

การพัฒนายาสลบแบบนาโนอิมัลชันจากน้ำมันหอมระเหยมะลิ (*Jasminum officinale* L.) สำหรับ
ปลาหมอเทศ (*Danio rerio* (Hamilton, 1822))

DEVELOPMENT OF A NANOEMULSION ANESTHETIC FROM JASMINE ESSENTIAL
OILS (*Jasminum officinale* L.) FOR ZEBRAFISH (*Danio rerio* (Hamilton, 1822))

ณัฐนิชา รื่นถ้อย

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2566

การพัฒนายาสลับแบบนาโนอิมัลชันจากน้ำมันหอมระเหยมะลิ (*Jasminum officinale* L.)
สำหรับปลาหมอไทย (*Danio rerio* (Hamilton, 1822))



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

DEVELOPMENT OF A NANOEMULSION ANESTHETIC FROM JASMINE ESSENTIAL
OILS (*Jasminum officinale* L.) FOR ZEBRAFISH (*Danio rerio* (Hamilton, 1822))



NATNICHA RUENTHOY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Biotechnology)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2023

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญาานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนายาสลับแบบนาโนอิมัลชันจากน้ำมันหอมระเหยมะลิ (*Jasminum officinale* L.) สำหรับ

ปลาหมอลาย (*Danio rerio* (Hamilton, 1822))

ของ

ณัฐนิชา รื่นถ้อย

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นลินา ประไพรัชสิทธิ์) (รองศาสตราจารย์ ดร.ปิวิณา ไตรเพิ่ม)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์)

ชื่อเรื่อง	การพัฒนายาสลับแบบนาโนอิมัลชันจากน้ำมันหอมระเหยมะลิ (<i>Jasminum officinale</i> L.) สำหรับปลาหมอ (Danio rerio (Hamilton, 1822))
ผู้วิจัย	ณัฐนิชา รินถ้อย
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นลินา ประไพรัชสิทธิ์

ยาสลับปลามีความสำคัญต่อสัตว์ทดลองสำหรับการศึกษาวิจัยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในปลาหมอ ซึ่งเป็นสัตว์ทดลองที่นิยมนำมาใช้ในการวิจัยเพิ่มขึ้น โดยยาสลับปลานั้นจำเป็นต่อการลดความเครียดทางสรีรวิทยา ระวังความเจ็บปวด และเพื่อความสะดวกในการดำเนินกิจกรรมต่าง ๆ ในขั้นตอนการวิจัย ยาสลับปลาที่ใช้กันอย่างแพร่หลายมากที่สุดในปลาหมอก็คือ tricaine methanesulfonate (MS-222) ซึ่งเป็นยาสลับปลาประเภทสารเคมีสังเคราะห์ที่ส่งผลข้างเคียงต่อปลาและมนุษย์ ดังนั้นจึงมีการใช้สารสกัดจากพืชในการเป็นยาสลับทางเลือกสำหรับปลาเพิ่มขึ้นเพื่อใช้ทดแทนและลดผลกระทบจากยาสลับปลาประเภทสารเคมีสังเคราะห์ สารสกัดที่นำมาวิจัยครั้งนี้คือ น้ำมันหอมระเหยมะลิจากดอกมะลิ (*Jasminum officinale* L.) โดยตรวจสอบสารองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยมะลิโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) พัฒนา ยาสลับปลาให้อยู่ในรูปนาโนอิมัลชัน วิเคราะห์คุณสมบัติของนาโนอิมัลชัน ประเมินระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยมะลิและนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิที่เหมาะสมสำหรับการชักนำการสลับปลาหมอ (*Danio rerio* (Hamilton, 1822)) และตรวจสอบพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาหมอหลังได้รับสารทดสอบ ผลการวิจัยพบว่า น้ำมันหอมระเหยมะลิมีสารออกฤทธิ์สำคัญที่สามารถชักนำการสลับปลาได้ คือ linalool (6.52%), β -pinene (4.34%), α -pinene (2.45%) และ limonene (2.4%) อนุภาคนาโนอิมัลชันมีขนาด 13.01 ± 0.09 นาโนเมตร ค่าการกระจายตัว 0.184 ± 0.014 และมีศักย์ไฟฟ้าซีตา -11.67 ± 0.81 mV ความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับชักนำการสลับเพื่อทำศัลยกรรมปลาหมอคือ 0.40 มิลลิลิตรต่อลิตร และนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิคือ 0.35 มิลลิลิตรต่อลิตร ความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับชักนำการสลับเพื่อการขนส่งปลาหมอคือ 0.04 มิลลิลิตรต่อลิตร และนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิคือ 0.02 มิลลิลิตรต่อลิตร ผลการตรวจสอบพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของปลาหมอหลังได้รับสารทดสอบทั้ง 5 ชนิด คือ 1. น้ำมันหอมระเหยมะลิที่ละลายด้วยเอทานอล 2. เอทานอล 3. นาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิ 4. ส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิว และ 5. MS-222 พบว่าทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกของปลาหมอคือ มีการเพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อเมือกของเหงือก แต่ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับของปลาหมอที่ได้รับสารทดสอบทั้ง 5 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

คำสำคัญ : นาโนอิมัลชัน น้ำมันหอมระเหยมะลิ ปลาหมอ

Title	DEVELOPMENT OF A NANOEMULSION ANESTHETIC FROM JASMINE ESSENTIAL OILS (<i>Jasminum officinale</i> L.) FOR ZEBRAFISH (<i>Danio rerio</i> (Hamilton, 1822))
Author	NATNICHA RUENTHOY
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2023
Thesis Advisor	Assistant Professor Nalena Praphairaksit , Ph.D.

Fish anesthetic is critical for reducing pain and distress caused by a variety of research procedures performed on zebrafish (*Danio rerio* (Hamilton, 1822)). The most commonly used fish anesthetic in the research is tricaine methanesulfonate (MS-222), which is a synthetic chemical with adverse side effects for fish and humans. Therefore, the use of herbal essential oils is an alternative anesthetic for fish has increased in order to prevent toxicity. Jasmine essential oils from jasmine flowers (*Jasminum officinale* L.) were utilized in this study to evaluate the anesthetic efficacy. The purpose of this study was to develop and optimize nanoemulsion of jasmine essential oils for use as an ethanol-free herbal fish anesthetic and to evaluate the appropriate concentration of anesthetic for zebrafish. Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) was used to determine the chemical composition of jasmine essential oils. The droplets of jasmine essential oils nanoemulsion were characterized using dynamic light scattering and transmission electron microscope. The results showed that the main active ingredient in jasmine essential oils that can induce anesthesia in fish, namely linalool (6.52%), β -pinene (4.34%), α -pinene (2.45%) and limonene (2.4%). The average diameter of droplets of 13.01 ± 0.09 nm, polydispersity index of 0.184 ± 0.014 and zeta potential of -11.67 ± 0.81 mV. The optimum concentrations of jasmine essential oils and jasmine essential oils nanoemulsion for inducing anesthesia for zebrafish surgery were 0.40 and 0.35 mL/L, respectively. The optimum concentrations of jasmine essential oils and jasmine essential oils nanoemulsion for inducing sedation for transport of zebrafish were 0.04 and 0.02 mL/L, respectively. Fish that received five test substances, namely jasmine essential oils ethanolic solution, ethanol, jasmine essential oils nanoemulsion, surfactant and MS-222 showed hyperplasia of the gill epithelium. However, as compared to the control group, it did not cause any histopathological changes in the liver tissue of zebrafish exposed to all five test substances.

Keyword : Jasmine essential oils Nanoemulsion Zebrafish

กิตติกรรมประกาศ

การทำปฏิญยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นลินา ประไพรัชสิทธิ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาผู้ให้ความรู้ คำแนะนำ และสนับสนุนการทำวิจัยด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงด้วยความเคารพ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ปวีณา ไตรเพิ่ม ที่ให้ความกรุณาในการเป็นประธานสอบปากเปล่าปฏิญยานิพนธ์และให้คำแนะนำในการทำปฏิญยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์ ที่ให้ความกรุณาในการเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปฏิญยานิพนธ์ รวมถึงให้ความรู้ ความช่วยเหลือ และคำแนะนำในการทำวิจัย ทำให้ปฏิญยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่านที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกในด้านต่าง ๆ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ญาติพี่น้อง และเพื่อน ๆ ทุกท่านที่ช่วยเหลือและให้การสนับสนุนด้านการศึกษาอย่างเต็มที่ รวมทั้งเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมาทำให้งานวิจัยและปฏิญยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์

ณัฐนิชา รื่นถ้อย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูปภาพ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	2
ภูมิหลัง	2
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	3
ความสำคัญของการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	2
กรอบแนวคิดในงานวิจัย.....	3
สมมติฐานงานวิจัย.....	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	5
ยาสลบปลา.....	5
การวางยาสลบ.....	5
ความสำคัญของยาสลบปลา.....	6
การประเมินประสิทธิภาพของยาสลบปลา.....	7
ประเภทของยาสลบปลา	8
ปลาม้าลาย	15
ข้อมูลทั่วไปของปลาม้าลาย	15

ความสำคัญของปลาม้าลาย	18
การใช้ยาสลบสำหรับปลาม้าลาย	18
น้ำมันหอมระเหยมะลิ.....	18
น้ำมันหอมระเหย.....	18
ข้อมูลพฤกษศาสตร์ของมะลิ	18
คุณสมบัติของมะลิ	18
สารออกฤทธิ์สำคัญในน้ำมันหอมระเหยมะลิ	18
กลไกการออกฤทธิ์ของไลนาโลอล.....	21
นาโนอิมัลชัน	25
ข้อมูลทั่วไปของนาโนอิมัลชัน	25
ประเภทของนาโนอิมัลชัน.....	26
การผลิตนาโนอิมัลชัน	27
ยาสลบปลานาโนอิมัลชัน.....	29
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	30
วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี.....	30
วัสดุ อุปกรณ์.....	30
เครื่องมือ	30
สารเคมี	31
วิธีการทดลอง	31
จรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง	31
สัตว์ทดลอง.....	31
การเลี้ยงปลาม้าลายสำหรับการทดลอง	31

การทดสอบประสิทธิภาพชักนำการสลายปลาของน้ำมันหอมระเหยมะลิ (การทดสอบเบื้องต้น)	32
การทดสอบประสิทธิภาพชักนำการสลายของน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับการคัดเลือกกรรมปลาม้าลาย	32
การทดสอบประสิทธิภาพชักนำการสลายของน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับการขนส่งปลาม้าลาย	33
การตรวจสอบคุณภาพน้ำ	34
การทดสอบชุดควบคุมผลบวก (positive control)	34
การทดสอบชุดควบคุมผลลบ (negative control)	34
การวิเคราะห์สารองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยมะลิ	35
การเตรียมนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิ	35
การวิเคราะห์คุณสมบัตินาโนอิมัลชัน	35
การทดสอบประสิทธิภาพชักนำการสลายของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับการคัดเลือกกรรมปลาม้าลาย.....	36
การทดสอบประสิทธิภาพชักนำการสลายของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับการขนส่งปลาม้าลาย.....	36
การตรวจสอบพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาม้าลายหลังได้รับสารทดสอบ ..	37
การวิเคราะห์ข้อมูล	38
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย.....	39
ผลการวิเคราะห์สารองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยมะลิ	39
ผลการวิเคราะห์คุณสมบัตินาโนอิมัลชัน	43
ผลการประเมินระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยมะลิและนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับใช้เป็นยาสลายปลาม้าลายเพื่อการคัดเลือกกรรม.....	45
ผลการประเมินเวลาชักนำการสลายปลาม้าลายสำหรับการคัดเลือกกรรม	45

ผลการประเมินเวลาฟื้นฟูสลับปลาฆ่าตายสำหรับการคัดเลือกกรรม.....	47
ผลการรักษาสภาวะสลับของปลาฆ่าตายระหว่างการจำลองคัดเลือกกรรม.....	48
ผลอัตราการตายของปลาฆ่าตายหลังการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	49
ผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำของการทดลองชักนำการสลับปลาฆ่าตายสำหรับการ คัดเลือกกรรม.....	49
ผลการประเมินระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยมะลิและนาโนอิมัลชันน้ำมัน หอมระเหยมะลิสำหรับใช้เป็นยาสลับปลาฆ่าตายเพื่อการขนส่ง.....	51
ผลการประเมินระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับการขนส่ง ปลาฆ่าตาย.....	51
ผลการประเมินระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิ สำหรับการขนส่งปลาฆ่าตาย.....	52
ผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำของการทดลองชักนำการสลับปลาฆ่าตายสำหรับการขนส่ง.....	54
ผลการตรวจสอบพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาฆ่าตายหลังได้รับสารทดสอบ	57
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	63
สรุปผลการวิจัย.....	63
อภิปรายผลการวิจัย.....	67
ข้อเสนอแนะ.....	68
บรรณานุกรม.....	69
ประวัติผู้เขียน.....	84

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 พฤติกรรมของปลาในแต่ละระยะของการสลบ	8
ตาราง 2 พฤติกรรมของปลาในแต่ละระยะของการฟื้นตัว	8
ตาราง 3 ผลข้างเคียงของยาสลบสารเคมีสังเคราะห์สำหรับปลา	10
ตาราง 4 ฤทธิ์ยาสลบของน้ำมันหอมระเหยในปลาชนิดต่าง ๆ.....	12
ตาราง 5 ผลข้างเคียงของยาสลบสารสกัดจากพืชสำหรับปลา.....	14
ตาราง 6 ยาสลบที่ใช้สำหรับปลาม้าลาย	18
ตาราง 7 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของไลนาโลอล	19
ตาราง 8 คุณสมบัติทางชีวภาพของไลนาโลอลต่อระบบประสาท	20
ตาราง 9 สารองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยมะลิ	40
ตาราง 10 การวิเคราะห์คุณสมบัตินาโนอิมัลชัน.....	44
ตาราง 11 อุณหภูมิน้ำแต่ละชุดการทดลอง	50
ตาราง 12 ค่า pH แต่ละชุดการทดลอง	50
ตาราง 13 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำแต่ละชุดการทดลอง	51
ตาราง 14 ประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลบปลาม้าลายของน้ำมันหอมระเหยมะลิในระหว่างการจำลองการขนส่งเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง	52
ตาราง 15 ประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลบปลาม้าลายของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิในระหว่างการจำลองการขนส่งเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง	53
ตาราง 16 อุณหภูมิน้ำแต่ละชุดการทดลอง	54
ตาราง 17 ค่า pH แต่ละชุดการทดลอง	55
ตาราง 18 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำแต่ละชุดการทดลอง	56

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 ภาพต่อเนื่องของการสงบประสาทและการระงับความรู้สึก	5
ภาพประกอบ 2 ปลาฆ่าลายเพศผู้ตัวเต็มวัย	18
ภาพประกอบ 3 ปลาฆ่าลายเพศเมียตัวเต็มวัย.....	18
ภาพประกอบ 4 โครงสร้างทางเคมีของ 3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol (linalool).....	19
ภาพประกอบ 5 โครงสร้างและการทำงานของ N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR)	22
ภาพประกอบ 6 กลไกการออกฤทธิ์ของยาสงบ.....	23
ภาพประกอบ 7 นาโนอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมันและนาโนอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำที่ประกอบด้วย สารลดแรงตึงผิว.....	25
ภาพประกอบ 8 ประเภทของนาโนอิมัลชัน	26
ภาพประกอบ 9 การเปลี่ยนแปลงความโค้งของโครงสร้างสารลดแรงตึงผิวระหว่างกระบวนการ ผลิตนาโนอิมัลชันแบบการเปลี่ยนแปลงวัฏภาค	27
ภาพประกอบ 10 การผลิตนาโนอิมัลชันด้วยวิธี catastrophic phase inversion (CPI)	28
ภาพประกอบ 11 ผลกราฟโครมาโตแกรมจาก Gas chromatography และวิเคราะห์สารด้วย Mass spectrometer โดยเทียบกับ NIST database	43
ภาพประกอบ 12 ลักษณะทางกายภาพของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิ.....	44
ภาพประกอบ 13 ลักษณะสัณฐานวิทยาจากกล้อง TEM ของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ เจือจาง 1,000 เท่าด้วยน้ำกลั่น.....	45
ภาพประกอบ 14 เวลาชักนำการสลบปลาฆ่าลายของสารทดสอบแต่ละชนิด	47
ภาพประกอบ 15 เวลาฟื้นสลบปลาฆ่าลายของสารทดสอบแต่ละชนิด	48
ภาพประกอบ 16 พยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกของปลาฆ่าลาย.....	58
ภาพประกอบ 17 พยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับของปลาฆ่าลาย.....	60

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ยาสลบปลา (fish anesthetic) มีความสำคัญต่อสัตว์ทดลองสำหรับการศึกษาวิจัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปลาฆ่าตายซึ่งเป็นหนึ่งในสัตว์ทดลองที่นิยมนำมาใช้ในการวิจัยเพิ่มขึ้น เนื่องจากปลาฆ่าตายเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังที่มีสรีรวิทยาค่อนข้างคล้ายคลึงกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Kalueff, Echevarria, & Stewart, 2014) นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษา และง่ายต่อการเลี้ยงและผสมพันธุ์ (Ablain & Zon, 2013; Valentim, Felix, Carvalho, Diniz, & Antunes, 2016) ยาสลบปลาเป็นสารที่ทำหน้าที่ระงับความรู้สึก ทำให้ปลาไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้าหรือสิ่งกระตุ้นภายนอก โดยยาสลบปลานั้นจำเป็นต่อการลดความเครียดทางสรีรวิทยา ระงับความเจ็บปวด และเพื่อความสะดวกในการดำเนินกิจกรรมต่าง ๆ ในขั้นตอนการวิจัยและการเลี้ยงปลา ในอุตสาหกรรม (Coyle, Durborow, & Tidwell, 2004; Zahl, Samuelsen, & Kiessling, 2012) เช่น การฉีดวัคซีน การฉีดยา การตรวจชิ้นเนื้อ การเก็บตัวอย่างเลือด การผ่าตัด และการขนส่ง เป็นต้น (Javahery, Nekoubin, & Moradlu, 2012; Maricchiolo & Genovese, 2011) ยาสลบปลาที่ใช้กันอย่างแพร่หลายมากที่สุดในปลาฆ่าตายคือ tricaine methanesulfonate (MS-222) ซึ่งเป็นยาสลบปลาประเภทสารเคมีสังเคราะห์ เนื่องจากเป็นยาสลบปลาที่มีประสิทธิภาพดูดซึมเข้าสู่เหงือกได้ดีมาก สามารถชักนำให้เกิดการสลบและฟื้นจากการสลบได้เร็ว (Collymore, 2020; Martins, Valentim, Pereira, & Antunes, 2016) นอกจากนี้ MS-222 เป็นยาสลบปลาที่ได้รับการขึ้นทะเบียนจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration; FDA) สามารถนำมาใช้กับปลาที่บริโภคเป็นอาหารและปลาที่จะปล่อยออกสู่แหล่งน้ำได้ แต่ต้องมีระยะหยุดใช้ยาเป็นเวลา 21 วัน (Ross & Ross, 2009) อย่างไรก็ตามมีรายงานผลเสียของ MS-222 ที่ส่งผลกระทบต่อมนุษย์และปลา คือ เป็นสารก่อมะเร็ง ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังและดวงตา (Al-Yaqout, Al-Ablani, & Lone, 2012; Ross & Ross, 2009) ดังนั้นปัจจุบันจึงเริ่มมีการใช้สารสกัดจากพืชในการเป็นยาสลบทางเลือกสำหรับปลาเพิ่มขึ้นเพื่อใช้ทดแทนและลดผลกระทบจากยาสลบปลาประเภทสารเคมีสังเคราะห์ (Mirghaed, Yasari, Mirzargar, & Hoseini, 2018) สารสกัดที่นำมาวิจัยครั้งนี้คือ น้ำมันหอมระเหยมะลิ (Jasmine essential oils) จากดอกมะลิ (*Jasminum officinale* L.) จากการศึกษพบว่า มีประสิทธิภาพเป็นยากดระบบประสาทส่วนกลาง ยาสงบประสาทและยาสลบ (Duke, Bogenschutz-Godwin,

DuCellier, & Duke, 2002; Khare, 2007) โดยมีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยมะลิมีสารไลนาโลล (linalool) (Khare, 2007) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญที่มีรายงานการชักนำการสลายในปลา (L. L. Silva et al., 2017) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานผลการศึกษาประสิทธิภาพการชักนำการสลายปลาของน้ำมันหอมระเหยมะลิ นอกจากนี้หนึ่งในข้อจำกัดการใช้ยาสลายปลาจากน้ำมันหอมระเหยคือ การใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย เนื่องจากเอทานอลมีความเป็นพิษต่อเหงือกของปลา (Bhanu & Philip, 2011) และส่งผลให้เกิดพฤติกรรมตื่นตกใจ (hyperactivity) ในปลา (Khumpirapang, Pikulkaew, Müllertz, Rades, & Okonogi, 2017) ดังนั้นน้ำมันหอมระเหยมะลิ จะถูกพัฒนาตำรับและปรับรูปแบบของน้ำมันหอมระเหยเพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำ โดยทำให้อยู่ในรูปอิมัลชัน (emulsion) ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ เนื่องจากอิมัลชันเป็นระบบกระจายตัวของน้ำมันและน้ำที่ทำให้เกิดความคงตัวด้วยสารลดแรงตึงผิว (surfactant) จึงช่วยเพิ่มการกระจายตัวของอนุภาคน้ำมันในน้ำได้ ทั้งนี้การผลิตอิมัลชันจะถูกพัฒนาเป็นนาโนอิมัลชัน (nanoemulsion) เพื่อเพิ่มความสะดวกระหว่างการเก็บรักษาเนื่องจากสารละลายนี้มีอนุภาคขนาดเล็กทำให้ต้านทานการสูญเสียความคงตัวทางกายภาพจากการแยกชั้นโดยการรวมหยดกันของอนุภาคน้ำมัน และจากขนาดอนุภาคที่เล็กส่งผลให้เพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งของยาสลายปลาได้ดียิ่งขึ้น (McClements, 2011)

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

1. เพื่อวิเคราะห์สารองค์ประกอบทางเคมีที่พบจากน้ำมันหอมระเหยมะลิ
2. เพื่อพัฒนานาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิในการใช้เป็นยาสลายปลาม้าลาย
3. เพื่อประเมินระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยมะลิ และสารในรูปนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยมะลิในการใช้เป็นยาสลายสำหรับปลาม้าลาย
4. เพื่อเปรียบเทียบผลของสารทดสอบทั้ง 5 ชนิด คือ 1. น้ำมันหอมระเหยมะลิที่ละลายด้วยเอทานอล 2. เอทานอล 3. นาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิ 4. ส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิว และ 5. MS-222 ต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาม้าลาย

ความสำคัญของการวิจัย

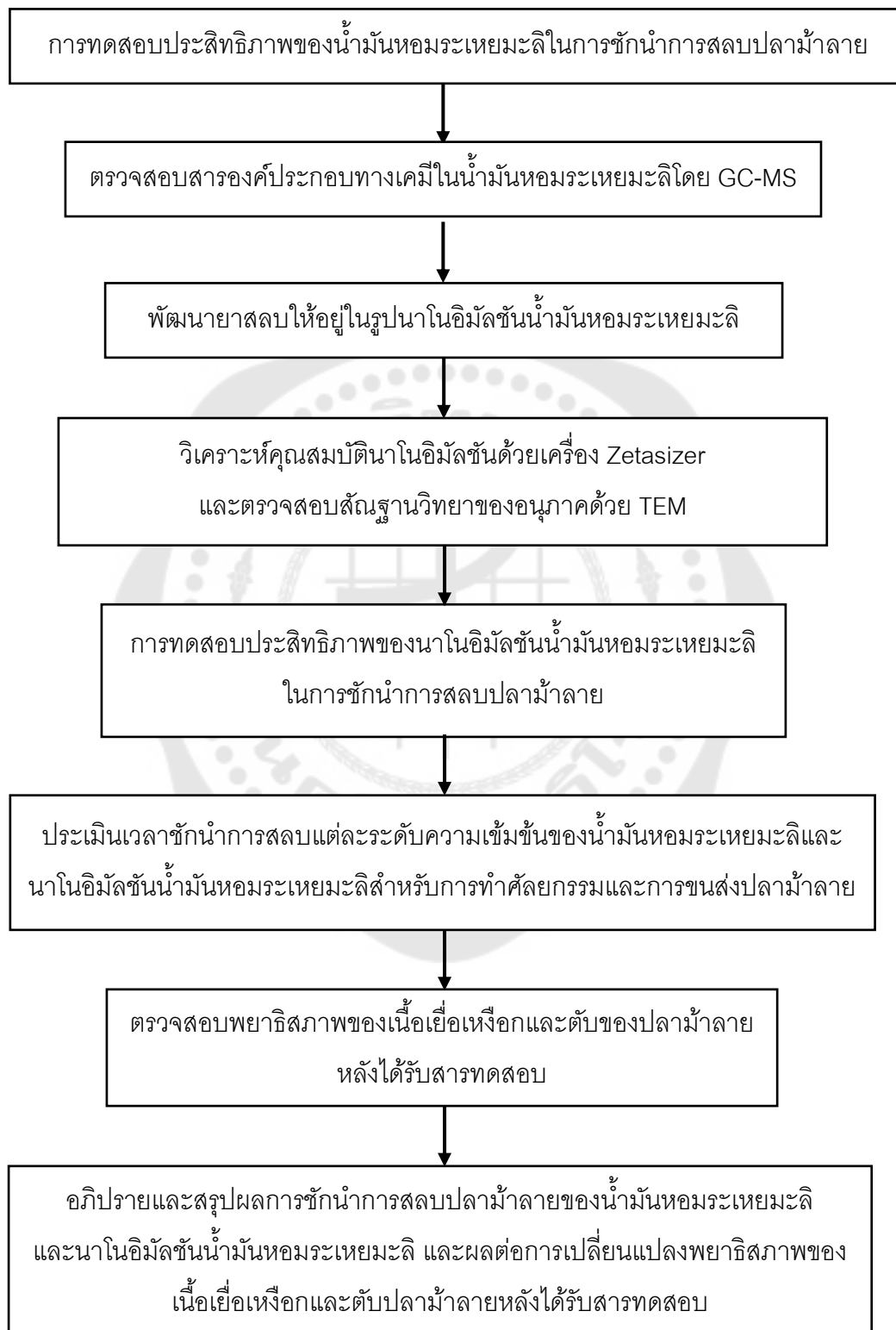
งานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อพัฒนายาสลายปลานาโนอิมัลชันและประเมินประสิทธิภาพการชักนำการสลายของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิโดยใช้ปลาม้าลายเป็นโมเดลในการศึกษา เนื่องจากปัจจุบันมีการศึกษาถึงยาสลายทางเลือกจากพืชเพื่อใช้ทดแทนยาสลายเคมีสังเคราะห์ที่

ก่อให้เกิดผลเสียและอันตรายต่อปลาและมนุษย์เพิ่มขึ้น (Aydin & Barbas, 2020) นอกจากนี้ ยาสลบปลายังมีความสำคัญต่องานวิจัยสำหรับการทดลองในห้องปฏิบัติการและอุตสาหกรรม การเพาะเลี้ยงปลา ซึ่งยาสลบสามารถลดความเครียด ลดความเจ็บปวด อาการบาดเจ็บ และอัตราการตายของปลาในขณะทำการหัตถการต่าง ๆ เพื่ออำนวยความสะดวกในการจับบังคับ (handling) เช่น การศึกษาวิจัย การทำศัลยกรรม การเก็บตัวอย่างเลือด การฉีดวัคซีน และรวมถึงด้านการขนส่งที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลา โดยงานวิจัยนี้นำน้ำมันหอมระเหย มะลิมาเป็นยาสลบทางเลือกเพื่อทดแทนยาสลบเคมีสังเคราะห์ และพัฒนายาสลบโดยปรับเปลี่ยนให้อยู่ในรูปแบบนาโนอิมัลชันเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้เอทานอลที่ส่งผลกระทบต่อปลา เพิ่มความคงตัว และเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งของยาสลบปลาให้ดียิ่งขึ้น

ขอบเขตของการวิจัย

1. ทดสอบเพื่อประเมินประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยมะลิ (*Jasminum officinale* L.) ในการชักนำการสลับของปลาม้าลาย (*Danio rerio* (Hamilton, 1822))
2. ตรวจสอบสารองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยมะลิโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (gas chromatography-mass spectrometry; GC-MS)
3. พัฒนายาสลบให้อยู่ในรูปแบบนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิเพื่อใช้ในการชักนำการสลับปลาม้าลาย
4. วิเคราะห์คุณสมบัติของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิโดยตรวจสอบขนาดอนุภาคนาโน วัดค่าการกระจายตัว และศักย์ไฟฟ้าซีตา โดยใช้เครื่อง Zetasizer และตรวจสอบสัณฐานวิทยาของอนุภาคเพื่อศึกษารูปร่างและขนาดของอนุภาคนาโนอิมัลชัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope; TEM)
5. ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยมะลิและนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิที่เหมาะสมในการชักนำการสลับปลาม้าลายสำหรับการศัลยกรรมและการขนส่ง โดยมีการตรวจสอบคุณภาพน้ำก่อนการทดลอง ขณะทำการทดลอง และหลังการทดลอง และเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการชักนำการสลับและการฟื้นตัวในแต่ละระดับความเข้มข้น
6. ตรวจสอบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาม้าลายโดยใช้วิธีพาราฟิน (paraffin method) ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin หลังได้รับสารทดสอบ

กรอบแนวคิดในงานวิจัย



สมมติฐานงานวิจัย

1. น้ำมันหอมระเหยมะลิมีสารออกฤทธิ์ชักนำการสลับในปลา
2. น้ำมันหอมระเหยมะลิมีประสิทธิภาพในการชักนำให้ปลาม้าลายเกิดการสลับและฟื้นจากการสลับในระยะเวลาตามเกณฑ์ที่กำหนด
3. นาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิสามารถชักนำให้ปลาม้าลายเกิดการสลับและฟื้นจากการสลับในระยะเวลาตามเกณฑ์ที่กำหนด โดยมีประสิทธิภาพชักนำการสลับดีกว่าน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ละลายในเอทานอล
4. น้ำมันหอมระเหยมะลิที่ละลายในเอทานอล เอทานอล และ MS-222 ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาม้าลาย และนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิช่วยลดผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาม้าลาย



บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

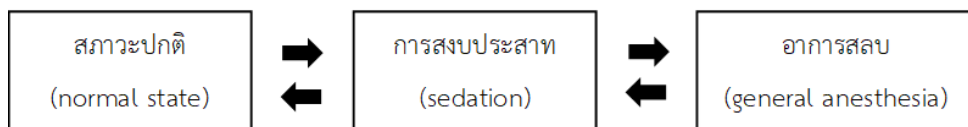
ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

1. ยาสลบปลา
2. ปลาฆ่าตาย
3. น้ำมันหอมระเหยมะลิ
4. นาโนอิมัลชัน

ยาสลบปลา

การวางยาสลบ

การวางยาสลบระงับความรู้สึก (anesthesia) anesthesia มีรากศัพท์มาจากภาษากรีก หมายถึง สูญเสียความรู้สึกหรือการไม่รู้สึกรู้ตัว โดยอาจเป็นการสูญเสียความรู้สึกส่วนใดส่วนหนึ่งหรือทั้งหมดของร่างกาย (Ross & Ross, 2009; Steffey, 1983) โดยการวางยาสลบระงับความรู้สึกเป็นภาวะต่อเนื่องเริ่มต้นจากการสงบประสาท (sedation) ซึ่งทำให้ผู้ถูกวางยาสลบเกิดอาการง่วงซึม เนื่องจากการรับรู้ทางประสาทสัมผัสลดลงและการลดความรู้สึกเจ็บปวด ต่อจากนั้นเป็นอาการสลบหรือสภาวะการระงับความรู้สึก (general anaesthesia) ซึ่งเป็นการสูญเสียการรับรู้ทางประสาทสัมผัสทั้งหมด โดยทั่วไปการวางยาสลบระงับความรู้สึกเป็นภาวะที่สามารถผันกลับได้ ดังภาพประกอบ 1 ประโยชน์ของการวางยาสลบปลามีตั้งแต่การสงบประสาทเพื่อให้ปลาอยู่นิ่งลดการเคลื่อนไหว การวางยาสลบเพื่อระงับความรู้สึกขณะศัลยกรรม และการการุณยฆาต (euthanasia) โดยประสิทธิภาพการวางยาสลบขึ้นอยู่กับขนาดยา (dose) และระยะเวลาในการรับยา (Ross & Ross, 2009)



ภาพประกอบ 1 ภาวะต่อเนื่องของการสงบประสาทและการระงับความรู้สึก

ที่มา: ดัดแปลงจาก Ross & Ross (2009)

ยาสลบ (anesthetic) หมายถึง สารที่ทำหน้าที่ระงับความรู้สึก ทำให้เกิดการสูญเสียการตอบสนองของร่างกาย (Steffey, 1983) ซึ่งการวางยาสลบปลานั้น ปลาจะดูดซึมยาสลบผ่านเหงือกและส่งผ่านระบบไหลเวียนเลือดทางหลอดเลือดแดงไปยังระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system; CNS) ที่เซลล์ประสาทของสมอง และจะออกฤทธิ์ที่ระบบประสาทส่วนกลาง โดยไปยับยั้งการรับส่งกระแสประสาทหรือสารสื่อประสาทของเซลล์ประสาททำให้ปลาเกิดการสลบ (Priborsky & Velisek, 2018; Ross & Ross, 2009)

ความสำคัญของยาสลบปลา

ยาสลบปลาถูกนำมาใช้ตั้งแต่กลางศตวรรษที่ 20 (McFARLAND, 1959) โดยยาสลบปลาจำเป็นต่อการลดความเครียด ลดการบาดเจ็บ และอัตราการตายของปลาในขณะดำเนินกิจกรรมต่าง ๆ เช่น การทำศัลยกรรม การศึกษาวิจัย การเก็บตัวอย่างเลือด การฉีดวัคซีนและการขนส่ง เป็นต้น (C. A. Harms, Lewbart, Swanson, Kishimori, & Boylan, 2005; Ross & Ross, 2009)

จากการรายงานของ Ross และ Ross (2009) พบว่าความเครียดของปลาส่งผลต่อสรีรวิทยา พฤติกรรม การเจริญเติบโต และประสิทธิภาพของปลาที่เพาะเลี้ยงหรือสัตว์ทดลอง ดังนั้นยาสลบปลาจึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อสวัสดิภาพของปลาและการเพิ่มความสะดวกในการศึกษาวิจัย การศัลยกรรมเพื่อการรักษา และการดำเนินงานสำหรับอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลา (C. A. Harms et al., 2005)

การศัลยกรรมปลาในห้องปฏิบัติการทำเพื่อการศึกษาวิจัยและการรักษาทางคลินิกในปลาที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ ยาสลบปลาจะถูกใช้ในขั้นตอนแรกของการทำศัลยกรรมเพื่อระงับความรู้สึกปลาก่อนการผ่าตัด ทำให้ปลาที่ได้รับการศัลยกรรมหรือทำหัตถการต่าง ๆ ไม่ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นที่เกิดจากการทำศัลยกรรมหรือหัตถการนั้น (Neiffer & Stamper, 2009; Ross & Ross, 2009) โดยทั่วไปการผ่าตัดเล็กหรือทำหัตถการที่ไม่ซับซ้อนใช้ระยะเวลาสั้น (น้อยกว่า 5 นาที) เช่น การขูดผิวหนัง การฉีดยา และการผ่าตัดตรวจชิ้นเนื้อเหงือก นอกจากนี้ยังมีการผ่าตัดใหญ่ เช่น การผ่าตัดเนื้องอก ที่มีความซับซ้อนและอาจใช้เวลานานมากกว่า 2 ชั่วโมง ดังนั้นยาสลบปลาที่ใช้ต้องมีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพชักนำให้ปลาสลบตลอดระยะเวลาการศัลยกรรม (Harms & Lewbart, 2000)

การขนส่งปลาเป็นขั้นตอนที่สำคัญสำหรับอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาและการศึกษาวิจัย สาเหตุหลักในการขนส่งปลาเนื่องจากผู้ค้าต้องการเคลื่อนย้ายลูกปลาหรือพ่อแม่พันธุ์เพื่อนำไปเพาะเลี้ยง การเคลื่อนย้ายปลาจากฟาร์มเพาะเลี้ยงไปยังตลาดปลา และการเคลื่อนย้ายสัตว์ทดลองปลาเพื่อการวิจัย เป็นต้น (Ross & Ross, 2009) ในระหว่างขั้นตอนการขนส่ง

จะมีแรงกระแทกทางกล ได้แก่ การสั่นสะเทือน และเสียงรบกวนจากยานพาหนะ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ทำให้เกิดความเครียดในปลา นอกจากนี้ปัจจัยดังกล่าวอาจทำให้ร่างกายปลาบอบช้ำหรือมีบาดแผลเนื่องจากการเสียดสีระหว่างตัวปลาและภาชนะที่ใช้ในการขนส่ง ส่งผลให้ปลาเกิดบาดแผลและติดเชื้อ ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ปลาตายในระหว่างการขนส่ง ดังนั้นยาสลบปลาจึงถูกนำมาใช้เพื่อชักนำให้ปลาสงบเนื่องจากการใช้ยาสลบ การทำให้ปลาสงบนั้นเพื่อลดความเครียดและความเสี่ยงต่อการบาดเจ็บของปลาขณะขนส่ง ตลอดจนการขนย้ายก็ทำได้ง่ายและสามารถขนส่งได้ในปริมาณที่มากกว่าสภาพปกติ (Ross & Ross, 2009) นอกจากนี้การทำให้ปลาสงบทำให้การทำงานของร่างกายและอวัยวะต่าง ๆ ลดลง ดังนั้นปลาจะมีเมแทบอลิซึมลดลงส่งผลให้ความต้องการใช้ออกซิเจนลดลง และอัตราการขับถ่ายของเสียจากเมแทบอลิซึมลดลง (Cooke, Suski, Ostrand, Tufts, & Wahl, 2004; Coyle et al., 2004; McFARLAND, 1959) ซึ่งของเสียจากเมแทบอลิซึมจะส่งผลต่อคุณภาพน้ำที่ใช้ขนส่งปลาเสื่อมลง ทำให้สรีรวิทยาของปลาที่ขนส่งเปลี่ยนแปลง (Ross & Ross, 2009)

การประเมินประสิทธิภาพของยาสลบปลา

ยาสลบปลาในอุดมคติควรชักนำให้เกิดการสลบอย่างรวดเร็ว โดยมีอาการเครียดและพฤติกรรมตื่นตกใจน้อยที่สุด และควรฟื้นจากการสลบได้อย่างรวดเร็วเมื่อนำปลาออกจากยาสลบปลา และยาสลบปลาไม่ควรให้ผลทางสรีรวิทยาที่คงอยู่นาน ควรมีการกำจัดออกจากร่างกายอย่างรวดเร็ว รวมถึงต้องมีความสามารถละลายน้ำสูง มีความสะดวกพร้อมใช้งาน ราคาถูก คุ่มค่า ทั้งนี้ยาสลบปลาควรปลอดภัยสำหรับผู้ใช้งานในระดับขนาดยาที่ใช้ชักนำการสลบ ไม่ควรระคายเคืองเป็นสารก่อมะเร็งหรือเป็นพิษต่อมนุษย์ (Coyle et al., 2004; Ross & Ross, 2009) การประเมินประสิทธิภาพของยาสลบปลาสามารถประเมินได้จากความเข้มข้น (concentration) ของยาสลบปลา และเวลาที่ใช้ในการชักนำการสลบ (induction time) และเวลาที่ฟื้นตัวหลังการสลบ (recovery time) ของปลา ซึ่งอาการสลบและการฟื้นตัวสามารถสังเกตได้จากพฤติกรรมของปลา เช่น การว่ายน้ำ การทรงตัว และการตอบสนองต่อสิ่งเร้า เป็นต้น โดยสามารถประเมินพฤติกรรมในแต่ละระยะของการสลบ (anesthetic stage) และระยะการฟื้นตัว (recovery stage) ได้ดังตาราง 1 และ 2 ตามลำดับ ความเข้มข้นของยาสลบปลาที่มีประสิทธิภาพดีสำหรับการศัลยกรรมปลาจะต้องสามารถชักนำให้ปลาเกิดการสลบจนถึงระยะที่ 3 (surgical anesthesia stage) ภายในระยะเวลา 3 นาที และเมื่อปลาอยู่ในน้ำที่ปราศจากยาสลบจะสามารถฟื้นตัวได้ภายในระยะเวลา 5 นาที นอกจากนี้ความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพชักนำการสลบจะต้องไม่ทำให้ปลาตายหลังจากได้รับยาสลบเป็นเวลา 15 นาที (Marking & Meyer, 1985; Ross & Ross, 2009) และความเข้มข้นของ

ยาสลบปลาที่มีประสิทธิภาพดีสำหรับการขนส่งปลาจะต้องสามารถชักนำให้ปลาเกิดการสลบใน
ระยะที่ 1 (sedation) ตลอดระยะเวลาการขนส่ง (Cooke et al., 2004)

ตาราง 1 พฤติกรรมของปลาในแต่ละระยะของการสลบ

ระยะการสลบ	พฤติกรรมของปลา
การสลบระยะที่ 1	อยู่ในอาการสงบ ทรงตัวอยู่ได้ ปลาไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้าภายนอก ยกเว้นแรงกด การเคลื่อนที่และอัตราการหายใจลดลง
การสลบระยะที่ 2	สูญเสียสมดุร่างกายบางส่วน สูญเสียการควบคุมกล้ามเนื้อ อัตราการหายใจช้าลง
การสลบระยะที่ 3	สูญเสียสมดุร่างกายทั้งหมด ไม่มีการเคลื่อนไหว ไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้า อัตราการหายใจช้ามาก
การสลบระยะที่ 4	หยุดหายใจ หัวใจหยุดเต้น และตาย

ที่มา: ดัดแปลงจาก Mylonas, Cardinaletti, Sigelaki, & Polzonetti-Magni (2005); Ross & Ross (2009)

ตาราง 2 พฤติกรรมของปลาในแต่ละระยะของการฟื้นตัว

ระยะการฟื้นตัว	พฤติกรรมของปลา
ระยะฟื้นเบื้องต้น	สมดุร่างกายเริ่มกลับมา ปลาเริ่มว่ายน้ำแบบไม่มีทิศทาง อัตราการหายใจคงที่
ระยะฟื้นเต็มรูปแบบ	มีการตอบสนองต่อสิ่งเร้า สมดุร่างกายปกติ การว่ายน้ำปกติ หลบหลีกสิ่งกีดขวางได้

ที่มา: ดัดแปลงจาก Mylonas et al. (2005)

ประเภทของยาสลบปลา

ยาสลบปลาสามารถแบ่งตามแหล่งที่มาและการผลิตออกเป็น 2 ประเภท คือ 1. ยาสลบปลาจากสารเคมีสังเคราะห์และ 2. ยาสลบปลาจากสารสกัดธรรมชาติ (สารสกัดจากพืช) (Purbosari, Warsiki, Syamsu, & Santoso, 2019)

1. ยาสลบปลาจากสารเคมีสังเคราะห์

ยาสลบปลาจากสารเคมีสังเคราะห์คือ ยาที่ได้จากการสังเคราะห์โดยปฏิกิริยาทางเคมี ปัจจุบันมีการใช้ยาสลบปลาประเภทสารเคมีสังเคราะห์กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ tricaine methanesulfonate, 2-phenoxyethanol, benzocaine, metomidate, etomidate, quinaldine sulfate, propofol และ ketamine hydrochloride เป็นต้น เนื่องจากยาสลบปลาประเภทนี้มีประสิทธิภาพดีและใช้งานง่าย อย่างไรก็ตามความปลอดภัยยังเป็นปัญหาอยู่สำหรับยาสลบปลาจากสารเคมีสังเคราะห์ เนื่องจากมีรายงานว่าก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อปลาและผู้ใช้งาน ดังแสดงตาราง 3



ตาราง 3 ผลข้างเคียงของยาสลบสารเคมีสังเคราะห์สำหรับปลา

ยาสลบจาก	ผลข้างเคียง	ผู้รายงาน
สารเคมีสังเคราะห์		
Tricaine	-สารก่อมะเร็ง	Al-Yaqout et al. (2012)
Methanesulfonate (MS-222)	-ทำลายจอประสาทตาของปลาและมนุษย์ (retinal deficits) -การบวมของเม็ดเลือดแดง (erythrocyte swelling) -การขาดออกซิเจน (hypoxia) -ระคายเคืองต่อผิวหนังและดวงตา -ภาวะหัวใจเต้นช้า (bradycardia)	Sladky, Swanson, Stoskopf, Loomis, & Lewbart (2001) Ross & Ross (2009) Huang et al. (2010)
Benzocaine	-กดภูมิคุ้มกันปลา (immunodepression)	Ortuno, Esteban, & Meseguer (2002)
2-Phenoxyethanol	-อัตราการเต้นของหัวใจลดลงและความดันโลหิตต่ำ -ระคายเคืองต่อผิวชั้นเยื่อเมือก (mucous membranes) -ลด pH ของเลือด -ก่อให้เกิดอาการผิดปกติด้านประสาทจิตวิทยา (neuropsychological syndrome) -กดการหายใจ (hypoventilation) -เป็นพิษต่อระบบประสาท (neurotoxic effects)	Fredricks, Gingerich, & Fater (1993) Hseu, Yeh, Chu, & Ting (1998) Neiffer & Stamper (2009) Mußhoff, Madeja, Binding, Witting, & Speckmann (2000)
Quinaldine	-ระคายเคืองต่อผิวหนังและดวงตา -ทำให้กระจกตาเสียหาย (corneal damage)	C. Harms & Bakal (1995) Ross & Ross (2009)
Metomidate	-ทำให้ความดันเลือดลดลง	Fredricks et al. (1993)

Collymore (2020) ได้ศึกษาพฤติกรรมการใช้ยาสลบปลาจากสารเคมีสังเคราะห์พบว่า tricaine methanesulfonate (MS-222) เป็นยาสลบปลาจากสารเคมีสังเคราะห์หลักที่มีการใช้ในปลาอย่างแพร่หลายมากที่สุดในงานวิจัย เนื่องจากมีประสิทธิภาพดีสำหรับการชักนำให้เกิดการสลบและฟื้นจากการสลบอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ MS-222 เป็นยาสลบปลาชนิดเดียวที่ได้รับการขึ้นทะเบียนจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration, FDA) โดยอนุญาตให้ใช้ MS-222 กับสัตว์น้ำบางชนิด (Matthews & Varga, 2012)

MS-222 มีสูตรทางเคมีคือ $C_9H_{11}O_2N+CH_3SO_3H$ มีชื่อทางเคมีว่า 3-aminobenzoic acid ethylester methanesulfonate เป็นอนุพันธ์ของ Benzocaine (Sirimanapong et al., 2020) โดย MS-222 มีฤทธิ์ไปจับกับโซเดียมชาแนล (Na^+ channels) และโพแทสเซียมชาแนล (K^+ channels) เพื่อปิดกั้นการไหลของโซเดียมและโพแทสเซียมในกระแสประสาท ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการส่งสัญญาณประสาท นำไปสู่การผ่อนคลายกล้ามเนื้อและทำให้สัตว์เกิดการสลบ (Collymore, 2020) อย่างไรก็ตามบางรายงานพบว่า MS-222 มีฤทธิ์เป็นกรด (pH 3.0) ซึ่งมีผลทำให้เกิดปัญหาในสัตว์ได้ เช่น การเกิดการระคายเคืองต่อเนื้อเยื่อ (Sirimanapong et al., 2020)

2. ยาสลบปลาจากสารสกัดธรรมชาติ (สารสกัดจากพืช)

การใช้ยาสลบปลาจากสารสกัดธรรมชาติได้กลายเป็นทางเลือกสำหรับอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงปลาและการวิจัยเพื่อทดแทนการใช้ยาสลบปลาจากสารเคมีสังเคราะห์ (Mirghaed et al., 2018) หนึ่งในสารสกัดธรรมชาติที่กำลังได้รับการศึกษาคูณสมบัติชักนำการสลบในปลาเพิ่มขึ้นคือ น้ำมันหอมระเหย ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสกัดจากพืช (Aydin & Barbas, 2020; Bianchini et al., 2017) นอกจากนี้ยังมีการประเมินประสิทธิภาพชักนำการสลบและรายงานผลกระทบในด้านข้อดีและข้อเสียของน้ำมันหอมระเหยที่มีต่อปลาชนิดต่าง ๆ ปัจจุบันมีรายงานการวิจัยประสิทธิภาพของการเป็นยาสงบประสาทและยาสลบปลาของสารออกฤทธิ์ภายในน้ำมันหอมระเหยจากพืชชนิดต่าง ๆ ดังตาราง 4

ตาราง 4 ฤทธิ์ยาสลับของน้ำมันหอมระเหยในปลาชนิดต่าง ๆ

น้ำมันหอมระเหย	สารออกฤทธิ์	ชนิดปลา	ผู้วิจัย
ข่า (<i>Alpinia galangal</i> L.)	1,8-cineole	ปลานิล (<i>Oreochromis niloticus</i> (Linnaeus, 1758))	Pikulkaew, Khumpirapang, Chaisri, & Okonogi (2017)
โรสวูด (<i>Aniba rosaeodora</i> Ducke)	Linalool	ปลาทอง (<i>Carassius auratus</i> (Linnaeus, 1758))	Kizak, Can, Danabaş, & Can (2018)
ส้มซ่า (<i>Citrus aurantium</i> L.)	Limonene	silver catfish (<i>Rhamdia quelen</i> (Quoy & Gaimard, 1824))	Lopes et al. (2018)
ลาเวนเดอร์ (<i>Lavandula hybrida</i> Mill.)	Linalool Linalyl acetate	ปลาหมอม้าลาย (<i>Amatitlania</i> <i>nigrofasciata</i> (Günther, 1867))	Can, Kizak, Can, & Özçiçek (2019)
<i>Lippia alba</i> Mill.	Linalool β -myrcene	ปลานิล (<i>Oreochromis niloticus</i> (Linnaeus, 1758))	Hohlenwerger et al. (2016)
กะเพรา (<i>Ocimum sanctum</i> L.)	Methyl eugenol Eugenol	ปลาคาร์ป (<i>Cyprinus carpio</i> (Linnaeus, 1758))	Khumpirapang et al. (2018)
กานพลู (<i>Syzygium</i> <i>aromaticum</i> L.)	Eugenol	ปลาการ์ตูนส้มขาว (<i>Amphiprion ocellaris</i> (Cuvier, 1830))	Pedrazzani & Neto (2016)

น้ำมันหอมระเหยกานพลู (*Syzygium aromaticum* L.) เป็นหนึ่งในยาสลับปลาจากสารสกัดธรรมชาติที่มีการศึกษาวิจัยจำนวนมาก (Javahery et al., 2012; Priborsky & Velisek, 2018) เนื่องจากกานพลูมีสารออกฤทธิ์สำคัญคือ ยูจีนอล (eugenol) ที่สามารถชักนำการสลับของปลาได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยกานพลูยังได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีต้นทุนต่ำ มีปริมาณมาก ความเป็นพิษต่ำ และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Mirghaed et al., 2018; Mitjana et al., 2014) Mitjana และคณะ (2014) รายงานความปลอดภัยของน้ำมันหอมระเหยกานพลูว่ายาสลับจากน้ำมันหอมระเหยกานพลูมีความปลอดภัยมากกว่า MS-222 และมีความเป็นพิษน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับ MS-222 และ 2-phenoxyethanol

อย่างไรก็ตามมีการศึกษาบางส่วนรายงานผลข้างเคียงของน้ำมันหอมระเหยกานพลู เช่น ทำให้ระดับคอร์ติซอล (cortisol) และกลูโคสในเลือดสูง และเซลล์นิวโทรฟิล (neutrophil) ในเลือดเพิ่มขึ้น (Hoseini, Hosseini, & Nodeh, 2011; Mirzargar et al., 2011; Velisek, Svobodova, Piackova, Groch, & Nepejchalova, 2005) นอกจากนี้ยังพบว่ายูจีนอลมีผลทำลายเนื้อเยื่อตับและไตในสัตว์อื่น ๆ (Goulet, Vachon, & Helie, 2011; Mizutani, Satoh, & Nomura, 1991) ทั้งนี้ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาผลข้างเคียงของยาสลับปลาสารสกัดจากพืชจำนวนมากดังแสดงในตาราง 5

ตาราง 5 ผลข้างเคียงของยาสลบสวารสกัดจากพืชสำหรับปลา

ยาสลบปลาจาก สารสกัดธรรมชาติ	ผลข้างเคียง	ผู้รายงาน
กานพลู (<i>Syzygium aromaticum</i> L.)	-เป็นพิษต่อระบบประสาทและตับใน ปลา -ทำให้ระดับคอร์ติซอล (cortisol) และ กลูโคสในเลือดสูง -เซลล์นิวโทรฟิล (neutrophil) ในเลือด เพิ่มขึ้น -ระบบหายใจล้มเหลว (ventilatory failure) -ทำให้เกิดภาวะหยุดหายใจ (medullary collapse) -เกิดการเพิ่มขึ้นของชั้น gill lamellae	Sladky et al. (2001) Velisek, Svobodova, Piackova, Groch, & Nepejchalova (2005) Hoseini, Hosseini, & Nodeh (2011) Mirzargar et al. (2011) Kumari, Abidi, & Parwez (2018)
<i>Lippia sidoides</i> Cham.	-เกิดการหดตัวกล้ามเนื้อ (involuntary muscle contractions)	L. d. L. Silva et al. (2013)
<i>Aloysia gratissima</i> Gillies & Hook	-เกิดการหดตัวกล้ามเนื้อ (involuntary muscle contractions) -ปลาพื้นตัวซ้ำ เป็นอัมพาต และอาจส่งผลให้ ปลาตาย	Simone Cristina Benovit et al. (2012) Simone C Benovit et al. (2015) Bianchini et al. (2017)
<i>Lippia alba</i> Mill.	-ส่งผลให้เกิดความเครียดในปลา	de Freitas Souza et al. (2019)

ปลาม้าลาย

ข้อมูลทั่วไปของปลาม้าลาย

ปลาม้าลาย (Zebra danio; Zebrafish) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Danio rerio* (Hamilton, 1822) เป็นปลาน้ำจืดเขตร้อน จัดอยู่ในวงศ์ Cyprinidae มีถิ่นกำเนิดในภูมิภาคเอเชียใต้ กระจายตัวอยู่ทั่วไปตามบริเวณลุ่มแม่น้ำที่สำคัญของประเทศอินเดีย บังคลาเทศและเนปาล ตามธรรมชาติ ปลาม้าลายมักจะอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่ค่อนข้างใสสะอาดบริเวณน้ำตื้น แอ่งน้ำนิ่งหรือน้ำที่ไหลช้า โดยมีพืชน้ำและดินตะกอนปกคลุมอยู่ใต้น้ำ (Spence, Gerlach, Lawrence, & Smith 2008) ปลาม้าลายกินแมลง แพลงก์ตอนสัตว์ สาหร่ายและเศษซากเป็นอาหาร (McClure, McIntyre, & McCune, 2006) คุณภาพน้ำในแหล่งที่อยู่อาศัยของปลาม้าลายแตกต่างกันมากคือ ช่วงของ pH มีค่า 5.9-8.1 และช่วงอุณหภูมิ 16-38 องศาเซลเซียส (Engeszer, Patterson, Rao, & Parichy, 2007; Spence et al., 2006) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปลาม้าลายสามารถปรับตัวและทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่แตกต่างได้ดี

ปลาม้าลายเป็นปลาขนาดเล็ก มีลำตัวค่อนข้างกลม ตัวเต็มวัยขนาดลำตัวยาวประมาณ 4 เซนติเมตร ผิวลำตัวปกคลุมด้วยเกล็ดขนาดเล็ก ด้านข้างลำตัวจะมีลายพาดตามความยาวของลำตัว จำนวนประมาณ 5-7 เส้น มีครีบเดี่ยว (unpaired fins) 3 ครีบ ครีบคู่ (paired fins) 2 คู่ ลำตัวปลาม้าลายจะมีสีพื้นของลายพาดเป็นแถบสีน้ำเงิน สีทอง และสีเงินสลับกัน (Spence et al., 2008) ทั้งนี้ปลาม้าลายเพศผู้จะมีลำตัวเรียวยาวกว่าเพศเมียแต่จะมีขนาดลำตัวเล็กกว่าเพศเมีย โดยลำตัวเพศเมียจะมีลักษณะอ้วนป้อมและใหญ่กว่า



1 cm

ภาพประกอบ 2 ปลาฆ่าลายเพศผู้ตัวเต็มวัย

ที่มา: ภาพถ่ายโดย นางสาวณัฐนิชา รื่นถ้อย



1 cm

ภาพประกอบ 3 ปลาฆ่าลายเพศเมียตัวเต็มวัย

ที่มา: ภาพถ่ายโดย นางสาวณัฐนิชา รื่นถ้อย

ความสำคัญของปลาฆ่าลาย

ปลาฆ่าลายเป็นสัตว์ทดลองที่ได้รับความนิยมอย่างมากในการใช้เป็นแบบจำลองในการทดสอบการศึกษาทางด้านวิทยาศาสตร์ เช่น พัฒนาการของสัตว์มีกระดูกสันหลัง พันธุกรรม สรีรวิทยาและพฤติกรรม (Grunwald & Eisen, 2002; Kalueff et al., 2013) รวมไปถึงด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ เช่น ประสาทวิทยา (Nguyen, Stewart, & Kalueff, 2014) และพิษวิทยา

(Hinton et al., 2005) ตลอดจนใช้ศึกษาและทดลองด้านเภสัชวิทยาทางน้ำและทางพิษวิทยาเพื่อทดสอบยาใหม่ (Kalueff et al., 2016) การใช้ปลาม้าลายเป็นสัตว์ทดลองมีข้อดีหลายประการ เช่น มีข้อมูลการศึกษาพฤติกรรมที่ครอบคลุมสำหรับตัวอ่อนและตัวเต็มวัย (Kalueff et al., 2013) ง่ายต่อการเลี้ยงและผสมพันธุ์ มีความทนทานสูง สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในช่วงอุณหภูมิและ pH กว้าง สืบพันธุ์ได้เร็วตลอดปี ระยะสืบพันธุ์ตามธรรมชาติใช้เวลา 5-6 เดือน (Engeszer et al., 2007) และเป็นปลาที่มีวงจรชีวิตสั้นจึงเหมาะต่อการใช้เป็นสัตว์ทดลอง (นิรานี บินนิมะ, 2558) ในปัจจุบันปลาม้าลายเป็นทางเลือกใหม่เพื่อใช้ศึกษาความปลอดภัยของยาและโมเลกุลขนาดเล็ก สารสกัดจากพืชและสารเคมีต่าง ๆ เนื่องจากใช้ระยะเวลาทดสอบสั้นและค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาถูก (Kalueff et al., 2016) นอกจากนี้ยังใช้สารที่ต้องการทดสอบในปริมาณที่น้อยกว่าทำให้เหมาะกับงานวิจัยที่ต้องการทดสอบในเบื้องต้น

