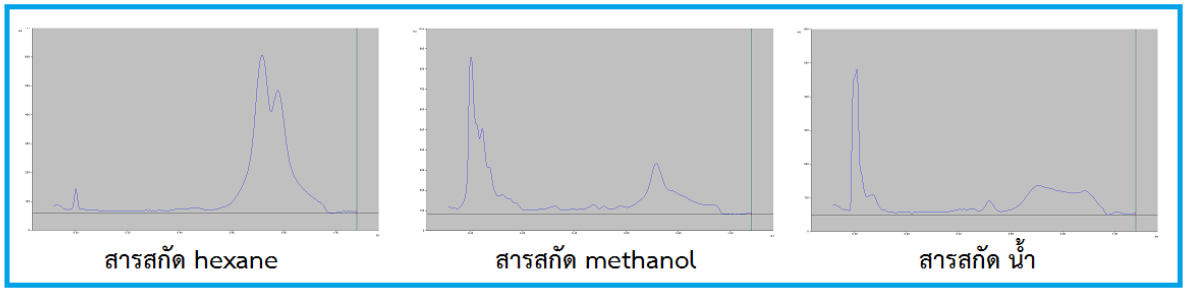
รูปที่ 4 สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากเมล็ดน้อยหน่า



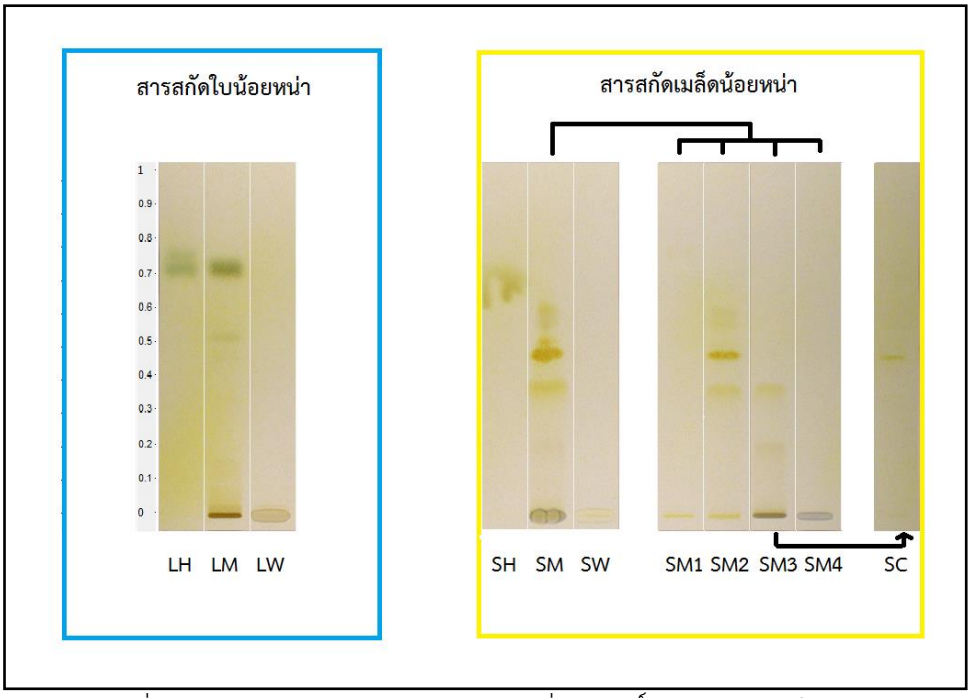
รูปที่ 5 spectrum ของสาร alkaloids ที่ Rf 0.50 และสาร terpenoids ที่ Rf 0.81



รูปที่ 6 HPTLC chromatogram ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากเมล็ดน้อยหน่า

