บทที่ 3
วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

3.1 การคัดเลือกชนิดของพืชสกุลพริกไทยที่ออกฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุง

จากการทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงของส่วนสกัดหยาบเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน และเมธานอล ของส่วนต่าง ๆ จากพืชสกุลพริกไทย 9 ชนิด ด้วยวิธีการในหัวข้อ 2.5.1 พบว่าในตัวทำละลายต่างกัน ส่วนของพืชต่างกัน และส่วนเดียวกันในพืชต่างชนิดกัน มีผลต่อการตายของลูกน้ำยุงลายต่างกัน (ตาราง 2.1)

เมื่อใช้ค่า LC_{50} เป็นเกณฑ์ สามารถจัดกลุ่มเรียงลำดับส่วนสกัดหยาบต่าง ๆ จากพืชสกุลพริกไทยที่ออกฤทธิ์สูงในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย (ค่า LC_{50} น้อยกว่า 10.00 ppm) ได้ดังตาราง 3.1

ตาราง 3.1 ส่วนสกัดหยาบจากพืชสกุลพริกไทยที่มีฤทธิ์สูงในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย

ลำดับที่	ชื่อพืช	ส่วนของพืช	ส่วนสกัด	LC_{50} (ppm)
1	P.retrofractum Vahl.	ก้าน	CH_2Cl_2	0.2904
2	P.boehmaeriaefolium Wall.	ผล	Hexane	0.5097
3	P.pedicellatum Wall.	ก้าน	Hexane	1.995
4	P.nigrum Linn.	ผล	Hexane	2.129
5	P.retrofractum Vahl.	ผล	CH_2Cl_2	2.632
6	P.retrofractum Vahl.	ผล	Hexane	3.008
7	P.retrofractum Vahl.	ก้าน	Hexane	3.468

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.1 (ต่อ)

ลำดับที่	ชื่อพืช	ส่วนของพืช	ส่วนสกัด	LC_{50} (ppm)
8	P. pedicellatum Wall.	ก้าน	CH_2Cl_2	4.211
9	P. peepuloides Roxb.	ราก+ก้าน	Hexane	4.440
10	P. peepuloides Roxb.	ราก+ก้าน	CH_2Cl_2	5.625
11	P. nigrum Linn.	ผล	CH_2Cl_2	7.740
12	P. boehmaeriaefolium Wall.	ก้าน	Hexane	8.428

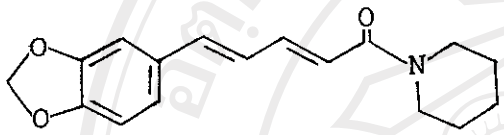
ดีปลี (Piper retrofractum Vahl.) ให้ผลการทดสอบที่เด่นมากกว่าพืชชนิดอื่น โดยส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนส่วนก้านแสดงฤทธิ์สูงสุดในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนส่วนก้าน และส่วนสกัดหยาบจากส่วนผลแสดงฤทธิ์ใกล้เคียงกับส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของผลพริกไทยดำที่มีรายงานว่ามีสารออกฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุง (50) สำหรับส่วนสกัดหยาบจากส่วนใบนั้น ไม่มีฤทธิ์ต่อการตายของลูกน้ำยุงจึงไม่ได้รายงานระดับความเป็นพิษไว้ในตาราง 2.1 การสกัดและแยกสารบริสุทธิ์จากดีปลีจึงทำเฉพาะจากส่วนก้านเท่านั้น

3.2 การสกัดและแยกสารบริสุทธิ์จากก้านดีปลี

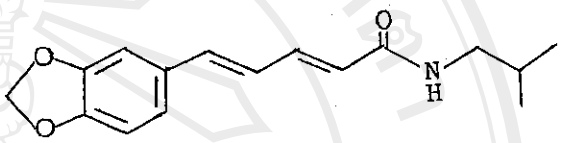
การแยกสารบริสุทธิ์จากก้านดีปลี แสดงดังแผนภาพที่ 1 ได้สารประกอบบริสุทธิ์ 6 สารคือ RT.1, RT.2, RT.3, RT.4, RT.6 และ RT.7 ซึ่งจากการศึกษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

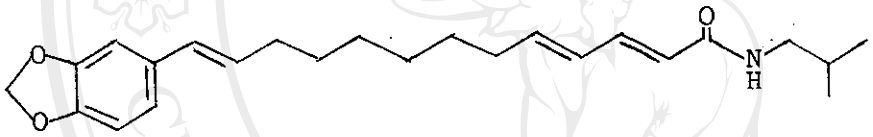
สูตรโครงสร้างโดยใช้ข้อมูลทาง spectroscopy และคุณสมบัติทางกายภาพ ทำให้ทราบว่าสารประกอบทั้ง 6 สารคือ Piperine, Piperlonguminine, Guineensine, Cinnamic acid piperidide, Retrofractamide C และ Pipercide ตามลำดับ และมีโครงสร้างดังนี้



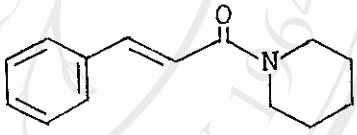
RT.1 (Piperine)



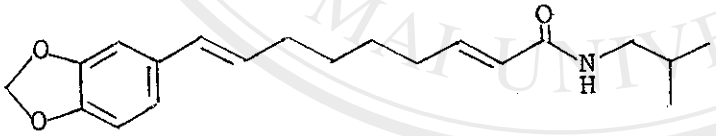
RT.2 (Piperlonguminine)



RT.3 (Guineensine)



RT.4 (Cinnamic acid piperidide)



RT.6 (Retrofractamide C)

RT.7 (Pipercide)

สารทั้ง 6 ชนิดนี้ มีรายงานการสกัดได้จากส่วนผลของพริกไทยดำ และจากส่วนเหนือดินของดีปลี ดังตารางที่ 1.1 บทที่ 1 รายละเอียดการวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบทั้ง 6 ชนิดมีดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

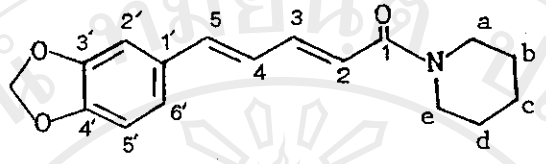
3.2.1 การวิเคราะห์โครงสร้างของ RT.1 (Piperine)

UV spectrum (รูป 3.1) แสดงการดูดกลืนแสงที่ 242 และ 340 nm

IR spectrum (รูป 3.2) แสดงการดูดกลืนแสงของหมู่ C-H ยืดของ CH_2 ที่ 2940 cm^{-1}, C=O ยืดที่ 1639 cm^{-1}, C═C ยืดของ aromatic ที่ 1583, 1510, 1495 และ 1445 cm^{-1}, C-O ยืดที่ 1255, 1195 และ 1135 cm^{-1}, trans C=C งอที่ 998 และ 925 cm^{-1}

NMR spectrum (รูป 3.3-3.4) แสดงสัญญาณ multiplet ที่ δ 1.59 เป็นสัญญาณของ methylene proton 4 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง b และ d ในวง piperidine สัญญาณ multiplet ที่ δ 1.67 เป็นของ methylene proton 2 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง c ในวง piperidine, สัญญาณ broad spectrum ที่ δ 3.53 เป็นสัญญาณของ methylene proton 2 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง e, สัญญาณ broad spectrum ที่ δ 3.64 เป็นสัญญาณของ methylene proton 2 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง a ในวง piperidine, สัญญาณ singlet ที่ δ 5.97 เป็นสัญญาณของโปรตอนในหมู่ methylene dioxy 2 ตัว, สัญญาณ doublet ที่ δ 6.44 เป็นสัญญาณของ olefinic proton 1 ตัว ตรงคาร์บอน ตำแหน่ง 2, สัญญาณ doublet of doublet ที่ δ 6.70 เป็นสัญญาณของ olefinic proton 1 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 4, สัญญาณ doublet ที่ δ 6.74 เป็นสัญญาณของ olefinic proton 1 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 5, สัญญาณ doublet ที่ δ 6.78 เป็นสัญญาณของ aromatic proton 1 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 5', สัญญาณ doublet of doublet ที่ δ 6.89 เป็นสัญญาณของ aromatic proton 1 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 6', สัญญาณ doublet ที่ δ 6.98 เป็นสัญญาณของ aromatic proton 1 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 2', สัญญาณ doublet of doublet of doublet of doublet ที่ δ 7.40 เป็นสัญญาณของ olefinic proton 1 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 3 และสารนี้มีจุดหลอมเหลว 128-129°C ใกล้เคียงกับ Piperine ซึ่งมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{17}H_{19}NO_3$, มวลโมเลกุล 285 (15)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



RT.1 (Piperine)

3.2.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ RT.2 (Piperlonguminine)

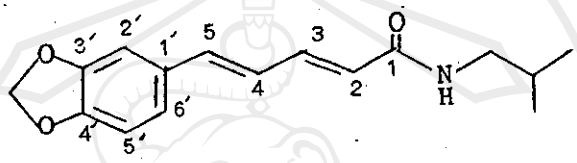
UV spectrum (รูป 3.5) แสดงการดูดกลืนแสงที่ 242 และ 336 nm

IR spectrum (รูป 3.6) แสดงการดูดกลืนแสงของหมู่ N-H ยืดที่ 3284 cm^{-1}, C-H ยืดของหมู่ CH_2 ที่ 2950 cm^{-1}, C=O ยืดที่ 1645 cm^{-1}, C=C ยืดที่ 1618 cm^{-1}, C═C ยืดของ aromatic ที่ 1505, 1490 cm^{-1}, N-H งอที่ 1550 cm^{-1}, C-H งอของหมู่ CH_3 ที่ 1440 cm^{-1}, C-O ยืดที่ 1258, 1040 cm^{-1}, C=C งอที่ 990 และ 925 cm^{-1}

NMR spectrum (รูป 3.7-3.8) แสดงสัญญาณ doublet ที่ δ 0.95 เป็นสัญญาณของ proton 6 ตัว ในหมู่ methyl 2 หมู่ของ isobutyl amide, สัญญาณ multiplet ที่ δ 1.83 เป็นสัญญาณของ proton 1 ตัวของ isobutyl ($-\underline{CH}Me_2$), สัญญาณ triplet ที่ δ 3.18 เป็นสัญญาณของ methylene proton 2 ตัว ของหมู่ isobutyl amide, สัญญาณ broad spectrum ที่ δ 5.54 เป็นสัญญาณของ proton ที่ติดกับไนโตรเจน, สัญญาณ doublet ที่ δ 5.92 เป็นสัญญาณของ olefinic proton 1 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2, สัญญาณ singlet ที่ δ 5.98 เป็นสัญญาณของโปรตอนในหมู่ methylene dioxy 2 ตัว, สัญญาณ doublet of doublet ที่ δ 6.66 เป็นสัญญาณของ olefinic proton 1 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 4, สัญญาณ doublet ที่ δ 6.77 เป็นของ aromatic proton 1 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 5', สัญญาณ doublet ที่ δ 6.79 เป็นของ olefinic proton 1 ตัว ตรง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คาร์บอนตำแหน่ง 5 , สัญญาณ doublet of doublet ที่ δ 6.88 เป็นของ aromatic proton 1 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 6′, สัญญาณ doublet ที่ δ 6.98 เป็นสัญญาณของ aromatic proton 1 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 2′, สัญญาณ doublet of doublet ที่ δ 7.36 เป็นของ olefinic proton 1 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 3 สารนี้มีจุดหลอมเหลว 160-161°C ใกล้เคียงกับ Piperlonguminine ซึ่งมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{16}H_{19}NO_3$ มวลโมเลกุล 273 (15)



RT.2 (Piperlonguminine)

หมายเหตุ.- * สัญญาณ singlet ที่ δ 1.6 เป็นสัญญาณของ proton 2 ตัวในน้ำ (H_2O)

3.2.3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ RT.3 (Guineensine)

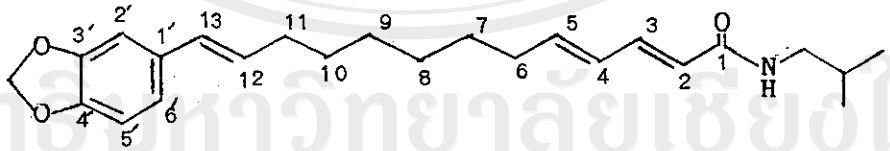
UV spectrum (รูป 3.9) แสดงการดูดกลืนแสงที่ 208 และ 258 nm

IR spectrum (รูป 3.10) แสดงการดูดกลืนแสงของหมู่ N-H ยืดที่ 3310 cm^{-1}, C-H ยืดของ CH_2 ที่ 2925 cm^{-1}, C=O ยืด 1660 cm^{-1}, C=C ยืดที่ 1630 และ 1620 cm^{-1}, N-H งอที่ 1545 cm^{-1}, C═══C ยืดของ aromatic ที่ 1510 และ 1495 cm^{-1}, C-H งอของ CH_3 ที่ 1445 cm^{-1}, C-O ยืดที่ 1260 cm^{-1}, C=C งอที่ 1000 และ 920 cm^{-1}

NMR spectrum (รูป 3.11-3.13) แสดงสัญญาณ doublet ที่ δ 0.92 ของโปรตอน 6 ตัว ในหมู่ methyl 2 หมู่ ของ Isobutyl amide, สัญญาณ multiplet ที่ δ 1.33 เป็นของ methylene proton 2 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 9, สัญญาณ multiplet ที่ δ 1.43 เป็นของ methylene proton 2 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 8, สัญญาณ doublet ที่ δ 1.62 เป็นสัญญาณของ methylene proton 4 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 7 และ 10, สัญญาณ multiplet ที่ δ 1.80

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นของ proton 1 ตัว ของ isobutyl ($-C\underline{H}Me_2$), สัญญาณ multiplet ที่ δ 2.16 เป็นของ methylene proton 4 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 6 และ 11, สัญญาณ triplet ที่ δ 3.16 เป็นของ methylene proton 2 ตัว ของหมู่ isobutyl amide, สัญญาณ broad spectrum ที่ δ 5.50 เป็นของ proton 1 ตัว ที่ติดกับไนโตรเจน, สัญญาณ doublet ที่ δ 5.74 เป็นของ olefinic proton 1 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 2, สัญญาณ singlet ที่ δ 5.93 เป็นของ proton 2 ตัว ของหมู่ methylene dioxy, สัญญาณ multiplet ที่ δ 6.07 เป็นของ olefinic proton 3 ตัว ที่คาร์บอนตำแหน่ง 4, 5 และ 12 ตามลำดับ, สัญญาณ doublet ที่ δ 6.28 เป็นของ olefinic proton 1 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 13, สัญญาณ doublet ที่ δ 6.73 เป็นของ aromatic proton 1 ตัว ที่คาร์บอนตำแหน่ง 5', สัญญาณ doublet of doublet ที่ δ 6.75 เป็นของ aromatic proton 1 ตัว ที่คาร์บอนตำแหน่ง 6', สัญญาณ doublet ที่ δ 6.89 เป็นของ aromatic proton 1 ตัว ที่คาร์บอนตำแหน่ง 2' และสัญญาณ doublet of doublet ที่ δ 7.19 เป็นสัญญาณของ olefinic proton 1 ตัว ที่คาร์บอนตำแหน่ง 3 สารนี้มีจุดหลอมเหลว 112-113°C ใกล้เคียงกับ Guineensine ซึ่งมีสูตรโมเลกุล $C_{24}H_{30}NO_3$ มวลโมเลกุล 383



RT.3 (Guineensine)

3.2.4 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ RT.4 (Cinnamic acid piperidide)

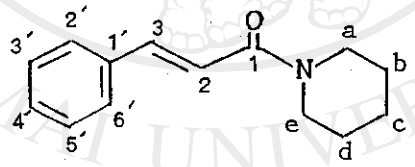
UV spectrum (รูป 3.14) แสดงการดูดกลืนแสงที่ 218 และ 276 nm

IR spectrum (รูป 3.15) แสดงการดูดกลืนแสงของหมู่ C-H ยืดของ

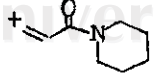
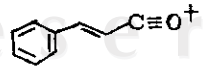
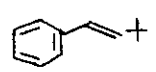
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

CH_2 ที่ 2855 และ 2940 cm^{-1}, C=O ยืดที่ 1640 cm^{-1}, C=C ยืดที่ 1585 cm^{-1}, C═══C ยืดของ aromatic ที่ 1500, 1460 และ 1440 cm^{-1}, C-N ยืดที่ 1245 cm^{-1}, C=C งอที่ 985 cm^{-1} และ $-CH_2$ โคลงที่ 760 cm^{-1}

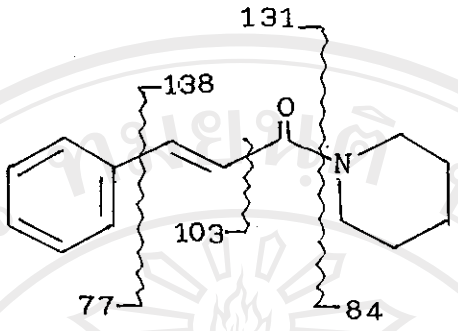
NMR Spectrum (รูป 3.16-3.17) แสดงสัญญาณ multiplet ที่ δ 1.67 ของ methylene proton 6 ตัว ในวง piperidine ที่คาร์บอนตำแหน่ง b, c, d สัญญาณ broad spectrum ที่ δ 3.63 เป็นสัญญาณของ methylene proton 4 ตัว ที่คาร์บอนตำแหน่ง a และ e ในวง piperidine, สัญญาณ doublet ที่ δ 6.90 เป็นของ olefinic proton 1 ตัว ที่คาร์บอนตำแหน่ง 2, สัญญาณ doublet of doublet ที่ δ 7.35 เป็นสัญญาณของ aromatic proton 3 ตัว ที่คาร์บอนตำแหน่ง 3', 4', 5', สัญญาณ doublet ที่ δ 7.50 และ multiplet ที่ δ 7.53 เป็นของ aromatic proton ที่ตำแหน่ง 2' และ 6' ตามลำดับ, สัญญาณ doublet ที่ δ 7.63 เป็นสัญญาณของ olefinic proton ที่คาร์บอนตำแหน่ง 3



RT.4 (Cinnamic acid piperidide)

Mass Spectrum (รูป 3.18) แสดงพีคของ molecular ion ที่ 215 m/e ตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{14}H_{17}NO$ มีจำนวน double bond equivalent = 7, แสดงการแตกหักของโมเลกุลด้วยพีคที่ 138 m/e ของ $C_8H_{12}ON^+$ ( 31.64 %), base peak ที่ 131 m/e ของ $C_9H_7O^+$ ( , 100 %), พีคที่ 103 m/e ของ $C_8H_7^+$ ( , 41.8 %), พีคที่ 84 m/e ของ $C_5H_{10}N^+$ (, 33.6 %) และพีคที่ 77 m/e ของ $C_6H_5^+$ (, 25.1 %) ซึ่งยืนยันถึงสูตรโครงสร้างต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



RT.4 (Cinnamic acid piperidide)

