ผลกึ่งเรื้อรังของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย *Azadirachta indica var. siamensis* Valeton ต่อตับและเลือดของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* Weighmann,1835

นางสาวพัชราณี ฟักทองพรรณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-0803-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SUBCHRONIC EFFECTS OF THAI NEEM *Azadirachta indica var.siamensis* Valeton SEED EXTRACT ON LIVER AND BLOOD OF TIGER FROG *Hoplobatrachus rugulosus* Weighmann,1835

Miss Pachranee Fagtongpan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Zoology

Department of Biology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-0803-1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลกึ่งเรื้อรังของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย *Azadirachta indica var. siamensis* Valeton ต่อตับและเลือดของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* Weighmann,1835
โดย	นางสาวพัชราณี ฟักทองพรรณ
ภาควิชา	ชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชนี สิงห์อาษา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ศาสตรจารย์ ดร.สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชนี สิงห์อาษา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ผุสตี ปริยานนท์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พัชราณี ฟักทองพรรณ : ผลกึ่งเรื้อรังของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย *Azadirachta indica var. siamensis* Valeton ต่อตับและเลือดของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* Weighmann,1835 (SUBCHRONIC EFFECTS OF THAI NEEM *Azadirachta indica var.siamensis* Valeton SEED EXTRACT ON LIVER AND BLOOD OF TIGER FROG *Hoplobatrachus rugulosus* Weighmann,1835) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.พัชนี สิงห์อาษา อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ, 128 หน้า. ISBN 974-03-0803-1

สารAzadirachtinจากเมล็ดสะเดามีผลกระทบต่อแมลง ปลา และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้คือศึกษาผลกึ่งเรื้อรังของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยหรือ สะเดาไทย 111 ที่มีต่อตับและเลือดของกบนา เริ่มจากนำลูกอ๊อดกบนาอายุ 2 สัปดาห์มาทดลองหาค่าความเป็นพิษเฉียบพลันที่ 96 ชั่วโมง โดยใช้วิธี static bioassay ได้ค่า 298.26 ppm. แล้วคำนวณหาความเข้มข้นที่จะใช้ศึกษาผลกึ่งเรื้อรังของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยเป็นเวลา 18 สัปดาห์ ได้เท่ากับ 49.66 ppm. ทุก 4 สัปดาห์จะทำการสุ่มตัวอย่างกบจำนวน 30 ตัว เพื่อศึกษาน้ำหนักตับ การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับ และองค์ประกอบของเลือด รวมทั้งระดับเอนไซม์ SGOT , SGPT

ผลการศึกษาพบว่ามีการเพิ่มของ % Relative liver weight ($p \leq 0.05$) ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงของตับ คือ เยื่อหุ้มตับหนาและอักเสบ มีการขยายตัวของช่องไซนูซอยด์ที่มีเลือดคั่งภายใน พบเซลล์ตับที่มีนิวเคลียสผิดปกติ และมีการตายของเซลล์ตับ ความเป็นพิษที่เกิดกับตับแสดงด้วยระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT ที่เพิ่มสูงขึ้น ($p \leq 0.05$) ส่วนผลการศึกษาเลือดพบว่ามีการเพิ่มของจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด จำนวนเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบิน และ ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น นอกจากนี้จำนวนเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดยังแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สรุปได้ว่าสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยมีผลกึ่งเรื้อรังต่อตับและเลือดของกบนาโดยความรุนแรงแปรตามระยะเวลาที่ได้รับสาร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต……..
สาขาวิชา สัตววิทยา	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา……....
ปีการศึกษา 2544	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม……..

4372346423 : MAJOR ZOOLOGY
KEY WORD: AZADIRACHTIN / SUBCHRONIC EFFECT / TIGER FROG / SGOT / SGPT

PACHRANEE FAGTONGPAN : SUBCHRONIC EFFECTS OF THAI NEEM *Azadirachta indica var.siamensis* Valeton SEED EXTRACT ON LIVER AND BLOOD OF TIGER FROG *Hoplobatrachus rugulosus* Weighmann,1835 THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. PATCHANEE SINGH-ASA, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. KINGKAEW WATTANASIRMKIT, Ph.D. 128 pp.
ISBN 974-03-0803-1

Azadirachtin from Neem seed has adverse effects on insects, fish and mammals. Aim of this study was to observe the subchronic effects of Thai Neem (*Azadirachta indica var.siamensis*) seed extract "Sadao-thai 111®" on liver and blood of Tiger frog (*Hoplobatrachus rugulosus*) .The experiment was conducted on 2 weeks old Tiger frogs to determine the median of lethal concentration (96-hr LC_{50}) for acute toxicity using static bioassay. The 298.26 ppm of LC_{50} of the extract and the calculated 49.66 ppm. of sublethal concentration were used to treat the Tiger frogs for 18 weeks for subchronic toxicity test. The frogs were randomly selected (n=30) every 4 weeks to study liver weight, histological changes of liver tissue, blood parameters, SGOT and SGPT levels.

The result showed that there was increment of the percentage relative liver weight ($p \leq 0.05$) with histological changes of liver tissue comprising the thickening of capsules, white blood cell infiltration, sinusoid dilatation and blood congestion, hemorrhages, cell with abnormal nucleus and cell necrosis. Hepatotoxicity was also presented by the increase of SGOT and SGPT levels ($p \leq 0.05$). The increase in number of total leucocyte, red blood cells,hemoglobin and %hematocrit ($p \leq 0.05$) was observed. Furthermore, the number of lymphocyte, monocyte, neutrophil, basophil and eosinophil were different from those of controls ($p \leq 0.05$). In conclusion, Thai Neem seed extract caused time-dependent subchronic toxicity effects, on liver and blood of Tiger frogs.

Department BIOLOGY Student's signature .....
Field of study ZOOLOGY Advisor'ssignature.....
Academic year 2001 Co-advisor's signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชนี สิงห์อาษาและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ สำหรับคำแนะนำ ข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ ประธานการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธีรวรรณ นุตประพันธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ผุสตี ปริยานนท์ และรองศาสตราจารย์ ดร.กำธร ธีรคุปต์ สำหรับคำแนะนำและข้อคิดต่างๆในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณโรงเรียนราชินีและราชินีมูลนิธิที่ให้ทุนการศึกษาและให้โอกาสในการศึกษา ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย สำหรับทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณสำหรับความช่วยเหลือและคำปรึกษาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ ลีลาภรณ์ คณะแพทย์ศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

ขอบขอบพระคุณ คุณอารมย์ แสงวนิชย์ ผู้อำนวยการสำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตสารธรรมชาติทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร สำหรับความอนุเคราะห์ในการตรวจหาสารออกฤทธิ์จากสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ รวมทั้งข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ ดร.สุริยา สาสนรักกิจ ฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย สำหรับคำแนะนำและข้อมูลต่างๆที่จำเป็นในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณมนตรี และคุณสมพร คำพร เจ้าของฟาร์มกบ อำเภอวังน้อย จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ที่อนุเคราะห์ในเรื่องสัตว์ทดลองตลอดการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณสัมพันธ์ สุวรรณรัตน์ คุณบุญช่วย สุขเฉลิมศรี คุณยุพิน ชุดไธสง คุณอัจฉริยา ไชยรัตน์ และคุณวรากรณ์ ชีวโศภิษฐ์ สำหรับความช่วยเหลือระหว่างทำวิจัยในห้องปฏิบัติการ

และสุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยาและอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีววิทยา ไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญภาพ.....ฌ
บทที่1 บทนำ..... 1
บทที่ 2 บทสอบสวนเอกสาร..... 6
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง..... 33
บทที่4 ผลการทดลอง..... 41
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง.....84
บทที่ 6 สรุปผลและข้อเสนอแนะ..... 89
รายการอ้างอิง..... 90
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก..... 98
ภาคผนวก ข..... 101
ภาคผนวก ค..... 103
ภาคผนวก ง..... 114
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 128

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

2.1 แสดงการเปรียบเทียบพืชสกุลสะเดาในประเทศไทย..... 7

4.1 แสดงค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน LC_{50} ของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ที่มีผลต่อการตายของกบนา.....41

4.2 แสดงค่าน้ำหนักตัว น้ำหนักตับ และ % Relative liver weight (%R) ของกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 6-18 สัปดาห์ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน).....52

4.3 แสดงระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT (IU/l)ในเลือดกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 10 -18 สัปดาห์ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน).....53

4.4 แสดงส่วนประกอบของเลือด (Haematological parameter) กบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 10 -18 สัปดาห์ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)..... 54

4.5 แสดงเปอร์เซนต์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดในกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 10 -18 สัปดาห์ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน).....55

4.6 แสดงจำนวนกบนาที่มีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับในลักษณะต่างๆภายหลังที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 6-18 สัปดาห์....63

4.7 แสดงผลของความรุนแรงในการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 6-18 สัปดาห์.... 65

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ หน้า

2.1 ลักษณะของสะเดาไทย (*Azadirachta indica var. siamensis* Valeton)…….8.

2.2 แสดงสูตรโครงสร้างเคมีของ Azadirachtin ……..10

2.3 แผนภูมิการสกัดสารออกฤทธิ์กำจัดแมลงจากเมล็ดสะเดา ……..12

2.4 แสดงลักษณะภายนอกของกบ ……..20

2.5 แสดงวงจรชีวิตของกบนา ……..21.

2.6 แผนภาพแสดงขบวนการดูดซึม การกระจายตัวและการขับถ่ายสารพิษออกจากร่างกาย…23

2.7 แสดงการทำงานของเอนไซม์ transminase ……..31

3.1 ลูกอ๊อดกบนาอายุ 2 สัปดาห์ ……33

3.2 สารสกัดเมล็ดสะเดาไทยหรือสะเดาไทย 111 ชนิดน้ำเข้มข้น …….. 34

4.1 กราฟแสดงค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน LC_{50} ของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยต่อกบนา …… 42

4.2 กราฟแสดงเปอร์เซนต์การอยู่รอดของกบนากับค่าความเข้มข้น (ppm.) ของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ในช่วงเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง……43

4.3 แผนภูมิแสดง % Relative liver weight ของกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 6-18 สัปดาห์ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)……..56

4.4 แผนภูมิแสดงระดับเอนไซม์ SGOT ในเลือดกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 10 -18 สัปดาห์ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)……57

4.5 แผนภูมิแสดงระดับเอนไซม์ SGPT ในเลือดกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 10 -18 สัปดาห์ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)……58

4.6 แผนภูมิแสดงปริมาณเม็ดเลือดแดงของกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 10 -18 สัปดาห์ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)……..59

4.7 แผนภูมิแสดงค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 10-18 สัปดาห์ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)……60

รูปที่ หน้า

4.8 แผนภูมิแสดงปริมาณฮีโมโกลบินของกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย
ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 10 -18 สัปดาห์
(ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)..... 61
4.9 แผนภูมิแสดงปริมาณเม็ดเลือดขาวของกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย
ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 10.-18 สัปดาห์
(ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน).....62
4.10 ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มควบคุม เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์.....66
4.11-4.13 ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย
ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์.....67
4.14 ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มควบคุม เป็นเวลานาน 10 สัปดาห์..... 70
4.15-4.18 ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย
ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นเวลานาน 10 สัปดาห์..... 71
4.19 ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มควบคุม เป็นเวลานาน 14 สัปดาห์.....75
4.20 – 4.21 ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย
ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นเวลานาน 14 สัปดาห์.....76
4.22 ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มควบคุม เป็นเวลานาน 18 สัปดาห์..... 78
4.23-4.25 ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย
ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นเวลานาน 18 สัปดาห์..... 79
4.26 ภาพแสดงเม็ดเลือดกบ ประกอบด้วยเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว.....82
4.27 ภาพแสดงเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆและ thrombocyte ของกบนา.....83

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันมลภาวะที่เกิดกับสิ่งแวดล้อมเป็นปัญหาระดับโลกที่หลายฝ่ายเร่งดำเนินการแก้ไขอย่างเร่งด่วน เป็นที่ทราบกันดีว่าสารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้ในการกำจัดศัตรูพืชก่อให้เกิดมลภาวะเป็นอย่างยิ่ง สำหรับประเทศไทยมีการใช้สารเคมีป้องกันและกำจัดศัตรูพืชในปริมาณมาก สารกำจัดแมลงเป็นสารกลุ่มหนึ่งในสารป้องกันและกำจัดศัตรูพืชที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ในปี พ.ศ. 2538 มีการนำเข้าของสารฆ่าแมลงปริมาณ 10,560 ตัน ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าปี 2537 ถึง 37% (ข้อมูลจากกรมวิชาการเกษตร) และมีแนวโน้มที่สูงขึ้นเรื่อยๆ สารฆ่าแมลงที่ใช้กันอย่างแพร่หลายมีมากกว่า 1,000 ชนิด สารเหล่านี้มิได้มีอันตรายต่อแมลงเท่านั้น แต่ยังมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้การใช้สารเคมีฆ่าแมลงต่อเนื่องเป็นเวลานาน ประสิทธิภาพในการทำลายแมลงศัตรูพืชกลับลดลง เพราะแมลงสามารถพัฒนาสร้างความต้านทานขึ้นมาได้ ทำให้เกษตรกรต้องเปลี่ยนชนิดของสารเคมีที่ใช้ฆ่าแมลงหรือเพิ่มความเข้มข้นให้สูงขึ้น หรือใช้บ่อยครั้งขึ้น ซึ่งมีผลให้เกิดอันตรายต่อผู้ใช้ ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม รวมทั้งเพิ่มต้นทุนการผลิต (พงศ์เทพ อันตะริกานนท์ และคณะ, 2541) แนวทางหนึ่งที่จะลดการใช้สารเคมีทางการเกษตร คือ ใช้พืชที่มีคุณสมบัติในการกำจัดศัตรูพืช ซึ่งจากการตรวจสอบเอกสารทางวิชาการพบว่าประเทศไทยมีพรรณพืชหลายชนิดที่มีสมบัติดังกล่าว และสะเดาไทยก็เป็นหนึ่งในพืชที่มีสารกำจัดแมลง

สะเดาไทย *Azadirachta indica var.siamensis* Valeton จัดอยู่ในวงศ์ Meliaceae เป็นพืชสมุนไพรที่มีความสำคัญทางการแพทย์ และมีสมบัติในการป้องกันกำจัดแมลง เป็นพืชที่ขึ้นทั่วไปในประเทศไทย สามารถนำส่วนต่างๆมาใช้ประโยชน์ได้ สารอินทรีย์ที่สกัดได้จากส่วนต่างๆ ของสะเดา ได้แก่ ใบ เปลือก ลำต้น เนื้อผล และเมล็ด มีมากกว่า 60 ชนิด พบว่าส่วนของเมล็ดสะเดามีสารอินทรีย์อยู่มากที่สุด ใบและเมล็ดสะเดาเป็นส่วนที่ได้รับความสนใจมากในการนำไปใช้เป็นยาฆ่าแมลง ต่อมาพบว่าส่วนของเมล็ดจะออกฤทธิ์ดีที่สุด (พงศ์เทพ อันตะริกานนท์ และคณะ, 2541) โดยในเมล็ดพบสาร azadirachtin A, azadirachtin B และ 1– tigloyl-3-acetyl azadirachtol นอกจากนี้ยังพบสาร tertratriterpenoids ตัวอื่น คือ salannin, nimbin และกรดไขมันอีกหลายชนิด (อารมณ์ แสงวนิชย์, 2541)

สารออกฤทธิ์ที่มีผลในการกำจัดศัตรูพืชที่สำคัญ คือ azadirachtin A อยู่ในเนื้อเมล็ด (seed kernal) ในสะเดา 3 สายพันธุ์ พบว่า สะเดาอินเดียให้ปริมาณสาร azadirachtin A สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ (4.7-7.8 มก./กรัม เนื้อในเมล็ด) สะเดาไทยให้สาร azadirachtin A 0.5-4.6 มก./กรัม เนื้อในเมล็ด Azadirachtin แยกได้ครั้งแรกจากเมล็ดสะเดาไทยโดย Morgan ในปี ค.ศ.1967 ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีทางโครมาโตกราฟีและการตกผลึก ได้เป็นผลึกสีขาว มีสูตรโมเลกุล $C_{35}H_{34}O_{16}$

สาร Azadirachtin มีผลต่อแมลงในทุกระยะของแมลง แต่ระยะตัวหนอนหรือตัวอ่อนจะอ่อนแอที่สุด สาร Azadirachtin มีสูตรโครงสร้างคล้าย molting hormone (ecdysone) ซึ่งมีผลยับยั้งการสร้างและการทำงานของฮอร์โมน ทำให้หนอนหรือตัวอ่อนไม่สามารถลอกคราบได้ สารสกัดสะเดาไม่ทำให้แมลงตายทันทีเหมือนกับสารฆ่าแมลงสังเคราะห์ แต่จะเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมหรือขบวนการดำรงชีวิตของแมลง ทำให้แมลงหยุดกินอาหารหรือลดการขยายพันธุ์

การใช้สารสกัดสะเดาในการป้องกันและกำจัดแมลงเริ่มมีการศึกษาอย่างจริงจังครั้งแรกในประเทศอินเดียเมื่อปีพ.ศ. 2503 และต่อมาในปี พ.ศ. 2513 ในเยอรมัน และ พ.ศ. 2518 ในสหรัฐอเมริกา (Schmutterer, 1980) สารสกัดสะเดามีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันและกำจัดแมลงหลายชนิด โดยมีรายงานจาก Schmutterer (1980), Sombatsiri และ Tigavattanont (1984) ว่าสารสกัดสะเดาสามารถป้องกันและกำจัดแมลงในอันดับ Coleoptera ได้ 20 ชนิด แมลงอันดับ Lepidoptera 25 ชนิด และอันดับ Orthoptera 5 ชนิด นอกจากนั้นยังสามารถป้องกันและกำจัดแมลงในอันดับ Homoptera,Hemiptera และDipteraได้อีกด้วย (อ้างโดย พงศ์เทพ อันตะริกานนท์ และคณะ, 2541)

ถึงแม้จะมีการสนับสนุนให้ใช้สารสกัดสะเดาในการกำจัดศัตรูพืช โดยอ้างเหตุผลว่าความปลอดภัยมากกว่าสารเคมีสังเคราะห์ ในแง่ที่ความเป็นพิษน้อยกว่า ไม่มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นและสิ่งแวดล้อม แต่ก็มีรายงานถึงพิษและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมของสารสะเดาดังต่อไปนี้

พิษต่อสัตว์น้ำมีรายงานเกี่ยวกับการทดสอบพิษของสารสกัดสะเดาเครื่องหมายการค้า Margan-O ถึงค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง ในปลา rainbow trout เท่ากับ 8.8 มิลลิลิตร/ลิตร และการทดลองในห้องปฏิบัติการกับสารสกัดสะเดา AZT-VR-K® พบว่าปลาน้ำจืดขนาดเล็กชื่อ guppies (*Lebistes reticulatus*) สามารถทนทานความเข้มข้นได้ถึง 1,000 ppm. ในฟิลิปปินส์มีรายงานว่าน้ำมันสะเดา (neem oil) ไม่มีอันตรายต่อปลา *Misgurus anguillicaudatus* ส่วนการทดสอบพิษในลูกปลานิล*Orechromis niloticus* ความยาวไม่เกิน 4 นิ้ว ด้วยสารสะเดา NSKE®,

น้ำมันสะเดา 50%EC และ Endosulfan 40 และ 80% พบว่าปลานิลตาย 100%ใน Endosulfan ในขณะที่ตาย 20% ใน NSKE® และในปลาคาร์ฟ *Cyprinus carpio* และปลานิลได้ค่าความเป็นพิษของน้ำมันสะเดาที่ 24 ชั่วโมงมีค่า LC_{50} 1,124.6 และ 302.7 ppm. ตามลำดับ (Jacobson, 1995) แต่ทั้ง น้ำมันสะเดา 50%EC และ NSKE®10% ในระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 0.1% กลับไม่มีผลต่อสัตว์ที่เป็นผู้ล่าอย่างคางคก *Bufo sp*. แต่ในสหรัฐอเมริกามีรายงานการทดลองใช้สารสกัดสะเดา เครื่องหมายการค้า Neem Away® กับการเจริญของลูกกบ African Clawed Frog ที่ความเข้มข้น 2, 4, 7 ppm. พบว่ามีการเกิดรูปร่างผิดปกติ (malformation) ขึ้นในกลุ่มทดลอง (McCormick, 1999)

Tangtong และ Wattanasirmkit (1998) รายงานถึงผลของสารสกัดเมล็ดสะเดาอินเดียต่อเลือดของปลานิล*Orechromis niloticus* โดยใช้สารสกัดจากเมล็ดสะเดาอินเดียความเข้มข้นต่ำ 25.07 มิลลิกรัม/ลิตรเป็นเวลานาน 7 เดือน พบว่าปลากลุ่มทดลองมีความผิดปกติของเลือด โดยที่ปริมาณเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณเม็ดเลือดแดงลดลง บ่งบอกถึงภาวะของโรคโลหิตจาง และเกิดความผิดปกติทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดแดง ส่วนผลทางชีวเคมีของเลือดแสดงให้เห็นถึงความผิดปกติของตับและจากรายงานการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับปลานิลที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาอินเดียความเข้มข้น 10.41 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลานาน 5 เดือน พบว่าสารสกัดเมล็ดสะเดาอินเดียก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อตับ โดยที่ความรุนแรงจะเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดา (Janart และ Wattanasirmkit, 1997)และยังมีรายงานถึงผลต่อระบบสืบพันธุ์ของปลานิลโดย Srijunngam และ Wattanasirmkit (1998) เมื่อใช้สารทดสอบชนิดและความเข้มข้นเดียวกับ Tangtong และ Wattanasirmkit (1998) พบว่าทำให้เกิดความเสียหายต่อระบบสืบพันธุ์ของปลานิล โดยไปรบกวนการเจริญของรังไข่และทำให้ปริมาณการวางไข่ลดลง

Schmutterer (1995) ให้ข้อสรุปเกี่ยวกับการใช้สารสกัดสะเดาว่าสารนี้ในปริมาณความเข้มข้นสูงเป็นอันตรายต่อลูกปลาและปลาขนาดเล็กและยังมีผลลดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของ Blue green algae จึงควรหลีกเลี่ยงการใช้สารสกัดสะเดาใกล้แหล่งน้ำ

นอกจากนี้ยังมีรายงานความเป็นพิษของสะเดาในสัตว์ปีก คือไก่ Brown hisex อายุ 7-35 วันกินอาหารผสมใบสะเดา 2% และ 5% นาน 2 สัปดาห์ มีผลทำให้ไก่กินอาหารได้น้อยลง น้ำหนักลดลง นอกจากนี้ยังมีผลต่อตับและไต มีอาการของโลหิตจาง ระดับโปรตีนในซีรั่มลดลง ในขณะที่ระดับเอนไซม์ SGOT, Alkaline phosphatase และ Lactic dehydrogenase เพิ่มสูงขึ้น

(Larson, 1989) Sadagopan และคณะ (1981) สรุปว่าสะเดาไม่เหมาะที่จะใช้เป็นอาหารไก่ เนื่องจากมีผลต่ออวัยวะภายใน ถึงแม้จะให้กินในระดับความเข้มข้นต่ำเพียง 2.5% ก็ยังทำให้เกิดความผิดปกติต่อตับ ไต ม้าม ลำไส้ และในบางกรณียังมีผลต่อหัวใจด้วย

สำหรับความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม Jacobson (1995) กล่าวว่าสะเดามีพิษต่อสัตว์มีกระดูกสันหลังบางชนิด รวมทั้งหนูและคน โดยเฉพาะในเด็ก การที่กินผลสุกของสะเดาหรือการกินใบอ่อนของสะเดาในอาฟริกา การนำใบสะเดามาชงดื่มแบบใบชาในอินเดีย มีรายงานว่าถ้าได้รับในปริมาณมากเกินไปจะทำให้มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย เด็กอ่อนในมาเลเซียที่กินน้ำมันสะเดา 5 มิลลิลิตร เกิดอาการอาเจียน มีภาวะโลหิตเป็นกรด และยังพบว่าน้ำมันสะเดามีผลชักนำให้เกิดอาการ Reye's syndrome นอกจากนี้ยังตรวจพบสาร Aflatoxin B และ G ซึ่งอาจมีผลทำให้เกิดมะเร็งตับอีกด้วย และมีรายงานว่าสารสกัดเมล็ดสะเดาทำให้เกิดการผ่าเหล่าในแบคทีเรีย strains TA 98 และ TA 100 *Salmonella typhimurium*

Akah และ Onuogu (1991) ศึกษาพิษของสารสกัดใบสะเดาที่มีต่อตับกระต่าย พบว่าในกระต่ายที่กินใบสะเดา 2,328 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีอาการผิดปกติที่ตับโดยที่ระดับเอนไซม์ SGPT SGOT และ ALP เพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับผลทางจุลพยาธิวิทยาที่พบการตายของเซลล์ตับ และมีจำนวนท่อน้ำดีเพิ่มขึ้น

ถึงแม้จะมีรายงานว่าสาร Azadirachtin ในสะเดาไม่มีผลต่อสิ่งแวดล้อม ไม่มีความเป็นพิษต่อแมงมุม ไส้เดือนดิน รวมทั้งแมลงที่ช่วยผสมเกสร เช่น ผึ้ง ผีเสื้อ และ แมงมุม แต่จากรายงานของนักวิจัยหลายกลุ่มชี้ให้เห็นว่าสาร Azadirachtin ในสะเดาก็ยังมีพิษหลายอย่างต่อสัตว์น้ำและสัตว์เลือดอุ่น โดยเฉพาะการใช้สารนี้ใกล้แหล่งน้ำย่อมมีอันตรายต่อสัตว์น้ำ และในขณะนี้ในประเทศไทยมีการใช้สารสกัดสะเดากำจัดศัตรูพืชอย่างแพร่หลาย และสารสะเดาก็มีโอกาสที่จะลงไปในแหล่งน้ำธรรมชาติหรือบ่อเลี้ยงปลา บ่อเลี้ยงกบ บ่อเลี้ยงกุ้ง ซึ่งมักอยู่ในบริเวณเดียวกันในแหล่งเกษตรกรรม ทำให้เกิดพิษต่อสัตว์น้ำเหล่านี้ทั้งที่อยู่ในสภาพธรรมชาติและในบ่อของเกษตรกรเอง โดยเฉพาะกบซึ่งเป็นสัตว์ที่คนนิยมบริโภคมาช้านาน เป็นอาหารโปรตีนที่ในอดีตสามารถหาได้ไม่ยากเนื่องจากอาหารของกบมีอยู่อย่างเพียงพอและสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ของกบ แต่ในปัจจุบันสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปมาก ส่งผลให้ปริมาณกบในธรรมชาติลดลง ในขณะที่ความต้องการบริโภคกบมีเพิ่มขึ้น ทำให้กบกลายเป็นอาหารที่มีราคาแพง (พงษ์พันธ์ อินทราวัฒน์, 2539) เนื่องจากกบเป็นสัตว์ที่ผิวหนังบอบบาง มีไข่ที่ไม่มีเครื่องป้องกันอันตราย และกบยังอาศัยอยู่ทั่วไปทั้งบนบกและในน้ำ ทำให้กบสามารถรับ

สารพิษได้ง่าย จึงเป็นเสมือนตัวชี้คุณภาพของสิ่งแวดล้อม (Netting, 2000) เพราะฉะนั้นกบนาในแหล่งเกษตรกรรมจึงมีโอกาสได้รับสาร Azadirachtin ในผลิตภัณฑ์สะเดาที่เกษตรกรนิยมใช้ในปัจจุบัน จึงเกิดความสนใจที่จะทำการศึกษาผลของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย หรือสะเดาไทย111 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สะเดาชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในประเทศไทยขณะนี้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาค่ามัธยฐานความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันที่ 96 ชั่วโมงของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยที่มีต่อกบนา
2. เพื่อศึกษาผลกึ่งเรื้อรังของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยที่มีต่อตับและเลือดของกบนา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบค่าความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยในกบนา เพื่อใช้ในการศึกษาพิษตกค้างที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ
2. ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดกับเนื้อเยื่อตับและเลือดของกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยความเข้มข้นต่ำ เป็นระยะเวลา 18 สัปดาห์ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาการใช้สารสกัดเมล็ดสะเดาไทยอย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อสัตว์น้ำในบริเวณที่ทำการเกษตรแบบผสมผสาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

บทสอบสวนเอกสาร

สะเดาไทย

สะเดาไทยเป็นพืชยืนต้นตระกูลเดียวกับมะฮอกกานี Brummit และคณะ (1993) และ Lymann(1959) ได้จัดสะเดาไทยอยู่ใน

Family : Meliaceae

Genus : *Azadirachta*

Species : *Azadirachta indica* A. Juss

Variety : *Azadirachta indica var. siamensis* Valeton

ชื่อสามัญ: Thai neem

ชื่อไทย : สะเดาไทย สะเลี่ยม (ภาคเหนือ) และ กะเดา (ภาคใต้) (Sombatsiri, 1995)

จากรายงานพันธุ์ไม้สกุลสะเดาในประเทศไทย พบว่ามีชื่อสกุลเดียวกันอยู่ 3 ชนิด ได้แก่

- สะเดาอินเดีย (*Azadirachta indica* A. Juss)
- สะเดาช้างหรือสะเดาเทียม (*Azadirachta excelsa* Jack)
- สะเดาไทย (*Azadirachta indica var. siamensis* Valeton)

เมื่อกล่าวถึงสะเดา นักวิทยาศาสตร์ชาวต่างชาติจะหมายถึงสะเดาอินเดีย ชื่อสกุล *Azadirachta* มาจากภาษาเปอร์เซียว่า Azal-darakht-I-hindi แปลว่า ต้นไม้ที่ไม่มีแมลงทำลายของอินเดีย (พงศ์เทพ อันตะริกานนท์ และคณะ, 2541)

ลักษณะทางชีววิทยา

สะเดาไทยเป็นไม้ยืนต้นผลัดใบขนาดกลาง ความสูง 15-20 เมตร แตกกิ่งก้านที่เรือนยอด ลำต้นตรง เปลือกไม้หนาสีเทาและเมื่ออายุมากจะแตกเป็นร่องตามยาว ใบสีเขียวเข้มความยาวมากที่สุดที่วัดได้ 45 เซนติเมตร ขอบใบหยักเล็กน้อย ก้านใบสั้น ดอกสีขาวนวล มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ออกดอกใน ช่วงเดือนธันวาคม- มกราคม ผลของสะดาไทยสุกประมาณเดือนเมษายน-พฤษภาคม ใบอ่อนและช่อดอกของสะเดาไทยสามารถนำมารับประทานเป็นผักได้ (Sombatsiri และคณะ, 1995)

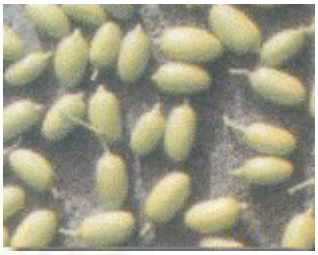
ตารางที่ 2.1 แสดงการเปรียบเทียบพืชสกุลสะเดาในประเทศไทย

ข้อเปรียบเทียบ	สะเดาไทย	สะเดาอินเดีย	สะเดาเทียม
1. การเจริญเติบโตและสภาพภูมิอากาศ	ปานกลางและทนความแห้งแล้ง	โตช้าและทนความแห้งแล้ง	โตเร็วและต้องการชุ่มชื้น
2. แหล่งปลูกที่สำคัญ	พบทั่วทุกภาคของไทย (ยกเว้นภาคใต้) ตั้งแต่สุราษฎร์ธานีลงไป มีการปลูกน้อย	พบบางจังหวัด เช่น ชลบุรี สกลนคร	พบมากทางภาคใต้ตั้งแต่ชุมพรลงไป
3. ฤดูออกดอกติดผลและผลสุก	ช่วงกลางเดือนธันวาคมถึงเมษายนของปีถัดไป	หมุนเวียนตลอดปี	ช่วงเดือนธันวาคมถึงเมษายนของปีถัดไป
4. ขนาดเมล็ดและปริมาณติดผล	เมล็ดขนาดปานกลาง ผลดก	เมล็ดขนาดเล็ก ผลดก ปานกลาง	เมล็ดโตแต่ติดผลน้อย
5. ส่วนที่นำมาใช้ป้องกันกำจัดศัตรูพืช	เมล็ด ใบ	เมล็ด ใบ	เมล็ด ใบ
6. ปริมาณสาร Azadirachtin ในเมล็ด	ปานกลาง 2-6 มก./ กรัม เนื้อในเมล็ด	มาก 3-7 มก./กรัม เนื้อในเมล็ด	น้อย
7. ลักษณะใบ	หยักเป็นฟันเลื่อย	หยักเป็นฟันเลื่อย	เรียบไม่หยัก

(พงศ์เทพ อันตะริกานนท์ และคณะ, 2541)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A.



B.

