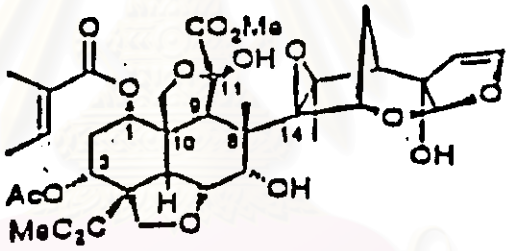
บทที่ 2

การสำรวจเอกสารอ้างอิง

2.1 การค้นพบโครงสร้างอะซาไดแรคทิน

นักเคมีได้ทำการแยกสารอินทรีย์ออกจากส่วนต่าง ๆ ของสะเดา ได้แก่ ใบ เมล็ด ผล เปลือก และกิ่ง ได้สารอินทรีย์ทั้งหมด 56 สาร โดยพบในส่วนของเมล็ดสะเดามีสารอินทรีย์อยู่มากที่สุด 35 สาร ในขณะที่ใบสะเดามีสารอยู่เพียง 9 สาร ทั้งส่วนใบและเมล็ดสะเดานี้จะเป็นส่วนของสะเดาที่ได้รับความสนใจมากที่สุด เนื่องจากนำไปใช้เป็นยาฆ่าแมลงได้ โดยพบว่าส่วนของเมล็ดจะออกฤทธิ์ดีที่สุดเพราะมีอะซาไดแรคทินอยู่มาก ซึ่งในใบไม่มีสารชนิดนี้อยู่ (Ermel, Pahlich, and Schmitterer, 1984; Warthen, Stroke and Jocobsonl, 1984)



รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างอะซาแรคทิน

อะซาไดแรคทิน ($C_{35}H_{44}O_{16}$) เป็นผงผลึกเล็กสีขาว ไม่มีรูปร่างไม่ละลายในอีเธอร์ ปิโตรเลียมอีเธอร์ ละลายได้เล็กน้อยในคาร์บอนเตตระคลอไรด์ ละลายในเบนซีนและโทลูอีน และละลายได้ดีที่สุดในเอทธานอล เมทธานอล อะซีโตน และคลอโรฟอร์ม มีจุดหลอมเหลวที่ 155-158 องศาเซลเซียส $[\alpha]_D$ -53 ν_{max} 3460 ,1745 , 1720 , 1650 , 1620 cm^{-1}[CCl_4] λmax (EtoH) 210 nm [Butterworth and Morgan ,1968]

อะซาไดแรคทินเป็นสารที่ไม่เสถียร (Larson, 1985; Ermel, 1986) จะสลายตัวได้ด้วยปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

1. ให้ความร้อนเกิน 60 ^{o}ซ
2. แสงแดด (Lange, 1983 ; Strokes และ Redfern, 1982)
3. ความเป็นกรดที่น้อยกว่า 3.5 และด่างมากกว่า 6.0
4. ความชื้น
5. การเก็บรักษา
6. วิธีการสกัด

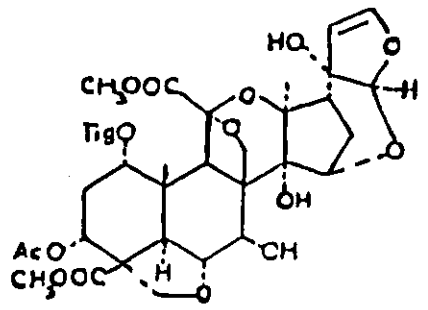
จากการทดลองพบว่า ถ้าสารสกัดสะเดามีอะซาไดแรคทินอยู่เพียงปริมาณเล็กน้อย ก็สามารถออกฤทธิ์ในการควบคุมแมลงได้ดี แต่ถ้าสารสกัดไม่มีอะซาไดแรคทินอยู่เลยจะไม่มีคุณสมบัติในการควบคุมแมลง ส่วนสะเดาที่มีสารอะซาไดแรคทินอยู่ จะพบในส่วนของเนื้อในเมล็ด (Butterworth and Morgan, 1972)สำหรับใบนั้นจากการทดลองจนถึงปัจจุบัน ยังไม่พบว่ามีสารอะซาไดแรคทินอยู่

ได้มีการพบอะซาไดแรคทินครั้งแรก ในปี คศ. 1968 โดย Butterworth และ Morgan (1968) จากการสกัดเมล็ดสะเดา โดยมีผลยับยั้งการกินอาหารและควบคุมการเจริญเติบโตของ Schistocerca gregaria ซึ่งเป็นตั๊กแตนในแถบแห้งแล้ง (Butterworth and Morgan, 1971) Zanno et al.(1975) ได้เสนอโครงสร้างอะซาไดแรคทิน (รูปที่ 1) ครั้งแรกโดยเทคนิค NMR (Nuclear Magnetic Resonance) Bitton et al.(1985) ได้แก้ไขข้อผิดพลาดบางส่วน ของโครงสร้างโดยใช้ข้อมูล NOE (Nuclear Overhause Effects) และ^{13}C NMR จนกระทั่งในปีเดียวกัน Kraus et al.(1986) ได้แสดงโครงสร้างอะซาไดแรคทินที่ถูกต้อง และ โครงสร้างนี้ถูกยืนยันโดยการวิเคราะห์ทาง x-ray ของ 1-Detigloyl-22,23-dihydroazadirachtin โดย Broughton et al.(1986) รวมทั้ง Howard(1986) ได้เสนอโครงสร้างตามที่ Kraus ได้เสนอไว้ โดยเขาเสนอโครงสร้างของอะซาไดแรคทินตามหลักฐาน x-ray ดังนี้

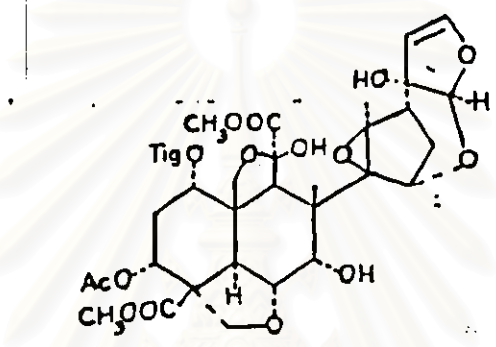
1. C-19 และ C-11 มีสะพานไฮโดรฟูราน (hydrofuran)
2. C-13 และ C-14 มีโครงสร้างที่มีวงแหวนอิพอกไซด์ (epoxide)
3. มีพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล (intramolecular hydrogen bonding) ที่เสถียร 2 พันธะในผลึกดังนี้
    3.1 พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ที่เกิดระหว่าง อะตอมออกซิเจนอิพอกไซด์ (epoxy oxygen atom) และไฮโดรเจนอะตอมของ C-11 ของกลุ่มไฮดรอกซี
    3.2 C-7 และ C-20 ของไฮดรอกซี ออกซิเจนอะตอม

ในปี 1987 Biton et al.ได้เสนอ โครงสร้างของ อะซาไดแรคทินจาก X-ray, Nuclear magnetic resonance (NMR) และ Mass spectroscopy(MS)

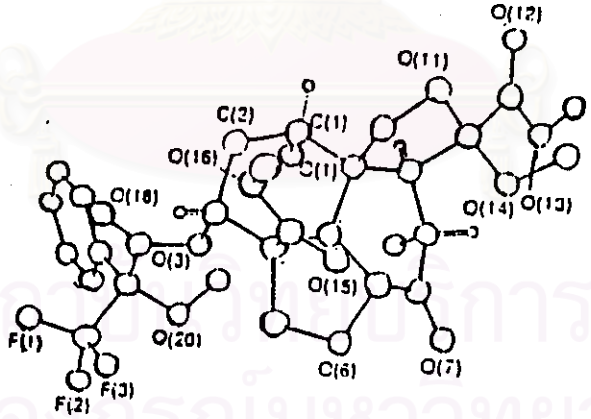
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สูตรโครงสร้างของอะซาไดแรคทินก่อน คศ. 1985



สูตรโครงสร้างของอะซาไดแรคทินหลัง คศ.1985



โครงสร้างของ อะซาไดแรคทินจาก X-ray

รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างอะซาไดแรคทินที่ได้รับการค้นพบ

