



การพัฒนายาสลบสำหรับปลาแฟนซีคาร์ป (*Cyprinus carpio* L.) โดยใช้น้ำมันโสม  
จูปาล์มพา (*Artemisia vulgaris* L.) ในรูปแบบอิมัลชัน

THE DEVELOPMENT OF ANESTHETIC FOR KOI CARP (*Cyprinus carpio* L.) USING  
MUGWORT (*Artemisia vulgaris* L.) OIL EMULSION

กันตินันท์ รักนาค

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การพัฒนายาสลับสำหรับปลาแพนซีคาร์ป (*Cyprinus carpio* L.) โดยใช้ น้ำมันโกลู  
จุฬาลัมพา (*Artemisia vulgaris* L.) ในรูปแบบอิมัลชัน



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
การศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา  
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา  
ปีการศึกษา 2562  
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา

THE DEVELOPMENT OF ANESTHETIC FOR KOI CARP (*Cyprinus carpio* L.) USING  
MUGWORT (*Artemisia vulgaris* L.) OIL EMULSION



KANTINAN RAKNAK

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

การพัฒนายาสลับสำหรับปลาแฟนซีคาร์ป (*Cyprinus carpio* L.) โดยใช้ น้ำมันโกฐ

จุฬาลัมพา (*Artemisia vulgaris* L.) ในรูปแบบอิมัลชัน

ของ

กัณดินันท์ รักนาค

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	การพัฒนายาสลบสำหรับปลาแฟนซีคาร์ป ( <i>Cyprinus carpio</i> L.) โดยใช้ น้ำมันโสมจุกฟ้าล้มพา ( <i>Artemisia vulgaris</i> L.) ในรูปแบบอิมัลชัน
ผู้วิจัย	กันตินันท์ รักนาค
ปริญญา	การศึกษามหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นลินา ประไพรัชสิทธิ์

การทำสลบปลาก่อนการดำเนินการกิจกรรมต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการทำศัลยกรรม มีความจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากสามารถลดความเครียดและความเสี่ยงต่อการบาดเจ็บของปลาได้ โดยยาสลบปลาที่นิยมใช้โดยทั่วไปมักเป็นสารเคมีสังเคราะห์ เช่น 2-phenoxy ethanol (2-PE) ซึ่งก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อทั้งปลาและมนุษย์ เพื่อลดผลกระทบจากการใช้สารเคมีสังเคราะห์ การใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืชที่มีฤทธิ์ชักนำการสลบในปลา จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยในการทำสลบปลา โดยงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยประยุกต์ใช้น้ำมันหอมระเหยจากต้นโสมจุกฟ้าล้มพา (*Artemisia vulgaris* L.) เป็นยาสลบสำหรับปลา โดยทำการตรวจสอบสารองค์ประกอบของน้ำมันโสมจุกฟ้าล้มพาด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (GC/MS) พัฒนาระบบนำส่งยาแบบอิมัลชัน ทำการประเมินระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำการสลบของน้ำมันโสมจุกฟ้าล้มพาและอิมัลชันน้ำมันโสมจุกฟ้าล้มพาในการทำศัลยกรรมปลาแฟนซีคาร์ป (*Cyprinus carpio* L.) และตรวจสอบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาแฟนซีคาร์ปหลังได้รับน้ำมันโสมจุกฟ้าล้มพาและอิมัลชันน้ำมันโสมจุกฟ้าล้มพา ผลการวิจัยพบว่า น้ำมันโสมจุกฟ้าล้มพามีสารออกฤทธิ์สำคัญที่ชักนำให้เกิดการสลบ คือ b-Pinene (11.70 %) 1,8-cineole (10.34 %) และ  $\alpha$ -pinene (8.29%) อิมัลชันมีเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาค  $395.37 \pm 10.81$  นาโนเมตร ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการทำศัลยกรรมปลาแฟนซีคาร์ปของน้ำมันโสมจุกฟ้าล้มพา คือ 400 ไมโครลิตรต่อลิตร และอิมัลชันน้ำมันโสมจุกฟ้าล้มพา คือ 10 มิลลิลิตรต่อลิตร ผลการตรวจสอบพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของปลาหลังได้รับน้ำมันโสมจุกฟ้าล้มพา 400 ไมโครลิตรต่อลิตร และอิมัลชันน้ำมันโสมจุกฟ้าล้มพา 10 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 10 นาที พบว่าสารทดสอบทั้งสองชนิดส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อเหงือก ได้แก่ การเพิ่มจำนวนชั้นของเยื่อบุผิวและการบวมของ gill lamellae

คำสำคัญ : น้ำมันโสมจุกฟ้าล้มพา ปลาแฟนซีคาร์ป ระบบนำส่งยา



Title	THE DEVELOPMENT OF ANESTHETIC FOR KOI CARP ( <i>Cyprinus carpio</i> L.) USING MUGWORT ( <i>Artemisia vulgaris</i> L.) OIL EMULSION
Author	KANTINAN RAKNAK
Degree	MASTER OF EDUCATION
Academic Year	2019
Thesis Advisor	Assistant Professor Dr. Nalena Praphairaksit

Fish are usually anesthetized before performing any activities in order to reduce the stress and injury rate, especially during surgery. However, most generally used fish anesthetics are chemical agents such as 2-phenoxyethanol (2-PE) causing some negative effects on fish and humans. Nowadays, herbal essential oils with a sedative property are widely used as an alternative way to anesthetize the fish. In this research, Mugwort (*Artemisia vulgaris* L.) essential oil (MT) was selected to evaluate the anesthetic efficacy. This research aimed to develop anesthesia emulsion from MT and evaluated the optimal concentrations of MT and MT emulsion to use as anesthetic agents for surgery on koi carp (*Cyprinus carpio* L.). The compounds in MT were detected by using gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). The results indicated that MT consisted of three active compounds including b-Pinene (11.7%), 1,8-cineole (10.34 %), and a-pinene (8.29%). The diameter of the emulsion droplets was  $395.37 \pm 10.81$  nm. The optimal concentration for koi carp surgery with MT was 400  $\mu$ l/L. In terms of mugwort oil emulsion, the optimal concentration was 10 ml/L. Moreover, Fish that received 400  $\mu$ l/L of mugwort oil and 10 ml/L of the emulsion showed Lamella epithelial hyperplasia and swollen gill lamellae.

Keyword : Mugwort oil Koi carp Drug delivery system

## กิตติกรรมประกาศ

การทำปฏิญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นลินา ประไพรัชสิทธิ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้ให้คำปรึกษา การอบรมสั่งสอน และให้การสนับสนุนในการทำวิจัยด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างยิ่ง ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. เฟื่องฟ้า อุ่นอบ ที่ให้ความกรุณาในการเป็นประธานสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์และให้คำแนะนำในการทำปฏิญานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนิษฐาน ศรีนวล ที่ให้ความกรุณาในการเป็นกรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์และให้คำแนะนำในการทำปฏิญานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่าน ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกในด้านต่าง ๆ

ขอขอบคุณสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ที่มอบทุนการศึกษาและทุนสนับสนุนการทำปฏิญานิพนธ์ ภายใต้โครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางด้านวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.)

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และเพื่อน ๆ ทุกท่านที่ช่วยเหลือทั้งด้านกำลังกายและกำลังใจ จนทำปฏิญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วง

กันตินันท์ รักษนาค



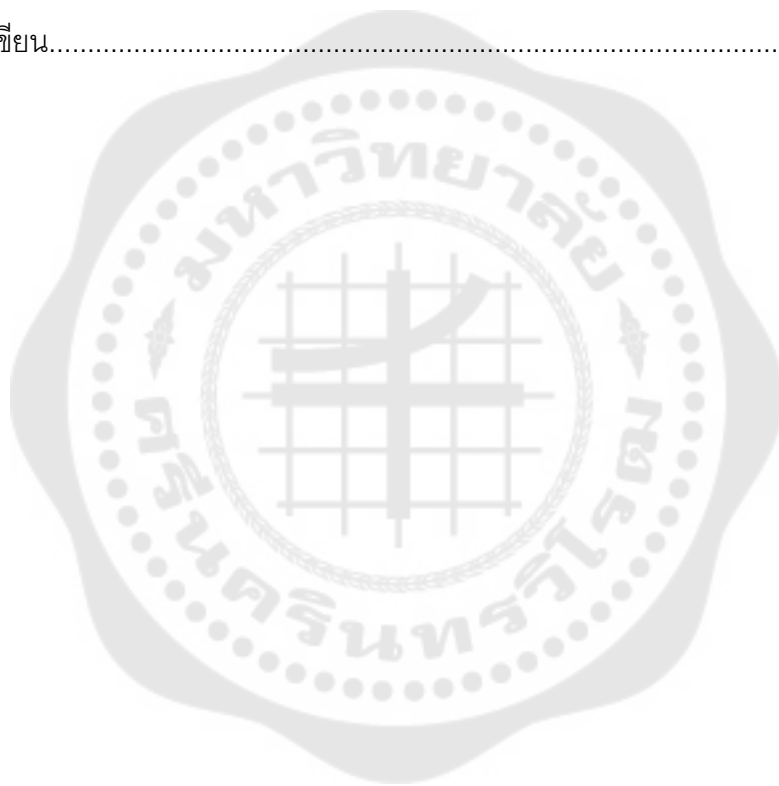
## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพประกอบ .....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง .....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
ความสำคัญของการวิจัย .....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
ขอบเขตการวิจัย .....	4
สมมติฐานการวิจัย.....	4
ระยะเวลาในการทำวิจัย .....	4
สถานที่ทำวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ยาสลบสำหรับปลา .....	5
ความสำคัญของการใช้ยาสลบสำหรับปลา.....	5
ประเภทของยาสลบสำหรับปลา .....	5
การประเมินประสิทธิภาพของยาสลบสำหรับปลา .....	9
ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของยาสลบ .....	10

ปลาแพนซีคาร์ป ( <i>Cyprinus carpio</i> L.).....	12
ข้อมูลทั่วไป.....	12
การใช้ยาสลบสำหรับปลาแพนซีคาร์ป.....	12
โกฐจุฬาลัมพา ( <i>Artemisia vulgaris</i> L.).....	14
ข้อมูลทั่วไปของต้นโกฐจุฬาลัมพา ( <i>Artemisia vulgaris</i> L.).....	14
การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากต้นโกฐจุฬาลัมพา.....	15
สารออกฤทธิ์สำคัญที่พบในน้ำมันโกฐจุฬาลัมพา.....	16
กลไกการออกฤทธิ์ของ 1,8-Cineole และ $\alpha$ -pinene.....	17
สารองค์ประกอบในน้ำมันโกฐจุฬาลัมพา.....	19
อิมัลชัน (emulsion).....	20
ข้อมูลทั่วไปของอิมัลชัน.....	20
การผลิตอิมัลชัน.....	22
อิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้เป็นยาสลบปลา.....	23
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	25
วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ.....	25
วัสดุ อุปกรณ์.....	25
เครื่องมือ.....	25
สารเคมี.....	26
สัตว์ทดลอง.....	26
วิธีการทดลอง.....	26
การเตรียมสัตว์ทดลอง.....	26
การเตรียมน้ำมันโกฐจุฬาลัมพา.....	27
การทดสอบเบื้องต้น (preliminary test).....	27

การตรวจสอบคุณภาพน้ำ .....	27
การทดสอบประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลบ .....	27
การทดสอบชุดควบคุมผลบวก (positive control) .....	28
การทดสอบชุดควบคุมผลลบ (negative control) .....	28
การตรวจสอบพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกและตับ .....	28
การตรวจสอบองค์ประกอบของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพา .....	29
การเตรียมและวิเคราะห์สมบัติอิมัลชันของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพา .....	30
การเตรียมอิมัลชันของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพา.....	30
การวิเคราะห์สมบัติอิมัลชัน .....	30
การทดสอบประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลบของอิมัลชันของน้ำมัน โกลูจุฟาล์มพา.....	30
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	30
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย .....	32
ผลการวิเคราะห์สารองค์ประกอบของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพา .....	32
ผลการวัดขนาดอนุภาคของอิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาล์มพา .....	33
การประเมินระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาและอิมัลชันน้ำมัน โกลู จุฟาล์มพาในการใช้เป็นยาสลบปลาแพนซีคาร์ป.....	34
การประเมินเวลาชักนำการสลบ (induction time) .....	34
การประเมินเวลาฟื้นสลบ (recovery time).....	35
ผลการชักนำการสลบระหว่างจำลองการทำศัลยกรรม.....	37
อัตราการตายหลังการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง .....	38
ผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำ.....	38
ผลของการเกิดพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาแพนซีคาร์ปหลังได้รับน้ำมันโกลู จุฟาล์มพาที่ทำละลายด้วยกับเอทานอลและอิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาล์มพา .....	39
การเกิดพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือก.....	39

การเกิดพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับ.....	41
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ .....	43
สรุปผลการวิจัย.....	43
อภิปรายผลการวิจัย .....	44
ข้อเสนอแนะ .....	47
บรรณานุกรม .....	48
ประวัติผู้เขียน.....	58



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 ผลข้างเคียงของสารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้เป็นยาสลบสำหรับปลา .....	6
ตาราง 2 น้ำมันหอมระเหยที่มีรายงานการใช้เป็นยาสลบสำหรับปลา .....	7
ตาราง 3 พฤติกรรมของปลาในแต่ละระยะของการสลบและการฟื้นตัว .....	9
ตาราง 4 ยาสลบที่นิยมใช้และมีการทดสอบกับปลาในสปีชีส์ <i>Cyprinus carpio</i> .....	13
ตาราง 5 สารองค์ประกอบของน้ำมันโกฐจุฬาลัมพา.....	32
ตาราง 6 ปริมาณน้ำมันโกฐจุฬาลัมพาในอิมัลชันน้ำมันโกฐจุฬาลัมพา .....	35
ตาราง 7 อุณหภูมิน้ำในแต่ละชุดการทดลอง.....	38
ตาราง 8 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำในแต่ละชุดการทดลอง .....	38
ตาราง 9 ค่า pH ในแต่ละชุดการทดลอง.....	39

## สารบัญภาพประกอบ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 ปลาแฟนซีคาร์ป ( <i>Cyprinus carpio</i> L.) พันธุ์ butterfly .....	12
ภาพประกอบ 2 ต้นโสมสุภาพ ( <i>Artemisia vulgaris</i> L.) .....	15
ภาพประกอบ 3 กระบวนการกลั่นด้วยไอน้ำ .....	16
ภาพประกอบ 4 โครงสร้างของสารออกฤทธิ์สำคัญในน้ำมันโสมสุภาพ .....	17
ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของ GABA <sub>A</sub> receptor .....	18
ภาพประกอบ 6 กลไกการออกฤทธิ์ของยาสงบ .....	18
ภาพประกอบ 7 ชนิดของอิมัลชัน .....	21
ภาพประกอบ 8 อิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน อิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ และสารลดแรงตึงผิว .....	21
ภาพประกอบ 9 การเปลี่ยนแปลงความโค้งของสารลดแรงตึงผิว .....	23
ภาพประกอบ 10 ลักษณะทางกายภาพของอิมัลชันน้ำมันโสมสุภาพ .....	33
ภาพประกอบ 11 เวลาชักนำการสลายของสารทดสอบแต่ละชนิด .....	36
ภาพประกอบ 12 เวลาพื้นสลายของสารทดสอบแต่ละชนิด .....	37
ภาพประกอบ 13 พยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกของปลาแฟนซีคาร์ป .....	40
ภาพประกอบ 14 พยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับของปลาแฟนซีคาร์ป .....	41

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ภูมิหลัง

ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลา การดำเนินกิจกรรมต่าง ๆ เช่น การผสมเทียม การขนส่ง และการทำศัลยกรรม ล้วนก่อให้เกิดความเครียดและส่งผลกระทบต่อด้านสรีรวิทยา และพฤติกรรมของปลา (Kiesling, Johansson, Zahl, & Samuelsen, 2009) และยิ่งก่อให้เกิดความเสียหายด้านมูลค่าทางเศรษฐกิจของปลา ดังนั้นเพื่อลดอันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากกิจกรรมดังกล่าว การวางยาสลบปลาก่อนการทำหัตถการจึงได้รับความนิยม (Ross, Ross, & Ross, 2008) ปัจจุบันมีการใช้ยาสลบที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์หลายชนิดในการสลบปลา หนึ่งในนั้นคือ 2-phenoxyethanal ที่นิยมใช้เป็นยาสลบสำหรับปลาสวยงาม แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานถึงผลเสียของ 2-phenoxyethanal ที่ก่อให้เกิดความผิดปกติด้านประสาทจิตวิทยา (neuropsychological syndrome) ในมนุษย์ (Neiffer & Stamper, 2009) ซึ่งเป็นอันตรายโดยตรงต่อผู้ใช้งาน ดังนั้นการใช้สารสกัดจากธรรมชาติจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้เป็นยาสลบสำหรับปลาเพื่อลดผลกระทบต่อสุขภาพจากการใช้ยาสลบที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ (Kizak, Can, Danabas, & Can, 2018; Small, 2003) โดยปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่เป็นที่นิยมเพาะเลี้ยงในอุตสาหกรรมปลาสวยงาม คือ ปลาแพนซีคาร์ป (*Cyprinus carpio* L.) เนื่องจากมีความสวยงาม ทนทานต่อสภาพแวดล้อม และนิยมเลี้ยงเพื่อประโยชน์ทางด้านภูมิสถาปัตยกรรม จึงมักมีการขนย้ายหรือทำกิจกรรมต่าง ๆ กับปลา เช่น การผสมเทียมและการทำศัลยกรรม ดังนั้นการเลือกใช้ยาสลบที่มีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยสำหรับปลาแพนซีคาร์ปจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

น้ำมันหอมระเหย (essential oil) ที่สกัดจากพืชหลายชนิดสามารถใช้เป็นยาสลบสำหรับปลาได้ เช่น น้ำมันหอมระเหยจากต้นกานพลู (*Syzygium aromaticum*) น้ำมันหอมระเหยจากต้นโรสวูด (*Aniba rosaeodora*) น้ำมันหอมระเหยจากต้นข่า (*Alpinia galanga*) และน้ำมันหอมระเหยจากต้น *Lippia alba* (Cunha et al., 2010; Kaiser et al., 2006; Keene, Noakes, Moccia, & Soto, 1998; Khumpirapang, Pikulkaew, Anuchapreeda, & Okonogi, 2018; Kizak et al., 2018) น้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้น 110-260 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพชักนำการสลบในลูกปลาบึก (*Pangasistodon gigas*) ได้ดีกว่า 2-phenoxyethanol (Seetapan, Mahawong, Boonkong, Moojareinsuk, & Kongha, 2010) Kizak et al. (2018) ยังได้รายงานว่าน้ำมันโรสวูดมีประสิทธิภาพชักนำให้ปลาทองสลบและฟื้นตัวได้ภายใน 10 นาที ทั้งนี้ยังมีราคา

ถูกและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อเทียบกับยาสลับปลาที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ อย่างไรก็ตาม การใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืชเพื่อเป็นยาสลับสำหรับปลาจะต้องใช้ในปริมาณและระยะเวลาที่เหมาะสม เนื่องจากความเข้มข้นที่สูงของน้ำมันหอมระเหยอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อปลาได้ เช่น น้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 21.77 ppm มีผลทำให้ปลากัดจีน (*Betta splendens*) ตายร้อยละ 50 เมื่อได้รับสารเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (Somjai, Pansue, & Chiayvareesajja, 2008) ดังนั้นการใช้น้ำมันหอมระเหยเพื่อเป็นยาสลับสำหรับปลาจึงต้องคำนึงถึงความเข้มข้นที่ใช้

โกลูจุฟาลัมพา (*Artemisia vulgaris* L.) พืชล้มลุกที่สามารถสกัดน้ำมันหอมระเหยได้จากส่วนใบ ซึ่งน้ำมันที่สกัดได้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Jerkovic et al., 2003; Lee et al., 1998; Wang, Zhu, Zhou, Niu, & Lei, 2006) โดยมีงานวิจัยรายงานว่าน้ำมันโกลูจุฟาลัมพามีสาร 1,8-cineole,  $\alpha$ -pinene และ  $\beta$ -Pinene ซึ่งเป็นกลุ่ม monoterpene (Judžentienė & Buzelyte, 2006) Tsuchiya (2017) ได้รายงานว่าทั้ง 1,8-cineole และสารในกลุ่ม pinene มีฤทธิ์ชักนำให้เกิดการสลับในกบ สอดคล้องกับสมบัติของ 1,8-cineole,  $\alpha$ -pinene และ  $\beta$ -Pinene สามารถเข้าจับกับโปรตีนตัวรับ GABA<sub>A</sub> ในตำแหน่ง benzodiazepine binding site เป็นผลให้เกิดการยับยั้งการส่งกระแสประสาทในใยประสาทหลังซินแนปส์ (inhibitory postsynaptic potential, IPSP) (Aoshima & Hamamoto, 1999; Kessler et al., 2014; Khumpirapang, Chaichit, et al., 2018)

ในปัจจุบันการใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืชเพื่อทำสลับปลาให้มีประสิทธิภาพนั้นจำเป็นจะต้องทำละลายน้ำมันหอมระเหยด้วยเอทานอลก่อนเพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำ แต่จากการศึกษาพบว่า เอทานอลมีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อเหงือกของปลา (Abalaka, Fatihu, Ibrahim, & Ambali, 2015; Bhanu & Philip, 2011) ดังนั้นเพื่อลดความเป็นพิษจากเอทานอลและเพิ่มความสะดวกในการใช้งาน การแปรรูปน้ำมันโกลูจุฟาลัมพาให้อยู่ในรูปอิมัลชัน (emulsion) ซึ่งสามารถละลายน้ำได้และช่วยเพิ่มการกระจายตัวของอนุภาคน้ำมัน จึงเป็นทางเลือกที่ดีในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาสลับปลาจากน้ำมันหอมระเหย นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าอิมัลชันของน้ำมันกานพลูเป็นยาสลับที่มีประสิทธิภาพดีสำหรับปลานิล (*Oreochromis niloticus*) (Kheawfu, Pikulkaew, Chaisri, & Okonogi, 2017) ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยเลือกใช้ propylene glycol และ tween 80 เป็นสารลดแรงตึงผิว (surfactant) เนื่องจากทั้ง propylene glycol และ tween 80 สามารถใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวในการสังเคราะห์อิมัลชันของ D-limonene ได้ นอกจากนี้สารทั้งสองชนิดยังมีความปลอดภัยและมีการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอางอย่างแพร่หลาย (Christy, Arimurni, Wahyudi, Martien, & Tunjung, 2017) ประกอบกับมี



การรายงานว่า propylene glycol มีความเป็นพิษต่อปลาต่ำกว่าเอทานอล (Majewski, Klaverkamp, & Scott, 1978)

ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเข้มข้นของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาและอิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการสลบในปลาแฟนซีคาร์ป และตรวจสอบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาแฟนซีคาร์ปหลังได้รับน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาและอิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาล์มพา

### ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาอิมัลชันของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาในการใช้เป็นยาสลบปลาแฟนซีคาร์ป
2. เพื่อประเมินระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาในการใช้เป็นยาสลบสำหรับปลาแฟนซีคาร์ป
3. เพื่อเปรียบเทียบผลของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาและอิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาแฟนซีคาร์ป

### ความสำคัญของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อพัฒนายาสลบสำหรับปลาแฟนซีคาร์ป เนื่องจากความสำคัญของยาสลบในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำที่สามารถลดอัตราการบาดเจ็บและความเครียดของปลาขณะดำเนินกิจกรรมต่าง ๆ เช่น การขนส่งปลา การคัดลอกปลา และการศึกษาวิจัย ดังนั้นการใช้ยาสลบสำหรับปลาที่มีประสิทธิภาพ จะช่วยรักษามูลค่าทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการเลี้ยงปลา โดยในงานวิจัยนี้ประยุกต์การใช้น้ำมันโกลูจุฟาล์มพา เพื่อเป็นยาสลบทางเลือกสำหรับทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ ซึ่งมีผลกระทบต่อปลา มนุษย์ และสิ่งแวดล้อม รวมทั้งพัฒนาผลิตภัณฑ์แปรรูปจากน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาให้อยู่ในรูปอิมัลชันเพื่อลดความเป็นพิษในการใช้งานร่วมกับเอทานอล เพิ่มประสิทธิภาพของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพา และเพิ่มความสะดวกในการใช้งาน

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาในการใช้เป็นยาสลบสำหรับปลาแฟนซีคาร์ป
2. พัฒนาอิมัลชันของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาในการใช้เป็นยาสลบปลาแฟนซีคาร์ป

3. ทราบการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาแพนซีคาร์ปที่เกิดขึ้นจากการได้รับน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาที่ทำละลายด้วยเอทานอลและอิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาล์มพา

### ขอบเขตการวิจัย

การทดสอบเพื่อประเมินประสิทธิภาพของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพา (*Artemisia vulgaris* L.) (av1310, Chemipan) ในการชักนำการสลบของปลาแพนซีคาร์ป (*Cyprinus carpio* L.) ในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ทราบระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาในการชักนำให้เกิดการสลบของปลา ตรวจสอบสารองค์ประกอบในน้ำมันโกลูจุฟาล์มพา โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโทรเมตรี (gas chromatography-mass spectrometry) ทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำ เมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง จากนั้นเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการชักนำให้เกิดการสลบและการฟื้นตัวหลังการสลบในแต่ละระดับความเข้มข้น ประเมินผลข้างเคียงทางพยาธิสภาพ ในเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาแพนซีคาร์ป หลังได้รับน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาในระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถชักนำให้เกิดการสลบภายในเวลา 5 นาที และฟื้นจากการสลบภายในเวลา 10 นาที ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของอิมัลชันของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาโดยวิเคราะห์ขนาดอนุภาคของอิมัลชัน และทำการทดลองเพื่อประเมินประสิทธิภาพอิมัลชันของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาในการเป็นยาสลบสำหรับปลาแพนซีคาร์ป

### สมมติฐานการวิจัย

1. น้ำมันโกลูจุฟาล์มพาสามารถชักนำให้เกิดการสลบได้เทียบเท่าหรือดีกว่า 2-phenoxyethanol ในการทำสลบปลาแพนซีคาร์ป
2. น้ำมันโกลูจุฟาล์มพาที่ละลายในเอทานอลก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาแพนซีคาร์ป
3. อิมัลชันของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาสามารถใช้เป็นยาสลบสำหรับปลาแพนซีคาร์ปได้

### ระยะเวลาในการทำวิจัย

ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัยเริ่มตั้งแต่เดือนมกราคม 2562 - เมษายน 2563

### สถานที่ทำวิจัย

อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ (อาคาร 19) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

1. ยาสลบสำหรับปลา
2. ปลาแฟนซีคาร์ป (*Cyprinus carpio* L.)
3. โกรฐจุฬาลัมพา (*Artemisia vulgaris* L.)
4. อิมัลชัน (emulsion)

#### ยาสลบสำหรับปลา

##### ความสำคัญของการใช้ยาสลบสำหรับปลา

ในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำมีการใช้ยาสลบสำหรับปลาอย่างแพร่หลายเพื่อดำเนินกิจกรรมต่าง ๆ กับปลา เช่น การขนส่ง การฉีดวัคซีน การเจาะเลือด การผสมพันธุ์เทียม การศึกษาวิจัย และการทำศัลยกรรม เนื่องจากการสลบสามารถลดความเครียดและความเสี่ยงต่อการบาดเจ็บของปลาได้ (Harms, Lewbart, Swanson, Kishimori, & Boylan, 2005; Marking & Meyer, 1985; Sena et al., 2016)

ทั้งนี้ยาสลบมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการทำศัลยกรรมปลา เช่นเดียวกับการทำสลบสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ การใช้ยาสลบจะต้องคำนึงถึงรูปแบบการทำศัลยกรรม ระยะเวลา และสรีระของสิ่งมีชีวิต โดยการศัลยกรรมปลาสามารถจำแนกได้ 2 รูปแบบตามระยะเวลาและความซับซ้อนในการผ่าตัด ได้แก่ การผ่าตัดเล็กซึ่งมีขั้นตอนในการผ่าตัดที่ไม่ซับซ้อนและใช้ระยะเวลาสั้นมักใช้เวลาไม่เกิน 5 นาที เช่น การตัดแต่งเหงือกและการขูดผิวหนัง ซึ่งต้องทำให้ปลาสลบตลอดระยะเวลาการผ่าตัด และการผ่าตัดใหญ่ที่ซับซ้อนและใช้เวลานาน เช่น การตัดเนื้องอก โดยการผ่าตัดชนิดนี้ต้องสอดท่อเพื่อลำเลียงยาสลบผ่านเหงือก เนื่องจากกระบวนการผ่าตัดอาจนานถึง 2 ชั่วโมง ดังนั้นการใช้ยาสลบในการทำศัลยกรรมจึงต้องเลือกระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อให้ปลาสลบตลอดระยะเวลาการดำเนินการ (Harms & Lewbart, 2000)

##### ประเภทของยาสลบสำหรับปลา

ยาสลบสำหรับปลาสามารถจำแนกได้ 2 ประเภท ดังนี้

1. ยาสลบจากสารเคมีสังเคราะห์

ยาสลบสำหรับปลาที่นิยมใช้โดยส่วนมากพัฒนามาจากสารเคมีสังเคราะห์หลายชนิด โดยสารเคมีที่นิยมใช้เป็นยาสลบปลาในประเทศไทย ได้แก่ 2-phenoxyethanol,

tricaine methanesulfonate (MS-222), benzocaine และ quinaldine (Limhang, Charoentum, & Charoenprayot, 2017) แม้ว่ายาสลบสำหรับปลาจากสารเคมีสังเคราะห์สามารถใช้งานได้ง่าย แต่ก็มีกรรายงานว่สารเคมีสังเคราะห์หลายชนิดมีผลข้างเคียงต่อปลา ผู้ใช้งาน ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม แสดงดังตาราง 1

ตาราง 1 ผลข้างเคียงของสารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้เป็นยาสลบสำหรับปลา

สารเคมี	ผลกระทบ	ผู้รายงาน
2-phenoxyethanol	ระคายเคืองต่อผิวหนังและดวงตา ก่อให้เกิดอาการผิดปกติด้านประสาทจิตวิทยา (neuropsychological syndrome)	Hseu, Yeh, Chu, and Ting (1998) Musshoff, Madeja, Binding, Witting, and Speckmann (2000) Ross et al. (2008)
Tricaine methanesulfonate (MS-222)	ก่อกะเจ็ ภาวะขาดออกซิเจนในปลา (hypoxemia) ทำลายเรตินาของปลาและมนุษย์ (retinal deficits)	Al-Yaqout, Al-Ablani, and Lone (2012) Coyle, Durborow, and Tidwell (2004) Neiffer and Stamper (2009)
Benzocaine	เกิดการปนเปื้อนสู่แหล่งน้ำได้ง่ายเนื่องจากใช้ เวลาสลบตัวยาวประมาณ 4 ชั่วโมง ลดอัตราการเจริญเติบโตและสมรรถภาพการ สืบพันธุ์ของปลา กดภูมิคุ้มกันปลา	Bressler and Ron (2004) Neiffer and Stamper (2009)
Quinaldine	ระคายเคืองต่อผิวหนังและดวงตา	Al-Yaqout et al. (2012) Neiffer and Stamper (2009)
Oxygen (O <sub>2</sub> )	ทำให้เลือดปลาเป็นกรดสูง	Neiffer and Stamper (2009)
Ketamine Hydrochloride	ก่อให้เกิดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อใน ปลากระดูกอ่อน (elasmobranchs) หัวใจเต้นช้ากว่าปกติ (bradycardia)	Fleming, Heard, Floyd, and Riggs (2003)

ในอุตสาหกรรมปลาสวยงาม 2-phenoxyethanol ถือเป็นสารเคมีสังเคราะห์ที่นิยมใช้เป็นยาสลบปลา เนื่องจากมีราคาถูกและใช้งานได้สะดวกเนื่องจากละลายน้ำได้ง่าย (Hseu et al., 1998) อย่างไรก็ตามได้มีการรายงานว่า 2-phenoxyethanol ส่งผลข้างเคียงต่อปลาและผู้ใช้งาน และมีรายงานความเป็นพิษของ 2-phenoxyethanol ดังนี้ ความเข้มข้นของ 2-phenoxyethanol ที่ทำให้ปลาเวลส์ (*Silurus glanis* L.) ตายลงครึ่งหนึ่ง (LC<sub>50</sub>) ในเวลา 10 นาทีคือ 0.77 มิลลิลิตรต่อลิตร นอกจากนี้ปลามีการหลังเมือกที่ผิว เหงือกมีสีดำคล้ำ และมีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงขึ้น (Velisek, Wlasow, Gomulka, Svobodova, & Novotny, 2007) สอดคล้องกับรายงานเกี่ยวกับปลาที่ได้รับ 2-phenoxyethanol ว่ามีระดับฮอร์โมนคอร์ติซอล (cortisol) เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าปลามีความเครียดสูงขึ้นเมื่อได้รับ 2-phenoxyethanol (Ross et al., 2008) นอกจากนี้ 2-phenoxyethanol ก่อให้เกิดความผิดปกติทางระบบประสาทต่อผู้ใช้งาน และจากการสอบถามผู้ใช้งานพบว่ามีอาการระคายเคืองผิวหนังบริเวณมือและนิ้ว มีอาการเวียนศีรษะ เหนื่อยหอบ และปวดไม่ชัด (Musshoff et al., 2000) จากรายงานการวิจัยข้างต้น 2-phenoxyethanol จึงเป็นสารเคมีที่ส่งผลกระทบต่อทั้งปลาและผู้ใช้งาน

## 2. ยาสลบประเภทสารสกัดจากพืช

เนื่องจากการใช้ยาสลบสำหรับปลาประเภทสารเคมีสังเคราะห์ส่งผลกระทบต่อหลายด้านดังที่กล่าวมาข้างต้น เพื่อลดผลกระทบดังกล่าวในปัจจุบันจึงมีการศึกษาวิจัยการประยุกต์ใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืชหลายชนิดเพื่อใช้เป็นยาสลบสำหรับปลา โดยน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดมีสารออกฤทธิ์แตกต่างกันดังแสดงดังตาราง 2

ตาราง 2 น้ำมันหอมระเหยที่มีรายงานการใช้เป็นยาสลบสำหรับปลา

พืช	สารออกฤทธิ์	ผู้วิจัย
กานพลู ( <i>Syzygium aromaticum</i> )	Eugenol	Keene et al. (1998) Seetapan et al. (2010)
<i>Lippia alba</i>	Linalool 1,8-cineole	Cunha et al. (2010)
ไพล ( <i>Zingiber montanum</i> )	Eugenol 1,8-cineole	Limhang et al. (2017)
โรสวูด ( <i>Aniba rosaeodora</i> )	Linalool	Kizak et al. (2018)

ตาราง 2 (ต่อ)

พืช	สารออกฤทธิ์	ผู้วิจัย
Canela-preta ( <i>Nectandra megapotamica</i> )	$\alpha$ -pinene $\beta$ -Pinene	Tondolo et al. (2013)
ยูคาลิปตัส ( <i>Eucalyptus</i> sp.)	1,8-cineole $\alpha$ -pinene	Bodur, Afonso, Montero, and Navarro (2018)
ออริกาโน ( <i>Origanum</i> sp.)	Carvacrol	
ข่า ( <i>Alpinia galanga</i> )	1,8-cineole 4-allylphenyl acetate Methyl eugenol	Khumpirapang, Chaichit, et al. (2018) Khumpirapang, Pikulkaew, et al. (2018)

ข้อดีของน้ำมันหอมระเหย คือ สามารถใช้เป็นยาสลบที่มีประสิทธิภาพดีสำหรับปลา มีความปลอดภัยต่อปลา มนุษย์ และสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังมีราคาถูก น้ำมันกานพลูสามารถใช้เป็นยาสลบสำหรับปลาเรนโบว์เทราต์ (*Oncorhynchus mykiss*) โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 40-60 ppm ไม่พบผลข้างเคียงทางด้านสรีระและพฤติกรรม และยังมีราคาถูกกว่า MS-222 ซึ่งเป็นยาสลบประเภทสารเคมีสังเคราะห์อีกด้วย (Keene et al., 1998) น้ำมัน *Lippia alba* ที่ระดับความเข้มข้น 100-500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นยาสลบที่มีประสิทธิภาพดีสำหรับปลาดุกเงิน (*Rhamdia quelen*) โดยปลาที่ได้รับน้ำมัน *Lippia alba* ขณะขนส่งมีความเครียดน้อยกว่าปลาที่ไม่ได้รับน้ำมันหอมระเหย นอกจากนี้ น้ำมัน *Lippia alba* ยังไม่ส่งผลกระทบต่อรสชาติและกลิ่นของปลาดุกเงินอีกด้วย (Cunha et al., 2010) น้ำมันโรสวูดสามารถใช้เป็นยาสลบสำหรับปลาทอง (*Carassius auratus*) ได้ และความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันโรสวูดที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการสลบ คือ 250 ไมโครลิตรต่อลิตร นอกจากนี้ น้ำมันโรสวูดยังไม่มีผลข้างเคียงต่อปลาผู้ใช้งาน เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม มีกลิ่นหอม และมีราคาถูก (Kizak et al., 2018) จากรายงานการวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชหลายชนิดสามารถประยุกต์ใช้เป็นยาสลบที่มีประสิทธิภาพดีสำหรับทั้งปลาที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคและปลาสวยงาม

แม้ว่ายาสลบปลาจากน้ำมันหอมระเหยจะมีข้อดีในหลายด้าน ข้อจำกัดหลักของการใช้น้ำมันหอมระเหยเพื่อเป็นยาสลบปลา คือ น้ำมันหอมระเหยไม่สามารถละลายน้ำได้ ดังนั้นการใช้น้ำมันหอมระเหยเพื่อเป็นยาสลบปลาจึงจำเป็นต้องทำละลายด้วยเอทานอล

ในอัตราส่วนที่เหมาะสม (Cunha et al., 2010; Kizak et al., 2018; Tondolo et al., 2013) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่ายาทานอลมีความเป็นพิษต่อปลา เช่น ปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) ที่ได้รับเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 0.65, 1.3 และ 2.6 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 และ 21 วัน มีการทำงานของเอนไซม์ ATPase ของเหงือกลดลง ซึ่งส่งผลกระทบต่อ การแลกเปลี่ยนแก๊สของเหงือก (Bhanu & Philip, 2011) ปลาดุกแอฟริกา (*Clarias gariepinus*) ที่ได้รับเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 6.25, 7.50, 8.20, 8.80 และ 9.30 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิน 96 ชั่วโมง เกิดพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือก เช่น การคั่งของเลือด การเพิ่มจำนวนชั้นของเยื่อบุผิว การลอกของเยื่อบุผิว การบวมของ lamella การเชื่อมรวมกันของ lamella และการเพิ่มจำนวนชั้นของเซลล์เมือก (Abalaka et al., 2015) นอกจากนี้การทำละลายด้วยเอทานอลยังทำให้เกิด ความยุ่งยากในการใช้น้ำมันหอมระเหยเพื่อทำสลบปลาอีกด้วย

#### การประเมินประสิทธิภาพของยาสลบสำหรับปลา

ประสิทธิภาพของยาสลบสำหรับปลาสามารถประเมินได้จากเวลาที่ใช้ชักนำให้ปลา เกิดการสลบ (induction time) และเวลาที่ฟื้นตัวหลังการสลบ (recovery time) ซึ่งสามารถประเมิน ได้จากการสังเกตพฤติกรรมในแต่ละระยะของการสลบ และระยะเวลาฟื้นตัว (ตาราง 3) โดยยาสลบ ที่มีประสิทธิภาพดีจะต้องสามารถชักนำให้ปลาเกิดการสลบจนถึงระยะที่ 3 ภายในระยะเวลา 5 นาที และเมื่อปลาอยู่ในน้ำที่ปราศจากยาสลบจะสามารถฟื้นตัวได้ภายในระยะเวลา 10 นาที (Gilderhus & Marking, 1987; Kizak et al., 2018; Mylonas, Cardinaletti, Sigelaki, & Polzonetti-Magni, 2005)

ตาราง 3 พฤติกรรมของปลาในแต่ละระยะของการสลบและการฟื้นตัว

ระยะ	พฤติกรรม
การสลบระยะที่ 1	อยู่ในอาการสงบ ยังคงมีการตอบสนองต่อสิ่งเร้า การเคลื่อนไหวและอัตราการหายใจลดลง
การสลบระยะที่ 2	สูญเสียสมดุร่างกายบางส่วน สูญเสียการควบคุมกล้ามเนื้อ อัตราการหายใจช้ามาก
การสลบระยะที่ 3	สูญเสียสมดุร่างกายทั้งหมด ไม่มีการเคลื่อนไหว ไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้า
การสลบระยะที่ 4	หยุดหายใจ หัวใจหยุดเต้น และตายในที่สุดเนื่องจากได้รับยาเกินขนาด
ระยะฟื้นตัว	มีการตอบสนองต่อสิ่งเร้า สมดุร่างกายปกติ การว่ายน้ำปกติ หลบหลีกสิ่งกีดขวางได้

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



## ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของยาสลบ

การใช้ยาสลบสำหรับปลาเพื่อให้มีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยต่อปลาควรต้องคำนึงถึงปัจจัยดังต่อไปนี้ (West, Heard, & Caulkett, 2014)

### 1. ชนิดของปลา

การคำนึงถึงชนิดของปลามีความจำเป็นอย่างยิ่งในการใช้ยาสลบ เนื่องจากปลาที่มีความหลากหลายกว่า 30,000 สปีชีส์ และยาสลบแต่ละชนิดส่งผลต่อปลาแต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น benzocaine ปริมาณ 100-150 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นยาสลบที่มีประสิทธิภาพดีและปลอดภัยสำหรับปลาคู้ดำ (*Colossoma macropomum*) แต่ส่งผลให้ปลาคอด (*Gardus morhua*) ตายได้ (Gomes, Chippari-Gomes, Lopes, Roubach, & Araujo-Lima, 2001; Mattson & Ripley, 1989)

### 2. สรีรวิทยาการหายใจ

เหงือกของปลาแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพการแลกเปลี่ยนสารที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปปลาหายใจโดยการขยายขากรรไกรล่างและแผ่นปิดเหงือกเพื่อให้น้ำไหลผ่านเหงือก อย่างไรก็ตามปลาบางชนิดหายใจโดยการอ้าปากขณะว่ายน้ำเพื่อให้น้ำไหลผ่าน (ram ventilation) เช่น ปลาทูน่า (Bushnell & Jones, 1994) ทั้งนี้รูปแบบการหายใจของปลาส่งผลอย่างยิ่งต่อการใช้ยาสลบ เนื่องจากอัตราการดูดซึมยาสลบและการชักนำให้เกิดการสลบมีความสัมพันธ์กับอัตราการแลกเปลี่ยนแก๊สของปลา โดยปลาที่แลกเปลี่ยนแก๊สจากน้ำเป็นหลักจะใช้เวลาชักนำให้เกิดการสลบน้อยกว่าปลาที่แลกเปลี่ยนแก๊สจากอากาศได้ อย่างไรก็ตามการวางยาสลบปลาที่สามารถหายใจโดยใช้อากาศสามารถทำได้โดยการฉีดยาสลบเข้าสู่ร่างกายโดยตรง (Bruecker & Graham, 1993) ดังนั้นการเลือกใช้งานยาสลบจึงต้องคำนึงถึงรูปแบบการหายใจของปลาและประเภทของการทำสลบให้เหมาะสมกับสรีรวิทยาการหายใจของปลา

### 3. เมแทบอลิซึม

ปลาโดยส่วนใหญ่เป็นสัตว์ประเภท ectotherm ดังนั้นอัตราการเมแทบอลิซึมจึงขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อม และมีรายงานผลของอุณหภูมิต่อการสลบ ดังนี้ อุณหภูมิของน้ำที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปลาเรนโบว์เทราต์ (*Oncorhynchus mykiss*) ที่ได้รับน้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้น 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สลบและฟื้นจากการสลบได้เร็วขึ้น (Woolsey, Holcomb, & Ingermann, 2004) เนื่องจากอุณหภูมิของน้ำที่สูงขึ้นส่งผลให้ปลามีอัตรา



เมแทบอลิซึมสูงขึ้น อัตราการหายใจเพิ่มขึ้น เวลาในการชักนำให้เกิดการสลบและการฟื้นจากการสลบจึงลดลง ในขณะที่เมื่ออุณหภูมิต่ำลงส่งผลให้เมแทบอลิซึมต่ำลง การหายใจช้าลง เวลาในการชักนำให้เกิดการสลบและการฟื้นจากการสลบจึงนานขึ้น

#### 4. หนึ่งปลา

หนึ่งของปลาโดยส่วนใหญ่ประกอบด้วยเกล็ดซึ่งมีลักษณะและการกระจายแตกต่างกันในแต่ละชนิด ทำให้มีผลต่อการวางยาสลบเนื่องจากปลาบางชนิดมีเกล็ดที่หนาและแข็งทำให้ยากต่อการฉีดยา นอกจากนี้หนึ่งของปลาหลายชนิดสามารถแลกเปลี่ยนแก๊สได้ จึงทำให้ปลาได้รับยาสลบผ่านทางผิวหนังได้เช่นกัน โดยเฉพาะปลาที่ไม่มีเกล็ด เช่น ปลาในตระกูลปลาตุก (Siluriformes) พบว่าความสามารถในการแลกเปลี่ยนแก๊สของผิวหนังขึ้นอยู่กับอายุของปลา โดยปลาที่มีอายุน้อยสามารถแลกเปลี่ยนแก๊สได้ดีกว่าเนื่องจากผิวหนังมีความบางกว่าและเกล็ดยังไม่เจริญเต็มที่ (Myszkowski, Kaminski, & Wolnicki, 2003)

#### 5. สิ่งแวดล้อมและปัจจัยทางกายภาพ

##### 5.1 อุณหภูมิ

นอกจากอุณหภูมิจะส่งผลต่ออัตราเมแทบอลิซึมของปลาแล้ว ยังส่งผลกระทบต่อระดับความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายน้ำ (dissolved oxygen, DO) โดยเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นค่า DO จะต่ำลง ส่งผลให้ปลาเกิดการขาดออกซิเจน (hypoxia) ได้ (West et al., 2014)

##### 5.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ระดับความเป็นกรด-ด่างของสารละลายยาสลบเป็นผลมาจากอัตราส่วนระหว่างโมเลกุลที่มีประจุและไม่มีประจุ โดยทั่วไปแล้วการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ส่งผลให้ยาสลบเกิดปฏิกิริยา protonation และ deprotonation ซึ่งรบกวนการดูดซึมยาสลบ ดังนั้นสารละลายยาสลบจึงต้องเติมสารบัฟเฟอร์ (buffering agent) เพื่อปรับระดับ pH ให้เป็นกลาง โดยในน้ำเค็มไม่จำเป็นต้องใช้สารบัฟเฟอร์ เพราะมีค่า pH สูงและมีบัฟเฟอร์ตามธรรมชาติมากกว่าน้ำจืด (Ross et al., 2008)

##### 5.3 เวลาที่ได้รับยา

เมื่อปลาได้รับยาสลบเป็นเวลานานขึ้นจะส่งผลให้เวลาที่ใช้ในการฟื้นตัวนานขึ้นด้วยเช่นกัน ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดภาวะออกซิเจนในเลือดต่ำและเลือดมีความเป็นกรดสูงเนื่องจากการขาดออกซิเจนเป็นเวลานาน ดังนั้นในการทดสอบการสลบจึงควรให้อากาศแก่ปลาตลอดเวลาเพื่อป้องกันภาวะขาดออกซิเจนในขณะที่ปลาสลบ (Hseu et al., 1998; Ross et al., 2008)

## ปลาแฟนซีคาร์ป (*Cyprinus carpio* L.)

### ข้อมูลทั่วไป

ปลาแฟนซีคาร์ป (*Cyprinus carpio* L.) เป็นปลาน้ำจืดในวงศ์ปลาตะเพียน (Cyprinidae) มีลักษณะลำตัวแบน หัวไม่มีเกล็ด ริมฝีปากบางเรียบ ภายในช่องปากไม่มีฟัน แต่จะพบฟันที่ลำคอ 1-3 แถว แต่ละแถวมีฟันไม่เกิน 8 ซี่ ลำตัวพบครีบหลัง ครีบหู ครีบท้อง และครีบท้อง (ภาพประกอบ 1)

ปลาแฟนซีคาร์ปนิยมนำมาเลี้ยงเนื่องจากสามารถปรับตัวได้ดีในน้ำที่อุณหภูมิแตกต่างกันมาก นอกจากนี้ยังมีการเพาะเลี้ยงเพื่อการค้าอย่างแพร่หลายทั้งภายในประเทศและส่งออก ทำให้ปลาแฟนซีคาร์ปมีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงเนื่องจากเป็นที่ต้องการของตลาดปลาสวยงาม (Poonpanich & Prapreut, 2013) ดังนั้นเพื่อรักษามูลค่าทางเศรษฐกิจของปลาแฟนซีคาร์ป การใช้ยาสลับที่มีคุณภาพและปลอดภัยในการขนส่งและทำศัลยกรรมปลาแฟนซีคาร์ปจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง



ภาพประกอบ 1 ปลาแฟนซีคาร์ป (*Cyprinus carpio* L.) พันธุ์ butterfly

ที่มา: ภาพถ่ายโดย นายกันตินันท์ รักนาค

### การใช้ยาสลับสำหรับปลาแฟนซีคาร์ป

การทำสลับปลาแฟนซีคาร์ปได้รับความสนใจจากนักวิจัยหลายท่าน เนื่องจากเป็นปลาสวยงามที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง โดยรายงานการทดสอบยาสลับประเภทสารเคมีสังเคราะห์และน้ำมันหอมระเหยเพื่อทำสลับปลาแฟนซีคาร์ปแสดงในตาราง 4 โดยตัวอย่างผลการวิจัยมีดังนี้

ปลาไน (*Cyprinus carpio* var. *Jian*) ที่ได้รับ 2-phenoxyethanol 0.3 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีระดับเอนไซม์ alanine aminotransferase ในเลือดสูงขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า 2-phenoxyethanol ส่งผลข้างเคียงต่อปลาไนจึงต้องใช้ความระมัดระวังในการใช้งานเป็นพิเศษ (Velíšek & Svobodova, 2004) ขณะที่ปลาไนที่ได้รับน้ำมันกานพลูเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับทำสลบปลาไนสปีชีส์ *Cyprinus carpio* ส่งผลให้ฮอร์โมนคอร์ติซอลและระดับกลูโคสในเลือดสูงขึ้นหลังจากได้รับน้ำมันหอมระเหยเป็นเวลา 10 นาทีและกลับสู่ระดับปกติในเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ค่าชีวเคมี (biochemical profile) ของเลือดหลังได้รับน้ำมันกานพลูเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่มีการเปลี่ยนแปลงและไม่เกิดพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือก ตับ และไต (Velíšek, Svobodova, Piackova, Groch, & Nepejchalova, 2005) จากผลการทดสอบประสิทธิภาพและความเป็นพิษของน้ำมันชาในการทำสลบปลาแฟนซีคาร์ปพบว่า น้ำมันชาสามารถใช้เป็นยาสลบประสิทธิภาพดีสำหรับปลาแฟนซีคาร์ป โดยมีความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 300-400 มิลลิกรัมต่อลิตรและไม่ส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อเหงือกและไม่ก่อให้เกิดความเครียดในปลาแฟนซีคาร์ป นอกจากนี้ระดับกลูโคสและฮอร์โมนคอร์ติซอลในเลือดของปลาที่ได้รับน้ำมันชามีปริมาณน้อยกว่า MS-222 ซึ่งเป็นยาสลบประเภทสารเคมีสังเคราะห์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า น้ำมันชาเป็นยาสลบที่มีประสิทธิภาพดีกว่า MS-222 (Khumpirapang, Pikulkaew, et al., 2018) จากผลการวิจัยข้างต้นเห็นได้ว่ายาสลบประเภทสารเคมีสังเคราะห์หลายชนิดส่งผลกระทบต่อปลาแฟนซีคาร์ป ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อประยุกต์ใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืชซึ่งมีผลต่อปลาน้อยกว่าสารเคมีสังเคราะห์เพื่อใช้เป็นยาสลบทางเลือกสำหรับปลาแฟนซีคาร์ปที่มีความปลอดภัยจึงเป็นประโยชน์ต่อผู้เพาะเลี้ยงปลาแฟนซีคาร์ปอย่างยิ่ง

ตาราง 4 ยาสลบที่นิยมใช้และมีการทดสอบกับปลาไนสปีชีส์ *Cyprinus carpio*

ยาสลบ	ความเข้มข้นที่เหมาะสม	ผู้วิจัย
2-phenoxyethanol	0.1-0.5 ml L <sup>-1</sup>	Neiffer and Stamper (2009) Velíšek and Svobodova (2004)
Tricaine methanesulfonate (MS-222)	50-200 mg L <sup>-1</sup>	Hisaki, Takase, Ogasawara, and Ogasawara (1986) Neiffer and Stamper (2009)
Eugenol	25-100 mg L <sup>-1</sup>	Hisaki et al. (1986)

ตาราง 4 (ต่อ)

ยาสลบ	ความเข้มข้นที่เหมาะสม	ผู้วิจัย
Alfaxalone	1.0-2.5 mg L <sup>-1</sup>	Minter, Bailey, Harms, Lewbart, and Posner (2014)
Isoeugenol	40-80 mg L <sup>-1</sup>	Gladden, Brainard, Shelton, Camus, and Divers (2010)
น้ำมันกานพลู	25-100 mg L <sup>-1</sup>	Neiffer and Stamper (2009) Velišek et al. (2005)
น้ำมันชา	300-400 mg L <sup>-1</sup>	Khumpirapang, Pikulkaew, et al. (2018)

### โถงจุฬาลัมพา (*Artemisia vulgaris* L.)

#### ข้อมูลทั่วไปของต้นโถงจุฬาลัมพา (*Artemisia vulgaris* L.)

โถงจุฬาลัมพา (*Artemisia vulgaris* L.) พืชในวงศ์ทานตะวัน (Asteraceae) เป็นพืชล้มลุก มีความสูงของลำต้นตั้งแต่ 70 ถึง 150 เซนติเมตร ผิวใบด้านล่าง (abaxial) มีขนปกคลุมขอบใบหยัก (ภาพประกอบ 2) เมื่อนำใบไปบดจะมีกลิ่นฉุน พบทั่วไปในทวีปยุโรป อเมริกาเหนือ และเอเชีย รวมไปถึงประเทศไทย พบกระจายตัวอยู่ทั่วไปตามเนินเขา พื้นที่รกร้าง หรือบริเวณชายป่าที่มีอากาศค่อนข้างเย็น (Anwar, Ahmad, & Alkharfy, 2016; กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2556)

น้ำมันหอมระเหยจากต้นโถงจุฬาลัมพาสามารถสกัดได้จากส่วนใบและลำต้น ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น ใช้ปรุงอาหาร ใช้ในอุตสาหกรรมน้ำหอม รวมไปถึงด้านการแพทย์ เนื่องจากน้ำมันโถงจุฬาลัมพามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ช่วยใหู้สึกผ่อนคลายและช่วยรักษาอาการนอนไม่หลับได้ (Anwar et al., 2016; Jerkovic et al., 2003; Wang et al., 2006) ดังนั้นน้ำมันโถงจุฬาลัมพาจึงเป็นสารสกัดจากพืชที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และมีสรรพคุณทางยาในหลายด้าน

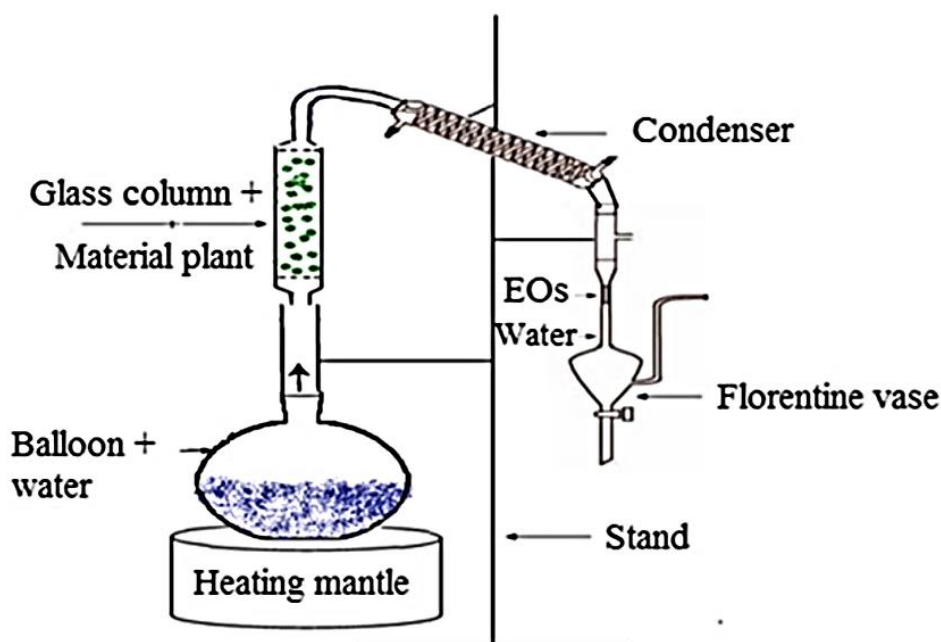


ภาพประกอบ 2 ต้นโกฐจุฬาลัมพา (*Artemisia vulgaris* L.)

ที่มา: El-Sahhar, K., Nassar, R., & Farag, H. (2011). Morphological and anatomical studies of *Artemisia vulgaris* L. (Asteraceae) II. Anatomical characteristics and volatile oil. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(6), 56-68.

### การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากต้นโกฐจุฬาลัมพา

การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชนิยมสกัดโดยใช้การกลั่นด้วยไอน้ำ ซึ่งสามารถสกัดน้ำมันหอมระเหยได้ถึงร้อยละ 93 โดยมีขั้นตอนการให้ความร้อนจากไอน้ำกับชิ้นส่วนพืชซึ่งบรรจุอยู่ในเนื้อแหล่งกำเนิดไอน้ำ ทำให้เกิดการสลายโครงสร้างกักเก็บน้ำมันหอมระเหย จากนั้นน้ำมันจะระเหยไปพร้อมกับไอน้ำและควบแน่นที่คอนเดนเซอร์ (condenser) ได้เป็นของเหลวที่มีการแยกชั้นระหว่างน้ำและน้ำมันหอมระเหย (Aziz et al., 2018) กระบวนการกลั่นด้วยไอน้ำแสดงดังภาพประกอบ 3

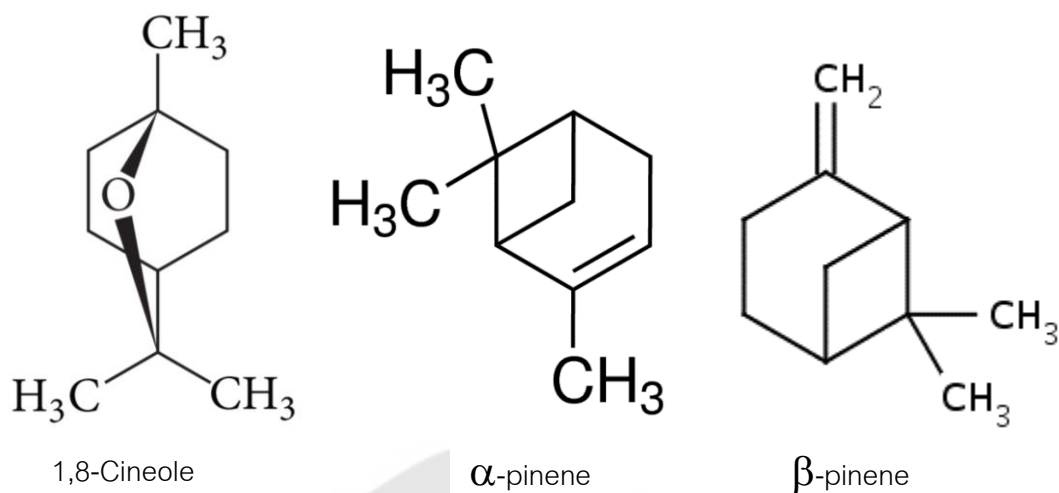


ภาพประกอบ 3 กระบวนการกลั่นด้วยไอน้ำ

ที่มา: Sahraoui, N., & Boutekedjiret, C. (2015). Innovative Process of Essential Oil Extraction: Steam Distillation Assisted by Microwave *Progress in Clean Energy*, Volume 1 (pp. 831-841): Springer.

