รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** -

2. **โครงการวิจัย** วิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติจากพืช

   กิจกรรม ศึกษาการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) เพื่อทำมาตรฐานเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในพืช

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) -

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** วิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในว่านน้ำ

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

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวพจนีย์ หน่อฝั้น	สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	นางพรรณีกา อัตตนนท์	สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาวณัฐพร ฉันทศักดา	สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. **บทคัดย่อ**

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

คำหลัก: เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี, ว่านน้ำ, หนอนใยผัก, อะซาโรน

The present communication attempts to evaluate the efficacy and the fingerprinting profile of *Acorus calamus* L. Dried powders of the rhizome as well as their extracts in different solvents such as methanol, ethanol, ethyl acetate, petroleum ether, chloroform, hexane, acetone and water were evaluated as bio-insecticides against *Plutella xylostella* L. The results showed that 2 %w/v crude methanol extract of A. calamus caused 96.33 % mortality. Phytochemical screening of the *Acorus calamus* L. showed revealed the presence of various secondary metabolise such as alkaloids, flavonoids, terpenoids, phenolic compounds, tannins, and glycosides. A high performance thin layer chromatography (HPTLC) method was developed to compare the extract through a fingerprint profile of their chemical compounds. The HPTLC fingerprint patterns of various sovent extracts of *Acorus calamus* L. resembled each other in some zones and Rf values. Main chemical compositions were also isolated, semi-purified and identified by HPTLC compared these data with reference fingerprint profile of β-asarone. The results confirm about the presence of the main chemical component of semi-purified compound might be β-asarone. The insecticidal activity of semi-purified compound was examined against *Plutella xylostella* L. and found that semi-purified compound caused 92.5 % mortality with 0.5 % w/v. The study revealed specific qualitative HPTLC data can be used as a diagnostic tool for the correct identification of the plant and it is useful as a phytochemical marker and also a good estimator for the plant for future standardization work.

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

6. คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม สามารถปลูกพืชได้ตลอดปี เนื่องจากภูมิประเทศตั้งอยู่ในเขตอบอุ่น สภาพอากาศโดยทั่วไปจึงเอื้อต่อการเจริญเติบโตและแพร่ระบาดของศัตรูพืชทำให้เกิดปัญหาด้านศัตรูพืชรุนแรง สร้างความเสียหายต่อผลผลิต ทำให้เกษตรกรตองพึ่งสารเคมีปองกันและกำจัดศัตรูพืช อันไดแกยาฆาแมลงตาง ๆ ซึ่งเป็นวิธีปฏิบัติที่ง่ายไม่ต้องใช้เทคโนโลยีซับซ้อน เห็นผลรวดเร็ว เกษตรกรจึงใช้สารเคมีป้องกันและกำจัดศัตรูพืชมากเกินความจำเป็น แม้ว่าการใช้สารเคมีในการควบคุมศัตรูพืชในระยะแรกพบว่ามีประสิทธิภาพสูงมาก แต่ก็ก่อให้เกิดปัญหาหลายอย่างตามมา เช่นสารพิษที่ตกค้างในดินและน้ำบริเวณพื้นที่เกษตร ซึ่งส่งผลกระทบต่อการใช้น้ำเพื่อบริโภคของเกษตรกรเป็นอันตรายต่อสุขภาพได้ สัตว์และสิ่งมีชีวิตที่มีประโยชน์ตาย ลดความหลากหลาย

ของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ และที่สำคัญคือ แมลงพัฒนาสร้างความต้านทานต่อสารเคมี (Sarwar and Salman, 2015) จากรายงานวิจัยของ Pérez *et al.* (2000) พบว่าแมลงศัตรูศัตรูพืชสามารถสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลง โดยค่าความเป็นพิษ (LC_{50}) มีค่าสูงกว่ากลุ่มชุดทดลองเปรียบเทียบ ยิ่งไปกว่านั้นปัญหาการตกค้างของสารเคมีในผลิตผลเกษตรยังเป็นปัญหาสำคัญในการส่งออกซึ่งนับวันยิ่งทวีความรุนแรงมากขึ้นเรื่อยๆ และส่งผลกระทบโดยตรงต่อผู้บริโภค รวมไปถึงสภาวะสินค้าเกษตรเพื่อการแข่งขันในตลาดโลก ซึ่งมีมาตรการกีดกันสินค้าเกษตรที่ผลิตในกระบวนการที่ไม่ได้มาตรฐาน ตลอดจนปัญหาสิ่งแวดล้อมและระบบนิเวศนวิทยาที่สูญเสียไป เพื่อเป็นแนวทางลดการใช้สารเคมีและเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาสิ่งที่ทดแทนการใช้สารเคมี ทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่ง คือ การใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรหรือสารธรรมชาติมาใช้ในการป้องกันและกำจัดศัตรูพืช เนื่องจากมีความปลอดภัยสูงกว่าการใช้สารเคมีสังเคราะห์และสลายตัวได้ง่าย จึงไม่มีพิษตกค้างในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร (Campos *et al.*, 2018]