1.2 การศึกษาพัฒนาการสกัดอะซาไดแรคทินโดยย่อ

ปี ค.ศ.1965 Shpan-Gabrielith ได้ทดลองโดยนำกระดาษกรองจุ่มน้ำตาลซูโครสและสารสกัดจากพืชจำนวนหนึ่งซึ่งทดสอบเพื่อดูว่ามีผลต่อตั๊กแตน *Schistocerca gregaria*_อย่างไร จากการทดลองพบว่ากระดาษกรดซึ่งจุ่มด้วยสารสกัดจากต้นสะเดา และสารสกัดจากต้น chinaberry แสดงผลยับยั้งอย่างแรง (Shpan-Gabrielith (1965) cited by Morgan, 1980)

ในปี 1968 Butterworth และ Morgan สามารถแยกและหาสารจากเมล็ดสะเดา และยังพบสารอะซาไดแรคทิน ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการกินอาหารในตั๊กแตนเขตแห้งแล้ง(*Schistocerca gregaria*)ที่เจริญเติบโตในขั้นที่ 5 ซึ่งอดอาหารมาประมาณ 25 ชั่วโมง ทำ partition แล้วทำ preparative Thin Layer Chromatography ด้วยการชะตัวทำละลายหลาย ๆ ชนิดและตกผลึกจาก CCl_4 จะได้อะซาไดแรคทินเป็นผงผลึกเล็ก ๆ ซึ่งมีจุดหลอมเหลว 155-158 องศาเซลเซียส สูตรโมเลกุลเป็น $C_{35}H_{44}O_{16}$ = 642.216 λmax 217 nm (EtOH) จากสเปคตรัม IR และ NMR ทำให้ได้สารอะซาไดแรคทิน

ค.ศ. 1971 Butterworth และ Morgan ได้ศึกษาสารยับยั้งการกินอาหารของตั๊กแตนของเมล็ดสะเดา (*Azadirachta Indica* A. Juss) และแยกสารประกอบหลักคืออะซาไดแรคทิน และกลุ่มโครงสร้าง (functional group)ของอะซาไดแรคทิน โดยมีการเตรียมไดไฮโดรอะซาไดแรคทิน (dihydroazadirachtin) และเตตระไฮโดรอะซาไดแรคทิน (tetrahydroazadirachtin) และพบว่า อนุพันธ์ของอะซาไดแรคทินไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Butterworth, และ Morgan, 1971)

ค.ศ. 1982 Stoke และ Redfern ได้แสดงให้เห็นว่าแสงอาทิตย์มีผลต่อการสลายตัวของอะซาไดแรคทิน โดยอะซาไดแรคทินที่ได้รับแสงอาทิตย์เป็นเวลา 7 วันจะทำให้การยับยั้งการกินอาหารลดลง คือ 50 % ขณะที่อะซาไดแรคทินที่ได้รับแสงอาทิตย์เป็นเวลา 16 วัน จะทำให้สารมีการสลายตัว สารแต่งเติมในการดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเล็ต เช่น กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก จะป้องกันการสลายตัวจากแสงได้เล็กน้อย อะซาไดแรคทินที่ถูกเติมด้วยน้ำมันพืชต่าง ๆ เช่น น้ำมันสะเดา , น้ำมัน angelica , ละหุ่ง , calmus ซึ่งได้รับแสงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ป้องกันการสลายตัวของอะซาไดแรคทินจากแสงอาทิตย์ได้ในระดับปานกลาง (25%)

ค.ศ. 1984 Warthen, Strokes และ Jacobson ได้สกัดสะเดา เพื่อหาปริมาณอะซาไดแรคทิน จากสารสกัดสะเดาและสารสกัดสะเดาที่ขายตามท้องตลาด

ค.ศ. 1985 Larson ได้เสนอว่า สารผสมสูตรน้ำยาสะเดา (formulations) จะเสถียรได้ต้องมีค่าความเป็นกรดด่าง อยู่ในช่วง 3.5 - 6.0 และมีความเข้มข้นของ อะซาไดแรคทินในช่วง 2000 - 4000 ppm

ค.ศ. 1986 Broughton และคณะได้พบโครงสร้างของอะซาไดแรคทิน , ไดไฮโดรอะซาไดแรคทิน และเตตระไดไฮโดรอะซาไดแรคทิน แต่ไม่มีรายงานในเรื่องการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

