เซลเซียส ความเร็วรอบ18,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสด้านบน (supernatant) มาทำการหาระดับเอนไซม์ทำลายพิษ และปริมาณโปรตีนรวมโดยเครื่อง spectrophotometer

การตรวจวัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส (carboxylesterase) การตรวจวัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส ใช้วิธี *p*NPA ดัดแปลงวิธีการของBullangpoti *et al.* (2007) and Visetson *et al.* (2002, 2003, 2004 and 2005) ตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 400 นาโนเมตร ตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงของ paranitrophenol (สารสีเหลือง) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของparanitrophenyl acetate (*p*NPA) โดยมีเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

การตรวจวัดเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส (glutathione S-transferase) การตรวจวัดเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส ใช้วิธี CDNB ตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 340 นาโนเมตร ตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงของ Monochloronitrobenzene glutathione ซึ่งเกิดจาก dichloronitrobenzene ทำปฏิกิริยากับ glutathione โดยมีเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

การตรวจวัดปริมาณโปรตีนรวมในแมลงวันผลไม้ ทำการตรวจวัดปริมาณโปรตีนรวมโดยดัดแปลงวิธีการของ Bradford assay ตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 595 นาโนเมตรเพื่อนำค่าโปรตีนรวมที่ได้มาเปรียบเทียบกับระดับเอนไซม์ทำลายพิษหลังจากได้รับสารสกัด

5. ผลการทดลอง

5.1 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชในการควบคุมประชากรของหนอนกระทู้หอม โดยจะเปรียบเทียบการทดสอบความเป็นพิษในรูปแบบต่างๆ กับหนอนวัยสอง และเปรียบเทียบอัตราการตายที่ช่วงเวลาหลังรับสารสกัดที่แตกต่างกัน

หลังจากสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบ Soxhlet extraction method ได้ทำการทดสอบ คัดเลือกหาสารสกัดจากพืชที่มีประสิทธิภาพที่สุด กับหนอนกระทู้หอมวัยที่สอง พบว่า สารสกัดจากละหุ่งแดงซึ่งเป็นสารที่หาง่าย และมีประสิทธิภาพดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดชนิดอื่น โดยให้ผลทั้งเรื่องความเป็นพิษทั้งในเรื่องราคา ปริมาณสารสกัดหยาบ และประสิทธิภาพ ในการควบคุมหนอนกระทู้หอม ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าความเป็นพิษของสารสกัดจากพืชชนิดต่างๆ ที่ 24 ชั่วโมง หลังทดสอบโดยวิธีการจุ่มโดยตรง (Dipping method), การพ่นฝอยหมอกด้านบน (Topical sprayer method)

24- Hour	Dipping method		Topical Sprayer method	
	Concentration (mg/l)	Standard Error	Concentration (mg/l)	Standard Error
Jatropha gossypifolia	6855.88 ($r^2 = 0.88$)	1699.650	10,716 ($r^2 = 0.95$)	891.35
Cleome viscose	14,512 ($r^2 = 0.89$)	387.76	14,716 ($r^2 = 0.87$)	888.74
Amaranthus viridis	15,201.73 ($r^2 = 0.89$)	358.43	16,241.13 (r^2=0.96)	958.43

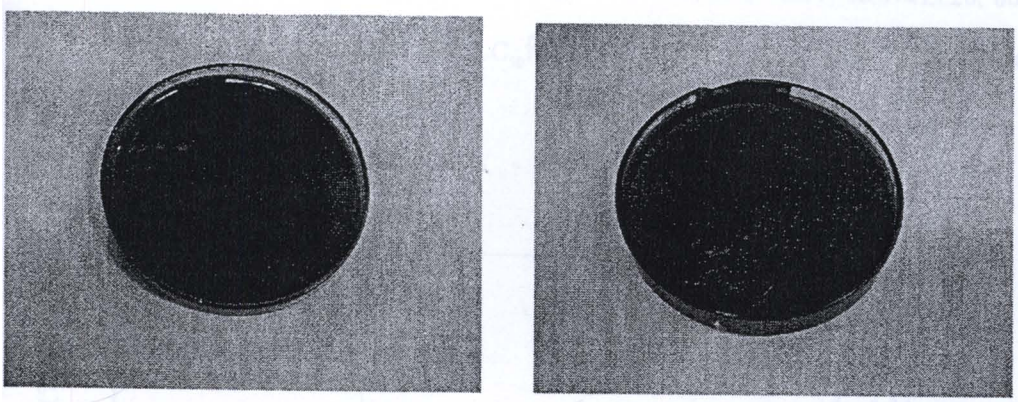
ดังนั้น สารสกัดจากใบละหุ่งแดง จึงมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้หอมมากที่สุด จึงจะขอมุ่งเน้นเฉพาะ การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับประสิทธิภาพละหุ่งแดง โดยใช้สารละลายที่มาสกัดโดยวิธีซอกซ์เลต สองตัวทำละลาย คือ Ethyl alcohol เพื่อเปรียบเทียบกับสารที่สกัดด้วยสาร ethylaceate จากนั้นนำสารที่ออกฤทธิ์ดีที่สุดมาหาสารออกฤทธิ์สำคัญต่อไป

5.2ปริมาณสารจากใบละหุ่งแดง (*Jatropha gossypifolia*)

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

ตารางที่ 2 ปริมาณสารจากใบละหุ่งแดง

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



ก ข

ภาพ สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายต่างๆ

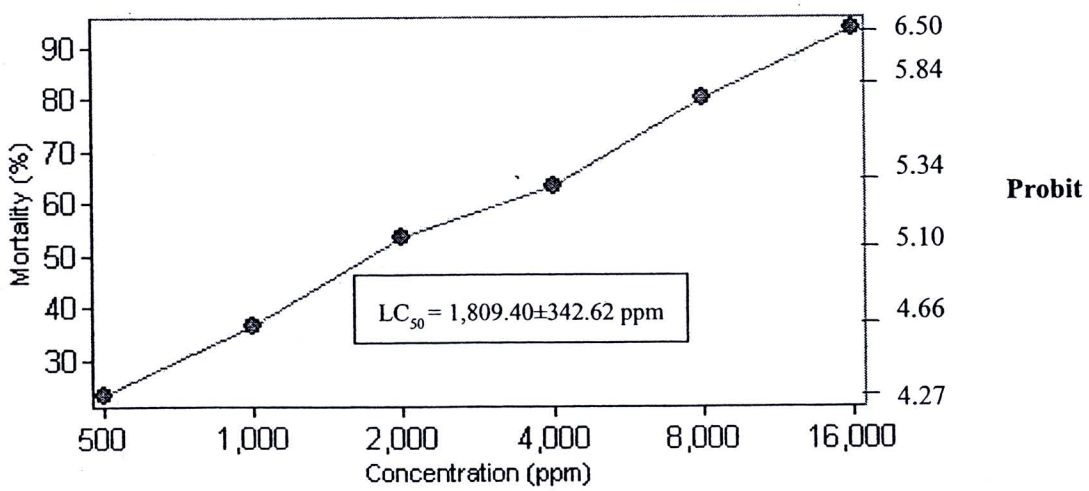
ก. สารสกัดหยาบที่มี Ethyl acetate เป็นตัวทำละลาย