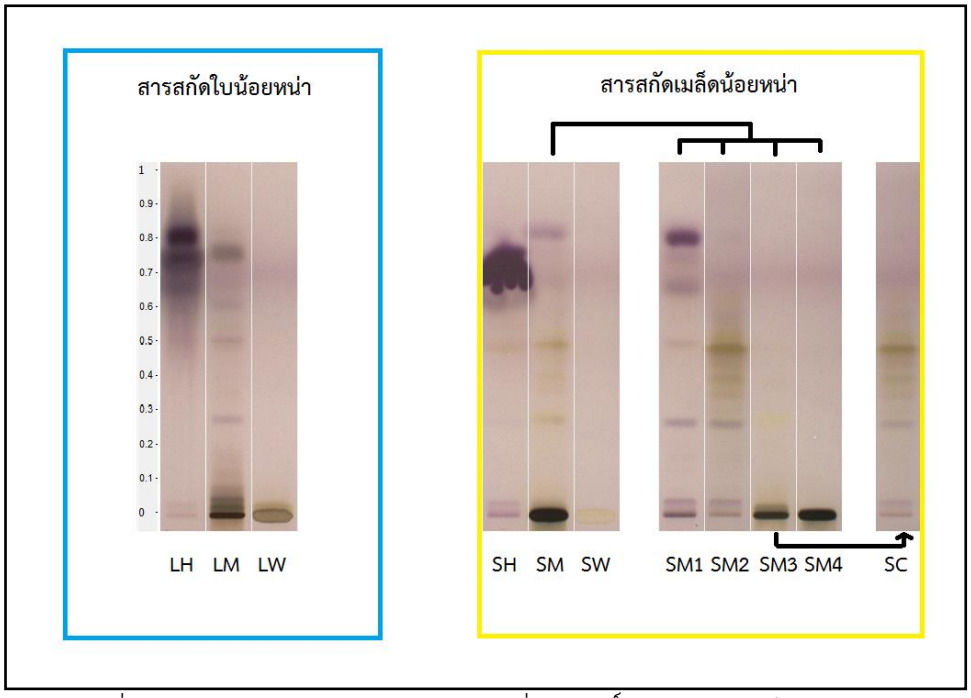


รูปที่ 7 HPTLC chromatogram ของสารสกัดจากใบน้อยหน่า



รูปที่ 8 HPTLC fingerprint ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากใบและเมล็ดน้อยหน่า ทดสอบ alkaloids ด้วยน้ำยา dragendroff's reagent

LH = สารสกัด hexane
LM = สารสกัด methanol
LW = สารสกัด น้ำ
SH = สารสกัด hexane
SM = สารสกัด methanol
SW = สารสกัด น้ำ
SM1 = น้ำมันสีเหลือง
SM2 = ของเหลวข้นสีน้ำตาลแดง
SM3 = ของเหลวข้นสีน้ำตาลเหลือง
SM4 = เกล็ดน้ำตาลสีขาว
SC = alkaloid กึ่งบริสุทธิ์



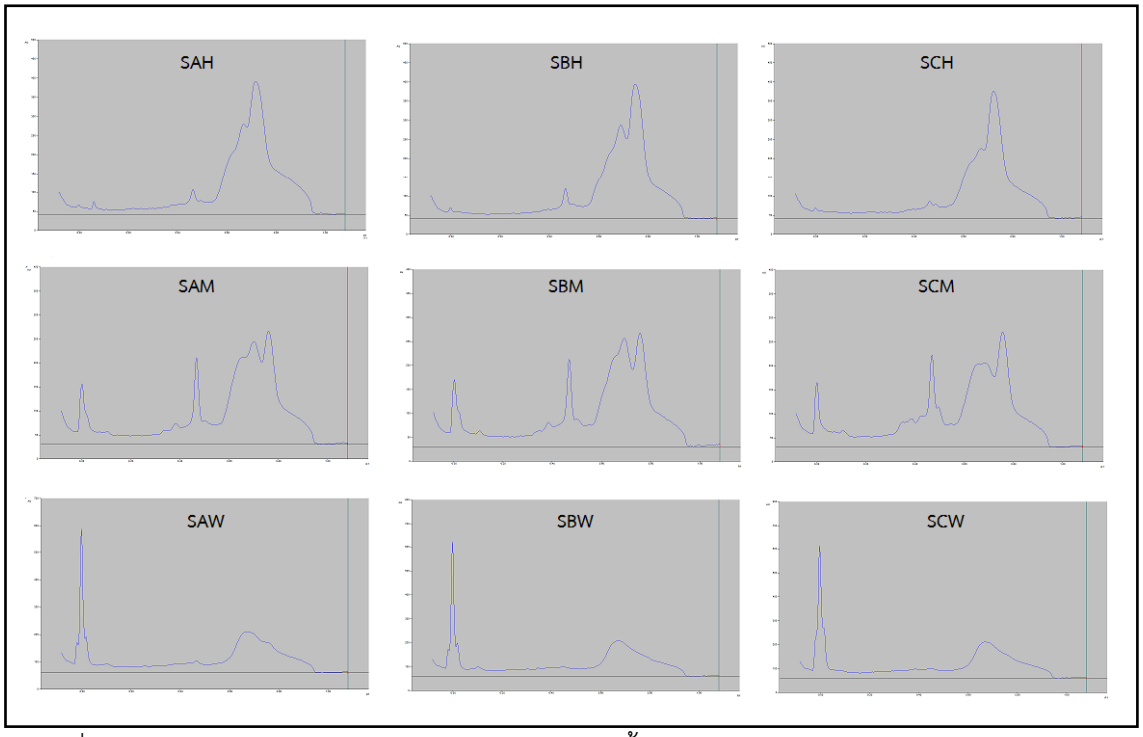
รูปที่ 9 HPTLC fingerprint ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากใบและเมล็ดน้อยหน่า
ทดสอบ terpenoids ด้วยน้ำยา anisaldehyde-sulfuric acid

LH = สารสกัด hexane LM = สารสกัด methanol LW = สารสกัด น้ำ

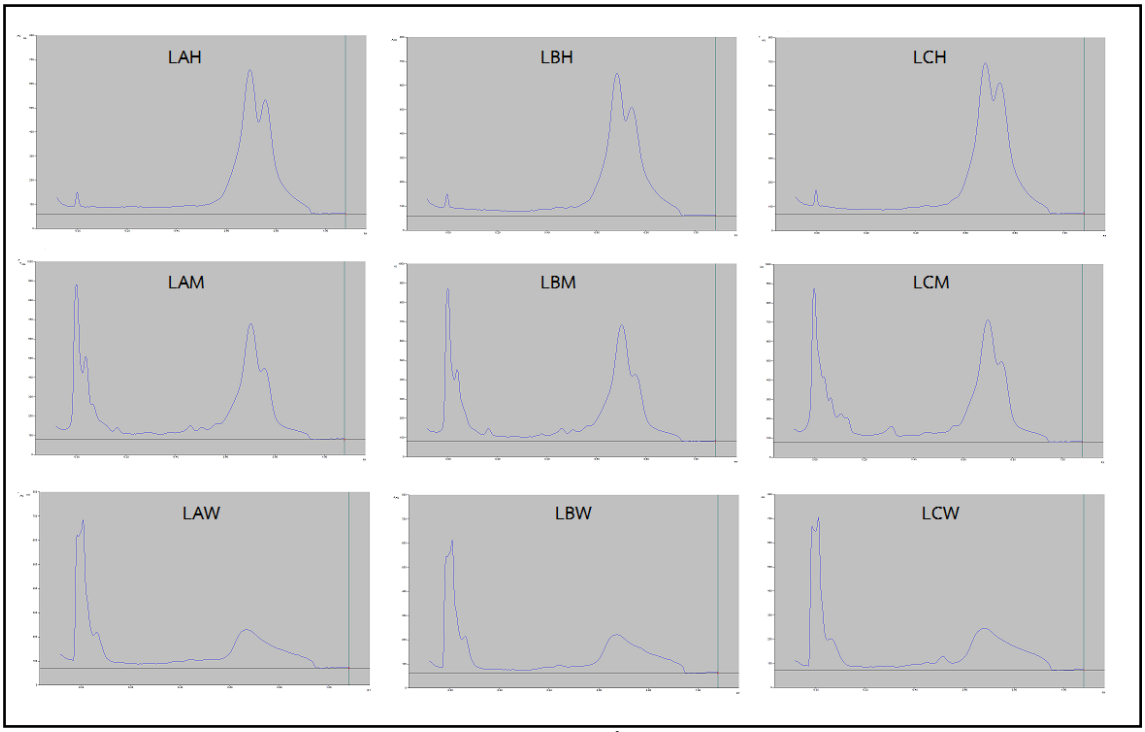
SH = สารสกัด hexane SM = สารสกัด methanol SW = สารสกัด น้ำ

