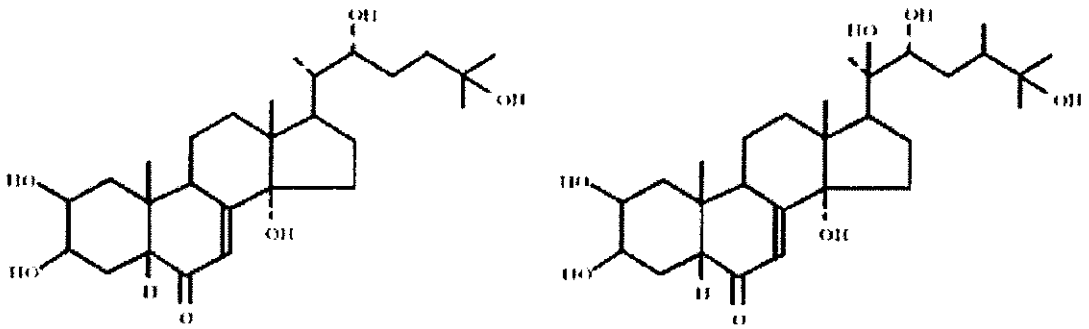
บทที่ 2
ทฤษฎี

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับฮอร์โมนเอคไดโซน

ฮอร์โมนเอคไดโซนเป็นฮอร์โมนลอกคราบ (molting hormone) ชนิดหนึ่งที่หลั่งมาจากต่อม โพรธอแรกซิก (prothoracic gland) มีสูตรโมเลกุลคือ C27 H44 O6 เป็นสารจำพวกสเตอรอยด์ ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่จำเป็นสำหรับการเจริญและเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ฮอร์โมนเอคไดโซนจะกระตุ้นเซลล์เอพิเดอร์มิส (epidermis)ให้หลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบและสารไคตินที่เป็นองค์ประกอบของชั้นคิวติเคิล (cuticle) และทำให้เซลล์เอพิเดอร์มิสนี้เจริญและแบ่งตัวได้ ผลโดยตรงที่เกิดจากฮอร์โมนเอคไดโซน ได้แก่ การกระตุ้นให้เกิดกระบวนการลอกคราบ ควบคุมการเจริญเติบโตของแมลง กระตุ้นปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์และมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม ส่วนผลทางอ้อมที่เกิดจากฮอร์โมนเอคไดโซนคือ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การซ่อมแซมส่วนที่ชำรุดเสียหาย และมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงสีของลำตัวของแมลง ฮอร์โมนลอกคราบในกลุ่มเอคไดโซนมีหลายชนิดด้วยกัน แต่ที่น่าสนใจและพบมากในธรรมชาติคือ เบตา-เอคไดโซน (beta-ecdysone) หรือ 20-ไฮดรอกซีเอคไดโซน (20-hydroxyecdysone) และแอลฟา-เอคไดโซน (alpha-ecdysone) ดังแสดงสูตรโครงสร้างในรูปที่ 1



alpha-ecdysone beta-ecdysone

รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของฮอร์โมนลอกคราบแอลฟาและเบตา-เอคไดโซน (Wilson *et al.*,1982)

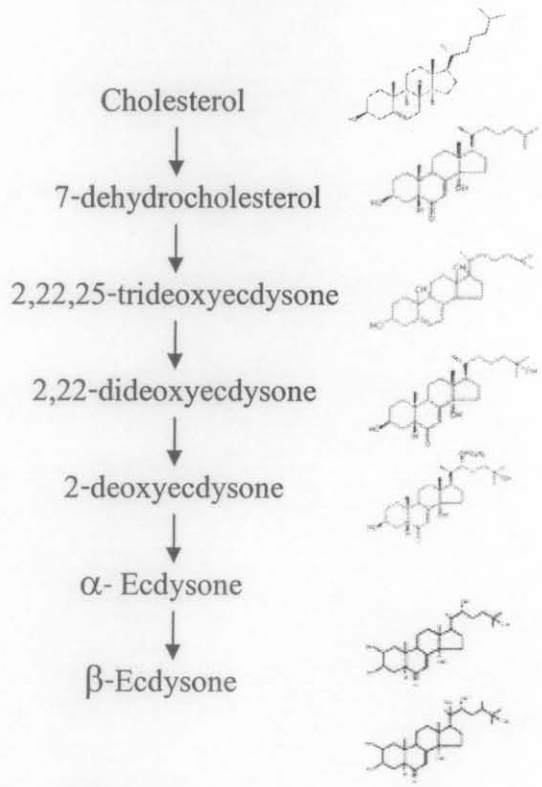
ในปัจจุบันฮอร์โมนลอกคราบสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ตามแหล่งที่มา คือ ฮอร์โมนลอกคราบจากสัตว์ (zooecdysone) และฮอร์โมนลอกคราบจากพืช (phytoecdysone) ฮอร์โมนทั้งสองประเภทนี้เป็นสารจำพวกโพลีไฮดรอกซีสเตอรอยด์ (polyhydroxy steroid)

กล่าวคือจะมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 22 ของแขนงข้าง (side chain) ฮอร์โมนลอกคราบจากสัตว์ชนิดแรกที่ค้นพบคือ แอลฟา-เอคไดโซน ซึ่งพบในดักแด้ของหนอนไหม (silkworm; *Bombyx mori*) ในปี ค.ศ.1954 (Butenandt and Karlson, 1954) ต่อมาในปี ค.ศ. 1956 ได้มีการค้นพบฮอร์โมนลอกคราบชนิดที่สองคือ เบตา-เอคไดโซน ซึ่งพบในหนอนไหมเช่นกัน (Karlson, 1956) (เบตา-เอคไดโซนต่างจากแอลฟา-เอคไดโซนตรงที่เบตา-เอคไดโซนจะมีหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 20 แต่แอลฟา-เอคไดโซนจะเป็นอะตอมไฮโดรเจนแทน) สำหรับเบตา-เอคไดโซนนี้อาจมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไปตามแหล่งที่พบ ตัวอย่างเช่น ครัสท์เอคไดโซน (crusecdysone) แยกสกัดได้จากกุ้งฝอย (crayfish; *Jasus lalandei*) ซึ่งจัดเป็นฮอร์โมนลอกคราบชนิดแรกที่แยกสกัดได้จากสัตว์พวกครัสตาเซียน (crustacean) หรือ 20-ไฮดรอกซีเอคไดโซน และเอคไดสเตอโรน (ecdysterone) ซึ่งแยกสกัดได้จากหนอนไหม เป็นต้น (Hamshire and Horn, 1966; Hoffmeister and Grutzmacher, 1966)

ส่วนฮอร์โมนลอกคราบจากพืชนั้น มีรายงานการศึกษาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1966 ฮอร์โมนชนิดแรกที่แยกสกัดได้จากพืชคือ เบตา-เอคไดโซน ซึ่งแยกสกัดได้จาก *Polypodium elatus* (Galbraith and Horn, 1966) ต่อมาได้มีการค้นพบฮอร์โมนลอกคราบอีกหลายชนิด ตัวอย่างเช่นโพสนาสเตอโรน (ponasterone) จากต้น *Podocarpus nakaii* Hay (Nakanishi *et al.*, 1966) แอลฟา-เอคไดโซนจาก *Polydium vulgare* L. และ *Pteridinium aquilinum* (Heinrich and Hoffmeister, 1967; Kaplanis *et al.*, 1967) และเบตา-เอคไดโซนและอิโนโคสเตอโรน จาก *Achyranthus fauriei* (Takemoto *et al.*, 1967) เป็นต้น จนถึงปัจจุบันมีการค้นพบฮอร์โมนลอกคราบจากพืชที่มีโครงสร้างแตกต่างกันมากกว่า 40 ชนิด ในจำนวนนี้เบตา-เอคไดโซนเป็นฮอร์โมนลอกคราบที่พบกระจายอยู่มากที่สุด สำหรับชนิดของพืชที่มีการสังเคราะห์ฮอร์โมนลอกคราบเท่าที่มีรายงานจนถึงปัจจุบันมีมากกว่า 1,056 ชนิด ตัวอย่างของพืชเหล่านี้ได้แก่ *Ajuga reptans, Spinacia oleraceae, Zea mays, Limnanthes douglasii* (Tomas *et al.*, 1992; Grebenok and Adler, 1993; Sarkery *et al.*, 1997) เป็นต้น