ค.ศ. 1986 Kenya ได้พบฤทธิ์ทางชีวภาพของอะซาไดแรคทินที่ทำอนุพันธ์ทางเคมีโดยทำไดไฮโดรจิเนตของอะซาไดแรคทินเอ และอะซาไดแรคทินบี

ค.ศ. 1987 Yamasaki และKlocke ได้สังเคราะห์อนุพันธ์อะซาไดแรคทิน 8 ตัว และศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโต และฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่อต้านแมลงศัตรูพืช *Heliothis viriescens* แต่การdeacetylation และ Hydrogenation ของ 2 พันธะคู่คาร์บอนของอะซาไดแรคทินไม่มีผลในฤทธิ์ทางชีวภาพ การเอาหมู่ tigloyl ออกมีผลทำให้อนุพันธ์มีความว่องไวเพียงเล็กน้อย แต่การเปลี่ยนหมู่ tigloyl ที่ไม่ละลายน้ำเป็น α,β--dihydroxy-α--methylbutyryl ที่ละลายน้ำจะลดความว่องไวลงอย่างมาก การสูญเสียอย่างมากในเรื่องความว่องไวจะเกิดขึ้นเมื่อหมู่ของไฮดรอกซิลถูกทำปฏิกิริยา cabomethoxylation หรือโดย o-methylation หมู่ไฮดรอกซิลในอะซาไดแรคทินมีความสำคัญในเรื่องความว่องไว

ค.ศ. 1990 Walter ได้เสนอวิธีสำหรับการผลิตสารละลายอะซาไดแรคทินที่มีความเสถียร ซึ่งประกอบด้วยการสกัดเมล็ดสะเดาบดด้วยตัวทำละลาย แล้วเติม molecular sieves ลงประมาณ 3-4 Angstom เพื่อเอาน้ำออกจากผลผลิตที่ได้ ทำให้สารละลายอะซาไดแรคทินมีน้ำน้อยกว่า 5%โดยปริมาตร

ค.ศ. 1991 Carter และคณะ เสนอสารสกัดสะเดาที่มีความเสถียรที่ประกอบด้วย การสกัดเมล็ดสะเดาซึ่งมี อะซาไดแรคทินที่มีตัวทำละลายที่ไม่สลายตัว โดยในขั้นแรกสารประกอบในการกำจัดแมลงอยู่ในตัวทำละลายที่ไม่มีโปรตอน (aprotic) มากกว่า 50 %โดยปริมาตร และน้ำน้อยกว่า 5 % โดยปริมาตร

ค.ศ. 1991 Govindachari , Sandhya และGaneshraj ได้ค้นพบการแยกอะซาไดแรคทิน H และ I โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

พ.ศ. 2535 บงกชรัตน์ ปิติยนต์ ชัยพัฒน์ จิระธรรมจารี และ อารมย์ แสงวนิชย์ ได้ทำการพัฒนาวิธีการสกัดอะซาไดแรคทินจากสะเดาให้ได้ปริมาณสูงขึ้น โดยนำสารสกัดจากสะเดาที่ได้จากการสกัดเอาน้ำมันออก แล้วทำPartial purification โดยขั้นแรกทำการสกัดเอาน้ำมันส่วนที่เหลือออกด้วยเฮกเซน สารสกัดที่ได้นำมาทำ liquid/liquid- extraction โดยใช้ระบบตัวทำละลายที่ต่างกัน 3 วิธี พบว่า การสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนให้ผลดีที่สุด