การใช้สารสกัดจากธรรมชาติในการควบคุมแมลงศัตรูพืชนั้นเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้รับการสนใจและเป็นวิธีหนึ่งในหลาย ๆ วิธีที่ถูกนำมาใช้ในกระบวนการบริหารศัตรูพืชแบบบูรณาการ จากการศึกษาวิจัยพบพืชหลายชนิดมีฤทธิ์ฆ่าแมลงเช่น หางไหลใช้ในการกำจัดเพลี้ย สารสกัดจากสะเดาใช้กำจัดหนอนใยผัก หนอนกระทู้ผัก และดอกไพรีทรัมใช้ไล่ยุง (Siegwart *et al*., 2015) พืชที่ใช้กำจัดศัตรูพืชส่วนใหญ่เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Annonaceae, Asteraceae, Cannellacceae, Libiatae และ Rutaceae ว่านน้ำ (*Acorus calamus* L.) เป็นไม้ล้มลุกเนื้ออ่อนสูง 1-2 เมตร อยู่ในวงศ์ Araceae ว่านน้ำมีลำต้นเป็นเหง้าอยู่ใต้ดินลักษณะเป็นแท่งค่อนข้างแบน มีใบแข็งตั้งตรงรูปร่างแบนเรียวยาว ปลายใบแหลม แตกใบเรียงสลับซ้ายขวาเป็นแผง ใบค่อนข้างฉ่ำน้ำ ดอกมีสีเขียว มีขนาดเล็กออกเป็นช่อ มีจำนวนมากอัดกันแน่นเป็นแท่งรูปทรงกระบอก มีก้านช่อดอกลักษณะคล้ายใบ ทั้งใบ เหง้า และรากมีกลิ่นหอมฉุน ชอบขึ้นตามที่น้ำขังหรือที่ชื้นแฉะ เหง้าของว่านน้ำให้น้ำมันหอมระเหยได้ดีและมีปริมาณมาก เป็นพืชที่มีการนำไปใช้ประโยชน์ในการจัดการกับโรคและแมลงศัตรูพืชทางการเกษตร (มงคล, 2547)

มีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเหง้าของว่านน้ำมีสารที่มีความเป็นพิษต่อแมลงหลายชนิดหลายชนิดโดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลง มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ การวางไข่ และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลง และยับยั้งการกินอาหารของแมลง เช่น รายงานวิจัยของ Tewary *et al*. (2005) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำสามารถกำจัดเพลี้ยไฟ (*A. craccivora*) โดยมีสมบัติการเป็นสารฆ่า สารยับยั้งการกินและสารยับยั้งการเจริญเติบโต Bhonde *et al*. (2002) ทดสอบน้ำมันสกัดจากว่านน้ำกับหนอนกระทู้ผัก Spodoptera litura ด้วยวิธี leaf disk bioassays พบว่า สารสกัดสามารถลดการกินอาหารของหนอนกระทู้ผักได้ อีกทั้งงานวิจัยของ Yoa *et al*. (2008) พบว่าสารสกัดเอธานอลของว่านน้ำมีฤทธิ์ในการขับไล่ด้วงข้าวโพด (*S. zeamais*) ว่านน้ำสามารถผลิตน้ำมันหอมระเหยจากกระบวนการ secondary metabolism และสารสำคัญที่พบในน้ำมันหอมระเหยของว่านน้ำคือ β-asarone (Bjornstad *et al*., 2009) สารดังกล่าวเป็นสารหลักที่ทำให้สารสกัดจากว่านน้ำมีฤทธิ์ควบคุมโรคพืชและมีพิษร้ายแรงต่อแมลงบางชนิด Koul *et al*. (1990) รายงานว่าสาร β-asarone สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและมีฤทธิ์เป็นสารขับไล่เมื่อทดสอบกับหนอนผีเสื้อกลางคืน (*Peridroma soucia*) Jacobson *et al*. (1976) ทดสอบนำสาร β-asarone acorangermacrone และ asarylaldehyde ที่

