การพัฒนาวิธีการสกัดและทดสอบประสิทธิภาพสารซาโปนินจากเปลือกเงาะ

Development on Saponin Extraction from Rambutan Peel and Its Efficacy Test

อภิรดี กอร์ปไพบูลย์ [1/] อรวินทินี ชูศรี [1/] ศิริพร เต็งรัง [2/]

Apiradee Korpphaiboon [1/] Orwintinee Chusri [1/] Siriporn Tengrang [2/]

ABSTRACT

Development on saponin extraction from rambutan peel and its efficacy test was carried out aiming to gain the most effective technique for this. Hence, agricultural waste as such rambutan peel can be utilized. The research was conducted at Chanthaburi Horticultural Research Center during September 2011 to October 2014. It was included testing and verifying of extraction techniques, identification and quantification of saponin, and efficacy test of saponin. Two extraction techniques, soaked and reflux extraction, using 3 solvents, 70% ethanol, 70% methanol and distilled water, were compared. The crude extract of which rambutan peel obtained from reflux technique compared with soaked extraction technique for nine days showed that higher the extract dry weight 44% and 33% for only nine hours.The extracts were identified as triterpene and steroid saponin by FTIR. Spectrophotometer was used to quantify the amount of saponin which the reflux extraction using 70% methanol yielded the highest saponin (422.05 mg/g). Therefore, it is the most effective extraction technique as it yielded more amount of saponin than distilled water and 70% ethanol reflux methods, 23% and 14% respectively. Efficacy test indicated that applied saponin solution at 2,000 and 4,000 mg/L to channeled apple snail (*Pomacea canaliculata*) could effectively kill the snail within 12 hours. Moreover, when mixed saponin with PDA at 2,000 mg/L, it could effectively inhibited growth of the 3 fungal pathogen, *Phytophthora palmivora*, *Colletotrichum* spp. and *Marasmius palmivorus* Sharples compared to control.

Key words : crude extraction, reflux extraction, ethanol, methanol, distilled water, crude saponin, spectrophotometer, efficacy test*, Pomacea canaliculata, Phytophthora palmivora*, *Colletotrichum* spp. and *Marasmius palmivorus* Sharples

[1] ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี กรมวิชาการเกษตร
Chanthaburi Horticultural Research Center, Department of Agriculture

[2/] กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร
Postharvest and Processing Research and Development Division, Department of Agriculture

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีการสกัดและทดสอบประสิทธิภาพสารซาโปนินจากเปลือกเงาะ มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการสกัดซาโปนินที่มีอยู่ในเปลือกเงาะ ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร และทดสอบประสิทธิภาพของสารที่สกัดได้เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ การวิจัยประกอบด้วยการศึกษาวิธีการสกัดสารซาโปนิน วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของซาโปนินที่สกัดได้ และการทดสอบประสิทธิภาพของสารซาโปนินต่อการควบคุมศัตรูพืช ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรีระหว่างเดือนกันยายน 2554 – ตุลาคม 2557 โดยทดลองวิธีการสกัดแบบแช่และแบบกลั่น reflux ใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอธานอล 70% เมทานอล 70% และน้ำกลั่น พบว่าการสกัดแบบกลั่น reflux โดยใช้ เอธานอล 70% และเมทานอล 70% เปรียบเทียบกับการสกัดแบบแช่ด้วยน้ำกลั่นที่ใช้เวลา 9 วัน พบว่ามีน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบสูงกว่า 44 % และ 33 % โดยใช้ระยะเวลาเพียง 9 ชั่วโมง การวิเคราะห์สารสกัดด้วย FTIR พบว่าสารที่ได้มีสมบัติเป็นไตรเทอร์พีนและสเตียรอยด์ซาโปนิน และเมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณซาโปนินโดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์พบว่าสารซาโปนินที่ได้จากการสกัดแบบกลั่น reflux ด้วยเมทานอล 70% มีปริมาณสูงที่สุด (422.05 มิลลิกรัม/กรัม) สูงกว่าวิธีการสกัดแบบกลั่น reflux ด้วยน้ำกลั่น และเอธานอล 70% ถึง 23 % และ 14% ตามลำดับ เมื่อทดสอบประสิทธิภาพต่อการควบคุมศัตรูพืช พบว่าการใช้สารสกัดหยาบซาโปนินที่ระเหยตัวทำละลายออกหมดแล้ว ผสมกับน้ำกลั่น ที่ความเข้มข้น 2,000 และ 4,000 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้หอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata*) ตายภายใน 12 ชั่วโมง และที่ระดับความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* *Colletotrichum* spp. และ *Marasmius palmivorus* Sharples บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารสกัดหยาบซาโปนินได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

คำหลัก : การสกัดหยาบ การสกัดแบบกลั่น reflux เอทธานอล เมทธานอล น้ำกลั่น สารสกัดหยาบซาโปนิน สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ การทดสอบประสิทธิภาพ หอยเชอรี่ *Phytophthora palmivora* *Colletotrichum* spp. และ *Marasmius palmivorus* Sharples

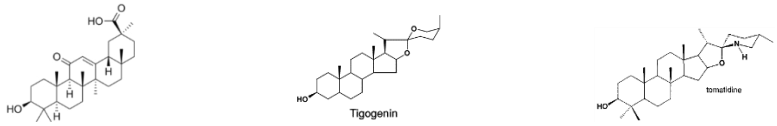
คำนำ

ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกเงาะที่ให้ผลผลิตแล้ว ในปี 2555 เป็นพื้นที่ 314,698 ไร่ ได้ผลผลิตรวม 335,745 ตัน จำหน่ายเป็นเงาะผลสด 11,241,822 กิโลกรัม เงาะในน้ำเชื่อม 5,986,429 กิโลกรัม (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556) พื้นที่ปลูกส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออกและภาคใต้ พันธุ์ที่นิยมปลูก ได้แก่ พันธุ์โรงเรียน พันธุ์สีทอง และ พันธุ์สีชมพู เป็นต้น นอกจากบริโภคสดแล้ว เงาะส่วนใหญ่ถูกนำมาแปรรูปในระดับอุตสาหกรรมเป็นเงาะบรรจุกระป๋อง การแปรรูปดังกล่าวทำให้มีเปลือกเงาะเป็นวัสดุเหลือใช้จากที่ต้องกำจัดทิ้งเป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงควรนำมาใช้ประโยชน์และสร้างมูลค่าเพิ่ม โดยการสกัดสารซาโปนิน (saponin) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่มีอยู่ในเปลือกเงาะ ดังรายงานไว้โดย เชิดศักดิ์และธนพัฒน์ (2544) ซึ่งได้ทดสอบเบื้องต้นโดยนำเปลือกเงาะขยี้ในน้ำและเขย่าจะเกิดฟอง และเมื่อเติมกรดฟองยังคงอยู่ จึงเป็นการบ่งชี้ว่าควรมีการศึกษาสารสำคัญในเปลือกเงาะเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ และเพิ่มมูลค่าให้กับเปลือกเงาะ มีการตรวจพบซาโปนินในสมุนไพรหลายชนิด เช่น โสม แปะก๊วย เจียวกู้หลาน พรมมิ และพริก เป็นต้น ซาโปนิน

เป็นสารสกัดที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ (Visetson *et al*., 2006) ณัฏฐวีและคณะ (2550) กล่าวว่า ในทางการเกษตรใช้ซาโปนินกำจัดหอยเชอรี่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยับยั้งเชื้อราสาเหตุของโรคผลเน่าและใบจุดที่สำคัญในผลไม้หลายชนิด เมื่อมีข้อบ่งชี้ว่ามีสารซาโปนินอยู่ในเปลือกเงาะ ซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีอยู่มากมายในประเทศ จึงควรนำกลับมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

การสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) ตัวทำละลายต้องแยกออกจากสารที่ต้องการสกัดได้ง่าย มีจุดเดือดต่ำ ระเหยง่าย ไม่เป็นพิษ และราคาถูก เป็นเทคนิคที่ใช้กันมากในเคมีอินทรีย์ เป็นการแยกสารบางชนิดจากสารผสมโดยใช้ตัวทำละลายสกัดออกมา ใช้สมบัติการทำละลายของสารต่างกันในตัวทำละลายชนิดต่างๆ สัมพันธ์ (2557) สกัดสารโพลีฟีนอลจากใบผักโขมโดยวิธีการสกัดแบบกลั่น reflux (reflux extraction) ด้วยเอทานอล 70% โดยให้ความร้อนแก่ตัวอย่างเพื่อให้ไอสารละลายควบแน่นแล้วย้อนกลับลงมาใหม่ สารผสมที่นำมาสกัดเป็นสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ การสกัดสารจากของแข็งสกัดโดยทำให้ของแข็งแห้ง บดละเอียด แช่ในตัวทำละลาย เช่น เฮกเซน อีเธอร์ แอลกอฮอล์ น้ำ เป็นต้น ได้สารสกัดขั้นต้น (crude extract) นำมาแยกต่อให้ได้สารบริสุทธิ์เพื่อหาโครงสร้างต่อไป

ซาโปนินมีมวลโมเลกุลสูง เป็นสารกลุ่มไกลโคไซด์ (glycoside) คือกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ที่เกิดจาก อะไกลโคน (aglycone) จับกับน้ำตาลหรืออนุพันธ์ของน้ำตาลซึ่งเรียกว่า ไกลโคพาท (glycopath) ผ่านไกลโคไซด์ดิกบอนด์ (glycosidic bond) ส่วนอะไกลโคนเป็นส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาลเป็นกลุ่มสารที่มีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน ดังนั้นฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจึงหลากหลาย ส่วนที่เป็นน้ำตาลช่วยให้การละลายและการดูดซึมเข้าสู่ร่างกายดีขึ้น คุณสมบัติของซาโปนินแตกต่างกันตามกลุ่มของพืช เรียกตามโครงสร้างโมเลกุลที่ไม่มีส่วนประกอบของน้ำตาล หรือเรียก จีนิน (genin) หรือสโปจีนิน (sapogenin) แบ่งตามกลุ่มของจีนิน ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ ไตรเทอร์ปีน (triterpene) สเตียรอยด์ (steroid) และสเตียรอยด์ อัลคาลอยด์ (steroid alkaloid) (Hostettmann and Marston, 1995)



Triterpene class Steroid class Steroid alkaloid class

Figure 1 Chemical structures of 3 groups of saponin

ซาโปนินเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญของรากโสมเรียกว่าจิงเซนโนไซด์ (ginsenosides) ซึ่งสูตรโครงสร้างหลักเป็นซาโปนินในกลุ่มสเตียรอยด์ (steroid) สามารถแยกออกเป็น ginsenosides Rb1, ginsenosides Rb2, ginsenosides Rc และginsenosides Rd (Gyeong *et al*., 2010) ทำให้โสมเป็นสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดรักษาโรค โดยไม่มีฤทธิ์ข้างเคียงที่เป็นอันตราย

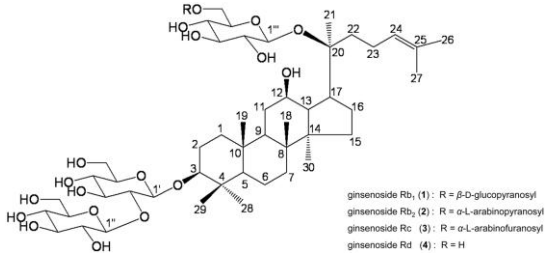


Figure 2 Chemical structure of ginsenosides from ginseng roots

ซาโปนินเป็นพิษรุนแรงในสัตว์เลือดเย็น เช่น ปลา กุ้ง และหอย มีผลต่อศูนย์ประสาทควบคุมการหายใจ ทำให้ขาดออกซิเจนและเม็ดเลือดแดงสลายตัว ทางการเกษตรใช้กำจัดหอยเชอรี่ ส่วนใหญ่นำเข้าจากประเทศจีน เป็นซาโปนินที่ได้จากการหีบน้ำมันออกจากเมล็ดของชาชื่อว่า *Camellia oleifera* abel มีสารซาโปนิน (tea saponin) 11-18 % ประกอบด้วยสารประกอบไกลโคไซด์ (Glycoside compound) จับกับไกลคูโรนิก เอซิด (glucuronic acid) อะราบิโนส (arabinose) ไซโรส (xylose) และกาแลคโตส (galactose) เป็นซาโปนินในกลุ่มไตรเทอร์ปีน (He *et al*., 2010).

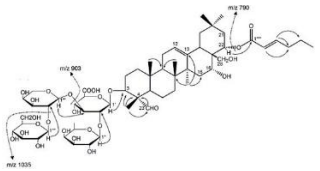


Figure 3 Molecular structure of Camellia oleifera abel saponin

ซาโปนินมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา สัมฤทธิ์ (2547) รายงานว่าซาโปนินจากพริกควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคในสตรอเบอรี่ เช่น *Collectotrichum* และ *Phomopsis* สาเหตุโรคผลเน่าและโรคใบจุด โดยแทรกไปตามรูเล็กๆ บนเซลล์เมมเบรนของเชื้อราทำให้เซลล์แตก และกำจัดเชื้อรา *Aspergillus flavus* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคพืชและโรคหลังการเก็บเกี่ยวได้ร้อยละ 95 ด้านเวชสำอางค์เป็นสารทำให้เกิดฟองเพราะมีคุณสมบัติเป็นสารดีเทอเจนท์ (detergent) เกิดโฟมที่เสถียรในน้ำ เป็นสารลดแรงตึงผิวธรรมชาติ (natural surfactant) การใช้สารซาโปนินสกัดจากสมุนไพร เช่น ซาโปนินจากพรมมิ (*Bacopa Monnieri*) เป็นชนิดเดียวกับจากโสมหรือแปะก๊วย (ginkgo) ช่วยชะลอการเสื่อมของเซลล์สมอง กระตุ้นความจำ ป้องกันเซลล์ประสาทถูกทำลายและโรคอัลไซเมอร์ในผู้สูงอายุได้

จากการศึกษาของเชิดศักดิ์ และธนพัฒน์ (2544) พบว่าเมื่อนำเปลือกเงาะมาสกัดสารซาโปนินและทดสอบโดยทำโครมาโทกราฟีผิวบางเปรียบเทียบกับสารซาโปนิน พบว่าเป็นสารซาโปนินกลุ่ม ไตรเทอร์พีนนอยด์ ซาโปนิน (triterpenoid saponin) และ สเตียรอยด์ ซาโปนิน (steroid saponin) แต่ยังไม่ทราบสูตรโครงสร้างและปริมาณของซาโปนินที่สกัดได้ จึงน่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติม การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการสกัดสารซาโปนินให้ได้วิธีการที่มีประสิทธิภาพ วิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารซาโปนินจากเปลือกเงาะ และทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมศัตรูพืช เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในทางการเกษตรและเป็นการนำวัสดุเหลือใช้ มาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดอีกทางหนึ่ง

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาวิธีการสกัดแยกสารซาโปนินจากเปลือกเงาะ ประกอบด้วย 2 การทดลอง คือ การทดสอบเบื้องต้นเพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมและได้สารสกัดหยาบปริมาณมาก และการศึกษาวิธีการสกัดแยกสารซาโปนิน

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดและทดสอบชนิดของสารซาโปนินได้แก่ ethanol methanol diethyl ether n-butanol chloroform anhydrous sodium sulfate acetic anhydride และ sulfuric acid

2. สารซาโปนิน : saponin (composition 8-25%) และ digitonin (50% TLC)

3. อุปกรณ์ ได้แก่ ตู้อบลมร้อน เครื่องชั่ง เครื่องบด ชุดกลั่น reflux เตาหลุม (heating mantle) เตาให้ความร้อน (hotplate) เครื่องกลั่นระเหยสูญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) กรวยแยก (separator funnel) กรวยบุชเนอร์ กระดาษกรอง

การทดสอบเบื้องต้นเพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมและได้สารสกัดหยาบปริมาณมาก

<u>การสกัดแบบแช่</u>

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 4 กรรมวิธี 3 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 สกัดแบบแช่โดยใช้ 70% ethanol เป็นตัวทำละลาย แช่ครั้งละ 3 วัน 3 ครั้ง รวม 9 วัน เป็นกรรมวิธีควบคุม (เชิดศักดิ์และธนพัฒน์, 2544)

กรรมวิธีที่ 2 สกัดแบบแช่โดยใช้ 70% ethanol เป็นตัวทำละลาย แช่ครั้งละ 2 วัน 3 ครั้ง รวม 6 วัน

กรรมวิธีที่ 3 สกัดแบบแช่โดยใช้ 70% ethanol เป็นตัวทำละลาย แช่ครั้งละ 1 วัน 3 ครั้ง รวม 3 วัน

กรรมวิธีที่ 4 สกัดแบบแช่โดยใช้ 70% ethanol เป็นตัวทำละลาย แช่ครั้งละ 4 วัน 3 ครั้ง รวม 12 วัน

<u>สกัดแบบกลั่น reflux</u> (Appendix Figure 1)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 5 กรรมวิธี 3 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 สกัดแบบกลั่น reflux ใช้ 70% ethanol เป็นตัวทำละลายกลั่นครั้งละ 1 ชม. 3 ครั้ง รวม 3 ชม.

กรรมวิธีที่ 2 สกัดแบบกลั่น reflux ใช้ 70% ethanol เป็นตัวทำละลายกลั่นครั้งละ 2 ชม. 3 ครั้ง รวม 6 ชม.

กรรมวิธีที่ 3 สกัดแบบกลั่น reflux ใช้ 70% ethanol เป็นตัวทำละลายกลั่นครั้งละ 3 ชม. 3 ครั้ง รวม 9 ชม.

กรรมวิธีที่ 4 สกัดแบบกลั่น reflux ใช้ 70% ethanol เป็นตัวทำละลายกลั่นครั้งละ 4 ชม. 3 ครั้ง รวม 12 ชม.

กรรมวิธีที่ 5 สกัดแบบกลั่น reflux ใช้ 70% ethanol เป็นตัวทำละลายกลั่นครั้งละ 5 ชม. 3 ครั้ง รวม 15 ชม.

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่าง นำเปลือกเงาะพันธุ์โรงเรียนในจังหวัดจันทบุรีระยะเก็บเกี่ยว จำนวน 5 กิโลกรัม ล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นขนาด 0.5 เซนติเมตร อบที่ 50-60 องศาเซลเซียส ด้วยตู้อบลมร้อนจนน้ำหนักแห้งคงที่ บดละเอียด เพื่อสกัดสารตามกรรมวิธี

2. การสกัดสารซาโปนิน (extraction of saponin) ชั่งเปลือกเงาะแห้งกรรมวิธีละ 10 กรัม

<u>สกัดโดยวิธีการแช่</u> แช่ด้วย 70% ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรรมวิธีที่ 1 (กรรมวิธีควบคุม) แช่ครั้งละ 3 วัน 3 ครั้ง การแช่ทำโดย ในวันที่ 1 เมื่อเติม 70% ethanol เขย่าวันละ 2 ครั้ง นานครั้งละ 10 นาที วันที่ 2 และ 3 เขย่าวันละ 2 ครั้ง นานครั้งละ 10 นาทีเช่นเดียวกับวันที่ 1 เมื่อครบ 3 วัน กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ระเหยตัวทำละลายออก ด้วย rotary vacuum evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระเหยน้ำออกด้วยตู้อบลมร้อนที่ 50-60 องศาเซลเซียสจนแห้ง ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ ส่วนเปลือกเงาะที่ผ่านการแช่และกรองเอาสารสกัดออกไปแล้วเติมสารละลาย 70% ethanol เพื่อแช่ครั้งที่ 2 ต่อไป แช่จนครบ 3 ครั้ง ทุกครั้งระเหยตัวทำละลายออกจากสารสกัดและชั่งน้ำหนักเช่นเดียวกับครั้งที่ 1 ในกรรมวิธีที่ 2-4 ทำเช่นเดียวกับกรรมวิธีที่ 1 แต่เปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการแช่แต่ละครั้งเป็นครั้งละ 2 1 และ 4 วัน ตามลำดับ

<u>สกัดโดยวิธีการกลั่นแบบ reflux</u> กลั่น reflux ด้วย 70% ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรรมวิธีที่ 1 กลั่นครั้งละ 1 ชั่วโมง 3 ครั้ง การกลั่นทำโดยเติม 70% ethanol กลั่นจนครบ 1 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ระเหยตัวทำละลายออก ด้วย rotary vacuum evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระเหยน้ำออก