รูปที่ 2.1 ลักษณะของสะเดาไทย (*Azadirachta indica var. siamensis* Valeton)

A. แสดงภาพลำต้นสะเดาไทย

B. แสดงเมล็ดสะเดาไทย

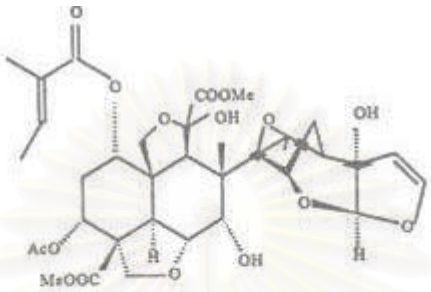
สะเดาไทยขึ้นทั่วไปทุกภาคของประเทศไทยทั้งภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และยังพบในประเทศเพื่อนบ้าน เช่น ลาว พม่า และทางด้านตะวันตกของประเทศกัมพูชา ในปี 1993 มีการนำสะเดาไทยไปปลูกในออสเตรเลียและฟลอริดาในสหรัฐอเมริกา สะเดาไทยสามารถปลูกได้ในสภาพอากาศและดินหลากหลาย ขึ้นได้ดีในเขตที่ฝนตกตั้งแต่ 1-1,300 มิลลิเมตร และในสภาพดินที่มีค่า pH ตั้งแต่ 6.2-6.5 แต่ไม่พบในเขตที่ฝนตกชุกหรือที่ระดับความสูงตั้งแต่ 200 เมตร จากระดับน้ำทะเล (Sombatsiri และคณะ, 1995)

สารออกฤทธิ์ในสะเดาไทย

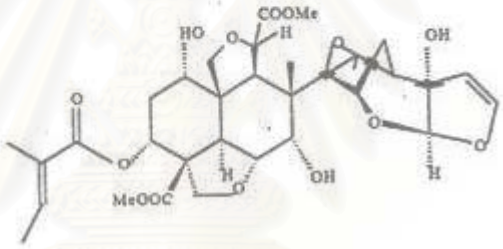
สารอินทรีย์ที่สกัดได้จากส่วนต่างๆของสะเดา ได้แก่ ใบ เปลือก ลำต้น เนื้อผล และเมล็ด มีมากกว่า 60 ชนิด พบว่าส่วนของเมล็ดสะเดามีสารอินทรีย์อยู่มากที่สุด ใบและเมล็ดสะเดาเป็นส่วนที่ได้รับความสนใจมากในการนำไปใช้เป็นยาฆ่าแมลง ต่อมาพบว่าส่วนของเมล็ดจะออกฤทธิ์ดีที่สุด สำหรับใบเป็นเพียงสารไล่แมลงเท่านั้น (พงศ์เทพ อันตะริกานนท์ และคณะ, 2541)
โดยในเมล็ดพบสาร azadirachtin A, azadirachtin B และ 1– tigloyl-3-acetyl azadirachtol นอกจากนี้ยังพบสาร tertratriterpenoids ตัวอื่น คือ salannin, nimbin และกรดไขมันอีกหลายชนิด (อารมณ์ แสงวนิชย์ , 2541) สารออกฤทธิ์ต่างๆ ถ้าเป็นผลดิบจะพบ salannin มากในเมล็ด

สารออกฤทธิ์ที่มีผลในการกำจัดศัตรูพืชที่สำคัญ คือ azadirachtin A อยู่ในเนื้อเมล็ด (seed kernal) ในสะเดา 3 สายพันธุ์ พบว่า สะเดาอินเดียให้ปริมาณสาร azadirachtin A สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ (4.7-7.8 มก./กรัม เนื้อในเมล็ด) สะเดาไทยให้สาร azadirachtin A 0.5-4.6 มก./กรัม เนื้อในเมล็ด Azadirachtin แยกได้ครั้งแรกจากเมล็ดสะเดาไทยโดย Morgan ในปี ค.ศ.1967 ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีทางโครมาโตการฟีและการตกผลึก ได้เป็นผลึกสีขาว มีสูตรโมเลกุล $C_{35}H_{34}O_{16}$ สูตรโครงสร้างแสดงในรูป 2-2 (Kraus, 1995)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



azadirachtin A



Azadirachtin B

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.2 แสดงสูตรโครงสร้างเคมีของ Azadirachtin

องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันสะเดา พบว่าสะเดาไทยมีกรดปาล์มมิติกสูงสุด 32.8%เป็นกรดไขมันอิ่มตัว ส่วนสะเดาอินเดียและสะเดาช้างพบกรดโอลิอิกซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว พบสูงสุด 42.3% และ 43.6% กรดไขมันตัวอื่นพบปริมาณน้อยมาก คือ กรดสเตียริก กรดลิโนลิอิก กรดลิโนลินิก และกรดอแรซิโดนิก (อารมณ์ แสงวนิชย์, 2541)

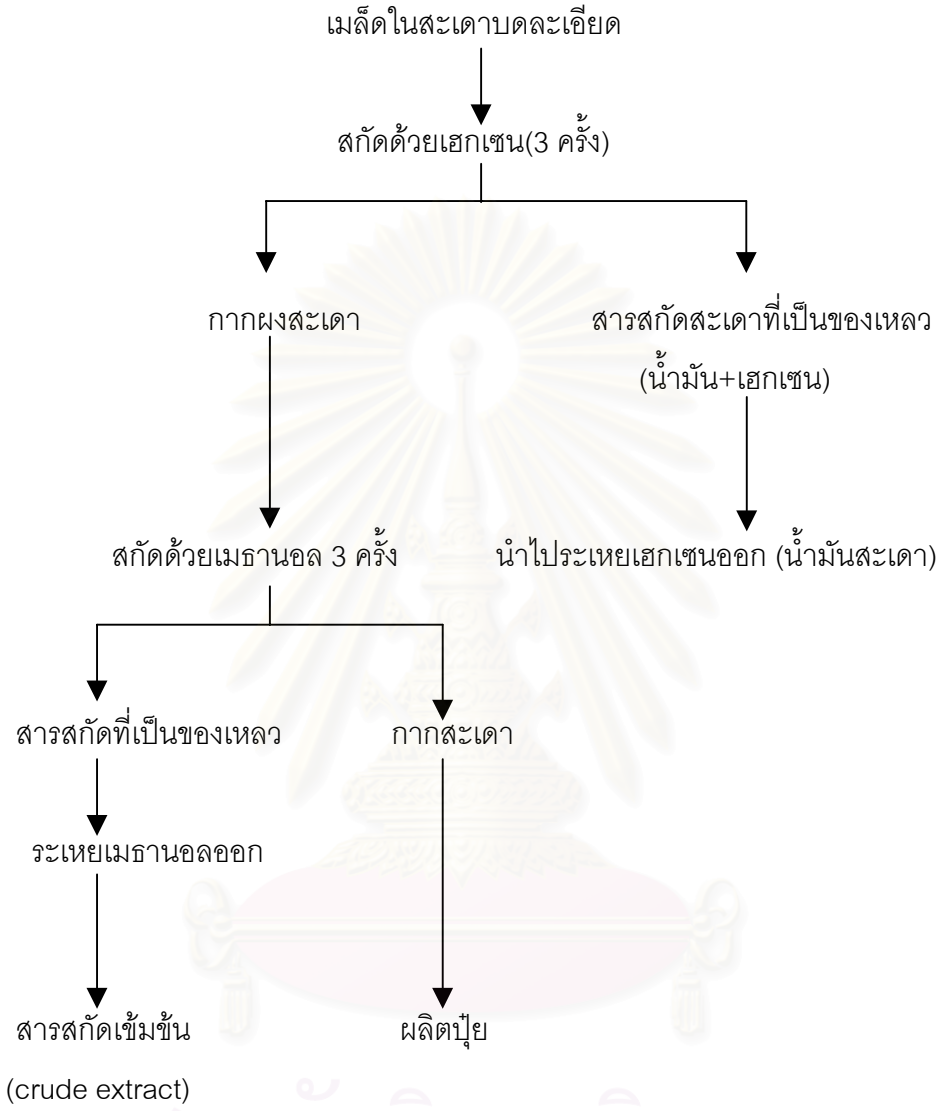
Azadirachtin เป็นสารที่ไม่เสถียร สลายตัวได้ด้วยภาวะต่างๆดังนี้

1. ได้รับความร้อนเกิน 60 องศาเซียลเซียส
2. แสง
3. กรด
4. ด่าง

การอบและเก็บรักษาเมล็ดสะเดาไทย เนื่องจากเมล็ดสะเดาไทยเก็บเกี่ยวได้ปีละครั้ง โดยทั่วไปเกษตรกรมักจะนำผลสะเดาไทยมาตากแดดแล้วเก็บใส่กระสอบไว้ใช้ตลอดปี ซึ่งทำให้เมล็ดสะเดาไทยที่เก็บโดยวิธีดังกล่าวมีคุณภาพต่ำ เนื่องจากสาร Azadirachtin สลายตัวอย่างรวดเร็วในเมล็ดที่มีความชื้นสูงและเก็บในที่อุณหภูมิสูง จากการทดลองของสำนักวิจัยและพัฒนาการผลิตสารธรรมชาติกรมวิชาการเกษตร พบว่าวิธีการเก็บรักษาเมล็ดสะเดาไทยที่เหมาะสมที่สุด คือนำเมล็ดมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทำให้ความชื้นในเมล็ดลดลงเหลือ 11% และมีปริมาณสารออกฤทธิ์ Azadirachtin ในเนื้อเมล็ดมากกว่า 2 มิลลิกรัม/น้ำหนักแห้งของเนื้อในเมล็ด 1 กรัม และเมื่อนำเมล็ดที่เก็บโดยวิธีดังกล่าวมาเก็บไว้ในห้องปรับอากาศเป็นเวลา 1 ปี พบว่าความชื้นในเมล็ดไม่เปลี่ยนแปลงและปริมาณสาร Azadirachtin ลดลงเพียง 27% จากปริมาณเริ่มต้น (อารมณ์ แสงวนิชย์, 2541)

กรรมวิธีการสกัดสารออกฤทธิ์ที่ดีที่สุดคือ วิธี Liquid-Liquid extraction แล้วนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วย HPLC (reverse phase) เป็น isocractic method ใช้คอลัมน์ชนิด ODS-11 ขนาด 250 x 40mm., 5 μm. มี mobile phase เป็นน้ำ: อะซิโตไนไตล์ (H_2O: CH_3CN)= 40:60 มี UV เป็น detector ทำการตรวจวัดที่ความถี่คลื่นแสง 214 nm. และสำหรับการผลิตสะเดาชนิดน้ำจากเมล็ดสะเดาไทยของโรงงานต้นแบบ กรมวิชาการเกษตร เริ่มจากการนำเมล็ดสะเดาไทยที่อบแห้งมากระเทาะเปลือก แล้วนำเนื้อในเมล็ดมาบดละเอียด นำผงสะเดาที่ได้ไปสกัดด้วยเฮกเซนเพื่อสกัดน้ำมันสะเดาออก จะเหลือส่วนที่เป็นกาก นำกากไปสกัดหาสารออกฤทธิ์ โดยใช้เมธานอลละลายสารAzadirachtin ออกมา แล้วแยกกากสะเดาออกเป็นครั้งที่ 2 นำสารสกัดด้วยเมธานอลไปลดปริมาตรจะได้สารสกัดหยาบ (crude extract) ที่มีสารออกฤทธิ์ Azadirachtin 0.1-0.8% ขึ้น

อยู่กับคุณภาพของเมล็ดสะเดาไทย หลังจากนั้นนำสารสกัดหยาบไปผสมสารปรุงแต่งเพื่อใช้ในการป้องกันและกำจัดศัตรูพืช



รูปที่ 2.3 แผนภูมิการสกัดสารออกฤทธิ์กำจัดแมลงจากเมล็ดสะเดา

สาร Azadirachtin มีผลต่อแมลงในทุกระยะของแมลง แต่ระยะตัวหนอนหรือตัวอ่อนจะอ่อนแอที่สุด สาร Azadirachtin มีสูตรโครงสร้างคล้าย molting hormone (ecdysone) ซึ่งมีผลยับยั้งการสร้างและการทำงานของฮอร์โมน ทำให้หนอนหรือตัวอ่อนไม่สามารถลอกคราบได้ สารสกัดสะเดาไม่ทำให้แมลงตายทันทีเหมือนกับสารฆ่าแมลงสังเคราะห์ แต่จะเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมหรือขบวนการดำรงชีวิตของแมลง ทำให้แมลงหยุดกินอาหารหรือลดการขยายพันธุ์ ผลของสาร Azadirachtin ที่มีต่อแมลงสรุปได้ดังนี้ (รัตนาภรณ์ พรหมศรัทธา, 2543)

1. ยับยั้งการลอกคราบของหนอนและแมลง โดยไปขัดขวางและยับยั้งการสร้างฮอร์โมนที่ใช้ในการลอกคราบ
2. ยับยั้งการกินอาหาร โดยทำให้การเคลื่อนที่ของระบบกระเพาะอาหารแมลงน้อยลงจนไม่ทำงานในที่สุด
3. ยับยั้งการเจริญเติบโตของไข่ หนอน และดักแด้
4. เป็นสารไล่หนอนและแมลง
5. ยับยั้งการวางไข่ของตัวเต็มวัย
6. ลดปริมาณไข่ของแมลง

การใช้สารสกัดสะเดาในการป้องกันและกำจัดแมลงเริ่มมีการศึกษาอย่างจริงจังครั้งแรกในประเทศอินเดียเมื่อปีพ.ศ. 2503 และต่อมาในปี พ.ศ. 2513 ในเยอรมัน และ พ.ศ. 2518 ในสหรัฐอเมริกา (Schmutterer, 1980) สารสกัดสะเดามีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันและกำจัดแมลงหลายชนิด โดยมีรายงานจาก Schmutterer (1980) และ Sombatsiri (1984) ว่าสารสกัดสะเดาสามารถป้องกันและกำจัดแมลงในอันดับ Coleoptera ได้ 20 ชนิด แมลงอันดับ Lepidoptera 25 ชนิด และอันดับ Orthoptera 5 ชนิด นอกจากนั้นยังสามารถป้องกันและกำจัดแมลงในอันดับ Homoptera, Hemiptera และ Diptera ได้อีกด้วย (อ้างโดย พงศ์เทพ อันตะริกานนท์และคณะ, 2541)

ในประเทศไทยมีการทดสอบให้หนอนกินอาหารที่มีสารสกัดสะเดาความเข้มข้นต่างๆ มีผลทำให้หนอนไม่สามารถเจริญเติบโตและลอกคราบได้ สาร Azadirachtin ประมาณ 0.3 ppm. สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของหนอนเจาะกระทู้ผัก หนอนใยผัก หนอนเจาะสมอฝ้ายได้ และการใช้สารสกัดสะเดาฉีดพ่นบนแปลงผักคะน้าและกะหล่ำปลีสัปดาห์ละครั้ง สามารถป้องกันและกำจัดหนอนใยผักและหนอน *Crociclolomia pavanana* ได้ผลดีเท่ากับการพ่นสารฆ่าแมลงสังเคราะห์ที่ใช้กันทั่วไป โดยมีการทดลองในหลายประเทศ เช่น โตโก ฟิลิปปินส์ แคนาดา อินเดีย และพม่า ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน (ขวัญชัย สมบัติศิริ, 2540)

Thapa และ Wongsiri (1997) รายงานถึงความเป็นพิษของสะเดาในผึ้งโพรงไทย (*Apis cerana*) ว่าสาร Azadirachtin a (Neemix ® 50 cc./ 20 l) ฉีดพ่นในอัตราส่วน 200 ml/l ต่อนาทีในช่วงที่ผึ้งออกหาอาหาร ไม่มีผลทำให้ผึ้งโพรงตาย แต่ทำให้พฤติกรรมการหาอาหารของผึ้งลดลงประมาณ 2 ชั่วโมง และผึ้งหยุดบินนาน 3-5 ชั่วโมง

การใช้สารสกัดจากเมล็ดสะเดาความเข้มข้น 5% (W/V) ฉีดพ่นแปลงถั่วเขียวสัปดาห์ละ 2 ครั้ง จำนวน 6 ครั้ง ตั้งแต่ถั่วเขียวเริ่มออกดอก สามารถลดความเสียหายที่เกิดจากการทำลายของหนอนเจาะฝักมารูกา (*Maruca testulalis*) อย่างได้ผลจากแปลงทดลอง 4 แปลง พบว่าแปลงที่พ่นสารสกัดเมล็ดสะเดามีฝักเสียที่เกิดจากการเจาะทำลายของหนอนเจาะมารูกา 0.7% ในขณะที่แปลงที่ไม่ได้พ่นสารสกัดเมล็ดสะเดามีฝักเสียหาย 33.8% ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตร กรมวิชาการเกษตร มีการทดลองใช้สารสกัดเมล็ดสะเดาบดละเอียดโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย อัตราส่วน 1 กิโลกรัม/น้ำ 20 ลิตร เปรียบเทียบกับการใช้สารสกัดเมล็ดสะเดาที่เตรียมในห้องปฏิบัติการของกองวัตถุมีพิษทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร อัตรา 280 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร ให้ผลดีใกล้เคียงกันในการป้องกันและกำจัดหนอนเจาะสมอฝ้าย เพลี้ยจักจั่นฝ้าย และเพลี้ยอ่อนที่ลงทำลายกระเจี๊ยบเขียว และไม่มีความแตกต่างกับการใช้สารฆ่าแมลงสังเคราะห์แอมบุชเปอร์เซนต์ EC อัตราส่วน 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตรและสารฆ่าแมลงทามารอน 600 SL อัตรา 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร นอกจากนี้สารสกัดเมล็ดสะเดายังไม่ทำลายแมงมุมที่ถือว่าเป็นตัวห้ำที่คอยทำลายแมลงศัตรูกระเจี๊ยบเขียว เมื่อเปรียบเทียบกับสารฆ่าแมลงสังเคราะห์ ได้มีผู้ทำการศึกษาการใช้สารสกัดสะเดาอัตรา 50 ppm. ร่วมกับเชื้อ ไวรัสของหนอนเจาะสมอฝ้าย อัตรา 30 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร และสารไวรัส Germstar 0.64% อัตรา 10 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร พบว่ามีประสิทธิภาพดีในการป้องกันและกำจัดหนอนเจาะสมอฝ้ายซึ่งเป็นปัญหาต่อการปลูกกุหลาบในแหล่งปลูกขนาดใหญ่ที่จังหวัดนตรปฐม

และยังมีรายงานการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันสะเดาเพื่อป้องกันและกำจัดด้วงงวงข้าวโพดในโรงเก็บ โดยการคลุกเมล็ดข้าวโพดกับน้ำมันสะเดา อัตรา 10, 15 และ 20 ppm. ต่อเมล็ดข้าวโพด 1 กิโลกรัม พบว่าน้ำมันสะเดาทั้ง 3 อัตราส่วนสามารถป้องกันการเข้าทำลายของด้วงงวงข้าวโพดในโรงเก็บได้นานประมาณ 3 เดือน (อ้างโดย พงศ์เทพ อันตะริกานนท์และคณะ, 2541)

ปัจจุบันมีการส่งเสริมให้นำเมล็ดสะเดาไปใช้ผลิตเป็นสารกำจัดศัตรูพืช โดยไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภค (มัณฑนา มิลน์, 2543)[b] ในปีพ.ศ. 2535 รัฐบาลได้ออกพระราชบัญญัติวัตถุอันตรายมาใช้แทนฉบับเดิม พ.ศ. 2510 ซึ่งตามพ.ร.บ.ฉบับนี้ ได้แบ่งวัตถุมีพิษทางการเกษตรออกเป็น 3 ชนิด

คือ - สารเคมีสังเคราะห์
- สารสกัดจากพืช
- สารชีวอินทรีย์

และตามพ.ร.บ.ฉบับนี้ สารสกัดเมล็ดสะเดาไทย จัดอยู่ในวัตถุอันตรายประเภทที่ 2 ซึ่งผู้นำเข้าหรือผู้ผลิตจะต้องระบุสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในการป้องกันควบคุมศัตรูพืช และต้องจดทะเบียนผลิตภัณฑ์ก่อนวางขายในท้องตลาด การจดทะเบียนได้แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. ส่งตัวอย่างสารเพื่อทำการทดลองหาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในสภาพของท้องถิ่นรวมทั้งข้อมูลทางพิษวิทยา เฉพาะความเป็นพิษเฉียบพลันของสารตัวอย่าง
2. ยื่นข้อมูลพิษกึ่งเรื้อรังและพิษเรื้อรัง ซึ่งได้จากการทดลองให้สัตว์กินสารนั้นติดต่อกันเป็นเวลา 2 ปี รวมทั้งข้อมูลพิษตกค้าง และผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เช่น นก ปลา non-target plant, non-target insect การสลายตัวในดิน น้ำ การดูดซึมและผลต่อสิ่งมีชีวิตในดิน
3. การตัดสินอนุญาตให้ใช้ผลิตภัณฑ์ในประเทศไทย โดยการประเมินความเสี่ยง พิจารณาจากอันตราย อัตราการใช้ วิธีการใช้ จำนวนครั้งที่ใช้ ผลของสารตกค้างในผลผลิตที่เก็บเกี่ยว รวมทั้งพิจารณาจากข้อมูลความเป็นพิษ และปริมาณสารที่ร่างกายได้รับ

แต่เนื่องจากประเทศไทยยังไม่มีกฎหมายหรือมาตรฐานการขึ้นทะเบียนสารชีวภาพ การขึ้นทะเบียนคงใช้แนวทางของ FAO ที่ใช้ขึ้นทะเบียนวัตถุมีพิษอื่นๆ จากข้อมูลที่ได้จากการทดลองได้แสดงว่า ผลิตภัณฑ์ที่สกัดจากเมล็ดสะเดาไทยที่ใช้ชื่อการค้า “สะเดาไทย 111” ได้ขึ้นทะเบียนเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ป้องกันกำจัดศัตรูพืชหลายชนิด มีสารออกฤทธิ์ คือ Azadirachtin a ในปริมาณความเข้มข้น 0.1% ข้อมูลทางพิษวิทยาได้ชี้ให้เห็นว่าไม่มีพิษต่อสัตว์เลือดอุ่นหรือมนุษย์ทั้งเฉียบพลันและเรื้อรัง ดังนั้นผลิตภัณฑ์สะเดาไทย 111 จึงเป็นผลิตภัณฑ์สารสกัดจากพืชชนิดแรกในประเทศไทยที่ได้ขึ้นทะเบียนครบ (มัณฑนา มิลน์, 2543)[a]

จากการสำรวจของกองวัตถุมีพิษ กรมวิชาการเกษตร ในช่วงเดือนสิงหาคม 2542-2543 พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ระบุว่าเป็นสารสกัดสะเดา จำนวน 10 ชื่อการค้า ตรวจพบสารสำคัญ Azadirachtin เพียง 4 ชื่อการค้า ซึ่งส่วนใหญ่มีค่าต่ำกว่า 0.1% (พรรณีกา อัตตานนท์, 2543)

พิษของสะเดา

ถึงแม้จะมีการสนับสนุนให้ใช้สารสกัดสะเดาในการกำจัดศัตรูพืช โดยอ้างเหตุผลว่าความปลอดภัยมากกว่าสารเคมีสังเคราะห์ ในแง่ที่ความเป็นพิษน้อยกว่า ไม่มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นและสิ่งแวดล้อม แต่ก็มีรายงานถึงพิษและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมของสารสะเดาดังต่อไปนี้

สาร Azadirachtin ดูดซึมทางรากพืชภายใน 3 ชั่วโมง แล้วเคลื่อนย้ายไปยังลำต้นและใบภายใน 3 วัน สามารถตรวจพบสารนี้ตกค้างในพืชในเวลา 10 วัน หลังจากพ่นสาร โดยตรวจพบในราก ลำต้น ใบ ในอัตราส่วน 8.1, 1.0 และ 2.3 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักสดของพืช และเมื่อทิ้งระยะเวลาหลังพ่นสาร 50 วัน จะตรวจพบในราก ลำต้น ใบ ในอัตราส่วน 2.7, 1.0 และ 1.2 ไมโครกรัม/กรัม ตามลำดับ และตรวจพบสาร Azadirachtin ตกค้างในดินประมาณ 25%ของความเข้มข้นเริ่มต้น สาร Azadirachtin หลังจากฉีดพ่นแล้วจะตกค้างบนต้นพืชได้นาน 7-10 วัน ขึ้นกับชนิดของพืชและอัตราการใช้ Azadirachtin ในสูตรผสมที่ใช้ (อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ, 2543)

ส่วนพิษต่อสัตว์น้ำมีรายงานเกี่ยวกับการทดสอบพิษของสารสกัดสะเดาเครื่องหมายการค้า Margansan-O ถึงค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง ในปลา rainbow trout = 8.8 มิลลิลิตร/ลิตร และการทดลองในห้องปฏิบัติการกับสารสกัดสะเดา AZT-VR-K® พบว่าปลาน้ำจืดขนาดเล็กชื่อ guppies (*Lebistes reticulatus*) สามารถทนทานความเข้มข้นได้ถึง 1,000 ppm. ในฟิลิปปินส์มีรายงานว่าน้ำมันสะเดา ไม่มีอันตรายต่อปลา *Misgurus anguillicaudatus* ส่วนการทดสอบพิษในลูกปลานิล *Orechromis niloticus* ความยาวไม่เกิน 4 นิ้ว ด้วยสารสะเดา NSKE®, น้ำมันสะเดา 50%EC และ Endosulfan 40% และ 80%W/W พบว่าปลานิลตาย 100%ใน Endosulfan ในขณะที่ตาย 20% ใน NSKE® และในปลาคาร์ฟ *Cyprinus carpio* และปลานิลได้ค่าความเป็นพิษของน้ำมันสะเดาที่ 24 ชั่วโมงมีค่า LC_{50} 1,124.6 และ 302.7 ppm. ตามลำดับ (Jacobson, 1995) แต่ทั้งน้ำมันสะเดา 50%EC และ NSKE®10% ในระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 0.1% กลับไม่มีผลต่อสัตว์ที่เป็นผู้ล่าอย่างคางคก *Bufo sp.* แต่ในสหรัฐอเมริกามีรายงานการทดลองใช้สารสกัดสะเดาเครื่องหมายการค้า Neem Away® กับการเจริญของลูกกบ African Clawed Frog ที่ความเข้มข้น 2, 4, 7 ppm. พบว่ามีการเกิดรูปร่างผิดปกติ (malformation) ขึ้นในกลุ่มทดลอง (McCormick, 1999)

Tangtong และ Wattanasirmkit (1998) รายงานถึงผลของสารสกัดเมล็ดสะเดาอินเดียต่อเลือดของปลานิล*Orechromis niloticus* ศึกษาผลของโดยใช้สารสกัดจากเมล็ดสะเดาอินเดียความเข้มข้นต่ำ 25.07 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลานาน 7 เดือน พบว่าปลากลุ่มทดลองมีความผิดปกติของเลือด โดยที่ปริมาณเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณเม็ดเลือดแดงลดลง บ่งบอกถึงภาวะของโรคโลหิตจาง และเกิดความผิดปกติทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดแดง ส่วนผลทางชีวเคมีของเลือดแสดงให้เห็นถึงความผิดปกติของตับจากระดับเอนไซม์ SGPT ในการทดลองเดือนที่ 7 มีค่า 1,235.78$\pm$167.01IU/l ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมในช่วงเวลาเดียวกัน และ

จากรายงานการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับปลานิลที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาอินเดีย ความเข้มข้น 10.41 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลานาน 5 เดือน พบว่าสารสกัดเมล็ดสะเดาอินเดียก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อตับ โดยที่ความรุนแรงจะเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดา (Janart และ Wattanasirmkit, 1997) และยังมีรายงานถึงผลต่อระบบสืบพันธุ์ของปลานิลโดย Srijanngam และ Wattanasirmkit (1998) เมื่อใช้สารทดสอบชนิดและความเข้มข้นเดียวกับ Tangtong และ Wattanasirmkit (1998) พบว่าทำให้เกิดความเสียหายต่อระบบสืบพันธุ์ของปลานิล โดยไป รบกวนการเจริญของรังไข่และทำให้ปริมาณการวางไข่ลดลง

Schmutterer (1995) ให้ข้อสรุปเกี่ยวกับการใช้สารสกัดสะเดาว่าสารนี้ในปริมาณความเข้มข้นสูงเป็นอันตรายต่อลูกปลาและปลาขนาดเล็ก และยังมีผลลดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของ Blue green algae จึงควรหลีกเลี่ยงการใช้สารสกัดสะเดาใกล้แหล่งน้ำ

สำหรับผลในสัตว์ปีก Larson (1989) รายงานถึงผลการทดสอบผลิตภัณฑ์สารสกัดสะเดา Morgansan-O ที่มีปริมาณสาร Azadirachtin 3,000 ppm. ซึ่งผลิตโดยบริษัท W.R. Grace Co. สหรัฐอเมริกา ว่าการใช้สารนี้ผสมในอาหารให้นกกระทากินในระดับความเข้มข้น 1,000-7,000 ppm. ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 5 วัน และให้เป็ด Mullard Duck กินอาหารผสม Marganson-O 1-16 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 14 วัน ปรากฏว่าสัตว์ทดลองยังมีสภาพปกติ ในขณะที่ Ibrahim และคณะ (1992) รายงานว่าการที่ให้ไก่ Brown hisex อายุ 7-35 วันกินอาหารผสมใบสะเดา 2% และ 5% นาน 2 สัปดาห์ มีผลทำให้ไก่กินอาหารได้น้อยลง น้ำหนักลดลง นอกจากนี้ยังมีผลต่อตับและไต มีอาการของโลหิตจาง ระดับโปรตีนในซีรั่มลดลง ในขณะที่ระดับเอนไซม์ SGOT, Alkaline phosphatase และ Lactic dehydrogenase เพิ่มสูงขึ้น และยังมีอีกหลายการทดลองที่สนับสนุนถึงพิษของสะเดาต่อสัตว์ปีก เช่น Sadagopan และคณะ (1981) สรุปว่าสะเดาไม่เหมาะที่จะใช้เป็นอาหารไก่ เนื่องจากมีผลต่ออวัยวะภายใน ถึงแม้จะให้กินในระดับความเข้มข้นต่ำเพียง 2.5% ก็ยังทำให้เกิดความผิดปกติต่อตับ ไต ม้าม ลำไส้ และในบางกรณียังมีผลต่อหัวใจด้วย

สำหรับความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม Jacobson (1995) กล่าวว่าสะเดามีพิษต่อสัตว์มีกระดูกสันหลังบางชนิด รวมทั้งหนูและคน โดยเฉพาะในเด็ก การที่กินผลสุกของสะเดาหรือการกินใบอ่อนของสะเดาในอาฟริกา การนำใบสะเดามาชงดื่มแบบใบชาในอินเดีย มีรายงานว่าถ้าได้รับในปริมาณมากเกินไปจะทำให้มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย เด็กอ่อนในมาเลเซียที่กินน้ำมันสะเดา 5 มิลลิลิตร เกิดอาการอาเจียน มีภาวะโลหิตเป็นกรด และยังพบว่าน้ำมันสะเดามี

ผลชักนำให้เกิดอาการ Reye's syndrome นอกจากนี้ยังตรวจพบสาร Aflatoxin B และ G ซึ่งอาจมีผลทำให้เกิดมะเร็งตับอีกด้วย และมีรายงานว่าสารสกัดเมล็ดสะเดาทำให้เกิดการผ่าเหล่าในแบคทีเรีย strains TA 98 และ TA 100 *Salmonella typhimurium*

Akah และ Onupgu (1991) ศึกษาพิษของสารสกัดใบสะเดาที่มีต่อตับกระต่าย พบว่าในกระต่ายที่กินใบสะเดา 2,328 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีอาการผิดปกติที่ตับโดยที่ระดับเอนไซม์ SGPT SGOT และ ALP เพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับผลทางจุลพยาธิวิทยาที่พบการตายของเซลล์ตับ และมีจำนวนท่อน้ำดีเพิ่มขึ้น

ถึงแม้จะมีรายงานว่าสาร Azadirachtin ในสะเดาไม่มีผลต่อสิ่งแวดล้อม ไม่มีความเป็นพิษต่อแมงมุม ไส้เดือนดิน รวมทั้งแมลงที่ช่วยผสมเกสร เช่น ผึ้ง ผีเสื้อ และ แมงมุม แต่จากรายงานของนักวิจัยหลายกลุ่มชี้ให้เห็นว่าสาร Azadirachtin ในสะเดาก็ยังมีพิษหลายอย่างต่อสัตว์น้ำและสัตว์เลือดอุ่น โดยเฉพาะการใช้สารนี้ใกล้แหล่งน้ำย่อมมีอันตรายต่อสัตว์น้ำ และในขณะนี้ในประเทศไทยมีการใช้สารสกัดสะเดากำจัดศัตรูพืชอย่างแพร่หลาย และสารสะเดาก็มีโอกาสที่จะลงไปในแหล่งน้ำธรรมชาติหรือบ่อเลี้ยงปลา บ่อเลี้ยงกบ บ่อเลี้ยงกุ้ง ซึ่งมักอยู่ในบริเวณเดียวกันในแหล่งเกษตรกรรม ทำให้เกิดพิษต่อสัตว์น้ำเหล่านี้ทั้งที่อยู่ในสภาพธรรมชาติและในบ่อของเกษตรกรเอง โดยเฉพาะกบซึ่งเป็นสัตว์ที่คนนิยมบริโภคมาช้านาน เป็นอาหารโปรตีนที่ในอดีตสามารถหาได้ไม่ยากเนื่องจากอาหารของกบมีอยู่อย่างเพียงพอและสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ของกบ แต่ในปัจจุบันสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปมาก ส่งผลให้ปริมาณกบในธรรมชาติลดลง ในขณะที่ความต้องการบริโภคกบมีเพิ่มขึ้น ทำให้กบกลายเป็นอาหารที่มีราคาแพง (พงษ์พันธ์ อินทราวัฒน์, 2539) เนื่องจากกบเป็นสัตว์ที่ผิวหนังบอบบาง มีไข่ที่ไม่มีเครื่องป้องกันอันตราย และกบยังอาศัยอยู่ทั่วไปทั้งบนบกและในน้ำ ทำให้กบสามารถรับสารพิษได้ง่าย จึงเป็นเสมือนตัวชี้คุณภาพของสิ่งแวดล้อม (Netting, 2000) เพราะฉะนั้นกบนาในแหล่งเกษตรกรรมจึงมีโอกาสได้รับสาร Azadirachtin ในผลิตภัณฑ์สะเดาที่เกษตรกรนิยมใช้ในปัจจุบัน จึงเกิดความสนใจที่จะทำการศึกษาผลของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย หรือสะเดาไทย111 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สะเดาชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในประเทศไทยขณะนี้

กบนา

อนุกรมวิธานของกบนา

Phylum : Chordata

Subphylum : Vertebrata

Class : Amphibia

Family : Ranidae

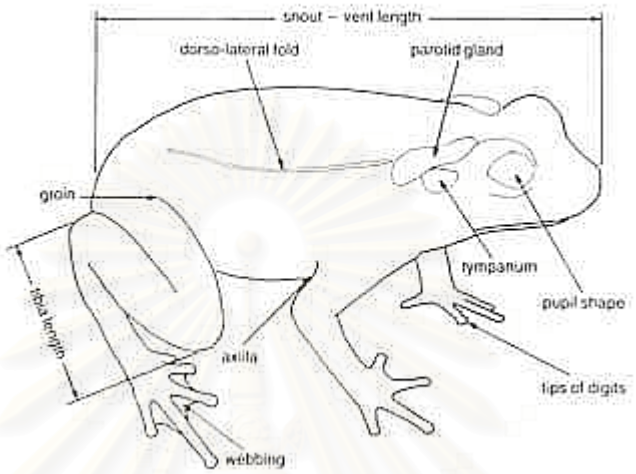
Genus : *Hoplobatrachus* Peter, 1863

Species : *Hoplobatrachus rugulosus* Weighmann, 1835

กบนา *Hoplobatrachus rugulosus* เปลี่ยนจาก *Rana rugulosa* มาใช้ชื่อนี้ตาม Authority: Dubois, 1992 (Duellman, 1993)

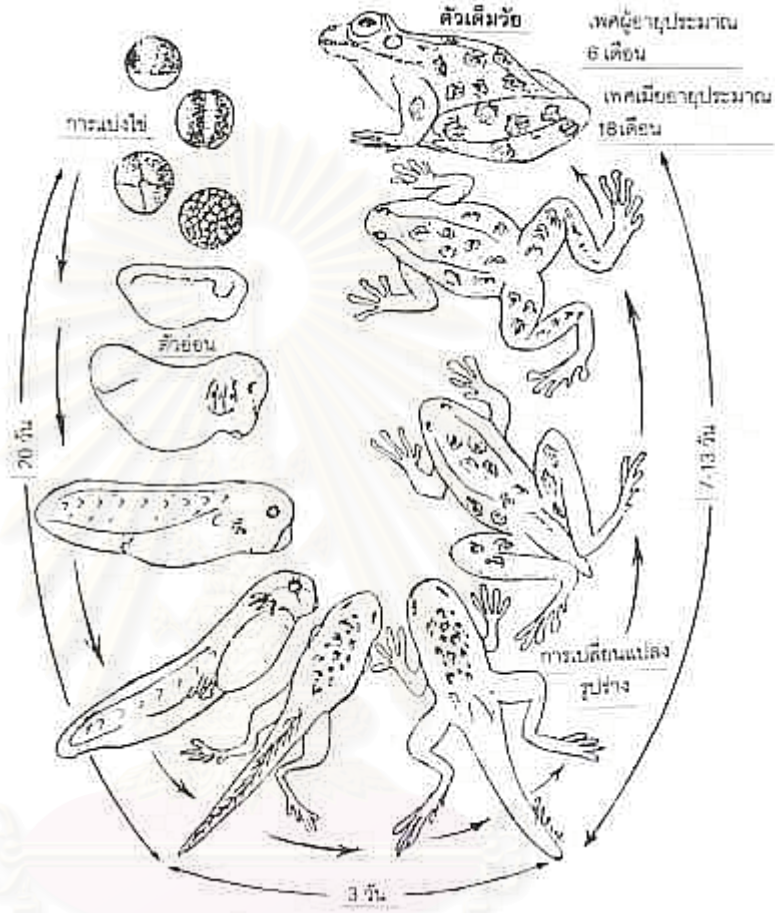
กบนาเป็นกบที่พบทั่วไปทุกภาคของประเทศไทย (Taylor, 1962) เป็นกบขนาดกลาง ผิวด้านหลังสีเขียวเข้มถึงน้ำตาล มีจุดสีดำอยู่ทั่วไป ผิวด้านท้องเรียบสีขาวหรือขาวอมเหลือง ในบางตัวมีจุดสีดำหรือเส้นสีดำใต้คาง ความยาวลำตัววัดจากริมฝีปากถึงก้น ประมาณ 90–180 มิลลิเมตร น้ำหนักเมื่อโตเต็มที่ประมาณ 100-350 กรัม หัวสั้นเป็นรูปทรงสามเหลี่ยมที่มีส่วนสูงเกือบเท่าฐานขาหลังใหญ่และยาวเป็น 1.5 เท่าของความยาวลำตัวและยาวเป็น 2 เท่าของขาหน้า ลูกตากลมค่อนข้างโตและมีขนาดใหญ่กว่าวงหู (tympanum) เล็กน้อย (Isarangkura และคณะ, 1989) การแยกเพศกบที่โตเต็มวัย กบตัวผู้จะมีขนาดเล็กกว่ากบตัวเมียและมีถุงเสียง (vocal sac) สีดำคล้ำอยู่ใต้คางทั้งสองข้างและในช่วงฤดูผสมพันธุ์จะพบแถบสีน้ำตาลหนาทางด้านในของนิ้วหัวแม่มือทั้งสองข้างของตัวผู้ที่ใช้ยึดตัวเมียขณะผสมพันธุ์ ส่วนตัวเมียมีขนาดใหญ่กว่าตัวผู้ถึง 2 เท่า บริเวณเอวพองโตโดยเฉพาะเวลามีไข่แก่อยู่เต็มท้อง และผิวหนังใต้คางจะเรียบตลอดไม่มีถุงเสียง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะภายนอกของกบ (Mattison, 1998)

วงจรชีวิตของกบนา ไข่กบที่ได้รับการผสมแล้วจะเจริญฟักออกเป็นตัวภายในเวลาประมาณ 18-28 ชั่วโมง ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม อุณหภูมิ 36-38 องศาเซลเซียส pH 6-6.5 ลูกอ๊อดกบที่เพิ่งฟักออกเป็นตัวใหม่ๆมีลำตัวแบน ยาวประมาณ 3-4 มิลลิเมตร การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (metamorphosis) จะเริ่มตั้งแต่ลูกอ๊อดกบอายุได้ 20 วัน จนกลายเป็นตัวสำเร็จภายในช่วงอายุ 28-36 วัน กบโตเต็มวัยและเริ่มผสมพันธุ์เมื่อตัวผู้อายุประมาณ 6 เดือน และตัวเมียอายุประมาณ 18 เดือน (ผุสตี ปริยานนท์ และคณะ, 2530) ส่วนอัตราการเจริญเติบโต เมื่อกบอายุประมาณ 4-5 เดือนจะมีขนาดตามที่ตลาดต้องการ คือตัวเมียหนักประมาณ 200-400 กรัม ตัวผู้หนักประมาณ 100-200 กรัม อัตราการเจริญเติบโตของกบจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงเดือนพฤศจิกายนโดยประมาณ เพราะหลังจากนั้นเมื่อเข้าสู่ฤดูหนาวกบจะลดการกินอาหารทำให้น้ำหนักลดลง (ผุสตี ปริยานนท์ และคณะ, 2527) สำหรับโครโมโซมของกบนาเป็น 2n=36 (วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล และคณะ, 2540)

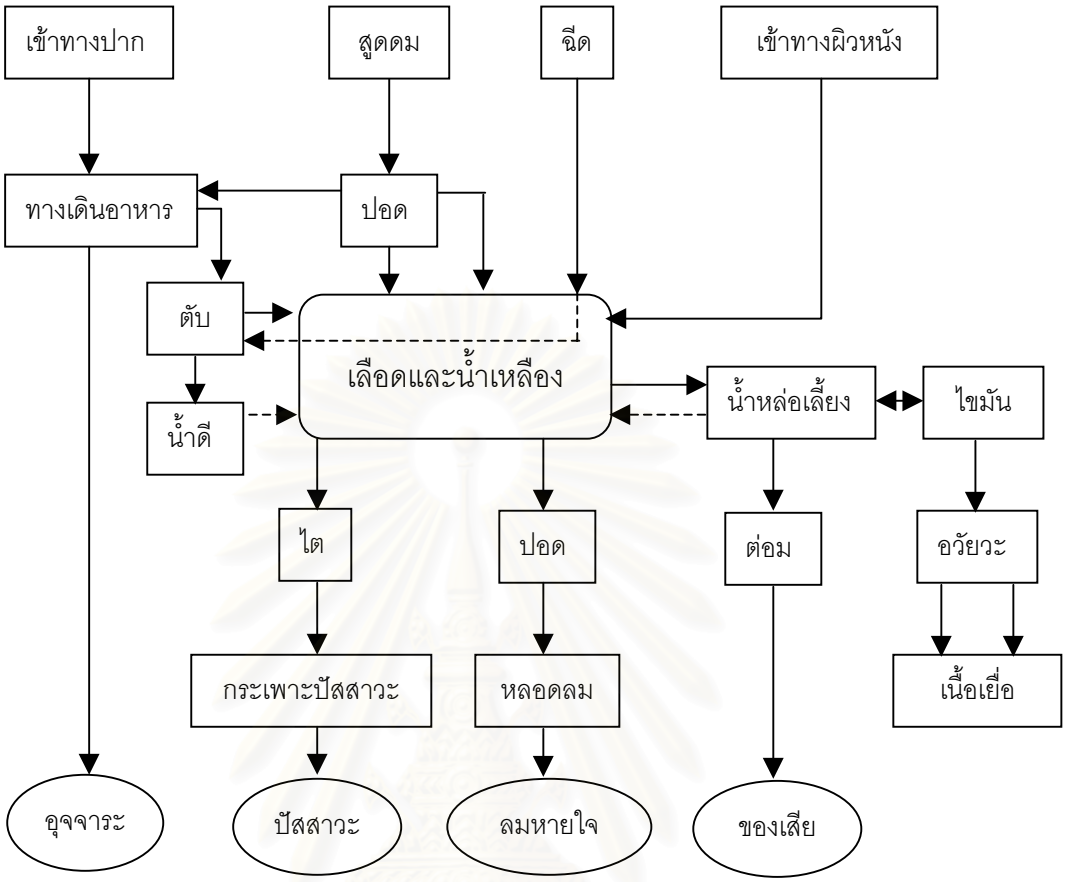


รูปที่ 2.5 แสดงวงจรชีวิตของกบนา (ผุสดี ปริยานนท์ และคณะ, 2530)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จำนวนประชากรของกบสามารถใช้เป็นตัววัดคุณภาพของสิ่งแวดล้อมได้ โดยมีผู้กล่าวว่ากบเปรียบเสมือนมาตรวัดสุขภาพของโลกตามลักษณะต่อไปนี้ คือกบเป็นสัตว์ที่สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมอย่างใกล้ชิด เพราะขณะเป็นตัวอ่อนอาศัยอยู่ทั้งในน้ำนิ่งและน้ำไหล กินพวกสาหร่าย สัตว์น้ำขนาดเล็ก เมื่อโตเต็มวัยกินแมลงและสัตว์ขนาดเล็กเป็นอาหาร มีผิวหนังที่บอบบาง เนื่องจากต้องใช้ผิวหนังในการหายใจ ไข่กบไม่มีเปลือกแข็งและเครื่องป้องกันอันตราย จึงสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมได้โดยตรง (Wake, 1991; Blaustein and Wake, 1995; Miloradov และคณะ, 1996 ; Netting, 2000) ดังนั้นในการศึกษาพิษของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยในครั้งนี้จึงเลือกกบเป็นสัตว์ทดลอง โดยที่เริ่มทดลองในลูกอ๊อดกบอายุ 2 สัปดาห์ และศึกษาผลกึ่งเรื้อรังเป็นเวลานาน 18 สัปดาห์ อวัยวะที่ศึกษาผลกึ่งเรื้อรังที่เกิดจากสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยเลือกใช้ตับและเลือดเป็นเป้าหมายของการเกิดพยาธิสภาพเพราะจากการศึกษาของนักวิจัยส่วนใหญ่ที่ศึกษาพิษวิทยาจะมุ่งศึกษาความผิดปกติที่เกิดกับตับและเลือดเนื่องจากตับมีหน้าที่สำคัญในการกำจัดและเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษที่ดูดซึมเข้ามาในทางเดินอาหาร ก่อนที่จะผ่านไปสู่กระแสเลือดและกระจายไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย ทำให้ตับกบเป็นอวัยวะที่จะสะสมสารพิษที่เข้าไปในร่างกายกบได้ในปริมาณสูง เพราะสารพิษหลายชนิดสามารถสะสมในไขมันในเซลล์ตับกบ (Miloradov และคณะ, 1996) Pesonen (1997) กล่าวว่าเซลล์ตับของสัตว์น้ำหลายชนิดเหมาะที่จะใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาพิษวิทยาและ xenobiotic metabolism ซึ่งมีความจำเป็นเกี่ยวกับมลพิษทางน้ำในปัจจุบัน

โดยทั่วไปในร่างกายสัตว์จะมีขบวนการเปลี่ยนแปลงสารที่ได้รับเข้าไป (xenobiotics) ให้เป็นสารที่เป็นอันตรายต่อร่างกายน้อยลง ตลอดจนเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ขับถ่ายออกจากร่างกายได้รวดเร็วขึ้น ถ้าสารถูกเปลี่ยนไปเป็นสารที่มีพิษน้อยลงหรือมีอันตรายน้อยลง เรียกขบวนการที่เกิดว่า Detoxification แต่ถ้าถูกเปลี่ยนไปเป็นสารที่มีพิษมากขึ้นหรือมีอันตรายต่อร่างกายมากขึ้น เรียกขบวนการที่เกิดว่า Lethal synthesis ปฏิกิริยาในขบวนการเปลี่ยนแปลงสารพิษส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่ตับ(อาจเกิดเล็กน้อยที่สมอง ไต ผนังลำไส้เล็ก และในเลือด) (มาลินี ลิ้มโภคา, 2523) หลังจากที่สารพิษเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ตับแล้ว สารที่เกิดขึ้นจะมีการขับถ่ายออกจากร่างกายโดยผ่านทางน้ำดี หรือขับถ่ายทางปัสสาวะโดยตรง (มาลินี ลิ้มโภคา, 2527)



รูปที่ 2.6 แผนภาพแสดงขบวนการดูดซึม การกระจายตัวและการขับถ่ายสารพิษออกจากร่างกาย (มาลินี ลิ้มโภคา, 2527 ; Klaassen และคณะ, 1991)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตับ (Liver)

ตับเป็นอวัยวะที่สำคัญอย่างหนึ่งในร่างกาย ตับทำหน้าที่สำคัญหลายอย่าง เช่น เป็นต่อมมีท่อ (exocrine gland) สร้างน้ำดี ซึ่งจะหลั่งตามท่อสู่ลำไส้เล็ก ตับมีหน้าที่เกี่ยวกับการสะสมอาหารพวกคาร์โบไฮเดรท เพื่อสลายสู่กระแสเลือดในยามที่ร่างกายต้องการ และยังสะสมอาหารอื่นไม่ว่าจะเป็นไขมัน โปรตีน รวมทั้งวิตามินไว้ในเซลล์ตับอีกด้วย นอกจากนี้ตับยังเป็นแหล่งสลายและกำจัดสารพิษออกจากเลือดโดยไม่มีเซลล์พิเศษทำหน้าที่เฉพาะเหมือนตับอ่อน (Copenhaver และ Johanson, 1958)

ตับกบอยู่ด้านหน้าสุดในช่องท้อง อยู่ติดกับผนังกั้นระหว่างช่องอกกับช่องท้อง (transverse septum) ตับกบมีลักษณะเป็นพูสีเหลืองอมน้ำตาล ตอนท้ายของพูข้างซ้ายแยกออกเป็น 2 ส่วน (สุภาพร อารีกิจ, 2540) ถ้านับจำนวนพูของตับกบจะได้ 3 พูหรือมากกว่า (Ecker, 1889) ตับรับเลือดจาก 2 แหล่ง คือ hepatic artery และ hepatic portal vein ซึ่งนำเลือดจากกระเพาะอาหาร ลำไส้ ตับอ่อน และม้าม โดยเลือดจะถูกลำเลียงจาก interlobular branches ของ hepatic artery และ hepatic artery เข้ามาในช่องไซนูซอยด์ของตับที่แตกแขนงเป็น capillary network (Andrew และ Hickmann, 1974) ดังนั้นสิ่งที่ถูกส่งมากับเลือดที่มีทั้งสารอาหารและสิ่งปนเปื้อน รวมทั้งสารพิษที่กบได้รับจากสิ่งแวดล้อม จะแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ผนังหลอดเลือดช่องไซนูซอยด์เข้าสู่เซลล์ตับต่อไป

เซลล์ตับ (liver cell หรือ hepatocyte) ของกบมีขนาดใหญ่ รูปร่างหลายเหลี่ยม มีนิวเคลียสรูปร่างกลมซึ่งปกติมี 1 อัน แต่บางกรณีอาจพบ 2 นิวเคลียส โดยที่นิวเคลียสจะถูกไขมันสะสมภายในเซลล์ดันให้ไปอยู่บริเวณขอบเซลล์ การจัดเรียงตัวของเซลล์ตับกบไม่เห็นเป็นแนวรัศมีที่เป็นระเบียบเหมือนในคนหรือสัตว์ชั้นสูงอื่น ส่วนสีภายในเซลล์ตับกบจะแตกต่างกันออกไปตามจำนวนเม็ดสี (pigment) ภายในเซลล์ตับซึ่งขึ้นอยู่กับช่วงอายุและสุขภาพของกบ (Ecker, 1889; Andrew และ Hickmann, 1974) เซลล์ตับกบเรียงตัวเป็น 2 ชั้น ไม่มี lobular อย่างแท้จริงซึ่งคล้ายกับตับปลาดุกด้านและตับปลาช่อน (สุภาพร อารีกิจ, 2540) ระหว่างเซลล์ตับจะพบช่องว่างระหว่างเซลล์ เรียกว่า ช่องไซนูซอยด์ (sinusoid) กระจายอย่างไม่เป็นระเบียบ ที่ขั้วตับมีเส้นเลือด hepatic vein ออกจากตับส่วนหน้าทะลุผ่าน transverse septum ไปยังหัวใจบริเวณ sinus venosus ในกบนาไม่ว่าจะเป็นระยะลูกอ๊อดหรือตัวเต็มวัยไม่พบ exocrine pancreas ที่อยู่รอบ hepatic portal vein ในตับ (สุภาพร อารีกิจ, 2540) เหมือนกับตับของปลา channel catfish

(Grizzle และ Roger, 1976) ปลา striped bass (Groman, 1982)และปลาอีกหลายชนิดที่ศึกษาโดย Hibiya (1982)

พยาธิสภาพของตับที่ได้รับอันตราย

ลักษณะของตับที่ผิดปกติเมื่อดูจากภายนอกขนาดของตับจะใหญ่กว่าปกติ ซึ่งพิจารณาได้จากค่า %Relative liver weight (%อัตราส่วนระหว่างน้ำหนักตับ/น้ำหนักตัว) ยกเว้นกรณีที่ตับเป็นโรคเรื้อรังขนาดของตับจะเล็กลง นอกจากนี้รูปร่างขอบตับที่ปกติปลายแหลมจะกลายเป็นปลายมน (Schmidt และ Hubbard, 1987) ส่วนผิวด้านนอกจะมีการสร้างตุ่ม (nodules) จำนวนเซลล์ตับปกติจะลดลง มีการสะสมของไขมันที่ผิดปกติคืออาจมากขึ้นหรือลดน้อยลง มีการสร้าง fibrous connective tissue แทรกภายในเนื้อเยื่อตับ (Hill, 1989) Braunbeck (1993) สนับสนุนการศึกษาเรื่องสารพิษด้วยการพิจารณาจากองค์ประกอบภายใน cytoplasm ของเซลล์ตับ โดยใช้ตับปลา rainbow troutในการศึกษา ส่วนการตายของเซลล์ตับมีลักษณะต่างๆดังนี้ การตายเป็นหย่อมเล็กๆ (focal necrosis) หรือมีการตายของเซลล์ตับเป็นกลุ่มใหญ่ (confluent necrosis) ซึ่งการตายมักเกิดรอบๆเส้นเลือดภายในตับ (periportal area) (สนั่น รังรักษ์ศิรวร และคณะ, 2528)

มีผู้รายงานลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับสัตว์ชนิดต่างๆไว้ดังนี้ Kasai และคณะ (1990) ทดลองในหนูที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรม mutant rat strain LEC ที่มียีนของอาการตับอักเสบ มาศึกษาพบว่าเมื่อหนูเหล่านี้อายุ 20 สัปดาห์จะเริ่มมีอาการของตับอักเสบ โดยที่ระดับเอนไซม์ SGPT และ SGPT สูงขึ้นร่วมกับอาการผิดปกติของตับ คือเซลล์ตับมีขนาดใหญ่ขึ้น นิวเคลียสขนาดใหญ่และมีรูปร่างผิดปกติ การจัดเรียงตัวของเซลล์ตับใน hepatic lobules ผิดปกติ จำนวน kupffer cells เพิ่มขึ้นและมีการตายของเซลล์ตับเป็นหย่อมๆ (spotty necrosis) Honrubia และคณะ (1993) ศึกษาผลเรื้อรังของยาฆ่าแมลงพวกคาร์บาเมต ชื่อการค้า ZZ-Aphox® ในลูกอ๊อดกบ *Rana perezi* โดยใช้ความเข้มข้น 0.02 และ 0.14%เป็นเวลานาน 9 สัปดาห์ พบว่าการสะสมไขมันภายในเซลล์ตับลดลงเนื่องจากการลดระดับของ NADH จึงมีผลให้ cytoplasm ภายในเซลล์ว่างและย้อมติดสีน้อยลง ช่องไซนูซอยด์ขยายตัวและการจัดเรียงตัวของเซลล์ตับผิดปกติ Helge และคณะ (1995) รายงานถึงผลการศึกษา Ultrastructure และปฏิกริยาชีวเคมีที่เกิดกับเซลล์ตับปลาrainbow trout ตัวผู้ที่ได้รับ endosulfan และ disulfoton ซึ่งมีค่า LC_{50} = 50 mg/l ของ endosulfan และ 20 μm/l ของ disulfoton และทำให้ภายในเซลล์ตับเกิดการบวมพองของ RER ลดการสะสมของไกลโคเจน และมีการเพิ่มจำนวนของไมโตคอนเดรียและไลโซโซม

ส่วนผลทางชีวเคมีพบว่าเกิดความผิดปกติของระดับเอนไซม์หลายชนิด และจากรายงานของ Sakulku และ Wattanasirmkit (1998) เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับปลานิลที่ได้รับสารสกัดจากใบถอบแถบน้ำเป็นระยะเวลานาน 5 เดือน พบว่าทำให้ตับเกิด hydropic swelling, vacuolation, เกิด fatty acid degenerate ของเซลล์ตับ มีการแทรกตัวของมาโครฟาจในเนื้อเยื่อตับ พบการตายของเซลล์ตับ และมี fibrosis นอกจากนี้การศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์ อิเลคตรอน ยังพบการขยายตัวและการหดตัวของไมโตคอนเดรีย การหักของท่อเอนโดพลาสมิก การเปลี่ยนสภาพของท่อเอนโดพลาสมิกจาก RER เป็น SER และการเพิ่มจำนวนของ 2°lysosome ซึ่งรายงานดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับปลานิลที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาอินเดียที่ศึกษาโดย Janart และ Wattanasirmkit (1997)

การศึกษาพิษของคลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) และคาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4) ที่มีต่อ primary culture ของเซลล์ตับปลา rainbow trout พบว่า CCl_4 มีผลทำลายเซลล์ตับได้รุนแรงกว่า $CHCl_3$ ถึง5 เท่า ซึ่งเชื่อว่าเกิดจากการที่ CCl_4 สร้างอนุมูลอิสระ (free radical) ออกมาทำลายเซลล์ตับ (Rabergh และคณะ, 1997) Faverney และคณะ (2001) รายงานว่า แคดเมียมมีผลทำให้เกิด apoptosis และ genotoxicity ในตับปลา rainbow trout

เลือดกบ

ระบบหมุนเวียนเลือดกบเป็นระบบปิด (closed circulatory system) เช่นเดียวกับคน ประกอบด้วย หัวใจ เลือด เส้นเลือด และระบบน้ำเหลือง

เลือดกบประกอบด้วย

1. น้ำเลือด (plasma) เป็นของเหลวสีเหลืองใส มีสภาพเป็นเบสอ่อนๆ (Ecker, 1889)
2. เม็ดเลือด (corpuscle หรือ blood cell) ประกอบด้วย
   2.1 เม็ดเลือดแดง (erythrocyte หรือ red blood cell) รูปร่างกลมรี ขนาดประมาณ 22 x 15 ไมครอน มีนิวเคลียสรูปไข่ขนาด 20 x 10 ไมครอน อยู่กลางเซลล์ องค์ประกอบภายในนิวเคลียสจะรวมกันอยู่แน่นเห็นเป็นสีน้ำเงินเข้ม ส่วนไซโตพลาสซึมติดสีชมพูอ่อน เมื่อย้อมด้วยสี Wright & Giemsa (สุภาพร อารีกิจ, 2540)

เม็ดเลือดแดงช่วงตัวอ่อนสร้างจากม้ามแต่ในช่วงตัวเต็มวัยสร้างจากไขกระดูก (Duellman และ Trueb, 1994) โดยเม็ดเลือดแดงมีอายุประมาณ 100 วัน ปัจจัยต่างๆ

เช่น อุณหภูมิ เพศและสุขภาพ ล้วนมีผลต่อจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงของกบ กบตัวผู้จะมีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงมากกว่ากบตัวเมีย (Noble, 1931) เหมือนในปลาคาร์ฟอินเดีย (*Labeo rahita*) ที่ศึกษาโดย Siddigui และ Naseem (1979) ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงมีฮีโมโกลบินซึ่งทำหน้าที่ลำเลียงออกซิเจนไปยังเนื้อเยื่อต่างๆทั่วร่างกาย

2.2 เม็ดเลือดขาว (leucocyte หรือ white blood cell) ทำหน้าที่ทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม เม็ดเลือดขาวมีจำนวนน้อยกว่าเม็ดเลือดแดง จำนวนเม็ดเลือดขาว:เม็ดเลือดแดงในกบ = 1:20 – 70 (Duellman และ Trueb, 1994) เม็ดเลือดขาวมีหลายชนิด แต่ละชนิดมีรูปร่างและลักษณะแตกต่างกันไป ลักษณะของเม็ดเลือดขาวกบเมื่อย้อมด้วยสี Giemsa เป็นดังนี้ (รูปที่ 4.27)

- lymphocyte เป็นเม็ดเลือดขาวชนิดที่ไม่มีแกรนูลในไซโตพลาสซึม (agranulocyte) พบทั้งขนาดเล็กตั้งแต่ 6 ไมครอน และขนาดใหญ่ 11 ไมครอน มีนิวเคลียสเกือบเต็มเซลล์ติดสีม่วงอมน้ำเงิน ไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงินอ่อน สามารถสร้าง pseudopodium มาจับสิ่งแปลกปลอม
- monocyte เป็นเม็ดเลือดขาวที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ขนาดประมาณ 12 ไมครอน รูปร่างค่อนข้างกลม นิวเคลียสติดสีม่วงและมักอยู่ค่อนไปด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงินจาง ภายในมี vacuole เห็นได้ชัดเจน ทำหน้าที่ทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยวิธี phagocytosis เมื่อ monocyte เคลื่อนที่ออกจากเส้นเลือดมายังเนื้อเยื่อ จะเรียกว่า macrophage
- neutrophil เป็นเม็ดเลือดขาวชนิดที่มีแกรนูลละเอียดภายในไซโตพลาสซึม (granulocyte) มีลักษณะเหมือน neutrophil ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม พบเม็ดเลือดขาวชนิดนี้มากเป็นอันดับ 2 รองจาก lymphocyte สำหรับ neutrophil ที่เจริญเต็มที่มีขนาดประมาณ 9 – 13 ไมครอน ไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงินหรือชมพูจาง ภายในเห็นเม็ดแกรนูลละเอียด นิวเคลียสมีรูปร่างหลายพูติดสีน้ำเงินแดง ทำหน้าที่เกี่ยวกับการอักเสบ แต่ไม่พบลักษณะการทำงานแบบ phagocytosis ที่แน่นอน (Ellis, 1977)
- eosinophil เป็นเม็ดเลือดขาวรูปร่างกลม ขนาด 6–10 ไมครอน มีแกรนูลหยาบลักษณะกลมขนาดเท่าๆกันติดสีส้มอยู่ภายในไซโตพลาสซึม มีนิวเคลียสเป็น 2 พู ติดสีน้ำเงินเข้ม ทำหน้าที่กำจัดพิษของโปรตีนแปลกปลอม (foreign protein) ทำลาย antigen-antibody complex ละลายก้อนเลือดที่แข็งตัวและทำลาย parasite ที่เข้ามาในร่างกาย (Leake, 1975)

- basophil เป็นเม็ดเลือดขาวที่มีรูปร่างกลม ขนาด 8 – 12 ไมครอน มีนิวเคลียสเป็นพู ติดสีน้ำเงินเข้ม ที่มักถูกบังโดยแกรนูลในไซโตพลาสซึมซึ่งมีลักษณะหยาบและขนาดไม่เท่ากันติดสีม่วงเข้มหรือสีน้ำเงินเข้ม ทำหน้าที่เกี่ยวกับอาการแพ้ต่างๆ (Leake, 1975)

เม็ดเลือดขาวพวกที่มีแกรนูลสร้างจากตับและไต และมีบางชนิดสร้างจากม้าม (Duellman และ Trueb, 1994) ส่วน lymphocyte นอกจากจะสร้างจากม้าม ไต และไขกระดูกแล้ว ยังเชื่อว่าต่อมไทมัสเป็นแหล่งสร้าง lymphocyte ทั้งชนิด T และ B cell (Ellis, 1977)

3. เกร็ดเลือด หรือ แผ่นเลือด (thrombocyte) มีรูปร่างคล้ายกระสวย ไม่มีสี มีนิวเคลียสมีรูปไข่หรือค่อนข้างกลมติดสีน้ำเงินเข้ม ไซโตพลาสซึมติดสีชมพูจางๆ ขนาดประมาณ 7x5 – 11x5 ไมครอน มีหน้าที่เกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด

เนื่องจากกบเป็นสัตว์เลือดเย็นอุณหภูมิภายในร่างกายต่ำกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม จึงสามารถนำออกซิเจนได้ดีกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เนื่องจากออกซิเจนสามารถละลายได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (Noble, 1931) และยังพบว่าประสิทธิภาพการนำออกซิเจนในลูกอ๊อดสูงกว่ากบตัวเต็มวัยเมื่อศึกษาในสภาพแวดล้อมที่เป็นน้ำและมีปริมาณออกซิเจนต่ำ (Duellman และ Trueb, 1994) เนื่องจากเม็ดเลือดแดงของลูกอ๊อดกับกบเต็มวัยมีความแตกต่างกัน จากรายงานของ Kalashikova (1992) ซึ่งศึกษา Kupffer cell ในกบที่เก็บรวบรวมในช่วง metamorphosis ในภาวะที่เม็ดเลือดแดงระยะตัวอ่อนถูกแทนที่ด้วยเม็ดเลือดแดงระยะตัวเต็มวัย พบว่าช่วงดังกล่าว kupffer cell มีขนาดใหญ่ภายในเต็มไปด้วย เม็ดเลือดแดงที่เสื่อมสภาพ นอกจากนี้ยังพบแกรนูลของ melanin ใน kupffer cell ซึ่งเชื่อว่า pigment เหล่านี้สร้างมาจากส่วนที่ถูกทำลายของเม็ดเลือดแดง

ความผิดปกติเกี่ยวกับเลือด

โดยทั่วไปการศึกษาทางโลหิตวิทยา จะพิจารณาเกี่ยวกับค่า hemoglobin hematocrit จำนวนเม็ดเลือดแดง จำนวนเม็ดเลือดขาว และการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว (Blaxhall และ Daisley, 1973 ; Christensen และคณะ, 1978) ทางพยาธิวิทยากำหนดว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวที่เพิ่มมากกว่าระดับปกติ แสดงถึงอาการผิดปกติหรือเกิดโรคขึ้น (พรเทพ เทียนสิวากุล, 2544) แต่ก็มีบางกรณีที่พบเป็นส่วนน้อยที่จำนวนเม็ดเลือดขาวลดลง (Copenhaver, 1958)

รายงานเกี่ยวกับความผิดปกติที่ศึกษาทางโลหิตวิทยามีหลายกรณี เช่น รายงานการศึกษา sublethal level ของแคดเมียมที่มีผลต่อการสร้างเม็ดเลือดขาวในปลาทอง (*Carassius auratus*) ที่ได้รับแคดเมียมในปริมาณ 90, 270 และ 445 ไมโครกรัม/ลิตร เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่ามีการลดลงของปริมาณเม็ดเลือดขาวทั้งหมด โดยจำนวน lymphocyte และ thrombocyte ลดลง ในขณะที่จำนวน neutrophil eosinophil และ basophil เพิ่มขึ้น (Murad และ Houston, 1988)

ส่วนรายงานจากคณะของ Cyriac และคณะ (1989) ที่ศึกษาผลระยะสั้นของทองแดงและปรอท ที่มีต่อhemoglobin และ hematocrit ของปลา *Oreochromis mossambicus* (Peter) พบว่าหลังจากที่ปลาได้รับสาร 2 ชนิดนี้ จะทำให้ปลามีการสร้างเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นเพื่อช่วยในการลำเลียงออกซิเจน โดยพิจารณจากค่า hematocrit และ hemoglobin ที่เพิ่มขึ้น และยังมีรายงานจากคณะของ Dutta และคณะ (1992) จากอินเดียที่ศึกษาผลของยาฆ่าแมลงพวก Malathion ที่มีต่อสภาวะทางโลหิตวิทยาของปลาดุกอินเดีย *Herteropneustes fossilis* (Bloch) พบว่าในปลาดุกที่ได้รับ Malathion ความเข้มข้น 11.676 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลาตั้งแต่ 24–72 ชั่วโมง มีจำนวนเม็ดเลือดแดง และhemoglobin ลดลง ในขณะที่จำนวนเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้น

Tangtong และ Wattanasirmkit (1998) รายงานถึงความผิดปกติของเลือดปลานิล *Oreochromis niloticus* ที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาอินเดียความเข้มข้น 25.07 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 เดือน พบว่าเกิดความผิดปกติทางสัณฐานของเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดแดงในกระแสเลือดมีการแบ่งตัว ส่วนเม็ดเลือดขาวโมโนไซต์มีนิวเคลียสขนาดขยายใหญ่

ตัวชี้บอกความเสียหายของตับ (Marker of hepatocyte necrosis)

เอนไซม์ SGOT และเอนไซม์ SGPT

อาการผิดปกติของตับยังสามารถวัดได้จาก activity ของเอนไซม์ aminotransferase 2 ชนิด คือ aspartate aminotransferase (AST) หรือ glutamic oxaloacetic transminase (SGOT) และ alanine aminotransferase (ALT) หรือ glutamic pyruvic transminase (SGPT) ซึ่งเป็นสิ่งที่ใช้มากที่สุดในการวินิจฉัยโรคตับ นอกจากนี้ยังเป็นค่าที่บอกถึงประสิทธิภาพการทำงานของตับ รวมทั้งการคืนสู่สภาพปกติของตับด้วย

เอนไซม์ SGOT และ SGPT เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ intracellular metabolism ของตับ โดยทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกริยาการเปลี่ยน α-keto group ของ aspartate และ alanine ไปเป็น α-keto group ของ ketoglutaric acid ซึ่งผลที่ได้คือ oxaloacetate และ pyruvate (ตามลำดับ) และต่อจากนั้น oxaloacetate และ pyruvate จะเกิด oxidation โดย NADH กลายเป็น malate และ lactate ดังสมการ

1. Aspartate + 2-oxoglutarate $\rightleftharpoons$ oxaloacetate+ glutamate

   Oxaloacetate + NADH+ H^+ $\rightleftharpoons$ malate + NAD^+

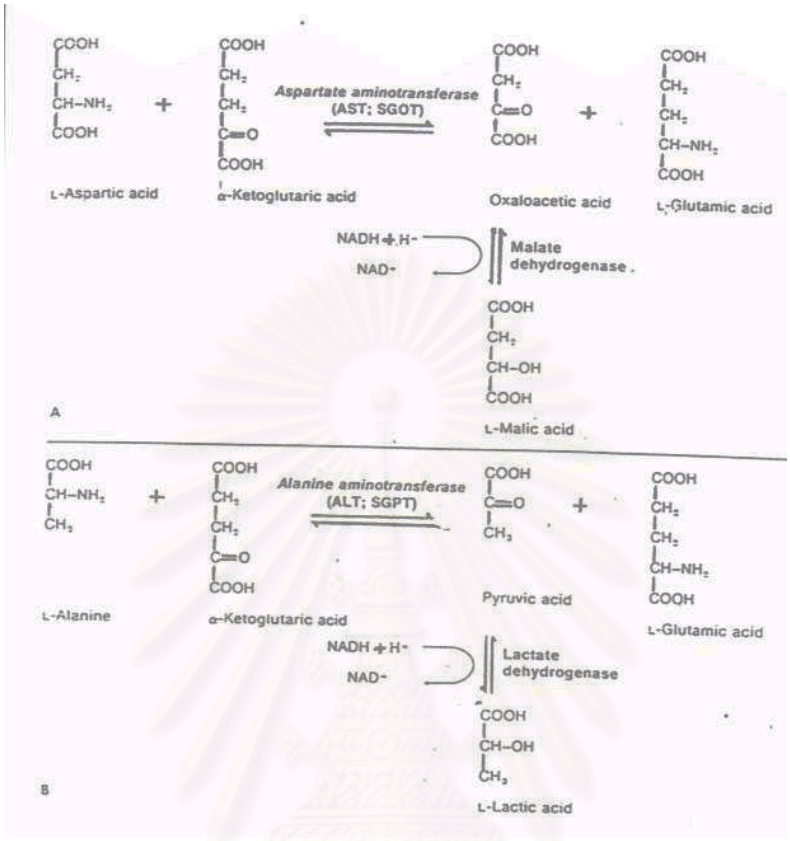
2. Alanine + 2-oxoglutarate $\rightleftharpoons$ pyruvate + glutamate

   Pyruvate + NDNH + H^+ $\rightleftharpoons$ acetate + NAD^+

จึงสามารถตรวจสอบได้โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ของ malate และ lactate ที่เกิดขึ้น (Price และ Stevens, 1999)

เอนไซม์ SGOT และ SGPT จะสร้างมากจากเซลล์ตับเวลาที่เซลล์ตับถูกทำลายหรือเกิด necrosis แล้วปล่อยออกสู่กระแสเลือด ดังนั้นการวัด activity ของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ในเลือดจึงเป็นการชี้ให้เห็นถึงสภาพตับที่ถูกทำลาย โดยที่อัตราส่วนของเอนไซม์ทั้ง 2 จะแตกต่างกันตามสภาพการถูกทำลายของตับ และการลดระดับลงของ เอนไซม์ SGOT และ SGPTในเลือดก็เป็นตัวชี้ให้เห็นถึงการกลับคืนสู่สภาพปกติของตับ (Zakim และ Boyer, 1982)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.7 แสดงการทำงานของเอนไซม์ transminase

A. เอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) หรือ glutamic oxaloacetic transminase (SGOT)

B. เอนไซม์ และ alanine aminotransferase (ALT) หรือ glutamic pyruvic transminase (SGPT)

(Zakim และ Boyer, 1982)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เตตระคลอไรด์ พบว่าระดับเอนไซม์ SGPT เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเกิดร่วมกับการที่ตับถูกทำลายอย่างเฉียบพลันทั้งที่เป็นส่วนของเซลล์ตับ ช่องไซนูซอยด์ พร้อมกับมีการสร้างไฟบรินขึ้นภายในตับ ส่วน Chakraborty และ Benerjee (1989) ศึกษาเอนไซม์ในเลือดของปลาดุก air-breathing catfish (*Heteropneustus fossilis*) ที่ได้รับสารพิษจากพืช Saponific plant toxicant ซึ่งมีผลทำลายเม็ดเลือดแดง และทำให้ระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT เพิ่มขึ้น ในขณะที่ไกลโคเจนในตับและโปรตีนในกล้ามเนื้อลดลง

Rahmann และคณะ (1990) ศึกษาความผิดปกติของเลือดและตับในไก่เล็กฮอร์นขาว ที่ได้รับ isocarp ซึ่งใช้เป็นยาฆ่าแมลง พบว่าทั้งไก่ตัวผู้และตัวเมียที่กินสาร isocarp ความเข้มข้น 75 , 112.5 และ 150 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ทุกวันเป็นเวลา 21 วัน จะมีระดับ hemoglobin hematocrit และระดับโปรตีนในเลือดลดลง รวมทั้งค่าเอนไซม์ SGPT ลดลง ในขณะที่ระดับกลูโคส ค่าเอนไซม์SGOT และ SAP (serum acid phosphatase) เพิ่มขึ้น และจาก Raje และคณะ (1990) ที่ศึกษาผลกึ่งเรื้อรังของ Lavastatin กับ acetaminophen ในหนู mice โดยให้กิน Lavastatin ผสมกับน้ำมันข้าวโพด 30 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม วันละ 3 มื้อเป็นเวลา 13 สัปดาห์และให้ acetaminophen 0.75%W/V ในน้ำดื่มเป็นเวลา 13 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าระดับเอนไซม์ SGPT (ALT) สูงขึ้นทั้งในหนูตัวผู้และตัวเมีย ส่วนผลการตรวจเนื้อเยื่อตับพบว่าเซลล์ตับบวม นอกจากนี้การศึกษาถึงผลของยารักษาวัณโรคคือ isoniazid และ rifampicin ในคนไข้ที่ได้รับยานานตั้งแต่ 3-6 เดือน พบว่าคนไข้ส่วนใหญ่จะมีระดับเอนไซม์ในตับ คือ SGOT และ SGPT เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นถึงพิษของยาที่มีต่อตับ (Krishnawamy และคณะ, 1991)

Skrzypinska-Gawrysiak และคณะ (1991) ทำการทดลองฉีดคลอโรฟอร์ม 1/8 ถึง 1 ส่วนของ lethal dose เข้าช่องท้องของหนู (mice) พบว่าระดับเอนไซม์ SGPTสูงขึ้น แสดงให้เห็นถึงความเสียหายของตับที่เกิดจากการทำลายของอนุมูลอิสระ (free radical) ที่มาจากคลอโรฟอร์ม ส่วน El-Massry และคณะ(1991) ศึกษาผลของ Vanillin ที่มีต่อขบวนการ เมตาบอลิซึมในสัตว์ทดลองโดยใช้หนูขาว (albino rat) พบว่าหลังจากหนูได้รับสารนาน 9 สัปดาห์ มีการลดลงของระดับไขมันทั้งไตรกลีเซอไรด์และคลอเลสเตอรอล ในขณะที่การทำงานของตับและไตเพิ่มขึ้น โดยพิจารณาจากผลของระดับ SGOT, SGPT และ acid phosphatase ที่เพิ่มขึ้น

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 สัตว์ทดลอง

ใช้พันธุ์กบนา *Hoplobatrachus rugulosus* Weighmann จากฟาร์มกบของคุณมนตรี คุณสมพร คำพร อำเภอวังน้อย จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

นำลูกอ๊อดกบอายุ 1 สัปดาห์มาอนุบาลในบ่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.30 เมตร ความจุ 500 ลิตรเลี้ยงเพื่อให้ปรับตัวเป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นทำการคัดกบที่มีความสมบูรณ์แข็งแรงและมีขนาดใกล้เคียงกัน สุ่มตัวอย่างนำไปเลี้ยงเพื่อทำการทดลองต่อไป ลูกอ๊อดกบที่เริ่มต้นการทดลองมีอายุ 2 สัปดาห์ ความยาวเฉลี่ย 3 เซนติเมตร

รูปที่ 3.1 ลูกอ๊อดกบนาอายุ 2 สัปดาห์

3.1.2 **อาหารสัตว์ทดลอง**

ใช้อาหารกบชนิดเม็ดสำเร็จรูปเครื่องหมายการค้า ไฮเกร็ด ซึ่งมีโปรตีนไม่ต่ำกว่า 40% และไขมันไม่เกิน 20%

3.1.3 **สารทดลอง**

ใช้สารสกัดเมล็ดสะเดาไทย *Azadirachta indica var.siamensis* Valenton ที่มีชื่อทางการค้าว่า “สะเดาไทย111” จากบริษัท ผลิตภัณฑ์สะเดาไทย จำกัด ซึ่งอยู่ในรูปสารละลายเข้มข้นและระบุสารสำคัญคือ Azadirachtin 0.1%

รูปที่ 3.2 สารสกัดเมล็ดสะเดาไทยหรือสะเดาไทย111 ชนิดน้ำเข้มข้น

3.1.4 **อุปกรณ์ต่าง ๆ** อยู่ในภาคผนวก ก.

3.1.5 **สารเคมีต่าง ๆ** อยู่ในภาคผนวก ข.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 วิธีดำเนินการทดลอง

3.2.1 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยหรือสะเดาไทย111

เพื่อกำหนดค่ามัธยฐานความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันหรือ LC_{50}ที่ 96 ชั่วโมง (50% lethal concentration at 96 hours) โดยใช้วิธี Static acute toxicity test และวิเคราะห์หาค่า LC_{50} ด้วยโปรแกรมโปรบิต (Probit analysis)(Finney,1971)

เตรียมสารละลายสะเดาไทย 111 ความเข้มข้นต่างๆที่ต้องการ คือ 1,000, 500, 100, 10, 1, 1.0 และ 0.01 ppm. โดยนำผลิตภัณฑ์สะเดาไทย 111 จากขวดที่อยู่ในรูปสารละลายเข้มข้น มาผสมน้ำกลั่นแล้วเจือจางด้วยสัดส่วนต่างๆ จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

ทดลองในโหลแก้วกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 นิ้ว สูง 14 นิ้ว ความจุ 12 ลิตร โดยเติมน้ำหรือสารละลายสะเดาไทย 111ปริมาตร 10 ลิตร จากนั้นนำลูกอ๊อดกบอายุ 2 สัปดาห์ที่เตรียมไว้มาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง แล้วดำเนินการทดลองหา Range-finding test และ Definite test ดังนี้

Range-finding test

ทำการทดลองหาช่วงความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยที่มีผลทำให้กบตายมากและน้อยกว่า 50% โดยกำหนดความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 7 ระดับ คือ 0.01,0.1 ,1, 10, 100, 500 และ1,000 ppm. ตามลำดับ ทำการทดลอง 3 ซ้ำของแต่ละความเข้มข้น และใช้สัตว์ทดลองซ้ำละ 10 ตัว เพื่อนับจำนวนกบที่ตายภายในเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

Definitive test

นำผลการทดลองจากการทดสอบข้อ 1 คือช่วงระดับความเข้มข้น 100 และ 500 ppm. มาทำการทดสอบต่อโดยกำหนดค่าความเข้มข้นให้ละเอียดขึ้นจำนวน 7 ระดับ คือ 150, 200, 250, 300, 350, 400 และ 500 ppm. ตามลำดับ ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆละ 10 ตัว นับจำนวนกบที่ตายในช่วงเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงตามลำดับ จากนั้นนำ

ข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมงโดยใช้ โปรแกรมโปรบิต (Probit analysis) (Finney,1971)

3.2.2 **การหาค่า Application factor (AF)** นำค่า LC_{50} ที่ได้มาคำนวณหาค่า Application factor (AF) เพื่อกำหนดความเข้มข้นในการทดลองหาค่าความเป็นพิษที่ระดับความเข้มข้นต่ำเป็นเวลานาน 18 สัปดาห์ (long-term level toxicity test) ในขั้นตอนต่อไป โดยการคำนวณจากสูตรดังนี้

$$AF = MATC / LC_{50\ 96\ hours}$$

MATC = ค่าความเป็นพิษสูงสุดของสารพิษที่ยอมรับได้

ค่า MATC ได้จากการประมาณโดยมีช่วงอยู่ระหว่างความเข้มข้น 2 ระดับ คือ

NOEC = ค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่มีผลต่อการตายของสัตว์ทดลอง กับ

LOEC = ค่าความเข้มข้นสูงสุดที่มีผลต่อการตายของสัตว์ทดลองน้อยที่สุด

3.2.3 **การทดลองเพื่อศึกษาผลกึ่งเรื้อรังของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยที่มีผลต่อเลือดและตับกบนาภายหลังได้รับสารในระดับความเข้มข้นต่ำเป็นระยะเวลา 18 สัปดาห์**

ขั้นตอนการดำเนินการ

ทำการทดลองโดยใช้กบอายุ 2 สัปดาห์ แบ่งออกเป็นกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยทดลองกลุ่มละ 3 ซ้ำๆละ 200 ตัว กลุ่มทดลองเลี้ยงในน้ำที่มีสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยความเข้มข้น 46.66 ppm.

การเลี้ยงกบในช่วงอายุ 2 สัปดาห์ถึง 1 เดือน เลี้ยงในบ่อพลาสติกความจุ 500 ลิตร ใส่น้ำปริมาตร 30 ลิตร ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน ส่วนการเลี้ยงกบตั้งแต่ช่วงอายุ 1 เดือนขึ้นไป เลี้ยงในบ่อปูนขนาด 40x 70x70 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่น้ำ 4 ลิตร ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวันจนกบอายุครบ 5 เดือน

สุ่มเก็บตัวอย่างกบทุกกลุ่มๆละ 10 ตัว ในระยะเวลาทุก4 สัปดาห์ เริ่มตั้งแต่ให้สารจนครบ 6 สัปดาห์ นำมาชั่งน้ำหนักตัวและน้ำหนักตับ ดูลักษณะภายนอกของตับ ศึกษา% Relative liver weight เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ t-test

3.3 วิธีการเตรียมเนื้อเยื่อตับเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

วิธีการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อตับโดยวิธีพาราฟิน และย้อมสี H&E

1. นำชิ้นเนื้อตับขนาด 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร มาดองในน้ำยา 10% buffer formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. แช่ชิ้นเนื้อตับใน ethyl alcohol เปอร์เซนต์ต่างๆเพื่อดึงน้ำออก โดยแช่ใน 70% ethyl alcohol นาน 1 ชั่วโมง 90% ethyl alcohol นาน 6 ชั่วโมง 95% ethyl alcoholนาน 6 ชั่วโมง 2 ครั้ง และ 100% n-butanol 1 ชั่วโมง ตามลำดับ
3. แช่ชิ้นเนื้อใน xylene 1 ชั่วโมง
4. นำมาแช่ในสารละลาย xylene + wax ที่ละลายในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 30 นาที ภายในตู้อบอุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. ฝังชิ้นเนื้อลงใน paraplast
6. นำชิ้นเนื้อที่ฝังใน paraplast มาตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบ rotary microtome ตัดหนา 5 ไมโครเมตร และติดบนแผ่นสไลด์

วิธีการย้อมสี Haematoxylin และ Eosin

1. นำสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อแช่ใน xylene 2 ครั้งๆละ 5 นาที
2. แช่ในแอลกอฮอลเปอร์เซนต์ต่างๆ จาก 100% n-butanol, 95% , 90% และ 70% ethanol ตามลำดับ เป็นเวลา 3 นาที ทุกขั้นตอน
3. นำสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อมาย้อมด้วยสี haematoxylin นาน 12 นาที แล้วจึง differeniate ในสารละลายที่ประกอบด้วย 70% ethyl alcohol + 2-3 หยด HCl (conc.) นาน 1 วินาที
4. ล้างด้วยน้ำประปา 10 นาที จนเห็นนิวเคลียสติดสีน้ำเงินเข้ม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. นำมาทำการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วย 70% , 90% ethyl alcohol ขั้นตอนละ 3 นาที
6. ย้อมด้วยสี eosin นาน 2 วินาที แล้วล้างสีส่วนที่เกินออกด้วย 95% ethyl alcohol นาน 2 วินาที
7. ดึงน้ำออกโดยแช่ใน n-butanol
8. แช่สไลด์ใน xylene 2 ครั้งๆละ 8 นาที แล้ว mount ด้วย canada balsum

3.4 การเก็บตัวอย่างเลือด

เมื่อให้สารครบ 10 สัปดาห์ เริ่มเก็บตัวอย่างเลือด โดยสุ่มตัวอย่างกบทุก 4 สัปดาห์ โดยเก็บตัวอย่างกลุ่มละ 8-10 ตัวทุกกลุ่ม การเก็บตัวอย่างเลือดทำโดยวิธีเจาะเลือดจากหัวใจ (cardiac puncture) เลือดจากแต่ละตัวอย่างจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน

ส่วนที่ 1 ผสมกับ EDTA ป้องกันการแข็งตัวของเลือด แล้วนำไปตรวจหาค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit) หาจำนวนเม็ดเลือดแดง ค่าฮีโมโกลบิน นับจำนวนเม็ดเลือดขาว และแยกชนิดเม็ดเลือดขาว

ส่วนที่ 2 ปล่อยให้เลือดแข็งตัว เพื่อแยกส่วนซีรั่มไปตรวจวิเคราะห์ทางชีวเคมีหาระดับเอนไซม์ 2 ชนิด คือ SGOT และ SGPT

วิธีการตรวจทางโลหิตวิทยา

การวัดค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น(Packed cell volume or Hematocrit)

โดยวิธี microhematocrit (Benjamin, 1981)(อ้างโดย อัจฉริยา ไศลสูต, 2536)ใช้ capillary tubes (75มม.x 1.0 มม.) บรรจุเลือดประมาณ ¾ ของหลอด แล้วกดปลายหลอดด้านที่มีเลือดลงไปในดินน้ำมัน นำไปปั่นในเครื่องปั่นพิเศษ 10,000-13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาอ่านค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาสิ่งต่อไปนี้ ได้แก่

จำนวนเม็ดเลือดแดง = ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น / 6 x 10^6 เซลล์/มม.^{3}

ค่าฮีโมโกลบิน = ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น / 3 กรัมเปอร์เซนต์

การวัดจำนวนเม็ดเลือดขาว

โดยใช้น้ำยาสูตร Herrick's solution (Campbell,1992) ดูดเลือดจากตัวอย่างที่เก็บมาเข้า leucocyte-diluting pipette ให้ถึงขีด 0.1 เช็ดเลือดที่ติดด้านนอก pipette ออกให้หมด แล้วดูดน้ำยาขึ้นมาจนถึงขีด 11 เขย่า pipette ประมาณ 2-4 นาที แล้วหยดน้ำยา 2-3 หยดแรกทิ้งไปเพื่อขจัดส่วนที่ไม่มีเม็ดเลือดออกให้หมด แล้วนำน้ำเจือจางเลือดจาก pipette ใส่ใน counting chamber เพื่อนำมานับจำนวนเม็ดเลือดขาวด้วยกล้องจุลทรรศน์ แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณ

จำนวนเม็ดเลือดขาว = จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ x 110 เซลล์/ มม.^{3}

การนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว

โดยการสเมียร์เลือด และแช่ใน methanol 1-2 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วย้อมด้วยสี Giemsa ที่เจือจางในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 นาน 10 นาที ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ตามด้วยน้ำ แล้วทิ้งไว้ให้แห้งตามวิธีของ Humason (1979) แล้วจึงนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อแยกชนิดเม็ดเลือดขาวและศึกษาลักษณะของเม็ดเลือด

การตรวจวิเคราะห์ค่าเอนไซม์ SGOT และ SGPT

วิธีการตรวจวิเคราะห์ค่าเอนไซม์ SGOT

1. ดูดสารละลาย SGOT substrate 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองแล้วอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
2. เติมซีรั่ม 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3. เติม phenylhydrazine 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที
4. เติม 0.4 N NaOH 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
5. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้น้ำเป็น blank แล้วตั้งค่าเป็น 0

6. พิจารณาค่า SGOT activity จาก Calibration curve

วิธีการตรวจวิเคราะห์ค่าเอนไซม์ SGPT

1. ดูดสารละลาย SGPT substrate 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองแล้วอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
2. เติมซีรั่ม 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน อุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
3. เติม phenylhydrazine 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที
4. เติม 0.4N NaOH 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
5. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้น้ำเป็น blank แล้วตั้งค่าเป็น 0
6. พิจารณาค่า SGPT activity จาก Calibration curve

3.5 การวิเคราะห์ผล

1. วิเคราะห์ข้อมูลค่าความเป็นพิษเฉียบพลันที่ 96 ชั่วโมง โดยใช้โปรแกรม Probit analysis (Finney,1971)
2. วิเคราะห์และเปรียบเทียบค่าทางสถิติของ% Relative liver weight ระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมโดยใช้ T-test
3. วิเคราะห์ผลการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับกบที่ได้รับสารสกัดเมล็ด สะเดาไทย ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 ถึง สัปดาห์ที่ 18 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพร้อมกับบันทึกผลและถ่ายภาพ
4. วิเคราะห์และเปรียบเทียบค่าทางสถิติของเลือด (Blood parameter) ได้แก่ ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น จำนวนเม็ดเลือดแดง ค่าฮีโมโกลบิน จำนวนและชนิดเม็ดเลือดขาว ค่าเอนไซม์ SGOT SGPTในเลือดระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมโดยใช้ T-test

บทที่ 4

ผลการทดลอง

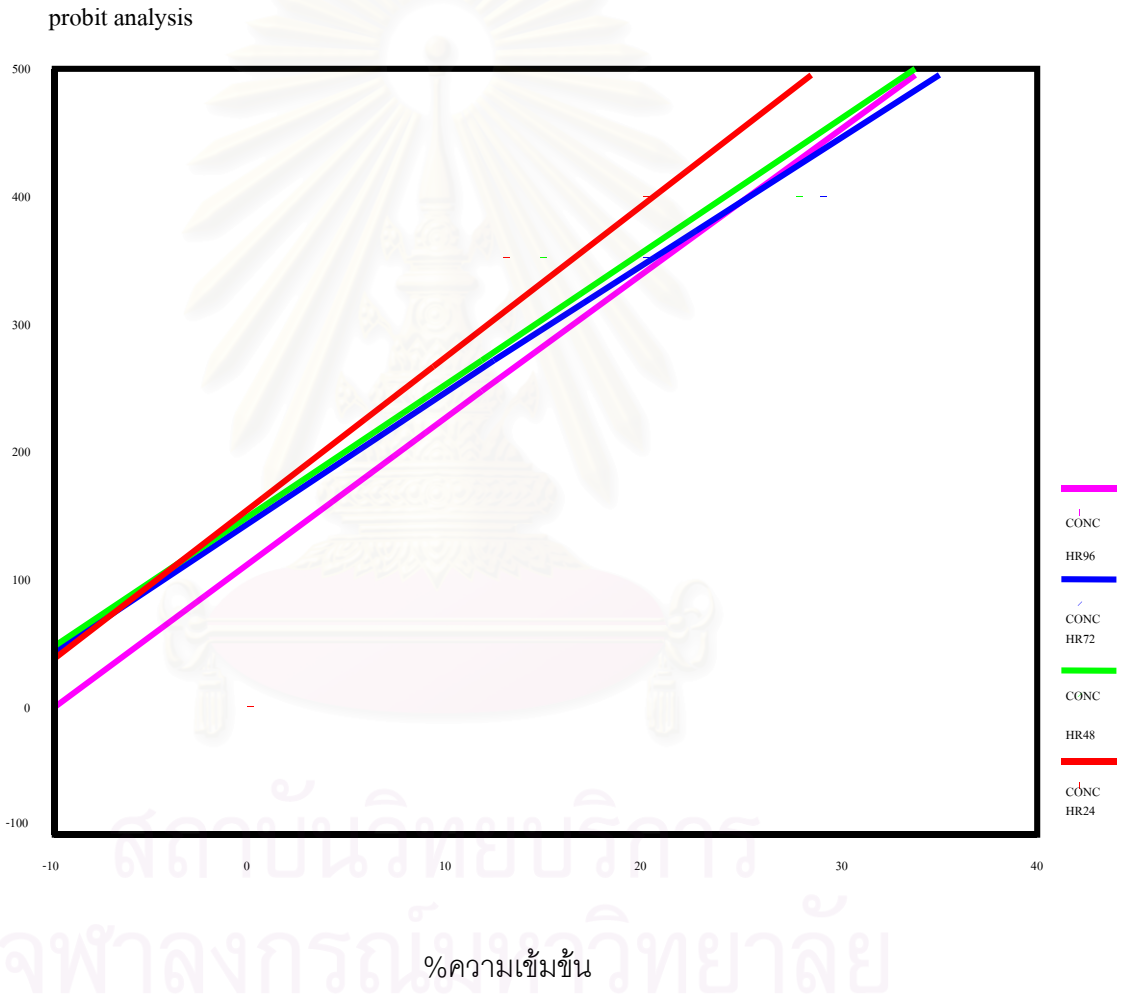
ผลการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน Acute toxicity test

ผลจากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยต่อกบอายุ 2 สัปดาห์ในเวลา 96 ชั่วโมง และวิเคราะห์จากโปรแกรม Probit analysis ปรากฏว่าได้ค่า LC_{50} ที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 353.73, 329.08, 315.87 และ 298.26 ppm. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1และรูปที่ 4.1 ส่วนเปอร์เซนต์การอยู่รอดของกบนาเมื่อได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยความเข้มข้นต่างๆ ในช่วงเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง แสดงในรูปที่ 4.2 และจากการสังเกตอาการของกบที่ได้รับพิษเฉียบพลันของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย พบว่ามีอาการทุรนทุราย ขึ้นมาหายใจถี่บริเวณผิวน้ำ เสียการทรงตัวและตายในที่สุด

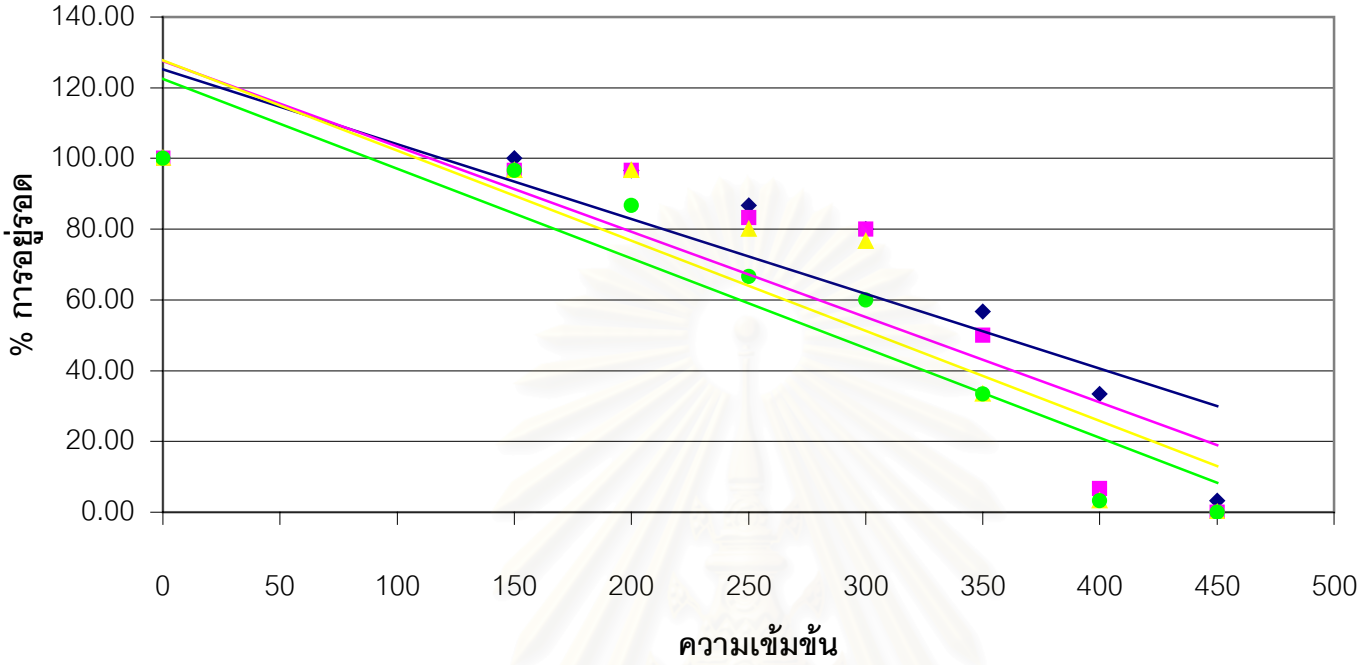
ตารางที่ 4.1 แสดงค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน LC_{50} ของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยที่มีผลต่อการตายของกบนา

เวลา (ชั่วโมง)	LC_{50} (ppm.)	**ค่าพิสัยของ LC_{50}**		R^2
		ต่ำสุด (ppm.)	**สูงสุด** (ppm.)	
24	353.73	336.66	372.48	3.83
48	329.08	297.88	363.89	13.63
72	315.87	288.76	344.81	11.09
96	298.26	281.31	315.50	5.18

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน LC_{50} ของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย หรือสะเดาไทย 111 ต่อกบนา



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงเปอร์เซนต์การอยู่รอดของกบนากับค่าความเข้มข้น (ppm.) ของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ในช่วงเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการคำนวณหาค่า Application factor (AF)

เมื่อนำค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 298.26 ppm. มาคำนวณหาค่า Application factor (AF) เพื่อกำหนดค่าความเข้มข้นที่จะนำไปใช้ทดลองความเป็นพิษของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยเป็นระยะเวลานาน 18 สัปดาห์ จากกสูตร

$$AF = MATC/ LC_{50}$$

ค่า MATC หมายถึงค่าความเข้มข้นสูงสุดของสารพิษที่ยอมรับได้ มีค่าอยู่ระหว่างความเข้มข้น 2 ระดับ คือ NOEC และ LOEC จากผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Probit analysis (ตารางที่ ค-4 ในภาคผนวก ค) พบว่า LOEC เป็นค่าความเข้มข้นสูงสุดที่สังเกตพบการตายของกบน้อยที่สุด คือค่า LC_1 มีค่าเท่ากับ 121.12 ppm.

หมายเหตุ: LC_1 หมายถึง ความเข้มข้นที่ทำให้สิ่งมีชีวิตตาย 1% หรือ ตาย 1 ตัวจากทั้งหมด 100 ตัว

ดังนั้น $MATC= LOEC = LC_1 = 121.12$ ppm.

$$AF = MATC / LC_{50}$$
$$= LC_1 / LC_{50}$$
$$= 121.12 / 298.26$$
$$= 0.41$$

จะได้ค่าความเข้มข้นที่จะนำไปใช้ในการทดสอบพิษแบบกึ่งเรื้อรัง

$$= AF \times LC_1$$
$$= 0.41 \times 121.12$$
$$= 49.66 \text{ ppm.}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษาตับกบหลังจากได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยแบบกึ่งเรื้อรัง

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยความเข้มข้น 49.66 ppm. แบบกึ่งเรื้อรัง เป็นระยะเวลานาน 18 สัปดาห์ ปรากฏว่ากบในแต่ละช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างทุก 4 สัปดาห์มีการเปลี่ยนแปลงของตับและเอนไซม์SGOT และ SGPT ที่เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพตับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมดังนี้

ลักษณะภายนอกของตับ

ตับกบปกติมีขนาดใหญ่อยู่ด้านหน้าสุดของช่องท้อง แยกเป็นพูมีสีตั้งแต่น้ำตาลอมเหลืองถึงน้ำตาลแดง ตอนท้ายของพูจะแยกเป็น 2 ส่วน ทำให้เห็นตับมีจำนวนพูตั้งแต่ 3 หรือ 4 พู ผิวด้านนอกเรียบเป็นมัน ส่วนตับกบกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. พบว่าในตับกบบางตัวจะมีสีซีดขาวหรือดำคล้ำด่างเป็นหย่อมๆ รวมทั้งมีตุ่มที่ผิวด้านนอกของตับ ซึ่งลักษณะดังกล่าวพบในกบกลุ่มทดลองบางตัวที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยเป็นเวลาตั้งแต่10 ถึง 18สัปดาห์

ผลของค่า%ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักตับกับน้ำหนักตัว (% Relative liver weight **หรือ** % R)

ค่า % R ของกบกลุ่มควบคุมที่ทำการทดลองเป็นเวลา 6, 14,10 และ 18 สัปดาห์ มีค่าเฉลี่ย 3.72 $\pm$ 0.26, 4.43 $\pm$ 0.30, 5.74$\pm$ 0.32 และ 8.0 $\pm$ 0.61 ตามลำดับ ส่วนกบในกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm.มีค่าเฉลี่ย %R 3.90$\pm$0.21, 6.11$\pm$0.18, 6.97$\pm$0.31 และ 6.69$\pm$0.31 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย%R ระหว่างกบในกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองในช่วงเวลาเดียวกัน โดยใช้สถิติ T-test ปรากฏว่ามีความแตกต่างโดยกบในกลุ่มทดลองเป็นเวลา 10 สัปดาห์ และ 14 สัปดาห์ มีค่า %R สูงกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยเป็นเวลา 18 สัปดาห์ มีค่า %Rต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$) (รูปที่ 4.3)(ตารางที่ ง-1 ในภาคผนวก ง)

ระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT ในเลือด

ระดับเอนไซม์ SGOT (IU/l) ในกบนากลุ่มควบคุมที่ทำการทดลองเป็นเวลา 10, 14 และ18 สัปดาห์ มีค่าเฉลี่ย 1530±18.9, 319.20±86.12 และ 551.0±142.69 ตามลำดับ ส่วนในกบกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm.มีค่าเฉลี่ยของระดับเอนไซม์ SGOT(IU/l) 1213.33±109.13,1809.27±174.82 และ 1258.75±196.30 ตามลำดับ และระดับเอนไซม์ SGPT (IU/l) ในกบนากลุ่มควบคุมที่ทำการทดลองเป็นเวลา 10,14 และ18 สัปดาห์ มีค่าเฉลี่ย 280.5±2.08, 157.6±12.27 และ 127.90±21.52 ตามลำดับ ส่วนในกบกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm.ในช่วงเวลาเดียวกันมีค่าเฉลี่ยของระดับเอนไซม์ SGPTในเลือด 468.54±41.78, 571.93±109.14 และ 258.08±41.09 ตามลำดับ (ตาราง 4.3) จากการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยโดยใช้ T-test พบว่าระดับเอนไซม์ SGOT ในกบนากลุ่มทดลองที่ได้รับสารเป็นเวลา 14 และ 18 สัปดาห์มีค่าสูงกว่าในกบนากลุ่มควบคุมในช่วงเวลาเดียวกัน และมีค่าเอนไซม์ SGPTของกลุ่มทดลองเป็นเวลา10 ถึง 18 สัปดาห์มีค่าสูงกว่ากบนากลุ่มควบคุมในช่วงเวลาเดียวกัน โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$) (รูปที่ 4.4 - 4.5)

ผลของเลือดกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นเวลานาน 18 สัปดาห์ ปรากฏว่ามีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นกับเลือดกบนาในด้านต่างๆดังนี้

จำนวนเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบิน และค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit)

ในกบนากลุ่มควบคุมที่ทำการทดลองเป็นเวลา 10, 14 และ 18 สัปดาห์มีค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดแดง ($x\ 10^6$ cell/mm^3) 3.8±0.27, 4.24±0.29 และ 6.2±0.49 ตามลำดับ ส่วนในกบนากลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm.ในช่วงเวลาเดียวกันมีค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดแดง 4.9±0.23, 6.15±0.23 และ 6.42±0.28 ตามลำดับ

ค่าฮีโมโกลบิน(กรัม%)ในกบนากลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ย 7.51±0.51, 8.38±0.65 และ 11.79±0.98 ตามลำดับ ส่วนในกบนากลุ่มทดลองมีค่าเฉลี่ยค่าฮีโมโกลบิน 9.47±0.46, 11.56±0.42 และ 12.34±0.55

ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น(%)ในกบนากลุ่มควบคุมมีค่า 23.5±1.67, 24.3±2.02 และ 34.1±2.75 ตามลำดับ ส่วนค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น(%)ในกบนากลุ่มทดลองมีค่าเป็น 27.67 ±1.37,33.67±1.09 และ 35.88±1.60 ตามลำดับ (ตาราง 4.4) เมื่อนำค่าเฉลี่ยเหล่านี้มาเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองในช่วงเวลาเดียวกัน โดยใช้ T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าในกบนากลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm.เป็นเวลา 10 สัปดาห์ และ 14 สัปดาห์ มีจำนวนเม็ดเลือดแดง และฮีโมโกลบินสูงกว่ากลุ่มควบคุมในช่วงเวลาเดียวกัน ส่วนค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของกลุ่มทดลองมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมในสัปดาห์ที่ 14 โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$) ส่วนกบที่ทำการทดลองเป็นเวลา 18 สัปดาห์ค่าเหล่านี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
(รูปที่ 4.6 – 4.8)

จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด

จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด(x 10^2 cell/mm^3)ในกบนากลุ่มควบคุมที่ทำการทดลองเป็นเวลา10, 14 และ18 สัปดาห์ มีค่าเฉลี่ย 72.26±5.21, 148.37±38.0 และ 81.0±34.24 ตามลำดับ ส่วนในกบนากลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. ในช่วงเวลาเดียวกันมีค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาว 148.57±10.87, 158.14±8.93 และ 195.80±18.64 ตามลำดับ (ตาราง 4.4) ซึ่งเมื่อใช้ T-test เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง จะพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ในกลุ่มทดลองเป็นเวลา 10 และ 18 สัปดาห์ มีจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงกว่ากลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.9และรูปที่ 4.26)

เปอร์เซนต์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด

เปอร์เซนต์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดได้แก่ %lymphocyte, monocyte, neutrophil, basophil และ eosinophil ในกบนากลุ่มควบคุมกับกบนากลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. มีค่าต่างๆตามตาราง 4.5 ดังนี้

% lymphocyteในกบนากลุ่มควบคุมที่ทำการทดลองเป็นเวลา10 , 14 และ 18 สัปดาห์มีค่า 79.6±0.48, 38.8±11.08 และ 54.7±7.85 ตามลำดับ ส่วนในกบนากลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm.เป็นเวลา 10 , 14 และ 18 สัปดาห์ มีค่า 56.42±2.47,35.9±1.56 และ 28.08±4.31 ตามลำดับ

% monocyte ในกบนานากลุ่มควบคุมที่ทำการทดลอง10 , 14 และ 18 สัปดาห์มีค่า 3.4±0.52, 6.7±1.54 และ 10.8±2.22 ตามลำดับส่วนในกบนากลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. มีค่า 14.75±1.43, 15.03±1.01 และ 11±1.28

% neutrophil ในกบนากลุ่มควบคุมที่ทำการทดลอง10 , 14 และ 18 สัปดาห์มีค่า 8.0±0.49, 41±10.83 และ 13.0±4.14 ตามลำดับ ส่วนในกบนากลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. มีค่า 23.0±2.48, 15.9±2.99 และ 50.75±5.2

% basophil ในกบนากลุ่มควบคุมที่ทำการทดลอง10 , 14 และ 18 สัปดาห์ มีค่า 4.4±0.58, 4.0±0.94 และ 7.9±1.52 ตามลำดับ ส่วนในกบนากลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นเวลา10 , 14 และ 18 สัปดาห์ มีค่า 1.25±0.43, 18.07±1.79 และ 2.5±0.35

% eosinophil ในกบนากลุ่มควบคุมที่ทำการทดลอง10 , 14 และ 18 สัปดาห์ มีค่าเฉลี่ย 4.6±1.27, 8.7±3.27 และ 13.6±2.99 ตามลำดับ ส่วนในกบนากลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. มีค่า 4.58±1.05, 15.17±1.3 และ 7.67±1.42

เมื่อนำค่าเหล่านี้มาเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองในช่วงเวลาเดียวกัน โดยใช้ T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกรณีต่อไปนี้ ได้แก่ %lymphocyteในกลุ่มทดลองที่ได้รับสารเป็นเวลา 10 และ 18 สัปดาห์มีค่าต่ำกว่าของกลุ่มควบคุมในช่วงเวลาเดียวกัน

%monocyte ในกลุ่มทดลองที่ได้รับสารเป็นเวลา 10 และ 14 สัปดาห์มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมในช่วงเวลาเดียวกัน

%neutrophil ในกลุ่มทดลองที่ได้รับสารเป็นเวลา 10 และ 18 สัปดาห์มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมในช่วงเวลาเดียวกัน แต่มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมในการทดลองเป็นเวลา 14 สัปดาห์

%basophil ในกลุ่มทดลองที่ได้รับสารเป็นเวลา 10 และ 18 สัปดาห์มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมในช่วงเวลาเดียวกัน แต่สูงกว่ากลุ่มควบคุมในการทดลองเป็นเวลา 14 สัปดาห์ ($p \leq 0.05$)

%eosinophil ของทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการทดลองเป็นเวลา 10 สัปดาห์ แต่ในกลุ่มทดลองเป็นเวลา 14 และ 18 สัปดาห์มีความแตกต่างโดยที่ในกลุ่มทดลองเป็นเวลา 14 สัปดาห์มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม และพบว่าในกลุ่มทดลองเป็นเวลา 18 สัปดาห์มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ผลการศึกษาเนื้อเยื่อตับภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดกับเนื้อเยื่อตับกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm.เป็นเวลา 6, 10 , 14 และ 18 สัปดาห์ ประเมินโดยใช้หลักการของการเกิด cell injury ซึ่งจาก Nowak และ Hanford (1994) ได้สรุปไว้ดังนี้

การเกิด cell injury มาจาก 3 สาเหตุใหญ่ๆได้แก่ การที่เซลล์ขาดสารที่จำเป็น การได้รับสารพิษ และ การที่เซลล์ถูกทำอันตราย ซึ่งการทดลองครั้งนี้ความเสียหายของเซลล์ตับกบมีสาเหตุมาจากการได้รับสารพิษ (intoxication) ในระดับที่สามารถทำอันตรายต่อเซลล์โดยตรง มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดังนี้

ผลที่เกิดจากการตอบสนองของเซลล์ตับที่ได้รับอันตรายและนำมาใช้พิจารณาการเปลี่ยนแปลงในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่

Hydropic change เกิดจากการที่มีน้ำเข้ามาในเซลล์มากผิดปกติ จนทำให้เซลล์บวม และถ้าการสะสมน้ำเกิดในออร์กาแนลต่างๆ จะมีผลทำให้ เกิดcloudy swelling

มีการรวมกลุ่มของโครโมโซมรอบๆเยื่อหุ้มนิวเคลียส เรียก Perinuclear chromatin clumping

Fatty change การเสียสภาพของตับทำให้เกิดความผิดปกติ ซึ่งอาจมีการสะสมไขมันมากผิดปกติ หรือไม่มีการสะสมไขมันในเซลล์ตับ

เมื่อเซลล์ได้รับอันตรายรุนแรงจนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพปกติ (irreversible change) และนำไปสู่การตายของเซลล์ ที่เรียกว่า necrosis ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสในลักษณะต่างๆดังต่อไปนี้

karyolysis เป็นการที่นิวเคลียสจางลงและสลายไป

pyknosis นิวเคลียสจะหดตัวเล็กลง

karyorrhexis นิวเคลียสแตกเป็นเสี่ยงๆ

ผลที่เกิดกับเนื้อเยื่อตับกบที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. **แบบกึ่งเรื้อรัง เป็นเวลานาน 18 สัปดาห์**

ลักษณะเนื้อเยื่อตับกบปกติ

จากการศึกษาเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มควบคุมที่ทำการทดลองเป็นเวลา 6, 10, 14 และ 18 สัปดาห์ (รูปที่ 4.10, 4.14, 4.19 และ 4.22) พบว่าตับกบมีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อปกติ ประกอบด้วยเซลล์ตับรูปร่างหลายเหลี่ยมมีนิวเคลียสกลมอยู่ค่อนไปด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ เนื่องจากถูกไขมันสะสมดันไป มีนิวคลีโอลัส 1-2 อัน เมื่อย้อมด้วยสี H&Eนิวเคลียสติดสีม่วงเข้มของ hematoxylinเห็นนิวคลีโอลัสชัดเจน ไซโตพลาสซึมติดสีชมพูของ eosin และมีบริเวณที่เป็นช่องว่างเนื่องจากไขมันสะสมที่ถูกชะล้างในขั้นตอนของการย้อมสี ปริมาณไขมันสะสมแตกต่างกันไปตามอายุและภาวะโภชนาการของกบ การจัดเรียงตัวของเซลล์ตับไม่เป็นระเบียบ ไม่เห็นเป็นแนวรัศมี จะเห็นเซลล์ตับเรียงตัวเป็น 2 แถวและกั้นด้วยช่องไซนูซอยด์ ซึ่งเป็นทางติดต่อกับเส้นเลือด central vein มีเส้นเลือด และท่อน้ำดีกระจายภายในเนื้อเยื่อตับ (รูปที่ 4.10) เนื้อเยื่อตับถูกหุ้มด้วยเยื่อหุ้มตับ เป็นเซลล์แบนบางชนิด simple squamous epithelium

ลักษณะตับกบกลุ่มทดลอง ที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นเวลา 6, 10, 14 และ 18 สัปดาห์ เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงดังต่อไปนี้

กลุ่มทดลองที่ได้รับสารเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เยื่อหุ้มตับมีความหนาผิดปกติและมีการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวใต้เยื่อหุ้มตับ ช่องไซนูซอยด์ขยายและมีเม็ดเลือดแดงคั่งภายใน กบบางตัวมีเลือดออกในเนื้อเยื่อตับ(hemorrhagic area) (รูปที่ 4.11) มีการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวและมาโครฟาจในระหว่างเซลล์ตับ (รูปที่ 4.11 A) นอกจากนี้ยังพบการตายของเซลล์ตับทั้งแบบเป็นกลุ่มและแบบแพร่กระจาย (รูปที่ 4.12 B) ส่วนความผิดปกติของนิวเคลียส พบทั้งแบบ perinuclear chromatin clumping nucleus และ การสลายตัวของนิวเคลียส (รูปที่ 4.13)

กลุ่มทดลองที่ได้รับสารเป็นเวลา 10 สัปดาห์ สภาพความเสียหายของตับและการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดคือ เยื่อหุ้มตับผิดปกติ โดยความหนาเพิ่มขึ้นและมีการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวใต้เยื่อหุ้มตับ (รูปที่ 4.15) มีการขยายตัวของช่องไซนูซอยด์ พบเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวคั่งภายในช่องไซนูซอยด์ (รูปที่ 4.17 A) การตายของเซลล์ตับพบน้อยกว่าในการทดลองสัปดาห์ที่ 6

(รูปที่ 4.17 – 4.18) ส่วนความผิดปกติของนิวเคลียสยังคงพบเช่นเดียวกับในสัปดาห์ที่ 6 (รูปที่ 4.16) และในกบบางตัวมีการสะสมของไขมันผิดปกติ (รูปที่ 4.17 B)

กลุ่มทดลองที่ได้รับสารเป็นเวลา 14 สัปดาห์ สภาพความเสียหายของตับใกล้เคียงกับในการทดลองสัปดาห์ที่ 10 ยังคงพบเยื่อหุ้มตับที่หนาและมีการอักเสบ ภาวะเลือดออกในเนื้อเยื่อตับ(รูปที่ 4.20) มีการขยายตัวของช่องไซนูซอยด์และมีการคั่งของเม็ดเลือดภายใน พบการตายของเซลล์ตับทั้งแบบกระจายและแบบเป็นกลุ่ม (รูปที่ 4.20) ยังคงมีการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวและมาโครฟาจระหว่างเซลล์ตับ (รูปที่ 4.21) ในกบบางตัวมีการสะสมไขมันผิดปกติ (รูปที่ 4.21 B) และมีความผิดปกติของนิวเคลียสแบบต่างๆรวมทั้งการสลายตัวของนิวเคลียส (รูปที่ 4.21)

กลุ่มทดลองที่ได้รับสารเป็นเวลา 18 สัปดาห์ การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับในช่วงนี้มีความรุนแรงน้อยกว่าของการทดลองช่วง 14 สัปดาห์ที่ผ่านมา คือภาวะเลือดออกในเนื้อเยื่อตับลดลง การแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวและมาโครฟาจระหว่างเซลล์ตับพบน้อยลงเมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 14 ส่วนการเปลี่ยนแปลงที่ยังคงพบโดยทั่วไป ได้แก่ ความผิดปกติของเยื่อหุ้มตับ (รูปที่ 4.23) การขยายตัวของช่องไซนูซอยด์ การตายของเซลล์ตับ (รูปที่ 4.24) รวมทั้งความผิดปกติของนิวเคลียสแบบต่างๆ (รูปที่ 4.25)

การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับกบในลักษณะต่างๆภายหลังจากที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 6 ถึง 18 สัปดาห์ แสดงในตาราง 4.6 และ 4.7 โดยเยื่อหุ้มตับกบกลุ่มทดลองมีความหนาผิดปกติ และหนามากในกลุ่มทดลองที่ได้รับสารนาน 14 และ 18 สัปดาห์ ส่วนการขยายตัวของช่องไซนูซอยด์และการคั่งของเลือดในช่องไซนูซอยด์เริ่มพบตั้งแต่การทดลองในสัปดาห์ที่ 6 และพบมากขึ้นเมื่อระยะเวลาที่ได้รับสารเพิ่มขึ้น การแทรกตัวของเลือดในเนื้อเยื่อตับ การแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวและมาโครฟาจพบมากที่สุดในกลุ่มทดลองที่ได้รับสารนาน 14 สัปดาห์ ส่วนความผิดปกติของนิวเคลียสพบในกลุ่มทดลองตั้งแต่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย 6 – 18 สัปดาห์ และการตายของเซลล์ตับพบมากที่สุดในช่วง 6 สัปดาห์แรกของการทดลอง ในสัปดาห์ที่ 10 – 18 พบการตายของเซลล์ตับน้อยกว่าในสัปดาห์ที่ 6

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าของน้ำหนักตัว น้ำหนักตับ และ % Relative liver weight (%R) ของกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 6-18 สัปดาห์ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ระยะเวลา	**กลุ่มควบคุม**			**กลุ่มทดลอง**		
	น้ำหนักตัว (กรัม)	น้ำหนักตับ (กรัม)	%R	น้ำหนักตัว (กรัม)	น้ำหนักตับ (กรัม)	%R
6 สัปดาห์	9.62 ± 0.87 (n=10)	0.37 ± 0.005 (n=10)	3.72 ± 0.26 (n=10)	3.55 ± 0.54* (n=30)	0.15 ± 0.002* (n=30)	3.90 ± 0.21 (n=30)
10 สัปดาห์	40.30 ± 1.70 (n=10)	1.78 ± 0.10 (n=10)	4.43 ± 0.30 (n=10)	97.0 ± 5.70* (n=24)	6.00 ± 0.40* (n=24)	6.11 ± 0.18* (n=24)
14 สัปดาห์	156.20 ± 6.00 (n=10)	8.90 ± 0.54 (n=10)	5.74 ± 0.32 (n=10)	121.5 ± 5.30* (n=30)	8.16 ± 0.40 (n=30)	6.97 ± 0.31* (n=30)
18 สัปดาห์	163.70 ± 18.00 (n=10)	13.58 ± 2.00 (n=10)	8.00 ± 0.61 (n=10)	124.8 ± 5.40* (n=24)	8.54 ± 0.63* (n=24)	6.69 ± 0.31* (n=24)

หมายเหตุ

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง ในช่วงเวลาเดียวกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 แสดงระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT(IU/l)ในเลือดกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 10 – 18 สัปดาห์ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ระยะเวลาที่ได้รับสาร	**กลุ่มควบคุม**		**กลุ่มทดลอง**	
	SGOT	SGPT	SGOT	SGPT
10 สัปดาห์	1530 ± 18.9 (n=8)	280.5 ± 2.08 (n=8)	1213.33 ± 109.13 (n=24)	468.54 ± 41.78* (n=24)
14 สัปดาห์	319.20 ± 86.12 (n=10)	157.60 ± 12.27 (n=10)	1809.27 ±174.82* (n=30)	571.93 ±109.14* (n=30)
18 สัปดาห์	551.0 ± 142.69 (n=10)	127.90 ± 21.52 (n=10)	1258.75 ±196.30* (n=24)	258.08 ± 41.09* (n=24)

หมายเหตุ

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองในช่วงเวลาเดียวกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 แสดงส่วนประกอบของเลือด (Haematological parameter) กบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 10 - 18 สัปดาห์ (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ระยะเวลา	กลุ่มควบคุม				กลุ่มทดลอง			
	เม็ดเลือดขาว ($x10^2$ cell/mm^3)	เม็ดเลือดแดง ($x10^6$ cell/mm^3)	ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%)	ฮีโมโกลบิน กรัม %	เม็ดเลือดขาว ($x10^2$ cell/mm^3)	เม็ดเลือดแดง ($x10^6$ cell/mm^3)	ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%)	ฮีโมโกลบิน กรัม %
10 สัปดาห์	72.16 $\pm$ 5.21 (n=10)	3.8 $\pm$ 0.27 (n=10)	23.50 $\pm$ 1.67 (n=10)	7.51 $\pm$ 0.51 (n=10)	148.57 $\pm$ 10.87* (n=24)	4.9 $\pm$ 0.23* (n=24)	27.67 $\pm$ 1.37 (n=24)	9.47 $\pm$ 0.46* (n=24)
14 สัปดาห์	148.37 $\pm$ 38.00 (n=10)	4.24 $\pm$ 0.29 (n=10)	24.30 $\pm$ 2.02 (n=10)	8.38 $\pm$ 0.65 (n=10)	158.14$\pm$ 8.93 (n=30)	6.15 $\pm$ 0.23* (n=30)	33.67 $\pm$ 1.09* (n=30)	11.56 $\pm$ 0.42* (n=30)
18 สัปดาห์	81.0 $\pm$ 34.24 (n=10)	6.2 $\pm$ 0.49 (n=10)	34.10 $\pm$ 2.75 (n=10)	11.79 $\pm$ 0.98 (n=10)	195.80 $\pm$ 18.64* (n=24)	6.42 $\pm$ 0.28 (n=24)	35.88 $\pm$ 1.60 (n=24)	12.34 $\pm$ 0.55 (n=24)

หมายเหตุ

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองในช่วงเวลาเดียวกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

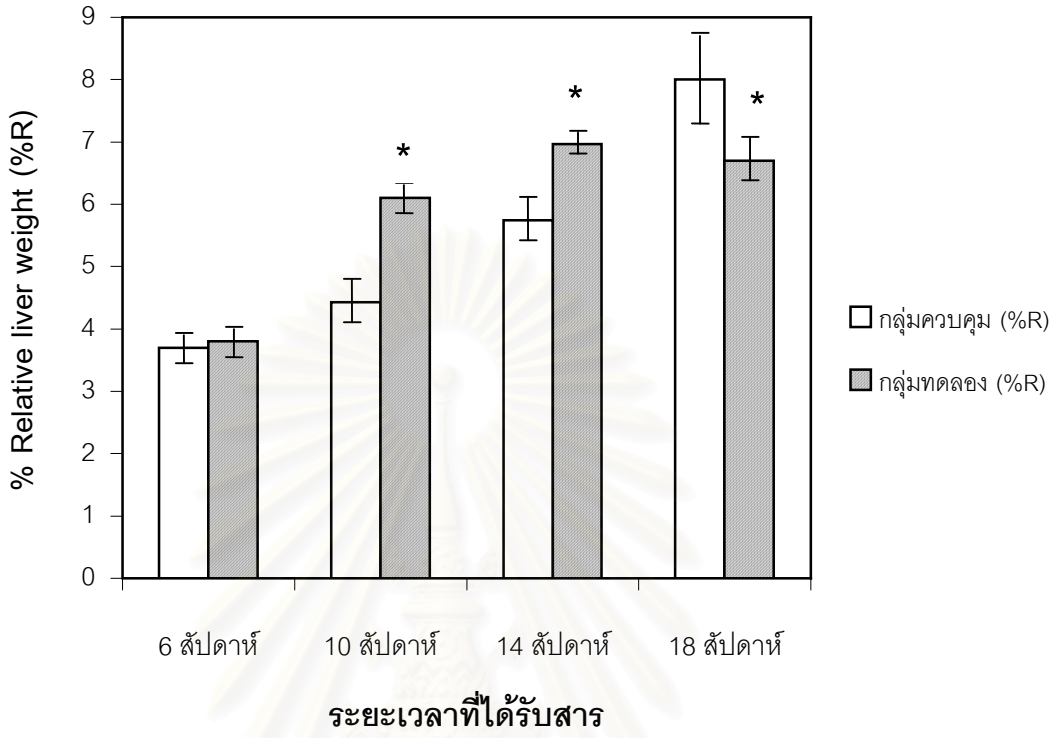
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 แสดงเปอร์เซนต์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดในกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลา 10 - 18 สัปดาห์ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ระยะเวลา	กลุ่มควบคุม					กลุ่มทดลอง				
	%Lymphocyte	%Monocyte	%Neutrophil	%Basophil	%Eosinophil	%Lymphocyte	%Monocyte	%Neutrophil	%Basophil	%Eosinophil
10 สัปดาห์	79.6±0.48 (n=10)	3.4±0.52 (n=10)	8.0±0.49 (n=10)	4.4±0.58 (n=10)	4.6±1.27 (n=10)	56.42±2.47* (n=24)	14.75±1.43* (n=24)	23.0±2.48* (n=24)	1.25±0.43* (n=24)	4.58±1.05 (n=24)
14 สัปดาห์	38.8±11.08 (n=10)	6.7±1.54 (n=10)	41±10.83 (n=10)	4.0±0.94 (n=10)	8.7±3.27 (n=10)	35.9±1.56 (n=30)	15.03±1.01* (n=30)	15.9±2.99* (n=30)	18.07±1.79* (n=30)	15.17±1.3* (n=30)
18 สัปดาห์	54.7±7.85 (n=10)	10.8±2.22 (n=10)	13.0±4.14 (n=10)	7.9±1.52 (n=10)	13.6±2.99 (n=10)	28.08±4.31* (n=24)	11±1.28 (n=24)	50.75±5.2* (n=24)	2.5±0.35* (n=24)	7.67±1.42* (n=24)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง ในช่วงเวลาเดียวกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

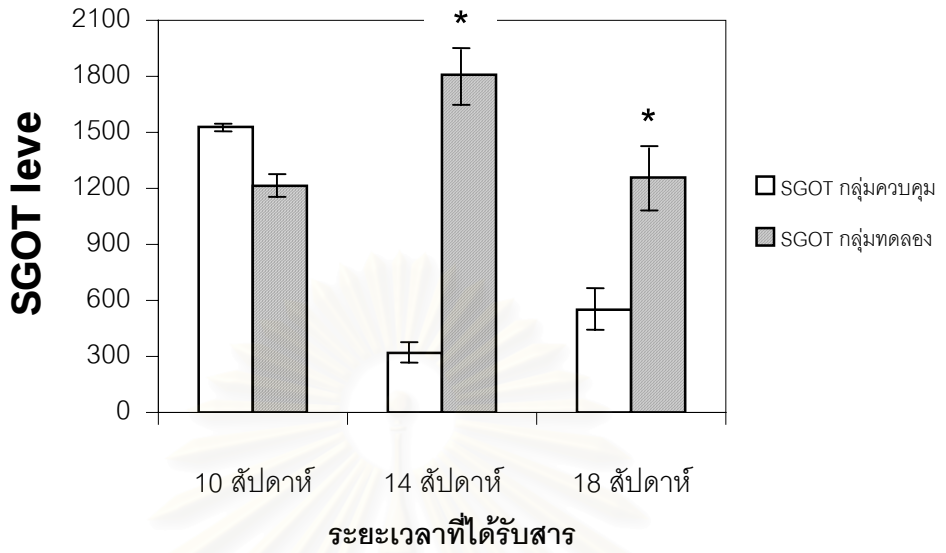


รูปที่ 4.3 แผนภูมิแสดง %Relative liver weight (%R) ของกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 6 -18 สัปดาห์

(ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง ในช่วงเวลาเดียวกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

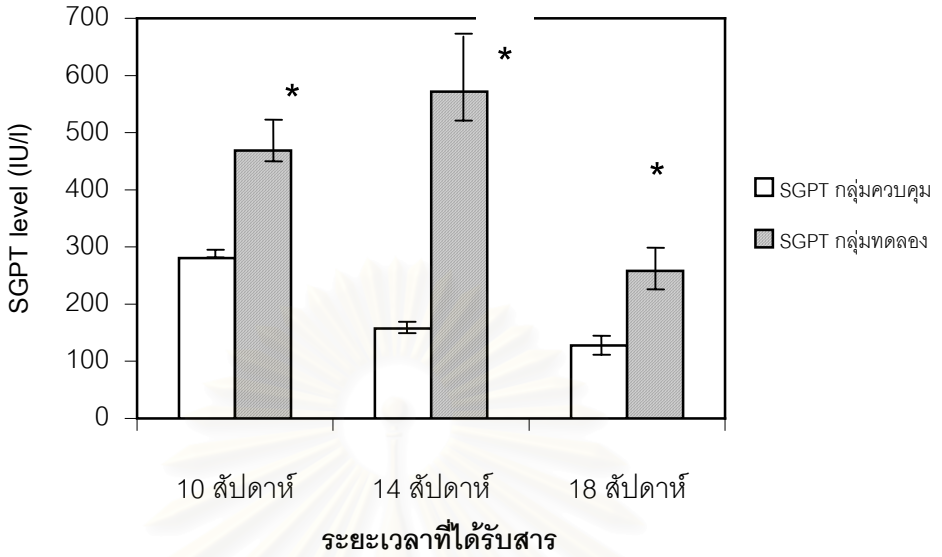


รูปที่ 4.4 แผนภูมิแสดงระดับเอนไซม์ SGOT ในเลือดกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 10 – 18 สัปดาห์

(ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง ในช่วงเวลาเดียวกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

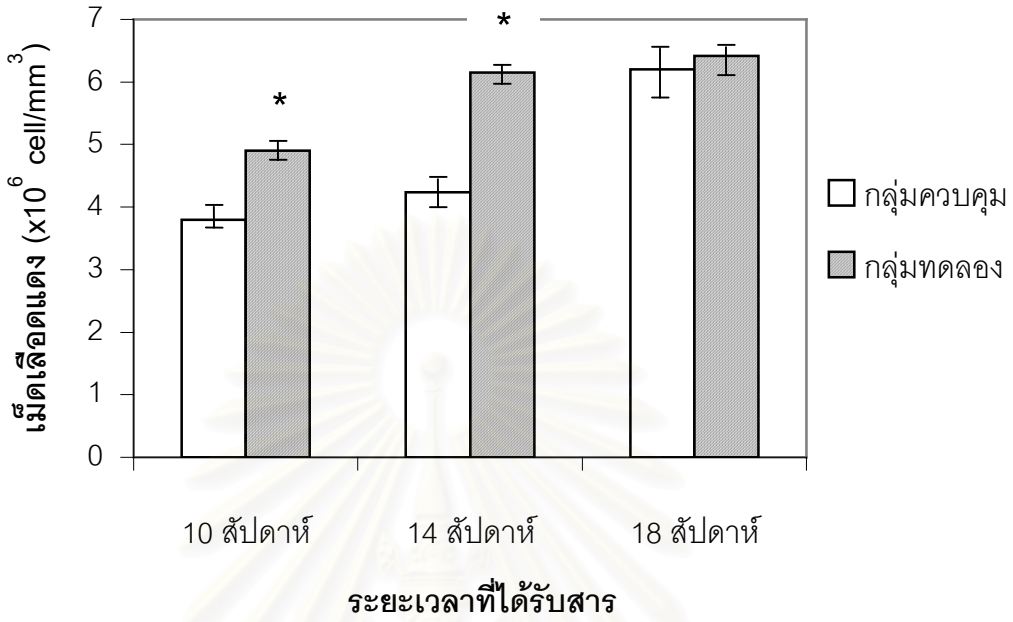


รูปที่ 4.5 แผนภูมิแสดงระดับเอนไซม์ SGPT ในเลือดกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 10 – 18 สัปดาห์

(ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง ในช่วงเวลาเดียวกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

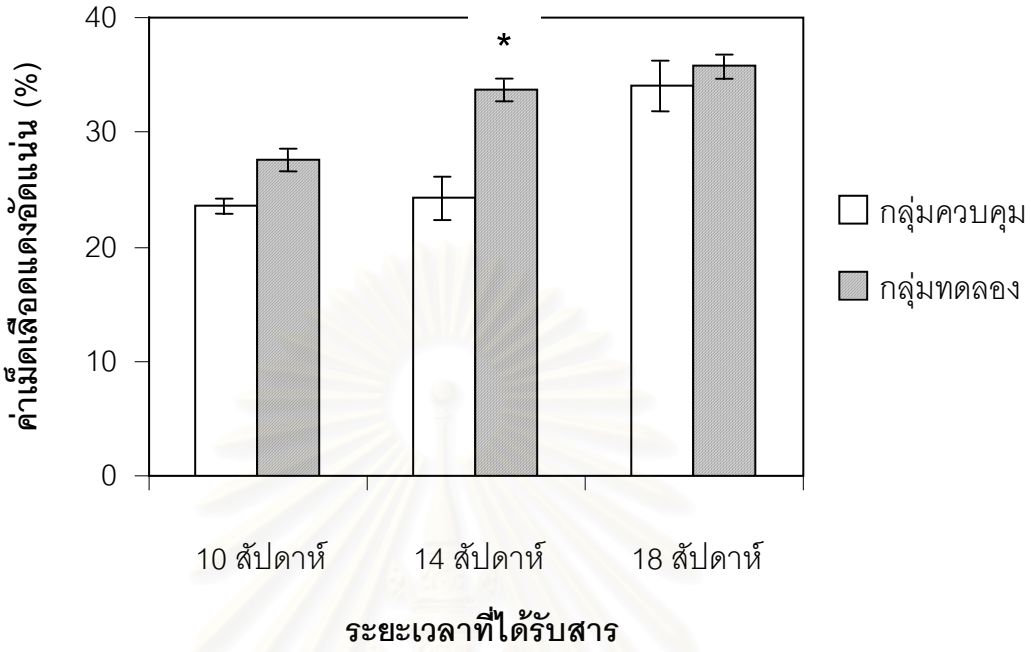


รูปที่ 4.6 แผนภูมิแสดงปริมาณเม็ดเลือดแดงของกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 10 - 18 สัปดาห์

(ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

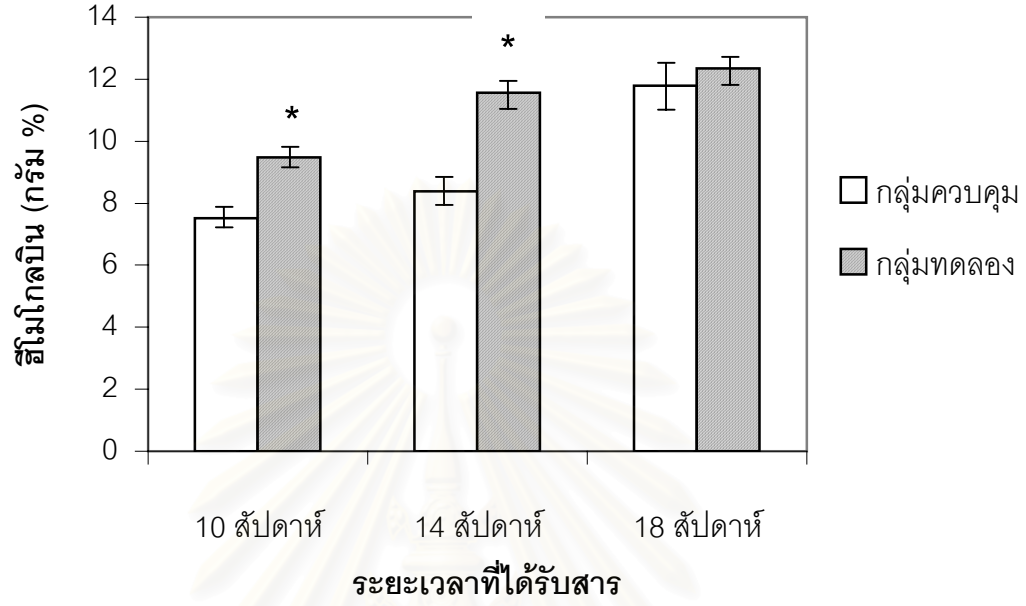
* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง ในช่วงเวลาเดียวกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.7 แผนภูมิแสดงค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 10 - 18 สัปดาห์
(ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง ในช่วงเวลาเดียวกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

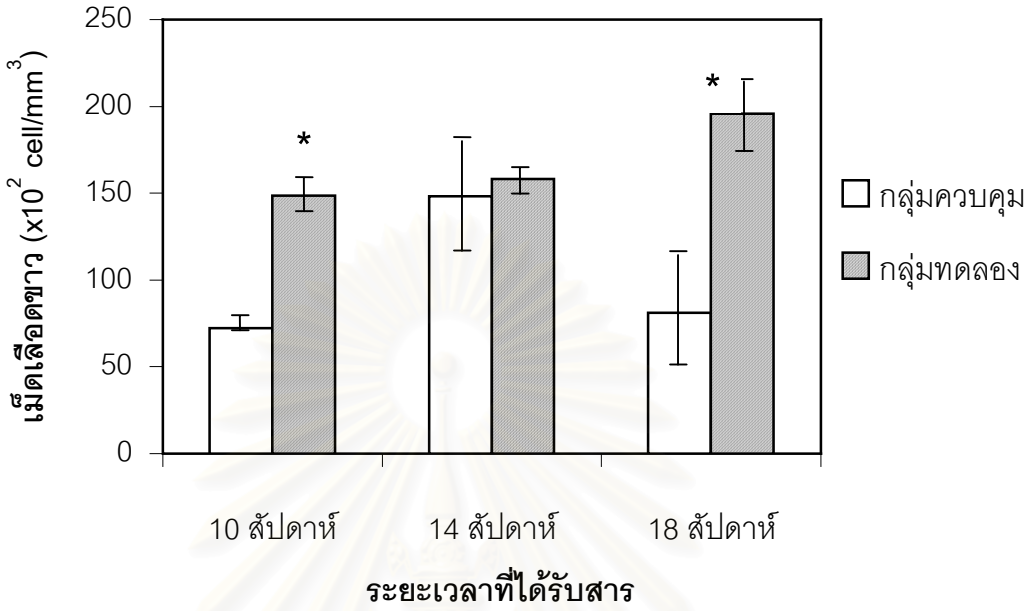


รูปที่ 4.8 แผนภูมิแสดงปริมาณฮีโมโกลบินของกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 10 - 18 สัปดาห์

(ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง ในช่วงเวลาเดียวกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.9 แผนภูมิแสดงปริมาณเม็ดเลือดขาวของกบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 10 - 18 สัปดาห์

(ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง ในช่วงเวลาเดียวกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6 แสดงจำนวนกบนาที่มีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับในลักษณะต่างๆ ภายหลังที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 6 ถึง18 สัปดาห์

	กลุ่มควบคุม				กลุ่มทดลอง			
สัปดาห์ที่	6	10	14	18	6	10	14	18
จำนวนสัตว์ทดลอง	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=30)	(n=24)	(n=30)	(n=24)
เยื่อหุ้มตับ								
เยื่อหุ้มตับปกติ	10	10	10	10	4	5	0	1
เยื่อหุ้มตับหนา	0	0	0	0	12	15	21	7
เยื่อหุ้มตับหนามาก	0	0	0	0	14	4	9	16
พบเม็ดเลือดขาวคั่งอยู่ในเยื่อหุ้มตับ	0	0	0	0	2	9	11	3
การขยายตัวของช่องไซนูซอยด์								
ไม่พบการขยายตัวของช่องไซนูซอยด์	10	10	10	10	2	0	0	0
มีการขยายตัวน้อย	0	0	0	0	12	11	5	5
มีการขยายตัวปานกลาง	0	0	0	0	13	13	21	12
มีการขยายตัวมาก	0	0	0	0	3	0	4	7
การคั่งของเลือดในไซนูซอยด์ และเนื้อเยื่อตับ								
ไม่พบการคั่งของเลือด	10	10	10	10	2	0	1	3
มีการคั่งของเลือดในไซนูซอยด์	0	0	0	0	28	24	29	21
มีการแทรกของเลือดในเนื้อเยื่อตับ	0	0	0	0	5	4	14	4

ตาราง 4.6 (ต่อ)

	กลุ่มควบคุม				กลุ่มทดลอง			
สัปดาห์ที่	6	10	14	18	6	10	14	18
จำนวนสัตว์ทดลอง	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=30)	(n=24)	(n=30)	(n=24)
การแทรกตัวของเม็ดโลหิตขาวและมาโครฟาจในเนื้อเยื่อตับ								
ไม่พบ	10	10	10	10	3	1	0	3
พบน้อย	0	0	0	0	13	5	8	11
พบมาก	0	0	0	0	14	18	22	10
ความผิดปกติของนิวเคลียส								
ไม่พบความผิดปกติของนิวเคลียส	10	10	10	10	0	0	0	0
Perinuclear chromatin clumping	0	0	0	0	27	20	29	23
นิวเคลียสผิดปกติแบบ pyknotiic	0	0	0	0	8	21	20	22
นิวเคลียสเป็นฝ้ามัวและเริ่มสลาย	0	0	0	0	27	22	19	4
นิวเคลียสสลาย	0	0	0	0	20	20	27	24
การตายของเซลล์ตับ								
ไม่พบการตายของเซลล์ตับ	10	10	10	10	2	9	14	10
มีการตายเป็นกลุ่มๆ และแบบแพร่กระจาย	0	0	0	0	28	15	16	14

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.7 แสดงผลเฉลี่ยของความรุนแรงในการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับของกบที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm.เป็นระยะเวลา 6 - 18 สัปดาห์

	กลุ่มควบคุม				กลุ่มทดลอง			
สัปดาห์	6	10	14	18	6	10	14	18
เยื่อหุ้มตับมีความผิดปกติ	-	-	-	-	+++	+++	++++	++++
มีการคั่งของเม็ดเลือดขาวใต้เยื่อหุ้มตับ	-	-	-	-	+	+	++	+
มีการขยายตัวของไซนูซอยด์	-	-	-	-	+++	++++	++++	++++
มีการคั่งของเลือดในไซนูซอยด์	-	-	-	-	+++	++++	++++	+++
มีการแทรกของเลือดในเนื้อเยื่อตับ	-	-	-	-	+	+	++	+
มีการตายของเซลล์ตับ	-	-	-	-	+++	++	++	++
การแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวและมาโครฟาจในเนื้อเยื่อตับ	-	-	-	-	+++	+++	++++	+++
ความผิดปกติของนิวเคลียส	-	-	-	-	++++	++++	++++	++++

หมายเหตุ

- ไม่พบการเปลี่ยนแปลง

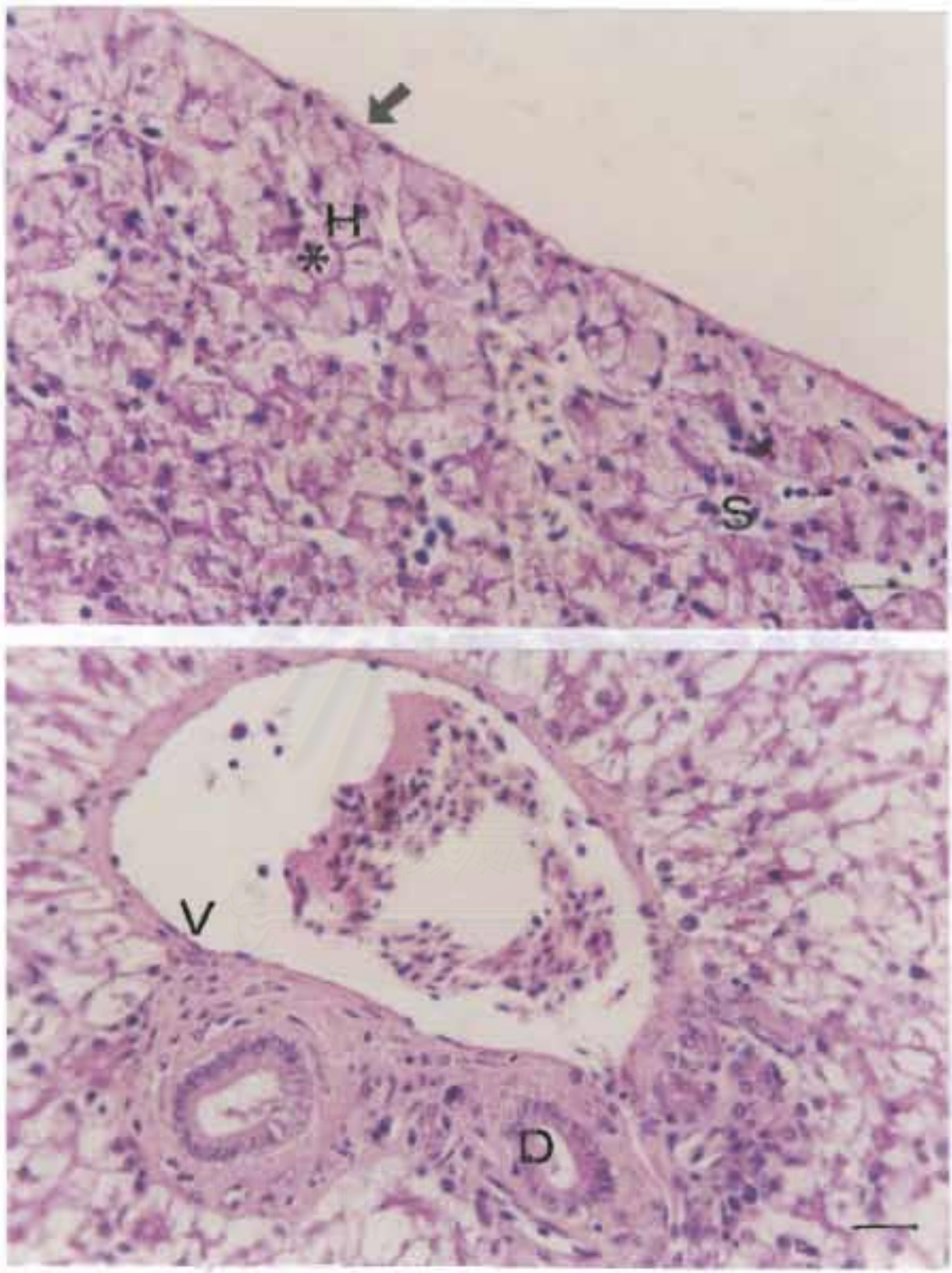
+ พบการเปลี่ยนแปลงรุนแรงน้อย คิดเป็น 1/4หรือ 25 % ของจำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมด

++ พบการเปลี่ยนแปลงรุนแรงปานกลาง คิดเป็น 1/2 หรือ 50% ของจำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมด

+++ พบการเปลี่ยนแปลงรุนแรงมาก คิดเป็น 3/4 หรือ 75% ของจำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมด

++++ พบการเปลี่ยนแปลงรุนแรงมาก คิดเป็น100% หรือ ของจำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

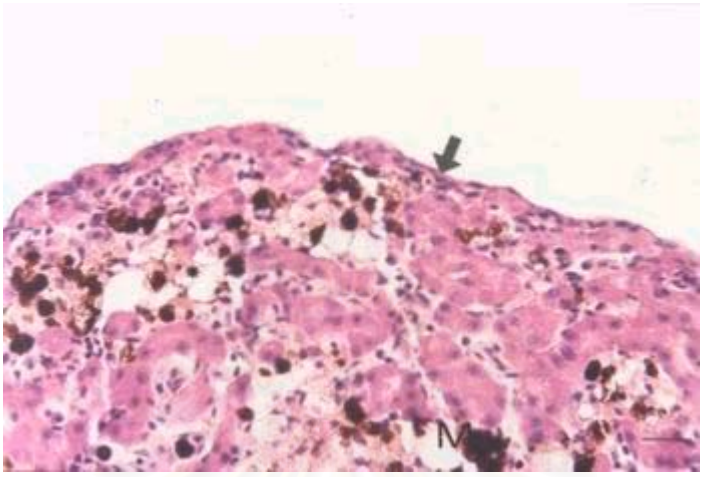


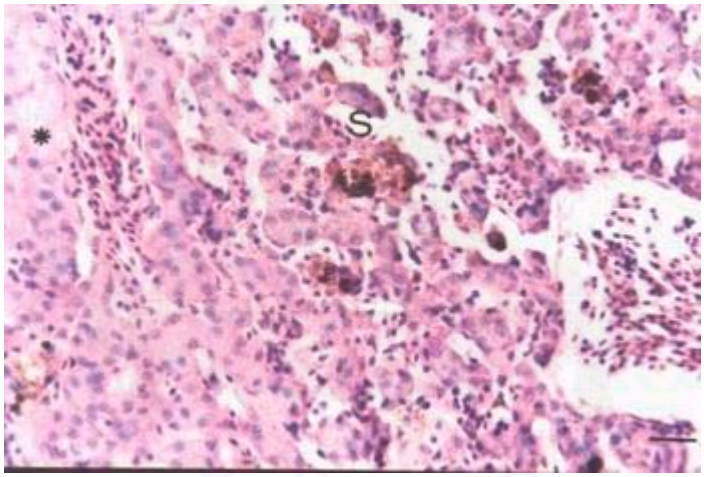
รูปที่ 4.10 ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มควบคุม เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์

A. แสดงลักษณะปกติของเยื่อหุ้มตับ ประกอบด้วยเซลล์คลุมผิวรูปร่างแบนบาง (ลูกศร) Hepatic plate(*) ที่มีเซลล์ตับ(H) คั่นด้วยช่องไซนูซอยด์(S)

B. แสดงเส้นเลือด central vein (V) และท่อภายในตับ(D)

H&E bar scale = 25 µm.





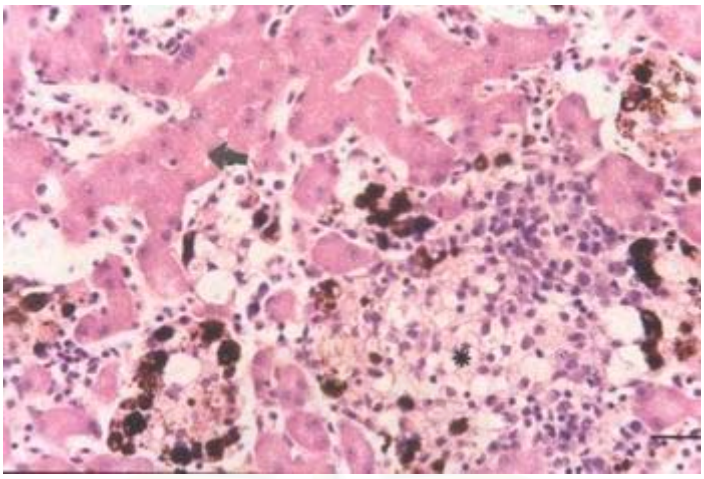
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

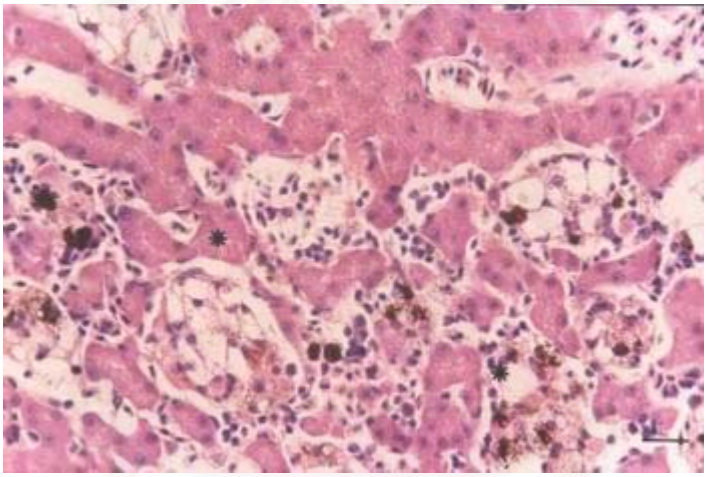
รูปที่ 4.11 **ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น** 49.66 ppm. **เป็นเวลานาน** 6 **สัปดาห์**

A. แสดงเยื่อหุ้มตับที่มีความหนาผิดปกติและมีการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวใต้เยื่อหุ้มตับ(ลูกศร) พบการแทรกตัวของมาโครฟาจ (M) และมีการสะสมไขมันผิดปกติ (*)

B. แสดงการเกิด Hydropic swelling (*)การขยายตัวของช่องไซนูซอยด์(S)

H&E bar scale = 25 μm





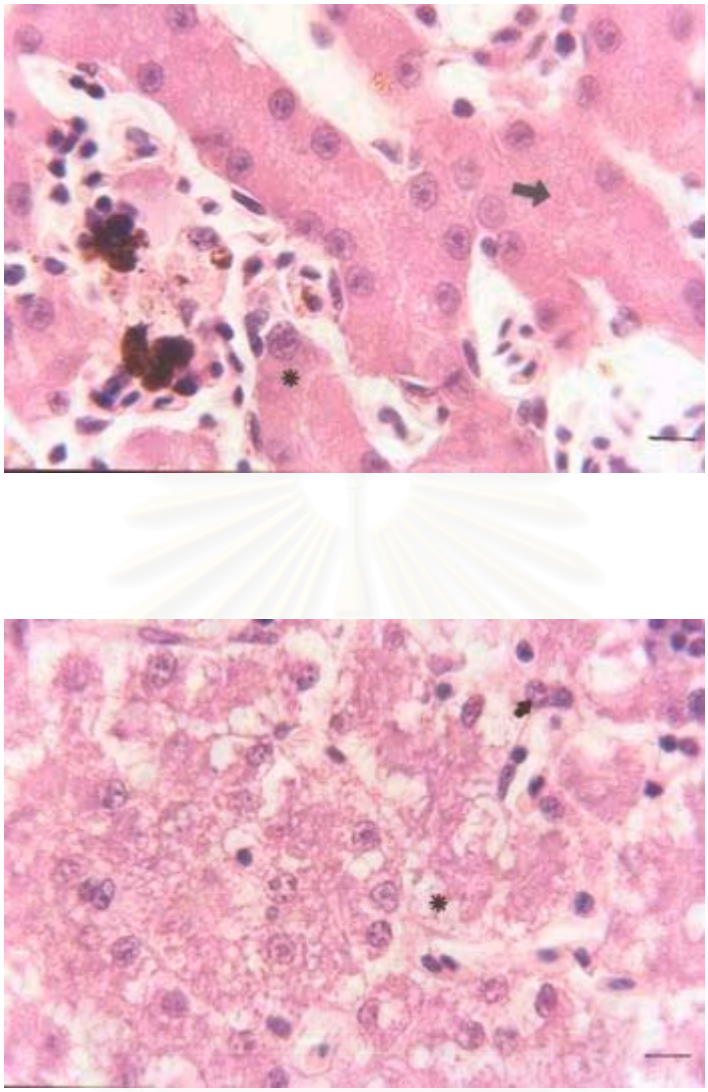
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.12 **ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น** 49.66 ppm. **เป็นเวลานาน** 6 **สัปดาห์**

A. แสดงการเกิดเลือดออกในเนื้อเยื่อตับ(*) การเกิด Hydropic swelling(ลูกศร)

B. แสดงการตายเป็นกลุ่มๆของเซลล์ตับ (*)

H&E bar scale = 10 μm



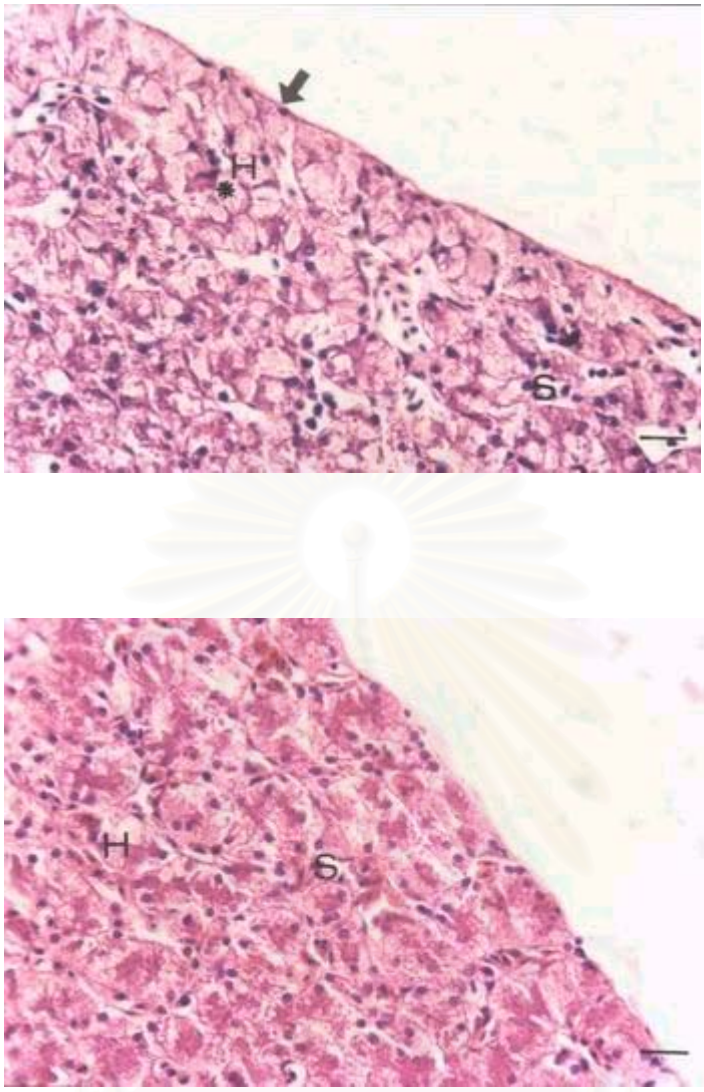
รูปที่ 4.13 **ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น** 49.66 ppm. **เป็นเวลานาน** 6 **สัปดาห์**

A. แสดงการตายของเซลล์ตับ(ลูกศร) การสลายตัวของนิวเคลียส (*)

B. แสดงความผิดปกติของนิวเคลียส แบบperinuclear chromatin clumping(ลูกศร) การตายของเซลล์ตับ(*)

H&E bar scale = 10 μm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



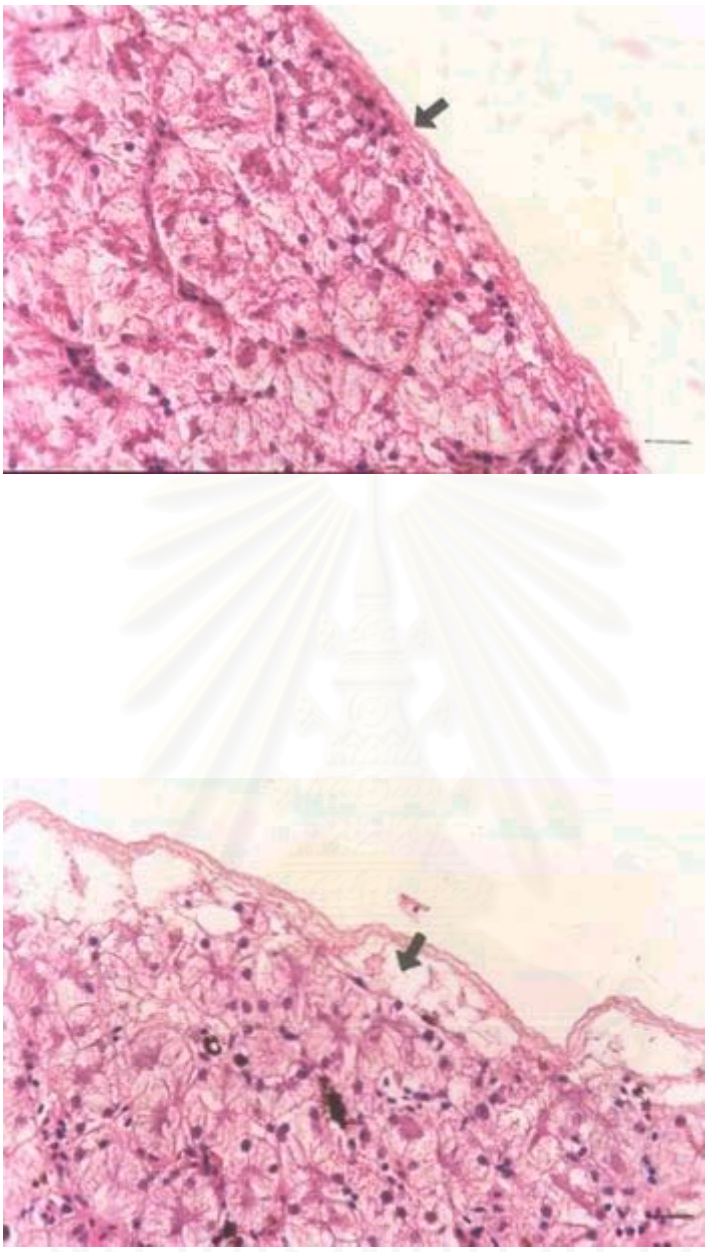
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.14 **ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มควบคุม เป็นเวลานาน** 10 **สัปดาห์**

A. แสดงลักษณะปกติของเยื่อหุ้มตับ ประกอบด้วยเซลล์คลุมผิวรูปร่างแบนบาง(ลูกศร) Hepatic plate(*) ที่มีเซลล์ตับ(H) คั่นด้วยช่องไซนูซอยด์(S)

B. แสดงเซลล์ตับ (H) และช่องไซนูซอยด์(S)

H&E bar scale = 25 μm



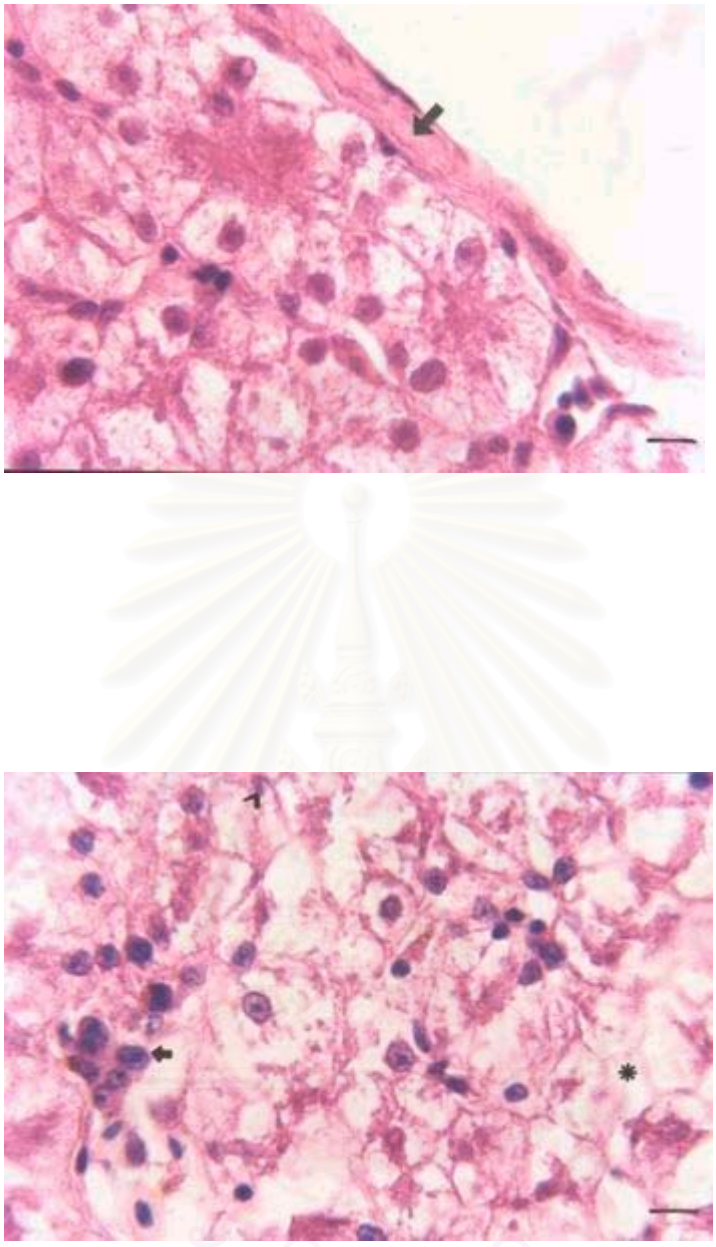
รูปที่ 4.15 **ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น** 49.66 ppm. **เป็นเวลานาน** 10 **สัปดาห์**

A. แสดงเยื่อหุ้มตับผิดปกติ ประกอบด้วยเซลล์คลุมผิวหนาหลายชั้นและมีการแทรกของเม็ดเลือดขาวใต้เยื่อหุ้มตับ(ลูกศร)

B. แสดงการสะสมของเหลวใต้เยื่อหุ้มตับ(ลูกศร)

H&E bar scale = 25 μm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



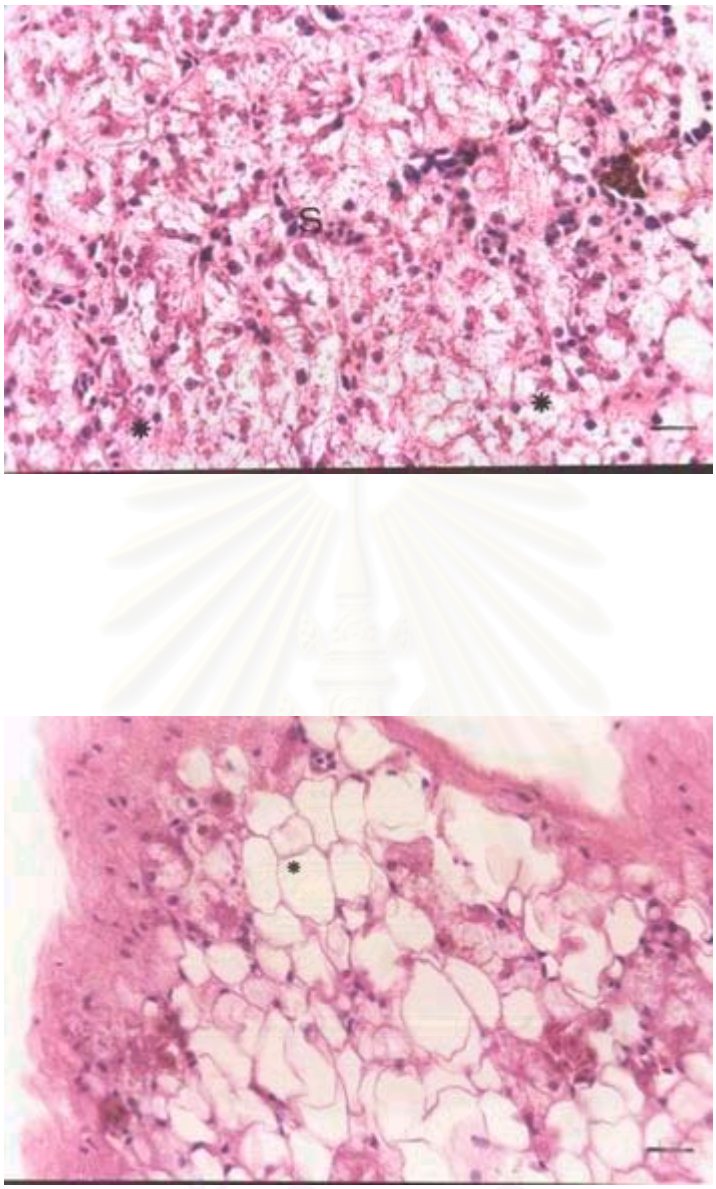
รูปที่ 4.16 **ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น** 49.66 ppm. **เป็นเวลานาน** 10 **สัปดาห์**

A. แสดงเยื่อหุ้มตับที่หนาผิดปกติ (ลูกศร)

B. แสดงการตายของเซลล์ตับ(*) ลักษณะผิดปกติของนิวเคลียสแบบ pyknotic nucleus (ลูกศร) และการสลายของนิวเคลียส(หัวลูกศร)

H&E bar scale = 10 μm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



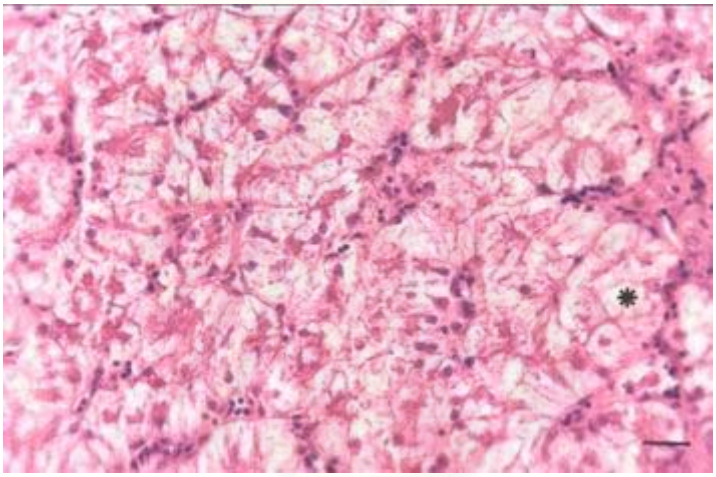
รูปที่ 4.17 **ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น** 49.66 ppm. **เป็นเวลานาน** 10 **สัปดาห์**

A. แสดงช่องไซนูซอยด์ที่มีการขยายตัวมีการคั่งของเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวภายใน(S) การตายของเซลล์ตับ(*)

B. แสดงการสะสมของไขมันที่ผิดปกติ(*)

H&E bar scale = 25 μm

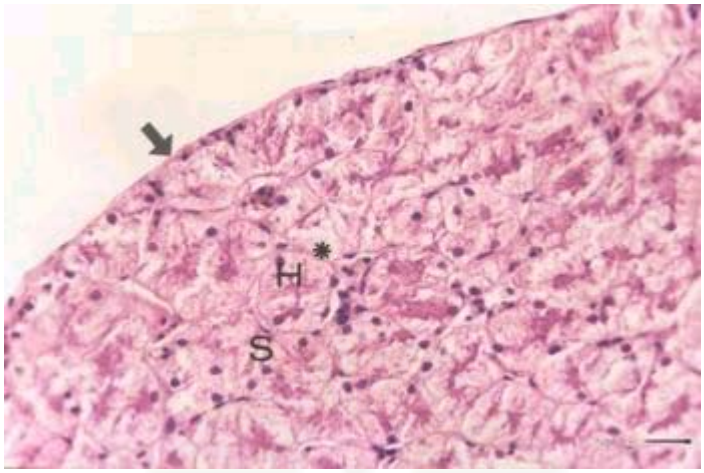
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

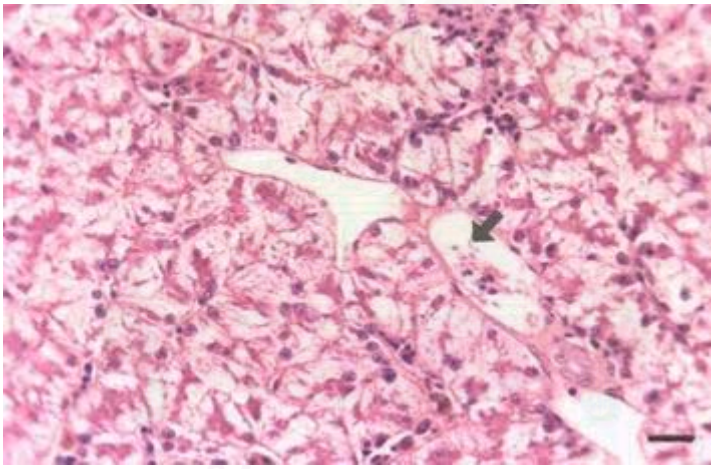


รูปที่ 4.18 **ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น** 49.66 ppm. **เป็นเวลานาน** 10 **สัปดาห์**
แสดงการตายของเซลล์ตับเป็นกลุ่มๆ (*)

H&E bar scale = 25 μm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





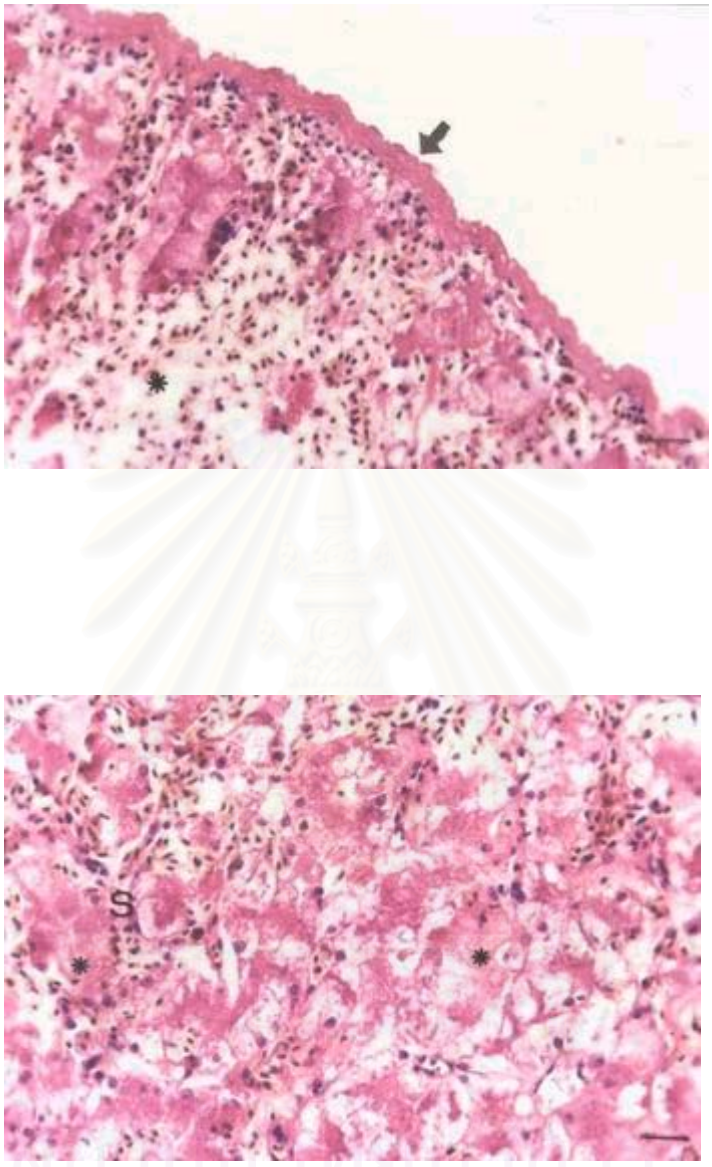
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.19 **ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มควบคุม เป็นเวลานาน 14 สัปดาห์**

A. แสดงลักษณะปกติของเยื่อหุ้มตับ ประกอบด้วยเซลล์คลุมผิวรูปร่างแบนบาง(ลูกศร) Hepatic plate(*) ที่มีเซลล์ตับ(H) คั่นด้วยช่องไซนูซอยด์ (S)

B. แสดงท่อภายในเนื้อเยื่อตับ(ลูกศร)

H&E bar scale = 25 μm



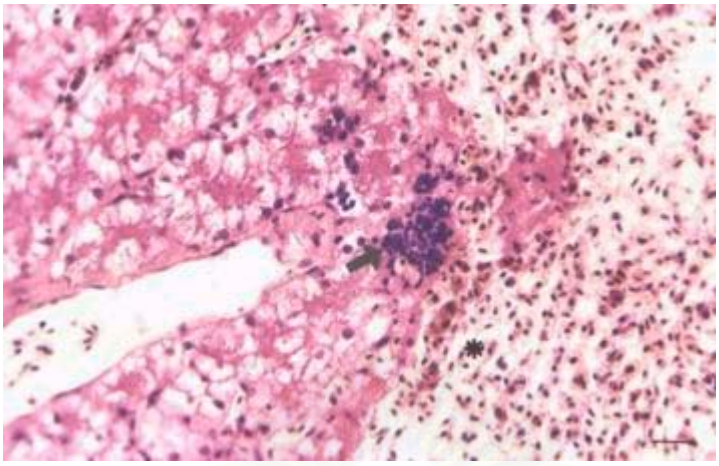
รูปที่ 4.20 **ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น** 49.66 ppm. **เป็นเวลานาน** 14 **สัปดาห์**

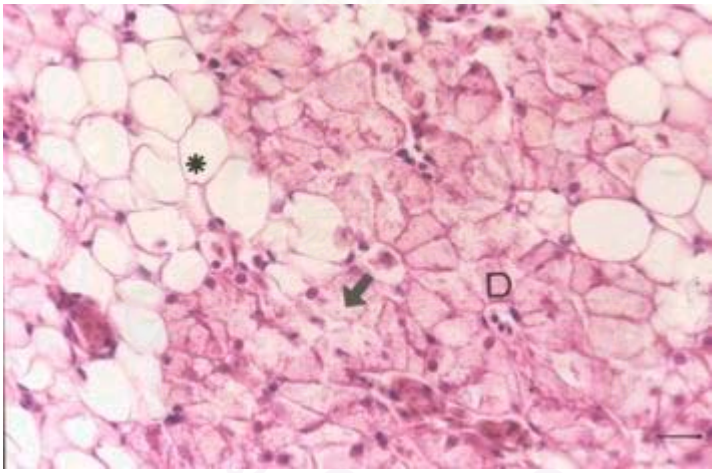
A. แสดงเยื่อหุ้มตับที่มีความหนาผิดปกติและมีการแทรกของเม็ดเลือดขาวใต้เยื่อหุ้มตับ (ลูกศร) การแทรกตัวของเลือดในเนื้อเยื่อตับ(*)

B. แสดงการขยายตัวของช่องไซนูซอยด์(S) และการตายของเซลล์ตับแบบกระจาย(*)

H&E bar scale = 25 μm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





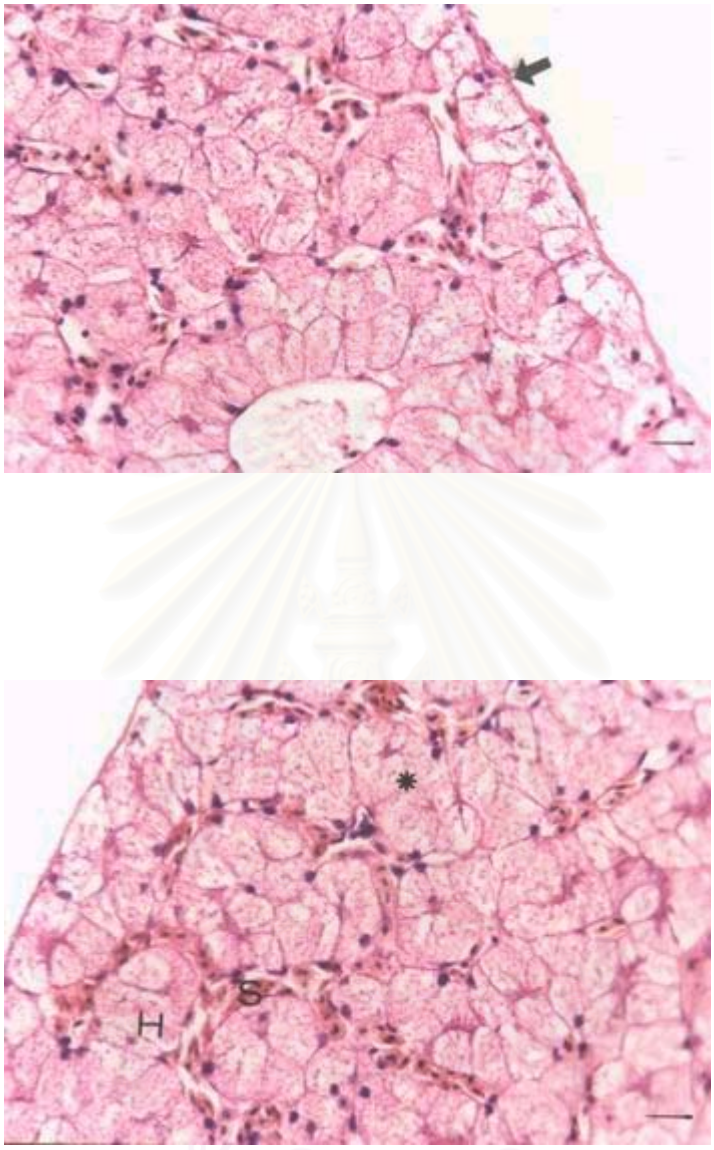
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.21 **ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น** 49.66 ppm. **เป็นเวลานาน** 14 **สัปดาห์**

A. แสดงการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาว(ลูกศร)และเลือด(*) ภายในเนื้อเยื่อตับ

B. แสดงการสะสมของไขมันที่ผิดปกติ(*) การสลายตัวของนิวเคลียส(D) และการเกิด Hydropic swelling (ลูกศร)

H&E bar scale = 25 μm



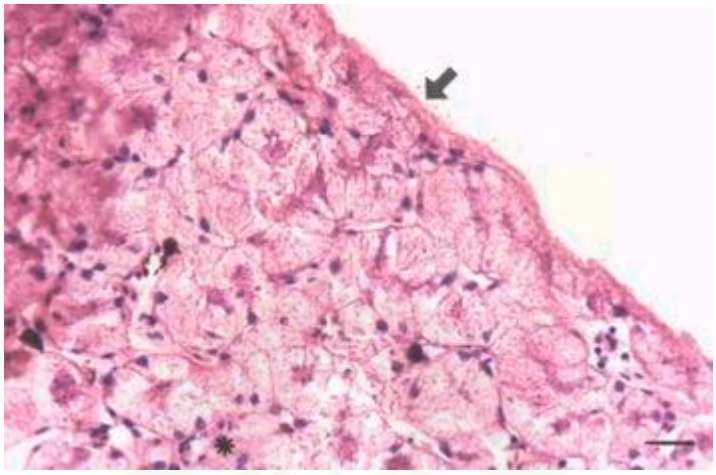
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

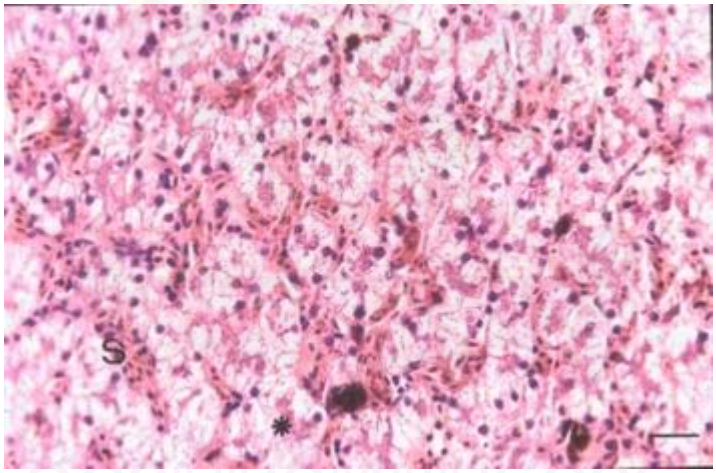
รูปที่ 4.22 **ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มควบคุม เป็นเวลานาน** 18 **สัปดาห์**

A. แสดงลักษณะปกติของเยื่อหุ้มตับ ประกอบด้วยเซลล์คลุมผิวรูปร่างแบนบาง(ลูกศร) เส้นเลือดภายตับ(V)

B. แสดง Hepatic plate(*) ที่มีเซลล์ตับ(H) คั่นด้วยช่องไซนูซอยด์ (S)

H&E bar scale = 25 μm





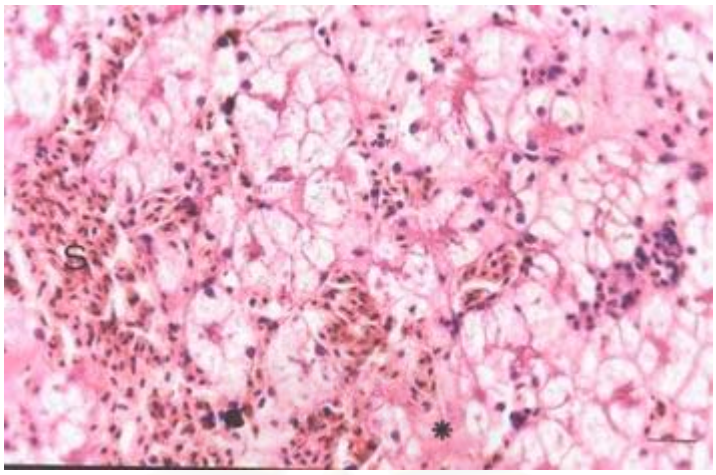
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

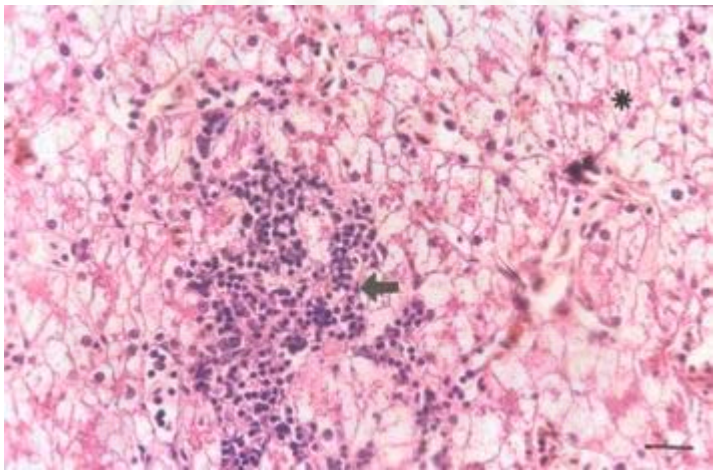
รูปที่ 4.23 **ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น** 49.66 ppm. **เป็นเวลานาน** 18 **สัปดาห์**

A. แสดงเยื่อหุ้มตับที่มีเซลล์คลุมผิวหนาผิดปกติ(ลูกศร) การตายของเซลล์ตับ(*)

B. แสดงการขยายตัวของช่องไซนูซอยด์ที่มีเลือดคั่งภายใน(S) การตายของเซลล์ตับ(*)

H&E bar scale = 25 μm



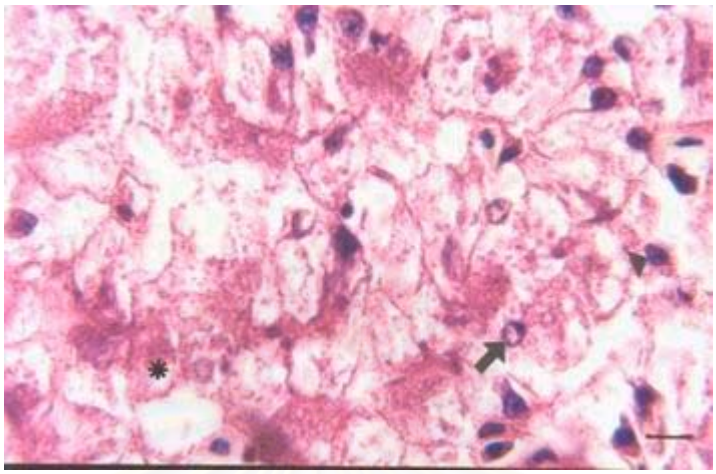


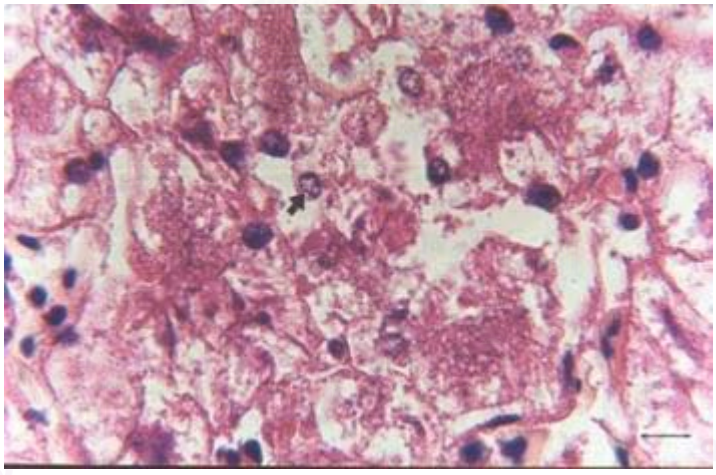
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.24 **ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น** 49.66 ppm. **เป็นเวลานาน** 18 **สัปดาห์**

A. แสดงการขยายตัวของช่องไซนูซอยด์ที่มีเลือดคั่งภายใน(S) และพบการตายของเซลล์ตับ(*)

B. แสดงการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวภายในเนื้อเยื่อตับ(ลูกศร) การตายของเซลล์ตับ(*) H&E bar scale = 25 μm



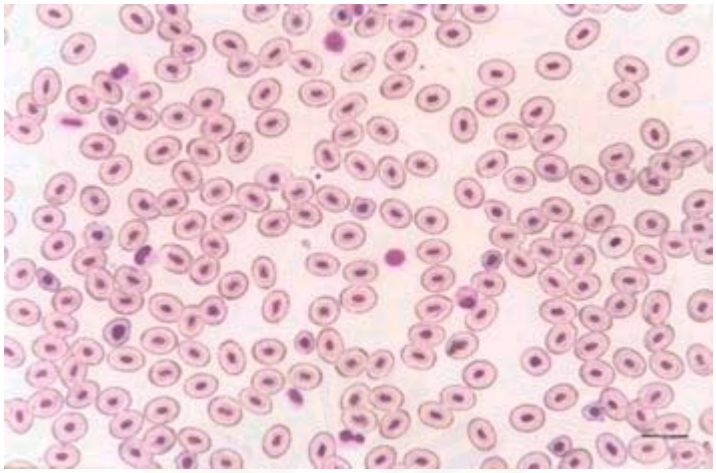


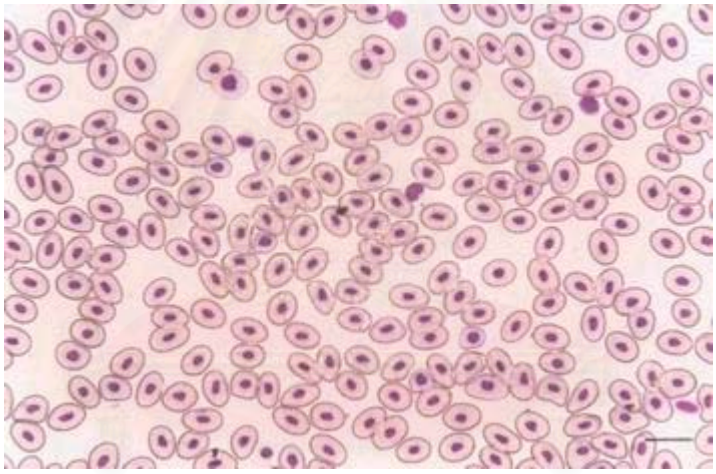
รูปที่ 4.25 ภาพแสดงเนื้อเยื่อตับกบกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นเวลานาน 18 สัปดาห์

A. แสดงความผิดปกติของนิวเคลียสแบบ perinuclear chromatin clumping(ลูกศร) pyknotic nucleus(หัวลูกศร) การสลายตัวของนิวเคลียส(*)

B. แสดงการตายของเซลล์ตับ(*) ความผิดปกติของนิวเคลียสแบบ perinuclear chromatin clumping (ลูกศร) H&E bar scale = 10 μm

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

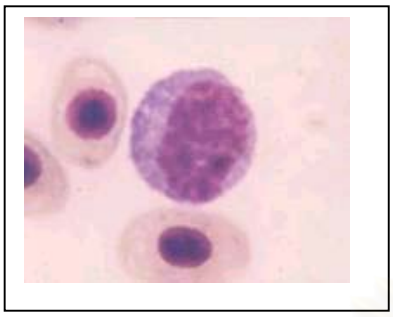
รูปที่ 4.26 ภาพแสดงเม็ดเลือดกบ ประกอบด้วยเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว (ลูกศร) เปรียบเทียบความหนาแน่นเม็ดเลือดขาวที่พบใน

A. กลุ่มควบคุม

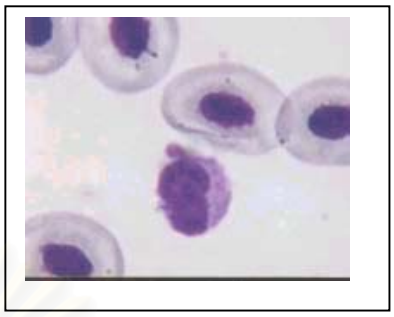
B. กลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย แบบกึ่งเรื้อรัง

Giemsa stain bar scale = 25 μm

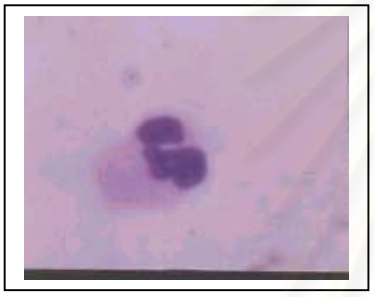
รูปที่ 4.27 **ภาพแสดงเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆและ** thrombocyte **ของกบนา**



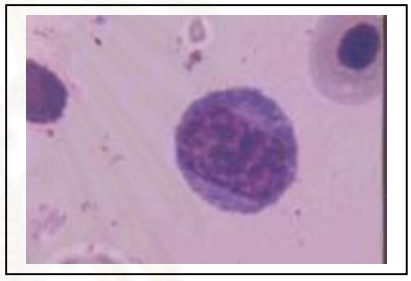
A. แสดงลักษณะของ monocyte



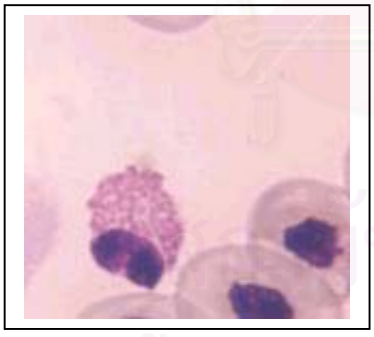
B. แสดงลักษณะของ lymphocyte



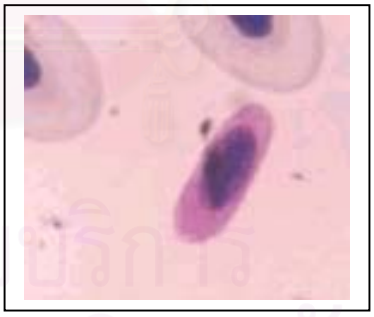
C. แสดงลักษณะของ neutrophil



D. แสดงลักษณะของ basophil



E. แสดงลักษณะของ eosinophil



F. แสดงลักษณะของ thrombocyte

Giemsa stain bar scale = 10 μm

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยต่อกบนา

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยหรือสะเดาไทย111 ที่ละลายในน้ำต่อกบนา มีค่าสูงกว่าค่าความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดเมล็ดสะเดาอินเดียต่อปลานิลที่รายงานโดย Tangtong และ Wattanasirmkit (1998) ; Janart และ Wattanasirmkit (1997) นอกจากนี้ยังมีค่าแตกต่างจากค่าความเป็นพิษเฉียบพลันของผลิตภัณฑ์สะเดาชนิดต่างๆ ต่อลูกปลานิล ได้แก่ Margosan-O, Burmese Neem, Thai Neem (โรงงาน ต้นแบบ), Thai Neem (โรงงานเอกชน), Indica Neem และ Neemazal (อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ, 2543) และค่าความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดสะเดา Margosan-O ในปลา rainbow trout ก็มีความแตกต่างจากในปลานิล (Jacobson, 1995) ซึ่งเห็นได้ว่าความเป็นพิษของสาร azadirachtin จากสะเดาที่มีต่อสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันมีค่าแตกต่างกันไปตามสัดส่วนของปริมาณสารนี้ในผลิตภัณฑ์ รวมทั้งชนิด carrier solvent หรือตัวทำละลายที่ใช้ ซึ่งทำให้ความเป็นพิษของสาร azadirachtinในผลิตภัณฑ์สะเดาให้ค่า LC_{50} ไม่เท่ากัน (อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ, 2543) นอกจากนี้ความเป็นพิษยังแตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์ทดลอง

ความเสียหายที่เกิดกับตับของกบนา

กบนากลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยเป็นเวลาตั้งแต่ 10-14 สัปดาห์ มีค่า%Relative liver weight เพิ่มขึ้น แสดงว่าตับมีการอักเสบและบวมน้ำ ส่วนกบนากลุ่มทดลองที่ได้รับสารนี้เป็นเวลา 18 สัปดาห์มีค่า %Relative liver weight ลดลง แสดงถึงการที่เซลล์ตับมีการตายและตับมีขนาดเล็กลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในช่วงเวลาเดียวกัน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความผิดปกติที่เกิดกับตับกบกลุ่มทดลอง ตามที่ Schmidt (1987) สรุปไว้ว่า ลักษณะของตับที่ผิดปกติจะมีขนาดใหญ่กว่าปกติ เมื่อดูจากภายนอก โดยการพิจารณาจากค่า %R ที่เพิ่มขึ้นยกเว้นในกรณีที่เป็นโรคเรื้อรัง ขนาดของตับจะลดลง นอกจากนี้ในกบกลุ่มทดลองบางตัวยังพบตับที่มีลักษณะภายนอกผิดปกติ คือ มีรอยด่างคล้ำซึ่งเป็นบริเวณที่มีเลือดแทรกหรือซีดขาวเป็นหย่อมๆซึ่งเป็นบริเวณที่เซลล์ตับตายแล้วมีfiberมาแทรก และมีตุ่มที่ผิวด้านนอกซึ่งแสดงถึงความผิดปกติของ

เยื่อหุ้มตับและเซลล์ ซึ่งตรงกับลักษณะตับผิดปกติที่ สนั่น รังรักษ์ศิรวร และคณะ (2528) ได้สรุปไว้ ผลความผิดปกติดังกล่าวสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อตับที่ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

ความผิดปกติของระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT

ระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT ใช้วินิจฉัยการทำงานของตับ โดยระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPTที่เพิ่มขึ้น แสดงถึงความเสียหายที่เกิดกับเซลล์ตับ และหลังจากนั้นเมื่อมีการลดลงของระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPTในเลือดก็เป็นตัวชี้ให้เห็นถึงการกลับสู่สภาพปกติของตับ (Zakim และ Boyer, 1982)

ในกบนากลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยเป็นเวลา 14 และ 18 สัปดาห์ มีระดับเอนไซม์ SGOT เพิ่มสูงขึ้น และในกบนากลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยเป็นเวลา 10, 14 และ 18 สัปดาห์ มีระดับเอนไซม์ SGPTสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในช่วงเวลาเดียวกัน ซึ่งพบว่าระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPTมีค่าสูงสุดในช่วงที่กบกลุ่มทดลองได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยเป็นเวลา 14 สัปดาห์ ซึ่งผลที่เกิดเหมือนกับการทดลองของ Chakraborty และ Benerjee (1989) ที่พบว่าสารพิษจากพืช Saponific plant toxicant ทำให้ระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT ในปลาดุกเพิ่มขึ้น และรายงานของ Skrzypinska และคณะ (1991) ถึงผลของ Vanillin ที่ทำลายตับของหนูขาวโดยพิจารณาจากระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPTที่เพิ่มขึ้น หรือยารักษาวัณโรคในคนที่มีผลทำให้คนไข้มีระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT เพิ่มขึ้น (Krishnaswamy และคณะ, 1991)

เมื่อพิจารณาระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPTที่เพิ่มขึ้นในกบกลุ่มทดลองจากการทดลองครั้งนี้ พบว่าสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงที่เกิดกับเนื้อเยื่อตับ คือมีการตายของเซลล์ตับในลักษณะต่างๆ

ลักษณะความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับกบนา

เซลล์ตับ (liver cell หรือ hepatocyte) ปกติของกบมีขนาดใหญ่ รูปร่างหลายเหลี่ยม มีนิวเคลียสรูปร่างกลม มีนิวคลีโอลัส 1-2 อันโดยที่นิวเคลียสจะถูกไขมันสะสมภายในเซลล์ดันให้ไปอยู่บริเวณขอบเซลล์ เซลล์ตับกบเรียงตัวเป็น 2 แถว การจัดเรียงตัวของเซลล์ตับกบไม่เห็นเป็นแนวรัศมีที่เป็นระเบียบเหมือนในคนหรือสัตว์ชั้นสูงอื่น ไม่มี lobular อย่างแท้จริงซึ่งคล้ายกับตับปลาดุกด้านและตับปลาช่อน (สุภาพร อารีกิจ, 2540) ระหว่างเซลล์ตับจะพบช่องว่างระหว่างเซลล์ เรียกว่า

ช่องไซนูซอยด์ กระจายอย่างไม่เป็นระเบียบ ในกบนาไม่ว่าจะเป็นระยะลูกอ๊อดหรือ ตัวเต็มวัย ไม่พบ hepato pancreas ที่อยู่รอบ hepatic portal vein ในตับ (สุภาพร อารีกิจ, 2540) เหมือนกับตับของปลา channel catfish (Grizzle และ Roger, 1976) ปลา striped bass (Groman, 1982)และปลาอีกหลายชนิดที่ศึกษาโดย Hibiya (1982) แต่ต่างจากปลานิล ปลาดุกด้าน และปลาช่อนที่มีเนื้อเยื่อตับอ่อนรอบๆ hepatic vein (สุปราณี ชินบุตร และคณะ, 2536)

ในตับของกบนากลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย เป็นเวลา 6 สัปดาห์ เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าเกิดความผิดปกติดังต่อไปนี้ เยื่อหุ้มตับหนาและแสดงการอักเสบโดยมีการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวใต้เยื่อหุ้มตับ ช่องไซนูซอยด์ขยายและมีเลือดคั่งภายใน พบภาวะเลือดออกในเนื้อเยื่อตับ การแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวและมาโครฟาจในเนื้อเยื่อตับบริเวณที่ถูกทำลาย นอกจากนี้ยังพบความผิดปกติของนิวเคลียส และมีการตายของเซลล์ตับทั้งแบบเป็นกลุ่มๆและแบบแพร่กระจาย ลักษณะความเสียหายดังกล่าวคล้ายกับการอักเสบที่พบในตับหนูที่เป็นโรคตับอักเสบซึ่งรายงานโดย Kasai และคณะ (1990) และผลของยาฆ่าแมลงพวกคาร์บาเมตความเข้มข้น 0.02 - 0.14 %ในลูกอ๊อดกบ *Rana perezi* ที่รายงานโดย Honrubia และคณะ (1993) รวมทั้งพิษของคลอโรฟอร์มและคาร์บอนเตตระคลอไรด์ต่อเซลล์ตับปลา rainbow trout (Rabergh และ Lipsky, 1997) และผลของแคดเมียมที่ทำลายตับปลา rainbow trout (Faverney และคณะ, 2001) ซึ่งความผิดปกติทั้งหมดนี้ยังคงเกิดขึ้นในกบกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยเป็นเวลา 10 และ 14 สัปดาห์ โดยทวีความรุนแรงขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับสาร แต่เมื่อทำการทดลองครบ 18 สัปดาห์ ปรากฏว่าตับของกบกลุ่มทดลองพบความเสียหายของเนื้อเยื่อตับน้อยกว่าในช่วงที่ได้รับสาร 14 สัปดาห์ คือพบภาวะเลือดออกในเนื้อเยื่อตับลดลงและการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวและมาโครฟาจในเนื้อเยื่อตับน้อยลง ซึ่งความเสียหายที่ลดลงของเนื้อเยื่อตับสอดคล้องกับค่า %R ลดลงในกบกลุ่มทดลองที่ได้รับสารเป็นเวลา 18 สัปดาห์

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ความเข้มข้น 49.66 ppm. ทำให้ตับกบนาได้รับความเสียหาย คือทำให้ %R เพิ่มขึ้น ระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPTสูงขึ้น รวมทั้งเนื้อเยื่อตับได้รับความเสียหาย โดยที่ความเสียหายที่เกิดกับตับกบนาในลักษณะข้างต้น จะพบรุนแรงที่สุดในกบนากลุ่มทดลองที่ได้รับสารเป็นเวลา 14 สัปดาห์ และเมื่อเวลานานขึ้นเป็น 18 สัปดาห์ความเสียหายของเนื้อเยื่อตับลดความรุนแรงลง โดยพบว่ากบมีการสร้างเซลล์กลุ่มใหม่พวก fibrous connective tissue ขึ้นแทนที่เซลล์ตับที่ตาย ร่วมกับค่า%R และระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPTลดลง

ความผิดปกติของเลือด

ผลของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยที่มีต่อเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบิน และค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น

สารสกัดเมล็ดสะเดาไทยมีผลทำให้เกิดความผิดปกติต่อเลือดของกบนากลุ่มทดลองที่ได้รับสารนี้ในระดับความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นเวลา 10 และ 14 สัปดาห์ พบว่ามีจำนวนเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบิน และค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น สูงกว่ากลุ่มควบคุมในช่วงเวลาเดียวกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากบนาที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยเป็นเวลา 10 - 14 สัปดาห์ มีการสร้างเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น เพื่อช่วยในการลำเลียงออกซิเจน เหมือนกับที่ Cyriac และคณะ (1989) รายงานถึงพิษของปรอทและตะกั่วที่มีผลต่อเลือดของปลา *Oreochromis mossambicus* (Peter) โดยทำให้ปลาสร้างเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น ซึ่งพิจารณาจากค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และฮีโมโกลบินที่เพิ่มขึ้น ส่วนในช่วงการทดลองครบ 18 สัปดาห์ ค่าต่างๆเหล่านี้ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม แสดงว่ามีแนวโน้มของการกลับสู่สภาพปกติ

ผลของสารสกัดสะเดาไทยที่มีต่อเม็ดเลือดขาว

กบนากลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยในระดับความเข้มข้น 49.66 ppm. เป็นเวลา 10 และ 18 สัปดาห์มีจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงกว่ากลุ่มควบคุมในช่วงเวลาเดียวกัน เหมือนกับผลของปลาดุกอินเดีย (Indian Catfish)ที่ได้รับ malathion จากรายงานของ Dutta และคณะ (1992) ที่สรุปว่า malathion เปรียบเสมือนแอนติเจนที่กระตุ้นให้ปลาดุกที่ได้รับสร้างเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้น เหมือนกับในกรณีของปลา Rosy Bard *Barbus (Puntius) conchonius* ที่ได้รับโลหะหนักพวกตะกั่วและทองแดง ที่ศึกษาโดย Gill และคณะ (1991)

ส่วน%เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดที่เปลี่ยนแปลงชี้ให้เห็นถึงความผิดปกติของเลือดกบนากลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทย ซึ่งพบว่า%lymphocyte ในกบนากลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยมีค่าลดต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าระบบภูมิคุ้มกันเสียหาย (Duellman, 1994) ส่วน%monocyte และ neutrophil ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นถึงภาวะอักเสบและมีการติดเชื้อ (Ellis, 1977) และ% basophil และ eosinophil ที่ทั้งเพิ่มและลดตลอดระยะเวลาที่ได้รับสาร ไม่บ่งบอกถึงเรื่องอาการแพ้และการติดโรคพยาธิ (Duellman และ Trueb, 1994)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยหรือสะเดาไทย111 ในระดับความเข้มข้น 49.66 ppm. มีผลต่อเลือดของกบนาโดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง โดยมีจำนวนเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบิน และค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเพิ่มขึ้น จำนวนเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้น รวมทั้ง%เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดผิดไปจากระดับปกติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

1. สารสกัดเมล็ดสะเดาไทยที่ระดับความเข้มข้นสูง ทำให้เกิดความเป็นพิษเฉียบพลันต่อลูกอ๊อดกบนา
2. สารสกัดเมล็ดสะเดาไทยที่ระดับความเข้มข้นต่ำเป็นเวลานาน ทำให้เกิดพิษกึ่งเรื้อรังต่อตับและเลือดของกบนา
3. ผลของสารสกัดเมล็ดสะเดาไทยทำให้เนื้อเยื่อตับกบนาเสียหาย โดยมีความรุนแรงเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับสารในช่วงต้น โดยพบความผิดปกติของเซลล์ตับในลักษณะที่มีการอักเสบและตาย มีการเพิ่ม %Relative liver weight และระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT รวมทั้งการอักเสบของเยื่อหุ้มตับ
4. ความเป็นพิษที่เกิดกับเลือดของกบนากลุ่มทดลอง โดยทำให้มีการสร้างเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้น และทำให้%เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดผิดไปจากระดับปกติ
5. ผลการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำไปพัฒนาการใช้สารสกัดเมล็ดสะเดาไทยกำจัดศัตรูพืช ในบริเวณที่ทำการเกษตรแบบผสมผสาน โดยเฉพาะในบริเวณที่ใกล้แหล่งน้ำ

ข้อเสนอแนะ

ควรทำการศึกษาความเป็นพิษของสารธรรมชาติที่ใช้กำจัดศัตรูพืชชนิดอื่นซึ่งใช้ร่วมกับสะเดา ที่มีต่อกบนา เพื่อนำข้อมูลมาใช้ประโยชน์ในการกำจัดศัตรูพืชโดยไม่ส่งผลกระทบต่อกบนา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ขวัญชัย สมบัติศิริ. 2540. สะเดา มิติใหม่ในการป้องกันกำจัดแมลง. กรุงเทพฯ: ภาควิชากีฏวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ผุสตี ปริยานนท์ และคณะ. 2527. การศึกษาชีววิทยาของกบเลี้ยงและการพัฒนาการเลี้ยงกบในประเทศไทย. รายงานการวิจัย. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ผุสตี ปริยานนท์ และคณะ. 2530. การเลี้ยงกบนาและการขยายพันธุ์โดยวิธีธรรมชาติ. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พงษ์พันธ์ อินทราวัฒน์. 2539. การเลี้ยงกบ . กรุงเทพฯ: อักษรสยามการพิมพ์.

พงศ์เทพ อันตะริกานนท์ และคณะ. 2541. การผลิตสารชีวภาพจากพืชเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช. รายงานวิจัยฉบับที่ 1 สถาบันวิจัยวิทยาศาตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.

พรเทพ เทียนสิวากุล และคณะ. 2544. โลหิตวิทยาคลินิก. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พรรณีกา อัตตานนท์. 2543. การผลิตสะเดา ปัญหาและการสำรวจผลิตภัณฑ์สะเดาทั่วประเทศ เอกสารประกอบการฝึกอบรม. สำนักวิจัยและพัฒนาการผลิตสารธรรมชาติ. กรมวิชาการเกษตร.

มาลินี ลิ้มโภคา. 2523. พิษวิทยาและการวินิจฉัยโรคทางสัตวแพทย์. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จรัลสนิทวงศ์.

มาลินี ลิ้มโภคา. 2527. พิษวิทยาและปัญหาที่พบในสัตว์. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จรัลสนิทวงศ์.

มัณฑนา มิลน์. 2543.(a) การพัฒนาสารสกัดจากพืชเป็นผลิตภัณฑ์สารธรรมชาติ. เอกสารประกอบการฝึกอบรม. สำนักวิจัยและพัฒนาการผลิตสารธรรมชาติ. กรมวิชาการเกษตร.

มัณฑนา มิลน์. 2543.(b) วิจัยและพัฒนาการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์สารธรรมชาติ. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการประจำปี 2542 สำนักวิจัยและพัฒนาการผลิตสารธรรมชาติ. กรมวิชาการเกษตร.

รัตนาภรณ์ พรมศรัทธา. 2543. วิจัยการสกัด จำแนกและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารธรรมชาติ . เอกสารประกอบการประชุมวิชาการประจำปี 2542 สำนักวิจัยและพัฒนาการผลิตสารธรรมชาติ. กรมวิชาการเกษตร.

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, ผุสตี ปริยานนท์ และเพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ. 2540. การศึกษาโครโมโซมเพศของกบบูลฟรอก (*Rana catesbieana*). ประมวลงานวิจัย. การเสนอผลงานวิจัย เฉลิมฉลอง 80 ปี แห่งการสถาปนาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (หน้า 735-742)

สนั่น รังรักษ์ศิริวร, ชูศักดิ์ วิรัชชัย และพงษ์ศักดิ์ วรรณไกรโรจน์. 2528. พยาธิวิทยาระบบ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุปราณี ชินบุตร, กัลยา จำเริญรัตนะ และ ชะลอ ลิ่มสุวรรณ. 2536. เนื้อเยื่อปลาช่อน. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ. กรมประมง.

สุภาพร อารีกิจ. 2540. การศึกษาเนื้อเยื่อปกติของกบนา(*Rana tigerina*). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ. 2543. วิจัยผลกระทบของการใช้การธรรมชาติ . เอกสารประกอบการประชุมวิชาการประจำปี 2542 สำนักวิจัยและพัฒนาการผลิตสารธรรมชาติ. กรมวิชาการเกษตร.

อารมณ์ แสงวนิชย์. 2542. สะเดา. เอกสารประกอบมหกรรมวิชาการเกษตร' 41 และการประชุมวิชาการประจำปี 2541 กรมวิชาการเกษตร.

อัจฉริยา ไศลสูต. 2536. การชันสูตรซากสัตว์. หน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Akah, P. A. and Onuogu, E. 1991. Hepatotoxic effect of *Azadirachta indica* leaf extract in rabbits. Fitoterapia LX111(4):311-319.

Andrew, W. and Hickmann, C.P. 1974. Histology of the Vertebrate. St. Louis: The C.V. Mosby Company.

Blaustein, A., R. and Wake, D.B. 1995. The puzzle of declining amphibian populations. Sci. American. 273:56-61.

Blaxhall, P. C. and Daisley, K.W. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. J. Fish Biol. 5:771-781.

Braunbeck, T. 1993. Cytological alternation in isolated hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vitro to 4-chloroaniline. Aquat. Toxicol. 25(1-2):83-110.

Brumit, R. K. and Powell, C.E. 1993. Authors of plant name. Kew: Royal Botanical Garden.

Campbell, T. 1992. Haematology of birds, reptiles and fish. Florida: Sea World of Florida.

Chakraborty, P. S. and Banerjee, S. 1989. Impact of saponific plant toxicant on serum enzymes and tissue constitutents of an air-breathing catfish (*Heteropneustes fossilis* Bloch.). J. Ecobiol. 1(4):283-286.

Christensen, G. M., Fiandt, J.T. and Poeschl, B.A. 1978. Cells, proteins, and certain physical-chemical properties of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) blood. J. Fish Biol. 12:51-60.

Copenhaver, W. M. and Johanson, D.D. 1958. Bailey's Textbook of Histology. Forteenth Edition. Baltimore: The Williams & Wilkins.

Cyriac, P. J., Antony, A. and Nambisan, P.N.K. 1989. Haemoglobin and Haematocrit Values in the Fish *Oreochromis mossambicus* (Peter) after Short Term Exposure to Copper and Mercury. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 43:315-320.

Duellman, W. E. 1993. Amphibian Species of the World: Addition and Corrections. Kansas: The University of Kansas Lawrence.

Duellman, W. E. and Trueb, L. 1994. Biology of Amphibians. New York: McGraw-Hill Book Company.

Dutta, H. M., Dogra, J.V.V., Singh, N.K., Roy, P.K., Nasar, S.S.T., Adhikari, S., Munshi, J.S.D. and Richmonds, C. 1992. Malathion induced Changes in the Serum Protein and Haematological Parameters of an Indian Catfish *Heteropneustes fossilis*(Blosh). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 49:91-97.

Ecker, A. 1889. The Anatomy of the Frog. Amsterdam: A. Asher & Co. N. V.

Ellis, A. E. 1977. The leucocytes of fish: A reveiw. J. Fish. Biol. 11:453-491.

El-Massry, R. A., Labib, S.M., Sitohy, M.Z. and El-Saadany, S.S. 1991. Studies on the effect of vanillin (food additive) on some metabolic reactions of the experimeneal animals. Grasas-Aceities. 42(6):428-436.

Faverney, C. R., Devaux, A., Girard, J.P., Bailly, B. and Rahmani, R. 2001. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocyte through generation of reactive oxygen species. Aquat Toxicol. 53(1):65-76.

Finney, D. J. 1971. Probit analysis. London: Cambridge Univ. Press.

Gill, T. S., Tewari, H. and Pant, J.C. 1991. Effect of water-copper and lead on the peripheral blood in rosy bard, *Barbus (Pantius) conchonius*. Bull Environ Contam Toxicol. 46:606-612.

Gizzle, J. M. and Roger, W.A. 1976. Anatomy and Histilogy of the Channel Catfish. Auburn: Auburn University Agriculture Experiment Station.

Groman, D. B. 1982. Histology of the Striped Bass. Maryland: American Fisheries Society.

Helge, A., Jurgen, P.H. and Braunbeck, T. 1995. Simultaneous exposure of fish to endosulfan and disulfoton in vivo: ultrastractural, stereological and biochemical reactions in hepatocytes of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 33(1):17-43.

Hibiya, T. 1982. An Atlas of Fish Histology and Normal and Pathology Feature. Tokyo: Kodansha.

Hill. 1989. Hill's Atlas Veterinary Clinical Anatomy. New York: Veterinary Medicine Publishing Company.

Hirata, K., Ogata, I., Ohta, Y. and Fujiwara, K. 1989. Hepatic sinusoidal cell destruction in the development of intravascular coagulation in acute liver failure of rats. J. Pathol. 158(2):157-165.

Honrubia, M. P., Herraez, M.P. and Alvarez, R. 1993. The Carbamate Insecticide ZZ-Aphox Induced Structural Changes of Gills, Liver, Gall-Bladder, Heart, and Notochord of *Rana perezi* Tadpoles. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 25:184-191.

Ibrahim, I. A., Khalid, S.A. and Adam, S.E.I. 1992. On the toxicology of *Azadirachta indica* leaves. J. of Ethopharmarcol. 35:267-273.

Isarankura, K., Chanpong, N. and Pariyanonth, P. 1989. General morphology and anatomy of frog (*Rana tigerina*). J. Sci. Res. Chula. Uni. 14(2):91-98.

Jacobson, M. 1995. Toxicology of neem to vertebrates and and side effects on beneficial and other ecologically important non-target organisms in H. Schmutterer (ed.). The Neem Tree. Germany : VCH Publisher.

Janart, K. and Wattanasirmkit, K. 1997. Hepatotoxic Effects of *Azadirachta indica* A Juss. Neem Seed Extract on Tilapia *Oreochromis niloticus* Linn. Abstract 23rd Congress on Science and Technology of Thailand. Chiang Mai, Thailand. Oct 20-22, 1997. pp.460-461.

Kalashnikova, M. M. 1992. Erythrophagocytosis and pigment cells of the amphibian liver. Biull Eksp Biol Med. 113(1):82-84.

Kasai, N., Osanai, T., Miyoshi, I., Kamimura, E., Yoshida, M.C. and Dempo, K. 1990. Clinio-Pathological Studies of LEC Rats with Heredity Hepatitis and Hepatoma in the Acute Phase of Hepatitis. Lab. Ani. Sci. 40(5):502-505.

Klaassen, C. D. and Rozman, K. 1991. Absorption, Distribution and Excretion of Toxicants. In M.O.Amdur, J. Doull and C.D., Klaassen (eds). Casarett and Doull's Toxicology.The Basic Science of Poisons. Fourth Ed. New York: Pergamon .

Kraus, W. 1995. Biological Active Ingradients. In Schmutterer, H.(ed.). The Neem Tree *Azadirachta indica*. A. Juss. and orther Meliaceous Plants. Germany: VHC Publisher.

Krishnaswamy, K., Prasad, C.E. and Murthy, K.J.R. 1991. Hepatic dysfunction in undernourished patients recieving isoniazid and rifampicin. Trop. Geogr. Med. 43(2):156-160.

Larson, R. O. 1989. The commercialization of neem. In Jacobson,M. (ed.). The Neem Tree. Boca Raton, CRC Press.

Leake, L. D. 1975. Comparative Histology and the Introduction to the Microscopic Structure of Animals. London: Acadamic Press.

Lymann, B. 1959. Plant Classification. Massachusetts: D.C. Health and Company.

Mattison, C. 1998. Frog&Toads of the World. New York: Sterling Publishing.

McCormick, S. A. 1999. The Developmental Effects of Exposure to Neem-Based insect Growth Regulator on Embryos of the African clawed frog (*Xenopus laevis*). Department of Environmental Science. USA: Alleghengy College.

Miloradov, M. V., Buzarov, D., Adamov, J., Simic, S. and Popovic, E. 1996. Determination of polychlorinated biphenyls and polyaromatic hydrocarbons in frog liver. Wat. Sci. Tech. 34:153-156.

Murad, A. and Houston, A.H. 1988. Leucocytes and leucopoietic capacity in goldfish, *Carassius auratus*, exposured to sublethal levels of cadmium. Aquat. Toxicol, 13:141-154.

Netting, J. 2000. Pesticides implicated in declining frog numbers. Nature. 408:760-761.

Noble, G. K. 1931. The Biological of Amphibian. New York: McGraw Hill book Company.

Nowak, T. J. and Handford, A.G. 1994. Essentials of Pathophysiology. Dubuque: Wm. C. Brown Publishers.

Pesonen, M. and Anderson, T.B. 1997. Fish Primary hepatocyte culture; an important model for xenobiotic metabolism and toxicity studies. Aquat. Toxicol. 37(2-3): 253-267.

Price, N. C. and Stevens, L. 1999. Fundamentals of Enzymology. Third Edition. London: Oxford Univer. Press.

Rabergh, C. M. I. and Lipsky, M.M. 1997. Toxicology of chloroform and carbon tetrachloride in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. Aquat. Toxicol. 37(2-3): 169-182.

Rahman, M. F., Siddiqui, M.K.J., Mahboob, M. and Mustafa, M. 1990. Haematological and hepatotoxic effects of isoprocarb in chicken. J. Appl. Toxicol. 10(3): 187-192.

Raje, R. R. and Bhattacharya, S. 1990. Lovastatin-acetaminophen subchronic toxicity in mice. Res. Commn. Chem. Pathol. Pharmacol. 69(3):373-376.

Sadagopan, V. R., Johri, T.S. and Reddy, C.V. 1981. Feeding value of neem seed meal in broiler and layer diet (chickens). Indian poultry Gazz. 65:462-465.

Sakulku, J., Wattanasirmkit, K. and Kokpol, U. 1998. The effects of *Derris trifoliata* Leaves Extracts on Tilapia Liver. Unesco Seminar on the Chemistry of Natural Products. Chulalongkorn University, Thailand. Oct 1-2, 1998. p.4.

Schmidt, R. E. and Hubbard, G.B. 1987. Atlas of Zoo Animal Pathology Vol. III Avian, Reptile, and Miscellaneous Species. Florida: CRC Press.

Schmutterer, H. 1980. Ten years of neem research in the Federal Republic of Germany. Proc. 1st Int. Neem Conf., West Germany.

Schmutterer, H. 1995. Side effects on beneficial and other ecologically important non-target organisms. In H. Schmutterer (ed.). The Neem Tree. Germany: VHC Publisher.

Siddiqui, A. Q. and Naseem, S.M. 1979. The haematology of Rohu, *Labeo rohita.* J. Fish. Biol. 14:67-72.

Skrzypinska-Gawrysiak, M., Piotrowski, J.K. and Koralewska,J. 1991. The hepatotoxic action of chloroform: Short-time dynamics of biochemical alternations and dose-effect relationships. Pol. Occup. Med. Environ. Health. 4(1):77-84.

Sombatsiri, K., Ermel, K. and Schmutterer, H. 1995. Other Meliaceous Plants Containing Ingradients for Integrated Pest Management and Further Purposes in H Schmutterer (ed.). The Neem Tree. Germany: VCH Publisher.

Sombatsiri, K. and Tigavattanont, S. 1984. Effects of neem extract on some pests of economic importance in Thailand. Proc. 2nd. Int. Neem Conf., West Germany.

Srijunngam, J. and Wattanasirmkit, K. 1998. Histological Effects of Neem *Azadirachta indica* Seed Extract on Ovary of Tilapia. Unesco Seminar on the Chemistry of Natural Products. Chulalongkorn University, Thailand. Oct 1-2, 1998. p.18.

Tangtong, B. and Wattanasirmkit, K. 1998. Subchronic Effects of Neem *Azadirachta indica* Seed Extract on Blood Cellular Elements of Tilapia *Oreochromis niloticus*. Unesco Seminar on the Chemistry of Natural Products. Chulalongkorn University, Thailand. Oct 1-2, 1998. p.19.

Thapa, R. and Wongsiri, S. 1997. Toxicity of Azadirachtin Derivatives and Synthetic Pyrethroids on Oilseed Rape to *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) In Rodchareon, J. and Wongsiri, S. (eds.). BiopesticidesToxicity,Safety, Development and Proper Use. Proceedings First International Symposium on Biopesticides. Naresuan University, Phitsanulok, Thailand. Oct 27-31, 1996. pp.82-86

Tylor, E. H. 1962. The Amphibian fauna in Thailand. The University of Kansas bullatin 403(8):265-599.

Wake, D. B. 1991. Declining amphibian population. Science. 253:860.

Zakim, D. and Boyer, T.D. 1982. Hepatology. Philadelphia: W.B. Saunder Company.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ก. วัสดุอุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับเลี้ยงกบ
   - 1.1 โหลแก้วกลมความจุประมาณ 12 ลิตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 9 นิ้ว สูง 14 นิ้ว จำนวน 30 ใบ สำหรับทดสอบหาค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน
   - 1.2 บ่อพลาสติกความจุ 500 ลิตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 110 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร จำนวน 4 ใบ
   - 1.3 บ่อปูนขนาด 70 x 40 x 40 เซนติเมตร จำนวน 4 บ่อ
   - 1.4 อุปกรณ์สำหรับให้ออกซิเจนในน้ำ ประกอบด้วยเครื่องอัดอากาศ สายยาง และหินอากาศ จำนวน 6 ชุด
   - 1.5 เครื่องถ่ายน้ำตู้ปลาชนิดใช้ไฟฟ้า 2 ชุด
   - 1.6 สวิงตักปลา
2. อุปกรณ์สำหรับชั่งน้ำหนักและวัดขนาดกบ
   - 2.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบทศนิยม 3 ตำแหน่ง
   - 2.2 เครื่องชั่งน้ำหนักขนาด 10 กิโลกรัม
   - 2.3 ไม้บรรทัด
3. อุปกรณ์สำหรับตรวจคุณภาพน้ำ
   - 3.1 เทอร์โมมิเตอร์
   - 3.2 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส
   - 3.3 บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร 6 ใบ
4. อุปกรณ์และเครื่องมือในการเตรียมชิ้นเนื้อตับและเก็บตัวอย่างเลือด
   - 4.1 กรรไกรผ่าตัดขนาดต่างๆ
   - 4.2 ปากคีบปลายโค้งแหลมเล็ก
   - 4.3 เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร
   - 4.4 ขวดขนาด 1 มิลลิลิตรสำหรับเก็บตัวอย่างเลือด 200 ขวด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 ขวดขนาด 2, 4 และ 8 ออนซ์ สำหรับดองกบ

4.6 จานผ่าตัด

5. อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำพาราฟิน

5.1 ตู้อบอุณหภูมิ 37-60 ^{0} C

5.2 เครื่องตัดเนื้อเยื่อ Rotary microtome

5.3 สไลด์แก้วและกระจกปิดสไลด์

5.4 ขวดแก้วขนาด 30 มิลลิลิตร

5.5 ปากคีบปลายมน

5.6 ขวดน้ำยาสำหรับสารละลายชนิดต่างๆ

5.7 นาฬิกาจับเวลา

5.8 บล็อกสำหรับทำพาราฟิน

5.9 ใบมีดสำหรับตัดพาราฟิน

5.10กล่องสำหรับเก็บเนื้อเยื่อพาราฟิน

5.11อุปกรณ์สำหรับย้อมสีเนื้อเยื่อ

5.11 พู่กัน

6. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์เลือด

6.1 หลอดแคปิลารี ขนาด 75 มม. X 1.0 มม.

6.2 เครื่องปั่นความเร็ว 10,000 – 13,000 รอบ/นาที

6.3 ดินน้ำมัน

6.4 ปิเปตสำหรับใช้เจือจางเม็ดเลือดขาว

6.5 สไลด์สำหรับนับเซลล์

6.6 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

ข. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารเคมีสำหรับทำพาราฟิน

1.1 formaldehyde	: Merck เยอรมัน
1.2 ethyl alcohol	: องค์การสุรา กรมสรรพสามิต
1.3 Eosin	: Merck เยอรมัน
1.4 Hematoxylin	: Mayer สหรัฐอเมริกา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.5 N- butanol : Merck เยอรมัน

1.6 Xylene : Merck เยอรมัน

1.7 Paraplast plus : Oxford labware สหรัฐอเมริกา

1.8 Canada balsum : Fisher Scientific สหรัฐอเมริกา

1.9 Glycerol : J.T. Baker Chemicals สหรัฐอเมริกา

2. สารเคมีสำหรับตรวจวิเคราะห์เอนไซม์ในเลือด

2.1 EDTA : Merck เยอรมัน

2.2 GOT substrate : Chemical Diagnotic ประเทศไทย

2.3 GPT substrate : Chemical Diagnotic ประเทศไทย

2.4 NaOH : Merck เยอรมัน

2.5 Phenylhydrazine : Chemical Diagnotic ประเทศไทย

2.6 Pyruvate standard : Chemical Diagnotic ประเทศไทย

3. สารเคมีสำหรับเจือจางเลือดเพื่อนับเม็ดเลือดขาว

3.1 น้ำยาสูตร Natt and Herrick's solution (Campbell, 1992)

4. สารเคมีสำหรับศึกษาและแยกชนิดเม็ดเลือด

4.1 สี Giemsa : Mayer เยอรมัน

4.2 Methanol : Merck เยอรมัน

4.3 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลาย

การเตรียมสารละลายสำหรับการย้อมสีเนื้อเยื่อพาราฟิน

Enrich acid Haematoxylin

สูตร	Haematoxylin	8	กรัม
	95% Ethyl alcohol	400	กรัม
	(ละลายใน water bath แล้วกรองสารละลายที่ได้)		
	Potass หรือ Ammonium alum sulphate	8	กรัม
	น้ำกลั่น	400	มิลลิลิตร
	(ละลาย Potass ในน้ำอุ่น)		
	ผสมสารละลายที่ได้ทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วเติม		
	Glycerine	400	มิลลิลิตร
	Glacial acetic acid	40	มิลลิลิตร

บรรจุสารละลายที่ได้ในขวด ปิดปากขวดด้วยจุกสำลี แล้วนำไปตั้งไว้ในที่ที่มีแสงแดดเป็นเวลาอย่างน้อย 6 สัปดาห์

0.5% Eosin Y

สูตร	Eosin Y (Yellow)	0.5	กรัม
	95% ethyl alcohol	100	กรัม

วิธีเตรียม

เติม Eosin 0.5 กรัม ลงใน 95 % ethyl alcohol 100 มิลลิลิตร คนจนละลาย จากนั้นกรองแล้วเก็บในขวด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมสารละลายสำหรับย้อมสีเม็ดเลือด

Giemsa

สูตร Giemsa stock solution

Giemsa powder	1.0	กรัม
Absolute methyl alcohol	66	มิลลิลิตร
Glycerol	66	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลาย Giemsa powder ใน Glycerol บน water bath ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วเติม Absolute methanol ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน แล้วกรอง

Phosphate buffer pH 7.2

สูตร Solution A :

KH_2PO_4	9.1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

สูตร Solution B :

Na_2HPO_4	9.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

สารละลายสำหรับเจือจางเม็ดเลือดขาว

น้ำยาสูตร Natt and Herrick's solution

สูตร

NaCl	3.88	กรัม
Na_2SO_4	2.50	กรัม
$Na_2HPO_4.H2O$	2.91	กรัม
KH_2PO_4	0.25	กรัม
Formaldehyde 37%	7.50	มิลลิลิตร
Gentian violet 6B	0.10	กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

ตารางที่ ค-1 แสดงผลการวิเคราะห์ค่า LC 50 ที่ 24 ชั่วโมง จากโปรแกรม Probit analysis

********** PROBIT ANALYSIS **********

Parameter estimates converged after 16 iterations.

Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
CONC	.01317	.00159	8.27830

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
-4.65728	.55205	-8.43626

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 3.836 DF = 6 P = .699

Since Goodness-of-Fit Chi square is NOT significant, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

********** PROBIT ANALYSIS **********

Observed and Expected Frequencies

CONC	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.00	30.0	.0	.000	.000	.00000
150.00	30.0	.0	.110	-.110	.00366
200.00	30.0	1.0	.644	.356	.02148
250.00	30.0	4.0	2.580	1.420	.08601
300.00	30.0	6.0	7.189	1.189	.23964
350.00	30.0	13.0	14.412	1.412	.48040
400.00	30.0	20.0	21.864	1.864	.72879
450.00	30.0	29.0	26.925	2.075	.89751

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

_********** PROBIT ANALYSIS **********

Confidence Limits for Effective CONC

		95% Confidence Limits	
Prob	CONC	Lower	Upper
.01	177.04030	123.00817	211.77047
.02	197.74492	149.65887	228.98814
.03	210.88134	166.50116	239.97894
.04	220.76335	179.12715	248.29068
.05	228.80161	189.36395	255.08511
.06	235.64343	198.04943	260.89590
.07	241.64237	205.64092	266.01478
.08	247.01370	212.41674	270.61960
.09	251.89872	218.55942	274.82715
.10	256.39538	224.19543	278.71854
.15	275.01276	247.30115	295.05880
.20	289.80927	265.31887	308.39150
.25	302.50335	280.44115	320.16510
.30	313.90303	293.68403	331.07553
.35	324.46653	305.61348	341.52774
.40	334.49026	316.58983	351.78939
.45	344.18834	326.87125	362.05599
.50	353.73265	336.66414	372.48532
.55	363.27697	346.15077	383.22092
.60	372.97505	355.50694	394.41276
.65	382.99878	364.91753	406.24017
.70	393.56228	374.59634	418.94301
.75	404.96196	384.81923	432.87344
.80	417.65604	395.99003	448.59852
.85	432.45255	408.79590	467.14306
.90	451.06993	424.66938	490.71557

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.91	455.56659	428.47247	496.43989
.92	460.45160	432.59271	502.66988
.93	465.82294	437.11074	509.53248
.94	471.82188	442.14279	517.21081
.95	478.66370	447.86582	525.98404
.96	486.70195	454.57029	536.31080
.97	496.58397	462.78763	549.03120
.98	509.72039	473.67511	565.97680
.99	530.42501	490.76813	592.75215

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค-2 แสดงผลการวิเคราะห์ค่า LC 50 ที่ 48 ชั่วโมง จากโปรแกรม Probit analysis

********** P R O B I T A N A L Y S I S **********

Parameter estimates converged after 17 iterations.

Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
CONC	.01469	.00166	8.83450

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
-4.83581	.54613	-8.85475

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 13.629 DF = 6 P = .034

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

********** P R O B I T A N A L Y S I S **********

Observed and Expected Frequencies

CONC	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.00	30.0	.0	.000	.000	.00000
150.00	30.0	1.0	.127	.873	.00425
200.00	30.0	1.0	.868	.132	.02892

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

250.00	30.0	5.0	3.678	1.322	.12260
300.00	30.0	6.0	10.037	-4.037	.33456
350.00	30.0	15.0	18.622	-3.622	.62072
400.00	30.0	28.0	25.540	2.460	.85132
450.00	30.0	30.0	28.866	1.134	.96220

********** PROBIT ANALYSIS **********

Confidence Limits for Effective CONC

		95% Confidence Limits	
Prob	CONC	Lower	Upper
.01	170.77176	56.70588	221.63868
.02	189.32242	87.68590	235.58943
.03	201.09222	107.22499	244.55748
.04	209.94618	121.84746	251.37981
.05	217.14819	133.68399	256.98698
.06	223.27824	143.71128	261.80701
.07	228.65309	152.46233	266.07416
.08	233.46563	160.26138	269.93136
.09	237.84244	167.32101	273.47262
.10	241.87130	173.78848	276.76329
.15	258.55186	200.18210	290.77095
.20	271.80904	220.58437	302.47834
.25	283.18252	237.53471	313.07523
.30	293.39626	252.20051	323.14770
.35	302.86081	265.22288	333.04901
.40	311.84174	277.00175	343.02248
.45	320.53090	287.81684	353.25303
.50	329.08229	297.88720	363.89464

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.55	337.63368	307.40323	375.09058
.60	346.32284	316.54569	386.99375
.65	355.30377	325.49986	399.79192
.70	364.76832	334.47153	413.74394
.75	374.98206	343.71322	429.24052
.80	386.35554	353.57674	446.92423
.85	399.61272	364.63795	467.97268
.90	416.29328	378.06773	494.94419
.91	420.32215	381.24841	501.52164
.92	424.69896	384.68068	508.69026
.93	429.51149	388.42933	516.59786
.94	434.88634	392.58760	525.45779
.95	441.01639	397.29735	535.59536
.96	448.21840	402.79118	547.54523
.97	457.07236	409.49426	562.28695
.98	468.84216	418.33140	581.95694
.99	487.39282	432.12366	613.0954

ตารางที่ ค-3 แสดงผลการวิเคราะห์ LC 50 ที่ 72 ชั่วโมง จากโปรแกรม Probit analysis

********** PROBIT ANALYSIS **********

Parameter estimates converged after 18 iterations.

Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
CONC	.01555	.00176	8.86032

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
-4.91331	.55798	-8.80549

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 11.097 DF = 6 P = .085

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity

factor is used in the calculation of confidence limits.

********** PROBIT ANALYSIS **********

Observed and Expected Frequencies

CONC	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.00	30.0	.0	.000	.000	.00000
150.00	30.0	1.0	.148	.852	.00494
200.00	30.0	1.0	1.072	-.072	.03575
250.00	30.0	6.0	4.583	1.417	.15277
300.00	30.0	7.0	12.075	-5.075	.40251
350.00	30.0	20.0	21.067	-1.067	.70225
400.00	30.0	29.0	27.140	1.860	.90467
450.00	30.0	30.0	29.446	.554	.98153

_********** PROBIT ANALYSIS **********

Confidence Limits for Effective CONC

		95% Confidence Limits	
Prob	CONC	Lower	Upper
.01	166.31264	73.80592	211.53315
.02	183.83769	101.13606	225.00913
.03	194.95678	118.37950	233.65586
.04	203.32124	131.28857	240.22296
.05	210.12508	141.74192	245.61198
.06	215.91621	150.60078	250.23746
.07	220.99391	158.33513	254.32623
.08	225.54037	165.23093	258.01664
.09	229.67521	171.47566	261.39964

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.10	233.48133	177.19921	264.53843
.15	249.23968	200.59214	277.83794
.20	261.76391	218.73352	288.85855
.25	272.50859	233.86900	298.74146
.30	282.15765	247.03417	308.04358
.35	291.09894	258.79955	317.09749
.40	299.58334	269.52100	326.13152
.45	307.79211	279.44590	335.32027
.50	315.87072	288.76571	344.81106
.55	323.94934	297.64531	354.74207
.60	332.15810	306.24135	365.25969
.65	340.64251	314.71671	376.53980
.70	349.58380	323.25668	388.81912
.75	359.23285	332.09463	402.44846
.80	369.97753	341.56290	417.99858
.85	382.50177	352.21350	436.50997
.90	398.26012	365.17773	460.23819
.91	402.06624	368.25218	466.02608
.92	406.20107	371.57124	472.33474
.93	410.74754	375.19779	479.29439
.94	415.82524	379.22233	487.09298
.95	421.61637	383.78256	496.01710
.96	428.42021	389.10430	506.53772
.97	436.78467	395.60039	519.51780
.98	447.90375	404.16888	536.83949
.99	465.42881	417.54970	564.26478

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค-4 แสดงผลการวิเคราะห์ค่า LC 50 ที่ 96 ชั่วโมง จากโปรแกรม Probit analysis

* * * * * * * P R O B I T A N A L Y S I S * * * * * * * * * * * *

Parameter estimates converged after 18 iterations.

Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
CONC	.01313	.00148	8.88169

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-3.91705	.45106	-8.68403

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 5.189 DF = 6 P = .520

Since Goodness-of-Fit Chi square is NOT significant, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

- -

* * * * * * * * * * * * P R O B I T A N A L Y S I S * * * * * * * * * * * *

Observed and Expected Frequencies

CONC	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.00	30.0	.0	.001	-.001	.00004
150.00	30.0	1.0	.773	.227	.02576
200.00	30.0	4.0	2.953	1.047	.09844
250.00	30.0	9.0	7.892	1.108	.26308
300.00	30.0	12.0	15.272	-3.272	.50908
350.00	30.0	20.0	22.547	-2.547	.75156

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

400.00	30.0	29.0	27.277	1.723	.90923
450.00	30.0	30.0	29.306	.694	.97685

********** PROBIT ANALYSIS **********

Confidence Limits for Effective CONC

		95% Confidence Limits	
Prob	CONC	Lower	Upper
.01	121.12520	68.27119	156.11984
.02	141.88245	94.48256	173.54818
.03	155.05226	111.05783	184.66090
.04	164.95939	123.49125	193.05609
.05	173.01808	133.57806	199.91174
.06	179.87729	142.14161	205.76888
.07	185.89148	149.63136	210.92327
.08	191.27647	156.32082	215.55512
.09	196.17390	162.38943	219.78279
.10	200.68199	167.96152	223.68844
.15	219.34669	190.85801	240.03233
.20	234.18081	208.79698	253.28037
.25	246.90716	223.93876	264.89427
.30	258.33582	237.28543	275.57502
.35	268.92617	249.39322	285.73222
.40	278.97538	260.61183	295.64091
.45	288.69811	271.18607	305.50758
.50	298.26668	281.30694	315.50353
.55	307.83526	291.14123	325.78606
.60	317.55799	300.85161	336.51659
.65	327.60720	310.61380	347.88170
.70	338.19755	320.63724	360.12325

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.75	349.62621	331.19821	373.58970
.80	362.35256	342.70606	388.83753
.85	377.18667	355.86029	406.87031
.90	395.85138	372.11988	429.85110
.91	400.35947	376.00944	435.43929
.92	405.25690	380.22114	441.52386
.93	410.64189	384.83706	448.22925
.94	416.65607	389.97546	455.73499
.95	423.51528	395.81639	464.31476
.96	431.57397	402.65534	474.41827
.97	441.48111	411.03294	486.86927
.98	454.65092	422.12632	503.46389
.99	475.40817	439.53120	529.69872

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของ % Relative liver weight, จำนวนเม็ดเลือดแดง, ฮีโมโกลบิน,Hematocrit, ระดับเอนไซม์ SGOT-SGPT ระหว่างกบกลุ่มควบคุม กับกบกลุ่มทดลอง โดยใช้ค่าสถิติ T-test

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง-1 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของ % Relative liver weight ระหว่างกบกลุ่มควบคุม (1) กับกบกลุ่มทดลอง (2) ในสัปดาห์ที่ 6 โดยใช้ค่าสถิติ T-test

GroupStatistics

	group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
%Relative liver weight	1	[illegible]	3.7190	.8090	.2558
	2	[illegible]	3.9097	1.1673	.2131

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
%Relative liver weight	Equal variances assumed	1.899	.176	-.478	38	.636	-.1907	.3991	-.9987	.6173
	Equal variances not assumed			-.573	22.469	.573	-.1907	.3330	-.8803	.4990

ตารางที่ ง-2 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของ %Relative liver weight,จำนวนเม็ดเลือดแดง, ฮีโมโกลบิน, Hematocrit, จำนวนเม็ดเลือดขาว,ค่าเอนไซม์ SGOT SGPT ระหว่างกบกลุ่มควบคุม(3) กับกบกลุ่มทดลอง (4) โดยใช้ค่าสถิติ T-test

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Group Statistics

	group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
%Relative liver weight	3	10	4.4340	.9658	.3054
	4	24	6.1125	.9228	.1884
red blood cell	3	10	3870000.00	861587.68	272457.95
	4	24	4970833.33	1142643.45	233241.12
hemoglobin	3	10	7.510	1.618	.512
	4	24	9.467	2.278	.465
haematocrit	3	10	23.50	5.28	1.67
	4	24	27.67	6.72	1.37
mean cell count	3	10	60.680	1.841	.582
	4	24	55.408	3.339	.682
white blood cell	3	10	7216.00	1648.94	521.44
	4	24	14857.08	5327.61	1087.49
neutrophil	3	10	8.00	1.56	.49
	4	24	23.00	12.14	2.48
basophil	3	10	4.40	1.84	.58
	4	24	1.25	2.11	.43
eosinophil	3	10	4.60	4.01	1.27
	4	24	4.58	5.12	1.05
lymphocyte	3	10	79.60	1.51	.48
	4	24	56.42	12.09	2.47
monocyte	3	10	3.40	1.65	.52
	4	24	14.75	7.02	1.43
enzyme SGPT	3	8	280.50	5.88	2.08
	4	24	468.54	204.69	41.78
enzyme SGOT	3	8	1530.00	53.45	18.90
	4	24	1213.33	534.62	109.13

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
%Relative liver weight	Equal variances assumed	.056	.815	-4.769	32	.000	-1.6785	.3520	-2.3954	-.9616
	Equal variances not assumed			-4.678	16.230	.000	-1.6785	.3588	-2.4383	-.9187
red blood cell	Equal variances assumed	.261	.613	-2.731	32	.010	-1100833.33	403138.70	-1921999.99	-279666.67
	Equal variances not assumed			-3.069	22.332	.006	-1100833.33	358656.87	-1844002.24	-357664.43
hemoglobin	Equal variances assumed	1.153	.291	-2.460	32	.020	-1.957	.796	-3.577	-.336
	Equal variances not assumed			-2.830	23.684	.009	-1.957	.691	-3.385	-.528
haematocrit	Equal variances assumed	.248	.622	-1.744	32	.091	-4.17	2.39	-9.03	.70
	Equal variances not assumed			-1.929	21.453	.067	-4.17	2.16	-8.65	.32
mean cell count	Equal variances assumed	4.011	.054	4.677	32	.000	5.272	1.127	2.976	7.568
	Equal variances not assumed			5.880	29.148	.000	5.272	.896	3.439	7.105
white blood cell	Equal variances assumed	4.222	.048	-4.413	32	.000	-7641.08	1731.59	-11168.22	-4113.94
	Equal variances not assumed			-6.336	30.651	.000	-7641.08	1206.04	-10101.96	-5180.21
neutrophil	Equal variances assumed	12.614	.001	-3.858	32	.001	-15.00	3.89	-22.92	-7.08
	Equal variances not assumed			-5.934	24.766	.000	-15.00	2.53	-20.21	-9.79
basophil	Equal variances assumed	.025	.876	4.107	32	.000	3.15	.77	1.59	4.71
	Equal variances not assumed			4.354	19.329	.000	3.15	.72	1.64	4.66
eosinophil	Equal variances assumed	.266	.609	.009	32	.993	1.67E-02	1.82	-3.69	3.72
	Equal variances not assumed			.010	21.538	.992	1.67E-02	1.64	-3.39	3.43
lymphocyte	Equal variances assumed	8.585	.006	5.993	32	.000	23.18	3.87	15.30	31.06
	Equal variances not assumed			9.227	24.658	.000	23.18	2.51	18.00	28.36
monocyte	Equal variances assumed	8.569	.006	-5.011	32	.000	-11.35	2.27	-15.96	-6.74
	Equal variances not assumed			-7.441	28.214	.000	-11.35	1.53	-14.47	-8.23

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
%Relative liver weight	Equal variances assumed	.056	.815	-4.769	32	.000	-1.6785	.3520	-2.3954	-.9616
	Equal variances not assumed			-4.678	16.230	.000	-1.6785	.3588	-2.4383	-.9187
red blood cell	Equal variances assumed	.261	.613	-2.731	32	.010	-1100833.33	403138.70	-1921999.99	-279666.67
	Equal variances not assumed			-3.069	22.332	.006	-1100833.33	358656.87	-1844002.24	-357664.43
hemoglobin	Equal variances assumed	1.153	.291	-2.460	32	.020	-1.957	.796	-3.577	-.336
	Equal variances not assumed			-2.830	23.684	.009	-1.957	.691	-3.385	-.528
haematocrit	Equal variances assumed	.248	.622	-1.744	32	.091	-4.17	2.39	-9.03	.70
	Equal variances not assumed			-1.929	21.453	.067	-4.17	2.16	-8.65	.32
mean cell count	Equal variances assumed	4.011	.054	4.677	32	.000	5.272	1.127	2.976	7.568
	Equal variances not assumed			5.880	29.148	.000	5.272	.896	3.439	7.105
white blood cell	Equal variances assumed	4.222	.048	-4.413	32	.000	-7641.08	1731.59	-11168.22	-4113.94
	Equal variances not assumed			-6.336	30.651	.000	-7641.08	1206.04	-10101.96	-5180.21
neutrophil	Equal variances assumed	12.614	.001	-3.858	32	.001	-15.00	3.89	-22.92	-7.08
	Equal variances not assumed			-5.934	24.766	.000	-15.00	2.53	-20.21	-9.79
basophil	Equal variances assumed	.025	.876	4.107	32	.000	3.15	.77	1.59	4.71
	Equal variances not assumed			4.354	19.329	.000	3.15	.72	1.64	4.66
eosinophil	Equal variances assumed	.266	.609	.009	32	.993	1.67E-02	1.82	-3.69	3.72
	Equal variances not assumed			.010	21.538	.992	1.67E-02	1.64	-3.39	3.43
lymphocyte	Equal variances assumed	8.585	.006	5.993	32	.000	23.18	3.87	15.30	31.06
	Equal variances not assumed			9.227	24.658	.000	23.18	2.51	18.00	28.36
monocyte	Equal variances assumed	8.569	.006	-5.011	32	.000	-11.35	2.27	-15.96	-6.74
	Equal variances not assumed			-7.441	28.214	.000	-11.35	1.53	-14.47	-8.23

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
enzyme SGPT	Equal variances assumed	25.221	.000	-2.570	30	.015	-188.04	73.18	-337.49	-38.59
	Equal variances not assumed			-4.495	23.114	.000	-188.04	41.83	-274.56	-101.52
enzyme SGOT	Equal variances assumed	13.242	.001	1.655	30	.108	316.67	191.39	-74.21	707.55
	Equal variances not assumed			2.859	24.328	.009	316.67	110.75	88.25	545.09

ตารางที่ ง-3 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของ% Relative liver weight , จำนวนเม็ดเลือดแดง, ฮีโมโกลบิน, Hematocrit, จำนวนเม็ดเลือดขาว, ค่าเอนไซม์ SGOT, SGPT ระหว่างกบกลุ่มควบคุม (5) กับกบกลุ่มทดลอง (6)

Group Statistics

	group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
%Relative liver weight	5	10	5.7470	1.0030	.3172
	6	30	6.9660	1.6965	.3097
red blood cell	5	10	4240000.00	927601.45	293333.33
	6	30	6150000.00	1253340.36	228827.60
hemoglobin	5	10	8.380	2.047	.647
	6	30	11.557	2.280	.416
haematocrit	5	10	24.30	6.38	2.02
	6	30	33.67	5.97	1.09
mean cell count	5	10	57.000	4.160	1.315
	6	30	55.053	3.205	.585
white blood cell	5	10	14837.00	12018.99	3800.74
	6	30	15814.33	4892.41	893.23
neutrophil	5	10	41.00	34.26	10.83
	6	30	15.90	16.38	2.99
basophil	5	10	4.00	2.98	.94
	6	30	18.07	9.79	1.79
eosinophil	5	10	8.70	10.33	3.27
	6	30	15.17	6.72	1.23
lymphocyte	5	10	38.80	35.03	11.08
	6	30	35.90	8.52	1.56
monocyte	5	10	6.70	4.85	1.54
	6	30	15.03	5.55	1.01
enzyme SGPT	5	10	157.60	38.80	12.27
	6	30	571.93	597.80	109.14
enzyme SGOT	5	10	319.20	272.33	86.12
	6	30	1809.27	957.52	174.82

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
%Relative liver weight	Equal variances assumed	1.553	.220	-2.140	38	.039	-1.2190	.5697	-2.3724	-6.5607E-02
	Equal variances not assumed			-2.750	26.789	.011	-1.2190	.4433	-2.1289	-.3091
red blood cell	Equal variances assumed	1.625	.210	-4.417	38	.000	-1910000.00	432451.19	-2785451.67	-1034548.33
	Equal variances not assumed			-5.134	20.886	.000	-1910000.00	372030.26	-2683935.71	-1136064.29
hemoglobin	Equal variances assumed	.083	.775	-3.906	38	.000	-3.177	.813	-4.823	-1.530
	Equal variances not assumed			-4.128	17.082	.001	-3.177	.770	-4.800	-1.554
haematocrit	Equal variances assumed	.249	.621	-4.225	38	.000	-9.37	2.22	-13.85	-4.88
	Equal variances not assumed			-4.085	14.643	.001	-9.37	2.29	-14.26	-4.47
mean cell count	Equal variances assumed	1.145	.291	1.543	38	.131	1.947	1.262	-.607	4.501
	Equal variances not assumed			1.352	12.760	.200	1.947	1.440	-1.170	5.063
white blood cell	Equal variances assumed	19.617	.000	-.369	38	.714	-977.33	2645.25	-6332.36	4377.69
	Equal variances not assumed			-.250	10.012	.807	-977.33	3904.29	-9675.20	7720.53
neutrophil	Equal variances assumed	43.782	.000	3.128	38	.003	25.10	8.02	8.86	41.34
	Equal variances not assumed			2.233	10.406	.049	25.10	11.24	.19	50.01
basophil	Equal variances assumed	20.338	.000	-4.441	38	.000	-14.07	3.17	-20.48	-7.65
	Equal variances not assumed			-6.961	37.923	.000	-14.07	2.02	-18.16	-9.98
eosinophil	Equal variances assumed	3.217	.081	-2.291	38	.028	-6.47	2.82	-12.18	-.75
	Equal variances not assumed			-1.853	11.648	.089	-6.47	3.49	-14.09	1.16
lymphocyte	Equal variances assumed	96.322	.000	.427	38	.672	2.90	6.79	-10.85	16.65
	Equal variances not assumed			.259	9.358	.801	2.90	11.19	-22.26	28.06

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
monocyte	Equal variances assumed	.489	.488	-4.232	38	.000	-8.33	1.97	-12.32	-4.35
	Equal variances not assumed			-4.531	17.516	.000	-8.33	1.84	-12.21	-4.46
enzyme SGPT	Equal variances assumed	4.205	.047	-2.171	38	.036	-414.33	190.82	-800.62	-28.04
	Equal variances not assumed			-3.772	29.722	.001	-414.33	109.83	-638.73	-189.94
enzyme SGOT	Equal variances assumed	4.797	.035	-4.818	38	.000	-1490.07	309.25	-2116.11	-864.02
	Equal variances not assumed			-7.646	37.640	.000	-1490.07	194.88	-1884.70	-1095.43

ตารางที่ ง-4 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของ % Relative liver weight, จำนวนเม็ดเลือดแดง, ฮีโมโกลบิน, Hematocrit, จำนวนเม็ดเลือดขาว, ค่าเอนไซม์ SGOT, SGPT ระหว่างกบกลุ่มควบคุม (7) กับกบกลุ่มทดลอง (8) โดยใช้ค่าสถิติ

T-test

Group Statistics

	group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
%Relative liver weight	7	10	8.0060	1.9425	.6143
	8	24	6.6996	1.5358	.3135
red blood cell	7	10	6200000.00	1543444.92	488080.14
	8	24	6420833.33	1379344.26	281557.47
hemoglobin	7	10	11.790	3.087	.976
	8	24	12.337	2.709	.553
haematocrit	7	10	34.10	8.70	2.75
	8	24	35.88	7.85	1.60
mean cell count	7	10	54.890	1.915	.605
	8	24	55.988	3.470	.708
white blood cell	7	10	8100.50	10828.51	3424.28
	8	24	19580.42	9132.95	1864.25
neutrophil	7	10	13.00	13.11	4.14
	8	24	50.75	25.28	5.16
basophil	7	10	7.90	4.82	1.52
	8	24	2.50	1.69	.35
eosinophil	7	10	13.60	9.47	2.99
	8	24	7.67	6.94	1.42
lymphocyte	7	10	54.70	24.82	7.85
	8	24	28.08	21.10	4.31
monocyte	7	10	10.80	7.00	2.22
	8	24	11.00	6.27	1.28
enzyme SGPT	7	10	127.90	68.05	21.52
	8	24	258.08	205.27	41.90
enzyme SGOT	7	10	551.00	451.23	142.69
	8	24	1258.75	961.69	196.30

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
%Relative liver weight	Equal variances assumed	.861	.360	2.091	32	.045	1.3064	.6249	3.350E-02	2.5793
	Equal variances not assumed			1.894	13.929	.079	1.3064	.6896	-.1734	2.7863
red blood cell	Equal variances assumed	.828	.370	-.411	32	.684	-220833.33	537255.98	-1315187.95	873521.29
	Equal variances not assumed			-.392	15.323	.701	-220833.33	563468.57	-1419639.27	977972.60
hemoglobin	Equal variances assumed	.924	.344	-.516	32	.610	-.547	1.062	-2.710	1.615
	Equal variances not assumed			-.488	15.096	.633	-.547	1.122	-2.937	1.842
haematocrit	Equal variances assumed	.779	.384	-.582	32	.564	-1.77	3.05	-7.98	4.43
	Equal variances not assumed			-.558	15.446	.585	-1.77	3.18	-8.54	4.99
mean cell count	Equal variances assumed	1.648	.208	-.937	32	.356	-1.097	1.171	-3.483	1.288
	Equal variances not assumed			-1.178	29.136	.248	-1.097	.932	-3.003	.808
white blood cell	Equal variances assumed	.024	.878	-3.164	32	.003	-11479.92	3628.37	-18870.66	-4089.17
	Equal variances not assumed			-2.944	14.623	.010	-11479.92	3898.86	-19808.83	-3151.00
neutrophil	Equal variances assumed	12.252	.001	-4.452	32	.000	-37.75	8.48	-55.02	-20.48
	Equal variances not assumed			-5.704	30.163	.000	-37.75	6.62	-51.26	-24.24
basophil	Equal variances assumed	18.052	.000	4.895	32	.000	5.40	1.10	3.15	7.65
	Equal variances not assumed			3.457	9.941	.006	5.40	1.56	1.92	8.88
eosinophil	Equal variances assumed	1.698	.202	2.037	32	.050	5.93	2.91	1.31E-03	11.87
	Equal variances not assumed			1.791	13.230	.096	5.93	3.31	-1.21	13.08
lymphocyte	Equal variances assumed	.044	.836	3.184	32	.003	26.62	8.36	9.59	43.65
	Equal variances not assumed			2.973	14.717	.010	26.62	8.95	7.50	45.73

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
monocyte	Equal variances assumed	.076	.785	-.082	32	.935	-.20	2.44	-5.17	4.77
	Equal variances not assumed			-.078	15.342	.939	-.20	2.56	-5.64	5.24
enzyme SGPT	Equal variances assumed	12.876	.001	-1.946	32	.060	-130.18	66.89	-266.44	6.07
	Equal variances not assumed			-2.764	31.189	.010	-130.18	47.10	-226.23	-34.14
enzyme SGOT	Equal variances assumed	1.561	.221	-2.213	32	.034	-707.75	319.82	-1359.20	-56.30
	Equal variances not assumed			-2.916	31.356	.006	-707.75	242.69	-1202.48	-213.02

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพัชราณี ฟักทองพรรณ เกิดเมื่อวันที่ 29 พฤศจิกายน พ.ศ. 2504 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2525 เข้าทำงานเป็นครูสอนวิทยาศาสตร์ที่โรงเรียนราชินี ถนนมหาราช ตั้งแต่จบการศึกษาจนปัจจุบัน และเข้ารับการศึกษาต่อระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ในสาขาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2543

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย