

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การแยกสารอะซาไดแรคตินจากเมล็ดสะเดา โดยวิธีที่ดัดแปลงของชินิสุธา (2541) โดยผ่านขั้นตอนตามลำดับต่างๆ ด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ เมทานอล สารละลายผสม เมทานอลและเฮกเซนอัตราส่วน 1:1 สารละลายผสมเอทิลอะซิเตตและน้ำอัตราส่วน 1:6 หลังจากนั้นนำสารสกัดไปแยกต่อโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ตัวชะ ได้แก่ สารละลายผสมคลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 2:1, เมทานอล, สารละลายผสมคลอโรฟอร์มและอะซิโตนในอัตราส่วน 5:1, สารละลายผสมเฮกเซน, คลอโรฟอร์มและอะซิโตนในอัตราส่วน 3:2:2 ทำให้ได้สารอะซาไดแรคตินที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้นจากนั้นแยกต่อด้วย reversed phase HPLC โดยใช้สารละลายตัวพา คือ 50% เมทานอลในน้ำกำจัดไอออน ได้สารอะซาไดแรคตินที่มีความบริสุทธิ์ 92.87% ซึ่งในการสกัดสารอะซาไดแรคตินโดยวิธีดัดแปลงของชินิสุธา (2541) เป็นทางเลือกอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการสกัดสารอะซาไดแรคติน และสารละลายที่ใช้ในการสกัดนี้เป็นสารละลายที่ใช้กันทั่วไปมีราคาไม่แพง ส่วนสารอะซาไดแรคตินที่แยกได้ต้องเก็บไว้ในอุณหภูมิต่ำและที่มืดเพราะอุณหภูมิ, แสงแดด ตลอดจน pH มีผลต่อการสลายตัวของสารอะซาไดแรคติน เนื่องจากสารอะซาไดแรคตินที่มีความบริสุทธิ์สูงจะสลายตัวได้รวดเร็ว (Schmutterer, 1990)

จากวิธีการทดสอบสารสกัดจากเมล็ดสะเดากับหนอนผีเสื้อกินใบไม้ขนาดใหญ่ในงานวิจัยนี้ได้ผสมสารสกัดจากเมล็ดสะเดาลงในอาหารเทียม ใช้ทดสอบกับหนอนระยะที่ 3 โดยจะต้องจับหนอนอดอาหารเพื่อให้หนอนลดกระบวนการเผาผลาญอาหารให้อยู่ในสภาวะที่พร้อมรับอาหารใหม่ ทำให้การออกฤทธิ์ของสารนั้นเกิดขึ้นตามกลไกของการออกฤทธิ์ และจำเป็นต้องใช้เวลาในการทดสอบ 3 วัน เนื่องจากการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากธรรมชาติต่อหนอนหรือสิ่งมีชีวิตนั้นส่วนใหญ่จะค่อยๆ มีฤทธิ์เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ประพนอม (2538) ที่พบว่าการทดสอบสารสกัดกับหนอนผีเสื้อกินใบไม้ขนาดใหญ่ โดยวิธีการผสมสารสกัดจากเมล็ดสะเดาในอาหารเทียมได้ผลดีกว่าการหยดสารสกัดลงบนตัวหนอน นอกจากนี้ยังพบว่าการทดสอบสารสกัดจากเมล็ดสะเดากับหนอนผีเสื้อกินใบไม้ขนาดใหญ่ พบว่าได้ผลดีกับหนอนในระยะที่ 3 ส่วนการใช้สารละลายเพื่อใช้ละลายสารสกัดที่จะนำมาทดสอบกับหนอนผีเสื้อกินใบไม้ใหญ่นั้น เลือกใช้เมทานอล เพราะสามารถละลายสารสกัดได้ดีและไม่เป็นพิษต่อหนอน ซึ่งได้ทำการทดสอบสาร

ละลายเอทานอลกับหนอนผีเสื้อกินไข่ม้วนขนาดใหญ่ พบว่ามีค่าไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงได้ทำการทดสอบสารสกัดที่ผ่านขั้นตอนการแยกด้วยตัวทำละลายเมทานอล (F003) และเอทธิลอะซิเตท (F004), สารสกัดที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโตกราฟี (F007, F011, F016, F022, F027) และสารอะซาไดแรคตินที่แยกได้จาก reversed phase HPLC (F030) กับสัตว์ทดลองซึ่งใช้หนอนผีเสื้อกินไข่ม้วนระยะที่ 3 ในเวลา 72 ชั่วโมง จากการทดสอบสารสกัดที่ผ่านขั้นตอนการแยกด้วยตัวทำละลายเมทานอล (F003) และเอทธิลอะซิเตท (F004), สารสกัดที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโตกราฟี (F007, F011, F016, F022, F027) และสารอะซาไดแรคตินที่แยกได้จาก reversed phase HPLC (F030) คำนวณหาค่า LC_{50} ได้เท่ากับ 0.4699, 0.1827, 0.0676, 0.0917, 0.1242, 0.0485, 0.0121 และ 0.0412 มก.ของสารสกัด/มก.ของอาหาร ตามลำดับ จะเห็นว่าในบาง fractions ที่ผ่านขั้นตอนการสกัดสารที่เจือปนออกไปมากกว่ามีค่า LC_{50} สูงกว่า fractions ที่ผ่านขั้นตอนการสกัดสารที่เจือปนออกไปน้อยกว่า ดังเช่น F007 มีค่า LC_{50} น้อยกว่า F011 และ F016 อาจเป็นเพราะใน fractions ที่ F011 และ F016 มีสารที่เสริมฤทธิ์สารที่เป็นองค์ประกอบใน fractions นั้น และ F030 มีค่า LC_{50} น้อยกว่า F027 อาจเป็นเพราะใน F027 มีสารที่มีคุณสมบัติเป็นสาร synergist คือไปเสริมฤทธิ์ของสารตัวอื่นให้เกิดความเป็นพิษมากขึ้นหรืออาจทำให้ความเป็นพิษลดลง (Amdur, Doull and Klaassen, 1991) หรืออาจมีสารตัวอื่นที่ออกฤทธิ์ได้ดีกว่าสารอะซาไดแรคติน เพราะสารสกัดจากเมล็ดสะเดามีสารตัวอื่นที่นอกเหนือจากสารอะซาไดแรคตินอยู่หลายชนิดที่มีคุณสมบัติในการฆ่าหนอนและยับยั้งการกินอาหารของหนอน ซึ่ง Schmutterer (1995) รายงานว่าสารสกัดจากเมล็ดสะเดาจะมี สารตัวอื่นปนอยู่ซึ่งเป็นสารกลุ่ม tetranortriterpenoids (salannin, nimbin etc.) ซึ่งออกฤทธิ์ฆ่าหนอนและเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งการกินอาหารของหนอนได้เช่นเดียวกับสารอะซาไดแรคติน (Schmutterer, 1995) หรืออาจเป็นเพราะสารที่อยู่ใน fractions ดังกล่าวมีการออกฤทธิ์ต่อหนอนผีเสื้อกินไข่ม้วนขนาดใหญ่ได้ไม่ดีดังเช่น การทดลองของ Blaney และคณะ ได้ทำการทดสอบอนุพันธ์ของสารอะซาไดแรคตินกับหนอนผีเสื้อ 4 ชนิด *Spodoptera littoralis*, *S. frugiperda*, *Heliothis virescens* และ *H. armigera* พบว่าสารที่นำมาทดสอบมีผลต่อ *Spodoptera littoralis* มากที่สุด (Blaney et al., 1990) และรายงานของ Gerard และ Ruf (1995) ที่ว่ากลุ่มของแมลงที่นำมาทดสอบ ดังเช่นในหนอนกลุ่มที่เป็นผีเสื้อเมื่อทดสอบด้วยสารอะซาไดแรคตินจะอยู่รอดน้อยกว่าหนอนกลุ่มที่เป็นแมลงปีกแข็ง

จากการหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการกินอาหารของหนอน ในเวลา 72 ชั่วโมงพบว่า สารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล(F003) และเอทิลอะซิเตท(F004), สารสกัดที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโตกราฟี(F007, F011, F016, F022, F027) มีฤทธิ์ยับยั้งการกินอาหารต่ำ ส่วนสารอะซาไดแรคติน (F030) มีฤทธิ์ยับยั้งการกินอาหารสูง จะเห็นว่าสารอะซาไดแรคติน (F030) ไม่ได้ออกฤทธิ์เฉียบพลันในการยับยั้งการกินอาหารแต่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นฤทธิ์ของสารมีมากขึ้นโดยเฉพาะที่เวลา 72 ชั่วโมงจะเห็นว่า F030 มีฤทธิ์ยับยั้งการกินอาหารสูง ในขณะที่สารสกัดอื่นนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งการกินอาหารปานกลาง ดังตารางที่ 3.24

จะเห็นว่าสารอะซาไดแรคติน (F030) ที่แยกได้ตามวิธีของชินสุธา (2541) มีฤทธิ์ทางชีวภาพมีความเป็นพิษต่อหนอนผีเสื้อกินไหม้ที่เวลาเพิ่มมากขึ้นซึ่งเป็นข้อดีคือไม่เป็นพิษเฉียบพลันเป็นผลดีต่อระบบนิเวศทำให้ควบคุมแมลงที่เป็นศัตรูเป้าหมาย ไม่ไปทำลายแมลงชนิดอื่น เพราะในธรรมชาตินั้นมีแมลงบางชนิดดำรงชีวิตอยู่ด้วยการกินแมลงเป็นอาหารหากสารที่นำมาใช้มีความเป็นพิษเฉียบพลันจะทำให้แมลงที่เป็นศัตรูเป้าหมายตายลงมากส่งผลให้แมลงที่กินแมลงด้วยกันอดอาหารตายหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมหันไปกินแมลงที่เป็นประโยชน์หรือเปลี่ยนไปกินพืชแทนทำให้ระบบนิเวศเปลี่ยนแปลงได้ (Gullan and Cranston, 1994) นอกจากนั้นแล้ว สารอะซาไดแรคติน (F030) มีฤทธิ์ยับยั้งการกินอาหารสูงซึ่งเป็นผลดีเมื่อไปใช้ในทางการเกษตรทำให้แมลงไม่กัดกินพืชเกษตรกรได้ผลผลิตที่ดีขึ้นมีรายได้เพิ่มขึ้น

ผลจากงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าสามารถนำหนอนหนอนผีเสื้อกินไหม้ขนาดใหญ่มาเป็นสัตว์ทดลองอีกชนิดหนึ่งในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากธรรมชาติที่เป็นที่สนใจ ที่จะนำมาใช้ในการกำจัดศัตรูพืช และใช้เป็นสัตว์ทดลองเพื่อคัดกรองสารอื่นที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการกินอาหาร และศึกษาคุณสมบัติของสารนั้นต่อไป

ข้อเสนอแนะ ควรนำ fractions อื่นข้างเคียงที่แยกได้ในแต่ละช่วง เช่น จาก F027 ที่นำไปแยกด้วย reversed phase HPLC ได้ F029, F030 และ F031 ควรนำ F029 และ F031 มาทดสอบกับหนอนผีเสื้อกินไหม้ขนาดใหญ่ด้วย เพื่อเป็นการยืนยันว่ามีสารอื่นที่ออกฤทธิ์เสริมสารอะซาไดแรคตินปนอยู่ใน F027 นอกจากนี้ควรนำผลที่ได้จากการศึกษาในห้องทดลองไปประยุกต์ใช้ในแปลงทดลองในสภาพธรรมชาติ เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารอะซาไดแรคตินที่เกิดขึ้นจริงในธรรมชาติ