นอกจากนี้ปลาม้าลายยังจัดเป็นปลาสวยงามที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยมีการนำเข้าและเพาะเลี้ยงปลาม้าลายเพื่อเป็นปลาสวยงามในหลายประเทศ โดยเฉพาะในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งในประเทศไทย เนื่องจากเป็นปลาขนาดเล็ก ลำตัวมีลวดลายสวยงาม คล้ายกับม้านลายทำให้เป็นที่ต้องการของตลาด ปัจจุบันมีการเพาะขยายพันธุ์ปลาม้าลายเพื่อประโยชน์ในเชิงพาณิชย์อย่างแพร่หลายทั้งภายในประเทศและส่งออกไปยังต่างประเทศ ธุรกิจปลาสวยงามถือว่าเป็นธุรกิจการเกษตรที่สำคัญเนื่องจากปลาสวยงามสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายและเป็นที่ต้องการของตลาด โดยธุรกิจปลาสวยงามมีการขยายตัวและมีแนวโน้มเติบโตอย่างต่อเนื่อง มีประเทศที่ทำธุรกิจปลาสวยงามทั่วโลกมากกว่า 90 ประเทศและมีมูลค่ารวมประมาณหมื่นล้านบาท (สำนักงานเกษตรและสหกรณ์ จังหวัดราชบุรี, 2563)

การใช้ยาสลบสำหรับปลาม้าลาย

การใช้ยาสลบปลาอย่างเหมาะสมเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการลดความเครียดและความเจ็บปวดที่อาจเป็นผลมาจากการทำหัตถการและขั้นตอนการทำวิจัยที่หลากหลายสำหรับปลาม้าลาย โดยตัวอย่างผลการวิจัยมีดังนี้ MS-222 เป็นยาสลบปลาที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิจัยเนื่องจากได้รับการอนุมัติใช้สำหรับสัตว์ทั่วโลก นอกจากนี้ MS-222 ยังเป็นยาสลบปลาที่ดีที่สุดสำหรับปลาม้าลาย เนื่องจากให้ผลช้กนการสลบและฟื้นจากการสลบได้อย่างรวดเร็ว ความเข้มข้นที่ใช้ในการช้กนการสลบสำหรับศัลยกรรมคือ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่ทำให้ปลาม้าลายตายในระหว่างการวางยาสลบและหลังการวางยาสลบใน 14 วัน (Collymore, Tolwani, Lieggi, & Rasmussen, 2014) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า MS-222 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาหลายอย่าง เช่น การเปลี่ยนแปลงของระบบหัวใจและหลอดเลือด ทำให้

อัตราการหายใจลดลงส่งผลให้เกิดภาวะขาดออกซิเจนในปลา ทำให้ภาวะเลือดเป็นกรดจากระบบหายใจส่งผลให้เกิดภาวะหัวใจล้มเหลวและทำให้ปลาตาย (Carter, Woodley, & Brown, 2011) นอกจากนี้มีรายงานว่าการใช้ยาสลบปลา MS-222 ก่อให้เกิดพฤติกรรมหลีกเลี่ยง (aversive behaviors) ในปลาม้าลาย เช่น พฤติกรรมกระวนกระวาย ว่ายน้ำผิดปกติ เกิดการกระตุกของกล้ามเนื้อทำให้ปลากระโดด (Readman, Owen, Murrell, & Knowles, 2013) น้ำมันกานพลูที่มีสารออกฤทธิ์ชักนำการสลบคือยูจีนอล ไอโซยูจีนอล (isoeugenol) และเมทิลยูจีนอล (methyleugenol) (Matthews & Varga, 2012) สามารถชักนำการสลบปลาม้าลายได้เร็วกว่า MS-222 และใช้ปริมาณต่ำกว่า MS-222 แต่ใช้เวลาฟื้นสลบนานมากกว่า โดยความเข้มข้นที่สามารถชักนำการสลบคือ 60-100 มิลลิกรัมต่อลิตร (Grush, Noakes, & Moccia, 2004) อย่างไรก็ตาม Readman และคณะ (2013) รายงานว่าไอโซยูจีนอลส่งผลให้เกิดพฤติกรรมหลีกเลี่ยงในปลาม้าลาย และมีรายงานว่าน้ำมันกานพลูส่งผลให้เกิดพฤติกรรมหลีกเลี่ยงในปลาม้าลายน้อยกว่า MS-222 (Wong, von Keyserlingk, Richards, & Weary, 2014) ทั้งนี้ส่วนประกอบบางอย่างของน้ำมันกานพลู เช่น เมทิลยูจีนอล อาจเป็นสารก่อมะเร็ง น้ำมันกานพลูจึงไม่ได้รับการอนุมัติจากองค์การอาหารและยาให้ใช้เป็นยาสลบสำหรับสัตว์ (Matthews & Varga, 2012) อย่างไรก็ตามยูจีนอลยังมีจำหน่ายทั่วไปและ AQUI-S (50% ไอโซยูจีนอล) มีจำหน่ายในบางประเทศ metomidate hydrochloride เป็นยาสลบปลาใช้สำหรับลดความเครียดระหว่างการขนส่ง โดยเป็นยาสงบประสาทที่มีประสิทธิภาพสำหรับปลาม้าลายโดยสามารถชักนำการสงบประสาทได้อย่างรวดเร็วที่ความเข้มข้น 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และที่ความเข้มข้น 6-10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการสลบตื่น (ระยะที่ 2) โดยไม่ทำให้ปลาม้าลายตายในระหว่างการวางยาสลบและหลังการวางยาสลบใน 14 วัน แต่การฟื้นสลบใช้เวลานาน (ประมาณ 10 นาที) (Collymore et al., 2014) อย่างไรก็ตาม metomidate hydrochloride ส่งผลให้เกิดการกระตุกของกล้ามเนื้อปลาทำให้ไม่เหมาะสำหรับใช้เป็นยาสลบปลาในการศัลยกรรม (Collymore, 2020) รายงานการทดสอบยาสลบต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับปลาม้าลายแสดงในตาราง 6

ตาราง 6 ยาสลบที่ใช้สำหรับปลาฆ่าตาย

ชนิดยาสลบ	ความเข้มข้น	ระยะการสลบ
Tricaine methansulfonate (MS-222)	50 mg/L	สงบประสาท (ระยะที่ 1)
	50-100 mg/L	สลบตื่น (ระยะที่ 2)
	100-200 mg/L	สลบลึก (ระยะที่ 3)
Benzocaine	25-100 mg/L	สลบตื่น (ระยะที่ 2)
2-Phenoxyethanol	200-300 mL/L	สลบตื่น (ระยะที่ 2)
Metomidate hydrochloride	2-4 mg/L	สงบประสาท (ระยะที่ 1)
	6-10 mg/L	สลบตื่น (ระยะที่ 2)
Lidocaine hydrochloride	300 mg/L	สลบตื่น (ระยะที่ 2)
	325 mg/L	สลบลึก (ระยะที่ 3)
Clove oil/eugenol/isoeugenol	2-5 mg/L	สงบประสาท (ระยะที่ 1)
	60-100 mg/L	สลบลึก (ระยะที่ 3)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Collymore (2020)

การวางยาสลบปลาควรมีระยะเวลาให้ปลาปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมอย่างน้อย 2 สัปดาห์ ก่อนการให้ยาสลบเพื่อลดความเครียด ป้องกันการเจ็บป่วยและการตายของปลา นอกจากนี้ควรงดอาหารก่อนการให้ยาสลบเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมงเพื่อป้องกันการสำรอกของปลา และยังช่วยลดการผลิตของเสียจากไนโตรเจน ซึ่งช่วยรักษาคุณภาพน้ำขณะให้ยาสลบปลา ในการให้ยาสลบปลาควรรักษาคุณภาพน้ำให้อยู่ในช่วงคงที่หรือเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด เพื่อป้องกันความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่เกิดจากความแตกต่างของพารามิเตอร์คุณภาพน้ำต่าง ๆ นอกจากนี้ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับปลาสามารถส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของยาสลบปลา เช่น ชนิดของปลา ขนาดหรือน้ำหนักปลา อายุ เพศ และความเครียด เป็นต้น (Ross & Ross, 2009)

น้ำมันหอมระเหยมะลิ

น้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย (essential oils) เป็นกลุ่มสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้นจัดเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) มีความสำคัญต่อการดำรงอยู่และปกป้องพืชที่ผลิตสารนั้น กลุ่มสารนี้มีลักษณะเป็นของเหลว มีกลิ่นเฉพาะตัว ระเหยง่ายที่อุณหภูมิห้อง และไม่ละลายในน้ำ (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008; Stringaro, Colone, & Angiolella, 2018) น้ำมันหอมระเหยสามารถสกัดได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืช โดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ (water distillation) หรือการกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) รวมถึงสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (Aziz et al., 2018) โดยน้ำมันหอมระเหยมีองค์ประกอบหลักทางเคมีที่สำคัญคือ เทอร์ปีน (terpenes) เทอร์ปีนอยด์ (terpenoids) ฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid) และองค์ประกอบอื่น ๆ ของอะโรมาติก (aromatic) และอะลิฟาติก (aliphatic) ซึ่งมีลักษณะเฉพาะคือน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Bakkali et al., 2008; Stringaro et al., 2018)

น้ำมันหอมระเหยมีประโยชน์ต่อมนุษย์เนื่องจากคุณสมบัติออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย เช่น มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ มีฤทธิ์ต่อระบบทางเดินหายใจ มีฤทธิ์ต่อระบบไหลเวียนเลือด และที่สำคัญน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต่อระบบประสาท (Chang & Shen, 2011; Lizarraga-Valderrama, 2021; Stringaro et al., 2018) ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อระบบประสาทโดยน้ำมันหอมระเหยทำปฏิกิริยากับสารสื่อประสาทที่เกี่ยวข้องกับสภาวะตื่นตัว (Rotiroti, Cristina Tassorelli, & Bagezza, 2009) ในทางกลับกันสารประกอบหลักบางตัวของน้ำมันหอมระเหยอาจส่งผลกระทบต่อระบบประสาท คลายความวิตกกังวล เช่น ไลนาโลลอล (linalool), ไลโมนีน (limonene) และไพเนน (pinene) เป็นต้น (Lima et al., 2013; Linck et al., 2010; Satou et al., 2013)

ข้อมูลพฤกษศาสตร์ของมะลิ

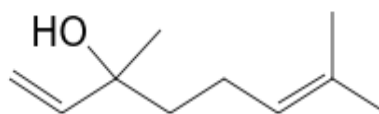
มะลิ (Common jasmine) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Jasminum officinale* L. จัดอยู่ในวงศ์ Oleaceae มีถิ่นกำเนิดในพื้นที่เขตร้อนและกึ่งเขตร้อนในแถบทวีปเอเชีย โดยขึ้นกระจายอยู่ในเขตร้อนหรือเขตอบอุ่นทั่วโลก ได้แก่ อัฟกานิสถาน บังกลาเทศ จีน อิหร่าน เนปาล ปากีสถาน ทาจิกิสถาน ทิเบต ตุรกี (POWO, 2020) มะลิเป็นไม้พุ่มรอเลื้อยขนาดเล็กจนถึงขนาดกลาง มีความสูงประมาณ 0.4-5 เมตร กิ่งอ่อนมีขนใบเป็นใบเดี่ยวออกเป็นคู่ตรงกันข้ามกัน ใบประกอบแบบขนนก โคนใบสอบเรียว ปลายใบแหลม ขอบใบเรียบเป็นมันสีเขียวเข้ม ใบกว้างประมาณ 2-3 เซนติเมตร และยาวประมาณ 3-5 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อแยกแขนง ออกดอกตามซอกใบและปลายกิ่ง กลีบดอกสีขาวรูปไข่ หลังกลีบสีชมพู มีกลิ่นหอม (Chang, Qiu, & Green, 1996)

คุณสมบัติของมะลิ

มะลิ (*Jasminum officinale* L.) มีสรรพคุณทางยาหลายด้าน ได้แก่ มีประสิทธิภาพรักษาโรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ (Al-Khazraji, 2015) มีฤทธิ์เป็นยากดประสาทส่วนกลาง ยากล่อมประสาท ยาสงบ และยาสมานแผล (Duke et al., 2002; Khare, 2007) นอกจากนี้ยังนำมาใช้รักษาภาวะซีมเศร้า ความอ่อนล้าทางประสาท และสภาวะที่เกี่ยวข้องกับความเครียด นอกจากนี้ยังใช้สำหรับรักษาโรคหัวใจ อาการไอ กล้องเสียงอักเสบ อาการปวดรอบเดือน อาการปวดตามร่างกาย ความผิดปกติของมดลูก ปัญหาผิวหนัง เช่น ผิวน้ำแข็ง ผิวน้ำมัน อาการระคายเคือง ผิวนอบบาง รวมถึงอาการกล้ามเนื้อกระดูกและเคล็ดขัดยอก (Din, 2006)

สารออกฤทธิ์สำคัญในน้ำมันหอมระเหยมะลิ

น้ำมันหอมระเหยมะลิมีสารไลนาโลอล (linalool) เป็นองค์ประกอบ (Khare, 2007; Prakash, Sahoo, & Rout, 2012) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญที่สามารถชักนำการสลบในปลาได้ (Heldwein et al., 2014) ไลนาโลอล มีชื่อทางเคมีว่า 3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol สูตรโมเลกุล คือ $C_{10}H_{18}O$ มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group; -OH) ที่ตำแหน่ง 3 เป็นสารประเภทแอลกอฮอล์ มีคาร์บอนเป็นโครงสร้างหลัก 10 อะตอมโดยมีการจัดเรียงตัวแบบไม่เป็นวง (acyclic monoterpene alcohols) และมีออกซิเจนอยู่ในสูตรโครงสร้าง เรียกว่า oxygenated monoterpenes (Pereira, Severino, Santos, Silva, & Souto, 2018) การมีหมู่ฟังก์ชันแอลกอฮอล์อยู่ในโครงสร้างทางเคมีของไลนาโลอลทำให้เกิดซั้วกับสารประกอบจึงทำให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมีได้ ไลนาโลอลละลายได้ดีในน้ำเนื่องจากมีโครงสร้างซั้วไฮโดรคาร์บอน อย่างไรก็ตามไลนาโลอลสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ เป็นต้น รวมถึง น้ำมัน และโพรพิลีนไกลคอล (Api et al., 2015; Ilc, Parage, Boachon, Navrot, & Werck-Reichhart, 2016)



ภาพประกอบ 4 โครงสร้างทางเคมีของ 3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol (linalool)

ที่มา: Chemicals (2014)

ตาราง 7 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของไลนาโลอล

คุณสมบัติทางกายภาพและเคมี	ไลนาโลอล
สูตรเคมี	$C_{10}H_{18}O$
ลักษณะที่ปรากฏ	ของเหลวไม่มีหรือสีเหลืองอ่อนๆ
กลิ่น	กลิ่นหอมของดอกไม้คล้ายกับน้ำมันมะกรูด
น้ำหนักโมเลกุล	154.25 g/mol
ความหนาแน่น	0.87 g/mL (at 25 °C)
ความสามารถในการละลายน้ำ	0.00159 g/mL (at 25 °C)
จุดเยือกแข็ง	น้อยกว่า -74 °C
จุดหลอมเหลว	น้อยกว่า 20° C

ที่มา: ดัดแปลงจาก Pereira, Severino, Santos, Silva, & Souto (2018)

ไลนาโลอลพบได้ในน้ำมันหอมระเหยของพืชที่มีกลิ่นหอมหลายชนิด โดยมีคุณสมบัติช่วยให้สงบ ผ่อนคลาย ต้านความเครียด และช่วยส่งเสริมการนอนหลับ (Linck et al., 2010) เนื่องจากไลนาโลอลมีคุณสมบัติทางชีวภาพต่อระบบประสาทดังแสดงตาราง 8 นอกจากนี้ ปัจจุบันเครื่องสำอางหลายชนิด เช่น น้ำหอม แชมพู และผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดส่วนใหญ่มีไลนาโลอลเป็นองค์ประกอบเนื่องจากมีกลิ่นหอม (Amiri, Shahpiri, Asadollahi, Momenbeik, & Partow, 2016; Aprotosoiaie, Hăncianu, Costache, & Miron, 2014; Lapczynski, Letizia, & Api, 2008)

ตาราง 8 คุณสมบัติทางชีวภาพของไลนาโลออลต่อระบบประสาท

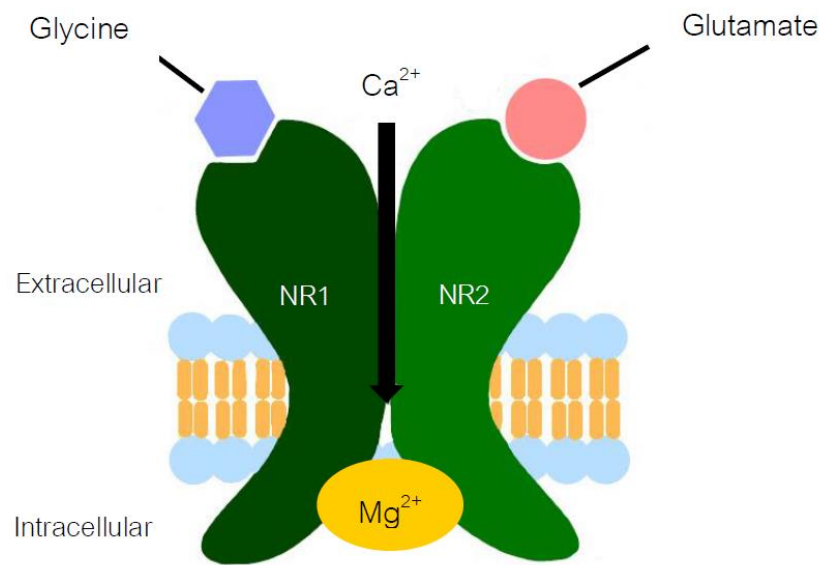
คุณสมบัติทางชีวภาพ	กลไกการออกฤทธิ์	ผู้รายงาน
ฤทธิ์ระงับปวด	กระตุ้นกลไก peripheral opioid ในการมีปฏิกิริยากับ opioid receptors และ หลั่งสารระงับปวดกลุ่ม opioid (endogenous opioid) ในระบบประสาทส่วนปลาย	Sakurada et al. (2011)
	ลดการกระตุ้นความเจ็บปวดจากการมีปฏิกิริยากับ ionotropic glutamatergic receptors โดยเฉพาะกับ N-methyl-D-aspartate (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) และ kainate receptors	Batista et al. (2008)
ฤทธิ์คลายความวิตกกังวล	คลายความวิตกกังวลจากการมีปฏิกิริยากับเซลล์ประสาทโดยการยับยั้ง voltage-dependent sodium channels	Leal-Cardoso et al. (2010)
ฤทธิ์กล่อมประสาท	ออกฤทธิ์กล่อมประสาทผ่าน monoaminergic system โดยมีปฏิกิริยากับ serotonin 1A receptor และ α 2 adrenergic receptors	Guzmán-Gutiérrez, Bonilla-Jaime, Gómez-Cansino, & Reyes-Chilpa (2015)

กลไกการออกฤทธิ์ของไลนาโลออล

ไลนาโลออลเป็นสารที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของระบบกลูตาเมเทอร์จิก (glutamatergic system) ในระบบประสาทส่วนกลาง (Elisabetsky, Marschner, & Onofre Souza, 1995) สารสื่อประสาทที่สำคัญในระบบนี้คือ กลูตาเมต (glutamate) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทชนิดกระตุ้น (excitatory neurotransmitter) ทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของเซลล์ประสาทโดยเพิ่มการส่งสัญญาณประสาทในระบบประสาทส่วนกลาง

ไลนาโลออลจะไปยับยั้งการทำงานของ glutamatergic receptor ชนิด N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) ซึ่งตัวรับชนิดนี้อาศัยสารสื่อประสาทกลูตาเมตเป็นตัวกระตุ้นส่งผลให้ร่างกายตื่นตัว (Elisabetsky, Brum, & Souza, 1999) โดย N-methyl-D-aspartate receptor เป็นตัวรับในระบบประสาทส่วนกลางที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampus) สมองส่วนหน้า (frontal lobe) และซีรีเบลลัม (cerebellum) NMDA receptor จะประกอบด้วย NR1 2 subunits และ NR2 2 subunits จัดเรียงตัวกันเป็นช่องไอออน ในภาวะพัก (resting state) ของศักย์เยื่อหุ้มเซลล์บริเวณด้านในของช่องไอออนจะมี Mg^{2+} ขวางไว้ไม่ให้ Ca^{2+} ผ่านช่องไอออนเข้ามาได้ โดยการเปิดของช่องไอออนนั้นจะต้องอาศัยการจับของกลูตาเมตที่ NR2 subunit และไกลซีน (glycine) ที่ NR1 subunit เมื่อมี depolarization เกิดขึ้น Mg^{2+} จะหลุดออก ทำให้ Ca^{2+} สามารถผ่านช่องไอออนเข้ามาได้และเกิดการส่งกระแสประสาทต่อไปได้ (ภาพประกอบ 5) (Waxman & Lynch, 2005; เมธา อภิวัฒน์ากุล, 2557) อย่างไรก็ตามหากสัตว์ได้รับไลนาโลออล สารนี้จะเข้าไปแย่งจับที่บริเวณจดจำกลูตาเมตแบบ competitive antagonist (Elisabetsky et al., 1999) ส่งผลให้ช่องไอออนปิดทำให้ Ca^{2+} ไม่สามารถผ่านช่องไอออนเข้าสู่เซลล์ประสาทได้จึงเกิดการยับยั้งการส่งกระแสประสาทที่ระบบประสาทส่วนกลางเป็นผลให้เกิดการระงับความรู้สึกและสัตว์สูญเสียการตอบสนองของร่างกายจึงทำให้สัตว์เกิดการสลบ (ภาพประกอบ 6) (Tsuchiya, 2017)

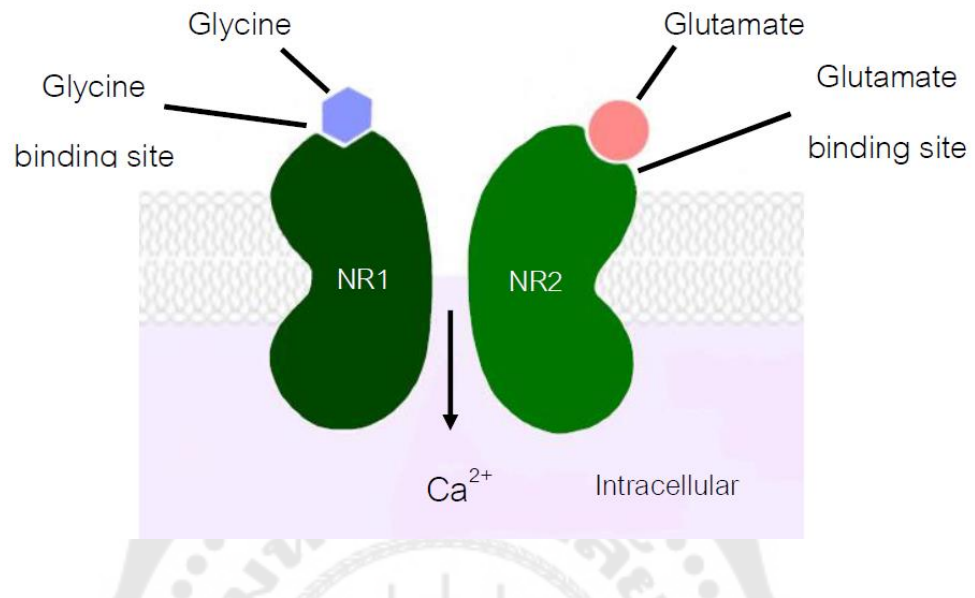
ทั้งนี้การศึกษางานวิจัยก่อนหน้าพบว่าไลนาโลออลมีฤทธิ์ลดการหลั่งกลูตาเมตที่ส่วนปลายของจุดประสานประสาทของเปลือกสมอง (cortical synaptosomes) ของหนู (Silva Brum, Emanuelli, Souza, & Elisabetsky, 2001) นอกจากนี้พบว่าไลนาโลออลยับยั้งการจับของกลูตาเมตกับตัวรับในเปลือกสมอง (cortex) แบบ competitive antagonist และยับยั้งการทำงานของกระแสประสาทโดยไปขัดขวางการทำงานของ NMDA receptor ในหนู (Elisabetsky et al., 1999)



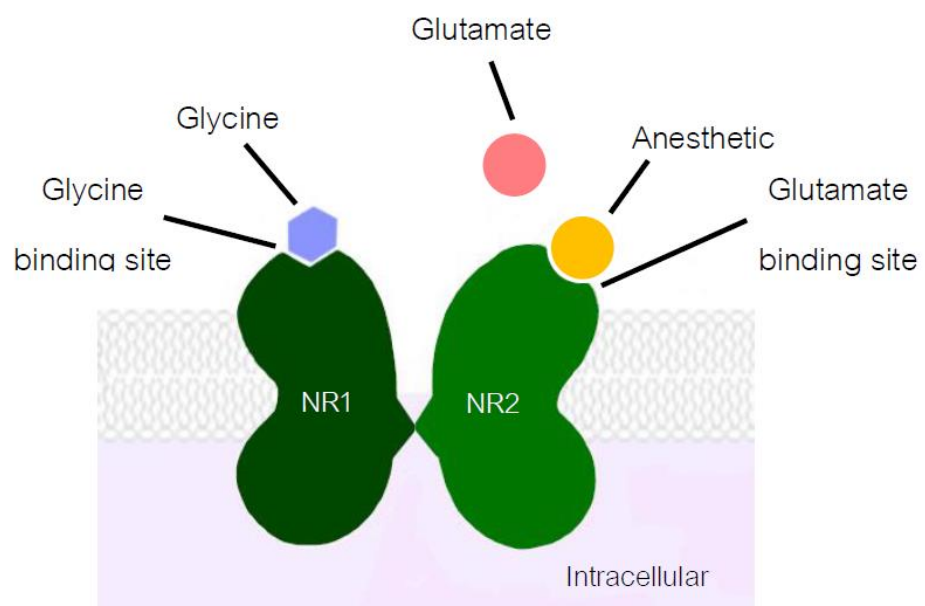
ภาพประกอบ 5 โครงสร้างและการทำงานของ N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Benarroch (2011)

Activated NMDAR



Competitive antagonist



ภาพประกอบ 6 กลไกการออกฤทธิ์ของยาสงบ

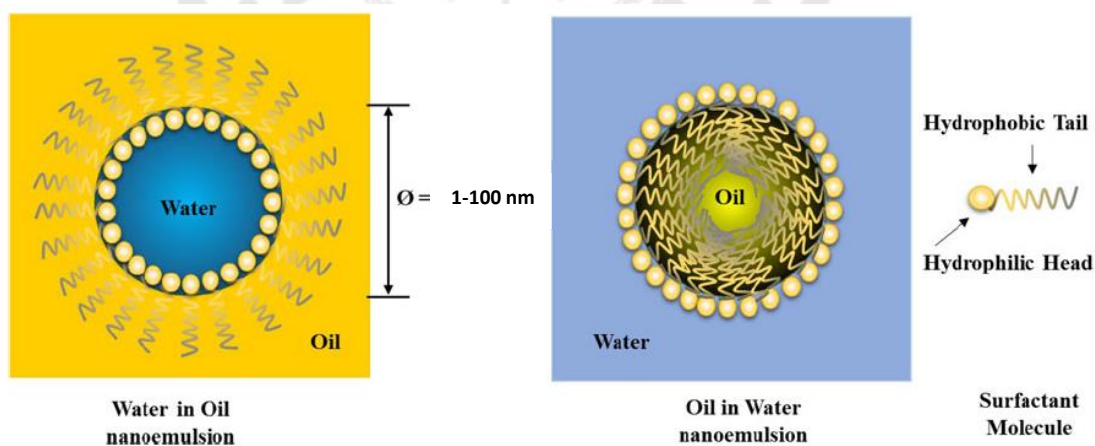
ที่มา: ดัดแปลงจาก Sinatra, Jahr, & Watkins-Pitchford (2010)

จากการศึกษาวิจัยก่อนหน้าพบว่าไลนาโลอลจาก *Lippia alba* Mill. มีฤทธิ์ในการสงบประสาทปลาตุกเงิน (*Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)) ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครลิตรต่อลิตร และมีประสิทธิภาพชักนำการสลบที่ความเข้มข้น 180 ไมโครลิตรต่อลิตร (Heldwein et al., 2014) น้ำมันหอมระเหยของ *Lippia alba* Mill. มีประสิทธิภาพสงบประสาทปลาตุกเงินที่ความเข้มข้น 5–20 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำการสลบที่ 100–500 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้การใช้น้ำมันหอมระเหย *Lippia alba* Mill. ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังช่วยยับยั้งระดับคอร์ติซอลซึ่งเป็นผลมาจากความเครียดในปลาและไม่ส่งผลต่อกลิ่นหรือรสชาติของเนื้อปลาตุกเงิน (da Cunha et al., 2010) นอกจากนี้ไลนาโลอลจากน้ำมันหอมระเหยของ *Lippia alba* Mill. ที่ความเข้มข้น 100 และ 300 ไมโครลิตรต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการสลบของปลาตุกเงินได้อย่างมีประสิทธิภาพและไม่ทำให้เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อตับและไต และไม่ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับคอร์ติซอลในพลาสมาซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีสำหรับยาสลบปลา (de Freitas Souza et al., 2018)

นาโนอิมัลชัน

ข้อมูลทั่วไปของนาโนอิมัลชัน

นาโนอิมัลชัน (nanoemulsion) เป็นระบบคอลลอยด์ (colloidal systems) ประเภทหนึ่ง ประกอบด้วยของเหลวอย่างน้อย 2 ชนิด ซึ่งไม่ละลายในกันและกันหรือไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เช่น น้ำกับน้ำมัน ทำให้ผสมรวมเป็นเนื้อเดียวกันและไม่แยกชั้นโดยใช้แรงกลจากเครื่องมือและสารลดแรงตึงผิวช่วยให้เกิดการกระจายตัวที่เสถียร (stable dispersion) ของของเหลวต่างชนิดภายในระบบและเกิดความคงตัวอยู่ได้นาน โดยนาโนอิมัลชันเป็นสภาวะของของเหลวชนิดหนึ่งที่แตกตัวเป็นหยดเล็ก ๆ เรียกว่า วัฏภาคภายในหรือส่วนที่กระจายตัว (internal or dispersed phase) กระจายตัวแทรกอยู่ในของเหลวชนิดหนึ่ง เรียกว่า วัฏภาคภายนอกหรือส่วนที่ต่อเนื่อง (external or continuous phase) โดยทั่วไประบบที่ได้จากการเตรียมนาโนอิมัลชันประกอบด้วย น้ำ น้ำมัน สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม (co-surfactant) นาโนอิมัลชันมีลักษณะเป็นของเหลวใส สามารถคงตัวอยู่ได้จากผิวฟิล์มของสารลดแรงตึงผิวซึ่งเป็นโมเลกุล amphiphilic ประกอบด้วยโมเลกุลที่มี 2 ส่วน คือ ส่วนที่มีขั้ว (hydrophilic) และส่วนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic) อยู่ในโมเลกุลเดียวกัน (ภาพประกอบ 7) โดยคุณสมบัติของนาโนอิมัลชันที่เสถียรควรมีขนาดอนุภาค 1-100 นาโนเมตร ตัวยาหรือสารสำคัญสามารถนำส่งด้วยระบบนี้ได้ (Jafari & McClements, 2018; Kale & Deore, 2017; พิมพ์ร ลีลาพรพิสิฐ, 2540)



ภาพประกอบ 7 นาโนอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมันและนาโนอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำที่ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิว

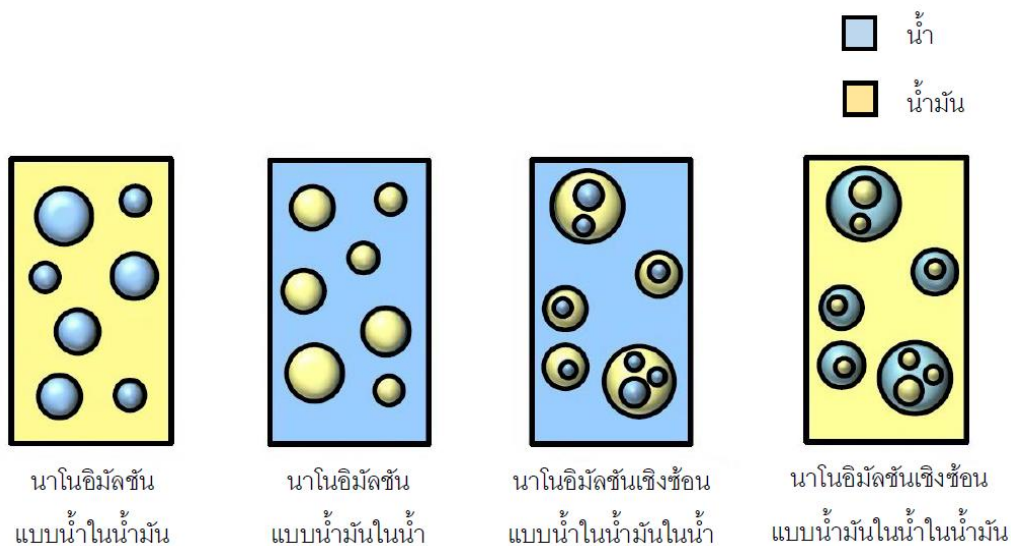
ที่มา: ดัดแปลงจาก Che Marzuki, Wahab, & Abdul Hamid (2019)

ประเภทของนาโนอิมัลชัน

นาโนอิมัลชันสามารถจำแนกตามลักษณะการกระจายตัวของวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมันในระบบได้เป็น 3 ประเภท คือ

1. นาโนอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน (water-in-oil; W/O) หมายถึง นาโนอิมัลชันที่มีน้ำเป็นวัฏภาคภายในกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคน้ำมัน
2. นาโนอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ (oil-in-water; O/W) หมายถึง นาโนอิมัลชันที่มีน้ำมันเป็นวัฏภาคภายในกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคน้ำ
3. นาโนอิมัลชันเชิงซ้อน (multiple emulsion) ได้แก่ นาโนอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมันในน้ำ (water-in-oil-in-water; W/O/W) และแบบน้ำมันในน้ำในน้ำมัน (oil-in-water-in-oil; O/W/O)

นาโนอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมันในน้ำประกอบด้วยหยดน้ำที่อยู่ภายในหยดน้ำมันที่ใหญ่กว่าซึ่งถูกแขวนลอยอยู่ในวัฏภาคน้ำ และนาโนอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำในน้ำมัน ประกอบด้วยหยดน้ำมันที่อยู่ภายในหยดน้ำที่ใหญ่กว่าซึ่งถูกแขวนลอยอยู่ในวัฏภาคน้ำมัน (Nour, 2018) ประเภทของนาโนอิมัลชันแสดงดังภาพประกอบ 8

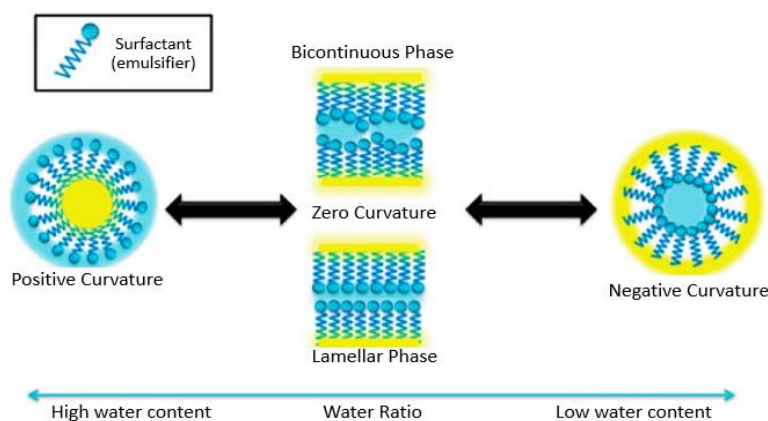


ภาพประกอบ 8 ประเภทของนาโนอิมัลชัน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Jafari & McClements (2018)

การผลิตนาโนอิมัลชัน

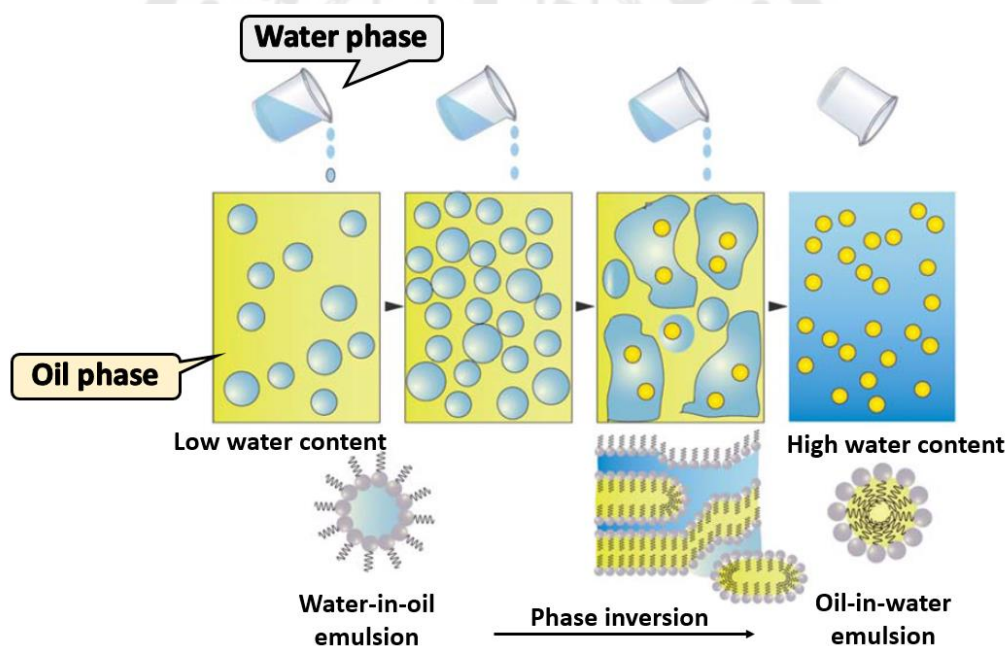
ในการผลิตนาโนอิมัลชันมีกระบวนการผลิต 2 รูปแบบ คือ กระบวนการผลิตแบบพลังงานสูง (high-energy method) การผลิตนี้จะอาศัยแหล่งพลังงานกลจากเครื่องมือเป็นหลัก เช่น การใช้เครื่องปั่นความเร็วสูง การใช้เครื่องโฮโมจีไนซ์เซอร์แบบความดันสูง (high pressure homogenizer) และ การใช้เครื่องอัลตราซาวด์หรือเครื่องกำเนิดคลื่นเหนือเสียง (ultrasound generator) เป็นต้น และกระบวนการผลิตแบบพลังงานต่ำ (low-energy method) การผลิตนี้จะใช้พลังงานเคมีของสารลดแรงตึงผิวหรือส่วนประกอบในระบบที่ปลดปล่อยออกมาจากการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการจัดเรียงโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวระหว่างกระบวนการผลิต และใช้พลังงานกลต่ำช่วยให้เกิดการแตกตัวหรือสร้างอนุภาคขนาดเล็กในระบบ โดยการผลิตนาโนอิมัลชันกระบวนการพลังงานต่ำแบ่งเป็น 2 วิธีหลักคือ การผลิตแบบ spontaneous emulsification method และการผลิตแบบการเปลี่ยนแปลงวัฏภาค (phase inversion method) (Jafari & McClements, 2018; วราภรณ์ ประเสริฐ, 2560) งานวิจัยนี้ ผู้วิจัยใช้วิธีการผลิตนาโนอิมัลชันโดยกระบวนการพลังงานต่ำคือ การผลิตแบบการเปลี่ยนแปลงวัฏภาค เป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงวัฏภาคหรือการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการจัดเรียงโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว โดยเปลี่ยนความโค้งของโครงสร้างสารลดแรงตึงผิวจากลบเป็นบวกจะทำให้เกิดนาโนอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ ในทางตรงข้ามหากเปลี่ยนความโค้งของโครงสร้างสารลดแรงตึงผิวจากบวกเป็นลบจะทำให้เกิดนาโนอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมันดังภาพประกอบ 9 (วราภรณ์ ประเสริฐ, 2560)



ภาพประกอบ 9 การเปลี่ยนแปลงความโค้งของโครงสร้างสารลดแรงตึงผิวระหว่างกระบวนการผลิตนาโนอิมัลชันแบบการเปลี่ยนแปลงวัฏภาค

ที่มาดัดแปลงจาก : วราภรณ์ ประเสริฐ (2560)

การเตรียมนาโนอิมัลชันแบบพลังงานต่ำด้วยวิธีการเปลี่ยนแปลงวัฏภาค ทำโดยแบ่งสารเป็น 2 วัฏภาคคือ วัฏภาคน้ำประกอบด้วย น้ำกลั่นและสารลดแรงตึงผิวร่วม และวัฏภาคน้ำมันประกอบด้วย น้ำมันและสารลดแรงตึงผิว และทำการไทเทรตวัฏภาคน้ำลงในสารผสมของวัฏภาคน้ำมันที่มีการใช้พลังงานกลจากเครื่องกวนในการปั่นสารผสมทำให้เกิดการแตกตัวของหยดของเหลว วิธีนี้เป็นการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารโดยการผกผันของนาโนอิมัลชันจากแบบน้ำในน้ำมันให้กลายเป็นแบบน้ำมันในน้ำโดยใช้คุณสมบัติที่ เรียกว่าวิธี catastrophic phase inversion (CPI) ดังภาพประกอบ 10 ทั้งนี้กระบวนการผกผันของนาโนอิมัลชันและขนาดอนุภาคของนาโนอิมัลชันที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของน้ำมันและสารลดแรงตึงผิว อัตราเร็วของเครื่องมือที่ใช้ในการปั่นสาร และอัตราเร็วของการไทเทรตวัฏภาคน้ำลงในวัฏภาคน้ำมัน เป็นต้น (Jafari & McClements, 2018; Jafari, Paximada, Mandala, Assadpour, & Mehrnia, 2017)



ภาพประกอบ 10 การผลิตนาโนอิมัลชันด้วยวิธี catastrophic phase inversion (CPI)

ที่มา: ดัดแปลงจาก McClements (2011)

ยาสลับปลานาโนอิมัลชัน

ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาผลของยาสลับปลาจากน้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีการปรับรูปแบบให้น้ำมันหอมระเหยละลายน้ำได้ และเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งยา โดยใช้วิธีการผลิตเป็นนาโนอิมัลชัน มีรายงานการศึกษาพบว่า นาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยกานพลูที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดการสลับและฟื้นตัวเร็วขึ้นในปลาทอง (*Carassius auratus* L.) เมื่อเทียบกับน้ำมันหอมระเหยกานพลูที่ละลายด้วยเอทานอล (Gholipourkanani, Gholinasab-Omran, Ebrahimi, & Jafaryan, 2015) สอดคล้องกับการศึกษาการผลิตสูตรนาโนอิมัลชันและสูตรระบบนำส่งยาที่เกิดไมโครอิมัลชันเอง (self-microemulsifying drug delivery system) ของน้ำมันหอมระเหยข่าและกานพลูที่ใช้เวลาชักนำการสลับของปลาคาร์ป (*Cyprinus carpio* L.) และปลาทอง (*Carassius auratus* L.) ได้เร็วกว่าน้ำมันหอมระเหยที่ละลายด้วยเอทานอล และไม่ส่งผลให้ปลาเกิดพฤติกรรมตื่นตกใจ (Kheawfu, Pikulkaew, Rades, Müllertz, & Okonogi, 2018; Khumpirapang et al., 2017) นอกจากนี้การศึกษาของ Kheawfu, Pikulkaew, Chaisri และ Okonogi (2017) ได้รายงานถึงศักยภาพของนาโนอิมัลชันในการปรับปรุงความสามารถในการละลายน้ำของน้ำมันหอมระเหยกานพลู ทำให้เพิ่มการดูดซึมยูจีนอล โดยไม่ต้องใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการนำส่งยา และรายงานว่านาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยกานพลูใช้เวลาชักนำการสลับของปลานิลน้อยกว่าสารละลายน้ำมันหอมระเหยกานพลูกับเอทานอลในความเข้มข้นของยูจีนอลเท่ากันที่ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร

ดังนั้นการปรับรูปแบบเป็นนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยเพื่อนำมาศึกษาการชักนำการสลับสำหรับปลาจึงเป็นทางเลือกที่ดีในการหลีกเลี่ยงการใช้เอทานอลที่ส่งผลกระทบต่อปลา และเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งของยาสลับปลาให้ดียิ่งขึ้นเพื่อประโยชน์ในการใช้งานสำหรับการวิจัยในห้องปฏิบัติการและการใช้งานในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงปลา ทั้งนี้การใช้ยาสลับปลาจากน้ำมันหอมระเหยมีความปลอดภัยกว่าการใช้ยาสลับปลาประเภทสารเคมีสังเคราะห์ที่ส่งผลกระทบต่อปลาและมนุษย์

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี

วัสดุ อุปกรณ์

วัสดุ อุปกรณ์	ยี่ห้อ
จานเพาะเชื้อ (petri dish) 25 x 25 มิลลิเมตร	Pyrex
กระจกสไลด์ 26 x 76 มิลลิเมตร	Citulus
แผ่นปิดสไลด์ 22 x 22 มิลลิเมตร	Menzel-glaser
กล่องเหลี่ยมไม 20.5 x 30 x 10.5 เซนติเมตร	Nam Ngai Hong
บีกเกอร์ (beaker) 20-250 มิลลิลิตร	Pyrex
แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)	Pyrex
ไมโครปิเปต (micro pipette) 10-1,000 มิลลิลิตร	Gilson
ตู้ปลาขนาด 20 นิ้ว (25 x 51 x 31 เซนติเมตร)	-
กล่องพลาสติก 16.5 x 23.5 x 11.5 เซนติเมตร	-
ถาดสี่เหลี่ยม 10 x 15 เซนติเมตร	-

เครื่องมือ

เครื่องมือ	ยี่ห้อ	รุ่น
เครื่องชั่งดิจิตอล	Satorius	DM750
เครื่องวัดอุณหภูมิและออกซิเจนที่ละลายน้ำ	Extech	DO700
เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter)	Extech	pH-100
เครื่องปั๊มเติมอากาศ	Resun	AP-10
กล้องถ่ายรูป	Apple	13
กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	Leica	DM750
เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer)	As one	RSH-1D
เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโทรเมตรี	AGILENT	7890GC/ 7000C
เครื่องวัดอนุภาคนาโน (Zetasizer)	malvern	ZSP
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	JEOL	JEM-1400

สารเคมี

สารเคมี	ยี่ห้อ
น้ำมันหอมระเหยมะลิ (jasmine essential oils)	Krungthepchemi
MS-222	Sigma-aldrich
Bouin's fixative	BIO optica
Xylene	RCI labscan
Paraplast	Surgipath
Hematoxylin	Sigma-aldrich
Eosin	Sigma-aldrich
Permount	Sigma-aldrich
Ethyl alcohol	Merck
Propylene glycol	Ajax Finechem
Tween 80	Sigma-aldrich
น้ำกลั่น	-

วิธีการทดลอง

จริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง

การขออนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ การปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลอง ต้องมีการขออนุญาตการใช้สัตว์ทดลองเพื่อรับรองว่าผู้วิจัยได้ปฏิบัติตามต่อสัตว์อย่างถูกต้องตามหลักจริยธรรมภายใต้การอนุญาตการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์เลขที่ SWU-A-009-2565

สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ ปลาหม้อลาย (*Danio rerio* (Hamilton, 1822)) ตัวเต็มวัย สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) จากฟาร์มปลาจังหวัดนครปฐม น้ำหนักเฉลี่ย 335.82 ± 19.33 มิลลิกรัม ความยาวลำตัวเฉลี่ย 4.30 ± 0.16 เซนติเมตร จำนวน 150 ตัว

การเลี้ยงปลาหม้อลายสำหรับการทดลอง

นำปลาหม้อลายมาเลี้ยงปรับสภาพภายในห้องปฏิบัติการก่อนการทดสอบอย่างน้อย 2 สัปดาห์ โดยน้ำประปาปราศจากคลอรีนในตู้ปลาขนาด 20 นิ้ว (25 x 51 x 31 เซนติเมตร) บรรจุน้ำตู้ละ 30 ลิตร โดยแบ่งเลี้ยงปลาตู้ละ 50 ตัว จำนวน 3 ตู้ อุณหภูมิแต่ละตู้ประมาณ 25 องศาเซลเซียส อัตราส่วนของแสงสว่างกลางวัน/กลางคืน 12/12 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรดต่าง 7-8 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำมากกว่า 6 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้เครื่องปั๊มเติมอากาศตลอดเวลา เปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 2 วัน และใส่น้ำยาปรับสภาพน้ำ (MA clean clear) เพื่อปรับสภาพ

น้ำหลังจากมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกครั้ง ให้อาหารปลาสำเร็จรูป (SAKURA®) ปริมาณมากเกินพอ 2 ครั้งต่อวัน โดยให้ปลาอดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนการทดลอง เพื่อป้องกันการสำรอกขณะที่ทำการทดลองการชักนำการสลบ (Neiffer & Stamper, 2009)

การเตรียมน้ำมันหอมระเหยมะลิเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการชักนำการสลบ

ในการทดสอบประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลบปลาของสารละลายน้ำมันหอมระเหยมะลิใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย โดยทำการผสมน้ำมันหอมระเหยมะลิกับเอทานอลสัมบูรณ์ (absolute ethanol) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 (Rodrigues et al., 2021)

การทดสอบประสิทธิภาพชักนำการสลบปลาของน้ำมันหอมระเหยมะลิ (การทดสอบเบื้องต้น)

ในการทดสอบเบื้องต้นเพื่อประเมินหาช่วงระดับความเข้มข้นของสารละลายน้ำมันหอมระเหยมะลิที่สามารถชักนำการสลบในปลาม้าลาย ใช้ น้ำมันหอมระเหยมะลิที่ระดับความเข้มข้น 0.10-0.80 มิลลิลิตรต่อลิตร (Aydin & Barbas, 2020) โดยมีเกณฑ์ประเมินเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อไปคือ ปลาม้าลายต้องสลบในระยะที่ 3 (ตาราง 1) ภายใน 5 นาที และฟื้นจากการสลบภายใน 10 นาที และไม่ส่งผลให้ปลาตายระหว่างการทดลองโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ตัว

การทดสอบประสิทธิภาพชักนำการสลบของน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับการคัดสรรปลาม้าลาย

ในการทดสอบประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลบของน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับการคัดสรรปลาม้าลาย ใช้ น้ำมันหอมระเหยมะลิที่ความเข้มข้น 0.30, 0.35 และ 0.40 มิลลิลิตรต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ได้จากการประเมินการทดสอบเบื้องต้น โดยมีเกณฑ์คัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการสลบเพื่อทำคัดสรรปลา คือ ปลาม้าลายต้องสลบในระยะที่ 3 (ตาราง 1) ภายใน 3 นาที และสามารถฟื้นตัวจากการสลบได้ภายใน 5 นาที (Marking & Meyer, 1985; Ross & Ross, 2009) โดยที่ปลาไม่ตายหลังจากการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ตัว โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

ขั้นที่ 1 เตรียมน้ำประปาปราศจากคลอรีนปริมาตร 2 ลิตร ใส่กล่องสี่เหลี่ยมใสขนาด 20.5 x 30 x 10.5 เซนติเมตร จากนั้นผสมสารละลายน้ำมันหอมระเหยมะลิในระดับความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ

ขั้นที่ 2 สุ่มจับปลาโดยวิธีสุ่มอย่างง่ายจากตู้มาทีละตัว ใส่น้ำที่ผสมสารละลายน้ำมันหอมระเหยมะลิ จากนั้นจับเวลา และสังเกตพฤติกรรมในแต่ละระยะการสลบจนกระทั่งปลาสลบถึงระยะที่ 3 ซึ่งเป็นระยะของการสลบที่สูงที่สุดในขณะที่ปลายังมีชีวิต โดยปลาจะสูญเสียสมดุลใน

การควบคุมร่างกายทั้งหมด ไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้าและไม่เคลื่อนที่ ตรวจสอบโดยการใช้แท่งแก้ว กดบริเวณครีบหางเพื่อดูการตอบสนองของปลา โดยสารผสมหนึ่งความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ตัว

ขั้นที่ 3 นำปลาที่สลบระยะที่ 3 ย้ายไปที่จานเพาะเชื้อ จากนั้นจับเวลารักษาภาวะสลบ 10 นาที เพื่อจำลองระยะเวลาการทำหัตถการและการศัลยกรรมเล็ก

ขั้นที่ 4 ย้ายปลาจากจานเพาะเชื้อไปยังกล่องสี่เหลี่ยมใส บรรจุน้ำประปาปราศจากคลอรีน ปริมาตร 2 ลิตร เพื่อให้ปลาฟื้นตัวจากการสลบ และจับเวลาพร้อมทั้งสังเกตพฤติกรรมจนกระทั่ง ปลาฟื้นตัวสมบูรณ์

ขั้นที่ 5 ย้ายปลาที่ฟื้นตัวอย่างสมบูรณ์ลงสู่ตู้ปลาที่บรรจุน้ำปราศจากคลอรีน และมีการให้ออกซิเจนตลอดเวลา บันทึกอัตราการตายของปลาภายใน 24 ชั่วโมง

การทดสอบประสิทธิภาพชักนำการสลบของน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับการขนส่งปลาม้าลาย

ในการทดสอบประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลบของน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับการขนส่งปลาม้าลายใช้น้ำมันหอมระเหยมะลิที่มีความเข้มข้น 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07 และ 0.08 มิลลิลิตรต่อลิตร โดยมีเกณฑ์คัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการสลบเพื่อการขนส่งปลา คือ ปลาม้าลายต้องสลบในระยะที่ 1 (ตาราง 1) ตลอดการจำลองการขนส่งระยะสั้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Cooke et al., 2004) โดยที่ปลาไม่ตายในระหว่างการทดลอง และสามารถฟื้นตัวจากการสลบในระยะที่ 1 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

ขั้นที่ 1 เตรียมน้ำประปาปราศจากคลอรีนปริมาตร 2 ลิตร ใส่กล่องพลาสติกขนาด 16.5 x 23.5 x 11.5 เซนติเมตร จากนั้นผสมสารละลายน้ำมันหอมระเหยมะลิในระดับความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ

ขั้นที่ 2 สุ่มจับปลาโดยวิธีสุ่มอย่างง่ายจากตู้จำนวน 10 ตัว ใส่ไปในกล่องพลาสติกที่มีน้ำปริมาณ 2 ลิตร ที่ผสมสารละลายน้ำมันหอมระเหยมะลิ จากนั้นนำกล่องพลาสติกวางบนเครื่องเขย่า (Shaker) ที่ความเร็ว 70 รอบต่อนาที เพื่อจำลองการขนส่ง จับเวลา และสังเกตการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมตามที่แสดงในระยะเวลาการสลบ (ตาราง 1) โดยใน 30 นาทีแรกสังเกตพฤติกรรมและบันทึกผลทุก ๆ 5 นาที หลังจาก 30 นาทีแรก กลับมาสังเกตพฤติกรรมและบันทึกผลทุก 30 นาที จนครบ 2 ชั่วโมง โดยการสลบในระยะที่ 1 ปลาจะอยู่ในอาการสงบ ทรงตัวอยู่ได้ ปลาไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้าภายนอกยกเว้นแรงกดและการเคลื่อนที่ลดลง

ขั้นที่ 3 เมื่อครบกำหนดเวลา ย้ายปลาทั้งหมดจากกล่องพลาสติกไปยังกล่องสี่เหลี่ยมใส บรรจุน้ำประปาปราศจากคลอรีนปริมาณ 2 ลิตร เพื่อให้ปลาฟื้นตัว และจับเวลาพร้อมทั้งสังเกตพฤติกรรมจนกระทั่งปลาฟื้นตัวสมบูรณ์

ขั้นที่ 4 ย้ายปลาที่ฟื้นตัวอย่างสมบูรณ์ลงสู่ตู้ปลาที่บรรจุน้ำปราศจากคลอรีน และมีการให้ออกซิเจนตลอดเวลา

การตรวจสอบคุณภาพน้ำ

ตรวจคุณภาพน้ำในการทดสอบประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลบสำหรับการศัลยกรรมและการขนส่งปลา โดยตรวจสอบเปรียบเทียบคุณภาพน้ำ 3 ครั้ง คือ ก่อนเดิมสารชักนำการสลบ หลังใส่สารชักนำการสลบ และหลังการทดสอบ คุณภาพน้ำที่ทำการตรวจสอบได้แก่ ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen, DO) อุณหภูมิ (Temperature) และค่าความเป็นกรดต่าง (pH)

การทดสอบชุดควบคุมผลบวก (positive control)

การทดสอบชุดควบคุมผลบวกทดลองโดยใช้ MS-222 ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการชักนำให้เกิดการสลบระยะที่ 3 เพื่อการศัลยกรรมปลาม้าลาย (Collymore et al., 2014) และใช้ MS-222 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการชักนำให้เกิดการสลบระยะที่ 1 เพื่อการขนส่งปลาม้าลาย (Lockwood, Parker, Wilson, & Frankel, 2017) โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลบปลาของน้ำมันหอมระเหยมะลิ

การทดสอบชุดควบคุมผลลบ (negative control)

การทดสอบชุดควบคุมผลลบ ทดลองโดยใช้เอทานอลสัมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิลิตรต่อลิตร สำหรับการศัลยกรรมปลาม้าลาย และใช้เอทานอลสัมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิลิตรต่อลิตร สำหรับการขนส่งปลาม้าลาย ซึ่งความเข้มข้นของเอทานอลที่ใช้ทดสอบเป็นปริมาณสูงสุดสำหรับใช้ทำละลายน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ใช้ทดลองการชักนำการสลบในปลาม้าลายสำหรับการศัลยกรรมและการขนส่ง โดยทำการทดลองให้ปลาม้าลายอยู่ในสารละลายเอทานอลสัมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 3 นาที สำหรับการศัลยกรรม และทดลองให้ปลาม้าลายอยู่ในสารละลายเอทานอลสัมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สำหรับการขนส่ง สังเกตพฤติกรรมและบันทึกผล

การวิเคราะห์สารองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยมะลิ

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยมะลิโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) โดยเตรียมตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยมะลิในเอทานอลที่ความเข้มข้น 50 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ซิลิกาคอลัมน์ (silica column) และใช้แก๊สพา (carrier gas) คือฮีเลียม (He) อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 250 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที โดยให้อุณหภูมิคงที่ 7 นาที โดยอุณหภูมิของจุดฉีดสาร (injector) และดีเทคเตอร์ (detector) อยู่ที่ 250 องศาเซลเซียส ฉีดสารตัวอย่างปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร เข้าสู่เครื่อง และตรวจวัดชนิดของสารประกอบโดยเครื่องแมสสเปกโตรเมตรี ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 70 eV และตั้งค่าช่วงคลื่นของการวัดค่ามวลต่อประจุที่ 33-500 m/z

การเตรียมนานอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิ

เตรียมนานอิมัลชันด้วยเทคนิค catastrophic phase inversion (CPI) โดยดัดแปลงจาก Zhang, Vriesekoop, Yuan และ Liang (2014) โดยเตรียมนานอิมัลชันครั้งละ 50 มิลลิลิตร การเตรียมนานอิมัลชันแบ่งออกเป็น 2 วัฏภาค ได้แก่ วัฏภาคน้ำ (water phase) เตรียมโดยผสมน้ำกลั่นกับสารลดแรงตึงผิวร่วมคือ propylene glycol ในอัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 41 มิลลิลิตร และวัฏภาคน้ำมัน (oil phase) เตรียมโดยผสมน้ำมันหอมระเหยมะลิปริมาตร 2 มิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 4 โดยปริมาตร กับสารลดแรงตึงผิวคือ Tween 80 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 14 โดยปริมาตร ทำการผสมวัฏภาคน้ำมันให้เข้ากันได้ก่อนโดยใช้ magnetic stirrer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันโดยการหยดวัฏภาคน้ำลงในวัฏภาคน้ำมัน ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที กวนสารผสมด้วยเครื่อง magnetic stirrer เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นเก็บรักษานานอิมัลชันไว้ในอุณหภูมิห้องและพ้นจากแสงเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของนานอิมัลชัน

การวิเคราะห์คุณสมบัติของนานอิมัลชัน

วัดขนาดอนุภาคในระดับนาโนสเกลโดยใช้เทคนิคการกระเจิงของแสง (dynamic light scattering) วัดค่าการกระจายตัว (polydispersity index; PDI) และศักย์ไฟฟ้าซีตา (zeta potential) ด้วยเครื่อง Zetasizer โดยวิเคราะห์คุณสมบัติของนานอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิเข้มข้นร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตั้งค่ามุมที่เกิดการกระเจิง 90 องศา สแกนวัดผล 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาค ค่าการกระจายตัว และศักย์ไฟฟ้าซีตา (Zhang et al., 2014) โดยคุณสมบัติของนานอิมัลชันที่เสถียรควรมีขนาดอนุภาค 1-100 นาโนเมตร (Kale & Deore, 2017) ค่าการกระจายตัวซึ่งแสดงถึงระบบที่อนุภาคมีขนาดเท่ากัน (monodisperse system) และการกระจายขนาดหยดเป็นเนื้อเดียวกันควรมีค่าอยู่ที่ 0-0.3 (Acevedo-Fani, Salvia-

Trujillo, Rojas-Graü, & Martín-Belloso, 2015; Kheawfu et al., 2021) และค่าศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำซึ่งแสดงถึงการผลักของไฟฟ้าสถิตระหว่างอนุภาคในการกระจายตัว โดยหากศักย์ไฟฟ้าที่ตามีค่า -2.5 ถึง -30 มิลลิโวลต์ จะทำให้เกิดความเสถียรสูงต่อการกระจายตัวและป้องกันการรวมกลุ่มกันของหยดอนุภาคได้ดี (พิมพ์พร ลีลาพรพิสิฐ, 2540)

ตรวจสอบสัณฐานวิทยาของอนุภาคเพื่อศึกษารูปร่างและขนาดของอนุภาคนาโนอิมัลชัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope; TEM) เจือจางนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะละ 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำตัวอย่างมาหยดใส่บน copper grids ที่มี formvar carbon เคลือบเป็นโพสิเมอร์ ที่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อให้ตัวอย่างแห้ง จากนั้น copper grids จะถูกใส่เข้าไปในตัวยึดตัวอย่างของกล้อง TEM (JEM-1400) ใช้ Accelerating Voltage ที่ 80 kV ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง และบันทึกภาพสัณฐานวิทยาของอนุภาคด้วยกล้อง CCD (Charge Coupled Device)

การทดสอบประสิทธิภาพชักนำการสลายของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะละ สำหรับการศัลยกรรมพลาสมาลาย

ในการทดสอบประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลายของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะละสำหรับการศัลยกรรมพลาสมาลาย ใช้นาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะละที่มีความเข้มข้น 0.30, 0.35 และ 0.40 มิลลิลิตรต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพชักนำการสลายของน้ำมันหอมระเหยมะละที่ทำละลายด้วยเอทานอล โดยมีเกณฑ์คัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมและขั้นตอนการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพชักนำการสลายของน้ำมันหอมระเหยมะละสำหรับการศัลยกรรมพลาสมาลาย

การทดสอบประสิทธิภาพชักนำการสลายของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะละ สำหรับการขนส่งพลาสมาลาย

ในการทดสอบประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลายของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะละสำหรับการขนส่งพลาสมาลาย ใช้นาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะละที่มีความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07 และ 0.08 มิลลิลิตรต่อลิตร โดยมีเกณฑ์คัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมและขั้นตอนการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพชักนำการสลายของน้ำมันหอมระเหยมะละสำหรับการขนส่งพลาสมาลาย

การตรวจสอบพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหียงอกและตับของปลาม้าลายหลังได้รับสาร

ทดสอบ

การเตรียมเนื้อเยื่อ

ตรวจสอบพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหียงอกและตับของปลาม้าลายหลังได้รับสารทดสอบ ได้แก่

1. น้ำมันหอมระเหยมะลิความเข้มข้น 0.40 มิลลิลิตรต่อลิตร ที่ละลายด้วยเอทานอล
2. เอทานอล ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิลิตรต่อลิตร
3. นาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ความเข้มข้น 0.35 มิลลิลิตรต่อลิตร
4. ส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิวความเข้มข้น 8.4 มิลลิลิตรต่อลิตร และ
5. MS-222 ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยตัดเนื้อเยื่อส่วนหัวและลำตัวแช่ในสารละลายคงสภาพเนื้อเยื่อ (Bouin's fixative) ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำประปาหลาย ๆ ครั้ง ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยการแช่เนื้อเยื่อในเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50, 70, 90, 95 และเอทานอลสัมบูรณ์ ขึ้นตอนละ 30 นาทีตามลำดับ จากนั้นแช่เนื้อเยื่อในสารละลายไซลีนผสมเอทานอลสัมบูรณ์อัตราส่วน 1 ต่อ 1 เป็นเวลา 30 นาที แล้วแช่ไซลีน 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที ทำการแทรกพาราฟลาสต์เข้าเนื้อเยื่อ โดยการแช่ชิ้นเนื้อเยื่อในสารละลายพาราฟลาสต์ผสมไซลีนอัตราส่วน 1 ต่อ 1 จากนั้นนำไปแช่ตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปลี่ยนพาราฟลาสต์ 2 ครั้ง และนำไปแช่ตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อฝังลงในพาราฟลาสต์ แล้วตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (microtome) ที่ความหนา 10 ไมโครเมตร นำชิ้นตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ตัดลงบนกระจกสไลด์ แล้ววางสไลด์บนแผ่นให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้จนแห้งและนำสไลด์ไปย้อมด้วยสีฮีมาทอกซาลีนและอีโอซิน (Hematoxylin & Eosin, H&E)

การย้อมสีฮีมาทอกซาลีนและอีโอซิน

แช่สไลด์ชิ้นเนื้อเยื่อในไซลีน 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แช่สารละลายไซลีนผสมเอทานอลสัมบูรณ์อัตราส่วน 1 ต่อ 1 เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่เอทานอลสัมบูรณ์ 5 นาที และแช่เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95, 90, 80 และ 70 ความเข้มข้นละ 5 นาที ตามลำดับ จากนั้นแช่น้ำกลั่น 5 นาที แล้วนำเนื้อเยื่อไปย้อมด้วยสีฮีมาทอกซาลีนเป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำประปา ต่อมนำสไลด์ไปแช่เอทานอลความเข้มข้น ร้อยละ 70, 80, 90 และ 95 ความเข้มข้นละ 10 นาที แล้วจึงย้อมด้วยสีอีโอซินเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นแช่สไลด์ลงในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นเวลา 2 นาที แช่ในเอทานอลสัมบูรณ์ 10 นาที แล้วแช่ในสารละลายไซลีนผสมเอทานอลสัมบูรณ์อัตราส่วน 1 ต่อ 1 เป็นเวลา 10 นาที และแช่ในไซลีน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ และเปอร์เมาททำเป็นสไลด์ถาวรแล้วนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ปลาสลบภายใน 3 นาที โดยหาค่าเฉลี่ย และ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ
2. วิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ปลาฟื้นจากการสลบภายในเวลา 5 นาที โดยหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ
3. ทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยระยะเวลาในการชักนำให้เกิดการสลบ และเวลาที่ฟื้นจากการสลบของแต่ละความเข้มข้นที่ทดสอบโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่โดยใช้ Tukey's honestly significant difference (HSD)



บทที่ 4

ผลการดำเนินงานวิจัย

จากการทดลองเพื่อประเมินประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยมะลิในการชักนำการสลายของปลาμάลาย และพัฒนาสายสลับปลานานาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิเพื่อประเมินประสิทธิภาพและใช้เป็นยาสลับสำหรับปลาμάลาย และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาμάลายหลังได้รับสารทดสอบ โดยผู้วิจัยได้ผลการทดลองดังนี้

1. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยมะลิ
2. ผลการวิเคราะห์คุณสมบัตินาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิ
3. ผลการประเมินระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยมะลิและนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิในการใช้เป็นยาสลับสำหรับปลาμάลาย
4. ผลการตรวจสอบพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาμάลายหลังได้รับสารทดสอบ

ผลการวิเคราะห์สารองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยมะลิ

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยมะลิโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) พบว่าน้ำมันหอมระเหยมะลิประกอบด้วยสารองค์ประกอบทางเคมี 51 ชนิด แสดงดังตาราง 9 พบสารออกฤทธิ์สำคัญที่สามารถชักนำการสลายในปลาโดยอ้างอิงจาก Aydın & Barbas (2020) คือ 1,6-octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- (linalool 6.52%), bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)- (β -pinene 4.34%), (1R)-2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene (α -pinene 2.45%) และ limonene (2.4%) ซึ่งผลกราฟโครมาโตแกรมจาก Gas chromatography และวิเคราะห์สารด้วย Mass spectrometer โดยเทียบจาก National Institute of Standards and Technology (NIST) database (webbook.nist.gov/chemistry) แสดงดังภาพประกอบ 11

ตาราง 9 สารองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยมะเดื่อ

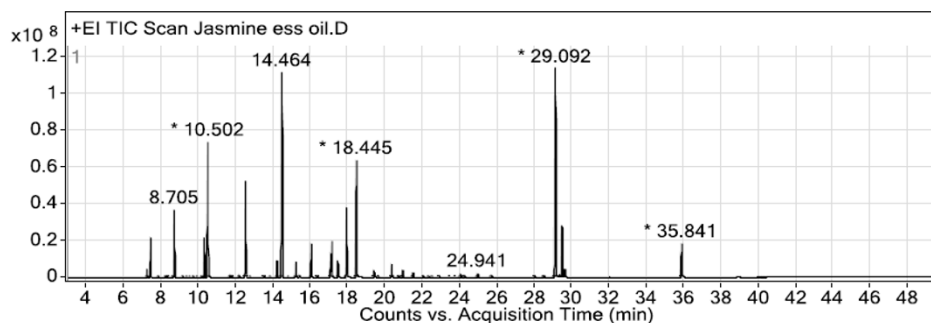
Peak	RT (min)	Compound	CAS No.	Content %
1	7.239	α -Phellandrene	99-83-2	0.47
2	7.428	(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene	7785-70-8	2.45
3	7.862	Camphene	79-92-5	0.05
4	8.236	Benzaldehyde	100-52-7	0.06
5	8.35	Ethanol, 2,2'-oxybis-	111-46-6	0.07
6	8.625	β -Phellandrene	555-10-2	0.03
7	8.705	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)-	18172-67-3	4.34
8	9.388	Cyclohexene, 3-methyl-6-(1-methylethyl)-, trans-	1124-26-1	0.01
9	9.736	3-Carene	13466-78-9	0.05
10	9.936	1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	99-86-5	0.01
11	10.181	Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)-	535-77-3	0.04
12	10.302	Limonene	5989-27-5	2.4
13	10.502	Benzyl alcohol	100-51-6	12.37
14	11.688	α -Methyl- α -[4-methyl-3-pentenyl]oxiranemethanol	1000132-13-0	0.37
15	11.821	Formic acid, phenylmethyl ester	104-57-4	0.04
16	12.516	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	78-70-6	6.52
17	12.776	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,5,5-trimethyl-	6168-62-3	0.01

ตาราง 9 สารองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยมะเดื่อ (ต่อ)

Peak	RT (min)	Compound	CAS No.	Content %
18	13.52	2,4-Heptadienal, 2,4-dimethyl-	42452-48-2	0.08
19	13.856	Cyclohexanol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-	619-01-2	0.03
20	14.2	Isoborneol	124-76-5	1.16
21	14.464	Acetic acid, phenylmethyl ester	140-11-4	17.87
22	14.831	Terpinen-4-ol	562-74-3	0.01
23	15.201	L- α -Terpineol	10482-56-1	1
24	15.409	Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-	586-81-2	0.18
25	16.02	Benzene, (2,2-dimethoxyethyl)-	101-48-4	2.23
26	16.33	3-Phenylpropanol	122-97-4	0.12
27	17.063	(+)-3-Carene	498-15-7	1.44
28	17.131	Propanoic acid, phenylmethyl ester	122-63-4	2.44
29	17.448	Cinnamaldehyde, (E)-	14371-10-9	1.17
30	17.924	Octanal, 7-hydroxy-3,7-dimethyl-	107-75-5	5.39
31	18.445	2-Propen-1-ol, 3-phenyl-	104-54-1	9.72
32	19.386	Methyl anthranilate	134-20-3	0.57
33	19.631	α -Copaene	1000360-33-0	0.03
34	20.337	Copaene	3856-25-5	0.87
35	20.73	3-Methyl-2-pent-2-enyl-cyclopent-2-enone	1000193-43-6	0.05
36	20.919	2-Cyclopenten-1-one, 3-methyl-2-(2-pentenyl)-, (Z)-	488-10-8	0.53

ตาราง 9 สารองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยมะลิ (ต่อ)

Peak	RT (min)	Compound	CAS No.	Content %
37	21.478	Caryophyllene	87-44-5	0.28
38	22.052	2-Propen-1-ol, 3-phenyl-, acetate, (E)-	21040-45-9	0.09
39	22.332	Humulene	6753-98-6	0.05
40	22.513	Patchoulene	1405-16-9	0.02
41	22.894	γ -Muurolene	30021-74-0	0.02
42	23.468	α -Muurolene	10208-80-7	0.01
43	23.755	Butylated Hydroxytoluene	128-37-0	0.02
44	24.027	Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro- 4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-	483-76-1	0.2
45	24.228	7-epi-cis-sesquibabinene hydrate	1000374-17-9	0.34
46	24.941	1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-	7212-44-4	0.24
47	25.685	Diethyl Phthalate	84-66-2	0.15
48	29.092	Octanal, 2-(phenylmethylene)-	101-86-0	18.14
49	29.368	Widdrol hydroxyether	29620-91-5	0.14
50	29.447	Benzyl Benzoate	120-51-4	3.61
51	35.841	Benzyl cinnamate	103-41-3	2.45



Integration Peak List

	Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %
α -pinene	1	7.371	7.428	7.496	21802381.32	49748492.74	13.7
β -pinene	2	8.648	8.705	8.784	36440758.24	86837546.33	23.91
Limonene	3	10.242	10.302	10.378	21382848.9	48808542.09	13.44
	4	10.393	10.502	10.657	73371252.29	251404704	69.22
Linalool	5	12.425	12.516	12.633	52155719.88	132533294.3	36.49
	6	14.362	14.464	14.574	111290175.7	363218067.7	100
	7	17.848	17.924	18.041	37812406.92	109462937.6	30.14
	8	18.343	18.445	18.574	63423849.83	197499058.2	54.37
	9	29.001	29.092	29.307	113730656.1	355184944.2	97.79
	10	29.387	29.447	29.534	27945874.81	73443625.83	20.22

ภาพประกอบ 11 ผลกราฟโครมาโตแกรมจาก Gas chromatography และวิเคราะห์สารด้วย Mass spectrometer โดยเทียบจาก NIST database

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัตินาโนอิมัลชัน

จากผลการวิเคราะห์คุณสมบัตินาโนอิมัลชันโดยวัดขนาดอนุภาคด้วยเทคนิคการกระเจิงของแสง (dynamic light scattering), ค่าการกระจายตัว (polydispersity index; PDI) และค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา (zeta potential) ด้วยเครื่อง Zetasizer แสดงดังตาราง 10 พบว่าอนุภาคนาโนอิมัลชันมีขนาด 13.01 ± 0.09 นาโนเมตร ค่าการกระจายตัว 0.184 ± 0.014 และมีค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา -11.67 ± 0.81 mV ซึ่งจัดว่าเป็นนาโนอิมัลชันที่เสถียร และเมื่อพิจารณาลักษณะทางกายภาพของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิพบว่า มีลักษณะใสและเป็นเนื้อเดียวกันดังแสดงภาพประกอบ 12

ตาราง 10 การวิเคราะห์คุณสมบัตินาโนอิมัลชัน

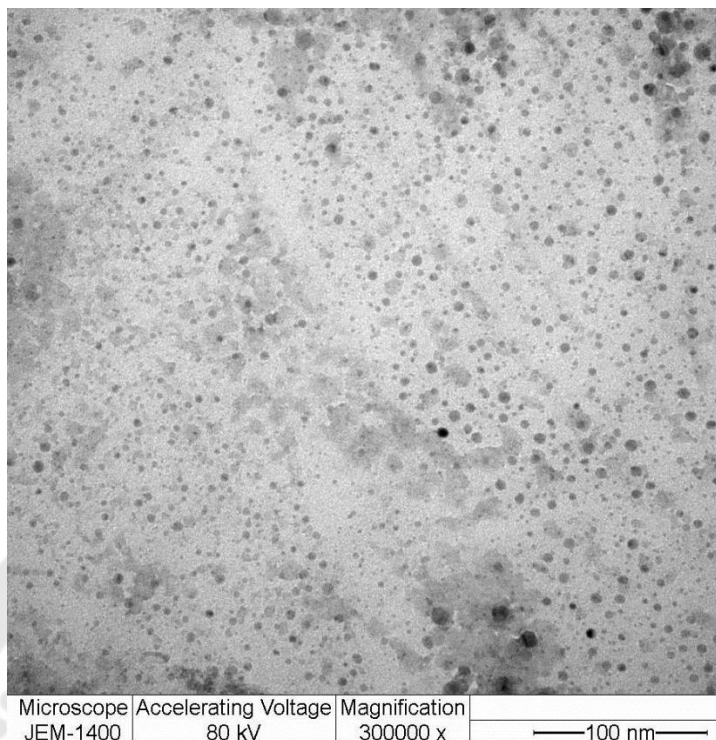
คุณสมบัตินาโนอิมัลชัน	ผลตัวอย่างนาโนอิมัลชัน น้ำมันหอมระเหยมะลิ	เกณฑ์นาโนอิมัลชันที่ เสถียร
ขนาดอนุภาค (particle size)	13.01 ± 0.09 นาโนเมตร	1-100 นาโนเมตร
ค่าการกระจายตัว (PDI)	0.184 ± 0.014	0-0.3
ศักย์ไฟฟ้าซีตา (zeta potential)	-11.67 ± 0.81 มิลลิโวลต์	-2.5 ถึง -30 มิลลิโวลต์



ภาพประกอบ 12 ลักษณะทางกายภาพของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิ

ที่มา: ภาพถ่ายโดย นางสาวณัฐนิชา รื่นถ้อย

ผลการตรวจสอบสัณฐานวิทยาของอนุภาคเพื่อศึกษารูปร่างและขนาดของอนุภาคนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิที่เจือจาง 1,000 เท่าด้วยน้ำกลั่น โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope; TEM) พบว่าอนุภาคนาโนอิมัลชันมีลักษณะเป็นทรงกลม โดยมีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 20 นาโนเมตร (ภาพประกอบ 13) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์คุณสมบัตินาโนอิมัลชันด้วยเครื่อง Zetasizer



ภาพประกอบ 13 ลักษณะสัณฐานวิทยาจากกล้อง TEM ของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิที่เจือจาง 1,000 เท่าด้วยน้ำกลั่น

ผลการประเมินระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยมะลิและนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับใช้เป็นยาสลบปลาม้าลายเพื่อการศัลยกรรม

จากผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อประเมินหาช่วงระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยมะลิที่สามารถชักนำการสลบปลาม้าลายในระยะที่ 3 (surgical anesthesia stage) ภายใน 5 นาทีและฟื้นจากการสลบภายใน 10 นาที และไม่ส่งผลให้ปลาทายในระหว่างการทดสอบ โดยใช้สารละลายน้ำมันหอมระเหยมะลิในช่วงระดับความเข้มข้น 0.10-0.80 มิลลิลิตรต่อลิตร (Aydin & Barbas, 2020) พบว่าน้ำมันหอมระเหยมะลิที่สามารถชักนำการสลบในปลาม้าลายตามเกณฑ์ที่กำหนดคือ 0.30-0.40 มิลลิลิตรต่อลิตร

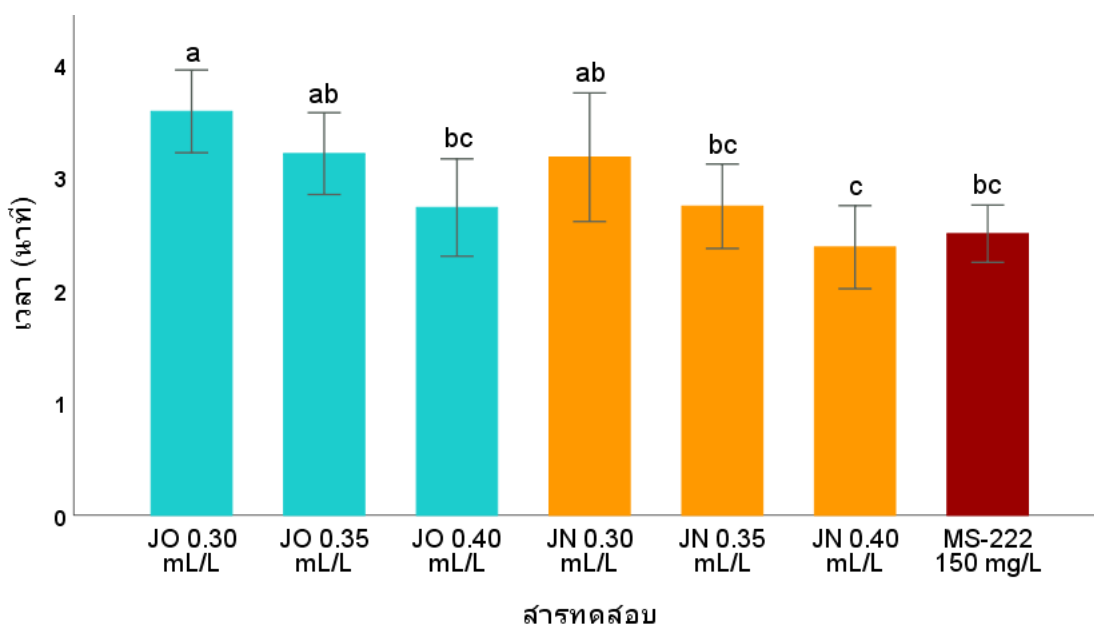
ผลการประเมินเวลาชักนำการสลบปลาม้าลายสำหรับการศัลยกรรม

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลบของน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับการศัลยกรรมปลาม้าลาย โดยประเมินเวลาชักนำการสลบของน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ระดับความเข้มข้น 0.30, 0.35 และ 0.40 มิลลิลิตรต่อลิตร และมีเกณฑ์คัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการสลบเพื่อศัลยกรรมปลา คือ ปลาม้าลายต้องสลบในระยะที่ 3 ภายใน 3 นาที โดยปลาจะสูญเสียสมดุลในการควบคุมร่างกายทั้งหมด ไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้าและไม่เคลื่อนไหวที่ ตรวจสอบโดย

การใช้แท่งแก้วคดบริเวณครึ่งทางเพื่อดูการตอบสนองของปลา และปลาต้องสามารถฟื้นตัวจากการสลบได้ภายใน 5 นาที (Marking & Meyer, 1985; Ross & Ross, 2009) ผลการทดสอบพบว่า ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยมะลิต่ำที่สุดที่มีประสิทธิภาพชักนำการสลบในระยะที่ 3 ภายใน 3 นาที คือ 0.40 มิลลิลิตรต่อลิตร ใช้เวลาชักนำการสลบ 2.73 ± 0.78 นาที โดยที่ปลาไม่ตายหลังจากการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลบของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับการศัลยกรรมปลาม้าลาย โดยประเมินเวลาชักนำการสลบของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ระดับความเข้มข้น 0.30, 0.35 และ 0.40 มิลลิลิตรต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพชักนำการสลบปลาม้าลายของน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ทำละลายด้วยเอทานอล ผลการทดสอบพบว่า ความเข้มข้นของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิต่ำที่สุดที่มีประสิทธิภาพชักนำการสลบในระยะที่ 3 ภายใน 3 นาที คือ 0.35 มิลลิลิตรต่อลิตร ใช้เวลาชักนำการสลบ 2.74 ± 0.68 นาที โดยที่ปลาไม่ตายหลังจากการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลการทดสอบชุดควบคุมผลบวกโดยใช้ MS-222 ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร (Collymore et al., 2014) พบว่าสามารถชักนำการสลบปลาม้าลายในระยะที่ 3 โดยใช้เวลาชักนำการสลบ 2.50 ± 0.46 นาที และปลาไม่ตายหลังจากการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับผลการทดสอบชุดควบคุมผลลบโดยใช้เอทานอลสัมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิลิตรต่อลิตร พบว่าไม่สามารถชักนำให้ปลาม้าลายเกิดการสลบได้ (ภาพประกอบ 14)



ภาพประกอบ 14 เวลาชักนำการสลายปลาฆ่าลายของสารทดสอบแต่ละชนิด

อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กในกราฟแท่งที่แตกต่างกัน แสดงเวลาชักนำการสลายที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยมะลิคือ 0.30, 0.35 และ 0.40 มิลลิลิตรต่อลิตร เปรียบเทียบกับ MS-222 ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร

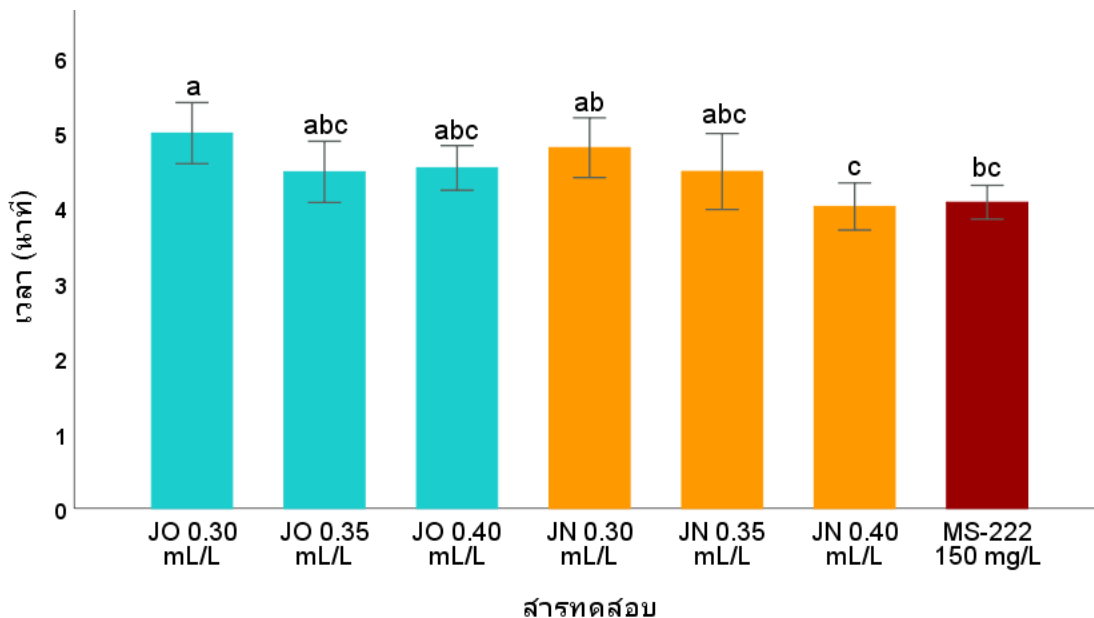
โดย JO = น้ำมันหอมระเหยมะลิ

JN = นาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิ

ผลการประเมินเวลาพื้นสลายปลาฆ่าลายสำหรับการคัดลอกกรรม

ผลการทดสอบเพื่อประเมินเวลาพื้นสลายของปลาฆ่าลายที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยมะลิและนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ระดับความเข้มข้น 0.30, 0.35 และ 0.40 มิลลิลิตรต่อลิตร พบว่าปลาฆ่าลายที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยมะลิและนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิทุกระดับความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพการชักนำการสลายสามารถพื้นสลายได้สมบูรณ์ในเวลา 5 นาที ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด โดยปลาฆ่าลายที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยมะลิ 0.40 มิลลิลิตรต่อลิตร ใช้เวลาพื้นสลาย 4.53 ± 0.54 นาที และปลาฆ่าลายที่ได้รับนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิ 0.35 มิลลิลิตรต่อลิตร ใช้เวลาพื้นสลาย 4.48 ± 0.91 นาที ส่วนผลการทดสอบชุดควบคุมผลบวกโดยใช้ MS-222 ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร (Collymore et al., 2014) พบว่า

ปลาฆ่าตายสามารถฟื้นจากการสลบได้สมบูรณ์ โดยใช้เวลาฟื้นสลบ 4.07 ± 0.41 นาที (ภาพประกอบ 15)



ภาพประกอบ 15 เวลาฟื้นสลบปลาฆ่าตายของสารทดสอบแต่ละชนิด

อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กในกราฟแท่งที่แตกต่างกัน แสดงเวลาชักนำการสลบที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยมะลิคือ 0.30, 0.35 และ 0.40 มิลลิลิตรต่อลิตร เปรียบเทียบกับ MS-222 ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร

โดย JO = น้ำมันหอมระเหยมะลิ

JN = นาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิ

ผลการรักษาภาวะสลบของปลาฆ่าตายระหว่างการจำลองศัลยกรรม

ผลการทดสอบเพื่อประเมินประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยมะลิและนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิในการรักษาภาวะสลบของปลาฆ่าตายระหว่างการจำลองศัลยกรรมเด็กเป็นเวลา 10 นาที (Harms & Lewbart, 2000) พบว่าน้ำมันหอมระเหยมะลิและนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิทุกระดับความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (0.30, 0.35 และ 0.40 มิลลิลิตรต่อลิตร) สามารถชักนำให้ปลาฆ่าตายสลบและรักษาภาวะสลบของปลาฆ่าตายระหว่างการจำลองศัลยกรรมได้ภายในเวลา 10 นาที สอดคล้องกับผลการทดสอบ MS-222 ที่ความเข้มข้น 150

มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถชักนำไปปลาฆ่าตายสงบและรักษาภาวะสงบของปลาฆ่าตายระหว่างการจำลองศัลยกรรมได้ภายในเวลา 10 นาที

ผลอัตราการตายของปลาฆ่าตายหลังการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากผลการสังเกตอัตราการตายของปลาฆ่าตายหลังการทดลองการชักนำการสงบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าน้ำมันหอมระเหยมะลิและนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิทุกระดับความเข้มข้น (0.30, 0.35 และ 0.40 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ MS-222 ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่ส่งผลให้ปลาฆ่าตายหลังจากการทดลองการชักนำการสงบ

ผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำของการทดลองชักนำการสงบปลาฆ่าตายสำหรับการศัลยกรรม

ผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่า pH และปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำก่อนการทดลอง หลังเติมยาสงบ และหลังการทดลองของน้ำเมื่อผสมน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ฆ่าละลายด้วยเอทานอล และเมื่อผสมนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย คุณภาพน้ำก่อนการทดลอง หลังเติมยาสงบ และหลังการทดลองของแต่ละชุดการทดลอง ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในตาราง 11 ถึง 13

ตาราง 11 อุณหภูมิน้ำแต่ละชุดการทดลอง

สารทดสอบ	ความเข้มข้น	อุณหภูมิ (C °)		
		ก่อนการทดลอง	หลังเติมสาร	หลังการทดลอง
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.30 mL/L	24.97 ± 0.15	25.23 ± 0.35	24.77 ± 0.31
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.35 mL/L	25.20 ± 0.26	24.63 ± 0.31	24.60 ± 0.53
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.40 mL/L	25.10 ± 0.40	25.40 ± 0.26	24.70 ± 0.20
นาโนอิมัลชัน	0.30 mL/L	25.43 ± 0.21	24.83 ± 0.57	25.27 ± 0.40
นาโนอิมัลชัน	0.35 mL/L	24.77 ± 0.23	25.30 ± 0.44	24.80 ± 0.40
นาโนอิมัลชัน	0.40 mL/L	24.90 ± 0.40	25.07 ± 0.15	25.33 ± 0.25
MS-222	150 mg/L	24.77 ± 0.75	24.50 ± 0.36	24.63 ± 0.85

ตาราง 12 ค่า pH แต่ละชุดการทดลอง

สารทดสอบ	ความเข้มข้น	ค่า pH		
		ก่อนการทดลอง	หลังเติมสาร	หลังการทดลอง
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.30 mL/L	8.04 ± 0.05	8.12 ± 0.03	8.04 ± 0.04
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.35 mL/L	8.06 ± 0.04	8.08 ± 0.03	8.01 ± 0.10
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.40 mL/L	8.02 ± 0.13	8.06 ± 0.02	8.06 ± 0.05
นาโนอิมัลชัน	0.30 mL/L	8.00 ± 0.03	8.00 ± 0.07	8.02 ± 0.08
นาโนอิมัลชัน	0.35 mL/L	8.02 ± 0.07	8.05 ± 0.17	8.03 ± 0.13
นาโนอิมัลชัน	0.40 mL/L	7.96 ± 0.06	7.95 ± 0.06	7.96 ± 0.12
MS-222	150 mg/L	7.98 ± 0.20	7.95 ± 0.14	7.91 ± 0.26

ตาราง 13 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำแต่ละชุดการทดลอง

สารทดสอบ	ความเข้มข้น	ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (mg/L)		
		ก่อนการทดลอง	หลังเติมสาร	หลังการทดลอง
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.30 mL/L	6.90 ± 0.35	6.90 ± 0.44	6.86 ± 0.06
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.35 mL/L	6.70 ± 0.20	6.67 ± 0.31	6.77 ± 0.25
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.40 mL/L	6.77 ± 0.49	6.73 ± 0.15	6.83 ± 0.38
นาโนอิมัลชัน	0.30 mL/L	6.73 ± 0.21	6.73 ± 0.15	6.77 ± 0.40
นาโนอิมัลชัน	0.35 mL/L	6.47 ± 0.15	6.60 ± 0.36	6.53 ± 0.35
นาโนอิมัลชัน	0.40 mL/L	6.73 ± 0.21	6.70 ± 0.53	6.70 ± 0.50
MS-222	150 mg/L	6.37 ± 0.47	6.43 ± 0.31	6.43 ± 0.51

ผลการประเมินระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยมะลิและนาโนอิมัลชัน น้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับใช้เป็นยาสลบปลาฆ่าเพื่อการขนส่ง

ผลการประเมินระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับการขนส่งปลาฆ่า

ในการทดสอบประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลบของน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับการขนส่งปลาฆ่าใช้น้ำมันหอมระเหยมะลิที่ความเข้มข้น 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07 และ 0.08 มิลลิลิตรต่อลิตร โดยมีเกณฑ์คัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการสลบเพื่อการขนส่งปลาคือ ปลาฆ่าต้องสลบในระยะที่ 1 (sedation) ตลอดการจำลองการขนส่งระยะสั้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยปลาอยู่ในอาการสงบ ทรงตัวอยู่ได้ ปลาไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้าภายนอก ยกเว้นแรงกด การเคลื่อนที่และอัตราการหายใจลดลง (Cooke et al., 2004) จากผลการทดลองพบว่าน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ระดับความเข้มข้น 0.05, 0.06, 0.07 และ 0.08 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่สูงเกินไปสำหรับการสลบในระยะที่ 1 ซึ่งไม่เป็นตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้สำหรับการสลบเพื่อการขนส่งปลา และจากผลการทดลองพบว่าน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ระดับความเข้มข้น 0.04 มิลลิลิตรต่อลิตร มีประสิทธิภาพชักนำให้ปลาฆ่าสลบในระยะที่ 1 ตลอดการจำลองการขนส่งระยะสั้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยที่ปลาไม่ตายในระหว่างการทดลอง และปลาฆ่าสามารถฟื้นตัวจากการสลบในระยะที่ 1 ภายในเวลาเฉลี่ย 1.83 ± 0.57 นาที สอดคล้องกับผลการทดสอบชุดควบคุมผลบวกโดยใช้ MS-222 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

(Lockwood et al., 2017) ที่สามารถชักนำให้ปลาฆ่าตายสลบในระยะเวลาที่ 1 ตลอดการจำลองการขนส่งระยะสั้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และปลาฆ่าตายสามารถฟื้นตัวจากการสลบในระยะเวลาที่ 1 ภายในเวลาเฉลี่ย 1.08 ± 0.54 นาที สำหรับผลการทดสอบชุดควบคุมผลลบโดยใช้เอทานอลสัมบูรณ์ที่มีความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าไม่สามารถชักนำให้ปลาฆ่าตายเกิดการสลบในระยะเวลาที่ 1 ได้ ผลการประเมินประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลบปลาฆ่าตายของน้ำมันหอมระเหยมะลิแต่ลดความเข้มข้นในระหว่างการจำลองการขนส่งเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง แสดงดังตาราง 14 ตาราง 14 ประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลบปลาฆ่าตายของน้ำมันหอมระเหยมะลิในระหว่างการจำลองการขนส่งเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ของสาร ทดสอบ (mL/L)	ระยะเวลาในการสลบ (นาที)										ระยะเวลา ในการฟื้น ตัว (นาที)	อัตรา รอด ชีวิต (%)
	5	10	15	20	25	30	60	90	120			
0 (control)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100
MS-222 50 mg/L	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.08 ± 0.54	100
JO 0.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100
JO 0.03	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1.79 ± 0.48	100
JO 0.04	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.83 ± 0.57	100
JO 0.05	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	3.32 ± 0.75	100
JO 0.06	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	4.12 ± 0.55	100
JO 0.07	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	4.20 ± 0.56	100
JO 0.08	1	1	1	1	2	2	3	-	-	-	5.00 ± 0.73	100
เอทานอล 0.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100

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

ผลการประเมินระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับการขนส่งปลาฆ่าตาย

ในการทดสอบประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลบของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับการขนส่งปลาฆ่าตาย ใช้นาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิที่มีความเข้มข้น 0.005, 0.01,

0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07 และ 0.08 มิลลิลิตรต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่านาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ระดับความเข้มข้น 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07 และ 0.08 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่สูงเกินไปสำหรับการสลบในระยะที่ 1 ซึ่งไม่เป็นตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้สำหรับการสลบเพื่อการขนส่งปลา และจากผลการทดลองพบว่า นาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ระดับความเข้มข้น 0.02 มิลลิลิตรต่อลิตร มีประสิทธิภาพชักนำให้ปลาฆ่าตายสลบในระยะที่ 1 ตลอดการจำลองการขนส่งระยะสั้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยที่ปลาไม่ตายในระหว่างการทดลอง และปลาฆ่าตายสามารถฟื้นตัวจากการสลบในระยะที่ 1 ภายในเวลาเฉลี่ย 1.77 ± 0.51 นาที ผลการประเมินประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลบปลาฆ่าตายของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิแต่ละความเข้มข้นในระหว่างการจำลองการขนส่งเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง แสดงดังตาราง 15

ตาราง 15 ประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลบปลาฆ่าตายของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิในระหว่างการจำลองการขนส่งเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารทดสอบ (mL/L)	ระยะเวลาในการสลบ (นาที)										ระยะเวลาในการฟื้นตัว (นาที)	อัตรารอดชีวิต (%)
	5	10	15	20	25	30	60	90	120			
JN 0.005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100
JN 0.01	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1.68 ± 0.43	100
JN 0.02	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.77 ± 0.51	100
JN 0.03	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3.85 ± 0.65	100
JN 0.04	1	1	1	1	1	2	3	-	-	-	4.90 ± 0.46	100

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

JN = นาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิ

ผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำของการทดลองชักนำการสลายปาล์มลายสำหรับการ ขนส่ง

ผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่า pH และปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ ก่อนการทดลอง หลังเติมยาสลับ และหลังการทดลองของน้ำเมื่อผสมน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ทำละลายด้วยเอทานอล และเมื่อผสมนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิพบว่าเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย คุณภาพน้ำก่อนการทดลอง หลังเติมยาสลับ และหลังการทดลองของแต่ละชุดการทดลอง ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในตาราง 16 ถึง 18

ตาราง 16 อุณหภูมิน้ำแต่ละชุดการทดลอง

สารทดสอบ	ความเข้มข้น	อุณหภูมิ (C °)		
		ก่อนการทดลอง	หลังเติมสาร	หลังการทดลอง
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.02 mL/L	24.77 ± 0.50	24.63 ± 0.15	24.57 ± 0.57
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.03 mL/L	24.60 ± 0.60	24.77 ± 0.12	24.63 ± 0.57
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.04 mL/L	24.57 ± 0.38	24.63 ± 0.40	24.70 ± 0.56
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.05 mL/L	25.67 ± 0.55	24.77 ± 0.32	24.57 ± 0.25
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.06 mL/L	24.97 ± 0.40	24.57 ± 0.25	24.77 ± 0.38
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.07 mL/L	24.87 ± 0.64	24.73 ± 0.25	24.63 ± 0.67
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.08 mL/L	25.07 ± 0.64	24.50 ± 0.46	24.87 ± 0.21
นาโนอิมัลชัน	0.005 mL/L	24.87 ± 0.50	24.73 ± 0.15	24.67 ± 0.57
นาโนอิมัลชัน	0.01 mL/L	24.87 ± 0.50	25.30 ± 0.66	25.00 ± 0.70
นาโนอิมัลชัน	0.02 mL/L	25.17 ± 0.32	24.97 ± 0.31	24.93 ± 0.64
นาโนอิมัลชัน	0.03 mL/L	24.60 ± 0.66	24.73 ± 0.12	24.63 ± 0.47
นาโนอิมัลชัน	0.04 mL/L	24.60 ± 0.40	24.73 ± 0.45	24.67 ± 0.55
MS-222	50 mg/L	24.63 ± 0.40	24.77 ± 0.47	24.70 ± 0.50

ตาราง 17 ค่า pH แต่ละชุดการทดลอง

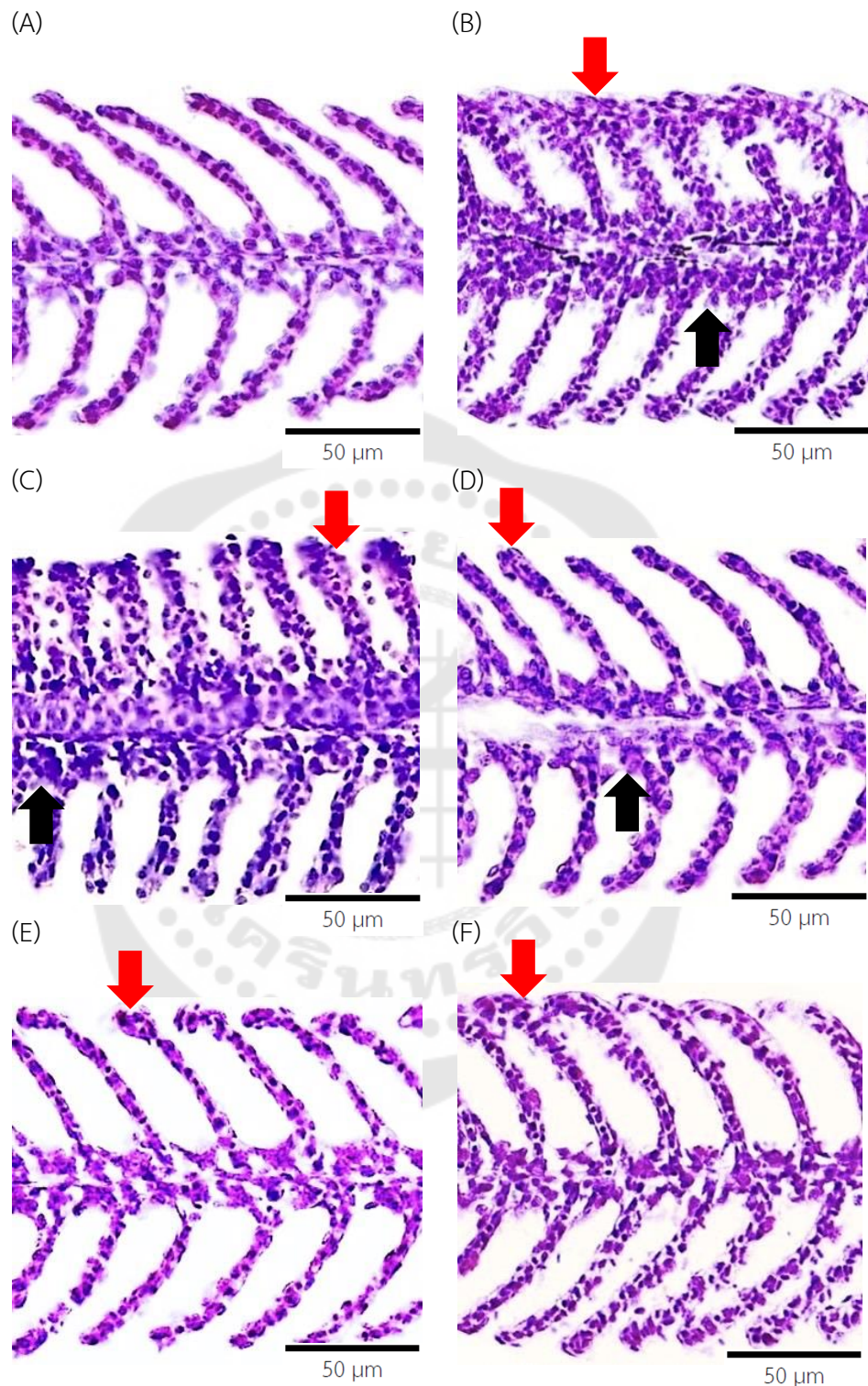
สารทดสอบ	ความเข้มข้น	ค่า pH		
		ก่อนการทดลอง	หลังเติมสาร	หลังการทดลอง
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.02 mL/L	7.86 ± 0.07	7.93 ± 0.12	7.85 ± 0.16
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.03 mL/L	7.87 ± 0.11	7.93 ± 0.21	7.91 ± 0.21
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.04 mL/L	8.00 ± 0.16	8.05 ± 0.12	8.03 ± 0.09
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.05 mL/L	8.01 ± 0.10	7.98 ± 0.15	7.98 ± 0.13
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.06 mL/L	7.83 ± 0.08	7.92 ± 0.22	7.90 ± 0.05
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.07 mL/L	7.95 ± 0.06	7.94 ± 0.12	7.96 ± 0.15
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.08 mL/L	7.96 ± 0.13	8.04 ± 0.14	7.99 ± 0.16
นาโนอิมัลชัน	0.005 mL/L	7.89 ± 0.09	7.94 ± 0.19	7.94 ± 0.19
นาโนอิมัลชัน	0.01 mL/L	7.98 ± 0.12	8.05 ± 0.08	8.04 ± 0.10
นาโนอิมัลชัน	0.02 mL/L	7.97 ± 0.10	7.99 ± 0.21	7.85 ± 0.13
นาโนอิมัลชัน	0.03 mL/L	8.00 ± 0.12	8.07 ± 0.10	8.02 ± 0.12
นาโนอิมัลชัน	0.04 mL/L	7.93 ± 0.16	7.89 ± 0.23	7.94 ± 0.30
MS-222	50 mg/L	7.94 ± 0.16	7.97 ± 0.19	8.01 ± 0.23

ตาราง 18 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำแต่ละชุดการทดลอง

สารทดสอบ	ความเข้มข้น	ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (mg/L)		
		ก่อนการทดลอง	หลังเติมสาร	หลังการทดลอง
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.02 mL/L	6.30 ± 0.26	6.50 ± 0.26	6.40 ± 0.30
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.03 mL/L	6.47 ± 0.25	6.50 ± 0.10	6.43 ± 0.32
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.04 mL/L	6.37 ± 0.15	6.43 ± 0.44	6.30 ± 0.41
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.05 mL/L	6.43 ± 0.21	6.47 ± 0.40	6.43 ± 0.35
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.06 mL/L	6.47 ± 0.15	6.50 ± 0.30	6.53 ± 0.23
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.07 mL/L	6.47 ± 0.40	6.40 ± 0.17	6.57 ± 0.49
น้ำมันหอมระเหยมะลิ	0.08 mL/L	6.47 ± 0.28	6.40 ± 0.20	6.47 ± 0.23
นาโนอิมัลชัน	0.005 mL/L	6.33 ± 0.35	6.50 ± 0.30	6.43 ± 0.21
นาโนอิมัลชัน	0.01 mL/L	6.37 ± 0.25	6.53 ± 0.40	6.47 ± 0.21
นาโนอิมัลชัน	0.02 mL/L	6.37 ± 0.31	6.93 ± 0.31	6.47 ± 0.25
นาโนอิมัลชัน	0.03 mL/L	6.50 ± 0.36	6.53 ± 0.06	6.47 ± 0.21
นาโนอิมัลชัน	0.04 mL/L	6.40 ± 0.26	6.47 ± 0.25	6.33 ± 0.49
MS-222	50 mg/L	6.40 ± 0.26	6.47 ± 0.15	6.40 ± 0.44

ผลการตรวจสอบพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาม้าลายหลังได้รับสารทดสอบ

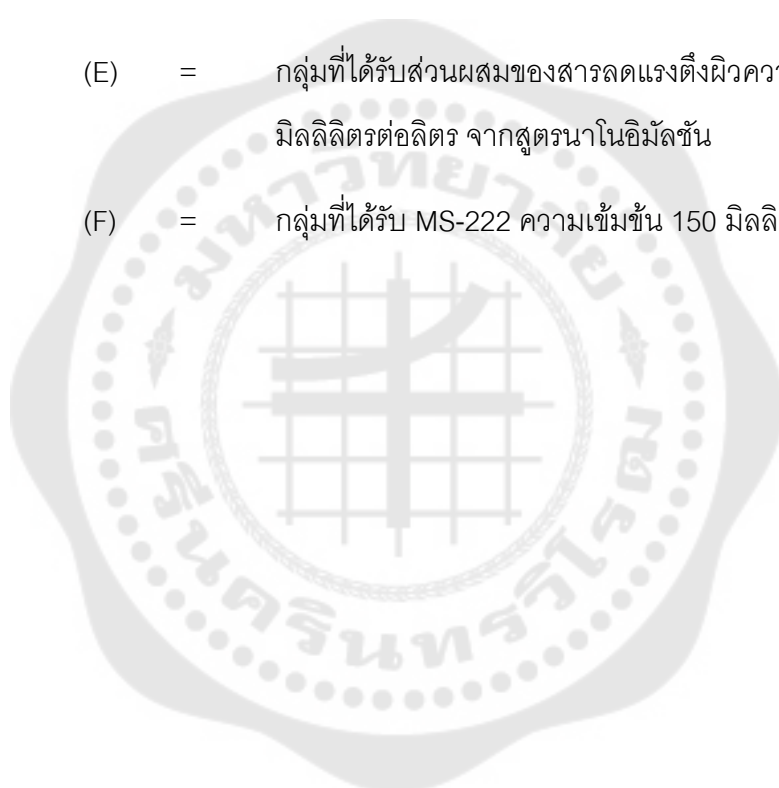
ผลการตรวจสอบพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาม้าลายหลังได้รับสารทดสอบ ได้แก่ 1. น้ำมันหอมระเหยมะลิความเข้มข้น 0.40 มิลลิลิตรต่อลิตร ที่ละลายด้วยเอทานอล 2. เอทานอลที่ความเข้มข้น 4 มิลลิลิตรต่อลิตร 3. นาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ความเข้มข้น 0.35 มิลลิลิตรต่อลิตร 4. ส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้น 8.4 มิลลิลิตรต่อลิตร และ 5. MS-222 ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกของปลาม้าลายที่ได้รับสารทดสอบคือ มีการเพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก (hyperplasia of the gill epithelium) ของปลาม้าลายที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ละลายในเอทานอล เอทานอล และ MS-222 ทำให้เซลล์เยื่อบุผิวเหงือกหนาขึ้น สำหรับปลาม้าลายที่ได้รับนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิและส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิวพบว่า มีการเพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อบุผิวบริเวณกิ่งเหงือก (gill lamellae) เพียงเล็กน้อย ดังภาพประกอบ 16 แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับของปลาม้าลายที่ได้รับสารทดสอบทั้ง 5 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังภาพประกอบ 17



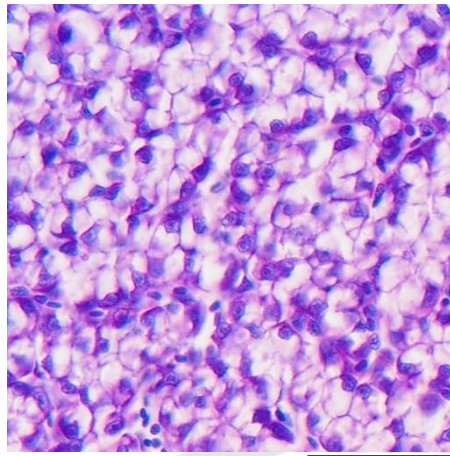
ภาพประกอบ 16 พยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกของปลาม้าลาย

สัญลักษณ์ลูกศรสีดำแสดงการเพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อผิวของซี่เหงือก (gill filaments) และ
สัญลักษณ์ลูกศรสีแดงแสดงการเพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อผิวของกิ่งเหงือก (gill lamellae)

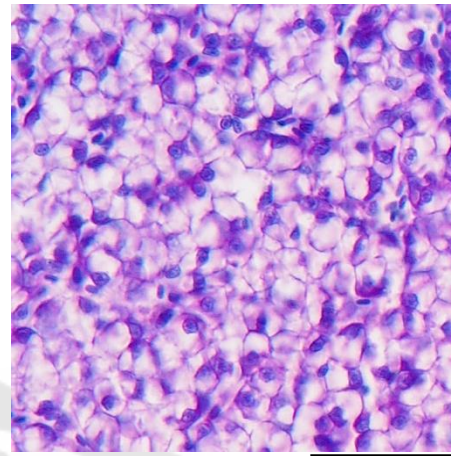
- โดย (A) = กลุ่มควบคุม
- (B) = กลุ่มที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยมะลิความเข้มข้น 0.40 มิลลิลิตรต่อลิตร ที่ละลายด้วยเอทานอล
- (C) = กลุ่มที่ได้รับเอทานอลความเข้มข้น 4 มิลลิลิตรต่อลิตร
- (D) = กลุ่มที่ได้รับนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิความเข้มข้น 0.35 มิลลิลิตรต่อลิตร
- (E) = กลุ่มที่ได้รับส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิวความเข้มข้น 8.4 มิลลิลิตรต่อลิตร จากสูตรนาโนอิมัลชัน
- (F) = กลุ่มที่ได้รับ MS-222 ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร



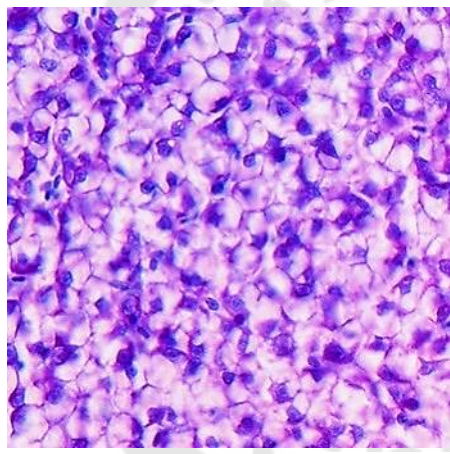
(A)



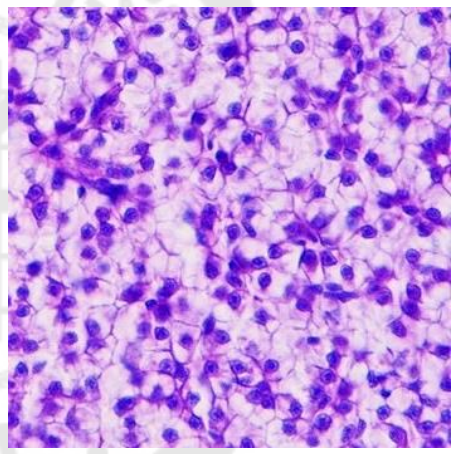
(B)



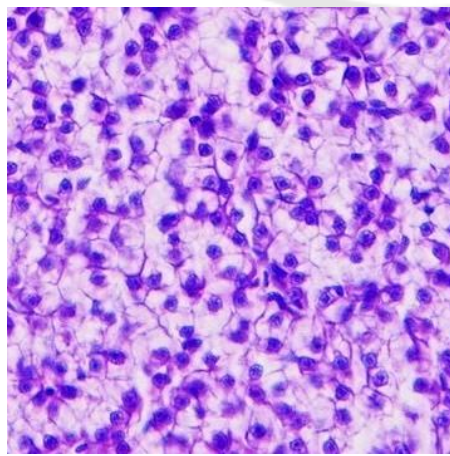
(C)



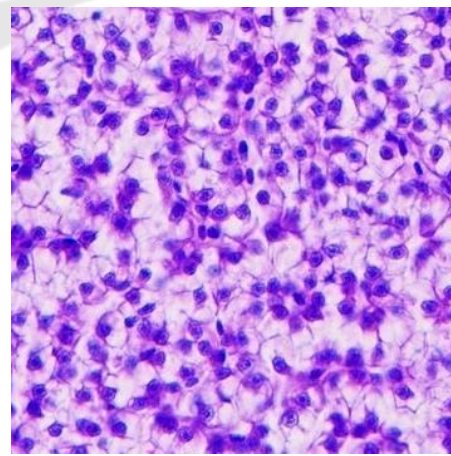
(D)



(E)

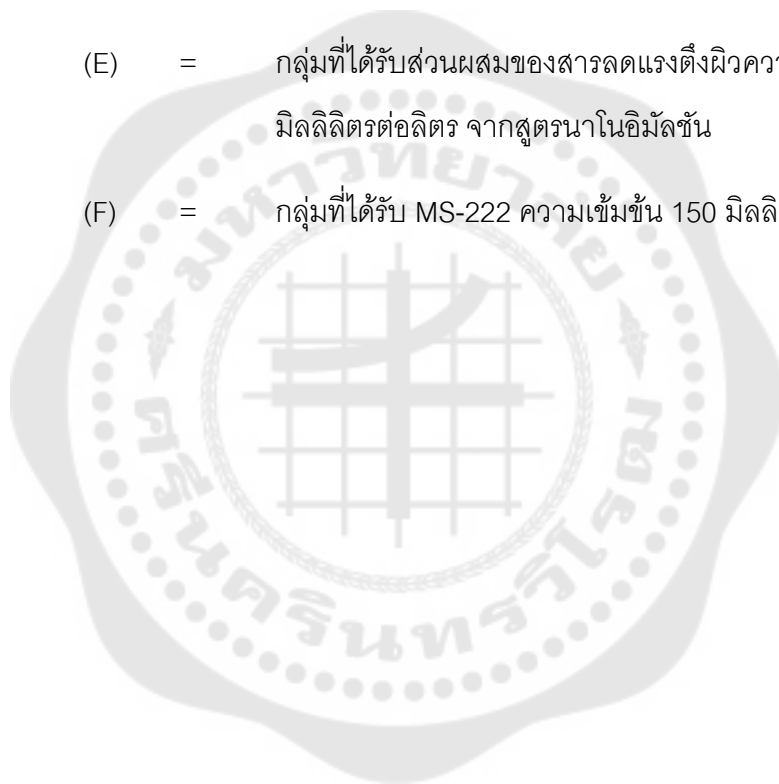


(F)



ภาพประกอบ 17 พยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับของปลาม้าลาย

- โดย (A) = กลุ่มควบคุม
- (B) = กลุ่มที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยมะลิความเข้มข้น 0.40 มิลลิลิตรต่อลิตร ที่ละลายด้วยเอทานอล
- (C) = กลุ่มที่ได้รับเอทานอลความเข้มข้น 4 มิลลิลิตรต่อลิตร
- (D) = กลุ่มที่ได้รับนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิความเข้มข้น 0.35 มิลลิลิตรต่อลิตร
- (E) = กลุ่มที่ได้รับส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิวความเข้มข้น 8.4 มิลลิลิตรต่อลิตร จากสูตรนาโนอิมัลชัน
- (F) = กลุ่มที่ได้รับ MS-222 ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การประเมินประสิทธิภาพน้ำมันหอมระเหยมะลิและพัฒนายาสลับปลานานาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิเพื่อใช้เป็นยาสลับสำหรับปลาฆ่าตาย และตรวจสอบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาฆ่าตายหลังได้รับสารทดสอบ สามารถสรุปผลการดำเนินงานวิจัยดังกล่าวต่อไปนี้

1. สรุปผลการวิจัย
2. อภิปรายผลการวิจัย
3. ข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

1. การตรวจสอบวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยมะลิพบสารออกฤทธิ์สำคัญซึ่งสามารถชักนำการสลับในปลาได้คือ 1,6-octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- (linalool 6.52%), bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)- (β -pinene 4.34%), (1R)-2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene (α -pinene 2.45%) และ limonene (2.4%)

2. การตรวจสอบวิเคราะห์คุณสมบัตินาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยมะลิพบว่าเป็นนาโนอิมัลชันที่เสถียร โดยอนุภาคนาโนอิมัลชันมีขนาด 13.01 ± 0.09 นาโนเมตร ค่าการกระจายตัว 0.184 ± 0.014 และมีศักย์ไฟฟ้าซีตา -11.67 ± 0.81 mV และสอดคล้องกับผลการตรวจสอบสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโนอิมัลชันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope; TEM) พบว่าอนุภาคนาโนอิมัลชันมีลักษณะเป็นทรงกลม มีการกระจายตัวของอนุภาคสม่ำเสมอและขนาดอนุภาคใกล้เคียงกัน โดยมีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 20 นาโนเมตร

3. น้ำมันหอมระเหยมะลิสามารถใช้เป็นยาสลับสำหรับปลาฆ่าตายเพื่อการศัลยกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยมะลิต่ำที่สุดที่มีประสิทธิภาพชักนำการสลับสำหรับการทำศัลยกรรมคือ 0.40 มิลลิลิตรต่อลิตร ใช้เวลาชักนำการสลับ 2.73 ± 0.78 นาที ขณะที่ประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการสลับเพื่อการศัลยกรรมปลาฆ่าตายของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิพบว่าความเข้มข้นของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิต่ำที่สุดที่มีประสิทธิภาพชักนำการสลับคือ 0.35 มิลลิลิตรต่อลิตร ใช้เวลาชักนำการสลับ 2.74 ± 0.68 นาที โดยทั้งน้ำมันหอมระเหยมะลิและนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิสามารถรักษาสภาวะสลับ

ของปลาฆ่าตายระหว่างการจำลองศัลยกรรมได้ภายในเวลา 10 นาที และปลาฆ่าตายสามารถฟื้นจากการสลบได้ภายใน 5 นาที และไม่พบการตายของปลาหลังจากการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. การทดสอบประสิทธิภาพน้ำมันหอมระเหยมะลิและนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับการขนส่งปลาฆ่าตายพบว่าน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ระดับความเข้มข้น 0.04 มิลลิลิตรต่อลิตร และนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ระดับความเข้มข้น 0.02 มิลลิลิตรต่อลิตร มีประสิทธิภาพชักนำให้ปลาฆ่าตายสลบในระยะที่ 1 (sedation) ตลอดการจำลองการขนส่งระยะสั้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยที่ปลาไม่ตายในระหว่างการทดลอง และปลาสามารถฟื้นจากการสลบได้ภายใน 2 นาที

5. สารทดสอบทั้ง 5 ชนิด คือ 1. น้ำมันหอมระเหยมะลิความเข้มข้น 0.40 มิลลิลิตรต่อลิตร ที่ละลายด้วยเอทานอล 2. เอทานอลที่ความเข้มข้น 4 มิลลิลิตรต่อลิตร 3. นาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ความเข้มข้น 0.35 มิลลิลิตรต่อลิตร 4. ส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้น 8.4 มิลลิลิตรต่อลิตร และ 5. MS-222 ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกของปลาฆ่าตายคือ มีการเพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อเมือกของเหงือก (hyperplasia of the gill epithelium) แต่ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตัวของปลาฆ่าตายที่ได้รับสารทดสอบทั้ง 5 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการตรวจสอบการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยมะลิโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) พบว่าน้ำมันหอมระเหยมะลิประกอบด้วยสารออกฤทธิ์สำคัญที่สามารถชักนำการสลบในปลาได้คือ 1,6-octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-(linalool 6.52%), bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)- (β -pinene 4.34%), (1R)-2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene (α -pinene 2.45%) และ limonene (2.4%) (Aydin & Barbas, 2020) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาประสิทธิภาพของการเป็นยาสงบประสาทและยาสลบปลาของสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหยจากพืชชนิดต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น linalool ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์จากน้ำมันหอมระเหยโรสวูด (*Aniba rosaeodora* Ducke) สามารถชักนำการสลบในปลาทอง (*Carassius auratus* L.) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Kizak et al., 2018) สำหรับ α -pinene และ β -pinene มีรายงานการศึกษาพบว่าเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในน้ำมันจาก canela-preta (*Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez) ซึ่งสามารถใช้เป็นยาสลบที่มีประสิทธิภาพสำหรับปลา fat snook (*Centropomus parallelus* Poey) (Tondolo et al., 2013)

ในขณะที่ limonene ซึ่งพบในน้ำมันหอมระเหยส้มซ่า (*Citrus aurantium* L.) มีฤทธิ์ชักนำการสลบในปลา silver catfish (*Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)) (Lopes et al., 2018)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ สารออกฤทธิ์ที่กระตุ้นการระงับความรู้สึกคือ linalool สารประกอบนี้เกี่ยวข้องกับการเป็น competitive antagonist ของตัวรับ N-methyl-D-aspartate (NMDARs) ในระบบกลูตาเมตอร์จิกของระบบประสาทส่วนกลาง ป้องกันไม่ให้แคลเซียมไอออนเข้าสู่เซลล์ประสาท ดังนั้นการส่งกระแสประสาทจึงถูกยับยั้งส่งผลให้เกิดการระงับความรู้สึก (Elisabetsky, Brum, & Souza, 1999) สำหรับ α -pinene และ β -pinene จะออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งกระแสประสาทที่ระบบประสาทส่วนกลางโดยจับที่บริเวณ benzodiazepine binding site ของตัวรับ GABA_A (GABA_A receptor) บนเซลล์ประสาทโพสโตไซแนปติก (postsynaptic neurons) กระบวนการนี้ทำให้เกิดการไหลเข้าของคลอไรด์ไอออนสู่เซลล์ประสาทโพสโตไซแนปติกและลดการส่งสารสื่อประสาทผ่านกลไก inhibitory postsynaptic potential (IPSP) (Aoshima & Hamamoto, 1999; Kessler et al., 2014; Khumpirapang et al., 2018) ในขณะที่ limonene จะจับกับตัวรับ adenosine A_{2A} (adenosine A_{2A} receptor) ซึ่งอาจทำให้เกิดการสงบประสาท (H. M. Park, Lee, Yaoyao, Jun, & Lee, 2011) นอกจากนี้ Do Vale, Furtado, Santos Jr, & Viana (2002) ยังรายงานว่า limonene ออกฤทธิ์สงบประสาทเช่นเดียวกับผลของการคลายกล้ามเนื้อซึ่งเป็นผลโดยตรงจากการลดการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง

จากการผลิตนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิพบว่า มีลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวใสมองเห็นสารเป็นเนื้อเดียวกัน และเมื่อนำไปวิเคราะห์คุณสมบัตินาโนอิมัลชันเพื่อหา ลักษณะเฉพาะของอนุภาคพบว่าจัดเป็นนาโนอิมัลชันที่เสถียรมีความคงตัวสูง โดยพิจารณาจากขนาดอนุภาค ค่าการกระจายตัวและศักย์ไฟฟ้าซีตา โดยผลอนุภาคนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ผลิตได้มีขนาด 13.01 ± 0.09 นาโนเมตร ซึ่งนาโนอิมัลชันที่มีขนาดอนุภาค 1-100 นาโนเมตร จัดว่าเป็นนาโนอิมัลชันที่มีความเสถียรสูง (Kale & Deore, 2017) เนื่องจากขนาดอนุภาคส่งผลต่อความคงตัวของนาโนอิมัลชัน หากนาโนอิมัลชันมีขนาดอนุภาคเล็กทำให้ต้านทานการสูญเสียความคงตัวทางกายภาพจากการแยกชั้นโดยแรงโน้มถ่วง รวมถึงการจับกลุ่มหรือการรวมหยดกันของอนุภาค ซึ่งเป็นผลจากการเคลื่อนไหวแบบบราวน์ของอนุภาคขนาดเล็กทำให้อัตราเร็วการแพร่สูงกว่าอัตราเร็วการรวมกลุ่มหรือตกตะกอนจากแรงโน้มถ่วง ผลค่าการกระจายตัวของอนุภาคนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ผลิตได้คือ 0.184 ± 0.014 ซึ่งค่าการกระจายตัวของอนุภาคนาโนอิมัลชัน เป็นการวัดความกว้างของการกระจายตัวของอนุภาคค่าจะอยู่ที่ 0 (monodispersed) ถึง 0.5 (relatively broad distribution) สำหรับค่าการกระจายตัวของอนุภาค

นาโนอิมัลชันควรรอยู่ที่ 0 – 0.3 ซึ่งหมายถึงระบบมีการกระจายตัวของอนุภาคแคบ คือแสดงถึงการมีขนาดอนุภาคใกล้เคียงกันและการกระจายตัวของอนุภาคสม่ำเสมอสารมีความเป็นเนื้อเดียวกัน (monodisperse system) ซึ่งส่งผลให้อิมัลชันมีความคงตัวสูง (Acevedo-Fani, Salvia-Trujillo, Rojas-Graü, & Martín-Belloso, 2015; Gholipourkanani et al., 2015; Kheawfu et al., 2021) และผลค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาที่ผิวของอนุภาคของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ผลิตได้คือ -11.67 ± 0.81 mV ซึ่งค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาที่ผิวของอนุภาคเป็นค่าหนึ่งซึ่งแสดงถึงความคงตัวของอนุภาคด้วยไฟฟ้าสถิตทำให้เกิดแรงผลักระหว่างประจุของอนุภาค โดยมีประโยชน์ในการคาดการณ์อายุหรือประเมินความคงสภาพของนาโนอิมัลชัน หากศักย์ไฟฟ้าซีตามีค่าประมาณ -2.5 ถึง -30 มิลลิโวลต์ จะมีประสิทธิภาพรักษาความคงสภาพของอนุภาคนาโนอิมัลชันสูงและมีอายุการเก็บรักษาได้นาน (Stevanović et al., 2012; พิมพ์ สิลภาพพิสิฐ, 2540)

จากผลการประเมินระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยมะลิในการชักนำให้เกิดการสลบของปลาม้าลายในระยะที่ 3 (surgical anesthesia stage) สำหรับการศัลยกรรมพบว่าเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยมะลิจะส่งผลให้เวลาชักนำการสลบของปลาม้าลายลดลง โดยน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ความเข้มข้น 0.40 มิลลิลิตรต่อลิตร สามารถชักนำไปปลาม้าลายเกิดการสลบได้เร็วกว่าน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ความเข้มข้น 0.35 มิลลิลิตรต่อลิตร และสามารถชักนำการสลบของปลาม้าลายได้เร็วกว่าที่ความเข้มข้น 0.30 มิลลิลิตรต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นเวลาชักนำการสลบของปลาม้าลายจึงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของยาสลบ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mazandarani และ Hoseini (2017) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของเมนทอล (menthol) ในการใช้เป็นยาสลบสำหรับปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758)) ซึ่งพบว่าเมนทอลที่ความเข้มข้น 118 ไมโครลิตรต่อลิตร สามารถชักนำไปปลาคาร์พสลบภายในเวลา 3 นาที และหากเพิ่มระดับความเข้มข้นของเมนทอลที่ 512 ไมโครลิตรต่อลิตร สามารถชักนำไปปลาคาร์พสลบเร็วขึ้นภายในเวลา 1 นาที อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาระยะเวลาฟื้นสลบของปลาม้าลายหลังได้รับน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ความเข้มข้น 0.30, 0.35 และ 0.40 มิลลิลิตรต่อลิตร พบว่าไม่แตกต่างกัน ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Benovit et al. (2012) ที่รายงานว่าน้ำมันหอมระเหยยี่หว่า (*Ocimum gratissimum* L.) ที่ความเข้มข้น 50, 70 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพชักนำการสลบในปลา Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839)) โดยใช้ระยะเวลาการฟื้นสลบไม่แตกต่างกัน

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการชักนำการสลบปลาม้าลายของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับการศัลยกรรมพบว่าที่ความเข้มข้น 0.35 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นความเข้มข้น

ต่ำสุดที่สามารถชักนำให้ปลาฆ่าตายสลบในระยะที่ 3 ภายในเวลา 3 นาที ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด (ระยะเวลาที่ใช้ในการชักนำการสลบควรน้อยกว่า 3 นาที และระยะเวลาฟื้นตัวหลังการสลบควรน้อยกว่า 5 นาที) อย่างไรก็ตามน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ความเข้มข้น 0.35 มิลลิลิตรต่อลิตร ใช้เวลาชักนำการสลบปลาฆ่าตายมากกว่า 3 นาที ทั้งนี้ นาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ความเข้มข้น 0.35 มิลลิลิตรต่อลิตร ใช้เวลาชักนำการสลบปลาฆ่าตายไม่แตกต่างกับน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ความเข้มข้น 0.40 มิลลิลิตรต่อลิตร ($p < 0.05$) และนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ความเข้มข้น 0.30 มิลลิลิตรต่อลิตร ใช้เวลาชักนำการสลบปลาฆ่าตายไม่แตกต่างกับน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ความเข้มข้น 0.35 และ 0.40 มิลลิลิตรต่อลิตร ($p < 0.05$) สอดคล้องกับการศึกษาของ Rodrigues et al. (2021) ที่รายงานว่านาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหย *Nectandra grandiflora* (Nees) ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพชักนำการสลบปลาไนล์ (*Oreochromis niloticus* L.) ได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหย *Nectandra grandiflora* (Nees) ที่ละลายด้วยเอทานอล โดยนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหย *Nectandra grandiflora* (Nees) ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพชักนำการสลบได้เทียบเท่ากับน้ำมันหอมระเหย *Nectandra grandiflora* (Nees) ที่ละลายด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาระยะเวลาฟื้นสลบของปลาฆ่าตายหลังได้รับนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิและน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ละลายด้วยเอทานอลที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันพบว่า ระยะเวลาฟื้นสลบของปลาฆ่าตายไม่แตกต่างกัน ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kheawfu et al. (2018) ที่รายงานว่านาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยกานพลู (*Syzygium aromaticum* L.) ที่ความเข้มข้นของยูจีนอล 40 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการสลบปลาทอง (*Carassius auratus* L.) ได้ในเวลา 4.0 ± 0.6 นาที ซึ่งเร็วกว่าน้ำมันหอมระเหยกานพลูที่ละลายด้วยเอทานอลอย่างมีนัยสำคัญ (5.0 ± 0.9 นาที) ในระดับความเข้มข้นเดียวกัน แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญสำหรับระยะเวลาการฟื้นสลบ

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการชักนำการสลบปลาฆ่าตายของน้ำมันหอมระเหยมะลิและนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับการขนส่งพบว่าน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ระดับความเข้มข้น 0.04 มิลลิลิตรต่อลิตร มีประสิทธิภาพชักนำให้ปลาฆ่าตายสลบในระยะที่ 1 (sedation) ตลอดการจำลองการขนส่งระยะสั้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยที่ปลาไม่ตายในระหว่างการทดลอง และปลาฆ่าตายสามารถฟื้นตัวจากการสลบในระยะที่ 1 ภายในเวลาเฉลี่ย 1.83 ± 0.57 นาที ขณะที่นาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ระดับความเข้มข้น 0.02 มิลลิลิตรต่อลิตร มีประสิทธิภาพชักนำให้ปลาฆ่าตายสลบในระยะที่ 1 โดยปลามีพฤติกรรมอยู่ในอาการสงบ สามารถ

ทรงตัวอยู่ได้ และปลาไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้าภายนอก ยกเว้นแรงกด ตลอดจนการจำลองการขนส่งระยะสั้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เช่นเดียวกับน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ระดับความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ปลาไม่ตายในระหว่างการทดลอง และปลาม้าลายสามารถฟื้นตัวจากการสลบในระยะที่ 1 ภายในเวลาเฉลี่ย 1.77 ± 0.51 นาที ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Cooke et al. (2004) ที่รายงานว่าน้ำมันหอมระเหยกานพลู (*Syzygium aromaticum* L.) ที่ความเข้มข้น 5-9 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ปลากะพงปากกว้าง (*Micropterus salmoides* (Lacépède, 1802)) อยู่ในอาการสงบ (sedation) โดยมีผลกดระบบประสาทส่วนกลาง ส่งผลให้ปลาสูญเสียการตอบสนองต่อสิ่งเร้าภายนอกและลดอัตราการเต้นของหัวใจ ในขณะที่ปลายังคงรักษาสมดุลของร่างกายได้ในระหว่างการขนส่งเป็นเวลา 7 ชั่วโมง

จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่านาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิมีประสิทธิภาพชักนำให้เกิดการสลบของปลาม้าลายได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ละลายด้วยเอทานอล และการที่นาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิมีประสิทธิภาพดีมากกว่าเป็นผลมาจากความสามารถในการละลายน้ำได้ดีของนาโนอิมัลชันและขนาดอนุภาคที่เล็กกว่า 200 นาโนเมตร ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมยาสลบผ่านเหงือกและผิวหนังของปลาได้ดียิ่งขึ้น และส่งผลให้เพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งยาสลบเข้าสู่ระบบไหลเวียนไปยังตัวรับเป้าหมายที่ระบบประสาทส่วนกลางได้ดีมากขึ้น จึงเป็นผลทำให้ปลาม้าลายเกิดการสลบได้เร็ว (Khumpirapang, von Gersdorff Jørgensen, Müllertz, Rades, & Okonogi, 2021; Salvia-Trujillo & McClements, 2016)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพชักนำการสลบของปลาม้าลายในระยะที่ 3 ภายในเวลา 3 นาที สำหรับการคัดลอกกรรมของน้ำมันหอมระเหยมะลิและนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิกับ MS-222 ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร (Collymore et al., 2014) พบว่าน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ความเข้มข้น 0.35 และ 0.40 มิลลิกรัมต่อลิตร และนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ความเข้มข้น 0.30, 0.35 และ 0.40 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้เวลาชักนำการสลบไม่แตกต่างกับ MS-222 ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ($p < 0.05$) และผลระยะเวลากการฟื้นสลบของปลาม้าลายไม่แตกต่างกัน ($p < 0.05$) เมื่อพิจารณาผลการรักษาภาวะสลบของปลาม้าลายระหว่างการจำลองคัดลอกกรรม พบว่าน้ำมันหอมระเหยมะลิและนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ความเข้มข้น 0.30, 0.35 และ 0.40 มิลลิกรัมต่อลิตร และ MS-222 ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถรักษาภาวะสลบของปลาม้าลายระหว่างการจำลองคัดลอกกรรมได้ภายในเวลา 10 นาที และเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพชักนำการสลบของปลาม้าลายในระยะที่ 1 สำหรับการขนส่งของน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร และนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหย

มะลิที่ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสอดคล้องกับผลการทดสอบโดยใช้ MS-222 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (Lockwood et al., 2017) ซึ่งสามารถชักนำให้ปลาม้าลายสลบในระยะที่ 1 ตลอดการจำลองการขนส่งระยะสั้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และปลาม้าลายสามารถฟื้นตัวจากการสลบได้ภายในเวลา 2 นาที อย่างไรก็ตามยาสลบปลา MS-222 เป็นยาสลบประเภทสารเคมีสังเคราะห์ที่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อปลาและมนุษย์คือ เป็นสารก่อมะเร็งและทำลายจอประสาทตาของปลาและมนุษย์ (Al-Yaqout et al., 2012; Sladky et al., 2001) ทั้งนี้ยังมีราคาแพงและเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าสารจากธรรมชาติ (Cho & Heath, 2000) ดังนั้นการใช้ยาสลบปลาจากน้ำมันหอมระเหยมะลิจึงมีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยมากกว่าการใช้ยาสลบปลาประเภทสารเคมีสังเคราะห์

จากผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำของการทดลองชักนำการสลบปลาม้าลายสำหรับการคัดสรรกรรมและการขนส่งพบว่าคุณภาพน้ำ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่า pH และปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ ก่อนการทดลอง หลังเติมยาสลบ และหลังการทดลองของแต่ละชุดการทดลองไม่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารชักนำการสลบที่นำมาทดสอบในการศึกษานี้ ทั้งน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ละลายด้วยเอทานอล นาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิ และ MS-222 ไม่ส่งผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำ ทั้งนี้การใช้ยาสลบปลาควรควบคุมคุณภาพน้ำให้อยู่ในช่วงคงที่หรือเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด เนื่องจากอุณหภูมิ ค่า pH และปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำอาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของยาสลบ (Collimore, 2020) คือเมื่ออุณหภูมิสูงส่งผลให้ปลามีอัตราเมแทบอลิซึมสูงขึ้น อัตราการเต้นของหัวใจและอัตราการหายใจถี่ขึ้น ทำให้เวลาชักนำการสลบและฟื้นจากการสลบเร็วขึ้น และหากอุณหภูมิต่ำส่งผลให้ปลามีอัตราเมแทบอลิซึมต่ำลง อัตราการเต้นของหัวใจและอัตราการหายใจช้าลง ทำให้เวลาชักนำการสลบและฟื้นจากการสลบจึงนานขึ้น (Mazandarani & Hoseini, 2017; M. Park, Im, Seol, & Park, 2009) นอกจากนี้อุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำต่ำลง (Timmons & Ebeling, 2013) ส่งผลให้ปลาเกิดการขาดออกซิเจน (hypoxia) และอาจทำให้ปลาตายในระหว่างการให้ยาสลบได้ (West, Heard, & Caulkett, 2014) และหากค่า pH สูงหรือต่ำเกินไป (ขีดจำกัดล่าง pH 4 ขีดจำกัดบน pH 11 สำหรับปลาม้าลาย) จะส่งผลให้เกิดความเครียดทางสรีรวิทยาในปลา เช่น การผลิตเมือกมากเกินไปมาปกคลุมผิวหนังและเหงือกซึ่งขัดขวางการแลกเปลี่ยนแก๊ส และส่งผลต่อการทำลายเยื่อบุทางเดินหายใจ รวมถึงทำให้ปลาสูญเสียสมดุลการว่ายน้ำ มีพฤติกรรมชักกระตุก และอาจทำให้ปลาตายได้ (Ross & Ross, 2009; Zahangir, Haque, Mostakim, & Islam, 2015) และผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำของการทดลองชักนำการสลบปลาม้าลายในการศึกษานี้พบว่าคุณภาพ

น้ำอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับปลาฆ่าลายคือ อุณหภูมิ น้ำ 24-28 องศาเซลเซียส (Schaefer & Ryan, 2006) ค่า pH 6.6-8.2 (McClure, McIntyre, & McCune, 2006; Spence et al., 2006) และปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ 6-8 มิลลิกรัมต่อลิตร (Cartner et al., 2019)

ส่วนผลการตรวจสอบพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาฆ่าลายหลังได้รับสารทดสอบ ได้แก่ 1. น้ำมันหอมระเหยมะลิที่ละลายด้วยเอทานอล 2. เอทานอล 3. นาโนอิมัลชัน น้ำมันหอมระเหยมะลิ 4. ส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิว และ 5. MS-222 พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกของปลาฆ่าลายที่ได้รับสารทดสอบคือ มีการเพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก (hyperplasia of the gill epithelium) ของปลาฆ่าลายที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยมะลิที่ละลายในเอทานอล เอทานอล และ MS-222 ทำให้เซลล์เยื่อบุผิวเหงือกหนาขึ้นสำหรับปลาฆ่าลายที่ได้รับนาโนอิมัลชัน น้ำมันหอมระเหยมะลิและส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิว พบว่า มีการเพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อบุผิวบริเวณกิ่งเหงือก (gill lamellae) เพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่านาโนอิมัลชัน น้ำมันหอมระเหยมะลิและส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิวนั้นช่วยลดผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกของปลาฆ่าลายได้ และการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกอาจเกิดจากส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิวในสูตรนาโนอิมัลชัน ซึ่งน้ำมันหอมระเหยมะลิอาจไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือก สำหรับการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อนั้นเกิดขึ้นจากการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตเมื่อได้รับสิ่งแปลกปลอมเช่นเชื้อโรคหรือสารพิษ เมื่อเซลล์ได้รับอันตรายจะมีการตอบสนองคือ มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นหนาตัวขึ้น เนื่องจากเหงือกเป็นอวัยวะหลักในการดูดซึมและแลกเปลี่ยนสารจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ดังนั้นการเพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกจึงเป็นการตอบสนองเพื่อเพิ่มจำนวนชั้นของเยื่อบุผิวให้หนาขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่มระยะเวลาแพร่กระจายของสารระหว่างสิ่งแวดล้อมภายนอกกับหลอดเลือด และเป็นการป้องกันสารพิษจากภายนอกแพร่กระจายเข้าสู่ร่างกาย (Abalaka, Fatihu, Ibrahim, & Ambali, 2015) ทั้งนี้จำนวนเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกที่หนาขึ้นอาจทำให้ประสิทธิภาพการแลกเปลี่ยนแก๊สของปลาตกลงเนื่องจากพื้นที่ผิวของเหงือกลดลง (Susithra, Jothivel, Jayakumar, & Paul, 2007) ซึ่งอาจทำให้ปลาหายใจลำบากและตายได้ สำหรับการตรวจสอบพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับของปลาฆ่าลายหลังได้รับสารทดสอบทั้ง 5 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับหลังได้รับสารทดสอบทั้ง 5 ชนิดคล้ายกับเนื้อเยื่อตับของกลุ่มควบคุมคือเซลล์ตับเรียงชิดติดกัน ลักษณะของเซลล์ตับมีรูปร่างหลายเหลี่ยมมีนิวเคลียสกลมอยู่กลางเซลล์หรืออาจอยู่ขอบเซลล์เมื่อมีการสะสมไขมันในเซลล์มาก (วันทนี ศรีจันทร์, 2551) อย่างไรก็ตามการศึกษา

นี้ทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) ต่อเนื้อเยื่อซึ่งใช้ระยะเวลาไม่นาน ทั้งนี้เซลล์ตับมีหน้าที่เมแทบอลิซึมสารอาหาร ทำลายสิ่งแปลกปลอมและสารพิษได้ จึงอาจทำให้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับจึงต้องมีการสะสมสารพิษตกค้างในปริมาณมากและเป็นระยะเวลานานจึงจะพบความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับ

ข้อเสนอแนะ

1. งานวิจัยนี้ผลิตนาโนอิมัลชันโดยวิธีการผลิตแบบพลังงานต่ำซึ่งอาศัยพลังงานเคมีของสารลดแรงตึงผิวเป็นหลักเพื่อสร้างอนุภาคขนาดเล็กในระบบ ดังนั้นในงานวิจัยต่อไปควรทำการทดลองโดยใช้กระบวนการผลิตรูปแบบอื่นเพื่อลดการใช้สารลดแรงตึงผิวหรือหาอัตราส่วนของสารองค์ประกอบที่เหมาะสมสำหรับการผลิตนาโนอิมัลชันที่มีความเสถียรมากยิ่งขึ้น

2. งานวิจัยนี้ประเมินระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยมะลิ และสารในรูปแบบนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยมะลิในการใช้เป็นยาเคลือบสำหรับปลาฆ่าสายซึ่งเป็นปลาขนาดเล็ก ดังนั้นในงานวิจัยต่อไปควรทำการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยมะลิและนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิสำหรับปลาขนาดใหญ่ต่อไป

3. งานวิจัยนี้ศึกษาผลข้างเคียงของน้ำมันหอมระเหยมะลิและนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยมะลิต่อพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาฆ่าสายเท่านั้น ดังนั้นในงานวิจัยต่อไปควรศึกษาผลข้างเคียงด้านอื่น ๆ ต่อปลาฆ่าสาย เช่น ผลต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของปลาฆ่าสาย และผลต่อระดับคอเลสเตอรอลและเซลล์นิวโทรฟิลในเลือดปลาฆ่าสาย เป็นต้น

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.
- Ablain, J., & Zon, L. I. (2013). Of fish and men: using zebrafish to fight human diseases. *Trends in cell biology*, 23(12), 584-586.
- Acevedo-Fani, A., Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., & Martín-Belloso, O. (2015). Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. *Food hydrocolloids*, 47, 168-177.
- Al-Khazraji, S. M. (2015). Evaluation of antibacterial activity of *Jasminum officinale*. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 10(1), 121-124.
- 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.
- Amiri, P., Shahpiri, A., Asadollahi, M. A., Momenbeik, F., & Partow, S. (2016). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for linalool production. *Biotechnology letters*, 38(3), 503-508.
- 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.
- Api, A., Belsito, D., Bhatia, S., Bruze, M., Calow, P., Dagli, M., . . . La Cava, S. (2015). RIFM fragrance ingredient safety assessment, Linalool, CAS registry number 78-70-6. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 82, S29-S38.
- Aprotosoiaie, A. C., Hăncianu, M., Costache, I. I., & Miron, A. (2014). Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour and Fragrance*

Journal, 29(4), 193-219.

- Aydın, B., & Barbas, L. A. L. (2020). Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. *Aquaculture*, 520, 734999.
- 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.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Batista, P. A., de Paula Werner, M. F., Oliveira, E. C., Burgos, L., Pereira, P., da Silva Brum, L. F., & Dos Santos, A. R. S. (2008). Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (–)-linalool in mice. *Neuroscience Letters*, 440(3), 299-303.
- Benarroch, E. E. (2011). NMDA receptors: recent insights and clinical correlations. *Neurology*, 76(20), 1750-1757.
- Benovit, S. C., Gressler, L. T., de Lima Silva, L., de Oliveira Garcia, L., Okamoto, M. H., dos Santos Pedron, J., . . . Baldisserotto, B. (2012). Anesthesia and transport of Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with essential oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 43(6), 896-900.
- Benovit, S. C., Silva, L. L., Salbego, J., Loro, V. L., Mallmann, C. A., Baldisserotto, B., . . . Heinzmann, B. M. (2015). Anesthetic activity and bio-guided fractionation of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. in silver catfish *Rhamdia quelen*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87, 1675-1689.
- Bhanu, S. V., & Philip, B. (2011). Effect of ethanol on branchial adenosine triphosphatases in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Toxicology international*, 18(1), 27.
- Bianchini, A., Garlet, Q., Da Cunha, J., Bandeira, G., Brusque, I., Salbego, J., . . . Baldisserotto, B. (2017). Monoterpenoids (thymol, carvacrol and S-(+)-linalool) with anesthetic activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*): evaluation of acetylcholinesterase and GABAergic activity. *Brazilian Journal of Medical and*

Biological Research, 50.

- Can, E., Kızak, V., Can, Ş. S., & Özçiçek, E. (2019). Anesthetic efficiency of three medicinal plant oils for aquatic species: coriander *Coriandrum sativum*, linaloe tree *Bursera delpechiana*, and lavender *Lavandula hybrida*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 31(3), 266-273.
- Carter, K. M., Woodley, C. M., & Brown, R. S. (2011). A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. *Reviews in fish biology and fisheries*, 21(1), 51-59.
- Cartner, S., Eisen, J. S., Farmer, S. F., Guillemin, K. J., Kent, M. L., & Sanders, G. E. (2019). *The Zebrafish in Biomedical Research: Biology, Husbandry, Diseases, and Research Applications*.
- Chang, K.-M., & Shen, C.-W. (2011). Aromatherapy benefits autonomic nervous system regulation for elementary school faculty in Taiwan. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
- Chang, M., Qiu, L., & Green, P. S. (1996). *Oleaceae Flora of China* (P. H. Z. Y. Wu Raven 15): Missouri Botanical Garden Press.
- Che Marzuki, N. H., Wahab, R. A., & Abdul Hamid, M. (2019). An overview of nanoemulsion: concepts of development and cosmeceutical applications. *Biotechnology & biotechnological equipment*, 33(1), 779-797.
- Chemicals, U. C. A. (2014). CLH report Proposal for harmonised classification and labelling Based on Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP Regulation). *Annex VI, Part*.
- Cho, G., & Heath, D. (2000). Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 31(6), 537-546.
- Collymore, C. (2020). Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia of the Laboratory Zebrafish *The Zebrafish in Biomedical Research* (403-413).
- Collymore, C., Tolwani, A., Lieggi, C., & Rasmussen, S. (2014). Efficacy and safety of 5 anesthetics in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 53(2), 198-203.

- Cooke, S. J., Suski, C. D., Ostrand, K. G., Tufts, B. L., & Wahl, D. H. (2004). Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture*, 239(1-4), 509-529.
- Coyle, S. D., Durborow, R. M., & Tidwell, J. H. (2004). *Anesthetics in aquaculture* (3900): Southern Regional Aquaculture Center Texas.
- da Cunha, M. A., de Barros, F. M. C., de Oliveira Garcia, L., de Lima Veeck, A. P., Heinzmann, B. M., Loro, V. L., . . . Baldisserotto, B. (2010). Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 306(1-4), 403-406.
- de Freitas Souza, C., Baldissera, M. D., Bianchini, A. E., da Silva, E. G., Mourão, R. H. V., da Silva, L. V. F., . . . Baldisserotto, B. (2018). Citral and linalool chemotypes of *Lippia alba* essential oil as anesthetics for fish: a detailed physiological analysis of side effects during anesthetic recovery in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 44(1), 21-34.
- de Freitas Souza, C., Descovi, S., Baldissera, M. D., Bertolin, K., Bianchini, A. E., Mourão, R. H. V., . . . Baldisserotto, B. (2019). Involvement of HPI-axis in anesthesia with *Lippia alba* essential oil citral and linalool chemotypes: gene expression in the secondary responses in silver catfish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 45(1), 155-166.
- Din, N. C. (2006). *Extraction of Essential Oils from Jasmine Flower Using Supercritical Co2 Co-solvent Extraction*. KUKTEM.
- Do Vale, T. G., Furtado, E. C., Santos Jr, J., & Viana, G. (2002). Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. *Phytomedicine*, 9(8), 709-714.
- Duke, J. A., Bogenschutz-Godwin, M., DuCellier, J., & Duke, P. (2002). CRC handbook of medicinal plants. *Taylor and Francis. Inc pub. SBN-13, Edition, 2*, 821.
- Elisabetsky, E., Brum, L. S., & Souza, D. (1999). Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. *Phytomedicine*, 6(2), 107-113.

- Elisabetsky, E., Marschner, J., & Onofre Souza, D. (1995). Effects of linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. *Neurochemical research*, 20(4), 461-465.
- Engeszer, R. E., Patterson, L. B., Rao, A. A., & Parichy, D. M. (2007). Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish*, 4(1), 21-40.
- Fredricks, K., Gingerich, W., & Fater, D. (1993). Comparative cardiovascular effects of four fishery anesthetics in spinally transected rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 104(3), 477-483.
- Gholipourkanani, H., Gholinasab-Omran, I., Ebrahimi, P., & Jafaryan, H. (2015). Anesthetic effect of clove oil loaded on lecithin based nano emulsions in gold fish, *Carassius auratus*. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 10(6), 553.
- Goulet, F., Vachon, P., & Helie, P. (2011). Evaluation of the toxicity of eugenol at anesthetic doses in African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Toxicologic pathology*, 39(3), 471-477.
- Grunwald, D. J., & Eisen, J. S. (2002). Headwaters of the zebrafish—emergence of a new model vertebrate. *Nature reviews genetics*, 3(9), 717-724.
- Grush, J., Noakes, D., & Moccia, R. (2004). The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). *Zebrafish*, 1(1), 46-53.
- Guzmán-Gutiérrez, S. L., Bonilla-Jaime, H., Gómez-Cansino, R., & Reyes-Chilpa, R. (2015). Linalool and β -pinene exert their antidepressant-like activity through the monoaminergic pathway. *Life sciences*, 128, 24-29.
- Harms, C., & Bakal, R. (1995). Techniques in fish anesthesia. *J Sm Exot Anim Med*, 3, 19-25.
- 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.
- Heldwein, C. G., de L Silva, L., Gai, E. Z., Roman, C., Parodi, T. V., Bürger, M. E., . . .

- Heinzmann, B. M. (2014). S-(+)-Linalool from *Lippia alba*: sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 41(6), 621-629.
- Hinton, D. E., Kullman, S. W., Hardman, R. C., Volz, D. C., Chen, P.-J., Carney, M., & Bencic, D. C. (2005). Resolving mechanisms of toxicity while pursuing ecotoxicological relevance? *Marine Pollution Bulletin*, 51(8-12), 635-648.
- Hohlenwerger, J. C., Baldisserotto, B., Couto, R. D., Heinzmann, B. M., Silva, D. T. d., Caron, B. O., . . . Copatti, C. E. (2016). Essential oil of *Lippia alba* in the transport of Nile tilapia. *Ciência Rural*, 47.
- Hoseini, S. M., Hosseini, S. A., & Nodeh, A. J. (2011). Serum biochemical characteristics of Beluga, *Huso huso* (L.), in response to blood sampling after clove powder solution exposure. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37(3), 567-572.
- 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.
- Huang, W.-C., Hsieh, Y.-S., Chen, I.-H., Wang, C.-H., Chang, H.-W., Yang, C.-C., . . . Chuang, Y.-J. (2010). Combined use of MS-222 (tricaine) and isoflurane extends anesthesia time and minimizes cardiac rhythm side effects in adult zebrafish. *Zebrafish*, 7(3), 297-304.
- Ilc, T., Parage, C., Boachon, B., Navrot, N., & Werck-Reichhart, D. (2016). Monoterpenol oxidative metabolism: role in plant adaptation and potential applications. *Frontiers in plant science*, 7, 509.
- Jafari, S. M., & McClements, D. J. (2018). *Nanoemulsions: formulation, applications, and characterization*: Academic Press.
- Jafari, S. M., Paximada, P., Mandala, I., Assadpour, E., & Mehrnia, M. A. (2017). Encapsulation by nanoemulsions *Nanoencapsulation technologies for the food and nutraceutical industries* (36-73): Elsevier.
- Javahery, S., Nekoubin, H., & Moradlu, A. H. (2012). Effect of anaesthesia with clove oil in fish (review). *Fish Physiol Biochem*, 38(6), 1545-1552.

- Kale, S. N., & Deore, S. L. (2017). Emulsion micro emulsion and nano emulsion: a review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 8(1), 39.
- Kalueff, A. V., Echevarria, D. J., Homechaudhuri, S., Stewart, A. M., Collier, A. D., Kaluyeva, A. A., . . . Wang, J. (2016). Zebrafish neurobehavioral phenomics for aquatic neuropharmacology and toxicology research. *Aquatic Toxicology*, 170, 297-309.
- Kalueff, A. V., Echevarria, D. J., & Stewart, A. M. (2014). Gaining translational momentum: more zebrafish models for neuroscience research. In (Vol. 55, pp. 1-6): Elsevier.
- Kalueff, A. V., Gebhardt, M., Stewart, A. M., Cachat, J. M., Brimmer, M., Chawla, J. S., . . . Landsman, S. (2013). Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, 10(1), 70-86.
- 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.
- Khare, C. (2007). *Indian Medicinal Plants: An Illustrated Dictionary* Springer: New York.
- 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.
- Kheawfu, K., Pikulkaew, S., Rades, T., Müllertz, A., & Okonogi, S. (2018). Development and characterization of clove oil nanoemulsions and self-microemulsifying drug delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 46, 330-338.
- Kheawfu, K., Pikulkaew, S., Rades, T., Müllertz, A., von Gersdorff Jørgensen, L., & Okonogi, S. (2021). Design and optimization of self-nanoemulsifying drug delivery systems of clove oil for efficacy enhancement in fish anesthesia. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61, 102241.
- 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., 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), e0188848.
- Khumpirapang, N., von Gersdorff Jørgensen, L., Müllertz, A., Rades, T., & Okonogi, S. (2021). Formulation optimization, anesthetic activity, skin permeation, and transportation pathway of *Alpinia galanga* oil SNEDDS in zebrafish (*Danio rerio*). *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 165, 193-202.
- Kizak, V., Can, E., Danabaş, D., & Can, Ş. S. (2018). Evaluation of anesthetic potential of rosewood (*Aniba rosaeodora*) oil as a new anesthetic agent for goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture*, 493, 296-301.
- Kumari, P., Abidi, S., & Parwez, I. (2018). Evaluation of anaesthetizing efficacy of clove oil in *Channa punctatus*. *Int J Fish Aquat Stud*, 6, 262-266.
- Lapczynski, A., Letizia, C., & Api, A. (2008). Addendum to fragrance material review on linalool. *Food and chemical toxicology*, 46(11), S190-S192.
- Leal-Cardoso, J. H., da Silva-Alves, K. S., Ferreira-da-Silva, F. W., dos Santos-Nascimento, T., Joca, H. C., de Macedo, F. H. P., . . . Cruz, J. S. (2010). Linalool blocks excitability in peripheral nerves and voltage-dependent Na⁺ current in dissociated dorsal root ganglia neurons. *European journal of pharmacology*, 645(1-3), 86-93.
- Lima, N. G., De Sousa, D. P., Pimenta, F. C. F., Alves, M. F., De Souza, F. S., Macedo, R. O., . . . De Almeida, R. N. (2013). Anxiolytic-like activity and GC–MS analysis of (R)-(+)-limonene fragrance, a natural compound found in foods and plants. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 103(3), 450-454.
- Linck, V. M., da Silva, A. L., Figueiro, M., Caramao, E. B., Moreno, P. R. H., & Elisabetsky, E. (2010). Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. *Phytomedicine*, 17(8-9), 679-683.
- Lizarraga-Valderrama, L. R. (2021). Effects of essential oils on central nervous system: Focus on mental health. *Phytotherapy research*, 35(2), 657-679.
- Lockwood, N., Parker, J., Wilson, C., & Frankel, P. (2017). Optimal anesthetic regime for motionless three-dimensional image acquisition during longitudinal studies of adult nonpigmented zebrafish. *Zebrafish*, 14(2), 133-139.

- Lopes, J. M., Souza, C. d. F., Schindler, B., Pinheiro, C. G., Salbego, J., Siqueira, J. C. d., . . . Baldisserotto, B. (2018). Essential oils from *Citrus x aurantium* and *Citrus x latifolia* (Rutaceae) have anesthetic activity and are effective in reducing ion loss in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Neotropical Ichthyology*, 16.
- Maricchiolo, G., & Genovese, L. (2011). Some Contributions to Knowledge of Stress Response in Innovative Species with Particular Focus on the Use of the Anaesthetics. *The Open Marine Biology Journal*, 5, 24-33.
- Marking, L. L., & Meyer, F. P. (1985). Are better anesthetics needed in fisheries? *Fisheries*, 10(6), 2-5.
- Martins, T., Valentim, A. M., Pereira, N., & Antunes, L. M. (2016). Anaesthesia and analgesia in laboratory adult zebrafish: a question of refinement. *Lab Anim*, 50(6), 476-488.
- Matthews, M., & Varga, Z. M. (2012). Anesthesia and euthanasia in zebrafish. *ILAR journal*, 53(2), 192-204.
- Mazandarani, M., & Hoseini, S. M. (2017). Menthol and 1, 8-cineole as new anaesthetics in common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research*, 48(6), 3041-3051.
- McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, 7(6), 2297-2316.
- McClure, M., McIntyre, P., & McCune, A. (2006). Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology*, 69(2), 553-570.
- McFARLAND, W. N. (1959). A study of the effects of anaesthetics on the behaviour and physiology of fishes. *Publ Inst Mar Sci*, 6, 23-55.
- Mirghaed, A. T., Yasari, M., Mirzargar, S. S., & Hoseini, S. M. (2018). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) anesthesia with myrcene: Efficacy and physiological responses in comparison with eugenol. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44(3), 919-926.
- Mirzargar, S., Soltani, M., Ahmadi, M., Abrishamifar, A., Bahonar, A., & Yousefi, P. (2011).

- Anesthetic effect of tricaine methanesulfonate, clove oil and electroanesthesia on lysozyme activity of *Oncorhynchus mykiss*. *Iranian journal of fisheries sciences*, 10(3), 393-402.
- Mitjana, O., Bonastre, C., Insua, D., Falceto, M. V., Esteban, J., Josa, A., & Espinosa, E. (2014). The efficacy and effect of repeated exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil and tricaine methanesulphonate as anesthetic agents on juvenile Angelfish (*Pterophyllum scalare*). *Aquaculture*, 433, 491-495.
- Mizutani, T., Satoh, K., & Nomura, H. (1991). Hepatotoxicity of eugenol and related compounds in mice depleted of glutathione: structural requirements for toxic potency. *Research communications in chemical pathology and pharmacology*, 73(1), 87-95.
- Mußhoff, U., Madeja, M., Binding, N., Witting, U., & Speckmann, E. (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.
- 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.
- Nguyen, M., Stewart, A. M., & Kalueff, A. V. (2014). Aquatic blues: modeling depression and antidepressant action in zebrafish. *Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry*, 55, 26-39.
- Nour, A. H. (2018). Emulsion types, stability mechanisms and rheology: A review. *International Journal of Innovative Research and Scientific Studies (IJIRSS)*, 1(1).
- Ortuno, J., Esteban, M., & Meseguer, J. (2002). Effects of four anaesthetics on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & shellfish immunology*, 12(1), 49-59.
- Park, H. M., Lee, J. H., Yaoyao, J., Jun, H. J., & Lee, S. J. (2011). Limonene, a natural

- cyclic terpene, is an agonistic ligand for adenosine A2A receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 404(1), 345-348.
- Park, M., Im, S.-Y., Seol, D.-W., & Park, I.-S. (2009). Efficacy and physiological responses of rock bream, *Oplegnathus fasciatus* to anesthetization with clove oil. *Aquaculture*, 287(3-4), 427-430.
- Pedrazzani, A. S., & Neto, A. O. (2016). The anaesthetic effect of camphor (*Cinnamomum camphora*), clove (*Styzygium aromaticum*) and mint (*Mentha arvensis*) essential oils on clown anemonefish, *Ampiprion ocellaris* (Cuvier 1830). *Aquaculture Research*, 47(3), 769-776.
- Pereira, I., Severino, P., Santos, A. C., Silva, A. M., & Souto, E. B. (2018). Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 171, 566-578.
- Pikulkaew, S., Khumpirapang, N., Chaisri, W., & Okonogi, S. (2017). Effects of *Alpinia galanga* oil on anesthesia and stress reduction in *Oreochromis niloticus*. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 11(4), 186-192.
- POWO. (2020). *Jasminum officinale* L. | Plants of the World Online | Kew Science. . Retrieved from <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:609672-1>
- Prakash, O., Sahoo, D., & Rout, P. K. (2012). Liquid CO₂ extraction of *Jasminum grandiflorum* and comparison with conventional processes. *Natural Product Communications*, 7(1), 1934578X1200700131.
- Priborsky, J., & Velisek, J. (2018). A review of three commonly used fish anesthetics. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 26(4), 417-442.
- Purbosari, N., Warsiki, E., Syamsu, K., & Santoso, J. (2019). Natural versus synthetic anesthetic for transport of live fish: A review. *Aquaculture and Fisheries*, 4(4), 129-133.
- Readman, G. D., Owen, S. F., Murrell, J. C., & Knowles, T. G. (2013). Do fish perceive anaesthetics as aversive? *PLoS One*, 8(9), e73773.
- Rodrigues, P., Ferrari, F. T., Barbosa, L. B., Righi, A., Laporta, L., Garlet, Q. I., . . .

- Heinzmann, B. M. (2021). Nanoemulsion boosts anesthetic activity and reduces the side effects of *Nectandra grandiflora* Nees essential oil in fish. *Aquaculture*, 545, 737146.
- Ross, L. G., & Ross, B. (2009). *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*: John Wiley & Sons.
- Rotiroti, D., Cristina Tassorelli, M., & Bagetta, G. (2009). Effects of systemic administration of the essential oil of bergamot (BEO) on gross behaviour and EEG power spectra recorded from the rat hippocampus and cerebral cortex. *Functional neurology*, 24(2), 107.
- Sakurada, T., Mizoguchi, H., Kuwahata, H., Katsuyama, S., Komatsu, T., Morrone, L. A., . . . Sakurada, S. (2011). Intraplantar injection of bergamot essential oil induces peripheral antinociception mediated by opioid mechanism. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 97(3), 436-443.
- Satou, T., Takahashi, M., Kasuya, H., Murakami, S., Hayashi, S., Sadamoto, K., & Koike, K. (2013). Organ accumulation in mice after inhalation of single or mixed essential oil compounds. *Phytotherapy research*, 27(2), 306-311.
- Schaefer, J., & Ryan, A. (2006). Developmental plasticity in the thermal tolerance of zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology*, 69(3), 722-734.
- Silva Brum, L., Emanuelli, T., Souza, D., & Elisabetsky, E. (2001). Effects of linalool on glutamate release and uptake in mouse cortical synaptosomes. *Neurochemical research*, 26(3), 191-194.
- Silva, L. d. L., Silva, D. T. d., Garlet, Q. I., Cunha, M. A., Mallmann, C. A., Baldisserotto, B., . . . Heinzmann, B. M. (2013). Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Neotropical Ichthyology*, 11, 443-451.
- Silva, L. L., Balconi, L. S., Gressler, L. T., Garlet, Q. I., Sutili, F. J., Vargas, A. P., . . . Heinzmann, B. M. (2017). S-(+)-and R-(-)-linalool: a comparison of the in vitro anti-*Aeromonas hydrophila* activity and anesthetic properties in fish. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89, 203-212.
- Sinatra, R. S., Jahr, J. S., & Watkins-Pitchford, J. M. (2010). *The essence of analgesia and*

analgesics: Cambridge University Press.

- Sirimanapong, W., Saetang, S., Namwongprom, K., Pabutta, C., Mitprayoon, T., Kaewkhao, P., & Mitemit, S. (2020). A Comparison of 3 Anesthetic Agents (MS-222, Benzocaine, and Clove oil) in East Asian Bullfrog (*Hoplobatrachus rugulosus*). *Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine*, 15(1), 43-55.
- Sladky, K. K., Swanson, C. R., Stoskopf, M. K., Loomis, M. R., & Lewbart, G. A. (2001). Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). *American journal of veterinary research*, 62(3), 337-342.
- Spence, R., Fatema, M., Reichard, M., Huq, K., Wahab, M., Ahmed, Z., & Smith, C. (2006). The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*, 69(5), 1435-1448.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological reviews*, 83(1), 13-34.
- Stevanović, M. M., Škapin, S. D., Bračko, I., Milenković, M., Petković, J., Filipič, M., & Uskoković, D. P. (2012). Poly (lactide-co-glycolide)/silver nanoparticles: Synthesis, characterization, antimicrobial activity, cytotoxicity assessment and ROS-inducing potential. *Polymer*, 53(14), 2818-2828.
- Stringaro, A., Colone, M., & Angiolella, L. (2018). Antioxidant, antifungal, antibiofilm, and cytotoxic activities of *Mentha* spp. essential oils. *Medicines*, 5(4), 112.
- Susithra, N., Jothivel, N., Jayakumar, P., & Paul, V. (2007). Toxicopathological impact of cadmium chloride on the accessory respiratory organ of the air-breathing catfish *Heteropneustes fossilis*.
- Timmons, M., & Ebeling, J. (2013). *Recirculating aquaculture 3rd ed.* Ithaca, NY. In: Ithaca Publishing Company, LLC Northeastern Regional Aquaculture Center
- Tsuchiya, H. (2017). Anesthetic agents of plant origin: a review of phytochemicals with anesthetic activity. *Molecules*, 22(8), 1369.
- Valentim, A. M., Felix, L. M., Carvalho, L., Diniz, E., & Antunes, L. M. (2016). A New Anaesthetic Protocol for Adult Zebrafish (*Danio rerio*): Propofol Combined with

- Lidocaine. *PLoS One*, 11(1), e0147747.
- Velisek, J., Svobodova, Z., Piackova, V., Groch, L., & Nepejchalova, L. (2005). Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Veterinari Medicina*, 50(6), 269-275.
- Waxman, E. A., & Lynch, D. R. (2005). N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease. *The Neuroscientist*, 11(1), 37-49.
- West, G., Heard, D., & Caulkett, N. (2014). *Zoo animal and wildlife immobilization and anesthesia*: John Wiley & Sons.
- Wong, D., von Keyserlingk, M. A., Richards, J. G., & Weary, D. M. (2014). Conditioned place avoidance of zebrafish (*Danio rerio*) to three chemicals used for euthanasia and anaesthesia. *PLoS One*, 9(2), e88030.
- Zahangir, M. M., Haque, F., Mostakim, G. M., & Islam, M. S. (2015). Secondary stress responses of zebrafish to different pH: Evaluation in a seasonal manner. *Aquaculture Reports*, 2, 91-96.
- Zahl, I. H., Samuelsen, O., & Kiessling, A. (2012). Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(1), 201-218.
- 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.
- เมธา อภิวัดนามกุล. (2557). AUTOIMMUNE ENCEPHALITIS. วารสารประสาทวิทยาแห่งประเทศไทย, 30(1), 2.
- นิรานี บินนิมะ. (2558). พิษของเดลตาเมทรินต่อการพัฒนาของเอ็มบริโอปลาฆ่าลาย (*Danio rerio*). มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พิมพ์พร ลีลาพรพิสิฐ. (2540). อิมัลชันทางเครื่องสำอาง = *Cosmetic emulsions* (พิมพ์ครั้งที่ 1.): กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.
- วราภรณ์ ประเสริฐ. (2560). นาโนอิมัลชันและการผลิตนาโนอิมัลชันโดยกระบวนการพลังงานต่ำ. วารสารอาหาร, 47(2), 37-45.
- วันทนี ศรีจันทร์. (2551). จุลพยาธิสภาพของเหงือกตับและไตในปลากระดี่หม้อ *Trichogaster trichopterus* และปลาตะเพียน *Puntius gonionotus* ในพื้นที่เกษตรกรรมคลอง 7 จังหวัดปทุมธานี. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สำนักงานเกษตรและสหกรณ์ จังหวัดราชบุรี. (2563). ข้อมูลเพื่อการวางแผนพัฒนาการเกษตรราย
สินค้า จ.ราชบุรี ปี 2563 ปลายวงม. สืบค้นจาก

<https://www.opsmoac.go.th/ratchaburi-dwl-preview-421591791942>



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ณัฐนิชา รื่นถ้อย
วัน เดือน ปี เกิด	17 พฤษภาคม 2541
สถานที่เกิด	อุทัยธานี
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	3/4 หมู่ 7 ต.สามเรือน อ.บางปะอิน จ.พระนครศรีอยุธยา 13160

