Thesis Title Bioinsecticide Production from Stemona Extract and Its Application in Agricultural Use

Author Mr. Thanapat Sastraruji

Degree Doctor of Philosophy (Environmental Science)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Araya Jatisatienr	Chairperson
Asst. Prof. Dr.Chaiwat Jatisatienr	Member
Lect. Dr. Damrat Supyen	Member

ABSTRACT

Three *Stemona* spp. i.e. *S. curtisii* collected from Trang Province, *Stemona* sp. (unknown 1) collected from Chiang Mai Province and *Stemona* sp. (unknown 2) collected from Phitsanulok Province were studied in order to discover new insecticidal compounds and to develop bioinsecticidal formulation. All of the studied *Stemona* spp. were identified and the voucher specimens of *S. curtisii*, unknown 1 and unknown 2, deposited at the Herbarium of the Department of Biology, Chiang Mai University, were the number 17581, 17582 and 25375, respectively.

The *Stemona* alkaloids were extracted from ethanolic crude of 3 *Stemona* spp., isolated by successive chromatographic techniques, and elucidated by NMR spectral data interpretation and from semisynthetic studies. From *S. curtisii*, three known

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

alkaloids stemocurtisinol, oxyprotostemonine and stemocurtisine were isolated. From unknown 1, two new tuberostemonine alkaloids, tuberostemonine L and tuberostemonine M, and a new stemofoline alkaloid, (3′*S*)-hydroxystemofoline, along with three known alkaloids, neotuberostemonine, (2′*S*)-hydroxystemofoline and stemocurtisine were isolated. From unknown 2, six new stemofoline alkaloids, methylstemofoline, (2′*R*)-hydroxystemofoline, (3′*R*)-stemofolenol, (3′*S*)-stemofolenol, stemofolinoside, and 1′,2′-didehydrostemofoline-*N*-oxide and three known stemofoline alkaloids, (2′*S*)-hydroxystemofoline, (11*Z*)-1′,2′-didehydrostemofoline and (11*E*)-1′,2′-didehydrostemofoline were isolated.

Stemona spp. bioactive compounds were determined by brine shrimp assays. Among crude extracts, *S. curtisii* ethanolic crude had the highest efficiency with the LC_{50} value of 37 ppm while oxyprotostemonine, pure compound from *S. curtisii*, had the highest efficiency among the pure compounds with the LC_{50} value of 18 ppm.

Bioinsecticidal formulation was produced using ethanolic crude of *S. curtisii* as the main content (30%w/w) along with different solvents and other supplement substances i.e. ethanol (30%w/w), methanol (10%w/w), water (10%w/w), pine oil (10%w/w) and Tween 80 (10%w/w).

Efficiency of bioinsecticidal formulation was tested in the laboratory with common cutworm by the leaf disk choice test and the topical application method. For the leaf disk choice test, it showed strong antifeedant activity at 0.015%, while presented repellent activity at higher concentrations above 0.030%. For the topical application method, the percent mortality was 0%, while the chemical pesticide gave the 100% mortality.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The formulation process on a pilot scale was studied to develop and reported. The *Stemona* crude extract, ethanol, methanol, water, pine oil and Tween 80 were put into the formulation machine and stirred until homogenized. The chromatographic pattern (fingerprint) of the formulation produced was established for quality control by using HPTLC quantitative analysis densitometry.

The efficiency of the bioinsecticidal formulation produced in pilot scale was studied on Chinese kale in the field trial of the Department of Agronomy, Chiang Mai University, compared with the control and the chemical pesticide. Evaluation was considered on both quantity and quality of products. Quantity items comprised an analysis of the height, the weight, the number of leaves, and the amount of insects found i.e. leaf eating beetles, diamondback moths, green aphids, cabbage loopers, common cutworms and predators followed by the quality of vegetable were investigated. For the height and the weight of vegetable, the results showed no statistically significant difference. For the number of leaves, bioinsecticide gave the best result. For the number of leaf eating beetles and the quality of vegetable, the results showed no statistically significant difference. Bioinsecticide gave the better result to the number of the diamondback moths, the cabbage loopers and the common cutworms but was no statistically significant difference. Bioinsecticide gave the best result for the number of the predators but was ineffective to the green aphids.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตสารกำจัดแมลงชีวภาพจากสารสกัดหนอนตายหยากและการนำไปใช้ทางการเกษตร

ผู้เขียน นายธนพัฒน์ ศาสตระรุจิ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. อารยา จาติเสถียร	ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. ชัยวัฒน์ จาติเสถียร	กรรมการ
อ. ดร. ดำรัส ทรัพย์เย็น	กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษาหนอนตายหยาก 3 สปีชีส์ ได้แก่ *S. curtisii* จากจังหวัดตรัง หนอนตายหยากไม่ทราบสปีชีส์ 1 (unknown 1) จากจังหวัดเชียงใหม่ และ หนอนตายหยากไม่ทราบสปีชีส์ 2 (unknown 2) จากจังหวัดพิษณุโลก เพื่อค้นหาสารประกอบที่มีคุณสมบัติเป็นสารกำจัดแมลงชนิดใหม่และเพื่อพัฒนาสูตรสารกำจัดแมลงชีวภาพ หนอนตายหยากทั้ง 3 สปีชีส์ได้รับการพิสูจน์เอกลักษณ์ และหลักฐานตัวอย่างพืชของหนอนตายหยากพันธุ์ *S. curtisii* หมายเลข 17581 unknown 1 หมายเลข 17582 และ unknown 2 หมายเลข 25375 ได้ถูกแสดงไว้ที่หอพรรณไม้ ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สารอัลคาลอยด์ถูกสกัดจากสารสกัดหยาบซึ่งได้จากการสกัดหนอนตายหยากทั้ง 3 สปีชีส์ ด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ สารอัลคาลอยด์ดังกล่าวจึงถูกสกัดแยกออกเป็นสารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี จากนั้นจึงทำการพิสูจน์โครงสร้างด้วยข้อมูล NMR และ การสังเคราะห์บางส่วนของโมเลกุล ใน *S. curtisii* พบสารอัลคาลอยด์ที่ได้เคยค้นพบแล้วได้แก่ stemocurtisinol oxyprotostemonine และ stemocurtisine ใน unknown 1 พบสารอัลคาลอยด์ใหม่ 3 ชนิด ได้แก่ tuberostemonine L, tuberostemonine M และ (3′*S*)-hydroxystemofoline นอกจากนั้นยังพบสารอัลคาลอยด์ที่ได้เคยค้นพบแล้วได้แก่ neotuberostemonine, (2′*S*)-hydroxystemofoline และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

stemocurtisine ใน unknown 2 พบสารอัลคาลอยด์ใหม่ 6 ชนิด ได้แก่ methylstemofoline, (2′*R*)-hydroxystemofoline, (3′*R*)-stemofolenol, (3′*S*)-stemofolenol, stemofolinoside และ 1′,2′-didehydrostemofoline-*N*-oxide นอกจากนั้นยังพบสารอัลคาลอยด์ที่ได้เคยค้นพบแล้วได้แก่ (2′*S*)-hydroxystemofoline, (11*Z*)-1′,2′-didehydrostemofoline และ (11*E*)-1′,2′-didehydrostemofoline

การตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทำโดยใช้วิธี brine shrimp assays จากการทดลองพบว่าเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างสารสกัดหยาบด้วยกันแล้วสารสกัดหยาบจาก *S. curtisii* มีประสิทธิภาพในการเป็นสารออกฤทธิ์สูงที่สุด (LC_{50} 37 ppm) ในขณะที่สารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพในการเป็นสารออกฤทธิ์สูงสุดได้แก่ oxyprotostemonine (LC_{50} 18 ppm)

สูตรสารกำจัดแมลงชีวภาพถูกผลิตขึ้นโดยใช้สารสกัดหยาบจากหนอนตายหยากพันธุ์ *S. curtisii* (30%w/w) เป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนั้นยังมีการใช้สารละลายและสารปรุงแต่งซึ่งประกอบด้วย เอธิลแอลกอฮอล์ (30%w/w) เมธิลแอลกอฮอล์ (10%w/w) น้ำ (10%w/w) น้ำมันสน (10%w/w) และ Tween 80 (10%w/w)

ประสิทธิภาพของสูตรสารกำจัดแมลงชีวภาพได้รับการทดสอบบนหนอนกระทู้โดยใช้วิธี leaf disk choice และ topical application สำหรับวิธี leaf disk choice พบว่ามีคุณสมบัติเป็น strong antifeedant ที่ความเข้มข้น 0.015 เปอร์เซ็นต์ และยังมีคุณสมบัติเป็น repellent ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.030 เปอร์เซ็นต์ สำหรับวิธี topical application เปอร์เซ็นต์การตาย มีค่าเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เปอร์เซ็นต์การตายเมื่อทดสอบด้วยสารเคมีกำจัดแมลงเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

กระบวนการผลิตสารกำจัดแมลงชีวภาพในระดับโรงงานสาธิตได้รับการศึกษาและรายงานรูปแบบทางโครมาโทกราฟี (fingerprint) ของสารกำจัดแมลงชีวภาพจากเทคนิค HPTLC ถูกใช้สำหรับควบคุมคุณภาพการผลิต

ประสิทธิภาพของสูตรสารกำจัดแมลงชีวภาพที่ผลิตได้ในระดับโรงงานสาธิต ได้รับการทดสอบในแปลงทดลองผักคะน้า ภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองที่ใช้สารเคมีกำจัดแมลง และ กลุ่มควบคุมที่ใช้น้ำ การประเมินผลใช้ข้อมูลทางด้านคุณภาพและปริมาณของผลิตผล การประเมินผลทางปริมาณประกอบด้วย ความสูง น้ำหนัก จำนวนใบพืช จำนวนศัตรูพืช ได้แก่ ด้วงหมัดผัก หนอนใยผัก เพลี้ยอ่อน หนอนคืบ และ หนอนกระทู้ และจำนวนแมลงศัตรูพืช การประเมินผลทางด้านคุณภาพพิจารณาจากคุณภาพของผลผลิต สำหรับความสูงและน้ำหนักของผลิตผลไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างวิธีทดลอง สำหรับจำนวนใบของผลิตผลพบว่าสารกำจัดแมลงชีวภาพให้ผลดีที่สุด สำหรับผลของปริมาณ หนอนใยผัก หนอนคืบ และ หนอนกระทู้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างวิธีทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากนั้นสารกำจัดแมลงชีวภาพยังให้ผลที่ดีต่อปริมาณแมลงศัตรูพืช แต่ไม่มีประสิทธิภาพต่อเพลี้ยอ่อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved