ผลของอาหารผสมสารสกัดหยาบรางจืดต่อเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส และอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในปลาตะเพียนขาวเมื่อได้รับพาราควอท

Effects of Babbler's Bill leaf (*Thunbergia laurifolia* Linn) crude extract on Glutathione S- transferase and Acetylcholinesterase enzymes in Silver Barb (*Barbonymus gonionotus*) exposed to paraquat

วิญญู บุญประเสริฐ[1], ประจวบ ฉายบุ[2], จงกล พรมยะ[2] เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน[2] และชนกันต์ จิตมนัส[2]

[1]นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

2อาจารย์ประจำคณะเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบรางจืดต่อการลดพิษพาราควอท โดยใช้ระดับเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส (GST) และอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) เป็นสิ่งบ่งชี้ถึงความผิดปกติ ทดลองให้อาหารผสมสารสกัดหยาบรางจืดในอัตรา 0, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ แก่ปลาตะเพียนขาว จากนั้นให้ปลาสัมผัสกับพาราควอท ในระดับความเข้มข้น 0.1%ของ LC_{50} (20.48 ml/l) เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าระดับ GST มีค่าเท่ากับ 0.149 ± 0.04, 0.239 ± 0.02, 0.152 ± 0.02, 0.219 ± 0.06 และ 0.133 ± 0.08 n mole product/mg protein/ml ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ส่วน AChE เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ระดับ AChE ของปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบรางจืดอัตราส่วน 0, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์มีค่าเท่ากับ 0.130 ± 0.02, 0.139 ± 0.04, 0.139 ± 0.01, 0.188 ± 0.07 และ 0.131 ± 0.04 n mole product/mg protein/ml ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) เช่นกัน ความสามารถของอาหารผสมรางจืดในการลดพิษของพาราควอทสำหรับปลาตะเพียนขาวยังเห็นผลไม่ชัดเจน ซึ่งอาจเกิดจากเหตุผลหลายประการเช่น การออกฤทธิ์ของรางจืด การสกัดสารสำคัญจากรางจืดที่มีผลต่อการลดพิษ เป็นต้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผล

คำสำคัญ : ปลาตะเพียนขาว รางจืด พาราควอท กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส

Abstract

This study aimed to determine the effect of Babbler's Bill leaf (*Thunbergia laurifolia* Linn) crude extract to detoxify paraquat in Silver barb (*Barbonymus gonionotus*) using Glutathione-s transferase (GST) and Acetylcholinesterase (AChE) enzymes as indicators. Fish were fed with commercial diets supplemented with 0%, 10%, 15% and 20% Babbler's Bill leaf crude extract. GST and AChE levels were examined every week. At the end of experiment, GSTs levels were 0.149 ± 0.04, 0.239 ± 0.02, 0.152 ± 0.02, 0.219 ± 0.06, and 0.133 ± 0.08 n mole product/mg protein/ml in

fish fed with 0%, 10%, 15%, and 20% Babbler's Bill leaf crude extract, respectively which were not significantly different among four groups (p>0.05). In addition, there were not significant differences in AChE at the end of experiment. AchEs were 0.130 ± 0.02, 0.139 ± 0.04, 0.139 ± 0.01, 0.188 ± 0.07, and 0.131 ± 0.04 n mole product/mg protein/ml in fish fed with 0%, 10%, 15%, and 20% Babbler's Bill leaf crude extract, respectively . In summary, the diet containing Babbler's Bill leaf crude extract cannot generate detoxication of paraquat in Silver barb. The possible explanation could be inaccurate dosage of either paraquat or Babbler's Bill leaf activity and Babbler's Bill leaf extraction methods.