ด้วยตู้อบลมร้อนที่ 50-60 องศาเซลเซียสจนแห้ง ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ ส่วนเปลือกเงาะที่ผ่านการกลั่นและกรองเอาสารสกัดออกไปแล้วเติมสารละลาย 70% ethanol เพื่อกลั่นครั้งที่ 2 ต่อไป กลั่นจนครบ 3 ครั้ง ทุกครั้งระเหยตัวทำละลายออกจากสารสกัดและชั่งน้ำหนักเช่นเดียวกับครั้งที่ 1 ในกรรมวิธีที่ 2-5 ทำเช่นเดียวกับกรรมวิธีที่ 1 แต่ลดระยะเวลาในการแช่แต่ละครั้งลง เป็นครั้งละ 2, 1 และ 4 วัน ตามลำดับ

การศึกษาวิธีการสกัดแยกสารซาโปนิน

<u>การสกัดหยาบ</u> วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 6 กรรมวิธี 3 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 สกัดแบบแช่ โดยใช้ 70% ethanol เป็นตัวทำละลาย เป็นกรรมวิธีควบคุม

กรรมวิธีที่ 2 สกัดแบบกลั่น reflux โดยใช้ 70% ethanol เป็นตัวทำละลาย

กรรมวิธีที่ 3 สกัดแบบแช่ โดยใช้ distilled water เป็นตัวทำละลาย

กรรมวิธีที่ 4 สกัดแบบกลั่น reflux โดยใช้ distilled water เป็นตัวทำละลาย

กรรมวิธีที่ 5 สกัดแบบแช่ โดยใช้ 70% methanol เป็นตัวทำละลาย

กรรมวิธีที่ 6 สกัดแบบกลั่น reflux โดยใช้ 70% methanol เป็นตัวทำละลาย

โดยกรรมวิธีที่ 2-6 ได้จากการทำ การทดสอบเบื้องต้นเพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมและได้สารสกัดหยาบปริมาณมาก ดังแสดงในTableผนวกที่ 1 และ 2

<u>สกัดแบบแช่</u> (กรรมวิธีที่ 1, 3 และ 5) โดยแช่ครั้งละ 3 วัน 3 ครั้ง รวม 9 วัน

<u>สกัดแบบกลั่น reflux</u> (กรรมวิธีที่ 2, 4 และ 6) โดยกลั่นครั้งละ 3 ชั่วโมง 3 ครั้ง รวม 9 ชั่วโมง

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่าง นำเปลือกเงาะพันธุ์โรงเรียนในจังหวัดจันทบุรีระยะเก็บเกี่ยว 5 กิโลกรัม ล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นขนาด 0.5 เซนติเมตร อบที่ 50-60 องศาเซลเซียสด้วยตู้อบลมร้อนจนน้ำหนักแห้งคงที่ บดละเอียด แบ่งเปลือกเงาะบดแห้งออกเป็น 6 ส่วน เพื่อสกัดสารตามกรรมวิธี

2. การสกัดสารซาโปนิน (extraction of saponin) ชั่งเปลือกเงาะแห้งกรรมวิธีละ 100 กรัม

2.1 สกัดโดยวิธีการแช่ (กรรมวิธีที่ 1, 3 และ 5) แช่ด้วยสารละลาย 70% ethanol distilled water และ 70% methanol ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เขย่าวันละ 2 ครั้ง นาน 10 นาที เป็นเวลา 3 วัน

2.2 สกัดโดยวิธีการกลั่นแบบ reflux (กรรมวิธีที่ 2, 4 และ 6) กลั่น reflux ด้วยสารละลาย 70% ethanol distilled water และ 70% methanol ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ทั้ง 2.1 และ 2.2 นำสารละลายที่ได้กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 สกัดซ้ำ 3 ครั้ง ระเหยตัวทำละลายออก ด้วย rotary vacuum evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระเหยน้ำออกด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียสจนแห้ง ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้

3. การทำให้สารซาโปนินบริสุทธิ์ (purification of saponin) เพื่อศึกษาชนิดของซาโปนิน นำสารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะ จากข้อ 2.1 และ 2.2 สกัดต่อด้วย diethyl ether เก็บชั้น ether ไว้ นำชั้นน้ำสกัดต่อด้วย n-butanol ที่อิ่มตัวด้วยน้ำ เก็บชั้น n-butanol และชั้นน้ำไว้ ระเหยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดออกด้วย rotary vacuum evaporator นำมาทดสอบชนิดของซาโปนินต่อไป

4. การทดสอบคุณสมบัติของซาโปนิน

4.1 การทดสอบการเกิดฟอง (froth test) นำสารซาโปนินที่สกัดได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด จากข้อ 2.1, 2.2 และ 3 เปรียบเทียบกับสาร saponin และ digitonin โดยชั่งสารสกัด 500 มิลลิกรัม ชั่ง saponin และ digitonin ชนิดละ 100 มิลลิกรัม ผสมน้ำร้อน 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็น เขย่าแรงๆ 10 วินาที กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 6 นำสารละลายที่กรองได้มา 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที สังเกตลักษณะการเกิดฟอง และความสูงของฟอง

4.2 การทดสอบชนิดของซาโปนินโดยวิธี Liebermann-Burchard test นำสารซาโปนินที่สกัดได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด จากข้อ 2.1, 2.2 และ 3 เปรียบเทียบกับ saponin และ digitonin โดยชั่งสารสกัด 500 มิลลิกรัม ชั่ง saponin และ digitonin ชนิดละ 100 มิลลิกรัม เติม 70% ethanol 5 มิลลิลิตร เติม sulfuric acid 0.2 M 10 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด 15 นาที ใส่กรวยแยก เติม chloroform 15 มิลลิลิตร เก็บชั้น chloroform ไว้ เติม sodium sulfate จนสารละลายใส เติม acetic acid 1 มิลลิลิตร และ sulfuric acid (conc.) 2 มิลลิลิตร สังเกตสีเปรียบเทียบกับสี digitonin ซึ่งเป็น triterpene saponin (ไตรเทอร์พีนนอยด์ ซาโปนิน) ให้สีม่วงแดง และ saponin ซึ่งเป็น steroid saponin (สเตียรอยด์ ซาโปนิน) ให้สีเขียว

การวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดซาโปนินจากเปลือกเงาะ

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สารเคมีใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารซาโปนิน ได้แก่ ethanol methanol distilled water vanillin perchloric acid acetic acid และ sulfuric acid

2. สารซาโปนิน : saponin (composition 8-25%) และ digitonin (50% TLC) บริษัท sigma

3. อุปกรณ์ ได้แก่ เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ยี่ห้อ Thermo รุ่น Nicolet IS5N เครื่อง spectrophotometer ยี่ห้อ Perkin รุ่น Lambda 35 เครื่องผสมสารละลาย (vertex mixer) micropipette ตู้อบลมร้อน เครื่องชั่ง เครื่องกลั่นระเหยสูญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

วิธีการ

1. การวิเคราะห์ปริมาณซาโปนิน (Quantitative analysis of saponin)

1.1. การวิเคราะห์หาปริมาณสารซาโปนินด้วยเทคนิค FTIR นำสารซาโปนินที่สกัดได้ วัดด้วยเครื่อง FTIR เปรียบเทียบกับ saponin และ digitonin

1.2. วิเคราะห์หาปริมาณสารซาโปนินด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Madland, 2013)

1.2.1. การเตรียมสารสกัด นำวิธีการสกัดที่ให้สารสกัดหยาบปริมาณมากที่สุด 3 กรรมวิธี จากการทดลองที่ 1 มาทำการสกัดใหม่ ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้

1.2.2. การหาปริมาณซาโปนินรวม (total saponin) วิเคราะห์หาปริมาณซาโปนินรวมเทียบกับ saponin และ digitonin มีขั้นตอนดังนี้

การเตรียมสารมาตรฐานและการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยปิเปต saponin และ digitonin ความเข้มข้น 30,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 0, 1, 2, 10, 20, 30 และ 40 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 50 ไมโครลิตรในทุกความเข้มข้น นำไปวิเคราะห์หาปริมาณซาโปนินโดย เติม 5% vanillin 0.2 มิลลิลิตร เขย่า เติม perchloric 0.8 มิลลิลิตร เขย่า ต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

นาน 15 นาที แช่ในอ่างน้ำแข็ง 30 วินาที เติม acetic acid 5 มิลลิลิตร เขย่า ดังนั้นทุกความเข้มข้นมีปริมาตรสุดท้าย 6.05 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร(A 550 nm) นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้สร้างกราฟมาตรฐานให้ได้สมการเส้นตรงเพื่อหาค่าความชัน ใช้คำนวณปริมาณสารซาโปนินรวมต่อไป

การเตรียมสารสกัดหยาบซาโปนินและการวิเคราะห์หาปริมาณซาโปนินรวม โดยนำสารสกัดหยาบทั้งหมดละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มล. นำมาเจือจาง 100, 500 และ 1,000 เท่าด้วยน้ำกลั่น สกัดต่อด้วย n-butanol ที่อิ่มตัวด้วยน้ำ เก็บชั้น n-butanol ระเหย n-butanol ออก ชั่ง 0.1 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร นำตัวอย่างมา 50 ไมโครลิตร วิเคราะห์หาปริมาณซาโปนินเช่นเดียวกับการสร้างกราฟมาตรฐาน

การคำนวณปริมาณสาร

หาความเข้มข้นของซาโปนินในหลอดทดลอง (X) จากสมการเส้นตรง ที่ได้จากการหากราฟมาตรฐาน จะได้ y = ค่าความชัน X (เมื่อ X คือ ความเข้มข้นของซาโปนินในหลอดทดลอง และ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้)

$$\text{ความเข้มข้นของสารซาโปนินในสารสกัดหยาบ (a)} = \left[\frac{\text{X x ปริมาตรสุดท้าย}}{\text{ปริมาตรสารสกัดเริ่มต้น}} \right] \text{ x dilution factor}$$

การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะในการฆ่าหอยเชอรี่

อุปกรณ์และสารเคมี

1. หอยเชอรี่จากนาข้าว เครื่องชั่ง
2. สารสกัดหยาบ (จากเปลือกเงาะโดยใช้ 70% ethanol สกัดแบบกลั่น reflux)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 4 กรรมวิธี 3 ซ้ำๆ ละ 3 ตัว

กรรมวิธีที่ 1 น้ำกลั่น เป็นกรรมวิธีควบคุม

กรรมวิธีที่ 2 น้ำกลั่นผสมสารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะความเข้มข้น 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร (1,000 มิลลิกรัม/ลิตร)

กรรมวิธีที่ 3 น้ำกลั่นผสมสารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะความเข้มข้น 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร (2,000 มิลลิกรัม/ลิตร)

กรรมวิธีที่ 4 น้ำกลั่นผสมสารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะความเข้มข้น 80 กรัม/น้ำ 20 ลิตร (4,000 มิลลิกรัม/ลิตร)

โดยนำหอยเชอรี่ที่เก็บได้จากนาข้าวมาทดลองแช่ในน้ำผสมสารซาโปนินตามกรรมวิธี

การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช

ทำการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora palmivora* จากทุเรียน *Colletotrichum* spp. จากมะละกอ และเชื้อ *Marasmius palmivorus* Sharples จากผลสละ

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรค cork borer จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) เครื่องชั่ง และตู้ปลอดเชื้อ
2. PDA (potato dextrose agar) ethanol และ distilled water
3. สารสกัดหยาบ (จากเปลือกเงาะโดยใช้ 70% ethanol สกัดแบบกลั่น reflux)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 3 กรรมวิธี 5 ซ้ำๆ ละ 3 plates

กรรมวิธีที่ 1 อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ไม่ผสมสารสกัดหยาบ เป็นกรรมวิธีควบคุม

กรรมวิธีที่ 2 อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัม/ลิตร
กรรมวิธีที่ 3 อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะความเข้มข้น 4,000 มิลลิกรัม/ลิตร

วิธีการ

นำชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรคแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting บน PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3-5 วัน ขยายเชื้อโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะขอบโคโลนีนำไปวางบนอาหาร PDA บ่มในที่มืด 3-5 วัน ทำการทดลองตามกรรมวิธี โดยใช้ cork borer เจาะขอบโคโลนีนำไปวางบนอาหาร PDA ผสมสารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะความเข้มข้นตามกรรมวิธี วัดขนาดโคโลนีของเชื้อแต่ละชนิดในแต่ละกรรมวิธี

ผลการทดลองและวิจารณ์

การสกัดสารซาโปนินด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ พบว่าการสกัดแบบกลั่น reflux โดยใช้ 70% ethanol และ 70% methanol ได้น้ำหนักแห้งสารสกัดหยาบมากกว่าการสกัดแบบแช่ ประหยัดเวลากว่าจากกรรมวิธีควบคุมที่ใช้เวลา 9 วันลดเวลาการสกัดเหลือ 9 ชั่วโมง เมื่อสกัดแบบกลั่น reflux การใช้ ethanol 70% สกัดแบบกลั่น reflux สกัดสารซาโปนินได้น้ำหนักแห้งสารสกัดหยาบมากที่สุด รองลงมาคือ 70% methanol สกัดแบบกลั่น reflux ได้สาร 51.63 และ 47.74 กรัมตามลำดับ ส่วนการสกัดแช่โดยใช้ distilled water สกัดได้น้อยที่สุด คือ 35.89 กรัม โดยทดลองวิธีการสกัดแบบแช่และแบบกลั่น reflux ใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอธานอล 70% เมทานอล 70% และน้ำกลั่น พบว่าการสกัดแบบแช่ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดใช้เวลา 9 วัน ได้สารสกัดหยาบ 42.47 45.91 และ 35.89 กรัม ตามลำดับ ขณะที่การสกัดแบบกลั่น reflux ใช้เวลาเพียง 9 ชั่วโมงได้สารสกัดหยาบ 51.63 47.74 และ 28.46 กรัม ตามลำดับ (Table 1) นำสารสกัดหยาบจากทุกกรรมวิธีมาทำให้สารซาโปนินบริสุทธิ์ขึ้น พบว่าทุกกรรมวิธีสารสกัดในชั้น diethyl ether เป็นผงสีเหลืองมีปริมาณน้อยประมาณ 0.1 กรัมไม่สามารถทำการทดลองต่อได้ ในชั้น n-butanol และชั้นน้ำสารมีลักษณะหนืดสีน้ำตาลเข้ม กลิ่นฉุน ในชั้น n-butanol กรรมวิธีที่สกัดด้วย 70% ethanol มีปริมาณสารสกัดมากที่สุด รองลงมา คือ 70% methanol และ distilled water ตามลำดับ ส่วนในชั้นน้ำกรรมวิธีที่สกัดด้วย distilled water มีปริมาณสารสกัดมากที่สุด รองลงมา คือ 70% ethanol และ 70% methanol มีปริมาณใกล้เคียงกัน (Table 2) นำสารสกัดในชั้น n-butanol และชั้นน้ำของทุกกรรมวิธีทดสอบการเกิดฟองเปรียบเทียบกับ saponin และ digitonin พบว่าฟองสูงประมาณ 1-2 เซนติเมตร (Table 3 และFigure 5) และทดสอบชนิดของซาโปนินโดยวิธี Liebermann-Burchard test พบว่ามีสีเขียวและม่วงแดงเหมือน saponin และ digitonin แสดงว่ามีสมบัติเป็นซาโปนิน (Table 4 และFigure 6) นำสารสกัดหยาบจากทุกกรรมวิธี มาวิเคราะห์ชนิดของซาโปนินด้วยเทคนิค FTIR พบว่า กรรมวิธีที่สกัดด้วย 70% ethanol, 70% methanol และ distilled water ทั้งแบบแช่และแบบกลั่น reflux มีสารซาโปนินเป็นส่วนประกอบ (Figure 8-9) นำมาหาปริมาณของสารซาโปนินด้วยเครื่อง spectrophotometer ตามวิธีของ Madland (2013) โดยเลือกเฉพาะวิธีการสกัดแบบกลั่น reflux ทำการวิเคราะห์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 550 นาโนเมตร พบว่าปริมาณซาโปนินที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ความเข้มข้น 1/1,000 1/500 และ 1/100 ตามลำดับ ปริมาณซาโปนินของสารสกัดจาก 70% methanol สกัดแบบกลั่น reflux มีค่ามากที่สุด คือ 456,229.51 403,663.93 และ 406,242.62

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา 70% ethanol สกัดแบบกลั่น reflux และ distilled water สกัดแบบกลั่น reflux ตามลำดับ ดังนั้นการสกัดสารซาโปนินจากเปลือกเงาะโดยใช้ 70% methanol สกัดแบบกลั่น reflux มีปริมาณ น้ำหนักสารที่สกัดได้จากเปลือกเงาะแห้ง 100 กรัม และ total saponin ต่อสารสกัด 1 กรัมมากที่สุด คือ 43.97 กรัม และ 422.05 มิลลิกรัม รองลงมาคือ ethanol 70% สกัดแบบกลั่น reflux คือ 40.19 กรัม และ 370.47 มิลลิกรัม และ distilled water สกัดแบบกลั่น reflux 24.24 กรัม และ 342.24 มิลลิกรัม (Table 5-6) เมื่อพิจารณาปริมาณซาโปนินทั้งหมดจากเปลือกเงาะแห้ง 1 กรัม พบว่า การสกัดสารโดยใช้ 70% ethanol สกัดแบบกลั่น reflux มีปริมาณมากที่สุดคือ 92.95 มิลลิกรัม รองลงมาคือ 70% methanol และ distilled water สกัดแบบกลั่น reflux คือ 84.20 มิลลิกรัม และ 20.77 มิลลิกรัม ตามลำดับ การใช้สารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะฆ่าหอยเชอรี่ พบว่าที่ 0 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร หอยเชอรี่มีชีวิต ในขณะที่อัตรา 40 และ80 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร หอยเชอรี่หยุดเคลื่อนไหวภายใน 1 ชั่วโมง และตายภายใน 12 ชั่วโมง (Figure 11) การควบคุมเชื้อรา *Phytophthora palmivora* จากทุเรียน *Colletotrichum* spp. จากมะละกอ และเชื้อ *Marasmius palmivorus* Sharples. จากผลสละ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารสกัดสูงขึ้น ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเพิ่มขึ้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ ชุดกรรมวิธีควบคุม โคโลนีของเชื้อรา *Marasmius palmivorus* และ *Phytophthora palmivora* เจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อขนาด 9 เซนติเมตร ที่ 2,000 มิลลิกรัม/ลิตร โคโลนีของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด มีขนาด 2.76 และ 7.50 เซนติเมตร ส่วนเชื้อรา *Colletotrichum* ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราชุดกรรมวิธีควบคุม มีขนาด 4.10 เซนติเมตร ที่ 2,000 มิลลิกรัม/ลิตร มีขนาด 2.13 เซนติเมตร (Table 7, Figure 4) การที่เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรามีขนาดลดลงแสดงให้เห็นว่าสารสกัดซาโปนินสามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีของเชื้อราทั้ง 3 ชนิด ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุปผลการทดลอง

การสกัดสารซาโปนินจากเปลือกเงาะที่เป็นวัสดุเหลือทิ้ง โดยนำเปลือกเงาะมาทำให้แห้ง แล้วกลั่นแบบ reflux โดยใช้ 70% ethanol เป็นตัวทำละลาย เป็นวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ให้น้ำหนักสารสกัดหยาบและมีปริมาณ total saponin มากที่สุด คือ 92.95 มิลลิกรัมต่อเปลือกเงาะแห้ง 1 กรัม เมื่อตรวจสอบชนิดของซาโปนิน พบว่าสารสกัดมีสมบัติเป็น triterpene saponin และ steroid saponin สามารถนำสารสกัดมาผสมน้ำใช้กำจัดหอยเชอรี่ โดยสารสกัดที่ความเข้มข้น 4,000 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้หอยเชอรี่ตายภายใน 12 ชั่วโมง และสามารถใช้ในการควบคุมเชื้อรา 3 ชนิด คือ *Phytophthora palmivora, Colletotrichum* spp. และ *Marasmius palmivorus* Sharples ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยสารสกัดความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีของเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การนำไปใช้ประโยชน์

วิธีการสกัดสารซาโปนินที่ได้เป็นวิธีการที่ไม่ซับซ้อน แต่มีประสิทธิภาพดีและใช้เวลาสั้นกว่าวิธีเดิมมาก กลุ่มเกษตรกรหรือผู้ประกอบการ สามารถนำไปพัฒนาเป็นการค้าเพื่อกำจัดวัสดุเหลือใช้และสร้างรายได้เพิ่ม ลดการนำเข้าจากต่างประเทศ และหากมีการพัฒนาให้ใช้ในรูปผงแห้ง หรือรูปแบบที่ง่ายต่อการปฏิบัติของเกษตรกร จะเป็นการเพิ่มทางเลือกในการควบคุมศัตรูพืชชนิดต่างๆ ในระบบการผลิตแบบอินทรีย์

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นางเกษสิริ ฉันทะพิริยะพูน ผู้อำนวยการกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6 ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2556. การนำเข้า ส่งออก เงาะ. สืบค้นจาก http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export.php. วันที่ 22 พฤษภาคม 2556.

เชิดศักดิ์ ใจแข็ง และธนพัฒน์ ศาสตระรุจิ. 2544. ซาโปนินในเงาะ. รายงานปัญหาพิเศษ ภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 45 หน้า.

ณัฏฐวี สิทธิไกรพงษ์ นิรมล อุตมอ่าง และอรุณี อภิชาติสรางกูร. 2550. ประสิทธิภาพในการสกัดซาโปนินจากเจียวกู้หลานโดยใช้เทคนิคไมโครเวฟและเทคนิคความดันสูงยิ่ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหารมหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 78 หน้า.

สัมพันธ์ สร้อยกล่อม ชนาธิป ชูศรี บวร บุญพร และโสภา กลิ่นจันทร์. 2557. ปริมาณสารโพลีฟีนอลและประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดผักโขม. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52. 4-7 ก.พ. 2557. หน้า 394-399.

สัมฤทธิ์ เกียววงษ์. 2547. เคย์-1 นวัตกรรมแห่งความเผ็ด. *วารสาร BIOTECH*. ปีที่ 2 ฉบับที่ 19 เดือนกรกฎาคม.

Gyeong, J.C.; M.K. Lee; J.W. Lee; H.J. Park; D.Y. Lee and Y.H. Lee. 2010. Physicochemical characterization and NMR assignments of ginsenosides Rb1, Rb2, Rc, and Rd isolated. *Panax ginseng*. *Journal of Ginseng reseach*. No.2 : 113-121.

Hostettmann, K and A. Marston. 1995. Saponins. Cambridge University, NY. USA. 564 p.

He, L.; Z. Guoying; Z. Huaiyun and H. Yuanhaoet. 2010. Chemical constituents and biological activities of saponin from the seed of *Camellia oleifera*. *Scientific Research and Essays* Vol.5(25) : 4088-4092.

Madland, E. 2013. Extraction, Isolation and Structure Elucidation of Saponins from *Herniaria Incana.* Norwegian University of Science and Technology, Dept. of Chemistry. 67 p.

Visetson, S.; V. Bullangpoti; T. Kunjerm; M. Milne; J. Milne and P. Kannasutra. 2006. Thai Herbs for Agricultural and Household Pest Control. Research Way Fair, Jakapanpensiri building, Kasetsart University, 27 January-4 February, Bangkok, Thailand.

Zar, H.J. 1999. Biostatistical Analysis. 4th ed. Prentice Hall International, Inc., USA. 663 p.

Table 1 The dry weight of the dried rambutan's peel extract 100 g extracted with solvents

Treatment	Extract dry weight (g)
70% ethanol soak	42.47 bc
70% ethanol reflux	51.63 a
distilled water soak	35.89 cd
distilled water reflux	28.46 d
70% methanol soak	45.91 ab
70% methanol reflux	47.74 ab
LSD 0.05	**
CV (%)	7.98

Table 2 The dry weight of the extracts when extracted with diethyl ether and n-butanol

Treatment	diethyl ether layer (g)	n-butanol layer (g)	water layer (g)	including 3 layers (g)	% lost substance (g)
70% ethanol soak	0.13	10.03 ab	8.61 c	38.73 ab	8.79 b
70% ethanol reflux	0.17	12.80 a	8.61 c	47.37 a	8.28 b
distilled water soak	0.16	8.49 bc	13.69 a	29.25 bc	13.10 a
distilled water reflux	0.14	5.16 c	12.88 b	26.32 c	14.55 a
70% methanol soak	0.18	8.69 bc	8.64 c	42.42 a	7.66 b
70% methanol reflux	0.16	9.19 ab	8.64 c	44.03 a	7.85 b
LSD 0.05	ns	**	**	*	**
CV (%)	13.04	17.95	3.08	11.47	13.34

Table 3 The height of the bubble of dried rambutan's peel crude extract and n-butanol extract and water layer compared with saponin and digitonin

Treatment	rambutan's peel extract(cm)	n-butanol class (cm)	water layer (cm)
70% ethanol soak	2.31 bc	2.63 ab	1.74 d
70% ethanol reflux	2.47 b	2.45 abc	1.76 d
distilled water soak	1.76 cd	1.93 bc	1.91 c
distilled water reflux	1.80 d	1.68 c	1.36 f
70% methanol soak	2.14 bcd	1.67 c	1.17 g
70% methanol reflux	1.66 d	2.04 bc	1.46 e
saponin	3.08 a	3.08 a	3.08 b
digitonin	3.24 a	3.24 a	3.24 a
LSD 0.05	*	*	*
CV (%)	11.60	15.36	1.91

Table 4 The extracts color of type testing of saponin by Liebermann-Burchard test

Treatment	n-butanol layer	water layer
70% ethanol soak	green	magenta
70% ethanol reflux	green	magenta
distilled water soak	green	magenta
distilled water reflux	green	magenta
70% methanol soak	green	magenta
70% methanol reflux	green	magenta
saponin	magenta	
digitonin	green	

Table 5 The light absorption at 550 nanometer and saponin content (µg/ml) calculated from the absorbance of the extract concentration 1/1,000 1/500 and 1/100

Extract	Abs. 550 nm	Saponin content (µg/ml) abs. calculated
distilled water reflux1/1000	0.02	335,229.51
distilled water reflux1/500	0.04	389,778.69
distilled water reflux1/100	0.15	301,706.56
70% methanol reflux1/1000	0.02	456,229.51
70% methanol reflux1/500	0.04	403,663.93
70% methanol reflux 1/100	0.20	406,242.62
70% ethanol reflux 1/1000	0.02	372,918.03
70% ethanol reflux1/500	0.04	372,918.03
70% ethanol reflux 1/100	0.18	365,578.69

Table 6 The weight extract and volume of total saponin

Treatment	Weight extract (g/ 100 g dried rambutan's peel)	Weight extract (extracted with buthanol (g))	Total saponin (mg/ 1 g extract)	Total saponin (mg/ 1g dried rambutan's peel)
70% ethanol reflux	40.19 b	25.09 a	370.47 ab	92.95 a
distilled water reflux	24.24 c	6.07 c	342.24 b	20.77 c
70% methanol reflux	43.97 a	19.95 b	422.05 a	84.20 b
LSD 0.05	**	**	*	**
CV (%)	0.10	0.48	8.18	5.76

Table 7 The average diameter of fungal colonies *Marasmius palmivorus*, *Phytophthora palmivora* and *Colletotrichum*at day 1, 3 and 5 on PDA mixed with crude saponin extract from dry rambutan's peel at various concentration

Concentration	The average diameter of fungal colonies at various concentration (cm)								
	Marasmius palmivorus			*Phytophthora palmivora*			*Colletotrichum*		
	1 day	3 days	5 days	1 day	3 days	5 days	1 day	3 days	5 days
0 มิลลิกรัม/ลิตร	0.95 b	5.37 b	9.00 c	1.33 c	6.67 c	9.00c	0.88 b	3.23 c	4.10 c
1,000 มิลลิกรัม/ลิตร	0.87 a	2.20 a	3.03 b	1.07 b	5.20 b	8.16 b	0.62 a	1.97 b	2.83 b
2,000 มิลลิกรัม/ลิตร	0.87 a	2.27 a	2.76 a	0.90 a	4.13 a	7.50a	0.63 a	1.73 a	2.13 a
LSD 0.05	**	**	**	**	**	**	**	**	**
CV (%)	3.27	2.82	0.78	4.46	2.61	2.70	2.84	1.24	2.88

9.00 cm. is the fungal colonies full up petri dish

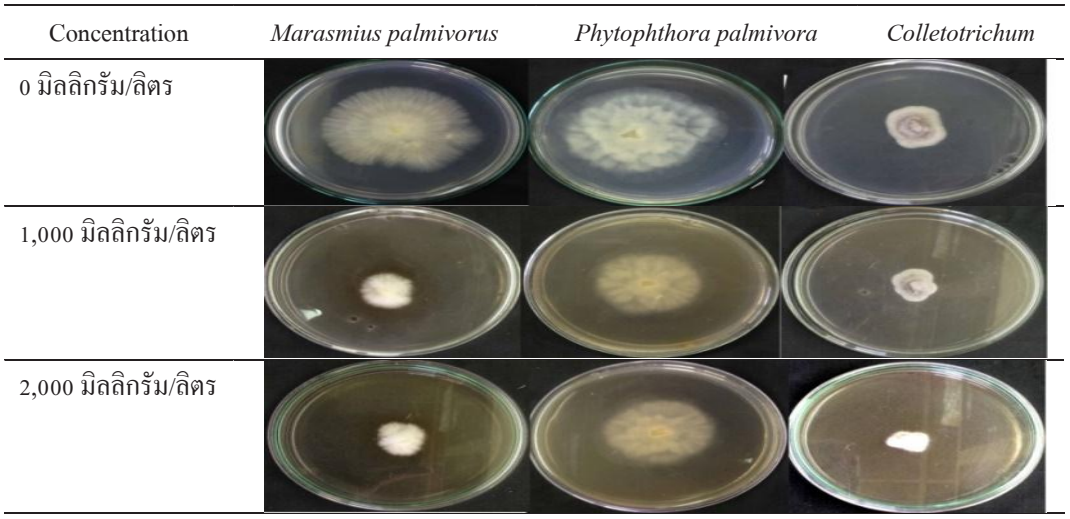


Figure 4 Fungal growth bioassay of *Phytophthora palmivora, Colletotrichum sp.* And *Marasmius palmivorus* Sharples at day 3 on PDA mixed with crude saponin extract of dry rambutan's peel at various concentration

Figure 5 The bubble height of the crude saponin extract

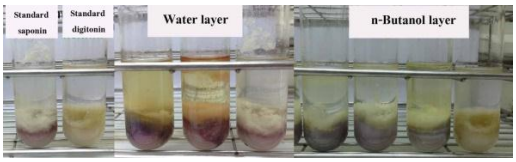


Figure 6 The color type of extracts for testing saponin by Liebermann-Burchard test

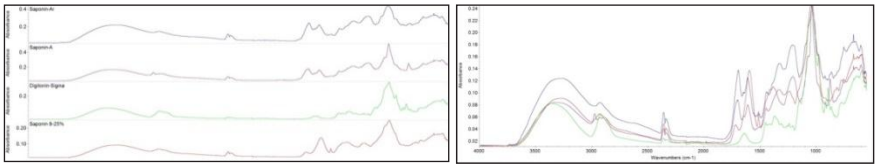


Figure 7 The FTIR spectra rambutan's extract, saponin-AR extracted 70% Ethanol Reflux, saponin-A extracted 70% Ethanol Soak, Digitonin-Sigma and Saponin 8-25% saponin standard

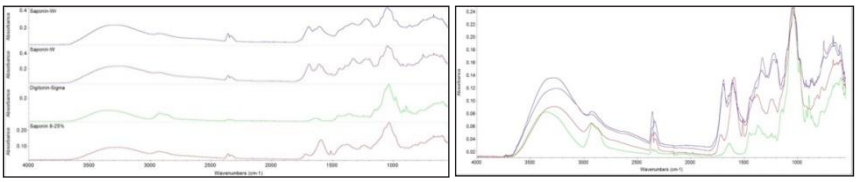


Figure 8 The FTIR spectra rambutan's extract, saponin-WR extracted 70% Water Reflux, saponin-W extracted 70% Water Soak, Digitonin-Sigma and Saponin 8-25% saponin standard

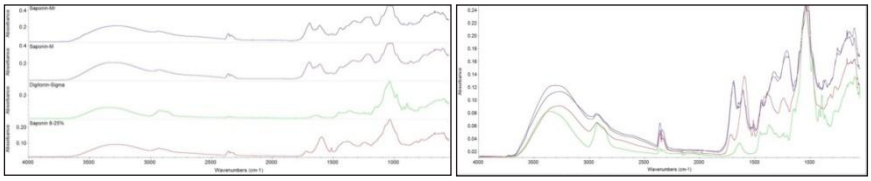


Figure 9 FTIR spectra rambutan's extract, saponin-MR extracted 70% Methanol Reflux, saponin-M extracted 70% Methanol Soak, Digitonin-Sigma and Saponin 8-25% saponin standard

Figure 10 The death of channeled apple snail when soaked in water mixed with saponin rate 0, 20, 40 and 80 g per 20 liter water

Appendix Figure 1 The reflux extraction

Appendix Table 1 The dry weight of the dried rambutan's peel extract 10 g extracted with 70% ethanol soak

treatment	Extract dry weight (g)				
	1	2	3	4	average
70% ethanol soak 1 day, 3 times	0.82	0.36	0.05	0.01	0.31
70% ethanol soak 2 days, 3 times	1.18	0.50	0.19	0.02	0.47
70% ethanol soak 3 days, 3 times	2.47	1.15	0.46	0.07	1.04
70% ethanol soak 4 days, 3 times	2.56	1.15	0.45	0.08	1.06
LSD 0.05	**	**	**	**	-
CV (%)	1.10	1.46	2.14	13.07	-

Appendix Table 2 The dry weight of the dried rambutan's peel extract 10 g extracted with 70% ethanol reflux

treatment	Extract dry weight (g)				
	1	2	3	4	average
70% ethanol reflux 1 hour, 3 times	0.84	0.42	0.08	0.02	0.34
70% ethanol reflux 2 hours, 3 times	1.30	0.65	0.26	0.06	0.57
70% ethanol reflux 3 hours, 3 times	2.59	1.44	0.62	0.16	1.20
70% ethanol reflux 4 hours, 3 times	2.60	1.50	0.60	0.15	1.21
70% ethanol reflux 5 hours, 3 times	2.63	1.56	0.61	0.16	1.24
LSD 0.05	**	**	**	**	-
CV (%)	1.01	1.90	3.03	9.96	-