วิจัยสูตรผลิตภัณฑ์สารสกัดหนอนตายหยาก และว่านน้ำเพื่อป้องกันกำจัดศัตรูพืช

Plant Extract Formulations from *Stemona* spp. and *Acorus calamus* L. for Plant Protection

รัตนาภรณ์ พรหมศรัทธา เสริม สีมา สมบัติ แผนดี อิสริยะ สืบพันธุ์ดี
อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

หนอนตายหยาก (*Stemona* spp.) และว่านน้ำ เป็นพืชที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ในรากหนอนตายหยากมีสารสำคัญพวกอัลคาลอยด์ (alkaloids) เก็บตัวอย่างรากหนอนตายหยากจากจังหวัดต่างๆ มาตรวจหาปริมาณอัลคาลอยด์ทั้งหมด (Total alkaloids) พบว่า มีปริมาณอยู่ระหว่าง 1.16 – 6.60 % สกัดรากหนอนตายหยาก *Stemona burkillii* Prain และ *Stemona phyllantha* Gagnep ด้วยเอทานอล นำสารสกัดหยาบที่ได้มาสกัดแยกส่วนโดยใช้ hexane, dichloromethane และ ethyl acetate ตรวจ alkaloids ในส่วนที่แยก พบว่าอยู่ในส่วนของ dichloromethane ในส่วนของ hexane พบว่ามีกรดไขมันที่อิ่มตัว (C16:0, C18:0) และไม่อิ่มตัว (C18:1, C18:2, C18:3) รวมทั้ง 4-methoxy benzoic acid, methyl ester ส่วนของ dichloromethane จาก *S. burkillii* Prain มี total alkaloids 20.01 % *S.phyllantha* Gagnep มี Total alkaloids 8.09 % non-alkaloid 27.40 % ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบกับหนอนใยผักวัยสอง พบว่าสารสกัดหยาบของ *S. burkillii* และ *S. phyllantha* เข้มข้น 1% ทำให้หนอนตาย 76.7% และ 36% ในเวลา 3 วัน และในส่วนของ dichloromethane เข้มข้น 1% ทำให้หนอนตาย 93.3 % และ 53% ผลิตภัณฑ์จาก *S. burkillii* อัตรา 5 และ 10 มิลลิลิตรต่อเอทานอล 100 มิลลิลิตร ทำให้หนอนตาย 80 และ 100 % ใน 3 วัน

สกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธี hydrodistillation พบว่ามีน้ำมันหอมระเหย 1.35 % ซึ่งมีปริมาณสารสำคัญ เบต้า อาซาโรน 85.10% สกัดเหง้าแห้งด้วยเมทานอลและเอทานอลได้สารสกัดหยาบ 21.87% และ 8.73 % มีเบต้าอาซาโรน 8.43 % และ 22.86 % น้ำมันว่านน้ำ 1.0 % และสารสกัดหยาบจากเอทานอล 2.5 % ทำให้หนอนใยผักวัยสองตาย 100 % ใน 48 ชั่วโมง

07-01-49-05-01-01-01-49

คำนำ

ศัตรูพืชเป็นปัญหาสำคัญในการทำเกษตรกรรม การจัดการศัตรูพืชของเกษตรกรส่วนใหญ่มักใช้สารเคมี อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีสังเคราะห์เพื่อป้องกันกำจัดศัตรูพืชอย่างไม่ถูกต้องก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม เช่น การปนเปื้อนสารเคมีในแหล่งน้ำ สารพิษตกค้างในผลผลิตและสิ่งแวดล้อมเป็นอันตรายต่อผู้ใช้ ผู้บริโภค และสัตว์เลี้ยงทั่วไป รวมทั้งสัตว์ที่เป็นอาหารของมนุษย์ การลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยการใช้สารสกัดจากพืชเป็นทางเลือกหนึ่งของการใช้ปัจจัยการผลิตที่ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม ซึ่งทำให้ผลผลิตทางการเกษตรมีคุณภาพปลอดภัยต่อการบริโภคและสนับสนุนให้เกษตรกรใช้เป็นทางเลือกที่ดีและปลอดภัย ลดค่าใช้จ่ายในการนำเข้าสารเคมีสังเคราะห์จากต่างประเทศ และเป็นการใช้ทรัพยากรที่มีอยู่ในประเทศให้เกิดประโยชน์ปัจจุบันได้มีการนำสารสกัดจากพืช (botanical pesticides) มาใช้ป้องกันและกำจัดศัตรูพืชทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ (Jacobson, 1989) เพิ่มขึ้น หนอนตายหยาก (*Stemona* spp.) และว่านน้ำ เป็นพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช

หนอนตายหยาก (*Stemona* spp.) เป็นไม้พุ่มกึ่งเลื้อยในตระกูล Stemonaceae หัวเป็นพวงคล้ายกระชาย ขึ้นในป่าทั่วๆ ไป มีมากแถบภาคกลางและภาคเหนือ ในประเทศไทยพบอย่างน้อย 7 ชนิด ซึ่งแต่ละท้องถิ่นเรียกชื่อแตกต่างกันไป รากของหนอนตายหยากมีฤทธิ์ฆ่าหนอน ชาวบ้านจึงนำไปใส่ไหปลาร้าเพื่อฆ่าแมลง (ธาวดี, 2524; มยุรา, 2537) วีรพลและคณะ (2536) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากหนอนตายหยากต่อเห็บโค พบว่าสามารถฆ่าเห็บโคในระยะวัยอ่อนและเต็มวัย หนอนตายหยากเป็นทั้งยาฆ่าแมลงและยารักษาโรค เช่น เป็นยาขับพยาธิ รักษาโรคไต โรคเจ็บหน้าอก แก้ไอ เป็นต้น สารสำคัญที่มีอยู่ในรากหนอนตายหยากประกอบด้วยสารกลุ่มพวกอัลคาลอยด์ (alkaloids) เป็นส่วนใหญ่ เช่น stemotinine, isostemonamine, tuberostemonone (Xu *et al.*, 1982; Lin *et al.*, 1992) นอกจากนี้ยังพบสารที่ไม่ใช่อัลคาลอยด์ได้แก่ สารประกอบไบเบนซิล (bibenzyl) สติลบีนอยด์ (stilbenoids) และกลุ่มโรตินอยด์ (rotenoids) Pacher *et al.*, (2002) ได้สกัด stilbenoids จาก *Stemona collinsae* และพบว่ามีคุณสมบัติกำจัดเชื้อรา (antifungal activity) สารอัลคาลอยด์ที่พบในรากหนอนตายหยากมีคุณสมบัติในการกำจัดแมลง (Brem *et al.*, 2002; Kaltenegger, 2003) ซึ่ง Greger (2006) ได้แสดงความสัมพันธ์ของโครงสร้างกับคุณสมบัติด้าน biological activity ของอัลคาลอยด์ในพืชพวกหนอนตายหยาก (Stemona alkaloids)

ว่านน้ำเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Araceae มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ในเขตอบอุ่นของทวีปเอเชีย เป็นพืชที่ขึ้นอยู่กับโคลน เลน หรือริมบ่อ หนอง บึง ว่านน้ำเป็นไม้ล้มลุกเนื้ออ่อน มีเหง้าอยู่ใต้ดิน มีการนำว่านน้ำมาใช้เป็นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชตั้งแต่ต้น ค.ศ. 1600 ในประเทศแถบทวีปยุโรป นำมาใช้เป็นสารไล่แมลง ซึ่งมีการใช้มาก่อนที่จะใช้หางไหล (Thacker, 2009) มงคล แก้วเทพ (2547) ได้รายงานวิจัยที่ระบุถึงฤทธิ์ในการกำจัดแมลงของว่านน้ำว่ามีผลต่อระบบสืบพันธุ์ การวางไข่และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลง สารสกัดเมทธานอลของว่านน้ำทำให้ด้วง*ข้าว* *Sitophilus oryzae* (L.) และด้วงถั่วเหลือง *Callosobruchus chinensis* ที่โตเต็มวัยตายมากกว่า 90% หลังจากการสัมผัสสารสกัดโดยตรง 3 – 4 วัน น้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำพบสาร β-asarone (2,4,5-trimethoxypropenylbenzenes), acorangermacrone และ

