

การพัฒนาวิธีการสกัดสารซาโปนินจากเปลือกเงาะและการทดสอบประสิทธิภาพ ของสารซาโปนิน

Development on Saponin Extraction from Rambutan Peel and the Efficacy Test of Saponin

อภิรดี กอรรพ์ไพบูลย์^{1/} อรวินทิณี ชูศรี^{1/} ศิริพร เต็งรัง^{2/}
Apiradee Korpphaiboon^{1/} Orwintinee Chusri^{1/} Siriporn Tengrang^{2/}

ABSTRACT

Development on saponin extraction from rambutan peel and its efficacy test was carried out aiming to gain the most effective technique for this. Hence, agricultural waste as such rambutan peel can be utilized. The research was conducted at Chanthaburi Horticultural Research Center during September 2011 to October 2014. It was included testing and verifying of extraction techniques, identification and quantification of saponin, and efficacy test of saponin. Two extraction techniques, soaked and reflux extraction, using 3 solvents, 70% ethanol, 70% methanol and distilled water, were compared. The crude extract of which rambutan peel obtained from reflux technique compared with soaked extraction technique for nine days showed that higher the extract dry weight 44% and 33% for only nine hours. The extracts were identified as triterpene and steroid saponin by FTIR. Spectrophotometer was used to quantify the amount of saponin which the reflux extraction using 70% methanol yielded the highest saponin (422.05 mg/g). Therefore, it is the most effective extraction technique as it yielded more amount of saponin than distilled water and 70% ethanol reflux methods, 23% and 14% respectively. Efficacy test indicated that applied saponin solution at 2,000 and 4,000 mg/L to channeled apple snail (*Pomacea canaliculata*) could effectively kill the snail within 12 h. Moreover, when mixed saponin with PDA at 2,000 mg/L, it could effectively inhibited growth of the 3 fungal pathogen, *Phytophthora palmivora*, *Colletotrichum* spp. and *Marasmius palmivorus* Sharples, compared to control.

Key words : crude extraction methods, crude saponin, pest control, *Pomacea canaliculata*, fungal plant pathogens.

^{1/} ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี กรมวิชาการเกษตร

Chanthaburi Horticultural Research Center, Department of Agriculture

^{2/} กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร

Postharvest and Processing Research and Development Division, Department of Agriculture

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีการสกัดสารซาโปนินที่มีอยู่ในเปลือกเงาะ วิเคราะห์ชนิด และปริมาณของซาโปนินที่สกัดได้ และการทดสอบประสิทธิภาพของสารซาโปนินในการควบคุมศัตรูพืช ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยพืชสวน จันทบุรี ระหว่างเดือนกันยายน พ.ศ. 2554 – ตุลาคม พ.ศ. 2557 ทดลองวิธีการสกัดแบบแช่และแบบกลั่น reflux โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล 70% เมทานอล 70% และน้ำกลั่น พบว่า การสกัดแบบกลั่น reflux โดยใช้ เอทานอล 70% และเมทานอล 70% มีน้ำหนักแห้งของสารสกัดหายาสสูง 44% และ 33% ใช้ระยะเวลาเพียง 9 ชม. การวิเคราะห์สารสกัดด้วย FTIR พบว่า สารที่ได้คือ ไตรเทอร์ปีน และสเตียรอยด์ซาโปนิน เมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณซาโปนินโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ พบว่า สารซาโปนิน ที่ได้จากการสกัดแบบกลั่น reflux ด้วยเมทานอล 70% มีปริมาณสูงที่สุด (422.05 มก./ก.) สูงกว่าวิธีการสกัดแบบกลั่น reflux ด้วยน้ำกลั่น และเอทานอล 70% ถึง 23 % และ 14% การทดสอบประสิทธิภาพของสารซาโปนินในการควบคุมศัตรูพืช พบว่า การใช้สารสกัดหายาซาโปนินที่ระเหยตัวทำละลายออกหมดแล้วผสมกับน้ำกลั่น ที่ความเข้มข้น 2,000 และ 4,000 มก./ล. ทำให้หอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata*) ตายภายใน 12 ชม. และที่ระดับความเข้มข้น 2,000 มก./ล. สามารถยับยั้งการเจริญของโคโรนารีเชียรา *Phytophthora palmivora*,

Colletotrichum spp. และ *Marasmius palmivorus* Sharples. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารสกัดหายาซาโปนินได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

คำหลัก : วิธีการสกัดหายา สารสกัดหายาซาโปนิน ควบคุมศัตรูพืช หอยเชอรี่ เชื้อราโรคพืช

คำนำ

ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกเงาะที่ให้ผลผลิตแล้ว ในปี พ.ศ. 2555 เป็นพื้นที่ 314,698 ไร่ ได้ผลผลิตรวม 335,745 ตัน จำหน่ายเป็นเงาะผลสด 11,241,822 กก. เงาะในน้ำเชื่อม 5,986,429 กก. (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556) พื้นที่ปลูกส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออกและภาคใต้ พันธุ์ที่นิยมปลูก ได้แก่ พันธุ์โรงเรียน พันธุ์สีทอง และ พันธุ์สีชมพู เป็นต้น นอกจากบริโภคสดแล้ว เงาะส่วนใหญ่ถูกนำมาแปรรูปในระดับอุตสาหกรรมเป็นเงาะบรรจุกระป๋อง การแปรรูปดังกล่าวทำให้มีเปลือกเงาะเป็นวัสดุเหลือใช้ที่ต้องกำจัดทิ้งเป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงควรนำมาใช้ประโยชน์และสร้างมูลค่าเพิ่ม โดยการสกัดสารซาโปนิน (saponin) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่มีอยู่ในเปลือกเงาะ เชิดศักดิ์และธนพัฒน์ (2544) ได้ทดสอบเบื้องต้นโดยนำเปลือกเงาะขยี้ในน้ำและเขย่า จะเกิดฟอง และเมื่อเติมกรด ฟองยังคงอยู่ จึงเป็นการบ่งชี้ว่ามีสารสำคัญในเปลือกเงาะจริง

ซาโปนิน มีมวลโมเลกุลสูง เป็นสารกลุ่มไกลโคไซด์ ประกอบด้วย อะไกลโคน จับกับ

น้ำตาล หรืออนุพันธ์ของน้ำตาลซึ่งเรียกว่า ไกลโคพาท ผ่านไกลโคไซด์ดิกลบอนด์ อะไกลโคน เป็นส่วนที่ไม่ใช่ น้ำตาล เป็นกลุ่มสารที่มีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน ดังนั้นฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจึงหลากหลาย ส่วนที่เป็นน้ำตาลช่วยให้การละลายและการดูดซึมเข้าสู่ร่างกายดีขึ้น คุณสมบัติของซาโปนินแตกต่างกันตามกลุ่มของพืช เรียกตามโครงสร้างโมเลกุลที่ไม่มีส่วนประกอบของน้ำตาล หรือเรียก จินิน (genin) หรือสโปจินิน (sapogenin) แบ่งตามกลุ่มของจินิน ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ ไตรเทอร์ปิน (triterpene) สเตียรอยด์ (steroid) และสเตียรอยด์ อัลคาลอยด์ (steroid alkaloid) (Hostettmann and Marston, 1995)

ในการสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) ตัวทำละลาย ต้องแยกออกจากสารที่ต้องการสกัดได้ง่าย มีจุดเดือดต่ำ ระเหยง่าย ไม่เป็นพิษ และราคาถูก ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้กันมากในเคมีอินทรีย์ โดยใช้สมบัติการทำละลายของสารต่างกันในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ สัมพันธ์ (2557) สกัดสารโพลีฟีนอลจากใบผักโขม ด้วยวิธีการสกัดแบบกลั่น reflux (reflux extraction) ด้วยเอทานอล 70% โดยให้ความร้อนแก่ตัวอย่างเพื่อให้ไอสารละลายควบแน่น แล้วย่นกลับลงมาใหม่ สารผสมที่นำมาสกัดเป็นสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ การสกัดสารจากของแข็ง สกัดโดยทำให้ของแข็งแห้ง บดละเอียด แช่ในตัวทำละลาย เช่น เฮกเซน อีเธอร์ แอลกอฮอล์ น้ำ เป็นต้น ได้สารสกัดหยาบ (crude extract)

นำมาแยกต่อให้ได้สารบริสุทธิ์เพื่อหาโครงสร้าง

ซาโปนินเป็นพิษรุนแรงในสัตว์เลือดเย็น เช่น ปลา กุ้ง และหอย มีผลต่อศูนย์ประสาทควบคุมการหายใจ ทำให้ขาดออกซิเจนและเม็ดเลือดแดงสลายตัว ญัฐวีและคณะ (2550) รายงานว่า ในทางการเกษตร ใช้สารซาโปนินกำจัดหอยเชอรี่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ส่วนใหญ่สารซาโปนินจะนำเข้าจากประเทศจีนเป็นซาโปนินที่ได้จากการทึบน้ำมันออกจากเมล็ดของชาชื่อว่า *Camellia oleifera* abel มีสารซาโปนิน (tea saponin) 11-18 % ประกอบด้วยสารประกอบไกลโคไซด์ จับกับไกลคูโรนิก เอซิด อะราบิโนส ไชโรส และกาแลคโตส เป็นซาโปนินในกลุ่มไตรเทอร์ปิน (He *et al.*, 2010). นอกจากนี้ มีรายงานว่า ซาโปนินมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา สัมฤทธิ์ (2547) พบว่า ซาโปนินจากพริก ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคในสตรอเบอรี่ เช่น *Collectotrichum* sp. และ *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคผลเน่าและโรคใบจุด โดยแทรกไปตามรูเล็ก ๆ บนเซลล์เมมเบรนของเชื้อรา ทำให้เซลล์แตก และสามารถกำจัดเชื้อรา *Aspergillus flavus* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคหลังการเก็บเกี่ยวได้ ร้อยละ 95

เชิดศักดิ์และธนพัฒน์ (2544) รายงานว่า เมื่อนำเปลือกเงาะมาสกัดสารซาโปนิน และทดสอบโดยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบางเปรียบเทียบกับสารซาโปนินมาตรฐาน พบว่าเป็นสารซาโปนินกลุ่มไตรเทอร์พีนนอยด์ ซาโปนิน และสเตียรอยด์ ซาโปนิน แต่ยังไม่ทราบสูตรโครงสร้าง และปริมาณของซาโปนินที่สกัดได้

การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาวิธีการสกัดสารซาโปนินที่มีประสิทธิภาพ วิเคราะห์ชนิด และปริมาณสารซาโปนินจากเปลือกเงาะ และทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมศัตรูพืช เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในทางการเกษตร

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาวิธีการสกัดแยกสารซาโปนินจากเปลือกเงาะ

1.1 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสม ให้ได้สารสกัดหยาบปริมาณมาก

เตรียมตัวอย่าง เปลือกเงาะพันธุ์โรงเรียนจาก จ. จันทบุรี ระยะเก็บเกี่ยว จำนวน 5 กก. ล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นขนาด 0.5 ซม. อบที่ 50-60 °ซ ด้วยตู้อบลมร้อนจนน้ำหนักแห้งคงที่ บดให้ละเอียดเพื่อสกัดสารตามกรรมวิธี

การสกัดแบบแช่

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 3 ซ้ำ 4 กรรมวิธี กรรมวิธีที่ 1 ใช้ 70% ethanol เป็นตัวทำละลาย แช่ครั้งละ 3 วัน 3 ครั้ง รวม 9 วัน เป็นกรรมวิธีควบคุม (เชิดศักดิ์และธนพัฒน์, 2544) กรรมวิธีที่ 2 ใช้ 70% ethanol เป็นตัวทำละลาย แช่ครั้งละ 1 วัน 3 ครั้ง รวม 3 วัน กรรมวิธีที่ 3 ใช้ 70% ethanol เป็นตัวทำละลาย แช่ครั้งละ 2 วัน 3 ครั้ง รวม 6 วัน

กรรมวิธีที่ 4 ใช้ 70% ethanol เป็นตัวทำละลาย แช่ครั้งละ 4 วัน 3 ครั้ง รวม 12 วัน

ซึ่งเปลือกเงาะแห้งบดละเอียด กรรมวิธีละ 10 ก. แช่ด้วย 70% ethanol ปริมาตร 100 มล. กรรมวิธีที่ 1 (กรรมวิธีควบคุม) แช่ครั้งละ 3 วัน 3 ครั้ง การแช่ทำโดย เติม 70% ethanol เขย่าวันละ 2 ครั้ง นานครั้งละ 10 นาที เมื่อครบ 3 วัน กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ระเหยตัวทำละลายออก ด้วย rotary vacuum evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °ซ ระเหยน้ำออกด้วยตู้อบลมร้อนที่ 50-60 °ซ จนแห้ง ซึ่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ ส่วนเปลือกเงาะที่ผ่านการแช่และกรองเอาสารสกัดออกไปแล้วเติมสารละลาย 70% ethanol เพื่อแช่ครั้งที่ 2 ต่อไป แช่จนครบ 3 ครั้ง ทุกครั้งระเหยตัวทำละลายออกจากสารสกัดและชั่งน้ำหนักเช่นเดียวกับครั้งที่ 1 ในกรรมวิธีที่ 2-4 ทำเช่นเดียวกับกรรมวิธีที่ 1 แต่เปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการแช่เป็นครั้งละ 1 2 และ 4 วัน ตามลำดับ

สกัดโดยวิธีการกลั่นแบบ reflux

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 3 ซ้ำ 5 กรรมวิธี กรรมวิธีที่ 1 สกัดแบบกลั่น reflux ใช้ 70% ethanol เป็นตัวทำละลายกลั่นครั้งละ 1 ชม. 3 ครั้ง รวม 3 ชม. กรรมวิธีที่ 2 สกัดแบบกลั่น reflux ใช้ 70% ethanol เป็นตัวทำละลายกลั่นครั้งละ 2 ชม. 3 ครั้ง รวม 6 ชม. กรรมวิธีที่ 3 สกัดแบบกลั่น reflux ใช้ 70%

ethanol เป็นตัวทำละลายกลั่น
ครั้งละ 3 ซม. 3 ครั้ง รวม 9 ซม.
กรรมวิธีที่ 4 สกัดแบบกลั่น reflux ใช้ 70%
ethanol เป็นตัวทำละลายกลั่น
ครั้งละ 4 ซม. 3 ครั้ง รวม 12 ซม.
กรรมวิธีที่ 5 สกัดแบบกลั่น reflux ใช้ 70%
ethanol เป็นตัวทำละลายกลั่น
ครั้งละ 5 ซม. 3 ครั้ง รวม 15 ซม.

การสกัดแบบกลั่น reflux ด้วย 70%
ethanol ปริมาตร 100 มล. กรรมวิธีที่ 1 กลั่น
ครั้งละ 1 ซม. 3 ครั้ง การกลั่นทำโดยเติม
70% ethanol กลั่นจนครบ 1 ซม. กรองด้วย
กระดาษกรองเบอร์ 1 ระเหยตัวทำละลายออก
ด้วย rotary vacuum evaporator ที่อุณหภูมิ
40 °C ระเหยน้ำออกด้วยตุ๋นลมร้อนที่ 50-60 °C
จนแห้ง ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ ส่วน
เปลือกเงาะที่ผ่านการกลั่น และกรองเอาสาร
สกัดออกไปแล้วเติมสารละลาย 70% ethanol
เพื่อกลั่นครั้งที่ 2 ต่อไป กลั่นจนครบ 3 ครั้ง
ทุกครั้งระเหยตัวทำละลายออกจากสารสกัดและ
ชั่งน้ำหนักเช่นเดียวกับครั้งที่ 1 ในกรรมวิธีที่ 2-5
ทำเช่นเดียวกับกรรมวิธีที่ 1 แต่เพิ่มระยะเวลา
ในการกลั่นแต่ละครั้ง เป็น 2, 3 และ 5 ซม.
ตามลำดับ

1.2 การศึกษาวิธีการสกัดแยกสาร ซาโปนิน และการทดสอบคุณสมบัติของสาร ซาโปนิน

การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่าง นำเปลือกเงาะพันธุ์
โรงเรียนจาก จ.จันทบุรี ระยะเวลาเก็บเกี่ยว 5 กก.

ล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นขนาด 0.5 ซม. อบที่
50-60 °C ด้วยตุ๋นลมร้อนจนน้ำหนักแห้งคงที่
บดละเอียด แบ่งเปลือกเงาะบดแห้งออกเป็น
6 ส่วน ๆ ละ 100 ก. เพื่อสกัดสารตามกรรมวิธี

วางแผนการทดลองแบบ Completely

Randomized Design มี 3 ซ้ำ 6 กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 สกัดแบบแช่ โดยใช้ 70% ethanol

เป็นตัวทำละลาย เป็นกรรมวิธีควบคุม

กรรมวิธีที่ 2 สกัดแบบกลั่น reflux โดยใช้ 70%

ethanol เป็นตัวทำละลาย

กรรมวิธีที่ 3 สกัดแบบแช่ โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัว

ทำละลาย

กรรมวิธีที่ 4 สกัดแบบกลั่น reflux โดยใช้น้ำกลั่น

เป็นตัวทำละลาย

กรรมวิธีที่ 5 สกัดแบบแช่ โดยใช้ 70% methanol

เป็นตัวทำละลาย

กรรมวิธีที่ 6 สกัดแบบกลั่น reflux โดยใช้ 70%

methanol เป็นตัวทำละลาย

โดยกรรมวิธีที่ 2-6 ได้จากการเลือก

สภาวะในการสกัดจากการทดสอบเบื้องต้นมาใช้

ในกรรมวิธีนี้ โดยเปลี่ยนตัวทำละลายเป็น

distilled water และ Methanol

สกัดโดยวิธีการแช่ (กรรมวิธีที่ 1, 3

และ 5) แช่เปลือกเงาะแห้งด้วยสารละลาย

70% ethanol distilled water และ 70%

methanol ปริมาตร 1,000 มล. เขย่าวันละ 2 ครั้ง

นาน 10 นาที เป็นเวลา 3 วัน

สกัดโดยวิธีการกลั่นแบบ reflux

(กรรมวิธีที่ 2, 4 และ 6) กลั่น reflux ด้วย

สารละลาย 70% ethanol, น้ำกลั่น และ 70%

methanol ปริมาตร 1,000 มล. เป็นเวลา 3 ชม.

