



วัตถุประสงค์ในการศึกษานี้อยู่ที่ว่าจะทำอย่างไรจึงจะสามารถสกัดเอาสารที่มีคุณสมบัติในการถ่ายพยาธิ คือ diospyrol ออกมาได้ง่าย รวดเร็ว ถูกออกซิไดส์น้อยที่สุด และเสียค่าใช้จ่ายน้อย จะได้เป็นแนวทางในการทดลองขนาดคั่นแมบ (pilot scale) ต่อไป

ในการศึกษานี้ยังได้หาวิธีที่เหมาะสมในการหาปริมาณ diospyrol ซึ่งยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษามาก่อน ปริมาณ diospyrol ที่หาได้นั้นจะเป็นค่าที่สัมพันธ์กับ oxidative products ที่เก็บเอา diospyrol ไว้ในเวลาต่าง ๆ กัน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการนำเอา diospyrol ไปใช้ทำเป็นยาถ่ายพยาธิ เพราะในการที่จะใช้เป็นยาดำยนั้นจำเป็นต้องทราบขนาดสาร และปริมาณของสารแสดงฤทธิ์ซึ่งมีอยู่ในนั้นในระยะเวลาที่เก็บเอาไว้ และประมาณเวลาการหมดอายุของยา

ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับ diospyrol กันมากมายโดยใช้ ethanol, acetone และ ether เป็นตัวสกัด ซึ่งตัวทำละลายที่กล่าวมานี้เหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวสกัดเพื่อการศึกษามากกว่า แต่ในแง่อุตสาหกรรมไม่อาจจะใช้ได้ เนื่องจากตัวทำละลายดังกล่าวราคาแพง ทำให้ต้นทุนการผลิตมีราคาสูง จึงได้พิจารณาหาวิธีปฏิบัติที่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ เบอร์ เซ็นต์ของสารแสดงฤทธิ์ใกล้เคียงกับผลที่รายงานไว้ ซึ่งได้สรุป เบอร์ เซ็นต์ผลการทดลองของผู้ที่ทำไว้ก่อนหน้าและจากการปฏิบัติที่ได้กระทำขึ้นอยู่ในตารางที่ 42

หลังจากที่ระเหยเอา ethanol ซึ่งใช้สกัดหุ้มะเกลียดโดยตรงออกไปแล้ว ได้ผลิตภัณฑ์สกัดออกมา 12-14% (วิธีที่ 1) ซึ่งถือได้ว่าได้ผลเท่ากับของผู้ที่ทำไว้ก่อนแล้ว (12-13%, คร. แถบและระเบียบ(13)) ส่วนผลของการใช้ acetone สกัดได้เบอร์ เซ็นต์สูงกว่า คือ 15-15.3% การที่ตัวทำละลายทั้งสองสกัดเอาสารออกมาได้มากเพราะว่ามีสารต่าง ๆ หลายชนิดละลายในตัวทำละลายดังกล่าวออกมาด้วยกัน ซึ่งจะเห็นได้จากผลการทดลองต่อ ๆ ไปว่า เบอร์ เซ็นต์ของสารแสดงฤทธิ์นั้นมีอยู่ไม่มาก

ตารางที่ 42 สรุปเปอร์เซ็นต์ผลการแยก diospyrol ที่มีผู้รายงานไว้ในวารสารและจากการปฏิบัติที่ได้กระทำขึ้น