### สารออกฤทธิ์สำคัญที่พบในน้ำมันโกลูจูปาล์มพา

แม้ว่าในปัจจุบันจะยังไม่มีการนำน้ำมันหอมระเหยโกลูจูปาล์มพาไปใช้เพื่อเป็นยาสลบสำหรับปลาแพนซีคาร์ป แต่จากการศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันโกลูจูปาล์มพาพบว่ามีส่วน 1,8-cineole และ  $\alpha$ -pinene ซึ่งเป็นสารประเภท bicyclic monoterpene และ bicyclic monoterpene oxides ตามลำดับ (Alizadeh, Aghaei, Sharifian, & Saadatian, 2012; Judžentienė & Buzelytė, 2006) โดยทั้ง 1,8-cineole และ  $\alpha$ -pinene เป็นสารที่พบในน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่นที่ได้มีการทดสอบและใช้เพื่อเป็นยาสลบสำหรับปลา เช่น น้ำมันข่า น้ำมันไพล น้ำมัน Canela-preta และน้ำมันยูคาลิปตัส และมีการรายงานว่าสารเหล่านี้สามารถชักนำให้ปลาเกิดการสลบได้ (Bodur et al., 2018; Khumpirapang, Chaichit, et al., 2018; Limhang et al., 2017; Tondolo et al., 2013; Tsuchiya, 2017)



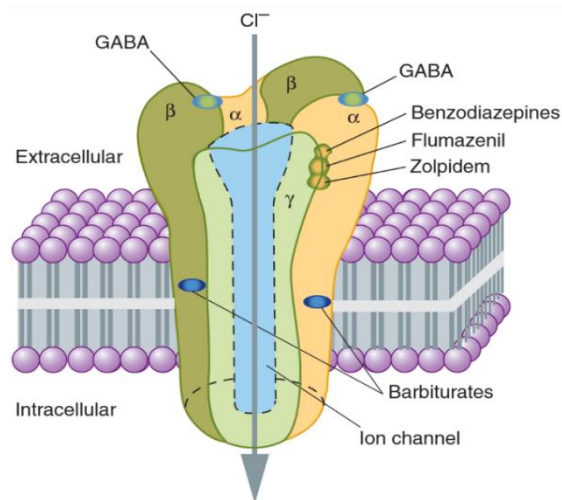
ภาพประกอบ 4 โครงสร้างของสารออกฤทธิ์สำคัญในน้ำมันโสมจันทน์

ที่มา: Tsuchiya, H. (2017). Anesthetic agents of plant origin: a review of phytochemicals with anesthetic activity. *Molecules*, 22(8), 1369.

#### กลไกการออกฤทธิ์ของ 1,8-Cineole และ $\alpha$ -pinene

1,8-Cineole และ  $\alpha$ -pinene มีการออกฤทธิ์ยับยั้งการรับส่งกระแสประสาทที่ระบบประสาทส่วนกลางโดยจับกับ  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor ชนิด A ( $GABA_A$  receptor) เนื่องจากโดยปกติแล้ว  $GABA_A$  receptor มีการจับกับสารสื่อประสาท  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) ทำให้เกิดการยับยั้งการส่งกระแสประสาท ซึ่ง  $GABA_A$  receptor ประกอบด้วย 5 subunits ได้แก่  $\alpha$  2 หน่วย,  $\beta$  2 หน่วย และ  $\gamma$  subunit 1 หน่วย มีการเรียงตัว ดังภาพประกอบ 5 ซึ่งสารออกฤทธิ์ของยาสลบโดยส่วนมากมักเข้าจับที่ตำแหน่ง benzodiazepine binding site ซึ่งอยู่ระหว่าง  $\alpha$  และ  $\gamma$  subunit (Aoshima & Hamamoto, 1999; Khumpirapang, Chaichit, et al., 2018) การเข้าจับกับ  $GABA_A$  receptor ของสารออกฤทธิ์ในยาสลบส่งผลให้เกิดการเคลื่อนที่ของคลอไรด์ไอออน ( $Cl^-$ ) เข้าสู่เซลล์ประสาท ทำให้เกิดการยับยั้งการส่งกระแสประสาทผ่านกลไก inhibitory postsynaptic potential (IPSP) (Meyer & Fish, 2008) แสดงดังภาพประกอบ 6

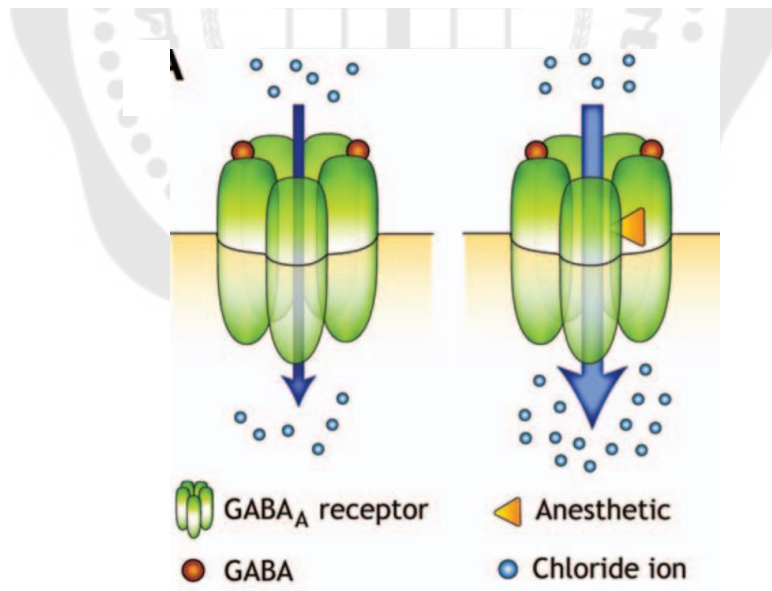




ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของ GABA<sub>A</sub> receptor

ที่มา: Katzung, B. G. (2012). *Basic and clinical pharmacology* (12 ed.):

McGraw-Hill Education.



ภาพประกอบ 6 กลไกการออกฤทธิ์ของยาสงบ

ที่มา: Orser, B. A., Mazer, C. D., & Baker, A. J. (2008). Awareness during anesthesia. *Cmaj*, 178(2), 185-188.



## สารองค์ประกอบในน้ำมันโกฐจุฬาลัมพา

การวิเคราะห์สารองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยสามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโทรเมตรี (gas chromatography-mass spectrometry)

### 1. หลักการทำงานของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

แก๊สโครมาโทกราฟีเป็นอุปกรณ์สำหรับแยกสารผสมที่สามารถเปลี่ยนสถานะให้เป็นแก๊สได้ที่อุณหภูมิหนึ่ง (ไม่เกิน 450 องศาเซลเซียส) และเสถียรที่อุณหภูมินั้น (Amornsit, 2010) โดยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี มีหลักการทำงานโดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่บนเฟสคงที่ (stationary phase) ของแต่ละองค์ประกอบในสารผสม ภายใต้การพาของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยเฟสคงที่ คือ สารที่อยู่ภายในคอลัมน์และสารในเฟสเคลื่อนที่ คือ แก๊สฮีเลียม ในการตรวจสอบองค์ประกอบของสารผสม ทำการฉีดสารที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านเข้าสู่เครื่อง GC สารจะเปลี่ยนสถานะเป็นแก๊ส จากนั้นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือเรียกว่า แก๊สตัวพา (carrier gas) จะพาแก๊สของสารผสมเข้าสู่คอลัมน์ และเกิดการแยกสารผสมตามการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารตัวอย่างและเฟสคงที่ (stationary phase) ภายในเฟสคงที่ประกอบด้วยสารที่สามารถดูดซับ (absorbed) gas-liquid chromatography โดยการแยกสารอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล จุดเดือด โครงสร้างของสาร และสมบัติทางเคมีในการทำปฏิกิริยากับสารที่อยู่ภายในคอลัมน์ สารแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ภายในคอลัมน์ในเวลาที่แตกต่างกัน จากนั้นสารแต่ละชนิดจะผ่านเครื่องวัดสัญญาณ (detector) และแปลผลเป็นโครมาโทแกรม (chromatogram) สารแต่ละชนิดมีระยะเวลาที่อยู่ในคอลัมน์เฉพาะตัว ดังนั้นการวิเคราะห์ผลจึงทำได้จากการคำนวณพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของสารแต่ละชนิดเทียบกับกราฟมาตรฐาน (calibration curve) (Amornsit, 2010; Koning, Janssen, & Udo, 2009)

### 2. หลักการทำงานของเครื่องแมสสเปกโทรเมตรี

เครื่องแมสสเปกโทรเมตรีเป็นเครื่องมือวิเคราะห์ที่ใช้วัดค่ามวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio,  $m/z$ ) ของไอออนที่เกิดจากการไอออไนซ์ ในกรณีที่สารตัวอย่างเกิดการไอออไนซ์และไม่เกิดการแตกตัว ค่ามวลต่อประจุของสารมีค่าเท่ากับมวลโมเลกุลของสาร เรียกว่า ไอออนโมเลกุล (molecular ion) เทคนิคนี้จึงสามารถใช้ตรวจสอบมวลโมเลกุลของสารได้ นอกจากนี้ หากสารตัวอย่างเกิดการแตกตัว (fragmentation) เป็นส่วนย่อยต่าง ๆ เรียกว่า ไอออนย่อย (fragmentation ion) จะสามารถใช้วิเคราะห์โครงสร้างของตัวอย่างได้

ผลการวิเคราะห์โดยเครื่องแมสสเปกโทรเมตรีแสดงในรูปกราฟ เรียกว่า แมสสเปกตรัม (mass spectrum) โดยแกนนอน คือ ค่ามวลต่อประจุ ( $m/z$ ) และแกนตั้ง คือ

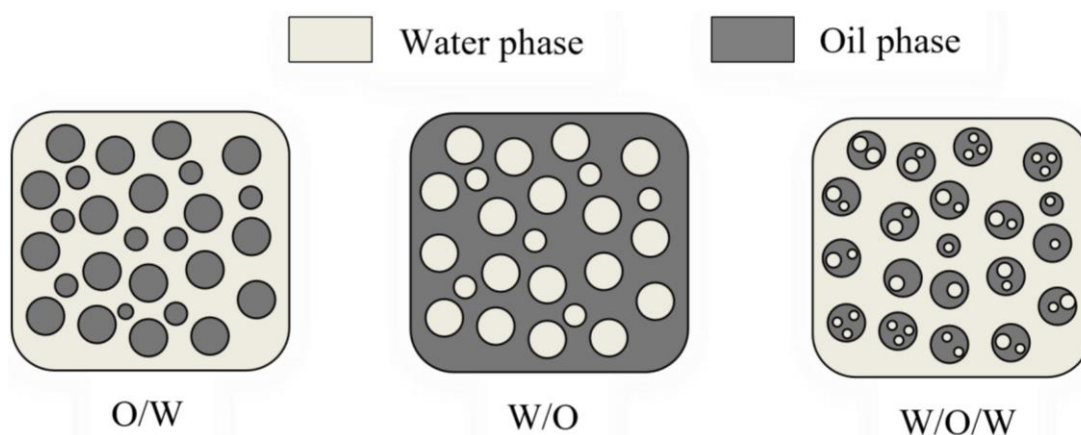
ค่าความเข้มข้นสัมพันธ์ โดยเรียกไอออนที่มีค่าความเข้มข้นสัมพันธ์ร้อยละ 100 ว่า เบสพีค (base peak) และค่ามวลต่อประจุอื่น ๆ คิดเป็นสัดส่วนกับค่ามวลต่อประจุที่สูงที่สุด (Amornsit, 2010)

## อิมัลชัน (emulsion)

### ข้อมูลทั่วไปของอิมัลชัน

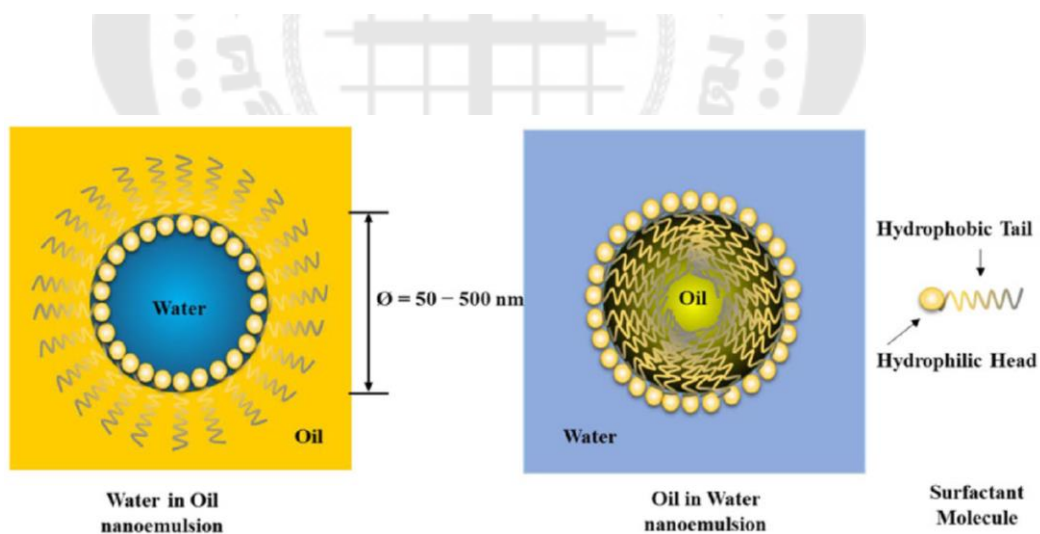
อิมัลชัน (emulsion) คือ ระบบคอลลอยด์ (colloid) ที่เกิดจากการผสมกันของของเหลวตั้งแต่ 2 ชนิด ขึ้นไป ซึ่งไม่สามารถผสมกันได้ในสภาวะปกติ เช่น น้ำกับน้ำมัน โดยใช้แรงกลหรือสารลดแรงตึงผิวซึ่งเป็นสารที่ประกอบด้วยโมเลกุล 2 ส่วน คือ ส่วนที่มีขั้ว (hydrophilic) และส่วนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic) เมื่อเกิดการผสมกันแล้ว อนุภาคของสารชนิดหนึ่งจะกระจายตัวอยู่ในสารอีกชนิดหนึ่ง อิมัลชันสามารถจำแนกตามลักษณะการกระจายตัวของวัฏภาคได้เป็น 3 ชนิด คือ การกระจายตัวของน้ำมันในน้ำ (oil-in-water; O/W) การกระจายตัวของน้ำในน้ำมัน (water-in-oil; W/O) และอิมัลชันเชิงซ้อน (multiple emulsion) ได้แก่ อิมัลชันแบบน้ำในน้ำมันในน้ำ (water-in-oil-in-water; W/O/W) และแบบน้ำมันในน้ำในน้ำมัน (oil-in-water-in-oil; O/W/O) แสดงดังภาพประกอบ 7 (Akbari & Nour, 2018; Kale & Deore, 2017)

อิมัลชันเกิดจากการลดแรงตึงผิวระหว่างสารแต่ละชนิดและการลดแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลภายในของสารชนิดเดียวกัน อิมัลชันมีความเสถียรและไม่เกิดการแยกชั้นกันเนื่องจากสารลดแรงตึงผิวสามารถล้อมรอบอนุภาคของวัฏภาค (ภาพประกอบ 8) ความเสถียรของอิมัลชันยังขึ้นอยู่กับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคของวัฏภาคภายใน โดยอิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคเล็กจะมีความเสถียรสูง เนื่องจากสามารถกระจายตัวได้ดีไม่เกิดการตกตะกอนเนื่องจากมีการเคลื่อนที่แบบบราวเนียน (Brownian motion) ที่มีอัตราการแพร่สูงกว่าอัตราการตกตะกอนที่เกิดจากแรงโน้มถ่วงได้ และไม่เกิดการแยกชั้นเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน (Akbari & Nour, 2018; Tadros, Izquierdo, Esquena, & Solans, 2004) ด้วยเหตุนี้อิมัลชันจึงสามารถใช้ประโยชน์ได้ในหลายด้าน เช่น ใช้ในการละลายยาที่เป็นน้ำมันหรือมีโมเลกุลที่ไม่มีขั้วเป็นองค์ประกอบ เพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึมและการออกฤทธิ์ของยา และใช้แปรรูปอาหารเสริมจากน้ำมันธรรมชาติให้รับประทานง่ายขึ้น (Kale & Deore, 2017) ดังนั้นการแปรรูปผลิตภัณฑ์ในรูปแบบอิมัลชันจึงได้รับความสนใจจากหลายอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง



ภาพประกอบ 7 ชนิดของอิมัลชัน

ที่มา: Akbari, S., & Nour, A. H. (2018). Emulsion types, stability mechanisms and rheology: A review. *International Journal of Innovative Research and Scientific Studies (IJIRSS)*, 1(1), 14-21.



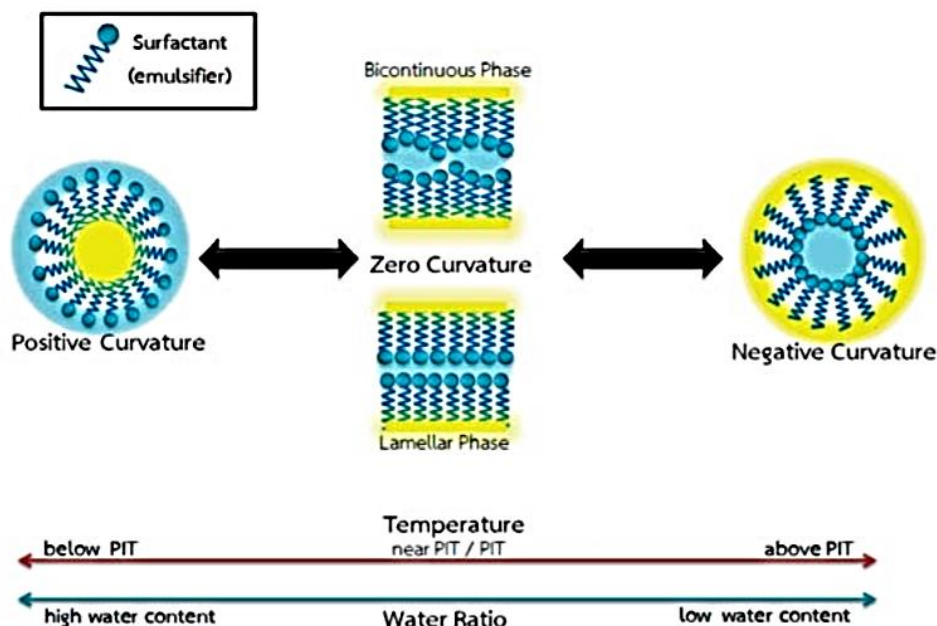
ภาพประกอบ 8 อิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน อิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ และสารลดแรงตึงผิว

ที่มา: Che Marzuki, N. H., Wahab, R. A., & Abdul Hamid, M. (2019). An overview of emulsion: concepts of development and cosmeceutical applications. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 779-797.

### การผลิตอิมัลชัน

งานวิจัยนี้ ผู้วิจัยใช้การผลิตอิมัลชันแบบการเปลี่ยนแปลงวัฏภาค (phase inversion) เนื่องจากเป็นการผลิตอิมัลชันที่ใช้พลังงานต่ำ เส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคมีขนาดเล็ก ใช้อุปกรณ์ที่ไม่ซับซ้อน และมีต้นทุนการผลิตต่ำ (Fernandez, André, Rieger, & Kühnle, 2004; Prasert, 2017; Zhang, Vriesekoop, Yuan, & Liang, 2014) การผลิตอิมัลชันแบบการเปลี่ยนแปลงวัฏภาคเป็นกระบวนการที่อาศัยการเปลี่ยนแปลงวัฏภาคหรือการจัดเรียงโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว หากเปลี่ยนความโค้ง (curvature) ของโครงสร้างสารลดแรงตึงผิวจากลบเป็นบวกจะทำให้เกิดอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ แต่หากเปลี่ยนความโค้งของโครงสร้างสารลดแรงตึงผิวจากบวกเป็นลบจะทำให้เกิดอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (ภาพประกอบ 9) การผลิตอิมัลชันโดยวิธีเปลี่ยนแปลงวัฏภาคสามารถจำแนกได้เป็น 2 วิธีย่อย คือ การเปลี่ยนแปลงวัฏภาคโดยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (phase inversion temperature; PIT) และการเปลี่ยนแปลงวัฏภาคโดยการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสาร (phase inversion composition; PIC) โดยใช้สารลดแรงตึงผิวกลุ่มที่ไม่มีประจุ (non-ionic surfactant) เช่น polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters (Tween) และ polyricinoleate (PGPR) (Fernandez et al., 2004; Prasert, 2017)

การเตรียมอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำด้วยวิธีเปลี่ยนแปลงวัฏภาคสามารถทำได้โดยการชักนำให้เกิดการผกผันของอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมันให้กลายเป็นแบบน้ำมันในน้ำด้วยวิธี catastrophic phase inversion (CPI) ซึ่งเป็นวิธีการที่อาศัยการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสาร โดยการไทเทรตน้ำลงในสารผสมระหว่างน้ำมันและสารลดแรงตึงผิว โดยในระยะแรกจะเกิดเป็นอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมันจนกระทั่งเกิดการกลับวัฏภาคเป็นแบบน้ำมันในน้ำในที่สุด การกลับวัฏภาคเป็นผลมาจากการเพิ่มอัตราเร็วของการรวมหยดของเหลวส่งผลให้อัตราเร็วของการรวมหยดและการแตกตัวของหยดของเหลวไม่สามารถรักษาสภาพอยู่ได้ นอกจากนี้ขนาดของอนุภาคน้ำมันยังขึ้นอยู่กับกระบวนการในการเตรียมสาร เช่น ความเร็วของเครื่องกวนสาร อัตราเร็วของการเติมน้ำ และความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว (Ostertag, Weiss, & McClements, 2012; Rangsimawong & Ngawhirunpat, 2014)



ภาพประกอบ 9 การเปลี่ยนแปลงความโค้งของสารลดแรงตึงผิว

ที่มา: Prasert, W. (2017). Nano-emulsion and nano-emulsification using low-energy method. *Institute of food research and product development journal*, 47(2), 37-45.

### อิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้เป็นยาสลบปลา

เนื่องจากอนุภาคของอิมัลชันมีคุณสมบัติการกระจายตัวในน้ำได้ดี สะดวกต่อการเก็บรักษาและการใช้งาน และสามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ง่าย การพัฒนาน้ำมันหอมระเหยในรูปอิมัลชันจึงเป็นทางเลือกที่ดีในการใช้เป็นยาสลบสำหรับปลา Kheawfu et al. (2017) ทำการศึกษาเพื่อประเมินประสิทธิภาพของอิมัลชันของน้ำมันกานพลูในการใช้เป็นยาสลบสำหรับปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ผลการวิจัยพบว่าอิมัลชันที่มีน้ำมันกานพลูร้อยละ 20 โดยมวลชักนำให้ปลานิลสลบได้เร็วกว่าสารละลายน้ำมันกานพลูกับเอทานอล มีเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาค  $63.2 \pm 1$  นาโนเมตร และไม่พบการแยกชั้นระหว่างน้ำและน้ำมันเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 30 วัน สอดคล้องกับรายงานการใช้อิมัลชันของน้ำมันกานพลูเพื่อเป็นยาสลบสำหรับปลาทองซึ่งรายงานว่า อิมัลชันของน้ำมันกานพลูเข้มข้น 50 ppm เป็นยาสลบที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยสำหรับปลาทอง (*Carassius auratus*) (Gholipourkanani, Gholinasab-Omran, Ebrahimi, & Jafaryan, 2015) สอดคล้องกับรายงานการใช้อิมัลชันของน้ำมันข่าเพื่อเป็นยาสลบสำหรับปลา

แฟนซีคาร์ปซึ่งรายงานว่ามีประสิทธิภาพดีกว่าสารละลายน้ำมันฆ่ากับเอทานอลเมื่อใช้น้ำมันในปริมาณเท่ากันในการใช้เป็นยาสลับสำหรับปลาแฟนซีคาร์ป โดยอิมัลชันของน้ำมันฆ่ามีเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาค  $48 \pm 1.6$  นาโนเมตร (Khumpirapang, Pikulkaew, Müllertz, Rades, & Okonogi, 2017) ดังนั้นการแปรรูปน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ชักนำการสลบในรูปอิมัลชันจึงมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ น้ำมันหอมระเหยร่วมกับเอทานอลและยังมีความปลอดภัยอีกด้วย

จากการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องสามารถสรุปได้ว่า การใช้ยาสลับสำหรับปลามีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการดำเนินกิจกรรมต่าง ๆ กับปลา เนื่องจากการทำสลับสามารถลดความเครียดและอัตราเสี่ยงต่อการบาดเจ็บของปลาได้ อย่างไรก็ตามการใช้ยาสลับประเภทสารเคมีสังเคราะห์นั้นก็มีผลกระทบต่อสุขภาพของปลาและมนุษย์ ตลอดจนส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นเพื่อลดปัญหาดังกล่าวจึงมีการนำน้ำมันหอมระเหยจากพืชมาใช้เป็นยาสลับสำหรับปลา ซึ่งในการวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพการชักนำการสลบของน้ำมันโกลูจุฟาลัมพา เนื่องจากน้ำมันโกลูจุฟาลัมพามีสารออกฤทธิ์ที่สามารถชักนำให้เกิดการสลบได้แก่ 1,8-cineole และ  $\alpha$ -pinene โดยทำการทดลองกับปลาแฟนซีคาร์ป (*Cyprinus carpio*) ซึ่งเป็นปลาที่นิยมเลี้ยงและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และทำการแปรรูปน้ำมันโกลูจุฟาลัมพาให้อยู่ในรูปอิมัลชันเพื่อใช้เป็นยาสลับสำหรับปลาที่มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นและง่ายต่อการใช้งานและเก็บรักษา



### บทที่ 3

## วิธีการดำเนินงานวิจัย

### วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ

#### วัสดุ อุปกรณ์

วัสดุ อุปกรณ์	ยี่ห้อ
จานเพาะเชื้อ (petri dish) 150 x 25 มิลลิเมตร	Pyrex
กระจกสไลด์ 26 x 76 มิลลิเมตร	Citolus
แผ่นปิดสไลด์ 22 x 22 มิลลิเมตร	Menzel-glaser
ไมโครปิเปต (micro pipette) 10 - 1,000 มิลลิลิตร	Gilson
ฟุ้งกัน เบอร์ 6	Masterart
กล่องเหลี่ยมใส 20 x 40 เซนติเมตร	Nam Ngai Hong
ถาดสี่เหลี่ยม 10 x 15 เซนติเมตร	Standard

ตู้ปลาขนาด 20 นิ้ว

#### เครื่องมือ

เครื่องมือ	ยี่ห้อ	รุ่น
กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	Leica	DM750
เครื่องชั่งดิจิทัล	Satorius	ED224S
เครื่องเขย่าสาร (vortex)	Vision	KMC1300V
เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter)	Extech	PH-100
เครื่องวัดออกซิเจนที่ละลายน้ำ (oxygen meter)	AMTAS	AMT08
เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome)	Leica	RM2135
เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโตรเมตรี	Shimadzu	QP2020
กล้องถ่ายรูป	Canon	EOS M50
เครื่องวัดขนาดอนุภาคนาโน และคักยซีต้า (Zetasizer)	malvern	ZSP
เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer)		



### สารเคมี

สารเคมี	ยี่ห้อ
น้ำมันโกฐจุฬาลัมพา (Mugwort oil)	Chemipan
Ethyl alcohol	Merck
Bouin's fixative	BIO optica
Xylene	RCI labscan
Hexane	RCI labscan
Paraplast	Surgipath
Hematoxylin	Sigma-aldrich
Eosin	Sigma-aldrich
Permout	Sigma-aldrich
HCl	Merck
NaOH	Sigma-aldrich
Propylene glycol	Ajax Finechem
Tween 80	Sigma-aldrich
2-phenoxyethanol	Sigma-aldrich

### สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ ปลาแพนซีคาร์ป (*Cyprinus carpio* L.) พันธุ์ butterfly จากฟาร์มปลาสวยงาม ในกรุงเทพมหานคร น้ำหนักเฉลี่ย  $7.44 \pm 1.66$  กรัม ความยาวลำตัวเฉลี่ย  $10.22 \pm 0.77$  เซนติเมตร อายุ 3-4 เดือน จำนวน 118 ตัว

### วิธีการทดลอง

#### การเตรียมสัตว์ทดลอง

เลี้ยงปลาแพนซีคาร์ปในน้ำประปาปราศจากคลอรีนในตู้ปลาปริมาตร 40 ลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราส่วนของแสงสว่างกลางวันกับกลางคืน 12/12 ชั่วโมง ควบคุมค่าความเป็นกรดต่าง 7-7.5 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำมากกว่า 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ออกซิเจนตลอดเวลา พักปลาก่อนทำการทดลองเป็นเวลา 7 วัน เปลี่ยนน้ำทุก 24 ชั่วโมง และให้อาหารปลาวันละ 2 ครั้ง โดยให้ปลาอดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนการทดลอง



## การเตรียมน้ำมันโกฐจุฬาลัมพา

ในการทดสอบประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลายของสารละลายน้ำมันโกฐจุฬาลัมพา ทำการผสมน้ำมันและเอทานอลสัมบูรณ์ (absolute ethanol) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 โดยปริมาตร

### การทดสอบเบื้องต้น (preliminary test)

ในการทดสอบเบื้องต้นเพื่อประเมินช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ ใช้น้ำมันโกฐจุฬาลัมพาที่ระดับความเข้มข้น 100 - 1,000 ไมโครลิตรต่อลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ใช้ปลาซัลละ 1 ตัว และมีเกณฑ์ในการประเมินเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการทดลองต่อไป คือ เมื่อปลาได้รับสารต้องสลบภายใน 10 นาที และฟื้นภายใน 10 นาที และไม่ส่งผลให้ปลาตาย

### การตรวจสอบคุณภาพน้ำ

ตรวจคุณภาพน้ำ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ (DO) และค่าความเป็นกรดต่าง (pH) โดยทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำ 3 ครั้ง คือ ก่อนเติมสารชักนำการสลาย หลังเติมสารชักนำการสลาย และหลังจากการทดสอบ

### การทดสอบประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลาย

ในขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลายของน้ำมันโกฐจุฬาลัมพาใช้น้ำมันโกฐจุฬาลัมพาที่ระดับความเข้มข้น 300, 400, 500 และ 600 ไมโครลิตรต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ประเมินจากการทดสอบเบื้องต้น โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

ขั้นที่ 1 เตรียมน้ำประปาปราศจากคลอรีนปริมาตร 2 ลิตร ใส่ภาชนะขนาด 20 x 40 x 10.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นผสมสารละลายน้ำมันหอมระเหยระดับความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ

ขั้นที่ 2 สุ่มจับปลาโดยวิธีสุ่มอย่างง่ายจากตู้มา 1 ตัว ปล่อยไปในน้ำที่ผสมสารละลายน้ำมันหอมระเหย จากนั้นจับเวลาสังเกตการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม และบันทึกวิธีดีไอเพื่อสังเกตอัตราการเปิด-ปิดแผ่นปิดเหงือก (opercular rate) และศึกษาพฤติกรรมในแต่ละระยะการสลบจนกระทั่งปลาสลบถึงระยะที่ 3 ซึ่งเป็นระยะที่ใช้สำหรับการทำศัลยกรรม ปลาจะสูญเสียสมดุลร่างกายทั้งหมด ไม่มีการตอบสนองต่อสิ่งเร้า และไม่เคลื่อนไหว

ขั้นที่ 3 หลังจากปลาสลบถึงระยะที่ 3 ย้ายปลาไปที่จานเพาะเชื้อที่รองด้วยสำลีชุบน้ำประปาปราศจากคลอรีนและวางสำลีชุบน้ำประปาปราศจากคลอรีนที่บริเวณแผ่นปิดเหงือกปลา จากนั้นจับเวลา 10 นาที

ขั้นที่ 4 ย้ายปลาจากจานเพาะเชื้อไปยังน้ำประปาปราศจากคลอรีนปริมาตร 2 ลิตร และจับเวลา เพื่อให้ปลาฟื้นตัว พร้อมทั้งสังเกตพฤติกรรมจนกระทั่งปลาฟื้นตัวสมบูรณ์พร้อมทั้งบันทึกวีดีโอ

ขั้นที่ 5 ย้ายปลาที่ฟื้นตัวสมบูรณ์แล้วลงสู่ตู้ปลาที่บรรจุน้ำประปาปราศจากคลอรีนและสังเกตพฤติกรรมปลาเป็นเวลา 3 วัน บันทึกพฤติกรรมและอัตราการตายของปลา

#### **การทดสอบชุดควบคุมผลบวก (positive control)**

ในการทดสอบชุดควบคุมผลบวก ทำการทดลองโดยใช้ 2-phenoxyethanol ที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครลิตรต่อลิตร (Neiffer & Stamper, 2009) โดยละลาย 2-phenoxyethanol ในน้ำ ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบน้ำมันหอมระเหย

#### **การทดสอบชุดควบคุมผลลบ (negative control)**

ในการทดสอบชุดควบคุมผลลบ ทำการทดลองโดยใช้เอทานอลสัมบูรณ์ ระดับความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบคือ 5,400 ไมโครลิตรต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณสูงสุดที่ใช้ทำละลายน้ำมันโกลูจุฟาลัมพา ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบน้ำมันหอมระเหย โดยให้ปลาอยู่ในสารละลายเอทานอล 10 นาที พร้อมทั้งสังเกตพฤติกรรมปลา

#### **การตรวจสอบพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกและตับ**

หลังจากปลาได้รับน้ำมันโกลูจุฟาลัมพาที่ทำละลายด้วยเอทานอลและอิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาลัมพาในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นยาสลบปลาแฟนซีคาร์ป และ 2-phenoxyethanol 500 ไมโครลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 10 นาที ทำการตรวจสอบพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกและตับปลาโดยมีขั้นตอนดังนี้

##### **ขั้นที่ 1 การเตรียมเนื้อเยื่อ**

ตัดเนื้อเยื่อเหงือกและตับ แช่ในสารละลายคงสภาพเนื้อเยื่อ (Bouin's fixative) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำประปาแล้วแช่ในเอทานอลที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาจึงเปลี่ยนไปแช่เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำซ้ำจนกระทั่งเนื้อเยื่อไม่มีสีของสารละลายคงสภาพ ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยการแช่เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 และเอทานอลสัมบูรณ์ตามลำดับ ทำซ้ำ 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที แช่เนื้อเยื่อในสารละลายไซลีนผสมเอทานอลสัมบูรณ์อัตราส่วน 1 ต่อ 1 เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยแช่ไซลีน 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที และทำการแทรกพาราฟลาสต์ โดยการแช่ชิ้นเนื้อในสารละลายพาราฟลาสต์ผสมไซลีนอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เป็นเวลา 30 นาที นำชิ้นเนื้อแช่ในพาราฟลาสต์ 2 ครั้ง ผึ่งชิ้นเนื้อเยื่อลงในพาราฟลาสต์ แล้วตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (microtome) ที่ความ

หนา 8 ไมโครเมตร ติดขึ้นตัวอย่างลงบนกระจกสไลด์ ที่งไว้จนแห้งแล้ววางสไลด์บนแผ่นให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส

#### ขั้นที่ 2 การย้อมสีอีมาทอกไซลินและอีโอซิน

แช่สไลด์ขึ้นเนื้อเยื่อในไซลิน 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แช่สารละลายไซลินผสมเอทานอลสัมบูรณ์อัตราส่วน 1 ต่อ 1 เป็นเวลา 5 นาที และแช่เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95, 90, และ 70 ความเข้มข้นละ 5 นาที ตามลำดับ จากนั้นแช่น้ำประปา 3 นาที และน้ำกลั่น 5 นาที แล้วนำเนื้อเยื่อไปย้อมด้วยสีอีมาทอกไซลิน 7 นาที ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลผ่านตลอดนาน 1 นาที จากนั้นจุ่มลงสารละลายไฮโดรคลอริก (HCl) ร้อยละ 0.05 ผ่านน้ำประปา 1 ครั้ง แล้วจุ่มลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ร้อยละ 1 จุ่มน้ำกลั่น 1 ครั้ง นำไปแช่เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70, 80, 90 และ 95 ชั้นละ 5 นาที แล้วจึงย้อมด้วยสีอีโอซิน 2 นาที จากนั้นใส่ลงในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นเวลา 2 นาที แล้วแช่ในเอทานอลสัมบูรณ์ 10 นาที แช่ในสารละลายไซลินผสมเอทานอลสัมบูรณ์อัตราส่วน 1 ต่อ 1 นาน 10 นาที และแช่ในไซลิน 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นปิดด้วยกระจกปิดสไลด์และเปอร์เมาทแล้วนำไปศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์

#### การตรวจสอบองค์ประกอบของน้ำมันโกฐจุฬาลัมพา

การตรวจสอบองค์ประกอบของน้ำมันโกฐจุฬาลัมพาทำได้โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทรเมตรีเพื่อวิเคราะห์สารองค์ประกอบในน้ำมันโกฐจุฬาลัมพา ใช้ซิลิกาคอลัมน์ (silica column) และใช้แก๊สพา (carrier gas) คือ ฮีเลียม (He) ตั้งค่าอัตราการไหล (flow rate) 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที split ratio ที่ 1:10 อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที และเพิ่มขึ้นทีละ 4 องศาเซลเซียสต่อนาที จนกระทั่งถึง 160 องศาเซลเซียส ค้างไว้ 6 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิครั้งละ 6 องศาเซลเซียสต่อนาที จนกระทั่งถึง 210 องศาเซลเซียส และค้างไว้เป็นเวลา 1 นาที โดยอุณหภูมิของจุดฉีดสาร (injector) และดีเทคเตอร์ (detector) อยู่ที่ 210 องศาเซลเซียส ฉีดสารตัวอย่างที่ผสมเฮกเซน (hexane) อัตราส่วน 1 ต่อ 10 โดยปริมาตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร เข้าสู่เครื่อง

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบโดยใช้เครื่องแมสสเปกโทรเมตรี โดยใช้ Quadrupole Mass Analyzer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 70 eV และตั้งค่าช่วงคลื่นของการวัดค่ามวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio, m/z) ที่ 40-450 (Said-Al Ahl, Hussein, Tkachenko, Nkomo, & Mudau, 2016)

## การเตรียมและวิเคราะห์สมบัติอิมัลชันของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพา

### การเตรียมอิมัลชันของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพา

เตรียมอิมัลชันด้วยเทคนิค catastrophic phase inversion (CPI) ทำการเตรียมอิมัลชันครั้งละ 50 มิลลิลิตรต่อลิตร โดยการเตรียมแบ่งออกเป็น 2 วัฏภาค ได้แก่ วัฏภาคน้ำ (water phase) คือ น้ำกลั่นและ propylene glycol ในอัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 45 มิลลิลิตรต่อลิตร และวัฏภาคน้ำมัน (oil phase) คือ น้ำมันโกลูจุฟาล์มพา 2 มิลลิลิตรต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 4 โดยปริมาตร ทำการผสมวัฏภาคน้ำมัน กับ Tween 80 3 มิลลิลิตรต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 6 โดยปริมาตร จากนั้นผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันโดยการหยดวัฏภาคน้ำลงในวัฏภาคน้ำมันที่ผสม Tween 80 ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที นำสารผสมไปกวนด้วยเครื่อง magnetic stirrer เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (Zhang et al., 2014)

### การวิเคราะห์สมบัติอิมัลชัน

วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคอิมัลชันด้วยเทคนิค dynamic light scattering ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใช้อิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาเข้มข้นร้อยละ 1 ตั้งค่ามุมที่เกิดการกระเจิง (scattering angle) 90 องศา ทำการสแกนทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาค (Zhang et al., 2014)

### การทดสอบประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลับของอิมัลชันของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพา

ในการทดสอบประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลับของอิมัลชันของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพา ใช้น้ำมันอิมัลชันที่ความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ 7.5 10 12.5 และ 15 มิลลิลิตรต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่คำนวณจากความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพยาสลับของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาและมีขั้นตอนการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพเช่นเดียวกับการทดสอบการชักนำให้เกิดการสลับของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพา

### การวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ปลาสลับภายใน 5 นาที โดยหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ
2. วิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ปลาฟื้นจากการสลับภายในเวลา 10 นาที โดยหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ
3. ทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยระยะเวลาในการชักนำให้เกิดการสลับและเวลาที่ฟื้นจากการสลับของแต่ละความเข้มข้นที่ทดสอบโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว

(one-way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่โดยใช้ Tukey's honestly significant difference (HSD)



## บทที่ 4

### ผลการดำเนินงานวิจัย

จากจุดมุ่งหมายของงานวิจัย ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการชักนำ การสลับของน้ำมันโกลูจูปาล์มพาและอิมัลชันน้ำมันโกลูจูปาล์มพาเพื่อใช้เป็นยาสลับสำหรับปลา แพนซีคาร์ป โดยผู้วิจัยได้วิเคราะห์ผลการทดลองดังนี้

1. ผลการวิเคราะห์สารองค์ประกอบของน้ำมันโกลูจูปาล์มพา
2. ผลการวัดขนาดอนุภาคของอิมัลชันน้ำมันโกลูจูปาล์มพา
3. ผลการประเมินระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันโกลูจูปาล์มพาและอิมัลชัน น้ำมันโกลูจูปาล์มพาในการใช้เป็นยาสลับปลาแพนซีคาร์ป
4. ผลของการเกิดพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาแพนซีคาร์ปหลัง ได้รับน้ำมันโกลูจูปาล์มพาที่ทำละลายโดยเอทานอลและอิมัลชันน้ำมันโกลูจูปาล์มพา

#### ผลการวิเคราะห์สารองค์ประกอบของน้ำมันโกลูจูปาล์มพา

ผลการวิเคราะห์สารองค์ประกอบของน้ำมันโกลูจูปาล์มพาโดยใช้เทคนิค GC-MS พบว่า น้ำมันโกลูจูปาล์มพาประกอบด้วยสารองค์ประกอบ 20 ชนิด ร้อยละของสารองค์ประกอบแต่ละ ชนิดแสดงดังตาราง 5 สารที่มีปริมาณมากที่สุดคือ  $\beta$ -Pinene ร้อยละ 11.70 และมีสารออกฤทธิ์ สำคัญอื่น ๆ ได้แก่ 1,8-cineole และ  $\alpha$ -pinene ร้อยละ 10.34 และ 8.29 ตามลำดับ

ตาราง 5 สารองค์ประกอบของน้ำมันโกลูจูปาล์มพา

สารองค์ประกอบ	ร้อยละของสารองค์ประกอบ
$\beta$ -Thujene	2.83
$\alpha$ -Pinene	8.29
Camphene	1.04
$\beta$ -Pinene	11.70
$\beta$ -Myrcene	1.46
(+)-3-Carene	4.51
o-Cymene	9.33
1,8-Cineole	10.34
Linalool	3.57

ตาราง 5 (ต่อ)

สารองค์ประกอบ	ร้อยละของสารองค์ประกอบ
Isoborneol	1.13
3-Cyclohexen-1-ol	10.17
$\alpha$ -Terpineole	10.49
Cyclohexanol	2.24
Benzaldehyde	1.17
Ascaridole	1.38
3-Allyl-6-methoxyphenol	1.25
Copaene	5.51
Caryophyllene	9.67
Naphthalene	1.49
Caryophyllene oxide	2.44
Total	100

### ผลการวัดขนาดอนุภาคของอิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาล์มพา

ผลการวัดขนาดอนุภาคของอิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาด้วยเทคนิค dynamic light scattering พบว่า อนุภาคอิมัลชันมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย  $395.37 \pm 10.81$  นาโนเมตร จัดเป็นอิมัลชันชนิดนาโนอิมัลชัน (nanoemulsion) เนื่องจากมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคไม่เกิน 500 นาโนเมตร (OstróŹka-CieŚlik & Sarecka-Hujar, 2017) และเมื่อพิจารณาลักษณะทางกายภาพพบว่า อิมัลชันมีลักษณะใสและเป็นเนื้อเดียวกัน (ภาพประกอบ 10)



ภาพประกอบ 10 ลักษณะทางกายภาพของอิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาล์มพา

ที่มา: ภาพถ่ายโดย นายกันตินันท์ รักนาค

## การประเมินระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาและอิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาในการใช้เป็นยาสลบปลาแพนซีคาร์ป

### การประเมินเวลาชักนำการสลบ (induction time)

จากผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาระดับความเข้มข้นของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาที่สามารถชักนำให้ปลาสลบในระยะที่ 3 ภายใน 10 นาที และฟื้นภายใน 10 นาที และไม่ส่งผลให้ปลาตาย โดยทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 100 - 1,000 ไมโครลิตรต่อลิตร พบว่า ช่วงของความเข้มข้นน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาที่เป็นไปตามเกณฑ์ดังกล่าว คือ 300 – 600 ไมโครลิตรต่อลิตร

ผลการทดสอบเพื่อประเมินเวลาชักนำการสลบของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาที่ระดับความเข้มข้น 300, 400, 500 และ 600 ไมโครลิตรต่อลิตร พบว่า ความเข้มข้นของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาต่ำที่สุดที่มีประสิทธิภาพในการชักนำการสลบระยะที่ 3 ภายในเวลา 5 นาที คือ 400 ไมโครลิตรต่อลิตร ใช้เวลาชักนำการสลบ  $4.94 \pm 0.38$  นาที และความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่ทำให้ปลาตาย คือ 600 ไมโครลิตรต่อลิตร ใช้เวลาชักนำการสลบ  $3.51 \pm 0.63$  นาที (ภาพประกอบ 11)

ผลการทดสอบเพื่อประเมินเวลาชักนำการสลบของอิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาล์มพา ระดับความเข้มข้น 7.5 10 12.5 และ 15 มิลลิลิตรต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่คำนวณจากความเข้มข้นของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาที่ใช้ในการทดลอง (ตาราง 6) พบว่า ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของอิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาต่ำที่สุดที่มีประสิทธิภาพในการชักนำการสลบระยะที่ 3 ภายใน 5 นาที คือ 10 มิลลิลิตรต่อลิตร ใช้เวลาชักนำการสลบ  $4.72 \pm 0.46$  นาที และความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่ไม่ทำให้ปลาตายคือ 12.5 มิลลิลิตรต่อลิตร ใช้เวลาชักนำการสลบ  $4.60 \pm 0.42$  นาที (ภาพประกอบ 11) ในขณะที่อิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิลิตรต่อลิตร ส่งผลให้ปลาตายระหว่างการทดสอบ

สำหรับ 2-PE ความเข้มข้น 500 ไมโครลิตรต่อลิตร ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก ใช้เวลาชักนำการสลบ  $5.46 \pm 0.57$  นาที และเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 5,400 ไมโครลิตรต่อลิตร ซึ่งเป็นชุดควบคุมผลลบไม่สามารถชักนำให้ปลาสลบถึงระยะที่ 3 ได้ เวลาชักนำการสลบของสารทดสอบแต่ละชนิดแสดงดังภาพประกอบ 11

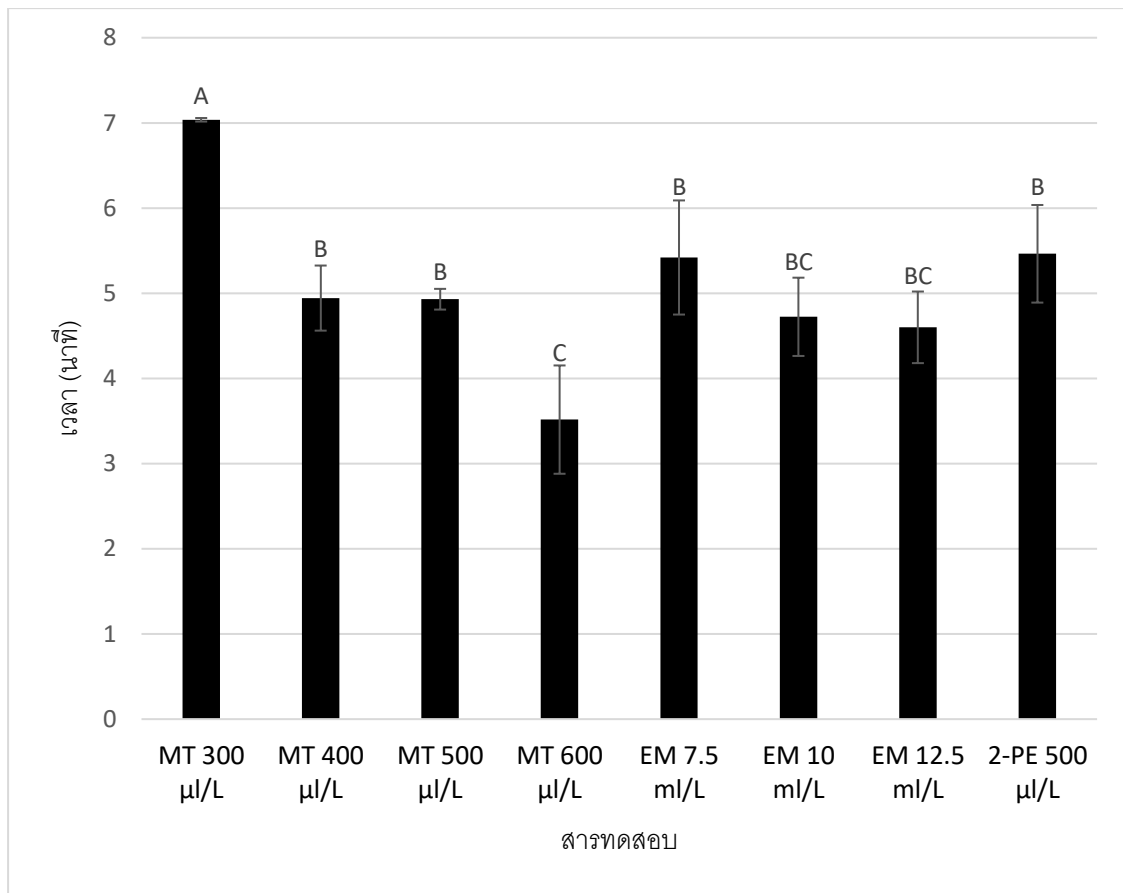


ตาราง 6 ปริมาณน้ำมันโกฐจุฬาลัมพาในอิมัลชันน้ำมันโกฐจุฬาลัมพา

ปริมาณอิมัลชันน้ำมันโกฐจุฬาลัมพา (ml)	ปริมาณน้ำมันโกฐจุฬาลัมพา ( $\mu$ l)
7.5	300
10	400
12.5	500
15	600

#### การประเมินเวลาฟื้นกลับ (recovery time)

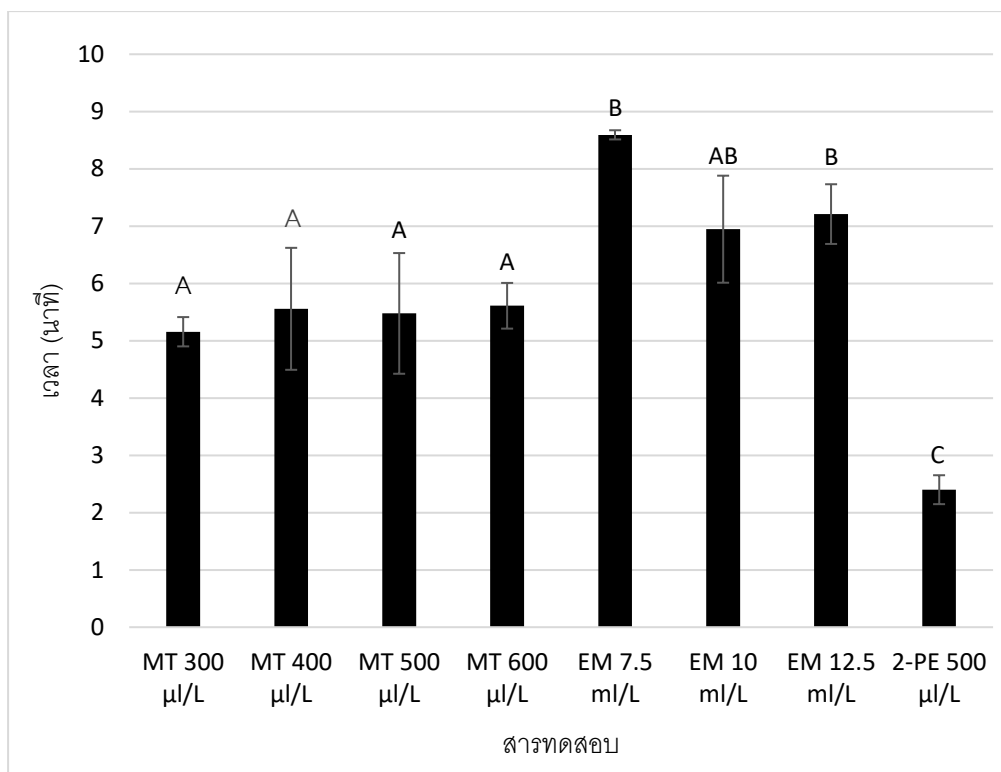
ผลการทดสอบเพื่อประเมินเวลาฟื้นกลับของปลาที่ได้รับน้ำมันโกฐจุฬาลัมพาที่ระดับความเข้มข้น 300 400 500 และ 600 ไมโครลิตรต่อลิตร พบว่า ปลาที่ได้รับน้ำมันโกฐจุฬาลัมพาทุกระดับความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบฟื้นกลับสมบูรณ์ในเวลา 10 นาที เช่นเดียวกับปลาที่ได้รับอิมัลชันน้ำมันโกฐจุฬาลัมพาที่ระดับความเข้มข้น 7.5 10 และ 12.5 มิลลิลิตรต่อลิตร และ 2-PE ความเข้มข้น 500 ไมโครลิตรต่อลิตร (ภาพประกอบ 12) โดยปลาที่ได้รับน้ำมันโกฐจุฬาลัมพาความเข้มข้น 400 ไมโครลิตรต่อลิตร ใช้เวลาฟื้นกลับ  $5.56 \pm 0.26$  นาที และปลาที่ได้รับน้ำมันโกฐจุฬาลัมพาความเข้มข้น 600 ไมโครลิตรต่อลิตร ใช้เวลา  $5.61 \pm 0.40$  นาที ขณะที่ปลาที่ได้รับอิมัลชันน้ำมันโกฐจุฬาลัมพาความเข้มข้น 10 มิลลิลิตรต่อลิตร ใช้เวลาฟื้นกลับ  $6.95 \pm 0.93$  นาที และปลาที่ได้รับอิมัลชันความเข้มข้นที่ 12.5 มิลลิลิตรต่อลิตร ใช้เวลาฟื้นกลับ  $7.21 \pm 0.52$  นาที และปลาที่ได้รับ 2-PE ความเข้มข้น 500 ไมโครลิตรต่อลิตร ใช้เวลาฟื้นกลับ  $2.40 \pm 0.25$  นาที



อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กในกราฟแท่งที่แตกต่างกัน แสดงเวลาชักนำการสลับที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

ภาพประกอบ 11 เวลาชักนำการสลับของสารทดสอบแต่ละชนิด

โดย MT = น้ำมันโกลูจุฟาลัมพา  
EM = อิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาลัมพา



อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กในกราฟแท่งที่แตกต่างกัน แสดงเวลาพื้นสลับที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

ภาพประกอบ 12 เวลาพื้นสลับของสารทดสอบแต่ละชนิด

โดย MT = น้ำมันโกฐจุฬาลัมพา  
EM = อิมัลชันน้ำมันโกฐจุฬาลัมพา

#### ผลการชักนำการสลับระหว่างจำลองการทำศัลยกรรม

ผลการทดสอบเพื่อประเมินประสิทธิภาพของน้ำมันโกฐจุฬาลัมพาและอิมัลชันน้ำมันโกฐจุฬาลัมพาในขั้นตอนการจำลองการศัลยกรรมเป็นเวลา 10 นาที พบว่าน้ำมันโกฐจุฬาลัมพาทุกระดับความเข้มข้นและอิมัลชันน้ำมันโกฐจุฬาลัมพาที่ระดับความเข้มข้น 7.5 10 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร สามารถชักนำให้ปลาสลับตลอดระยะเวลาจำลองการทำศัลยกรรม ขณะที่ 2-PE เข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร สามารถชักนำให้ปลาสลับในขั้นตอนการจำลองการศัลยกรรมได้เพียง  $4.89 \pm 3.03$  นาที

### อัตราการตายหลังการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลการสังเกตอัตราการตายของปลาหลังการทดลองเป็น 24 ชั่วโมง พบว่าน้ำมัน  
โกฐจุฬาลัมพาทุกระดับความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบและอิมัลชันน้ำมันโกฐจุฬาลัมพาที่ระดับ  
ความเข้มข้น 7.5 10 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่ส่งผลให้ปลาตายหลังจากการทดลอง ในขณะที่  
ที่ 2-PE ที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อลิตร ส่งผลให้ปลาตายหลังการทดลองร้อยละ 11.1

### ผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำ

ผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำ ได้แก่ อุณหภูมิ (ตาราง 7) ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย  
น้ำ (ตาราง 8) และค่า pH (ตาราง 9) ก่อนเติมยาสลบ หลังเติมยาสลบ และหลังการทดลองของ  
น้ำเมื่อผสมน้ำมันโกฐจุฬาลัมพาที่ทำละลายด้วยเอทานอลและเมื่อผสมอิมัลชันน้ำมัน  
โกฐจุฬาลัมพา พบว่า เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ คุณภาพน้ำก่อนเติมยาสลบ หลังเติมยาสลบ  
และหลังการทดลองของแต่ละชุดการทดลองไม่แตกต่างกัน

ตาราง 7 อุณหภูมิในน้ำในแต่ละชุดการทดลอง

สารทดสอบ	ความเข้มข้น	อุณหภูมิ (C°)		
		ก่อนการทดลอง	หลังเติมสาร	หลังการทดลอง
น้ำมันโกฐจุฬาลัมพา	300 µl/L	26.43 ± 0.78	25.57 ± 0.99	25.57 ± 0.99
น้ำมันโกฐจุฬาลัมพา	400 µl/L	26.30 ± 0.69	25.85 ± 0.58	25.75 ± 0.48
น้ำมันโกฐจุฬาลัมพา	500 µl/L	24.32 ± 0.80	24.13 ± 1.22	23.20 ± 1.06
น้ำมันโกฐจุฬาลัมพา	600 µl/L	24.33 ± 0.80	23.32 ± 0.47	23.20 ± 1.06
อิมัลชัน	7.5 ml/L	25.00 ± 1.01	24.85 ± 1.02	24.82 ± 9.44
อิมัลชัน	10 ml/L	24.67 ± 0.81	24.27 ± 0.45	23.98 ± 0.60
อิมัลชัน	12.5 ml/L	24.37 ± 0.66	24.28 ± 0.43	24.05 ± 0.53

ตาราง 8 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำในแต่ละชุดการทดลอง

สารทดสอบ	ความเข้มข้น	ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (mg/L)		
		ก่อนการทดลอง	หลังเติมสาร	หลังการทดลอง
น้ำมันโกฐจุฬาลัมพา	300 µl/L	6.20 ± 0.33	6.43 ± 0.45	6.48 ± 0.20
น้ำมันโกฐจุฬาลัมพา	400 µl/L	6.27 ± 0.31	6.57 ± 0.33	6.60 ± 0.27
น้ำมันโกฐจุฬาลัมพา	500 µl/L	6.80 ± 0.32	7.08 ± 0.48	6.95 ± 0.42
น้ำมันโกฐจุฬาลัมพา	600 µl/L	6.82 ± 0.33	7.20 ± 0.41	6.92 ± 0.33
อิมัลชัน	7.5 ml/L	6.58 ± 0.60	6.32 ± 0.57	6.77 ± 0.53

ตาราง 8 (ต่อ)

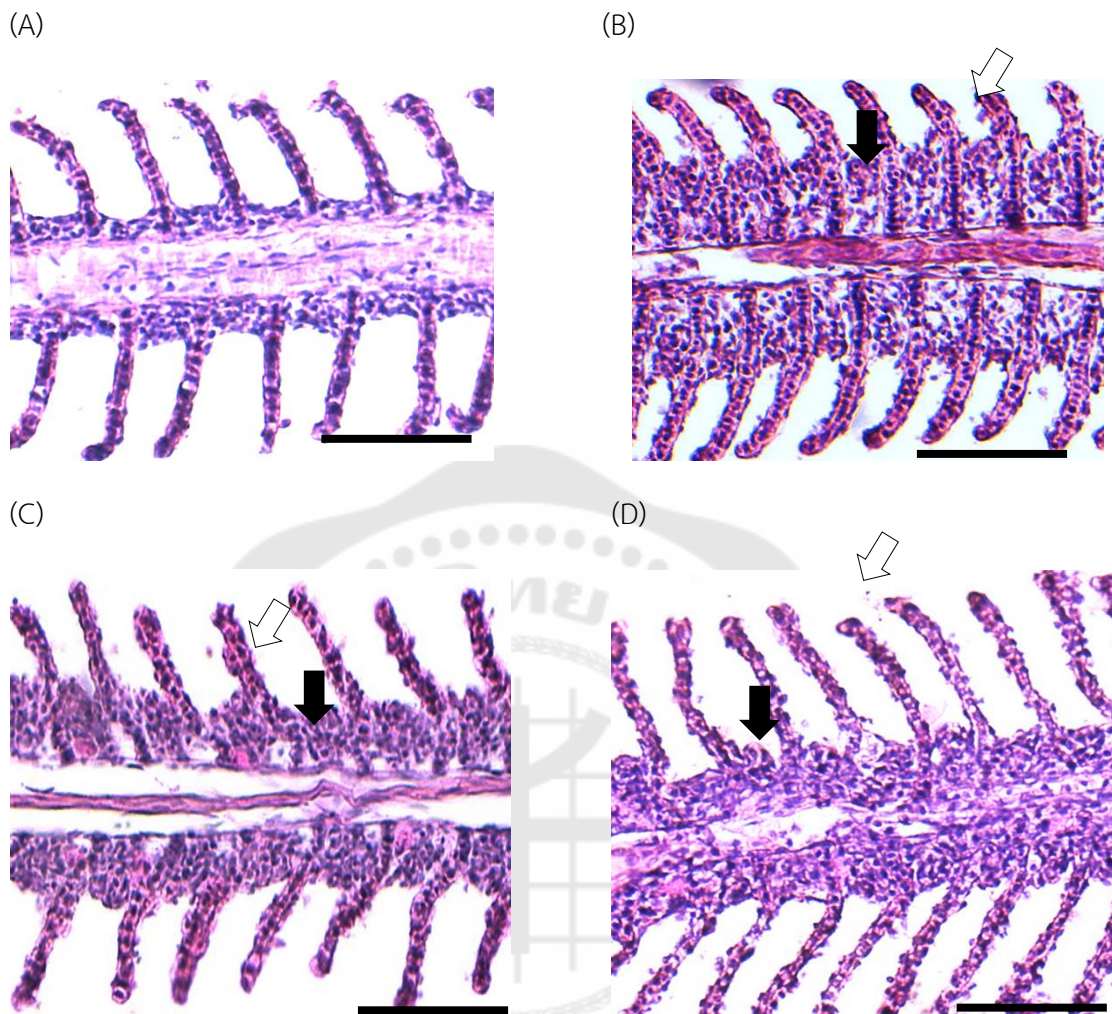
สารทดสอบ	ความเข้มข้น	ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (mg/L)		
		ก่อนการทดลอง	หลังเติมสาร	หลังการทดลอง
อิมัลชัน	10 ml/L	6.58 ± 0.54	6.88 ± 0.68	6.85 ± 0.54
อิมัลชัน	12.5 ml/L	6.9 ± 0.47	6.97 ± 0.68	7.05 ± 0.68

ตาราง 9 ค่า pH ในแต่ละชุดการทดลอง

สารทดสอบ	ความเข้มข้น	ค่า pH		
		ก่อนการทดลอง	หลังเติมสาร	หลังการทดลอง
น้ำมันโกลูจุฟาล์มพา	300 µl/L	7.55 ± 0.15	7.70 ± 0.20	7.76 ± 0.25
น้ำมันโกลูจุฟาล์มพา	400 µl/L	7.92 ± 0.13	8.0 ± 0.11	8.03 ± 0.12
น้ำมันโกลูจุฟาล์มพา	500 µl/L	8.28 ± 0.15	8.42 ± 0.12	8.31 ± 0.10
น้ำมันโกลูจุฟาล์มพา	600 µl/L	8.35 ± 0.14	8.43 ± 0.14	8.40 ± 0.14
อิมัลชัน	7.5 ml/L	8.38 ± 0.25	8.28 ± 0.21	8.28 ± 0.20
อิมัลชัน	10 ml/L	8.17 ± 0.45	8.05 ± 0.28	8.17 ± 0.45
อิมัลชัน	12.5 ml/L	8.17 ± 0.19	8.00 ± 0.21	8.30 ± 0.23

**ผลของการเกิดพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาแฟนซีคาร์ปหลังได้รับ  
น้ำมันโกลูจุฟาล์มพาที่ทำละลายด้วยกับเอทานอลและอิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาล์มพา  
การเกิดพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือก**

ผลการตรวจสอบการเกิดพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกของปลาแฟนซีคาร์ปหลังจากได้รับน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาความเข้มข้น 400 ไมโครลิตรต่อลิตร ที่ทำละลายด้วยเอทานอล อิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิลิตรต่อลิตร และ 2-PE ที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครลิตรต่อลิตร พบว่า เหงือกของปลาที่ได้รับสารทดสอบทั้งสามชนิดมีการเพิ่มจำนวนชั้นของเยื่อบุผิว (Lamella epithelial hyperplasia) และการบวมของ gill lamellae ดังภาพประกอบ 13



สัญลักษณ์ลูกศรสีดำแสดงการเพิ่มจำนวนชั้นของเยื่อบุผิวและสัญลักษณ์ลูกศรสีขาวแสดงการบวมของ gill lamellae โดย scale bar = 100  $\mu\text{m}$

ภาพประกอบ 13 พยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกของปลาแฟนซีคาร์ป

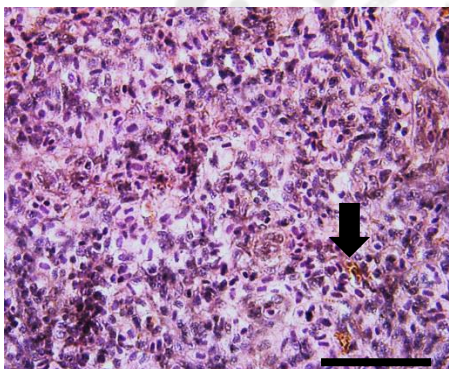
- |         |   |  |
|---------|---|--|
| โดย (A) | = | กลุ่มควบคุม  |
| (B)     | = | กลุ่มที่ได้รับน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาที่ทำละลายด้วยเอทานอล |
| (C)     | = | กลุ่มที่ได้รับอิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาล์มพา              |
| (D)     | = | กลุ่มที่ได้รับ 2-PE                                    |



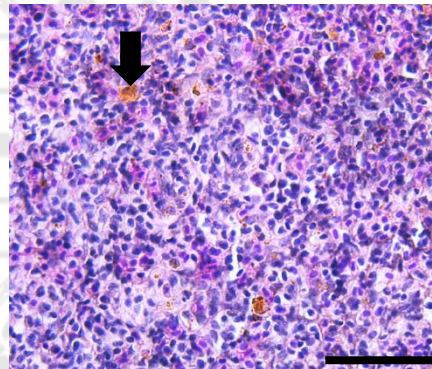
### การเกิดพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับ

ผลการตรวจสอบการเกิดพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับของปลาแฟนซีคาร์ปหลังจากได้รับน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาเข้มข้น 400 ไมโครลิตรต่อลิตร ที่ทำละลายด้วยกับเอทานอลที่ อิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิลิตรต่อลิตร และ 2-PE ที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครลิตรต่อลิตร พบว่า เนื้อเยื่อตับของปลาในแต่ละกลุ่มมีจำนวนเซลล์ที่มีการสะสมไขมันแตกต่างกัน โดยปลาที่ได้รับอิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาล์มพามีปริมาณเซลล์ตับที่มีการสะสมของ ceroid pigment ซึ่งเป็นรงควัตถุสีเหลืองมากกว่าปลาในกลุ่มอื่น ๆ ในขณะที่ลักษณะของเซลล์ตับปลาแฟนซีคาร์ปที่ได้รับสารทดสอบทั้งสามชนิดไม่แตกต่างกับชุดควบคุม โดยเซลล์ตับ (hepatocyte) มีรูปร่างค่อนข้างกลมและมีนิวเคลียสที่กึ่งกลางเซลล์ดังภาพประกอบ 14

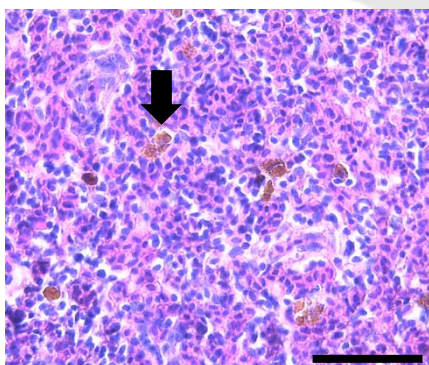
(A)



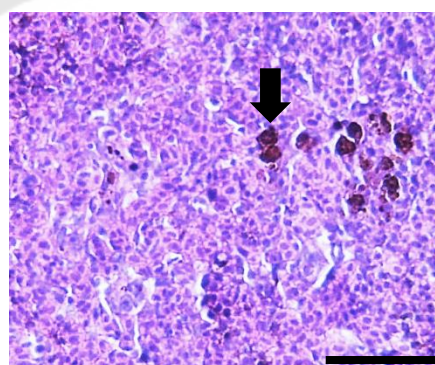
(B)



(C)



(D)



สัญลักษณ์ลูกศรสีดำแสดงเซลล์ตับที่มีการสะสม ceroid pigment โดย scale bar = 50 µm

ภาพประกอบ 14 พยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับของปลาแฟนซีคาร์ป

- โดย (A) = กลุ่มควบคุม  
(B) = กลุ่มที่ได้รับน้ำมันโกลูจุฟาลัมพาที่ทำละลายด้วย  
เอทานอล  
(C) = กลุ่มที่ได้รับอิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาลัมพา  
(D) = กลุ่มที่ได้รับ 2-PE





## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การประเมินประสิทธิภาพของน้ำมันโสมกู่ฟ้าลัมพาและอิมัลชันน้ำมันโสมกู่ฟ้าลัมพาเพื่อใช้เป็นยาสลบสำหรับการทำศัลยกรรมปลาแฟนซีคาร์ป สามารถสรุปผลการดำเนินงานวิจัยได้ดังหัวข้อต่อไปนี้

1. สรุปผลการวิจัย
2. อภิปรายผลการวิจัย
3. ข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

1. น้ำมันโสมกู่ฟ้าลัมพาประกอบด้วยสารออกฤทธิ์สำคัญซึ่งส่งผลชักนำการสลบปลา คือ  $\beta$ -Pinene ร้อยละ 11.70 1,8-cineole ร้อยละ 10.34 และ  $\alpha$ -pinene 8.29 ตามลำดับ

2. ทั้งน้ำมันโสมกู่ฟ้าลัมพาและอิมัลชันน้ำมันโสมกู่ฟ้าลัมพาสามารถใช้เป็นยาสลบสำหรับการทำศัลยกรรมปลาแฟนซีคาร์ปที่มีประสิทธิภาพดี โดยความเข้มข้นของน้ำมันโสมกู่ฟ้าลัมพาและอิมัลชันน้ำมันโสมกู่ฟ้าลัมพาที่เหมาะสม คือ 400 ไมโครลิตรต่อลิตร และ 10 มิลลิลิตรต่อลิตรตามลำดับ เนื่องจากเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่มีประสิทธิภาพดี โดยสารทั้ง 2 ชนิดที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวใช้เวลาชักนำการสลบไม่แตกต่างกัน ( $p > 0.05$ ) สามารถชักนำให้ปลาสลบตลอดระยะเวลาการจำลองการผ่าตัด และไม่พบการตายของปลาแฟนซีคาร์ปหลังจากเสร็จสิ้นการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำ ได้แก่ อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ และค่า pH ทั้งหลังเติมสารและหลังการทดลอง

3. น้ำมันโสมกู่ฟ้าลัมพาและอิมัลชันน้ำมันโสมกู่ฟ้าลัมพามีประสิทธิภาพในการใช้เป็นยาสลบสำหรับปลาแฟนซีคาร์ปที่มีประสิทธิภาพดีกว่า 2-PE เนื่องจาก 2-PE ความเข้มข้น 500 ไมโครลิตรต่อลิตร ไม่สามารถชักนำให้ปลาสลบตลอดระยะเวลาการจำลองการผ่าตัดและส่งผลให้ปลาร้อยละ 11.1 ตายหลังจากเสร็จสิ้นการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. ทั้งน้ำมันโสมกู่ฟ้าลัมพาที่ทำละลายด้วยเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 400 ไมโครลิตรต่อลิตร และอิมัลชันน้ำมันโสมกู่ฟ้าลัมพาที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิลิตรต่อลิตร ก่อให้เกิดพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือก คือ การเพิ่มจำนวนชั้นของเยื่อบุผิวและการบวมของ gill lamellae แต่ไม่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับของปลาแฟนซีคาร์ป

## อภิปรายผลการวิจัย

จากการตรวจสอบสารองค์ประกอบของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพา พบว่า สารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ  $\beta$ -pinene 1,8-cineole และ  $\alpha$ -pinene ซึ่ง 1,8-cineole และ  $\alpha$ -pinene เป็นสารออกฤทธิ์ที่พบในน้ำมันหอมระเหยที่มีการรายงานว่าสามารถใช้เป็นยาสลับปลาที่มีประสิทธิภาพดีหลายชนิด 1,8-cineole พบเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในน้ำมัน *Lippia alba* น้ำมันไพล และน้ำมันข่า (Cunha et al., 2010; Khumpirapang, Chaichit, et al., 2018; Limhang et al., 2017) ในขณะที่  $\alpha$ -pinene พบเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในน้ำมัน Canela-preta (Tondolo et al., 2013) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าในน้ำมันยูคาลิปตัสซึ่งเป็นยาสลับที่มีประสิทธิภาพดีสำหรับการทำสลับปลากระพง (*Dicentrarchus labrax*) และปลา meagre (*Argyrosomus regius*) พบทั้ง 1,8-cineole และ  $\alpha$ -pinene เป็นองค์ประกอบ (Bodur et al., 2018) ขณะที่  $\beta$ -pinene เป็นสารออกฤทธิ์ชักนำการสลับที่พบในน้ำมัน Canela-preta (Tondolo et al., 2013) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าสารในกลุ่ม pinene ซึ่งรวมถึง  $\alpha$ -pinene และ  $\beta$ -pinene เป็นสารที่มีฤทธิ์ชักนำการสลับ (Kasanen et al., 1998)

เมื่อพิจารณาลักษณะทางกายภาพของอิมัลชันพบว่า มีลักษณะใสและไม่มีการแยกชั้น และเมื่อตรวจสอบขนาดอนุภาคของอิมัลชันพบว่าจัดเป็นนาโนอิมัลชัน นาโนอิมัลชันเป็นระบบนำส่งยาแบบหนึ่งที่น่าใช้กับยาที่มีองค์ประกอบเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ เช่น น้ำมัน (Ostróžka-Ciešlik & Sarecka-Hujar, 2017) ขนาดอนุภาคของอิมัลชันถือเป็นตัวบ่งชี้ (indicator) หนึ่งที่บ่งบอกถึงความเสถียรของอิมัลชันได้ โดยนาโนอิมัลชันซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคไม่เกิน 500 นาโนเมตร มีความเสถียรสูง เนื่องจากอนุภาคที่มีขนาดเล็กจึงมีการเคลื่อนที่แบบบราวเนียน (Brownian motion) ที่สามารถชนะแรงโน้มถ่วงได้ ส่งผลให้การแยกชั้น การตกตะกอน และการรวมตัวซึ่งเกิดจากแรงโน้มถ่วงเกิดขึ้นได้ยาก เช่น นาโนอิมัลชันของน้ำมันรำข้าวและนาโนอิมัลชันของ D-limonene สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานถึง 90 วัน โดยไม่เกิดการแยกชั้น (Bernardi et al., 2011; Zhang et al., 2014) นอกจากนี้ นาโนอิมัลชันยังเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของยา (drug solubility) เนื่องจากองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิว (surfactant) และสารลดแรงตึงผิวร่วม (cosurfactant) ความสามารถในการละลายน้ำที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ยาสามารถเข้าสู่กระแสเลือดได้ดีขึ้น ส่งผลให้ชีวปริมาณการออกฤทธิ์ (bioavailability) ของยาเพิ่มขึ้นเช่นกัน (Kotta et al., 2012; Ostróžka-Ciešlik & Sarecka-Hujar, 2017) ดังนั้นการแปรรูปน้ำมันโกลูจุฟาล์มพาให้อยู่ในรูปแบบนาโนอิมัลชันจึงช่วยเพิ่ม

ความสามารถในการละลายน้ำ เพิ่มความเสถียร และเพิ่มชีวปริมาณการออกฤทธิ์ของน้ำมัน  
โสมสุญญาดำได้

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการชักนำการสลบของน้ำมันโสมสุญญาดำ พบว่า น้ำมัน  
โสมสุญญาดำเข้มข้น 300 ไมโครลิตรต่อลิตร ใช้เวลาชักนำการสลบปลาแพนซีคาร์ปมากกว่าที่  
ระดับความเข้มข้น 400, 500 และ 600 ไมโครลิตรต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )  
และน้ำมันโสมสุญญาดำเข้มข้น 600 ไมโครลิตรต่อลิตรใช้เวลาชักนำการสลบน้อยที่สุดอย่างมี  
นัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของน้ำมัน  
โสมสุญญาดำส่งผลให้เวลาชักนำการสลบลดลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kizak et al. (2018)  
ซึ่งทำการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันโรสฮูดในการใช้เป็นยาสลบสำหรับปลาทอง (*Carassius*  
*auratus*) และได้รายงานว่ เวลาชักนำการสลบปลาทองมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของน้ำมัน  
หอมระเหย โดยความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้เวลาชักนำการสลบลดลง  
อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาเวลาที่สิ้นสุดของปลาแพนซีคาร์ปที่ได้รับน้ำมันโสมสุญญาดำแต่ละ  
ระดับความเข้มข้นพบว่าไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Cunha et al. (2010)  
ซึ่งได้รายงานว่ ปลาตุ๊กเงิน (*Rhamdia quelen*) ที่ได้รับน้ำมัน *Lippia alba* ที่ระดับความเข้มข้น  
300 400 และ 500 ไมโครลิตรต่อลิตร ใช้เวลาฟื้นฟูสลบไม่แตกต่างกัน

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการชักนำการสลบของอิมัลชันน้ำมันโสมสุญญาดำพบว่า  
อิมัลชันน้ำมันโสมสุญญาดำที่ระดับความเข้มข้น 7.5 มิลลิลิตรต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่  
เทียบเท่ากับน้ำมันโสมสุญญาดำความเข้มข้น 300 ไมโครลิตรต่อลิตร ใช้เวลาชักนำการสลบเร็ว  
กว่าน้ำมันโสมสุญญาดำความเข้มข้น 300 ไมโครลิตรต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p <$   
 $0.05$ ) และไม่แตกต่างกับน้ำมันโสมสุญญาดำที่ระดับความเข้มข้น 400 และ 500 ไมโครลิตรต่อ  
ลิตร นอกจากนี้อิมัลชันน้ำมันโสมสุญญาดำที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 12.5 ไมโครลิตรต่อลิตร  
ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำมันโสมสุญญาดำเทียบเท่ากับ 400 และ 500 ไมโครลิตรต่อลิตร ใช้เวลา  
ชักนำการสลบไม่แตกต่างกับน้ำมันโสมสุญญาดำเข้มข้น 600 ไมโครลิตรต่อลิตร และพบการตาย  
ของปลาแพนซีคาร์ปที่ได้รับอิมัลชันน้ำมันโสมสุญญาดำที่ระดับความเข้มข้น 15 ไมโครลิตรต่อ  
ลิตร แสดงให้เห็นว่ ปลาได้รับยาเกินขนาด (overdose) ดังนั้นอิมัลชันน้ำมันโสมสุญญาดำจึงมี  
ประสิทธิภาพชักนำการสลบสูงกว่าการใช้น้ำมันโสมสุญญาดำที่ละลายด้วยกับเอทานอล  
ประสิทธิภาพที่เพิ่มขึ้นเป็นผลจากความสามารถละลายน้ำได้ดีและขนาดอนุภาคที่เล็กของอิมัลชัน  
น้ำมันโสมสุญญาดำซึ่งมีขนาดอนุภาคในระดับนาโนอิมัลชัน ด้วยเหตุนี้เหงือกและผิวของปลาจึง  
สามารถดูดซึมอนุภาคของอิมัลชันได้เร็วกว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยที่ละลายด้วยเอทานอล

ส่งผลให้ประสิทธิภาพการนำส่งและการออกฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์สำคัญเพิ่มมากขึ้น (Kheawfu et al., 2017; Ostróžka-Cieślak & Sarecka-Hujar, 2017) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับรายงานการใช้ อิมัลชันน้ำมันกานพลูในการทำสลับปลาทองและอิมัลชันน้ำมันข่าในการทำสลับปลาแพนซีคาร์ป พบว่าอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดใช้เวลาชักนำการสลบน้อยกว่าน้ำมันหอมระเหยที่ ทำละลายด้วยเอทานอล (Kheawfu et al., 2017; Khumpirapang et al., 2017)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำมันโสรูจุฟาลัมพาและอิมัลชันน้ำมันโสรูจุฟาลัมพา กับ 2-PE เข้มข้น 500 ไมโครลิตรต่อลิตร พบว่าทั้งอิมัลชันที่ระดับความเข้มข้น 400 ไมโครลิตรต่อ ลิตรและอิมัลชันที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิลิตรต่อลิตร ใช้เวลาชักนำการสลบไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาตามเกณฑ์ที่กำหนด พบว่า 2-PE เข้มข้น 500 ไมโครลิตรต่อลิตร ไม่สามารถชักนำให้ปลาสลบได้ภายใน 5 นาที ขณะที่น้ำมันโสรูจุฟาลัมพาและอิมัลชันน้ำมัน โสรูจุฟาลัมพาที่ระดับความเข้มข้นข้างต้นสามารถชักนำให้ปลาสลบได้ในเวลา 5 นาที และยังพบ การตายของปลาแพนซีคาร์ปร้อยละ 11.1 หลังได้รับ 2-PE อีกด้วย นอกจากนี้เมื่อพิจารณา การสลบของปลาแพนซีคาร์ปในขั้นตอนการจำลองการผ่าตัด พบว่าปลาที่ได้รับ 2-PE ที่ระดับ ความเข้มข้น 500 ไมโครลิตรต่อลิตร ไม่สามารถสลบตลอดระยะเวลาการทดสอบได้ เนื่องจากปลา ที่ได้รับ 2-PE รู้สึกตัวในระหว่างขั้นตอนการจำลองการผ่าตัด จึงส่งผลให้เวลาที่ปลาสลบของปลาที่ ได้รับ 2-PE น้อยกว่าปลาที่ได้รับสารทดสอบอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) จากผล การทดลองข้างต้นจึงสรุปได้ว่าทั้งน้ำมันโสรูจุฟาลัมพาและอิมัลชันน้ำมันโสรูจุฟาลัมพาเป็น ยาสลบสำหรับการทำศัลยกรรมปลาแพนซีคาร์ปที่มีประสิทธิภาพดีกว่า 2-PE ที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครลิตรต่อลิตร

เมื่อพิจารณาคุณภาพน้ำก่อนการทดสอบ หลังเติมสารทดสอบ และหลังการทดลอง แสดงให้เห็นว่าทั้งน้ำมันโสรูจุฟาลัมพาที่ทำละลายด้วยเอทานอลและอิมัลชันน้ำมันโสรูจุฟาลัมพา ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำ นอกจากนี้คุณภาพน้ำในทุกชุดการทดลองอยู่ใน ระดับที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลาน้ำจืด ได้แก่ มีอุณหภูมิ 20-35 องศาเซลเซียส ค่า pH ระหว่าง 6.5 ถึง 9 และมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำไม่ต่ำกว่า 5 มก./ล. (นฤมล, 2550)

สำหรับการเกิดพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาแพนซีคาร์ปที่ได้รับน้ำมัน โสรูจุฟาลัมพาที่ทำละลายด้วยเอทานอล อิมัลชันน้ำมันโสรูจุฟาลัมพา และ 2-PE พบว่า สารทดสอบทั้งสามชนิดส่งผลให้เนื้อเยื่อเหงือกเกิดการเพิ่มจำนวนชั้นของเยื่อบุผิวและมีการบวม ของ gill lamellae การเกิดพยาธิสภาพดังกล่าวจัดเป็นกลไกการป้องกันตัวของปลาเมื่ออยู่ในน้ำที่ มีการปนเปื้อนของสารเคมี เนื่องจากเหงือกเป็นอวัยวะที่มีบทบาทสำคัญในการหายใจและ

แลกเปลี่ยนสาร และมีการสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอกโดยตรง ดังนั้นจำนวนชั้นของเยื่อผิวหนังของเหงือกที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้พื้นที่ผิวของเหงือกลดลงและช่วยเพิ่มระยะห่างระหว่างสิ่งแวดล้อมภายนอกกับหลอดเลือด ทำให้ปลาได้รับสารที่ปนเปื้อนในน้ำน้อยลง ในขณะที่การบวมของ gill lamellae เกิดจากการอักเสบของเลือดที่เพิ่มมากขึ้นเพื่อให้ร่างกายสามารถกำจัดสารที่เข้าสู่ร่างกายได้เร็วขึ้น (Camargo & Martinez, 2007) เมื่อพิจารณาการเกิดพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับของปลาที่ได้รับสารทดสอบทั้งสามชนิด พบว่า เนื้อเยื่อตับของปลาที่ได้รับอิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาล์มพามีปริมาณเซลล์ตับที่ ceroid pigment มากกว่ากลุ่มอื่น อย่างไรก็ตามปริมาณของ ceroid pigment ที่เพิ่มขึ้นเกิดจากการได้รับอาหารน้อยกว่าปกติหรืออดอาหาร (Sales et al., 2017) และไม่พบพยาธิสภาพอื่น ๆ ของเซลล์ตับ ผลการวิจัยข้างต้นสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Velišek et al. (2005) ซึ่งได้รายงานไว้ว่า ปลาไน (*Cyprinus carpio*) ที่ได้รับน้ำกานพลูมีการบวมของหลอดเลือดฝอยในเหงือก และไม่พบการบวมหลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ น้ำมันกานพลูยังไม่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับ ผลการวิจัยของ Velisek et al. (2007) พบว่า 2-PE ซึ่งก่อให้เกิดการบวมของหลอดเลือดฝอยในเหงือกของปลาเวลส์ (*Silurus glanis*) แต่ไม่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับเช่นกัน จึงสรุปได้ว่าทั้ง 2-PE ซึ่งเป็นยาสลบประเภทสารเคมีสังเคราะห์และน้ำมันหอมระเหยสามารถก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกปลาได้

### ข้อเสนอแนะ

1. งานวิจัยนี้ทำการตรวจสอบผลกระทบของน้ำมันโกลูจุฟาล์มพและอิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาล์มพ 2 ด้าน ได้แก่ อัตราการตายและการเกิดพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับเท่านั้น ดังนั้น ในงานวิจัยต่อไปควรทำการทดลองเพื่อศึกษาผลกระทบเพิ่มเติมของยาสลบ เช่น การเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมีของเลือดปลา

2. งานวิจัยนี้ได้ทำการผลิตอิมัลชันโดยใช้วิธีการและอัตราส่วนของสารที่อ้างอิงจากงานวิจัยอื่น ดังนั้น ในงานวิจัยต่อไปจึงควรทำการทดลองโดยใช้วิธีการอื่นหรือการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของสารองค์ประกอบของอิมัลชันเพื่อให้ได้อิมัลชันน้ำมันโกลูจุฟาล์มพที่มีขนาดอนุภาคเล็กและมีความเสถียรมากที่สุด



## 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.
- Akbari, S., & Nour, A. H. (2018). Emulsion types, stability mechanisms and rheology: A review. *International Journal of Innovative Research and Scientific Studies (IJIRSS)*, 1(1), 14-21.
- Al-Yaqout, A., Al-Ablani, S., & Lone, K. P. (2012). COMPARATIVE ANESTHETIC EFFICACY OF CLOVE OIL, MS-222 AND QUINALDINE FOR A NEW AQUACULTURE CANDIDATE, SILVERY POMFRET *PAMPUS ARGENTEUS*. *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 27(1-4), 73-87.
- Alizadeh, M., Aghaei, M., Sharifian, I., & Saadatian, M. (2012). Chemical composition of essential oil of *Artemisia vulgaris* from West Azerbaijan, Iran. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 11(5), 493-496.
- Amornsit, M. (2010). *Principle and Techniques of Instrumental Analysis PART II Chromatography and others*. Bangkok: Chuan-pim 50.
- Anwar, F., Ahmad, N., & Alkharfy, K. M. (2016). Mugwort (*Artemisia vulgaris*) oils *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (pp. 573-579): Elsevier.
- Aoshima, H., & Hamamoto, K. (1999). Potentiation of GABAA receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfume and phytoncid. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 63(4), 743-748.
- Aziz, Z. A., Ahmad, A., Setapar, S. H. M., Karakucuk, A., Azim, M. M., Lokhat, D., . . . Ashraf, G. M. (2018). Essential oils: Extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential-A review. *Current drug metabolism*, 19(13), 1100-1110.
- Bernardi, D. S., Pereira, T. A., Maciel, N. R., Bortoloto, J., Viera, G. S., Oliveira, G. C., & Rocha-Filho, P. A. (2011). Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. *Journal of*

*nanobiotechnology*, 9(1), 44.

- Bhanu, S. V., & Philip, B. (2011). Effect of Ethanol on Branchial Adenosine Triphosphatases in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Toxicology international*, 18(1), 27-30.  
doi:10.4103/0971-6580.75849
- 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.
- Bressler, K., & Ron, B. (2004). Effect of anesthetics on stress and the innate immune system of gilthead seabream (*Sparus surata*).
- Bruecker, P., & Graham, M. (1993). The effects of the anesthetic ketamine hydrochloride on oxygen consumption rates and behaviour in the fish *Heros (Cichlasoma) citrinellum* (Günther, 1864). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 104(1), 57-59.
- Bushnell, P. G., & Jones, D. R. (1994). Cardiovascular and respiratory physiology of tuna: adaptations for support of exceptionally high metabolic rates. *Environmental biology of fishes*, 40(3), 303-318.
- Camargo, M. M., & Martinez, C. B. (2007). Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, 5(3), 327-336.
- Christy, G. P., Arimurni, D. A., Wahyudi, M. D. P., Martien, R., & Tunjung, W. A. S. (2017). Formulation and Characterization of Kaffir Lime Oil Nanoemulsion. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 14(3), 915-922.
- Coyle, S. D., Durborow, R. M., & Tidwell, J. H. (2004). *Anesthetics in aquaculture*: Southern Regional Aquaculture Center Texas.
- Cunha, M. A., Barros, F. M. C., Oliveira Garcia, L., 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.
- El-Sahhar, K., Nassar, R., & Farag, H. (2011). Morphological and anatomical studies of *Artemisia vulgaris* L.(Asteraceae) II. Anatomical characteristics and volatile oil. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(6), 56-68.

- Fernandez, P., André, V., Rieger, J., & Kühnle, A. (2004). Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 251(1-3), 53-58.
- Fleming, G. J., Heard, D. J., Floyd, R. F., & Riggs, A. (2003). Evaluation of propofol and medetomidine–ketamine for short-term immobilization of Gulf of Mexico sturgeon (*Acipenser oxyrinchus desotii*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 34(2), 153-159.
- Gholipourkanani, H., Gholinasab-Omran, I., Ebrahimi, P., & Jafaryan, H. (2015). Anesthetic effect of clove oil loaded on lecithin based nanoemulsions in gold fish, *Carassius auratus*. *J Fish Aquat Sci*, 10(6), 553-561.
- Gilderhus, P. A., & Marking, L. L. (1987). Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. *North American Journal of Fisheries Management*, 7(2), 288-292.
- Gladden, J. N., Brainard, B. M., Shelton, J. L., Camus, A. C., & Divers, S. J. (2010). Evaluation of isoeugenol for anesthesia in koi carp (*Cyprinus carpio*). *American journal of veterinary research*, 71(8), 859-866.
- Gomes, L. C., Chippari-Gomes, A. R., Lopes, N. P., Roubach, R., & Araujo-Lima, C. A. (2001). Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture society*, 32(4), 426-431.
- Harms, C. A., & Lewbart, G. A. (2000). Surgery in fish. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 3(3), 759-774.
- Harms, C. A., Lewbart, G. A., Swanson, C. R., Kishimori, J. M., & Boylan, S. M. (2005). Behavioral and clinical pathology changes in koi carp (*Cyprinus carpio*) subjected to anesthesia and surgery with and without intra-operative analgesics. *Comparative Medicine*, 55(3), 221-226.
- Hisaki, Y., Takase, K., Ogasawara, T., & Ogasawara, S. (1986). Anesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp, *Cyprinus carpio*. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 48(2), 341-351.
- Hseu, J.-R., Yeh, S.-L., Chu, Y.-T., & Ting, Y.-Y. (1998). Comparison of efficacy of five anesthetics in goldlined sea bream, *Sparus sarba*. *Acta Zoologica Taiwanica*, 9(1),



35-41.

- Jerkovic, I., Mastelic, J., Milos, M., Juteau, F., Masotti, V., & Viano, J. (2003). Chemical variability of *Artemisia vulgaris* L. essential oils originated from the Mediterranean area of France and Croatia. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(5), 436-440.
- Judžentiene, A., & Buzelyte, J. (2006). Chemical composition of essential oils of *Artemisia vulgaris* L.(mugwort) from North Lithuania. *Chemija*, 17(1), 12-15.
- Kaiser, H., Brill, G., Cahill, J., Collett, P., Czypionka, K., Green, A., . . . Stonier, T. (2006). Testing clove oil as an anaesthetic for long-distance transport of live fish: the case of the Lake Victoria cichlid *Haplochromis obliquidens*. *Journal of Applied Ichthyology*, 22(6), 510-514.
- Kale, S. N., & Deore, S. L. (2017). Emulsion micro emulsion and nano emulsion: a review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 8(1), 39.
- Kasanen, J.-P., Pasanen, A.-L., Pasanen, P., Liesivuori, J., Kosma, V.-M., & Alarie, Y. (1998). Stereospecificity of the sensory irritation receptor for nonreactive chemicals illustrated by pinene enantiomers. *Archives of toxicology*, 72(8), 514-523.
- Katzung, B. G. (2012). *Basic and clinical pharmacology* (12 ed.): McGraw-Hill Education.
- Keene, J., Noakes, D., Moccia, R., & Soto, C. (1998). The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 29(2), 89-101.
- Kessler, A., Sahin-Nadeem, H., Lummis, S. C., Weigel, I., Pischetsrieder, M., Buettner, A., & Villmann, C. (2014). GABAA receptor modulation by terpenoids from *Sideritis* extracts. *Molecular nutrition & food research*, 58(4), 851-862.
- 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.
- Khumpirapang, N., Chaichit, S., Jiranusornkul, S., Pikulkaew, S., Müllertz, A., & Okonogi, S. (2018). In vivo anesthetic effect and mechanism of action of active compounds from *Alpinia galanga* oil on *Cyprinus carpio* (koi carp). *Aquaculture*, 496, 176-184.
- Khumpirapang, N., Pikulkaew, S., Anuchapreeda, S., & Okonogi, S. (2018). *Alpinia*

- galanga oil—A new natural source of fish anaesthetic. *Aquaculture research*, 49(4), 1546-1556.
- Khumpirapang, N., Pikulkaew, S., Müllertz, A., Rades, T., & Okonogi, S. (2017). Self-microemulsifying drug delivery system and nanoemulsion for enhancing aqueous miscibility of *Alpinia galanga* oil. *PLoS one*, 12(11), 1-18.
- Kiessling, A., Johansson, D., Zahl, I. H., & Samuelsen, O. B. (2009). Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated Atlantic salmon (*Salmo salar*) following bath administration. *Aquaculture*, 286(3-4), 301-308.
- Kizak, V., Can, E., Danabas, D., & Can, S. S. (2018). Evaluation of anesthetic potential of rosewood (*Aniba rosaeodora*) oil as a new anesthetic agent for goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture*, 493, 296-301.
- Koning, S., Janssen, H.-G., & Udo, A. T. (2009). Modern methods of sample preparation for GC analysis. *Chromatographia*, 69(1), 533-578.
- Kotta, S., Khan, A. W., Pramod, K., Ansari, S. H., Sharma, R. K., & Ali, J. (2012). Exploring oral nanoemulsions for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drugs. *Expert opinion on drug delivery*, 9(5), 585-598.
- Lee, S. J., Chung, H.-Y., Maier, C. G.-A., Wood, A. R., Dixon, R. A., & Mabry, T. J. (1998). Estrogenic flavonoids from *Artemisia vulgaris* L. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(8), 3325-3329.
- 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 Science and Technology Silpakorn University*, 4(5), 56-64.
- Majewski, H., Klaverkamp, J., & Scott, D. (1978). Acute lethality, and sub-lethal effects of acetone, ethanol, and propylene glycol on the cardiovascular and respiratory systems of rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Water Research*, 12(4), 217-221.
- Marking, L. L., & Meyer, F. P. (1985). Are better anesthetics needed in fisheries? *Fisheries*, 10(6), 2-5.
- Mattson, N., & Ripley, T. (1989). Metomidate, a better anesthetic for cod (*Gadus morhua*) in

- comparison with benzocaine, MS-222, chlorobutanol, and phenoxyethanol. *Aquaculture*, 83(1-2), 89-94.
- Meyer, R. E., & Fish, R. (2008). Pharmacology of injectable anesthetics, sedatives, and tranquilizers: Anesthesia and analgesia of laboratory animals. 2nd ed. San Diego: Academic
- Minter, L. J., Bailey, K. M., Harms, C. A., Lewbart, G. A., & Posner, L. P. (2014). The efficacy of alfaxalone for immersion anesthesia in koi carp (*Cyprinus carpio*). *Veterinary anaesthesia and analgesia*, 41(4), 398-405.
- Musshoff, U., Madeja, M., Binding, N., Witting, U., & Speckmann, E.-J. (2000). 2-Phenoxyethanol: a neurotoxicant?-Reply. *Archives of Toxicology*, 74(4), 284-287.
- 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.
- Myszkowski, L., Kaminski, R., & Wolnicki, J. (2003). Response of juvenile tench *Tinca tinca* (L.) to the anaesthetic 2-phenoxyethanol. *Journal of Applied Ichthyology*, 19(3), 142-145.
- Neiffer, D. L., & Stamper, M. A. (2009). Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. *ILAR journal*, 50(4), 343-360.
- Orser, B. A., Mazer, C. D., & Baker, A. J. (2008). Awareness during anesthesia. *Cmaj*, 178(2), 185-188.
- Ostertag, F., Weiss, J., & McClements, D. J. (2012). Low-energy formation of edible nanoemulsions: factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *Journal of colloid and interface science*, 388(1), 95-102.
- Ostróžka-Cieślík, A., & Sarecka-Hujar, B. (2017). The use of nanotechnology in modern pharmacotherapy *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics* (pp. 139-158): Elsevier.
- Poonpanich, K., & Prapreut, P. (2013). *Importation of Aquatic Animals under Quarantine*

- System Case Study: Importation of Fancy Carp into the Kingdom of Thailand through Suvarnabhumi Airport Fish Inspection Office From 2007-2011 (55-0107-55124)*. Fisheries Administration and Management Bureau
- Prasert, W. (2017). Nano-emulsion and nano-emulsification using low-energy method. *Institute of food research and product development journal*, 47(2), 37-45.
- Rangsimawong, w., & Ngawhirunpat, T. (2014). Nonoemulsions in transdermal drug delivery system. *Thai Bulletin of Pharmaceutical Sciences*, 9(2), 46-61.
- Ross, L. G., Ross, B., & Ross, B. (2008). *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*: Wiley Online Library.
- Said-Al Ahl, H. H., Hussein, M. S., Tkachenko, K. G., Nkomo, M., & Mudau, F. N. (2016). Essential oil composition of *Artemisia vulgaris* grown in Egypt. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 8(9), 120-123.
- Sales, C. F., Silva, R. F., Amaral, M. G., Domingos, F. F., Ribeiro, R. I., Thomé, R. G., & Santos, H. B. (2017). Comparative histology in the liver and spleen of three species of freshwater teleost. *Neotropical Ichthyology*, 15(1).
- Seetapan, K., Mahawong, N., Boonkong, K., Moojareinsuk, T., & Kongha, V. (2010). The efficiency of three anaesthetic agents effect to juvenile Mekong giant catfish (*Pangasistodon gigas*). *Naresuan Phayao Journal*, 5(1), 8-14.
- 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.
- Small, B. C. (2003). Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 218(1-4), 177-185.
- Somjai, D., Pansue, O., & Chiayvareesajja, S. (2008). Toxicity and Efficacy of Clove Oil for Anesthetizing Siamese Fighting Fish (*Betta splendens*). *Thaksin University Journal*, 11(2), 31-38.
- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., & Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-

- emulsions. *Advances in colloid and interface science*, 108, 303-318.
- Tondolo, J. S. M., Amaral, L. d. P., Simões, L. N., Garlet, Q. I., Schindler, B., Oliveira, T. M., . . . Mallmann, C. A. (2013). Anesthesia and transport of fat snook *Centropomus parallelus* with the essential oil of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. *Neotropical Ichthyology*, 11(3), 667-674.
- Tsuchiya, H. (2017). Anesthetic agents of plant origin: a review of phytochemicals with anesthetic activity. *Molecules*, 22(8), 1369-1403.
- Velíšek, J., & Svobodova, Z. (2004). Anaesthesia of common carp (*Cyprinus carpio* L.) with 2-phenoxyethanol: acute toxicity and effects on biochemical blood profile. *Acta Veterinaria Brno*, 73(2), 247-252.
- Velíšek, J., Svobodova, Z., Piackova, V., Groch, L., & Nepejchalova, L. (2005). Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Vet Med*, 50(6), 269-275.
- Velisek, J., Wlasow, T., Gomulka, P., Svobodova, Z., & Novotny, L. (2007). Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on sheatfish (*Silurus glanis* L.). *VETERINARNI MEDICINA-PRAHA-*, 52(3), 103.
- Wang, J., Zhu, F., Zhou, X., Niu, C., & Lei, C. (2006). Repellent and fumigant activity of essential oil from *Artemisia vulgaris* to *Tribolium castaneum* (Herbst)(Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research*, 42(3), 339-347.
- West, G., Heard, D., & Caulkett, N. (2014). *Zoo animal and wildlife immobilization and anesthesia*: John Wiley & Sons.
- Woolsey, J., Holcomb, M., & Ingermann, R. (2004). Effect of temperature on clove oil anesthesia in steelhead fry. *North American Journal of Aquaculture*, 66(1), 35-41.
- Zhang, Z., Vriesekoop, F., Yuan, Q., & Liang, H. (2014). Effects of nisin on the antimicrobial activity of D-limonene and its nanoemulsion. *Food chemistry*, 150, 307-312.
- กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. (2556). *ฐานข้อมูลพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน*. Retrieved from <http://www.qsbg.org/Database/plantdb/mdp/medicinal-specimen.asp?id=102>
- นฤมล อิศวเกษตรนิ. (2550). *การเลี้ยงปลาน้ำจืด*. กรุงเทพฯ: ภาพพิมพ์.





## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	กันตินันท์ รักษนาค
วัน เดือน ปี เกิด	31 มีนาคม 2538
สถานที่เกิด	ระยอง
วุฒิการศึกษา	การศึกษาระดับบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	25/7 ซ.สัตวแพทย์ ถ.ตากสินมหาราช ต.ท่าประดู่ อ.เมือง จ.ระยอง 21000

