



การชักนำให้เกิดการสลบโดยแผ่นฟิล์มน้ำมันหอมระเหยจากต้นโรสวูด (*Aniba rosaeodora*)
สำหรับการขนส่งลูกปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

ANESTHETIC INDUCTION OF ROSEWOOD (*Aniba rosaeodora*) ESSENTIAL OIL FILM
FOR TRANSPORTATION OF NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)

ปราภรณา จันทรภักดิ์

การชักนำให้เกิดการสลบโดยแผ่นฟิล์มน้ำมันหอมระเหยจากต้นโรสวูด (*Aniba rosaeodora*)
สำหรับการขนส่งลูกปลานิล (*Oreochromis niloticus*)



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
การศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ANESTHETIC INDUCTION OF ROSEWOOD (*Aniba rosaeodora*) ESSENTIAL OIL FILM
FOR TRANSPORTATION OF NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)



PRADTANA JANKRAJANG

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF EDUCATION
(Biology)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2019

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การชักนำให้เกิดการสลบโดยแผ่นฟิล์มน้ำมันหอมระเหยจากต้นโรสวูด (*Aniba rosaeodora*)

สำหรับการขนส่งลูกปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

ของ

ปรารธนา จันทร์กระจ่าง

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นลินา ประไพรัชสิทธิ์) (รองศาสตราจารย์ ดร.เฟื่องฟ้า อุ่นอบ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนิษฐาน ศรีนวล)

ชื่อเรื่อง	การชักนำให้เกิดการสลบโดยแผ่นฟิล์มน้ำมันหอมระเหยจากต้นโรสวูด (<i>Aniba rosaeodora</i>) สำหรับการขนส่งลูกปลานิล (<i>Oreochromis niloticus</i>)
ผู้วิจัย	ปรารภนา จันทร์กระจ่าง
ปริญญา	การศึกษามหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นลินา ประไพรัชสิทธิ์

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อประเมินระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดในการใช้เป็นยาสลบสำหรับลูกปลานิล (3.43 ± 1.06 กรัม) โดยประเมินระดับความเข้มข้นที่ทำให้ลูกปลานิลเข้าสู่การสลบลึกในระยะที่ 3 ภายในเวลา 5 นาที และฟื้นจากการสลบภายในเวลา 10 นาที ผลการทดลองพบว่า น้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ความเข้มข้น 300 ไมโครลิตรต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่เหมาะสมสำหรับการทำสลบลูกปลานิล นอกจากนี้ ผลการประเมินประสิทธิภาพของแผ่นฟิล์มยาสลบน้ำมันหอมระเหยโรสวูดเพื่อใช้เป็นยาสลบสำหรับการขนส่งลูกปลานิล พบว่า แผ่นฟิล์มทุกสูตรมีความสามารถในการละลายน้ำไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยผลการประเมินสำหรับการขนส่งระยะสั้น (2 ชั่วโมง) พบว่า แผ่นฟิล์มยาสลบน้ำมันหอมระเหยโรสวูดในอัตราส่วน อัลจินต ต่อ น้ำมันหอมระเหยโรสวูด ต่อ ทวีน 80 1 : 1 : 1 ที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการชักนำให้ลูกปลานิลเข้าสู่การสลบในระยะที่ 1 ตลอด 2 ชั่วโมง ในทุกการทดลอง ลูกปลานิลมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 100 ทั้งระหว่างการทดลองและหลังการทดลอง 24 ชั่วโมง ด้านผลการวัดคุณภาพน้ำ พบว่า คุณภาพน้ำก่อนการทดลองและหลังการทดลองการจำลองการขนส่งมีคุณภาพไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพ พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกหลังได้รับน้ำมันหอมระเหยโรสวูด ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า แผ่นฟิล์มยาสลบน้ำมันหอมระเหยโรสวูดมีประสิทธิภาพในการทำสลบลูกปลานิลสำหรับการขนส่งระยะสั้น และสามารถใช้เป็นยาสลบปลาทางเลือกแทน MS-222 เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของปลา และยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

คำสำคัญ : น้ำมันหอมระเหยโรสวูด, การขนส่งปลา, ปลานิล, ยาสลบ

Title	ANESTHETIC INDUCTION OF ROSEWOOD (<i>Aniba rosaeodora</i>) ESSENTIAL OIL FILM FOR TRANSPORTATION OF NILE TILAPIA (<i>Oreochromis niloticus</i>)
Author	PRADTANA JANKRAJANG
Degree	MASTER OF EDUCATION
Academic Year	2019
Thesis Advisor	Assistant Professor Dr. Nalena Praphairaksit

This research aimed to evaluate the anesthetic efficacy of rosewood essential oil (EO) in juvenile Nile Tilapia (3.43 ± 1.06 g). The fish were exposed to different EO concentrations. The optimal concentration was recorded at Stage Three of anesthesia (less than five minutes) and a complete recovery time (less than ten minutes). The results demonstrated that the lowest effective concentration of rosewood essential oil (RD) was 300μ I/L. Additionally, different formulas of rosewood EO film (RDF) was developed for the short-term transportation of the fish. The results revealed that there were no significant differences between the water solubility of each film formula ($p < 0.05$). However, the ratio of 1:1:1 (alginate: rosewood EO: tween 80) film, at a concentration of 1 g/L was the optimal ratio for the fish to remain in Stage One of anesthesia for two hours. No mortality was observed during and after 24 hours of transportation. The water parameters showed no significant differences ($p < 0.05$) before and after applying RDF. Moreover, histopathological examination exhibited that being exposed to rosewood EO can subtly damage gill tissue. Therefore, RDF is likely to be an effective and alternative anesthetic agent (MS-222) for the transportation of short-term juvenile Nile tilapia, due to its low toxicity for the fish and environmentally friendly.

Keyword : Rosewood essential oil, Fish transport, Nile Tilapia, Anesthetic agent

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นลินา ประไพรัชสิทธิ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ได้ให้ความรู้และคำปรึกษาตลอดระยะเวลาการทำวิจัย รวมทั้งสนับสนุน ปลูกฝังลักษณะการเป็นนักวิจัยที่ดี ผู้วิจัยจึงต้องขอกราบพระคุณเป็นอย่างสูงด้วยความนับถือ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.เฟื่องฟ้า อุ่นอบ ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานกรรมการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์ และให้การแนะนำในการทำปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อัชฌริยา รังษิรุจิ ที่ให้ความกรุณาในการเป็นผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบเค้าโครงปริญญาานิพนธ์ และให้การแนะนำในการทำปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ ที่ให้ความกรุณาในการเป็นผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบเค้าโครงปริญญาานิพนธ์ และให้การแนะนำในการทำปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐาปนา ชลธนานารถ ที่ให้ความกรุณาในการเป็นผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบเค้าโครงปริญญาานิพนธ์ และให้การแนะนำในการทำปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนิษฐาน ศรีนวล ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์ และให้คำแนะนำในการทำปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำในการทำปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณมารดา พี่ น้อง และเพื่อน ๆ ทุกคน ที่ได้ช่วยเหลือทั้งในด้านกายและกำลังใจ จนทำให้ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ปรารภณา จันทร์กระจ่าง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพประกอบ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	3
ความสำคัญของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
ขอบเขตการวิจัย	4
สมมติฐานการวิจัย.....	4
ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย	5
สถานที่ทำการวิจัย	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
การวางยาสลบปลา	6
ความหมายของยาสลบ	6
ประเภทของการระงับความรู้สึก.....	6
ระยะการสลบและการฟื้นตัว	7
ยาสลบประเภทสารเคมีสังเคราะห์.....	8

ผลกระทบของการใช้ยาสลับประเภทสารเคมีสังเคราะห์ต่อปลา.....	10
ยาสลับประเภทน้ำมันหอมระเหย	11
การขนส่งปลา	13
การใช้ยาสลับในการขนส่งปลา.....	13
น้ำมันหอมระเหยโรสวูด.....	15
ลักษณะทั่วไปของน้ำมันหอมระเหยโรสวูด	15
คุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยโรสวูด	15
การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยโรสวูดโดยเครื่องแก๊ส โครมาโทกราฟี- แมสสเปกโตรมิเตอร์.....	16
หลักการการทำงานของเครื่อง GC-MS	17
ไลนาโลอล.....	19
ข้อมูลทั่วไป.....	19
กลไกการออกฤทธิ์ของไลนาโลอล	20
สารก่อรูปฟิล์ม	22
อัลจิเนต.....	23
สมบัติทางกายภาพและเคมีของอัลจิเนต.....	24
การประยุกต์ใช้อัลจิเนต	24
ปลานิล	26
รูปร่างและลักษณะของปลานิล	26
วงชีวิตและการสืบพันธุ์.....	27
การดำรงชีวิตของปลานิล	27
ความสำคัญทางเศรษฐกิจ	27
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	29

วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี.....	29
วัสดุ อุปกรณ์.....	29
เครื่องมือ	29
เครื่องมือ (ต่อ)	30
สารเคมี	30
วิธีการทดลอง	31
การเตรียมสัตว์ทดลอง	31
การเตรียมสารละลาย	31
การวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี- แมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS)	31
การหาระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่เหมาะสมในการชักนำให้ลูกปลานิล สลบและฟื้นตัวภายในระยะเวลาที่กำหนด	32
การทดลองเบื้องต้น (preliminary test)	32
การทดลองอย่างละเอียด (full scale test)	32
การหาระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่เหมาะสมสำหรับการขนส่งลูกปลานิล	33
การตรวจคุณภาพน้ำ	33
การเตรียมและทดสอบประสิทธิภาพของแผ่นฟิล์ม.....	34
การเตรียมฟิล์มอัลจินตที่ผสมกับน้ำมันหอมระเหยโรสวูด.....	34
การทดสอบประสิทธิภาพการละลายน้ำของฟิล์มน้ำมันหอมระเหยโรสวูด.....	35
การทดสอบประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลบของฟิล์มน้ำมัน หอมระเหยโรสวูด	35
การตรวจสอบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของลูกปลานิลหลังการทำสลบด้วย น้ำมันหอมระเหยโรสวูด.....	36

การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	36
การย้อมเนื้อเยื่อด้วยฮีมาทอกไซลีน-อีโอซิน	36
การวิเคราะห์ทางสถิติ	37
บทที่ 4 ผลการดำเนินวิจัย	38
ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดด้วยเครื่อง GC-MS	39
ผลการประเมินระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นยาสลบลูก ปลานิล	39
ผลการทดลองเบื้องต้น (preliminary test)	39
การทดลองแบบละเอียด (full scale test).....	40
ผลการตรวจวัดคุณภาพน้ำก่อนและหลังการสลบในระยะที่ 3	42
ผลการประเมินระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่เหมาะสมสำหรับการขนส่งลูก ปลานิล	43
ระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่เหมาะสมสำหรับการขนส่งลูกปลานิล ..	43
ผลการประเมินประสิทธิภาพแผ่นฟิล์มน้ำมันหอมระเหยโรสวูดในการชักนำให้เกิดการสลบใน ลูกปลานิลในระหว่างการขนส่ง.....	45
ผลการสังเคราะห์ฟิล์มอัลจินเตอร่วมกับน้ำมันหอมระเหยโรสวูด	45
ผลการทดสอบประสิทธิภาพการละลายน้ำของฟิล์มยาสลบ	46
การทดสอบประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลบของฟิล์มยาสลบน้ำมัน หอมระเหยโรส วูด	46
ผลการตรวจวัดคุณภาพน้ำก่อนและหลังการจำลองการขนส่ง.....	48
ผลการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของลูกปลานิลหลังได้รับน้ำมัน หอมระเหยโรสวูด	49
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	52
สรุปผลการวิจัย.....	52

อภิปรายผลการวิจัย 53

ข้อเสนอแนะ 59

บรรณานุกรม 60

ประวัติผู้เขียน..... 67



สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 พฤติกรรมการตอบสนองของปลาในระยะเวลาสลบและระยะฟื้นตัว	7
ตาราง 2 ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทำสลบปลา	11
ตาราง 3 ปริมาณที่เหมาะสมของยาสลบที่ใช้ในการขนส่งปลาแต่ละชนิด	14
ตาราง 4 สารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในน้ำมันหอมระเหยโรสวูด	18
ตาราง 5 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของไลนาโลอล	20
ตาราง 6 สูตรฟิล์มน้ำมันหอมระเหยโรสวูด	34
ตาราง 7 วิเคราะห์สารองค์ประกอบสำคัญในน้ำมันหอมระเหยโรสวูดด้วยเครื่อง GC-MS.....	39
ตาราง 8 คุณภาพน้ำก่อนและหลังการทดลองการสลบในระยะที่ 3	42
ตาราง 9 ประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการสลบในระหว่างการขนส่งเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง	44
ตาราง 10 ประสิทธิภาพฟิล์มน้ำมันหอมระเหยโรสวูดในการชักนำให้เกิดการสลบในระหว่างการขนส่งเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง.....	47
ตาราง 11 คุณภาพน้ำก่อนและหลังการทดลองการจำลองการขนส่ง 2 ชั่วโมง	48
ตาราง 12 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อก่อนและหลังได้รับสารทดสอบ	49

สารบัญภาพประกอบ

หน้า

ภาพประกอบ 1 โครงสร้างทางเคมีของ 3-aminobenzoic acid ethylester methanesulfonate (MS-222)	9
ภาพประกอบ 2 ภาพประกอบของเครื่อง Gas Chromatograph-Mass Spectrometer (GC-MS)	16
ภาพประกอบ 3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ 3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol (linalool)	19
ภาพประกอบ 4 กลไกการทำงานของตัวรับ N-methyl-D-aspartate (NMDA receptor)	21
ภาพประกอบ 5 โครงสร้างทางเคมีของอัลจินเตชันิต 1,4- β -D-manuronic acid (M) และ α -L-guluronic acid (G)	23
ภาพประกอบ 6 โครงสร้างทางเคมีของไซโตไคน์อัลจินเต	24
ภาพประกอบ 7 ปลานิล (<i>Oreochromis niloticus</i> Linnaeus, 1758).....	26
ภาพประกอบ 8 ระยะเวลาการชักนำให้ลูกปลานิลเกิดการสลบในระยะที่ 3	41
ภาพประกอบ 9 ระยะเวลาการฟื้นสลบของลูกปลานิล	41
ภาพประกอบ 10 ผลการสังเคราะห์ฟิล์ม	45
ภาพประกอบ 11 ประสิทธิภาพการละลายน้ำของฟิล์มยาสลบน้ำมันหอมระเหยโรสวูด	46
ภาพประกอบ 12 พยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกของลูกปลานิลก่อนและหลังได้รับสารทดสอบ.....	50
ภาพประกอบ 13 พยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับของลูกปลานิลก่อนและหลังได้รับสารทดสอบ	51

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

อุตสาหกรรมการขนส่งสัตว์น้ำมีการใช้ยาสลับเพื่อลดความเครียด การบาดเจ็บ และการตายของปลาในระหว่างการเคลื่อนย้าย (Harms, 2005) อย่างไรก็ตาม ยาสลับปลาที่นิยมใช้ทั่วไปในประเทศไทยหลายชนิดล้วนเป็นสารเคมีสังเคราะห์ เช่น Quinaldine (2,4-methyquinoline), Benzocaine, 2-PE (2-phenoxyethanol) และ MS-222 (3-aminobenzoic acid ethyester methanesulfonate) (Velišek & Svobodová, 2004) ซึ่งการใช้สารเคมีสังเคราะห์เหล่านี้มีข้อยกเว้น เช่น MS-222 ต้องมีการหยุดใช้ยาเป็นระยะเวลาประมาณ 21 วัน ก่อนปล่อยปลากลับสู่ธรรมชาติหรือก่อนนำไปบริโภค (Ross, Ross, & Ross, 2008) นอกจากนี้ยังพบว่า สารเคมีสังเคราะห์สามารถตกค้างในตัวปลา สิ่งแวดล้อม และส่งผลต่อสุขภาพของผู้ใช้งาน (Bell, 1964) จากข้อจำกัดดังกล่าว การใช้สารสกัดจากธรรมชาติจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการทำสลับปลาเพื่อลดความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้น

น้ำมันหอมระเหยโรสวูดเป็นสารที่สกัดได้จากเนื้อไม้ของต้นโรสวูด (*Aniba rosaeodora* Ducke) นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและการผลิตน้ำหอม มีสารออกฤทธิ์สำคัญคือไลนาโลอล (linalool) ซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของระบบกลูตาเมตเทอจิก (glutamatergic system) ในระบบประสาทส่วนกลาง (Altevogt, Davis, & Pankevich, 2011) ไลนาโลอลมีผลยับยั้งการทำงานของตัวรับ N-methyl-D-aspartate (NMDA receptor, NMDAR) โดยไปแย่งจับแบบแข่งขัน (competitive) กับกลูตาเมตที่บริเวณจดจำกลูตาเมต (glutamate recognition site) ทำให้ระบบประสาทส่วนกลางถูกยับยั้งและเป็นผลทำให้สัตว์เกิดการสงบ (Tsuchiya, 2017) ทั้งนี้มีการรายงานว่า น้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ความเข้มข้น 250 ไมโครลิตรต่อลิตร สามารถชักนำให้ปลาทอง (*Carassius auratus*) เข้าสู่สภาวะสลบ (induction stage) และฟื้นตัวจากการสลบ (recovery stage) ภายในระยะเวลาที่กำหนดโดยไม่มี การตายเกิดขึ้น (Kizak, Can, Danabaş, & Can, 2018) แต่น้ำมันหอมระเหยนั้นเป็นสารที่มีความไวต่อแสง และอุณหภูมิที่สูงขึ้น ส่งผลให้น้ำมันหอมระเหยเสื่อมประสิทธิภาพและมีอายุการใช้งานน้อยลง (Ayala-Zavala, Del-Toro-Sánchez, Alvarez-Parrilla, & González-Aguilar, 2008) ดังนั้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเก็บรักษาน้ำมันหอมระเหยโรสวูดและการใช้งานที่สะดวกมากขึ้น สำหรับใช้เป็นยาสลับสำหรับการขนส่งลูกปลา ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นการสร้างผลิตภัณฑ์น้ำมันหอมระเหยโรสวูดในรูปแบบแผ่นฟิล์มยาสลับ

โซเดียม อัลจีเนต (sodium alginate) เป็น polymer ประเภท พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) สกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล (Phaeophyceae) มีคุณสมบัติในการก่อรูปเป็นแผ่นฟิล์มและสามารถละลายน้ำได้ดี (hydrophilic) ปัจจุบันมีการนำโซเดียมอัลจีเนตมาใช้ในการก่อรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่หลากหลาย เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมทางการแพทย์และการผลิตยา (Choi et al., 1999) จากงานวิจัยก่อนหน้าพบว่า การก่อรูปแผ่นฟิล์มโซเดียมอัลจีเนตร่วมกับน้ำมันหอมระเหยหลายชนิด ได้แก่ คาโมมายด์ ซินนามอน ลาเวนเดอร์ ทีทรีออยล์ เปเปอรัมินท์ ยูคาลิปตัส ตะไคร้ และมะนาว สามารถปลดปล่อยน้ำมันหอมระเหยเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Escherichia coli* และเชื้อรา *Candida albicans* (Liakos et al., 2014) นอกจากนี้มีการทดลองการเพิ่มประสิทธิภาพของแผ่นฟิล์มโซเดียมอัลจีเนตโดยใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารเชื่อมพันธะ และพบว่า แผ่นฟิล์มมีความหนาและความแข็งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารเชื่อมพันธะ (Benavides, Villalobos-Carvajal, & Reyes, 2012)

ปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ นิยมนำมาประกอบอาหาร เนื่องจากเป็นแหล่งโปรตีนราคาไม่แพง ประเทศไทยมีการส่งออกผลิตภัณฑ์จากปลานิลปริมาณ 3,000 ตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 200 ล้านบาท (เกวลิน หนูฤทธิ์, 2560) ส่งผลให้ผู้ประกอบการต้องคำนึงถึงการควบคุมคุณภาพและปริมาณของผลผลิต เพื่อหลีกเลี่ยงการขาดทุนจากการตายของปลาที่เกิดขึ้นระหว่างการขนส่งและป้องกันการตกค้างของสารเคมีจากยาสลับ จากงานวิจัยก่อนหน้า มีรายงานการใช้น้ำมันจากต้นกานพลู (*Eugenia caryophyllus*) เป็นยาสลับในการขนส่งลูกปลานิลพบว่า น้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ลูกปลานิลเกิดการสลบในระหว่างการขนส่งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (Wongtavatchai, Rojsitthisak, Tipmongkolsin, & Jongaroonngamsang, 2006) และน้ำมันจากต้นข่า (*Alpinia galanga*) ที่ความเข้มข้น 700 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ลูกปลานิลเกิดการสลบลีกภายในระยะเวลา 3 นาทีและฟื้นจากการสลบในเวลาไม่เกิน 5 นาที (Pikulkaew, Khumpirapang, Chaisri, & Okonogi, 2017) ดังนั้นการศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อประเมินประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดในรูปแบบแผ่นฟิล์มเพื่อใช้เป็นยาสลับสำหรับการขนส่งลูกปลานิล รวมทั้งศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของลูกปลานิลหลังได้รับน้ำมันหอมระเหยโรสวูดซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยง ขนส่ง รวมไปถึงการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของลูกปลานิล

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

1. ประเมินระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นยาสลบลูกปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เปรียบเทียบกับ MS-222
2. ประเมินประสิทธิภาพน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่เหมาะสมสำหรับการขนส่งลูกปลานิล
3. ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของลูกปลานิลหลังได้รับน้ำมันหอมระเหยโรสวูด
4. ประเมินประสิทธิภาพแผ่นฟิล์มน้ำมันหอมระเหยโรสวูดในการชักนำให้เกิดการสลบในลูกปลานิลในระหว่างการขนส่ง

ความสำคัญของการวิจัย

งานวิจัยฉบับนี้มีเป้าหมายเพื่อประเมินประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการสลบโดยใช้ น้ำมันหอมระเหยโรสวูดในลูกปลานิล เนื่องจากในปัจจุบันมีการคำนึงถึงความปลอดภัยจากการใช้ยาสลบซึ่งเป็นสารเคมีสังเคราะห์ จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า ยังไม่มีรายงานการวิจัยการนำ น้ำมันหอมระเหยโรสวูดมาใช้ในการชักนำให้เกิดการสลบในลูกปลานิลซึ่งเป็นปลาเศรษฐกิจของประเทศไทย ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองเพื่อประเมินระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดสำหรับการขนส่ง ตรวจสอบผลกระทบทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของลูกปลานิลหลังได้รับยาสลบ 10 นาที และพัฒนายาสลบในรูปแบบแผ่นฟิล์ม เพิ่มความสะดวกต่อการใช้งาน และการเก็บรักษา เพื่อนำไปเป็นแนวทางในการใช้น้ำมันหอมระเหยโรสวูดเป็นยาสลบสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดในการชักนำให้ลูกปลานิลเกิดการสลบในการขนส่ง เพื่อให้สามารถใช้น้ำมันหอมระเหยโรสวูดในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำได้อย่างเหมาะสม เกิดประสิทธิภาพสูงสุด และสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของลูกปลานิลจากการขนส่งได้
2. ทราบถึงผลกระทบทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของลูกปลานิล โดยตรวจสอบความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยโรสวูด เพื่อป้องกันความเป็นพิษที่อาจส่งผลกระทบต่อปลา รวมทั้งทราบแนวทางแก้ไขผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นภายหลังจากการทำสลบ

3. สามารถพัฒนายาสลบจากน้ำมันหอมระเหยโรสวูดให้อยู่ในรูปของแผ่นฟิล์ม

ขอบเขตการวิจัย

ตรวจสอบสารองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยโรสวูด โดยใช้เทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometry เพื่อวิเคราะห์สารออกฤทธิ์สำคัญในน้ำมันหอมระเหยโรสวูด ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยโรสวูด (AB1801, Chemipan) เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถชักนำให้ลูกปลานิลเกิดการสลบและฟื้นจากการสลบในระยะเวลาตามเกณฑ์ที่กำหนด ซึ่งคัดแปลงจาก (Mylonas, Cardinaletti, Sigelaki, & Polzonetti-Magni, 2005; Schoettger & Julin, 1967) และหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการขนส่งลูกปลานิลภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง โดยสังเกตการตายของปลานิลในระหว่างการทดลองและหลังทำการทดลอง 24 ชั่วโมง การทดลองครั้งนี้ใช้ MS-222 เป็นกลุ่มควบคุมทางบวก (positive control) ซึ่งลูกปลานิลที่ใช้ในการทดลอง คือลูกปลานิลพันธุ์จิตรลดา อายุ 1 เดือน น้ำหนักเฉลี่ย 3.43 ± 1.06 กรัม ตรวจสอบทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของลูกปลานิลหลังได้รับยาสลบ 7 วัน โดยใช้วิธีพาราฟิน (paraffin method) ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin จากนั้นทำการพัฒนา ยาสลบน้ำมันหอมระเหยโรสวูดให้อยู่ในรูปของแผ่นฟิล์ม โดยทดสอบการละลายน้ำและประเมินประสิทธิภาพของฟิล์มน้ำมันหอมระเหยโรสวูดเพื่อใช้เป็นยาสลบสำหรับขนส่งลูกปลานิล

สมมติฐานการวิจัย

1. น้ำมันหอมระเหยโรสวูดมีประสิทธิภาพในการชักนำให้ลูกปลานิลเกิดการสลบและฟื้นจากการสลบในระยะเวลาตามเกณฑ์ที่กำหนด และมีประสิทธิภาพดีกว่าหรือเทียบเท่ากับ MS-222
2. น้ำมันหอมระเหยโรสวูดมีประสิทธิภาพในการชักนำให้ลูกปลานิลเกิดการสลบระหว่างการขนส่งภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง
3. น้ำมันหอมระเหยโรสวูดไม่ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับในลูกปลานิล
4. น้ำมันหอมระเหยโรสวูดในรูปแบบแผ่นฟิล์มสามารถชักนำให้ลูกปลานิลเกิดการสลบในระหว่างการจำลองการขนส่ง

ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย

ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัยตั้งแต่สิงหาคม 2562 – กรกฎาคม 2563

สถานที่ทำการวิจัย

อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ (อาคาร 19) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย
ศรีนครินทรวิโรฒ



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. การวางยาสลบปลา
2. น้ำมันหอมระเหยโรสวูด
3. สารก่อรูปฟิล์ม
4. ปลาไนล์

การวางยาสลบปลา

ความหมายของยาสลบ

ยาสลบ (anesthetic) หมายถึง สารเคมีที่ทำหน้าที่ระงับความรู้สึก ทำให้เกิดอาการสูญเสียการตอบสนองของร่างกาย โดยยาสลบจะแพร่เข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง (Central Nervous System, CNS) ไปยับยั้งการทำงานของเซลล์ประสาท (Heavner, 1981; Miller & Pardo, 2011)

ประเภทของการระงับความรู้สึก

การระงับความรู้สึกสามารถแบ่งได้ 3 ประเภท ได้แก่ 1) การระงับความรู้สึกเฉพาะที่ (local anesthesia) คือ การให้ยาชาตรงตำแหน่งเฉพาะที่ต้องการทำหัตถการ 2) การระงับความรู้สึกเฉพาะส่วน (regional anesthesia) คือ การทำให้ส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกายหมดความรู้สึกชั่วคราวด้วยยาชา โดยยาชาจะมีฤทธิ์ในการระงับความเจ็บปวดและทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อ 3) การระงับความรู้สึกทั่วร่างกาย (general anesthesia) คือ ยาออกฤทธิ์ทั่วร่างกาย โดยยาสลบจะแพร่เข้าสู่ระบบประสาทไปมีผลต่อการตอบสนองของร่างกายเริ่มจากร่างกายไม่รู้สึกเจ็บปวด ไม่สามารถจำเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นขณะทำหัตถการ สูญเสียการรับรู้ ยับยั้งปฏิกิริยาโต้ตอบ ทั้งนี้สัตว์ที่อยู่ในสภาวะสลบจะไม่รับรู้ต่อการถูกกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อม รวมถึงความเจ็บปวดที่เกิดขึ้นกับร่างกาย ดังนั้น การวางยาสลบแบบทั่วร่างกายจึงเป็นการสลบที่ถูกนำมาใช้ในการผ่าตัดหรือการเคลื่อนย้ายสัตว์น้ำ (Miller & Pardo, 2011)

ระยะการสลบและการฟื้นตัว

การประเมินระยะการสลบ (anesthetic stage) และระยะการฟื้นตัว (recovery stage) ของปลาสังเกตได้จากพฤติกรรม เช่น การว่ายน้ำ การทรงตัว และการเปิด-ปิดแผ่นปิดเหงือก โดยระยะการสลบแบ่งออกเป็น 4 ระยะ ดังนี้ ระยะที่ 1 sedation ปลาว่ายน้ำช้าลง ลำตัวตรง ไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้าภายนอก ยกเว้นแรงกดที่ปลายครีบกาง ระยะที่ 2 loss of equilibrium ปลาสามารถว่ายน้ำได้ แต่ลำตัวเอียงและไม่สามารถควบคุมทิศทางได้ ระยะที่ 3 loss of reflex reactivity ปลาไม่มีการตอบสนองต่อสิ่งเร้าภายนอก รวมทั้งแรงกดที่บริเวณครีบกาง และระยะที่ 4 medullary collapse ปลาตาย นอกจากนี้ ระยะการฟื้นตัวประกอบไปด้วย ระยะพักฟื้นเริ่มต้น initial recovery และระยะพักฟื้นเต็มรูปแบบ full recovery ซึ่งระยะฟื้นตัวเริ่มต้น คือ ปลาเริ่มว่ายน้ำได้ ลำตัวเอียง ไม่สามารถควบคุมทิศทาง และไม่สามารถหลบหลีกสิ่งกีดขวางได้ ส่วนระยะฟื้นตัวเต็มรูปแบบ ปลาว่ายน้ำอย่างมีทิศทาง ลำตัวตรง สามารถหลบหลีกสิ่งกีดขวาง และมีอัตราการหายใจคงที่ (Mylonas et al., 2005; Schoettger & Julin, 1967) ดังที่แสดงในตาราง 1

ตาราง 1 พฤติกรรมการตอบสนองของปลาในระยะการสลบและระยะฟื้นตัว

ระยะการสลบ	พฤติกรรมการตอบสนองของปลา
ระยะที่ 1	ปลาไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้าภายนอก ยกเว้นแรงกด การทรงตัวปกติ อัตราการหายใจช้าลงกว่าปกติเล็กน้อย
ระยะที่ 2	ปลาสูญเสียการควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อทั้งหมด เริ่มสูญเสียการทรงตัว ไม่สามารถควบคุมทิศทางได้ ตอบสนองต่อสิ่งเร้าที่รุนแรง
ระยะที่ 3	ปลาสูญเสียการสมดุลของร่างกายทั้งหมด ไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้าที่มากกระตุ้น อัตราการหายใจช้ามาก
ระยะที่ 4	ปลาหยุดหายใจ ไม่พบการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือก

ตาราง 1 (ต่อ)

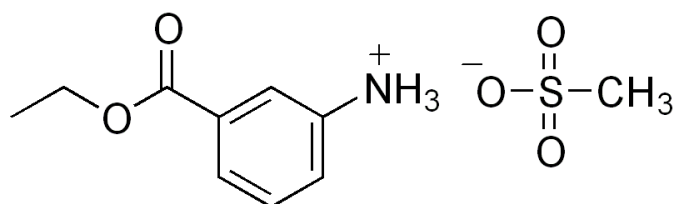
ระยะการฟื้นตัว	พฤติกรรมการตอบสนองของปลา
ระยะพักฟื้นเริ่มต้น	ปลาเริ่มว่ายน้ำแบบไม่มีทิศทาง
ระยะพักฟื้นเต็มรูปแบบ	ปลาวว่ายน้ำแบบมีทิศทาง สมดุลร่างกายกลับมาทั้งหมด อัตราการหายใจคงที่

ที่มา: Mylonas, C. C., Cardinaletti, G., Sigelaki, I., & Polzonetti-Magni, A. (2005). Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture*, 246(1-4), 467-481.

ยาสลบประเภทสารเคมีสังเคราะห์

ปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้ายาสลบปลาหลายชนิด สามารถจัดลำดับตามความสามารถในการละลายน้ำจากมากไปน้อย ได้แก่ MS-222 (3-aminobenzoic acid ethylester methanesulfonate) มีลักษณะเป็นผงสีขาวละเอียด มีประสิทธิภาพในการละลายน้ำมาก 2-PE (2-Phenoxyethanol) มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองอ่อน ละลายน้ำได้ปานกลาง Quinadine (2-4-methyquinoline) ลักษณะเป็นของเหลวสีเหลือง ละลายน้ำได้น้อย แต่ละลายได้ดีในอะซีโตน (acetone) และ Benzocaine (ethyl-p-aminobenzoate) เป็นผงสีขาว ละลายน้ำได้น้อยที่สุด แต่ละลายได้ดีในอะซีโตนและเอทานอล (ethanol) (Velíšek & Svobodová, 2004)

ยาสลบที่นิยมใช้ในการสลบปลา คือ MS-222 เพราะสามารถใช้กับปลาที่นำมาประกอบอาหารได้ เนื่องจากเป็นยาสลบปลาที่ได้รับการขึ้นทะเบียนจากองค์การอาหารและยา (Food and Drug Administration, FDA) ของประเทศสหรัฐอเมริกา แคนาดา และประเทศอังกฤษ ซึ่งทั้งสามประเทศอนุญาตให้ใช้ MS-222 เป็นยาสลบเพียงชนิดเดียวที่สามารถนำไปใช้กับปลาที่นำไปบริโภคและปลาที่จะนำไปปล่อยออกสู่แหล่งน้ำในธรรมชาติ (Ross et al., 2008) โดย MS-222 มีชื่อทางเคมีว่า 3-aminobenzoic acid ethylester methanesulfonate (ภาพประกอบ 1) เป็นสารประกอบระหว่าง tricaïne, methane และ sulfonate มีสูตรโมเลกุลคือ $C_9H_{11}NO_2 \cdot CH_4SO_3$ น้ำหนักโมเลกุล 261.29 กรัมต่อโมล มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 147-152 °C (Carter, Woodley, & Brown, 2011)



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างทางเคมีของ 3-aminobenzoic acid ethylester methanesulfonate (MS-222)

ที่ ม ๑ : Ross, L. G., Ross, B., & Ross, B. (2008). Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals: Wiley Online Library.

ยาสลบ MS-222 สามารถละลายได้ทั้งน้ำจืดและน้ำเค็ม โดยมีอัตราการละลายเท่ากับปริมาณ MS-222 1 กรัม ละลายในน้ำ 0.8 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 20 °C (Carter et al., 2011) จากนั้นผ่านเข้าเหงือกและผิวหนังของปลาไปยังกระแสเลือดแล้วแพร่กระจายไปทั่วร่างกาย (Hunn & Allen, 1974) โดยปริมาณและความเข้มข้นของ MS-222 ที่ใช้ในการสลบปลาขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการสลบ เช่น การสลบปลาเพื่อการผ่าตัด หรือการฉีดวัคซีน ซึ่งเป็นการสลบที่เหนียวนำไปสู่การสลบในระยะที่ 3 หรือการสลบลึก ทำให้จำเป็นต้องใช้ยาสลบในความเข้มข้นที่ค่อนข้างสูง จากงานวิจัยก่อนหน้า รายงานว่า MS-222 ที่ความเข้มข้น 60-100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการทำหัตถการ เนื่องจากสามารถชักนำให้ปลาเข้าสู่การสลบลึกภายในระยะเวลา 3 นาที โดยที่ปลาสามารถฟื้นตัวจากการสลบได้ภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที (Schoettger & Julin, 1967) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของปลา เนื่องจากมีการรายงานการใช้ MS-222 ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) พบว่าความเข้มข้นที่ 130 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำสลบ (Pikulkaew et al., 2017) นอกจากนี้ในการใช้ MS-222 เพื่อการขนส่งปลา มีการใช้ยาสลบในปริมาณและความเข้มข้นที่ต่ำกว่าการทำหัตถการ เนื่องจากปัจจัยในด้านระยะเวลาและการควบคุมคุณภาพน้ำระหว่างการขนส่ง โดยยาสลบนั้น ๆ ไปมีผลทำให้ปลาเข้าสู่การสลบในระยะที่ 1 เป็นระยะเวลานานโดยไม่ฟื้นจากการสลบในระหว่างการขนส่ง จากงานวิจัยก่อนหน้า มีการศึกษาการใช้ MS-222 ในปลาหลายชนิด เช่น ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) จากผลการทดลองพบว่า MS-222 ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ปลานิลเกิดการสลบในระหว่างการจำลองการขนส่งเป็นระยะเวลา 24 และ 48

ชั่วโมง (Amani & James, 2007) นอกจากนี้ MS-222 ที่ความเข้มข้น 40, 70 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ปลา *Betta splendens*, *Puntius filamentous* และ *Poecilia reticulata* ให้เข้าสู่สภาวะการสลบในระยะที่ 1 ได้นาน 48 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยปลาทุกชนิดสามารถฟื้นตัวจากการสลบได้ภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที ทั้งนี้ MS-222 ยังสามารถลดความเครียดและลดอัตราการตายของปลาภายหลังจากการขนส่งได้อย่างมีนัยสำคัญ (Pramod, Ramachandran, Sajeevan, Thampy, & Pai, 2010; Sommani, Kerdkriengkai, & Ingkapairoj, 1999) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า MS-222 ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 30-80 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการขนส่งปลา ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาด ชนิดของปลา รวมทั้งระยะเวลาในการขนส่ง (Schoettger & Julin, 1967)

ผลกระทบของการใช้ยาสลบประเภทสารเคมีสังเคราะห์ต่อปลา

ยาสลบปลาประเภทสารเคมีสังเคราะห์อาจส่งผลกระทบต่อปลา ผู้ใช้งานและผู้บริโภค โดยเฉพาะการพบสารตกค้างในปลา ทำให้ต้องมีการระมัดระวังเรื่องความปลอดภัยของการใช้สารเคมี เช่น การใช้งานยาสลบ MS-222 ต้องมีระยะการหยุดยา (withdrawal period) เป็นระยะเวลาประมาณ 21 วัน ก่อนปล่อยปลากลับสู่แหล่งน้ำธรรมชาติหรือก่อนนำไปบริโภค (Ross et al., 2008) นอกจากนี้พบว่า MS-222 เป็นยาสลบที่ละลายได้ดีทั้งในน้ำและไขมัน ทำให้ยาสามารถซึมผ่านเนื้อเยื่อเหงือกได้ง่าย แต่คุณสมบัติการละลายนี้อาจส่งผลกระทบต่อปลาที่กำลังวางไข่หรือปลาที่ร่างกายอ่อนแอ เพราะปลาจะมีความไวต่อยาสลบมากขึ้น ส่งผลให้ปลาอยู่ในสภาวะการสลบนานขึ้น (Coyle, Durborow, & Tidwell, 2004) ทั้งนี้ยาสลบที่มีลักษณะเป็นผงละเอียด เช่น MS-222 และ Benzocaine สามารถส่งผลกระทบต่อผู้ใช้งาน คือ เมื่อมีการสูดดมสารเข้าไป ทำให้เกิดการระคายเคืองทางเดินหายใจ ปวดศีรษะ รวมทั้งการสัมผัสสารเคมีโดยตรงจะทำให้ผู้ใช้งานเกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังบริเวณที่สัมผัส (Bell, 1964) โดยยาสลบ 2-PE ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลว เมื่อสัมผัสหรือสูดดมเป็นเวลานานสามารถลดอัตราการหายใจและส่งผลกระทบต่อความผิดปกติต่อระบบประสาทของมนุษย์ (Fernández-Parra, Donnelly, Pignon, Noirault, & Zilberstein, 2017) ยิ่งไปกว่านั้นพบว่า ยาสลบหลายชนิดไม่อนุญาตให้ใช้กับปลาที่เลี้ยงไว้เป็นอาหารของมนุษย์ เช่น 2-PE, Quinadine และ Benzocaine ดังนั้น จากผลกระทบของสารเคมีทำให้นักวิจัยตระหนักถึงข้อเสียของการใช้สารเคมีในการทำสลบปลาและเปลี่ยนมาศึกษาการใช้สารสกัดจากพืชแทน

ยาสลบประเภทน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย (essential oil) จัดเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) คือ สารเคมีที่พืชสร้างขึ้นตามธรรมชาติโดยไม่ได้มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต แต่มีความจำเป็นในการคงอยู่ของพืชชนิดนั้น ๆ เช่น พืชจะผลิตน้ำมันหอมระเหยเพื่อวัตถุประสงค์ในการดึงดูดแมลงให้ช่วยผสมเกสร ช่วยไล่แมลงศัตรูพืช รวมทั้งช่วยในการรักษาความชุ่มชื้น โดยน้ำมันหอมระเหยที่สร้างมาจะถูกเก็บไว้ในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น เมล็ด กลีบดอก เปลือกผล ใบ เนื้อไม้ เปลือกไม้ ลำต้น ยาง ราก และเหง้า

น้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติทั่วไป คือ มีกลิ่นเฉพาะตัว สามารถระเหยได้ง่าย ที่อุณหภูมิปกติ มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำ และมีสารประกอบทางเคมีหลายชนิด ทั้งนี้มีการใช้น้ำมันหอมระเหยในการบำบัดรักษาโรค (aromatherapy) และใช้เป็นสารแต่งกลิ่นในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น น้ำหอม สบู่ เครื่องสำอาง มีจุดประสงค์เพื่อเป็นสารให้ความหอมและช่วยให้เกิดความผ่อนคลาย ในปัจจุบันได้มีการนำน้ำมันหอมระเหยมาใช้ในการสลบปลา เพื่อลดผลกระทบและความเป็นพิษที่เกิดจากการใช้ยาสลบประเภทสารเคมีสังเคราะห์ โดยมีการรายงานการใช้น้ำมันหอมระเหยเพื่อเป็นยาสลบในปลาหลายชนิดแสดงดังตารางที่ 2

ตาราง 2 ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทำสลบปลา

น้ำมันหอมระเหย	สิ่งมีชีวิต	ความเข้มข้นที่ใช้	ผู้วิจัย
<i>Eugenia caryophyllus</i> oil	<i>Onchorynchus mykiss</i>	30 ppm	Prince and Powell (2000)
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	40 ppm	Mylonas et al. (2005)
	<i>Sparus aurata</i>	55 ppm	
	<i>Oreochromis niloticus</i>	10 ppm	Wongtavatchai et al. (2006)
	<i>Pangasianodon gigas</i>	100 ppm	Songkaew et al. (2007)
		110 ppm	Seetapan, Mahawong, Boonkong, Moojareinsup, and Kongha (2010)
	<i>Argyrosomus regius</i>	0.085 ppm	Cárdenas et al. (2016)
		40–50 ppm	

ตาราง 2 (ต่อ)

น้ำมันหอมระเหย	สิ่งมีชีวิต	ความเข้มข้นที่ใช้	ผู้วิจัย
	<i>Puntius gonionotus</i>	10-16 ppm	Kulkham, Champasri, and Vanichkul (2017)
<i>Ocimum gratissimum</i> oil	<i>Rhamdia quelen</i>	40-300 ppm	de Lima Silva et al. (2012)
<i>Thymus vulgaris</i> oil	<i>Acanthopagrus latus</i>	20 ppm	Al-Yaqout et al. (2010)
	<i>Sparidentex hasta</i>	10 ppm	
<i>Mentha piperita</i> oil	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	200 ppm	METİN, DİDİNEN, KUBİLAY, Mesut, and İjlal (2015)
<i>Origano</i> sp. oil	<i>Dicentrarchus labrax</i>	50-75 µl/L	Bodur, Afonso,
	<i>Argyrosomus regius</i>	50-75 µl/L	Montero, and Navarro (2018)
<i>Eucalyptus</i> sp. oil	<i>Dicentrarchus labrax</i>	300 µl/L	Bodur et al. (2018)
	<i>Argyrosomus regius</i>	300 µl/L	
<i>Alpinia galanga</i> oil	<i>Oreochromis niloticus</i>	700 ppm	Pikulkaew et al. (2017)
<i>Zingiber montanum</i> oil	<i>Oreochromis niloticus</i>	10-3000 ppm	Limhang, Charoentum, and Charoenprayot (2017)
<i>Lippia alba</i> oil	<i>Argyrosomus regius</i>	160 ppm	Cárdenas et al. (2016)
	<i>Hippocampus reidi</i>	150 µl/L	
	<i>Rhamdia quelen</i>	100-500 ppm	da Cunha et al. (2010)
<i>Aniba rosaeodora</i> oil	<i>Carassius auratus</i>	250 µl/L	Kizak et al. (2018)

การขนส่งปลา

การขนส่งปลาเป็นขั้นตอนสำคัญในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ ซึ่งนิยมขนส่งลูกปลาหรือปลาขนาดเล็ก โดยขนาดเฉลี่ยประมาณ 3-5 เซนติเมตร และมีอายุประมาณ 1 เดือน ในระหว่างการขนส่งต้องมีการควบคุมคุณภาพน้ำ ได้แก่ ปริมาณออกซิเจน อุณหภูมิ และค่ากรด-เบส ให้เหมาะสมกับระยะทาง (Belema et al., 2017) นอกจากนี้ ความเครียดและความตื่นตกใจของปลาที่เกิดขึ้นในระหว่างการขนส่งเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการตายของปลา โดยอาการตื่นตกใจสามารถสังเกตได้จากปลาที่มีการเคลื่อนไหวตลอดเวลา ทำให้มีการเพิ่มอัตราการเผาผลาญพลังงาน (metabolism) ไม่ว่าจะเป็นอัตราการหายใจที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปลามีการใช้ออกซิเจนสูง เมื่อมีการใช้ออกซิเจนมากขึ้นส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนในบ่อขนส่งไม่เพียงพอ นอกจากนี้การขบถ่ายของเสียที่มากขึ้นจะทำให้น้ำมีปริมาณแอมโมเนียสูงและทำให้ความเป็นเบสของน้ำเพิ่ม จึงต้องเปลี่ยนน้ำตลอดระยะทางการขนส่งเพื่อควบคุมคุณภาพของน้ำให้เหมาะสม ดังนั้น ในการเคลื่อนย้ายหรือขนส่งสัตว์น้ำจึงมีการนำยาสลบมาใช้เพื่อทำให้ปลาเกิดการสลบ ช่วยลดการเคลื่อนไหว ลดอัตราการเผาผลาญ และลดการขบถ่ายของเสีย เพื่อลดอัตราการตายของปลาที่เกิดขึ้นในระหว่างการขนส่งและหลังการขนส่ง (ดุสิต เอื้ออำนวย, อารีวรรณ สังเพ็ชร, อัจฉริยา สันติประเสริฐ และรุ่งตะวัน ยมหล้า, 2559)

การใช้ยาสลบในการขนส่งปลา

ในระหว่างการขนส่งมีการใส่สารเคมีหลายชนิดเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของปลา ได้แก่ สารที่ใช้ควบคุมคุณภาพน้ำ (water quality stabilizer) ยาปฏิชีวนะ (antibiotic) และกลุ่มยาสลบ (anesthetic) โดยเฉพาะกลุ่มยาสลบที่มีความสำคัญต่อการลดกระบวนการเผาผลาญของปลา ลดอัตราการบาดเจ็บ และความเครียดของปลาที่เกิดขึ้น ซึ่งปริมาณการใช้ยาขึ้นอยู่กับชนิด ขนาด และน้ำหนักของปลา รวมทั้งระยะเวลาในการขนส่ง โดยการใช้ยาสลบในการขนส่งลูกปลามีความประสงค์ให้ลูกปลานิลเกิดการสลบในระยะที่ 1 (ตาราง 1) เนื่องจากเป็นระยะที่ปลาลดการเคลื่อนไหว และการตอบสนองจากสิ่งเร้าภายนอกโดยยังไม่สูญเสียสมดุลของร่างกาย ดังนั้น สภาวะการสลบในระยะที่ 1 จึงเหมาะสมในการขนส่งปลาขณะมีชีวิต (ทัศนัย อ่องสาคร, 2528) ทั้งนี้มีการรายงานการใช้ยาสลบทั้งประเภทสารเคมีสังเคราะห์และน้ำมันหอมระเหยในปลาหลายชนิดดังตารางที่ 3

ตาราง 3 ปริมาณที่เหมาะสมของยาสลบที่ใช้ในการขนส่งปลาแต่ละชนิด

ชนิดยาสลบ	ชนิดของปลา	ระยะเวลา การสลบ (ชม.)	ความ เข้มข้น	ผู้วิจัย
MS-222	<i>Oreochromis niloticus</i>	24	30 ppm	Amani and James (2007)
		48	25-30 ppm	Amani and James (2007)
	<i>Poecilia reticulata</i>	48	70-80 ppm	Amani and James (2007)
	<i>Betta splendens</i>	48	65-70 ppm	Sommani et al. (1999)
Benzocaine	<i>Puntius filamentosus</i>	48	40 ppm	Pramod et al. (2010)
	<i>Puntius filamentosus</i>	48	20 ppm	Pramod et al. (2010)
	<i>Betta splendens</i>	48	80-85 ppm	Sommani et al. (1999)
<i>Lippia alba</i> oil	<i>Piaractus mesopotamicus</i> x	8	10 µl/L	Sena et al. (2016)
	<i>Colossoma macropomum</i>			
<i>E.</i> <i>caryophyllus</i> oil	<i>Puntius gonionotus</i>	12	2-6 ppm	Kulkham et al. (2017)
	<i>Clarias gariepinus</i>	16	15 ppm	ดุสิต เต็มอำนาจ และ คนอื่น ๆ (2559)
	<i>Oreochromis niloticus</i>	12	5, 8 ppm	Wongtavatchai et al. (2006)
	<i>Betta splendens</i>	24	15 ppm	Somjai, Pansue, and Chiayvareesajja (2008)

น้ำมันหอมระเหยโรสวูด

ลักษณะทั่วไปของน้ำมันหอมระเหยโรสวูด

ต้นโรสวูด (rosewood) จัดอยู่ในวงศ์ Lauraceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Aniba rosaeodora* Ducke มีลักษณะวิสัยเป็นไม้ต้น และไม้เนื้อแข็ง พบได้ตามป่าเขตร้อน (tropical) และกึ่งเขตร้อนทั่วโลก (subtropical) (de Almeida et al., 2009) โดยน้ำมันหอมระเหยโรสวูดสกัดได้จากเนื้อไม้ของต้นโรสวูด มีรายงานการศึกษาโครงสร้างไซเล็มทุติยภูมิ (secondary xylem) ในพืชสกุล *Aniba* พบว่า *Aniba rosaeodora* Ducke มีการสร้างและเก็บน้ำมันไว้ที่เซลล์น้ำมัน (oil cell) (Urbinati, Silva, Silva, Lisboa, & Mori, 2014) ทั้งนี้ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ คือ เป็นสารไม่มีสีและมีกลิ่นหอม จึงนิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและการผลิตน้ำหอม (de Almeida et al., 2009)

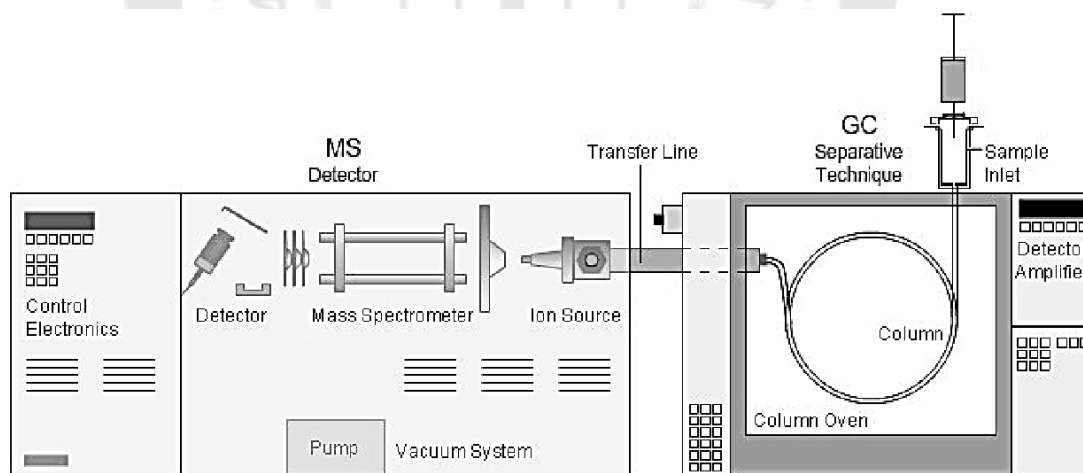
คุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยโรสวูด

น้ำมันหอมระเหยโรสวูดมีประสิทธิภาพช่วยในการผ่อนคลายและนอนหลับ ทั้งนี้ยังมีฤทธิ์ในด้านอาการซึมเศร้า (antidepressant) ต้านจุลชีพ (antimicrobial) และต้านแบคทีเรีย (antibacteria) (Sarrazin, Oliveira, Maia, & Mourão, 2016) ในงานวิจัยก่อนหน้ารายงานว่า น้ำมันหอมระเหยโรสวูดมีฤทธิ์ในการสลบหนู (de Almeida et al., 2009) นอกจากนี้ยังพบว่า น้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ความเข้มข้น 250 ไมโครลิตรต่อลิตร สามารถชักนำให้ปลาทอง น้ำหนักเฉลี่ย 7.36 ± 0.77 กรัม เข้าสู่ภาวะสลบ (induction stage) ภายในระยะเวลา 171 ± 2.28 วินาที และสามารถฟื้นตัว (recovery stage) ได้ในระยะเวลา 297 ± 7.69 วินาที โดยให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกับยาสลบ 2-PE ที่ความเข้มข้น 700 ไมโครลิตรต่อลิตร และไม่พบว่ามีอาการตายเกิดขึ้นทั้งในระหว่างการทดลองและหลังการทดลอง (Kizak et al., 2018)

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยโรสวูดโดยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์

แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Gas Chromatograph-Mass Spectrometer, GC-MS) เป็นเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ที่ใช้เพื่อแยกสารผสมของน้ำมันหอมระเหยออกจากกัน ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ทำให้ทราบถึงองค์ประกอบทางเคมี ความเข้มข้น และทราบสัดส่วนของสารเคมีชนิดต่าง ๆ ในน้ำมันหอมระเหยชนิดนั้น ๆ

เครื่อง GC-MS ประกอบไปด้วย 2 ส่วน โดยส่วนประกอบ 1 คือ ส่วนของเครื่อง GC (Gas Chromatography) มีส่วนประกอบหลัก ซึ่งแสดงในภาพประกอบ 2 ได้แก่ หัวฉีด (injector) ตู้อบ (oven) ภายในตู้อบจะบรรจุคอลัมน์ที่ใช้แยกสาร (GC column) และหัววัด (detector) ในส่วนประกอบ 2 คือ ส่วนของเครื่อง MS (Mass Spectrometer) มีส่วนประกอบหลัก คือ เครื่องคัดเลือกและแยกแยะขนาดประจุ (mass analyzer) และเครื่องตรวจวัด (mass detector) นอกจากนี้ยังมีอุปกรณ์สำคัญ คือ ถังบรรจุแก๊สตัวพา (carrier gas) อุปกรณ์ควบคุมการไหลของแก๊สตัวพา (GC pneumatics) และอุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิส่วนหัวฉีด ตู้อบ และส่วนหัววัด (Hussain & Maqbool, 2014)



ภาพประกอบ 2 ภาพประกอบของเครื่อง Gas Chromatograph-Mass Spectrometer (GC-MS)

ที่มา: Hussain, S. Z., & Maqbool, K. (2014). GC-MS: Principle, Technique and its application in Food Science. *International Journal of Current Science*, 13, 116-126.

หลักการการทำงานของเครื่อง GC-MS

เครื่อง GC-MS มีหลักการทำงาน คือ สารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าเครื่อง GC จะระเหยเป็นไอ และผ่านเข้าคอลัมน์ที่อยู่ในตู้อบ จากนั้นสารจะถูกแยกองค์ประกอบด้วยความร้อน โดยสารที่แยกออกมาก่อนสารจะผ่านคอลัมน์เข้าไปในเครื่อง MS ที่มีสถานะเป็นสุญญากาศ แล้วเกิดการไอออไนซ์โมเลกุลที่เข้ามาให้กลายเป็นไอออนบวกและอิเล็กตรอนด้วย ion source จากนั้นประจุจะเคลื่อนที่ผ่านเข้าเครื่องคัดเลือกและแยกแยะขนาดประจุ เพื่อวัดขนาดมวลของประจุ และเคลื่อนที่ไปยังเครื่องตรวจวัด เพื่อตรวจหาปริมาณของประจุ แล้วแปลผลเป็นแมสสเปกตรัม จากนั้นนำแมสสเปกตรัมที่ได้ไปเปรียบเทียบกับแมสสเปกตรัมของสารเคมีในฐานข้อมูล (library) และประมวลผลออกมาเป็นชนิดของสารเคมี (Amornsit, 2553; Hussain & Maqbool, 2014)

จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า น้ำมันหอมระเหยโรสวูดมีสารไลนาโลอล (linalool) เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ ซึ่งพบมากถึง 86.23% ของสารประกอบทั้งหมด ดังแสดงในตาราง 4 (Kizak et al., 2018)



ตาราง 4 สารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในน้ำมันหอมระเหยโรสวูด

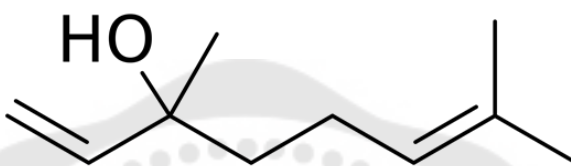
สารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญ	ร้อยละของสารสำคัญ (%)
Linalool	86.23
Cis-linalool oxide	1.06
beta-Selinene	0.95
Trans-linalool oxide	0.93
alpha-Pinene	0.42
beta-Pinene	0.23
Limonene	0.42
1.8-Cineol	0.11
alpha-Selinene	0.81
Benzyl benzoate	0.81
alpha-Terpineol	0.72
alpha-Copaene	0.50
Geraniol	0.49
Spathulenol	0.46
Hotrienol	0.27
gamma-Murolene	0.24
Nerol	0.16

ที่ ม ๑ : Kizak, V., Can, E., Danabaş, D., & Can, Ş. S. (2018). Evaluation of anesthetic potential of rosewood (*Aniba rosaeodora*) oil as a new anesthetic agent for goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture*, 493, 296-301.

ไลนาโลอล

ข้อมูลทั่วไป

ไลนาโลอล (linalool) มีชื่อทางเคมีว่า 3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol และมีสูตรโมเลกุล คือ $C_{10}H_{18}O$ โดยพบไลนาโลอลได้ในน้ำมันหอมระเหยหลายชนิด เช่น โรสวูด ลาเวนเดอร์ เบออร์กามอท และเพตติแกรน โดยเฉพาะในน้ำมันหอมระเหยโรสวูดมีการสกัดไลนาโลอลมาใช้ในการอุตสาหกรรมน้ำหอม (Urbinati et al., 2014)



ภาพประกอบ 3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ 3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol (linalool)

ที่มา : Letizia, C., Cocchiara, J., Lalko, J., & Api, A. (2003). Fragrance material review on linalool. *Food and Chemical Toxicology*, 41(7), 943-964

โดยหากจัดกลุ่มตามโครงสร้างทางเคมีพบว่า ไลนาโลอลเป็นสารเคมีประเภทแอลกอฮอล์ ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ในโครงสร้างโมเลกุล โดยมีคาร์บอนเป็นโครงสร้างหลัก 10 ตัว และมีออกซิเจนอยู่ในสูตรโครงสร้าง เรียกว่า oxygenated monoterpenes โครงสร้างมีการจัดเรียงตัวแบบไม่เป็นวง (acyclic monoterpene alcohols) (Letizia, Cocchiara, Lalko, & Api, 2003) แสดงในภาพประกอบ 3 ทั้งนี้มีการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของไลนาโลอล (แสดงในตาราง 5)

ตาราง 5 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของไลนาโลอล

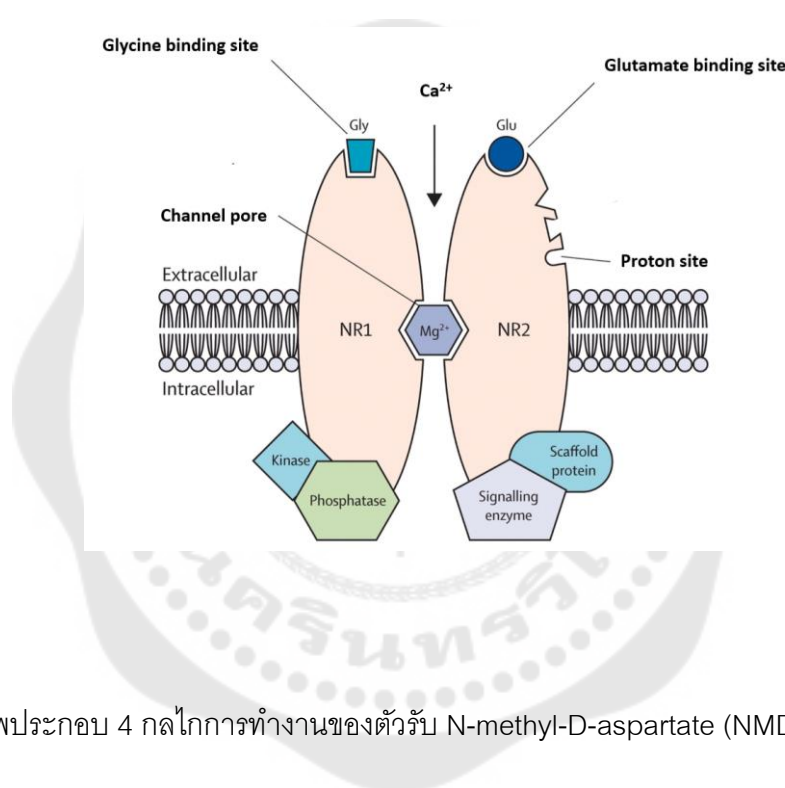
คุณสมบัติทางกายภาพและเคมี	ไลนาโลอล
น้ำหนักโมเลกุล	154.24 g mol ⁻¹
จุดเดือด	198-199 °C
จุดหลอมเหลว	มากกว่า 20 °C
ความสามารถในการละลายน้ำ	854-1589 mg L ⁻¹ ที่ 23.5-25 °C
ความดันไอ	0.2 hPa ที่ 23.5 °C
ค่าคงที่ของ Henry	1.9·10 ⁻⁵ atm m ³ mol ⁻¹
ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในชั้นออกทานอลต่อชั้นน้ำ	log P _{ow} = 2.97 ที่ 23.5 °C
ค่าครึ่งชีวิตในน้ำ	54 ชั่วโมง

ที่มา : Linalool, S. (2002). Initial Assessment Report For SIAM 14: OECD SIDS, Paris, France.

กลไกการออกฤทธิ์ของไลนาโลอล

ไลนาโลอลออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการทำงานของระบบกลูตาเมเทอร์จิก (glutamatergic system) ของระบบประสาทส่วนกลาง (ภาพประกอบ 4) โดยยับยั้งการทำงานของ N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้ร่างกายตื่นตัว โดย NMDAR เป็นช่องให้ Ca²⁺ ไหลผ่าน จากภาพประกอบ 4 จะเห็นได้ว่า NMDAR ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ NR1 และ NR2 โดยการทำงานเริ่มจากการเข้าจับของไกลซีน (glycine) ที่ตำแหน่งจดจำไกลซีน (glycine binding site) ของหน่วยย่อย NR1 และจากนั้นกลูตาเมต (glutamate) เข้าจับกับบริเวณจดจำกลูตาเมต (glutamate binding site) ของหน่วยย่อย NR2 ส่งผลให้ NMDA receptor เปิด ทำให้ Ca²⁺ สามารถไหลผ่านเข้าสู่เซลล์ประสาทได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับไลนาโลอล ไลนาโลอลจะเข้าไปแย่งจับที่บริเวณจดจำกลูตาเมตแบบ antagonist ส่งผลให้ Ca²⁺ ไม่สามารถไหลเข้าสู่เซลล์ประสาท ทำให้เกิดการยับยั้งการส่งกระแสประสาทที่ระบบประสาทส่วนกลางเป็นผลให้สัตว์เกิดการสลบ (Tsuchiya, 2017)

จากการศึกษางานวิจัยก่อนหน้าพบว่า ไลนาโลอลในน้ำมันหอมระเหยจากต้นลาเวนเดอร์ (*Lavandula spica*) มีฤทธิ์ในการยับยั้งกระแสประสาทโดยไปขัดขวางการทำงานของ NMDA receptor ในหนู และมีผลทำให้กล้ามเนื้อเรียบที่บริเวณหลอดเลือดคลายตัว (de Moura Linck et al., 2009) นอกจากนี้ยังพบว่า ไลนาโลอลที่สกัดได้จากต้น *Lippia alba* ที่ความเข้มข้น 100 และ 300 ไมโครลิตรต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการชักนำให้ปลา silver catfish (*Rhamdia quelen*) เกิดการสลบโดยไม่ทำลายสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ตับและไตของปลา silver catfish (de Freitas Souza et al., 2018)



ภาพประกอบ 4 กลไกการทำงานของตัวรับ N-methyl-D-aspartate (NMDA receptor)

ที่มา: Kalia, L. V., Kalia, S. K., & Salter, M. W. (2008). NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *The Lancet Neurology*, 7(8), 742-755.

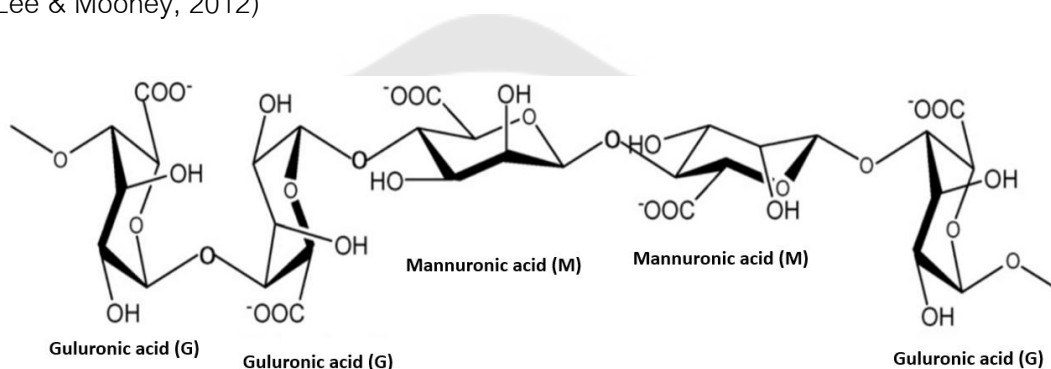
สารก่อรูปฟิล์ม

แผ่นฟิล์ม คือ วัสดุแผ่นบางที่สามารถใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ได้ โดยการก่อรูปฟิล์มนั้นมีโครงสร้างที่เชื่อมต่อกันภายในด้วยวิธีทางเคมี (chemical cross-linking) ทางกายภาพ (physical cross-linking) รวมทั้งชนิดของสารที่ใช้ในการก่อฟิล์ม ทำให้แผ่นฟิล์มที่ได้มีสมบัติแตกต่างกันออกไปทั้งในด้านต่าง ๆ เช่น ความยืดหยุ่น การละลายน้ำ ความสามารถในการขนส่งยา (drug delivery) และการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) (Akhtar, Hanif, & Ranjha, 2016)

สารที่สามารถก่อรูปเป็นแผ่นฟิล์มจัดเป็นสารประเภท hydrocolloids คือ polymer ที่มีสมบัติในการละลายน้ำ (hydrophilic polymer) เนื่องจากมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล ทั้งนี้ hydrocolloids สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทตามแหล่งที่มา ได้แก่ 1) hydrocolloids จากธรรมชาติ คือ สกัดได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืช สัตว์ และสาหร่าย เช่น โล คัส บี น กัม (locust bean gum) สกัดได้จากเมล็ดพืช อัล จิ เน ต (alginate) คาร์ราจีแนน (carrageenan) สกัดได้จากสาหร่าย และไคติน (chitin) สกัดได้จากสัตว์ 2) hydrocolloids ที่ดัดแปลงจากสารที่ได้จากธรรมชาติ เช่น carboxymethyl cellulose (CMC) ที่เกิดจากการดัดแปลงสมบัติของเซลลูโลส (cellulose) 3) hydrocolloids สังเคราะห์ เช่น polyethylene oxide polymers (PEO) (Williams & Phillips, 2009) ในปัจจุบันพบว่า มีการใช้ hydrocolloids ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมทางการแพทย์ และเภสัชกรรม เพื่อจุดประสงค์ต่าง ๆ เช่น การเป็นสารเพิ่มความคงตัว (stabilizer) สารเพิ่มความหนืด (thickener) และสารก่อเจล (gelling agent) (Phillips & Williams, 2000; Saha & Bhattacharya, 2010)

อัลจิเนต

อัลจิเนต (alginate) จัดเป็นสาร hydrocolloids ประเภท polysaccharide สกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล ได้แก่ *Laminaria hyperborea*, *L. digitata*, *L. japonica*, *Ascophyllum nodosum* และ *Macrocystis pyrifera* โดยอัลจิเนตมีโครงสร้างเป็น unbranched binary copolymer คือ polymer 2 สาย ไม่มีกิ่ง และประกอบด้วยมอนอเมอร์ (monomer) 2 ชนิด ได้แก่ 1,4- β -D-manuronic acid (M) และ α -L-guluronic acid (G) ซึ่งมอนอเมอร์แต่ละชนิดจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ glycosidic และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 32,000-40,000 กรัมต่อโมล (Lee & Mooney, 2012)



ภาพประกอบ 5 โครงสร้างทางเคมีของอัลจิเนตชนิด 1,4- β -D-manuronic acid (M) และ α -L-guluronic acid (G)

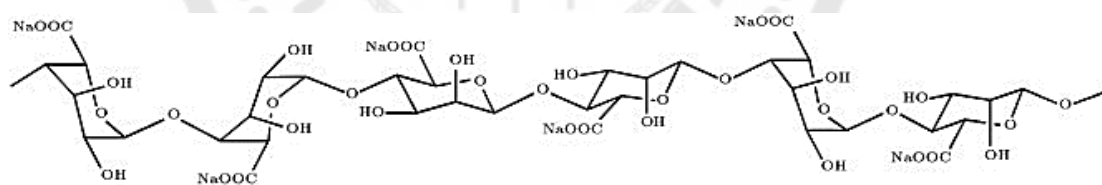
ที่ ม ๑ : Harding, S. E., Smith, I. H., Lawson, C. J., Gahler, R. J., & Wood, S. (2011). Studies on macromolecular interactions in ternary mixtures of konjac glucomannan, xanthan gum and sodium alginate. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 329-338.

สมบัติทางกายภาพและเคมีของอัลจิเนต

สมบัติทางกายภาพของอัลจิเนตเป็นส่วนสำคัญในการควบคุมความเสถียรภาพและความสามารถในการดูดซับน้ำในเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น ความเสถียรของการก่อรูปเจล ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณ manuronic acid หรือ guluronic acid ที่พบในโครงสร้างนั้น ๆ โดย polymer ที่มีปริมาณ manuronic acid มากก็ส่งผลให้เกิดเจลที่อ่อนนุ่ม ในทางตรงกันข้ามหาก polymer มีปริมาณ guluronic acid สูงก็ทำให้เกิดเจลที่มีความแข็ง ทั้งนี้พบว่า อัลจิเนตแต่ละชนิดมีความสามารถในการละลายน้ำที่แตกต่างกัน เนื่องจากอัลจิเนตทุกชนิดไม่สามารถละลายน้ำได้ โดยทั่วไปอัลจิเนตที่ละลายน้ำได้จะอยู่ในรูปสารประกอบผลสมเกลือของ Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ และ K^+ ของกรดอัลจิเนต (Lee & Mooney, 2012)

การประยุกต์ใช้อัลจิเนต

ในด้านเภสัชกรรมมีการนำอัลจิเนตมาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลาย ทั้งที่ใช้เป็นตัวยาสำคัญ (active ingredient) ใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ หรือใช้เป็นส่วนประกอบในตำรับยา (pharmaceutical necessities) โดยเฉพาะโซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) ซึ่งนิยมนำมาใช้ในการขึ้นรูปแผ่นฟิล์ม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพความแข็งแรงของ polymer (Jaipan, Nguyen, & Narayan, 2017) รวมทั้งเพิ่มความสามารถในการกักเก็บ และปลดปล่อยยา สารละลาย หรือน้ำมันหอมระเหย (Dong, Wang, & Du, 2006)



ภาพประกอบ 6 โครงสร้างทางเคมีของโซเดียมอัลจิเนต

ที่ ม า : Daemi, H., & Barikani, M. (2012). Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles. *Scientia Iranica*, 19(6), 2023-2028.

จากงานวิจัยก่อนหน้าพบว่า การก่อรูปแผ่นฟิล์มโดยใช้โซเดียมอัลจิเนตสร้างพันธะร่วมกับน้ำมันหอมระเหย โดยใช้กลีเซอรอลเป็นตัวกลางในการสร้างพันธะ ทั้งนี้ น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ คาโมมายด์ ซินนามอน ลาเวนเดอร์ ทีทรีออยล์ เปเปอรัมินท์ ยูคาลิปตัส ตะไคร้ และมะนาว จากการทดลองพบว่า แผ่นฟิล์มโซเดียมอัลจิเนตมีความสามารถในการปลดปล่อยน้ำมันหอมระเหย เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Escherichia coli* และเชื้อรา *Candida albicans* (Liakos et al., 2014) นอกจากนี้ยังมีการทดสอบการก่อรูปฟิล์มอัลจิเนตร่วมกับน้ำมันออริกาโน (*Origanum* sp.) โดยใช้แคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate) เป็นสารเชื่อมพันธะ (crosslinking agent) ผลการทดลองพบว่า ฟิล์มอัลจิเนตมีความหนาและความแข็งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารเชื่อมพันธะ และเมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของแผ่นฟิล์มอัลจิเนตร่วมกับน้ำมันออริกาโนที่ความเข้มข้น 1.0 และ 1.5 ร้อยละโดยมวล สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* และ *Salmonella enteritidis* (Benavides et al., 2012)



ปลานิล

รูปร่างและลักษณะของปลานิล

ปลานิลจัดอยู่ในวงศ์ Cichlidae สปีชีส์ *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758 รูปร่างคล้ายสีห์เหลี่ยมผืนผ้า หัวโต ลำตัวแบน มีลายดำพาดขวางข้างลำตัว 3-4 แถว บริเวณครีบหลังมีลายสีดำและจุดสีขาวสลับกัน และมีก้านครีบแข็งจำนวนมาก ครีบอกยาว ครีบท้องใหญ่ ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล บริเวณด้านท้องมีสีชมพูอ่อน และขอบครีบมีสีแดง ความยาวประมาณ 10-30 เซนติเมตร และสามารถมีขนาดตัวใหญ่ได้มากถึง 60 เซนติเมตร โดยทั่วไปเพศผู้มีขนาดตัวใหญ่กว่าเพศเมีย (Simões, Lombardi, Gomide, & Gomes, 2011) ทั้งนี้ ปลานิลมีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศแอฟริกา พบได้ในพื้นที่เขตร้อนตามหนอง บึง ทะเลสาบในหลายประเทศ เช่น ตอนล่างของทวีปอเมริกาเหนือ ศรีลังกา ชูदान ยูกันดา และแทนแกนยิกา ซึ่งปลานิลถูกนำเข้าสู่ประเทศไทยครั้งแรกเมื่อวันที่ 25 มีนาคม พ.ศ. 2508 โดยสมเด็จพระจักรพรรดิอะกิฮิโตะได้จัดถวายพันธุ์ปลาแก่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช (รัชกาลที่ 9) ทรงทดลองเลี้ยงในสวนจิตรลดา และพระราชทานชื่อปลาว่า “ปลานิล” (เพิ่มพูนศักดิ์เกษม, 2531)



ภาพประกอบ 7 ปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758)

ที่มา: ภาพถ่ายโดยนางสาว ปราวรธนา จันทร์กระจ่าง

วงชีวิตและการสืบพันธุ์

ปลาชนิดสามารถสืบพันธุ์ได้ตลอดทั้งปี โดยใช้พ่อแม่พันธุ์ที่ขนาดยาว 10 เซนติเมตร ปลายอายุ 4 เดือนขึ้นไป การแพร่ขยายพันธุ์ของปลานิลนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณไข่ที่แม่พันธุ์วาง ปริมาณมากน้อยขึ้นอยู่กับขนาดของแม่พันธุ์และฤดูกาล โดยปริมาณของไข่จะเพิ่มขึ้นตามขนาด และอายุของแม่พันธุ์ แม่พันธุ์ 1 ตัวจะวางไข่ 2-3 เดือนต่อครั้ง แต่ถ้าบ่อเลี้ยงดีมีอาหารเพียงพอ แม่พันธุ์ 1 ตัวจะสามารถแพร่พันธุ์ได้ประมาณ 3-4 ครั้งในเวลา 1 ปี (Simões et al., 2011)

การดำรงชีวิตของปลานิล

ปลานิลมีอุปนิสัยอยู่รวมกันเป็นฝูง โดยสามารถอาศัยได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อย เนื่องจากทนทานต่อความเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดี คือ ทนได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 11-42 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ ปลานิลจัดเป็นสัตว์ประเภท Omnivore คือ กินได้ทั้งเนื้อและพืชเป็นอาหาร เช่น สาหร่าย ตะไคร่น้ำ ตัวอ่อนของแมลง หรือ ไรน้ำที่มีอยู่ตามธรรมชาติในบ่อเลี้ยง ทั้งนี้ ปลานิลสามารถขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วในบ่อเลี้ยง ทำให้มีลูกปลาเกิดขึ้นมาทดแทนกันอยู่เสมอ ส่งผลให้การเลี้ยงปลานิลจึงสามารถพัฒนาเป็นระบบการเพาะเลี้ยงที่มีผลผลิตที่แน่นอนและเพียงพอต่อการส่งออกโดยไม่จำเป็นต้องจับพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติ (เพิ่มพูน ศักดิ์เกษม, 2531)

ความสำคัญทางเศรษฐกิจ

องค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) รายงานว่าปลานิลเป็นปลาชนิดเดียวที่มีการเลี้ยงในทุกทวีปทั่วโลก รวม 135 ประเทศ สำหรับประเทศไทยปลานิลมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ซึ่งเป็นที่นิยมในการนำมารับประทาน เนื่องจาก หาซื้อง่าย ราคาถูก สามารถนำมาประกอบอาหารได้หลากหลาย นอกจากนี้ปลานิลยังเป็นแหล่งโปรตีนราคาไม่แพง จากการรายงานกลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง ประมวลข้อมูลจากกรมศุลกากร ปี 2560 พบว่า มีปริมาณการส่งออกปลานิลประมาณ 3,108.7 ตัน คิดเป็นมูลค่า 189.5 ล้านบาท โดยประเทศไทยมีการส่งออกปลานิลทั้ง ปลานิลมีชีวิต ปลานิลสด ปลานิลแช่แข็ง ปลาแล่นเนื้อแช่แข็ง ไปตามตลาดหลัก 3 ตลาดใหญ่ของโลก ได้แก่ กลุ่มประเทศ ตะวันออกกลาง สหรัฐอเมริกา และกลุ่มประเทศสหภาพยุโรป (เกวลิน หนูฤทธิ์, 2560) ดังนั้น ผู้ประกอบการจึงคำนึงถึงการควบคุมทั้งคุณภาพ ปริมาณของผลผลิตเป็นสำคัญ เพื่อหลีกเลี่ยง การขาดทุนจากการตายของปลาที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการขนส่ง

ทั้งนี้ มีรายงานการใช้น้ำมันหอมระเหยในการขนส่งลูกปลานิลพบว่า น้ำมันกานพลู (*Eugenia caryophyllus*) ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ลูกปลานิลเกิดการสลบในระหว่างการขนส่งภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง โดยไม่มีการตายเกิดขึ้น (Wongtavatchai et al., 2006) ทั้งนี้ ยังมีการทดสอบการใช้ น้ำมันหอมระเหยในการทำสลบปลานิลสำหรับการทำหัตถการ เช่น การใช้สารสกัดไพล (*Zingiber montanum*) เพื่อใช้เป็นยาสลบในปลานิลน้ำหนักเฉลี่ย 12.47 ± 2.77 กรัม และ 37.95 ± 3.49 กรัม จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดไพลที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ปลานิลทั้งสองขนาดเข้าสู่การสลบได้ในระยะเวลาประมาณ 4 นาที และความเข้มข้น 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ปลานิลเกิดการสลบได้เร็วที่สุดคือ 1.68 ± 0.46 นาที (Limhang et al., 2017) นอกจากนี้ ยังมีการใช้น้ำมันกานพลูในการสลบปลานิลขนาด 5-20 เซนติเมตร ทดสอบที่ความเข้มข้น 15, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ปลานิลขนาด 5, 10 และ 15 เซนติเมตรสามารถสลบได้ที่ความเข้มข้น 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ปลานิลขนาด 20 เซนติเมตรสามารถสลบได้ที่ความเข้มข้น 60-100 มิลลิกรัมต่อลิตร (วิจิตรวาท์ ตุงชี่ และ ญัฐพล ราชูภิมนต์, 2561) และพบว่า มีการทดลองการใช้ น้ำมันจากข่า (*Alpinia galanga*) ผลการทดลอง รายงานว่า น้ำมันข่าที่ความเข้มข้น 700 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ลูกปลานิลเกิดการสลบในระยะที่ 3 และเมื่อทำการตรวจวัดค่าระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดและระดับฮอร์โมน cortisol ในพลาสมา พบว่า มีค่าใกล้เคียงกับค่าปกติคือ 50-70 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และ 20-30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จึงสามารถสรุปได้ว่าน้ำมันหอมระเหยข่ามีประสิทธิภาพในการลดความเครียดของปลานิลได้อย่างมีนัยสำคัญ (Pikulkaew et al., 2017) โดยทุกการทดลองสามารถเหนี่ยวนำให้ปลานิลเกิดการสลบได้ในระยะเวลา 2-7 นาที และสามารถฟื้นจากการสลบได้ในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที

จากการทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า ยังไม่มีรายงานการวิจัยการประเมินประสิทธิภาพของการใช้น้ำมันหอมระเหยโรสวูดในการขนส่งลูกปลานิล ดังนั้น ในงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองเพื่อประเมินระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดในรูปแบบแผ่นฟิล์มและตรวจสอบผลกระทบทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของลูกปลานิล

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี

วัสดุ อุปกรณ์

วัสดุ อุปกรณ์	ยี่ห้อ
จานเพาะเชื้อ (petri dish) 25x25 เซนติเมตร	Pyrex
บีกเกอร์ (beaker) 20-50 มิลลิเมตร	Pyrex
แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)	Pyrex
กระบอกตวง (cylinder) 100 และ 500 มิลลิลิตร	Witeg
กระจกสไลด์ 26x76 มิลลิเมตร	HDA
แผ่นปิดสไลด์ 22x22 มิลลิเมตร	HDA
ไมโครปิเปต (micro pipette) 10-1,000 มิลลิลิตร	Gilson
ไมโครปิเปตทิป (micropipette tip)	Gilson
ฟู่กัน เบอร์ 6	Masterant
กล่องเหลี่ยมใส 40x20 เซนติเมตร	Nam Ngai Hong
กล่องโฟมขนาด 29x47x30 นิ้ว	-
ตู้ปลาขนาด 20 นิ้ว	-
ถาดขนาด 10x15 เซนติเมตร	-

เครื่องมือ

เครื่องมือ	ยี่ห้อ	รุ่น
กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ	Leica	MZ6
กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา	Leica	DM750
เครื่องตั้งดิจิทัล	Satorius	ED224S
เครื่องให้ความร้อน	Nuova	SP18420
เครื่องกวนสารละลาย	Aa one	RSH-1D
เครื่องเขย่าสาร	Vision	KMC
เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส	Extech	PH-100
เครื่องวัดออกซิเจนที่ละลายน้ำ	AMTAST	AMT08
เครื่องไมโครโทม	Leica	RM135

เครื่องมือ (ต่อ)

เครื่อง GC-MS	Shimadzu	QP2020
เครื่องไฮโมจีไนซ์เซอร์	Ultra-Turraz	T25
ตู้อบลมร้อน	Memmert	VO200
เครื่องเขย่าสาร	GERHARDT	RO 5
เครื่องปั๊มเติมอากาศ	Resun	AP-10
เครื่องให้อาหารปลาอัตโนมัติ	Resun	AF-2003
กล้องถ่ายรูป	Cannon	EOSM50
อ่างส่งคลื่นความถี่สูง	Elma	-

สารเคมี

สารเคมี	ยี่ห้อ
น้ำมันหอมระเหยโรสวูด	เคมีภัณฑ์
MS-222	Sigma-aldrich
Ethyl alcohol	Merck
Bouin's fixative	BIO optica
Xylene	RCI labscan
Paraplast	Surgipath
Hematoxylin	Sigma-aldrich
Eosin	Sigma-aldrich
Permount	Sigma-aldrich
HCl	Merck
NaOH	Sigma-aldrich
Absolute ethanol	Merck
Tween 80	Sigma-aldrich
Alginate	Sigma-aldrich

วิธีการทดลอง

การเตรียมสัตว์ทดลอง

ลูกปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) คละเพศจากไพศาลพันธุ์ปลา กรุงเทพมหานคร อายุ 1 เดือน จำนวน 144 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 3.43 ± 1.06 กรัม ทำการเลี้ยงในตู้ปลาขนาด 20 นิ้ว ตู้ละ 20 ตัว ในน้ำประปาปราศจากคลอรีน เต็มออกซิเจนโดยเครื่องฟอกอากาศตลอดเวลา เปลี่ยนน้ำทุก 24 ชั่วโมง ให้อาหารวันละครั้ง โดยให้อาหารวันละประมาณร้อยละ 5 ของน้ำหนักปลา (เพิ่มพูน ศักดิ์เกษม, 2531) และให้ปลาอดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนเริ่มทำการทดลอง

การเตรียมสารละลาย

เตรียมสารละลายโรสคูต (stock solution) โดยใช้เอทานอลร้อยละ 99.9 เป็นตัวทำละลายในอัตราส่วน 1:4 โดยปริมาตร (น้ำมันหอมระเหยโรสคูต 1 ส่วนในเอทานอล 4 ส่วน)

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS)

เตรียมตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยโรสคูตในเอทานอลที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตัวอย่างจะถูกวิเคราะห์โดยมีใช้คอลัมน์ GC column DP-5 ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 ไมโครเมตร ใช้ฮีเลียม (He) เป็นแก๊สตัวพาหรือ carrier gas ด้วยอัตรา 0.6 มิลลิกรัมต่อนาที ปริมาณตัวอย่างที่ฉีด 0.5 ไมโครลิตร โดยใช้โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิดังนี้ ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ เริ่มต้นที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที โดยเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 250 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที โดยให้อุณหภูมิคงที่นาน 5 นาที จากนั้นบันทึกผลเป็นโครมาโทแกรมและประเมินผลโดยเทียบค่า retention time และ mass spectrum ขององค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยโรสคูตแต่ละพีค (peak) ได้กับค่า retention time และ mass spectrum ของค่ามาตรฐานที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล

**การหาระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่เหมาะสมในการชักนำให้
ลูกปลานิลสลบและฟื้นตัวภายในระยะเวลาที่กำหนด**

การทดลองเบื้องต้น (preliminary test)

การทดลองหาช่วงความเข้มข้นสูงสุดของสารละลายน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ไม่ทำให้ลูกปลานิลตาย เพื่อประมาณช่วงความเข้มข้นของสารละลายที่จะนำไปใช้ในการทดลองอย่างละเอียด

การทดลองอย่างละเอียด (full scale test)

เกณฑ์กำหนดระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้ลูกปลานิลเกิดการสลบในระยะเวลาที่ 3 และฟื้นตัวจากการสลบแบบเต็มรูปแบบ ดังที่แสดงในตารางที่ 1 คือ น้ำมันหอมระเหยโรสวูดต้องสามารถชักนำให้ลูกปลานิลเกิดการสลบภายในระยะเวลา 5 นาที และสามารถฟื้นตัวจากการสลบภายในระยะเวลาไม่เกิน 10 นาที โดยมีร้อยละการตายเท่ากับ 0 (Kizak et al., 2018)

ทำการทดลองโดยใช้ช่วงความเข้มข้นของสารละลายน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ได้จากการทดลองเบื้องต้น โดยทำการทดลอง 6 ความเข้มข้น คือ 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 ไมโครลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร เริ่มการทดลองโดยสูบลูกปลานิลที่ละตัวไปใส่ในบ่อสลบ (induction tank) โดยสารผสม 1 ความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 6 ตัว เมื่อนำปลาทดลองลงในบ่อสลบทำการบันทึกผลการทดลองโดยการสังเกตพฤติกรรมของปลาที่เปลี่ยนแปลงไป ได้แก่ จำนวนครั้งของการเปิด-ปิดแผ่นปิดเหงือก ลักษณะการว่ายน้ำ การทรงตัว และการตอบสนองต่อแรงกดที่บริเวณครีบกาง บันทึกระยะเวลาในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสลบ (induction time) เป็นนาที คือ ระยะเวลาตั้งแต่ย้ายปลาลงถึงสลบจนกระทั่งปลาอยู่ในสภาวะสลบในระยะเวลาที่ 3 (ตาราง 1) ตรวจสอบโดยการใช้แท่งแก้วกดบริเวณโคนครีบกาง อัตราการเปิด-ปิดของแผ่นปิดเหงือกข้าง และนอนนิ่งอยู่กับบ่อ หากปลาทดลองไม่เข้าสู่สภาวะสลบในระยะเวลาที่ 3 ภายใน 10 นาที ถือว่าปลาไม่สามารถเข้าสู่สภาวะสลบได้ และนำปลาลงสู่ถังฟื้นสลบทันที (recovery tank) ขั้นตอนสุดท้ายนำปลาไปพักฟื้นในถังออกซิเจนที่มีปริมาณน้ำ 2 ลิตร จับเวลา และหยุดเวลาเมื่อปลาฟื้นตัวแบบเต็มรูปแบบ

การทดลองครั้งนี้ใช้ MS-222 ซึ่งเป็นยาสลบปลามาตรฐานเป็นกลุ่มควบคุมทางบวก (positive control) ที่ความเข้มข้น 120 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การหาระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่เหมาะสมสำหรับการ ขนส่งลูกปลานิล

การทดลองนี้มุ่งเน้นการใช้ยาสลบในการจำลองการขนส่งลูกปลานิล จึงมีความประสงค์ให้ลูกปลานิลเกิดการสลบในระยะที่ 1 (ตาราง 1) เนื่องจากเป็นระยะที่ปลาลดการเคลื่อนไหว และการตอบสนองจากสิ่งแวดล้อมภายนอกโดยยังไม่สูญเสียสมดุลของร่างกาย ดังนั้นสภาวะการสลบในระยะที่ 1 จึงเหมาะสมในการขนส่งปลาขณะมีชีวิต (ทัศนัย อ่องสาคร, 2528)

เตรียมน้ำปริมาตร 10 ลิตร ใส่ในกล่องโฟมขนาด 29x47x30 นิ้ว ใส่น้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ละลายในเอทานอลในอัตราส่วน 1:4 ที่ระดับความเข้มข้น 25, 50, 75 และ 100 ไมโครลิตรต่อลิตร จากนั้นสูบลูกปลานิล 10 ตัวใส่ลงในกล่องโฟมที่เตรียมไว้ แล้วนำกล่องโฟมที่บรรจุลูกปลานิลวางบนเครื่องเขย่าสาร (shaker) ที่ความเร็ว 45 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อจำลองสถานการณ์การขนส่ง ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บันทึกผลการทดลอง โดยสังเกตอาการและพฤติกรรมของลูกปลานิลหลังได้รับยาสลบทุก 30 นาที จนครบ 2 ชั่วโมง บันทึกระยะเวลาในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสลบ (induction time) เป็นนาที คือ 1) ระยะเวลาตั้งแต่ย้ายลูกปลานิลลงถังสลบจนกระทั่งปลาอยู่ในสภาวะสลบในระยะที่ 1 และ 2) ระยะเวลาที่ลูกปลานิลยังคงอยู่ในสภาวะสลบในระยะที่ 1 โดยไม่มีการตายหรือการฟื้นจากการสลบภายใน 2 ชั่วโมง หลังสิ้นสุดการทดลองปลาไปพักฟื้นในถังออกซิเจนที่มีปริมาณน้ำ 10 ลิตร จับเวลาเมื่อปล่อยปลาลงน้ำ และหยุดเวลาเมื่อปลาฟื้นตัวแบบเต็มรูปแบบ (full recovery time)

การทดลองครั้งนี้ใช้ MS-222 ซึ่งเป็นยาสลบปลามาตรฐานเป็นกลุ่มควบคุมทางบวก (positive control) ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การตรวจคุณภาพน้ำ

ตรวจคุณภาพน้ำโดยการวัดค่ากรด-เบส (pH) ปริมาณออกซิเจนในน้ำ (dissolved oxygen, DO) และอุณหภูมิ น้ำ ทำการตรวจคุณภาพน้ำ 3 ครั้ง ได้แก่ 1) ก่อนการทดลอง 2) หลังใส่สารและเริ่มทำการทดลอง และ 3) หลังการทดลองเกิดการสลบ เพื่อวัดความเปลี่ยนแปลงของสภาพน้ำของทุกการทดลอง

การเตรียมและทดสอบประสิทธิภาพของแผ่นฟิล์ม

การเตรียมฟิล์มอัลจิเนตที่ผสมกับน้ำมันหอมระเหยโรสวูด

เตรียมฟิล์มน้ำมันหอมระเหยโรสวูด 4 สูตร โดยนำน้ำมันหอมระเหยโรสวูดผสมกับทวิน 80 (tween 80) ร้อยละ 25, 50, 75 และ 100 โดยปริมาตรของน้ำมันหอมระเหยโรสวูด (ตาราง 6) นำผงอัลจิเนตมาละลายในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร แล้วกวนอัลจิเนตให้ละลายด้วยเครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer) ที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที จากนั้นเติมน้ำมันหอมระเหยที่เตรียม แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนเป็นเวลา 30 นาที และเครื่องโฮโมจีไนซ์เซอร์ (homogenizer) ที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที และกำจัดฟองอากาศด้วยอ่างส่งคลื่นความถี่สูง (sonicator bath) เป็นเวลา 20 นาที ทำการขึ้นรูปฟิล์มด้วยเทคนิค solvent casting โดยการเทสารละลายปริมาตร 40 มิลลิลิตร ลงบนภาชนะขนาด 10x15 เซนติเมตร จากนั้นนำภาชนะใส่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Benavides et al., 2012; Yanwong, 2014) แล้วลอกฟิล์มอัลจิเนตออกจากภาชนะ นำไปชั่งน้ำหนัก เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

ตาราง 6 สูตรฟิล์มน้ำมันหอมระเหยโรสวูด

สูตรฟิล์มน้ำมันหอมระเหยโรสวูด	ปริมาณสารผสมต่อน้ำ 100 ml			อัตราส่วน
	อัลจิเนต (g)	น้ำมันหอมระเหยโรสวูด (ml)	Tween 80 (ml)	
สูตรที่ 1	2	2	0.50	1:1:0.25
สูตรที่ 2	2	2	1.00	1:1:0.50
สูตรที่ 3	2	2	1.50	1:1:0.75
สูตรที่ 4	2	2	2.00	1:1:1.00

การทดสอบประสิทธิภาพการละลายน้ำของฟิล์มน้ำมันหอมระเหยโรสวูด

การทดสอบการละลายน้ำของฟิล์มอัลจิเนต ทำการทดสอบโดยการตัดฟิล์มให้มีขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร นำฟิล์มใส่ในบีกเกอร์เพื่อชั่งน้ำหนัก จากนั้นทำการเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเข้าสู่อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อระเหยน้ำ นำฟิล์มอัลจิเนตอบแห้งมาชั่งน้ำหนัก โดยสามารถคำนวณค่าร้อยละการละลายน้ำ (Solubility in Water, WS) (Wang, Liu, Holmes, Kerry, & Kerry, 2007) ได้ดังสมการ (1) ต่อไปนี้

$$\text{ค่าร้อยละการละลายน้ำ (WS)} = [(W_f - W_i) / W_i] \times 100 \quad \text{--- (1)}$$

เมื่อ W_i คือ น้ำหนักแห้งของฟิล์มเริ่มต้น

W_f คือ น้ำหนักแห้งของฟิล์มสุดท้าย

การทดสอบประสิทธิภาพการชักน้ำให้เกิดการสลายของฟิล์มน้ำมัน

หอมระเหยโรสวูด

การประเมินประสิทธิภาพการชักน้ำให้เกิดการสลายของแผ่นฟิล์มน้ำมันหอมระเหยโรสวูด ทำการทดสอบโดยใช้ฟิล์มที่น้ำหนัก 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร โดยมีขั้นตอนและเกณฑ์การทดลองเช่นเดียวกับการหาระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่เหมาะสมสำหรับการขนส่งลูกปลานิล

การตรวจสอบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของลูกปลานิลหลังการทำ สลบด้วยน้ำมันหอมระเหยโรสวูด

การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

ทำการเตรียมสไลด์ถาวรโดยวิธีพาราฟิน (paraffin method) โดยตัดแบ่งเนื้อเยื่อเหงือกและตับขนาดประมาณ 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร มาแช่ในสารละลายคงสภาพเนื้อเยื่อ (Bouin's fixative) เป็นเวลา 6-12 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำประปา 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ชั่วโมง จากนั้นดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) ด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 50, 70, 90 เปอร์เซ็นต์ อย่างละ 1 ครั้ง และแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที ตามลำดับ ต่อมาให้ นำเนื้อเยื่อแช่ในแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 3 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที และเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อเข้าสู่กระบวนการแทรกพาราพลาสติกโดยแช่เนื้อเยื่อในสารละลาย 1:1 ไซลีนผสมแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 30 นาที จากนั้นแช่ไซลีน 3 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที ต่อมาแช่ชิ้นเนื้อในสารละลาย 1:1 พาราพลาสติกผสมไซลีน 30 นาที แล้วย้ายชิ้นเนื้อลงแช่ในพาราพลาสติก 2 ครั้ง จากนั้นทำการฝังเนื้อเยื่อลงในพาราพลาสติก และตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (microtome) ให้เนื้อเยื่อมีความหนาประมาณ 8 ไมโครเมตร นำเนื้อเยื่อลงบนสไลด์ที่เคลือบด้วยเจลาตินจนแห้ง แล้วนำไปวางบนแท่นอุ่นสไลด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำสไลด์ไปย้อมด้วยสีฮีมาทอกซาลีน-อีโอซิน (Heamatoxylin & Eosin, H&E)

การย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีฮีมาทอกซาลีน-อีโอซิน

นำสไลด์ที่ติดเนื้อเยื่อแช่ลงไซลีน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นแช่ในสารละลาย 1:1 ไซลีนผสมแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 5 นาที แช่แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 95, 90 และ 70 เปอร์เซ็นต์ 5 นาที ตามลำดับ แล้วย้อมด้วยสีฮีมาทอกซาลีน 8 นาที ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน 1 นาที ต่อมานำสไลด์จุ่มลงในสารละลาย HCl 0.05 เปอร์เซ็นต์ และจุ่มลงในสารละลาย NaOH 1 เปอร์เซ็นต์ อย่างละ 1 ครั้ง ตามลำดับ แล้วล้างน้ำประปาขึ้น-ลง 1 รอบ จากนั้นแช่แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 70, 90 และ 95 เปอร์เซ็นต์ อย่างละ 5 นาที แล้วย้อมที่สีอีโอซิน 5 นาที แช่ลงในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 5 นาที แล้วแช่ลงในแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 10 นาที ต่อมาแช่ใน 1:1 ไซลีนผสมแอลกอฮอล์ 10 นาที และแช่ในไซลีนอีก 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นปิดสไลด์แล้วนำไปศึกษาเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. วิเคราะห์ความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดในการใช้เป็นยาสลบสำหรับลูกปลานิลโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ (post hoc) โดยใช้ Tukey's honestly significant difference (HSD) ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 23
2. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดและเวลาการสลบโดยการหาค่าสหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient, r)
3. วิเคราะห์คุณภาพน้ำ และสมบัติการละลายน้ำของแผ่นฟิล์มยาสลบโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ (post hoc) โดยใช้ Tukey's honestly significant difference (HSD) ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



บทที่ 4

ผลการดำเนินวิจัย

ผลงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อประเมินระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นยาสลบสำหรับการขนส่งลูกปลานิล ประเมินประสิทธิภาพแผ่นฟิล์มยาสลบน้ำมันหอมระเหยโรสวูดในการชักนำให้เกิดการสลบในลูกปลานิลในระหว่างการขนส่ง ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของลูกปลานิลหลังได้รับน้ำมันหอมระเหยโรสวูดและแผ่นฟิล์มยาสลบ โดยผู้วิจัยได้วางแผนการทดลองและได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

1. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS)
2. ผลการประเมินระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นยาสลบลูกปลานิล
3. ผลการประเมินระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่เหมาะสมสำหรับการขนส่งลูกปลานิล
4. ผลการประเมินประสิทธิภาพในการละลายน้ำ และการชักนำให้เกิดการสลบสำหรับการขนส่งลูกปลานิลของแผ่นฟิล์มยาสลบน้ำมันหอมระเหยโรสวูด
5. ผลการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของลูกปลานิลหลังได้รับน้ำมันหอมระเหยโรสวูด

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดด้วยเครื่อง GC-MS

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยโรสวูด พบสารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญ 7 ชนิด แสดงดังตาราง 7 โดยมีไลนาโลอลเป็นสารองค์ประกอบสำคัญที่พบมากที่สุดถึงร้อยละ 43.66

ตาราง 7 วิเคราะห์สารองค์ประกอบสำคัญในน้ำมันหอมระเหยโรสวูดด้วยเครื่อง GC-MS

สารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญ	ร้อยละของสารสำคัญ (%)
Linalool	43.66
Isobornyl acetate	6.07
L-alpha-Terpineol	5.71
3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-(R)-	3.56
Benzene	1.96
(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo [3.1.1] hept-2-ene	1.95
Beta-Pinene	1.69
Others	35.40
Total	100.00

ผลการประเมินระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นยาสลบลูกปลานิล

ผลการทดลองเบื้องต้น (preliminary test)

จากการทดลองหาช่วงความเข้มข้นสูงสุดของสารละลายน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ไม่ทำให้ลูกปลานิลตาย ได้กำหนดช่วงความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดในการทดลองที่ 100-1000 ไมโครลิตรต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า น้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ความเข้มข้น 700 ไมโครลิตรต่อลิตร มีผลทำให้ลูกปลานิลตายภายในระยะเวลา 5 นาที โดยมีอัตราการตายอยู่ที่ร้อยละ 100 ในขณะที่ น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 600 ไมโครลิตรต่อลิตร ไม่มีผลให้ลูกปลานิลตาย ดังนั้น ในการทดลองแบบละเอียด (full scale test) จึงทำการทดลองที่ความเข้มข้น 100-600 ไมโครลิตรต่อลิตร ในการประเมินระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดสำหรับการสลบลูกปลานิลในระยะที่ 3

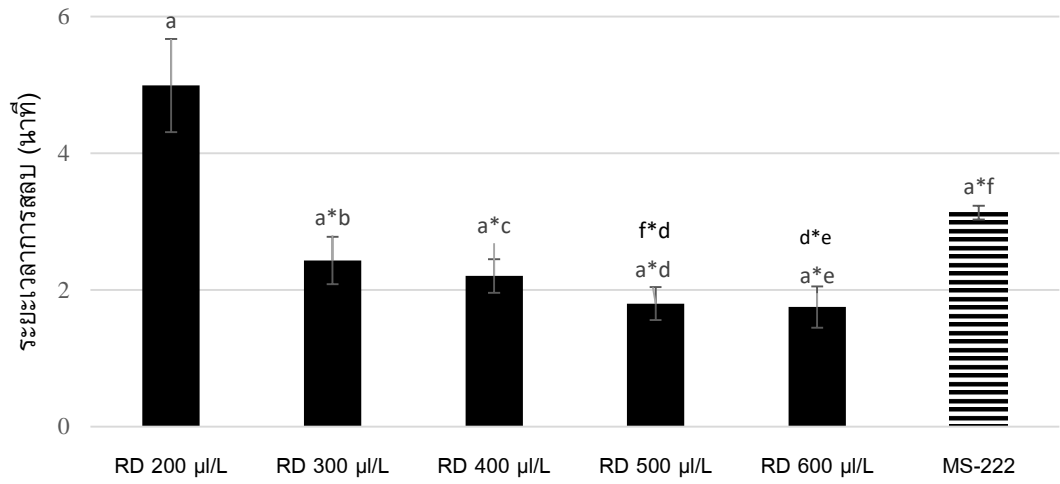
การทดลองแบบละเอียด (full scale test)

ผลการทดสอบการใช้น้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ความเข้มข้น 100-600 ไมโครลิตรต่อลิตร พบว่า ลูกปลานิลในกลุ่มควบคุม (control) และเอทานอลที่ความเข้มข้น 1,200 ไมโครลิตรต่อลิตร ไม่มีผลทำให้ลูกปลานิลเกิดการสลบ โดยมีพฤติกรรมการว่ายน้ำ การทรงตัวปกติ และการเปิด-ปิดแผ่นปิดเหงือกอยู่ที่ 167.83 ± 2.83 ครั้งต่อนาที

น้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อลิตร ไม่สามารถชักนำให้ลูกปลานิลเข้าสู่การสลบในระยะที่ 3 (loss of reflex reactivity) เพียงแต่สามารถเข้าสู่การสลบในระยะที่ 2 (loss of equilibrium) ในเวลา 5 นาที โดยลูกปลานิลมีพฤติกรรมการแสดงออก คือ มีการว่ายน้ำอย่างไม่มีทิศทาง การทรงตัวเอียง และมีตอบสนองต่อสิ่งเร้าที่รุนแรง

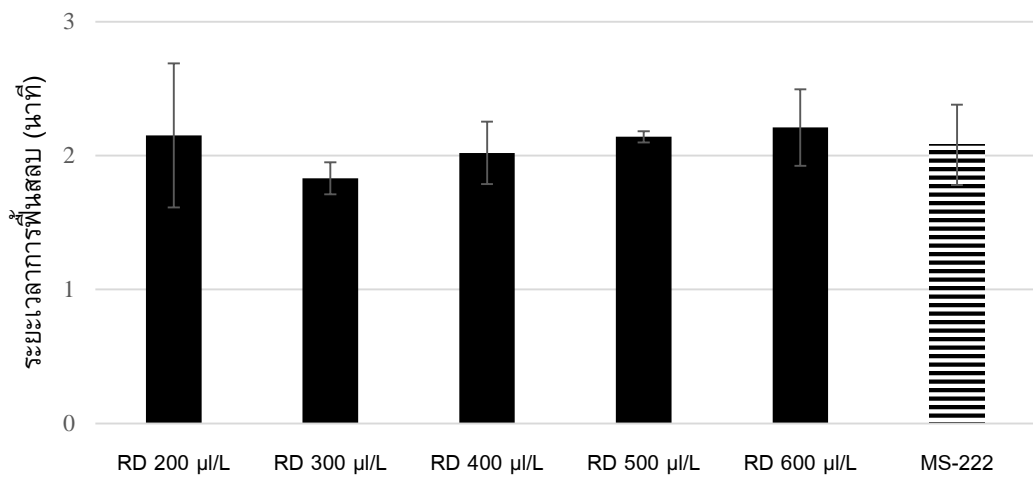
น้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ความเข้มข้น 200-600 ไมโครลิตรต่อลิตร รวมทั้งกลุ่มควบคุมทางบวก MS-222 ที่ความเข้มข้น 120 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ลูกปลานิลเข้าสู่การสลบภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที (ภาพประกอบ 8) โดยมีพฤติกรรม คือ ปลาไม่มีการว่ายน้ำ อัตราการเปิด-ปิดแผ่นปิดเหงือกช้ากว่ากลุ่มควบคุม และไม่มีการตอบสนองต่อแรงกดที่บริเวณโคนคีบหาง ทั้งนี้ จากการทดสอบค่าสหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient, r) พบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำหอมระเหยโรสวูดเพิ่มมากขึ้น ลูกปลานิลจะใช้ระยะเวลาในการสลบเร็วขึ้นตามลำดับ ($r = -0.83$) โดยที่น้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ความเข้มข้น 200 ไมโครลิตรต่อลิตร ใช้เวลา 4.99 ± 0.68 นาที ในการชักนำให้ลูกปลานิลสลบมากกว่าเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ผลของการฟื้นสลบพบว่า ลูกปลานิลที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยโรสวูดทุกความเข้มข้นรวมทั้ง MS-222 สามารถฟื้นตัวเต็มรูปแบบ (full recovery) ภายหลังจากการสลบในระยะที่ 3 ได้ภายใน 10 นาที ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพประกอบ 9)



หมายเหตุ x * y แสดงถึงค่าเฉลี่ยของระยะเวลาการสลบที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05

ภาพประกอบ 8 ระยะเวลาการชักนำให้ลูกปลานิลเกิดการสลบในระยะที่ 3



ภาพประกอบ 9 ระยะเวลาการฟื้นสลบของลูกปลานิล

ผลการตรวจวัดคุณภาพน้ำก่อนและหลังการสลบในระยะที่ 3

จากการตรวจวัดคุณภาพน้ำก่อนและหลังการทดลองพบว่า คุณภาพน้ำก่อนการทดลองมีค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิเท่ากับ 27.39 ± 1.04 องศาเซลเซียส ค่า pH เท่ากับ 7.66 ± 0.10 และค่า DO เท่ากับ 5.74 ± 0.74 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบกับการคุณภาพน้ำหลังการทดลองของทุกการทดลองตามตาราง 8 พบว่า คุณภาพน้ำที่ได้นั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตาราง 8 คุณภาพน้ำก่อนและหลังการทดลองการสลบในระยะที่ 3

ระดับความเข้มข้นของสารทดสอบ ($\mu\text{L/L}$)	พารามิเตอร์น้ำก่อนหลังการทดลองการสลบในระยะที่ 3		
	T ($^{\circ}\text{C}$)	pH	DO (mg/L)
ก่อนการทดลอง			
0 (control)	27.39 ± 1.04	7.66 ± 0.10	5.74 ± 0.74
หลังการทดลอง			
120 mg/L MS-222	27.45 ± 0.30	7.73 ± 0.12	6.42 ± 0.13
เอทานอล	27.93 ± 0.55	7.55 ± 0.04	6.08 ± 0.74
200	26.22 ± 1.13	7.70 ± 0.11	5.93 ± 0.55
300	25.72 ± 0.58	7.76 ± 0.05	6.28 ± 0.26
400	25.77 ± 0.03	7.58 ± 0.03	6.67 ± 0.23
500	25.81 ± 1.93	7.58 ± 0.32	6.45 ± 0.51
600	27.03 ± 0.74	7.70 ± 0.05	6.65 ± 0.10

ผลการประเมินระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่เหมาะสมสำหรับการขนส่งลูกปลานิล

จากผลการทดลองการชักนำให้ลูกปลานิลสลบในระยะเวลาที่ 3 พบว่า น้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อลิตร สามารถชักนำให้ลูกปลานิลสลบเข้าสู่การสลบได้เพียงระยะที่ 2 ดังนั้น การจำลองการขนส่งจึงใช้น้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อลิตร เป็นความเข้มข้นสูงสุดในการทดลอง

ระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่เหมาะสมสำหรับการขนส่งลูกปลานิล

การทดลองการจำลองการขนส่งระยะสั้นภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง ทำการทดลองโดยใช้ระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ 25, 50, 75 และ 100 ไมโครลิตรต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า ลูกปลานิลในกลุ่มควบคุม (control) และเอทานอลไม่มีผลในการชักนำให้ลูกปลานิลเกิดการสลบ ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ความเข้มข้น 25 ไมโครลิตรต่อลิตร ทั้งนี้พบว่า น้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ความเข้มข้น 75 และ 100 ไมโครลิตรต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่สูงเกินไปสำหรับการสลบในระยะที่ 1 (sedation) ซึ่งไม่เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ข้างต้น

ในขณะที่ น้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ความเข้มข้น 50 ไมโครลิตรต่อลิตรมีประสิทธิภาพในการชักนำให้ลูกปลานิลเข้าสู่การสลบในระยะที่ 1 ตลอดระยะเวลา 2 ชั่วโมง โดยมีพฤติกรรมคือ ลูกปลานิลไม่ตอบสนองต่อแสงและการสัมผัส มีการว่ายน้ำช้าลง แต่การทรงตัวปกติ ตลอดระยะเวลาการขนส่ง และเมื่อครบระยะเวลา 2 ชั่วโมงพบว่า ลูกปลานิลสามารถฟื้นจากการสลบได้ภายในระยะเวลาเฉลี่ย 0.90 ± 0.31 นาที ซึ่งสอดคล้องกับการใช้ MS-222 (positive control) ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตาราง 9)

ตาราง 9 ประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการสลบในระหว่างการขนส่งเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

ระดับความเข้มข้น ของสารทดสอบ ($\mu\text{l/L}$)	ระยะเวลาในการสลบ (นาที)									ระยะเวลาในการ ฟื้นตัว (นาที)	อัตรา การรอด ชีวิต (%)
	5	10	15	20	25	30	60	90	120		
0 (control)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100
50 mg/L MS-222	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0.93 \pm 0.34	100
เอทานอล	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100
50	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0.90 \pm 0.31	100
75	0	1	1	1	2	2	2	2	2	3.53 \pm 0.03	100
100	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	100

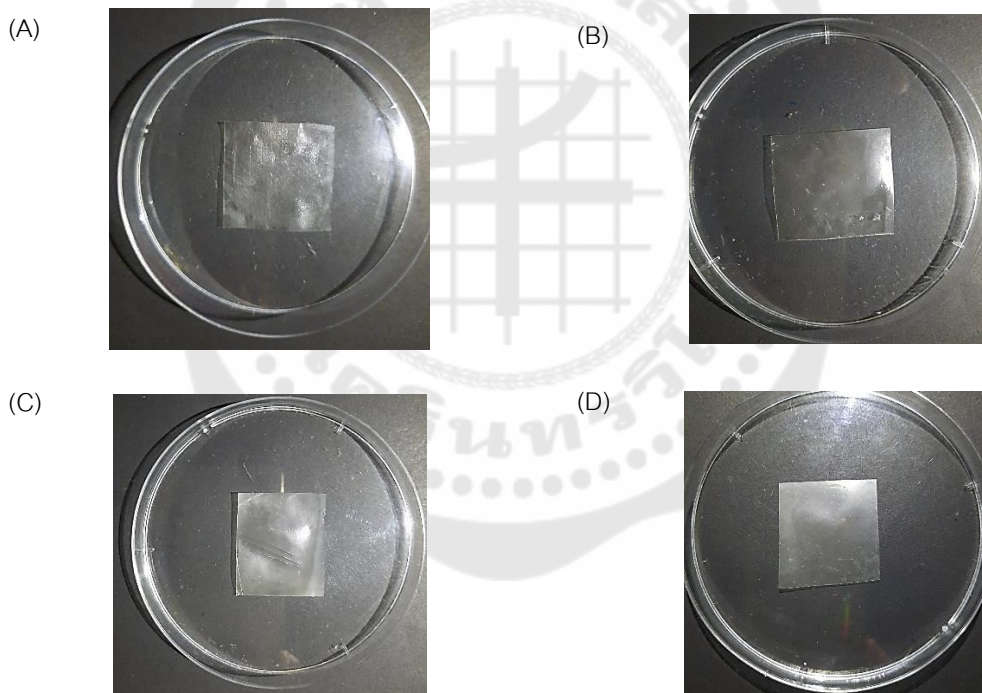
โดย 0 = ไม่เกิดการสลบ, 1 = การสลบระยะที่ 1, 2 = การสลบระยะที่ 2, 3 = การสลบระยะที่ 3,

4 = การสลบระยะที่ 4

ผลการประเมินประสิทธิภาพแผ่นฟิล์มน้ำมันหอมระเหยโรสวูดในการชักนำให้เกิดการ สลบในลูกปลานิลในระหว่างการขนส่ง

ผลการสังเคราะห์ฟิล์มอัลจินเตอร่วมกับน้ำมันหอมระเหยโรสวูด

ผลการสังเคราะห์ฟิล์มไฮเดียมอัลจินเตอร่วมกับน้ำมันหอมระเหยโรสวูดด้วยวิธี solvent casting จากนั้นนำเข้าสู่ตู้อบลมร้อน 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบลักษณะทางกายภาพเบื้องต้น ดังนี้ แผ่นฟิล์มสูตรที่ 1 และ 2 มีลักษณะบางใส เปราะง่าย และการกระจายตัวของสารยังคงไม่สม่ำเสมอ ฟิล์มสูตรที่ 3 แผ่นฟิล์มที่ได้มีสีขุ่น การกระจายตัวของสารไม่สม่ำเสมอ มีความเปราะน้อยกว่าฟิล์มสูตรที่ 1 และ 2 ในส่วนของฟิล์มสูตรที่ 4 มีสีขาวขุ่น การกระจายตัวของสารสม่ำเสมอทั่วทั้งแผ่น แผ่นฟิล์มที่ได้มีลักษณะเรียบเนียน และไม่เปราะแตกง่าย เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มอีก 3 สูตร (ภาพประกอบ 10)

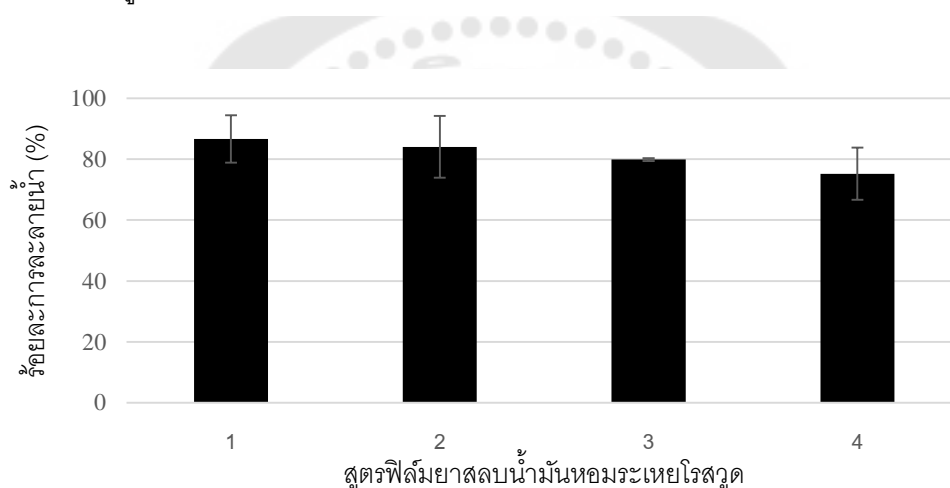


ภาพประกอบ 10 ผลการสังเคราะห์ฟิล์ม

โดย (A)	=	ฟิล์มสูตรที่ 1
(B)	=	ฟิล์มสูตรที่ 2
(C)	=	ฟิล์มสูตรที่ 3
(D)	=	ฟิล์มสูตรที่ 4

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการละลายน้ำของฟิล์มยาสลบ

จากการเตรียมฟิล์มน้ำมันหอมระเหยโรสวูดทั้ง 4 สูตร ตามตารางที่ 6 แล้วนำมาทดสอบการละลายน้ำดังสมการ (1) พบว่า ฟิล์มน้ำมันหอมระเหยโรสวูดสูตรที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าการละลายอยู่ที่ร้อยละ 86.63, 84.23, 79.87, และ 75.23 ตามลำดับ (ภาพประกอบ 11) โดยที่ทั้ง 4 สูตรมีประสิทธิภาพในการละลายน้ำไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพประกอบ 11 ประสิทธิภาพการละลายน้ำของฟิล์มยาสลบน้ำมันหอมระเหยโรสวูด

การทดสอบประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลบของฟิล์มยาสลบน้ำมันหอมระเหยโรสวูด

จากการทดสอบประสิทธิภาพการละลายน้ำพบว่า แผ่นฟิล์มทั้ง 4 สูตร มีความสามารถในการละลายน้ำที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้น ในการคัดเลือกฟิล์มเพื่อนำไปทดสอบการสลบในระหว่างการขนส่ง 2 ชั่วโมง จึงใช้ลักษณะทางกายภาพเบื้องต้นเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือก ได้แก่ ความเรียบเนียนและความเปราะบางของแผ่นฟิล์ม และพบว่า แผ่นฟิล์มสูตรที่ 4 (ภาพประกอบ 10D) มีลักษณะเรียบเนียน ไม่เปราะบางแตกง่าย เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มอีก 3 สูตร จากนั้นจึงนำฟิล์มสูตรที่ 4 ไปทำการทดสอบการสลบในขั้นตอนต่อไป

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการชักนำให้ลูกปลานิลเกิดการสลบเพื่อการขนส่งระยะสั้น (2 ชั่วโมง) ด้วยแผ่นฟิล์มน้ำมันหอมระเหยโรสวูดพบว่า ฟิล์มน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ความเข้มข้น 0.2-0.8 กรัมต่อลิตร ไม่สามารถชักนำให้ลูกปลานิลเข้าสู่การสลบในระยะที่ 1 ในขณะที่ฟิล์มน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ 1 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดอยู่ประมาณ 500 ไมโครลิตร มีประสิทธิภาพในการชักนำในลูกปลานิลให้เข้าสู่การสลบในระยะที่ 1 ได้ตลอดเวลา 2 ชั่วโมง และสามารถฟื้นจากการสลบได้ภายในระยะเวลา 0.40 ± 0.01 นาที (ตาราง 10) ทั้งนี้พบว่า ทุกการทดลองไม่มีการตายของลูกปลานิลเกิดขึ้นทั้งขณะทดลองและหลังการทดลองเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง

ตาราง 10 ประสิทธิภาพฟิล์มน้ำมันหอมระเหยโรสวูดในการชักนำให้เกิดการสลบในระหว่างการขนส่งเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

น้ำหนักฟิล์ม (g/L)	ระยะเวลาในการสลบ (นาที)									ระยะเวลาในการฟื้นตัว (นาที)	อัตราการรอดชีวิต (%)
	5	10	15	20	25	30	60	90	120		
alginate+tween80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100
0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100
0.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100
0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100
0.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100
1.0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0.40 ± 0.01	100

โดย 0 = ไม่เกิดการสลบ, 1 = การสลบระยะที่ 1, 2 = การสลบระยะที่ 2, 3 = การสลบระยะที่ 3,

4 = การสลบระยะที่ 4

ผลการตรวจวัดคุณภาพน้ำก่อนและหลังการจำลองการขนส่ง

จากการตรวจวัดคุณภาพน้ำก่อนและหลังการทดลองพบว่า คุณภาพน้ำก่อนการทดลองมีค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิเท่ากับ 26.17 ± 0.58 องศาเซลเซียส ค่า pH เท่ากับ 7.53 ± 0.06 และค่า DO เท่ากับ 7.53 ± 0.12 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมันหอมระเหยโรสวูด และแผ่นฟิล์มยาสลบในการจำลองการขนส่ง 2 ชั่วโมง พบว่า คุณภาพน้ำของทุกการทดลองตามตารางที่ 11 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) และยังคงอยู่ในมาตรฐานการขนส่งสัตว์น้ำ

ตาราง 11 คุณภาพน้ำก่อนและหลังการทดลองการจำลองการขนส่ง 2 ชั่วโมง

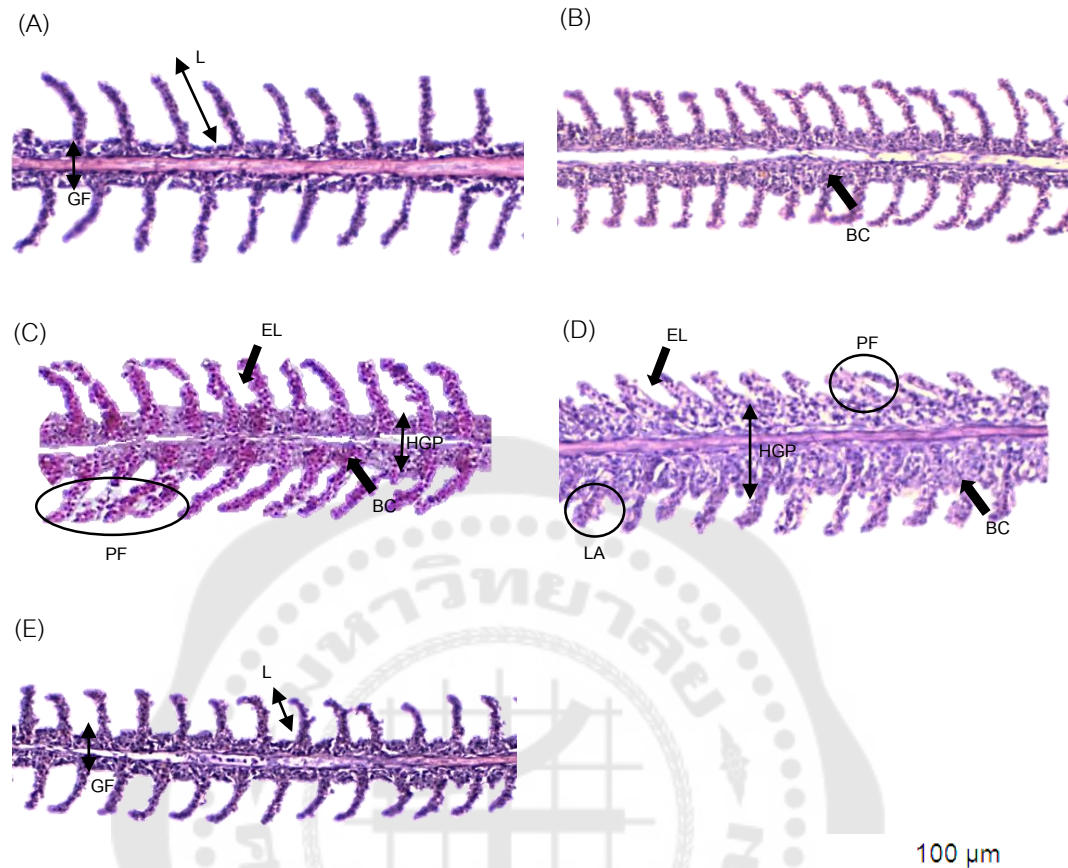
ระดับความเข้มข้นของ ทดสอบ ($\mu\text{L/L}$)	พารามิเตอร์น้ำก่อนและหลังการขนส่ง		
	T ($^{\circ}\text{C}$)	pH	DO (mg/L)
ก่อนการทดลอง			
0 (control)	26.17 ± 0.58	7.53 ± 0.06	7.53 ± 0.12
น้ำมันหอมระเหยโรสวูด			
50 mg/L MS-222	26.83 ± 0.29	7.63 ± 0.06	7.57 ± 0.12
เอทานอล	26.40 ± 0.17	7.47 ± 0.06	7.53 ± 0.15
25	26.50 ± 0.00	7.67 ± 0.06	7.63 ± 0.06
50	26.73 ± 0.25	7.63 ± 0.06	7.50 ± 0.00
75	26.83 ± 0.29	7.67 ± 0.06	7.67 ± 0.06
แผ่นฟิล์มยาสลบสูตรที่ 4			
1 g/L	26.67 ± 0.45	7.53 ± 0.12	7.70 ± 0.10

ผลการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของลูกปลานิลหลังได้รับน้ำมันหอมระเหยโรสวูด

ลูกปลานิลหลังได้รับน้ำมันหอมระเหยและแผ่นฟิล์มยาสลบเป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับด้วยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกขึ้นดังตาราง 12 แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับหลังได้รับน้ำมันหอมระเหยโรสวูด และแผ่นฟิล์มยาสลบ (ภาพประกอบ 13)

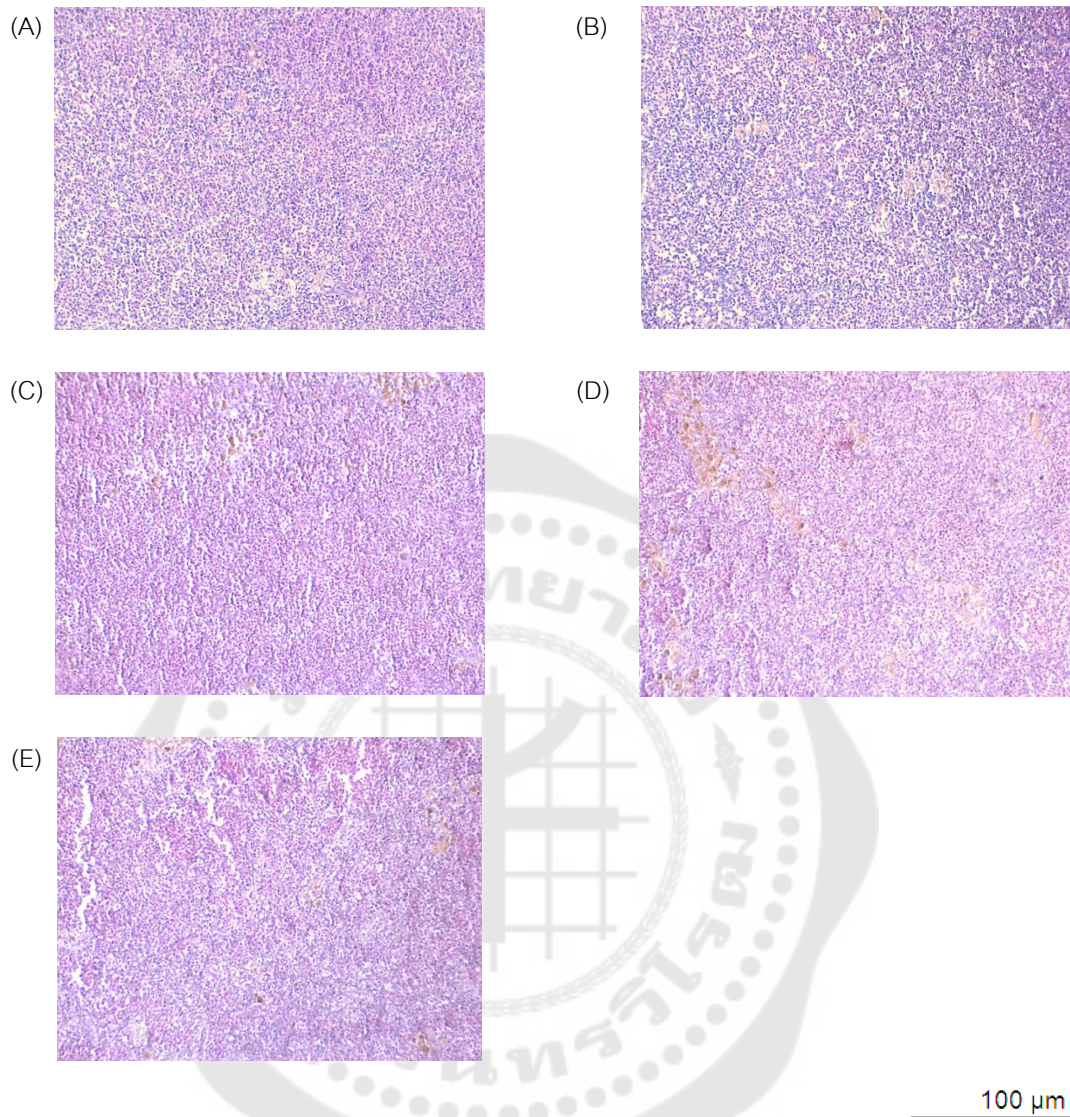
ตาราง 12 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อก่อนและหลังได้รับสารทดสอบ

สารทดสอบ	การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือก
กลุ่มควบคุม	Normal appearance of gill filaments (GF) Normal appearance of lamellae (L)
น้ำมันหอมระเหยโรสวูด 300 µl/L	Blood congestion (BC)
MS-222 (positive control)	Hyperplasia of the gill epithelium (HGP) Blood congestion (BC) Partial fusion of some lamellae (PF) Epithelial lifting (EL)
เอทานอล	Hyperplasia of the gill epithelium (HGP) Blood congestion (BC) Partial fusion of some lamellae (PF) Epithelial lifting (EL) Lamellar aneurysm (LA)
ฟิล์มยาสลบสูตรที่ 4 (1 g/L)	Normal appearance of gill filaments (GF) Normal appearance of lamellae (L)



ภาพประกอบ 12 พยาธิสภาพเนื้อเยื่อเยือกของลูกปลานิลก่อนและหลังได้รับสารทดสอบ

- | | | |
|---------|---|---------------------------------------|
| โดย (A) | = | กลุ่มควบคุม |
| (B) | = | กลุ่มได้รับน้ำมันหอมระเหยโรสจูด |
| (C) | = | กลุ่มได้รับ MS-222 (positive control) |
| (D) | = | กลุ่มได้รับเอทานอล |
| (E) | = | กลุ่มได้รับแผ่นฟิล์มยาสลบสูตรที่ 4 |



ภาพประกอบ 13 พยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับของลูกปลานิลก่อนและหลังได้รับสารทดสอบ

- | | | |
|---------|---|---------------------------------------|
| โดย (A) | = | กลุ่มควบคุม |
| (B) | = | กลุ่มได้รับน้ำมันหอมระเหยโรสวูด |
| (C) | = | กลุ่มได้รับ MS-222 (positive control) |
| (D) | = | กลุ่มได้รับเอทานอล |
| (E) | = | กลุ่มได้รับแผ่นฟิล์มยาสลบสูตรที่ 4 |

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การประเมินระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นยาสลบสำหรับการขนส่งลูกปลานิล ประเมินประสิทธิภาพแผ่นฟิล์มยาสลบน้ำมันหอมระเหยโรสวูดในการชักนำให้เกิดการสลบในลูกปลานิลในระหว่างการขนส่ง ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของลูกปลานิลหลังได้รับน้ำมันหอมระเหยโรสวูดในระดับห้องปฏิบัติการ สามารถสรุปผลการดำเนินงานวิจัยโดยแบ่งหัวข้อได้ดังนี้

1. สรุปผลการวิจัย
2. อภิปรายผลการวิจัย
3. ข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

1. การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีพบว่า น้ำมันหอมระเหยโรสวูดมีไลนาลออลเป็นองค์ประกอบสำคัญที่พบมากที่สุดถึง 43.66%
2. การทำสลบระยะที่ 3 พบว่า น้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ความเข้มข้น 300 ไมโครลิตรต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่เหมาะสมสำหรับการทำสลบในระยะที่ 3 โดยสามารถชักนำให้ลูกปลานิลสลบได้เร็วกว่าน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 200 ไมโครลิตรต่อลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
3. การทดสอบการขนส่งพบว่า น้ำหอมระเหยโรสวูดที่ความเข้มข้น 50 ไมโครลิตรต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการชักนำให้ลูกปลานิลเข้าสู่การสลบในระยะที่ 1 ตลอดระยะเวลา 2 ชั่วโมง โดยลูกปลานิลมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 100 ทั้งระหว่างการทดลองและหลังการทดลอง 24 ชั่วโมง
4. การสังเคราะห์แผ่นฟิล์มยาสลบพบว่า แผ่นฟิล์มยาสลบทั้ง 4 สูตรให้ผลการทดสอบการละลายน้ำที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ลักษณะทางกายภาพเบื้องต้นของฟิล์มสูตรที่ 4 (alginate : rosewood oil : tween80 = 1 : 1 : 1) มีความเรียบเนียน ไม่เปราะแตกง่ายเมื่อเทียบกับแผ่นฟิล์มอีก 3 สูตร ทั้งนี้ผลการทดสอบการขนส่งพบว่า แผ่นฟิล์มยาสลบสูตรที่ 4 ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการชักนำให้ลูกปลานิลเข้าสู่การสลบในระยะที่ 1 ตลอดระยะเวลาการขนส่ง โดยสามารถฟื้นจากการสลบได้โดยไม่มีการตายเกิดขึ้น

5. การเปลี่ยนแปลงจากพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อพบว่า ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ (ภาพประกอบ 13) แต่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกหลังได้รับสารทดสอบตามตารางที่ 12 และภาพประกอบที่ 12

อภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการประเมินระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้เป็นยาสลบลูกปลานิลสำหรับการทำกิจกรรมต่าง ๆ โดยเฉพาะการขนส่งระยะสั้นเปรียบเทียบกับยาสลบสัตว์น้ำ MS-222 ทั้งนี้กลไกการออกฤทธิ์ของยาสลบหรือน้ำมันหอมระเหยนั้นจะแตกต่างกันไปตามการออกฤทธิ์ของสารสำคัญต่อระบบประสาทส่วนกลาง (CNS)

จากการศึกษาวิจัยก่อนหน้าพบว่า MS-222 ออกฤทธิ์โดยยับยั้งการทำงานของ Na^+ channel ทำให้ Na^+ ไม่สามารถไหลผ่านเข้าสู่เซลล์ เกิดการยับยั้งการส่งกระแสประสาท ทำให้ปลาไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้าภายนอก (Zullian, Dodelet-Devillers, Roy, & Vachon, 2016) ทั้งนี้ผู้วิจัยได้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดด้วยเครื่อง GC-MS พบว่ามีไลนาลออลเป็นองค์ประกอบมากที่สุดถึง 43.66% (ตาราง 7) สอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2018 ที่รายงานว่า น้ำมันหอมระเหยโรสวูดมีองค์ประกอบทางเคมีที่ซับซ้อน พบสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีถึง 17 ชนิด (ตาราง 4) โดยมีสัดส่วนของไลนาลออลมากกว่า 80% (Kizak et al., 2018) นอกจากนี้ สามารถพบไลนาลออลได้ในน้ำมันหอมระเหยชนิดต่าง ๆ เช่น ลาเวนเดอร์ เบอร์กามอต เพตติเกรน และ *Lippia alba* (Urbinati et al., 2014) โดยมีรายงานการออกฤทธิ์ของไลนาลออลที่สกัดได้จากต้น *Lippia alba* พบว่า ไลนาลออลที่ความเข้มข้น 100-300 ไมโครลิตรต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการชักนำให้ปลา silver catfish (*Rhamdia quelen*) เกิดการสลบในระยะที่ 3 (de Freitas Souza et al., 2018) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานกลไกการทำงานของไลนาลออลในปี 2017 ว่า ไลนาลออลสามารถยับยั้งการทำงานของระบบ Glutamatergic ที่ glutamate receptor ประเภท N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) โดยการเข้าไปแย่งจับที่บริเวณจดจำกลูตาเมต (glutamate binding site) แบบ antagonist ส่งผลให้ Ca^{2+} ไม่สามารถไหลเข้าสู่เซลล์ประสาท เกิดการยับยั้งกลไก excitatory postsynaptic potential (EPSP) ที่ระบบประสาทส่วนกลางเป็นผลให้สัตว์เกิดเข้าสู่ภาวะสงบในระยะที่ 1 จนถึงการสลบในเวลาต่อมา (Tsuchiya, 2017) ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า น้ำมันหอมระเหยโรสวูดมีไลนาลออลเป็นสารองค์ประกอบหลักซึ่งมีรายงานการออกฤทธิ์ว่าสามารถทำให้เกิดการสลบในสัตว์น้ำได้

ในการทำสลบปลา มีเกณฑ์การสลบ 4 ระยะ (ตาราง 1) ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของผู้เลี้ยงปลา โดยเฉพาะการสลบระยะที่ 3 หรือการสลบลึก มีความสำคัญในด้านทำหัตถการเกี่ยวกับปลา เช่น การผ่าตัดเล็ก การฉีดวัคซีนป้องกันโรค และเพื่อนงานวิจัย เป็นต้น ซึ่งปลาควรเข้าสู่ภาวะสลบลึกเป็นภายในเวลา 5 นาที และสามารถฟื้นจากการสลบได้ภายใน 10 นาที (Bodur et al., 2018) ทั้งนี้ ผลการประเมินระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดในการสลบลูกปลานิลในระยะที่ 3 พบว่า เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูด ลูกปลานิลจะใช้เวลาในการเข้าสู่การสลบเร็วขึ้น (ภาพประกอบ 8) โดยน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ความเข้มข้น 300 ไมโครลิตรต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้ลูกปลานิลน้ำหนักเฉลี่ย 3.43 ± 1.06 กรัม เข้าสู่ภาวะสลบลึกภายในระยะเวลา 5 นาที และมีอัตราการรอดชีวิตระหว่างการทดลองและหลังการทดลองร้อยละ 100 ทุกการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kizak et al. (2018) รายงานว่า น้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ความเข้มข้น 250 ไมโครลิตรต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำสลบปลาของที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 7.36 ± 0.77 กรัม ทั้งนี้ระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ก็อาจขึ้นอยู่กับคุณภาพและแหล่งที่มาของน้ำมันหอมระเหย หรืออายุ น้ำหนัก และชนิดของปลาที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยในปี 2010 และ 2016 ซึ่งทั้งสองงานวิจัยใช้น้ำมันหอมระเหยชนิดเดียวกัน คือ *Lippia alba* ผลการทดลองของ da Cunha et al. (2010) พบว่า น้ำมัน *Lippia alba* ที่ความเข้มข้น 500 ppm มีประสิทธิภาพในการชักนำปลา silver catfish ให้เข้าสู่การสลบลึกในระยะที่ 3 แต่ในงานวิจัยของ Cárdenas et al. (2016) รายงานว่า น้ำมัน *Lippia alba* ที่ความเข้มข้น 160 ppm ก็สามารถชักนำให้ปลา *Argyrosomus regius* เกิดการสลบลึกได้ภายใน 5 นาที โดยที่สามารถฟื้นจากการสลบได้โดยไม่มีอาการตายเกิดขึ้น

นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสลบระหว่างน้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ความเข้มข้น 300 ไมโครลิตรต่อลิตร กับ MS-222 ที่ความเข้มข้น 120 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมทางบวกพบว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้ลูกปลานิลสลบนั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งนี้ ระดับความเข้มข้นของ MS-222 ที่ใช้สอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2017 รายงานว่า MS-222 ที่ความเข้มข้น 130 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่สามารถเหนี่ยวนำให้ปลานิลเกิดการสลบในระยะที่ 3 ภายใน 5 นาที โดยไม่มีอาการตายเกิดขึ้น (Pikulkaew et al., 2017) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า น้ำมันหอมระเหยโรสวูดมีประสิทธิภาพเทียบเท่า MS-222 ซึ่งเป็นยาสลบปลามาตรฐานที่ใช้ในอุตสาหกรรมของสัตว์น้ำ

ผลการประเมินระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดในการชักนำให้เกิดการสลบในลูกปลานิลในระหว่างการขนส่งซึ่งเป็นการสลบในระยะที่ 1 สามารถสังเกตพฤติกรรมของปลา คือ ปลามีการทรงตัวปกติ แต่การเคลื่อนไหวร่างกายและอัตราการเปิด-ปิดแผ่นปิดเหงือกช้าลงกว่าสภาวะปกติ (ตาราง 1) ไม่มีการตอบสนองต่อสิ่งเร้าภายนอก เช่น ไม่ตอบสนองต่อและการสัมผัส (Mylonas et al., 2005) ทั้งนี้ เพื่อลดกระบวนการเผาผลาญและลดอัตราการบาดเจ็บของปลาที่เกิดขึ้น ดังนั้น สภาวะการสลบในระยะที่ 1 จึงเหมาะสมในการขนส่งปลาขณะมีชีวิต (ทัศนัย, 2528) โดยผลการทดลองการจำลองการขนส่งพบว่า น้ำมันหอมระเหยโรสวูดที่ความเข้มข้น 50 ไมโครลิตรต่อลิตร ทำให้ลูกปลานิลอยู่ในสภาวะสงบในระยะที่ 1 ได้ตลอดระยะเวลา 2 ชั่วโมง และฟื้นจากการสลบได้ในระยะเวลา 0.90 ± 0.31 นาที ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wongtavatchai et al. (2006) รายงานว่า น้ำมันจากต้นกานพลู (*Eugenia caryophyllus*) ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ลูกปลานิลเกิดการสลบในระหว่างการขนส่งภายในระยะเวลา 12 ชั่วโมง โดยไม่มีการตายเกิดขึ้น ทั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองกับ MS-222 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่า ผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือ สามารถชักนำให้ลูกปลานิลเข้าสู่การสลบระยะที่ 1 ได้ภายในระยะเวลา 5 นาที และฟื้นจากการสลบได้ภายในระยะเวลา 0.93 ± 0.34 นาที นอกจากนี้ การใช้ MS-222 เพื่อการขนส่งยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Amani and James (2007) รายงานว่า MS-222 ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ลูกปลานิลเกิดการสลบในระหว่างการจำลองการขนส่งเป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ MS-222 ที่ความเข้มข้น 40, 70 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ปลา *Betta splendens*, *Puntius filamentous* และ *Poecilia reticulata* ให้เข้าสู่สภาวะการสลบในระยะที่ 1 ได้นาน 48 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยปลาทุกชนิดสามารถฟื้นตัวจากการสลบได้ภายในระยะไม่เกิน 5 นาที ทั้งนี้ MS-222 ยังสามารถลดความเครียดและลดอัตราการตายของปลาได้ภายหลังจากการขนส่งได้อย่างมีนัยสำคัญ (Prמוד et al., 2010; Sommani et al., 1999) ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า การใช้น้ำมันหอมระเหยโรสวูดและ MS-222 เพื่อการขนส่งปลาที่มีการใช้ยาสลบในความเข้มข้นที่ต่ำกว่าการทำหัตถการหรือการสลบในระยะที่ 3 เนื่องจากปัจจัยในด้านระยะเวลาและการควบคุมคุณภาพน้ำระหว่างการขนส่ง โดยยาสลบนั้น ๆ ไปมีผลทำให้ปลาเข้าสู่การสลบในระยะที่ 1 เป็นระยะเวลานานโดยไม่ฟื้นจากการสลบในระหว่างการขนส่ง

ผลการสังเคราะห์ฟิล์มไฮเดียมอัลจิเนตร่วมกับน้ำมันหอมระเหยโรสวูด โดยอาศัยเกณฑ์การประเมินประสิทธิภาพในการละลายน้ำตามสูตรคำนวณของ Wang et al. (2007) พบว่าแผ่นฟิล์มยาสบทั้ง 4 สูตร (ตาราง 6) ให้ผลทดสอบการละลายน้ำที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจาก ไฮเดียมอัลจิเนตมีคุณสมบัติในการก่อฟิล์มและสามารถละลายน้ำได้ (Lee & Mooney, 2012) แต่ทั้งนี้ ฟิล์มสูตรที่ 4 (alginate : rosewood oil : tween80 = 1 : 1 : 1) ซึ่งมีปริมาณ tween 80 มากกว่าฟิล์มอีก 3 สูตร โดย tween 80 ทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิว (Liakos et al., 2014) ระหว่างสารละลายอัลจิเนตกับน้ำมันหอมระเหยโรสวูด เป็นผลทำให้ฟิล์มสูตรที่ 4 อาจมีการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยโรสวูดมากกว่าฟิล์มสูตรอื่น สอดคล้องกับคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดซึ่งมีความเป็น hydrophobic ดังนั้น เมื่อฟิล์มอัลจิเนตมีน้ำมันหอมระเหยมากส่งผลให้ฟิล์มอัลจิเนตที่จัดเป็น hydrophilic มีความเป็น hydrophobic เพิ่มมากขึ้น (Yanwong, 2014) ฟิล์มสูตรที่ 4 จึงมีค่าการละลายน้ำต่ำกว่าฟิล์มอีก 3 สูตรแต่ยังคงไม่มีผลทางสถิตินอกจากนี้ การที่ฟิล์มสูตรที่ 4 มีการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยโรสวูดมากกว่าฟิล์มสูตรอื่น ซึ่งในน้ำมันหอมระเหยโรสวูดมีไลนาลออลในสัดส่วนที่มากถึง 43.66% (ตาราง 7) จากงานวิจัยของ Letizia et al. (2003) รายงานว่าไลนาลออลมีองค์ประกอบของสารที่เป็น monoterpene จัดเป็นสารประกอบ hydrocarbon ซึ่งหากมีปริมาณของสาย hydrocarbon มากจะส่งผลให้สายไฮเดียมอัลจิเนตมีความยืดหยุ่นมากขึ้นตามลำดับ ส่งผลให้ลักษณะทางกายภาพของฟิล์มสูตรที่ 4 มีความเรียบเนียน ที่สำคัญ คือ ไม่เปราะแตกง่ายเมื่อเทียบกับแผ่นฟิล์มอีก 3 สูตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yanwong (2014) รายงานว่า ฟิล์มเจลลาตินที่เติมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 10% ของน้ำหนักเจลลาติน ซึ่งน้ำมันหอมระเหยตะไคร้มีองค์ประกอบของสารที่เป็น monoterpene มากกว่าฟิล์มเจลลาตินที่เติมน้ำมันหอมระเหยเปปเปอร์มินท์ที่ปริมาณ 10% เท่ากัน ส่งผลให้ค่าร้อยละการยืดตัว (elongation at break) ของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เนื่องจากฟิล์มมีความยืดหยุ่นมากกว่าฟิล์มเจลลาตินที่เติมน้ำมันหอมระเหยเปปเปอร์มินท์ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Benavides et al. (2012) รายงานว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยออริกานโนในฟิล์มอัลจิเนต ส่งผลให้ร้อยละการยืดตัวของฟิล์มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลของแผ่นฟิล์มยาสลบสูตรที่ 4 ในการชักนำให้เกิดการสลบสำหรับการขนส่งลูกปลานิล พบว่า แผ่นฟิล์มยาสลบที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการชักนำให้ลูกปลานิลเข้าสู่การสลบในระยะที่ 1 ตลอดระยะเวลาการขนส่ง สามารถฟื้นจากการสลบได้ในเวลา 0.40 ± 0.01 นาที โดยไม่มีการตายเกิดขึ้น ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการใช้น้ำมันหอมระเหยโรสวูดเพื่อการขนส่ง ทั้งนี้ มีการศึกษากลไกการนำส่งยาสลบของแผ่นฟิล์มสู่เหงือกปลา พบว่า การนำส่งยาสลบขึ้นอยู่กับทำงานของ tween80 ซึ่งเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) ชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water emulsifier) ทำหน้าที่ประสานระหว่างสารละลายโซเดียมอัลจิเนตและน้ำมันหอมระเหยโรสวูดเข้าด้วยกัน โดย tween80 จะจับตัวกันเป็นไมเซลล์ (micelle) ล้อมรอบน้ำมันหอมระเหยด้วยการนำส่วนหางที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic tail) รวมกันอยู่ด้านใน และหันส่วนหัวที่ชอบน้ำ (hydrophilic head) ให้ปกคลุมด้านนอก (Barzegar, Mehmia, Nasehi, & Alipour, 2018) ส่งผลให้น้ำมันหอมระเหยสามารถละลายในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่ใช้ น้ำเป็นตัวทำละลายได้ ดังนั้น เมื่อนำแผ่นฟิล์มไปละลายน้ำ ไมเซลล์จึงสามารถละลายอยู่ในน้ำและเคลื่อนที่ผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ของเนื้อเยื่อเหงือกของปลาได้โดยตรง (Kheawfu, Pikulkaew, Chaisri, & Okonogi, 2017)

ผลการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของลูกปลานิลหลังได้รับน้ำมันหอมระเหยโรสวูดและแผ่นฟิล์มยาสลบเป็นเวลา 10 นาที พบว่า ลูกปลานิลทุกตัวไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพประกอบ 13) เนื่องจากงานวิจัยนี้ทำการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) ซึ่งก่อให้เกิดอาการอักเสบทันที และใช้ระยะเวลาไม่นาน แต่ทั้งนี้ตับเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงสภาพของยา (drug metabolism) หรือสารที่ละลายในไขมันให้มีคุณสมบัติที่สามารถละลายน้ำได้มากขึ้น เพื่อให้ง่ายต่อการขับออกนอกร่างกาย และป้องกันการสะสมของสารเคมี นำไปสู่การเป็นพิษต่อตับ (Adamson, Dixon, Francis, & Rall, 1965) โดยอัตราเร็วของกระบวนการเปลี่ยนแปลงในแต่ละสิ่งมีชีวิตจะไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่หลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ อายุ เพศ และสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (Lidman, Förlin, Molander, & Axelson, 1976) ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับต้องใช้เวลา และความเข้มข้นของสารที่มากพอจนเกิดความเป็นพิษ และแสดงออกถึงการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับ

แต่ในทางตรงข้ามพบการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณเนื้อเยื่อเหงือกของลูกปลานิลที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยโรสวูดร่วมกับเอทานอลที่ความเข้มข้น 300 ไมโครลิตรต่อลิตร เมื่อเทียบกับกลุ่มลูกปลานิลที่ไม่ได้รับสาร (กลุ่มควบคุม) โดยเนื้อเยื่อเหงือกของลูกปลานิลในกลุ่มควบคุมนั้นมี gill filament และ gill lamella ปกติ และเม็ดเลือดมีการเรียงตัวกันค่อนข้างเป็นระเบียบ แต่ในส่วนของเนื้อเยื่อเหงือกของลูกปลานิลหลังจากได้รับน้ำมันหอมระเหยโรสวูด พบว่า เกิดการอักเสบที่บริเวณเยื่อบุผิวบริเวณ gill filament โดยเกิดการคั่งตัวของเม็ดเลือด (blood congestion) (ตาราง 12, ภาพประกอบ 12B) ซึ่งการคั่งตัวของเม็ดเลือดจากการที่หลอดเลือดขยายตัว ทำให้เลือดไหลเข้าสู่บริเวณนั้นมากขึ้น ส่งผลให้มีการคั่งค้างของเม็ดเลือดในปริมาณมาก (Martinson, 2016) ทั้งนี้ ผลการทดลองสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเหงือกของลูกปลานิลที่ได้รับเอทานอลที่ 1,200 ไมโครลิตรต่อลิตรเพียงอย่างเดียว พบว่า มีการอักเสบของเนื้อเยื่อที่บริเวณเนื้อเยื่อบุผิว โดย gill lamellae บางส่วนเกิดการรวมกัน เนื่องจากอาการอักเสบรุนแรง เกิดการแยกตัวของเนื้อเยื่อบุผิว (epithelial lifting) เกิดการคั่งตัวของเม็ดเลือดที่บริเวณ gill filament และเกิดการโป่งพองของผนังหลอดเลือด (lamellar aneurysm) (ตาราง 12, ภาพประกอบ 12D) สอดคล้องกับรายงานของ Abalaka, Fatihu, Ibrahim, and Ambali (2015) ที่ได้ศึกษาผลของเอทานอลที่ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกของปลา *Clarias gariepinus* พบว่า เกิดการตายของเนื้อเยื่อแบบ necrosis และเกิดการรวมกันของ gill lamellae เป็นบริเวณกว้าง ทั้งนี้ มีรายงานการประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันของเอทานอลในปลาพบว่า ค่า LC₅₀ ของปลา *Pimephales peromelas* ที่ได้รับเอทานอลเป็นเวลา 96 ชั่วโมง อยู่ที่ 13.5 กรัมต่อลิตร (Sciencetific, 2013) นอกจากนี้ เอทานอลยังมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATPase ในเหงือกและส่งผลให้เกิดการลดลงของน้ำหนักปลา *Oreochromis mossambicus* อีกด้วย (Bhanu & Philip, 2011) ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า เอทานอลมีผลก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อเหงือกของลูกปลานิลหลังได้รับสารทันที และก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อเหงือกมากกว่า MS-222 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมทางบวก (ภาพประกอบ 12)

นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อเหงือกของลูกปลานิลหลังได้รับน้ำมันหอมระเหยโรสวูด (ภาพประกอบ 12B) และได้รับแผ่นฟิล์มยาสลบสูตรที่ 4 ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร พบว่า แผ่นฟิล์มยาสลบไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกของลูกปลานิล (ภาพประกอบ 12E)

สรุปผลการทดลอง พบว่า ในการทดลองการสลบทั้งระหว่างการทดลองและเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ไม่พบการตายของลูกปลานิลที่ใช้ในการทดลอง โดยทั้งน้ำมันหอมระเหยโรสวูด และแผ่นฟิล์มยาสลบต่างก็มีประสิทธิภาพในการทำสลบลูกปลานิล และสามารถใช้เป็นยาสลบปลาทางเลือกแทน MS-222 ได้ แต่แผ่นฟิล์มยาสลบนั้นไม่มีเอทานอลเป็นส่วนผสม จึงไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อเหงือกและตับของลูกปลานิล ดังนั้น แผ่นฟิล์มยาสลบมีประสิทธิภาพสามารถใช้ในการสลบลูกปลานิลเพื่อการขนส่งระยะสั้น 2 ชั่วโมง โดยไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อปลา และยังเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภค

ข้อเสนอแนะ

1. งานวิจัยนี้ทำการประเมินระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดสำหรับการขนส่งลูกปลานิลเพียง 2 ชั่วโมงเท่านั้น ดังนั้น ในงานวิจัยต่อไปควรนำผลการทดลองนี้ไปทำการทดลองต่อภายในระยะเวลาที่เพิ่มมากขึ้นสำหรับการขนส่งลูกปลานิลทางไกล
2. งานวิจัยนี้ทำการทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดต่อลูกปลานิลเท่านั้น ดังนั้นในงานวิจัยครั้งต่อไปควรทำการศึกษาความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยโรสวูดต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ
3. งานวิจัยนี้ทำการทดสอบการสลบเพียงระยะสั้น 2 ชั่วโมง โดยเริ่มใช้แผ่นฟิล์มยาสลบที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ดังนั้น เมื่อครบ 2 ชั่วโมง และต้องการทำสลบปลาแบบต่อเนื่อง อาจต้องลดระดับความเข้มข้นของแผ่นฟิล์มยาสลบลงเพื่อให้ปลาลงอยู่ในระยะสลบได้นานขึ้น

บรรณานุกรม

- Abalaka, S. E., Fatihu, M. Y., Ibrahim, N. D. G., & Ambali, S. F. (2015). Gills and skin histopathological evaluation in African sharptooth catfish, *Clarias gariepinus* exposed to ethanol extract of *Adenium obesum* stem bark. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 41(1), 119-127.
- Adamson, R. H., Dixon, R. L., Francis, F. L., & Rall, D. P. (1965). Comparative biochemistry of drug metabolism by azo and nitro reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54(5), 1386.
- Akhtar, M. F., Hanif, M., & Ranjha, N. M. (2016). Methods of synthesis of hydrogels... A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(5), 554-559.
- Al-Yaqout, A., Azad, I., Al-Roumi, M., Al-Abdul Elah, K., Al-Kamdari, M., & Yaseen, S. (2010). Comparative analysis of thyme oil, clove oil, quinaldine and AQUI-S as anesthetics for the cultured marine fish. *FM068K. Report No. KISR, 10220*.
- Altevogt, B. M., Davis, M., & Pankevich, D. E. (2011). *Glutamate-related biomarkers in drug development for disorders of the nervous system: Workshop summary*: National Academies Press.
- Amani, Y. A., & James, C. M. (2007, September-October). Anesthetics in aquaculture: the emerging popularity of clove oil *Aquaculture AsiaPacific Magazine*, 32-34.
- Amornsit, M. (2553). *Principles and Techniques of Instrumental Analysis PART II Chromatography and others*: Chuan-pim 50.
- Ayala-Zavala, J., Del-Toro-Sánchez, L., Alvarez-Parrilla, E., & González-Aguilar, G. (2008). High relative humidity in-package of fresh-cut fruits and vegetables: advantage or disadvantage considering microbiological problems and antimicrobial delivering systems? *Journal of Food Science*, 73(4), R41-R47.
- Barzegar, H., Mehrnia, M. A., Nasehi, B., & Alipour, M. (2018). Fabrication of peppermint essential oil nanoemulsions by spontaneous method: Effect of preparing conditions on droplet size. *Flavour and Fragrance Journal*, 33(5), 351-356.
- Belema, M., Idowu, K. O., Aghogho, K.-D., Ndubuisi, A., Oluwakemi, A., & Stella, U.

- (2017). Handling and packaging of ornamental fishes for successful transportation. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 5(5), 263-265.
- Bell, G. R. (1964). *A Guide to the Properties, Characteristics and Users of Some General Anaesthetics for Fish*: Fisheries Research Board of Canada.
- Benavides, S., Villalobos-Carvajal, R., & Reyes, J. (2012). Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *Journal of food engineering*, 110(2), 232-239.
- Bhanu, S. V., & Philip, B. (2011). Effect of ethanol on branchial adenosine triphosphatases in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Toxicology international*, 18(1), 27.
- Bodur, T., Afonso, J. M., Montero, D., & Navarro, A. (2018). Assessment of effective dose of new herbal anesthetics in two marine aquaculture species: *Dicentrarchus labrax* and *Argyrosomus regius*. *Aquaculture*, 482, 78-82.
- Cárdenas, C., Toni, C., Martos-Sitcha, J. A., Cárdenas, S., de Las Heras, V., Baldisserotto, B., . . . Mancera, J. M. (2016). Effects of clove oil, essential oil of *Lippia alba* and 2-phe anaesthesia on juvenile meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801). *Journal of Applied Ichthyology*, 32(4), 693-700.
- Carter, K. M., Woodley, C. M., & Brown, R. S. (2011). A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. *Reviews in fish biology and fisheries*, 21(1), 51-59.
- Choi, Y. S., Hong, S. R., Lee, Y. M., Song, K. W., Park, M. H., & Nam, Y. S. (1999). Study on gelatin-containing artificial skin: I. Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge. *Biomaterials*, 20(5), 409-417.
- Coyle, S. D., Durborow, R. M., & Tidwell, J. H. (2004). *Anesthetics in aquaculture*: Southern Regional Aquaculture Center Texas.
- da Cunha, M. A., de Barros, F. M. C., de Oliveira Garcia, L., de Lima Veeck, A. P., Heinzmann, B. M., Loro, V. L., . . . Baldisserotto, B. (2010). Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 306(1-4), 403-406.
- de Almeida, R. N., Araújo, D. A. M., Gonçalves, J. C. R., Montenegro, F. C., de Sousa, D. P., Leite, J. R., . . . Cruz, J. S. (2009). Rosewood oil induces sedation and inhibits

- compound action potential in rodents. *Journal of ethnopharmacology*, 124(3), 440-443.
- de Freitas Souza, C., Baldissera, M. D., Bianchini, A. E., da Silva, E. G., Mourão, R. H. V., da Silva, L. V. F., . . . Baldisserotto, B. (2018). Citral and linalool chemotypes of *Lippia alba* essential oil as anesthetics for fish: a detailed physiological analysis of side effects during anesthetic recovery in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish physiology and biochemistry*, 44(1), 21-34.
- de Lima Silva, L., Parodi, T. V., Reckziegel, P., de Oliveira Garcia, V., Bürger, M. E., Baldisserotto, B., . . . Heinzmann, B. M. (2012). Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: Anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 350, 91-97.
- de Moura Linck, V., da Silva, A. L., Figueiró, M., Piato, A. L., Herrmann, A. P., Birck, F. D., . . . Elisabetsky, E. (2009). Inhaled linalool-induced sedation in mice. *Phytomedicine*, 16(4), 303-307.
- Dong, Z., Wang, Q., & Du, Y. (2006). Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release. *Journal of Membrane Science*, 280(1-2), 37-44.
- Fernández-Parra, R., Donnelly, T. M., Pignon, C., Noirault, A., & Zilberstein, L. (2017). Immersion Anesthesia with Alfaxalone in a Goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of exotic pet medicine*, 26(4), 276-282.
- Harms, C. A. (2005). Surgery in fish research: common procedures and postoperative care. *Lab animal*, 34(1), 28-35.
- Heavner, J. E. (1981). Animal models and methods in anesthesia research. *Methods of Animal Experimentation*, 6, 313.
- Hunn, J. B., & Allen, J. L. (1974). Movement of drugs across the gills of fishes. *Annual review of pharmacology*, 14(1), 47-54.
- Hussain, S. Z., & Maqbool, K. (2014). GC-MS: Principle, Technique and its application in Food Science. *International Journal of Current Science*, 13, 116-126.
- Jaipan, P., Nguyen, A., & Narayan, R. J. (2017). Gelatin-based hydrogels for biomedical applications. *MRS Communications*, 7(3), 416-426.

- Kheawfu, K., Pikulkaew, S., Chaisri, W., & Okonogi, S. (2017). Nanoemulsion: A suitable nanodelivery system of clove oil for anesthetizing Nile tilapia. *Drug discoveries & therapeutics*, 11(4), 181-185.
- Kizak, V., Can, E., Danabaş, D., & Can, Ş. S. (2018). Evaluation of anesthetic potential of rosewood (*Aniba rosaeodora*) oil as a new anesthetic agent for goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture*, 493, 296-301.
- Kulkham, J., Champasri, S., & Vanichkul, K. (2017). Effect of Clove Oil as Anesthetizing in Handling and Transportation for *Puntius gonionotus*. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 45.
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, 37(1), 106-126.
- Letizia, C., Cocchiara, J., Lalko, J., & Api, A. (2003). Fragrance material review on linalool. *Food and Chemical Toxicology*, 41(7), 943-964.
- Liakos, I., Rizzello, L., Scurr, D. J., Pompa, P. P., Bayer, I. S., & Athanassiou, A. (2014). All-natural composite wound dressing films of essential oils encapsulated in sodium alginate with antimicrobial properties. *International journal of pharmaceutics*, 463(2), 137-145.
- Lidman, U., Förlin, L., Molander, O., & Axelson, G. (1976). Induction of the drug metabolizing system in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) liver by polychlorinated biphenyls (PCBs). *Acta pharmacologica et toxicologica*, 39(2), 262-272.
- Limhang, K., Charoentum, K., & Charoenprayot, A. (2017). Effect of Isuppli (*Zingiber montanum*) extracts as an anesthetic agent in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Veridian E-Journal*, 4.
- Linalool, S. (2002). Initial Assessment Report For SIAM 14: OECD SIDS, Paris, France.
- Martinson, S. PATHOLOGY OF THE CARDIOVASCULAR SYSTEM.
- METİN, S., DİDİNEN, B. İ., KUBİLAY, A., Mesut, P., & İjlal, A. (2015). Determination of anesthetic effects of some medicinal plants on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research*, 1(1), 37-42.

- Miller, R. D., & Pardo, M. (2011). *Basics of anesthesia e-book*: Elsevier Health Sciences.
- Mylonas, C. C., Cardinaletti, G., Sigelaki, I., & Polzonetti-Magni, A. (2005). Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture*, 246(1-4), 467-481.
- Phillips, G. O., & Williams, P. A. (2000). *Handbook of hydrocolloids*: CRC press Boca Raton, FL.
- Pikulkaew, S., Khumpirapang, N., Chaisri, W., & Okonogi, S. (2017). Effects of *Alpinia galanga* oil on anesthesia and stress reduction in *Oreochromis niloticus*. *Drug discoveries & therapeutics*, 11(4), 186-192.
- Pramod, P. K., Ramachandran, A., Sajeevan, T. P., Thampy, S., & Pai, S. S. (2010). Comparative efficacy of MS-222 and benzocaine as anaesthetics under simulated transport conditions of a tropical ornamental fish *Puntius filamentosus* (Valenciennes). *Aquaculture Research*, 41(2), 309-314.
- Prince, A., & Powell, C. (2000). Clove oil as an anesthetic for invasive field procedures on adult rainbow trout. *North American Journal of Fisheries Management*, 20(4), 1029-1032.
- Ross, L. G., Ross, B., & Ross, B. (2008). *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*: Wiley Online Library.
- Saha, D., & Bhattacharya, S. (2010). Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review. *Journal of food science and technology*, 47(6), 587-597.
- Sarrazin, S. L. F., Oliveira, R. B., Maia, J., & Mourão, R. H. V. (2016). Antibacterial activity of the rosewood (*Aniba rosaeodora* and *A. parviflora*) linalool-rich oils from the Amazon. *European Journal of Medicinal Plants*, 12, 1-9.
- Schoettger, R. A., & Julin, A. M. (1967). *Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four salmonids*. Retrieved from
- Seetapan, K., Mahawong, N., Boonkong, K., Moojareinsup, T., & Kongha, V. (2010). The efficiency of three anaesthetic agents effect to juvenile Mekong giant catfish (*Pangasistodon gigas*). *Naresuan Phayao Journal*, 3(1).

- Sena, A. C., Teixeira, R. R., Ferreira, E. L., Heinzmann, B. M., Baldisserotto, B., Caron, B. O., . . . Copatti, C. E. (2016). Essential oil from *Lippia alba* has anaesthetic activity and is effective in reducing handling and transport stress in tambacu (*Piaractus mesopotamicus* × *Colossoma macropomum*). *Aquaculture*, 465, 374-379.
- Simões, L. N., Lombardi, D. C., Gomide, A., & Gomes, L. C. (2011). Efficacy of clove oil as anesthetic in handling and transportation of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Actinopterygii: Cichlidae) juveniles. *Zoologia (Curitiba)*, 28(3), 285-290.
- Somjai, D., Pansue, O., & Chiayvareesajja, S. (2008). Toxicity and Efficacy of Clove Oil for Anesthetizing Siamese Fighting Fish (*Betta splendens*). *Thakksin journal*, 11(2), 31-38.
- Sommani, A., Kerdkriengkai, S., & Ingkapairoj, N. (1999). Effect of MS-222 and benzocaine to the transportation of Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan). *Witthayasan Kasetsart (Sakha Witthayasat)*.
- Songkaew, A., Chokboonmongkol, C., Khattiya, R., Wongsathein, D., Mengumpun, K., & Pikulkaew, S. (2007). Induction time and behavior of anesthesia and recovery in Mekong Giant Catfish 12 (*Pangasianodon gigas*) after anesthetized with clove oil and tricaine methanesulfonate (MS-222). *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 58.
- Tsuchiya, H. (2017). Anesthetic agents of plant origin: a review of phytochemicals with anesthetic activity. *Molecules*, 22(8), 1369.
- Urbinati, C. V., Silva, R. C. R. d., Silva, S. S. d., Lisboa, P. L. B., & Mori, F. A. (2014). Structure of the secondary xylem of *Aniba* Aubl. species from the Brazilian Amazon. *Acta Botanica Brasilica*, 28(3), 484-488.
- Velišek, J., & Svobodová, Z. (2004). Anaesthesia of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) with 2-phenoxyethanol: Acute toxicity and biochemical blood profile. *Acta Veterinaria Brno*, 73(3), 379-384.
- Wang, L. Z., Liu, L., Holmes, J., Kerry, J. F., & Kerry, J. P. (2007). Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. *International journal of food science & technology*, 42(9), 1128-1138.

- Williams, P., & Phillips, G. (2009). Introduction to food hydrocolloids *Handbook of hydrocolloids* (pp. 1-22): Elsevier.
- Wongtavatchai, J., Rojsitthisak, P., Tipmongkolsin, N., & Jongaroonngamsang, N. (2006). *Formulation of clove oil solution as an anesthetic for aquatic animals*. Retrieved from Veterinary Medicine: Research and Reports
- Yanwong, S. (2014). *Effect of Essential Oils and Crosslink Agent on Properties of Fish Skin Gelatin Eible Films*. (Undergraduate), Silpakorn University.
- Zullian, C., Dodelet-Devillers, A., Roy, S., & Vachon, P. (2016). Evaluation of the anesthetic effects of MS222 in the adult Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 7, 1.
- เกวลิน หนูฤทธิ. (2560). สถานการณ์การผลิตและการค้าปลานิลและผลิตภัณฑ์, น. 17-27, ในจุดสารเศรษฐกิจการประมง ประจำปี 2557, ส่วนเศรษฐกิจการประมง สำนักพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการประมง กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- ทัศนัย อ่องสาคร. (2528). ผลของการสลับต่อการขนส่งปลาตะเพียนขาว. วารสารสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ 17: 13-27.
- เพิ่มพูน ศักดิ์เกษม. (2531). ปลานิล: ศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร.
- วิจิตรา ตั้งชี, ณัฐพล ราชมินต์. (2561). ประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูในการสลับปลานิล (*Oreochromis niloticus*). *Walailak Procedia*, 2018(2), 66.
- ดุสิต เอื้ออำนวย, อารีวรรณ สังข์เพชร, อัจฉริยา สันติประเสริฐ และรุ่งตะวัน ยมหล้า. (2559). การใช้น้ำมันกานพลูในการควบคุมระดับการสลับเพื่อการขนส่งลูกปลาดุกแอฟริกา. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า, 34(2), 114-121.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ปรารธนา จันทร์กระจ่าง
วัน เดือน ปี เกิด	20 พฤศจิกายน 2538
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
ที่อยู่ปัจจุบัน	2/8 หมู่ 3 ตำบลสาकु อำเภอถลาง จังหวัด ภูเก็ต 83110