สกัดออกมาในรูปน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำ นำมาทดสอบกับแมลงวันผลไม้เพศเมีย 2 ชนิด คือ *Ceratitis capitata* และ *Dacus cucurbita* ส่วน *D. dorsalis* ใช้เพศผู้มาทดสอบ พบว่า สาร β-asarone ทำให้ Ceratitis capitata ตายได้ ส่วนสาร asarylaldehyde มีผลทำให้ตัวผู้ และเมียของ *D. dorsalis* ตายได้เช่นกัน Rao *et al*. (2002) รายงานว่าเมื่อนำว่านน้ำ สะเดา และโลติ๊น มาผสมในอัตราส่วนต่างๆกัน พบว่าอัตราส่วน 1:1:1 มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการกินอาหารของตัวอ่อนผีเสื้อกลางคืน (*Earias vittella* (Fab)) ได้ถึง 80% ของกลุ่มควบคุม Wafaa *et al.* (2017) อธิบายว่าสารสกัดจากพืชส่งผลต่อกระบวนการในการลอกคราบของแมลง (molting) โดยจะไปยับยั้งการสังเคราะห์การสร้างชั้นคิวติเคิล (cuticle) ใหม่ของแมลง ในการเป็นสารฆ่าของสารสกัดจากพืช พิษของสารสกัดจากพืชจะเข้าสู่แมลงทางรูหายใจ (spiracle) ข้อต่อ (joint) รอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อ (membrane)

วงการวิทยาศาสตร์สมัยใหม่เชื่อว่าในพืชสมุนไพร ประกอบด้วยสารทางเคมีหลายชนิดแต่ละส่วนของพืชสมุนไพรมีสารประกอบที่แตกต่างกันไป สารเหล่านี้เป็นตัวกำหนดสรรพคุณของพืชชนิดและปริมาณของสารจะแปรตามชนิดของพันธุ์พืชและสภาพแวดล้อม (Isman, 2000; Miresmailli and Isman, 2013) ในสภาพปัจจุบันการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรของประเทศไทยยังมีปัญหาในเรื่องการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรในเภสัชตำรับหรือในผลิตภัณฑ์เพื่อการกำจัดศัตรูพืช ซึ่งมีพืชเพียงไม่กี่ชนิดที่มีการกำหนดสารบ่งชี้ ส่วนใหญ่มีเพียงหนึ่งหรือสองชนิดซึ่งในพืชสมุนไพรไม่ได้มีเพียงสารบ่งชี้ดังกล่าว แต่จะประกอบด้วยสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) อีกหลายชนิด ซึ่งสารเหล่านี้ก็มีส่วนร่วมในการออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพรดังกล่าว (Rattan, 2010; Jiang *et al*., 2010) นักวิจัยได้พยายามแก้ปัญหาดังกล่าว โดยการทำลายพิมพ์ขององค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) เป็นการตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อหากลุ่มสารสำคัญในพืชสมุนไพรโดยอาศัยหลักการที่ว่าไม่มีพืชสมุนไพรใดที่มีองค์ประกอบและปริมาณสารที่เหมือนกันทุกอย่าง ผลการตรวจสอบจะเป็นลักษณะเฉพาะตัวเปรียบเสมือนลายพิมพ์นิ้วมือ (Fingerprint) ของสมุนไพรนั้นๆ เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการพิสูจน์เอกลักษณ์ และ ควบคุมคุณภาพของสารสกัดพืชสมุนไพร (Gocan and Cimpan , 2004; Sidney *et al*., 2010; Toniolo *et al*., 2014; Nicoletti *et al*., 2012) เนื่องจากยังมีพืชอีกมากมายหลายชนิดที่ยังขาดข้อมูลด้านการศึกษาหาสารออกฤทธิ์ต่อต้านแมลง หากสามารถศึกษาและรู้ถึงสารออกฤทธิ์และนำมาควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและปริมาณสารสำคัญเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลงจะเป็นการเพิ่มมูลค่าการใช้ประโยชน์ของพืชในประเทศ รวมถึงกระตุ้นให้เกษตรไทยหันมาใช้สารสกัดจากธรรมชาติอย่างแพร่หลายต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

7.1 อุปกรณ์ เครื่องมือเครื่องแก้ว และสารเคมี

1. เครื่องแก้ว ได้แก่ volumetric flask, pipette, round bottom flask, cylinder, beaker, vial เป็นต้น

2. สารเคมี ได้แก่ diethyl ether, petroleum ether, tert-butyl methyl ether, methanol, ethanol, butanol, propanol, propane1,2diol, emyl alcohol, tetrahydrofuran, formaldehyde, acetic acid, dichloromethane, ethyl acetate, dioxane, acetone, acetonitrile, benzene, toluene, xylene, chloroform, hexane และ waterน้ำยาทดสอบ ได้แก่ Dragendorff's reagent, Mayer's reagent, ferric

chloride, lead acetate, Salkowski's test, Benedict's reagent, Fehling's reagent, Barfoed's reagent เป็นต้นและสารมาตรฐาน ได้แก่ β-asarone

3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้า, ultrasonic bath, vacuum pump, เครื่องบดตัวอย่าง, ตู้อบตัวอย่าง, เครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator), เครื่องทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC,High performance thin layer chromatography) และแผ่น HPTLC plate silica gel 60F254 size 20x10cm

