บทที่ 2
วิธีการที่ใช้ในการศึกษา

2.1. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

- Electronic stirrer 2008 (Fisher scientific, USA)
- High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Shimadzu, Japan)
- Hot air oven (Memmert, Schwabach, Germany)
- Rheometer (Brookfield® Model DV-III, Brookfield Engineering Laboratories, USA)
- Stirrer (Model RCT – B, KIKA Labortechnik, Germany)
- Vortex Genie (Scientific Industries Inc., USA)
- ZetaPALS Particle sizing (Brookhaven Instruments Corporation, USA)

2.2. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

- Acetonitrile, HPLC grade (Lab-scan Analytical Sciences, Bangkok, Thailand)
- Anisaldehyde TS
- Caprylic/Capric Triglyceride (Lexol GT® 865) (Namsiang Co. Ltd., Bangkok, Thailand)
- Chloroform AR grade (Labscan, Ireland)
- Dragendorf TS
- Ethanol 95%, Commercial grade (Liquor Distillery Organization, Chachoengsao, Thailand)
- Ethylacetate AR grade (Labscan, Ireland)
- Hexane AR grade (Labscan, Ireland)
- Methanol AR grade (Labscan ,Ireland)
- Methanol, HPLC grade (Labscan Asia Co. Ltd., Bangkok, Thailand)
- Naringenin (Sigma-Aldrich, Germany)
- Orthophosporic acid 85% ,H_3PO_4 (Merck, Darmstadt, Germany)
- Quercetin (Sigma-Aldrich, Germany)
- Piperine, standard Batch no.01902TD (Aldrich, USA)
- Sarmentosine (ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.ธิติมา รุกขไชยศิริกุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง)
- Sodium dihydrogen orthophosphate 1-hydrate ($NaH_2PO_4.H_2O$) (BHD, England)

- Span 80 (Srichamd United Dispensary Co. Ltd., Bangkok, Thailand)
- TLC Silica gel 60 F_{254} , Aluminium sheet (Merck, Germany)
- Tween 80 (Srichamd United Dispensary Co. Ltd., Bangkok, Thailand)

2.3. วิธีการดำเนินการทดลอง

1). **การเตรียมสารสกัดช้าพลูและดีปลี**

1.1). **สารสกัดใบช้าพลู**

ตัวอย่างพืช

ใบช้าพลูได้มาจากเขาค้อทะเลภู จ. เพชรบูรณ์

วิธีการสกัดช้าพลู

นำใบช้าพลูแห้งที่ได้รับจากเขาค้อทะเลภูมาทำการอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นบดเป็นผงละเอียด ชั่งน้ำหนักก่อนสกัดแล้วหมักด้วย เอทานอลร้อยละ 95 เป็นเวลา 3 วัน นำส่วนใสที่กรองได้ไประเหยแห้งภายใต้ความดันที่อุณหภูมิไม่เกิน 55 องศาเซลเซียส จนได้สารสกัดเหนียวข้น หมักซ้ำอีกด้วยเอทานอล ร้อยละ 95 ซ้ำ 4 รอบ จนสีของน้ำใบช้าพลูจาง รวมสารสกัดที่ได้ทั้งหมดในขวดเดียวกัน หาปริมาณสารที่สกัดได้

1.2). **สารสกัดดีปลี**

ตัวอย่างพืช

ผลดีปลีแห้ง ได้มาจากคุณจรัญ จ. กาญจนบุรี

วิธีการสกัดดีปลี

นำผลดีปลีมาอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน จากนั้นบดเป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบด จากนั้นชั่งน้ำหนักดีปลีที่บดแล้วก่อนนำไปหมักในเอทานอลร้อยละ 95 ในโหลแก้ว เป็นเวลา 3 วัน จึงนำไปกรอง แล้วนำสารละลายส่วนใสที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส ได้สารสกัดที่มีลักษณะเหนียว นำกากดีปลีไปหมักซ้ำอีก 1 ครั้ง แล้วสกัดด้วยวิธีเดิม นำสารสกัดทั้งสองครั้งมารวมกัน หาปริมาณสารที่สกัดได้

2). **การควบคุมคุณภาพสารสกัดใบช้าพลู และดีปลี โดยวิธีการโครมาโทรกราฟฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง**

2.1). **การควบคุมคุณภาพสารสกัดใบช้าพลู**

ตัวบ่งชี้ *(Marker)*

Naringenin, quercetin และ sarmentosine

เครื่องมือ

High Pressure Liquid Chromatography, HPLC (Shimadzu, Japan) ประกอบด้วย

- Detector - SPD-20A UV-Vis detector
- Controller; Computer software Class LC10A (Shimadzu, Japan)
- Pump; Shimadzu LC-20AT Liquid Chromatography
- Autosampler; SIL-20A (Shimadzu Auto Inject)
- Column: Phenomenex Luna C 18 (5 μ, 150x4.60mm)
- Guard column; Phenomenex C 18

สภาวะการวิเคราะห์

- สารละลายของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) สำหรับวิเคราะห์

Naringenin ประกอบด้วย acetonitrile:water อัตราส่วน 40:60 ปรับให้เป็นกรดด้วย phosphoric acid 0.05%

Quercetin ประกอบด้วย 0.2 %formic acid ในน้ำ: acetonitrile อัตราส่วน 70:30

Sarmentosine ประกอบด้วย acetonitrile:water อัตราส่วน 45:55

- อัตราการไหล (Flow rate): 1 ml/min
- Injection volume: 20 μl
- ความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัดการดูดกลืนแสง

ความยาวคลื่น 288 nm สำหรับตรวจวัดปริมาณ naringenin และ sarmentosine

ความยาวคลื่น 360 nm สำหรับตรวจวัดปริมาณ quercetin

การเตรียมสารละลายของสารมาตรฐาน

ละลาย naringenin, quercetin และ sarmentosine ในเมทานอล เป็น stock solution ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาเตรียมสารละลายความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ mobile phase เจือจางโดยเตรียมใน Volumetric flask ได้ความเข้มข้นดังนี้ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองตัวอย่างด้วย Nylon filter ขนาด 0.45 μm (Chromtech, U.S.A.) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การเตรียมสารละลายของสารสกัดใบช้าพลู

ละลายสารสกัดใบช้าพลูด้วยเอทานอล ให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองตัวอย่างด้วย Nylon filter ขนาด 0.45 μm ทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.2). การควบคุมคุณภาพสารสกัดดีปลี

ตัวบ่งชี้ (Marker)

Piperine

เครื่องมือ

High Pressure Liquid Chromatography, HPLC (Shimadzu, Japan) ประกอบด้วย

- LC -20A pump
- SPD-M10A VP UV-Vis detector
- Controller; Computer software Class LC10A
- Rheodye Injector ที่มี loop ขนาด 20 µl
- Column: Phenomenex Luna C 18 (5 µ, 150x4.60mm)
- Guard column; Phenomenex C 18

สภาวะการวิเคราะห์

- สารละลายของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) สำหรับวิเคราะห์คือ Methanol:water อัตราส่วน 70:30
- อัตราการไหล (Flow rate): 1 มิลลิลิตรต่อนาที
- Injection volume: 20 ไมโครลิตร
- ความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัดการดูดกลืนแสง = 340 นาโนเมตร

การเตรียมสารละลายของสารดีปลี

ละลายสารสกัดดีปลีด้วย mobile phase กรองตัวอย่างด้วย Nylon filter ขนาด 0.45 µm ทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3). การควบคุมคุณภาพสารสกัดใบช้าพลูโดยวิธีการรงคเลขผิวบาง (Thin-layer chromatography)

เตรียมสารสกัดใบช้าพลูโดยละลายสารสกัดใบช้าพลูในเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมโดยใช้ vortex เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปใส่ใน ultrasonic bath 5 นาที เพื่อให้สารสกัดละลายหมด

Spot สารสกัดใบช้าพลู spot ละ 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น TLC (Aluminium sheet 10X3 cm., Silica gel 60 F_{254}) ให้จุดสารอยู่ห่างจากขอบแผ่น TLC ด้านล่าง 1 เซนติเมตร แล้วผึ่งให้แห้ง นำแผ่น TLC ใส่ในแท็งค์ซึ่งบรรจุสารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งตั้งไว้ให้อิ่มตัวเป็นเวลา 1 คืน ในการศึกษานี้ได้ทดลองใช้สารละลายเคลื่อนที่ 2 ประเภท คือ Chloroform 100 % และ Hexane ผสมกับ Ethylacetate ในอัตราส่วน 80:20 เมื่อจุดสารเคลื่อนที่สูงจากจุดเริ่มต้น 8.5 เซนติเมตร นำออกมาผึ่งให้แห้ง ตรวจวัดแผ่น TLC ด้วยตาเปล่า และด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร พ่น

แผ่น TLC ด้วย Anisaldehyde TS และ Dragendroff TS บันทึกภาพจุดสีบนแผ่น TLC และคำนวณค่า R_f

4). การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดใบช้าพลูและดีปลีต่อหนอนใยผักและหนอนกระทู้ผัก (Efficacy of Cha Plu Extracts on Diamondback Moth and Common Cutworm)

4.1). พืชอาหารสำหรับเลี้ยงแมลง

ทำการปลูกผักคะน้าในโรงเรือนตาข่าย โดยปลูกในแปลงขนาดเล็ก (รูปที่ 2-1) เพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงขยายปริมาณหนอนใยผักและหนอนกระทู้ผัก ทำการปลูกผักคะน้าอย่างต่อเนื่องเป็นระยะ ๆ เพื่อให้มีผักคะน้าเพียงพอต่อการใช้เลี้ยงหนอนทั้งสองชนิดได้อย่างเพียงพอตลอดเวลา

รูปที่ 2-1 โรงเรือนตาข่ายปลูกผักคะน้า (ก) และแปลงปลูกผักในโรงเรือน (ข)

4.2). การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณแมลง

ทำการเก็บรวบรวมหนอนใยผัก (รูปที่ 2-2ก) และหนอนกระทู้ผัก (รูปที่ 2-2ข) จากแปลงปลูกผักวงศ์กะหล่ำของเกษตรกรในเขต อ. แม่ริม และ อ. สารภี จ. เชียงใหม่ และนำมาเลี้ยงต่อในห้องปฏิบัติการของภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (รูปที่ 2-3) โดยเลี้ยงในกล่องพลาสติกสี่เหลี่ยมใสขนาดต่าง ๆ โดยให้ใบคะน้าเป็นอาหาร จนกระทั่งหนอนเข้าดักแด้ โดยรวบรวมดักแด้ของหนอนใยผักที่ใกล้ฟักไปไว้ในถ้วยพลาสติกขนาดเล็ก แล้วนำดักแด้ไปใส่ไว้ในกล่องพลาสติกเลี้ยงแมลงที่มีต้นคะน้าปักอยู่ในน้ำ เมื่อดักแด้ฟักออกเป็นผีเสื้อ ผีเสื้อเหล่านี้จะทำการผสมพันธุ์และวางไข่บนใบคะน้าและตามผนังกล่อง ให้น้ำผึ้งความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นอาหารของผีเสื้อ เมื่อผีเสื้อวางไข่ ทำการเปลี่ยนกล่องและต้นคะน้าทุกวัน เพื่อให้ได้ไข่ที่จะพัฒนาต่อไปเป็นตัวหนอนที่มีอายุเท่ากัน และอยู่ในวัยเดียวกัน (วัยที่ 3) สำหรับใช้ทดสอบประสิทธิภาพ