SM1 = น้ำมันสีเหลือง SM2 = ของเหลวข้นสีน้ำตาลแดง SM3 = ของเหลวข้นสีน้ำตาลเหลือง

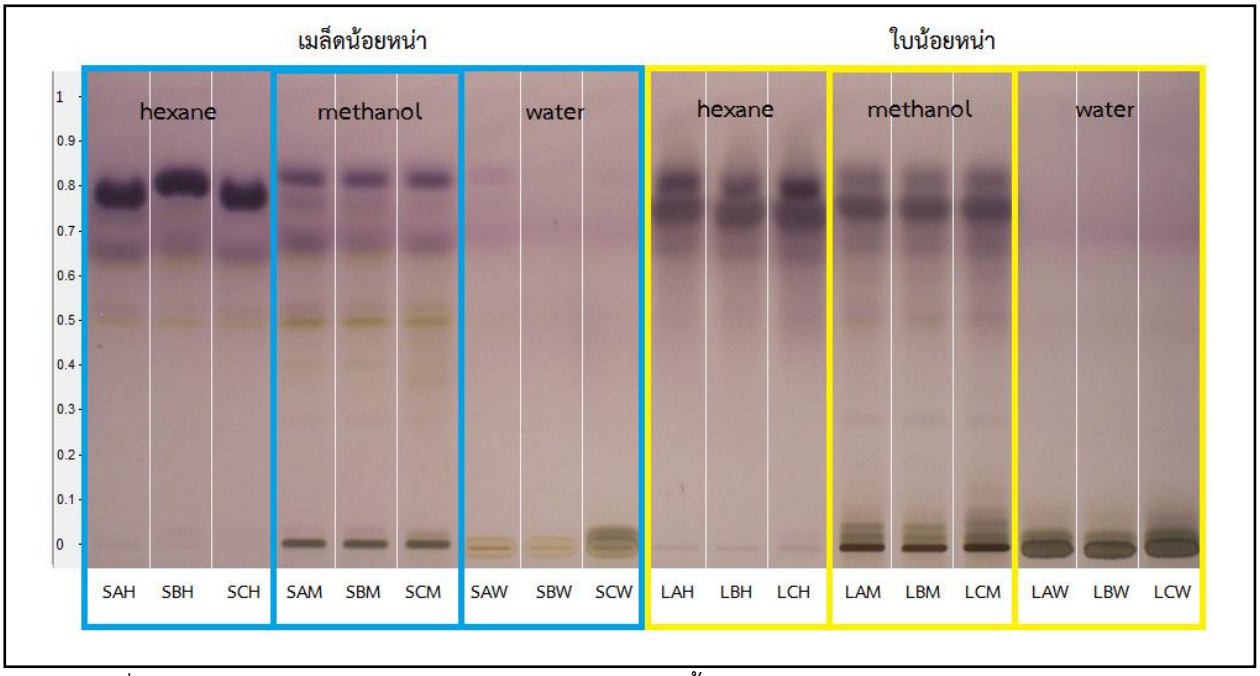
SM4 = เกล็ดน้ำตาลสีขาว SC = alkaloid กึ่งบริสุทธิ์



รูปที่ 10 HPTLC chromatogram ของเมล็ดน้อยหน่าเนื้อ น้อยหน่าหนัง และน้อยหน่าเพชรปากช่อง ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ



รูปที่ 11 HPTLC chromatogram ของใบน้อยหน่าเนื้อ น้อยหน่าหนัง และน้อยหน่าเพชรปากช่อง ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

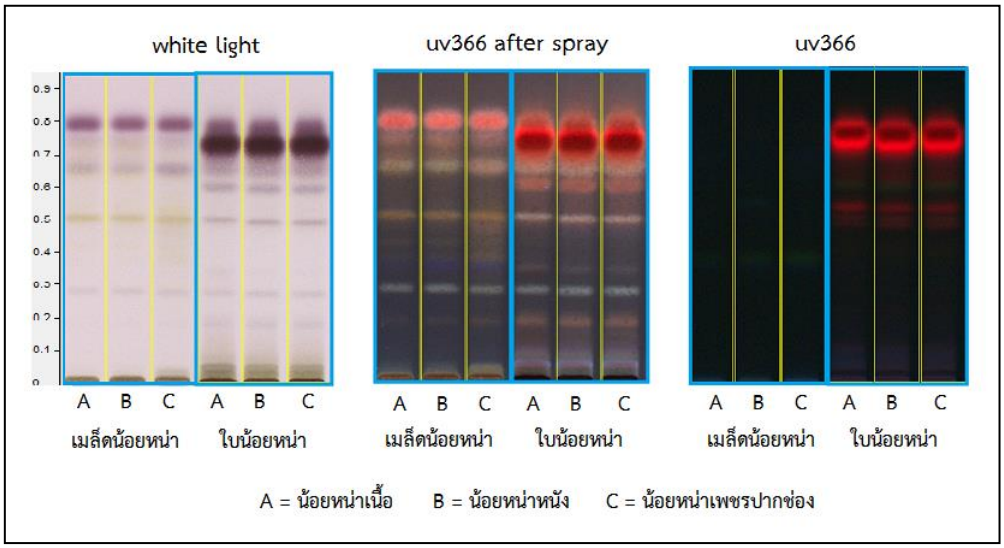


รูปที่ 12 HPTLC fingerprint ของใบและเมล็ดน้อยหน่าเนื้อ น้อยหน่าหนัง และน้อยหน่าเพชรปากช่อง ที่สกัดด้วย hexane, methanol และ น้ำ

SAH, SAM, SAW, LAH, LAM, LAW = น้อยหน่าเนื้อ

SBH, SBM, SBW, LBH, LBM, LBW = น้อยหน่าหนัง

SCH, SCM, SCW, LCH, LCM, LCW = น้อยหน่าเพชรปากช่อง



รูปที่ 13 เปรียบเทียบ fingerprint ของใบและเมล็ดน้อยหน่า ที่สกัดด้วย methanol เมื่อตรวจวัดที่ความยาวคลื่น uv366 และ white light