ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา)

ปริญญา

สัตววิทยา | สัตววิทยา

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง ประสิทธิภาพของสารริซินินจากการสกัดใบละหุ่งแดงต่อหนอนกระทู้หอม : ความเป็นพิษและปฏิกิริยาเอนไซม์ทำลายพิษ

Efficiency of ricinine from *Jatropha gossypifolia* (Euphorbiaceae) leave extract against *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) : Toxicity and detoxification enzyme activities

นามผู้วิจัย นางสาวณัฐชยา คำรังษี

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ .....

(อาจารย์วสกร บัลลังก์โพธิ์, ปร. ด.)

กรรมการ .....

(อาจารย์วันชัย ปลื้มภาณุภัทร, ปร. ด.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์สมภพ นวีภาพ, วท. ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ประสิทธิภาพของสารริซินินจากการสกัดใบละหุ่งแดงต่อหนอนกระทู้หอม : ความเป็นพิษและปฏิกิริยาเอนไซม์ทำลายพิษ

Efficiency of ricinine from *Jatropha gossypifolia* (Euphorbiaceae) leave extract against *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) : Toxicity and detoxification enzyme activities

โดย

นางสาวณัฐชยา คำรังษี

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา)
พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ณัฐชยา คำรังษี 2553: ประสิทธิภาพของสารริซินินจากการสกัดใบละหุ่งแดงต่อหนอนกระทู้หอม: ความเป็นพิษและปฏิกิริยาเอนไซม์ทำลายพิษปริญญาวิทยาศาสตมหาบัณฑิต (สัตววิทยา) สาขาสัตววิทยา ภาควิชาสัตววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์วสกร บัลลังก์โพธิ์, ปร.ด. 78 หน้า

การทดลองนี้ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากใบละหุ่งแดง ทั้งในรูปสารสกัดหยาบ และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ คือ Ricinine ต่อหนอนกระทู้หอมวัยที่สอง (Secondary instar *Spodoptera exigua* Hübner) ใบละหุ่งแดงจะถูกสกัดโดยวิธีการซอกซ์เลต โดยใช้เอทิลแอซิเทตหรือเอทานอลเป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดที่ออกฤทธิ์ดีที่สุด มาแยกสารบริสุทธิ์โดยวิธีการทางโครมาโทรกราฟฟี จากการทดสอบโดยวิธีจุ่มแมลงโดยตรง (Dipping method) ในสารสกัดหยาบซึ่งสกัดด้วยเอทิลแอซิเทต ค่า LC50 ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงเท่ากับ 1,809.40±342.62 ppm และ 1,588.39±295.10 ppm ตามลำดับ และสารสกัดหยาบซึ่งสกัดด้วยเอทานอล ค่า LC50 ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงเท่ากับ 34,570.65± 3,572.17 ppm และ 26,796.21±3,527.98 ตามลำดับ จากการทดสอบโดยวิธีพ่นฝอยหมอกด้านบน (Topical sprayer method) ค่า LC50 ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 8,644.63 ± 1,566.54 ppm และ 3,215.56±1,030.75 สำหรับสารสกัดหยาบ (EtOAc) และสาร Ricinine ตามลำดับ และค่า LC50 ที่ 48 ชั่วโมงของสารสกัดหยาบ (EtOAc) และสาร Ricinine เท่ากับ 6,027.16±1,227.16 ppm และ 2,087.63±882.38.75 ppm ผลการศึกษาผลกระทบต่อแตนเบียน คือ Meteorus pulchricornis พบอัตราการตายที่ 60% เมื่อรับสารสกัดหยาบ (EtOAc) ที่ระดับความเข้มข้น 40,000 ppm โดยวิธี Filter paper method ทั้งนี้จากการศึกษาถึงกลไกของสารต่อระดับเอนไซม์ทำลายพิษ พบว่าสารสกัดจากใบละหุ่งแดงกระตุ้นระดับเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรสและ กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรสของหนอนกระทู้หอมวัยที่สอง 0.12 และ 1.62 เท่า ตามลำดับ จึงอาจเป็นไปได้ว่าหากใช้สารนี้ต่อเนื่อง เอนไซม์ทั้งสองอาจมีส่วนทำให้หนอนกระทู้หอมเกิดการต้านทานต่อสารสกัดได้ในอนาคต

_____ _____ ___ / __ /___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Nutchaya Kumrungsee 2010: Efficiency of ricinine from *Jatropha gossypifolia* (Euphorbiaceae) leave extract against *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera : Noctuidae) : Toxicity and detoxification enzyme activities. Master of Science (Zoology), Major Field: Biology, Department of Zoology. Thesis Advisor: Ms.Vasakorn Bullungpoti, Ph.D. 78 pages.

This study explored the control efficacy of crude extract and Ricinine from *Jatropha gossypifolia* leave extract against second instar *Spodoptera exigua* Hübner. The leave of *Jatropha gossypifolia* was extracted with EtOAc or EtOH using soxhlet extractor whereas Ricinine, the purified compound from EtOAc crude extract was isolated by chromatography techniques. From toxicity analysis, EtOAc crude extract showed the highest insecticidal activity with an LC_{50} by dipping method 1,809.40±342.62 ppm and 1,588.39±295.10 ppm after 24 and 48 hours exposed, compare with EtOH crude extract which showed LC_{50} as 34,570.65 ±3,572.17 ppm and 26,796.21±3,527.98 ppm after 24 and 48 hours exposed. The topical sprayer method of EtOAc crude extract showed the control efficiency as LC_{50} value at 24 hours as 8,644.63 ± 1,566.54 ppm while Ricinine showed LC_{50} value as 3,215.56±1,030.75 ppm, and showed LC_{50} value of EtOAc crude extract and Ricinine at 48 hours as 6,027.16 ± 1,227.16 ppm and 2,087.63±882.38.75 ppm respectively. This study also analyzed the effect of EtOAc crude extract to parasitoid insect, *Meteorus pulchricornis* which it showed the 60% mortality at dose 40,000 ppm by filter paper method. In addition, the detoxification enzyme activity analysis result showed EtOAc crude extract induce activity of carboxyl esterase and glutathione-*S*-transferase (GST) activity 0.12 and 1.62 fold, respectively . Thus, these both detoxification enzymes may play important role for *S. exigua* resistance to this extract in the future.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ดร.วสกร บัลลังก์โพธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษา แนะนำ และแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ ดร.วันชัย ปลื้มภาณุภัทร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์รองที่กรุณาให้คำแนะนำเทคนิคการสกัดสารสำคัญจากพืชและช่วยเหลือแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ Prof. Dr. Hiroshi HONDA และ Assoc. Prof. Dr.Yooichi KAINOH Institute of Agriculture and Forestry, University of Tsukuba, Japan ที่เอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการในการทดลอง คำแนะนำเกี่ยวกับการแยกองค์ประกอบทางเคมีจากพืช และ เทคนิคการทดสอบความเป็นพิษของพืชที่มีต่อแมลงรวมทั้งเอื้อเฟื้อพาราสิตอยด์และหนอนกระทู้หอมในการทดลอง

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้องชายที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ รวมทั้งสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง และขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ รวมทั้งผู้ที่เกี่ยวข้องในภาควิชาสัตววิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จ

ณัฐชยา คำรังษี

มีนาคม 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	21
อุปกรณ์	21
วิธีการ	23
ผลและวิจารณ์	31
ผล	31
วิจารณ์	59
สรุปและข้อเสนอแนะ	66
สรุป	66
ข้อเสนอแนะ	67
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	68
ภาคผนวก	78
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลการสกัดสารจากใบละหุ่งแดง	31
2	อัตราการตายเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ *S.exigua* หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงโดยวิธี Dipping Method	33
3	อัตราการตายเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ *S.exigua* หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงโดยวิธี Topical sprayer method	35
4	อัตราการตายเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ *S.exigua* หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethanol crude extract) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยวิธี Dipping Method	37
5	การแยกองค์ประกอบทางเคมีของใบละหุ่งแดง โดยวิธี Quick Column Chromatography ด้วยระบบตัวทำละลายต่างๆ	42
6	อัตราการตายเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ *S.exigua* หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (CH_2Cl_2 : EtOAc) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงโดยวิธี Dipping method	44
7	เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ *S.exigua* หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Fraction ที่ 1,2,3,4,6 และ 7) ที่เวลา 24 ชั่วโมงโดยวิธี Dipping method	45
8	เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ *S.exigua* หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Fraction ที่ 1,2,3,4,6 และ 7) ที่เวลา 48 ชั่วโมงโดยวิธี Dipping method	46
9	ผลการวิเคราะห์สาร Ricinine โดยวิธี NMR spectroscopy (^{1}H NMR และ ^{13}C NMR)	50

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
10	อัตราการตายเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ *S.exigua* หลังจากได้รับสารสกัด จากใบละหุ่งแดง (Ricinine) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงโดยวิธี Topical sprayer method	52
11	เปรียบเทียบค่า LC_{50} ของหนอนกระทู้หอมวัยที่สองหลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงโดยวิธี Dipping method และ Topical sprayer method	54
12	ปฏิกิริยาของเอนไซม์ Carboxyl esterase ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยวิธี pNPA assay	55
13	ปฏิกิริยาของเอนไซม์ Glutathione-*S*-transferase ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยวิธี CDNB assay	56
14	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ *Meteorus pulchricornis* หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ที่ระดับ ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมงโดยวิธีการ Filter paper method	58

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของต้นละหุ่งแดง	5
2	4'-*O*-demethylretrochinensin	5
3	Cyclogossine A, Cyclogossine B	6
4	Cleomiscosin A	6
5	Soxhlet extractor และส่วนประกอบ	8
6	ลักษณะของหนอนกระทู้หอมวัยที่ห้า	11
7	การทำลายใบพืชของหนอนกระทู้หอม	11
8	วงจรชีวิตของหนอนกระทู้หอม	12
9	เขตพื้นที่แพร่ระบาดของหนอนกระทู้หอมในประเทศไทย	13
10	*Meteorus pulchricornis*	15
11	วงจรชีวิตของ *Meteorus pulchricornis*	16
12	การเลี้ยงหนอนกระทู้หอมบนอาหารเทียมวิธีใหม่	23
13	การสกัดใบละหุ่งแดงด้วยเครื่อง Soxhlet extractor	24
14	ระเหยตัวทำละลายด้วย Rotary evaporator	25
15	ขั้นตอนการแยกองค์ประกอบทางเคมีจากใบละหุ่งแดง	26
16	การทำ Quick column chromatography	27
17	การทำ Column chromatography	28
18	วิธี Filter paper method	29
19	Stock solution ของสารสกัดใบละหุ่งแดง	29
20	สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายต่างๆ	32
21	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ที่เวลา 24 ชั่วโมงโดยวิธี Dipping method	34

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ที่เวลา 48 ชั่วโมงโดยวิธี Dipping method	34
23	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ที่เวลา 24 ชั่วโมงโดยวิธี Topical sprayer method	36
24	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ที่เวลา 48 ชั่วโมงโดยวิธี Topical sprayer method	36
25	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethanol crude extract) ที่เวลา 24 ชั่วโมงโดยวิธี Dipping method	38
26	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethanol crude extract) ที่เวลา 48 ชั่วโมงโดยวิธี Dipping method	38
27	การแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี Quick Column Chromatography	39
28	สารสกัดหยาบ (Crude extract) จากระบบตัวทำละลายต่างๆ โดยวิธี Quick Column Chromatography	40
29	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่ระบบตัวทำละลาย CH_2Cl_2 : EtOAc ที่เวลา 24 ชั่วโมงโดยวิธี Dipping method	47
30	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่ระบบตัวทำละลาย CH_2Cl_2 : EtOAc ที่เวลา48 ชั่วโมงโดยวิธี Dipping method	47

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
31	การแยกองค์ประกอบทางเคมีจากใบละหุ่งแดงโดยวิธี Column Chromatography	48
32	สาร Ricinine จากขั้นตอน Column Chromatography	49
33	สูตรโครงสร้างของสาร Ricinine ที่ระบุตำแหน่ง H และ C	49
34	^{1}H NMR spectrum ของสาร Ricinine	50
35	^{13}C NMR spectrum ของสาร Ricinine	51
36	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสาร Ricinine จากใบละหุ่งแดงที่เวลา 24 ชั่วโมงโดยวิธี Topical sprayer method	53
37	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสาร Ricinine จากใบละหุ่งแดงที่เวลา 48 ชั่วโมงโดยวิธี Topical sprayer method	53

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CDNB	=	1-chloro-2, 4-dinitrobenzene
d	=	Doublet
DMSO	=	Dimethylsulfoxide
EDTA	=	Ethylsene randomized design
GST	=	Glutathione-*S*-transferase
Hz	=	Hertz
J	=	Coupling constant
LC_{50}	=	Median lethal concentration
M	=	Molar
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
nm	=	Nanometre
NMR	=	Nuclear Magnetic Resonance
pNPA	=	Paranitrophenyl acetate
ppm	=	Parts per million
PVPP	=	Polyvinyl poly pyrrolidone
S	=	Single
TLC	=	Thin Layer Chromatography
δ	=	Chemical shift

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประสิทธิภาพของสารริซินินจากการสกัดใบละหุ่งแดงต่อหนอนกระทู้หอม : ความเป็นพิษและปฏิกิริยาเอนไซม์ทำลายพิษ

Efficiency of ricinine from *Jatropha gossypifolia* (Euphorbiaceae) leave extract against *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) : Toxicity and detoxification enzyme activities

คำนำ

หนอนกระทู้หอม (Beet armyworm), *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) เป็นแมลงศัตรูพืชชนิด Polyphagous ที่พบแพร่กระจายไปทั่วโลกโดยเป็นแมลงศัตรูพืชที่กัดกินทำลายใบ (Defoliating) ต่อพืชเศรษฐกิจทางการเกษตรเช่น ข้าวโพด ฝ้าย มะเขือเทศ ขึ้นฉ่าย ผักกาดหอม กะหล่ำปลี และหญ้าที่ใช้ในการเลี้ยงปศุสัตว์ (Alfafa) (Wang *et al*., 2006) หนอนชนิดนี้ พบบันทึกครั้งแรกในปี ค.ศ. 1876 ที่รัฐโอเรกอน ประเทศสหรัฐอเมริกา และแพร่กระจายไปยังทวีปยุโรป ประเทศเม็กซิโก และแถบคาริบเบียน (Taylor and David, 2007) สำหรับในประเทศไทยมีการแพร่ระบาดตามแหล่งปลูกต้นหอมมานานหลายสิบปี เช่น จังหวัดราชบุรี กรุงเทพมหานคร นนทบุรี ปทุมธานี สมุทรสาคร สมุทรสงคราม กาญจนบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งแหล่งดังกล่าว มีการระบาดของหนอนกระทู้หอมเป็นประจำ และมักระบาดรุนแรงในช่วงฤดูร้อน (ศศิเทพ, 2547)

นอกจากนั้นยังพบว่าหนอนกระทู้หอมมีการสร้างความต้านทานต่อสารเคมีฆ่าแมลงหลายชนิดเช่นจากรายงานของ Wang *et al*. (2006) พบว่าหนอนกระทู้หอมมีการพัฒนาตัวเองให้ต้านทานต่อยาฆ่าแมลงเช่น Organochlorine, Organophosphate, Carbamate และ Pyrethroid แต่ในปัจจุบันก็ยังมียาฆ่าแมลงชนิดใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพดีที่ใช้ควบคุมหนอนชนิดนี้ได้ เช่น Chlorfenapyr, Tebufenozide, Emamectin benzoate, Indoxacarb และ Spinosad อย่างไรก็ดีในการใช้ยาฆ่าแมลงมักก่อให้เกิดสารตกค้างในผลผลิตทางการเกษตร รวมทั้งยาฆ่าแมลงหลายชนิด เช่น สารในกลุ่ม Organophosphorous และ Organochlorine เมื่อมีการใช้อย่างต่อเนื่องจะส่งผลกระทบต่อแหล่งน้ำและสิ่งแวดล้อม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดังนั้นจึงมีการพัฒนาทางเลือกใหม่ๆในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ซึ่งที่ผ่านมาได้มีการเริ่มใช้พืชที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่สามารถออกฤทธิ์และใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชต่างๆ (Nathan *et al*., 2008) สำหรับประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศเกษตรกรรม และมีการประกาศตัวว่าจะเป็นครัวอาหารของโลก แต่ในปัจจุบันเกษตรกรยังมีการใช้สารเคมีฆ่าแมลงกันอย่างกว้างขวาง ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในพืช ซึ่งก็มีหลายวิธีในการลดสารพิษตกค้าง โดยการปลูกพืชแบบไม่ใช้ดินและสารเคมี รวมทั้งใช้การควบคุมแบบชีววิธีก็สามารถลดปัญหาดังกล่าวได้ จึงมีการรณรงค์ให้เกษตรกรมีการทำการเกษตรอินทรีย์โดยปราศจาก หรือลดการใช้สารเคมีฆ่าแมลง รวมไปถึงการลดปัญหาสารพิษตกค้าง และเพื่อให้ได้มาตรฐานระดับสากลเพื่อลดข้อกีดกันทางการค้าสากล และเกิดผลดีต่อการส่งออก รวมถึงอาจสามารถลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกรจากการซื้อสารเคมีเพื่อกำจัดศัตรูพืช อีกทั้งเกษตรกรและผู้บริโภคเองก็จะได้ปลอดภัยจากสารเคมี ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีงานวิจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการนำสารสกัดจากพืชมาใช้ควบคุมศัตรูพืช เช่น สารสกัดจากหญ้าแห้วหมู (*Cyperus rotundus* L.) เพื่อใช้ควบคุมหอยเชอรี่ (วัชราภรณ์, 2544) สารสกัดจากหางไหลเพื่อใช้ควบคุมแมลงวันผลไม้ (ทิพนาถ, 2550) สารสกัดจากใบของ *Goniothalau s* (Annonaceae), *Melia azederach* L.เพื่อใช้ควบคุมประชากรหนอนกระทู้หอม (Nathan *et al*., 2008) สารสกัดจากใบเสม็ดขาว (*Melaleuca leucadendron* Linn.)เพื่อใช้ควบคุมหนอนกระทู้ผัก และหนอนกระทู้หอม (นฤมล, 2546) สารสกัดจากเปลือกมังคุดเพื่อควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (Bullungpoti, 2007) นอกจากการใช้สารจากพืชในการควบคุมแมลงศัตรูพืชแล้วยังมีการใช้ไวรัสนิวเคลียร์โพลีฮีโดรซีส (Nuclear polyhedrosis Virus) สำหรับกำจัดหนอนกระทู้หอม (อรรจน์สิทธิ, 2541) และใช้ Microbial toxinsเช่น O-endotoxins ซึ่งได้มาจาก *Bacillus thuringiensis* (Gill *et al*., 1992) และโปรตีนที่สกัดได้จากฟังไจเช่น *Metarhizum anisopliae, Beauveria bassiana, Beauveria brongniartii* และ *Scopulariopsis brevicaulis* นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดจากละหุ่งแดงมีฤทธิ์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชเนื่องจากมีสารสำคัญ เช่น Jatrophenone ใช้ควบคุมประชากรของหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) (Ravindranath *et al*., 2003) Jatrodien และ Gossypifan ใช้ควบคุมประชากรของ Jewel bug (Das *et al*., 2003)

ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์จากใบละหุ่งแดง (*Jatropha gossypifolia*) เพื่อใช้ในการควบคุมประชากรหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) โดยวัดประสิทธิภาพในการควบคุมในรูปแบบค่าความเป็นพิษ (LC_{50}) รวมถึงผลต่อระดับเอนไซม์ทำลายพิษต่าง ๆ เช่น Carboxyl esterae และ Glutathione-*S*- transferase ผ่านทางเครื่องมือ Spectrophotometer

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบละหุ่งแดง (*Jatropha gossypifolia*) ที่มีต่อหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*)

2. ศึกษาหาสารบริสุทธิ์ของสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (*Jatropha gossypifolia*) ที่มีผลต่อความเป็นพิษในหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*)

3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ Carboxylesterase และ Glutathione-*S*- transferase ของหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (*Jatropha gossypifolia*)

4. ศึกษาผลต่อแมลงกลุ่มที่มีประโยชน์คือ *Meteorus Pulchricornis*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. ละหุ่งแดง (*Jatropha gossypifolia* L.)

ละหุ่งแดง (*Jatropha gossypifolia* L.) มีการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานดังนี้

Kingdom Plantae
Division Magnoliophyta
Class Magnoliopsida
Order Malpighiales
Family Euphorbiaceae
Genus *Jatropha*
Species *Jatraopha gossypifolia*
(เต็ม, 2544)

1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

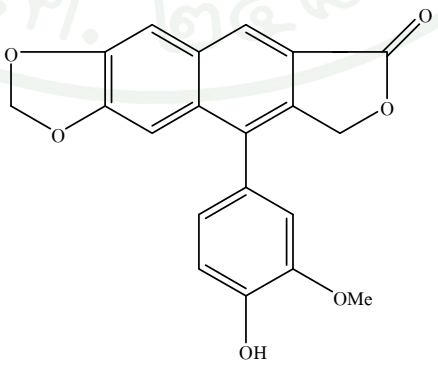
ละหุ่งแดงจัดว่าเป็นไม้พุ่มขนาดกลาง (ภาพที่ 1) ซึ่งมีขนาดลำต้นสูงสุดถึง 1.8 เมตร มีกลีบดอก 3-5 กลีบ ส่วนของใบมีความกว้างและยาวประมาณ 20 เซนติเมตร อีกทั้งยังมีก้านใบที่ค่อนข้างยาวและปกคลุมไปด้วยขน นอกจากนั้นใบอ่อนยังมียางเหนียว ส่วนลำต้นของละหุ่งแดงนั้น จะมีสีเขียวและมีน้ำยางไหลซึมออกมาจากลำต้น และละหุ่งแดงนั้นยังถือว่าเป็นพืชที่ทนความแห้งแล้ง นอกจากนั้นยังพบว่าละหุ่งแดงแพร่กระจายอยู่ในแถบประเทศเขตร้อน (Ogundare, 2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 1 ลักษณะของต้นละหุ่งแดง

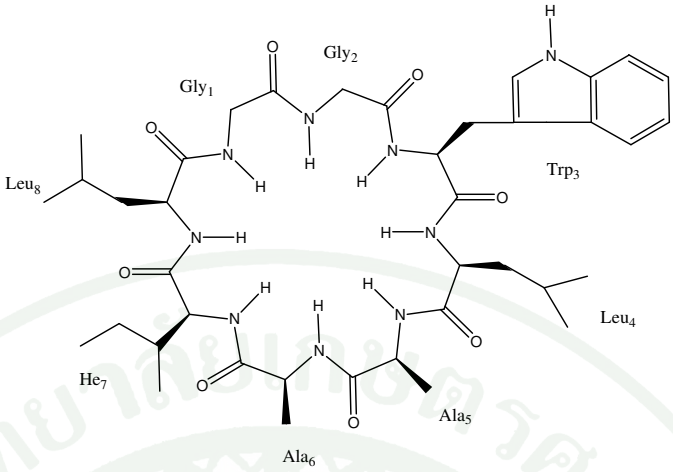
1.2 สารที่พบ

จากรายงานการวิจัยของ Ravindranath *et al*. (2007) พบว่าละหุ่งแดงประกอบด้วยสาร Jatrophenone, Diterpene ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำยารักษาโรคและยาฆ่าแมลงนอกจากนั้นยังพบว่าละหุ่งแดงประกอบด้วยสาร 4'-*O*-demethylretrochinensin (Das *et al*., 2003) (ภาพที่ 2) และมีสารเคมีสำคัญอื่นๆ เช่น CyclogossineA, Cyclogossine B และ Gossypifan (Guette *et al*., 1997) (ภาพที่ 3 และ ภาพที่ 4)

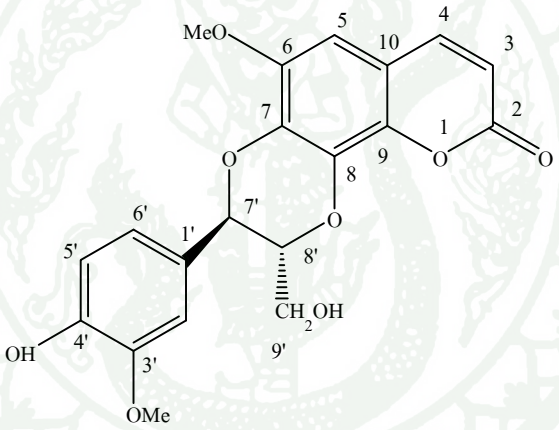


ภาพที่ 2 4'-*O*-demethylretrochinensin

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 3 Cyclogossine A, Cyclogossine B



ภาพที่ 4 Cleomiscosin A

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3 ประโยชน์

จากรายงานของ Ogundare (2007) กล่าวว่าส่วนของ ราก ลำต้น ใบ และผลของละหุ่งแดงนำมาใช้ทำยาของชาวพื้นเมืองในแถบประเทศแอฟริกา ส่วนของลำต้นอ่อนนำมาใช้ทำความสะอาดลิ้นและฟัน นอกจากนั้นยังนำมารักษาอาการปากอักเสบที่เกิดจากเชื้อราได้อีกด้วย และยังพบอีกว่าชาวไนจีเรียยังปลูกต้นละหุ่งแดงเพื่อป้องกันการชะล้างพังทลายของหน้าดิน ประโยชน์ของละหุ่งแดงยังมีอีกมากมายตัวอย่างเช่น ส่วนของใบยังนำมาสกัดเป็นยาล้างแผล นำมาอาบเพื่อลดอาการปวดเมื่อย แก้ผื่นคันต่างๆ รวมถึงส่วนของลำต้นนั้นยังมีน้ำยางที่สามารถนำมาใช้ห้ามเลือดจากบาดแผล (Oduola *et al*., 2005) และในส่วนของอุตสาหกรรมนั้นยังนำเมล็ดของละหุ่งแดงมาสกัดเอาสารที่มีประโยชน์เพื่อใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตพลาสติกได้อีกด้วย (Hosamani *et al*., 2007)

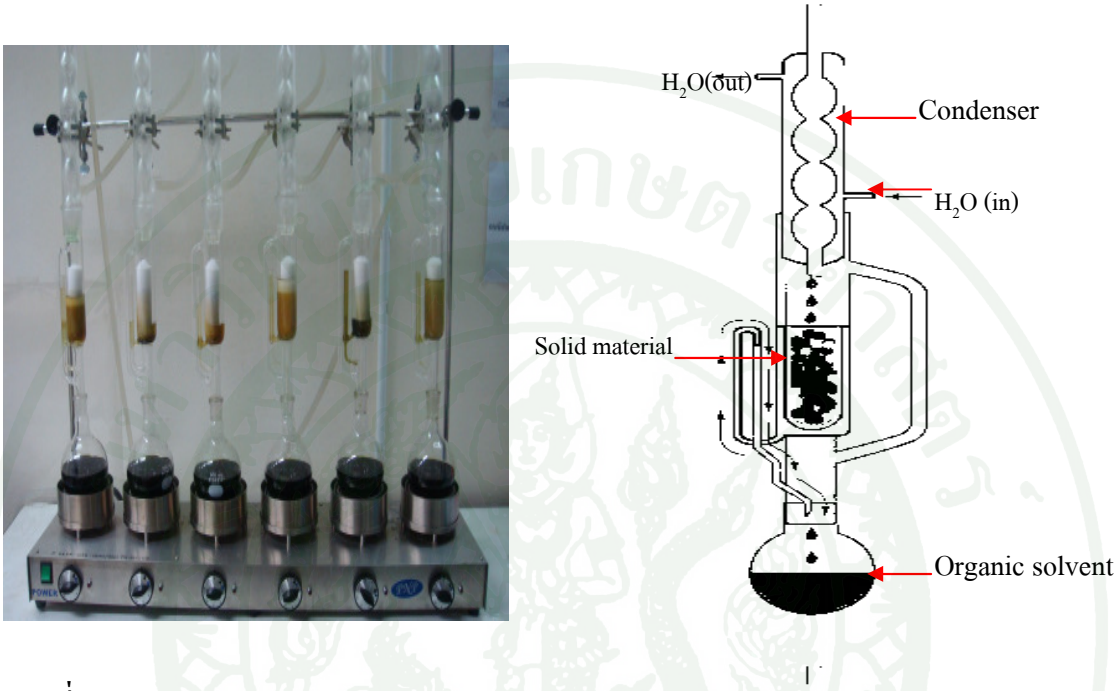
2. การตรวจสอบสารเคมีจากสารสกัดจากพืช (Phytochemical Screening)

เนื่องจากภายในพืชมีองค์ประกอบสารเคมีภายในมากมาย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจหาสารเคมีซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารสกัดจากพืชโดยนำพืชต่าง ๆ มาตรวจสอบหาสารเคมีโดยการนำมาสกัดและแยกต่อโดยวิธีการต่างๆ จนได้สารบริสุทธิ์จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบฤทธิ์ทางชีววิทยา ทั้งนี้วิธีการตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อหาสารเคมีในพืชควรจะต้องเป็นวิธีที่มีลักษณะดังต่อไปนี้คือ เร็ว ง่าย ใช้เครื่องมือน้อยที่สุด เป็นวิธีตรวจสอบที่ค่อนข้างเฉพาะสำหรับกลุ่มของสารเคมีที่ต้องการ สามารถบอกปริมาณของสารคร่าว ๆ ได้และสามารถบอกได้ว่าเป็นสารตัวใดตัวหนึ่ง (นพมาศ, 2544)

ทั้งนี้การสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของสารสกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้เช่น การสกัดด้วย Soxhlet Extractor (ภาพที่ 5) ซึ่งเป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายในขวดกลม (Round bottle flask) ระเหยขึ้นไป แล้วกลั่นตัวลงมาใน Thimble ซึ่งบรรจุสารที่ต้องการสกัดไว้ เมื่อตัวทำละลายใน Extracting chamber สูงถึงระดับสารสกัดจะไหลกลับลงไปในขวดที่บรรจุสารละลาย (Round bottle flask) ด้วยวิธีกาลักน้ำขวดนี้ได้รับความร้อนจาก Heating mantle หรือหม้อถังไอน้ำตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไป ทิ้งสารสกัดไว้ใน Flask

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตัวทำละลายเมื่อกระทบเครื่องควบแน่น (Condenser) จะกลั่นตัวกลับลงมาสกัดสารใหม่ วนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ (นพมาศ, 2544)



ภาพที่ 5 Soxhlet extractor และส่วนประกอบ

ตัวทำละลายเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญสำหรับการสกัดแยกสารซึ่งในการเลือกใช้ตัวทำละลายอาศัยหลักเกณฑ์ต่อไปนี้คือ

1. สารละลายและตัวทำละลายมีคุณสมบัติความมีขั้วคล้ายคลึงกัน
2. ละลายสารที่ต้องการออกมามากที่สุด ในขณะที่ละลายสารที่ไม่ต้องการออกมาน้อยที่สุด (Selectivity)
3. แรง (Force) แรงซึ่งเกี่ยวข้องในการละลายที่สำคัญคือ

3.1 Dispersion force เป็นแรงที่เกิดจาก Transient charger induced ในโมเลกุลพวกตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วจะประกอบด้วยโมเลกุลซึ่งเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ทำให้พวกสารที่ไม่มีขั้วเข้าไปแทรกตัวอยู่ระหว่างโมเลกุลได้ง่าย

3.2 Dipole-dipole force เป็นแรงที่พบในตัวทำละลายที่มีขั้ว เกิดการเหนี่ยวนำในโมเลกุลเกิดเป็นขั้วบวกและขั้วลบทำให้โมเลกุลของตัวทำละลายที่มีขั้วจับกันแน่นพวกสารซึ่งไม่มีขั้วจะแทรกตัวเข้าไปได้ยาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3 H-bonding สารที่สามารถสร้าง H-bonding กับตัวทำละลายได้ดีก็จะละลายได้ดี

ตัวทำละลายอาจจะจัดเรียงตามลำดับความมีขั้วจากน้อยไปมากได้ดังนี้ Cyclohexane, Carbontetrachloride, Benzene, Ether, Chloroform, Acetone, Ethyl acetate, Ethanol, Methanol, Water, Acids และ Bases

ตัวทำละลายที่ใช้มาก ๆ ได้แก่

1. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) เป็นตัวทำละลายที่ดีแต่มี Selectivity น้อย เกิด emulsion ง่ายถ้าใช้สกัดสารซึ่งเป็นด่างแก่อาจจะสลายตัวให้กรดเกลือ

2. อีเทอร์ (Ether) มีอำนาจในการละลายน้อยกว่าคลอโรฟอร์ม แต่มี Selectivity ดีกว่าคลอโรฟอร์ม ข้อเสียคือ ระเหยง่าย ระเบิดง่าย เกิดoxide ได้ง่ายและดูดน้ำได้มาก

3. เฮกเซน (Hexane) เหมาะสำหรับพวกสารที่ไม่มีขั้วมักใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับกำจัดไขมันจากสมุนไพร

4. แอลกอฮอล์ (Alcohol) ที่ใช้มากคือเมธานอล และเอทานอล เป็น All purpose solvent เนื่องจากมีอำนาจในการละลายกว้างมาก

อย่างไรก็ดีในพืชแต่ละชนิดจะมีสารเคมีหลายชนิดอยู่ภายใน ดังนั้นสารสกัดที่ได้เบื้องต้นจึงเป็นส่วนผสมของสารเคมี ดังนั้นเพื่อให้ได้สารสำคัญที่บริสุทธิ์จึงจำเป็นต้องอาศัยวิธีการแยกโดยใช้เทคนิคและอุปกรณ์ต่าง ๆ วิธีหนึ่งที่ทำกันอย่างแพร่หลายคือ การใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี (Chromatography) เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยหลักการกระจายของสารในระหว่าง Phase 2 ชนิด ซึ่งไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน คือ วัฏภาคคงที่ (Stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) โดยสารจะเคลื่อนที่ (Migrate) ไปบน Stationary phase โดยการพาของ Mobile phase ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของสารไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับการทำปฏิกิริยา (Interact) ระหว่างสาร (Solute) กับ Stationary phase และระหว่าง Solute กับ Mobile phase สารใดที่มีการทำปฏิกิริยา (Interact) กับ Stationary phase ได้ดีสารนั้นจะเคลื่อนที่ไปได้ช้า ตัวอย่างของเทคนิคโครมาโทกราฟี เช่น Thin layer chromatography (TLC) ซึ่งจัดว่าเป็นเทคนิคโครมาโทกราฟีที่มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างต่ำ ใช้เวลาน้อย อีกทั้งยังเป็นวิธีแยกสารที่มีประสิทธิภาพ (Soponar *et al*., 2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. แมลงที่นำมาศึกษา

3.1 หนอนกระทู้หอม

หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) มีหลักการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานดังนี้

Phylum Arthopoda
Class Insecta
Order Lepidoptera
Family Noctuidae
Genus *Spodoptera*
Species *Spodoptera exigua*

ชีวประวัติและพฤติกรรม

หนอนกระทู้หอม (Beet armyworm) เป็นหนอนที่มีลักษณะลำตัวอ้วน ผนังลำตัวเรียบเมื่อโตเต็มที่จะมีสีหลายแบบตั้งแต่สีเขียวอ่อน เทา หรือน้ำตาลดำ ด้านข้างจะมีแถบสีขาวข้างละแถบพาดตามยาวลำตัว (ภาพที่ 6) วางไข่เป็นกลุ่มเล็ก ช่วงเวลาการวางไข่อยู่ระหว่าง 16.00-20.00 น. เช่นเดียวกับหนอนผีเสื้ออื่น ไข่จะวางตามใต้ใบ ถ้าเป็นกะหล่ำ ผักกาด จะค่อนไปทางปลายใบ ถ้าเป็นหนอนหอมมีจำนวนตั้งแต่ 20-80 ฟองขึ้นไป ในธรรมชาติจะฟักเป็นตัวไม่เกิน 72 ชั่วโมง ในช่วงที่อุณหภูมิและความชื้นสูง ไข่จะฟักเป็นตัวเร็วขึ้น

เมื่อหนอนออกจากไข่จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มแทะกินผิวใบด้านล่าง หนอนจะเข้าหลอดหอมภายใน 3 ชั่วโมงในใบหอม ถ้าเป็นพืชอื่นจะอยู่รวมกันจนกระทั่งระยะที่ 3 จากระยะกาเจริญเติบโตทั้งหมด 6 ระยะ และจะมีการลอกคราบทั้งหมด 5 ครั้ง ระยะที่ 3 เป็นระยะที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงทางสีสัน และหนอนจะแยกกันอยู่เพราะตัวโตขึ้น หนอนอาจเข้าไปกัดกินใบยอด กาบใบ หัว ผัก ผล ความรุนแรงของการทำลายจะเริ่มตั้งแต่ระยะนี้ (ภาพที่ 7)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

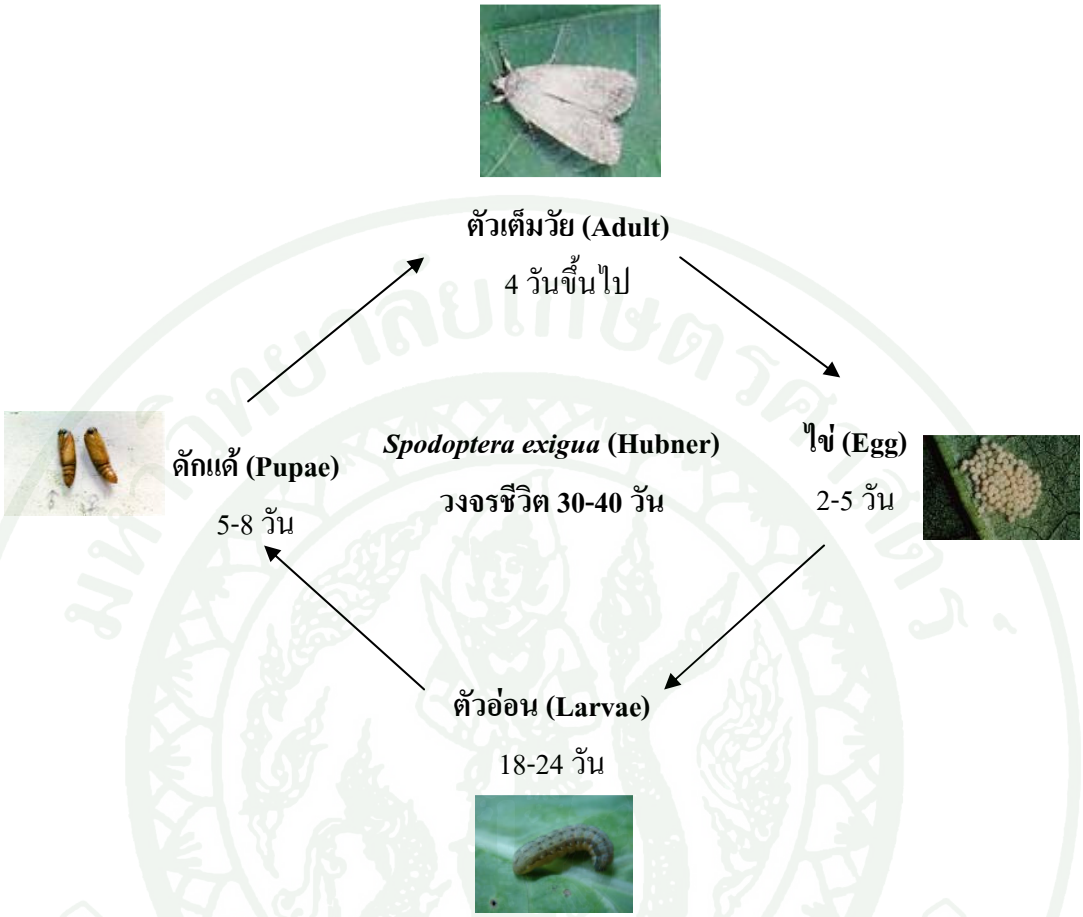
ภาพที่ 6 ลักษณะของหนอนกระทู้หอมวัยที่ห้า

นอกจากนี้ยังพบว่าหนอนสามารถทนต่อสารเคมีได้สูง ตัวโตเต็มที่มีขนาด 3.0 เซนติเมตร อายุตลอดการเจริญเติบโตในธรรมชาติ 14-17 วัน มีระยะการหดตัวประมาณ 2-3 วัน ก่อนเข้าดักแด้ ในระยะนี้หนอนจะเริ่มหาทางเข้าใต้ผิวดินบริเวณโคนต้นพืชเพื่อเข้าดักแด้ จะพบดักแด้ในดินลึกประมาณ 1-2 เซนติเมตร ระยะดักแด้ประมาณ 5-7 วัน (ศศิเทพ, 2547)

ตัวเต็มวัยเป็นผีเสื้อขนาดกลาง มีสีน้ำตาลแก่ปนเทา ขนาดปีกกว้าง 2.0-2.5 เซนติเมตร ลักษณะเด่นคือ จุดสีน้ำตาลอ่อน 2 จุด ตรงกลางปีกคู่หน้า ตัวผีเสื้ออาศัยอยู่ตามลำต้น ใบ หรือตามพุ่มไม้หนา ใต้ฟางที่คลุมแปลงหอม ตัวเต็มวัยอยู่ได้ประมาณ 5-10 วัน (อรรจน์สิทธิ, 2541)

ภาพที่ 7 การทำลายใบพืชของหนอนกระทู้หอม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 8 วงจรชีวิตของหนอนกระทู้หอม

หนอนกระทู้หอมเป็นหนอนที่กินจุรวดเร็ว และมักหลบซ่อนตัวตามใบยอด ซากกาบใบ กัดกินใบหลอดหรือใบหอม หรืออาจจะเข้าในหัวกะหล่ำ ฝักถั่ว การทำลายอาจเกิดทั้งกลางวัน และกลางคืน หนอนจะอาศัยกัดกินในใบที่เป็นหลอดจะออกมาเมื่อโตแล้ว หัวหอมอาจถูกทำลายในขณะตากแห้ง และอาจมีหนอนติดไปในที่เก็บ หากนำไปปลูกก็จะแพร่พันธุ์ไปใน แหล่งปลูกใหม่ได้ (ศศิเทพ, 2547)

ความสำคัญทางเศรษฐกิจ

การทำลายของหนอนกระทู้หอมก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรวดเร็ว เนื่องจากหนอนชนิดนี้เป็นชนิด Polyphagous จึงมีพืชอาศัยมากโอกาสที่หนอนจะดำรงชีวิตและขยายพันธุ์มีมาก จึงเป็นปัญหาร้ายแรงสำหรับพืชไร่และพืชสวนหลายชนิดโดยหากพบการระบาดมาก ๆ จึงไม่สามารถที่จะ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ควบคุมประชากรของหนอนกระทู้หอมได้ทันจะส่งผลให้ไม่สามารถเก็บผลผลิตมาส่งออกได้ (อรรจน์สิทธิ, 2541)

การระบาดและเขตการแพร่กระจาย

พบการระบาดรุนแรงในช่วงเดือนเมษายน - มิถุนายน ในแหล่งปลูกผักทั่วไปในเขตภาคกลางเช่น กรุงเทพมหานคร นนทบุรี สมุทรสงคราม ปทุมธานี นครปฐม ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี และกาญจนบุรี (ภาพที่ 9) นอกจากประเทศไทยแล้วยังพบในสหรัฐอเมริกา ประเทศอินเดีย และจีน (อุทัย, 2537) หนอนกระทู้หอมมีพืชอาหารมากมาย เช่น พืชตระกูลกะหล่ำ หน่อไม้ฝรั่ง หอม มันเทศ องุ่น ถั่วเหลือง ถั่วลิสง ฟักทอง มะระ มะเขือเทศ ข้าวโพด ยาสูบ ฯลฯ โดยหนอนกัดกินใบให้ขาด หรือเป็นรอยแหว่งจากขอบใบเข้าภายใน ตลอดไปจนถึงยอดอ่อนและลำต้น (อรรจน์สิทธิ, 2541) เหตุผลสำคัญที่ทำให้หนอนกระทู้หอมระบาดคือ ระยะหนอน (Larvae) ซึ่งสามารถแพร่กระจายได้ง่ายโดยหนอนกระทู้หอมสามารถเคลื่อนที่ไปยังพื้นดินรวมถึงไปยังพืชผักหรือพุ่มไม้ใกล้เคียงได้โดยเฉพาะในช่วงเวลากลางวัน (Wie *et al*., 2008)

ภาพที่ 9 เขตพื้นที่แพร่ระบาดของหนอนกระทู้หอมในประเทศไทย

ที่มา www.dpt.go.th

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การป้องกันกำจัด

หนอนชนิดนี้ได้พัฒนาต้านทานต่อสารฆ่าแมลงมากมายหลายชนิด การป้องกันกำจัดในพืชผักส่งออกที่ต้องเก็บเกี่ยวทุกวันการใช้สารฆ่าแมลงจะต้องคำนึงถึงพิษตกค้างของสารฆ่าแมลงในผลผลิตมาก ซึ่งมีหลายวิธีเพื่อเลือกปฏิบัติดังนี้

1. ชีววิธี เช่น การควบคุมโดยจุลินทรีย์ เพื่อลดการใช้สารเคมีปราบศัตรูพืช มีความปลอดภัยต่อแมลงที่เป็นประโยชน์ คน สัตว์ รวมทั้งสิ่งแวดล้อมเช่นการใช้เชื้อราในการกำจัดหนอนกระทู้หอมในระยะไข่และตัวหนอน (ศศิเทพ, 2547) และการใช้ไวรัสนิวเคลียร์โพลีฮีโดรซีส(NPV) สำหรับกำจัดหนอนกระทู้หอม (อรรจน์สิทธิ, 2541) และการใช้สารสกัดจากพืชในการกำจัดหนอนกระทู้หอม เช่นใช้สารสกัดจากใบเสม็ดขาว (*Melaleuca leucadendron* Linn.) (นฤมล, 2546)

2. วิธีกล เป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่ายและสะดวก เมื่อพบกลุ่มไข่ของหนอนกระทู้หอม สามารถเก็บทำลายได้ทันที

3. การใช้สารเคมีกำจัดหนอนกระทู้หอม เช่น การใช้สาร Spinosad (Wang *et al*., 2006) Goniothalamin และ Abamectin (Nathan *et al*., 2008)

3.2 *Meteorus pulchricornis*

Meteorus pulchricornis มีการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานดังนี้

Phylum Arthopoda
Class Insecta
Order Hymenoptera
Family Braconidae
Genus *Meteorus*
Species *Meteorus Pulchricornis*

Meteorus pulchricornis (Wesmael) (=*Japonicus* Ashmead) หรือแตนเบียน (ภาพที่ 10) มีต้นกำเนิดมาจากทวีปยุโรปและแอฟริกาเหนือ ถือว่าเป็น Endoparasitoid ที่อาศัยและโจมตีอยู่ในตัวอ่อนของ Lepidopterous รวมถึงแมลงศัตรูพืชต่างๆ เช่น *S. exigua*(Hübner), *Helicoverpa*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

armigera , *H. assulata*, *S. litura*, *Plutella xylostella*, *Mamestra brassicae, Anomis flava* และ *Cystidia couaggaria* (Wu *et al*., 2008)

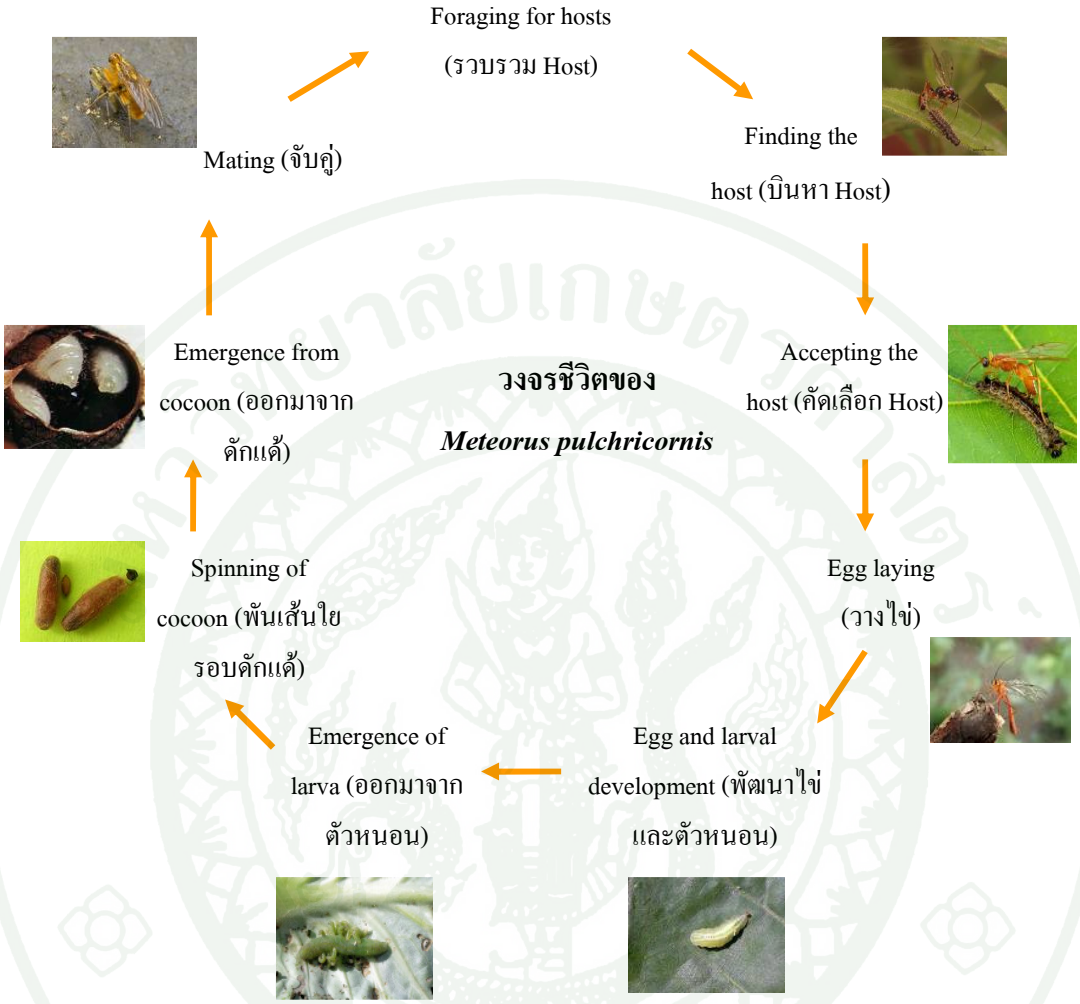
วงจรชีวิตของแตนเบียนนั้น ตัวเมียจะบินหา Host และจำแนก Host โดยใช้ Antennae หลังจากนั้นจะ Inject ไข่เข้าไปใน Caterpillar เมื่อ ตัวอ่อน (Larvae) พัฒนาตัวเองอย่างสมบูรณ์แล้ว จะเข้าสู่ระยะดักแด้ (Pupae) และ ตัวเต็มวัย (Adult) ต่อไป ระยะเวลาจากไข่จนเข้าสู่ตัวเต็มวัย จะใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 5 สัปดาห์ (ภาพที่ 11)

ภาพที่ 10 *Meteorus pulchricornis*

เขตแพร่กระจาย

Meteorus pulchricornis แพร่กระจายในเขตทวีปยุโรป แอฟริกาเหนือ นิวซีแลนด์ และแถบเอเชียเช่น จีน เกาหลี และญี่ปุ่น (Chao *et al*., 2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 11 วงจรชีวิตของ *Meteorus pulchricornis*

ความสำคัญของ *Meteorus pulchricornis*

จากการรายงานพบว่าใช้ *Meteorus pulchricornis* ควบคุมแมลงศัตรูพืช เช่น ควบคุมประชากรของ Gypsy moth (*Lymantria dispar* (L.) Cotton bollworm (*Helicoverpa armiger* (Hübner), Beet armyworm (*Spodoptera exigua* Hubner) และ *Spodoptera litura* Fabricius ซึ่งวิธีการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้แตนเบียนนั้น พบแพร่หลายในประเทศญี่ปุ่น นิวซีแลนด์ จีน ทวีปยุโรป และ ทวีปอเมริกาเหนือ (Wu *et a.l*, 2008) จากรายงานของ Yahui and Baoping (2006)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พบว่าเมื่อเลี้ยง *Meteorus pulchricornis* ไว้ในกรงเดียวกับหนอนกระทู้หอมซึ่งเป็น Host ทำให้ *Meteorus pulchricornis*วางไข่ในหนอนกระทู้หอมรวมทั้งมีการพัฒนาตัวอ่อนภายในหนอนกระทู้หอมอย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นตัวอ่อนของ *Meteorus pulchricornis* ทำการเจาะผนังลำตัวของหนอนกระทู้หอมออกมาสู่สภาพแวดล้อมภายนอก จึงทำให้หนอนกระทู้หอมตายในที่สุด

4. การต้านทานของแมลงที่มีต่อสารเคมี

การต้านทานของแมลงที่มีต่อสารเคมีที่เข้าสู่ร่างกายนั้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ สารพันธุกรรมรวมถึงกระบวนการคัดเลือกทางธรรมชาติ (Process of natural selection) เมื่อสภาพแวดล้อมภายนอก ส่งผลต่อประชากรของแมลงจึงทำให้ลักษณะของรูปแบบพันธุกรรม (Genotype) ในแมลงแต่ละตัวมีการปรับเปลี่ยนเพื่อให้อยู่รอดและคัดลอกลักษณะเด่นไปยังรุ่นต่อไปจึงทำให้ แมลงมีการพัฒนาตัวเองและปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีขึ้นและมีการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว

ปัจจุบันเกษตรกรมักจะประสบปัญหาการต้านทานของแมลงที่มีต่อสารเคมี ส่งผลให้จำนวนของแมลงศัตรูพืชเพิ่มจำนวนมากขึ้น และยากต่อการควบคุมกำจัด จึงทำให้ใช้สารเคมีฆ่าแมลงในปริมาณเที่สูงขึ้นตามไปด้วย จากรายงานของ Decombel *et al*. (2004) พบว่า Homoptera, Lepidoptera เกิดการต้านทานต่อสาร Abamectin นอกจากนั้นยังพบว่าหนอนกระทู้หอมจะเกิดการต้านทานต่อสารเคมี Spinosad ในวัยที่ 3 (Third-instar larvae) นอกจากนี้ยังพบว่าหนอนกระทู้หอมในประเทศไทยเกิดการต้านทานต่อสาร Tebufenozide และ Methoxyfenozide (Wang *et al*., 2006)

กลไกการป้องกันและทำลายพิษของแมลง

สิ่งมีชีวิตเมื่อได้รับสารแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย ย่อมมีกลไกการตอบสนองต่อสารเหล่านั้น โดยมีกระบวนการป้องกันเพื่อทำหน้าที่ทำลายสารพิษหรือสารแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย (เกิดการ Detoxification) ทั้งนี้ จะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางชีววิทยา (Biotransformation)โดยมีเอนไซม์ทำลายพิษ (Detoxification enzymes) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แล้วจึงถูกกำจัดออกนอกร่างกาย สิ่งที่มีชีวิตทุกชนิดเมื่อได้รับสารแปลกปลอมเข้าไปไม่ว่าจะทางการกิน การดม หรือการสัมผัสทางผิวหนัง สารแปลกปลอมจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ซึ่งเป็นผลมาจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิต อย่างไรก็ตาม พบว่าปฏิกิริยาหลายชนิดไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ เช่น สาร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แปลกปลอมอาจเกาะกับสารที่ร่างกายสร้างขึ้น (Endogenous) ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิส โดยไม่มีเอนไซม์เร่งปฏิกิริยา ผลจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษนั้น นอกจากจะทำให้มีคุณสมบัติทั่วไปในการละลายน้ำได้ดีขึ้นแล้วยังมีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารนั้นด้วย คือเมื่อถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแล้วจะมีฤทธิ์น้อยลงหรือไม่มีฤทธิ์(Detoxification) แต่สารพิษบางชนิดต้องมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเสียก่อนจึงจะสามารถออกฤทธิ์ได้ (Toxification) หรือเรียกว่ากระบวนการเมตาบอลิซึมของสารพิษ (Metabolism of toxic compound) (ชัยวัฒน์ และคณะ, 2539) อวัยวะที่สำคัญในกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษและขับถ่ายสารพิษออกนอกร่างกาย ได้แก่ ตับ ไต ปอด และทางเดินอาหาร เป็นต้น

สำหรับแมลง เมื่อได้รับสารเคมี จะเกิดพฤติกรรมหลีกเลี่ยงสารเคมีที่ก่อเกิดพิษกับแมลง โดยเรียกพฤติกรรมนี้ว่า พฤติกรรมหลีกเลี่ยง (Behavior avoidance) เพื่อไม่ให้ร่างกายสัมผัสกับสารนั้นๆ ถ้าแมลงรับสารในปริมาณที่ไม่มากพอที่จะทำให้เสียชีวิต ก็จะเกิดการสะสมสารนั้นไว้ในชั้นไขมัน และเนื้อเยื่อต่างๆ นอกจากนี้แมลงมีกลไกการหลีกเลี่ยง หรือทำลายพิษหลายๆแบบ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการดำรงชีวิต เช่นในปัจจุบันที่แมลงมีการสร้างความต้านทานต่อสารปราบศัตรูพืชเพิ่มมากขึ้น โดยพบว่าแมลงมีกลไกการใช้เอนไซม์ช่วยในการกำจัดสารพิษ เพื่อให้สารพิษถูกกำจัด (พุทธิพร, 2549)

เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส (Carboxyl esterase)

เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส จัดว่าเป็นเอนไซม์เอสเทอเรส (Esterase) ชนิดหนึ่ง (Zhang and Fariss, 2001) เอนไซม์ชนิดนี้พบได้ในไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial), ไซโทซอล (Cytosol), ไมโครโซม (Microsome), นิวเคลียส (Nucleus) ของเซลล์ลำไส้ และกล้ามเนื้อส่วนหลัง โดยจะเกิดปฏิกิริยาใน Nuclei, Cell debris และมีความสามารถละลายน้ำได้ค่อนข้างต่ำ และพบว่าในแมลงเอนไซม์ชนิดนี้จะมีบทบาทต้านทานการทำงานของยาฆ่าแมลงในกลุ่มของ Organophosphorus (OPs) (Zhu and Brindley, 1990) จากการรายงานของ Sogorb *et al.* 2006 ยังพบว่าเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส ยังมีผลต่อกระบวนการ Phosphorylation ของสารพวก คาร์บาเมต (Carbamate) นอกจากนั้น Chang and Whalon (1987) ได้ศึกษากระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ของเอนไซม์ Carboxyl esterase ในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ต้านทาน ต่อสารกลุ่ม Malathion อีกทั้ง Dai and Sun (1984) พบว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์ Esteraseในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลต้านทานต่อสารกลุ่ม Permethrin และ Pyrethroid เช่น Phenothrin และจากการรายงานของ Chen and Sun (1994) พบว่าเอนไซม์ Carboxyl esterase เป็นเอนไซม์ทำลายพิษที่มีต่อยาฆ่าแมลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เช่น Malathion และ Trans - permathrin นอกจากนั้นยังไปจับกับโปรตีนในกลุ่มของ Organophosphates เช่น Paraoxon, Malaoxon, Carbamates และ Pyrethroid จากรายงานของ Cohen *et al*. (1997) พบว่าในแมลงชนิดเดียวกันแต่ต่างระยะกันการทำงานของเอนไซม์ Esterase ก็จะแตกต่างกันด้วยเช่น *Tribolium castaneum* (Herbst) ระยะไข่จะมีการทำงานของ Esterase น้อยลงและเพิ่มขึ้นในระยะตัวหนอน จากนั้นเมื่อเข้าสู่ระยะดักแด้การทำงานของ Esterase จะลดลงและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเป็นตัวเต็มวัย นอกจากนั้น สุรพล และ คณะ (2544) พบว่าหลังจากหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera.litura*) ได้รับสารสกัดจากเหง้าข่ามีผลทำให้เหนี่ยวนำเอนไซม์ Esterase เพิ่มขึ้นประมาณ 1-5 เท่า จากรายงานของ Lara *et al*. (2004) พบว่าสารสกัดจากใบยาสูบ มีผลทำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ Carboxyl esterase ลดลง

เอนไซม์กลูตาไทโอนเอสทรานสเฟอเรส (Glutathione-*S*-transferase)

Glutathione -*S*-transferase (GST) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ทำลายพิษที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในวัฏภาคสอง (Phase II) สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่มีการใช้ออกซิเจน (Aerobic organisms) โดยจะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาConjugation ของ Thiol group ที่จะรีดิวซ์ Glutathione-*S*-transferase ให้ถึง Electrophilic center ทำให้สารเคมีเกิดการละลายน้ำและถูกขับออกนอกร่างกาย ส่วนในกลุ่มที่ไม่มีปฏิกิริยา Conjugation ของ GST ซับสเตรทจะต้องอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ Peroxidase ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการขนส่งสารภายในเซลล์และมีผลต่อการสังเคราะห์ฮอร์โมนภายในเซลล์ ซึ่งเอนไซม์ Glutathione-*S*-transferase ในแมลงนั้นมีทั้งหมด 3 ประเภทด้วยกันคือ Delta, Sigma และ Epsilon นอกจากนั้นยังพบเอนไซม์ Glutathione-*S*-transferase ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โปรโตซัว สาหร่าย ฟังไจ แบคทีเรียและในพืชซึ่ง Glutathione-*S*-transferase ในแมลงมีความสำคัญในการต้านทานต่อยาฆ่าแมลงและพบว่า Glutathione-*S*-transferase จะมีปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้นในการต้านทานต่อสารในกลุ่ม Organophosphate, Organochlorines และ Pyrethroid (Cheng *et al*., 2007) นอกจากนั้น Motoyama and Dauterman (1980) รวมทั้ง Vontas *et al.*(2001) ได้ศึกษาในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลกับการต้านทานของสารกลุ่ม Pyrethroid และ Perpethrin นอกจากนั้นได้มีการวิเคราะห์ทางชีวเคมีและวิเคราะห์สารเสริมฤทธิ์ (Synergistic) ที่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Glutathione-*S*-transferase โดยแสดงให้เห็นว่า Glutathione-*S*-transferase มีผลต่อปฏิกิริยา Peroxidase ในการต้านทานต่อสารกลุ่ม Pyrethroid และมีข้อสมมติฐานว่าระดับเอนไซม์ Glutathione-*S*-transferase ที่สูงขึ้นจะทำให้เกิดการต้านทานในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเพื่อป้องกันการเสียหายของเนื้อเยื่อเมื่อเกิดกระบวนการ Oxidative นอกจากนั้นรายงานของ Rose *et al* .(1996) พบว่าระดับเอนไซม์ Glutathione-*S*-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

transferase ในหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) เพิ่มสูงขึ้นจากระยะตัวหนอนไปจนถึงระยะดักแด้ และจะค่อยๆลดลงเมื่อเข้าสู่ตัวเต็มวัย และพบในสายพันธุ์ต้านทานต่อสาร Methoxyfenozide มากกว่าสายพันธุ์อ่อนแอ 3-4 เท่า นอกจากนั้น Visetson and Milne (2001) พบว่าสารสกัดหางไหลผสมกับสารเสริมฤทธิ์ (Triphenylphosphate) มีผลต่อระดับเอนไซม์ทำลายพิษในหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) โดยส่งผลให้เอนไซม์ Glutathione-*S*-transferase ลดลง 10-20% และจากรายงานของ Rachokarn *et al*. (2008) สารสกัดจากใบ *Melia azedarach* (Meliaceae) และ *Amaranthus viridis* มีผลยับยั้งเอนไซม์ Glutathione-*S*-transferase ในหนอนกระทู้หอม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับสกัดสารจากใบละหุ่งแดง

1. เครื่อง Rotary evaporator (BUCHI R-215)
2. Soxhlet extractor
3. Ethyl acetate
4. Cellulose Extraction Thimble (28 x 100 mm) (Whatman®)
5. เครื่องกลั่นสารละลายบริสุทธิ์

2. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับแยกสารบริสุทธิ์

1. แผ่น TLC
2. ขวดแก้วสำหรับ Thin layer chromatography มีฝาปิด
3. Column แก้วขนาด 1.5 cm x 30 cm
4. Silica gel (Merck®)
5. Methanol
6. Hexane
7. Dichloromethane
8. Ethanol

3. วัสดุอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์เอนไซม์ทำลายพิษ

1. เครื่อง Spectrophotometer ของ Hitachi รุ่น U200
2. เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยง Centrifuge ของ Hettich รุ่น Universal 16 R
3. pH meter ของ Sartorius รุ่น PP25
4. Micropipette (NICHIRYO)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. Microtube ขนาด 1.5 ml.
6. โกร่งบด
7. กระดาษกรองเบอร์ 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 ซม (Whatman®)
8. Potassium phosphate buffer
9. Glutathione reduce form
10. Paranitrophenyl acetate (pNPA)
11. Polyvinyl poly pyrrolidone (PVPP)
12. Ethylsene diamine tetra acetic acid (EDTA)
13. Bradford solution (BioRad ®)

4. วัสดุอุปกรณ์สำหรับทดสอบความเป็นพิษ

1. Petridish plate (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.5 เซนติเมตร)
2. ขวดแก้ว Spray (ขนาด 5 มิลลิลิตร)
3. กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman ®)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. การเลี้ยงเพื่อขยายพันธุ์หนอนกระทู้หอม

นำหนอนกระทู้หอมมาจากกรมวิชาการเกษตร จากนั้นเลี้ยงหนอนกระทู้หอมภายในตู้เลี้ยงแมลงที่มีการควบคุมอุณหภูมิ (Environment chamber) ที่ 27 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ (% RH) 70% และช่วงระยะแสงที่ 14 :10 Day / Night โดยจะต้องเปลี่ยนอาหารและกล่องเลี้ยงหนอนทุก ๆ 2 วัน เพื่อรักษาความสะอาดและเพื่อป้องกันการติดเชื้อ เมื่อหนอนเข้าสู่วัยที่ 4-6 ต้องย้ายหนอนไว้ในกล่องเลี้ยงพลาสติกที่มีอาหารเทียม (Silkmate®) และขี้เลื่อยเพื่อที่จะเตรียมเข้าสู่ระยะดักแด้ เมื่อหนอนเข้าสู่ระยะดักแด้หนอนจะมีพฤติกรรมการขุดอาหารเทียมเพื่อทำรัง อาจจะต้องทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ให้ทุกวันและทำการล้างดักแด้ด้วย 70 % Ethanol เป็นเวลา 3 วินาที หลังจากนั้นล้างด้วย 5% Formalin เป็นเวลา 5 นาที เพื่อลดความสกปรกและลดอัตราการตาย จากนั้นจึงย้ายดักแด้ไปไว้ในกล่องเลี้ยงที่บุด้วยกระดาษกรอง จนเมื่อดักแด้กลายเป็นตัวเต็มวัยแล้วจึงใช้สำลีชุบน้ำผึ้ง 5 % วางไว้ในกล่องเพื่อใช้เป็นอาหารของตัวเต็มวัย เมื่อตัวเต็มวัยผสมพันธุ์จะวางไข่บนกระดาษกรอง หลังจากนั้นทำการเก็บไข่หนอนและเปลี่ยนกระดาษกรองทุกวัน และนำไข่ที่ได้ไปเลี้ยงในกล่องเลี้ยงที่มีอาหารเทียมต่อรอจนหนอนฟักออกมาและนำไปทำการวิจัยต่อไป โดยจะใช้หนอนวัยที่ 2

ภาพที่ 12 การเลี้ยงหนอนกระทู้หอมบนอาหารเทียมวิธีใหม่

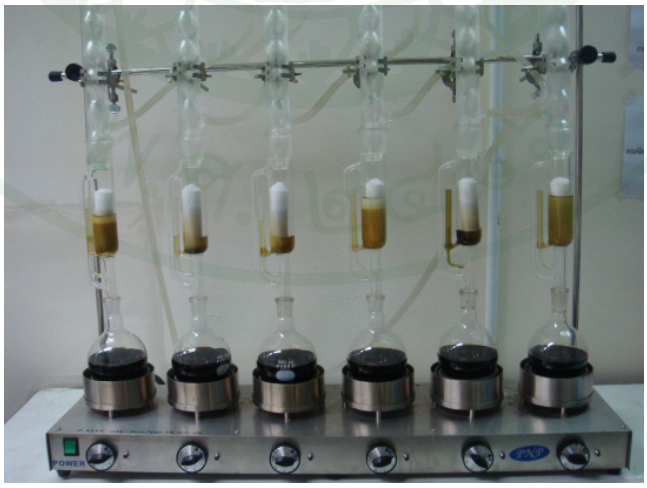
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การเพิ่มปริมาณแตนเบียน (*Meteorus pulchricornis*)

คัดเลือกแตนเบียน (*Meteorus pulchricornis*) จากห้องปฏิบัติการเลี้ยงแมลง Institute of Agriculture and Forestry, University of Tsukuba, Japan โดยควบคุมอุณหภูมิห้องเลี้ยงแมลงที่ 27 องศาเซลเซียส และช่วงระยะแสงที่ 12:12 Day/Night โดยใช้น้ำผึ้ง 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นอาหารของ *Meteorus pulchricornis* และให้วางไข่บนหนอนกระทู้หอม เพื่อเพิ่มปริมาณประชากรของ *Meteorus pulchricornis*

3. การสกัดสารหยาบจากใบละหุ่งแดง (Crude extraction)

การสกัดสารหยาบจากใบละหุ่งแดงนั้นจะใช้วิธีการสกัดแบบ Soxhlet โดยนำใบละหุ่งแดงมาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นอบโดยใช้ตู้อบ (Hot Air oven ของ Memmert) เมื่อแห้งสนิทดีแล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่น (Panasonic รุ่น MX-795N) ให้ละเอียด ให้ได้ปริมาณ 15 กรัม ต่อ 1 ชุดสกัด Soxhlet แล้วนำไปสกัดโดยเครื่อง Soxhlet extractor (ภาพที่ 13) เป็นเวลานาน 8 ชั่วโมง โดยใช้ Ethanol และ Ethyl acetate เป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator (ภาพที่ 14) แล้วเก็บส่วนที่ได้จากการระเหยซึ่งเป็นสารสกัดหยาบ ที่มีลักษณะเหนียวข้นไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษกับหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 ต่อไป



ภาพที่ 13 การสกัดใบละหุ่งแดงด้วยเครื่อง Soxhlet extractor

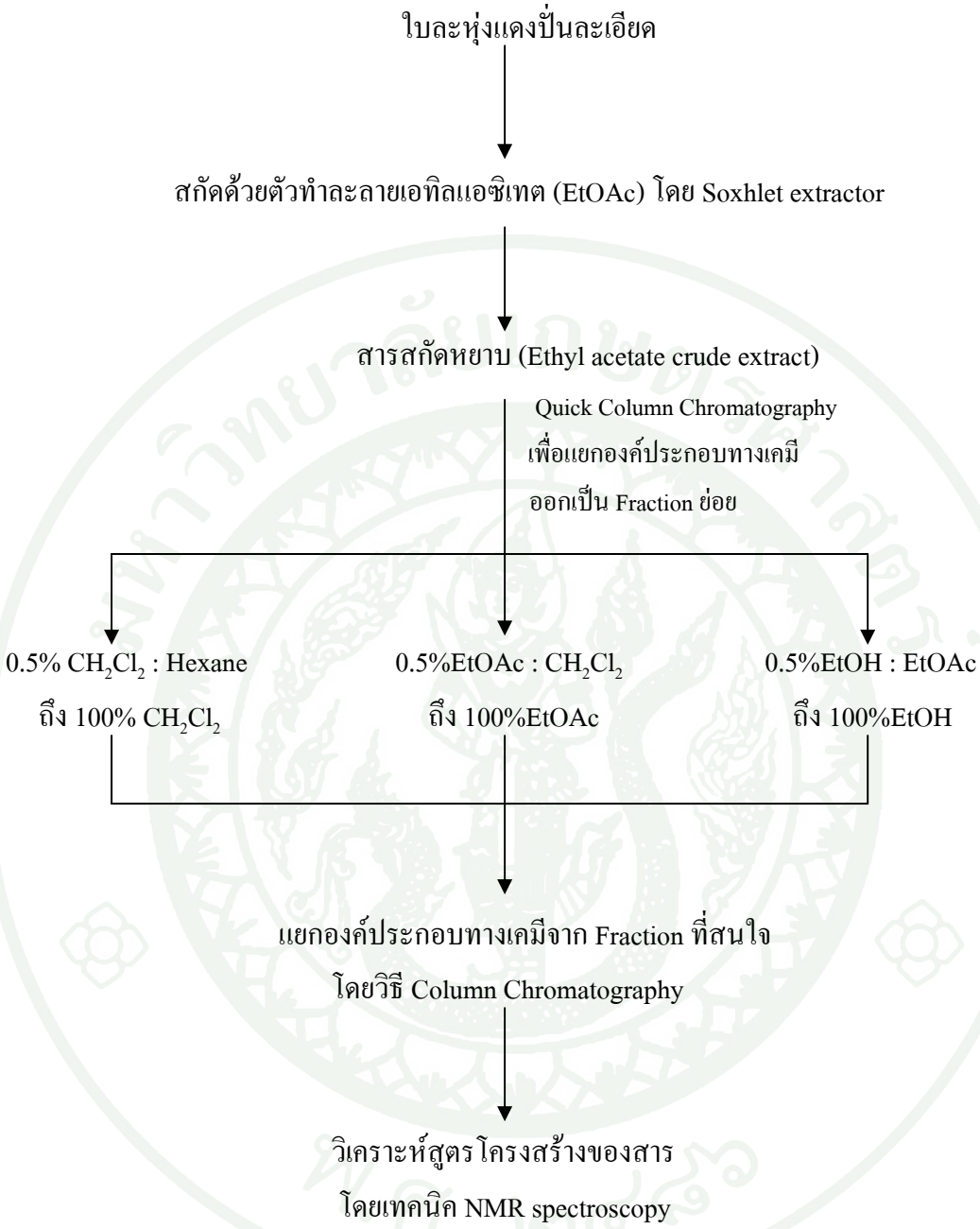
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 14 ระเหยตัวทำละลายด้วย Rotary evaporator

4. การแยกสารบริสุทธิ์จากใบละหุ่งแดง (Isolation)

หลังจากได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) ของใบละหุ่งแดงแล้ว จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ออกฤทธิ์ดีที่สุดมาแยกองค์ประกอบทางเคมีเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์โดยวิธีการ Quick column chromatography และ Column chromatography ตามลำดับ โดยใช้กรวยแก้วแยกสารและหลอดแก้วกลวง (Column) สำหรับการทำ Quick column chromatography นั้นจะบรรจุ Silica gel (Merck, เกรด 7731) ลงบนกรวยแก้วแยกสาร และนำสารสกัดหยาบของใบละหุ่งแดง (100 กรัม) ผสมกับ Silica gel แล้วเทตัวอย่าง (Load sample) ลงไปในกรวยแก้วแยกสาร โดยในขั้นตอนนี้จะใช้ตัวทำละลายคือ 0.5%CH_2Cl_2 : Hexane - 100%CH_2Cl_2 , 0.5%EtOAc : CH_2Cl_2 – 100% EtOAC และ 0.5%EtOH : EtOAc – 100%EtOH ที่อัตราส่วนต่างๆ เป็นตัวชะตามลำดับ จากนั้นเก็บตัวอย่างแต่ละ fraction เพื่อนำไปหาองค์ประกอบสำคัญทางเคมีเบื้องต้นโดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) โดยนำแผ่น TLC ไป Developed ในระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น Hexane : EtOAc (7:1), CH_2Cl_2 : EtOAc (2:1) และตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีบนแผ่น TLC โดย UV light ที่ความยาวคลื่นแสง 254 นาโนเมตร จากนั้นนำ Fraction ที่สนใจมาแยกสารให้บริสุทธิ์โดยวิธี Chromatography ที่มี Silica gel (Merck, เกรด 7734) เป็นตัวดูดซับ โดยใช้ตัวทำละลายผสมที่เหมาะสม เช่น Hexane : CH_2Cl_2, Hexane : EtOAc หรือ CH_2Cl_2 : MeOH ที่อัตราส่วนต่างๆ เป็นตัวชะ เมื่อได้สารที่บริสุทธิ์แล้วจะนำสารดังกล่าวไปวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโดยเทคนิค NMR spectroscopy

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 15 ขั้นตอนการแยกองค์ประกอบทางเคมีจากใบละหุ่งแดง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 16 การทำ Quick column chromatography

ภาพที่ 17 การทำ Column chromatography

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การทดสอบเปรียบเทียบผลของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ จากใบละหุ่งแดงที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมและแตนเบียน

ทำการทดลองโดยดัดแปลงวิธีการของ Nathan *et al*. (2008) ทำการเปรียบเทียบทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์จากใบละหุ่งแดง โดยทำการทดสอบเพื่อหาความเป็นพิษเบื้องต้น (Preliminary test) ที่มีต่อหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 และ แตนเบียน ซึ่งทำการทดสอบทั้งหมด 3 วิธีคือ Dipping method, Spray method และ Filter paper method โดยวิธี Filter paper method นั้นจะใช้ทดสอบความเป็นพิษกับแตนเบียนเท่านั้น โดยทำการ Stock solution ของสารสกัดที่ความเข้มข้นสูงสุดและ Dilute ความเข้มข้นของสารสกัดแบบ Double concentration (ภาพที่ 19) หลังจากนั้นนำไปทดสอบกับหนอนกระทู้หอมทั้งสิ้น 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว

การทดสอบหนอนกระทู้หอมและแตนเบียนกับสารสกัดหยาบ จะเตรียมความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ 70% Ethanol เป็นตัวทำละลาย ส่วนสารบริสุทธิ์จะเตรียมความเข้มข้นโดยใช้ 100% Acetone

1. วิธีจุ่มแมลงกับสารละลายโดยตรง (Dipping method) นั้นจะนำหนอนกระทู้หอมใส่ลงไปในผ้าก็อตที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 5x5 เซนติเมตร แล้วจุ่มลงในไปสารสกัดที่เตรียมไว้เป็นเวลา 3 วินาที

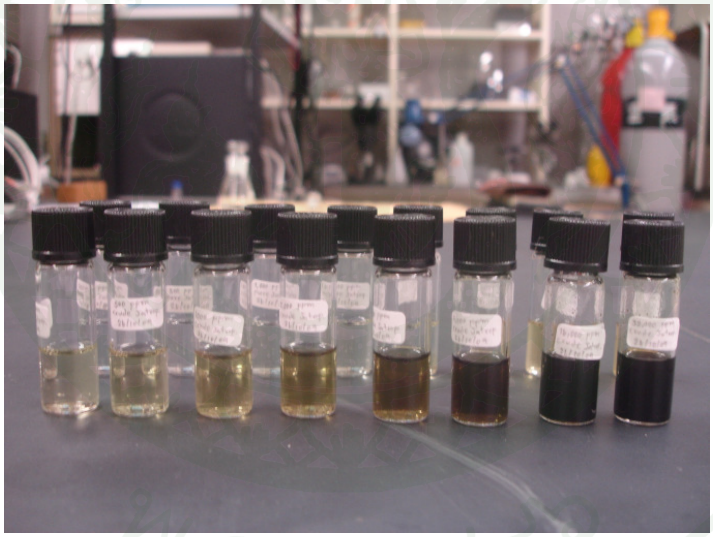
2. วิธีพ่นฝอยหมอกด้านบน (Topical sprayer method) นั้นนำหนอนกระทู้หอมใส่ลงไปใน Petridish ที่รองด้วยกระดาษกรองและสเปรย์สารสกัดแต่ละความเข้มข้นลงไปบนตัวหนอนกระทู้หอม

สำหรับสองวิธีแรกนั้นหลังจากทดสอบความเป็นพิษแล้ว นำหนอนกระทู้หอมไปเลี้ยงไว้ในอาหารเทียมและบันทึกผลอัตราการตายและหาค่า LC_{50} ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงโดยใช้วิธี Probit analysis ผ่านทางโปรแกรม Stat plus version 2008

3. วิธีสัมผัสผ่านกระดาษกรอง (Filter paper method) นั้นใช้ทดสอบความเป็นพิษกับแตนเบียน (*Meteorus pulchricornis*) (ภาพที่ 18) โดยนำสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ หยดลงไปใน Petridish ที่รองด้วยกระดาษกรองและระเหยกระดาษกรองให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจากนั้นนำแมลงเบียนใส่ลงไปใน Petridish หลังจากนั้นวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การตายที่เวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมงตามลำดับ ผ่านทางโปรแกรม Stat plus version 2008

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 18 วิธี Filter paper method



ภาพที่ 19 Stock solution ของสารสกัดใบละหุ่งแดง

6. การสกัดเอนไซม์จากหนอนกระทู้หอม

หลังทำการทดสอบหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 กับสารสกัดละหุ่งแดงแล้วนำหนอนที่รอดชีวิตมาศึกษาผลของสารสกัดจากละหุ่งแดงที่มีต่อเอนไซม์ทำลายพิษ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ Carboxyl esterase และ Glutathione-*S*-transferase ซึ่งดัดแปลงวิธีการของ Cheng *et al*. (2007) , Bullangpoti *et al*. (2007) และ Visetson *et al.* (2001) โดยนำหนอนกระทู้หอมที่รอดชีวิตมาบดในโกร่งที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แช่เย็น ผสม Homogenized buffer, Polyvinyl poly pyrolidone (PVPP) 0.002 กรัม, 0.1M Potassium phosphate buffer ที่ pH 7.3 และ pH 7.7 สำหรับเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส และเอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส ตามลำดับ (ซึ่งประกอบด้วย KH_2PO_4 , 1 mM EDTA,10 mM GSH reduce form และ Polyvinyl poly pyrrolidone (PVPP) 0.002 กรัม จากนั้นนำสารละลายใส่ในหลอด Micro tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปปั่นด้วยความเร็ว 18,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสด้านบน (Supernatant) ใส่หลอด Micro tubeขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์เอนไซม์ Carboxylesterase ตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงของ Paranitrophenol (สารละลายสีเหลือง) ที่ความยาวคลื่นแสง 400 นาโนเมตรและ Glutathione-S-transferase) เพื่อตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงของ Monochloronitrobenzene glutathione ที่ความยาวคลื่นแสง 340 นาโนเมตร

7. สถานที่และระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง

เริ่มการทดลองตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ. 2552 รวมระยะเวลาในการทดลองทั้งสิ้น 1 ปี 3 เดือน ณ ภาควิชาสัตววิทยา, ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ Institute of Agriculture and Forestry, University of Tsukuba, Japan

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

ผล

1. ผลการสกัดสารจากใบละหุ่งแดง (*Jatropha gossypifolia*)

จากการสกัดสารจากใบละหุ่งแดงปั่นละเอียดทั้งหมด 90 กรัม/1 ชุดสกัดซอกห์เลต โดยมี Ethyl acetate หรือ Ethanol เป็นตัวทำละลายแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) ปริมาณ 6.35 กรัม (7.06% w/w) และ 4.28 กรัม (4.76% w/w) ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และสารสกัดหยาบมีลักษณะ เหนียวข้นสีเขียวเข้มออกดำ (ภาพที่ 20)

ตารางที่ 1 ผลการสกัดสารจากใบละหุ่งแดง

ตัวทำละลาย	น้ำหนัก (กรัม)	เปอร์เซ็นต์ yield (w/w)	ลักษณะสาร
Ethyl acetate	6.35	7.06	เหนียวข้นสีเขียวเข้มออกดำ
Ethanol	4.28	4.76	เหนียวข้นสีเขียวเข้มออกดำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ก ข

ภาพที่ 20 สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายต่างๆ

ก. สารสกัดหยาบที่มี Ethyl acetate เป็นตัวทำละลาย

ข. สารสกัดหยาบที่มี Ethanol เป็นตัวทำละลาย

2. ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบละหุ่งแดง (*Jatropha gossypifolia*) ที่มีต่อหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*)

2.1 ผลความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบละหุ่งแดงที่มี Ethyl acetate เป็นตัวทำละลาย (Ethyl acetate crude extract) โดยวิธี Dipping method

เมื่อนำสารสกัดไปทดสอบประสิทธิภาพความเป็นพิษต่อเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดแบบ Double concentration รวมทั้งหมด 7 ความเข้มข้น ดังนี้ กลุ่มควบคุม (70% Ethanol) 500, 1,000, 2,000, 4,000, 8,000 และ 16,000 ppm. ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่ากับ 0.00±0.00, 23.33±5.77, 36.67±5.77, 53.33±5.77, 63.33±20.82, 80.00±17.32 และ 93.33±5.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมเท่ากับ 0.00±0.00, 23.33±5.77, 40.00±0.00, 56.67±5.77, 66.67±15.28, 86.67±15.28 และ 93.33±5.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีค่า LC_{50}ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 1,809.40±342.62 และ 1,588.39±295.10 ppm

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน[1] ของ *S.exigua* หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยวิธี Dipping Method

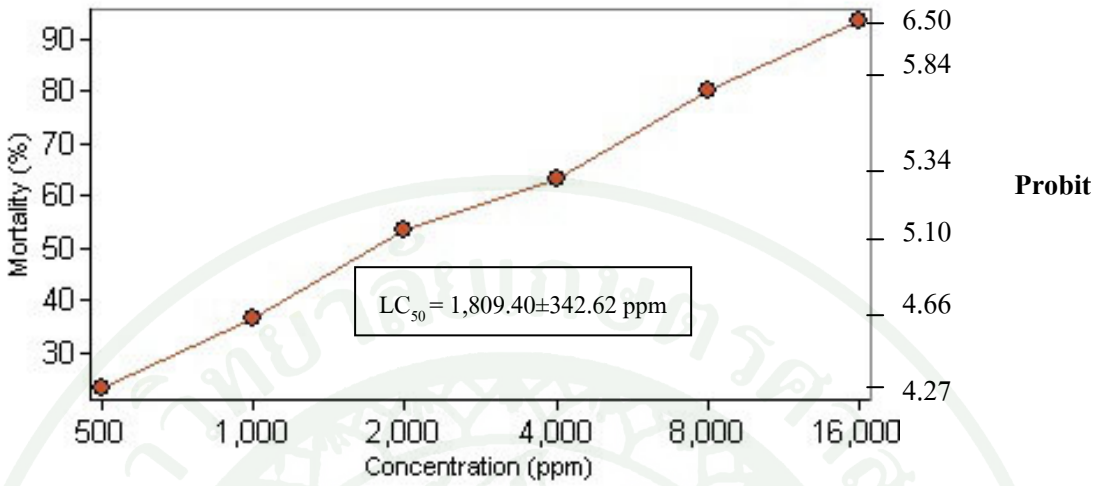
ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (ppm)	เปอร์เซ็นต์ตายเฉลี่ยของหนอนกระทู้หอม[3] ± SD	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
0.00[2]	0.00±0.00^{g}	00.00±0.00^{g}
500	23.33±5.77^{f}	23.33±5.77^{f}
1,000	36.67±5.77^{e}	40.00±0.00^{e}
2,000	53.33±5.77^{d}	56.67±5.77^{d}
4,000	63.33±20.82^{c}	66.67±15.28^{c}
8,000	80.00±17.32^{b}	86.67±15.28^{b}
16,000	93.33±5.77^{a}	93.33±5.77^{a}

[1] การตายเฉลี่ยได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว

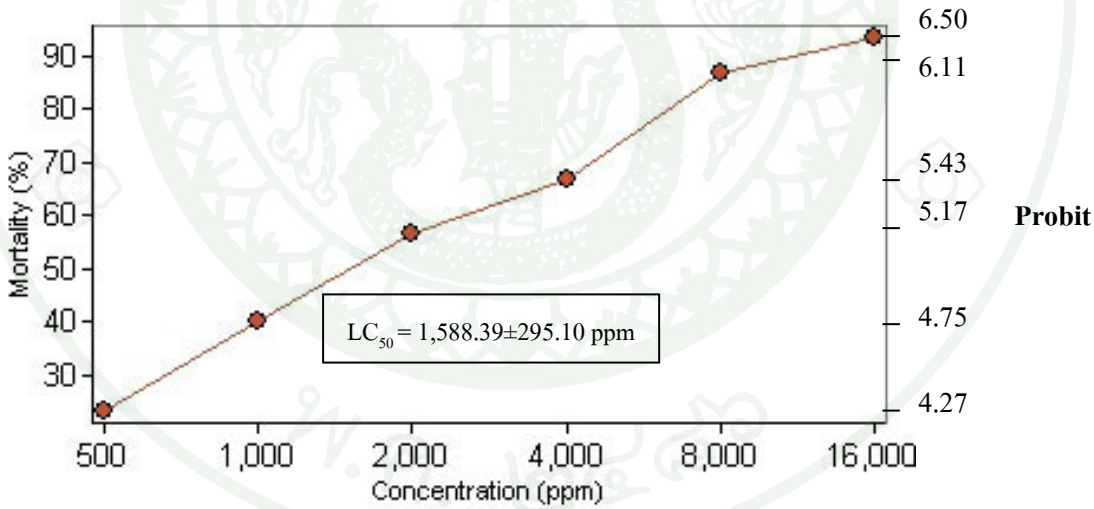
[2] Control treatment : Ethanol 70%

[3] Mean ± SD ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P < 0.05$) โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 21 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี Dipping method



ภาพที่ 22 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยวิธี Dipping method

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 ผลความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบละหุ่งแดงที่มี Ethyl acetate เป็นตัวทำละลาย (Ethyl acetate crude extract) โดยวิธี Topical sprayer method

เมื่อนำสารสกัดไปทดสอบประสิทธิภาพความเป็นพิษต่อเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดแบบ Double concentration รวม 6 ความเข้มข้น ดังนี้ กลุ่มควบคุม (70%Ethanol), 1,000, 2,000, 4,000, 8,000 และ 16,000 ppm เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่ากับ 0.00±0.00, 0.00±0.00, 20.00±20.00, 53.33±15.28, 63.33±20.82 และ 63.33±20.82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมที่เวลา 48 ชั่วโมงเท่ากับ 00.00±0.00, 16.67±15.28, 33.33±11.55, 56.67±11.55, 66.67±25.17 และ 76.67±5.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3) และมีค่า LC_{50} ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 8,644.63 ± 1,566.54 ppm และ 6,027.16±1,227.16 ppm ตามลำดับ

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน [(1)] ของ *S.exigua* หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงโดยวิธี Topical sprayer method

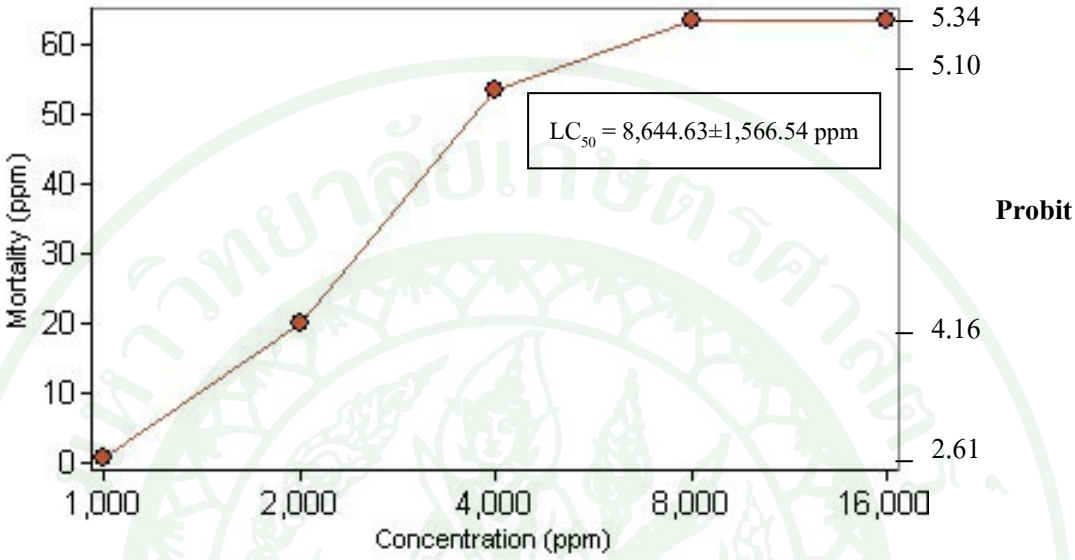
ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (ppm)	เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยของหนอนกระทู้หอม[(3)] ± SD	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
0.00[(2)]	0.00±0.00 [d]	00.00±0.00[f]
1,000	0.00±0.00 [d]	16.67±15.28[e]
2,000	20.00±20.00[c]	33.33±11.55 [d]
4,000	53.33±15.28b[b]	56.67±11.55 [c]
8,000	63.33±20.82 [a]	66.67±25.17[b]
16,000	63.33±20.82 [a]	76.67±5.77 [a]

(1) การตายเฉลี่ยได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว

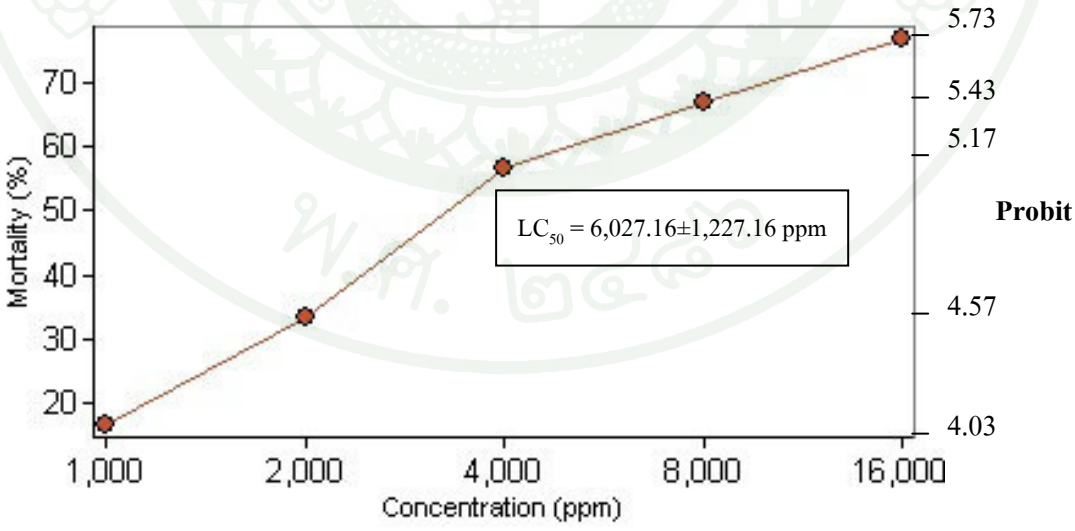
(2) Control treatment : 70% Ethanol

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(3) Mean ± SD ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P < 0.05) โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 23 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ที่เวลา 24 ชั่วโมงโดยวิธี Topical sprayer method



ภาพที่ 24 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ที่เวลา 48 ชั่วโมงโดยวิธี Topical sprayer method

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 ผลความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบละหุ่งแดงที่มี Ethanol เป็นตัวทำละลาย (Ethanol crude extract) โดยวิธี Dipping method

เมื่อนำสารสกัดไปทดสอบประสิทธิภาพความเป็นพิษต่อเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 โดยวิธี Dipping method โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด รวมทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ดังนี้ กลุ่มควบคุม (95%Ethanol) 10,000, 20,000, 30,000 และ 40,000 ppm. ตามลำดับ พบว่า เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่ากับ 0.00±0.00, 16.67±5.77, 30.00±10.00, 50.00±10.00 และ 53.33±5.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่เวลา 48 ชั่วโมงมีค่าเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 0.00±0.00, 17.80±7.32, 31.25±11.26, 48.75±17.27 และ 52.39±20.43 ppm เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4) มีค่า LC_{50} ที่เวลา 24 ชั่วโมงและ48 ชั่วโมงเท่ากับ 34,570.65± 3,572.17 ppm และ 26,796.21±3,527.98 ppm

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน[(1)] ของ *S.exigua* หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethanol crude extract) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยวิธี Dipping Method

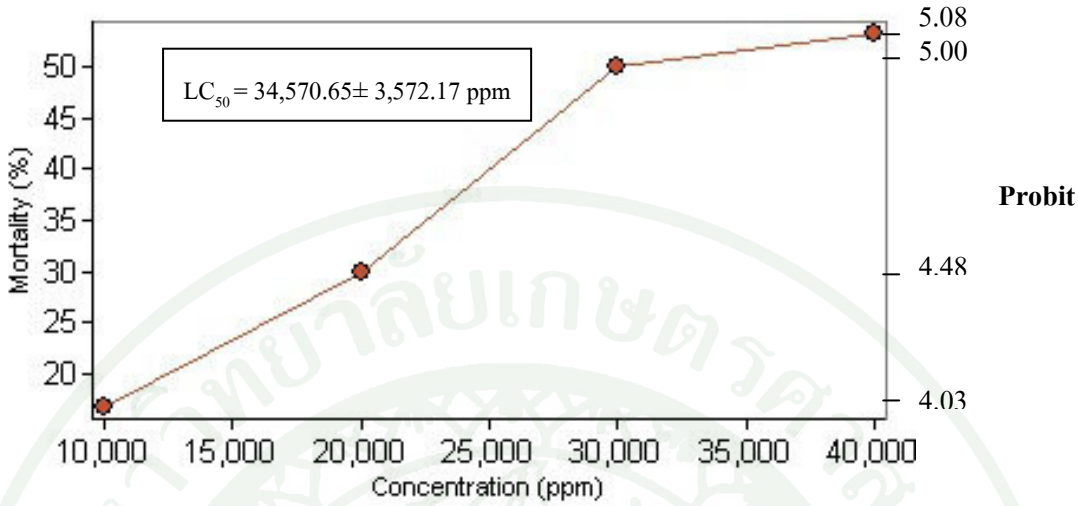
ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (ppm)	เปอร์เซ็นต์ตายเฉลี่ยของหนอนกระทู้หอม[(3)] ± SD	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
0.00[(2)]	0.00±0.00[e]	0.00±0.00[e]
10,000	16.67±5.77[d]	17.80±7.32[d]
20,000	30.00±10.00[c]	31.25±11.26[c]
30,000	50.00±10.00[b]	48.75±17.27[b]
40,000	53.33±5.77[a]	52.39±20.43[a]

(1) การตายเฉลี่ยได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว

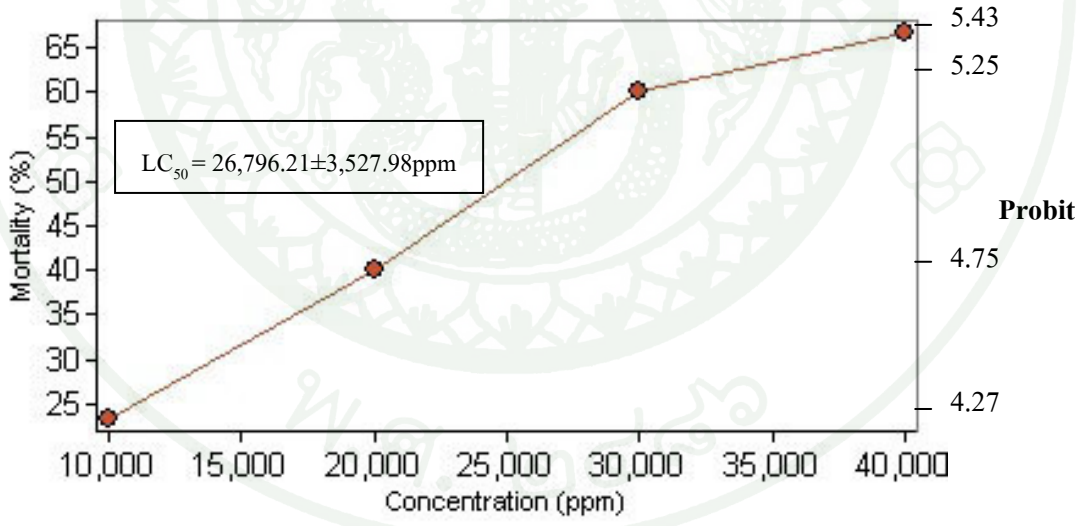
(2) Control treatment : 70% Ethanol

(3) Mean ± SD ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P < 0.05$) โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 25 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethanol crude extract) ที่เวลา 24 ชั่วโมงโดยวิธี Dipping method



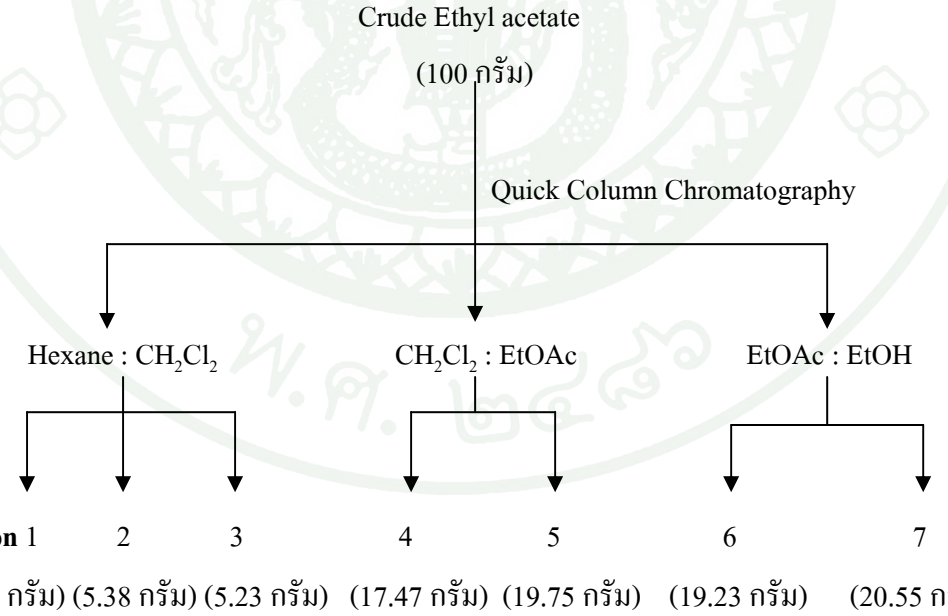
ภาพที่ 26 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethanol crude extract) ที่เวลา 48 ชั่วโมงโดยวิธี Dipping method

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ผลการแยกสารบริสุทธิ์ของสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (*Jatropha gossypifolia*) ที่มีผลต่อความเป็นพิษในหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*)

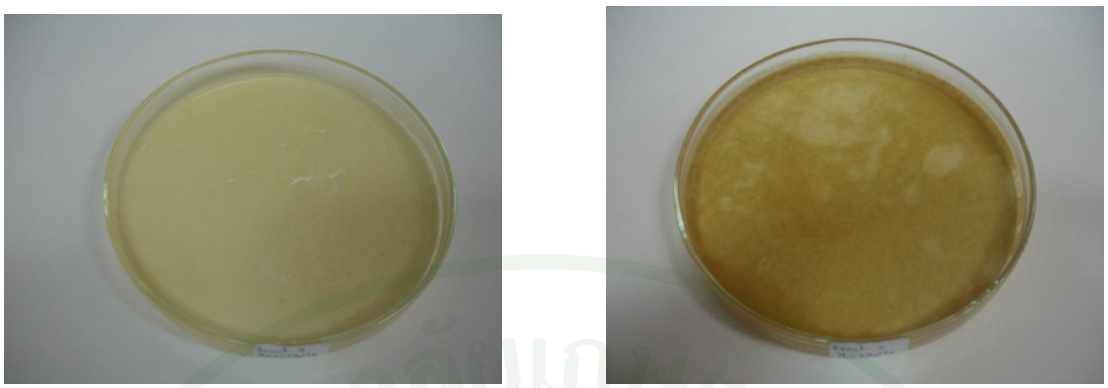
3.1 ผลการแยกองค์ประกอบทางเคมีของใบละหุ่งแดงโดยวิธี Quick Column Chromatography

จากใบละหุ่งแดง (*Jatropha gossypifolia*) น้ำหนักแห้ง 1.44 กิโลกรัมที่สกัดด้วยวิธีซอกท์เลต (Soxhlet extraction) โดยมี Ethyl acetate เป็นตัวทำละลายแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบ (Ethyl acetate crude extract) ที่มีลักษณะเหนียวข้นสีเขียวเข้มปริมาณ 100 กรัม แล้วนำมาแยกองค์ประกอบ ทางเคมีโดยวิธี Quick Column Chromatography โดยใช้ตัวทำละลายในการแยกสารดังนี้ 0.5%CH_2Cl_2 : Hexane – 100%CH_2Cl_2 , 0.5%EtOAc : CH_2Cl_2- 100% EtOAc และ 0.5% EtOH : EtOAc – 100% EtOH จากระบบตัวทำละลายดังกล่าวเก็บ Fraction ได้ทั้งหมด 7 Fraction (ภาพที่ 27 และ ตารางที่ 5)



ภาพที่ 27 การแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี Quick Column Chromatography

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ก ข

ค ง

ภาพที่ 28 สารสกัดหยาบ (Crude extract) จากระบบตัวทำละลายต่างๆ โดยวิธี Quick Column Chromatography

ก สารสกัดหยาบจาก Fraction ที่ 1 (0.5%CH_2Cl_2 : Hexane - 20% CH_2Cl_2 : Hexane)

ข สารสกัดหยาบจาก Fraction ที่ 2 (20% CH_2Cl_2 : Hexane - 70%CH_2Cl_2 : Hexane)

ค สารสกัดหยาบจาก Fraction ที่ 3 (70%CH_2Cl_2 : Hexane - 100% CH_2Cl_2)

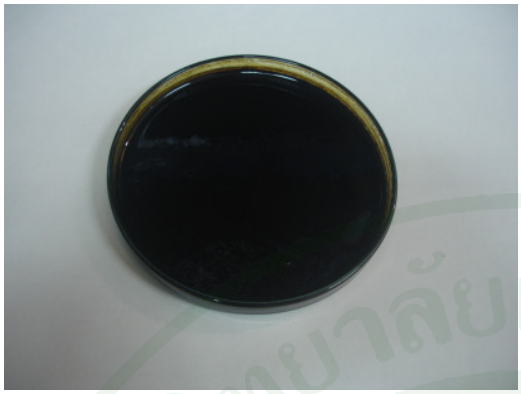
ง สารสกัดหยาบจาก Fraction ที่ 4 (0.5% EtOAc : CH_2Cl_2 - 35%EtOAc : CH_2Cl_2)

จ สารสกัดหยาบจาก Fraction ที่ 5 (40% EtOAc : CH_2Cl_2 - 100 % EtOAc)

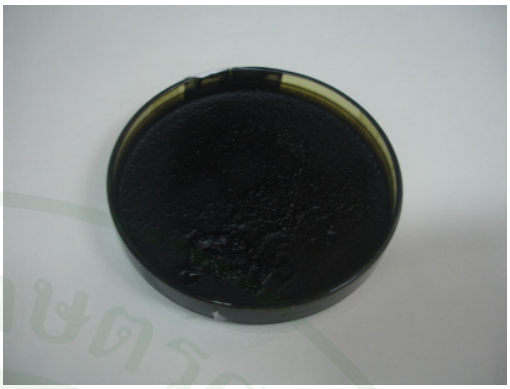
ฉ สารสกัดหยาบจาก Fraction ที่ 6 (0.5% EtOH : EtOAc - 50% EtOH : EtOAc)

ช สารสกัดหยาบจาก Fraction ที่ 7 (55% EtOH : EtOAc - 100% EtOH)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



จ



ฉ

ช

ภาพที่ 28 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของใบละหุ่งแดง โดยวิธี Quick Column Chromatography ด้วยระบบตัวทำละลายต่างๆ

Fraction	ระบบตัวทำละลาย	ลักษณะสารสกัด	น้ำหนัก (กรัม)
1	0.5%CH_2Cl_2 : Hexane ถึง 20% CH_2Cl_2 : Hexane	หนืดสีขาวขุ่น	4.75
2	20% CH_2Cl_2 : Hexane ถึง 70%CH_2Cl_2 : Hexane	หนืดสีน้ำตาลอ่อน	5.38
3	70%CH_2Cl_2 : Hexane ถึง 100% CH_2Cl_2	หนืดสีเขียวเข้มออกดำ	5.23
4	0.5% EtOAc : CH_2Cl_2 ถึง 35%EtOAc : CH_2Cl_2	หนืดสีเขียวเข้มออกดำ และมีผลึกของแข็ง	17.47
5	40% EtOAc : CH_2Cl_2 ถึง 100 % EtOAc	หนืดสีเขียวเข้มออกดำ	19.75
6	0.5% EtOH : EtOAc ถึง 50% EtOH : EtOAc	หนืดสีเขียวเข้มออกดำ	19.23
7	55% EtOH : EtOAc ถึง 100% EtOH	หนืดสีเขียวเข้มออกดำ	20.55

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 ผลของสารสกัดหยาบจากระบบตัวทำละลายผสมที่มีต่อหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 โดยวิธี Dipping method

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากระบบตัวทำละลายผสม ได้แก่ Hexane : CH_2Cl_2, CH_2Cl_2 : EtOAc และ EtOAc : EtOH ไปทดสอบประสิทธิภาพความเป็นพิษต่อเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 โดยวิธี Dipping methodโดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด รวมทั้งหมด 6 ความเข้มข้น ดังนี้ กลุ่มควบคุม (95%Ethanol) 1,000, 2,000, 3,000, 4,000 และ 5,000 ppm. พบว่าสกัดหยาบจากระบบตัวทำละลายผสม CH_2Cl_2 : EtOAc (40% EtOAc : CH_2Cl_2 - 100 % EtOAc) ซึ่งอยู่ใน Fraction ที่ 5 มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมที่เวลา 24 ชั่วโมงดังนี้ 0.00±0.00 , 23.33±5.77, 43.33±5.77, 53.33±5.77, 63.33±5.77 และ 73.33±5.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมเท่ากับ 0.00±0.00, 26.67±5.77, 43.33±5.77, 56.67±5.77, 66.67±5.77 และ 76.67±5.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6) และมีค่า LC_{50} ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงเท่ากับ 2,887.34±363.24 ppm และ 2,665.22±350.47 ppm ทั้งนี้พบว่าที่ระบบตัวทำละลายผสมอื่นๆ (Hexane : CH_2Cl_2และ EtOAc : EtOH) (Fraction 1-4, 6-7) ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมมากนัก โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การตายอยู่ที่ 10-13.33 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบกับสารที่ความเข้มข้น 9,000 ppm เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 7 และตารางที่ 8)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน [1] ของ *S.exigua* หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดงจาก Fraction ที่ 5 (40% EtOAc : CH_2Cl_2 - 100 % EtOAc) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงโดยวิธี Dipping method

ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (ppm)	เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยของหนอนกระทู้หอม[3] ± SD	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
0.00[2]	0.00±0.00[f]	00.00±0.00[f]
1,000	23.33±5.77[e]	26.67±5.77[e]
2,000	43.33±5.77[d]	43.33±5.77[d]
3,000	53.33±5.77[c]	56.67±5.77[c]
4,000	63.33±5.77[b]	66.67±5.77[b]
5,000	73.33±5.77[a]	76.67±5.77[a]

[1] การตายเฉลี่ยได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว

[2] Control treatment : 70% Ethanol

[3] Mean ± SD ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P < 0.05$) โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน [(1)] ของ *S.exigua* หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Fraction ที่ 1,2,3,4,6 และ 7) ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี Dipping method

ความเข้มข้น	เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยของหนอนกระทู้หอม[(3)] ± SD แต่ละFraction					
(ppm)	1	2	3	4	6	7
0.00[(1)]	0.00±0.00^{d}	0.00±0.00^{d}	0.00±0.00^{d}	0.00±0.00^{d}	0.00±0.00^{e}	0.00±0.00^{d}
5,000	0.00±0.00^{d}	3.33±5.77^{c}	6.67±5.77^{c}	3.33±5.77^{c}	3.33±5.77^{d}	6.67±5.77^{c}
6,000	3.33±5.77^{c}	6.67±5.77^{b}	6.67±5.77^{c}	3.33±5.77^{c}	3.33±5.77^{d}	6.67±5.77^{c}
7,000	6.67±5.77^{b}	6.67±5.77^{b}	10.00±0.00^{b}	6.67±5.77^{b}	6.67±5.77^{c}	10.00±0.00^{b}
8,000	6.67±5.77^{b}	10.00±0.00^{a}	10.00±0.00^{b}	6.67±5.77^{b}	10.00±0.00^{b}	10.00±0.00^{b}
9,000	10.00±0.00^{a}	10.00±0.00^{a}	13.33±5.77^{a}	13.33±5.77^{a}	10.00±0.00^{a}	13.33±5.77^{a}

[(1)] การตายเฉลี่ยได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว

[(2)] Control treatment : 70% Ethanol

[(3)] Mean ± SD ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P < 0.05$) โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน [(1)] ของ *S.exigua* หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Fraction ที่ 1,2,3,4,6 และ 7) ที่เวลา 48 ชั่วโมงโดยวิธี Dipping method

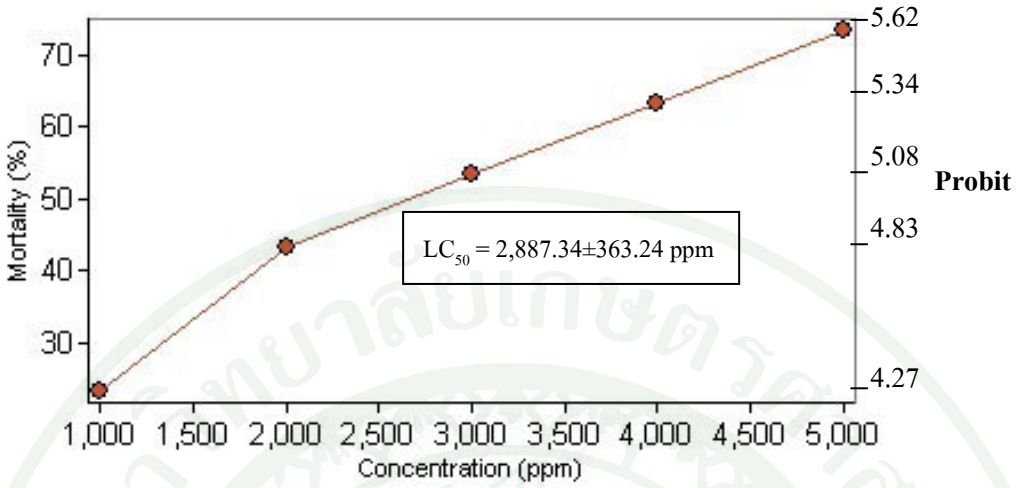
ความเข้มข้น (ppm)	เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยของหนอนกระทู้หอม[(3)] ± SD แต่ละ Fraction					
	1	2	3	4	6	7
0.00[(1)]	0.00±0.00^{f}	0.00±0.00^{f}	0.00±0.00^{f}	0.00±0.00^{f}	0.00±0.00^{e}	0.00±0.00^{f}
5,000	1.25±3.54^{e}	6.14±4.52^{e}	6.56±4.38^{e}	3.64±4.45^{e}	4.89±4.68^{d}	7.81±3.59^{e}
6,000	4.89±4.68^{d}	7.81±3.59^{d}	7.81±3.59^{d}	4.89±4.68^{d}	4.89±4.68^{d}	6.56±4.38^{d}
7,000	6.67±5.77^{c}	9.10±5.63^{c}	8.75±3.54^{c}	6.56±4.38^{c}	6.56±4.38^{c}	8.75±3.54^{c}
8,000	7.81±3.60^{b}	11.25±6.41^{b}	10.00±7.56^{b}	7.81±3.60^{b}	8.75±3.54^{b}	10.00±5.35^{b}
9,000	10.00±5.35^{a}	10.00±5.35^{a}	12.39±5.12^{a}	12.39±5.12^{a}	10.00±5.35^{a}	12.39±5.12^{a}

[(1)] การตายเฉลี่ยได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว

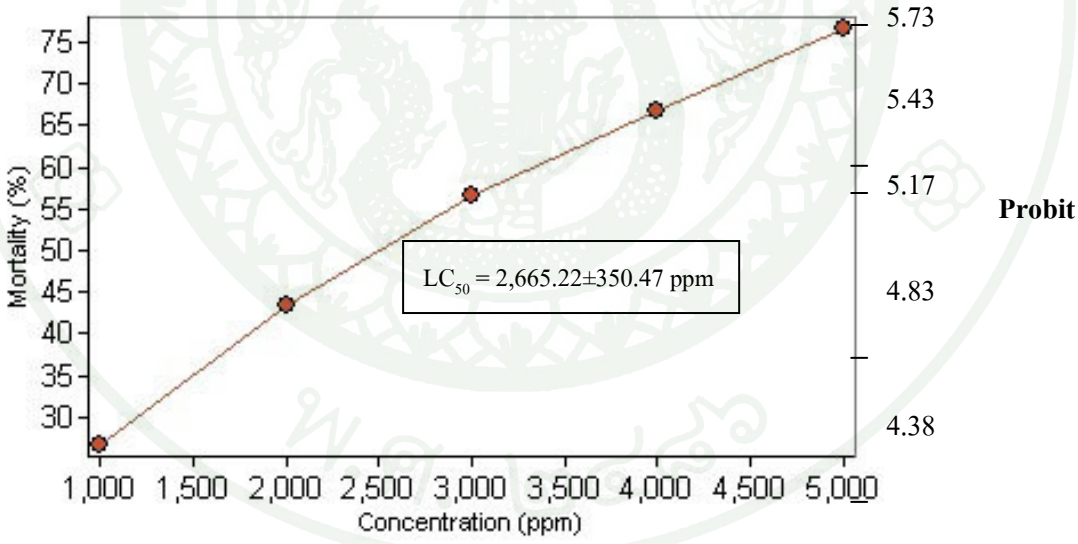
[(2)] Control treatment : 70% Ethanol

[(3)] Mean ± SD ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P < 0.05$) โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 29 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่ระบบตัวทำละลาย CH_2Cl_2 : EtOAc ที่เวลา 24 ชั่วโมงโดยวิธี Dipping method

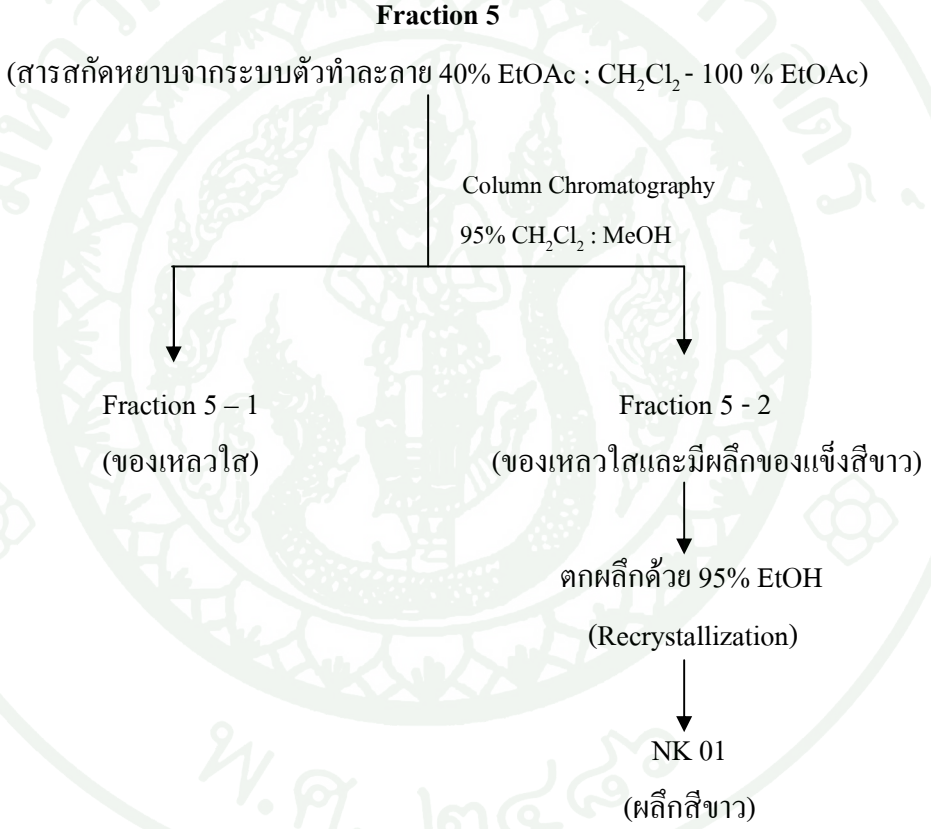


ภาพที่ 30 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่ระบบตัวทำละลาย CH_2Cl_2 : EtOAc (Fraction ที่ 5) ที่เวลา48 ชั่วโมงโดยวิธี Dipping method

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3 ผลการแยกองค์ประกอบทางเคมีของใบละหุ่งแดงโดยวิธี Column Chromatography และการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโดยวิธี NMR spectroscopy

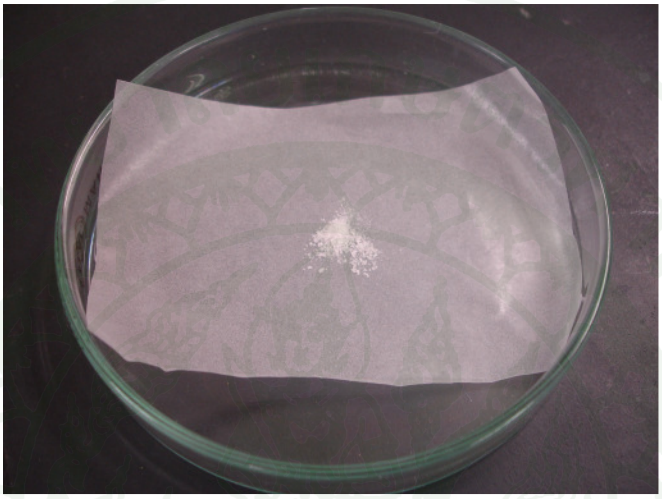
จากวิธีการแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี Quick Column Chromatograpy พบว่า Fractionที่ 5 จากระบบตัวทำละลายผสม (40% EtOAc : CH_2Cl_2 - 100 % EtOAc) มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 จึงนำ Fraction ดังกล่าวมาแยกองค์ประกอบทางเคมีต่อโดยวิธี Column Chromatograpy โดยแสดงผลการทดลองดังนี้



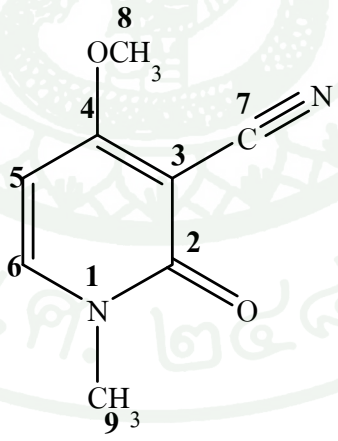
ภาพที่ 31 การแยกองค์ประกอบทางเคมีจากใบละหุ่งแดงโดยวิธี Column Chromatography

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากนั้นนำสาร NK01 ซึ่งเป็นสารผลึกสีขาว (ภาพที่ 32) ไปวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโดยวิธี NMR spectroscopy แสดงผลดังนี้ ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.07 (1H, d, J = 7.6 Hz), 6.40 (1H, d, J = 7.6 Hz), 3.96 (3H, s), 3.41 (3H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 172.6, 160.9, 146.1, 114.6, 93.7, 85.7, 57.6, 36.7 ซึ่งเป็นโครงสร้างของสาร Ricinine (ภาพที่ 33)



ภาพที่ 32 สาร Ricinine จากขั้นตอน Column Chromatography

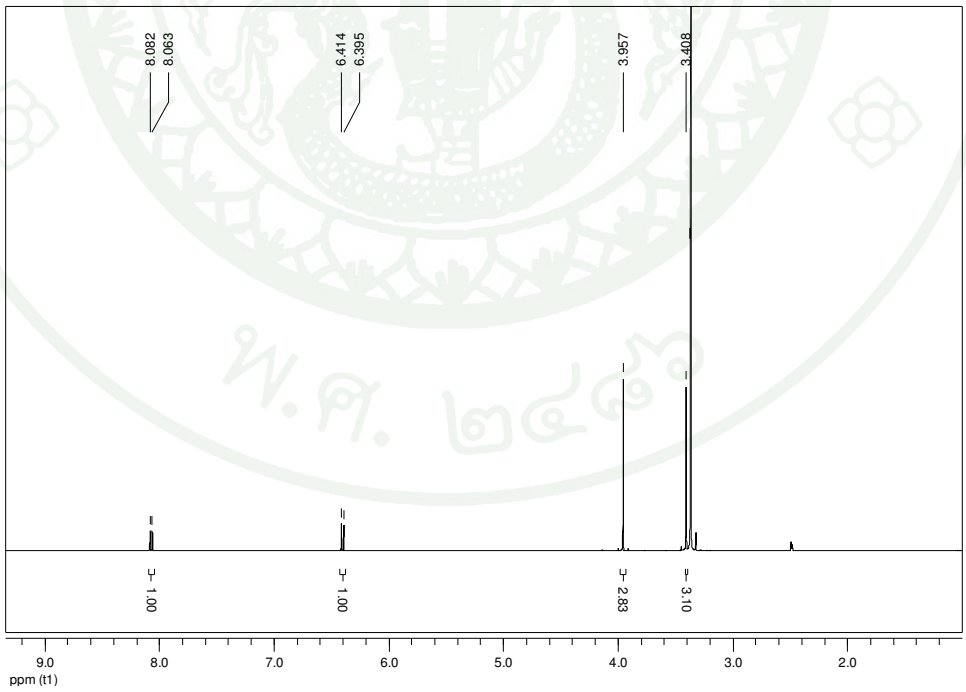


ภาพที่ 33 สูตรโครงสร้างของสาร Ricinine ที่ระบุตำแหน่ง H และ C

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

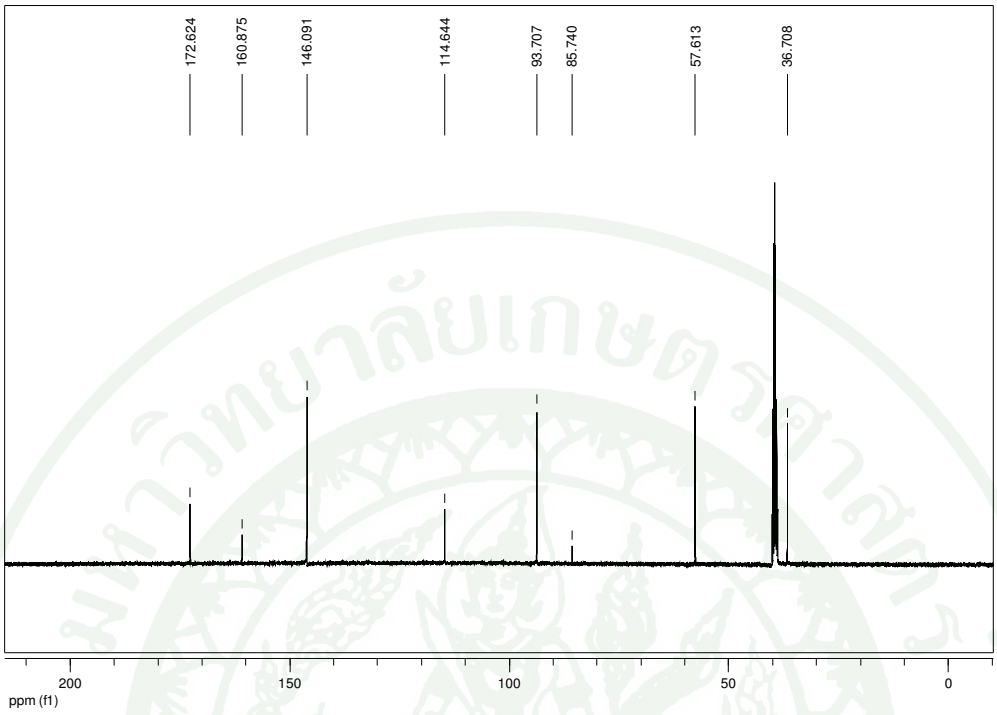
ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์สาร Ricinine โดยวิธี NMR spectroscopy (^{1}H NMR และ ^{13}C NMR)

ตำแหน่ง	^{1}H NMR	^{13}C NMR
2	-	172.6
3	-	114.6
4	-	160.9
5	6.40 (1H, d,*J* =7.6Hz)	93.7
6	8.07 (1H,d,*J* =7.6 Hz)	146.1
7	-	85.7
8	3.96 (3H, s)	57.6
9	3.41 (3H, s)	36.7



ภาพที่ 34 ^{1}H NMR spectrum ของสาร Ricinine

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 35 ^{13}C NMR spectrum ของสาร Ricinine

3.4 ผลของสาร Ricinine ที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 โดยวิธี Topical sprayer method

จากการนำสาร Ricinine ไปทดสอบกับหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 ด้วยวิธี Topical sprayer method โดยเตรียมความเข้มข้นของสารสกัด 6 ความเข้มข้นดังนี้ กลุ่มควบคุม (100% acetone), 1,000, 2,000, 4,000, 8,000 และ 16,000 ppm เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่ากับ 0.00±0.00, 23.33±20.82, 53.33±5.77, 56.67±20.82, 60.00±0.00 และ 73.33±25.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมที่เวลา 48 ชั่วโมงเท่ากับ 00.00±0.00, 30.00±26.46, 60.00±10.00, 63.33±15.28, 66.67±5.77 และ 76.67±25.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 10) มีค่า LC_{50} ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงเท่ากับ 3,215.56±1,030.75 ppm และ 2,087.63±882.38.75 ppm

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน [(1)] ของ *S.exigua* หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ricinine) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงโดยวิธี Topical sprayer method

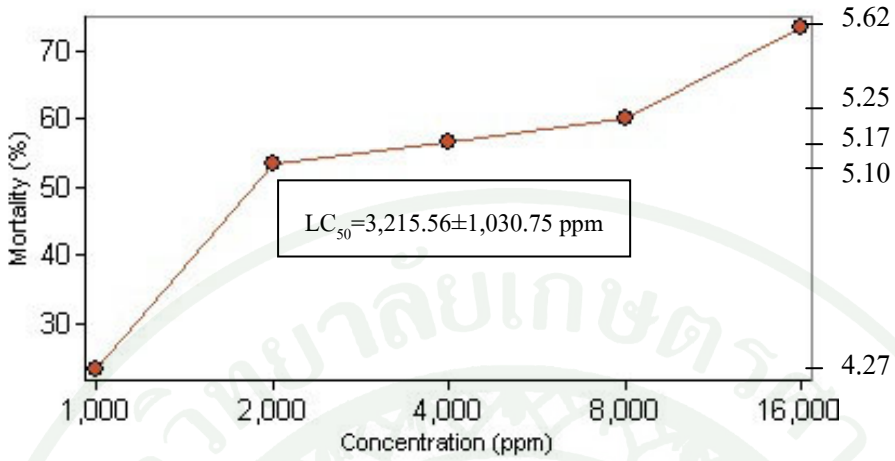
ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (ppm)	เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยของหนอนกระทู้หอม[(3)] ± SD	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
0.00[(2)]	0.00±0.00[f]	00.00±0.00[f]
1,000	23.33±20.82[e]	30.00±26.46[e]
2,000	53.33±5.77[d]	60.00±10.00[d]
4,000	56.67±20.82[c]	63.33±15.28[c]
8,000	60.00±0.00[b]	66.67±5.77[b]
16,000	73.33±25.17[a]	76.67±25.17[a]

(1) การตายเฉลี่ยได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว

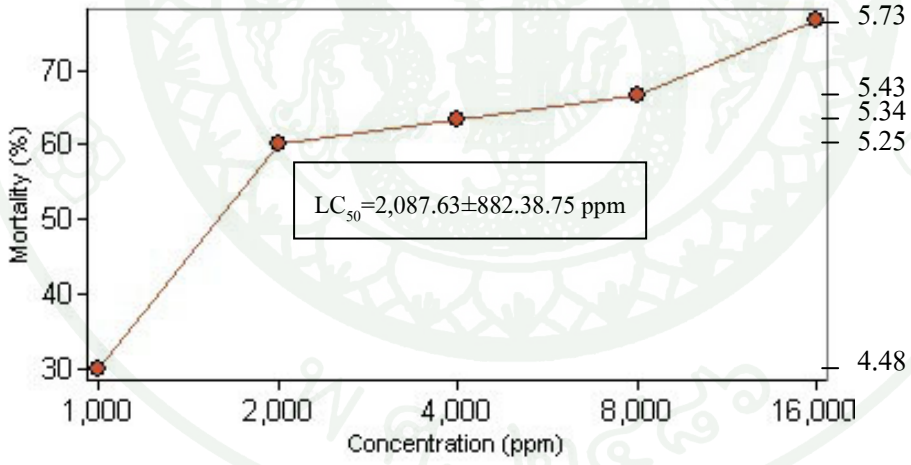
(2) Control treatment : 100% Acetone

(3) Mean ± SD ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P < 0.05) โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 36 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสาร Ricinine จากใบละหุ่งแดงที่เวลา 24 ชั่วโมงโดยวิธี Topical sprayer method



ภาพที่ 37 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสาร Ricinine จากใบละหุ่งแดงที่เวลา 48 ชั่วโมงโดยวิธี Topical sprayer method

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบค่า LC_{50} ของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงโดยวิธี Dipping method และ Topical sprayer method

Jatropha gossypifolia	วิธี	LC_{50} (24 ชม.) ppm	LC_{50} (48 ชม.) ppm
EtOAc crude extract	Dipping	1,809.40±342.62	1,588.39±295.10
	Topical sprayer	8,644.63 ± 1,566.54	6,027.16±1,227.16
EtOH crude extract	Dipping	34,570.65± 3,572.17	26,796.21±3,527.98
Ricinine	Topical sprayer	3,215.56±1,030.75	2,087.63±882.38.75

หมายเหตุ EtOAc crude extract ละลายใน 70% Ethanol
EtOH crude extract ละลายใน 70% Ethanol
Ricinine ละลายใน 100% Acetone

4. ผลการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ Carboxylesterase และ Glutathione-*S*-transferase ของหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (*Jatropha gossypifolia*)

4.1 ผลการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ Carboxylesterase

หลังจากหนอนกระทู้หอมได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำหนอนกระทู้หอมที่รอดชีวิตมาตรวจวัดระดับของเอนไซม์ โดยใช้ pNPA (Paranitrophenyl acetate) เป็นสารตั้งต้น และตรวจวัดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสาร pNPA โดยใช้ Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 400 นาโนเมตร พบว่าสารละลาย pNPA จากที่มีลักษณะเป็นสารละลายใส เปลี่ยนเป็นสารละลายที่มีสีเหลืองของสาร Paranitrophenol จากการตรวจวัดปฏิกิริยาของเอนไซม์ ดังกล่าวพบว่า กลุ่มควบคุม (Control) และ กลุ่ม Treatment มีปฏิกิริยาเท่ากับ 1.55±0.47 nM

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

paranitrophenol / mg protein / min และ 17.90±4.66 nM paranitrophenol / mg protein / min ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม และ กลุ่ม Treatment พบว่าระดับของเอนไซม์ Carboxylesterase เพิ่มขึ้น 0.12 เท่า (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ Carboxyl esterase ± ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐานโดยวิธี pNPA assay

หนอนกระทู้หอมวัยที่ 2	ปฏิกิริยาเอนไซม์ Carboxyl esterase[(1)] (nM paranitrophenol / mg protein / min)	CF[(4)]
Control[(2)]	1.55±0.47[b]	-
Treatment[(3)]	17.90±4.66[a]	0.12

(1) คือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันภายในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$)

(2) คือระดับของเอนไซม์ Carboxyl esterase ของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 ที่ทดสอบด้วย 70% Ethanol (กลุ่มควบคุม)

(3) คือระดับของเอนไซม์ Carboxyl esterase ของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 ที่รอดชีวิตที่เวลา 24 ชั่วโมง

(4) Correction factor = (Enzyme activity of control) / (Enzyme activity of treatment)

4.2 ผลการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ Glutathione-*S*-transferase

หลังจากหนอนกระทู้หอมได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำหนอนกระทู้หอมที่รอดชีวิตมาตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ Glutathione-*S*-transferase โดยใช้ CDNB (Chorodinitrobenzene) เป็นสารตั้งต้น และตรวจวัดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 340 นาโนเมตร พบว่ากลุ่มควบคุม (Control) และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลุ่ม Treatment มีปฏิกิริยาเท่ากับ 0.05±0.02 CDNB Conjugated product/mg protein/ min และ 0.43±0.68 conjugated product/mg protein/min ตามลำดับ และปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่ม Treatment เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุม 1.62 เท่า

ตารางที่ 13 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ Glutathione-*S*-transferase ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยวิธี CDNB assay

หนอนกระทู้หอมวัยที่ 2	ปฏิกิริยาเอนไซม์ Glutathione-*S*-transferase[(1)] (CDNB conjugated product / mg protein / min)	CF[(4)]
Control[(2)]	0.05±0.02[b]	-
Treatment[(3)]	0.43±0.68[a]	1.62

[(1)] คือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันภายในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$)

[(2)] คือระดับของเอนไซม์ Glutathione-*S*-transferase ของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 ที่ทดสอบด้วย 70% Ethanol (กลุ่มควบคุม)

[(3)] คือระดับของเอนไซม์ Glutathione-*S*-transferase ของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 ที่รอดชีวิตที่เวลา 24 ชั่วโมง

[(4)] Correction factor = (Enzyme activity of control)/ (Enzyme activity of treatment)

5. ผลของสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่มีผลต่อแตนเบียน คือ *Meteorus pulchricornis*

เมื่อนำสารสกัดหยาบของใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ทดสอบความเป็นพิษกับ *Meteorus pulchricornis* โดยวิธี Filter paper method ซึ่งมีระดับความเข้มข้นดังนี้ กลุ่มควบคุม (70%Ethyl acetate), 2500, 5000, 10,000, 20,000 และ 40,000 ppm ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การตาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่เวลา 24 ชั่วโมง จากกลุ่มควบคุมและความเข้มข้นที่ 2,500, 5,000, 10,000 และ 20,000 ppm ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตาย ส่วนความเข้มข้นที่ 40,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 20.00±16.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมง จากกลุ่มควบคุมและความเข้มข้นที่ 2,500, 5,000, 10,000 และ 20,000 ppm ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตาย แต่ที่ความเข้มข้น 40,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 26.67±11.55 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 72 ชั่วโมงจากกลุ่มควบคุมและความเข้มข้นที่ 2,500, 5,000, 10,000และ 20,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 0.00±0.00 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 40,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 33.33±11.55 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 96 ชั่วโมง จากกลุ่มควบคุมจนถึงความเข้มข้นที่ 10,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 0.00±0.00, 6.67±11.55 และ 46.67±11.55 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 120 ชั่วโมงจากกลุ่มควบคุมจนถึงความเข้มข้นที่ 2,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 0.00±0.00, 6.67±11.55, 13.33±23.09 และ 53.33±11.55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์หาค่าความแตกต่างค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การตาย โดยใช้วิธี Duncan' s New Multiple Range Test พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของ *Meteorus pulchricornis* ที่ได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ที่ระดับความเข้มข้น 40,000 ppm ที่เวลา 24-72 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้น 20,000-40,000 ppm ที่เวลา 96 ชั่วโมงและที่ระดับความเข้มข้น 10,000-40,000 ppm ที่เวลา 120 ชั่วโมง แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ (ตารางที่ 14)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน [(1)] ของ *Meteorus pulchricornis* หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48, 72,96 และ 120 ชั่วโมงโดยวิธีการ Filter paper method

ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (ppm)	เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยของ *Meteorus pulchricornis* [(3)] ± SD				
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	96ชั่วโมง	120ชั่วโมง
0.00[(2)]	0.00±0.00[b]	0.00±0.00[b]	0.00±0.00[b]	0.00±0.00[c]	0.00±0.00[d]
2,500	0.00±0.00[b]	0.00±0.00[b]	0.00±0.00[b]	0.00±0.00[c]	0.00±0.00[d]
5,000	0.00±0.00[b]	0.00±0.00[b]	0.00±0.00[b]	0.00±0.00[c]	0.00±0.00[d]
10,000	0.00±0.00[b]	0.00±0.00[b]	0.00±0.00[b]	0.00±0.00[c]	6.67±11.55[c]
20,000	0.00±0.00[b]	0.00±0.00[b]	0.00±0.00[b]	6.67±11.55[b]	13.33±23.09[b]
40,000	20.00±16.33[a]	26.67±11.55[a]	33.33±11.55[a]	46.67±11.55[a]	53.33±11.55[a]

[(1)] การตายเฉลี่ยได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ตัว

[(2)] Control treatment : 70% Ethanol

[(3)] Mean ± SDตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิจารณ์

1. ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบละหุ่งแดง (*Jatropha gossypifolia*) ที่มีต่อหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*)

การศึกษาผลของสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่มีผลต่อหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 นั้น ต้องทำการผึ่งใบละหุ่งแดงก่อน ซึ่งอาจทำให้แห้งตามธรรมชาติโดยผึ่งแห้งในที่ร่ม (Shade drying) หรือผึ่งแดด (Sun drying) เพื่อทำลายเชื้อราหรือเชื้อแบคทีเรียต่างๆ ที่ปนเปื้อนมากับใบละหุ่งแดง อีกทั้งยังช่วยให้สะดวกแก่การจัดเก็บ และการที่นำใบละหุ่งแดงมาปั่นให้ละเอียดนั้น เนื่องจากองค์ประกอบสำคัญทางเคมีจะอยู่ภายในเซลล์ จึงต้องทำลายผนังเซลล์ให้แตกออกก่อน และเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของตัวทำละลาย เพื่อให้ตัวทำละลายชะองค์ประกอบทางเคมีออกมาในปริมาณสูงสุด ซึ่งการทดลองครั้งนี้ได้สกัดสารหยาบจากใบละหุ่งแดง โดยวิธีซอกท์เลท (Soxhlet extractor) และเป็นวิธีการสกัดร้อน อาจจะทำให้สารเคมีในพืชชนิดนี้สลายตัวได้ แต่วิธีการสกัดดังกล่าวมีข้อดี คือ สะดวกและทำได้ง่าย อีกทั้งยังประหยัดตัวทำละลาย เนื่องจาก Flask ที่บรรจุตัวทำละลายได้รับความร้อนจาก Heating mantle ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไปกระทบเครื่องควบแน่น (Condenser) และกลั่นตัวลงมาสกัดสารใหม่วนเวียนเช่นนี้ จนกระทั่งการสกัดสารหยาบเสร็จสมบูรณ์ การทดลองครั้งนี้ ได้สกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีจากใบละหุ่งแดงโดยใช้ เอทิลแอซิเทต (Ethyl acetate) และเอทานอล (Ethanol) เป็นตัวทำละลาย ซึ่งตัวทำละลายดังกล่าวมีขั้วสูงจึงทำให้มีอัตราการละลายของสารกว้างจึงทำให้มีการชะ (Elute) องค์ประกอบทางเคมีจากใบละหุ่งแดงออกมาหลายชนิด อีกทั้งการสกัดด้วยเอทานอลนั้น ยังช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (รัตนา, 2547) และเมื่อทำการสกัดใบละหุ่งแดงแล้วจะนำสารละลายที่ได้ทั้งหมดไประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator ซึ่งการใช้เครื่องมือดังกล่าว จัดเป็นวิธีการระเหยตัวทำละลายในภาวะสุญญากาศ (Distillation in vacuo) จึงเป็นวิธีการที่สะดวก ประหยัดเวลา อีกทั้งยังสามารถควบคุมอุณหภูมิการระเหยให้คงที่ได้ และสารละลายที่ระเหยออกมายังสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์และนำกลับมาใช้ใหม่ได้

การศึกษาครั้งนี้ได้นำสารสกัดหยาบโดยมีเอทิลแอซิเทตเป็นตัวทำละลาย (Ethyl acetate crude extract) มาทดสอบกับหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 โดยวิธีจุ่มตัวหนอน (Dipping method) และวิธีพ่นฝอยหมอกด้านบน (Topical sprayer method) นั้น เนื่องจากสารสกัดหยาบดังกล่าวมีปริมาณ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มากกว่า และมีผลต่ออัตราการตายของหนอนกระทู้หอมมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบที่มีเอทานอลเป็นตัวทำละลาย (Ethanol crude extract) ถึงแม้ว่าเอทานอลจะเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงกว่าเอทิลแอซิเทต มีอัตราการละลายสารที่มากกว่า แต่สารบางตัวที่มีฤทธิ์ต่อหนอนกระทู้หอมนั้นอาจจะไม่ได้ละลายในเอทานอลได้ทุกตัว จึงทำให้สารสกัดหยาบที่มีเอทิลแอซิเทตเป็นตัวทำละลายมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอทานอล

จากการศึกษาผลของสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (*Jatropha gossypifolia*) ด้วยวิธีซอกซ์เลต (Soxhlet extraction) โดยมีเอทิลแอซิเทต (Ethyl acetate) เป็นตัวทำละลายที่มีผลต่อการตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 (*Spodoptera exigua*) โดยวิธีการจุ่มตัวหนอน (Dipping method) และวิธีพ่นฝอยหมอกด้านบน (Topical sprayer method) วิธีการทดสอบความเป็นพิษทั้งสองวิธีทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อทราบถึงระดับความเข้มข้นที่ทำให้หนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 ตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) ผลการทดลองพบว่าหนอนกระทู้หอมมีเปอร์เซ็นต์การตายสูงขึ้น ตามระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นของสารที่ใช้ในการทดลอง ระดับความเข้มข้นของสารที่ใช้มีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกันในเชิงบวก โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธีการจุ่ม (Dipping method) มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงที่สุดและมีค่า LC_{50}ที่ต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีพ่นฝอยหมอกด้านบน (Topical sprayer method) เนื่องจากวิธีจุ่มนั้น หนอนกระทู้หอมได้รับสารสกัดเข้าไปทางปาก ผิวหนัง และระบบการหายใจ แล้วซึมผ่านเข้าสู่อวัยวะที่เกิดพิษ รวมทั้งผ่านเข้าระบบไหลเวียนได้มากกว่า ซึ่งแตกต่างจากวิธีพ่นฝอยหมอกด้านบน โดยที่หนอนกระทู้หอมได้รับสารสกัดเพียงบางส่วนเช่น ทางด้านบนของลำตัว (Dorsal) จึงทำให้ได้รับปริมาณสารสกัดได้น้อยกว่า (สุรพล, 2546)

นอกจากนั้น มณฑกาญจน์ (2549) ได้นำสารสกัดหยาบจากพืชวงศ์ Zingiberaceae มาใช้ควบคุมหนอนกระทู้หอม โดยพบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 500 ppm ทำให้หนอนกระทู้หอมตายทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองครั้งนี้ จะเห็นว่าจะมีค่า LC_{50} ที่ต่ำกว่าการใช้สารสกัดจากใบละหุ่งแดง เนื่องจากพืชต่างชนิดกันจะมีองค์ประกอบทางเคมี รวมทั้งสารออกฤทธิ์ที่มีต่อหนอนกระทู้หอมแตกต่างกัน และจากรายงานของ อรุณ และคณะ (2533) ใช้สารสกัดจากหางไหล รวมทั้งผสมสารสกัดจากหางไหล รวมกับรากหนอนตายหยาก ดีปลี กานพลู และพริกไทย พบว่าสารสกัดดังกล่าวไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมประชากรของหนอนกระทู้หอม ซึ่งต่างจากการทดลองครั้งนี้ เนื่องจากสารสกัดหยาบจากใบละหุ่งแดง มีผลต่ออัตราการตายของหนอนกระทู้หอมตามระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น และยังมีการใช้สารสกัดจากพืชชนิดอื่นนอกจากใบละหุ่งแดงที่ใช้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ควบคุมแมลงศัตรูพืชในกลุ่ม Lepidopterous เช่น ใช้สารสกัดจากดอกกานพลูควบคุมหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) วัยที่ 2 และ 3 โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 13,000 ppm (คำนวณ, 2549) นอกจากนั้น พุทธิพร (2549) ใช้สารสกัดจากเมล็ดน้อยหน่า เมล็ดมันแกว และพริกขี้หนูมาควบคุมประชากรของหนอนกระทู้ผักเช่นเดียวกัน โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 12,000 ppm ซึ่งมีค่าความเป็นพิษต่ำกว่าสารสกัดจากใบละหุ่งแดง

2. ความเป็นพิษของสารบริสุทธิ์จากใบละหุ่งแดงที่มีต่อหนอนกระทู้หอม

การทดลองครั้งนี้แยกองค์ประกอบทางเคมีของใบละหุ่งแดงด้วยวิธีการโครมาโทกราฟี (Chromatography) ได้แก่ Quick column chromatography, Column chromatography และ Thin layer chromatography (TLC) ซึ่งการแยกองค์ประกอบทางเคมีจากใบละหุ่งแดงด้วยวิธี Quick column chromatography และ Column chromatography นั้น เนื่องจากวิธีดังกล่าวสามารถแยกสารแต่ละชนิดออกจากสารผสมได้ ส่วนการใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC) ใช้ตรวจองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากใบละหุ่งแดงได้ อีกทั้งการตรวจสอบยังใช้สารปริมาณน้อยจึงมีความรวดเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างสาร

จากการแยกองค์ประกอบทางเคมีของใบละหุ่งแดง (*Jatropha gossypifolia*) ด้วยวิธี Quick Column Chromatography และ Column Chromatography พบสารออกฤทธิ์สำคัญคือ Ricinine ซึ่งเป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์ (Alkaloid) จากการใช้ระบบตัวทำละลายต่างๆ ในการแยกสาร เช่น Hexane : CH_2Cl_2, CH_2Cl_2 : EtOAc และ EtOAc : EtOH ซึ่งคล้ายคลึงกับการแยกสาร Ricinine จากเมล็ดของ *Ricinus communis* โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ CH_2Cl_2 : EtOH : H_2O (Cazal *et al*., 2009)

Ricinine มีฤทธิ์เป็นยาฆ่าแมลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ (รัตนา, 2547) ที่พบว่าสาร Ricinine เป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์ที่เป็นพิษเนื่องจากมีโครงสร้างพื้นฐานเป็น 2-pyridone ring ซึ่งเป็น Tertiary base ที่มักใช้เป็นยาฆ่าแมลง นอกจากนั้นสารชนิดนี้ยังสามารถพบได้ในพริกไทย ยาสูบ และพืชในวงศ์ Solanaceae จากรายงานของ Rizwan-ul-Haq *et al.* (2009) ได้สังเคราะห์สาร Ricinine และทดสอบความเป็นพิษต่อหนอนกระทู้หอมโดยวิธี Feeding method โดยพบค่า EC_{50} เท่ากับ 0.54 mg/ml นอกจากการใช้สาร Ricinine ควบคุมหนอนกระทู้หอม แล้วยังมีรายงานของ Olaifa *et al*. (1991) ที่นำสาร Ricinine ซึ่งสกัดได้จากเมล็ดของละหุ่ง (*Ricinus communis*) มา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทดสอบความเป็นพิษต่อเพลี้ย (*Myzus persicae*) โดยวิธี Feeding method พบว่าทำให้เพลี้ยชนิดนี้ตายทั้งหมดที่เวลา 8-24 ชั่วโมง อีกทั้งสาร Ricinine ที่สกัดได้จากเมล็ดละหุ่งยังมีผลต่ออัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (Brown planthopper) (Kwon *et al.*, 2006)

สาร Ricinine ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญพบว่า หลังจากหนอนกระทู้หอมได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดงจะมีการเคลื่อนไหวที่ช้าลง รวมทั้งหนอนกระทู้หอมบางตัวจะพลิกตัวไปมา ซึ่งสารสกัดมีผลต่อระบบประสาทของแมลง ทำให้มีผลต่อการขยับตัว (Leahey, 1985) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Ferraz *et al*. (2009) ซึ่งใช้สาร Ricinine ที่ได้จากการสกัดใบของ *Ricinus communis* และเป็นพืชวงศ์เดียวกันกับละหุ่งแดง (Euphorbiaceae) ทดสอบความเป็นพิษกับหนู พบว่าสาร Ricinine ที่ความเข้มข้นสูงมีผลต่อการหดตัวคลายตัวของกล้ามเนื้อ (Clonic) ทำให้หนูเกิดอาการชักเกร็ง (Seizures) และตายในที่สุด จากการตรวจคลื่นไฟฟ้าสมองของหนูพบว่าก่อให้เกิดผลต่อระบบประสาทและสมองส่วนกลาง (Central nervous system) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสมองส่วน Cerebral cortex และ Hippocampus นอกจากนั้นยังพบว่าที่ความเข้มข้นของสารต่ำยังมีผลต่อความจำในหนู นอกจากสาร Ricinine จะมีฤทธิ์เป็นยาฆ่าแมลง และมีผลต่อระบบประสาทและสมองในหนูรายงานของ นพมาศ (2544) พบว่าสาร Ricinine เป็นสารพิษที่ทำให้เกิดการอาเจียน คลื่นไส้ ความดันโลหิตต่ำ มีพิษต่อตับ ไต ทำให้หยุดหายใจและเสียชีวิตได้รวมทั้งมีฤทธิ์ทางสรีรวิทยา (Physiological active) ต่อมนุษย์และสัตว์

นอกจากนั้น เรณู (2543) นำสารลิโมนอยด์ (Limonoid) ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเมล็ดส้มเขียวหวานมาควบคุมประชากรของหนอนกระทู้หอม พบว่าที่ความเข้มข้น 750-1,000 ppm ซึ่งมีความเป็นพิษมากกว่าสารสกัดจากใบละหุ่งแดง โดยสามารถยับยั้งการฟักไข่ของหนอนกระทู้หอมและจากการฉีดพ่นสารลิโมนอยด์มาทดสอบกับหนอนกระทู้หอมที่ความเข้มข้น 306 ppm ทำให้หนอนกระทู้หอมตายหลังจากฉีดพ่นสารลิโมนอยด์ 2 วัน รวมทั้งทำให้หนอนกระทู้หอมเข้าสู่ระยะดักแด้ได้น้อยลง เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองครั้งนี้โดยใช้สาร Ricinine ควบคุมหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 ด้วยวิธีการพ่นฝอยหมอกด้านบน (Topical sprayer method) ซึ่งมีค่า LC_{50} ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงเท่ากับ 3,215.56 ±1,030.75 ppm และ 2,087.63±882.38.75 ppm ตามลำดับ ดังนั้นสาร Ricinine มีความเป็นพิษต่ำกว่าสาร Limonoid

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ Carboxylesterase และ Glutathione-*S*-transferase ของหนอนกระทู้หอมหลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง

จากการศึกษาระดับเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส (Carboxyl esterase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในวัฏภาคที่หนึ่ง (Phase I) ซึ่งเป็นกลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารพิษ ให้มีฤทธิ์ที่รุนแรงขึ้น รวมทั้งทำให้สารพิษหมดฤทธิ์ โดยเอนไซม์ Carboxyl esteraseนั้น จะทำหน้าที่ Hydrolyzed สารกลุ่ม Ester ให้กลายเป็นสารพิษตัวใหม่ที่เป็นกรด และเป็นแอลกอฮอล์ (ชัยวัฒน์ , 2539)

จากการทดลองพบว่าเมื่อหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 ที่รอดชีวิตหลังจากรับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ที่เวลา 24 โดยวิธี Dipping method มีระดับเอนไซม์ Carboxyl esterase ที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งคล้ายคลึงกับการทดลองของสุรพล (2537) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดสะเดาต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ทำลายพิษของหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) พบว่าระดับเอนไซม์ Esterase มีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารมาลาไทออน และไซฟลูธริน (Cyfluthrin) ซึ่งจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงระดับของเอนไซม์ Esterase ในหนอนกระทู้ผักสูงขึ้นถึง 50-100%สำหรับการศึกษาระดับเอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส (Glutathione-*S*-transferase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสารพิษที่เข้าสู่ร่างกายในวัฏภาคสอง (Phase II) ในการเร่งปฏิกิริยาคอนจูเกชัน (Conjugation) และมีการเกิดกรดเมอร์แคพทูริกออกมา โดยเอนไซม์ชนิดนี้สามารถพบได้ในแมลงทุกชนิด จากการทดลองพบว่าภายหลังจากหนอนกระทู้หอมได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่เวลา 24 ชั่วโมง (Ethyl acetate crude extract) พบว่าระดับเอนไซม์ Glutathione-*S*-transferase เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม การที่ระดับเอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลง จะมีผลต่อขบวนการเมแทบอลิซึมเพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย หรือมีการสร้างความต้านทานในชีวิต (สุรพล, 2544)

จากการที่ระดับของเอนไซม์ทำลายพิษ (Detoxification enzyme) ทั้ง 2 ชนิดเพิ่มขึ้นนั้น เนื่องจากร่างกายเกิดกลไกให้มีการเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์ทำลายพิษเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอม (Xenobiotic) หรือสารเคมีต่างๆ เข้าไปภายในร่างกาย รวมทั้งเกิดการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาทางเคมีภายในร่างกาย (Biotransformation) เพื่อให้สิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายเปลี่ยนแปลงเป็นโมเลกุลที่มีขั้วเพื่อละลายน้ำและถูกกำจัดออกนอกร่างกาย จึงทำให้สารพิษที่ได้รับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เข้าไปในร่างกายลดลง โอกาสที่จะเกิดพิษหรือสะสมสารพิษก็ลดลงตามไปด้วย ดังนั้นถ้าใช้สารสกัดจากใบละหุ่งแดงกับหนอนกระทู้หอมต่อไปเป็นเวลานาน จึงมีโอกาสที่หนอนกระทู้หอมจะเกิดการต้านทาน (Resistance) ต่อสารชนิดนี้ได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Natsuhara *et al*. (2004) พบว่าหนอนกระทู้หอมต้านทานต่อสาร Permethrin โดยพบว่าเอนไซม์ Cytochrome P450 monooxygenases เพิ่มขึ้น 4.5 เท่า และจากรายงานของ พุทธิพร (2549) พบว่าผลการทดลองนี้สอดคล้องกันโดยหลังจากทดสอบสารสกัดจากพริกขี้หนูที่มีต่อหนอนใยผักพบว่าระดับของเอนไซม์เอสเทอเรสเพิ่มสูงขึ้น 2.45 เท่า

4. ผลของสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่มีผลต่อแมลงกลุ่มมีประโยชน์ คือ *Meteorus pulchricornis*

ความเป็นพิษของสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่มีผลต่อแตนเบียน (*Meteorus pulchricornis*) ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมาย (Non target) โดยวิธี Filter paper method จากการใช้สารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ที่ระดับความเข้มข้น 2,500, 5,000, 10,000 และ 20,000 ppm ทดสอบความเป็นพิษกับ *Meteorus pulchricornis* เป็นเวลา 120 ชั่วโมงโดยวิธี Filter paper method พบว่าที่ระดับความเข้มข้นต่ำ 2,500-5,000 ppm นั้นไม่ส่งผลกระทบต่อ *Meteorus pulchricornis* ซึ่งแตนเบียนชนิดนี้เป็นแมลงที่มีประโยชน์ในการควบคุมประชากรของหนอนกระทู้หอม

ทั้งนี้ปัจจัยที่ส่งผลให้และ *Meteorus pulchricornis* มีเปอร์เซ็นต์การตายที่เพิ่มขึ้นเนื่องมาจากใช้เอทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงมีอัตราการละลายสารกว้างจึงทำให้แมลงสามารถดูดซับสารสกัดได้ดีจึงทำให้สารสกัดซึมผ่านเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตและเข้าสู่อวัยวะเป้าหมายในการเกิดพิษได้ดี (สุรพล, 2546)

วิธี Filter paper method นั้นแตนเบียนจะสัมผัสปริมาณของสารสกัดแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ความชื้น ความแข็งแรงของแตนเบียนแต่ละตัวในขณะทดลอง รวมทั้งระยะเวลาในการสัมผัสกับสาร จากการทดสอบสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่มีผลต่อแตนเบียนจะเห็นว่าที่ระดับความเข้มข้นสูงคือระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10,000 ppm ขึ้นไปจะทำให้เปอร์เซ็นต์การตายของแตนเบียนเพิ่มสูงขึ้นไปด้วย ดังนั้นสามารถใช้สารสกัดจากใบละหุ่งแดง ควบคุมประชากรของหนอนกระทู้หอมได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีประโยชน์มากนัก นอกจากนั้นการนำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แตนเบียนมาควบคุมหนอนกระทู้หอมยังเป็นการควบคุมแมลงศัตรูพืชแบบชีววิธี และสามารถนำไปใช้ในแปลงเพาะปลูกพืชได้จริงแทนการใช้สารเคมีฆ่าแมลงและลดปัญหาสารพิษตกค้างในพืชและสิ่งแวดล้อม รวมทั้งสามารถลดต้นทุนในการซื้อยาฆ่าแมลงและลดข้อกีดกันทางการค้าในการส่งออกผลผลิตทางการเกษตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการศึกษาผลของสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่มีผลต่ออัตราการตายของหนอนกระทู้หอม โดยใช้เอทิลแอซิเทตเป็นตัวทำละลาย (Ethyl acetate crude extract) ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบที่ออกฤทธิ์ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบ โดยเอทานอลทดสอบด้วยวิธีจุ่ม (Dipping method) มีค่า LC_{50} ที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่ากับ 1,809.40±342.62 ppm และที่เวลา 48 ชั่วโมงเท่ากับ 1,588.39±295.10 ppm ตามลำดับ สำหรับวิธีพ่นฝอยหมอกด้านบน (Topical sprayer method) มีค่า LC_{50} ที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 8,644.63 ± 1,566.54 ppm และที่เวลา 48 ชั่วโมง เท่ากับ 6,027.16±1,227.16 ppm

จากการแยกองค์ประกอบทางเคมีของใบละหุ่งแดงโดยวิธี Quick column chromatography และ Column chromatography และนำไปวิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีโดยวิธีสเปกโตรสโกปี (^{1}H NMR และ ^{13}C-NMR) พบสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ คือ Ricinine และนำไปทดสอบกับหนอนกระทู้หอมโดยวิธีพ่นฝอยหมอกทางด้านบน (Topical sprayer method) พบค่า LC_{50} ที่มีต่อหนอนกระทู้หอมที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 3,215.56±1,030.75 ppm และ 2,087.63±882.38.75 ppm ตามลำดับ

ส่วนระดับปฏิกิริยาของเอนไซม์ทำลายพิษคือ คาร์บอกซิลเอสเทอเรส (Carboxyl esterase) และกลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส (Glutathione-*S*-transferase) ของหนอนกระทู้หอมที่รอดชีวิตหลังจากได้รับสารสกัด Ethyl acetate crude extract ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์ทั้งสองมีค่าระดับปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยมีค่า CF (Correction factor) เท่ากับ 0.12 เท่า สำหรับเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส และ 1.62 เท่า สำหรับเอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส

การทดสอบสารสกัดหยาบซึ่งสกัดโดยเอทิลแอซิเทต (Ethyl acetate) ที่มีต่อแตนเบียน (*Meteorus pulchricornis*) โดยวิธี Filter paper method มีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 40,000 ppm ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาพฤติกรรมและการเปลี่ยนแปลงของหนอนกระทู้หอมหลังจากได้รับสารสกัด
2. ควรมีการศึกษาเปรียบเทียบผลการใช้แตนเบียนและการใช้สารสกัดจากพืชในการควบคุมหนอนกระทู้หอม
3. ประยุกต์ใช้สารสกัดจากพืชในพื้นที่จริงเพื่อทราบความแตกต่างและปัญหาเพื่อนำไปพัฒนาสารสกัดจากพืชในครั้งต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

คำนวณ จินดา. 2549. **ประสิทธิภาพในการเป็นสารกำจัดแมลงและการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกกานพลูต่อหนอนใยผัก (*Plutella xylostella* Linn.).** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว, ธีระยุทธ กลิ่นสุคนธ์ และปัญญา เต็มเจริญ . 2539 . **หลักการทางพิษวิทยา** . ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

เต็ม สมิตินันทน์. 2544. **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย**. สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

ทิพนาถ อันตรเสน. 2550. **ประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชบางชนิดต่ออัตราการตายระดับเอนไซม์เอสเทอเรส และกลูตาไทโอน-เอส-ทรานสเฟอเรสในแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis* Hendel).** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. 2544. **ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม1**.พิมพ์ครั้งที่ 3. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

นฤมล สังข์โอธาน. 2546. **ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวในการควบคุมแมลงศัตรูพืช.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พุทธิพร สายสงเคราะห์. 2549. **ปฏิกิริยาเอนไซม์เอสเทอเรสและกลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรสในหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura* L.)**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มณฑกาญจน์ ชนะภัย. 2549. **ชนิดและปริมาณของสารสกัดจากพืชวงศ์ Zingiberaceae, Apiaceae และ Piperaceae ต่อการควบคุมหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) และเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด (*Alternaria brassicicola*)**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัชราภรณ์ รวมธรรม. 2545. **ผลของสารสกัดจากแห้วหมูต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์เอสเทอเรส และกลูตาไทโอน-เอส-ทรานเฟอเรส ในระบบทางเดินอาหารของหอยเชอรี่.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. **การตรวจสอบและการสกัดแยกสาระสำคัญจากสมุนไพร**. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

เรณู รวยรื่น. 2543. **การสกัดสารลิโมนอยด์จากเมล็ดส้มเขียวหวาน (Citrus reticulate Blanco) ในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*).** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ศศิเทพ ปิติพรเทพิน.2547. **การใช้เชื้อราในการกำจัดหนอนกระทู้หอมในระยะไข่และตัวหนอน.** ปัญหาพิเศษ.ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรพล วิเศษสรรค์. 2537. **ผลการใช้สารสกัดสะเดาต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ของแมลง**. เอกสารสัมนาเชิงปฏิบัติการการใช้สารสกัดจากพืชทดแทนการใช้สารเคมีภัณฑ์ทางการเกษตร.

_____, 2544. **เอกสารประกอบการสอนวิชาพิษวิทยาเบื้องต้น.** ภาควิชาสัตววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____ , 2546. **เอกสารประกอบการสอนวิชากลไกสารพิษในสัตว์.** ภาควิชาสัตววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อรุณ โสตถิกุล, สุธีกานต์ โสตถิกุล, สุมาลี พรหมรุกขชาติ และ เจนจิรา จาติ. 2533. **การพัฒนาสารสกัดจากรากหางไหลสำหรับควบคุมหนอนกระทู้หอมในแปลงผักกาดขาวปลี**. สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง, ลำปาง.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อรรจน์สิทธิ สร้อยทอง. 2541. **การศึกษาความเป็นไปได้ทางเศรษฐศาสตร์ของโครงการผลิตไวรัสนิวเคลียร์โพลีฮีโดรซีส (เอ็นพีวี) สำหรับกำจัดหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* Hubner) เชิงการค้า**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Bullangpoti, V. 2007. **The novel botanical insecticide, alpha-mangostin from mangosteen pericarp extracts, for control of *Nilapavata lugens* (Stal.).** Ph.D. Thesis, Kasetsart University.

Cazal, C.M., B. Jaqueline., V. Domingues., O. Bueno and E. Filho. 2009. High-speed counter-current chromatographic isolation of ricinine, an insecticide**. J. Chromatography**. 1216: 4290–4294.

Chang, C.K. and M.E. Whalon. 1987. Substrate specificities and multiple form of esterase in the brown planthopper, *Nilapavata lugens* (Stal)**. Pestic. Biochem. Physiol**. 27: 30-35.

Chao, N.B and K. Maeto. 2007. Intraspecific larval competition in *Meteorus pulchricornis* (Hymenoptera: Braconidae), a solitary endoparasitoid of lepidopteran larvae. **Applied Entomology and Zoology**. 43: 159-165.

Chen, W.L and C.N Sun. 1994. Purification and characterization of carboxylesterases of rice brown planthopper, Nilaparvata lugens Stal. **Insect. biochem. Molec biol**. 24: 347-355.

Cheng, W., W. Dou., Y.Chai., and J. Wang. 2007. Comparison of biochemical and toxicological characterizations of glutathione *S-transferases* and superoxide dismutase between *Liposcelis bostrychophila* Badonnel and L. *entomophila* (Enderlein) (Psocoptera:Liposcelididae). **Pestic. Biochem. Physiol**. 7: 151-157.

Dai, S.M and C.N. Sun. 1984. Pyrethroid resistance and synergism in *Nilaparvata lugens* Stal. (Homoptera : Delphacidae) in Taiwan. **J. Econ. Entomol**. 77: 891-897.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Das, B., A. Kashinatham., B. Venkataiah., K.V.N.S., Srinivas., G. Mahender and M. R. Reddy. 2003. Cleomiscosin A, a coumarino-lignoid from *Jatropha gossypifolia*. **Biol Pest**. 12: 175-180.

Decombel, L., G. Smagghe and L. Tirry. 2004. Action of major insecticide groups on insect coo lines of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, compared with larvicidal toxicity. **Biol. Animal.** 40: 43-51.

_____, K. Venkateswarlu., V. Saidi and D. Biswanath. 2004. 4'-*O*-demethyl retrochinensin a minor new lignan from *Jatropha gossypifolia***. Indian Journal of Hetero Chemist.** 14: 169-170.

Ferraz, A.C., A. Janete., A. Francib., R. Sandra and F. Eduardo. 2009. Amino acid and monoamine alterations in the cerebral cortex and hippocampus of mice submitted to ricinine-induced seizures. **Biochem and Behav**. 72: 779–786.

Gill, S.S., E.A. Elizabeth and P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus Thuringiensis* endotoxins. **Rev.Entermol**. 37: 615-618.

Guette, C.A., C. Baraguey., A. Blond., J.L. Pousset and B. Bodo. 1997. Cyclogossine B, Cyclic Octapeptide from *Jatropha gossypifolia*. **J. Nat. Prod**. 60: 1155-1157.

Hosamani, K.M. and K.S. Katagi. 2007. Characterization and structure elucidation of 12-hydroxyoctadec-*cis*-9-enoic acid in *Jatropha gossypifolia* and *Hevea brasiliensis* seed oils: a rich source of hydroxy fatty acid. **Chemist. Physics of Lipids**. 152: 9-12.

Kwon, O.K., K.S. Seong., Y.K. Kim., H.S. Lee and B.S. Hwang. 2006. Development of a botanical pesticide against the brown planthopper from the castor oil plant. **Crop. Sci.** 75: 56-60.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lara, P., F. Ortego. , E. Gonzalez-Hidalgo., P. Castañera and P. Carbonero. 2004. Adaptation of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to barley trypsin inhibitor BTI-CMe expressed in transgenic tobacco. **Biol Control**. 10: 169-178.

Motoyama, N and W.C. Dauterman. 1980. Glutathione-S-transferase : Their Role in the Metabolism of Organophosphorus insecticides. **Rev. Biochem. Toxicol**. 2: 49-69.

Nathan, S.S., C. Manyoung., P. Chae-Hoon and K. Kandaswamy. 2008. The toxicity and physiological effect of goniothalamin, a styryl-pyrone, on the generalist herbivore, *Spodoptera exigua* Hubner. **Crop Sci**. 10: 256-259.

Oduola, T., O.G Avsioro and T.B Ayanniyi. 2005. Suitability of the leaf extract of *Jatropha gossypifolia* as an anticoagulant for biochemical and haematological analyses. **African Journal of Biotechnology.** 7: 679-681.

Ogundare, A.O. 2007. Anitimicrobial Effect of *Tithonia diversifolia* and *Jatropha gossypifolia* Leaf Extracts. **Trends in Applied Sciences Research.** 2: 145-150.

Olaifa, J.I., F. Matsumura., A.D. Zeevaart and P. Charalambous. 1991. Lethal amounts of ricinine in green peach aphids *(Myzus persicae)* (Suzler) fed on castor bean plants. **Plant Sci.** 73: 253-256.

Rachokarn, S., N. Piyasaengthong and V. Bullangpoti. 2008. Impact of botanical extracts derived from leaf extracts *Melia azedarach* L. (Meliaceae) and *Amaranthus viridis* L. (Amaranthaceae) on populations of *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) and detoxification enzyme activities. **Comm. Appl. Biol. Sci, Ghent University**. 8: 451-458.

Rahman, M., H.M. Ismail and L.T. Yin. 1990 . Jatropholone a and Jatrophatrione Two Diterpenes from *Jatropha-Gossypifolia*. **Pertanika.** 13: 405-408.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Rizwan-ul-Haq, M., Q.B. Mei Ying Hu and Q.S. Wan Li Zhang. 2009. Biological impact of harmaline, ricinine and their combined eVects with *Bacillus thuringiensis* on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera:Noctuidae). **J Pest Sci**. 82:327–334.

Ravindranath, N., V. Bollu., R. Chimmani., J. Pagadala and D. Biswanath. 2007. Jatrophenone, a Novel Macrocyclic Bioactive Diterpene from *Jatropha gossypifolia*). **Acade** 2: 145-150.

Small, G.J. and J. Hemingway. 2000. Differential glycosylation produces heterogeneity in elevated esterases associated with insecticide resistance in the brown planthopper Nilaparvata lugens Stål. Insect biochem. **Molec biol**. 30: 443-53.

Sogorb, M.A., R. Ganga., E. Vilanova and F. Soler. 2006. Plasma phenylacetate and 1-naphthyl acetate hydrolyzing activities of wild birds as possible non-invasive biomarkers of exposure to organophosphorus and carbamate insecticides. **Toxicol Letters**. 168: 278–285.

Soponar, F., A. Catalin Mot and C. Sarbu. 2008. Quantitative determination of some food dyes using digital processing of images obtained by thin-layer chromatography. **J. of Chromatography A**, 1188: 295-300.

Taylor, J.E., and R.D. David. 2007. Artificial infestations of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), used to estimate an economic injury level in tomato. **Crop Protect**. 7: 190-197.

Venkates, W., K. Reddy., V. Saidi., and B. Das. 2004. 4'-O-demethyl retrochinensin a minor new lignan from *Jatropha gossypifolia*. **Hetero Chem**. 14: 169-170.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Visetson, S., and M. Milne. 2001. **Effects of root extract from derris *(Derris elliptica* Benth) on mortality and detoxification enzyme levels in the diamondback moth larvae (*Plutella xylostella* Linn.)**. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 35: 157-163.

Vontas, J.G., G.J. Small and J. Hemingway. 200. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroidresistance in Nilaparvata lugens. Biochem. 8: 65-72.

Wang, W., C. Jianchu Mo, Jia'an, Peijun Zhuang and T. Zhenhua. 2006. Selection and characterization of spinosad resistance in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pestic. Biochem. Physiol**. 8: 180-187.

Wie, L., M.Z. Bing-yu and L. Feng. 2008. Effects of Tebufenozide on the Biological Characteristics of Beet Armyworm (*Spodoptera exigua* Hubner) and Its Resistance Selection. **J. Agricultural Sci**. 7: 1222-1227.

Wu, H., L. Meng and L. Baoping. 2008. Effects of feeding frequency and sugar concentrations on lifetime reproductive success of *Meteorus pulchricornis* (Hymenoptera: Braconidae). **Biol. Control.** 45: 353-359.

Yahui, L. and L. Baoping. 2006. Developmental interactions between *Spodoptera exigua* (Noctuidae: Lepidoptera) and its uniparental endoparasitoid, *Meteorus pulchricornis* (Braconidae: Hymenoptera). **Biol. Control**. 38: 264-269.

Zhang, J.G and M.W. Fariss. 2001. Thenoyltrifluoroacetone, a potent inhibitor of carboxyl esterase activity. **Biochem. Phramacol**. 63: 751-754.

Zhu, K.Y. and W.A. Brindley. 1990. Acethyl-Cholinesterase and its Reduced Sensitivity to Inhibition by Paraoxon in Organophosphate-Resistant Lygus *Hesperus* Knight (Hemiptera : Miridae). **Pestic. Biochem. Physiol**. 36: 22-28

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

1. ขั้นตอนการวิเคราะห์เอนไซม์ทำลายพิษ

2.1 การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์

2.1.1 Buffer : Potassium phosphate buffer(KH_2PO_4)

Potassium dihydrogenthiophosphate(M.W = 136.09)

0.1 M = M.W/L

= 13.609 กรัม/น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

วัดค่า pH โดยใช้ pH meter

2.1.2 1mM EDTA

0.45224 กรัม/น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

2.1.3 1L 0.1 M Phosphate buffer + 1 มิลลิลิตร 1mM EDTA

2.1.4 PVPP : 50% w/w

2.2 การเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์

2.2.1 บดแมลงรวมกับ 2,000 µl 0.1 M PPB + EDTA

1,000 µl 10 mM GSH

50% w/w PVPP

นำไป Centrifuged ที่ 18,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.3 pNPA assay เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปฏิกิริยาของเอนไซม์ carboxyl esterase โดยวัดค่าดูดกลืนแสงจาก spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 400 nm เป็นเวลา 3 นาที

Stock solution

- 1ml 1mM EDTA + 0.1 Phosphate buffer
- 10 mM Glutathione reduced form (0.15 g GSH / 50 ml Buffer)
- Substrate : 0.12 M paranitrophenylacetate (pNPA) (0.1 g / 5 ml ethanol)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขั้นตอนในการวิเคราะห์

สารละลาย	Blank	Sample
0.1 M Phosphate buffer	2,900 µl	2,900 µl
Substrate	50 µl	50 µl
0.1 M Phosphate buffer + EDTA (Homogehized buffer)	50 µl	-
ส่วนใสของเอนไซม์(Supernatant)		50 µl

Paranitrophenol product = OD/min × 58.8235 × total volume assay (ml)

2.4 CDNB assay เพื่อใช้ในการวิเคราะปฏิกิริยาของห์เอนไซม์ Glutathione-*S*-transferase โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงจาก spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 340 nm เป็นเวลา 3 นาที

Stock solution

- 1 ml 1mM EDTA + 0.1 M Phosphate buffer
- 10 mM Glutathione reduced form(0.15 g GSH / 50 ml buffer)

ขั้นตอนในการวิเคราะห์

สารละลาย	Blank	Sample
0.1 M Phosphate buffer	1,150 µl	1,150 µl
0.1 M Phosphate buffer + GSH	20 µl	-
ส่วนใสของเอนไซม์(Supernatant)	-	20 µl
Substrate	10 µl	10 µl

CDNB product = (OD/min × 1.316) / (9.6 × 1000 n mole)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	ณัฐชยา คำรังษี
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 6 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2528
สถานที่เกิด	จังหวัดน่าน
ประวัติการศึกษา	วท.บ (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม) มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	- เสนอผลงาน (Oral presentation)ในงาน The 2nd International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region 2-3 October 2008 Hanoi, Vietnam - ผู้ช่วยสอนภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภาคเรียนที่ 2 / 2551 - ได้รับให้นำเสนอในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ (Poster presentation) ในงาน 62 nd International Conference of Crop protection 18 May 2010, Ghent ประเทศเบลเยี่ยม
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	- ทุนโครงการส่งเสริมการวิจัยร่วมแบบทวิภาคี (Bilateral Research Cooperation ; BRC) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์เพื่อไปทำวิจัย ณ University of Tsukuba, Japan - ทุนเพื่อเข้าร่วมเสนอผลงาน (Oral presentation) ในงานสัมนาBotanical insecticide 1-3 February 2008, University of Tsukuba, Japan

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์