| ผลมะเกลือ | พาหะที่นำสารออก | สารที่ช่วยให้ตกตะกอน | ตัวทำละลายที่ใช้สกัด | ที่ทำการทดลอง | | จากวารสาร | |
|-----------|------------------|------------------------|----------------------------------|---------------|---------|-----------|-----------------|
| | | | | %* | วิธีที่ | %* | ผู้ทำการวิจัย |
| สด | - | - | EtOH | 12-14 | 1 | 12-13 | แถบและระเบียบ |
| สด | - | - | Acetone | - | - | 15-15.3 | แถบและระเบียบ |
| แห้ง สุก | - | - | Et ₂ O | - | - | 0.7-0.9 | Loder และสตางค์ |
| สด | - | - | Et ₂ O | 2-2.4 | 2 | - | - |
| สด | - | AcOH+H ₂ O | EtOH | - | - | 1.5-2.2 | มงคล |
| สด | - | AcOH+H ₂ O | EtOH | - | - | 1.06-1.25 | อนงค์พันธุ์ |
| สด | - | HCl + H ₂ O | EtOH | 0.98-1.18 | 3 | - | - |
| สด | H ₂ O | HCl + NaCl | Et ₂ O(จากตะกอนเปียก) | 1.23 | 4 | - | - |
| สด | H ₂ O | HCl + NaCl | Et ₂ O(จากตะกอนแห้ง) | 1.1-1.5 | 5 | - | - |
| สด | H ₂ O | HCl + H ₂ O | EtOH | 0.73-0.88 | 6 | - | - |
| สด | H ₂ O | HCl + H ₂ O | Acetone | 0.8 | | - | - |
| สด | H ₂ O | HCl | - | 1.3-1.5 | 7 | - | - |
| สด | H ₂ O | AcOH | - | 1.2-1.5 | 8 | - | - |
| สด | H ₂ O | HCl + NaCl | - | 1.6-2.9 | 9 | - | - |
| สด | H ₂ O | HCl + NaCl | - | 1.56 | 10** | - | - |

* % ที่แสดงไว้นี้หมายถึงได้เอาพาหะหรือตัวทำละลายออกไปโดยวิธีสามัญที่ทำการในห้องปฏิบัติการ

** ทำให้แห้งโดยการทำ Freeze dry.

เมื่อใช้อีเธอร์เป็นตัวสกัดบ้าง Loder และ ดร. สตางค์แยกได้สาร 0.7-0.9% จากการสกัดผลมะเกลือแห้ง ในทำนองเดียวกันผลจากการทดลองที่กระทำด้วยการใช้ผลมะเกลือสดได้สาร 2-2.4 % (วิธีที่ 2) ซึ่งให้เห็นว่าสารนี้จะละลายใน ether ได้น้อยกว่าใน ethanol หรือ acetone และเปอร์เซ็นต์ของสารที่ได้จากการสกัดผลสดโดยตรงมากกว่าที่ได้จากผลแห้ง แสดงว่าสารได้สูญเสียหรือสลายเป็นสารอื่นที่ไม่ละลายใน ether เกินกว่า 65% (จาก 2% เหลือ 0.7%)

ได้มีการสกัดสารจากผลมะเกลือสดโดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลายแล้วแยกเอาสารออกมาโดยการเติมกรดน้ำส้มที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตรลงไปเป็นปริมาตรสองเท่าตัว (2:1) เพื่อให้ตกตะกอน กรองออกและทำให้แห้งได้สาร 1.5-2.2% (มกคล (5)) หรือใช้สารละลาย glacial acetic acid ปรับ pH ให้เป็น 2.76 กรองตะกอนและทำให้แห้งได้สาร 1.06-1.25 % (อนงค์พันธุ์ (20)) ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าสารส่วนใหญ่จะละลายใน ethanol นั้นละลายได้ในน้ำด้วย ส่วนสารที่ไม่ละลายนั้นมีเปอร์เซ็นต์ค่อนข้างต่ำ จากสืบกว่าเปอร์เซ็นต์ที่ละลายใน ethanol เหลืออยู่ประมาณหนึ่งเปอร์เซ็นต์ สำหรับกรดที่ใช้เพื่อช่วยให้ตะกอนรวมตัวเป็นก้อน ตกเป็นตะกอน นอนกันเร็ว ทำให้กรองได้สะดวก ด้วยเหตุที่ว่าสารละลาย ethanol เมื่อผสมกับน้ำกลายเป็นสารละลายขุ่นขาว ยากต่อการกรอง แทนที่จะใช้สารละลาย glacial acetic acid ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ สามารถละลายสารอินทรีย์ด้วยกันได้บ้าง จึงเปลี่ยนมาใช้กรด HCl ในน้ำเป็นตัวที่ช่วยให้ตกตะกอน ได้ผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายออกมา 0.98-1.18% (วิธีที่ 3)

จากคุณสมบัติที่ diospyrol ละลายได้ใน alcohol, acetone และ ether แต่ไม่ละลายในน้ำ ตะกอนที่แขวนลอยในน้ำรวมตัวเป็นก้อน เมื่อทำให้เป็นกรด และจากวิธีการที่แพทย์แผนโบราณและพัฒนามนุษ (6) ใช้ น้ำคั้นผลมะเกลือสดในการถ่ายพยาธิ ดังนั้นจึงเล็งเห็นว่า การใช้ น้ำเป็นพาหะนำเอา diospyrol ร่วมกับสารอื่น ๆ ออกมาด้วย เช่นเดียวกันกับ น้ำคั้นผลมะเกลือสดที่ใช้กันมาก่อนแล้ว เป็นสิ่งที่เป็นไปได้ ต่อมาคือการเลือกใช้กรดช่วยในการตกตะกอน หาวิธีเร่งให้ตะกอนรวมตัวเป็นก้อนเร็วขึ้น วิธีการกรองจำนวนมาก ๆ และการอบแห้ง

ในวิธีที่ 4 ใช้น้ำเป็นพาหะนำเอาสารออกจากผลสดที่ตำให้แหลก กรองเอากากออกไปด้วยผ้าดิบ ทำสารแขวนลอยที่กรองได้ให้ตกตะกอนโดยการเติมเกลือแกงและกรด HCl จน pH เป็น 2 ทิ้งไว้ให้ตะกอนนอนกัน ตูดเอาน้ำใสข้างบนออก นำตะกอนไปทำให้ pH เป็น 8 ด้วย sodium bicarbonate แล้วสกัดหลาย ๆ ครั้งด้วย ether หลังจากทำตามกรรมวิธีที่ปฏิบัติกัน และระเหยไล่ ether ออกไปแล้ว ได้ผลิตภัณฑ์เป็นผงสีขาวนวล 1.23% สำหรับในวิธีที่ 5 แตกต่างจากวิธีที่ 4 ตรงที่นำเอาตะกอนที่รวมตัวเป็นก้อนด้วยเกลือแกงและกรดเกลือไปกรองและทำตะกอนให้แห้งก่อน แล้วจึงสกัดด้วย ether ได้ผลิตภัณฑ์ 1.1-1.5% ส่วนวิธีที่ 6 นั้นเพื่อตรวจสอบปริมาณของ diospyrol ที่น้ำเป็นตัวพาออกมา โดยการนำเอาตะกอนแห้งที่ได้จากการใช้กรดเกลือช่วยให้ตกตะกอนมาสกัดด้วย ethanol และ acetone แล้วดำเนินการทำถึงขั้นสุดท้าย ได้สารประมาณ 0.73-0.88% ไม่ว่าจะใช้ ethanol หรือ acetone ก็ตาม จะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ที่ได้นี้ต่ำกว่าวิธีที่ 4 และ 5 ที่ใช้ ether สกัด ทั้งนี้ก็เนื่องจากว่าผลมะเกลือที่ใช้ในการทดลองวิธีที่ 6 นี้มีขนาดเล็กและแก่สน

อย่างไรก็ตาม เชื่อว่ามีปริมาณอยู่ในเกณฑ์เดียวกันกับน้ำคั้นผลมะเกลือที่แพทย์แผนโบราณหรือแพทย์ชนบทใช้เป็นยาถ่ายพยาธิ อนึ่ง เปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้แตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับขนาดของผลมะเกลือที่นำมาสกัด อายุ ความสมบูรณ์ และแหล่งที่มา อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ที่ได้จะอยู่ในช่วง 1-2 %

ในการทดลองนี้ได้พยายามหาวิธีที่ง่ายและรวดเร็วในการแยกเอาสารแสดงฤทธิ์ออกจากสารแขวนลอยในน้ำที่มาจากการคั้นผลมะเกลือสด เติมสารช่วยให้ตกตะกอนได้แก่กรด HCl (วิธีที่ 7) และ glacial acetic acid (วิธีที่ 8) มีผลต่างกัน ตะกอนที่ตกในกรด glacial acetic acid เป็นวุ้นเบา กรองได้ยากกว่าตะกอนที่ตกในกรด HCl ซึ่งเป็นก้อนและหนักนอนกัน ในการทดลองต่อมา (วิธีที่ 9) ได้พบว่าเมื่อนำเอาสารแขวนลอยของน้ำคั้นผลมะเกลือในกรด HCl และเกลือแกงไปอุ่นที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ปรากฏว่าช่วยเร่งให้ตะกอนรวมตัวกันเป็นก้อน และตกนอนกันเป็นตะกอนหนักเร็วขึ้น เป็นผลทำให้กรองได้สะดวกกว่าที่ไม่ได้ทำให้ร้อน และอุณหภูมิที่เหมาะสมที่เร่งการตกตะกอนนี้อยู่ระหว่าง 45-50° C

ในเรื่องของการกรองนี้เป็นปัญหาด้วย ต้องจัดการทำให้รวดเร็ว บังคับไม่ให้อากาศเข้าสัมผัสกับตะกอน หรือถูกสัมผัสน้อยที่สุด ในการกรองปริมาณน้อย ทำได้โดยใช้วิธี

suction pump ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน ในกรณีที่ทำปริมาณมากก็ไม่อาจจะใช้การกรองระบบ filter press ได้ด้วย เพราะว่าเกิดการอุดตันที่แผ่นผ้ากรอง และมีไอออนของโลหะจากเครื่องกรองเข้ามาเจือปน เนื่องด้วยสารละลายเป็นกรด ทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดการออกซิเดชันเร็วยิ่งขึ้น การกรองวิธีนี้จึงไม่เป็นผลดี จากการศึกษาพบว่า การกรองที่เป็นผลดีคือ ใช้ผ้าคัมพัช เป็นถุง ไล่อากาศออกไปด้วยไนโตรเจน ผูกปาก ทิ้งให้น้ำไหลจนหมดหยดน้ำ แล้วนำเข้าไปเครื่องอัดบีบเอาน้ำออก และอบให้แห้ง ได้ผลผลิต 1.6-2.9 % (วิธีที่ 9)

นอกจากนี้ได้ทดลองทำให้แห้งโดยวิธี freeze dry (วิธีที่ 10) คือ หลังจากดูดเอาน้ำใสที่อยู่ชั้นบนของตะกอนที่ได้จากการเติมกรด HCl และเกลือแกงลงในสารแขวนลอยในน้ำคั้นผสมเกลือ น้ำตะกอนที่มีลักษณะเป็นสเลอรี่ (slurry) เข้าเครื่อง freeze dry เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้สารผงสีคล้ำ เนื่องจากไม่ได้ใช้ไนโตรเจน เข้าแทนที่ตอน เปลี่ยนความดัน อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่เหมาะที่จะทำในทางการค้า

จากการศึกษาพบว่าวิธีที่จะเอา diospyrol มาใช้เป็นยาถ่ายพยาธินั้น สามารถทำได้โดยการใช้ น้ำเป็นพาหะ ใช้กรด HCl และเกลือแกง หรือกรด HCl อย่างเดียวเป็นสารที่ช่วยให้ตกตะกอน ใช้เกลือแกงอย่างเดียวตะกอนรวมตัวกันช้า และพบว่าในสารละลายที่เป็นกรด diospyrol จะเสถียรดีกว่าสารละลายเป็นกลาง ต่าง หรือมีไอออนของหมู่ II หรือโลหะหนักอย่างอื่น ยกเว้น NaCl แรงให้ตะกอนรวมตัวตกเป็นก้อนเร็วขึ้นโดยการทำให้ร้อนที่ 45-50° C กรองตะกอนด้วยผ้าคัมพัช แล้วนำไปอัดให้ตะกอนแห้งยิ่งขึ้นด้วยเครื่องอัด และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100° C ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ประหยัด ทำได้ง่าย และสารถูกออกซิไดส์น้อยที่สุด จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับแยกสารจากผสมเกลือใช้เป็นยาถ่ายพยาธิได้ มีส่วนผสมเหมือนกับน้ำคั้นมะเกลือที่แพทย์แผนโบราณหรือแพทย์ชนบทใช้ ต่างกันที่ไม่มีน้ำอยู่ด้วย ทั้งนี้ทำให้สามารถเก็บเอาไว้ได้นาน

ในการเก็บผสมเกลือแห้งนั้น ได้ลองเอาบรรจุในซองใส่ยาแบบที่ทางเภสัชปฏิบัติกัน วิธีที่เก็บได้ผล คือ เปอร์เซนต์สารแสดงฤทธิ์เริ่มแรก 94.02% หลังจากเก็บไว้ 10 เดือน ยังมีสารแสดงฤทธิ์อยู่ 92.90% และผลจากการทดลองฆ่าไส้เดือน ให้ผลดังตารางที่ 41 ซึ่งยังมีประสิทธิภาพในการฆ่าไส้เดือนได้ การเก็บนี้ใช้ของอะลูมิเนียมที่ภายในบุด้วยพลาสติก เอาไนโตรเจนไล่อากาศ บรรจุลงในซองนั้นภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน และปิดปากซองด้วยเครื่องรีดที่มีความร้อน ทำให้ปากซองติดแน่น

เพื่อเป็นการยืนยันว่าสารที่แยกได้โดยวิธีที่กล่าวถึงนี้มี diospyrol อยู่ด้วย ได้นำเอาผลิตภัณฑ์ได้ตามวิธีที่ 4 ทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีที่ Loder และ ดร. สตางค์ (14) ได้กล่าวไว้ จากนั้นเตรียม tetra-o-acetyl และ tetra-o-methyl derivatives ได้สารที่มีจุดหลอมเหลว 237°C และ 235°C ตามลำดับ นำสารทั้งสองไปทำการตรวจสอบทางสเปกโตรสโคปี โดยใช้เครื่องมือ UV, IR, ^1H NMR และ ^{13}C NMR Spectrophotometer ปรากฏว่าเป็น tetra-o-acetyl และ tetra-o-methyl diospyrol เหมือนที่รายงานไว้ก่อนแล้ว

นอกจากนี้ยังพบว่า diospyrol เมื่อถูกกับไอออนของโลหะจะเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลได้รวดเร็วและจะเร็วมากเมื่ออยู่ในสารละลายต่าง แต่ในทางตรงกันข้ามเมื่อสารละลายเป็นกรดจะเสถียรมากขึ้น

สำหรับวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ diospyrol นั้นได้ใช้วิธีการหาปริมาณของสารประกอบพวก phenol เพราะ diospyrol เป็นสารประกอบพวก phenol วิธีที่ใช้ในการทดลองมี 3 วิธี คือ

1. Potentiometric Titration โดยใช้ 0.1 M tetrabutylammonium hydroxide เป็น titrant จาก Titration Curve ที่ได้ พบว่ามี end point 2 จุด ทั้งนี้ก็เพราะ diospyrol เป็น dimer ของ 1, 8-dihydroxynaphthalene ดังนั้นจึงได้ end point 2 จุด แต่ในการศึกษานี้ต้องการหาปริมาณของหมู่ phenolic -OH ทั้งหมด จึงต้องใช้ end point หลังในการคำนวณ วิธีนี้มีข้อดีตรงที่ แม้ว่าสารละลายที่นำมาไทเทรตจะมีสีน้ำตาล เนื่องจากมีสารประกอบพวก quinone ผสมอยู่ ก็ยังสามารถหาปริมาณ diospyrol ที่เหลืออยู่ได้ เพราะ end point ของการไทเทรตหาได้จาก Titration Curve ไม่ได้ขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย

2. Visual Titration ด้วยการใช้อาโซไวโอเล็ต เป็น indicator และใช้ 0.1 M tetrabutylammonium hydroxide เป็น titrant ซึ่งจะให้ได้ผลดีในกรณีที่มีปริมาณของสารประกอบพวก quinone อยู่่น้อย คือสารละลายที่ใช้ในการไทเทรตจะต้องไม่เป็นสีน้ำตาล มิฉะนั้นจะไม่สามารถเห็น end point ของการไทเทรตได้

3. Back Titration โดยนำเอาผลที่ได้จากการทำ acetylation ของ diospyrol ไปหาปริมาณ acetic anhydride ที่เข้าทำปฏิกิริยา acetylation โดยการไตเตรทกับสารละลาย sodium hydroxide มาตรฐาน แล้วนำไปหักออกจาก Blank แต่วิธีนี้อาจจะเกิดการคลาดเคลื่อนได้ถ้าการทำปฏิกิริยา acetylation ไม่สมบูรณ์

แต่อย่างไรก็ตามจากผลการวิเคราะห์ทั้ง 3 วิธี จะให้ค่าที่แตกต่างกัน อยู่ในช่วง 1-3.5% ซึ่งสรุปผลอยู่ในตารางที่ 40

ได้ใช้ทั้ง 3 วิธีทำการวิเคราะห์หาปริมาณ diospyrol เมื่อเก็บไว้ที่เวลา 0, 3, 6 และ 10 เดือนตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ (ตารางที่ 40) พบว่า ที่เวลา 0 เดือนจะมีเปอร์เซ็นต์ของหมู่ phenolic -OH อยู่มากที่สุด และที่เวลา 3 และ 10 เดือน เปอร์เซ็นต์ใกล้เคียงกัน ทั้งนี้เป็นเพราะเมื่อเวลาเริ่มต้นเก็บ diospyrol ไว้ในช่องอะลูมิเนียม นั้นยังคงมีอากาศเหลืออยู่ภายใน เมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่งออกซิเจนในอากาศที่อยู่ภายในช่อง จะไปออกซิไดส์ diospyrol จนไม่มีออกซิเจนเหลืออยู่ ปริมาณ diospyrol ก็จะคงที่ ดังนั้นไม่ว่าเวลาจะผ่านไปนานเท่าใดปริมาณของ diospyrol ก็จะคงที่ แต่ผลการวิเคราะห์ที่เวลา 6 เดือนได้เปอร์เซ็นต์ของหมู่ phenolic -OH ลดลงเหลือ 87.95 % ซึ่งน้อยกว่าที่เวลา 10 เดือน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเวลาที่บรรจุ diospyrol นั้นยังมีอากาศเหลืออยู่ภายในช่องมาก หรืออาจเป็นเพราะช่องที่บรรจุนั้นรั่ว

นอกจากนี้ได้ส่งสารที่เก็บไว้เป็นเวลา 3 เดือนไปทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าไส้เดือน ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ผลปรากฏว่า สารที่สกัดด้วย ether และ ethanol สามารถฆ่าไส้เดือนตายหมด 6 ตัวภายในเวลา 60 นาที ซึ่งให้ผลเหมือนกับสารที่สกัดโดยกรวมวิทย์ฯ (สกัดด้วย alcohol และเก็บไว้ในหลอดยาฉีดที่อุดอากาศออกจนเป็นสุญญากาศ) แต่สารที่ได้จากการใช้น้ำเป็นตัวพาออกมาจะใช้เวลา 150 นาที ซึ่งใช้เวลามากกว่าสารที่สกัดด้วย ether และ ethanol ทั้งนี้ก็เพราะว่าสารที่สกัดด้วย ether และ ethanol มีเปอร์เซ็นต์ของสารแสดงฤทธิ์มากกว่าการใช้น้ำเป็นตัวพาออกมาเกือบเท่าตัว เพราะการใช้น้ำเป็นตัวพา สารออกมาจะมีกากปนออกมามาก ดังนั้นเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าไส้เดือน โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากัน สารที่ได้จากการใช้น้ำเป็นตัวพาออกมาจึงใช้เวลาในการฆ่าไส้เดือนตายหมด 6 ตัวมากกว่า