บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

ใน 30 ปีที่ผ่านมา มีการพัฒนาอย่างมากในเทคนิคการวิเคราะห์หาสารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ฆ่าแมลงทำให้ลดการใช้สารฆ่าแมลงที่เป็นสารสังเคราะห์ลงกอปรกับนักวิชาการในปัจจุบันมีความสนใจเพิ่มขึ้นในการใช้สารเคมีที่ได้จากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ไล่แมลงที่เป็นศัตรูพืชเพื่อป้องกันการเสียหายของธัญพืช ตัวอย่างของสารฆ่าแมลงที่ได้จากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพที่ดีในการกำจัดศัตรูพืช ได้แก่ การใช้นิโคตินใช้ในปริมาณต่ำๆแต่สามารถกำจัดศัตรูพืชได้ดี ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการมีประสิทธิภาพที่ดี (Foster and Harris, 1997)

สารฆ่าแมลงที่ได้จากธรรมชาตินั้นมนุษย์นำมาใช้เป็นเวลานานแล้ว เช่น ดอกไพรีทรัม (pyrethrum, *Chrysanthemum cinerariaefolium*), รากหางไหลหรือโล่ติ้น (*Derris elliptica*) และใบยาสูบ (*Nicotina tabacum* and *Nicotina rustica*) ต่อมานักวิทยาศาสตร์ได้ศึกษาสารฆ่าแมลงจากธรรมชาติอีกมากมาย เช่น พืชตระกูล Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Annonaceae, Malvaceae, Labital และ Canellaceae พบว่าพืชตระกูลดังกล่าว มีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาเป็นสารฆ่าแมลงได้ โดยเฉพาะพืชในตระกูล Meliaceae ซึ่งมีหลายชนิดได้แก่ สะเดาอินเดีย, สะเดาบ้าน, เลี่ยน (*Melia azedarach* L.) เป็นต้น สารสามัญ คือ triterpenoid compounds โดยเฉพาะกลุ่ม limonoid (นพมาศ , 2535)

ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเหล่านี้ ยังไม่ได้ใช้ในทางการค้าอย่างแพร่หลาย มีการค้นคว้าวิจัยสารฆ่าแมลงจากสารสกัดจากเมล็ดสะเดา แสดงให้เห็นว่าการจัดการศัตรูพืชที่เป็นแมลงเป็นปัญหาที่สำคัญในการพัฒนาประเทศ สารสำคัญที่พบในเมล็ดสะเดาคือสารอะซาไดแรคติน เป็นสารไล่แมลงตัวใหม่ เมื่อใช้สารสกัดจากเมล็ดสะเดาพ่นต้นพืช สารสกัดนั้นจะถูกดูดซึมเข้าสู่ต้นพืช ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการกินอาหารของแมลง และมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลงอีกด้วย (Brady,1982)

1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นสะเดา

Adrien Henri Laurent De Jussieu ได้อธิบายไว้ในปี ค.ศ. 1830 ต้นสะเดาหรือชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Azadirachta indica* มีลำดับทางอนุกรมวิธาน (Taxonomy) ดังนี้

Order : Rutales

Suborder : Rutineae

Family : Meliaceae

Subfamily : Melioideae

Tribe . Melieae

Genus : *Azadirachta*

Species : *indica*

ในประเทศอินเดียมีชื่อเรียกต้นสะเดามากกว่า 100 ชื่อ แต่ที่นิยมเรียกกันคือ Neem ส่วนในประเทศไทยเรียกว่า สะเดา, ควินิน หรือเดา (National research council, 1992)

Azadirachta indica เป็นต้นไม้ที่เจริญเติบโตเร็ว โดยปกติจะสูงถึง 15 – 20 เมตร และภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม จะสูงเฉลี่ยถึง 35 – 40 เมตร ความกว้างของลำต้นวัดโดยรอบ 80 – 200 เซนติเมตร เรือนยอดเป็นพุ่มหนาทึบตลอดปี และจะแทงยอดอ่อนพร้อมออกดอกสีเทา มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ในช่วงเดือนธันวาคมถึงมีนาคม หลังดอกสะเดาบานประมาณ 60 วัน จะได้ผลสุกของสะเดามีสีเหลืองหรือเหลืองอมเขียว จำนวนเมล็ดส่วนใหญ่มี 1 เมล็ดต่อผล แต่บางครั้งจะมี 2 เมล็ด เมล็ดมีลักษณะกลมยาวขนาด 5 – 15 มิลลิเมตร สะเดาให้ผลผลิตเต็มที่เมื่ออายุประมาณ 10 ปี (โชคชัย,2537) ผลที่สุกจัดจะมีสารอะซาไดแรคติน สูงกว่าผลอ่อนนอกจากนั้นแล้วปริมาณสารอะซาไดแรคตินในเมล็ดสะเดาจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและพันธุกรรมของต้นสะเดา (Schmutterer, 1990)

การเก็บผลควรใช้ไม้สอยหรือเก็บจากโคนต้นใหม่ๆ หลังการเก็บผลสะเดาควรนำมาบีบแยกเนื้อออกจากเมล็ดสดๆอาจนำไปขยำรวมกับทรายเพื่อให้ส่วนเนื้อหุ้มผลออกง่าย เสร็จแล้ว

