บทที่ 2
การทดลองและผลการทดลอง

2.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 การทดลองคัดเลือกชนิดของพืชที่ออกฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุง และการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณสารบริสุทธิ์โดยใช้โครมาโตกราฟีของเหลวความดันสูง (HPLC) ใช้พืชในสกุล Piper 11 ชนิดดังนี้

2.1.1.1 พลู (Piper betle Linn.) ส่วนก้าน, ลำต้น, ใบ และผล

2.1.1.2 พริกไทย (Piper nigrum Linn.) ส่วนผล

2.1.1.3 ดีปลี (Piper retrofractum Vahl.) ส่วนก้าน, ลำต้น, ใบ และผล

2.1.1.4 ชะพลู (Piper sarmentosum Roxb.) ส่วนเหนือดิน

2.1.1.5 พลูตีนช้าง (Piper umbellatum Linn.) ส่วนราก, ใบ และผล

พืชทั้ง 5 ชนิดนี้ จัดซื้อและเก็บจากแหล่งปลูกในจังหวัดทางภาคใต้ของประเทศด้วยความร่วมมือของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2.1.1.6 Piper pedicellatum Wall. ส่วนก้านและใบ เก็บจากอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

2.1.1.7 Piper peepuloides Roxb. ส่วนราก, ก้าน และใบเก็บจากอำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่

2.1.1.8 Piper boehmaeriaefolium Wall. ส่วนก้าน, ใบ และผล เก็บจากอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

2.1.1.9 Piper sp. ส่วนใบ เก็บจากจังหวัดเชียงใหม่

2.1.1.10 Piper-2 ส่วนก้านและใบ เก็บจากจังหวัดเชียงใหม่

2.1.1.11 Piper 89-1551 ส่วนก้านและใบ เก็บจากจังหวัดเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

พืชในรายการ 2.1.1.6-2.1.1.8 ไม่ทราบชื่อเรียกในภาษาไทย หรือชื่อพื้นเมือง การตรวจวิเคราะห์และบ่งชี้บอกชนิดของพืชได้รับความกรุณาจากอาจารย์ J.F. Maxwell นักพฤกษศาสตร์ และอาจารย์ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย-เชียงใหม่

พืชในรายการ 2.1.1.9-2.1.1.11 ยังไม่สามารถบอกชื่อวิทยาศาสตร์ที่แน่ชัดลงไปได้ จึงใช้รหัสสำหรับเรียกในห้องปฏิบัติการแทน

2.1.2 การสกัดเพื่อแยกสารบริสุทธิ์ออกจากพืช

ใช้ดีปลี (Piper retrofractum Vahl.) ส่วนก้านและลำต้นโดยในการสกัดครั้งแรก จัดซื้อจากแหล่งปลูกในภาคใต้ การสกัดครั้งที่สอง จัดซื้อจากเขตอำเภอแม่สาย จังหวัดเชียงราย

2.2 สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

2.2.1 ลูกน้ำยุงลาย (Aedes aegypti) และยุงรำคาญ (Culex quinquefasciatus) วัย 3 หรือวัย 4 ระยะเริ่มต้น ทำการเพาะเลี้ยงบริเวณห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยใช้ไข่ยุงลายและยุงรำคาญจากตัวเต็มวัยที่ทำการเลี้ยงและจัดส่งมาให้จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ภาชนะที่ใช้คือ อ่างเลี้ยงปลาขนาด 20 x 50 x 30 ซม. และบีกเกอร์ขนาด 3000 มล. น้ำที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเป็นน้ำประปาที่เก็บไว้ในถังพักน้ำสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการบริเวณคณะเภสัชศาสตร์ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อลูกน้ำฟักออกจากไข่ได้ 2-3 วัน จะเริ่มให้อาหารปลาชนิดเม็ด ไม่ใส่สีผสม บดละเอียด วันเว้นวัน เพิ่มปริมาณขึ้นตามขนาดของลูกน้ำ คอยระวังและถ่ายน้ำไม่ให้น้ำเสีย จนลูกน้ำอายุประมาณ 7-10 วัน จะมีขนาดและวัยตามที่ต้องการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2 ยุงลายตัวเต็มวัย (Adult) อายุหลังจากออกจากตัวโม่ง 1 วัน

2.2.3 ลูกปลานิล (Tilapia nilotica) ขนาดความยาว 2.5-3.5 ซม.

2.2.4 หอย Biomphalaria glabrata เป็นหอยไม่มีฝาขนาดความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางของเปลือกที่ขดเป็นวง 1.5.-2.0 ซม. ไม่มีชื่อเรียกทั่วไป

2.2.5 หอยบัวหรือหอยคัน (Lymnaea rubiginosa) เป็นหอยไม่มีฝาเช่นกัน ขนาดความยาวของเปลือก 1.0-1.5 ซม.

2.2.6 หอยคัน (Bithynia siamensis) หอยมีฝาขดเป็นวงขนาดเล็ก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเปลือก 0.3-0.5 ซม.

2.3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

2.3.1 เครื่องบด

2.3.2 เครื่องระเหยภายใต้ความดันต่ำ (High Speed Reduced Pressure Evaporator) ใช้เครื่อง Buchi 011 EL 131 Rotavaper และ Buchi 461 Water Bath

2.3.3 หลอดแสงอุลตราไวโอเลต (UV-Lamp) ใช้เครื่อง Spectroline ENF-240 C/F ช่วงความยาวคลื่น 254 nm. และ 365 nm.

2.3.4 เครื่องไล่ฟองอากาศ ใช้เครื่อง Bransonic 221

2.3.5 การหาจุดหลอมเหลว (Melting Point) ใช้เครื่อง Buchi smp-20 หน่วยเป็น °ซ

2.3.6 สเปคตรัม

Ultraviolet (UV) Spectra บันทึกด้วยเครื่อง Jasco WVIDEC 650 Double Beam Spectrophotometer หน่วยความยาวคลื่นเป็น นาโนเมตร (nm)

Infrared (IR) Spectra บันทึกด้วยเครื่อง Jasco IR 810, SERIAL NO.116288 หน่วยเป็น wave number (cm^{-1})

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectra บันทึกด้วยเครื่อง Bruker WM-400

Mass Spectra (MS) Low Resolution Mass Spectra บันทึกด้วยเครื่อง A.E.IM.S.30 Spectrometer

2.3.7 โครมาโตกราฟฟี

คอลัมน์โครมาโตกราฟฟีแบบรวดเร็ว (Quick Column Chromatography) และโครมาโตกราฟฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography) ใช้ซิลิกาเจล (Siliga gel) Merck's 60 GF 254 Art.7730 เป็นตัวดูดซับ

โครมาโตตรอน (Chromatotron) ใช้เครื่อง Chromatotron Model 7924 ของ Harrison Research Ser.no. H 20 Patented. ใช้ซิลิกาเจล Merck's 60 GF 254 Art.7730 เป็นตัวดูดซับ

โครมาโตกราฟฟีของเหลวชนิดความดันปานกลาง (Medium Pressure Liquid Chromatography : MPLC) ใช้เครื่องมือชุดซึ่งประกอบด้วย Buchi 681 Chromatography Pump, Buchi UV/Vis Filter-Photometer และเครื่องบันทึกโครมาโตแกรมของ KNAUER ใช้ซิลิกาเจล Merck's 60 GF 254 Art.7730 เป็นตัวดูดซับเช่นกัน

โครมาโตกราฟฟีของเหลวชนิดความดันสูง (High Pressure Liquid Chromatography : HPLC) ใช้เครื่องมือชุดประกอบด้วย Waters Automated Gredient Controller, Water 590 Programmable HPLC Pump, Waters Model 510. Operating Pressure, Waters Lambda-Max Model 481 LC. Spectrophotometer และ Waters 745 Data Module

2.3.8 เครื่องชั่งสารอย่างละเอียด ใช้เครื่อง Sartorius 2472 อย่างหยาบใช้เครื่อง Precisa 600C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.4.1 ตัวทำละลายที่ใช้ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม, น้ำ, เอธิลอะ-ซิเตต, อีเธอร์, อะซิโตน, เมธานอล และเอธานอล โดยนำมากลั่นที่สภาวะจุดเดือดของตัวทำละลายนั้น ๆ ก่อนนำมาใช้

: สารสกัดจากพืชที่ได้จากการใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย เรียกว่า "ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน"

: สารสกัดจากพืชที่ได้จากการใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย เรียกว่า "ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนโดยตรง"

: สารสกัดจากพืชที่ได้จากการนำกากที่เหลือจากการสกัดด้วยเฮกเซนมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน เรียกว่า "ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน"

: สารสกัดจากพืชที่ได้จากการนำกากที่เหลือจากการสกัดด้วยเฮกเซนและสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมาสกัดด้วยเมธานอล เรียกว่า "ส่วนสกัดหยาบเมธานอล"

2.4.2 สารเคมีที่ใช้

สารลดแรงตึงผิว TWEEN 80, โปตัสเซียมโบรไมด์ (Potassium Bromide)

2.5 วิธีการทดลอง

2.5.1 การคัดเลือกชนิดของพืชในสกุลพริกไทยที่ออกฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุง

เก็บพืชในสกุลพริกไทย 9 ชนิด โดยแยกส่วนราก, ใบ, ก้านและลำต้น และส่วนผลจากแหล่งต่าง ๆ (หัวข้อ 2.1 รายการที่ 2.1.1.1-2.1.1.9) ในปริมาณน้ำหนักสด 1/2 กิโลกรัม ตากและอบให้แห้ง นำแต่ละส่วนบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดจะได้น้ำหนักเมื่อบดละเอียดแล้วประมาณ 100 กรัม แช่ในตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอธานอล 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร เป็นเวลา 1 คืน รินส่วนที่เป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารละลายออกมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยภายใต้ความดันต่ำ ทำซ้ำโดยนำส่วนกากที่เหลือมาแช่ในตัวทำละลายชนิดเดิมแล้วระเหยเอาตัวทำละลายออกอีก 2 ครั้ง จะได้สารที่เป็นส่วนสกัดหยาบ (Crude extract) ปริมาณเพียงพอที่จะใช้ในการทดสอบเพื่อหาและเปรียบเทียบระดับความเป็นพิษต่อการตายของลูกน้ำยุงลาย ดังนี้:-

สารที่ใช้ : สารละลายส่วนสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของพืชในสกุลพริกไทยในอะซิโตน ความเข้มข้นต่าง ๆ กันในหน่วย ppm

สัตว์ที่ใช้ทดสอบ : ลูกน้ำยุงลายวัย 3 ทำการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการในหัวข้อ 2.1.1 จำนวน 20 ตัว : 1 ความเข้มข้น : 1 ซ้ำ (replication)

วิธีการที่ใช้ทดสอบ : การแช่ในสารละลาย (immersion) ใช้สารละลายในน้ำปริมาตร 200 ซม^3 : 1 ความเข้มข้น : 1 ซ้ำ

จำนวนซ้ำที่ใช้ : 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ความเข้มข้น

เวลาที่ใช้ทดสอบ : 24 ชั่วโมง

สถานที่ทดสอบ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ระดับความเป็นพิษ : ใช้ข้อมูลจำนวนลูกน้ำยุงลายตายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ใน 24 ชั่วโมง ที่ได้จากการทดสอบ ทำ Probit log analysis คำนวณหาค่า LC_{50}, LC_{95} และ LC_{99} โดยใช้ Harvard Programing (Hg 1, 2) กับเครื่องคอมพิวเตอร์

ผลการทดสอบ : แสดงในตารางที่ 2.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หมายเหตุ: ทำการทดลองโดยกลุ่มคณะวิจัยภายใต้การควบคุมของ ศาสตราจารย์ ดร.สุชาติ อุปถัมภ์

ตารางที่ 2.1 ระดับความเป็นพิษของส่วนสกัดหยาบจากพืชในสกุล Piper ต่อการตายของลูกน้ำยุงลายวัย 3 ใน 24 ชั่วโมง

ลำดับที่	ชื่อพืช	ส่วนของพืช	ตัวทำละลายในการสกัด	ระดับความเป็นพิษ (ppm)		
				LC_{50}	LC_{95}	LC_{99}
1	พลู (Piper betle Linn.)	ก้าน	เฮกเซน	160.9	200.7	220.3
		ก้าน	ไดคลอโรมีเทน	133.2	207.4	249.8
		ใบ	เฮกเซน	98.82	293.4	463.8
		ใบ	ไดคลอโรมีเทน	100.5	176.2	223.2
		ผล	เฮกเซน	105.9	124.7	133.6
		ผล	ไดคลอโรมีเทน	82.12	143.0	180.5
2	พริกไทย (Piper nigrum Linn.)	ผล	เฮกเซน	2.129	5.807	8.859
		ผล	ไดคลอโรมีเทน	7.740	17.64	24.95
		ผล	เมธานอล	14.84	27.62	35.87
3	ดีปลี (Piper retrofractum Vahl.)	ก้าน	เฮกเซน	3.468	8.174	11.72
		ก้าน	ไดคลอโรมีเทน	0.2904	0.7780	1.178
		ก้าน	เมธานอล	14.27	32.57	46.09

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

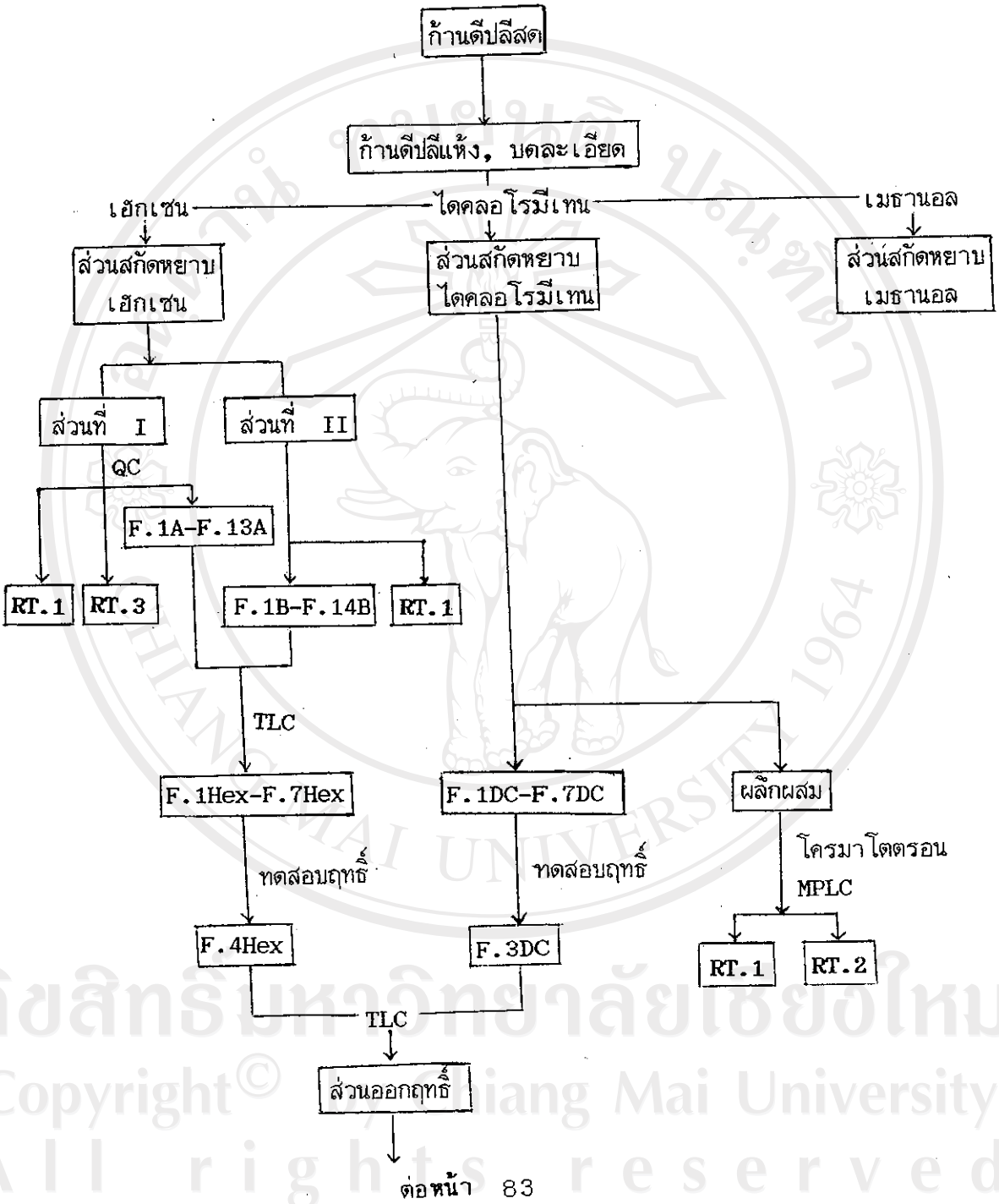
ลำดับที่	ชื่อพืช	ส่วนของพืช	ตัวทำละลายในการสกัด	ระดับความเป็นพิษ (ppm)		
				LC_{50}	LC_{95}	LC_{99}
		ผล	เฮกเซน	3.008	8.834	13.90
		ผล	ไดคลอโรมีเทน	2.632	8.422	13.74
		ผล	เมธานอล	145.5	250.1	314.1
4	ชะพลู (Piper sarmentosum Roxb.)	ส่วนเหนือดิน	เฮกเซน	20.90	47.93	67.97
			ไดคลอโรมีเทน	111.30	177.90	216.80
5	พลูดินช้าง (Piper umbellatum Linn.)	ราก	เฮกเซน	109.0	175.3	214.1
		ใบ	ไดคลอโรมีเทน	84.74	239.3	374.4
		ผล	เฮกเซน	98.82	239.3	347.2
6	จะข้าน (Piper pedicellatum Wall.)	ก้าน	เฮกเซน	1.995	3.802	4.998
		ก้าน	ไดคลอโรมีเทน	4.211	7.843	10.190

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ลำดับที่	ชื่อพืช	ส่วนของพืช	ตัวทำละลายในการสกัด	ระดับความเป็นพิษ (ppm)		
				LC_{50}	LC_{95}	LC_{99}
7	Piper peepuloides Roxb.	ราก + ก้าน	เฮกเซน	4.440	8.395	10.97
		ราก + ก้าน	ไดคลอโรมีเทน	5.625	12.68	17.85
		ใบ	เฮกเซน	41.61	73.07	92.60
		ใบ	ไดคลอโรมีเทน	24.35	56.20	79.91
8	Piper boehmaeriaefolium	ก้าน	เฮกเซน	8.428	18.13	25.02
		ใบ	เฮกเซน	63.27	99.51	120.4
		ใบ	ไดคลอโรมีเทน	36.4	85.79	92.098
		ผล	เฮกเซน	0.5097	3.06	6.505
		ผล	เมธานอล	86.79	197.5	279.2
9	Piper sp.	ใบ	เฮกเซน	101.4	197.9	262.2
		ใบ	ไดคลอโรมีเทน	36.40	85.79	123.1

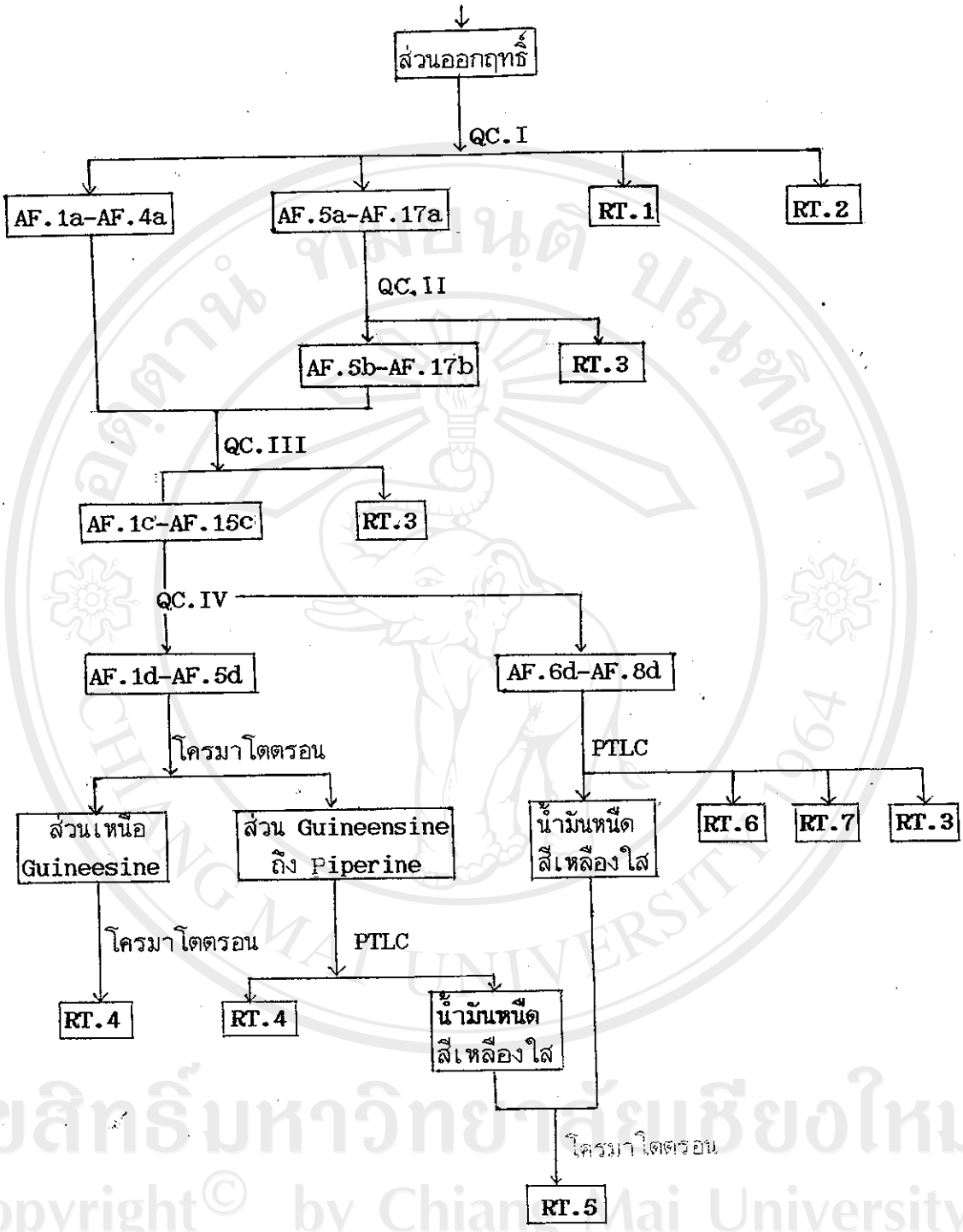
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ต่อหน้า 83

แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนการสกัดแยกสารบริสุทธิ์ออกจากก้านดีปลี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



หมายเหตุ:- QC : Quick column chromatography
TLC : Thin layer chromatotraphy
PTLC : Preparative thin layer chromatography

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.2 การสกัดสารบริสุทธิ์ออกจากก้านดีปลี

แสดงวิธีการสกัดโดยย่อดังแผนภาพที่ 1

แช่ผงก้านดีปลีแห้ง (1.5 กก.) ในเฮกเซน (5 ลิตร) เป็นเวลา 2 วัน กรองเอาส่วนที่เป็นสารละลายในเฮกเซนมาระเหยเอาตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ นำตัวทำละลายที่ระเหยได้กลับไปใช้ในการแช่ซ้ำใหม่อีก 2 ครั้ง ได้ส่วนสกัดหยาบก้านดีปลีโดยเฮกเซน (26.66 กรัม) แช่กากที่เหลือในไดคลอโรมีเทน และเมธานอล ตามลำดับ ด้วยปริมาณและวิธีการเดียวกับเฮกเซน ได้ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน (20.78 กรัม) และส่วนสกัดหยาบเมธานอล (67.18 กรัม)

ทำการทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายของส่วนสกัดหยาบเฮกเซน และส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน ที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ด้วยวิธีการเดียวกับการทดสอบเพื่อคัดเลือกพืชในหัวข้อ 2.5.1 ได้ผลดังตาราง 2.2

ตารางที่ 2.2 ระดับความเป็นพิษของส่วนสกัดหยาบเฮกเซน และไดคลอโรมีเทนของก้านดีปลีต่อการตายของลูกน้ำยุงลายวัย 3

ชนิดของสาร	ระดับความเป็นพิษ (ppm)	
	LC_{50}	LC_{95}
ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน	0.7785	1.319
ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน	1.646	7.564

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.2.1 การแยกสารจากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนเพื่อให้ได้ส่วนออกฤทธิ์

แบ่งส่วนสกัดหยาบเฮกเซนเป็นสองส่วน ส่วนที่ 1 หนัก 13.00 กรัม ส่วนที่สอง 10.66 กรัม นำส่วนที่ 1 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโต-กราฟฟีแบบรวดเร็ว ชะคอลัมน์ด้วยเฮกเซน, เฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน-อะซิโตน และอะซิโตน ตามลำดับ โดยค่อย ๆ เพิ่มสัดส่วนตัวทำละลายที่ผสมให้มีสภาพขั้วสูงขึ้นทีละน้อย ๆ ตรวจดูส่วนประกอบของสารส่วนที่ชะออกมาได้ด้วยโครมาโตกราฟฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography และ UV-Lamp) รวบรวมสารที่มีส่วนประกอบเหมือนกันไว้ด้วยกันได้สาร 13 ส่วนคือ F.1A-F.13A และผลึกรูปเหลี่ยมสีเหลืองออกเขียวของ RT.1 กับผลึกไม่มีสีเป็นแผ่นเล็ก ๆ ของ RT.3 ที่ยังไม่บริสุทธิ์นัก

ใช้วิธีการเดียวกันในการแยกส่วนสกัดหยาบเฮกเซน ส่วนที่ 2 ได้สาร 14 ส่วนคือ F.1B-F.14B และผลึกรูปเหลี่ยมสีเหลืองออกเขียวของ RT.1

ใช้โครมาโตกราฟฟีแผ่นบาง ตรวจและเปรียบเทียบส่วนที่แยกได้จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนทั้ง 2 ส่วนอีกครั้ง แล้วรวบรวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้ 7 ส่วนคือ F.1Hex-F.7Hex มีลักษณะและน้ำหนักดังตารางที่ 2.3 และได้ผลึกของ RT.1 ที่ยังไม่บริสุทธิ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.3 ลักษณะและน้ำหนักของ F.1Hex–F.7Hex ที่แยกได้จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีอย่างรวดเร็ว

ส่วนที่แยกได้	ลักษณะ	น้ำหนัก (กรัม)
F.1Hex	ของเหลวเกือบแข็งมีสีเหลืองออกขาวขุ่น และส่วนของเหลวเป็นน้ำมันสีเหลืองอ่อนใส	2.00
F.2Hex	ของเหลวเกือบแข็งสีเหลืองขุ่น ส่วนน้ำมันสีเหลืองเข้มเกือบเป็นสีส้ม	1.62
F.3Hex	ของเหลวค่อนข้างข้นสีเหลืองออกเขียว	4.37
F.4Hex	ของเหลวสีเขียวเข้มเกือบดำ	4.67
F.5Hex	ของเหลวสีเขียวเข้มเกือบดำ	0.83
F.6Hex	ของเหลวสีเขียวเข้ม	2.57
F.7Hex	ของเหลวสีเหลืองออกเขียว	0.23

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.2.1.1 การทำ RT.1 และ RT.3 ให้บริสุทธิ์

นำผลึก RT.1 ที่ได้จากการแยกส่วนสกัดหยาบเฮกเซนด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีทั้ง 2 ส่วน มาตกผลึกใหม่ โดยละลายผลึกในอะซิโตนจนหมดแล้วเติมเฮกเซนลงไปปริมาตรประมาณ 2 เท่า ของสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ ได้ผลึกรูปรอมบิกสีเหลืองอ่อนตกลงมา กรองผลึกแล้วทำให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก ได้ผลึก RT.1 (Piperine) 3.26 กรัม

จุดหลอมเหลว 128-129 °ซ (เอกสาร 15, 128-129 °ซ)

UV λ_{max}^{EtOH} nm (log ε) : 242 (4.09), 340 (4.46)

IR KBr ν_{max} cm^{-1} : 2940, 1639, 1583, 1510, 1495, 1445, 1255, 1195, 1135, 998, 925

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$ + TMS, δ ppm) : 7.40 (dddd, J = 14.4 Hz, 1H), 6.98 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 6.89 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 6.78 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.74 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.70 (dd, J = 14.4, 8.4 Hz, 1H), 6.44 (d, J = 14.4 Hz, 1H), 5.97 (S, 2H), 3.64 (br S, 2H), 3.53 (br S, 2H), 1.67 (m, 2H), 1.59 (m, 4H)

นำผลึก RT.3 ที่แยกได้จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนส่วนที่ 1 มาตกผลึกใหม่ด้วยวิธีการเดียวกับ RT.1 ได้ผลึก RT.3 (Guineensine) บริสุทธิ์ 32.8 มก.

จุดหลอมเหลว 112-113 °ซ (เอกสาร 28, 112-114 °ซ)

UV λ_{max}^{EtOH} nm (log ε) : 208 (4.49), 258 (4.71),

IR KBr ν_{max} cm^{-1} : 3310, 2925, 1660, 1630, 1620, 1545, 1510, 1495, 1445, 1260, 1000, 920

H^1 NMR (400 MHz, $CDCl_3$ + TMS, δ ppm) : 7.19 (dd, J = 15, 10 Hz, 1 H), 6.89 (d, J = 1.5 Hz, 1 H), 6.75 (dd, J = 8, 2 Hz, 1 H), 6.73 (d, J = 8 Hz,1 H), 6.28 (d, J =15.0 Hz, 1 H), 6.07 (m, 3 H), 5.93 (s, 2 H), 5.74 (d, J = 15 Hz, 1 H), 5.50 (br , 1 H), 3.16 (t, J = 6.6 Hz, 2 H), 2.16 (m, 4 H), 1.80 (m, 1 H), 1.62 (d, J = 12 Hz, 4H), 1.43 (m, 2 H), 1.33 (m, 2 H), 0.92 (d, J = 6.6 Hz, 6 H)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายของ F.1Hex-F.7Hex จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของก้านตีปลี

ส่วนที่ทดสอบ	จำนวนลูกน้ำยุงลายตาย (ตัว/20 ตัว)											
	0 ppm			0.5 ppm			1.0 ppm			2.5 ppm		
ซ้ำที่	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
F.1Hex	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F.2Hex	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F.3Hex	-	-	1	-	-	-	-	-	-	3	2	4
F.4Hex	-	-	1	10	6	8	20	20	20	20	20	20
F.5Hex	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
F.6Hex	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
F.7Hex	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.2.1.2 การทดสอบหาส่วนออกฤทธิ์จาก F.1Hex-F.7Hex

ทำการทดสอบฤทธิ์ F.1Hex-F.7Hex ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายด้วยวิธี immersion ใน 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกับหัวข้อ 2.5.1 ได้ผลดังตารางที่ 2.4

2.5.2.2 การแยกสารจากส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนเพื่อให้ได้ส่วนที่ออกฤทธิ์

แยกส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน 20.78 กรัม ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีแบบรวดเร็วโดยใช้ชนิดสารละลายที่ใช้ชะเช่นเดียวกันกับการแยกส่วนสกัดหยาบเฮกเซนได้ส่วนที่เป็นสารละลายคือ F.1DC-F.7DC มีลักษณะและน้ำหนักดังตาราง 2.5 และได้ผลึกสีเหลืองปนขาว ซึ่งเมื่อตรวจดูด้วยโครมาโตกราฟฟีแผ่นบาง และ UV-Lamp พบว่ามี 2 องค์ประกอบที่อยู่ใกล้กัน

ตารางที่ 2.5 ลักษณะและน้ำหนักของ F.1DC-F.7DC ที่แยกได้จากส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีอย่างรวดเร็ว

ส่วนที่แยกได้	ลักษณะ	น้ำหนัก (กรัม)
F.1DC	สารละลายสีเหลืองอ่อนใส	0.33
F.2DC	สารละลายสีเหลืองอ่อนใส	0.32
F.3DC	สารละลายสีเขียวออกเหลือง	4.44

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.5 (ต่อ)

ส่วนที่แยกได้	ลักษณะ	น้ำหนัก (กรัม)
F.4DC	สารละลายสีเขียวเข้มเกือบดำ	3.17
F.5DC	สารละลายสีเขียวออกน้ำตาลจาง	1.12
F.6DC	สารละลายสีเขียวใส	0.75
F.7DC	สารละลายสีเหลืองปนเขียวจาง	1.89

2.5.2.2.1 การทำผลึกที่ได้จากส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนให้บริสุทธิ์ ละลายผลึกที่ได้จากการชะคอลัมน์ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนในอะซิโตนจนหมดแล้วเติมเฮกเซนลงไป 2 เท่าของสารละลายทิ้งไว้ค้างคืน ได้ผลึกตกใหม่โดยผลึกละเอียดเล็ก ๆ สีขาวตกออกมาก่อน กรองแยกเอาผลึกส่วนนี้ออกทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโตตรอน (Chromatotron) และโครมาโตกราฟฟีของเหลวความดันปานกลาง (MPLC) โดยใช้สารละลาย 30 % เอธิลอะซิเตตในเฮกเซนเป็นตัวพา ได้ผลึกไม่มีสีของ RT.2 (Piperlonguminine) 11.3 มิลลิกรัม

จุดหลอมเหลว 160-161 °ซ (เอกสาร 15, 166-168 °ซ)

UV λ_{max}^{EtOH} nm (log ϵ) : 242 (4.071), 336 (4.35)

IR KBr ν_{max} cm^{-1} : 3280, 2950, 1645, 1618, 1550, 1505, 1490, 1440, 1258, 1040, 990, 925

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$ + TMS, δ ppm) : 7.36 (dd, J = 9.75, 15 Hz, 1H), 6.98 (d, J= 1.5 Hz, 1H), 6.88 (dd, J = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 6.79 (d, J = 15 Hz, 1H), 6.77 (d, J= 9.75 Hz, 1H), 6.66 (dd, J =15, 9.75 Hz, 1H), 5.98 (S, 2H), 5.92 (d, J = 15 Hz, 1H), 5.54 (br, 1H), 3.18 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.83 (m, 1H), 0.95 (d, J = 7.5 Hz, 6H)

ตั้งสารละลายที่เหลือจากการกรองเอา RT.2 ออกไว้ให้ตกผลึก ได้ผลึกสีเหลืองอ่อนของ RT.1 ตกผลึกใหม่อีกครั้งให้บริสุทธิ์ด้วยอะซิโตน: เฮกเซน = 1:2 โดยปริมาตรได้ RT.1 2.24 กรัม เก็บรวมไว้กับ RT.1 ที่แยกได้จากส่วนสกัดเฮกเซน

2.5.2.2.2 การทดสอบหาส่วนออกฤทธิ์จาก F.1DC-F.7DC

ใช้สาร F.1DC-F.7DC ส่วนละประมาณ 30 มิลลิกรัม นำไปทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 ppm พร้อมกับ F.1Hex-F.7Hex ได้ผลดังตาราง 2.6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายของ F.1DC-F.7DC จากส่วนสกัดทยาบไดคลอโรมีเทนของก้านดีปลี

ส่วนที่ทดสอบ / ซ้ำที่	จำนวนลูกน้ำยุงลายตาย (ตัว/20 ตัว)											
	0 ppm.			1 ppm.			3 ppm.			5 ppm.		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
F.1DC	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-
F.2DC	-	-	-	-	-	-	2	3	3	6	8	10
F.3DC	-	-	-	3	6	7	20	19	19	20	20	20
F.4DC	-	-	-	-	-	-	2	-	1	2	4	3
F.5DC	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
F.6DC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F.7DC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำข้อมูลที่ได้สำหรับ F.4Hex และ F.3DC ซึ่งเป็นส่วนออกฤทธิ์สูงสุดจากการทดสอบมาคำนวณหาค่า LC_{50} และ LC_{95} โดยทำ Probit log analysis ได้ผลดังตารางที่ 2.7

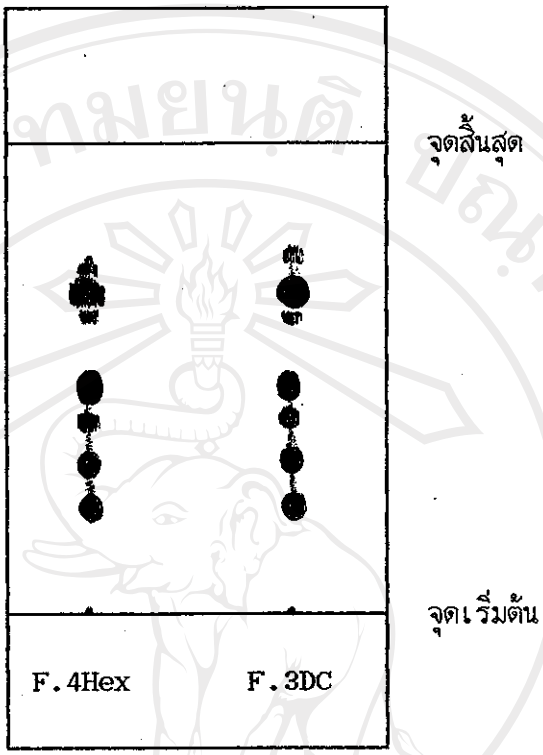
ตารางที่ 2.7 ระดับความเป็นพิษของ F.4Hex และ F.3DC ต่อการตายของลูกน้ำยุงลาย

ส่วนของสาร	LC_{50} (ppm)	LC_{95} (ppm)
F.4Hex	0.5482	4.67
F.3DC	1.317	2.712

ผลการตรวจสอบการเคลื่อนที่บนตัวดูดซับด้วย UV-Lamp โดยใช้โครมาโตกราฟฟีแผ่นบาง มีสารละลาย 30 % เอซิลอะซิเตตในเฮกเซนเป็นตัวพาของ F.4Hex และ F.3DC แสดงดังรูปที่ 2.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 2.1 การเคลื่อนที่ของ F.4 Hex และ F.3 DC บนโครมาโตกราฟีแผ่นบาง



รวมส่วนออกฤทธิ์ F.4Hex และ F.3DC เข้าด้วยกัน แล้วใช้สำหรับทดสอบกับยุงลายตัวเต็มวัย, การสลายตัวของสาร, เปรียบเทียบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงในบริเวณที่ร่มและกลางแจ้ง และสำหรับแยกให้ได้สารบริสุทธิ์

2.5.2.3 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนออกฤทธิ์

แยกส่วนออกฤทธิ์ (F.4Hex + F.3DC) ด้วยคอลัมน์โครมาโต-กราฟีแบบรวดเร็ว ชะคอลัมน์ด้วยเฮกเซน, เฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน-อะซิโตน และอะซิโตน ตามลำดับ ตรวจดูส่วนประกอบของส่วนที่ชะออกด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบาง และ UV-Lamp

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รวมส่วนที่มีส่วนประกอบเหมือนกันไว้ด้วยกันได้ 17 ส่วนคือ AF.1a-AF.17a และได้ผลึกสีเหลืองปนขาวของ RT.1 และ RT.2 ปนอยู่ด้วยกัน

แยกของผสม RT.1 + RT.2 ด้วยการตกผลึกใหม่ในอะซิโตน : เฮกเซนอัตราส่วน 1:2 โดยปริมาตร ผลึกละเอียดสีขาวของ RT.2 ตกออกมาก่อน กรองและนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโตตรอนและ MPLC มี 30 % เอธิลอะซิเตตในเฮกเซนเป็นตัวพาได้ผลึก RT.2 บริสุทธิ์ 5.4 มิลลิกรัม เก็บรวมไว้กับ RT.2 ที่แยกได้ก่อน

สารละลายที่เหลือจากการกรองแยก RT.2 ออก ตั้งทิ้งไว้ให้ RT.1 ตกผลึกกรองและนำไปตกผลึกซ้ำด้วยอะซิโตน : เฮกเซน 1:2 โดยปริมาตร ได้ผลึกรอมบิกสีเหลืองอ่อนของ RT.1 ตกลงมา 33.1 มิลลิกรัม เก็บรวมไว้กับผลึก RT.1 ที่แยกได้ก่อน

รวมส่วน AF.5a-AF.17a เข้าด้วยกันได้สารหนัก 5.28 กรัม นำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีแบบรวดเร็วครั้งที่ 2 โดยใช้ขนาดของคอลัมน์, ชนิดและปริมาณตัวดูดซับ และตัวทำละลายในการชะเช่นเดียวกับการชะครั้งแรก ตรวจดูส่วนที่ชะออกด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบาง และ UV-Lamp รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้ 8 ส่วนคือ AF.5b-AF.17b และได้ผลึกสีเหลืองอ่อนของ RT.1 และผลึกไม่มีสีของ RT.3 ซึ่งเมื่อนำไปตกผลึกใหม่ในอะซิโตน : เฮกเซน 1:2 โดยปริมาตร ได้ผลึก RT.1 และ RT.3 บริสุทธิ์ หนัก 41.6 มิลลิกรัม และ 28.3 มิลลิกรัม ตามลำดับ

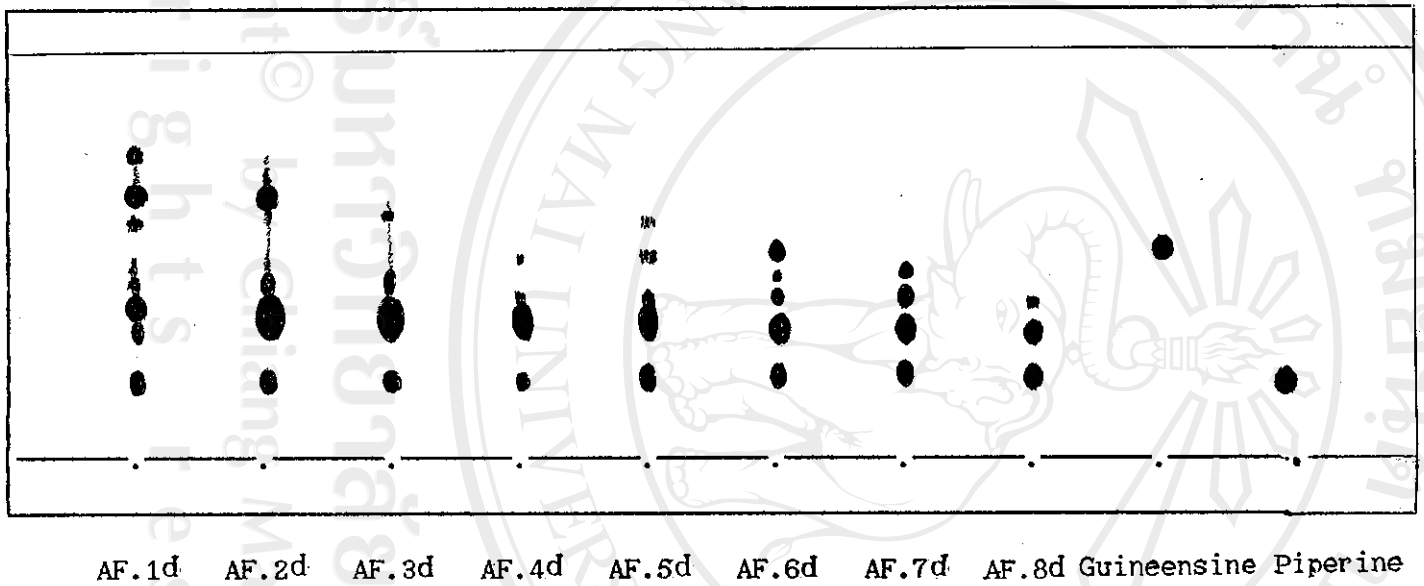
รวมส่วน AF.1a-AF.4a และ AF.5b-AF.15b เข้าด้วยกันได้สาร 5.24 กรัม แยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีแบบรวดเร็วครั้งที่ 3 ด้วยวิธีการเดียวกับที่ผ่านมาได้ผลึกของ RT.3 ซึ่งเมื่อตกผลึกใหม่ให้บริสุทธิ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หนัก 15.7 มิลลิกรัม และได้ AF.1c-AF.15c 15 ส่วน โดยแต่ละส่วนมีสารที่เป็นส่วนประกอบเหมือนกัน เมื่อตรวจดูด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบางและ UV-Lamp

แยก AF.1c-AF.15c หนัก 3.0 กรัม อีกครั้งด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบรวดเร็ว ครั้งที่ 4 ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการชะเช่นเดียวกับวิธีการที่ผ่านมา ตรวจดูส่วนที่ชะออกมาได้ด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบางและ UV-Lamp รวบส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้ AF.1d-AF.8d ซึ่งมีลักษณะการเคลื่อนที่บนตัวดูดซับของโครมาโตกราฟีแผ่นบางเปรียบเทียบกับ Piperine และ Guineensine บริสุทธิ์ ดังรูปที่ 2.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 2.2 การเคลื่อนที่บนตัวดูดซับของโครมาโตกราฟีแผ่นบางของ AF.1d-AF.8d เปรียบเทียบกับ Piperine และ Guineensine บริสุทธิ์ โดยมีสารละลาย 30 % เอธิลอะซิเตตในเฮกเซนเป็นตัวพา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.2.3.1 การแยก RT.4 (Cinnamic acid piperidide)

ทำการแยก AF.1d-AF.5d ทีละส่วนด้วยโครมาโตตรอนอย่างระมัดระวังเพื่อให้ได้ส่วนเหนือ Guineensine และส่วนตั้งแต่ Guineensine ถึง Piperine ออกจากกัน โดยใช้ 30 % เอธิลอะซิเตตในเฮกเซนเป็นตัวพา

เมื่อตรวจดูส่วนเหนือ Guineensine ที่แยกได้ด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบาง และ UV-Lamp อีกครั้ง พบสารอีกตัวหนึ่งลักษณะที่ปรากฏให้เห็นจากการส่องดูด้วย UV-Lamp ค่อนข้างบริสุทธิ์ และอยู่ต่ำลงมาในช่วงระหว่าง Guineensine กับ Piperine จึงแยกส่วนนี้อีกครั้งด้วยโครมาโตตรอน ใช้ 30 % เอธิลอะซิเตตในเฮกเซนเป็นตัวพา ทิ้งไว้ให้ตกผลึกได้สาร RT.4 เป็นผลึกละเอียดสีขาวหนัก 10.6 มิลลกรัม

จุดหลอมเหลว 108-111 °ซ

UV λ_{max}^{EtOH} nm (log ε) : 218 (6.09), 276 (6.20)

IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 2940, 2855, 1640, 1585, 1460, 1440, 1245, 985, 760

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$ + TMS, δ ppm) 7.63 (d, J = 15.2 Hz, 1 H), 7.53 (m, 1 H), 7.50 (d, J = 2 Hz, 1 H), 7.35 (dd, J = 2, 5 Hz, 3 H), 6.90 (d, J = 15 Hz, 1 H), 3.63 (br, 4 H), 1.67 (m, 6 H),

MS m/e (re.int.) : 138 (31.64), 131 (100), 103 (41.8), 84 (37.6), 77 (25.1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารที่มีส่วนประกอบอยู่ระหว่าง Guineensine-Piperine ที่แยกได้จาก AF.1d-AF.5d นำมาแยกด้วยโครมาโตกราฟฟีแผ่นบาง (Preparative TLC) ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ โดยมีสารละลาย 30 % เอธิล-อะซิเตตในเฮกเซนเป็นตัวพา ปล่อยให้สารละลายผ่านตัวดูดซับจากส่วนล่างขึ้นไปส่วนบน 2 ครั้ง ตรวจดูการแยกของสารด้วย UV-lamp ขูดเอาซิลิกาเจลที่มีสารที่ต้องการในแต่ละแถบออกมาแช่ในอะซิโตน คนด้วยแท่งคนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) อย่างน้อย 1 ชั่วโมง กรองแยกเอาส่วนที่เป็นสารละลายในอะซิโตนออกมา ระเหยจนเกือบแห้ง ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก ได้ผลึกสีขาวของ RT.4 ปริมาณ 6.5 มิลลิกรัม และอีกส่วนหนึ่งมีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองเข้ม เมื่อตรวจดูด้วยโครมาโตกราฟฟีแผ่นบางและ UV-Lamp พบว่ามีส่วนของ Piperine และสารอีกตัวหนึ่งที่อยู่ติดกันเหนือ Piperine เก็บส่วนนี้ไว้เพื่อแยกให้บริสุทธิ์อีกครั้ง

2.5.2.3.2 การแยก RT.6 (Retrofractamide C) และ RT.7 (Pipercide)

แยก AF.6d-AF.8d ทีละส่วนด้วยโครมาโตกราฟฟีแผ่นบาง (Preparative TLC) โดยใช้สารละลายที่เป็นตัวพาเช่นเดียวกับที่ใช้ในการแยกส่วน Guineensine-Piperine ของ AF.1d-AF.5d จากการตรวจดูด้วย UV-Lamp ได้สารแยกออกมา 4 แถบ เมื่อขูดแยกแต่ละแถบออกจากกันแล้วนำมาแช่ในอะซิโตน กรองแยกซิลิกาเจลออก ระเหยตัวทำละลายจนเกือบแห้ง ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึกได้ผลึกไม่มีสีของ RT.3 ปริมาณ 5.2 มิลลิกรัม, ผลึกเป็นเกล็ดบางไม่มีสีของ RT.6 (Retrofractamide C) 8.4 มิลลิกรัม, ผลึกรูปเข็มไม่มีสีของ RT.7 (Pipercide) 15.5 มิลลิกรัม และส่วนที่เป็นน้ำมันหนืดสีเหลืองเข้มใสที่ยังไม่บริสุทธิ์อีกปริมาณหนึ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

RT.6 (Retrofractamide C)

จุดหลอมเหลว 118-120 °ซ (เอกสาร 31, 120 °ซ)

UV λ_{max}^{EtOH} nm (log ε) : 210(4.40), 261(4.14)

IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3300, 2940, 2910, 1660, 1620, 1545, 1500, 1490, 1440, 1255, 1040, 960, 920

^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$ + TMS, δ ppm) : 6.87 (d, J = 1.5 Hz, 1 H), 6.80 (dd, J = 8.5, 1.5 Hz, 1 H), 6.73 (d, J = 4.5 Hz, 2 H), 6.29 (dd, J = 15.5, 4.5 Hz, 1 H), 6.07 (ddd, J = 22.8 Hz, 1 H), 5.93 (S, 2 H), 5.75 (tt, J = 1.5, 15.5 Hz, 1 H), 5.48 (br, 1 H), 3.15 (t, J = 6.5 Hz, 2 H), 2.18 (m, 4 H), 1.81 (m, 1 H), 1.5 (m, 4H), 0.95 (d, J = 5.5 Hz, 6 H)

RT.7 (Pipercide)

จุดหลอมเหลว 116-118 °ซ (เอกสาร 50, 114-115 °ซ)

UV λ_{max}^{EtOH} nm (log ε) : 204(4.44), 260(4.34)

IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3300, 2900, 1650, 1620, 1545, 1500, 1485, 1440, 1255, 1040, 960, 920

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$ + TMS, δ ppm) : 7.18 (ddd, J = 3, 9 Hz, 1 H), 6.89 (S, 1 H), 6.74 (S, 2 H), 6.28 (d, J = 16 Hz, 1 H), 6.05 (m, 3 H), 5.93 (S, 2 H), 5.74 (d, J = 15, 1 H), 5.44 (br, 1 H), 3.17 (t, J = 6 Hz, 2 H), 2.17 (m, 4 H), 1.80 (m, 1 H), 1.47 (m, 4H), 0.92 (d, J = 7 Hz, 6 H)

2.5.2.3.3 การแยก RT.5 (Mixture)

รวมส่วนที่เป็นน้ำมันหนืดสีเหลืองใสที่แยกได้จาก Preparative TLC ของ AF.1d-AF.5d และ AF.6d-AF.8d เข้าด้วยกัน แยกอีกครั้งด้วย โครมาโตตรอนใช้สารละลาย 30 % เอธิลอะซิเตตในเฮกเซนเป็นตัวพา ได้สารที่อยู่ติดกับ Piperine ด้านบนแยกออกมาคือ RT.5 ปริมาณ 127.0 มิลลิกรัม จากการตรวจดูด้วยโครมาโตกราฟฟีแผ่นบาง และ UV-Lamp น่าจะเป็นสารบริสุทธิ์ แต่ข้อมูลจาก ^{1}H NMR (400 MHz) พบว่าเป็นของผสมของสารหลายตัว เก็บสารส่วนนี้ไว้สำหรับทดสอบฤทธิ์กับลูกน้ำยุง

เนื่องจากปริมาณสารบริสุทธิ์บางตัวที่แยกได้จากก้านดีปลีครั้งแรกมีน้อย จึงทำการสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากก้านดีปลีอีกครั้งเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ปริมาณเพียงพอที่จะใช้ในการทดสอบฤทธิ์ และการหาโครงสร้างทางเคมี โดยใช้ก้านดีปลีสดที่เก็บจากอำเภอแม่สาย จังหวัดเชียงราย ตากและบดได้น้ำหนัก 1.4 กิโลกรัม มาทำการสกัดด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟฟีดังเช่นครั้งแรก เก็บสารบริสุทธิ์ที่แยกได้รวมกับครั้งแรกได้น้ำหนักรวมทั้งหมดโดยประมาณ ดังตารางที่ 2.8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.8 น้ำหนักของสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากก้านดีปลี

ชนิดของสารบริสุทธิ์	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)		
	สกัดครั้งที่ 1	สกัดครั้งที่ 2	รวม
RT.1	6240.0	-	6240.0
RT.2	16.7	-	16.7
RT.3	82.0	38.0	100.0
RT.4	17.1	-	17.1
RT.5	127.0	-	127.0
RT.6	8.4	10.0	18.4
RT.7	15.5	5.0	20.5

2.5.2.4 การหาอัตราการเคลื่อนที่ (Rf) ของสารที่แยกได้

นำสารบริสุทธิ์ RT.1-RT.4, RT.6, RT.7 และ RT.5 (Mixture) ที่แยกได้มาหาค่า R_f (Rate of flow) ด้วยโครมาโตกราฟฟีแผ่นบาง โดยมีซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ สารละลาย 30 % เอธิลอะซิเตตในเฮกเซนเป็นตัวพาได้ผลดังตารางที่ 2.9

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.9 ค่า Rf ของ RT.1- RT.7 ที่แยกได้จากก้านดีปลี

สาร	ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (ซม.)	ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (ซม.)	$Rf = \frac{\text{ระยะที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$
RT.1	2.6	6.8	2.6/6.8 = 0.3824
RT.2	3.15	6.8	3.15/6.8 = 0.4632
RT.3	4.85	6.8	4.85/6.8 = 0.7132
RT.4	3.80	6.8	3.80/6.8 = 0.5588
RT.5	3.35	6.8	3.35/6.8 = 0.4926
RT.6	3.90	6.8	3.90/6.8 = 0.5735
RT.7	4.35	6.8	4.35/6.8 = 0.6397

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.3 การทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงของ RT.1-RT.7 ที่แยกได้จากก้านตีปลี

นำ RT.1-RT.7 มาทดสอบอย่างคร่าว ๆ กับลูกน้ำยุงลายวัย 3 จำนวน 10 ตัว ในน้ำ 100 ลบ.ซม. ต่อสารละลายที่ใช้ทดสอบ 1 ความเข้มข้น พบว่า RT.1, RT.2, RT.4 และ RT.5 ไม่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายตายทั้งหมดที่ 100 ppm โดยที่ RT.2 และ RT.4 ไม่แสดงฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายที่ 50 ppm ส่วน RT.3, RT.6 และ RT.7 สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ทั้งหมดที่ 20 ppm, 5 ppm และ 5 ppm ตามลำดับ จึงนำ RT.3, RT.6, RT.7 มาทดสอบหาระดับความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลาย RT.1 มีฤทธิ์ต่ำ แต่นำมาทดสอบด้วยเพราะมีปริมาณสารมากเพียงพอ

การทดสอบหาระดับความเป็นพิษของ RT.1, RT.3, RT.6 และ RT.7 ต่อการตายของลูกน้ำยุงลาย ทำดังนี้:-

เตรียม Stock Solution ของ RT.1 เข้มข้น 0.2 % (2000 ppm) โดยชั่ง RT.1 หนัก 200 มิลลิกรัม ใส่อะซิโตนลงไปปริมาณน้อยที่สุดที่จะทำให้สารละลายหมด แล้วใส่ TWEEN 80 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวลงไปด้วยอัตราส่วนสาร : TWEEN 1:50 โดยน้ำหนัก อุ่นให้สารทั้งหมดเข้ากัน และให้อะซิโตนระเหยออกจนหมด เหลือแต่ TWEEN ซึ่งจะเคลือบสารไว้ให้สามารถละลายน้ำได้ เทสารละลายใน TWEEN ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ซม^3 เติมน้ำกลั่นลงไปจนถึงขีดปริมาตรที่กำหนด

ด้วยวิธีการเดียวกันเตรียม Stock Solution ของ RT.3 เข้มข้น 0.02 % (200 ppm) ปริมาตร 100 ซม^3 โดยใช้ RT.3 หนัก 20 มิลลิกรัม สำหรับ Stock Solution ของ RT.6 และ RT.7 เตรียมให้มีความเข้มข้น 0.005 % (50 ppm) ปริมาตร 100 ซม^3 โดยใช้ RT.6 และ RT.7 อย่างละ 5 มิลลิกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารที่ใช้ทดสอบ : สารละลาย RT.1, RT.3, RT.6 และ RT.7 ใน TWEEN 80 อัตราส่วน 1:50 โดยน้ำหนัก ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยทดสอบสารละลาย TWEEN 80 ในน้ำเข้มข้น 1 % (10000 ppm) พบว่าไม่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายใน 24 ชั่วโมง

สัตว์ที่ใช้ทดสอบ : ลูกน้ำยุงลายวัย 3 และวัย 4 ระยะแรก เลือกที่มีขนาดใกล้เคียงกันได้จากการเพาะเลี้ยงจากไข่ ดังวิธีการข้อ 2.2.1 จำนวน 20 ตัว : 1 ความเข้มข้น : 1 ซ้ำ

วิธีการที่ใช้ทดสอบ : การแช่ในสารละลาย (immersion) ใช้สารละลายในน้ำ 200 ซม^3 : 1 ความเข้มข้น : 1 ซ้ำ

จำนวนซ้ำที่ใช้ : 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ความเข้มข้น

ความเข้มข้นควบคุม : 0 ppm เตรียมโดยใช้ TWEEN 80 ปริมาณเท่ากับที่มีอยู่ในสารละลายความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในแต่ละการทดสอบ ละลายน้ำจนได้สารละลาย 100 ซม^3

เวลาที่ใช้ทดสอบ : 24 ชั่วโมง

สถานที่ทดสอบ : ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ผลการทดสอบ : แสดงในตารางที่ 2.10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.10 ผลการทดสอบฤทธิ์ RT.1, RT.3, RT.6 และ RT.7 ต่อการตายของลูกน้ำยุงลายวัย 3

สาร	ความเข้มข้น (ppm.)	จำนวนตาย (ตัว/จำนวนที่ใช้ทดสอบ)			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	รวม
RT.1	0	0/20	0/20	0/20	0/60
	20	1/20	0/20	2/20	4/60
	40	5/20	5/20	2/20	12/60
	60	12/20	8/20	9/20	29/60
	80	13/20	12/20	12/20	37/60
	100	20/20	15/20	20/20	55/60
RT.3	0	0/20	0/20	0/20	0/60
	5.0	15/20	12/20	15/20	42/60
	7.5	17/20	15/20	15/20	47/60
	10.0	17/20	19/20	17/20	53/60
	12.5	17/20	20/20	18/20	55/60
	15.0	19/20	19/20	20/20	58/60

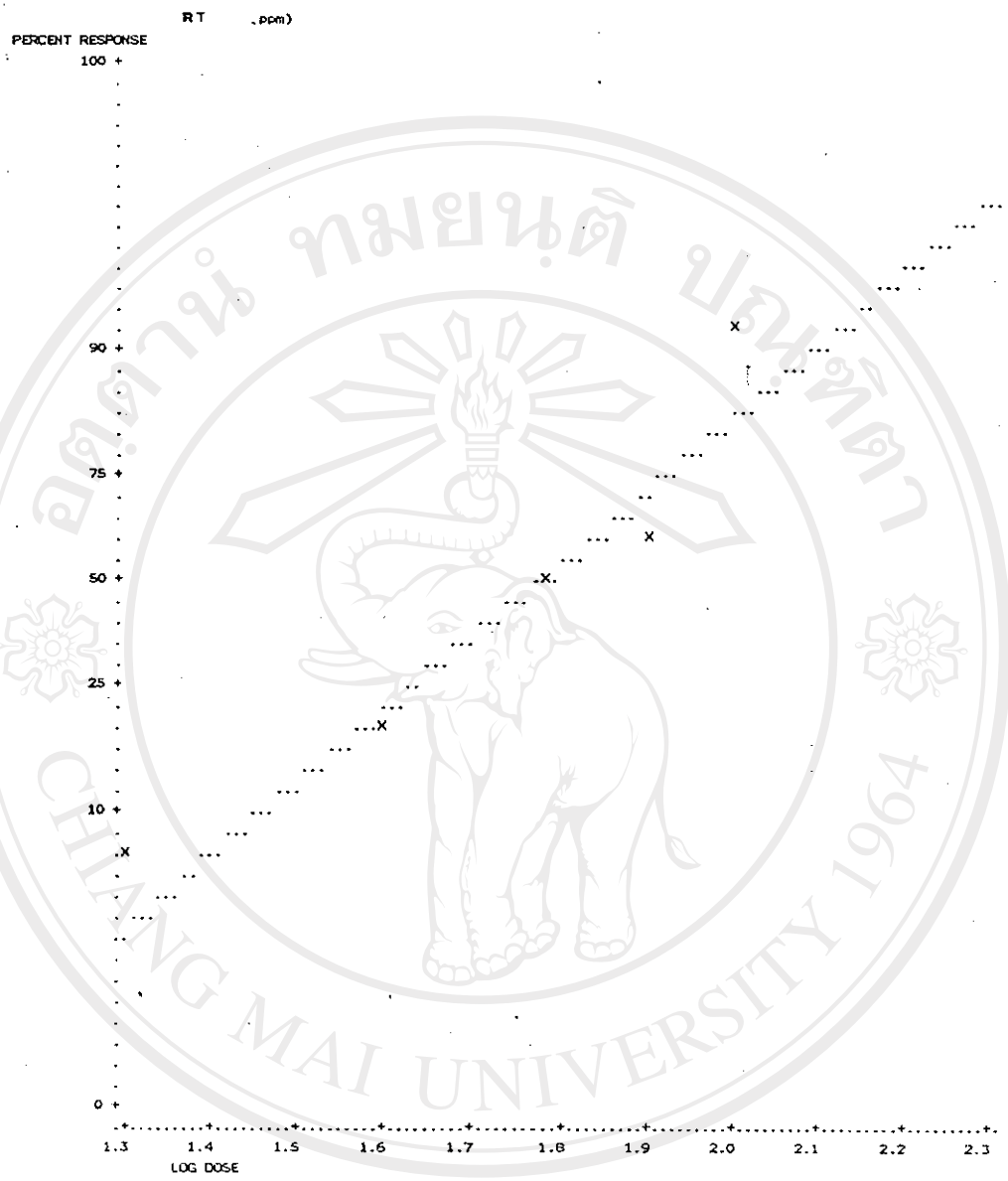
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.10 (ต่อ)

สาร	ความเข้มข้น (ppm)	จำนวนตาย (ตัว/จำนวนที่ใช้ทดสอบ)			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	รวม
RT.6	0	0/20	0/20	0/20	0/60
	0.25	1/20	1/20	2/20	4/60
	0.5	8/20	7/20	14/20	29/60
	1.0	16/20	16/20	14/20	46/60
	2.0	20/20	17/20	19/20	56/60
	3.0	20/20	20/20	20/20	60/60
RT.7	0	0/20	0/20	0/20	0/60
	0.25	8/20	3/20	6/20	17/60
	0.5	8/20	10/20	11/20	29/60
	1.0	13/20	16/20	12/20	41/60
	2.0	13/20	16/20	17/20	46/60
	4.0	17/20	16/20	18/20	51/60

นำข้อมูลที่ได้จากตาราง 2.10 มาคำนวณหาระดับความเป็นพิษ (LC_{50} และ LC_{99}) โดยใช้วิธี Probit log analysis ได้ผลดังแสดงในรูป 2.3-2.6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ACTUAL DOSE	LOG DOSE	NUMBER TESTED	NUMBER DEAD	PERCENT RESPONSE	EXPECTED RESPONSE
20.00	1.3010	60	4	6.67	3.51
40.00	1.6021	60	12	20.00	22.65
60.00	1.7782	60	29	48.33	49.79
80.00	1.9031	60	37	61.67	70.20
100.00	2.0000	60	55	91.67	82.18

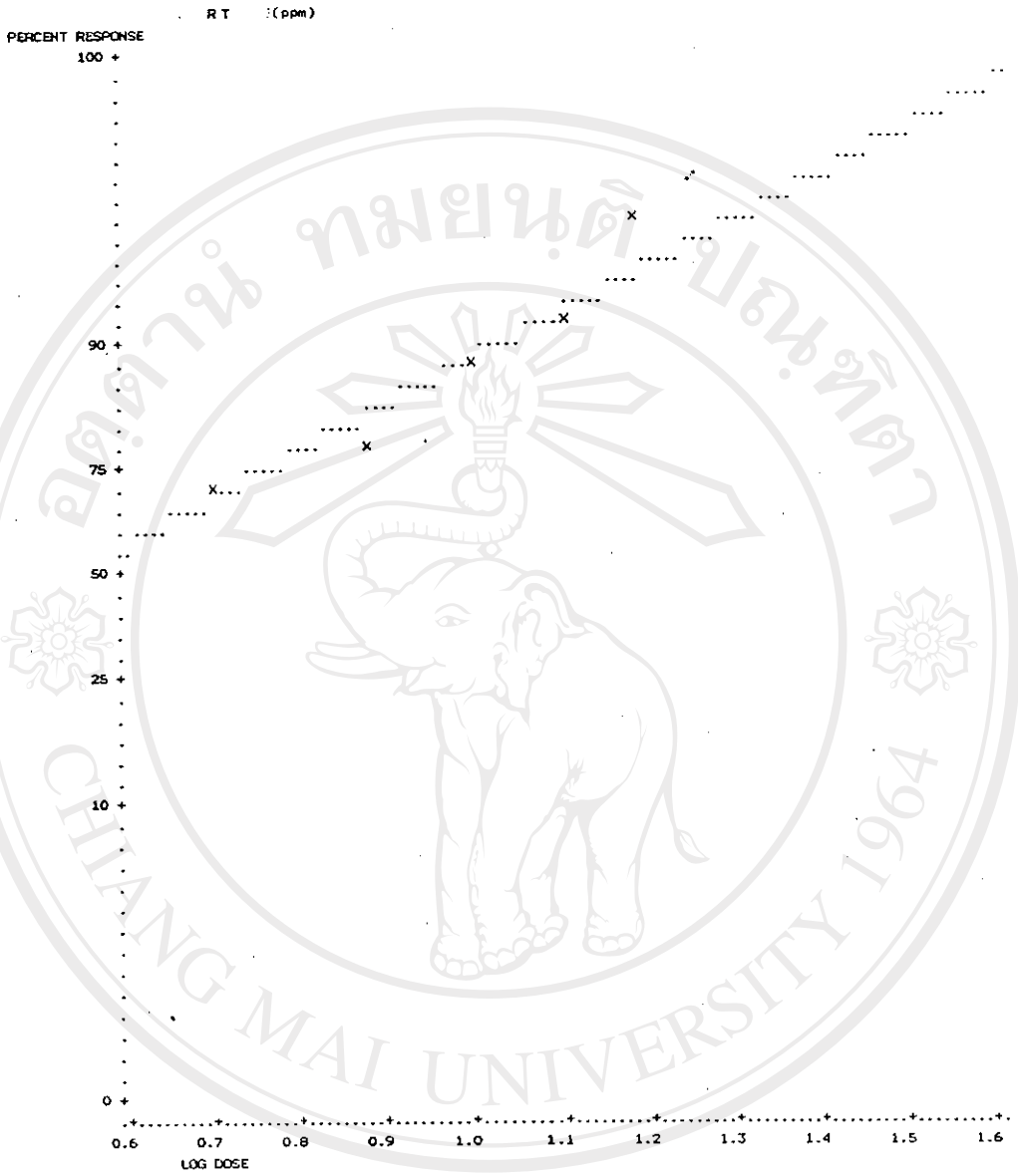
*** DATA ASSUMED TO BE BINOMIAL ***

*** HETEROGENEITY FACTOR INCLUDED IN S.E.S DUE TO SIGNIFICANT LACK OF FIT ***

N	L.D.(N)	S.E.	ANTILOG L.D.	95% CONF. LIMITS	
50	1.7794	0.0335	60.17	43.07	80.87
99	2.4427	0.1322	277.16	150.90	3502.35

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 2.3 : แสดงการคำนวณหา LC_{50} และ LC_{99} ของ RT.1



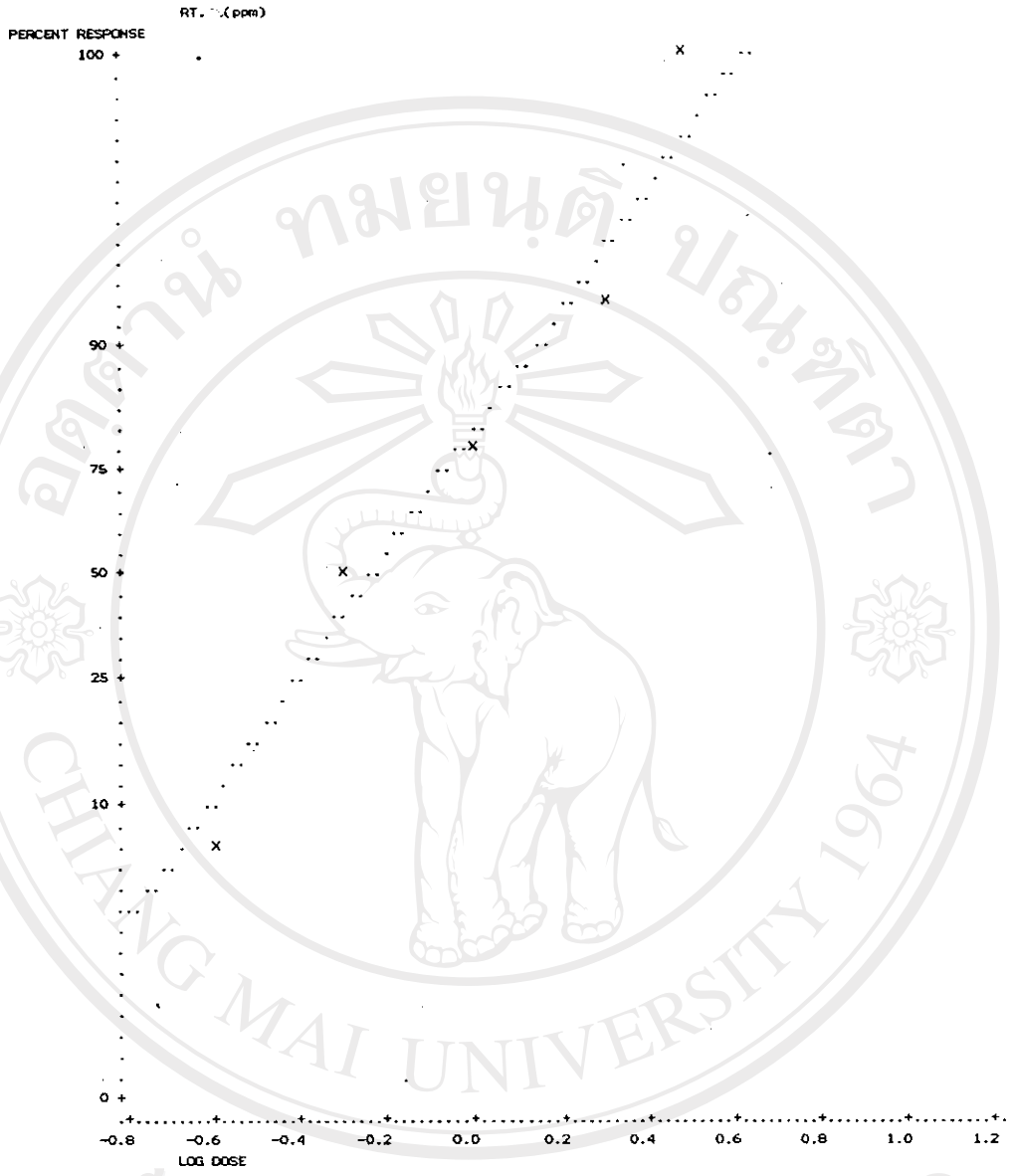
ACTUAL DOSE	LOG DOSE	NUMBER TESTED	NUMBER DEAD	PERCENT RESPONSE	EXPECTED RESPONSE
5.000	0.6990	60	42	70.00	67.48
7.500	0.8751	60	47	78.33	81.91
10.000	1.0000	60	53	88.33	88.74
12.500	1.0969	60	55	91.67	92.37
15.000	1.1761	60	58	96.67	94.50

*** DATA ASSUMED TO BE BINOMIAL ***

N	* L.D.(N)	S.E.	ANTILOG L.D.	95% CONF. LIMITS	
50	0.5343	0.0878	3.422	1.729	4.559
99	1.5710	0.1604	37.238	22.417	134.817

รูปที่ 2.4 : แสดงการคำนวณหา LC_{50} และ LC_{99} ของ RT.3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



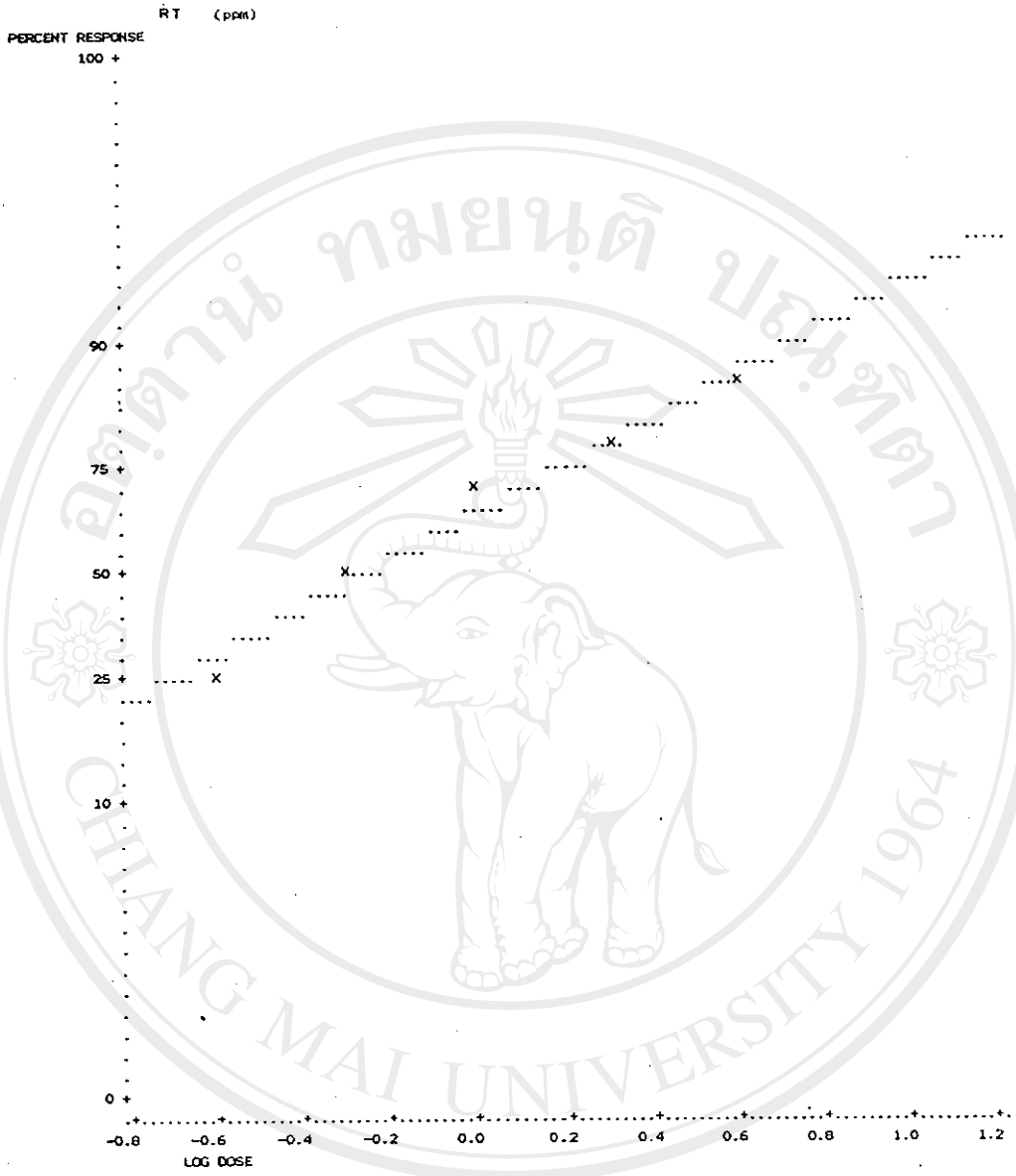
ACTUAL DOSE	LOG DOSE	NUMBER TESTED	NUMBER DEAD	PERCENT RESPONSE	EXPECTED RESPONSE
0.2500	-0.6021	60	4	6.67	10.56
0.5000	-0.3010	60	29	48.33	40.51
1.0000	0.0000	60	46	76.67	79.71
2.0000	0.3010	60	56	93.33	95.77
3.0000	0.4771	60	60	100.00	98.44

*** DATA ASSUMED TO BE BINOMIAL ***

N	L.D.(N)	S.E.	ANTILOG L.D.	95% CONF. LIMITS	
50	-0.2351	0.0301	0.5820	0.5045	0.6662
99	0.5543	0.0873	3.5838	2.5791	5.8781

รูปที่ 2.5 : แสดงการคำนวณหา LC_{50} และ LC_{99} ของ RT.6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ACTUAL DOSE	LOG DOSE	NUMBER TESTED	NUMBER DEAD	PERCENT RESPONSE	EXPECTED RESPONSE
0.2500	-0.6021	60	17	28.33	31.33
0.5000	-0.3010	60	29	48.33	47.20
1.0000	0.0000	60	41	68.33	63.65
2.0000	0.3010	60	46	76.67	77.43
4.0000	0.6021	60	51	85.00	87.05

*** DATA ASSUMED TO BE BINOMIAL ***

M	L.D.(M)	S.E.	ANTILOG L.D.	95% CONF. LIMITS	
50	-0.2508	0.0633	0.5613	0.4010	0.7317
99	1.8061	0.2881	63.9867	23.2528	397.4833

รูปที่ 2.6 : แสดงการคำนวณหา LC_{50} และ LC_{99} ของ RT.7

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.4 การทดสอบหาระดับความเป็นพิษของส่วนออกฤทธิ์ F.4 Hex ต่อการตายของ
ยุงลายตัวเต็มวัย

ทำการทดสอบโดยใช้ภาชนะทรงกระบอกขนาดมาตรฐานของ WHO ปลายมีฝาปิด-เปิดทั้ง 2 ด้าน ตรงกลางมีลิ้นปิดเปิดให้ทั้งสองด้านติดต่อถึงกัน เตรียมสารละลาย F.4 Hex ในอะซิโตนความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 ppm นำกระดาษกรองจุ่มสารละลายให้เปียกแล้วบรรจุกระดาษลงในกระบอกที่ปลายด้านหนึ่ง ให้กระดาษแนบติดกับผิวด้านในของกระบอก ปล่อยยุงลายตัวเต็มวัยที่อยู่ในกระบอกอีกด้านหนึ่งให้เข้ามายังด้านที่มีกระดาษกรองชุบสาร บันทึกจำนวนยุงที่ตายภายใน 24 ชั่วโมง เนื่องจากการสัมผัสกับสารโดยตรง นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่า LC_{50}, LC_{95} และ LC_{99} ได้ผลดังตารางที่ 2.11

ตารางที่ 2.11 การทดสอบฤทธิ์ของ F.4 Hex ต่อการตายของยุงลายตัวเต็มวัยโดย
ทางสัมผัส

ความเข้มข้น (ppm)	จำนวนตาย (ตัว/60 ตัว)	% การตาย	ระดับความเป็นพิษ (ppm)		
			LC_{50}	LC_{95}	LC_{99}
0	2	0	119.9	198.9	246.0
50	2	0			
100	17	25.86			
150	49	81.04			
200	56	93.10			

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.5 การทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์ของส่วนออกฤทธิ์ (F.4 Hex + F.3 DC) ต่อ การตายของลูกน้ำยุงลาย (Aedes aegypti) และลูกน้ำยุงรำคาญ (Culex quinguefasciatus) ในที่ร่มและกลางแจ้ง

สารที่ใช้ทดสอบ : ส่วนออกฤทธิ์ (F.4 Hex + F.3 DC) ในรูปของสารละลายมีอะซิโตนเป็นตัวทำละลายความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 ppm

ความเข้มข้นควบคุม : 0 ppm, ใช้สารละลายอะซิโตนในน้ำเข้มข้น 2 ppm

สัตว์ที่ใช้ทดสอบ : ลูกน้ำยุงลาย (Aedes aegypti) และลูกน้ำยุงรำคาญ (Culex quinquefasciatus) วัย 3 ขนาดเท่า ๆ กัน ทำการเพาะเลี้ยงที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 20 ตัว : 1 ความเข้มข้น : 1 ซ้ำ

วิธีการที่ใช้ทดสอบ : การแช่ในสารละลาย (immersion) ใช้สารละลายในน้ำ 200 ซม^3 : 1 ความเข้มข้น : 1 ซ้ำ

จำนวนซ้ำที่ใช้ : 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ความเข้มข้น

เวลาที่ใช้ทดสอบ : 24 ชั่วโมง

สถานที่ทดสอบ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยทำในห้องปฏิบัติการและบริเวณกลางแจ้งที่มีแสงแดดส่องถึง

ระดับความเป็นพิษ : ทำ Probit log analysis คำนวณค่า LC_{50} และ LC_{95} จากข้อมูลที่ได้จากการทดสอบ

ผลการทดสอบ : แสดงในตารางที่ 2.12

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.12 ผลการทดลองเปรียบเทียบฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงของส่วนออกฤทธิ์ (F.4 Hex + F.3 DC) ในที่ร่มและกลางแจ้ง

ชนิดของลูกน้ำยุง	สภาวะ	จำนวนตายที่ความเข้มข้น (ppm)				ระดับความเป็นพิษ (ppm)	
		0	0.5	1	2	LC_{50}	LC_{95}
- Culex quinquefasciatus	ที่ร่ม	4/60	30/60	56/60	58/60	0.4979	1.397
	กลางแจ้ง	3/60	3/60	44/60	58/60	0.8820	1.5840
- Aedes aegypti	ที่ร่ม	0/60	12/60	56/60	60/60	0.6413	1.0410
	กลางแจ้ง	1/60	1/60	6/60	48/60	1.5410	2.5810

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.6 การทดสอบการสลายตัวของส่วนออกฤทธิ์ (F.4 Hex + F.3 DC) ในช่วงเวลาต่าง ๆ

สารที่ใช้ทดสอบ : สารละลายของส่วนออกฤทธิ์ (F.4 Hex + F.3 DC) ในอะซิโตนความเข้มข้นในหน่วย ppm

สัตว์ที่ใช้ทดสอบ : ลูกน้ำยุงลายวัย 3 และตัวเต็มวัยยุงลาย

วิธีการที่ใช้ทดสอบ : - การแช่ในสารละลาย (immersion) สำหรับลูกน้ำโดยใช้ลูกน้ำ 1 ตัว ต่อสารละลาย 10 ซม^3

- การตายจากการสัมผัส สำหรับตัวเต็มวัยโดยใช้กล่องทดสอบขนาดมาตรฐานของ WHO ด้วยวิธีการเดียวกับหัวข้อ 2.5.4

จำนวนซ้ำที่ใช้ : 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ความเข้มข้น

เวลาที่ใช้ทดสอบ : - 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน สำหรับลูกน้ำยุงโดยเมื่อครบกำหนดเวลาในแต่ละช่วงจะเปลี่ยนลูกน้ำชุดใหม่ลงไปแทนในสารละลายเดิม

- 4, 16 และ 24 ชั่วโมง สำหรับตัวเต็มวัย โดยเมื่อครบกำหนดเวลาแต่ละช่วงจะเปลี่ยนตัวเต็มวัยชุดใหม่ปล่อยเข้าไปให้สัมผัสกับสารละลายเดิม

สถานที่ทดสอบ : ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผลการทดสอบ : แสดงด้วยค่า LC_{50} และ LC_{95} ดังตารางที่ 2.13

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.13 ระดับความเป็นพิษของส่วนออกฤทธิ์ (F.4 Hex + F.3 DC) ในการฆ่าลูกน้ำและตัวเต็มวัยยุงลายในช่วงเวลาต่าง ๆ

ชนิดของยุง	ช่วงเวลาที่ใช้ทดสอบ	ระดับความเป็นพิษ (ppm)	
		LC_{50}	LC_{95}
ลูกน้ำยุงลายวัย 3	1 วัน	0.6413	1.0410
	2 วัน	2.584	10.270
	3 วัน	1.681	3.228
	4 วัน	1.660	2.611
	5 วัน	1.924	3.186
ตัวเต็มวัยยุงลาย	4 ชั่วโมง	84.9	1984.0
	16 ชั่วโมง	568.4	1753.0
	24 ชั่วโมง	424.3	2227.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.7 การทดสอบฤทธิ์ของส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนต่อสัตว์น้ำอื่น ๆ

สารที่ใช้ทดสอบ : ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนในรูปของสารละลายโดยมีอะซิโตนและ TWEEN 80 เป็นตัวทำละลาย

สัตว์ที่ใช้ทดลอง : ลูกปลานิล (Tilapia nilotica), หอย Biomphalaria glabrata, หอย Lymnaea rubiginosa และหอย Bithynia siamensis ขนาดดังรายละเอียดข้อ 2.2.3-2.2.6

วิธีการที่ใช้ทดสอบ : แช่ในสารละลาย (immersion)

จำนวนซ้ำที่ใช้ : 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ความเข้มข้น

เวลาที่ใช้ทดสอบ : 24 ชั่วโมง

สถานที่ทดสอบ : ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผลการทดสอบ : แสดงด้วย LC_{50} และ LC_{95} ในตารางที่ 2.14

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.14 ระดับความเป็นพิษของส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนจากก้านดีปลีต่อลูกปลานิล และหอย

สาร	ตัวทำละลาย	ชนิดของสัตว์ที่ทดสอบ	ระดับความเป็นพิษ (ppm)	
			LC_{50}	LC_{95}
ส่วนสกัดหยาบไดคลอมีเทน จากก้านดีปลี	อะซิโตน	ลูกปลานิล	1.878	3.989
	TWEEN 80	(Tilapia nilotica)	3.410	8.425
	อะซิโตน	หอย	95.76	189.5
	TWEEN 80	(Biomphalaria glabrata)	75.82	94.11
	อะซิโตน	หอย	9.643	16.52
	TWEEN 80	(Lymnaea rubiginosa)	141.40	206.50
	อะซิโตน	หอย	4.0×10^3	1.372×10^3
	TWEEN 80	(Bithynia siamensis)	141.40	206.50

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.8 การวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากก้านดีปลีกับพืชในสกุล Piper ชนิดอื่น ๆ ด้วยโครมาโตกราฟฟีของเหลวความดันสูง (HPLC)

ทำการวิเคราะห์แยกส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของพืชในสกุล Piper โดยใช้เทคนิค HPLC (reverse phase) ซึ่งอุปกรณ์เป็นเครื่องมือชุดดังรายละเอียดหัวข้อ 2.3.6

คอลัมน์ที่ใช้คือ Liquid Chromatography Column "Waters" μ Bondapac ™ C18 P/N 27324. Stainless Stell P.71141A32

Pre-Column ใช้ Pre-column Inserts Guard-PAK ™ Resolve ™ C 18. T.63564 "waters"

สารละลายที่ใช้ 20 % H_2O/MeOH โดยผ่านการกรองด้วย membrane filters 0.5 μ m และกำจัดก๊าซที่เกิดขึ้นจากตัวทำละลายผสมด้วยเครื่องกำจัดก๊าซเป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำมาใช้ทุกครั้ง

2.5.8.1 การเตรียมสารละลายอ้างอิง และการหาตำแหน่งของสารอ้างอิงในโครมาโตแกรม

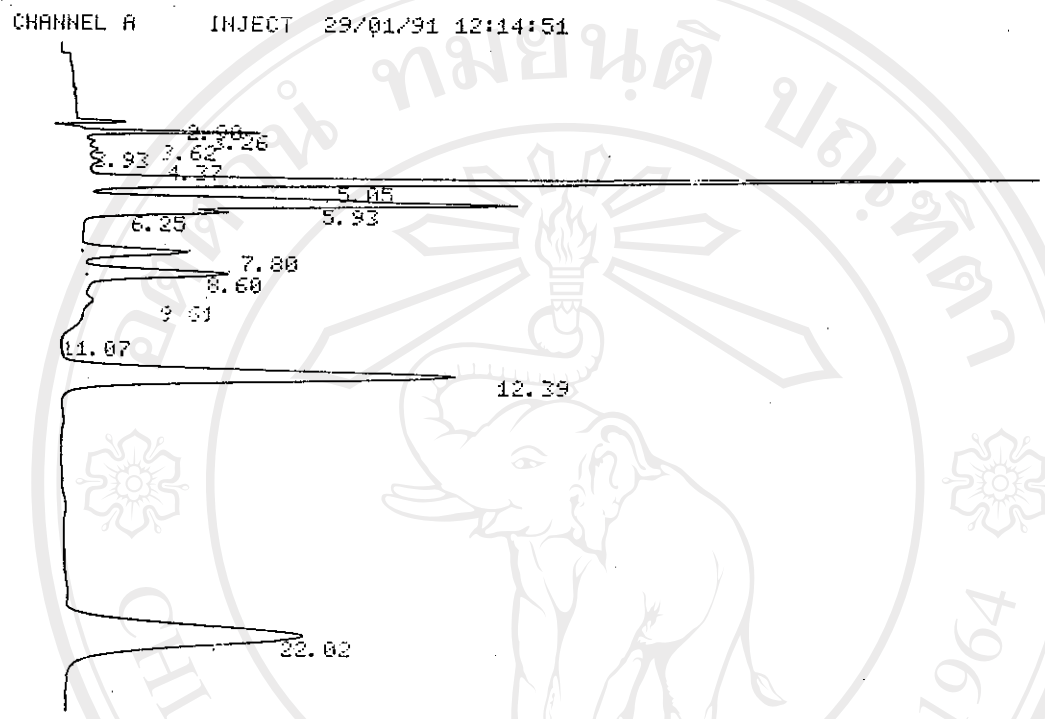
ชั่งสารอ้างอิง RT.1, RT.2, RT.3, RT.4, RT.6 และ RT.7 ที่ได้จากการสกัดก้านดีปลีปริมาณ 1.3, 1.0, 1.4, 1.4, 1.2 และ 1.1 มิลลิกรัม ตามลำดับ ด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียด นำสารทั้งหมดมาละลายในเมธานอลจนได้สารละลายผสมปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยสารอ้างอิงทั้ง 6 ชนิดจะมีความเข้มข้น 26, 20, 28, 28, 24 และ 22 ppm.ตามลำดับ กรองสารละลายอ้างอิงด้วย Micro-Mate Interchangeable Hypo-dermic Syringe ใช้ Membrane Filters 0.5 μm. เพื่อกำจัดสารไม่บริสุทธิ์อื่น ๆ ที่อาจจะรบกวนการทำงานของระบบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บรรจุสารละลายอ้างอิง 5 µl ลงใน Hamilton "801 RN 1 OUL. HAMILTON" Syringe Removable Needle QC. โดยที่ระบบขณะนั้นต้องอิ่มตัวด้วยตัวทำละลาย 20 % H_2O/MeOH เครื่องจะรายงานเวลาที่สารบริสุทธิ์แยกผ่านคอลัมน์ (Retention Time) ในรูปของโครมาโตแกรม ซึ่งประกอบไปด้วยพีคที่มีพื้นที่ใต้พีคแตกต่างกันตามปริมาณของสารที่แยกได้ทั้งหมด 6 พีคด้วยกัน

ตรวจจากตำแหน่งของสารบริสุทธิ์ในโครมาโตแกรมของสารละลายอ้างอิง โดยการใส่สารบริสุทธิ์ทีละชนิดเพียงเล็กน้อยในสารละลายอ้างอิงแล้วฉีดเข้าไปในเครื่อง พีคที่เป็นตำแหน่งของสารบริสุทธิ์ชนิดที่ใส่เพิ่มเข้าไปจะมีขนาดเปลี่ยนแปลง หรือมีความสูงของพีคเพิ่มขึ้นเห็นได้ชัดเจน ทำเช่นนี้กับสารอ้างอิงทุกสารจนครบ 6 สาร ได้ผลดังรูปที่ 2.7

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



PIPERPLANT 29/01/91 12:14:51 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 5. RUN 7 INDEX 1 CALIB

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF	
1	0.	2.9	49148	02		
2	0.	3.26	174826	03		
3	0.	3.62	6423	02		
4	0.	3.93	11172	03		
5	0.	4.37	12753	01		
RT2	20.	5.05	1533819	02	76690.95	
RT1	26.	5.93	1656341	02	40628.5	
8	0.	6.25	218354	03		
9	0.	7.8	235489	02		
RT6	24.	8.6	351475	03	14644.792	
11	0.	9.61	20902	01		
12	0.	11.07	1050	01		
RT7	22.	12.39	1442653	01	65575.136	
RT3	28.	22.02	1601974	01	57213.357	
TOTALS	120.		6716379			

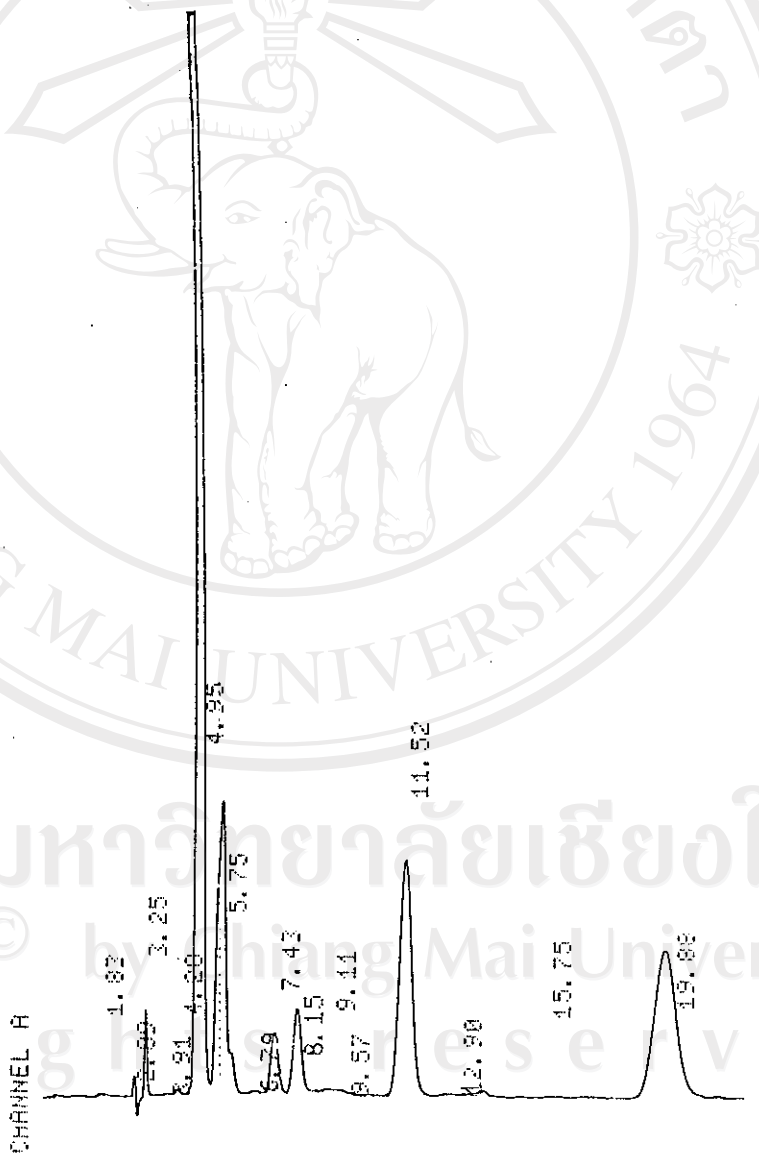
NEW FILE:

NAME	RF	RT
RT2	76690.95	5.05
RT1	40628.5	5.91
RT6	14644.792	8.59
RT7	65575.136	12.34
RT3	57213.357	21.9

รูปที่ 2.7 ตำแหน่งของสารอ้างอิงในการทำ HPLC

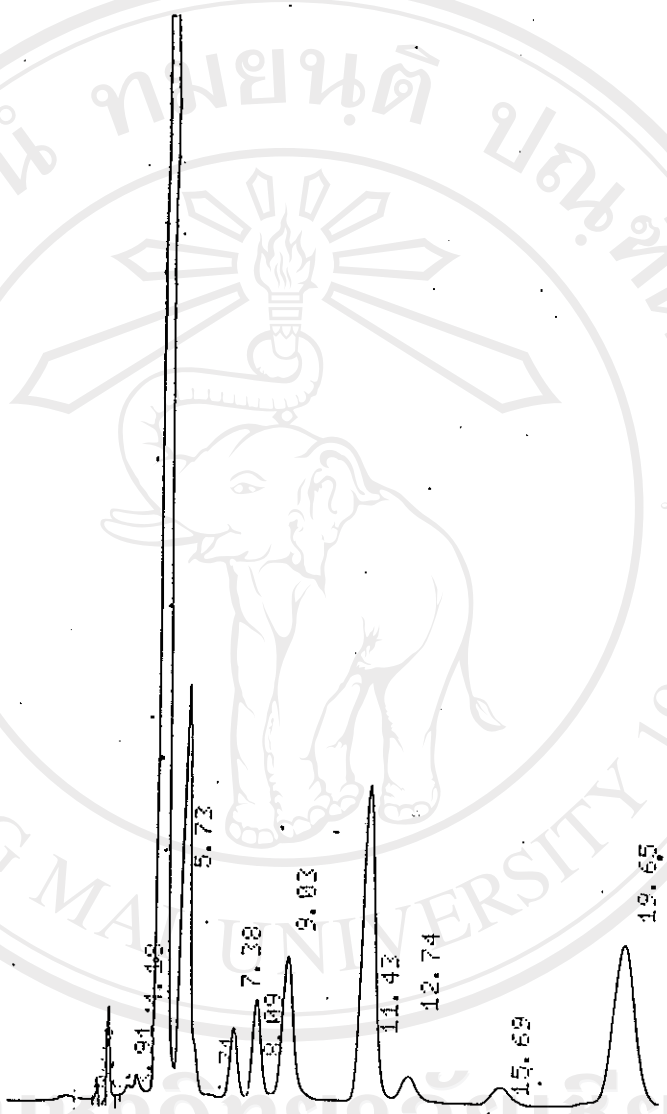
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับ RT.2 และ RT.4 มีตำแหน่งเดียวกันคือ พีคแรกที่แยกได้ ดังรูปที่ 2.8-2.9 การวิเคราะห์สาร 2 ตัวนี้ จึงรายงานปริมาณรวมของทั้งสองสาร



รูปที่ 2.8 ขนาดพีคของสารอ้างอิง เมื่อเพิ่มปริมาณ RT.2 ในสารละลาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

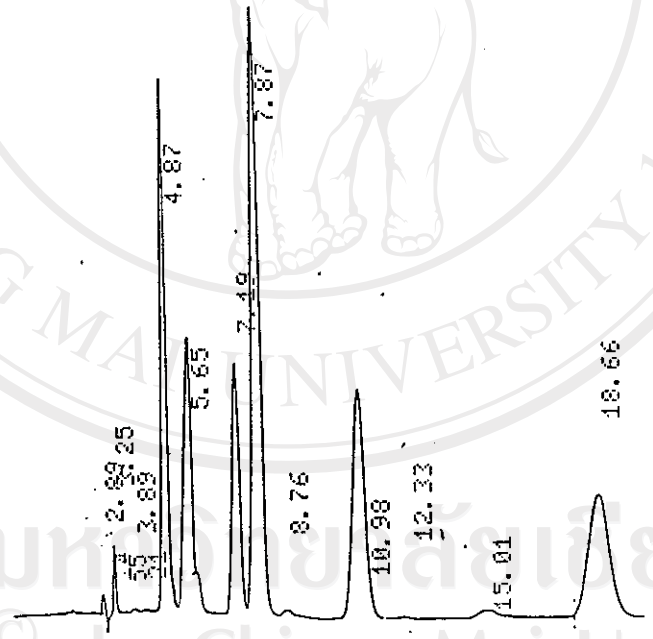


รูปที่ 2.9 ขนาดพีคของสารอ้างอิง เมื่อเพิ่ม RT.4 ในสารละลาย

RT.6 มีตำแหน่งปรากฏ 2 พีค ในอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค 1:1.51 ดังรูปที่ 2.10-2.11

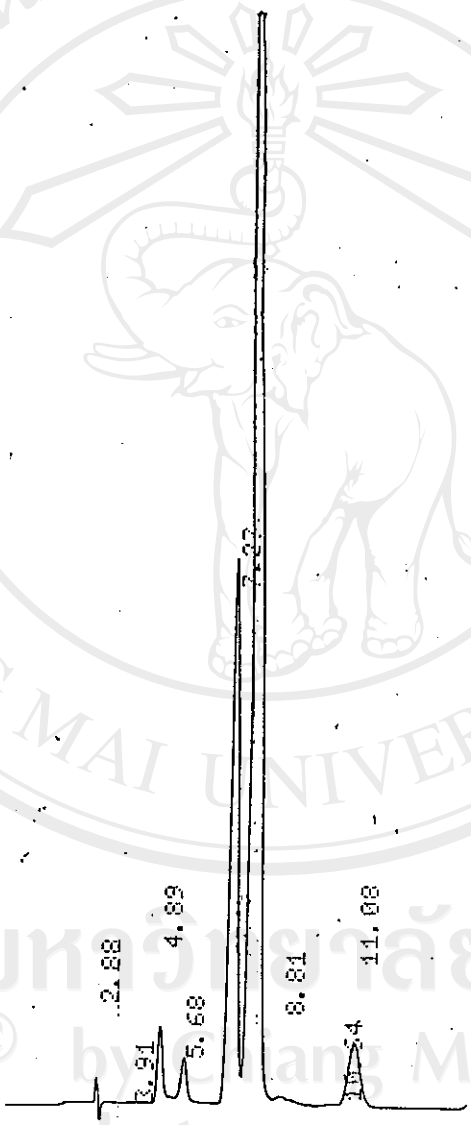
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ปริมาณ RT.6 จึงคำนวณจากอัตราส่วนความเข้มข้นซึ่งคำนวณได้จากอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคอีกทอดหนึ่ง



รูปที่ 2.10 ขนาดของพีคของสารอ้างอิงเมื่อเพิ่มปริมาณ RT.6 ในสารละลาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 2.11 ตำแหน่งและขนาดพีคของ RT.6 บริสุทธิ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.8.2 การเตรียมสารละลายส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของพืชสกุล Piper ชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์

ใช้ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของพืชสกุล Piper ในรายการ 2.1.1.1-2.1.1.11 (ยกเว้น Piper baehmaeriaefolium Wall ในรายการ 2.1.1.8 เพราะสารที่จะใช้ทดสอบหมด) และดีปลีในรายการ 2.1.1.3 เตรียมสารละลายส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของพืชแต่ละชนิด 25 มิลลิลิตร โดยชั่งน้ำหนักแน่นอนในหน่วยมิลลิกรัม ใช้ MeOH เป็นตัวทำละลายได้สารละลายในหน่วยความเข้มข้นเป็น ppm. กรองสารละลายเช่นเดียวกับสารอ้างอิงก่อนที่จะฉีดเข้าเครื่องวิเคราะห์

สำหรับดีปลี เตรียมส่วนสกัดหยาบส่วนก้าน ใบ และผลใหม่ โดยใช้น้ำหนักแห้ง 500 กรัม เท่ากัน แช่ในตัวทำละลายเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 1.5 ลิตรเท่ากัน 3 ครั้ง ๆ ละ 24 ชั่วโมง ระเหยเอาตัวทำละลายออก ได้ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนโดยตรง กากที่เหลือจากการแช่ในเฮกเซน นำมาแช่ต่อในไดคลอโรมีเทน 1.5 ลิตร 3 ครั้ง ๆ ละ 24 ชั่วโมง แล้วระเหยตัวทำละลายออกเช่นกัน ได้ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน

ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทนโดยตรง และส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนของก้านผลรวมกับผลจะช้านก็เตรียมโดยวิธีการเดียวกัน แต่ใช้ปริมาณก้านผลรวมกับผลแห้ง 100 กรัม แช่ในตัวทำละลาย 200 ซม^3 เนื่องจากมีปริมาณน้อย

เตรียมสารละลายส่วนสกัดหยาบเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทนโดยตรง และส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนของก้าน ใบ และผลดีปลี และของก้านผลรวมกับผลจะช้านโดยใช้เมธานอล เป็นตัวทำละลาย หน่วยความเข้มข้นเป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ppm กรองเอาส่วนที่ไม่ละลายออกเช่นเดียวกับส่วนสกัดหยาบเฮกเซนจากพืชชนิดอื่น ๆ

2.5.8.3 วิธีการวิเคราะห์และผลการวิเคราะห์

ทดลองฉีดสารละลายส่วนสกัดหยาบที่ต้องการวิเคราะห์เข้าไปในเครื่องปรับ ความเข้มข้นของสารละลาย โดยการเจือจางลงเพื่อให้เหมาะสม หากสารละลายเข้มข้นมากเกินไปจนครบตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์

ฉีดสารละลายอ้างอิง 5 µl เข้าเครื่อง นำค่า Retention Time ที่รายงานจากโครมาโตแกรม และความเข้มข้นในหน่วย ppm ของสารอ้างอิงแต่ละตัว รวมทั้งข้อมูลปลีกย่อยอื่น ๆ ป้อนเข้าโปรแกรมสำหรับการคำนวณความเข้มข้น และพื้นที่ใต้พีคของสารบริสุทธิ์ที่มีอยู่ในแต่ละส่วนสกัดหยาบที่มีค่า Retention Time ตรงกับสารอ้างอิง รายงานออกมาจากเครื่องนำความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์แต่ละตัวที่วิเคราะห์ได้มาคำนวณเป็นปริมาณในหน่วยเปอร์เซ็นต์ของส่วนสกัดหยาบ

ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 2.15 และโครมาโตแกรมของแต่ละตัวอย่างแสดงในรูปที่ 2.12-2.41

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.15 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารในพืชสกุล Piper ด้วยเทคนิค HPLC

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้น (ppm)	ชื่อพืชและส่วนของพืช	ตัวทำละลายในการสกัด	% ของสารโดยน้ำหนัก					หมายเหตุ
				RT.2+RT.4	RT.1	RT.6	RT.7	RT.3	
1	1252	ผลพริกไทย	Hexane	0.98	2.74	2.95	0.51	0.96	รูปที่ 2.12
2	1250	ก้านดีปลี	Hexane	2.20	14.18	0.78	0.29	0.82	รูปที่ 2.13
3	1250	ก้านดีปลี	CH_2Cl_2	2.80	11.99	0.69	0.21	0.67	รูปที่ 2.14
4	1250	ก้านดีปลี	$CH_2Cl_2^*$	2.71	10.87	0.50	0.20	0.37	รูปที่ 2.15
5	1250	ผลดีปลี	Hexane	1.23	6.30	0.77	0.82	1.49	รูปที่ 2.16
6	1250	ผลดีปลี	CH_2Cl_2	1.20	13.61	0.98	0.95	1.57	รูปที่ 2.17
7	1250	ผลดีปลี	$CH_2Cl_2^*$	1.76	23.47	0.31	0.42	0.49	รูปที่ 2.18
8	1250	ใบดีปลี	Hexane	3.45	1.08	0.30	0.05	0.09	รูปที่ 2.19
9	1250	ใบดีปลี	CH_2Cl_2	6.29	0.91	0.69	0.07	0.07	รูปที่ 2.20
10	1250	ใบดีปลี	$CH_2Cl_2^*$	3.58	0.52	0.19	0.02	0.04	รูปที่ 2.21
11	2500	ก้านจะข้าน	Hexane	0.10	4.79	1.25	0.05	0.85	รูปที่ 2.22
12	2500	ใบจะข้าน	Hexane	0.02	0.41	0.22	0.13	0.76	รูปที่ 2.23
13	5000	ก้านผล+ผลจะข้าน	Hexane	0.10	0.09	0.57	-	-	รูปที่ 2.24

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.15 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้น (ppm)	ชื่อพืชและส่วนของพืช	ตัวทำละลายในการสกัด	% ของสารโดยน้ำหนัก					หมายเหตุ
				RT.2+RT.4	RT.1	RT.6	RT.7	RT.3	
14	5000	ก้านผล+ผลจะข้าน	CH_2Cl_2	0.10	0.15	0.16	0.05	-	รูปที่ 2.25
15	5000	ก้านผล+ผลจะข้าน	$CH_2Cl_2^*$	0.16	0.07	0.24	0.006	0.02	รูปที่ 2.26
16	2500	ส่วนเหนือดินชะพลู	Hexane	0.17	0.45	0.11	0.07	0.10	รูปที่ 2.27
17	5000	ก้านพลู	Hexane	0.02	0.09	2.40	0.02	0.02	รูปที่ 2.28
18	5000	ผลพลู	Hexane	0.22	0.03	0.63	0.04	0.08	รูปที่ 2.29
19	5000	ใบพลู	Hexane	0.20	0.04	0.29	-	-	รูปที่ 2.30
20	2500	ใบ P.peepuloides	Hexane	0.58	0.03	0.57	0.01	0.04	รูปที่ 2.31
21	5000	ก้านพลูตีนช้าง	Hexane	0.01	0.02	-	-	0.008	รูปที่ 2.32
22	5000	ผลพลูตีนช้าง	Hexane	0.11	0.02	-	-	0.03	รูปที่ 2.33
23	5000	ใบพลูตีนช้าง	Hexane	-	0.01	0.10	0.006	0.03	รูปที่ 2.34
24	5000	รากพลูตีนช้าง	Hexane	-	0.04	0.13	-	0.03	รูปที่ 2.35
25	2500	ก้าน Pip.sp.	Hexane	0.15	3.31	0.24	0.20	0.05	รูปที่ 2.36
26	2500	ใบ Pip.sp.	Hexane	0.16	0.45	0.15	0.07	0.17	รูปที่ 2.37

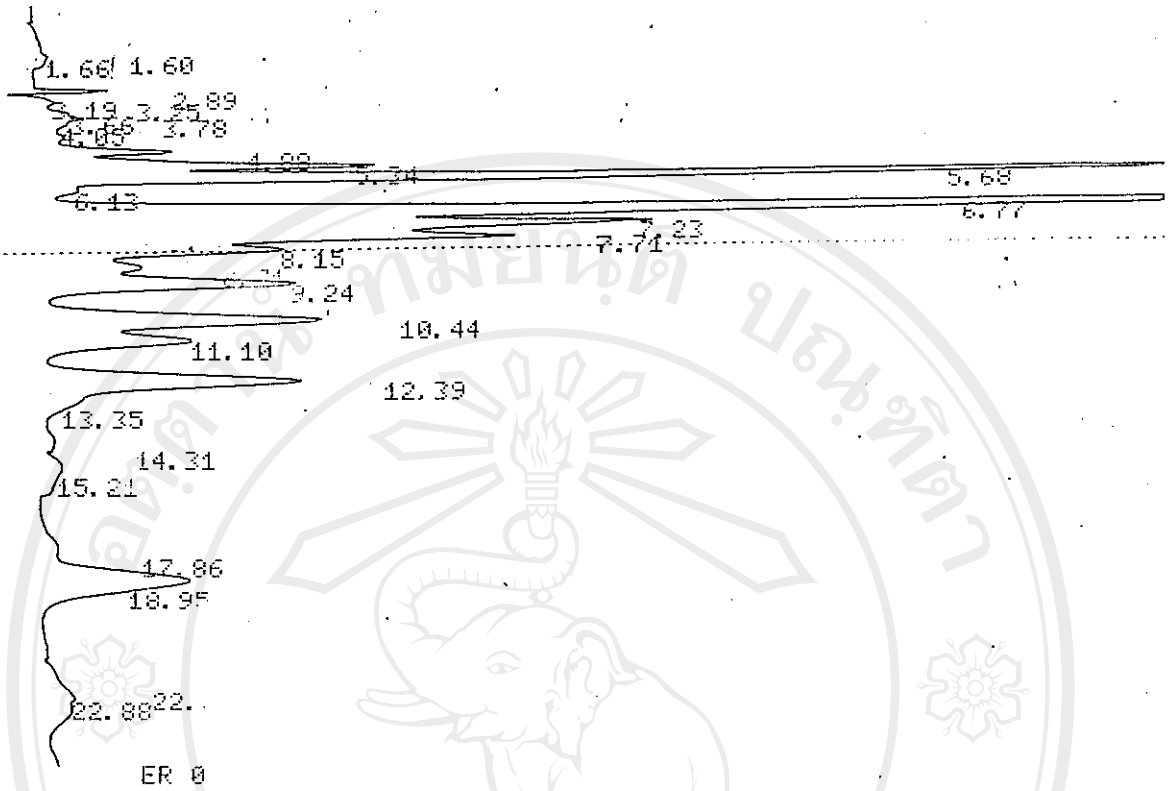
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.15 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้น (ppm)	ชื่อพืชและส่วนของพืช	ตัวทำละลายในการสกัด	% ของสารโดยน้ำหนัก					หมายเหตุ
				RT.2+RT.4	RT.1	RT.6	RT.7	RT.3	
27	5000	ก้าน Pip.2	Hexane	0.47	0.12	0.25	-	-	รูปที่ 2.38
28	5000	ใบ Pip.2	Hexane	0.98	0.02	0.18	-	-	รูปที่ 2.39
29	5000	ก้าน Pip.89-1551	Hexane	0.02	0.01	0.03	0.006	-	รูปที่ 2.40
30	5000	ใบ Pip.89-1551	Hexane	0.01	0.28	-	-	-	รูปที่ 2.41

$CH_2Cl_2^*$:-สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนหลังจากสกัดด้วยเฮกเซนแล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



PIPERPLANT 24/01/90 14:01:33 CH= "A" PS= 1.

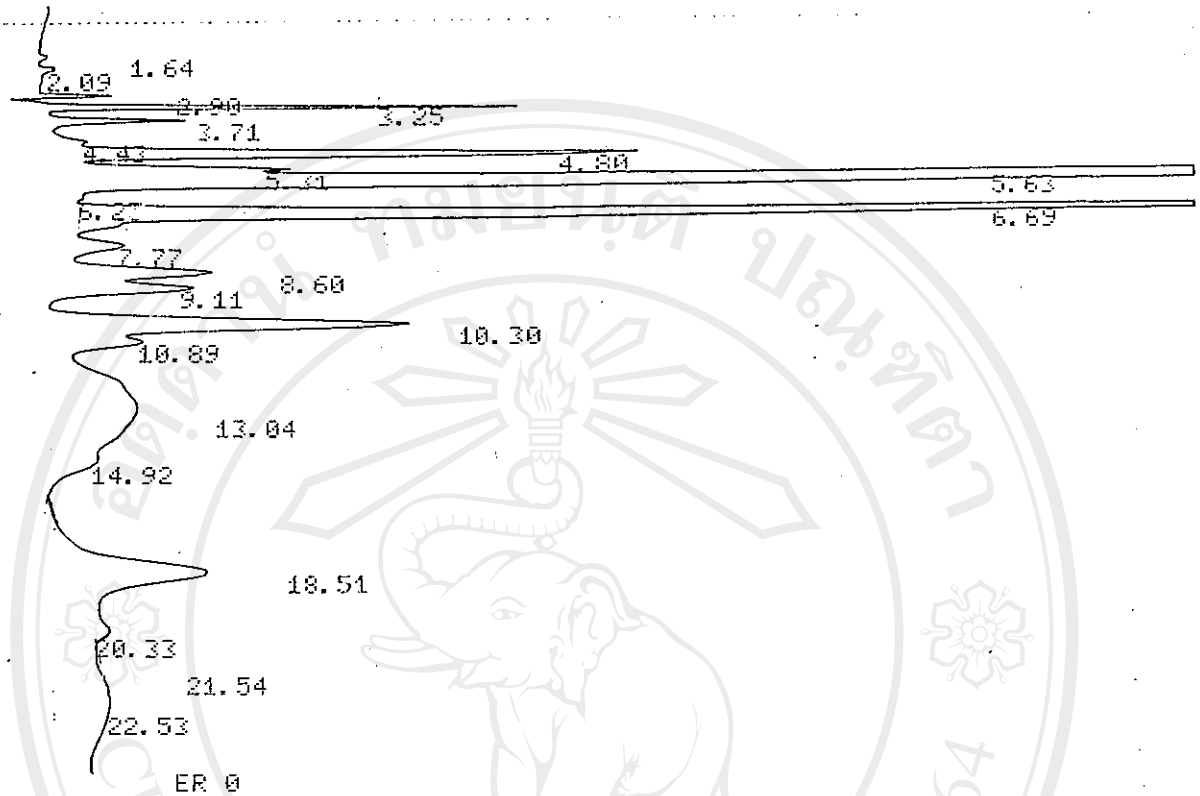
FILE 1. METHOD 5. RUN 4 INDEX 1

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF
1	0.	1.6	11418	02	
2	0.	1.66	1260	03	
3	0.	2.89	53247	02	
4	0.	3.19	34234	02	
5	0.	3.25	58783	02	
6	0.	3.66	95324	02	
7	0.	3.78	102270	02	
8	0.	4.05	64957	02	
RT2	5.087	4.88	401217	02	78873.85
10	0.	5.34	604282	02	
RT1	34.301	5.68	1768790	02	51566.113
12	0.	6.13	110374	02	
13	0.	6.77	2919461	02	
14	0.	7.23	1541207	02	
15	0.	7.71	1121629	02	
RT6	36.893	8.15	539628	02	16253.458
17	0.	8.71	273065	02	
18	0.	9.24	752803	02	
19	0.	10.44	887701	02	
RT7	6.443	11.1	481339	02	74699.773
21	0.	12.39	943755	02	
22	0.	13.35	65928	03	
23	0.	14.31	38820	02	
24	0.	15.21	120558	03	
25	0.	17.86	85513	02	
RT3	12.021	18.95	761860	03	63380.071
27	0.	22.57	16760	02	
28	0.	22.88	19658	03	
TOTALS	94.745		13935841		

รูป 2.12 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของผลพริกไทย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



PIPERPLANT 04/01/90 15:35:19 CH= "A" PS= 1.

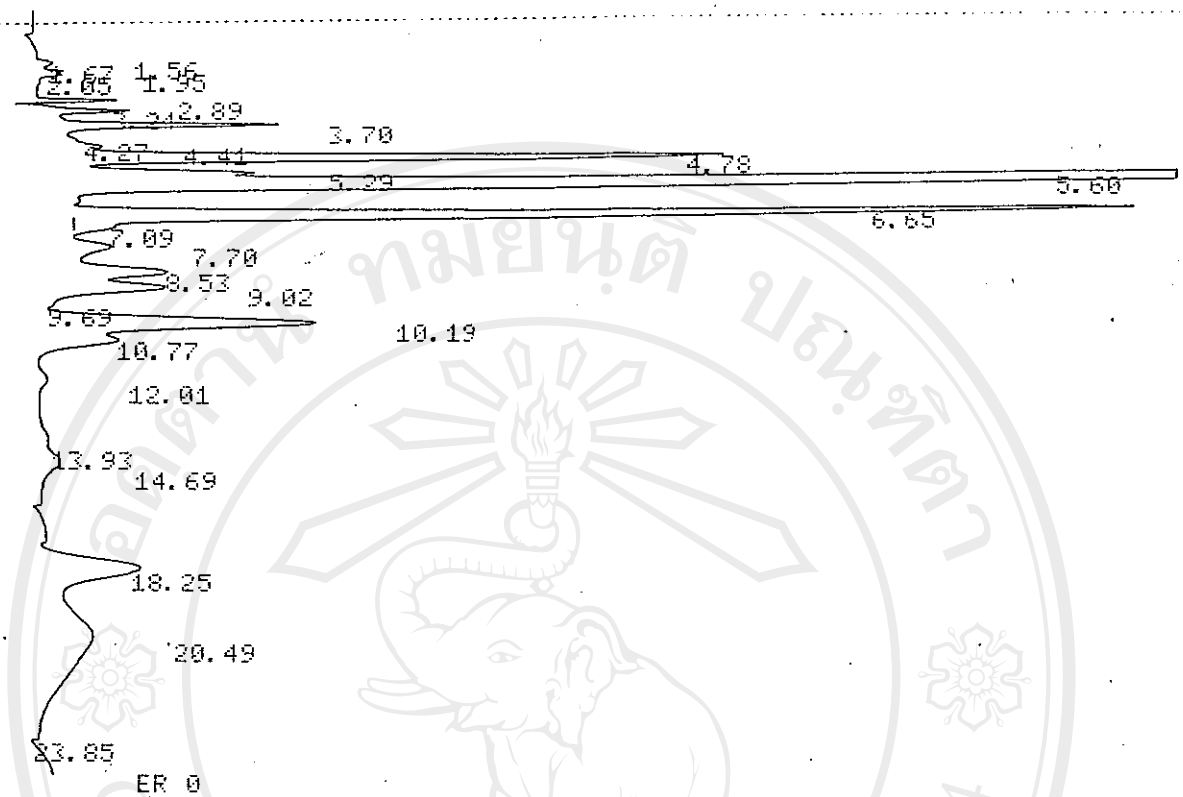
FILE 1. METHOD 5. RUN 6 INDEX 3

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA BC	RF
1	0.	1.64	8165 01	
2	0.	2.09	16490 01	
3	0.	2.9	53662 02	
4	0.	3.25	343671 03	
5	0.	3.71	189364 08	
6	0.	4.43	8939 06	
RT2	11.454	4.8	903443 02	78873.85
8	0.	5.31	265640 02	
RT1	177.19	5.63	9136981 08	51566.115
10	0.	6.25	2911 06	
11	0.	6.69	2372894 06	
RT6	9.768	7.77	158763 06	16253.458
13	0.	8.5	373035 06	
14	0.	9.11	338570 06	
15	0.	10.3	1003954 06	
RT7	3.656	10.89	273077 06	74699.773
17	0.	13.04	1410211 06	
18	0.	14.92	249746 07	
RT3	10.297	18.51	652632 01	63380.071
20	0.	20.33	41098 02	
21	0.	21.54	29050 02	
22	0.	22.53	231391 03	
TOTALS	212.365		16063687	

รูป 2.13 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของก้านดีปลี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



PIPERPLANT 24/01/90 16:16:45 CH= "A" PS= 1.

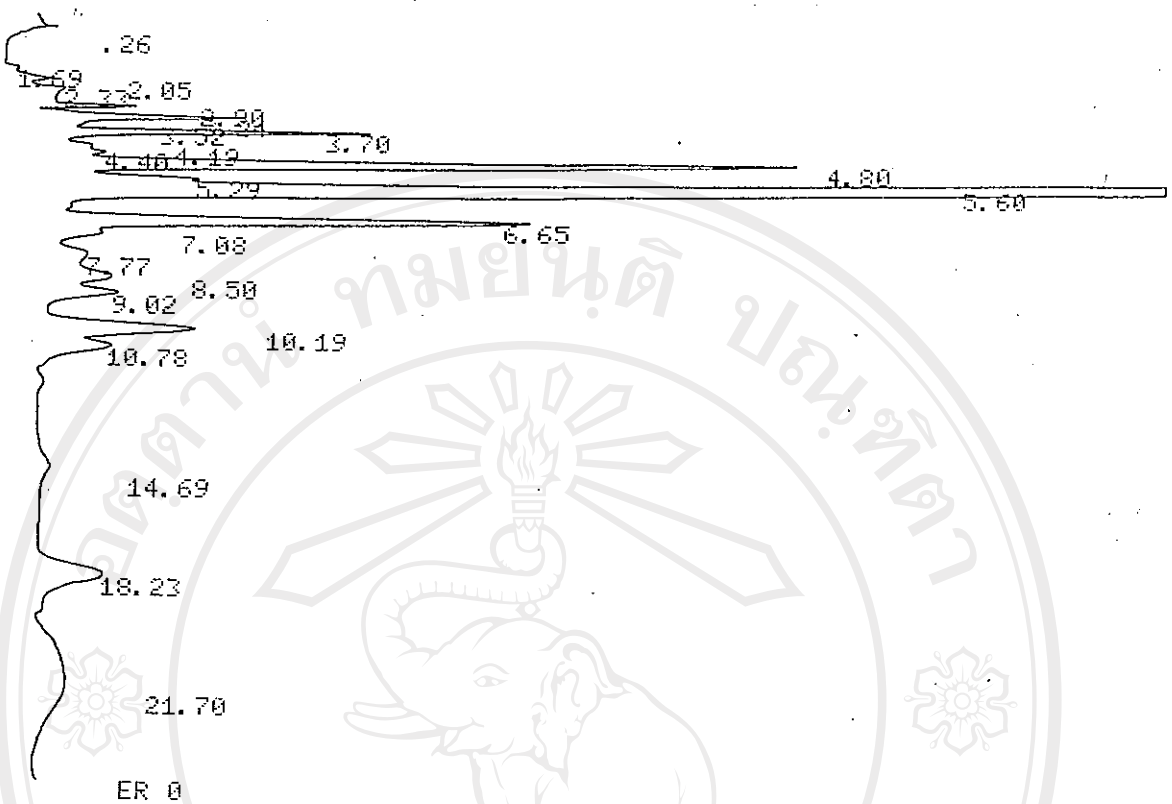
FILE 1. METHOD 5. RUN 7 INDEX 4

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF
1	0.	1.56	21526	02	
2	0.	1.67	22228	02	
3	0.	1.95	21093	02	
4	0.	2.05	13322	03	
5	0.	2.89	53641	02	
6	0.	3.24	151477	02	
7	0.	3.7	394887	02	
8	0.	4.27	78491	02	
9	0.	4.41	116438	02	
RT2	14.566	4.78	1148880	02	78873.85
11	0.	5.29	282730	02	
RT1	149.908	5.6	7730186	08	51566.115
13	0.	6.65	1661537	06	
14	0.	7.09	59106	06	
RT6	8.644	7.7	140498	06	16253.458
16	0.	8.53	282880	06	
17	0.	9.02	287766	06	
18	0.	9.69	2073	06	
19	0.	10.19	734635	06	
RT7	2.66	10.77	198669	07	74699.773
21	0.	12.01	25929	01	
22	0.	13.93	24307	02	
23	0.	14.69	89748	03	
RT3	8.368	18.25	530349	02	63380.071
25		20.49	916749	02	
26		23.85	4826	03	
TOTALS	184.146		14993971		

รูป 2.14 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนโดยตรงของก้านดีปลี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



PIPERPLANT 24/01/90 16:56:28 CH= "A" PS= 1.

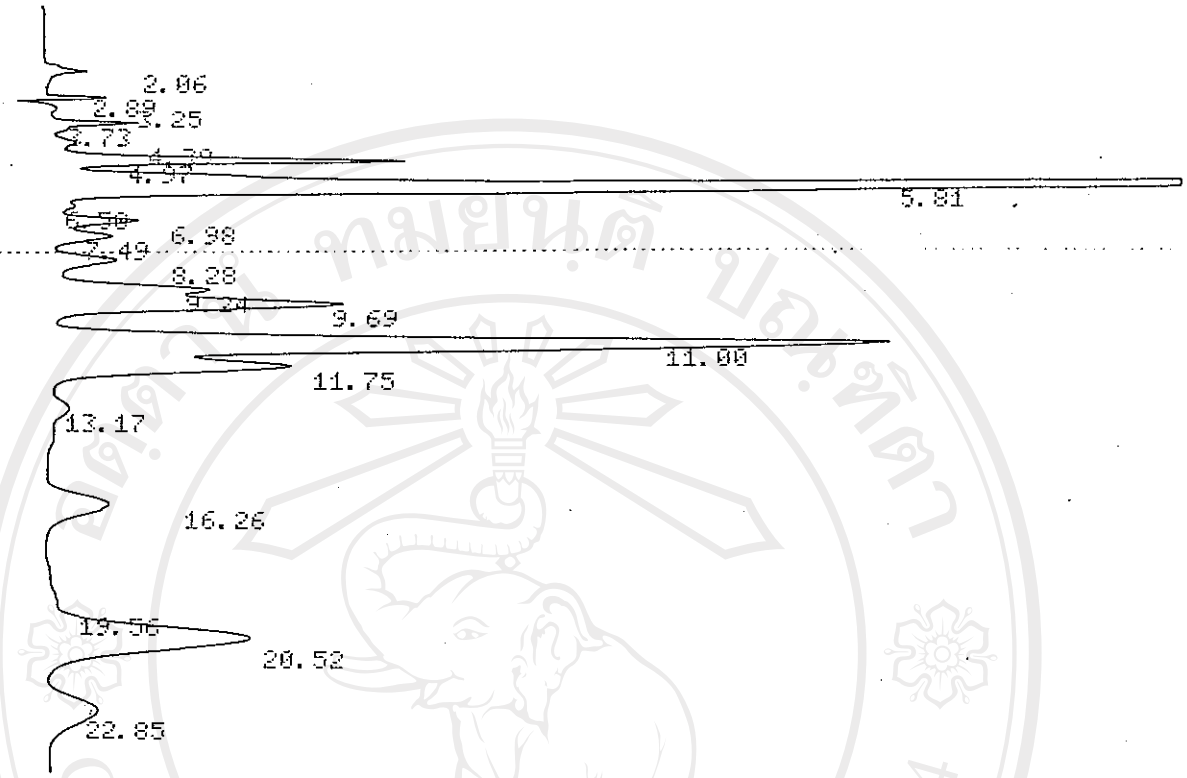
FILE 1. METHOD 5. RUN 8 INDEX 5

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF
1	0.	0.26	56759	01	
2	0.	1.69	6694	02	
3	0.	2.05	24146	02	
4	0.	2.33	14275	03	
5	0.	2.9	55837	02	
6	0.	3.24	233946	02	
7	0.	3.52	24498	02	
8	0.	3.7	335776	02	
9	0.	4.19	56365	02	
10	0.	4.4	64852	02	
RT2	14.099	4.8	1112078	02	78873.85
12	0.	5.29	148058	02	
RT1	135.9	5.6	7007836	03	51566.115
14	0.	6.65	750199	02	
15	0.	7.08	65349	03	
RT6	6.267	7.77	101853	02	16253.458
17	0.	8.5	168035	02	
18	0.	9.02	165171	03	
19	0.	10.19	406566	02	
RT7	2.452	10.78	183146	03	74699.773
21	0.	14.69	38874	01	
RT3	4.563	18.23	289197	01	63380.071
23	0.	21.7	463489	01	
TOTALS	163.281		11772999		

รูป 2.15 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนของก้านดีปลี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



PIPERPLANT 25/01/91 11:49:31 CH= "A" PS= 1.

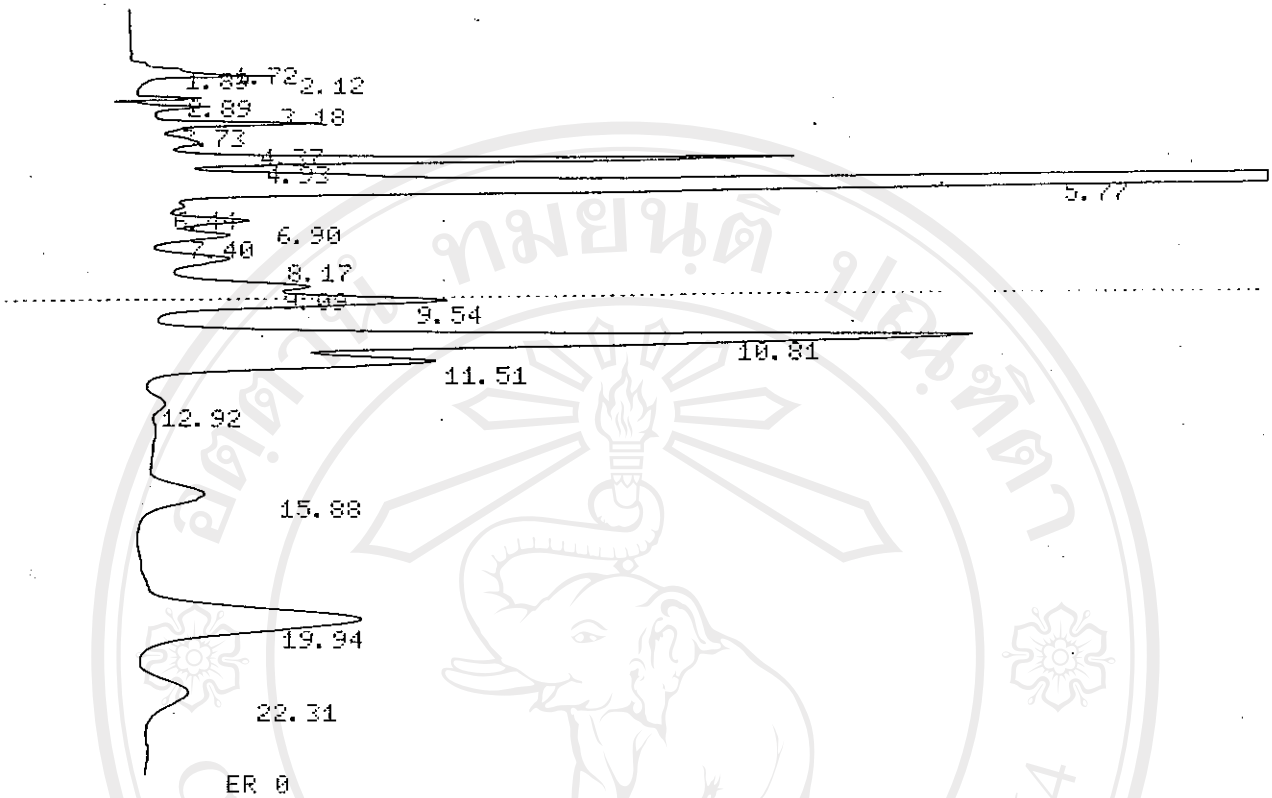
FILE 1. METHOD 5. RUN 4 INDEX 1

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF
1	0.	2.06	47826	01	
2	0.	2.89	49465	02	
3	0.	3.25	41591	03	
4	0.	3.73	104803	02	
5	0.	4.39	46456	02	
RT2	6.402	4.97	534619	02	83513.2
RT1	78.727	5.81	4368196	02	55484.885
8	0.	6.5	38864	02	
9	0.	6.98	162797	02	
10	0.	7.49	133749	02	
RT6	9.565	8.28	162071	02	16944.167
12	0.	9.24	353835	02	
13	0.	9.69	845979	02	
14	0.	11.	2545102	02	
RT7	10.246	11.75	744821	02	72698.318
16	0.	13.17	50811	03	
17	0.	16.26	304514	01	
18	0.	19.56	55289	02	
RT3	8.632	20.52	1202110	02	64517.036
19	0.	22.85	309497	03	
TOTALS	123.572		12102386		

รูป 2.16 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของผลดีปลี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



PIPERPLANT 25/01/91 13:47:53 CH= "A" PS= 1.

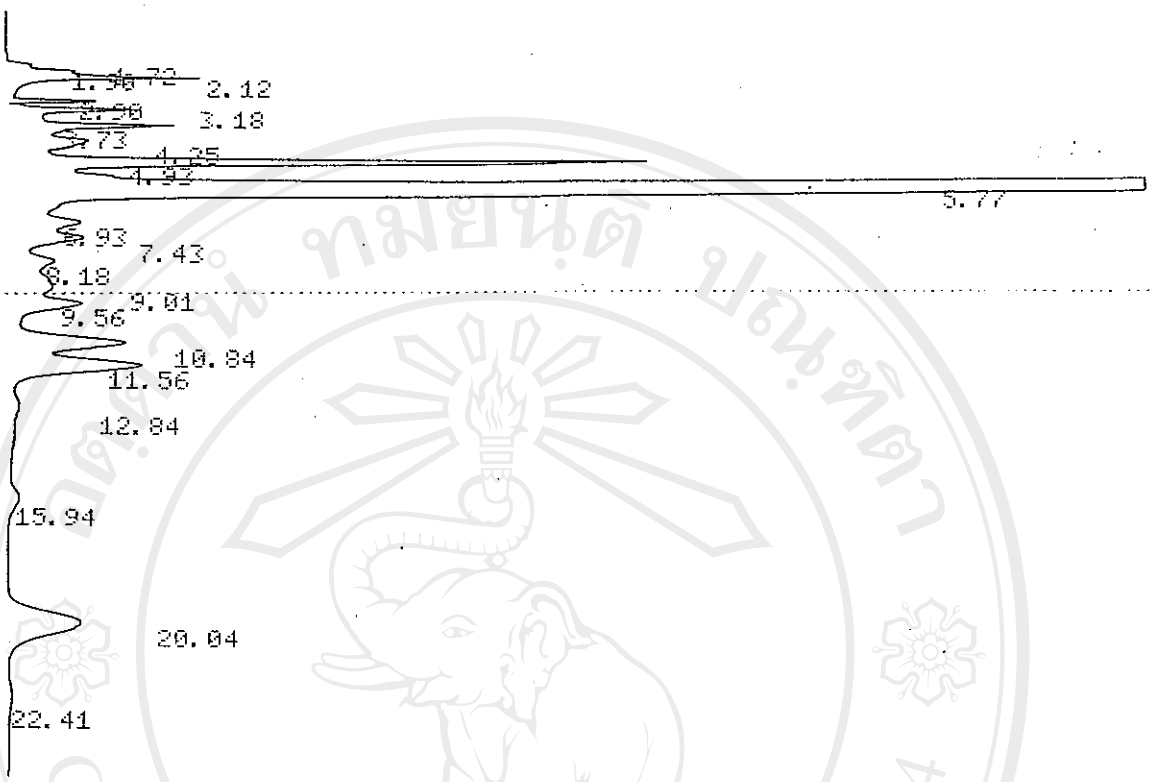
FILE 1. METHOD 5. RUN 6 INDEX 3

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF
1	0.	1.72	10381	02	
2	0.	1.89	36097	02	
3	0.	2.12	142534	03	
4	0.	2.89	50130	02	
5	0.	3.18	85733	03	
6	0.	3.73	184645	02	
7	0.	4.37	109902	02	
RT2	10.395	4.93	868160	02	83513.2
RT1	170.103	5.77	9438098	08	55484.885
10	0.	6.44	9609	06	
11	0.	6.9	142324	06	
12	0.	7.4	143340	06	
RT6	12.267	8.17	207861	06	16944.167
14	0.	9.09	378520	06	
15	0.	9.54	834830	06	
16	0.	10.81	2424198	06	
RT7	11.873	11.51	863135	06	72698.318
18	0.	12.92	47426	07	
19	0.	15.88	273801	01	
RT3	19.617	19.94	1265665	02	64517.035
21	0.	22.31	324402	03	
TOTALS	224.255		17840791		

รูป 2.17 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนโดยตรงของผลดีปลี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



PIPERPLANT 25/01/91 13:21:10 CH= "A" PS= 1.

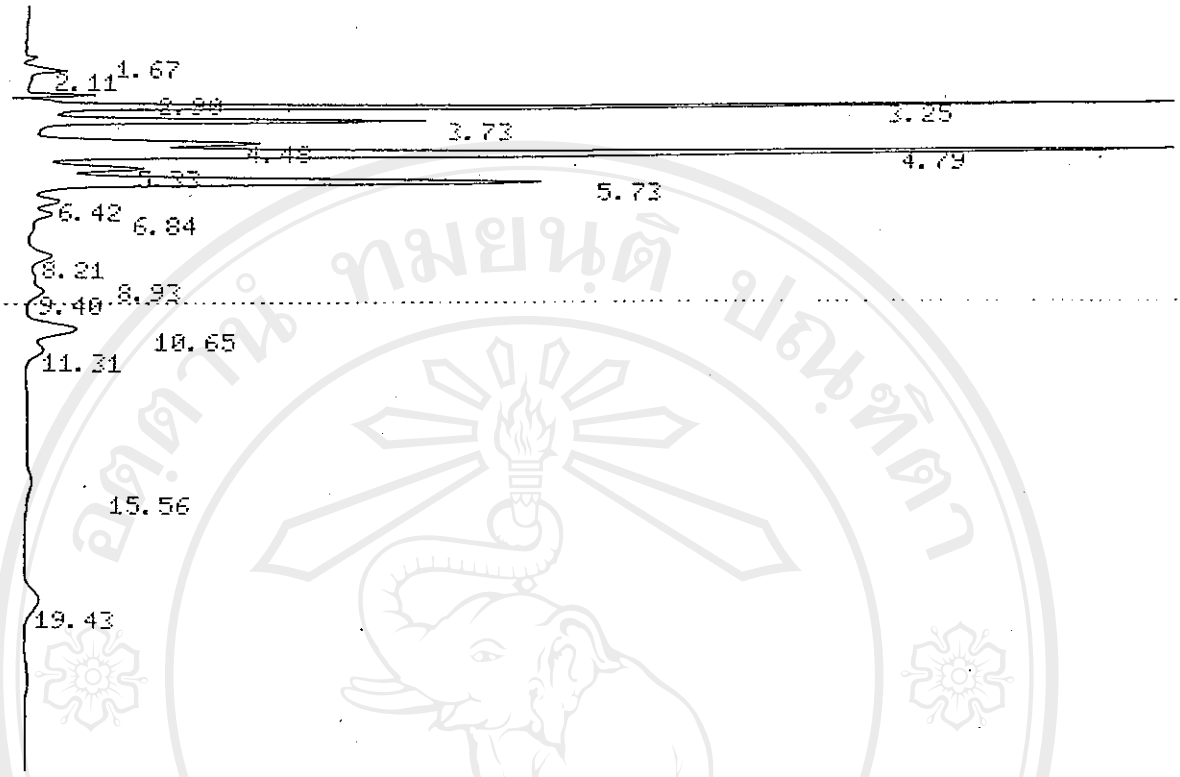
FILE 1. METHOD 5. RUN 5 INDEX 2

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF
1	0.	1.72	19130	02	
2	0.	1.9	46272	02	
3	0.	2.12	186196	03	
4	0.	2.9	52516	02	
5	0.	3.18	101048	03	
6	0.	3.73	145271	02	
7	0.	4.25	111521	02	
RT2	9.17	4.93	765778	02	83513.2
RT1	293.338	5.77	16275866	08	55484.885
10	0.	6.93	76809	06	
11	0.	7.43	101302	06	
RT6	3.847	8.18	65172	06	16944.167
13	0.	9.01	113795	06	
14	0.	9.56	153911	07	
15	0.	10.84	307461	02	
RT7	5.306	11.56	385755	03	72698.318
17	0.	12.84	17695	01	
18	0.	15.94	46700	01	
RT3	6.134	20.04	395744	01	64517.036
20	0.	22.41	14720	01	
TOTALS	317.795		19382662		

รูป 2.18 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนของผลดีปลี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



PIPERPLANT 25/01/91 15:12:25 CH= "A" PS= 1.

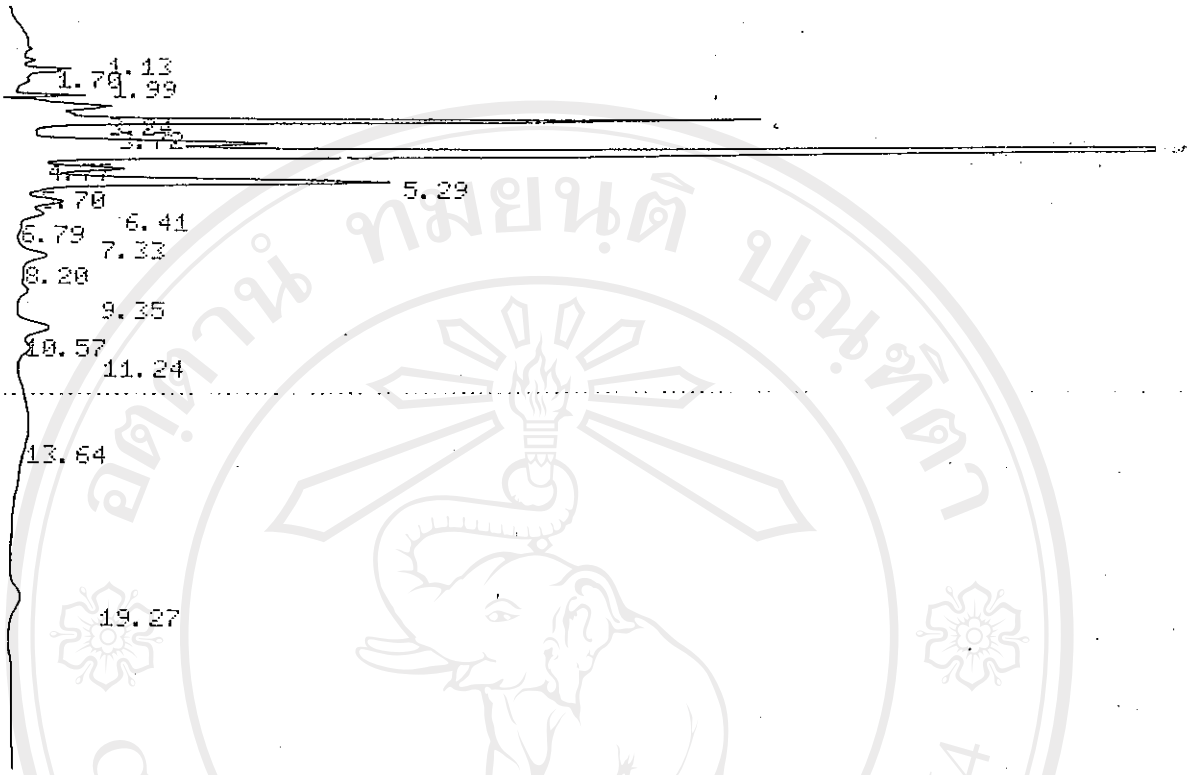
FILE 1. METHOD 5. RUN 7 INDEX 4

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF
1	0.	1.67	8735	02	
2	0.	2.11	41320	03	
3	0.	2.9	46189	02	
4	0.	3.25	1040146	08	
5	0.	3.73	331715	05	
6	0.	4.48	286460	02	
RT2	17.971	4.79	1500833	02	83513.2
8	0.	5.33	149834	02	
RT1	13.453	5.73	746408	02	55484.885
10	0.	6.42	40527	02	
11	0.	6.84	29480	03	
RT6	3.738	8.21	63338	02	16944.167
13	0.	8.93	32151	02	
14	0.	9.4	43030	03	
15	0.	10.65	138857	02	
RT7	0.666	11.31	48472	03	72698.318
17	0.	15.56	18236	01	
RT3	1.126	19.43	72627	01	64517.036
TOTALS	36.954		4628368		

รูป 2.19 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบดีปลี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



PIPERPLANT 25/01/91 15:38:27 CH= "A" PS= 1.

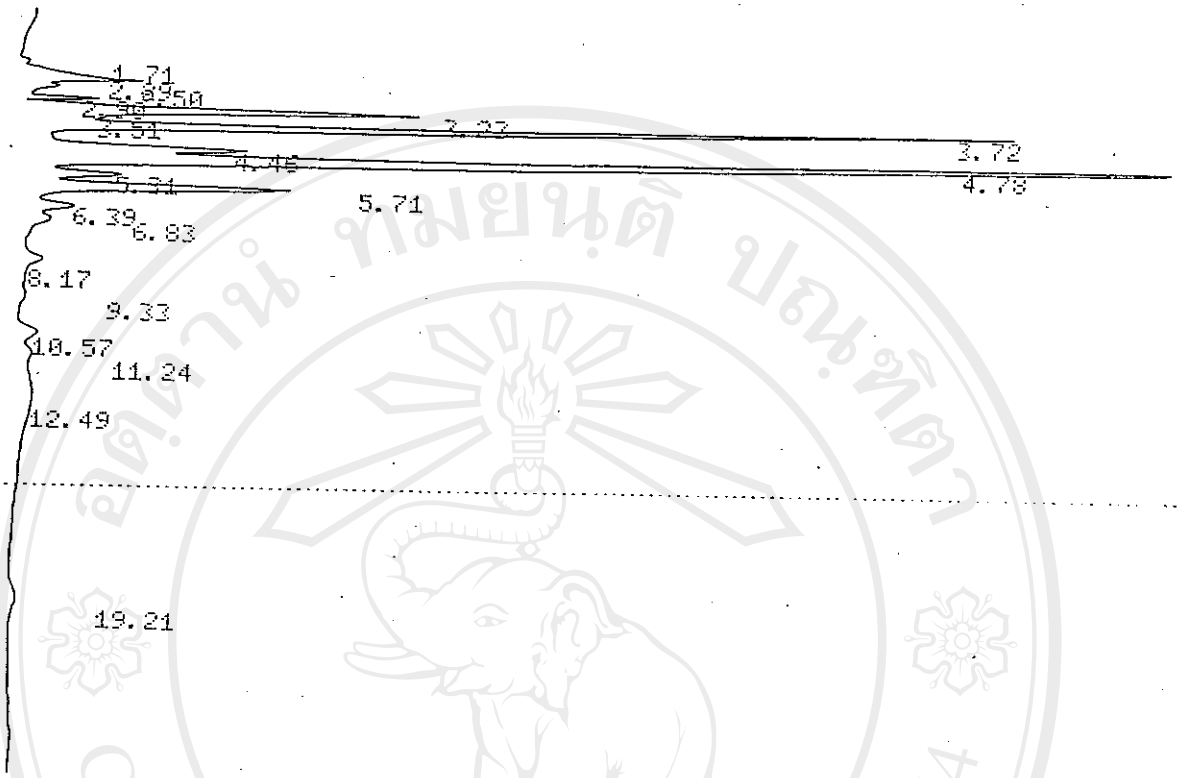
FILE 1. METHOD 5. RUN 8 INDEX 5

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF
1	0.	1.13	114257	02	
2	0.	1.7	31295	02	
3	0.	1.99	122615	02	
4	0.	3.24	231002	02	
5	0.	3.72	806225	02	
RT2	32.76	4.77	2735885	02	83513.2
7	0.	5.29	142829	02	
RT1	11.33	5.7	628626	02	55484.885
9	0.	6.41	118099	02	
10	0.	6.79	61928	02	
11	0.	7.33	19804	02	
RT6	8.59	8.2	145552	02	16944.167
13	0.	9.35	55897	02	
14	0.	10.57	131504	02	
RT7	0.864	11.24	62844	02	72698.318
16	0.	13.64	292339	03	
RT3	0.868	19.27	55966	01	64517.036
TOTALS	54.412		5759667		

รูป 2.20 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนโดยตรงของใบดีปลี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



PIPERPLANT 25/01/91 16:05:31 CH= "A" PS= 1.

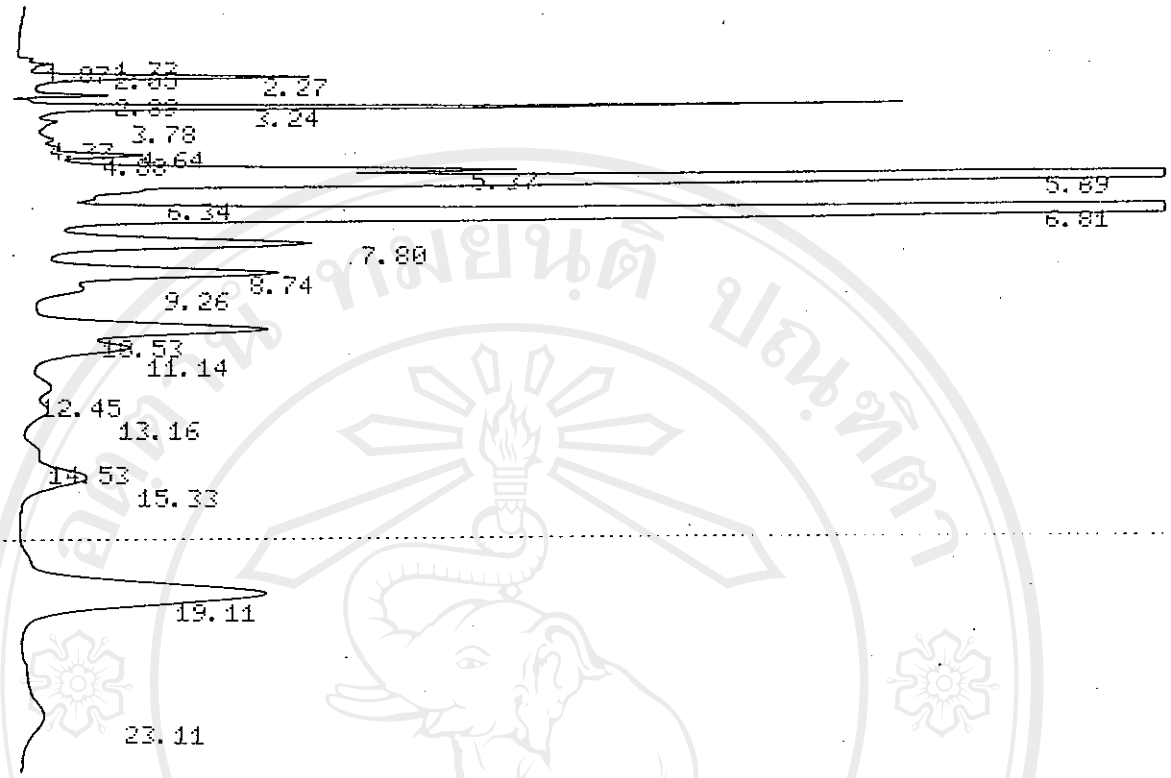
FILE 1. METHOD 5. RUN 9 INDEX 6

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA BC	RF
1	0.	1.71	8760 02	
2	0.	2.29	170094 02	
3	0.	2.5	32805 03	
4	0.	2.9	41348 02	
5	0.	3.23	520477 02	
6	0.	3.51	38000 02	
7	0.	3.72	883835 03	
8	0.	4.46	245921 02	
RT2	18.664	4.78	1558702 02	83513.2
10	0.	5.31	96804 02	
RT1	6.466	5.71	358734 02	55484.885
12	0.	6.39	58437 02	
13	0.	6.83	34490 03	
RT6	2.427	8.17	41134 01	16944.167
15	0.	9.33	9391 01	
16	0.	10.57	40278 02	
RT7	0.245	11.24	17813 03	72698.318
18	0.	12.49	70460 01	
RT3	0.515	19.21	33211 01	64517.036
TOTALS	28.317		4260694	

รูป 2.21 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนของใบดีปลี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



PIPERPLANT 25/01/91 16:32:47 CH= "A" PS= 1.

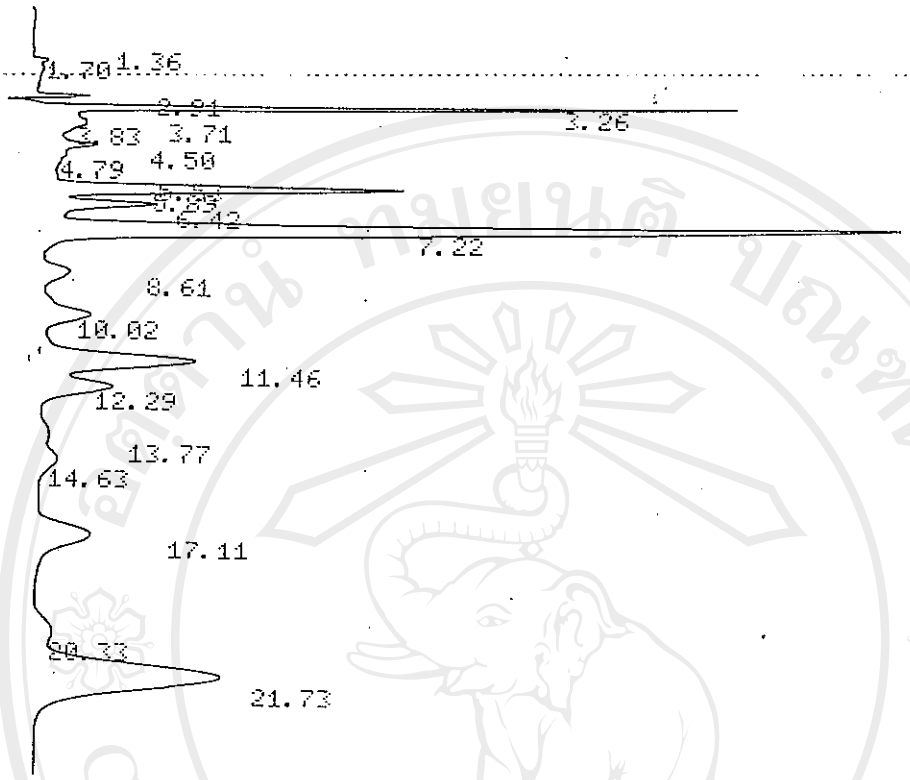
FILE 1. METHOD 5. RUN 10 INDEX 7

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF
1	0.	1.73	8063	02	
2	0.	1.87	22069	02	
3	0.	2.05	8242	02	
4	0.	2.27	264822	03	
5	0.	2.89	60215	02	
6	0.	3.24	922761	08	
7	0.	3.78	22068	06	
8	0.	4.37	12652	06	
9	0.	4.64	8862	06	
RT2	1.047	4.88	87435	06	83513.2
11	0.	5.37	636433	02	
RT1	119.676	5.69	6640190	08	55484.885
13	0.	6.34	4909	06	
14	0.	6.81	6462338	06	
15	0.	7.8	549811	06	
RT6	31.307	8.74	530471	06	16944.167
17	0.	9.26	94757	02	
18	0.	10.53	681945	02	
19	0.	11.14	285238	02	
RT7	1.288	12.45	93649	02	72698.318
21	0.	13.16	81940	02	
22	0.	14.53	54687	02	
23	0.	15.33	306639	03	
RT3	21.194	19.11	1367410	01	64517.036
25	0.	23.11	182420	01	
TOTALS	174.512		19390026		

รูป 2.22 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของก้านจะข้าน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



PIPERPLANT 26/01/91 10:24:58 CH= "A" PS= 1.

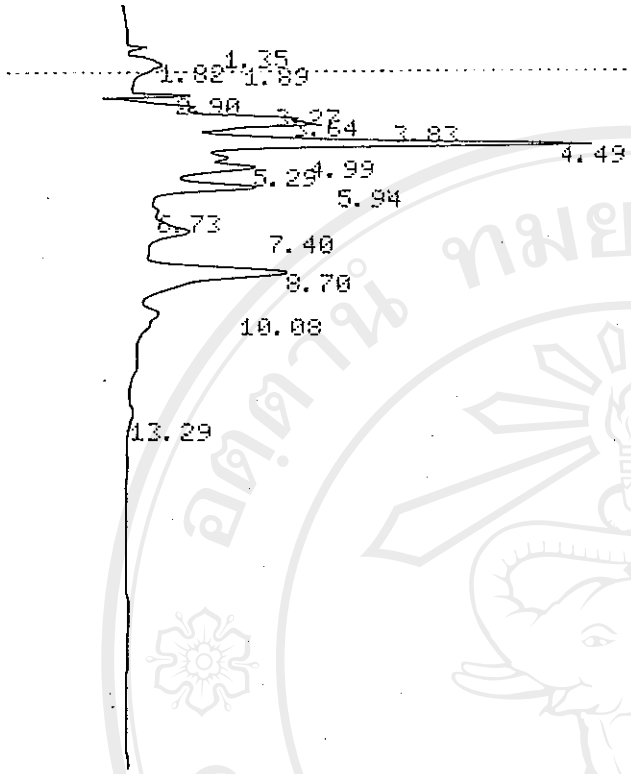
FILE 1. METHOD 5. RUN 3 INDEX 1

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA BC	RF
1	0.	1.36	1403 01	
2	0.	1.7	14875 01	
3	0.	2.91	44084 02	
4	0.	3.26	489847 03	
5	0.	3.71	10271 02	
6	0.	3.83	14170 03	
7	0.	4.5	52266 02	
RT2	0.179	4.79	14553 02	81475.8
9	0.	5.53	4056 02	
RT1	10.246	5.89	550887 02	53765.038
11	0.	6.42	197357 02	
12	0.	7.22	1657463 08	
RT6	5.495	8.61	85532 06	15564.333
14	0.	10.02	175978 06	
15	0.	11.46	528525 06	
RT7	3.325	12.29	234595 07	70689.455
17	0.	13.77	39344 02	
18	0.	14.63	82593 03	
19	0.	17.11	279685 01	
20	0.	20.33	98836 02	
RT3	18.903	21.73	1187340 03	62809.25
TOTALS	38.148		5764060	

รูป 2.23 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบจะข้าน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



PIPERPLANT 26/01/91 11:02:59 CH= "A" PS= 1.

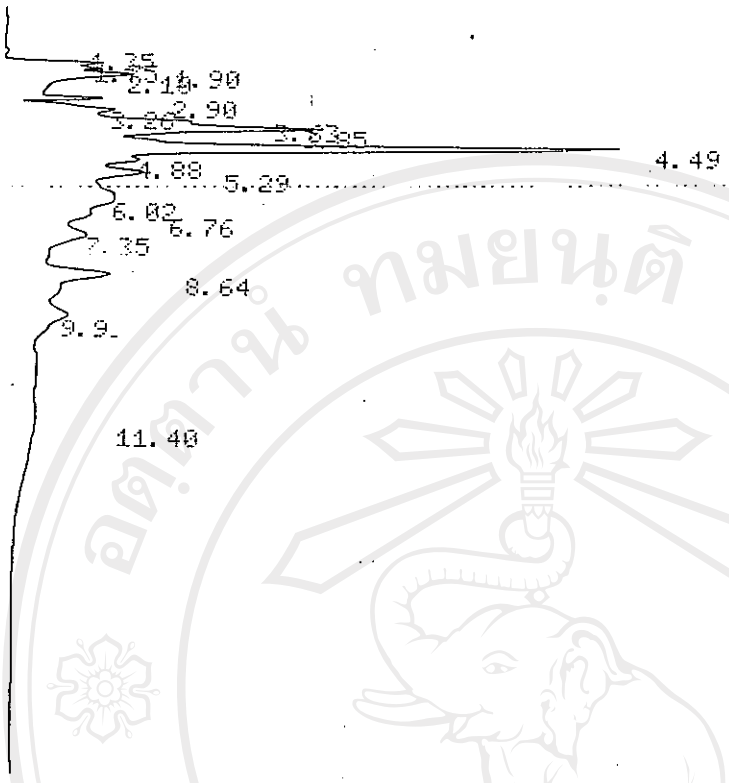
FILE 1. METHOD 5. RUN 4 INDEX 2

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF
1	0.	1.35	10154	01	
2	0.	1.82	17596	02	
3	0.	1.89	19712	03	
4	0.	2.9	47560	02	
5	0.	3.27	125124	02	
6	0.	3.64	276880	02	
7	0.	3.83	420092	02	
8	0.	4.49	924214	02	
RT2	2.101	4.99	171215	02	81475.8
10	0.	5.29	291116	02	
RT1	4.433	5.94	238323	03	53765.038
12	0.	6.73	13195	02	
13	0.	7.4	110060	03	
RT6	28.541	8.7	444221	02	15564.333
15	0.	10.08	29724	03	
16	0.	13.29	22424	01	
TOTALS	35.075		3161610		

รูป 2.24 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของก้านผล + ผลจะข้าน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



PIPERPLANT 26/01/91 11:29:24 CH= "A" PS= 1.

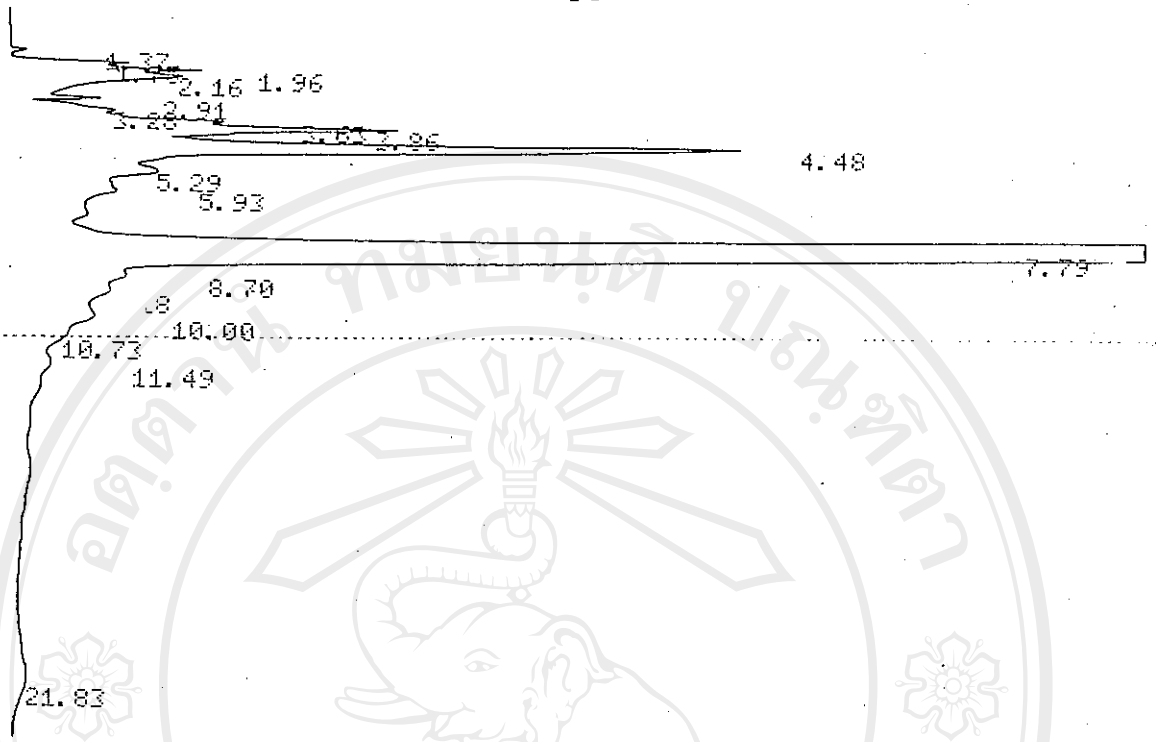
FILE 1. METHOD 5. RUN 5 INDEX 3

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF
1	0.	1.35	2694	01	
2	0.	1.75	78638	02	
3	0.	1.9	67041	02	
4	0.	2.1	165434	03	
5	0.	2.9	46386	02	
6	0.	3.26	155168	02	
7	0.	3.63	219088	02	
8	0.	3.85	541467	02	
9	0.	4.49	1013406	02	
RT2	2.178	4.88	177483	02	81475.8
11	0.	5.29	282018	02	
RT1	7.712	6.02	414591	02	53765.038
13	0.	6.76	117661	02	
14	0.	7.35	142821	03	
RT6	7.971	8.64	124067	01	15564.333
16	0.	9.99	86901	01	
RT7	2.737	11.4	193504	01	70689.456
TOTALS	20.598		3828368		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 2.25 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนโดยตรงก้านผล + ผลจะช้าน



PIPERPLANT 29/01/91 17:24:50 CH= "A" PS= 1.

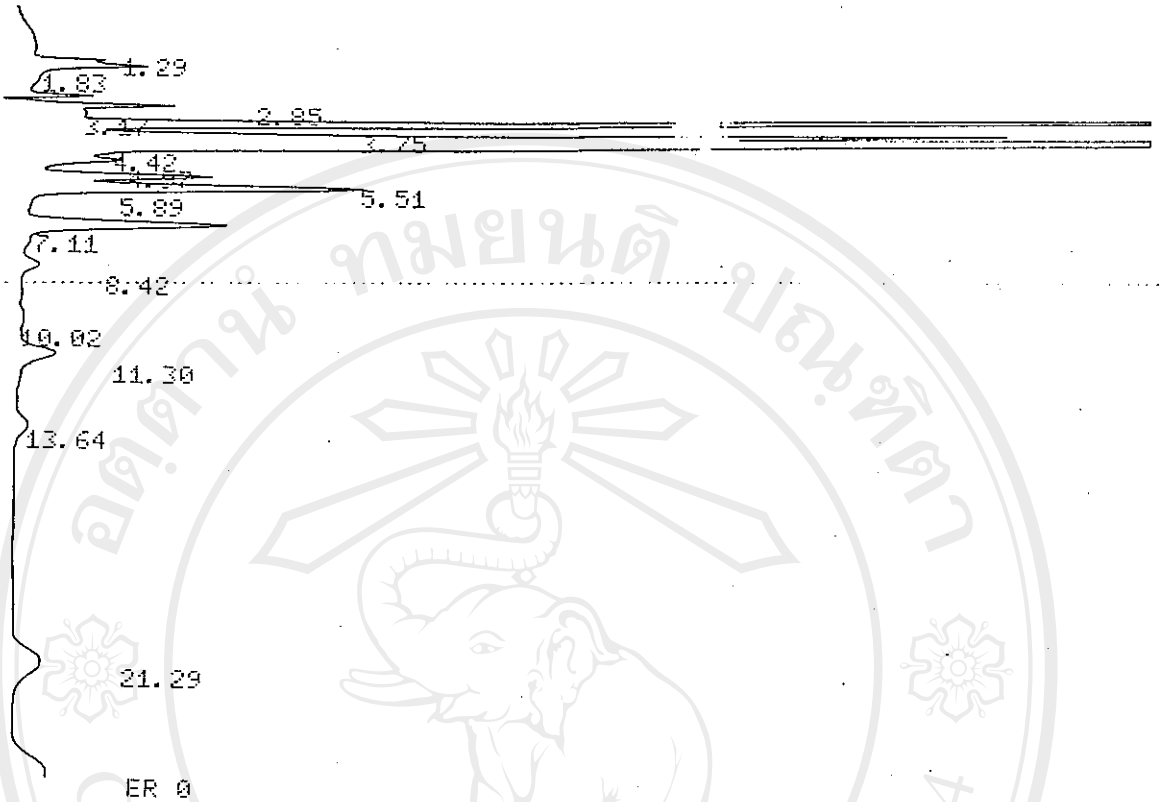
FILE 1. METHOD 5. RUN 18 INDEX 11

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF
1	0.	1.37	8906	01	
2	0.	1.75	89154	02	
3	0.	1.96	196280	02	
4	0.	2.16	389707	02	
5	0.	2.91	45384	02	
6	0.	3.28	124647	02	
7	0.	3.63	254202	02	
8	0.	3.86	653070	02	
9	0.	4.48	1573007	02	
RT2	3.311	5.29	253897	02	76690.95
RT1	3.383	5.93	137457	03	40628.5
12	0.	7.79	33711184	02	
RT6	11.931	8.7	174721	02	14644.792
14	0.	9.18	180745	02	
15	0.	10.	189086	02	
16	0.	10.73	30829	03	
RT7	0.325	11.49	21346	01	65575.136
RT3	0.85	21.83	48439	01	57213.357
TOTALS	19.8		38082261		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 2.26 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนก้านผล + ผลจะข้าน



ER 0

PIPERPLANT [illegible] 26/01/91 11:57:50 CH= "A" PS= 1.

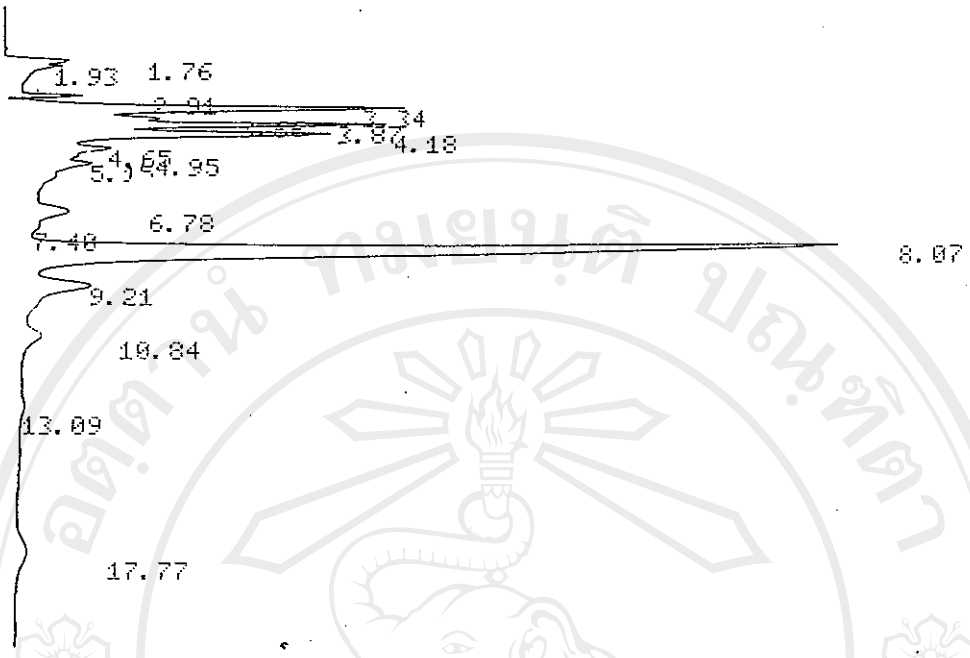
FILE 1. METHOD 5. RUN 6 INDEX 4

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA BC	RF
1	0.	1.29	93272 02	
2	0.	1.83	305942 02	
3	0.	2.85	58532 02	
4	0.	3.17	203094 02	
5	0.	3.75	1658800 02	
6	0.	4.42	4073849 02	
RT2	1.804	4.97	146942 02	81475.8
8	0.	5.51	263139 02	
RT1	11.166	5.89	600369 02	53765.078
10	0.	7.11	404849 02	
RT6	2.858	8.42	44489 03	15564.333
12	0.	10.02	19621 02	
RT7	1.817	11.3	128431 03	70689.455
14	0.	13.64	43923 01	
RT3	2.469	21.29	155050 01	62809.25
TOTALS	20.114		8200302	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 2.27 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของส่วนเหนือดินชะพลู



PIPERPLANT 30/01/91 14:09:49 CH= "A" PS= 1.

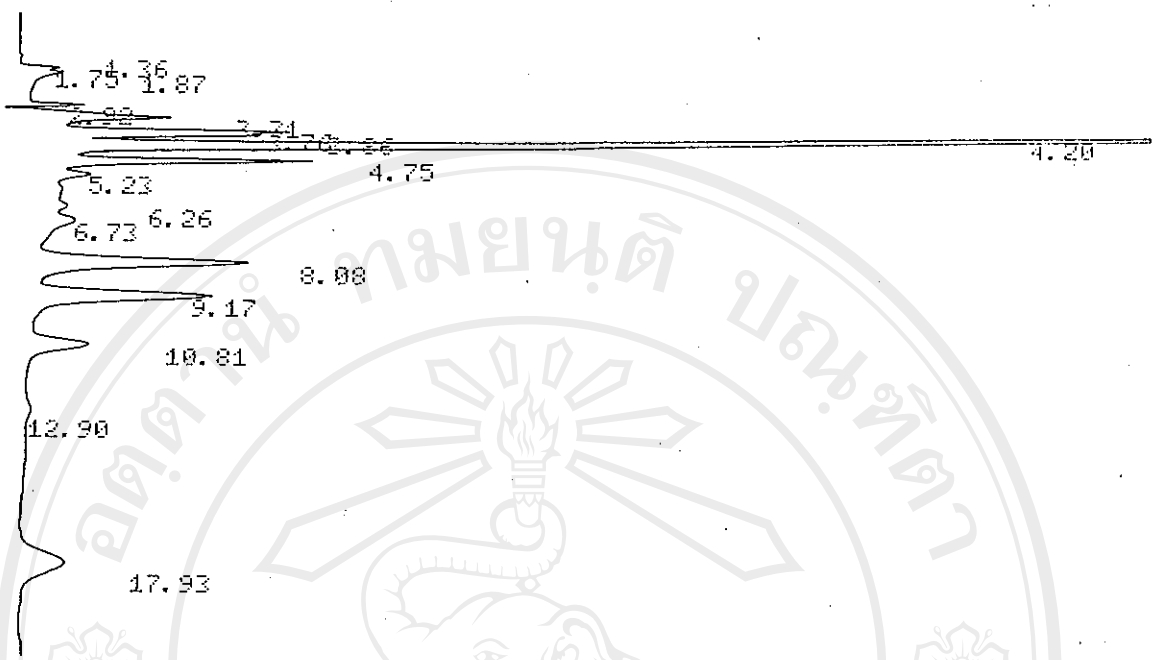
FILE 1. METHOD 5. RUN 12 INDEX 8

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF	
1	0.	1.76	64760	02		
2	0.	1.93	57115	03		
3	0.	2.91	43978	02		
4	0.	3.34	564886	02		
5	0.	3.66	165295	02		
6	0.	3.87	413509	02		
7	0.	4.18	486402	02		
8	0.	4.65	177206	02		
RT2	0.409	4.95	31546	02	77092.15	
RT1	4.472	5.15	187018	03	41826.115	
11	0.	6.78	87853	02		
12	0.	7.4	3416	03		
RT6	119.873	8.07	1793978	02	14965.625	
14	0.	9.21	143993	03		
RT7	0.773	10.84	54305	01	70262.591	
16	0.	13.09	11666	01		
RT3	1.074	17.77	62084	01	57776.607	
TOTALS	126.601		4349010			

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 2.28 โครมาโตแกรม แสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของก้านพลู



PIPERPLANT 30/01/91 14:32:32 CH= "A" PS= 1.

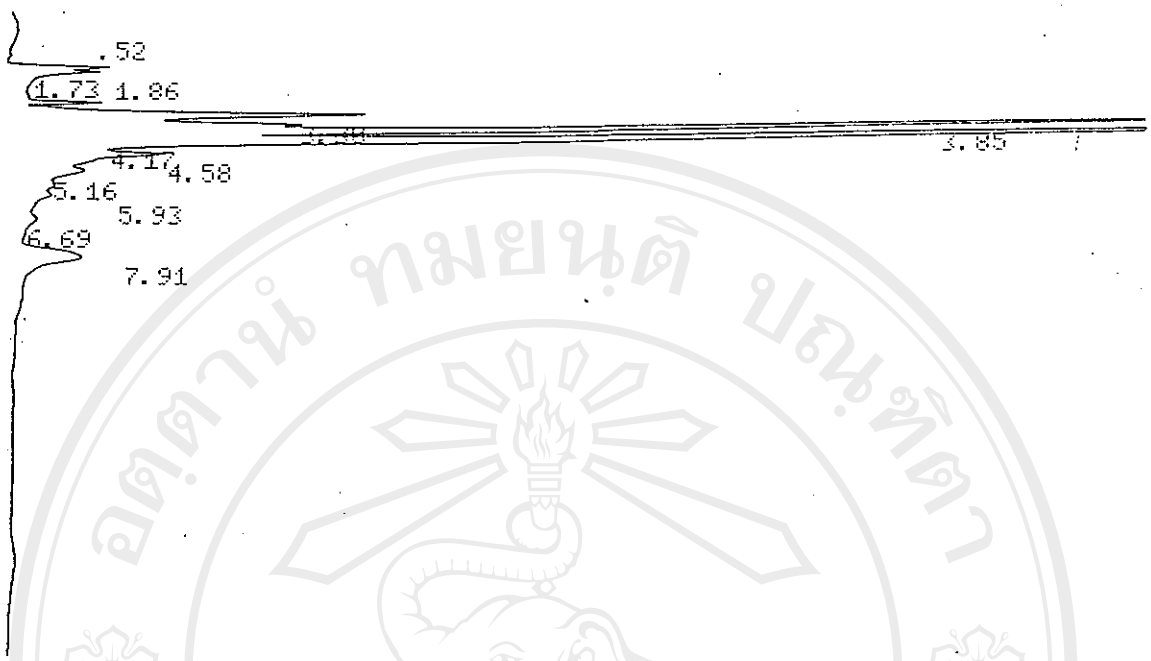
FILE 1. METHOD 5. RUN 13 INDEX 9

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF	
1	0.	1.36	1578	01		
2	0.	1.75	27258	02		
3	0.	1.87	52041	03		
4	0.	2.92	42323	02		
5	0.	3.31	299160	02		
6	0.	3.76	247797	02		
7	0.	3.86	189556	02		
8	0.	4.2	1945554	02		
RT2	4.564	4.75	351876	02	77092.15	
RT1	1.713	5.23	71648	03	41826.115	
11	0.	6.26	18487	02		
12	0.	6.73	71240	02		
RT6	31.358	8.08	469293	02	14965.625	
14	0.	9.17	425379	03		
RT7	2.186	10.81	153552	01	70262.591	
16	0.	12.9	17003	01		
RT3	3.923	17.93	226644	01	57776.607	
TOTALS	43.744		4610389			

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 2.29 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของผลพลู



PIPERPLANT 30/01/91 14:58:08 CH= "A" FS= 1.

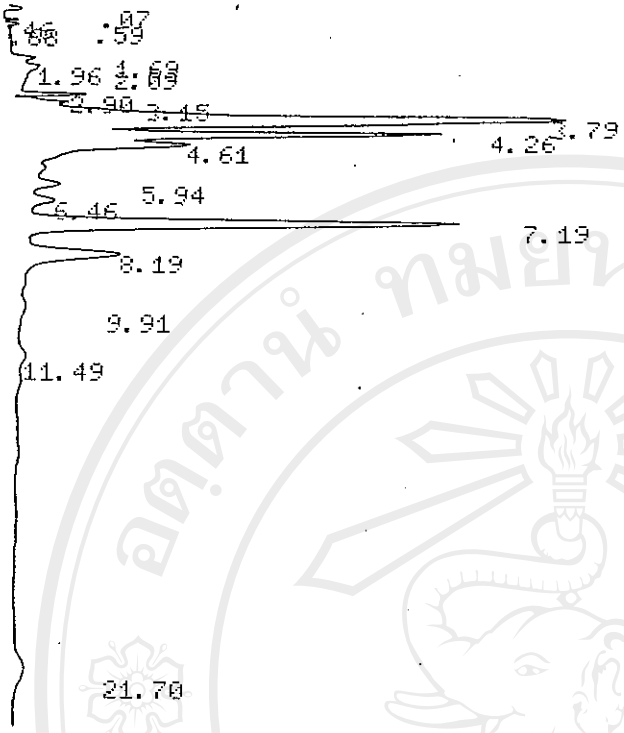
FILE 1. METHOD 5. RUN 14 INDEX 10

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF
1	0.	0.52	38258	02	
2	0.	1.73	100404	02	
3	0.	1.86	137112	02	
4	0.	3.3	683394	02	
5	0.	3.85	1664576	02	
6	0.	4.17	1825723	02	
RT2	4.187	4.58	322749	02	77092.15
8	0.	5.16	221138	02	
RT1	2.206	5.93	92307	02	41826.115
10	0.	6.69	62950	02	
RT6	14.668	7.91	219514	03	14965.625
TOTALS	21.061		5368125		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 2.30 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบพลู



PIPERPLANT 29/01/91 14:27:16 CH= "A" PS= 1.

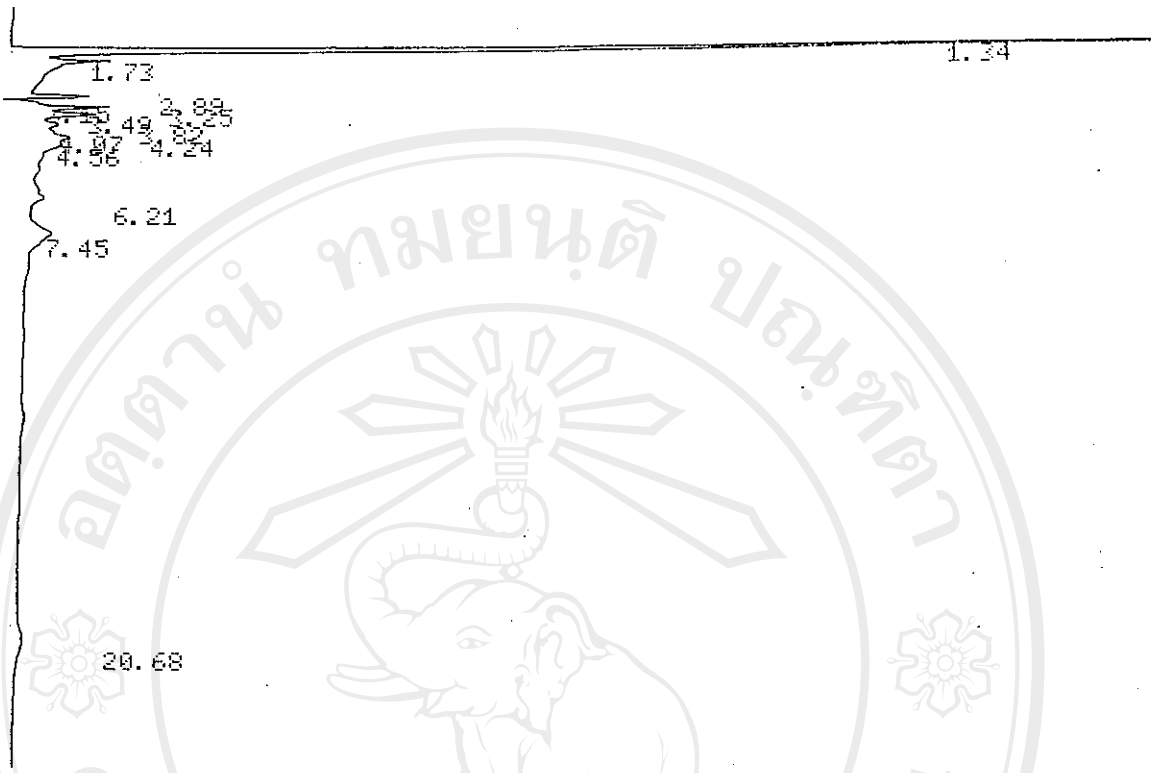
FILE 1. METHOD 5. RUN 11 INDEX 4

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF
1	0.	0.07	11153	01	
2	0.	0.46	3512	02	
3	0.	0.59	7607	02	
4	0.	0.68	1413	03	
5	0.	1.69	21011	02	
6	0.	1.96	25104	02	
7	0.	2.09	38319	03	
8	0.	2.9	42889	02	
9	0.	3.15	55160	02	
10	0.	3.79	1448337	02	
11	0.	4.26	592786	02	
RT2	6.061	4.61	464810	08	76690.95
RT1	0.863	5.94	35054	06	40628.5
14	0.	6.46	34522	07	
15	0.	7.19	726461	01	
RT6	14.369	8.19	210430	01	14644.792
17	0.	9.91	13511	01	
RT7	0.259	11.49	17024	01	65575.136
RT3	0.92	21.7	52603	01	57213.357
TOTALS	22.472		3801706		

รูปที่ 2.31 โครมาโตแกรม แสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน ของใบ P.peepuloides

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



PIPERPLANT 29/01/91 14:54:17 CH= "A" PS= 1.

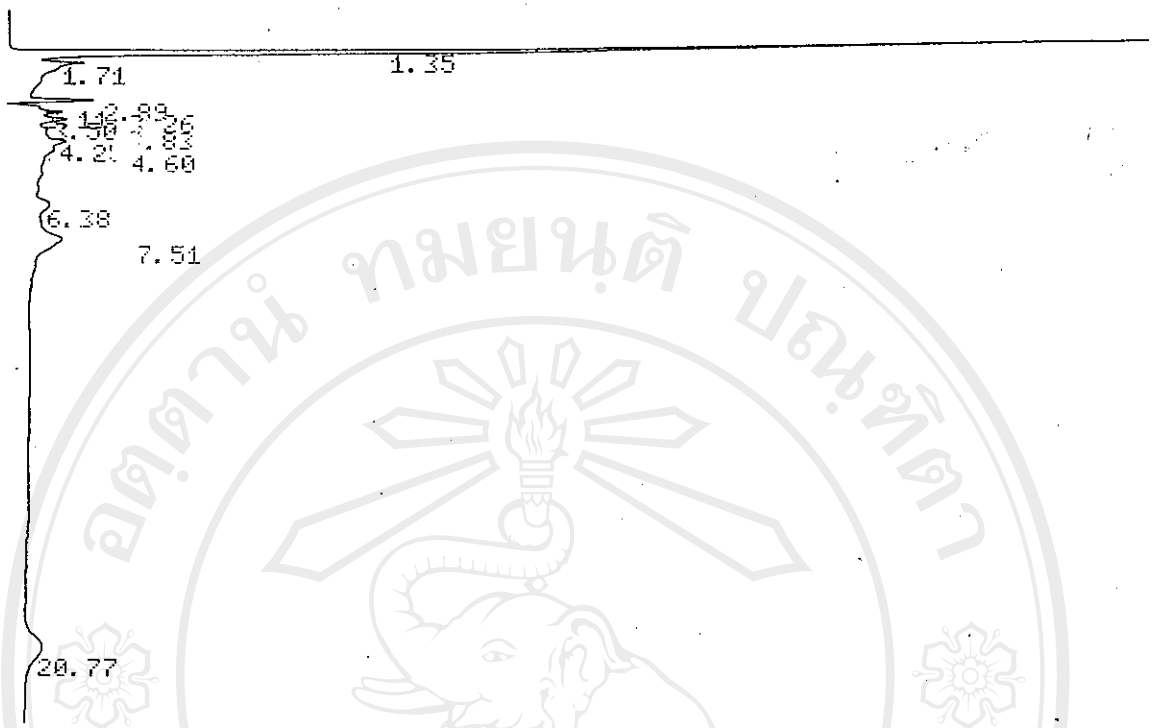
FILE 1. METHOD 5. RUN 12 INDEX 5

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF
1	0.	1.34	1183394	08	
2	0.	1.73	58198	05	
3	0.	2.89	49534	02	
4	0.	3.15	24781	02	
5	0.	3.25	89148	02	
6	0.	3.49	98522	02	
7	0.	3.82	62253	02	
8	0.	4.07	28210	02	
9	0.	4.24	85477	02	
RT2	0.221	4.56	16971	03	76690.95
RT1	0.759	6.21	30838	01	40628.5
12	0.	7.45	72752	01	
RT3	0.415	20.68	23717	01	57213.357
TOTALS	1.395		1823795		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 2.32 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของก้านพลูตีนช้าง



PIPERPLANT 29/01/91 15:20:25 CH= "A" PS= 1.

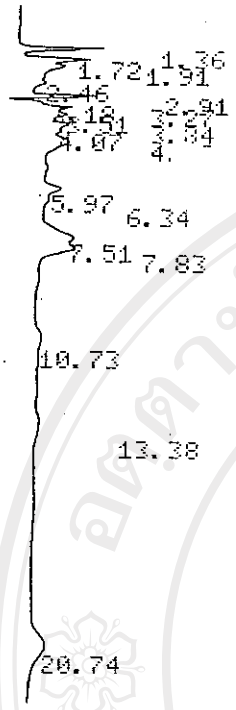
FILE 1. METHOD 5. RUN 13 INDEX 6

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF	
1	0.	1.35	939141	02		
2	0.	1.71	278868	02		
3	0.	2.89	66479	02		
4	0.	3.11	26689	02		
5	0.	3.26	60192	02		
6	0.	3.5	82323	02		
7	0.	3.83	43559	02		
8	0.	4.25	113780	02		
RT2	2.258	4.6	173205	02	76690.95	
RT1	0.907	6.38	36832	03	40628.5	
11	0.	7.51	69959	01		
RT3	1.623	20.77	92879	01	57213.357	
TOTALS	4.788		1989906			

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 2.33 โครมาโตแกรม แสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน ของผลพลูตีนช้าง



PIPERPLANT 29/01/91 15:45:48 CH= "A" PS= 1.

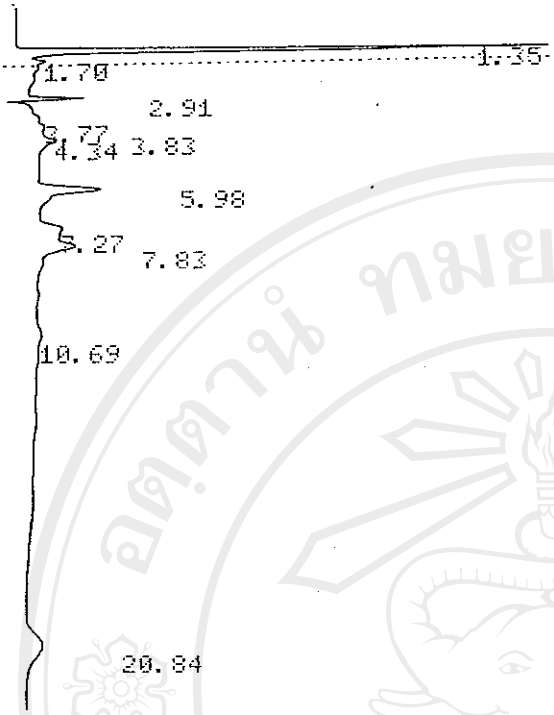
FILE 1. METHOD 5. RUN 14 INDEX 7

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF
1	0.	1.36	46979	01	
2	0.	1.72	60168	02	
3	0.	1.91	79900	02	
4	0.	2.46	18213	03	
5	0.	2.91	48800	02	
6	0.	3.18	27098	02	
7	0.	3.27	66883	02	
8	0.	3.51	75817	02	
9	0.	3.84	77454	02	
10	0.	4.07	39711	02	
11	0.	4.43	108273	03	
RT1	0.714	5.97	29028	02	40628.5
13	0.	6.34	7352	03	
14	0.	7.51	87527	02	
RT6	4.835	7.83	70805	03	14644.792
16	0.	10.73	16569	01	
RT7	0.315	13.38	20605	01	65575.136
RT3	1.455	20.74	82261	01	57213.357
TOTALS	7.319		964451		

รูป 2.34 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบพลูตีนช้าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



PIPERPLANT 29/01/91 16:10:11 CH= "A" PS= 1.

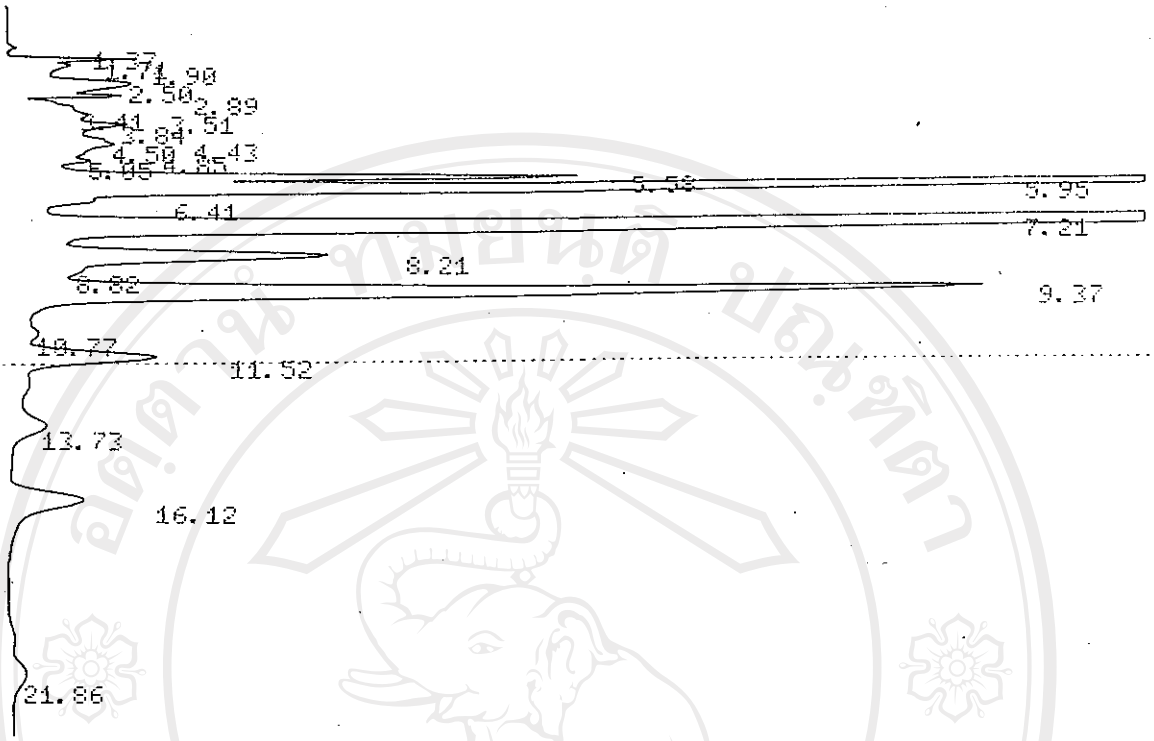
FILE 1. METHOD 5. RUN 15 INDEX 8

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF
1	0.	1.35	377966	08	
2	0.	1.7	34773	05	
3	0.	2.91	40478	02	
4	0.	3.77	97035	02	
5	0.	3.83	52158	02	
6	0.	4.34	47873	03	
RT1	2.034	5.98	82623	01	40628.5
8	0.	7.27	48478	02	
RT6	6.278	7.83	91948	03	14644.792
10	0.	10.69	11281	01	
RT3	1.723	20.84	98590	01	57213.357
TOTALS	10.035		983203		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 2.35 โครมาโตแกรม แสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน ของรากพลูตีนช้าง



PIPERPLANT 29/01/91 16:35:17 CH= "A" PS= 1.

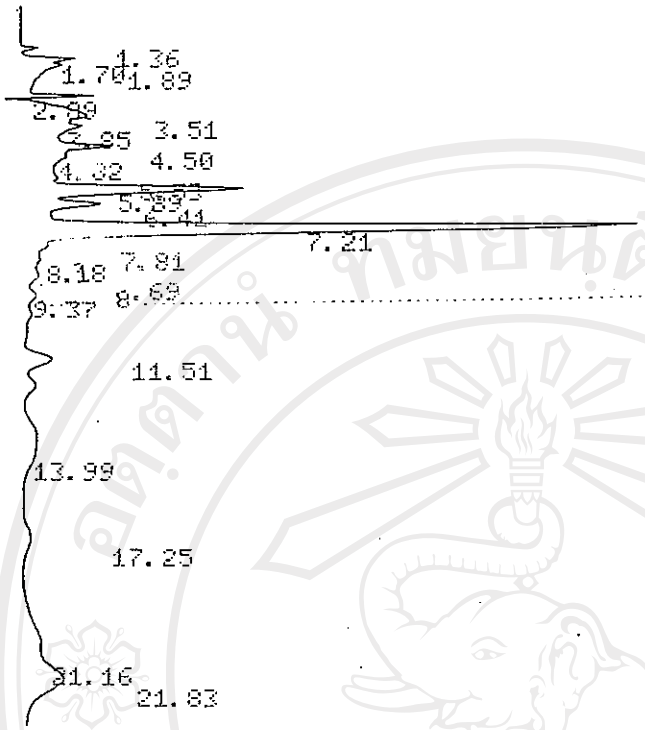
FILE 1. METHOD 5. RUN 16 INDEX 9

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF
1	0.	1.37	7404	01	
2	0.	1.71	99044	02	
3	0.	1.9	131070	02	
4	0.	2.5	314404	02	
5	0.	2.89	93273	02	
6	0.	3.41	133354	02	
7	0.	3.51	137857	02	
8	0.	3.84	251509	02	
9	0.	4.43	132956	02	
10	0.	4.5	193692	02	
11	0.	4.85	64100	02	
RT2	1.574	5.05	120736	02	76690.95
13	0.	5.58	790086	02	
RT1	82.767	5.95	3362700	02	40628.5
15	0.	6.41	125514	02	
16	0.	7.21	6675080	02	
17	0.	8.21	826899	02	
RT6	5.919	8.82	86676	02	14644.792
19	0.	9.37	2250463	03	
20	0.	10.77	18557	02	
RT7	5.036	11.52	330256	03	65575.136
22	0.	13.73	110613	01	
23	0.	16.12	335904	01	
RT3	1.186	21.86	67846	01	57213.357
TOTALS	96.482		16660193		

รูป 2.36 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของก้าน Piper sp.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



PIPERPLANT 29/01/91 17:00:20 CH= "A" PS= 1.

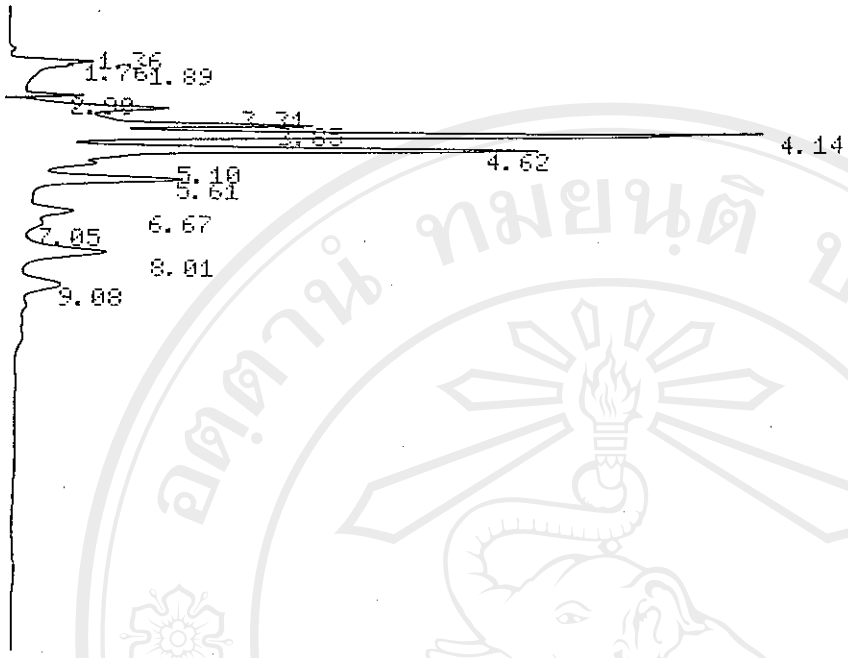
FILE 1. METHOD 5. RUN 17 INDEX 10

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF
1	0.	1.36	8528	01	
2	0.	1.7	61980	02	
3	0.	1.89	151556	02	
4	0.	2.89	68126	02	
5	0.	3.51	275924	02	
6	0.	3.85	186598	02	
7	0.	4.5	238834	02	
RT2	1.653	4.82	126805	02	76690.95
9	0.	5.53	133258	02	
RT1	11.16	5.89	453387	02	40628.5
11	0.	6.41	178198	02	
12	0.	7.21	1262704	02	
13	0.	7.81	44013	02	
14	0.	8.18	54899	02	
RT6	3.705	8.69	54269	02	14644.792
16	0.	9.37	65596	03	
RT7	1.747	11.51	114539	01	65575.136
18	0.	13.99	110589	01	
19	0.	17.25	34611	01	
20	0.	21.16	87540	02	
RT3	4.148	21.83	237334	03	57213.357
TOTALS	22.413		3949288		

รูป 2.37 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบ Piper sp.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



PIPERPLANT 30/01/91 13:46:35 CH= "A" PS= 1.

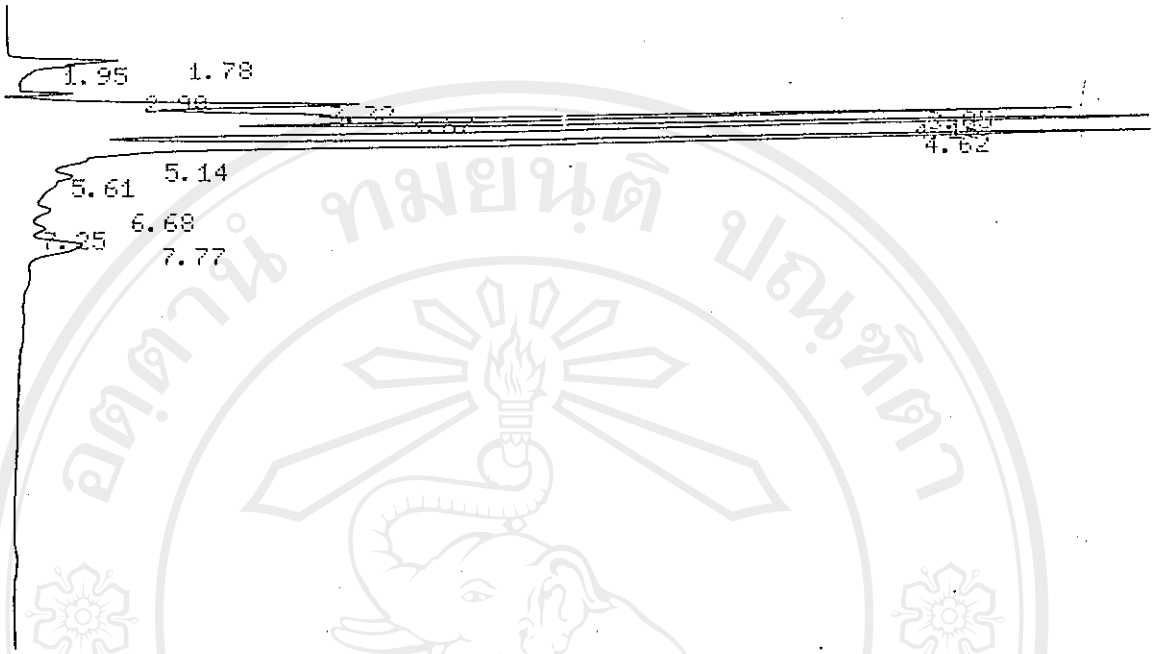
FILE 1. METHOD 5. RUN 11 INDEX 7

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF
1	0.	1.36	2545	01	
2	0.	1.76	65007	02	
3	0.	1.89	49433	03	
4	0.	2.9	42820	02	
5	0.	3.31	294225	02	
6	0.	3.85	454082	02	
7	0.	4.14	971746	02	
RT2	9.706	4.62	748284	02	77092.15
9	0.	5.1	116056	02	
RT1	6.177	5.61	258341	03	41826.115
11	0.	6.67	77096	02	
12	0.	7.05	27945	03	
RT6	12.569	8.01	188102	01	14965.625
14	0.	9.08	82437	01	
TOTALS	28.452		3378119		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 2.38 โครมาโตแกรม แสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน ของก้าน Piper - 2



PIPERPLANT 30/01/91 12:37:51 CH= "A" PS= 1.

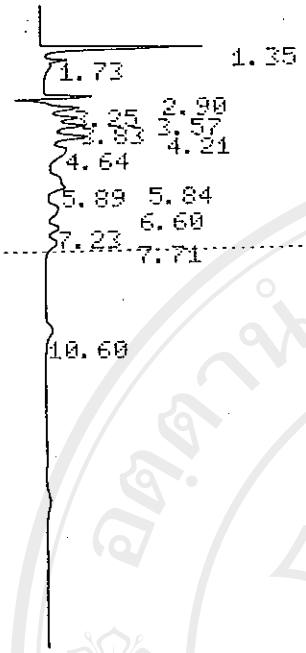
FILE 1. METHOD 5. RUN 8 INDEX 4

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF
1	0.	1.78	106909	02	
2	0.	1.95	63961	03	
3	0.	2.9	41223	02	
4	0.	3.32	525685	02	
5	0.	3.67	384189	02	
6	0.	3.85	1065232	02	
7	0.	4.16	1501322	02	
RT2	20.384	4.62	1571478	08	77092.15
9	0.	5.14	186	05	
RT1	1.019	5.61	42621	05	41826.115
11	0.	6.68	23712	01	
12	0.	7.25	16625	02	
RT6	9.115	7.77	136403	03	14965.625
TOTALS	30.518		5479546		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 2.39 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบ Piper-2



PIPERPLANT 30/01/91 13:01:03 CH= "A" PS= 1.

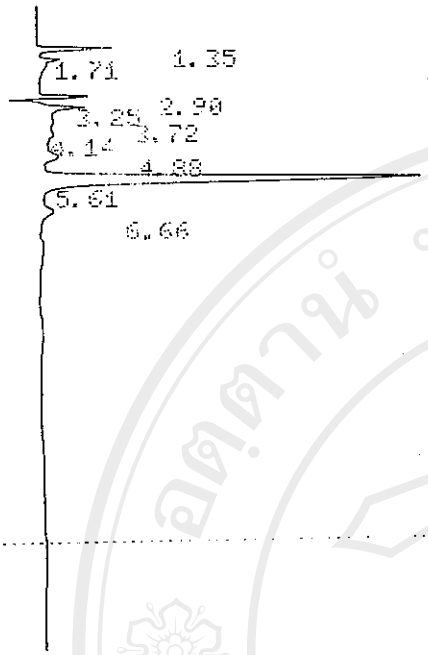
FILE 1. METHOD 5. RUN 9 INDEX 5

ANALYST: UMPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF	
1	0.	1.35	98666	01		
2	0.	1.73	10184	01		
3	0.	2.9	40961	02		
4	0.	3.25	95554	02		
5	0.	3.57	58016	02		
6	0.	3.83	68369	02		
7	0.	4.21	51275	03		
RT2	0.439	4.64	33805	01	77092.15	
RT1	0.629	5.84	26313	02	41826.115	
10	0.	5.89	19732	03		
11	0.	6.6	26275	02		
12	0.	7.23	19983	02		
RT6	1.501	7.71	22472	03	14965.625	
RT7	9.316	10.6	22157	01	70262.591	
TOTALS	2.885		593762			

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 2.40 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของก้าน Piper 89-1551



PIPERPLANT 30/01/91 13:23:53 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 5. RUN 10 INDEX 6

ANALYST: UNPAI

NAME	PPM	RT	AREA	BC	RF	
1	0.	1.35	44430	01		
2	0.	1.71	9771	01		
3	0.	2.9	41289	02		
4	0.	3.25	72613	03		
5	0.	3.72	3060	01		
6	0.	4.14	4366	01		
RT2	0.252	4.88	19422	01	77052.15	
RT1	13.785	5.61	576596	02	41826.115	
9	0.	6.66	28813	03		
TOTALS	14.037		800360			

รูป 2.41 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบ Piper89-1551

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.9 การทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย และระดับความเป็นพิษของส่วนสกัด

หยาบจากพืชสกุลพริกไทยที่มีผลการวิเคราะห์โดย HPLC ว่ามีปริมาณสารออกฤทธิ์สูง

ทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงอย่างคร่าว ๆ ของส่วนสกัดหยาบจากพืชสกุลพริกไทย ตัวอย่างที่ 1-12 จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าส่วนสกัดหยาบส่วนใบดีปลี (ตัวอย่างที่ 8-10) ไม่แสดงฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายที่ 100 ppm และส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบจะช้าน (ตัวอย่างที่ 12) ฆ่าลูกน้ำยุงลายไม่หมดที่ 50 ppm จึงไม่ทดสอบสารในตัวอย่างที่ 8-10 และ 12

เตรียมสารละลาย Stock Solution ของส่วนสกัดหยาบผลพริกไทย, ก้าน, ผลดีปลี และก้านจะช้าน (ตัวอย่างที่ 1-7 และ 11) เข้มข้น 1 % (10000 ppm) โดยละลายส่วนสกัดหยาบ 100 มิลลิกรัม ในตัวทำละลายอะซิโตนได้สารละลายปริมาตร 10 มล. แบ่งนำมาใช้ทดสอบตามความเข้มข้นที่ต้องการ

สารที่ใช้ทดสอบ : สารละลายในอะซิโตนของส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของผลพริกไทย, ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทนโดยตรง และส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนของผลและก้านดีปลี และส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของก้านจะช้านความเข้มข้นต่าง ๆ ในหน่วย ppm

ความเข้มข้นควบคุม : 0 ppm ใช้อะซิโตนปริมาณเท่ากับอะซิโตนในความเข้มข้นสูงสุดในแต่ละการทดสอบ ละลายน้ำได้ปริมาตร 200 ซม^3

สัตว์ที่ใช้ทดสอบ : ลูกน้ำยุงลายวัย 3 จำนวน 20 ตัว : 1 ความเข้มข้น : 1 ซ้ำ

วิธีการที่ใช้ทดสอบ : การแช่ในสารละลาย (immersion) ใช้สารละลายในน้ำปริมาตร 200 ซม^3 : 1 ความเข้มข้น : 1 ซ้ำ ในบีกเกอร์ขนาด 200 มล.

จำนวนซ้ำที่ใช้ : 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ความเข้มข้น

เวลาที่ใช้ทดสอบ : 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สถานที่ทดสอบ : ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การหาระดับความเป็นพิษ : คำนวณหาค่า LC_{50} และ LC_{99} โดยการนำข้อมูลจำนวนลูกน้ำยุงที่ตายใน 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำ Probit log analysis

ผลการทดสอบ : แสดงดังตารางที่ 2.16

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.16 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายและระดับความเป็นพิษของส่วนสกัดทยาบจากพืชสกุลพริกไทยที่มีสารออกฤทธิ์ปริมาณสูง

ชนิดของพืช	ตัวทำละลายในการสกัด	จำนวนตาย (ตัว/60 ตัว)						ระดับความเป็นพิษ (ppm)	
		0 ppm	1 ppm	2 ppm	4 ppm	6 ppm	8 ppm	LC_{50}	LC_{99}
ผลพริกไทย	Hexane	0	Ø	17	4Ø	57	6Ø	2.8960	10.2978
		0 ppm	2 ppm	3 ppm	4 ppm	5 ppm	6 ppm		
ผลของดีปลี	Hexane	0	13	35	50	53	60	2.7507	8.1616
		0 ppm	1 ppm	2 ppm	3 ppm	4 ppm	5 ppm		
ผลดีปลี	CH_2Cl_2	0	0	9	23	49	55	3.0899	7.9294
		0 ppm	2 ppm	4 ppm	6 ppm	8 ppm	10 ppm		
ผลดีปลี	$CH_2Cl_2^*$	0	0	3	12	29	44	8.065	22.303

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.16 (ต่อ)

ชนิดของพืช	ตัวทำละลายในการสกัด	จำนวนตาย (ตัว/60 ตัว)						ระดับความเป็นพิษ (ppm)	
		0 ppm	1 ppm	2 ppm	4 ppm	6 ppm	8 ppm	LC_{50}	LC_{99}
ก้านดีปลี	Hexane	0	0	11	36	55	60	3.2840	10.8060
		0 ppm	2 ppm	4 ppm	6 ppm	8 ppm	10 ppm		
ก้านดีปลี	CH_2Cl_2	0	0	14	31	41	56	5.888	19.546
		0 ppm	2 ppm	4 ppm	6 ppm	8 ppm	10 ppm		
ก้านดีปลี	CH_2Cl_2*	0	0	1	10	20	40	8.837	22.945
		0 ppm	5 ppm	7.5 ppm	10 ppm	12.5 ppm	15 ppm		
ก้านจะช้าน	Hexane	0	0	10	19	43	54	10.747	23.318

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

164