4. สิ่งทดลอง ได้แก่ ว่านน้ำ และหนอนใยผัก

7.2 วิธีการ

1. การเตรียมสารสกัดว่านน้ำ

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

2. ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดว่านน้ำที่มีฤทธิ์ในการควบคุมหนอนใยผัก

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

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

3. ทดสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening Test) โดยวิธีการทดสอบทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบชนิดต่างๆ

นำสารสกัดว่านน้ำด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ มาทำการทดสอบทางเคมีเบื้องต้นโดยการทำให้เกิดสีหรือการเกิดตะกอน ซึ่งประกอบด้วยการทดสอบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloids) ด้วยน้ำยาทดสอบ Dragendorff's reagent, Mayer's reagent, ทดสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ด้วยน้ำยาทดสอบ Shinoda'sreagent, Ferric chloride, Lead acetate, ทดสอบสารกลุ่มฟีนอลและแทนนิน (Phenol and

Tannin) ด้วยน้ำยาทดสอบ Ferric chloride, Lead acetate, ทดสอบสารกลุ่มซาโปนิน (Saponin) ด้วยน้ำยาทดสอบ Olive oil test, ทดสอบสารกลุ่มเทอร์ปินอยด์ และเสตียรอยด์ ด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น salkowski's test, ทดสอบสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น Benedict's reagent, Fehling's reagent, Barfoed's reagent

4. การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีเบื้องต้นของว่านน้ำด้วยเทคนิค HPTLC

4.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารต่างๆ ที่มีในสารสกัดว่านน้ำด้วยวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPTLC

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

ตารางที่ 1 แสดงระบบระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ในการแยกสารสกัดด้วยเทคนิค HPTLC

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

4.2 การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบว่านน้ำ

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

5. การสกัดแยกสารกึ่งบริสุทธิ์

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

6. บันทึกและรวบรวมข้อมูล

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2560 สิ้นสุด กันยายน 2561 (ระยะเวลา 1 ปี)

สถานที่ทดลอง กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสำรวจ เก็บตัวอย่างว่านน้ำ และเตรียมเป็นสารสกัดหยาบ

ได้ตัวอย่างว่านน้ำ ที่สับเป็นท่อน ผึ่งแห้ง บดแล้วเก็บในภาชนะทึบแสง (รูปที่ 1)

ก) ข) ค)

รูปที่ 1ก) เหง้าว่านน้ำสด ข) สับเป็นท่อน ค) ว่านน้ำบดละเอียด

2. ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดว่านน้ำ ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผัก

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

<u>ตารางที่ 2</u> ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผัก วัย 2 ที่ใช้สารสกัดหยาบว่านน้ำจากตัวทำละลายต่างๆ ในการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นต่อหนอนใยผัก

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

หมายเหตุ : ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3. ผลการทดสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น โดยวิธีการทดสอบทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบ

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

<u>ตารางที่ 3</u> ผลการทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีในสารสกัดว่านน้ำ ด้วยน้ำยาทดสอบชนิดต่างๆ

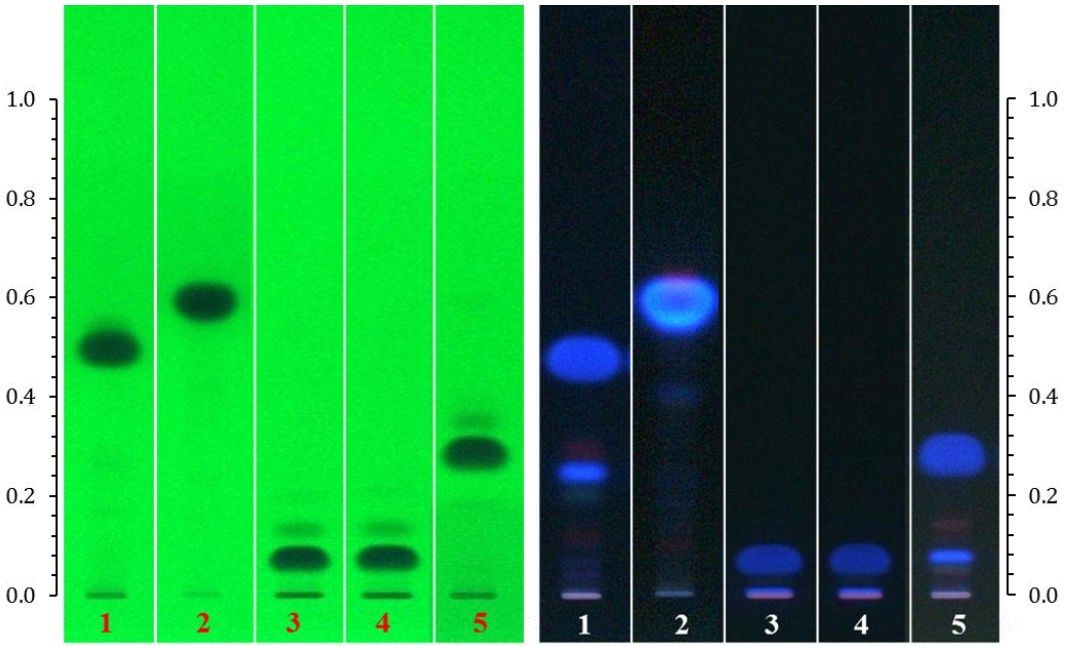
กลุ่มสารพฤกษเคมี	น้ำยาทดสอบ	สารสกัดว่านน้ำด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ								
		Acetone	Hexane	Chloroform	Petroleum ether	Dichloromethane	Ethyl acetate	Ethanol	Methanol	น้ำ
alkaloids	Dragendorff's reagent	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mayer's reagent	+	+	+	-	+	-	+	+	-
flavonoids	Shinoda's reagent	+	+	+	+	+	+	+	-	-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

หมายเหตุ – หมายถึง ตรวจสอบไม่พบ, + หมายถึง ตรวจสอบพบ

4. ผลการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีเบื้องต้นของว่านน้ำด้วยเทคนิค HPTLC

4.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารต่างๆ ที่มีในสารสกัดว่านน้ำด้วยวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPTLC

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



(ก) (ข)

<u>รูปที่ 2</u> เปรียบเทียบทีแอลซีโครมาโทแกรมของสารสกัดว่านน้ำ ด้วยวัฏภาคของเหลวทั้ง 5 ระบบ (ก) ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (ข) ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

ระบบที่ 1 Dichloromethane : Ethylacetate (96:4)

ระบบที่ 2 Dichloromethane : Methanol (97:3)

ระบบที่ 3 Hexane : Ethylacetate (90:10)

ระบบที่ 4 Petroleum ether : Ethylacetate (97 : 3)

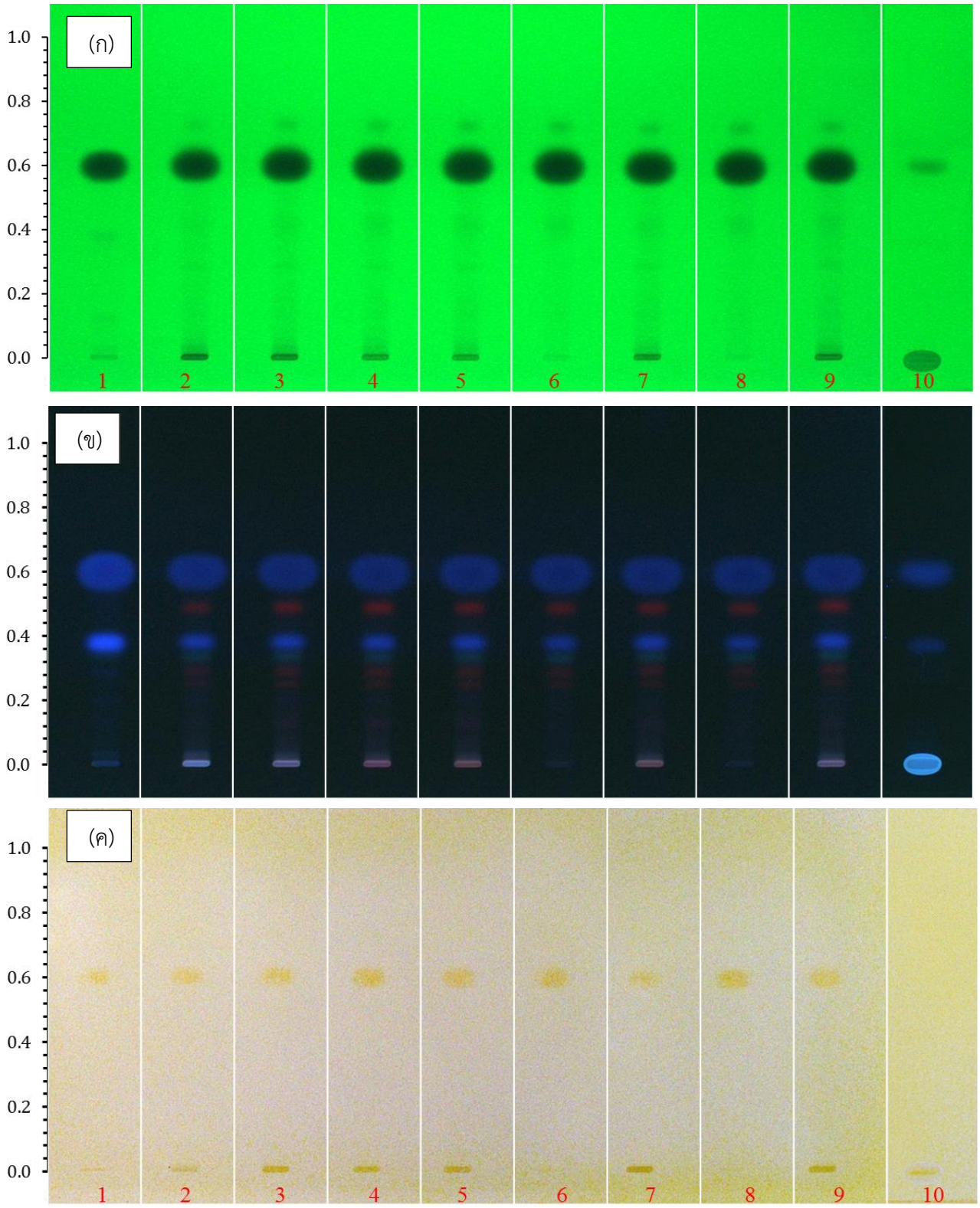
ระบบที่ 5 Tolunene : Ethylacetate (97 : 3)

จากผลการศึกษาจึงได้สภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของกลุ่มสารสำคัญจากว่านน้ำ ดังนี้

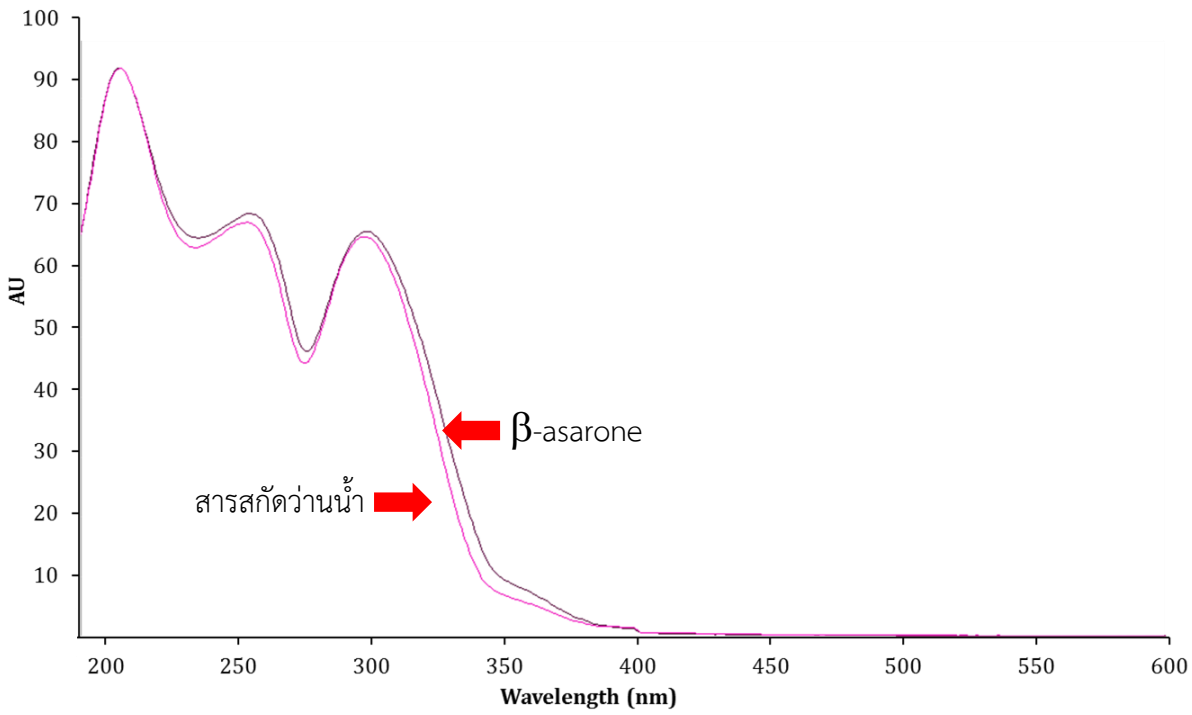
วัฏภาคคงที่ : แผ่น TLC ชนิด HPTLC plate silica gel 60 F254 size 20x10 cm
วัฏภาคของเหลว (mobile phase) : Dichloromethane/ethylacetate (96/4)
ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 298 nm
ส่องภายใต้แสง uv254 และ366nm

4.2 ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของว่านน้ำด้วยเทคนิค High Performance Thin Layer (HPTLC)

ผลการศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทรกราฟีพบว่าในสารสกัดว่านน้ำด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ พิจารณาจากทีแอลซีโครมาโทแกรม (รูปที่ 3) แถวที่ 2-9 ปรากฏตำแหนงการเคลื่อนที่ของสารตางชนิดกันที่ตำแหนงแตกตางกันอย่างชัดเจน โดยสารที่แยกได้มีจำนวน 9 แถบ มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับ (Rf) 0.13, 0.21, 0.31, 0.37, 0.42, 0.53, 0.62 และ 0.78 โดยพบแถบสารที่เด่นชัดมีค่า Rf 0.62 และตรงกับค่า Rf ของสารมาตรฐาน β-asarone สามารถตรวจสอบได้ชัดเจนภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรจะพบเป็นจุดสีดำและเป็นจุดเรืองแสงสีฟ้า เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร จากการยืนยันด้วยการสเปรย์ด้วย Dragendroff’ s reagent พบว่าทุกแถบสารที่ Rf 0.62 เปลี่ยนเป็นสีเหลืองเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน เมื่อศึกษา ultraviolet spectrum ของสารสกัดว่านน้ำจากจุด Rf 0.62 พบว่าจุดดังกล่าวมี maximum absorption ที่ 298 นาโนเมตร และตรงกันกับสารมาตรฐาน (รูปที่ 4) และระยะการเคลื่อนที่ของสารที่ปรากฏบนทีแอลซีโครมาโทแกรมแสดงใหเห็นวาสารสกัดหยาบจากว่านน้ำถึงแมจะสกัดด้วยตัวทำละลายคนละชนิดก็สามารถสกัดไดสารชนิดเดียวกัน ในทางตรงกันข้ามกับสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำ เมื่อพิจารณาจาก ทีแอลซีโครมาโทแกรมแถวที่ 10 ปรากฏแถบสารที่เด่นชัดเพียง 2 จุด แสดงใหเห็นวายังมีสารบางชนิดสกัดออกมาไมหมด ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากความมีขั้วของน้ำไม่สามารถสกัดสารที่ไม่มีขั้วในว่านน้ำได้ แต่เมื่อพิจารณา 2 แถบสารพบว่ามีค่า Rf ตรงกับสารมาตรฐาน แสดงว่าน้ำสามารถสกัดแยกสารสำคัญออกมาได้เช่นเดียวกันกับตัวทำละลายอื่นแต่สกัดออกมาได้ไม่ดี ดังนั้นน้ำจึงไมเหมาะสมที่จะใชสกัดว่านน้ำ



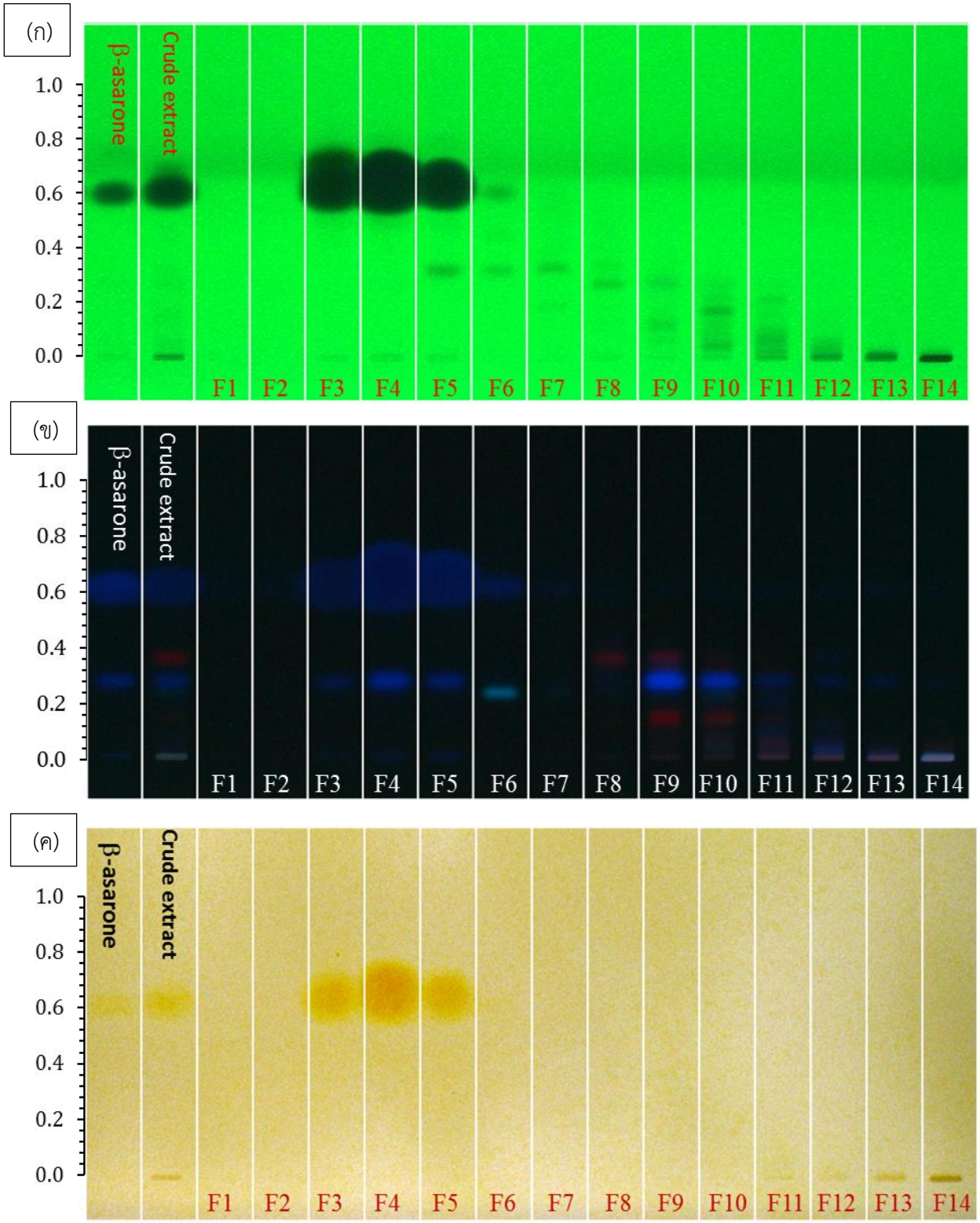
รูปที่ 3 ทีแอลซีโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน β-asarone และสารสกัดว่านน้ำในตัวทำละลายต่างๆ 1= β-asarone, 2=methanol, 3=ethanol, 4= ethyl acetate, 6= petroleum ether, 7=chloroform, 8 = hexane, 9=acetone, 10=น้ำ (ก) ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (ข) ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร (ค) ตรวจสอบด้วยน้ำยาพ่น Dragendorff's reagent



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

5. การสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์เพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก

นำสารสกัดหยาบ methanol ไปสกัดแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ silica gel 60 ขนาดอนุภาค 0.040-0.063 มิลลิเมตร เป็นวัฏภาคคงที่ ชะด้วยระบบตัวทำละลายแบบ gradient elution ของเอทิลอะซิเตทต่อไดคลอโรมีเทน โดยเริ่มชะด้วยไดคลอโรมีเทน จากนั้นเพิ่มความมีขั้วขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงเอทิลอะซิเตท (0% - 100% เอทิลอะซิเตทต่อไดคลอโรมีเทน) จากนั้นนำ ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนจนแห้ง และทำการเปรียบเทียบส่วนสกัดย่อยด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดแผ่นบาง โดยตรวจสอบภายใต้หลอดกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต สารที่แยกได้มีทั้งหมด 14 fraction (F1-F14) นำแต่ละ fraction มา spot บน TLC plate นำไปดูลักษณะ fingerprint ของสารดวยเครื่อง UV ผลจากทีแอลซีโครมาโทแกรม (รูปที่ 5) พบว่า fraction F3, F4 และ F5 มีลักษณะ Band ที่มีค่า Rf ตรงกับสารมาตรฐาน β-asarone เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรพบว่าเป็นจุดสีดำ และเป็นจุดเรืองแสงสีฟ้า เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร จากการยืนยันด้วยการสเปรย์ด้วยน้ำยาพ่น Dragendorff's reagent พบว่าเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน ดังนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่ามีการตรวจพบสารสำคัญ β-asarone ในสารสกัดว่านน้ำ จากนั้นทำการรวม fraction แตละ fraction โดยอาศัยลักษณะการแยกของสารที่เหมือนกันนำมารวมเปน fraction เดียวกัน โดยใช้อักษรสองตัวหน้าของ Acorus Calamus Linn เป็นชื่อของ fractions ต่าง ๆ ได้สารทั้งหมด 4 ชุด คือ AC1 (F1-F2), AC2 (F3-F7), AC3 (F8-F11) และ AC4 (F12-F14)



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

6. ผลการทดสอบประสิทธิภาพ (efficacy) ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์

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

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักวัย2 ในการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดว่านน้ำกึ่งบริสุทธิ์ที่อัตรา 0.5 %w/v

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

หมายเหตุ ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมัน 95%

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

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

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลงานวิจัยนี้ ทำให้ทราบข้อมูลกลุ่มสารสำคัญ วิธีการสกัดและตรวจสอบสารที่มีฤทธ์ต่อหนอนใยผักจากว่านน้ำได้ข้อมูลเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีเป็นต้นแบบในการทำข้อมูลเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในพืชที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เพื่อเป็นมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพสารสำคัญในพืชทั้งในรูปแบบของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ เป็นฐานข้อมูลของสารสกัดในพืชที่มีศักยภาพทางด้านป้องกันกำจัดศัตรูพืช ซึ่งจะเป็นปัจจัย

สนับสนุนการผลิตผลิตภัณฑ์การเกษตรจากสารธรรมชาติ เพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคสินค้าเกษตร สามารถวิจัยต่อยอดงานวิจัย โดยนำสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ใช้เป็นสารมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ หรือทำผลิตภัณฑ์สูตรเข้มข้นต่อไป

11. คำขอบคุณ -

12. เอกสารอ้างอิง

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

13. ภาคผนวก

-