asarylaldehyde ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่มีผลต่อแมลงวันผลไม้ 3 ชนิด คือ *Ceratitis capitata*, *Dacus cucurbita* และ *D. dorsalis* เมื่อนำว่านน้ำ สะเดา และโล่ติ้นมาผสมในอัตราส่วน 1:1:1 พบว่ามีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการกินอาหารของตัวอ่อนผีเสื้อกลางคืน *Earias vittella* (Fab) นอกจากนี้ว่านน้ำยังสามารถใช้ป้องกันกำจัดแมลงศัตรูในโรงเก็บได้ (Kim *et al.*, 2003) เมื่อนำข้าวสาลีไปคลุกกับน้ำมันว่านน้ำที่ความเข้มข้น 100, 500 และ 1,000 ppm สามารถป้องกันมอดแป้ง *Tribolium castaneum* ได้ และเมื่อมอดแป้งถูกสารสกัดที่มีความเข้มข้น 200 ppm พบว่าทำให้การเจริญเติบโตของตัวอ่อนและตัวโตเต็มวัยลดลง และสาร asarones ซึ่งสกัดแยกมาจากน้ำมันหอมระเหยจากรากว่านน้ำมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการกินอาหารของผีเสื้อกลางคืนชนิด *Peridramasaucia* Nawamaki and Kuroyanagi (1996) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากว่านน้ำในการยับยั้งการงอกของเมล็ดผักกาดหอม ประเทศอินเดียมีการนำว่านน้ำมาใช้เป็นยารักษาโรคในปลาที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *(Aeromonas hydrophila)* (Bhuvaneswari and Balasundaram,2009.) ในประเทศจีนมีการนำว่านน้ำมาใช้ป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยและแมลง โดยพบว่าในว่านน้ำมีสาร Phenylpropanoids α และ β-asarone เป็นสารออกฤทธิ์ (Perrett and Whitfield, 2006) ในประเทศไทยใช้ว่านน้ำในการป้องกันกำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่อง *(Aedes aegypti)* มีค่า LC_{50} 16.0-48.2 mg/l (Narumon, *et al.*, 2006) น้ำมันจากว่านน้ำ (Calamus oils) ทำให้ผิวหนัง และตาเกิดการระคายเคืองเมื่อสัมผัสโดยตรง เมื่อหายใจเข้าไปเกิดระคายเคืองต่อระบบทางเดินหายใจ สามารถตกค้างอยู่ได้ในผิวดินและผิวน้ำในระบบนิเวศน์หลังการใช้ ควรหลีกเลี่ยงการบรรจุในภาชนะที่มีสารที่เป็นกรด ด่าง หรือ oxidizing agents Calamus oils มีค่า LD_{50} (oral, rat) 777 mg/kg ค่า LD_{50} (dermal, rabbit) >5,000 mg/kg มีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ (aquatic organisms) มีความเป็นพิษถ้ากลืนกินเข้าไป (Lluch, 2009)

ดังนั้น จึงทำการวิจัยการสกัด แยกและหาปริมาณสารออกฤทธิ์ในรากหนอนตายหยากและเหง้าว่านน้ำ เพื่อนำมาเป็นตัวชี้วัด (marker) คุณภาพของผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป รวมทั้งศึกษากระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์จากรากหนอนตายหยากและเหง้าว่านน้ำ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ถังสเตนเลสขนาด 20 ลิตร สำหรับแช่/หมักรากหนอนตายหยาก
2. เครื่องชั่งหยาบ (2 ตำแหน่ง) และละเอียด (4 ตำแหน่ง)
3. เครื่องบดตัวอย่าง ตู้อบตัวอย่าง เครื่องกวนตัวอย่าง
4. เครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary evaporator)
5. ขวดก้นกลมขนาดต่างๆ กรวยกรอง กรวยแยก บีกเกอร์ กระดาษวัดความเป็นกรดด่าง
6. เอทานอล 95 %, เมทานอล, คลอโรฟอร์ม, ไดคลอโรมีเทน, hexane, Dragendroff spray reagent, hydrochloric acid, ammonium hydroxide
7. Chromatographic tank สำหรับ Thin Layer Chromatography (TLC)
8. เครื่องแก้วและสารเคมีอื่นๆ ที่ใช้ในการทดลอง

9. เครื่อง Gas chromatography-Mass spectrometer (GC-MS)
10. เครื่องระเหยแห้ง (freeze dry)
11. ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย

วิธีการ หนอนตายหยาก

การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างรากหนอนตายอยากมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด สับเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบในตู้อบที่ 50°C จนแห้งแล้วนำมาบดโดยเครื่องบดตัวอย่างพืช เก็บตัวอย่างไว้ในถุงพลาสติก

ศึกษาปริมาณอัลคาลอยด์ทั้งหมด (Total alkaloids)

