

## บทที่ 2

### ทบทวนเอกสาร

#### หนอนตายหยาก

ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Stemona curtisii</i> Hk. f.
วงศ์	Stemonaceae
อันดับ	Liliales
ชื่อสามัญ	หนอนตายหยาก
ชื่ออื่นๆ	ปงช้าง ฮากสามสิบ กะเพียด รากลิง

#### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

หนอนตายหยากเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ประเภทไม้เลื้อย พบได้ทั่วไปในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และออสเตรเลีย Craib (1920) ได้กล่าวถึงลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นหนอนตายหยากนี้ว่า เป็นไม้ล้มลุก ประเภทไม้เลื้อย อายุหลายปี ลำต้นตั้งตรงสูงและต่อมาจะเจริญเลื้อยพันสิ่งอื่นๆ ยาวได้ถึง 2 เมตร ลำต้นกลม สีเขียว มีข้อและปล้องเห็นชัดเจน รากมีรูปร่างคล้ายกระชาย เปลือกกรากบางสีน้ำตาลอ่อน ใบติดกับลำต้นแบบสลับ (alternate) ก้านใบยาว ตรงโคนพองเล็กน้อย ด้านหน้าเป็นร่อง ด้านหลังมนกลม ตัวใบรูปไข่ ปลายใบแหลม (acuminate) โคนใบโค้งลึกรูปหัวใจ (cordate) ขอบใบหยักเป็นคลื่นเล็กน้อย เส้นใบออกจากโคนใบไปหาปลายใบเรียงแบบ palmately venation 9-15 เส้น สำหรับในประเทศไทย เสียงม (2508) พะยอม (2521) เต็ม (2523) Gagnepain (1934) Konoshima (1973) Duyfjes (1993) และ Wongsatit (2002) ได้รวบรวมพืชสกุล *Stemona* และรายงานพบประมาณ 10 ชนิด ซึ่งในแต่ละท้องถิ่นจะมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไป (ตาราง 1)

ตาราง 1 ชนิดของพืชในสกุล *Stemona* ที่พบในประเทศไทย

ชนิด	ชื่อท้องถิ่น	จังหวัดที่พบ
<i>Stemona aphylla</i> Craib	เครือปุง	แพร่, ลำปาง
<i>Stemona asperula</i> J.J.Sm	ไม่มีรายงานชื่อไทย	ไม่ระบุจังหวัด
<i>Stemona burkilianii</i> Prain	ปงมดง่าม โปงมดง่าม	คอดยสุเทพ เชียงใหม่
<i>Stemona collinsae</i> Craib	ปงช้าง หนอนตายหยาก	ภาคเหนือและภาคกลาง (ไม่ระบุจังหวัด)
<i>Stemona curtisii</i> Hk.f.	รากลิง หนอนตายหยาก	พัทลุง, จันทบุรี
<i>Stemona griffithiana</i> Kurz	ไม่มีรายงานชื่อไทย	แพร่

ตาราง 1 ชนิดของพืชในสกุล *Stemona* ที่พบในประเทศไทย (ต่อ)

ชนิด	ชื่อท้องถิ่น	จังหวัดที่พบ
<i>Stemona hutanguriana</i> W.sp.nov.	ไม่มีรายงานชื่อไทย	อ.เมือง อุบลราชธานี
<i>Stemona kerrii</i> Craib	ไม่มีรายงานชื่อไทย	คอยสุเทพ เชียงใหม่
<i>Stemona phyllantha</i> Gagnep	ไม่มีรายงานชื่อไทย	เพชรบุรี, ภูเก็ต
<i>Stemona tuberosa</i> Lour.	กะเพียด หนอนตายหยาก	ประจวบคีรีขันธ์, ชลบุรี, เพชรบุรี, นครสวรรค์, แม่ฮ่องสอน

ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Stemona aphylla</i> Craib
วงศ์	Stemonaceae
อันดับ	Liliales
ชื่อสามัญ	หนอนตายหยาก
ชื่ออื่นๆ	เครือปุง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (เต็ม, 2523)

หนอนตายหยากเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ลำต้นเหนือดินไม่เลื้อย สูง 20-30 เซนติเมตร ลำต้นเกลี้ยง ลำต้นใต้ดินเป็นเหง้าสั้น รากสะสมอาหารรูปกระสวย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 10-20 เซนติเมตร เกิดเป็นกระจุก ใบเดี่ยว การเรียงใบแบบตรงข้าม แผ่นใบรูปไข่หรือไข่กว้าง ขนาดกว้าง 5-10 เซนติเมตร ยาว 10-15 เซนติเมตร ฐานใบรูปหัวใจ ปลายใบแหลม ก้านใบยาว 4-12 เซนติเมตร โคนก้านใบโป่งพอง ช่อดอกออกที่ซอกใบ ก้านช่อดอกยาว 5-10 เซนติเมตร ใบประดับเรียวยาวแหลม ยาว 1-2 เซนติเมตร ดอกมีกลีบรวม 4 กลีบ เรียง 2 ชั้น กลีบรวมรูปใบหอกยาว ขนาดกว้าง 0.5-0.6 เซนติเมตร ยาว 2.0 -2.7 เซนติเมตร ด้านนอกสีแดงเข้ม มีลายเส้นสีเขียวยาวตั้งแต่โคนกลีบรวมถึงปลาย 9-15 เส้น ด้านในสีแดงเข้ม เกสรเพศผู้ 4 อัน สีแดงเข้ม บางครั้งพบปลายสีเหลือง ขนาดกว้างประมาณ 0.3 เซนติเมตร ยาว 1.8-2.5 เซนติเมตร ก้านอับเรณูมีฐานติดกัน อับเรณูยาว 1.2-1.5 เซนติเมตร สันแบ่งพูอับเรณูเรียบ สูง 0.1 เซนติเมตร ยาว 1.5-2.2 เซนติเมตร ไม่มีระยางค์ของพูอับเรณู รังไข่ ขนาดกว้าง 0.3 เซนติเมตร ยาว 0.4 เซนติเมตร ยอดเกสรเพศเมียไม่เด่นชัดและไม่มีก้าน ผลสีเขียว รูปไข่ยาว ปลายแหลม ขนาดกว้าง 1 เซนติเมตร ยาว 2.5 เซนติเมตร เมล็ด สีแดงเข้ม รูปทรงรี ปลายแหลม มีสันนูนตามความยาวของเมล็ด ฐานล้อมรอบด้วยปุยหุ้มเมล็ด จำนวน 5-10 เมล็ดต่อผล