นำสารละลายที่ได้จากแต่ละกรรมวิธีมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 สกัดซ้ำ 3 ครั้ง ระเหยตัวทำละลายออก ด้วย rotary vacuum evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °ซ ระเหยน้ำออก ด้วยตุ๋นลมร้อนที่อุณหภูมิ 50-60 °ซ จนแห้ง ซึ่งนำหน้าสารสกัดหยาบที่ได้

1.3 การทำให้สารซาโปนินบริสุทธิ์ (purification of saponin) เพื่อศึกษาชนิดของซาโปนิน นำสารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะ ทุกกรรมวิธีมาสกัดต่อด้วย diethyl ether เก็บชั้น ether ไว้ นำชั้นน้ำสกัดต่อด้วย n-butanol ที่อิ่มตัวด้วยน้ำ เก็บชั้น n-butanol และชั้นน้ำไว้ ระเหยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดออกด้วย rotary vacuum evaporator แล้วนำมาทดสอบชนิดของซาโปนินต่อไป

1.4 การทดสอบคุณสมบัติของซาโปนิน

ทดสอบการเกิดฟอง (froth test) นำสารซาโปนินที่สกัดได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับสาร saponin และ digitonin มาตรฐานโดยชั่งสารสกัด 100 มก. ชั่ง saponin และ digitonin มาตรฐานชนิดละ 100 มก. ผสมน้ำร้อน 10 มล. ทิ้งไว้ให้เย็น เขย่าแรง ๆ 10 วินาที กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 6 นำสารละลายที่กรองได้มา 1 มล. ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มล. เขย่าแรง ๆ ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที สังเกตลักษณะการเกิดฟอง และความสูงของฟอง

ทดสอบชนิดของซาโปนินโดยวิธี Liebermann-Burchard test นำสารซาโปนิน

ที่สกัดได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับ saponin และ digitonin มาตรฐาน โดยชั่งสารสกัด 100 มก. ชั่ง saponin และ digitonin ชนิดละ 100 มก. เติมน้ำ 70% ethanol 5 มล. เติมน้ำ sulfuric acid 0.2 M 10 มล. ต้มให้เดือด 15 นาที ใส่กรวยแยก เติมน้ำ chloroform 15 มล. เก็บชั้น chloroform ไว้ เติมน้ำ sodium sulfate จนสารละลายใส เติมน้ำ acetic acid 1 มล. และ sulfuric acid (conc.) 2 มล. สังเกตสีเปรียบเทียบกับสีของ digitonin ซึ่งเป็น triterpene saponin (ไตรเทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน) ให้สีม่วงแดง และ saponin ซึ่งเป็น steroid saponin (สเตียรอยด์ ซาโปนิน) ให้สีเขียว

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดซาโปนินจากเปลือกเงาะ (Quantitative analysis of saponin)

2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสารซาโปนินด้วยเทคนิค FTIR นำสารซาโปนินที่สกัดได้ วัดด้วยเครื่อง FTIR เปรียบเทียบกับ saponin (composition 8-25%) และ digitonin (50 % TLC) มาตรฐาน (บริษัท Sigma)

2.2 วิเคราะห์หาปริมาณสารซาโปนินด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Madland, 2013)

การเตรียมสารสกัด นำวิธีการสกัดที่ให้สารสกัดหยาบปริมาณมากที่สุด 3 กรรมวิธี จากการทดลองที่ 1 มาทำการสกัดใหม่ ซึ่งนำหน้าสารสกัดหยาบที่ได้ (total saponin) วิเคราะห์หาปริมาณซาโปนินรวม เปรียบเทียบกับ saponin และ digitonin มาตรฐานมีขั้นตอนดังนี้

การเตรียมสารมาตรฐาน และการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยเปิด saponin และ digitonin ความเข้มข้น 30,000 ไมโครกรัม/มล. ปริมาตร 0, 1, 2, 10, 20, 30 และ 40 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในทุกความเข้มข้น นำไปวิเคราะห์หาปริมาณซาโปนิน โดยเติม 5% vanillin 0.2 มล. เติม perchloric 0.8 มล. เขย่า จากนั้นต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 70 °ซ นาน 15 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็ง 30 วินาที เติม acetic acid 5 มล. เขย่า ดังนั้นทุกความเข้มข้นมีปริมาตรสุดท้าย 6.05 มล. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (Absorbance 550 nm) นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้สร้างกราฟมาตรฐาน ให้ได้สมการเส้นตรงเพื่อหาค่าความชัน ใช้คำนวณปริมาณสารซาโปนินรวมต่อไป

ความเข้มข้นของสารซาโปนินในสารสกัดหยาบ (a) =

การเตรียมสารสกัดหยาบซาโปนิน และการวิเคราะห์หาปริมาณซาโปนินรวม โดยนำสารสกัดหยาบทั้งหมดละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตรเป็น 100 มล. นำมาเจือจาง 100, 500 และ 1,000 เท่า ด้วยน้ำกลั่น สกัดต่อด้วย n-butanol ที่อิ่มตัวด้วยน้ำ เก็บชั้น n-butanol ระเหย n-butanol ออก ชั่ง 0.1 ก. ปริมาตรเป็น 10 มล. นำตัวอย่างมา 50 ไมโครลิตร วิเคราะห์หาปริมาณซาโปนิน เช่นเดียวกับการสร้างกราฟมาตรฐาน

การคำนวณปริมาณสาร

หาความเข้มข้นของซาโปนินในหลอดทดลอง (X) จากสมการเส้นตรง ที่ได้จากการหากราฟมาตรฐาน จะได้ $y = \text{ค่าความชัน} X$ (เมื่อ X คือ ความเข้มข้นของซาโปนินในหลอดทดลอง และ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้)

$$\text{ปริมาณสารสกัดเริ่มต้น} = \frac{X \times \text{ปริมาตรสุดท้าย}}{\text{dilution factor}}$$

3. การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะในการควบคุมศัตรูพืช

3.1 ควบคุมหอยเชอร์รี่

นำหอยเชอร์รี่ที่เก็บได้จากนาข้าวมาทดลองแช่ในน้ำผสมสารซาโปนินความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 12 ชม. โดยใช้สารสกัดหยาบ (จากเปลือกเงาะที่ใช้ 70% ethanol สกัดแบบกลั่น reflux) ตามกรรมวิธี วางแผน การทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 4 กรรมวิธี 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ตัว

กรรมวิธีที่ 1 น้ำกลั่น เป็นกรรมวิธีควบคุม

กรรมวิธีที่ 2 น้ำกลั่นผสมสารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะความเข้มข้น 20 ก./น้ำ 20 ล. (1,000 มก./ล.)

กรรมวิธีที่ 3 น้ำกลั่นผสมสารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะความเข้มข้น 40 ก./น้ำ 20 ล. (2,000 มก./ล.)

กรรมวิธีที่ 4 น้ำกลั่นผสมสารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะความเข้มข้น 80 ก./น้ำ 20 ล. (4,000 มก./ล.)

3.2 การควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช

ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora palmivora* จากทุเรียน *Colletotrichum* spp. จากมะละกอ และเชื้อ *Marasmius palmivorus* Sharples. จากผลสละ โดยใช้สารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะที่สกัด แบบกลั่น reflux โดยใช้ 70% ethanol ในห้องปฏิบัติการ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 3 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ๆ ละ 3 plates

กรรมวิธีที่ 1 อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ไม่ผสมสารสกัดหยาบ เป็นกรรมวิธีควบคุม

กรรมวิธีที่ 2 อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะความเข้มข้น 1,000 มก./ล.

กรรมวิธีที่ 3 อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะความเข้มข้น 2,000 มก./ล.

นำชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรค แยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting บน PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3-5 วัน เพิ่มปริมาณเชื้อโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. เจาะขอบโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรค แต่ละชนิดนำไปวางบนอาหาร PDA บ่มในที่มืด 3-5 วัน ทำการทดลองตามกรรมวิธี โดยใช้ cork borer เจาะขอบโคโลนีของเชื้อราแต่ละชนิดนำไปวางบนอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะความเข้มข้นตามกรรมวิธี บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัดขนาดโคโลนีของเชื้อแต่ละชนิดในแต่ละ

กรรมวิธี เมื่อเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. วิธีการสกัดแยกสารซาโปนินจากเปลือกเงาะ

1.1 ระยะเวลาที่เหมาะสม เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบปริมาณมาก

การสกัดสารซาโปนิน ด้วยตัวทำละลาย 70% ethanol แบบแช่ และแบบกลั่น reflux พบว่า การสกัดแบบกลั่น reflux 3 ครั้งจะได้น้ำหนักแห้งสารสกัดหยาบ (1.20 ก.) มากกว่าการสกัดแบบแช่ (1.04 ก.) และลดเวลาการสกัดจาก 9 วัน เหลือเพียง 9 ชม. (Table 1, 2)

1.2 วิธีการสกัดแยกสารซาโปนิน และการทดสอบคุณสมบัติของสารซาโปนิน

การสกัดแบบกลั่น reflux โดยใช้ ethanol 70% สามารถสกัดสารซาโปนิน ได้น้ำหนักแห้งสารสกัดหยาบมากที่สุด (51.63 ก.) รองลงมาคือ 70% methanol สกัดแบบกลั่น reflux (47.74 ก.) ส่วนการสกัดแบบแช่โดยใช้น้ำกลั่น สกัด ได้ปริมาณสารน้อยที่สุด คือ 35.89 ก. (Table 3) และพบว่า การสกัดแบบแช่ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ใช้เวลา 9 วัน ขณะที่การสกัดแบบกลั่น reflux ใช้เวลาเพียง 9 ชม. จากนั้นนำสารสกัดหยาบจากทุกกรรมวิธี มาทำให้สารซาโปนินบริสุทธิ์ขึ้น พบว่า ทุกกรรมวิธีสารสกัดในชั้น diethyl ether เป็นผงสีเหลือง มีปริมาณน้อยประมาณ 0.1 ก. ไม่สามารถทำการทดลองต่อได้ ในชั้น n-butanol และชั้นน้ำ สารมีลักษณะหนืดสีน้ำตาลเข้ม

Table 1 Dry weight of the dried rambutan's peel crude extract when extracted with 70% ethanol soak with various times

treatment	Extract dry weight (g)				
	1 ^{1/}	2	3	4	average
70% ethanol soak 1 day, 3 times	0.82 a ^{2/}	0.36 c	0.05 c	0.01 b	0.31 d
70% ethanol soak 2 days, 3 times	1.18 c	0.50 b	0.19 b	0.02 b	0.47 c
70% ethanol soak 3 days, 3 times	2.47 b	1.15 a	0.46 a	0.07 a	1.04 b
70% ethanol soak 4 days, 3 times	2.56 a	1.15 a	0.45 a	0.08 a	1.06 a
CV (%)	1.10	1.46	2.14	13.07	-

^{1/} Experimental trail

^{2/} Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at 5 % level by LSD

Table 2 Dry weight of the dried rambutan's peel crude extract when extracted with 70% ethanol reflux with various times

treatment	Extract dry weight (g)				
	1 ^{1/}	2	3	4	average
70% ethanol reflux 1 hour, 3 times	0.84 c ^{2/}	0.42 c	0.08 c	0.02 c	0.34 d
70% ethanol reflux 2 hours, 3 times	1.30 b	0.65 d	0.26 b	0.06 b	0.57 c
70% ethanol reflux 3 hours, 3 times	2.59 a	1.44 c	0.62 a	0.16 a	1.20 b
70% ethanol reflux 4 hours, 3 times	2.60 a	1.50 b	0.60 a	0.15 a	1.21 b
70% ethanol reflux 5 hours, 3 times	2.63 a	1.56 a	0.61 a	0.16 a	1.24 a
CV (%)	1.01	1.90	3.03	9.96	-

^{1/} Experimental trail

^{2/} Means in the same column, followed by a common letter are not significantly different at 5 % level by LSD

Table 3 Dry weight of the dried rambutan's peel extract when extracted with different solvents and methods

Treatment	Extracted dry weight (g)
70% ethanol soak	42.47 bc ^{1/}
70% ethanol reflux	51.63 a
distilled water soak	35.89 cd
distilled water reflux	28.46 d
70% methanol soak	45.91 ab
70% methanol reflux	47.74 ab
CV (%)	7.98

^{1/} Means in the same column, followed by a common letter are not significantly different at 5 % level by DMRT

กลั่นในชั้น n-butanol กรรมวิธีที่สกัดด้วย 70% ethanol มีปริมาณสารสกัดมากที่สุด รองลงมา คือ 70% methanol และน้ำกลั่น (Table 4) ส่วนในชั้นน้ำ กรรมวิธีที่สกัดด้วยน้ำกลั่นมีปริมาณสารสกัดมากที่สุด รองลงมา คือ 70% ethanol และ 70% methanol มีปริมาณไม่แตกต่างกัน

นำสารสกัดในชั้น n-butanol และชั้นน้ำ ของทุกกรรมวิธี ทดสอบการเกิดฟองเปรียบเทียบกับ saponin และ digitonin มาตรฐาน พบว่า ฟองมีความสูงประมาณ 1-2 ซม. (Table 5) และทดสอบชนิดของซาโปนินโดยวิธี Liebermann-Burchard test พบว่า มีสีเขียวและม่วงแดงเหมือน saponin และ digitonin มาตรฐาน แสดงว่าสารที่สกัดได้มีสมบัติเป็นซาโปนิน

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดซาโปนินจากเปลือกเงาะ (Quantitative analysis of saponin)

นำสารสกัดหยาบจากทุกกรรมวิธี มาวิเคราะห์ชนิดของซาโปนินด้วยเทคนิค FTIR พบว่า กรรมวิธีที่สกัดด้วย 70% ethanol, 70% methanol และน้ำกลั่นทั้งแบบแช่ และแบบกลั่น reflux มีสารซาโปนินเป็นส่วนประกอบ (Figure 1-3) เมื่อนำมาหาปริมาณของสารซาโปนินด้วยเครื่อง spectrophotometer ตามวิธีของ Madland (2013) โดยเลือกเฉพาะวิธีการสกัดแบบกลั่น reflux ทำการวิเคราะห์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 550 นาโนเมตร พบว่า การสกัดสารซาโปนินจากเปลือกเงาะโดยใช้ 70% methanol สกัดแบบกลั่น reflux มีปริมาณน้ำหนักรวมที่สกัดได้จากเปลือกเงาะแห้ง 100 ก. และ total saponin ต่อสารสกัด 1 ก. มากที่สุด คือ 43.97 ก. และ 422.05 มก. รองลงมาคือ 70% ethanol สกัดแบบกลั่น reflux คือ 40.19 ก. และ 370.47 มก. และน้ำกลั่นสกัดแบบกลั่น reflux 24.24 ก. และ 342.24 มก. ตามลำดับ (Table 6) ปริมาณซาโปนินทั้งหมดจากเปลือกเงาะแห้ง 1 ก. พบว่า การสกัดสาร

Table 4 Dry weight of the extracts of diethyl ether n-butanol and water layer when extracted with different methods

Treatment	diethyl ether layer (g)	n-butanol layer (g)	water layer (g)	including 3 layers (g)	% lost substance (g)
70% ethanol soak	0.13	10.03 ab	8.61 c	38.73 ab	8.79 b
70% ethanol reflux	0.17	12.80 a	8.61 c	47.37 a	8.28 b
distilled water soak	0.16	8.49 bc	13.69 a	29.25 bc	13.10 a
distilled water reflux	0.14	5.16 c	12.88 b	26.32 c	14.55 a
70% methanol soak	0.18	8.69 bc	8.64 c	42.42 a	7.66 b
70% methanol reflux	0.16	9.19 ab	8.64 c	44.03 a	7.85 b
CV (%)	13.04	17.95	3.08	11.47	13.34

^{1/} Mean in the same column followed by a common letter are not significantly different at 5 % level by DMRT

Table 5 The height of the bubble of dried rambutan's peel crude extract n-butanol extract and water layer compared to saponin and digitonin standard

Treatment	rambutan's peel extract(cm)	n-butanol layer (cm)	water layer (cm)
70% ethanol soak	2.31 bc	2.63 ab	1.74 d
70% ethanol reflux	2.47 b	2.45 abc	1.76 d
distilled water soak	1.76 cd	1.93 bc	1.91 c
distilled water reflux	1.80 d	1.68 c	1.36 f
70% methanol soak	2.14 bcd	1.67 c	1.17 g
70% methanol reflux	1.66 d	2.04 bc	1.46 e
saponin	3.08 a	3.08 a	3.08 b
digitonin	3.24 a	3.24 a	3.24 a
CV (%)	11.60	15.36	1.91

Mean in the column, followed by a common letter are not significantly different at 5 % level by DMRT

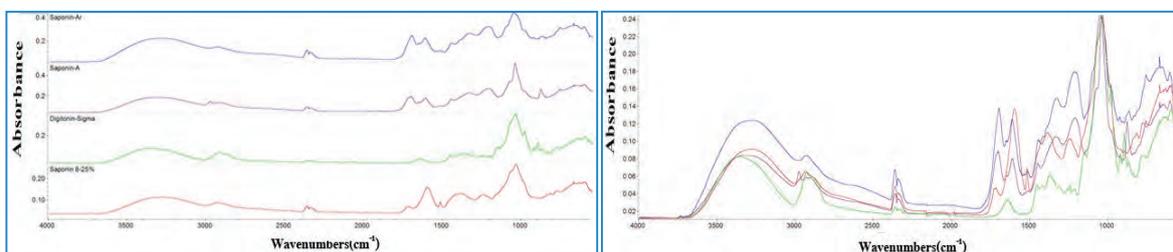


Figure 1 The FTIR spectra rambutan's extract, saponin-AR extracted 70% Ethanol Reflux, saponin-A extracted 70% Ethanol Soak, Digitonin-Sigma and Saponin 8-25% saponin standard

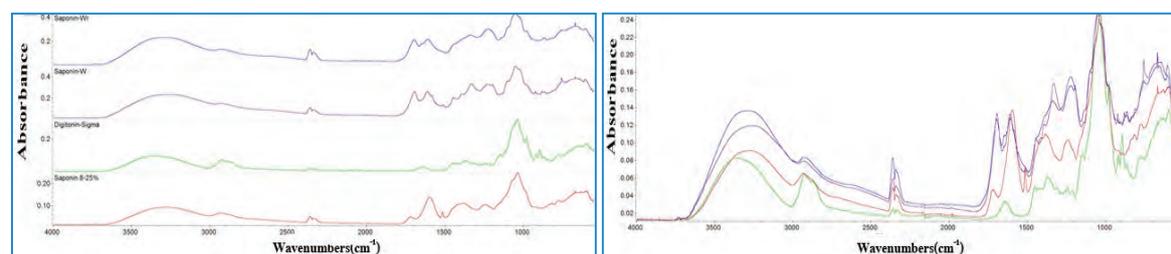


Figure 2 The FTIR spectra rambutan's extract, saponin-WR extracted Water Reflux, saponin-W extracted Water Soak, Digitonin-Sigma and Saponin 8-25% saponin standard

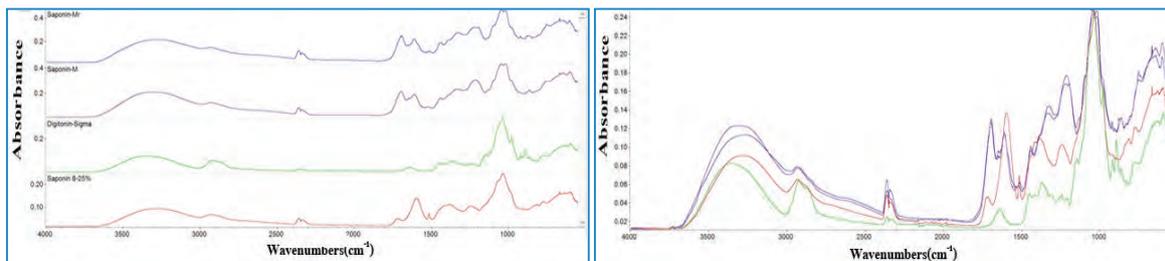


Figure 3 FTIR spectra rambutan's extract, saponin-MR extracted 70% Methanol Reflux, saponin-M extracted 70% Methanol Soak, Digitonin-Sigma and Saponin 8-25% saponin standard

Table 6 The weight extract and volume of total saponin

Treatment	Weight extract (g/ 100 g dried rambutan's peel)	Weight extract (extracted with buthanol (g))	Total saponin (mg/ 1 g extract)	Total saponin (mg/ 1g dried rambutan's peel)
70% ethanol reflux	40.19 b	25.09 a	370.47 ab	92.95 a
distilled water reflux	24.24 c	6.07 c	342.24 b	20.77 c
70% methanol reflux	43.97 a	19.95 b	422.05 a	84.20 b
CV (%)	0.10	0.48	8.18	5.76

Means in the same column, followed by a common letter are not significantly different at 5 % level by LSD

โดยใช้ 70% ethanol สกัดแบบกลั่น reflux มี ปริมาณสารซาโปนินรวมมากที่สุด คือ 92.95 มก.รองลงมาคือ 70% methanol และน้ำกลั่น สกัดแบบกลั่น reflux คือ 84.20 มก. และ 20.77 มก.

3. ประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะ ในการควบคุมศัตรูพืช

3.1 ควบคุมหอยเชอรี่

การใช้สารสกัดหยาบจากเปลือกเงาะ ควบคุมหอยเชอรี่ พบว่า ที่ 0 ก./น้ำ 20 ล. หอยเชอรี่มีชีวิตอยู่รอด ในขณะที่อัตรา 2,000 มก./ล. และ 4,000 มก./ล. หอยเชอรี่หยุด เคลื่อนไหวภายใน 1 ชม. และตายภายใน 12 ชม.

3.2 การควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช

การควบคุมเชื้อรา *Phytophthora palmivora* จากทุเรียน *Colletotrichum* spp. จากมะละกอ และเชื้อ *Marasmius palmivorus* Sharples. จากผลสละ เมื่อเพิ่มความเข้มข้น สารสกัดหยาบซาโปนินสูงขึ้น ประสิทธิภาพการ ยับยั้งการเจริญของเชื้อราเพิ่มขึ้น โดยขนาดเส้น ผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *Marasmius palmivorus* และ *Phytophthora palmivora* ในวันที่ 5 มีขนาด 2.76 และ 7.50 ซม. ของ กรรมวิธีที่มีสารสกัด 2,000 มก/ล. ขณะที่ ชุดควบคุมมีขนาด 9.00 ซม. ส่วนเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ของโคโลนีเชื้อราชุดกรรมวิธีควบคุม มีขนาด 4.10 ซม. และที่ความเข้มข้น 2,000 มก/ล.

Table 7 The average diameter of fungal colonies *Marasmius palmivorus*, *Phytophthora palmivora* and *Colletotrichum* spp. at day 1, 3 and 5 on PDA mixed with crude saponin extract from dry rambutan's peel at various concentration

Concentration mg/L	average diameter of fungal colonies (cm)								
	<i>Marasmius palmivorus</i>			<i>Phytophthora palmivora</i>			<i>Colletotrichum</i>		
	1 day	3 days	5 days	1 day	3 days	5 days	1 day	3 days	5 days
0	0.95 b	5.37 b	9.00 c	1.33 c	6.67 c	9.00c	0.88 b	3.23 c	4.10 c
1,000	0.87 a	2.20 a	3.03 b	1.07 b	5.20 b	8.16 b	0.62 a	1.97 b	2.83 b
2,000	0.87 a	2.27 a	2.76 a	0.90 a	4.13 a	7.50a	0.63 a	1.73 a	2.13 a
CV (%)	3.27	2.82	0.78	4.46	2.61	2.70	2.84	1.24	2.88

Means in the same column, followed by a common letter are not significantly different at 5 % level by LSD

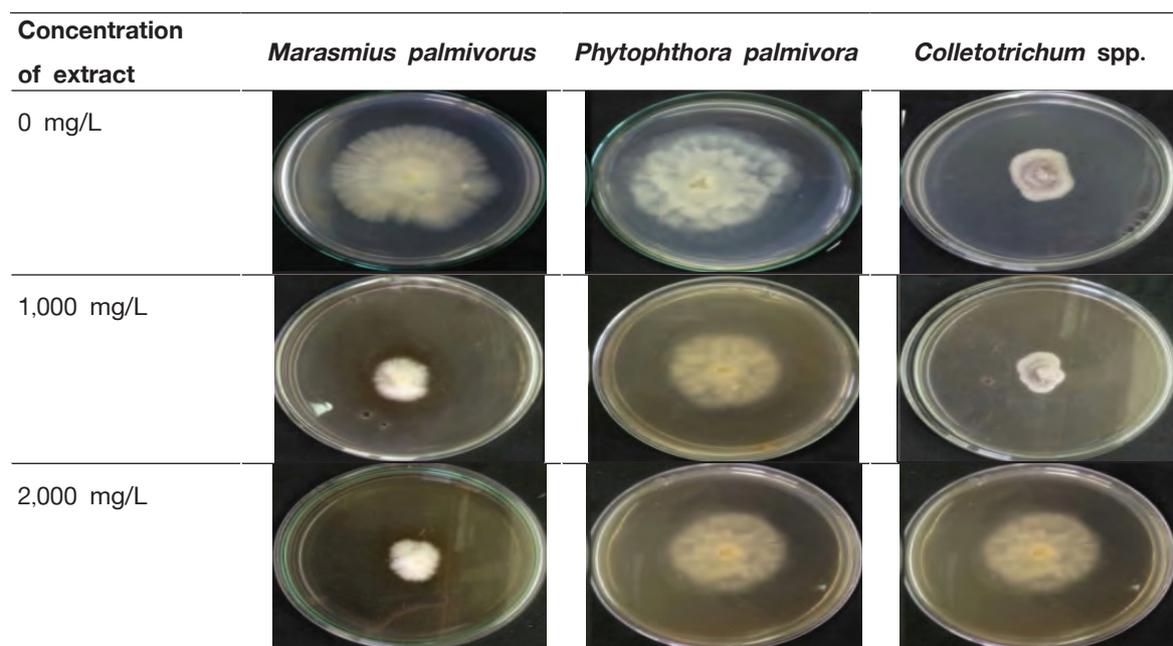


Figure 4 Fungal growth of *Marasmius palmivorus* *Phytophthora palmivora*, and *Colletotrichum* spp. at days 3 on PDA mixed with crude saponin extract of dry rambutan's peel at 0 mg/L 1,000 mg/L and 2,000 mg/L

มีขนาดโคโลนี 2.13 ซม. (Table 7 and Figure 4) การที่เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรามีขนาดลดลง แสดงให้เห็นว่าสารสกัดซาโปนิน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้โดยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Marasmius palmivorus* *collectotrichum* spp. ได้ 69.33% และ 48.04%

สรุปผลการทดลอง

การสกัดสารซาโปนินจากเปลือกเงาะแบบกลั่น reflux โดยใช้ 70% ethanol เป็นตัวทำละลาย เป็นวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด มีปริมาณ total saponin มากที่สุด คือ 92.95 มก.ต่อเปลือกเงาะแห้ง 1 ก. เมื่อตรวจสอบชนิดของซาโปนิน พบว่า สารสกัดมีสมบัติ

เป็น triterpene saponin และ steroid saponin สามารถนำสารสกัดหยาบ ที่ความเข้มข้น 4,000 มก/ล. กำจัดหอยเชอรี่ให้ตายภายใน 12 ชม. และสามารถควบคุมการเจริญเชื้อรา *Phytophthora palmivora*, และ *Colletotrichum* spp. และ *Marasmius palmivorus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารสกัดความเข้มข้น 2,000 มก/ล. ได้อย่างมีประสิทธิภาพ วิธีการสกัดสารซาโปนิน ที่ได้เป็นวิธีการที่ไม่ซับซ้อน แต่มีประสิทธิภาพดี และใช้เวลาสั้นกว่าวิธีเดิม กลุ่มเกษตรกรหรือผู้ประกอบการ สามารถนำไปพัฒนาเป็นการค้า เพื่อกำจัดวัสดุเหลือใช้ และสร้างรายได้เพิ่ม และหากมีการพัฒนาให้ใช้ในรูปผงแห้ง หรือ รูปแบบที่ง่ายต่อการปฏิบัติของเกษตรกร จะเป็นการเพิ่มทางเลือกในการควบคุมศัตรูพืช ชนิดต่าง ๆ ในระบบการผลิตแบบอินทรีย์

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นางเกษสิริ ฉันทะพิริยะพูน ผู้อำนวยการกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและ ปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 6 ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2556. *การนำเข้า ส่งออก เงาะ*. แหล่งข้อมูล : http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export.php. สืบค้น : วันที่ 22 พฤษภาคม 2556.
เชิดศักดิ์ ใจแข็ง และธนพัฒน์ ศาสตระรุจิ. 2544. *ซาโปนินในเงาะ*. รายงานปัญหาพิเศษ ภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 45 หน้า.
สัมพันธ์ สร้อยกล่อม ชนาธิป ชูศรี บวร บุญพร

และโสภา กลิ่นจันทร์. 2557. *ปริมาณสารโพลีฟีนอลและประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดผักโขม*. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52. 4-7 ก.พ. 2557. หน้า 394-399.

สัมฤทธิ์ เกียววงษ์. 2547. เคย์-1 นวัตกรรมแห่งความเฟื่อง. *วารสาร BIOTECH*. ปีที่ 2 ฉบับที่ 19 เดือนกรกฎาคม.

Gyeong, J.C.; M.K. Lee; J.W. Lee; H.J. Park; D.Y. Lee and Y.H. Lee. 2010. Physicochemical characterization and NMR assignments of ginsenosides Rb1, Rb2, Rc, and Rd isolated. *Panax ginseng. J. of Ginseng Res.* No.2 : 113-121.

Hostettmann, K and A. Marston. 1995. *Saponins*. Cambridge University, NY. USA. 564 p.

He, L.; Z. Guoying; Z. Huaiyun and H. Yuanhaoet. 2010. Chemical constituents and biological activities of saponin from the seed of *Camellia oleifera*. *Scientific Research and Essays* Vol.5(25) : 4088-4092.

Madland, E. 2013. *Extraction, Isolation and Structure Elucidation of Saponins from Herniaria Incana*. Norwegian University of Science and Technology, Dept. of Chemistry. 67 p.

Zar, H.J. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4th ed. Prentice Hall International, Inc., USA. 663 p.