เก็บตัวอย่างรากหนอนตายหยากจากจังหวัดต่างๆ ในภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ นำมาเตรียมตัวอย่างและสกัดหาอัลคาลอยด์(Natori *et al.*, 1981)เพื่อเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของผลิตภัณฑ์โดยใช้เมทานอลสกัด (1:20) กรอง นำกากไปสกัดซ้ำด้วยเมทานอลอีก 2 ครั้ง รวม filtrate ที่ได้ไประเหยที่อุณหภูมิ 40 °C โดยใช้เครื่อง rotary evaporator จะได้สารสกัดหยาบ นำสารสกัดหยาบที่ได้มาละลายใน 1M HCl สกัดด้วย dichloromethane 2 ครั้ง นำส่วนที่เป็นน้ำมาปรับ pH ด้วย dil. NH_4OH ให้ pH = 10 แล้วสกัดอัลคาลอยด์ด้วย dichloromethane นำส่วนที่เป็น dichloromethane มาระเหยให้แห้งชั่งปริมาณอัลคาลอยด์ทั้งหมดที่ได้

ตรวจสอบอัลคาลอยด์ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) ตามวิธีของ Svendsen and Verpoorte (1983) Developing solvent คือ Chloroform:Methanol (9:1) โดยใช้ Dragendroff reagent เป็น spray reagent วัดระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (solvent front) และระยะที่สารเคลื่อนที่ คำนวณหาค่า retardation factor (R_f)

สกัดแยกสารด้วยการแบ่งส่วน (Partition)

นำรากหนอนตายหยากที่เตรียมไว้มาสกัดด้วยเอทานอล 95 % (1:10) โดยแช่ทิ้งไว้ 5 วัน นำมากวนด้วยเครื่องกวนตัวอย่าง 1 ชั่วโมง กรองด้วยเครื่อง suction pump นำกากที่ได้ไปสกัดด้วยเอทานอลซ้ำอีก 2 ครั้ง นำ filtrate ที่ได้มาระเหยให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator จะได้สารสกัดหยาบ นำมาละลายใน 50% เอทานอล (1:10) ถ่ายใส่ในกรวยแยก แล้วสกัดด้วย hexane 3 ครั้ง ด้วยปริมาตรเท่ากับ 50% เอทานอล รวมส่วน hexane เข้าด้วยกัน ส่วนที่เป็นน้ำนำไปสกัดต่อด้วย dichloromethane 3 ครั้ง รวมส่วน dichloromethane เข้าด้วยกัน ส่วนที่เป็นน้ำนำไปสกัดต่อด้วย ethyl acetate 3 ครั้ง รวมส่วน ethyl acetate เข้าด้วยกัน ระเหย fraction ที่ได้จากการสกัด แล้วนำแต่ละ fraction ไป spot ลงบนแผ่น HPTLC ทำเช่นเดียวกับการตรวจหาอัลคาลอยด์ แล้วพ่นด้วย Dragendroff reagent บันทึกการเกิดสี

ตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีของ hexane fraction ด้วย GC-MS

ละลาย hexane fraction 10 mg ด้วย hexane ใน volumetric flask 10 ml กรองสารละลายด้วย syringe filter Nylon 66 pore size 45 um ใส่ในขวดฉีดตัวอย่างขนาด 2 ml นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC-MS ตรวจสอบหาสารโดยเปรียบเทียบ spectrum กับสารมาตรฐานหรือ reference spectrum ใน library search

ตรวจปริมาณอัลคาลอยด์ใน dichloromethane fraction

นำ dichloromethane fraction ที่ระเหยแล้ว มาละลาย 50% เอทานอล (1:10) ปรับ pH (~5) ให้เป็นกรดด้วย 5% HCl แล้วสกัดด้วย dichloromethane ปริมาตร 2 เท่าโดยใช้กรวยแยก นำชั้นที่เป็นน้ำมาปรับ pH (9-10) ด้วย dil. ammonium hydroxide สกัดด้วย dichloromethane นำส่วน dichloromethane ทั้ง 2 ครั้งไประเหยให้แห้ง จดน้ำหนักของแต่ละครั้ง

การแยกสารสำคัญด้วย semi-prep. HPLC

นำส่วนของ dichloromethane fraction ที่ระเหยแล้วมา 50 ml ละลายในเมทานอล HPLC grade กรองสารละลายที่ได้ด้วย syringe filter Nylon 66 pore size 45 um นำสารละลายที่กรองแล้วฉีดเข้าเครื่อง semi-prep HPLC ที่มี UV detector ตรวจจับที่ความยาวคลื่น 254 nm ใช้ 75 % เมทานอลเป็น mobile phase เก็บสารละลายที่แยกตามพีคที่เกิด นำแต่ละส่วนของพีคที่เก็บได้ไประเหยจนหมดเมทานอลเหลือแต่น้ำ นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dry นำสารที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดแมลงระดับห้องปฏิบัติการกับหนอนใยผักวัยสอง

