

*

การศึกษาการสกัดวัตถุดิบจากกัญชาและประสิทธิภาพในการกำจัดแมลง

ปริญญานิพนธ์

ของ

สมบัติ กาญจนคุณย์

พหุศาสตรบัณฑิต

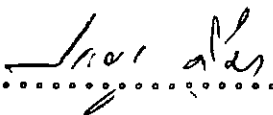
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

16 ส.ค. 19

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาค้นคว้า
ปริญญาดุษฎีบัณฑิตกิตติมศักดิ์

- กรกฎาคม 2519

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิตได้พิจารณาปัญหานี้แล้ว เห็นสมควร
รับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต ของมหาวิทยาลัย-
ศรีนครินทรวิโรฒได้

.....  ประธาน

.....  กรรมการ

กรกฎาคม 2519

ประกาศนุญผลการ

การศึกษากันกว่าและวิจัยปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือจากบุคคล
หลายท่าน ผู้วิจัยจึง

ขอกราบขอบพระคุณ! กร. ประยูร ถึงว่า หัวหน้าสาขาวิจัยวัตุภูมิขี และ อาจารย์
อภรรณี วีรสาร ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆตลอดจนให้กำลังใจ
แก่ผู้วิจัยจนกระทั่งปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ! คุณ สุณทรี วรณลิก ฝ่ายวิจัยโรงงานยาสูบ ที่ช่วยแนะนำและให้
แนวคิดในการทดลองวิจัย

ขอขอบพระคุณ! คุณ นางเยาว์ กระมุณาก ฝ่ายสังเคราะห์วัตุภูมิขี ที่กรุณาให้คำ
ปรึกษา และ แนะนำการใช้เครื่องมือการทดลองอย่าง ใกล้เคียง

ขอขอบพระคุณ! คุณ อวิชัย หงษ์ตระกูล คุณ ชีระพล อุ่นจิตต์วรธนะ ตลอดจนผู้ได้
กล่าวนาบในฝ่ายทดสอบประสิทธิภาพวัตุภูมิขี สาขาวิจัยวัตุภูมิขี ที่ให้ความร่วมมือในการ
เก็บตัวอย่างหนอง การเพาะเลี้ยง และ การทดสอบประสิทธิภาพวัตุภูมิขี

ขอขอบพระคุณ! คุณ วิมลภา บุตรรัตน์ ที่ช่วยเหลือในด้านการพิมพ์

ขอกราบขอบพระคุณ! คุณทองทอง คุณแม่ และพี่ๆ ที่ช่วยแนะนำการปลูกและ
บำรุงรักษาต้นยาสูบเพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการวิจัย

ท้ายสุดนี้ ขอขอบพระคุณ! เขาวมาลัย สุขอุดม ที่ได้ช่วยแก้ไขผู้วิจัยเกิดกำลังใจในการ
ทำงานมาตลอด

สมมติ กาญจนกณย์

สารบัญ

บทที่

หน้า

๑	บทนำ	๑
	กาน้ำ	๑
	ประวัติยาสูบ	๓
	ความมุ่งหมายของการค้นคว้า	๖
	ความสำคัญของการค้นคว้า	๖
	ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	๖
	คำจำกัดความศัพท์เฉพาะ	๗
	เอกสารที่เกี่ยวข้องในการค้นคว้า	๘
๒	ทฤษฎี	๑๕
๓	การดำเนินการทดลอง	๒๔
	ตัวอย่างยาสูบ	๒๔
	ตัวอย่างหนอน	๒๗
	เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	๒๗
	สารเคมี	๒๘
	วิธีดำเนินการทดลอง	๒๘
๔	ผลการทดลอง	๔๖
	ผลของการหาปริมาณนิโคตินในยาสูบที่ปลูกที่อำเภอท่าม่วง จังหวัด	
	กาญจนบุรี และที่อำเภอบางเลน กรุงเทพมหานคร	๔๖
	ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการสกัดนิโคตินโดยวิธีการต่าง ๆ	๕๑
	ผลการหาประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงต่อหนอนหลอดหอม	๖๓

ผลการหาประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงทอนนไยฝัก	๒๔
ผลการหาประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงทอนนคืบกะหล่ำ	๒๕
๕ สรุป อภิปรายผล และ ข้อเสนอแนะ	๒๖
สรุป	๒๖
อภิปรายผลการทดลอง	๓๑
ข้อเสนอแนะ	๓๓
บรรณานุกรม	๓๔

บัญชีการวาง

การวาง

หน้า

๑. แสดงผลผลิตใบยาสูบพันธุ์เมืองกาญจน์ซึ่งปลูกในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี	๔
๒. แสดงค่า MLC ของ nicotine vapor ก่อแหล่งชนิดต่างๆ	๑๐
๓. แสดงความเป็นพิษของนิโคตินก่อก่อแหล่งโดยวิธี topical application	๑๑
๔. แสดงความเป็นพิษของนิโคตินก่อก่อแหล่งโดยทดลองในวิธีต่างๆกัน	๑๒
๕. แสดงเปอร์เซ็นต์ของนิโคตินในใบยาสูบ (โดยน้ำหนักแห้ง) และ	๑๔
ดูยาสูบเมืองกาญจน์รุ่นปี ๒๕๑๐ - ๒๕๑๕	
๖. แสดงปริมาณของนิโคตินของยาสูบอายุ ๓ เดือนปลูกที่จังหวัด	
กาญจนบุรี	๔๖
๗. แสดงปริมาณของนิโคตินของยาสูบอายุ ๔ เดือนปลูกที่จังหวัด	๔๗
กาญจนบุรี	
๘. แสดงปริมาณของนิโคตินของยาสูบอายุ ๕ เดือนปลูกที่จังหวัด	
กาญจนบุรี	๔๗
๙. แสดงปริมาณของนิโคตินของยาสูบอายุ ๓ เดือนปลูกที่จังหวัด	
กรุงเทพมหานคร	๔๘
๑๐. แสดงปริมาณของนิโคตินของยาสูบอายุ ๔ เดือนปลูกที่จังหวัด	
กรุงเทพมหานคร	๔๘
๑๑. แสดงปริมาณของนิโคตินของยาสูบอายุ ๕ เดือนปลูกที่จังหวัด	
กรุงเทพมหานคร	๕๐
๑๒. แสดงประสิทธิภาพการสกัดโดยการแปรผันปริมาณยาสูบและน้ำ	
โดยน้ำหนักของปริมาณที่แตกต่างกัน	๕๒
๑๓. แสดงประสิทธิภาพการสกัดยาสูบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ๐.๑ % ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน	๕๓

๑๔. แสดงประสิทธิภาพการสกัดโดยวิธีค้อนเนื่องจากผงยาสูบ ๑๐ กรัม ค้อนน้ำ ๒๐๐ cm ³ ที่อุณหภูมิห้อง (๓๓ C°)	๕๔
๑๕. แสดงประสิทธิภาพการสกัดโดยวิธีค้อนเนื่องจากผงยาสูบ ๑๐ กรัม ค้อนน้ำ ๒๐๐ cm ³ ที่อุณหภูมิ ๖๐°	๕๕
๑๖. แสดงประสิทธิภาพการสกัดโดยวิธีค้อนเนื่องจากผงยาสูบ ๑๐ กรัม กรดสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ๐.๑ % ๒๐๐ cm ³ ที่อุณหภูมิ ๖๐ °	๕๖
๑๗. แสดงประสิทธิภาพการสกัดด้วยน้ำในเวลาและอุณหภูมิที่ต่างกัน โดยยาสูบ ๑๐ กรัม ค้อนน้ำ ๒๐๐ cm ³	๕๗
๑๘. แสดงประสิทธิภาพ การสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ๐.๑ % ๒๐๐ cm ³ ค้อนยาสูบ ๑๐ กรัม ในเวลาและอุณหภูมิที่ ๐.๑ % ทางกัน	๕๘
๑๙. แสดงประสิทธิภาพการแปรรูปผงยาสูบด้วยกรรกอนิก ๕ % แล้วสกัด ด้วยน้ำในอัตราส่วนต่างๆกัน	๕๙
๒๐. แสดงประสิทธิภาพในการสกัดโดยใช้ฮีเทอร์เป็นหัวทำละลาย	๖๐
๒๑. แสดงประสิทธิภาพในการสกัดโดยใช้กลอโรฟอร์มเป็นหัวทำละลาย	๖๑
๒๒. แสดงประสิทธิภาพการสกัดโดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ	๖๒
๒๓. แสดง เปอร์ เซนต์ความเข้มข้นของวัตถุที่หิมและเปอร์ เซนต์การคาย ของหนอนหลอดหอม	๖๓
๒๔. แสดง เปอร์ เซนต์ความเข้มข้นของวัตถุที่หิมและ เปอร์ เซนต์การคาย ของหนอนใบไม้	๖๔
๒๕. แสดง เปอร์ เซนต์ความเข้มข้นของวัตถุที่หิมและ เปอร์ เซนต์การคาย ของหนอนกึ่งกะหล่ำที่ไ้จากการทดลองและจากabbot's formula	๖๕

บัญชีภาพ

ภาพ	หน้า
๑. แสดงการสังเคราะห์ไนโตรเจนของ Pinner	๑๗
๒. แสดงการสังเคราะห์ไนโตรเจนของ Spath	๑๘
๓. แสดง Biosynthesis ของไนโคติน.....	๒๐
๔. แสดงการแพร่ซึมของไนโคตินไปยังบริเวณที่ออกฤทธิ์ ในแมลง	๒๓
๕. แสดงต้นยาสูบพันธุ์เมืองกาญจน์	๒๕
๖. แสดงเครื่องบดแบบ "Norton mill"	๒๖
๗. แสดงเครื่องมือการสกัดโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ	๓๒
๘. แสดงเครื่อง Magnetic stirrer-lamp combination (ข้าง)	
แสดงเครื่อง Magnetic stirrer - hot plate	๓๓
๙. แสดงการสกัดโดยใช้ Soxhlet Extractor	๓๕
๑๐. แสดงหนอนกับกะหล่ำ (<i>Trichoplusia ni</i> Hubn)	๓๘
๑๑. แสดงหนอนหลอดหอม (<i>Spodoptera exigua</i> Hubn)	๓๙
๑๒. แสดงหนอนใยผัก (<i>Plutella xylostella</i> L.)	๔๐
๑๓. แสดงกรงลวดตาข่ายสำหรับเลี้ยงขยายพันธุ์หนอน	๔๑
๑๔. แสดงเครื่อง Micro - applicator	๔๒
๑๕. แสดงเครื่อง Hand micro - applicator	๔๓

บทที่ ๑

บทนำ

คำนำ

ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปแล้วว่า ผลผลิตทางด้านการเกษตรกรรมนับเป็นส่วนประกอบสำคัญของรายได้ประชาชาติ และเงินทุนที่นำไปใช้ในการพัฒนาประเทศนั้นส่วนใหญ่ก็มาจากผลผลิตทางการเกษตร และเมื่อพิจารณาถึงแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่สาม (พ.ศ. ๒๕๑๕ - ๒๕๑๙) ก็จะได้เห็นว่าเน้นถึงเรื่องการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรเป็นสำคัญ แต่การเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรนั้นย่อมขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหลายอย่าง เช่น การใช้พันธุ์พืชที่ดี การชลประทานที่ถูกต้อง การรักษาดูแลดินควบคู่กับการไถพรวนและรวมทั้งการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ฯลฯ ซึ่งสิ่งเหล่านี้จำเป็นต้องมีผู้ศึกษาค้นคว้าถึงวิธีที่ถูกต้องและมีประสิทธิภาพ เพื่อให้เกิดผลประโยชน์อย่างจริงจังและคุ้มค่าต่อการลงทุน

วัฏภูมิพิษที่ใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร เพราะถ้าไม่มีการป้องกันกำจัดอย่างถูกต้องแล้วก็จะเกิดความเสียหายแก่ผลผลิตทางการเกษตรอย่างใหญ่หลวง คือ ทำให้ผลผลิตลดลง หรืออาจทำให้เก็บผลผลิตไม่ได้เลย นอกจากนี้การใช้วัฏภูมิพิษในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ถูกต้องยังต้องพิจารณาถึงอันตรายที่จะเกิดขึ้นจากการใช้วัฏภูมิพิษนั้นๆ อีกด้วย

หลังสงครามโลกครั้งที่สอง เป็นต้นมา ประเทศไทยได้สั่งวัฏภูมิพิษที่ใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชมาจากต่างประเทศและเพิ่มจำนวนมากขึ้นทุกปี ทำให้ต้องสูญเสียเงินตราต่างประเทศเป็นจำนวนมาก อีกทั้งยังมีราคาสูงทำให้ต้นทุนการผลิตของเกษตรกรสูงขึ้นอีกด้วย ดังจะเห็นได้จากสถิติการสั่งวัฏภูมิพิษเข้ามาในประเทศไทย (๑) ปี ๒๕๐๕ เป็นจำนวนน้ำหนัก ๔, ๑๐๐, ๓๕๓ กิโลกรัม เป็นมูลค่า ๑๔๒, ๔๘๓, ๖๕๒ บาท ปี ๒๕๐๖ เป็นจำนวนน้ำหนัก ๔, ๕๒๔, ๖๔๕ กิโลกรัม เป็นมูลค่า ๑๔๔, ๘๔๔, ๐๒๖ บาท และในปี ๒๕๐๗ เป็นจำนวนน้ำหนัก ๕, ๔๗๓, ๑๐๑ กิโลกรัม เป็นมูลค่า ๒๕๕, ๕๐๓, ๗๔๓ บาท ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ประเทศไทยได้สั่งวัฏภูมิพิษมีอัตราการเพิ่มขึ้นทุกปี

เพื่อสนองความต้องการของกสิกร

ในัจจุบันนี้ วัตถุมีพิษที่ใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่นิยมใช้กันมากมักเป็นวัตถุมีพิษที่ได้จากการสังเคราะห์ (synthetic organic pesticides) ได้แก่พวก กลอรีเนตเตคไฮโดรคาร์บอน (chlorinated hydrocarbons) สารประกอบอินทรีย์ที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ (organophosphorus compounds) และการบาเมท (carbamates) วัตถุมีพิษบางชนิดเป็นสารที่สลายตัวช้า โดยเฉพาะสารพวกกลอรีเนตเตคไฮโดรคาร์บอน ดังนั้นเมื่อสารเหล่านี้เข้าไปอยู่ในพืช ถ้าหากกสิกรเก็บในขณะวัตถุมีพิษยังไม่สลายตัว ก็จะทำให้เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ (๒)

อีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดปัญหากับสิ่งแวดล้อมได้เช่นกัน คือ วัตถุมีพิษที่ฉีดพ่นพืชผัก ผลไม้ และไม้ยืนต้นต่าง ๆ นั้น บางส่วนจะระเหยระเหยอยู่ในอากาศ ตกลงบนดิน บางส่วนถูกชะล้างไปกับดิน (soil leaching) ลงสู่แหล่งน้ำ แล้วถ่ายเทไปยังสัตว์น้ำชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นอาหารของมนุษย์ และสัตว์ สัตว์น้ำบางชนิดอาจจะเสียชีวิตได้ ซึ่งจะทำให้ห่วงจรอาหาร (food chain) เสียไป นอกจากนี้วัตถุมีพิษหลายชนิดในดินอาจถูกดูดซึมเข้าสู่ระบบรากพืช แล้วเคลื่อนย้ายไปสะสมในส่วนต่างๆ ของพืชได้อีกทอดหนึ่ง อันจะมีผลร้ายไปสู่ผู้บริโภคอีกด้วย

วัตถุมีพิษบางชนิดที่ใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช อาจเป็นสารอินทรีย์ที่ได้จากพืช (organic compound of plant origin) ซึ่งใช้ไ้ได้ผลก็มีพิษตกค้างในพืชน้อย และสลายตัวไ้รวดเร็วกว่าสารอินทรีย์สังเคราะห์ พืชเหล่านี้ได้แก่ ยาสูบและโล่ดิน เป็นต้น ยาสูบมีสารอัลคาลอยด์ (alkaloids) หลายชนิด อัลคาลอยด์ที่มีมากที่สุดคือ นิโคติน (nicotine) มีอยู่ประมาณ ๘๙ % ของอัลคาลอยด์ทั้งหมด แต่ปริมาณของนิโคตินขึ้นอยู่กับพันธุ์ แหล่งปลูก ฤดูปลูก ส่วนประกอบของต้น อายุ ฯลฯ ปกติในใบยาสูบมีปริมาณของอัลคาลอยด์เฉลี่ยประมาณ ๔ % (๓)

ในประเทศไทยมีการปลูกยาสูบกันทั่วทุกภาคของประเทศ ทางภาคเหนือมีการปลูกมากที่สุด ส่วนใหญ่เป็นยาสูบพันธุ์เวอร์จิเนีย (virginia) และเบอร์เลย์ (berley) สำหรับพันธุ์พื้นเมือง เช่น พันธุ์เมืองกาญจน์ นิยมปลูกกันมากทางจังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี และอุทัยธานี

และพบว่ายาสูบพันธุ์เมืองกาญจน์มีปริมาณนิโคตินสูงกว่าพันธุ์อื่นๆ (๘)

ผู้วิจัยมีความเห็นว่า ยาสูบพันธุ์เมืองกาญจน์มีปริมาณนิโคตินสูง และนิโคตินนี้มีสมบัติเป็นพิษสามารถกำจัดแมลงได้ หากได้นำมาศึกษาวิธีการสกัดหาปริมาณวัฏภูมิพิษเพื่อใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืชก็ย่อมจะเกิดประโยชน์อย่างยิ่ง เพราะจะทำให้ลดการสูญเสียเงินตราต่างประเทศในการซื้อวัฏภูมิพิษ ทั้งยังเป็นการลดอันตรายแก่ผู้ใช้และผู้บริโภค และยังสาบรณนำเอาส่วนที่ทิ้งแล้ว เช่น ก้านใบยาสูบ ต้นยาสูบ นำมาสกัดเอานิโคตินได้อีกด้วย เหตุนี้จึงกล่าว เป็นสิ่งจูงใจที่ทำให้ผู้วิจัยทำการศึกษากันว่าเรื่องนี้

ประวัติยาสูบ

ยาสูบเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกา ชาวอินเดียนแดงเป็นพวกแรกที่รู้จักปลูกและบริโภคยาสูบ ชาวยุโรปได้รู้จักยาสูบและนำผลิตภัณฑ์ของมันมาใช้ในการทำบุหรี่สูบตั้งแต่โคตรพบทวีปอเมริกาในปี ค.ศ. ๑๔๙๒ Shepard (๘) รายงานว่า ได้นำยาสูบมาจากสหรัฐอเมริกาเข้าสู่สเปน และโปรตุเกสในปี ค.ศ. ๑๕๕๕ โดย Joen Nicot เอกอัครราชทูตฝรั่งเศสประจำโปรตุเกส และหลังจากนั้นเขาได้นำเมล็ดยาสูบไปยังฝรั่งเศส อิตาลี และต่อมา เซอร์จอห์น ฮอว์กินส์ (Sir John Horkins) ก็ได้นำยาสูบไปปลูกในอังกฤษ ในปี ค.ศ. ๑๖๖๕

สำหรับประเทศไทย ยาสูบพันธุ์เมืองกาญจน์ เข้าใจว่าเริ่มปลูกกันครั้งแรกในราว พ.ศ. ๒๔๕๐ โดยพวกชาวจีนกะ ซึ่งนำเมล็ดพันธุ์มาจากประเทศจีน (๖) และเข้ามาปลูกในที่ที่เขตจังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งยาสูบพันธุ์เมืองกาญจน์นี้มีพันธุ์ใหญ่ ๓ พันธุ์ คือ

๑. พันธุ์ใบเล็กยาวปลายแหลม ใบมีหูใบ ใบยาพันธุ์นี้มีความหอมมากกว่าพันธุ์อื่น ต้านทานโรคและทนความแห้งแล้งได้ดี เมื่อต้นแล้วเส้นยาคุณภาพดี
๒. พันธุ์ใบเล็กยาวปลายใบไม่แหลม ก้านใบสั้นมาก มีหูใบใหญ่ใบลาคัน
๓. พันธุ์ใบใหญ่ป้อม มีความหอมน้อย ความต้านทานโรคและทนความแห้งแล้งน้อยกว่าพันธุ์อื่น

สองพันธุ์แรก ชาวโรเนียนิยมปลูกมากกว่าพันธุ์ชนิดหลัง เนื่องจากสามารถต้านทาน

โรค และสภาพแวดล้อมได้ดี และมีความหอม จึงมีราคาถูก

จากผลผลิตใบยาสูบพันธุ์เมืองกาญจน์ ในปี ๒๕๑๕ - ๒๕๑๘ แสดงได้ตามตารางที่ ๑

ตารางที่ ๑ แสดงผลผลิตใบยาสูบพันธุ์เมืองกาญจน์ ซึ่งปลูกในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี

ปีฤดูกาลเก็บเกี่ยว	เนื้อที่ปลูก (ไร่)	น้ำหนักใบยาสูบแห้ง (กิโลกรัม)	เฉลี่ยกิโลกรัม/ไร่
๒๕๑๕ - ๒๕๑๖	๕,๖๑๑	๑,๗๒๕,๕๘๐	๑๘๐
๒๕๑๖ - ๒๕๑๗	๑๐,๕๐๑	๑,๕๒๖,๑๕๐	๑๕๐
๒๕๑๗ - ๒๕๑๘	๑๖,๕๑๐	๑,๓๐๔,๓๐๐	-

หมายเหตุ ปี ๒๕๑๗ - ๒๕๑๘ บางอำเภอไม่ไ้รายงานน้ำหนักใบยาสูบ

ที่มา สำนักงานเกษตรจังหวัดกาญจนบุรี กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตร
และสหกรณ์ เมษายน ๒๕๑๘

ส่วนประวัติทางเคมีของนิโคตินั้น หลักฐานจากเอกสารกล่าวว่า ก.ศ.๑๖๔๖ นักเคมีชาวปารีสเซียน(parisiàn) ชื่อGohory ซึ่งเป็นลูกศิษย์ของ Paracelsus ได้เรียกชื่อสารชนิดหนึ่งซึ่งได้จากยาสูบว่า "น้ำมันยาสูบ"(an oil from tobacco) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการทาผิวหนังเพื่อรักษาโรคผิวหนังบางชนิด "น้ำมันยาสูบ" สันนิษฐานว่า คงเป็นของเหลวที่สกัดมาจากยาสูบ โดยมีนิโคตินเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย (๙) สำหรับการนำมาใช้ในการกำจัดแมลงนั้น Holman (๕) มีความเห็นว่า Jean de la Quintiye ได้สกัดยาสูบเป็นครั้งแรกในปี ก.ศ.๑๖๕๐ เพื่อใช้สำหรับป้องกันตัวแมลงเล็ก ๆ ที่มาเกาะและทำลายใบต้น Pear ในปี ก.ศ.๑๗๖๓ ชาวฝรั่งเศสนิยมใช้ของยาสูบในการกำจัดเพลี้ยศัตรูพืช (plant lice) และในปี ก.ศ.๑๗๗๓ Weston พบว่าวันที่ได้จากยาสูบนั้นสามารถนำมาอบฆ่าแมลงได้ (fumigating insect) ต่อมาในคริสต์ศตวรรษที่ ๑๘ ก็ได้มีผู้รู้จักนำผงยาสูบมาสกัดใช้

ในการกำจัดแมลง นอกจากนั้นยังได้มีแปรงควันที่ได้จากยาสูบมาอบใน green-house เพื่อป้องกันกำจัดแมลงให้ได้นิสัยยิ่งขึ้น ในปี ค.ศ. ๑๘๘๒ ได้เริ่มรู้จักกำหนดความเข้มข้นของสารที่สกัดได้จากยาสูบ และในปี ค.ศ. ๑๘๘๒ สหรัฐอเมริกาได้กำหนดมาตรฐานของสารที่สกัดได้จากยาสูบเป็นครั้งแรก ซึ่งเรียกว่า rose leaf ซึ่งมีนิโคตินอยู่ไม่เกิน ๑๓ % ส่วนในยุโรปไม่ได้มีรายงานสารที่ถูกสกัดไว้เป็นมาตรฐานที่แท้จริง ต่อมาในปี ค.ศ. ๑๙๐๔ ได้มีการทำ Nico Fume Tobacco Paper และเปลี่ยนมาเป็น Nico Fume Liquid ใน ค.ศ. ๑๙๐๕ โดยนิโคตินอิสระ (free nicotine) อยู่ ๘๐ %

การศึกษาทางเคมีของนิโคตินนั้นมิได้สนใจมานานแล้ว โดยตอนแรกมนุษย์รู้จักในชื่อของ Oleum tobaci (oil of tobacco) มาตั้งแต่ ค.ศ. ๑๖๘๖ (๘) แต่สนใจอย่างจริงจัง เป็นคนแรกคือ Vanquelin กล่าวคือใน ค.ศ. ๑๘๐๘ เขาได้ศึกษาสารที่อยู่ในยาสูบจากส่วนที่กลั่นได้ (distillate) และสรุปว่าสารนี้มีสมบัติคล้ายกับ ammonia จน ค.ศ. ๑๘๒๘ (๙) Posselt และ Reimann สามารถแยก alkaloid และทำสารให้บริสุทธิ์ได้และให้ชื่อสารนั้นว่า นิโคติน (nicotine) เพื่อเป็นเกียรติแก่ Jean Nicot

๑) ความมุ่งหมายของการศึกษากันกว่า

๑. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดวัตถุมิพิษในยาสูบ โดยใช้น้ำ (water) อีเทอร์ (ether) กลอโรฟอร์ม (chloroform) และวิธีสกัดโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ (Steam distillation)
๒. เพื่อศึกษาปริมาณของวัตถุมิพิษในยาสูบพันธุ์เมืองกาญจน์ ซึ่งปลูกที่จังหวัดกาญจนบุรี และอำเภอบางเขน กรุงเทพมหานคร เมื่ออายุ ๓ เดือน ๔ เดือน และ ๕ เดือน
๓. เพื่อศึกษาปริมาณของวัตถุมิพิษในแต่ละส่วน (position) ของต้น ได้แก่ ใบ ลำต้น เมื่อน้ำอายุต่างกัน
๔. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงของวัตถุมิพิษที่สกัดได้จากยาสูบ

ความสำคัญของการศึกษากันกว่า

๑. ผลการศึกษาการสกัดวัตถุมิพิษจะได้หลักเกณฑ์วิธีสกัดที่มีประสิทธิภาพ และเหมาะสม เพื่อนำมาใช้เป็นประโยชน์ในการสกัดวัตถุมิพิษเป็นอุตสาหกรรม
๒. ผลการศึกษากันกว่า จะทำให้ทราบว่าควรใช้สภาวะการหมักใดในการปลูกยาสูบที่จะให้ปริมาณวัตถุมิพิษมากที่สุด โดยพิจารณาจากแหล่งปลูก
๓. ผลจากการศึกษากันกว่า จะทำให้ทราบว่า ส่วนประกอบใดของต้นและอายุของต้นยาสูบที่ให้ปริมาณของวัตถุมิพิษมากที่สุด
๔. ผลของการศึกษากันกว่านี้จะทำให้ทราบว่า ยาสูบที่ปลูกนอกฤดูกาลกับยาสูบที่ปลูกตามฤดูกาล จะให้ปริมาณวัตถุมิพิษแตกต่างกันเพียงใด เพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกยาสูบ เพื่อวัตถุประสงค์ในการสกัดเป็นวัตถุมิพิษต่อไป
๕. ผลจากการศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงของวัตถุมิพิษที่สกัดได้จะมีประโยชน์ในการนำเอาวัตถุมิพิษนี้ไปใช้ในการกำจัดแมลง ที่สำคัญทางเศรษฐกิจต่างๆ

๒) ขอบเขตของการศึกษากันกว่า

๑. ศึกษาเฉพาะยาสูบพันธุ์เมืองกาญจน์ ซึ่งปลูกที่อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี และอำเภอบางเขน กรุงเทพมหานคร ปลูกระหว่างวันที่ ๑๓ พฤษภาคม - ๑๓ พฤศจิกายน ๒๕๐๔

๒. ศึกษาใบ ยอดยาสูบพันธุ์เมืองกาญจน์ซึ่งปลูกปี พ.ศ. ๒๕๓๓ และปี ๒๕๓๔

๓. ศึกษาเฉพาะวัฏมียพิษซึ่งเป็นนิโคติน กัดเป็นอัลกาลอยด์ทั้งหมดที่ได้จากยาสูบพันธุ์เมืองกาญจน์

๔. แมลงที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของวัฏมียพิษ คือ

หนอนหลอดหอม (Bect armyworm)

Spodoptera exigua Hubn.

หนอนก๊ีบกะหล่ำ (Cabbage looper)

Trichoplusia ni Hubn.

หนอนใยผัก (Diamond - back moth)

Plutella xylostella L.

คำจำกัดความและศัพท์เฉพาะ

๑. การสกัด (extraction) หมายถึงการแยกวัฏมียพิษที่ต้องการออกจากยาสูบ

๒. วัฏมียพิษ (pesticide) หมายถึงสารออกฤทธิ์ซึ่งมีสมบัติอันทำให้เกิดอันตรายแก่แมลงและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ

๓. แมลง (insects) หมายถึงสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง ลำตัวแบ่งออกเป็น ๓ ส่วน คือ ส่วนหัว ส่วนอก ส่วนท้อง มีขา ๓ คู่ ในการวิจัยนี้ใช้แมลงที่เป็นระยะตัวหนอน ได้แก่ หนอนหลอดหอม หนอนก๊ีบกะหล่ำ หนอนใยผัก

๔. ต้นยาสูบ (tobacco plant) หมายถึงยาสูบพันธุ์เมืองกาญจน์ ซึ่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Nicotiana tabacum

๕. LD₅₀ (Median Lethal Dosage) หมายถึงค่าเฉลี่ยของปริมาณวัฏมียพิษที่ทำให้แมลงที่ใช้ในการทดลองตาย ๕๐ % ของจำนวนแมลงที่ใช้ทดลองทั้งหมด ภายในเวลา ๒๔ ชั่วโมงหลังจากแมลงได้รับวัฏมียพิษ เช่น วัฏมียพิษชนิดหนึ่งจำนวน ๒ มิลลิกรัมสามารถทำให้สัตว์ที่ใช้ในการทดลองเสียชีวิตได้ครึ่งหนึ่งของสัตว์ทดลองทั้งหมด ซึ่งมีน้ำหนักตัวเฉลี่ย ๑ กรัม ภายในเวลา ๒๔ ชั่วโมง ค่า LD₅₀ เท่ากับ 2 mg/g

๖. MLC (Median Lethal Concentration, LC_{50}) หมายถึงค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของวัตถุมีพิษที่ทำให้แมลงที่ไ้ทดลองตาย ๕๐ % ของจำนวนแมลงที่ไ้ทดลองทั้งหมดภายในเวลา ๒๔ ชั่วโมง หลังจากแมลงได้รับวัตถุมีพิษ

๗. โคนัน หมายถึง ลำต้นและใบตรงส่วนโคนที่อยู่มากำหนดเท่ากับความสูงหนึ่งในสามของต้น

๘. กลางต้น หมายถึง ลำต้นและใบตรงส่วนกลางที่อยู่มากำหนดเท่ากับความสูงหนึ่งในสามของต้น

๙. ยอดต้น หมายถึง ลำต้นและใบตรงส่วนยอดที่อยู่มากำหนดเท่ากับความสูงหนึ่งในสามของต้น

๑๐. เปอร์เซนต์ของนิโคติน หมายถึงน้ำหนักเป็นกรัมของนิโคตินที่เกิดเป็นอัลกาดอยด์ทั้งหมดในผงยาสูบแห้งหนัก ๑๐๐ กรัม

๑๑. Soxhlet extraction หมายถึง การสกัดโดยใช้เครื่องมือนี่เรียกว่า Soxhlet continuous extraction apparatus เพื่อไ้แยกนิโคตินออกจากยาสูบ ด้วยตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ (Organic solvent) ที่เหมาะสม เช่น อีเทอร์ กลอโรฟอร์ม นิโคตินจะละลายอยู่ในตัวทำละลายดังกล่าว

๑๒. การกลั่นด้วยไอน้ำ (Steam distillation) หมายถึงการสกัดนิโคติน โดยผ่านไ้ไปยังวัตถุที่ตองการสกัด คือ ยาสูบ นิโคตินที่ไ้ไ้จะผสมอยู่กับน้ำโดยไม่สลายตัว และไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำ

๑๓. Topical application หมายถึงการหาประสิทธิภาพของวัตถุมีพิษในการกำจัดแมลงโดยใช้เครื่อง Micro-applicator หยดวัตถุมีพิษประมาณ ๐ ไมโครลิตร หรือเครื่อง Hand micro-applicator หยดวัตถุมีพิษประมาณ ๐.๒๕ ไมโครลิตร ลงบนส่วนนอกของแมลง

เอกสารที่เกี่ยวข้องในการทบทวน

Hansberry กับคณะ (๑๐) ได้ทดลองความเป็นพิษของนิโคตินและสารประกอบของนิโคตินหลายชนิดกับหนอน ผีเสื้อ และทดลองกับแมลงเต่าทองโคโลราโด (Colorado potato beetle) ทั้งตัวแก่ (adult) และตัวอ่อน (larvae) นอกจากนั้นยังพบว่า Silkworm, *Bombyx mori* L. มีความไวต่อนิโคตินสูง วัสดุเกี่ยวกับ Silkworm นี้ทดลองยืนยันโดย Campbell โดยวิธี injection พบว่านิโคตินมีค่า LD₅₀ เท่ากับ ๐.๐๐๖๐ mg/g และ ๖.๘ mg/g เมื่อทดลองกับ Silkworm และ Cabbageworm, *Pieris rapae* L. ตามลำดับ

Richardson และ Busbey (๑๑) ได้ทำการศึกษากันพบว่า นิโคตินออกฤทธิ์ได้ดีในแมลงบางชนิด จากการทดลองโดยการใช้นicotine vapor กับแมลงต่างๆ พบว่ามีค่า Median Lethal Concentration (MLC) ตามตารางที่ ๑

ตารางที่ ๒ แสดงค่า MLC ของ nicotine vapor ต่อแมลงชนิดต่างๆ

insects	dose to produce 50% mortality in 30 min.,mg/L
<u>Aphis gossypii</u> Glov.	๐.๐๐๓๒
<u>Carpocapsa pomonella</u> (L.)	๐.๐๐๔๒
<u>Thrips tabaci</u> Lind.	๐.๐๐๗๕
<u>Empoasca fabae</u> (Harr.)	๐.๐๐๕๔
<u>Carpocapsa pomonella</u> (L.) (1st.instar)	๐.๐๑๔
<u>Tetranychus bimaculatus</u> Harvey.	๐.๐๒๕
<u>Musca domestica</u> L.	๐.๑๒๐
<u>Epilachna varivestis</u> Muls.	๐.๑๔๕
<u>Periplaneta americana</u> (L.)	๐.๑๕๐

Ward (๑๒) ได้รายงานถึงวิธีสกัดนิโคตินจากยาสูบว่า วิธีสกัดนิโคตินนั้นขึ้นอยู่กับความเหมาะสมในการนำไปใช้ แต่โดยทั่วไปแล้วจะใช้วิธีใดวิธีหนึ่ง ดังนี้

๑. การสกัดด้วยน้ำ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและใช้กันโดยทั่วไป
๒. การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์
๓. การทำให้เกิดนิโคตินอิสระในเบส แล้วตามด้วยการกลั่นด้วยไอน้ำ

Menusan และ Beard (๑๓) ได้ทำการทดสอบและศึกษาความเป็นพิษของนิโคตินต่อแมลง โดยวิธี topical application ผลที่ได้ตามตารางที่ ๓

ตารางที่ ๓ แสดงความเป็นพิษของนิโคตินต่อแมลงโดยวิธี topical application

แมลง	LD ₅₀ (mg/kg)
American cockroach	๒๕๐
Squash bug	๓๕๐
Milkweed bug	๑๕๐
Japanese beetle	๒๕๐
Yellow mealworm	๓๒๐๐
Bombyx silkworm	๘
Honey bee	๓๑๕

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า แมลงบางชนิดมีความต้านทานต่อนิโคตินสูง มีหนอนไหม (silkworm) เพียงชนิดเดียวที่มีความไวต่อพิษของนิโคตินมาก

Metcalf (๑๔) ได้ศึกษาและรายงานถึงความเป็นพิษของนิโคตินต่อแมลงหลายชนิดโดยวิธีการต่างๆกัน ดังผลในตารางที่ ๔

ตารางที่ ๔ แสดงความเป็นพิษของนิโคตินต่อแมลงโดยการทดลองในวิธีการต่างๆกัน

แมลง	LD ₅₀ %/g	วิธีทดลอง
<u>Bombyx mori</u> L.	๑๐	Oral
<u>Bombyx mori</u>	๒, ๓	Injected
<u>Bombyx mori</u>	๔	Topical
<u>Protoparce quinquemaculata</u> L.	> ๔๖๕๐	Oral
<u>Protoparce quinquemaculata</u>	ca ๒๐๐๐	Injected
<u>Pieris rapae</u> L.	> ๓๖๕๐	Oral
<u>Pieris rapae</u>	ca ๑๕๐๐	Injected
<u>Hyphantria cunea</u> L.	> ๑๐๒๐	Oral
<u>Hyphantria cunea</u>	> ๒๕๐๐	Injected
<u>Leptinotarsa decemlineata</u>	> ๕๗๐	Oral
<u>Leptinotarsa decemlineata</u> L.	> ๑๐๑๐	Oral
<u>Ceratomia catalpae</u> L.	๔๐	Injected
<u>Ceratomia catalpae</u>	๑๐๐	Topical
<u>Periplaneta americana</u>	๑๐๐	Injected
<u>Periplaneta americana</u>	๒๕๐	Topical
<u>Periplaneta americana</u>	๑๒๐๐	vapor
<u>Anasa tristis</u>	๒๐๐	Injected
<u>Anasa tristis</u>	๓๕๐	Topical
<u>Oncopeltus fasciatus</u>	๓๖	Injected
<u>Oncopeltus fasciatus</u>	๑๐๘ , ๑๔๐	Topical

แมลง	LD ₅₀ ๕/g	วิธีทดลอง
<u>Popillia japonica</u>	๘๐๐	Injected
<u>Popillia japonica</u>	๖๕๐	Topical
<u>Popillia japonica</u> L.	๕๓๖	Oral
<u>Popillia japonica</u> L.	๓๓๘	Injected
<u>Popillia japonica</u> L.	๘๕๐	Topical
<u>Galleria mellonella</u> L.	๓๘๖	Oral
<u>Galleria mellonella</u>	๘๘๓	Injected
<u>Galleria mellonella</u>	๒๒,๘๐๐	Topical
<u>Apis mellifera</u>	๓๐๕	Topical
<u>Apis mellifera</u>	๕๖	Injected

จะเห็นว่า silkworm Larvae มีความต้านทานต่อนิโคตินน้อย แต่แมลงบางชนิดก็มีความต้านทานต่อนิโคตินสูงกว่าวัตถุที่มีพิษที่ใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงที่สังเคราะห์ขึ้น (synthetic insecticides) เสียอีก และความเป็นพิษของนิโคตินที่มีต่อแมลงแต่ละชนิดมีค่าไม่คงที่ อีกทั้งเมื่อทำการทดลองในวิธีที่ต่างกัน ความเป็นพิษของนิโคตินก็ยิ่งแตกต่างกันมากขึ้น ดังจะเห็นว่า เมื่อทดลองโดยวิธี Topical จะมีความรุนแรงน้อยกว่าวิธี Injection ทั้งนี้สาเหตุเนื่องมาจากการดูดซึม (absorption) ผ่านทางผิว (cuticle) ของแมลงแต่ละชนิดซึ่งแตกต่างกัน

สุนทรี วรฉลัก (๔) ได้ทำการศึกษาสกัดและวิเคราะห์องค์ประกอบในใบยาสูบพันธุ์พื้นเมือง ๘ ชนิด โดยวิธี paper chromatography พบว่าใบยาพันธุ์เมืองกาญจน์ มีปริมาณนิโคตินสูงกว่าพันธุ์นิโคติน และแอนาเบิน

ถนน มีเมทกุด (๒) ได้รายงานการวิเคราะห์ทางเคมีของใบยาพันธุ์เมืองกาญจน์ ซึ่งเป็น
ใบยา โคนต้น และลูกยา (ใบยาที่เกิดจากแขนง) พบว่ามีนิโคติน ตามตารางที่ ๕

ตารางที่ ๕ แสดงเปอร์เซ็นต์ ของนิโคตินในใบยาโคนต้นโดยน้ำหนักแห้ง และลูกยา
พันธุ์เมืองกาญจน์รุ่นปี ๒๕๑๐ - ๒๕๑๕

ใบยารุ่นปี	% ของนิโคติน
๒๕๑๐	๑.๒๓
๒๕๑๑	๑.๔๓
๒๕๑๒	๑.๕๑
๒๕๑๓	๑.๔๖
๒๕๑๔	๑.๕๐
๒๕๑๕	๑.๗๓

บทที่ ๒

ทฤษฎี

ยาสูบมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Nicotiana tabacum ซึ่งอยู่ใน Genus
 Solanaceae ใน Genus นี้มีประมาณร้อยกว่า Species แต่มีอยู่ ๒ Species
 เท่านั้น เป็นแหล่งของนิโคตินคือ Nicotiana tabacum และ Nicotiana rustica
 สำหรับ Nicotiana tabacum เป็นยาสูบที่ใช้สำหรับมวนบุหรี่ ซึ่งมีหลายพันธุ์ (๑๘)
 เช่นพันธุ์เวอร์จิเนีย พันธุ์เคอร์กิช พันธุ์เคนทักกี พันธุ์เบอร์เลย์ และพันธุ์พื้นเมือง เป็นต้น
 จากการศึกษพบว่า ใบยาสูบมีสารพวกอัลคาลอยด์อยู่ ๑๒ ชนิด (๑๖) คือ

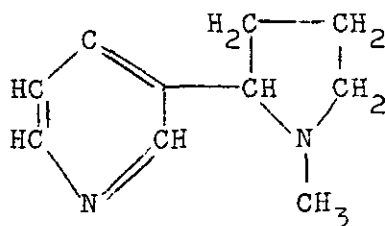
Nicotine	$C_{10}H_{14}N_2$
Nicotimine	$C_{10}H_{14}N_2$
Anabasine	$C_{10}H_{14}N_2$
N-methylanabasine	$C_{11}H_{16}N_2$
Iso-nicotine	$C_{10}H_{12}N_2$
Anatabine	$C_{10}H_{12}N_2$
1-N-methylanatabine	$C_{11}H_{14}N_2$
Nicotine	$C_{10}H_{10}N_2$
Nicotine	$C_{10}H_8N_2$
2:3-Dipyridyl	$C_{10}H_8N_2$
Nornicotine	$C_9H_{12}N_2$
Nicotine	$C_8H_{11}N$

อัลคาลอยด์เหล่านี้สามารถสกัดได้โดยใช้น้ำ ถ้าละลายที่เป็นสารอินทรีย์หรือโดยวิธี
 การกลั่นด้วยไอน้ำ อัลคาลอยด์ที่ได้จากยาสูบ จะมีนิโคตินในปริมาณที่มากกว่าอัลคาลอยด์ชนิดอื่นๆ
 ทั้งหมดคือ จะมีนิโคตินอยู่ประมาณ ๕๘% รองลงมาก็เป็นแอนาเบซิน หรือนอร์นิโคติน (๑๖)

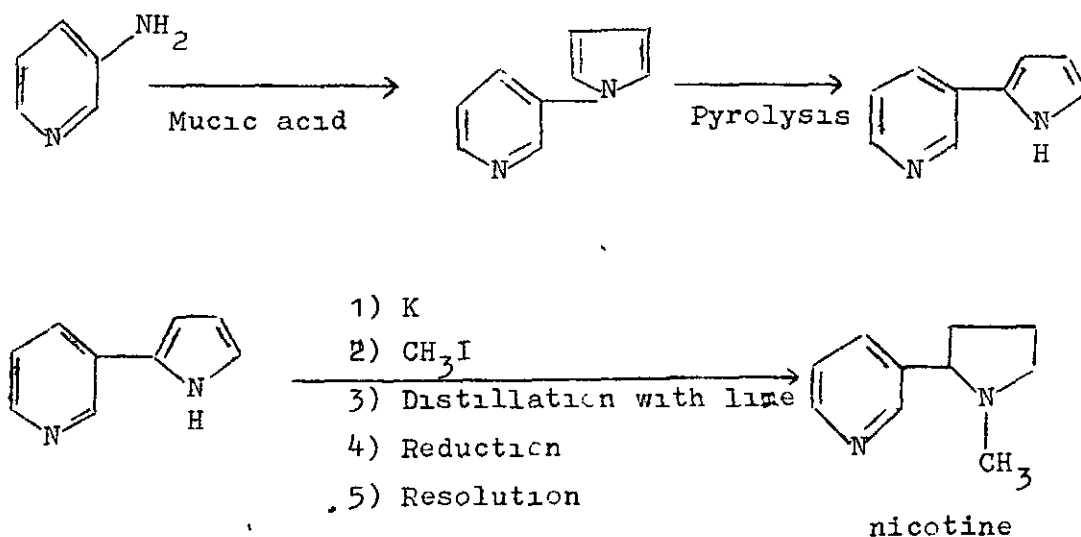
และอัลคาลอยด์ชนิดอื่นๆ อีกเล็กน้อย เนื่องจากอัลคาลอยด์แต่ละชนิดในยาสูบมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันมาก จึงยุ่งยากและมีความลำบากในการสกัดแยกชนิดของอัลคาลอยด์ในแต่ละชนิด แต่นิโคตินมีปริมาณสูงถึงใกล้เคียงมาแล้ว ดังนั้น การสกัดปริมาณอัลคาลอยด์ที่ได้จึงนิยมคิดเป็นนิโคตินในอัลคาลอยด์ทั้งหมด (๑๗)

นิโคติน (Nicotine) มีสูตร $C_{10}H_{14}N_2$ Vauqueline ได้ศึกษาเป็นคนแรกในปี ก.ศ. ๑๘๐๕ ต่อมาได้มีการแยกให้ได้อาร์ที่บริสุทธิ์ โดย Posselt และ Reimann หลังจากนั้น Melsens ได้เสนอสูตรเอมไพริคัล (empirical formula) ที่ถูกต้องคือ $C_{10}H_{14}N_2$ ซึ่งได้ confirmed โดย Barral ต่อมา Schloesing ได้ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของนิโคตินเป็นผลสำเร็จ นิโคตินเป็นของเหลวที่ไม่มีสี จุดเดือด $๒๔๖.๑ - ๒๔๖.๒^{\circ}C$ / ๑๔๐ mm d_4^{20} ๑.๐๐๕๕ n_D^{20} ๑.๕๒๕๒ เมื่อถูกอากาศจะมีสีและมีกลิ่นฉุน ละลายได้ในน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า $๒๐^{\circ}C$ และอุณหภูมิสูงกว่า $๒๑๐^{\circ}C$ แต่จะละลายได้น้อยในอุณหภูมิที่อยู่ระหว่างนี้ นิโคตินเป็น levorotatory $[\alpha]_D - ๑๖๕.๓^{\circ}$ แต่เกลือของมันจะเป็น dextrorotatory เช่นเกลือซัลเฟต $[\alpha]_D + ๔๔.๘^{\circ}$ acid d-tartrate $C_{10}H_{14}N_2 \cdot 2C_4H_6O_6 \cdot 2H_2O$ mp $๔๔ - ๔๕^{\circ}C$ $[\alpha]_D^{27} + ๒๖.๕^{\circ}$ (คำนวณเมื่อเป็น dry salt) ส่วน Neutral d-tartrate $C_{10}H_{14}N_2 \cdot C_4H_6O_6 \cdot 2H_2O$ mp $๒๒๒^{\circ}C$ นิโคตินปกติจะเป็น monacidic base ซึ่งสามารถ titrated กับ acid ใน indicators base และอนุพันธ์ของมันมี strong absorption band ที่ ๒๒๕๐ A (๑๘)

โครงสร้าง (Structure) Pinner ได้ศึกษาและสามารถหาสูตรโครงสร้างของนิโคตินใน ก.ศ. ๑๘๙๔ (๓) โดยเขาเสนอสูตรโครงสร้างของนิโคตินดังนี้



การสังเคราะห์ (synthesis) หลังจาก Pinner ได้เสนอสูตรโครงสร้าง ต่อมา Pictet และ Rotschy ได้ทำการ confirmed โดยการสังเคราะห์นิโคตินขึ้น (๑๔) โดย Pictet ได้ใช้ β -aminopyridine ทำปฏิกิริยากับ mucic acid ซึ่งจะได้ N- β -pyridyl pyrrole เป็นตัวเริ่มต้นของปฏิกิริยา ซึ่งผลสุดท้ายจะได้นิโคติน ดังภาพที่ ๑ (๑)

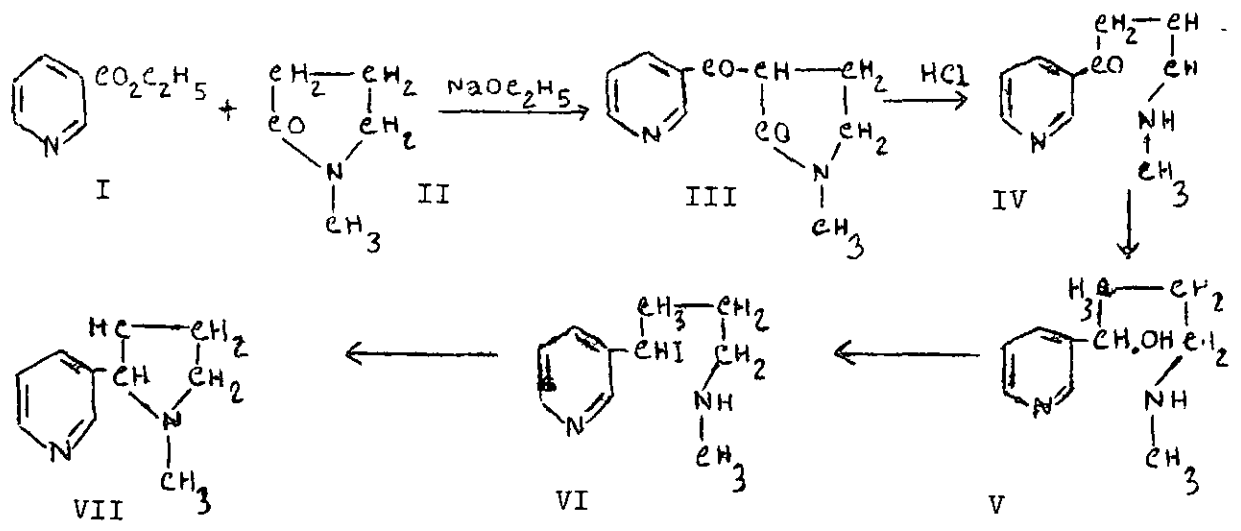


ภาพที่ ๑ แสดงการสังเคราะห์นิโคตินของ Pictet

แต่การสังเคราะห์ Pictet ใช้ระยะเวลาที่นานมาก โดยระยะแรก Pictet ได้ศึกษาร่วมกับ Crépieux แต่ยังไม่ได้ผลดี ต่อมาระยะหลังเขาได้ศึกษาร่วมกันกับ Rotschy อย่างไรก็ตาม ผลงานของ Pictet นั้นยุ่งยากซับซ้อน และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เกิดที่อุณหภูมิสูง และอีกอย่างหนึ่ง การสังเคราะห์นั้นผ่านกระบวนการ rearrangement ซึ่งเขาไม่สามารถจะอธิบายผลการพิสูจน์ของโครงสร้างของ Pinner ที่เสนอไว้ได้อย่างถูกต้องนัก ต่อมา Späth และ Bretschneider (๑๘) รายงานถึงการสังเคราะห์นี้โดยใช้นานชนวนการ

rearrangement ที่อุณหภูมิสูง คือ นำเอา Ethyl nicotinate (I) มา condensed กับ N-methylpyrrolidone (II) ใน sodium ethylate จะได้

β -pyridyl- β' -(N-methyl- α -pyrrolidonyl)-ketone (III) นำไป hydrolyzed ด้วย fuming hydrochloric acid ที่ ๑๓๐ °c จะได้ amine ketone (IV) แล้วนำไป reduced ด้วย Zinc ใน alcoholic sodium hydroxide เป็น amine alcohol (V) แล้วเปลี่ยนให้เป็นอนุพันธ์ไอโอได (iodo derivative) (VI) โดย heat กับ fuming hydriodic acid ที่ ๑๐๐ °c สารประกอบที่ได้สุดท้ายนี้นำไปทำปฏิกิริยากับเบส และกลั่นด้วยไอน้ำ ring จะบิด ได้ di-nicotine (VII) ตามภาพที่ ๒



ภาพที่ ๒ แสดงการสังเคราะห์นี้โคตินของ--Späth

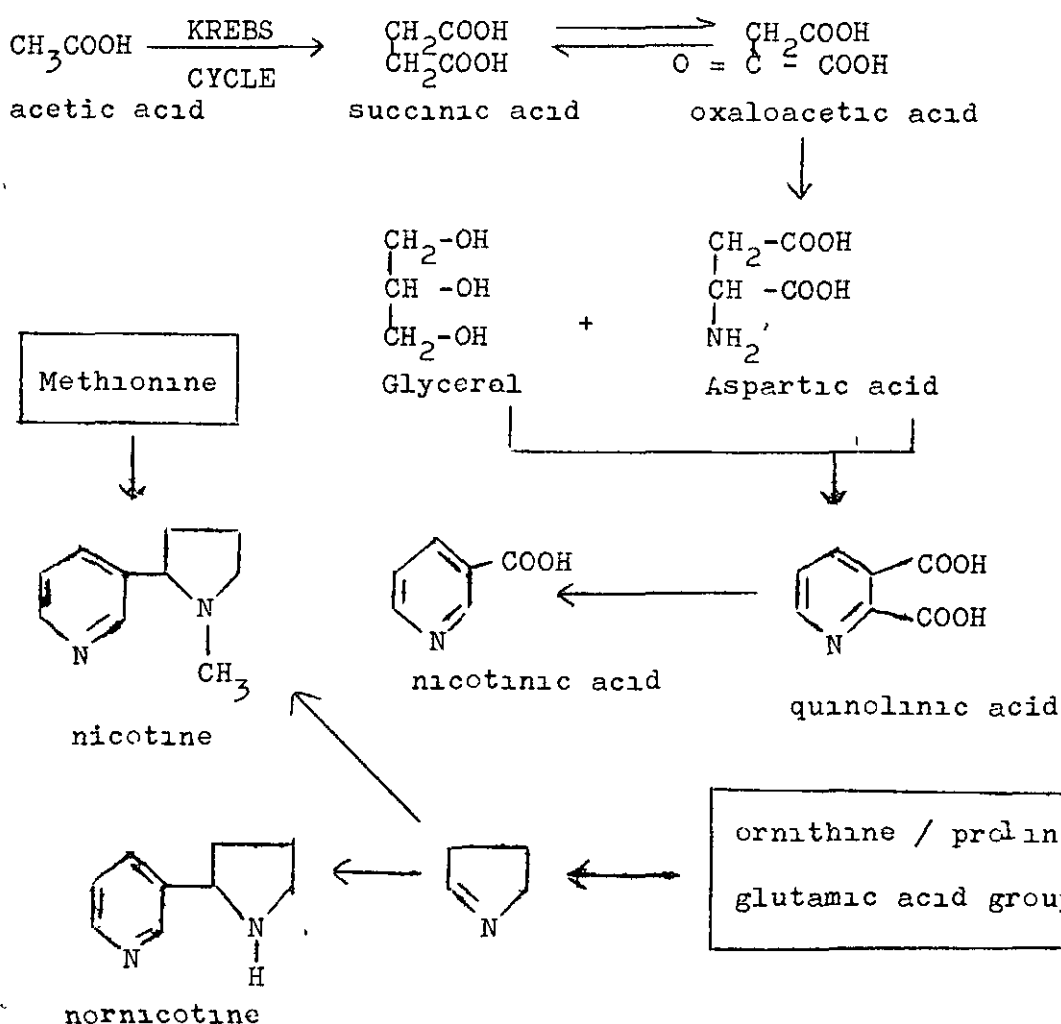
Biosynthesis: Dawson, Leete, Mothes, Byerrum, Rapoport

และ Tso ได้ศึกษาการสังเคราะห์นิโคตินในพืชพบว่า เกิดจาก Pyridine ring กับ pyrrolidine ring จับกันเป็น two heterocycles และพบว่าการสังเคราะห์นิโคตินในพืชเกิดขึ้นที่ราก จากนั้นอัลกาลอยด์ก็จะถูกส่ง (translocated) ไปยังส่วนต่างๆ ของต้น และจะสะสมไว้ที่ใบในปริมาณสูงที่สุด จากการศึกษาอย่างกว้างขวางแสดงให้เห็นว่า heterocyclic rings ทั้งสองของนิโคตินได้มาจาก amino acid (๑๕) และจากการศึกษาทางรังสีเทคนิคของสารต้นตอ (precursor compound) โดย label ^{14}C , ^3H ทำให้ทราบถึง pathway ที่ถูกต้อง จากการทดลองได้ใช้ precursor acetate-2- ^{14}C และ succinate-2,3- ^{14}C ผลการทดลองทำให้ทราบว่า nicotinic acid เป็น precursor ของ pyridine ring ของนิโคติน (๒๐) และจากการศึกษาทางรังสีเทคนิคในยาสูบนั้นทำให้ทราบต่อมาอีกว่า pyridine ring ของ nicotinic acid เกิดจาก condensation ของ 3-carbon unit (ซึ่งอาจเป็น glyceraldehyde, glyceral, glyceraldehyde-3-phosphate) (๒๑) กับ amino acid ซึ่งเป็น aspartic acid (๒๒) จะได้ Quinolinic acid ซึ่งจะเกิด decarboxylation ได้ nicotinic acid เป็น pyridine ring ของ nicotine (๒๓)

สำหรับ ornithine เป็น precursor ของ pyrrolidine ring ใน nicotine นอกจากนี้อาจได้จาก glutamic acid หรือ proline การสังเคราะห์นิโคตินในพืชแบบหนึ่งของ ornithine เป็น pyrrolidine เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา deamination (หรือ transamination) ของ α -amino group การเกิด oxidative decarboxylation เป็น 4-aminobutyraldehyde และการเกิด cyclization เป็น five-membered nitrogen heterocycle (๑๕)

จากการเกิด ring system ทั้งสองที่ได้อีกมาแล้ว C-๒ ของ pyrrolidyl ก็เข้า attached กับ pyridine nucleus ของ nicotinic acid ที่ตำแหน่ง ๓ ในขณะที่เกิด decarboxylation (๒๓) นอกจากนี้ L-methionine ยังสามารถผ่าน tranmethylation รวมกับ nicotinic acid ได้ไนโคตินเช่นกัน

Biosynthesis pathway ตามที่กล่าวมาสรุปได้ตามภาพที่ ๓



ภาพที่ ๓ แสดง Biosynthesis ของนิโคติน

ผลต่อแมลง (Effect on insects)

หลักการทั่วไป (general principle) นิโคตินจะมีผลทำให้แมลงเกิดอาการสัน
ชักกระตุก และท้ายสุดจะเป็นอัมพาต ถ้าอาการรุนแรงมากจะทำให้ตาย McIndoo (๒๑)
ได้ทดลองผลของนิโคตินที่มีต่อผึ้ง (honey bees) เมื่อผึ้งสัมผัสกับนิโคตินแล้ว อาการเริ่มต้น
จะมีนงง จากนั้นจะเป็นอัมพาตที่ขาหน้า ปีก ขาหลัง สัน หนวด และกราม การเกิดอัมพาตจะเกิด
ไปตาม ventral nerve cord ระหว่างส่วนท้องไปจนถึงสมอง สำหรับเพลี้ยอ่อน
(aphids) เพลี้ยหอย (coccids) หนอนผีเสื้อ (caterpillars) ตัวอ่อนแมลงเต่า
โกโลราโด (larva of the colorado potato beetle) และแมลงวัน
(houseflies) จะตายเนื่องจากอัมพาตเมื่อสัมผัสกับนิโคตินบริสุทธิ์

วิธีทางเข้าในการออกฤทธิ์ (mode of action) ถ้านิโคตินสัมผัสกับผิวหนัง
ส่วนนอก (cuticle) ของแมลง ตอนแรกนิโคตินจะผ่านไปในลำตัว ต่อจากนั้นจะเข้าไปรบกวน
กลไกทางสรีระของแมลงดังนี้

๑. การแทรกซึมไปในตัวแมลง (penetration into the insect body)
นิโคตินจะแทรกซึมผ่านในตัวแมลงโดยตรงทางผิวหนัง (cuticle) ได้ดี เช่นเกี่ยวข้องกับ
ระบบหายใจ สำหรับหอยทากเป็นทางเข้าของนิโคตินไปสู่ศูนย์รวมประสาทได้มาก ทางผิวหนังของ
แมลงมีบทบาทสำคัญ โดยเป็นแหล่งการนำนิโคตินผ่านไปในตัวแมลง ส่วนไอของนิโคติน (ni-
cotine vapors) จะผ่านได้โดยตรงทางผิวของส่วนขา ปีก หรือลำตัว สำหรับ
corn ear worm (ตัวอ่อน) แมลงสาบ (cockroaches) และ ตั๊กแตน
(grasshopper) ซึ่งปริมาณนั้นขึ้นอยู่กับตำแหน่งของอวัยวะจากการทดลอง พบว่า ถ้าอัตรา
การซึมผ่านเข้าความเป็นพิษจะน้อย (๑๕) นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบอื่นที่มีผล เช่น
ความหนาของผิว ปริมาณของ wax content ของผิวหนัง (cuticle) และ
ความสามารถในการแตกตัวของอัลคาลอยด์ Richardson และ Shepard (๒๔)
ได้ศึกษาพบว่า ในสารละลายของนิโคตินที่เป็นเบสอิสระ (free base) จะมีความเป็นพิษ
ต่อ American - cockroach มากกว่าในรูปของไอออนไนซ์ (ionized form)

ความเป็นพิษของนิโคตินจะเพิ่มขึ้นเมื่อ pH เพิ่มขึ้น และจะมีความเป็นพิษสูงขึ้นมากเมื่ออยู่ในรูปของควาอีสระ

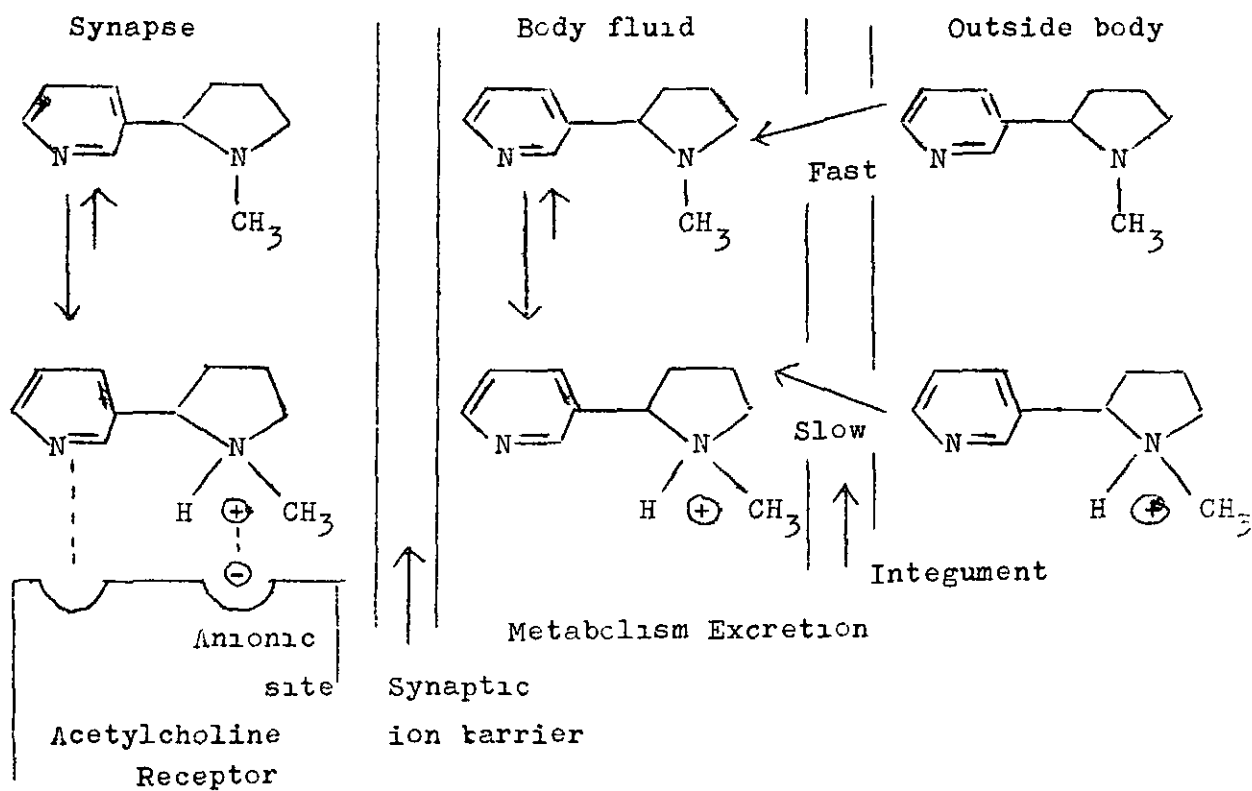
๒. การแทรกซึมไปยังตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ (penetration into site of action)

พบว่า การแทรกซึมของไอออนไนซ์นิโคติน (ionized nicotine) จะถูกยับยั้งในเนื้อเยื่อที่ป้องกันไม่ให้ไอออนผ่านไปยังภายในลำตัวแมลงซึ่งเป็นการป้องกันพิษของนิโคตินที่จะเกิดทางระบบประสาทของแมลงอันเป็นตำแหน่งที่จะออกฤทธิ์ เราอาจกล่าวได้ว่า การออกฤทธิ์ของไอออนไนซ์นิโคตินจะมีผลต่ออวัยวะเป้าหมาย คือ ภาวะของประสาท (nerve synapse) น้อยกว่านิโคตินอิสระ (free nicotine) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่านิโคตินจะมีพิษสูงต่อเพลี้ยมากกว่าแมลงชนิดอื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากเพลี้ยมีไอออนบารเรีย (ion barrier) กำ (๒๔) ในขณะที่เดียวกัน Yang และ Guthrie (๒๖) พบว่า อัตราการแทรกซึมของนิโคตินในแกนประสาท (nerve cord) ของ horn worm และ silkworm จะแตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจาก pH และ species

๓. กลไกของการออกฤทธิ์ (Mechanism of action)

ความเป็นพิษต่อแมลงนั้นสันนิษฐานว่า nicotinium ion ซึ่งมีประจุบวกที่ pyrrolidine nitrogen จะเข้าทำปฏิกิริยากับ acetylcholine โดยการแทรกซึมของนิโคตินที่เป็นควาอีสระ ผ่านเข้าไปในซินแนพส์ โดยผ่านไอออนของซินแนพส์ที่เป็นตัวกักกัน (synapse ion barrier) จากนั้นจะเกิดสมดุล (equilibrium) ของไอออน และเบสอิสระได้ nicotinium ion อย่างไรก็ตาม นิโคตินจะแตกต่างกับ acetylcholine คือไม่สามารถจะถูก hydrolyse ได้โดย acetylcholinesterase (๒๖) (ปกติ acetylcholine จะถูกทำลายโดย acetylcholinesterase อย่างรวดเร็ว หลังจากถ่ายทอดสัญญาณประสาทขึ้นแล้ว) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้แมลงเกิดอาการสั่น ถ้าสารมีความเข้มข้นน้อย และเกิดอาการชัก อัมพาต และตายเมื่อสารมีความเข้มข้นสูง การอธิบายกลไก อาจสันนิษฐานว่า มิติโมเลกุลของ acetylcholine กับ nicotinium ion มีความคล้ายคลึงกันมาก จึงสามารถถูกทำลายได้

จึงสามารถถูกทำลายได้ การออกฤทธิ์ของนิโคตินแสดงไว้ในภาพที่ ๔



ภาพที่ ๔ การแทรกซึมของนิโคตินไปยังบริเวณที่ออกฤทธิ์ในแมลง

บทที่ ๓

การดำเนินการทดลอง

๑. ตัวอย่างยาสูบ

๑.๑ ชนิดของตัวอย่าง การศึกษาครั้งนี้ใช้ยาสูบพันธุ์เมืองกาญจน์ (ตามภาพที่ ๕) ซึ่งแบ่งออกเป็น ๓ กลุ่ม

๑. ยาสูบพันธุ์เมืองกาญจน์ ซึ่งปลูกที่ อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี ในวันที่ ๑๓

พฤษภาคม ๒๕๑๔

๒. ยาสูบพันธุ์เมืองกาญจน์ ซึ่งปลูกที่ อ.บางเขน กรุงเทพมหานคร ในวันที่

๑๓ พฤษภาคม ๒๕๑๔

๓. ใบยอกต้นยาสูบพันธุ์เมืองกาญจน์ จากไร่ยาสูบ จังหวัดกาญจนบุรี เป็นยาสูบรุ่นปี ๒๕๑๓ และปี ๒๕๑๔

๑.๒ วิธีเก็บตัวอย่าง แบ่งเป็น

๑.๒.๑ การเก็บตัวอย่างจากกลุ่มที่ ๑ - ๒ ใช้วิธีคัดต้นยาสูบให้ชิดโคนต้นในโคนเขา แล้วแบ่งเป็นสองส่วน

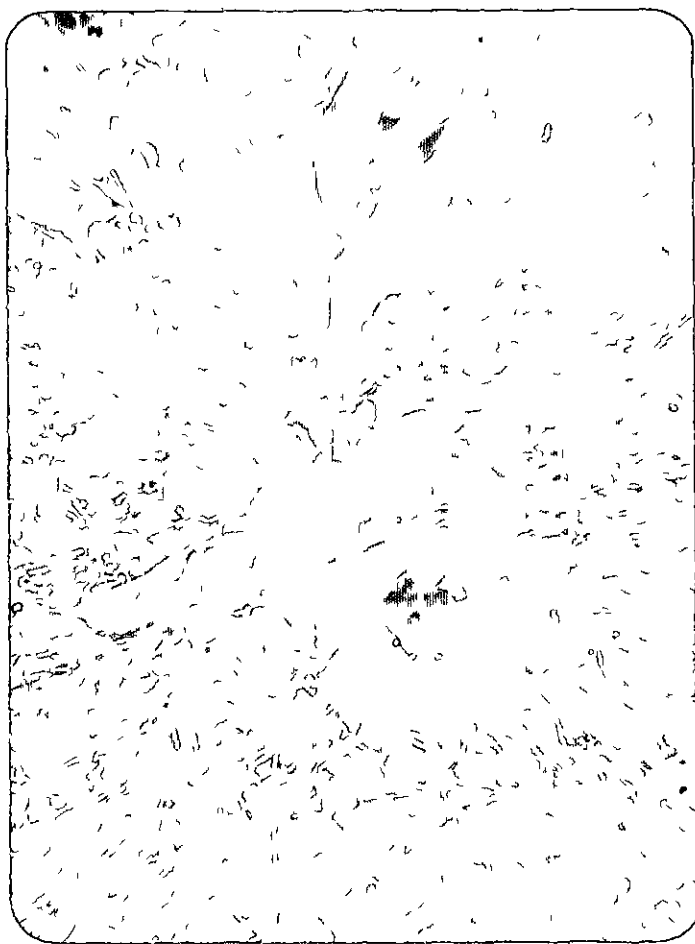
— ส่วนที่หนึ่ง นำมาตัดแบ่งลำต้นเป็นสามระยะ คือ ส่วนโคนต้น ส่วนกลางต้น และส่วนยอดต้น จากนั้นวิคใบในแต่ละส่วน นำใบไปบ่ม เป็นเวลา ๓ วัน แล้วนำมาตากแดดให้แห้ง รวมลำต้นของแต่ละส่วนนำไปบ่มและตากแดดเช่นเดียวกับส่วนใบ ส่วนหลังนี้เรียกว่า ส่วนลำต้น

— ส่วนที่สองนำมาริคใบออกจากลำต้น แล้วบ่มทั้งใบและลำต้นรวมกัน เป็นเวลา ๓ วัน จึงนำไปตากแดดจนแห้ง ส่วนนี้เรียกว่า ยาสูบทั้งต้น

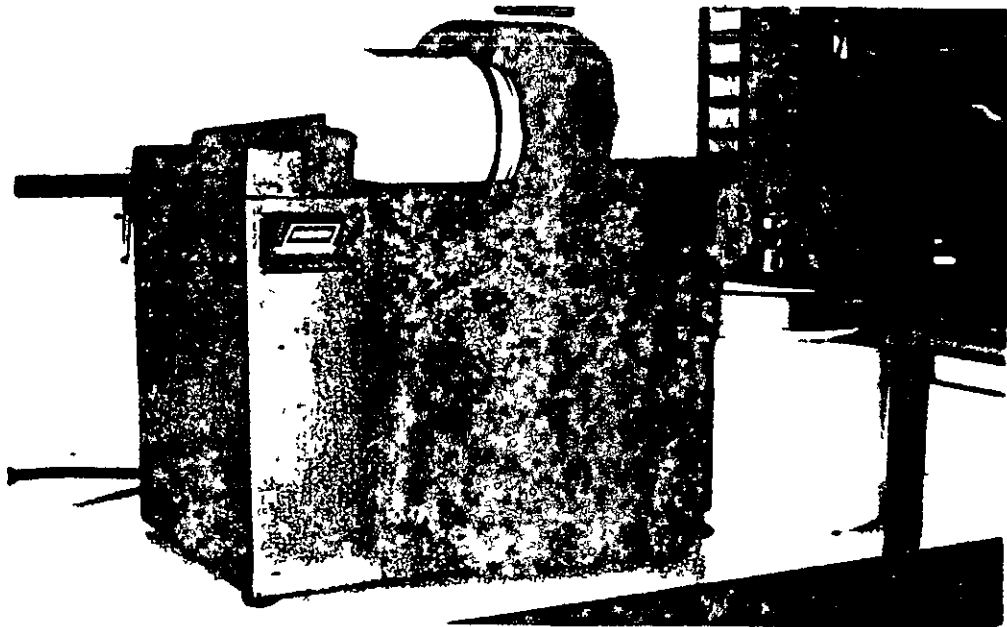
๑.๒.๒ การเก็บตัวอย่างจากกลุ่มที่ ๓ ใช้วิธีซื้อใบยอกยาสูบที่บ่มแล้วจากไร่ยาสูบ จังหวัดกาญจนบุรี แล้วนำมาตากจนแห้ง

นำยาสูบที่ตากจนแห้งแต่ละตัวอย่าง มาอบในตู้อบ (oven) ที่อุณหภูมิ 60°C

ประมาณ ๑ ชั่วโมง แล้วนำเข้าเครื่องบด (ตามภาพที่ ๒) ทันที บดจนกระทั่งยาสูบตัวอย่าง
ละเอียด จึงเก็บไว้ในเครื่องดูดความชื้น (desiccater) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ ๒ ยาสูบพันธุ์เมืองกาญจน์



ภาพที่ ๖ แสดงเครื่องบดแบบ NORTON'S MILL

๒. ตัวอย่างหนอน

๒.๑ ชนิดของตัวอย่าง การศึกษารังนี้ใช้ตัวอย่างหนอน ๓ ชนิด คือ

หนอนก๊ีบกะหล่ำ (Cabbage looper) Trichoplusia ni Hubn.

หนอนหลอดหอม (Beet army worm) Spodoptera exigua Hubn.

หนอนใยผัก (Diamond back-moth) Plutella xylostella L.

๒.๒ วิธีเก็บตัวอย่างหนอน เก็บหนอนก๊ีบกะหล่ำและหนอนหลอดหอม ในท้องที่
อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ส่วนหนอนใยผักเก็บในท้องที่นิคมหุบกระพง อำเภอชะอำ
จังหวัดเพชรบุรี จากนั้นนำหนอนทั้งสามชนิดดังกล่าวมาเพาะเลี้ยง จนกระทั่งได้หนอนรุ่นใหม่
ซึ่งได้จากการขยายพันธุ์ คัดเลือกหนอนในแต่ละชนิดให้มีขนาดใกล้เคียงกัน ในระยะ instar
ที่ ๓ เพื่อนำมาทดลองต่อไป

๓. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

๓.๑ Norton mill ("Norton" Formerly U.S. Stoneware Inc.,
Akron, Ohio)

๓.๒ Hot plate (Thermolyne, Dubuque, Iowa, USA)

๓.๓ Magnetic Stirrer-lamp combination (Thermolyne, Iowa)

๓.๔ Magnetic stirrer-hot plate (Thermolyne, Dubuque, -
Iowa)

๓.๕ Soxhlet extractor apparatus ประกอบด้วย

- Isopad isomantle (Borehawood, Herts. England)

- Condensor (Kimax, USA)

- Soxhlet extractor (Kontes Glass company, Vineland,
Newjersey)

- Thimble glass tube (pyrex, USA)

- Thimble

๓.๖ Steam Distillation apparatus)ประกอบด้วย

- Isopad isomantle(Borehamwood, Herts, England)
- Conical flask 1000 cm³ (Kontes Glass Co., Vineland, N J.
- Condenser
- Adapter (Kimax, USA)
- Beaker 200 cm³ 600 cm³ (Pyrax, USA.)

๓.๗ Oven (Arthur H. Thomas Co., USA)

๓.๘ เครื่องมืออื่นๆ

- Beaker ขนาดต่างๆ
- Erlenmeyer flask ขนาด 125, 250, 500 cm³
- Pipet ขนาดต่างๆ
- Funnel
- Stirring rod
- นาฬิกาจับเวลา
- Spatula
- Aluminum foil
- Mortar and pestle
- Boiling chip
- Thermometer วัดได้ - ๑๐ °C ถึง ๒๕๐ °C
- เครื่องชั่งหยาบ นิกพลากประมาณ ±๑๐ mg (Mettler, Switzerland)
- เครื่องชั่งละเอียด นิกพลากประมาณ ±๐.๐๑ mg (Mettler, Switzerland)
- Fritted glass filter funnel (Kimex, USA)

๓.๘ เครื่องหยกน้ำยาละเอียด Micro - Applicator (Instrumentation
Specialties Co., Inc., USA)

๓.๑๐ Hand ~~micro~~-applicator (Hamilton Co., USA)

๔. สารเคมี

สารเคมีต่างๆที่มีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งจำเป็นต้องใช้มีดังต่อไปนี้

- ๔.๑ Silicotungstic acid (Merck, Germany)
- ๔.๒ Diethyl ether (BDH Chemicals Ltd., Poole, England)
- ๔.๓ Chloroform (Merck, Germany)
- ๔.๔ Sodium hydroxide, Pellets (Matheson Coleman & Bell,
Newwood, Ohio, USA)
- ๔.๕ Sodium chloride, Crystals (J.T. Baker Chemical Co.,
Phillipsburg, N.J., USA)
- ๔.๖ Ethanol
- ๔.๗ Acetone (Kontes glass Co., Vineland, N.J.)
- ๔.๘ Hydrochloric acid (J.T. Baker Chemical Co., USA)
- ๔.๙ Glacial acetic acid

๕. วิธีดำเนินการทดลอง

ในการดำเนินการทดลอง กระทำเป็นขั้นตอน ดังนี้

๑. ทาปริมาณของนิโคตินในยาสูบที่ปลูกที่ อำเภอท่าวัง จังหวัดกาญจนบุรี และที่
อำเภอบางเขน กรุงเทพมหานคร เมื่ออายุ ๓ เดือน ๔ เดือน และ ๕ เดือน

ในการหาปริมาณของนิโคตินจากยาสูบ ใช้ Silicotungstic acid
method(๑๓) โดยมีวิธีการดังนี้ นำผงยาสูบแห้ง ๑๐ กรัม มาใส่ลงใน conical flask

ขนาด ๑๐๐๐ cm^3 เติมโซเดียมคลอไรด์ ๑๐ กรัม สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ๓๐ % ๑๐ cm^3 บิดจุกที่หม้อหลอกแก้วสองทาง โดยทางหนึ่งเป็นทางเข้าของไอน้ำ ส่วนอีกทางหนึ่งเป็นทางออกของไอน้ำ ผสมนิโคตินอิสระผ่านมากวนแน่นยังคอนเดนเซอร์ (condensor) ซึ่งปลายต่ออยู่กับ adapter ที่หุ้มลงในกรกไฮโดรคลอริก ($\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}=1:4$) ๑๐ cm^3 กลั่นด้วยไอน้ำ (ตามภาพที่ ๓) จนกระทั่งไม่มีนิโคตินเหลืออยู่ในสารตัวอย่าง ทดสอบโดยนำสารละลายที่ได้ (distillate) ประมาณ ๑๐ หยด เติมกรกไฮโดรคลอริก ($\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}=1.4$) ๑ หยด คนสารละลายให้เข้ากัน แล้วหยด Silicotungstic acid solution (ละลาย Silicotungstic acid, $4\text{H}_2\text{O}.\text{SiO}_2.12\text{WO}_3.22\text{H}_2\text{O}$ ๑๒๐ กรัมในน้ำกลั่น ๑ ลิตร) ประมาณ ๒ - ๓ หยด จะไม่เกิดสีขาวขุ่น ถ้ามีนิโคตินในยาสูบตัวอย่างถูกสกัดหมด จากนั้นวัดปริมาณสารละลายที่กลั่นได้ แล้วตวงสารละลายที่กลั่นได้นั้นมา ๕๐ cm^3 ใส่ลงในกรกไฮโดรคลอริก ($\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}=1.4$) ๓ cm^3 หยด Silicotungstic acid solution จนกระทั่งไม่เกิดสีขาวขุ่นเพิ่มขึ้น ตั้งทิ้งไว้ข้างคืน กรองเอาตะกอนที่ได้ด้วยเครื่องกรอง (fritted glass filter funnels) ซึ่งหุ้มด้วยกระดาษกรอง แล้วนำตะกอนที่ได้ออกมาละลายในกรกไฮโดรคลอริก ($\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}=1:1000$) จนกระทั่งไม่มี Silicotungstic acid ตกค้างอยู่ที่ตะกอน แล้วนำตะกอนที่ได้ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ ๑๐๕°C ประมาณ ๓ ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็น แล้วนำไปชั่งหาน้ำหนักตะกอนที่ได้ นำไปคำนวณหาปริมาณนิโคตินที่ได้จากสูตร

$$\text{wt. residue} \times 0.1012 = \text{wt. nicotine in aliquot}$$

สำหรับการทดลองทุกครั้งที่จะต้องหาปริมาณนิโคติน ให้ใช้วิธี Silicotungstic acid method (๓) ดังกล่าวแล้วทุกครั้งไป

