

transferase รวมทั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase โดยพบว่าสารสกัดจากใบละหุ่งแดง มีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสามชนิด จึงเป็นไปได้ว่าน่าจะเป็นกลไกหนึ่งในการส่งผลการตายภายในแมลง นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลกระทบต่อนิวแมมีโคไซด์ คือ แมลงเบียน ชนิด *Meteorus pulchricornis* โดยวิธีการปล่อยหมอกด้านบน โดยไม่พบการตายที่ระดับความเข้มข้นต่ำแต่พบเปอร์เซ็นต์การตายที่ 60 เปอร์เซ็นต์เมื่อทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 40,000 ppm จึงอาจเป็นไปได้ว่า สารสกัดจากใบละหุ่งแดงน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำมาใช้ควบคุมหนอนกระทู้หอมได้ เนื่องจากมีผลน้อยกับแมลงในกลุ่มมีประโยชน์ เช่น *Meteorus pulchricornis*.

3. วัตถุประสงค์

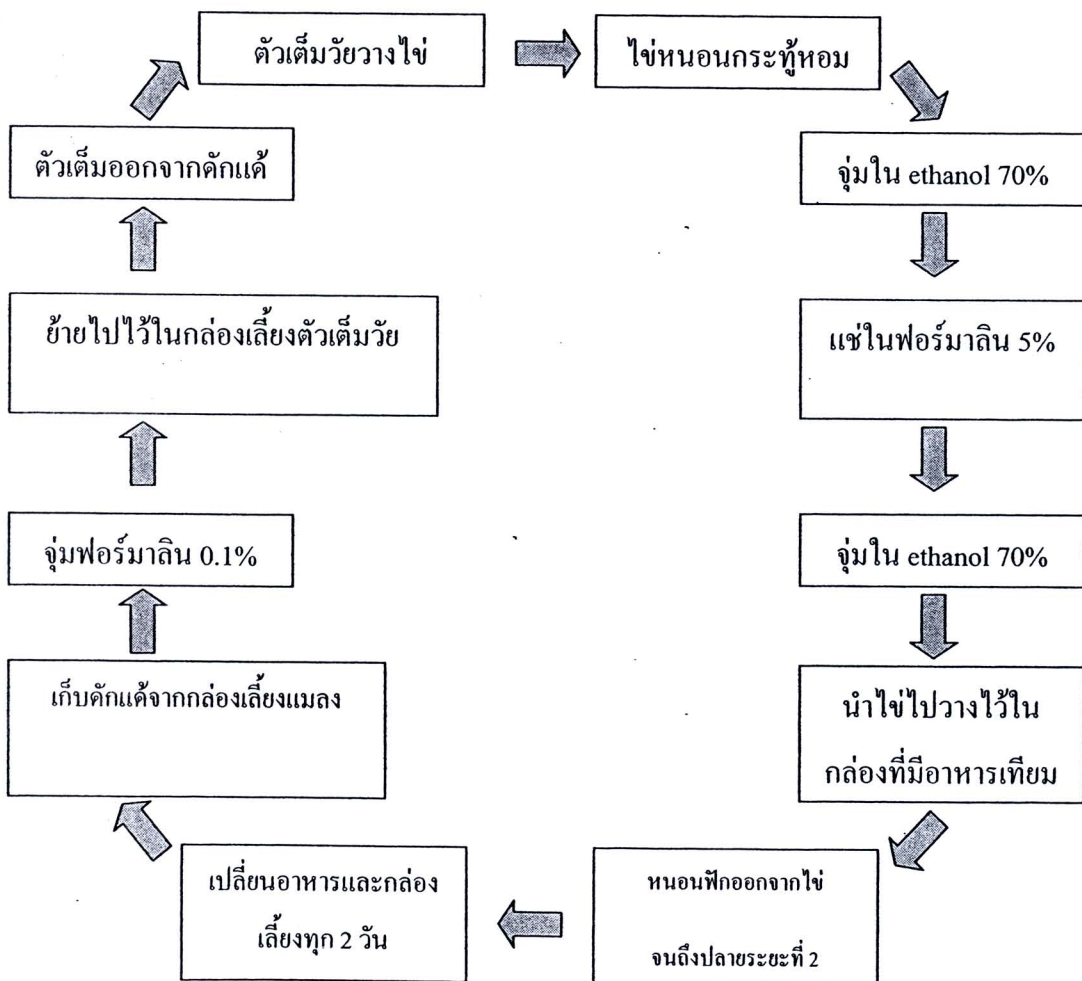
โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักมุ่งเน้นการศึกษาศาสตรสกัดจากพืชใหม่ๆ เพื่อนำมาควบคุมประชากรของแมลงที่เป็นศัตรูของพืชผักที่สำคัญ คือ หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) โดยจะศึกษากลไกการทำงานและการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชชนิดนั้นๆ ในตัวแมลง ทำการศึกษากลไกที่แมลงจะใช้เพื่อพัฒนาการต้านทานต่อสารนั้นๆ เช่น ปฏิกิริยาเอนไซม์ทำลายพิษ (Detoxification enzymes activities) เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาสารสกัดให้มีประสิทธิภาพและสามารถพัฒนาต่อไปในเชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต โดยทั้งนี้จะสามารถแบ่งวัตถุประสงค์ของงานวิจัยในโครงการนี้ได้เป็นหัวข้อย่อย ดังนี้

- (1) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชในการควบคุมประชากรของหนอนกระทู้หอม โดยจะเปรียบเทียบการทดสอบความเป็นพิษในรูปแบบต่างๆ กับหนอนวัยสอง และเปรียบเทียบอัตราการตายที่ช่วงเวลาหลังรับสารสกัดที่แตกต่างกัน
- (2) ศึกษาหากลไกการออกฤทธิ์ เช่น การยับยั้งระบบเอนไซม์ทำลายพิษ เมื่อหนอนรับสารสกัดทันที
- (3) ศึกษาหาผลกระทบของสารสกัดต่างๆ ต่อสิ่งแวดล้อม เช่น สัตว์มีประโยชน์

4. วิธีทดลอง

การเลี้ยงเพื่อขยายพันธุ์หนอนกระทู้หอม นำไข่หนอนกระทู้หอมมาจากกรมวิชาการเกษตร จุ่มไข่หนอนลงใน ethanol 70% จากนั้นแช่ด้วยฟอร์มาลิน 5% เป็นระยะเวลา 5 นาที แล้วจึงนำกลับมาจุ่มใน ethanol อีกครั้งเพื่อล้างฟอร์มาลินออก จากนั้นวางในกล่องเลี้ยงหนอนพลาสติกที่มีอาหารเทียมอยู่ภายใน โดยเลี้ยงหนอนกระทู้หอมภายในตู้เลี้ยงแมลงที่มีการควบคุมอุณหภูมิ (Environment chamber) ที่ 27 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์(% RH) 70% และช่วงระยะแสงที่ 16:8 day/night ตัวหนอนวัย 1 หลังจากฟักตัวออกจากไข่

และวัย 2 ไม่ควรเปลี่ยนอาหารในช่วงนี้เพราะหนอนมีขนาดเล็กมาก ซึ่งอาจทำให้หนอนตายหรือติดเชื้อได้ เมื่อหนอนเข้าสู่ปลายวัย 2 เปลี่ยนอาหารและกล่องพลาสติกเลี้ยงหนอนทุก 2 วัน เพื่อรักษาความสะอาดและป้องกันการติดเชื้อ เมื่อหนอนเข้าสู่ปลายระยะที่ 5 หนอนจะมีพฤติกรรมการขุดอาหารเทียมและมุดตัวลงไปเพื่อเข้าดักแด้ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 2-3 วัน จึงทำการเก็บดักแด้ ล้างดักแด้โดยใช้ฟอร์มาลิน 0.1% เพื่อฆ่าเชื้อและลดอัตราการตายของดักแด้ จากนั้นจึงย้ายดักแด้ไปไว้ในกล่องเลี้ยงแมลงพลาสติกทรงกระบอก โดยปะกระดาษกรองไว้ที่ปากกล่องเพื่อให้ตัวเต็มวัยวางไข่ จนเมื่อดักแด้กลายเป็นตัวเต็มวัยแล้วจึงใช้สำลีชุบสารละลายน้ำตาล 10% ใส่ในถ้วยพลาสติกเล็ก ไว้ในกล่องเพื่อใช้เป็นอาหารของตัวเต็มวัย เมื่อตัวเต็มวัยผสมพันธุ์จะวางไข่บนกระดาษกรอง หลังจากนั้นตัดกระดาษกรองที่มีไข่อยู่ออกเป็น 4-5 ส่วน รองจนกระทั่งไข่เปลี่ยนเป็นสีดำจึงนำไปใช้ต่อไป ซึ่งในการทำวิจัยครั้งนี้จะใช้หนอนกระทู้หอมวัย 2 ในการทดลอง

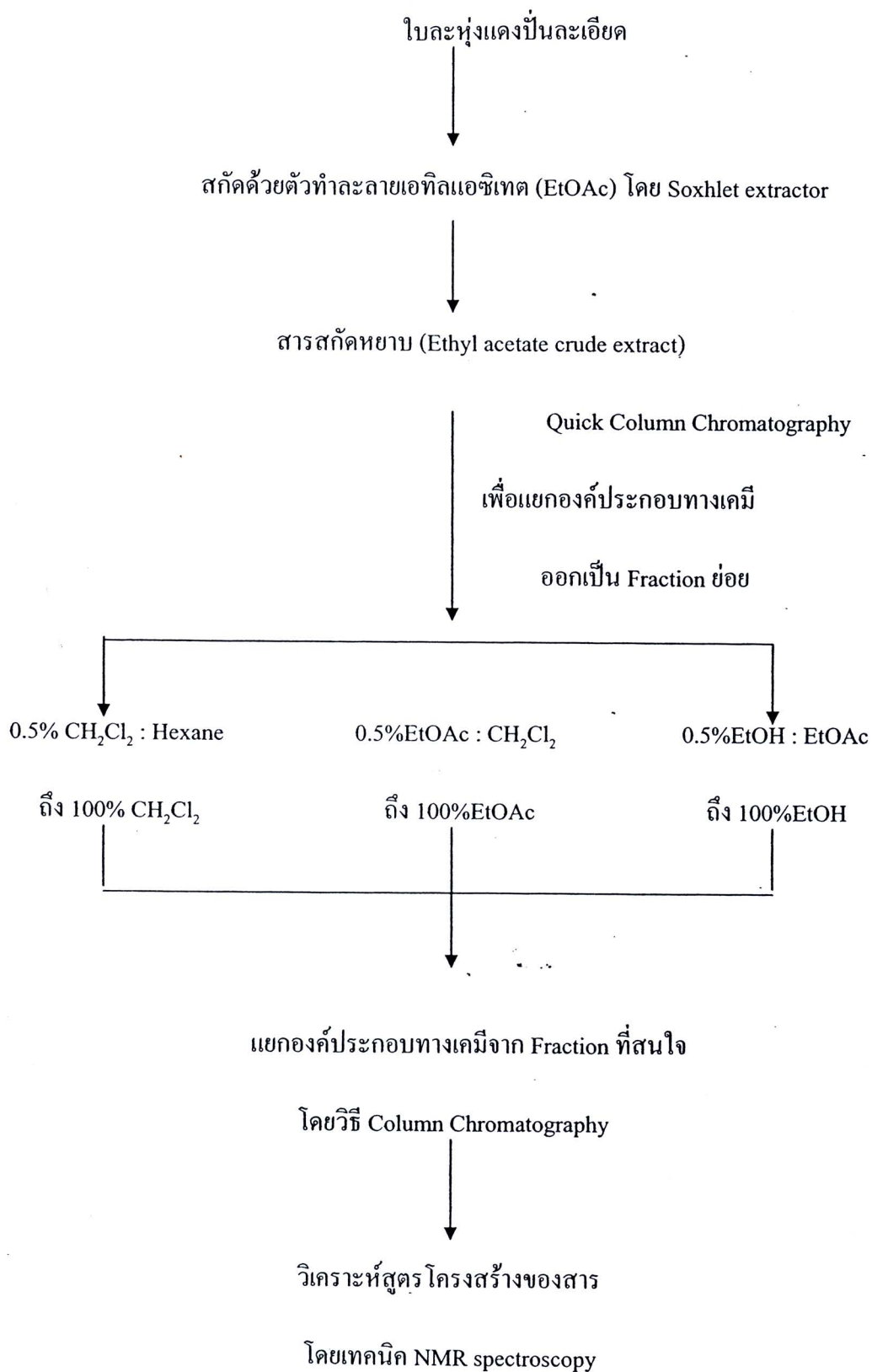


ภาพ แสดงวิธีการเลี้ยงหนอนกระทู้หอม

การเลี้ยงเพื่อขยายพันธุ์ *Meteorus pulchricornis* ปล่อยตัวเต็มวัยเพศเมีย *Meteorus pulchricornis* ลงในกล่องที่มีหนอน *Mythimna separate* ทิ้งไว้ 1-2 วัน เพื่อให้ตัวเต็มวัยวางไข่ภายในตัวหนอน จากนั้นนำตัวเต็มวัย *Meteorus pulchricornis* ออกจากกล่องเลี้ยงหนอน รอจนกระทั่งมี cocoon เกิดขึ้น จึงเก็บ cocoon ไปไว้ในกรงเลี้ยง โดยใช้สาลิซุบน้ำกลั่นวางไว้ในกรงเพื่อควบคุมความชื้น และใช้น้ำผึ้งป้ายข้างกรงเพื่อเป็นอาหารตัวเต็มวัย

การสกัดสารสกัด การสกัดสารหยาบจากพืชในการทดลองนี้นั้น สกัดโดยใช้ Soxhlet's extractor โดยนำใบกะหล่ำแดงมาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เมื่อแห้งสนิทแล้วจึงปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (Panasonic รุ่น MX-795N) ให้ได้ปริมาณ 15 กรัมต่อ 1 timber แล้วนำไปสกัดโดยเครื่อง Soxhlet's extractor เป็นเวลานาน 8 ชั่วโมงโดยใช้ ethanol 95% หรือ ethyl acetate เป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator แล้วเก็บส่วนที่ได้จากการระเหยซึ่งเป็น crude extract ที่มีลักษณะเหนียวข้นไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอมต่อไป

หลังจากได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) ของใบกะหล่ำแดงแล้ว จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ออกฤทธิ์ดีที่สุดมาแยกองค์ประกอบทางเคมีเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์โดยวิธีการ Quick column chromatography และ Column chromatography ตามลำดับ โดยใช้กรวยแก้วแยกสารและหลอดแก้วกลวง (Column) สำหรับการทำให้ Quick column chromatography นั้นจะบรรจุ Silica gel (Merck, เกรด 7731) ลงบนกรวยแก้วแยกสาร และนำสารสกัดหยาบของใบกะหล่ำแดง (100 กรัม) ผสมกับ Silica gel แล้วเทตัวอย่าง (Load sample) ลงไปในกรวยแก้วแยกสาร โดยในขั้นตอนนี้จะใช้ตัวทำละลายคือ 0.5%CH₂Cl₂ : Hexane - 100%CH₂Cl₂, 0.5%EtOAc : CH₂Cl₂ - 100% EtOAc และ 0.5%EtOH : EtOAc - 100%EtOH ที่อัตราส่วนต่างๆ เป็นตัวชะตามลำดับ จากนั้นเก็บตัวอย่างแต่ละ fraction เพื่อนำไปหาองค์ประกอบสำคัญทางเคมีเบื้องต้นโดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) โดยนำแผ่น TLC ไป Developed ในระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น Hexane : EtOAc (7:1), CH₂Cl₂ : EtOAc (2:1) และตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีบนแผ่น TLC โดย UV light ที่ความยาวคลื่นแสง 254 นาโนเมตร จากนั้นนำ Fraction ที่สนใจมาแยกสารให้บริสุทธิ์โดยวิธี Chromatography ที่มี Silica gel (Merck, เกรด 7734) เป็นตัวดูดซับ โดยใช้ตัวทำละลายผสมที่เหมาะสม เช่น Hexane : CH₂Cl₂, Hexane : EtOAc หรือ CH₂Cl₂ : MeOH ที่อัตราส่วนต่างๆ เป็นตัวชะ เมื่อได้สารที่บริสุทธิ์แล้วจะนำสารดังกล่าวไปวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโดยเทคนิค NMR spectroscopy



ภาพ ขั้นตอนการแยกองค์ประกอบทางเคมีจากใบมะหุ่งแดง

การทดสอบเปรียบเทียบผลของสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆจากใบชะมวงแดงต่ออัตราการตายของ
หนอนกระทู้หอม โดยวิธี Dipping Method และ Topical sprayer method ทำการทดสอบเพื่อหาความเป็น
พิษเบื้องต้น (preliminary test) ทดสอบหาความเข้มข้นของสารสกัดในช่วงความเข้มข้นต่ำสุดและสูงสุดที่มี
ผลต่ออัตราการตายของหนอนกระทู้หอม จากนั้น จึงเลือกช่วงของความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสม
โดยใช้น้ำ เป็นตัวทำละลาย สำหรับการค้นหาสารที่ออกฤทธิ์ดีที่สุด ในที่นี้จะทำการทดสอบทั้งสิ้น 3 ซ้ำ ซ้ำ
ละ 30 ตัว โดยจุ่มหนอนกระทู้หอมวัย 2 ที่บรจอยู่ในผ้าก๊อชที่มีลักษณะคล้ายถุง ลงในสารละลายที่
ต้องการทดสอบโดยตรง (Dipping method) แล้วจึงย้ายหนอนไปใส่ plate ที่มีอาหารเทียม บันทึกผลการตาย
ที่ 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตายหลังจากที่ได้รับสารที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง
แล้วนำมาหาค่า LC_{50} โดยใช้วิธี Probit analysis ผ่านโปรแกรม StatPlus สำหรับวิธีการ Topical sprayer
method นั้น จะทำการพ่นฝอยหมอกลงบนตัวหนอนวัยสองด้านบน จำนวนความเข้มข้นละ 1 ml ต่อหนอน
10 ตัว บันทึกผลอัตราการตายที่ 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตายหลังจากที่ได้รับสาร
ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาหาค่า LC_{50} โดยใช้วิธี Probit analysis ผ่านโปรแกรม StatPlus เมื่อได้สาร
สกัดที่ดีที่สุดแล้วจะทำการศึกษาเชิงลึกโดยหาสารออกฤทธิ์ต่อไป

การทดสอบผลของสารสกัดจากใบเสี้ยนและใบชะมวงแดงต่อ *Meteorus pulchricornis* โดยใช้วิธี Filter-
paper Method การทดสอบกับ *Meteorus pulchricornis* จะใช้สารสกัดจากใบชะมวงแดงที่ระดับความเข้มข้น
1000, 2000, 4000, 8000, 16000 และ 32,000 ppm และใช้ตัวทำละลายคือ ethanol 70% โดยนำสารละลายที่
ระดับความเข้มข้นต่างๆปริมาตร 1 ml หยดลงบนกระดาษกรองที่บรรจุอยู่ใน Petridish plate ทิ้งไว้จนแห้งที่
อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงปล่อย *Meteorus pulchricornis* จำนวน 5 ตัวต่อ 1 plate จำนวนชุดทดลอง 4 ซ้ำ
บันทึกผลอัตราการตายที่ 24 และ 48 ชั่วโมง นำผลการทดลองที่ได้มาหาค่าเปอร์เซ็นต์การตายที่ 24 และ 48
ชั่วโมง

การหาระดับเอนไซม์ทำลายพิษ ก่อนทำการทดสอบเรื่องเอนไซม์ทำลายพิษ จะทำการหาช่วง pH optimum
ที่เหมาะสมของแต่ละเอนไซม์ก่อนโดยการทดลองจะทำทั้งสิ้นสองเอนไซม์ คือ คาร์บอกซิลเอสเทอเรส
(carboxylesterase) และกลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส (glutathione S-transferase) เราจะทำการศึกษาที่
รอดชีวิตหลังการทดสอบกับความเข้มข้นที่ LC_{50} ของสารสกัดโดยดัดแปลงวิธีการของ Bullangpoti *et al.*
(2007) and Visetson *et al.* (2002, 2003, 2004 and 2005) โดยจะบดแมลงร่วมกับ buffer solution (phosphate
buffer + EDTA and phosphate buffer + GSH and PVPP) บดน้ำแข็งหลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศา