รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย -

2. โครงการวิจัย วิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติจากพืช

กิจกรรมที่ 3 ศึกษาการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) เพื่อทำมาตรฐานเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในพืช ระยะเวลาดำเนินการ 2559-2561 (3ปี)

3. ชื่อการทดลอง การทดลองที่ 3.1

วิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในสะเดา

Study on HPTLC technique for providing fingerprint of active substances in Neem

4. คณะผู้ดำเนินงาน

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

5. บทคัดย่อ

การวิจัยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ในการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารสำคัญในพืชที่มีศักยรูปสูงในการกำจัดศัตรูพืช เช่น สะเดา ได้ดำเนินการสกัดใบและเมล็ดสะเดาด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ เช่น hexane, chloroform, methanol และ น้ำ ทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนใยผักโดยวิธี Leaf dipping method และทดสอบกลุ่มสารด้วยน้ำยาทดสอบทางพฤกษเคมีชนิดต่างๆ แล้วหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ของสารสกัดสะเดาที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก ผลการวิจัยพบว่า สารสกัดสะเดา มีสารออกฤทธิ์กลุ่ม terpenoids เป็นจำนวนมาก โดยพบว่าในเมล็ดสะเดา มีสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุดคือ สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ผงสีน้ำตาล ซึ่งมีสารสำคัญเป็นกลุ่ม azadirachtin รองลงมาคือ สารสกัด hexane (น้ำมันสะเดา) ส่วนในใบสะเดาพบสารออกฤทธิ์น้อยกว่าในเมล็ด โดยพบสารออกฤทธิ์มากที่สุดอยู่ในสารสกัดน้ำ ผลจากการทดสอบชนิดของกลุ่มสารทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบต่างๆ พบว่า น้ำมันสะเดา และสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ผงสีน้ำตาลจากเมล็ดสะเดา และสารสกัดน้ำจากใบสะเดา เป็นสารกลุ่ม terpenoids สำหรับการหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี ของสารสกัดสะเดากึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก ด้วยเทคนิค HPTLC ที่ความยาวคลื่น 214 nm และตรวจสอบภายใต้แสง uv 254, uv366 และ white light ได้ HPTLC fingerprint หลังพ่นด้วยน้ำยา anisaldehyde-sulfuric acid ผลการทดสอบสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ผงสีน้ำตาล ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ toluene/methanol/ ethyl acetate (10/1.2/3) พบสารสำคัญคือ azadirachtin a ที่ Rf 0.30 ผลทดสอบน้ำมันสะเดาด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ hexane/ethyl acetate (90/10) พบสารสำคัญ terpenoids ที่ Rf 0.51 และผลการทดสอบสารสกัดน้ำจากใบสะเดา ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ butanol/ethanol/ water/ acetic acid (114/42/32/0.2) พบสารสำคัญที่ Rf 0.30 และ 0.38 เมื่อได้ข้อมูลสาร

ออกฤทธิ์และวิธีการตรวจสอบแล้ว จึงได้ทำการสกัดสะเดาไทย สะเดาอินเดีย และสะเดาช้าง มาตรวจวิเคราะห์คุณรูปด้วยวิธี HPTLC เปรียบเทียบกับ HPTLC fingerprint ของผลิตภัณฑ์สะเดา ผลพบว่า สามารถตรวจสารบ่งชี้ได้ถูกต้องชัดเจน สามารถประเมินปริมาณสาร terpenoids ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์โดยรวมได้ ทำให้สามารถนำวิธีการดังกล่าว ไปใช้ควบคุมคุณรูปวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สะเดา ซึ่งเป็นวิธีการที่รวดเร็ว ไม่สิ้นเปลืองสารละลาย และได้ข้อมูลสารสำคัญของผลิตภัณฑ์มากขึ้น
คำหลัก : สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์, เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี, สะเดา, หนอนใยผัก

Abstract

Research HPTLC fingerprint by using HPTLC technique in plants that have high potential as pesticides such as Neem. Extracted leaves and seed with hexane, chloroform, methanol and water were provided efficiency testing to *Plutella xylostella* L. by leaves dipping method and phytochemical compounds group testing was tested with different testing reagent. Then find the effective substance's fingerprint by HPTLC. The results showed that the active substance of Neem extract are many terpenoids. The major effective substance in Neem seeds is the semi-purified brown powder that the main compounds was azadirachtin group and a minor effective substance was Neem oil. For the Neem leaves, the most effective substances are in water extract which are less effective than substance form seed extract. Testing on group of phytochemical compounds with different testing reagent found that the main substance in oil, semi-purified brown powder from seed and water extract of leaves, respectively were terpenoids. These terpenoids are detected by HPTLC at wavelength 214 nm with different mobile phase. First, toluene/methanol/ ethyl acetate (10/1.2/3) for semi-purified brown powder was found azadirachtin A at Rf 0.30. Second, hexane/ethyl acetate (90/10) for Neem oil was found the main terpenoids substance at Rf 0.51. Finally, butanol/ethanol/ water/ acetic acid (114/42/32/0.2) for leaves extract from water was found the main terpenoids substance at Rf 0.30 and 0.38. These data and method of HPTLC fingerprint was applied to 3 species of Neem and Neem products. It was found that the terpenoids substance can be identified, estimate the amount of the active ingredient overall and be used for control the quality of raw materials and Neem products.
Key word : semi-purified, HPTLC HPTLC fingerprint, Neem, *Plutella xylostella* L.

6. คำนำ

โครงการวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติในพืช เป็นโครงการที่ขานรับนโยบายของรัฐบาล เรื่องวางกรอบแนวทางการปฏิรูปภาคเกษตร 7 ส่วน ส่งเสริมการลดต้นทุนการผลิต พร้อมพัฒนาโครงสร้างพื้นฐานทาง

การเกษตรเพื่อให้ชาวนามีชีวิตที่ดีขึ้น 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 การวิจัยเกี่ยวกับการผลิตอาหารปลอดภัยในประเด็นการบริหารสิ่งแวดล้อมและการพัฒนาคุณค่าของทรัพยากรธรรมชาติ 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

ประเทศไทยมีพืชหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชและวัชพืช 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 ยังมีพืชและสมุนไพรอีกหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชและวัชพืชได้

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

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

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

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 สามารถใช้บ่งชี้ข้อมูลในการพิจารณารับรองสารสกัดหยาบได้ (Sunil, Sayeed & Sharma, 2011) การสร้างเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสาหร่ายสีน้ำตาล (Lobophora variegate) โดยวิธีทีแอลซีสมรรถนะสูง สกัดด้วยสารละลายเมทานอลิค (methanolic) พบ 9 พีค ให้ค่า Rf อยู่ในช่วง 0.18-0.86 ซึ่งสรุปได้ว่าการวิเคราะห์เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี ด้วยทีแอลซีสมรรถนะสูง ของสารสกัดเมทานอลิคสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาหร่าย และเป็น

ประโยชน์ในการบ่งชี้ทางพฤกษเคมีของสายพันธุ์ต่างๆ 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 วัฏภาคเคลื่อนที่ และ สเปรย์ด้วย Dragendorff's reagent ตามด้วย 10%Sodium nitrile reagent และอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตรวจสอบภายใต้แสง 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 วัฏภาคเคลื่อนที่ 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 ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์ทางพฤกษเคมี 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 methanol, chloroform, hexane, petroleum ether, น้ำยาพ่น Anisaldehyde-sulfuric acid, น้ำยาพ่นและน้ำยาทดสอบ dragendroff เป็นต้น
3. สารเปรียบเทียบ ได้แก่ azadirachtin A, azadirachtin B, nimbin, salanin, cadinene, caryophylene, copaene, cubebene, humulene, valencene, phytol
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 ใบและเมล็ดสะเดาพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ สะเดาไทย สะเดาอินเดีย และสะเดาช้าง จาก จ. สุพรรณบุรี และ จ.ระนอง

วิธีการ

1. เตรียมตัวอย่างใบและเมล็ดสะเดา

นำใบและเมล็ดสะเดาไทย สะเดาอินเดีย และสะเดาช้าง ทำความสะอาดแล้วบดให้ละเอียดตาม รูปที่ 1

ศึกษาตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักจากใบและเมล็ดสะเดา

2. ศึกษาวิธีการสกัดสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักจากใบและเมล็ดสะเดา

2.1 ศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักจากเมล็ดสะเดา โดยศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญจากเมล็ดสะเดา โดยนำเมล็ดสะเดาบด สกัดด้วยตัวทำละลาย petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, ethanol, methanol, acetone และน้ำ แล้วนำไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ได้สารสกัดหยาบ 39.9, 55.5, 41.8, 35.8, 28.8, 34.0 และ 15.3 %w/w ตามลำดับ นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผักในอัตรา 2%w/v ได้ผลการตายเฉลี่ยของหนอนใยผัก 35.0, 72.5, 75.0, 77.5, 70.0, 70.0 และ 45.0% ตามลำดับทำให้ทราบว่าตัวทำละลาย petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, ethanol, methanol และ acetone สามารถสกัดสารออกฤทธิ์ต่อหนอนใยผักได้ไม่ต่างกัน และสารสกัดที่มีสรูปขั้วปานกลาง สามารถสกัดสารออกฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุด โดยมีผล HPTLC fingerprint แสดงในรูปที่ 2 จึงนำเมล็ดสะเดาสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก ด้วย hexane, methanol และน้ำ แล้วนำไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ได้สารสกัดหยาบ 37.9, 25.0 และ 15.4 %w/w ตามลำดับ นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผักในอัตรา 2%w/v ผลทดสอบพบว่า สารสกัด hexane และ methanol ทำให้หนอนใยผักตายมากว่าสารสกัดน้ำ จึงนำสารสกัดหยาบ methanol ไปสกัดต่อด้วย hexane, chloroform และ methanol ได้สารสกัดหยาบ น้ำมันสีเขียว4.7%w/w สารข้นหนืดสีเขียวเข้ม 24.0%w/w และสารข้นหนืดสีน้ำตาลแดง 67.4 %w/w ตามลำดับ ผลทดสอบหนอนใยผักพบว่า สารข้นหนืดสีเขียวเข้ม ทำให้หนอนใยผักตายมากที่สุด จึงนำไปสกัดต่อเป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ ด้วย chloroform และน้ำ ได้ผงสีน้ำตาล และของเหลวหนืดสีน้ำตาล ตามลำดับ นำสารกึ่งบริสุทธิ์ที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก และหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก

2.2 ศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักจากใบสะเดา โดยนำใบสะเดาบด สกัดด้วย hexane, methanol และน้ำ แล้วนำไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ได้สารสกัดหยาบ 5.5, 16.9 และ 24.2 %w/w

ตามลำดับ นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผักในอัตรา 2%w/v ผลทดสอบหนอนใยผัก พบว่า สารสกัดน้ำ ทำให้หนอนใยผักตายมากกว่าสารสกัด hexane และ methanol จึงนำสารสกัดหยาบ methanol ไปสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์ต่อด้วย chloroform และน้ำ แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก และหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก

3. ทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก ด้วยน้ำยาทดสอบต่างๆ ดังนี้

3.1 ทดสอบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloids) ด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น Dragendroff 's reagent, Hager 's reagent, Marme 's reagent เป็นต้น

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

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

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

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

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

4. ศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) หลังพ่นด้วยน้ำยา anisaldehyde-sulfuric acid ของสารสกัดใบและเมล็ดสะเดาด้วยตัวทำละลายต่างๆ เปรียบเทียบกับ HPTLC fingerprint ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์สะเดา และสารมาตรฐานต่างๆ

4.1 ศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)

ศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่ สำหรับวิเคราะห์สารสกัด hexane (น้ำมันสะเดา) โดยเปรียบเทียบผลการใช้ hexane/dichloromethane/95%ethanol (41/49/10) และ hexane/ethyl acetate (90/10) พบว่าการใช้ hexane/ ethyl acetate (90/10) สามารถแยกสารได้ดีกว่า จึงเลือกใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในการทดสอบสารสกัด hexane

ศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่ สำหรับวิเคราะห์สารสกัด chloroform และ สารสกัด methanol โดยเปรียบเทียบผลการใช้ toluene/methanol/ ethyl acetate (10/25/10), Toluene/methanol/ ethyl acetate (10/1.2/1) และ toluene/methanol/ ethyl acetate (10/1.2/3) พบว่าการใช้ toluene/ methanol/ethyl acetate (10/1.2/3) สามารถแยกสารได้ดีกว่า จึงเลือกใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในการทดสอบสารสกัด chloroform และ สารสกัด methanol

ศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่ สำหรับวิเคราะห์สารสกัดน้ำ โดยเปรียบเทียบผลการใช้ butanol/ethanol/water/acetic acid (108/36/27/2 และ butanol/ethanol/water/acetic acid (114/42/32/0.2) พบว่าการใช้ butanol/ethanol/water/acetic acid (114/42/32/0.2) สามารถแยกสารได้ดีกว่า จึงเลือกใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในการทดสอบสารสกัดน้ำ

4.2 เตรียมสารสกัดใบและเมล็ดสะเดาพันธุ์ต่างๆ ด้วย hexane, methanol และน้ำ ในอัตรา 5%w/v

4.3 เตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์สะเดา 15 ตัวอย่าง โดยปิเปตผลิตภัณฑ์สะเดา 5 มิลลิลิตร เจือจางด้วย methanol 5 มิลลิลิตร แล้วสกัดด้วย hexane 3 ครั้งๆละ 5 มิลลิลิตร แล้วกรองชั้น methanol และชั้น hexane ด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45um ก่อนนำไปทดสอบด้วยเครื่อง HPTLC

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2558 สิ้นสุด กันยายน 2559

สถานที่ทดลอง กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักจากใบและเมล็ดสะเดา

ผลการใช้กระบวนการทางเคมี สกัดเมล็ดสะเดา ด้วย hexane, methanol และน้ำ แล้วนำสารสกัดหยาบไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผัก พบว่าหนอนใยผักตายเฉลี่ย 47.5, 55.0 และ 12.5% ตามลำดับ ทำให้ทราบว่า ในสารสกัด hexane (น้ำมันสะเดา) และ ในสารสกัดหยาบ methanol มีสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก เพื่อสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก จึงนำสารสกัดหยาบ methanol ไปสกัดต่อด้วย hexane, chloroform และ methanol ได้ น้ำมันสีเขียว สารข้นหนืดสีเขียวเข้ม และสารข้นหนืดสีน้ำตาลแดง ตามลำดับ เมื่อทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผัก พบว่าหนอนใยผักตายเฉลี่ย 57.5, 95.0 และ 55.0% ตามลำดับ ทำให้ทราบว่า สารสารข้นหนืดสีเขียวเข้ม มีสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุด จึงเลือกสารสกัด สารข้นหนืดสีเขียวเข้ม ไปสกัดต่อเป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ด้วย chloroform และ น้ำ ได้ผงสีน้ำตาล และ ของเหลวหนืดสีน้ำตาล เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผัก พบว่าหนอนใยผักตาย 80.0 และ 60.0% ตามลำดับ ทำให้ทราบว่า สารสกัดเมล็ดสะเดาที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุดคือ สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ผงสีน้ำตาล รองลงมาคือ สารสกัด hexane (น้ำมันสะเดา) (สารสกัดที่ได้ รูปที่ 3, HPTLC chromatogram รูปที่ 4 และ HPTLC fingerprint รูปที่ 5)

ผลการสกัดใบสะเดา ด้วย hexane, methanol และน้ำ แล้วนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผัก พบว่าหนอนใยผักตาย 60.0, 65.0 และ 82.5% ตามลำดับ ทำให้ทราบว่าในสารสกัดน้ำ มีสารมีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุด เพื่อยืนยันผล จึงเลือกสารสกัดหยาบ methanol ไปสกัดต่อด้วย chloroform และ น้ำ เมื่อทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อหนอนใยผัก พบว่าหนอนใยผักตายเฉลี่ย 77.5 และ 82.5% ตามลำดับ ทำให้ทราบว่า สารสกัดใบสะเดาที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุดคือ สารสกัดน้ำ (HPTLC chromatogram รูปที่ 6 และ HPTLC fingerprint รูปที่ 7)

8.2 การทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก ด้วยน้ำยาทดสอบต่างๆ

ผลการทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีของ น้ำมันสะเดา สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ผงสีน้ำตาล และสารสกัดน้ำจากใบสะเดา ตรวจพบสารหลักเป็นกลุ่ม terpenoids (ตารางที่ 1)

8.3 การวิเคราะห์เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ด้วยเครื่องทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ของกลุ่มสารที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลายต่างๆ (จากวิธีการข้อ 4.2)

8.3.1 ผลการศึกษาสภาวะ (condition) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมาะสมในการหาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ในสารสกัดใบและเมล็ดสะเดาด้วย hexane, chloroform, methanol และน้ำ

ได้สภาวะเครื่อง HPTLC ที่เหมาะสมบนแผ่น TLC ชนิด HPTLC Plate silica gel $60F_{254}$ ขนาด 20x10cm ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 214 nm โดยใช้น้ำยาพ่น (spray reagent) น้ำยา anisaldehyde sulfuric acid เพื่อทดสอบสารกลุ่ม terpenoids (แสดง HPTLC fingerprint และ spectrum ของสารสำคัญในสะเดาใน รูปที่ 8)

ได้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) สำหรับวิเคราะห์สารสกัด hexane คือ hexane/ethyl acetate (90/10) โดยใช้เวลาในการ develop 5 นาที, วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) สำหรับวิเคราะห์สารสกัด chloroform และ สารสกัด methanol คือ toluene/ methanol/ ethyl acetate (10/1.2/3) โดยใช้เวลาในการ develop 10 นาที และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) สำหรับวิเคราะห์สารสกัดน้ำ คือ butanol/ethanol/ water/ acetic acid (114/42/32/0.2) โดยใช้เวลาในการ develop 55 นาที

8.3.2 ผลการศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) โดยตรวจสอบภายใต้แสง uv254, uv366 และ white light หลังพ่นด้วยน้ำยา anisaldehyde-sulfuric acid ของสารสกัดใบและเมล็ดสะเดาด้วยตัวทำละลายต่างๆ เปรียบเทียบกับ HPTLC fingerprint ของสารมาตรฐาน azadirachtin A, azadirachtin B, nimbin, salannin, cadinene, copaene, caryophylene, cubebene, humulene, valencene และ phytol

ได้เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ของสารสกัด methanol ในเมล็ดสะเดาไทย เมล็ดสะเดาอินเดีย ใบสะเดาไทย ใบสะเดาอินเดีย และใบสะเดาช้าง โดยใช้ วัฏภาคเคลื่อนที่ toluene/ methanol/ ethyl acetate (10/1.2/3) พบพีคจาก HPTLC chromatogram เด่นที่ Rf 0.0, 0.58 และ 0.79 ผลของ HPTLC fingerprint พบแถบสีม่วงที่เห็นชัดเจนของสารสกัดใบสะเดาทั้ง 3 พันธุ์ ที่ Rf 0.50, 0.58 และ 0.79 และของสารสกัดเมล็ดสะเดาทั้ง 2 พันธุ์ ที่ Rf 0.50, 0.58, 0.72 และ 0.79 เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานซึ่งใช้ วัฏภาคเคลื่อนที่ เดียวกัน พบว่า cadinene, copaene, caryophylene, cubebene, humulene, valencene, phytol, salannin, nimbin, azadirachtin b ปรากฏที่ Rf 0.72, 0.72, 0.66, 0.72, 0.72, 0.72 0.65, 0.55, 0.65, 0.45 ตามลำดับ และสารมาตรฐาน azadirachtin a ปรากฏ ที่ Rf 0.30 (รูปที่ 9 และ 10) จากผลที่ได้พบว่า แถบสีม่วงที่มองเห็นได้ชัด เป็นคนละสารกับสารมาตรฐานที่นำมาเปรียบเทียบ ยกเว้นแถบสีม่วงเข้มที่ Rf 0.72 จากสารสกัดเมล็ดสะเดาด้วย methanol (ซึ่งสารที่ Rf 0.72 เป็นสารที่พบในปริมาณมาก

เมื่อสกัดด้วย hexane (น้ำมันสะเดา) จึงใช้สารสกัด hexane ในการทดสอบ) เป็นสารให้ค่า Rf 0.72 ตรงกับสารมาตรฐาน cadinene, copaene, cubebene, humulene, valencene เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นสารใด จึงต้องใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ สำหรับสารสกัด hexane ซึ่งใช้ทดสอบสารที่สรูปขั้วน้อยในการทดสอบ ซึ่งจากผลทดสอบพบว่า แถบสีม่วงของสาร terpenoids ที่ตำแหน่ง Rf 0.72 ไม่ใช่สารชนิดเดียวกับสารมาตรฐานที่นำมาเปรียบเทียบ

ผลการทดสอบเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ของสารสกัด hexane (น้ำมันสะเดา) ทั้งในเมล็ดสะเดาไทย และเมล็ดสะเดาอินเดีย โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ hexane/ethyl acetate (90/10) พบพีค HPTLC chromatogram เด่นที่ Rf 0.51 ผลของ HPTLC fingerprint พบแถบสีม่วงที่ Rf 0.05 และ 0.51 ซึ่งพบเฉพาะในน้ำมันเมล็ดสะเดาทั้ง 2 พันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบกับ สารมาตรฐานซึ่งใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ เดียวกัน พบว่า cadinene, copaene, caryophylene, cubebene, humulene, valencene และ phytol ปรากฏที่ Rf 0.67, 0.67, 0.33, 0.67, 0.66, 0.66, 0.16 ตามลำดับ และสารมาตรฐาน azadirachtin a ปรากฏ ที่ Rf 0.00 (รูปที่ 11 และ 12) จากผลที่ได้พบว่า แถบสีม่วงที่ Rf 0.51 สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของน้ำมันสะเดาได้

สำหรับใบสะเดา ซึ่งมีสารออกฤทธิ์มากที่สุดเมื่อสกัดด้วยน้ำ ได้เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ของสารสกัด น้ำ ในเมล็ดสะเดาไทย เมล็ดสะเดาอินเดีย ใบสะเดาไทย ใบสะเดาอินเดีย และใบสะเดาช้าง โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ butanol/ethanol/water/acetic acid (114/42/32/0.2) พบพีค HPTLC chromatogram เด่นของใบสะเดาทั้ง 3 พันธุ์ที่ Rf 0.00, 0.42 และ 0.80 และใบสะเดาช้างมีเพิ่มเติมที่ Rf 0.65 สำหรับเมล็ดสะเดาทั้ง 2 พันธุ์ พบที่ Rf 0.00, 0.16, 0.42 และ 0.80 ส่วนผลของ HPTLC fingerprint (การตรวจสอบภายใต้แสง white light ทำให้แยกสีได้ไม่ดีเท่าที่ควร จึงแสดงรูปที่ uv366 ร่วมด้วย) พบแถบสีเขียวของสารสกัดใบสะเดาทั้ง 3 พันธุ์ และของสารสกัดเมล็ดสะเดาทั้ง 2 พันธุ์ ที่ Rf 0.00, 0.30, 0.38, และ 0.55 และใบสะเดาช้างมีเพิ่มเติมที่ Rf 0.65 ส่วนสารมาตรฐาน azadirachtin a ปรากฏที่ Rf 0.68 (รูปที่ 13 และ 14) จากผลที่ได้จาก HPTLC fingerprint ของใบและเมล็ดสะเดา เมื่อเปรียบเทียบกับผลทดสอบหนอนใยผักของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ด้วยน้ำจากใบสะเดา(จากวิธีการข้อ 3.2) ทำให้ทราบว่า สารที่ออกฤทธิ์เมื่อนำเมล็ดสะเดาแช่ด้วยน้ำอาจจะเป็น สารที่ Rf 0.00, 0.30, 0.38 และ 0.55 มากกว่าสารกลุ่ม azadirachtin ซึ่งละลายน้ำได้น้อย

3. ผลการศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ของผลิตภัณฑ์สะเดา 15 ตัวอย่าง โดยตรวจสอบภายใต้แสง uv254, uv366 และ white light หลังพ่นด้วยน้ำยา anisaldehyde-sulfuric acid เปรียบเทียบกับสารสกัดใบและเมล็ดสะเดาด้วยตัวทำละลายต่างๆ และสารมาตรฐาน azadirachtin A, azadirachtin B, nimbin, salannin, cadinene, copaene, caryophylene, cubebene, humulene, valencene และ phytol

ผลการทดสอบเพื่อควบคุมคุณรูปผลิตภัณฑ์ โดยนำ HPTLC fingerprint ที่ Rf ต่างๆ ของสารสกัดสะเดาใน Hexane Methanol และ น้ำ เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์สะเดา 15 ตัวอย่าง (ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เสื่อมสรูป ถูกเปิดใช้แล้วและเก็บมานานหลายปี จึงตรวจไม่พบสารสำคัญ azadiractin a ซึ่งเป็นสารบ่งชี้ของสะเดา) พบว่าสามารถพิสูจน์ได้ว่า ผลิตภัณฑ์ 13 ตัวอย่าง เป็นผลิตภัณฑ์สะเดา โดยผลิตภัณฑ์ A, B, C, D, F, G และ K มีส่วนผสมของน้ำมันสะเดาซึ่งได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์, ผลิตภัณฑ์ H, I, J, และ L อาจจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่หมักหรือสกัดด้วยน้ำ, ผลิตภัณฑ์ O ซึ่งเป็นแชมพูก็สามารถตรวจสอบได้ ส่วนผลิตภัณฑ์ E และ M

ไม่พบสารบ่งชี้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์สะเดา เนื่องจากทดสอบที่ความเข้มข้นน้อยเกินไป จากผลที่ได้ พบว่าวิธีนี้สามารถตรวจวัดคุณรูปวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ทุกรูปแบบ (รูปที่ 15-21)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สะเดา มีสารออกฤทธิ์กลุ่ม terpenoids เป็นจำนวนมาก การสกัดกลุ่มสารทุตยภูมิ จากใบและเมล็ดสะเดาด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ hexane, chloroform, methanol และน้ำ จึงพบสาร terpenoids หลายชนิดอยู่ในตัวทำละลายต่างๆ โดยพบว่าในเมล็ดสะเดา มีสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุดคือ สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ผงสีน้ำตาล ซึ่งมีสารสำคัญเป็นกลุ่ม azadirachtin รองลงมาคือ น้ำมันสะเดาซึ่งสกัดด้วย hexane ส่วนในใบสะเดา มีสารออกฤทธิ์น้อยกว่าในเมล็ด โดยพบสารออกฤทธิ์มากที่สุดอยู่ในสารสกัดน้ำ เมื่อทดสอบชนิดของกลุ่มสารทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบต่างๆ พบว่า สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ผงสีน้ำตาล น้ำมันสะเดา และสารสกัดน้ำจากใบสะเดา เป็นสารกลุ่มเป็นสารกลุ่ม terpenoids เมื่อตรวจหาตำแหน่งของสารสำคัญ ด้วยวิธี HPTLC ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 214 nm และตรวจสอบภายใต้แสง uv 254, uv366 และ white light ได้เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) หลังพ่นด้วยน้ำยา anisaldehyde sulfuric acid ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ผงสีน้ำตาล เมื่อทดสอบด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ toluene/methanol/ ethyl acetate (10/1.2/3) พบสารหลักคือ azadirachtin a ที่ Rf 0.30 เมื่อทดสอบน้ำมันสะเดา ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ hexane/ethyl acetate (90/10) พบสารหลักคือสาร terpenoids ที่ Rf 0.51 และเมื่อทดสอบสารสกัดน้ำจากใบสะเดา ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ butanol/ethanol/water/ acetic acid (114/42/32/0.2) พบสารหลักที่ Rf 0.30 และ 0.38 จากการศึกษาเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ของใบและเมล็ดสะเดาพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ สะเดาไทย สะเดาอินเดีย และสะเดาช้าง เพื่อตรวจวิเคราะห์คุณรูปผลิตภัณฑ์สะเดา พบว่าการเปรียบเทียบ HPTLC fingerprint สามารถตรวจสารบ่งชี้ได้ถูกต้องชัดเจน สามารถประเมินปริมาณสาร terpenoids ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์โดยรวมได้ ทำให้สามารถนำวิธีการดังกล่าวไปใช้ควบคุมคุณรูปวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สะเดาต่อไป