ข. สารสกัดหยาบที่มี Ethanol เป็นตัวทำละลาย

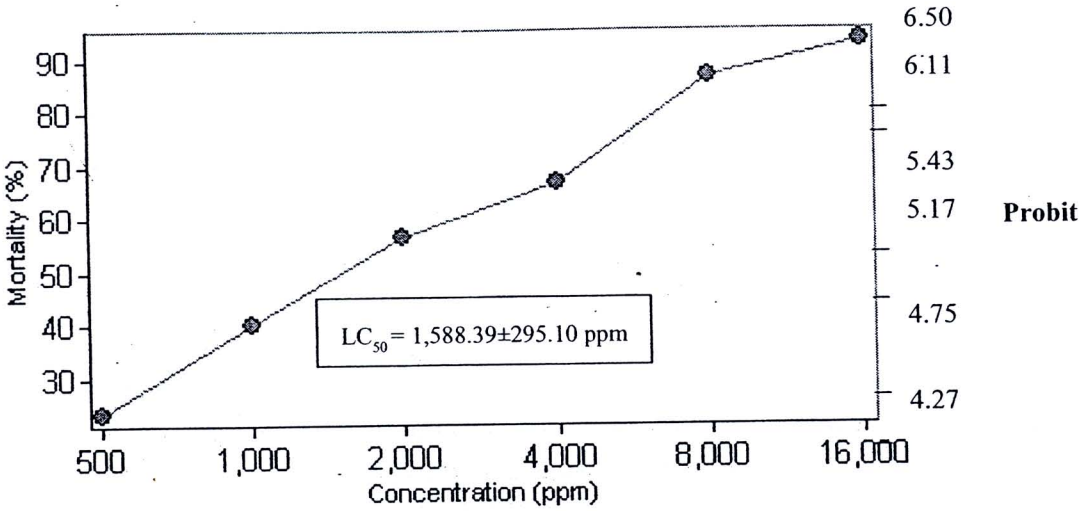
5.3.1 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบละหุ่งแดง (*Jatropha gossypifolia*) ที่มีต่อหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*)

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

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



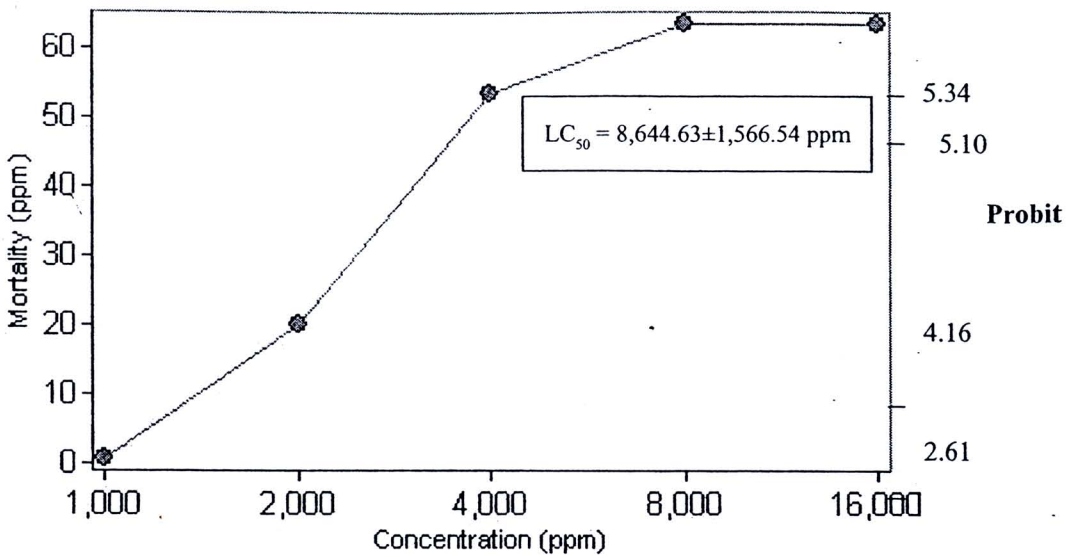
ภาพ เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ที่เวลา 24 ชั่วโมงโดยวิธี Dipping method



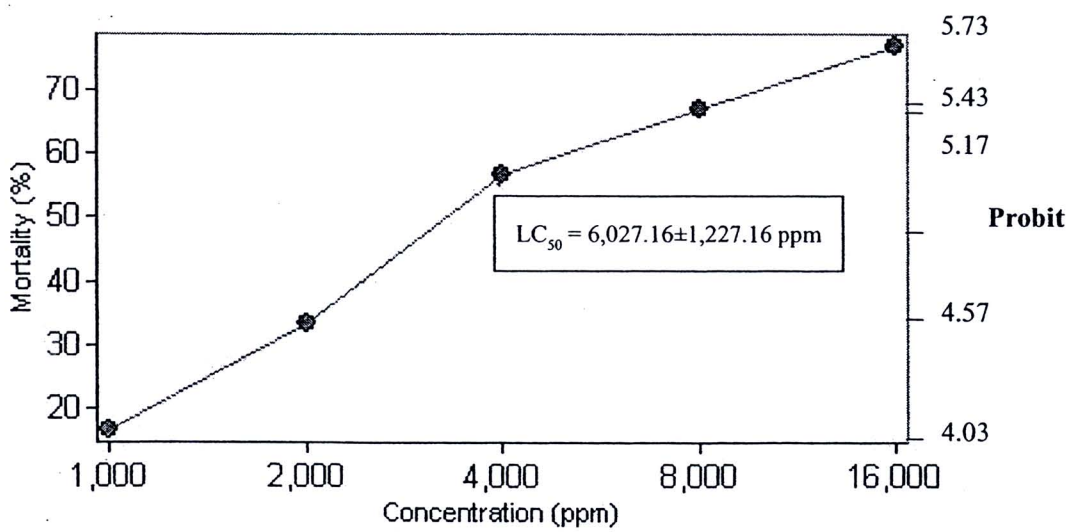
ภาพ เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ที่เวลา 48 ชั่วโมงโดยวิธี Dipping method

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

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



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

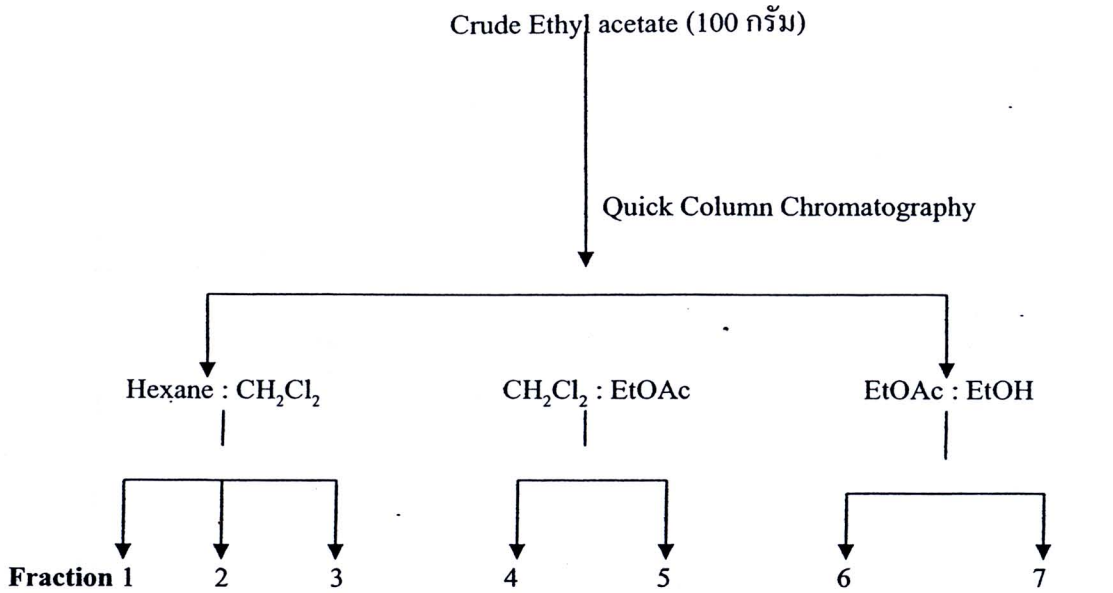


ภาพ เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ที่เวลา 48 ชั่วโมงโดยวิธี Topical sprayer method

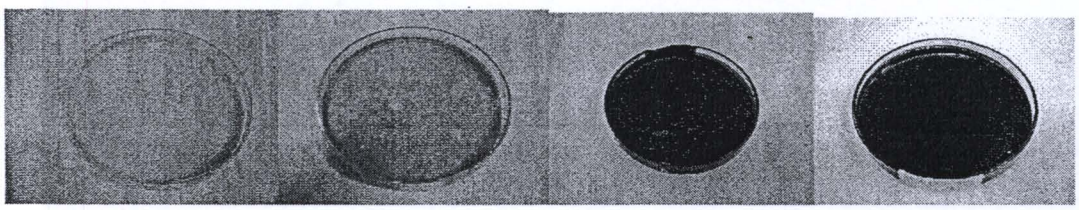
เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองดังตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่า สารสกัดด้วยตัวทำละลาย ethylacetate ให้ผลการทดลองดีกว่า คือมีค่าความเป็นพิษสูงกว่าสารสกัดจากใบแก่ละหุ่งแดง ที่สกัดโดยethyl alcohol ดังนั้น การทดลองนี้ จึงทำการแยกหาสารบริสุทธิ์ ภายในสารสกัดจากใบละหุ่งแดงแก่ซึ่งสกัดโดยใช้ ethylaceate ต่อไป

5.4 ผลการแยกสารบริสุทธิ์ของสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (*Jatropha gossypifolia*) ที่มีผลต่อความเป็นพิษในหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*)

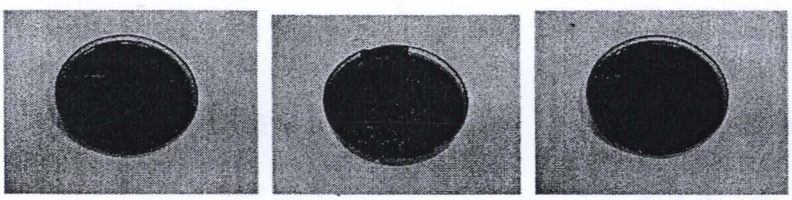
5.4.1 ผลการแยกองค์ประกอบทางเคมีของใบละหุ่งแดงโดยวิธี Quick Column Chromatography จากใบละหุ่งแดง (*Jatropha gossypifolia*) น้ำหนักแห้ง 1.44 กิโลกรัมที่สกัดด้วยวิธีซอกท์เลต (Soxhlet extraction) โดยมี Ethyl acetate เป็นตัวทำละลายแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส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



ภาพ การแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี Quick Column Chromatography



ก ข ค ง



จ ฉ ช

ภาพ สารสกัดหยาบ (Crude extract) จากระบบตัวทำละลายต่างๆ โดยวิธี Quick Column Chromatography

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

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

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

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

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

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

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

ตารางที่ การแยกองค์ประกอบทางเคมีของใบละหุ่งแดง โดยวิธี Quick Column Chromatography ด้วยระบบตัวทำละลายต่างๆ

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

5.4.2 ผลของสารสกัดหยาบจากระบบตัวทำละลายผสมที่มีต่อหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 โดยวิธี Dipping method

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

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

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

[1] การตายเฉลี่ยได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว

[2] Control treatment : 70% Ethanol

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

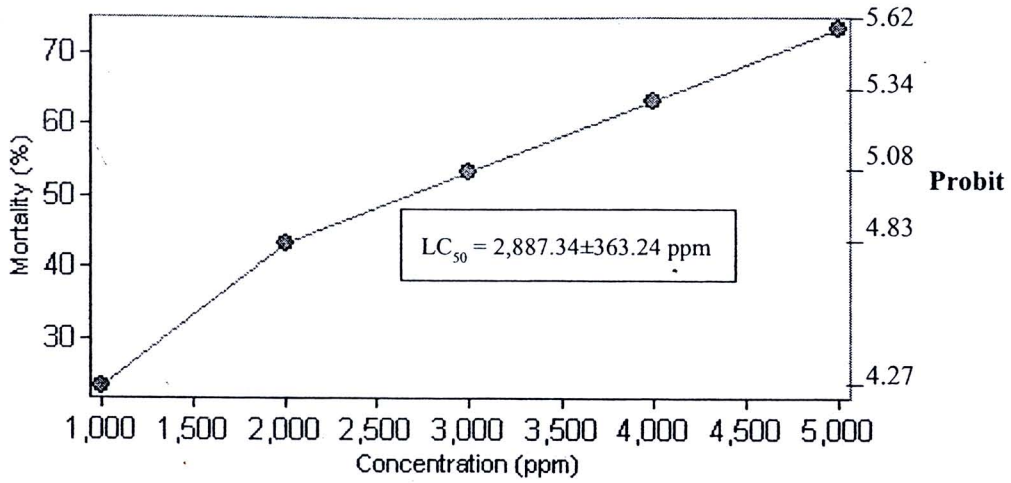
ตาราง เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน[1] ของ *S.exigua* หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Fraction ที่ 1,2,3,4,6 และ 7) ที่เวลา 24 ชั่วโมงโดยวิธีDipping method

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

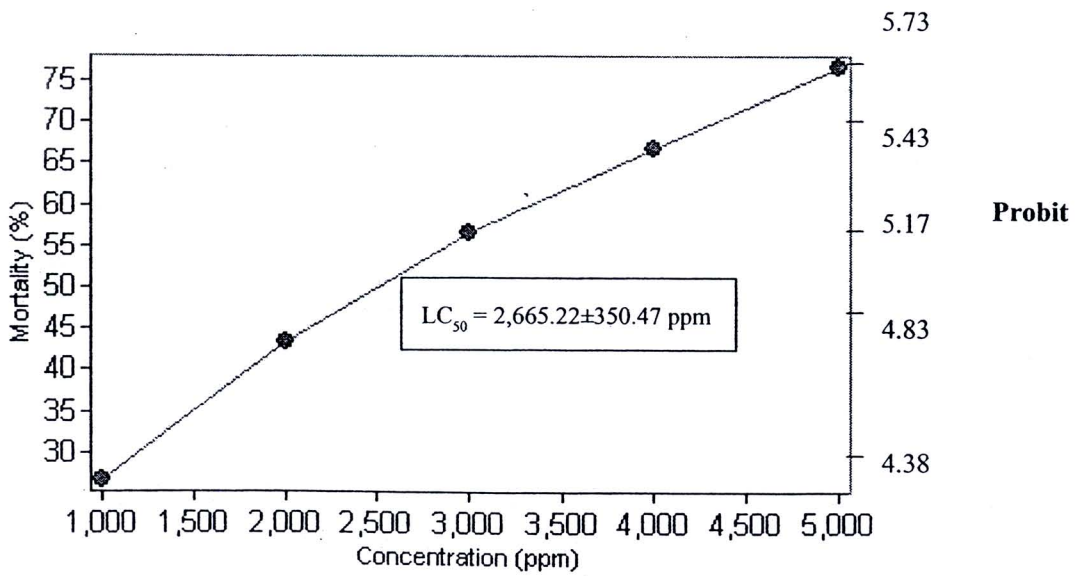
[1] การตายเฉลี่ยได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว

[2] Control treatment : 70% Ethanol

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



ภาพ เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง ที่ระบบตัวทำละลาย CH_2Cl_2 : EtOAc ที่เวลา 24 ชั่วโมงโดยวิธี Dipping method



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

5.4.3 ผลการแยกองค์ประกอบทางเคมีของใบละหุ่งแดงโดยวิธี Column Chromatography และการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโดยวิธี NMR spectroscopy

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

Fraction 5

(สารสกัดหยาบจากระบบตัวทำละลาย 40% EtOAc : CH_2Cl_2 - 100 % EtOAc)

Column Chromatography

95% CH_2Cl_2 : MeOH

Fraction 5 – 1

(ของเหลวใส)

Fraction 5 - 2

(ของเหลวใสและมีผลึกของแข็งสีขาว)

ตกผลึกด้วย 95% EtOH

(Recrystallization)

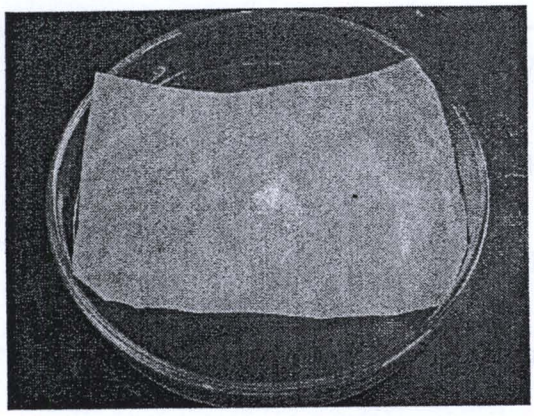
NK 01

(ผลึกสีขาว)

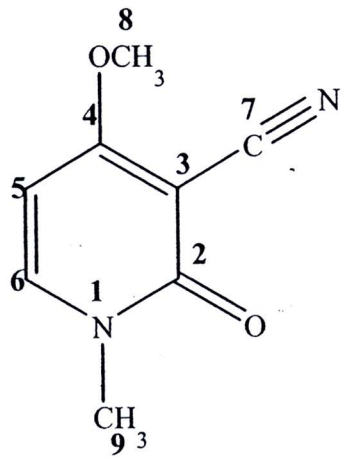
ภาพ การแยกองค์ประกอบทางเคมีจากใบละหุ่งแดงโดยวิธี Column Chromatography

จากนั้นนำสาร NK01 ซึ่งเป็นสารผลึกสีขาว (ภาพที่ 32) ไปวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโดยวิธี NMR spectroscopy แสดงผลดังนี้ ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.07 (1H, d, J = 7.6 Hz), 6.40 (1H, d, J =

7.6 Hz), 3.96 (3H, s), 3.41 (3H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 172.6, 160.9, 146.1, 114.6, 93.7, 85.7, 57.6, 36.7 ซึ่งเป็นโครงสร้างของสาร Ricinine



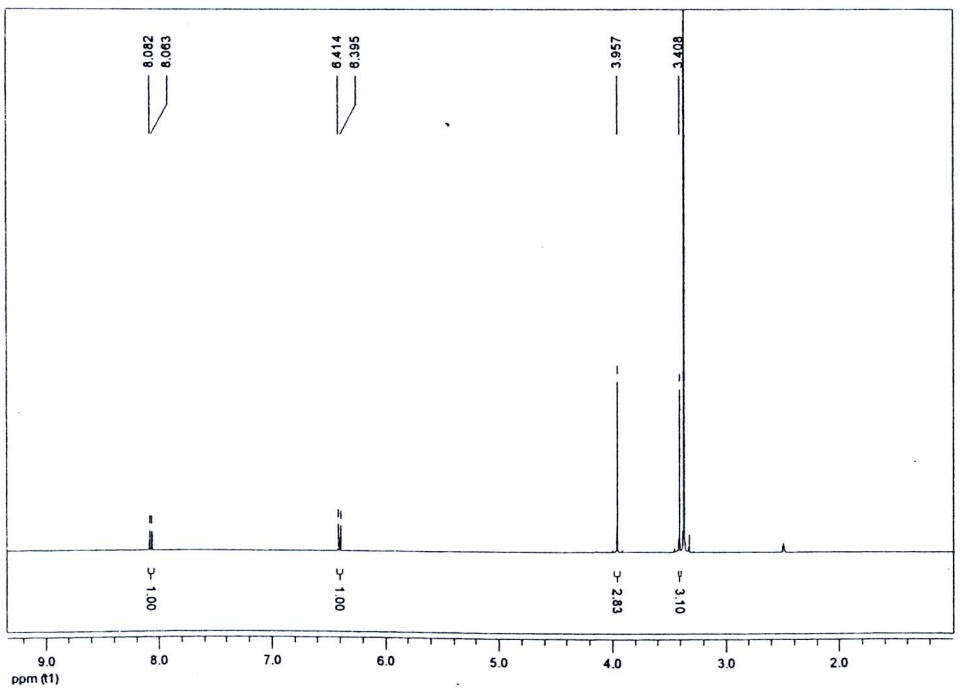
ภาพ สาร Ricinine จากขั้นตอน Column Chromatography



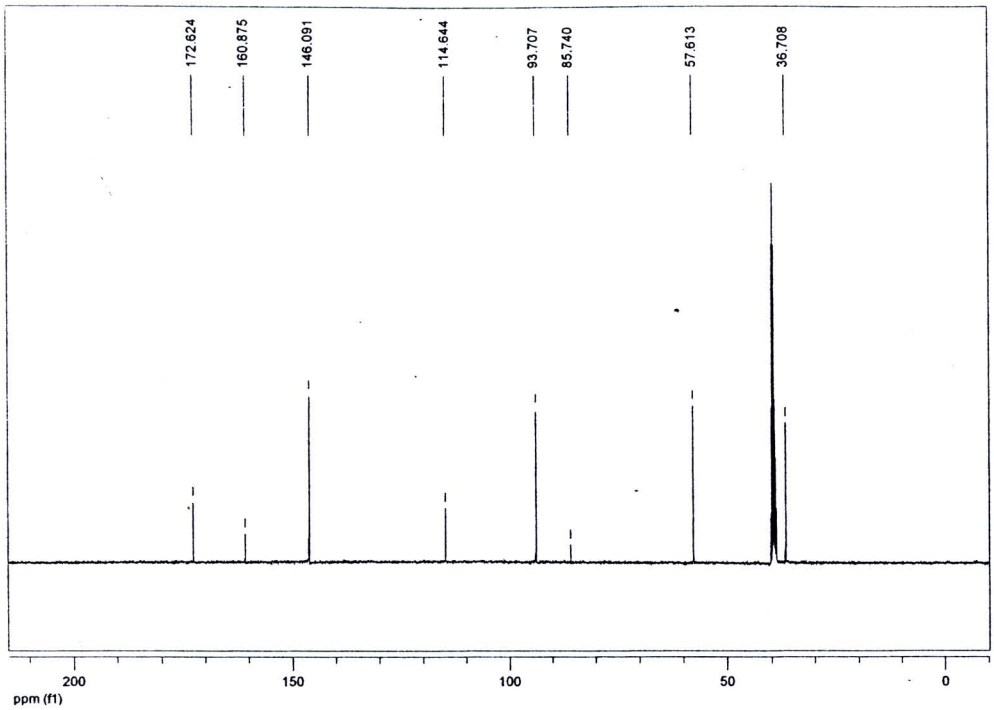
ภาพ สูตรโครงสร้างของสาร Ricinine ที่ระบุตำแหน่ง H และ C

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

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



ภาพ ^{1}H NMR spectrum ของสาร Ricinine

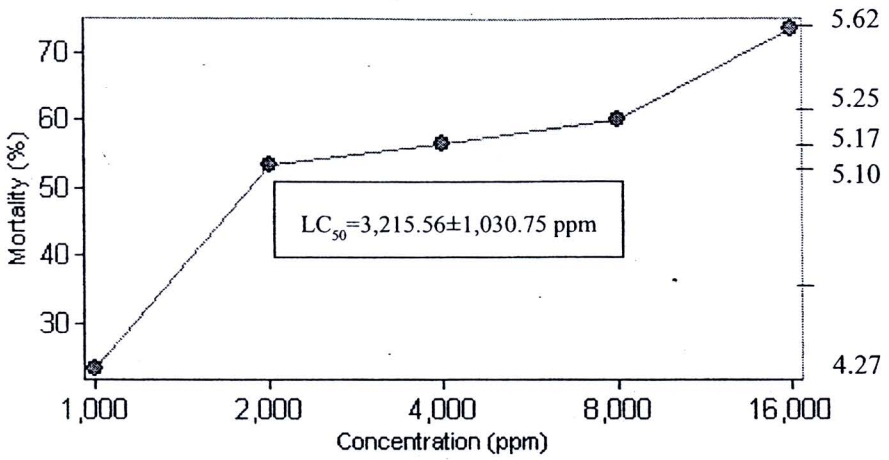


สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย

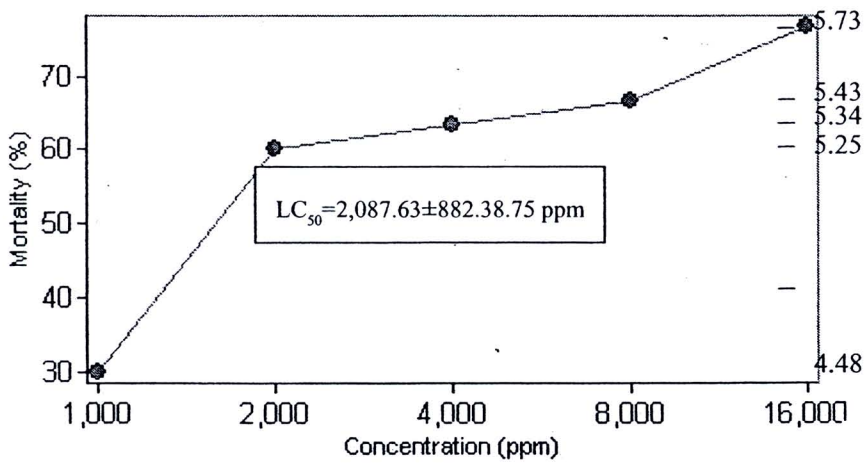
ภาพ ^{13}C NMR spectrum ของสาร Ricinine

5.4.4 ผลของสาร Ricinine ที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 โดยวิธี Topical sprayer method

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



ภาพ เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสาร Ricinine จากใบละหุ่งแดงที่เวลา 24 ชั่วโมงโดยวิธี Topical sprayer method



ภาพ เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 หลังจากได้รับสาร Ricinine จากใบละหุ่งแดงที่เวลา 48 ชั่วโมงโดยวิธี Topical sprayer method

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

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

หมายเหตุ EtOAc crude extract ละลายใน 70% Ethanol

EtOH crude extract ละลายใน 70% Ethanol

Ricinine ละลายใน 100% Acetone

5.5. ผลการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ Carboxylesterase และ Glutathione-*S*-transferase ของ หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) หลังจากได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (*Jatropha gossypifolia*)

5.5.1 ผลการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ Carboxylesterase

หลังจากหนอนกระทู้หอมได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำหนอนกระทู้หอมที่รอดชีวิตมาตรวจวัดระดับของเอนไซม์ โดยใช้ pNPA (Paranitrophenyl acetate) เป็นสารตั้งต้น และตรวจวัดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสาร pNPA โดยใช้ Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 400 นาโนเมตร พบว่าสารละลาย pNPA จากที่มีลักษณะเป็นสารละลายใส เปลี่ยนเป็นสารละลายที่มีสีเหลืองของสาร Paranitrophenol จากการตรวจวัดปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังกล่าวพบว่า กลุ่มควบคุม (Control)

และ กลุ่ม Treatment มีปฏิกิริยาเท่ากับ 1.55±0.47 nM paranitrophenol / mg protein / min และ 17.90±4.66 nM paranitrophenol / mg protein / min ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม และ กลุ่ม Treatment พบว่าระดับของเอนไซม์ Carboxylesterase เพิ่มขึ้น 0.12 เท่า

ตาราง ปฏิกิริยาของเอนไซม์ Carboxyl esterase ± ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน โดยวิธี pNPA assay

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

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

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

[3] คือระดับของเอนไซม์ Carboxyl esterase ของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 ที่รอดชีวิตที่เวลา 24 ชั่วโมง

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

5.5.2 ผลการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ Glutathione-*S*-transferase

หลังจากหนอนกระทู้หอมได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำหนอนกระทู้หอมที่รอดชีวิตมาตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ Glutathione-*S*-transferase โดยใช้ CDNB (Chorodinitrobenzene) เป็นสารตั้งต้น และตรวจวัดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 340 นาโนเมตร พบว่ากลุ่มควบคุม (Control) และกลุ่ม Treatment มีปฏิกิริยาเท่ากับ 0.05±0.02

DNB Conjugated product/mg protein/ min และ 0.43±0.68 conjugated product/mg protein/min ตามลำดับ ละปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่ม Treatment เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุม 1.62 เท่า

าราง ปฏิกิริยาของเอนไซม์ Glutathione-*S*-transferase ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยวิธี CDNB assay

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

) คือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันภายในแต่ละคอลัมน์ไม่มี ความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test

($P < 0.05$)

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

) คือระดับของเอนไซม์ Glutathione-*S*-transferase ของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 ที่รอดชีวิตที่เวลา 24 ชั่วโมง

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

.6 ผลของสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่มีผลต่อแตนเบียน คือ *Meteorus pulchricornis*

เมื่อนำสารสกัดหยาบของใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ทดสอบความเป็นพิษกับ *Meteorus pulchricornis* โดยวิธี Filter paper method ซึ่งมีระดับความเข้มข้นดังนี้ กลุ่มควบคุม (70%Ethyl acetate), 2500, 5000, 10,000, 20,000 และ 40,000 ppm ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การตายที่เวลา 24 ชั่วโมง จาก

กลุ่มควบคุมและความเข้มข้นที่ 2,500, 5,000, 10,000 และ 20,000 ppm ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตาย ส่วนความเข้มข้นที่ 40,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 20.00±16.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมง จากกลุ่มควบคุมและความเข้มข้นที่ 2,500, 5,000, 10,000และ 20,000 ppm ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตาย แต่ที่ความเข้มข้น 40,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 26.67±11.55 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 72 ชั่วโมง จากกลุ่มควบคุมและความเข้มข้นที่ 2,500, 5,000, 10,000และ 20,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 0.00±0.00 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 40,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 33.33±11.55 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 96 ชั่วโมง จากกลุ่มควบคุมจนถึงความเข้มข้นที่ 10,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 0.00±0.00, 6.67±11.55 และ46.67±11.55 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 120 ชั่วโมงจากกลุ่มควบคุมจนถึงความเข้มข้นที่ 2,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 0.00±0.00, 6.67±11.55, 13.33±23.09 และ 53.33±11.55 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์หาค่าความแตกต่างค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การตาย โดยใช้วิธีDuncan' s New Multiple Range Test พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของ *Meteorus pulchricornis* ที่ได้รับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ที่ระดับความเข้มข้น 40,000 ppm ที่เวลา 24-72 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้น 20,000-40,000 ppm ที่เวลา 96 ชั่วโมงและที่ระดับความเข้มข้น 10,000-40,000 ppm ที่เวลา 120 ชั่วโมง แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$

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

ความเข้มข้นของสารสกัด	เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยของ *Meteorus pulchricornis* [3] ± SD				
จากใบละหุ่งแดง (ppm)	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	96ชั่วโมง	120ชั่วโมง
0.00[2]	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00^{d}
2,500	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00^{d}
5,000	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00^{d}
10,000	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{c}	6.67±1.155^{c}
20,000	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}	6.67±1.155^{b}	13.33±2.309^{b}
40,000	20.00±1.633^{a}	26.67±1.155^{a}	33.33±1.155^{a}	46.67±1.155^{a}	53.33±1.155^{a}

(1) การตายเฉลี่ยได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ตัว

(2) Control treatment : 70% Ethanol

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

5.7 ผลการศึกษาหาผลกระทบของสารสกัดต่อปลาหางนกยูง

ในโครงการทดลองนี้ได้ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อสัตว์น้ำ เพื่อดูผลกระทบหากมีการปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำ โดยตัวแทนสำหรับสัตว์น้ำคือ ปลาหางนกยูง ซึ่งถือว่าเป็น Bio-indicator ตัวหนึ่งในการทดสอบความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำในทางพิษวิทยา ทั้งนี้ผลการทดลองเป็นไปตาม ตาราง

ตาราง ค่าความเป็นพิษที่ 24 ชม. และ 48 ชม. ของปลาหางนกยูงหลังรับสารสกัดจากใบละหุ่งแดง

ความเข้มข้น (ppm)	จำนวนซ้ำการทดลอง	เปอร์เซ็นต์การตาย (Mean ± SD)	
		24 hr	48 hr
0	10	00.00 ± 00.00	00.00 ±0.00
700	10	06.67 ± 0.577	16.67 ± 0.577
750	10	46.67 ± 0.577	56.67± 0.577
900	10	53.33 ± 0.577	60.00 ± 0.577
1000	10	100.0 ± 00.00	100.0 ± 00.00

ทั้งนี้จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากละหุ่งแดง มีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำต่ำเมื่อเทียบกับประสิทธิภาพในการใช้กำจัด หนอนกระทู้หอม โดยพบว่า มีค่า LC_{50} = 787.68 (r^2 = 0.96) และ 726.78 (r^2 = 0.89) ppm สำหรับ 24 และ 48 ชั่วโมงหลังทดสอบสารสกัดจากละหุ่งแดง ตามลำดับ นอกจากนี้จากการทดลองพบว่า หากมีการให้ปลาหางนกยูงรับสารในระยะเวลาสั้น คือประมาณ สามสิบวินาที แล้วกลับสู่สภาพน้ำตามปกติ ปลาหางนกยูงจะไม่มีความเป็น พิษ หรือไม่มีเปอร์เซ็นต์การตายเกิดขึ้น จึงอาจสรุปได้ว่าหากรับสารเพียงช่วงเวลาสั้น เช่นในสภาพจริงเช่นการปล่อยลงสู่แม่น้ำ ชนิด Point source จะไม่ก่อเกิดพิษแก่สัตว์น้ำ แต่หากสัตว์น้ำรับสารนั้นแบบต่อเนื่อง แนวโน้มการเกิดความเป็นพิษสามารถเกิดขึ้นได้ แต่ก็ยังอยู่ในระดับพิษต่ำกว่าเมื่อเทียบกับพิษต่อหนอน กระทู้หอม

6. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

1. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชในการควบคุมประชากรของหนอนกระทู้หอม โดยจะเปรียบเทียบการทดสอบความเป็นพิษในรูปแบบต่างๆ กับหนอนวัยสอง และเปรียบเทียบอัตราการตายที่ช่วงเวลาหลังรับสารสกัดที่แตกต่างกัน

การศึกษาผลของสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่มีผลต่อหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 นั้น ต้องทำการผึ่งใบละหุ่งแดงก่อน ซึ่งอาจทำให้แห้งตามธรรมชาติโดยผึ่งแห้งในที่ร่ม (Shade drying) หรือผึ่งแดด (Sun drying)

เพื่อทำลายเชื้อราหรือเชื้อแบคทีเรียต่างๆ ที่ปนเปื้อนมากับใบละหุ่งแดง อีกทั้งยังช่วยให้สะดวกแก่การจัดเก็บและการที่นำใบละหุ่งแดงมาปั่นให้ละเอียดนั้น เนื่องจากองค์ประกอบสำคัญทางเคมีจะอยู่ภายในเซลล์ จึงต้องทำลายผนังเซลล์ให้แตกออกก่อน และเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของตัวทำละลาย เพื่อให้ตัวทำละลายชะองค์ประกอบทางเคมีออกมาในปริมาณสูงสุด ซึ่งการทดลองครั้งนี้ได้สกัดสารหยาบจากใบละหุ่งแดงโดยวิธีซอกท์เลท (Soxhlet extractor) และเป็นวิธีการสกัดร้อน อาจจะทำให้สารเคมีในพืชชนิดนี้สลายตัวได้ แต่วิธีการสกัดดังกล่าวมีข้อดีคือ สะดวกและทำได้ง่าย อีกทั้งยังประหยัดตัวทำละลาย เนื่องจาก Flask ที่บรรจุตัวทำละลายได้รับความร้อนจาก Heating mantle ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไปกระทบเครื่องควบแน่น (Condenser) และกลั่นตัวลงมาสกัดสารใหม่วนเวียนเช่นนี้ จนกระทั่งการสกัดสารหยาบเสร็จสมบูรณ์ การทดลองครั้งนี้ ได้สกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีจากใบละหุ่งแดงโดยใช้ เอทิลแอซิเทต (Ethyl acetate) และเอทานอล (Ethanol) เป็นตัวทำละลาย ซึ่งตัวทำละลายดังกล่าวมีขั้วสูงจึงทำให้มีอัตราการละลายของสารกว้าง จึงทำให้มีการชะ (Elute) องค์ประกอบทางเคมีจากใบละหุ่งแดงออกมาหลายชนิด อีกทั้งการสกัดด้วยเอทานอลนั้น ยังช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (รัตนา, 2547) และเมื่อทำการสกัดใบละหุ่งแดงแล้วจะนำสารละลายที่ได้ทั้งหมดไประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator ซึ่งการใช้เครื่องมือดังกล่าว จัดเป็นวิธีการระเหยตัวทำละลายในภาวะสุญญากาศ (Distillation in vacuo) จึงเป็นวิธีการที่สะดวกประหยัดเวลา อีกทั้งยังสามารถควบคุมอุณหภูมิการระเหยให้คงที่ได้ และสารละลายที่ระเหยออกมายังสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์และนำกลับมาใช้ใหม่ได้

หลังจากสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบ Soxhlet extraction method ได้ทำการทดสอบ คัดเลือกหาสารสกัดจากพืชที่มีประสิทธิภาพที่สุด กับหนอนกระทู้หอมวัยที่สอง พบว่า สารสกัดจากละห[illegible] เซึ่งเป็นสารที่หาง่าย และมีประสิทธิภาพดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดชนิดอื่น โดยให้ผลทั้งเรื่องความเป็นพิษทั้งในเรื่องราคา ปริมาณสารสกัดหยาบ และประสิทธิภาพ ในการควบคุมหนอนกระทู้หอม งานวิจัยนี้จึงได้มุ่งเน้นไปที่การศึกษาผลของสารสกัดจากใบละหุ่งแดงเพิ่มเติมต่อไป

2. ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบละหุ่งแดง (*Jatropha gossypifolia*) ที่มีต่อหนอน กระทู้หอม (*Spodoptera exigua*)

การศึกษาครั้งนี้พบว่า สารสกัดหยาบโดยมีเอทิลแอซิเทตเป็นตัวทำละลาย (Ethyl acetate crude extract) ให้ผลในการควบคุมหนอนกระทู้หอมวัยสอง ได้ดีกว่าสารจากใบละหุ่งแดงที่สกัดด้วยสารethyl alcohol จากการทดสอบกับหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 โดยวิธีจุ่มตัวหนอน (Dipping method) และวิธีพ่นฝอย

หมอกด้านบน (Topical sprayer method) นั้น เนื่องจากสารสกัดหยาบดังกล่าวมีปริมาณมากกว่า และมีผลต่ออัตราการตายของหนอนกระทู้หอมมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบที่มีเอทานอลเป็นตัวทำละลาย (Ethanol crude extract) ถึงแม้ว่าเอทานอลจะเป็นตัวทำละลายที่มี ขั้วสูงกว่าเอทิลแอซิเทต มีอัตราการละลายสารที่มากกว่า แต่สารบางตัวที่มีฤทธิ์ต่อหนอนกระทู้หอมนั้นอาจจะไม่ได้ละลายในเอทานอลได้ทุกตัว จึงทำให้สารสกัดหยาบที่มีเอทิลแอซิเทตเป็นตัว ทำละลายมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอทานอล

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

นอกจากนั้น มณฑกาญจน์ (2549) ได้นำสารสกัดหยาบจากพืชวงศ์ Zingiberaceae มาใช้ควบคุมหนอนกระทู้หอม โดยพบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 500 ppm ทำให้หนอนกระทู้หอมตายทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองครั้งนี้ จะเห็นว่าจะมีค่า LC_{50} ที่ต่ำกว่าการใช้สารสกัดจากใบละหุ่งแดง เนื่องจากพืชต่างชนิดกันจะมีองค์ประกอบทางเคมี รวมทั้งสารออกฤทธิ์ที่มีต่อหนอนกระทู้หอมแตกต่างกัน และจากรายงานของ อรุณ และคณะ (2533) ใช้สารสกัดจากหางไหล รวมทั้งผสมสารสกัดจากหางไหล รวมกับรากหนอนตายหยาก ดีปลี กานพลู และพริกไทย พบว่าสารสกัดดังกล่าวไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมประชากรของหนอนกระทู้หอม ซึ่งต่างจากการทดลองครั้งนี้ เนื่องจากสารสกัดหยาบจากใบละหุ่งแดง มีผลต่ออัตราการตายของหนอนกระทู้หอมตามระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น และยังมีการใช้สารสกัดจากพืชชนิดอื่นนอกจากใบละหุ่งแดงที่ใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชในกลุ่ม Lepidopterous เช่น ใช้สารสกัดจากดอกกานพลูควบคุมหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) วัยที่ 2 และ 3 โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 13,000 ppm (คำนวณ, 2549)

นอกจากนั้น พุทธิพร (2549) ใช้สารสกัดจากเมล็ดน้อยหน่า เมล็ดมันแกว และพริกขี้หนูมาควบคุมประชากรของหนอนกระทู้ผักเช่นเดียวกัน โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 12,000 ppm ซึ่งมีค่าความเป็นพิษต่ำกว่าสารสกัดจากใบละหุ่งแดง

3. ความเป็นพิษของสารบริสุทธิ์จากใบละหุ่งแดงที่มีต่อหนอนกระทู้หอม

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

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

Ricinine มีฤทธิ์เป็นยาฆ่าแมลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ (รัตนา, 2547) ที่พบว่าสาร Ricinine เป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์ที่เป็นพิษเนื่องจากมีโครงสร้างพื้นฐานเป็น 2-pyridone ring ซึ่งเป็น Tertiary base ที่มักใช้เป็นยาฆ่าแมลง นอกจากนั้นสารชนิดนี้ยังสามารถพบได้ในพริกไทย ยาสูบ และพืชในวงศ์ Solanaceae จากรายงานของ Rizwan-ul-Haq *et al.* (2009) ได้สังเคราะห์สารRicinine และทดสอบความเป็นพิษต่อหนอนกระทู้หอมโดยวิธี Feeding method โดยพบค่า EC_{50} เท่ากับ 0.54 mg/ml นอกจากการใช้สาร Ricinine ควบคุมหนอนกระทู้หอม แล้วยังมีรายงานของ Olaifa *et al.* (1991) ที่นำสาร Ricinine ซึ่งสกัดได้จากเมล็ดของละหุ่ง (*Ricinus communis*) มาทดสอบความเป็นพิษต่อเพลี้ย (*Myzus persicae*) โดยวิธี Feeding method พบว่าทำให้เพลี้ยชนิดนี้ตายทั้งหมดที่เวลา 8-24 ชั่วโมง อีกทั้งสาร Ricinine ที่สกัดได้จากเมล็ดละหุ่งยังมีผลต่ออัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (Brown planthopper) (Kwon *et al.*, 2006)

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

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

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

จากการศึกษาระดับเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส (Carboxyl esterase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในวัฏภาคที่หนึ่ง (Phase I) ซึ่งเป็นกลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารพิษ

ให้มีฤทธิ์ที่รุนแรงขึ้น รวมทั้งทำให้สารพิษหมดฤทธิ์ โดยเอนไซม์ Carboxyl esteraseนั้น จะทำหน้าที่ Hydrolyzed สารกลุ่ม Ester ให้กลายเป็นสารพิษตัวใหม่ที่เป็นกรด และเป็นแอลกอฮอล์ (ชัยวัฒน์ , 2539)

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

จากการที่ระดับของเอนไซม์ทำลายพิษ (Detoxification enzyme) ทั้ง 2 ชนิดเพิ่มขึ้นนั้นเนื่องจากร่างกายเกิดกลไกให้มีการเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์ทำลายพิษเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอม (Xenobiotic) หรือสารเคมีต่างๆ เข้าไปภายในร่างกาย รวมทั้งเกิดการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาทางเคมีภายในร่างกาย (Biotransformation) เพื่อให้สิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายเปลี่ยนแปลงเป็นโมเลกุลที่มีขั้วเพื่อละลายน้ำและถูกกำจัดออกนอกร่างกาย จึงทำให้สารพิษที่ได้รับเข้าไปในร่างกายลดลง โอกาสที่จะเกิดพิษหรือสะสมสารพิษก็ลดลงตามไปด้วย ดังนั้นถ้าใช้สารสกัดจากใบละหุ่งแดงกับหนอนกระทู้หอมต่อไปเป็นเวลานาน จึงมีโอกาสที่หนอนกระทู้หอมจะเกิดการต้านทาน (Resistance) ต่อสารชนิดนี้ได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Natsuhara *et al.* (2004) พบว่าหนอนกระทู้หอมต้านทานต่อสาร Permethrin โดยพบว่าเอนไซม์ Cytochrome P450 monooxygenases เพิ่มขึ้น 4.5 เท่า และจากรายงานของ พุทธิพร (2549) พบว่าผลการทดลองนี้สอดคล้องกันโดยหลังจากทดสอบสารสกัดจากพริกขี้หนูที่มีต่อหนอนใยผักพบว่าระดับของเอนไซม์เอสเทอเรสเพิ่มสูงขึ้น 2.45 เท่า

5. ผลของสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่มีผลต่อแมลงกลุ่มมีประโยชน์ คือ *Meteorus pulchricornis*

ความเป็นพิษของสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่มีผลต่อแตนเบียน (*Meteorus pulchricornis*) ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมาย (Non target)โดยวิธี Filter paper method จากการใช้สารสกัดจากใบละหุ่งแดง (Ethyl acetate crude extract) ที่ระดับความเข้มข้น 2,500, 5,000, 10,000 และ 20,000 ppm ทดสอบความเป็นพิษกับ *Meteorus pulchricornis* เป็นเวลา 120 ชั่วโมงโดยวิธี Filter paper method พบว่าที่ระดับความเข้มข้นต่ำ 2,500-5,000 ppm นั้นไม่ส่งผลกระทบต่อ *Meteorus pulchricornis* ซึ่งแตนเบียนชนิดนี้เป็นแมลงที่มีประโยชน์ในการควบคุมประชากรของหนอนกระทู้หอม ทั้งนี้ปัจจัยที่ส่งผลให้และ *Meteorus pulchricornis* มีเปอร์เซ็นต์การตายที่เพิ่มขึ้นเนื่องมาจากใช้เอทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงมีอัตราการละลายสารกว้างจึงทำให้แมลงสามารถดูดซับสารสกัดได้ดีจึงทำให้สารสกัดซึมผ่านเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตและเข้าสู่อวัยวะเป้าหมายในการเกิดพิษได้ดี (สุรพล, 2546)

วิธี Filter paper method นั้นแตนเบียนจะสัมผัสปริมาณของสารสกัดแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิความชื้น ความแข็งแรงของแตนเบียนแต่ละตัวในขณะทดลอง รวมทั้งระยะเวลาในการสัมผัสกับสาร จากการทดสอบสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่มีผลต่อแตนเบียนจะเห็นว่าที่ระดับความเข้มข้นสูงคือระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10,000 ppm ขึ้นไปจะทำให้เปอร์เซ็นต์การตายของแตนเบียนเพิ่มสูงขึ้นไปด้วย ดังนั้นสามารถใช้สารสกัดจากใบละหุ่งแดง ควบคุมประชากรของหนอนกระทู้หอมได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีประโยชน์มากนัก นอกจากนั้นการนำแตนเบียนมาควบคุมหนอนกระทู้หอมยังเป็นการควบคุมแมลงศัตรูพืชแบบชีววิธี และสามารถนำไปใช้ในแปลงเพาะปลูกพืชได้จริงแทนการใช้สารเคมีฆ่าแมลงและลดปัญหาสารพิษตกค้างในพืชและสิ่งแวดล้อม รวมทั้งสามารถลดต้นทุนในการซื้อยาฆ่าแมลงและลดข้อกีดกันทางการค้าในการส่งออกผลผลิตทางการเกษตร

6. ผลของสารสกัดจากใบละหุ่งแดงที่มีผลต่อปลาหางนกยูง

จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากละหุ่งแดง มีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำต่ำเมื่อเทียบกับประสิทธิภาพในการใช้กำจัด หนอนกระทู้หอม โดยพบว่า มีค่า LC_{50} = 787.68 (r^2 = 0.96) และ 726.78 (r^2 = 0.89) ppm สำหรับ 24 และ 48 ชั่วโมงหลังทดสอบสารสกัดจากละหุ่งแดง ตามลำดับ นอกจากนี้จากการทดลองพบว่า หากมีการให้ปลาหางนกยูงรับสารในระยะเวลาสั้น คือประมาณ สามสิบวินาที แล้วกลับสู่สภาพน้ำตามปกติ ปลาหางนกยูงจะไม่มีความเป็น พิษ หรือไม่มีเปอร์เซ็นต์การตายเกิดขึ้น จึงอาจสรุปได้ว่าหากรับสารเพียงช่วงเวลาสั้น เช่นในสภาพจริงเช่นการปล่อยลงสู่แม่น้ำ ชนิด Point source จะไม่ก่อเกิดพิษ

แก่สัตว์น้ำ แต่หากสัตว์น้ำรับสารนั้นแบบต่อเนื่อง แนวโน้มการเกิดความเป็นพิษสามารถเกิดขึ้นได้ แต่ก็ยังอยู่ในระดับพิษต่ำกว่าเมื่อเทียบกับพิษต่อหนอน กระทู้หอม

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการทดลองในพื้นที่จริง เพราะการทดลองที่ได้อาจมีความแตกต่างกับผลในห้องปฏิบัติการ

2. ควรมีการศึกษาทางด้านสรีวิทยา (physiology) และทางมิชวิทยา (histology) ของหนอนกระทู้หอม ร่วมกับการทดสอบทางพิษวิทยา เพื่อศึกษาความผิดปกติของร่างกาย และความผิดปกติของเนื้อเยื่อหลังจากได้รับสารสกัด รวมทั้งการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสาร(Mode of action) ต่อหนอนกระทู้หอม เพิ่มเติมต่อไป