รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด

.....

1. **แผนงานวิจัย** -
2. **โครงการวิจัย** วิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติจากพืช

   กิจกรรมที่ 3 ศึกษาการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) เพื่อทำมาตรฐานเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในพืช
3. **ชื่อการทดลอง** วิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในสาบเสือ

   Study on HPTLC technique for providing fingerprint of active substances in *Chromolaena odorata* (L.) R.M. King & H. Robin
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

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

5. **บทคัดย่อ**

วิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในสาบเสือ ซึ่งเป็นพืชที่มีศักยภาพในการกำจัดศัตรูพืช ดำเนินการเก็บตัวอย่างพืชสาบเสือ จาก ต.หนองบัว อ.พัฒนานิคม จ.ลพบุรี สกัดใบสาบเสือด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ คือ petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, methanol และ acetronitrile ทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผักโดยวิธี leaf dipping method พบว่าสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ มีผลทำให้หนอนใยผักวัย 2 ตายที่ 4 วัน เท่ากับ 63.33, 66.67, 40.00, 36.67 และ 40.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยที่สารสกัดหยาบ petroleum ether และ dichloromethane ทำให้หนอนใยผักตายสูงสุดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาชนิดต่างๆ พบว่าสารสกัดหยาบ petroleum ether และ dichloromethane มีสารออกฤทธิ์กลุ่ม terpenoids และ phenol ตามลำดับ และศึกษาหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารกลุ่ม terpenoids และ phenol ด้วยเทคนิค HPTLC บนแผ่น HPTLC plate silica gel 60 F_{254} ขนาด 20x10 ซม. ผลพบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ วัฏภาคเคลื่อนที่: ethyl acetate : hexane (1:9, v/v) และ dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (79:20:1, v/v/v) ตามลำดับ; ตัวตรวจสอบ: UV 254 nm, UV 366 nm และ white light; สแกนสาร กลุ่ม terpenoids ที่ความยาวคลื่น 202 และ 263 nm สารกลุ่ม phenol ที่ความยาวคลื่น 290 nm ; น้ำยาพ่น p-anisaldehyde/sulfuric acid reagent และ Fast Blue B reagent ตามลำดับ พบสารกลุ่ม terpenoids ในใบ ดอก และก้านสาบเสือ ที่ R_F 3 ตำแหน่ง คือ 0.16, 0.33 และ 0.63 และพบสารกลุ่ม phenol ในใบและดอกสาบเสือที่ R_F 1 ตำแหน่ง คือ 0.55 และเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์สาบเสือ พบว่า ผลิตภัณฑ์ให้เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี terpenoids ในตำแหน่ง R_F 0.10, 0.43 และ 0.53 และไม่พบสารกลุ่ม phenol ในผลิตภัณฑ์สาบเสือ

คำหลัก : เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี, สาบเสือ, หนอนใยผัก

Abstract

Siam weed is locally used in Thailand as botanical pesticide. A high performance thin-layer chromatography (HPTLC) method was developed for a fast analysis of HPTLC fingerprint of active substances in Siam weed from Lopburi province. Siam weed's leaves were sequentially extracted with petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, methanol and acetronitrile. These extracts were tested against 2nd star diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) by leaf dipping method. Results showed the mortality were 63.33, 66.67, 40.00, 36.67 and 40.00%, respectively. The highest insecticidal activity was observed from petroleum ether and dichloromethane extract of Siam weed. Preliminary phytochemical screening of the effective crude extracts showed the presence of terpenoids and phenol group. HPTLC fingerprint of terpenoids and phenol were performed by ethyl acetate : hexane (1:9, v/v) and dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (79:20:1, v/v/v), respectively as mobile phase. The terpenoids were detected at wavelength 202 and 263 nm also 209 nm for phenol. HPTLC fingerprint of Siam weed revealed three peaks of terpenoids (R_F 0.16, 0.33, 0.63) in leaf, branch and flower parts and one peak of phenol (R_F 0.55) in leaf and branch. Commercial products revealed three peaks of terpenoids (R_F 0.10, 0.43, 0.53).

Key words : HPTLC fingerprint, Siam weed*, Plutella xylostella* L.

6. คำนำ

การใช้สารสกัดจากพืชในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เป็นทางเลือกหนึ่งในการสนับสนุนการลดการใช้สารเคมีในภาคการเกษตร เพื่อแก้ไขปัญหาสารพิษตกค้างในผลผลิตทางการเกษตร และสิ่งแวดล้อม จนส่งผลกระทบต่อภาคการส่งออก และระบบนิเวศ รวมถึงการสร้างความต้านทานต่อสารเคมีของแมลงศัตรูพืช สารสกัดจากพืชสามารถสลายตัวได้ง่ายในธรรมชาติ ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม สารสกัดจากพืชยังมีองค์ประกอบหลายชนิด แมลงจึงต้องใช้ระยะเวลาในการสร้างความต้านทาน สารสกัดจากพืชที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เช่น สะเดา หางไหล หนอนตายหยาก ว่านน้ำ รวมถึง สาบเสือ สาบเสือเป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยมจากเกษตรกร เนื่องจากหาง่าย และขึ้นได้เองตามธรรมชาติ

สาบเสือ (Siam weed, bitter bush) เป็นพืชในสกุล Chromolaena จัดอยู่ในวงศ์ทานตะวัน COMPOSITAE (ASTERACEAE) จัดเป็นวัชพืชที่มีถิ่นกำเนิดในแถบอเมริกากลาง และระบาดทั่วไปในเขตร้อนทั่วทุกทวีป สารสกัดสาบเสือมีศักยภาพในการควบคุมวัชพืช จากการศึกษาของ ชอุ่ม และคณะ (2550) ซึ่งทำการทดสอบประสิทธิภาพสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำ ต่อพืชปลูก ที่อัตราการสกัด 1 กิโลกรัมสาบเสือสดต่อน้ำ 3 ลิตร พ่นให้แก่พืชปลูกอายุสั้นที่นิยมบริโภคสด และวัชพืชที่เป็นปัญหาในสภาพไร่ พบว่าการพ่นแบบก่อนพืช และวัชพืชงอก (pre-emergence) และหลังพืช และวัชพืชงอก (post-emergence) มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช และวัชพืช คือ วัชพืชจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตมากกว่าพืชปลูก และ ธนิตา และคณะ (2558) ได้ศึกษาประสิทธิภาพเบื้องต้นของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบจากสาบเสือต่อการงอกของวัชพืช พบว่า ทั้งสองมีผลต่อการงอก ความยาวราก ความยาวยอดของต้นไมยราบยักษ์ และสารสกัดหยาบให้ผลการยับยั้งการงอกของไมยราบยักษ์สูงกว่าน้ำมันหอมระเหย

สาบเสือยังมีฤทธิ์ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช โดยจากการศึกษาของ วันวิสา (2549) พบว่า สารสกัดหยาบจากสาบเสือแห้งที่สกัดด้วยวิธี Moving bed ด้วยตัวทำละลาย n-hexane มีแนวโน้มออกฤทธิ์ต่อหนอนกระทู้ผักดีที่สุด โดยจะทำให้หนอนกระทู้ผักมีอัตราการตาย 50% ส่วนการสกัดสารจากสาบเสือแห้งโดยวิธี Fixed bed พบว่าสารสกัด dichloromethane มีแนวโน้มออกฤทธิ์ต่อหนอนกระทู้ผักดีที่สุด และจากการทดสอบสมบัติการยับยั้งการกินอาหารของหนอนกระทู้ผัก พบว่า สารสกัดหยาบจากสาบเสือแห้งที่สกัดด้วยตัวทำละลาย dichloromethane โดยวิธี Moving bed มีผลในการยับยั้งการกินอาหารดีที่สุด มี %AFI เท่ากับ 28.49 และงานวิจัยของ Nathapong (2560) พบว่า สารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล สามารถไล่ ฆ่า และยับยั้งการกินของเพลี้ยอ่อนถั่วโดยวิธีจุ่มใบพืช ในห้องปฏิบัติการได้ Bouda *et al.* (2001) ได้ศึกษาประสิทธิภาพความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากสาบเสือต่อด้วงงวงข้าวโพด พบว่ามีค่า LC_{50} เท่ากับ 6.78% w/v ที่เวลา 24 ชั่งโมง Ezena (2016) ได้ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดสาบเสือต่อแมลงศัตรู และผลกระทบต่อศัตรูธรรมชาติ ในแปลงกะหล่ำปลี พบว่า สารสกัดสาบเสือที่ความเข้มข้น 10-30 g/L w/v สามารถควบคุมเพลี้ยอ่อน และหนอนใยผัก โดยที่ความเข้มข้น 10-20 g/L w/v พบจำนวนศัตรูธรรมชาติสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และกรรมวิธีสารเคมี เช่นเดียวกับงานวิจัยของ ธนิตา และคณะ (2558) พบว่าสารสกัดหยาบจากสาบเสือมีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผักได้สูงกว่าน้ำมันหอมระเหยจากสาบเสือ

นอกจากผลการศึกษาเชิงประสิทธิภาพแล้ว ธนิตาและคณะ (2558) ได้ศึกษากลุ่มสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากส่วนต่างๆของสาบเสือด้วยเครื่อง GC/MS พบว่ากลุ่มสารสำคัญที่พบได้แก่ germacrene D, trans-caryophyllene, pregeijerene, Geyrene, α-pinene, β-pinene, delta-cadinene, α-copaen, α-caryophyllene เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Lawal และคณะ (2015) ได้วิเคราะห์สารประกอบระเหยง่ายในสารสกัดใบสาบเสือ ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด คือ hexane, chloroform, ethyl acetate และ methanol พบว่าสารสกัดใบสาบเสือจาก hexane มีองค์ประกอบหลักคือ phytol, caryophyllene oxide, germacrene D และ β-caryophyllene สำหรับสารสกัดจาก chloroform ประกอบด้วย dodecyl acetate, oleic acid methyl ester, di-n-octyl phthalate และ hexadecanoic acid methyl ester สารสกัดจาก ethyl acetate พบว่ามี phytol,

caryophyllene oxide, γ-muurolene, hexadecanoic acid และองค์ประกอบหลักของสารสกัดเมทานอล ได้แก่ hexadecanoic acid, caryophyllene oxide, α-terpineol และ α-cubebene

ทีแอลซีสมรรถนะสูง (High Performance Thin Layer Chromatography : HPTLC) คือ เป็นเทคนิคหนึ่งที่ได้รับความนิยมสูงในการควบคุมคุณภาพสมุนไพร ซึ่งพัฒนามาจากเทคนิคทีแอลซี (Thin Layer Chromatography: TLC) โดยอาศัยหลักการการแยกสารบนแผ่นที่เคลือบด้วยตัวดูดซับ เทคนิค HPTLC สามารถตรวจสอบได้ทั้งเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ โดยอาศัยเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี และการตรวจวัดความเข้มข้นด้วยอุปกรณ์ Densitometer ซึ่งมีความถูกต้อง (accuracy) มีความแม่นยำ (precision) มีสภาพไว (sensitivity) และมีความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำ (reproducibility) เทคนิค HPTLC สามารถควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพรในทัศนะระดับชาติและระดับสากล นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน จึงเป็นเทคนิคที่ประหยัดเวลา และค่าใช้จ่าย

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยข้างต้นยังขาดวิธีการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สาบเสือสำหรับกำจัดศัตรูพืช เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวเทคนิค HPTLC จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากเทคนิคนี้สามารถตรวจเอกลักษณ์สารสำคัญของตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับเอกลักษณ์มาตรฐาน ทำให้สามารถใช้ควบคุณคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพรได้เบื้องต้น โดยงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาข้อมูลเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในสาบเสือที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช สำหรับการทำเป็นมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพสารสำคัญในสาบเสือ

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ เครื่องมือ เครื่องแก้ว และสารเคมี

1. เครื่องบดตัวอย่างพืช
2. ตู้อบตัวอย่าง : POL-EKO-APARATURA รุ่น SL 53
3. เครื่องชั่งทศนิยมสองตำแหน่ง : Sartorius รุ่น CP 3202 S
4. เครื่องชั่งทศนิยมสี่ตำแหน่ง : Sartorius รุ่น AC 211 S
5. ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump)
6. เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) : BUCHI รุ่น R-124
7. เครื่องทีแอลซีสมรรถนะสูง (High-performance thin-layer chromatography, HPTLC)
8. เครื่องแก้ว ได้แก่ กรวยแยก กรวยกรองบูชเนอร์ ขวดกำหนดปริมาตร กรวยกรองแก้ว บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต ขวดก้นกลม หลอดทดลอง หลอดหยดสาร
9. TLC Tank (20 x 10 เซนติเมตร)
10. แผ่น HPTLC plate silica gel 60F254 size 20x10 เซนติเมตร
11. สารเคมี ได้แก่ ethyl acetate, ethanol, methanol, chloroform, hexane, petroleum ether, Dragendorff's reagent, Mayer's reagent, ferric chloride, lead acetate, Salkowski's test, Benedict's reagent, Fehling's reagent, Barfoed's reagent เป็นต้น
12. สิ่งทดลอง : หนอนใยผัก *Plutella xylostella* Linnaeus.

วิธีการ

1. ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสาบเสือที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผัก

1.1 เก็บและเตรียมตัวอย่างสาบเสือ

เก็บตัวอย่างพืชสาบเสือจาก ต.หนองบัว อ.พัฒนานิคม จ.ลพบุรี (พิกัด 14.846731, 101.086401) และเตรียมตัวอย่างโดยแยกส่วน ดอก ใบ และก้าน หั่นและอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 40°C บดให้เป็นผงละเอียด และเก็บในภาชนะทึบแสง

1.2 แช่ผงใบ ก้าน และดอกสาบเสือด้วยตัวทำละลาย methanol ในอัตราส่วน 5% w/v แล้วกรองหยาบด้วยผ้าคอตตอนดิบ นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นต่อหนอนใยผักวัย 2 วิธี leaf dipping method 3 กรรมวิธี ดังนี้ สารสกัดใบใน methanol, สารสกัดก้านใน methanol และสารสกัดดอกใน methanol พบเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักเท่ากับ 25.64, 6.41 และ 8.33% ตามลำดับ จึงเลือกใบมาศึกษาประสิทธิภาพในขั้นตอน 1.3

1.3 ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบใบสาบเสือที่มีฤทธิ์ในการควบคุมหนอนใยผัก

สกัดใบสาบเสือ 60 g ด้วยเครื่อง Soxhlet Extractor ในตัวทำละลาย petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, methanol และ acetronitrile ตามลำดับ ระเหยส่วนที่ได้จากการสกัด นำสารสกัดหยาบทั้ง 5 ชนิด ในอัตราส่วน 2.5% w/v มาทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนใยผักวัย 2 โดยวางแผนแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ดังนี้ สารสกัดหยาบใบสาบเสือใน petroleum ether, สารสกัดหยาบใบสาบเสือใน dichloromethane, สารสกัดหยาบใบสาบเสือใน ethyl acetate, สารสกัดหยาบใบสาบเสือใน methanol, สารสกัดหยาบใบสาบเสือใน acetronitrile โดยมี methanol เป็นกรรมวิธีควบคุม ดำเนินการทดสอบโดยวิธี leaf dipping method โดยการจุ่มลงในสารทดสอบเป็นเวลา 5 วินาที ผึ่งใบผักคะน้าให้แห้ง จากนั้นนำไปใส่ในกล่องเลี้ยงหนอนสำหรับทดสอบ ทำการปล่อยหนอนใยผักกล่องละ 10 ตัว บันทึกผลการทดลอง โดยตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง หลังการทดลอง ตามลำดับ

2. ศึกษาชนิดของกลุ่มสารในสารสกัดชนิดต่างๆ โดยวิธีการทดสอบทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบ

นำสารสกัดใบสาบเสือที่ได้จาก 1.3 มาทดสอบกลุ่มสารต่างๆ โดยวิธีทางพฤกษเคมี นพมาศและคณะ (2554)

- ทดสอบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloids) ด้วยน้ำยาทดสอบ Dragendorff’s reagent, Mayer’s reagent, Wagner’s reagent, Valser’s reagent
- ทดสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ด้วยน้ำยาทดสอบ Shinoda’s reagent, Ferric chloride, Lead acetate, Alkaline reagent
- ทดสอบสารกลุ่มฟีนอลและแทนนิน (Phenol and Tannin) ด้วยน้ำยาทดสอบ Ferric chloride, Lead acetate, Gelatin
- ทดสอบสารกลุ่มซาโปนิน (Saponin) ด้วยน้ำยาทดสอบ Foam test

- ทดสอบสารกลุ่มเทอร์ปินอยด์ และเสตียรอยด์ ด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น Salkowski's test, Lieberman Burchard
- ทดสอบสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น Benedict's reagent, Fehling's reagent, Barfoed's reagent, Molisch reagent

ผลจากการทดสอบ <u>ตารางที่ 3</u> พบว่าสารสกัดหยาบ petroleum ether มีสารกลุ่ม terpenoids เป็นสารหลัก และสารสกัดหยาบ dichloromethane มีสารกลุ่ม phenol เป็นสารหลัก จึงทำการศึกษาสารทั้งสองกลุ่มด้วย HPTLC ในขั้นตอนต่อไป

3. ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสกัดใบสาบเสือด้วยเครื่อง High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)

3.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีสารกลุ่ม terpenoids ในสารสกัดหยาบ petroleum ether จากใบสาบเสือด้วยเทคนิค High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)

หาสภาวะของเครื่อง HPTLC ในการทดสอบสารสกัดสาบเสือ โดยนำข้อมูลกลุ่ม terpenoids ที่ได้จากข้อ 2. หา วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) และน้ำยาพ่น (spray reagent) ที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นวิธีตรวจวัดชนิดและตำแหน่ง (R_F) ของสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก เตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ 6 ระบบ ได้แก่ ethyl acetate : hexane (1:9, v/v), (2:8, v/v), (3:7, v/v), (5:5, v/v), ethyl acetate : hexane : acetic acid (28:71:1, v/v/v), dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (79:20:1, v/v/v)

3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีสารกลุ่ม phenol ในสารสกัดหยาบ dichloromethane จากใบสาบเสือด้วยเทคนิค High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)

หาสภาวะของเครื่อง HPTLC ในการทดสอบสารสกัดสาบเสือ โดยนำข้อมูลกลุ่ม phenol ที่ได้จากข้อ 2. หา วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) และน้ำยาพ่น (spray reagent) ที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นวิธีตรวจวัดชนิดและตำแหน่ง (R_F) ของสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก เตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ 3 ระบบ ได้แก่ benzene : 1,4-dioxane : acetic acid (90:25:2, v/v/v), dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (91:8:1, v/v/v) และ (79:20:1, v/v/v)

3.3 ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของกลุ่มสารสำคัญจากสาบเสือ ได้แก่ ใบสาบเสือ ก้านสาบเสือ ดอกสาบเสือ และตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด โดยสกัดสาบเสือและผลิตภัณฑ์ด้วย methanol อัตราส่วน 10% w/v แล้วนำสารสกัดไป ทดสอบด้วยเทคนิค HPTLC

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2560 สิ้นสุด กันยายน 2561

สถานที่ทดลอง กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

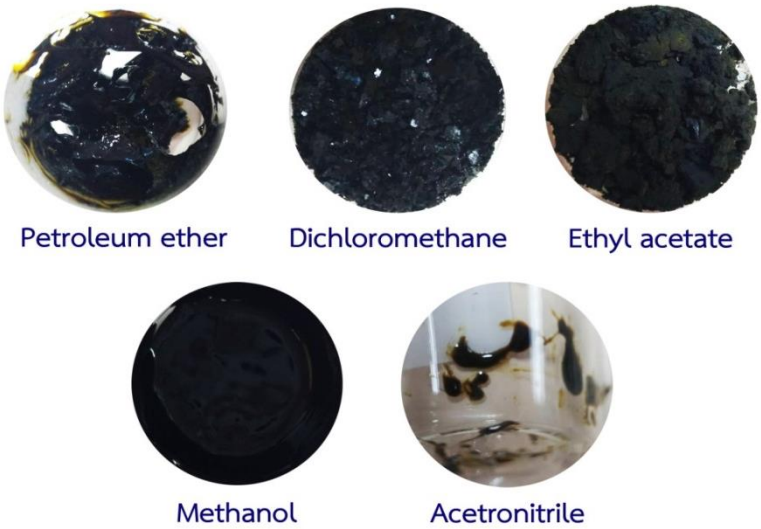
ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสาบเสือที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผัก

ผลการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดส่วน ใบ ก้าน และดอกสาบเสือด้วย methanol พบว่า สารสกัดส่วนใบ มีผลทำให้หนอนใยผักตายมากที่สุด 25.64% รองลงมาคือ ดอก 8.33% และก้าน 6.41% จึงเลือกส่วนใบมาศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผัก

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ 5 ชนิด สารสกัดหยาบใบสาบเสือจากทุกตัวทำละลายได้สารสกัด 1.26-11.74% w/w (ตารางที่ 1) ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบ petroleum ether มีลักษณะเป็นสารสีเขี้ยวขี้เม้าเข้ม เหนียวข้น สารสกัดหยาบ dichloromethane มีลักษณะเป็นเกล็ดของแข็งสีดำแวววาว สารสกัดหยาบ ethyl acetate มีลักษณะเป็นของแข็งสีเขียวแก่ ด้าน ไม่แวววาว สารสกัดหยาบ methanol มีลักษณะสีน้ำตาลเข้มหนืด และสารสกัดหยาบ acetronitrile เป็นสารสีน้ำตาลเข้มหนืด (รูปที่ 1) ผลการทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผัก พบว่า สารสกัดหยาบ petroleum ether, dichloromethane มีผลทำให้หนอนใยผักตายสูงสุดเท่ากับ 63.33, 66.67% รองลงมา คือ สารสกัดหยาบ ethyl acetate, acetronitrile และ methanol มีผลทำให้หนอนใยผักตายเท่ากับ 40.00, 40.00 และ 36.67% ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

<u>ตารางที่ 1</u> แสดงลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบใบสาบเสือ และปริมาณสารสกัดหยาบต่อกรัม

ตัวทำละลาย	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบ	% (w/w)
petroleum ether	สารสีเขียวขี้ม้าเข้ม เหนียวข้น	6.69
dichloromethane	เกล็ดของแข็งสีดำแวววาว	5.69
ethyl acetate	ของแข็งสีเขียวแก่ถึงดำ ด้าน ไม่แวววาว	3.42
methanol	สารสีน้ำตาลเข้มหนืด	11.74
acetronitrile	สารสีน้ำตาลเข้มหนืด	1.26



รูปที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดใบสาบเสือจากตัวทำละลาย petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, methanol และ acetronitrile

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผัก วัย 2 ที่ใช้สารสกัดสาบเสือจากตัวทำละลายต่างๆ ในการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นต่อหนอนใยผัก

กรรมวิธี	% Mortality
สารสกัดหยาบสาบเสือ 2.5% (w/v) ใน petroleum ether	63.33 ab
สารสกัดหยาบสาบเสือ 2.5% (w/v) ใน dichloromethane	66.67 a
สารสกัดหยาบสาบเสือ 2.5% (w/v) ใน ethyl acetate	40.00 bc
สารสกัดหยาบสาบเสือ 2.5% (w/v) ใน methanol	36.67 cd
สารสกัดหยาบสาบเสือ 2.5% (w/v) ใน acetronitrile	40.00 bc
เมทานอล (กรรมวิธีควบคุม)	13.33 d
CV(%)	**30.30**

หมายเหตุ : ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ศึกษาชนิดของกลุ่มสารในสารสกัดชนิดต่างๆ โดยวิธีการทดสอบทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบ

จากการทดสอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดสาบเสือ (1.3) พบว่าสารสกัด petroleum ether และ dichloromethane ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักตรวจพบสารกลุ่ม terpenoids, flavonoids, phenol/tannin และ alkaloids แตกต่างจากสารสกัด methanol และ acetronitrile ที่พบเพียง flavonoids, phenol/tannin, saponin และ carbohydrate และสารสกัด ethyl acetate ที่พบเพียง flavonoids (ตารางที่ 3) โดยสารกลุ่ม terpenoids พบมากและเป็นสารกลุ่มหลักในสารสกัดหยาบ petroleum ether และสารกลุ่ม phenol พบมากและเป็นสารกลุ่มหลักในสารสกัดหยาบ dichloromethane

ผลการทดสอบชนิดกลุ่มสารด้วยน้ำยาทดสอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบ petroleum ether พบสารกลุ่ม terpenoids และผลการทดสอบของสารสกัดหยาบ dichloromethane พบสารกลุ่ม phenol เป็นสารออกฤทธิ์ในการควบคุมหนอนใยผัก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่ระบุว่า terpenoids และ phenol บางชนิดมีคุณสมบัติเป็นพิษต่อแมลง, Carlsen et al (2008)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีในสารสกัดหยาบใบสาบเสือ ด้วยน้ำยาทดสอบชนิดต่างๆ

กลุ่มสารพฤกษเคมี	น้ำยาทดสอบ	สารสกัดหยาบ				
		Petroleum ether	Dichloromethane	Ethyl acetate	Methanol	Acetronitrile
Alkaloids	Dragendorff's reagent	+	+	-	-	-
	Mayer's reagent	+	+	-	-	-
	Wagner’s reagent	+	+	-	-	-
	Valser’s reagent	+	+	-	-	-
Flavonoids	Shinoda's reagent	-	+	+	+	+
	Ferric chloride	-	-	-	-	-
	Lead acetate	+	+	+	+	+
	Alkaline reagent	+	+	+	+	+
Phenol/ tannin	Ferric chloride	+	+	+	+	+
	Lead acetate	+	+	-	+	+
	Gelatin	+	+	-	-	-
Saponin	Foam test	-	-	-	+	+
Terpenoids/steroids	Salkowski's test	+	-	-	-	-
	Lieberman Burchard	+	+	-	-	-
Carbohydrate	Benedict's reagent	-	-	-	+	+
	Fehling's reagent	-	-	-	+	+
	Barfoed's reagent	-	-	-	-	+
	Molisch	-	-	-	+	+

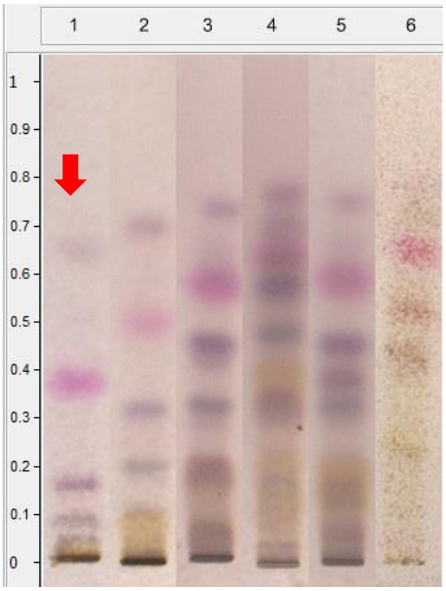
ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสกัดใบสาบเสือด้วยเครื่อง High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)

1. ผลศึกษาสภาวะ (conditions) เหมาะสมบนแผ่น TLC ชนิด HPTLC plate silica gel 60 F_{254} size 20x10 cm ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีสารกลุ่ม **terpenoids** ในสารสกัดหยาบ petroleum ether ใบสาบเสือ

1.1 วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่จำนวน 6 ระบบ ดังนี้

ระบบ	วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)	ตำแหน่ง terpenoids (R_F)
1	ethyl acetate : hexane (1:9, v/v)	0.16, 0.33, 0.63
2	ethyl acetate : hexane (2:8, v/v)	0.22, 0.40, 0.70
3	ethyl acetate : hexane (3:7, v/v)	0.42, 0.53, 0.72
4	ethyl acetate : hexane (5:5, v/v)	0.59, 0.65, 0.77
5	ethyl acetate : hexane : acetic acid (28:71:1, v/v/v)	0.45, 0.60, 0.75
6	dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (79:20:1, v/v/v)	0.52, 0.65, 0.78

จากการศึกษาข้างต้นพบว่า วัฏภาคเคลื่อนที่ ethyl acetate : hexane (1:9, v/v) สามารถแยกสารกลุ่ม terpenoids ได้โดยไม่ถูกรบกวนจากพีคอื่น ซึ่งใช้เวลาในการ develop 11.10 นาที (รูปที่ 2)



<u>รูปที่ 2</u> HPTLC fingerprint ของสารสกัดหยาบ petroleum ether ใบสาบเสือ 6 ระบบ ภายใต้แสงขาว เมื่อถูก derivertized โดย p-anisaldehyde/sulfuric acid reagent [ระบบ 1-4 EtOAc : hexane (1:9, v/v; 2:8, v/v; 3:7, v/v; 5:5, v/v); ระบบ 5 EtOAc : hexane : acetic acid (28:71:1, v/v/v) และ ระบบ 6 CH_2Cl_2 : EtOAc : acetic acid (79:20:1, v/v/v)

1.2 น้ำยาพ่นที่เหมาะสม

ทำการสเปรย์น้ำยาทดสอบ p-anisaldehyde/sulfuric acid reagent ซึ่งใช้สำหรับตรวจสารกลุ่ม terpenoids ผลการทดสอบ ได้ผลบวก คือ ให้สีม่วง, ชมพู เมื่อตรวจสอบภายใต้แสง white light ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลผลการศึกษาชนิดของกลุ่มสารในสารสกัดชนิดต่างๆ โดยวิธีการทดสอบทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบข้างต้นที่พบว่าสารสกัดหยาบ petroleum ether มีสารกลุ่ม terpenoids ดังนั้นจึงเลือก p-anisaldehyde/sulfuric acid reagent เป็นน้ำยาพ่นที่เหมาะสม

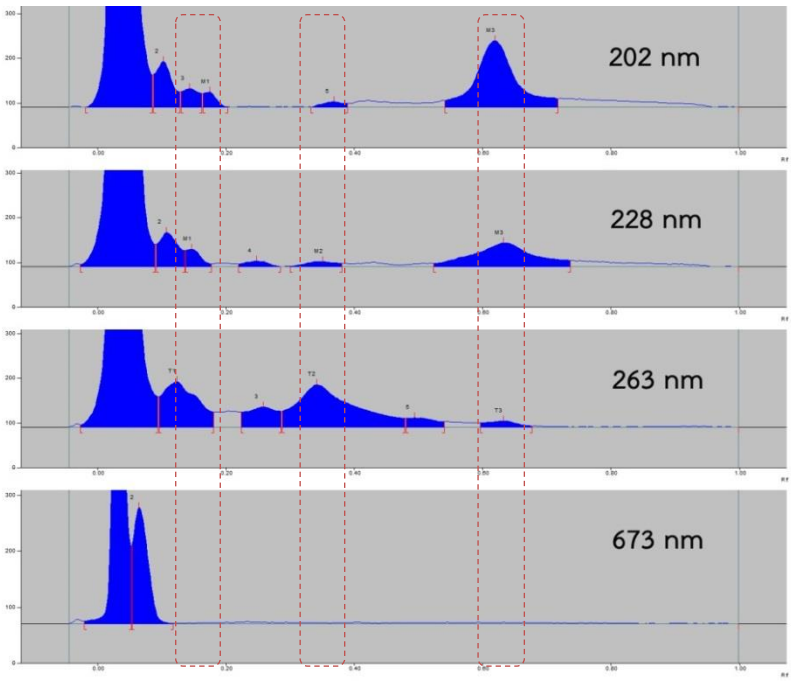
1.3 ความยาวคลื่นที่เหมาะสม

ผลการตรวจวัดสารสกัดหยาบ petroleum ether (สารกลุ่ม terpenoids) ที่ความยาวคลื่น 202, 228, 263 และ 673 nm พบว่า HPTLC chromatogram ของสารกลุ่ม terpenoids ให้ค่า absorbance สูง ที่ความยาวคลื่น 202 และ 263 nm เมื่อเทียบกับความยาวคลื่นอื่น ดังรูปที่ 3 จึงเลือกความยาวคลื่น 202 เป็นความยาวคลื่นที่ให้ค่า absorbance สูงสุดของ สารกลุ่ม terpenoids (R_F 0.16 และ 0.63) และ 263 nm เป็นความยาวคลื่นที่ให้ค่า absorbance สูงสุดของ สารกลุ่ม terpenoids (R_F 0.33) เป็นความยาวคลื่นที่เหมาะสมดังรูปที่ 4

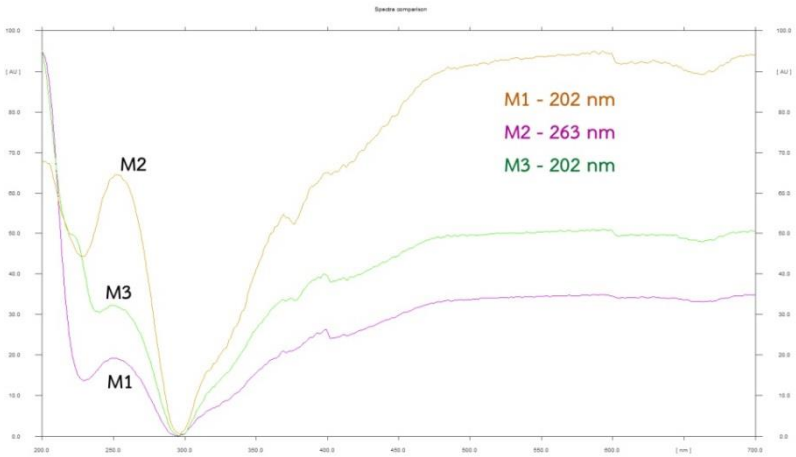
2. ผลศึกษาสภาวะ (conditions) เหมาะสมบนแผ่น TLC ชนิด HPTLC plate silica gel 60 F_{254} size 20x10 cm ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีสารกลุ่ม **phenol** ในสารสกัดหยาบ dichloromethane ใบสาบเสือ

2.1 วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่จำนวน 3 ระบบ ดังนี้

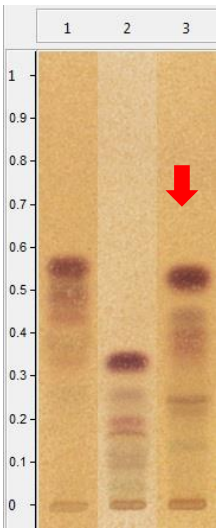
ระบบ	วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)	ตำแหน่ง phenol (R_F)
1	benzene : 1,4-dioxane : acetic acid (90:25:2, v/v/v)	0.57
2	dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (91:8:1, v/v/v)	0.33
3	dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (79:20:1, v/v/v)	0.55



<u>รูปที่ 3</u> HPTLC chromatogram ของสารสกัดหยาบสาบเสือ ภายใต้ความยาวคลื่น 202, 228, 263 และ 673 nm



จากการศึกษาข้างต้นพบว่า วัฏภาคเคลื่อนที่ dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (79:20:1, v/v/v) สามารถแยกสารกลุ่ม phenol ได้โดยไม่ถูกรบกวนจากพีคอื่น ซึ่งใช้เวลาในการ develop 13 นาที (รูปที่ 5)



<u>รูปที่ 5</u> HPTLC fingerprint ของสารสกัดหยาบ dichloromethane ใบสาบเสือ 3 ระบบ ภายใต้แสงขาว เมื่อ derivertized โดย Fast Blue B reagent [ระบบ 1 benzene : 1,4-dioxane : acetic acid (90:25:2, v/v/v),ระบบ 2-3 dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (91:8:1, v/v/v) และ (79:20:1, v/v/v) ตามลำดับ]

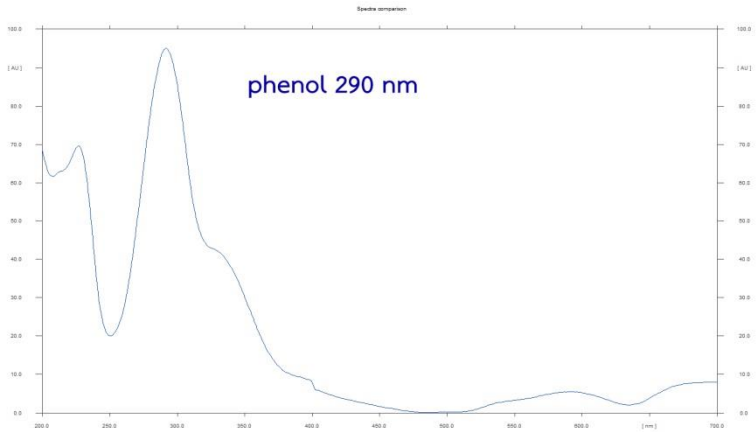
<u>รูปที่ 4</u> สเปคตรัมสาร terpenoids หลัก (M1, M2, M3) ที่พบในสารสกัดสาบเสือ

2.2 น้ำยาพ่นที่เหมาะสม

ทำการสเปรย์น้ำยาทดสอบ Fast Blue B reagent ซึ่งใช้ตรวจสารกลุ่ม phenol ผลการทดสอบ ได้ผลบวก คือ แถบสีแดง เมื่อตรวจสอบภายใต้แสง white light ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลผลการศึกษาชนิดของกลุ่มสารในสารสกัดชนิดต่างๆ โดยวิธีการทดสอบทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบ ข้อ 2. ที่พบว่าสารสกัดหยาบ dichloromethane มีสารกลุ่ม phenol ดังนั้นจึงเลือก Fast Blue B reagent เป็นน้ำยาพ่นที่เหมาะสม

2.3 ความยาวคลื่นที่เหมาะสม

ผลการตรวจวัดสารสกัดหยาบ dichloromethane (สารกลุ่ม phenol) พบว่า HPTLC chromatogram ของสารกลุ่ม dichloromethane ให้ค่า absorbance สูง ที่ความยาวคลื่น 290 nm ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ให้ค่า absorbance สูงสุดของ สารกลุ่ม phenol (R_F 0.55) จึงเลือกให้เป็นความยาวคลื่นที่เหมาะสม ดังรูปที่ 6



<u>รูปที่ 6</u> สเปคตรัมสาร phenol ที่พบในสารสกัดสาบเสือ

สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของกลุ่มสาร terpenoids ในสารสกัดหยาบ petroleum ether ใบสาบเสือ และสารกลุ่ม phenol ในสารสกัดหยาบ dichloromethane ใบสาบเสือ ดังนี้

สภาวะ	**กลุ่มสาร terpenoids ในสารสกัดหยาบ petroleum ether ใบสาบเสือ**	**สารกลุ่ม phenol ในสารสกัดหยาบ dichloromethane ใบสาบเสือ**
วัฏภาคคงที่	แผ่น TLC ชนิด HPTLC plate silica gel 60 F254 size 20x10 cm	
วัฏภาคของเหลว	ethyl acetate : hexane (1:9, v/v)	dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (79:20:1, v/v/v)
ความยาวคลื่น (nm)	202, 263	290
Spray Reagent	p-anisaldehyde/sulfuric acid reagent	Fast Blue B reagent

3. ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสกัดสาบเสือด้วยเครื่อง High-performance thin-layer chromatography (HPTLC)

3.1 ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของกลุ่มสารสำคัญจากสาบเสือ ได้แก่ ใบสาบเสือ ก้านสาบเสือ ดอกสาบเสือ

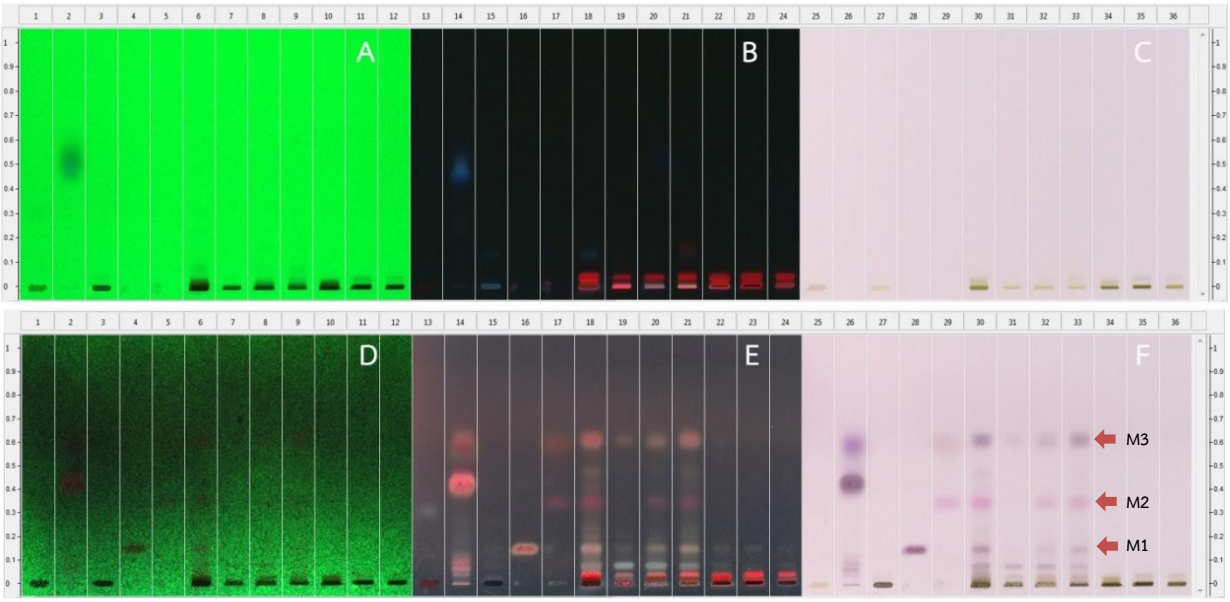
3.1.1 จากการศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารกลุ่ม terpenoids ในใบ ก้าน และดอกสาบเสือ ได้วิเคราะห์สารสกัด methanol จากใบ ก้าน และดอกสาบเสือ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คือใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ ethyl acetate : hexane (1:9, v/v) เมื่อนำเพลทไปตรวจสอบภายใต้แสง UV 244, UV 366 และ white light จะได้ HPTLC fingerprint ดังรูปที่ 7 (T30-32) หลังใช้น้ำยาพ่น p-anisaldehyde/sulfuric acid reagent พบแถบสีม่วงชมพูของ terpenoids ชัดเจนที่ R_F 0.16, 0.33, 0.63 และพบพีคจาก HPTLC chromatogram ชัดเจนที่ R_F 0.16, 0.33, 0.63 เช่นกัน ในส่วนใบ (T30) และดอก (T32) ส่วนก้าน (T31) พบ terpenoids เพียง 1 ตำแหน่ง R_F 0.63ดังรูปที่ 8 โดย terpenoids ทั้ง 3 ตำแหน่ง มีตำแหน่งใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน lupeol และ trans-caryophyllene แต่อย่างไรก็ตาม ควรพิสูจน์ความถูกต้องของสาร lupeol และ trans-caryophyllene กับสารสกัดสาบเสือโดยยืนยันด้วยเทคนิค GC/MS และ HPLC

3.1.2 จากการศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารกลุ่ม phenol ในใบ ก้าน และดอกสาบเสือ ได้วิเคราะห์สารสกัด methanol จากใบ ก้าน และดอกสาบเสือภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คือใช้วัฏภาคเคลื่อนที่

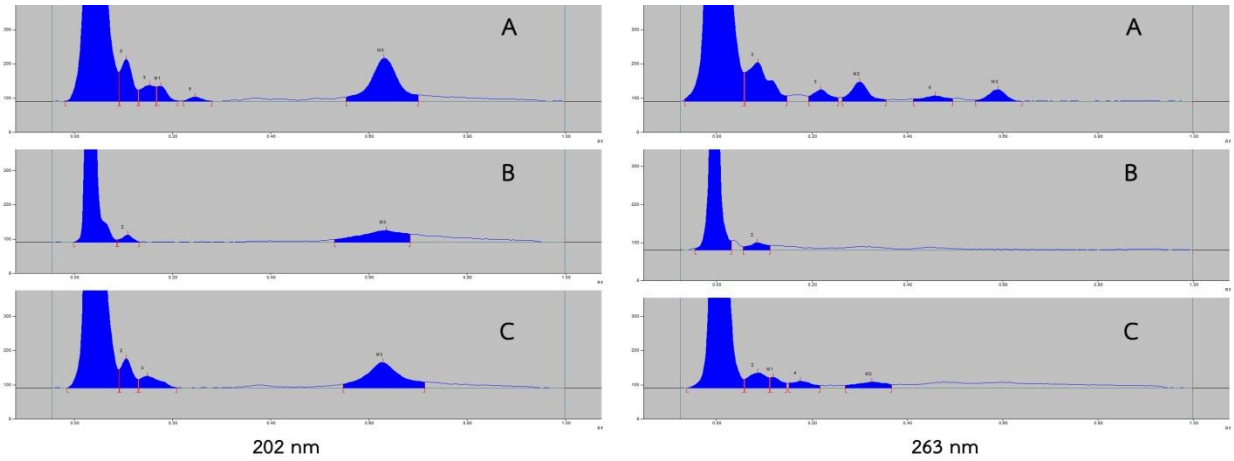
dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (79:20:1, v/v/v) เมื่อนำเพลทไปตรวจสอบภายใต้แสง UV 244, UV 366 และ white light จะได้ HPTLC fingerprint ดังรูปที่ 9 หลังใช้น้ำยาพ่น Fast blue B reagent พบแถบสีแดงของ phenol ชัดเจนที่ R_F 0.55 และพบพีคจาก HPTLC chromatogram ชัดเจนที่ R_F 0.55 เช่นกันในใบ ก้าน และดอก ดังรูปที่ 10 (T21-T23) แต่พบน้อยในก้าน (T22)

3.2 ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของกลุ่มสารสำคัญจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์สาบเสือในท้องตลาด

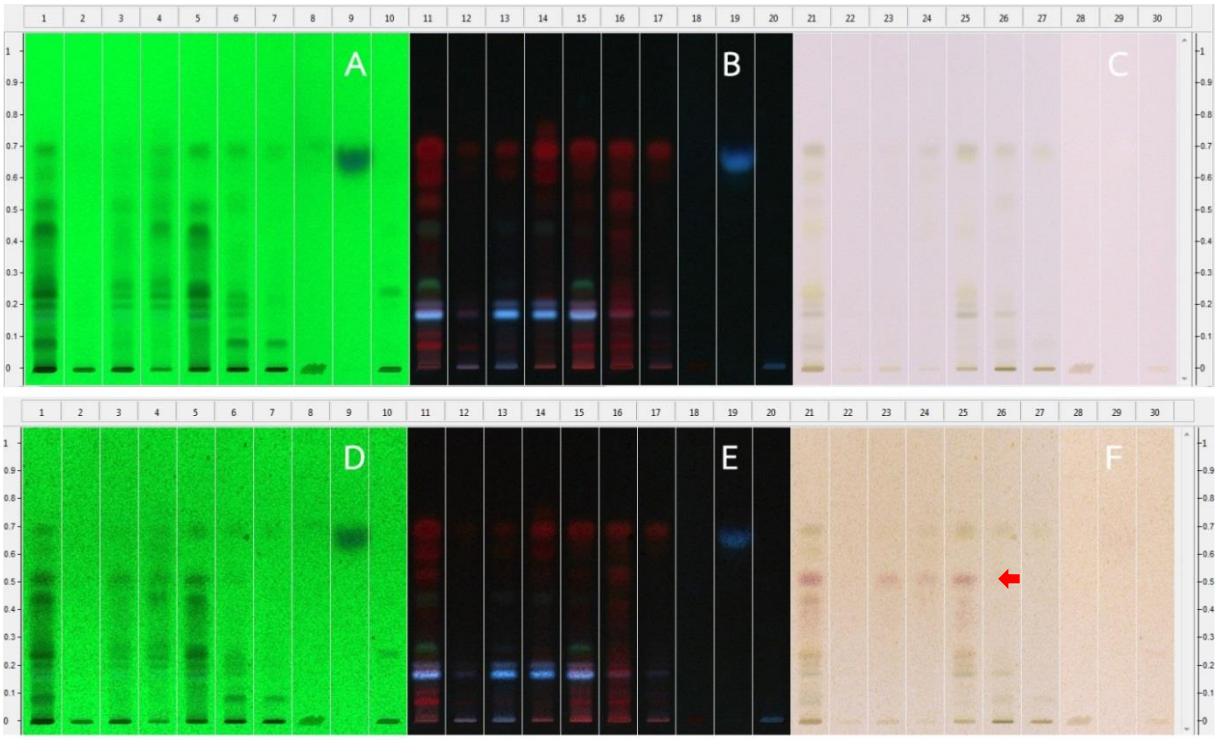
ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารกลุ่ม terpenoids และ phenol ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้เอกลักษณ์โครมาโทกราฟีดังรูป 7, 9 โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ ethyl acetate : hexane (1:9, v/v) และ dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (79:20:1, v/v/v) ตามลำดับ พบสารกลุ่ม terpenoids ในตัวอย่างจำนวน 1 ตัวอย่าง โดยพบสารที่ตำแหน่ง R_F 0.1, 0.43 และ 0.58 ซึ่งแตกต่างจากตำแหน่ง R_F ของสารสกัดจากสาบเสือ นอกจากนี้ จากการศึกษาไม่พบสารกลุ่ม phenol ในตัวอย่างทั้ง 3 ตัวอย่าง อาจเป็นเพราะ phenol เป็นกลุ่มสารที่สลายตัวได้ง่ายในสภาวะปกติ อาจเกิดการแปรสภาพ หรือเปลี่ยนโครงสร้างเป็นสารชนิดอื่น จึงตรวจไม่พบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์



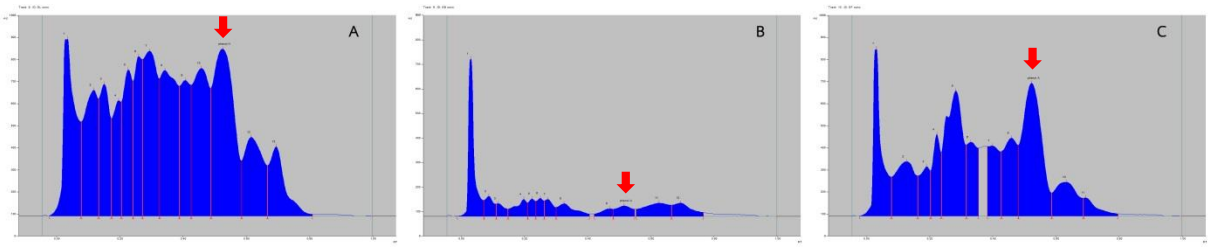
รูปที่ 7 HPTLC fingerprint ของสารกลุ่ม terpenoids ในสารสกัดสาบเสือ : T25 – T 27 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สาบเสือในท้องตลาด; T28 lupeol; T29 trans-caryophyllene; T30 สารสกัดใบสาบเสือ; T31 สารสกัดก้านสาบเสือ; T32 สารสกัดดอกสาบเสือ; T33 สารสกัดหยาบ petroleum ether; T34 สารสกัดหยาบ dichloromethane; T35 สารสกัดหยาบ ethyl acetate; T36 สารสกัดหยาบ methanol ในสภาวะ A-C) ก่อน derivatized และ D-F) หลัง derivatize ภายใต้แสง UV 254 nm, UV 366 nm และ white light ตามลำดับ



<u>รูปที่ 8</u> HPTLC chromatogram ของสารสกัด A) ใบสาบเสือ B) ก้านสาบเสือ และ C) ดอกสาบเสือ ภายใต้ความยาวคลื่น 202 และ 263 nm (terpenoids)



<u>รูปที่ 9</u> HPTLC fingerprint ของสารกลุ่ม phenol ในสารสกัดสาบเสือ : T21 สารสกัดใบสาบเสือ; T22 สารสกัดก้านสาบเสือ; T23 สารสกัดดอกสาบเสือ; T24 สารสกัดหยาบ petroleum ether; T25 สารสกัดหยาบ dichloromethane; T26 สารสกัดหยาบ ethyl acetate; T27 สารสกัดหยาบ methanol; T28-30 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สาบเสือในท้องตลาด ในสภาวะ A-C) ก่อน derivatized และ D-F) หลัง derivatized ภายใต้แสง UV 254 nm, UV 366 nm และ white light ตามลำดับ



รูปที่ 10 HPTLC chromatogram ของสารสกัด A) ใบสาบเสือ B) ก้านสาบเสือ และ C) ดอกสาบเสือ สาบเสือ ภายใต้ความยาวคลื่น 290 nm (phenol)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สาบเสือ มีสารออกฤทธิ์กลุ่ม terpenoids และ phenol สารสกัดหยาบจากใบสาบเสือด้วยตัวทำละลาย petroleum ether และ dichloromethane เป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุด เมื่อทดสอบชนิดของกลุ่มสารทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบต่างๆ พบว่า สารสกัดหยาบ petroleum ether มีสารกลุ่ม terpenoids และสารสกัดหยาบ dichloromethane มีสารกลุ่ม phenol เป็นหลัก และเมื่อตรวจหาตำแหน่งของสารกลุ่ม terpenoids ด้วยวิธี HPTLC ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 202 และ 263 nm ส่วน 209 nm สำหรับสารกลุ่ม phenol และตรวจสอบภายใต้แสง UV 254 nm, UV 366 nm และ white light ได้เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) หลังพ่นด้วยน้ำยา p-anisaldehyde/sulfuric acid reagent สำหรับสารสกัด petroleum ether และ Fast Blue B reagent สำหรับสารสกัด dichloromethane เมื่อพัฒนาด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ ethyl acetate : hexane (1:9, v/v) และ dichloromethane : ethyl acetate : acetic acid (79:20:1, v/v/v) พบสารกลุ่มหลักคือ terpenoids ที่ R_F 0.16, 0.33, 0.63 และ phenol ที่ R_F 0.55 ตามลำดับ และจากการศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ของสารสกัดใบ ก้าน และดอกสาบเสือที่ R_F 0.16 เป็นตำแหน่งเดียวกับสารมาตรฐาน lupeol และ R_F 0.33 ตำแหน่งเดียวกับสารมาตรฐาน trans-caryophyllene แต่อย่างไรก็ตาม ควรพิสูจน์ความถูกต้องด้วยเทคนิค GC/MS และ HPLC เพิ่มเติม เพื่อยืนยันว่าเป็นสารชนิดนี้ และเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด พบว่าในผลิตภัณฑ์มีสารกลุ่ม terpenoids 3 ตำแหน่ง ที่ R_F แตกต่างจากสารสกัดสาบเสือ เป็นไปได้ว่าเป็นสาร terpenoids ต่างชนิด ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยากันระหว่างสารองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์เมื่ออยู่ในสภาวะที่เปลี่ยนไป เช่น อุณหภูมิ ความชื้น และสารนั้นอาจเปลี่ยนสภาพ ส่งผลต่อการคุณสมบัติที่เปลี่ยนไป นอกจากนี้ในอนาคตสามารถศึกษาการแยกสารออกฤทธิ์ในสารสกัดสาบเสือเป็นสารบริสุทธิ์เพื่อเป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์คุณภาพต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลงานวิจัยนี้ทำให้ได้ข้อมูลเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีสารสกัดสาบเสือ เป็นต้นแบบในการทำข้อมูลเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสาระสำคัญในพืชที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เพื่อเป็นมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพสาระสำคัญในพืชทั้งในรูปแบบของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ โดยใช้สารออกฤทธิ์เป็นตัวชี้วัดในการควบคุมคุณภาพ รวมถึง สามารถวิจัยต่อยอดเพื่อสกัดสารบริสุทธิ์เป็นฐานข้อมูลของสารสกัดในพืชที่มีศักยภาพทางด้านป้องกันกำจัดศัตรูพืช ซึ่งจะเป็นปัจจัยสนับสนุนการผลิตผลิตภัณฑ์การเกษตรจากสารธรรมชาติ เพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคสินค้าเกษตร

11. คำขอบคุณ -

12. เอกสารอ้างอิง

ชอุ่ม เปรมัษเฐียร, ศิริพร ซึงสนธิพร. 2550. *แบบรายงานเรื่องเต็มผลงานวิจัยสิ้นสุดปีงบประมาณ 2550 วิจัยประสิทธิภาพของสาบเสือในการป้องกันกำจัดวัชพืช : IV. ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสาบเสือแปลงปลูกพืชอายุสั้น*. (ระบบออนไลน์) แหล่งข้อมูล : http://www.kasetloongkim.com/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=564 (14 พฤศจิกายน 2559)

ธนิตา ค่ำอำนวย, ธิติยาภรณ์ อุดมศิลป์, พรรณีกา อัตตนนท์, ศิริพร สอนท่าโก. 2558. ศึกษาประสิทธิภาพกลุ่มสารสำคัญของสาบเสือในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช (วัชพืชและหนอนใยผัก). หน้า 111-118. *ใน : เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการ ประจำปี 2558*. กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร 14-16 พฤษภาคม 2558 ชลบุรี.

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, อุทัย โสธนะพันธุ์, ประไพ วงศ์สินคงมั่น. 2554. *ทีแอลซี:วิธีอย่างง่ายในการวิเคราะห์คุณภาพเครื่องยาไทย*. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ. 468 หน้า.

วันวิสา ริ้วทองชุ่ม. 2549. สารสกัดหยาบจากสาบเสือเพื่อควบคุมหนอนกระทู้ผัก. ปัญหาพิเศษ. คณะศิลปสาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 75 หน้า.

Bouda, H., Tapondjou, L.A., Fontem, D.A., Gumedzoe, M.Y. 2001. Effect of essential oils from leaves of Ageratum conyzoides, Lantana camara and *Chromolaena odorata* on the mortality of Sitophilus zeamais (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*. 37: 103-109.

Ezena, G.N., Akotsen-Mensah, G., Fening, K.O. 2016. Exploiting the insecticidal potential of the invasive Siam weed, *Chromolaena odorata* L. (Asteraceae) in the management of the major pests of cabbage and their natural enemies in Southern Ghana. *Advance in Crop Science and Technology*. 4: 1-6.

Lawal, O.A., Opoku, A.R., Ogunwande, I.A. 2015. Phytoconstituents and insecticidal activity of different solvent leaf extracts of *Chromolaena odorata* L. against Sitophilus zeamais *(Coleoptera: Curculionidae). European Journal of Medicinal Plants.* 5: 237-347.

Nathapong Matintarangsan. 2017. Effect of Siam weed leaf extract, *Chromolaena odorata* (L.) R.M. King & H. Rob in controlling cowpea aphid, Apis craccivora Koch (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Science & Technology MSU.* 37: 79-84.

Osariyekemwen, O.U., Benedicta, N.O. 2017. Evaluation of the repellent and insecticidal activities of the leaf, stem and root powders of Siam weed (*Chromolaena odorata*) against the Cowpea beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Applied Sciences and environmental management*. 21: 511-518.