สารตัวนี้มีจุดหลอมเหลว 108-111°C จากการสำรวจเอกสารไม่มีรายงานถึงสารตัวนี้ในพืชสกุล Piper แต่มีการสังเคราะห์สารตัวนี้ในห้องปฏิบัติการ จากปฏิกิริยาของ aral-dehydes กับ 1,1-dimethoxy-1-(N-piperidinyl) ethane ซึ่งมีจุดหลอมเหลว 110-114°C มวลโมเลกุล 215.29 (เอกสาร 121)

3.2.5 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ RT.6 (Retrofractamide C)

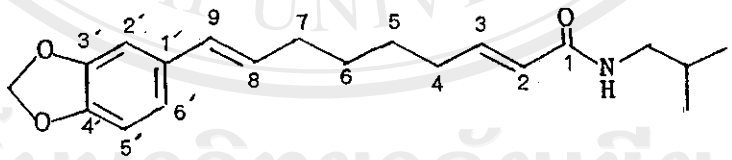
UV spectrum (รูป 3.19) แสดงการดูดกลืนแสงที่ 210 และ 261 nm

IR spectrum (รูป 3.20) แสดงการดูดกลืนแสงของหมู่ N-H ยืดที่ 3330 cm^{-1}, C-H ยืดของหมู่ CH_2 ที่ 2910 และ 2940 cm^{-1}, C=O ยืดที่ 1660 cm^{-1}, C=C ยืดที่ 1620 cm^{-1}, N-H งอที่ 1545 cm^{-1}, C═C ยืดของ aromatic ที่ 1500, 1490 cm^{-1}, C-H งอของ CH_3 ที่ 1440 cm^{-1}, C-O ยืดที่ 1260, 1040 cm^{-1}, C=C งอที่ 960 และ 920 cm^{-1}

NMR spectrum (รูป 3.21-3.23) แสดงสัญญาณ doublet ที่ δ 0.95 ของ proton 6 ตัว ในหมู่ methyl 2 หมู่ ของ isobutyl amide, สัญญาณ multiplet ที่δ1.50 เป็นของ methylene proton 4 ตัว ที่คาร์บอนตำแหน่ง 5 และ 6, สัญญาณ multiplet ที่ δ 1.81 เป็นของ proton 1 ตัว ของ isobutyl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

($-C\underline{H}Me_2$), สัญญาณ multiplet ที่ δ 2.18 เป็นของ methylene proton 4 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 4 และ 7, สัญญาณ triplet ที่ δ 3.15 เป็นสัญญาณของ methylene proton 2 ตัว ของ isobutyl amide, สัญญาณ broad spectrum ที่ δ 5.48 เป็นของ proton 1 ตัว ที่ติดกับไนโตรเจน, สัญญาณ triplet of triplet ที่ δ 5.75 เป็นของ olefinic proton 1 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 2, สัญญาณ singlet ที่ δ 5.93 เป็นของ proton 2 ตัว ในหมู่ methylene dioxy, สัญญาณ doublet of doublet of doublet ที่ δ 6.07 เป็นของ olefinic proton 1 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 3, สัญญาณ doublet of doublet ที่ δ 6.29 เป็นของ olefinic proton 1 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 9, สัญญาณ doublet ที่ δ 6.73 เป็นของ aromatic proton 1 ตัว ที่คาร์บอนตำแหน่ง 5' และของ olefinic proton 1 ตัว ที่คาร์บอนตำแหน่ง 8, สัญญาณ doublet of doublet ที่ δ 6.80 เป็นของ aromatic proton 1 ตัว ที่คาร์บอนตำแหน่ง 6', สัญญาณ doublet ที่ δ 6.87 เป็นของ aromatic proton 1 ตัว ที่คาร์บอนตำแหน่ง 2' สารนี้มีจุดหลอมเหลว 118-120°C ใกล้เคียงกับ Retrofractamide C ซึ่งมีสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{27}NO_3$ มวลโมเลกุล = 329 (31)



RT.6 (Retrofractamide C)

3.2.6 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ RT.7 (Pipercide)

UV spectrum (รูป 3.24) แสดงการดูดกลืนแสงที่ 204, 260 nm

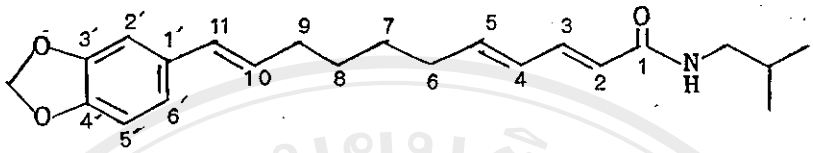
IR spectrum (รูป 3.25) แสดงการดูดกลืนแสงของหมู่ N-H ยืดที่ 3300 cm^{-1}, C-H ยืดของ CH_2 ที่ 2900 cm^{-1}, C=O ยืดที่ 1650 cm^{-1}, C=C ยืดที่ 1620

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

cm^{-1}, N-H งอที่ 1545 cm^{-1}, C═══C ยืดของ aromatic ที่ 1500, 1485 cm^{-1}, C-H งอของ CH_3 ที่ 1440 cm^{-1}, C-O ยืดที่ 1255, 1040 cm^{-1}, C=C งอที่ 960 และ 920 cm^{-1}

NMR spectrum (รูป 3.26-3.28) แสดงสัญญาณ doublet ที่ δ 0.92 เป็นของ proton 6 ตัว ในหมู่ methyl 2 หมู่ของ isobutyl amide, สัญญาณ multiplet ที่ δ 1.47 เป็นของ methylene proton 2 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 7 และ 8, สัญญาณ multiplet ที่ δ 1.80 เป็นของ proton 1 ตัว ของ isobutyl ($-C\underline{H}Me_2$), สัญญาณ multiplet ที่ δ 2.17 เป็นของ methylene proton 4 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 6 และ 9, สัญญาณ triplet ที่ δ 3.17 เป็นของ methylene proton 2 ตัว ของ isobutyl amide, สัญญาณ broad spectrum ที่ δ 5.44 เป็นของ proton 1 ตัว ที่ติดกับไนโตรเจน, สัญญาณ doublet ที่ δ 5.74 เป็นของ olefinic proton 1 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 2, สัญญาณ singlet ที่ δ 5.93 เป็นสัญญาณของ proton ในหมู่ methylene dioxy 2 ตัว, สัญญาณ multiplet ที่ δ 6.05 เป็นของ olefinic proton 2 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 5 และ 10, สัญญาณ doublet ที่ δ 6.28 เป็นของ olefinic proton 1 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 11, สัญญาณ singlet ที่ δ 6.74 เป็นของ aromatic proton 2 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 2' และ 5', สัญญาณ singlet ที่ δ 6.89 เป็นของ aromatic proton 1 ตัว ตรงคาร์บอนตำแหน่ง 6' และสัญญาณ doblet of doublet of doublet ที่ δ 7.18 เป็นสัญญาณของ olefinic proton ที่คาร์บอนตำแหน่ง 3 สารนี้มีจุดหลอมเหลว 116-118°C ใกล้เคียงกับ Piperciide ซึ่งมีสูตรโมเลกุล $C_{22}H_{29}NO_3$ มวลโมเลกุล 355 (50)

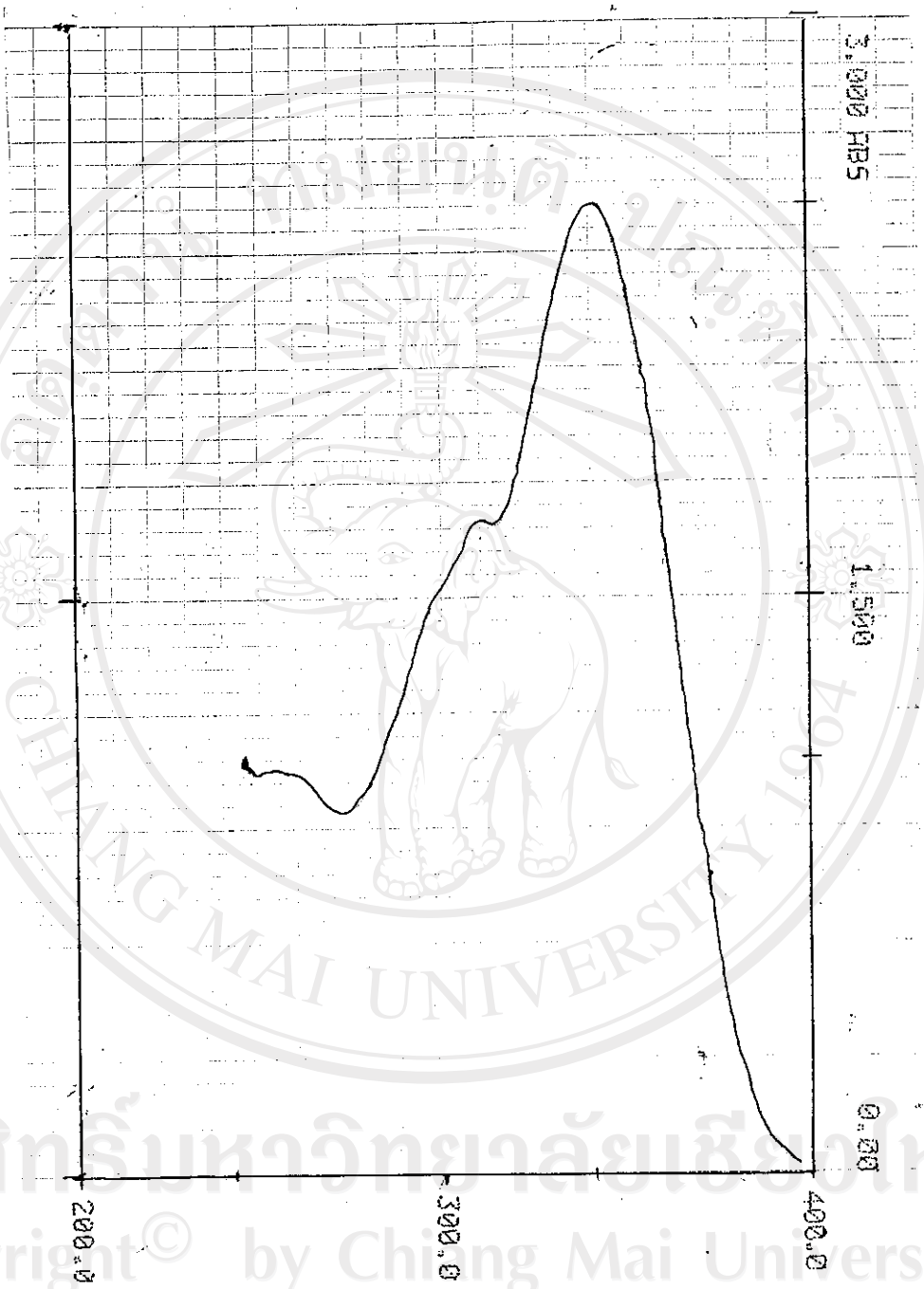
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



RT.7 (Pipercide)

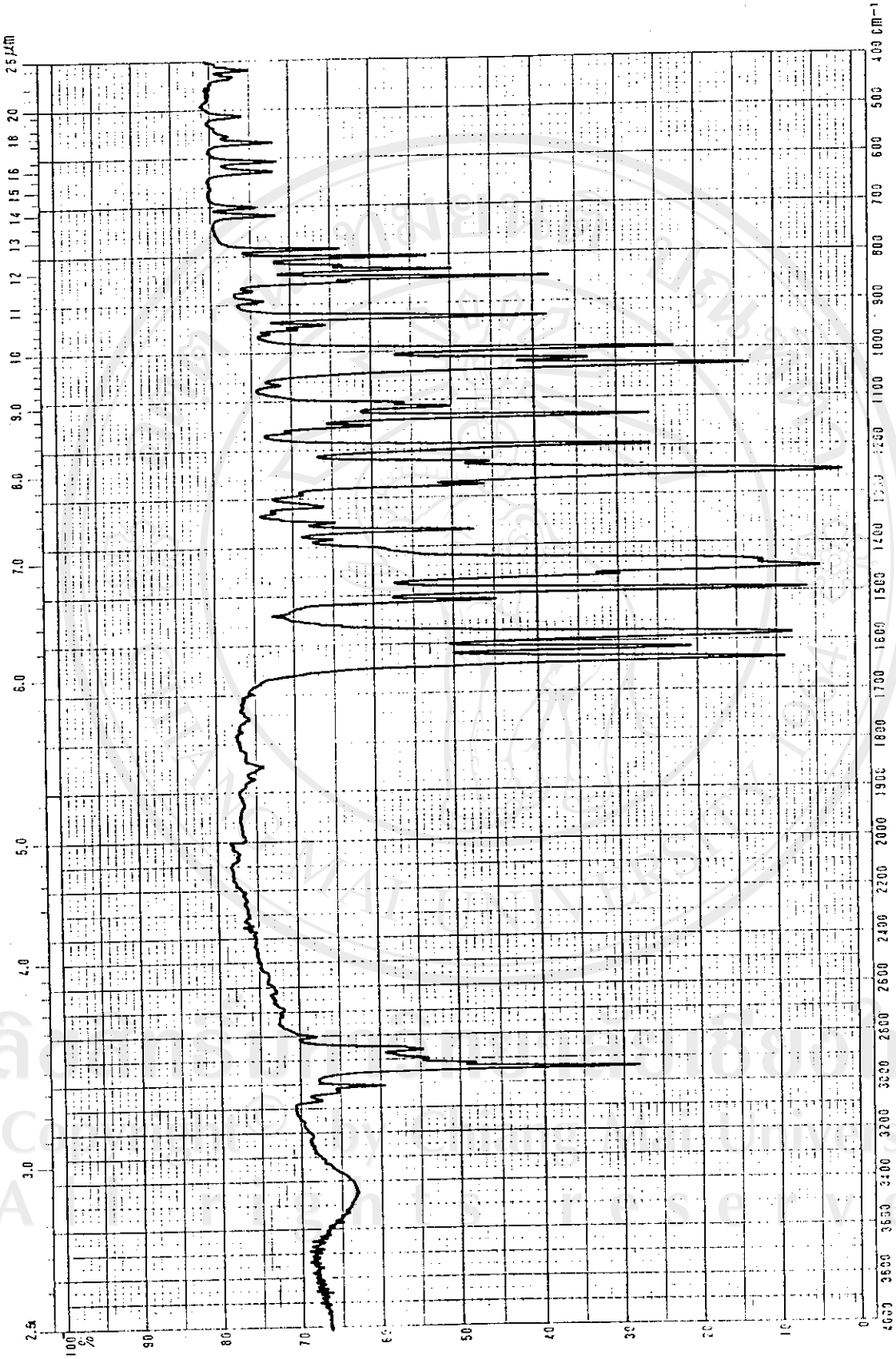
โครงสร้างของสารประกอบ 6 ชนิด (ยกเว้น RT.4) ที่วิเคราะห์ได้นี้ไม่ได้อ้างอิงข้อมูลทาง Mass Spectroscopy เนื่องจากสารที่ได้มีปริมาณน้อย แต่เปรียบเทียบข้อมูลของ UV, IR และ ^{1}H NMR ของสารทั้ง 6 ชนิดกับสารประกอบอ้างอิงที่ทราบโครงสร้างแน่นอน ได้ตำแหน่งการดูดกลืนแสงและสัญญาณที่ตรงกัน อีกทั้งค่าจุดหลอมเหลวที่ได้ก็ใกล้เคียงกันมาก จึงสามารถยืนยันโครงสร้างของสารประกอบทั้ง 6 ชนิดได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



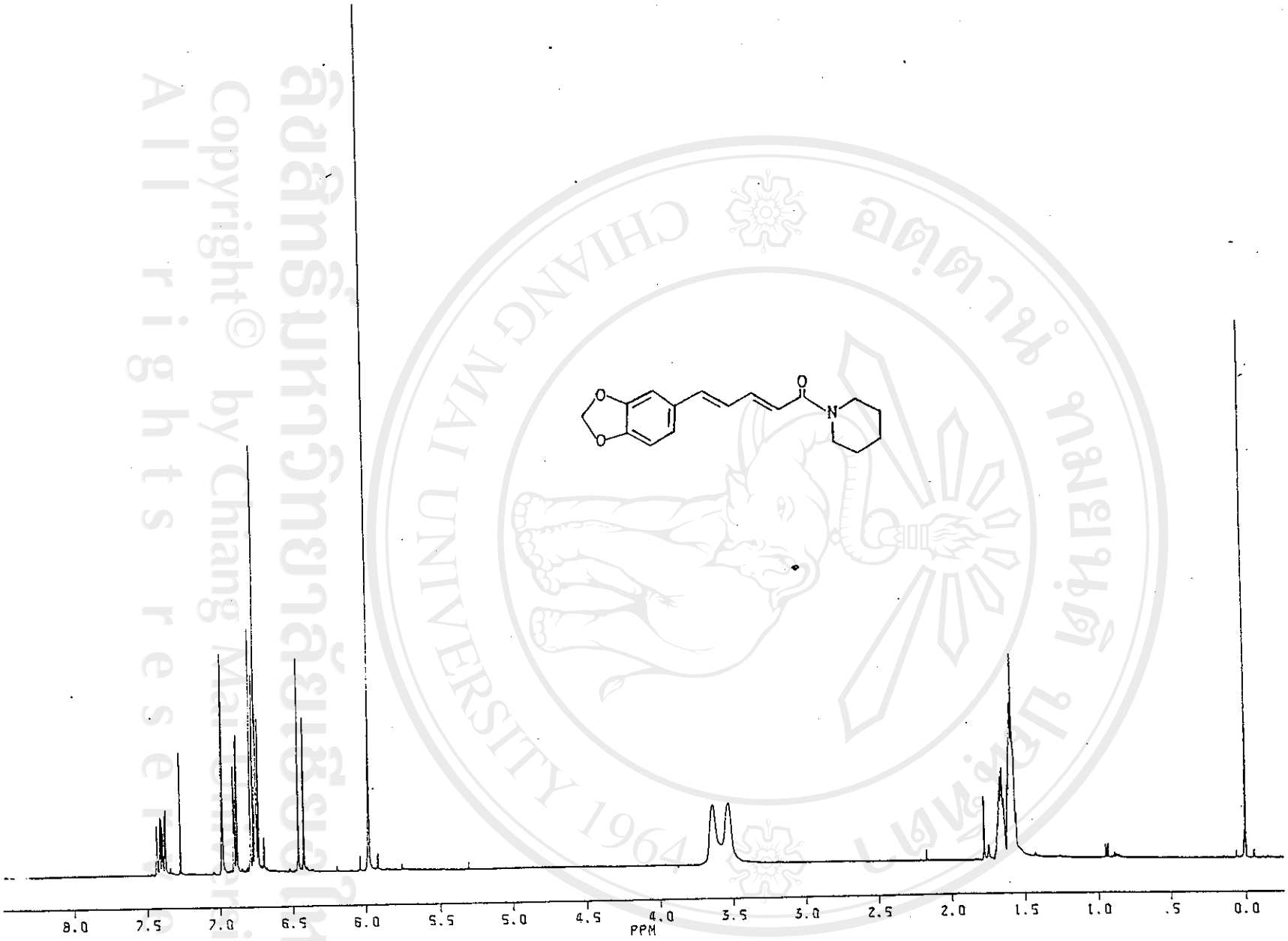
รูป 3.1 UV spectrum ของ RT.1 (Piperine)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



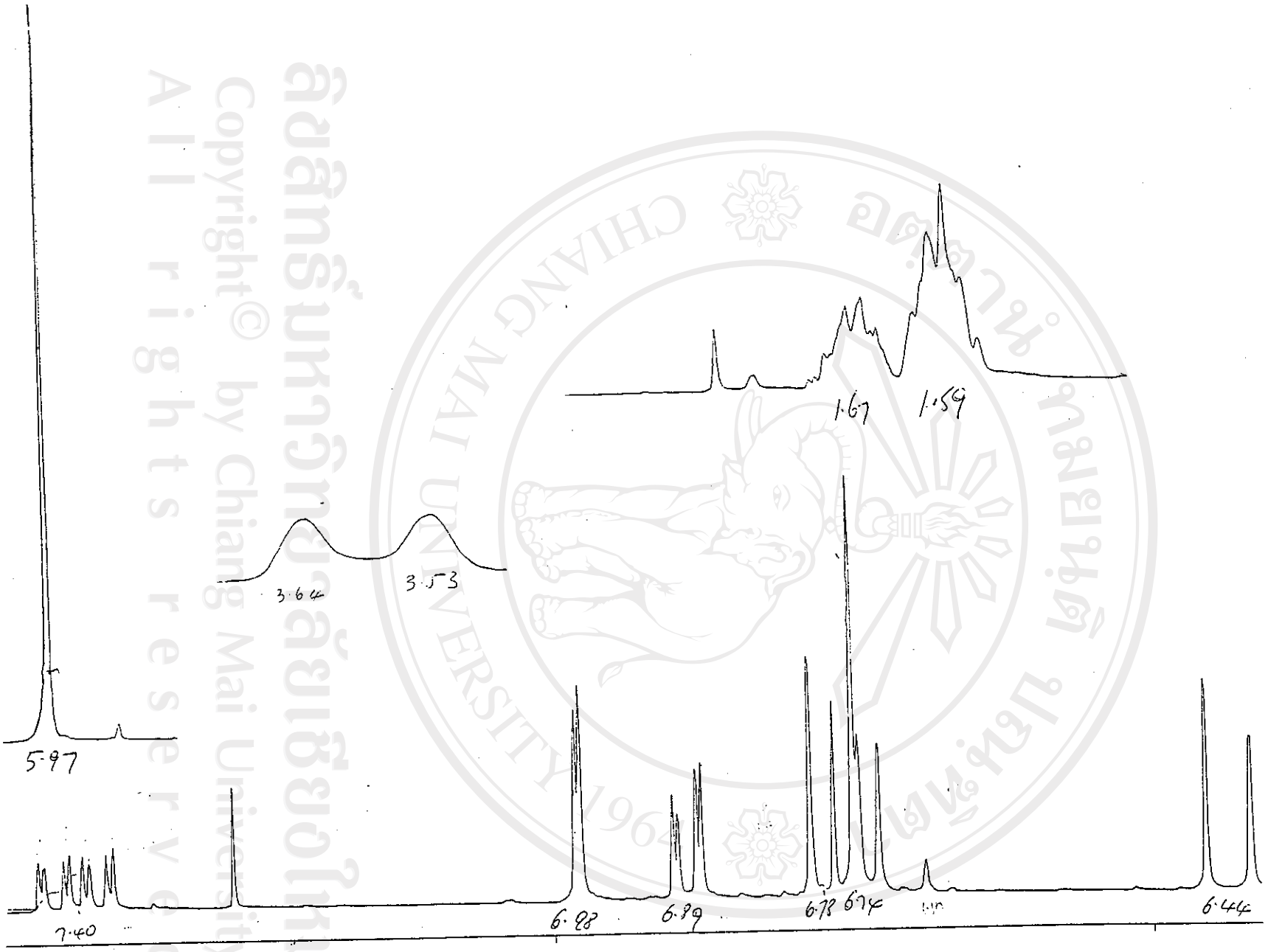
รูป 3.2 IR spectrum (KBr) ของ RT.1 (Piperine)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



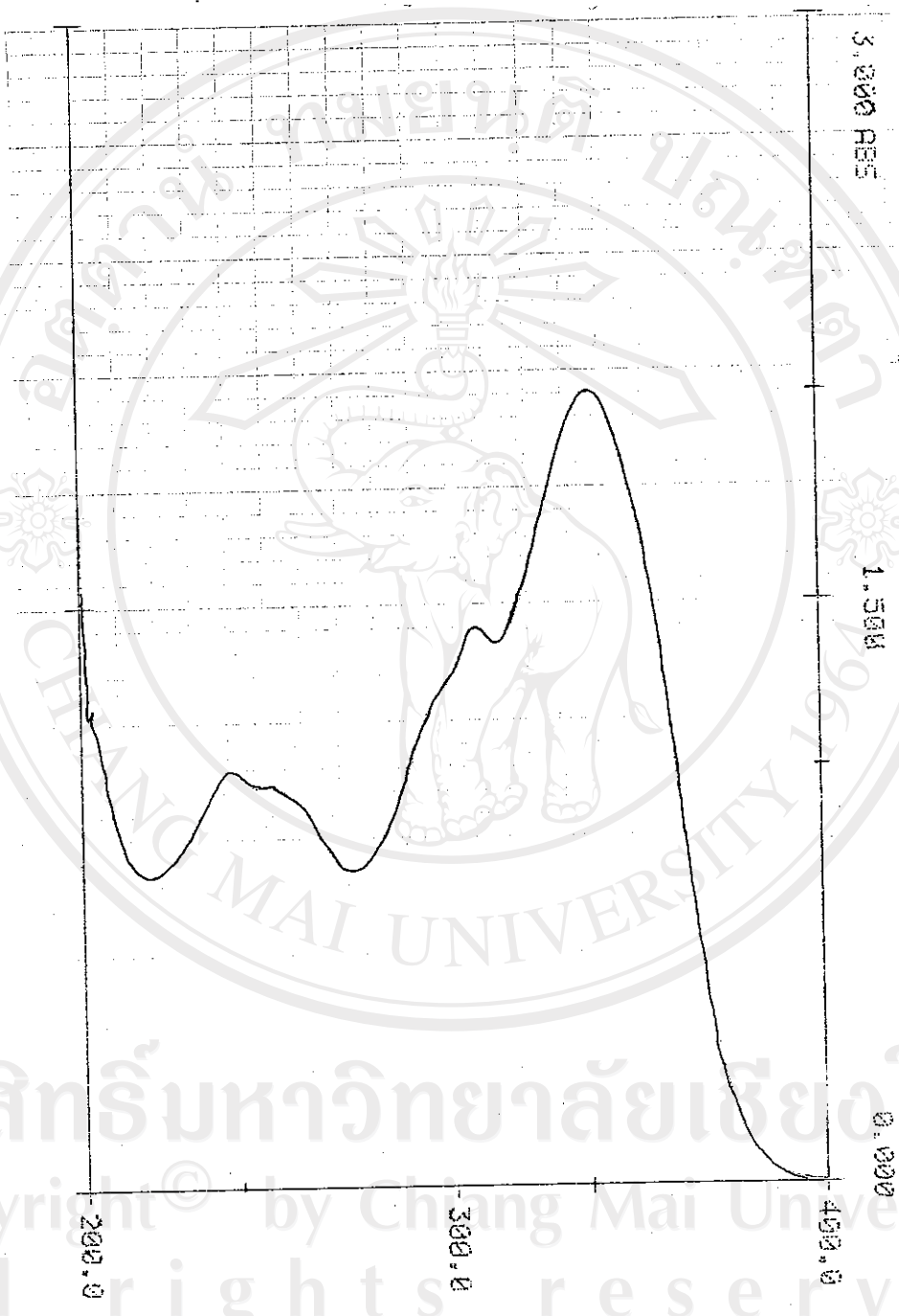
รูป 3.3 400 MHz ^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$) ของ RT.1(Piperine)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



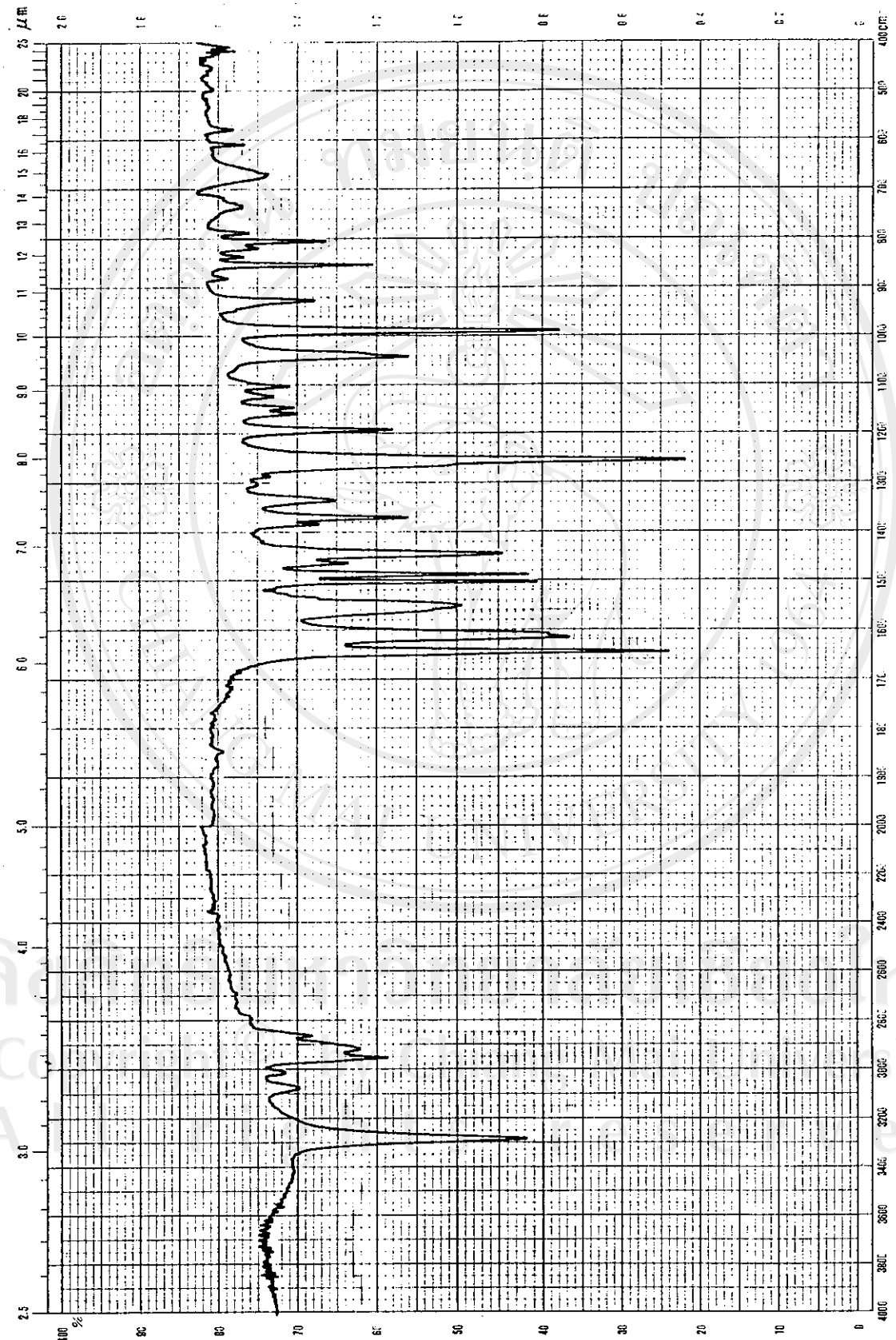
รูป 3.4 ชยาย ^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$) ของ RT.1 (Piperine)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

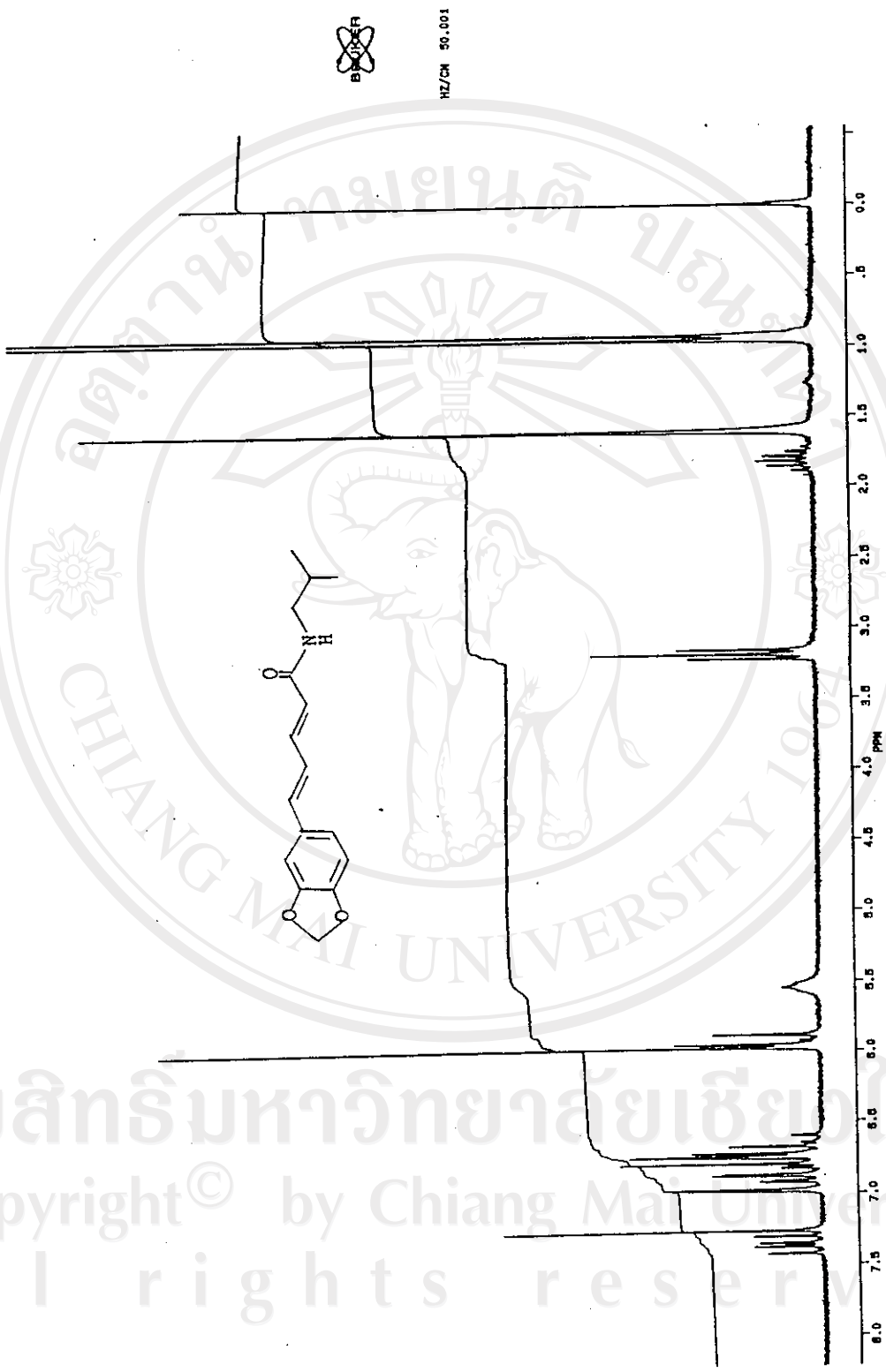


รูป 3.5 UV spectrum ของ RT.2 (Piperlonguminine)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

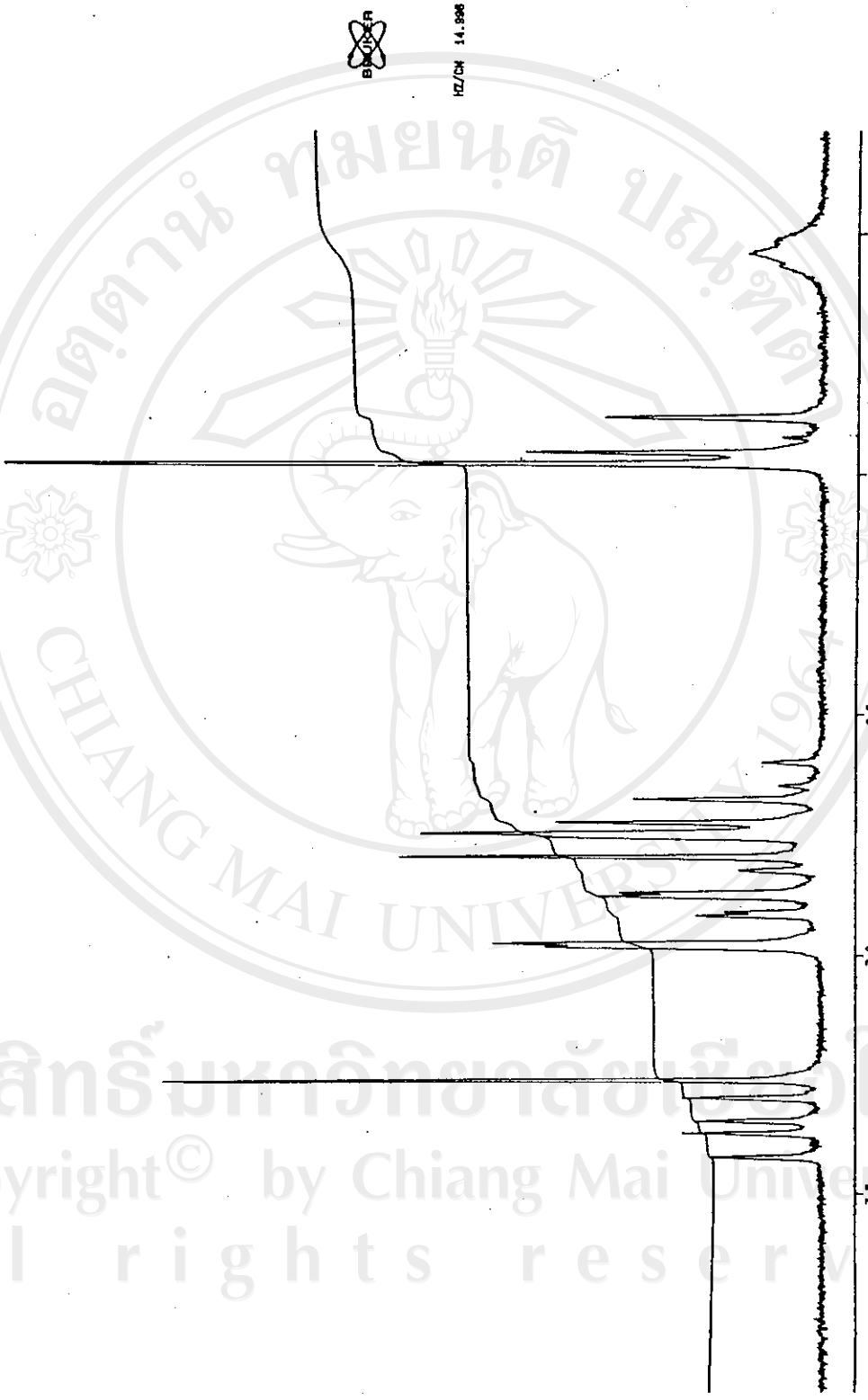


รูป 3.6 IR spectrum (KBr) ของ RT.2 (Piperlongumine)



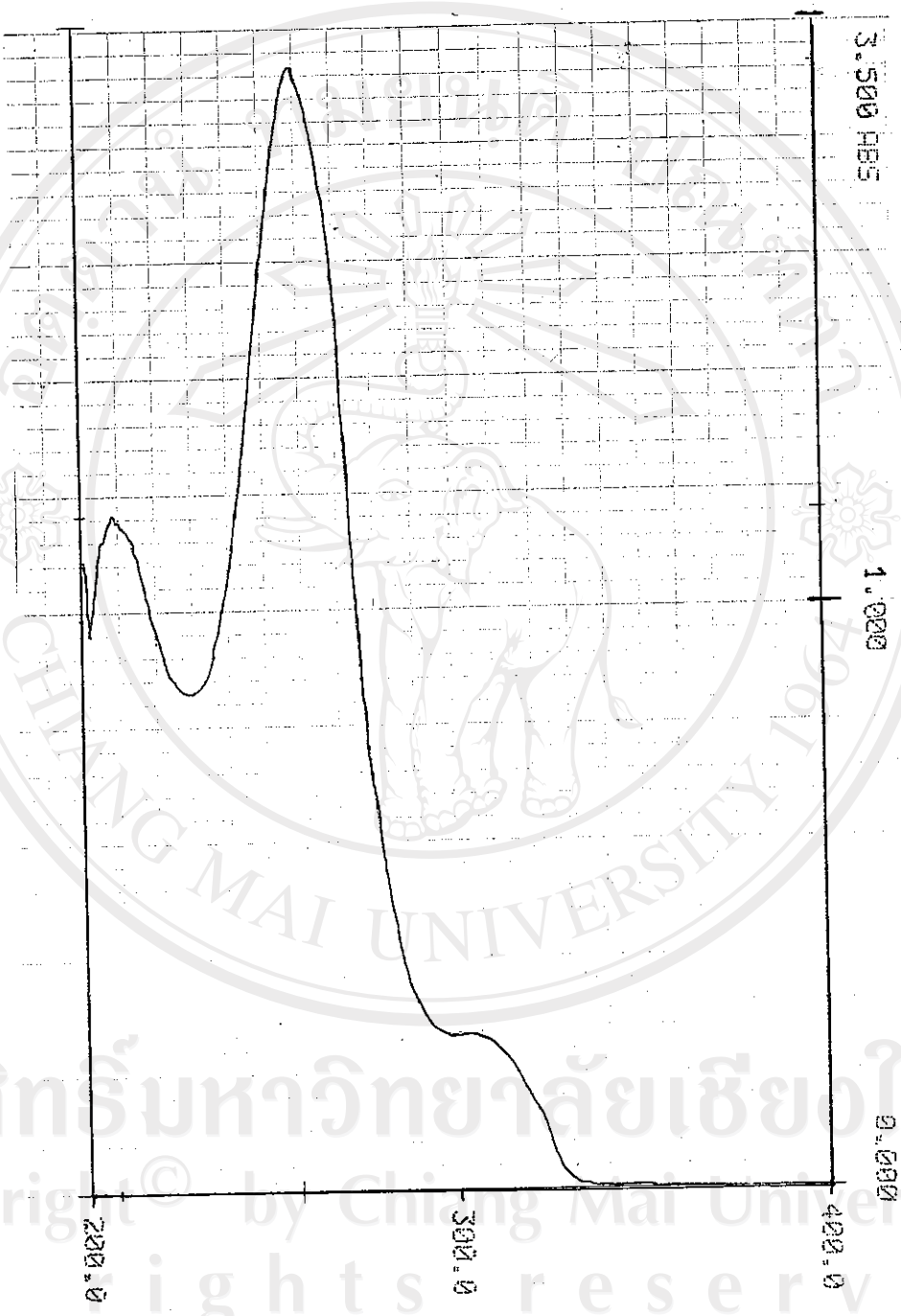
รูปที่ 3.7 400 MHz ^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$) ของ RT.2 (Piperlongumine)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



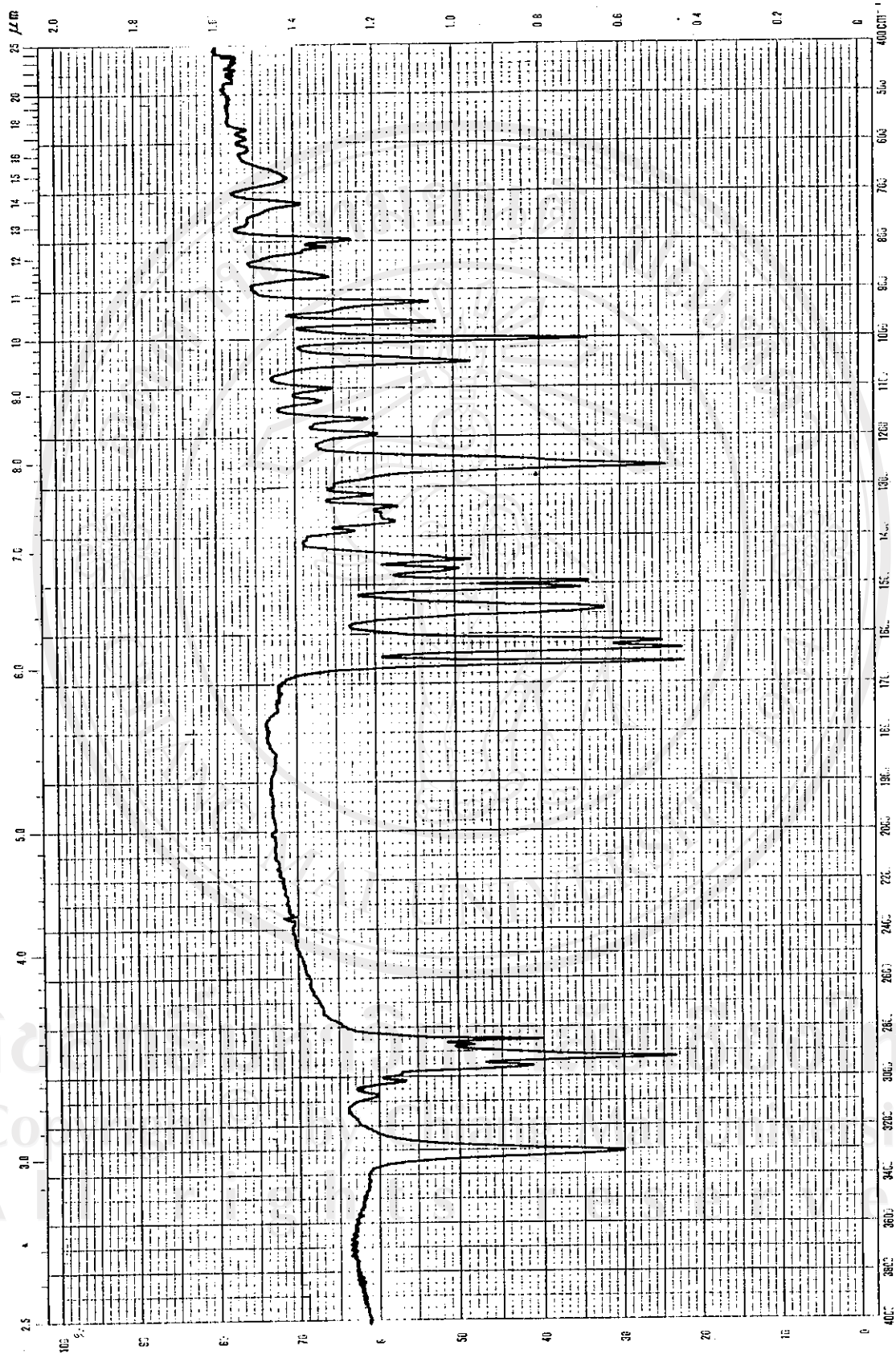
รูปที่ 3.8 สเปกตรัม ^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$) ของ RT.2 (Piperlonguminine)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 3.9 UV spectrum ของ RT.3 (Guineensine)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 3.10 IR spectrum (KBr) ของ RT.3 (Guineensine)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

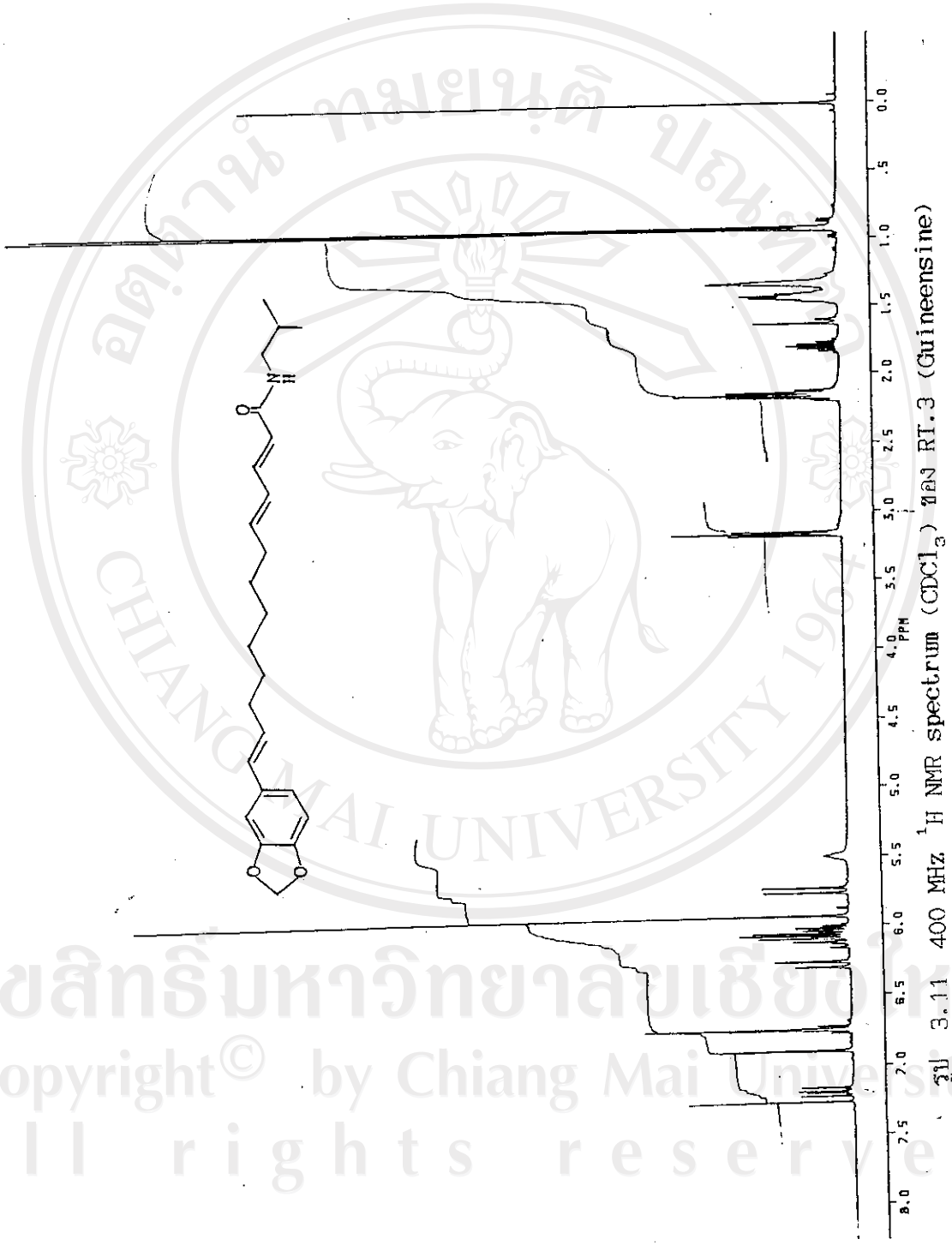
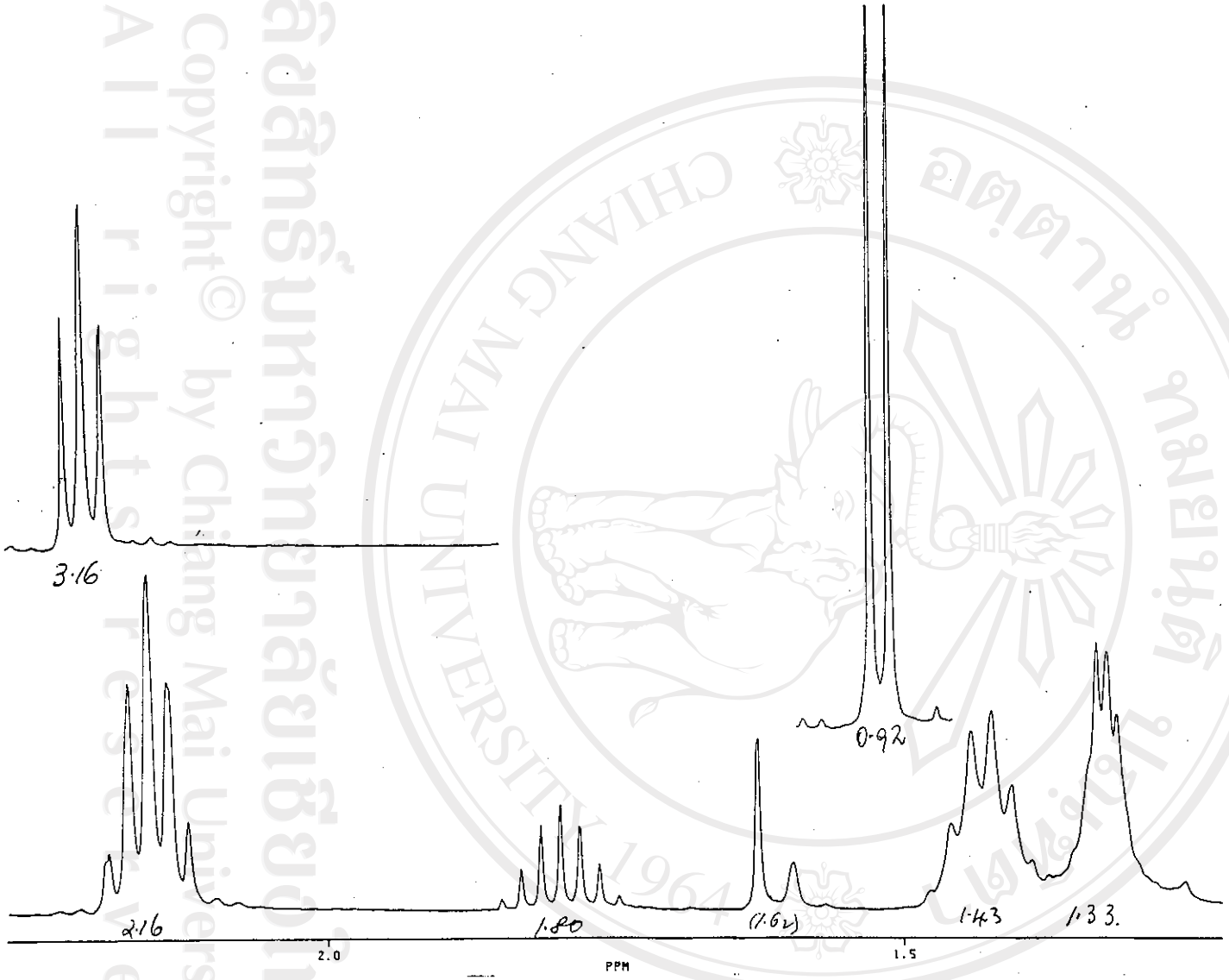


Fig 3.11 400 MHz ^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$) of RT.3 (Guineensine)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

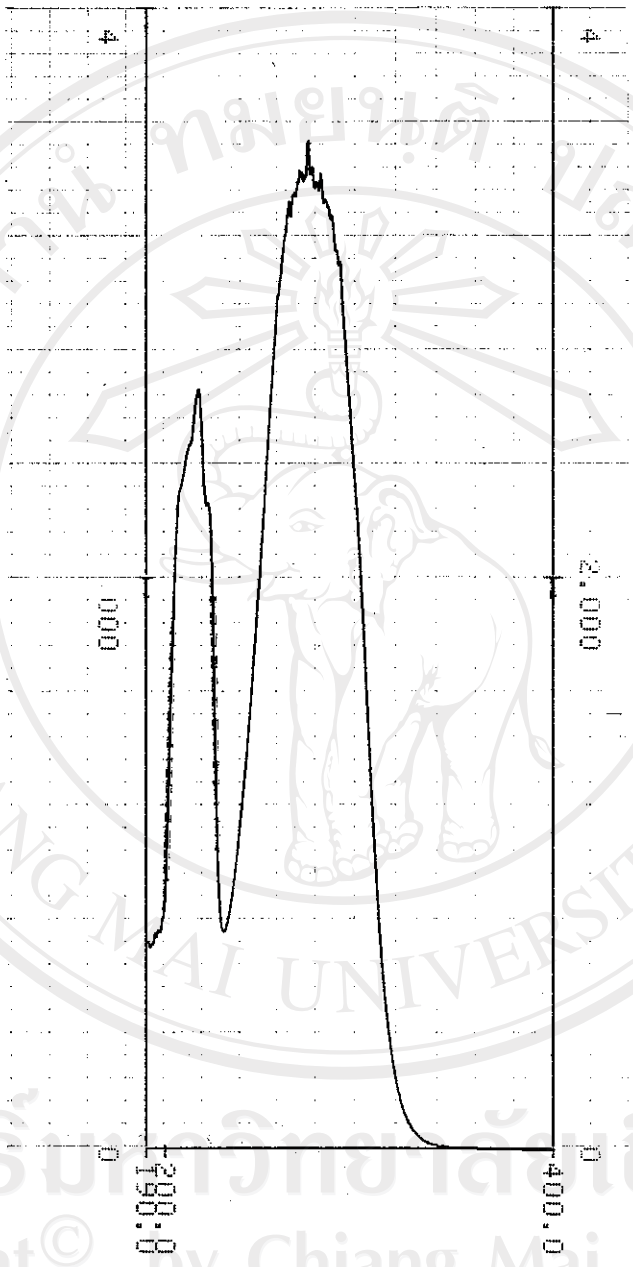


รูป 3.12 ชยาย ^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$) ของ RT.3 (Guineensine)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

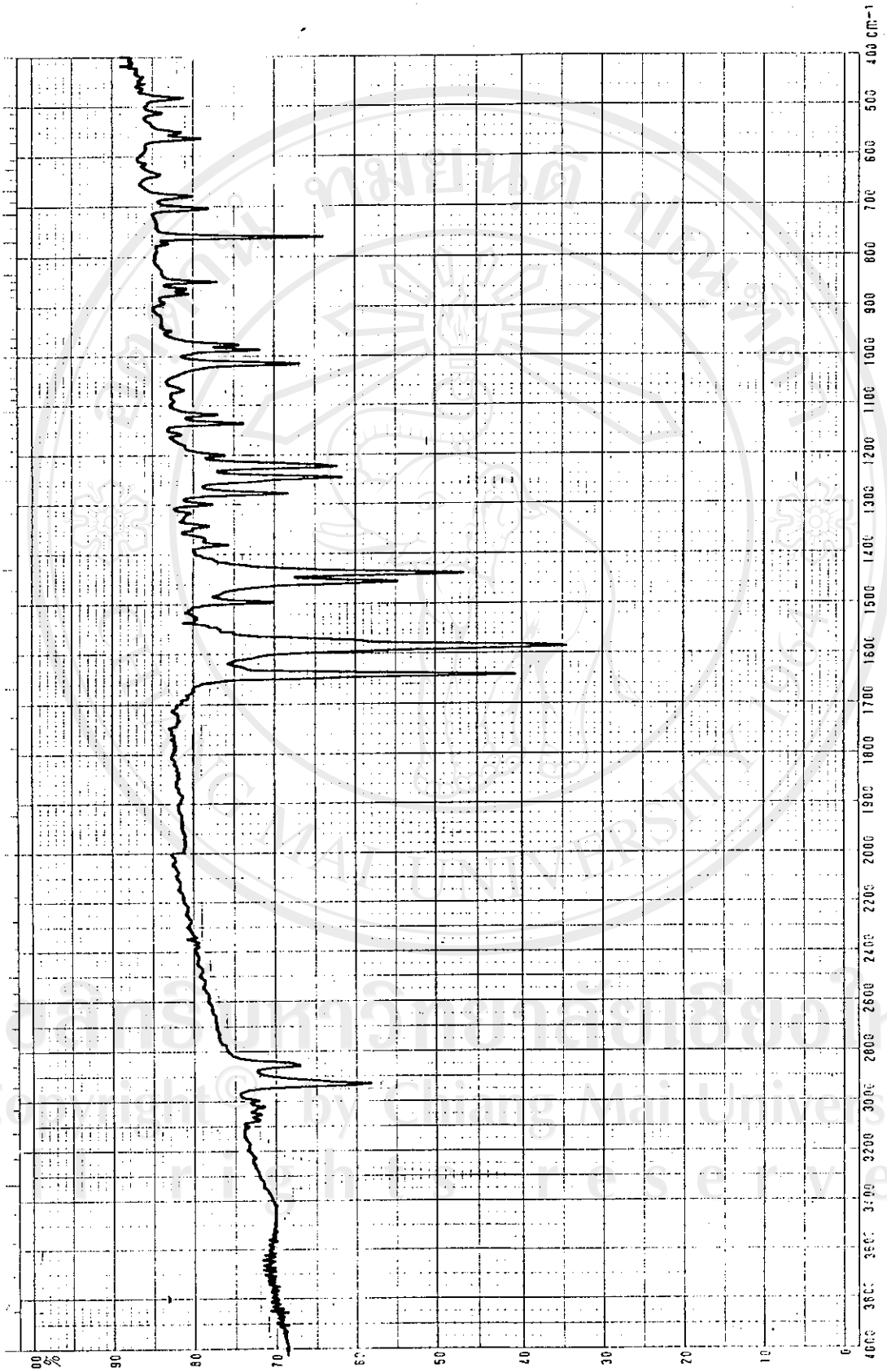
รูป 3.13 สเปกตรัม ^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$) ของ RT.3 (Quineensine)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



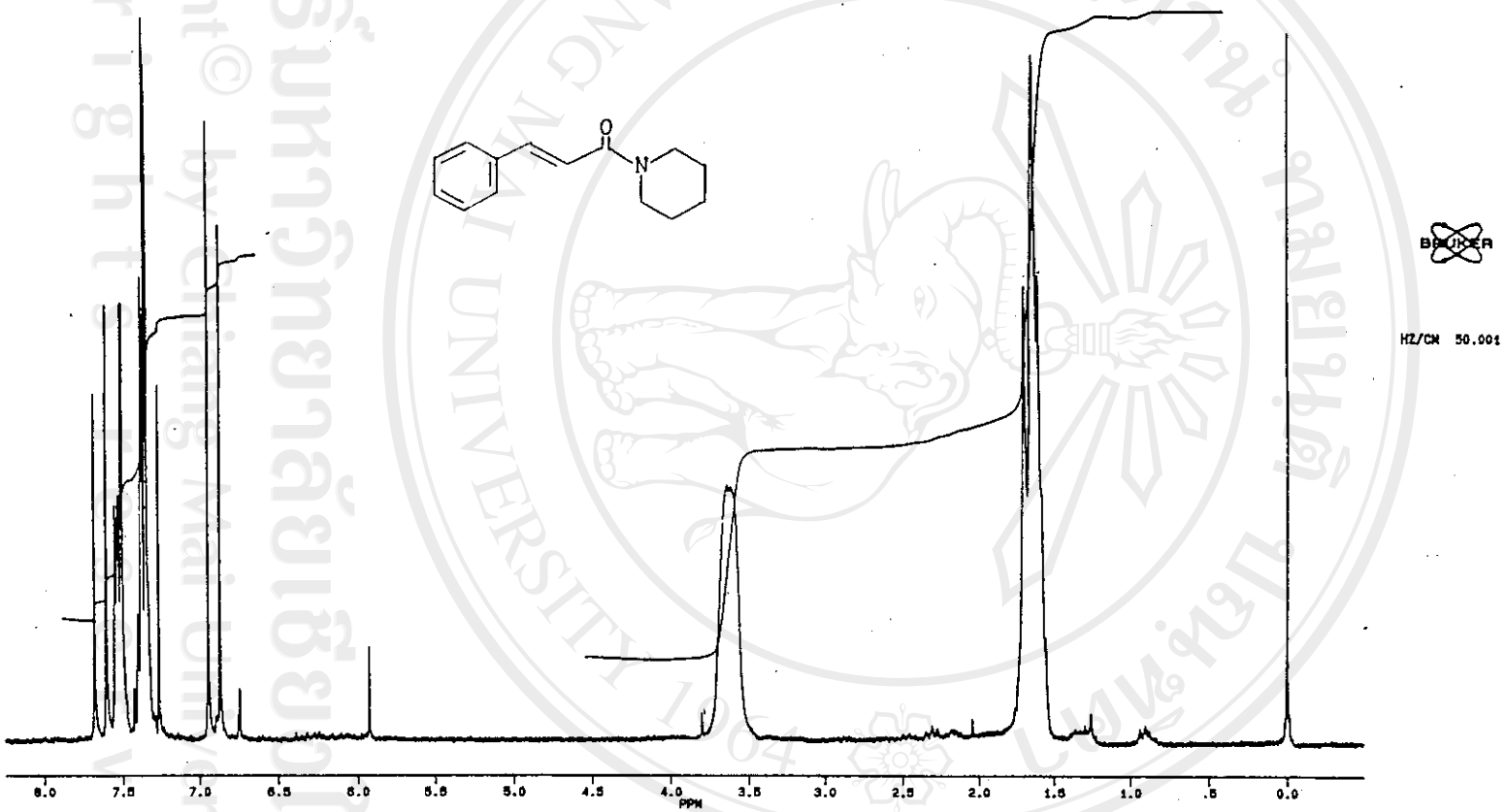
รูป 3.14 UV spectrum ของ RT.4 (Cinnamic acid piperidide)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



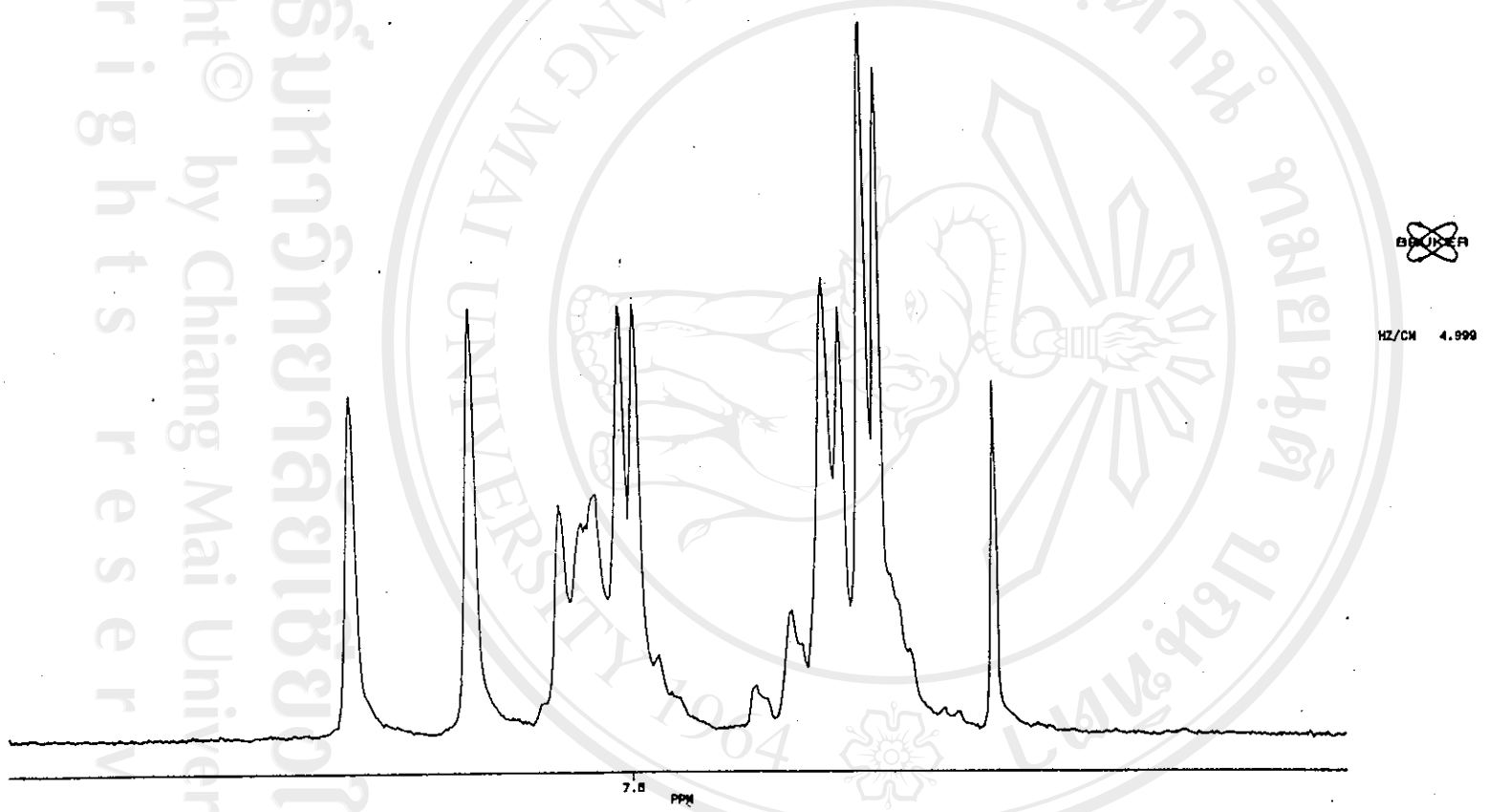
รูป 3.15 IR spectrum (KBr) ของ RT.4 (Cinnamic acid piperidide)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



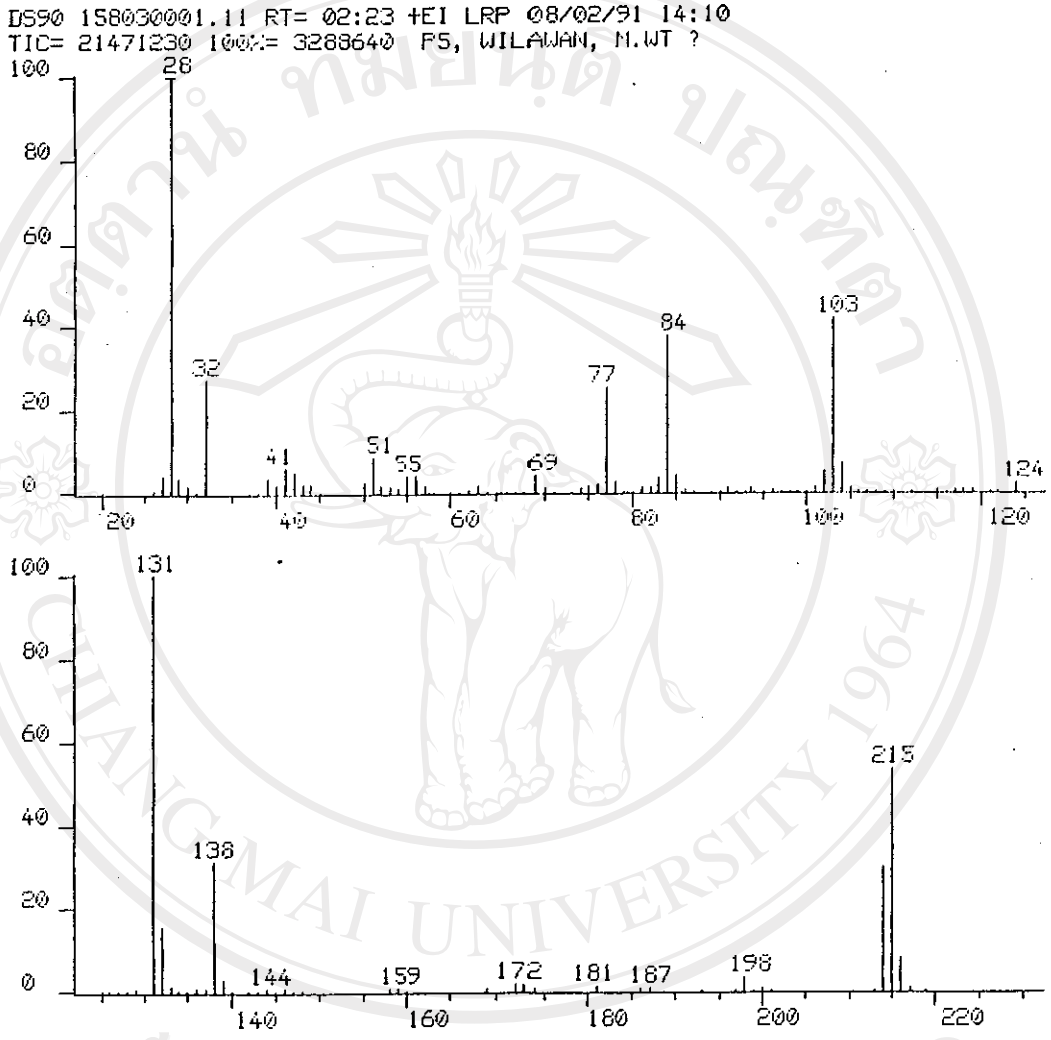
รูป 3.16 400 MHz ^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$) ของ RT.4 (Cinnamic acid piperidide)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 3.17 สเปกตรัม ^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$) ของ RT.4 (Cinnamic acid piperidide)

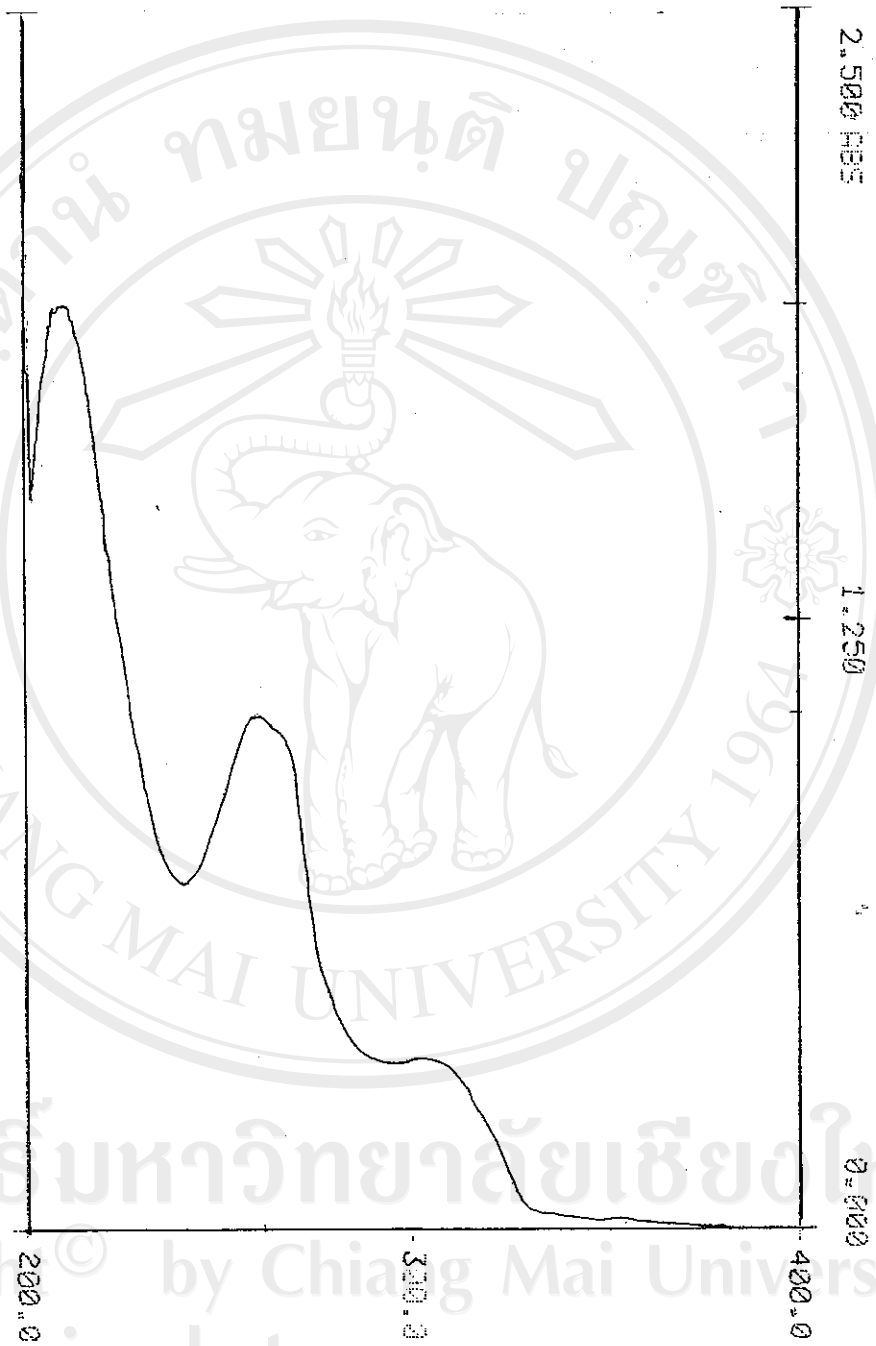
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 3.18 Mass spectrum (Low resolution) ของ RT.4

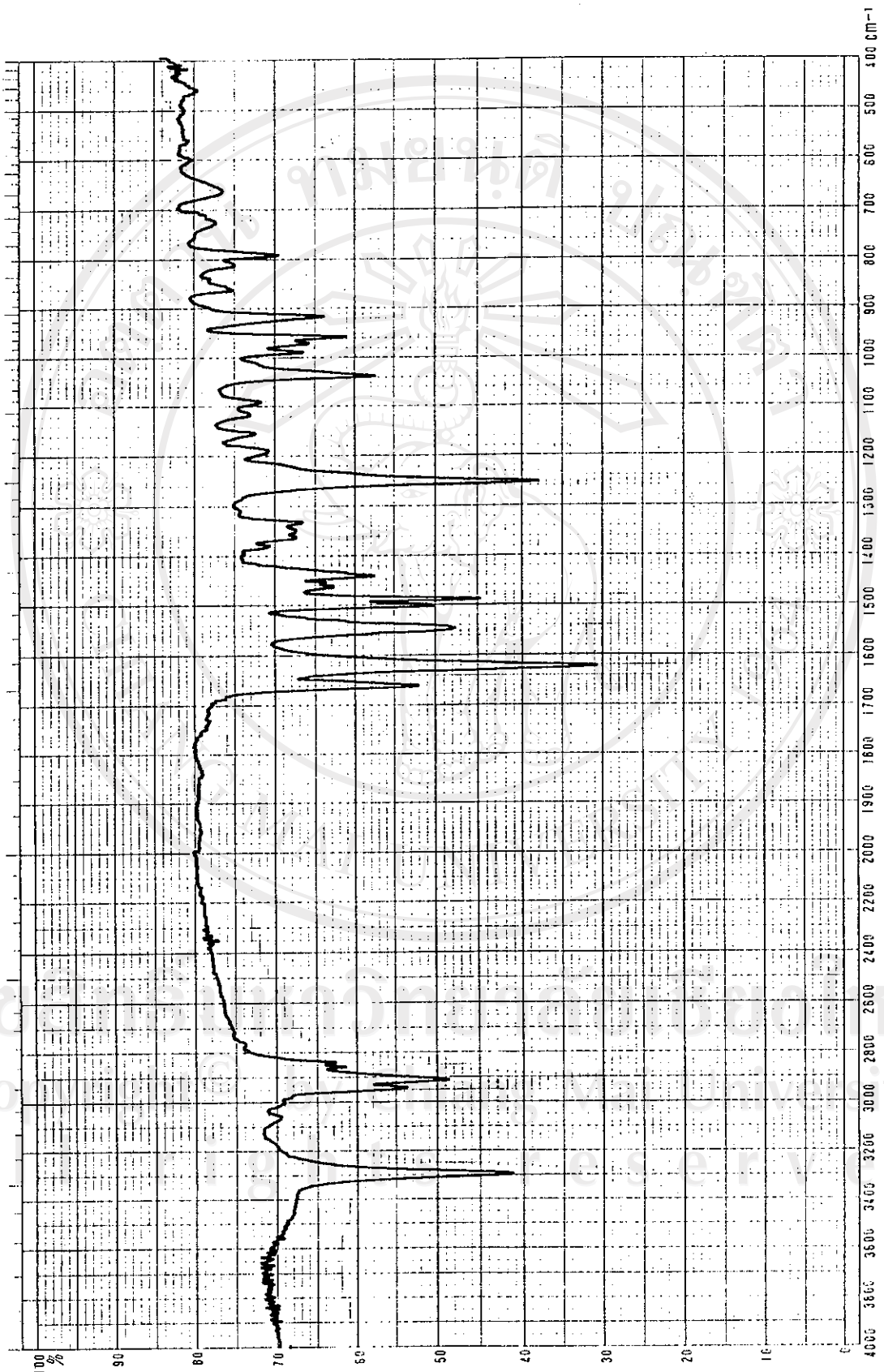
(Cinnamic acid piperidide)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



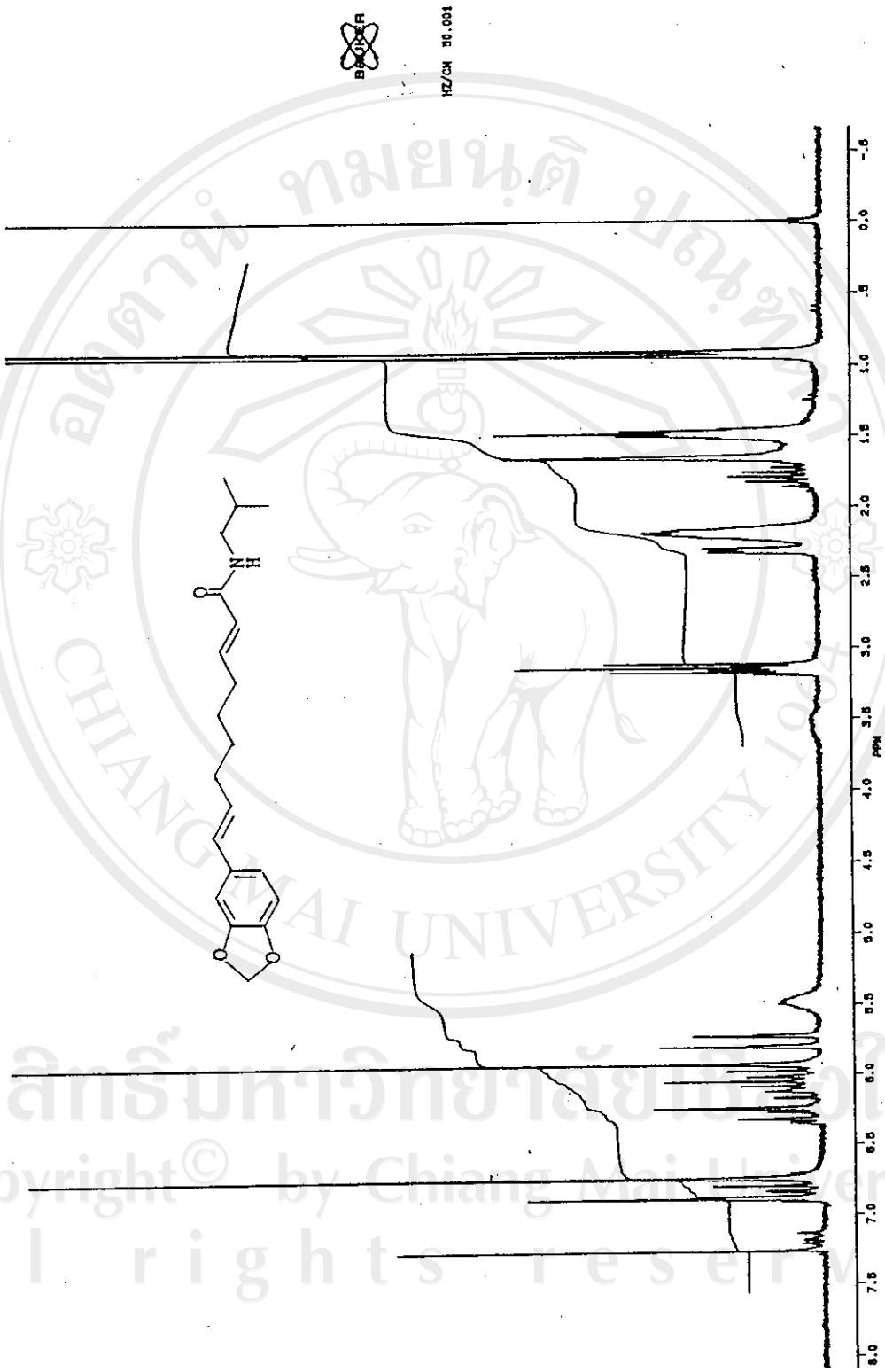
รูป 3.19 UV spectrum ของ RT.6 (Retrofractamide C)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 3.20 IR spectrum (KBr) ของ RT.6 (Retrofractamide C)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

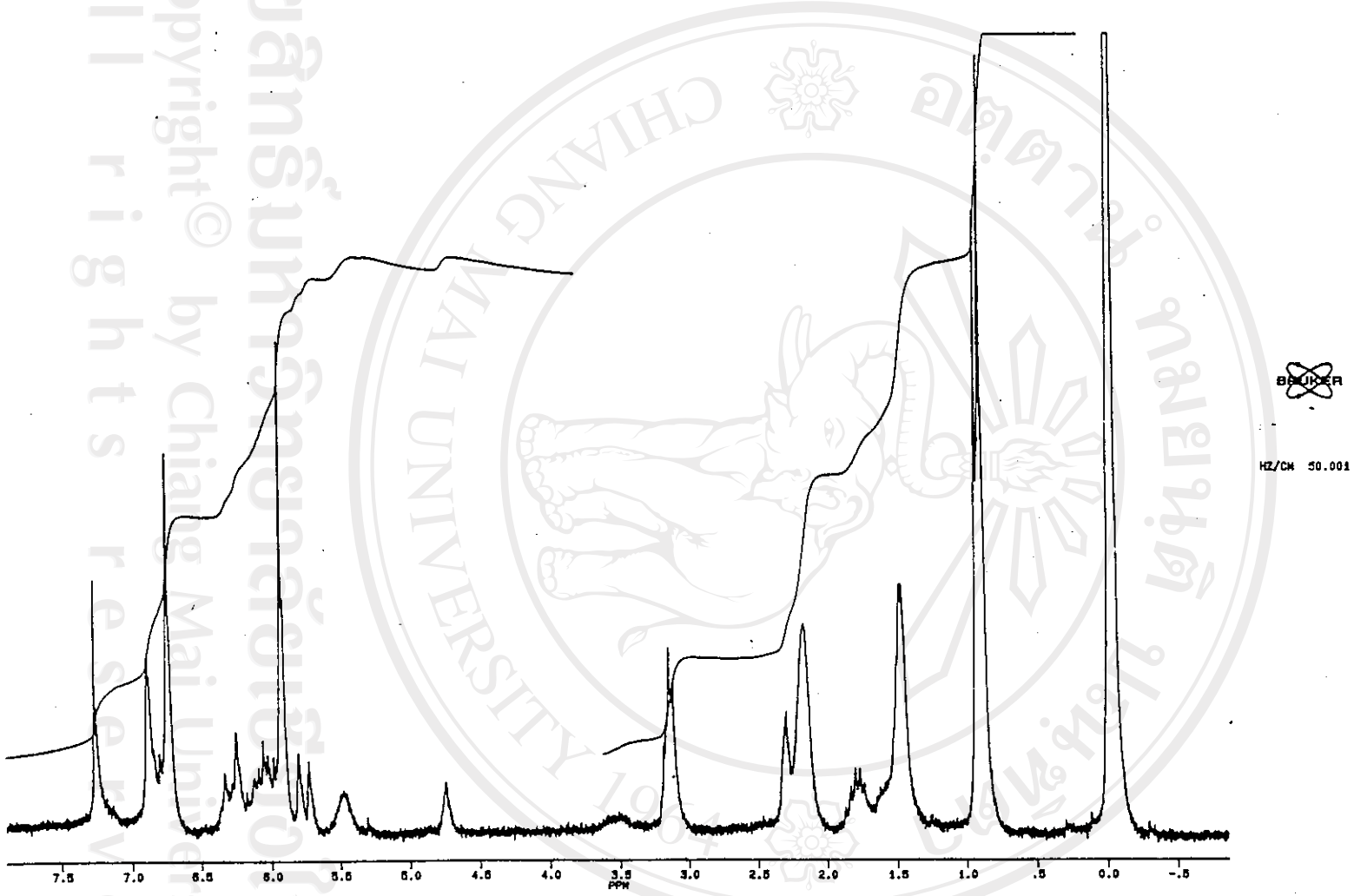


รูป 3.21 400 MHz ^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$) ของ RT.6 (Retrofractamide C)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

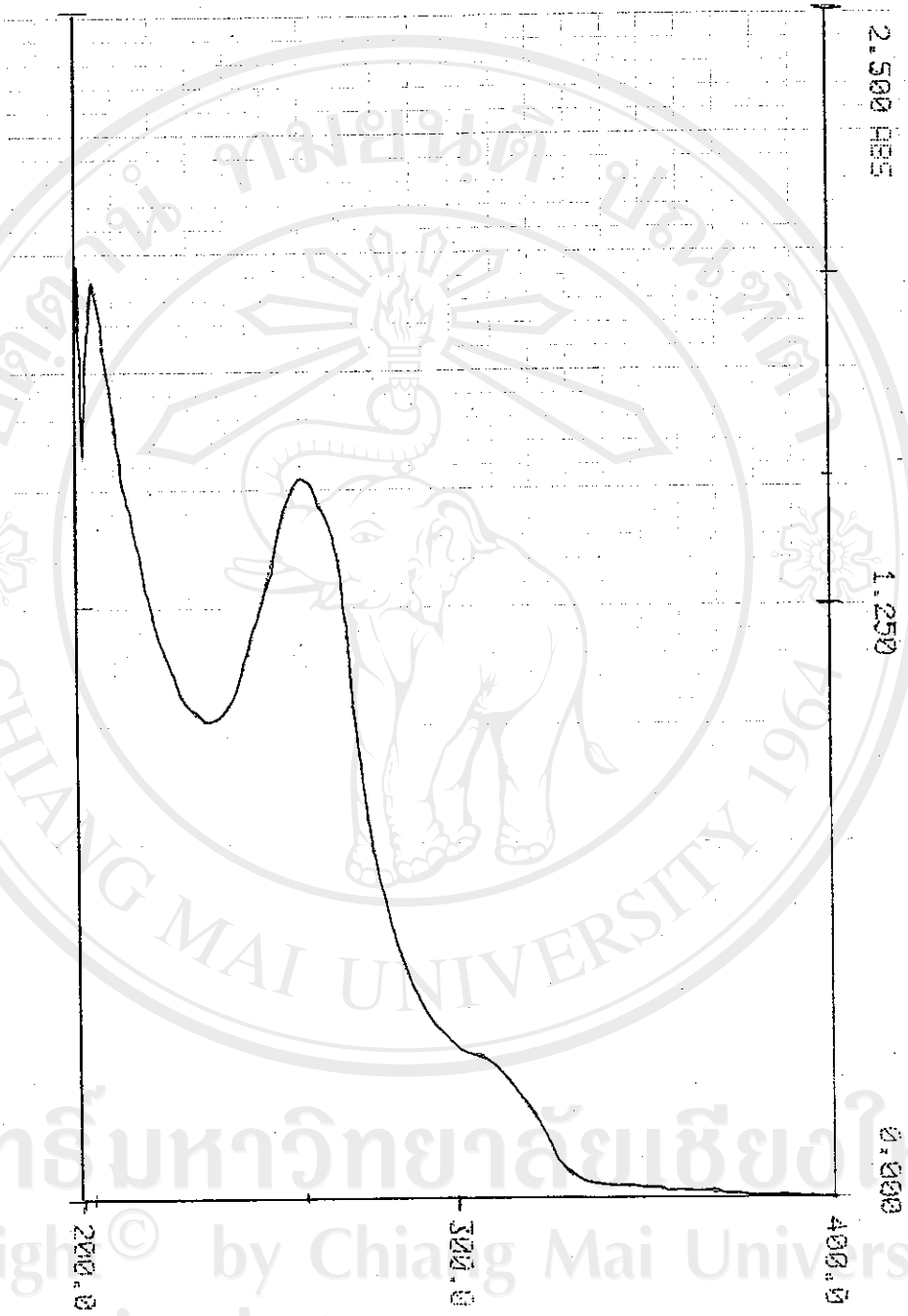
รูป 3.22 สเปกตรา ^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$) ของ RT.6 (Retrofractamide C)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



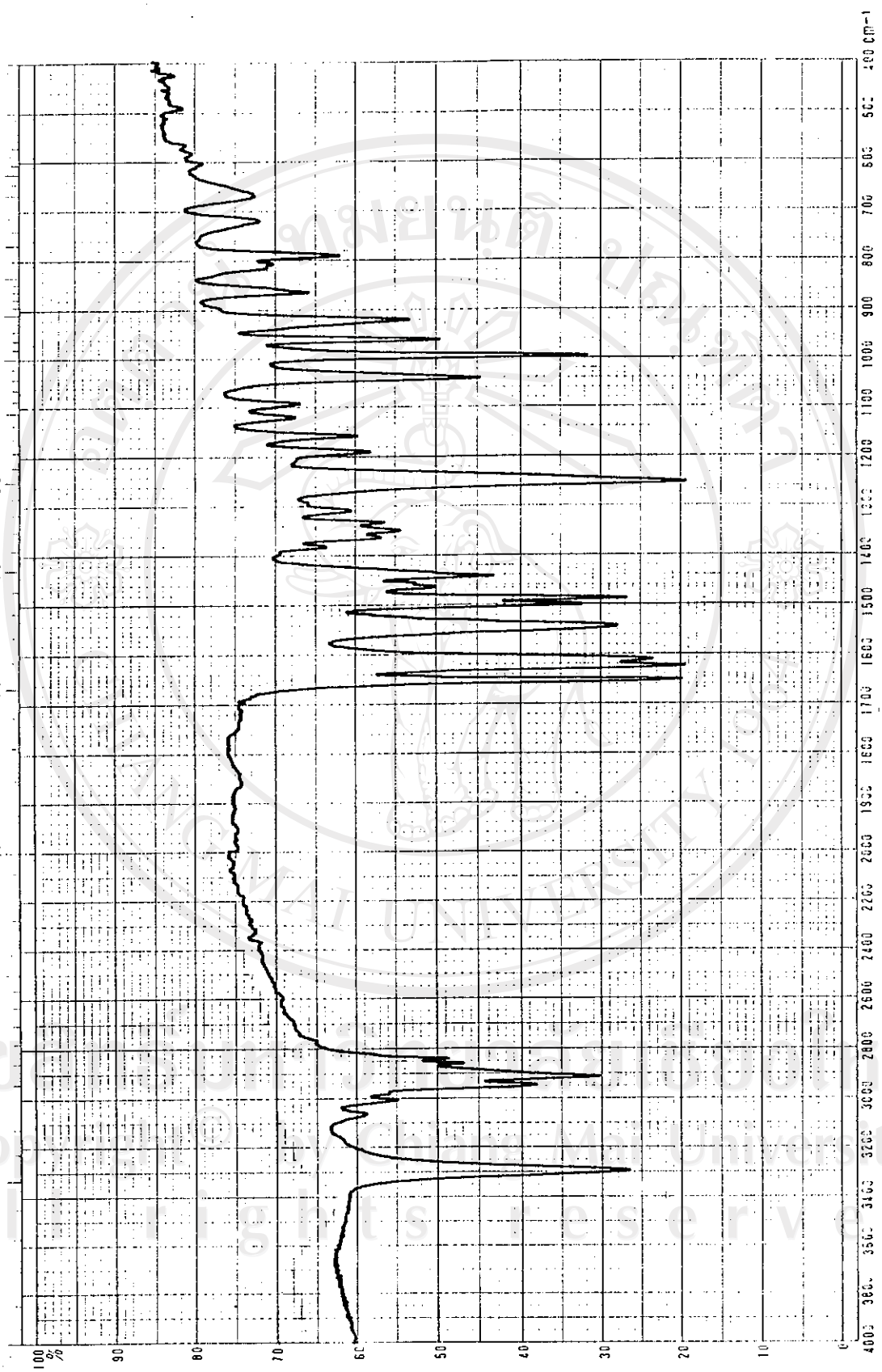
รูป 3.23 ชยาย ^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3 + D_2O$) ชอง RT.6 (Retrofractamide C)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



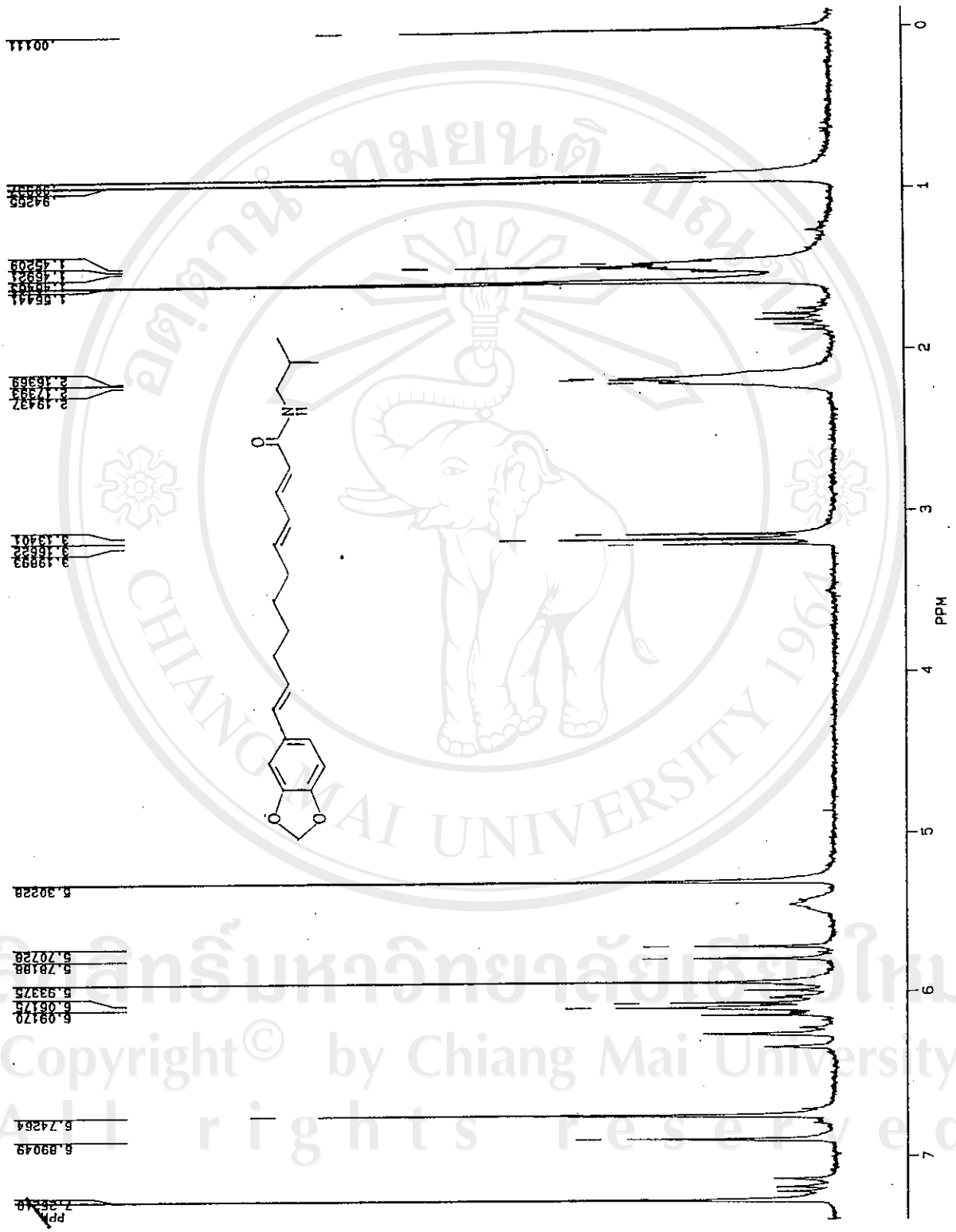
รูป 3.24 UV spectrum ของ RT.7 (Pipercide)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



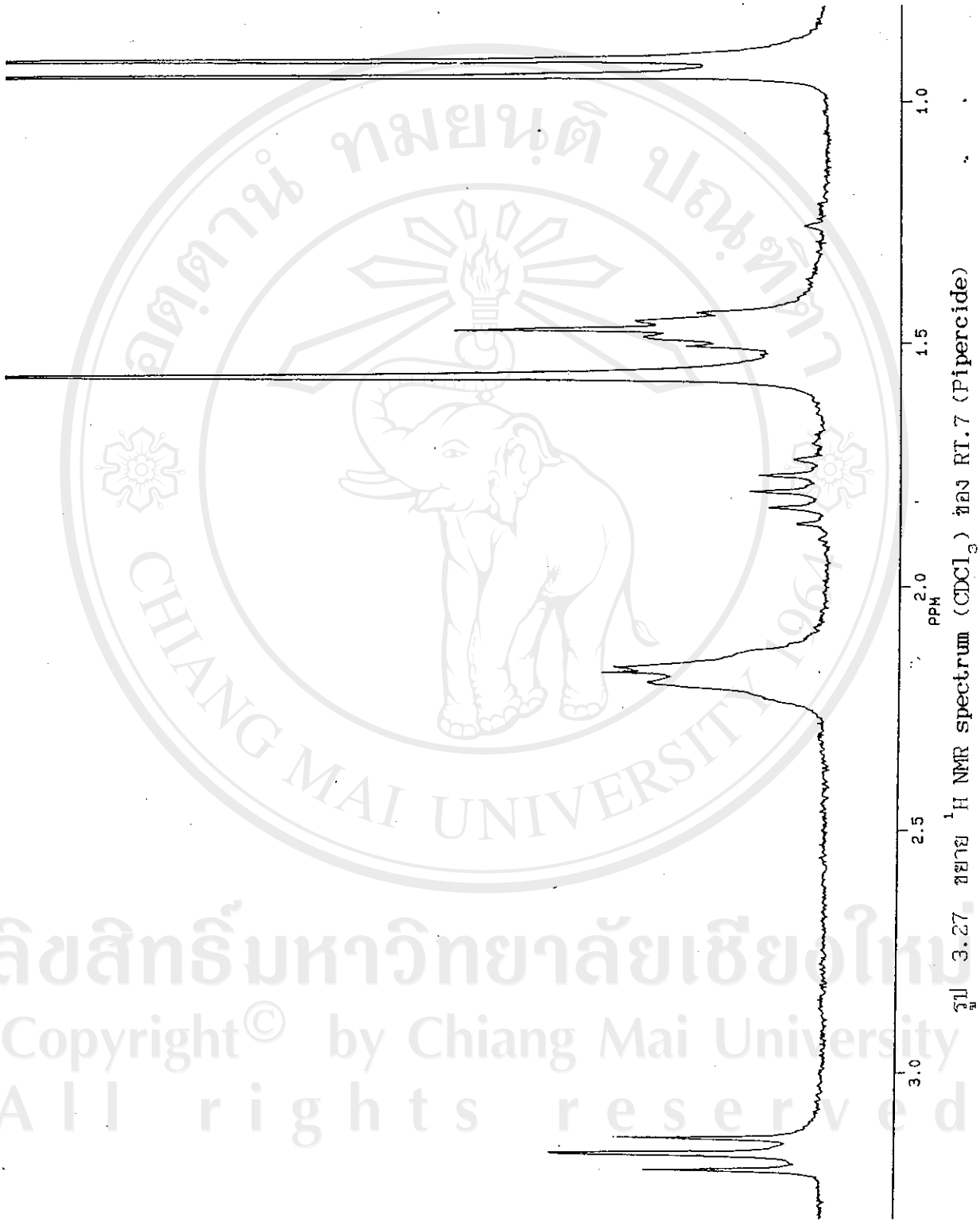
รูป 3.25 IR spectrum (KBr) ของ RT.7 (Pipercide)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



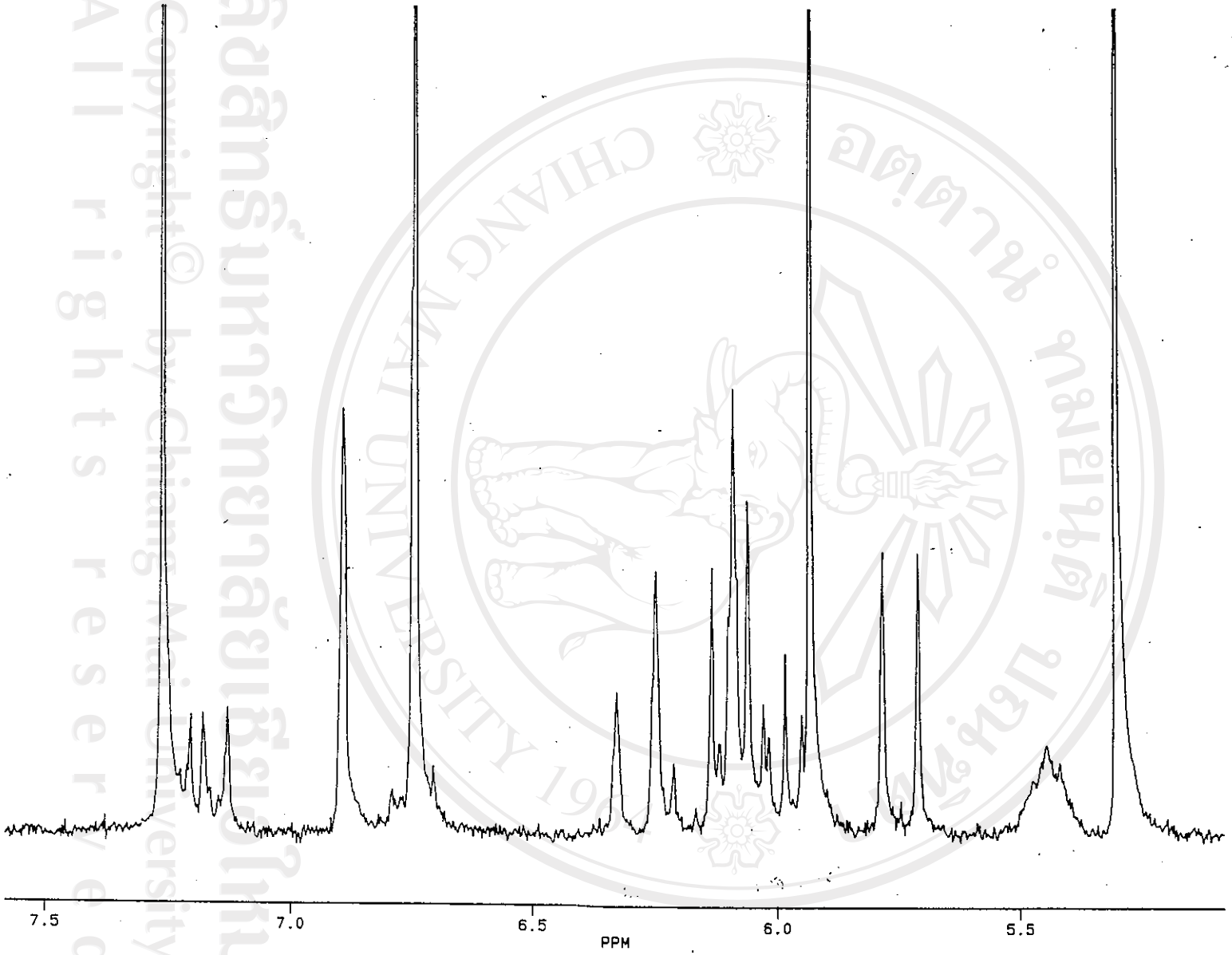
รูป 3.26 400 MHz ^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$) ของ RT.7 (Pipercide)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 3.27 สเปกตรัม ^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$) ของ RT.7 (Pipercide)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 3.28 สเปกตรัม ^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$) ของ RT.7 (Pipercide)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การศึกษาฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายของสารจากก้านดีปลี

การศึกษาฤทธิ์เบื้องต้น ได้ทำการสกัดก้านดีปลีโดยใช้ตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วเพิ่มขึ้นคือ เฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน, และเมธานอล ได้ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมธานอล ตามลำดับ นำเฉพาะ 2 ส่วนแรกที่มีฤทธิ์สูง (ตาราง 2.1) มาทดสอบอีกครั้งกับลูกน้ำยุงลายวัย 3 โดยวิธี immersion เพื่อยืนยันฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย ปรากฏว่าส่วนสกัดหยาบเฮกเซน (LC_{50} = 0.7785 ppm.) แสดงฤทธิ์สูงกว่าส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน (LC_{50} = 1.646 ppm.) ดังตาราง 2.2 ซึ่งให้ผลการทดลองตรงข้ามและแตกต่างจากการทดสอบเพื่อคัดเลือกชนิดของพืช ในตาราง 2.1 เพราะพืชที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 2 ครั้งนี้ มีตัวแปรทางธรรมชาติที่ไม่อาจควบคุมได้ ได้แก่ สภาพแวดล้อมของพืช สภาพอากาศ อายุของพืช และอื่น ๆ อย่างไรก็ตามผลที่ได้ยืนยันฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงได้เป็นอย่างดี

เมื่อนำส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของก้านดีปลีมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งได้สาร 7 ส่วนคือ F.1 Hex - F.7 Hex และผลึก RT.1 (Piperine) กับ RT.3 (Guineensine) บริสุทธิ์ เมื่อนำสารทั้ง 7 ส่วนมาทดสอบฤทธิ์ (ตาราง 2.4) พบว่า F.4 Hex เป็นส่วนแสดงฤทธิ์ (LC_{50} = 0.5482 ppm.)

ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนเมื่อแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีอย่างรวดเร็ว ได้สาร 7 ส่วนเช่นกันคือ F.1 DC - F.7 DC และผลึก RT.2 (Piperlonguminine) นำ F.1 DC - F.7 DC มาทดสอบฤทธิ์ (ตาราง 2.6) พบว่า F.3 DC เป็นส่วนแสดงฤทธิ์ (LC_{50} = 1.317 ppm)

เมื่อใช้โครมาโตกราฟฟีแผ่นบางตรวจสอบองค์ประกอบของ F.4 Hex และ F.3 DC (รูป 2.1) พบว่ามีส่วนประกอบย่อยเหมือน ๆ กัน และเมื่อใช้โครมาโตกราฟฟีแผ่นบาง ตรวจองค์ประกอบของ F.4 Hex เทียบกับส่วนที่ไม่ออกฤทธิ์ (F.1-3 Hex, F.5-7 Hex) และตรวจองค์ประกอบของ F.3 DC เทียบกับส่วนที่ไม่ออกฤทธิ์ (F.1-2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

DC, F.4-7 DC) โดยใช้ Piperine และ Guineensine เปรียบเทียบไปพร้อม ๆ กัน พบว่าองค์ประกอบของสารในช่วงของ Piperine ถึง Guineensine เป็นส่วนที่แสดงฤทธิ์ จึงรวม F.4 Hex และ F.3 DC เข้าด้วยกัน และจะทำการแยกให้ได้สารที่อยู่ในช่วงของ Piperine ถึง Guineensine

เมื่อนำส่วนออกฤทธิ์ (F.4 Hex + F.3 DC) มาแยกอีกหลายครั้งด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีอย่างรวดเร็วและโครมาโตตรอน โดยพยายามแยกส่วนเหนือ Guineensine ซึ่งเป็นส่วนที่นอกเหนือความสนใจออกจากส่วนตั้งแต่ Guineensine ถึง Piperine และนำส่วนหลังนี้มาทำ Preparative TLC. แยกได้สารประกอบบริสุทธิ์อีก 3 สารคือ RT.4 (Cinnamic acid piperidide), RT.6 (Retrofractamide C) และ RT.7 (Pipercide) และ RT.5 ซึ่งเป็นของผสม

สารประกอบที่แยกได้ทั้ง 6 สาร (RT.1, RT.2, RT.3, RT.4, RT.6 และ RT.7) และสารผสม (RT.5) นำมาทดสอบฤทธิ์อย่างคร่าว ๆ พบว่า RT.3, RT.6 และ RT.7 แสดงฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ดี ส่วน RT.1, RT.2, RT.4, RT.5 และ RT.7 มีฤทธิ์น้อย จึงทดสอบเฉพาะ RT.3, RT.6 และ RT.7 (RT.1 มีปริมาณสารมากจึงนำมาทดสอบด้วย) พบว่าRT.6 (Retrofractamide C) แสดงฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย 100 % ที่ความเข้มข้น 3 ppm (LC_{50} = 0.5820, LC_{99} = 3.5838 ppm) ในขณะที่ RT.7 (Pipercide) ฆ่าได้ 85 % ที่ 4 ppm (LC_{50} = 0.5613, LC_{99} = 63.9867 ppm.), RT.3 (Guineensine) ฆ่าได้ 96.67 % ที่ 15 ppm (LC_{50} = 3.422, LC_{99} = 37.237 ppm) ส่วน RT.1 (Piperine) ฆ่าได้ 91.67 % ที่ 100 ppm. (LC_{50} = 60.17, LC_{99} = 277.16 ppm) ดังตาราง 2.10 และรูป 2.3-2.6

จากค่า LC_{50} และ LC_{99} ของ RT.7 และ RT.3 จะเห็นว่ามีช่วงห่างจากกันมาก หมายความว่า ใช้ RT.7 และ RT.3 เพียง 0.5613 และ 3.422 ppm ก็

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายตายได้ถึง 50 % ของทั้งหมด แต่ถ้าต้องการให้ตายเกือบหมด (99 %) กลับต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึง 63.9867 และ 37.237 ppm ซึ่งเมื่อพิจารณาจากกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ Percent Response กับค่า LOG DOSE ในรูป 2.4 และ 2.6 จะเห็นว่ามีความชันค่อนข้างมาก นั่นคือต้องใช้สาร 2 ตัวนี้ในปริมาณสูงจึงจะสามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ 100 % ที่เป็นเช่นนี้อาจมีคำอธิบายได้ 2 ลักษณะ คือ เป็นผลเนื่องมาจากการแบ่งช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบให้มีค่าใกล้เคียงกันเกินไป โดยใน RT.7 แบ่งเป็น 0.25, 0.5, 1, 2 และ 4 ppm ส่วนใน RT.3 แบ่งเป็น 5, 7, 10, 12 และ 15 ppm ซึ่งความเข้มข้นที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยนี้อาจจะทำให้ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนการตายของลูกน้ำยุงลายเลย แต่จากการทดสอบอย่างคร่าว ๆ ก่อนทำการทดลองจริง พบว่าถ้าใช้ RT.7 และ RT.3 ปริมาณ 4 และ 15 ppm ตามลำดับ จะสามารถฆ่าลูกน้ำยุงได้ทั้งหมด 100 % (10 ตัวในน้ำ 100 cm^3) จึงอาจจะสันนิษฐานได้อีกทางหนึ่งว่าเป็นความคลาดเคลื่อนที่อาจเกิดจากตัวลูกน้ำยุงเอง แม้ว่าจะพยายามเพาะเลี้ยง และควบคุมขนาด อายุของลูกน้ำยุงที่ใช้ในการทดสอบ แต่ธรรมชาติของลูกน้ำยุงนั้นค่อนข้างจะอ่อนแอและตายง่ายจึงทำให้ผลการทดสอบแต่ละครั้งแตกต่างกันไป

สาเหตุอีกประการหนึ่งที่อาจเป็นไปได้ เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบของ RT.6 (Retrofractamide C) ที่ใช้ลูกน้ำยุงซึ่งเพาะเลี้ยงในชุดเดียวกับ RT.7 และ RT.3 อีกทั้งใช้ช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบใกล้เคียงกันมาก (0.25, 0.5, 1, 2 และ 3 ppm) แต่ก็ให้ค่า LC_{50} และ LC_{99} ไม่ห่างกันมากนัก ดังนั้น จึงอาจเป็นไปได้ว่าทั้ง RT.7 และ RT.3 นั้น มีธรรมชาติของสารที่สามารถออกฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงได้โดยมีขีดจำกัดปริมาณหนึ่ง ซึ่งถ้าเราจะใช้ปริมาณมากเกินไปกว่านี้ก็ไม่ทำให้ลูกน้ำยุงลายตาย 100 % และเมื่อเปรียบเทียบค่า LC_{50} และ LC_{95}, LC_{99} ของ RT.3, RT.6 และ RT.7 กับของส่วนสกัดหยาบเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน (ตาราง 2.2) และกับส่วนออกฤทธิ์ F.4 Hex และ F.3 DC (ตาราง 2.7) จะเห็นว่าการนำไปใช้ในรูปของส่วนสกัดหยาบ หรือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารผสมหลาย ๆ สารจะให้ผลในการฆ่าลูกน้ำยุงลายสูงกว่าการใช้ในรูปสารประกอบบริสุทธิ์เพียงตัวใดตัวหนึ่ง

คุณสมบัติสำคัญสำหรับสารที่จะนำมาใช้เป็นยาฆ่าลูกน้ำยุง (Larvicides) คือ ต้องมีการสลายตัวได้ในธรรมชาติ เพื่อจะได้ไม่มีพิษตกค้างอยู่นานเกินไป จึงได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์ของส่วนออกฤทธิ์ (F.4 Hex + F.3 DC) ต่อการตายของลูกน้ำยุงลาย และลูกน้ำยุงรำคาญในที่ร่ม และกลางแจ้ง (หัวข้อ 2.5.5 และตาราง 2.12) พบว่าเมื่อทดสอบกับยุงชนิดเดียวกันที่ความเข้มข้นของสารเท่ากัน ในที่ร่มสารจะออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงได้ดีกว่าในที่กลางแจ้ง ทั้งนี้เนื่องจากการสลายตัวของสารเมื่อได้รับความร้อนจากแสงอาทิตย์ และเมื่อเปรียบเทียบลูกน้ำยุงต่างชนิดกันในสภาวะเดียวกันพบว่า ลูกน้ำยุงลายมีจำนวนตายน้อยกว่าลูกน้ำยุงรำคาญ เนื่องจากลูกน้ำยุงลายมีความแข็งแรงกว่าสามารถต้านฤทธิ์สารได้ดีกว่าลูกน้ำยุงรำคาญ

เมื่อนำส่วนออกฤทธิ์ F.4 Hex + F.3 DC มาทดสอบโดยเฉพาะกับลูกน้ำยุงลาย และยุงลายตัวเต็มวัยในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน เมื่อหาความคงทนของสาร (หัวข้อ 2.5.6 และตาราง 2.13) ผลการทดสอบที่ได้จากลูกน้ำยุงลายในระยะเวลา 5 วัน ไม่เป็นที่น่าพอใจนัก เพราะค่า LC_{50} และ LC_{95} เพิ่มขึ้นมากในวันที่ 2 แล้วลดลงในวันที่ 3 ซึ่งใกล้เคียงกับวันที่ 4 และเพิ่มขึ้นอีกในวันที่ 5 แต่เมื่อเปรียบเทียบวันที่ 1 และวันที่ 5 จะเห็นว่าค่า LC_{50} และ LC_{95} เพิ่มขึ้น แสดงถึงการตายน้อยลงของลูกน้ำยุง อันเนื่องจากการสลายตัวของสารในธรรมชาติ และจากค่า LC_{50}, LC_{95} ในวันที่ 5 ซึ่งยังมีค่าสูง ทำให้คาดคะเนได้ว่าสารมีการสลายตัวได้อย่างช้า ๆ อันจะเป็นผลดีในแง่ของการนำไปใช้โดยมีช่วงเวลาการออกฤทธิ์นาน แต่ต้องไม่มีผลต่อคนและสัตว์ที่จะใช้น้ำบริโภค สำหรับผลการทดสอบกับยุงลายตัวเต็มวัยนั้นพบว่า มีการสลายตัวได้ค่อนข้างดีใน 24 ชั่วโมง โดยดูจากค่า LC_{50} และ LC_{95} ที่เพิ่มขึ้นอย่างมาก แสดงถึงจำนวนตายที่ลดน้อยลงเนื่องจากสารแสดงฤทธิ์ได้น้อยลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพื่อเป็นการเพิ่มคุณค่าของสารที่สกัดจากก้านดีปลีให้มากยิ่งขึ้น จึงได้นำส่วนออกฤทธิ์ F.4 Hex มาทดสอบกับยุงลายตัวเต็มวัยโดยทางสัมผัส (หัวข้อ 2.5.4 และตาราง 2.11) พบว่าที่ความเข้มข้น 200 ppm มีจำนวนยุงลายตัวเต็มวัยที่สัมผัสถูกสารตกมาตาย 93.10 % (LC_{50} = 119.9, LC_{95} = 198.9 ppm) และทดสอบฤทธิ์ของส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนต่อลูกปลานิล และหอย 3 ชนิด (หัวข้อ 2.5.7 และตาราง 2.14) พบว่ามีฤทธิ์สูงต่อลูกปลานิล (LC_{50} = 1.878, LC_{95} = 3.989 ppm) และหอยดันหรือหอยบัว (Lymnaea rubiginosa) ซึ่งพบจำนวนมากในแหล่งน้ำธรรมชาติ (LC_{50} = 9.643, LC_{95} = 16.52) และถ้าใช้ TWEEN 80 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวผสมลงไปเพื่อทำให้การละลายของสารในน้ำดีขึ้น พบว่าจะลดการออกฤทธิ์ของสารลง ส่วนหอยอีก 2 ชนิด คือ Biomphalaria glabrata และ Bithynia siamensis นั้น ให้ผลการทดสอบที่ค่า LC_{50} และ LC_{95} ค่อนข้างสูง แต่ก็แสดงให้เห็นได้ว่าสารจากก้านดีปลีแสดงฤทธิ์ต่อสัตว์น้ำอื่นนอกเหนือจากลูกน้ำยุง ซึ่งอาจจะเป็นแนวทางในการศึกษาต่อไป

3.4 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากก้านดีปลีกับพืชในสกุล Piper ชนิดอื่น ๆ ด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวความดันสูง (HPLC)

จากการทดสอบฤทธิ์ของส่วนสกัดหยาบส่วนต่าง ๆ ของพืชในสกุล Piper ต่อการตายของลูกน้ำยุงลาย (หัวข้อ 2.5.1) และการแยกสารบริสุทธิ์ออกฤทธิ์ RT.3, RT.6 และ RT.7 จากก้านดีปลี (หัวข้อ 2.5.2 และ 2.5.3) ทำให้เกิดความคิดที่จะวิเคราะห์หาและเปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ทั้ง 3 ชนิดในพืชสกุลพริกไทยชนิดอื่น ๆ ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่ช่วยในการพิจารณาการนำพืชชนิดนั้น ๆ ไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น

เนื่องจากการทดสอบฤทธิ์ของพืชสกุลพริกไทยในหัวข้อ 2.5.1 นั้น ต่างก็กระทำในระยะเวลาต่าง ๆ กัน จึงมีตัวแปรมากมายที่มีผลต่อการทดสอบที่ไม่ได้ควบคุม ในการวิเคราะห์ครั้งนี้จึงนำดีปลีส่วนก้าน ผล และใบมาทำการสกัดใหม่ โดยควบคุมตัว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

แปรต่าง ๆ เท่าที่จะทำได้ ส่วนพืชชนิดอื่นนั้นจะใช้เฉพาะส่วนสกัดหยาบเฮกเซนมาเปรียบเทียบ และยืนยันผลจากการทดสอบฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงลายอีกครั้ง โดยทำการทดสอบพร้อม ๆ กันกับลูกน้ำที่เพาะได้ในช่วงเวลาเดียวกัน และสภาพแวดล้อมเดียวกันดังรายละเอียดการวิเคราะห์ในหัวข้อ 2.5.8, ตาราง 2.15, รูป 2.12-2.41 และผลการทดสอบฤทธิ์ในตาราง 2.16

สารอ้างอิง RT.2 และ RT.4 เป็นสารที่มีตำแหน่งเดียวกันในโครมาโตแกรม (รูป 2.8-2.9) แต่เป็นสารที่ไม่แสดงฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายทั้งคู่ จึงวิเคราะห์หาปริมาณสารทั้งสองนี้รวมกัน ส่วน RT.6 (Retrofractamide C) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์สูง ปรากฏเป็น 2 พีคในโครมาโตแกรม (รูป 2.10-2.11) จึงคำนวณปริมาณสารจากอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค

จากตาราง 2.15 และ 2.16 จะเห็นแนวโน้มไปในทางเดียวกันของผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ในพืชสกุลพริกไทย และค่า LC_{50}, LC_{99} ที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์กับลูกน้ำยุงลาย ในตัวทำละลายต่างชนิดกัน ผลดีปลีที่สกัดด้วยเฮกเซนจะมีค่า LC_{50}, LC_{99} ต่ำกว่าที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนโดยตรง และใกล้เคียงกับผลพริกไทยดำ ในขณะที่ข้อมูลจากการวิเคราะห์พบว่าผลดีปลีที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนโดยตรงมีปริมาณสารออกฤทธิ์มากกว่าเล็กน้อย ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากสัดส่วนที่แตกต่างกันของสารบริสุทธิ์ที่เสริมฤทธิ์กันในส่วนสกัดหยาบ ส่วนก้านดีปลีที่สกัดด้วยเฮกเซนแสดงฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ดีกว่าที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนที่ค่า LC_{50}, LC_{99} ต่ำกว่า และสอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วย HPLC ซึ่งแสดงว่าส่วนที่สกัดของก้านดีปลีด้วยเฮกเซนมีปริมาณสารออกฤทธิ์มากกว่าส่วนที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนโดยตรง และถ้าหากใช้เฮกเซนสกัดสารออกแล้วแช่ด้วยไดคลอโรมีเทนซ้ำอีกครั้ง ส่วนสกัดที่ได้จากไดคลอโรมีเทนหลังจากสกัดด้วยเฮกเซนแล้วจะยังคงมีปริมาณสารออกฤทธิ์อยู่แม้จะน้อยลง แต่ก็ให้ผลทดสอบกับลูกน้ำยุงลายด้วยค่า LC_{50}, LC_{99} ที่ไม่สูงมากนัก กล่าวคือ ยังคงมีฤทธิ์สูงในการฆ่าลูกน้ำยุงลายอยู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อเปรียบเทียบในตัวทำละลายชนิดเดียวกัน พบว่าผลดีปลีจะมีปริมาณสารออกฤทธิ์มากกว่า และแสดงฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายที่ LC_{50}, LC_{99} ต่ำกว่าก้านดีปลี ส่วนใบดีปลีนั้นมีสารออกฤทธิ์ปริมาณน้อยมากและไม่มีฤทธิ์ที่ชัดเจนในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย

สำหรับจะข้าน (Piper pedicelatum Wall.) ส่วนสกัดเฮกเซนของก้านพบว่ามีปริมาณ RT.6 และ RT.3 มากแต่มี RT.7 น้อยและแสดงฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ดีพอควร (ที่ LC_{50}, LC_{99} ไม่สูงมากนัก) ส่วนสกัดด้วยเฮกเซนของใบมี RT.3 มาก แต่ RT.6 และ RT.7 ค่อนข้างน้อย และไม่แสดงฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงลาย สำหรับส่วนผลและก้านผล เนื่องจากเก็บได้ไม่เพียงพอจึงไม่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณและทดสอบฤทธิ์กับลูกน้ำยุง

เพื่อสะดวกในการเปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ และผลการทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายของส่วนสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของดีปลี จึงนำข้อมูลมาสรุปอีกครั้งในตาราง 3.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.2 ปริมาณสารออกฤทธิ์และระดับความเป็นพิษต่อยุงของส่วนสกัดหยาบจากดีปลี

ชื่อพืช	ส่วนของพืช	ตัวทำละลาย	ปริมาณสารออกฤทธิ์ (%)			ระดับความเป็นพิษ (ppm)	
			RT.3	RT.6	RT.7	LC_{50}	LC_{99}
ดีปลี (P.retrofractum Vahl.)	ผล	Hexane	1.49	0.77	0.82	2.7507	8.1616
	ผล	CH_2Cl_2	1.57	0.98	0.95	3.0899	7.9294
	ผล	CH_2Cl_2*	0.49	0.31	0.42	8.065	22.3030
	ก้าน	Hexane	0.82	0.78	0.29	3.2840	10.8060
	ก้าน	CH_2Cl_2	0.67	0.69	0.21	5.888	19.5460
	ก้าน	CH_2Cl_2*	0.37	0.50	0.20	8.837	22.945
	ใบ	Hexane	0.09	0.30	0.50	-	-
	ใบ	CH_2Cl_2	0.07	0.69	0.07	-	-
	ใบ	CH_2Cl_2*	0.04	0.19	0.02	-	-

หมายเหตุ.- CH_2Cl_2* : สกัดด้วย CH_2Cl_2 หลังจากสกัดด้วย hexane แล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 สรุปผลการทดลอง

1. การทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายของพืชสกุลพริกไทย 9 ชนิด คือ พลู, พริกไทย, ดีปลี, ชะพลู, พลูตีนช้าง, จะช้าน, P.peepuloides Roxb., P.boehmaeriaefolium Wall. และ Piper sp. ทั้งในส่วนราก, ก้าน, ใบ และผล พบว่าดีปลี (P.retrofractum Vahl.) แสดงฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงได้ดีกว่าพืชชนิดอื่น ๆ และส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนของก้าน แสดงฤทธิ์สูงสุดที่ค่า LC_{50} = 0.2904, LC_{95} = 0.7780 ppm

2. การสกัดและแยกสารประกอบบริสุทธิ์จากก้านดีปลีได้สารประกอบ 6 ชนิด คือ RT.1 (Piperine), RT.2 (Piperlonguminine), RT.3 (Guineensine), RT.4 (Cinnamic acid piperidide), RT.6 (Retrofractamide C), RT.7 (Pipercide) และ RT.5 ซึ่งเป็นสารผสม

RT.1, RT.2, RT.4 และ RT.5 แสดงฤทธิ์ต่ำในการฆ่าลูกน้ำยุงลายโดย RT.1 มีฤทธิ์พอประมาณมีค่า LC_{50} = 60.17, LC_{99} = 277.16 ppm ส่วน RT.6, RT.7 และ RT.3 มีฤทธิ์สูง RT.6 มีค่า LC_{50} = 0.5820, LC_{99} = 63.9867 ppm , RT.7 มีค่า LC_{50} = 0.5613, LC_{99} = 63.9867 ppm. และ RT.3 มีค่า LC_{50} = 3.422, LC_{99} = 37.237 ppm

3. นอกเหนือจากฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายแล้ว ส่วนสกัดหยาบของก้านดีปลียังแสดงฤทธิ์ในการฆ่ายุงลายตัวเต็มวัย (LC_{50} = 119.9, LC_{95} = 198.9 ppm), ลูกปลานิล (LC_{50} = 1.878, LC_{95} = 3.989 ppm) และหอยคันหรือหอยบัว (LC_{50} = 9.643, LC_{95} = 16.52 ppm) สารเหล่านี้สลายตัวได้เมื่อละลายอยู่ในน้ำ และจะสลายตัวได้เร็วขึ้นเมื่อถูกแสงแดด

4. การวิเคราะห์หาปริมาณสารบริสุทธิ์ออกฤทธิ์ในพืชสกุลพริกไทยโดยวิธี HPLC พบว่าพืชที่มีปริมาณสารออกฤทธิ์สูงกว่าชนิดอื่น ๆ คือ พริกไทยดำ ดีปลี และจะช้าน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สอดคล้องกับค่า LC_{50}, LC_{99} ที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์กับลูกน้ำยุงลาย โดยในผลดีปลีจะมีปริมาณสารออกฤทธิ์มากกว่าส่วนก้านและส่วนใบ การสกัดสารจากก้านดีปลีโดยใช้เฮกเซนจะให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ในสัดส่วนที่มากกว่าการใช้ไดคลอโรมีเทน สำหรับใบดีปลี มีสารออกฤทธิ์ปริมาณน้อย และไม่แสดงฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย

5. ปัญหาสำคัญในการวิจัยนี้ คือ พืชที่เก็บได้ในแต่ละแหล่งมีปริมาณสารแตกต่างกันออกไป พืชบางชนิดไม่เป็นที่รู้จักกันแพร่หลาย การบอกชนิดของพืชอาจจะคลาดเคลื่อนได้หากขาดความชำนาญในการตรวจวิเคราะห์ลักษณะ และสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์มีอยู่ในปริมาณน้อยในพืชทำให้ต้องใช้พืชปริมาณมากสำหรับสกัดซึ่งสิ้นเปลืองเวลาและวัสดุอุปกรณ์ อีกปัญหาหนึ่งคือ การทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงไม่สามารถทำพร้อม ๆ กันในครั้งเดียวได้หลาย ๆ สาร เนื่องจากจำนวนลูกน้ำไม่เพียงพอ การใช้ลูกน้ำต่างชุดกันนี้ อาจทำให้ผลการทดสอบ แต่ละครั้งคลาดเคลื่อนไปได้ แม้จะพยายามทำการเพาะเลี้ยงลูกน้ำภายใต้สภาวะและสิ่งแวดล้อมเดียวกัน ลูกน้ำที่เพาะเลี้ยงได้ก็ยังมีความแตกต่างกัน

งานวิจัยชิ้นนี้มุ่งที่จะศึกษาเพื่อนำสารจากธรรมชาติมาใช้ทดแทนสารสังเคราะห์ที่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม จากผลการทดสอบฤทธิ์กับยุงตัวเต็มวัย ปลาและหอยนอกเหนือจากฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุง ทำให้สรุปได้ว่าสารที่สกัดจากดีปลีน่าจะนำไปใช้ประโยชน์ได้อีกมาก หากมีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved