บทที่ 2

การตรวจสอบเอกสาร

2.1 หลักพิษวิทยาเบื้องต้น

2.1.1 ความหมายของพิษวิทยา (Toxicology)

หมายถึง การศึกษาผลของสารพิษที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยาและสรีรวิทยาต่อสิ่งมีชีวิต (ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว, ธีรยุทธ์ กลิ่นสุคนธ์และปัญญา เต็มเจริญ, 2535) ซึ่งความเป็นพิษของเคมีวัตถุต่าง ๆ คือ ความรุนแรง ของอาการพิษที่แสดงออกมาหลังจากที่ได้ในวัตถุมีพิษเข้าไปไม่ว่าจะโดยการทางใดหรือวิธีการใดก็ตาม ความรุนแรงของอาการพิษมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหลายอย่าง ได้แก่ ชนิดของสารพิษที่ได้รับ ความสามารถในการละลายของสารพิษ ชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ได้รับสารพิษ แต่ที่สำคัญที่สุดได้แก่ ปริมาณของวัตถุมีพิษที่ได้รับ ถ้าได้รับเข้าไปในปริมาณมากก็จะทำให้เกิดอาการเป็นพิษตามไปด้วย (สุโขทัยธรรมาธิราชมหาวิทยาลัย, 2537)

2.1.2 การเกิดพิษในร่างกายคนและสัตว์ทดลอง

การศึกษาถึงความเป็นพิษในสัตว์ทดลองจากสารพิษชนิดใดนั้นสามารถนำมาเป็นบรรทัดฐานของการเกิดพิษของสารพิษนั้นต่อมนุษย์ได้ เนื่องจากไม่สามารถทำการทดลองได้ในคน จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาในสัตว์ทดลอง การที่จะนำเอาผลการทดลองที่ได้ในสัตว์ทดลองมาเป็นบรรทัดฐานของคนนั้น จะต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายประการในการที่จะนำมาคำนวณหาขนาด และปริมาณที่ปลอดภัยของคนต่อสารพิษนั้น นอกจากนี้การศึกษาความเป็นพิษของสารเคมีในสัตว์ทดลองก็เพื่อนำมาเป็นแนวทางหรือดูความเป็นพิษของสารเคมีหรือวัตถุมีพิษต่าง ๆ ก่อนที่จะนำออกสู่ท้องตลาดเพื่อการรักษาโรคซึ่งการเกิดพิษในร่างกายของสิ่งมีชีวิตนั้นสามารถแบ่งออกได้ดังนี้ คือ

การเกิดพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity) หมายถึง การที่มนุษย์หรือสัตว์แสดงอาการเป็นพิษออกมาให้เห็นหลังจากที่ให้สารพิษเข้าไปเพียงครั้งเดียวหรือหลายครั้งภายในช่วงระยะเวลา 24 ชั่วโมง ลักษณะ

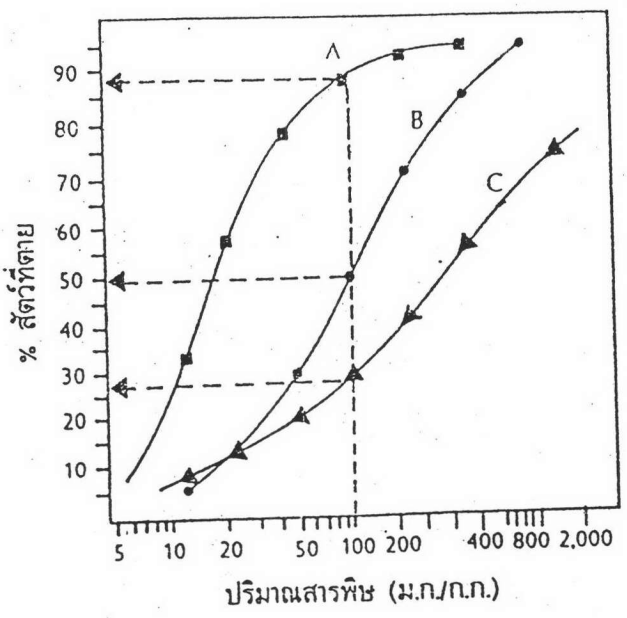
อาการเป็นพิษที่แสดงออกมามากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณสารพิษที่ได้รับเข้าไป แต่การเกิดพิษจะรุนแรงทำให้มีการเสียชีวิตได้

การเกิดพิษกึ่งเรื้อรัง (Sub-chronic toxicity) หมายถึง การที่มนุษย์หรือสัตว์เกิดอาการเป็นพิษแสดงออกมาให้เห็นหลังจากได้รับสารพิษเข้าไปติดต่อกันเป็นเวลานานๆ ประมาณ 1-3 เดือน หรือได้รับสารพิษเข้าไปไม่มากกว่าร้อยละ 10 ของอายุขัย ในสัตว์ทดลอง

การเกิดพิษเรื้อรัง (Chronic toxicity) หมายถึง การที่มนุษย์และ สัตว์แสดงอาการออกมาให้เห็นในลักษณะต่าง ๆ หลังจากได้รับสารพิษในปริมาณน้อยติดต่อกันเป็นเวลานานมากกว่า 3 เดือนขึ้นไป หรือได้รับสารพิษเข้าไปมากกว่าร้อยละ 10 ของอายุขัยในสัตว์ทดลอง ส่วนใหญ่แล้วการได้รับสารพิษเข้าไปแบบเรื้อรังนั้นจะได้โดยการกินเข้าไปหรือสูดดมเข้าไปเป็นระยะเวลานาน ๆ จนเกิดอาการของการเป็นพิษแสดงออกมา เช่น การเกิดเป็นมะเร็งที่อวัยวะภายในร่างกาย การเกิดการกลายพันธุ์ การเกิดผิดปกติในอวัยวะของทารกที่เกิดออกมา และการเกิดผิดปกติในระบบภูมิคุ้มกัน (Wallace A., 1994)

2.1.3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารที่ได้รับกับการตอบสนอง

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพิษที่ร่างกายได้รับกับการตอบสนองต่อการเกิดพิษสามารถประเมินความเป็นพิษของสารใด ๆ ได้จากความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพิษที่ได้รับเข้าไปกับการตอบสนองต่อการเกิดพิษในสัตว์ทดลอง การวัดการตอบสนองต่อการเกิดพิษของสารพิษสามารถวัดได้หลายวิธี เช่น การวัดอัตราการตาย การวัดการทำงานของเอนไซม์บางตัวในเลือด หรือการวัดกระแสไฟฟ้าของกล้ามเนื้อหัวใจ เส้นประสาท หรือ สมอง แต่สำหรับการประเมินความเป็นพิษของสารพิษที่มีกลไกในการทำให้เกิดความเป็นพิษและเกิดการเป็นพิษต่ออวัยวะจำเพาะของสารพิษแตกต่างกันออกไป จำเป็นต้องใช้การวัดอัตราการตายของสัตว์ทดลองเป็นตัวบอกถึงการเกิดพิษของสารพิษแต่ละชนิด ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2.1 จะเห็นได้ว่าสารพิษ A,B และ C จะทำให้อัตราการตายของสัตว์ทดลองแตกต่างกันออกไป สารพิษ A จะทำให้สัตว์ทดลองตายมากที่สุดเมื่อเทียบกับสาร B และ C ในขนาดและปริมาณของสารพิษที่เท่ากัน ดังนั้นสามารถที่จะบอกได้ถึงความรุนแรงของสารพิษจากความสัมพันธ์นี้ได้ (ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว, ธีรยุทธ์ กลิ่นสุคนธ์และปัญญา เต็มเจริญ, 2535)



รูปที่ 2.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพิษที่ได้รับเข้าไป (ม.ก. /ก.ก.) กับการตอบสนองต่อการเกิดพิษของสารพิษแต่ละชนิด (แสดงด้วย % สัตว์ที่ตาย)

ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพิษที่ได้รับเข้าไปกับการตอบสนองต่อการเกิดพิษสามารถนำมาใช้ในการคำนวณหาดัชนีความเป็นพิษซึ่งแบ่งออกเป็น ดัชนีการเกิดพิษถึงตายที่นิยมใช้มากคือ LD_{50} (mean lethal dose 50) หรือ LC_{50} (mean lethal concentration) และ ดัชนีการเกิดพิษถึงเจ็บป่วย ที่นิยมใช้กัน คือ TD_{50} (mean toxic dose), ดัชนีการเกิดผลทางเภสัชวิทยา (mean effective dose – ED) ที่นิยมใช้คือ ED_{50} และดัชนีความปลอดภัยจากสารพิษได้ (ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว, ธีรยุทธ์ กลิ่นสุคนธ์และปัญญา เต็มเจริญ, 2535)

2.1.4 การทดสอบการเกิดพิษเฉียบพลัน

วัตถุประสงค์ของการทดสอบ

เพื่อให้ได้ค่า LC_{50} หรือ LD_{50} ของสารเคมีที่ทดสอบซึ่งใช้เปรียบเทียบความเป็นพิษเฉียบพลันกับสารเคมีอื่น ๆ เพื่อประเมินโอกาสที่จะแสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษที่เกิดขึ้นกับระบบต่าง ๆ ของร่างกายเมื่อเกิดความเป็นพิษเฉียบพลัน และเพื่อเป็นแนวทางของการทดลองขั้นต่อ ๆ ไป (แก้ว กังสดาลอำไพ, 2537)

ดัชนีแสดงความเป็นพิษ

- LD_{50} (mean lethal dose 50) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารพิษต่อน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองที่ได้รับเข้าไปครั้งเดียว ทำให้สัตว์ทดลองตายไปครึ่งหนึ่ง (50%) ของจำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ทั้งหมด การหาค่า LD_{50} ในทางพิษวิทยานั้นส่วนใหญ่จะทำกับสารเคมีที่ผลิตขึ้นมาใหม่เพื่อทดสอบหาความเป็นพิษของสารเคมีนั้น โดยทั่วไปแล้วจะใช้สัตว์ทดลองจำพวกหนู และให้สารเคมีทางปากหรือโดยการฉีดเข้าไปในช่องท้องและต้องใช้สัตว์ทดลองไม่ต่ำกว่า 10 ตัว ต่อกลุ่มขนาดหรือปริมาณของสารเคมีที่ใช้จะต้องมากกว่า 3 ขนาด ซึ่งทำให้สัตว์ทดลองตาย (100%) หรือทำให้สัตว์ทดลองตายบางส่วน และไม่ทำให้สัตว์ทดลองตายเลย ตามลำดับ จากนั้นก็นำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพิษกับอัตราการตายเพื่อคำนวณหาค่า LD_{50} ซึ่งค่านี้จะบอกถึงความเป็นไปได้ของการเกิดพิษในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยเฉพาะในคน นอกจากนี้ยังทำให้ทราบว่าสารเคมีตัวนั้นจัดอยู่ในสารเคมีที่ทำให้เกิดพิษต่ออวัยวะใดในร่างกาย และความรุนแรงของสารเคมีต่อร่างกายได้อีกด้วย

- LC_{50} (mean lethal concentration) หมายถึง ความเข้มข้นของสารเคมีในอากาศหรือในน้ำที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่งของสัตว์ทดลองที่ใช้ทั้งหมด ซึ่งจะต้องบอกถึงระยะเวลาของสัตว์หายใจเอาสารเคมีเข้าไป หรือระยะเวลาที่สัตว์น้ำอยู่ในน้ำที่มีสารเคมีละลายอยู่ การที่ต้องใช้ค่า LC_{50} เนื่องจากสารเคมีที่ระเหยได้หรือที่ละลายอยู่ในน้ำเมื่อสัตว์ได้รับเข้าไปโดยการหายใจหรือสัตว์ที่อาศัยอยู่ในน้ำ พบว่าขนาดหรือปริมาณของสารเคมีที่สัตว์ได้รับเข้าไปนั้นไม่รู้แน่นอน ดังนั้นมีความจำเป็นที่จะต้องรู้ค่าความเข้มข้นของสารเคมีดังกล่าวที่ละลายอยู่ในน้ำหรือที่ระเหยอยู่ในอากาศที่เข้าไปในสัตว์ทดลองแล้วทำให้สัตว์ทดลองตายไป 50% ของจำนวนสัตว์ทั้งหมดที่ใช้ทดลอง

ทั้งค่า LD_{50} และ LC_{50} ในสัตว์ทดลองจะมีค่าไม่คงที่ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างซึ่งสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าดังกล่าวได้ เช่น พันธุ์และชนิดของสัตว์ทดลอง เพศ อายุ สภาวะแวดล้อมได้แก่ อุณหภูมิ ความเค็ม ความกระด้างของน้ำ ปริมาณของสัตว์ทดลอง และการมีสารพิษชนิดอื่นปะปนอยู่ในอากาศและอาหาร (Wallace A., 1994)

การคำนวณหาค่า LC_{50}

- การคำนวณค่า LC_{50} จากกราฟทำได้หลายวิธีเช่น การสร้างกราฟปกติระหว่างปริมาณความเข้มข้นของสารพิษกับอัตราการตาย (%) และหาค่า LC_{50} จะสร้างกราฟที่เป็นค่าลอกจ์ (log)ของความเข้มข้นของสารกับค่าความเป็นไปได้ (probability หรือ probit) ด้วยวิธีทางสถิติหรือวิธีของลิชฟิลด์และวิลค็อกซอน (Litchfield and Wilcoxon) (ปรีชา สมมณี, 2520)

- การคำนวณค่า LC_{50} ด้วยโปรแกรมการวิเคราะห์โพรบิท (probit analysis) (Finney, 1971) เช่นเดียวกับวิธีคำนวณโดยใช้กราฟปกติ (โชคชัย เหลืองธุวปราณีต, 2531)

สัตว์ทดลอง การเลือกสัตว์ที่จะนำมาทดสอบต้องคำนึงถึง ชนิดของสัตว์ทดลองซึ่งควรใช้ขนาดเล็ก และมีสายพันธุ์ที่แน่นอน จำนวนสัตว์ทดลอง ควรมีจำนวนตั้งแต่ 5-10 ตัวต่อปริมาณความเข้มข้นของสารพิษ จำนวนกลุ่มของสัตว์ทดลอง ขึ้นอยู่กับชนิดของสารพิษและผลการทดลองในขั้นตอนแรก โดยทั่วไปแล้วจำนวนปริมาณความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ จะมีดังนี้คือ LD_{100}, LD_{50} และ LD_0 เพื่อการคำนวณหาค่า LD_{50} (Wallace A., 1994)

การเตรียมสารละลาย สารพิษที่จะให้สัตว์ทดลองจะต้องพิจารณาสารที่เป็นตัวทำละลายควบคู่กันไปได้แก่ ตัวทำละลายที่เป็นน้ำ เช่น น้ำ น้ำเกลือ และแอลกอฮอล์ ตัวทำละลายที่เป็นไขมัน เช่น น้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ ตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ การละลายถ้าละลายดีในน้ำให้ใช้น้ำหรือน้ำเกลือ แต่ถ้าไม่ละลายในน้ำก็ใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์หรือน้ำมันพืชแทน ซึ่งความเข้มข้นของสารละลายที่คงที่จะให้การตอบสนองต่อการเกิดพิษได้ดี

การตรวจสอบและบันทึกผลการทดลอง การกำหนดช่วงเวลาในการตรวจสอบและบันทึกผลการทดลองนั้น ขึ้นอยู่กับสาเหตุการตาย ช่วงระยะเวลาของการตาย การคืนกลับสู่สภาพปกติ และลักษณะของ

การตายเมื่อมีการตายเกิดขึ้นจะต้องบันทึกเวลาที่ตายได้อย่างแน่นอนพร้อมจำนวนสัตว์ทดลองที่ตาย (Wallace A., 1994)

การวิเคราะห์สาเหตุการตาย การวิเคราะห์ผลเพื่อหาสาเหตุการตายนี้จะวิเคราะห์จากข้อมูลต่าง ๆ เหล่านี้ คือ สภาพของการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา การเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยา การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารชีวเคมีในพลาสมาในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของตับไต ทางเดินอาหาร ปอด และกล้ามเนื้อ การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของเซลล์เนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ภายในร่างกาย (ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว, ธีรยุทธ์ กลิ่นสุคนธ์และปัญญา เต็มเจริญ, 2535)

2.2 สิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.2.1 ไรสีน้ำตาล , อาร์ทีเมีย *Artemia salina* Linn.

อนุกรมวิธาน

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Order Anostraca

Family Artemiidae

Genus Artemia

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Artemia salina* L. ชื่อสามัญ Brine shrimp

ลักษณะทั่วไป

ไรสีน้ำตาล เป็นสิ่งมีชีวิตในคลาสครัสตาเซียน (Crustaceans) ชั้นต่ำ มีขา 1 คู่ ลำตัวตรง ตัวเมียกับตัวผู้แตกต่างกันตรงหนวดคู่แรก ลำตัวมีเปลือกบางมาก จัดเป็นแพลงค์ตอนชนิดหนึ่ง ไม่มีอวัยวะป้องกันตัว การที่ไรสีน้ำตาลสามารถเจริญแพร่พันธุ์ได้ดีในน้ำทะเล เนื่องจากว่าเมื่ออาศัยอยู่ในอุณหภูมิของน้ำที่เหมาะสม ไรสีน้ำตาลจะมีการเจริญเติบโตได้เร็วมาก จากตัวอ่อนซึ่งมีขนาดยาว 0.4 มิลลิเมตร ถึงตัวเต็มวัยขนาด 1 เซนติเมตร โดยใช้เวลาเพียง 2 อาทิตย์ และตัวเต็มวัยมีอายุอยู่นานถึง 6-7 เดือน เหตุผลอีกประการหนึ่ง คือ ไร

สีน้ำตาลกินอาหารได้ทุกชนิด ตั้งแต่แบคทีเรีย ยีสต์ จุลินทรีย์ สิ่งเน่าเปื่อยต่าง ๆ ขนาดของอาหารประมาณ 2-3 ไมครอน จนกระทั่งถึง 50 ไมครอน กินอาหารตลอดเวลา และวิธีการกินอาหารมีประสิทธิภาพมากโดยอาศัยขนที่ขา อก กรองอาหารเข้าปาก ตัวอ่อนสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดีเช่นเดียวกับตัวเต็มวัย

โดยทั่วไป ถ้าสภาพแวดล้อมดี มีความเค็มเหมาะสม อาหารดีพอสมควร ไรสีน้ำตาลจะมีการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศและออกลูกเป็นตัวจำนวน 100-300 ตัว ทุก 4-5 วัน แต่ถ้าในสภาพน้ำที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิสูง ความเค็มต่ำ จะมีการออกลูกเป็นไข่แบบ oviparus โดยให้ไข่ (cyst) หรือระยะพักตัวของตัวอ่อน จำนวน 300 ฟอง ทุก 4-5 วัน ซึ่งสามารถเก็บอยู่ได้นานในสภาพไข่แห้ง (dry cyst)

ไข่แห้งนี้เมื่อนำไปฟักในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมและให้ออกซิเจนตลอดเวลา จะฟักเป็นตัวอ่อนระยะ nauplius ขนาด 0.4 มิลลิเมตร ภายใน 24 ชั่วโมง และอีกประมาณ 2 อาทิตย์ต่อมา ก็จะเติบโตขึ้นเป็นตัวเต็มวัย น้ำหนักเพิ่มขึ้น 500 เท่า (ลัดดา วงศ์รัตน์ ,2530)

ไรสีน้ำตาลแบ่งออกเป็น 2 สายพันธุ์

1. Bisexual strain คือ พวกที่แยกได้เป็นตัวเมียกับตัวผู้ และมีการ fertilization เกิดขึ้นเมื่อมีการผสมพันธุ์

2. Parthenogenetic strain เป็นพวกที่มีแต่ตัวเมียสืบพันธุ์โดยไม่ต้องอาศัยเพศ ส่วนมากขนาดประมาณ 2 เซนติเมตร ตัวโตกว่าพวก Bisexual ประมาณ 1 เท่า

วงจรชีวิตของไรสีน้ำตาล

เริ่มตั้งแต่ออกจากไข่ถึงตัวเต็มวัยจะมีการลอกคราบ 15 ครั้ง โดยเริ่มต้นจากไข่จะเป็นตัวอ่อน มี 2 ระยะ คือ nauplius กับ instar ไข่ไรสีน้ำตาลมีรูปร่างลักษณะคล้ายถ้วย ไข่ (cyst) คือตัวอ่อนที่เจริญเติบโตยังไม่เต็มที่ เพราะสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม ตัวแม่จำเป็นต้องสร้างเปลือกที่หนาหุ้มเอาไว้ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในน้ำ น้ำจะซึมเข้าไปในไข่ทำให้พองกลม ต่อมาเปลือกไข่จะแตกออก ตัวอ่อนระยะ nauplius จะหลุดออกมา มีลักษณะคล้ายลูกแพร์ มีขา 3 คู่ จากนั้น nauplius จะมีการเจริญเติบโตโดยลำตัวจะเริ่มแบ่งเป็นปล้อง ประมาณระยะ instar ที่ 5 จะเริ่มการสร้างระยางค์และมีทางเดินอาหาร มีการงอกของขาที่อก บริเวณส่วนลำตัวจะเริ่มแบ่งเป็นปล้อง

ตัวเมียระยะตัวอ่อนตั้งแต่ระยะที่ 10 ขึ้นไป จะมีหนวด (Antenna) หนวดคู่ที่ 2 ใช้รับความรู้สึก มีตา 2 ชนิด คือ nauplius eye กับ compound eye (lateral complex eye) และมีขา ซึ่งมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของไรสีน้ำตาล ขาของไรสีน้ำตาลมี 3 ส่วนทำหน้าที่แตกต่างกันคือ ขาส่วนที่เรียกว่า exopodite จะทำหน้าที่หายใจ endopodite ด้านบนทำหน้าที่กรองอาหาร และส่วน endopodite ด้านล่างก็ทำหน้าที่เคลื่อนที่ การสืบพันธุ์ของไรสีน้ำตาลที่จะให้ได้ตัวอ่อนหรือไข่นั้นขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมเป็นสำคัญ ไข่จะอยู่ในถุงเก็บไข่ คือ uterus และมี รังไข่ อยู่ส่วนบนของลำตัว

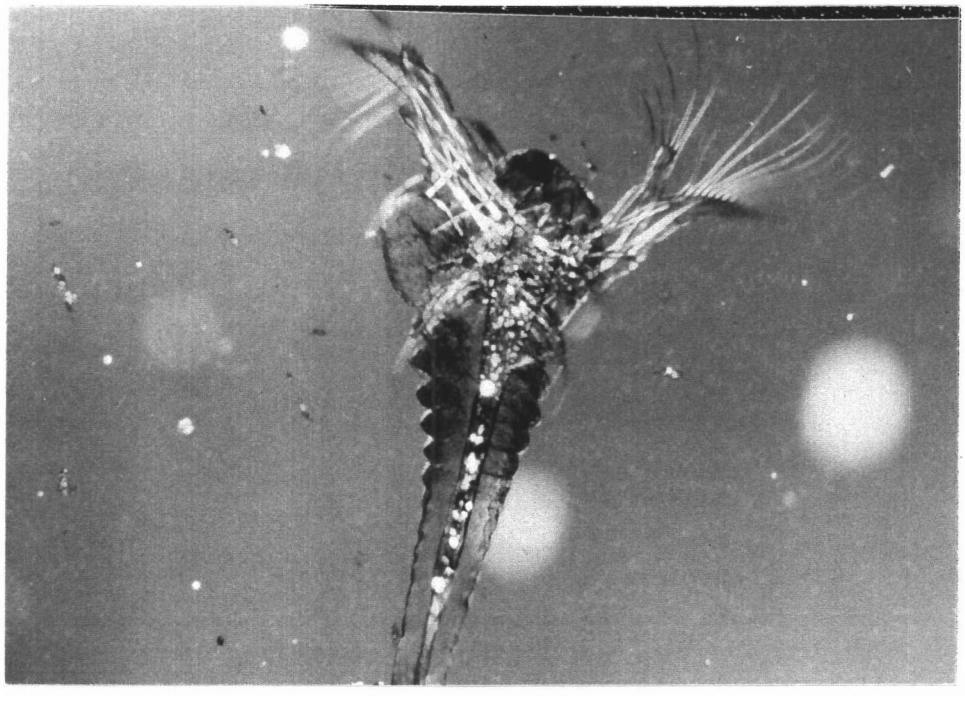
ในตัวอ่อนที่เป็นตัวผู้ มี antenna เริ่มพัฒนาเป็นขอซึ่งเป็นอวัยวะเพื่อใช้จับตัวเมียเวลาผสมพันธุ์ antenna มีลักษณะเป็นกล้ามเนื้อแข็งแรงมีความสำคัญอย่างยิ่งเวลาผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศและออกลูกเป็นตัว ก่อนที่ไรสีน้ำตาลจะผสมพันธุ์จะมีการจับคู่กันนานหลาย ๆ ชั่วโมง หรือเป็นวัน (อนันต์ ตันสุตะพานิช, 2530)

ลักษณะสภาพแวดล้อม

ไรสีน้ำตาลที่เป็นตัวอ่อน หรือตัวแก่ จะสามารถอยู่ในน้ำที่มีอุณหภูมิตั้งแต่ 6-40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 25-30 องศาเซลเซียส ส่วนไข่ทนได้สูงคือ -273 ถึง 100 องศาเซลเซียส ความเค็มขึ้นอยู่กับ strain แต่จะอยู่ในช่วง 45-240 ppt ไรสีน้ำตาลเป็นสัตว์ที่ทนอยู่ในน้ำได้ทุกประเภท ตั้งแต่ไม่มีออกซิเจนเลย แต่จะทนอยู่ได้เพียงระยะสั้น ๆ จนถึง over saturated 150 ppm และ ionic composition ของน้ำก็เช่นกัน ในน้ำทะเลปกติ อัตราส่วนของ Na : K = 28 : 1 แต่ว่าไรสีน้ำตาลอยู่ได้ตั้งแต่ 8:1 ถึง 173:1 จะเห็นว่าไรสีน้ำตาลทนต่อไอออนของน้ำสูงมาก pH ก็เช่นเดียวกัน สามารถอยู่ได้ในน้ำตั้งแต่สภาพเป็นกลาง จนถึงด่าง (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2530)

การใช้ประโยชน์ของไรสีน้ำตาล

ไรสีน้ำตาลวัยอ่อนใช้เลี้ยงลูกกุ้งปลาในโรงเพาะฟัก ไรสีน้ำตาลวัยรุ่นใช้อนุบาลลูกกุ้งปลา ส่วนไรสีน้ำตาลตัวเต็มวัยใช้เลี้ยงกุ้งปลาที่จะส่งออกสู่ตลาดและใช้เป็นอาหารสำหรับการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ ใช้ในการศึกษาทางด้านพันธุกรรม (genetic) และสามารถนำไรสีน้ำตาลไปเป็นตัวอย่างในการศึกษา molecular biology, รังสีวิทยา, สารพิษ, สรีระวิทยา และนิเวศวิทยา ไรสีน้ำตาลสามารถใช้ในรูปแช่แข็ง หรือทำอาหารเม็ด หรือผสมในสูตรอาหารเม็ด (เรณู ยาชิโร, 2530)



รูปที่ 2.2 ลักษณะของตัวอ่อนไรสีน้ำตาล

การใช้ไรสีน้ำตาลเป็นตัวแทนในการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลมะเร็ง

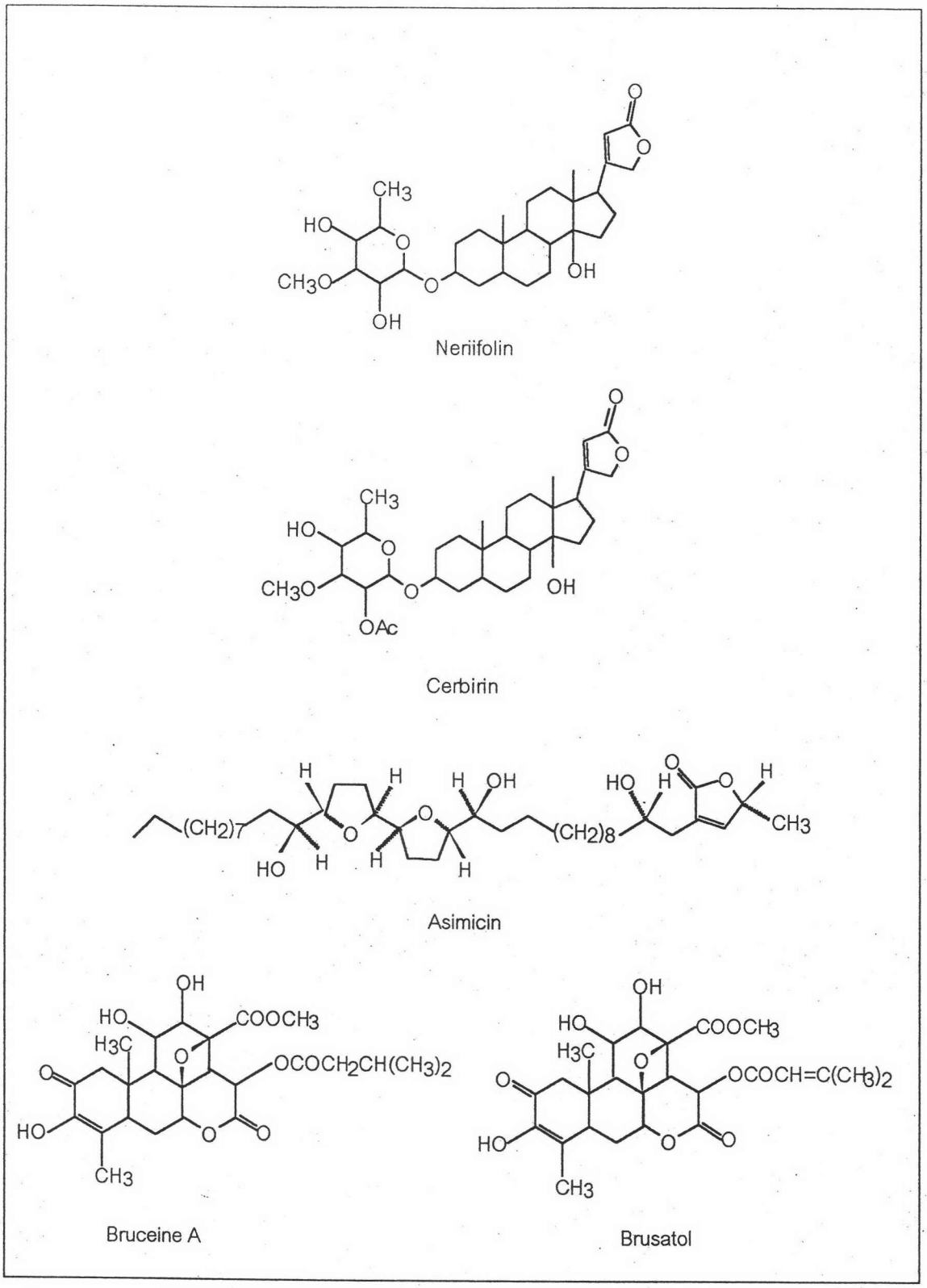
วิธีการทดสอบความเป็นพิษของสารที่มีต่อไรสีน้ำตาล เป็นการตรวจสอบเบื้องต้นของการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร ซึ่งเป็นการทดสอบสิ่งมีชีวิตทั้งตัว เนื่องจากไรสีน้ำตาลมีการตอบสนองคล้ายคลึงกับระบบสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดย มีเอนไซม์ DNA- dependent RNA polymerase คล้ายกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งในการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลมะเร็ง เป็นวิธีทดสอบที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายมาก จึงจำเป็นต้องทำการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น เพื่อเป็นแนวทางของฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา(วิเชียร ตั้งธนานุวัฒน์, พิกุล กรณีย์สุทธิ์และปิยะกร กองอรรถ,2538) และจากการศึกษาวิธีการตรวจฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไรสีน้ำตาล โดยใช้เทคนิคการใช้ไมโครเพลทนี้เปรียบเทียบกับฤทธิ์ทางชีวภาพวิธีอื่น ๆ เช่น ความเป็นพิษต่อ KB cell (Human nassopharyngeal carcinoma) และฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium falciparum*) ของสารประเภท Qussinoid พบว่าทั้ง 2 วิธีนี้ให้ผลกับไรสีน้ำตาลเช่นเดียวกัน เนื่องจากวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษของสารกับไรสีน้ำตาลโดยใช้ไมโครเพลท เป็นวิธีที่ใช้สารทดสอบปริมาณน้อย ง่าย สะดวก รวดเร็ว และราคาถูก จึงเหมาะสมที่จะใช้ในการติดตามสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะมีผลต่อ KB cell และเชื้อมาลาเรีย เช่น สารประเภท Qussinoid หรือ สารบริสุทธิ์ที่มีปริมาณน้อย ๆ ที่แยกได้จากพืช (Solis *et. al*, 1992)

สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไรสีน้ำตาล

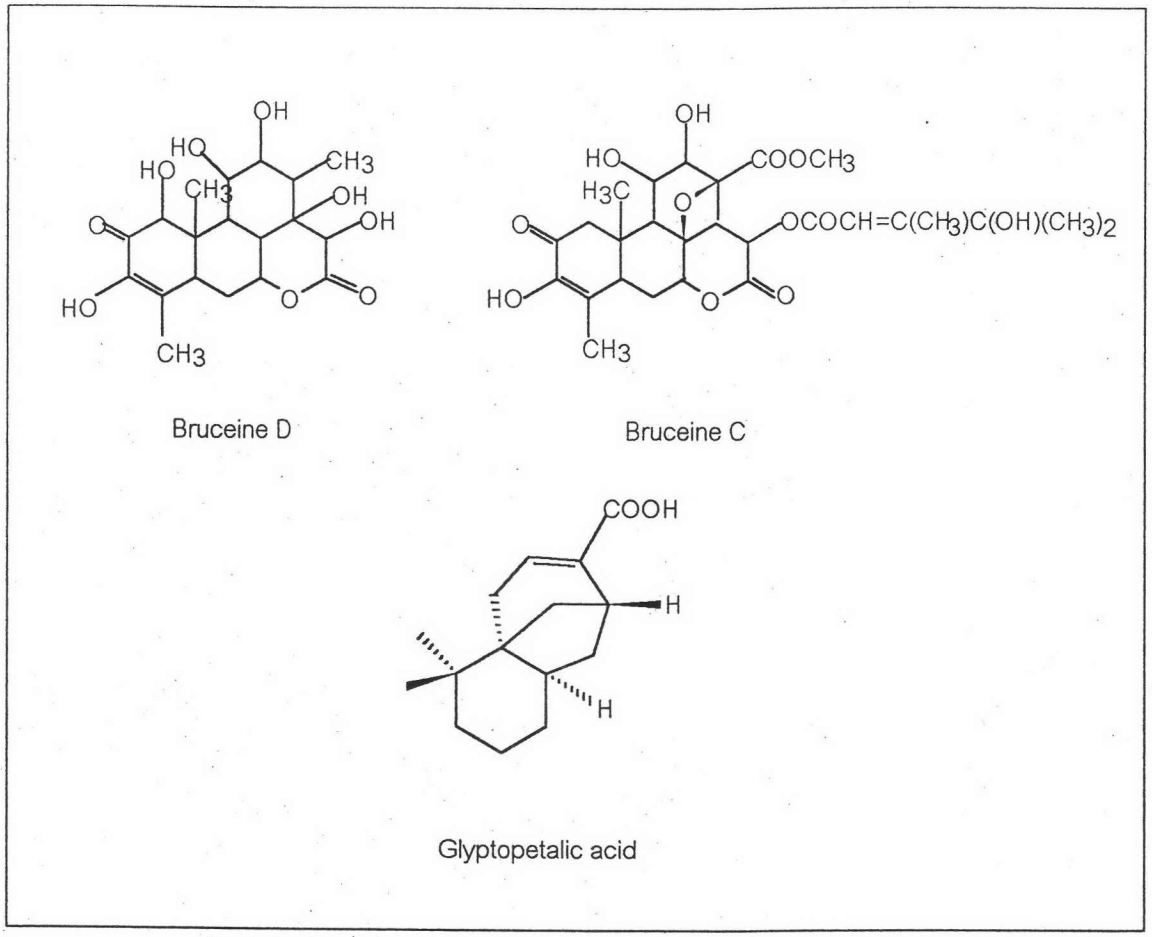
มีรายงานการทำการทดลองใช้ไรสีน้ำตาลในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารอินทรีย์ที่แยกได้จากพืชชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.1 และสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารอินทรีย์ดังกล่าวแสดงในรูปที่ 2.3

ตารางที่ 2.1 สารอินทรีย์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไรสีน้ำตาล

ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนของพืช	ชื่อสารอินทรีย์	อ้างอิง
Cerbera odollam (ตีนเป็ดน้ำ)	ผล	Cerbirin Neriifolin	Sam T.W.,1993
Glyptopetalum sclerocarpum Laws (ข้องนาง)	เปลือกลำต้น	Glyptopetalic acid	Sotanaphu, U., Lipipum, V., Suttisri, R. and Bavovada, R., 1996
Asimina triloba	เปลือกต้น	Asimicin	Alkofahi A. *et.al.*, 1989
Brucea javania (ราชดัด)	ผล	Bruceine A Bruceine C Bruceine D Brusatol	Sam T.W., 1993



รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของสารอินทรีย์ที่แยกได้จากพืชที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไรสีน้ำตาล



รูปที่ 2.3 (ต่อ) **สูตรโครงสร้างของสารอินทรีย์ที่แยกได้จากพืชที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไรสีน้ำตาล**

2.2.2 ปลาตะเพียนขาว *Puntius gonionotus* Bleeker

จำแนกตามหลักอนุกรมวิธาน ได้ดังนี้

Phylum Chordata

Class Osteichthyes

Family Cyprinoidae

Genus *Puntius*

Species *gonionotus*

ชื่อสามัญ : Common silver carp ชื่อไทย : ปลาตะเพียนขาว หรือปลาปึก

ลักษณะทั่วไป

ปลาตะเพียนขาวเป็นปลาน้ำจืด มีเกล็ดสีขาวหรือสีเงินลำตัวแบนข้าง ขอบหลังโค้งยกสูงขึ้น หัวเล็กปากเล็ก ริมฝีปากบาง เป็นปลากินพืช (hirbivore) ตัวเต็มวัยมีขนาดตั้งแต่ 8 - 36 ซม. ปลาตะเพียนขาวอายุ 6 เดือน หนักประมาณ 0.5 กก. อาศัยอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำธรรมชาติ ทั้งแหล่งน้ำไหลและน้ำนิ่ง สืบพันธุ์และวางไข่ในช่วงฤดูฝน และเป็นปลาพื้นบ้านของไทยที่พบทั้งไปในแม่น้ำสายต่าง ๆ ปลาชนิดนี้มีชื่อเรียกภาษาอังกฤษว่า ไทย ซิลเวอร์ คาร์พ (Thai Silver Carp) (ชวริต เข็มพรหมา, 2529)

คุณสมบัติและนิสัย

ปลาตะเพียนขาวจัดอยู่ในกลุ่มปลากินพืชที่อยู่ร่วมกันเป็นฝูง หากินอยู่ในบริเวณที่มีกระแสน้ำอ่อนและมีคุณสมบัติที่ดี ในธรรมชาติปลาตะเพียนขาวจะสืบพันธุ์วางไข่ในฤดูฝน ขณะที่มีน้ำหลากหรือน้ำขึ้นทุ่งนา ปลาตะเพียนขาวจะว่ายจากแม่น้ำไปในทุ่งนาเพื่อผสมพันธุ์ โดยปลาจะผสมพันธุ์เป็นฝูง ไข่ปลาที่ได้รับการผสมจะลอยไปตามน้ำในเวลา 12 ชั่วโมง จึงจะฟักตัว ลูกปลาวัยอ่อนกินอาหารประเภทไรน้ำเล็ก ๆ ในทุ่งนาเพื่อการเจริญเติบโต เมื่อน้ำลดจะว่ายน้ำกลับไปอยู่ตามแม่น้ำตามเดิม ปลาตะเพียนขาวจัดเป็นปลาหัวเบา เนื่องจากเมื่อน้ำเสียหรือมีสารพิษ ปลาตะเพียนขาวจะตายไวกว่าปลาชนิดอื่น

2.2.3 แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค

Staphylococcus aureus

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.5 ไมโครเมตร และมักจะอยู่เป็นกลุ่ม เนื่องจากการแบ่งตัวจะแบ่งทั้ง 3 มิติ และเซลล์ใหม่ที่ได้มักอยู่ติดกับเซลล์แบ่งเดิม ยกเว้นในบางสภาวะเท่านั้นที่จะพบอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรืออยู่เป็นคู่ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป เช่น Nutrient agar, Tryptic soy agar pH 4.8-7.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือระหว่าง 37 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะมีหรือไม่มีออกซิเจน แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* มีโคโลนีสีเหลืองทอง ทำให้เกิดฝี แผลผุพอง เนื้อเยื่อบริเวณเล็บอักเสบ และสิว

Salmonella typhi

Salmonella เจริญได้ง่ายบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาที่ใช้ทั่วไปเช่น Tryptic soy agar, MacConkey agar โคโลนีบน differential media และ selective media จะไม่มีสี เชื้อส่วนมากจะเคลื่อนที่ได้ และไม่หมักน้ำตาลแลคโตส โคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มม. ลักษณะกลมขอบเรียบผิวเรียบมันไม่มีสี สามารถให้ไฮโดรเจนซัลไฟด์จากไธโอซัลเฟต (thiosulfate) และให้ก๊าซจากการหมักน้ำตาลกูลโคส *Salmonella typhi* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคเฉพาะกับคน และคนเท่านั้นที่เป็นพาหะนำเชื้อ ซึ่งทำให้เกิดโรคในคนคือ ไข้ไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์ กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ เลือดเป็นพิษ (septicemia)

Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลาเส้นอาจจะอยู่เป็นเส้นเดี่ยวๆ เป็นคู่หรือเป็นสายสั้น ๆ สร้างชั้นสไลม์ (slime) ซึ่งมีไกลโคโปรตีนเป็นส่วนประกอบ เจริญได้ดีบน blood agar และ MacConkey agar โคโลนีมีลักษณะเรียบ , หยาบ , เป็นเมือก , ใสคล้ายหยดน้ำและหนืดมากหรือมีขนาดเล็กมาก มักแผ่ไปตามรอยสตรีค โคโลนี บน blood agar มักให้ฮีโมลัยลิสชนิดเบต้า และมีกลิ่นคล้ายองุ่น ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อนี้ *P. aeruginosa* ก่อโรคได้ทุกระบบของร่างกาย เช่น เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ , เลือดเป็นพิษ , เยื่อหุ้มสมองอักเสบ , การติดเชื้อในหู , ตา ,กระดูก

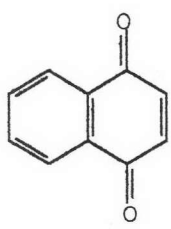
และข้อ การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และการติดเชื้อที่ผิวหนัง (นรีกุล สุระพัฒน์, จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์, ปรีชา พุทธาวุฒิไกรและคณะ, 2526)

2.3 **พืชที่ใช้ในการศึกษา**

2.3.1 มะไฟนกคุ่ม *Ammannia baccifera* Linn. อยู่ในวงศ์ Lythraceae มีชื่อสามัญว่า acrid weed, tooth cap ในประเทศไทยนิยมเรียก มะไฟนกคุ่ม (กรุงเทพ) , แก้วรักนา มะไฟนา (ราชบุรี), สะเดานา (ชลบุรี)และ หญ้ารักนา (ภาคเหนือ)(เต็ม สมิตินันทน์, 2523)

ลักษณะทั่วไป เป็นพืชล้มลุกต้นสูง 20-45 เซนติเมตร ลำต้นมีสีแดงปนน้ำตาล ใบเป็นใบเดี่ยวเกิดเป็นคู่ ๆ แบบตรงกันข้ามขนาดของใบเล็ก รูปเรียวแคบ โคนใบทั้งสองข้างสอบเข้าหาเส้นกลางใบ ดอกขนาดเล็กสีเขียว เมื่อแก่มีสีแดง เกิดเป็นช่อกระจุกแน่น อยู่ระหว่างซอกใบมีก้านสั้น กลีบรองมีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยม ปลายแหลมมีแฉก 4 แฉก ส่วนตรงโคนกลีบเชื่อมติดกัน ไม่มีกลีบดอก ที่เห็นเป็นสีเขียวหรือแดงนั้นเป็นสีของกลีบรอง ผลมีรูปกลม เมื่อแก่จะแตกตามขวางประมาณกลาง ๆ ฝัก ให้เมล็ดสีดำเล็กหลุดออกมา (อำไพ ยงบุญเกิด ,2518)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ศิริพร ซึงสนธิพรและคณะ (2528) ได้ศึกษาวัชพืชที่มีความเป็นพิษต่อปลาพบว่า มะไฟนกคุ่มแสดงความเป็นพิษรุนแรงต่อปลาหางนกยูงมากที่สุด คือทำให้ปลาตาย 100% ที่ความเข้มข้น 0.5 มก./น้ำ 100 มล. ที่เวลา 24 ชั่วโมง และในปี 2529 ศิริพรและคณะได้ทำการแยกสารที่มีฤทธิ์ต่อปลานิลจากมะไฟนกคุ่มพบสารที่มีฤทธิ์ต่อปลาคือ 1,4- Naphthoquinone สูตรโครงสร้างทางเคมีแสดงดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของสาร 1,4-Naphthoquinone

Prasad K.V., Bharathi K. และ Srinivasan K.K. (1994) ได้ศึกษาผลของมะไฟนกคุ่มที่มีต่อระบบปัสสาวะในหนูเผือก พบว่าสารที่สกัดจากมะไฟนกคุ่มด้วยเอทานอล มีผลต่อการลดการเกิดนิ่วในท่อปัสสาวะของหนูเผือกตัวผู้ที่ความเข้มข้น 2 กรัม/กก./วัน ซึ่งในกระเพาะปัสสาวะของหนูเผือกจะฝังด้วยแผ่นสังกะสี(zinc discs) ไว้เป็นตัวชักนำทำให้เกิดก้อนนิ่วได้ซึ่งก้อนนิ่วจะเกิดขึ้นได้โดยการรวมตัวของแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟตกับแคลเซียมออกซาเลต ซึ่งสารสกัดนี้จะช่วยลดปริมาณก้อนนิ่วให้อยู่ในระดับปกติที่สามารถรักษาได้

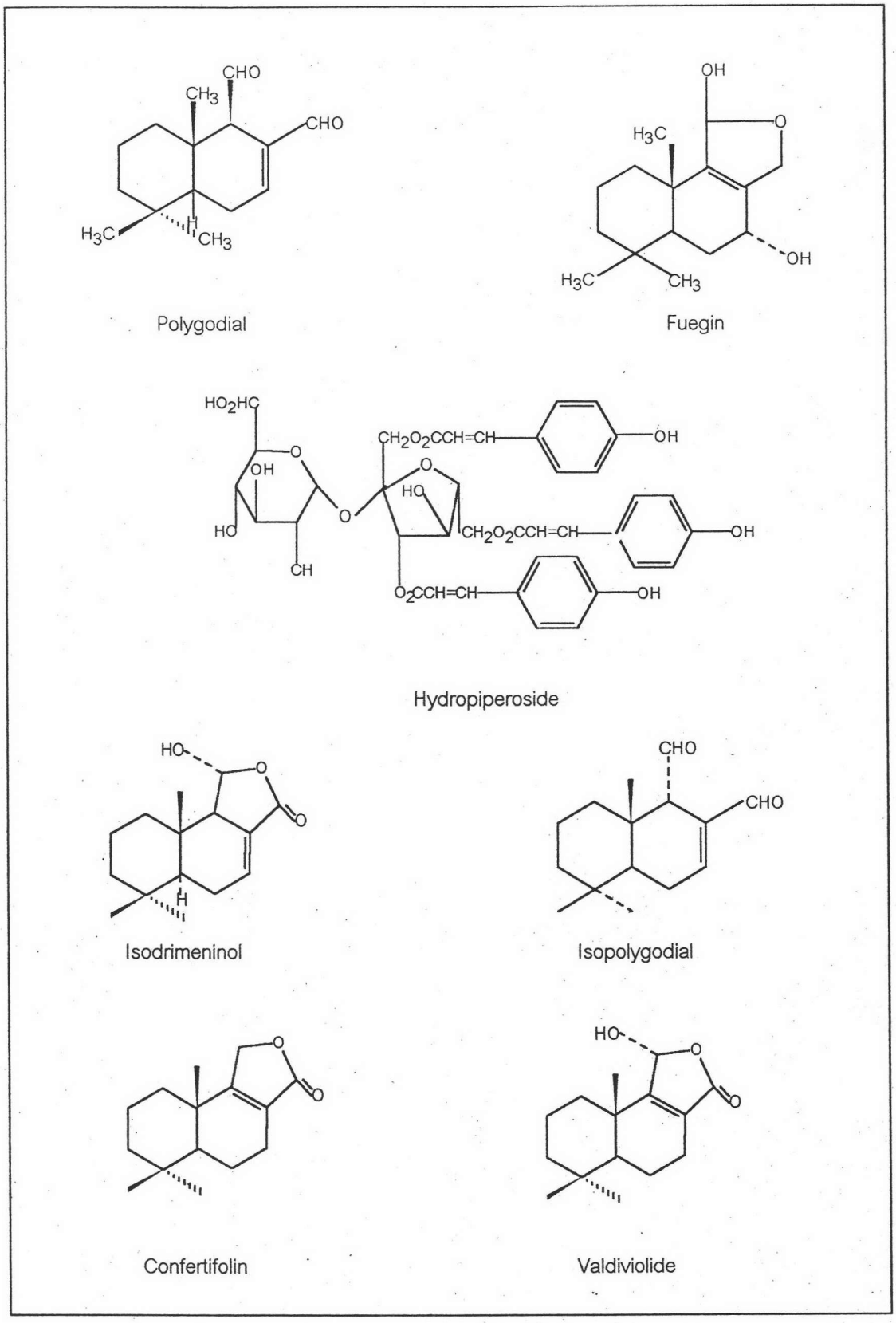
2.3.2 ผักไผ่น้ำ *Polygonum hydropiper* Linn. อยู่ในวงศ์ Polygonaceae มีชื่อสามัญว่า marsh pepper และ smart weed ในประเทศไทยเรียกว่า ผักไผ่น้ำ (ธวัชชัย รัตน์ชเลศ และ Maxwell J.F., 1992)

ลักษณะทั่วไป เป็นพืชพรรณไม้ล้มลุก มีประโยชน์ทางเภสัชคือทั้งต้นใช้ขับปัสสาวะ ขับลม ขับพยาธิ ราก มีรสขมช่วยให้เจริญอาหาร ใบ ใช้ตำพอกแผล (สุวรรณา เวชอภิกุล, 2528) ส่วนที่เป็นพิษคือน้ำยางหรือของเหลวจากพืชทั้งต้น อาการพิษเกิดจากน้ำยางหรือของเหลวจากพืชนี้จะมีรสเผ็ดร้อนเมื่อสัมผัสถูกผิวหนังจะทำให้แสบร้อนระคายเคืองต่อผิวหนังและถ้ารับประทานเข้าไปมาก ๆ จะทำให้เกิดอาการปั่นป่วนในกระเพาะอาหารและลำไส้(ฝ่ายความปลอดภัยด้านเคมีวัตถุ, 2537)

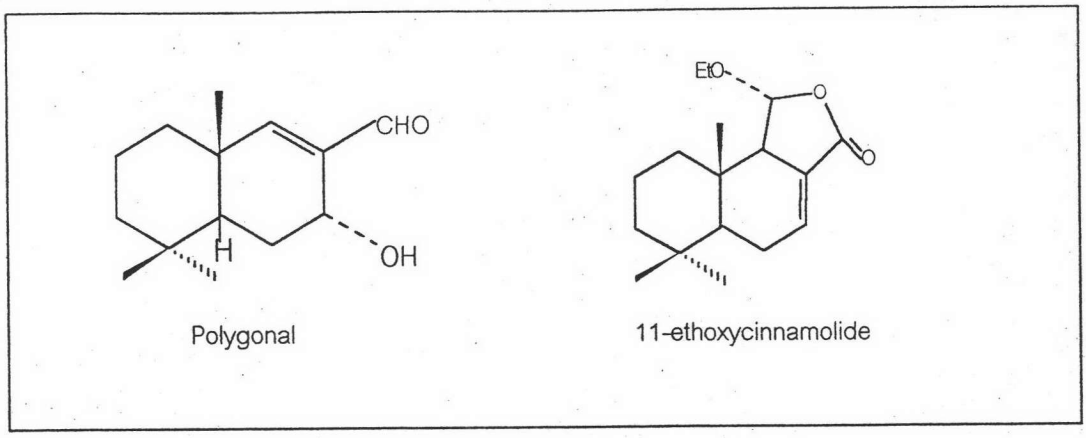
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง Harada J. และ Yano M. (1983) ได้ทำการทดลองแยกหาสารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าปลาพบสาร polygodial ซึ่งมีฤทธิ์ในการฆ่าปลาในระดับสูง ในปี 1982 Yoshiyazu F., Tsuneo S., Iwao M., Yoshinori A. และ Tsunematsu T. รายงานว่า สาร Warburganal ซึ่งแยกได้จากใบของ *P. hydropiper* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลมะเร็งชนิด KB cell ที่ระดับ 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ต้านการกินของหนอนแอฟริกาที่ 0.1 ppm/cm^2 และพบว่ารากของ *P. hydropiper* ซึ่งสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการทำให้หนูขาวเป็นหมันได้ จากการศึกษาเอกสารอ้างอิงพบว่ามีผู้วิจัยองค์ประกอบทางเคมีของ *P. hydropiper* อยู่พอสมควรซึ่งสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.2 และสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารเหล่านี้แสดงดังรูป 2.5

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีที่พบใน *Polygonum hydropiper*

ส่วนของพืช	ชื่อสาร	เอกสารอ้างอิง
เมล็ด	Polygonal	Asakawa Y. and Takemoto T.,
	Isodrimeninol	1979
	Polygodial	
	Isopolygodial	
	Confertifolin	
ใบ	Polygonic acid	Fukuyama, Y., *et.al.* , 1984
	11-ethoxycinnamolide	
	Polygodial acetals	
	Valdiviolide	
	Fuegin	
ราก	Hydropiperoside	Fukuyama, Y., *et.al.* , 1983



รูปที่ 2.5 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารที่พบในผักไผ่น้ำ



รูปที่ 2.5 (ต่อ) สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารที่พบในผักไผ่น้ำ

2.3.3 **มะคำดีควาย** (*Sapindus rarak* DC.) อยู่ในวงศ์ Sapindaceae ชื่อสามัญเรียกว่า soap nut tree, cha-sae, sa-le-de ในประเทศไทยเรียก มะคำดีควาย, มะสักและส้มป่อยเทศ (Norman R.F.และ Nuntavan B., 1992)

ลักษณะทั่วไป เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูงประมาณ 5-10 เมตร ขนาดใบกว้างหนาแน่น บริเวณยอด ใบเป็นใบรวมแบบขนนก ใบย่อยมีตั้งแต่ 8-12 ใบ เปลือกมีลักษณะค่อนข้างเรียบสีน้ำตาล ดอกมีขนาดเล็กสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน ผลค่อนข้างกลมมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 ซม. สีน้ำตาล เมล็ดเดี่ยวแข็งสีดำ กลม (พะยอม ตันติวัฒน์, 2521)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง Chiayvareesajja, S., *et.al.* (1987) ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากพืช 221 สายพันธุ์กับปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.) พบว่า สารสกัดจากเมล็ดมะคำดีควายมีฤทธิ์ต่อปลานิลโดยความเข้มข้นสูงสุดที่ทำให้ปลาไม่ตายเลยคือ 10 ppm และความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ปลาตายหมดเท่ากับ 100 ppm

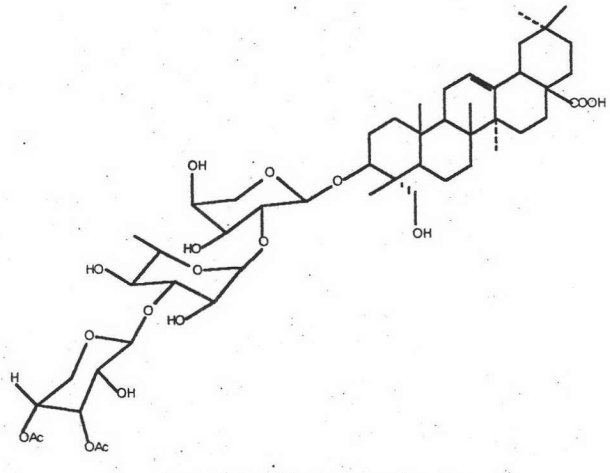
วไลพร พรวิฬุห์ และวีณา สือวิเศษสิน (2531) ได้ศึกษาดัชนีการทำลายเซลเม็ดเลือดแดงในมาตรฐานสมุนไพรไทย พบว่ามะคำดีควาย มีฤทธิ์ในการทำลายเซลเม็ดเลือดแดงมาก โดยให้ค่าดัชนีการทำลายเซลเม็ดเลือดแดงเท่ากับ 3,000

Mokkhasmit M., Sawasdimongkol K. และ Satrawaha P. (1971) ได้ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดเอทานอลจากมะคำดีควายพบว่า มีฤทธิ์ความเป็นพิษกับหนูในระดับต่ำ โดยให้ค่า LC_{50} เท่ากับ 2 กรัม/กก.

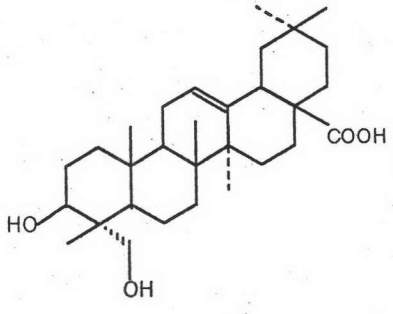
Gedeon J. (1954) , Uppal I. S. (1954) และ Uppal I. S. and Mehta R L. (1952) ได้ทำการแยกหาสารอินทรีย์ในมะคำดีควาย พบสาร hederagenin, saponin , sapindussaponin, α-cellulose

Hamburger M., Slacanin I., Hostettmann K., Dyatmito W. and Sutarjadi (1992) พบว่าสาร Acetylated saponins ในมะคำดีควายมี ฤทธิ์ในการฆ่าหอยได้

Chung M.S., Kim N.C.,Long L.,*et.al* (1997) ได้ทำการแยกหาองค์ประกอบทางเคมีจากมะคำดีควาย พบสารประเภท sesquiterpene glycoside ชื่อว่า Mukuroziside IIb



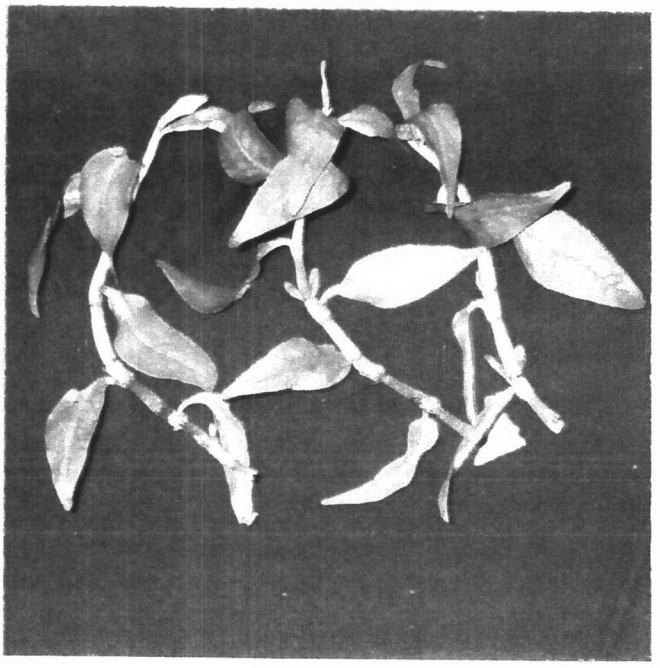
Acetylated Hederagenin



Hederagenin

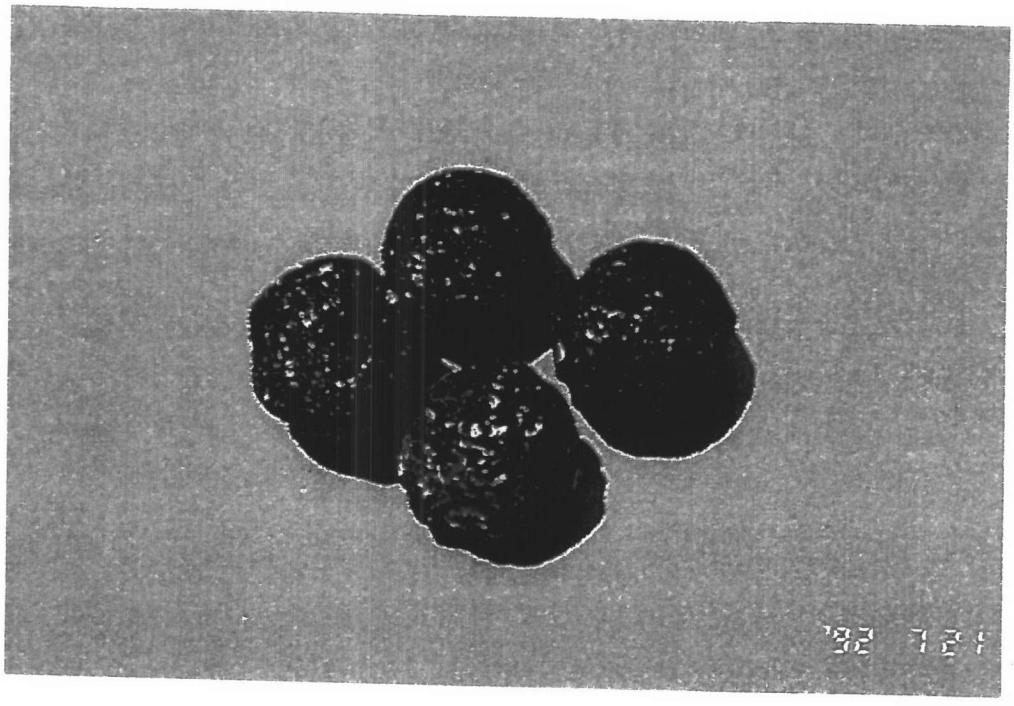
รูปที่ 2.6 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารที่พบในมะคำดีควาย

A. ตะไฟนกคุ่ม *(Ammannia baccifera)*



B. ผักไผ่น้ำ *(Polygonum hydropiper)*

รูปที่ 2.7 ลักษณะต้นตะไฟนกคุ่ม (A) และ ผักไผ่น้ำ (B)



C. เมล็ดมะคำดีควาย *(Sapindus rarak)*

D. ต้นมะคำดีควาย *(Sapindus rarak)*

รูปที่ 2.8 ลักษณะเมล็ดมะคำดีควาย (C)**และ**ต้นมะคำดีควาย (D)

2.4 การสกัดแยกสารจากพืช

2.4.1 การเตรียมตัวอย่างพืช (Plant material preparation)

พืชที่ใช้เป็นตัวอย่างต้องมีการตรวจเอกลักษณ์ที่ถูกต้อง เพราะพืชที่เก็บมานั้นถ้ามีพืชอื่นปนจะทำให้ได้สารแปลกปลอมและเป็นอันตรายได้ ถ้าตัวอย่างที่เก็บมามีจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืชจุลินทรีย์อาจให้สาร ซึ่งถูกสกัดออกมาพร้อมกับสารที่เราต้องการ นอกจากนี้จุลินทรีย์อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนของกระบวนการชีวสังเคราะห์ในพืชได้สารที่แตกต่างไปจากธรรมชาติ ความแตกต่างของสารสำคัญในพืชเกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่น ความแตกต่างเนื่องจากสายพันธุ์ แหล่งที่ปลูก เป็นต้น ผลของการเก็บรักษาและการเตรียมพืช ในระหว่างการเก็บพืชควรพยายามควบคุมให้มีน้ำอยู่น้อยกว่า 5 % เพื่อลดการทำงานของเอนไซม์

2.4.2 การทำสมุนไพรให้แห้ง

เพื่อเป็นการขจัดเอนไซม์ และเป็นการคงคุณค่าของสมุนไพร ควรจะทำให้แห้งโดยวิธีที่เร็วและใช้อุณหภูมิต่ำ ๆ เพราะอุณหภูมิที่สูงจะทำให้สารสำคัญสลายหรือเปลี่ยนแปลงไปได้ การทำให้แห้งอาจทำได้โดยวิธี

- Air drying ซึ่งเป็นการทำแห้งในอากาศอาจเป็นการทำให้แห้งในที่ร่ม หรือตากแดด

- Artificial heat เป็นการทำให้แห้งโดยใช้ความร้อนจากพลังงานอื่น เช่น ไฟฟ้า ได้แก่การทำแห้งโดยใช้ตู้อบ ซึ่งจะมีการควบคุมอากาศที่ผ่านเข้าออกและอุณหภูมิ วิธีนี้จะดีกว่าวิธีแรกตรงที่สามารถควบคุมอุณหภูมิที่แน่นอนได้

2.4.3 การแตกย่อยเนื้อเยื่อ

เป็นกระบวนการแตกย่อยเนื้อเยื่อให้มีขนาดเล็กลง เพื่อเป็นผลดีในการให้สารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธีคือ

- Mechanical method เป็นวิธีที่บดด้วยโกร่งหรือเครื่องมือที่เหมาะสม ได้แก่ เครื่อง driven hamer mill เมื่อบดแล้วนำมาร่อนด้วยตะแกรง เพื่อให้ได้ขนาดที่ต้องการ สมุนไพรบางชนิดต้องทำให้แห้งใน dessicator ก่อน หรืออาจแช่แข็งก่อนบดก็ได้ สมุนไพรสด อาจทำได้โดยการหั่น (slicing) โดยใช้มีด หรือบดด้วยตะแกรงบดเนื้อ อาจจำเป็นต้องใช้ทรายหรือ alumina ผสมเพื่อช่วยให้บดง่ายขึ้นและละเอียดขึ้น หรือใช้วิธี Dilute

suspension ใช้ warring blender , sonic และ suspensonic vibration เขย่ากับทราย หรืออัดด้วยก๊าซ และทำให้ก๊าซขยายตัว

- Enzymatic disintegration เป็นวิธีย่อยเนื้อเยื่อโดยใช้สารเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เช่น เอนไซม์สำหรับย่อย pectin และ cellulose เป็นต้น (นันทวัน บุณยะประภัศร,2536)

2.4.4 การสกัดสารสำคัญจากพืช

การสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธี ขึ้นกับชนิดของสารสกัด สมบัติในการทนความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ วิธีเหล่านี้ได้แก่

การหมัก (Maceration) คือกระบวนการสกัดองค์ประกอบที่สำคัญจากพืชสมุนไพรโดยการแช่ผงสมุนไพรในน้ำยาสกัดจนกระทั่งน้ำยาสกัดสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในสมุนไพรออกมาได้

การสกัดโดยการหมักแบ่งออกได้เป็น

- Simple Maceration การสกัดด้วยตัวทำละลายโดยมีการเขย่าเป็นครั้งคราวที่อุณหภูมิห้องเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดแบบอื่นแล้วถือเป็น stationary condition

- Kinetic Maceration กระทำที่อุณหภูมิห้อง แต่มีการเขย่าสม่ำเสมอ

- Digestion คือ การสกัดด้วยการหมักที่อุณหภูมิสูงประมาณ 40-50 ° C

Maceration เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือ โถ เป็นต้น เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดจึงค่อย ๆ รินเอาสารละลายออก และบีบสารละลายออกจากกาก (marc) ให้มากที่สุด รวมสารสกัดที่ได้นำไปกรอง การสกัดให้หมดจด จำเป็นต้องมีการสกัดซ้ำ วิธีนี้ดีเพราะสารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก (นันทวัน บุญยะภัศร, 2536)

Percolation เป็นวิธีสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า percolator โดยการนำพืชสมุนไพรหมักกับตัวทำละลายในลักษณะที่ชื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้พองตัวเต็มที่ แล้วค่อย ๆ บรรจุผงสมุนไพรทีละน้อยเป็นชั้นลงใน percolator เติมตัวทำละลายลงไปในระดับที่ตัวทำละลายสูงเหนือสมุนไพรอย่าให้แห้ง

เพื่อทำให้ได้สารสกัดปริมาณมาก ๆ ควรบีบกากเอาสารสกัดออกให้มากที่สุด นำสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดรวมกัน แล้วนำไปกรอง

การสกัดด้วย Soxhlet Extractor เป็นวิธีการสกัดต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยการใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายใน flask ระเหยขึ้นไป แล้วกลั่นตัวลงมาใน thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายใน extracting chamber สูงถึงระดับจะเกิดกาลักน้ำ การสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ความร้อนจึงอาจทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัว

การเลือกใช้ตัวทำละลาย

ในการสกัดจะได้ผลดีหรือไม่อยู่ที่การคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม ตัวทำละลายที่ดีควรมีลักษณะคือ เป็นตัวทำละลายที่ละลายสารสกัดได้ดีพอ ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด ไม่เป็นพิษ ราคาถูก

ในการเลือกใช้ตัวทำละลายอาศัยหลักเกณฑ์คือ สารละลายและตัวทำละลายมีสมบัติความมีขั้วคล้ายคลึงกัน ละลายสารที่ต้องการออกมามากที่สุด แรง (force) ที่เกี่ยวข้องในการละลายที่สำคัญคือ

- Dipole-dipole force เป็นแรงที่พบในตัวทำละลายมีขั้วเกิดการเหนี่ยวนำในโมเลกุลเกิดเป็นขั้วบวก และขั้วลบ ทำให้โมเลกุลของตัวทำละลายมีขั้วจับกันแน่น พวกสารที่ไม่มีขั้วจะแทรกตัวเข้าไปยาก

- Dispersion force เป็นแรงที่เกิดจาก Transient charge induced ในโมเลกุล พวกตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วจะประกอบด้วยโมเลกุลซึ่งเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ทำให้สารพวกไม่มีขั้วเข้าไปแทรกตัวอยู่ระหว่างโมเลกุลได้ง่าย

- H-bonding force สารที่สามารถสร้าง H-bonding กับตัวทำละลายได้ดีก็จะละลายได้ดี

โดยทั่วไปตัวทำละลายที่มีขั้วเหมาะกับตัวทำละลายที่มีขั้ว และตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วเหมาะกับตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว การผสมระหว่างตัวทำละลายที่มีขั้วกับตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วอาจทำให้การละลายดีขึ้น เช่น กรดสามารถละลายได้ทั้งในเอทานอล อะซิโตน และส่วนผสมของตัวทำละลายทั้งสอง

ตัวทำละลายเรียงลำดับความมีขั้วจากน้อยไปมากมีดังนี้ cyclohexane, carbon tetra-chloride, benzene, chloroform, ether, acetone, ethyl acetate, ethanol, methanol, water, acid & bases

ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัด ได้แก่

- Hexane ใช้สกัดสารพวก non-polar เช่น ไขมัน สเตียรอยด์ terpenoids นิยมใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับการกำจัดไขมันจากสมุนไพร ซึ่งมีข้อดีคือราคาถูก

- Chloroform เป็นตัวทำละลายที่ดีแต่มี selectivity น้อย เกิด emulsion ง่าย ถ้าใช้สกัดสารที่เป็นด่างแก่อาจจะสลายตัวให้กรดเกลือ นิยมใช้สกัดสารพวก non-polar และมี polar functional group ในโมเลกุล เช่น อัลคาลอยด์ในสภาพอิสระ

- Ether มีอำนาจในการละลายน้อยกว่าคลอโรฟอร์ม แต่มี selectivity ดีกว่า chloroform ข้อเสียคือระเหยง่าย ระเบิดง่าย เกิด oxide ได้ง่ายและดูดน้ำได้มาก นิยมใช้สกัดสารพวก non-polar และมี functional group ในโมเลกุล เช่นอัลคาลอยด์ในสภาพอิสระ

- Alcohol ที่ใช้มากคือ methanol และ ethanol เป็น ตัวทำละลายที่มีอำนาจในการละลายกว้างมาก และยังใช้ทำลายเอนไซม์พืช ใช้สกัดสารพวก polar นิยมใช้เอทานอลมากกว่าเพราะราคาถูกกว่า และเป็นพิษน้อยกว่า

2.4.5 การทำให้สารสกัดเข้มข้นขึ้น

เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารสกัดที่ได้จะมีปริมาตรมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกส่วนไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องนำมาทำให้เข้มข้นก่อนซึ่งอาจทำได้หลายวิธีคือ

- Free Evaporation คือการระเหยให้แห้งโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (water bath) หรือ hot plate บางครั้งอาจเป่าอากาศร้อนเข้าไปในสารสกัดเพื่อให้ระเหยได้เร็วขึ้น

- Distillation in vacuum เป็นวิธีการระเหยแห้งโดยวิธีการกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันออกให้เป็นสุญญากาศโดยใช้ vacuum pump เครื่องมือนี้เรียกว่า Rotary evaporator (นันทวัน บุณยะประภัศร, 2536)

2.5 โครมาโทกราฟี (Chromatography)

การแยกสารประกอบในของผสมที่มีลักษณะซับซ้อน และการสกัดสารประกอบในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ให้บริสุทธิ์ เป็นเรื่องสำคัญในกระบวนการอินทรียเคมี วิธีการแยกได้แก่ การตกผลึกและการกลั่นมักให้ผลที่ไม่แน่นอน แต่ปัจจุบันนี้วิธีโครมาโทกราฟี (chromatography) มีส่วนช่วยให้กระบวนการแยกสารประกอบอินทรีย์ที่เป็น กรด เบส และ เป็นกลางให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เทคนิคโครมาโทกราฟีใช้ประโยชน์ได้ดีในการแยกที่ยุ่งยากซับซ้อน

วิธีโครมาโทกราฟีทุกชนิดย่อมเกี่ยวข้องกับการสัมผัสระหว่างตัวกลางเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งอาจจะเป็นก๊าซหรือของเหลวหรือของแข็ง และตัวกลางอยู่กับที่ (stationary phase) เป็นของแข็ง หลักการแยกสารประกอบออกจากกันเป็นลักษณะการดูดเกาะหรือการดูดซับ (adsorption) และเมื่อตัวกลางอยู่กับที่เป็นของเหลวหลักการแยกเป็นลักษณะ partition (นันทวัน บุณยะประภัศร, 2536)

2.5.1 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

เทคนิคโครมาโทกราฟีมาจากการแยกสารประกอบที่มีสี แต่ปัจจุบันได้แยกสารประกอบที่ไม่มีสีได้ ตัวกลางอยู่กับที่ (stationary phase) ของคอลัมน์โครมาโทกราฟีเป็นตัวกลางดูดซับ ที่เป็นผงละเอียด (ผงแป้ง) เช่น อาลูมินา (Alumina) หรือซิลิกาเจล (silica gel) บรรจุตัวกลางอยู่กับที่ในหลอดแก้ว โดยผสมตัวกลางดูดเกาะหรือตัวกลางอยู่กับที่กับตัวทำละลายอินทรีย์ให้เป็นของเหลวผสมคล้ายโคลน (Slurry) แล้วเทลงในคอลัมน์ ซึ่งมีตัวทำละลายเพื่อการชะล้างบรรจุอยู่แล้วครึ่งหนึ่งแล้วปล่อยให้ของแข็งที่เป็นตัวกลางอยู่กับที่ ทิ้งตัวลงสู่ก้นคอลัมน์จนแน่นตัวและไม่มีฟองอากาศ ปรากฏอยู่ (ถ้ามีเขย่าคอลัมน์หรือบรรจุใหม่) ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ปิโตรเลียม หรือ เบนซีน เป็นตัวกลางเคลื่อนที่ (mobile phase)

เติมของผสม (ของสารประกอบต่าง ๆ) บนส่วนยอดของคอลัมน์ หรือบนพื้นผิวยอดของตัวกลางอยู่กับที่ของผสมจะถูกดูดซับโดยตัวกลางอยู่กับที่ จึงเติมตัวทำละลายผ่านคอลัมน์เพื่อชะล้างให้สารประกอบเคลื่อนที่ลงสู่ส่วนล่างของคอลัมน์ สารประกอบแต่ละองค์ประกอบจะถูกชะล้างให้สารประกอบเคลื่อนที่ไปกับตัวกลางเคลื่อนที่ ด้วยอัตราเร็วซึ่งขึ้นอยู่กับอำนาจการดูดเกาะของตัวกลางดูดเกาะหรือตัวกลางอยู่กับที่ การชะล้างสารประกอบให้ลงสู่เบื้องล่างของคอลัมน์เรียกว่า developing เมื่อองค์ประกอบในของผสมถูกชะล้าง

ให้แยกจากกัน จะปรากฏเป็นแถบของสารประกอบสองสามแถบแยกจากกัน เมื่อการชะล้างดำเนินต่อไป แถบของสารประกอบจะแยกจากกันอย่างชัดเจนจนหลุดออกจากคอลัมน์ทีละแถบ สารประกอบที่มีสมบัติโพล่า เช่น แอลกอฮอล์, เอมีน และคาร์บอกซิลิก แอซิด จะถูกตัวกลางดูดเกาะดึงดูดอย่างรุนแรง และมีการเคลื่อนที่ช้ามาก หรือไม่เคลื่อนที่เลย สารประกอบที่มีสมบัติไม่โพล่า เช่น ไฮโดรคาร์บอน อีเทอร์ และอัลคิลเฮไลด์ จะถูกดึงดูดหรือดูดเกาะไม่รุนแรง จึงเคลื่อนลงสู่ส่วนล่างของคอลัมน์ได้อย่างรวดเร็ว

การแยกสารประกอบที่มีสีโดยวิธีโครมาโทกราฟีจะปรากฏแถบสีแยกจากกันให้เห็นด้วยตาเปล่า ส่วนการแยกสารประกอบที่ไม่มีสี จะต้องใช้ fraction collector คอยรองรับเพื่อเก็บองค์ประกอบสารที่ชะออกมาได้เป็นส่วนย่อย ๆ (fraction) เมื่อเอาส่วนย่อย ๆ ที่แยกจากคอลัมน์มาตรวจหาชนิดสารประกอบด้วยวิธี spectroscopic method หรือวิธีการอื่น ๆ แล้วเอาส่วนย่อย ๆ นั้นมารวมกันจะได้สารประกอบบริสุทธิ์จำนวนหนึ่ง จากนั้นจึงนำไปกลั่นไล่ตัวทำละลายออกจะได้ผลึกสารประกอบบริสุทธิ์ เราอาจใช้คอลัมน์สั้นเพื่อแยกสารประกอบอินทรีย์ที่มีโพลาลิตี้ต่างกันมาก ๆ เช่น ไฮโดรคาร์บอนกับแอลกอฮอล์ แต่ถ้าสารประกอบมีคุณสมบัติโพลาลิตี้ใกล้เคียงกันต้องใช้คอลัมน์ยาว ๆ และจะต้องเลือกใช้ตัวกลางดูดเกาะ (adsorbent) และตัวทำละลายเพื่อชะล้าง (eluting solvent) เพื่อให้มันแยกจากกันโดยเด็ดขาด

2.5.2 ธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-layer Chromatography, TLC)

เป็นการแยกสารโดยใช้ stationary phase ซึ่งแผ่เป็นแผ่นเคลือบบน support ซึ่งอาจเป็นแก้ว, Aluminum หรือ polyethylene เมื่อหยดสารผสมลงบน stationary phase แล้วจึงนำแผ่น TLC ที่ได้ไปใส่ Tank ซึ่งบรรจุ mobile phase ที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดกระบวนการที่ตัวทำละลายจะเคลื่อนที่ผ่านไปบน stationary phase ซึ่งเรียกว่า development ขณะที่เกิด development สารก็จะแยกออกจากกัน กลวิธีในการแยกจะมีทั้ง adsorption และ partition แต่จะมีกลวิธีใดมากกว่า ขึ้นกับว่าแผ่น TLC ที่เตรียมขึ้นนั้นถูกนำไป activate หรือไม่ การ activate แผ่น TLC โดยอบที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง จะทำให้น้ำระเหยออกไปจาก particle ของ adsorbent ทำให้กลวิธีเป็น adsorption มากกว่า partition แต่ถ้าไม่ได้นำ plate ไป activate น้ำที่จับอยู่ที่ particle จะทำหน้าที่เป็น liquid stationary phase จะมี partition mechanism เกิดมากกว่าเดิม น้ำที่เคลือบอยู่นี้มาจากความชื้นในอากาศนั่นเอง

TLC มีหลายขนาด ได้แก่

- Microscopic slide TLC เป็น TLC ขนาดเล็กใช้แผ่น microscopic slide ใช้แยกสารโดยใช้เวลาสั้น เช่น แยกสาร 4 ชนิด ในเวลา 5 นาที เตรียมง่าย ไม่ต้อง activate โดยมากใช้ทาง qualitative เช่น ตรวจ synthetic reaction หรือตรวจ fraction ของ column chromatography ที่มีสารไม่มากชนิดนัก

- Macro-layer TLC เป็น TLC ที่ใช้ทั่วไปและมีขายสำเร็จรูป มีขนาด 5x20, 10x20, 20x20 ซม. ความหนาของ adsorbent =0.25 มม. ใช้ทั้ง qualitative และ quantitative

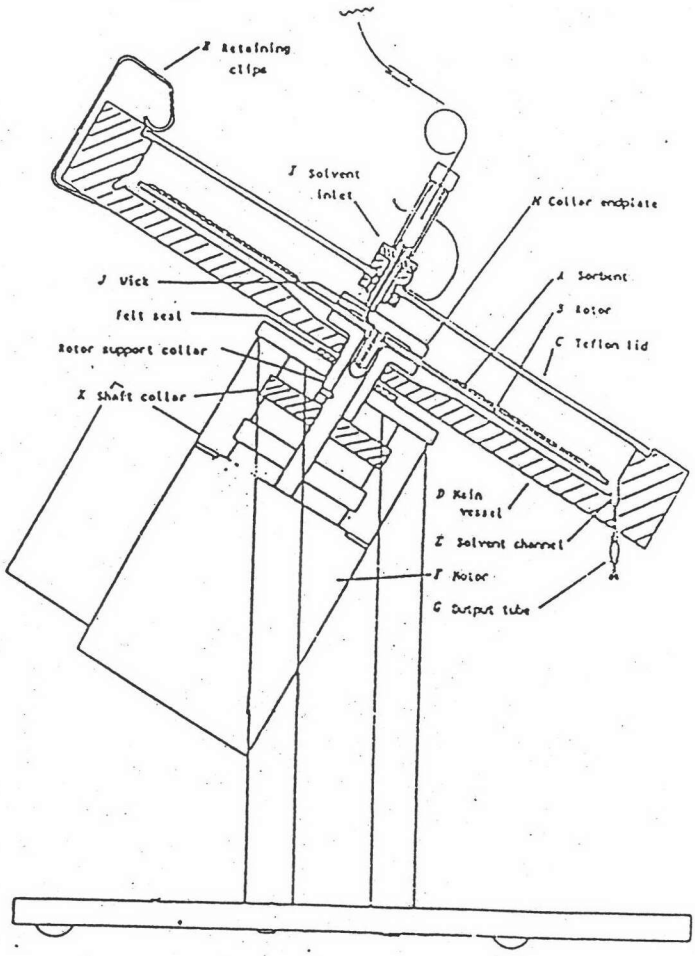
- Preparative TLC เป็น TLC ที่มี adsorbent หนาขึ้นถึง 2 มม. ใช้เมื่อแยกสารปริมาณมากขึ้นเช่นเดียวกับ Macro-layer TLC

Adsorbent สำหรับ TLC มีขนาด 125-250 μ adsorbent สำหรับ TLC จำเป็นต้องผสมกับสารที่ช่วยให้ adsorbent ติดแน่นกับแผ่นแก้ว หรือแผ่น support ชนิดอื่น สารเหล่านี้เรียกว่า binder ที่ใช้กันมาก ได้แก่ plaster of parries or gypsum (hydrated calcium sulfate) 5-15% ใช้ตัวย่อว่า G , starch 1-3 % ใช้ตัวย่อว่า S, low molecular weight silicon dioxide หรือ hydrated silicon dioxide ใช้ตัวย่อว่า H, organic polymer เช่น polyvinyl alcohol บางครั้งยังผสมสารซึ่งเรืองแสงลงไปใน adsorbent ด้วย โดยผสม phosphor (F) ซึ่งเมื่อถูกกับ UV light จะเรืองแสง ส่วนที่เป็นตำแหน่งของสาร สารจะบังไม่ให้ phosphor ถูกกับ UV จึงปรากฏเป็น dark spot ดังนั้นการเลือกซื้อ adsorbent จึงต้องเลือกชนิดที่เหมาะสมกับงาน adsorbent ที่ใช้มาก ได้แก่ silica gel บางครั้งเราอาจจะเปลี่ยนแปลง adsorbent ให้เหมาะสมกับการแยก เช่น การเตรียม adsorbent สำหรับ reversed phase chromatography

2.5.3 โครมาโททรอน (Chromatotron)

เป็นวิธีที่ใช้แยกของผสมหรือทำสารให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี (Chromatography) ร่วมกับแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (centifugally force acceleration) โดยใช้แผ่นแก้ววงกลม (rotor) เคลือบ (coat) ด้วยตัวดูดซับ (adsorbent) บนแผ่นแก้ววงกลม ซึ่งหมุนได้ด้วยมอเตอร์ไฟฟ้าด้วยความเร็วคงที่ สารตัวอย่างที่ต้องการแยกจะถูกใส่ลงไปบริเวณตรงกลางแผ่นแก้ววงกลม และจะถูกชะจากด้านในของแก้ววงกลม ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ตัวถูกละลาย (eluent) จะเคลื่อนที่ผ่านตัวดูดซับด้วยแรงเหวี่ยงหนีศูนย์

กลาง (centrifugal force) เห็นเป็นแถบ (band) อยู่บนแก้ววงกลมเมื่อใช้ UV lamp ส่องดูแถบสารที่ดูดกลืนแสง แต่ละแถบ (band) จะเคลื่อนที่อย่างช้าๆไปที่ขอบของผิวแก้ว จากนั้นแยกเก็บแต่ละแถบ (band) ออกจากกัน แล้วนำมาวิเคราะห์โดยวิธีธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Harrison Research, 1990)



รูปที่ 2.9 อุปกรณ์ของเครื่องโครมาโททรอน

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วิเชียร ตั้งธนานุวัฒน์, พิกุล กรณีย์สุทธิ์และปิยะกร กองอรรถ (2538) ได้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่สกัดด้วย Dichloromethane จากสิ่งมีชีวิตไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลบริเวณเกาะภูเก็ต จำนวน 60 ตัวอย่าง โดยใช้วิธี Microwell Cytotoxicily Assay Using Brine Shrimp *Artemia salina* พบว่า สารสกัดที่มีฤทธิ์ในระดับสูงมีจำนวน 7 ตัวอย่าง (LD_{50} 10 μg/ml) มีฤทธิ์ในระดับปานกลาง (LD_{50} 100 μg/ml) จำนวน 18 ตัวอย่าง และมีสารสกัดที่มีฤทธิ์ในระดับต่ำ (LD_{50} 1,000 μg/ml) จำนวน 18 ตัวอย่าง ส่วนที่เหลือพบว่ามีฤทธิ์ในระดับต่ำมากจนถึงไม่มีฤทธิ์เลย

ในปี ค.ศ. 1992 Solis และคณะ ศึกษาวิธีการตรวจฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไรสีน้ำตาล โดยเทคนิคการใช้ไมโครเพลท เปรียบเทียบกับฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ เช่น ความเป็นพิษต่อ KB Cell (Human nassopharyngeal Carcinoms) และฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium faleiparum*) พบว่าทั้ง 2 วิธีนี้ให้ผลเช่นเดียวกับการใช้ไรสีน้ำตาล

ชวลิต เข็มพรหมา (2529) ศึกษาพิษเฉียบพลันของสารคาร์บาริลและคาร์โบฟูราน ซึ่งเป็นสารฆ่าแมลงที่มีต่อปลาตะเพียนขาวได้ค่า 96 ชั่วโมง LC_{50} ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% ของคาร์บาริล และคาร์โบฟูรานที่มีต่อปลาตะเพียนขาว เท่ากับ 7.36 (7.32-7.38) mg/l และ 1.05 (0.80-1.38)mg/l ตามลำดับ

กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ(2530) ได้ทำการทดลองหาค่าความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารกำจัดวัชพืช imazapyr ต่อปลานิล และปลาตะเพียนขาว โดยวิธีชีววิเคราะห์น้ำนิ่ง ใช้ลูกปลาที่มีความยาวเฉลี่ย 2-3 เซนติเมตร พบว่าความเข้มข้นของ imazapyr ที่ทำให้ปลานิลตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง มีค่า 4.67(4.4425-4.9194), 4.63(4.9378-4.8772), 4.61(4.3710-4.8785) และ4.36(4.2070-4.5287) มก./ลิตร ตามลำดับ และทำให้ปลาตะเพียนขาวตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 96 ชั่วโมง มีค่า 2.706 (2.664-2.746) มก./ลิตร และพบว่าค่า LC_{50}ที่ 24 ชม และ LC_{50} ที่ 96 ชม ของสาร imazapyr ต่อปลาตะเพียนขาวมีค่าเท่ากัน

ณุฉัตรา ฉัตรทอง (2528) ได้ศึกษาหาค่าความเป็นพิษของสารสกัดจากต้นหนอนตายหยาก (*Stemona tuberosa* Lour.) ต่อสัตว์ น้ำชนิดต่างๆ ได้แก่ลูกปลานิล , ลูกปลาไน,มวนวน,ลูกน้ำยุงลาย,และไรแดง ได้ค่า 24

ชั่วโมง LC_{50} ของสารสกัดหนอนตายหยาก ต่อสัตว์ทดลอง มีค่า 720 (678-770) mg/l , 1200 (1108-1302) mg/l , 180 (131-247) mg/l และ 600(428-840) mg/l ตามลำดับ และค่า 96 ชั่วโมง LD_{50} ของสารสกัดหนอนตายหยาก ต่อลูกปลานิลและลูกปลาไนมีค่าเท่ากับ 640(590-694) mg/l และ 1100 (956-1265) mg/l ตามลำดับ

สุมาลี เหลืองสกุล (2530) ศึกษาผลของสารสกัดจาก เทียนบ้าน (*Impatiens balsamina* L.) , ดาวเรือง (*Tagetes erecta* L.) , ปีกแมลงสาบ (*Zebrina pendula* Schnizl.) , กระสัง (*Peperomia pellucida* B.H.K.)และบัวบก (*Centella asatica* (L.) Urban.) ต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดหนอง 3 ชนิด คือ coagulase positive *Staphylococcus aureus* , B-hemolytic *Streptococcus* group A และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยใช้ 95 % เอทานอลเป็นตัวทำละลายพบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทั้ง 3 ชนิด

คมขำ แสงมหาชัย (2521) ศึกษาสารสกัดที่ได้จากหอม (*Alliumcepa* L.) และกระเทียม (*Allium sativum* L.) ต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย 5 ชนิด คือ *Bacillus mycoides* , *Staphylococcus aureus* , *Klebsialla pnemoniae* , *Escherichia coli* และ *Proteus vulgaris* พบว่าน้ำสกัดจากหอมโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 4 ชนิด ยกเว้น *P. vulgaris* ส่วนน้ำสกัดจากกระเทียมโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทั้ง 5 ชนิดและในการตรวจสอบคุณสมบัติของ essential oil ที่สกัดจากหอมโดยใช้ diethyl ether เป็น solvent และการกลั่นด้วยไอ พบว่าน้ำมันหอม (Onion oil) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทุกชนิด เช่นเดียวกับน้ำมันกระเทียม (Garlic oil) ที่สกัดโดยใช้ไอน้ำ