ฤทธิ์ฆ่าแมลงของสารสกัดจากหนอนตายหยาก (*Stemona tuberose* Lour)
Insecticidal Activity of *Stemona tuberose* Lour Extract

วาสนา สอนเพ็ง (Wasana Sornpeng)[1]
สุภาณี พิมพ์สมาน (Supanee Pimsamarn)[2]
ฉันทนา อารมย์ดี (Chantana Aromdee)[3]

บทคัดย่อ

หนอนตายหยาก (*Stemona tuberosa* Lour : Stemonaceae) เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่ง สารออกฤทธิ์สำคัญเป็นสารในกลุ่ม alkaloids และ isoflavonoids จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากรากหนอนตายหยากด้วยวิธีการสกัดอย่างต่อเนื่องด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นำสารสกัดมาทดสอบความเป็นพิษกับแมลง 3 ชนิด คือ (1) หนอนกระทู้ผัก *(Spodoptera litura Hubner)* โดยให้กินใบพืชที่จุ่มสารสกัด (2) ตัวเต็มวัยด้วงงวงข้าวโพด *(Sitophilus zeamais Motschulsky)* โดยการสัมผัสผิวที่พ่นสาร และ (3) ลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti* Linnaeus) โดยการใส่ลูกน้ำลงไปในสารละลาย หลังจากที่แมลงได้รับสารสกัด 48 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดไดคลอโรมีเทน แสดงความเป็นพิษสูงสุดต่อหนอนกระทู้ผักและลูกน้ำยุงลาย และสารสกัดเมทานอลแสดงความเป็นพิษสูงสุดต่อด้วงงวงข้าวโพด เมื่อนำสารสกัดไดคลอโรมีเทนไปแยก fraction โดย column chromatography ได้ 9 fractions จากการทดสอบความเป็นพิษกับลูกน้ำยุงลาย พบว่า fraction ที่ 6 และ 7 (F6, F7) แสดงความเป็นพิษสูงสุดโดยมีค่า LC50 (median lethal concentration) เท่ากับ 13 และ 14 ppm ตามลำดับ จากการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ของ fraction ดังกล่าวด้วย Thin Layer Chro-matography (TCL) เปรียบเทียบกับสาร rotenone บริสุทธิ์ ซึ่งเป็นสาร isoflavonoid แต่ไม่พบ rotenone จึงเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์เป็นสารกลุ่มอื่น จากการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า การสกัดรากหนอนตายหยากด้วยไดคลอโรมีเทน ทำให้ได้สารออกฤทธิ์ที่มีศักยภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ดี ซึ่งเป็นแนวทางในการนำไปใช้ควบคุมแมลงได้

Abstract

Nontaiyak (*Stemona tuberose* Lour: Stemonaceae) is identified as a medical herbaceous plant. The plant root contains alkaloid and isoflavonoid active ingredient substances. In this work, the root of the plant was sequentially extracted with a Soxhlet apparatus by hexane, dichloromethane and 70% methanol. The extracts were studied for their insecticidal activities. The tests were carried out by 1) a feeding leaf disc tested

[1]*นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[2]*รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[3]*รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

01 112 4/2/09, 8:54 AM
Black

on the larvae of *Spodoptera litura* Hubner 2) a residual film tested on adult *Sitophilus zeamais* Motschulsky and 3) an aqueous dispersion tested on the larvae of *Aedes aegypti* Linnaeus, after test of crude extract on insects for 24 hours. Dichloromethane crude extract gave the highest mortality rate on *S. litura* and *Ae. aegypti.* For the *S. zeamais* toxicity test, the 70% methanol extract gave the highest rate. After fractional extraction of dichloromethane crude extract by column chromatography and subsequently differentiated fractions using the Thin Layer Chromatography (TLC) 9 fractions were obtained from crude extract. F6 and F7 are the fractions which responded at the lowest LC50 values with 13 and 14 ppm, respectively. Detection of the active component under the TLC technique was compared to purified rotenone, but the active component responsible was not rotenone but another component. The component had high efficacy for killing *Ae. aegypti.* It is concluded from this study that dichloromethane crude extract from *S. tuberosa* root has high potential for practical application as a natural insect control agent.

คำสำคัญ: ลูกน้ำยุงลาย, ด้วงงวงข้าวโพด, หนอนกระทู้ผัก, หนอนตายหยาก

Keywords: *Aedes aegypti*, *Sitophilus zeamais*, *Spodoptera litura*, *Stemona tuberose*

คำนำ

สารฆ่าแมลงที่นิยมใช้ในภาคการเกษตรส่วนใหญ่เป็นสารสังเคราะห์ที่มีความเป็นพิษสูงต่อสัตว์เลือดอุ่น เกษตรกรมักนำมาใช้เพื่อควบคุมแมลงในฤดูกาลระบาดเนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่หาซื้อได้ง่าย มีประสิทธิภาพฆ่าแมลงอย่างรวดเร็ว การใช้สารฆ่าแมลงของเกษตรกรจึงเป็นไปในลักษณะที่ไม่คำนึงถึงต้นทุนการผลิตที่เพิ่มขึ้น ไม่คำนึงถึงผลกระทบต่อสุขภาพของผู้ใช้และผู้บริโภค ตลอดจนผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูให้ความสนใจและมุ่งเน้นที่จะใช้สารที่มีพิษต่ำต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ตลอดจนการบริหารจัดการที่ถูกต้องและเหมาะสมกับสถานการณ์ เพื่อให้ได้ผลผลิตที่ปลอดภัยต่อการบริโภคซึ่งเป็นที่ต้องการของตลาด การใช้สารจากพืชที่มีคุณสมบัติในการป้องกันกำจัดแมลงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาพัฒนาทดแทนสารเคมีที่มีพิษสูง(สุภาณีและคณะ, 2546) ได้มีการค้นคว้าวิจัยสารจากพืชอีกจำนวนมากที่มีคุณสมบัติในการป้องกันกำจัดแมลงได้ เช่น แมงลัก ข่า ตะไคร้หอม หางไหล และหนอนตายหยาก ในส่วนของหนอนตายหยาก (*Stemona* sp.) เป็นพืชที่มีคุณสมบัติพิเศษอีกชนิดหนึ่งที่ในอดีตเกษตรกรได้นำมาใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืชได้ผลดีมาแล้ว ชาวบ้านบางท้องที่นำมาใช้เป็นยาฆ่าเห็บ เหา ชาวจันทบุรีนำสารสกัดจากหนอนตายหยากพ่นบนต้นพริกไทยเพื่อกำจัดเพลี้ยเป็นต้น (พนัส,2539) หนอนตายหยากเป็นพันธุ์ไม้ในวงศ์ Stemonaceae พบในทวีปเอเชีย ออสเตรเลีย นิวกินี (Duyfjes, 1993) เช่น ญี่ปุ่น จีน ฮอลแลนด์ ฟิลิปปินส์ มีประมาณ 30 ชนิดทั่วโลก ในแถบอินโดจีนพบประมาณ 11 ชนิด (Gagnepain,1934) ส่วนในประเทศไทย พบพืชสกุลStemona ตามภาคต่างๆ ทั่วไป มักพบตามป่าดิบชื้น ป่าผลัดใบและป่าไผ่ บางแห่งพบเป็นวัชพืชหรือใช้ปลูกประดับในบ้าน พืชสกุล Stemona ที่พบในประเทศไทยมี 8 ชนิด โดยแต่ละท้องที่มักมีชื่อเรียกแตกต่างกันไป (พะยอม, 2521 ; เต็ม, 2523 ; สุทธาพันธ์, 2544 ; Gagnepain, 1934 ; Konoshima, 1973 ; Chuakul, 2000) ได้แก่

S. burkillii Prain

โป่งมดง่าม ปงมดง่าม (เชียงใหม่)

S. collinsae Craib.
หนอนตายหยาก (ภาคกลาง) ปงช้าง (ภาคเหนือ)
S. curtisii Hook f.
รากลิง หนอนตายหยาก (พัทลุง)
S. aphylla Craib.
เครือปุง (ลำปาง)
S. phyllantha Gangep
ไม่มีรายงานชื่อไทย พบในจังหวัดเพชรบุรี ภูเก็ต
S. beerii Craib.
ไม่มีรายงานชื่อไทย พบในจังหวัดเชียงใหม่
S. tuberosa Lour.
หนอนตายหยาก(แม่ฮ่องสอน นครสวรรค์)
S. hutunguriana sp.Nov
สามสิบกลีบน้อย (อุบลราชธานี) หญ้าปอบน้อย (ศรีสะเกษ)