การผสมปรุงแต่งเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป

จากการทดสอบข้างต้นพบว่าสารอัลคาลอยด์ทั้งหมดอยู่ในส่วนของ dichloromethane fraction จึงนำส่วนนี้มาผสมปรุงแต่ง นำ dichloromethane fraction จากรากหนอนตายหยากจากจังหวัดอุตรดิตถ์และ ราชบุรี คือ *Stemona burkillii* Prain และ *Stemona phyllantha* Gagnep มาผสมกับ propylene glycol และ Tween 80 ใช้ 50% เอทานอล เป็นตัวทำละลายแล้วนำสูตรผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นในระดับห้องปฏิบัติการกับหนอนใยผักวัย 2 แล้วจึงนำสูตร (fraction 2.5 %w/w, อุตรดิตถ์) ที่มีประสิทธิภาพดีไปทดสอบในแปลงทดสอบกับแมลงศัตรูคะน้าคือด้วงหมัดผักเปรียบเทียบกับสารฆ่าแมลงฟิโปรนิล

ว่านน้ำ

เตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างว่านน้ำจากจังหวัดราชบุรีมาล้างด้วยน้ำจนสะอาด แยกเหง้าและใบ เป็นตัวอย่างทดสอบสดและแห้ง ส่วนที่ทดสอบแบบใช้ตัวอย่างแห้ง ให้นำเหง้าว่านน้ำมาสับเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบในตู้อบที่ 50 °C จนแห้ง บดด้วยเครื่องบด เก็บตัวอย่างในถุงพลาสติก ปิดไม่ให้อากาศเข้า

กลั่นน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี hydrodistillation ด้วยชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย โดยใช้รากสด 500 กรัมต่อน้ำ 350 ml เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เก็บน้ำมันที่ได้

สกัดตัวอย่างอบแห้งด้วยเอทานอล และเมทานอล โดยใช้เหง้าว่านน้ำบดที่เตรียมไว้ 10 กรัมต่อตัวทำละลาย 300 ml แช่ค้างคืน แล้วนำมากวนด้วยเครื่องกวน 1 ชั่วโมง กรอง นำกากมาสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง นำ filtrate ที่ได้ไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator จนแห้ง จดน้ำหนักที่ได้

ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันและสารสกัดหยาบจากเหง้าว่านน้ำกับหนอนใยผักวัยสองด้วยวิธี Leaf Disc Feeding Test

ตรวจหาปริมาณเบต้าอาซาโรนโดย GC-MS

ดูดน้ำมันว่านน้ำมา 2 ul ละลายใน abs. ethanol 10 ml กรองผ่าน filter Nylon 66 ใส่ขวดฉีดตัวอย่างสำหรับฉีดเข้าเครื่อง GC-MS สารสกัดหยาบจากเมทานอลและเอทานอล ทำเช่นเดียวกันโดยใช้สารสกัด 50 mg ละลายใน abs. ethanol 25 ml กรองผ่าน filter Nylon 66 ฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง GC-MS เพื่อแยกและวัดปริมาณสารเบต้าอาซาโรน โดยใช้ operating condition ดังนี้

Column: RTx-5 W/Integra-Guard capillary column (Restek) 30 mx0.25 mm, film thickness 0.25 um

Temperature: Injector 200°C Mass transfer line 280°C

Column oven: Initial 50°C initial time 1 min rate 5°C/min final temp 230 °C final time 10 min

Solvent delay	4 min
Energy ion source	70eV, EI mode
Mass range	40-500 amu
Injection volume	1 ul
Carrier gas	Helium 1 ml/min

ระยะเวลา ตุลาคม 2549 – กันยายน 2553

สถานที่ดำเนินการ กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

หนอนตายหยาก

การศึกษาปริมาณอัลคาลอยด์ทั้งหมด (Total alkaloids) ในรากหนอนตายหยากเพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของผลิตภัณฑ์ โดยเก็บตัวอย่างรากหนอนตายหยากจากจังหวัดในภาคต่างๆ พบว่ามีปริมาณอยู่ระหว่าง 1.16 – 6.60 % ดังแสดงในตารางที่ 1 รากหนอนตายหยากจากจังหวัดนครราชสีมามีปริมาณอัลคาลอยด์สูงสุด 6.60 % จังหวัดตรังมีปริมาณต่ำสุด คือ 1.16 % ตรวจสอบสารประกอบพวกอัลคาลอยด์เบื้องต้นด้วยวิธี TLC โดยใช้ solvent system chloroform : methanol (9:1) พบว่าหนอนตายหยากจากทุกแหล่งเก็บตัวอย่างที่มีอัลคาลอยด์จะมีค่า R_f ทั้งเท่าและแตกต่างกัน ซึ่งแสดงว่าเป็นอัลคาลอยด์ต่างชนิดกัน

สกัดรากหนอนตายหยากจากอุตรดิตถ์ (*Stemona burkillii* Prain) ด้วย เอทานอล 95 % ได้สารสกัดหยาบ 19.75 % รากหนอนตายหยากจากราชบุรี (*Stemona phyllantha* Gagnep) 18.45 % สกัดสารสกัดหยาบโดย partition กับ hexane, dichloromethane และ ethyl acetate แล้วตรวจหาอัลคาลอยด์พบอยู่ในส่วนของ dichloromethane ส่วนของ ethyl acetate พบแต่มีความเป็นขั้วสูงยากต่อการแยกสารจึงนำส่วนของ dichloromethane มาศึกษา ส่วนของ hexane เมื่อนำไปตรวจด้วย GC-MS พบสารที่เป็นกรดไขมันอิ่มตัว (C16:0, C18:0) และไม่อิ่มตัว (C18:1, C18:2, C18:3) รวมทั้ง 4-methoxy benzoic acid, methyl

ester ส่วนของ dichloromethane ของสารสกัดจาก *S. burkillii* Prain มี total alkaloids 20.01 % *S.phyllantha* Gagnep มี Total alkaloids 8.09 % non-alkaloid 27.40 % จากการแยกสารในส่วนของ dichloromethane ด้วย semi-preparative HPLC ได้สารบริสุทธิ์ 1 ตัวมีน้ำหนักโมเลกุล 398 (ตรวจด้วย LC-MS) เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.1 % กับหนอนใยผักทำให้หนอนตาย 96.67 และ 100% ที่ 3 วัน แต่เนื่องจากปริมาณที่แยกได้น้อยมากไม่เพียงพอที่จะนำมาใช้แสดงเป็นสารออกฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์

ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบกับหนอนใยผักวัยสอง พบว่าสารสกัดหยาบของ *S. burkillii* และ *S. phyllantha* เข้มข้น 1% ทำให้หนอนตาย 76.7% และ 36% ในเวลา 3 วัน และส่วนของ dichloromethane เข้มข้น 1% ทำให้หนอนตาย 93.3 % และ 53% จึงนำ *S. burkillii* มาใช้ในการทำเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปให้มีความเข้มข้น 1-2.5 % w/w แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพพบว่า ผลิตภัณฑ์จาก *S. burkillii* (2.5% w/w) อัตรา 5 และ 10 มิลลิลิตรต่อเอทานอล 100 มิลลิลิตร ทำให้หนอนตาย 80 และ 100 % ใน 3 วัน จากการทดลองในแปลงเกษตรกรพบว่าสารสกัดหนอนตายหยาก (fraction 2.5%w/w, อุตรดิตถ์) อัตรา 100 และ 200 ลิตร/น้ำ 20 ลิตร ทำให้ด้วงหมัดผักลดลง 68.32 % สารฟิโปรนิลทำให้ด้วงหมัดผักลดลง 79.35 % (เสริม และคณะ, 2551)

ตารางที่ 1. ปริมาณ Total alkaloids ในรากหนอนตายหยากจากแหล่งต่างๆ

แหล่งที่มา	ปริมาณ Total alkaloids (%)	R_f
อุตรดิตถ์ (*Stemona burkillii* Prain)	5.60	0.71
เชียงใหม่ (*Stemona burkillii* Prain)	4.05	0.71, 0.60
พิษณุโลก (*Stemona* spp.)	2.55	0.71
แพร่ (*Stemona* spp.)	4.30	0.78,0.66,0.57
นครราชสีมา (*Stemona* spp.)	6.60	0.76,0.71
ปราจีนบุรี (*Stemona* spp.)	2.45	0.71
กาญจนบุรี (*Stemona curtisii* Hook)	2.10	0.71,0.68
นครสวรรค์ (*Stemona* spp.)	6.05	0.77
ราชบุรี (*Stemona phyllantha* Gagnep)	1.45	0.65,0.29,0.08
ราชบุรี (*Stemona* spp.)	1.63	0.73,0.69
เพชรบุรี (*Stemona curtisii* Hook)	1.70	0.71
สงขลา (*Stemona curtisii* Hook)	2.00	0.63,0.53
ตรัง (*Stemona curtisii* Hook)	1.16	0.63,0.53

ว่านน้ำ

สกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธี hydrodistillation พบว่ามีน้ำมันหอมระเหย 1.35 % ซึ่งมีปริมาณสารสำคัญ เบต้า อาซาโรน 85.10% เมื่อสกัดด้วยเมทานอลและเอทานอลได้สารสกัดหยาบ 21.87% และ 8.73 % มีเบต้าอาซาโรน 8.43 % และ 22.86 % น้ำมันว่านน้ำ 1.0 % และสารสกัดหยาบจากเอทานอล 2.5 % มีประสิทธิภาพทำให้หนอนใยผักวัยสองตาย 100 % ใน 48 ชั่วโมง

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ปริมาณอัลคาลอยด์ทั้งหมดในรากหนอนตายหยากจากแหล่งต่างๆ มีปริมาณอยู่ระหว่าง 1.16 – 6.60 % พบอยู่ในส่วนของ dichloromethane นอกจากอัลคาลอยด์แล้วยังพบกรดไขมันที่อิ่มตัว (C16:0, C18:0) และไม่อิ่มตัว (C18:1, C18:2, C18:3) 4-methoxy benzoic acid, methyl *Stemona burkillii* Prain มี total alkaloids 20.01 % *Stemona phyllantha* Gagnep มี Total alkaloids 8.09 % ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบกับหนอนใยผักวัยสอง พบว่าประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจาก *S. burkillii* มีประสิทธิภาพกว่า *S. phyllantha* ผลิตภัณฑ์จาก *S. burkillii* อัตรา 5 และ 10 มิลลิลิตรต่อเอทานอล 100 มิลลิลิตร ทำให้หนอนตาย 80 และ 100 % ใน 3 วัน เนื่องจากตัวชี้วัดคุณภาพในผลิตภัณฑ์หนอนตายหยากใช้ปริมาณอัลคาลอยด์เป็นตัวแสดงสารออกฤทธิ์ ซึ่งแต่ละพันธุ์สารอัลคาลอยด์แตกต่างกัน คุณภาพผลิตภัณฑ์อาจแตกต่างกัน ดังนั้นในผลิตภัณฑ์ควรระบุชนิดของหนอนตายหยากที่นำมาใช้

เหง้าว่านน้ำมีสารสำคัญคือ เบต้าอาซาโรน ปริมาณอาซาโรนในน้ำมันจากเหง้าว่านน้ำมีสูงกว่าในสารสกัดหยาบ สารสกัดหยาบจากเมทานอลและเอทานอล มีเบต้าอาซาโรน 8.43 % และ 22.86 % ในขณะที่น้ำมันมีสารสำคัญ เบต้าอาซาโรน 85.10% น้ำมันว่านน้ำ 1.0 % และสารสกัดหยาบจากเอทานอล 2.5 % ทำให้หนอนใยผักวัยสองตาย 100 % ใน 48 ชั่วโมง ซึ่งจะดำเนินการวิจัยสูตรผลิตภัณฑ์ว่านน้ำต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำไปใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยเฉพาะในการปลูกพืชอินทรีย์ เป็นการลดการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ลดต้นทุนการผลิต เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม
2. ถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์และวิธีการใช้อย่างมีประสิทธิภาพให้กับเกษตรกรและผู้ประกอบการผลิตสารธรรมชาติจากพืชเพื่อผลิตในระดับอุตสาหกรรม
3. นำข้อมูลงานวิจัยไปบรรยายให้แก่เกษตรกร นักวิชาการและผู้สนใจ ในการฝึกอบรมเกษตรกรหลักสูตรการใช้สารสกัดเพื่อควบคุมศัตรูพืช จัดโดย สปผ. 8 เม.ย. 2552

เอกสารอ้างอิง

ธาวดี ผ่องลักษณ์. 2524. พืชที่ใช้ฆ่าและไล่แมลงใน ***วารสารวิทยาศาสตร์*** ปีที่ 35(8): 559-569.

มงคล แก้วเทพ. 2547.ว่านน้ำสมุนไพรฆ่าแมลง ***จุลสารข้อมูลสมุนไพร*** ปีที่ 21 ฉบับที่ 4 หน้า 8-11

มยุรา สุนยีวีระ. 2537. พืชสมุนไพรไทย: พืชฆ่าแมลง. ***รายงานการสัมมนาเรื่องการฟื้นฟูพืชสมุนไพรไทยเพื่อสังคมไทย***, โรงแรมมารวยการ์เด้น กรุงเทพมหานคร, หน้า จ-1 ถึง จ-27.

วีระพล จันทร์สวรรค์, สุภาพร จิตตปาลพงศ์ และนงนุช จันทรราช. 2536. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากหนอนตายหยากต่อเห็บโค ***ว.เกษตรศาสตร์(วิทย์)*** 27: 336-340.

เสริม สีมา, รัตนาภรณ์ พรหมศรัทธา, พรรณีกา อัตตนนท์, อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ, อิสริยะ สืบพันธุ์ดี และวัชรพงศ์ เมธีทวีพิทักษ์. 2551. การทดลองประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูคะน้า . ***รายงานการประชุมวิชาการประจำปี 2551 สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร*** กรมวิชาการเกษตร ณ โรงแรมฮอลิเดย์ อินน์ รีสอร์ท รีเจ้นท์ บีช เพชรบุรี หน้า 12-18.

Bhuvaneswari, R.and Balasundaram, C.; 2009. "Anti-bacterial activity of *Acorus calamus* and some of its derivatives against fish pathogen (*Aeromous hydrophila*)" ***J. of Medicinal Plants Research***, v.3 (7), p.538-547.

Brem, B., Seger, C., Pacher, T., Hofer, O., Vajrodaya, S. and Greger, H. 2002. Feeding Deterrence and Contact Toxicity of *Stemona* Alkaloids-A Source of Potent Natural Insecticides. **J. Agric. Food Chem**. 50:6383-6388.

Greger, H. 2006. Structure Relationships, Distribution and Biological Activities of *Stemona* Alkaloids. *Planta Med.* 72: 99-113.

Jacobson, M. 1989. Botanical Pesticides: Past, Present, and Future *In* Insecticides of Plant Origin. ACS Symposium Series 387, American Chemical Society, Washington D. C., 1989: pp. 1-10.

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

Kim, S.; Park, C. and Ohh, M. 2003a. Contact and fumigant activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Lasiderma serricorne* ***Journal of Stored Products Research*** 39:11-19.

Kim, S.; Roh, J.; Kim, D. Lee, H. and Ahn, Y. 2003b. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Stiophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis* ***Journal of Stored Products Research*** 39:293-303.

Lin, W., Ye,Y. and Xu, R.S. 1992. Chemical Studies on New *Stemona* Alkaloids, IV Studies on New Alkaloids from *Stemona tuberose*. ***J. Nat. Prod.*** 551 (5): 571-576.

Lluche, 2009. "Calamus Oils" Material Safety Data Sheet, available on http://www.Lluche.com/eng/pdf/00408QQQL IN.pdf. (2009).

Natori, S., Ikekawa, N. and Suziki, M. 1981. Extraction and Isolation of Biological Active Compounds. *In Advance in Natural Products Chemistry* John Wiley&Sons, New York: chapter 23.

Nawamaki, K. and Kuroyanagi, M. 1996. Sesquiterpenods from *Acorus calamus* as Ggermination Inhibitors ***Phytochemistry*** 43(6) :1175-1182.

Pacher, T., Seger, C., Engelmeier, D. Vajrodaya, S., Hofer, O.and Greger, H. 2002. Antifungal Stilbenoids from Stemona collinsae. ***J. Nat. Prod.*** 65: 820-827.

Perrett, S.; Whitfield, P.J.; 2006. "Anthelmintic and Pesticidal activity of *Acorus gramineus* (Araceae) is associated with Phenylpropanoids Asarone" ***Phytotherapy Research,*** v.9 (6), p. 405-409.

Svendsen, A.B. and Verpoorte, R. 1983. Chromatography of Alkaloids Part A: Thin –layer Chromatography. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam: Pp. 3-57.

Thacker, J.R.M., 2009. "An Introduction to Arthropod Pest Control" Dept. of Biological Science, Universityof Paisley, UK, available on http: //assets.cambridge.org/97805215/61068/sample /978052156068

Xu, R.S., Lu, Y.J., Chu, J.H., Iwashita, T., Naoki,H., Naya, T. and Nakanishi, K. 1982. Study on some new *Stemona* alkaloids, A diagnostically useful 1H NMR line-broadening effect. ***Tetrahedron.*** 38(17): 2667-2670.

Zhao, W.M., Quin, G.W., Ye, Y., Xu, R.S. and Le, X.F. 1995. Bibenzyl from *Stemona tuberose*. *Phytochemistry*. 38(3): 711-713.