Keywords: Silver Barb, *Thunbergia laurifolia* Linn, Paraquat, Glutathione-s transferase, Acetylcholinesterase

คำนำ

พาราควอท (1, 1-dimetthyl-4,4-bipyridylium dichloride) เป็นสารปราบวัชพืชหลังการงอกที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย (Melchiorri,1996) เพื่อป้องกันความเสียหายของผลผลิตจากศัตรูพืชและเร่งผลิตพืชผลทางการเกษตรสนองความต้องการอาหารของผู้บริโภคที่นับวันจะเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากพาราควอทละลายน้ำได้ง่าย ทำให้เกิดการปนเปื้อนของสารพิษนี้ลงสู่แหล่งน้ำสูง เกิดการดูดซับและสะสมในแพลงค์ตอนพืช แพลงค์ตอนสัตว์ ตะกอนดินและสัตว์น้ำ นอกจากพาราควอททำให้เนื้อเยื่อตับ ไต และเหงือกปลา ถูกทำลาย (Tortorelli *et al.,*1990) การสะสมในตัวสัตว์น้ำอาจจะส่งผลร้ายต่อผู้บริโภคได้

ปลาตะเพียนขาว (*Barbonymus gonionotus*) เป็นปลาน้ำจืดที่พบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำ จึงน่าจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของพาราควอทในแหล่งน้ำได้ เมื่อพาราควอทเข้าสู่ร่างกายทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species) และ lipid peroxidation ขึ้นมากมาย (Usanawarong *et al*, 2000) มีรายงานว่าพาราควอททำให้ปลาช่อนพันตาต้า (*Channa punctata*) มีเมทาโลไธโอนีนเพิ่มสูงขึ้นในขณะที่ระดับกลูตาไธโอนลดลง (Parvez and Raisuddin, 2006) นอกจากนี้พาราควอทยังยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Acetylcholinesterase (AChE) ในปลาคาร์พ การที่ AChE ลดลงหรือถูกจับโดยสารพิษทำให้อะซิทิลโคลีน (ACh) ไม่ถูกไฮโดรไลซ์จะมีอะซิทิลโคลีนสะสมมากขึ้น และกระตุ้นให้เซลล์ประสาท หรือกล้ามเนื้อบริเวณนั้นทำงานอย่างต่อเนื่อง มีผลทำให้เกิดความเหนื่อยล้าและเกิดอาการตะคริวของกล้ามเนื้ออย่างต่อเนื่องและรุนแรงกล้ามเนื้อ (Gabryelak and Klekot, 1985)นักวิจัยได้พยายามที่จะลดอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species) ที่เกิดจากพาราควอท โดยใช้สารกำจัดอนุมูลอิสระ หรือทำลายอนุมูลอิสระ (Antioxidants, Quencher หรือ Scavenger) เช่น วิตามินอี วิตามินซี ไนอาซิน N-acetylcysteine เบต้าแคโรทีน และกลูตาไธโอน แต่พบว่าได้ผลน้อย อาจเป็นเพราะความสามารถที่จะผ่านชั้นผนังเซลล์ได้น้อยหรือความเร็วในการกำจัดพิษพาราควอทจากเซลล์ช้า (Melchiorri, 1995)

รางจืด (*Thunbergia Laurifolia* Linn.) เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณใช้ถอนพิษสัตว์กัดต่อย เห็ดพิษ สารเบื่อหนู และสารกำจัดแมลง (Utokaphad,1982) รวมทั้งใช้รักษาผู้ป่วยพิษสุราเรื้อรังหรือรับประทานสัตว์ที่มีพิษ เช่น ปลาปักเป้าทะเล และแมงดาทะเล เข้าไป นอกจากนี้มีการทดลองนำสารสกัดจากใบรางจืดที่ได้จากการนำรางจืดสดมาปั่นให้ละเอียด ใส่น้ำ 3 เท่าของปริมาณรางจืดที่ปั่นได้ ใช้เวลาคั้นใบรางจืด 10 นาที กรองด้วยผ้าขาวบางแล้วนำมาลดพิษหนูขาวที่ได้รับพิษจากพาราควอทโดยการฉีดเข้าช่องท้อง 6 ซีซีต่อน้ำหนักหนูขาว 1กิโลกรัม พบว่าระดับเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสในน้ำเลือดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (Usanawarong *et al*, 2001) แต่ยังไม่มีรายงานการใช้รางจืดเพื่อการลดพิษในปลา

การวิจัยนี้เป็นการใช้สารสกัดหยาบรางจืดผสมอาหารเพื่อการลดพิษของพาราควอท โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระบบเอนไซม์ทำลายพิษบางชนิด เช่น กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส และเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

นำปลาตะเพียนขาว ขนาด 3 – 5 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 0.75 ± 0.23 กรัม มาพักในตู้กระจกขนาด 25 นิ้ว ที่มีน้ำปราศจากคลอรีนและเติมอากาศต่อเนื่อง ปริมาตรน้ำ 31.25 ลิตร (อุณหภูมิเฉลี่ย 30.5 ºC, pH 7.5, DO 4.2, แอมโมเนีย 0.8, ไนไตรท์ 1.8, ไนเตรท 0.9, ออร์โทฟอสเฟส 0.9 mg/l) ในห้องทดลองคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ นาน 7 วันก่อนเริ่มทดลอง

2. การเตรียมอาหารผสมสารสกัดหยาบรางจืด

นำสมุนไพรรางจืดมาประมาณ 10 กิโลกรัม ไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บดเป็นผงละเอียด แล้วร่อนผ่านตะแกรงหมายเลข 20 จากนั้นสกัดสมุนไพรตามวิธีการของ Herunsalee and Direkbusarakom (1993) โดยชั่งผงรางจืด 100 กรัม หมักด้วยแอลกอฮอล์ 95% ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นาน 5 วัน กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรอง No.1 นำส่วนใสที่กรองได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง evaporator จากนั้นเติมสาร polyvinyl povidone ปริมาตร 4 เท่าของน้ำหนักสารสกัด โดยละลาย polyvinyl povidone ด้วยแอลกอฮอล์ 95% จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง evaporator จนแห้ง ก็จะได้สารสกัดหยาบรางจืด เพื่อใช้ในการทดลอง

3. การให้สารพิษพาราควอท

โดยปล่อยปลาตะเพียนขาว 100 ตัว/ตู้ ให้อาหารผสมรางจืด โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ ระยะเวลาในการเลี้ยงเวลา 4 สัปดาห์ แต่ละชุดการทดลองแบ่งออกเป็นดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 คือ การให้อาหารชุดควบคุมร่วมกับการเลี้ยงในน้ำปราศจากพาราควอท

ชุดการทดลองที่ 2 คือ การให้อาหารชุดควบคุมร่วมกับการเลี้ยงในน้ำที่ปนเปื้อนสารพิษพาราควอท

ชุดการทดลองที่ 3 คือ การให้อาหารที่ผสมรางจืด 10% ร่วมกับการเลี้ยงในน้ำที่ปนเปื้อนสารพิษพาราควอท

ชุดการทดลองที่ 4 คือ การให้อาหารที่ผสมรางจืด 15% ร่วมกับการเลี้ยงในน้ำที่ปนเปื้อนสารพิษพาราควอท ชุดการทดลองที่ 5 คือ การให้อาหารที่ผสมรางจืด 20% ร่วมกับการเลี้ยงในน้ำที่ปนเปื้อนสารพิษพาราควอท ความเข้มข้นของพาราควอทที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ เท่ากับ 0.1%ของ LC_{50} (20.48 ml/l) ซึ่งได้ทดลองโดย Moonkhow (2009) ซึ่งเป็นปริมาณที่ทำให้เกิดพิษในระดับต่ำต่อปลาตะเพียนขาว แช่ตลอดการทดลอง 4 สัปดาห์

4. การตรวจวัดระดับเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรสจากปลาตะเพียนขาว

นำตัวอย่างปลาตะเพียนขาวจำนวน 10 ตัวต่อชุดการทดลองมาตรวจวัดระดับเอนไซม์ โดยสลบปลาทดลองด้วยสารละลายน้ำมันกานพลู 40 พีพีเอ็ม (Mahawong *et al*, 2006) จากนั้นสกัดเอนไซม์ตามวิธีการสกัดเอนไซม์ดัดแปลงจากวิธีการของ Feng *et al*. (1995); Karoly *et al*. (1996) ; Visetson and Mantana, (2001) ; Yang *et al*. (2000) and Visetson (2001) โดยตัดเหงือกปลา 0.05 กรัมเติม polyvinylpol-pyrrolidone 0.025 กรัม ใส่ลงในโกร่งที่แช่เย็น บดให้ละเอียด แล้วเติม GSH-reduce form 3 มิลลิลิตร นำมากรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวที่กรองได้ใส่หลอด centrifuge แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที ดูดส่วนใสข้างบนใส่หลอดพลาสติก ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อใช้วัดเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรสต่อไป

การตรวจวัดระดับเอนไซม์ กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส (glutathione s-transferase) โดยใช้เครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นแสง 340 นาโนเมตร ตรวจวัดค่าการดูดกลืนของแสง monochloro-nitrobenzene glutathione ซึ่ง dichloronitro-benzene จะเกิดปฏิกิริยารวมตัวกับ glutathione โดยมีเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Booth *et al*,1996)

5. การตรวจวัดระดับเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส

นำตัวอย่างปลาตะเพียนขาวจำนวน 10 ตัวต่อชุดการทดลองมาตรวจวัดระดับเอนไซม์ โดยสลบปลาทดลองด้วยสารละลายน้ำมันกานพลู 40 พีพีเอ็ม (Mahawong *et al*, 2006) จากนั้นนำสมองของปลา 20 มิลลิกรัม เก็บใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทุกขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างเอนไซม์ได้ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ประมาณ 4 องศาเซลเซียส บดใน 0.1 M Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วปั่นที่ความเร็ว 3,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเก็บของเหลวใสด้านบนไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ตรวจหาระดับอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสต่อไป

ตรวจหาเอนไซม์โดยดัดแปลงจากวิธีของ Ellman *et al*. (1961) และ Ferrari *et al*. (2004) โดยใส่ 5, 5' dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 1.3 มิลลิลิตรในทุกหลอดการทดลอง จากนั้นเติมเอนไซม์อะซิทิล-โคลีนเอสเทอเรส และตัวอย่างที่สกัดได้ปริมาตร 63 และ130 µl ตามลำดับ ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที วัดระดับอะซิทิล-โคลีนเอสเทอเรสโดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร และคำนวณการทำงานของเอนไซม์ดังนี้

$$R = \frac{\Delta A}{} \times \frac{1}{1.36\ (62.5/1492.5)} = 4.22\ (10^{-5})\ \frac{\Delta A}{C_0}$$

R = rate in moles substrate hydrolyzed per min per g of tussue

ΔA = change in absorbance per min

C_0 = original concentration of tissue (mg/ml)

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ผลของอาหารผสมสารสกัดหยาบรางจืดต่อระดับเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรสและเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองโดยวิเคราะห์ One-way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Post Hoc Test ตามวิธีของ Duncan โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชั่น 11.5

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลของอาหารผสมสารสกัดหยาบรางจืดต่อระดับเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรสเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส (GST) ทำหน้าที่ในการต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นเมื่อปลาตะเพียนขาวสัมผัสกับพาราควอทจะมีระดับเอนไซม์ GST สูงขึ้น (ตาราง 1) เช่นเดียวกับปลานิลที่สัมผัสกับพาราควอทซึ่งมีระดับของเอนไซม์ GST เพิ่มสูงขึ้น (Figueiredo-Fernandes *et al*., 2006) และปลาที่ได้รับอาหารผสมรางจืดในชุดการทดลองที่ 3 – 5 มีแนวโน้มที่ระดับ GST ลดลงในสัปดาห์ที่ 1 แสดงว่า น่าจะช่วยลดพิษของพาราควอทได้ ทำให้เอนไซม์ GST ของปลาในกลุ่มดังกล่าวมีค่าต่ำกว่าชุดที่ไม่ได้รับอาหารผสมรางจืด อย่างไรก็ตาม ผลของมลพิษที่มีต่อเอนไซม์ GST ยังไม่มีข้อพิสูจน์ที่แน่นอน กล่าวคือ บางครั้งสารพิษไม่ทำให้ GST เปลี่ยนแปลงในขณะที่บางครั้งเกิดการยับยั้งปฏิกิริยาของ GST (Figueiredo-Fernandes *et al*., 2006) ดังเช่น งานวิจัยของ Martinez *et al*.(1996) ซึ่งรายงานว่า GST ของปลา Gilthead seabream (*Sparus aurata*) ที่ได้รับพาราควอทลดลง การลดลงของ GST ในปลาตะเพียนขาวแต่ละชุดการทดลองอาจเกิดจากการสลายตัวที่รวดเร็วของพาราควอท รวมทั้งความสามารถละลายน้ำได้ดีของพาราควอท เอนไซม์ทำลายพิษในระยะที่ 1 จึงสามารถขับออกภายนอกร่างกายได้ทันที โดยไม่สามารถเข้าสู่ปฏิกิริยาการทำลายพิษในระยะที่ 2 (เอนไซม์ กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส) ซึ่งทำให้สารพาราควอทให้มีความเป็นพิษต่อปลาน้อยลงและไม่สามารถทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) ส่วน Stegeman *et al.* (1992) กล่าวว่า เพศและฤดูกาลจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ GST

รางจืดนอกจากใช้สำหรับถอนพิษยาฆ่าแมลงแล้ว ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Chan and Lim, 2006) จะเห็นได้ว่า ปลาตะเพียนกลุ่มที่ได้รับรางจืดมีแนวโน้มของเอนไซม์ GST สูงขึ้น แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ปัญหาของการใช้สมุนไพรในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่สำคัญคือ ความไม่คงตัวของสารสำคัญในสมุนไพรและวิธีการในการสกัด ทำให้ประสิทธิภาพของสมุนไพรไม่ชัดเจน

Rojtinnakorn *et al.* (2009) รายงานว่า การสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรโดยใช้เอธานอล 50 เปอร์เซ็นต์ สามารถสกัดสารสำคัญต่าง ๆ จากสมุนไพรได้มากกว่าเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ หรือน้ำบริสุทธิ์

Table 1 Values (mean±SD) of glutathione s-transferase in Silver Barb (*Babonymus gonionotus*) fed with commercial diets supplementary for 4 weeks

Week	GST (n mole product/mg protein/ml)				
	T1	T2	T3	T4	T5
1	0.149±0.04	0.239±0.02	0.152±0.02	0.219±0.06	0.133±0.08
2	0.136±0.03	0.109±0.02	0.139±0.01	0.152±0.03	0.164±0.08
3	0.188±0.07	0.158±0.03	0.231±0.04	0.228±0.02	0.249±0.07
4	0.130±0.02	0.139±0.04	0.139±0.01	0.188±0.07	0.131±0.04

Data express as mean ± SD; there were no differences in any treatment ($P > 0.05$).

2. ผลของอาหารผสมสารสกัดหยาบรางจืดต่อระดับเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (AchE)

สารพิษปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์แกนโนฟอสเฟตและคาร์บาเมท มีผลต่อการยับยั้ง AChE ในปลา (Monserrat *et al*., 2002) Glusczak *et al*. (2007) รายงานว่า AChE มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญใน silver catfish (*Rhamdia quelen)* ที่สัมผัสกับยาปราบวัชพืชไกลโฟเซตนั้นเป็นที่รู้จักแพร่หลายในชื่อการค้า “ราวนด์-อัพ” (Roundup) Chitmanat *et al.* (2008) กล่าวว่า การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ AChE ในหอยขมอาจจะใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของยาปราบศัตรูพืชในแหล่งน้ำธรรมชาติ แม้ว่าระดับเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) ในปลาไนที่ได้รับพาราควอท 5 ppm จะลดลง 50% แต่หลังจากนั้นสองสัปดาห์เอนไซม์นี้จะเพิ่มสูงถึง 130% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Stegeman *et al.,* 1992) เช่นเดียวกับงานทดลองนี้ซึ่งระดับเอนไซม์ AChE ที่สูงขึ้นอาจจะเกิดจากการสร้างใหม่ของเอนไซม์เนื่องจากสัตว์น้ำสามารถปรับตัวได้แล้ว โดยปลาที่มีขนาดเล็กจะมีระดับการคืนสภาพของการทำงานของเอนไซม์ AChE ที่เร็ว (Rath and Misra,1981) ดังนั้นจึงควรมีการทดสอบเพิ่มเติมโดยสุ่มปลาเพื่อวัดการทำงานของเอนไซม์ในเวลาที่สั้นลงระดับชั่วโมงหลังจากปลาสัมผัสกับพาราควอท ซึ่งอาจจะทำให้ผลการทำงานของรางจืดในการลดความเป็นพิษของพาราควอทได้ชัดเจนมากขึ้น Chaiyasing (2005) แนะนำให้มีการให้สารสกัดรางจืดแก่หนูทดลองก่อนได้รับพิษจากยาฆ่าแมลง และความสามารถในการต้านพิษจะเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารสกัดรางจืดที่ได้รับ

Table 2 Values (mean±SD) of Acetylcholinesterase enzymes in Silver Barb (*Babonymus gonionotus*) fed with commercial diets supplementary for 4 weeks

Week	AChE(n mole product/mg protein/ml)				
	T1	T2	T3	T4	T5
1	2.800±0.09	2.873±0.05	2.847±0.02	2.807±0.09	2.800±0.12
2	2.707±0.09	2.763±0.01	2.467±0.46	2.687±0.02	2.713±0.06
3	2.743±0.18	2.997±0.61	2.883±0.42	2.970±0.19	3.170±0.70
4	2.467±0.62	2.226±0.85	2.357±0.04	2.587±0.40	2.363±0.37

Data express as mean ± SD; there were no differences in any treatment ($P > 0.05$).

สรุปผลการทดลอง

ความสามารถของอาหารผสมรางจืดในการลดพิษของพาราควอทสำหรับปลาตะเพียนขาว ยังเห็นผลไม่ชัดเจน จากผลการทดลองที่ได้ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกและปฏิกิริยาของเอนไซม์ทำลายพิษในแต่ละระยะของปลาตะเพียนขาวเมื่อได้รับพาราควอท การสะสมของพาราควอทในอวัยวะต่าง ๆ ของตัวปลา รวมทั้งความเป็นพิษหรือผลข้างเคียงของรางจืดที่มีผลต่อสัตว์น้ำ นอกจากนี้ควรศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้รางจืดร่วมกับสารชนิดอื่น ๆ หรือวิธีอื่น ๆ ในการลดความเป็นพิษดังกล่าว

เอกสารอ้างอิง

Booth, J., Boyland, E., and Sims, P. 1996. An enzyme from rat liver catalyzing conjugation with glutathione. Biochem. J. 79: 515 – 524.

Chaiyasing, K. 2005. Effect of *Thunbegia Laurifolia* left extract on methomyl-induced cholinesterase inhibition. Master'sThesis. Chiangmai University. CMU-eThesis. Available from http://library.cmu.ac.th/digital_collection/etheses/fulltext.php?id=14006# [in Thai].

Chan, E.W.C., and Lim, Y.Y. 2006. Antioxidant activity of *Thunbergia laurifolia* tea. Journal of Tropical Forest Science 18 (2): 130 – 136.

Chitmanat, C, Prakobsin, N., Chaibu, P., and Traichaiyaporn, S. 2008. The Use of acetylcholinesterase inhibition in river snails (*Sinotaia ingallsiana*) to determine the pesticide contamination in the Upper Ping River. Int. J. Agri. Biol., 10: 658 – 660.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andrea, V., and Featherstone, R. N. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical pharmacology. 7 : 88 – 95.

Martinez-Lara, E., Toribio, F., Lopez-Barea, J., and Barcena, J.A. 1996. Glutathione-S-transferase isoenzyme patterns in the gilthead seabream (*Sparus aurata*) exposed to environmental contaminants. Comp. Biochem. Physiol. 113: 215 – 220.

Ferrari, A., Venturino, A., and Pechen de D'Angelo, A. M. 2004. Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*). Ecotoxicology and Environmental safety. 57: 402 – 425.

Figueiredo-Fernandes, A., Fontainhas-Fernandes, A., Peixoto, F., Rocha, E., and Reis-Henriques, M.A. 2006. Effects of gender and temperature on oxidative stress enzymes in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. Pesticide Biochemistry and Physiology. 85: 97 – 103.

Feng, R., Chen, W., and Isman, M. B. 1995. Synergism of malathion and inhibition of midgut esterase activities by an extract from *Melia toosendan* (Meliaceae). Pest. Biochem. and Physiol. 53: 34 – 41.

Gabryelak, T., and Klekot, J. 1985. The effect of paraquat on the peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. Comp Biochem Physiol 81: 415 – 418.

Glusczak, L., Miron, D.S., Moraes, B.S., Simoes, R.R., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., and Loro, V.L. 2007. Acute effects of glyphosate herbiside on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). Comp. Biochem. Physiol. C. 146: 519 – 524.

Herunsalee, A., and Direkbusarakom, S. 1993. Investigation on the bioactive Thai medicical plants to virus in tiger prawns. On Conference marine Biotechnology in the Asian Pacific Region. 104 – 106.

Karoly, E. D., Rose, R. L., Thompson, D. M., Hodgson, E., Rock, G. C., and Roe, R.M. 1996. Monooxygenase, esterase, and glutathione transferase activity associated with azinphosmethyl resistance in the tufted apple bud moth, *Platynota idaeusalis*. Pest. Biochem. and Physiol. 55: 109 – 121.

Mahawong, N., Khachaphichat, M., Apitanakul, P., and Boonprasert, P. 2006. Experiment of Using Clove oil as an Anesthetic in Several Commercially Important Freshwater Fish. Extension

Paper No.1/2006. Phayao Inland Fisheries Research and Development Center, 15 p. [in Thai]

Melchiorri. 1995. Potent Protective Effect of Melatonin on in Vivo Paraquatinduced Oxidative Damage in rats. Life Science. 56(2): 83 – 89.

Melchiorri. 1996. Paraquat Toxicity and Oxidation Damage Reduction by Melatonin. Biochemical Pharmacology. 51: 1095 – 1099.

Monserrat, J.M., Bainchini, A., and Bainy, A.C.D. 2002. Kinetic and toxicological Characteristics of acetylcholinesterase from the gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic speices. Mar. Environ. Res. 54 : 781-785 p.

Moonkhow, T., 2009. Impact of Glyphosate and Paraquat on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Common Silver Barb (*Barbodes gonionotus*). Master's Thesis. Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources. Maejo University, Chiangmai. 42 – 43.

Rath, S., and Misra, B.N. 1981. Toxicological effects of dichlorvos (DDVP) on brain and liver acetylcholinesterase (AChE) activity of *Tilapia mossambica*, peters Toxicology 19(3) : 239 – 245.

Rojtinnakorn J., Inphen T., Gadkong T., Wongkit N., Khunkaew, P., and Jabprakon, A. 2009. The use of herb extracts replacement antibiotic for antifungal in freshwater fish hatchery. IRPUS 2009 The Thailand Research Fund (TRF) Code: I152D03010 [in Thai].

Stegeman, J.J., Brouwer, M., Richard, T.D.G., Forlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., and van Veld, P.A.1992, Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect, in: H. Huggett (Ed.), Biomarkers. 235 – 335.

Parvez, S., and Raisuddin, S. 2006. Effects of Paraquat on the Freshwater Fish, *Channa punctata* (Bloch): Non-Enzymatic Antioxidants as Biomarkers of Exposure. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 50(3): 392 – 397.

Tortorelli, M.C., Hernandez, D.A., Vazquez, G., and Saibian, A. 1990. Effects of paraquat on mortality and cardiorespiratory function of catfish fry *Plecostomus commersoni*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 19: 523 – 529.

Usanawarong, S., and Thesiri, T. 2001. Effect of *Thunbergia Laurifolia* Linn. on Detoxication of Parathion in Rat. Department of Pharmacognosy and ToxicologyKhonkaen University. 13 p.

Usanawarong, S., Thesiri, T., Mahakunakorn, P., and Parasupattana, S. 2000. Effect of *Thubergia Laurifolia* Linn. on Detoxication of Paraquat. Department of Pharmacognosy and ToxicologyKhonkaen University. 11 – 17.

Utokaphad, C. 1982. Book of medicinal plants for curing the venom of venomous animals and poisonous plants, poisonous animals.Bangkok: Pharepittaya Printing.

Visetson, S. 2001. Effects of Azadirachtin from various Thai Neem extracts on some detoxification enzyme activities in *Callosobruchus maculates* F. 20th Asean/2nd APRC seminar on Postharvest Technology. 11-14 September 2001. Lotus Hotel Pang Suan Kaew. Chiangmai, Thailand. 38 – 46.

Visetson, S., and Mantana, T. 2001. Effect 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.

Yang, X., Margolies, D.C., Zhu, K.Y., and Buschman, L. 2001. Host plant-induced changes in detoxification enzymes and susceptibility to pesticides in the twospotted spider mite (Acari : Tetranychidae). J. of Econ. Entomol. 94(2): 381 – 387.