หนอนตายหยากเป็นเถาไม้เนื้อแข็ง ลำต้นมักไม่ค่อยตรง รากลักษณะคล้ายกระสวย เป็นพวงคล้ายรากกระชาย ใบคล้ายใบพลูเห็นเส้นใบชัดเจน ดอกเล็กเป็นกลีบคล้ายดอกจำปามีกลีบดอกสีขาวข้างในสีม่วงแดง ฝักเล็กปลายแหลมสีน้ำตาล (นิจศิริและพยอม, 2534) เป็นสมุนไพรที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย โดยได้นำมาใช้เป็นตัวยารักษาโรค เช่น โรคผิวหนัง น้ำเหลืองเสีย ผื่นคัน ฆ่าเชื้อโรค พยาธิภายใน มะเร็งตับ ลดระดับน้ำตาล นอกจากนี้ในประเทศจีนมีการนำรากหนอนตายหยากชนิด *S. tuberosa* มาใช้รักษาอาการไอ วัณโรค (มณฑาและคณะ, 2548) ในประเทศไทยใช้เป็นยารักษาโรคผิวหนัง ยาขับพยาธิและยาฆ่าเหา (Salalamp, 1996) ส่วนทางด้านการเกษตรนั้นหนอนตายหยากได้ถูกนำมาใช้เป็นสารกำจัดแมลง ซึ่งสมจิตรและสุภาพ (2534) รายงานว่า ชาวบ้านนำรากหนอนตายหยากตำละลายน้ำหยอดใส่แผล โค กระบือที่มีหนอนไชอยู่ หนอนจะตายหมด สอดคล้องกับการรายงานของรัตนาภรณ์ (2543) ที่พบว่าชาวบ้านนำรากหนอนตายหยากตำละลายน้ำหรือแช่ในน้ำมันมะพร้าวทาแผลสัตว์เลี้ยง เพื่อป้องกันแมลง ฆ่าหนอนที่เกิดในบาดแผล ใช้ฉีดป้องกันแมลงที่กัดกินใบของต้นพริกไทย สารสกัดหนอนตายหยาก (*S. collinsae*) มีความเป็นพิษสูงต่อหนอนแมลงวันบ้าน (*Musca domestica* L.) (เลาจนาและประคอง, 2520) รากหนอนตายหยากบดละเอียดอัตรา 9 เปอร์เซ็นต์ผสมในอาหารและมูลไก่สามารถยับยั้งการเกิดของหนอนแมลงวันในมูลไก่ได้ (ธวัธชัย และคณะ, 2545) และการใช้สารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์มีผลกำจัดเห็บโค (*Boophilus microplus* L.) ระยะตัวอ่อนได้ 100 เปอร์เซ็นต์ กำจัดตัวเต็มวัยได้ 93.3 เปอร์เซ็นต์ (วีระพลและคณะ, 2536) กฤษณา (2525) รายงานว่า สารสกัดจากรากหนอนตายหยากชนิด *S. curtisii* มีความเป็นพิษสูงต่อลูกน้ำยุงลาย (*Aedes sp.*) และลูกน้ำยุงรำคาญ (*Culex sp.*) จากรายงานของรัตติยาและพิทยา (2542) พบว่า หนอนตายหยากชนิด *S. collinsae* ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการกินของหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura Hubner*) เช่นเดียวกับการศึกษาของสุภาณีและคณะ (2546) ที่พบว่าการสกัดสารออกฤทธิ์ในรากหนอนตายหยากด้วย เมทานอลมีผลการยับยั้งการกินของหนอนกระทู้ผัก และหนอนใยผักโดยมีค่า EC50 ที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 702.11 และ 129.22 ppm ตามลำดับ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

(1) ศึกษาวิธีการเตรียมสารสกัดจากหนอนตายหยากด้วยตัว ทำละลายที่เหมาะสมในการออกฤทธิ์ฆ่าแมลง

(2) เพื่อศึกษาฤทธิ์ฆ่าแมลงของสารสกัดจากหนอนตายหยาก

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่างและวิธีการสกัด : เก็บตัวอย่างหนอนตายหยากจากอำเภอด่านขุนทด จังหวัดนครราชสีมา นำส่วนรากมาล้างและหั่นบางๆ ผึ่งลมให้แห้งนำไปบดให้ละเอียด ทำการสกัดอย่างต่อเนื่องโดยใช้เครื่องสกัดชนิด Soxhlet apparatus เป็นวิธีการสกัดสารออกฤทธิ์จากพืชโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ที่มีระดับความเป็นขั้ว

(polarity) ต่างกันเพื่อให้ได้สารสกัดกลุ่มต่างกันออกมา ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในการสกัดใช้ตัวอย่างพืชเริ่มต้น 300 กรัม ใส่ในถุงผ้าขนาด 8 x 20 เซนติเมตร ใส่ลงไปในเครื่องสกัด จากนั้นเติมตัวทำละลายอินทรีย์โดยเติมเฮกเซนลงไปก่อน เมื่อตัวทำละลายเดือดส่วนของตัวทำละลายที่สกัดสารแล้ว จะระเหยขึ้นไปในเครื่องควบแน่นและกลั่นตัวลงมากระทบกับตัวอย่างพืชลงไปในขวดสกัดใหม่ เป็นเช่นนี้ไปเรื่อย เมื่อสกัดด้วยเฮกเซนเสร็จสมบูรณ์ (สารที่ดูดลงมาใสไม่มีสี) จึงเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นไดคลอโรมีเทน และเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยตัวทำละลายทั้งหมดจะใช้ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกให้หมดด้วย rotary evaporator จะได้สารสกัดที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพกับแมลงทดสอบ

การแยกสารสกัดโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี: การแยกสารสกัดเป็นขั้นตอนของการนำสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนของหนอนตายหยากไปแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจล 60 (ขนาดอนุภาค 0.063-0.200 มิลลิเมตร) ปริมาณ 60 กรัม เป็นเฟสที่อยู่กับที่ (stationary phase) สำหรับการเตรียมคอลัมน์จะใช้สำลีรองเพื่อป้องกันการไหลออกของซิลิกาเจล ผสมซิลิกาเจลกับ 100 เปอร์เซ็นต์เฮกเซนเทลงในคอลัมน์รอให้ผงซิลิกาตกตะกอน เปิดคอลัมน์ให้สารละลายไหลจนสูงเหนือระดับซิลิกาประมาณ 0.5 เซนติเมตร ปรับผิวหน้าให้เรียบ ผสมซิลิกาเจลกับสารสกัดบดให้ละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน (อัตราส่วนประมาณ 30 กรัมต่อสารสกัด 1 กรัม) โปรยบนคอลัมน์ทีละน้อยจนหมด ทำการชะด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ตามลำดับดังนี้เฮกเซน 100เปอร์เซ็นต์, เอททิลอะซิเตทในเฮกเซน 30 เปอร์เซ็นต์, เอททิลอะซิเตทในเฮกเซน 50 เปอร์เซ็นต์, เอททิลอะซิเตท 100 เปอร์เซ็นต์, เอททิลอะซิเตทในเมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ และ เมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปริมาตรสารละลายที่ใช้คือ 500 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้นำไประเหยตัวทำละลายออกเช่นกัน

การทดสอบฤทธิ์ฆ่าแมลง: เป็นขั้นตอนการคัดเลือกสารสกัดหยาบจากพืชตัวอย่างที่ได้จากกระบวนการสกัดอย่างต่อเนื่องกับแมลงทดสอบ 3 ชนิด คือ หนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura* Hubner) วัย 2 ทดสอบโดยวิธีให้กินใบพืชที่จุ่มสารสกัด (feeding leaf disc) ตัวเต็มวัยด้วงงวงข้าวโพด (*Sitophilus zeamais* Motschulsky) ทดสอบโดยวิธีสัมผัสกับผิวที่พ่นสารสกัด (rasidual film) และลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti* Linnaeus) วัย 3 ทดสอบโดยวิธีใส่ลูกน้ำลงไปในสารละลาย (test with aqueous dispersion) มีการทดลอง 3 วิธีการ เพื่อให้เหมาะสมกับกลไกการได้รับสารของแมลงที่ใช้ทดสอบ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD)

วิธีให้กินใบพืชที่จุ่มสารสกัด เป็นการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดในลักษณะกินตาย (stomach poison) โดยใช้หนอนกระทู้ผักวัย 2 (อายุ 5 วัน) จำนวน 10 ตัวต่อซ้ำ ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ปล่อยตัวหนอนให้กินบนชิ้นคะน้า (ตัดเป็นชิ้นกลมโดยใช้ cork boror ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 21 มิลลิเมตร) ที่จุ่มด้วยสารละลายที่ต้องการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 ppm ในกล่องพลาสติกใสรูปกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 2 เซนติเมตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนให้อาหารปกติ คือ ชิ้นผักคะน้าที่ไม่จุ่มสารใดๆเลย ตรวจนับการตายและการรอดชีวิตของหนอนทุก 24 ชั่วโมง จนกระทั่งเข้าดักแด้และลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย

วิธีสัมผัสกับผิวที่พ่นสารสกัดเป็นการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อด้วงงวงข้าวโพดในลักษณะสัมผัสตาย (contact poison) ดัดแปลงจากการทดลองของพนัส (2537) โดยนำสารสกัดเจือจางด้วยอะซิโตนให้ได้ความเข้มข้น 2,000 และ 5,000 ppm (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) พ่นลงบนด้านในของจานทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ทั้ง 2 ฝาๆ ละ 2 มิลลิลิตรโดยเครื่องพ่นสารชนิด Potter's spray tower ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว บรรจุสารในเครื่องพ่นครั้งละ 2 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 10 ซ้ำต่อหนึ่งหน่วยการทดลอง ปล่อยด้วงงวงข้าวโพด 10 ตัว

ต่อหนึ่งจานทดลอง (1 ซ้ำ) เพื่อให้แมลงสัมผัสกับสารที่พ่นเคลือบไว้ ตรวจนับการตายของแมลงที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

วิธีการใส่ลูกน้ำลงไปในสารละลาย เป็นวิธีการทดสอบสารฆ่าแมลงโดยการปล่อยแมลงลงในสารละลายของสารฆ่าแมลงอัตราต่างๆ กัน แล้วนับจำนวนแมลงที่ตายที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มักใช้วิธีนี้กับลูกน้ำยุงและแมลงในน้ำ (มานิตย์, 2543) ซึ่งดัดแปลงการทดลองจาก Attri และ Prasad (1980) และตามมาตรฐานของ WHO (1963) โดยนำลูกน้ำยุงลายวัย 3 จำนวน 10 ตัว ปล่อยลงในน้ำที่มีสารที่ต้องการทดสอบในระดับความเข้มข้นต่างๆ ในปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในขวดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร สูง 8 เซนติเมตร ทำการทดลอง 5 ซ้ำต่อความเข้มข้น บันทึกจำนวนลูกน้ำยุงที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

การทดสอบความเป็นพิษของสารแต่ละ fraction: การทดสอบความเป็นพิษของสารแต่ละ fraction ที่ได้จากการแยกสารสกัดโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ว่า fraction ใดมีความเป็นพิษสูงสุดต่อแมลง โดยเลือกแมลงทดสอบ คือ ลูกน้ำยุงลาย เนื่องจากมีความไวต่อสารสกัดมากที่สุดและเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ง่าย ทำให้ได้ลูกน้ำยุงที่อยู่ในวัยเดียวกันมาทดสอบด้วย ทำการทดสอบสารสกัดของสารแต่ละ fraction กับลูกน้ำยุงลายวัย 3 ด้วยวิธีการใส่ลูกน้ำลงไปในสารละลาย โดยละลายสารสกัดที่ได้ในอะซิโตนก่อน จากนั้นจึงนำไปละลายในน้ำที่ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 125, 250, 500, และ 1,000 ppm ส่วนตัวควบคุมใช้อะซิโตนละลายในน้ำ ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ใช้ลูกน้ำยุง 10 ตัวต่อซ้ำ ตรวจผลที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

เนื่องจากอัตราการตายของลูกน้ำยุงใน F6 และ F7 ใกล้เคียงกัน โดยมีปริมาณการตายสูงที่สุด และใน fraction ทั้งสองยังใช้ระบบตัวทำละลายในขั้นตอนการแยกโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟีเหมือนกัน จึงนำสารสกัดที่ได้มารวมกัน ละลายสารสกัดในเมทานอล ปล่อยให้สารละลายตกผลึก จากนั้นจึงนำผลึกไปกรองและล้างด้วยเมทานอลจนสะอาดจะได้ผลึกสีขาวรูปร่างแบบอสัณฐาน เก็บผลึกเพื่อนำไปตรวจสอบโดย TLC เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน rotenone

วิเคราะห์ผลโดยการวิเคราะห์ค่า LD50 (Median Lethal Dose) โดยวิธี Probit analysis (Finney, 1971) โดยใช้โปรแกรม QuantX 13 และวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ F-test และ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

สกัดสารออกฤทธิ์จากหนอนตายหยากโดยวิธีการสกัดอย่างต่อเนื่อง โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีระดับความเป็นขั้วจากต่ำไปสูงได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อการสกัดเสร็จสมบูรณ์ พบว่า ในส่วนของหนอนตายหยากได้ปริมาณสารสกัดหยาบเท่ากับ 0.9, 1.0 และ 8.6 เปอร์เซ็นต์ (w/w)

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากหนอนตายหยากต่อหนอนกระทู้ผัก โดยวิธีให้กินใบพืชที่จุ่มสารสกัด พบว่า ในส่วนของสารสกัดจากหนอนตายหยาก สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนแสดงความเป็นพิษสูงสุด โดยที่ที่ระดับความเข้มข้น 40,000 ppm มีอัตราการตาย 46 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดที่มีพิษรองลงมา คือ สารสกัดหยาบ เมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดหยาบเฮกเซน ตามลำดับ เมื่อนำอัตราการตายของหนอนกระทู้ผักจากสารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน และสารสกัดหยาบเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ มาทำการวิเคราะห์ F-test พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 10,000, 20,000 และ 40,000 ppm อัตราการตายของหนอนกระทู้ผักมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 1

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากหนอนตายหยากต่อด้วงงวงข้าวโพด โดยวิธีสัมผัสกับผิวที่พ่นสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 20,000 และ 50,000 ppm ที่ 48 ชั่วโมง พบว่า ในส่วนของสารสกัดหนอนตายหยาก สารสกัดหยาบเมทานอล70 เปอร์เซ็นต์แสดงความเป็นพิษต่อด้วงงวงข้าวโพดสูงที่สุด โดยที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm มีอัตราการตาย

48 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดที่มีพิษรองลงมา คือ สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนและสารสกัดหยาบเฮกเซน ตามลำดับ เมื่อนำอัตราการตายของด้วงงวงข้าวโพดจากสารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนและสารสกัดหยาบเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์มาทำการวิเคราะห์ F-test พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 20,000 ppm ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm อัตราการตายของด้วงงวงข้าวโพดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 2

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากหนอนตายหยากต่อลูกน้ำยุงลายวัย 3 โดยวิธีการใส่ลูกน้ำลงไปในสารละลาย พบว่า ที่ 48 ชั่วโมง ในส่วนของหนอนตายหยากสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนแสดงความเป็นพิษสูงสุด โดยที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm มีอัตราการตาย 60 เปอร์เซ็นต์ และที่ระดับความเข้มข้น 500, 1,000 และ 2,000 ppm มีอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดที่มีพิษรองลงมา คือ สารสกัดหยาบเฮกเซน และสารสกัดหยาบเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายจากสารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน และสารสกัดหยาบ 70 เปอร์เซ็นต์เมทานอล มาทำการวิเคราะห์ F-test พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 250, 500 และ 1,000 ppm อัตราการตายของลูกน้ำยุงลายมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ppm ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 3

การทดสอบความเป็นพิษของสารแต่ละ fraction หลังจากตรวจผลที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า F7 มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลายสูงที่สุดโดยมีค่า LC50 13 ppm รองลงมา คือ F6 มีค่า LC50 14 ppm และ F5 มีค่า LC50 15 ppm (ตารางที่ 4)

จากภาพที่ 1 เมื่อทำการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ของสารสกัดหนอนตายหยากด้วย TLC โดยใช้โรทีโนนซึ่งเป็นไอโซฟลาโวนอยด์ชนิดหนึ่งเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ ซึ่งไม่พบโรทีโนนในสารสกัด จึงเป็นไปได้ว่า สารสกัดมีโรทีโนนในปริมาณน้อยหรือไม่มีโรทีโนน ซึ่งการตรวจสอบด้วย TLC อาจเป็นวิธีการที่ไม่มีความละเอียดพอที่จะใช้ตรวจสอบโรทีโนน ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาโดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีอื่นๆ เพิ่มเติม หรืออีกนัยหนึ่ง คือ สารออกฤทธิ์ที่พบในสารสกัดเป็นสารในกลุ่มอื่น จากการรายงานของ Kinoshita และ Mori (1996) กล่าวว่า ในสารสกัดหนอนตายหยากประกอบด้วยสารในกลุ่ม polycyclic alkaloids หลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลง เช่น stemonine, stenin และ stemospironin (Koyanma and Oda, 1970) และจากการรายงานของ Peter และ Lee (1997) ก็พบว่า stemoamide เป็น alkaloid ที่แยกได้จากสารสกัดหนอนตายหยาก (*S. tuberosa*) มีศักยภาพในการฆ่าแมลงได้ดี สอดคล้องกับการศึกษาของสุภาณี และคณะ (2546) ที่พบว่าหนอนตายหยาก (*S. tuberose*) มีประสิทธิภาพสูงในลักษณะสัมผัสตายต่อด้วงถั่วเขียว (*Callosobruchus maculatus*) และผลการยับยั้งการกินอาหารของหนอนใยผัก และหนอนกระทู้ผัก ส่วนการตรวจสอบด้วย HPLC-ELSD โดย Ren และคณะ (2006)พบสารประกอบ 4 ชนิด ได้แก่ neotuberostemonine, tuberospironine, croomine และ stemoninine Jiwajinda และคณะ (2001) รายงานว่าพบสารกลุ่ม alkaloid ในรากหนอนตายหยาก (*S. collinsae*) ได้แก่ stemofoline และ 16,17-didehydro-16-(E)-stemofoline ซึ่งมีฤทธิ์กำจัดแมลงศัตรูพืช เช่น หนอนกัดกินใบ และเพลี้ยอ่อน นอกจากนี้ยังกำจัดเชื้อสาเหตุโรคพืช เช่น *Rhizoctonia solani* และ *Erwinia carotovora* รวมทั้งมีพิษในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย (นันทวันและอรนุช, 2543) จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่า การสกัดสารในรากหนอนตายหยากด้วย dichloromethane ทำให้ได้สารออกฤทธิ์ที่มีศักยภาพในการฆ่าแมลงได้ดี หากมีการศึกษาสารออกฤทธิ์ด้วยวิธีการที่ละเอียดจะได้สารบริสุทธิ์ที่นำมาสู่การสังเคราะห์สาร ซึ่งเป็นแนวทางในการนำไปใช้ควบคุมแมลงในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

กฤษณา ภูตคาม. 2525. รวบรวมรายงานการศึกษารากหนอนตายหยาก. **เชียงใหม่เภสัชสาร.** 1(1) : 28-34.

เต็ม สมิตินันท์. 2523. ชื่อพันธุ์ไม้แห่งประเทศไทย. กรมป่าไม้. หน้า 314.

ธวัธชัย, ศุภประดิษฐ์, วิโรจน์, กิติคุณ, รุ่งจรัส หุตะเจริญ, สัญชัย, จตุรสิทธาและสุทธาพันธุ์ โพธิ์กำเนิด. 2545. การใช้รากสมุนไพรหนอนตายหยากผสมในอาหารและมูลไก่เพื่อควบคุมหนอนแมลงวัน. **แก่นเกษตร.** 30(2) : 137-145.

นิจศิริ เรืองรังสี และพะยอม ตันติวัฒน์. 2534. พืชสมุนไพร. สำนักพิมพ์โคเดียนสโตร์ : วังบูรพา กรุงเทพฯ.

นันทวัน บุณยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร. 2543. สมุนไพรพื้นบ้าน. บริษัทประชาชน จำกัด กรุงเทพฯ.

พะยอม ตันติวัฒน์. 2521. สมุนไพร. สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย. หน้า 142.

พนัส วงศ์วรรณ. 2537. การใช้สารสกัดจากข่า (*Alpinia galangal* L.) เพื่อป้องกันกำจัดด้วงถั่วเขียว (*Callosobruchus maculates* F.) .วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชา กีฏวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

มานิตย์ นาคสุวรรณ. 2543. ประสิทธิภาพของสารสกัดสะเดาและน้ำมันสะเดาต่อลูกน้ำยุงลายและยุงรำคาญ. **วารสารกีฏและสัตววิทยา.** 22(2) : 138-150.

มณฑา วงศ์มณีโรจน์, สุรัตน์วดี จิวะจินดา, ศิริวรรณ บุรีคำ และรงรอง หอมหวล 2548. หนอนตายหยาก : พืชที่เรียกชื่อเหมือนกันแต่เป็นพืชต่างชนิดกัน. **วารสารข่าวศูนย์ฯ.**19(2) : 20.23.

รัตติยา นวลหล้า และพิทยา สรวมศิริ. 2542. การคัดเลือกสมุนไพรป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ผัก.**วารสารเกษตร.** 15(2) : 192-202.

รัตนาภรณ์ พรหมศรัทธา. 2543. การสกัดสารออกฤทธิ์จากโล่ติ๊น หนอนตายหยากและสะเดา. เอกสารการฝึกอบรมการสกัดสารออกฤทธิ์จากโล่ติ๊น หนอนตายหยากและสะเดาในการป้องกันและกำจัดศัตรูพืช. สถาบันวิจัยและพัฒนาการผลิตสารธรรมชาติ กรมวิชาการเกษตร. 52 หน้า.

เลาจนา ธีรภัทรสกุล และประคอง พันธุ์อุไร. 2520. การศึกษาพิษของหนอนตายหยากที่มีกับหนอนแมลงวันบ้าน.**วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.** 19(4) : 217-227.

วีระพล จันทร์สวรรค์ สถาพร จิตตปาลพงศ์ และนงนุช จันทราช. 2536. ประสิทธิภาพของหนอนตายหยากต่อเห็บโค. **วารสารเกษตรศาสตร์ (สาขาวิทย์).** 27 : 336-340.

สมจิตร พงษ์พงัน และสุภาพ ภู่ประเสริฐ. 2534. พืชกินได้และพืชมีพิษในป่าเมืองไทย. สำนักพิมพ์โคเดียนสโตร์ : วังบูรพา กรุงเทพฯ.167 หน้า.

สุภาณี พิมพ์สมาน รัตนาภรณ์ พรหมศรัทธา และสังวาลย์ สมบูรณ์. 2546. สารสกัดจากหนอนตายหยาก (*Stemona sp.*) เพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืช ใน การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 6 ณ โรงแรมโซฟิเทลราชาออคิดขอนแก่น วันที่ 24-27 พฤศจิกายน 2546. หน้า 22.

สุทธาพันธ์ โพธิ์กำเนิด. 2544. การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้สมุนไพรหนอนตายหยากผสมอาหารไก่เพื่อควบคุมปริมาณหนอนแมลงวันในมูลไก่. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีเพื่อการพัฒนาทรัพยากรณ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล.

Abbott, W.S. 1925. Method for computing the effectiveness of an insecticide. **J. Econ.Entomol.** 18 : 265-267.

Attri, B.S., and E. Prasad. 1980. Neem oil extractive- An effective mosquito larvicide.**Can. J. Entomol.** 43: 371-374.

Chuakul, w. 2000. *Stemona hutangurina* sp. Nov. (Stemonaceae) from Thailand. **Kew bulletin.**55: 977-980.

Duyfjies, B.E.E. 1993. Stemonaceae. In : C. Kalkman, P.F. Stevens, D.W. Kirkup,W.J.J.O. de Wild(H.P. Nooteboom(eds.), Flora Malesiana,Ser. 111 (2): 399-409.

Finney, D.J. 1971. Probit analysis, 3rd ed. Cambridge University Press : London.

Gagnepain, F. 1934. Stemonaceaes (Roxburghiacees) .In H. Lecomte (ed.),Flore General deIndo-Chine. 6(6): 745-753.

Jiwajinda, S., N. Hirai, K. Watanabe, V. Santisopasri, N. Chuengsamarnyart, K. Koshimiazu and H. Ohigashi. 2001. Occurrence of the insecticidal 16,17-didehydro-16-(E)-stemofoline in *Stemona collinsae*. **Phytochemistry.** 56: 693-695.

Kinoshita, A., and M. Mori. 1996. Total synthesis of (-) stemoamide using ruthenium catalyteenzyme metalysis reaction. **J. Org. Chem.**: 8356-8357.

Koyanma, H., and K, Oda. 1970. Structural and biological investigations of the *Stemona* alkaloids. **J. Chem. Soc.** 125 : 268.

Konoshima, M. 1973. Medicinal plants in Thailand.Kyoto university scientific surveys ofcrude drugs and medicinal plants inThailand,Kyoto. 41 p.

Peter, A.J., and K. Lee. 1997. Total synthesis of (+ข) Stemoamide. **J, Am. Chem. Soc.** 119 : 3409-3410.

Ren W.J, P.M. Hon, Z. Yan, Y.M. Chan, Y.T Xu, H. Xu, H. Greger, P.C. Shaw and P.H. But.2006. Alkaloids and chemical diversity of *Stemona tuberosa*. **J. Nat. Prod.** 69(5): 749-754.

Salalamp P. 1996. Medical plants in Thailand volume 1. Department of Phamaceutical Botany. Faculty of Phamacy, Mahidol University. Amarin Printing and Publishing,Bangkok.

World Health Organization. 1963. Technique ReportSeries, No 265 Insecticide Resistance andVector Control: Thirteenth report of WHOExpert Committee on Insecticide, World Health Organization, Geneva,

ตารางที่ 1. ผลของสารสกัดจากหนอนตายหยากต่อหนอนกระทู้ผัก ที่เวลา 48 ชั่วโมง

ชนิดสารสกัด	เปอร์เซ็นต์การตายที่ระดับความเข้มข้น (ppm)[1/]			
	5,000	10,000	20,000	40,000
สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน	4 a[2/]	24 a	32 a	46 a
สารสกัดหยาบเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์	2 a	8 b	18 b	24 b
สารสกัดหยาบเฮกเซน	10 a	10 b	16 b	22 b
F-test	ns	*	*	*

1/ ค่าเฉลี่ยอัตราการตายเป็นเปอร์เซ็นต์ของหนอนกระทู้ผักจาก 5 ซ้ำ ปรับโดยใช้สูตร Abbott (1925)

2/ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2. ผลของสารสกัดจากหนอนตายหยากต่อตัวเต็มวัยด้วงงวงข้าวโพด ที่เวลา 48 ชั่วโมง

ชนิดสารสกัด	เปอร์เซ็นต์การตายที่ระดับความเข้มข้น (ppm)[1/]	
	20,000	50,000
สารสกัดหยาบ 70 เปอร์เซ็นต์เมทานอล	22 a[2/]	48 a
สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน	14 a	18 b
สารสกัดหยาบเฮกเซน	8 a	14 b
F-test	ns	**

1/ ค่าเฉลี่ยอัตราการตายเป็นเปอร์เซ็นต์ของตัวเต็มวัยด้วงงวงข้าวโพดทั้งหมด 5 ซ้ำปรับโดยใช้สูตร Abbott (1925)

2/ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3. ผลของสารสกัดจากหนอนตายหยากต่อลูกน้ำยุงลาย ที่เวลา 48 ชั่วโมง

ชนิดสารสกัด	เปอร์เซ็นต์การตายที่ระดับความเข้มข้น (ppm)[1/]			
	250	500	1,000	2,000
สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน	60 a[2/]	100 a	100 a	100 a
สารสกัดหยาบเฮกเซน	44 a	90 a	100 a	100 a
สารสกัดหยาบเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์	4 b	16 b	50 b	100 a
F-test	**	**	**	ns

1/ ค่าเฉลี่ยอัตราการตายเป็นเปอร์เซ็นต์ของลูกน้ำยุงลายจาก 5 ซ้ำ ปรับโดยใช้สูตร Abbott (1925)

2/ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

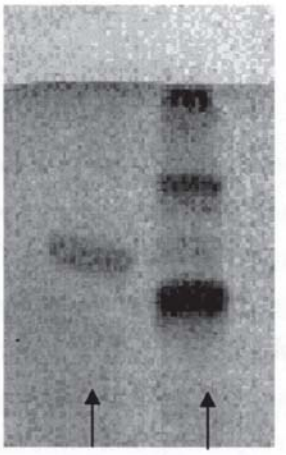
** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4. ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารแต่ละ fraction จากสารสกัดหนอนตายหยากต่อลูกน้ำยุงลายวัย 3 ที่เวลา 48 ชั่วโมง

fraction	LC_{50} [1/] (ppm)	95% fiducial limit		LC_{95} (ppm)
		lower	upper	
F1	1,292	823	2,658	72,380
F2	976	620	2,948	30,591
F3	488	264	801	40,260
F4	32	24	42	31
F5	15	13	17	27
F6	14	12	16	31
F7	13	8	18	94
F8	90	66	153	820
F9	157	81	1,686	9,671
rotenone	ความเข้มข้น 3 ppm ทำให้ลูกน้ำยุงลายวัย 3 ตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง			

1/ คำนวณจากอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายทั้งหมด

โรทีโนน สตีโมนา
ก



โรทีโนน สตีโมนา
ข

ภาพที่ 1. การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ของสารสกัดหนอนตายหยากเปรียบเทียบกับโรทีโนนด้วยวิธี Thin Layer Chromatography

ก เปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารสกัดหนอนตายหยากกับโรทีโนน เมื่อส่องด้วยแสงยูวี 367 นาโนเมตร

ข เปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารสกัดหนอนตายหยากกับโรทีโนน เมื่อพ่นด้วย 1 เปอร์เซ็นต์วานิลลินในสารละลายกรดซัลฟุริกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ในเมทานอล