จึงล้างให้สะอาดก่อนนำไปตากแดดให้แห้ง ถ้ามีความชื้นจะทำให้เมล็ดเกิดเชื้อรา ทำให้ปริมาณสารอะซาไดแรคตินลดลงได้ (โชคชัย, 2537)

ในประเทศไทยพบพืชสกุล Azadirachta จำนวน 3 ชนิด ดังนี้

1.สะเดาอินเดีย *Azadirachta indica* A. Juss ลำต้นสูง 15 – 25 เมตร เปลือกลำต้นสีน้ำตาลอมเทา มีลักษณะแตกเป็นร่องเล็กๆ เห็นไม่ชัดเจน ใบเล็กสีเขียวปนเหลืองขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อย แต่ปลายของฟันเลื่อยแหลม โคนใบเบี้ยว ฐานใบเยื้องกันมาก ปลายใบแหลมเรียวแคบมากจนคล้ายเส้นขน ออกดอกประปรายตลอดปี

2.สะเดาไทย *Azadirachta indica* var. siamensis Valeton ช่วงลำต้นสั้นสูง 15– 20 เมตร เปลือกลำต้นเป็นร่องลึกเห็นชัดเจน เรือนยอดแผ่กว้างเป็นพุ่มหนาทึบกว่าต้นสะเดาอินเดีย ใบสีเขียวเข้มเป็นมัน ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อยทู่ โคนใบเบี้ยวแต่กว้าง ฐานใบเยื้องกันเล็กน้อย ปลายใบแหลมขนาดใหญ่กว่าต้นสะเดาอินเดีย ออกดอกเดือนธันวาคมถึงเดือนมกราคม ดอกมีสีขาว มีกลิ่นหอมเล็กน้อย เป็นช่อตามปลายกิ่ง ให้ผลแก่เดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคม

3.สะเดาช้าง หรือสะเดาเทียม *Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs ลำต้นตรงสูง 20 – 40 เมตร ต้นอ่อนมีเปลือกต้นเรียบสีน้ำตาลแดง แต่เมื่ออายุมากกว่า 10 ปี เปลือกต้นมีสีเทาและแตกออกเป็นแผ่นตามยาว ขนาดใบค่อนข้างใหญ่ ใบหนามีสีเขียวเป็นมัน ขอบใบเรียบหรือบิดขึ้นลงเล็กน้อย โคนใบเบี้ยว ปลายใบแหลม ออกดอกประมาณเดือนมีนาคม ดอกเป็นช่อสีเขียว ให้ผลแก่เดือนพฤษภาคม ถึงมิถุนายน (โชคชัย, 2537)

1.3 ประโยชน์ของสะเดาในด้านต่างๆ

1.3.1 ประโยชน์ของสะเดาในการป้องกันกำจัดแมลง

ในเมล็ดสะเดามีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ azadirachtin มีผลต่อแมลงในด้านต่างๆ

- มีฤทธิ์ยับยั้งการกินอาหาร (antifeedant)
- มีฤทธิ์ขับไล่แมลง (insect repellant)
- มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลง (growth disruption)
- มีฤทธิ์ทำให้แมลงเป็นหมัน (sterilant)
- มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไข่ (anti – oviposition)
- มีฤทธิ์ทำให้การเจริญเติบโตของแมลงผิดปกติ (abnormal development)

จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้เกษตรกรนำไปใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชและแมลงศัตรูในโรงเก็บได้ (Schmutterrer, 1998, Koul, Isman and Ketkar, 1990)

1.3.2 ประโยชน์ของสะเดาในทางการแพทย์

ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ของต้นไม้ชนิดต่างๆ มีวัตถุประสงค์ที่ใช้ในทางการแแพทย์ ส่วนต่างๆที่ถูกนำไปใช้และผลที่เกิดขึ้นของส่วนต่างๆ จากต้นสะเดาได้ถูกบันทึกไว้ดังนี้

- ส่วนราก, เปลือกของลำต้น และผลอ่อน ใช้เป็นยาบำรุงกำลังและแก้อักเสบ
- เมล็ด, น้ำมัน และใบ ใช้ยับยั้งเชื้อโรค, เป็นยาฆ่าแมลง และเป็นสารขับไล่
- ดอก เป็นยากระตุ้นระบบประสาทและแก้ปวดท้อง
- ยาง ใช้บรรเทาอาการเจ็บปวด
- น้ำตาลเมา ใช้เป็นยาแก้ร้อนใน, ยาบำรุง

(Mitra, 1963)

