รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด

.....

1. แผนงานวิจัย -

2. โครงการวิจัย วิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติจากพืช

กิจกรรมที่ 1 วิจัยผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืชจากน้อยหน่า

ระยะเวลาดำเนินการ 2559-2561 (3ปี)

3. ชื่อการทดลอง การทดลองที่ 1.3

(ภาษาไทย) วิจัยสูตรและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าเพื่อการป้องกันกำจัดศัตรูพืช

(ภาษาอังกฤษ) Formulation and efficacy of *Annona squamosal* L. Product for using as insecticide

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง นางสาวภัควรินทร์ ศานติธีรโรจน์ สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผู้ร่วมงาน นางพรรณีกา อัตตนนท์ สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

นางสาวณัฐพร ฉันทศักดา สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

การวิจัยสูตรและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าเพื่อการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เนื่องจากน้อยหน่าจัดเป็นพืชที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยแต่ละส่วนได้แก่ ใบ เปลือกผล เมล็ด เปลือกต้นและราก ให้สารที่มีฤทธิ์แตกต่างกัน ในที่นี้เป็นการทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผัก (*Plutella xylostella* L.) โดยการสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยเมทานอล ได้สารสกัดหยาบ แล้วนำไปสกัดด้วยเฮกเซน เมทานอล ไดคลอโรมีเทนและน้ำ แยกเป็น 4 ส่วน ได้ crude1, crude2, crude3 และ crude4 เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนใยผักพบว่า crude2 มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก จึงได้นำ crude2 ไปศึกษาสภาวะ (condition) ที่เหมาะสมสำหรับเครื่อง HPTLC ในการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ, สกัดต่อเป็นสารกึ่งบริสุทธิ์และเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์เข้มข้นสูตรต่างๆ จากการศึกษาสภาวะ โดยใช้ HPTLC glass plate silica gel60 F_{254} ได้สารตัวพา EtOAc/MTBE/MeOH (93/5/2) ส่องภายใต้แสง UV 254, 366 nm และแสงธรรมชาติ แล้วสเปรย์ด้วยน้ำยา dragendorff's spray reagent พบว่าสามารถแยกอัลคาลอยด์ต่างๆ ออกจากกันได้ จึงใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่สกัดได้จาก crude2 โดยแยกได้เป็น 5 ส่วน คือ F1, F2, F3, F4 และ F5 พบอัลคาลอยด์ 8 ชนิด จากการทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก พบว่า F1และ F2 ให้เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักสูง ทำให้ทราบว่า อัลคาลอยด์2 (Rf 0.57) คือสารที่ออกฤทธิ์สูงสุด จึงใช้เป็นสารอ้างอิง ในการวัดปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ ซึ่งจากการวิจัยสูตรผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ พบว่า สูตรที่เหมาะสมในการทำผลิตภัณฑ์มี 2 สูตรคือ EC (emulsifiable concentrates) และ EW (emulsion in water) เมื่อทดสอบความคงสภาพหลังให้ความร้อนเป็นตัวเร่งที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส 14 วัน พบว่าผลิตภัณฑ์ยังคงสภาพไม่เปลี่ยนแปลงทั้ง 2 สูตร เมื่อทดสอบประสิทธิภาพต่อ

หนอนใยผัก ของผลิตภัณฑ์สูตร EC ที่อัตรา 0.33%w/v และสูตร EW ที่อัตรา 2.67%w/v พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การตายหนอนหนอนใยผักเกิน 80% ไม่แตกต่างทางสถิติทั้งก่อนและหลังอบที่อัตราเดียวกัน สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย HPTLC และ HPLC ซึ่งให้ chromatogram ของ alkaloid2 คงที่เมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ ในช่วงเวลา 0-14 วัน ผลิตภัณฑ์เหล่านี้สามารถนำไปต่อยอดศึกษาประสิทธิภาพต่อแมลงศัตรูพืชชนิดอื่นๆได้ในอนาคต เพื่อเพิ่มมูลค่าและสนองนโยบายการลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช
คำหลัก: สารสกัดน้อยหน่า, สูตรผลิตภัณฑ์, หนอนใยผัก, ทีแอลซีสมรรถนะสูง, อัลคาลอยด์

Abstract

The development and efficacy of the formulate products of(*Annona squamosa* L.) extract for controlling insects were studies. Crude extracts form seeds, leaves, barks and roots of sugar apple have been extensively tasted for insecticidal activity. In this study the efectiveness of sugar apple extract was tested against *Plutella xylostella* L. Seeds of sugar apple were extracted with methanol and then the extract was separated into 4 fractions by hexane, methanol, dichloromethane and water and collected crude1, crude2, crude3 and crude4, respectively. The efficacy for killing *Plutella xylostella* L.was tested. It was found that crude2 had the highest efficiency against *Plutella xylostella* L.The extract was then subjected to qualitative chemical analysis, quantitative analysis and semi-purification using high performance thin layer chromatography (HTPLC) method. The optimum conditions were studied on HTPLC glass plate silica gel 60 F_{254}. EtoAc/MTBE/MeOH (93/5/2) was used as mobile phase. The developed plates were visualized under visible, UV254 and 366 nm light. As post derivatization the plates were sprayed with Dragendoff's reagent, the results showed that the crude extract2 can be identified. There were 5 bands observed including F1, F2, F3,F4 and F5 with 8 types of alkaloids. The insecticidal activity of 5 bands against *Plutella xylostella* L.were studied. The results indicated that F1 and F2 caused the highest mortality and alkaloid2 (Rf 0.57) was the active compound that was used as reference standard for quantitative study. *Annona squamosa* L. extract was formulated into 2 formulas including formulation EC (emulsifiable concentrates) and formulation EW (emulsion in water). The stability test of the formulations were also studied at 54 °C for 14 days, the result indicated that the products still be stable. Two formulations were evaluated against *Plutella xylostella* L. treatment with formulaion EC at 0.33% w/v and formulation EW at 2.67 %w/v gave more than 88% mortality and the results of two formulations were not significantly different before and after oven. The result was absolutely related with HTPLC and HPLC analyzing. The chromatograms of alkaloid2 were still constant. The results from this study represent helpful information. Efficacy of the formulations

against others insect pests should be further evaluated in order to assess their potential uses as natural insecticide.

Key words :*Annona squamosa* L. extract, formulation, HPTLC, alkaloids

6. คำนำ

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 เช่น น้อยหน่า (*Annona. Squamosa* L.) เป็นพืชผลไม้ในกลุ่ม custard apple family ในประเทศไทยเพาะปลูกน้อยหน่าสายพันธุ์ *Annoana squamosa* L. สารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยเอทานอลและเมทานอลมีฤทธิ์กำจัด ด้วง pulse (*Callosobruchus chinensis*) ได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Al-Lawati *et al.*, 2002) และสามารถกำจัดด้วง khapra (*Trogoderma granarium*) ได้ สารสกัดใบและเมล็ดน้อยหน่ายังสามารถควบคุมแมลงได้อีกหลายชนิด เช่น เพลี้ย หนอนฝ้าย ตั๊กแตน มด แมลงหวี่ จากรายงานสารเคมีในผลน้อยหน่าประกอบด้วย diterpenoid compound เช่น kaur-16-en-18-oic acid, α-pinene, sabinene และ limonene (Andrade *et al.*, 2001)

น้อยหน่า เป็นพืชที่มีแนวโน้มในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช จากการศึกษาค้นคว้าจากเอกสารงานวิจัยต่างๆ พบว่ามีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ควบคุมและกำจัดแมลงต่างๆได้ ข้อมูลส่วนใหญ่ของงานวิจัยน้อยหน่า จะเป็นการศึกษาทางด้านประสิทธิภาพและสารสำคัญ มีส่วนน้อยที่ทำการศึกษาและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป จึงได้นำมาทำการวิจัยและพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อทดแทนหรือลดการใช้สารเคมี นอกจากนี้ยังให้ความสำคัญในการศึกษาเอกลักษณ์ทางโครมาโทกราฟีของสารสำคัญในพืชต่างๆ เพื่อการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ

การนำพืชมาใช้เป็นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเข้าใจถึงคุณภาพทางเคมีของส่วนต่างๆของพืช เช่น ต้องทราบว่าสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในพืชนั้นเป็นประเภทใด และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างไร จึงจำเป็นต้องศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสม ซึ่งขึ้นอยู่กับพืชและประเภทของสารออกฤทธิ์ในพืชนั้นๆ และใช้สารเหล่านี้เป็นตัวบ่งชี้ในการวิเคราะห์คุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ทำจากพืชชนิดนั้น ๆ การศึกษาสารสำคัญในพืช และการทดสอบประสิทธิภาพสารสำคัญจากพืชเพื่อใช้ในการควบคุมศัตรูพืชเป็นสิ่งสำคัญในการเป็นแนวทางการวิจัยสูตรและผลิตภัณฑ์สารสกัดจากพืชสำเร็จรูปพร้อมใช้ที่มีคุณภาพ

น้อยหน่า ชื่อวิทยาศาสตร์ *Annona squamosa* Linn. มีชื่อสามัญ Sugar Apple, Sweetsop, Custard Apple องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดมีสาร anonaine alkaloid, isocorydine สารกลุ่ม acetogenin ชื่อ annonacin A จำแนกตามลักษณะเป็น 2 ชนิด ได้แก่ น้อยหน่าพื้นเมืองหรือน้อยหน่าฝ้าย แบ่งออกได้เป็น 2 สาย

พันธุ์ ตามลักษณะของสีผลคือ น้อยหน่าฝ้ายเขียวซึ่งมีผลสีเขียว กับน้อยหน่าฝ้ายครั่งมีผลสีม่วงเข้ม และน้อยหน่าหนังหรือน้อยหน่าญวน แบ่งได้ 3 สายพันธุ์ คือ น้อยหน่าหนังเขียวมีผลสีเขียว น้อยหน่าหนังทอง และน้อยหน่าหนังครั่ง นอกจากนี้ยังมี น้อยหน่าพันธุ์ลูกผสม 2 สายพันธุ์ คือ พันธุ์เพชรปากช่องและพันธุ์เนื้อทอง

สารสกัดเมทานอลจากใบน้อยหน่ามีความเป็นพิษต่อเพลี้ยอ่อนถั่ว โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 2,089.30µg/mL (สุดารัตน์และคณะ, 2554) จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อเพลี้ยอ่อนพบว่า สารสกัดจากน้อยหน่า ออกฤทธิ์ดีที่สุดต่อเพลี้ยอ่อน จากรายงานวิจัยพบว่าสารสำคัญในใบน้อยหน่าเป็นสารแอลคาลอยด์(alkaloids) แอนโนเนอีน (anonaine) และเรซิน (resin) ในเมล็ดมีน้ำมันอยู่ประมาณ 45% น้ำมันเป็นพิษกับด้วงปีกแข็ง เพลี้ยอ่อน แมลงวัน และมวนปีกแข็ง (สมสุข, 2546) กรกช (2554) ได้ศึกษาฤทธิ์ต่อการสัมผัสโดยตรง (direct contact) ต่อหนอนแมลงวันทองโดยการจุ่มหนอน (dipping) ลงในสารผสมระหว่างใบน้อยหน่าและใบแมงลักคา มีค่า LC_{50} 652.80 ± 13.15 ppm และ 683.25 ± 38.08 ppm ตามลำดับ และสารสกัดใบน้อยหน่าด้วยเอทานอลน่าจะเป็นสารเพิ่มฤทธิ์แบบ additive effect ให้แก่สารสกัดใบสะเดาด้วยเอทานอล และฤทธิ์ของสารสกัดต่อการกินของแมลงวันทองตัวเต็มวัย พบว่าสารสกัดใบน้อยหน่าด้วยน้ำมีประสิทธิภาพทำให้แมลงตายได้ ปานกลาง LC_{50} 1,710.91 ± 67.07 ppm ฤทธิ์สารสกัดผสมควบคุมแมลงได้ปานกลางเช่นกัน สารสกัดใบสะเดาผสมใบน้อยหน่าด้วยเอทานอลกำจัดแมลงได้สูงสุด LC_{50} 1,605.87 ± 67.93 ppm จากการศึกษาของ Khalequzzaman andSultana (2006) ทดสอบสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยตัวทำละลายต่างๆกับตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของมอดแป้ง (Red flour beetle) 4 สายพันธุ์ คือ Raj, CR 1, FSS II และ CTC-12 พบว่า สารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยเมทานอลมีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนมอดแป้งสายพันธุ์ FSS II น้อยที่สุด และสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยปิโตรเลียมสปิริท มีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนมอดแป้งสายพันธุ์ Raj สูงที่สุด สำหรับตัวเต็มวัยของมอดแป้ง สารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยปิโตรเลียมสปิริทมีความเป็นพิษกับสายพันธุ์ CTC-12 สูงที่สุด และสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยอะซิโตนมีความเป็นพิษกับสายพันธุ์ CR 1 น้อยที่สุด สารสกัดหยาบของน้อยหน่าสามารถควบคุมตัวอ่อนผีเสื้อ (Leatemia and Isman, 2004) ควบคุมแมลงวันผลไม้ ชนิด Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) ในระยะฟักไข่ รบกวนการวางไข่และยืดเวลาพัฒนาการของตัวอ่อน (Epino and Chang, 1993) ควบคุมตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของมอดแป้งสีแดง *Tribolium castaneum* Herbst (Khalequzzaman and Sultana, 2006)

ทีแอลซีสมรรถนะสูง (High Performance Thin Layer Chromatography : HPTLC) คือวิธีการแยกสารบนแผ่นที่เคลือบด้วยตัวดูดซับ เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมสูงในห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพสมุนไพร ที่สามารถแยกสารได้ดีกว่าวิธีทีแอลซี (Thin Layer Chromatography: TLC) เดิม มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรและการตรวจเอกลักษณ์ของวัตถุดิบสมุนไพร เนื่องจากเป็นวิธีทดสอบเชิงปริมาณที่สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิดในเวลาเดียวกันจึงประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายและเมื่อนำไปผนวกกับเครื่องวัดความหนาแน่น (Densitometer) ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับสารเพิ่มขึ้นช่วยในการพิสูจน์เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี (Fingerprint) และวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ ซึ่งมีเทคนิคต่างๆ ช่วยในการตรวจสารที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเอชพีแอลซี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) ทำให้สามารถควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพรในทัศนะระดับชาติและระดับสากล อีกทั้งมีความถูกต้อง (accuracy) มีความแม่นยำ (precision) มีสภาพไว (sensitivity) และมีความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำ (Reproducibility)

มีงานวิจัยเกี่ยวกับการสร้างเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีในพืชสมุนไพรหลายชนิด ด้วยการใช้เทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง จากการศึกษารากยาสูบ ลักษณะภายนอก และคุณสมบัติทางพฤกษเคมี การวิเคราะห์ทางพฤกษเคมีและเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีโดยทีแอลซีสมรรถนะสูง ผลทางพฤกษวิทยาพบสารฟลาโวนอยด์ ไฟโตสเตอรอล ไตรเทอร์ปินอยด์ และแทนนิน โดยการสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) เมื่อตรวจค่า Rf ที่ 400nm พบว่าเอกลักษณ์โครมาโทกราฟี โดยเครื่อง HPTLC-densitometer สามารถใช้บ่งชี้ข้อมูลในการพิจารณารับรองสารสกัดหยาบได้ (Sunil*et al.*, 2011) การสร้างเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีของสาหร่ายสีน้ำตาล (*Lobophora variegate*) โดยวิธีทีแอลซีสมรรถนะสูง สกัดด้วยสารละลายเมทานอลิค (methanolic) พบ 9 พีค ให้ค่า Rf อยู่ในช่วง 0.18-0.86 ซึ่งสรุปได้ว่าการวิเคราะห์เอกลักษณ์โครมาโทกราฟี ด้วยทีแอลซีสมรรถนะสูงของสารสกัดเมทานอลิคสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาหร่าย และเป็นประโยชน์ในการบ่งชี้ทางพฤกษเคมีของสายพันธุ์ต่างๆ ได้ (Thennarasan *et al.*,2014) นอกจากนี้ Manikandan and Doss (2010) ศึกษาส่วนประกอบทางชีวเคมี คุณค่าทางโภชนาการ ตรวจวัดขนาดโมเลกุลของโปรตีน และตรวจทางพฤกษเคมีโดยวิธีทีแอลซีสมรรถนะสูง และสารสกัดใบต้อยติ่ง และจ๊าหอมด้วย 50% เมทานอลิคพบสารฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ ฟีนอล ซาโปนิน และธาตุอาหารปริมาณเล็กน้อย ได้แก่ ฟีโนลิค คาโรทีนอยด์ จากการศึกษาทีแอลซีสมรรถนะสูงของพืชสมุนไพรกาง (*Albizia lebbeck*) ตามวิธี Harborneและ Wagner *et al*.โดยใช้เอทิลอะซิเตต : เมทานอล : น้ำ (100:13.5:10) เป็น mobile phase และ สเปรย์ด้วย Dragendorff's reagent ตามด้วย 10%Sodium nitrile reagent และอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ส่องภายใต้แสง uv 366 nm และ แสงธรรมชาติ พบ อัลคาลอยด์ สเตียรอยด์ เทอร์ปินอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน และ ไกลโคไซด์ สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ พบอัลคาลอยด์ 10 ชนิดที่ค่า Rf ระหว่าง 0.02-0.85 สารสกัดเอทิลอะซิเตต พบอัลคาลอยด์ที่แตกต่างกัน 5 ชนิดที่ค่า Rf ระหว่าง 0.09-0.84 และสารสกัดเมทานอลิคพบอัลคาลอยด์ที่ต่างกัน 4 ชนิดที่ค่า Rf ระหว่าง 0.02-0.79 (Nazneen *et al.*,2012) และ (Sachin *et al.*, 2009) วิเคราะห์สาร quercetin ในบัวเผื่อน (*Nymphaea stellata* willd) โดยสกัดบัวเผื่อนด้วยกรดไฮโดรคลอริค(hydrochloric) และใช้ mobile phase คือ โทลูอีน(toluene) : เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) : 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 ได้ และเป็นวิธีที่ถูกต้องและรวดเร็ว จากการตรวจสอบทางพฤกษเคมีของว่านหางจระเข้ (*A. vera*) เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการทำมาตรฐาน โดยการวิเคราะห์ทางพฤกษเคมี การทดสอบการละลายโลหะหนัก ศึกษาการต้านจุลชีพ และหาปริมาณของ gallic acid และ berberine โดยวิธีทีแอลซีสมรรถนะสูง ผลที่ได้คือ การทดสอบทางพฤกษเคมีเผยให้เห็นถึง อัลคาลอยด์ คาร์โบไฮเดรต แทนนิน สเตียรอยด์ ไตรเทอปินอยด์ และ ไกลโคลไซด์ โดยพบฟลาโวนอยด์และฟีนอล 1.9% และ 13.11% ตามลำดับ พบ berberine และ gallic acid 2.74% และ 0.543% ตามลำดับ (Patel *et al.*, 2012)

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ เครื่องมือเครื่องแก้ว และสารเคมี

1. เครื่องแก้ว ได้แก่ volumetric flask, pipette, round bottom flask, cylinder, beaker, vial เป็นต้น
2. สารเคมี ได้แก่ ethyl ether, ethyl acetate, methanol, chloroform, hexane, petroleum ether, น้ำยาพ่น Anisaldehyde-sulfuric acid, น้ำยาพ่นและน้ำยาทดสอบ dragendorff
3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้า, ultrasonic bath, vacuum pump, เครื่องบดตัวอย่าง, ตู้อบตัวอย่าง, เครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator), เครื่องทีแอลซีสมรรถนะสูง (High performance thin layer chromatography, HPTLC) และแผ่น HPTLC plate silica gel 60F254 size 20x10cm
4. สิ่งทดลอง ได้แก่ เมล็ดน้อยหน่า และหนอนใยผัก

วิธีการ

1. จัดซื้อสารเคมี ตัวทำละลายสารอิมัลซิไฟเออร์ และสารลดแรงตึงผิว และเครื่องแก้ว และเก็บหนอนใยผักจากแปลงคะน้า และแปลงกะหล่ำดอก จ.นครราชสีมา และ จ.กาญจนบุรี สำหรับเลี้ยงเพื่อทดสอบ

2. เตรียมสารสกัดหยาบเมล็ดน้อยหน่า โดยนำผลน้อยหน่าสุก แกะเมล็ด ล้างทำความสะอาด อบแห้งและบดให้ละเอียด แล้วสกัดด้วย methanol กรองด้วยกระดาษกรองผ่านระบบปั๊มสุญญากาศ และระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator

3. นำสารสกัดหยาบ ไปทดสอบหนอนใยผัก และสกัดต่อจนได้เป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ เพื่อหาสารออกฤทธิ์

4. วิจัยสูตรผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่านำสารสกัดหยาบที่ได้มาศึกษาหาสูตรผสมของสารสกัดน้อยหน่า โดยทดลองผสมตัวทำละลาย (Solvent) สารอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) และสารลดแรงตึงผิว (surfactants) เมื่อได้สูตรผสมของสารสกัดน้อยหน่าแล้วนำมาตรวจวิเคราะห์หาสารสำคัญ และทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสูตรผสมต่อหนอนใยผัก หลังจากได้สูตรที่เหมาะสมทั้งลักษณะทางกายภาพและประสิทธิภาพแล้วนำสารดังกล่าวมาทดสอบความคงสภาพต่อไป

5. ศึกษาการคงสภาพของผลิตภัณฑ์น้อยหน่าเตรียมผลิตภัณฑ์สำหรับการทดสอบการคงสภาพวิเคราะห์หาปริมาณของกลุ่มสารสำคัญและคุณสมบัติทางกายภาพ ก่อนและหลังใช้ความร้อนเป็นตัวเร่ง

6. ทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์สารสกัดจากน้อยหน่าในหนอนใยผักที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 6 กรรมวิธีๆละ 4 ซ้ำ

7. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปและรายงานผล

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2560

สถานที่ทดลอง กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ
กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การเก็บตัวอย่างเมล็ดน้อยหน่า และเตรียมเป็นสารสกัดน้อยหน่า

เตรียมตัวอย่างเมล็ดน้อยหน่าบด (รูปที่ 1)

รูปที่ 1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเมล็ดน้อยหน่าบด

สกัดสารสกัดหยาบจากเมล็ดน้อยหน่าด้วยเมทานอล แล้วนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (รูปที่ 2) แล้วนำ crude ที่ได้ ไปแยกเป็น 4 ส่วนตามสภาพขั้วน้อยไปมาก (เฮกเซน เมทานอล ไดคลอโรมีเทน และน้ำ) ได้ crude1, crude2, crude3 และ crude4 นำไปทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก ได้เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ย 27.5, 90.0, 0.0, 0.0% ตามลำดับทำให้ทราบว่าสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักอยู่ใน crude2 จึงนำ crude2 ไปศึกษาสภาวะ (condition) ที่เหมาะสมสำหรับเครื่อง HPTLC ในการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ, สกัดต่อเป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ และเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์เข้มข้นสูตรต่างๆ

รูปที่ 2 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบจากเมล็ดน้อยหน่า

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในสารสกัดและสูตรผลิตภัณฑ์น้อยหน่า

การศึกษาสภาวะ (condition) ที่เหมาะสม (ทดสอบตัวอย่าง crude2) ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC) ด้วยแผ่น TLC aluminium sheets silica gel60 F_{254} ส่องภายใต้แสง UV366 nm และสเปรย์ด้วยน้ำยา dragendorff s spray reagent แล้วส่องภายใต้แสงธรรมชาติ เพื่อทดสอบการแยกของ alkaloids ชนิดต่างๆ

- การหาสภาวะสารตัวพา (mobile phase) ด้วยตัวทำละลาย 1 ชนิด 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 พบว่าไม่สามารถแยก alkaloids แต่ละตัวออกจากกันได้

- การหาสภาวะสารตัวพา(mobile phase) ด้วยตัวทำละลายผสม 2 ชนิด ได้แก่ (EtOAc/MeOH(9/1), (EtOAc/MeOH(8/2), (EtOAc/Hexane(1/1),(EtOAc/MeOH/AcOH(7/2/1), (EtOAc/AcOH(5/5), (EtOAc/MTBE(5/5), (EtOAc/propanol(8/2), (MeOH/$CHCl_3$(5/5), (MeOH/ACN(5/5) ตามลำดับ พบว่าไม่สามารถแยกได้ดีเท่าที่ควร

- การหาสภาวะสารตัวพา (mobile phase) ด้วย ตัวทำละลายผสม 3-4 ชนิด (ทดสอบตัวอย่าง crude1-4) ได้แก่

(1) toluene/ MeOH/EtOAc/AcOH(20/12/20/1)

(2) toluene/ MeOH/EtOAc/AcOH(20/12/20/1)

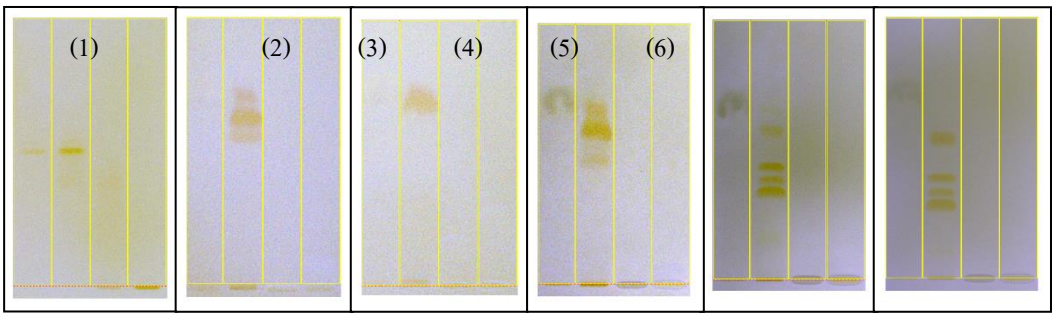
(3) EtOAc/MeOH/$CHCl_3$(5/4/1)

(4) EtOAc/MeOH/$CHCl_3$(7/1.5/1.5)

(5) EtOAc/MTBE/MeOH(93/5/2)

(6) EtOAc/MTBE/AcOH(95/4/1)

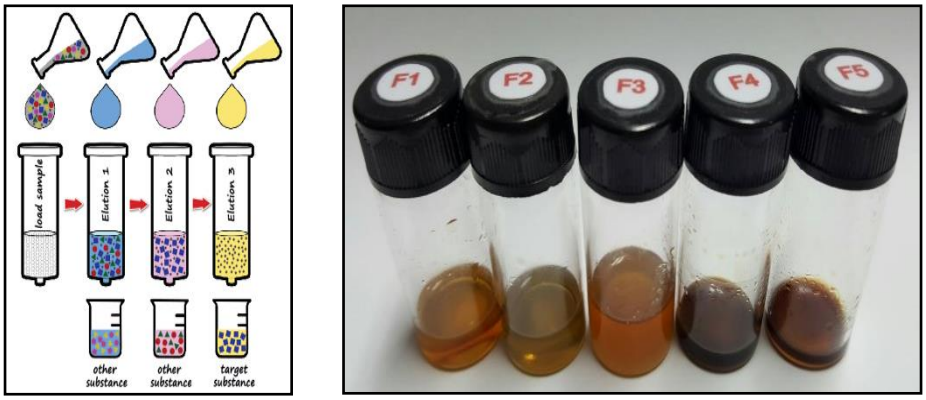
พบว่าการใช้ EtOAc/MTBE/MeOH (93/5/2) สามารถแยก alkaloids ต่างๆ ออกจากกันได้ดีกว่า จึงเลือกใช้เป็นสารตัวพาสำหรับทดสอบสารกึ่งบริสุทธิ์ที่สกัดได้ต่อไป (รูปที่ 3)



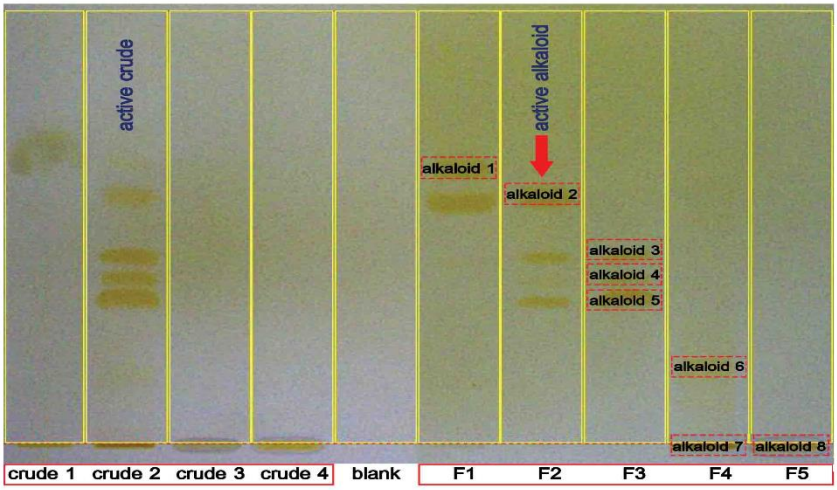
รูปที่ 3 การหาสภาวะสารตัวพา ด้วยตัวทำละลาย 3-4 ชนิด

การสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์เพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก

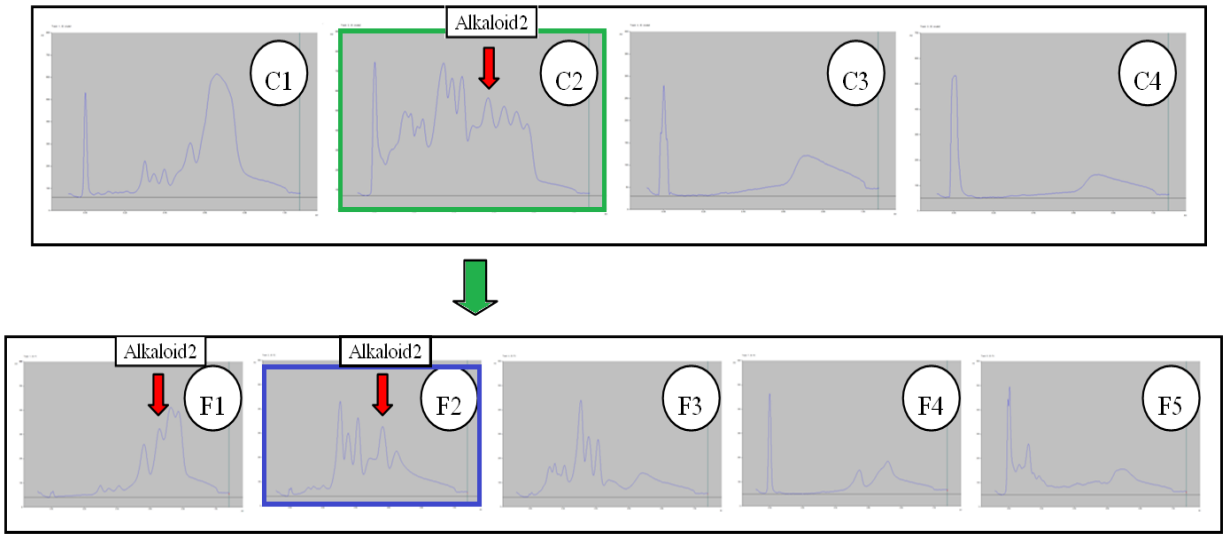
นำcrude2 ซึ่งมีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุด มาสกัดต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้สารกึ่งบริสุทธิ์F1, F2, F3, F4 และ F5(รูปที่ 4) แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก ได้%การตายเฉลี่ย67, 97, 30, 30 และ 13 %ตามลำดับ ทำให้ทราบว่า F2 มี alkaloid ชนิดที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักมากที่สุด คือ alkaloid2 (รูปที่ 5-6)และจาก spectrum ทำให้ทราบว่าความยาวคลื่นสูงสุด (λmax) ที่ใช้วัด alkaloid2 คือ 215nm(รูปที่ 7)



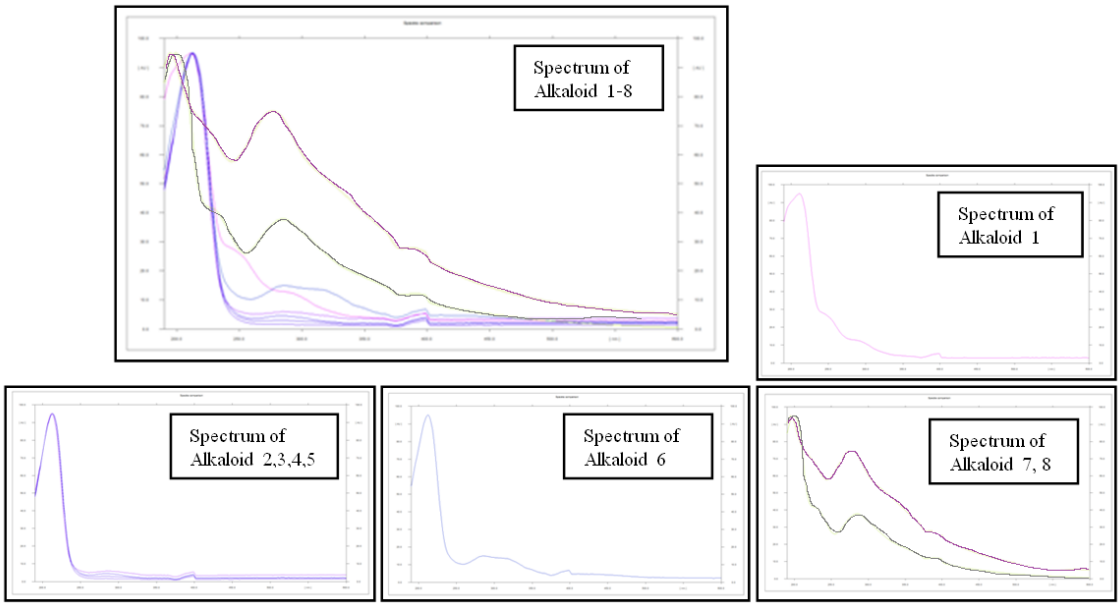
รูปที่ 4 การใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีเพื่อแยกสารกึ่งบริสุทธิ์



รูปที่ 5 Fingerprintของ crude 1-4 และ F1-5



รูปที่ 6 HPTLC chromatogram ของ crude 1-4 และ F1-5



รูปที่ 7 Spectrum ของสารalkaloids ต่างๆ ที่พบใน crude2

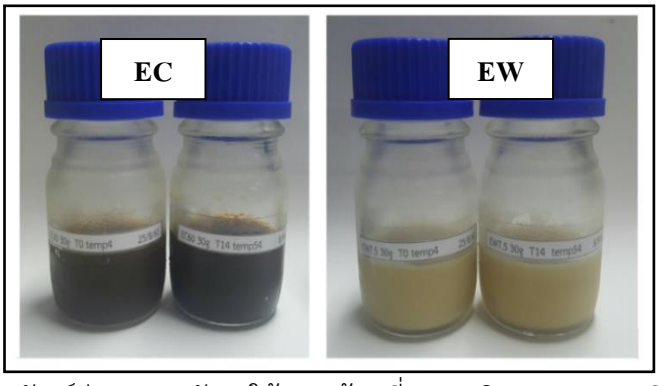
การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์จากสารสกัดน้อยหน่า

เตรียมเป็นผลิตภัณฑ์เข้มข้นสูตรต่างๆ โดยนำ crude2 มาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สูตร EC (emulsifiable concentrates) และ EW (emulsion in water) โดยผสมตัวทำละลาย สารอิมัลซิไฟเออร์ สารลดแรงตึงผิว และสารเติมแต่งในอัตราส่วนต่างๆ และทดสอบการคงสภาพเบื้องต้น จนได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมในสูตรEC และ EW อย่างละ 1สูตร (รูปที่ 8)เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผัก

รูปที่ 8 ผลิตภัณฑ์จากสารสกัดเมล็ดน้อยหน่าสูตร EWและ EC

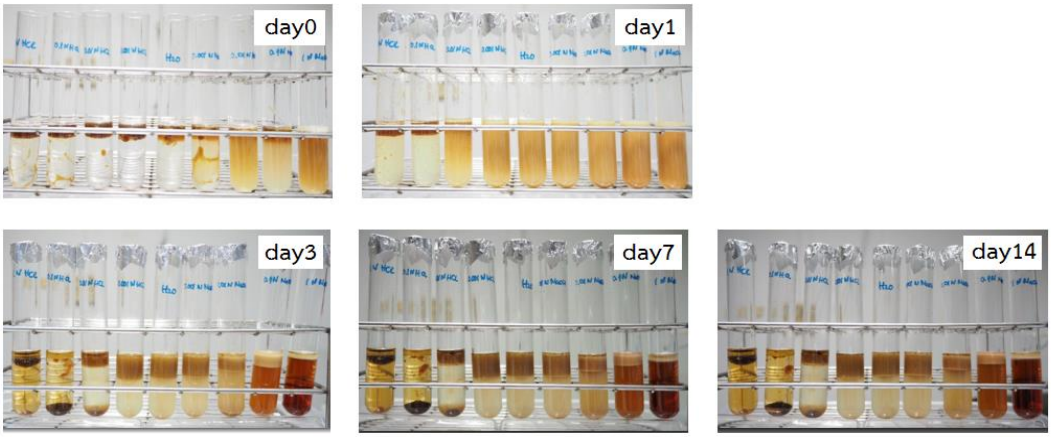
การทดสอบการคงสภาพ (stability) ของสูตรผลิตภัณฑ์สารสกัดเมล็ดน้อยหน่า

- การคงสภาพของผลิตภัณฑ์ก่อนและหลังใช้ความร้อนเป็นตัวเร่ง โดยอบที่อุณหภูมิ 54องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน พบว่าลักษณะทางกายภาพไม่เปลี่ยนแปลงทั้ง สูตร EW และสูตร EC(รูปที่ 9)



รูปที่ 9 ผลิตภัณฑ์ก่อนและหลังอบให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส 14 วัน

- การคงสภาพของสารสกัดน้อยหน่าcrude2 เมื่อละลายในตัวทำละลายที่มีสภาพกรด-ด่าง ได้แก่ 1 N HCl, 0.1N HCl, 0.01N HCl, 0.001N HCl, H2O, 0.001N NaOH, 0.01N NaOH, 0.1N NaOHและ 1N NaOHเรียงจากซ้ายไปขวาตามลำดับ(รูปที่ 10)สังเกตการเปลี่ยนแปลงในระยะเวลา0, 1, 3, 7 และ 14 วันโดยชั่งสารสกัดน้อยหน่า 1กรัม ละลายด้วยตัวสารละลายกรด-ด่าง 4 มิลลิลิตร พบว่า ในสภาวะด่าง crude2 ละลายในตัวทำละลายได้ดีและคงสภาพมากกว่าในสภาวะกรด

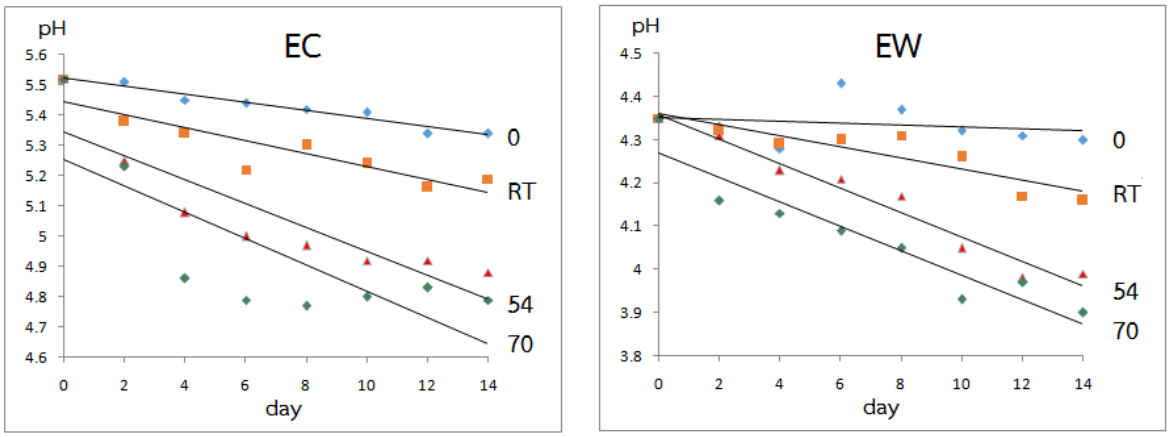


รูปที่ 10 สารสกัด Crude2 ในตัวทำละลายกรด-ด่างที่เวลาต่างๆ

- การคงสภาพของลักษณะทางกายภาพของใบคะน้า (phytotoxicity) หลังฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์สูตร EC และ สูตร EW หลังฉีดพ่น 3 วัน พบว่าใบคะน้ามีสภาพปกติ (รูปที่ 11)

รูปที่ 11 ใบคะน้า ก่อนและหลังฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์สูตร EC และ EW

- การคงตัวของpH ของสารสกัดน้อยหน่าสูตร EC และ EW โดยแบ่งใส่ภาชนะขนาดเล็กแล้วแยกเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 0องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง(RT), 45องศาเซลเซียสและ 70องศาเซลเซียส โดยวิเคราะห์ทุก 2 วัน จนครบ 14 วันจากการวัดค่า pH พบว่า ทั้งสูตร EC และ EW มีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น และมีอัตราการลดมากขึ้นเมื่อเก็บที่อุณหภูมิสูงขึ้น (รูปที่ 12)



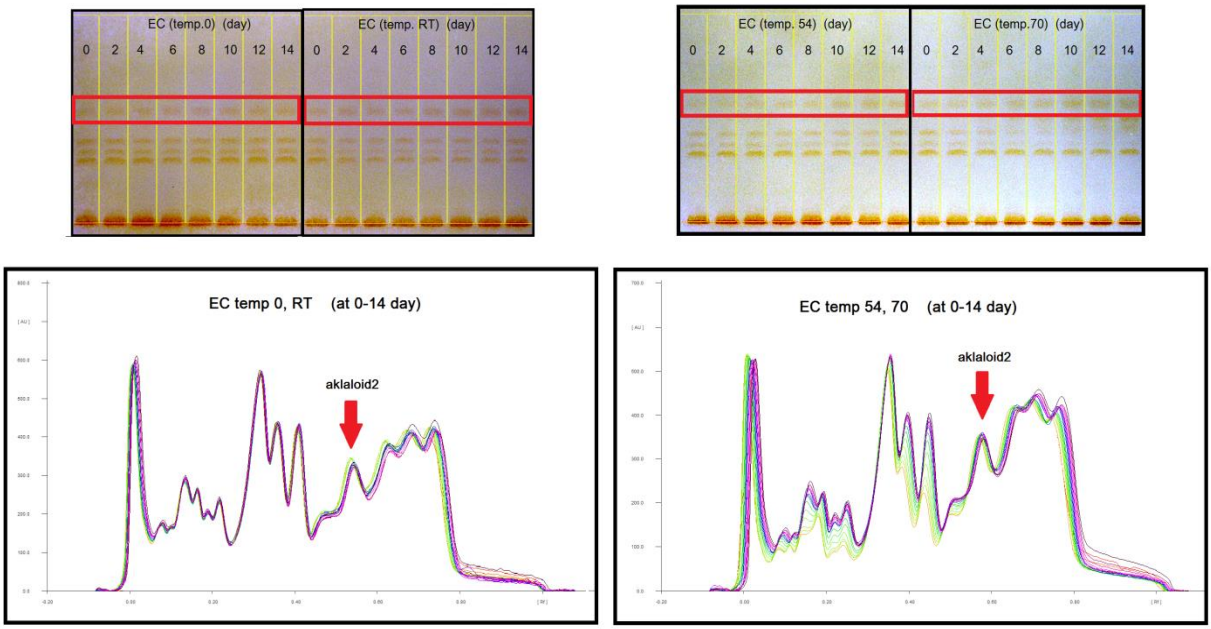
รูปที่ 12 แนวโน้มของค่า pH เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์สูตร EC และ EW ที่อุณหภูมิต่างๆ

EC				
day	0	RT	54	70
0	5.52	5.52	5.52	5.52
2	5.51	5.38	5.25	5.23
4	5.45	5.34	5.08	4.86
6	5.44	5.22	5.00	4.79
8	5.42	5.30	4.97	4.77
10	5.41	5.24	4.92	4.80
12	5.34	5.16	4.92	4.83
14	5.34	5.19	4.88	4.79

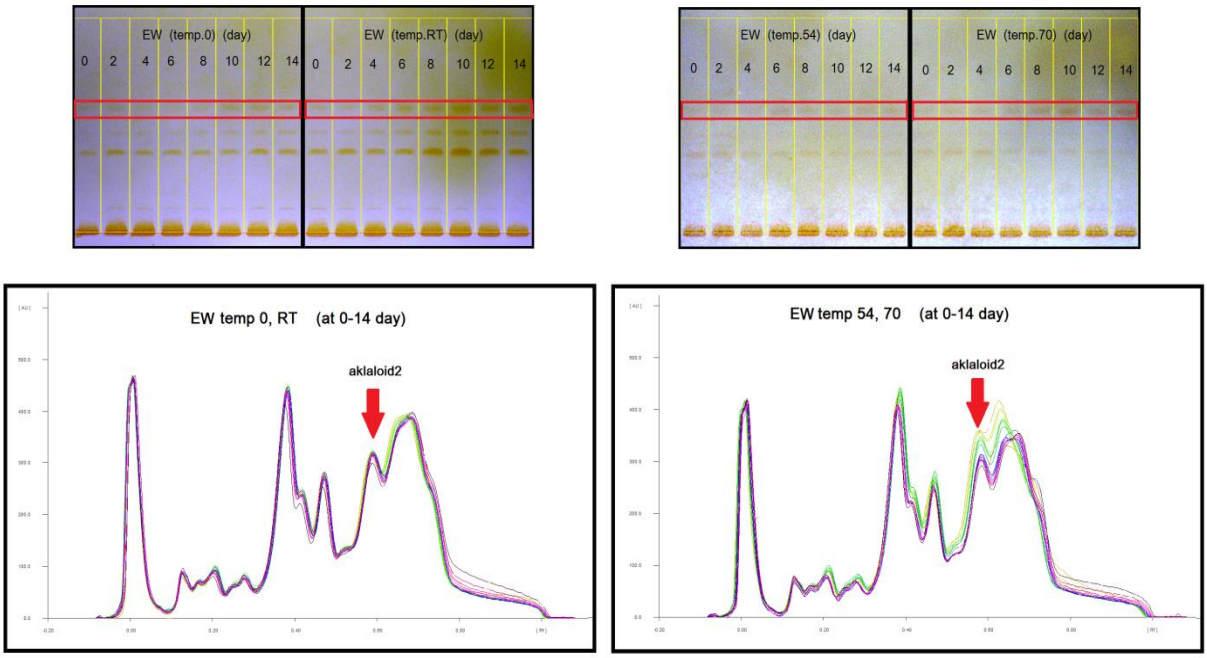
EW				
day	0	RT	54	70
0	4.35	4.35	4.35	4.35
2	4.33	4.32	4.31	4.16
4	4.28	4.29	4.23	4.13
6	4.43	4.30	4.21	4.09
8	4.37	4.31	4.17	4.05
10	4.32	4.26	4.05	3.93
12	4.31	4.17	3.98	3.97
14	4.30	4.16	3.99	3.90

ตารางที่ 1 ค่า pH จากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์สูตร EC และ EW ที่อุณหภูมิต่างๆ

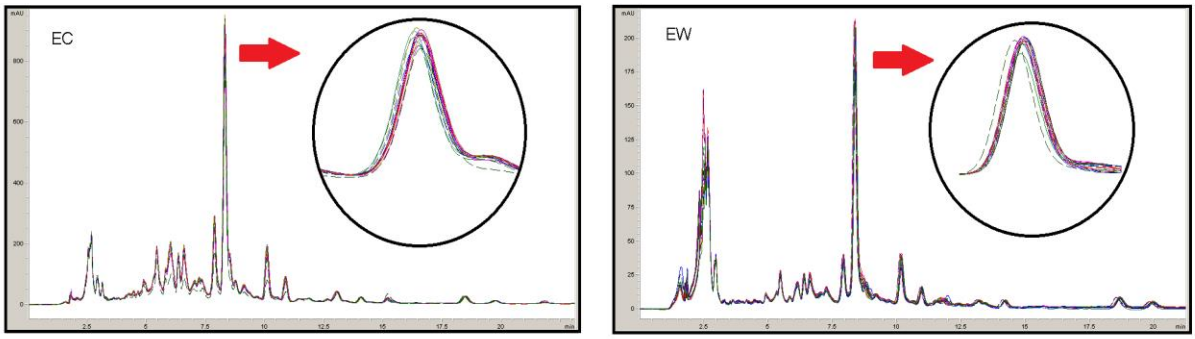
- การคงตัวของสารออกฤทธิ์ในสารสกัดน้อยหน่าสูตร EC และ EW โดยแบ่งใส่ภาชนะขนาดเล็กแล้วแยกเก็บ ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 0องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง(RT),45องศาเซลเซียส และ 70องศาเซลเซียส โดยวิเคราะห์ทุก 2 วัน จนครบ 14 วันจากการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์alkaloid2ในผลิตภัณฑ์น้อยหน่าสูตร EC และ EW ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0, RT, 54 และ 70 องศาเซลเซียสด้วยเครื่องHPTLC ในระยะเวลา 0, 2, 6, 8, 10, 12 และ 14 วัน ผลการเปรียบเทียบ HPTLC chromatogramและ HPTLC fingerprint ไม่พบความแตกต่างหรือลดลงของ alkaloid2 ในทั้ง 2สูตรผลิตภัณฑ์ (รูปที่ 13-14) จึงนำตัวอย่างดังกล่าว ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องHPLC ซึ่งมีความละเอียดในการแยกที่ดีกว่า โดยใช้ column ODS3, สารตัวพา water/methanol/acetonitrile(15/50/35)ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 215nm ผลการเปรียบเทียบ HPLC chromatogram (รูปที่ 15) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสารสำคัญเพียงเล็กน้อยเท่านั้น



รูปที่ 13 HPTLC fingerprintและ HPTLC chromatogramของผลิตภัณฑ์สูตร EC
เก็บที่อุณหภูมิ 0, RT, 54 และ 70 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 0, 2, 6, 8, 10, 12 และ 14 วัน



รูปที่ 14 HPTLC fingerprintและ HPTLC chromatogram ของผลิตภัณฑ์สูตร EW
เก็บที่อุณหภูมิ 0, RT, 54 และ 70 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 0, 2, 6, 8, 10, 12 และ 14 วัน



รูปที่ 15 HPLC chromatogram ของผลิตภัณฑ์สูตร EC และ EW
เก็บที่อุณหภูมิ 0, RT, 54 และ 70 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 0, 2, 6, 8, 10, 12 และ 14 วัน

- การคงตัวของคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ก่อนอบและหลังอบอุณหภูมิ 54องศาเซลเซียส 14 วัน ผลการสดสอบความเป็นกรด-ด่าง พบว่าก่อนและหลังอบมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย และ ผลิตภัณฑ์หลังอบทั้ง 2 สูตร มีค่า pH ลดลง ค่าต่างๆ แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ EC, EW ก่อนและหลังอบ

สูตร EW	ก่อนอบ	หลังอบ	วิธีทดสอบ
กรด-ด่าง	as H_2SO_4 0.008%	as H_2SO_4 0.010%	MT191 CIPAC L

การไหลเท	3.44%	-	MT148.1 CIPAC J
pH	4.38	3.91	MT75.3 CIPAC J
ฟอง	1min=4ml, 12min=0ml	-	MT47.1 CIPAC O

สูตร EC	ก่อนอบ	หลังอบ	วิธีทดสอบ
กรด-ด่าง	as H_2SO_4 0.008%	as H_2SO_4 0.009%	MT191 CIPAC L
ปริมาณน้ำ	2.356	2.156	MT30.5 CIPAC J
pH	5.10	4.88	MT75.3 CIPAC J
ฟอง	1min=4ml, 12min=4ml	-	MT47.1 CIPAC O

การทดสอบประสิทธิภาพ (efficacy) เบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สารสกัดเมล็ดน้อยหน่าสูตร EC และ EW

ผลการทดสอบผลิตภัณฑ์สูตร EC ต่อหนอนใยผักวัย2-3 โดยวิธี Leaf dipping method วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ โดยมี 6 ระดับความเข้มข้นเป็นกรรมวิธีที่อัตรา 0.00, 0.33, 0.50, 0.67, 0.83 และ 1.00%w/v พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผัก 17, 93, 100, 93, 100 และ 97% ตามลำดับ จากผลที่ไม่แตกต่างกันทุกความเข้มข้น จึงลดความเข้มข้นลง ที่อัตรา 0.00, 0.02, 0.08, 0.17, 0.25 และ 0.33%w/v พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผัก 12.5, 40.0, 50.0, 60.0, 62.5 และ 85.0% ตามลำดับจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า การใช้อัตรา 0.17, 0.25 และ 0.33% ให้ผลการตายของหนอนใยผักไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตาราง 3, รูปที่ 16)

ผลการทดสอบผลิตภัณฑ์สูตร EW ต่อหนอนใยผักวัย2-3 โดยวิธี Leaf dipping method วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ โดยมี 6 ระดับความเข้มข้นเป็นกรรมวิธีที่อัตรา 0.00, 2.67, 4.00, 5.33, 6.67และ 8.00%w/vให้ %การตายของหนอนใยผัก 33, 90, 70, 100, 97 และ 93% ตามลำดับ จากผลที่ไม่แตกต่างกันทุกความเข้มข้น จึงลดความเข้มข้นลง ที่อัตรา 0.00, 0.13, 0.67, 1.33, 2.00 และ 2.67%w/vพบว่าให้%การตายของหนอนใยผัก 12.5, 22.5, 32.5, 55.0, 72.5 และ77.5% ตามลำดับจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า การใช้อัตรา 2.00 และ 2.67 % ให้ผลการตายของหนอนใยผักไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%(ตาราง 3, รูปที่ 16)

รูปที่ 16 หนอนใยผักที่ตายหลังได้รับผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่า

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักวัย2 ในการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์น้อยหน่า สูตร EC และ สูตร EW

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักวัย2 (%corrected mortality)
1. EC formulation 0.00%w/v (additive)	12.5 f
2. EC formulation 0.02%w/v	40.0 c-f
3. EC formulation 0.08%w/v	50.0 b-e
4. EC formulation 0.17%w/v	60.0 a-d
5. EC formulation 0.25%w/v	62.5 abc
6. EC formulation 0.33%w/v	85.0 a
7. EW formulation 0.00%w/v (additive)	12.5 f
8. EW formulation 0.13%w/v	22.5 ef
9. EW formulation 0.67%w/v	32.5 def
10. EW formulation 1.33%w/v	55.0 bcd
11. EW formulation 2.00%w/v	72.5 ab
12. EW formulation 2.67%w/v	77.5ab
13. น้ำ (กรรมวิธีควบคุม)	-
CV(%)	**37.80**

หมายเหตุ ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การทดสอบประสิทธิภาพ (efficacy) ของผลิตภัณฑ์สารสกัดเมล็ดน้อยหน่าสูตร EC และ EW ก่อน-หลังให้ความร้อนเป็นตัวเร่งที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

ผลการทดสอบผลิตภัณฑ์สูตร EC ต่อหนอนใยผักวัย2-3 โดยวิธี Leaf dipping method วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ โดยมี 6 ระดับความเข้มข้นเป็นกรรมวิธีที่อัตรา 0.00, 0.02, 0.08, 0.17, 0.25 และ 0.33%w/v ผลิตภัณฑ์ก่อนอบให้%การตายของหนอนใยผัก 3, 8, 40, 53, 65และ88% ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์หลังอบให้%การตายของหนอนใยผัก 3, 13, 30, 70, 60และ85% ตามลำดับจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าที่อัตราเดียวกัน ทั้งก่อนและหลังอบให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4)

ผลการทดสอบผลิตภัณฑ์สูตร EW ต่อหนอนใยผักวัย2-3 โดยวิธี Leaf dipping method วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ โดยมี 6 ระดับความเข้มข้นเป็นกรรมวิธีที่อัตรา 0.00, 0.13, 0.67, 1.33, 2.00 และ 2.67%w/vผลิตภัณฑ์ก่อนอบให้ %การตายของหนอนใยผัก 5, 18, 38, 68, 70 และ 88% ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์หลังอบให้%การตายของหนอนใยผัก 3, 13, 48, 70, 80และ83% ตามลำดับจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าที่อัตราเดียวกัน ทั้งก่อนและหลังอบให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักวัย2 ในการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์น้อยหน่า สูตร EC ก่อนและหลังอบที่ อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส 14 วัน

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักวัย2 (%corrected mortality)
1. EC formulation 0.00%w/v (additive) ก่อนอบ	2.5 f
2. EC formulation 0.02%w/v ก่อนอบ	7.5 f
3. EC formulation 0.08%w/v ก่อนอบ	40.0 cd
4. EC formulation 0.17%w/v ก่อนอบ	52.5 bc
5. EC formulation 0.25%w/v ก่อนอบ	65.0 ab
6. EC formulation 0.33%w/v ก่อนอบ	87.5 a
7. EC formulation 0.00%w/v (additive) หลังอบ	2.5 f
8. EC formulation 0.02%w/vหลังอบ	12.5 ef
9. EC formulation 0.0.08%w/vหลังอบ	30.0 de
10. EC formulation 0.17%w/vหลังอบ	70.0 ab
11. EC formulation 0.25%w/vหลังอบ	60.0 bc
12. EC formulation 0.33%w/vหลังอบ	85.0 a
13. น้ำ (กรรมวิธีควบคุม)	-
CV(%)	**34.0**

หมายเหตุ ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมัน 95%

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักวัย2 ในการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์น้อยหน่า สูตร EW ก่อนและหลังอบที่ อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส 14 วัน

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผักวัย2 (%corrected mortality)
7. EW formulation 0.00%w/v (additive) ก่อนอบ	5.0 e
8. EW formulation 0.13%w/vก่อนอบ	17.5 de
9. EW formulation 0.67%w/vก่อนอบ	37.5 cd
10. EW formulation 1.33%w/vก่อนอบ	67.5 ab
11. EW formulation 2.00%w/vก่อนอบ	70.0 ab
12. EW formulation 2.67%w/vก่อนอบ	87.5 a
7. EW formulation 0.00%w/v (additive) หลังอบ	5.0 e
8. EW formulation 0.13%w/vหลังอบ	5.0 e
9. EW formulation 0.67%w/vหลังอบ	47.5 bc
10. EW formulation 1.33%w/vหลังอบ	70.0 ab

11. EW formulation 2.00%w/vหลังอบ		80.0 a
12. EW formulation 2.67%w/vหลังอบ		82.5 a
13. น้ำ (กรรมวิธีควบคุม)		-
	CV(%)	**38.7**

หมายเหตุ ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมัน 95%

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การวิจัยสูตรและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าเพื่อการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เนื่องจากน้อยหน่าจัดเป็นพืชที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยแต่ละส่วนได้แก่ ใบ เปลือกผล เมล็ด เปลือกต้นและราก ให้สารที่มีฤทธิ์แตกต่างกัน ในที่นี้เป็นการทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผัก *Plutella xylostella* L. โดยการสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วย methanol ได้สารสกัดหยาบ แล้วนำไปแยกเป็น 4 ส่วน ได้ crude1, crude2, crude3 และ crude4 เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนใยผักพบว่า crude 2 มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก จึงได้นำ crude2 ไปศึกษาสภาวะ (condition) ที่เหมาะสมสำหรับเครื่อง HPTLC ในการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ, สกัดต่อเป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ และเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์เข้มข้นสูตรต่างๆ จากการศึกษาสภาวะ โดยใช้ HPTLC glass plate silica gel60 F254 ได้สารตัวพา EtOAc/MTBE/MeOH (93/5/2) ส่องภายใต้แสง uv254, 366nm และแสงธรรมชาติ แล้วสเปรย์ด้วยน้ำยา dragendorff s spray reagent พบว่าสามารถแยก alkaloid ต่างๆ ออกจากกันได้ จึงใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่สกัดได้จาก crude 2 โดยแยกได้เป็น 5 ส่วน คือ F1, F2, F3, F4 และ F5 พบ alkaloids 8 ชนิด จากการทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก พบว่า F1และ F2 ให้%การตายของหนอนสูง ทำให้ทราบว่า alkaloid2 (Rf 0.57) คือสารที่ออกฤทธิ์สูงสุด จึงใช้เป็นสารอ้างอิง ในการวัดปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ ซึ่งจากการวิจัยสูตรผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ พบว่า สูตรที่เหมาะสมในการทำผลิตภัณฑ์มี 2 สูตรคือ EC (emulsifiable concentrates) และ EW (emulsion in water) เมื่อทดสอบความคงตัวหลังให้ความร้อนเป็นตัวเร่งที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส 14 วัน พบว่าผลิตภัณฑ์ยังคงลักษณะทางกายภาพไม่เปลี่ยนแปลงทั้ง 2 สูตร เมื่อทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผัก ของผลิตภัณฑ์สูตร EC ที่อัตรา 0.33%w/v และสูตร EW ที่อัตรา 2.67%w/v พบว่าให้%การตายหนอนหนอนใยผักเกิน 80% ไม่แตกต่างทางสถิติทั้งก่อนและหลังอบที่อัตราเดียวกันสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย HPTLC และ HPLC ซึ่งให้ chromatogram ของ alkaloid2 คงที่เมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ ในช่วงเวลา 0-14วันแต่ค่า pH มีแนวโน้มลดลง และมีอัตราการลดมากขึ้นเมื่อเก็บที่อุณหภูมิสูงขึ้นการทดลองนี้ควรต่อยอดเพื่อหาสูตรโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ alkaloid2 ด้วยเครื่องมือแมสสเปกโตรมิเตอร์ จะทำให้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ที่แน่นอนได้ สำหรับผลิตภัณฑ์สูตร EC และ EW ที่พัฒนาขึ้น สามารถนำไปต่อยอดศึกษาประสิทธิภาพต่อแมลงศัตรูพืชชนิดอื่นๆได้ในอนาคต เพื่อเพิ่มมูลค่าและสนองนโยบายการลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลการวิจัยนี้ ทำให้ทราบวิธีสกัดและตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ต่อหนอนใยผักจากเมล็ดน้อยหน่า สามารถพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืชจากน้อยหน่า โดยใช้ข้อมูลเอกลักษณ์ทางโครมาโทกราฟี (HPTLC

fingerprint) ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สารสกัดน้อยหน่าซึ่งสามารถใช้เป็นปัจจัยการผลิตที่ช่วยลดการใช้วัตถุมีพิษการเกษตรจากสารเคมี เพิ่มคุณภาพชีวิต ประหยัดค่าใช้จ่าย และเพิ่มมูลค่าให้เกิดประโยชน์สูงสุดจากเมล็ดที่เหลือจากการบริโภค โดยสามารถถ่ายทอดความรู้ไปยังนักวิจัย ภาครัฐ ภาคเอกชน เกษตรกรและผู้ที่สนใจต่อไป

11. คำขอบคุณ -

12. เอกสารอ้างอิง

กรกชอินทราพิเชฐ. 2554. **รายงานการวิจัยการควบคุมโดยชีววิธีแมลงวันผลไม้ด้วยพืช**. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุนารี.

สุดารัตน์ หอมหวล, ยุวดี ชูประภาวรรณ และวิรัตน์ จันทร์ตรี. 2554. ฤทธิ์ฆ่าแมลงของพืชต่อเพลี้ยอ่อนถั่ว. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*ปี 22 ที่ 13 ฉบับที่ 4 ตุลาคม-ธันวาคม.

สมสุขศรีจักรวาฬ. 2546. พืชฆ่าแมลง. *ใน*: พืชฆ่าแมลงและพืชมีพิษบางชนิดในประเทศไทย. (ไม่ระบุบรรณาธิการ). สำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดอุบลราชธานี: อุบลราชธานี.

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

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

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

Khalequzzaman, M. and S. Sultana. 2006. Insecticidal activity of *Annona squamosa* L. seed extracts against the red flour beetle, *Tribolium castsnrum* (Herbst). ***Journal of Biological-Sciences***14: 107-112.

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

Manikandan, A. and 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.). ***Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*** 2(3): 295-303.

Nazneen, B., E.G. Wesely and 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 byHPTLCtechniques. ***Journal of Acute Disease***: 47-50.

Sachin, U.R., P.R. Patil, V.R. Salunkhe, P.N. Dhabale and K.B.,Burade. 2009. HPTLC method for quantitative determination of Quercetin in Hydroalcoholic extract of dried flower of *Nymphaea stellata* wild. Sachin U. Rakesh et al. ***International Journalof ChemTech Research*** 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), ***Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*** 6(1): 674-677.

13. ภาคผนวก

-