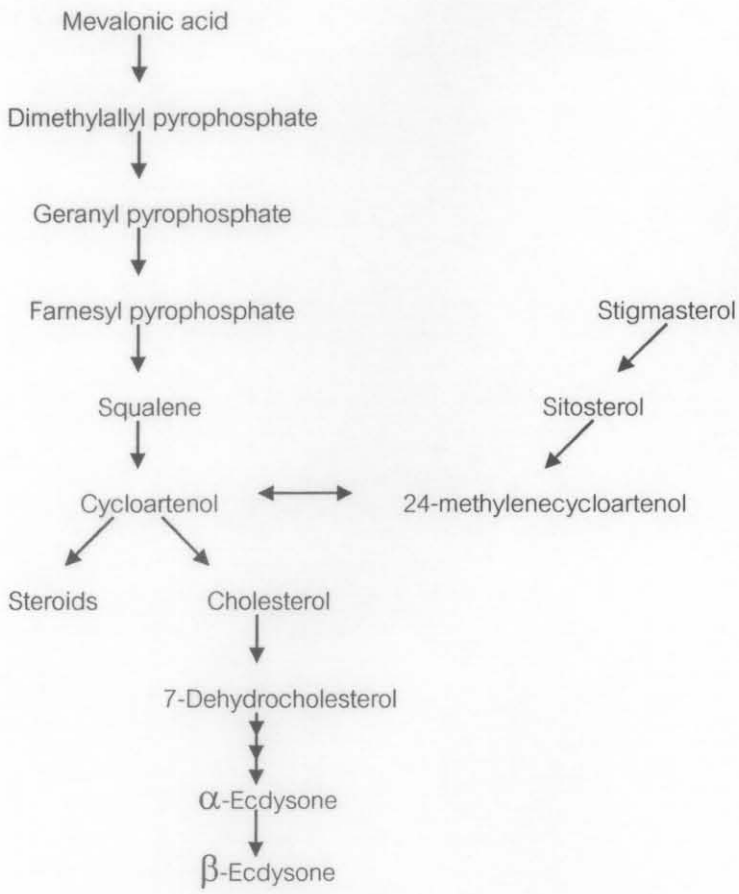
ในการสังเคราะห์ฮอร์โมนลอกคราบจากสัตว์และพืชนั้น มีวิถีการสังเคราะห์ที่เป็นไปได้ดังแสดงในรูปที่ 2 และ 3 ในวิถีการสังเคราะห์ฮอร์โมนลอกคราบจากสัตว์ พบว่ามีเพียง 2 ปฏิกิริยาเท่านั้นที่ได้รับการทดสอบและยืนยันว่าเกิดได้จริงในแมลงตัวอ่อนขณะที่เป็นหนอน ปฏิกิริยาดังกล่าวคือปฏิกิริยาการเปลี่ยน 2-ดีออกซีเอคไดโซน (2-dcoxyecdysone) ไปเป็น แอลฟา-เอคไดโซน และปฏิกิริยาการเปลี่ยนแอลฟา-เอคไดโซนโดยการเติมหมู่ไฮดรอกซิลได้เป็นเบตา-เอคไดโซน (Luu and Werner, 1996) อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาที่จัดว่ามีความสำคัญมากในกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมนลอกคราบจากสัตว์ คือปฏิกิริยาการเปลี่ยนแอลฟา-เอคไดโซน ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดยอาศัยเอนไซม์ ecdysone 20-monooxygenase ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม cytochrome P450 เอนไซม์ดังกล่าวนี้ได้รับการศึกษากันอย่างแพร่หลาย และยอมรับว่าเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญใน

กระบวนการพัฒนาและการสืบพันธุ์ของแมลง แหล่งที่สำคัญของเอนไซม์ดังกล่าวคือเนื้อเยื่อในส่วนของระบบทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ท่อมัลพิเจียน (mulpighian tubules) ผนังลำตัว (intergument) และอวัยวะสืบพันธุ์ (gonads) (Smith, 1985 cite in Yu, 1995)



รูปที่ 2 วิถีที่เป็นไปได้ในการสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซนในแมลง (Luu and Werner, 1996)

ส่วนการสังเคราะห์ฮอร์โมนลอกคราบในพืชนั้น (ดังรูปที่ 3) พบว่าขั้นตอนที่มีความสำคัญมากคือปฏิกิริยาการเปลี่ยนแอลฟา-เอคไดโซนไปเป็นเบตา-เอคไดโซน ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดยอาศัยเอนไซม์ ecdysone 20-monooxygenase เช่นเดียวกับวิถีการสังเคราะห์ฮอร์โมนสัตว์ เอนไซม์ดังกล่าวนี้จัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม cytochrome P450 เช่นกัน (Grebenok *et al.*, 1996)



รูปที่ 3 วิถีการสังเคราะห์ฮอร์โมนลอกคราบที่เป็นไปได้ในพืช (Vickery and Vickery, 1981)

2.2 ต้นไข่เน่า

ต้นไข่เน่าชื่อวิทยาศาสตร์ *Vitex glabrata* R.Br. จัดเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ VERBENACEAE มีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไปเช่น กะมอบ กะมอย ขี้เห็น ค่ามอบน้อย คมขวาน ฝรั่งโคก ปลู ลักษณะทั่วไปของต้นไข่เน่าคือเป็นไม้ยืนต้น ขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ผลัดใบ สูงประมาณ 10 เมตร ลำต้นตั้งตรง เปลือกหนาสีน้ำตาลเข้ม ทรงพุ่มกลมแผ่กว้าง กิ่งอ่อนและยอดอ่อนมีขนใบเป็นใบประกอบแบบนิ้วมือเรียงตามขวาง ใบย่อย 3-5 ใบ รูปไข่ กลมแกมวงรี หรือรูปใบหอกกลม กว้าง 4.5-6 เซนติเมตร ยาว 8.5-12.5 เซนติเมตร ปลายแหลม ขอบใบหยักรูปฟันเลื่อย สีเขียวสด ดอกมีสีขาวหรือสีม่วงอ่อน ออกเป็นช่อที่ซอกใบ มีดอกย่อย 3-5 ดอก ช่อดอกเชื่อมติดกันเป็นหลอดกว้าง ปลายแยกเป็นกลีบ 5 กลีบ มีขนละเอียด เกสรตัวผู้โพล่พ้นกลีบดอก ขนาดดอก 1.8 เซนติเมตร ผล สด รูปไข่ หรือรูปไข่กลม มีขนาด 1.2-1.5 เซนติเมตร เมื่อสุกมีสีม่วงคล้ายสีผลแห้วหรือสีดำเทามีรสหวานอมเปรี้ยว มีกลิ่น การขยายพันธุ์ โดยใช้เมล็ดและตอนกิ่ง (รูปที่ 4)

ต้นไข่เน่าพบได้ทั่วไปในที่ดอน พบกระจายในภาคเหนือและภาคตะวันออก สรรพคุณที่สำคัญของต้นไข่เน่าคือ เป็นยาช่วยเจริญอาหาร เปลือกต้น แก้บิด แก้เด็กถ่ายเป็นฟอง แก้โรคพยาธิในเด็กที่มีอาการเบื่ออาหาร แก้ไข้ แก้โรคเบาหวาน ผล เป็นยาแก้โรคตานขโมย เปลือกผล รักษาโรคเกล็ดกระดี่ขึ้นนัยน์ตา แก้ซาง แก้โรคกระเพาะอาหาร หรือลำไส้อักเสบของทารก

รูปที่ 4 ลักษณะของต้นไข่เน่า (www.dnp.go.th)

2.3 งานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตสารเอคไดโซนจากต้นไข่เน่า

ในปี พ.ศ. 2532 ปัทมา ถาวรนิธิ และคณะ รายงานว่าเปลือกต้นไข่เน่าที่ปลูกในธรรมชาติมีการผลิตและสะสมสารเบตา-เอคไดโซนไว้ได้สูงถึง 2.513 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง ในขณะที่ใบและต้นมีการผลิตเบตา-เอคไดโซนได้ในระดับค่อนข้างต่ำประมาณ 0.133 และ 0.147 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการที่จะผลิตฮอร์โมนลอกคราบเบตา-เอคไดโซน จากธรรมชาติโดยวิธีการลอกเปลือกต้นไข่เน่าจะทำให้ต้นแคระแกร็นและตายได้ อีกประการหนึ่งต้นไข่เน่าเป็นไม้ยืนต้นเจริญเติบโตช้า ไม่เหมาะในการลงทุนปลูกและบำรุงรักษา จึงทำให้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆ เพื่อใช้ในการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนจากต้นไข่เน่า

ในปี พ.ศ. 2533 ปัทมา ถาวรนิธิ และคณะ รายงานถึงการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อช่วยในการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนจากต้นไข่เน่า โดยวิธีการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากส่วนต้นใบ และเปลือกของต้นไข่เน่าในอาหารสูตร Murashike and Skoog ครึ่งสูตร (1/2 MS) ที่เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-ไดคลอฟีนอกซีอะซิติกแอซิด เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กับเบนซิลอะดินีน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตฮอร์โมนลอกคราบเบตา-เอคไดโซนได้สูงโดยเฉลี่ยประมาณ 0.015-0.020 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง

อุทัยพรรณ ประเสริฐสม (2533) ได้รายงานถึงปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนจากเซลล์แขวนลอยของต้นไข่เน่า พบว่าการเจริญของเซลล์แขวนลอยในอาหารสูตร B-5 จะสูง

กว่าในอาหารสูตร ½ MS เล็กน้อย และการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนจะสูงขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วย 2,4-ไดคลอฟีนอกซีอะซิติกแอซิด นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมโคเลสเตอรอยและสติกมาเสตอรอล-ซิโตสเตอรอลในอาหารเพาะเลี้ยงจะช่วยให้การผลิตสารเบตา-เอคไดโซนเพิ่มขึ้นอีกด้วย

ปรียดา ดวงหาคลัง (2544) ศึกษาการผลิตฮอร์โมนลอกคราบเบตา-เอคไดโซนจากเซลล์เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-Lift ขนาด 2 ลิตร พบว่าภายใต้สภาวะการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเท่ากับ 5.60 ให้แสงสีม่วง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในอาหารสูตร B-5 ที่เติมเออร์โกแคลซิเฟอรอล 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถผลิตเบตา-เอคไดโซนได้สูงประมาณ 2.12 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร B-5 ที่เติมเออร์โกแคลซิเฟอรอล 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับฟีโนบาร์บิทอล 120 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถผลิตแอลฟา-เอคไดโซนได้ประมาณ 2.67 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน