รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ "การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบยาสูบเพื่อใช้เป็นยากำจัดศัตรูพืชในรูปแบบอิมัลชันเข้มข้น"

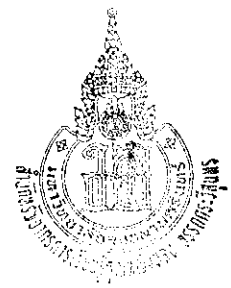
(The development of concentrated emulsion containing *Nicotiana tabaccum* extract for pesticide)

โดย ผศ.ดร.จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์ และคณะ

กุมภาพันธ์ 2553

สัญญาเลขที่ RDG5120016

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์



โครงการ "การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบยาสูบเพื่อใช้เป็นยากำจัดศัตรูพืชในรูปแบบอิมัลชันเข้มข้น"

(The development of concentrated emulsion containing *Nicotiana tabaccum* extract for pesticide)

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมเกียรติ สงคราม	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
3. ดร.ธนพร อำนวยกิจ	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
4. ดร.ลือลักษณ์ ล้อมลิ้ม	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
5. นางนิวรณ์รณ อินทรักษา	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
6. นางสาวจันทน์ผา ตันธนา	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชุดโครงการ "สมุนไพรเพื่อคุณภาพชีวิต"

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สมอ

เลขหมู่.....

Bib Key.....

28 ก.ย. 2553

Executive Summary

การวิจัยด้านสมุนไพร ได้ถูกกำหนดให้เป็นหนึ่งในทิศทางของการวิจัยที่มุ่งเน้นของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งเน้นตั้งแต่การศึกษาทางพฤกษเคมี การสกัด การแยกสารสำคัญ การทดสอบเอกลักษณ์ การทดสอบทางเภสัชวิทยา รวมทั้งการแปรรูปสมุนไพรหรือนำมาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นยา อาหาร และเครื่องสำอาง อย่างครบวงจร ซึ่งสอดคล้องกับบทบาทของสมุนไพรที่ได้เข้ามามีความสำคัญในชีวิตของคนไทย ปัจจุบันสมุนไพรไม่ได้จำกัดการใช้เฉพาะในการบำบัด บรรเทา ป้องกัน หรือรักษาโรคเท่านั้น มีสมุนไพรบางชนิดสามารถใช้ควบคุม หรือกำจัดศัตรูพืชได้ด้วย เช่น ใบยาสูบ รากโล่ติ้น รากหนอนตายหยาก เป็นต้น ซึ่งปัจจุบันกระแสการใช้สมุนไพรในวัตถุประสงค์นี้มีเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการใช้สารเคมีในการควบคุม หรือกำจัดศัตรูพืชนั้นก่อให้เกิดอันตราย มีการตกค้างของสารที่นำมาใช้ ซึ่งเป็นอันตรายต่อเกษตรกรผู้ใช้ ตลอดจนส่งผลมายังผู้บริโภคหากมีการตกค้างของสารเคมีที่นำมาใช้ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการใช้สมุนไพรเพื่อการควบคุม และกำจัดศัตรูพืชยังมีข้อจำกัดอยู่ เนื่องจากเป็นสารธรรมชาติทำให้ความคงตัวไม่ดี สลายตัวง่ายทำให้ประสิทธิภาพในการใช้ไม่แน่นอน ตลอดจนรูปแบบของผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่เหมาะสมเพื่อใช้ในวัตถุประสงค์ดังกล่าวขาดการควบคุมคุณภาพ และการศึกษาความคงตัว จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์เหล่านี้ขึ้นมา

งานวิจัยนี้ได้นำวิธีการทางวิทยาศาสตร์มาใช้ในการศึกษาเพื่อเตรียมสารสกัดจากใบยาสูบ โดยเน้นงานวิจัยด้านการพัฒนาวิธีการควบคุมคุณภาพและมาตรฐาน (quality control and standardization) ของสารสกัดใบยาสูบ และผลิตภัณฑ์ที่เตรียมขึ้นในรูปแบบของอิมัลชันเข้มข้น ศึกษาความคงตัวของสารสกัดใบยาสูบ และผลิตภัณฑ์ เพื่อให้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการกำหนดคุณลักษณะ (specification) ที่แน่นอนและเหมาะสมของสารสกัดใบยาสูบได้ โดยจากผลการวิจัยสามารถพัฒนาวิธีการควบคุมคุณภาพ โดยกำหนดเป็นมาตรฐานของสารสำคัญ nicotine ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในใบยาสูบ และหาความคงตัวของสารสกัดใบยาสูบ และผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบยาสูบในรูปแบบอิมัลชันเข้มข้น ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในการหาปริมาณสารสำคัญ nicotine ที่มีอยู่ในใบยาสูบได้ นอกจากนี้อาจประยุกต์ใช้กับสมุนไพรอื่นที่สารสำคัญ nicotine เป็นองค์ประกอบได้เช่นเดียวกัน และผลจากงานวิจัยนี้สามารถนำไปถ่ายทอดให้กับเกษตรกร ตลอดจนหน่วยงานของรัฐ หรือเอกชน เช่น หน่วยวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นต้น ในการกำหนดวิธีการในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบหรือผลิตภัณฑ์ของใบยาสูบได้ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อวงการสมุนไพรไทย และเกษตรกรไทย อันจะส่งผลในการเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันของประเทศในตลาดโลกอย่างต่อเนื่องและยั่งยืน

บทคัดย่อ

ปัญหาในการนำสมุนไพรมาใช้เป็นตัวควบคุม หรือกำจัดแมลงศัตรูพืชนั้นคือความไม่คงตัวของสมุนไพร สารสำคัญในสมุนไพรสลายตัวง่ายทำให้ประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ไม่แน่นอนมีความแปรปรวนสูง นอกจากนี้ปริมาณสารสำคัญที่มีในสมุนไพรนั้นอาจขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ์พืช ฤดูกาล และแหล่งเพาะปลูก ปัจจุบันสมุนไพรไทยที่นำมาใช้ในในการควบคุม และกำจัดศัตรูพืชนั้นมีอยู่น้อย และใช้กันเองในหมู่เกษตรกร ไม่มีกระบวนการในการตรวจสอบมาตรฐาน และควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบ หรือผลิตภัณฑ์ ตลอดจนขาดการหาปริมาณสารสำคัญหรือสารที่ออกฤทธิ์ งานวิจัยนี้ได้นำวิธีการทางวิทยาศาสตร์ มาใช้ในการศึกษาเพื่อเตรียมสารสกัดจากใบยาสูบ พัฒนาวิธีการควบคุมคุณภาพและมาตรฐานของสารสกัดใบยาสูบและผลิตภัณฑ์ที่เตรียมในรูปแบบของอิมัลชันเข้มข้น เพื่อให้สามารถนำไปใช้เป็นต้นแบบในการกำหนดคุณลักษณะ (specification) ที่แน่นอนและเหมาะสมในการนำใบยาสูบมาเตรียมเป็นสารสกัด หรือผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการควบคุม และกำจัดศัตรูพืช

งานวิจัยนี้ได้เตรียมสารสกัดจากใบยาสูบ ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดคือ 95% ethanol โดยน้ำหนักของสารสกัดเมื่อคิดเป็นร้อยละเทียบกับใบยาสูบแห้งจะได้ 19.55% สารสกัดใบยาสูบมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นฉุนของใบยาสูบ นำสารสกัดที่ได้มาหารูปแบบการเคลื่อนที่บนแผ่นรงคเลขผิวบาง (TLC-Fingerprint) และรูปแบบการเคลื่อนที่ใน High Performance Liquid Chromatography (HPLC-Fingerprint) งานวิจัยนี้ได้ศึกษา และพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ nicotine โดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ชนิด reversed phase (C-18) ใช้อัตราส่วนของตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ water 700ml+Triethylamine (TEA) 1 ml – acetonitrile ในอัตราส่วน 70 : 30 กำหนดอัตราการไหล 1 ml/min และตรวจวัดสารสำคัญ nicotine ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 260 nm โดยใช้เครื่อง diode-arrays พบว่า retention time ของสารสำคัญ nicotin เท่ากับ 9.35 – 9.40 นาที ซึ่งวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้ดัดแปลงมาจากหัวข้อ assay ของ Nicotine transdermal system ในเภสัชตำรับ USP 27 เมื่อศึกษา stability-indicating assay จะได้ว่าสารสำคัญ nicotine ในสารสกัดจากใบยาสูบค่อนข้างคงตัวภายใต้สภาวะกรด ด่าง และความร้อน เมื่อทำการศึกษาความคงตัวของสารสกัดใบยาสูบในสภาวะเร่ง (อุณหภูมิห้อง, 45 และ 70°C ; ความชื้นสัมพัทธ์ 75%) พบว่าไม่สามารถบ่งชี้ถึงความคงตัวของสารสกัดใบยาสูบได้อย่างชัดเจนเนื่องจากมีความแปรปรวนของสารสำคัญในสารสกัดสูง ได้ทำการพัฒนาผลิตภัณฑ์ของสารสกัดใบยาสูบให้อยู่ในรูปแบบของอิมัลชันเข้มข้น ซึ่งได้สูตรตำรับมีลักษณะทางกายภาพ และเคมีที่ดี ไม่ตกตะกอนเมื่อตั้งทิ้งไว้ กระจายตัวได้ดีและไม่ตกตะกอนเมื่อนำไปเจือจางด้วยน้ำขณะนำไปใช้ และองค์ประกอบเพิ่มเติมที่มีในสูตรตำรับไม่รบกวนวิธีการ

วิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้ไปศึกษาหาความคงตัวพบว่าผลิตภัณฑ์มีความคงตัวที่ดี และอายุของผลิตภัณฑ์นี้สามารถอยู่ได้อย่างน้อย 6 เดือน

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้ไปทำการเจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วนต่าง ๆ และนำไปฉีดพ่นในแปลงเกษตรทดลองพบว่าในทุกอัตราส่วนแมลงศัตรูพืชที่ใช้ทดลองคือเพลี้ยอ่อนนั้นตายทั้งหมด และใบของพืชที่ใช้ทดลองก็ยังมีความเขียวสดอยู่ไม่เกิดรอยไหม้บริเวณที่ฉีดพ่น และผู้ใช้มีความพึงพอใจ

Abstract

The problems of using plants as control or pest insect were limited and due to the degradation of active ingredients content. This variation emerges from species differences, the places of plantation and seasons of harvesting. Currently, Using of plants to control or pest insect is limited and there is no standard procedure for their quality control. In this research, crude extracts of tobacco leaves were studied for their preparation (concentrated emulsion) and standardization.

Tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* Linn., Solanaceae), were used in our study. Dried leaves were extracted in a 95% ethanol and then dried under rotary evaporator. The percentage yields of the crude tobacco extracts, brown syrupy mass and strong odors, were 19.55. TLC- and HPLC-Fingerprints of tobacco extract were obtained. One of the active ingredients, nicotine was selected to be used as a marker in suitable high performance liquid chromatography (HPLC) system developed in this study. Separation was performed at room temperature on a reversed phase C-18 column, with a mobile phase consisted of 1 ml Triethylamine in 700 ml water and acetronitrile in the ratio of 7:3. The column eluent was monitored using a diode array at a wavelength of 260 nm, a flow rate of 1.0 ml/min. The retention time of quercetin was about 9.35 – 9.40 minutes. In stability-indicating assay, the tobacco extract was stable in acid, base and heat conditions. For specificity evaluation, it was found that the HPLC system can detect nicotine retaining in both the extracts and the product, concentrated emulsion without any interfering from the additive added. However, it has been found that nicotine in crude extracts are not indicated for the stability under accelerated conditions (25, 45 and 70°C, 75% RH), Accordingly, the extract from tobacco leaves was selected for further study to its product development and stability. The concentrated emulsion of tobacco extract was prepared by combining fixed oil (palm oil), emulsifiers (Tween and Span), giving a more physically stable product. The product contained about 10% w/w nicotine. Under room temperature and 75% RH for 6 month, the overall of % remaining nicotine in the product forms demonstrated that stable more than 6 month.

The suitable concentrated emulsion of tobacco extract was studied in the field. After dilution with water to make difference ration and the conversion of agriculture spray test showed all of the exhausted died and the plants trials are still green and not burn.

สารบัญ

	หน้า
Executive Summary	iii
บทคัดย่อ	iv
Abstract	vi
สารบัญ	vii
สารบัญตาราง	vii
สารบัญรูป	ix
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตัวอย่างสมุนไพร เครื่องมือ สารเคมี วัสดุ และอุปกรณ์	6
บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย	12
บทที่ 4 ผลการทดลอง สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง	24
บทที่ 5 บทสรุป	52
บทที่ 6 บรรณานุกรม	54
ภาคผนวก	55

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 4-1	แสดง %yield ของสารสกัดใบยาสูบด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	25
ตารางที่ 4-2	แสดง %yield ของสารสกัดใบยาสูบด้วยตัว 95% ethanol	26
ตารางที่ 4-3	Peak area ที่วัดได้จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นต่างๆ	30
ตารางที่ 4-4	Peak area ที่วัดได้จากการวิเคราะห์หา nicotine ในสารสกัดใบยาสูบ	31
ตารางที่ 4-5	แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ nicotine ในสารสกัดใบยาสูบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้องที่เวลาต่าง ๆ กัน	34
ตารางที่ 4-6	แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ nicotine ในสารสกัดใบยาสูบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิ 45°C ที่เวลาต่าง ๆ กัน	35
ตารางที่ 4-7	แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ nicotine ในสารสกัดใบยาสูบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิ 70°C ที่เวลาต่าง ๆ กัน	35
ตารางที่ 4-8	แสดงค่า pH ของสารสกัดจากใบยาสูบในตัวทำละลายกรด – ด่าง	39
ตารางที่ 4-9	แสดงค่าการละลายของสารสกัดใบยาสูบใน medium ต่าง ๆ	40
ตารางที่ 4-10	ลักษณะทางกายภาพของ concentrated emulsion ของสารสกัดใบยาสูบที่ได้จากสูตรต่าง ๆ	40
ตารางที่ 4-11	แสดงลักษณะทางกายภาพของแต่ละสูตรตำรับเมื่อก่อนและหลัง freeze-thaw	45
ตารางที่ 4-12	แสดงลักษณะทางกายภาพของสูตรตำรับที่ 2 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเมื่อเวลาผ่านไป 1 และ 3 เดือน	45
ตารางที่ 4-13	แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ nicotine ใน concentrated emulsion ของสารสกัดใบยาสูบสูตรตำรับที่สองที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้องที่เวลาต่าง ๆ กัน	46
ตารางที่ 4-14	ลักษณะทางกายภาพของ concentrated emulsion ของสารสกัดใบยาสูบที่เจือจางด้วยน้ำสะอาด	48
ตารางที่ 4-15	ผลการกำจัดเพลี้ยอ่อนของ concentrated emulsion สารสกัดใบยาสูบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ณ เวลา 0, 2 และ 24 ชั่วโมง	48

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1-1	*Nicotiana tabacum* Linn., SOLANACEAE	1
รูปที่ 1-2	แสดงโครงสร้างของนิโคติน (**1**) (nicotine)	3
รูปที่ 1-3	แสดงผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของ nicotine	3
รูปที่ 1-4	ความสัมพันธ์ระหว่างชีวประสิทธิผล สูตรตำรับ รวมทั้งกระบวนการผลิต และความคงตัวของผลิตภัณฑ์	5
รูปที่ 2-1	ลักษณะของยาสูบแห้งที่นำมาใช้การวิจัย	6
รูปที่ 2-2	แสดงแปลงปลูกใบยาสูบ	8
รูปที่ 2-3	แสดงการตัด และหั่นใบยาสูบ	8
รูปที่ 2-4	แสดงการตากใบยาสูบ	9
รูปที่ 2-5	แสดงลักษณะเส้นแห้งของใบยาสูบ	9
รูปที่ 3-1	แสดงภาพของเพลี้ยอ่อน (*Aphis glycines* Mats.)	23
รูปที่ 4-1	แสดงภาพการหมักของใบยาสูบในตัวทำละลาย 5 ชนิดคือ *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol และ 95% ethanol	24
รูปที่ 4-2	แสดงภาพสารสกัดใบยาสูบที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด	25
รูปที่ 4-3	แสดงภาพการหมักของยาสูบในตัวทำละลาย 95% ethanol	25
รูปที่ 4-4	แสดงภาพสารสกัดใบยาสูบ	26
รูปที่ 4-5	HPLC-fingerprint or Chromatogram ของสารสกัดจากใบยาสูบ (ความเข้มข้น 0.1 mg/ml)	29
รูปที่ 4-6	ตัวอย่าง Chromatogram ของสารมาตรฐาน nicotine hydrogen tartrate (98.0%) (ความเข้มข้น 18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	29
รูปที่ 4-7	Standard curve ของการวิเคราะห์หาปริมาณ nicotine จากสารสกัดใบยาสูบ	30
รูปที่ 4-8	chromatogram ของสารสกัดใบยาสูบ	32
รูปที่ 4-9	chromatogram ของสารสกัดใบยาสูบที่ถูกเร่งการสลายตัวภายใต้สภาวะกรด	32
รูปที่ 4-10	chromatogram ของสารสกัดใบยาสูบที่ถูกเร่งการสลายตัวภายใต้สภาวะด่าง	33
รูปที่ 4-11	chromatogram ของสารสกัดใบยาสูบที่ถูกเร่งการสลายตัวภายใต้ความร้อน	33
รูปที่ 4-12	แสดงภาพ Stability curve ของสารสกัดใบยาสูบที่อุณหภูมิต่าง ๆ	36
รูปที่ 4-13	แสดงลักษณะทางกายภาพของสารสกัดจากใบยาสูบ ณ เวลาเริ่มต้น	37
รูปที่ 4-14	แสดงลักษณะทางกายภาพของสารสกัดจากใบยาสูบที่เวลา 1 วัน	37
รูปที่ 4-15	แสดงลักษณะทางกายภาพของสารสกัดจากใบยาสูบที่เวลา 3 วัน	37
รูปที่ 4-16	แสดงลักษณะทางกายภาพของสารสกัดจากใบยาสูบที่เวลา 7 วัน	38

สารบัญรูป (ต่อ)

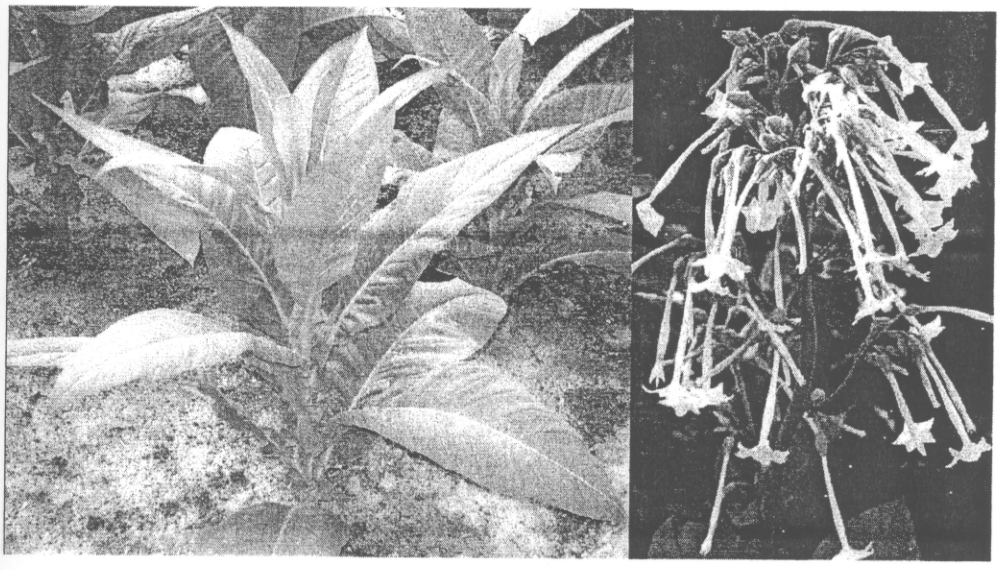
		หน้า
รูปที่ 4-17	แสดงลักษณะทางกายภาพของสารสกัดจากใบยาสูบที่เวลา 14 วัน	38
รูปที่ 4-18	แสดงภาพของ concentrated emulsion ของสารสกัดใบยาสูบ ที่ได้จากสูตรที่ 1(**A**), 8(**B**), 9(**C**), 16(**D**), 25(**E**) และ 26(**F**)	42
รูปที่ 4-19	แสดงภาพของ concentrated emulsion ของสารสกัดใบยาสูบ ที่มีปริมาณของสารสำคัญ Nicotin 10%	43
รูปที่ 4-20	แสดงลักษณะของสูตรตำรับ concentrated emulsion แต่ละสูตรตำรับ	43
รูปที่ 4-21	ลักษณะของ concentrated emulsion แต่ละสูตรตำรับ	44
รูปที่ 4-22	แสดงลักษณะทางกายภาพของสูตรตำรับที่ 2 ของ nicotine emulsion	45
รูปที่ 4-23	ภาพแสดงผลิตภัณฑ์ concentrated emulsion จากสารสกัดใบยาสูบ และเจือจางในน้ำสะอาดที่ความเข้มข้นต่างๆ	48
รูปที่ 4-24	แสดงภาพของใบในแปลงทดลอง (A ไม่มีเพลี้ย B มีเพลี้ย)	49
รูปที่ 4-25	แสดงภาพของเพลี้ยอ่อนหลังจากฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ในความเข้มข้น 1 : 10	49
รูปที่ 4-26	แสดงภาพของเพลี้ยอ่อนหลังจากฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ในความเข้มข้น 1 : 20	49
รูปที่ 4-27	แสดงภาพของเพลี้ยอ่อนหลังจากฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ในความเข้มข้น 1 : 50	50
รูปที่ 4-28	แสดงภาพของเพลี้ยอ่อนหลังจากฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ในความเข้มข้น 1 : 80	50
รูปที่ 4-29	แสดงภาพของเพลี้ยอ่อนหลังจากฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ในความเข้มข้น 1 : 100	50

บทที่ 1
บทนำ

ปัจจุบันภาคการเกษตร และการผลิตสัตว์ในประเทศไทยได้มีพัฒนาและขยายผลกำลังการผลิตสู่ระบบอุตสาหกรรมมากขึ้น ซึ่งในการพัฒนาที่เพิ่มมากขึ้นนี้ได้มีการใช้สาร หรือยาในการไล่ศัตรูพืช หรือกำจัดแมลงที่เพิ่มมากขึ้น ตลอดจนสารไล่แมลงที่มาคอยรบกวนสัตว์ ซึ่งยาหรือสารเหล่านี้มักจะเป็นสารสังเคราะห์ซึ่งการใช้ในปริมาณสูงอาจทำให้เป็นอันตรายต่อพืช และสัตว์ที่สัมผัสโดยตรง นอกจากนี้ยา สารไล่ หรือฆ่าแมลงเหล่านี้มักเป็นสารสังเคราะห์ซึ่งจะเสื่อมสลายยาก มีตกค้างอยู่ในธรรมชาติค่อนข้างมาก ซึ่งอาจเป็นอันตราย หรือส่งผลไปยังผู้บริโภคได้โดยตรง

ข้อมูลทั่วไปของใบยาสูบ

ต้นยาสูบ (tobacco) (รูปที่ 1-1) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nicotiana tabacum* Linn. อยู่ในวงศ์ Solanaceae ปลูกมากในแถบ subtropical ของทวีปอเมริกาเป็นพืชยืนต้นขนาดเล็ก (small tree) สูงประมาณ 0.9 – 1.5 เมตร ใบเดี่ยวเป็นรูปวงรี หรือรูปใบหอกมีสีเขียว ใบมีขนทั้งสองด้าน ดอกช่อออกที่ยอดรูประฆังมีสีขาวหรือสีชมพู ผลมีเมล็ดกลม ต้นยาสูบนี้มีความไวต่ออุณหภูมิ สภาพภูมิอากาศ ความชื้น และแหล่งที่ปลูก อุณหภูมิที่เหมาะสมในการปลูกคือ 20 – 30 องศาเซลเซียสโดยมีความชื้นสัมพัทธ์ระหว่าง 80-85% และแหล่งที่ปลูกจะต้องไม่มีปริมาณของธาตุไนโตรเจนที่สูงเกินไป สรรพคุณของต้นยาสูบ ใช้ใบบรรเทาหวัด คัดจมูก แก้บาดแผล แก้ลมพิษ แก้ปวด ขับเสมหะ ใช้เป็นยาฆ่าแมลง รบกวนการกินอาหารของแมลง ฆ่าเหา ฆ่าหอย ฆ่าปลา ใช้ห้ามเลือด ขับพยาธิในลำไส้ ใช้ยาถ่าย และอื่น ๆ อีกมากมาย (นันทวัน, 2543)



รูปที่ 1-1 *Nicotiana tabacum* Linn., SOLANACEAE

ชื่อสามัญ : TOBACCO

ชื่อทางวิทยาศาสตร์ : *Nicotiana tabacum* Linn.

ชื่อวงศ์ : SOLANACEAE

ชื่อเรียกตามภาษาท้องถิ่น : จะวั้ (เขมร สุรินทร์)

รูปลักษณะ : เป็นพืชฤดูเดียวลำต้นตั้งตรง มีขนซึ่งให้ความรู้สึกเหนียวเมื่อสัมผัส ลำต้นสูงประมาณ 1 – 2 เมตร

ใบ : เป็นใบเดี่ยว มีขนาดใหญ่ ยาวประมาณ 50 –60 ซม. และกว้างประมาณ 25 – 30 ซม. แต่ละต้นจะมีจำนวนใบ 20 – 30 ใบ ขอบใบเรียบ ส่วนมากจะไม่มีก้านใบ มีหูใบ ฐานใบจะหุ้มลำต้นไว้ครึ่งหนึ่ง ใบจะมีขนปกคลุม

ดอก : ออกเป็นช่อชนิดราซีมเกิดที่ส่วนยอดของลำต้น ช่อดอกหนึ่งจะมีดอกประมาณ 150 ดอก ดอกยาว 1.5 – 2 นิ้ว มีสีชมพู ขาวหรือแดง มีกลีบดอก 5 กลีบ โดยส่วนล่างของกลีบดอกเชื่อมติดกัน ทำให้ดอกมีรูปร่างเหมือนระฆัง

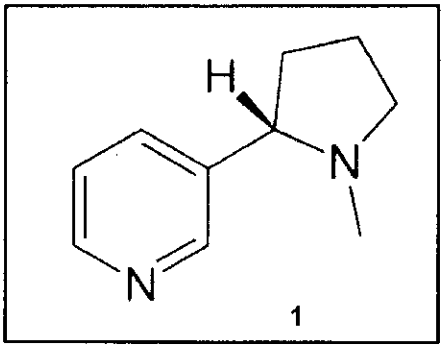
เมล็ด : มีขนาดเล็กมาก รูปไข่ สีน้ำตาลเข้ม ผิวเมล็ด มีเส้นสานกันเป็นร่างแห

พันธุ์ : ยาสูบที่นิยมปลูกในประเทศไทยเป็นสายพันธุ์เวอร์จิเนียร์ เป็นยาสูบประเภทบ่มไอร้อน อีกสายพันธุ์หนึ่งก็คือ เตอร์กิช เป็นยาสูบที่บ่มด้วยแสงแดด

พันธุ์ยาสูบที่แนะนำให้ปลูกมีดังนี้

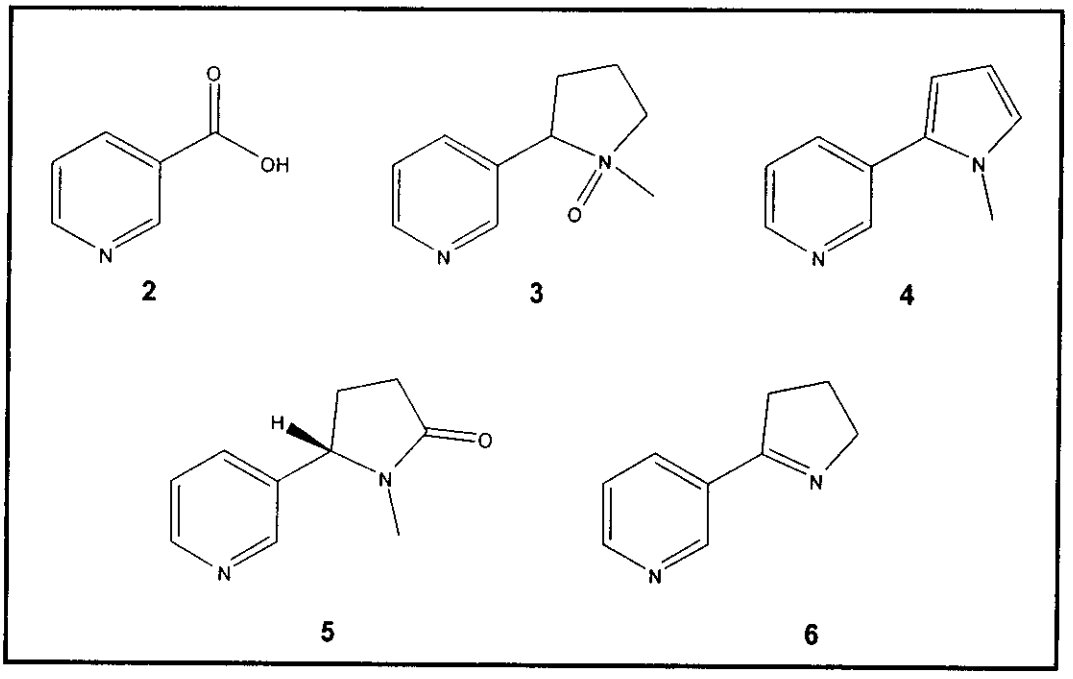
1. ยาสูบเวอร์จิเนีย จากการทดลองของสถานียาสูบแม่โจ้ พันธุ์ที่มีลักษณะเหมาะสมคือ ยาปี และยาฝน ใช้พันธุ์ Coker 347 และ Coker 411 ส่วนยาทา ใช้พันธุ์ Coker 187 Hicks
2. ยาสูบเบอร์เลย์ ที่ใช้ปลูกได้แก่ Ky 14, Ky 17, Burley 21 และ Burley 37
3. ยาสูบเตอร์กิช ที่ให้ใบยาที่มีคุณภาพดีในประเทศไทยคือ พันธุ์แซมซูน (Samsun) ซึ่งมีใบขนาดเล็ก ยาว 5-20 เซนติเมตร กว้าง 3-10 เซนติเมตร ใบเป็นรูปหัวใจ หูใบเล็ก เนื้อบาง นุ่ม พรุน และละเอียดมาก ก้านกลางใบเล็กบาง เมื่อบ่มแล้วจะมีสีเหลืองแถบน้ำตาล หรือเหลืองทอง กลิ่นหอมมาก ความยืดหยุ่นและการไหม้ลามดีและเถ้ามีสีขาว

สำหรับองค์ประกอบทางเคมีในต้นยาสูบจากที่มีรายงานไว้ (นันทวัน, 2543) พบว่ามีเป็นจำนวนมากกว่าสองร้อยชนิด แต่สารที่เป็นองค์ประกอบหลักและสำคัญของต้นยาสูบและมีในปริมาณสูงคือนิโคติน nicotine (1) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ (รูปที่ 1-2) สารนี้พบในทุกส่วนของต้นยาสูบโดยเฉพาะอย่างยิ่งในใบยาสูบซึ่งพบปริมาณของนิโคตินถึง 64% สำหรับนิโคตินในลำต้น ราก และดอก มีปริมาณเท่ากับ 18, 13 และ 5% ตามลำดับ



รูปที่ 1-2 แสดงโครงสร้างของนิโคติน (**1**) (nicotine)

นิโคติน $C_{10}H_{14}N_2$ เป็นสารที่มีลักษณะเป็นของเหลวที่มีความมัน (oily liquid) ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ระเหยได้ (volatile) นิโคตินละลายได้ดีในน้ำ อีเทอร์ แอลกอฮอล์ หรือ น้ำมัน มีความเป เบสที่พร้อมจะเปลี่ยนเป็นเกลือเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดทั่วไป นิโคตินไม่คงตัวเมื่ออยู่ในอากาศ และเมื่อโดนแสง โดยจะทำให้ของเหลวใสนั้นเกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาล (Merck Index, 2000) และมีกลิ่นของยาสูบ สารนิโคตินจะในรูป free base เป็นสารที่ระเหยได้ง่าย (volatile) การสูญเสียนิโคตินจะเกิดจากการระเหย (evaporation) และการเสื่อมสลายทางเคมี (chemical degradation) โดยผ่านปฏิกิริยา oxidation (Jackson, 1941) ได้ผลิตภัณฑ์จากการสลายตัว คือ Nicotinic acid (**2**), oxynicotine (**3**), nicotyrine (**4**), cotinine (**5**) และ myosmine (**6**) (Wada, 1959)สารละลายของ nicotine ไม่คงตัวอย่างมากในอากาศ โดยลดลงเหลือต่ำกว่า 30% ของความเข้มข้นเริ่มต้น เมื่อตั้งไว้ 2-3 เดือน (Haritharan, 1988) (รูปที่ 1-3)

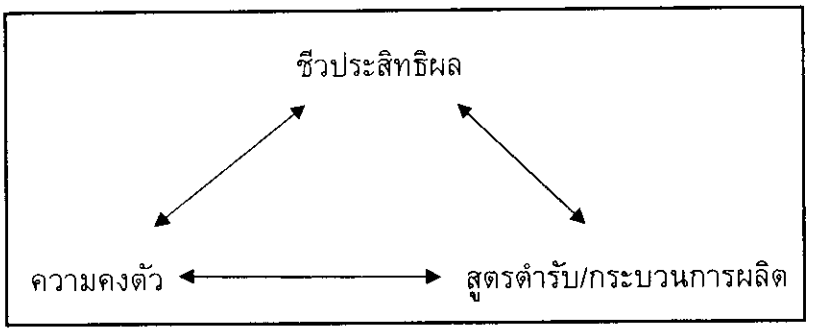


รูปที่ 1-3 แสดงผลิตภัณฑ์จาการสลายตัวของ nicotine

จากการ review literature พบว่ามีการ stabilize นิโคตินเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ช่วยลดอาการถอนยา (withdrawal effects) ระหว่างการอดบุหรี่ โดยทำการดูดซับนิโคติน (sorption nicotine) บน cellulose powder พบว่าทำให้นิโคตินในผลิตภัณฑ์มีความคงตัวดีขึ้น (Mihranyan, 2004) และเมื่อใช้เทคนิค HPLC ในการวิเคราะห์โดยใช้ mobile phase ที่เหมาะสมสามารถวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินได้ดี และสามารถแยกออกจาก degradation products อื่นได้ดี HPLC-assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ปริมาณที่สามารถ apply กับตัวอย่างที่หลากหลายมากกว่า สารสลายตัวบางชนิด อาจไม่ volatile หรืออาจสลายตัวเมื่อถูกความร้อน ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมที่จะใช้ GC และการวิเคราะห์ด้วย HPLC นอกจากจะทราบปริมาณของ nicotine ที่เหลืออยู่ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ แล้ว ยังช่วยให้เห็นแนวโน้มการสลายตัวของ nicotine ใน สารสกัดได้ชัดเจนว่าสลายตัวไปเป็น degradation product ชนิดใดไปมากน้อยเพียงใด และรายงานการวิจัยฉบับใหม่ ๆ มีแนวโน้มที่จะใช้วิธี HPLC ในการวิเคราะห์ปริมาณ nicotine ในสูตรตำรับต่างๆ และเป็นวิธีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณ nicotine ในเภสัชภัณฑ์ที่ official ใน pharmacopoeia เช่น BP 2005, USP 27 เป็นต้น

นอกจากนี้มีรายงานการทำ inclusion complex ของนิโคตินใน β-cyclodextrin (β-CD) เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์เลิกบุหรี่ โดยมีความเห็นว่านิโคตินเป็นสารที่ระเหย และเกิด oxidative degradation ซึ่งสามารถ stabilize ได้ใน pharmaceutical formulation (Berglund, 1997) สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของนิโคตินนั้น สารนิโคตินจะจับกับตัวรับนิโคติน (nicotinic receptor) ที่ autonomic ganglia, adrenal medulla, neuromuscular junction และที่สมอง โดยผลจะทำให้เกิดการกระตุ้นที่ระบบประสาทส่วนกลาง several central nervous system neurohumoral pathways, leading to the release of acetylcholine, norepinephrine, dopamine, serotonin, vasopressin, growth hormone และ ACTH สำหรับผู้ที่ได้รับนิโคตินในปริมาณต่ำจะทำให้เพิ่มความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจ หากได้รับในปริมาณสูง สาร nicotine อาจส่งผลโดยตรงต่อระบบ peripheral nervous system กระตุ้นให้มีการผลิต ganglionic sละมีการปลดปล่อยของ adrenal catecholamines และเมื่อได้รับในปริมาณสูงมาก (extremely high doses) สาร nicotine จะทำให้เกิดความดันต่ำ ลดอัตราการเต้นของหัวใจ เกิดการยับยั้งของ peripheral ganglionic กระตุ้น vagal afferent nerve หรือส่งผลโดยตรงต่อการกดการหลั่งของสารในสมอง (direct depressor effects mediated by action on the brain) (http://www.inchem.org/ documents/pims/plant/nicotab.htm)

ผลิตภัณฑ์ยาฆ่าแมลงที่มีประสิทธิภาพดีเป็นที่ยอมรับ จะต้องมีชีวประสิทธิผลของตัวยาสำคัญที่ออกฤทธิ์ในการทำลายแมลง ซึ่งการที่สารสำคัญจะออกฤทธิ์ได้ดีนั้น ส่วนหนึ่งเป็นผลสืบเนื่องมาจากการพัฒนาสูตรตำรับที่ถูกต้อง โดยสูตรตำรับที่มีการพัฒนาสามารถปลดปล่อยตัวยาสำคัญอย่างเหมาะสม ไม่มีปัญหาเรื่องความไม่คงตัวหรือความไม่เข้ากันของสารที่ใช้ในตำรับ และผลิตโดยกระบวนการที่ถูกต้องตามคุณสมบัติของตัวยาสำคัญ ประสิทธิภาพและชีวประสิทธิผลของยาก็จะตามมา ดังแสดงความสัมพันธ์ ในรูปที่ 1-4



รูปที่ 1-4 ความสัมพันธ์ระหว่างชีวประสิทธิผล สูตรตำรับ รวมทั้งกระบวนการผลิตและความคงตัวของผลิตภัณฑ์

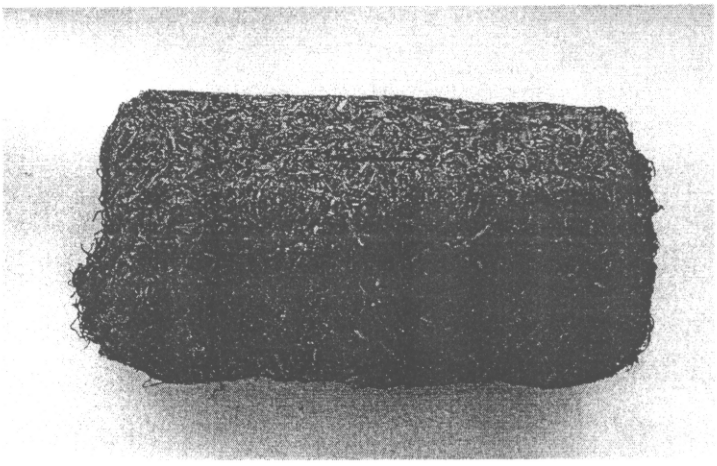
เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ยาฆ่าแมลงที่คงตัว ใช้ง่าย และมีต้นทุนที่เหมาะสม จำเป็นต้องหารูปแบบในการเตรียมและวิธีการผลิตที่เหมาะสม ซึ่งในปัจจุบันใบยาสูบ สารสกัดจากใบยาสูบหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสารสกัดใบยาสูบนั้นยังไม่มีรูปแบบที่เหมาะสม ที่เป็นเช่นนี้ก็เนื่องจากความคงตัวของสารสำคัญคือนิโคตินที่มีอยู่ในธรรมชาตินั้นไม่คงตัว ทำให้เกิดปัญหาในการทำวิจัย ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เล็งเห็นความสำคัญของปัญหาดังกล่าวจึงได้คิดโครงการวิจัยนี้ขึ้นมาเพื่อพัฒนาใบยาสูบให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีรูปแบบเหมาะสม และมีความคงตัวที่ดีสำหรับใช้เป็นผลิตภัณฑ์ฆ่าแมลงที่ได้จากสารสกัดจากธรรมชาติ ไม่ทำลายธรรมชาติ และช่วยให้ผู้บริโภคปลอดภัยจากการตกค้างของสารเคมีสังเคราะห์ที่นำมาใช้ในปัจจุบัน และเป็นการส่งเสริมธุรกิจทางด้านการผลิตยาฆ่าแมลงจากสารที่ได้จากธรรมชาติให้เป็นที่ยอมรับในตลาดโลกอีกด้วย (ไกรสีห์ อัมพรายน์, 2530 และ 2549) โดยรูปแบบที่จะศึกษาคือการทำให้เป็นอิมัลชันแบบเข้มข้น (concentrated emulsion) ซึ่งจะช่วยประหยัดปริมาณที่ต้องขนส่งและให้เกษตรกรมาเตรียมใช้เองตามความเหมาะสมของพื้นที่หรือบริเวณที่ต้องการฉีดพ่นได้โดยตรง และศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ ตลอดจนอายุของผลิตภัณฑ์หลังจากที่เจือจางแล้วเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค

บทที่ 2
ตัวอย่างสมุนไพร เครื่องมือ สารเคมี วัสดุ และอุปกรณ์

ตัวอย่างสมุนไพร

ใบยาสูบที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้เป็นยาสูบที่ดำเนินการปลูกโดยเกษตรกรในตำบลนาหม่อม อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ได้นำกิ่งที่สมบูรณ์มาทำเป็นพิพิธภัณฑ์พืชแห้ง (Herbarium, No. NT51001) และได้ทำการตรวจสอบเอกลักษณ์ (Identification) โดยเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยากับตัวอย่างสมุนไพรมาตรฐานของภาควิชาเภสัชเวท และเภสัชพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ลักษณะของใบยาสูบที่นำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้แสดงดังรูปที่ 2-1

เกษตรกรผู้ปลูกใบยาสูบนั้นเป็นผู้ที่มีความรู้ และชำนาญในการปลูกเป็นอย่างดี มีการคัดเลือกพันธุ์ที่จะนำมาปลูก การเตรียมแปลงปลูก การดูแลต้นกล้าก่อนลงแปลงปลูกจริง การดูแลให้น้ำ ให้ปุ๋ยอินทรีย์ การกำจัดวัชพืชของต้นยาสูบ ความรู้ในการเก็บเกี่ยวใบยาสูบที่เจริเต็มที่ ตลอดจนกรรมวิธีในการผลิตใบยาสูบที่มีจำหน่ายในท้องตลาด



รูปที่ 2-1 ลักษณะของยาสูบแห้งที่นำมาใช้การวิจัย

การปลูกยาสูบของเกษตรกรที่ใช้ในการวิจัย
(ได้จากการสัมภาษณ์เกษตรกรผู้ปลูก)

การขยายพันธุ์ ยาสูบขยายพันธุ์โดยวิธีการใช้เมล็ด ซึ่งจะคัดเลือกจากเมล็ดที่แก่จัด มีลักษณะความอุดมสมบูรณ์สูง ปราศจากการทำลายของโรคแมลง

การเตรียมดิน โดยขุดหรือไถพรวนเพื่อให้ดินร่วนซุย และเป็นการกำจัดวัชพืช ถ้าพื้นที่มีวัชพืชไม่มากและดินมีการร่วนซุยดี อาจทำการไถพรวนเพียงครั้งเดียว แต่ถ้าเป็นพื้นที่มีวัชพืชมาก และมีหน้าดินแข็ง ควรทำการไถพรวน 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 เพื่อทำการเปิดหน้าดินให้

ร่วนซุย ตากดินไว้ประมาณ 1 – 2 สัปดาห์ เพื่อทำลายแมลงและกำจัดเชื้อโรคในดิน และไถครั้งที่ 2 เพื่อกลับหน้าดิน ทำให้ดินร่วนซุยมากขึ้น

การเตรียมแปลงปลูก ถ้าปลูกในช่วงฤดูฝน การเตรียมแปลงปลูกต้องขุดยกแปลงให้สูงประมาณ 20 เซนติเมตร ขนาดแปลงปลูกความกว้าง 120 เซนติเมตร ความยาวขึ้นกับความยาวของพื้นที่และความสะดวกในการปฏิบัติงาน แต่ถ้าในสภาพพื้นที่ไม่มีน้ำท่วมขัง หรือหากมีการระบายน้ำดี ก็ไม่จำเป็นต้องยกร่องแปลงปลูก

วิธีการปลูก ปลูกโดยวิธีการเพาะต้นกล้าลงในแปลงเพาะก่อน โดยการขุดยกแปลงเพาะขนาดประมาณ 1 เมตร ความยาวขึ้นกับจำนวนต้นที่ต้องการเพาะ ยกแปลงสูงประมาณ 20 เซนติเมตร ย่อยดินให้ละเอียดใส่ปุ๋ยอินทรีย์คลุกเคล้าให้เข้ากับดิน เกลี่ยดินให้เรียบ นำเมล็ดพันธุ์ที่เตรียมไว้หว่านลงในแปลงเพาะ

การเตรียมหลุมปลูก ขุดหลุมขนาดประมาณ 15 x 15 เซนติเมตรลึก 10 เซนติเมตร เป็นแถว ระยะปลูกประมาณ 50 x 100 เซนติเมตร ในสภาพดินที่มีความสมบูรณ์ต่ำควรใช้ปุ๋อินทรีย์รองก้นหลุมและคลุกเคล้าให้เข้ากับดิน

การย้ายปลูก เมื่อเพาะต้นกล้าได้ประมาณ 45 - 50 วัน ต้นกล้าเริ่มมีใบ 4 – 5 ใบ ทำการย้ายต้นกล้า แต่ก่อนทำการย้ายต้องรดน้ำแปลงเพาะให้ชุ่ม ใช้ช้อนปลูกขุดต้นกล้าไปปลูในหลุมที่เตรียมไว้ 1 ต้น/หลุม กลบดินและกดดินที่โคนต้นกล้าให้แน่น หลังปลูกต้องรดน้ำทันที

การปลูกซ่อม หลังปลูก 7- 10 วัน ถ้าพบต้นกล้าตาย ต้องทำการปลูกซ่อมทันที เพื่อให้ต้นยาสูบสามารถเจริญเติบโตได้ทันกัน

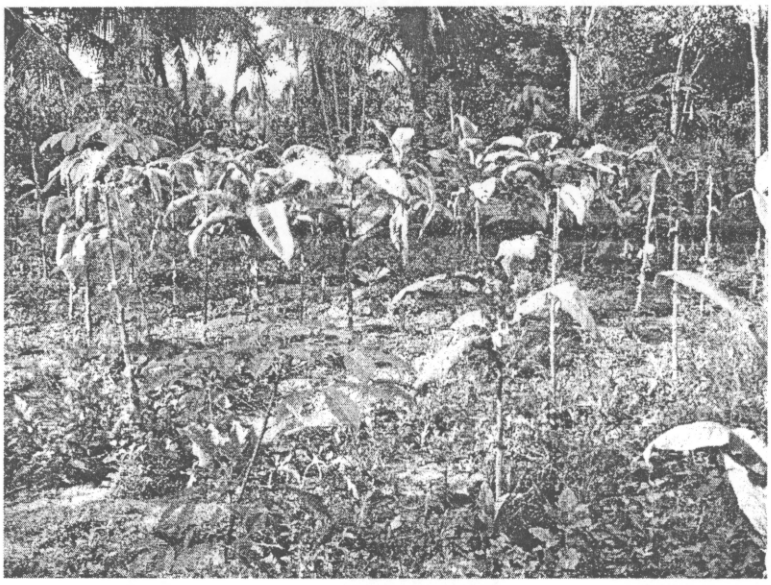
การให้น้ำ หลังปลูกพืชต้องให้น้ำทันที ในระยะแรกปลูกถึง 4 เดือน ควรให้น้ำเต็มที่วันละ 2 ครั้ง เช้า- เย็น เมื่อเริ่มเข้าสู่ช่วงระยะก่อนการเก็บเกี่ยวอาจ ให้น้ำวันละ 1 ครั้ง เฉพาะตอนเช้า ทั้งนี้ขึ้นอยู่สภาพดินฟ้าอากาศด้วย

การใส่ปุ๋ย ในช่วงการเพาะต้นกล้าส่วนใหญ่จะให้ปุ๋ยอินทรีย์ผสมดินปลูก เมื่อทำการย้ายปลูกและต้นกล้ามีความแข็งแรงดีแล้ว ก็จะเริ่มให้ปุ๋ยมากขึ้น วิธีการใส่ปุ๋ยโดยการหว่านบริเวณรอบรัศมีของต้นส่วนใหญ่จะทำพร้อมๆ กับการพรวนดินและการกำจัดวัชพืช และต้องให้น้ำทุกครั้งหลังใส่ปุ๋ย

การเก็บเกี่ยว เมื่อปลูกได้ระยะหนึ่ง ต้องทำการทยอยเด็ดใบล่างทิ้ง ประมาณ 7 – 8 ใบ และเมื่อต้นยาสูบเจริญเติบโตเต็มที่จนถึงระยะก่อนออกดอก จึงทำการเก็บเกี่ยวใบยาสูบ โดยก่อนทำการเก็บเกี่ยว ต้องฉีดพ่นน้ำ เพื่อทำความสะอาดใบยาสูบ ปล่อยให้น้ำที่ใบยาแห้งประมาณ 4- 5 ชั่วโมงแล้วแต่ช่วงฤดูกาล เลือกต้นที่สมบูรณ์พร้อมที่จะเก็บเกี่ยว การเก็บต้องเก็บทีเดียวหมดทั้งต้น เว้นเฉพาะใบส่วนยอด จากนั้นตัดลำต้นให้ส่วนที่เหลือสูงจากพื้นดินประมาณ 30 เซนติเมตร เพื่อให้ต้นสามารถแตกใบใหม่ได้อีกครั้ง แต่ความสมบูรณ์อาจไม่เท่าครั้งแรก

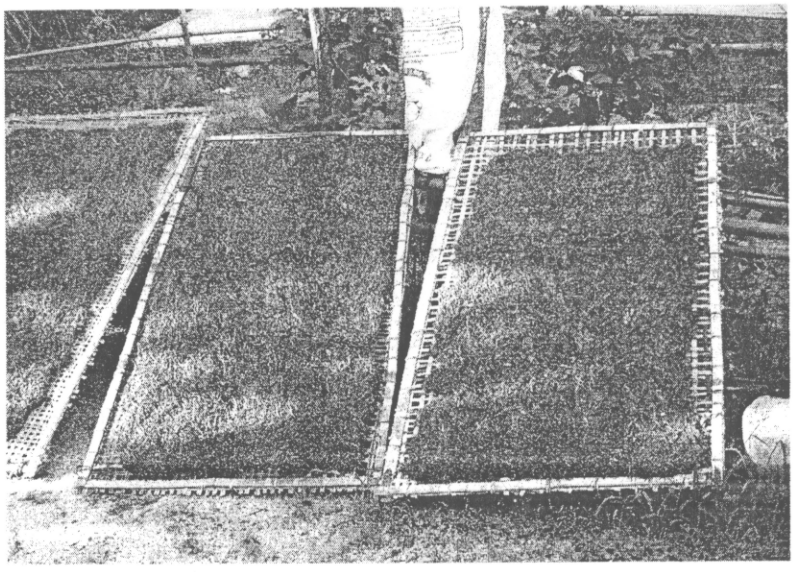
กรรมวิธีหลังการเก็บเกี่ยว เมื่อเก็บได้ใบมาแล้วนำมาตัดเอาเส้นกลางใบออก นำใบมาวางซ้อนกันหลายๆ ชั้นห่อด้วยใบตองแห้ง ม้วนเป็นมัดๆ นำไปเก็บในกระสอบหรือถุงที่มีการ

ถ่ายเทอากาศได้ประมาณ 50% บ่มไว้ 3 – 4 วัน ใบยาสูบจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเหลือง จากนั้นจึงนำมาหั่นเป็นเส้นๆ วางบนตะแกรงไม้ไผ่และนำไปตากแดดอีก 5 – 7 วัน เมื่อยาสูบแห้งดีแล้ว นำมาห่อด้วยวัสดุที่ไม่ดูดความชื้น เก็บในที่แห้งและมีอากาศถ่ายเทได้สะดวก จะสามารถเก็บไว้ได้นานถึง 1 ปี ดังแสดงในรูปที่ 2-2 – 2-4



รูปที่ 2-2 แสดงแปลงปลูกใบยาสูบ

รูปที่ 2-3 แสดงการตัด และหั่นใบยาสูบ



รูปที่ 2-4 แสดงการตากใบยาสูบ

รูปที่ 2-5 แสดงลักษณะเส้นแห้งของใบยาสูบ

เครื่องมือ

1. UV/Vis Spectrophotometer (Spectronic®)
2. HPLC (Millennium Water®)
3. Rotary Evaporator (Eyela®)
4. Hot Air Oven (Memmert®)
5. Vacumm Oven (Hauser®)
6. Microplate Reader (Bio-TEK®)

7. Balance (Shimadzu®)
8. Fraction Collector (Retriever II®)
9. Hot Plate
10. Sonicator (Crest®)
11. Dryer (National®)

สารเคมี

1. 95% Ethanol (Merck®)
2. Absolute Ethanol (Merck®)
3. Methanol AR grade (Labscan®)
4. Ethyl acetate (Merck®)
5. Chloroform (Merck®)
6. *n*-Hexane
7. Acetone
8. Distilled water
9. DI-water
10. Silica gel 60 for column chromatography (Merck®)
11. Sulfuric acid (Merck®)
12. Phosphoric acid (Merck®)
13. modified Dragendroff's reagent
14. Reference Standard nicotine hydrogen tartrate (98.0%) (Merck®)

Note : solvent ที่ไม่ระบุบริษัทจำหน่ายเป็น commercial grade จะต้องกลั่นก่อนนำมาใช้

วัสดุ และอุปกรณ์

1. Beaker
2. Test tube
3. Erlenmyer flask
4. Pear-shape Flask
5. Volumetric flask
6. TLC tank
7. TLC-plate (Silica gel GF_{254}, Merck®)
8. Vial
9. กระดาษกรอง #4
10. Stirring rod

11. Foil
12. Pipette
13. Multi-channel pipette & Tip
14. Micropipette & Tip
15. Cylinder
16. Forcep
17. Cotton
18. Sand
19. Evaporating dish
20. Dropper
21. Glass Column
22. Desiccators
23. HPLC-columns and guard (C-18)

บทที่ 3
ระเบียบวิธีการวิจัย

การเตรียมสารสกัดจากใบยาสูบ และการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบยาสูบเพื่อใช้เป็นยากำจัดศัตรูพืชในรูปแบบอิมัลชั่นเข้มข้น เป็นวิธีการหนึ่งของการสร้างทางเลือกให้กับเกษตรกรในการนำสมุนไพรไปใช้ประโยชน์ในการกำจัดศัตรูพืชในภาคการเกษตร ซึ่งจากการศึกษาจะได้ว่าองค์ประกอบที่สำคัญในใบยาสูบคือสารประกอบในกลุ่มอัลคาลอยด์ที่มีชื่อว่านิโคติน ซึ่งสารนิโคตินนี้มีความสามารถในการกำจัดศัตรูพืชค่อนข้างสูง สำหรับการวิจัยในครั้งนี้เป็นการทำสารสกัดนิโคติน ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ และเคมีของสารสกัด พร้อมทั้งพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญนิโคตินที่มีอยู่ในสารสกัด การหาความคงตัวของสารสกัด พัฒนาสูตรตำรับของสารสกัดนิโคตินเพื่อทำอยู่ในรูปแบบของอิมัลชันเข้มข้น การศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ในระยะเวลา 6 เดือน และศึกษาผลของการฆ่าเพลี้ยอ่อนในแปลงพืชเมื่อนำผลิตภัณฑ์ไปเจือจางในอัตราส่วนต่าง ๆ ซึ่งประกอบไปด้วยขั้นตอน และรายละเอียด ดังนี้

1. สกัดใบยาสูบให้ได้เป็นสารสกัดจากใบยาสูบ (Tobacco extract) โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการแช่สกัดใบยาสูบมาทำการระเหยตัวทำละลายออกไป โดยเทคนิค reduce pressure evaporator และทำให้แห้งด้วย speed vacuum (SpeedVac®) จะได้สารสกัดจากใบยาสูบ คำนวณหา %yield เก็บสารสกัดจากใบยาสูบที่ได้ในภาชนะปิด กันแสง และความชื้น อยู่ในตู้เย็นที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 5-10°C ก่อนนำไปทดลองต่อไป
2. นำสารสกัดจากใบยาสูบที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญเมื่อคำนวณอยู่ในรูปของนิโคติน (nicotine) โดยใช้เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) ใช้ nicotine hydrogen bitratrate เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งดัดแปลงจากวิธีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณ nicotine ของ Mihranyan, 2004 และ Haritharan, 1988
3. ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของสารสกัดใบยาสูบที่เตรียมได้ เช่น การละลาย เป็นต้น ศึกษา stability-indicating assay ซึ่งมีความสำคัญเพื่อตรวจสอบการเร่งการสลายตัวของสารสกัด (ที่ไม่ใช่สารบริสุทธิ์) แล้วดูสภาวะของ HPLC ที่ได้พัฒนานั้นสามารถตรวจวัดปริมาณของ nicotine ที่ลดลงไปได้หรือไม่ เพราะเมื่อเวลาที่ผ่านไปนอกจากจะต้องแยก nicotine ออกจากสารอื่นในสารสกัด และยังมีการสลายตัวของ nicotine เองและสารสลายตัวของสารอื่น ๆ ในสารสกัด

4. ศึกษาความคงตัวของสารสกัดใบยาสูบ โดยเก็บตัวอย่างสารสกัดใน vial เปิด เก็บในตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25) 45 และ 70±0.5 °C ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 3 เดือน ทำการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณ nicotine ที่เหลืออยู่ในช่วงเวลาต่าง ๆ ด้วยเทคนิค HPLC
5. นำสารสกัดจากใบยาสูบมามาพัฒนาสูตรตำรับเพื่อให้ได้รูปแบบผลิตภัณฑ์ที่เป็นอิมัลชันแบบเข้มข้น (concentrated emulsion) เนื่องจากสารสกัดนิโคตินที่ได้เป็นของเหลวที่มีความมัน (oily liquid) ที่สามารถระเหยได้ง่าย การเตรียมในรูปแบบอิมัลชันเข้มข้นจะทำให้สารสกัดนิโคตินที่สามารถละลายได้ในชั้นน้ำมันกระจายตัวในน้ำด้วยสารก่ออิมัลชัน โดยใช้ fixed oil ในการพัฒนาสูตรตำรับที่จะทำการพัฒนาเพื่อเป็นการหน่วงหรือตรึงให้สารสกัดสามารถระเหยได้ช้าลงก็เป็นกลยุทธ์หนึ่งที่นำมาใช้ในการพัฒนาตำรับ ซึ่ง fixed oil ที่สามารถนำมาใช้ได้แก่ mineral oil, น้ำมันพืชต่างๆ เติมสารประกอบอื่นที่เพิ่มความคงตัว
6. ประเมินคุณลักษณะที่เหมาะสม ของอิมัลชันเข้มข้น ตามข้อกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์นั้น ๆ มีการประเมินลักษณะภายนอก โดยต้องไม่เกิด coalescence ของ internal phase ประเมินปริมาณสารสำคัญที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์
7. ศึกษา และวัดอัตราการเสื่อมสลายทางเคมีหรือความคงตัวของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบยาสูบ รวมถึงการเกาะติดกับใบไม้และไม่เกิดรอยไหม้ของพืชเมื่อสัมผัสกับผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้
8. ประเมินอัตราการเสื่อมสลายของสารสำคัญ nicotine หรือประเมินความคงตัวของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบยาสูบในรูปแบบอิมัลชันเข้มข้น โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 เดือน
9. ศึกษาลักษณะของผลิตภัณฑ์หลังจากได้มีการผสม หรือเจือจางผลิตภัณฑ์ที่พร้อมใช้ในการฉีดพ่นของเกษตรกร พร้อมใช้ในการฉีดพ่นลงบนใบไม้ เพื่อดูถึงลักษณะทางกายภาพของใบที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากฉีดพ่น และผลจากสารสกัดต่อการกำจัดศัตรูพืช

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารสกัดใบยาสูบด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ กัน

1.1 ใบยาสูบที่ซื้อจากเกษตรกรในตำบลนาหม่อม อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา มีลักษณะเป็นเส้นที่เกิดจากการหั่นให้เป็นเส้นฝอยของใบยาสูบ ชั่งน้ำหนัก เติมตัวทำละลาย *n*-hexane ลงไปให้ท่วมตัวอย่างใบยาสูบ หมักทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน

1.2 เมื่อครบกำหนดให้นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง กากของผงใบยาสูบนำกลับไปหมักซ้ำด้วยตัวทำละลายชนิดเดิมอีก 3 ครั้ง

1.3 นำสารละลายที่กรองได้จากข้อ 1.2 ไประเหยด้วยวิธีการลดความดัน (rotary evaporation, 40 ^{o}C, 120 mbar) พยายามระเหยให้ตัวทำละลายออกไปให้มากที่สุด จากนั้นนำไปทำให้แห้งในขั้นตอนสุดท้ายด้วยเครื่อง centrifugal evaporation (SpeedVac®) หรือเครื่อง vacuum oven ที่อุณหภูมิห้องเพื่อเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของสารสกัดที่ได้

1.4 ชั่งสารสกัดที่ได้นำไปคำนวณหา %yield เมื่อเทียบกับน้ำหนักของใบยาสูบเริ่มต้น

1.5 ทำการทดลองซ้ำจากข้อ 1.1 – 1.4 แต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็น chloroform, ethyl acetate, methanol และ 95% ethanol ตามลำดับ

1.6 คัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการสกัดใบยาสูบต่อไป

2. เตรียมสารสกัดใบยาสูบด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม

2.1 นำตัวทำละลายที่เหมาะสมจากข้อ 1 (95% ethanol) ไปหมักใบยาสูบ โดยให้ตัวทำละลายท่วมยาสูบ ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน

2.2 เมื่อครบกำหนดให้นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง และบีบกากของยาสูบผ่านกระดาษกรอง นำกากของยาสูบที่เหลือกลับไปหมักซ้ำด้วย 95% ethanol เหมือนเดิม ให้ทำซ้ำเช่นเดียวกันจำนวน 3 ครั้ง

2.3 นำสารละลายที่กรองได้จากข้อ 2.2 ไประเหยเอาตัวทำละลาย 95% ethanol ด้วยเครื่องมือระเหยโดยใช้หลักการลดความดัน (rotary evaporation)

2.4 ชั่งน้ำหนักของสารสกัดใบยาสูบที่ได้ คำนวณหา %yield เมื่อเทียบกับน้ำหนักของยาสูบที่ใช้เริ่มต้น

2.5 นำสารสกัดที่ได้บรรจุในภาชนะที่ปิดสนิท และกันแสงได้ นำไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 – 8 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทำการทดลองต่อไป

3. การทำ TLC-Fingerprint หรือ TLC-Profile ของสารสกัดใบยาสูบ

นำสารสกัดใบยาสูบมาทำการศึกษาเพื่อจัดทำรูปแบบการเคลื่อนที่ของสารสกัดบนแผ่นรงคเลข (TLC-plate) โดยใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ชนิดต่าง ๆ กันอย่างน้อย 3 ระบบตัวทำละลาย และใช้วิธีการการตรวจสอบผล 2 ชนิดคือ modified Dragendroff's reagent และ 50% sulfuric acid โดยรูปแบบการเคลื่อนที่ของสารมาตรฐาน nicotine และสารสกัดใบยาสูบบนแผ่นรงคเลข (TLC-plate) ในระบบของตัวทำละลายเคลื่อนที่

4. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ nicotine ในสารสกัดใบยาสูบโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

คณะผู้วิจัย ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ nicotine ในสารสกัดจากใบยาสูบ โดยกำหนดให้ชั่งสารที่ใช้ในการวิเคราะห์จำนวน 3 ตัวอย่าง และกำหนดจำนวนครั้งที่ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตัวอย่างละ 2 ครั้ง โดยได้ดัดแปลงจากสภาวะทางโครมาโตกราฟีในการวิเคราะห์ปริมาณ nicotine ในสารตัวอย่างชนิดต่างๆที่เคยมีการรายงานมาแล้ว โดยพบว่า สภาวะของโครมาโตกราฟีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณ nicotine ในสารสกัดจากใบยาสูบได้แก่สภาวะที่ดัดแปลงมาจากหัวข้อ assay ของ Nicotine transdermal system USP 27 ดังต่อไปนี้

สภาวะทางโครมาโตกราฟี

Column	C18, 250x46 mm, particle size 5 μm
Mobile phase	Pump A: water 700ml+Triethylamine (TEA) 1 ml
	Pump B: acetonitrile
	(อัตราส่วนสารละลาย Pump A : Pump B = 70:30)
Flow rate :	1 ml/min
Detector :	uv 260 nm
Injector: autosampler	Injection volume 10 μL

สารมาตรฐาน nicotine hydrogen tartrate (98.0%)

สารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐาน nicotine hydrogen tartrate (98.0%) อย่างถูกต้องแม่นยำประมาณ 25 mg ละลายใน methanol 25 ml ในการทำ standard curve เจือจางสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นของ nicotine ในช่วง 3.6-180 μg/ml (คำนวณในรูป free base) ปรับปริมาตรด้วย mobile phase

การวิเคราะห์หาปริมาณ nicotine ในสารสกัดใบยาสูบ

สารละลายตัวอย่าง ชั่งสารสกัดใบยาสูบ ประมาณ 27 mg ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml ละลายสารตัวอย่างด้วย methanol ปิเปตสารละลายมา 500 μl ปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย mobile phase

5. การศึกษา stability-indicating assay

คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการศึกษา stability-indicating assay โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินสภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ nicotine ในสารสกัดใบยาสูบว่ามีความเหมาะสมที่จะทำไปใช้ในการศึกษาความคงตัวของสารสกัดใบยาสูบ และผลิตภัณฑ์ต่อไปหรือไม่ สภาวะทางโครมาโตกราฟีที่เหมาะสม นอกจากจะต้องสามารถแยกสัญญาณของ nicotine ออกจากสารอื่นๆที่ปะปนในสารสกัดใบยาสูบแล้ว ยังต้องสามารถแยกสัญญาณของ nicotine ออกจากสารสลายตัวที่เกิดขึ้นภายใต้สภาวะต่างๆที่อาจมีผลมาจากการดั้งสูตรตำรับอีกด้วย

คณะผู้วิจัย ได้ทำการเร่งการสลายตัวของสารสกัดใบยาสูบภายใต้สภาวะกรด ด่าง และความร้อน แล้วศึกษาความสามารถการแยก (resolution) ของ nicotine กับสารสลายตัว (degradation products) ต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นโดยใช้สภาวะโครมาโตกราฟีที่ได้พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณ nicotine ในสารสกัดใบยาสูบในข้อที่ 5 สำหรับการเร่งการสลายตัวของสารสกัดใบยาสูบทำตามวิธีการดังต่อไปนี้

การเร่งการสลายตัวภายใต้สภาวะกรด

ใช้สารสกัดจากใบยาสูบ ประมาณ 25 mg ละลายใน methanol 1.5 ml เติม 5% HCl 1.5 ml คนสารละลายที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามกำหนดเวลา ทำสารละลายให้เป็นกลางต่อ pH paper นำสารละลายที่ได้กรองผ่าน membrane ขนาด 45 micron และนำไปศึกษาด้วย HPLC ต่อไป

การเร่งการสลายตัวภายใต้สภาวะด่าง

ใช้สารสกัดจากใบยาสูบ ประมาณ 25 mg ละลายใน methanol 1.5 ml เติม 5% NaOH 1.5 ml คนสารละลายที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามกำหนดเวลา ทำสารละลายให้เป็นกลางต่อ pH paper นำสารละลายที่ได้กรองผ่าน membrane ขนาด 45 micron และนำไปศึกษาด้วย HPLC ต่อไป

การเร่งการสลายตัวด้วยความร้อน

ใช้สารสกัดจากใบยาสูบ ประมาณ 25 mg ละลายใน methanol 1.5 ml เติมน้ำกลั่น 1.5 ml คนสารละลายที่อุณหภูมิ 80° เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามกำหนดเวลา ทำสารละลายให้เป็นกลางต่อ pH paper นำสารละลายที่ได้กรองผ่าน membrane ขนาด 45 micron และนำไปศึกษาด้วย HPLC ต่อไป

สภาวะทางโครมาโตกราฟี

Column	C18, 250x46 mm, particle size 5 μm
Mobile phase	Pump A: water 700ml+Triethylamine (TEA) 1 ml
	Pump B: acetonitrile
	(อัตราส่วนสารละลาย Pump A : Pump B = 70:30)
Flow rate :	1 ml/min
Detector :	uv 260 nm
Injector: autosampler	Injection volume 5 μL

6. การศึกษาความคงตัวของสารสกัดใบยาสูบ

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเพื่อหาความคงตัวของสารสกัดจากใบยาสูบโดยนำเอาสารสกัดใบยาสูบจากที่เตรียมได้ในข้อ 2 โดยชั่งให้มีน้ำหนักประมาณ 2000 mg บรรจุลงในขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิท จำนวน 4 ขวด แต่ละขวดเก็บใน desiccators ที่อุณหภูมิห้อง 45° และ 70°C โดยควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ที่ 70% และในทำการสุ่มตัวอย่างแต่ละครั้งเพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ nicotine จะทำการสุ่มตัวอย่างมาประมาณครั้งละ 200 mg แล้วแบ่งวิเคราะห์ 3 ครั้ง (n=3) ในระยะเวลา 90 วันหรือ 2 half-life โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ในข้อ 4 ที่ทำการพัฒนาแล้วดังนี้

สภาวะทางโครมาโตกราฟี

Column	C18, 250x46 mm, particle size 5 μm
Mobile phase	Pump A: water 700ml+Triethylamine (TEA) 1 ml
	Pump B: acetonitrile
	(อัตราส่วนสารละลาย Pump A : Pump B = 70:30)
Flow rate :	1 ml/min
Detector :	uv 260 nm
Injector: autosampler	Injection volume 10 μL

7. การศึกษาลักษณะทางกายภาพของสารสกัดเมื่ออยู่ในสภาวะกรด – ด่าง

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาลักษณะทางกายภาพของสารสกัดจากใบยาสูบเมื่ออยู่ในสภาวะกรด – ด่าง ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ โดยมีวิธีการทดลองดังนี้

1. ชั่งสารสกัดจากใบยาสูบน้ำหนักประมาณ 1 g
2. เติมสารละลายกรด HCl ความเข้มข้น 1.0, 0.1, 0.01, 0.001 N ลงไป 4 ml (หลอดที่ 1-4)

3. เติมน้ำกลั่นลงในหลอดที่ 5 จำนวน 4 ml
4. เติมสารละลายด่าง NaOH ความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1 และ 1.0 N ลงไป 4 ml (หลอดที่ 6-9)
5. ศึกษาลักษณะทางกายภาพของสารสกัดจากใบยาสูบที่ระยะเวลาต่าง ๆ กันที่ 0, 1, 3, 7 และ 14 วัน

8. การพัฒนาสูตรตำรับในรูปของ concentrated emulsion เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบยาสูบ

1, นำสารสกัดจากใบยาสูบที่ได้จากการสกัดในข้อ 2 ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ nicotine ที่มีอยู่ในสารสกัดซึ่งมีปริมาณของสาร nicotine ประมาณ 14% ในสารสกัดมาทำการพัฒนาสูตรตำรับเพื่อให้ได้รูปแบบผลิตภัณฑ์ที่มีความคงตัวมากขึ้น โดยเลือกรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่จะพัฒนาสูตรตำรับ คือ อิมัลชันแบบเข้มข้น (concentrated emulsion) เนื่องจากสารสกัดนิโคตินที่ได้เป็นของเหลวที่มีความมัน (oily liquid) ที่สามารถระเหยได้ง่าย การเตรียมในรูปแบบอิมัลชันเข้มข้นจะทำให้สารสกัดนิโคตินที่สามารถละลายได้ในชั้นน้ำมันกระจายตัวในน้ำด้วยสารทาอิมัลชันที่เหมาะสมได้เป็นอย่างดี
2. นำสารอิมัลชันชนิดที่เป็น self emulsifying agent (tween) ในปริมาณต่าง ๆ มาใช้ในการพัฒนาเพื่อเตรียมผลิตภัณฑ์ให้ได้ลักษณะที่ดีและคงตัวได้ง่าย รวมถึงวิธีการเตรียมอิมัลชันในรูปแบบที่เป็นชนิดที่ไม่ต้องใช้ความร้อนช่วยเพื่อป้องกันการระเหยของสารสกัดนิโคติน
3. ศึกษาค่าการละลายของสารสกัดใบยาสูบใน medium ต่าง ๆ โดยการเติมสารสกัดใบยาสูบในปริมาณที่มากเกินพอลงใน medium ที่ทำการทดสอบ ซึ่งในที่นี้จะใช้น้ำ, Ethanol, Methanol และน้ำที่มี Tween 80 ผสมอยู่ในความเข้มข้นต่าง ๆ จนได้สารละลายอิ่มตัวของสารสกัดใน medium แยกส่วนที่ไม่ละลายออกด้วย Nylon syring filter ขนาด 0.45 µm นำสารละลายที่กรองได้ไปวิเคราะห์หาค่าการละลายของสารสกัดใบยาสูบด้วย HPLC
4. การเติม fixed oil (rice bran oil) ในการพัฒนาสูตรตำรับที่จะทำการพัฒนาในปริมาณต่าง ๆ กัน เพื่อเป็นการหน่วงหรือตรึงให้สารสกัดสามารถระเหยได้ช้าลงก็เป็นกลยุทธ์หนึ่งที่นำมาใช้ในการพัฒนาตำรับ จากนั้นก็ทำการประเมินสูตรตำรับที่ได้ก่อนนำไปพัฒนาในขั้นตอนต่อไป
5. เปลี่ยนแปลงชนิดของ fixed oil เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความคงตัวที่ดี และมีต้นทุนของผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมโดยคัดเลือก fixed oil มา 3 ชนิดที่หาได้ง่ายตามท้องตลาดคือ Palm oil, Rice bran oil และ Soy bean oil โดยนำมาทำการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ และประเมินสูตรตำรับที่ได้ก่อนนำไปใช้ในในแปลงเกษตร

การศึกษาค่าการละลายของสารสกัดใบยาสูบ

ทำการศึกษาหาค่าการละลายของสารสกัดใบยาสูบใน medium ต่าง ๆ โดยการเติมสารสกัดใบยาสูบในปริมาณที่มากเกินพอลงใน medium ที่ทำการทดสอบ ซึ่งในที่นี้จะใช้น้ำ, Ethanol, Methanol และน้ำที่มี Tween 80 ผสมอยู่ในความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 5%, 10% และ 15% v/v จากนั้นเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนได้สารละลายอิ่มตัวของสารสกัดใน medium กรองด้วยาที่ไม่ละลายออกด้วย Nylon syringes filter ขนาด 0.45 µm นำสารละลายที่กรองได้ไปวิเคราะห์หาค่าการละลายของสารสกัดใบยาสูบด้วย HPLC

สภาวะทางโครมาโตกราฟี

Column	C18, 250x46 mm, particle size 5 µm
Mobile phase	Pump A: water 700ml+Triethylamine (TEA) 1 ml
	Pump B: acetonitrile
	(อัตราส่วนสารละลาย Pump A : Pump B = 70:30)
Flow rate :	1 ml/min
Detector :	uv 260 nm
Injector: autosampler	Injection volume 10 µL

การพัฒนาสูตรตำรับนิโคตินในรูปของ concentrated emulsion ส่วนที่ 1

ส่วนประกอบของตำรับ

1. สารสกัดจากใบยาสูบ (ปริมาณของสารสำคัญ nicotine เท่ากับ 14%)
2. Tween 20
3. Tween 80
4. Oil : rice bran oil

วิธีการทดลอง

1. ชั่งสารสกัดจากใบยาสูบในปริมาณที่กำหนดของสูตรตำรับที่กำหนดไว้ตามตารางที่ 9-2
2. เติม Tween 20 จำนวน 1 g ลงไปในสูตรตำรับที่กำหนดไว้ตามตารางที่ 9-2
3. เติม Tween 80 จำนวน 1 g ลงไปในสูตรตำรับที่กำหนดไว้ตามตารางที่ 9-2
4. เติม Rice bean oil จำนวน 1 g ลงไปในสูตรตำรับที่กำหนดไว้ตามตารางที่ 9-2
5. คนสูตรตำรับที่เตรียมให้เข้ากัน สังเกตการละลายของสารสกัด และสารต่าง ๆ ที่เติมลงไป
6. ประเมินคุณลักษณะของสูตรตำรับ concentrated emulsion ของสารสกัดจากใบยาสูบที่เตรียมได้จากสูตรต่าง ๆ ที่กำหนด

สำนักทรัพยากรการเรียนรู้คุณหนิงหนง มหาวิทยาลัย

สูตรตำรับของการเตรียม concentrated emulsion ของสารสกัดจากใบยาสูบ

สูตรที่	สารสกัดจากใบยาสูบ (g)	Emulsifying agent (g)		Fixed oil (g)
		Tween 20	Tween 80	Rice bran oil
1	1	1	-	-
2	2	1	-	-
3	3	1	-	-
4	4	1	-	-
5	5	1	-	-
6	6	1	-	-
7	7	1	-	-
8	8	1	-	-
9	1	-	1	-
10	2	-	1	-
11	3	-	1	-
12	4	-	1	-
13	5	-	1	-
14	6	-	1	-
15	7	-	1	-
16	8	-	1	-
17	1	1	-	1
18	2	1	-	1
19	3	1	-	1
20	4	1	-	1
21	5	1	-	1
22	6	1	-	1
23	7	1	-	1
24	8	1	-	1
25	1	-	1	1
26	2	-	1	1
27	3	-	1	1

สูตรที่	สารสกัดจากใบยาสูบ (g)	Emulsifying agent (g)		Fixed oil (g)
		Tween 20	Tween 80	Rice bran oil
28	4	-	1	1
29	5	-	1	1
30	6	-	1	1
31	7	-	1	1
32	8	-	1	1

สูตรตำรับ concentrated emulsion ของสารสกัดจากใบยาสูบเพื่อให้มีปริมาณของสารสำคัญ Nicotine 10%

1. ชั่งสารสกัดจากใบยาสูบ (มีปริมาณของสารสำคัญ nicotine 14%) มา 7 กรัม
2. เติม Tween 80 มา 1.5 กรัม
3. ชั่งน้ำมันรำข้าวมา 1.5 กรัม
4. คนให้เข้ากัน สังเกตลักษณะของตำรับที่ได้
5. นำตำรับที่ได้จากข้อ 4 มาทดสอบการกระจายตัวในน้ำโดยนำผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1:1
6. คนให้เข้ากัน สังเกตลักษณะของสารละลายที่ได้

การพัฒนาสูตรตำรับนิโคตินในรูปของ concentrated emulsion ส่วนที่ 2

ส่วนประกอบของตำรับ

1. สารสกัดจากใบยาสูบ (ปริมาณของสารสำคัญ nicotine เท่ากับ 14%)
2. Tween 80
3. Span 80
4. Fixed Oils 3 ชนิดคือ Palm oil, Rice bran oil และ Soy bean oil
5. Water

สูตรตำรับ Concentrated emulsion 1 (สูตรที่ 1)

สารสกัดจากใบยาสูบ	10	g
Tween 80	10	g
Span 80	10	g
Rice bran oil	5	g
Water qs to	100	g

สูตรตำรับ Concentrated emulsion 2 (สูตรที่ 2)

สารสกัดจากใบยาสูบ	10	g
Tween 80	10	g
Span 80	10	g
Palm oil	5	g
Water qs to	100	g

สูตรตำรับ Concentrated emulsion 3 (สูตรมี่ 3)

สารสกัดจากใบยาสูบ	10	g
Tween 80	10	g
Span 80	10	g
Soy bean oil	5	g
Water qs to	100	g

วิธีการทดลอง

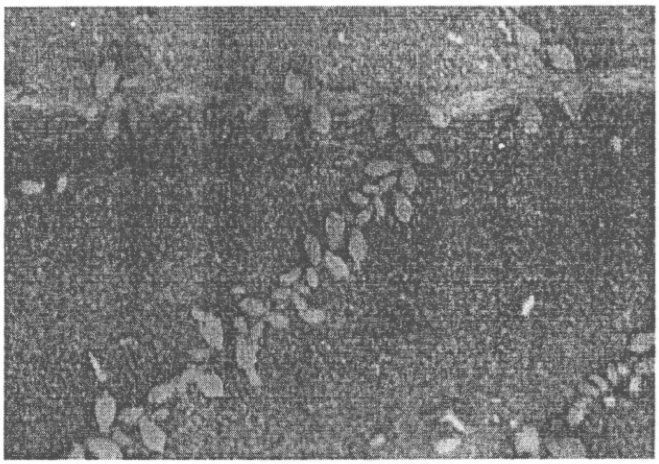
1. ชั่งสารสกัดใบยาสูบ จำนวน 10 กรัมในบีกเกอร์ที่เตรียมไว้
2. ผสม fixed oil จำนวน 5 กรัมลงในบีกเกอร์ คนให้สารสกัดและ oil เข้ากัน
3. เติม Tween 80 และ Span 80 อย่างละ 10 กรัมลงในบีกเกอร์ คนให้เข้ากัน
4. ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 100 กรัม คนให้ส่วนผสมทุกอย่างเข้ากัน

9. การประเมินประสิทธิภาพความคงตัวของสูตรตำรับอิมัลชั่นของสารสกัดใบยาสูบ

นำสูตรตำรับอิมัลชั่นของสารสกัดใบยาสูบมาศึกษาความคงตัวทางกายภาพโดยเก็บสูตรตำรับอิมัลชั่นแต่ละสูตรในภาชนะปิดสนิทโดยผ่านกระบวนการ Freeze-thaw ซึ่งเก็บตำรับไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถือเป็น 1 รอบของการทดสอบ ทำการทดสอบเป็นจำนวน 6 รอบ หลังจากนั้นเลือกสูตรที่ดีที่สุดมาศึกษาความคงตัวทางกายภาพและทางเคมี โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 และ 3 เดือน แล้วนำมาตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ วัดความหนืดและค่า pH วิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดใบยาสูบทั้งหมดในตำรับเมื่อเวลาผ่านไป โดยใช้ HPLC

10. การทดสอบการใช้ concentrated emulsion ที่ได้จากสารสกัดใบยาสูบ

นำผลิตภัณฑ์ concentrated emulsion ที่เตรียมจากสารสกัดจากใบยาสูบสูตรที่ 1 ไปทดสอบการใช้งานจริงในแปลงทดลองการเกษตร โดยได้รับความร่วมมือจาก รศ.ดร.อรัญ งามผ่องศัย และคุณปฐมพงศ์ วงษ์เลี้ยง ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยนำผลิตภัณฑ์ที่เตรียมทำการเจือจางในอัตราส่วนต่าง ๆ แล้วนำไปฉีดในแปลงทดลองพืชที่มีตัวเพลี้ยอ่อน (*Aphis glycines* Mats.) (รูปที่ 10.1) แล้วสังเกตการณ์ติดของผลิตภัณฑ์บนใบของพืช และผลการกำจัดเพลี้ยอ่อน



รูปที่ 3-1 แสดงภาพของเพลี้ยอ่อน (*Aphis glycines* Mats.)

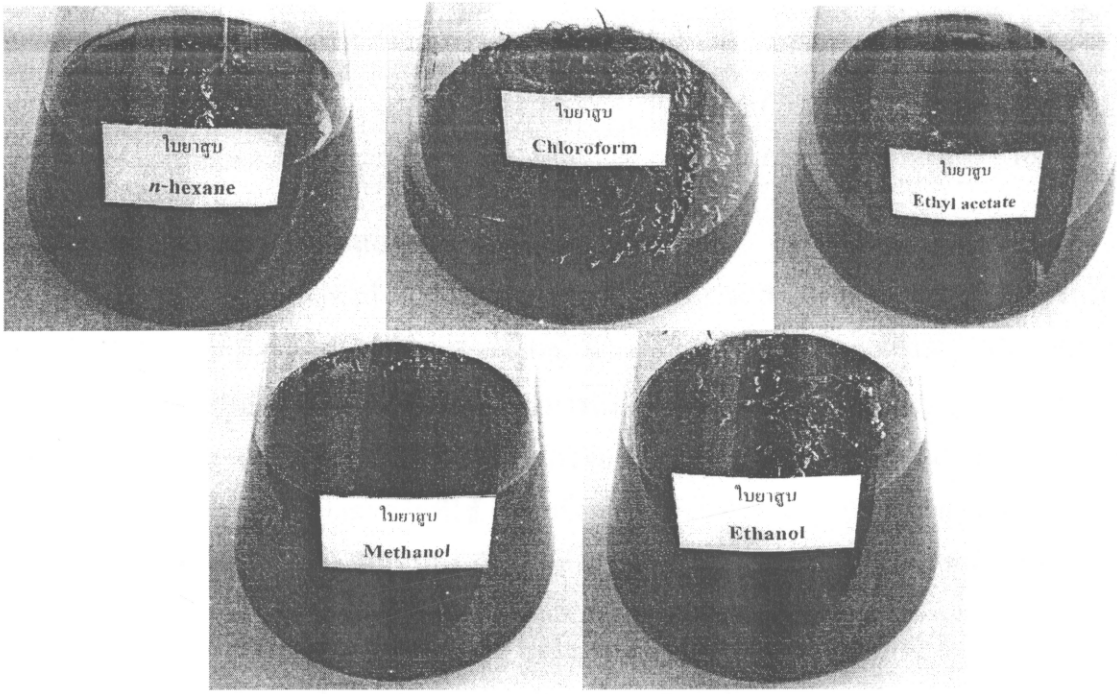
วิธีการทดลอง

1. เตรียม concentrated emulsion จากสารสกัดใบยาสูบ สูตรที่ 2 จำนวน 1 ลิตร
2. เจือจางผลิตภัณฑ์จากข้อ 10.1 ด้วยน้ำสะอาดในอัตราส่วน 1:10, 1:20, 1:50, 1:80 และ 1:100 ตามลำดับ
3. นำสารละลายเจือจางไปฉีดพ่นในแปลงเกษตรที่มีเพลี้ยอ่อนอยู่บนใบพืช
4. สังเกตการติดของผลิตภัณฑ์บนใบพืช และผลการกำจัดเพลี้ยอ่อนในเวลาที่ 0, 2 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ

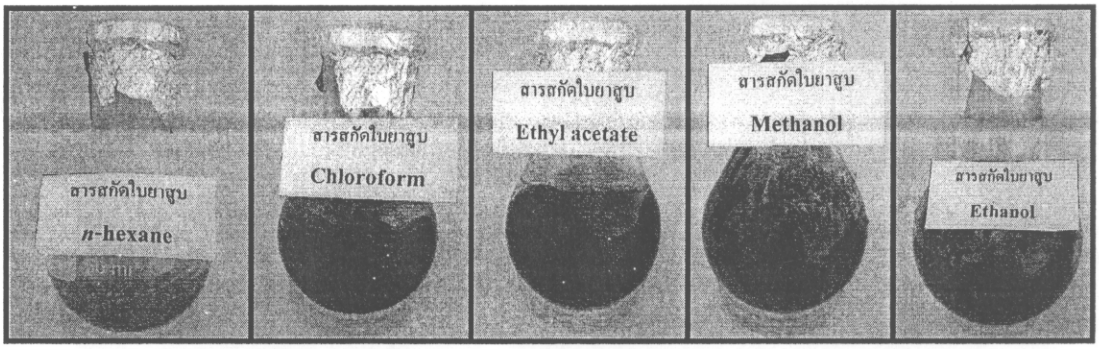
บทที่ 4
ผลการทดลอง สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เตรียมสารสกัดใบยาสูบด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ กัน

1.1 การสกัดใบยาสูบโดยใช้ตัวทำละลาย 5 ชนิด คือ *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol และ 95% ethanol พร้อมทั้งลักษณะของสารที่สกัดได้ (รูปที่ 4-1 และ 4-2)



รูปที่ 4-1 แสดงภาพการหมักของใบยาสูบในตัวทำละลาย 5 ชนิดคือ *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol และ 95% ethanol



รูปที่ 4-2 แสดงภาพสารสกัดใบยาสูบที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด

1.2 %yield ของสารสกัดใบยาสูบด้วยตัวทำละลายทั้งห้าชนิดเมื่อเทียบกับใบยาสูบเริ่มต้นที่ใช้ (ตารางที่ 4-1)

ตารางที่ 4-1 แสดง %yield ของสารสกัดใบยาสูบด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

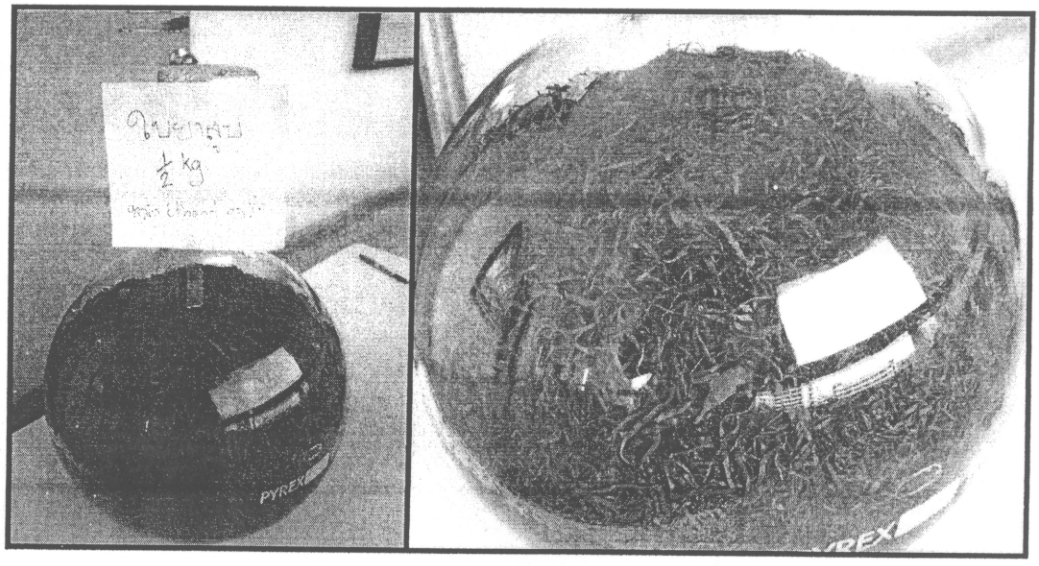
ชนิดของตัวทำละลาย	น้ำหนัก (กรัม)		% yield
	ใบยาสูบที่ใช้	สารสกัดใบยาสูบ	
n-hexane	40.0	1.18	2.95
Chloroform	43.4	4.22	9.72
Ethyl acetate	40.6	4.68	11.53
Methanol	40.1	7.18	17.91
95% Ethanol	40.0	7.26	18.15

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองที่ได้จะเห็นว่าตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารที่ให้ % yield เรียงลำดับจากน้อยไปหามากคือ *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol และ 95% ethanol ซึ่งจาก % yield ที่ได้จะเห็นว่าตัวทำละลายที่สามารถสกัดได้สารสกัดในปริมาณสูงคือ methanol และ ethanol และเมื่อคำนึงถึงความปลอดภัยของนักวิจัยในการเตรียมสารในปริมาณมากเพื่อที่จะพัฒนาผลิตภัณฑ์ และการหาตัวทำละลายที่ใช้ ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ตัวทำละลาย 95% ethanol ในการสกัดสำหรับการวิจัยครั้งนี้ เพื่อเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ ถึงแม้ว่าค่าใช้จ่ายจะสูงกว่าการเลือกใช้ methanol ในการสกัด

2. การสกัดสารสกัดจากใบยาสูบด้วย 95% เอทานอล

2.1 การสกัดโดยใช้ 95% ethanol เป็นตัวทำละลาย (รูปที่ 4-3)



รูปที่ 4-3 แสดงภาพการหมักของยาสูบในตัวทำละลาย 95% ethanol

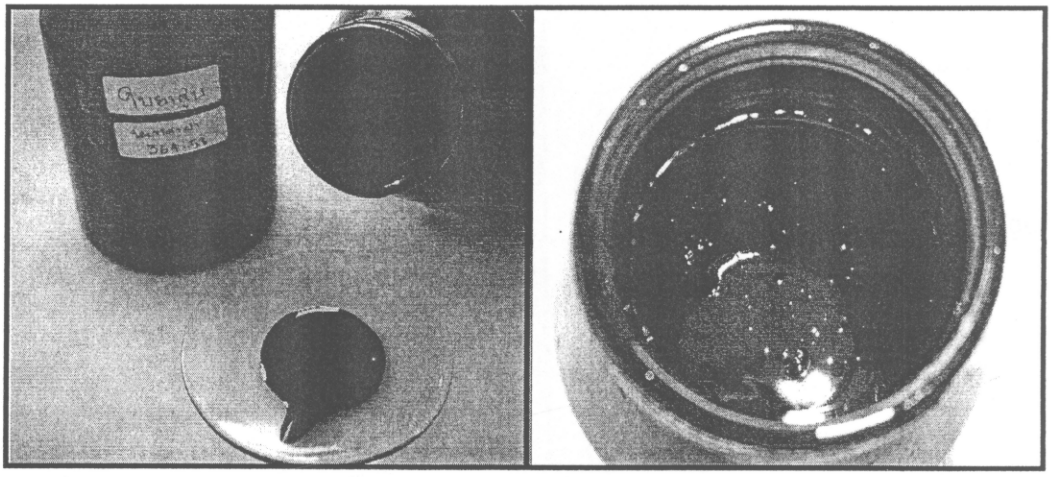
2.2 %yield ของสารสกัดใบยาสูบ95% ethanol (ตารางที่ 4-2)

ตารางที่ 4-2 แสดง %yield ของสารสกัดใบยาสูบด้วยตัว 95% ethanol

ตัวทำละลาย	น้ำหนัก (กรัม)		% yield
	ใบยาสูบที่ใช้	สารสกัดใบยาสูบ	
95% Ethanol	5,000.00	977.65	19.55

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

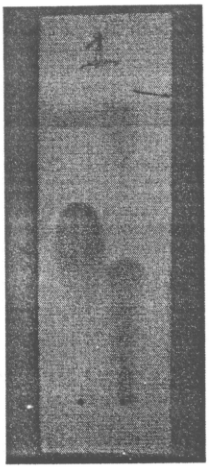
ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดที่ได้จากการทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporation จะมีลักษณะเป็นของเหลวข้น หนืด สีน้ำตาลดำ มีกลิ่นฉุนของยาสูบ ดังแสดงในรูปที่ 4-4



รูปที่ 4-4 แสดงภาพสารสกัดใบยาสูบ

3. การทำ TLC-Fingerprint หรือ TLC-Profile ของสารสกัดใบยาสูบ

นำสารสกัดใบยาสูบมาทำการวิเคราะห์เพื่อจัดทำรูปแบบการเคลื่อนที่ของสารสกัดบนแผ่นรงคเลข (TLC-plate) โดยใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ชนิดต่าง ๆ กันอย่างน้อย 3 ระบบตัวทำละลาย และใช้วิธีการการตรวจสอบผล 2 ชนิดคือ ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ พ่นด้วย modified Dragendroff's reagent โดยรูปแบบการเคลื่อนที่ของสารมาตรฐาน nicotine และสารสกัดใบยาสูบบนแผ่นรงคเลข (TLC-plate) ในระบบของตัวทำละลายเคลื่อนที่แต่ละชนิดได้ผลการทดลองดังนี้



1 2

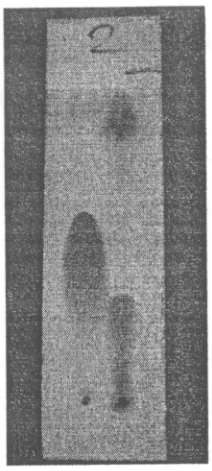
ระบบตัวทำละลายที่ 1

Ethyl acetate : MeOH (1:1)

Detection : UV 254 nm

1 = nicotine

2 = สารสกัดใบยาสูบ



1 2

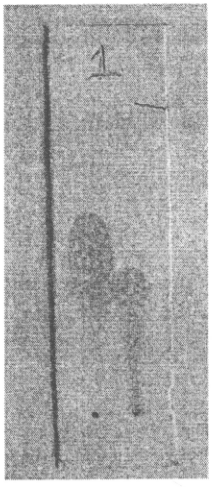
ระบบตัวทำละลายที่ 2

Ethyl acetate : MeOH (2:1)

Detection : UV 254 nm

1 = nicotine

2 = สารสกัดใบยาสูบ



1 2

ระบบตัวทำละลายที่ 1

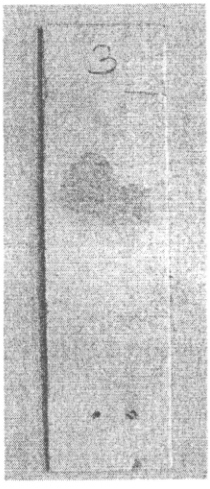
Ethyl acetate : MeOH (1:1)

Detection :

Dragendroff's reagent

1 = nicotine

2 = สารสกัดใบยาสูบ



1 2

ระบบตัวทำละลายที่ 3

$CHCl_3$: MeOH (1:1)

Detection :

Dragendroff's reagent

1 = nicotine

2 = สารสกัดใบยาสูบ

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองที่ได้เมื่อทำ TLC-fingerprint หรือ TLC-profile ของสารสกัดใบยาสูบเมื่อเปรียบเทียบกับสารสำคัญคือ nicotine ในระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่แตกต่างกัน 3 ระบบ และใช้การตรวจสอบ 2 แบบคือการดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และการฉีดพ่นด้วย Dragenfroff's reagent พบว่า สาร nicotine เป็นสารที่มีความเป็นขั้ว (polar) ค่อนข้างสูงดังจะเห็นได้จาก spot บนแผน TLC (HR_f value = 57, 49 และ 60 ในระบบตัวทำลายที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ) สำหรับ TLC-profile ของสารสกัดใบยาสูบจะเห็นว่ามีสารที่เป็นองค์ประกอบอื่นปนอยู่ในสารสกัดด้วย ทั้งที่มีความเป็นขั้วน้อยกว่า หรือมากกว่าสารสำคัญ nicotine จากผลการทดลองจะเห็นว่าพบสารสำคัญ nicotine ในสารสกัดใบยาสูบ (ดังแสดงด้านบน)

4. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ nicotine ในสารสกัดใบยาสูบโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

จากการทดลองจะได้ว่า สภาวะของโครมาโตกราฟีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณ nicotine ในสารสกัดจากใบยาสูบได้แก่สภาวะที่ดัดแปลงมาจากหัวข้อ assay ของ Nicotine transdermal system USP 27 ดังต่อไปนี้

สภาวะทางโครมาโตกราฟี

Column	C18, 250x46 mm, particle size 5 μm
Mobile phase	Pump A: water 700ml+Triethylamine (TEA) 1 ml Pump B: acetonitrile (อัตราส่วนสารละลาย Pump A : Pump B = 70:30)
Flow rate :	1 ml/min
Detector :	uv 260 nm
Injector: autosampler	Injection volume 10 μL

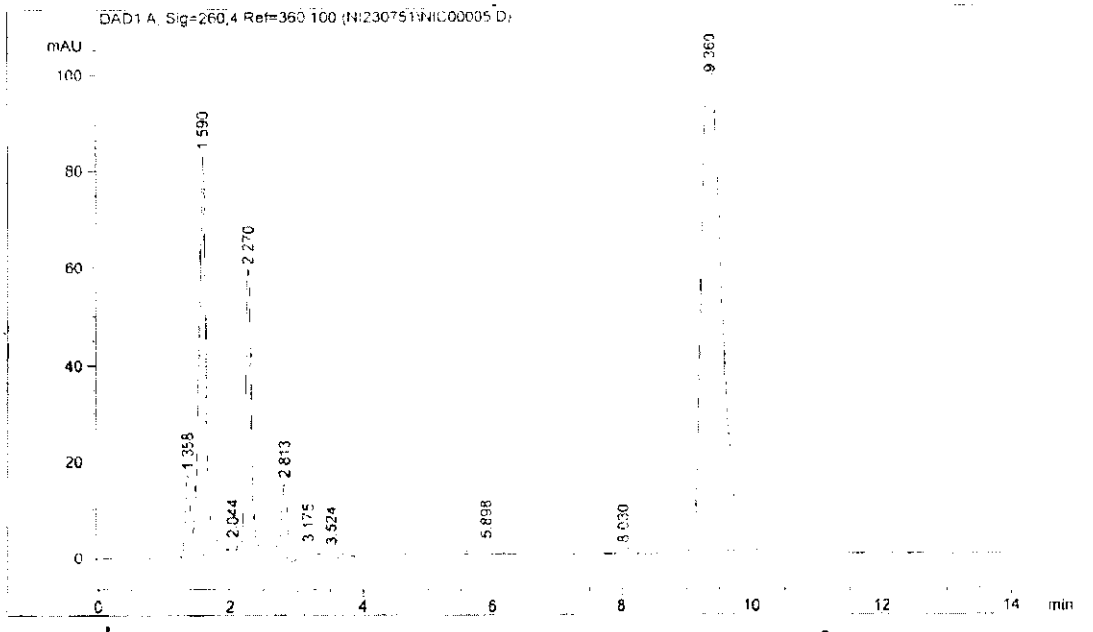
สารมาตรฐาน nicotine hydrogen tartrate (98.0%)

สารละลายมาตรฐาน ชั่งสารมาตรฐาน nicotine hydrogen tartrate (98.0%) อย่างถูกต้องแม่นยำประมาณ 25 mg ละลายใน methanol 25 ml ในการทำ standard curve เจือจางสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นของ nicotine ในช่วง 3.6-180 μg/ml (คำนวณในรูป free base) ปรับปริมาตรด้วย mobile phase

Chromatogram จากสภาวะดังกล่าว พบว่าสัญญาณของ nicotine ปรากฏที่ retention time อยู่ในช่วง 9.35 – 9.40 นาที

HPLC-fingerprint of Nicotina extract (HPLC-profile)

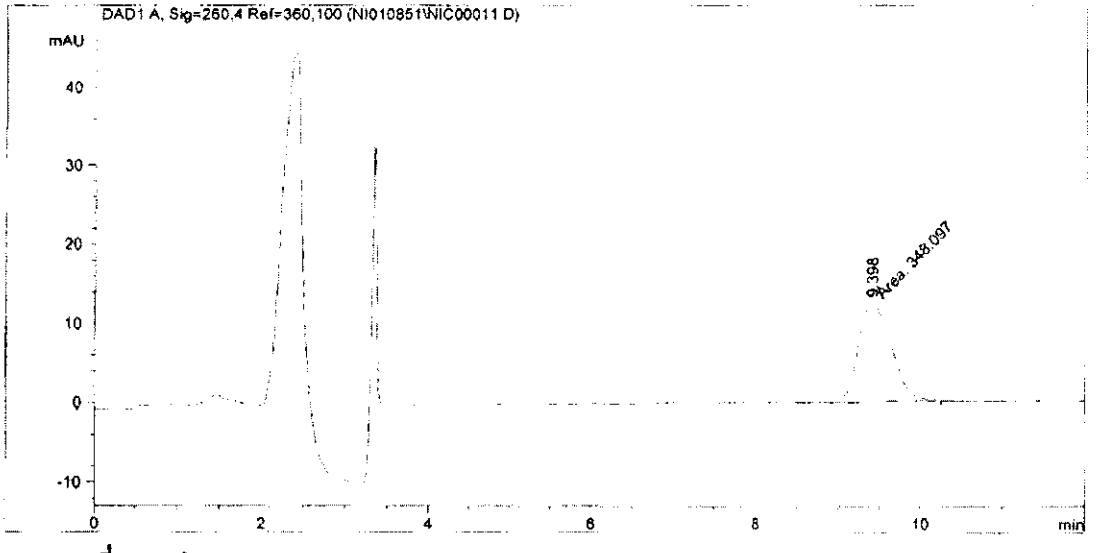
ผู้วิจัยได้ทำการเตรียมสารสารสกัดจากใบยาสูบจากข้อ 2 ให้มีความเข้มข้น 0.1 mg/ml แล้วนำมาหารูปแบบของการเคลื่อนที่ของสารต่าง ๆ ในระบบ HPLC ที่ได้ระบุไว้แล้ว ได้รูปแบบการเคลื่อนที่ (HPLC-fingerprint / HPLC-profile) ดังรูปที่ 4-5



รูปที่ 4-5 HPLC-fingerprint or Chromatogram ของสารสกัดจากใบยาสูบ (ความเข้มข้น 0.1 mg/ml)

Standard curve ของการวิเคราะห์หาปริมาณ nicotine จากสารสกัดใบยาสูบ

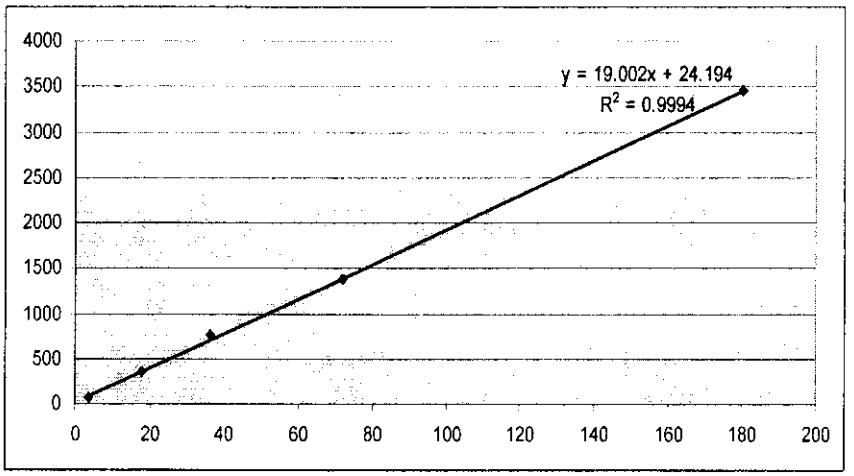
เมื่อนำสารละลายมาตรฐานมาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ได้ Chromatogram ของสารละลายมาตรฐานตามรูปที่ 4-6 เมื่อนำPeak area ที่วัดได้จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงในตารางที่ 4-3 เมื่อทำการ plot ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและค่าเฉลี่ยของ peak area ที่ตรวจวัดได้ จะได้ภาพของ standard curve ดังแสดงในรูปที่ 4-7 โดยมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (r^2 = 0.9994)



รูปที่ 4-6 ตัวอย่าง Chromatogram ของสารมาตรฐาน nicotine hydrogen tartrate (98.0%) (ความเข้มข้น 18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ตารางที่ 4-3 Peak area ที่วัดได้จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารละลายที่	ความเข้มข้นของ nicotine (free base, μg/ml)	Peak area 1	Peak area 2	ค่าเฉลี่ย peak area
1	3.6	69.71041	67.35080	68.53061
2	18.0	345.98514	348.09735	347.0412
3	36.0	767.38800	769.12756	768.2578
4	72.1	1380.06189	1386.29785	1383.18
5	180.2	3438.51953	3446.50708	3442.513



รูปที่ 4-7 Standard curve ของการวิเคราะห์หาปริมาณ nicotine จากสารสกัดใบยาสูบ

การวิเคราะห์หาปริมาณ nicotine ในสารสกัดใบยาสูบ

สภาวะทางโครมาโตกราฟี

Column	C18, 250x46 mm, particle size 5 μm
Mobile phase	Pump A: water 700ml+Triethylamine (TEA) 1 ml
	Pump B: acetonitrile
	(อัตราส่วนสารละลาย Pump A : Pump B = 70:30)
Flow rate :	1 ml/min
Detector :	uv 260 nm
Injector: autosampler	Injection volume 10 μL

สารมาตรฐาน nicotine hydrogen tartrate (98.0%)

สารละลายมาตรฐาน ชั่งสารมาตรฐาน nicotine hydrogen tartrate (98.0%) อย่างถูกต้องแม่นยำ ประมาณ 25 mg ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml ละลายด้วย methanol ในการทำ standard curve เจือจางสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นของ nicotine ในช่วง 7.2-180 µg/ml (คำนวณในรูป free base) ปรับปริมาตรด้วย mobile phase

สารละลายตัวอย่าง ชั่งสารสกัด ประมาณ 28 - 40 mg ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml ละลายตัวอย่างด้วย methanol ปิเปต stock solution มา 1 ml ปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย mobile phase

ผลการวิเคราะห์

เมื่อนำสารสกัดที่เตรียมได้ มาวิเคราะห์หาปริมาณ nicotine ด้วยเครื่อง HPLC พบว่ามีปริมาณ nicotine ในสารสกัดอยู่ระหว่าง 13.03-14.24% ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 13.47% (n=3, S.D.=0.66, %RSD 4.94, standard curve r^2=1) แสดงดังตารางที่ 4-4

ตารางที่ 4-4 Peak area ที่วัดได้จากการวิเคราะห์หา nicotine ในสารสกัดใบยาสูบ

ตัวอย่าง	น้ำหนักตัวอย่าง (mg)	Peak area 1	Peak area 2	% nicotine
1	41.2	443.4042	445.9593	14.24
2	30.9	308.8247	310.779	13.15
3	28.3	282.8246	279.9127	13.03

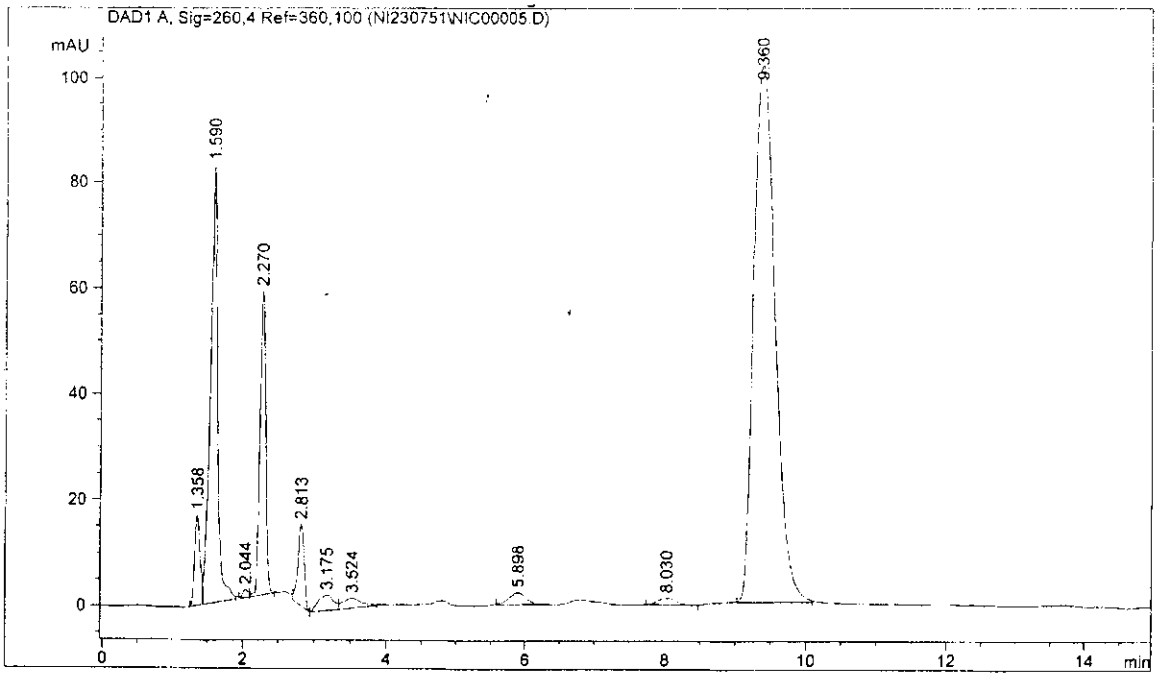
5. การศึกษา stability-indicating assay

สภาวะทางโครมาโตกราฟี

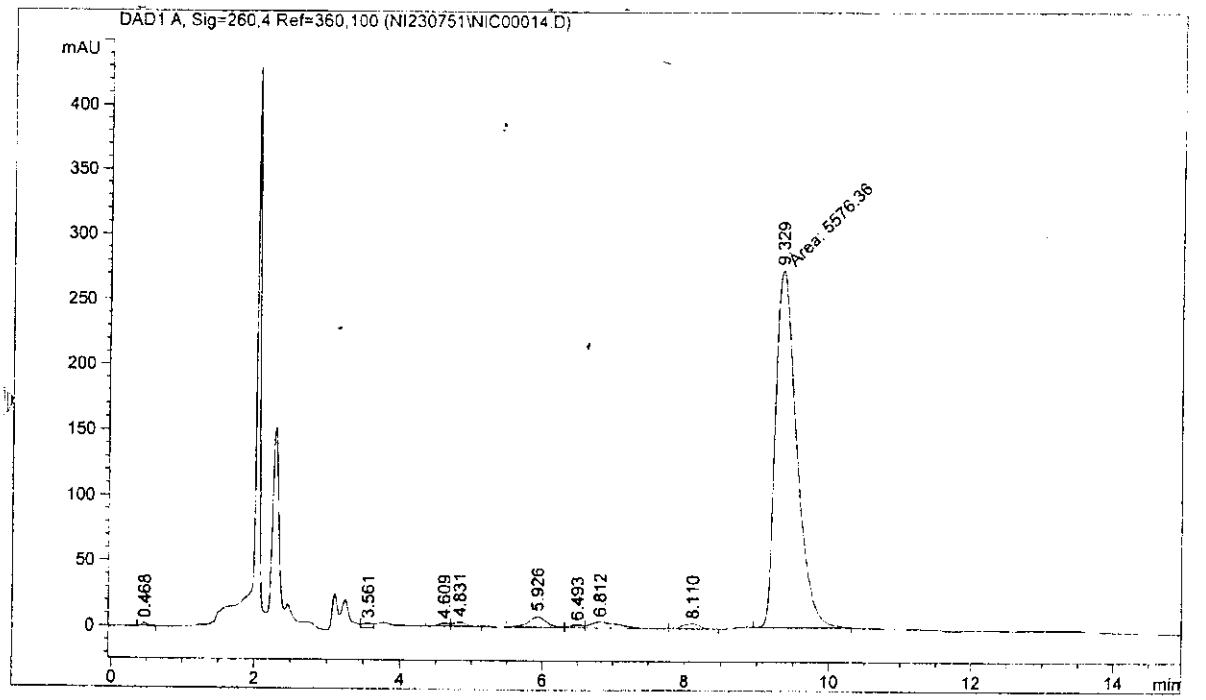
Column	C18, 250x46 mm, particle size 5 µm
Mobile phase	Pump A: water 700ml+Triethylamine (TEA) 1 ml
	Pump B: acetonitrile
	(อัตราส่วนสารละลาย Pump A : Pump B = 70:30)
Flow rate :	1 ml/min
Detector :	uv 260 nm
Injector: autosampler	Injection volume 5 µL

ผลการศึกษา stability-indicating assay

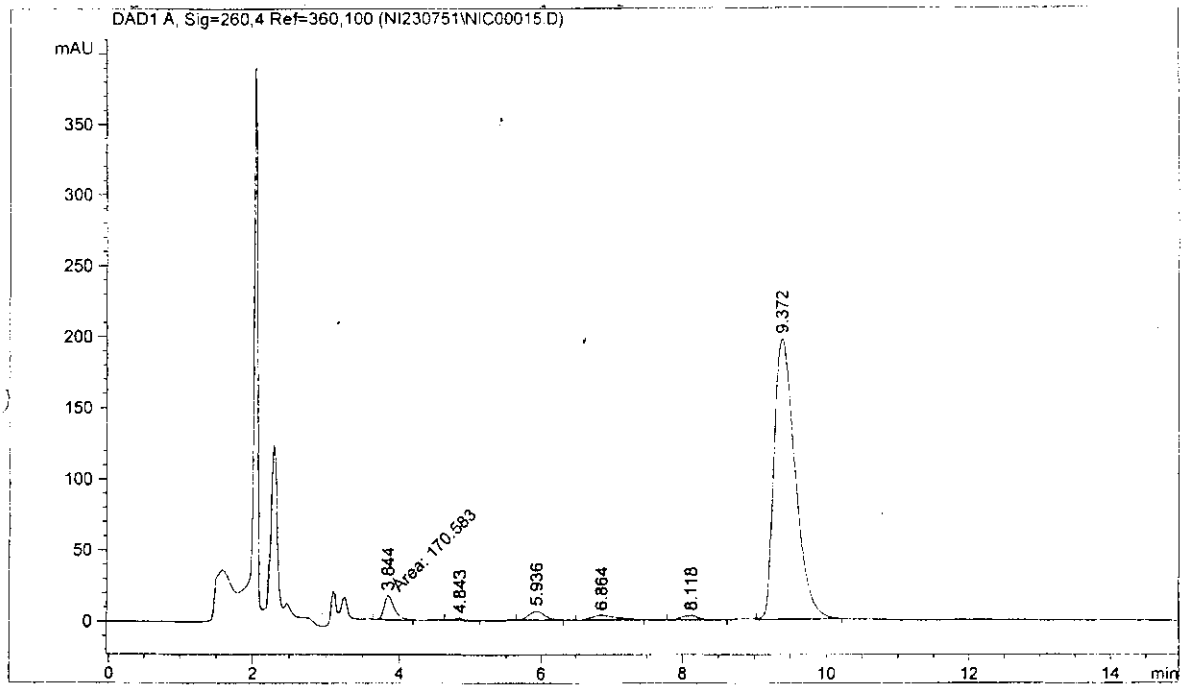
จากการที่ได้ทำการเร่งการสลายตัวของสารสกัดใบยาสูบภายใต้สภาวะกรด ด่าง และความร้อนเพื่อศึกษาความสามารถการแยก (resolution) ของ nicotine กับสารสลายตัว (degradation products) ต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น ได้ผลการศึกษาดังรูปที่ 4-8 – 4-11



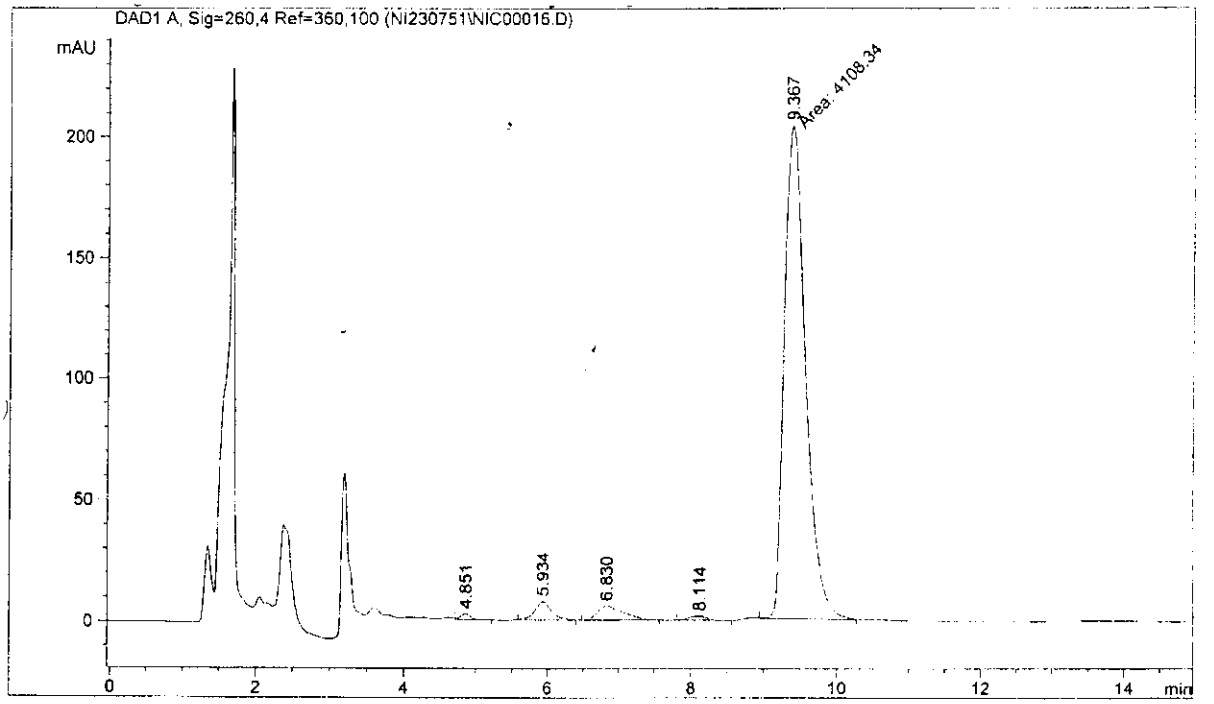
รูปที่ 4-8 chromatogram ของสารสกัดใบยาสูบ



รูปที่ 4-9 chromatogram ของสารสกัดใบยาสูบที่ถูกเร่งการสลายตัวภายใต้สภาวะกรด



รูปที่ 4-10 chromatogram ของสารสกัดใบยาสูบที่ถูกเร่งการสลายตัวภายใต้สภาวะด่าง



รูปที่ 4-11 chromatogram ของสารสกัดใบยาสูบที่ถูกเร่งการสลายตัวภายใต้ความร้อน

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

เมื่อเปรียบเทียบ chromatogram ของสารสกัดใบยาสูบ (รูปที่ 4-7) กับ chromatogram ของสารสกัดใบยาสูบที่ถูกเร่งการสลายตัวภายใต้สภาวะกรด ด่าง และ ความร้อน (รูปที่ 4-9, 4-10 และ 4-11 ตามลำดับ) พบ สัญญาณของ nicotine ปรากฏที่ retention time ประมาณ 9.35 นาที และพบสัญญาณของสารสลายตัวที่ retention time ต่ำกว่า 9.35 นาที

จาก chromatogram พบว่า สภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณ nicotine ในสารสกัดที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นดังกล่าว สามารถแยกสารอื่นๆในสารสกัด สารที่เกิดจากการสลายตัวออกจากสัญญาณของ nicotine ได้ดี และ พบว่า nicotine ในสารสกัดจากใบยาสูบค่อนข้างคงตัวภายใต้สภาวะกรด ด่าง และ ความร้อน

6. การศึกษาความคงตัวของสารสกัดใบยาสูบ

จากการเก็บตัวอย่างสารสกัดในยาสูบที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ และ ระยะเวลาต่างๆ เป็นเวลา 105 วัน เตรียมเป็นสารละลายตัวอย่างดังวิธีการในข้อ 5 แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ nicotine ด้วยเครื่อง HPLC ได้ผลวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 4-5 – 4-7 เมื่อนำข้อมูล % remain ของ nicotine ในสารสกัดใบยาสูบ มา plot ที่เวลาต่างๆ จะได้ stability curve ของสารสกัดใบยาสูบ ดังแสดงในรูปที่ 4-12

ตารางที่ 4-5 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ nicotine ในสารสกัดใบยาสูบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้องที่เวลาต่าง ๆ กัน

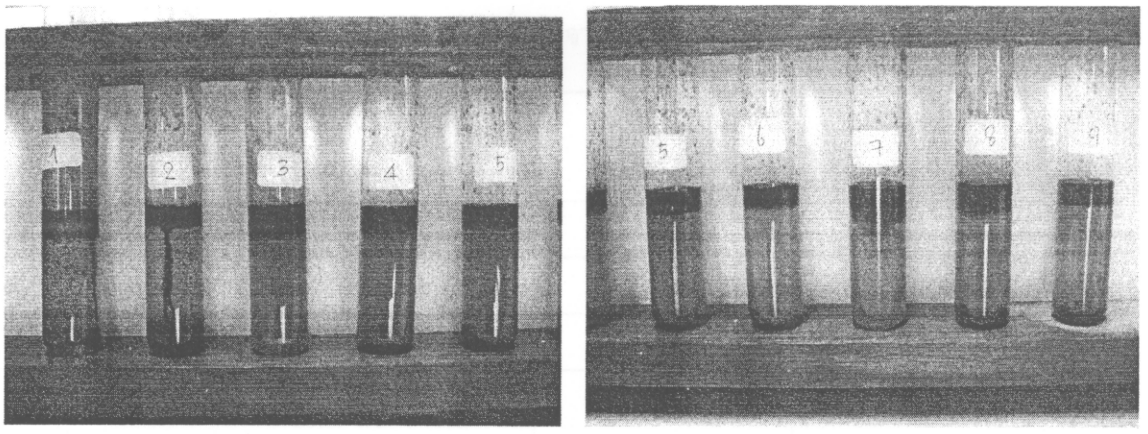
ครั้งที่	เวลา (วัน)	ปริมาณสารสำคัญ nicotine ในสารสกัดใบยาสูบ	
		% nicotine	%remain
0	0	13.47	100.00
1	7	9.37	69.56
2	14	9.89	73.44
3	21	8.09	60.08
4	42	7.87	58.46
5	63	8.73	64.83
6	84	9.66	71.72
7	105	10.46	77.66

ตารางที่ 4-6 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ nicotine ในสารสกัดใบยาสูบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิ 45°C ที่เวลาต่าง ๆ กัน

ครั้งที่	เวลา (วัน)	ปริมาณสารสำคัญ nicotine ในสารสกัดใบยาสูบ	
		% nicotine	%remain
0	0	13.47	100.00
1	7	9.19	68.19
2	14	10.14	75.27
3	21	14.19	105.35
4	42	10.98	81.47
5	63	12.21	90.61
6	84	14.63	108.58
7	105	12.71	94.33

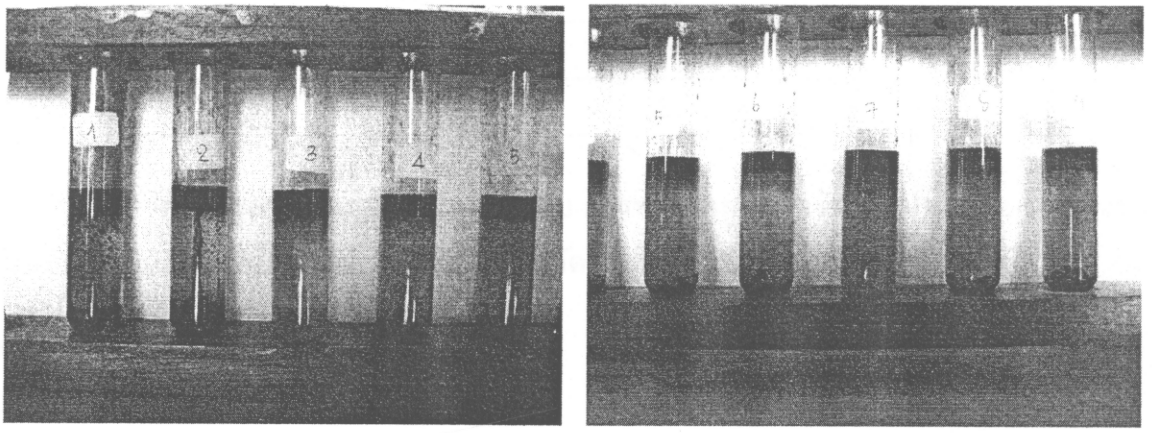
ตารางที่ 4-7 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ nicotine ในสารสกัดใบยาสูบที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิ 70°C ที่เวลาต่าง ๆ กัน

ครั้งที่	เวลา (วัน)	ปริมาณสารสำคัญ nicotine ในสารสกัดใบยาสูบ	
		% nicotine	%remain
0	0	13.47	100.00
1	7	8.29	61.56
2	14	9.24	68.61
3	21	11.43	84.88
4	42	10.43	77.45
5	63	9.84	73.02
6	84	15.59	115.73
7	105	16.00	118.75



A B

รูปที่ 4-16 แสดงลักษณะทางกายภาพของสารสกัดจากใบยาสูบที่เวลา 7 วัน (**A** = กรด, **B** = ด่าง)



A B

รูปที่ 4-17 แสดงลักษณะทางกายภาพของสารสกัดจากใบยาสูบที่เวลา 14 วัน (**A** = กรด, **B** = ด่าง)

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลอง จะได้ว่า ณ เวลาที่เริ่มทำการทดลอง (T = 0) เมื่อเติมสารละลายกรด – ด่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไป สารสกัดที่เติมกรด HCl ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 0.1 N ลงไปจะมีการแยกชั้นอย่างชัดเจน แต่ที่ความเข้มข้นของกรดที่เจือจาง น้ำกลั่น และในสารละลายด่างทุกความเข้มข้นจะเห็นลักษณะของความขุ่นของสารสกัด ซึ่งในสารละลายด่างที่มีความเข้มข้นมาก ก็จะมีความขุ่นมากกว่าในสารละลายที่มีความเป็นด่างที่เจือจางน้อยกว่า และเมื่อวางทิ้งไว้ และเขย่าเป็นระยะ ในเวลาที่กำหนดไว้พบว่าความขุ่นของสารที่อยู่ในหลอดทดลองจะลดลง และจะการแยกชั้นอย่างชัดเจนมากขึ้น (ในกรณีที่นำมาเขย่าและวางทิ้งไว้ก่อนถ่ายภาพ) และเมื่อวัดค่า pH ของสารสกัดในสารละลายกรด และด่างทั้งก่อน และหลังการทดลองให้ค่า pH ที่เท่ากันดังตารางที่ 4-8

ตารางที่ 4-8 แสดงค่า pH ของสารสกัดจากใบยาสูบในตัวทำละลายกรด – ด่าง

หลอดที่	ตัวทำละลายที่เติมในสารสกัดใบยาสูบ	pH ก่อนการทดลอง	pH หลังการทดลอง
1	1 N HCl	5	5
2	0.1 N HCl	6	6
3	0.01 N HCl	6.5	6.5
4	0.001N HCl	6.5	6.5
5	H_2O	7	7
6	0.001N NaOH	7.5	7.5
7	0.01N NaOH	7.5	7.5
8	0.1N NaOH	7.5	7.5
9	1 N NaOH	8	8

8. ศึกษาค่าการละลายของสารสกัดใบยาสูบ การพัฒนาสูตรตำรับในรูปของ concentrated emulsion เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบยาสูบ และการศึกษาความคงตัว

ศึกษาค่าการละลายของสารสกัดใบยาสูบ

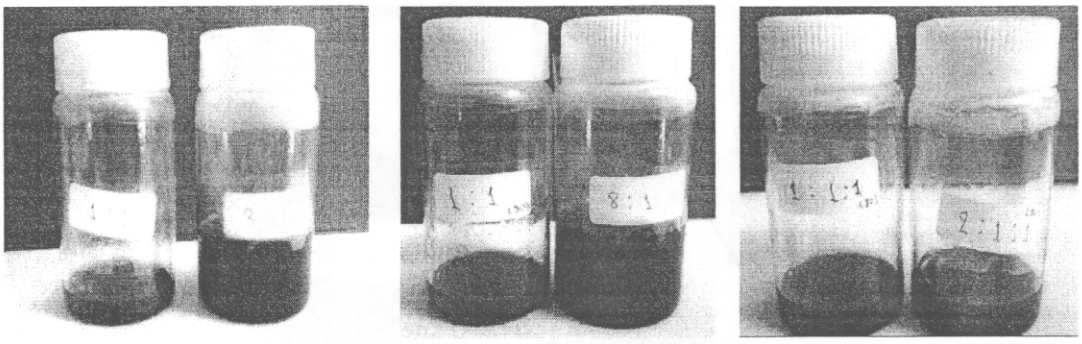
สภาวะทางโครมาโตกราฟี

Column	C18, 250x46 mm, particle size 5 μm
Mobile phase	Pump A: water 700ml+Triethylamine (TEA) 1 ml
	Pump B: acetonitrile
	(อัตราส่วนสารละลาย Pump A : Pump B = 70:30)
Flow rate :	1 ml/min
Detector :	uv 260 nm
Injector: autosampler	Injection volume 10 μL

ผลการทดลอง

ได้ทำการศึกษาค่าการละลายของสารสกัดใบยาสูบด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4-9

สูตรที่	ลักษณะทางกายภาพ	หมายเหตุ
9	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน หนืดเท่ากับสารตั้งต้นนิโคติน	
10	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน หนืดมากกว่าสูตรที่ 9	
11	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน หนืดมากขึ้น	
12	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน หนืดมากขึ้น	
13	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน หนืดมากขึ้น คล้ายยางมะตอย	
14	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน หนืดน้อยลง	
15	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน หนืดน้อยลง	
16	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน หนืดเท่ากับสารตั้งต้นนิโคติน	
17	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน เหลว	น้ำมันทำให้สารละลายเหลวขึ้น
18	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน เหลว	
19	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน เหลว	
20	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน เหลว	
21	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน เหลว	
22	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน เหลว	
23	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน เหลว	
24	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน เหลว	
25	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน เหลว	
26	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน เหลว	
27	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน เหลว	
28	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน เหลว	
29	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน เหลว	
30	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน เหลว	
31	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน เหลว	
32	สีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกัน เหลว	



A B C D E F

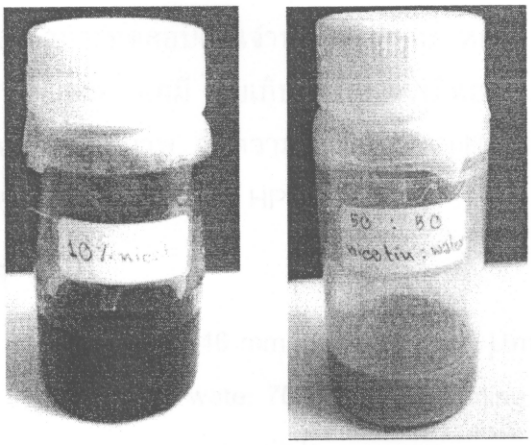
รูปที่ 4-18 แสดงภาพของ concentrated emulsion ของสารสกัดใบยาสูบ ที่ได้จากสูตรที่ 1(**A**), 8(**B**), 9(**C**), 16(**D**), 25(**E**) และ 26(**F**)

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองที่ได้เมื่อประเมินสูตรตำรับของ concentrated emulsion ของสารสกัดใบยาสูบที่ได้จากสูตรต่าง ๆ แล้วพบว่าสูตรตำรับที่ 29 ให้ตำรับที่มีคุณลักษณะทางกายภาพเป็นที่ดีมีสีที่เป็นเนื้อเดียวกัน และมีความเหลวที่เหมาะสม จึงได้ทดลองเตรียมเป็นสูตรตำรับที่ให้มีปริมาณของสารสำคัญ nicotine ใน concentrated emulsion อยู่ปริมาณ 10% ซึ่งได้ทำการทดลองเตรียมเป็นสูตรตำรับ และนำไปทดลองละลายในน้ำในอัตราส่วน 1:1 เพื่อศึกษาถึงลักษณะทางกายภาพที่เกิดขึ้น

สูตรตำรับ concentrated emulsion ของสารสกัดจากใบยาสูบเพื่อให้มีปริมาณของสารสำคัญ Nicotin 10%

จากการทดลองพบว่าเมื่อเตรียม concentrated emulsion ของสารสกัดจากใบยาสูบเพื่อให้มีปริมาณของสารสำคัญ Nicotin 10% พบว่าได้สูตรตำรับที่มีลักษณะเป็นของเหลวที่ละลายเป็นเนื้อเดียวกันสีน้ำตาลดำ มีความหนืดที่เหมาะสม และน้อยกว่าสารตั้งต้นที่เป็นสารสกัดจากใบยาสูบ และเมื่อนำตำรับที่เตรียมได้มาละลายน้ำในอัตราส่วน 1:1 พบว่าได้เป็นสารละลายขุ่นมีลักษณะคล้ายอิมัลชันสีน้ำตาล ความหนืดน้อยลงจากเดิมประมาณครึ่งหนึ่ง ดังแสดงในรูปที่ 4-19

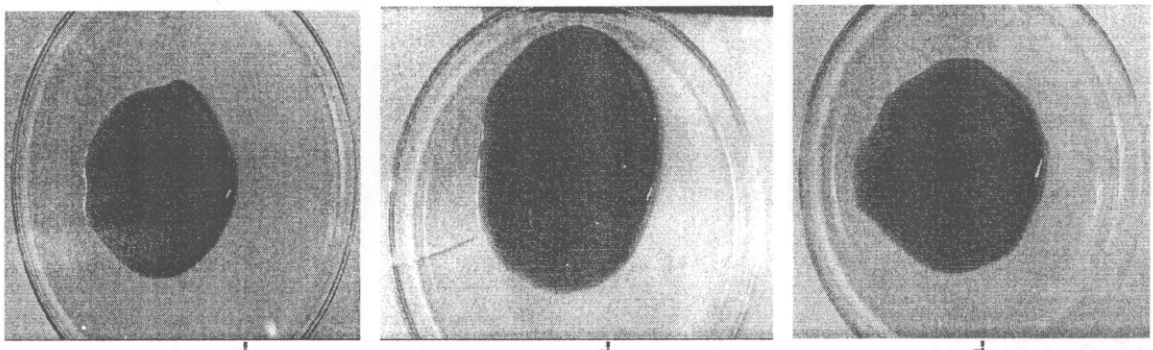


A B

รูปที่ 4-19 แสดงภาพของ concentrated emulsion ของสารสกัดใบยาสูบ ที่มีปริมาณของสารสำคัญ Nicotin 10% (**A** = concentrated emulsion ของสารสกัดใบยาสูบที่มีปริมาณของสารสำคัญ nicotine 10% และ **B** = สูตรตำรับ **A** ที่เจือจางด้วยน้ำใอัตราส่วน 1 : 1)

การพัฒนาสูตรตำรับนิโคตินในรูปของ concentrated emulsion ส่วนที่ 2

จากผลการทดลองที่ได้เมื่อประเมินสูตรตำรับของ concentrated emulsion ของสารสกัดใบยาสูบที่ได้จากสูตรต่าง ๆ พบว่าลักษณะทางกายภาพของแต่ละสูตรตำรับจะเป็นอิมัลชั่นสีน้ำตาลอ่อนเป็นเนื้อเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 4-20 ซึ่งจะนำไปทำการทดสอบความคงตัวของสูตรตำรับอิมัลชั่นต่อไป



สูตรที่ 1 **สูตรที่ 2** **สูตรที่ 3**

รูปที่ 4-20 แสดงลักษณะของสูตรตำรับ concentrated emulsion แต่ละสูตรตำรับ (สูตรที่ 1 rice bran oil ; สูตรที่ 2 palm oil ; สูตรที่ 3 soy bean oil)

การประเมินประสิทธิภาพความคงตัวของสูตรตำรับอิมัลชั่นของสารสกัดใบยาสูบ

นำสูตรตำรับอิมัลชั่นของสารสกัดใบยาสูบมาศึกษาความคงตัวทางกายภาพโดยเก็บสูตรตำรับอิมัลชั่นแต่ละสูตรในภาชนะปิดสนิทโดยผ่านกระบวนการ Freeze-thaw ซึ่งเก็บตำรับไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถือ

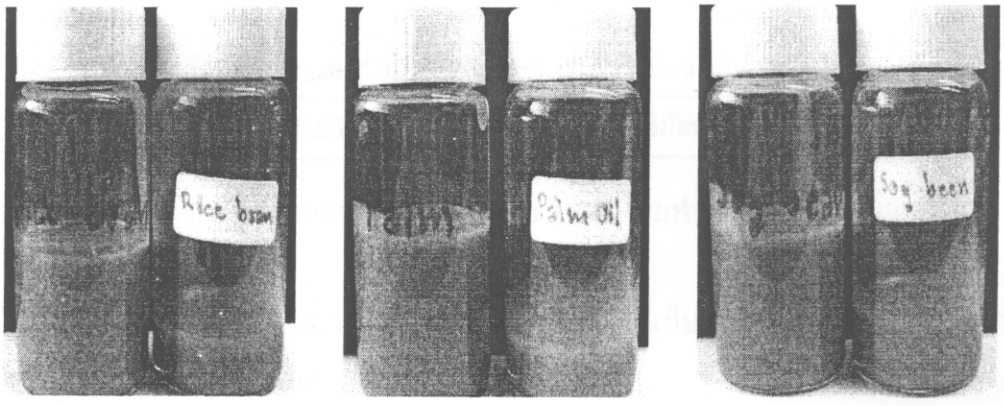
เป็น 1 รอบของการทดสอบ ทำการทดสอบเป็นจำนวน 6 รอบ หลังจากนั้นเลือกสูตรที่ดีที่สุดมาศึกษาความคงตัวทางกายภาพและทางเคมี โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 และ 3 เดือน แล้วนำมาตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ วัดความหนืดและค่า pH วิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดใบยาสูบทั้งหมดในตำรับเมื่อเวลาผ่านไป โดยใช้ HPLC

สภาวะทางโครมาโตกราฟี

Column	C18, 250x46 mm, particle size 5 μm
Mobile phase	Pump A: water 700ml+Triethylamine (TEA) 1 ml
	Pump B: acetonitrile
	(อัตราส่วนสารละลาย Pump A : Pump B = 70:30)
Flow rate :	1 ml/min
Detector :	uv 260 nm
Injector: autosampler	Injection volume 10 μL

ผลการทดลอง

จากการประเมินประสิทธิภาพความคงตัวของสูตรตำรับอิมัลชั่นของสารสกัดใบยาสูบทั้งสามสูตรได้ผลการทดลองตามรูปที่ 4-21 – 4-22 และ ตารางที่ 4-11 – 1-12



A B C

รูปที่ 4-21 ลักษณะของ concentrated emulsion แต่ละสูตรตำรับ : A คือ สูตรตำรับที่ 1, B คือ สูตรตำรับที่ 2 และ C คือ สูตรตำรับที่ 3 โดยขวดที่บรรจุ nicotine emulsion ทางด้านซ้ายมือเป็นลักษณะที่เตรียมไว้และเก็บที่อุณหภูมิห้องส่วนขวดทางด้านขวามือได้ผ่านกระบวนการ Freeze-thaw

รูปที่ 4-22 แสดงลักษณะทางกายภาพของสูตรตำรับที่ 2 ของ nicotine emulsion ขวดด้านซ้ายมือเป็นการเตรียมขึ้นใหม่ ตรงกลางเมื่อระยะเวลาผ่านไป 1 เดือน และขวดด้านขวามือเมื่อระยะเวลาผ่านไป 3 เดือนเก็บที่สภาวะอุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 4-11 แสดงลักษณะทางกายภาพของแต่ละสูตรตำรับเมื่อก่อนและหลัง freeze-thaw

สูตรตำรับ.	คุณสมบัติของสูตรตำรับที่เตรียมได้ (t_0)			คุณสมบัติของสูตรตำรับเมื่อผ่าน freeze-thaw 6 cycles		
	ลักษณะและสีของตำรับ	pH*	Viscosity* (cps	ลักษณะและสีของตำรับ	pH*	Viscosity* (cps)
1	อิมัลชั่นสีน้ำตาลอ่อน	5.29±0.02	135.77±0.00	อิมัลชั่นสีน้ำตาลเข้ม	5.12±0.015	239.20±0.80
2	**อิมัลชั่นสีน้ำตาลอ่อน**	**5.26±0.02**	**216.05±0.17**	**อิมัลชั่นสีน้ำตาลอ่อน**	**5.18±0.031**	**284.95±0.44**
3	อิมัลชั่นสีน้ำตาลอ่อน	5.25±0.02	115.11±0.12	อิมัลชั่นสีน้ำตาลเข้ม	5.06±0.06	219.80±0.42

หมายเหตุ : * ค่าที่ได้จากการวัดเป็นค่าเฉลี่ย ± SD โดยทำการทดลองเป็นจำนวน 3 ครั้ง

ตารางที่ 4-12 แสดงลักษณะทางกายภาพของสูตรตำรับที่ 2 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเวลาผ่านไป 1 และ 3 เดือน

เวลา	สูตรตำรับที่ 2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง		
	ลักษณะและสีของตำรับ	pH	Viscosity (cps)
1 เดือน	อิมัลชั่นสีน้ำตาลอ่อน	5.29±0.03	798.93±0.48
3 เดือน	อิมัลชั่นสีน้ำตาลอ่อน	5.27±0.03	857.42±0.69

หมายเหตุ : * ค่าที่ได้จากการวัดเป็นค่าเฉลี่ย ± SD โดยทำการทดลองเป็นจำนวน 3 ครั้ง

การศึกษาความคงตัวของสารสำคัญ nicotine ใน concentrated emulsion ของสารสกัดใบยาสูบสูตรตำรับที่ 2

นำผลิตภัณฑ์ concentrated emulsion ของสารสกัดในยาสูบสูตรตำรับที่สองเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลาต่างๆ กัน (0, 1, 3 และ 6 เดือน) เมื่อครบกำหนดเวลานำตัวอย่างมาเตรียมเป็นสารละลายตัวอย่างดังวิธีการในข้อ 5 แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ nicotine ด้วยเครื่อง HPLC ได้ผลวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 4-13

ตารางที่ 4-13 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ nicotine ใน concentrated emulsion ของสารสกัดใบยาสูบสูตรตำรับที่สองที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้องที่เวลาต่าง ๆ กัน

ครั้งที่	เวลา (เดือน)	ปริมาณสารสำคัญ nicotine ในสารสกัดใบยาสูบ	
		% nicotine (±SD) (Labelle amount)	%remain
0	0	122.56 (3.41)	100.00
1	1	104.97 (3.88)	85.67
2	3	117.14 (0.31)	95.57
3	6	114.47 (3.37)	93.39

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลอง พบว่าหลังผ่าน freeze-thaw สูตรตำรับที่ 1 และ 3 มีลักษณะทางกายภาพเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย คือ สีของตำรับเข้มขึ้นและมีความหนืดเพิ่มขึ้น แต่สูตรตำรับที่ 2 จะมีลักษณะทางกายภาพคงเดิม ดังแสดงในรูปที่ 4-21 (B) และเมื่อพิจารณาค่า pH พบว่าทุกสูตรตำรับมีค่าลดลง ดังแสดงในตารางที่ 4-11 ดังนั้นเมื่อพิจารณาผลจาก freeze-thaw และมูลค่าต้นทุนของส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ จึงทำการเลือกสูตรตำรับที่ 2 ซึ่งเป็นสูตรตำรับที่ดีที่สุดมาทำการประเมินในขั้นตอนต่อไป

เมื่อนำสูตรตำรับที่ 2 มาทำการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 และ 3 เดือน จะได้ว่าลักษณะทางกายภาพของสูตรตำรับยังคงเดิมไม่เปลี่ยนแปลง คือมีลักษณะเป็นอิมัลชั่นสีน้ำตาลอ่อนเหมือนกับตอนที่ตั้งตำรับครั้งแรก และสำหรับค่า pH ของตำรับเมื่อเวลาผ่านไป 1 และ 3 เดือน พบว่าค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อพิจารณาค่าความหนืด พบว่า มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 1 และ 3 เดือน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4-12

ในการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ concentrated emulsion ของสารสกัดใบยาสูบด้านคุณสมบัติทางเคมีในสูตรตำรับที่เลือก โดยการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ nicotine ที่คงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์หลังจากตั้งทิ้งไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 0, 1 และ 6 เดือน ตามลำดับ ให้ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญอยู่ในช่วงระหว่าง 105 – 120% labelle amount ซึ่งมีปริมาณของสารสำคัญ nicotine ที่เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ เฉลี่ย 93.65% ตามตารางที่ 4-13 ซึ่ง

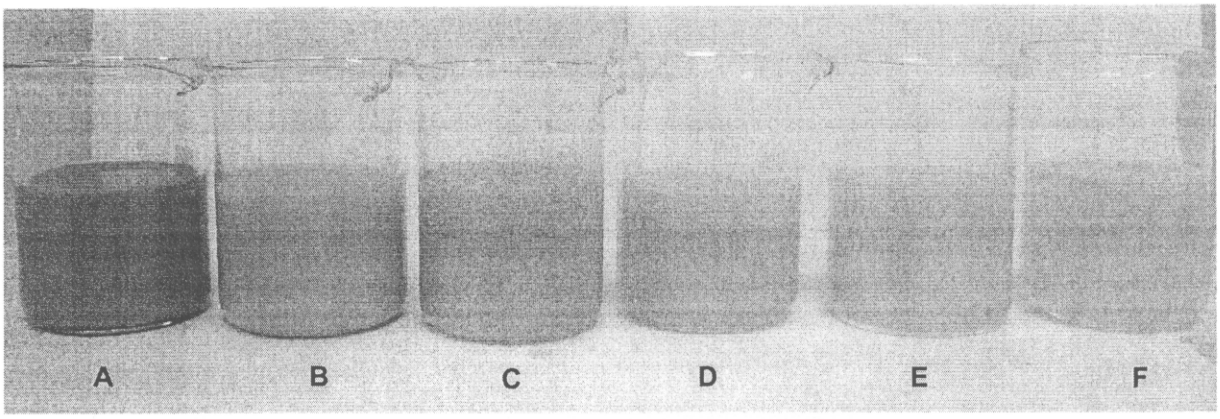
แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ concentrated emulsion ของสารสกัดใบยาสูบสูตรที่ 2 นี้มีความคงตัวที่ดี และอายุของผลิตภัณฑ์นี้สามารถอยู่ได้อย่างน้อย 6 เดือน ซึ่งหากทำการศึกษาในระดับสูงต่อไปก็จะสามารถทำนายอายุของผลิตภัณฑ์ได้แม่นยำยิ่งขึ้น

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลองในส่วนของการพัฒนาสูตตำรับ

จากผลการทดลองของการพัฒนาสูตรตำรับทั้งหมดที่ได้จากทั้งคุณลักษณะทางกายภาพและการทดสอบความคงตัวทางเคมีในเบื้องต้นพบว่าสูตรที่ 2 มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการเตรียมเป็นสูตรตำรับอิมัลชันเข้มข้นของสารสกัดนิโคติน ซึ่งรอระยะเวลาในการตรวจสอบความคงตัวทางเคมีที่ระยะเวลาต่างๆ และคุณสมบัติทางกายภาพให้มั่นใจอีกครั้งหนึ่ง อย่างไรก็ตามผลจากตารางที่ 4-12 จะพบว่ามีความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อระยะเวลาผ่านไป 1 และ 3 เดือนเมื่อเทียบกับลักษณะความหนืดของตำรับที่เตรียมได้ใหม่ โดยที่ปริมาตรไม่ลดลงแสดงถึงการไม่ได้หายไปของตัวทำละลาย นอกจากนี้จากปริมาณของสารนิโคตินรวมถึง pH ที่ได้ค่อนข้างคงที่ แสดงว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพอันอาจเกิดจากส่วนประกอบในตำรับ เมื่อพิจารณาส่วนประกอบของตำรับทั้งหมดจะเห็นว่า Tween และ Span ไม่น่าจะสลายตัวในสภาวะของตำรับและสภาวะที่ทำการทดสอบ (http://gzhanglian.en.alibaba.com/product/51143509-50197700/Emulsifier_Tween_20_60_80_Span_60_80.html) สารที่อาจจะเกิดการสลายตัวจึงควรเป็น น้ำมันปาล์มที่ใช้ มีรายงานว่าที่อุณหภูมิสูงจะมีการเกิดสารพอลิเมอร์ที่มีโมเลกุลสูง ซึ่งทำให้ความหนืดเพิ่มขึ้น (Pambou-Tobi, 2010) และถ้าพิจารณาถึงโครงสร้างทางเคมีของน้ำมันปาล์มที่เป็นน้ำมันที่เลือกใช้สำหรับสูตรที่ดีที่สุดนั้นมีส่วนประกอบที่มีคุณสมบัติเป็น Glyceryl ester ของ fatty acid จะเห็นได้ว่าสารอาจเกิดการ hydrolysis ได้ในตำรับที่มีน้ำเป็นส่วนใหญ่ในตำรับ นอกจากนี้ตำรับยังมีความเป็นกรดอ่อนๆ ซึ่งทำให้อาจเกิด ester hydrolysis ได้ แต่อย่างไรก็ตามหากเกิดปรากฏการณ์ดังกล่าว free fatty acid ที่เกิดขึ้นน่าจะสามารถ form salt กับนิโคติน อันจะส่งผลให้การระเหยของนิโคตินลดลงและ salt ที่เกิดขึ้นควรจะมีลักษณะเป็น self emulsifying agent รวมถึงมีความเป็น buffer ได้ด้วย จึงทำให้ส่งผลถึงการเปลี่ยนแปลง pH น้อย ในขณะที่สิ่งที่จะส่งผลกระทบอย่างเด่นชัดจึงมีเพียงความหนืดของตำรับเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามเพื่อยืนยันถึงสมมุติฐานดังกล่าวจึงควรมีการวัดระดับ fatty acid ในตำรับ ณ เวลาเริ่มต้นเปรียบเทียบกับเมื่อเวลาผ่านไปเพื่อยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลงความหนืดเกิดจากการสลายตัวของน้ำมันที่ใช้โดยไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพโดยรวมของตำรับ

9. การทดสอบการนำ concentrated emulsion ที่ได้จากสารสกัดใบยาสูบไปทดลองใช้ในแปลงเกษตรทดลอง

นำ concentrated emulsion จากสารสกัดใบยาสูบสูตรตำรับที่ 2 ที่ผ่านการพิจารณาคัดเลือกแล้วจากหัวข้อที่ 8 มาเจือจางด้วยน้ำสะอาดในอัตราส่วน 1:10, 1:20, 1:50, 1:80 และ 1:100 เท่า จะได้ลักษณะทางกายภาพของสารละลายเจือจางของผลิตภัณฑ์ และผลจากการฉีดพ่นในแปลงผักทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4-14 – 4-15 และรูปที่ 4-23 – 4-29 ตามลำดับ



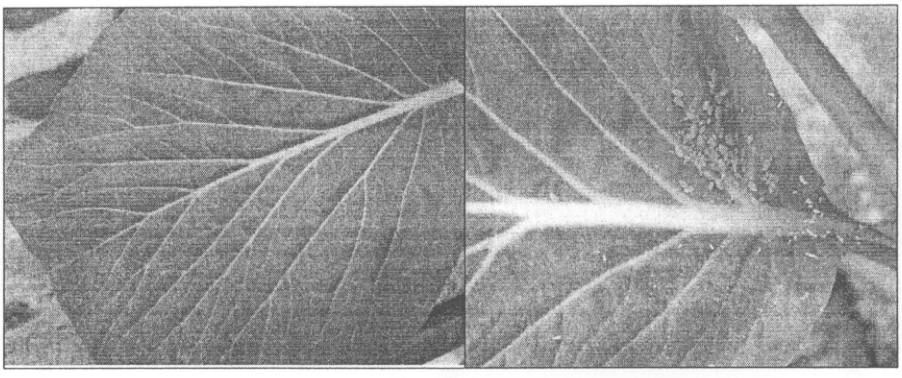
รูปที่ 4-23 ภาพแสดงผลิตภัณฑ์ concentrated emulsion จากสารสกัดใบยาสูบและเจือจางในน้ำสะอาดที่ความเข้มข้นต่างๆ (A = concentrated emulsion, B = เจือจางในอัตราส่วน 1 : 10, C = เจือจางในอัตราส่วน 1 : 20, D = เจือจางในอัตราส่วน 1 : 50, E = เจือจางในอัตราส่วน 1 : 80 และ F = เจือจางในอัตราส่วน 1 : 100

ตารางที่ 4-14 ลักษณะทางกายภาพของ concentrated emulsion ของสารสกัดใบยาสูบที่เจือจางด้วยน้ำสะอาด

ผลิตภัณฑ์สูตรตำรับที่ 2	ลักษณะทางกายภาพของตำรับ
Concentrated emulsion	อิมัลชั่นสีน้ำตาล
เจือจางด้วยน้ำสะอาดในอัตราส่วน 1 : 10	อิมัลชั่นสีน้ำตาลอ่อน
เจือจางด้วยน้ำสะอาดในอัตราส่วน 1 : 20	อิมัลชั่นสีน้ำตาลอ่อน
เจือจางด้วยน้ำสะอาดในอัตราส่วน 1 : 50	อิมัลชั่นสีน้ำตาลอ่อนจาง
เจือจางด้วยน้ำสะอาดในอัตราส่วน 1 : 80	อิมัลชั่นสีน้ำตาลอ่อนจาง
เจือจางด้วยน้ำสะอาดในอัตราส่วน 1 : 100	อิมัลชั่นสีน้ำตาลอ่อนจาง

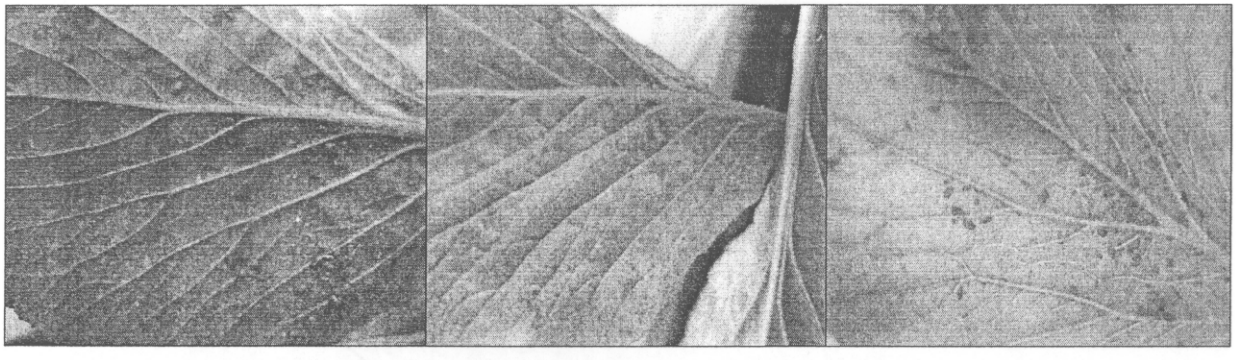
ตารางที่ 4-15 ผลการกำจัดเพลี้ยอ่อนของ concentrated emulsion สารสกัดใบยาสูบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ณ เวลา 0, 2 และ 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ concentrated emulsion สารสกัดใบยาสูบ	ผลการกำจัดเพลี้ยอ่อน ณ เวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง)		
	0	2	24
Concentrated emulsion	ตัวยาติดบนใบดี	เพลี้ยตาย	เพลี้ยตาย
เจือจางด้วยน้ำสะอาดในอัตราส่วน 1 : 10	ตัวยาติดบนใบดี	เพลี้ยตาย	เพลี้ยตาย
เจือจางด้วยน้ำสะอาดในอัตราส่วน 1 : 20	ตัวยาติดบนใบดี	เพลี้ยตาย	เพลี้ยตาย
เจือจางด้วยน้ำสะอาดในอัตราส่วน 1 : 50	ตัวยาติดบนใบดี	เพลี้ยตาย	เพลี้ยตาย
เจือจางด้วยน้ำสะอาดในอัตราส่วน 1 : 80	ตัวยาติดบนใบดี	เพลี้ยตาย	เพลี้ยตาย
เจือจางด้วยน้ำสะอาดในอัตราส่วน 1 : 100	ตัวยาติดบนใบดี	เพลี้ยตาย	เพลี้ยตาย



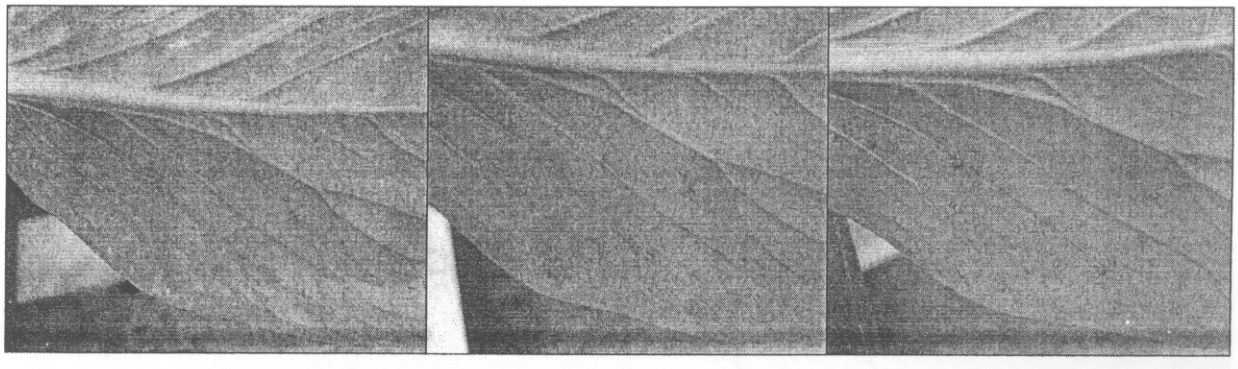
A B

รูปที่ 4-24 แสดงภาพของใบในแปลงทดลอง (A ไม่มีเพลี้ย B มีเพลี้ย)



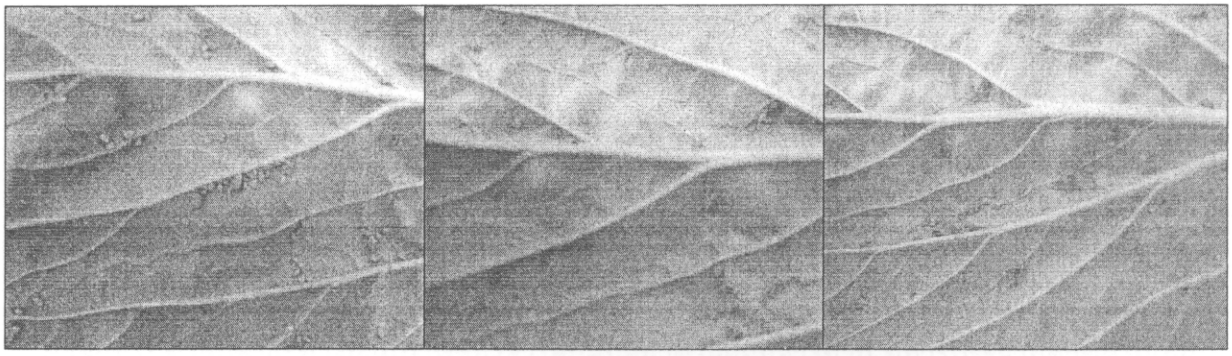
A B C

รูปที่ 4-25 แสดงภาพของเพลี้ยอ่อนหลังจากฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ในความเข้มข้น 1 : 10
(A เวลา 0 ชั่วโมง, B เวลา 2 ชั่วโมง, C เวลา 24 ชั่วโมง)



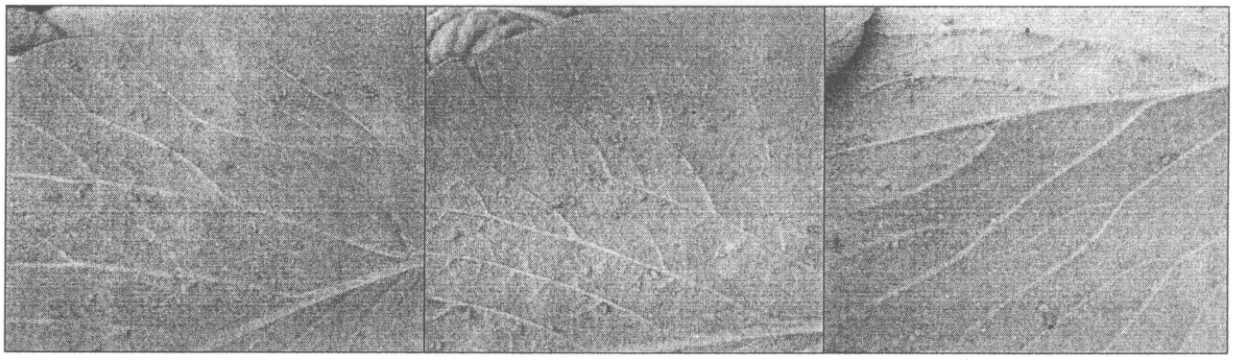
A B C

รูปที่ 4-26 แสดงภาพของเพลี้ยอ่อนหลังจากฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ในความเข้มข้น 1 : 20
(A เวลา 0 ชั่วโมง, B เวลา 2 ชั่วโมง, C เวลา 24 ชั่วโมง)



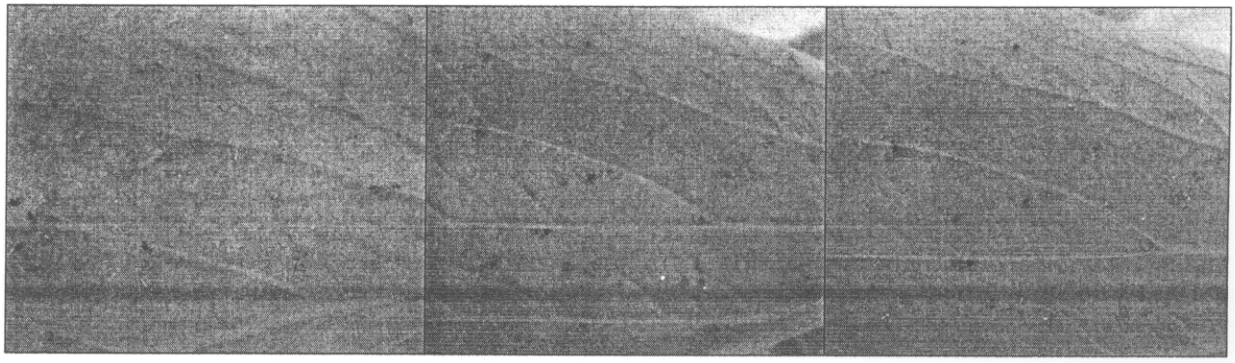
A B C

รูปที่ 4-27 แสดงภาพของเพลี้ยอ่อนหลังจากฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ในความเข้มข้น 1 : 50 (A เวลา 0 ชั่วโมง, B เวลา 2 ชั่วโมง, C เวลา 24 ชั่วโมง)



A B C

รูปที่ 4-28 แสดงภาพของเพลี้ยอ่อนหลังจากฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ในความเข้มข้น 1 : 80 (A เวลา 0 ชั่วโมง, B เวลา 2 ชั่วโมง, C เวลา 24 ชั่วโมง)



A B C

รูปที่ 4-29 แสดงภาพของเพลี้ยอ่อนหลังจากฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ในความเข้มข้น 1 : 100 (A เวลา 0 ชั่วโมง, B เวลา 2 ชั่วโมง, C เวลา 24 ชั่วโมง)

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการนำผลิตภัณฑ์ concentrated emulsion ของสารสกัดใบยาสูบสูตรดำรับที่ 2 ไปทำการเจือจางด้วยน้ำสะอาดในอัตราส่วนต่าง ๆ จากนั้นนำไปใช้ฉีดพ่นในแปลงทดลองเพื่อกำจัดเพลี้ยอ่อนซึ่งเป็นศัตรูพืชที่ทำลายพืชผักในแปลงทดลองปรากฏว่าได้ผลเป็นที่น่าพึงพอใจ สามารถทำลาย หรือฆ่าเพลี้ยอ่อนได้ภายใน 2 ชั่วโมง ด้วยความเข้มข้นต่ำสุดที่เตรียมคือ 1 : 100 ส่วน (ใช้ผลิตภัณฑ์ concentrated emulsion 1 มิลลิลิตรเจือจางด้วยน้ำสะอาด ละปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร) ซึ่งลักษณะทางกายภาพของสารสกัดมีสีน้ำตาลอ่อนจางมาก มีการกระจายตัวที่ดีไม่เกิดการแยกชั้นในน้ำสะอาด สารละลายที่ได้มีกลิ่นของใบยาสูบบ้างเล็กน้อย และเมื่อฉีดพ่นทิ้งไว้กลิ่นก็จะจางลง

บทที่ 5
บทสรุป

งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการสกัดใบยาสูบ ด้วยตัวทำละลายทั้งหมด 5 ชนิดคือ *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol และ 95% ethanol แล้วเปรียบเทียบหาความสามารถในการสกัดของตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งจากการผลการทดลองจะได้ว่า 95% ethanol เป็นตัวทำละลายที่มีความเหมาะสมในการสกัดใบยาสูบ และเมื่อใช้ 95% ethanol สกัดใบยาสูบ ระเหยตัวทำละลายและทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ซึ่งให้ลักษณะของสารสกัดใบยาสูบเป็นของเหลวหนืดข้นสีน้ำตาลดำ มีกลิ่นของยาสูบ ได้ % yield เท่ากับ 19.55 % เมื่อคำนวณเปรียบเทียบกับใบยาสูบแห้ง เนื่องจากสารสำคัญในใบยาสูบมีความไม่คงตัว เสื่อมสลายได้ง่าย ดังนั้นจึงได้มีการเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มความคงตัวให้กับสารสกัด โดยในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาสารสกัดดังกล่าวให้อยู่รูปของผลิตภัณฑ์ที่เป็นอิมัลชันแบบเข้มข้น (concentrated emulsion) นอกจากนี้ได้ทำการศึกษารูปแบบการเคลื่อนที่ของสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในสารสกัดใบยาสูบเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน nicotine hydrogen tartrate (98% purity) บนแผ่นรงคเลขผิวบาง (TLC-Plate) ศึกษารูปแบบการเคลื่อนที่ของสารต่าง ๆ ในสารสกัดใบยาสูบโดยใช้วิธี HPLC (HPLC-Fingerprint) พัฒนาหาวิธีการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารสำคัญ nicotine ที่มีอยู่ในสารสกัดใบยาสูบ โดยดัดแปลงจากหัวข้อ assay ของ Nicotine transdermal system USP XXVII ด้วยเทคนิคทาง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ให้ความถูกต้อง แม่นยำค่อนข้างสูง ซึ่งจากผลการวิจัยพบว่าสารสกัดใบยาสูบมีปริมาณของสารสำคัญ nicotine เท่ากับ 13.47% (n=3, S.D.=0.66, %RSD 4.94, standard curve r^2=1) การวิจัยนี้ได้มีการพัฒนากระบวนการวิเคราะห์ หาเงื่อนไขในการแยกหรือ HPLC chromatographic condition ซึ่งจากผลการพัฒนาวิธีการได้รูปแบบการแยก (chromatogram profile/fingerprint) ที่สามารถแยก peak ของสารสำคัญ nicotine ได้อย่างชัดเจน ไดทำการพัฒนา chromatographic condition ที่สามารถแยก peak ของสารสำคัญ nicotine จากการฉีดสารละลายของสารสกัดใบยาสูบออกจากกันรวมถึงการ พิสูจน์ว่า peak ที่เกิดขึ้นคือสารสำคัญ nicotine ซึ่งเป็น peak identification ด้วย โดยเทียบกับสารอ้างอิงมาตรฐาน nicotine (reference standard) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ nicotine ในสารสกัดใบยาสูบ และผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบยาสูบในรูปแบบอิมัลชันเข้มข้น (concentrated emulsion) งานวิจัยนี้ได้ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของสารสกัดใบยาสูบที่เตรียมได้ เช่น การละลาย เป็นต้น ศึกษา stability-indicating assay ซึ่งมีความสำคัญเพื่อตรวจสอบการเร่งการสลายตัวของสารสกัด (ที่ไม่ใช่สารบริสุทธิ์) แล้วดูสภาวะของ HPLC ที่ได้พัฒนานั้นสามารถตรวจวัดปริมาณของ nicotine ที่ลดลงไปได้หรือไม่ เพราะเมื่อเวลาที่ผ่านไปนอกจากจะต้องแยก nicotine

ออกจากสารอื่นในสารสกัด และยังมีการสลายตัวของ nicotine เองและสารสลายตัวของสารอื่น ๆ ในสารสกัด พบว่าสารสกัดจากใบยาสูบค่อนข้างคงตัวภายใต้สภาวะกรด ด่าง และ ความร้อน ศึกษาความคงตัวของสารสกัดใบยาสูบ โดยเก็บตัวอย่างสารสกัดใน vial เปิด เก็บในตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่อุณหภูมิ 25, 45 และ 70±0.5 °C ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นเวลา 105 วัน เมื่อถึงช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ได้ทำการตรวจหาปริมาณสารสำคัญ nicotine โดยใช้วิธี HPLC พบว่าจาก stability curve ได้ว่า % remain ของ nicotine ในสารสกัดใบยาสูบที่เก็บไว้ในทั้งสามอุณหภูมิมีแนวโน้มลดลงในช่วงแรกแต่กลับมีแนวโน้มสูงขึ้นในช่วงหลังของการทดลอง ทำให้ไม่สามารถบ่งชี้ถึงความคงตัวของสารสกัดใบยาสูบได้อย่างชัดเจนคาดว่ามีสาเหตุมาจากการระเหยของ solvent เนื่องจากสารสกัดที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวข้นหนืด การกำจัดตัวทำละลายที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดอาจทำได้ไม่สมบูรณ์ เมื่อตัวอย่างถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงเป็นระยะเวลานานอาจเกิดการระเหยออกไปของตัวทำละลายจึงตรวจพบ % nicotine ในสารสกัดมีค่าสูงกว่าที่ควรจะเป็น

การวิจัยครั้งนี้ได้นำสารสกัดจากใบยาสูบมามาพัฒนาสูตรตำรับเพื่อให้ได้รูปแบบผลิตภัณฑ์ที่เป็นอิมัลชันแบบเข้มข้น (concentrated emulsion) เนื่องจากสารสกัดนิโคตินที่ได้เป็นของเหลวที่มีความมัน (oily liquid) ที่สามารถระเหยได้ง่าย การเตรียมในรูปแบบอิมัลชันเข้มข้นจะทำให้สารสกัดนิโคตินที่สามารถละลายได้ในชั้นน้ำมันกระจายตัวในน้ำด้วยสารก่ออิมัลชัน โดยผลจากการประเมินสูตรตำรับของ concentrated emulsion ของสารสกัดใบยาสูบ พบว่าลักษณะทางกายภาพที่เหมาะสม มีลักษณะเป็นอิมัลชั่นสีน้ำตาลอ่อนเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อนำไปกระจายตัวในน้ำจะสามารถกระจายตัวได้ดี และไม่แยกชั้น เมื่อนำไปทดลองในแปลงโดยเจือจางด้วยน้ำสะอาด 100 เท่า พบว่าผู้ใช้มีความพึงพอใจเนื่องจากสามารถกำจัดเพลี้ยอ่อนได้หมด และไม่ส่งผลต่อพยาธิสภาพของใบผักที่ใช้

ภาคผนวก

กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

1. เกษตรกรสามารถนำผลการวิจัยไปใช้ได้โดยตรง หน่วยงานของรัฐ หรือเอกชน สามารถนำผลวิจัยไปต่อยอดเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ concentrated emulsion ของสารสกัดใบยาสูบ สำหรับจำหน่ายให้กับเกษตรกรต่อไป
2. คณะผู้วิจัยยินดีที่จะถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตให้กับเกษตรกรตามการร้องขอ

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ดำเนินการมา

วัตถุประสงค์	กิจกรรมหลัก	กิจกรรมรอง	กิจกรรมที่ได้ดำเนินการมา
1. เพื่อพัฒนาสารสกัดจากใบยาสูบให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นสารฆ่าแมลง	1.1 เตรียมสารสกัด จากใบยาสูบ	1.1.1 เตรียมสารสกัดใบยาสูบ	ได้ดำเนินการบรรลุตามวัตถุประสงค์
	1.2 ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ และเคมีของสารสกัดใบยาสูบ	1.2.1 ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ และเคมีของสารสกัดใบยาสูบ	ได้ดำเนินการบรรลุตามวัตถุประสงค์
	1.3 ศึกษา และพัฒนารูปแบบสารสกัดใบยาสูบให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสม	1.3.1 พัฒนาสารสกัดใบยาสูบให้เป็นสารไล่แมลงในรูปแบบ conc. Emulsion ที่มีความคงตัวที่ดีมีอายุไม่น้อยกว่า 2 ปี	ได้ดำเนินการบรรลุตามวัตถุประสงค์
2. เพื่อพัฒนาวิธีการทดสอบความคงตัวของสารสกัดจากใบยาสูบ และผลิตภัณฑ์	2.1 พัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหา nicotine ด้วยวิธี HPLC	2.1.1 พัฒนา/ดัดแปลง วิธีวิเคราะห์สาร nicotine ด้วยวิธี HPLC เพื่อใช้ศึกษาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดใบยาสูบ	ได้ดำเนินการบรรลุตามวัตถุประสงค์
		2.1.2 ศึกษา และพัฒนาวิธี stability-indicating assay	ได้ดำเนินการบรรลุตามวัตถุประสงค์
		2.1.3 วิเคราะห์หาปริมาณสาร สำคัญ nicotine ที่มีอยู่ในสารสกัดใบยาสูบที่เตรียมจากข้อ 1.1.1	ได้ดำเนินการบรรลุตามวัตถุประสงค์
3. เพื่อสามารถกำหนดอายุของสารสกัดจากใบยาสูบ และผลิตภัณฑ์	3.1 ศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมจากสารสกัดใบยาสูบในรูปแบบ concentrated emulsion	3.1.1 ศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ conc. Emulsion จากสารสกัดใบยาสูบที่เตรียมจากข้อ 1.3.1	ได้ดำเนินการบรรลุตามวัตถุประสงค์

ผลที่ได้รับตลอดโครงการ

1. ได้ข้อมูลต่าง ๆ ของการใช้ใบยาสูบ
2. ได้สารสกัดใบยาสูบ
3. ได้ข้อมูลความคงตัวของสารสกัด เมื่อวางทิ้งไว้ในสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ เช่น แสง ความร้อน ความชื้น ความเป็นกรด หรือด่าง เป็นต้น
4. ได้รูปแบบการเคลื่อนที่ของสารทั้ง TLC- และ HPLC-chromatogram ของสารสกัดใบยาสูบ
5. ได้วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ nicotine ในสารสกัดใบยาสูบโดยใช้ HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากหัวข้อ assay ของ Nicotine transdermal system ในเภสัชตำรับ USP XXVII
6. ได้ผลิตภัณฑ์ concentrated emulsion ของสารสกัดใบยาสูบที่มีความเหมาะสมในด้านกายภาพ และผลิตภัณฑ์มีความคงตัวดีสามารถอยู่ได้ที่อุณหภูมิห้องมากกว่า 6 เดือน
7. ได้ข้อมูลฤทธิ์ในการฆ่าเพลี้ยอ่อนในแปลงทดลองทางเกษตร