



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สัตววิทยา)

ปริญญา

สัตววิทยา

สัตววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ผลของสารสกัดจากแก่น้ำต่อความเป็นพิษและระดับเอนไซม์เอสเทอเรส และ
กลูตาไธโอน-เอส-ทรานสเฟอเรสในระยะต่างๆของเห็บสุนัข (*Rhipicephalus sanguineus*)

Effects of Sweet flag Extracts (*Acorus calamus* L.) on Toxicity and the Levels of
Esterase and Glutathione -S- transferase on the Brown Dog Tick (*Rhipicephalus sanguineus*)

นามผู้วิจัย นางสาวชนิดดา สีนวงศ์พันธ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์สุรพล วิเศษสรรค์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์มณจันท์ เมฆธน, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์มัทนา มินน์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สมภพ นีภาพ, M.S.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของสารสกัดจากว่านน้ำต่อความเป็นพิษและระดับเอนไซม์เอสเทอเรส
และ กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสในระยะต่างๆของเห็บสุนัข (*Rhipicephalus sanguineus*)

Effects of Sweet flag Extracts (*Acorus calamus* L.) on Toxicity and the Levels of Esterase
and Glutathione - S - transferase on the Brown Dog Tick (*Rhipicephalus sanguineus*)

โดย

นางสาวชนิดดา ลีวงศ์พันธ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา)

พ.ศ. 2551

ชนิดดา ถิ่นวงศ์พันธ์ 2551: ผลของสารสกัดจากว่านน้ำต่อความเป็นพิษและระดับ
เอนไซม์เอสเทอเรส และ กลูตาไทโอน-เอส-ทรานสเฟอเรสในระยะต่างๆ ของเห็บสุนัข
(*Rhipicephalus sanguineus*). ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา)
สาขาสัตววิทยา ภาควิชาสัตววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์
สุรพล วิเศษสรรค์, Ph.D. 120 หน้า

การศึกษาผลของสารสกัดจากว่านน้ำต่อความเป็นพิษและระดับเอนไซม์เอสเทอเรส และ
กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสในระยะต่างๆ ของเห็บสุนัข (*Rhipicephalus sanguineus*)
โดยวิธีแช่ และโดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย นำสารสกัดมาทดสอบกับเห็บสุนัขทั้ง
2 ระยะ คือระยะเห็บกลางวัยและระยะเต็มวัย วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 4
ซ้ำ พบว่าเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยที่ทดสอบกับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่มีค่า LC_{50} ที่
24 และ 36 ชั่วโมง เท่ากับ 1.49 และ 1.13 %w/v ตามลำดับ ในเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยที่
ทดสอบกับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่มีค่า LC_{50} ที่ 24 และ 36 ชั่วโมง เท่ากับ 1.07
และ 0.86 %w/v ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำมีผลต่อการเหนี่ยวนำเอนไซม์ทำลายพิษ
เอสเทอเรส และกลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรส ของเห็บสุนัขทั้ง 2 ระยะให้ค่าเพิ่มสูงขึ้น
ตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงขึ้น แต่เอนไซม์ กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรส มี
การเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

สารสกัดจากเหง้าของว่านน้ำมีผลทำให้ปริมาณไข่และเปอร์เซ็นต์การฟักออกของเห็บ
ลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นของสารสกัดสูงขึ้น สารสกัดจากเหง้าของว่านน้ำมีผลไล่เห็บสุนัขได้ดี
ที่ระดับความเข้มข้น 30 %w/v โดยเทียบกับกลุ่มชุดควบคุมและกลุ่มทดลองที่เวลาต่างๆ

ผลการทดสอบความเป็นพิษกับสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมายที่ทดสอบกับสารสกัดจากเหง้า
ว่านน้ำด้วยวิธีแช่ พบว่าหนูถีบจักรมีค่า LD_{50} ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 15.38 %w/v ผลการทดสอบ
ที่ดวงตาและผิวหนังของหนูถีบจักรด้วยสารสกัดพบว่าไม่ปรากฏอาการอักเสบขึ้นที่ดวงตาและ
ผิวหนัง

Chanatda Leenuwongphun 2008: Effects of Sweet flag Extracts (*Acorus calamus* L.) on Toxicity and the Levels of Esterase and Glutathione - S - transferase on the Brown Dog Tick (*Rhipicephalus sanguineus*). Master of Science (Zoology), Major Field: Zoology, Department of Zoology. Thesis Advisor: Associate Professor Surapon Visetson, Ph.D. 120 pages.

Effects of sweetflag extracts (*Acorus calamus* L.) on toxicity and the levels of esterase and glutathione - S - transferase on the brown dog tick (*Rhipicephalus sanguineus*). An extract using sweet flag rhizomes using 95% ethanol was trialed against nymphs and adults of the brown dog tick. A completely randomized design (CRD) with 4 replicates was used to analyse LC₅₀. The toxicity of sweet flag extracts showed LC₅₀ ca. 1.49% w/v. after exposure at 24 hours and after exposure for 36 hours was 1.13% w/v. for the brown dog tick nymph and LC₅₀ ca. 1.07% w/v. after exposure at 24 hours and after exposure for 36 hours was 0.86% w/v. for the brown dog tick adult. The enzyme activities of esterase and glutathione - S - transferase in the brown dog tick after 24 hours were induced after levels of sweet flag rhizomes were increased. Glutathione - S - transferase increased a litter when compared with control.

Sweet flag extracts reduced the amount of eggs and percent hatch of brown dog tick as levels of sweet flag extracts was increased. Sweet flag extracts at 30 percent was more repellent to the brown dog tick when compared with control.

The toxicity of sweet flag extracts showed LD₅₀ ca. 15.38% w/v. after exposure at 24 hours for *Mus musculus* and did not affect the eyes and skin of *Mus musculus*.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

/ /

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุรพล วิเศษสรรค์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนผลงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนให้คำปรึกษาและแนะนำตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอกราบขอบพระคุณ ดร. มณฑนา มิลน์ กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอกและรองศาสตราจารย์ ดร. มณจันทร์ เมฆชน กรรมการที่ปรึกษาวิชารองที่กรุณาให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณ ดร. วสกร บัลลังก์โพธิ์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นທີ່ปรึกษา ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกท่านของภาควิชาสัตววิทยาที่คอยเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จ สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยให้ความช่วยเหลือ เป็นกำลังใจและคอยการสนับสนุนในการดำเนินการวิจัยวิทยานิพนธ์นี้มาโดยตลอดจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ชนิดดา ถิณวงศ์พันธ์

ตุลาคม 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	44
อุปกรณ์	44
วิธีการ	47
ผลและวิจารณ์	59
ผล	59
วิจารณ์	94
สรุปและข้อเสนอแนะ	101
สรุป	101
ข้อเสนอแนะ	106
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	107
ภาคผนวก	116
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	120

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ค่า Mean minimum and maximum ของระยะต่างๆ ในวงจรชีวิตของเห็บสุนัขในการทดลอง	16
2	เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธี soxhlet extraction ที่ความเข้มข้นต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมง และ 36 ชั่วโมง	59
3	เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยโดยใช้สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธี soxhlet extraction และค่าสมการ regression เปรียบเทียบในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง และ 36 ชั่วโมง	61
4	เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ความเข้มข้นต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมง และ 36 ชั่วโมง	62
5	เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยโดยใช้สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ และค่าสมการ regression เปรียบเทียบในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง และ 36 ชั่วโมง	64
6	เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ความเข้มข้นต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมง และ 36 ชั่วโมง	65
7	เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยโดยใช้สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ และค่าสมการ regression เปรียบเทียบในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง และ 36 ชั่วโมง	67
8	เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากใบว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ความเข้มข้นต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมง และ 36 ชั่วโมง	68

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
9	เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยโดยใช้สารสกัดจากใบว่านน้ำด้วยวิธีแช่ และค่าสมการ regression เปรียบเทียบในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง และ 36 ชั่วโมง	70
10	ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับเอนไซม์เอสเทอร์สของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยเมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง	71
11	ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับเอนไซม์เอสเทอร์สของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยเมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง	73
12	ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับเอนไซม์กลูตาไทโอน – เอส – ทรานสเฟอเรสของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยเมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง	75
13	ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับเอนไซม์กลูตาไทโอน – เอส – ทรานสเฟอเรสของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยเมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง	76
14	ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับโปรตีนของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยเมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง	78
15	ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับโปรตีนของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยเมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง	80
16	ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณไข่ของเห็บสุนัขเมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง	82
17	ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์การฟักของเห็บสุนัขเมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง	84
18	ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์การหนีของเห็บสุนัขเมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง	86

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
19	เปอร์เซ็นต์การตายของหนูถีบจักรหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ความเข้มข้นต่างกัน 24 ชั่วโมง	88
20	เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยโดยใช้สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ และค่าสมการ regression เปรียบเทียบในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง	90
21	เปอร์เซ็นต์การแสดงความผิดปกติของดวงตาหนูหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ความเข้มข้นต่างกัน ณ เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง	91
22	เปอร์เซ็นต์การแสดงความผิดปกติของผิวหนังหนูหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ความเข้มข้นต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมง	92
23	ปริมาณของ β - asarone ระหว่างใบและเหง้าของว่านน้ำด้วยวิธีแช่	93

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เห็บสุนัข <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	4
2	สรีระวิทยาเห็บ	5
3	วงจรชีวิตเห็บสุนัข	11
4	วงจรชีวิตเห็บ	12
5	สรีระภายในของเห็บ	14
6	หนูลีบจักร	18
7	ว่านน้ำ	22
8	ตัวอย่างโครงสร้างสารในว่านน้ำ	23
9	ภาพวาดส่วนประกอบของว่านน้ำ (<i>Acorus calamus</i> Linn.)	25
10	ลักษณะภาพตัดขวางของเหง้าว่านน้ำ	26
11	แผนภูมิแสดงการเปลี่ยนแปลงสารพิษและเมแทบอลิซึมในร่างกาย	30
12	แสดงทิศทางการขึ้นตอนการแพร่กระจายของสารพิษในร่างกาย โดยทาง intravenous, intramuscular, subcutaneous, oral and topical	33
13	แสดงขั้นตอนการเปลี่ยนโครงสร้างสารพิษด้วยวิธีทางชีววิทยาในรูปแบบของ ปฏิกริยาระยะที่ 1 และ 2	34
14	ปฏิกริยาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางชีววิทยาในระยะที่ 1	35
15	ปฏิกริยาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางชีววิทยาในระยะที่ 1 ของปฏิกริยา oxidation, reduction และ hydrolysis	37
16	ตัวอย่างของสารแปลกปลอมที่เข้าในปฏิกริยา reduction และ oxidation	38
17	การเกิดกรดเมอร์แคปทอริก	41
18	ปฏิกริยาการรวมตัวของเอนไซม์ transferase และ กลุ่ม functional	43
19	กรงเลี้ยงกระต่าย	47
20	พืชและสารสกัดจากพืช	48
21	การสกัดสารจากพืช	48

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	การทดสอบเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัข	49
23	การทดสอบตรวจวัดแอนไซม์	53
24	การตรวจวัดหาโปรตีนในแอนไซม์จากเห็บ	54
25	การทดลองสัตว์ที่ไม่ใช่เป้าหมาย	57
26	เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้า ว่านน้ำด้วยวิธี soxhlet extraction ณ เวลา 24 ชั่วโมง และ 36 ชั่วโมง	60
27	เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้า ว่านน้ำด้วยวิธีแช่ ณ เวลา 24 ชั่วโมง และ 36 ชั่วโมง	63
28	เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้า ว่านน้ำด้วยวิธีแช่ ณ เวลา 24 ชั่วโมง และ 36 ชั่วโมง	66
29	เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากใบว่าน น้ำด้วยวิธีแช่ ณ เวลา 24 ชั่วโมง และ 36 ชั่วโมง	69
30	ระดับแอนไซม์เอสเทอร์ของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยหลังจากได้รับสารสกัด จากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง	72
31	ระดับแอนไซม์เอสเทอร์ของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจาก เหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง	73
32	ระดับแอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัย หลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง	75
33	ระดับแอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย หลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง	77
34	ระดับโปรตีนของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ ด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง	79
35	ระดับโปรตีนของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ ด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง	81
36	ปริมาณไข่ของเห็บสุนัขหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่	83

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
37	เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ของเห็บสุนัขหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธี แช่	85
38	เปอร์เซ็นต์การหนีของเห็บสุนัขเมื่อได้รับการทดสอบจากสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ ด้วยวิธีแช่	87
39	เปอร์เซ็นต์การตายของหนูถีบจักรหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธี แช่ ณ เวลา 24 ชั่วโมง	89

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CDNB	=	cholodinitrobenzene
CRD	=	complete randomized design
EDTA	=	ethylene diamine tetra acetic acid
GST	=	gluthathione-s-transferase
hr	=	hour
LC ₅₀	=	median lethal concentration
LD ₅₀	=	median lethal dose
M	=	molar
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
n mole	=	nano mole
pNPA	=	paranitrophenyl acetate
PVPP	=	polyvinyl poly pyrrolidone

ผลของสารสกัดจากว่านน้ำต่อความเป็นพิษและระดับเอนไซม์เอสเทอเรส และ กลูตาไธโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสในระยะต่างๆของเห็บสุนัข (*Rhipicephalus sanguineus*)

Effects of Sweetflag Extracts (*Acorus calamus* L.) on Toxicity and the Levels of Esterase and Glutathione - S - transferase on the Brown Dog Tick (*Rhipicephalus sanguineus*)

คำนำ

เห็บสุนัข เป็นปรสิตภายนอกที่จัดว่ามีความสำคัญอย่างมากต่อสุขภาพสุนัข โดยเห็บเหล่านี้จะทำให้เกิดความสูญเสียโดยตรงต่อสุนัขเช่น การดูดเลือด การทำความรบกวนและระคายเคือง ทำให้สัตว์เลี้ยงเกิดภาวะโลหิตจาง (anemia) ในเห็บบางกลุ่มสามารถทำให้เกิดอันตรายจากการที่เห็บสร้างและปล่อยสารพิษ (toxin) ออกมากับน้ำลายทำให้เกิดกลุ่มอาการที่เรียก tick paralysis ซึ่งพบอาการทั้งในคนและสัตว์เลี้ยง และเนื่องจากสุนัขเป็นสัตว์ที่มีความใกล้ชิดมนุษย์มากที่สุด มนุษย์จึงให้ความสำคัญต่อสัตว์เลี้ยงชนิดนี้มากขึ้น ซึ่งในการป้องกันและกำจัดเห็บมีทั้งวิธีการใช้ยาฆ่าแมลง การใช้ยาหยดบริเวณหลัง รวมถึงการใช้ยากำจัดเห็บโดยวิธีฉีดเข้าใต้ผิวหนังสุนัข (อาคม, 2538) ตัวยาที่ใช้นั้นมีราคาแพงอีกทั้งต้องนำเข้าจากต่างประเทศทำให้เงินตราไหลออกจากประเทศเป็นจำนวนมาก ปัจจุบันประชาชนได้ตระหนักถึงอันตรายที่เกิดจากการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในการฆ่าแมลงก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม เกิดผลเสียต่อสุขภาพอนามัย เกิดสารพิษตกค้างในธรรมชาติ หากใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานแมลงอาจเกิดความต้านทานต่อสารเคมี ปัจจุบันได้มีการนำสารสกัดจากพืชเรียกว่า botanical pesticides มาควบคุมแมลง ช่วยลดการสร้าง ความต้านทานของแมลงได้ เนื่องจากสารสกัดจากพืชมีสารประกอบทางเคมีหลายชนิด การที่แมลงจะสร้างความต้านทานต่อสารประกอบดังกล่าวจะต้องใช้เวลานานมาก วิธีดังกล่าวยังไม่ทำลายสิ่งแวดล้อมและระบบนิเวศให้เสียไปด้วยเนื่องจากสารสกัดที่ได้จากพืชสลายตัวง่าย (Visetson, 1991)

ปัจจุบันพบว่ามีการนำสารสกัดจากธรรมชาติจากพืชหลายชนิดที่พบในประเทศไทยมีผลต่อการยับยั้งระบบของ detoxification enzyme เช่น mixed function oxidase, esterase และ glutathione - S - transferase ในแมลงหลายชนิด เช่น สาร annonine จาก เมล็ดน้อยหน่ามีผล

ต่อความเป็นพิษในแมลงวันผลไม้ (ทิพนาค , 2550) citronellal จากตะไคร้หอมมีผลต่อความเป็นพิษในเห็บสุนัข (เรวดี, 2541) สาร isoflavonoid จากเมล็ดมันแกวมี่ผลต่อความเป็นพิษในลูกยูง (ประภาพร, 2549)

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการสกัดจากเหง้าว่านน้ำโดยใช้ เอชทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย ได้ทดสอบถึงผลของสารสกัดจากว่านน้ำต่อความเป็นพิษและการเปลี่ยนแปลงระดับของเอนไซม์ เอสเทอเรส (esterase) และกลูตาไธโอน-เอส-ทรานสเฟอเรส (glutathione - S - transferase) ของเห็บสุนัขในระยะตัวกลางวัยและระยะตัวเต็มวัยเพื่อประโยชน์ในการป้องกันและกำจัดเห็บสุนัข แทนการใช้สารเคมีอันก่อให้เกิดอันตรายต่อสภาพแวดล้อมมีผลกระทบต่อร่างกายและผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมายซึ่งตัวแทนของสัตว์ดังกล่าวในการวิจัยนี้คือหนูถีบจักร (*Mus musculus*)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากว่านน้ำที่มีต่อระยะต่างๆของเห็บสุนัข (*Rhipicephalus sanguineus*)
2. เพื่อเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดจากว่านน้ำที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การตายของ เห็บสุนัขระยะต่างๆ
3. ศึกษาเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นระดับต่างๆ ของสารสกัดจากว่านน้ำที่มีต่อจำนวนไข่และเปอร์เซ็นต์การฟักของเห็บสุนัข
4. ศึกษาเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นระดับต่างๆ ของสารสกัดจากว่านน้ำที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การหนีของเห็บสุนัข
5. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบกลไก ลักษณะของเอนไซม์ และผลของความเข้มข้นระดับต่างๆ ของสารสกัดจากว่านน้ำที่มีต่อเอสเทอเรสและกลูตาไทโอน- เอส - ทรานสเฟอเรสของเห็บสุนัขระยะต่างๆ
6. ศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า LC_{50} กับปริมาณของเอนไซม์ในเห็บสุนัขระยะต่างๆ

การตรวจเอกสาร

1. เห็บสุนัข

การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน

ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille)
ชื่อสามัญ	Brown Dog Tick, Kennel tick
Phylum	Arthropoda
Class	Arachnida
Order	Acarina
Family	Ixodides
Genus	<i>Rhipicephalus</i>



(ก)



(ข)

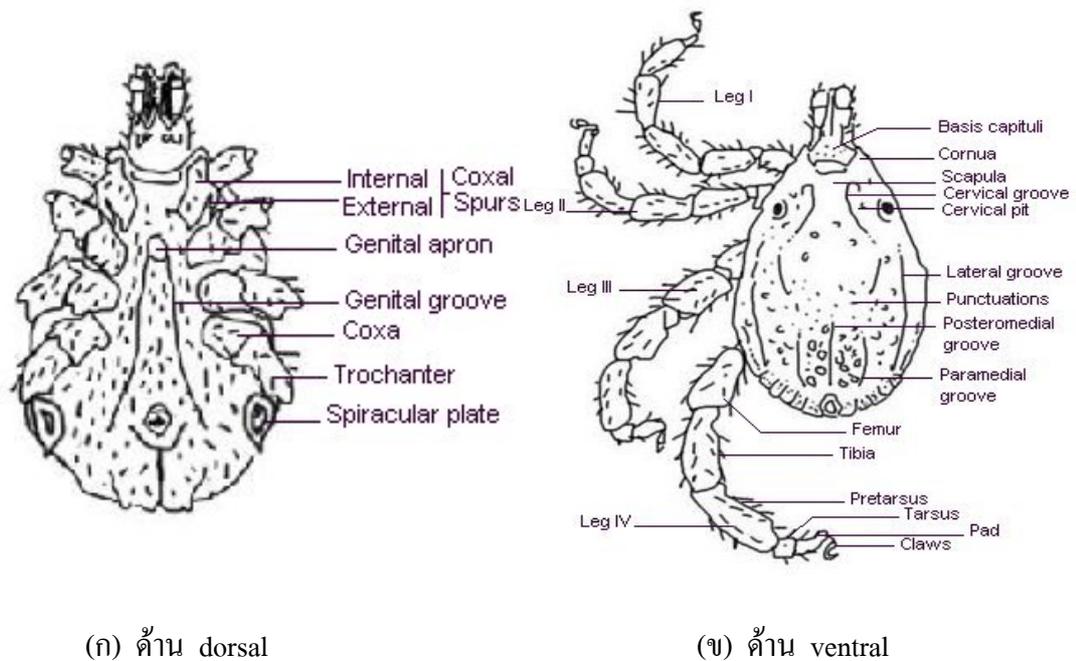
ภาพที่ 1 เห็บสุนัข *Rhipicephalus sanguineus* (ก) เพศเมีย (ข) เพศผู้

รูปร่างลักษณะและชีวประวัติ

เห็บชนิดนี้เป็นเห็บสุนัขโดยเฉพาะ แต่อาจพบได้ในสัตว์อื่นๆ พบได้มากในประเทศไทย ใน ค.ศ. 1806 Latreille ได้ทำการสำรวจเห็บสุนัข (*R. sanguineus*) ในประเทศไทยพบในจังหวัด เชียงใหม่ จันทบุรี กรุงเทพมหานคร นครราชสีมา ปราจีนบุรี มักพบมากในสุนัขที่มีขนยาว

ถ้าตัวจะมีสีแดง เห็บสุนัขมีการแพร่กระจายอยู่ทั่วโลก เนื่องจากเป็นเห็บที่มีสัตว์อาศัย (host) กว้างขวาง สัตว์อาศัยได้แก่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์เลื้อยคลานบางชนิด และนก เห็บมักจะเกาะกับสัตว์อาศัยในขณะที่ยังเป็นตัวอ่อนทำให้มันสามารถกระจายไปตามเขตต่างๆของโลกได้ไกล (Lesson, 1951)

เห็บสุนัขเป็นพวก Tree-host-tick ตัวเมียที่ใกล้วางไข่จะมีสีฟ้าปนเทา เมื่อถึงเวลาวางไข่มันจะปล่อยตัวจากสุนัขไปซ่อนตัวตามรอยแตกของหลังคา เพดานบ้าน และที่อื่นๆซึ่งอยู่ที่สูง แล้วเริ่มวางไข่ประมาณ 2,000–3,900 ฟอง ซึ่งตัวเมียจะวางไข่แค่ครั้งเดียวแล้วตายไป ตัวผู้มีลักษณะรูปร่างกลมขาวสีน้ำตาลแดง ตัวผู้มักอยู่เกาะกลุ่มกันในบริเวณที่ตัวเมียอยู่



(ก) ด้าน dorsal

(ข) ด้าน ventral

ภาพที่ 2 สรีระวิทยาเห็บ

ที่มา: Anonymous (n.d.)

ลักษณะโดยทั่วไปของเห็บ

1. ส่วนปาก (mouthpart)

ส่วนปากของเห็บประกอบด้วย chelicerae 1 คู่ และ pedipalp 1 คู่ ซึ่งเหมือนกับส่วนปากของพวก arachnid ทั้งหมด แต่ส่วนปากของเห็บจะมี median toothed process ซึ่งเรียกว่า hypostome ทั้ง chelicerae และ pedipalp จะเกิดขึ้นบนแผ่น chitin ซึ่งเรียกว่า basis capituli โครงสร้างทั้งหมดของส่วนปากเหล่านี้ซึ่งประกอบไปด้วย basis capituli chelicerae 1 คู่ และ hypostome รวมเรียกว่า gnathosoma หรือ capitulum หรือ rostrum หรือ false head ในเห็บ basis capituli อาจจะมีสันตามขวางบนพื้นผิวดอนบน ขอบสันจะมีทิสทางหรือซี่ไปทางด้านหลัง มุมของขอบนี้จะยื่นออกมาและบริเวณยื่นออกมาเรียกว่า cornua บนพื้นผิวด้านบนของ capitulum เห็บตัวเมียเท่านั้นจะมีบริเวณที่เรียกว่า porose area ช่องว่างระหว่าง porose area จะเรียกว่า interval

2. โครงสร้างที่พบด้านบนของลำตัว

พื้นผิวด้านบนทั้งหมดของลำตัวเห็บอ่อน (argasidae) อาจจะมีขนขึ้นทำให้เกิดเป็นตุ่มหรือตะปุ่มตะป่ำจำนวนมาก และมีขนาดเล็กมากซึ่งเรียกว่า mammillae เห็บอ่อนไม่มี scutum ด้านบนของลำตัวเห็บแข็ง (ixodidae) จะไม่ถูก mammillated และจะมีแผ่น chitin ซึ่งเรียกว่า scutum หรือ dorsal shield scutum เป็น dorsal tergite ของ propodosoma และ propodosomal plate ในตัวผู้ scutum จะปกคลุมพื้นที่ผิวด้านบนของลำตัวทั้งหมด และจะป้องกันลำตัวของตัวผู้ไม่ให้ขยายมากเกินไปหลังจากกินเลือด ในตัวเมีย scutum จะปกคลุมส่วนหนึ่งของพื้นผิวด้านบนตอนหน้าของลำตัวเท่านั้น ในระยะตัวกลางวัยและตัวอ่อน scutum จะปกคลุมประมาณครึ่งหนึ่งของพื้นผิวด้านบนของลำตัว

Scutum จะเชื่อมต่อกับ basis capituli และเมื่อ scutum ถูกทำให้เป็นแอ่งเพื่อรองรับ basis capituli เรียกว่า scutum ถูก emarginated หรือเกิด emargination shoulder จะเป็นมุมตอนหน้าของ scutum บนแต่ละด้านของ emargination จะเรียกว่า scapulae มีจุดเล็กๆ 2 จุด ซึ่งเรียกว่า foveae foveae อาจจะมีพบใกล้ตอนกลางของ scutum ของเห็บตัวผู้ หรือในเห็บตัวเมีย อาจจะมีพบบน integument ของลำตัว

ร่อง (groove) ต่างๆบนพื้นผิวด้านบนของลำตัวเห็บแข็งซึ่งใช้สำหรับการแยกชนิดของเห็บบางชนิด

1. cervical groove จะพบมี 2 groove และจะวิ่งไปทางด้านหลังของลำตัวเหนือ scutum จากมุมด้านในของ scapulae ส่วนของ scutum ซึ่งอยู่ระหว่าง cervical groove เรียกว่า median field และส่วนของ scutum ซึ่งอยู่นอก cervical groove เรียกว่า lateral field

2. lateral groove จะวิ่งไปทางด้านข้างของ scutum ในทั้ง 2 เพศของเห็บแข็ง ในเห็บตัวผู้ร่องอาจจะวิ่งไปข้างหลังและไปยังขอบตอนท้ายของลำตัว ในตัวเมียซึ่ง scutum สั้นส่วนของ lateral groove หลัง scutum อาจจะปรากฏบนผิวของลำตัว และเรียกว่า marginal groove

พวกเห็บแข็งส่วนมากพบว่าขอบตอนท้ายของลำตัวจะถูกแบ่งเป็นบริเวณรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ซึ่งเรียกว่า festoon festoon จะพบเห็นได้ชัดในเห็บที่ยังไม่ได้กินเลือด เมื่อเห็บตัวเมียดูดกินเลือดเข้าไปเต็มที่ festoon จะหายไปหรือเห็นไม่ชัด การมีหรือไม่มี festoon จะช่วยในการแยกชนิดของเห็บแข็งได้เช่นกัน นอกจากนี้ festoon จะไม่พบในเห็บอ่อนทั้งหมด ดังนั้นอาจจะใช้ festoon ช่วยแยกระหว่างเห็บแข็งและเห็บอ่อนได้

ตาจะพบในเห็บบางชนิด ในเห็บแข็งที่มีตาจะพบ 1 คู่ ซึ่งจะมี single facet ตาจะอยู่ในแอ่งเล็กๆ บนขอบด้านข้างและตอนท้ายของ scutum ใกล้บริเวณขาคู่ที่ 2 ในเห็บอ่อนจะมีตา 2 คู่ และพบอยู่ด้านล่างของ supracoxal fold

3. โครงสร้างที่พบบนด้านล่างของลำตัว

พื้นผิวด้านล่างของลำตัวของเห็บจะพบ รูเปิดของอวัยวะสืบพันธุ์ ทวารหนัก และรูเปิดของท่ออากาศ (stigmata) ของระบบการหายใจโดยท่อลม รูเปิดของอวัยวะสืบพันธุ์ (genital aperture) ของเห็บจะตั้งอยู่ที่แนวกลางของพื้นผิวด้านล่างของลำตัวในระดับครึ่งของตอนหน้าหรือ 1 ใน 3 ของตอนหน้าของลำตัว ในเห็บตัวผู้รูเปิดของอวัยวะสืบพันธุ์อาจจะถูกปกคลุมโดย chitinous flap ซึ่งเรียกว่า apron apron จะไม่พบบนรูเปิดของอวัยวะสืบพันธุ์ของเห็บตัวเมีย apron จะปกคลุมรูเปิดของอวัยวะสืบพันธุ์ของเห็บแข็งเพศผู้ทั้งหมดยกเว้นเห็บที่อยู่ในสกุล *Ixodes* ในเห็บแข็งสกุลนี้จะพบว่า apron มีขนาดเล็กหรือไม่มีเลย

ทวารหนัก (anus) จะอยู่ใกล้ปลายตอนท้ายของลำตัว ทวารหนักจะประกอบด้วยวงแหวน ซึ่งภายในวงแหวนจะเป็นลิ้น 2 อัน ซึ่งจะเคลื่อนไหวทางด้านข้างเท่านั้น

รูเปิดของท่ออากาศ (stigmata) จะตั้งอยู่บน plate ซึ่งเรียกว่า peritreme หรือ stigmatal plate peritreme อาจจะเป็นรูปไข่ กลม หรือรูป comma ก็ได้ stigmatal plate เหล่านี้จะตั้งอยู่บนด้านข้างของลำตัว ในเห็บแข็ง plate จะอยู่บริเวณหลัง coxa ของขาคู่ที่ 4 แต่ในเห็บอ่อน plate จะอยู่หน้า coxa ของขาคู่ที่ 4 stigmatal plate อาจจะถูกล้อมรอบโดยวงแหวนของ chitin ซึ่งเรียกว่า frame รูเปิดแท้จริงบน stigmatal plate ซึ่งยอมให้อากาศผ่านเข้าไปในท่อลมเรียกว่า ostium

ในเห็บแข็งพื้นผิวด้านล่างของลำตัวจะพบ genital และ anal groove anal groove จะเริ่มต้นบนแต่ละด้านของอวัยวะสืบพันธุ์และวิ่งไปทางด้านหลังของลำตัวทางด้านในของ coxa ของขาซึ่งอาจจะวิ่งไปลงขอบตอนท้ายของลำตัว ในเห็บสกุล *Ixodes* anal groove จะอยู่ล้อมรอบทางด้านหน้าของ anus ใน species อื่นๆทั้งหมดของวงศ์ Ixodidae พบว่า anal groove จะล้อมรอบทางด้านหลังของ anus แล้ววิ่งไปข้างหน้าถึง genital groove

4. โครงสร้างที่พบบนขา

บนพื้นผิวด้านล่างของลำตัวจะพบขา ขาของตัวกลางวัยและตัวเต็มวัยของเห็บจะมี 4 คู่ ส่วนขาของตัวอ่อนของเห็บจะมีเพียง 3 คู่เท่านั้น

ปล้องขาปล้องแรกเรียกว่า coxa ซึ่งจะเคลื่อนไหวไม่ได้และจะติดกับลำตัว ส่วนปล้องขาอื่นๆนอกจากนี้สามารถเคลื่อนไหวได้ ถัดจาก coxa ไปเป็น trochanter และตามด้วย pre-femur ซึ่งจะสั้นและจะเชื่อม trochanter กับ femur ถัดจาก femur ไปจะเป็น tarsus ซึ่งประกอบด้วย 2-3 ปล้อง บนพื้นผิวด้านบนของปล้องขาบริเวณปล้องปลายของขาคู่แรก ในทุกระยะของทุก species ของเห็บจะมีอวัยวะรับความรู้สึก ซึ่งเรียกว่า Haller's organ

บนพื้นผิวด้านล่างของ tarsal claw จะพบโครงสร้างขยายออกคล้ายจาน ซึ่งเรียกว่า pulvillus pulvillus จะเป็ยโครงสร้างที่ช่วยให้เห็บสามารถจับยึดบนพื้นผิวขณะเดินได้ ในเห็บอ่อนจะไม่มี pulvillus หรือโครงสร้างดังกล่าวอาจหายไปก็ได้

Coxa อาจจะมี spur หรือ teeth ซึ่งจะช่วยให้แยกชนิดเห็บ ลักษณะหนึ่งของเห็บแข็งที่ปรากฏบน scutum capitulum ขาหรือที่อื่นๆของลำตัวคือ อาจจะมีปื้นสีคล้าย enamel เห็บซึ่งมีปื้นสีเหล่านี้เรียกว่าเห็บถูก ornate หรือเป็น ornate tick พวกที่ไม่มีปื้นสีเรียก inornate

การแบ่งเห็บแข็งตามวงจรชีวิตและการเจริญเติบโตแบ่งออกได้ดังนี้

1. one - host tick

เห็บพวกนี้พบว่าช่วงระยะเวลาของการเจริญเติบโตทั้งหมดตั้งแต่ระยะตัวอ่อนจนถึงตัวเต็มวัยจะเกิดขึ้นบนสัตว์ตัวเดียวกัน การหล่นของเห็บจากตัวโฮสต์ (drop) จะมีเพียงครั้งเดียวเท่านั้น คือระยะที่ตัวเมียดูดกินเลือดจนตัวเป่งเต็มที่ (engorged female) แล้วหล่นลงมาจากตัวของสัตว์เพื่อหาที่วางไข่ ตัวอย่างของเห็บพวกนี้ได้แก่ เห็บโค

2. two – host tick

ตัวอ่อนของเห็บพวกนี้เมื่อฟักออกมาจากไข่จะเกาะโฮสต์ แล้วดูดกินเลือดจนตัวเป่ง จากนั้นจะลอกคราบแล้วกลายเป็นระยะตัวกลางวัย ตัวกลางวัยจะดูดกินเลือดของโฮสต์จนตัวเป่งกลายเป็น Engorged nymph ซึ่งต่อมาตัวกลางวัยดังกล่าวจะหล่นจากตัวโฮสต์ แล้วลอกคราบเป็นระยะตัวเต็มวัย ซึ่งจะคอยหาโฮสต์ตัวใหม่เพื่อจะเกาะดูดกินเลือดและเจริญเติบโตต่อไป จะเห็นได้ว่าในเห็บพวกนี้จะมีการหล่น (drop) จากตัวโฮสต์ 2 ระยะ คือระยะที่เป็น engorged female หล่นจากตัวโฮสต์เพื่อวางไข่ และระยะ engorged nymph หล่นจากตัวโฮสต์เพื่อลอกคราบเป็นระยะตัวเต็มวัย ตัวอย่างของเห็บพวกนี้ได้แก่ red – legged tick

3. three – host tick

ตัวอ่อนของเห็บพวกนี้เมื่อดูดกินเลือดจากโฮสต์ตัวหนึ่งจนเป่งเต็มที่แล้วจะตกลงมาบนพื้นดิน แล้วลอกคราบเป็นระยะตัวกลางวัย ซึ่งจะเกาะโฮสต์อื่นๆ อีกแล้วดูดกินเลือดจนตัวเป่งเต็มที่ และจะหล่นจากโฮสต์เพื่อมาลอกคราบเป็นระยะตัวเต็มวัย (ดังภาพที่ 4) ซึ่งเห็บจะคอยหาโฮสต์ตัวใหม่เพื่อเกาะดูดเลือดและเจริญเติบโตต่อไป จะเห็นได้ว่าในเห็บพวกนี้จะมีการหล่น

(drop) จากตัวโฮสต์ถึง 3 ครั้ง คือในระยะ engorged female, nymph และ larvae ตัวอย่างของเห็บพวกนี้ ได้แก่ brown dog tick

ชีววิทยาของเห็บ

ทุกระยะของวงจรชีวิตของเห็บส่วนมาก (ยกเว้นระยะที่เป็นไข่) จะเป็นปรสิต ในระยะไข่ไข่ที่มีสีน้ำตาล มันจะวางไข่เป็นกลุ่มตามผนังรอยแตก ไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนภายในเวลา 17-30 วัน ที่ไข่จะมีช่องของเหลวจาก cephalic gland เคลือบเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ แต่อากาศสามารถผ่านเข้าออกได้ (Lombardini, 1950) ไข่จะฟักเป็นตัวประมาณ 80-99 % ที่ 25 และ 90 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 80-100 % (Srivastava *et al.*, 1964)

ระยะตัวอ่อนของเห็บ (Larva) หลังจากตัวอ่อนฟักออกจากไข่ ตัวอ่อนของเห็บหรือ seed tick ตามปกติจะยังคงอยู่รวมกันเป็นกลุ่มใกล้บริเวณที่ฟักออกมาจากไข่ การอยู่รวมกันเป็นกลุ่มเป็นวิธีการป้องกันความแห้งแล้งและเพื่อการอยู่รอดของเห็บ ตัวอ่อนของเห็บจะไม่ค่อยดูดกินเลือดของโฮสต์ภายใน 1 สัปดาห์หลังจากฟักออกจากไข่ เมื่อตัวอ่อนของเห็บเตรียมตัวที่จะดูดกินเลือด จะพบบ่งชี้ว่าตัวอ่อนเห็บจะมาคัดกรองโฮสต์อยู่บนใบหญ้า ต้นไม้เล็กๆ หรือกิ่งไม้ เมื่อโฮสต์เคลื่อนที่เข้ามาใกล้ ตัวอ่อนจะรู้ตัวและกระดกกระเจิงมากและพยายามที่จะเกาะโฮสต์ ตัวอ่อนของเห็บจะถูกระคายคายโดยคาร์บอนไดออกไซด์และกลิ่น ซึ่งการสั่นของต้นไม้ กระแสลม การขาดหายของแสงเป็นช่วง ความอบอุ่น และความชื้นก็เป็นปัจจัยช่วยให้ตัวอ่อนของเห็บว่องไวเมื่อโฮสต์เคลื่อนที่ผ่าน เมื่อตัวอ่อนของเห็บเกาะโฮสต์ได้แล้ว ตัวอ่อนจะหาดำแหน่งบนตัวโฮสต์ที่เหมาะสมสำหรับดูดเลือด ตัวอ่อนจะดูดกินเลือดจนกระทั่งตัวเป่ง (engorge) แล้วตกลงมาจากโฮสต์เพื่อลอกคราบ ตัวอ่อนที่ตกลงมาหลังจากโฮสต์จะคลานไปยังบริเวณที่สามารถหลบซ่อนและป้องกันอันตรายได้ ต่อมาตัวอ่อนเหล่านี้จะลอกคราบเป็นระยะตัวกลางวัย ระยะเวลาการลอกคราบขึ้นกับอุณหภูมิและความชื้น เห็บระยะตัวอ่อนมีขนาดเล็ก ว่องไว มีขา 3 คู่เท่านั้น ขาคู่ที่ 4 จะไม่มี ตัวอ่อนของเห็บอาจมีชื่อสามัญว่า seed tick เมื่อมีโอกาสมันจะเกาะติดสุนัขแล้วดูดเลือดจนกลายเป็นระยะ engorged larva ซึ่งมีตัวเป็นสีฟ้าแล้วจึงปล่อยตัวลงจากสุนัขกลับไปตามซอกรอยแตกเพื่อลอกคราบเป็นตัวกลางวัย (nymph)

ระยะตัวกลางวัย (nymph) มีขา 4 คู่และมีขนาดใหญ่กว่าตัวอ่อน ตัวกลางวัยมีลักษณะคล้ายกับตัวเต็มวัยมากจะแตกต่างกันตรงที่ตัวกลางวัยยังไม่มี genital aperture ตัวกลางวัยนั้นล่าตัว

มีสีน้ำตาลแดง หลังจากเกาะนิ่งกับที่ 2-3 วัน ตัวกลางวัยจะกลับขึ้นไปดูดกินเลือดสุนัขจนเป็นระยะ engorged nymph ซึ่งมีรูปร่างคล้ายไขสีเทาดำ แล้วจึงผละจากสุนัขหาที่ซ่อนตัวเพื่อลอกคราบกลายเป็นตัวเต็มวัย (adult)

ระยะตัวเต็มวัย (adult) ระยะนี้จะมีตัวสีน้ำตาลแดง ว่องไวมากเมื่อถูกรบกวน ระยะนี้ตัวเต็มวัยจะกลับขึ้นไปดูดเลือดอีกและผสมพันธุ์บนตัวสุนัข ตัวเมียจะดูดเลือดจนกลายเป็นระยะ engorged female จึงผละจากสุนัขเพื่อวางไข่ต่อไป



ก. กลุ่มไข่เห็บ

ข. เห็บระยะตัวอ่อน

ค. เห็บระยะกลางวัย

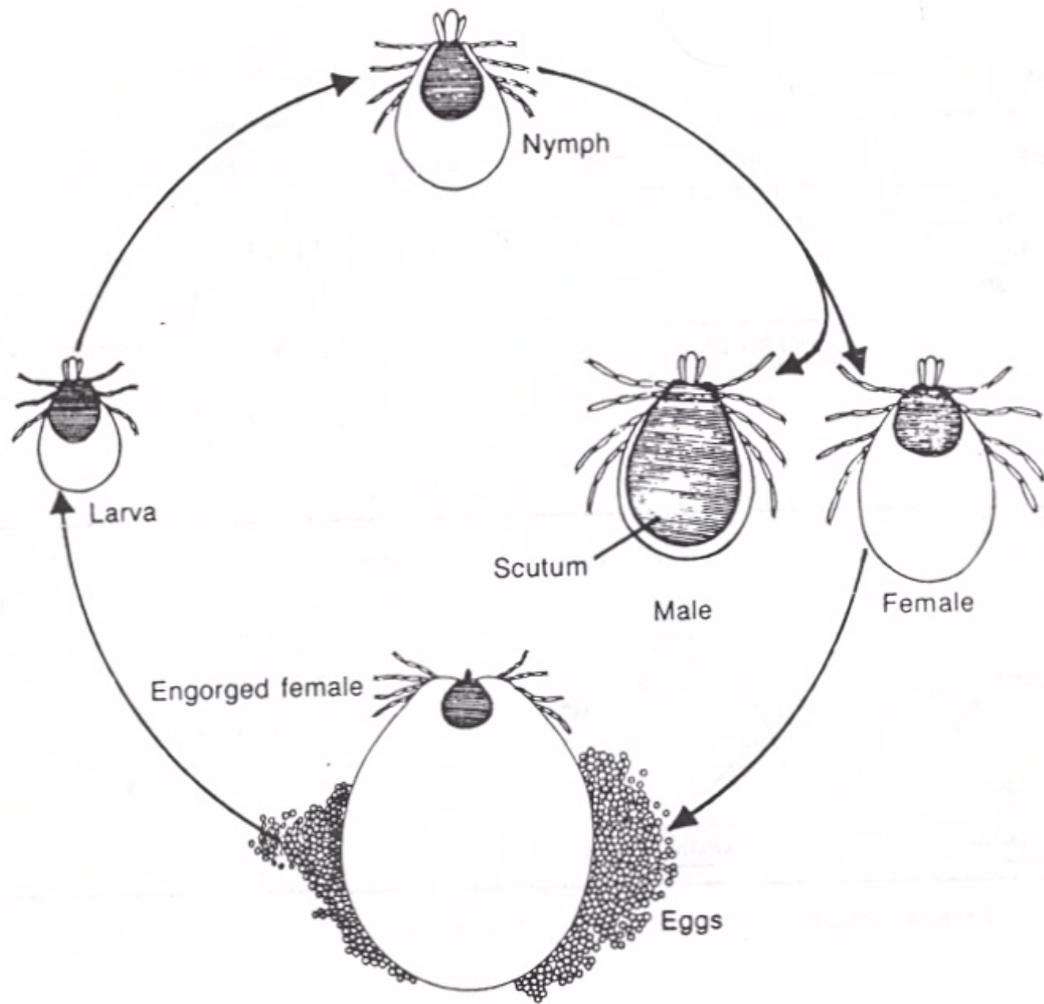


ง. เห็บตัวเมียระยะตัวเต็มวัย



จ. เห็บตัวผู้ระยะตัวเต็มวัย

ภาพที่ 3 วงจรชีวิตเห็บสุนัข



ภาพที่ 4 วงจรชีวิตเห็บ
ที่มา: Urquhart *et al.* (1987)

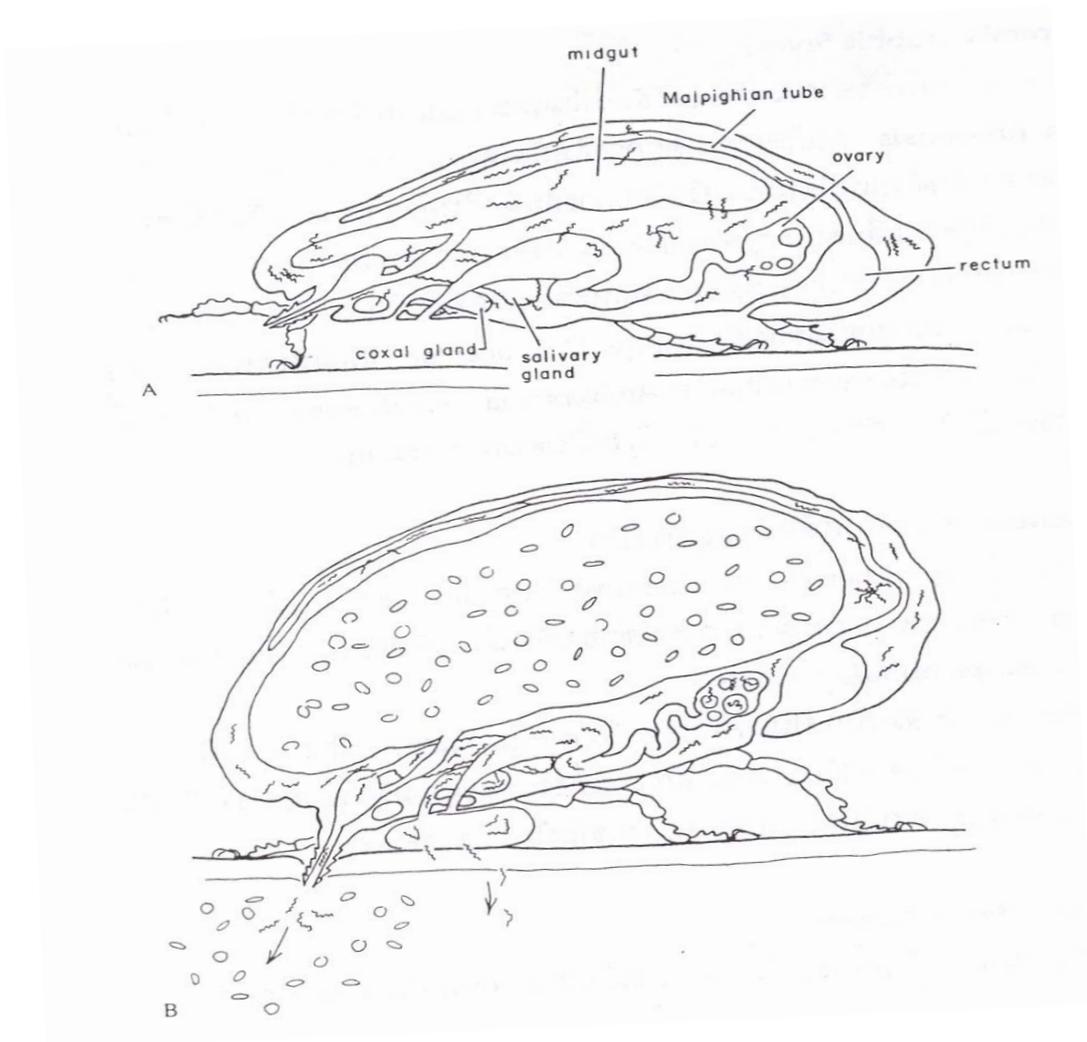
ตำแหน่งและเวลาที่พบเห็น

ตำแหน่งที่พบเห็นเห็บชนิดนี้คือ หู, vulva, โคนหาง, ขาและขนหาง จากการทดลองพบว่าในเห็บสุนัขจะพบตัวผู้ : ตัวเมียในอัตราส่วน 48.6 : 34.4 บริเวณที่พบ ตัวผู้จะพบที่หู ส่วนตัวเมียจะพบที่หูและบริเวณท้อง ในช่วงฤดูหนาวพบ 16.6% และในฤดูร้อนเป็น 34.4% (Mumcuoglu *et al.*, 1993) เห็บสุนัขพบได้ทุกฤดูแต่จะพบมากช่วงมีนาคม-เมษายน และช่วง ตุลาคม-พฤศจิกายน จะลดลงในช่วงธันวาคม-กุมภาพันธ์ และกันยายน (Vazquez *et al.*, 2006)

การวางไข่และระยะฟักตัวของไข่

ตัวเมียของเห็บซึ่งมีไข่อยู่ภายในจะเตรียมตัวเองสำหรับการวางไข่ โดยการโค้งส่วนหัวลงมาจนกระทั่งส่วนหัวนอนทอดตัวไปตามพื้นผิวด้านล่างของลำตัวใกล้รูเปิดของระบบสืบพันธุ์ gene's organ จะยื่นออกมาระหว่าง basis capituli และ scutum gene's organ ซึ่งจะขยายใหญ่ ออกเป็น 2 lobe ภายในจะมีต่อมซึ่งทำหน้าที่ขับสารที่เป็นจีรัง เมื่อไข่ถูกขับออกมาจากรูเปิดของระบบสืบพันธุ์ ไข่จะได้รับจีรังผ่านทาง lobe ของอวัยวะนี้ซึ่งจะห่อหุ้มไข่ของเห็บไว้ จีรังจะทำหน้าที่ในการป้องกันการสูญเสียน้ำและทำให้ไข่ติดกันเป็นก้อน

ในตัวเมียของเห็บแฉ่งจะมีการ engorge เพียงครั้งเดียว และจะตายหลังจากการวางไข่เรียบร้อยแล้วไม่นาน



ภาพที่ 5 สรีระภายในของเห็บ
ที่มา: Harwood and James (1979)

วงจรชีวิต (Life cycle) ของ *Rhipicephalus sanguineus*

การวางไข่ของเห็บเพศเมีย	4,000 ไข่
ระยะเวลาในการฟักออกจากไข่	17-30 วัน หรือนานกว่า
ระยะเวลาที่ตัวอ่อน engorge	2-4 วัน (อาจถึง 6 วัน)
ระยะเวลาซึ่งตัวอ่อน ใช้ในการลอกคราบ	5-23 วัน
ระยะเวลาซึ่งตัวกลางวัย engorge	4-9 วัน
ระยะเวลาซึ่งตัวกลางวัยใช้ในการลอกคราบ	11-73 วัน
ระยะเวลาซึ่งตัวเมีย engorge	6-21 วัน
ระยะเวลาตัวอ่อนที่อดอาหารสามารถอยู่รอดได้	อาจถึง 8 เดือนครึ่ง
ระยะเวลาซึ่งตัวกลางวัยที่อดอาหารสามารถอยู่รอดได้	อาจถึง 6 เดือน
ระยะเวลาซึ่งตัวเต็มวัยที่อดอาหารสามารถอยู่รอดได้	อาจถึง 19 เดือน

Jacob *et al.* (2004) ทำการทดลองเปรียบเทียบวงจรชีวิตของเห็บสุนัข *Haemaphysalis leachi* และ *Rhipicephalus sanguineus* ได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ค่า Mean minimum and maximum ของระยะต่างๆในวงจรชีวิตของเห็บสุนัขในการทดลอง (Jacob *et al.*, 2004)

Item	Mean minimum	Temperature and humidity regime	Mean maximum	Temperature and humidity regime
Pre-oviposition period	4.8 days	25°C 90%RH	21.0 days	15°C 40%RH
Egg incubation period	19.0 days	30°C 90%RH	72.0 days	15°C 90%RH
Survival of flat larvae	11.0 days	30°C 40%RH	133.5 days	15°C 90%RH
Larval pre-moult period	9.5 days	30°C all RH	36.5 days	15°C 90%RH
Larval moulting success	0%	10°C all RH	100%	15°C 70%RH 25°C 90%RH
Survival of flat nymphs	22.5 days	25°C and 30°C 40%RH	166.5 days	15°C 90%RH
Nymph pre-moult period	15 days	30°C 90%RH	44.5 days	20°C 70%RH
Nymph moulting success	0%	10°C and 15°C all RH	100%	20°C all RH; 25°C 70% and 90% RH, 30°C 90% RH

ความสำคัญทางสัตวแพทย์ (Veterinary Importance)

อาคม (2538) กล่าวว่า เห็บสุนัข *Rhipicephalus sanguineus* จัดว่าเป็นปรสิตที่ทำอันตรายร้ายแรงมากที่สุดในสุนัข และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับคน เห็บนี้ทำให้สุนัขอยู่ไม่เป็นสุข และสูญเสียเลือดเนื่องจากการกัดของเห็บ นอกจากนี้เห็บชนิดนี้ยังนำโรคหลายชนิดตัวอย่างเช่น โรคไขเห็บของสุนัข (canine piroplasmosis) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Babesia canis* และโรค canine ehrlichiosis ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Ehrlichia canis* และเชื้อริคเกตเซียจะมีการติดต่อโดยผ่านทางไข

ของเห็บ เห็บมีความสำคัญทางสัตวแพทย์ เนื่องมาจากเป็นสาเหตุโดยตรงของการเกิดความเสียหายต่อสุขภาพสัตว์เช่น ทำให้เกิดแผลที่ผิวหนัง หรือ สัตว์สูญเสียเลือดจากการเกะดูดเลือด ยิ่งถ้าหากเป็นกรณีการติดเห็บจำนวนมาก (heavy infestation) สัตว์อาจเกิดสภาพโลหิตจาง (anemia) ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อสุขภาพสัตว์ สำหรับความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์คือ เป็นพาหะนำโรค (vectors of infection)

1. เห็บทำให้เกิดความเสียหายโดยตรงต่อสัตว์อาศัย (direct damage)
2. เห็บทำให้เกิดความรำคาญ (tick Worry)
3. เห็บทำให้เกิดการกดภูมิคุ้มกันของสัตว์อาศัย (immunosuppression)
4. น้ำลายเห็บเป็นตัวการทำให้เกิดอาการเป็นพิษ (tick paralysis or tick toxicosis)
5. เห็บเป็นตัวพาหะนำโรค (transmitted diseases)

โรคที่เห็บสุนัขเป็นพาหะ

1. โปรโตซัวชนิด *Leishmania donovani* ทำให้เกิดโรค leishmaniasis กับสุนัข ในบางครั้งก็ถ่ายทอดโรคมาติดคน (Sherlock, 1964)
2. Rickettsia ทำให้เกิดโรคหลายชนิดเช่น เชื้อ *Rickettsia rickettsi* ทำให้เกิดโรค rocky mountain spotted fever (Green and Breitshwerdt, 1990)
3. Babesiosis, *Babesia canis* ในสุนัข (Shortt, 1973) และ *Babesia gibsoni* (Sen, 1933) มีความสัมพันธ์กับเชื้อไวรัสที่ทำอันตรายแก่สัตว์เลี้ยง โดยถ่ายทอดเชื้อ *Canine hepatitis virus* (Corrado and Mantovani, 1966)

ศัตรูธรรมชาติของเห็บ

ศัตรูธรรมชาติของเห็บได้แก่ แตนเบียน *Hunterellus hookeri* และแมงมุมตัวห้า *Teutana triangulosa* (Sautet, 1936)

2. หนูถีบจักร

การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานของหนูถีบจักร

ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Mus musculus</i>
Phylum	Chordata
Class	Mammalia
Order	Rodentia
Family	Muridae
Genus	<i>Mus</i>



ภาพที่ 6 หนูถีบจักร

หนูถีบจักรหรือหนูบ้านมีวิวัฒนาการเกิดมาในโลกและอยู่อาศัยมานานนับล้านปีในแหล่งที่มีมนุษย์อยู่อาศัย ผู้นิยมเลี้ยงหนูบ้านได้ผสมแพร่พันธุ์ให้มีหลากหลายพันธุ์ และนับว่าเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยของนักวิทยาศาสตร์ในศตวรรษที่สิบเก้า หนูขาวเฟือกสวิส (swiss albino mouse) นับได้ว่าเป็นต้นแหล่งกำเนิดของหนูขาวทดลองหลายสายพันธุ์ซึ่งไม่ได้ผสมในเหล่าพันธุ์เดียวกัน (Non-inbred) แม้ว่าจะมีหนูขาวที่เป็นพวกผสมภายในเหล่าพันธุ์เดียวกัน (inbred) มีหนูที่มีอยู่ตามธรรมชาติหลายสกุลถูกนำมาเลี้ยงไว้เป็นฝูงสำหรับงานวิจัยทดลอง (เสรี, 2543)

ลักษณะทั่วไป

ลำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ (2551) หนูถีบจักรเป็นหนูที่มีขนาดเล็กน้ำหนักตัวเมื่อโตเต็มวัยทั้งตัวผู้และตัวเมีย 30-40 กรัม ขนสีขาว ตาแดง ไม่มีขนบริเวณหาง ขาหน้ามี 4 นิ้ว ส่วนขาหลังมี 5 นิ้ว มีเต้านม 10 เต้า ลักษณะนิสัยเปรียว มีความว่องไว พฤติกรรมของตัวผู้เมื่อโตเต็มวัยถ้าอยู่รวมกรงเดียวกันตั้งแต่ 2 ตัวขึ้นไปจะกัดกัน ส่วนตัวเมียระยะเลี้ยงลูกเมื่อสภาพแวดล้อมผิดปกติเช่น อากาศร้อนจะเครียด มีพฤติกรรมกัดลูก

ข้อมูลทางสรีรวิทยา

ระยะรอบการเป็นสัด	4-5 วัน
ช่วงเป็นสัด	10 ชั่วโมง
ระยะตั้งท้อง	19-21 วัน
จำนวนลูกต่อครอกเฉลี่ย 14 ตัว อายุเมื่อหย่านม	19-21 วัน
น้ำหนักตัวเมื่อหย่านม (ตัวผู้และตัวเมีย)	10-14 กรัม
น้ำหนักเมื่อโตเต็มวัย	
- ตัวผู้	25-40 กรัม
- ตัวเมีย	20-35 กรัม
อายุเมื่อพร้อมผสมพันธุ์	8 สัปดาห์
ช่วงอายุ	2-3 ปี

การสังเกตสุขภาพสัตว์

การสังเกตสุขภาพสัตว์เบื้องต้นจะสังเกตโดยการตรวจลักษณะภายนอกเพื่อดูอาการซึม การเคลื่อนไหวของหนูปกติหนูจะเคลื่อนไหวไม่เชื่องซึม, ขนต้องสะอาด เรียบ ไม่ฟูตั้ง และไม่แห้วหาย, คราบน้ำตา (ocular discharge), คราบน้ำจมูก (nasal discharge), การคิมน้ำ, การกินอาหาร สังเกตลักษณะอวัยวะต่างๆ เช่น ระบบสืบพันธุ์, เต้านม, หู, ตา, จมูก, ขน, ปาก, ทวารหนัก เพื่อตรวจดูความผิดปกติ

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยง

กรง

ขนาดพื้นที่และส่วนสูงของกรงมีส่วนสร้างความเครียดกับหนู กรงที่มีขนาดเล็ก ส่วนสูงเตี้ยเกินกว่าที่หนูจะยืนได้ พื้นกรงไม่เหมาะสมเป็นสาเหตุที่สร้างความเครียดแก่หนูได้ทั้งสิ้น กรงที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงหนูมีขนาดต่างๆ ดังนี้

กรงพลาสติกเล็กขนาด 7.5x11.5x5 นิ้ว ใช้เลี้ยงแม่เลี้ยงลูก 1-3 สัปดาห์ (1 ตัว/กรง)

กรงสแตนเลสเล็กขนาด 7.5x11.5x5 นิ้ว ใช้เลี้ยงหนูพ่อ-แม่พันธุ์ผสม, แม่พันธุ์ท้อง 1-2 สัปดาห์ (6 ตัว/กรง)

กรงอลูมิเนียมใหญ่ขนาด 14x29x6 นิ้ว ใช้เลี้ยงหนูแม่พันธุ์พักท้องรอผสม

หนูรุ่น 3-4 สัปดาห์ (50 ตัว/กรง)

หนูรุ่น 5-8 สัปดาห์ (35 ตัว/กรง)

วัสดุรองนอน

การเลี้ยงหนูถีบจักรใช้ขี้กบเพื่อซึมซับปัสสาวะและรองรับอุจจาระ ลักษณะขี้กบต้องมีลักษณะไม่แข็งเกินไป ควรมาจากไม้เนื้ออ่อนถ้ามาจากไม้เนื้อแข็งมักมีเหลี่ยม มีมุมแข็ง แหลคม และมียางเป็นอันตรายต่อสัตว์ได้

- วัสดุรองนอน 1 ถุง (6 กิโลกรัม) เตรียมกรงพลาสติก และสแตนเลสเล็กขนาด 7.5x11.5x5 นิ้ว ได้ 70-80 กรง

- วัสดุรองนอน 1 ถุง (6 กิโลกรัม) เตรียมกรงอลูมิเนียมใหญ่ขนาด 14x29x6 นิ้ว ได้ 10-11 กรง

อาหาร

อาหารหนูถีบจักรต้องการอาหารประมาณ 3-6 กรัม/ตัว/วัน ลักษณะอาหารที่ดีควรมีขนาดพอดี ไม่แข็งเกินไป ไม่มีสิ่งเจือปนในอาหาร

น้ำดื่ม

หนูถีบจักรต้องการน้ำ 3-8 cc./ตัว/วัน น้ำดื่มที่ให้หนูถีบจักรต้องสะอาดปราศจากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นน้ำกรองที่ผสมคลอรีนที่มีความเข้มข้นเป็น 12 ppm.

การจัดการสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงหนูถีบจักร 25±2 องศาเซลเซียส สภาพอากาศประเทศไทยมีอากาศร้อน อุณหภูมิในห้องเลี้ยงอาจสูงเกิน 28 องศาเซลเซียส หนูอาจแสดงอาการเบื่ออาหาร ดื่มน้ำมาก เติบโตช้า หยุดการผสมพันธุ์ การตั้งท้องผิดปกติ น้ำมน้อย หงุดหงิด ไม่เลี้ยงลูกและกัดลูก ความชื้นสัมพัทธ์ หนูถีบจักรไม่มีต่อมเหงื่อ ใช้วิธีระบายความร้อนพร้อมกับลมหายใจอย่างเดียว ถ้าความชื้นสัมพัทธ์ต่ำหนูจะระบายความร้อนได้ดีกว่าที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์สูง ความชื้นสัมพัทธ์ในห้องเลี้ยงหนูถีบจักรอยู่ในช่วง 60-90 % การถ่ายเทอากาศในห้องเลี้ยงเพื่อถ่ายเทความร้อนออกจากห้องเลี้ยงและการนำเอาอากาศดีเข้ามาทดแทน โดยให้อากาศผ่านเข้าห้องเลี้ยง โดยใช้แผ่น filter กรองอากาศเป็นตัวจ่ายแสง หนูถีบจักรเป็นสัตว์หากินกลางคืนตาไม่ทนต่อแสงและแยกสีไม่ได้ แสงสว่างในกรงหนูประมาณ 350-400 ลักซ์ อัตราส่วนชั่วโมงแสงสว่างกับความมืดในแต่ละวันมีความสำคัญต่อระบบสืบพันธุ์ของหนูที่มีวงจรการสืบพันธุ์หมุนเวียนสืบเนื่องติดต่อกันตลอดปีถ้าชั่วโมงแสงสว่างยืดยาวนานเช่นฤดูร้อนวงจรในระบบการสืบพันธุ์จะยืดออกไป ถ้าสั้นเช่นฤดูหนาววงจรก็จะสั้นเข้า ช่วงเวลาความมืดต้องสม่ำเสมอ ชั่วโมงแสงสว่างต่อความมืดที่นิยมทุกๆ ไปคือ 12 ชั่วโมงสว่าง และ 12 ชั่วโมงมืด เสียง เป็นสิ่งที่สร้างปัญหาในการเลี้ยงหนูเนื่องจากหนูสามารถรับคลื่นเสียงได้ดีต่ำกว่าที่มนุษย์รับ เสียงที่มนุษย์ได้ยินเพียงแผ่วเบาหรือไม่ได้ยินเลยอาจเป็นเสียงที่ทำให้หนูตกใจได้ การตกใจสร้างความเครียด แก่หนูส่งผลกระทบต่อระบบต่างๆ ของร่างกาย หนูจะหมดความสนใจในการสืบพันธุ์ หรือหมดความสนใจที่จะเลี้ยงลูก และอาจต้องใช้เวลา 3-4 วันจะกลับคืนสู่สภาพปกติ เสียงในห้องเลี้ยงสัตว์ไม่ควรเกิน 50 dB

คุณสมบัติที่นำมาใช้งาน

หนูถีบจักรนิยมนำไปศึกษาและวิจัยทางด้านต่างๆ ดังนี้

- จุลชีววิทยา (microbiology) ได้แก่ การศึกษาทางด้าน แบคทีเรีย, ไวรัส, เชื้อรา, ปรสิต เป็นต้น

- พยาธิวิทยา (pathology) ได้แก่ การศึกษาเนื้องอก (Oncology), ศึกษาเปรียบเทียบพยาธิสภาพของโรคต่างๆ (comparative pathology study) เป็นต้น

- เภสัชวิทยา (pharmacology) ได้แก่ การทดสอบความปลอดภัยของยาชนิดต่างๆ (Drug testing), ทดสอบความปลอดภัยของวัคซีน (vaccine testing), การทดสอบความเป็นพิษ เป็นต้น

- สรีรวิทยา (physiology) ได้แก่ การศึกษาทางด้านสรีรวิทยาการสืบพันธุ์ เป็นต้น

3. สมุนไพรที่นำมาศึกษา

ว่านน้ำ (ภาพที่ 7)

การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน

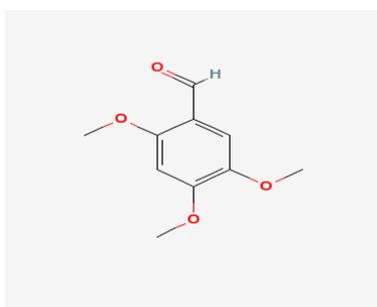
ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Acorus calamus</i> L.
ชื่อวงศ์	Araceae
ชื่อสามัญ	Calamus flargoot, Myrtle gress, Sweet sedge, Sweet flag
ชื่อท้องถิ่น	คาเจียงจี้, ทีลีปุดอ, ผมผา, ส้มชัน, ฮางคาวน้ำ, ฮางคาวบ้าน, ฮางคาวผา



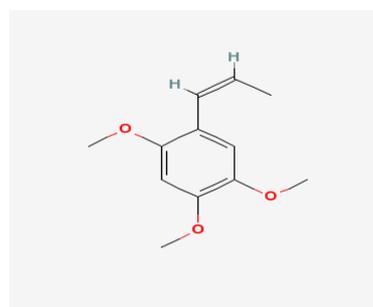
ภาพที่ 7 ว่านน้ำ

สารที่พบ

α - asarone, β - asarone (Mukherjee *et al.*, 2007), acalamol aldehyde (ลาวัลย์, 2542) asaryl aldehyde, eugenol, asarone, acorin และสารอื่นๆ เช่น ยาง แป้ง แทนนินเป็นต้น (กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2548) สารที่พบมากที่สุดจากสารสกัดจากว่านน้ำโดยวิธี hydroalcoholic extract คือ β - asarone (79.54%) ตรวจโดย GC/MS ซึ่ง β - asarone มีคุณสมบัติยับยั้ง acetylcholinesterase (Mukherjee *et al.*, 2007)



Asaryl aldehyde



β - asarone

ภาพที่ 8 ตัวอย่างโครงสร้างสารในว่านน้ำ

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (ภาพที่ 9)

ลักษณะทั่วไป	เป็นพืชที่ขึ้นอยู่ในโคลน เลน ตามริมน้ำ หนอง บึง มีเหง้าเหมือนข่าแต่เล็กกว่า มีกลิ่นหอม รสเผ็ดร้อน
ใบ	ใบเดี่ยวรูปยาว เรียวยาวคล้ายใบดาบ กว้าง 1-20 ซม. ยาว 70-120 ซม. ใบหนา สีเขียวเข้มเป็นมัน และค่อนข้างฉ่ำน้ำ ใบมีกลิ่นหอม เมื่อแรกออกมาจากต้นจะตีบ และค่อยๆแผ่ออกไปคล้ายว่านหางจิ้งจอก
ดอก	ออกเป็นช่อเป็นแท่ง สีเขียวอมน้ำตาล รูปร่างเหมือนรูป ยาวประมาณ 5-10 ซม. ก้านดอกใหญ่ ตรงยาวประมาณ 15-30 ซม.
ผล	เป็นผลชนิดสด

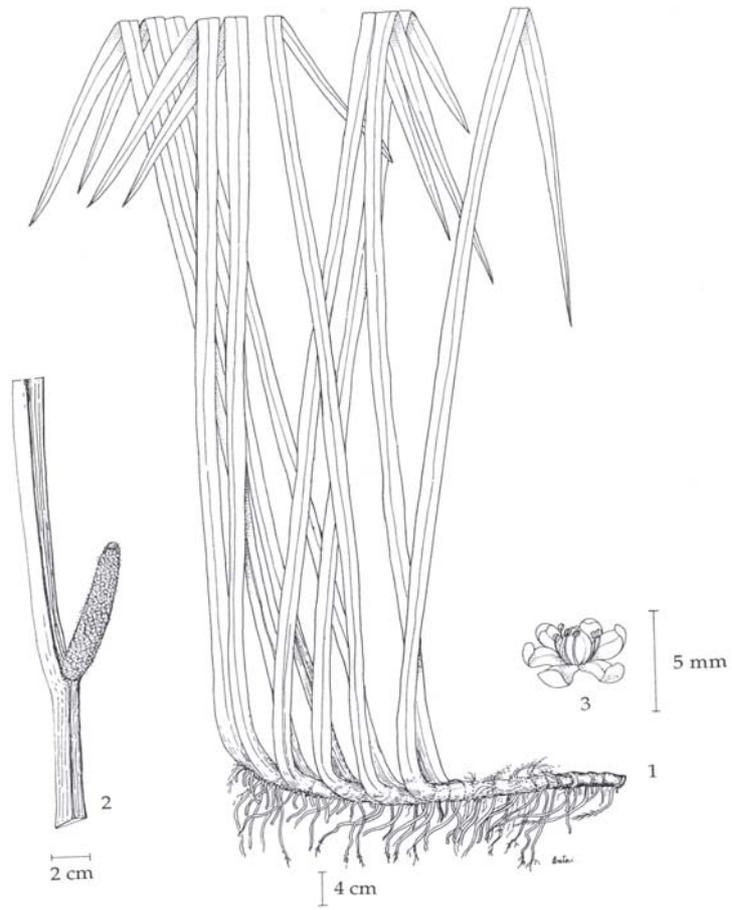
เหง้า	มีกลิ่นหอม มีรูปทรงกระบอกที่ค่อนข้างแบนภายนอกสีน้ำตาลอ่อนหรือน้ำตาลอมชมพู
ราก	เล็กเป็นฝอยๆ

เขตการแพร่กระจาย

มีเขตการกระจายพันธุ์ในประเทศตามริมห้วย ริมลำธาร ทางภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แถบจังหวัดเลย ถึงความสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1,200 เมตร ในต่างประเทศพบในเขตอบอุ่นของทวีปเอเชียถึงความสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 2,000 เมตร, ศรีลังกา, อินเดีย, สิกขิม, ประเทศแถบอินโดจีน, อินโดนีเซียถึงนิวกินี (Chopra *et al.*, 1956) ในประเทศไทยพบว่ามีอีก 2 ชนิด คือ *A. pusillu* และ *A. gramineus* ซึ่งเป็นว่านน้ำที่นำเข้ามาจากต่างประเทศเพื่อใช้ด้านความสวยงามในตู้ปลา (สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, ม.ป.ป.)

วิธีการเก็บพืชสมุนไพร

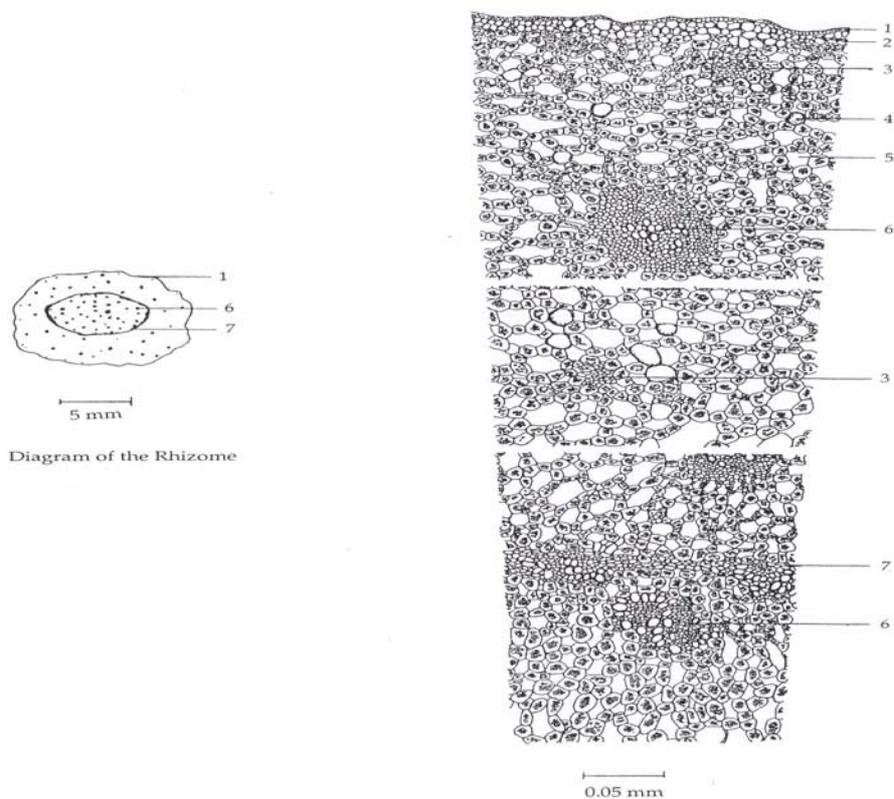
- ส่วนที่เป็นใบให้เก็บขณะที่เริ่มออกดอก
- ส่วนที่เป็นรากให้เก็บขณะที่มีดอก
- ส่วนที่เป็นดอกให้เก็บขณะดอกตูม
- ส่วนที่เป็นผลให้เก็บขณะผลโตเต็มที่แต่ยังไม่สุก



1. ลำต้น (The plant) 2. ช่อดอก (Flowering spadix) 3. ดอก (Flower)

ภาพที่ 9 ภาพวาดส่วนประกอบของว่านน้ำ (*Acorus calamus* Linn.)

ที่มา: Department of Medical Sciences (2000)



- | | | | |
|------------------------|--------------------|----------------|-------------|
| 1. epidermis | 2. collenchyma | 3. fibre group | 4. oil cell |
| 5. intercellular space | 6. vascular bundle | 7. endodermis | |

ภาพที่ 10 ลักษณะภาพตัดขวางของเหง้าว่านน้ำ

ที่มา: Department of Medical Sciences (2000)

การใช้ประโยชน์จากการกำจัดศัตรูพืช

มีความเป็นพิษต่อแมลง, สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลงได้, มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ การวางไข่และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลง, ยับยั้งการกินอาหารของแมลง (มงคล, 2547)

ความเป็นพิษต่อแมลง

เมื่อนำสารสกัดเมทานอลของว่านน้ำมาทดสอบโดยใช้วิธีสัมผัสโดยตรงกับตัวเต็มวัยของด้วงวงข้าว *Sitophilus oryzae* (L.) และด้วงถั่วเหลือง *Celosobruchus chinensis* (L.) Kim *et al.* (2003) พบว่ามีอัตราการตายมากกว่า 90% หลังจากการสัมผัสสารสกัด 3-4 วัน จากการทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยจากว่านน้ำต่อเพลี้ยไก่อีฟ่ากระถิน *Heteropsylla cubana* Sharma *et al.* (1992) พบว่าน้ำมันจากว่านน้ำมีความเป็นพิษสูงต่อเพลี้ยไก่อีฟ่ากระถิน Jacobson *et al.* (1976) ได้นำสาร β - asarone (2,4,5-trimethoxypropenylbenzenes), acorangermacrone และ asarylaldehyde ซึ่งพบได้ในน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำ มาทดสอบกับแมลงวันผลไม้เพศเมีย 3 ชนิดคือ *Ceratitis capitata*, *Dacus cucurbita*, *D. dorsalis* ส่วนแมลงผลไม้ *D. dorsalis* ใช้เพศผู้มาทดสอบ พบว่าสาร β - asarone มีผลต่ออัตราการตายของ *Ceratitis capitata* และสาร asarylaldehyde มีผลต่ออัตราการตายทั้งตัวผู้และเมียของ *D. dorsalis*

ยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลง

Rao *et al.* (2002) รายงานว่าเมื่อนำว่านน้ำ สะเดา และโลติ้น มาผสมในอัตราส่วนต่างๆกัน พบว่าอัตราส่วน 1:1:1 มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการกินอาหารของตัวอ่อนผีเสื้อกลางคืน *Earias vittella* (Fab) ได้ถึง 80% ของกลุ่มควบคุม Nakakita *et al.* (1994) ได้ทดสอบผลของสารสกัดจากว่านน้ำต่อกระบวนการควบคุมการเจริญเติบโตของตัวอ่อน *Tribolium freemani* พบว่าสารสกัดจากว่านน้ำมีผลต่อกระบวนการควบคุมการเจริญเติบโตของตัวอ่อนได้ และสารที่ออกฤทธิ์คือ β - asarone Koul *et al.* (1990) ได้ทดสอบโดยนำสาร asarones ซึ่งสกัดแยกมาจากรากว่านน้ำทดสอบกับหนอนผีเสื้อกลางคืน *Peridrama saucia* พบว่ามีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการกินอาหารของหนอนผีเสื้อกลางคืน *P. saucia*

ยับยั้งการกินอาหารของแมลง

Bhonde *et al.* (2002) ได้ทดสอบน้ำมันจากว่านน้ำกับหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* ด้วยวิธี leaf disk bioassays พบว่าสามารถลดการกินอาหารของหนอนกระทู้ผักได้ Schmidt *et al.* (1994) พบว่าสารหอมระเหยและ β - asarone จากว่านน้ำเมื่อนำไปทดสอบกับการกินอาหารของด้วง *Prostephanus truncates* Horn เป็นเวลา 21 วัน มีผลทำให้อัตราการกิน

อาหารของด้วงลดลง 50% ที่อุณหภูมิ 25°C จากการสังเกตพบว่าช่วงอุณหภูมิมีผลต่อการออกฤทธิ์โดยหากอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 30°C อัตราการกินอาหารของด้วงลดลงถึง 80%

กระบวนการป้องกันและทำลายพิษ

สิ่งมีชีวิตเมื่อได้รับสารพิษเข้าไปจะมีกลไกในการตอบสนองต่อพิษและมีกระบวนการทำลายสารพิษหรือสารแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย (detoxification) ทั้งนี้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางชีววิทยา (biotransformation) โดยมีเอนไซม์ทำลายพิษ (detoxification enzyme) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแล้วจึงถูกกำจัดออกจากร่างกาย (ชัยวัฒน์ และคณะ, 2535)

อวัยวะที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารพิษ

สารพิษเมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตแล้วจะกระจายไปยังอวัยวะต่างๆ เพื่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างการออกฤทธิ์ และการขับออกจากร่างกาย อวัยวะที่ทำหน้าที่ในการขับสารพิษออกจากร่างกายได้แก่ ตับ ไต ปอด และต่อมต่างๆ ในทางเดินอาหารเป็นต้น ขณะเดียวกันนี้อวัยวะต่างๆเหล่านี้คือ ตับ ไต ปอด และเซลล์บุผิวของทางเดินอาหารก็จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษด้วยเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงพอจะสรุปได้ว่า ตับ ไต ปอด และทางเดินอาหารเป็นอวัยวะที่สำคัญอย่างยิ่งในกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษและขับถ่ายสารพิษออกจากร่างกาย (ชัยวัฒน์ และคณะ, 2535)

ความเป็นพิษและอันตราย

ความเป็นพิษ (toxicity) คือ ความสามารถของสารที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บ เมื่อสารกระทบต่อเซลล์หรือตำแหน่งในร่างกายหรือบนร่างกาย ส่วนคำว่าอันตราย (hazard) หมายถึงอันตรายที่เกิดจากการใช้สารดังกล่าว การได้รับสารพิษอาจแบ่งออกได้ ดังนี้

1. การได้รับสารพิษอย่างเฉียบพลัน (acute exposure) หมายถึง การได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายในปริมาณมากในระยะเวลาน้อยกว่า 24 ชั่วโมง ส่วนใหญ่การได้รับสารพิษโดยวิธีนี้ผ่านทาง การฉีดเข้าเส้นเลือด การฉีดเข้าช่องท้อง การฉีดเข้าใต้ผิวหนัง โดยการกินและโดยการทาที่ผิวหนัง โดยปกติแล้วหมายถึงการได้รับสารพิษเพียงครั้งเดียว แต่ก็สามารถให้สารพิษได้อีกครั้ง

ภายใน 24 ชั่วโมง ในกรณีที่สารพิษนั้นเป็นพิษน้อยส่วนกรณีที่สารพิษระเหยได้นั้นร่างกายจะดูดดมเข้าไปแบบต่อเนื่องแต่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง

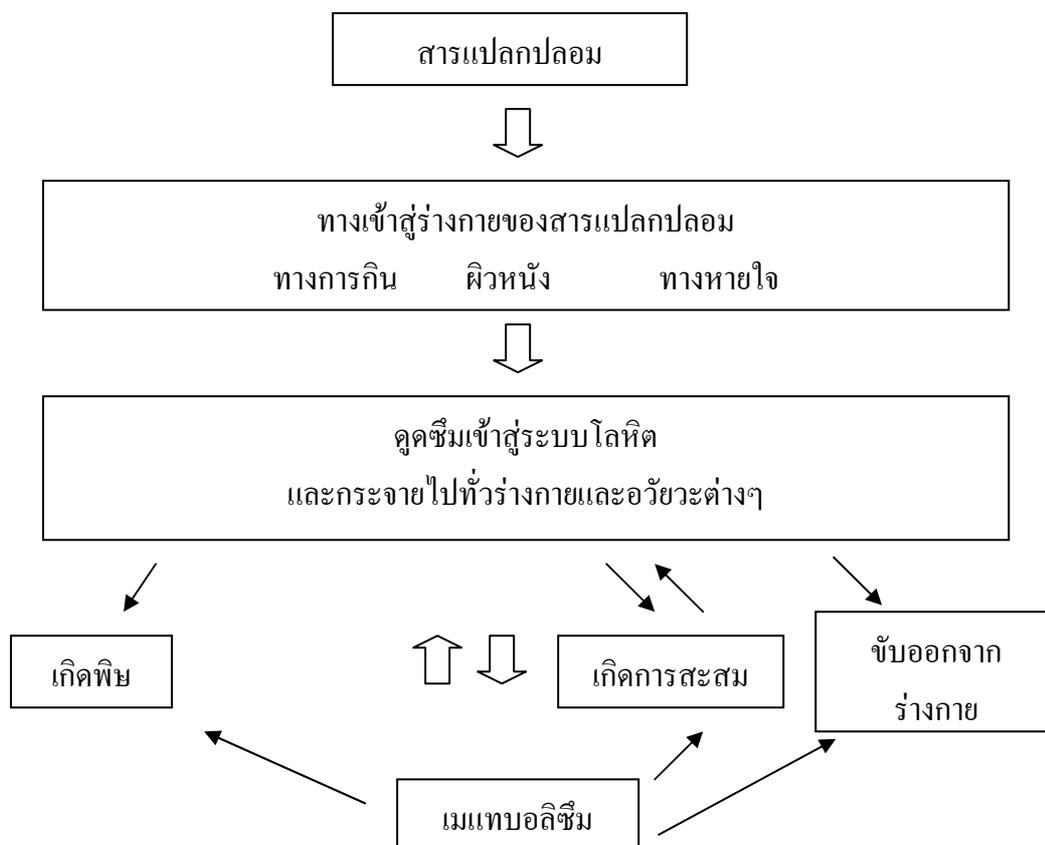
2. การได้รับสารพิษแบบกึ่งเฉียบพลัน (subacute exposure) หมายถึงการได้รับเข้าสู่ร่างกายในปริมาณน้อยติดต่อกันเป็นเวลา 1 เดือนหรือน้อยกว่า 1 เดือน

3. การได้รับสารพิษกึ่งเรื้อรัง (subchronic exposure) หมายถึงการได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายในปริมาณน้อยติดต่อกันเกิน 1-3 เดือน

4. การได้รับพิษแบบเรื้อรัง (chronic exposure) หมายถึงการได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายในปริมาณน้อยติดต่อกันเกิน 3 เดือนขึ้นไป (ชัยวัฒน์ และคณะ, 2535)

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษ

สิ่งมีชีวิตเมื่อได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกาย ไม่ว่าจะทางผิวหนัง การกิน หรือการหายใจก็ตาม สิ่งมีชีวิตย่อมจะมีกลไกในการตอบสนองต่อสารพิษเหล่านั้น โดยมีกระบวนการป้องกัน หรือทำลายสารพิษ สารแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกายโดยวิธีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษทางชีววิทยาโดยมีเอนไซม์ทำลายพิษ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สามารถกำจัดออกจากร่างกายได้ โดยกลไกการทำลายสารพิษนั้นจะแตกต่างกันไป ขึ้นกับโครงสร้างทางเคมีของสารแปลกปลอม ระยะเวลา และปัจจัยสภาวะแวดล้อมต่างๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง (ชัยวัฒน์ และคณะ, 2539)



ภาพที่ 11 แผนภูมิแสดงการเปลี่ยนแปลงสารพิษและเมแทบอลิซึมในร่างกาย

ที่มา: Hodgson *et. al.* (1994)

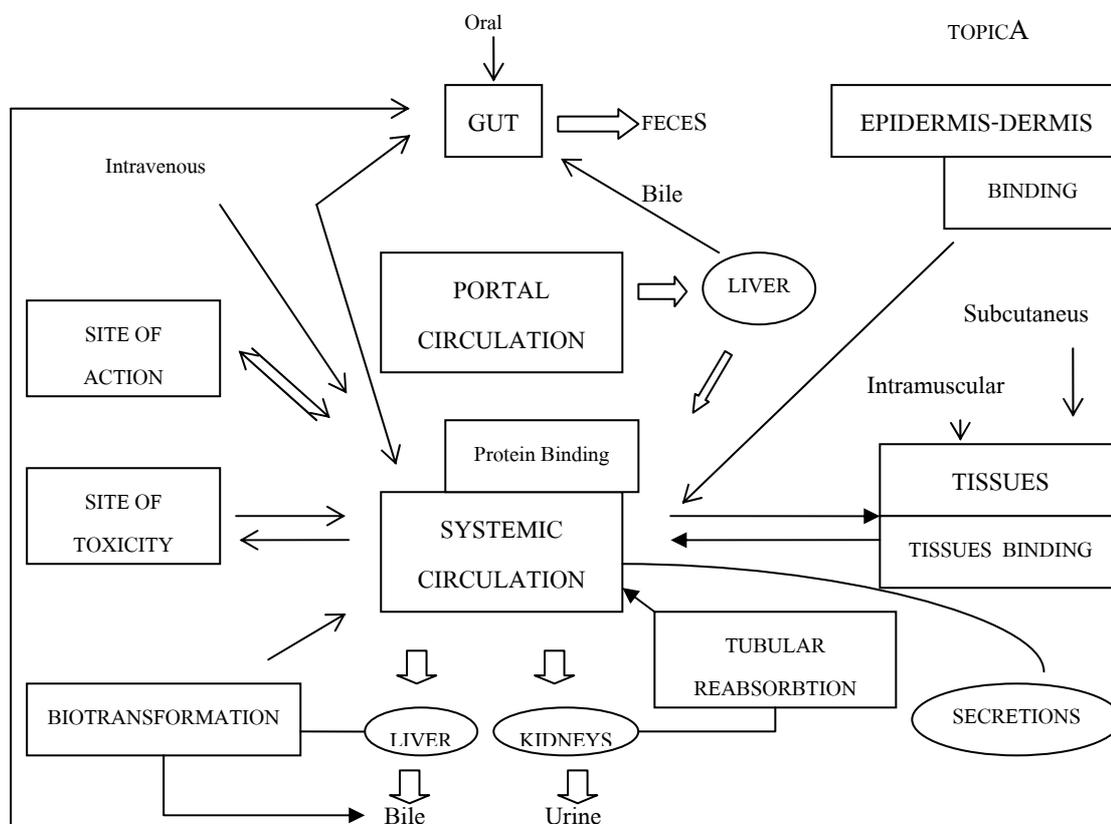
สิ่งมีชีวิตเมื่อได้รับสารพิษจากสิ่งแวดล้อมจะมีกลไกตอบสนองต่อสารพิษที่ได้รับ ส่วนโครงสร้างภายนอกของแมลง ที่เคลือบผิวของชั้น chitin เป็นบริเวณที่ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้สารฆ่าแมลงผ่านเข้าไปในตัวแมลง จะลดอัตราการผ่านเข้าของสาร (Yu and Nguyen, 1992) อัตราความแน่นอนในการเคลื่อนที่ของสารขึ้นอยู่กับตัวแปรหลายอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งความหนาของชั้นไคติน อัตราการแทรกซึมยังเปลี่ยนแปลงไปตามตำแหน่งการเข้าของสารฆ่าแมลง (อนันต์, 2540)

วิธีทางกายภาพที่ช่วยลดสภาพให้ซึมได้ของไคตินทำได้โดยการเพิ่มความหนาของเคลือบผิว การเพิ่มพื้นที่ผิวส่วนที่เป็นสีน้ำตาล หรือการตัดแปลงส่วนประกอบของเคลือบผิว นอกจากนี้ การเปลี่ยนความเป็นกรดและด่างในท่ออาหารจะเป็นผลให้ลดปริมาณตัวละลายและอัตราการดูด

ซีมของสารฆ่าแมลงอีกด้วย แมลงบางชนิดสามารถเพิ่มปริมาณการสะสมไขมัน เนื่องจากสารฆ่าแมลงส่วนใหญ่จะละลายได้ในไขมัน และมีการสะสมในเนื้อเยื่อที่เป็นไขมันซึ่งจะไม่มีผลต่อแมลงวิธีหนึ่งที่สำคัญที่สุดที่แมลงใช้ในการทำลายและกำจัดสารพิษออกจากร่างกายได้แก่ การเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ทำลายพิษ เพื่อกำจัดหรือลดความเป็นพิษ (อนันต์, 2540) สารพิษต่างๆ ที่อยู่ในสภาพแวดล้อม รวมทั้งสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาใช้ในชีวิตประจำวันได้แก่ อาหาร ยา เครื่องสำอาง สารเหล่านี้ถ้าเข้าไปในร่างกายทางใดก็ตามจะกลายเป็นสารตั้งต้น (substrate) ของเอนไซม์ต่างๆ ในร่างกาย สารตั้งต้นบางชนิดเป็นสารยับยั้ง บางชนิดเป็นสารเหนี่ยวนำในการทำงานของเอนไซม์ (Hodgson and Levi, 1994) ปฏิกริยาต่างๆ ในสิ่งมีชีวิตมักมีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง ทำให้สารตั้งต้นถูกเปลี่ยนแปลงรูปไป คุณสมบัติของเอนไซม์แต่ละชนิด รวมทั้งวิธีการทำงานมีปัจจัยต่างๆ ควบคุมอยู่ด้วยตัวอย่างเช่น ความเป็นกรดและด่าง อุณหภูมิ และลักษณะอื่นๆ ในสถานะที่เฉพาะต่อการทำงานของเอนไซม์ (Visetson, 1991) อัตราการสังเคราะห์เอนไซม์ถูกกำหนดโดยการถ่ายถอดจากยีนส์ (transcription) ซึ่งอาจเกิดจากการกระตุ้นของสารแปลกปลอมที่ร่างกายไม่ได้สร้างขึ้นจะทำให้ mRNA นั้นเกิดการแปลรหัส (translation) และการสังเคราะห์โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะมากขึ้น (Hodgson and Levi, 1994) เอนไซม์ที่ถูกสร้างใหม่นี้จะทำงานได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง เช่น เอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นใหม่นี้จะไปเร่งการดีคลอรีน (dechlorinate) ออกจากสารประกอบดีดีที (DDT) และก่อเกิดเป็นอนุพันธ์ของไดคลอโรเอทิลีน (dichloro ethylene derivative) คือ ดีดีอี (DDE) ซึ่งมีพิษน้อยกว่าดีดีที แมลงบางชนิดเปลี่ยนดีดีทีไปเป็นสารอื่นที่มีพิษน้อยกว่าเช่น ดีดีเอ (DDA) เป็นอนุพันธ์ของกรดอะซิติก และดีดีดี (DDD) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไดคลอโรเอเทน (dichloroethane derivative) ส่งผลให้แมลงมีความต้านทนต่อดีดีที (อนันต์, 2540)

ในระบบเอนไซม์ทำลายพิษ (detoxification enzymes system) มีลักษณะการทำงานเช่นเดียวกับเอนไซม์ทั่วไป เมื่อมีสารแปลกปลอมจากภายนอกเข้าไปในเซลล์ เอนไซม์เหล่านี้จะเข้าไปเป็นตัวเร่งให้สารเหล่านั้นมีความสามารถในการละลายน้ำเพิ่มขึ้น หรือทำให้สารดังกล่าวเป็นสารที่มีขั้ว (electrophilic) เพื่อที่จะสามารถกำจัดออกจากร่างกายผ่านระบบต่างๆ ได้มากขึ้น ดังนั้นเอนไซม์ดังกล่าวจึงต้องมีความพร้อมที่จะทำงานอย่างสมบูรณ์ทุกเมื่อ ซึ่งควรจะมีคุณสมบัติคือ จะอยู่ภายในอวัยวะที่มักจะได้รับสารแปลกปลอมอยู่เสมอเช่น ตับ ปอด ลำไส้ ของสัตว์มีกระดูกสันหลังในเซลล์ไขมัน และในลำไส้ของพวกแมลง (Schoknechy and Ono, 1989)

กระบวนการซึมผ่านของสาร และเมตาโบลิซึมโดยระบบเอนไซม์ทำลายพิษ (penetration and metabolism of xenobiotic in organism) ของสารประกอบเคมีจากสภาพแวดล้อมเข้าสู่ร่างกายก่อนที่สารเคมีนั้นจะไปออกฤทธิ์ที่เนื้อเยื่อเป้าหมาย ในกรณีที่สารพิษผ่านช่องทางเดินอาหาร (gastro intestinal tract) จะผ่านจากช่องปาก หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ช่องภายในลำไส้เล็ก และเข้าสู่เซลล์บุผนังลำไส้ เข้าสู่ภายในเซลล์บุผนัง basement membrane และ lamina propria เข้าสู่เส้นเลือดฝอย และท่อน้ำเหลืองขนาดเล็กไปยังตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ ที่ตำแหน่งนั้น สารพิษจะซึมผ่านจากเส้นเลือดฝอยเข้าสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์ และผ่านมายังตำแหน่งออกฤทธิ์บนผนังเซลล์ต่างๆ ในที่สุด ซึ่งที่เยื่อหุ้มเซลล์สามารถผ่านเข้าเซลล์หรือจับกับ receptor ที่มีอยู่ในระบบชีวภาพ (Riviere, 1994) ลำดับขั้นตอนการเกิดพิษของสารฆ่าแมลงในร่างกาย แสดงดังภาพที่ 12 เริ่มจากการที่สารฆ่าแมลงทำปฏิกิริยากับชีวสารเป้าหมายเช่น เอนไซม์ สารสื่อประสาท (neurotransmitter) โปรตีน หรือ ลิพิดบางพวก ซึ่งมีความสำคัญในการดำรงชีวิต

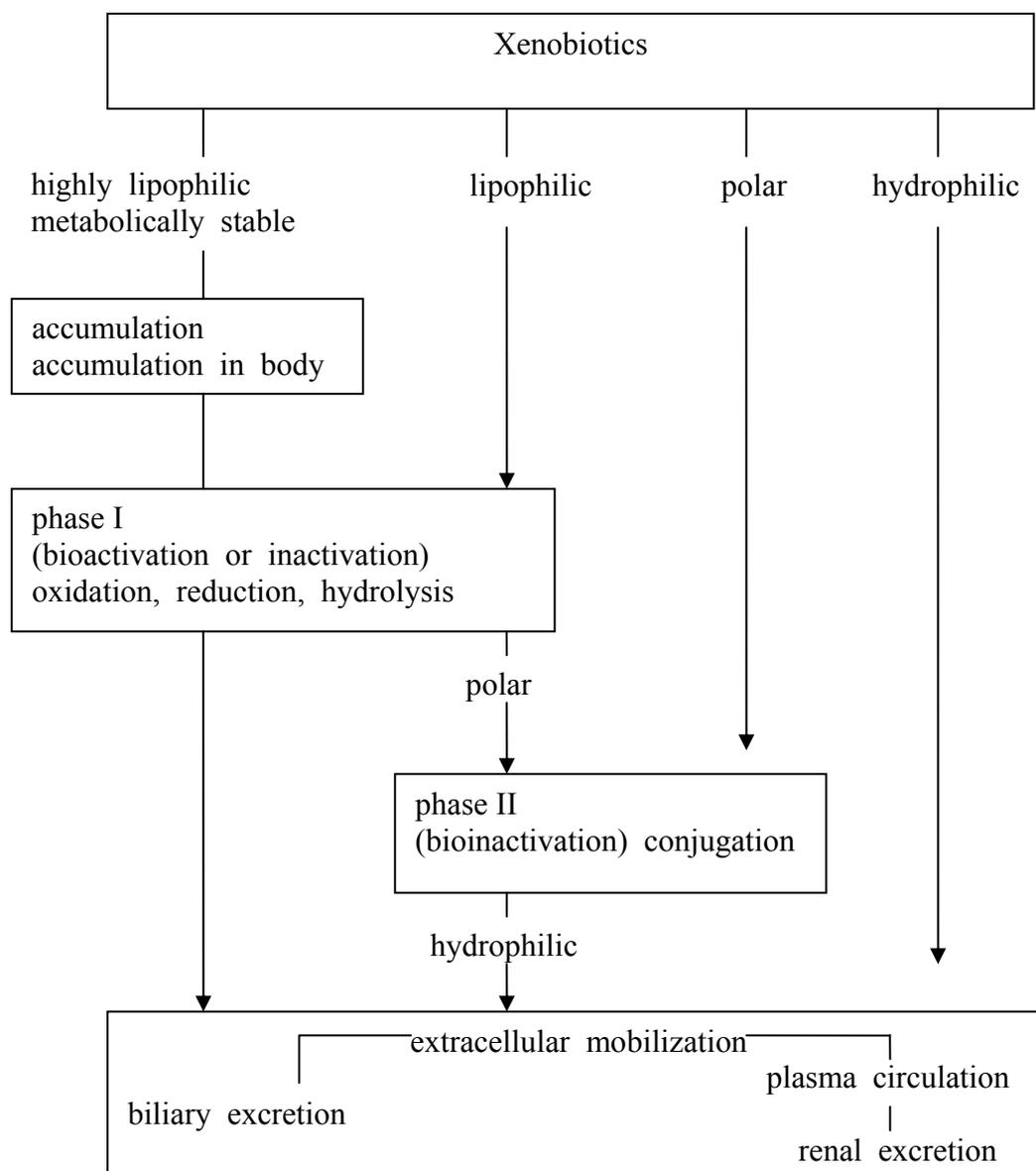


ภาพที่ 12 แสดงทิศทางการแพร่กระจายของสารพิษในร่างกาย โดยทาง intravenous, intramuscular, subcutaneous, oral and topical

ที่มา: Rivere (1994)

สารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (organorine) ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate), คาร์บาเมต (carbamate) และ ไพริทอยด์ (pyrethroid) เป็นสารกำจัดศัตรูพืชที่สำคัญ มีผลต่อระบบประสาทเมื่อสารพิษเหล่านี้เข้าสู่ตัวแมลงแล้วจะไปทำปฏิกิริยากับพวกเอนไซม์ที่เป็นเอนไซม์ที่ไม่จำเพาะเจาะจงกับสารแปลกล้อม (nonspecific enzyme) ที่ร่างกายของแมลงสร้างขึ้น กลไกการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ทำลายพิษนั้นเกิดขึ้น 2 ระยะ (Phase) ในระยะที่ 1 (Phase I reaction) จะไปจับกับซับสเตรท (substrate) ภายในอวัยวะต่างๆทำให้เกิดความมีขี้ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากความมีขี้ที่ได้ในระยะที่ 1 ดังนั้นอาจเกิดปฏิกิริยาในระยะที่ 2 (Phase II reaction) ซึ่งเรียกว่าปฏิกิริยาคอนจูเกชัน (conjugation) ทำให้เกิดการละลายน้ำอย่างดี และสามารถขับออกนอกร่างกายได้ดียิ่งขึ้นอีกด้วย แต่สารประกอบบางชนิดอาจเข้ามาโดยไม่จำเป็นต้องผ่านระยะที่ 1 ก่อนแต่จะตรงเข้าไประยะที่ 2 เลยแล้วถูกกำจัดออกนอกร่างกายเลยแต่

สารประกอบบางชนิด อาจผ่านแต่ระยะที่ 1 หรือไม่ผ่านทั้งสองระยะสามารถขับออกนอกร่างกาย
ก็ได้ แสดงดังภาพที่ 13

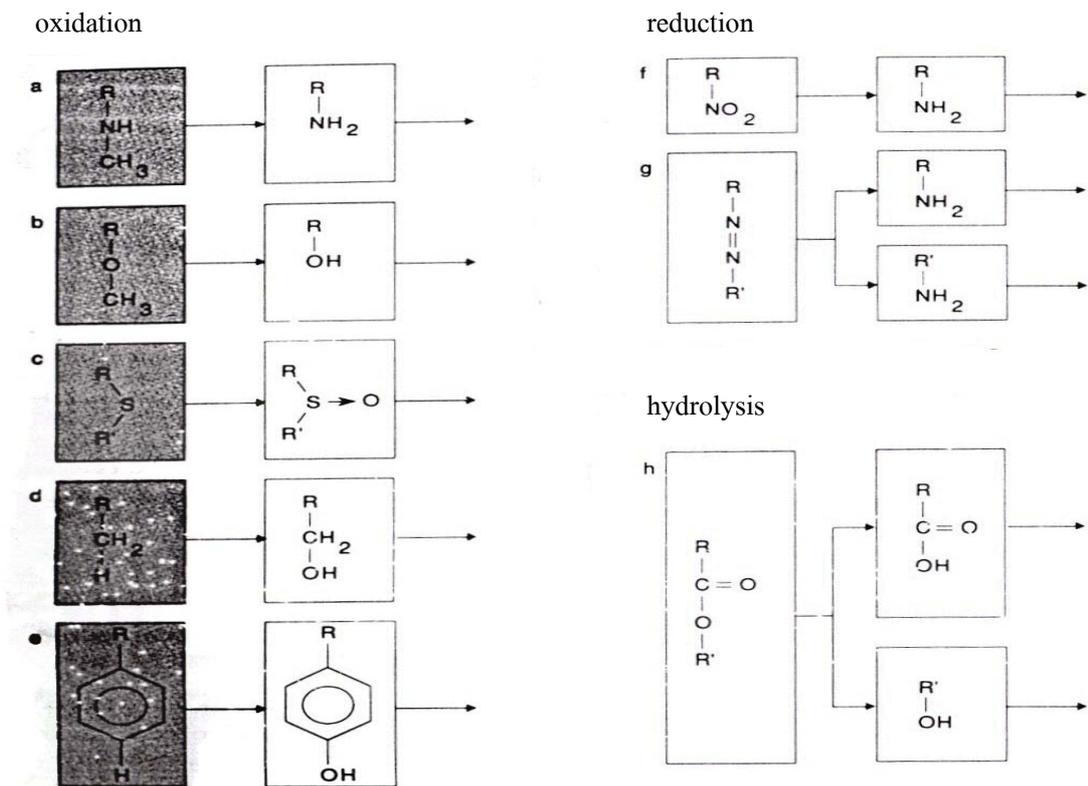


ภาพที่ 13 แสดงขั้นตอนการเปลี่ยนโครงสร้างสารพิษด้วยวิธีทางชีววิทยาในรูปแบบของปฏิกิริยา
ระยะที่ 1 และ 2

ที่มา: Niesink *et. al.* (1996)

ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาระยะที่ 1 (phase I)

เอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับกับโมเลกุลของสารพิษ โดยจะยื่น active site ที่เป็น polar group ออกไปจับกับโมเลกุลของสารพิษ ทำให้สารพิษมีการแตกตัวเป็นสารที่มีขั้ว และเปลี่ยนรูปไปเป็นกลุ่มที่ละลายน้ำได้ดีขึ้น ซึ่งสามารถกำจัดออกจากร่างกายง่ายขึ้น และนอกจากนั้นเอนไซม์ยังทำให้สารพิษต่างๆเหมาะที่จะเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาใน Phase II ต่อ ปฏิกิริยาสำคัญที่เกิดขึ้นในขณะนี้ ได้แก่ oxidation, reduction และ hydrolysis โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาระยะที่ 1 สารพิษเมื่อเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระยะที่ 1 นี้คือ เอสเทอเรส (esterase) (สุรพล, 2542)



ภาพที่ 14 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางชีววิทยาในระยะที่ 1

ที่มา: Niesink *et. al.* (1996)

Oxidation เป็นปฏิกิริยาที่ทำให้มีการนำออกซิเจนเข้าไปในโครงสร้างของสารพิษ ทำให้เกิดสารพิษที่มีจำนวนออกซิเจนเพิ่มขึ้น

Reduction เป็นปฏิกิริยาที่จะทำให้มีการนำไฮโดรเจนเข้าไปในโมเลกุลของสารพิษจนทำให้สารพิษมีจำนวนอะตอมของไฮโดรเจนในโมเลกุลเพิ่มขึ้น 1 อะตอม

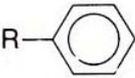
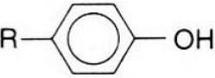
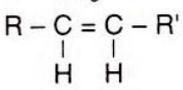
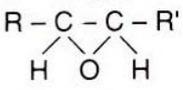
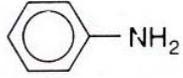
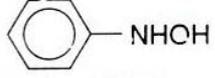
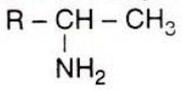
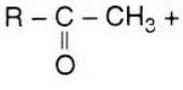
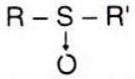
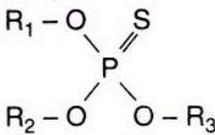
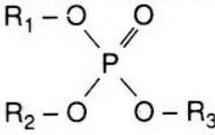
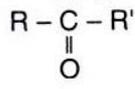
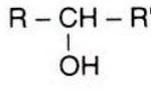
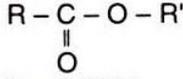
Hydrolysis เป็นปฏิกิริยาการเติมน้ำเข้าไปในโมเลกุลของสารพิษ จากนั้นจะเกิดการแยกตัวของโมเลกุลเป็นกลุ่มของเอสเทอร์ (ester) สองกลุ่ม หรือกลุ่มของเอมีนสองกลุ่ม

อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาออกซิเดชัน เป็นปฏิกิริยาที่สำคัญที่สุดในระยะที่ 1 ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาในการเร่งของเอนไซม์ไมโครโซมัล มิกซ์ฟังก์ชัน ออกซิเดส (microsomal mix function oxidase) หรือ MFO ซึ่งเกี่ยวข้องกับการออกซิเดชันสารพิษเข้าสู่ร่างกายและเอนไซม์ที่สำคัญในการกำจัดสารพิษของปฏิกิริยาที่ 1 ก็คือ esterase และ monooxygenase ซึ่งพบมากใน cytochrome P-450 ในตัวของแมลง อวัยวะที่มีไซโตโครมชนิดนี้มากก็คือลำไส้ส่วนกลาง, fatbody, ท่อมัลพีเจียล (malpighial tube) แต่ละแหล่งที่พบจะมีลักษณะการทำงานไม่เหมือนกัน แต่มีจุดมุ่งหมายเดียวกัน คือ กำจัดความเป็นพิษออกจากร่างกาย

ในขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงระยะที่ 1 สารพิษเมื่อเข้าสู่เซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่ 1 ด้วยกลไกที่สำคัญ 2 กลไกคือ

ก. กลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่ใช้เอนไซม์โดยตรง เอนไซม์เหล่านี้จะอยู่ในไซโทพลาซึม (cytoplasm) และอยู่ในไมโทคอนเดรีย โดยเอนไซม์เหล่านี้จะทำให้สารพิษมีโครงสร้างใหม่ขึ้นได้

ข. กลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่ใช้เอนไซม์ในไมโครโซม (microsomal enzymes) เอนไซม์นี้เป็นเอนไซม์ที่มีองค์ประกอบพิเศษที่มีไซโตโครม พี 450 ร่วมในการทำงานด้วย (ชัยวัฒน์ และคณะ, 2535)

Type of reaction	Substrate	Metabolite(s)
A. oxidations		
<i>Mixed-function oxidase-dependent reactions</i>		
aromatic hydroxylation		
aliphatic hydroxylation	$R - CH_3$	$R - CH_2OH$
epoxidation		
N-hydroxylation		
O-dealkylation	$R - O - CH_3$	$ROH + CH_2O$
N-dealkylation	$R - NHCH_3$	$R - NH_2 + CH_2O$
S-dealkylation	$R - S - CH_3$	$R - SH + CH_2O$
deamination		
S-oxidation	$R - S - R'$	
dechlorination	CCl_4	$[CCl_3^*] \rightarrow CHCl_3$
oxidative desulfuration		
II amine oxidation	$R - CH_2 - NH_2$	$R - CHO + NH_3$
III dehydrogenation	$CH_3 - CH_2 - OH$	$CH_3CHO \quad CH_3COOH$
B. reductions		
azoreduction	$R - N = N - R'$	$R - NH_2 + R' - NH_2$
nitroreduction	$R - NO_2$	$R - NH_2$
carbonyl reduction		
C. hydrolyses		
esters		$R - C(=O) - OH - R' - OH$
amides	$R - CONH_2$	$R - COOH + NH_3$

ภาพที่ 15 ปฏิกริยาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางชีววิทยาในระยะที่ 1 ของปฏิกริยา oxidations, reductions, hydrolyses

ที่มา: Niesink *et. al.*, 1996

Enzyme	Examples
Cytochrome P450 (P450)	
Epoxidation and hydroxylation	Aldrin, benzo(a)pyrene, aflatoxin, nicotine, bromobenzene
N-Dealkylation	Ethylmorphine, atrazine, dimethylnitrocarbamate, dimethylaniline
O-Dealkylation	p-Nitroanisoole, chlorfenvinphos
S-Dealkylation	Methylmercaptan
S-Oxidation	Thiobenzamide, phorate, endosulfan, methiocarb, chlorpromazine
N-Oxidation	2-Acetylaminofluorene
P-Oxidation	Diethylphenylphosphine
Desulfuration	Parathion, fonofos, carbon disulphide
Dehalogenation	CCl ₄ , CHCl ₃
Nitro reduction	Nitrobenzene
Azo reduction	O-Aminoazotoluene
Flavin-containing Monooxygenase (FMO)	
N-Oxygenation	Nicotine, dimethylaniline, imipramine
S-Oxygenation	Thiobenzamide, phorate, thiourea
P-Oxygenation	Diethylphenylphosphine
Desulfuration	Fonofos
Prostaglandin synthetase (PGS)-cooxidation	
Dehydrogenation	Acetaminophen, benzidine, DES, epinephrine
N-Demethylation	Dimethylaniline, benzphetamine, aminocarb
Hydroxylation	Benzo(a)pyrene, 2-aminofluorene, phenylbutazone
Expoxidation	7,8-dihydrobenzo(a)pyrene
Sulfoxidation	Methylphenylsulfide
Oxidations	FANFT, ANFT, bilirubin
Molybdenum hydroxylases (aldehyde oxidase, xanthine oxidase)	
Oxidations	Purines, pteridine, methotrexate, quinolones, 6-deoxycyclovir
Reductions	Aromatic nitrocompounds, azo dyes, nitrosoamines, N-oxides, sulfoxides
Alcohol dehydrogenase	
Oxidations	Methanol, ethanol, isopropanol, glycols, glycol ethers (2-butoxyethanol)
Reduction	Aldehydes and ketones
Aldehyde dehydrogenase	
Oxidations	Aldehydes resulting from alcohol and glycol oxidations
Esterases and Amidases	
	Parathion, paraoxon, dimethoate, phenyl acetate
Epoxide hydrolase	
	Benzo(a)pyrene epoxide, styrene oxide
DDT-dehydrochlorinase	
	p,p-DDT
Glutathione reductase	
	disulfiram

ภาพที่ 16 ตัวอย่างของสารแปลกปลอมที่เข้าในปฏิกิริยาของ oxidation และ redation

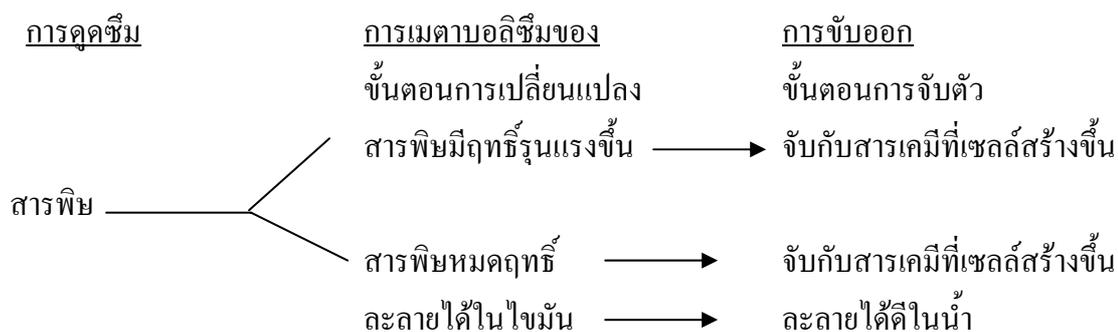
ที่มา: Hodgson and Levi, 1994

ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาระยะที่ 2 (phase II)

ในขั้นนี้เป็นปฏิกิริยาที่เรียกว่า ปฏิกิริยาคอนจูเกชัน โดยสารประกอบต่างๆที่เกิดการเปลี่ยนแปลงใน Phase I Reaction จะเข้าไปรวมตัวกับสารละลายที่มีความสามารถละลายน้ำได้ดี ซึ่งพวก endogenous substrate ต่างๆและสารที่มีโมเลกุลเล็ก เช่น glucose, glutathione และ amino acid เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่สามารถขับออกจากร่างกายง่ายขึ้น ซึ่งเป็นคุณลักษณะของ detoxification Mechanism (แต่บางครั้งพบว่าสารพิษต่างๆเมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้ว สารพิษเหล่านั้นจะมีความเป็นพิษสูงขึ้นเนื่องจากเข้าทำปฏิกิริยากับ nonspecific Enzyme บางชนิด หรือเป็นยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางตัว เพื่อให้เกิดพิษสูงขึ้น เรียกว่า activation หรือ โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาระยะที่ 2 นี้คือ กลูตาไทโอน-เอส-ทรานเฟอร์ส (glutathione - S - transferase)

ขั้นตอนการจับตัวในระยะ 2 สารพิษจะยังคงไม่ถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง หรือที่ถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแล้วจะจับตัวกับสารที่อยู่ในเซลล์ เรียกว่า คอนจูเกชัน จนได้เป็นสารที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดีขึ้น เพื่อต่อการขับถ่ายออกนอกร่างกายขั้นตอนต่างๆจะเริ่มเมื่อสารประกอบผ่านระยะที่ 1 จะไปจับเกาะกับยับยั้งหรือในอวัยวะต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน หรือกลุ่มของกำมะถัน และองค์ประกอบของฟอสเฟต ต่างๆจากการมีขั้วในปฏิกิริยาแรก อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาคอนจูเกชัน ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาส่วนใหญ่จะเป็นคอนจูเกต โปรคักส์ (conjugation product) มีองค์ประกอบที่มีคุณสมบัติในการละลายในไขมันได้น้อยลงแต่ละลายน้ำได้ดีขึ้น มีพิษน้อยลง สามารถขับออกนอกร่างกายได้ดีขึ้น (Dauterman, 1994)

ปฏิกิริยาทั้ง 2 ระยะในระบบการทำลายพิษสามารถสรุปการทำงานได้ดังโคอะแกรมข้างล่างนี้

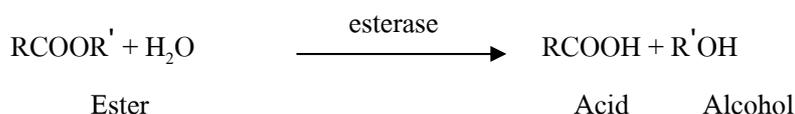


ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารพิษในเซลล์ (ชัยวัฒน์ และคณะ, 2539)

ระบบเอนไซม์ทำลายสารพิษ

ระบบเอนไซม์ทำลายสารพิษเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาให้กับสารตั้งต้นหรือซับสเตรทที่เปลี่ยนรูปไป โดยเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิ, PH และชนิดของสิ่งมีชีวิต เป็นต้น ทั้งนี้สารแปลกปลอมสามารถเข้าสู่ร่างกายได้หลายทางเช่น ทางปาก ที่ผิวหนัง การหายใจ เมื่อร่างกายได้รับสารแปลกปลอม ร่างกายจะมีการขับถ่าย และเกิดเมแทบอลิซึม (metabolism) หรือเกิด การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนแปลงนี้เป็นผลมาจากการเร่งของเอนไซม์ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต (สุรพล, 2542)

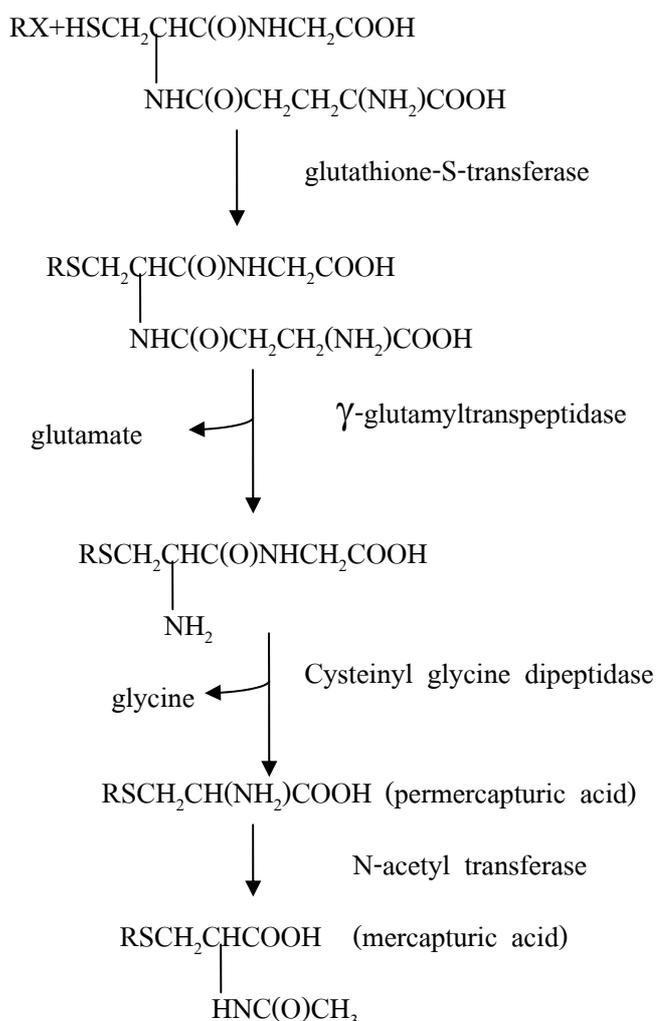
เอสเทอร์เรส เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาระยะที่ 1 โดยเกิด hydrolysis ซึ่งเอสเทอร์เรสเป็นเอนไซม์ hydrolase ที่ไปแยกกลุ่มของเอสเทอร์เรส เอนไซม์กลุ่มนี้มีความสามารถในการ metabolized สารฆ่าแมลง carboxyl ester เช่นสารในกลุ่มไพรีทรอยด์รวมทั้งสารในกลุ่มฟอสเฟต และคาร์บาเมต เอสเทอร์ด้วย ดังนั้น เอนไซม์ชนิดนี้จึงมีส่วนทำให้เกิดการต้านทานต่อสารฆ่าแมลงกลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟต และ คาร์บาเมต ผลที่ได้อาจมีพิษน้อยลงหรือเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสารตั้งต้น แล้วจึงถูกกำจัดออกนอกร่างกาย (Visetson, 1991) ในแมลงระดับเอนไซม์เอสเทอร์เรสระดับต่ำกว่าสัตว์เลื้อยลูกด้วยนม หน้าที่ของเอนไซม์นี้ทั่วไปคือ ควบคุมปริมาณของสารที่ผลิตขึ้นในร่างกายให้อยู่ในระดับเหมาะสมและหน้าที่สำคัญในการทำลายพิษของสารแปลกปลอมที่เป็นสารเอสเทอร์หรือสารที่ยึดกันด้วย anhydrid bone



ตัวอย่างของการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เอสเทอร์เรส (Hodgson and Levi, 1994)

ในแมลงนั้นเอนไซม์นี้พบมากใน cytosol, microsomes, mitochondria และ nucleus ของเซลล์กล้ามเนื้อ และกล้ามเนื้อส่วนหลัง (thoracic muscle) ปริมาณขึ้นกับอายุ ชนิด และสายพันธุ์แมลง และการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะถูกควบคุมโดยสารธรรมชาติเช่น Juvenile Hormone (สุรพล, 2546)

กลูตาไทโอน เอส – ทรานเฟอร์ส เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง
 ในระยะที่ 2 ในการเร่งปฏิกิริยาออกซิดาชัน ซึ่งมีการเกิดกรดเมอร์แคปตริก แสดงดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 การเกิดกรดเมอร์แคปตริก

ที่มา: Dauterman (1994)

Glutathione conjugation เป็นการรวมตัวของ xenobiotic product จากปฏิกิริยาในระยะที่ 1 รวมทั้งสารอันตรายมีขั้วกับ conjugation agent ที่สำคัญในร่างกาย คือ glutathione (GSH) โดยที่ GSH เป็นกลุ่มของ tripeptide โดยมีกลุ่มอะมิโนยัดเหนี่ยวกัน 3 ชุด คือ กลูตามีน (glutamine) ซีสตีอีน (cysteine) และไกลซีน (glycine) จากโครงสร้างของกลูตาไทโอน พบว่า สารประกอบซัลไฟดริล (SH) มีบทบาทในการเกิดการยัดเหนี่ยวโดยเป็นกลุ่มโควาเลนต์ (covalent)

ผลที่ได้คือสารจะถูกกำจัดออกนอกร่างกายหรืออาจเกิดการจับรูปแบบใหม่เป็นกลุ่มเมอแคปทริกที่มีกลุ่มของเอน-อะเซทิลซิสทีนีน (N-acetylcysteine) ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ดี และถูกกำจัดออกนอกร่างกายได้เร็ว (Visetson and Naknatti, 1996) สามารถแบ่งขั้นตอนเป็น 3 แบบ

- | | | | |
|----------|---|---|--------------------|
| แบบที่ 1 | xenobiotic + activated conjugating agent | → | conjugated product |
| แบบที่ 2 | Active - xenobiotic + amino acid | → | conjugated product |
| แบบที่ 3 | Reactive - xenobiotic + conjugating agent | → | conjugated product |

Reaction	Transferase	Functional Group
Glucuronidation	UDP-Glucuronyltransferase	-OH -COOH NH ₂ -SH
Glycosidation	UDP-Glycosyltransferase	-OH -COOH -SH
Sulfation	Sulfotransferase	-OH -NH ₂ -SO ₂ NH ₂
Methylation	Methyltransferase	-OH -NH ₂
Acetylation	Acetyltransferase	-OH -NH ₂ -SO ₂ NH ₂
Amino acid conjugation		-COOH
Glutathione conjugation	Glutathione-S-transferase	Epoxide Organic halide
Fatty acid conjugation		-OH

ภาพที่ 18 ปฏิกริยาการรวมตัวของเอนไซม์ transferase และ กลุ่ม functional
ที่มา: Donia *et. al.* (2002)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เลี้ยงเห็บ
 - 1.1 เห็บสุนัข
 - 1.2 กระจ่าย
 - 1.3 ถังพลาสติกหรือขวดสำหรับใส่เลี้ยงเห็บสุนัข
 - 1.4 กรงสำหรับเลี้ยงกระจ่าย
 - 1.5 น้ำกลั่น
 - 1.6 พู่กัน
 - 1.7 กระจกยี่ห้อ (Tissue)
 - 1.8 ผ้าตาถี่
 - 1.9 ถุงมือยาง
 - 1.10 คีมคีบ (Forceps)

2. อุปกรณ์สำหรับสกัดสารจากพืช
 - 2.1 Thimbles rotary evaporator
 - 2.2 สายยางทนความร้อน
 - 2.3 Soxhlet extractor
 - 2.4 Vacuum pump
 - 2.5 ตู้เย็นปรับอุณหภูมิ
 - 2.6 Ethanol 95%
 - 2.7 ขวดสีชาขนาด 500 มิลลิลิตร
 - 2.8 เครื่อง freeze dry (Hettich-Universal 16R)
 - 2.9 Petridish plate
 - 2.10 เหย้าว่านน้ำ
 - 2.11 ไบว่านน้ำ
 - 2.12 เครื่องปั่น

3. อุปกรณ์สำหรับทดสอบเปอร์เซ็นต์การตายของสัตว์ทดลอง
 - 3.1 กล่องพลาสติกทรงกลมมีสำหรับ treat ตัวกลางคืน และตัวเต็มวัย
 - 3.2 ปากกึบ
 - 3.3 Label paper
 - 3.4 กระบอกตวงขนาด 25, 100, 250, 500
 - 3.5 สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ
 - 3.6 สารสกัดจากใบว่านน้ำ
 - 3.7 กระดาษกรอง
 - 3.8 ขวดสีชาขนาด 100 มิลลิลิตร
 - 3.9 ถุงตาข่ายใส่เห็บ

4. อุปกรณ์สำหรับทดสอบการหนีของเห็บและเปอร์เซ็นต์การฟักออกของเห็บ
 - 4.1 เห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย
 - 4.2 Petridish plate
 - 4.3 ฟู่กัน
 - 4.4 สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ

5. อุปกรณ์สำหรับทดสอบเปรียบเทียบผลของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ จากว่านน้ำที่มี
 ต่อน้าหนักไข่ของเห็บสุนัขและการฟักออกของเห็บสุนัข
 - 5.1 เห็บสุนัขเพศเมียระยะตัวเต็มวัยที่อยู่ในระยะ engorged
 - 5.2 Petridish plate
 - 5.3 ฟู่กัน
 - 5.4 สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ
 - 5.5 กล้องจุลทรรศน์สเตปโตสโคป
 - 5.6 เข็มปลายแหลม
 - 5.7 ตาชั่งไฟฟ้า 5 ตำแหน่ง

6. อุปกรณ์ที่ใช้ทดสอบวัดเอนไซม์
 - 6.1 กรวยกรอง
 - 6.2 ฝ้ายขาวบาง

- 6.3 ขวดแก้วใสสารเคมี
 - 6.4 ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร
 - 6.5 น้ำกลั่น
 - 6.6 กระจายเชื้อ (tissue)
 - 6.7 ถุงมือยาง
 - 6.8 Mask
 - 6.9 คีมคีบ (forceps)
 - 6.10 โฟมใส่น้ำแข็ง
 - 6.11 น้ำแข็ง
 - 6.12 Parafilm
 - 6.13 Pipette tip ขนาด 1, 100, 1000 ไมโครลิตร
 - 6.14 Microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
 - 6.15 โกร่งบด
 - 6.16 เครื่อง spectrophotometer ของ Perkin Elma Lambda 25 UV/VIS
 - 6.17 เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยง Centrifuge ของ Kubota
 - 6.18 pH meter
 - 6.19 Potassium phosphate buffer
 - 6.20 Glutathione reduce form
 - 6.21 Paranitrophenyl acetate (pNPA)
 - 6.22 Polyvinyl poly pyrrolidone (PVPP)
 - 6.23 Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA)
 - 6.24 Chlorodinitrobenzene (CDNB)
 - 6.25 Hydrocholic acid
 - 6.26 Sodium hydroxide
-
7. อุปกรณ์สำหรับทดสอบสัตว์ทดลองที่ไม่ใช่เป้าหมาย
 - 7.1 หนูถีบจักร *Mus musculus*
 - 7.2 Pipette tip ขนาด 100 ไมโครลิตร
 - 7.3 หลอดหยอดยาหนู
 - 7.4 หลอดฉีดยา

วิธีการ

การเลี้ยงเพื่อขยายพันธุ์หีบสุนัข

นำหีบสุนัขจากสุนัขมาพักเลี้ยงไว้ในกล่องเลี้ยงหีบ (Jacobs *et al.*, 2004) รอจนหีบสุนัขออกไข่ เมื่อตัวอ่อนฟักตัวจึงนำขึ้นไปเลี้ยงบนกระดาษ (ภาพที่ 19) โดยนำหีบใส่ถุง ear bag ถูมติดกับหูกระดาษเพื่อให้ได้ระยะต่างๆ ที่จะนำไปทดลอง



ภาพที่ 19 กรงเลี้ยงกระดาษ

การสกัดสารจากว่านน้ำ

นำส่วนต่างๆของว่านน้ำ เหง้า ใบ มาสกัดโดยใช้วิธีการสกัดแบบ soxhlet extraction และแบบแช่โดยการนำส่วนต่างๆ ของว่านน้ำมาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เมื่อแห้งสนิทแล้วจึงปั่นด้วยเครื่องปั่นให้ละเอียด แล้วใช้เอทานอล 95 % เป็นตัวทำละลาย สกัดนาน 7 วัน (นันทวัน, 2534) จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator เก็บส่วนที่ได้จากการระเหยซึ่งมีลักษณะเหนียวข้นไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปทำแห้งด้วยเครื่อง freeze dry ซึ่งสารสกัดที่ได้จะเป็น crude extract นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพต่อไป (ภาพที่ 20 และ 21)



ก. ใบและสารสกัดจากใบของว่านน้ำ



ข. เหง้าสารสกัดจากเหง้าของว่านน้ำ

ภาพที่ 20 พืชและสารสกัดจากพืช



ก. เครื่อง soxhlet



ข. Rotary evaporator



ค. เครื่อง Freeze dry

ภาพที่ 21 การสกัดสารจากพืช

การทดสอบเปรียบเทียบผลของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ จากว่านน้ำที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัข

ทำการเปรียบเทียบทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของว่านน้ำที่สกัดด้วยวิธีการแบบแช่ซึ่งมีเอทานอล 95 % เป็นตัวทำละลาย และวิธีสกัดแบบ soxhlet extraction เพื่อหาวิธีที่ดีที่สุดในการเลือกวิธีในการทดสอบต่อไป (ภาพที่ 22) โดยทั้งนี้ได้ทำการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดจากว่านน้ำที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัข จากนั้นทำการทดสอบเปอร์เซ็นต์การตาย (toxicity test) จากการทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้น นำมาทดสอบหาความเข้มข้นที่ทำให้เห็บตาย 50 % (LC_{50}) แล้วเลือกช่วงของความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสม โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่ม (complete Randomized Design: CRD)

ดำเนินการทดลองโดยนำกล่องสำหรับทดสอบแมลงที่แห้งและสะอาดที่เตรียมไว้พร้อมทั้งรองก้นด้วยกระดาษกรองสาร แล้วนำเห็บที่เตรียมไว้ ใส่ลงในถุงตาข่าย ในการทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การตายใช้เห็บทั้งหมด 2 ระยะ คือ ระยะตัวกลางวัยและระยะตัวเต็มวัย ในการทดสอบจะใส่เห็บสุนัขในระยะตัวกลางวัยถุงละ 10 ตัว ในระยะตัวเต็มวัยถุงละ 15 ตัว จากนั้นจุ่มลงในสารสกัดจากว่านน้ำ 1 นาที ใช้ความเข้มข้น 4 ระดับเข้มข้น แต่ละความเข้มข้นจะมี 4 ซ้ำ รวม 160 ตัว และ 240 ตัว ตามลำดับ จากนั้นนำเห็บออกจากถุงตาข่ายใส่ลงในกล่องสำหรับทดสอบ ปิดฝากล่องที่เจาะรูไว้ด้านบน แล้วสังเกตพฤติกรรมและการตายของเห็บ พร้อมทั้งตรวจนับจำนวนการตายของเห็บที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำผลข้อมูลมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS



ภาพที่ 22 การทดสอบเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัข

1. การทดสอบเปรียบเทียบสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ จากวุ้นน้ำ โดยวิธีการสกัดที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัข

สารสกัดจากเหง้าของวุ้นน้ำโดยวิธี soxhlet extraction ที่ความเข้มข้น 0, 2.5, 3.5 และ 4.5 %w/v ตามลำดับ

สารสกัดจากเหง้าของวุ้นน้ำโดยวิธีการแช่ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.5 และ 2.5 %w/v ตามลำดับ

ในการทดสอบขั้นแรกใช้เห็บสุนัขระยะเต็มวัยเพื่อหาวิธีที่ประสิทธิภาพของเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขดีที่สุด เมื่อได้วิธีต่อมาจึงนำวิธีที่ได้มาทดสอบเปรียบเทียบสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ จากวุ้นน้ำ กับเห็บสุนัข 2 ระยะ ได้แก่ระยะตัวกลางวัยและระยะตัวเต็มวัย

2. การทดสอบเปรียบเทียบสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ จากส่วนต่างๆ จากวุ้นน้ำที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัข

สารสกัดจากใบของวุ้นน้ำที่ความเข้มข้น 0, 6, 9 และ 12 %w/v ตามลำดับ

สารสกัดจากเหง้าของวุ้นน้ำที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.5 และ 2.5 %w/v ตามลำดับ

ในการทดสอบขั้นแรกใช้เห็บสุนัขระยะเต็มวัยเพื่อหาส่วนที่ให้ที่ประสิทธิภาพของเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขดีที่สุด เมื่อได้วิธีต่อมาจึงนำวิธีที่ได้มาทดสอบเปรียบเทียบสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ จากวุ้นน้ำ กับเห็บสุนัข 2 ระยะ ได้แก่ระยะตัวกลางวัยและระยะตัวเต็มวัย

การสกัดเอนไซม์จากเห็บสุนัข

หลังจากทำการทดสอบสารสกัดจากวุ้นน้ำ ในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเห็บที่รอดมีชีวิตในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดวุ้นน้ำ มาศึกษาระดับเอนไซม์ทำลายพิษ 2 ชนิด คือ เอสเทอร์เลส และ กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรส โดยนำเห็บที่รอดชีวิตมาบดในโกร่งที่แช่เย็น

ขณะบดผสม Polyvinyl poly pyrrolidone (PVPP) 0.002 กรัม แล้ว ค่อยๆเติม 0.1M Potassium phosphate buffer ที่ pH 7.5 (ที่ประกอบไปด้วย KH_2PO_4 , 1 mM EDTA และ 10 mM GSH reduce form) ขณะที่บดด้วย เมื่อบดละเอียดแล้ว กรองด้วยผ้าขาวบาง ใส่ในหลอด Micro tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำส่วนของเหลวที่กรองได้ไปทำการปั่น (centrifuge) ด้วยความเร็ว 18,000 รอบ/นาที (10,000 g) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ใช้หลอดหยดดูดส่วนใสด้านบนของ (supernatant) ใส่หลอด micro tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร อีกหลอดเพื่อวัดเอนไซม์เอสเทอร์ส และ กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรส โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ของ Hitachi รุ่น U200 (โดยดัดแปลงวิธีการของ Mackness *et al.*, 1983; Visetson, 1991)

การตรวจวัดระดับเอนไซม์ทำลายพิษ

ในการศึกษาครั้งนี้ จะทำการตรวจวัดระดับเอนไซม์ทำลายพิษ 2 ชนิดคือ เอนไซม์เอสเทอร์ส และ กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรส

1. การตรวจวัดเอนไซม์เอสเทอร์ส

การตรวจวัดระดับเอนไซม์เอสเทอร์สใช้วิธี pNPA assay ของ Mackness *et al.* (1983) โดยใช้หลักการว่าเอนไซม์เอสเทอร์สจะเร่งปฏิกิริยา hydrolysis ของสารที่ใช้ paranitrophenyl acetate (pNPA) ให้เปลี่ยนไปเป็น paranitrophenol ซึ่งเป็นสารสีเหลือง ทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 400 นาโนเมตร ตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงของ paranitrophenol โดยมีวิธีการดังนี้

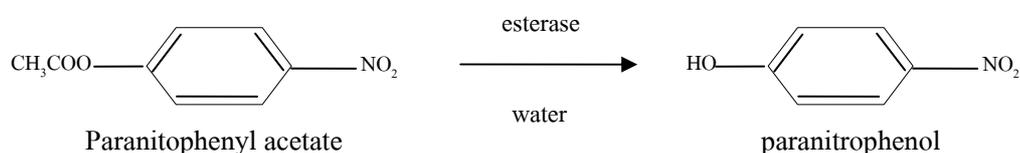
หลอด reference ประกอบด้วย

- 0.1 M phosphate buffer 2900 ไมโครลิตร
- Phosphate buffer + EDTA 50 ไมโครลิตร
- pNPA (Substrate) 50 ไมโครลิตร

หลอด sample ประกอบด้วย

- 0.1 M phosphate buffer 2900 ไมโครลิตร
- pNPA (Substrate) 50 ไมโครลิตร

- Enzyme (ที่สกัดได้จากเห็บ) 50 ไมโครลิตร



ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการตรวจวัดเอนไซม์เอสเทอเรส

2. การตรวจวัดเอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรส

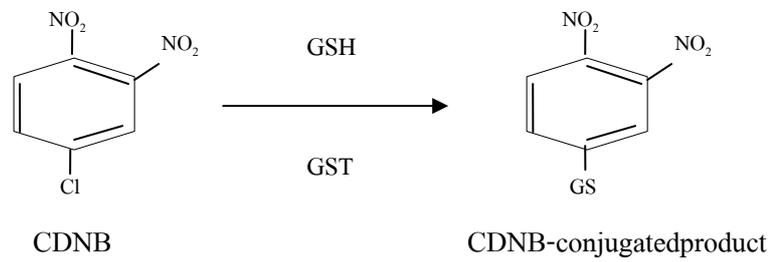
เอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสใช้วิธีของ CDNB assay ของ Booth *et al.* (1961) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 340 นาโนเมตร ตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงของ dinitrophenyl thioether ซึ่งเกิดจาก chloro - dinitrobenzene เกิดปฏิกิริยารวมตัวกับ glutathione โดยมีเอนไซม์กลูตาไทโอน-เอส- ทรานสเฟอเรสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา การวัดการดูดกลืนแสงของเอนไซม์กลูตาไทโอน-เอส- ทรานสเฟอเรสมิ่ววิธีการ ดังนี้ (ภาพที่ 23)

หลอด reference ประกอบด้วย

- 0.1 M phosphate buffer 1150 ไมโครลิตร
- Phosphate buffer + GSH reduced form 20 ไมโครลิตร
- CDNB (substrate) 10 ไมโครลิตร

หลอด sample ประกอบด้วย

- 0.1 M phosphate buffer 1150 ไมโครลิตร
- Enzyme (ที่สกัดได้จากเห็บ) 20 ไมโครลิตร
- CDNB (substrate) 50 ไมโครลิตร



ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นตอนการตรวจวัดเอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรส



ภาพที่ 23 การทดสอบตรวจวัดเอนไซม์

การตรวจสอบวัดโปรตีนในเห็บ

ตรวจสอบวัดโปรตีนในเห็บโดยใช้วิธีการของ lowry method (Lowry *et al.*, 1951) โดยการใช้เครื่อง spectrophotometer ใช้ค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 650 นาโนเมตร เพื่อนำค่าโปรตีนรวมที่ได้มาก่อนได้รับสารสกัดเปรียบเทียบกับค่าโปรตีนรวมหลังจากที่ได้รับสารสกัดจากเหง้าของว่านน้ำ โดยวิธีการ ดังนี้ (ภาพที่ 24)

หลอด reference ประกอบด้วย

- 0.1 M phosphate buffer 500 ไมโครลิตร
- Lowry solution 1500 ไมโครลิตร
- Folin-ciocalteau 150 ไมโครลิตร

หลอด sample ประกอบด้วย

- Enzyme (ที่สกัดได้จากเห็บ) 500 ไมโครลิตร
- Lowry solution 1500 ไมโครลิตร
- Folin-ciocalteau 150 ไมโครลิตร



ภาพที่ 24 การตรวจวัดหาโปรตีนในเอนไซม์จากเห็บ

การทดสอบเปรียบเทียบผลของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ จากวุ้นน้ำที่มีต่อไข่ของเห็บสุนัข

นำเห็บสุนัขที่เป็น engorged adult จุ่มลงสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 4 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ แต่ซ้ำใช้เห็บ 1 ตัวเพื่อดูปริมาณไข่ของแต่ละตัว โดยการทดสอบใช้การวางแผนการทดลองแบบสุ่ม (complete Randomized Design: CRD) ปล่อยให้เห็บสุนัขในระยะ engorged adult ไข่จนหมด (การสังเกตการออกไข่ของเห็บสุนัขโดยวิธีตรวจตัวแม่เห็บเห็บสุนัขจะไข่ครั้งเดียวแล้วตายไป) นำไข่ที่ได้ไปซึ่งเปรียบเทียบในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดจากวุ้นน้ำที่เห็บระยะ engorged adult ได้รับ และรอจนเห็บสุนัขฟักออกมาเป็นระยะตัวอ่อน นับหาเปอร์เซ็นต์การฟักของเห็บระยะตัวอ่อนเพื่อเปรียบเทียบหาเปอร์เซ็นต์การฟักของแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดจากวุ้นน้ำ

การทดสอบเปรียบเทียบผลของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ จากวุ้นน้ำที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การหนีของเห็บสุนัข

นำเห็บสุนัขระยะเต็มวัยมาทดสอบ โดยทำการทดสอบสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ลงที่ขอบของ petridish plate เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การหนีของเห็บ ในการทดสอบสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 4 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว โดยการทดสอบใช้การวางแผนการทดลองแบบสุ่ม การรายงานผลใช้การรายงานแบบบรรยาย

สารสกัดจากเหง้าของวุ้นน้ำที่ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30 %w/v ตามลำดับ

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากวุ้นน้ำต่อสัตว์ที่ไม่ใช่เป้าหมาย

ทำการเปรียบเทียบทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้น (preliminary test) โดยนำมาทดสอบหาความเข้มข้นที่ทำให้สิ่งมีชีวิตตาย 50% (LD_{50}) ของสารสกัดจากเหง้าจากวุ้นน้ำที่สกัดด้วยวิธีเดียวกับการทดสอบเห็บซึ่งมีเอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย โดยทำการทดสอบเพื่อหาความเป็นพิษเบื้องต้น ทดสอบหาความเข้มข้นของสารสกัดในช่วงความเข้มข้นต่ำสุด และสูงสุดที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตายของสัตว์ที่ไม่ใช่เป้าหมาย (ในการทดลองนี้จะใช้หนูถีบจักร เนื่องจากเป็นสัตว์ที่เป็นตัวแทนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่สำคัญ โดยทำการทดสอบโดยวิธีการ ให้อิน หยอดตา

และทาผิว ใช้วิธีของ Bullangpoti (2007) ในการทดสอบใช้หนูเพศผู้และเมียในปริมาณเท่าๆ กัน ดังภาพที่ 25)

การทดสอบความเป็นพิษโดยวิธีกิน นำมาทดสอบหาความเข้มข้นที่ทำให้หนูตาย 50 % (LD₅₀) แล้วเลือกช่วงของความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสม โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่ม ใช้ความเข้มข้น 4 ความเข้มข้น 4 ชั่วโมง 4 ชั่วโมง 10 ตัว โดยสารสกัดจากเหง้าของว่านน้ำใช้ความเข้มข้น 0, 6, 16 และ 26 %w/v ตามลำดับ โดยให้กิน 5 มิลลิลิตรต่อตัว โดยสังเกตพฤติกรรมของหนูถึงจากรณะได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ

การทดสอบความเป็นพิษโดยวิธีหยอดตา นำมาทดสอบหาความเข้มข้นที่ทำให้ตาหนูเกิดการอักเสบ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่ม ใช้ความเข้มข้น 4 ความเข้มข้น 4 ชั่วโมง 4 ชั่วโมง 10 ตัว โดยสารสกัดจากเหง้าของว่านน้ำใช้ความเข้มข้น 0, 20, 30 และ 40 %w/v ตามลำดับ โดยหยอดตา 50 ไมโครลิตรต่อตัว ลักษณะการแสดงออกที่ดวงตาหลังได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีนี้แสดงผลตามค่าตัวเลข ดังแสดงจาก (Dunn, 2002)

ไม่แสดงอาการผิดปกติ	n.d.
ดวงตาแสดงอาการแดง	1
ดวงตาแสดงอาการขุ่นมัว	2
ดวงตาแสดงอาการระคายเคือง	3
ดวงตาแสดงอาการบวม	4
มีการแสดงอาการอื่นๆ ที่ไม่ปรากฏตามที่กล่าวมา	5

การทดสอบความเป็นพิษโดยวิธีทาผิว นำมาทดสอบหาความเข้มข้นที่ทำให้ผิวของหนูเกิดการอักเสบ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่ม ใช้ความเข้มข้น 4 ความเข้มข้น 4 ชั่วโมง 4 ชั่วโมง 10 ตัว หนูที่นำมาทดสอบทำการโกนขนเป็นพื้นที่ 2×2 ตารางเซนติเมตร โดยสารสกัดจากเหง้าของว่านน้ำใช้ความเข้มข้น 0, 40, 70 และ 100 %w/v ตามลำดับ ทำการทาผิว 1 มิลลิลิตรต่อตัว ลักษณะการแสดงออกที่ผิวหนังหลังได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีนี้แสดงผลตามค่าตัวเลข ดังแสดงจาก (Bonnette, 2002)

ไม่แสดงอาการผิดปกติ	n.d.
มีการแสดงอาการผื่นขึ้นที่ผิวหนัง	1
มีการแสดงอาการบวมของผิวหนัง	2
มีการแสดงอาการผื่นร่วมกับอาการบวม	3
มีการแสดงอาการคันที่ผิวหนัง	4
มีการแสดงอาการอื่นๆ ที่ไม่ปรากฏตามที่กล่าวมา	5



ก. การทดสอบความเป็นพิษโดยวิธีกิน

ข. การทดสอบความเป็นพิษโดยวิธีหยอดตา



ค. การทดสอบความเป็นพิษโดยวิธีทาผิว

ภาพที่ 25 การทดลองสัตว์ที่ไม่ใช่เป้าหมาย

การวิเคราะห์ข้อมูล

2.1 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตายที่แท้จริง

โดยใช้วิธีของ Abbott's formula (Abbott's, 1925) เพื่อนำกราฟมา Plot ค่าระหว่างความเข้มข้นกับเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขแล้วหาค่า LC_{50} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เห็บตายหลังจากได้รับสารสกัดจากวุ้นน้ำ จากสมการถดถอย

Abbott's formula

$$\% \text{ corrected mortality} = \frac{(\text{alive control} - \text{alive treated}) \times 100}{(\text{alive control})}$$

2.2 สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวน

ใช้โปรแกรม SPSS version 10.1 ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (one way anova analysis of variance) ทดสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยทำการเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธี DUNCAN MULTIPLE RANGE TEST (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (คัดแปลงจาก เรวดี ชูช่วย, 2541, Visetson *et al.*, 2001)

ผลและวิจารณ์

ผล

1. ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำต่อเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัข

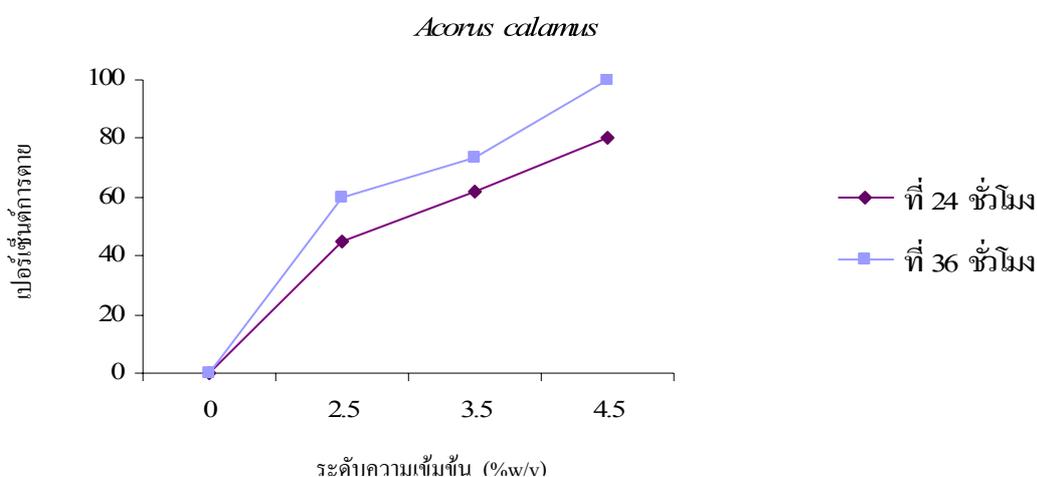
1.1 ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธี soxhlet extraction ต่อเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย

เมื่อนำสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่สกัดด้วยวิธี soxhlet extraction โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลายที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ ชุดควบคุม (น้ำกลั่น), 2.5, 3.5 และ 4.5 % w/v ตามลำดับ ทดสอบกับเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย เพอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขที่ 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.00, 45.00, 61.67 และ 80.00 % w/v ตามลำดับ และเมื่อใช้เวลาเป็น 36 ชั่วโมง เพอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยมีค่าเป็น 0.00, 60.00, 73.33 และ 100.00% w/v (ตารางที่ 2 และภาพที่ 26) ซึ่งเปอร์เซ็นต์การตายทุกระดับความเข้มข้นของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง และ 36 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 2 เพอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธี soxhlet extraction ที่ความเข้มข้นต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมงและ 36 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดจาก เหง้าว่านน้ำ (%w/v)	เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย ($\bar{X} \pm SD$)	
	24 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
2.5	45.00 \pm 3.34 ^b	60.00 \pm 0.00 ^b
3.5	61.67 \pm 3.34 ^c	73.33 \pm 0.00 ^c
4.5	80.00 \pm 0.00 ^d	100.00 \pm 0.00 ^d

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $P=0.05$, $n = 15$, $rep = 4$, โดย DMRT (Duncan Multiple Range Test)



ภาพที่ 26 เปอร์เซนต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ ด้วยวิธี soxhlet extraction ณ เวลา 24 ชั่วโมงและ 36 ชั่วโมง

ระดับความเป็นพิษของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธี soxhlet extraction ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง สมการ regression ได้เท่ากับ $Y = 0.13 + 17.73X$ แทนค่า Y เป็น เปอร์เซนต์การตายที่ 50 เปอร์เซนต์จะได้ค่า X ที่เป็นความเข้มข้นในระดับ LC_{50} เท่ากับ 2.81 % w/v และ ณ ช่วงเวลาที่ 36 ชั่วโมง สมการ regression ได้เท่ากับ $Y = 1.04 + 21.82X$ แทนค่า Y เป็น เปอร์เซนต์การตายที่ 50 เปอร์เซนต์จะได้ค่า X ที่เป็นความเข้มข้นในระดับ LC_{50} เท่ากับ 2.24 % w/v (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยโดยใช้สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธี soxhlet extraction และค่าสมการ regression เปรียบเทียบกันในช่วงเวลา 24 และ 36 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	สมการ regression ⁽¹⁾	ค่า LC ₅₀ ⁽²⁾ (%w/v)	r ² ⁽³⁾
24	Y= 0.13 + 17.73X	2.81	1.00
36	Y= 1.04 + 21.82X	2.24	0.99

⁽¹⁾ คือ สมการ regression เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยจากการได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธี soxhlet extraction

X คือ เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธี soxhlet extraction

Y คือ เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัข

⁽²⁾ LC₅₀ คือ The median lethal concentration

⁽³⁾ r² คือ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient Determination) ของเปอร์เซ็นต์การตาย

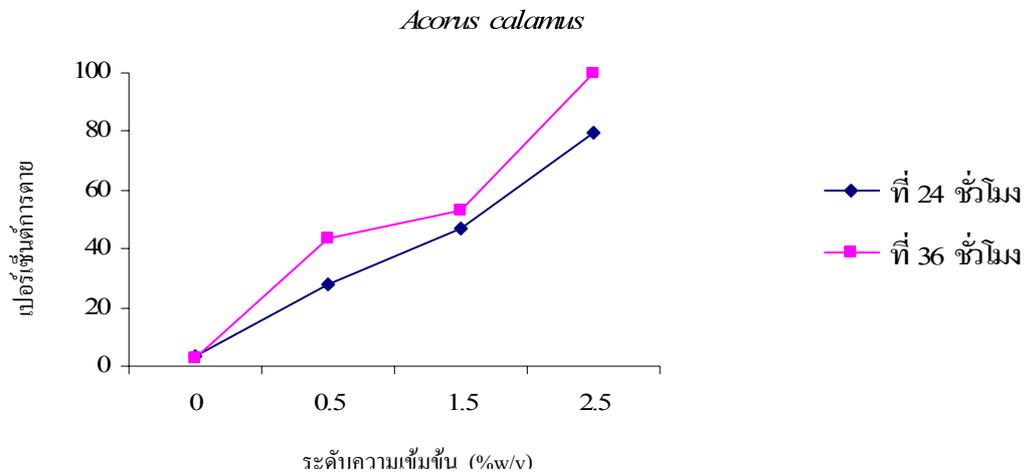
1.2 ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ต่อเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัย

เมื่อนำสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่สกัดด้วยวิธีแช่โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น ชุดควบคุม (น้ำกลั่น), 0.5, 1.5 และ 2.5 % w/v ตามลำดับ ทดสอบกับเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัย เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขที่ 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 3.33, 28.06, 47.22 และ 79.44 % w/v ตามลำดับ และเมื่อใช้เวลาเป็น 36 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยมีค่าเป็น 2.50, 43.61, 52.78 และ 100.00 % w/v (ตารางที่ 4 และภาพที่ 27) ซึ่งเปอร์เซ็นต์การตายทุกระดับความเข้มข้นของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง และ 36 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ความเข้มข้นต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมงและ 36 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดจาก เหง้าว่านน้ำ (%w/v)	เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัย ($\bar{X} \pm SD$)	
	24 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	2.50 \pm 5.00 ^a	2.50 \pm 5.00 ^a
0.5	28.06 \pm 3.89 ^b	43.61 \pm 4.75 ^b
1.5	47.22 \pm 3.21 ^c	52.78 \pm 3.20 ^c
2.5	79.44 \pm 1.11 ^d	100.00 \pm 0.00 ^d

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $P=0.05$, $n = 10$, $rep = 4$, โดย DMRT (Duncan Multiple Range Test)



ภาพที่ 27 เปอร์เซนต์การตายของเห็บสุนัขระยะกลางวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ ณ เวลา 24 ชั่วโมงและ 36 ชั่วโมง

ระดับความเป็นพิษของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง สมการ regression ได้เท่ากับ $Y = 7.28 + 28.65X$ แทนค่า Y เป็นเปอร์เซนต์การตายที่ 50 เปอร์เซนต์จะได้ค่า X ที่เป็นความเข้มข้นในระดับ LC_{50} เท่ากับ 1.49 % w/v และ ณ ช่วงเวลาที่ 36 ชั่วโมง สมการ regression ได้เท่ากับ $Y = 10.91 + 34.50X$ แทนค่า Y เป็นเปอร์เซนต์การตายที่ 50 เปอร์เซนต์จะได้ค่า X ที่เป็นความเข้มข้นในระดับ LC_{50} เท่ากับ 1.13 % w/v (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยโดยใช้สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธี
แช่ และค่าสมการ regression เปรียบเทียบกันในช่วงเวลา 24 และ 36 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	สมการ regression ⁽¹⁾	ค่า LC ₅₀ ⁽²⁾ (%w/v)	r ² ⁽³⁾
24	Y= 7.28 + 28.65X	1.49	0.98
36	Y= 10.91 + 34.50X	1.13	0.91

⁽¹⁾ คือ สมการ regression เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยจากการได้รับสารสกัด
จากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่

X คือ เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่

Y คือ เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัข

⁽²⁾ LC₅₀ คือ The median lethal concentration

⁽³⁾ r² คือ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient determination) ของเปอร์เซ็นต์การตาย

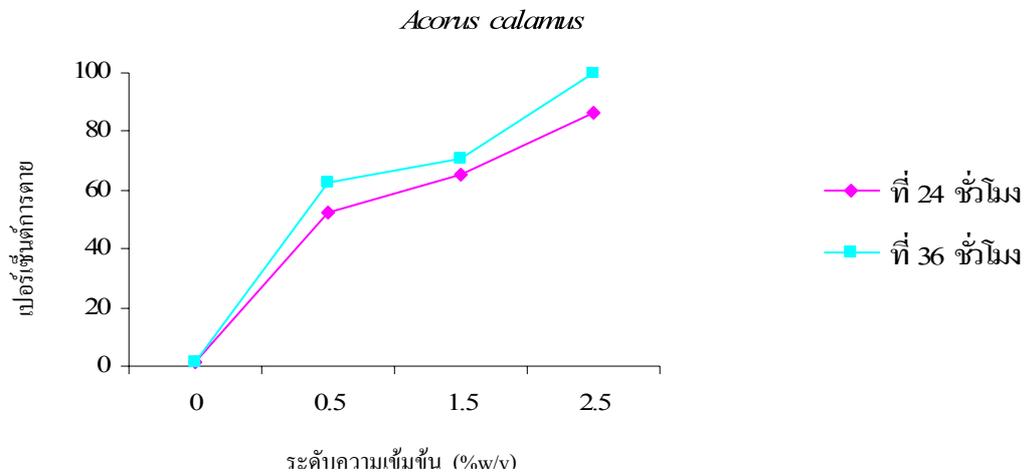
1.3 ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ต่อเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย

เมื่อนำสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่สกัดด้วยวิธีแช่โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น ชุดควบคุม (น้ำกลั่น), 0.5, 1.5 และ 2.5 % w/v ตามลำดับ ทดสอบกับเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขที่ 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 1.67, 52.50, 65.48 และ 86.43 % w/v ตามลำดับ และเมื่อใช้เวลาเป็น 36 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยมีค่าเป็น 1.67, 62.74, 70.72 และ 100.00 % w/v (ตารางที่ 6 และภาพที่ 28) ซึ่งเปอร์เซ็นต์การตายทุกระดับความเข้มข้นของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง และ 36 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ความเข้มข้นต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมงและ 36 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดจาก เหง้าว่านน้ำ (%w/v)	เปอร์เซ็นต์ตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย ($\bar{X} \pm SD$)	
	24 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	1.67 ± 3.33 ^a	1.67 ± 3.33 ^a
0.5	52.50 ± 1.67 ^b	62.74 ± 3.31 ^b
1.5	65.48 ± 1.40 ^c	70.23 ± 2.84 ^c
2.5	86.43 ± 0.48 ^d	100.00 ± 0.00 ^d

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $P=0.05$, $n = 15$, $rep = 4$, โดย DMRT (Duncan Multiple Range Test)



ภาพที่ 28 เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ ด้วยวิธีแช่ ณ เวลา 24 ชั่วโมงและ 36 ชั่วโมง

ระดับความเป็นพิษของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง สมการ regression ได้เท่ากับ $Y = 18.36 + 29.48X$ แทนค่า Y เป็นเปอร์เซ็นต์การตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์จะได้ค่า X ที่เป็นความเข้มข้นในระดับ LC_{50} เท่ากับ 1.07 % w/v และ ณ ช่วงเวลาที่ 36 ชั่วโมง สมการ regression ได้เท่ากับ $Y = 21.28 + 33.34X$ แทนค่า Y เป็นเปอร์เซ็นต์การตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์จะได้ค่า X ที่เป็นความเข้มข้นในระดับ LC_{50} เท่ากับ 0.86 % w/v (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยโดยใช้สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธี
แช่ และค่าสมการ regression เปรียบเทียบกันในช่วงเวลา 24 และ 36 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	สมการ regression ⁽¹⁾	ค่า LC ₅₀ ⁽²⁾ (%w/v)	r ² ⁽³⁾
24	Y= 18.36 + 29.48X	1.07	0.82
36	Y= 21.28 + 33.34X	0.86	0.80

⁽¹⁾ คือ สมการ regression เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยจากการได้รับสารสกัด
จากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่

X คือ เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่

Y คือ เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัข

⁽²⁾ LC₅₀ คือ The median lethal concentration

⁽³⁾ r² คือ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient determination) ของเปอร์เซ็นต์การตาย

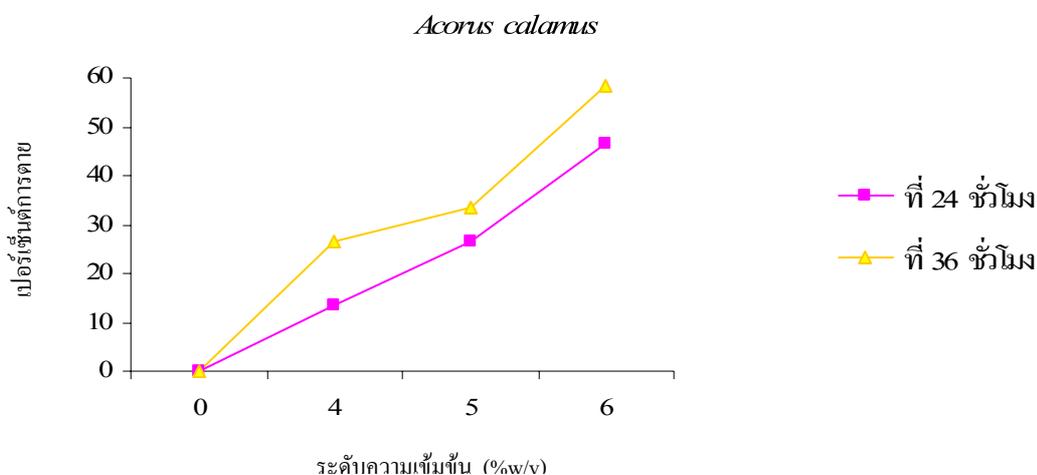
1.2 ผลของสารสกัดจากใบว่านน้ำด้วยวิธีแช่ต่อเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย

เมื่อนำสารสกัดจากใบว่านน้ำที่สกัดด้วยวิธีแช่โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น ชุดควบคุม (น้ำกลั่น), 6, 9 และ 12 % w/v ตามลำดับ ทดสอบกับเห็บสุนัขระยะระยะตัวเต็มวัย เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บที่ 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.00, 46.66, 60.00 และ 81.67 % w/v ตามลำดับ และเมื่อใช้เวลาเป็น 36 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยมีค่าเป็น 0.00, 60.00, 73.33 และ 91.92 % w/v (ตารางที่ 8 และภาพที่ 29) ซึ่งเปอร์เซ็นต์การตายทุกระดับความเข้มข้นของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง และ 36 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากใบว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ความเข้มข้นต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมงและ 36 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดจาก ใบว่านน้ำ (%w/v)	เปอร์เซ็นต์ตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย ($\bar{X} \pm SD$)	
	24 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
6	46.66 ± 0.00 ^b	60.00 ± 0.00 ^b
9	60.00 ± 0.00 ^c	73.33 ± 0.00 ^c
12	81.67 ± 3.34 ^d	91.92 ± 2.83 ^d

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $P=0.05$, $n = 15$, $rep = 4$, โดย DMRT (Duncan Multiple Range Test)



ภาพที่ 29 เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากไบบาน้ำด้วยวิธีแช่ ณ เวลา 24 ชั่วโมงและ 36 ชั่วโมง

ระดับความเป็นพิษของสารสกัดจากไบบาน้ำด้วยวิธีแช่ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง สมการ regression ได้เท่ากับ $Y = 1.76 + 6.71X$ แทนค่า Y เป็นเปอร์เซ็นต์การตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์จะได้ค่า X ที่เป็นความเข้มข้นในระดับ LC_{50} เท่ากับ 7.19 % w/v และ ณ ช่วงเวลาที่ 36 ชั่วโมง สมการ regression ได้เท่ากับ $Y = 4.66 + 7.65X$ แทนค่า Y เป็นเปอร์เซ็นต์การตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์จะได้ค่า X ที่เป็นความเข้มข้นในระดับ LC_{50} เท่ากับ 5.93 % w/v (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยโดยใช้สารสกัดจากใบว่านน้ำด้วยวิธีแช่ และค่าสมการ regression เปรียบเทียบกันในช่วงเวลา 24 และ 36 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	สมการ regression ⁽¹⁾	ค่า LC ₅₀ ⁽²⁾ (%w/v)	r ² ⁽³⁾
24	Y= 1.76 + 6.71X	7.19	0.99
36	Y= 4.66 + 7.65X	5.93	0.97

⁽¹⁾ คือ สมการ regression เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยจากการได้รับสารสกัดจากใบว่านน้ำด้วยวิธีแช่

X คือ เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบว่านน้ำด้วยวิธีแช่

Y คือ เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัข

⁽²⁾ LC₅₀ คือ The median lethal concentration

⁽³⁾ r² คือ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient determination) ของเปอร์เซ็นต์การตาย

2. ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อระดับเอนไซม์เอสเทอร์สในเห็บสุนัข

จากการทดสอบตรวจวัดหาเอนไซม์เอสเทอร์สของเห็บสุนัขโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร (Mackness *et al.*, 1983) มี pNPA เป็นซับสเตรต ทำให้เกิดสารที่มีสีเหลืองซึ่งเป็นผลผลิตจากการทำปฏิกิริยา hydrolysis ของสาร paranitrophenyl cetrate (pNPA) ไปเป็น paranitrophenol ทดสอบทำการวัดเอนไซม์เอสเทอร์สโดยวิธีดังกล่าวได้ผลดังนี้

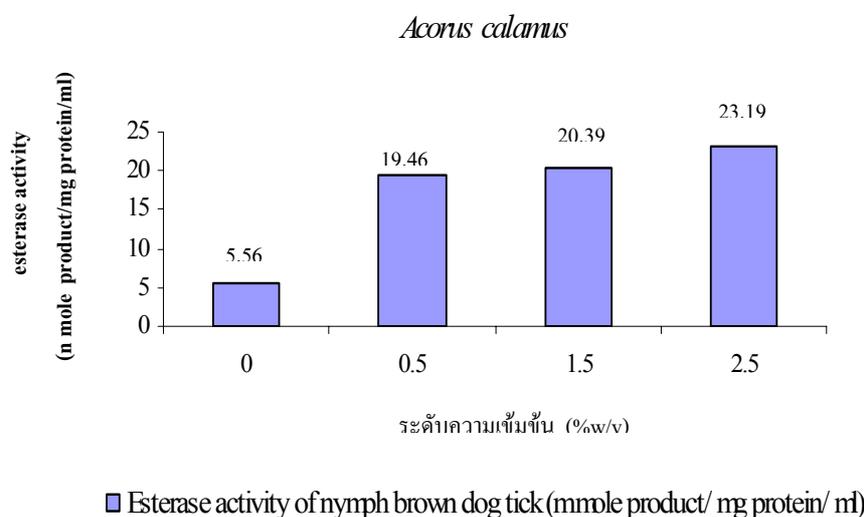
2.1 ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อระดับเอนไซม์เอสเทอร์สในเห็บสุนัขระยะกลางวัย

ระดับเอนไซม์เอสเทอร์สของเห็บสุนัขระยะกลางวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ ชุดควบคุม (น้ำกลั่น), 0.5, 1.5 และ 2.5 % w/v ตามลำดับ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าของ esterase product เท่ากับ 5.56 ± 0.44 , 19.46 ± 0.43 , 20.39 ± 0.37 และ 23.19 ± 0.17 n mole product/ mg protein/ m ตามลำดับ (ตารางที่ 10 และภาพที่ 30) ซึ่งระดับเอนไซม์ที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับเอนไซม์เอสเทอร์สของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยเมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดจากเหง้า ว่านน้ำด้วยวิธีแช่ (%w/v)	ระดับเอนไซม์เอสเทอร์ส (n mole product/ mg protein/ m)
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	5.56 ± 0.44^a
0.5	19.46 ± 0.43^b
1.5	20.39 ± 0.37^c
2.5	23.19 ± 0.17^d

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $P=0.05$, $n = 10$, $rep = 4$,
โดย DMRT (Duncan Multiple Range Test)



ภาพที่ 30 ระดับเอนไซม์เอสเทอเรสของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้า ว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง

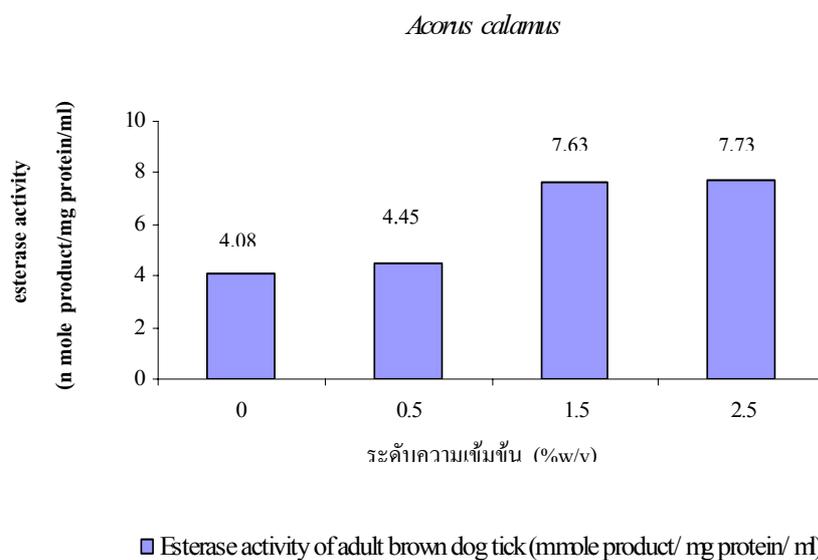
2.2 ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อระดับเอนไซม์เอสเทอเรสในเห็บสุนัข ระยะตัวเต็มวัย

ระดับเอนไซม์เอสเทอเรสของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้า ว่านน้ำที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ ชุดควบคุม (น้ำกลั่น), 0.5, 1.5 และ 2.5 % w/v ตามลำดับ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าของ esterase product เท่ากับ 4.08 ± 0.43 , 4.45 ± 0.32 , 7.63 ± 0.53 และ 7.73 ± 0.15 n mole product/ mg protein/ m ตามลำดับ (ตารางที่ 11 และภาพที่ 31) ซึ่งระดับเอนไซม์ที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับเอนไซม์เอสเทอเรสของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยเมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดจากเหง้า ว่านน้ำด้วยวิธีแช่ (%w/v)	ระดับเอนไซม์เอสเทอเรส (n mole product/ mg protein/ m)
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	4.08 \pm 0.43 ^a
0.5	4.45 \pm 0.32 ^a
1.5	7.63 \pm 0.53 ^b
2.5	7.73 \pm 0.15 ^b

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $P=0.05$, $n = 15$, $rep = 4$, โดย DMRT (Duncan Multiple Range Test)



ภาพที่ 31 ระดับเอนไซม์เอสเทอเรสของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง

3. ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อระดับเอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสในเห็บสุนัข

จากการทดสอบเอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรส ใช้วิธีของ CDNB assay ของ Booth *et al.* (1961) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 340 นาโนเมตร ตรวจค่าของ conjugated product ที่เป็นกลุ่มของกรดเมอแคพทริกซึ่งผลจากการให้สารสกัดจากว่านน้ำด้วยวิธีแช่เป็นดังต่อไปนี้

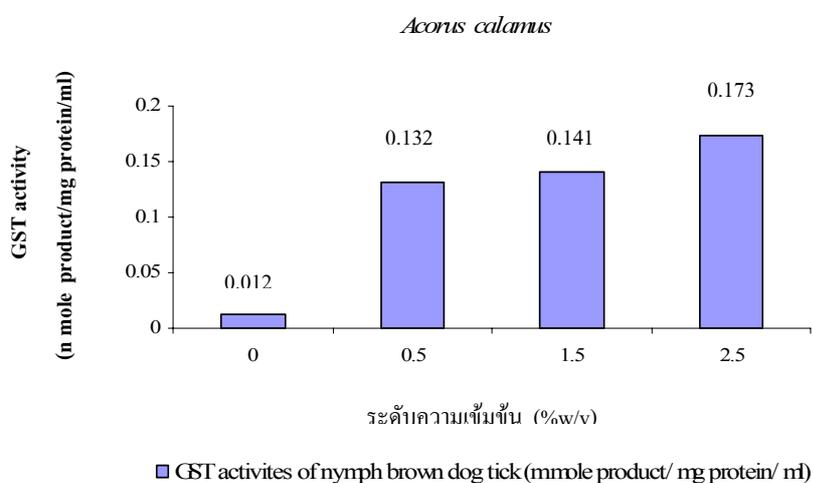
3.1 ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อระดับเอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสในเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัย

ระดับเอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัย หลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ ชุดควบคุม (น้ำกลั่น), 0.5, 1.5 และ 2.5 % w/v ตามลำดับ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าของ conjugated product ที่เป็นกลุ่มของกรด เมอแคพทริกเท่ากับ 0.012 ± 0.001 , 0.132 ± 0.002 , 0.141 ± 0.005 และ 0.173 ± 0.001 n mole product/ mg protein/ m ตามลำดับ (ตารางที่ 12 และภาพที่ 32) ซึ่งระดับเอนไซม์ที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

ตารางที่ 12 ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับเอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยเมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดจากเหง้า ว่านน้ำด้วยวิธีแช่ (%w/v)	ระดับเอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรส (n mole product/ mg protein/ m)
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	0.012 \pm 0.001 ^a
0.5	0.132 \pm 0.002 ^b
1.5	0.141 \pm 0.005 ^c
2.5	0.173 \pm 0.001 ^d

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $P=0.05$, $n = 10$, $rep = 4$, โดย DMRT (Duncan Multiple Range Test)



ภาพที่ 32 ระดับเอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง

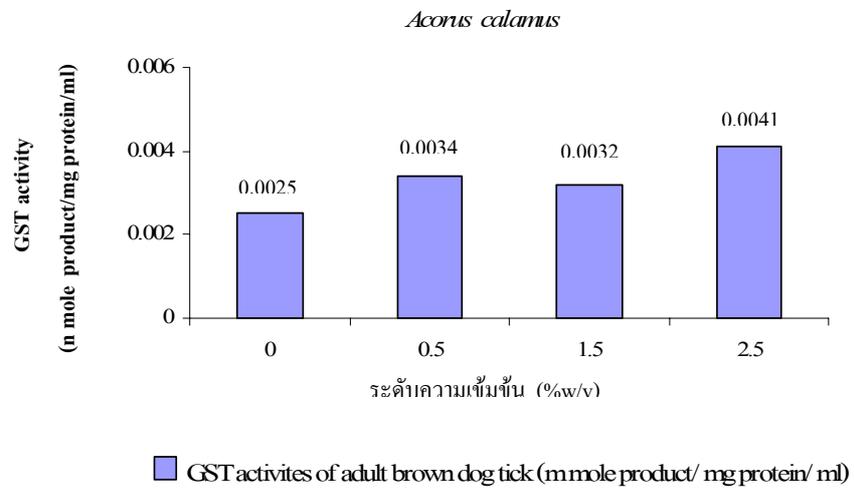
3.2 ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อระดับเอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสในเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย

ระดับเอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย หลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ ชุดควบคุม (น้ำกลั่น), 0.5, 1.5 และ 2.5 % w/v ตามลำดับ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าของ conjugated product ที่เป็นกลุ่มของ mercapturic acid เท่ากับ 0.0025 ± 0.0002 , 0.0034 ± 0.0094 , 0.0032 ± 0.0009 และ 0.0041 ± 0.0002 n mole product/ mg protein/ m ตามลำดับ (ตารางที่ 13 และภาพที่ 33) ซึ่งระดับเอนไซม์ที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

ตารางที่ 13 ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับเอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยเมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดจากเหง้า ว่านน้ำด้วยวิธีแช่ (%w/v)	ระดับเอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรส (n mole product/ mg protein/ m)
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	0.0025 ± 0.0002^a
0.5	0.0034 ± 0.0004^b
1.5	0.0032 ± 0.0009^b
2.5	0.0041 ± 0.0002^c

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $P=0.05$, $n = 15$, $rep = 4$,
โดย DMRT (Duncan Multiple Range Test)



ภาพที่ 33 ระดับเอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง

4. ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อระดับโปรตีนในเห็บสุนัข

จากการทดสอบหาระดับโปรตีนโดยใช้วิธี lowry method ของ Lowry *et al.* (1951) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 650 นาโนเมตร ตรวจสอบค่าระดับของโปรตีน ซึ่งผลจากการให้สารสกัดจากว่านน้ำด้วยวิธีแช่เป็นดังต่อไปนี้

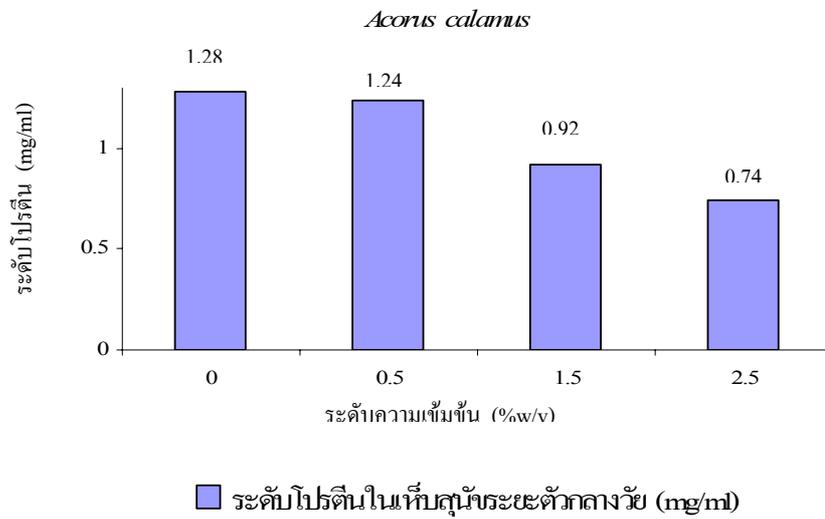
4.1 ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อระดับโปรตีนในเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัย

ระดับโปรตีนของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ ชุดควบคุม (น้ำกลั่น), 0.5, 1.5 และ 2.5 % w/v ตามลำดับ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 1.28 ± 0.089 , 1.24 ± 0.160 , 0.92 ± 0.090 และ 0.74 ± 0.011 mg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 14 และภาพที่ 34) ซึ่งระดับโปรตีนที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

ตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับโปรตีนของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยเมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดจากเหง้า ว่านน้ำด้วยวิธีแช่ (%w/v)	ระดับโปรตีน (mg/ml)
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	1.28 ± 0.089^a
0.5	1.24 ± 0.160^a
1.5	0.92 ± 0.090^b
2.5	0.74 ± 0.011^c

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $P=0.05$, $n = 10$, $rep = 4$, โดย DMRT (Duncan Multiple Range Test)



ภาพที่ 34 ระดับโปรตีนของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง

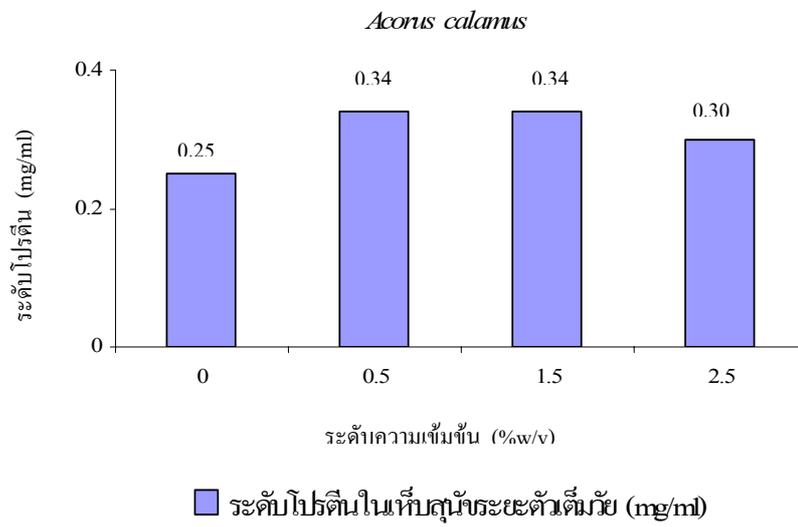
4.2 ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อระดับโปรตีนในเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย

ระดับโปรตีนของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ ชุดควบคุม (น้ำกลั่น), 0.5, 1.5 และ 2.5 % w/v ตามลำดับ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.25 ± 0.002 , 0.34 ± 0.002 , 0.34 ± 0.003 และ 0.30 ± 0.003 mg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 15 และภาพที่ 35) ซึ่งระดับโปรตีนที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

ตารางที่ 15 ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับโปรตีนของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยเมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดจากเหง้า ว่านน้ำด้วยวิธีแช่ (%w/v)	ระดับโปรตีน (mg/ml)
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	0.25 ± 0.002^a
0.5	0.34 ± 0.002^b
1.5	0.34 ± 0.003^b
2.5	0.30 ± 0.003^b

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $P=0.05$, $n = 15$, $rep = 4$, โดย DMRT (Duncan Multiple Range Test)



ภาพที่ 35 ระดับโปรตีนของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 24 ชั่วโมง

5. ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อไข่ของเห็บสุนัข

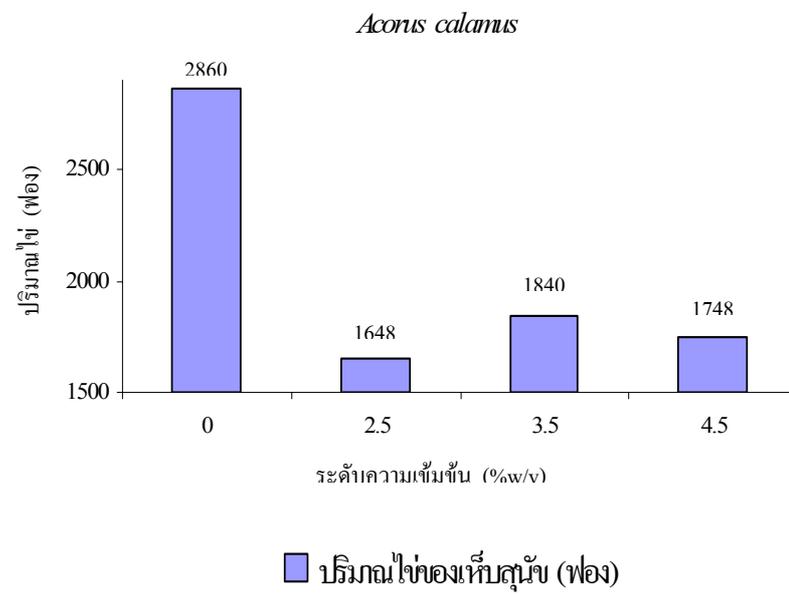
5.1 ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อปริมาณไข่ของเห็บสุนัข

ปริมาณไข่ของเห็บสุนัขหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ ชุดควบคุม (น้ำกลั่น), 2.5, 3.5 และ 4.5 % w/v ตามลำดับ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 2860 ± 40.96 , 1648 ± 36.91 , 1748 ± 89.36 และ 1849 ± 101.07 ฟอง ตามลำดับ (ตารางที่ 16 และภาพที่ 36) ซึ่งปริมาณไข่ทั้ง 4 ระดับความเข้มข้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

ตารางที่ 16 ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณไข่ของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยเมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่

ความเข้มข้นของสารสกัดจากเหง้า ว่านน้ำด้วยวิธีแช่ (%w/v)	ปริมาณไข่ (ฟอง)
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	2860 ± 40.96^d
2.5	1648 ± 36.91^a
3.5	1840 ± 101.07^c
4.5	1748 ± 89.36^b

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $P=0.05$, rep = 10, โดย DMRT (Duncan Multiple Range Test)



ภาพที่ 36 ปริมาณไซ้ของเห็บสุนัขหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าवानน้ำด้วยวิธีแช่

5.2 ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การฟักของเห็บสุนัข

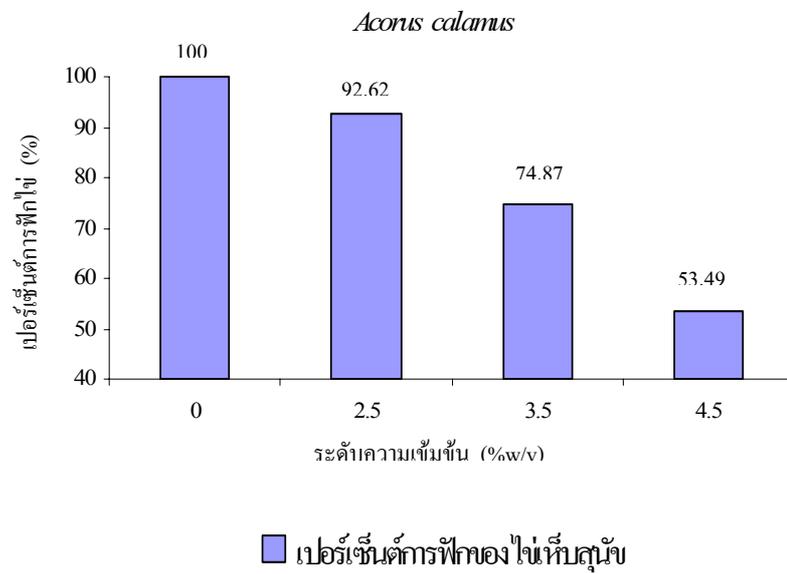
เปอร์เซ็นต์การฟักของเห็บสุนัขหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ ชุดควบคุม (น้ำกลั่น), 2.5, 3.5 และ 4.5 % w/v ตามลำดับ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 100 ± 0.00 , 92.62 ± 0.44 , 74.87 ± 3.32 และ 53.49 ± 2.79 % ตามลำดับ (ตารางที่ 17 และภาพที่ 37) ซึ่งเปอร์เซ็นต์การฟักทั้ง 4 ระดับมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

ตารางที่ 17 ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์การฟักของเห็บสุนัขเมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่

ความเข้มข้นของสารสกัดจากเหง้า ว่านน้ำด้วยวิธีแช่ (%w/v)	ปริมาณไข่ที่ฟัก (ฟอง)
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	100 ± 0.00^d
2.5	92.62 ± 0.44^a
3.5	74.87 ± 3.32^c
4.5	53.49 ± 2.79^b

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $P=0.0$, rep = 10, โดย

DMRT (Duncan Multiple Range Test)



ภาพที่ 37 เปอร์เซ็นต์การฟอกใบเห็บสุนัขหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าवान้ำด้วยวิธีแช่

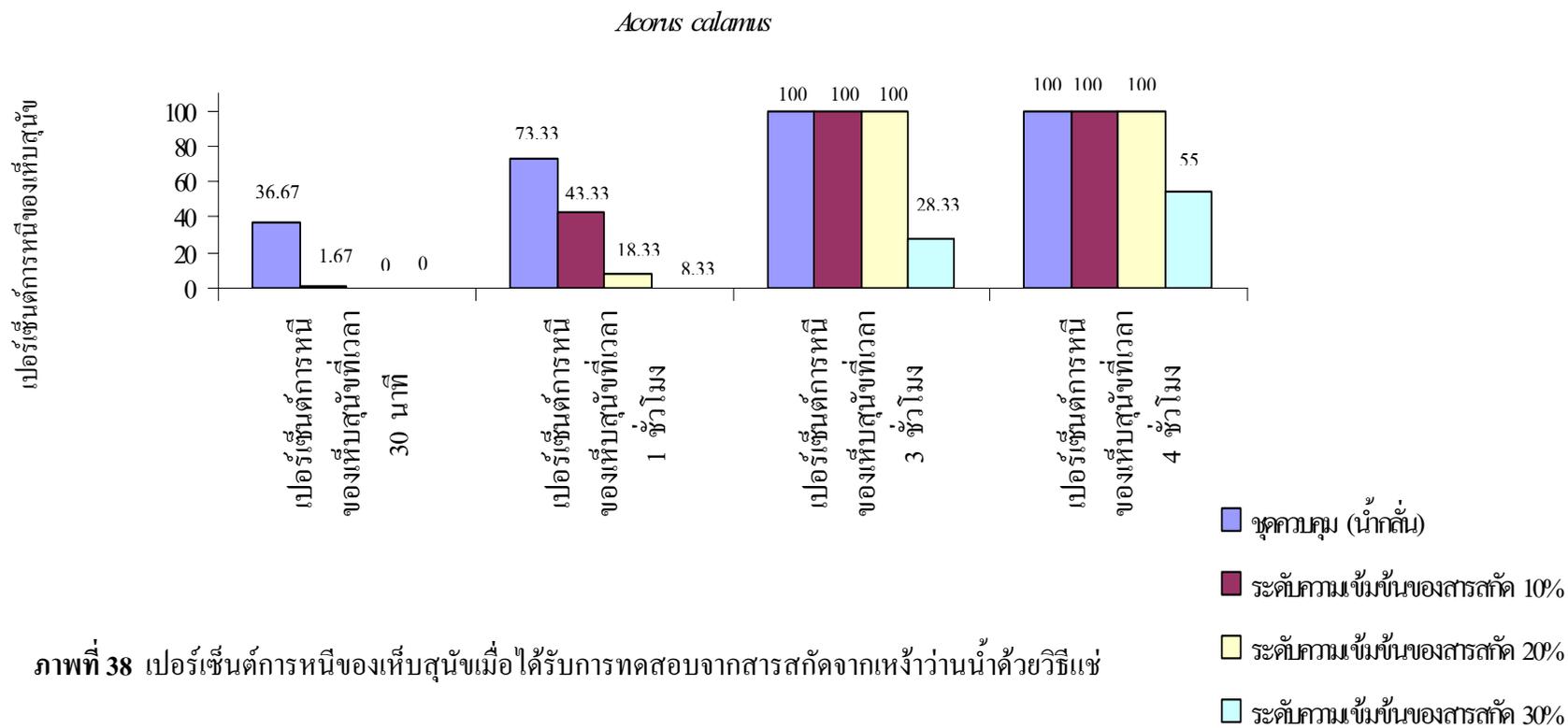
6. ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การหนีของเห็บสุนัข

ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การหนีของเห็บสุนัข เปอร์เซ็นต์การหนีของเห็บสุนัขหลังจากได้รับการทดสอบจากสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ ชุคควบคุม (น้ำกลั่น), 10, 20 และ 30 % w/v ตามลำดับ ณ ช่วงเวลา 30 นาที มีค่าเท่ากับ 36.67 ± 5.16 , 1.67 ± 4.08 , 0.00 ± 0.00 และ 0.00 ± 0.00 % ตามลำดับ ที่ช่วงเวลา 1 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 73.33 ± 5.16 , 43.33 ± 5.16 , 18.33 ± 4.08 และ 8.33 ± 4.08 % ตามลำดับ ที่ช่วงเวลา 3 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 100.00 ± 0.00 , 100.00 ± 0.00 , 100.00 ± 0.00 และ 28.33 ± 4.08 % ตามลำดับ และ 4 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 100.00 ± 0.00 , 100.00 ± 0.00 , 100.00 ± 0.00 และ 55.00 ± 8.37 % ตามลำดับ (ตารางที่ 18 และภาพที่ 38) ซึ่งเปอร์เซ็นต์การหนีของเห็บที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำทั้ง 4 ระดับความเข้มข้น ที่เวลาแตกต่างกันทั้ง 4 ช่วงเวลา มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

ตารางที่ 18 ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์การหนีของเห็บสุนัขเมื่อได้รับการทดสอบจากสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่

ความเข้มข้นของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ (%w/v)	เปอร์เซ็นต์การหนีของเห็บ (%)			
	30 นาที	1 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง
ชุคควบคุม (น้ำกลั่น)	36.67 ± 5.16^a	73.33 ± 5.16^a	100.00 ± 0.00^a	100.00 ± 0.00^a
10	1.67 ± 4.80^b	43.33 ± 5.16^b	100.00 ± 0.00^a	100.00 ± 0.00^a
20	0.00 ± 0.00^b	18.33 ± 4.08^c	100.00 ± 0.00^a	100.00 ± 0.00^a
30	0.00 ± 0.00^b	8.33 ± 4.08^d	28.33 ± 4.08^b	55.00 ± 8.37^b

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $P=0.05$, $n = 10$, $rep = 6$, โดย DMRT (Duncan Multiple Range Test)



ภาพที่ 38 เปอร์เซ็นต์การหนีของเห็บสุนัขเมื่อได้รับการทดสอบจากสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่

7. ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ต่อสัตว์ที่ไม่ใช่เป้าหมาย

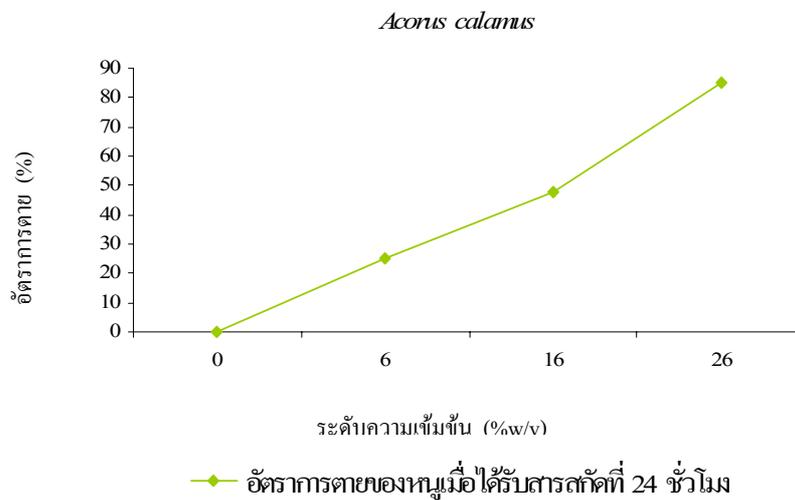
7.1 ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตายของหนูถีบจักร โดยให้ทางกิน

เมื่อนำสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่สกัดด้วยวิธีแช่โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่น), 6, 16 และ 26 % w/v ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การตายของหนูถีบจักรที่ 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.00, 25.00, 47.50 และ 85.00 % w/v ตามลำดับ (ตารางที่ 19 และภาพที่ 39) ซึ่งเปอร์เซ็นต์การตายทุกระดับความเข้มข้นของหนูถีบจักรที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พฤติกรรมหลังจากที่หนูถีบจักรได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ ก่อนตายจะตายมีอาการเกร็ง ชัก และตายในที่สุด

ตารางที่ 19 เปอร์เซ็นต์การตายของหนูถีบจักรหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ความเข้มข้นต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ (%w/v)	เปอร์เซ็นต์การตายของหนูถีบจักร ($\bar{X} \pm SD$)
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	0.00 \pm 0.00 ^a
6	25.00 \pm 5.77 ^b
16	47.50 \pm 5.00 ^c
26	85.00 \pm 5.77 ^d

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $P=0.05$, $n = 10$, $rep = 4$, โดย DMRT (Duncan Multiple Range Test)



ภาพที่ 39 เปอร์เซ็นต์การตายของหนูกิ่งจากรหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ ณ เวลา 24 ชั่วโมง

ระดับความเป็นพิษของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง สมการ regression ได้เท่ากับ $Y = 1.72 + 3.14X$ แทนค่า Y เป็นเปอร์เซ็นต์การตายที่ 50 เปอร์เซนต์จะได้ค่า X ที่เป็นความเข้มข้นในระดับ LD_{50} เท่ากับ 15.38 % w/v (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 20 เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยโดยใช้สารสกัดจากใบว่านน้ำด้วยวิธีแช่ และค่าสมการ regression เปรียบเทียบกันในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	สมการ regression ⁽¹⁾	ค่า LC ₅₀ ⁽²⁾ (%w/v)	r ² ⁽³⁾
24	Y= 1.72 + 3.14X	15.38	0.99

⁽¹⁾ คือ สมการ regression เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขจากรากการได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่

X คือ เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่

Y คือ เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขจากราก

⁽²⁾ LC₅₀ คือ The median lethal concentration

⁽³⁾ r² คือ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient determination) ของเปอร์เซ็นต์การตาย

7.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษโดยวิธีหยอดตาจากสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่

เมื่อนำสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่สกัดด้วยวิธีแช่โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่น), 20, 30 และ 40 % w/v ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าไม่พบอาการผิดปกติจากดวงตาของหนูทั้ง 4 ระดับความเข้มข้น (ตารางที่ 21) ซึ่งดวงตาของหนูทุกระดับความเข้มข้นของหนูถีบจักรทุกช่วงเวลาไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 21 เปรียบเทียบการแสดงผลการแสดงความผิดปกติของดวงตาหนูหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ความเข้มข้นต่างกัน ณ เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดจาก เหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ (%w/v)	การแสดงผลการอักเสบของดวงตาหนู ($\bar{X} \pm SD$)		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	n.d.	n.d.	n.d.
20	n.d.	n.d.	n.d.
30	n.d.	n.d.	n.d.
40	n.d.	n.d.	n.d.

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $P=0.05$, $n = 10$, $rep = 4$,

โดย DMRT (Duncan Multiple Range Test), n.d.= หนูทุกตัวไม่แสดงอาการผิดปกติ

7.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษโดยวิธีทาผิวจากสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่

เมื่อนำสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่สกัดด้วยวิธีแช่โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่น), 40, 70 และ 100% w/v ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าไม่พบอาการผิดปกติจากผิวของหนูทั้ง 4 ระดับความเข้มข้น (ตารางที่ 22) ซึ่งผิวของหนูทุกระดับความเข้มข้นของหนูถีบจักรไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 22 เปอร์เซ็นต์การการแสดงความผิดปกติของผิวหนังหนูหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ความเข้มข้นต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำ (%w/v)	การแสดงอาการอักเสบของผิวหนังหนู ($\bar{X} \pm SD$)
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	n.d.
40	n.d.
70	n.d.
100	n.d.

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $P=0.05$, $n = 10$, $rep = 4$,

โดย DMRT (Duncan Multiple Range Test), n.d.= หนูทุกตัวไม่แสดงอาการผิดปกติ

8. ผลการเปรียบเทียบปริมาณของ β -asarone ระหว่างใบและเหง้าของว่านน้ำด้วยวิธีแช่

จากการทดสอบหาปริมาณของสาร β -asarone ซึ่งเป็นสารที่มีอยู่ปริมาณมากในว่านน้ำ (Mukherjee *et al.*, 2007) โดยทำการส่งตรวจ ณ กลุ่มงานวิจัยวัตถุดิบพืชการเกษตรจากสารธรรมชาติ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยวิธี GC-MS เพื่อเปรียบเทียบปริมาณ β -asarone ของใบและเหง้าของว่านน้ำด้วยวิธีแช่ ได้ผลการทดสอบดังนี้ คือ 5.71 และ 12.25 % w/v ตามลำดับ ตามตารางที่ 23

ตารางที่ 23 ปริมาณของ β -asarone ที่ตรวจหาโดยวิธี GC-MS

ส่วนประกอบของว่านน้ำ	ปริมาณ β -asarone (%w/w)
ใบ	5.71
เหง้า	12.25

วิจารณ์

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ทำลายพิษบางชนิดของเห็บสุนัขเพื่อหา กลไกการทำลายพิษบางอย่างที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตาย เฮอร์เซ็นต์ และการไล่ จากการใช้สาร สกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ แต่อย่างไรก็ตามกลไกเกี่ยวกับการทำงานของเอนไซม์จากการ ได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ต่อเห็บสุนัขยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษามาก่อน

ปัจจุบันการใช้สารเคมีเป็นวิธีที่ประชาชนเลือกใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูของสิ่งมีชีวิต เพิ่มขึ้นอย่างมาก แต่จากการใช้ที่ไม่ถูกวิธีนำมาซึ่งผลต่อสภาพแวดล้อมของผู้ใช้เอง และเป็นการ ทำให้ศัตรูเหล่านั้นสร้างความต้านทาน โดยกลไกการทำงานของเอนไซม์ทำลายพิษที่สิ่งมีชีวิต เหล่านี้สร้างขึ้น (Visetson, 1991) การใช้สารสกัดจากพืชจึงได้เข้ามาเป็นทางเลือกอีกทางให้กับ เกษตรกรที่ช่วยลดปัญหาดังกล่าว

พืชสมุนไพรเป็นพืชที่มีประโยชน์หลายอย่างกล่าวคือ เป็นพืชอาหาร ยารักษาโรค และใช้ ควบคุมศัตรูพืช การนำพืชสมุนไพรมาควบคุมศัตรูพืชมีมาแต่สมัยโบราณเช่น การใช้หนอนตาย อยาก ยาสูบ และหางไหลมาควบคุมแมลง ปัจจุบันพืชสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพในการควบคุม ศัตรูพืชได้หลายชนิด ทำให้เกษตรกรมีทางเลือกเพิ่มมากขึ้น เกษตรกรสามารถนำพืชสมุนไพร มาใช้ได้โดยวิธีเทคโนโลยีชาวบ้านหรือได้จากงานวิจัยของนักวิชาการ การใช้พืชสมุนไพรที่ กว้างขวางมากขึ้นทำให้มีการลดการใช้สารเคมีควบคุมแมลง ลดสารพิษตกค้างต่อสิ่งแวดล้อม และลดการสร้าง ความต้านทานของแมลงต่อสารเคมี (ลาวัลย์, 2542) ความรู้เกี่ยวกับกลไกการ ทำลายพิษจะเป็นแนวทางในการศึกษาแนวโน้มการสร้าง ความต้านทานต่อไป

จากการศึกษาผลของสารสกัดจากว่านน้ำ พบว่าสารสกัดจากว่านน้ำทั้งใบและเหง้ามี ประสิทธิภาพทำให้เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขเพิ่มขึ้นทั้งในระยะตัวกลางวัยและระยะตัวเต็ม วัย และมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ที่ศึกษาทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์เอสเทอร์เอส และกลูตาไทโอน - เอส- ทรานสเฟอเรส มีค่าสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากเหง้า ว่านน้ำที่เพิ่มขึ้น แม้ว่าเห็บสุนัขระหว่างตัวกลางวัยและตัวเต็มวัยที่ได้รับสารจากว่านน้ำส่วน เดียวกันแต่ผลของเปอร์เซ็นต์การตายและผลต่อการทำงานของเอนไซม์เอสเทอร์เอสและกลูตาไท โอน - เอส - ทรานสเฟอเรสที่ระดับต่างกันที่ได้ก็ไม่ได้เหมือนกัน แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากพืช ชนิดเดียวกันก็อาจให้ผลได้แตกต่างกันซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของทิพนาด (2550) ได้ทำการ

ทดลองสารสกัดจากเหง้าโพลีที่มีสารโรดิโนนเป็นองค์ประกอบ มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เอสเทอเรสและกลูตาไธโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสที่ระดับต่างกันในแมลงวันผลไม้ระยะตัวอ่อนและระยะตัวเต็มวัย

ผลของสารสกัดจากวุ้นน้ำที่มีต่อเห็บสุนัข

จากการศึกษาหาเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขเมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธีสกัดแบบ soxhlet extraction กับแบบวิธีแช่ที่มีเอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขที่ทดสอบกับสารสกัดจากวุ้นน้ำที่สกัดด้วยวิธี soxhlet extraction ค่า LC_{50} ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมงเท่ากับ 2.81 และ 2.24 ตามลำดับ มีค่าสูงกว่าการตายของเห็บสุนัขที่ทดสอบกับสารสกัดจากวุ้นน้ำที่สกัดด้วยวิธีแช่ ค่า LC_{50} ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมงเท่ากับ 1.07 และ 0.86 ตามลำดับ นั้นแสดงว่าสารสกัดจากวุ้นน้ำที่สกัดด้วยวิธีแช่มีความเป็นพิษสูงกว่าสารสกัดจากวุ้นน้ำที่สกัดด้วยวิธี soxhlet extraction การที่สารสกัดจากวุ้นน้ำที่สกัดด้วยวิธีแช่มีความเป็นพิษสูงกว่าสารสกัดจากวุ้นน้ำที่สกัดด้วยวิธี soxhlet extraction อาจเป็นเพราะวิธี soxhlet extraction เป็นวิธีที่ใช้ความร้อนจึงอาจทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัว (นันทวัน, 2534)

เมื่อทำการเปรียบเทียบหาเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขที่ทดสอบกับสารสกัดจากใบและเหง้าของวุ้นน้ำด้วยวิธีแช่ พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขที่ทดสอบกับสารสกัดจากใบวุ้นน้ำด้วยวิธีแช่มีค่า LC_{50} ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมงเท่ากับ 7.19 และ 5.93 ตามลำดับ สารสกัดจากเหง้าวุ้นน้ำด้วยวิธีแช่มีค่า LC_{50} ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมงเท่ากับ 1.07 และ 0.86 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่า LC_{50} จากส่วนประกอบของวุ้นน้ำทั้ง 2 ส่วน พบว่าค่า LC_{50} ของสารสกัดจากเหง้าวุ้นน้ำด้วยวิธีแช่มีค่าต่ำกว่าสารสกัดจากใบของวุ้นน้ำด้วยวิธีแช่ นั้นแสดงว่าสารสกัดจากเหง้าวุ้นน้ำด้วยวิธีแช่มีพิษสูงกว่าสารสกัดจากใบวุ้นน้ำด้วยวิธีแช่ ซึ่งสอดคล้องกับผลการเปรียบเทียบปริมาณของ β - asarone ระหว่างใบและเหง้าของวุ้นน้ำด้วยวิธีแช่ ผลการทดสอบส่วนของเหง้าจากวุ้นน้ำมีปริมาณของ β - asarone สูงกว่าส่วนของใบวุ้นน้ำนั้นคือ 12.25 และ 5.71 %w/w ตามลำดับ β - asarone นั้นเป็นสารที่ออกฤทธิ์ในการฆ่าแมลงซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Jacobson *et al.* (1976) ที่ได้นำสาร β - asarone ซึ่งพบได้ในน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าวุ้นน้ำ มาทดสอบกับแมลงวันผลไม้เพศเมีย 3 ชนิดคือ *Ceratitis capitata*, *Dacus cucurbita*, *D. dorsalis* ส่วนแมลงผลไม้ *D. dorsalis* ใช้เพศผู้มาทดสอบ พบว่าสาร β - asarone มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตายของ *Ceratitis capitata*

จากการศึกษาหาเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขในระยะตัวกลางวัยและตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตายสูงขึ้นในกลุ่มทดลองเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่เพิ่มสูงขึ้น โดยพบว่า เห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยมีค่า LC_{50} ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมง เท่ากับ 1.49 และ 1.13 ตามลำดับ ในเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยมีค่า LC_{50} ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมง เท่ากับ 1.07 และ 0.86 ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบค่า LC_{50} ของเห็บสุนัขทั้ง 2 ระยะ ใน 2 ช่วงเวลา พบว่าค่า LC_{50} ของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยสูงกว่าเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย นั่นแสดงว่าสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่มีความเป็นพิษกับเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยมากกว่ากับเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัย Mukherjee *et al.* (2007) รายงานว่าสาร β - asarone มีคุณสมบัติในการไปยับยั้ง acetylcholinesterase เมื่อ acetylcholinesterase ถูกจับและถูกยับยั้งไม่ทำงาน จึงเกิดการสะสมของ acetylcholine ซึ่งเป็น neurotransmitter ขึ้นตามส่วนของร่างกายนั้นๆ acetylcholine ที่สะสมนี้จะไปจับกับ receptor ทั้งชนิด muscarinic และ nicotinic ทำให้เกิดอาการต่างๆ มากมาย เช่น น้ำลายฟูมปาก น้ำตาไหล กล้ามเนื้อลายกระตุก (muscle fasciculations) ไม่มีแรง และเคลื่อนไหวลำบาก (Ramathibodi Poison Center, n.d.) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้ที่เห็บสุนัขในกลุ่มทดลองเกิดการเคลื่อนไหวตัวตลอดเวลา ขากระตุกชักและตายไปในที่สุด ดังนั้นน่าจะเป็นไปได้ว่า การใช้สารสกัดจากว่านน้ำสามารถใช้ควบคุมปริมาณเห็บสุนัขและอาจมีผลช่วยลดประชากรของเห็บสุนัขทั้ง 2 ระยะได้

จากการศึกษาผลของสารสกัดต่อระดับของเอนไซม์เอสเทอร์เอส (esterase activity) ของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยและตัวเต็มวัยเมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ พบว่ากลุ่มทดลองมีระดับแอกติวิตีของเอนไซม์เอสเทอร์เอสสูงตามการเพิ่มของระดับความเข้มข้นของสารสกัด ค่าระดับแอกติวิตีของเอนไซม์เอสเทอร์เอสในเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 0.5 % w/v ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เช่นเดียวกับรายงานของทิพนาถ (2550) พบว่าระดับแอกติวิตีของเอนไซม์เอสเทอร์เอสในระยะตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้สูงตามการเพิ่มของระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากหางไหล เอนไซม์เอสเทอร์เอส เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาระยะที่ 1 โดยเกิด Hydrolysis ซึ่งเอสเทอร์เอสเป็นเอนไซม์ Hydrolase ที่ไปแยกกลุ่มของเอสเทอร์เอส เอนไซม์กลุ่มนี้มีความสามารถในการ Metabolized สารฆ่าแมลง Carboxyl ester เช่นสารในกลุ่มไพริทรอยด์รวมทั้งสารในกลุ่มฟอสเฟตและคาร์บาเมต เอสเทอร์ด้วย ดังนั้น เอนไซม์ชนิดนี้จึงมีส่วนทำให้เกิดการต้านทานต่อสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตผลที่ได้อาจมีพิษน้อยลงหรือเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสารตั้งต้น แล้วจึงถูกกำจัดออกนอกร่างกาย (Visetson, 1991) ในแมลงระดับเอนไซม์เอสเทอร์เอสระดับต่ำ

กว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม หน้าที่ของเอนไซม์นี้ทั่วไปคือ ควบคุมปริมาณของสารที่ผลิตขึ้นในร่างกายให้อยู่ในระดับเหมาะสมและหน้าที่สำคัญในการทำลายพิษของสารแปลกปลอมในแมลงนั้น เอนไซม์นี้พบมากใน ลำไส้ส่วนกลาง, ไขมัน , ท่อมัลพิเจียลของแมลง ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์เอสเทอร์เอสอาจมีผลมาจากการเหนี่ยวนำจากสารพิษต่อกลไกการทำลายสารพิษในอวัยวะดังกล่าว (สุรพล, 2542) ดังนั้นจากการทดลองพบว่าเห็บสุนัขทั้ง 2 ระยะมีการเพิ่มของระดับเอนไซม์เอสเทอร์เอสตามความเข้มข้นของสารสกัด อาจเป็นเพราะแมลงสามารถปรับตัวและมีแนวโน้มเกิดความต้านทานต่อสารได้ ในเห็บสุนัขระยะกลางวัยพบว่ามีค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เอสเทอร์เอสสูงกว่าเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์การตายในเห็บสุนัขทั้ง 2 ระยะ เมื่อเปรียบเทียบค่า LC_{50} ของเห็บสุนัข เห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยมีค่า LC_{50} มากกว่าเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย

จากผลทดลอง พบว่าระดับแอกติวิตีของเอนไซม์เอสเทอร์เอสมีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกันของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยและระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ สุรพล (2544) รายงานว่าแม้ว่าจะเป็นแมลงชนิดเดียวกันแต่การสร้างเอนไซม์เพื่อลดความเป็นพิษจะความแตกต่างกันขึ้นกับ อายุและปริมาณของสารพิษที่ได้รับ

จากการศึกษาระดับแอกติวิตีของเอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสที่ใช้ CDNB เป็นตัวยับยั้งเห็บสุนัขในระยะตัวกลางวัย และระยะตัวเต็มวัยเมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ เห็บสุนัขระยะตัวกลางวัย และระยะตัวเต็มวัยของกลุ่มทดลองมีแอกติวิตีของระดับเอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสสูงขึ้นตามการเพิ่มของระดับความเข้มข้นของสารสกัด เอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสเป็นเอนไซม์ในปฏิกิริยาในระยะที่ 2 โดย glutathione conjugation เป็นการรวมตัวของ xenobiotic product จาก Phase I reaction รวมทั้งสารอันตรายมีขั้วกับ conjugation agent ที่สำคัญในร่างกาย คือ glutathione (GSH) โดยผลที่ได้คือสารจะถูกกำจัดออกนอกร่างกายหรืออาจเกิดการจัดรูปแบบใหม่เป็นกลุ่มเมอแคปทริกที่มีกลุ่มของเอน - อะเซทิลซีสทีนซึ่งสามารถละลายน้ำได้ดี และถูกกำจัดออกนอกร่างกายได้เร็ว (Visetson and Naknatti, 1996) ดังนั้นจากการทดลองนี้พบว่าเห็บสุนัขทั้ง 2 ระยะ มีการเพิ่มระดับเอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มสูงขึ้น อาจเป็นเพราะแมลงสามารถปรับตัวและมีแนวโน้มเกิดความต้านทานต่อสารสกัดได้ ในระดับแอกติวิตีของเอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสในเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ 0.5 %w/v ไม่แตกต่างกับทดลองที่ระดับความเข้มข้นของ

สารสกัดที่ 1.5 % w/v เป็นไปได้ว่าความเข้มข้นที่ระดับ 0.5 %w/v ของสารสกัดสามารถยับยั้ง เอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสในเห็บสุนัขได้ แต่ค่าเอนไซม์จะถูกเหนี่ยวนำให้สูงขึ้นในระดับ 2.5 %w/v ดังนั้นการได้รับสารพิษในปริมาณสูงอาจเหนี่ยวนำในการสร้างเอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสมากกว่าการได้รับสารพิษในความเข้มข้นต่ำ

ในการศึกษาหาปริมาณโปรตีนในเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยและระยะตัวเต็มวัยเมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณโปรตีนที่ระยะตัวกลางวัยที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 0.5 %w/v ไม่แตกต่างกับกลุ่มชุดควบคุมแต่มีความแตกต่างกันเล็กน้อยกับกลุ่มทดลองที่ระดับอื่น โดยค่าโปรตีนลดลงในกลุ่มทดลองที่ระดับความเข้มข้น 1.5 และ 2.5 %w/v การที่ปริมาณโปรตีนลดลงน่าจะมาจากโปรตีนหลายชนิดทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ (Wikipedia, n.d.) โปรตีนในเห็บสุนัขระยะกลางวัยอาจเปลี่ยนไปทำงานเป็นเอนไซม์ทำลายสารพิษ ทำให้ปริมาณโปรตีนในเห็บสุนัขระยะกลางวัยมีปริมาณลดลง ในสุนัขระยะตัวเต็มวัยปริมาณโปรตีนที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1.5 และ 2.5 ไม่แตกต่างกันแต่แตกต่างกันกับกลุ่มชุดควบคุมโดยมีปริมาณโปรตีนที่เพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย เช่นเดียวกับรายงานของประภาพร (2549) พบว่าปริมาณโปรตีนของลูกยุงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ซึ่งทั้ง 24 และ 48 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันภายในชุดการทดลองเพียงเล็กน้อยหลังจากให้สารสกัดหยาบจากหัวหญ้าแห้วหมู

จากการศึกษาผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อไข่ของเห็บสุนัข พบว่าปริมาณไข่เห็บสุนัขที่ได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ในกลุ่มทดลองมีปริมาณไข่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มชุดควบคุมสอดคล้องกับการรายงานของ Nandi *et al.* (2008) สารสกัดจากว่านน้ำสามารถลดการวางไข่ของด้วงถั่ว (*Callasobruchus chinensis* L.) ได้ เมื่อทำการเปรียบเทียบหาเปอร์เซ็นต์การฟักของเห็บสุนัขหลังจากทดสอบกับสารสกัด พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟักมีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มชุดควบคุม นั้นแสดงว่าสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่สามารถลดเปอร์เซ็นต์การฟักของเห็บจากไข่ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

ในการศึกษาหาเปอร์เซ็นต์การหนีของเห็บทดสอบโดยสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การหนีที่เวลาต่างๆ พบว่าที่เวลา 30 นาทีแรก เห็บสุนัขในกลุ่มชุดควบคุมและที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ 10 %w/v สามารถทำให้เห็บสุนัขหนีได้ 36.67 และ 1.67 % ตามลำดับ ส่วนที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆของสารสกัดยังไม่พบการหนีของเห็บ แต่เมื่อเวลาที่ 1

ชั่วโมง เห็นสุนัขทุกระดับความเข้มข้นมีเปอร์เซ็นต์การหนีเพิ่มสูงขึ้น โดยในกลุ่มชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การหนีสูงที่สุด รองมาคือที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 10% 20% และ 30% ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 3 เห็นสุนัขที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดกลุ่มชุดควบคุม 10% และ 20% มีเปอร์เซ็นต์การหนี 100% ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 30% มีเปอร์เซ็นต์การหนีเพิ่มเป็น 28.33% และในชั่วโมงที่ 4 ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดกลุ่มชุดควบคุม 10% และ 20% มีเปอร์เซ็นต์การหนี 100% ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 30% มีเปอร์เซ็นต์การหนีเพิ่มเป็น 55% เมื่อทำการสังเกตในกลุ่มระดับความเข้มข้นของสารสกัด 30% ที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมงไม่มีเห็นในกลุ่มทดลองหนีออกมาจาก petridish plate โดยอาการเห็บที่เหลือนใน petridish plate เริ่มมีอาการหมอบและขามีอาการกระตุกตลอดเวลาและค่อยๆ ตาย อาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากเห็บว่าน น้ำด้วยวิธีแช่มีผลต่อการไล่เห็บสุนัข ดังนั้นจากผลการทดลองนี้น่าจะเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากเห็บว่าน น้ำด้วยวิธีแช่สามารถไล่เห็บจากพื้นที่หรือบริเวณที่มีเห็บได้ โดยดูจากผลการทดลองที่เห็นสุนัขในกลุ่มทดลองมีเปอร์เซ็นต์การหนีน้อยกว่ากลุ่มชุดควบคุม

ผลของสารสกัดจากเห็บว่าน น้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมาย สิ่งมีชีวิตที่ใช้ทดสอบในครั้งนี้ได้ใช้หนูถีบจักรเป็นตัวแทน หนูถีบจักรนิยมนำไปศึกษาและวิจัยทางการแพทย์ ความเป็นพิษ (สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ, 2551)

จากการทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การตายของสัตว์โดยวิธีการให้กิน พบว่าหลังจากได้รับสารสกัดจากเห็บว่าน น้ำด้วยวิธีแช่ค่า LD_{50} ของหนูถีบจักรเท่ากับ 15.38 %w/v โดยหนูถีบจักรที่ได้รับสารสกัดจากเห็บว่าน น้ำกลุ่มชุดควบคุมไม่แสดงอาการและเปอร์เซ็นต์การตาย แต่ที่ในกลุ่มระดับความเข้มข้นของสารสกัด 6, 16 และ 26 %w/v มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของระดับความเข้มข้นของสารสกัด อาการก่อนหนูถีบจักรก่อนตายมีอาการชัก และนอนตายคล้ายลักษณะการตายของเห็บสุนัขเมื่อได้รับสารสกัดจากเห็บว่าน น้ำ เป็นไปได้ว่าสารสกัดจากเห็บว่าน น้ำมีความเป็นพิษกับหนูถีบจักรเช่นเดียวกับเห็บสุนัขซึ่งเกิดอาการกล้ามเนื้อลายกระตุก (Ramathibodi Poison Center, n.d.) การทดลองนี้สอดคล้องกับ Jenner *et al.* (1991) ทำการทดลองกรอกสารสกัดจากเห็บผสมลำต้นว่านน้ำให้หนูขาวกิน พบว่าขนาดที่ทำให้หนูตายเป็นจำนวนครั้งหนึ่งคือ 0.777 กรัม/กิโลกรัม พฤติกรรมหลังจากที่หนูถีบจักรได้รับสารสกัดจากเห็บว่าน น้ำด้วยวิธีแช่ ก่อนตายจะตายมีอาการเกร็ง ชัก และตายในที่สุด สารสกัดจากเมล็ดน้อยหน่า พบว่าขนาดที่ทำให้หนูตายเป็นจำนวนครั้งหนึ่งคือ 1 กรัม/กิโลกรัม และมีผลทำให้เกิดการอักเสบต่อดวงตา (Bhakuni *et al.*, 1969) โรติโนนในทางไหลพบว่ามีขนาดที่ทำให้หนูตายเป็นจำนวน

ครึ่งหนึ่งคือระหว่าง 0.132 - 1.5 กรัม/กิโลกรัม อีกทั้งโรติโนนในหางไหลนั้นมีผลทำให้เกิดความระคายเคืองต่อดวงตาและการอักเสบที่ผิวหนังได้ (WHO, 1992) และเมื่อเทียบกับสารสกัดจากว่านน้ำ สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำแสดงความเป็นพิษที่ต่ำกว่าโรติโนนในหางไหล

จากการทดสอบหาความผิดปกติของดวงตาหนูถีบจักร พบว่าหลังจากหนูถีบจักรได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ ดวงตาหนูถีบจักรไม่แสดงอาการผิดปกติ ผลทดสอบในกลุ่มชุดทดลองที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ทุกระดับความเข้มข้นของสารสกัด แสดงอาการไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

จากการทดสอบหาความผิดปกติที่ผิวหนังหนูถีบจักร พบว่าหลังจากหนูถีบจักรได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ ผิวหนังหนูถีบจักรไม่แสดงอาการผิดปกติ ผลทดสอบในกลุ่มชุดทดลองที่ทุกระดับความเข้มข้นของสารสกัด แสดงอาการไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

จากการศึกษาผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมาย พบว่ามีความเป็นพิษต่อหนูถีบจักรค่า LD_{50} ของหนูถีบจักรเท่ากับ 15.38 %w/v แต่ไม่พบผลแสดงอาการผิดปกติที่ดวงตาและผิวหนังหนูถีบจักรเมื่อทำการทดสอบ

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากว่านน้ำผลของสารสกัดจากว่านน้ำต่อความเป็นพิษและระดับเอนไซม์เอสเทอเรส และ กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสในระยะต่างๆของเห็บสุนัข (*Rhipicephalus sanguineus*) สารสกัดหยาบจากว่านน้ำมีสารสำคัญ คือ α - asarone, β - asarone (Mukherjee *et al.*, 2007), acalamol aldehyde (ลาวัลย์, 2542) asarylaldehyde, eugenol, asarone, acorin และสารอื่นๆ รากของว่านน้ำสามารถแก้ไข้มาลาเรีย แก้หวัด บำรุงหัวใจ เป็นยาระบาย แก้เส้นกระดูกได้ หัวสามารถช่วยขับลมในท้อง แก้ท้องขึ้นอืดเฟ้อได้ แก้โรคกระเพาะอาหาร ใบเมื่อพอกแก้ปวดกล้ามเนื้อ และข้อได้ (สำนักงานข้อมูลสมุนไพร, 2542) ว่านน้ำมีความเป็นพิษต่อแมลง, สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลงได้, มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ การวางไข่และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลง, ยับยั้งการกินอาหารของแมลง (มงคล, 2547) เนื่องจากมีสารที่ออกฤทธิ์ต่อแมลงเช่นสาร β - asarone, acorangermacrone และ asarylaldehyde ซึ่งพบได้ในน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำ มีผลต่อ *Ceratitidis capitata*, *Dacus cucurbita*, *D. dorsalis* (Jacobson *et al.*, 1976) จากการทดลองนี้ไม่ได้เจาะจงที่จะใช้สารใดสารหนึ่งเป็นตัวเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ทำลายพิษในเห็บสุนัข

ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำต่อเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัข เพอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขทั้งสองระยะสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากว่านน้ำที่เพิ่มสูงขึ้นทั้งวิธี soxhlet extraction และวิธีแช่ ทั้งสองส่วนประกอบของว่านน้ำ

ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธี soxhlet extraction ต่อเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย เมื่อนำสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่สกัดด้วยวิธี soxhlet extraction โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่น), 2.5, 3.5 และ 4.5 % w/v ตามลำดับ ณ ช่วงเวลาที่ 24 ชั่วโมง สมการ regression ได้เท่ากับ $Y = 0.13 + 17.73X$ แทนค่า Y เป็นเปอร์เซ็นต์การตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์จะได้ค่า X ที่เป็นความเข้มข้นในระดับ LC_{50} เท่ากับ 2.81% w/v และ ณ ช่วงเวลาที่ 36 ชั่วโมง สมการ regression ได้เท่ากับ $Y = 1.04 + 21.82X$ แทนค่า Y เป็นเปอร์เซ็นต์การตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์จะได้ค่า X ที่เป็นความเข้มข้นในระดับ LC_{50} เท่ากับ 2.24% w/v

ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ต่อเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัย เมื่อนำสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่สกัดด้วยวิธีแช่โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลายที่มีความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่น), 0.5, 1.5 และ 2.5 %w/v ตามลำดับ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง สมการ regression ได้เท่ากับ $Y = 7.28 + 28.65X$ แทนค่า Y เป็นเปอร์เซ็นต์การตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์จะได้ค่า X ที่เป็นความเข้มข้นในระดับ LC_{50} เท่ากับ 1.49% w/v และ ณ ช่วงเวลาที่ 36 ชั่วโมง สมการ regression ได้เท่ากับ $Y = 10.91 + 34.50X$ แทนค่า Y เป็นเปอร์เซ็นต์การตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์จะได้ค่า X ที่เป็นความเข้มข้นในระดับ LC_{50} เท่ากับ 1.13% w/v

ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ต่อการตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย เมื่อนำสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่สกัดด้วยวิธีแช่โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลายที่มีความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่น), 0.5, 1.5 และ 2.5 %w/v ตามลำดับ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง สมการ regression ได้เท่ากับ $Y = 18.36 + 20.48X$ แทนค่า Y เป็นเปอร์เซ็นต์การตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์จะได้ค่า X ที่เป็นความเข้มข้นในระดับ LC_{50} เท่ากับ 1.07 %w/v และ ณ ช่วงเวลาที่ 36 ชั่วโมง สมการ regression ได้เท่ากับ $Y = 21.28 + 33.34X$ แทนค่า Y เป็นเปอร์เซ็นต์การตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์จะได้ค่า X ที่เป็นความเข้มข้นในระดับ LC_{50} เท่ากับ 0.86 %w/v

ผลของสารสกัดจากใบว่านน้ำด้วยวิธีแช่ต่อเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย เมื่อนำสารสกัดจากใบว่านน้ำที่สกัดด้วยวิธีแช่โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลายที่มีความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่น), 6, 9 และ 12 %w/v ตามลำดับ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง สมการ regression ได้เท่ากับ $Y = 1.76 + 6.71X$ แทนค่า Y เป็นเปอร์เซ็นต์การตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์จะได้ค่า X ที่เป็นความเข้มข้นในระดับ LC_{50} เท่ากับ 7.19 %w/v และ ณ ช่วงเวลาที่ 36 ชั่วโมง สมการ regression ได้เท่ากับ $Y = 4.66 + 7.65X$ แทนค่า Y เป็นเปอร์เซ็นต์การตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์จะได้ค่า X ที่เป็นความเข้มข้นในระดับ LC_{50} เท่ากับ 5.93 %w/v

ผลของการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ทำลายพิษ มีดังนี้ เมื่อได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่มีระดับเอนไซม์เอสเทอร์เอสและกลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสมีระดับสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ไปเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิดขึ้นในเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยและระยะตัวเต็มวัย

ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อระดับเอนไซม์เอสเทอร์เอสในเห็บสุนัขระยะกลางวัย ระดับเอนไซม์เอสเทอร์เอสของเห็บสุนัขระยะกลางวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่าน

น้ำที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ ชุดควบคุม (น้ำกลั่น), 0.5, 1.5 และ 2.5 %w/v ตามลำดับ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าของ esterase product เท่ากับ 5.56 ± 0.44 , 19.46 ± 0.43 , 20.39 ± 0.37 และ 23.19 ± 0.17 n mole product/ mg protein/ m ตามลำดับ ซึ่งระดับเอนไซม์ในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อระดับเอนไซม์เอสเทอเรสในเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย ระดับเอนไซม์เอสเทอเรสหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ ชุดควบคุม (น้ำกลั่น), 0.5, 1.5 และ 2.5 %w/v ตามลำดับ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าของ esterase product เท่ากับ 4.08 ± 0.43 , 4.45 ± 0.32 , 7.63 ± 0.53 และ 7.73 ± 0.15 n mole product/ mg protein/ m ตามลำดับ ซึ่งระดับเอนไซม์ในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อระดับเอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสในเห็บในเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ ชุดควบคุม (น้ำกลั่น), 0.5, 1.5 และ 2.5 %w/v ตามลำดับ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าของ conjugated product เท่ากับ 0.012 ± 0.001 , 0.132 ± 0.002 , 0.141 ± 0.005 และ 0.173 ± 0.001 n mole product/ mg protein/ m ตามลำดับ ซึ่งระดับเอนไซม์ในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อระดับเอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสในเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย ระดับเอนไซม์กลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ ชุดควบคุม (น้ำกลั่น), 0.5, 1.5 และ 2.5 % w/v ตามลำดับ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าของ conjugated product ที่เป็นกลุ่มของ mercapturic acid เท่ากับ 0.0025 ± 0.0002 , 0.0034 ± 0.0004 , 0.0032 ± 0.0009 และ 0.0041 ± 0.0002 n mole product/ mg protein/ m ตามลำดับ ซึ่งระดับเอนไซม์ในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อระดับโปรตีนในเห็บสุนัขระยะตัวกลางวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ ชุดควบคุม (น้ำกลั่น), 0.5, 1.5 และ 2.5 %w/v ตามลำดับ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 1.28 ± 0.089 , 1.24 ± 0.160 , 0.92 ± 0.090 และ 0.74 ± 0.011 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งระดับโปรตีนในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อระดับโปรตีนในเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัย ระดับโปรตีนของเห็บสุนัขระยะตัวเต็มวัยหลังจาก

ได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ ชุดควบคุม (น้ำกลั่น), 0.5, 1.5 และ 2.5 %w/v ตามลำดับ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.25 ± 0.002 , 0.34 ± 0.002 , 0.34 ± 0.003 และ 0.30 ± 0.003 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งระดับโปรตีนที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อไข่ของเห็บสุนัข ปริมาณไข่ของเห็บสุนัข หลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ ชุดควบคุม (น้ำกลั่น), 2.5, 3.5 และ 4.5 %w/v ตามลำดับ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 2860 ± 40.96 , 1648 ± 36.91 , 1748 ± 89.36 และ 1849 ± 101.07 ฟอง ตามลำดับ ซึ่งปริมาณไข่ทั้ง 4 ระดับความเข้มข้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% เปอร์เซ็นต์การฟักของเห็บสุนัขหลังจากได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ ชุดควบคุม (น้ำกลั่น), 2.5, 3.5 และ 4.5 %w/v ตามลำดับ ณ ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 100 ± 0.00 , 92.62 ± 0.44 , 74.87 ± 3.32 และ 53.49 ± 2.79 % ตามลำดับ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การฟักทั้ง 4 ระดับมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การหนีของเห็บสุนัข เห็บสุนัข ที่ระดับความเข้มข้นสารสกัดต่ำมีเปอร์เซ็นต์การหนีของเห็บสุนัขมากกว่าที่ระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า เปอร์เซ็นต์การหนีของเห็บสุนัขหลังจากได้รับการทดสอบจากสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ ชุดควบคุม (น้ำกลั่น), 10, 20 และ 30 %w/v ตามลำดับ ณ ช่วงเวลา 30 นาที มีค่าเท่ากับ 36.67 ± 5.16 , 1.67 ± 4.08 , 0.00 ± 0.00 และ 0.00 ± 0.00 % ตามลำดับ ที่ช่วงเวลา 1 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 73.33 ± 5.16 , 43.33 ± 5.16 , 18.33 ± 4.08 และ 8.33 ± 4.08 % ตามลำดับ ที่ช่วงเวลา 3 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 100.00 ± 0.00 , 100.00 ± 0.00 , 100.00 ± 0.00 และ 28.33 ± 4.08 % ตามลำดับ และ 4 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 100.00 ± 0.00 , 100.00 ± 0.00 , 100.00 ± 0.00 และ 55.00 ± 8.37 % ตามลำดับ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การหนีของเห็บที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำทั้ง 4 ระดับความเข้มข้น ที่เวลาแตกต่างกันทั้ง 4 ช่วงเวลา มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

ผลของสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตายของหนูถีบจักร โดยให้ทางกิน ที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่น), 6, 16 และ 26 %w/v ตามลำดับ สมการ regression ได้เท่ากับ $Y = 1.72 + 3.14X$ แทนค่า Y เป็นเปอร์เซ็นต์การตายที่ 50 เปอร์เซนต์จะได้

ค่า X ที่เป็นการเพิ่มความเข้มข้นในระดับ LD₅₀ เท่ากับ 15.38 % w/v พฤติกรรมหลังจากที่หนูถีบจักรได้รับสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ ก่อนตายจะตายมีอาการเกร็ง ชัก และตายในที่สุด

ผลการทดสอบความเป็นพิษโดยวิธีหยอดตาจากสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่น), 20, 30 และ 40 %w/v ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าไม่พบอาการผิดปกติจากดวงตาของหนูทั้ง 4 ระดับความเข้มข้น ดวงตาของหนูทุกระดับความเข้มข้นของหนูถีบจักรทุกช่วงเวลาไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการทดสอบความเป็นพิษโดยวิธีทาผิวจากสารสกัดจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีแช่ ที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่น), 40, 70 และ 100 %w/v ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าไม่พบอาการผิดปกติจากผิวของหนูทั้ง 4 ระดับความเข้มข้น ผิวของหนูทุกระดับความเข้มข้นของหนูถีบจักรไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ปริมาณ β - asarone ของใบและเหง้าของว่านน้ำด้วยวิธีแช่ ได้ผลการทดสอบดังนี้ คือ 5.71 และ 12.25 %w/v ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. ในการทำการวิจัยในครั้งนี้เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากว่านน้ำ โดยใช้สารสกัดหยาบ (crude extracts) แต่ในพืชมีองค์ประกอบของสารอยู่มากมาย ในการวิจัยนี้ไม่ได้จำเพาะเจาะจงสารที่ใช้ในการทดสอบ หากมีผู้สนใจการทดลองของพืชชนิดนี้ ควรทำการทดลองต่อโดยนำไปแยกหาสารเพื่อนำมาศึกษาหาสารที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ทำลายพิษของเห็บสุนัข โดยอาจมีการใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีมาใช้แยกสารจากสารสกัด
2. ควรมีการศึกษาหาเปอร์เซ็นต์การตาย ปริมาณไข่ และเปอร์เซ็นต์การฟักในรุ่นต่อไปของเห็บสุนัข
3. ควรมีการทดสอบกับสุนัขซึ่งเป็นสัตว์เป้าหมายที่จะนำสารสกัดไปใช้จริง
4. ควรมีการทดลองขยายผลในระดับพื้นที่จริง ภายใต้อากาศแวดล้อมจริง ซึ่งมีปัจจัยทางกายภาพอื่นๆ เข้ามาเกี่ยวข้องส่งผลต่อการทดสอบ อาจทำให้ผลของการทดสอบแตกต่างกับผลในห้องปฏิบัติการ
5. ในอนาคตควรมีการพัฒนาสารสกัดในรูปแบบอื่นๆ เช่นนำไปทำเป็นรูปผงเพื่ออำนวยความสะดวกการใช้และเก็บรักษา
6. วิธีการสกัดโดยวิธีแช่ให้ประสิทธิภาพดีควรมีการนำไปประยุกต์ศึกษาใช้ต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2548. **พืชม่าแมลง**. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.
- ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว, ชีระยุทธ กลิ่นสุคนธ์ และปัญญา เต็มเจริญ. 2535. **หลักการทางพิษวิทยา**. ภาควิชาสรีรวิทยาและพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลและมหาวิทยาลัยรังสิต, กรุงเทพฯ.
- ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว, ชีระยุทธ กลิ่นสุคนธ์ และปัญญา เต็มเจริญ. 2539. **หลักการทางพิษวิทยา**. ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.
- ทิพนาด อันตรเสน .2550 .ประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชบางชนิดต่ออัตราการตายและระดับเอนไซม์เอสเทอร์เอส และกลูตาไทโอน - เอส - ทรานสเฟอเรสในแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis* Hendel) วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นันทวัน บุญยะประกฤษ. 2534. การสกัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสำคัญจากสมุนไพร, น .99-136. ใน ถนอมศรี วงศ์รัตนาสถิต, นันทวัน บุญยะประกฤษ, พรรณีภา ชุมศรี, วันดี กฤษณพันธ์, วิภา จิรัจรรย์กุล, อ้อมบุญ ส้วนรัตน์และเอมอร โสมนะพันธ์, บรรณาธิการ .ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ .ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.
- ประภาพร ศรีคง. 2549. ผลของสารสกัดหยาบจากพืชบางชนิดต่อการทำงานของเอนไซม์เอสเทอร์เอสและกลูตาไทโอน-เอส-ทรานสเฟอเรสในยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti* L.). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มงคล แก้วเทพ. 2547. ว่านน้ำสมุนไพรมาแมลง. **จุลสารข้อมูลสมุนไพร**. 21 (4): 8-14.

- รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพรมะเขือเทศ.
สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เรวดี ชูช่วย. 2541. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากตะไคร้หอม (*Cymbopogon winterianus jiewitti*) และสะเดา (*Azadirachta indica* var. *siamensis* Valetton) กับการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ทำลายพิษในเห็บสุนัข (*Rhipicephalus sanguineus* Latreille).
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ลาวัลย์ จิระพงษ์. 2542. พืชสมุนไพรควบคุมศัตรูพืช. กลุ่มงานชีววิถี ส่วนบริหารศัตรูพืช สำนักพัฒนาคุณภาพสินค้าเกษตร.
- สำนักข้อมูลสมุนไพร. 2542. สมุนไพรไม้พุ่มบ้าน (3). บริษัทประชาชนจำกัด, กรุงเทพฯ.
- สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. ม.ป.ป. แหล่งที่มา : http://www.onep.go.th/bdm/webalien/doc/AquaPlant_AS.pdf, 30 กันยายน 2551.
- สุรพล วิเศษสรรงค์. 2542. เอกสารประกอบการสอนวิชาพิษวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุรพล วิเศษสรรงค์. 2544. เอกสารประกอบการสอนวิชากลไกของสารพิษในสัตว์. ภาควิชาสัตววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุรพล วิเศษสรรงค์. 2546. พืชสมุนไพรและกลไกสารพิษจากพืชต่อศัตรู. ภาควิชาสัตววิทยา, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- เสรี ดอนแก้วบัว. 2543. ชีววิทยาและอายุศาสตร์ของกระต่ายและสัตว์ฟันแทะ. สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ. 448 น. แปลจาก Harkness, J.N. and J.E. Wagner, ed. The biology and medicine of rabbits and rodents. Williams & Wilkins, USA.

สำนักสัตวทดลองแห่งชาติ. 2551. Mouse หนูเม้าส์. แหล่งที่มา : http://www.nlac.mahidol.ac.th/nlacwwwtha/spec_outMouse.htm, 22 กรกฎาคม 2551.

อาคม สังข์วรานนท์. 2538. **กีฏวิทยาทางสัตวแพทย์**. วี. บี. บุ๊คเซนเตอร์, กรุงเทพฯ.

Abbott, W.S. 1925. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. **J. Econ. Ent.** 18, 265-267.

Anonymous. n.d. **Tick Tick Anatomy**. Identification Key. Available Source: http://webpages.lincoln.ac.uk/fruedisueli/FR-webpages/parasitology/Ticks/TIK/tick-key/tick_anatomy.htm, August 9, 2008.

Bhakuni, D.S, M.L. Dhar, M.M. Dha, S.H. Dhawan and B.N. 1969. Mehrotra. Screening of Indian plants for biological activities Part II. **Indian J. Exp Biol.** 7: 250-62.

Bhonde, S.B., B.P. Kapadnis, S.G. Deshpande and R.N. Sharma. 2002. Anti-feedant activity of some plant products against *Spodoptera litura* and its enhancement in combination. **J. Medicinal Aromatic Plant Sciences.** 24(3): 721-725.

Bonnette, K.L., D.D. Rodabaugh and C.W. Wilson. 2002. Dermal Irritation and sensitization, pp. 127-201. In M.J. Derelanko and M.A. Hollinger (eds.) Handbook of Toxicology 2 d. ed., CRC Press, America.

Booth, J.E., P. Boyland and P. Sims. 1961. An enzyme from rat liver catalyzing conjugation with Glutathione. **J. Biochem** . 79: 516-524.

Bullangpoti, V. 2007. The novel botanical insecticide, alpha-mangostin from mangosteen pericarp extracts, for control of *Nilaparvata lugens* (Stal.). Ph.D.Thesis, Kasetsart University.

Chopra, R.N., S.L. Nayar and I.C. Chopra. 1956. Glossary of Indian medicinal plants.

Council of Scientific & Industrial Research. New Delhi, India.

Corrado, A. and A. Mantovani. 1966. Transmission of canine hepatitis virus by

Rhipicephalus sanguineus. **Appl. Ent. Ser. B.** 57: 203.

Dauterman, W.C. 1994. Metabolism of toxicant : Phase II reaction, pp. 133-132. *In*

H. Ernest and E.L. Patricia (eds.). **Introduction to Biochemical Toxicology.**

2nd ed., Appleton & Lange. Norwalk, Connecticut.

Department of Medical Sciences. 2002. Thai Herbal Pharmacopoeia Volume II 2000.

Prachachon Co., Ltd, Thailand.

Donia, M.B., E.M. Elmasry and A.W. Qare. 2002. Metabolism and Toxicokinetics of

Xenobiotics, pp. 767-833. *In* M.J. Derelanko and M.A. Hollinger (eds.) Handbook of Toxicology 2 d. ed., CRC Press, America.

Dunn, J.B. 2002. Ocular Toxicology, pp. 203-264. *In* M.J. Derelanko and M.A. Hollinger

(eds.) Handbook of Toxicology 2 d. ed., CRC Press, America.

Green, C.E. and E.B. Breitshwerdt. 1990. Rocky Mountain spotted fever and Q fever. **In**

Infectious Diseases of the Dog and Cat, ed. Greene, C., E. 419-433. Philadelphia.

W.B. Saunders company.

Harwood, R.F. and M.T. James. 1979. **Entomology in human and animal health.** Seventh

Edition. Mac Millan Publishing Co., Inc., New York, U.S.A. 548 pp.

Hodgson, E., P.E. Levi and F.E. Guthrie. 1994. Biochemical Toxicology: Definition and

Scope, pp. 1-9. *In* E. Hodgson and P.E. Levi (eds.) Introduction to biochemical

Toxicology 2 d. ed., Appleton&Lange Norwalk, Connection.

- Jacobs, P.A.H., L.J. Fourie and I.G. Horak. 2004. A laboratory comparison of the life cycles of the dog ticks *Haemaphysalis leachi* and *Rhipicephalus sanguineus*. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**. 71: 15-28.
- Jacobson, M., I. Keiser, D.H. Miyashita and E.J. Harris. 1976. Indian calamus root oil: attractiveness of the constituents to oriental fruit flies, melon flies, and Mediterranean fruit flies. **Lloydia**. 39(6): 412-415.
- Jenner, P.M., E.C. Hagan, J.M. Taylor, E.L. Cook and O.G. Fitzhugh. 1964. Food flavourings and compounds of related structure. I. Acute oral toxicity. **Food Cosmet Toxicol**. 2: 327.
- Kim, S.I., J.Y. Roh, D.H. Kim, H.S. Lee and Y.J. Ahn. 2003. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Stored Products Research**. 39(3): 293-303.
- Koul, O., M.J. Smirle and M.B. Isman. 1990. Asarones from *Acorus calamus* L. oil: their effect on feeding behavior and dietary utilization in *Peridroma saucia*. **J. Chem Ecol**. 16(6): 1911-1920.
- Lesson, H.S. 1951. The recorded distribution of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille). **Bulletin of Entomological Research**. 42: 370-373.
- Lombardini, G. 1950. Biological and anatomical observation on *Rhipicephalus sanguineus*. **Appl. Ent. Ser. B**. 41: 71.
- Lowry, H. *et al.* 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **J. Biol. Chem**. 193: 265-275.
- Mackness, M.I., C.h. walker, D.G. Rowlands and N.R. price. 1983. Esterase activity in

homogenates of three strains of the red rust flour beetle (*Tribolium castaneum*, Herbst). **Comp. Biochem. Physiol.** 74 (1): 65-68.

Mukherjee, P.K, V. Kumar, M. Mal and P.J. Houghton. 2007. In vitro Acetylcholinesterase inhibitory Activity of the Essential Oil from *Acorus calamus* and its Main constituents. **Plant A Med.** 73 (3): 283-285.

Mumcuoglu, K., Y. Burgan, I. Ioffe-Uspensky, I and O Manor. 1993. *Rhipicephalus sanguineus*: observations on the parasitic stage on dogs in the Negev Desert of Israel. Available Source: [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?itool=abstractpkus&db=pub...](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?itool=abstractpkus&db=pub...), November 16, 2006.

Nandi, R., A. Naganagoud and B.V. Patil. 2008. Effect of Sweet flag Rhizome, *Acorus calamus* Linn. formulations with Cow Dung Ash as a Carrier Against *Callasobruchus chinensis* Linn. Pigeonpea. Karnataka J. Agric. Sci., 21(1): 45-48.

Nakakita, H., P. Sittisuang and T. Suzuki. 1994. A new bioassay detecting for IGR activity with larvae of *Tribolium freemani* (Hinton.) (Coleoptera: Tenebrionidae). Proceedings of the International working Conference on Stored-Product Protection, 6th, Canberra, Aust., 17-23 Apr 1994. 824-827.

Niesink, R.J.M., J.D. Vries and M.A. Hollinger. 1996. Toxicology: principles and application. CRC press, Inc, Netherlands.

Ramathibodi Poison Center. n.d. General Approach to Diagnosis and Treatment of Poisoning. Available Source: [http:// www.ra2.mahidol.ac.th](http://www.ra2.mahidol.ac.th), August 16, 2008.

Rao, N.S., R. Rajendran and S. Raguraman. 2002. Antu-feedant and growth inhibitory effects of neem in combination with sweet-flag and pungam extracts on okra

shoot and fruit borer, *Earias vittella* (Fab.). **Journal Entomol Research**. 26(3): 233-238.

Riviere, J.E. 1994. Absorption and distribution, pp 11-48. *In* H. Ernest and E.L. Patricia (eds.). Introduction to Biochemical Toxicology 2d. ed., Appleton&Lange Norwalk, Connection.

Sautet, J. 1936. Invasion domiciliaire de *Rhipicephalus sanguineus* et de *Teutana triangulosa* Role ixodiphage des araignees. **Appl. Ent. Ser. B**. 24: 119.

Schokechy, U. and D. Ono. 1989. Enzymes involved in the metabolism of organophosphorus carbamate and pyrethroid insecticide. Chemistry of Plant Protection 2, Sprinder Verlag Heidelberg. 118-142.

Schmidt, G.H. and M. Strelake. 1994. Effect of *Acorus calamus* (L.) (Araceae) oil and its main compound β -asarone on *Prostephanus truncates* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae). **Journal of Stored Products Research**. 30(3): 227-235.

Sen, S.K. 1933. The vector of canine piroplasmiasis due to *Piroplasma gibsoni*. **Indian Journal of Veterinary Science**. 3: 356-363.

Sharma, R.N., P.P. Vrushali and P.H. Vartak. 1992. Toxic effects of some plant oils and their common constituents on the psyllid pest, *Heteropsylla cubana* (Homoptera:Psyllidae) of social forestry tree *Leucaena leucocephala*. **Applied Entomology and Zoology**. 27(2): 285-287.

Sherlock, I.A. 1964. Note on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Appl. Ent. Ser. B**. 54: 148.

- Shortt, H.E. 1973. *Babesia canis*: the life cycle and laboratory maintenance in its arthropod and mammaline hosts. **International Journal for Parasitology**. 3: 119-148.
- Srivastava, S.C. and M.G.R. Varma. 1964. The culture of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Ixodidae) in the laboratory. **J. Med. Ent.** 1 (2): 154-157.
- Urquhart, G.M., J. Armour, J.L. Duncan, M.D. Dunn and F.W. Jennings. 1987. **Verterinary Parasitology**. Longman Scientific and Technical, London. 286P.
- Vazquez, C.C., Z.G. Vazquez, M.M. Soto. 2006. TRABAJO OF *Rhipicephalus sanguineus* INFESTATION IN DOG IN CUERNAVACA, MORELOS, MEXICO. Available Source: [http// www.scieio.el/sclelo.pld=s0716-07201998000100005&script=sci_arttext&tlng=en](http://www.scieio.el/sclelo.pld=s0716-07201998000100005&script=sci_arttext&tlng=en), July 7, 2006.
- Visetson, S. 1991. **Insecticide resistance mechanism in the red rust flour beetle (*Tribolium castaneum*. Herbst)**. Ph D. Thesis. The University of Sydney. Australia.
- _____, and M. Milne. 2001. Effects of root extract from derris (*Derris elliptica* Benth) on mortality and detoxification enzyme levels in the diamondback moth larvae (*Plutella xylostella* Linn.). *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 35: 157-163.
- _____, and S. Naknatti. 1996. An Improved Neem extraction method on farms in Thailand. **International Neem Conference, Conference**, Feb. 4-9, 1996. The University of Queensland, Gatton College, Australia.
- _____, M. Piansiri, and T. Watanasombat. 2001. **The effects of the Siam weed (*Chromolaena odorata*) extracts and the alpinia (*Alpinia galanga* Stuntz) extracts on some detoxification enzymes of the diamondback moths (*Plutella***

xylostella L.) The 5th National Plant Protection Conference: FOOD PRODUCTS FOR THE WORLD. Thai association, Chemical Businessmen, Plant Protection Association and Association of Entomology and Zoology of Thailand. 21-23 November 2001. Falix River Kew, Kanjanaburi.

WHO. 1992. World Health Organization. Rotenone Health and Safety Guide No. 73.

Wikipedia. n.d. **Protein**. Available Source: <http://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B9%82%E0%B8%9B%E0%B8%A3%E0%B8%95%E0%B8%B5%E0%B8%99>, September 30, 2007.

Yu, S.J. and N. Nguyen. 1992. Detection and Biochemical characterization of insecticide resistance in the diamond back moth Pestic. **Biochem Physiol.** 44: 74-81.

ภาคผนวก

การวิเคราะห์ Esterase โดยวิธี pNPA assay ของ Mackness *et al.* (1983)

Paranitrophenol product = OD/min x 58.8235 x total volume assay (ml)

แทนค่า OD/min ที่วัดได้จากเครื่อง spectrophotometer ด้วย A และปริมาณรวมที่ใช้วิเคราะห์ใน 1 cuvette = 3.0 ml ฉะนั้น ปริมาณเอนไซม์ที่วัดได้ = A x 58.8235x3

การวิเคราะห์ Glutathione - s - transferase โดยวิธี CDNB assay ของ Booth *et al.* (1961)

CDNB product = (OD/min x 1.316) / (9.6 x 1000 n mole)

แทนค่า OD/min ที่วัดได้จากเครื่อง spectrophotometer ด้วย C ฉะนั้น ปริมาณเอนไซม์ที่วัดได้ = C x 1.316 / 9.6 x 1000 n mole

การเตรียมสารเคมี

Phosphate Buffer

0.1 M KH_2PO_4 (Potassium dihydrothiophosphate : M.W = 136.09) เตรียมโดยชั่ง KH_2PO_4 13.609 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

Stock EDTA (1mM EDTA)

1 mM EDTA (Ethyline Dibromide Triacetic acid : M.W = 452.24) เตรียมโดยการชั่ง EDTA จำนวน 0.45224 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

Phosphate buffer with EDTA

นำ Stock 1mM EDTA ที่เตรียมจาก Stock EDTA จำนวน 1 มิลลิลิตร เติมลงใน 0.1 M phosphate buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้สารละลายเข้ากัน

Phosphate buffer with GST reduced form

เตรียมโดยชั่ง GST reduced form ปริมาณ 0.15 กรัม เติมลงใน phosphate buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร คนให้สารละลายจนหมด

0.12 M pNPA (Paranitrophenyl acetate)

เตรียมโดยชั่ง pNPA ปริมาณ 0.1 กรัม แล้วเติมนลงในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % ปริมาตร 5 มิลลิลิตร คนจนสารละลายเข้ากัน

150 mM CDNB (Chlorodinitrobenzene)

เตรียมโดยชั่ง CDNB ปริมาณ 0.152 กรัม แล้วเติมนลงในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % ปริมาตร 5 มิลลิลิตร คนจนสารละลายเข้ากัน

เตรียมสาร Lowry method

1% คอปเปอร์ซัลเฟต

ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml

2% โซเดียมโปแตสเซียมคาร์เตรต

ชั่งโซเดียมโปแตสเซียมคาร์เตรต 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml

2% โซเดียมคาร์บอเนตใน 0.1 นอร์มัล โซเดียมไฮดรอกไซด์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 40 ml ชั่ง โซเดียมคาร์บอเนต 2 กรัม เติมลงไปคนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วปรับเป็นปริมาตร 100 ml

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวชนิดดา ถิณวงศ์พันธ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	3 กุมภาพันธ์ 2524
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	จบปริญญาตรีมหาวิทยาลัยแม่โจ้ (พ.ศ. 2545)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	- เข้าร่วมการประชุมวิชาการนานาชาติ The 5 th International Symposium on Biocontrol and Biothechnology, November 1-3, 2007
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	- ทุนอุดหนุนการค้นคว้าและวิจัยประเภทวิทยานิพนธ์ - ทุนสนับสนุนการเสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าในการประชุมวิชาการนานาชาติ The 5 th International Symposium on Biocontrol and Biothechnology, November 1-3, 2007