สภาพทางนิเวศวิทยา พบทั่วไปในภาคเหนือ กระจายพันธุ์ในพื้นที่ ป่าเต็งรัง ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 500-800 เมตร

สารสำคัญในรากหนอนตายหยาก และการนำไปใช้ประโยชน์

จากประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงทำให้มีนักวิจัยหลายท่านพยายามศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในการฆ่าแมลงจากรากหนอนตายหยาก โดย Ye *et al.* (1994) ได้ศึกษาสารอัลคาลอยด์ในรากหนอนตายหยากชนิด *S. japonica* ที่นำมาจากมณฑลซีเจียง ซึ่งการศึกษาพบสารสกัดสารอัลคาลอยด์ 2 ชนิดใหม่คือ stemonamid และ isostemonamide ในปีเดียวกันเขาได้ศึกษาสารอัลคาลอยด์ในรากหนอนตายหยากชนิดเดิม จากแหล่งเดิม พบสารอัลคาลอยด์เพิ่มอีก 4 ชนิดคือ neostemonine, bisdehydroneostemmonanine, bisdehydroprotostemonine และ isoprotostemonine นอกจากนี้ยังได้ศึกษาสารอัลคาลอยด์ในรากหนอนตายหยากชนิด *S. tuberosa* ที่นำมาจากมณฑลยูนนาน พบสารอัลคาลอยด์อีก 2 ชนิดคือ neotuberostemonine และ bisdehydroneotuberostemonine นอกจากนี้ Lin *et al.* (1994) ได้ศึกษาพบสารอัลคาลอยด์ที่ได้จากรากหนอนตายหยากชนิด *S. tuberosa* ที่นำมาจากมณฑลกว่างตุง พบสารอัลคาลอยด์ 2 กลุ่มใหม่ คือ tuberostemoninol และ stemoninoamide ต่อมา Zhao *et al.* (1995) ได้ศึกษาสารประเภท Bibenzyl จากรากหนอนตายหยากชนิด *S. tuberosa* โดยการวิเคราะห์โครงสร้างวิธี spectroscopic พบ bibenzyl 3 ชนิดใหม่ คือ 3, 5 - dihydroxy - 4 - methylbenzyl, 3,5 - dihydroxy - 2 - methoxy - 4 - methylbibenzyl และ 3 - hydroxyl - 2, 5 - dimethoxy - 2 - methylbibenzyl นอกจากนี้ยังมีรายงานจาก กฤษณา (2529) ว่ามีนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นพบสารอัลคาลอยด์ที่สกัดได้จากพืชวงศ์ Stemonaceae 18 ชนิด ที่ทราบสูตรโครงสร้างทางเคมีทั้งหมด 9 ชนิดและยังไม่ทราบสูตรโครงสร้างทางเคมีอีก 9 ชนิด สำหรับการศึกษเกี่ยวกับสารสำคัญในรากหนอนตายหยากในประเทศไทยนั้นได้มีการรายงานจาก ญัตตรา (2528) พบว่าสารออกฤทธิ์ในหนอนตายหยากได้แก่ stemonacetal และ stemonol ซึ่งสารสกัดนี้จะฆ่าหนอนได้ต่อเมื่อหนอนกินเข้าไป ซึ่งจะทำให้หนอนเมาและต่อมาจะเข้าไปมีผลต่อระบบประสาทและตายในที่สุด โสรยา (2531) ได้รายงานว่าสารในรากหนอนตายหยากที่เป็นพิษต่อแมลงเป็นสารประกอบพวกโรทีโน (rotenone) เช่นเดียวกับโล่ดิน นอกจากนี้ยังมีรายงานจาก นิจศิริและพะยอม (2534) ว่าในรากของหนอนตายหยากมีสารประกอบอัลคาลอยด์ คือ stemonine, tuberostemonine, stemonidine, isostemonidine นอกจากนี้ยังพบ rotenoid compounds ได้แก่ stemonacetal, stemonal และ stemonone สำหรับ *Stemona collinsae* พบอัลคาลอยด์ 2 ชนิดคือ 16,17-dihydro-16(E)-stemofoline และ 16,17-dihydro-4(E)-16(E)-stemofoline ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดมีคุณสมบัติในการกำจัดแมลง จากการทดลองพบว่าอัลคาลอยด์ชนิดนี้แสดงการยับยั้งการกินของหนอนไยฝักวัย 3 อย่างสมบูรณ์ที่ 2.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  หลังจากได้รับสารเป็นระยะเวลา 4 วัน (Jiwajinda *et al.*, 2001)

**สารกำจัดแมลงจากธรรมชาติ (natural insecticides)** (ถนอมศรีและคณะ, 2534)

สารกำจัดแมลงอาจแบ่งออกตามลักษณะการออกฤทธิ์ (mode of action) ได้เป็น 3 ประเภทด้วยกันคือ

1. ยาพิษสัมผัส (contact poisons) หมายถึง สารพิษที่สามารถฆ่าแมลงได้เมื่อแมลงสัมผัสกับสารนั้นๆ ตัวอย่างเช่น นิโคติน ไพรีทริน เป็นต้น

2. ยาพิษเมื่อเข้าสู่กระเพาะ (stomach poisons) เป็นสารที่ออกฤทธิ์เมื่อแมลงกินเข้าไป ได้แก่ สารจำพวกอาร์เซนิก (arsenates) โรติโนน (rotenones) เป็นต้น