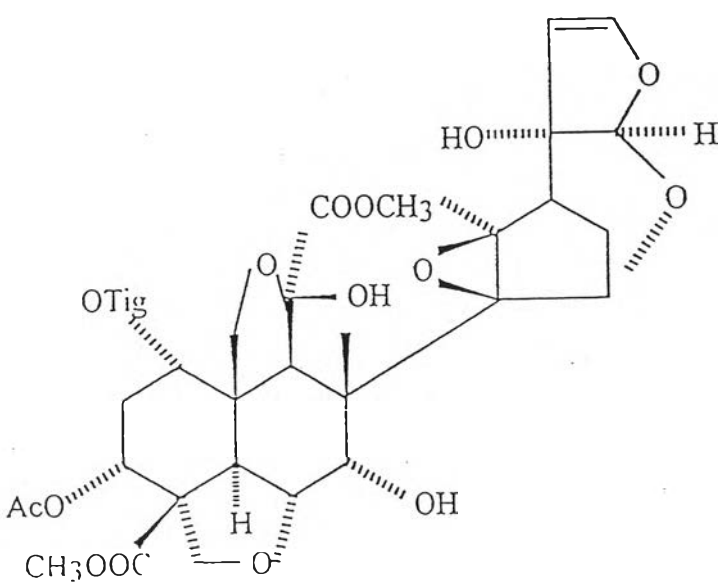
1.3.3 ประโยชน์ด้านอื่น

ส่วนที่เป็นเนื้อไม้ าานี จึงเหมาะสำหรับใช้ในการก่อสร้างและทำเฟอร์นิเจอร์ ชาว ฝาบ้าน, ใช้เป็นไม้เชื้อเพลิงที่ให้ค่าความร้อนสูงมาก (โชคชัย, 253.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4 องค์ประกอบของสารที่สำคัญในเมล็ดสะเดา

มีการศึกษาการสกัดและแยกชนิดของสารประกอบจากเมล็ดสะเดา เริ่มทำการศึกษาในประเทศอินเดีย โดย Siddiqui (1942) ได้ทำการแยกสาร nimbin, nimbinin และ nimbidin จากน้ำมันที่สกัดได้จากเมล็ดสะเดา (อ้างถึงใน Butterworth and Morgan, 1972) ในปี 1963 Mitra ได้สกัดแยกสาร nimbidinin, desacetylnimbin, nimbinic acid, neonimbidin และ neutral D (Mitra, 1963) ต่อมาได้มีการศึกษาและพัฒนาวิธีการแยกสารจากเมล็ดสะเดา พบว่าสารที่ออกฤทธิ์ฆ่าแมลง ได้แก่ triterpenoids, phenolic compounds, carotenoid, steroids และ ketone เป็นต้น สารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งการกินอาหารของแมลง ได้ถูกแยกในปี1968 โดย Morgan และ Butterworth ให้ชื่อว่า azadirachtin (อ้างถึงในNagasampagi และคณะ, 1995) สาร azadirachtin มีโครงสร้างคล้ายสารจำพวก steroids ซึ่งเป็นกลุ่ม tetranortriterpenoid (limnoid) มีการรายงานสูตรโครงสร้างครั้งแรกของสาร azadirachtinในปี ค.ศ. 1972 (Butterworth, Morgan and Percy,1972) ต่อมานักเคมี Broughton (1986) และKraus (1987) ได้ทำการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร azadirachtin พบว่าสูตรโครงสร้างที่รายงานครั้งแรกนั้นผิด จึงได้เสนอสูตรโครงสร้างที่ถูกต้องขึ้นมาใหม่ดังนี้



รูปที่ 1.1 สูตรโครงสร้างของสารอะซาไดแรคติน (Schmutterer,1988)

ในปัจจุบันมีอนุพันธ์ของ tetranortriterpenes ถึง 80 อนุพันธ์ และอนุพันธ์ของ Azadirachtin ถูกแยกจากสารสกัดเมล็ดสะเดา และยังมี nimbinene, nimbandiol, azadiradione, salanin, vilasinin, gedunin, meldenindiol เป็นต้น (Nagasampagi และคณะ, 1995)

เป็นที่รู้จักกันดีว่าในน้ำมันสะเดามีสารอะซาไดแรคตินอยู่ซึ่งได้มา 2 วิธีโดยการบีบอัดเมล็ดสะเดาในอุณหภูมิที่เย็น และการสกัดน้ำมันออกด้วยตัวทำละลาย หลังจากสกัดน้ำมันออกแล้วสกัดกากที่เหลือด้วยการใช้ตัวทำละลาย เช่น อัลกอฮอล์ หรือตัวทำละลายอื่นๆ ได้สารกลุ่ม limonoids ซึ่งมีสารอะซาไดแรคตินมีฤทธิ์เป็นสารฆ่าแมลง (Locke, Walter and Larew, 1995) ตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารอะซาไดแรคตินจากเมล็ดสะเดาได้แก่ เมทธานอล, เอทธานอล, น้ำ, เมทธิลลีน, คลอไรด์,คลอโรฟอร์ม, เฮกเซน,เมทธิลเอทธิลคีโตน, บิวธานอล, ปิโตเลียมเบนซีน อีเธอร์, อะซิโตน, เมทธิลเทิร์ทบิวธิล อีเธอร์,ไดเอทธิล คาร์บอเนต เป็นต้นพบว่าประสิทธิภาพ ของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น สามารถทำได้โดยการเพิ่มขั้วของสารละลาย ตัวอย่างเช่น จากเฮกเซนไปเป็นเอทธานอล, จากเอทธานอลไปเป็นเมทธานอล, จากเมทธานอลไปเป็นน้ำ เป็นต้น (Carter et al.,1991)

อะซาไดแรคติน ($C_{35}H_{44}O_{16}$) เป็นสาร tetranortriterpenoid ที่ได้จาก (*Azadirachta indica* A. Juss) เทคนิคที่ถูกเตรียมในการแยกสารอะซาไดแรคติน ควรจะทำให้ได้ปริมาณของสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่บริสุทธิ์อย่างมากซึ่งเป็นที่ต้องการสำหรับวัตถุประสงค์ใน การทดลองค้นคว้า การทำให้สารอะซาไดแรคตินบริสุทธิ์ยากที่จะทำให้สำเร็จได้ ต้องใช้เทคนิคพิเศษ เทคนิคที่ดีสำหรับการทำให้สารบริสุทธิ์คือ high performance liquid chromatography (HPLC) (Butterworth ,Morgan and Percy, 1972) แต่ก่อนที่จะมาถึงขั้นที่ทำให้สารมีความบริสุทธิ์สูงต้องผ่านเทคนิคต่างๆ ซึ่งสามารถแยกสารที่เป็นองค์ประกอบในเมล็ดสะเดาออกมาได้หลายชนิด และมีการนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับหนอนชนิดต่างๆยกตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 1.1

ตารางที่1.1 แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารอะซาไดแรคตินและอนุพันธ์

Compounds and Test Organisms	Source	Biological Activity	References
Azadirachtin	Seeds		BUTTERWORTH *et al.*, 1968 KRAUS *et al.*, 1985b, 1987c
Acricotopus lucidus		G 100% at 1 µg/ml	STAIBER, 1992
Epilachna varivestis		A EC50 = 13 ppm	SCHWINGER ,1985 SCHWINGER *et al.*, 1984 KRAUS *et al.*, 1991, 1993a
		(F) G LC50 = 1.66 ppm	REMBOLD, 1989a,b
		(F) G 69% at 1.00 ppm	SCHWINGER, 1985
		(T) G 60% 0.01 µg	BAUMANN, 1985 KRAUS *et al.*, 1991, 1993a
Helicoverpa zea		G EC50 = 0.7 ppm	KUBO and KLOCKE, 1982
Heliothis virescens		G ED50 = 0.7 ppm	"
		G EC50 = 0.07 ppm	YAMASAKI *et al.*, 1987
		L LC50 = 0.80 ppm	"
Melanoplus sanguinipes		(F) G ED50 = 10.8 µg/g	CHAMPAGNE *et al.*, 1989, 1992
Oncopeltus fasciatus		(T) G ED50 = 3.5 ng	ISMAN *et al.*, 1990
		(T) G ED50 = 5 ng	CHAMPAGNE *et al.*, 1989, 1992
Pectinophora gossypiella		G EC50 = 0.4 ppm	KUBO and KLOCKE, 1982, KUBO *et al.*, 1986
Peridroma saucia		A EC50 = 8.0 ng/cm^2	ISMAN *et al.*, 1990
		(F) G EC50 = 0.26 ppm	"
		(F) G EC50 = 0.4 nmol/g	CHAMPAGNE *et al.*, 1989, 1992
		(I) G 100% at 2 µg/g	KOUL *et al.*, 1991
Popillia japonica		A EC50 = 2.00 ppm	SCHWINGER, 1985
Schistocerca gregaria		(F) A 100% at 0.07 ppm	BUTTERWORTH *et al.*, 1968
Spodoptera frugiperda		G EC50 = 0.4 ppm	KUBO and KLOCKE, 1982, KUBO *et al.*, 1986
		G EC50 = 0.08 ppm	LEE *et al.*, 1991
		L LC50 = 1.00 ppm	"
Spodoptera littoralis		A EC50 = 0.07 ppm	KLINGELE, 1985
		A 98.8% at 1 ppm	LEY *et al.*, 1993
		(F) G 20-30% at 10 ppm	BAUMANN, 1985
		(T) G 90-100% at 10 µg	"
Tenebrio molitor		(I) G 100% at 1 µg/pupa	PASCUAL *et al.*, 1990
Trypanosoma cruzi		G ED50 = 0.25 µg/ml	GONZALES *et al.*, 1992
3-Deacetylazadirachtin	Seeds		REMBOLD, 1989a,b THIELE, 1991 KRAUS *et al.*, 1991, 1993a
Epilachna varivestis		G EC50 = 0.38 ppm	REMBOLD, 1989a,b
Heliothis virescens		G EC50 = 0.09 ppm	YAMASAKI *et al.*, 1987
		L LC50 = 0.37 ppm	"
1-Detigloylazadirachtin ('Azadirachtin E')	"		REMBOLD, 1989a,b
Epilachna varivestis		G EC50 = 0.57 ppm	"
1-Detigloyl-1-isovaleroyl-azadirachtin	"	A 100% at 100 ppm	ZHOU-HALWART, 1993
Marrangin	Seed kernels[2]		ERMEL *et al.*, 1991
('Azadirachtin L')			KALINOWSKI *et al.*, 1993
Epilachna varivestis		(F) G EC50 = 0.25 ppm	ERMEL *et al.*, 1991
		L 100% at 1 ppm	"

[2] Azadirachtin can also be isolated from tissue cultures (ALLAN *et al.*, 1994).

A = Antifeedant activity; EC = Effective concentration; (F) = Application by feeding; G = Growth inhibition; (I) = Application by injection; L = Larvicidal activity; (T) = Topical application.

(อ้างถึงใน Schmutterer, 1995)

สารอะซาไดแรคตินในเมล็ดสะเดาที่มาจากต้นกำเนิดที่แตกต่างกันจะมีปริมาณสารอะซาไดแรคตินที่ต่างกัน ตัวอย่างของเมล็ดสะเดาจากประเทศต่างๆถูกนำมาสังเกตมากกว่า 4 ปี หลังจากเก็บเมล็ดมาทำให้แห้ง กะเทาะเปลือกออก นำไปสกัดด้วยวิธี soxhlet และหาปริมาณสารอะซาไดแรคตินและน้ำมันในเมล็ด แสดงดังตารางที่ 1.2

ค่าเฉลี่ยของตัวอย่างทั้งหมดมีสารอะซาไดแรคติน 3.6 มก./ก. ของเมล็ดที่ยังไม่ได้กะเทาะเปลือกและมีน้ำมันอยู่ 46 % ปริมาณอะซาไดแรคตินที่สูงที่สุดจากตัวอย่างที่เก็บมาจากเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ประเทศอินเดีย, พม่า และไทย

ตารางที่ 1.2 แสดงค่าเฉลี่ยของสารอะซาไดแรคตินและน้ำมันในเมล็ดสะเดาจากประเทศต่างๆ

Country	No. of sample	Oil (% ± S.E.)	Azadirachtin (mg/g ± S.E.)
Dominican Rep.	44	46.6 ± 6.4	3.43 ± 0.74
Haiti	16	46.5 ± 4.6	3.05 ± 0.59
Ecuador	26	46.6 ± 3.1	3.99 ± 1.19
Senegal	22	44.3 ± 4.0	3.30 ± 0.63
Gambia	6	45.5 ± 1.5	2.98 ± 0.88
Niger	15	48.1 ± 2.6	3.40 ± 0.67
Benin	57	47.4 ± 4.4	3.75 ± 0.94
Sudan	9	44.8 ± 4.0	2.53 ± 0.60
Somalia	19	46.4 ± 2.4	2.90 ± 0.88
Iran	4	45.4 ± 1.9	2.75 ± 1.65
Yemen	7	49.7 ± 2.5	4.44 ± 0.9
India	9	47.6 ± 5.5	5.14 ± 1.80
Sri Lanka	3	50.1 ± 5.0	3.40 ± 0.34
Myanmar (Burma)	3	48.8 -	6.10 ± 0.70
Thailand	6	45.0 ± 5.0	5.20 ± 1.10
Australia	1	48.1 -	4.90 -

(อ้างถึงใน Schmutterer, 1995)

1.5 วิธีการทดสอบฤทธิ์ของสารโดยชีววิธี (Bioassay)

การทดสอบฤทธิ์สารโดยวิธีชีววิธีนั้น สามารถทำได้กับสิ่งมีชีวิตหลายๆ ชนิด เช่น ต้นพืช, แมลง, ปลา, หนู เป็นต้น ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการทดสอบสารนั้นๆ ในการใช้สารเพื่อการเกษตรจะพิจารณาโดยใช้แมลง ซึ่งแมลงแต่ละชนิดจะมีการตอบสนองต่างๆ กันไป ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางชีวเคมี, กายภาพ, พันธุกรรมและนิเวศวิทยาของแมลงแต่ละชนิดนั้น ซึ่งในการทดสอบในห้องทดลองต้องปรับสภาพในห้องทดลองให้ใกล้เคียงธรรมชาติมากที่สุด เพื่อประโยชน์ในการนำสารที่ต้องการทดสอบไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ชนิดของสารในสารตัวอย่างที่นำมาทดสอบ หากมีหลายชนิดจะทำให้ผลการทดสอบมีความคลาดเคลื่อน เพราะทำให้ความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงมีค่าลดลง แมลงบางชนิดอาจจะมีการปรับตัวให้ต้านทานต่อสารได้ การใช้สารเพื่อป้องกันและกำจัดแมลงต้องมีผลชัดเจนต่อแมลงศัตรูที่เป็นเป้าหมาย ความเข้มข้นของสารเคมีที่มีผลทางชีววิทยาอยู่ในสารละลายเมื่อทดสอบกับสิ่งมีชีวิตในช่วงเวลาที่กำหนดและดูผลที่เกิดขึ้นนั้นเป็นการทดสอบโดยชีววิธี ภายใต้สภาวะในการทดสอบของแต่ละชุดการทดลองและช่วงเวลาที่สิ่งมีชีวิตได้สัมผัสกับสารทดสอบ ที่ความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการตายจะถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติเป็นค่า LC_{50} (concentration producing 50% mortality) (Glass, 1973)

การทดสอบฤทธิ์ของสารโดยชีววิธี (bioassay) ที่ใช้แมลงเป็นตัวทดสอบสามารถทำได้ดังนี้

1.Residue test เป็นการทดสอบโดยใช้พิษตกค้างบนวัสดุหรือใบพืชเพื่อให้แมลงสัมผัสหรือให้แมลงกิน

- Adult vial test เป็นการทดสอบโดยนำสารฆ่าแมลงอัตราต่างๆ เคลือบภาชนะหรือวัสดุแล้วให้ตัวเต็มวัยแมลงสัมผัส เช่น ใช้สารฆ่าแมลงหยดลงในขวดแก้วขนาดเล็กแล้วทำให้สารฆ่าแมลงกระจายที่ผิวขวด โดยวางขวดแก้วนั้นบนเครื่องหมุนให้แห้ง แล้วจึงปล่อยตัวเต็มวัยแมลงไป เพื่อทำการทดสอบโดยตรวจนับแมลงที่ตายหลังทำการทดลอง 24 ชั่วโมง

- Leaf dip bioassay ใช้ใบพืชที่เป็นอาหารของแมลงจุ่มลงในสารฆ่าแมลงที่อัตราต่างๆ ทิ้งใบให้แห้งจึงปล่อยหนอน หรือตัวอ่อนแมลงให้กินใบพืชนั้นเป็นอาหาร ตรวจนับจำนวนแมลงที่ตายหลังการทดลอง 24 ชั่วโมง

2.Topical bioassay เป็นวิธีการทดสอบที่ยอมรับกันว่าค่อนข้างเที่ยงตรงที่สุด โดยใช้สารฆ่าแมลงหยดลงบนอกปล้องที่ 2 ของแมลง โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า microapplicator syringe ลักษณะคล้ายเข็มฉีดยา แต่มีกลไกควบคุมการไหลของสารฆ่าแมลงให้เท่ากับ 1 ไมโครลิตร

เพื่อให้หยดลงบนตัวแมลงโดยใช้สารฆ่าแมลงอัตราต่างๆ หลังจากนั้นเลี้ยงแมลงไว้โดยให้อาหารตามปกติ วิเคราะห์ผลโดยตรวจนับจำนวนแมลงที่ตายหลังการหยดสารฆ่าแมลง 24 ชั่วโมง

3. Dip bioassay โดยการปล่อยแมลงลงในสารละลายของสารฆ่าแมลงอัตราต่างๆ หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงนับจำนวนแมลงที่ตาย วิธีนี้มักใช้กับลูกน้ำยุง และแมลงที่อาศัยในน้ำชนิดอื่นๆ

4. Feeding bioassay วิธีนี้ผสมสารฆ่าแมลงลงในอาหารของแมลงเพื่อทดสอบ

5. Fumigant assay วิธีนี้มักใช้ทดสอบกับแมลงศัตรูในโรงเก็บเพื่อทดสอบความต้านทานต่อสารรม เช่น ฟอสฟีน (phosphine) เป็นต้น โดยปล่อยแมลงที่จะทดสอบไว้ใน chamber ซึ่งอาจใช้โหลดูดความชื้นดัดแปลงมาใช้ในการทดลอง ใช้เข็มดูดก๊าซฟอสฟีน ปล่อยก๊าซลงใน chamber ที่มีแมลงอยู่ ทิ้งไว้ประมาณ 20 ชั่วโมง จึงนับแมลงที่ตาย

(พรรณเพ็ญ, 2539)

1.6 การศึกษาผลของสารอะซาไดแรคตินที่มีต่อแมลงและสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

ปี ค.ศ. 1984 Ladd, Warthen และ Klein ได้ทำการทดสอบสารอะซาไดแรคตินบริสุทธิ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ กับตัวอ่อนของ *Popillia japonica* พบว่ามีผลทำให้การพัฒนาจากตัวอ่อนไปสู่ตัวเต็มวัยไม่สมบูรณ์ แต่ไม่มีผลกับตัวอ่อนระยะที่ 3 และที่แก่กว่านั้น คำนวณหาค่า LC_{50} และ LC_{90} ได้เท่ากับ 0.1 และ 0.4 µg ตามลำดับ

ปี ค.ศ. 1984 Malik และ Mujtaba ได้นำพืช 7 ชนิด มาทดสอบหาฤทธิ์ในการไล่แมลงกับหนอน *Tribolium castaneum* และฤทธิ์ยับยั้งการกินอาหารต่อ *Rhyzopertha dominica* พบว่าฤทธิ์ในการขับไล่แมลงมีอยู่ในรากของ *Saussurea lappa* และฤทธิ์ยับยั้งการกินอาหารมีอยู่ในเมล็ดสะเดาโดยได้แยกสาร azadirachtin มาทดสอบ

ปี ค.ศ. 1983 Gujar และ Mehrotra พบว่า ในอาหารที่มี azadirachtin ทำให้ *Spodoptera litura* ลดการกินอาหารและยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลง และสาร azadirachtin มีผลต่อ การเปลี่ยนรูปร่างของหนอนไปสู่ดักแด้

ปี ค.ศ. 1985 Gujar และ Mehrotra พบว่า ผลของ azadirachtin และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเมล็ดสะเดา มีผลต่อการเจริญและการพัฒนาของตัวอ่อน *Spodoptera litura* โดยการให้หนอนกินใบไม้ที่จุ่มสาร ทั้งนี้ความรุนแรงที่เกิดขึ้นนั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและชนิดของสารที่ใช้

ปี ค.ศ. 1987 Koul, Amanai และ Ohtaki ศึกษาผลของสารอะซาไดแรคตินต่อการเจริญ

ของตัวอ่อนระยะที่ 5 ของ *Bombyx mori* โดยการฉีดสารนี้สู่ตัวอ่อนอายุ 0-6 วัน พบว่าเกิดผล 2 ทางคือ ทำให้การเจริญของตัวอ่อนอายุ 0-3 วัน ไม่สมบูรณ์ ส่วนตัวอ่อนอายุ 4-6 วัน ตัวอ่อนไม่สามารถเจริญเข้าสู่ดักแด้ได้เพราะถูกยับยั้งการสร้างผิวชั้นนอกรอบปล้องลำตัวหนอนทำให้หนอนตายในระยะต่อมาประมาณ 12 วัน

ปี ค.ศ. 1989 Barnly, Yamasaki และ Kloce ได้ทำการทดสอบสารอะซาไดแรคตินและอนุพันธ์อีก 3 ตัว โดยการฉีดเข้าทางปากของตัวอ่อนระยะที่ 5 *Heliothis virescens* ที่ปริมาณสารต่ำสุด 0.5µg พบว่าสารทั้ง 4 ตัว มีผลป้องกันการเข้าสู่ดักแด้ของตัวอ่อนระยะที่ 5 และทำให้ตัวอ่อนตาย 100 %ที่ระดับปริมาณสารสูงกว่า 4.0 µg และได้นำสารทั้ง 4 ตัว ให้ถูกแสง UV เป็นเวลา 90, 200 และ 400 ชั่วโมง พบว่าการให้สารถูกแสงอย่างน้อยที่สุด 400 ชั่วโมง ทำให้สารอะซาไดแรคตินลดฤทธิ์ทางชีวภาพลง

ปี ค.ศ. 1990 Jilani และ Saxena ได้ทดสอบฤทธิ์การขับไล่ของน้ำมันขมิ้น, *Curcuma longa* (L.) ,พันธุ์ไม้รากหอม, *Acorus calamus* (L.) , สะเดา ,*Azadirachta indica* A Juss. เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยชุบสารด้วยกระดาษกรองที่ 200, 400 และ 800 µg/cm^2 เพื่อไล่แมลง พบว่าน้ำมันขมิ้นและพันธุ์ไม้รากหอมมีฤทธิ์ขับไล่มากกว่าน้ำมันสะเดาใน 2 สัปดาห์แรก แต่ฤทธิ์การขับไล่ลดลงอย่างรวดเร็วมากกว่าน้ำมันสะเดา

ปี ค.ศ. 1990 Blaney และคณะ ได้พบว่า ฤทธิ์ยับยั้งการกินอาหารของ azadirachtin และอนุพันธ์ของสาร azadirachtin กลุ่ม limonoids ต่อหนอนผีเสื้อ 4 ชนิด *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens* และ *Heliothis armigera* พบว่ามีผลต่อหนอนทั้ง 4 ชนิด แต่มีผลต่อ *Spodoptera littoralis* มากที่สุด

ปี ค.ศ. 1992 Stark และคณะได้ศึกษาพบการเจริญพันธุ์ของ *Psutallia incisi* ไปเป็นตัวเต็มวัยลดลงถึง 63 – 88% เมื่อให้สาร azadirachtin เข้มข้น มากกว่า 20 ppm.

ปี ค.ศ. 1993 Lawery, Isman และ Brard ได้ทำการทดลองในห้องทดลองและภาคสนามด้วยน้ำมันสะเดาที่ถูกแยกออกมาตามกระบวนการแยกแล้วและสารสกัดจากเมล็ดสะเดา พบว่ามีผลต่อเพลี้ย ทำให้เพลี้ยลดจำนวนลง ความเข้มข้นโดยประมาณที่ทำให้เพลี้ยลดลง 50% (LC_{50}) อยู่ในช่วง0.2-1.4%ส่วนการทดลองในภาคสนามนั้นได้ผลควบคุมเพลี้ยบนพริกไทยและสตอรเบอรี แต่ไม่มีผลควบคุมเพลี้ยดอกกะหล่ำ แสดงว่าการใช้สารดังกล่าวควบคุมเพลี้ยนั้นไม่ได้ผลเสมอไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพืชที่อาศัย, ชนิดของเพลี้ย และสภาวะอากาศด้วย

ปี ค.ศ. 1994 Bhathal และ Singh ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการกินอาหารของผลิตภัณฑ์ทางการค้าจากสารสกัดเมล็ดสะเดา 80% ซึ่งมี azadirachtin อยู่ ต่อหนอนระยะที่ 3 *Spilosoma*

obliqua โดยการจุ่มใบที่ 48 ชม. หนอนมีการกินลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ความเข้มข้นต่ำสุด 6.7% มีผลยับยั้งการกินอาหารของหนอน 0.313% และ ความเข้มข้นสูงสุด 86% มีผลยับยั้งการกินอาหารของหนอน 5%

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดสะเดาได้ ทำการศึกษากับสิ่งมีชีวิตอื่นอีกด้วยในปี 1984 Sinha และคณะ ได้ทำการทดสอบน้ำมันจากเมล็ดสะเดาที่ยังไม่ได้เจือจางกับลิงโดยใส่ในปากช่องคลอดก่อนที่จะมีการผสมพันธุ์กัน พบว่ามีผลกับสเปิร์มที่แข็งแรงคือสารอะซาไดแรคตินจะไปทำลายผนังเซลล์ของสเปิร์มทำให้สเปิร์มฝ่อเป็นการป้องกันการตั้งครรภ์ได้ ในปีเดียวกัน Pillai และ Santhakumari ได้ทดสอบความเป็นพิษของสารจากเมล็ดสะเดากับหนูพันธุ์ผสมโดยผสมกับอาหารสูงถึง 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักหนู) พบว่าไม่มีความเป็นพิษ (อ้างถึงใน Ahmed และ Grainge, 1986) สารสกัดจากสะเดามีฤทธิ์ไล่ไส้เดือนดิน มีฤทธิ์ต่อปลาหางนกยูงในเวลา 96 ชั่วโมง โดยผสมสารสกัดต่อน้ำ 8.8 มล./ลิตร ความเป็นพิษต่อปลาน่าจะมีสาเหตุจากน้ำมันที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดจากเมล็ดสะเดา การทดสอบความเป็นพิษกับสัตว์เลือดอุ่นโดยการทดสอบกับเป็ดด้วยการผสมอาหารให้กิน พบว่าใช้ปริมาณสารถึง 16.0 มล. / กก. (7,000 ppm) จึงจะเป็นพิษต่อสัตว์ทดลอง ในปี 1974 Schmutterer ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากเมล็ดสะเดากับหนูโดยให้สารสกัดจากเมล็ดสะเดา 5,000 มก./กก.ของน้ำหนักตัวของหนูแสดงให้เห็นว่าสารไม่เป็นพิษต่อหนูโดยการกิน รวมทั้งความเป็นพิษทางผิวหนังซึ่งทำการทดสอบในลักษณะเดียวกันโดยให้ความเข้มข้น 5,000 และ 8,750 มก./กก.ของน้ำหนักตัวหนู เพื่อทดสอบให้แน่ใจว่าสารสกัดจากเมล็ดสะเดาไม่มีพิษทั้งทางการกินและทางสัมผัส ได้ทำการทดสอบตามวิธีเดิมโดยใช้ระยะเวลาในการทดสอบถึง 28 วันพบว่าสารสกัดไม่มีความเป็นพิษต่อหนูทั้งทางการกินและทางสัมผัส (Schmutterer, 1990)

1.7 มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

ปัจจุบันได้มีการนำสารที่สกัดจากธรรมชาติมาใช้ในการป้องกันและกำจัดแมลงเพื่อลดการใช้สารเคมีซึ่งมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม สารอะซาไดแรคตินเป็นสารที่สกัดได้จากเมล็ดสะเดา มีฤทธิ์ต่อแมลงโดยยับยั้งการกินอาหาร ยับยั้งการสร้างไข่ เป็นสารฆ่าแมลงทำให้หนอนไม่สามารถลอกคราบจากระยะดักแด้ไปเป็นตัวเต็มวัยได้ เป็นต้น แต่เนื่องจากสารอะซาไดแรคตินสลายตัวได้ง่ายเมื่อโดนแสงหรือถูกความร้อน ดังนั้นปริมาณสารอะซาไดแรคตินที่เตรียมได้จะเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับสภาพและอายุของการเก็บรักษา ซึ่งในการนำสารสกัดที่มีสารอะซาไดแรคตินไปใช้ควบคุมแมลงจำเป็นต้องทราบปริมาณของสารอะซาไดแรคติน และตามปกติการใช้สารสกัดจากเมล็ดสะเดามักอยู่ในขั้นตอนที่เป็นสารสกัดด้วยน้ำหรือเมทธานอลซึ่งมีปริมาณสารอะซาไดแรคตินอยู่น้อยและไม่แน่นอน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการสกัดสารในแต่ละขั้นตอนเพื่อให้ได้สารสกัดที่มีปริมาณสารอะซาไดแรคตินที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้นตามลำดับและจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะนำผลที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์ของสารอะซาไดแรคติน ที่มีต่อแมลงมาใช้เลือกสารสกัดเบื้องต้นเพื่อเป็นแนวทางในการสกัดสารให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นต่อไป

1.8 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อสกัดแยกสารอะซาไดแรคตินจากเมล็ดสะเดาให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นและนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ของสารอะซาไดแรคตินต่อตัวอ่อนของแมลง

1.9 ขอบเขตของงานวิจัย

1.สกัดสารจากเมล็ดสะเดาด้วยการสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย,โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีและโดยใช้การแยกด้วย reversed phase HPLC เพื่อให้ได้สารอะซาไดแรคตินที่ค่อนข้างบริสุทธิ์

2.วิเคราะห์หาปริมาณสารอะซาไดแรคติน ที่ได้จากข้อ (1) โดยวิธี HPLC

3.ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดตามลำดับขั้นที่ได้จากข้อ (1) ต่อแมลงโดยวิธีการกิน (feeding bioassay) ซึ่งใช้หนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ (*Gallleria mellonella* L.) เป็นสัตว์ทดลอง

4.ศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) และหาค่า LC_{50} ที่ 72 ชั่วโมงโดยใช้สารสกัดที่ได้จากข้อ (1)

5.ศึกษาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการกินอาหารของหนอน โดยใช้สารสกัดที่ได้จากข้อ (1)

6.วิเคราะห์ค่า LC_{50} โดยใช้ probit analysis และเปรียบเทียบความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการกินอาหารที่ระดับความเชื่อมั่น 95%โดยใช้ Duncan's new multiple range test