๒. การศึกษาการสกัด

๒.๑ สกัดด้วยน้ำ (Extraction with water)

๒.๑.๑ สกัดโดยการแบ่งปริมาณของยาสูบ และน้ำโดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่แตกต่างกัน

ซึ่งผงยาสูบแห้ง ซึ่งบางส่วนได้แบ่งไปหาปริมาณของนิโคตินแล้ว ๑๐ กรัม ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด ๕๐๐ cm^3 เติมน้ำไปตามปริมาตรที่ต้องการ แล้วนำไปตั้งบน Magnetic stirrer-hot plate (ตามภาพที่ ๔) ที่อุณหภูมิ ๖๐ $^{\circ}\text{C}$ กวนอยู่ประมาณ ๓๐ นาที จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางพับสองชั้น ก่อนเสิร์ฟการกรองให้ปิดฝาการกรอง และกากให้แห้งพอสมควร แล้ววัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ (filtrate) จากนั้นนำกากที่ได้ไปหานิโคตินที่เหลือต่อไป

๒.๑.๒ สกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ๐.๑ % กับยาสูบในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

ทำการทดลองเหมือนวิธี ๒.๑.๑ แต่ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์แทนน้ำ

๒.๑.๓ สกัดโดยวิธีคอกเนื่องด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง

ซึ่งผงยาสูบแห้งที่ได้แบ่งบางส่วนไปหาปริมาณของนิโคตินแล้ว ๑๐ กรัม ใส่ลงใน Erlenmeyer flask เติมน้ำ ๒๐๐ cm^3 แล้วนำไปวางบน Magnetic stirrer-lamp combination (ตามภาพ ๕) กวนอยู่ครึ่งชั่วโมง จากนั้นนำมารองด้วยผ้าขาวบาง วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ แล้วเติมน้ำให้ครบ ๒๐๐ cm^3 ใส่ลงในกากยาสูบที่ผสมยาสูบแห้งอีก ๑๐ กรัม แล้วนำไปวางบน Magnetic stirrer-lamp combination ใช้เวลา ๓๐ นาทีเช่นกัน จากนั้นก็นำมารองเหมือนตอนแรก

ทำเช่นนี้อยู่ ๕ ครั้ง

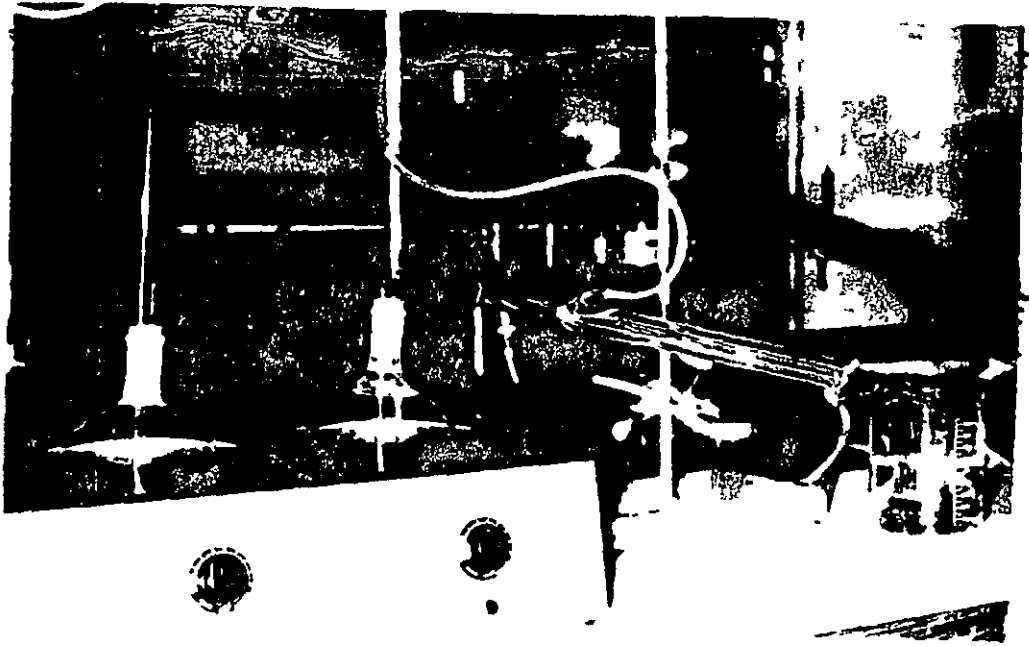
๒.๑.๔ สกัดโดยวิธีคอกเนื่องด้วยน้ำที่อุณหภูมิ ๖๐ $^{\circ}\text{C}$

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการทดลอง ๒.๑.๓ แต่ใช้ Magnetic stirrer-hot plate เพื่อปรับอุณหภูมิให้คงที่ โดยใช้อุณหภูมิ ๖๐ $^{\circ}\text{C}$

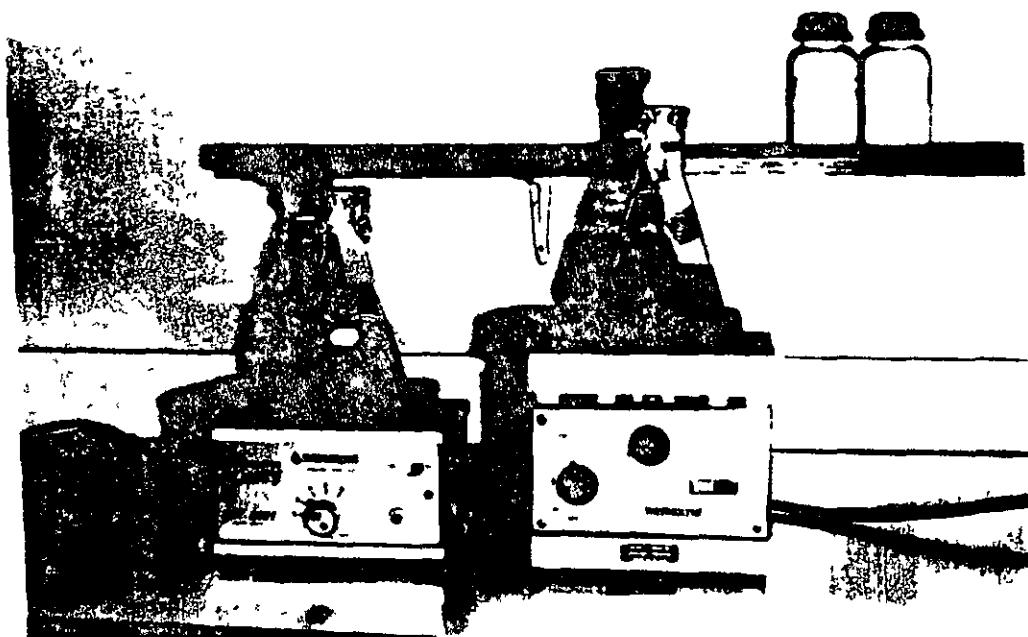
๒.๑.๕ สกัดโดยวิธีคอกเนื่องด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ๐.๑ %

ที่อุณหภูมิ ๖๐ $^{\circ}\text{C}$

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลอง ๒.๑.๔ แต่ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ๐.๑ % แทนน้ำ



ภาพที่ ๘ แสดงการสักระบบโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ



ภาพที่ ๔ แสดงเครื่อง Magnetic stirrer - lamp combination (ซ้าย)
 แสดงเครื่อง Magnetic stirrer - hot plate (ขวา)

๒.๑.๖ สกัดด้วยน้ำในเวลา และอุณหภูมิที่ต่างกัน

ซึ่งผงยาสูบแห้ง ๑๐ กรัม สกัดด้วยน้ำเหมือนกับการทดลอง ๒.๑.๑ กวนด้วย
Magnetic stirrer - lamp combination ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้
เวลา ๓๐ , ๖๐ , ๕๐ และ ๑๒๐ นาที เป็นการสกัดในเวลาต่างกัน ในอุณหภูมิเดียวกัน
ช่วงหนึ่ง ส่วนอีกช่วงหนึ่งกวนด้วย Magnetic stirrer-hot plate ที่
อุณหภูมิ ๖๐ °C ใช้เวลา ๓๐ , ๖๐ , ๕๐ และ ๑๒๐ นาทีเช่นเดียวกัน

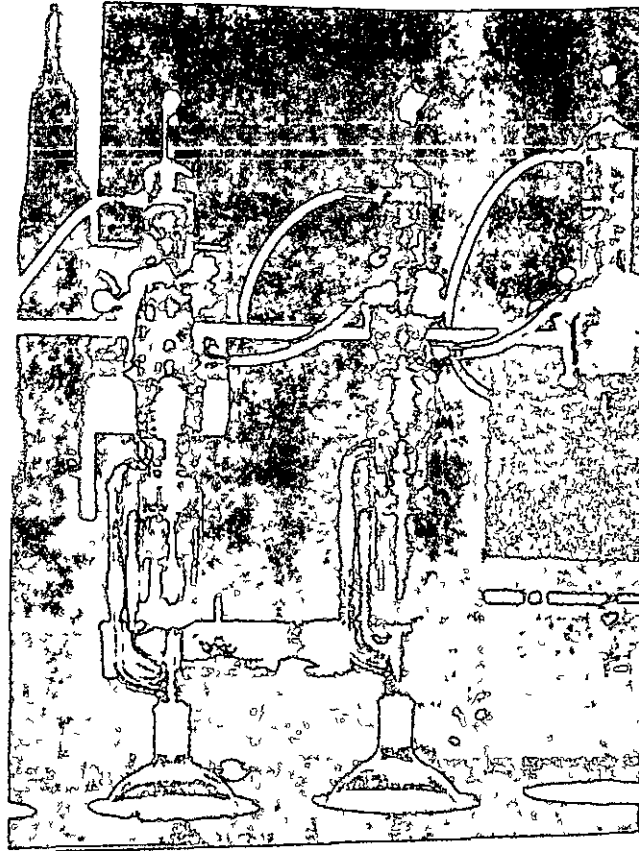
๒.๑.๗ สกัดผงยาสูบที่แช่กับ ๕ % กรดอะซิติก ด้วยน้ำ

ซึ่งผงยาสูบแห้ง ๑๐ กรัม แฉ่นำมาแช่กับกรดอะซิติก ให้เปียกชุ่ม จากนั้นกวนให้ทั่ว
โดยใช้แท่งแก้ว (stirring rod) แล้วจึงนำมาสกัดด้วยน้ำ ในแต่ละการทดลองให้เปลี่ยน
อัตราส่วนของยาสูบกับน้ำ สกัดที่อุณหภูมิ ๖๐ °C โดยกวนบน Magnetic stirrer -
hot plate

๒.๒ สกัดด้วยตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ (Extraction with Organic solvents)

๒.๒.๑ สกัดด้วยอีเทอร์ (Extraction with ether) โดยใช้
Soxhlet extractor (ตามภาพที่ ๕)

ซึ่งผงยาสูบแห้ง ๑๐ กรัม นำไปแช่ (soak) กับโซเดียมไฮดรอกไซด์ ใน
เอทิลแอลกอฮอล์ ๕๕ % ๑๐ cm³ (เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ๑๖ กรัม
ในน้ำกลั่น ๔๐ cm³ และเติม เอทิลแอลกอฮอล์ ๕๕ % ปริมาตร ๑๒๐ cm³)
กวนผงยาสูบกับสารละลายให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันด้วยแท่งแก้ว แล้วนำส่วนผสมทั้งหมดนี้ใส่ลง
ใน thimble สกัดใน Soxhlet extractor ใช้อีเทอร์เป็นตัวทำละลาย
หลังจากสกัด นำผงยาสูบไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ ๖๐ °C ประมาณ ๑ ชั่วโมง แล้วจึงนำ
มาหาปริมาณของนิโคตินที่เหลือโดยวิธี Silicotungstic acid method
เพื่อหาปริมาณนิโคตินที่สกัดได้ต่อไป



๑

ภาพที่ ๕ แสดงการสกัดโดยใช้ Soxhlet extractor

๒.๒.๒ สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (Extraction with chloroform)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลอง ๒.๒.๑ แต่ใช้คลอโรฟอร์ม เป็นตัว

ทำละลายแทนอีเทอร์

๒.๓ สกัดโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ (Extraction with steam distillation)

ทำการทดลองโดยวิธี Silicotungstic acid method (๑๙)

แต่สกัดเป็นช่วงเวลา แต่ละช่วงเวลานำไปหาปริมาณของนิโคตินที่สกัดได้ สำหรับกรดไฮโดรคลอริกที่รองรับนั้น ใน ๑ ชั่วโมงช่วงแรกใช้ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริก ($\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}=1:4$) 5 cm^3 จากนั้น ๒ ชั่วโมง และ ๓ ชั่วโมงช่วงหลังใช้กรดไฮโดรคลอริกครั้งละ 2 cm^3 สำหรับ ๔ ชั่วโมง และ ๕ ชั่วโมงหลัง ใช้กรดไฮโดรคลอริกรองรับเพียงครั้งละ 1 cm^3

๓. การหาประสิทธิภาพในการกำจัดแมลง ปฏิบัติตามขั้นตอน ดังนี้

๓.๑ การเลี้ยงหนอนเพื่อขยายพันธุ์

วันที่ ๒ เมษายน ๒๕๔๔ เก็บหนอนก๊ิบกะหล่ำ Trichoplusia ni Hubn.

(ตามภาพที่ ๑๐) และหนอนหลอดหอม Spodoptera exigua Hubn.

(ตามภาพที่ ๑๑) ในเขตจังหวัดกาญจนบุรี ต่อมาในวันที่ ๓๐ เมษายน ๒๕๔๔ เก็บหนอนใยผัก

Plutella xylostella L. (ตามภาพที่ ๑๒) ในเขตจังหวัดเพชรบุรี

นำหนอนก๊ิบกะหล่ำและหนอนใยผักมาเลี้ยงด้วยใบผักกวางตุ้ง และใบผักกะหล่ำปลี ในกรงลวดตาข่ายขนาด $6 \times 6 \times 90$ " (ตามภาพประกอบที่ ๑๓) ส่วนหนอนหลอดหอมแยกเลี้ยงด้วยใบหอมในกล่องพลาสติกขนาด $2 \times 3 \times 9$ " จนกระทั่งหนอนทั้ง ๓ ชนิดนี้เข้าดักแด้ จากนั้นนำหนอนแต่ละชนิดใส่ลงในกล่องพลาสติกขนาด $2 \times 3 \times 9$ " วางในกรงตาข่ายขนาด $6 \times 6 \times 90$ " ภายในกรงมีขวดใส่ผักกวางตุ้งอยู่ ดักแด้จะฟักตัวออกเป็นผีเสื้อ แล้ววางใบในใบผักกวางตุ้ง มีอาหารสำหรับตัวแก่คือน้ำผึ้งวางอยู่ในกรงอีกกว่า เป็นใบผักกวางตุ้งทุกๆ ๒ วัน หรือ ตามความเหมาะสม

แยกไข่ของหนอนหลอดหอมใส่กล่องพลาสติกขนาด $2 \times 3 \times 9$ " จนกระทั่งฟักเป็นตัวหนอน

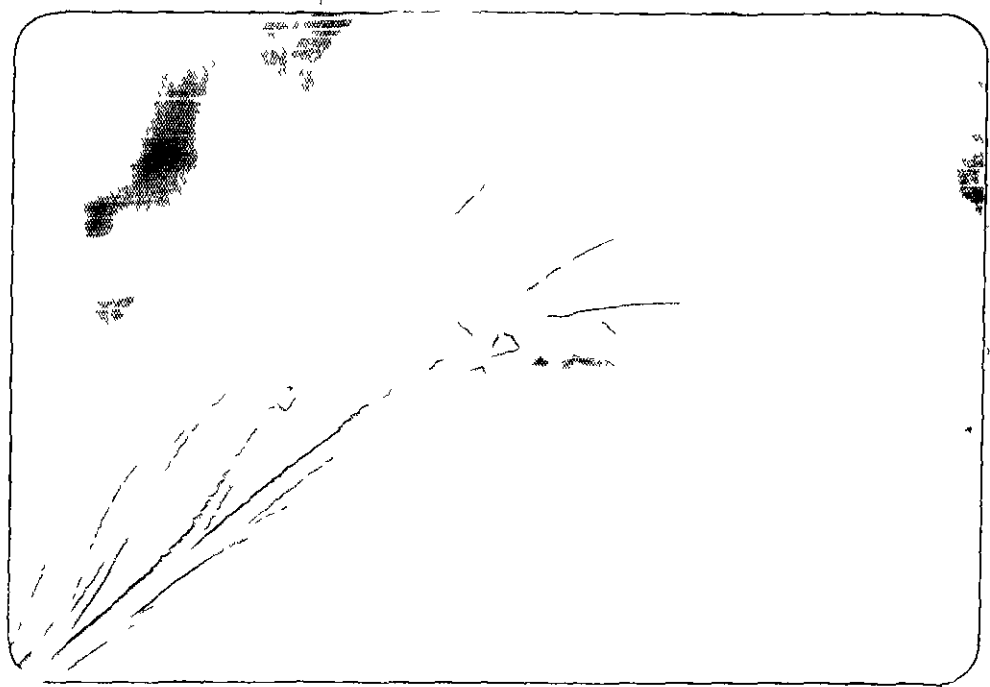
ให้โบหมเป็นอาหารประมาณ ๒ - ๓ วัน จึงแยกเลี้ยงด้วยอาหารผสมภายในถ้วยพลาสติก ขนาดเล็กมีฝาปิด ส่วนไข่ของหนอนที่บะท้าวและหนอนใยผัก ปลอ่ยได้พักเป็นตัวหนอนอยู่ ภายในกรงเค็ม รอจนกระทั่งหนอนทั้ง ๓ ชนิด มีอายุในระยะ instar ที่ ๓ จึงนำมา ทดลองประสิทธิภาพของวัตถุมีพิษที่สกัดได้

๓.๒ การเตรียมวัตถุมีพิษที่สกัดได้เพื่อใช้ในการทดลอง

ซึ่งผงยาสูบแห้งซึ่งหาปริมาณนิโคตินแล้วประมาณ ๓๐ กรัม ใส่ใน beaker เติมน้ำเค็มไฮดรอกไซด์ในเอทิลแอลกอฮอล์ ๓๐ cm³ กลุกเกล้านจนยาสูบเปียกชุ่มด้วย น้ำแล้ว แล้วนำส่วนผสมทั้งหมดนี้ใส่ลงใน thimble จากนั้นสกัดโดยใช้เครื่องสกัดแบบ Soxhlet extractor ใช้ไอเทอร์เป็นตัวทำตัวสกัด ใช้เวลาประมาณ ๑๐ ชั่วโมง จากนั้น นำส่วนที่สกัดได้ไปใส่ Solvent ออกจนหมด นำเอาส่วนที่เหลือซึ่งเป็นสารละลายหนึ่งมาหา ปริมาตร จากนั้นแบ่งสารละลายนี้ส่วนหนึ่งไปหาปริมาณของนิโคติน โดยหักแปลงจากวิธี Silicotungstic acid method สำหรับสารละลายอีกส่วนหนึ่งเก็บไว้ทดลอง กับหนอนต่อไป

๓.๓ การทดลองประสิทธิภาพของวัตถุมีพิษที่มีต่อหนอน

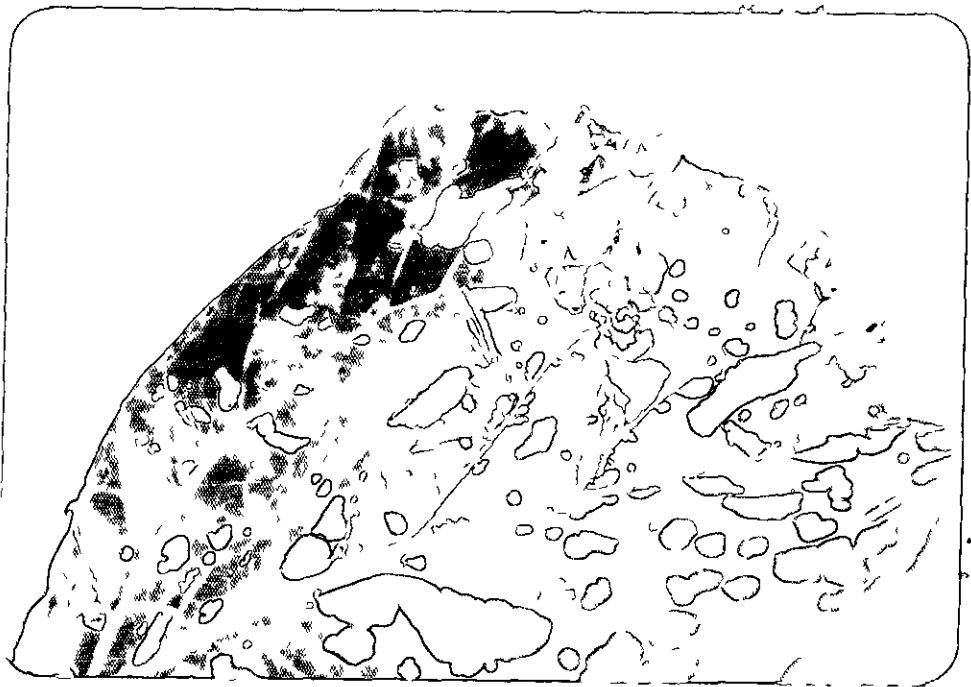
นำสารละลายที่สกัดได้ ซึ่งมีนิโคตินที่ทราบปริมาณแล้วมาละลายในอะซิโตน โดยแบ่งออกเป็น ๔ ความเข้มข้น (dosage) ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์น้ำหนักของวัตถุมีพิษต่อ ปริมาตรของสารละลาย การทดลองหนอนหลอดหอม หนอนที่บะท้าว ใช้ Micro - applicator (ภาพประกอบที่ ๑๔) หยดวัตถุมีพิษปริมาณ ๑ ไมโครลิตร ด้วย Microsyring NO.27 ลงบนส่วนนอกก้านบน (Dorsal Thoracic surface) ของหนอนแต่ละตัวที่ทราบค่าน้ำหนักเฉลี่ยแล้ว สำหรับหนอนใยผักมีขนาดตัวเล็กจึงใช้ Hand micro-applicator (ภาพประกอบที่ ๑๕) หยดวัตถุมีพิษปริมาณ ๐.๒๕ ไมโครลิตร ด้วย Microsyring ขนาด ๑๐ ไมโครลิตร ลงบนตำแหน่งส่วนนอกก้านบนเช่นเดียวกัน เนื่องจากวัตถุมีพิษที่ทดลองใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลาย จึงมีหนอนทดลองเปรียบเทียบกับ หนอนหลอดหอมเช่นเดียวกัน ทำการทดลองสามครั้ง รวมทั้งหนอนทดลองเปรียบเทียบกับ



ภาพที่ 10 หนอนกับกะหล่ำ (Trichoplusia ni Hubn.)



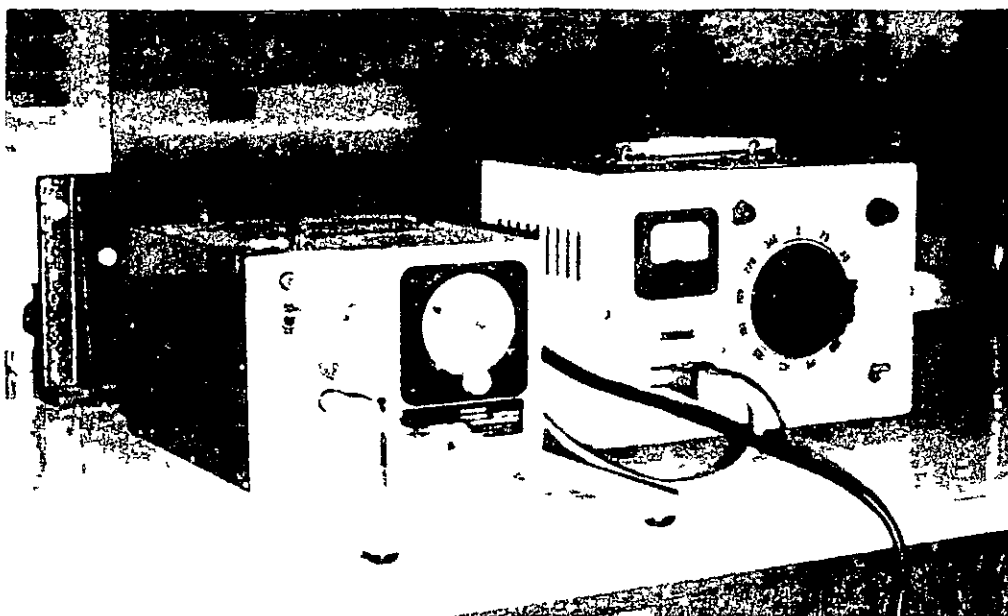
ภาพที่ ๑๑ หนอนหลอดกิน (Spodoptera exigua Hubn.)



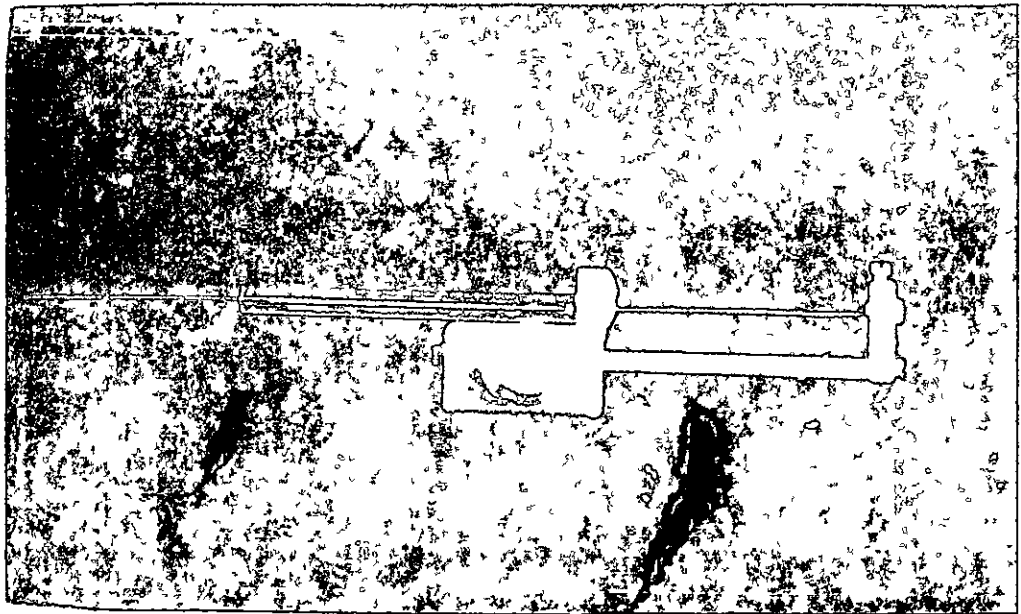
ภาพที่ ๑๒ หนอนใยผัก (Plutella xylostella L)



ภาพที่ ๑๓ แสดงกรงลวดตาข่ายสำหรับเลี้ยงขยายพันธุ์หอน



ภาพที่ ๑๔ แสดงเครื่อง Macro - applicator



ภาพที่ ๑๕ แสดงเครื่องมือ Hand micro - applicator

หลังจากนั้นนำหนอนทดลองดังกล่าวไปเลี้ยงต่อในกล่องพลาสติกซึ่งภายในมีอาหารผสมอยู่ เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนต่อไป

๓.๔ การวิเคราะห์ข้อมูลการตายของหนอน

ตรวจสอบอาการการตายของหนอนภายหลังจากหยดวัคซีนที่ ๑, ๒, ๑๘ และ ๒๔ ชั่วโมงตามลำดับ การตรวจว่าหนอนตายหรือไม่ ทำโดยใช้ปากคีบเขี่ยลำตัวของหนอนดู ถ้ายังเคลื่อนไหวดิ้นว่ายังไม่ตาย โดยกำหนดว่าไม่มีหนอนที่เป็นตัวเปรียบเทียบตาย แต่ถ้ามีหนอนเป็นตัวเปรียบเทียบตาย ให้กำหนดหาเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนทดลองที่ถูกต้อง โดยใช้ Abbot's formula (๒๗) ซึ่งป็นสูตรดังนี้

$$\text{corrected \% mortality} = \left[\frac{(\% \text{test mortality} - \% \text{control mortality})}{100 - \% \text{control mortality}} \right] \times 100$$

เมื่อได้เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนแต่ละความเข้มข้นของวัคซีนที่ ๒๔ ชั่วโมงแล้ว จึงนำค่าที่ได้ไปคำนวณหา LC_{50} โดยใช้สมการ Linear Regression พิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้นสองตัว ซึ่งสามารถเขียนสมการแสดงความสัมพันธ์ได้ดังนี้

$$x = a + by$$

ในเมื่อ x = เปอร์เซนต์ของความเข้มข้นซึ่งเป็นตัวแปรที่ขึ้นอยู่กับกาเปอร์เซ็นต์การตายของหนอน

y = เปอร์เซนต์การตายซึ่งเป็นตัวแปรอิสระ

b = เป็นค่าความชัน (slope) ซึ่งได้จากสูตร

$$b = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum (y - \bar{y})^2}$$

a = เป็นค่า Intercept ได้จากสูตร $a = \bar{x} - b\bar{y}$

เมื่อได้ค่า LC_{50} จึงนำมากำหนดค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S) โดยใช้สูตร

$$s^2 = \frac{\sum e^2}{N - k - 1}$$

เมื่อ s^2 = Variance

ϵ = Error term

N = จำนวน Sample

$-k-1$ = การสูญเสีย Degree of freedom

และตรวจสอบความเชื่อมั่นถึงความสัมพันธ์ของข้อมูลโดยใช้ t -test หาก t จากสูตร

$$t = \frac{\frac{b}{\sqrt{s^2}}}{\sqrt{(y-\bar{y})^2}}$$

แล้วจึงนำค่า LC_{50} ที่ได้นำมาคำนวณหาค่า LD_{50} ของหนอนแต่ละตัวต่อไป

บทที่ ๔

ผลการทดลอง

๑. การหาปริมาณของนิโคตินในยาสูบที่ปลูกที่อำเภอท่าวุ้ง จังหวัดกาฬสินธุ์ และที่อำเภอบางเขน กรุงเทพมหานคร ผลที่ได้ดังแสดงไว้ตามตารางที่ ๒ - ๑๑

ตารางที่ ๒ ปริมาณของนิโคติน ในยาสูบอายุ ๓ เดือนซึ่งปลูกที่จังหวัดกาฬสินธุ์

ตำแหน่งของก้นยาสูบ	% นิโคติน
ใบยอด	๐.๓๒๒
ใบกลาง	๐.๖๔๖
ใบโคน	๐.๔๔๕
ลำต้น	๐.๑๒๔
ทั้งต้น	๐.๓๑๖

ตารางที่ ๓ ปริมาณของนิโคติน ในยาสูบอายุ ๔ เดือนซึ่งปลูกที่จังหวัดกาญจนบุรี

ตำแหน่งของต้นยาสูบ	% นิโคติน
ใบยอด	๐.๘๖๖
ใบกลาง	๐.๕๓๓
ใบโคน	๐.๖๘๕
ลำต้น	๐.๑๘๖
ทั้งต้น	๐.๓๘๕

ตารางที่ ๔ ปริมาณของฟีนิกอลในยาสูบอายุ ๕ เดือนซึ่งปลูกที่จังหวัดกาญจนบุรี

ตำแหน่งของต้นยาสูบ	% ของนิโคติน
ใบยอด	๐.๖๔๑
ใบกลาง	๐.๖๘๔
ใบโคน	๐.๕๘๖
ลำต้น	๐.๔๘๑
ทั้งต้น	๐.๖๑๖

ตารางที่ ๕ ปริมาณของนิโคติน ในยาสูบอายุ ๓ เดือน ซึ่งปลูกที่กรุงเทพมหานคร

ตำแหน่งของต้นยาสูบ	% นิโคติน
ใบยอด	๐.๙๖๔
ใบกลาง	๐.๘๖๙
ใบโคน	๐.๙๑๐
ลำต้น	๐.๕๒๘
ทั้งต้น	๐.๙๖๐

ตารางที่ ๑๐ ปริมาณของนิโคติน ในยาสูบอายุ ๔ เดือน ซึ่งปลูกที่กรุงเทพมหานคร

ตำแหน่งของต้นยาสูบ	% นิโคติน
ใบยอด	๐.๘๘๐
ใบกลาง	๐.๙๒๗
ใบโคน	๑.๐๕๘
ก้าน	๐.๙๔๕
ทั้งต้น	๐.๘๖๕

ตารางที่ ๑๑ ปริมาณของนิโคติน ในยาสูบอายุ ๕ เดือน ซึ่งปลูกที่กรุงเทพมหานคร

ตำแหน่งของต้นยาสูบ	% นิโคติน
ใบยอด	๐.๙๓๖
ใบกลาง	๑.๒๓๓
ใบโคน	๑.๑๖๙
ลำต้น	๐.๓๕๘
ทั้งต้น	๐.๘๙๐

๒. ผลจากการศึกษาประสิทธิภาพในการสกัดนิโคตินโดยวิธีการต่างๆ ผลที่ได้
 ดังแสดงไว้ในตารางที่ ๑๒ - ๒๒ ตัวอย่างยาสูบที่ไร้สกัด เป็นยาสูบที่ได้จากการปลูกทดลอง
 ในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี กรุงเทพมหานคร และใบยาสูบพันธุ์เมืองกาญจน์ จากไร่ยาสูบ
 จังหวัดกาญจนบุรี

ตารางที่ ๑๒ ประสิทธิภาพการสกัดโดยการแปรผันปริมาณยาสูบและน้ำโดยน้ำหนักต่อปริมาณต่างกัน

การทดลอง ที่	น้ำหนักยาสูบ (กรัม)	ปริมาณน้ำ ยาสูบ:น้ำ อัตราส่วน	% นิกอตินใน ยาสูบ(กรัม)	% นิกอตินที่ สกัดได้ (กรัม)	สารละลายที่ ได้น้ำหนัก (C ₁₀ H ₁₆)	น้ำหนักนิกอติน (กรัม)ในสาร ละลาย ๑๐๐ กรัม	ประสิทธิภาพ คิดเป็น %
๑	๑๐	๒๕๐	๑ : ๒๕	๓.๓๔	๑๔๓	๐.๒๐	๔๓.๒
๒	๑๐	๒๐๐	๑ : ๒๐	๓.๘๐	๑๔๔	๐.๒๒	๔๔.๖
๓	๑๐	๑๕๐	๑ : ๑๕	๓.๕๕	๑๑๖	๐.๓๐	๔๐.๔
๔	๑๐	๑๐๐	๑ : ๑๐	๓.๑๒	๕๖	๐.๕๖	๓๒.๓
๕	๑๐	๕๐	๑ : ๕	๓.๐๔	๑๔	๑.๖๕	๓๐.๕

ตารางที่ ๑๓ ประสิทธิภาพจากการสกัดยาสูบสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ๐.๑ % ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

การทดลอง ที่	น้ำหนักยาสูบ (กรัม)	ปริมาตร สารละลาย NaOH ๐.๑ %	อัตราส่วน ยาสูบ : สาร ละลาย	% นิโคตินใน ยาสูบ (กรัม)	% นิโคตินที่ สกัดได้ (กรัม)	สารละลาย ที่ได้อาจ สกัด (กรัม)	น้ำหนักนิโคติน (กรัม) ในสาร ละลาย ๑๐๐ กรัม	ประสิทธิภาพ เกิดเป็น %
๑	๑๐	๒๕๐	๑ : ๒๕	๕.๒๕	๓.๘๗	๒๐๔	๐.๑๕	๕๐.๒
๒	๑๐	๒๐๐	๑ : ๒๐	๕.๒๕	๔.๑๐	๑๖๕	๐.๒๔	๕๓.๖
๓	๑๐	๑๕๐	๑ : ๑๕	๕.๒๕	๔.๓๑	๑๑๔	๐.๔๐	๕๓.๕
๔	๑๐	๑๐๐	๑ : ๑๐	๕.๒๕	๓.๕๖	๙๑	๐.๕๐	๘๖.๐
๕	๑๐	๕๐	๑ : ๕	๕.๒๕	๓.๔๔	๑๕	๑.๘๖	๘๖.๕

ตารางที่ ๑๘ ประสิทธิภาพจากการสกัดโดยวิธีสกัดเย็นจากผงยาสูบ ๑๐ กรัมต่อน้ำ ๒๐๐ ซีซี ที่อุณหภูมิห้อง (๒๓°C)

สกัดครั้งที่	% นิโคตินใน ยาสูบ(กรัม)	% นิโคตินที่ สกัดได้ (กรัม)	ผลรวม % นิโคติน ทั้งหมดที่สกัดได้ (กรัม)	ปริมาณของสาร ละลายภายใต้ สภาวะ (ซีซี)	นิโคติน(กรัม) ในสารละลาย ๑๐๐ ซีซี ³	ประสิทธิภาพ ในการสกัด ให้เป็น %
๑	๘.๒๕	๓.๘๔	๓.๘๔	๑๕๖	๐.๒๔	๘๐.๑
๒	๘.๒๕	๐.๓๔	๓.๙๘	๑๕๐	๐.๒๕	๙.๕
๓	๘.๒๕	๐.๑๑	๓.๙๐	๑๐๖	๐.๓๘	๒.๕
๔	๘.๒๕	๐.๐๖	๓.๙๖	๙๔	๐.๔๒	๑.๔
๕	๘.๒๕	๐.๐๑	๓.๙๗	๘๘	๐.๔๕	๐.๒

ตารางที่ ๑๕ ประสิทธิภาพการสกัดโดยวิธีช้อนแบ่งจากผงยาสูบ ๑๐ กรัม ต่อ น้ำ ๒๐๐ ซีซี ที่อุณหภูมิ ๖๐°C

ลำดับที่	ปริมาณยาสูบ (กรัม)	% นิโคตินที่สกัดได้ (กรัม)	ผลรวม % นิโคติน (กรัม) ทั้งหมดที่สกัดได้	ปริมาณของสารละลายภายใต้สภาวะ (ซีซี)	นิโคติน (กรัม) ในสารละลาย ๑๐๐ ซีซี คิดเป็น %	ประสิทธิภาพในการสกัด
๑	๔.๒๕	๓.๘๓	๓.๘๓	๑๔๓	๐.๒๖๗	๘๕.๓
๒	๔.๒๕	๓.๕๘	๓.๕๘	๑๔๗	๐.๕๓	๙๒.๘
๓	๔.๒๕	๒.๕๖	๑๐.๖๓	๑๐๐	๑.๐๖	๕๖.๕
๔	๔.๒๕	๑.๘๘	๑๑.๕๑	๙๓	๑.๒๖	๓๕.๕
๕	๔.๒๕	๑.๒๖	๑๓.๖๗	๘๕	๑.๕๗	๓๘.๓

ตารางที่ ๑๖ ประสิทธิภาพจากการสกัดโดยวิธีต่อเนื่องจากยางสูบ ๑๐ กรัม ต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์
 ๐.๑% ๒๐๐ ซี.ซี ที่อุณหภูมิ ๖๐ °C

ลำดับที่	ปริมาณยางสูบ (กรัม)	ปริมาณสารสกัดได้ (กรัม)	ผลรวมสารสกัดได้ (กรัม) ทั้งหมดที่สกัดได้	ปริมาณสารละลายยางหลังสกัด (ซี.ซี)	ปริมาณสารละลายในสารละลาย ๑๐๐ ซี.ซี	ประสิทธิภาพในการสกัด
๑	๔.๒๕	๔.๐๘	๔.๐๘	๑๔๒	๐.๒๕	๕๕.๑
๒	๔.๒๕	๓.๘๓	๓.๘๕	๑๔๔	๐.๕๕	๕๐.๒
๓	๔.๒๕	๒.๓๔	๑๐.๒๕	๕๕	๑.๐๔	๕๕.๖
๔	๔.๒๕	๑.๖๐	๑๑.๘๕	๕๓	๑.๒๘	๓๓.๓
๕	๔.๒๕	๑.๕๘	๑๓.๔๓	๘๔	๑.๖๐	๓๖.๘

ตารางที่ ๓๓ ประสิทธิภาพการสกัดด้วยน้ำในเวลาและอุณหภูมิที่ต่างกันโดยใช้เวลา ๑๐ กรัม คอนำ ๒๐๐ ซีซี

การทดลอง ที่	เวลาที่สกัด (นาที)	อุณหภูมิ °C	น้ำที่สกัดใน ยาสูบ(กรัม)	น้ำที่สกัด สกัดได้(กรัม)	ปริมาณของ สารละลาย ภายหลัง สกัด (ซีซี)	น้ำที่สกัด(กรัม)ใน สารละลาย ๑๐๐ ซีซี	ประสิทธิภาพ ในการสกัด คิดเป็น %
๑	๓๐	ห้อง	๑.๘๖	๑.๘๘	๑๖๖	๐.๐๐๕	๘๑.๓
๒	๖๐	ห้อง	๑.๘๖	๑.๘๐	๑๖๕	๐.๐๐๕	๘๒.๔
๓	๙๐	ห้อง	๑.๘๖	๑.๘๖	๑๖๕	๐.๐๐๕	๘๓.๕
๔	๑๒๐	ห้อง	๑.๘๖	๑.๘๖	๑๖๕	๐.๐๐๕	๘๓.๕
๕	๓๐	๖๐	๑.๘๖	๑.๘๕	๑๖๓	๐.๐๑๐	๘๑.๕
๖	๖๐	๖๐	๑.๘๖	๑.๘๖	๑๖๓	๐.๐๑๐	๘๒.๔
๗	๙๐	๖๐	๑.๘๖	๑.๘๓	๑๖๓	๐.๐๑๐	๘๔.๐
๘	๑๒๐	๖๐	๑.๘๖	๑.๘๓	๑๖๓	๐.๐๑๐	๘๔.๐

หมายเหตุ อุณหภูมิห้องประมาณ ๒๕ °C

ตารางที่ ๔๘ ประสิทธิภาพการสกัดด้วยสารละลายไซโคลเฮกไซล์ ๐.๑% ๒๐๐ C พอลิเอทิลีน ๑๐ กรัม ในเวลา และอุณหภูมิที่ต่างกัน

การทดลองที่	เวลาที่สกัด (นาที)	อุณหภูมิ	ปริมาณสารละลาย (กรัม)	ปริมาณสารสกัด (กรัม)	ปริมาณสารละลาย (กรัม)	ประสิทธิภาพในการสกัด
๑	๓๐	ห้อง	๑.๘๖	๑.๕๓	๐.๐๕	๘๔.๐
๒	๖๐	ห้อง	๑.๘๖	๑.๕๔	๐.๐๕	๘๔.๖
๓	๙๐	ห้อง	๑.๘๖	๑.๕๔	๐.๐๕	๘๔.๖
๔	๑๒๐	ห้อง	๑.๘๖	๑.๕๕	๐.๐๕	๘๕.๑
๕	๓๐	๖๐	๑.๘๖	๑.๙๐	๐.๑๑	๙๓.๙
๖	๖๐	๖๐	๑.๘๖	๑.๙๒	๐.๑๑	๙๔.๕
๗	๙๐	๖๐	๑.๘๖	๑.๙๓	๐.๑๑	๙๕.๐
๘	๑๒๐	๖๐	๑.๘๖	๑.๙๓	๐.๑๑	๙๕.๐

หมายเหตุ อุณหภูมิห้องประมาณ ๒๕ C

ตารางที่ ๑๕ ประสิทธิภาพเมื่อผสมยางสับด้วยกรออะซิติค ๘% แล้วสกัดด้วยน้ำในอัตราส่วนต่างๆกัน

การทดลอง ที่	น้ำหนักยางสับ (กรัม)	ปริมาณคร่งน้ำ (๘๗)	อัตราส่วน ยางสับ:น้ำ	นิโคตินใน ยางสับ(กรัม)	นิโคตินที่ สกัดได้(กรัม)	สารละลาย ที่ได้อัตรา สกัด(๘๗) ³	นิโคติน(กรัม) ในสารละลาย ๑๐๐ ๘๗ ³	ประสิทธิภาพ เกิดเป็น %
๑	๑๐	๒๕๐	๑ : ๒๕	๔.๒๕	๔.๐๕	๑๘๕	๐.๒๒	๕๔.๔
๒	๑๐	๒๐๐	๑ : ๒๐	๔.๒๕	๔.๐๒	๑๘๖	๐.๒๘	๕๓.๖
๓	๑๐	๑๕๐	๑ : ๑๕	๔.๒๕	๓.๙๕	๑๑๖	๐.๓๔	๕๓.๑
๔	๑๐	๑๐๐	๑ : ๑๐	๔.๒๕	๓.๙๕	๒๖	๐.๕๗	๘๗.๕
๕	๑๐	๕๐	๑ : ๕	๔.๒๕	๓.๒๒	๑๕	๑.๕๑	๘๔.๔

ตารางที่ ๒๐ ประสิทธิภาพในการสกัดโดยใช้อัลกอฮอล์เป็นตัวทำละลาย

การทดลองที่	น้ำหนักยาสูบ (กรัม)	ปริมาณในยาสูบ (กรัม)	เวลาที่สกัด (ชั่วโมง)	ปริมาณที่สกัดได้ (กรัม)	ประสิทธิภาพ เป็น %
๑	๑๐	๓.๖๓	๑	๓.๑๙๙	๘๓.๘๑
๒	๑๐	๓.๖๓	๒	๓.๔๓๓๐	๘๓.๕๒
๓	๑๐	๓.๖๓	๓	๓.๔๓๘๑	๘๓.๔๘
๔	๑๐	๓.๖๓	๔	๓.๔๓๙๓	๘๓.๕๑
๕	๑๐	๓.๖๓	๕	๓.๔๓๐๐	๘๓.๕๐

ตารางที่ ๒๑ ประสิทธิภาพในการสกัดโดยใช้คลอโรฟอร์ม เป็นตัวละลาย

การทดลองที่	น้ำหนักยาสูบ (กรัม)	ปริมาณในยาสูบ (กรัม)	เวลาที่สกัด (ชั่วโมง)	ปริมาณที่สกัดได้ (กรัม)	ประสิทธิภาพ คิดเป็น %
๑	๑๐	๓.๖๓	๑	๒.๒๔๔๕	๘๑.๘๔
๒	๑๐	๓.๖๓	๒	๓.๑๒๕๔	๘๓.๓๕
๓	๑๐	๓.๖๓	๓	๓.๑๘๒๓	๘๖.๑๓
๔	๑๐	๓.๖๓	๔	๓.๑๘๕๖	๘๖.๒๓
๕	๑๐	๓.๖๓	๕	๓.๒๓๓๑	๘๘.๘๕

ตารางที่ ๒๒ ประสิทธิภาพในการสกัดโดยวิธีการกวนด้วยไอน้ำ

การทดลองที่	น้ำหนักยาสูบ (กรัม)	น้ำหนักในยาสูบ (กรัม)	เวลาที่สกัด (ชั่วโมง)	น้ำหนักที่สกัดได้ (กรัม)	ประสิทธิภาพ คิดเป็น %
๑	๑๐	๓.๖๓	๑	๓.๔๖๑๒	๔๔.๘๔
๒	๑๐	๓.๖๓	๒	๒.๒๓๕๖	๓๔.๑๔
๓	๑๐	๓.๖๓	๓	๑.๑๖๓๕	๔๕.๔๕
๔	๑๐	๓.๖๓	๔	๐.๓๖๔๕	๕๓.๓๐
๕	๑๐	๓.๖๓	๕	๐.๒๔๕๒	๕๖.๕๖

๓. การหาประสิทธิภาพในการกำจัดแมลง

๓.๑ หนอนลอกหอย ใช้หนอนลอกหอยทดลอง ๑๕๐ ตัว น้ำหนักเฉลี่ยตัวละ ๑๐.๔ mg คัดหาเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนที่ ๒๔ ชั่วโมง ปรากฏว่าไม่มีหนอนที่ใช้ทดลองเปรียบเทียบ ตาย ข้อมูลและผลการทดลองปรากฏตามตารางที่ ๒๓

ตารางที่ ๒๓ แสดงเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของวัตถุมีพิษ และเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนลอกหอย

เปอร์เซ็นต์ความ เข้มข้นของวัตถุมีพิษ (x)	เปอร์เซ็นต์การตาย ของหนอน (y)
๘๐	๓๓.๓๓
๑๐๐	๘๓.๓๓
๑๒๐	๘๖.๖๗
๑๖๐	๘๖.๖๗ ๕๐%

จากข้อมูลที่ได้ เมื่อนำมาใช้วิธีการทางสถิติจะได้รูปแบบ Linear Regression ดังนี้

$$x = 41.5 + .98 y$$

ดังนั้น

$$LC_{50} = 90.0 \quad \checkmark$$

$$S = 24.4$$

$$t = 1.97$$

$$LD_{50} = 86.54 \text{ mg / g}$$

๓.๒ หนอนใยผัก ใช้หนอนใยผักทดลอง ๑๕๐ ตัว น้ำหนักเฉลี่ยตัวละ ๒.๕๖ mg คิดหาเปอร์เซ็นต์การตายของหนอน ๒๔ ชั่วโมง ปรากฏว่าไม่มีหนอนที่ใช้ในการควบคุม (Control) ตาย ข้อมูลและผลการทดลอง ปรากฏตามตารางที่ ๒๔ (หมายเหตุ ใช้ Hand micro-applicator หยดวัตถุมีพิษ ปริมาณ ๐.๕ ไมโครลิตร ต่อหนอน ๑ ตัว)

ตารางที่ ๒๔ แสดงเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของวัตถุมีพิษและ เปอร์ เซนต์การตายของ หนอนใยผัก

เปอร์ เซนต์ความเข้มข้น ของวัตถุมีพิษ (x)	เปอร์ เซนต์การตาย ของหนอน (y)
๐.๐	๓๖.๖๓
๑	๕๓.๓๓
๕	๘๐.๐๐
๑๐	๑๐๐

จากข้อมูลที่ได้นำมาใช้ในการทางสถิติจะใ้รูปแบบการแบบ Linear Regression ดังนี้

$$x = -6.775 + 0.16 y$$

ดังนั้น

$$LC_{50} = 1.225$$

$$S = 1.27$$

$$t = 6.63$$

$$LD_{50} = 2.49 \text{ mg / g}$$

๓.๓ หนอนกึ่งกะหล่ำ ใช้หนอนกึ่งกะหล่ำทดลอง ๑๕๐ ตัว น้ำหนักเฉลี่ยตัวละ ๑๔.๓๘ mg คัดหาเปอร์เซ็นต์การตายของหนอน ๖๔ ชั่วโมง ปรากฏว่ามีหนอนที่ใช้ในการควบคุม (control) ตาม ๓๓.๓๓ % จึงหาเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนที่ถูกต้อง โดยใช้ Abbot's formula ข้อมูลและผลการทดลองปรากฏตามตารางที่ ๒๕

ตารางที่ ๒๕ แสดงเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของวัฏภูมิพิษ และเปอร์เซ็นต์การตายของ หนอนกึ่งกะหล่ำ ที่ได้จากการทดลอง และจาก Abbot's formula

เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น ของวัฏภูมิพิษ (x)	เปอร์เซ็นต์การตาย ของหนอน	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอน โดย Abbot's formula (y)
๑๕	๕๖.๖๖	๑๕.๕๕
๒๐	๕๖.๖๗	๓๕.๐๑
๓๐	๖๖.๖๗	๕๐.๐๑
๔๐	๗๖.๖๗	๖๕.๐๑

จากข้อมูลที่ได้เมื่อนำมาใช้วิธีทางสถิติจะได้อุปสมการแบบ Linear Regression ดังนี้

$$x = 1.97 + 0.57 y$$

ดังนั้น

$$LC_{50} = 30.47$$

$$S = 1.9$$

$$t = 10.05$$

$$LD_{50} = 16.22 \text{ mg / g}$$

บทที่ ๕

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ความมุ่งหมายของการศึกษากันว่า

๑. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดวัตถุดิบพิษในยาสูบ โดยใช้น้ำ (water) อีเทอร์ (ether) กลอโรฟอร์ม (chloroform) และวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation)
๒. เพื่อศึกษาปริมาณวัตถุดิบพิษในยาสูบพันธุ์เมืองกาญจน์ ซึ่งปลูกที่จังหวัดกาญจนบุรี และที่กรุงเทพมหานคร เมื่ออายุ ๓ เดือน ๔ เดือน และ ๕ เดือน
๓. เพื่อศึกษาปริมาณวัตถุดิบพิษในแต่ละส่วน (position) ของต้น ได้แก่ ใบ ลำต้น เมื่อมีอายุต่างกัน
๔. เพื่อหาประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงของวัตถุดิบพิษที่สกัดได้จากยาสูบ

การดำเนินการทดลอง

๑. การเก็บตัวอย่างยาสูบ แบ่งเป็น
 - ๑.๑ เก็บตัวอย่างยาสูบพันธุ์เมืองกาญจน์ ซึ่งปลูกที่อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี และที่อำเภอบางเขน กรุงเทพมหานคร โดยวิธีตัดต้นยาสูบให้ชิดโคนต้น ในตอนเช้า แล้วแบ่งเป็นสองส่วน
 - ส่วนที่หนึ่ง นำมาตัดแบ่งลำต้นเป็นสามระยะคือ ส่วนโคนต้น ส่วนกลางต้น และส่วนยอดต้น จากนั้นรีดใบในแต่ละส่วน นำไปบ่มเป็นเวลา ๓ วัน แล้วนำมาตากแดดให้แห้ง สำหรับลำต้นของแต่ละส่วนรวมนำไปบ่ม และตากแดดเช่นเดียวกับส่วนใบ
 - ส่วนที่สอง นำมารีดใบออกจากลำต้น แล้วบ่มทั้งใบและลำต้นรวมกันเป็นเวลา ๓ วัน จึงนำไปตากแดดจนแห้ง ส่วนนี้เรียกว่ายาสูบทั้งต้น
 - ๑.๒ เก็บตัวอย่างส่วนใบยอดยาสูบเมืองกาญจน์ที่บ่มแล้ว จากไร่ยาสูบจังหวัด

กาณฐบุรี แล้วนำมาตากจนแห้ง ตัวอย่างยาสูบนี้ ไว้ทดลองศึกษาการสกัดวัฏมึพิษ

นำยาสูบและตัวอย่างที่ตากไว้แห้งแล้ว มาอบในตูบ (oven) ที่อุณหภูมิ ๖๐ °C ประมาณ ๑ ชั่วโมง แล้วนำเข้าเครื่องบดทันที บดจนยาสูบละเอียด จึงเก็บไว้ในเครื่องสุญญากาศ เพื่อใช้ในการทดลอง

๒. การเก็บตัวอย่างหนอน

เก็บหนอนกับกะหล่ำและหนอนหลอดหอม ในท้องที่อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ส่วนหนอนใยผัก เก็บในท้องที่นิคมหุบกระพง อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี นำหนอนทั้งสามชนิด คัดกล่าวนำเลี้ยงขยายพันธุ์ จนได้หนอนรุ่นใหม่ แล้วคัดเลือกหนอนในแต่ละชนิด ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกันในระยะ instar ที่ ๓ เพื่อนำมาทดลองต่อไป

๓. วิธีดำเนินการทดลอง

๓.๑ หาปริมาณนิโคตินในยาสูบที่ปลูกที่ อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี และที่ อำเภอบางเลน กรุงเทพมหานคร เมื่ออายุ ๓ เดือน ๔ เดือน และ ๕ เดือน

การหาปริมาณนิโคตินจากยาสูบใช้ Silicotungstic acid method โดยมีวิธีการสรุปได้ดังนี้ นำผงยาสูบแห้ง ๑๐ กรัม และโซเดียมคลอไรด์ ๑๐ กรัม ใส่ลงใน conical flask เติมน้ำละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ๓๐ ٪ ๑๐ cm³ ปิดจุก ที่มีหลอดแก้วสองทาง โดยทางหนึ่งเป็นทางเข้าของไอน้ำ อีกทางหนึ่งเป็นทางออกของไอน้ำ ผสมกับนิโคตินอิสระผ่านมาความเข้มข้นยังคอนเซนเชอร์ ซึ่งปลายค้อยู่กับ adapter ซึ่งจุ่มลงในกรดไฮโดรคลอริก (HCl:H₂O=1:4) ๑๐ cm³ กลั่นด้วยไอน้ำจนไม่มีนิโคตินเหลืออยู่ในสารตัวอย่าง จากนั้นวัดปริมาตรของสารละลายที่กลั่นได้ แล้วตวงสารละลายที่กลั่นได้นั้นมาหยด Silicotungstic acid solution จึงได้ผลึกของ nicotine silicotungstate แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณนิโคตินที่ได้จากสูตร

$$\text{wt.residue} \times 0.1012 = \text{wt. nicotine in aliquot}$$

๓.๒ การศึกษาการสกัด

๓.๒.๑ สกัดด้วยน้ำ

๓.๒.๑.๑ สกัดโดยแปรผันปริมาณของยาสูบต่อน้ำโดยปริมาตรที่แตกต่างกัน

๓.๒.๑.๒ สกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ๐.๑ % กับยาสูบ

ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

๓.๒.๑.๓ สกัดโดยวิธีค้อนเนื่องด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง

๓.๒.๑.๔ สกัดโดยวิธีค้อนเนื่องด้วยน้ำที่อุณหภูมิ ๒๐ °C

๓.๒.๑.๕ สกัดโดยวิธีค้อนเนื่องด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ๐.๑ %

ที่อุณหภูมิ ๒๐ °C

๓.๒.๑.๖ สกัดด้วยน้ำในเวลาและอุณหภูมิที่ต่างกัน

๓.๒.๑.๗ สกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเวลาและอุณหภูมิที่ต่างกัน

๓.๒.๑.๘ สกัดผงยาสูบที่แห้งกับกรดอะซิติก ๕ % ด้วยน้ำ

๓.๒.๒ สกัดด้วยตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์

๓.๒.๒.๑ สกัดด้วยอีเทอร์ โดยใช้ soxhlet extractor

๓.๒.๒.๒ สกัดด้วยกลอโรฟอร์ม

๓.๒.๓ สกัดโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ

๓.๓ การหาประสิทธิภาพในการกำจัดแมลง

เก็บหนอนที่บักะหล่ำ หนอนหลอกหอม และหนอนใบผัก แล้วนำมาเลี้ยงขยายพันธุ์จนได้หนอรุ่นใหม่ เมื่อมีอายุในระยะ instar ที่ ๓ จึงนำมาทดลองประสิทธิภาพวัตถุที่มีพิษที่สกัดได้ ซึ่งมีนิโคตินที่ทราบปริมาณแล้ว มาละลายในอะซิโตน โดยแบ่งออกเป็น ๔ ความเข้มข้น เนื่องจากวัตถุที่มีพิษที่ทดลอง ใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลาย ดังนั้นจึงมีทดลองเปรียบเทียบ โดยหยดอะซิโตนเช่นเดียวกัน ทดลองสามครั้งรวมทั้งตัวเปรียบเทียบด้วย การทดลองในหนอนที่บักะหล่ำและหนอนหลอกหอมใช้ micro-applicator หยดวัตถุที่มีปริมาณ ๑ ไมโครลิตรด้วย microsyring เบอร์ ๒๗ ลงบนส่วนนอกด้านบนของหนอน

สำหรับหนอนใบผักใช้ hand micro-applicator หยดยาปริมาณ ๐.๒๕ ไมโครลิตร ด้วย microsyring ขนาด ๑๐ ไมโครลิตร จากนั้นหาเปอร์เซ็นต์การตายของหนอน ภายหลังหยดผักกูดที่วัยแล้ง ๒๔ ชั่วโมง หากหนอนที่ใช้ทดลองเปรียบเทียบกับ (control) ตาย จะต้องใช้ Abbot's formula มาใช้ในการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตายด้วย เมื่อได้เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนแต่ละความเข้มข้น จึงนำข้อมูลที่ได้มาหาค่าสถิติเพื่อหาสมการแบบ Linear Regression หา LC_{50} ของผักกูดที่มีต่อหนอนที่ใช้ทดลอง จากนั้นนำน้ำหนักของหนอนเฉลี่ยในหนึ่งตัวและค่า LC_{50} ที่ได้มาหาค่า LD_{50} ของน้ำหนักผักกูดที่พบเป็นมิลลิกรัม ต่อน้ำหนักหนอน ๑ กรัม

ผลการทดลอง

- จากการวิเคราะห์ในทุกๆ ส่วนของต้นยาสูบพบว่า นิโคตินมีปริมาณต่ำสุด จะอยู่ในบริเวณส่วนของลำต้น คือ ยาสูบที่อยู่ในจังหวัดกาญจนบุรีที่มีอายุ ๓ เดือน ๔ เดือน และ ๕ เดือน พบปริมาณนิโคตินในส่วนของลำต้น ๐.๑๒๔ %, ๐.๒๘๖% และ ๐.๔๘๑% ตามลำดับ ยาสูบที่ปลูกที่กรุงเทพมหานครที่มีอายุ ๓ เดือน ๔ เดือน และ ๕ เดือนพบปริมาณนิโคตินในส่วนของลำต้น ๐.๕๖๘% ๐.๙๕๕% และ ๐.๙๘๘% ตามลำดับ
- ปริมาณนิโคตินในส่วนของใบยาสูบอายุ ๓ - ๕ เดือน ซึ่งปลูกเปรียบเทียบในกรุงเทพฯ กับกาญจนบุรี พบว่า ส่วนใหญ่ในส่วนใบยอดจะมีปริมาณนิโคตินต่ำสุด ยกเว้นใบยาสูบอายุ ๔ เดือน ซึ่งปลูกที่จังหวัดกาญจนบุรีจะมีปริมาณนิโคตินต่ำสุดอยู่ที่ใบโคนต้น สำหรับปริมาณนิโคตินสูงสุดในใบยาสูบ พบว่า จะอยู่ในตำแหน่งที่ไม่แน่นอน ยกเว้นยาสูบอายุ ๕ เดือน จะมีปริมาณนิโคตินสูงสุดที่ใบกลางต้น
- จากการวิเคราะห์ยาสูบในช่วงอายุ ๓ - ๕ เดือน ที่ปลูกในท้องที่กรุงเทพฯ จะมีปริมาณนิโคตินสูงกว่ายาสูบที่ปลูกในจังหวัดกาญจนบุรี คือ ที่กรุงเทพฯ ปริมาณนิโคตินสูงสุดจะอยู่ในยาสูบอายุ ๔ เดือนที่ตำแหน่งใบกลางต้น จะมีนิโคตินอยู่ ๑.๖๓๓% ส่วนที่จังหวัดกาญจนบุรี ปริมาณนิโคตินสูงสุดจะอยู่ในยาสูบอายุ ๓ เดือน ที่ตำแหน่งใบกลางต้น โดยมีนิโคตินอยู่ ๐.๖๔๖ %

๔. การสกัดด้วยน้ำ ปรากฏว่าอัตราส่วนของยาสูบต่อตัว ทำละลาย โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่ได้ประสิทธิภาพในการสกัดสูง มีดังนี้ ยาสูบต่อน้ำ ๑ : ๒๐ สกัดได้ ๔๔.๖ % ยาสูบต่อสารละลายโซเกียมไฮดรอกไซด์ ๑ : ๑๕ สกัดได้ ๕๓.๕ % และจะมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อนำยาสูบไปแช่กับกรละอะซิติก ๕ % ก่อนสกัดด้วยน้ำ ซึ่งใช้อัตราส่วนก่อนนำ ๑ : ๒๕ โดยสกัดได้ถึง ๕๔.๔ %

๕. ในการสกัดโดยวิธีต่อเนื่องโดยใช้ผงยาสูบ ๑๐ กรัม คือน้ำ ๒๐๐ cm^3 ทำการสกัดต่อเนื่องกับ ๕ ครั้ง โดยเปรียบเทียบที่อุณหภูมิห้อง (๒๓°C) กับที่อุณหภูมิ ๖๐°C (ตามตารางที่ ๑๔ - ๑๕) พบว่าที่อุณหภูมิ ๖๐°C จะมีประสิทธิภาพในการสกัดสูงกว่า โดยดูจากผลการสกัดครบครั้งที่ ๕ น้ำหนักของนิโคตินในสารละลายหลังสกัด ๑๐๐ cm^3 จะมีมากกว่าเมื่อสกัดในอุณหภูมิห้องอยู่ถึง ๑.๑๒ g/cm^3 แต่ในขณะเดียวกัน ถ้าเปรียบเทียบจากการสกัดด้วยน้ำกับสารละลายโซเกียมไฮดรอกไซด์ ๐.๑ % ที่อุณหภูมิ ๖๐°C (ตามตารางที่ ๑๕ - ๑๖) ปรากฏว่า สกัดด้วยสารละลายโซเกียมไฮดรอกไซด์ ๐.๑ % ประสิทธิภาพเมื่อสกัดในครั้งแรกคิดเป็น ๕๕.๑ % และประสิทธิภาพจะลดลง เมื่อสกัดในครั้งที่ต่อไป แต่เมื่อสกัดด้วยน้ำประสิทธิภาพจะน้อยกว่า คือประสิทธิภาพจะสูง เมื่อสกัดในครั้งที่สอง คิดเป็น ๕๒.๔ % จากการสกัดเมื่อครบครั้งที่ ๕ แล้ว ปรากฏว่า การสกัดด้วยสารละลายโซเกียมไฮดรอกไซด์ ๐.๑ % น้ำหนักนิโคตินในสารละลายหลังสกัด ๑๐๐ cm^3 จะมากกว่าการสกัดด้วยน้ำอยู่ถึง ๐.๐๓ $\text{g} / ๑๐๐ \text{ cm}^3$

๖. ผลการสกัดด้วยน้ำในเวลาและอุณหภูมิต่างกัน โดยใช้ยาสูบ ๑๐ กรัม คือน้ำ ๒๐๐ cm^3 (ตารางที่ ๑๗) ที่อุณหภูมิห้อง (๒๕°C) ใช้เวลาสกัด ๓๐ ๖๐ ๙๐ และ ๑๒๐ นาที ประสิทธิภาพในการสกัดได้ ๔๑.๓ % ๔๒.๔ % ๔๓.๕ % และ ๔๓.๕ % ตามลำดับ แต่ที่อุณหภูมิ ๖๐°C ช่วงเวลาสกัดเท่ากัน จะได้ประสิทธิภาพในการสกัด เป็น ๔๑.๕ % ๔๒.๔ % ๔๔.๐ % และ ๔๔.๐ % ตามลำดับ

๓. ผลการสกัดยาสูบ ๑๐ กรัม คอสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ๑.๑ % (ตารางที่ ๑๔) ที่อุณหภูมิห้อง (๒๕°C) ใช้เวลาสกัด ๓๐ ๖๐ ๙๐ และ ๑๒๐ นาที ประสิทธิภาพในการสกัดได้ ๔๐.๐ % ๔๔.๖ % ๔๔.๖% และ ๔๕.๑ % ตามลำดับ แต่ถ้า อุณหภูมิเป็น ๖๐°C ช่วงเวลาสกัดเท่ากันจะได้ประสิทธิภาพในการสกัดเป็น ๓๐.๙ % ๔๔.๕% ๔๕.๐ % และ ๔๕.๐ % ตามลำดับ

๔. การสกัดโดยใช้ตัวหาละลายที่เป็นสารอินทรีย์ (ตารางที่ ๒๐-๒๑) อีเทอร์เป็นสารละลายที่ใช้สกัดได้ดีกว่าคลอโรฟอร์ม จากยาสูบ ๑๐ กรัม ใช้เวลาสกัด ๕ ชั่วโมง อีเทอร์จะมีประสิทธิภาพในการสกัดวัฏุมิพิได้ ๙๓.๙๐ % สำหรับคลอโรฟอร์ม สามารถสกัดได้ ๔๔.๔๔ % ส่วนการสกัดโดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำจากน้ำหนัทยาสูบและ เวลาที่ใช้สกัดเท่ากัน (ตารางที่ ๒๒) จะมีประสิทธิภาพในการสกัด ๙๖.๙๖ %

๕. จากการหาประสิทธิภาพของวัฏุมิพิในการกำจัดแมลงปรากฏว่า ค่า LD_{๕๐} ของวัฏุมิพิที่ทอ้งใช้กับหนอนหลอดหอมปีกา = ๔๖.๕๔ mg/g หนอนก้นกะหล่ำปีกา = ๑๖.๒๒ mg/g หนอนใยผักปีกา = ๒.๔๔ mg/g

อภิปรายผลการทดลอง

๑. จากผลการทดลองแสดงว่า วัฏุมิพิจะมีอยู่ในส่วนต่างๆของใบมากกว่าลำต้น และเมื่ออายุของต้นยาสูบมากขึ้น ปริมาณวัฏุมิพิในยาสูบก็จะสูงขึ้นด้วย ในระยะยาสูบ มีอายุ ๔ เดือน ปริมาณวัฏุมิพิที่มีอยู่ในส่วนต่างๆของใบมีปริมาณใบแน่นอน แต่เมื่อ ยาสูบมีอายุ ๕ เดือน วัฏุมิพิจะมีปริมาณสูงในใบกลางต้น

๒. ยาสูบที่ปลูกในพื้นที่กรุงเทพมหานครจะมีปริมาณวัฏุมิพิสูงกว่ายาสูบที่ปลูกใน พื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี

๓. การสกัดวัฏุมิพิจากยาสูบด้วยน้ำจะมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อนำผงยาสูบ ไปแช่ (soak) กับกรดอะซิติก ๕ % ก่อนสกัดด้วยน้ำ ซึ่งใช้อัตราส่วน ๑:๒๕ จะสกัด ได้ถึง ๔๔.๔ %

๔. การสกัดวัฏภูมิพิษจากยาสูบด้วยน้ำที่อุณหภูมิ ๖๐°c จะมีประสิทธิภาพในการสกัดได้ดีกว่าอุณหภูมิที่ต่ำ และถ้าสกัดโดยวิธีการต่อเนื่อง จะมีประสิทธิภาพในการสกัดสูง ในคอนสแตนท์ครั้งแรก แต่เมื่อทำการสกัดครั้งต่อไปประสิทธิภาพจะลดลง แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ได้สารละลายซึ่งมีความเข้มข้นของวัฏภูมิพิษสูงกว่าการสกัดเพียงครั้งเดียว

๕. จากผลการสกัดด้วยน้ำโดยทำในระยะเวลาที่ใช้สกัดต่างกัน จะมีประสิทธิภาพในการสกัดสูง เมื่อใช้เวลาดำกลั่นมากขึ้น แต่ประสิทธิภาพในการสกัดจะคงที่ เมื่อใช้เวลาดำกลั่น ๔๘ นาที เป็นต้นไป

๖. การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น อีเทอร์ และคลอโรฟอร์ม จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำ

๗. จากผลการทดลองประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงของวัฏภูมิพิษแสดงให้เห็นว่า หนอนหลอกหอม มีความต้านทานต่อวัฏภูมิพิษมากที่สุด รองลงไปได้แก่หนอนกุ่มกะหล่ำ และหนอนไผ่ผัก ตามลำดับ

๘. จากผลการทดลองของหนอนกุ่มกะหล่ำ อัตราการตายของหนอน หลังจากรับวัฏภูมิพิษภายใน ๒๔ ชั่วโมง ปรากฏว่ามีหนอนที่โช้ทกลองเปรียบเทียบกับ ๓๐.๓๓ % ดังนั้นการทดลองอาจคลาดเคลื่อนไปบ้าง แต่ผู้วิจัยก็เห็นว่า การคาดเดาเบื้องต้นมีผลต่อการทดลองน้อยมาก ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อสังเกตการตายของหนอน หลังจากรับวัฏภูมิพิษในช่วง ๐ , ๒ , ๔ ชั่วโมง ตามลำดับ ปรากฏว่าไม่มีหนอนเปรียบเทียบกับตาย แต่อัตราการตายของหนอนที่ได้รับวัฏภูมิพิษจะคงที่ในชั่วโมงที่สอง อนึ่งนิโคติน เมื่อบริโภคจะประเภท knock down คือจะออกฤทธิ์ต่อหนอนทันที การสังเกตการตายจึงมักทำในระยะสั้น เช่นการทดลองของ Richardson และ Busbey (๑๑) ใช้เวลาสังเกตอัตราการตายของหนอนภายในเวลา ๓๐ นาที แต่จากการทดลองครั้งนี้หนอนที่โช้ทกลองเปรียบเทียบกับตายภายใน ๑๔ ชั่วโมง ดังนั้น ความคลาดเคลื่อนต่ออัตราการตายของหนอนที่ได้รับวัฏภูมิพิษจึงมีน้อยมาก

ข้อเสนอแนะ

๑. ในการสกัดวัตถุมีพิษจากต้นยาสูบที่จะให้ปริมาณสูง ควรจะสกัดจากต้นยาสูบที่มีอายุตั้งแต่ ๕ เดือน และควรจะสกัดจากใบกลางต้น รองลงไปได้แก่ ใบโคนต้น ใบยอดต้น และลำต้น ตามลำดับ

๒. ผลการมีผลต่อปริมาณนิโคตินในยาสูบ ซึ่งจะเห็นได้จากใบยาสูบที่ปลูกตามฤดูกาลจากไร่ยาสูบ (ปลูกราวเดือนกันยายน) ซึ่งการวิจัยให้นำใบยาสูบเหล่านี้ เป็นตัวอย่างในการศึกษาการสกัด ปรากฏว่ามีนิโคตินสูงถึง ๘.๖๐ % แต่การทดลองปลูกยาสูบในเดือนพฤษภาคม มีปริมาณสูงสุดเพียง ๑.๒๗ %

๓. การหาปริมาณวัตถุมีพิษโดยการสกัดด้วยน้ำ จากการกรองด้วยผ้าขาวบางขณะที่บีบกากที่กรอง อาจจะใช้แรงบีบที่ไม่เท่ากัน จึงมีสารละลายที่ไล่ จึงไม่แน่นอน จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีแรงกด (pressure) คงที่

๔. การสกัดด้วยน้ำ ถึงแม้จะมีประสิทธิภาพที่ต่ำกว่าการสกัดโดยวิธีการอื่นๆ ผู้วิจัยเห็นว่า เป็นการสกัดโดยวิธีการที่ประหยัด และไม่ซับซ้อนมากนัก เหมาะสำหรับเกษตรกรจะนำไปใช้กับแหล่งที่ปลูกความต้านทานพิษต่ำ เว้น เคียโนไรโดทีนที่ แต่มิขอเสียอยู่ว่า หากจำเป็นต้องลดปริมาณ เพื่อให้สารละลายที่สกัดได้มีความเข้มข้นมากขึ้น จะต้องใช้อุณหภูมิสูง ซึ่งจะทำให้นิโคตินระเหยได้ง่าย

๕. การสกัดโดยไรต์หัวละลายที่เป็นสารอินทรีย์ เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงและสารละลายที่สกัดได้ สามารถลดปริมาณลงเพื่อให้สารละลายมีความเข้มข้นสูง และตัวทำละลายสามารถกลับมาใช้ในการสกัดได้อีก แต่ขอเสียอยู่ที่ว่า จำเป็นต้องสร้างเครื่องมือที่มีราคาสูง

๖. จากการทดสอบความเป็นพิษของวัตถุมีพิษต่อแมลงที่เป็นศัตรูพืชที่สำคัญ ได้แก่ หนอนก้นกะหล่ำ หนอนหลอกหอม และหนอนใยผัก ปรากฏว่า หนอนใยผักมีความต้านทานวัตถุมีพิษชนิดนี้ต่ำมากคือมีค่า $LD_{50} = ๒.๔๘ \text{ mg/g}$ จึงเหมาะแก่การนำเอาวัตถุมีพิษชนิดนี้ไปใช้ในการกำจัดหนอนใยผักให้พืช

บรรณาธิการ

บรรณานุกรม

- (๑) กองควบคุมวัตถุเพื่อการเกษตร กรมวิชาการเกษตร สถิติการส่งวัตถุดิบเข้ามาในประเทศ
๒๕๑๔ , ๓ หน้า
- (๒) ประยูร กีมา, กร. วัตถุดิบที่ใช้ในการเกษตรและการสาธารณสุข เอกสารทางวิชาการ
ที่ ๑๘ กองส่งเสริมการเกษตร ชุมชนสหกรณ์การเกษตรและการรื้อแห่งประเทศไทย
๒๕๑๓ , ๕๑๓ หน้า
- (๓) Swan, G.A. An Introduction to the Alkaloids St. Paul's
Press Ltd, Malta, 1967, 326 pp.
- (๔) สุนทรี วรณิก "การวิเคราะห์แอลคาลอยด์ในใบยาสูบพันธุ์พื้นเมือง" วารสารสภาวิจัย
แห่งชาติ ๑ ๑ เดือนพฤศจิกายน ๒๕๐๓ .
- (๕) Shepard, H.H, The Chemistry and Toxicology of Insecticides,
1940, pp. 243 - 264 .
- (๖) ถนน มีเนทกุล "ใบยาเมืองกาญวณ" ยาสูบ ๒๔(๔) กรกฎาคม ๒๕๑๖ หน้า
๑๓ - ๒๒ .
- (๗) Fletcher, H.G , Jr. Journal of Chemistry of Education
vol.1^o, 303, 1941
- (๘) Holman, H.J., A Survey of Insecticide Materials of
Vegetable Origin, 1939, pp. 42 - 58 .
- (๙) Paller, M., " Chemistry of Nicotine and Related Alkaloids "
in Tobacco Alkaloids and Related Compounds, vol. 1,
pp. 15 - 36 ,edited by V.S.Vou Euter, Mc Millan,
New York, 1965 .
- (๑๐) Shepard, H.H., The Chemistry and Action of Insecticides,
McGrow - Hill Book co., Inc., 1951, 125 pp.

- (99) Richardson, H H , and Casanges, A.H , "Studies of Nicotine as an Insect Fumicant" in Journal Economic Entomology, 35 . 242 - 246, 1942 .
- (9b) Ward, G.M., " Nicotine - A Product of Tobacco " in Technical Bulletin, 3 , Department of Agriculture, Dominion of Canada, 1941
- (9m) O'Brien, R.D., Insecticides Action and Metabolism, Academic Press, Inc., New York, 2nd. printing, 1969, 332 pp.
- (9c) Metcalf, R.L., Organic Insecticides, Interscience Publishers, Inc., New York, 1955, pp. 9 - 10
- (9d) Kuhn, H. "Tobacco Alkaloid and Their Pyrolysis Products in The Smoke" in Tobacco Alkaloids and Related Compounds, Vol. 4 , pp. 37 - 51 ,
edited by U.S. Von Euler, Pergamon Press Ltd., 1965 .
- (9b) Henry, T.A., The plant Alkaloids, 4th ed.,
J & A Churchill Ltd., London, 1947, pp. 35
- (9e) "Tobacco and Tobacco Products" in Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry, 12 th ed., 1975 , pp. 97 - 98
- (9d) Leo Marion " The Pyridine Alkaloids " in The Alkaloids Chemistry and Physiology, Vol. 1, pp. 167 - 269 ,
edited by Manske, R.H.F., and Holmes, H.L., Academic Press, Inc., New York, 1950

- (9c) Martin Jacobsen and Crosby, D.G., Naturally Occurring Insecticides, Marcel Dekker, Inc., New York, 1971, 535pp.
- (10) Dowson, R.F. and Others., Journal of the American Chemical Society, Vol. 82, 262 , 1960
- (11) Fleeker J. and Byerrum, R.U , Journal of Biological Chemistry, Vol. 240, 4099, 1965. Vol. 242, 3042, 1967
- (12) Jackaniez, T M. and Byerrum, R.U., Journal of Biological Chemistry, Vol. 241, 1296, 1966.
- (13) Yang, K.S and Others, Journal of the American Chemical Society, Vol. 87, 4184, 1965
- (14) Richardson, C.H. and Shepard, H.H. Journal of Agricultural Research, Vol. 41, 337, 1930.
- (15) O'Brien, R.D., Toxic Phosphorous Esters, Academic Press, Inc., New York, 1960 , 330 pp.
- (16) Yang, R.S.H. and Guthrie, F.E. Bulletin of the Entomological Society of America, Vol. 13, 172, 1967.
- (17) Brazzel, J.R. " Second Conference on Test Methods for Resistance in Insect of Agricultural Importance " in Bulletin of the Entomological Society of America, Vol. 16, No 3, September, 1970, pp. 151.