ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา)

ปริญญา

สัตววิทยา | สัตววิทยา

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง ผลของสารสกัดจากเหง้าข่า (*Alpinia galanga* (Linn.) Sw.) ต่อการตายและปฏิกิริยาเอนไซม์ทำลายพิษในแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis* (Hendel))

Effects of *Alpinia galanga* (Linn.) Sw. Rhizome Extract on Mortality and Detoxification Enzyme Activity of Oriental Fruit Fly (*Bactrocera dorsalis* (Hendel))

นามผู้วิจัย นางสาวนิสากร สุขหิรัญ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(อาจารย์วสกร บัลลังก์โพธิ์, ปร.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์วันชัย ปลื้มภาณุภัทร, ปร.ด.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์สมภพ นวีภาพ, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของสารสกัดจากเหง้าข่า (*Alpinia galanga* (Linn.) Sw.) ต่อการตายและปฏิกิริยาเอนไซม์ทำลายพิษในแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis* (Hendel))

Effects of *Alpinia galanga* (Linn.) Sw. Rhizome Extract on Mortality and Detoxification Enzyme Activity of Oriental Fruit Fly (*Bactrocera dorsalis* (Hendel))

โดย

นางสาวนิสากร สุขหิรัญ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา)
พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นิสากร สุขหิรัญ 2553: ผลของสารสกัดจากเหง้าข่า (*Alpinia galanga* (Linn.) Sw.) ต่อการตายและปฏิกิริยาเอนไซม์ทำลายพิษในแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis* (Hendel)) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา) สาขาสัตววิทยา ภาควิชาสัตววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์วสกร บัลลังก์โพธิ์, ปร.ด. 87 หน้า

แมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis* (Hendel)) เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญซึ่งโดยทั่วไปมักใช้สารเคมีฆ่าแมลงในการควบคุม การวิจัยครั้งนี้ต้องการศึกษาผลของสารสกัดจากเหง้าข่าต่อแมลงวันผลไม้และปฏิกิริยาเอนไซม์ทำลายพิษ ใช้สารสกัดจากเหง้าข่าซึ่งสกัดโดยวิธี soxhlet extraction และใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกันได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเทต และเอทานอล 95% ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาทดสอบกับตัวเต็มวัยโดยวิธีการพ่นถูกตัวแบบฝอยหมอก ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดด้วยเฮกเซน มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงวันผลไม้สูงสุด โดยมีค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง ของสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเทต และเอทานอล 95% มีค่าเท่ากับ 4,866.06 ± 184.52, 24,156.66 ± 880.33, 14,778.32 ± 641.27 และ 6,337.54 ± 145.42 ppm เมื่อนำส่วนสารสกัดเฮกเซนมาแยกสารออกฤทธิ์หลักโดยวิธีควิกคอลัมน์โครมาโทกราฟี คอลัมน์โครมาโทกราฟี และพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ทั้งหมดที่แยกได้โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีจาก ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR พบว่ามีสาร*E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether และสาร *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol โดยสาร *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol เป็นสารที่มีค่าความเป็นพิษสูงสุด คือมีค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 3,654.52 ± 168.11 ppm และจากการตรวจสอบเอนไซม์ทำลายพิษในรูป *in vitro* ในแมลงวันผลไม้ที่รอดชีวิตจากการที่ได้รับสารสกัดจากข่าที่สกัดด้วยเฮกเซน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ 24 ชั่วโมง พบว่าแมลงวันผลไม้ที่รอดชีวิตจากการได้รับสารสกัดจากข่าด้วยเฮกเซน พบการถูกยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส 3.23 เท่า ส่วนปฏิกิริยาเอนไซม์กลูตาไธโอนเอส-ทรานสเฟอเรส พบว่าลดลง 1.14 เท่า แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางด้านปฏิกิริยากับชุดควบคุมที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Nisakorn Sukhirun 2010: Effects of *Alpinia galanga* (Linn.) Sw. Rhizome Extract on Mortality and Detoxification Enzyme Activity of Oriental Fruit Fly (*Bactrocera dorsalis* (Hendel)). Master of Science (Zoology), Major Field: Zoology, Department of Zoology. Thesis Advisor: Ms. Vasakorn Bullungpoti, Ph.D. 87 pages.

The oriental fruit fly, *Bactorcera dorsalis* (Hendel) is one of most economically damaging pests, and generally is controlled by insecticides. This research was done to evaluate the effect of rhizomes of *Alpinia galanga* extract on the oriental fruit fly and detoxification enzyme activity. The rhizome of galanga was extracted by Soxhlet's apparatus using hexane, dichloromethane, ethylacetate and 95% ethanol as separate solvent system. Various concentrations of all crude extracts were tested with adult *B. dorsalis* using topical spray application. The results showed that the hexane extract displayed the highest efficacy against adult *Bactrocera dorsalis* . LC_{50} values at 24 hours were 4,866.06 ± 184.52, 24,156.66 ± 880.33, 14,778.32± 641.27 and 6,337.54 ± 145.42 ppm for hexane, dichloromethane, ethylacetate and 95% ethanol extract, respectively. The hexane crude extract was purified by quick column chromatography, column chromatography and preparative thin layer chromatography to give two active pure compounds. Structural elucidation of the isolated compounds on the basis of spectral analyses, including ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR showed 2 compounds as *E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether and *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol. The active ingredient compound, *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol exhibited the highest efficacy as shown by its LC_{50} values at 24 hours as 3,654.52 ± 168.11 ppm. The *in vitro* detoxification enzyme activities of carboxylesterase and glutathione S-transferase from hexane extract treated adult *Bactrocera dorsalis* after treated with hexane extract for 24 hours exposure showed that carboxylesterase Activity was inhibited 1.14 fold activity showed no difference with control although it was at 95% significant.

/ /

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลงได้โดยความกรุณาและช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน ขอขอบพระคุณอ.ดร.วสกร บัลลังก์โพธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และอ.ดร. วันชัย ปลื้มภาณุภัทร ที่กรุณาให้คำแนะนำต่างๆในการทดลอง ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์เป็นที่เรียบร้อย

ขอขอบคุณ คุณปิยรัตน์ นาควิโรจน์ ที่ให้ความอนุเคราะห์หนอนแมลงวันผลไม้เพื่อนำมาเลี้ยง และศึกษาต่อไป และให้ความช่วยเหลือ และเป็นที่ปรึกษา ขอขอบคุณ คุณแดนชัย ปานคง ที่เป็นผู้ช่วยประดิษฐ์อุปกรณ์ต่างๆในการเลี้ยงแมลงวันผลไม้ ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆทุกท่านของภาควิชาสัตววิทยา และที่คอยเป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ผู้ให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาด้วยดีตลอดมา

นิสากร สุขหิรัญ

กุมภาพันธ์ 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	21
อุปกรณ์	21
วิธีการ	24
ผลและวิจารณ์	37
ผล	37
วิจารณ์	62
สรุปและข้อเสนอแนะ	68
สรุป	68
ข้อเสนอแนะ	69
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	70
ภาคผนวก	78
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเทียมสำหรับเพาะเลี้ยงแมลงวันผลไม้	79
ภาคผนวก ข การตรวจวัดเอนไซม์	81
ภาคผนวก ค การวัดปริมาณโปรตีน	85
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	87

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน	37
2	ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ หลังจากได้รับสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ที่ความเข้มข้นต่างกันในเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง	39
3	ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ หลังจากได้รับสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้นต่างกันในเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง	41
4	ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ หลังจากได้รับสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลาย เอทิลแอซิเทตที่ความเข้มข้นต่างกันในเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง	43
5	ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ หลังจากได้รับสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลาย เอทานอล 95%ที่ความเข้มข้นต่างกันในเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง	45
6	เปรียบเทียบค่า LC_{50} ของแมลงวันผลไม้หลังจากได้รับสารสกัดหยาบ จากเหง้าข่าทีสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีลำดับขั้วแตกต่างกันในเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง	47
7	การแยกสารออกฤทธิ์สารสกัดจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน	49
8	ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ หลังจากได้รับสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าแต่ละ fraction ที่ระดับ LC_{50} (4,866.06 ± 184.52 ppm) ในเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง	49
9	ข้อมูลสเปกตรัมของ ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของ *E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether	51

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
10	ข้อมูลสเปกตรัมของ ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของ *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol	53
11	ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้หลังจากได้รับสาร *E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether ที่ความเข้มข้นต่างกันในเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง	55
12	ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้หลังจากได้รับสาร *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol ที่ความเข้มข้นต่างกันในเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง	56
13	เปรียบเทียบค่า LC_{50} ของแมลงวันผลไม้หลังจากได้รับสารสกัดบริสุทธิ์บางส่วนจากเหง้าข่าในเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง	58
14	ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับเอนไซม์เอนไซม์ทำลายพิษคาร์บอกซิลเอสเทอเรส ของแมลงวันผลไม้ที่รอดชีวิตหลังการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยทำละลายเฮกเซนในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง	59
15	ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตารฐานของระดับเอนไซม์ทำลายพิษกลูตาไธโอนเอส-ทรานสเฟอเรส ของแมลงวันผลไม้ที่รอดชีวิตหลังการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง	60
16	ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตารฐานของปริมาณโปรตีนของแมลงวันผลไม้ที่รอดชีวิตหลังการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง	61

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะทั่วไปของข่า (*Alpinia galanga* (Linn) Sw.)	5
2	โครงสร้างทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่เป็นองค์ประกอบหลักในเหง้าข่า	6
3	แสดงแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis* (Hendel)) ตัวเต็มวัยเพศเมีย	10
4	เปรียบเทียบแมลงวันผลไม้เพศผู้และเพศเมีย (*Bactrocera dorsalis* (Hendel))	10
5	วงจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis* (Hendel))	12
6	ลักษณะการทำลายของแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis* (Hendel))	13
7	การเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase)	19
8	กล่องเลี้ยงเลี้ยงตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis* (Hendel)) ในอาหารเทียม	24
9	กรงเลี้ยงแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis* (Hendel)) ในกรงมุ้งลวด	25
10	เหง้าข่าตากแห้ง (*Alpinia galanga* (Linn.) Sw.)	26
11	เหง้าข่าบดละเอียด (*Alpinia galanga* (Linn.) Sw.)	26
12	การสกัดสารด้วยเครื่อง Soxhlet apparatus	27
13	เครื่อง Rotary vacuum evaporator (BUCHI R-215)	27
14	ขั้นตอนการสกัดสารจากเหง้าข่า (*Alpinia galanga* (Linn.) Sw.)	28
15	การทดสอบแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis* (Hendel)) ด้วยสารสกัดจากข่า	29
16	การแยกสารสกัดด้วยวิธีควิกคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Quick Column Chromatography)	30
17	การแยกสกัดสารด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)	31
18	ขั้นตอนการแยกสารด้วยวิธี Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC)	32
19	อุปกรณ์สำหรับแยกองค์ประกอบสารด้วยวิธี Preparative Thin Layer chromatography	33
20	เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerater centrifuge) ของ Hettich Universal 16R	34

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	การตรวจวัดระดับเอนไซม์ทำลายพิษด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)	35
22	สารสกัดหยาบจากเหง้าข่าด้วยตัวทำละลายที่มีลำดับขั้วต่างกัน	38
23	ผลความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนที่ความเข้มข้นต่างกันต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 24 ชั่วโมง	40
24	ผลความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนที่ความเข้มข้นต่างกันต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 24 ชั่วโมง	40
25	ผลความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้นต่างกันต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 24 ชั่วโมง	42
26	ผลความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้นต่างกันต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 48 ชั่วโมง	42
27	ผลความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลแอซิเทตที่ความเข้มข้นต่างกันต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 24 ชั่วโมง	44
28	ผลความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลแอซิเทตที่ความเข้มข้นต่างกันต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 48 ชั่วโมง	44
29	ผลความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้นต่างกันต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 24 ชั่วโมง	46

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
30	ผลความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้นต่างกันต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 48 ชั่วโมง	46
31	การแยกสารออกฤทธิ์สารสกัดจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน	48
32	การแยกสารสกัดจากเหง้าข่า fraction 1 (fraction ที่ออกฤทธิ์สูงสุด)	50
33	โครงสร้างทางเคมีของ *E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether	51
34	สเปกตรัมของ ^{1}H-NMR ของ *E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether	52
35	สเปกตรัมของ ^{13}C-NMR ของ *E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether	52
36	โครงสร้างทางเคมีของ *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol	53
37	สเปกตรัมของ ^{1}H-NMR ของ *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol	54
38	สเปกตรัมของ ^{13}C-NMR ของ *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol	54
39	ผลความเป็นพิษของสาร *E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether ที่ความเข้มข้นต่างกันต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 24 ชั่วโมง	55
40	ผลความเป็นพิษของสาร *E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether ที่ความเข้มข้นต่างกันต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 48 ชั่วโมง	56
41	ผลความเป็นพิษของสาร *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol ที่ความเข้มข้นต่างกันต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 24 ชั่วโมง	56
42	ผลความเป็นพิษของสาร *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol ที่ความเข้มข้นต่างกันต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 48 ชั่วโมง	57

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

Ac	=	acetyl
CDNB	=	1-chloro-2, 4-dinitrobenzene
cm	=	centimeter
δ	=	chemical shift
CRD	=	complete randomized design
J	=	coupling constant
d	=	doublet
dd	=	doublet of doublet
dt	=	doublet of tripet
EDTA	=	ethylsene randomized design
GST	=	glutathione S-transferase
Hz	=	hertz
LC_{50}	=	median lethal concentration
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
M	=	molar
nm	=	nanometre
n mole	=	nano mole
NMR	=	Nuclear Magnetic Resonance
*p*NPA	=	*para*-nitrophenyl acetate
ppm	=	parts per million
PVPP	=	polyvinyl poly pyrrolidone
PTLC	=	Preparative Thin Layer Chromatography
q	=	quatet
s	=	singlet
TLC	=	Thin Layer Chromatography

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลของสารสกัดจากเหง้าข่า (*Alpinia galanga* (Linn.) Sw.) ต่อการตายและปฏิกิริยาเอนไซม์ทำลายพิษในแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis* (Hendel))

Effects of *Alpinia galanga* (Linn.) Sw. Rhizome Extract on Mortality and Detoxification Enzyme Activity of Oriental Fruit Fly (*Bactrocera dorsalis* (Hendel))

คำนำ

แมลงวันผลไม้ (oriental fruit fly) (*Bactrocera dorsalis* (Hendel)) เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของไทยซึ่งทำความเสียหายให้กับผลไม้ที่เป็นผลผลิตทางการเกษตรกรหลายชนิด เช่น ชมพู่ ฝรั่ง น้อยหน่า พุทรา มะม่วง และกระท้อน เป็นต้น บางคนเรียกแมลงวันผลไม้ว่าแมลงวันทองเนื่องจากบริเวณหลังของลำตัวบางส่วนมีสีทอง แมลงวันผลไม้จะวางไข่ โดยจะเจาะเข้าทำลายทำให้ผลไม้เน่าเสียและร่วงหล่นได้รับความเสียหายทำให้มีการหาวิธีในการป้องกันและกำจัดแมลงวันผลไม้ที่หลากหลายกันไป การป้องกันและกำจัดแมลงวันผลไม้โดยการใช้ยาฆ่าแมลงอย่างเดียวในการป้องกัน และกำจัดแมลงวันผลไม้แม้จะได้ผลรวดเร็วแต่ก่อให้เกิดพิษตกค้างยาฆ่าแมลงในผลไม้ สารเคมีเหล่านั้นอยู่ในกลุ่มพวก ออกาโนคลอรีน เช่น DDT หรือสารสังเคราะห์อื่นๆ ซึ่งสารเหล่านี้นอกจากการเกิดตกค้างในธรรมชาติแล้วหากใช้เวลานานอาจก่อให้เกิดการดื้อยาของแมลงได้นอกจากนี้ยังมีค่าใช้จ่ายสูงเนื่องจากจำเป็นต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศจนในปัจจุบันประชาชนได้ตระหนักถึงอันตรายที่เกิดจากการใช้สารเคมีในการฆ่าแมลงซึ่งก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม เกิดผลเสียหายต่อสุขภาพอนามัย เกิดพิษตกค้างในผลผลิตทางการเกษตร

ปัจจุบันได้มีการนำสารสกัดจากพืช (botanical pesticides) มาควบคุมแมลงศัตรูพืชมากขึ้นซึ่งเป็นสารกลุ่มหนึ่งที่ช่วยลดอัตราการสร้างความต้านทานของแมลงได้เนื่องจากสารสกัดจากพืชมีองค์ประกอบมากมายโดยที่แมลงจะสร้างความต้านทานต่อองค์ประกอบดังกล่าว ใช้เวลาเวลานานมาก (Visetson, 2002) ซึ่งวิธีดังกล่าวยังไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม และระบบนิเวศให้เสียไปด้วย ประเทศไทยตั้งอยู่ในพื้นที่ที่มีความหลากหลายของพืชสมุนไพรมากที่สุดของโลกแห่งหนึ่ง สารสกัดจากธรรมชาติจากพืชหลายชนิดในประเทศไทย มีผลต่อการยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันในกลุ่มของ เอนไซม์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทำลายพิษ (detoxification enzyme) เช่น เอนไซม์มิกฟังก์ชันออกซิเดส (mixed function oxidase), คาร์บอกซิลเอสเทอเรส (carboxylesterase) และกลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส (glutathione S-transferase) ในแมลงหลายชนิด เช่น หนอนใยผัก (*Plutella xylostella* Linn.) หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน (*Heliothis amigera* Hubn.) ด้วงงวงข้าว (*Sitophilus oryzae* Linn.) สารธรรมชาติเหล่านั้นเป็นกลุ่มสาร allelochemicals เช่น citronellal จากตะไคร้หอม (เรวดี, 2541) สาร capsaicin จากพริกขี้หนู (Bullangpoti *et al*., 2002) สารโรติโนน (rotenone) จากรากหางไหล (Visetson and Mile, 2001) สาร curcumin จากข่า (สุรพล และคณะ,2544) สารอะซาดิแรคติน (azadirachtin) จากสะเดา (Visetson, 2001) สาร selinnadiene จากแห้วหมู (Visetson *et al*. 2001, 2002) สาร sitosterol จากพญายอ (กิติมา, 2545) สาร sasamoline จากเมล็ดงา (Visetson *et al*. 2003) ผลของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้มีผลต่อความเป็นพิษ พัฒนาการและอัตราการตายในแมลงบางชนิด

ในการวิจัยครั้งนี้ต้องการศึกษาและพัฒนาสารสกัดจากข่า (*Alpinia galanga* (Linn.) Sw.) เพื่อใช้ในการควบคุมแมลงวันผลไม้ซึ่งยังไม่มีรายงานวิจัยมาก่อน โดยทดสอบด้วยสารสกัดทั้งรูปแบบสารสกัดหยาบและสารสกัดบริสุทธิ์ต่อการตายของตัวเต็มวัยรวมทั้งศึกษาระดับเอนไซม์ทำลายพิษหลังจากแมลงได้รับสารสกัดจากพืช เช่น เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส และกลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส ผลงานวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาสารสกัดจากข่าเพื่อมาใช้แทนสารเคมีในการกำจัดแมลงวันผลไม้ต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากเหง้าข่าที่มีต่อแมลงวันผลไม้

2. ศึกษาหาสารออกฤทธิ์สำคัญของสารสกัดจากเหง้าข่าที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงวันผลไม้

3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส (carboxylesterase) และกลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส (glutathione S-transferase) ของแมลงวันผลไม้หลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าข่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

ข่า

1. การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน

Kingdom Plantae

Division Anthophyta

Family Zingiberaceae

Genus *Alpinia*

Species *Alpinia galanga*

ที่มา: เต็ม (2544)

2. ลักษณะทั่วไป

ข่าเป็นพืชล้มลุก เหง้ามีข้อปล้องเห็นได้ชัด เหง้าสีน้ำตาลอมแสด ใบเดี่ยว เรียงสลับกัน แผ่นใบรูปหอกปลายแหลม ขอบใบเรียบ โคนใบแหลมเกลี้ยง ก้านใบมีขนเล็กน้อย ดอกออกเป็นช่อก้านช่อเกลี้ยง แกนกลางช่อมีขน ดอกขนาดเล็ก ใบประดับรูปไข่ กลีบเลี้ยงสีเขียวอมขาว มีขนโคนเชื่อมติดต่อกัน ปลายแยกเป็นหยักมนๆ กลีบดอกมีโคนเชื่อมติดกันเป็นหลอดสั้นๆ ปลายแยกเป็น 3 กลีบมีกลีบบนหนึ่งกลีบ กลีบล่างสองกลีบที่โคนกลีบดอกชั้นในมีเกสรเทียมเล็กๆ 2 อัน เกสรผู้ 1 อัน รูปโค้งก้านเกสรแบนอับเรณูยาวประมาณ 6-7 มม. รังไข่ 1 อัน รูปเกือบกลมภายในแบ่งเป็น 3 ช่อง ผลรูปกลมหรือรี สีแดงอมส้ม แก่จัดสีดำ ภายในมี 2-3 เมล็ด (ภาพที่ 1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ก. ข.

ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของข่า (*Alpinia galang*a (Linn) Sw.)

ก. ลักษณะของต้นข่า

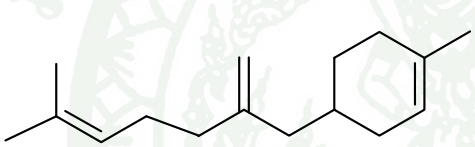
ข. เหง้าข่า

3. สารที่พบ การใช้ประโยชน์จากความเป็นพิษ และทดสอบความเป็นพิษ

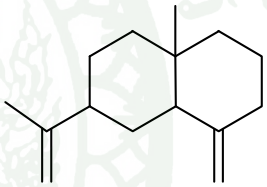
เหง้าข่ามีน้ำมันระเหยง่ายที่มีสาร aromatic components ทำให้มีกลิ่นหอมประกอบด้วย phenolic compounds ข่าที่ปลูกในญี่ปุ่นพบสารพวก monoterpenoids และ sesquiterpenoids เช่น geranyl acetate, delta-s-carene, alpha-terpinene, alpha-terpineole, 1,8-cineole, neral, geranial และ geraniole (Sakamura and Hayashi, 1978) จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากสารสกัดข่าที่เตรียมด้วยตัวทำละลายเฮกเซนด้วย GC-MS และ GC องค์ประกอบที่พบมาก ได้แก่ 1,8 cineole, β-caryophyllene, β-bisabolene, β-selinene, α-humulene และ 1,4-terpineole ตามลำดับ (สังวาล และคณะ, ม.ป.ป.) Oonmetta-aree (2005) วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดข่าด้วยเมทานอล และเอทานอล ด้วยวิธี thin layer chromatography GC-MS และ NMR พบสารประกอบได้แก่ D, L-1'-acetoxychavicol acetate, *p*-coumaryl diacetate และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

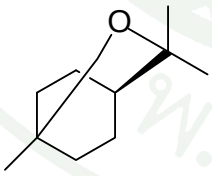
1'-acetoxyeugenol acetate น้ำมันระเหยง่ายจากข่าใช้เป็นสารป้องกัน และกำจัดแมลงศัตรูพืชในโรงเก็บ เช่น มอดแป้ง ด้วงงวงข้าว และด้วงถั่วเขียว (สังวาล และคณะ, ม.ป.ป.) อัศวิน (2538) นำสารสกัดข่าอัตราความเข้มข้น (ข่า:น้ำ) 1:5, 1:10 และ 1:15 ภายใต้สภาวะห้องทดลอง หลังพ่นแล้ว 24 ชั่วโมงพบว่าหนอนแมลงวัน (*Musca domestica*) ที่ถูกพ่นด้วยสารสกัดข่าอัตรา 1:5 และ 1:10 ตายหมด 100% อัตรา 1:15 ตาย20.5% ในทางปฏิบัติแนะนำให้ใช้สารสกัดข่าในอัตรา 1:10 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่มีประสิทธิภาพสูงสุด เมื่อฉีดสารสกัด 50% เอทานอลจากเหง้าข่าเข้าช่องท้องหนูถีบจักร พบว่าขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) เท่ากับ 1 ก./กก. (Bhakuni *et al*., 1969) และ 188 มก./กก. (Dhawan *et al*., 1977) และเมื่อให้สารสกัด 50% เอทานอลเข้าทางปากหรือใต้ผิวหนังหนูถีบจักรพบว่าไม่เป็นพิษ (Qureshi *et al*., 1992) จากการทดสอบพิษเฉียบพลันโดยป้อนสารสกัด 95% เอทานอลจากเหง้าข่าให้หนูถีบจักรในน้ำดื่มในขนาด 100 มก./กก. ติดต่อกัน 3 เดือน ทำให้หนูถีบจักรตาย 15% (Mokkhasmit *et al*., 1971)



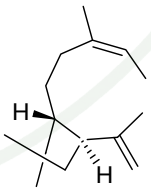
β-bisabolene



β-selinene



1,8-cineole

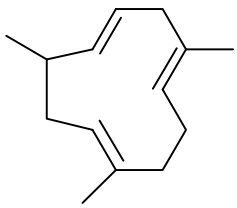


β-caryophyllene

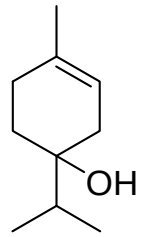
ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของสารองค์ประกอบในเหง้าข่า

ที่มา: สังวาล และคณะ(2546) และ Oonmetta-aree (2005)

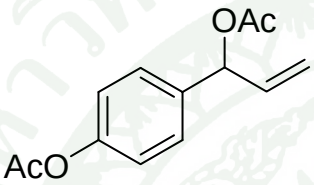
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



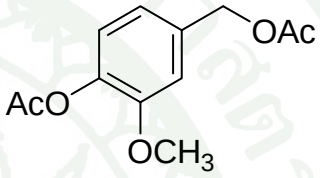
α-humulene



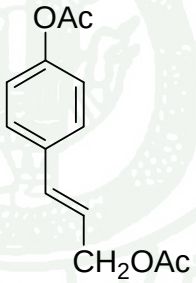
1,4-terpineole



D, L-1'-acetoxychavicol acetate



1'-acetoxyeugenol acetate



p-coumaryl diacetate

ภาพที่ 2 (ต่อ)

ที่มา: สังวาล และคณะ(2546) และ Oonmetta-aree (2005)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การแยกองค์ประกอบของสารสกัดข่า

การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดข่านั้นมีหลายวิธี ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบที่จะศึกษาว่าเป็นสารกลุ่มใด สังวาล และคณะ (2546) สกัดน้ำมันระเหยง่ายด้วยวิธี hydro-distillation และแยกองค์ประกอบทางเคมีสำคัญด้วย GC และ GC-MS เตรียมน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากพืชตัวอย่างในเฮกเซนที่ความเข้มข้น 10 ppm สำหรับ GC-MS และ 200 ppm สำหรับ GC

Oonmetta-aree (2005) สกัดสารจากข่า (*Alpinia galang*a (Linn) Sw.) ด้วยวิธีแช่ในเมทานอล และเอทานอล ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24ชั่วโมง และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดข่าด้วยเมทานอล และเอทานอลดังกล่าว ด้วยวิธี thin layer chromatography GC-MS และ NMR

Samart (2007) สกัดสารจากข่าเล็ก *(Alpinia officinarum* Hance) ด้วยวิธี soxhlet extraction ที่มีเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล เป็นตัวทำละลาย และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดข่าด้วยคลอโรฟอร์ม และเมทานอล และเอทานอล ด้วยวิธี thin layer chromatography ซึ่งมีวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นสารละลายผสมคลอโรฟอร์ม: เมทานอล (9:1 และ 8:2) สำหรับการ developed แผ่น TLC เพื่อหาสาร galangin แล้วนำสารสกัดข่าด้วยคลอโรฟอร์มมาแยกองค์ประกอบทางเคมีต่อด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล (Silica gel 60 G cat No. 7734) เป็นตัวดูดซับแล้วชะด้วยตัวทำละลายเฮกเซน, เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม (1:1), คลอโรฟอร์ม, คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (1:1) และ เมทานอล ตามลำดับ โดยเก็บสารแต่ละ Fraction แล้วนำมาตรวจสอบด้วย thin layer chromatography ใช้สารละลายผสมคลอโรฟอร์ม:เมทานอล (9:1) ในการ developed แผ่น TLC หลังจากนั้นนำ Fraction ที่มีสารคล้ายกันมารวมกันแล้วนำไปแยกต่อด้วยวิธี Preparative Thin Layer Chromatography เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ และพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ทั้งหมดที่แยกได้โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีจาก UV, IR, MS, ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ร่วมกับการเปรียบเทียบค่าที่ได้มีรายงานไว้แล้ว

Kaur *et al*. (2010) สกัดสารจากเหง้าข่า (*Alpinia galanga* (Linn.)) ด้วยวิธี soxhlet extraction และนำส่วนสกัดเฮกเซนมาแยกด้วยวิธี vacuum liquid chromatography (VLC) และ HPLC สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 4 ชนิด คือ *p*-coumaryl diacetate, 1'-acetoxychavicol acetate, 1'-acetoxyeugenol acetate และ *trans-p*-acetoxycinnamyl alcohol

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แมลงวันผลไม้

1. การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน

Kingdom Animalia

Phylum Arthropoda

Class Insecta

Order Diptera

Family Tephritidae

Genus *Bactrocera*

Species *Bactrocera dorsalis*

2. รูปร่างลักษณะและชีวประวัติ

ขนาดลำตัวยาว 4.5-6.5 มม. ปีกยาว 5.0- 6.4 มม. หัว มีสีเหลืองอมน้ำตาล จุดดำใต้หนวด 2 จุดค่อนข้างใหญ่ มีขน inferior fronto-orbital 2 คู่ และขน superior fronto-orbital 1 คู่ หนวดปล้องที่ 1 สีเหลืองหนวดปล้องที่ 2 และ 3 สีน้ำตาล ปลาย arista สีน้ำตาลดำ อก (scutum) มีสีดำมีขนสั้นๆสีเหลืองอกปล้องแรกไม่มีแถบ mesonotum มีแถบข้างอกทั้งสองสีเหลือง scutellum สีเหลือง มีขน 2 เส้น ขาสีเหลืองน้ำตาล fermur และ tibia สีน้ำตาล ปีก มีปีกใส ขอบปีกด้านบนมีสีน้ำตาลเข้ม ปลายปีกมีสีเข้มขอบบางไม่ขยายออก และท้องปล้องแรกสีน้ำตาล ปล้องที่สองด้านข้างสีน้ำตาลเข้ม ปล้องที่สาม มีสีดำคาดตามขวางและตรงกลางมีแถบคาดตามขวางสีดำ อวัยวะเพศผู้ปลายอวัยวะเพศผู้ มีลักษณะขรุขระ และมีหนาม 2 เส้น อวัยวะเพศเมีย ปลายอวัยวะวางไข่ มีปลายแหลมข้างละ 4 เส้น (ภาพที่ 3) ความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียที่เห็นได้ชัดเจน คือ เพศเมียจะมีอวัยวะวางไข่ (ovipositor) แหลมยื่นออกมาส่วนเพศผู้จะไม่มี (ภาพที่ 4) (ฉันทนี, 2544)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 3 แสดงแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis* (Hendel)) ตัวเต็มวัยเพศเมีย

แมลงวันผลไม้เป็นแมลงขนาดเล็ก หลังการผสมพันธุ์เพศเมียจะวางไข่ โดยใช้อวัยวะวางไข่แทงลงไปใต้ผิวผลไม้ ไข่มีลักษณะ ยาวรี ระยะไข่ 2-4 วัน เมื่อฟักออกจากไข่ใหม่ๆ ตัวหนอนมีสีขาวใส เมื่อโตเต็มที่มีขนาด 8.0-10.0 มิลลิเมตร ระยะหนอน 7-8 วัน เมื่อเข้าดักแด้เริ่มแรก มีสีขาวนวลหรือเหลืองอ่อน และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ระยะดักแด้ 7-9 วัน แล้วจึงออกเป็นตัวเต็มวัยเมื่อตัวเต็มวัยอายุ 12-14 วัน จะเริ่มผสมพันธุ์และวางไข่ เพศเมียมีการผสมพันธุ์กับเพศผู้หลายครั้ง สามารถวาง ไข่ได้ประมาณ 1,300 ฟอง วงจรชีวิตประมาณ 21-28 วัน

ก.

ข.

ภาพที่ 4 เปรียบเทียบแมลงวันผลไม้เพศผู้และเพศเมีย (*Bactrocera dorsalis* ((Hendel))

ก. แมลงวันผลไม้เพศผู้ (male)

ข. แมลงวันผลไม้เพศเมีย (female)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. วงจรชีวิต

แมลงวันผลไม้มีวงจรชีวิตแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis) แบ่งออกเป็น 4 ระยะ (ภาพที่ 5) คือ ไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย เมลงวันผลไม้มีวงจรชีวิตยาวประมาณ 1 เดือน โดยวงจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ มีดังนี้

ระยะไข่: ไข่มีสีขาวขุ่น ผิวมันสะท้อนแสง รูปร่างเหมือนกล้วยขนาดกว้างประมาณ 0.2 มิลลิเมตร ยาว 0.4 มิลลิเมตร มันจะวางไข่เป็นกลุ่มในเนื้อของผลไม้ เมื่อเจาะเปลือกผลไม้จะไม่เห็นระยะแรก แต่บริเวณรอบ ๆ นั้นจะเป็นสีเหลือง ใช้เวลาฟักไข่ 1-3 วันและตัวหนอนจะเจาะรูเข้าไปในเนื้อผลไม้ จำนวนตัวหนอนต่อผลไม้ 1 ผลมีตั้งแต่ 1-12 ตัวหรือบางครั้งก็มากกว่า สารฆ่าแมลงประเภทดูดซึมสามารถทำลายไข่ที่อยู่ในผลไม้ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ภาพที่ 5)

ระยะตัวหนอน: ตัวสีขาวใส เมื่อกินอาหารจะมีสีตัวตามสีของอาหารที่กิน หัวแหลม ท้ายป้าน ไม่มีตา ไม่มีขา มีตะขอที่ปาก (mount hook) (ภาพที่ 5) หนอนของแมลงวันผลไม้จะแบ่งเป็น 3 ระยะ ดังนี้

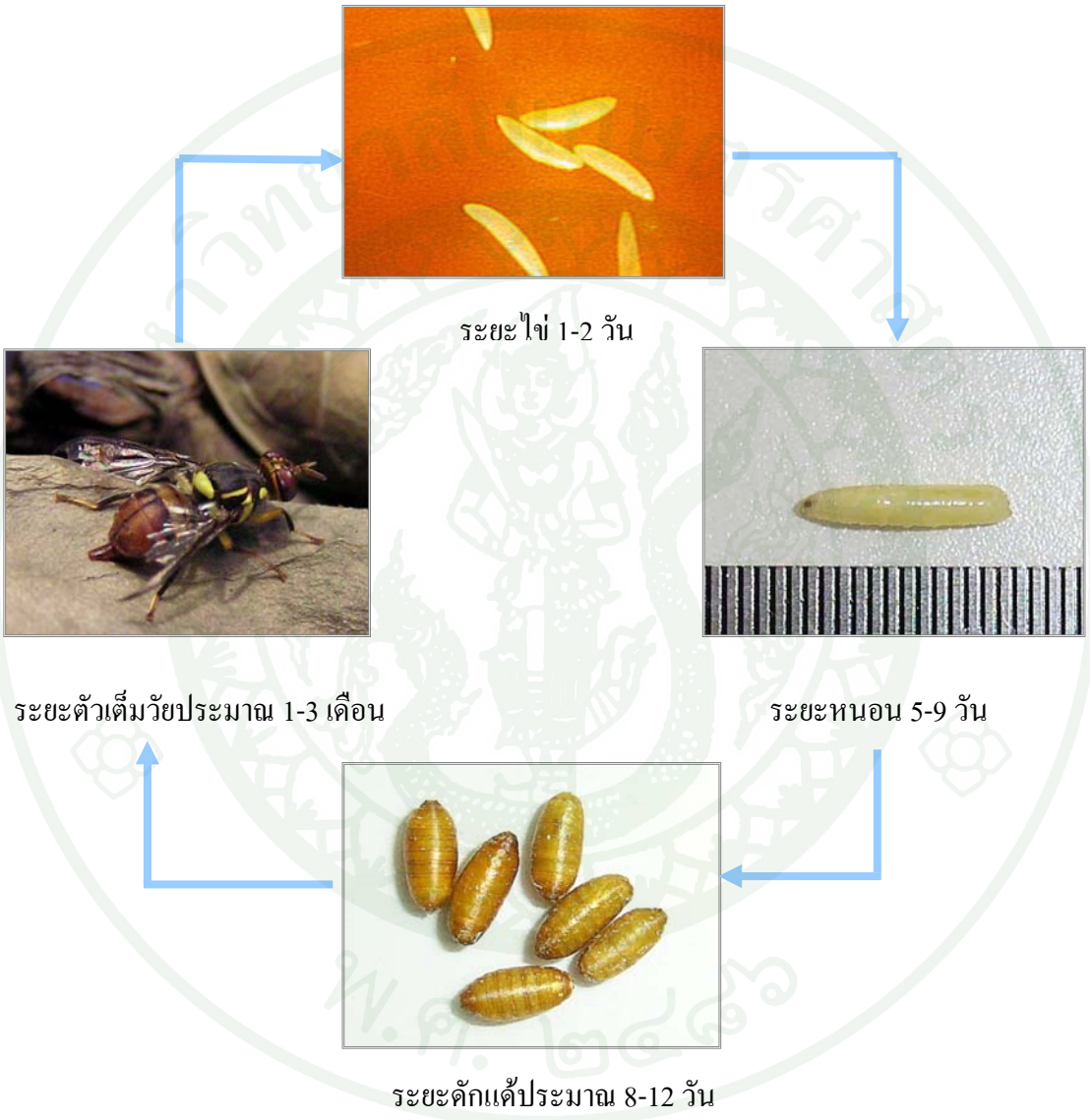
- หนอนวัย 1 ลำตัวมีสีขาวใส ตะขอสีน้ำตาลอ่อน ลำตัวยาว 1.5 มิลลิเมตรอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม
- หนอนวัย 2 อายุ ประมาณ 2.5-3.0 วันลำตัวมีสีขาวขุ่น ตะขอที่ปากมีสีน้ำตาลแก่ขนาดใหญ่กว่าวัยที่ 1 ประมาณ 2.5 เท่า ตัวหนอนยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร
- หนอนวัย 3 อายุ 5-8 วัน ลำตัวมีสีขาวขุ่น ส่วนหลังมีสีขาวใสเล็กน้อย ผิวสีตัวสะท้อนแสง ตะขอมีสีดำ เมื่อโตเต็มที่จะยาว 10 มิลลิเมตร ตามตัวมีขนเล็กๆ สามารถดีดตัวได้ ไกลระยะหนอนอาศัยอยู่ในผลไม้เป็นระยะเดียวที่ทำลายผลผลิตระยะนี้การใช้สารฆ่าแมลง แทบไม่สามารถทำลายระยะตัวหนอนได้เลย

ระยะดักแด้: ดักแด้เกิดในดินมีรูปร่างกลมทรงกระบอกคล้ายถังเบียร์ลำตัวเป็นปล้องๆ มีสีน้ำตาล ใช้เวลาเพียงแค่ 8-12 วัน ระยะดักแด้ กว้าง 2 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 4 มิลลิเมตร (ภาพที่ 5)

ตัวเต็มวัย: ลำตัวมีสีน้ำตาลปนดำ มีแถบสีเหลืองที่ตรงส่วนอก ปีกบางใสสะท้อนแสง (ภาพที่ 5) เมื่อดูภาพรวมแล้วชาวบ้านจึงเรียกว่าแมลงวันทองระยะตัวเต็มวัยเป็นระยะที่ไม่ทำลายพืชผลเพียงแต่กินน้ำหวาน ตัวเมียจะกินอาหารที่เป็นโปรตีน 1 สัปดาห์ เช่น แบคทีเรียที่กำลังเจริญเติบโตในแมลงวันผลไม้ และผิวหน้า ส่วนต่างๆ ของพืชและน้ำตาล เช่น ใน honeydew

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และน้ำหวานดอกไม้ก่อนที่จะวางไข่ หลังจากออกจากดักแด้ประมาณ 11 วัน จึงเริ่มวางไข่ ระยะตัวเต็มวัยเป็นระยะที่เหมาะสมที่เกษตรกรสามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ได้ง่าย หากพ่นสารฆ่าแมลงไปถูกตัวหรือใช้เหยื่อพิษล่อให้แมลงมากิน (มนตรี, 2544)



ภาพที่ 5 วงจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis* (Hendel))

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. ลักษณะการทำลาย

ความเสียหายของแมลงวันผลไม้มักจะเกิดขึ้นเมื่อเพศเมียใช้อวัยวะวางไข่ (ovipositor) แทงเข้าไปในผลไม้ ตัวหนอนที่ฟักจากไข่จะอาศัยและชอนไชอยู่ภายใน (ภาพที่ 6) ทำให้ผลไม้เน่าเสียและร่วงหล่นลงพื้น ตัวหนอนจะออกมาเพื่อเข้าดักแด้ในดิน แล้วจึงออกเป็นตัวเต็มวัย แมลงวันผลไม้วางไข่ในผลไม้ที่ใกล้สุก และมีเปลือกบาง ในระยะเริ่มแรกจะสังเกตได้ยาก ทำให้ผลไม้เน่าเสีย และร่วงหล่นลงพื้น ตัวหนอนจะออกมาเพื่อเข้าดักแด้ในดิน ในระยะแรกจะสังเกตได้ยากอาจพบอาการช้ำบริเวณใต้ผิวเปลือก เมื่อหนอนโตขึ้นเรื่อยๆ จะทำให้ผลไม้เน่าเละ และมีน้ำไหลเยิ้มออกทางรูที่หนอนเจาะออกมาเพื่อเข้าดักแด้ ผลไม้ที่ถูกทำลายนี้มักจะมีโรคและแมลงชนิดอื่นๆเข้าทำลายซ้ำแมลงวันผลไม้ ระบาดทั่วทุกภาค ทั้งในเขตป่าและในบ้าน และสามารถอยู่ได้แม้มีระดับความสูงถึง 2,760 เมตร จากระดับน้ำทะเล และยังพบตลอดทั้งปี เนื่องจากมีพืชอาหารมากมาย แต่จะมีปริมาณแมลงวันผลไม้สูงสุดในช่วงเดือนที่มีผลไม้สุก คือ ในช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนมิถุนายน อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 25-28 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 6 ลักษณะการทำลายของแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis* (Hendel))

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การแพร่กระจายและฤดูกาลระบาด

แมลงวันผลไม้ระบาดในทวีปอเมริกา ยุโรป เอเชีย หมู่เกาะแปซิฟิก ไต้หวัน ญี่ปุ่น ปาปัวนิวกินี ฮาวาย ฯลฯ ในประเทศไทยพบการระบาดทั่วทุกภาค ทั้งในเขตป่าและในบ้าน และสามารถอยู่ได้แม้มีระดับความสูงถึง 2,760 เมตร จากระดับน้ำทะเล และยังพบตลอดทั้งปี เนื่องจากมีพืชอาหารมากมาย แต่จะมีปริมาณแมลงวันผลไม้สูงสุดในช่วงเดือนที่มีผลไม้สุก คือ ในช่วงเดือนมีนาคมถึงมิถุนายน อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 25-28 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์

6. พืชอาหาร

พืชอาหารของแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis*) พบแพร่กระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทยมีมากกว่า 122 ชนิด เช่น มะม่วง ฝรั่ง น้อยหน่า ขนุน เงาะ ลำไย ลิ้นจี่ พุทรา กระท้อน กล้วยน้ำว้า มะกอกฝรั่ง มะเฟือง มะปราง มะละกอ มะยง พริก มะกอกน้ำ มะตูม เป็นต้น (มนตรี, 2544)

7. ศัตรูธรรมชาติ

มีแตนเบียนหนอนแมลงวันผลไม้วางไข่ตามรอยแผลบนผลไม้ตรงที่แมลงวันวางไข่ไว้ที่พบในประเทศไทย (โกศล, 2534) ได้แก่ *Biosteres arisanus* Sonan, *Biosteres longicaudatus* Ashmead, *Opius makii* Sonan และตัวห้ำที่ช่วยทำลายแมลงวันผลไม้มีหลายชนิด ได้แก่ มดคัน (*Pheidologeton diversus*) นก และสัตว์หลายชนิดที่กินแมลงเป็นอาหาร ตัวห้ำชนิดหนึ่งที่ช่วยควบคุมแมลงวันผลไม้ได้ดี ได้แก่ แมงมุมชนิดต่างๆที่พบในสวนผลไม้ เช่น แมงมุมกระโดด (*Evarcha flavocincta* (C.L.Koch)) แมงมุมตาหกเหลี่ยม (*Oxyopes javanus*) แมงมุมสุนัขป่า (*Pardosa pseudoannulata* (Boes.et.Str)) (อัมพร และคณะ, 2544)

8. การป้องกันกำจัด

8.1 การทำความสะอาดบริเวณแปลงเพาะปลูกแมลงวันผลไม้สามารถเพิ่มจำนวนประชากรได้อย่างรวดเร็วในขณะที่มีพืชอาศัยอยู่มาก โดยการรวบรวมทำลายผลไม้ที่เน่าเสีย อันเนื่องมาจากถูกแมลงวันผลไม้เข้าทำลายสามารถหยุดยั้งการเพิ่มจำนวนของประชากรอย่างรวดเร็วของแมลงได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8.2 การห่อผลไม้เป็นการป้องกันการเข้าไปวางไข่ในผลไม้ที่ง่ายและได้ผลดีที่สุดวิธีหนึ่งอีกทั้งยังเป็นวิธีการที่ปลอดภัยจากการใช้สารฆ่าแมลง การห่อผลไม้นี้ควรจะห่อให้มิดชิดไม่ให้มีรูหรือรอยฉีกขาดเกิดขึ้นมิฉะนั้นแมลงจะเข้าไปวางไข่ได้

8.3 การควบคุมโดยชีววิธี ได้แก่ การนำเอาศัตรูธรรมชาติชนิดต่างๆ มาใช้ในการควบคุมศัตรูพืช ศัตรูธรรมชาติเหล่านั้น ได้แก่ ตัวเบียน (parasitoids) ตัวห้ำ (predators) และเชื้อจุลินทรย์(microorganism) คือ ไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา รวมทั้งไส้เดือนฝอย ศัตรูธรรมชาติส่วนใหญ่ที่นิยมนำมาใช้ในการควบคุมแมลงวันผลไม้โดยชีววิธี ได้แก่ แมลงเบียน สำหรับแมลงเบียนที่ตรวจพบในประเทศไทยได้รายงานไว้ทั้งหมด 8 ชนิด คือ *Biosteres vandenboschi* (Fullaway), *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead), *Diachasmimorpha angaleti* Fullaway, *Fopius arisanus* (Sonan), *Psyttalia fletcheri Psyttalia makii*, *Psyttalia incise* และ *Spalangia sp.* แมลงเบียนมักจะเข้าทำลายแมลงศัตรูพืชโดยการเบียนในระยะไข่ หรือระยะตัวอ่อน รวมทั้งตัวเต็มวัย และเจริญอยู่ภายในหรืออยู่บนแมลงอาศัยเพียงตัวเดียว แมลงศัตรูพืชจะถูกทำลายอย่างช้าๆจนตายในที่สุด ขณะที่ไข่ ตัวอ่อน หรือตัวเต็มวัยของแมลงเบียนค่อยๆเจริญเติบโต (อัมพร และคณะ, 2544)

8.4 การฉีดพ่นด้วยสารฆ่าแมลง การใช้สารฆ่าแมลงนั้นเป็นการลดปริมาณประชากรของแมลงวันผลไม้ในธรรมชาติได้อย่างรวดเร็วและเห็นผลได้ชัดแต่ในขณะเดียวกันแมลงก็มีการเคลื่อน ย้ายจากแหล่งที่ไม่ได้ฉีดพ่นสารฆ่าแมลงเข้าทำลายอีก และต้องพ่นซ้ำแล้วซ้ำอีก เพื่อป้องกันไม่ให้แมลงเข้าทำลายซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาเรื่องสารพิษตกค้าง การทำลายแมลงศัตรูธรรมชาติและการดื้อยาของแมลงได้ เช่น การใช้สารมาลาไธออนกำจัดแมลงวันผลไม้ก่อให้เกิดการต้านทานต่อสารมาลาไธออน (Hsu *et al*., 2004b) และจากการทดลองในห้องปฏิบัติการศึกษาใช้สาร spinosad ควบคุมประชากรแมลงวันผลไม้พบว่าไม่เกิดการดื้อยาในแมลงวันผลไม้ แต่เมื่อนำไปใช้ในแปลงพืชอาจก่อให้เกิดการต้านทานต่อสาร spinosad ได้ (Hsu and Feng, 2006)

8.5 การใช้สารล่อ

8.5.1 การใช้สารล่อแมลงวันผลไม้สารเคมีที่ใช้เป็นสารล่อนี้จะสามารถดึงดูดได้เฉพาะแมลงวันผลไม้ตัวผู้เท่านั้น และการใช้สารล่อนั้นจะต้องคำนึงถึงแมลงที่ต้องการให้เข้ามาในกับดักด้วย เพราะว่าแมลงวันผลไม้จะมีความเฉพาะเจาะจงกับสารล่อแต่ละชนิด เช่น เมธิลยูจินอล (methyl eugenol)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8.5.2 การใช้เหยื่อโปรตีน โดยการนำเอาโปรตีนไฮโดรไลเสท (protein hydrolysate) ผสมกับสารฆ่าแมลงมาเป็นเหยื่อล่อแมลงวันผลไม้ โดยใช้โปรตีนไฮโดรไลเสท 200 ซีซี ผสมสารฆ่าแมลงมาลาไธออน (malathion) 83 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 70 ซีซี ผสมน้ำ 5 ลิตร พ่นเป็นจุด ๆ เท่านั้นวิธีการนี้ให้ผลที่ดีมาก นอกจากจะประหยัดทั้งค่าใช้จ่ายในการใช้สารฆ่าแมลงและแรงงานแล้ว ยังเป็นพิษต่อสภาพแวดล้อม แมลงผสมเกสร รวมทั้งตัวห้ำ ตัวเบียนน้อยลง ที่สำคัญคือสารนี้สามารถดึงดูดได้ทั้งแมลงวันผลไม้ตัวผู้ และตัวเมียซึ่งจะช่วยลดอัตราการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้ได้อย่างดี

8.6 การทำหมันแมลง จุดมุ่งหมายของวิธีการนี้คือ การกำจัดแมลงให้หมดไปจากพื้นที่ที่ต้องการ จะต้องมีการเลี้ยงแมลงวันผลไม้ให้มีปริมาณมาก แล้วทำหมันแมลงเหล่านี้โดยการฉายรังสีแกมมา จากนั้นจึงนำแมลงที่เป็นหมันนี้ไปปล่อยในธรรมชาติเพื่อลดปริมาณแมลงในธรรมชาติจนหมดไป แต่การกระทำด้วยวิธีนี้จะสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูงมากและก็ยังมีข้อจำกัดอื่น ๆ อีกที่จะต้องคำนึงถึง เช่นการป้องกันการแพร่ระบาดเข้ามาใหม่ของแมลงและการที่แมลงศัตรูชนิดอื่นจะเพิ่มความสำคัญขึ้นมา (อนันต์, 2540)

8.7 การใช้สมุนไพร เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ป้องกันแมลงศัตรูพืชทดแทนการใช้สารเคมีได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งพืชส่วนใหญ่เป็นพืชในท้องถิ่นสามารถปลูกและหาได้ง่ายรวมทั้งมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต และสภาพแวดล้อมน้อยกว่าสารเคมี เนื่องจากมีการสลายตัวได้รวดเร็วจากการศึกษาของ Areekul *et al*. (1987) ใช้พืชในการกำจัดแมลงวันผลไม้ พบว่า พืชที่เป็นพิษต่อแมลงวันผลไม้สูง ได้แก่ สารสกัดจากข่าเล็ก (*Alpinia officinarum*) เมล็ดน้อยหน่าสด (*Annona squamosa*) ผลสลอดสด (*Croton tiglium*) พญาไร้ใบสด (*Euphorbia tirucalli* Linn.) แสยกสด (*Pedilanthus tithymaloides*) เมล็ดพริกไทยดำแห้ง (*Piper nigrum*) ดอกบัวตอง (*Tithonia diversifolia*) และเหง้าขิงสด (*Zingiber officinale*) และจากการศึกษาของทิพนาถ (2550) ใช้สารสกัดจากพืช 3 ชนิด ได้แก่ รากหางไหล (*Derris ellipitica* Benth.) เมล็ดน้อยหน่า (*Annona squamosa* Linn.) และผลประคำดีควาย (*Sapindus rarak* DC.) ทดสอบความเป็นพิษกับแมลงวันผลไม้พบว่าสารสกัดจากรากหางไหลมีความเป็นพิษต่อแมลงวันผลไม้สูงสุด รองลงมาคือ เมล็ดน้อยหน่า และผลประคำดีควาย ตามลำดับ สารสกัดจากสะเดา (*Azadirachta indica* Juss. var. *siamensis* Valeton) มีผลทำให้การวางไข่ และพัฒนาของรังไข่ของแมลงวันผลไม้ลดลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(Khan *et al*., 2007) และเมื่อสกัดข่าเล็ก (*Alpinia officinrum*) ด้วยเฮกเซนจะได้สารสกัดที่มีฤทธิ์แรงที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ และที่ 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถฆ่าแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยตายภายใน 24 ชั่วโมง ได้ 100 และ 83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (วิรจิตร, 2531)

กลไกการป้องกันและทำลายพิษของแมลง

สิ่งมีชีวิตเมื่อได้รับสารพิษเข้าไปจะมีกลไกในการตอบสนองต่อพิษและมีกระบวนการทำลายสารพิษหรือสารแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย (detoxification) ซึ่งเป็นวิธีทางชีวเคมีในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษโดยมีเอนไซม์ทำลายพิษ (detoxification enzyme) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้โครงสร้างของสารพิษเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารที่มีขั้วหรือสามารถละลายน้ำได้ดี ทำให้ง่ายต่อการกำจัดออกนอกร่างกาย (Visetson, 2001) ส่วนโครงสร้างภายนอกของแมลงที่ชั้นเคลือบผิวของชั้นไคติน (chitin) เป็นบริเวณที่ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้สารฆ่าแมลงผ่านเข้าไปในตัวของแมลงจะลดอัตราผ่านเข้าของสารนอกจากนี้ชั้นซีเมนต์อาจจะทำหน้าที่ในการป้องกันการแทรกซึมสารฆ่าแมลง ซึ่งอยู่ในรูปของสารที่ละลายน้ำทำให้สามารถเคลื่อนที่ผ่านได้แต่อัตราความแน่นอนในการเคลื่อนที่ของสาร ขึ้นอยู่กับตัวแปรหลายอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งความหนาของชั้นไคตินอัตราการแทรกซึมยังเปลี่ยนแปลงไปตามตำแหน่งการเข้าของสารฆ่าแมลง เช่น บริเวณระหว่างปล้อง หรือที่คลุมอยู่บนขนเกี่ยวกับการรับความรู้สึกจะต่อต้านการซึมผ่านของสารได้น้อยกว่า (อนันต์, 2540) วิธีการหนึ่งที่สำคัญ ที่แมลงใช้ในการทำลายพิษ ได้แก่ การเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ทำลายพิษ เพื่อกำจัดหรือลดความเป็นพิษ (อนันต์, 2540) ในแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis*) นั้นมีกลไกการป้องกันสารฆ่าแมลงหลายวิธี เช่น กลไกการต้านทานสารมาลาไธออนโดยอาศัยเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรสในการเพิ่มอัตราการสลายตัวของสารมาลาไธออน (Welling *et al*., 1974) และมีรายงานว่าไม่ทราบแน่ชัดว่าแมลงใช้กลไกใดในการต้านทานสารมาลาไธออน (Hsu *et al*., 2004a) สารพิษต่างๆที่อยู่ในสภาพแวดล้อม รวมทั้งสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาใช้ในชีวิตประจำวัน ได้แก่ อาหาร ยา เครื่องสำอางสารเหล่านี้ถ้าเข้าไปในร่างกายทางใดก็ตามจะกลายไปเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ต่างๆในร่างกาย สารตั้งต้นบางชนิดเป็นสารยับยั้ง บางชนิดเป็นสารเหนี่ยวนำในการทำงานของเอนไซม์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระบบเอนไซม์ทำลายพิษ (Detoxification enzymes system)

ระบบเอนไซม์ทำลายสารพิษเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาให้กับสารตั้งต้นที่เปลี่ยนรูปไปโดยเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายอย่างเช่น อุณหภูมิ, pH และชนิดของสิ่งมีชีวิต เป็นต้น ทั้งนี้สารแปลกปลอมสามารถเข้าสู่ร่างกายได้หลายทาง เช่น ทางปาก ทางผิวหนัง การหายใจเมื่อร่างกายได้รับสารแปลกปลอมร่างกายจะมีการขับถ่ายและเกิดเมแทบอลิซึมหรือเกิดbiotransformation โดยการเปลี่ยนแปลงนี้เป็นผลมาจากการเร่งของเอนไซม์ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต (สุรพล, 2542) มีรายงานว่าตำแหน่งที่เกิดเอนไซม์ทำลายพิษในสัตว์มีกระดูกสันหลัง คือ ตับ ปอด และลำไส้ แต่ในแมลงเอนไซม์จะสะสมอยู่ในลำไส้ และ/หรือ เซลล์ไขมันเมื่อแมลงสัมผัสสารเคมีแมลงจะเปลี่ยนพฤติกรรมเพื่อให้สัมผัสกับสารเคมีน้อยลง ถ้าแมลงไม่ตาย แมลงจะสะสมสารเคมีเหล่านั้นใน adipose tissue และเนื้อเยื่ออื่นๆ แมลงมีพฤติกรรมในการหลบหนีหลายรูปแบบ และระบบเอนไซม์ทำลายพิษที่หลากหลาย แมลงใช้เอนไซม์ทำลายพิษเพื่อลดความเป็นพิษเพราะเป็นกลไกที่เกิดขึ้นเร็วมาก (Visetson, 2001)

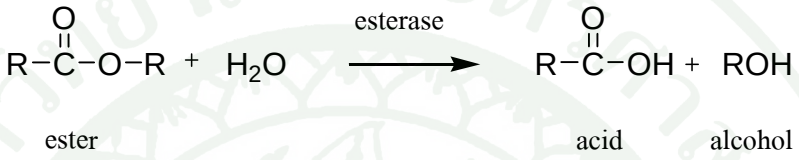
1. เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส (carboxylesterase)

เป็นเอนไซม์ทำลายพิษที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาระยะที่ 1 โดยเกิดไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โดยคาร์บอกซิลเอสเทอเรสเป็นเอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolase) ที่ไปแยกกลุ่มของเอสเทอร์ เอนไซม์กลุ่มนี้มีความสามารถในการ metabolized สารฆ่าแมลง carboxyl ester เช่น สารกลุ่มไพรีทรอยด์ กลุ่มฟอสเฟต และคาร์บาเมต เอสเทอร์ด้วย ดังนั้นเอนไซม์ชนิดนี้จึงมีส่วนทำให้เกิดการต้านทานต่อสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) เช่น การต้านทานสารมาลาไธออน โดยอาศัยเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรสในการเพิ่มอัตราการสลายตัวของสารมาลาไธออน (Welling *et al*., 1974) และคาร์บาเมต (carbamate) ผลที่ได้อาจมีพิษน้อยลงหรือเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสารตั้งต้น แล้วจึงถูกกำจัดออกนอกร่างกาย (Visetson, 1991) ในแมลงระดับเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสมีระดับต่ำกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม หน้าที่ของเอนไซม์นี้ทั่วไป คือ ควบคุมปริมาณของสารที่ผลิตขึ้นในร่างกาย (endogenous substrate) ให้อยู่ในระดับเหมาะสม และหน้าที่สำคัญในการทำลายพิษของสารแปลกปลอม (xenobiotics) ที่เป็นสารเอสเทอร์หรือสารที่ยึดกันด้วย anhydride bond โดยเอนไซม์ชนิดนี้มีกลไกในการเปลี่ยนแปลงพันธะเอสเทอร์ของสารแปลกปลอมไปเป็นกรด และแอลกอฮอล์ (ภาพที่ 7) มีรายงานว่าการต้านทานสารมาลาไธออนในมอดแป้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(*Tribolium castanium*) ทำให้ค่าปฏิกิริยาของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรสในกลุ่มที่ต้านทานเพิ่มขึ้นประมาณ 44 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ต้านทาน (Haubruge *et al*., 2002)

ในแมลงพบเอนไซม์นี้มากในไมโทคอนเดรีย (mitochondria), ไซโทซอล (cytosol), ไมโครโซม (microsomes) และนิวเคลียส (nucleus) ของเซลล์ลำไส้ และกล้ามเนื้อส่วนหลัง (thoracic muscle) ปริมาณขึ้นกับอายุ ชนิด และสายพันธุ์แมลง (Zhu and Brindley, 1990)



ภาพที่ 7 การเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase)

ที่มา: Visetson (1991)

Chen and Sun (1994) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส (carboxyl eterase) ในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens* (Stal)) พบว่าเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส (carboxylesterase) มีบทบาทในการทำลายพิษของสารฆ่าแมลงโดยเกิดไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โดยคาร์บอกซิลเอสเทอเรสเป็นเอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolase) ที่ไปแยกกลุ่มของเอสเทอร์ และมีรายงานว่ามีการต้านทานสารมาลาไธออนโดยอาศัยเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรสในการเพิ่มอัตราการสลายตัวของสารมาลาไธออน (Welling *et al*., 1974) และจากการศึกษาในแมลงวันผลไม้ที่ได้รับสารมาลาไธออนพบว่ากลุ่มที่ต้านทานต่อสารมาลาไธออนมีปฏิกิริยาของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส (esterases) สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ต้านทาน (Hsu *et al*., 2004) และในแมลงวันผลไม้เมื่อได้รับสารสกัดจากพืชมีผลทั้งยับยั้ง และเหนี่ยวนำปฏิกิริยาของเอนไซม์ชนิดนี้ทิพนาถ (2550) ทดสอบสารสกัดจากหางไหล (*Derris elliptica* Benth.) และเมล็ดน้อยหน่า (*Annona squamosa* L.) พบว่าสารสกัดดังกล่าวยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส และเมื่อแมลงวันผลไม้ได้รับสารสกัดจากเมล็ดพริกไทยดำ (*Piper nigrum*) พบว่าสารสกัดชนิดนี้เหนี่ยวนำปฏิกิริยาของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส (ณัฐกานต์, 2551)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส (glutathione S-transferase)

เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในระยะที่ 2 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ชนิดนี้พบมากที่ fat body และ midguts ของแมลงซึ่งเนื้อเยื่อทั้ง 2 เป็นตำแหน่งที่มีความสำคัญในกระบวนการทำลายสารพิษ (Enayati *et al*., 2005) เอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส เร่งปฏิกิริยาคอนจูเกชันซึ่งมีการเกิดกรดเมอร์แคปทูริก glutathione conjugation เป็นการรวมตัวของ xenobiotic product จากปฏิกิริยาระยะที่ 1 รวมทั้งสารอันตรายมีขั้วกับ conjugation agent ที่สำคัญในร่างกาย คือ กลูตาไธโอน (glutathione (GSH)) พบมากที่ ไซโทซอล (cytosol) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม, แมลง, โพรโทซัว, สาหร่าย, ฟังไจ, แบคทีเรีย และพืช (Jakoby, 1978) เอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส ประกอบด้วยกลุ่มอะมิโนยึดเหนี่ยวกัน 3 ชุด คือ ไกลซีน (glycine) ซีสตีอีน (cysteine) และกลูตามีน (glutamine) จากโครงสร้างของกลูตาไธโอน พบว่าสารประกอบซัลไฮดริล (SH) มีบทบาทในการเกิดการยึดเหนี่ยวโดยเป็นกลุ่มโควาเลนต์ (covalent) ผลที่ได้คือสารจะถูกกำจัดออกนอกร่างกายหรืออาจเกิดการจัดรูปแบบใหม่เป็นกลุ่มเมอแคพทูริค แอซิต (mercapturic acid) ที่มีกลุ่มของเอน-แอซิทิลซีสทีอีน (N-Acetyl cysteine) ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ดีและถูกกำจัดออกนอกร่างกายได้เร็ว (Visetson and Naknatti, 1996)

ระดับของเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส มีความสำคัญในการต้านทานสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) และสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Motoyama and Dauterman, 1980) Vontas *et al*. (2002) ศึกษาเอนไซม์ชนิดนี้ในการต้านทานสารในกลุ่มไพรีทรอยด์(pyrethroid) และเพอร์เมทริน (permethrin) ในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens* (Stal)) ของสารพาราไธออน (parathion) และเมธิลพาราไธออน (methyl parathion) ในหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) (Chen and Sun, 1994) ในแมลงวันบ้าน (*Musca domestica*) (Wei *et al*., 2001) และในยุงลาย (*Aedes aegypti*) แต่ในแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis*) ยังไม่แน่ชัดว่ากลไกใดเป็นกลไกหลักที่แมลงวันผลไม้นำมาใช้ในการเกิดการต้านทานต่อสารมาลาไธออน ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส (Hsu *et al*., 2004a) ทิพนาถ (2550) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาของเอนไซม์ชนิดนี้ในแมลงวันผลไม้หลังจากได้รับสารสกัดจากประคำดีควาย (*Sapindus rarak* DC.) พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีผลยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ชนิดนี้ 18 เท่า แต่จากการศึกษาของณัฐกานต์ (2551) หลังจากแมลงวันผลไม้ได้รับสารสกัดจากพริกไทยดำ (*Piper nigrum*) มีผลทำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 0.2 เท่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับเลี้ยงแมลงวันผลไม้

    1.1 แมลงวันผลไม้
    1.2 กรงมุ้งลวดรูปสี่เหลี่ยมสำหรับเลี้ยงแมลงวันผลไม้ ขนาด 30 x 30 x 30 เซนติเมตร
    1.3 กล่องพลาสติกสำหรับเลี้ยงตัวอ่อน ขนาด 15 x 17 x 5.5 เซนติเมตร
    1.4 กล่องพลาสติกสำหรับใส่ดักแด้ ขนาด 17 x 30 x 9.5 เซนติเมตร
    1.5 ขวดขนาด 200 มิลลิลิตร

2. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับสกัดสารจากพืชและการแยกสารสกัด

    2.1 Soxhlet apparatus (PNP)
    2.2 Hexane
    2.3 Dichloromethane
    2.4 Ethylacetate
    2.5 Ethanol 95%
    2.6 Cellulose Extraction Thimble (28 mm×100 mm) (Whatman®)
    2.7 Petridish plate
    2.8 Hot air oven (Lenton WF-200)
    2.9 ตู้เย็นปรับอุณหภูมิ (SANYO)
    2.10 ข่าตากแห้งบดละเอียด จาก อ. ดอนสัก จ. สุราษฎร์ธานี
    2.11 เครื่อง Rotary Evaporator (BUCHI R-215)
    2.12 อุปกรณ์สำหรับแยกองค์ประกอบของสารด้วยวิธี Quick Column Chromatography ประกอบด้วย กรวยขนาด 1,000 มิลลิลิตร, ซิลิกาเจล (Merck's Kieselgel 60 G cat No. 7731), ซิลิกาเจล (Merck's Kieselgel 60 G cat No. 7734), ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร, แผ่น TLC (precoated silica gel 60 F_{254} (Merck's layer thickness 0.25 mm Aluminium sheets 20×20 cm)), หลอด capillary, ขวดแก้วสำหรับการ developed แผ่น TLC มีฝาปิด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.13 อุปกรณ์สำหรับแยกองค์ประกอบสารด้วยวิธี Column Chromatography ประกอบด้วย column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ยาว 45 เซนติเมตรcolumn ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.0 เซนติเมตร ยาว 40 เซนติเมตร, ซิลิกาเจล (Merck's Kieselgel 60 G cat No. 7734), ขวดขนาด 20 มิลลิลิตร, ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร แผ่น TLC (precoated silica gel 60 F_{254} (Merck's layer thickness 0.25 mm Aluminium sheets 20×20 cm)), หลอด capillary, ขวดแก้วสำหรับการ developed แผ่น TLC มีฝาปิด

2.14 อุปกรณ์สำหรับแยกองค์ประกอบสารด้วยวิธี Preparative Thin-Layer chromatography (PTLC) (ภาพที่ 19) ประกอบด้วย ซิลิกาเจล (Merck's silica gel 60 PF_{254} cat No. 7747, แผ่นกระจกขนาด 20 ×20 เซนติเมตร, ถังแก้วสำหรับการ developed แผ่น TLC มีฝาปิด, ขวดก้นกลมขนาด 50 มิลลิลิตร, กรวยกรองขนาด 50 มิลลิลิตร และ โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulphate) (CARLOERBA)

2.15 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์โครงสร้างสาร ประกอบด้วย เครื่อง NMR 400 MHz (VARIAN ^{unity} INOVA NMR), คลอโรฟอร์ม-ดี (chloroform-D1) และหลอด NMRใส่ตัวอย่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร ยาว 18 เซนติเมตร

2.16 อุปกรณ์สำหรับกลั่นตัวทำละลายให้บริสุทธิ์

3. อุปกรณ์สำหรับทดสอบการตายของแมลงวันผลไม้

3.1 กล่องพลาสติกทรงกลมมีฝาปิดสำหรับทดสอบตัวเต็มวัย (ภาพที่ 15)
3.2 กระบอกตวงขนาด 10, 25 และ100 มิลลิลิตร
3.3 ปิเปตขนาด 1 และ5 มิลลิลิตร
3.4 กระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาด 110 มิลลิเมตร
3.5 ขวดสเปรย์ขนาด 10 มิลลิลิตร

4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ทดสอบวัดเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน

4.1 โกร่งบด
4.2 Micropipette ขนาด 20, 200 และ1000 ไมโครลิตร (NICHIRYO)
4.3 Microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
4.4 ขวดใส่สารเคมีขนาด 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.5 น้ำกลั่นชนิดกลั่น 2 ครั้ง

4.6 เครื่อง spectrophotometer (Perkin Elma Lamda 45 UV/VIS)

4.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hettich Universal 16R)

4.8 pH meter (Sartorius Series PP 25)

4.9 Potassium Phosphate (Sigma)

4.10 Glutathione reduce form (Sigma)

4.11 *para*-nitrophenyl acetate (*p*NPA) (Sigma)

4.12 Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) (Sigma)

4.13 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Fluka)

4.14 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) (ALDRICH)

4.15 Hydrocholic acid (J.T. Baker)

4.16 Sodium hydroxide (MERCK)

4.17 สารละลาย Bradford (Bio-RAD)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. การเพิ่มปริมาณแมลง

การเพิ่มปริมาณแมลงดัดแปลงจากวิธีการของ ทิพนาถ (2550) โดยนำสำลีชุบน้ำผึ้งใส่ในถ้วยพลาสติกที่เจาะรูแล้วปิดฝาเพื่อให้แมลงวันผลไม้วางไข่แล้วนำถ้วยดังกล่าววางไว้ในกรงเลี้ยงตัวเต็มวัยของแมลงวันผลไม้ที่พร้อมจะวางไข่ เมื่อแมลงวันผลไม้วางไข่เรียบร้อยแล้ว (ใช้เวลาประมาณ 1 วัน) ใช้กระบอกฉีดน้ำเพื่อชะไข่ลงมา จากนั้นใช้หลอดหยดดูดไข่ นำไข่มาหยดลงในกล่องเลี้ยงตัวอ่อน (ภาพที่ 8) ที่มีอาหารเทียมสำหรับเลี้ยงตัวอ่อนบรรจุอยู่โดยใช้กระดาษทิชชูรองไข่ไว้เพื่อป้องกันไม่ให้ไข่จมลงในอาหาร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ไข่จะใช้เวลา 2-4 วันก็จะฟักตัวเป็นหนอนระยะที่ 1 และจะชอนไชอาหารที่เตรียมไว้จนถึงหนอนระยะที่ 3 จะใช้เวลาประมาณ 1 อาทิตย์ ก็จะพร้อมที่จะเข้าระยะดักแด้จึงนำกล่องเลี้ยงตัวอ่อนไว้ในกรงมุ้งลวด (ภาพที่ 9) เพื่อรอเป็นตัวเต็มวัยต่อไป หลังจากเป็นตัวเต็มวัยแล้ว จึงเลี้ยงด้วยอาหารเทียมที่เตรียมไว้ของตัวเต็มวัย และคอยเก็บไข่ออกจากกรงเพื่อทำการฟักเลี้ยงเพิ่มปริมาณต่อไปสำหรับสูตรอาหารจะทำตามวิธีการของทิพนาถ (2550) (ภาคผนวก ก)

ภาพที่ 8 กล่องลี้ยงตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis* (Hendel)) ด้วยอาหารเทียม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 9 กรงเลี้ยงแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis* (Hendel))

2. การเตรียมสารสกัดหยาบจากข่า (แผนภาพที่ 1)

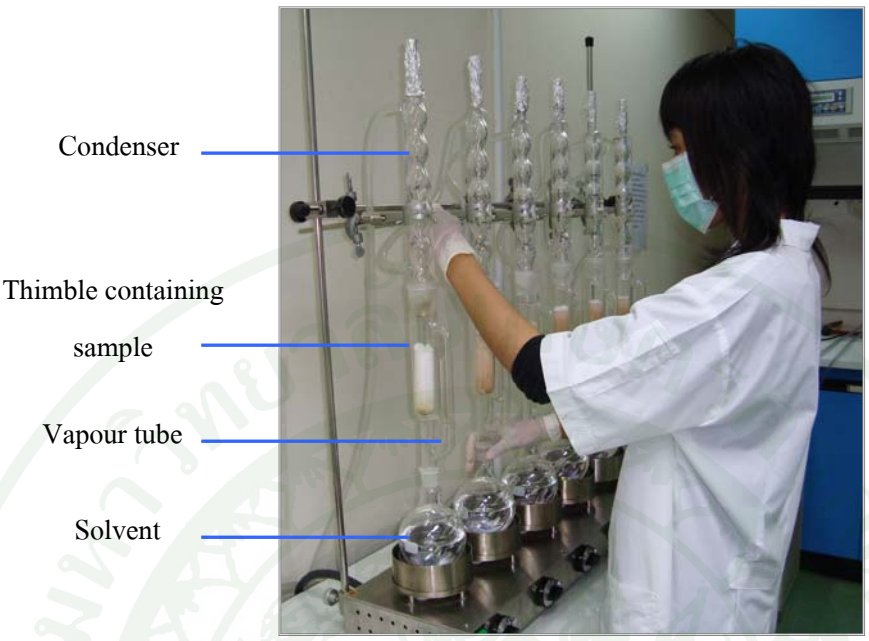
การสกัดสารจากพืชจะดัดแปลงวิธีการของ Bullangpoti *et al*. (2007), Visetson and Miline (2001) และ Samart (2007) โดยนำเหง้าข่าสดจำนวน 20 กิโลกรัมที่เก็บรวบรวมจากหมู่ 14 ต. ปากแพรก อ. ดอนสัก จ. สุราษฎร์ธานี (ระยะทางประมาณ 700 กม. จากกรุงเทพฯ) ล้างทำความสะอาด แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆอบให้แห้ง (ภาพที่ 10) โดยใช้ตู้อบ (Lenton WF-200) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน จากนั้นนำไปบดให้เป็นผงละเอียดโดยใช้เครื่องบด (Moulinex AY 46) หลังจากนั้นนำเหง้าข่าบดละเอียด (ภาพที่ 11) จำนวน 2 กิโลกรัมสกัดด้วยเครื่อง soxhlet apparatus (ภาพที่ 12) ในที่นี้จะใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกัน ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเทต และเอทานอล 95% ตามลำดับ (ภาพที่ 14) (ข่าบดละเอียด 15 กรัม ต่อตัวทำละลาย 300 มิลลิลิตรต่อ 8 ชั่วโมง ต่อครั้ง) หลังจากได้สารสกัดหยาบแล้ว จะนำมาระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง Rotary vacuum evaporator (BUCHI R-215) (ภาพที่ 13) เพื่อให้สารสกัดหยาบแห้งแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปแยกสารออกฤทธิ์สูงสุด และทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 10 เหง้าข่าตากแห้ง (*Alpinia galanga* (Linn.) Sw.)

ภาพที่ 11 เหง้าข่าบดละเอียด (*Alpinia galanga* (Linn.) Sw.)

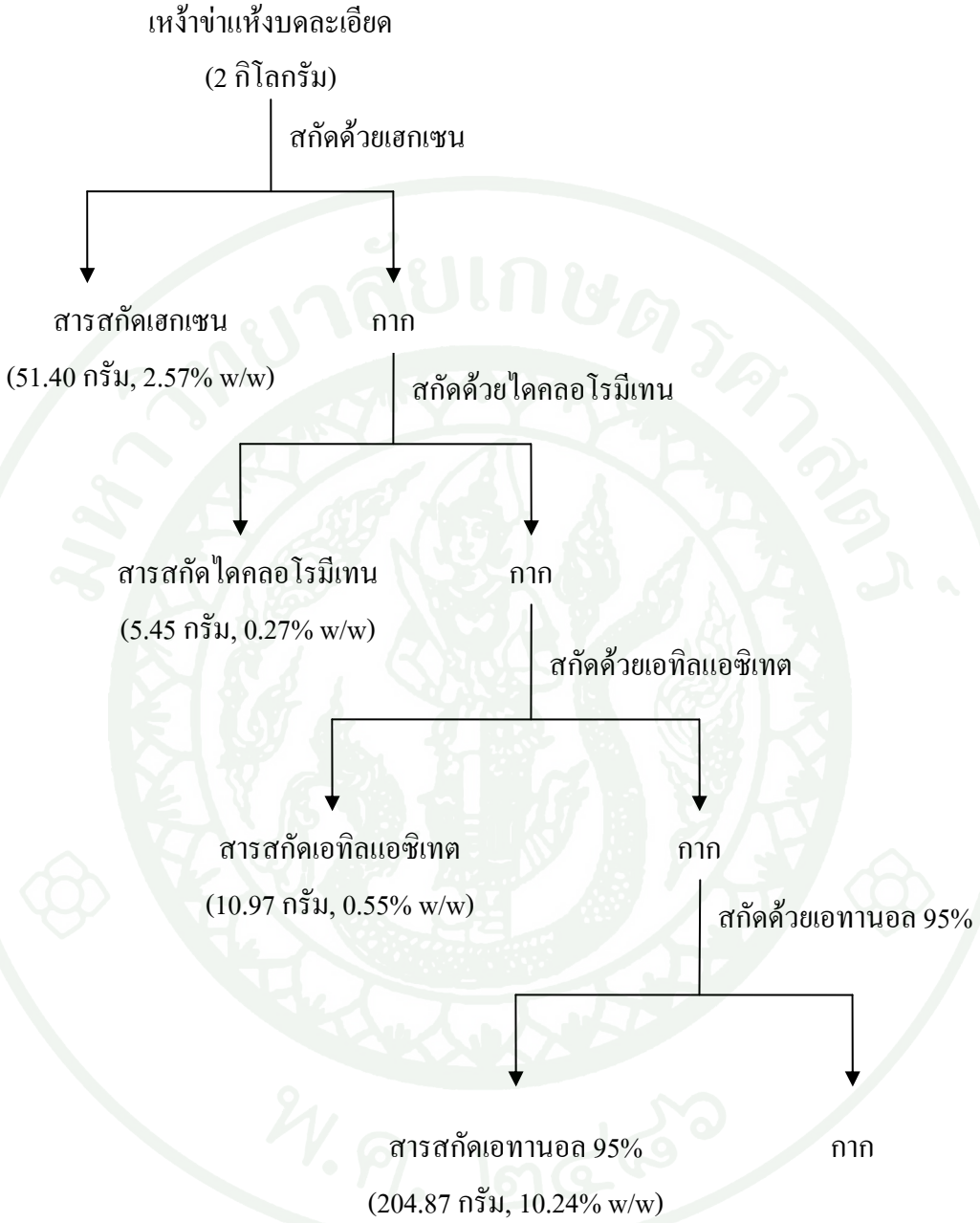
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 12 การสกัดสารด้วยเครื่อง Soxhlet apparatus

ภาพที่ 13 เครื่อง Rotary vacuum evaporator (BUCHI R-215)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 14 ขั้นตอนการสกัดสารจากเหง้าข่า (*Alpinia galang*a (Linn.) Sw.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากข่าต่อแมลงวันผลไม้

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดสอบหาความเข้มข้นของสารสกัดต่ำสุด และสูงสุดที่มีผลต่อการตายของแมลงวันผลไม้ในระยะตัวเต็มวัย จากนั้นจึงทดสอบหาความเป็นพิษเพื่อหาความเข้มข้นที่ทำให้แมลงตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) โดยนำแก้วพลาสติกทรงกลมใสมีฝาบุด้วยผ้าขาวบาง ที่แห้งสะอาดรองก้นแก้วพลาสติกด้วยกระดาษกรองแล้วนำตัวเต็มวัยที่ฟักจากดักแด้แล้วเป็นเวลา 2 วัน ใส่ลงในภาชนะดังกล่าว ภาชนะละ 30 ตัว แล้วนำสารสกัดจากเหง้าข่าที่ด้วยตัวทำละลายต่างๆ ที่เจือจางด้วยตัวทำละลายแอซิโทน 20% ใส่ในขวดสเปรย์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นต่างๆดังนี้ สารสกัดจากเหง้าข่าด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ความเข้มข้น 0, 2,000, 4,000, 8,000 และ 10,000 ppm ตามลำดับ สารสกัดจากเหง้าข่าด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 0, 6,000, 12,000, 25,000 และ 40,000 ppm ตามลำดับ สารสกัดจากเหง้าข่าด้วยตัวทำละลายเอทิลแอซิเทตความเข้มข้น 0, 4,000, 8,000, 15,000 และ 30,000 ppm ตามลำดับ และสารสกัดจากเหง้าข่าด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ความเข้มข้น 0, 5,000, 6,000, 7,000 และ 10,000 ppm ตามลำดับ และใช้แอซิโทน 20% เป็นกลุ่มควบคุมหลังจากนั้นนำสารสกัดดังกล่าวพ่นลงบนตัวเต็มวัยที่ใส่ในภาชนะดังกล่าว ปิดฝาแก้วพลาสติกด้วยฝาที่บุด้วยผ้าขาวบาง แล้วให้อาหารโดยใช้สำลีชุบน้ำผึ้ง 10% ใส่ลงไปในแก้วพลาสติก (ภาพที่ 15) การทดสอบจะทำทั้งหมด 5 ซ้ำ สังเกตพฤติกรรมการตายของแมลงวันผลไม้และตรวจนับจำนวนการตายของแมลงวันผลไม้ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์สถิติและหาค่าความเป็นพิษ (LC_{50}) โดยวิธี Probit Analysis ผ่านทางโปรแกรม SPSS version 16.0 และ StatPlus version 2008

ภาพที่ 15 การทดสอบแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis* (Hendel)) ด้วยสารสกัดจากข่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การแยกสารออกฤทธิ์ของสารสกัดจากข่า

ขั้นตอนการแยกเพื่อหาสารออกฤทธิ์ภายในสารสกัดจากเหง้าข่าจะดัดแปลงวิธีการของงามผ่อง (2538) โดยนำสารที่มีฤทธิ์สูงสุดต่อแมลงวันผลไม้จากการทดสอบประสิทธิภาพของสกัดหยาบจากข่าในการควบคุมประชากรแมลงวันผลไม้ สารที่ออกฤทธิ์สูงสุด คือสารสกัดจากข่าด้วยตัวทำละลายเฮกเซน โดยนำสารสกัดจากข่าด้วยตัวทำลายเฮกเซน 51.4 กรัม มาแยกองค์ประกอบด้วยวิธีควิกคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Quick Column Chromatography) (ภาพที่ 16) โดยใช้ซิลิกาเจล (Merck's Kieselgel 60 G cat No. 7731) เป็นตัวดูดซับและใช้ตัวชะเป็นตัวทำละลายผสม เช่น เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน:เอทิลแอซิเทต และเอทิลแอซิเทต:เอทานอล 95% ที่อัตราส่วนต่างๆ จากนั้นนำตัวทำละลายที่ได้จากการชะแต่ละส่วนมาตรวจสอบด้วยวิธี thin layer chromatography เพื่อนำส่วนที่มีสารคล้ายกันมารวมเป็น fraction เดียวกัน และนำไปทดสอบกับแมลงวันผลไม้โดยใช้ความเข้มข้นที่ระดับ LC_{50} (4,866.06) ppm เพื่อหา fraction ที่ออกฤทธิ์ดีที่สุดไปแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี เช่น คอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) (ภาพที่ 17) หรือ Preparative Thin Layer Chromatography (ภาพที่ 18) เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ และพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ทั้งหมดที่แยกได้โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี เช่น ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR

ภาพที่ 16 การแยกสารสกัดด้วยวิธีควิกคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Quick Column Chromatography)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 17 การแยกสารสกัดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

5. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดบริสุทธิ์ที่แยกได้บางส่วน

นำสารที่ได้จากวิธีการที่ 4 มาทดสอบความเป็นพิษต่อแมลงวันผลไม้โดยการพ่นบนตัวเต็มวัยโดยทั้งจะมีทั้งสิ้น 5 ความเข้มข้น รวมกลุ่มควบคุม การทดสอบจะทำทั้งสิ้น 5 ซ้ำ ต่อความเข้มข้น ใช้แมลงวันผลไม้ความเข้มข้นละ 30 ตัว นำค่าเปอร์เซ็นต์การตายที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง วิเคราะห์ความเป็นพิษ (LC_{50}) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 16.0 และ StatPlus version 2008

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. เตรียมแผ่น Preparative TLC

2. หยดสารตัวอย่างลงบนแผ่น Preparative TLC

3. นำแผ่น Preparative TLC วางในถัง ซึ่งบรรจุสารละลายผสมเฮกเซน:เอทิลแอซิเทต (6:1 ระบบที่ 1 และ 3:1 ระบบที่ 2)

4. ปล่อยให้ตัวทำละลายผสมซึมผ่านขึ้นไปตามแผ่น Preparative TLC จนสูงห่างจากขอบปลายบนประมาณ 2-3 เซนติเมตร

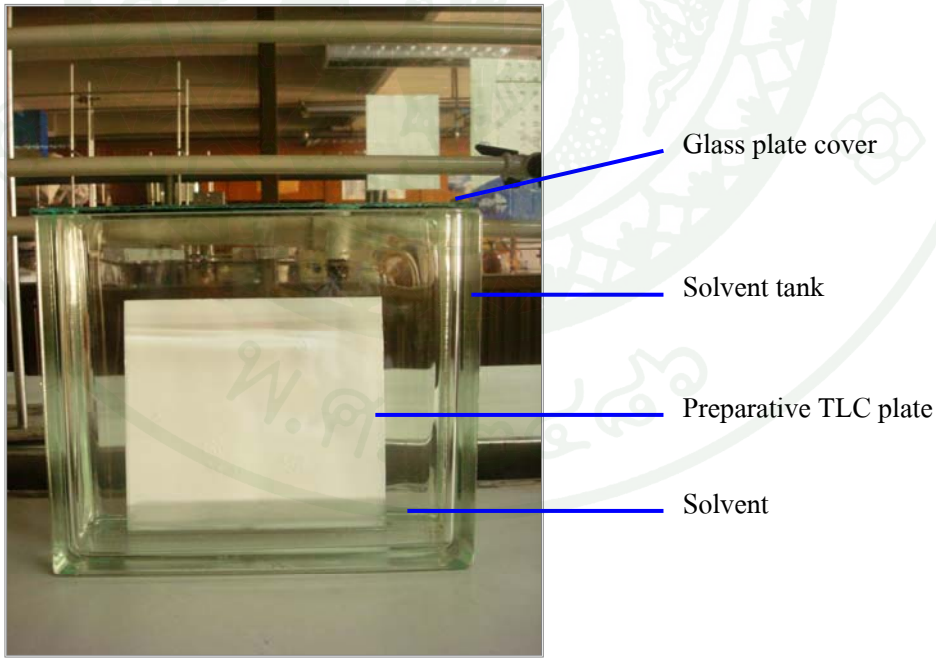
ภาพที่ 18 ขั้นตอนการแยกสารด้วยวิธี Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. นำแผ่น Preparative TLC ออกจากถัง ผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปส่องใต้ UV ใช้ดินสอลากตามแถบที่เห็น แล้วขูดซิลิกาออกตามรอยที่ขีดไว้

6. นำซิลิกาที่ขูดได้ใส่กรวยกรองแล้วล้างด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน เพื่อให้ได้สารตัวที่เราต้องการ

ภาพที่ 18 (ต่อ)



ภาพที่ 19 อุปกรณ์สำหรับแยกองค์ประกอบสารด้วยวิธี Preparative Thin Layer Chromatography

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. การหาระดับเอนไซม์ทำลายพิษ

ก่อนทำการทดสอบเรื่องเอนไซม์ทำลายพิษ จะทำการหาช่วง pH optimum ที่เหมาะสมของแต่ละเอนไซม์ก่อนโดยการทดลองจะทำทั้งสิ้นสองเอนไซม์ คือ คาร์บอกซิลเอสเทอเรส (carboxylesterase) และกลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส (glutathione S-transferase)

เก็บแมลงที่รอดชีวิตหลังการทดสอบกับความเข้มข้นที่ LC_{50} ของสารสกัดข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ออกฤทธิ์สูงสุดในที่นี้ คือสารสกัดข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนมาสกัดเอนไซม์โดยดัดแปลงวิธีการของ Bullangpoti *et al*. (2007) โดยจะบดแมลงร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer solution) (pH 7.5 สำหรับเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส และpH 7.3 สำหรับเอนไซม์กลูตาไธ เอส-ทรานสเฟอเรส) (2000 µl 0.1 M phosphate buffer + EDTA และ 1000 µl 10 mM GSH และ 50% w/w PVPP) (ภาคผนวก ข) บนน้ำแข็งหลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 18,000 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที (ภาพที่ 20) จากนั้นนำส่วนใสด้านบน (supernatant) มาทำการหาระดับเอนไซม์ทำลายพิษ และปริมาณโปรตีนรวมโดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

ภาพที่ 20 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคมอุณหภูมิ (Refrigerater centrifuge) ของ Hettich Universal 16R

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.1 การตรวจวัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส

การตรวจวัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส ใช้วิธี *p*NPA ดัดแปลงวิธีการของ Bullangpoti *et al*. (2007) ตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 400 นาโนเมตร (ภาพที่ 21) ตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงของ paranitrophenol (สารสีเหลือง) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของparanitrophenyl acetate (*p*NPA) โดยมีเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

6.2 การตรวจวัดเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส

การตรวจวัดเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส ใช้วิธี CDNB ตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นแสง 340 นาโนเมตร (ภาพที่ 21) ตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงของ monochloronitrobenzene glutathione ซึ่งเกิดจาก dichloronitrobenzene ทำปฏิกิริยากับ glutathione โดยมีเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ภาพที่ 21 การตรวจวัดระดับเอนไซม์ทำลายพิษด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. การตรวจวัดปริมาณโปรตีนรวมในแมลงวันผลไม้

ทำการตรวจวัดปริมาณโปรตีนรวมโดยใช้ชุดทดสอบจาก Bio-RAD® ตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 595 นาโนเมตรเพื่อนำค่าโปรตีนรวมที่ได้มาเปรียบเทียบกับระดับเอนไซม์ทำลายพิษหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าข่า

8. สถานที่และระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง

เริ่มการทดลองตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2551 ถึงเดือนมกราคม 2553 รวมระยะเวลาทำการทดลอง 1 ปี 7 เดือน ณ ภาควิชาสัตววิทยา และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

ผล

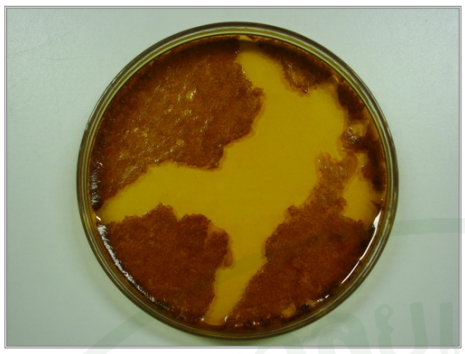
1. ผลการสกัดสารจากเหง้าข่า

การสกัดสารจากเหง้าข่าโดยสกัดด้วยเครื่อง soxhlet apparatus โดยใช้ตัวทำละลายที่มีลำดับขั้วต่างกันจากต่ำไปสูง ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเทต ตามลำดับให้ปริมาณสารสกัดหยาบ และลักษณะทางกายภาพต่างกัน (ตารางที่ 1 และภาพที่ 22) โดยสารสกัดไดคลอโรมีเทนให้สารสกัดหยาบน้อยที่สุด 5.45 กรัม (0.27% w/w) ส่วนสารสกัดเอทานอล 95% ให้ปริมาณสารสกัดหยาบมากที่สุด 204.87 กรัม (10.24% w/w)

ตารางที่ 1 ลักษณะสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน

สารสกัด	น้ำหนัก (กรัม)	เปอร์เซ็นต์ yield (w/w)	ลักษณะทางกายภาพ
เฮกเซน	51.40	2.57	น้ำมันสีเหลืองออกน้ำตาล
ไดคลอโรมีเทน	5.45	0.27	หนืดสีน้ำตาลเข้ม
เอทิลแอซิเทต	10.97	0.55	เกร็ดสีน้ำตาลเข้ม
เอทานอล 95%	204.87	10.24	เหนียวสีน้ำตาลเข้ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ก.

ข.

ค.

ง.

ภาพที่ 22 สารสกัดหยาบจากเหง้าข่าด้วยตัวทำละลายที่มีลำดับขั้วแตกต่างกัน

ก. สารสกัดเหง้าข่าจากตัวทำละลายเฮกเซน

ข. สารสกัดเหง้าข่าจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน

ค. สารสกัดเหง้าข่าจากตัวทำละลายเอทิลแอซิเทต

ง. สารสกัดเหง้าข่าจากตัวทำละลายเอทานอล 95%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเหง้าข่าต่อแมลงวันผลไม้

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยวิธี soxhlet extraction ด้วยตัวทำละลายที่มีลำดับขั้วต่างกันจากต่ำไปสูง ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเทต และเอทานอล 95% ตามลำดับ มีความเป็นพิษต่อแมลงวันผลไม้ดังนี้

2.1 ผลความเป็นพิษของสารสกัดจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

จากการทดสอบพบว่าสารสกัดจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยทำลายเฮกเซนที่ความเข้มข้น 0, 2,000, 4,000, 8,000 และ10,000 ppm ตามลำดับ พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.00 ± 0.00, 11.33 ± 3.80, 48.67 ± 1.82, 84.67 ± 1.83 และ 90.67 ± 2.79 % ตามลำดับ และที่เวลา 48 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยมีค่าเท่า 0.00 ± 0.00, 14.67 ± 1.83, 54.00 ± 2.79, 89.33 ± 1.49 และ 94.00 ± 2.79 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) เมื่อวิเคราะห์ค่าความเป็นพิษพบว่าค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 4,866.06 ± 184.52 และ 4,357.76 ± 194.82 ppm ตามลำดับ (ภาพที่ 23 และ 24) และจากการสังเกตพฤติกรรมการตายของแมลงวันผลไม้พบว่าแมลงวันผลไม้ที่ได้รับสารสกัดจะมีการเคลื่อนไหวช้าลง หยุดบิน และดิ้นตายในที่สุด

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้หลังจากได้รับสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนที่ความเข้มข้นต่างกันในเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

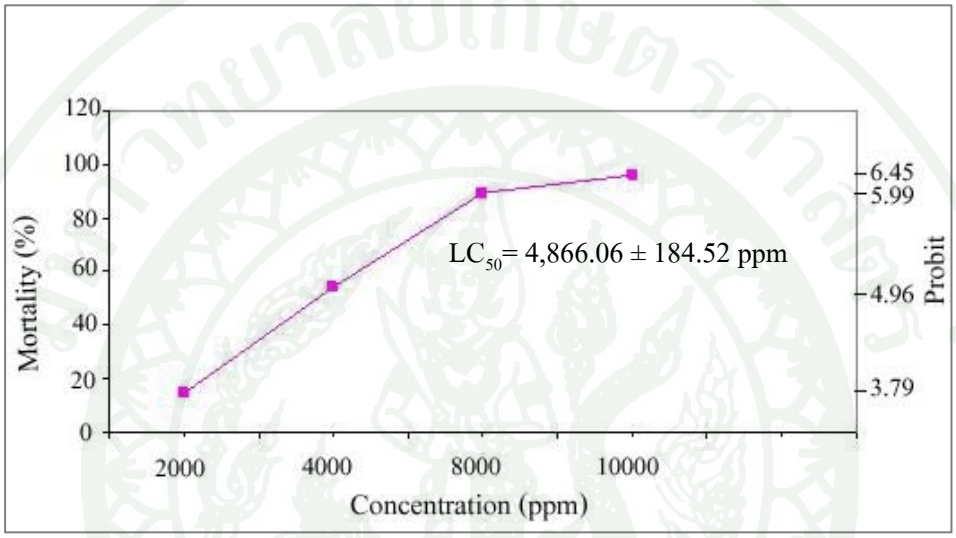
ความเข้มข้น (ppm)	จำนวนแมลงทดลอง/ซ้ำ	จำนวนซ้ำ	% การตายเฉลี่ย[3]	
			24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
0 [1]	30	5	0.00 ± 0.00 [e]	0.00 ± 0.00 [e]
0 [2]	30	5	0.00 ± 0.00 [e]	0.00 ± 0.00 [e]
2,000	30	5	11.33 ± 3.80 [d]	14.67 ± 1.83 [d]
4,000	30	5	48.67 ± 1.82 [c]	54.00 ± 2.79 [c]
8,000	30	5	84.67 ± 1.83 [b]	89.33 ± 1.49 [b]
10,000	30	5	90.67 ± 2.79 [a]	94.00 ± 2.79 [a]

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

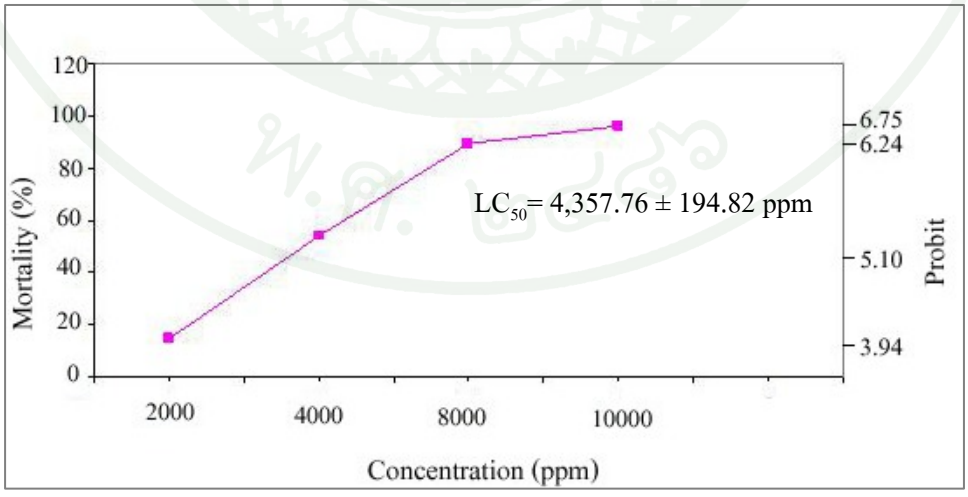
หมายเหตุ [1] ชุดควบคุม A (น้ำกลั่นแบบกลั่น 2 ครั้ง)

[2] ชุดควบคุม B (แอซิโทน 20%)

[3] ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ตามด้วยตัวอักษรอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 23 ผลความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนที่ความเข้มข้นต่างกันต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 24 ผลความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนที่ความเข้มข้นต่างกันต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 48 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 ผลความเป็นพิษของสารสกัดจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน

จากการทดสอบพบว่าสารสกัดจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ที่ความเข้มข้น 0, 6,000, 12,000, 25,000 และ40,000 ppm ตามลำดับ พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.00 ± 0.00, 10.66 ± 2.78, 24.00 ± 1.49, 48.67 ± 1.83 และ 86.00 ± 2.79 % ตามลำดับ และที่เวลา 48 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยมีค่าเท่ากับ 0.00 ± 0.00, 14.67 ± 1.82, 27.33 ± 2.78, 52.00 ± 2.98 และ 88.00 ± 1.82 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) เมื่อวิเคราะห์ค่าความเป็นพิษพบว่าค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 24,156.66 ± 880.33 และ 22,599.18 ± 915.26 ppm ตามลำดับ (ภาพที่ 25 และ 26) และจากการสังเกตพฤติกรรมการตายของแมลงวันผลไม้พบว่าแมลงวันผลไม้ที่ได้รับสารสกัดจะมีการเคลื่อนไหวช้าลง หยุดบิน หงายท้องขึ้น และดิ้นตายในที่สุด

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้หลังจากได้รับสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้นต่างกันในเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

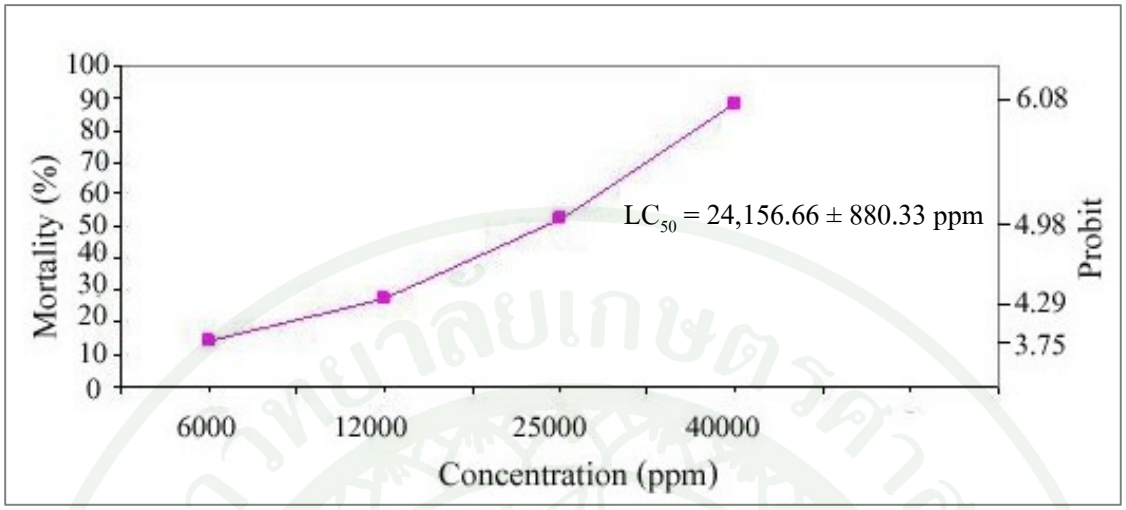
ความเข้มข้น (ppm)	จำนวนสัตว์ทดลอง/ซ้ำ	จำนวนซ้ำ	% การตายเฉลี่ย[3]	
			24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
0 [1]	30	5	0.00 ± 0.00 [a]	0.00 ± 0.00 [a]
0 [2]	30	5	0.00 ± 0.00 [a]	0.00 ± 0.00 [a]
6,000	30	5	10.66 ± 2.78 [b]	14.67 ± 1.82 [b]
12,000	30	5	24.00 ± 1.49 [c]	27.33 ± 2.78 [c]
25,000	30	5	48.67 ± 1.83 [d]	52.00 ± 2.98 [d]
40,000	30	5	86.00 ± 2.79 [e]	88.00 ± 1.82 [e]

หมายเหตุ [1] ชุดควบคุม A (น้ำกลั่นแบบกลั่น 2 ครั้ง)

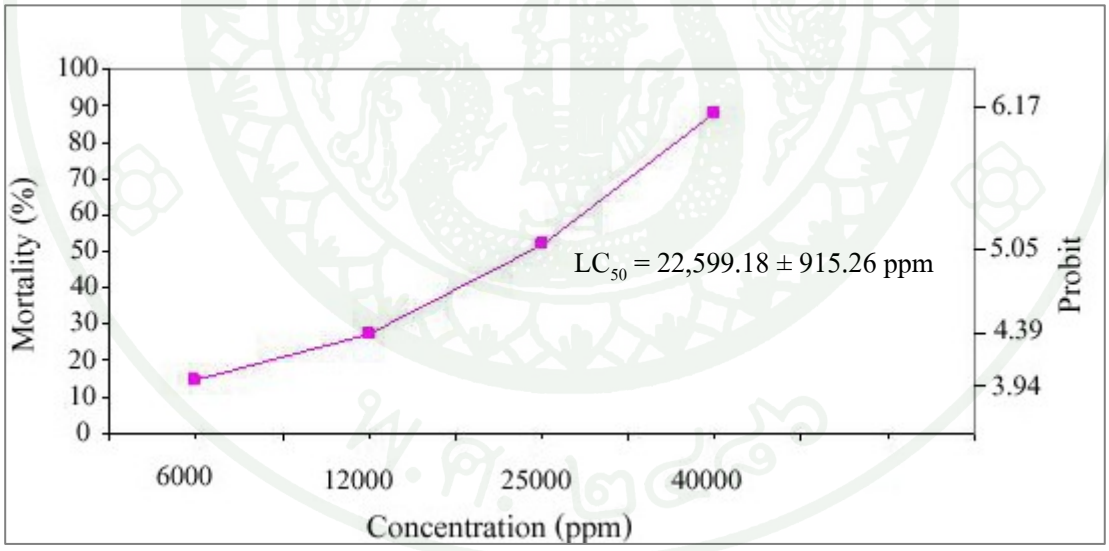
[2] ชุดควบคุม B (แอซิโทน 20%)

[3] ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ตามด้วยตัวอักษรอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 25 ผลความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ที่ความเข้มข้นต่างกันต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 26 ผลความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ที่ความเข้มข้นต่างกันต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 48 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 ผลความเป็นพิษของสารสกัดจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลแอซิเทต

จากการทดสอบพบว่าสารสกัดเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลแอซิเทตที่ความเข้มข้น 0, 4,000, 8,000, 15,000 และ30,000 ppm ตามลำดับ พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยที่เวลา 24ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.00 ± 0.00, 11.99 ± 1.82, 20.00 ± 2.35, 48.00 ± 1.82 และ 87.20 ± 2.84 % ตามลำดับ และที่เวลา 48 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยมีค่าเท่ากับ 0.00 ± 0.00, 14.67 ± 1.82, 22.67 ± 2.78, 52.00 ± 3.79 และ 92.00 ± 1.82 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) เมื่อวิเคราะห์ค่าความเป็นพิษพบว่าค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 16,744.73 ± 641.27 และ 14,778.32 ± 584.13 ppm ตามลำดับ (ภาพที่ 27 และ 28) และจากการสังเกตพฤติกรรมการตายของแมลงวันผลไม้พบว่าแมลงวันผลไม้ที่ได้รับสารสกัดจะมีการเคลื่อนไหวช้าลง หยุดบิน หงายท้องขึ้น และตายในที่สุด

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้หลังจากได้รับสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลแอซิเทตที่ความเข้มข้นต่างกันในเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

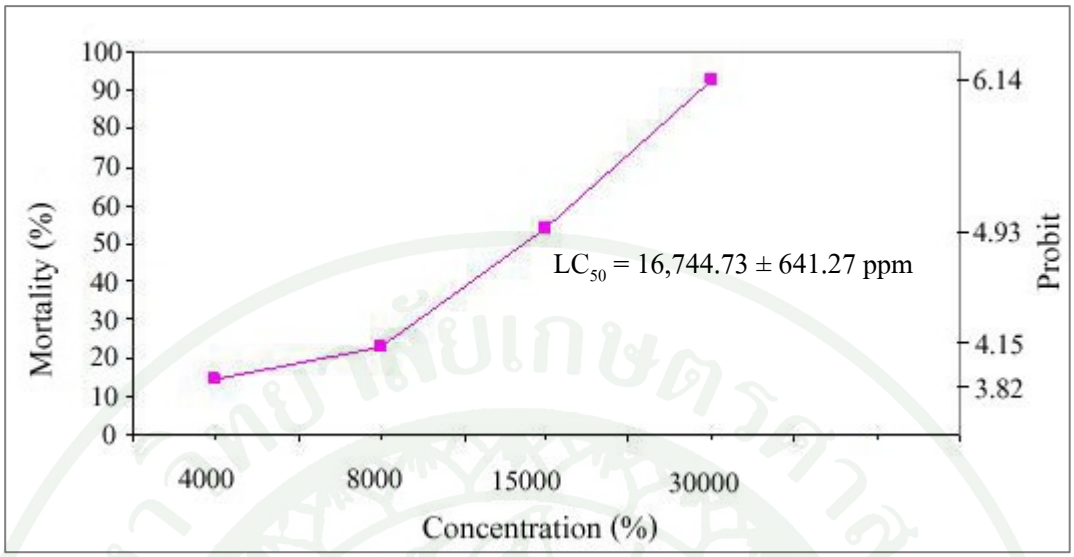
ความเข้มข้น (ppm)	จำนวนสัตว์ทดลอง/ซ้ำ	จำนวนซ้ำ	% การตายเฉลี่ย[3]	
			24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
0 [1]	30	5	0.00 ± 0.00 [a]	0.00 ± 0.00 [a]
0 [2]	30	5	0.00 ± 0.00 [a]	0.00 ± 0.00 [a]
4,000	30	5	11.99 ± 1.82 [b]	14.67 ± 1.82 [b]
8,000	30	5	20.00 ± 2.35 [c]	22.67 ± 2.78 [c]
15,000	30	5	48.00 ± 1.82 [d]	52.00 ± 3.79 [d]
30,000	30	5	87.20 ± 2.84 [e]	92.00 ± 1.82 [e]

หมายเหตุ [1] ชุดควบคุม A (น้ำกลั่นแบบกลั่น 2 ครั้ง)

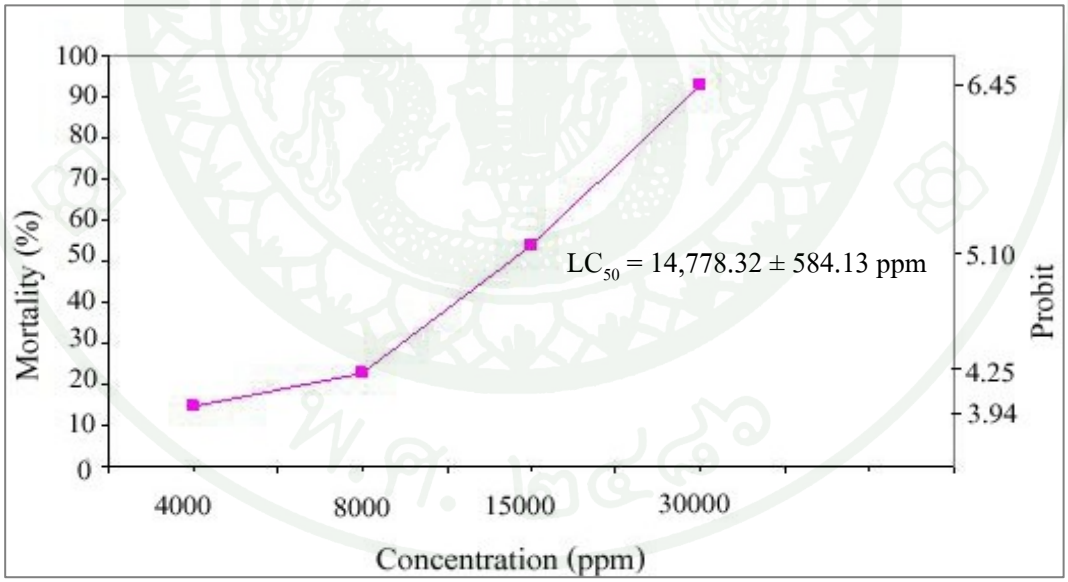
[2] ชุดควบคุม B (แอซิโทน 20%)

[3] ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ตามด้วยตัวอักษรอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 27 ผลความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลแอซิเทต ที่ความเข้มข้นต่างกันต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 28 ผลความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลแอซิเทต ที่ความเข้มข้นต่างกันต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 48 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.4 ผลความเป็นพิษของสารสกัดจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95%

จากการทดสอบพบว่าสารสกัดจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้น 0, 5,000, 6,000, 7,000 และ10,000 ppm ตามลำดับ พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยที่เวลา 24ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.00 ± 0.00, 15.33 ± 1.83, 50.00 ± 2.35, 79.33 ± 2.79 และ 87.234 ± 1.49 % ตามลำดับ และที่เวลา 48 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยมีค่าเท่า 0.00 ± 0.00, 19.33 ± 1.49, 53.33 ± 2.36, 83.33 ± 2.36 และ 90.67 ± 1.49 ตามลำดับ (ตารางที่ 5) เมื่อวิเคราะห์ค่าความเป็นพิษพบว่าค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 6,337.54 ± 145.42 และ 6,012.14 ± 137.23 ppm ตามลำดับ (ภาพที่ 29 และ 30) และจากการสังเกตพฤติกรรมการตายของแมลงวันผลไม้พบว่าแมลงวันผลไม้ที่ได้รับสารสกัดจะมีการเคลื่อนไหวช้าลง หยุดบิน หงายท้องขึ้น และดิ้นตายในที่สุด

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้หลังจากได้รับสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้นต่างกันในเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

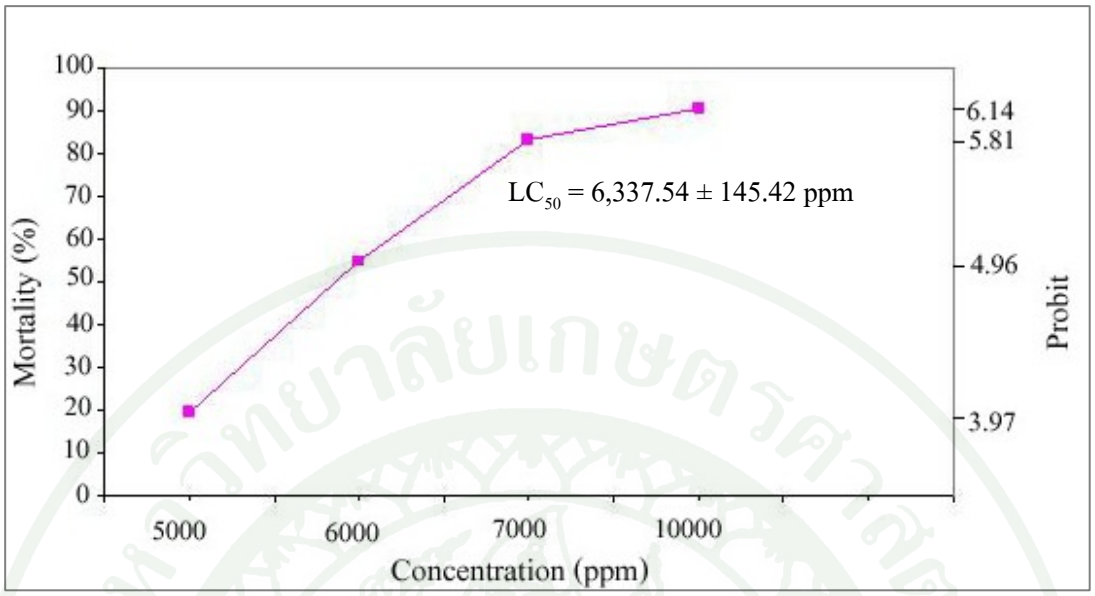
ความเข้มข้น (ppm)	จำนวน สัตว์ทดลอง/ซ้ำ	จำนวนซ้ำ	% การตายเฉลี่ย[3]	
			24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
0 [1]	30	5	0.00 ± 0.00 [a]	0.00 ± 0.00 [a]
0 [2]	30	5	0.00 ± 0.00 [a]	0.00 ± 0.00 [a]
5,000	30	5	15.33 ± 1.83 [b]	19.33 ± 1.49 [b]
6,000	30	5	50.00 ± 2.35 [c]	53.33 ± 2.36 [c]
7,000	30	5	79.33 ± 2.79 [d]	83.33 ± 2.36 [d]
10,000	30	5	87.34 ± 1.49 [e]	90.67 ± 1.49 [e]

หมายเหตุ [1] ชุดควบคุม A (น้ำกลั่นแบบกลั่น 2 ครั้ง)

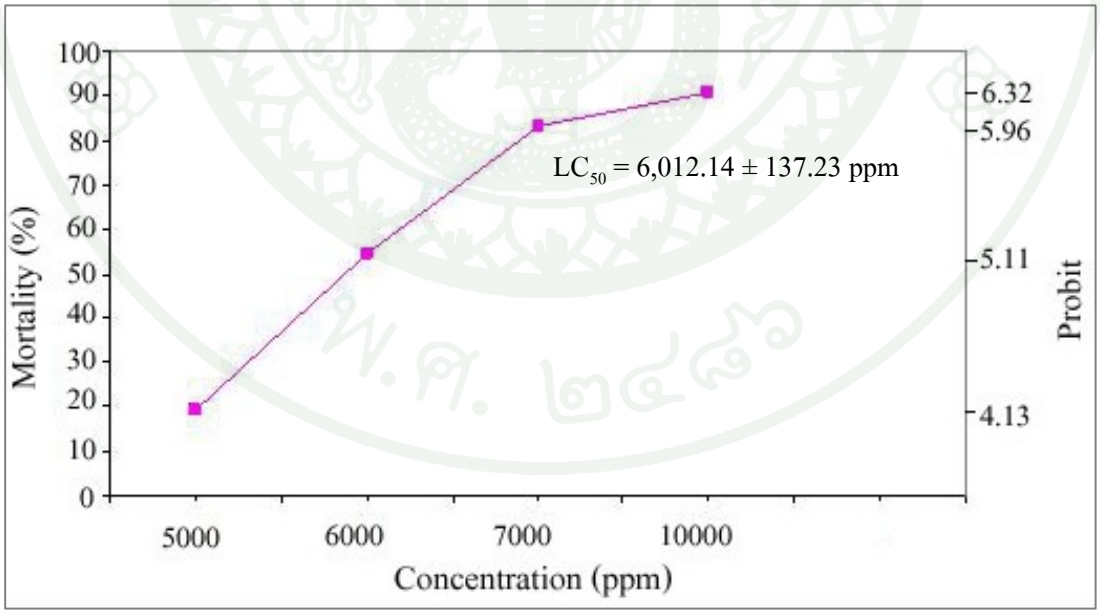
[2] ชุดควบคุม B (แอซิโทน 20%)

[-3] ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ตามด้วยตัวอักษรอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 29 ผลความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้นต่างกันต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 30 ผลความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้นต่างกันต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 48 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน ไดคลอมีเทน เอทิลแอซิเทต และเอทานอล 95% ต่อแมลงวันผลไม้พบว่าส่วนของสารสกัดเฮกเซนแสดงความเป็นพิษสูงสุด รองลงมาคือ สารสกัดจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% เอทิลแอซิเทต และ ไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ โดยพิจารณาจากค่า LC_{50} (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบค่า LC_{50} ของแมลงวันผลไม้หลังจากได้รับสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดได้จากตัวทำละลายที่มีลำดับขั้วแตกต่างกันในเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

สารสกัด	ค่า LC_{50} (ppm)[(1), (2)]	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
เฮกเซน	4,866.06 ± 184.52[a]	4,357.76 ± 194.82[a]
ไดคลอโรมีเทน	24,156.66 ± 880.33[d]	22,599.18 ± 915.26[d]
เอทิลแอซิเทต	16,744.73 ± 641.27[c]	14,778.32 ± 584.13[c]
เอทานอล 95%	6,337.54 ± 145.42[b]	6,012.14 ± 137.23[b]

หมายเหตุ [(1)] ค่า LC_{50} คือ ระดับความเข้มข้นที่ทำให้สิ่งมีชีวิตตายเป็นจำนวน 50 เปอร์เซ็นต์

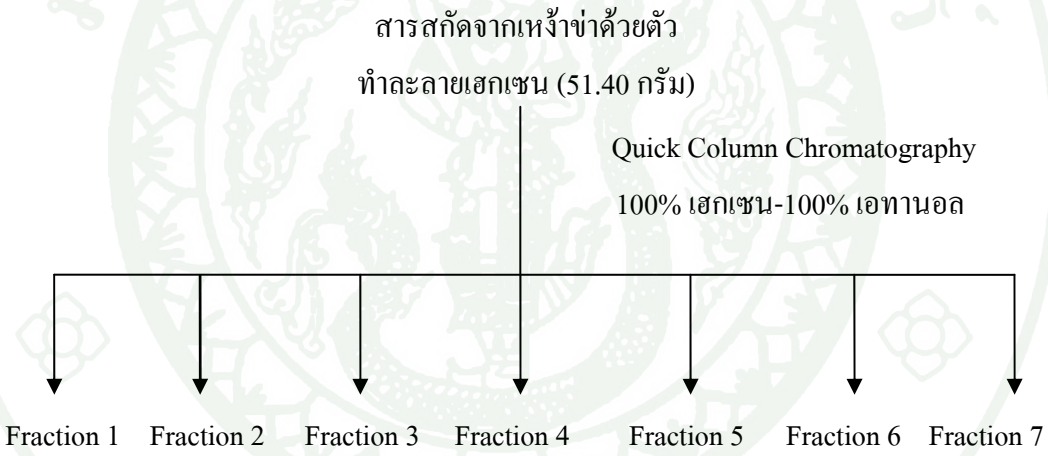
[(2)] ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ตามด้วยตัวอักษรอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test

3. ผลการแยกสารออกฤทธิ์สารสกัดจากเหง้าข่า และการทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์

จากการทดสอบแยกสารออกฤทธิ์ด้วยวิธีควิกคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Quick Column Chromatography) สามารถแยกได้สาร 7 fraction (ภาพที่ 31 และตารางที่ 7) และจากการทดสอบกับแมลงวันผลไม้โดยวิธีการพ่นถูกตัวแบบฝอยหมอกด้านบนแล้วตรวจนับผลที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ใช้แมลงวันผลไม้จำนวน 30 ตัวต่อซ้ำ พบว่า fraction 1 ให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงสุด เท่ากับ 71.33 ± 2.97 และ 74.67 ± 2.98 เปอร์เซ็นต์ ที่ช่วงเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 8) และเมื่อนำ fraction 1 (2.16 กรัม) ไปแยกให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) สามารถรวม fraction ที่เหมือนกันได้ 3 fraction คือ fraction 1-1 (0.37 กรัม), 1-2 (0.17 กรัม) และ1-3 (0.33 กรัม) ซึ่งเป็นของเหลวสีเหลืองที่ไม่บริสุทธิ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แล้วนำ fraction ทั้ง 3 ไปแยกให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี Preparative Thin Layer Chromatography และพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ทั้งหมดที่แยกได้โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีจาก ^{1}H-NMR และ^{13}C-NMR ได้สารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญ 2 ตัว คือ *E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether เป็นเหลวไม่มีสี (43.50 มิลลิกรัม) และ *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน (38.50 มิลลิกรัม) (ตารางที่ 9, 10 และภาพที่ 32-38) จากนั้นนำสารประกอบดังกล่าวไปทดสอบกับแมลงวันผลไม้พบว่าสารทั้ง 2 ให้ประสิทธิภาพความเป็นพิษต่อแมลงวันผลไม้ (ตารางที่ 11-13 และภาพที่ 39-42) โดย *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol มีค่า LC_{50} ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 3,654.52 ± 168.11 และ 3,441.47 ± 157.63 ppm ตามลำดับ ซึ่งแสดงความเป็นพิษสูงกว่า *E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether ซึ่งมีค่า LC_{50} ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 4,044.51 ± 174.58 และ 3,827.56 ± 190.52 (ตารางที่ 13)



ภาพที่ 31 การแยกสารออกฤทธิ์สารสกัดจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 การแยกสารออกฤทธิ์สารสกัดจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

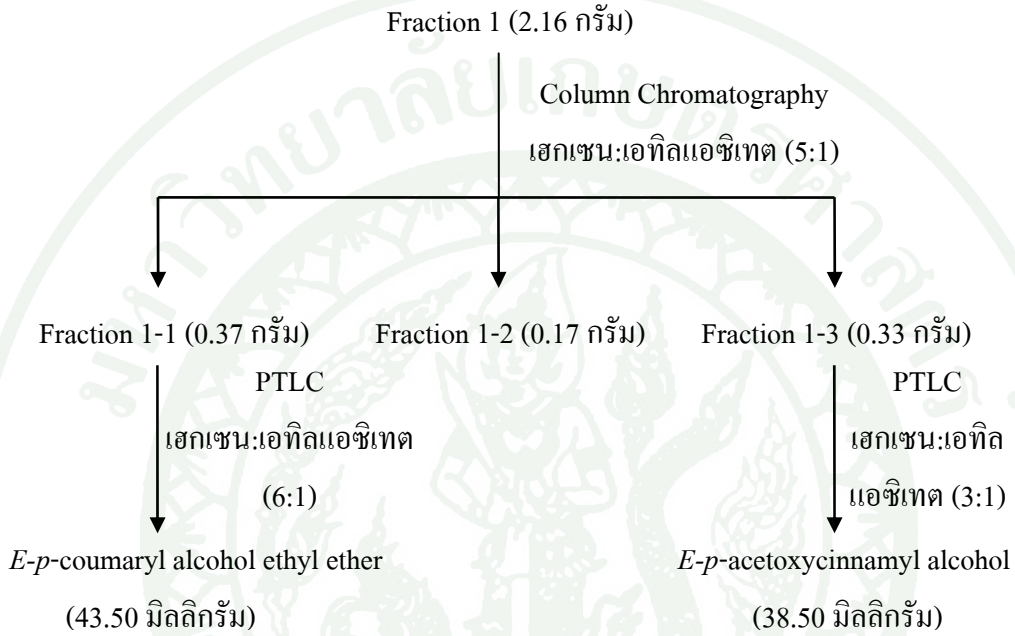
Fraction	ระบบตัวทำละลาย	ลักษณะที่สังเกตเห็น	น้ำหนัก (กรัม)
1	100% เฮกเซน-90% ไดคลอโรมีเทน: เอทิลแอซิเทต	ของเหลวหนืดสีเหลือง	2.16
2	80% ไดคลอโรมีเทน:เอทิลแอซิเทต-60% ไดคลอโรมีเทน:เอทิลแอซิเทต	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.47
3	60% ไดคลอโรมีเทน:เอทิลแอซิเทต	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.12
4	50% ไดคลอโรมีเทน:เอทิลแอซิเทต	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.26
5	50% ไดคลอโรมีเทน:เอทิลแอซิเทต-30% ไดคลอโรมีเทน:เอทิลแอซิเทต	ของเหลวหนืดสีเหลืองออกน้ำตาล	0.83
6	20% ไดคลอโรมีเทน:เอทิลแอซิเทต-100% เอทิลแอซิเทต	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.45
7	90% เอทิลแอซิเทต:เอทานอล-100% เอทานอล	ของเหลวสีน้ำตาลออกเหลือง	15.16

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้หลังจากได้รับสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าแต่ละ fraction ที่ความเข้มข้นระดับ LC_{50} (4,866.06 ppm) ใน เวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

Fraction	จำนวนสัตว์ทดลอง/ซ้ำ	จำนวนซ้ำ	% การตายเฉลี่ย[(1)]	
			24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
1	30	5	71.33 ± 2.97^{f}	74.67 ± 2.98^{f}
2	30	5	41.33 ± 3.80^{e}	42.00 ± 2.98^{e}
3	30	5	32.67 ± 2.78^{d}	34.00 ± 2.79^{d}
4	30	5	26.00 ± 2.79^{c}	28.67 ± 1.82^{c}
5	30	5	14.00 ± 2.79^{a}	14.67 ± 3.80^{a}
6	30	5	19.33 ± 2.78^{b}	22.00 ± 1.82^{b}
7	30	5	20.67 ± 2.78^{b}	22.66 ± 1.48^{b}

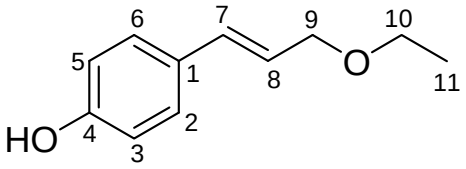
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หมายเหตุ [1] ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ตามด้วยตัวอักษรอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 32 การแยกสารสกัดจากเหง้าข่า fraction 1 (fraction ที่ออกฤทธิ์สูงสุด)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

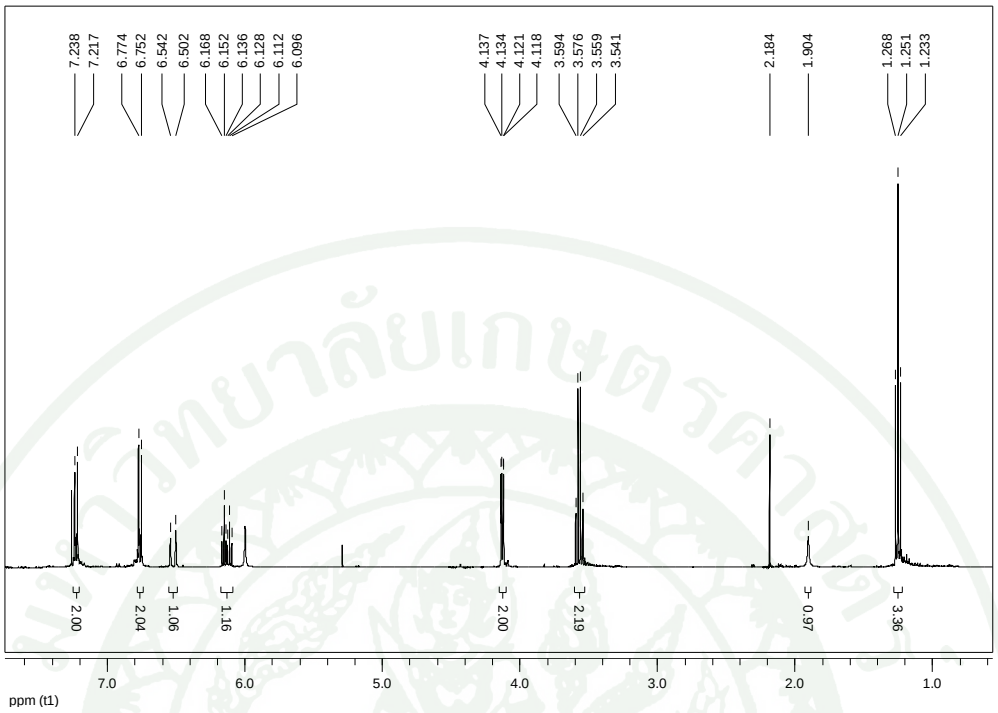


ภาพที่ 33 โครงสร้างทางเคมีของ *E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether

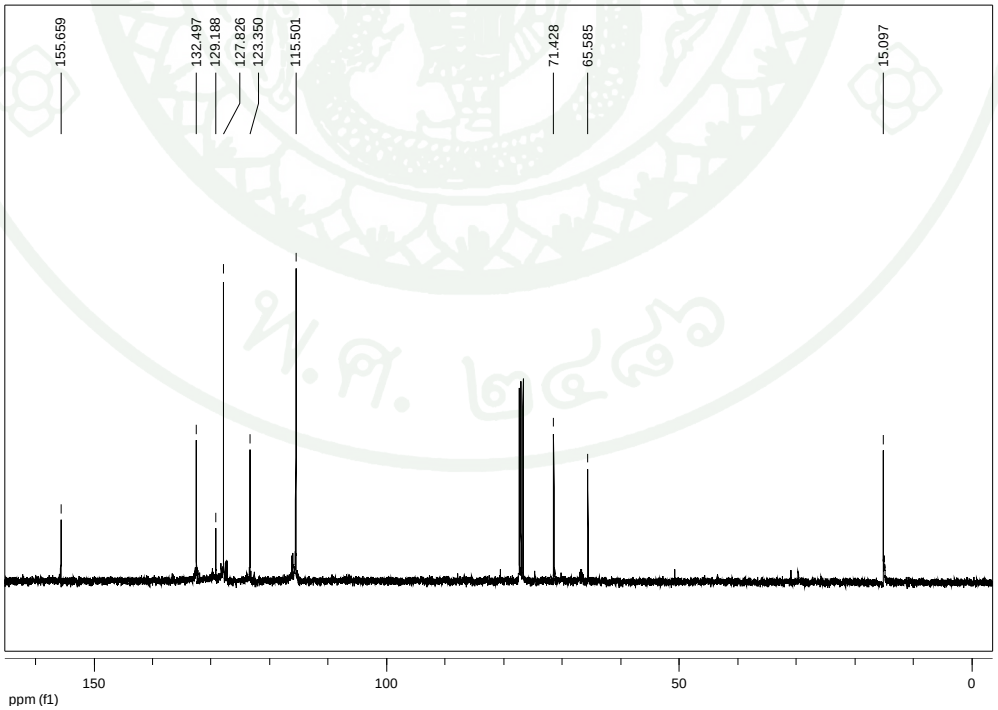
ตารางที่ 9 ข้อมูลสเปกตรัมของ ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของ *E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether

ตำแหน่ง	^{1}H NMR	^{13}C NMR
1	-	129.2
2,6	7.23 (2H, d, *J* = 8.4 Hz)	127.8
3,5	6.76 (2H, d, *J* = 8.8 Hz)	115.5
4	-	155.7
7	6.52 (1H, d, *J* = 16 Hz)	132.5
8	6.13 (1H, dt, *J* = 16, 6.4 Hz)	123.4
9	4.13 (2H, dd, *J* = 6.4, 1.2 Hz)	71.4
10	3.56 (2H, q, *J* = 7.2 Hz)	65.6
11	1.25 (3H, t, *J* = 7.2 Hz)	15.1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

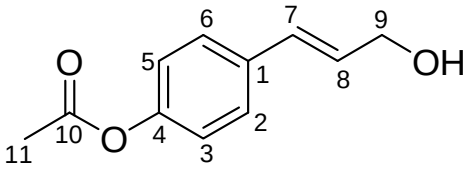


ภาพที่ 34 สเปกตรัมของ ^{1}H-NMR ของ *E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether



ภาพที่ 35 สเปกตรัมของ ^{13}C-NMR ของ *E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

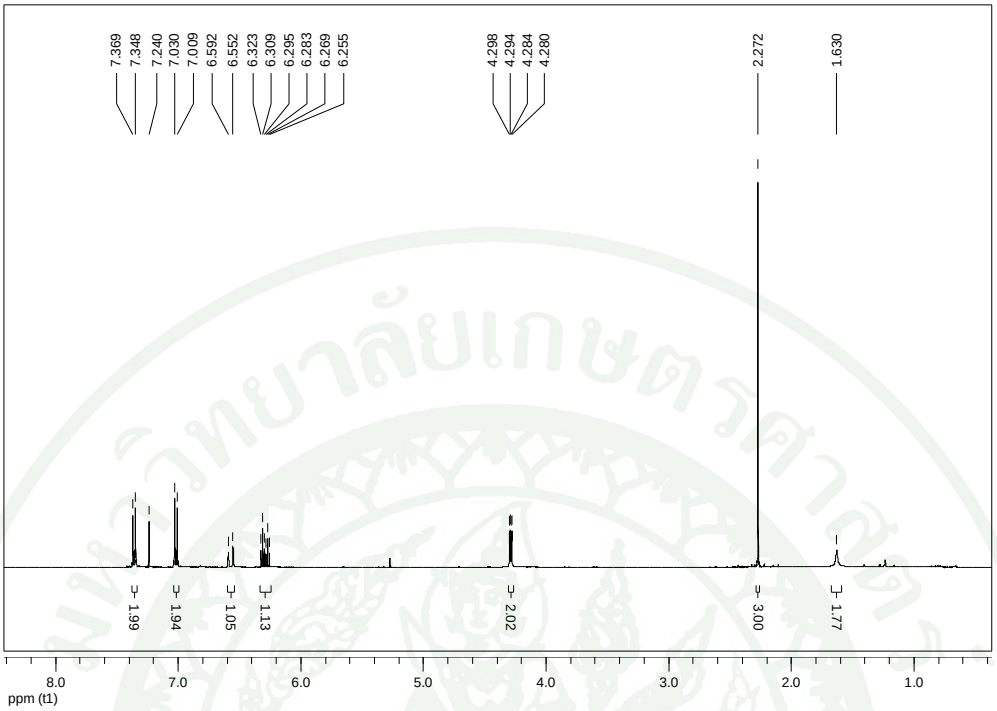


ภาพที่ 36 โครงสร้างทางเคมีของ *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol

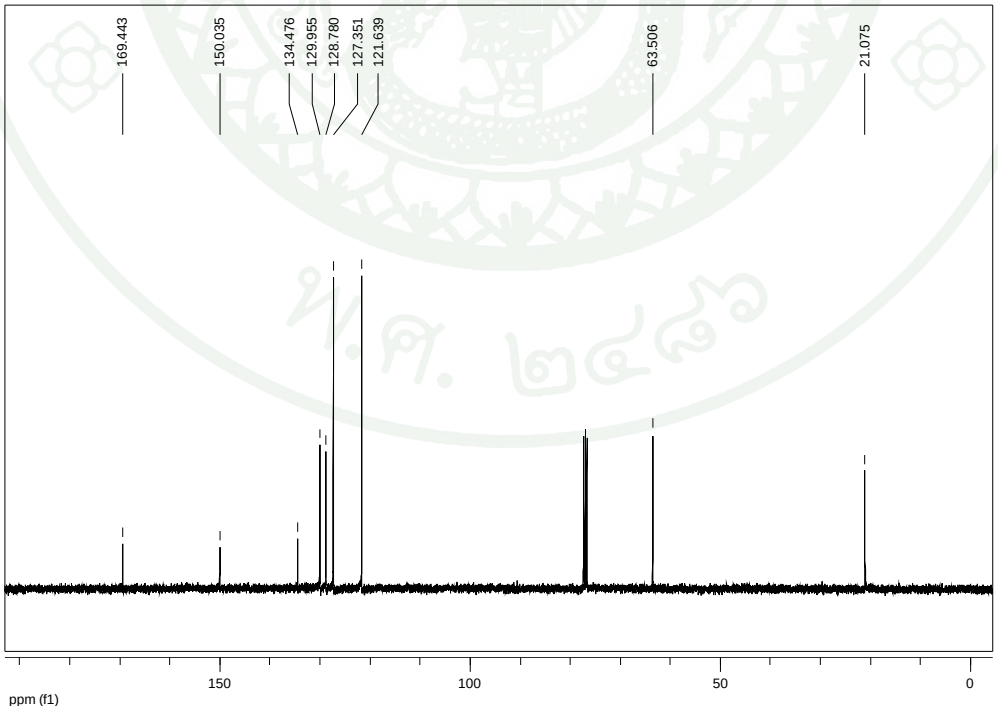
ตารางที่ 10 ข้อมูลสเปกตรัมของ ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของ *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol

ตำแหน่ง	^{1}H NMR	^{13}C NMR
1	-	134.5
2,6	7.35 (2H, d, *J* = 8.4 Hz),	127.4
3,5	7.02 (2H, d, *J* = 8.4 Hz)	126.1
4	-	150.0
7	6.57 (1H, d, *J* = 16 Hz)	130.0
8	6.28 (1H, dt, *J* = 16, 5.6 Hz)	128.8
9	4.29 (2H, dd, *J* = 5.6, 1.6 Hz)	63.5
10	-	169.4
11	2.27 (3H, s)	21.1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 37 สเปกตรัมของ ^{1}H-NMR ของ *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol



ภาพที่ 38 สเปกตรัมของ ^{13}C-NMR ของ *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

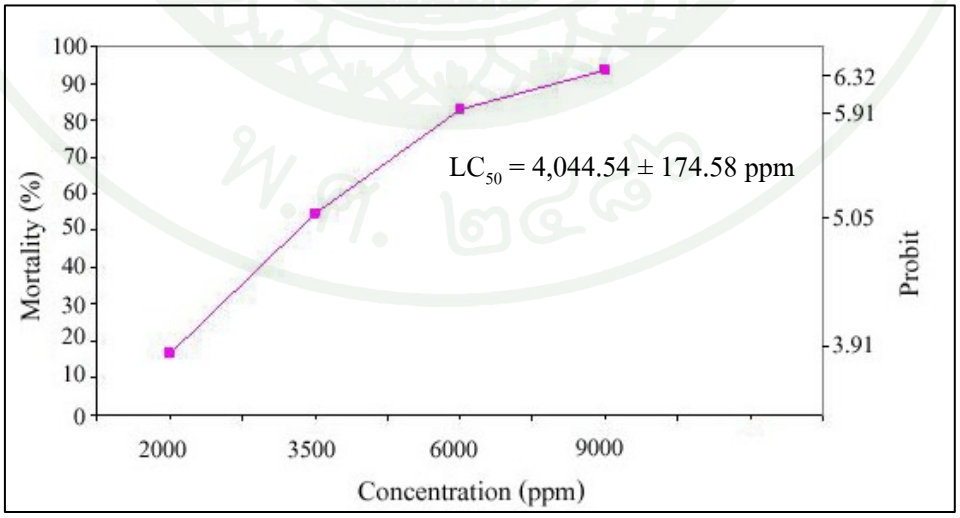
ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้หลังจากได้รับสาร *E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether ที่ความเข้มข้นต่างกันในเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (ppm)	จำนวนสัตว์ทดลอง/ซ้ำ	จำนวนซ้ำ	% การตายเฉลี่ย[3]	
			24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
0[1]	30	5	0.00 ± 0.00 [a]	0.00 ± 0.00 [a]
0[2]	30	5	0.00 ± 0.00 [a]	0.00 ± 0.00 [a]
2,000	30	5	13.99 ± 1.49 [b]	16.67 ± 2.35 [b]
3,500	30	5	51.99 ± 1.82 [c]	54.67 ± 1.83 [c]
6,000	30	5	81.99 ± 1.82 [d]	82.67 ± 2.78 [d]
9,000	30	5	90.67 ± 2.78 [e]	93.33 ± 2.35 [e]

หมายเหตุ [1] ชุดควบคุม A (น้ำกลั่นแบบกลั่น 2 ครั้ง)

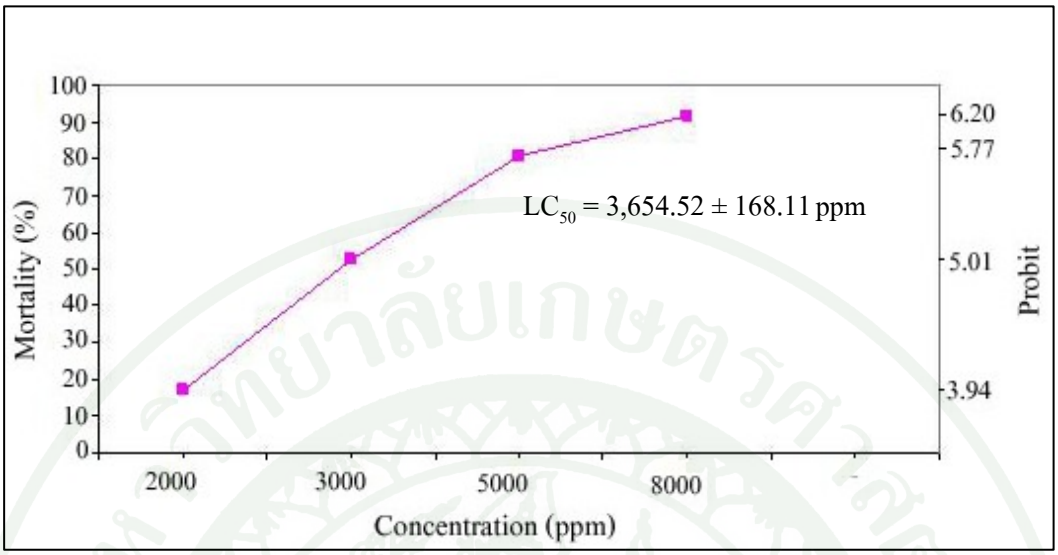
[2] ชุดควบคุม B (แอซิโทน 20%)

[3] ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ตามด้วยตัวอักษรอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test

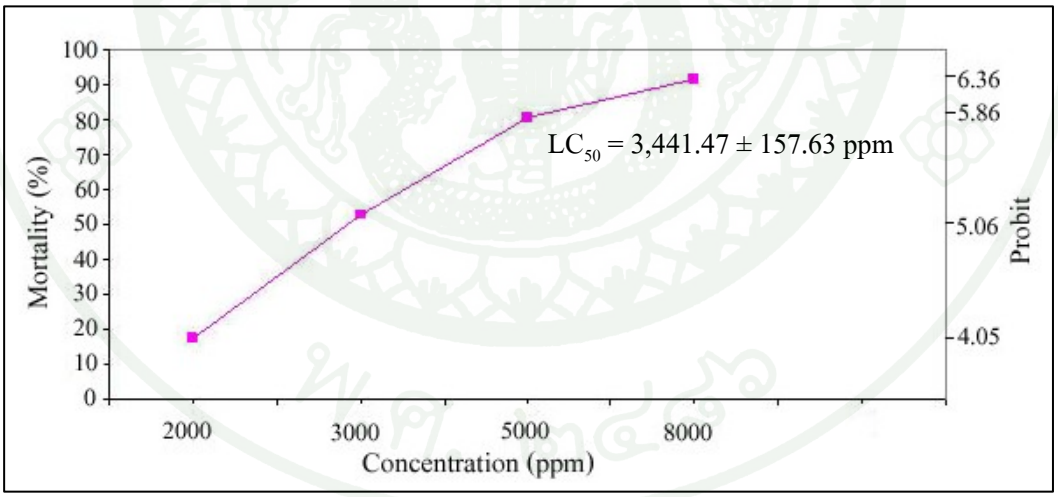


ภาพที่ 39 ผลความเป็นพิษของสาร *E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether ที่ความเข้มข้นต่างกันต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 41 ผลความเป็นพิษของสาร *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol ที่ความเข้มข้นต่างกัน ต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 42 ผลความเป็นพิษของสาร *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol ที่ความเข้มข้นต่างกัน ต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 48 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบค่า LC_{50} ของแมลงวันผลไม้หลังจากได้รับสารสกัดบริสุทธิ์บางส่วนจากเหง้าข่าในเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

สารสกัด	ค่า LC_{50} (ppm)[(1), (2)]	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
E-p-coumaryl alcohol ethyl ether	4,044.51 ± 174.58[a]	3,827.56 ± 190.52[a]
E-p-acetoxycinnamyl alcohol	3,654.52 ± 168.11[b]	3,441.47 ± 157.63[b]

หมายเหตุ [(1)] ค่า LC_{50} คือ ระดับความเข้มข้นที่ทำให้สิ่งมีชีวิตตายเป็นจำนวน 50 เปอร์เซ็นต์

[(2)] ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ตามด้วยตัวอักษรอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้วิธี t-test

4. ผลของสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนต่อระดับเอนไซม์ทำลายพิษในแมลงวันผลไม้

4.1 เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส

หลังจากให้สารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนต่อแมลงวันผลไม้จากการตรวจวัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรสโดยใช้ paranitrophenyl acetate (*p*NPA) เป็นสารตั้งต้นตรวจวัดโดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร ผลจากกการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของสาร paranitrophenyl acetate (*p*NPA) ไปเป็น paranitrophenol ทำให้สารละลายเปลี่ยนจากใสไม่มีสีเป็นสารละลายสีเหลือง การทดลองแบ่งการทดสอบเป็น 2 ชุด คือ ชุดควบคุม และชุดที่ใส่สารละลายที่ระดับ LC_{50} คือ 4,866.06 ppm ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลองโดยผลของระดับเอนไซม์ carboxylesterase activity เท่ากับ 4.91 ± 1.17 และ 1.52 ± 0.21 nM paranitrophenol/ mg protein/ min ที่ชุดควบคุมและชุดที่ใส่ตัวทำละลายที่ระดับ LC_{50} ตามลำดับ (ตารางที่ 14) ซึ่งระดับเอนไซม์ในชุดควบคุม และชุดที่ใส่สารละลายที่ระดับ LC_{50} คือ 4,866.06 ppm มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยมีค่า CF เท่ากับ 3.23 แสดงว่าสารสกัดจากเหง้าข่ามีผลยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับเอนไซม์เอนไซม์ทำลายพิษคาร์บอกซิลเอสเทอเรสของแมลงวันผลไม้ที่รอดชีวิตหลังการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยทำละลายเฮกเซนในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเหง้าข่า (ppm)	จำนวนซ้ำ	ระดับเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส [2] (nM paranitrophenol/ mg protein/ min)	CF [3]
0[1]	5	4.91 ± 1.17^{a}	-
4,866.06	5	1.52 ± 0.20^{b}	3.23

หมายเหตุ [1] คือ ชุดควบคุม (แอซิโทน 20%)

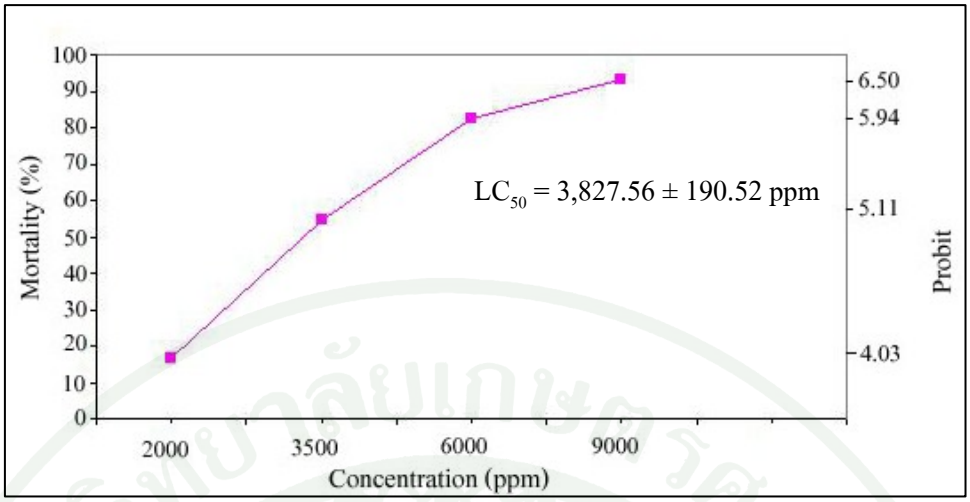
[2] คือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ตามด้วยอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้วิธี t-test

[3] คือ correction factor = (enzyme activity of control)/ (enzyme activity of treatment)

4.2 เอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรสในแมลงวันผลไม้

หลังจากให้สารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนต่อแมลงวันผลไม้จากการตรวจวัดระดับเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส โดยใช้ chlorodinitrobenzene (CDNB) เป็นสารตั้งต้นตรวจวัดโดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร การทดลองแบ่งการทดสอบเป็น 2 ชุด คือชุดควบคุม และชุดที่ใส่สารละลายที่ระดับ LC_{50} คือ 4,866.06 ppm ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งการทดลองทำทั้งหมด 5 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลองโดยผลของระดับเอนไซม์ glutathione S-transferase activity เท่ากับ 0.39 ± 0.03 และ 0.34 ± 0.03 CDNB conjugated product/ mg protein/ min ที่ชุดควบคุม และชุดที่ใส่ตัวทำละลายที่ระดับ LC_{50} ตามลำดับ (ตารางที่ 15) ซึ่งระดับเอนไซม์ในชุดควบคุม และชุดที่ใส่สารละลายที่ระดับ LC_{50} คือ 4,866.06 ppm ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทั้งนั้นสารสกัดจากข่ามีผลในการยับยั้งปฏิกิยาของเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส โดยมีค่า CF เท่ากับ 1.14

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 40 ผลความเป็นพิษของสาร *E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether ที่ความเข้มต่างกันต่อเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 12 ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้หลังจากได้รับสาร *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol ที่ความเข้มข้นต่างกันในเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (ppm)	จำนวนสัตว์ทดลอง/ซ้ำ	จำนวนซ้ำ	% การตายเฉลี่ย[(-3)]	
			24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
0 [(1)]	30	5	0.00 ± 0.00 [a]	0.00 ± 0.00 [a]
0 [(2)]	30	5	0.00 ± 0.00 [a]	0.00 ± 0.00 [a]
2,000	30	5	14.67 ± 1.83 [b]	17.34 ± 1.49 [b]
3,000	30	5	50.67 ± 2.79 [c]	52.67 ± 2.79 [c]
5,000	30	5	78.00 ± 1.82 [d]	80.67 ± 1.49 [d]
8,000	30	5	88.67 ± 1.82 [e]	91.33 ± 1.82 [e]

หมายเหตุ [(1)] ชุดควบคุม A (น้ำกลั่นแบบกลั่น 2 ครั้ง)

[(2)] ชุดควบคุม B (แอซิโทน 20%)

[(3)] ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ตามด้วยตัวอักษรอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 15 ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับเอนไซม์ทำลายพิษกลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส ของแมลงวันผลไม้ที่รอดชีวิตหลังการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเหง้าข่า (ppm)	จำนวนซ้ำ	ระดับเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส[2] (CDNB conjugated product/mg protein/ min)	CF[3]
0[1]	5	0.39 ± 0.03^{a}	-
4,866.06	5	0.34 ± 0.03^{a}	1.14

หมายเหตุ [1] คือ ชุดควบคุม (แอซิโทน 20 %)

[2] คือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันภายในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้วิธี t-test

[3] คือ correction factor = (enzyme activity of control)/ (enzyme activity of treatment)

5. ผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนของแมลงวันผลไม้

หลังจากให้สารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนต่อแมลงวันผลไม้ ทำการทดสอบการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนโดยวิธีการ Bradford ซึ่งการทดลองแบ่งการทดสอบเป็น 2 ชุด คือ ชุดควบคุม และชุดที่ใส่สารละลายที่ระดับ LC_{50} คือ 4,866.06 ppm ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งการทดลองทำทั้งหมด 5 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลองพบว่าปริมาณโปรตีนมีค่าเท่ากับ 1.514 ± 0.162 และ 1.677 ± 0.082 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 16) ซึ่งปริมาณโปรตีนในชุดควบคุม และชุดที่ใส่สารละลายที่ระดับ LC_{50} คือ 4,866.06 ppm ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 16 ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตารฐานของปริมาณโปรตีนของแมลงวันผลไม้ที่รอดชีวิตหลังการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากเหง้าข่าที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเหง้าข่า (ppm)	จำนวนซ้ำ	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)[2]
0[1]	5	1.514 ± 0.162^{a}
4,866.06	5	1.677 ± 0.082^{a}

หมายเหตุ [1] ชุดควบคุม (แอซิโทน 20 %)

[2] ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ตามด้วยตัวอักษรอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้วิธี t-test

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิจารณ์

จากการนำเหง้าข่าสดมาล้างด้วยน้ำจนสะอาดหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันเชื้อราและโรคพืชติดมา เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้อาจถูกสกัดออกมาพร้อมกับสารที่ต้องการอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการชีวสังเคราะห์ในพืช ทำให้ได้สารที่ได้แตกต่างออกไปจากธรรมชาติ และการสกัดต้องนำเหง้าข่าไปบดให้ละเอียดทั้งนี้เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของเหง้าข่าให้สามารถได้สัมผัสกับตัวทำละลายได้มากขึ้น จากนั้นนำไปสกัดโดยวิธี soxhlet extraction ด้วยตัวทำละลายที่มีลำดับขั้วแตกต่างกัน ได้แก่ตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเทต และเอทานอล 95% เพื่อดูความแตกต่างของสารออกฤทธิ์จากตัวทำละลาย เพราะสารแต่ละตัวมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายต่างกัน เมื่อสกัดเสร็จแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง Rotary vaccuum evaporator (BUCHI R-215) ผลการสกัดพบว่าสารสกัดจากเหง้าข่าด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนให้ปริมาณสารสกัดออกมาน้อยสุด คือ 0.27% w/w และให้สารสกัดหยาบออกมามากที่สุดเมื่อใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลายในการสกัด 10.24 % w/w แล้วจึงปรับความเข้มข้นเพื่อหาค่าความเป็นพิษต่อแมลงวันผลไม้

อย่างไรก็ตามการทดลองนี้สารสกัดเหง้าข่าจากตัวทำละลายแต่ละชนิดจะมีความเป็นพิษต่อตัวเต็มวัยของแมลงวันผลไม้แตกต่างกันโดยจะขอแยกเป็นหัวข้อตามการศึกษา ดังนี้

1. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเหง้าข่าต่อแมลงวันผลไม้

จากการศึกษาเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในระยะตัวเต็มวัยผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากเหง้าข่าด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกันให้ค่าการตายของแมลงวันผลไม้ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) แตกต่างกัน โดยค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง ของสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเทต และเอทานอล 95% มีค่าเท่ากับ 4,866.06 ± 184.52, 24,156.66 ± 880.33, 16,744.73 ± 641.27 และ 6,337.54 ± 145.42 ppm ตามลำดับ และที่เวลา 48 ชั่วโมง ให้ค่า LC_{50} เท่ากับ 4,357.76 ± 194.82, 22,599.18 ± 915.26, 14,778.32 ± 584.13 และ 6,012.14 ± 137.23 ppm (ตารางที่ 6) ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากค่า LC_{50} พบว่าสารสกัดจากเหง้าข่าด้วยตัวทำละลายเฮกเซนมีความเป็นพิษสูงสุด รองลงมา คือ สารสกัดจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% เอทิลแอซิเทต และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของทิพนาถ (2550) ซึ่งใช้สารสกัดจากหางไหล (*Derris elliptica* Benth) สารสกัดจากเมล็ดน้อยหน่า (*Annona squamosa* L.) และประคำดีควาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(*Sapindus rarak* DC.) ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ในการควบคุมแมลงวันผลไม้โดยพบว่าสารสกัดจากหางไหลมีค่า LC_{50} ที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 13,500 และ 11,900 ppm ส่วนสารสกัดจากเมล็ดน้อยหน่ามีค่า LC_{50} ที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 30,900 และ 29,200 ppm และประคำดีควายมีค่า LC_{50} ที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 40,800 และ 37,300 ppm แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเทต และเอทานอล 95% มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้สูงกว่าสารสกัดจากเมล็ดน้อยหน่า และประคำดีควาย ส่วนสารสกัดจากหางไหลมีประสิทธิภาพสูงกว่าสารสกัดจากข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ไดคลอโรมีเทน และเอททิลแอซิเทต แสดงให้เห็นว่าแม้จะเป็นพืชชนิดเดียวกันเมื่อใช้ตัวทำละลายต่างกันวิธีการในการสกัดต่างกันจะให้ความรุนแรงของความเป็นพิษแตกต่างกัน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Areekul *et al* (1987) ที่ใช้สารสกัดจากพืชหลายชนิดทดสอบความเป็นพิษกับแมลงวันผลไม้พบว่าพืชที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การตายที่ 24 ชั่วโมงสูง ได้แก่ สารสกัดจากข่าเล็ก (*Alpinia officinarum*) ด้วยวิธี cold rolling ที่มีเอทานอล และเฮกเซนเป็นตัวทำละลายจะให้เปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 86 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่วิธี cold rolling ด้วยน้ำให้เปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 37 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากเมล็ดน้อยหน่าสด (*Annona squamosa*) ด้วยวิธีต้มกลั่นด้วยน้ำ ให้เปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 73 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากผลสลอดสด (*Croton tiglium*) ด้วยวิธี cold rolling ที่มีน้ำ และแอซิโทนเป็นตัวทำละลายให้เปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 100 และ 97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สารสกัดจากพญาไร้ใบสด (*Euphorbia tirucalli*) ด้วยวิธี cold rolling ที่มีเฮกเซนเป็นตัวทำละลายจะให้เปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากแสยกสด (*Pedilanthus tithymaloid*) ด้วยวิธี cold rolling ที่มีเอทานอล และเฮกเซนเป็นตัวทำละลายให้เปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 97 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่วิธี cold rolling ด้วยน้ำให้เปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากเมล็ดพริกไทยดำแห้ง (*Piper nigrum*) ด้วยวิธี soxhlet extraction ที่มีปิโตรเลียมอีเธอร์เป็นตัวทำละลายให้เปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากดอกบัวตอง (*Tithonia diversifolia*) ด้วยวิธีต้มกลั่นด้วยน้ำ ให้เปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากเหง้าขิงสด (*Zingiber officinale*) ด้วยวิธีต้มกลั่นด้วยน้ำ ให้เปอร์เซ็นต์เท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องมาจากมีปัจจัยหลายอย่างเข้ามาเกี่ยวข้องซึ่งเป็นผลสืบเนื่องมาจากกลไกที่แตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตที่สัมพันธ์กับสารพิษโดยมีปัจจัยที่มีผลต่อความเป็นพิษ คือปัจจัยทางด้านชีวภาพ เช่น ชนิด อายุ เพศ ความแตกต่างของชนิด อายุ เพศสัตว์จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบภายในตัวเองแตกต่างกันไป ปัจจัยทางด้านกายภาพ ปัจจัยทางด้านเคมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(Visetson, 1991) การศึกษาของอัศวิน (2538) ใช้สารสกัดข่า (*Alipinia galanga* (Linn.) Sw.) ผสมน้ำแล้วฉีดพ่นหนอนแมลงวัน (*Musca domestica*) หลังจาก 24 ชั่วโมง พบว่าหนอนแมลงวันที่ถูกพ่นด้วยสารสกัดข่าอัตราส่วน (ข่า:น้ำ) 1:5 และ 1:10 ตาย 100 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน 1:15 ตาย 20.5 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากข่ามีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดหนอนแมลงวันเมื่อใช้ในอัตราส่วนที่เหมาะสมเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Hsu *et al*. (2004a) ซึ่งใช้สารมาลาไธออนในการกำจัดแมลงวันผลไม้พบว่ามีค่า LD_{50} เท่ากับ 53.5 ng ต่อ 1 ตัว แสดงให้เห็นว่าสารมาลาไธออนมีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้สูงกว่าสารสกัดจากข่า การใช้สารเคมีแม้จะให้ผลรวดเร็วแต่ก่อให้เกิดพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม และหากใช้เป็นเวลานานอาจก่อให้เกิดการดื้อยาของแมลงวันผลไม้ได้ (Brow and Payne, 1988) แต่การใช้สารสกัดจากพืชจะไม่ก่อให้เกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อมเพราะสลายตัวได้เร็วเมื่อสัมผัสแสง (Barnby *et al*., 1989) ฤทธิ์ของสารสกัดจากข่าจากผลการทดลองนี้แตกต่างจากการศึกษาของ Areekul *et al*.(1988a) ซึ่งศึกษาประสิทธิภาพจากสารสกัดจากพืชในการเป็นสารไล่ (Repellent) แมลงวันผลไม้ไม่ให้วางไข่ที่สกัดด้วยวิธี soxhlet extraction, cold rolling และต้มกลั่นด้วยน้ำ จากนั้นนำสารสกัดปริมาตร 2 มิลลิลิตรทดสอบกับตัวเต็มวัยโดยวิธีการพ่นถูกตัวแบบฝอยหมอก พบว่าพืชที่มีประสิทธิภาพสูงในการไล่แมลงวันผลไม้ไม่ให้วางไข่ได้แก่ สารสกัดจากสะเดา (*Azadirachta indica* var. *siamensis* Veleton) คำแสด (*Bixa orellana* Linn.) มะกรูด (*Citrus hystrix* D.C.) แตงไทย (*Cucumis melo* Linn.) ตะไคร้ (*Cymbopogon citrates* Stapf.) ข่าดง (*Hedychium coccineum* var. *angustifolium* Roxb.) หญ้างวงช้าง (*Heliotropium indieum* R. Br.) ว่านเสน่ห์จันทร์เขียว (*Homalomena* sp) ยี่หร่า (*Ocimum gratissimum* Linn.) ละหุ่ง (*Ricinus communis* Linn.) ไก่แดง (*Ternstroemia japonica* Thum) รวมทั้งในพืชบางชนิดที่มีสารดึงดูดแมลงวันผลไม้ซึ่งทำการทดสอบโดยนำสำลีชุบสารสกัดปริมาตร 2 มิลลิลิตรใส่ในกล่องกับดักพบว่าสารที่มีประสิทธิภาพในการเป็นสารดึงดูดสูงซึ่งได้แก่ พลับพลึง (*Crinum asiaticum* Linn.) สาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia sequine* Scott.) ยี่โถ (*Nerium indicum* Mill.) กระเพรา (*Ocimum sanctum* Linn.) บัวตอง (*Thitonia diversifolia* Gray) และชำมะนาด (*Vallaris graba* Ktze) (Areekul *et al*., 1988b) จึงจะเห็นได้ว่ามีสารสกัดจากพืชมากมายที่มีฤทธิ์ในการใช้ในการควบคุมแมลงวันผลไม้ทั้งนี้จำเป็นจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น สารออกฤทธิ์หลัก กลไก ผลกระทบต่อสัตว์กลุ่มที่ไม่ใช่เป้าหมาย เพื่อใช้ในการพัฒนาการควบคุมที่สมดุลต่อไปในอนาคต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ผลการแยกสารออกฤทธิ์สารสกัดจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

เมื่อนำสารสกัดจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนมาแยกส่วนให้บริสุทธิ์เพื่อหาองค์ประกอบสารออกฤทธิ์ด้วยวิธีควิกคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งเป็นการแยกสารโดยใช้แรงดันจากปั๊มซึ่งเหมาะสำหรับการแยกสารสกัดหยาบ เนื่องจากสามารถแยกสารที่มีขั้วใกล้เคียงกันออกมาในปริมาณมากและรวดเร็ว โดยเริ่มชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว หลังจากนั้นค่อยๆ เพิ่มขั้วของตัวทำละลายไปเรื่อยๆ จากนั้นนำตัวทำละลายที่ได้จากการชะมาทำการตรวจสอบด้วยวิธี TLC เพื่อทำการรวบรวม fraction ที่มีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายคลึงกันพบว่าสามารถแยกสารได้ทั้งหมด 7 fraction เมื่อนำสารสกัดทั้ง 7 fraction มาทดสอบประสิทธิภาพพบว่า fraction 1 ออกฤทธิ์สูงสุด จึงนำสารสกัด fraction ดังกล่าวไปแยกสารด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้องค์ประกอบทางเคมีที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันได้ 3 fraction แล้วนำ fraction ทั้ง 3 ไปแยกให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี Preparative Thin Layer Chromatography เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ วิธีนี้เหมาะกับการแยกสารปริมาณน้อย (ประมาณ 50 มิลลิกรัม/TLC ขนาด 20×20 เซนติเมตร 1 แผ่น) ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีการแยกสารที่สะดวกและรวดเร็วเนื่องจากสามารถตรวจสอบตำแหน่งของสารที่ต้องการได้จากการใช้ uv lamp ได้สารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญ 2 ตัว และพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ดังกล่าวโดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี เช่น ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR พบว่าสารทั้ง 2 ตัว คือ *E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether และ *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol จากนั้นนำสารทั้ง 2 ตัวไปทดสอบกับแมลงวันผลไม้ พบว่า *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol แสดงความเป็นพิษสูงกว่า *E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether โดยพิจารณาจากค่า LC_{50} โดย *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol มีค่า LC_{50} ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 3,654.52 ± 168.11 และ 3,441.47 ± 157.63 ppm ตามลำดับ แสดงความเป็นพิษสูงกว่า *E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether ซึ่งมีค่า LC_{50} ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 4,044.51 ± 174.58 และ 3,827.56 ± 190.52 ppm

3. ผลของสารสกัดจากเหง้าข่าต่อระดับเอนไซม์ทำลายพิษของแมลงวันผลไม้

จากการศึกษาผลของสารสกัดจากเหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนต่อการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาของเอนไซม์ทำลายพิษคาร์บอกซิลเอสเทอเรส และกลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส จากการนำแมลงวันผลไม้ที่รอดชีวิตจากการได้รับสารสกัดจากข่าด้วยตัวทำละลายเฮกเซนในช่วงเวลา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

24 ชั่วโมงที่ 2 ระดับความเข้มข้น คือ ชุดควบคุม (แอซิโทน 20%) และชุดที่ใส่สารละลายที่ระดับ LC_{50} คือ 4,866.06 ppm พบว่าสารสกัดนี้ยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส 3.23 เท่า (ตารางที่ 14) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของทิพนาถ (2550) หลังจากแมลงวันผลไม้ได้รับสารสกัดจากหางไหล (*Derris elliptica* Benth) และเมล็ดน้อยหน่า (*Annona squamosa* L.) พบว่าสารสกัดดังกล่าวยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส 1.4 และ 1.3 เท่า ตามลำดับ แต่ผลการทดลองนี้แตกต่างกับการทดลองของ ณัฐกานต์ (2551) หลังจากแมลงวันผลไม้ได้รับสารสกัดจากเมล็ดพริกไทยดำ (*Piper nigrum*) พบว่าสารสกัดดังกล่าวเหนี่ยวนำปฏิกิริยาของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส 0.8 เท่า แสดงว่าร่างกายเกิดกลไกเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรสออกมาเพื่อเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสารพิษให้มีความเป็นพิษน้อยลง ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรสมีผลทำให้แมลงมีแนวโน้มที่สามารถต้านทานสารสกัดชนิดนี้ได้ เนื่องจากการทดลองของ Hsu *et al.* (2004a) หลังจากที่แมลงวันผลไม้ได้รับสารมาลาไธออนพบว่ากลุ่มที่ต้านทานมีปฏิกิริยาของเอนไซม์เอสเทอเรส (esterases) และเอนไซม์ mixed function oxidases สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ต้านทาน เมื่อทำการศึกษาการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรสพบว่า ปริมาณ CDNB conjugated product มีแนวโน้มลดลง (ตารางที่ 15) โดยมีผลทำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ชนิดนี้ลดลง 1.14 เท่า แต่ระดับเอนไซม์ที่ลดลงดังกล่าวไม่พบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของทิพนาถ (2550) หลังจากแมลงวันผลไม้ได้รับสารสกัดจากประคำดีควาย (*Sapindus rarak* DC.) พบว่าสารสกัดดังกล่าวยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส 2 เท่า ซึ่งถ้าปริมาณเอนไซม์ลดลง เอนไซม์ที่ไปจับกับสารพิษก็มีน้อยลง (สุรพล, 2544 ก, ข) และทำให้สารสกัดสามารถเข้าไปทำให้เกิดความเป็นพิษภายในตัวแมลงวันผลไม้ และกลไกนี้น่าจะเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เกิดการตาย และจากการลดลงของเอนไซม์ทั้งสองนี้เอง กลไกทั้งสองที่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปนี้ น่าจะเป็นกลไกสำคัญที่แมลงจะทำการทำลายพิษของสารสกัดจากข่าซึ่งมักพบเมื่อแมลงได้รับสารแปลกปลอมโดยเฉพาะพืชอาหารที่แมลงไม่คุ้นเคย แต่จากการศึกษาของทิพนาถ (2550) หลังจากแมลงวันผลไม้ได้รับสารสกัดจากหางไหล (*Derris elliptica* Benth) และเมล็ดน้อยหน่า (*Annona squamosa* L.) พบว่าสารสกัดดังกล่าวเหนี่ยวนำปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส 3 และ 97 เท่า ตามลำดับ เช่นเดียวกับการทดลองของณัฐกานต์ (2551) หลังจากแมลงวันผลไม้ได้รับสารสกัดจากเมล็ดพริกไทยดำ (*Piper nigrum*) พบว่าปริมาณ CDNB conjugated product มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นมีผลทำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ชนิดนี้เพิ่มขึ้น 0.2 เท่า อาจเป็นเพราะแมลงสามารถปรับตัว และมีแนวโน้มเกิดความต้านทานต่อสารสกัดดังกล่าว แต่การที่จะเกิดขบวนการเหนี่ยวนำหรือการยับยั้งนั้นก็ขึ้นอยู่กับชนิดของสารและชนิดของแมลงอีกด้วย (Yu, 1983, 1984)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอนไซม์ทำลายพิษเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งการได้รับสารสกัดจากพืชจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ได้ (Visetson, 1991) จากการทดลองผลของสารสกัดจากเหง้าข่าต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน พบว่าปริมาณโปรตีนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 16) จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดนี้มีผลที่ปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ไม่มีผลในด้านการเพิ่มการสังเคราะห์เอนไซม์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการทดสอบสารสกัดจากข่า (*Alpinia galanga* (Linn.) Sw.) ต่อการตายของแมลงวันผลไม้ด้วยวิธีการพ่นถูกตัวแบบฝอยหมอก ในอัตราความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่าให้ประสิทธิภาพดีที่สุดเมื่อใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายสกัดให้ค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 4,866.06 ± 184.52 และ 4,357.76 ± 194.82 ppm ตามลำดับในขณะที่สารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% เอทิลแอซิเทต และไดคลอโรมีเทน ให้ค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 6,337.54 ± 145.42, 16,744.73 ± 641. 27 และ 24,156.66 ± 880.33 ppm ตามลำดับ และที่ 48 ชั่วโมงให้ค่า LC_{50} เท่ากับ 6,012.14 ± 137.23, 14,778.32 ± 584.13 และ 22,599.18 ± 915.26 ppm ตามลำดับ

จากการแยกส่วนของสารสกัดจากข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนด้วยวิธีควิกคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้ส่วนสารสกัดจำนวน 7 fraction โดย fraction 1 ให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงสุด โดยค่าเปอร์เซ็นต์การตายที่ 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 71.33 และ 74.67 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำสาร fraction ที่ 1ไปแยกต่อด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้สารสกัดจำนวน 3 fractions และ fraction ที่ได้บาง fraction ไปแยกต่อด้วยวิธี Preparative Thin Layer Chromatography และพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีจาก ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR พบว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้คือ *E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether และ *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol จากนั้นนำสารประกอบดังกล่าว ไปทดสอบกับแมลงวันผลไม้พบว่า *E-p*-acetoxycinnamyl alcohol แสดงความเป็นพิษสูงกว่า *E-p*-coumaryl alcohol ethyl ether โดยพิจารณาจากค่า LC_{50}

และจากการตรวจสอบระดับเอนไซม์ทำลายพิษของแมลงวันผลไม้ที่ได้รับสารสกัดข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนที่ระดับ LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง คือ 4,866.06 ppm พบว่าระดับเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรสลดลง 3 เท่า ส่วนระดับเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส ลดลงประมาณ 1 เท่า ในการลดลงของระดับเอนไซม์เหล่านี้ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนโดยรวม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการทดลองในสภาพพื้นที่จริง เพราะผลการทดลองที่ได้อาจมีความแตกต่างกับผลในห้องปฏิบัติการ

2. ควรมีการประยุกต์ใช้สารสกัดจากพืชในรูปแบบอื่นๆ เช่น เหยื่อล่อ เพื่อง่ายต่อการนำมาใช้ และการเก็บรักษา

3. ควรมีการศึกษาทางด้านสรีวิทยา (physiology) และทางมิญชวิทยา (histology) ของแมลงวันผลไม้ร่วมกับการทดสอบทางพิษวิทยา เพื่อศึกษาความผิดปกติของร่างกาย และความผิดปกติของเนื้อเยื่อหลังจากที่แมลงวันผลไม้ได้รับสารสกัดจากเหง้าข่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กิติมา ชลสินธุ์. 2545. **ความสามารถของสารสกัดพญายอ (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau) ในการยับยั้งการติดเชื้อ Newcastle Disease Virus (NDV) ในเซลล์เพาะเลี้ยง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โกศล เจริญสม . 2534. **บทบาทของศัตรูธรรมชาติต่อแมลงศัตรูมะม่วง.** สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

งามผ่อง คงคาทิพย์. 2538. **การสกัด และแยกสารออกฤทธิ์สูงสุดซึ่งเป็นสารรองจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร.** ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ฉันทนี เฮงสวัสดิ์. 2544. อนุกรมวิธานของแมลงวันผลไม้. น. 19-38. *ใน* อรนุช กองกาญจนะ และคณะ. **แมลงวันผลไม้ในประเทศไทย. เอกสารวิชาการของกองกีฏและสัตววิทยา.** ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

เต็ม สมิตินันทน์. 2544. **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย**. สวนพฤษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิทยาการป่าไม้ กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

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

ณัฐกานต์ ทองอ่อน. 2551**. ฤทธิ์ในการกำจัดแมลงและผลต่อปฏิกิริยาระดับเอนไซม์ทำลายพิษจากสารสกัดเมล็ดพริกไทยดำ (*Piper nigrum* Linn) ต่อแมลงวันผลไม้ Oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis* Hendel).** ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มนตรี จิรสุรัตน์. 2544. แมลงวันผลไม้ที่สำคัญของประเทศไทยและการแพร่กระจาย. น. 14. *ใน* อรนุช กองกาญจนะและคณะ. **แมลงวันผลไม้ในประเทศไทย เอกสารวิชาการกองกีฏและสัตวิทยา.** ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

เรวดี ชูช่วย. 2541. **ประสิทธิภาพของสารสกัดจากตะไคร้หอมและสะเดากับการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ทำลายพิษในเห็บสุนัข**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิรจิต แซ่จิว. 2531. **วิทยาการทดแทนสารเคมี: การรวบข้อมูลเบื้องต้นสำหรับทดลองใช้ในพื้นที่, โครงการสำรวจวิทยาการทดแทนสารเคมี**, กรุงเทพฯ.

สังวาล สมบูรณ์, สุภาณี พิมพ์สมาน, รัตนาภรณ์ พรหมศรัทธา, วาสนา ไชยคำ และพรทิพย์ วิสารทานนท์. 2546. การใช้น้ำมันระเหยง่ายจากพืช Zingiberaceae ในการควบคุมแมลงศัตรูหลังเก็บเกี่ยว และองค์ประกอบทางเคมี, น. 22. *ใน* **การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 6 หนึ่งทศวรรษแห่งการอารักขาพืชในประเทศไทย วันที่ 24-28 พฤศจิกายน 2546 ณ โรงแรมโซฟิเทล ราชาออคิด**, ขอนแก่น.

สุรพล วิเศษสรรค์. 2542. **เอกสารประกอบการสอนวิชาพิษวิทยาเบื้องต้น**. ภาควิชาสัตววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____. 2544 ก. **กลไกของสารพิษในสัตว์**. ภาควิชาสัตววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____. 2544 ข. ขบวนการเมแทบอลิซึมของสารแปลกปลอมในสัตว์โดยเอนไซม์ทำลายสารพิษ,น. 1-78 *ใน* **เอกสารวิชาการประกอบการฝึกอบรม การพัฒนาพืชสมุนไพรเพื่อสรีรวิทยาการผลิตสัตว์และสุขภาพมวลมนุษย์ การอบรมวิชาการสรีรวิทยา-พยาธิสรีรวิทยา ครั้งที่ 19, 18-20 เมษายน 2544**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุรพล วิเศษสรรค์, มนัญญา เพียรเจริญ และ ธารี วัฒนสมบัติ. 2544. ผลของสารสกัดจากใบสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) และเหง้าข่า (*Alpinia galanga* Stuntz.) ต่อระดับเอนไซม์ทำลายพิษในหนอนใยผัก (*Plutella xylostella* L.). น. 55-61. *ใน* **การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 5 อารักขาพืช: ผลิตอาหารเพื่อประชากรโลก, 21-23 พฤศจิกายน2544. จัดโดยสมาคมคนไทย-ผู้ประกอบธุรกิจสารเคมีเกษตรสมาคมอารักขาพืชไทย/สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย/ สมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย/สมาคมวิศวกรรมเกษตรแห่งประเทศไทย/สมาคมกีฏและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย** ณ โรงแรมเฟล็กซ์ริเวอร์แคว, กาญจนบุรี.

อนันต์ สกุลกิม. 2540. **เอกสารประกอบการสอนรายวิชาแมลงสำคัญทางเศรษฐกิจ.** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันราชภัฏสมเด็จเจ้าพระยา.

อัมพร วิโนทัย, วิภาดา วังศิลาบัตร และวัชรี สมสุข. 2544. บทบาทของศัตรูธรรมชาติในการควบคุมแมลงวันผลไม้. น. 151-161. *ใน* อรนุช กองกาญจนะและคณะ. **แมลงวันผลไม้ในประเทศไทย เอกสารวิชาการกองกีฏ และสัตวิทยา.** ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

อัศวิน กิ่งแก้ว. 2538. **ผลการใช้สารสกัดข่าต่อการควบคุมตัวอ่อนของแมลงวันในมูลสุกร**. คณะวิชาสัตวศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล. 408-411.

Areekul, S., P. Sinchaisri and S. Tigvatananon. 1987. Effects of Thai plant extracts on the Oriental Fruit Fly I. Toxicity Test. **Kasetsart J. (Nat. Sci.).** 21: 395-407.

_____. 1988a. Effects of Thai plant extracts on the Oriental Fruit Fly II. Repellency Test. **Kasetsart J. (Nat. Sci.).** 22: 56-61.

_____. 1988b. Effects of Thai plant extracts on the Oriental Fruit Fly III. Attractancy Test. **Kasetsart J. (Nat. Sci.).** 22: 160-164.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Barnby, M. A., R. B. Yamasaki, and J. A. Kloske. 1989. Biological activity of azadirachtin, three derivatives, and other ultra violet radiation degradation products against tobacco budworm (*Lepidoptera: Noctuidae*) larvae. **J. Econ. Entomol**. 82: 58-63.

Bhakuni, O.S., M.L. Dhar, M.M. Dhar, BN. Dhawan and B.N. Merotra. 1969. Screening of Indian plants for biological activity. Part II. **Indian J. Exp. Biol**. 7: 250-262.

Brown, T. M. and G. T. Payne. 1988. Experimental selection for insecticide resistance. **J. Econ. Entomol**. 81: 49-56.

Bullangpoti, V., J. Penssok, P. Wisarntanon, P. Kannasutra and S. Visetson. 2002. Chili Extracts (*Capsicum frutescens* L.) for control of corn weevil (*Sitophilus zaemai* Motschulsky). **Agricultural Sci. J**. 33:6 (Suppl.): 300-304.

Bullangpoti, V. 2004. **Effects of Some Plant Extracts on Toxicity and Activities of Esterase and Glutathion-S-transferase in Rice Weevils (*Sitophilus oryzae* L.).** M.S. Thesis, Kasetsart University.

_____. 2007. **The Novel Botanical Insecticide, Alpha-Mangostin from Mangosteen Pericarp Extracts, for Control of *Nilaparvata lugens* (Stal).** Ph.D. Thesis, Kasetsart University.

Chen, W.-L. and C.-N. Sun. 1994. Purification and characterization of carboxylesterases of a rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stal. **Insect Biochem. Molec. Biol.** 24(4): 347-355.

Dhawan, B.N., G.K. Patnaik, R.P. Rastogi, K.K. Singh and J.S. Tandon. 1977. Screening of Indian plants for biological activity. **Indian J. Exp. Biol**. 15: 208-19.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Enayati, A.A., H. Ranson and J. Hemingway. 2005. Insect glutathione transferase and insecticide resistance. **Insect Molec. Biol.** 14: 3-8

Haubruge, E., M. Amichot, A. Cuany, J.B. Berge and L. Arnaud. 2002. Purification And characterization of carboxylesterase involved in malathion specific resistance from Tribolium castanium (Coleoptera: Tenebrionidae). **Insect Biochem. Molec. Biol.** 32 (9): 1181-1191

Hsu, J.C. and H.T. Feng. 2006. Development of Resistance to Spinosad in Oriental Fruit Fly (Diptera: tephitidae) in Laboratory Selection and Cross-Resistanc. **J. Econ. Entomol.** 99(3): 931-936.

Hsu, J.C., H.T. Feng and W.J. Wu. 2004a. Biochemical mechanisms of malathion resistance in oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*). **Plant Prot. Bull**. 46: 255-266.

_____. 2004b. Resistance and Synergistic Effects of insecticides in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Ttephritidae) in Taiwan. **J. Econ. Entomol**. 97(5): 1682-1688.

Jakoby, B. 1978. The glutathione-S-transferase: A group of multifunctional detoxification Protein. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.** 46: 383-414.

Kaur, A., R. Singh, C.S. Dey, S.S. Sharma, K.K. Bhutani and I.P. Singh. 2010. Antileishmanial phenylpropanoids from *Alpinia galanga* (Linn.) Willd. **Indian J. Exp. Biol.** 48: 314-317.

Khan, M., M.A. Hossain and M.S. Islam. 2007. Efects of Neem Leaf Dust and a Commercial of a Neem Compound on the Longevity, Fecundity and Ovarian Development of the Melon Fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and the Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae). **Pakistan J. Biol. Sci.** 10 (20): 3656-3661.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Qureshi, S., AH. Shah and AM. Ageel. 1992. Toxicity studies on *Alpinia galanga* and *Curcuma longa*. **Planta Med.** 58: 124-127.

Mokkhasmit, M., K. Swatdimongkol and P. Satrawaha. 1971. Study on toxicity of Thai medicinal plants. **Bull. Dept. Med. Sci**. 12(2/4): 36-65.

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

Oonmetta-aree, J. 2005. **Effects of the ZINGIBERACEAE spice extracts on growth and morphology changes of foodborne pathogens**. Ph.D. Thesis, Suranaree University.

Sakamura, F. and S. Hayashi. 1978. Constituents of essential oil from rhizomes of *Zingiber officinale* Roscoe. **J. Agric.** 20(2): 203-206.

Samart, N. 2007. **Isolation and Identification of Galangin and other compounds from *Alpinia galanga* (Linn) Willd and *Alpinia officinarum* Hance.** M.S. Thesis, Suranaree University.

Visetson, S. 1991. **Insecticide resistance mechanism in the red rust flour beetle (*Tribolium castaneum*. Herbst)**. Ph.D. Thesis. The University of Sydney. Australia.

_____ and S. Naknatti. 1996. An improved neem extraction method on farms in Thailand. *In* **International Neem Conference, Feb. 4-9, 1996**. The University of Queensland, Gotton College, Australia.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Visetson, S. 2001. Effects of Azadirachtin from various Thai Neem extracts on some detoxification enzyme activities in *Callosobruchus maculatus* F., pp. 38-46. *In* **20th ASEAN/2nd APRC seminar on Postharvest Technology, 11-14 September 2001.** Lotus Hotel, Pang Suan Kaew. Chiang Mai, Thailand.

_____ 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.

_____, M. Milne and J. Milne. 2001. Toxicity of 4, 11-selinnadien-3-one from nutsedge (*Cyperus rotundus* L.) tuber extracts to diamondback moth lavae (*Plutella xylostella* L.), detoxification mechanisms and toxicity to non target species. **Kasetsart J. (Nat.Sci.).** 35: 2844-292.

_____, S. Naknatti, W. Ruamthum, and J. Milne. 2002. Detoxification mechanism of the golden apple snail (*Pomacea canaliculata* L.) againt nut grass (*Cyperus rotundus* L.) extracts containing 4,11-selinnadiene-3-one and extract toxicity to some nontarget spiecies, pp. 285-294. *In* **The 3rd International Conference on Biopesticides (ICOB) "Positioning Biopesticides in Pest Management Systems", 22-26 April 2002.** Renaissance Kuala Lumpur Hotel, Kuala Lumpur, Malaysia.

_____, J. Milne, M. Milne and P. Kanasutar. 2003. Synergistic effects of seasame oil with cypermethin on the survival and detoxification enzyme activity of *Plutelle xylostella* L. Larvae. *In* **The 6thInternational Conference on Plant Protection in the Tropics. "Globalization and Plant Protection in Developing Economics", 11-14 August 2003.** Pan Pacific Hotel, Kuala Lumpur, Malaysia.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Vontas, J.G., M.J. Hejazi, N.J. Hawkes, N. Cosmidis, M. Loukas and J. Hemingway. 2002. Resistance-associated point mutation of organophosphate insensitive Acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. **Insect Mol. Biol.** 11: 329-336.

Wei, S.H., A.G. Clark and M. Syvanen. 2001. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione-S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the hosefly *Musca domestica*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 31: 1145-1153.

Welling, W., A.W. De Vries and S. Xoerman. 1974. Oxidative cleavage of a carboxyester bond as a mechanism of resistance to malaoxon in houseflies. **Pestic. Biochem. Physiol**. 4: 31-43.

Yu, S.J. 1983. Induction of detoxifying enzymes by allelochemicals and host plant in the fall Armyworm. **Pestic. Biochem. Physiol**. 12: 330-336.

Yu, S.J. 1984. Interaction of allelochemical with detoxification enzymes of insecticide susceptible and resistant fall armyworm. **Pestic. Biochem. Physiol**. 14: 275-281.

Zhu, K.Y. and W.A. Brindley. 1990. Acetylcholinesterase and its reduced sensitivity to Inhibition by paraoxon in organophosphate-resistant *Lygus herperus* Knight (Hemitera: Miridae**). Pestic. Biochem. Physiol.** 36: 22-28.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเทียมสำหรับเพาะเลี้ยงแมลงวันผลไม้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเทียมสำหรับเพาะเลี้ยงแมลงวันผลไม้

ภาคผนวก ก 1 สูตรอาหารสำหรับตัวอ่อนแมลงวันผลไม้

กล้วยน้ำว้าสุก	150 กรัม
ข้าวโพดสด	150 กรัม
น้ำตาลทราย	30 กรัม
กระดาษทิชชู	30 กรัม
น้ำกลั่นชนิดกลั่น 2 ครั้ง	300 กรัม
Brewer'Yeast	30 กรัม
Sodiumbenzoate	0.6 กรัม
Hydrochloric acid	1.2 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ก 2 สูตรอาหารเทียมสำหรับเลี้ยงตัวเต็มวัย

Icing sugar	70 กรัม
Yeast extract	10 กรัม
Brewer's yeast	20 กรัม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

การตรวจวัดเอนไซม์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

การตรวจวัดเอนไซม์

ภาคผนวก ข 1 การเตรียมสารเคมี

1. phosphate buffer

0.1 M KH_2PO_4 (Potassium dihydrothiophosphate: M.W = 136.09) เตรียมโดยชั่ง KH_2PO_4 ปริมาณ 13.61 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

2. stock EDTA (1mM EDTA)

1 mM EDTA (Ethyline Dibromide Triacetic acid : M.W = 452.24) เตรียมโดยชั่ง EDTA ปริมาณ 0.45 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่น1,000 มิลลิลิตร

3. phosphate buffer with EDTA

นำ stock 1mM EDTA ที่เตรียมได้จากข้อ 1.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงใน 0.1 M Phosphate buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากัน

4. 10 mM GSH

เตรียมโดยชั่ง GSH reduced form ปริมาณ 0.15 กรัม เติมลงใน Phosphate buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร คนให้สารละลายจนหมด

5. 0.12 M *p*NPA (paranitrophenylacetate)

เตรียมโดยชั่ง *p*NPA ปริมาณ 0.10 กรัม แล้วเติมลงในเอทานอล 100% ปริมาตร 5 มิลลิตร คนจนสารละลายเข้ากัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. 150 mM CDNB (chlorodinitrobenzene)

เตรียมโดยชั่ง CDNB ปริมาณ 0.15 กรัม แล้วเติมลงในเอทานอล 100% ปริมาตร 5 มิลลิตร คนจนสารละลายเข้ากัน

ภาคผนวก ข 2 การเตรียมเอนไซม์

โดยจะบดแมลงร่วมกับ buffer solution (2000 µl 0.1 M phosphate buffer + EDTA และ 1000 µl 10 mM GSH และ 50% w/w PVPP) บนน้ำแข็งหลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ18,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

ภาคผนวก ข 3 การตรวจวัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส

หลอด Blank ประกอบด้วย

- 0.1 M phosphate buffer	2900	ไมโครลิตร
- 0.1 M phosphate buffer + EDTA	50	ไมโครลิตร
- *p*NPA (substrate)	50	ไมโครลิตร

หลอดตัวอย่าง (Sample) ประกอบด้วย

- 0.1 M phosphate buffer	2900	ไมโครลิตร
- enzyme (ที่สกัดจากแมลงวันผลไม้)	50	ไมโครลิตร
- *p*NPA (substrate)	50	ไมโครลิตร

การคำนวณ

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

แทนค่า OD/min ที่วัดได้จากเครื่อง spectrophotometer ด้วย A และปริมาตรรวมที่ใช้ในการวิเคราะห์ 1 cuvette = 3.0 ml ดังนั้น ปริมาณเอนไซม์ที่วัดได้ = A × 58.8235 × 3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข 4 การตรวจวัดเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส

หลอด Blank ประกอบด้วย

- 0.1 M phosphate buffer	1150	ไมโครลิตร
- 0.1 M phosphate buffer + GSH	20	ไมโครลิตร
- CDNB (substrate)	10	ไมโครลิตร

หลอดตัวอย่าง (Sample) ประกอบด้วย

- 0 .1 M phosphate buffer	1150	ไมโครลิตร
- enzyme (ที่สกัดจากแมลงวันผลไม้)	20	ไมโครลิตร
- CDNB (substrate)	10	ไมโครลิตร

การคำนวณ

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

แทนค่า OD/min ที่วัดได้จากเครื่อง spectrophotometer ด้วย B ดังนั้น ปริมาณเอนไซม์ที่วัดได้ = B × 1.316 / 9.6 × 1000 n mole

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ค

การวัดปริมาณโปรตีน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ค

การวัดปริมาณโปรตีน

หลอด Blank ประกอบด้วย

- Bradford solution	2.5	มิลลิลิตร
- 0.1 M phosphate buffer	0.25	มิลลิลิตร

หลอดตัวอย่าง (Sample) ประกอบด้วย

- Bradford solution	2.5	มิลลิลิตร
- enzyme (ที่สกัดจากแมลงวันผลไม้)	0.25	มิลลิลิตร

หมายเหตุ หลังจากเตรียมตัวอย่างใส่ในหลอด cuvette เรียบร้อยแล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ก่อนนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 595 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ–นามสกุล	นางสาวนิสากร สุขหิรัญ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 13 พฤศจิกายน พ.ศ. 2527
สถานที่เกิด	จังหวัดสุราษฎร์ธานี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (อนามัยสิ่งแวดล้อม) มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	- เข้าร่วมเสนอผลงานแบบปากเปล่าในงาน The 2nd International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region 2-3 October 2008 Hanoi, ประเทศเวียดนาม
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	- ทุนเพื่อไปบรรยายในสัมนาพิเศษจากมหาวิทยาลัย Tsukuba เกี่ยวกับสารจากพืชเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช ณ University of Tsukuba, ประเทศญี่ปุ่น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์