3. สารยับยั้งการกิน (feeding deterrents) การที่แมลงจะกินพืชชนิดใดนั้น ขึ้นอยู่กับว่าพืชนั้นผลิตสารกระตุ้นการกิน (feeding stimulants) ในแมลงหรือไม่ ในทางตรงกันข้ามแมลงจะไม่กินพืชที่สร้างสารยับยั้งการกิน (antifeedants) ในแมลงชนิดนั้น ซึ่งสารกลุ่มหลังนี้มีแนวโน้มที่จะมีบทบาทในการป้องกันพืชจากแมลงรบกวนในอนาคต ตัวอย่างของสารเหล่านี้ ได้แก่ อะซาดิแรคติน และ ไอโซโบลคิน เป็นต้น

สารสกัดจากพืชเป็นสาร allelochemicals ที่มีผลต่อการปรับตัวของแมลง เมื่อแมลงได้รับสารสกัดจากพืชเข้าไปในปริมาณที่เหมาะสม แมลงจะมีการเปลี่ยนแปลงการสร้าง detoxification enzymes เช่น esterase, GSH-S-transferase และ monooxygenase เพื่อต่อต้านหรือทำลายสารแปลกปลอมดังกล่าวเพื่อการอยู่รอด (สุรพล, 2536)

มีรายงานว่ามียุงประมาณ 2,000 ชนิด ซึ่งมีสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพในการใช้ฆ่าแมลง ปัจจุบันเกษตรกรจึงให้ความสนใจและศึกษาค้นคว้ามากขึ้น พืชในกลุ่มนี้เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายได้แก่

ไพรีทรินส์ (pyrethrins)

สารในกลุ่มไพรีทรินส์เป็นสารที่สกัดได้จากดอก pyrethrum ซึ่งเป็นดอกแห้งของ *Tanacetum cinerariifolium* Trev. Sch. Bip. , *Pyrethrum cinerariifolium* Trev. หรือ *Chrysanthemum cinerariifolium* Trev. Vis. ในวงศ์ Compositae นับเป็นสารฆ่าแมลงที่มีความสำคัญในกลุ่มสารธรรมชาติที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน

องค์ประกอบทางเคมี

สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ฆ่าแมลงในดอกไพรีทรัมเป็นสารจำพวกเอสเทอร์ ซึ่งมีโครงสร้างสัมพันธ์กัน 6 ชนิด รวมเรียกว่า ไพรีทรินส์ (pyrethrins) หรือ ไพรีทรอยด์ (pyrethroids) ได้แก่ pyrethrin I, pyrethrin II, cinerin I, cinerin II, jasmolin I และ jasmolin II

กลไกการออกฤทธิ์

กลไกการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มไพรีทรินส์ยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างแน่ชัด แต่สารเหล่านี้จะออกฤทธิ์โดยตรงต่อระบบประสาทของแมลง โดยสันนิษฐานว่าอาจเกี่ยวข้องกับการส่งผ่านของ

โซเดียมและโปแตสเซียมไอออนในเซลล์ประสาท เมื่อสัมผัสกับสารกลุ่มนี้ แมลงจะมีอาการตื่นเต้น (hyperexcitation) สั่นและเป็นอัมพาตอย่างรวดเร็ว เป็นคุณสมบัติในการทำให้เกิด knock-down effect อย่างรวดเร็ว ทำให้สารเหล่านี้เป็นที่นิยมใช้เป็นส่วนผสมในยาฆ่าแมลงสำหรับใช้ในครัวเรือน สารที่มีฤทธิ์ทำให้แมลงสลบอย่างรวดเร็ว คือ pyrethrin II ส่วนสารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าแมลงดีที่สุด ได้แก่ pyrethrin I ในยาฆ่าแมลงที่มีไพรีทรินส์เป็นสารออกฤทธิ์นั้น ส่วนใหญ่มักนิยมผสมสารเพิ่มฤทธิ์ (synergists) เข้าไปด้วย สารเหล่านี้ได้แก่ sesamin ซึ่งเป็นสารที่แยกได้จากน้ำมันงา ส่วนสารเสริมฤทธิ์ไพรีทรินส์ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ได้แก่ piperonyl butoxide เป็นสารที่สังเคราะห์เลียนแบบโครงสร้างของ sesamin

### นิโคติน (nicotine)

นิโคตินเป็นอัลคาลอยด์ที่ได้จากใบยาสูบ (*Nicotiana tabacum* วงศ์ Solanaceae) คุณสมบัติในการฆ่าแมลงของใบยาสูบ และนิโคตินเป็นที่รู้จักกันมาตั้งแต่ศตวรรษที่ 18 โดยในปี ค.ศ. 1763 ได้มีการใช้ยาสูบในรูปของยาชงเพื่อกำจัดเพลี้ย (aphids) ปัจจุบันนิโคตินเป็นยาฆ่าแมลงที่มีความสำคัญทางเกษตรกรรมชนิดหนึ่ง

### องค์ประกอบทางเคมี

นิโคตินเป็นอัลคาลอยด์ในกลุ่มพรีดีน/ไพโรลิดีน โดยมี pyridine ring เชื่อมต่อกับ N-methyl-pyrrolidine ที่ตำแหน่ง 2 นิโคตินมีลักษณะเป็นของเหลวไม่มีสีถึงสีเหลือง แต่เมื่อถูกอากาศและแสงจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล นิโคตินเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง มีค่า LD<sub>50</sub> เท่ากับ 50-60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในหนู เมื่อให้ทางปาก เมื่ออยู่ในรูปอิสระนิโคตินสามารถดูดซึมผ่านเข้าทางเยื่อเมือกและทางผิวหนังได้ นอกจากนิโคตินแล้วยังมีอัลคาลอยด์ที่มีโครงสร้างสัมพันธ์กับนิโคติน และมีคุณสมบัติในการฆ่าแมลงได้เช่นเดียวกัน คือ นอร์นิโคติน (normicotine) ซึ่งพบใน *N. glutinosa* และ แอนาเบซิน (anabasine) เป็น homologue ของนิโคติน พบใน *N. glauca* และ *Anabasis aphylla* สารเหล่านี้รวมเรียกว่า นิโคตินอยด์ (nicotinoids) แม้ว่าสาร 2 ชนิดหลังจะมีฤทธิ์ในการฆ่าแมลงต่ำกว่านิโคตินก็ตาม แต่ก็มีการใช้เป็นยาฆ่าแมลงได้เช่นเดียวกัน

### กลไกการออกฤทธิ์

สารกลุ่มนิโคตินอยด์เป็นสารพิษแบบสัมผัส ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการส่งผ่านสัญญาณระหว่างเซลล์ประสาท ทั้งนิโคตินและแอนาเบซินเป็นพิษต่อกันด้วย ดังนั้นจึงต้องระมัดระวังในการใช้

### โรติโนน (rotenones)

โรติโนนเป็นกลุ่มสารที่พบในรากของพืชบางชนิดในวงศ์ถั่ว (Leguminosae) โดยเฉพาะพืชในสกุล *Derris* และ *Lonchocarpus* การค้นพบคุณสมบัติในการฆ่าแมลงของสารเหล่านี้เนื่องมาจากประวัติการใช้รากสมุนไพรดังกล่าวในการเบื่อปลา จากการศึกษาพบว่าสารเหล่านี้เป็นพิษเฉพาะต่อสัตว์เลือดเย็น และไม่มีพิษต่อสัตว์เลือดอุ่น ต่อมาในปี ค.ศ. 1911 จึงได้มีการจดทะเบียนสิทธิบัตร (patent) เป็นยาฆ่าแมลง ในประเทศไทยมีสมุนไพรสกุล *Derris* ที่มีฤทธิ์ฆ่าแมลงคือ หางไหลหรือโล่ตื้น (*D. elliptica*, หางไหลแดง และ *D. malaccensis*, หางไหลขาว) ชาวบ้านรู้จักนำรากหางไหลซึ่งมีน้ำยางสีขาวมาทุบแช่น้ำ แล้วนำน้ำที่ได้มาใช้รดต้นผักตามสวนผัก เพื่อฆ่าแมลงและตัวหนอน ตลอดจนใช้เบื่อปลาในห้วยหนองคลองบึงมาช้านานแล้ว นอกจากนี้หางไหลยังใช้เป็นยาฆ่าเห็บ เหา เรือด และไรได้อีกด้วย

### องค์ประกอบทางเคมี

รากหางไหล และ *Lonchocarpus* มีสารสำคัญ คือ โรติโนนอยู่ 3-10% สารนี้มีลักษณะเป็นผลึกไม่มีสี ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด เช่น อะซีโตน โรติโนนเป็นอนุพันธ์ของสารจำพวก isoflavone ซึ่งนอกจากโรติโนนแล้ว ยังมีสารฆ่าแมลงที่มีโครงสร้างสัมพันธ์กันอีกหลายชนิด สารเหล่านี้รวมเรียกว่า โรติโนน (rotenones) หรือ โรติโนยด์ (rotenoids)

### กลไกการออกฤทธิ์

สารกลุ่มโรติโนนออกฤทธิ์ที่กระบวนการหายใจ (respiration) ของแมลง โดยขัดขวางการส่งผ่านของอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย สารเหล่านี้เป็นพิษโดยเฉพาะกับแมลงและปลา แต่ไม่พิษต่อสัตว์เลือดอุ่นยกเว้นหมี

### การสกัด การแยกสารและการทำให้อัลคาลอยด์บริสุทธิ์ (กฤษณา, 2529)

อัลคาลอยด์จากแหล่งที่มาจากธรรมชาติส่วนมากมักมีปริมาณน้อย เป้าหมายที่สำคัญในการแยกสารสกัดอัลคาลอยด์ ให้ได้อัลคาลอยด์ที่แท้จริง โดยปราศจากสิ่งแปลกปลอมที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการแยกสกัด และทำให้บริสุทธิ์ ดังนั้นในการสกัดอัลคาลอยด์จะต้องเลือกวิธีที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณสูงสุด อัลคาลอยด์ที่มีอยู่ในพืชมักอยู่ในรูปของเกลือที่เกิดจากกรดอินทรีย์ที่มีอยู่ในพืช และกรดอินทรีย์กับสารผสมของสารประกอบที่ละลายน้ำ เช่น กัม (gums) โปรตีน เกลือ อนินทรีย์ แทนนิน ไขมัน และ เรซิน (resins) ดังนั้นการสกัดอัลคาลอยด์มักจะสกัดสารประกอบที่ไม่ใช่อัลคาลอยด์ (non-alkaloidal compounds) เหล่านี้ออกไป นอกจากนี้ยังพบว่าในพืชแต่ละชนิดมักจะมีอัลคาลอยด์มากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งมักจะมีโครงสร้างของโมเลกุลคล้ายกัน ดังนั้นจึงมีขั้นตอนในการสกัดอัลคาลอยด์หลายขั้นตอนเพื่อให้ได้อัลคาลอยด์บริสุทธิ์

วิธีการสกัดอัลคาลอยด์จากพืชโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ โดยการนำสมุนไพรมุ่งที่ต้องการศึกษาแช่ทิ้งไว้ หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออกให้หมดจนได้สารสกัดแบบหยาบ แล้วจึงแยกสารเอาสารที่ไม่ใช่อัลคาลอยด์ออกโดยการทำ acid-base partition เริ่มด้วยการ partition สารสกัดด้วยกรดเจือจางหลายๆ ครั้ง เพื่อเปลี่ยนอัลคาลอยด์อิสระให้อยู่ในรูปเกลือซึ่งละลายในชั้นน้ำ จากนั้นแยกชั้น acidic aqueous solution ออกมา แล้วทำให้เป็นด่างอ่อน ซึ่งเกลือของอัลคาลอยด์จะถูกเปลี่ยนกลับมาเป็นอัลคาลอยด์อิสระ และ partition ด้วยตัวทำละลายหลายๆ ครั้ง จนได้อัลคาลอยด์อยู่ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ ถ้าต้องการให้อัลคาลอยด์บริสุทธิ์แต่ละชนิดก็จะต้องนำไปแยกในขั้นต่อไป

การแยกอัลคาลอยด์ออกจากสารประกอบที่ไม่ใช่อัลคาลอยด์โดยใช้ silica gel หรือ aluminium oxide column วิธีการนี้คือ นำสารสกัดอัลคาลอยด์มาแยกด้วย column ดังกล่าว ซึ่งจะดูดซับสารประกอบที่ไม่ใช่อัลคาลอยด์เอาไว้ ในขณะที่ต้องการกำจัดไขมัน และ เรซิน ที่ติดมาในสารสกัดอัลคาลอยด์ โดยให้ผ่านสารสกัดใน column ที่มี phosphoric acid-containing silica gel อัลคาลอยด์จะถูกจับใน column ในสภาพเกลือ ในขณะที่พวกสารประกอบอื่นๆ จะถูกชะออกไปจาก column หลังจากนั้นทำให้เป็นด่าง และชะอัลคาลอยด์ออกจาก column โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์

โครมาโตกราฟี (chromatography) เป็นวิธีการแยกสารที่ใช้ได้ผลดีกับอัลคาลอยด์ทุกประเภท และไม่จำกัดปริมาณ เริ่มแรกจะต้องหา chromatographic system ที่เหมาะสมสำหรับ อัลคาลอยด์ที่ต้องการ ซึ่งมักจะลองทำ TLC (thin layer chromatography) หรือ PC (paper chromatography) แล้วจึงต้องขยายเป็น preparative TLC หรือ column chromatography หลังจากแยกได้อัลคาลอยด์แต่ละชนิดโดยใช้วิธี chromatography แล้ว มักจะตามด้วยการตกผลึกเพื่อให้แน่ใจว่าได้สารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์จริงๆ

Adsorbents ที่นิยมมากที่สุดในการ TLC analysis ของอัลคาลอยด์ ได้แก่ silica gel รองลงมาคือ aluminium oxide นอกจากนี้อาจใช้ kieselguhr, cellulose, magnesium oxide, calcium carbonate และ polyamide บางชนิด

Mobile phase หรือ solvent system ที่ใช้ในการแยกอัลคาลอยด์โดย chromatography สามารถเลือกได้มากมาย โดยส่วนใหญ่มักจะเป็นของผสมของตัวทำละลายที่ใช้บ่อยๆ นอกจากนี้ อาจเติมด่าง (ammonia, diethylamine และ tetraethylamine) เพื่อลดการเกิด tailing

การตรวจสอบอัลคาลอยด์บน chromatogram นิยมใช้น้ำยาฉีดพ่นดราเจนดอร์ฟ (Dragendroff's reagent) และ โปแตสเซียมไอโอไดพลาทิเนต (potassium iodiplatinate)

### การทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นกับไรทะเล (Brine shrimp Lethality Test)

การทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี Brine Shrimp Lethality Test (ชัยวัฒน์และคณะ, 2535) เป็นการทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดหยาบต่างๆ ซึ่งเป็นวิธีที่ทำการทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro* test) ที่ทำได้ง่าย ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือขนาดใหญ่ หรือชนิดพิเศษให้ยุ่งยาก ไม่ต้องใช้วิธีปราศจากเชื้อ จึงทำให้ประหยัดค่าใช้จ่าย อีกทั้งยังใช้เวลาในการทดลองสั้น และใช้สารตัวอย่างน้อย (2-20 มิลลิกรัม) การทดสอบความเป็นพิษ โดยวิธีนี้เป็นการทดสอบความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง (acute toxicity)

การแสดงผลของระดับความเป็นพิษเบื้องต้นของวิธี Brine Shrimp Lethality Test จะแสดงด้วยค่า  $LC_{50}$  (ค่าความเข้มข้นที่ทำให้ตัวอ่อนของไรทะเลตายไป 50% ในเวลา 24 ชั่วโมง)

ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับพิษวิทยา (Toxicology)

“พิษวิทยา” หมายถึง การศึกษาผลของสารพิษที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยา และสรีรวิทยาต่อสิ่งมีชีวิต

การเกิดพิษในร่างกายแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะใหญ่ๆ คือ

1. ลักษณะการเกิดพิษทั่วไป ได้แก่ การเกิดพิษอย่างเฉียบพลัน (acute test) การเกิดพิษแบบกึ่งเรื้อรัง (subchronic test) และ การเกิดพิษอย่างเรื้อรัง (chronic test)

การประเมินความเป็นพิษอย่างเฉียบพลัน (acute test) เป็นการให้สัตว์ทดลองได้รับสารพิษเพียงครั้งเดียว หรือได้รับหลายครั้งในระยะเวลาที่สั้น โดยทั่วไปสัตว์ทดลองจะแสดงอาการให้เห็นภายใน 24 ชั่วโมง และเพิ่มความรุนแรงมากขึ้นภายใน 1-3 วัน ในการบอกระดับความเป็นพิษเฉียบพลัน นิยมใช้ค่าลีดัลโดส หรือลีดัลคอนเซนเทรชันเป็นกรณีแสดง

ค่าลีดัลโดส (lethal dose, LD) หมายถึง ปริมาณ (dose) ของสารพิษที่ทำให้สัตว์ทดลองตายภายในระยะเวลาที่กำหนด โดยทั่วไปจะใช้เปอร์เซ็นต์การตายของสัตว์ประกอบในการกำหนดค่าลีดัลโดส เช่น  $LD_{50}$  (median lethal dose) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารพิษที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50% ภายในระยะเวลาที่กำหนด เป็นเกณฑ์ในการบอกระดับความเป็นพิษ มีหน่วยเป็นปริมาณสารพิษต่อตัว หรือต่อหน่วยน้ำหนักของสัตว์ทดลอง

ค่าลีดัลคอนเซนเทรชัน (lethal concentration, LC) หมายถึง ค่าความเข้มข้น (concentration) ของสารพิษ ซึ่งทำให้สัตว์ทดลองตายภายในระยะเวลาที่กำหนด ใช้หน่วยเป็น ppm (part per million), เปอร์เซ็นต์, มิลลิกรัมต่อลิตร, มิลลิกรัมต่อกรัม เป็นต้น ซึ่งการประเมินค่า LC นี้ จะไม่รู้ว่สัตว์ทดลองแต่ละตัวได้รับสารพิษในปริมาณเท่าใด แต่รู้ว่สัตว์ทดลองได้รับพิษที่ความเข้มข้นเท่าใด

2. ลักษณะการเกิดพิษแบบพิเศษ ได้แก่ การเกิดพิษในลักษณะเฉพาะ เช่น การเกิดมะเร็ง การเกิดการกลายพันธุ์ การเกิดลูกวิรูป และการเกิดพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น

## สัตว์ทดลองและแมลงศัตรูพืช

### ไรทะเล หรือ Brine shrimp (*Artemia salina* Leach.)

เป็นสัตว์ในจำพวก crustacean อยู่ใน Subclass Branchiopoda Order Anostraca พบได้ทั่วไปในน้ำกร่อยถึงน้ำเค็มจัด มีความทนทานต่อสภาพความเค็มที่แตกต่างกันสูงมากคือจาก 10-20 ถึง 180-220 กรัมต่อลิตร จากคุณสมบัติของไรทะเลที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีและรวดเร็ว แม้ในสภาวะห้องปฏิบัติการ สะดวกและง่ายต่อการเลี้ยง ราคาถูกหาซื้อได้ง่ายตามท้องตลาด จึงทำให้การศึกษาทางด้านชีววิทยา เกษษวิทยา โดยเฉพาะการหาความเป็นพิษของสารต่างๆ นิยมใช้ไรทะเลเป็นสัตว์ทดลอง โดยระยะที่นิยมใช้ในการทดลองคือ ช่วง 24 ถึง 48 ชั่วโมงหลังจากการเพาะเลี้ยง (Meyer *et al.*, 1982)

ไรทะเลมีวงจรชีวิต (life cycle) คือ ในช่วงฤดูแล้งซึ่งมีปริมาณน้ำน้อยไข่ของไรทะเลจะอยู่ในระยะพักตัว ซึ่งไข่ของไรทะเลมีความทนทานต่อสภาพที่ไม่เหมาะสมสูงและยาวนานมาก และเมื่อถึงฤดูฝนหรือไข่ได้รับน้ำ ไข่จะคุดน้ำ จากนั้นจะเริ่มกระบวนการ embryogenesis กระบวนการนี้จะดำเนินต่อไปจนกระทั่ง ครบ 16-30 ชั่วโมง จึงจะสิ้นสุด หลังจากนั้นจะเกิดการพัฒนา antennae และ mandibles ไรทะเลในช่วงที่เป็นลว้า (larvae) จะมีลักษณะที่เป็นสีแดง เนื่องมาจากสีของ yolk ในช่วงนี้จะพบ appendages 3 คู่ antenulae 1 คู่ antennae 1 คู่ และ mandible 1 คู่ ไรทะเลสามารถมีอายุอยู่ได้ถึง 3 วัน โดยที่ไม่ได้รับอาหารจากแหล่งอื่นเลยนอกจาก yolk เมื่อไรทะเลเจริญจนเต็มที่ (mature) โดยใช้เวลาประมาณ 20-35 ชั่วโมง จะมีขนาดประมาณ 8.5-9.5 มิลลิเมตร (Coletate and Molyneus, 1993)

### หนอนกระทู้ผัก (ฉรรฐพล, 2528)

ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Spodoptera litura</i> F.
วงศ์	Noctuidae
อันดับ	Lepidoptera
ชื่อสามัญ	tobacco cutworm, cotton worm, cotton leaf worm

### ลักษณะรูปร่าง

ตัวเต็มวัยมักวางไข่เป็นกลุ่มใต้ใบพืชอาหาร ไข่กลุ่มหนึ่งๆ มีจำนวนนับร้อยฟอง บนกลุ่มไข่มีใยสีน้ำตาลปกคลุม ไข่มีลักษณะเป็นแบบ with sculp คือ คล้ายรูปฝาชี ผิวของไข่มีลายเส้นต่างๆ โดยรอบ ตรงกลางมีรอยนูนและมีเส้นเป็นรัศมีรอบๆ ไข่ใหม่ๆ มีสีครีมค่อนข้างขาว ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเป็นมัน ระยะการเป็นไข่ประมาณ 3-5 วัน ตัวเต็มวัย ตัวหนึ่งๆ สามารถวางไข่ได้ตั้งแต่ 800-3250 ฟอง



ตัวหนอนที่ฟักออกจากไข่ใหม่ๆ มีขนาดตัวเล็ก ความยาวประมาณ 1.5 มิลลิเมตร หัวโต ตัวใส ลักษณะตัวหนอนเป็นแบบ eruciform มีขาจริง 3 คู่ สีดำ ขาเทียม 5 คู่ ปรากฏอยู่ที่ส่วนท้องปล้องที่ 3, 4, 5 และปล้องสุดท้ายของลำตัว ที่ส่วนท้องปล้องที่ 1 มีสีดำ ลำตัวมีขนและตุ่มขนสีดํา ออกปล้องแรกทางด้านบนมีแผ่นแข็งสีดำปกคลุม สีของลำตัวจะเปลี่ยนแปลงไปเมื่อโตขึ้น เมื่อเริ่มกินอาหารลำตัวจะมีสีเขียว พอหนอนอายุได้ 5 วัน จะมองเห็นแถบสีเหลืองเริ่มจากออกปล้องแรกทางด้านบน พาดไปตามความยาวของลำตัวตรงกลางของสันหลังจนถึงส่วนท้ายของลำตัว และถุดออกไปทางด้านข้างจะพบแถบสีเหลือง ข้างละแถบพาดจากออกปล้องแรกไปยังส่วนท้ายของลำตัว หัวและแผ่นแข็งบนอกปล้องแรกเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ทางด้านข้างของลำตัวมีแถบสีน้ำตาลแถบใหญ่อยู่ข้างละแถบ และมีเส้นสีขาวแนวอยู่ทั้งด้านบนและด้านล่างของแถบสีนี้ รูหายใจที่ส่วนท้องเห็นเป็นจุดสีขาว บนอกปล้องที่ 2 และ 3 ใกล้กับรูหายใจมีจุดสีดำติดอยู่ เมื่อตัวหนอนมีอายุได้ประมาณ 10 วัน สีของลำตัวจะเปลี่ยนไป คือ ทางด้านข้างของลำตัวจะมีสีดำใหญ่พาดไปตามความยาวของลำตัว หัวมีสีค่อนข้างดำ เนื้อแถบสีดำใหญ่ด้านข้างลำตัวขึ้นไป จะมีจุดสีเหลืองปล้องละหลายจุด ยกเว้นปล้องท้องปล้องที่ 1 และทางด้านบนของจุดสีเหลืองนี้จะมีรอยแฉับรูปร่างค่อนข้างเป็นสามเหลี่ยมสีดำ ตัวหนอนเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว มีความยาวประมาณ 32-34 มิลลิเมตร ตัวหนอนในระยะที่ 3 จะทำความเสียหายให้กับพืชผักมาก (ภาพ 4) ชอบกัดกินผักใบอ่อนมากกว่าใบแก่ ออกหากินในเวลากลางคืน แต่บางครั้งก็พบหนอนกระทู้ผักในเวลากลางวัน ซึ่งอยู่รวมกันเป็นกลุ่มๆ โดยซ่อนตัวกัดกินเนื้อเยื่ออยู่ทางด้านล่างของใบ ระยะการเป็นตัวอ่อนของหนอนประมาณ 15-21 วัน ก่อนเข้าดักแด้ตัวหนอนจะลงไปในดิน และหุดตัวสั้นลง จากนั้นก็จะเข้าดักแด้ในดินนั้น

ดักแด้ของแมลงชนิดนี้เป็นแบบ obtected pupa มีอวัยวะขาและปีกติดกันเป็นเนื้อเดียวกับลำตัว ขนาดของดักแด้ยาวประมาณ 14-16 มิลลิเมตร และมีสีน้ำตาลแก่ ที่ปลายหางของดักแด้มี cremaster ส่วนโคนมีสีดำ ส่วนปลายมีสีขาวใส เมื่อดักแด้อายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลไหม้ รูหายใจมีสีดำเห็นชัดเจน ระยะการเป็นดักแด้ประมาณ 7-10 วัน จึงออกเป็นตัวเต็มวัย

ตัวเต็มวัยเป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง มีขนาดลำตัวยาวประมาณ 11-16 มิลลิเมตร เมื่อกางปีกเต็มที่วัดจากขอบปีกหนึ่งไปยังอีกขอบปีกหนึ่งประมาณ 24-30 มิลลิเมตร เมื่อเกาะนิ่งอยู่กับที่ ปีกจะหุบเป็นรูปหลังคา ปีกคู่หน้ามีรูปมีสีดำปน และมีจุดกลมสีเทาเข้มปนแดงอยู่ตรงกลางปีกข้างละจุด ขอบปีกด้านข้างมีจุดสีดำเรียงกันอยู่เป็นแถว 7-8 จุด ปีกคู่หลังมีสีอ่อนกว่า มองเห็นเป็นสีขาวบริเวณขอบปีกทางด้านหน้า (costal margin) และด้านปลายปีก (apical margin) ปีกมีขนขึ้นจำนวนมาก หนวดเป็นแบบเส้นด้าย ตารวมมีขนาดใหญ่ ขาและลำตัวเต็มไปด้วยเกล็ด บริเวณด้านล่างของอกและเท้ามีสีเทา แต่ทางด้านบนมีสีเข้มกว่า ตัวเต็มวัยมีอายุ 7-10 วัน



สำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่นเปราะ หรือ โสมชบาสามารถทำได้หลายวิธี อาทิ การผสมพันธุ์ และการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อให้ได้พืชที่มีลักษณะตามที่ต้องการ ความผันแปรทางพันธุกรรมทำให้มีโอกาสที่จะเลือกได้ลักษณะที่ใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์มีหลายวิธี คือ การกระตุ้นให้กลายพันธุ์โดยการใช้รังสี สารเคมี การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการใช้วิธีตัดต่อพันธุกรรม โดย EMS (Ethyl methanesulphonate) เป็นสารเคมีที่นิยมใช้มากในการเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์ เนื่องจากใช้ได้ผลดีกับพืชหลายชนิด

สารตัวหนึ่งคือ Colchicine เป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดจำนวนโครโมโซมในพืชหลายชนิด หรือ Somatic mutation เช่นสามารถได้ต้นพืชที่เป็น tetraploid หากเริ่มจากต้นที่เป็น diploid โดยพืชที่เป็น polyploidy นั้น มักจะแสดงลักษณะที่โดดเด่นในด้านการเจริญทางต้น หรือส่วนขยายพันธุ์ เช่น มีขนาดใบ ต้น ดอก ผล ใหญ่ขึ้น หรือทำให้ต้นพืชผลิตสาร secondary metabolite ได้มากกว่าปกติ มีรายงานการใช้ Colchicine ในพืชหลายชนิด ในด้านไม้ดอกไม้ประดับนั้นมีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในพืชหลายชนิด อาทิ การทดลองแช่ปลายยอด *Alocasia micholitziana* ด้วย colchicine and oryzalin ในสภาพปลอดเชื้อ Thao *et al.* (2003) Eeckaut *et al.* (2002) ใช้วิธีหยด Colchicine ลงระหว่างใบเลี้ยงของต้นอ่อน อายุ 3 สัปดาห์ ของต้น *Rhododendron simsii* ทุกวันเป็นเวลา 3 และ 7 วัน ส่วน Takamura and Miyajima (1996) ได้นำขึ้นส่วนหัวของ *Cyclamen persicum* มาจุ่มในสารละลายของ Colchicine โดยไม่มีการแช่เป็นเวลา 1, 2, 4 and 7 วัน นอกจากนี้ในการใช้ชิ้นส่วนอื่นของพืช Ishikawa (1999) รายงานการใช้ Colchicine ในการผลิต amphidiploids ของ *Alstroemeria* โดยเลี้ยงรังไข่ใน Colchicine เข้มข้น 0.05% เป็นเวลา 4 วัน ในสภาพปลอดแก้ว หรือแช่ส่วน ลำต้นใต้ดินลงใน Colchicine ที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นที่ 0.5% ซึ่งพบว่าเกิดต้นที่เพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้น จำนวน 1 ต้น จากหัวที่ถูกแช่เป็นเวลา 1 วัน และมี 3 ต้น ที่เกิดจากการจุ่มหัวเป็นเวลา 4 วัน ใน Colchicine โดยต้นที่เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นนี้ไม่เป็นหมัน นอกจากนี้ยังให้ดอกที่ใหญ่กว่าปกติ และเจริญเติบโตได้ดี Wu *et al.* (2007) ใช้ Colchicine ในการกระตุ้นให้เกิดเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียที่เป็น diploid จากดอกที่ยังอ่อนอยู่ *Lilium* ของบางสายพันธุ์ พบว่า Colchicine ความเข้มข้น 0.02-0.2% สามารถกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ 0-25.8%

Chen and Gao (2007) ได้รายงานการกระตุ้นให้เกิด tetraploid ของ *Astragalus membranaceus* อย่างมีประสิทธิภาพในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำเอาตายอดที่ได้จากต้นที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี DMSO (dimethyl Sulfoxide) 2% และ Colchicine เข้มข้น 0.2 % เป็นเวลา 36 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นให้เกิด tetraploid ได้ สูงถึง 35.3 % ส่วน Takamura and Miyajima (1996) ทดลองใช้ Colchicine 100 mg/L กระตุ้น ขึ้นส่วนหัวของ cyclamen 'Kage Yellow' พบว่าทำให้เกิดต้นที่เป็น tetraploid จำนวน 2 ต้น ที่มีกลีบดอกขนาดใหญ่ อย่างไรก็ตาม Yetisira and Sari (2003) รายงานว่าวิธีการจุ่มปลายยอดของ *Cucumis melo* ที่ปลูกใน

สภาพโรงเรือน ในสารละลาย colchicine ทำให้เกิด dihaploid ถึง 89% ซึ่งดีกว่าการแช่ต้นอ่อนหรือขึ้นส่วนต้นลงในสารละลายของ Colchicine ในสภาพหลอดแก้ว ถึง 3 เท่า นอกจากนี้ยังมีการใช้ Colchicine ในการกระตุ้นเมล็ดของพืชด้วย โดย Rubuluza *et al.* (2006) ทำการเหนี่ยวนำให้เกิด polyploidisation ของ ต้นไม้ *Colophospermum mopane* โดยนำเมล็ดมาแช่ในสารละลาย Colchicines 0.05, 0.1% (w/v) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายเมล็ดไปในอาหาร 1/8 MS เมื่อวิเคราะห์พบว่าจากต้นที่รอดชีวิตทั้งหมด 45 ต้น มี 44% ที่เป็น tetraploid ซึ่งต้นเหล่านี้แสดงลักษณะที่แตกต่างไปจากต้นควบคุมคือมีการแตกกิ่งแขนง ใบย่อย และแตกยอดเร็ว การใช้ Colchicine เข้มข้นมากกว่า 0.1% และใช้เวลามากกว่า 48 ชั่วโมงทำให้การเจริญ ชะงักและตายลง ส่วน Lehrer (2008) นำเมล็ดที่เริ่มงอกของ Japanese barberry มาจุ่มใน Colchicine .02%, .05%, .1% and .2% และ oryzalin .002%, .005%, .01% and .02% ที่ละลายใน 1% DMSO เป็นเวลา 6, 12 and 24 ชั่วโมง พบว่าสารทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพเท่าเทียมกันในการกระตุ้นให้เกิด tetraploid แต่ oryzalin ทำให้เมล็ดตายมากกว่า colchicine ทั้งนี้ colchicine มีความเป็นพิษน้อยกว่าต้นกล้า อย่างไรก็ตาม oryzalin สามารถกระตุ้น tetraploid ได้ที่ความเข้มข้นต่ำ โดยความเข้มข้น ของ oryzalin ที่เหมาะสมคือ 0.002% ซึ่งทำให้เกิด polyploidy 28% ขณะที่ colchicine 0.05 %-0.2% อยู่ในช่วงเหมาะสม พบว่าเวลาในการจุ่มสาร 6-24 ชั่วโมง ไม่ส่งผลแตกต่างกันต่อการเกิด tetraploid และพบว่าต้นที่มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมนั้น บางต้นมีใบผิดปกติ ขอบใบขรุขระ