ผลจากงานวิจัย ทำให้ทราบว่าสารออกฤทธิ์ในเมล็ดสะเดา ส่วนใหญ่เป็นสารประเภทขั้วน้อย-ปานกลาง จึงควรใช้สารสกัดที่เหมาะสมที่หาได้ง่าย เช่น ethanol หรือ ethanol ผสมน้ำ เพราะการนำเมล็ดสะเดาไปแช่น้ำซึ่งมีขั้วมาก อาจทำให้ได้สารออกฤทธิ์ไม่เต็มที่จนใช้ไม่ได้ผลเท่าที่ควร หากจำเป็นต้องแช่น้ำ ก็ควรให้ความสำคัญกับการบดเมล็ดสะเดาให้ละเอียดและใช้สารลดแรงตึงผิว เช่นน้ำยาล้างจานทั่วไปร่วมด้วย ซึ่งจะช่วยดึงสารออกฤทธิ์ออกจากเมล็ดสะเดาได้มากกว่าการแช่น้ำธรรมดา (รูปที่ 22)

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลการวิจัยนี้ ทำให้ทราบข้อมูลกลุ่มสารสำคัญ วิธีสกัดและตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักจากใบและเมล็ดสะเดา สามารถใช้ข้อมูลเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (HPTLC fingerprint) ในการควบคุมคุณรูปวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สารสกัดสะเดา สามารถวิจัยต่อยอดเพื่อสกัดสารบริสุทธิ์ และเป็นฐานข้อมูลของสารสกัดในพืชที่มีศักยรูปทางด้านป้องกันกำจัดศัตรูพืช ซึ่งจะเป็นปัจจัยสนับสนุนการผลิตผลิตภัณฑ์การเกษตรจากสารธรรมชาติ เพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคสินค้าเกษตร และเพิ่มมูลค่าให้พืชท้องถิ่นไทย โดยสามารถถ่ายทอดความรู้ไปยังนักวิจัยภาครัฐ ภาคเอกชน เกษตรกรและผู้ที่สนใจ และยังสามารถแนะนำเกษตรกรให้ใช้สะเดาอย่างถูกวิธี สามารถนำ

ความรู้ใหม่นี้ไปแนะนำการผลิตภาคเกษตรกรให้มีการสกัดได้สารออกฤทธิ์ที่สูงขึ้น โดยการต่อยอดวิธีการสกัดอย่างง่าย ประหยัด และปลอดภัย

11. คำขอบคุณ -

12. เอกสารอ้างอิง

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	น้ำมันสะเดา	ผงสีน้ำตาล	สารสกัดน้ำจากใบสะเดา
alkaloids	Dragendroff's reagent	×	×	×
	Hager 's reagent	×	×	×
	Marme 's reagent	×	×	×
flavonoids	Ferric chloride	×	×	×
	Lead acetate	×	×	×

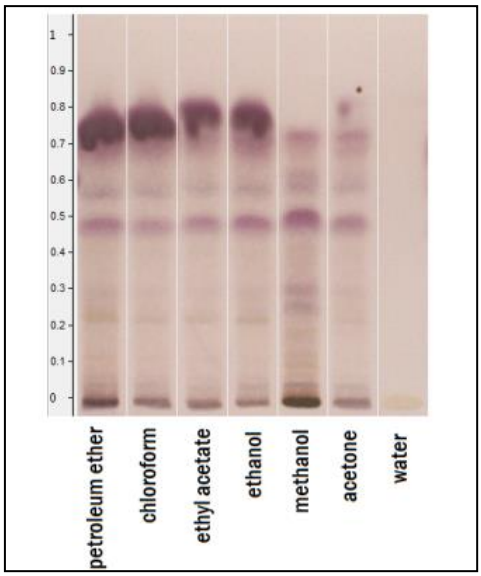
Phenol and Tannin	Ferric chloride	×	×	×
	Lead acetate	✓	×	×
Saponin	Foam test	×	×	×
	Olive oil test	×	×	×
Terpenoids, Stearoids	salkowski 's test	✓	✓	✓
	Terpenoids test	✓	✓	✓
monosaccharide	Benedict ‘s reagent	×	×	×
	Fehling ‘s reagent	×	×	×

ตารางที่ 2 ผลการเปรียบเทียบ HPTLC fingerprint ของสารสกัดพืชและผลิตภัณฑ์สะเดา

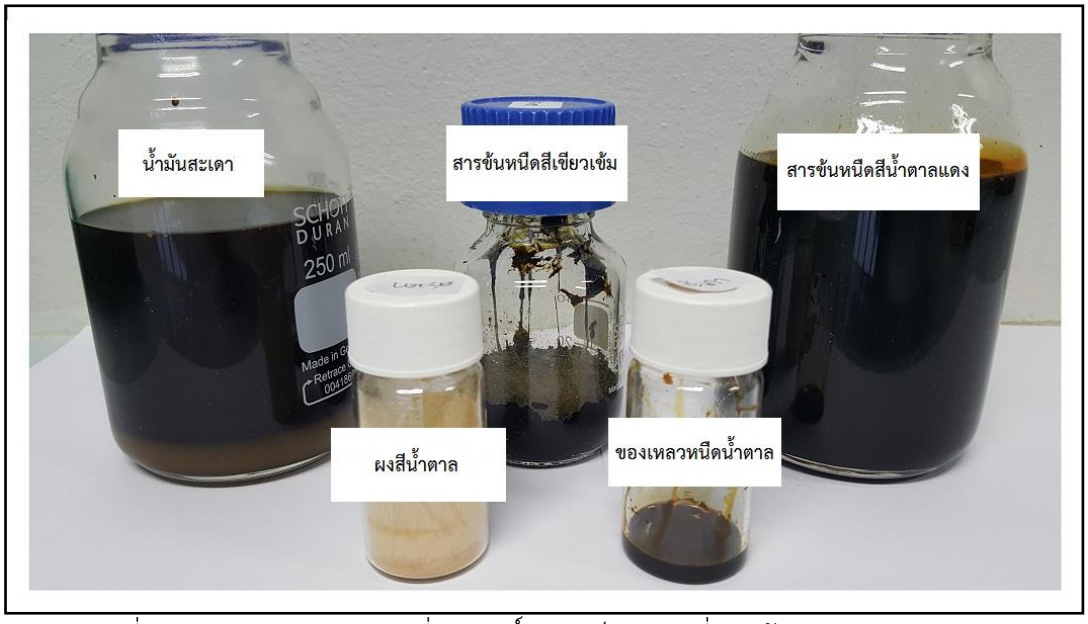
Sample	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
MP 1	✓	✓	✓	✓		✓	✓				✓				
MP 2	✓	✓	✓	✓		✓									✓
MP 3		✓		✓		✓		✓	✓	✓	✓	✓		✓	
summary	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓

MP1 คือ วัฏภาคเคลื่อนที่ hexane/ethyl acetate (90/10)
MP2 คือ วัฏภาคเคลื่อนที่ toluene/methanol/ ethyl acetate (10/1.2/3)
MP3 คือ วัฏภาคเคลื่อนที่ butanol/ethanol/water/acetic acid (114/42/32/0.2)
เครื่องหมาย ✓ หมายถึง ให้ผลเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีตรงกับสารสกัดสะเดา
เครื่องหมาย ✗ หมายถึง ไม่สามารถบ่งชี้ได้

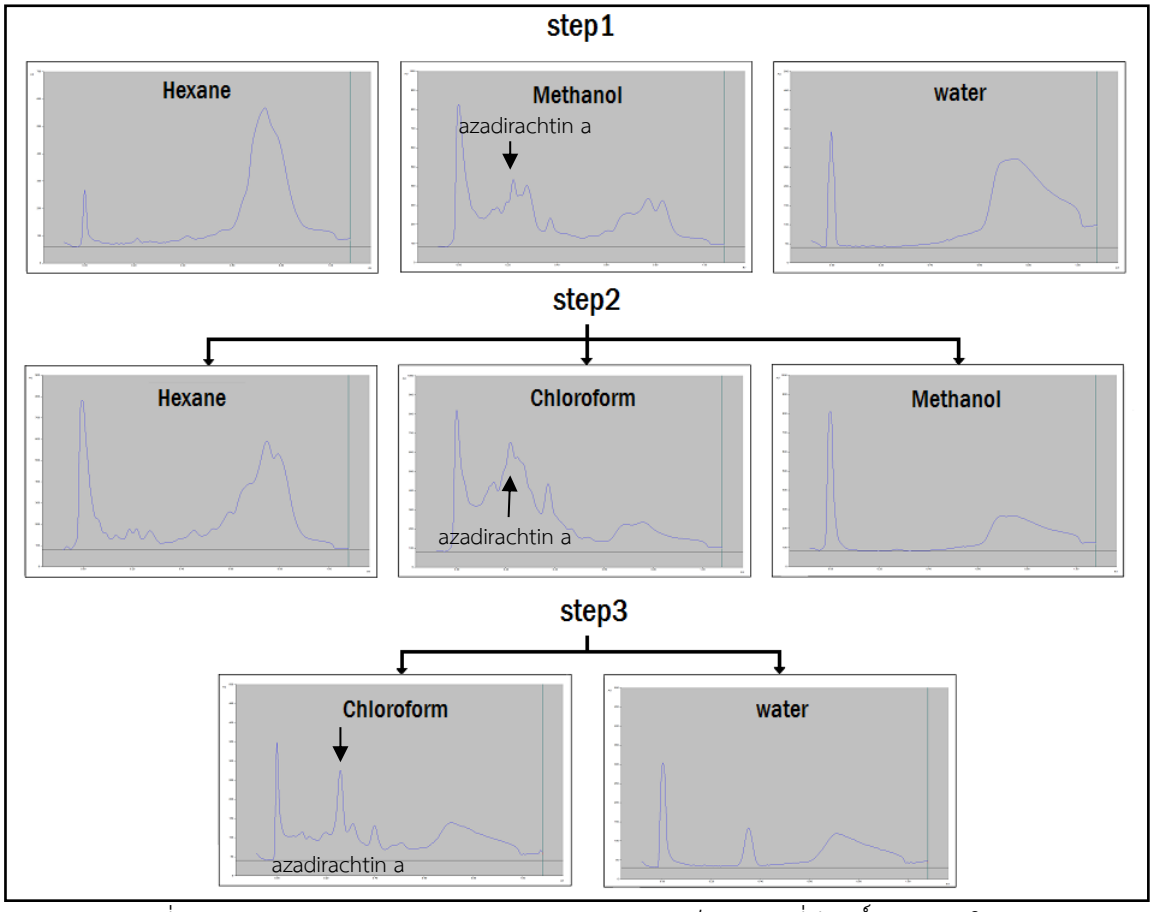
รูปที่ 1 เมล็ดและใบสะเดา



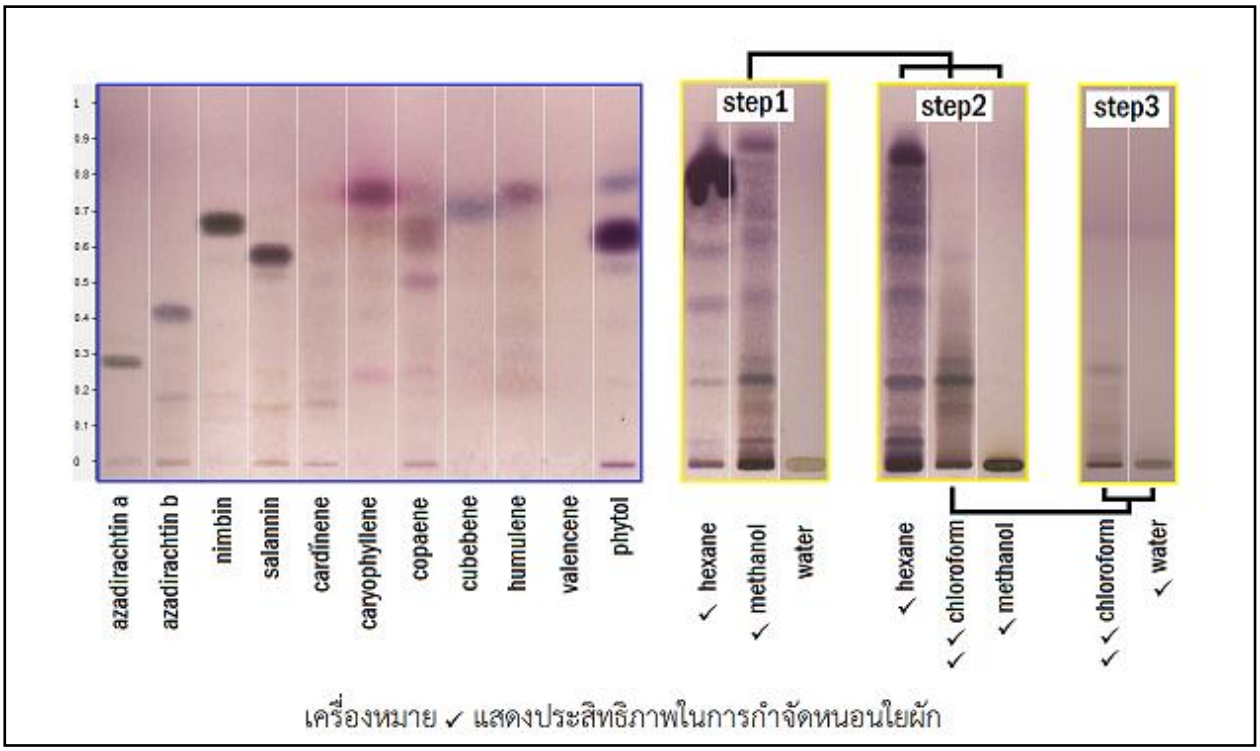
รูปที่ 2 HPTLC fingerprint ของสารสกัดหยาบเมล็ดสะเดาด้วยตัวทำละลายต่างๆ



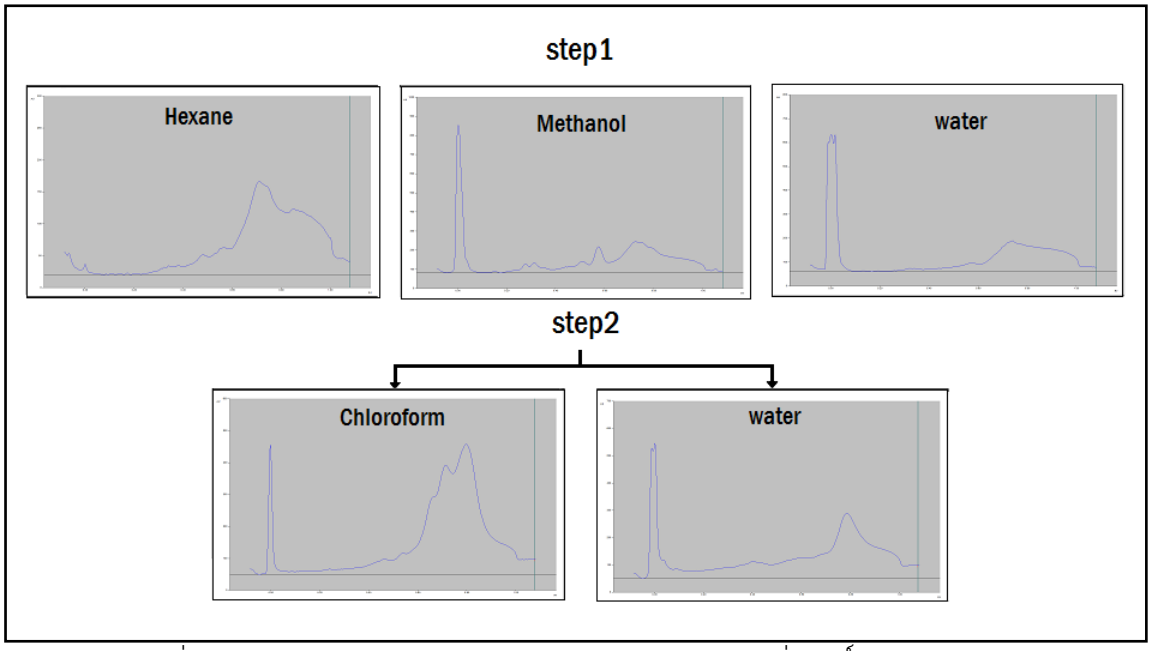
รูปที่ 3 สารสกัดหยาบและสารกึ่งบริสุทธิ์จากเมล็ดสะเดาที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ



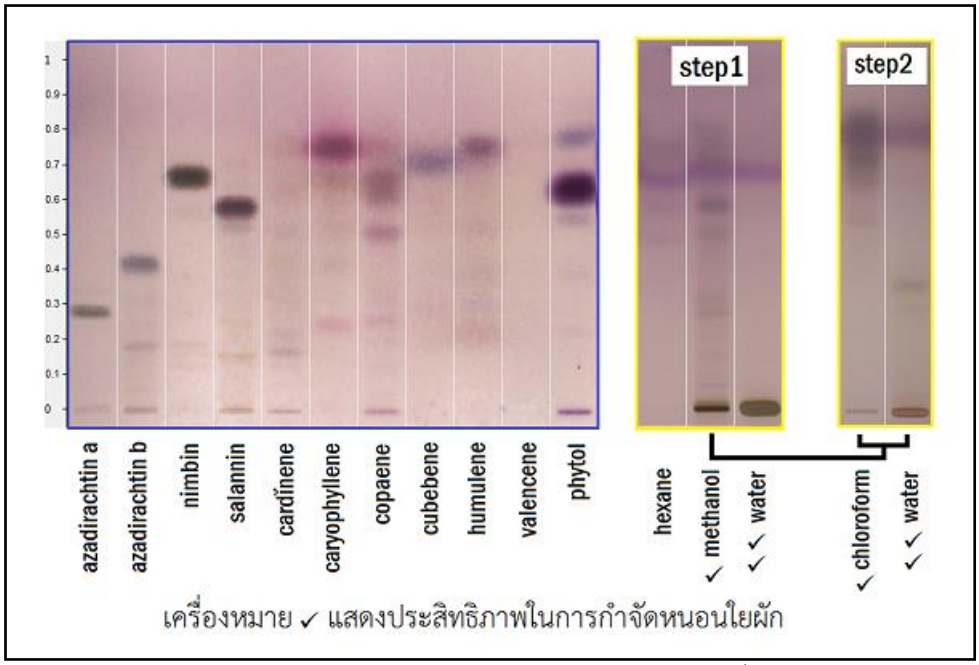
รูปที่ 4 HPTLC chromatogram ของสารสกัดจากเมล็ดสะเดาที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก



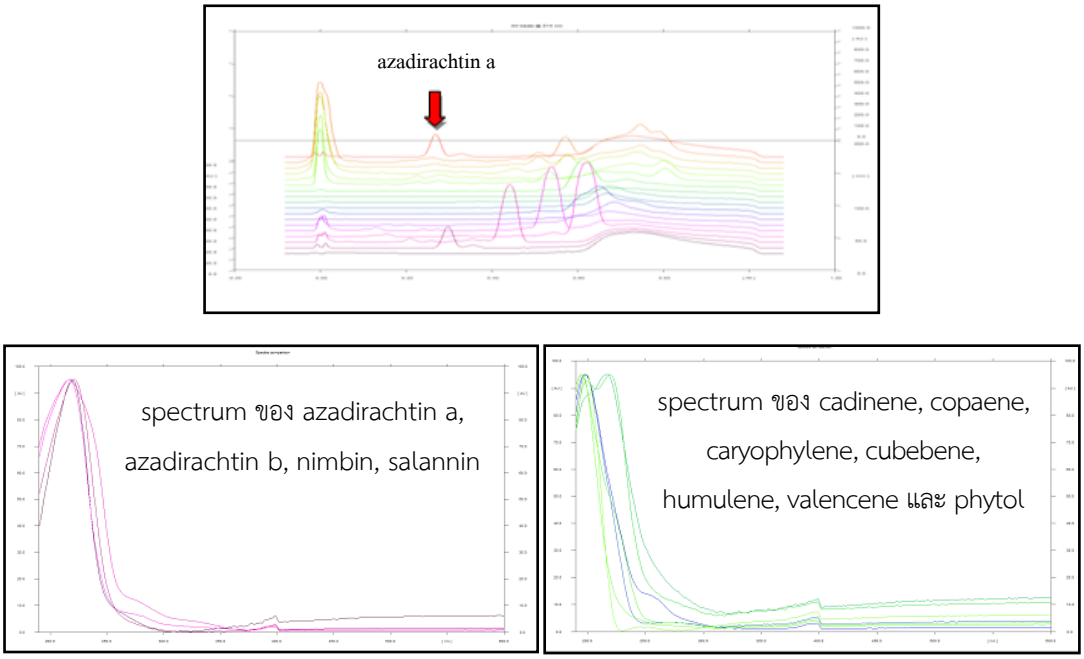
รูปที่ 5 HPTLC fingerprint ของสารสกัดจากเมล็ดสะเดาที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก



รูปที่ 6 HPTLC chromatogram ของสารสกัดจากใบสะเดาที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก

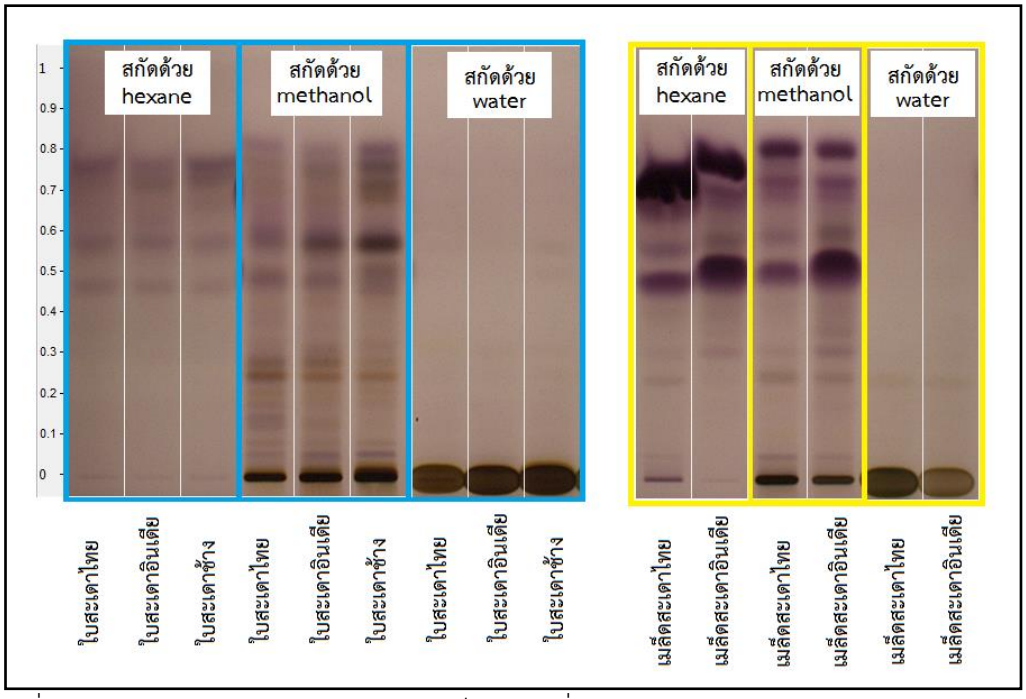


รูปที่ 7 HPTLC fingerprint ของสารสกัดจากใบสะเดาที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก

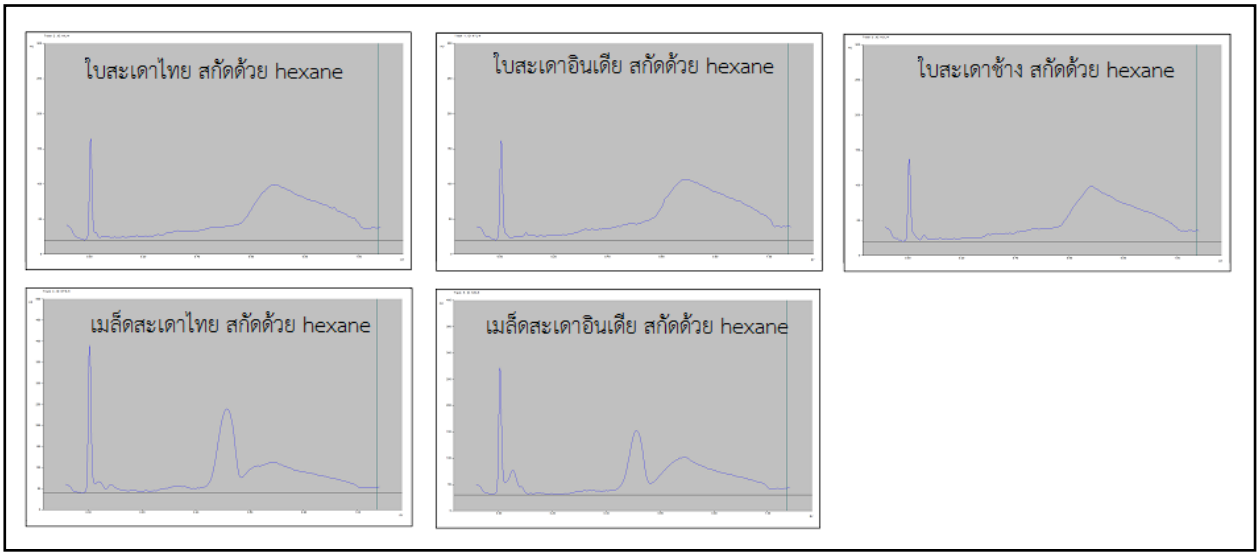


รูปที่ 8 HPTLC chromatogram และ Spectrum ของสารสำคัญในสะเดา

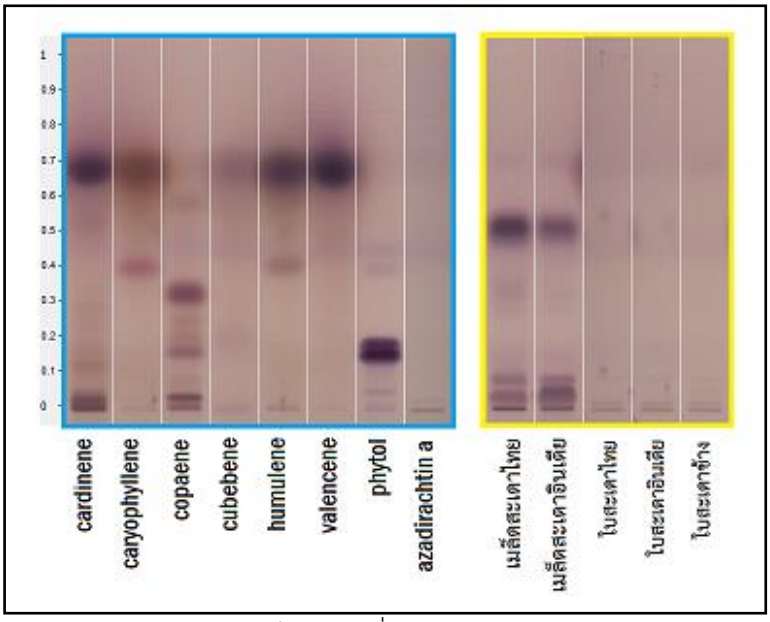
รูปที่ 9 HPTLC chromatogram ของใบและเมล็ดสะเดาที่สกัดด้วย hexane, methanol และ น้ำ โดยใช้ วัฏภาคเคลื่อนที่ toluene/methanol/ethyl acetate (10/1.2/3)



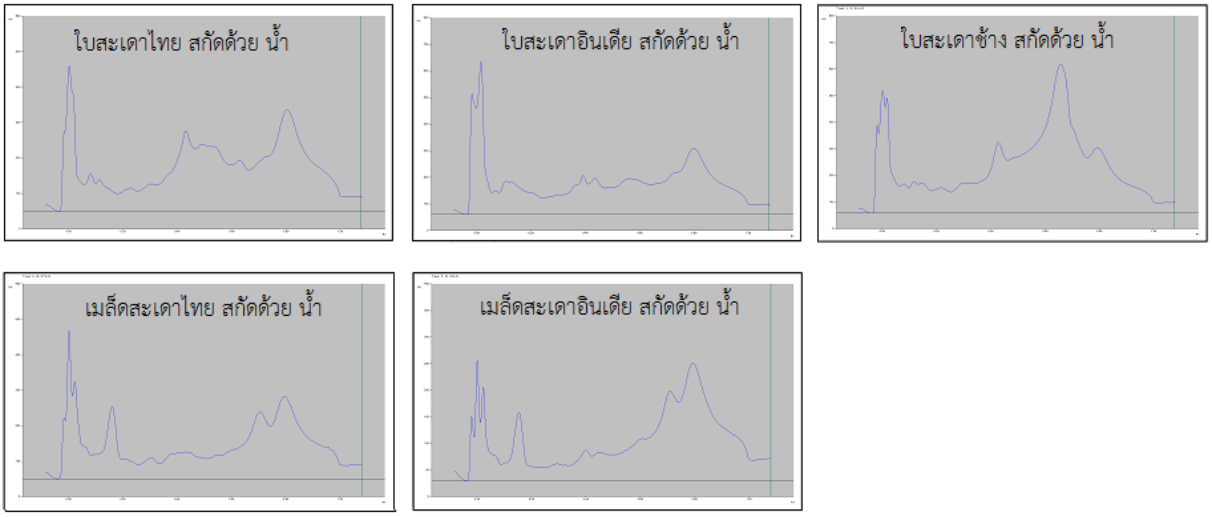
รูปที่ 10 HPTLC fingerprint ของใบและเมล็ดสะเดาที่สกัดด้วย hexane, methanol และ water โดยใช้ วัฏภาคเคลื่อนที่ toluene/methanol/ethyl acetate (10/1.2/3)



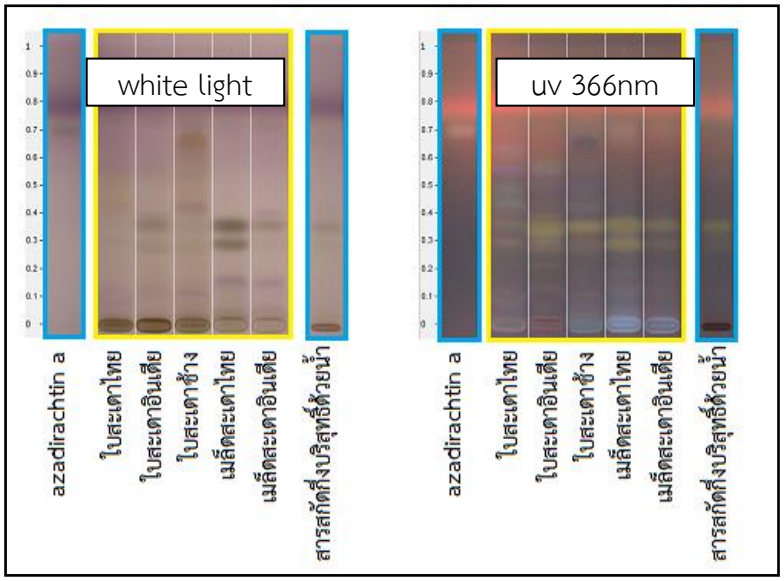
รูปที่ 11 HPTLC chromatogram ของใบและเมล็ดสะเดาที่สกัดด้วย hexane โดยใช้ วัฏภาคเคลื่อนที่ hexane/ethyl acetate (90/10)



รูปที่ 12 HPTLC fingerprint ของเมล็ดสะเดาที่สกัดด้วย hexane เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน
โดยใช้ วัฏภาคเคลื่อนที่ hexane/ethyl acetate (90/10)

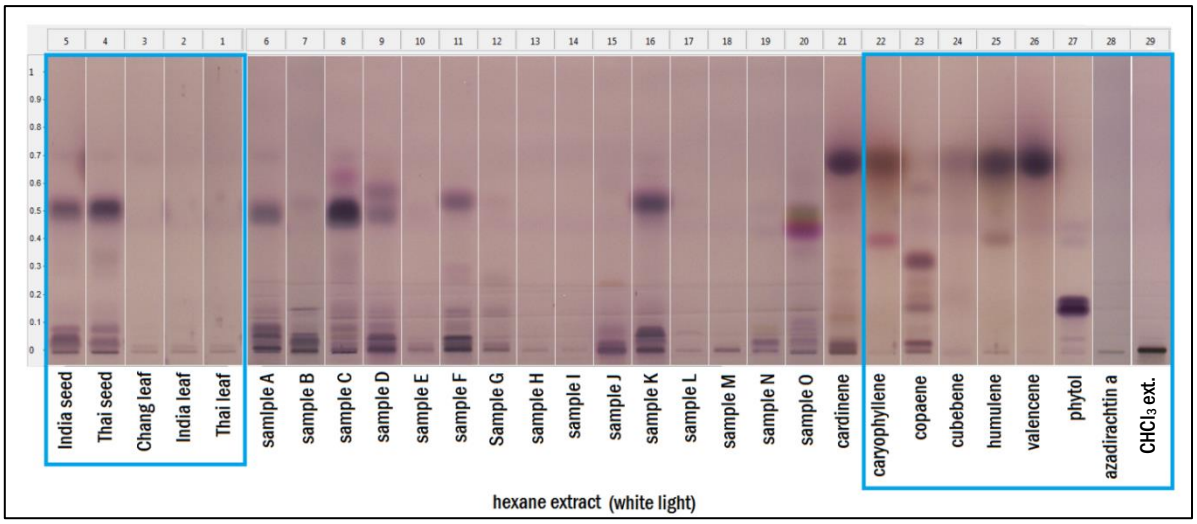


รูปที่ 13 HPTLC chromatogram ของใบและเมล็ดสะเดาที่สกัดด้วยน้ำ
โดยใช้ วัฏภาคเคลื่อนที่ butanol/ethanol/water/acetic acid (114/42/32/0.2)

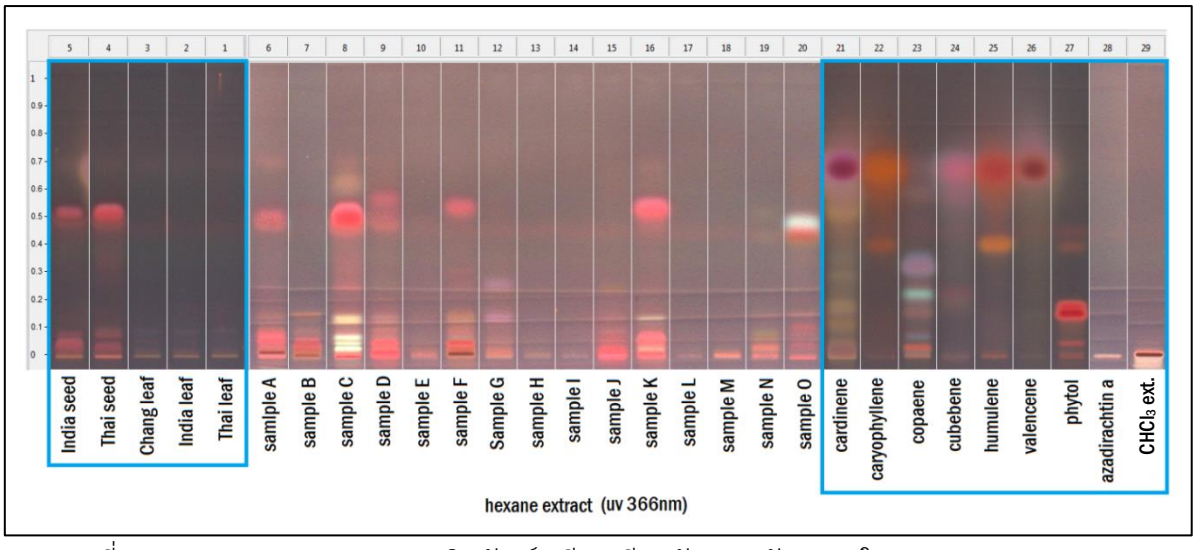


รูปที่ 14 HPTLC fingerprint ของเมล็ดสะเดาที่สกัดด้วย น้ำ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดยใช้ วัฏภาคเคลื่อนที่ butanol/ethanol/water/acetic acid (114/42/32/0.2)

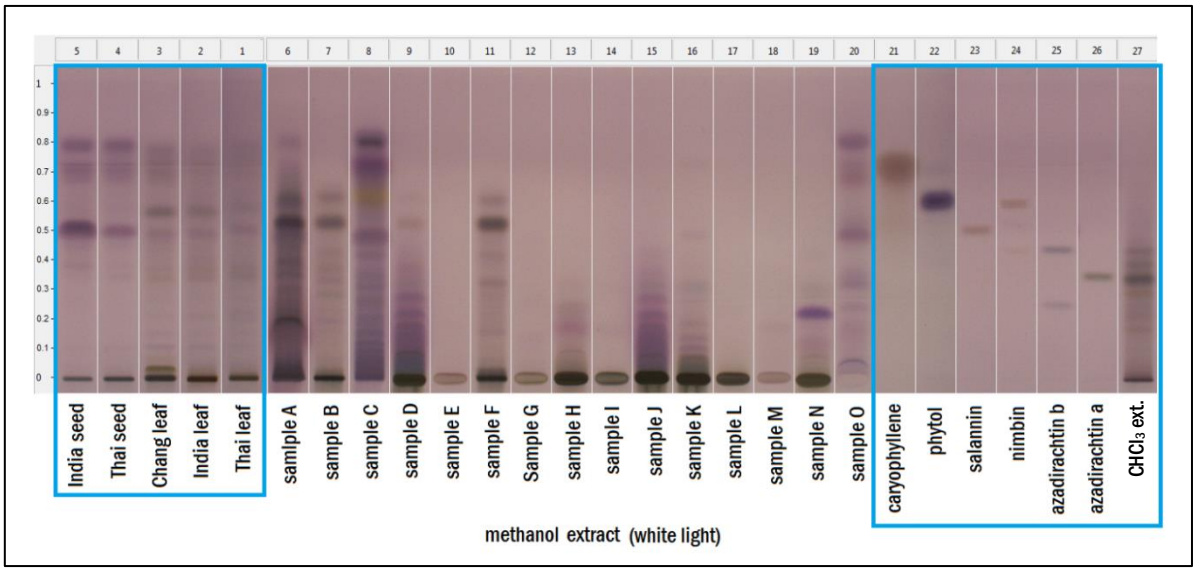
รูปที่ 15 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สะเดาที่นำมาทดสอบ



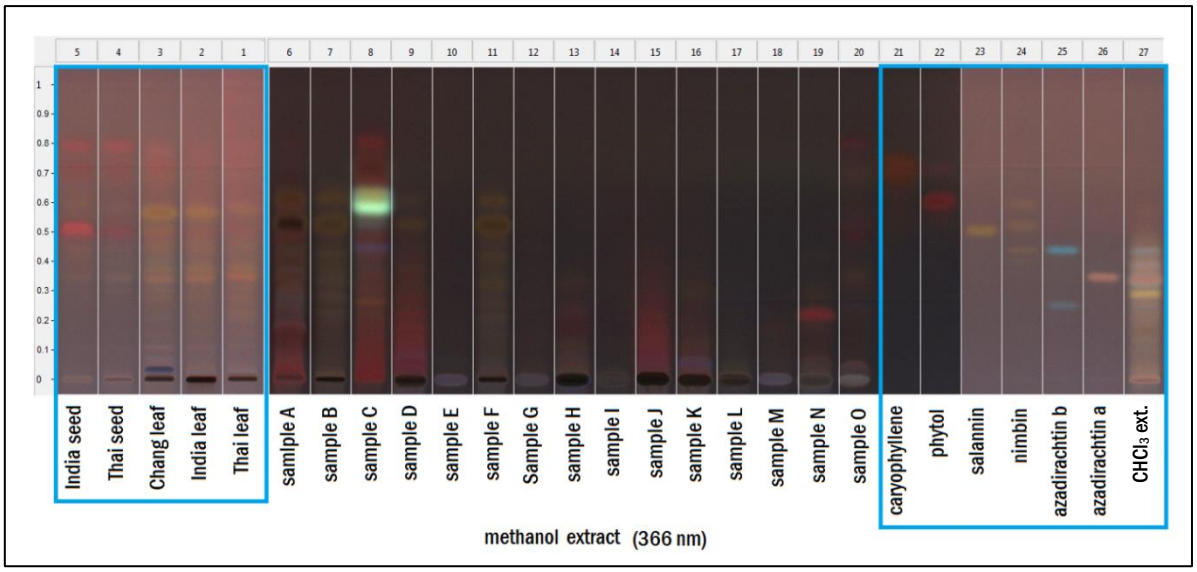
รูปที่ 16 HPTLC fingerprint ของผลิตภัณฑ์สะเดาเปรียบเทียบกับสารสกัดสะเดาใน hexane (white light)



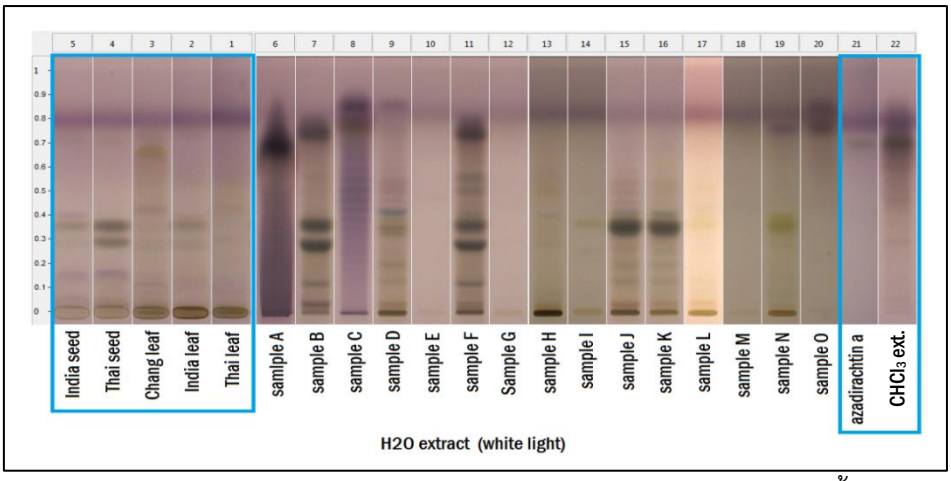
รูปที่ 17 HPTLC fingerprint ของผลิตภัณฑ์เปรียบเทียบกับสารสกัดสะเดาใน hexane (uv366nm)



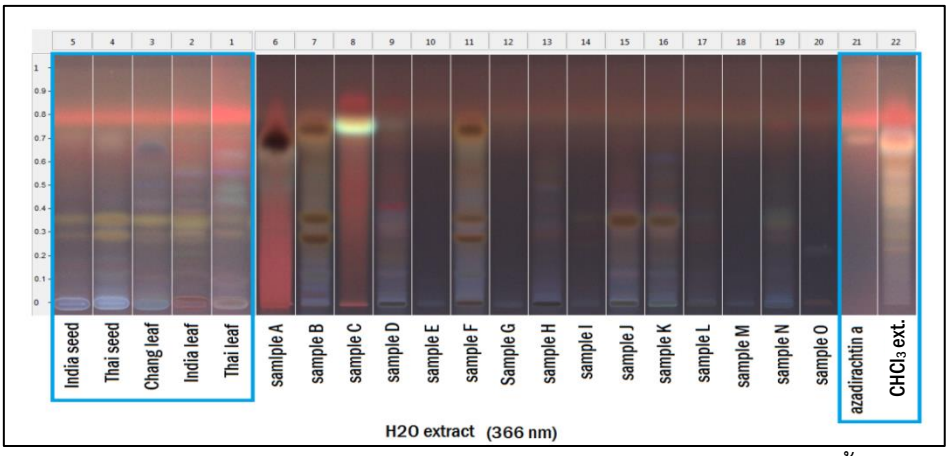
รูปที่ 18 HPTLC fingerprint ของผลิตภัณฑ์สะเดาเปรียบเทียบกับสารสกัดสะเดาใน methanol (white light)



รูปที่ 19 HPTLC fingerprint ของผลิตภัณฑ์สะเดาเปรียบเทียบกับสารสกัดสะเดาใน methanol (uv366nm)



รูปที่ 20 HPTLC fingerprint ของผลิตภัณฑ์สะเดาเปรียบเทียบกับสารสกัดสะเดาในน้ำ (white light)

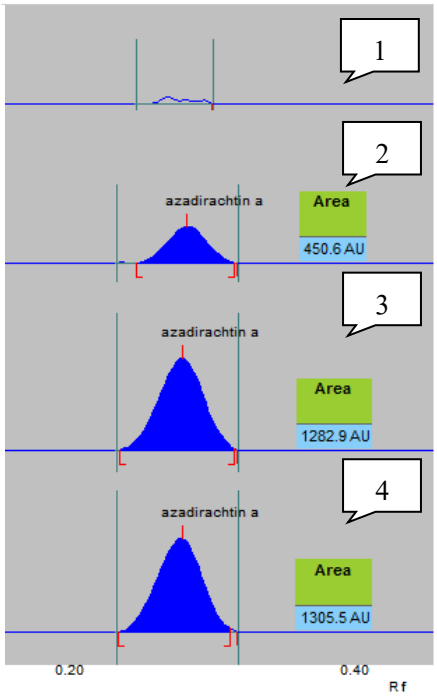


รูปที่ 21 HPTLC fingerprint ของผลิตภัณฑ์สะเดาเปรียบเทียบกับสารสกัดสะเดาในน้ำ (uv366nm)

เปรียบเทียบวิธีการสกัดสาร azadirachtin a จากเมล็ดสะเดาบดในอัตรา 5%w/v ด้วยน้ำ

1. บดเมล็ดสะเดาหยาบๆ กวนแล้วแช่ทิ้งไว้ 1 คืน
2. บดเมล็ดสะเดาจนละเอียดเป็นผง แล้วกวนอย่างสม่ำเสมอ 5 นาที
3. บดเมล็ดสะเดาจนละเอียดเป็นผง แล้วสกัดด้วย blender จนน้ำเป็นสีขาวขุ่น 5 นาที
4. บดเมล็ดสะเดาจนละเอียดเป็นผง แล้วเติมน้ำยาล้างจาน 1% แล้วกวนอย่างสม่ำเสมอ 5 นาที

ผลที่ได้พบว่าการบดให้ละเอียดเป็นผง สามารถช่วยสกัดสาร azadiractin a ได้มากขึ้น และการใช้สารลดแรงตึงผิวสามารถช่วยสกัดสาร azadirachtin a มากขึ้นถึง 3 เท่า และยังสามารถดึงสารอื่นๆ ที่มีสภาพขั้วน้อย ได้อีกด้วย



รูปที่ 22 เปรียบเทียบวิธีการสกัดสาร azadirachtin a ด้วยน้ำ