ของสารสกัดใบช้าพลูและดีปลี สำหรับดักแด้ของหนอนกระทู้ผักนำไปใส่ไว้ในกล่องพลาสติกขนาดเล็ก เพื่อนำไปใส่ไว้ในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 45x60x90 เซนติเมตร เพื่อรอการฟักออกเป็นผีเสื้อ ซึ่งจะทำการผสมพันธุ์และวางไข่ในกรงนี้ต่อไป ให้น้ำผึ้งความเข้มข้นร้อยละ 10 แก่ผีเสื้อ และนำกลุ่มต้นหญ้าที่ปักแช่น้ำอยู่ในภาชนะหรือต้นคะน้าที่ปลูกอยู่ในกระถาง ใส่ไว้ในกรงเพื่อให้ผีเสื้อใช้เป็นสถานที่วางไข่ด้วย เมื่อผีเสื้อเริ่มวางไข่ ทำการเก็บกลุ่มไข่ทุกวันเพื่อนำไปรอฟักเป็นตัวหนอนในกล่องพลาสติกต่อไป การดำเนินการกับหนอนใยผักและหนอนกระทู้ผักในลักษณะนี้หมุนเวียนกันไป จะทำให้ได้หนอนใยผักและหนอนกระทู้ผักวัย 3 สำหรับใช้ทดสอบกับสารสกัดใบช้าพลูและดีปลีได้ต่อเนื่องตลอดเวลา

นอกจากนี้ มีการดำเนินการเก็บรวบรวมหนอนทั้งสองชนิดจากแปลงเกษตรกรเพิ่มเติมทุก 2 สัปดาห์ และนำมาเลี้ยงจนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัย จึงปล่อยเข้าไปให้ผสมพันธุ์กับตัวเต็มวัยที่มีอยู่เดิมในห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้เพื่อไม่ให้หนอนที่เลี้ยงอยู่อ่อนแอลงเนื่องจากการผสมพันธุ์ในกลุ่มประชากรเดียวกันมากเกินไป

รูปที่ 2-2 ลักษณะของหนอนใยผัก (ก) และหนอนกระทู้ผัก (ข)

รูปที่ 2-3 สภาพการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณหนอนใยผักและหนอนกระทู้ผัก ในห้องปฏิบัติการ

4.3). **การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด**

4.3.1). การเตรียมตัวอย่างสารสกัดเพื่อการทดสอบ

ไมโครอิมัลชันเปล่า (วิธีการเตรียมตัวอย่างไมโครอิมัลชันเปล่า A, B, C จะกล่าวในส่วนต่อไปของรายงาน) การเตรียมตัวอย่างทำโดยผสมไมโครอิมัลชันเปล่า กับน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นของไมโครอิมัลชันในน้ำที่ร้อยละ 3 และ 5 โดยปริมาตร

ตัวอย่างสารสกัดใบช้าพลู และดีปลี ทำการเตรียมให้ได้ระดับความเข้มข้นร้อยละ 3 และ 5 เช่นกัน โดยใช้เอธิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 โดยปริมาตร เป็นตัวทำละลายก่อน แล้วจึงผสมน้ำกลั่นเพื่อให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 3 และ 5 ของปริมาณสารสกัดในน้ำ

ชุดควบคุม (Control) ใช้น้ำกลั่น

โดยตัวอย่างที่ใช้ทดสอบทุกตัวอย่างรวมทั้งชุดควบคุมจะผสมสารจับใบ ซี. ตอล เจอาร์ (C. Trol JR) ในอัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ลงไปผสมด้วย

4.3.2) การทดสอบกับหนอน

การทดสอบผลของสารสกัดใบช้าพลู สารสกัดดีปลี และไมโครอิมัลชันเปล่าที่มีต่อหนอนใยผักและหนอนกระทู้ผักในห้องปฏิบัติการ ได้ดำเนินการทดสอบความเป็นพิษ 2 วิธีการ คือ 1) ทดสอบพิษทางการกิน (Oral toxicity test) โดยการจุ่มใบพืช (leaf dipping) ในตัวอย่างที่เตรียมตามวิธีการข้างต้น ปล่อยให้ตัวอย่างแห้ง แล้วจึงนำมาให้หนอนกิน เพื่อเป็นการศึกษาฤทธิ์ทางการกิน (stomach poison) และ 2) ทดสอบพิษทางผิวหนัง (Dermal toxicity test) โดยการพ่นสารสกัดโดยตรง (direct spray) บนตัวหนอนด้วย air brush sprayer เพื่อเป็นการศึกษาฤทธิ์ทางสัมผัส (contact poison)

สารสกัดข้าพลู สารสกัดดีปลีและไมโครอิมัลชันเปล่าแต่ละความเข้มข้นหรือกรรมวิธี (Treatment) รวมทั้งกรรมวิธีเปรียบเทียบ (control) ที่ใช้ ดำเนินการ 3 ซ้ำ (replications) โดยแต่ละซ้ำใช้หนอนเพื่อการทดสอบจำนวน 10 ตัว ทำการบันทึกการตายของหนอนที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงภายหลังให้สารทดสอบกับหนอน

4.3.3) การวิเคราะห์ข้อมูล

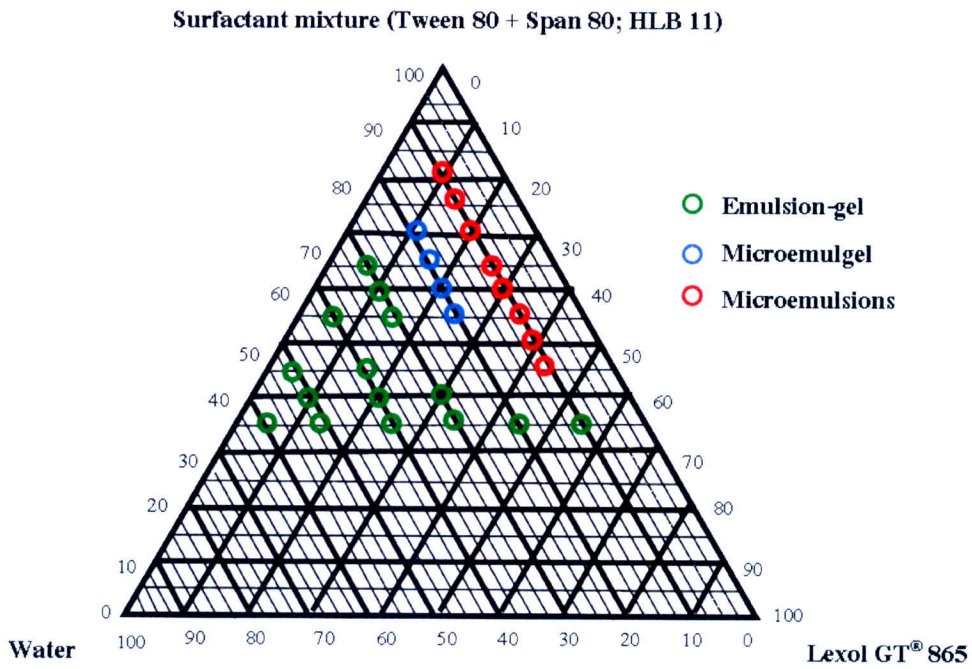
นำข้อมูลการตายของหนอนใยผักและหนอนกระทู้ผักที่ได้จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดข้าพลู สารสกัดดีปลี และไมโครอิมัลชันเปล่าในห้องปฏิบัติการมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละการตายของหนอนโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) โดยกำหนดความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

5). การเตรียมตำรับ

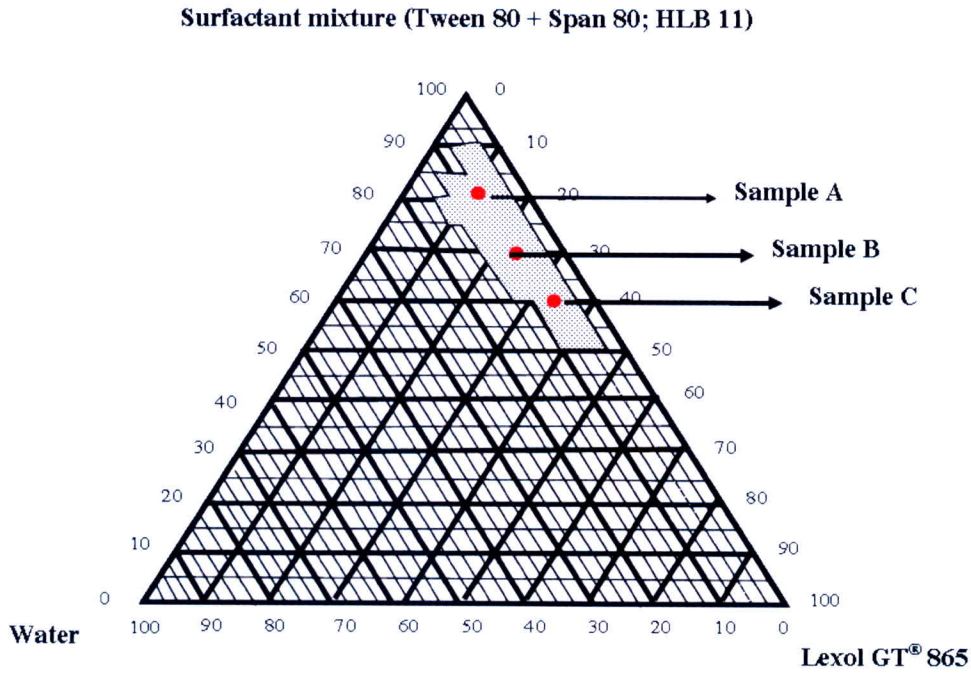
5.1). สร้างเฟสไดอะแกรมเพื่อหาส่วนประกอบของไมโครอิมัลชัน และคัดเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมขององค์ประกอบต่าง ๆ ที่จะทำให้เกิดไมโครอิมัลชัน เพื่อนำมาใช้ในการตั้งตำรับ

จากผลการศึกษาในโครงการก่อนหน้านี้ (โครงการ การเตรียมไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกไทยดำ และพริก สำหรับการป้องกันและการกำจัดศัตรูพืช (Preparation of microemulsions of black pepper and capsicum extract for plant pest control) โดยการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ปี พ.ศ. 2549 ชุดโครงการ "สมุนไพรเพื่อคุณภาพชีวิต") พบว่า ระบบที่ให้พื้นที่ที่เกิดไมโครอิมัลชันภายใต้ pseudoternary phase diagram กว้างที่สุด คือระบบที่ประกอบด้วย Lexol GT® 865 (caprylic/capric triglyceride) ซึ่งใช้สารลดแรงตึงผิว (surfactant) สารลดแรงตึงผิวร่วม (co-surfactant) คือ Tween 80 และ Span 80; HLB 11 (62.6 + 37.4) (รูปที่ 2-4)

จากบริเวณที่เกิดเป็นไมโครอิมัลชันบนเฟสไดอะแกรมที่สร้างขึ้น ทำการเลือกส่วนประกอบและอัตราส่วนที่เหมาะสมที่เตรียมเป็นไมโครอิมัลชันได้ 3 ตัวอย่าง (รูปที่ 2-5, ส่วนประกอบแสดงในตารางที่ 2-1)



รูปที่ 2-4 ภาพแสดง pseudoternary phase diagram ของระบบ Lexol GT® 865/Tween80+Span80 (HLB 11)/Water



รูปที่ 2-5 ภาพแสดงพื้นที่ของการเกิดไมโครอิมัลชันใน pseudoternary phase diagram of Lexol GT® 865 /Tween80+Span80 (HLB 11)/Water ตัวอย่าง A, B และ C ได้ถูกคัดเลือกมาทำการศึกษา

ตารางที่ 2-1 ส่วนประกอบของไมโครอิมัลชัน A, B และ C

ตัวอย่างไมโครอิมัลชัน	น้ำมัน Caprylic/capric triglyceride (กรัม)	สารลดแรงตึงผิว (Tween 80 + Span 80; สัดส่วน 62.6+37.4) (กรัม)	น้ำกลั่น (กรัม)
ตัวอย่าง A	12.5	80	7.5
ตัวอย่าง B	22.5	70	7.5
ตัวอย่าง C	32.5	60	7.5

5.2) หาความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่สามารถละลายได้และมีความคงตัวดีในไมโครอิมัลชัน

นำสารสกัดช้าพลู และดีปลีมาละลายในไมโครอิมัลชันให้มีความเข้มข้นร้อยละ 1-15 โดยน้ำหนัก จากนั้นสังเกตการละลาย โดยหากไม่พบตะกอนหลังการละลายสารสกัด แสดงว่าละลายได้หมด แต่หากมีตะกอนเกิดขึ้นแสดงว่าสารสกัดไม่สามารถละลายในไมโครอิมัลชันได้หมด จากนั้นนำไปประเมินตามข้อ 5.3

5.3). การประเมินไมโครอิมัลชัน

คัดเลือกตัวอย่างจากข้อ 5.2 มาทำการประเมินดังนี้

5.3.1) ขนาดอนุภาคของวัตภาคภายในของไมโครอิมัลชัน โดยเครื่องวัดขนาดอนุภาค ZetaPALS Particle Sizing (Brookhaven Instruments Corporation, USA) ค่าดัชนีหักเหสำหรับใช้ในการวัดขนาดอนุภาคหาโดย Refractometer (RX 500, Atago, Japan)

5.3.2) ความหนืดโดยเครื่องวัดความหนืด Brookfield รุ่น DV-III, spindles CP40

5.3.3) จุดขุ่น (Cloud point) หรืออุณหภูมิที่ทำให้ไมโครอิมัลชันขุ่น โดยให้ความร้อนแก่ไมโครอิมัลชัน จาก 5 องศาเซลเซียส ถึง 90 องศาเซลเซียส และบันทึกอุณหภูมิที่ไมโครอิมัลชันเริ่มเปลี่ยนจากสภาวะใสเป็นขุ่น

6). การศึกษาความคงตัวทางกายภาพของตำรับโดยสภาวะอุณหภูมิสลับ (Freeze-thaw test)

คัดเลือกสูตรตำรับที่สามารถละลายสารสกัดได้ในปริมาณสูงสุดจากการทดลองในข้อ 5.2 มาทำการทดสอบความคงตัวทางกายภาพ โดยทำการทดสอบที่อุณหภูมิสลับ สภาวะที่ทำการทดสอบ คือ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถือเป็น 1 รอบ (cycle) ทำการทดสอบทั้งหมด 7 cycles ลักษณะทางกายภาพของไมโครอิมัลชันที่คงตัว คือไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสี ความขุ่น-ความใส ไม่เกิดการแยกชั้น และไม่เกิดการตกตะกอนของสารสกัดเปรียบเทียบกับก่อนการทดสอบ

7). การทดสอบประสิทธิภาพของตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดต่อหนอนใยผักและหนอนกระทู้ผัก

7.1). การเตรียมตัวอย่างเพื่อการทดสอบ

ตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดใบช้าพลู และดีปลี ทำการเตรียมให้ได้ระดับความเข้มข้นร้อยละ 3 และ 5 โดยการผสมตำรับไมโครอิมัลชันของสารสกัดกับน้ำกลั่นเพื่อให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 3 และ 5 ของปริมาณตำรับในน้ำ

ชุดควบคุม (Control) ใช้น้ำกลั่น

โดยตัวอย่างที่ใช้ทดสอบทุกตัวอย่างรวมทั้งชุดควบคุมจะผสมสารจับใบ ซี. ตอล เจอาร์ (C. Trol JR) ในอัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ลงไปผสมด้วย

7.2) **การทดสอบกับหนอน**

ทำเช่นเดียวกับข้อ 4.3.2

7.3) **การวิเคราะห์ข้อมูล**

ทำเช่นเดียวกับข้อ 4.3.3

8) **การศึกษาความคงตัวทางกายภาพและเคมีของตำรับที่เตรียมขึ้นในภาวะเร่ง**

นำตำรับไมโครอิมัลชันที่ผสมสารสกัดมาทดสอบความคงตัวทางกายภาพและเคมีโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และ อุณหภูมิ 45 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 $\pm$ 5 เป็นเวลานาน 6 เดือน และสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของตำรับ และวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญที่ 0, 1, 3 และ 6 เดือน ตามลำดับ