พ.ศ. 2537 งามผ่อง คงคาทิพย์ , จิตราภรณ์ เจียมไชยศรี และชวัญชัย สมบัติศิริ ได้หาวิธีการสกัดสารจากเมล็ดสะเดาไทย ทำการผ่านขั้นตอน การขจัดเอาไขมันออกด้วยเฮกเซน จากนั้นจึงสกัดด้วย 95% เอทธิลแอลกอฮอล์ และทำการสกัดต่อด้วยเอทธิลอะซิเตต โดยขจัดเอาโปรตีนและน้ำตาลออกจากน้ำ จากนั้นจึงนำเอาสารสกัดด้วย เอทธิลอะซิเตตไปทดสอบกับแมลง และอีกส่วนหนึ่งนำมาแยกสารให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคของลิควิดคอลัมน์โครมาโทกราฟี (quick column chromatagraphy) โดยนำส่วนที่แยกได้ไปทดสอบกับแมลง จากนั้นจึงนำเอาส่วนที่ออกฤทธิ์กับแมลงสูงที่สุดมาทำการแยกให้บริสุทธิ์อีกครั้ง ด้วยเทคนิคของ flash column chromatography ซึ่งทำให้ได้สารอะซาไดแรคทินออกมา

พ.ศ. 2537 ชัยพัฒน์ จิระธรรมจารี บงกชรัตน์ ปิติยนต์ และ อารมย์ แสงวนิชย์ ได้ศึกษาวิธีการสกัดและสลายตัวของสารออกฤทธิ์จาก เมล็ดสะเดาโดยการเปรียบเทียบระหว่างวิธีการสกัดคือ การตั้งทิ้งไว้ , กวนด้วยแม่เหล็กไฟฟ้า และกวนด้วยแม่เหล็กไฟฟ้าโดยสกัดน้ำมันทิ้งไปก่อน กับชนิดของตัวทำละลาย ได้แก่น้ำและเอทธานอล และ โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง เมล็ดสะเดากับตัวทำละลายคือ 1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1:20 ผลปรากฏว่าการใช้เอทธานอลเป็นตัวสกัดสามารถสกัดสารอะซาไดแรคทินได้ดีกว่าใช้น้ำทุกวิธีการ และทุกอัตราส่วน เมื่อเปรียบ

เทียบวิธีการสกัดพบว่าถ้าใช้น้ำเป็นตัวสกัดแบบการตั้งทิ้งไว้และวิธีการกวนด้วยแม่เหล็กไฟฟ้า จะให้ผลไม่แตกต่างกัน แต่ถ้าใช้เอทธานอลเป็นตัวสกัดวิธีการกวนด้วยแม่เหล็กไฟฟ้าจะให้ผลดีกว่าการตั้งทิ้งไว้ เมื่อเปรียบเทียบ อัตราส่วนระหว่างเมล็ดสะเดาและตัวทำละลายที่ใช้สกัดพบว่าประสิทธิภาพการสกัดจะเพิ่มขึ้น ถ้าเพิ่มปริมาณตัวทำละลายขึ้นทุกวิธีการจะให้ผลเช่นเดียวกันทั้งตัวทำละลายที่เป็นน้ำและ เอทธานอล

เมื่อนำสารสกัดสะเดาด้วยเอทธานอลซึ่งมีความเข้มข้นของอะซาไดแรคทิน 25 % มาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ ห้อง ถึง 40 องศาเซลเซียส และในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 ถึง8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน ตามลำดับ ได้ผลการทดลองดังนี้

- พบปริมาณอะซาไดแรคทิน 0.25 , 0.23 , 0.20 , 0.19 , 0.18 , 0.16 , และ 0.15 กรัมเปอร์เซ็นต์ ที่ 0 , 2 , 4 , 6 , 8 , 10 และ 12 เดือน ตามลำดับ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- พบอะซาไดแรคทิน 0.25 , 0.20 , 0.16 , 0.15 , 0.13 , 0.11 และ 0.09 กรัมเปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเก็บสารสกัดไว้ที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
- เมื่อเก็บสารสกัดไว้ใน อุณหภูมิตู้เย็น 4-8 องศาเซลเซียส พบอะซาไดแรคทิน 0.25 , 0.25 , 0.24 , 0.24, 0.24 , 0.23 , และ0.22 กรัมเปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

จากการทดลองแสดงว่าสารอะซาไดแรคทินจะสลายตัวได้เร็วที่อุณหภูมิสูง การเก็บสารสกัดในตู้เย็นจะช่วยรักษาสารสกัดได้ดีที่สุด (ชัยพัฒน์ จิระธรรมจารี บงกชรัตน์ ปิติยนต์ และ อารมย์ แสงวนิชย์ ,2537)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย