รายงานการวิจัย

การพัฒนาสูตรตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูเป็นยาสลบในสัตว์น้ำ

Formulation of Clove Oil Solution as an Anesthetic for Aquatic Animals

โดย

รศ.สพ.ญ.ดร.เจนนุช ว่องธวัชชัย
ผศ.ภก.ดร.พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์
สพ.ญ.นุชนารถ ทิพย์มงคลศิลป์
ภก.ณัฐพล จงอรุณงามแสง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการวิจัยสู่ชุมชน กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

ประจำปีงบประมาณ 2549

กิตติกรรมประกาศ

โครงการ " การพัฒนาสูตรตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูเป็นยาสลบในสัตว์น้ำ " ได้รับสนับสนุนทุนวิจัยจาก กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2549

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร. ลิลา เรืองแป้น ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคสัตว์น้ำ กรมประมง ภูเก็ตอะบาโลนฟาร์ม ป.เจริญฟาร์ม มานิตย์ฟาร์ม และคุณสิบทิศ หิรุญวงส์ สำหรับสถานที่ทำการศึกษาและคำแนะนำต่างๆ ซึ่งทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การพัฒนาสูตรตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูเป็นยาสลบในสัตว์น้ำ

บทคัดย่อ

น้ำมันกานพลู เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากพืช มีฤทธิ์ทางชีวภาพทำให้สัตว์น้ำมีอาการเชื่องซึม สงบระงับ กล้ามเนื้อคลายตัว จนถึงทำให้สัตว์ซึมลึกและสลบซึ่งเป็นประโยชน์สำหรับการจัดการสัตว์น้ำ เช่น การควบคุมลดความก้าวร้าว การผสมเทียม ชั่งน้ำหนัก และการขนส่ง เป็นต้น แม้ว่าน้ำมันกานพลูสามารถสลายตัวด้วยกระบวนการทางชีวภาพและปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม แต่การนำมาใช้เป็นยาสลบในสัตว์น้ำมีข้อจำกัดด้านประสิทธิภาพเนื่องจากน้ำมันกานพลูไม่ละลายน้ำ ทำให้การกระจายตัวในน้ำไม่ดีและออกฤทธิ์ไม่สม่ำเสมอ เป็นแผ่นฟิล์มน้ำมันลอยปกคลุมที่ผิวน้ำ การศึกษานี้เป็นการพัฒนาสูตรตำรับผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลูพร้อมใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการนำไปใช้งานและปลอดภัยในการทำให้สัตว์น้ำสลบหรือสงบระงับ

ความปลอดภัยของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อสัตว์น้ำประเมินโดยการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูในสัตว์น้ำชนิดต่างๆ เมื่อสัมผัสสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าระดับความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่ทำให้สัตว์ตายครึ่งหนึ่งของจำนวนสัตว์ที่ใช้ทดสอบ (Lethal Dose 50%, LD_{50}) ในหอยเป๋าฮื้อขนาด 8-12 มิลลิเมตร 13.18 ppm ปลากะพงขนาด 1 กรัม 12.21 ppm ปลานิลขนาด 0.4 กรัม 11.45 ppm และปลาหมอสีขนาด 20-30 กรัม 15.07 ppm ขนาด 8-10 กรัม 16.31 ppm การศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูในปลาหมอสีขนาด 20-30 กรัม สัมผัสน้ำมันกานพลู 4-6 ppm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ไม่พบจุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกที่แสดงถึงความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลู

ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้สัตว์น้ำสงบระงับ ลดการเคลื่อนไหว และลดการขับถ่ายของเสีย สามารถใช้ขนส่งสัตว์น้ำเป็นระยะเวลา 12-24 ชั่วโมง ในภาชนะบรรจุน้ำจำกัดและไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำระหว่างการขนส่ง พบว่าความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่เหมาะสมในการสงบระงับสัตว์น้ำเพื่อการขนส่ง คือ 4 ppm สำหรับลูกปลากะพงขนาด 1 กรัม 5-10 ppm สำหรับลูกปลานิลขนาด 0.3-5 กรัม และ 4-6 ppm สำหรับปลาหมอสีขนาด 8-30 กรัม นอกจากนี้การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการจับบังคับสัตว์น้ำซึ่งต้องการระดับสลบลึกหรือสูญเสียการทรงตัวเพื่อการจัดการ เช่น ชั่งน้ำหนัก ผสมเทียม ฉีดยา ความเข้มข้นของสารละลายน้ำมันกานพลู 50-500 ppm สามารถทำให้ปลาสงบต่อการจับบังคับและฟื้นกลับสู่สภาพปกติหลังจากเปลี่ยนถ่ายน้ำโดยปลาไม่แสดงอาการระคายเคืองหรือตื่นตระหนก

การทดสอบประสิทธิภาพและความปลอดภัยของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อสัตว์น้ำ แสดงว่าสารละลายน้ำมันกานพลูที่พัฒนาขึ้นสามารถออกฤทธิ์ให้สัตว์น้ำสงบระงับ ลดการเคลื่อนไหว กล้ามเนื้อคลายตัว การเผาผลาญในร่างกายลดลง จนถึงทำให้สัตว์ซึมลึกและสลบ โดยไม่ทำให้สัตว์น้ำเกิดความระคายเคือง ผลิตภัณฑ์สามารถออกฤทธิ์ได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม และเนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่พัฒนามาจากสารสกัดสมุนไพรธรรมชาติที่มีการใช้ในการปรุงอาหาร จึงมีความปลอดภัยต่อสัตว์น้ำ ผู้ใช้ และผู้บริโภคสัตว์น้ำที่ได้รับยา นอกจากนี้การพัฒนาสูตรตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูเป็นยาสลบในสัตว์น้ำยังแสดงถึงการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ยูจีนอลโดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี ให้ได้ปริมาณของยูจีนอลในผลิตภัณฑ์ระหว่าง 90-110% ของปริมาณที่กำหนดและสามารถนำไปสู่การผลิตสูตรตำรับยาสัตว์ในระดับอุตสาหกรรมเพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านพาณิชย์และเกษตรกรรมของประเทศไทย

คำสำคัญ : น้ำมันกานพลู ยาสลบ สัตว์น้ำ

Formulation of Clove Oil Solution as an Anesthetic for Aquatic Animals

Abstract

Anesthetics are used in aquaculture during transportation to minimize stress and reduce metabolism. They are also used to immobilize fish during fishery management; manual spawning, weighing, measuring, marking or veterinary practice. Many compounds have been evaluated to anesthetize fish effectively and some are being distributed commercially. Effects of clove oil to produce sedation and anesthesia have been reported in some fish spp. and abalone. The constituents found in clove oil are phenolic compounds, mainly eugenol. Because clove oil is not soluble and poorly distributed in water, the use of inadequately formulated clove oil solution results in different effectiveness. Using ethanol to dissolve clove oil may irritate and cause skin burn to fish. The present study has formulated the ready-to-use clove oil solution for anesthesia of aquatic animals. The product is water-soluble and its safety and efficacy has been experimentally evaluated.

The toxicity of clove oil to different aquatic animals was studied and median Lethal Concentration (LC_{50}) at 24 hr were reported in acute toxicity testing. LC_{50} of clove oil evaluated in the static bath exposure were; 13.18 ppm for abalone *Haliotis diversicolor* spat (8-12 mm.), 12.21 ppm for Sea Bass *Lates calcarifer* (1 g. body weight), 11.45 ppm for Nile tilapia *Oreochromis nilotica* (0.4 g. body weight), 15.07 ppm for Cichlid *Herichthys spp.* (20-30 g. body weight) and 16.31 ppm (8-10 g. body weight). Subcellular changes in gill or intoxication signs were not observed in Cichlid (20-30 g. body weight) exposed to 4-6 ppm clove oil solution for 48 hr, thus, suggesting the 48 hr exposure of $\leq$ 6 ppm clove oil was safe for fish.

The formulated clove oil solution can be used to sedate fish during transport, thus reducing their activities and injuries from hyperactivity or aggression. Different dosages have been demonstrated effectiveness in fishery use; 4 ppm clove oil for Sea bass fry (1 g. body weight), 5-10 ppm for Nile tilapia fry (0.3-5 g. body weight) and 4-6 ppm for Cichlid (8-30 g. body weight). Rapid anesthesia can be accomplished with levels range from 50-500 ppm clove oil solution.

The present study has formulated clove oil solution intended for the temporary immobilization of fish, abalone and other aquatic animals. The product has been evaluated for efficacy and safety to be used as anesthetic for aquatic animal. Anesthetization can be achieved effectively in fresh water and seawater. As the product is formulated from natural plant product being used as food additive, it is proposed to be safe for use in handling aquatic animals for human comsumption. The quality control of the formulated clove oil solution was performed by the analysis of the pharmaceutical active ingredient, eugenol content, using gas chromatography. The content of eugenol in the product was found comparable to 98.59% of the labeled amount, indicating that the formulated clove oil solution can be standardized for active pharmaceutical ingredient, and hence promoting commercial production for the use in aquaculture.

Keywords : Clove oil Anesthetic Aquatic animal

สารบัญ

การพัฒนาสูตรตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูเป็นยาสลบในสัตว์น้ำ

หน้า

บทคัดย่อ ....

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการเคลื่อนย้ายหรือขนส่งหอยเป๋าฮื้อ

วิธีการศึกษา 3

2.1 ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้กล้ามเนื้อเท้าของลูกหอยเป๋าฮื้อคลายตัวเพื่อประโยชน์ในการขนส่ง 3

2.2 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกหอยเป๋าฮื้อ 4

ผลการศึกษา 5

บทที่ 3 การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งลูกปลากะพง

วิธีการศึกษา 7

3.1 ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้ลูกปลากะพงลดการเคลื่อนไหวเพื่อประโยชน์ในการขนส่ง 7

3.2 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกปลากะพง.... 8

ผลการศึกษา 9

บทที่ 4 การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งลูกปลานิล

วิธีการศึกษา 12

4.1 ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้ลูกปลานิลลดการเคลื่อนไหวเพื่อประโยชน์ในการขนส่ง : การขนส่งปลาจำลองสภาพการขนส่งภายในห้องปฏิบัติการ..... 12

4.2 ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้ลูกปลานิลลดการเคลื่อนไหวเพื่อประโยชน์ในการขนส่ง : การขนส่งปลาลักษณะปฏิบัติจริงภายในฟาร์ม..... 13

4.3 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกปลานิลดำ..... 14

ผลการศึกษา 15

สารบัญ

การพัฒนาสูตรตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูเป็นยาสลบในสัตว์น้ำ

หน้า

บทที่ 5 การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งปลาหมอสี

วิธีการศึกษา 20

5.1 ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้ปลาหมอสีลดการเคลื่อนไหวเพื่อประโยชน์ในการขนส่ง : การขนส่งปลาจำลองสภาพการขนส่งภายในห้องปฏิบัติการ (ปลาขนาดใหญ่)..... 20

5.2 ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้ปลาหมอสีลดการเคลื่อนไหวเพื่อประโยชน์ในการขนส่ง : การขนส่งปลาจำลองสภาพการขนส่งภายในห้องปฏิบัติการ (ปลาขนาดเล็ก)..... 21

5.3 ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้ปลาหมอสีลดการเคลื่อนไหวเพื่อประโยชน์ในการขนส่ง : การขนส่งปลาลักษณะปฏิบัติจริงภายในฟาร์ม..... 22

5.4 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อปลาหมอสี : ปลาขนาดใหญ่..... 23

5.5 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อปลาหมอสี : ปลาขนาดเล็ก..... 23

ผลการศึกษา 25

บทที่ 6 การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูเพื่อการสงบระงับปลาขนาดใหญ่

วิธีการศึกษา 35

6.1 ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการสงบระงับปลาเก๋า..... 35

6.2 ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการสงบระงับปลานิลวัยเจริญพันธุ์..... 36

ผลการศึกษา 37

สารบัญ

การพัฒนาสูตรตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูเป็นยาสลบในสัตว์น้ำ

หน้า

บทที่ 7 การควบคุมคุณภาพสูตรตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูพร้อมใช้

วิธีการศึกษา 40

7.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง..... 40

7.2 การวิเคราะห์หาปริมาณยูจีนอลในผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลู..... 42

7.3 การคำนวณ..... 43

ผลการศึกษา 43

บทที่ 8 บทสรุปและข้อเสนอแนะงานวิจัย 47

เอกสารอ้างอิง 52

ภาคผนวก 53

ประวัตินักวิจัยและคณะ..... 67

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

การพัฒนาสูตรตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูเป็นยาสลบในสัตว์น้ำ

หน้า

บทที่ 2 การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการเคลื่อนย้ายหรือขนส่งหอยเป๋าฮื้อ

ตารางที่ 2.1 การคลายตัวของกล้ามเนื้อเท้าและการฟื้นตัวของลูกหอยเป๋าฮื้อหลังจากการสัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลูโดยการแช่ 5

ตารางที่ 2.2 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกหอยเป๋าฮื้อ ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 6

บทที่ 3 การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งลูกปลากะพง

ตารางที่ 3.1 พฤติกรรมของปลากะพงเมื่อสัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 9

ตารางที่ 3.2 ผลของการใช้สารละลายน้ำมันกานพลูต่อคุณภาพน้ำเมื่อใช้ในการขนส่งลูกปลากะพงที่ความหนาแน่นต่างๆ 10

ตารางที่ 3.3 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกปลากะพงทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 11

บทที่ 4 การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งลูกปลานิล

ตารางที่ 4.1 คุณภาพน้ำที่ใช้บรรจุลูกปลานิล (0 ชั่วโมง) และหลังจากการขนส่งในถุงพลาสติกโดยไม่เปลี่ยนถ่ายน้ำ (12 ชั่วโมง)..... 15

ตารางที่ 4.2 อัตราการตายและค่า RPS ของปลานิลขนาด 0.3 และ 5 กรัม หลังจากการขนส่งในถุงพลาสติกโดยไม่เปลี่ยนถ่ายน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 16

ตารางที่ 4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูโดยการขนส่งลูกปลานิล ขนาด 0.3 และ 5 กรัม แสดงคุณภาพน้ำก่อนและหลังจากการขนส่งเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยไม่เปลี่ยนถ่ายน้ำ..... 17

ตารางที่ 4.4 ลักษณะการตอบสนองของลูกปลานิลหลังจากสัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลูโดยการแช่ในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง..... 18

ตารางที่ 4.5 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกปลานิลดำทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 19

สารบัญตาราง

การพัฒนาสูตรตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูเป็นยาสลบในสัตว์น้ำ

หน้า

บทที่ 5 การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งปลาหมอสี

ตารางที่ 5.1 คุณภาพน้ำก่อนและหลังการขนส่งปลาเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ปลากลุ่มที่ได้รับสารละลายน้ำมันกานพลูขณะขนส่ง มีการขับถ่ายของเสียลดลง ทำให้ปริมาณแอมโมเนีย ไนไตร์ต ในน้ำมีปริมาณต่ำกว่ากลุ่มควบคุม.... 26

ตารางที่ 5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการสงบระงับเพื่อขนส่งปลาหมอสี (ขนาด 2.5 นิ้ว) การทดลองชุดแรก : ปลาที่อดอาหารอย่างสมบูรณ์ก่อนขนส่ง..... 27

ตารางที่ 5.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการสงบระงับเพื่อขนส่งปลาหมอสี (ขนาด 2.5 นิ้ว) การทดลองชุดแรก : ปลาที่ไม่ได้อดอาหารอย่างสมบูรณ์ก่อนขนส่ง..... 28

ตารางที่ 5.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งปลาหมอสีขนาด 2.5 นิ้ว แสดงอัตราการตายและค่า RPS หลังจากการขนส่งเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในสารละลายน้ำมันกานพลูความเข้มข้นต่างๆ... 31

ตารางที่ 5.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งปลาหมอสีขนาด 2.5 นิ้ว แสดงคุณภาพน้ำก่อนและหลังการขนส่งเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยไม่เปลี่ยนถ่ายน้ำ..... 31

ตารางที่ 5.6 ลักษณะการตอบสนองของปลาหมอสี (ขนาด 4 นิ้ว) หลังจากสัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลูโดยการแช่ในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง..... 32

ตารางที่ 5.7 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อปลาหมอสีขนาด 4 นิ้ว (20-30 กรัม) ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง..... 33

ตารางที่ 5.8 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อปลาหมอสีขนาด 2.5 นิ้ว (8-10 กรัม) ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง..... 34

สารบัญตาราง

การพัฒนาสูตรตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูเป็นยาสลบในสัตว์น้ำ

หน้า

บทที่ 6 การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูเพื่อการสงบระงับปลาขนาดใหญ่

ตารางที่ 6.1 การตอบสนองของปลาเก๋าต่อสารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงระยะเวลาตั้งแต่ปลาเริ่มสัมผัสสารจนกระทั่งปลาแสดงอาการสงบระงับ (induction time) และระยะเวลาที่ปลาฟื้นสู่ปกติหลังจากการเปลี่ยนถ่ายน้ำ (recovery time)..... 37

ตารางที่ 6.2 การตอบสนองของปลานิลวัยเจริญพันธุ์ต่อสารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงระยะเวลาตั้งแต่ปลาเริ่มสัมผัสสารจนกระทั่งปลาแสดงอาการสงบระงับหรือสลบ (induction time) และระยะเวลาที่ปลาฟื้นสู่สภาพปกติหลังจากการเปลี่ยนถ่ายน้ำ (recovery time)..... 38

บทที่ 7 การควบคุมคุณภาพสูตรตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูพร้อมใช้

ตารางที่ 7.1 Temperature Program ของการวิเคราะห์..... 42

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

การพัฒนาสูตรตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูเป็นยาสลบในสัตว์น้ำ

หน้า

บทที่ 2 **การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการเคลื่อนย้ายหรือขนส่งหอยเป๋าฮื้อ**

รูปที่ 2.1 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกหอยเป๋าฮื้อ ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูและจำนวนตัวตายสะสม 6

บทที่ 3 **การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งลูกปลากะพง**

รูปที่ 3.1 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกปลากะพงทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูและจำนวนตัวตายสะสม 11

บทที่ 4 **การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งลูกปลานิล**

รูปที่ 4.1 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกปลานิลดำทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูและจำนวนตัวตายสะสม 19

บทที่ 5 **การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งปลาหมอสี**

รูปที่ 5.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูและระยะเวลาการขนส่งปลาขนาด 2.5 นิ้วที่ผ่านการอดอาหารอย่างสมบรูณ์..... 27

รูปที่ 5.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูและระยะเวลาการขนส่งปลาขนาด 2.5 นิ้วที่ไม่ผ่านการอดอาหารอย่างสมบรูณ์..... 28

รูปที่ 5.3 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของซี่เหงือก (gill filaments) ปลาหมอสีที่ได้รับสารละลายน้ำมันกานพลูโดยการแช่ (immersion bath) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ติดต่อกัน (ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 4-6 ppm)..... 29

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

การพัฒนาสูตรตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูเป็นยาสลบในสัตว์น้ำ

หน้า

บทที่ 5 **การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งปลาหมอสี**

รูปที่ 5.4 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกปลา หมอสี ขนาด 4 นิ้ว (20-30 กรัม) ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูและจำนวนตัวตายสะสม 33

รูปที่ 5.5 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกปลา หมอสี ขนาด 2.5 นิ้ว (8-10 กรัม) ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูและจำนวนตัวตายสะสม 34

บทที่ 7 **การควบคุมคุณภาพสูตรตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูพร้อมใช้**

รูปที่ 7.1 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลที่พบในน้ำมันกานพลู..... 40

รูปที่ 7.2 โครมาโตแกรมของ eugenol solution (A) และ vanillin solution (B)..... 44

รูปที่ 7.3 โครมาโตแกรมของ standard solution (A) และ sample solution (B)... 45

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาคผนวก

การพัฒนาสูตรตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูเป็นยาสลบในสัตว์น้ำ

หน้า

บทที่ 2 **การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการเคลื่อนย้ายหรือขนส่งหอยเป้าฮื้อ**

ภาคผนวกที่ 2.1 ระยะเวลาที่กล้ามเนื้อลูกหอยเป้าฮื้อคลายตัว (นาที) หลังจากสัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลู ทดสอบที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 1-12 ไมโครลิตร/ลิตร..... 54

ภาคผนวกที่ 2.2 ระยะเวลาที่ลูกหอยฟื้นตัว (นาที) หลังจากหยุดสัมผัสสารสารละลายน้ำมันกานพลู ทดสอบที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 1-12 ไมโครลิตร/ลิตร..... 54

ภาคผนวกที่ 2.3 คุณภาพน้ำระหว่างการศึกษา การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้กล้ามเนื้อเท้าของลูกหอยเป้าฮื้อคลายตัว 55

ภาคผนวกที่ 2.4 คุณภาพน้ำระหว่างการศึกษาพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกหอยเป้าฮื้อ..... 56

ภาคผนวกที่ 2.5 Probit analysis แสดงค่าความเข้มข้นระดับต่างๆ ของน้ำมันกานพลูที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อลูกหอยเป้าฮื้อ ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 57

บทที่ 3 **การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งลูกปลากะพง**

ภาคผนวกที่ 3.1 Probit analysis แสดงค่าความเข้มข้นระดับต่างๆ ของน้ำมันกานพลูที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อลูกปลากะพง ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 59

บทที่ 4 **การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งลูกปลานิล**

ภาคผนวกที่ 4.1 Probit analysis แสดงค่าความเข้มข้นระดับต่างๆ ของน้ำมันกานพลูที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อลูกปลานิล ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 61

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาคผนวก

การพัฒนาสูตรตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูเป็นยาสลบในสัตว์น้ำ

หน้า

บทที่ 5 **การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งปลาหมอสี**

ภาคผนวกที่ 5.1 Probit analysis แสดงค่าความเข้มข้นระดับต่างๆ ของน้ำมันกานพลูที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อปลาหมอสีขนาด 4 นิ้ว ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง.... 63

ภาคผนวกที่ 5.2 Probit analysis แสดงค่าความเข้มข้นระดับต่างๆ ของน้ำมันกานพลูที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อปลาหมอสีขนาด 2.5 นิ้ว ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง..... 65

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ
การพัฒนาสูตรตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูเป็นยาสลบในสัตว์น้ำ

การเคลื่อนย้ายสัตว์น้ำจากบ่อเพาะเลี้ยงไปยังตลาดผู้บริโภคมีการใช้สารเคมีชนิดต่าง ๆ เพื่อทำให้สัตว์น้ำสลบหรือลดการเคลื่อนไหว และลดอัตราการเผาผลาญพลังงาน (metabolism) เนื่องจากสัตว์น้ำต้องอยู่ในเนื้อที่และปริมาณน้ำที่จำกัดในระหว่างการเคลื่อนย้าย การใช้สารเคมีเพื่อทำให้สัตว์น้ำสลบยังเป็นการลดการขับถ่ายของเสียจากสัตว์น้ำ มิเช่นนั้นแล้วต้องเปลี่ยนถ่ายน้ำตลอดระยะเวลาขนส่ง นอกจากนี้การลดการเคลื่อนไหวของสัตว์น้ำโดยการใช้สารเคมีทำให้กล้ามเนื้อคลายตัวจะช่วยลดความบอบช้ำจากการเคลื่อนย้าย ด้วยเหตุนี้จึงมีการใช้ยาและสารเคมีหลายชนิดมีคุณสมบัติดังกล่าวในการเคลื่อนย้ายสัตว์น้ำ

ปัจจุบันมีการนำเข้ายาและสารเคมีหลายชนิดจากต่างประเทศเพื่อใช้ในการเคลื่อนย้ายสัตว์น้ำ สารเคมีที่นิยมใช้ในการทำให้สัตว์น้ำสลบหรือลดการเคลื่อนไหวในขณะเคลื่อนย้าย เช่น สาร quinaldine หรือ quinaldine sulfate quinaldine มีลักษณะเป็นของเหลว เหนียว ไม่มีสี กลิ่นฉุน ไม่ละลายน้ำ ละลายใน acetone และ ethanol ส่วน quinaldine sulfate มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน ละลายได้ดีในน้ำ (Hseu *et al.*, 1998) สารในกลุ่มนี้แม้ว่าจะใช้ได้ผลดีในการทำให้ปลาสลบ แต่มีรายงานถึงผลข้างเคียงของสารกลุ่มนี้ เนื่องจากการใช้ในปลาพบว่าทำให้เกิดการระคายเคืองต่อเหงือก และกระจกตาของปลา และตัวทำละลายที่ใช้ในการละลาย quinaldine ทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผู้ใช้เมื่อใช้ในพื้นที่ที่การระบายอากาศไม่เพียงพอ (Bowser, 2001) นอกจากนี้สารเคมีในกลุ่มนี้ยังไม่ได้รับการรับรองให้ใช้ในสัตว์น้ำที่เป็นอาหาร

Tricaine เป็นสารเคมีอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในการทำให้สัตว์น้ำสลบ มีชื่อทางเคมี คือ 3-aminobenzoic acid ethyl ester methanesulfonate, ethyl m-aminobenzoate methadesulfonate, methadesulfonate salt of alkyl aminobenzoate, and methandsulfonate salt of ethyl meta-aminobenzoate ชื่อที่เป็นที่รู้จักได้แก่ methanesulfonate, MS-222, Tricane-s™ และ Meta-caine มีลักษณะเป็นผงสีขาว ละลายน้ำได้ง่ายและสามารถละลายได้ในไขมัน ทำให้สามารถซึมผ่านเหงือกได้ดี ความเข้มข้นในน้ำใช้เท่ากับ 15 ถึง 330 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นสารเคมีที่ได้รับการอนุญาตโดยองค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา (USFDA) ให้ใช้ในปลาที่นำมาเป็นอาหาร (Hseu *et al.*, 1998) แต่เป็นสารเคมีที่มีราคาสูงมากและต้องมีระยะเวลาหยุดยาเป็นเวลา 21 วัน (Bowser, 2001)

อย่างไรก็ตามการใช้ยาหรือสารเคมีต่อสัตว์น้ำอาจไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค เช่น การใช้สารเคมีที่ไม่ได้รับการรับรองให้ใช้ในสัตว์ที่เป็นอาหาร และการใช้ยาและสารเคมีส่วนใหญ่จำเป็นต้องมีระยะหยุดยาก่อนการนำสัตว์มาบริโภค ซึ่งต้องมีการเฝ้าระวังการใช้สารเคมีดังกล่าวให้เกษตรกรปฏิบัติอย่างเคร่งครัดจึงจะปลอดภัยต่อผู้บริโภค การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาคุณสมบัติและวิธีการใช้สารสมุนไพรที่มีคุณสมบัติทำให้ปลาสลบหรือลดการเคลื่อนไหวแทนการใช้สารเคมี

กานพลู (clove) เป็นไม้ยืนต้น มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Eugenia caryophyllus* ชื่อพ้อง *Syzygium aromatium* น้ำมันกานพลูได้จากการนำดอกกานพลูแห้งมากลั่นด้วยไอน้ำ เป็นสารสกัดสมุนไพรที่มีมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ในประเทศไทย ส่วนประกอบหลักได้แก่ eugenol acetate และ caryopahyllene (นิจศิริ, 2542 ; สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม, 2541) มีการนำน้ำมันกานพลูมาใช้ประโยชน์หลายอย่าง เช่น ใช้เป็นยาชาเฉพาะที่ แก้ปวดฟัน ปวดหัวและปวดตามข้อ ใช้ผสมอาหารจำพวกเครื่องแกง ไส้กรอก หมูแฮมเพื่อแต่งกลิ่น (นิจศิริ, 2542) สารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการระงับความรู้สึกคือ eugenol โดยออกฤทธิ์กดการทำงานของตัวรับความรู้สึก (sensory receptor) ที่เกี่ยวข้องกับความเจ็บปวด (Ghelardini *et al.*, 2001) ในทางการประมง น้ำมันกานพลูถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการจับสัตว์ การขนส่ง การเพาะเลี้ยง และงานทดลองเพื่อช่วยไม่ให้สัตว์น้ำเคลื่อนไหว ในการสังเกต ตรวจวัด หรือทำเครื่องหมายสัตว์น้ำ (Munday and Wilson, 1997) น้ำมันกานพลูออกฤทธิ์ได้ดีแม้ใช้ในความเข้มข้นต่ำ (Munday and Wilson, 1997) มีราคาไม่แพง ปลอดภัยต่อผู้ใช้ สามารถชักนำการสลบอย่างสงบ และไม่ต้องมีระยะหยุดยาก่อนส่งขาย แต่สัตว์น้ำมีความทนทานต่อน้ำมันกานพลูแตกต่างกันทำให้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้สัตว์ยังมีระยะเวลาฟื้นตัว (recovery time) นานกว่ายาสลบชนิดอื่น (Griffiths, 2000; Munday and Wilson, 1997; Pirhonen and Schreck, 2003)

เนื่องจากน้ำมันกานพลูไม่เป็นมลภาวะต่อสภาพแวดล้อมและปลอดภัยต่อการบริโภค ดังนั้นการศึกษาคุณสมบัติของน้ำมันกานพลูเพื่อใช้ลดการเคลื่อนไหวของสัตว์น้ำในขณะการขนส่งจะเป็นวิธีปฏิบัติที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และเป็นการส่งเสริมการใช้สารสกัดสมุนไพรที่มีมาตรฐานแทนการใช้สารเคมีในสัตว์ที่เป็นอาหาร

บทที่ 2

การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการเคลื่อนย้ายหรือขนส่งหอยเป๋าฮื้อ

หอยเป๋าฮื้อเป็นหอยฝาเดียว (gastropod) ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเนื่องจากเป็นที่นิยมบริโภคและมีราคาสูง ทำให้ปริมาณหอยเป๋าฮื้อในธรรมชาติลดลงอย่างรวดเร็ว ปัจจุบันจึงเริ่มมีการเพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อในรูปแบบของฟาร์มซึ่งมีจุดประสงค์เพื่อการส่งออกลูกหอยมีชีวิตอายุประมาณ 1-3 เดือน และในขั้นตอนของการเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อจำเป็นต้องมีการย้ายบ่อในแต่ละช่วงอายุของการเลี้ยง เกษตรกรใช้อุปกรณ์แคะหอยที่ทำมาจากแผ่นพลาสติกบางขนาดเล็กสอดเข้าใต้บริเวณกล้ามเนื้อ แล้วทำการแคะให้หลุดออกจากพื้นผิวเพื่อย้ายบ่อหรือส่งขาย ทำให้ลูกหอยได้รับบาดเจ็บบริเวณกล้ามเนื้อเท้า หรืออาจทำให้เปลือกแตก เป็นผลให้ลูกหอยตายในที่สุด เนื่องจากธรรมชาติของหอยเป๋าฮื้อมีกล้ามเนื้อเท้าที่แข็งแรงมาก และจะใช้กล้ามเนื้อเท้าเกาะยึดกับพื้นผิวที่อาศัยอยู่อย่างเหนียวแน่นจึงทำให้มีการศึกษาถึงการนำสารละลายน้ำมันกานพลูมาใช้ในหอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis diversicolor*) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดความสูญเสียจากการจับสัตว์เพื่อการขนส่ง และการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารละลายน้ำมันกานพลูมาใช้เพื่อคลายกล้ามเนื้อของลูกหอยเป๋าฮื้อเพื่อให้หลุดออกจากพื้นผิวที่เกาะได้โดยง่าย และไม่เป็นอันตรายต่อตัวหอย เพื่อลดการสูญเสียที่เกิดขึ้นจากขั้นตอนการเคลื่อนย้ายลูกหอยด้วยวิธีการดั้งเดิม

วิธีการศึกษา

2.1 ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้กล้ามเนื้อเท้าของลูกหอยเป๋าฮื้อคลายตัวเพื่อประโยชน์ในการขนส่ง

2.1.1 สัตว์ทดลอง

หอยเป๋าฮื้อ *Haliotis diversicolor* อายุประมาณ 3 เดือน ขนาดลำตัวยาวประมาณ 8-12 มิลลิเมตร จำนวน 390 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มควบคุม 7 กลุ่ม และกลุ่มทดลอง 6 กลุ่ม กลุ่มละ 30 ตัว เลี้ยงในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งในอ่างพลาสติก ปริมาตรน้ำทะเล 5 ลิตร ความเค็ม 30 ppt ให้อากาศตลอดการทดลองด้วยหัวทราย และใส่เศษกระเบื้องขนาด 600 ตารางเซนติเมตร เพื่อให้หอยเป๋าฮื้อยึดเกาะ ตรวจวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ ความเค็ม ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ปริมาณแอมโมเนีย และควบคุมคุณภาพน้ำให้อยู่ในช่วงเหมาะสมตลอดการทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.2 **การทดลอง**

- เลี้ยงลูกหอยเป๋าฮื้อก่อนเริ่มทำการทดลองเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อปรับลูกหอยให้คุ้นเคยกับสภาพของการทดลอง
- สารละลายน้ำมันกานพลูเตรียมโดยใช้ 90% เอทานอล เป็นตัวทำละลายในอัตราส่วนน้ำมันกานพลูต่อเอทานอลเป็น 1:9
- กลุ่มทดลองได้รับสารละลายน้ำมันกานพลูโดยวิธีการแช่ขนาด 1, 2, 5, 8, 10 และ 12 ไมโครลิตร/ลิตร กลุ่มควบคุม ได้แก่ กลุ่มที่ไม่ได้รับการสัมผัสสารใด ๆ และกลุ่มที่สัมผัสตัวทำละลายของสารละลายน้ำมันกานพลู (90% เอทานอล)
- กำหนดให้ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มใส่สารจนถึงหอยตัวสุดท้ายหลุดออกจากพื้นผิวที่เกาะเป็นระยะเวลาที่ใช้ทำให้กล้ามเนื้อเท้าคลายตัว
- ย้ายหอยทั้งหมดลงไปใส่ในอ่างใหม่ในท่านอนหงายทุกตัว (เอาเปลือกลง) และสังเกตการฟื้นตัวของหอย โดยกำหนดให้เวลาตั้งแต่เริ่มย้ายหอยจนถึงเวลาที่หอยทุกตัวพลิกตัวกลับเอากล้ามเนื้อเท้าลงเป็นระยะเวลาในการฟื้นตัวของหอย
- เลี้ยงหอยต่อไปอีก 3 วัน โดยสังเกตพฤติกรรมลูกหอยและตรวจคุณภาพน้ำในอ่างทุก 12 ชั่วโมง

2.2 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกหอยเป๋าฮื้อ

2.2.1 **สัตว์ทดลอง**

หอยเป๋าฮื้อ *Haliotis diversicolor* อายุประมาณ 3 เดือน ขนาดลำตัวยาวประมาณ 8-12 มิลลิเมตร จำนวน 350 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม และกลุ่มทดลอง 6 กลุ่ม กลุ่มละ 50 ตัว เลี้ยงในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งในอ่างพลาสติก ปริมาตรน้ำทะเล 5 ลิตร ความเค็ม 30 ppt ให้อากาศตลอดการทดลองด้วยหัวทราย และใส่เศษกระเบื้องขนาด 600 ตารางเซ็นติเมตร เพื่อให้หอยเป๋าฮื้อยึดเกาะ ตรวจวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ ความเค็ม ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ปริมาณแอมโมเนีย และควบคุมคุณภาพน้ำให้อยู่ในช่วงเหมาะสมตลอดการทดลอง

2.2.2 **การทดลอง**

- เลี้ยงลูกหอยเป๋าฮื้อก่อนเริ่มทำการทดลองเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อปรับลูกหอยให้คุ้นเคยกับสภาพของการทดลอง
- สารละลายน้ำมันกานพลูเตรียมโดยใช้ 90% เอทานอล เป็นตัวทำละลายในอัตราส่วนน้ำมันกานพลูต่อเอทานอลเป็น 1:9

- กลุ่มทดลองได้รับการสัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลูขนาด 10, 13, 16, 19, 20 และ 40 ไมโครลิตร/ลิตร กลุ่มควบคุมได้แก่กลุ่มที่ไม่ได้รับการสัมผัสสารใด ๆ
- สังเกตอาการและบันทึกจำนวนลูกหอยตายทุก 1 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง

ผลการศึกษา

ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้กล้ามเนื้อเท้าของลูกหอยเป๋าฮื้อคลายตัวเพื่อประโยชน์ในการขนส่ง

ระยะเวลาในการทำให้กล้ามเนื้อคลายตัวและการฟื้นตัวของหอยที่ได้รับสารละลายน้ำมันกานพลูในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 2.1 ผลของตัวทำละลายของสารละลายน้ำมันกานพลู (90% เอทานอล) ทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อในหอยบางตัวที่ได้รับการสัมผัสสาร แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณเอทานอลที่สัมผัส

ตารางที่ 2.1 การคลายตัวของกล้ามเนื้อเท้าและการฟื้นตัวของลูกหอยเป๋าฮื้อหลังจากการสัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลูโดยการแช่ (ลูกหอยจำนวน 30 ตัวต่อกลุ่มทดสอบ)

ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู (ppm)	ระยะเวลาในการสัมผัสสารจนถึงกล้ามเนื้อคลายตัว (นาที)	ระยะเวลาหลังจากหยุดสัมผัสสารจนถึงลูกหอยฟื้นตัว(นาที)
1	≤ 56[a] (34.27± 19.53)[c]	≤ 48[b] (6.97± 10.37)[c]
2	≤ 54[a] (25.13± 11.82)[c]	≤ 12[b] (7± 5.09)[c]
5	≤ 64[a] (27.73± 11.76)[c]	≤ 19[b] (5.33± 5.11)[c]
8	≤ 29[a] (16.16± 7.75)[c]	≤ 26[b] (9.20± 16.98)[c]
10	≤ 24[a] (16.40± 5.88)[c]	≤ 60[b] (34.80± 27.40)[c]
12	≤ 27[a] (17.57± 5.51)[c]	≤ 28[b] (8.93± 7.72)[c]

[a] ระยะเวลาที่นานที่สุดในการทำให้กล้ามเนื้อคลายตัว, [b] ระยะเวลาที่นานที่สุดในการทำให้ลูกหอยฟื้นตัว และ [c] ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การสังเกตลักษณะภายนอกของลูกหอยและคุณภาพน้ำเป็นเวลา 3 วันหลังสัมผัสสาร (ภาคผนวก 2.4) ไม่พบความผิดปกติทางกายภาพของลูกหอยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และลูกหอยมีอัตราการรอดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (มากกว่า 90%)

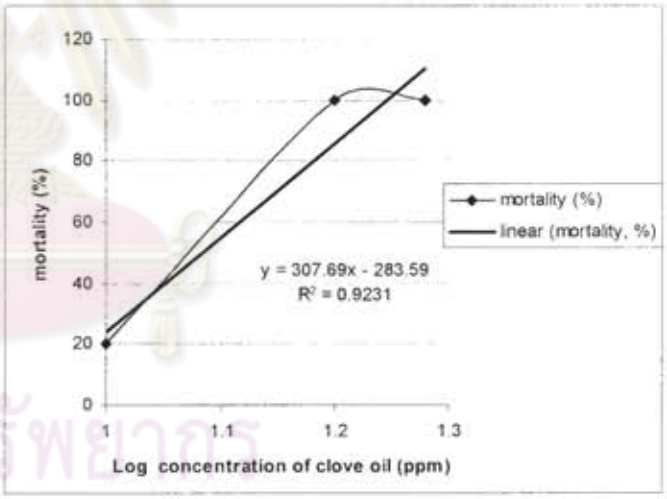
ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกหอยเป๋าฮื้อ

ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกหอยเมื่อศึกษาโดยการสัมผัสสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงค่าความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่ทำให้ลูกหอยตายดังตารางที่ 2.2 และการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่ทำให้ลูกหอยตาย 50% (LC_{50}) โดย probit analysis แสดงระดับความเข้มข้น 13.18 ppm (รูปที่ 2.1 และภาคผนวก 2.5)

ตารางที่ 2.2 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกหอยเป๋าฮื้อ ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Lethal Concentration Dose 24 hr) (n=50)

ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู (ppm)	จำนวนตาย
control	0
10	10
13	9
16	50
19	50
20	49
40	50

รูปที่ 2.1 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกหอยเป๋าฮื้อ ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูและจำนวนตายสะสม



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งลูกปลากะพง

ศึกษาการใช้สารละลายน้ำมันกานพลูเพื่อลดการเคลื่อนไหวและการขับของเสียของลูกปลากะพง (*Lates calcarifer*) เพื่อใช้ในขณะขนส่งจากโรงเพาะฟักเพื่อนำไปเลี้ยงต่อในบ่อดิน โดยหาความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อใช้ลดการเคลื่อนไหวและ metabolism ของลูกปลาในขณะขนส่ง และศึกษาความเป็นพิษของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกปลากะพง

วิธีการศึกษา

3.1 ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้ลูกปลากะพงลดการเคลื่อนไหวเพื่อประโยชน์ในการขนส่ง

3.1.1 ความเข้มข้นของสารละลายน้ำมันกานพลูที่เหมาะสมเพื่อใช้ลดการเคลื่อนไหวลูกปลากะพง

3.1.1.1 สัตว์ทดลอง

ลูกปลากะพง (*Lates calcarifer*) อายุ 45 วัน น้ำหนักประมาณ 1 กรัม จำนวน 140 ตัว แบ่งการทดลองออกเป็น 14 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว เลี้ยงระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งในถังไฟเบอร์ปริมาตรน้ำทะเล 10 ลิตร ความเค็ม 35 ppt ให้อากาศตลอดการทดลองด้วยหัวทราย ตรวจวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ ความเค็ม ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ปริมาณแอมโมเนีย

3.1.1.2 การทดลอง

- เลี้ยงลูกปลากะพงก่อนเริ่มทำการทดลองเป็นเวลา 7 วัน เพื่อปรับสภาพลูกปลา
- เตรียมสารละลายน้ำมันกานพลูโดยใช้ 90% ethanol เป็นตัวทำละลาย โดยใช้อัตราส่วนน้ำมันกานพลู : ethanol เท่ากับ 1:9
- ให้ปลากะพงกลุ่มทดลองสัมผัสน้ำมันกานพลูขนาด 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 และ 13 ไมโครลิตร/ลิตร (ppm)
- สังเกตพฤติกรรมของลูกปลากะพงแต่ละกลุ่ม ในช่วงเวลา 1 ชั่วโมงและบันทึกผล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2 ผลของการใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งลูกปลาต่อคุณภาพน้ำ

3.1.2.1 สัตว์ทดลอง

ลูกปลากะพง (*Lates calcarifer*) อายุ 45 วัน น้ำหนักประมาณ 1 กรัม จำนวน 274 ตัว เลี้ยงเพื่อปรับสภาพก่อนการทดลอง 3 วัน

3.1.2.2 การทดลอง

- บรรจุลูกปลาในถุงพลาสติกโดยแบ่งการทดลองเป็น 6 ชุด ตามความหนาแน่นของปลา ได้แก่ 7, 15, 20, 25, 30, 40 ตัว/ถุง ชุดละ 2 กลุ่ม (กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 4 ppm) แต่ละถุงบรรจุน้ำ 500 มิลลิลิตร
- อัดออกซิเจนและมัดปากถุงในลักษณะเดียวกับที่ขนส่งลูกปลา ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
- เมื่อครบ 12 ชั่วโมง นับจำนวนลูกปลาที่เหลืออยู่ในถุง และตรวจคุณภาพน้ำ ได้แก่ ค่าออกซิเจนละลายในน้ำ (DO) (YSI model 57), ค่าความเป็นด่าง (alkalinity) (HACH),ปริมาณแอมโมเนีย (HACH DR 700), pH, อุณหภูมิ

3.2 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกปลากะพง

3.2.1 สัตว์ทดลอง

ลูกปลากะพง (*Lates calcarifer*) อายุ 45 วัน น้ำหนักประมาณ 1 กรัม จำนวน 170 ตัว แบ่งการทดลองออกเป็น 17 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว เลี้ยงระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งในถังไฟเบอร์ปริมาตรน้ำทะเล 10 ลิตร ความเค็ม 35 ppt ให้อากาศตลอดการทดลองด้วยหัวทราย ตรวจวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ ความเค็ม ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ปริมาณแอมโมเนีย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2 การทดลอง

- ปรับความเข้มข้นของสารละลายน้ำมันกานพลูในถังไฟเบอร์ทดลองซึ่งมีปริมาตรน้ำทะเล 10 ลิตร ให้ได้ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 5 – 20 ppm
- เมื่อครบ 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง นับจำนวนลูกปลา เพื่อหาอัตราการตายและนำมาวิเคราะห์หาค่า LC_{50} ด้วยโปรแกรม Probit analysis

ผลการศึกษา

ความเข้มข้นของสารละลายน้ำมันกานพลูที่เหมาะสมเพื่อใช้ลดการเคลื่อนไหวลูกปลากะพง

จากการสังเกตพฤติกรรมของลูกปลากะพงพบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 4 ppm ลูกปลามีอาการลอยตัวอยู่ที่ก้นภาชนะ มีการเคลื่อนที่น้อยมากเมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่ต่ำกว่า ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูตั้งแต่ 5 ppm ขึ้นไป ปลาเคลื่อนที่เร็วมากขึ้น อาจเป็นความเข้มข้นที่สารละลายน้ำมันกานพลูเริ่มเป็นพิษหรือทำให้เกิดความระคายเคืองต่อปลา และที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่ 12 ppm ปลาจะสูญเสียการทรงตัว ไม่สามารถว่ายน้ำเป็นปกติได้ ดังนั้นความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่ 4 ppm จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะใช้เพื่อลดการเคลื่อนไหวและลดการขับของเสียลงได้ อาการของลูกปลาเมื่อแช่ในน้ำมันกานพลูความเข้มข้น 0-13 ppm แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 พฤติกรรมของปลากะพงเมื่อสัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู	พฤติกรรมของปลากะพง
กลุ่มควบคุม	มีการว่ายน้ำและการตอบสนองต่อการกระตุ้นปกติ
1 ppm	มีการว่ายน้ำและการตอบสนองต่อการกระตุ้นปกติ
2 ppm	มีการว่ายน้ำและการตอบสนองต่อการกระตุ้นปกติ
3 ppm	มีการว่ายน้ำปกติ เมื่อเอาไม้เขี่ยยังว่ายหนีอยู่แต่ช้าลง
4 ppm	การว่ายน้ำลดลง การทรงตัวยังปกติ ตอบสนองต่อการกระตุ้นช้าลง
5 ppm	ว่ายน้ำตลอดเวลาในอัตราเร็วสม่ำเสมอ ว่ายเอนเอียงเล็กน้อย เมื่อเอาไม้เขี่ยยังสามารถทรงตัวได้แต่ไม่ว่ายหนีไม้
6 ppm	ปลาว่ายน้ำตลอดเวลาด้วยอัตราเร็วที่เพิ่มขึ้น บางตัวเอาหัวชุกที่มุมตู้
7 ppm	ปลาว่ายน้ำตื่นตัวมากกว่าที่ความเข้มข้นต่ำๆ ไม่ว่ายน้ำหนีเมื่อเอาไม้เขี่ยแต่การทรงตัวยังดีอยู่
8 ppm	ปลาว่ายน้ำเร็วและเอียงเล็กน้อย
9 ppm	ว่ายน้ำตลอดเวลา พยายามเอาหน้าชุกที่มุมตู้ บางตัวว่ายเอียงขนานกับพื้นตู้ปลา ต้องใช้เวลาในการพลิกตัวกลับมาเมื่อเอาไม้เขี่ย
10 ppm	ว่ายน้ำไม่มีทิศทางที่แน่นอน บางตัวลำตัวตั้งฉาก ว่ายวนเป็นวงกลม
11 ppm	ว่ายน้ำไม่มีทิศทางที่แน่นอน บางตัวลำตัวตั้งฉาก ว่ายวนเป็นวงกลม
12 ppm	ปลานอนตะแคง มีบางตัวว่ายวนเป็นวงกลม สูญเสียการทรงตัวไม่สามารถกลับสู่ท่าปกติได้เมื่อเอาไม้เขี่ย
13 ppm	ปลานอนตะแคง มีบางตัวว่ายวนเป็นวงกลม สูญเสียการทรงตัวไม่สามารถกลับสู่ท่าปกติได้เมื่อเอาไม้เขี่ย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของการใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งลูกปลาต่อคุณภาพน้ำ

เปรียบเทียบคุณภาพน้ำระหว่างกลุ่มที่ใช้กับกลุ่มที่ไม่ใช้สารละลายน้ำมันกานพลูที่ความหนาแน่นของปลาต่าง ๆ กัน (ตารางที่ 3.2)

- ผลการตรวจคุณภาพน้ำค่า DO สูงกว่า 7.5 ทุกกลุ่มการทดลอง
- ค่า Alkalinity และ pH ไม่มีความแตกต่างกัน
- ค่า Ammonia ในกลุ่มทดลองต่ำกว่าในกลุ่มควบคุม
- สีของตัวปลาในกลุ่มควบคุมจะซีดในทุกถุง ในขณะที่กลุ่มทดลองที่ใช้น้ำมันกานพลูยังคงมีสีปกติ

ตารางที่ 3.2 ผลของการใช้สารละลายน้ำมันกานพลู (น้ำมันกานพลู 4 ppm) ต่อคุณภาพน้ำเมื่อใช้ในการขนส่งลูกปลากะพงที่ความหนาแน่นต่างๆ

	กลุ่ม1*		กลุ่ม2*		กลุ่ม3*		กลุ่ม4*		กลุ่ม5*		กลุ่ม6*	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
DO (mg/l)	16	15	16	15	13.5	13.5	11	12.5	12.5	11	10.5	7.5
Alkalinity (mg/l)	140	140	180	180	160	170	170	170	180	160	180	170
Ammonia (mg/l)	4.77	3.7	9.7	8.54	10.66	11.19	>12	>12	>12	>12	>12	>12
pH	7.6	7.6	7.0	7.0	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
Temp (^{o}c)	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26

* กลุ่มที่ 1 = 7 ตัว, กลุ่มที่ 2 = 15 ตัว, กลุ่มที่ 3 = 20 ตัว, กลุ่มที่ 4 = 25 ตัว, กลุ่มที่ 5 = 30 ตัว, กลุ่มที่ 6 = 40 ตัว / ถุงบรรจุน้ำ 500 มิลลิลิตร

C= control, T= Treatment

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

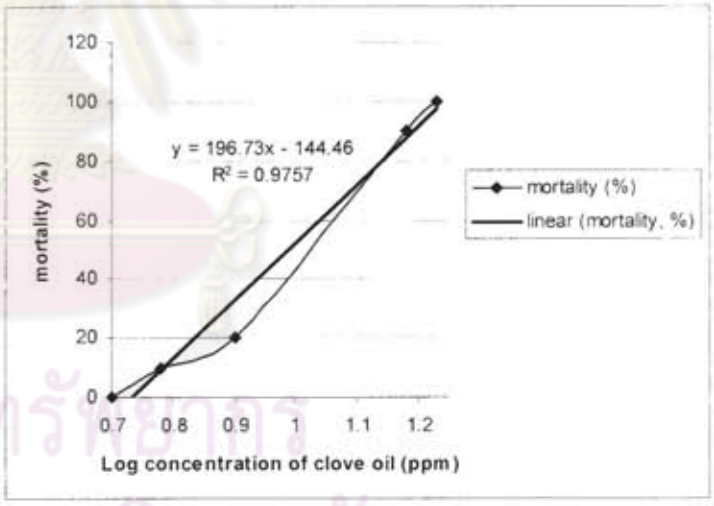
ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกปลากะพง

การศึกษาความเป็นพิษของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกปลากะพงเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 5 – 20 ppm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปลาเริ่มตายที่ความเข้มข้น 6 ppm และตาย 100% ที่ความเข้มข้น 17 ppm วัดค่าออกซิเจนละลายในน้ำ เท่ากับ 5.5 ppm วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Probit analysis ได้ความเข้มข้นที่ทำให้ปลาตาย 50% (LC_{50}) เท่ากับ 12.21 ppm โดยมีความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูและจำนวนตัวตายสะสมดังสมการ $Y=196.73x-144.46$, $r^2=0.9757$ (ตารางที่ 3.3 และรูปที่ 3.1) (ภาคผนวก 3.1)

ตารางที่ 3.3 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกปลากะพง ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Lethal Concentration Dose 24 hr) (n=10)

ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู (ppm)	จำนวนปลาตาย
Control	0
5	0
6	1
8	2
9	2
11	2
13	5
14	5
15	9
16	9
17	10
18	10
19	10
20	10

รูปที่ 3.1 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกปลากะพง ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูและจำนวนตายสะสม



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งลูกปลานิล

ปลานิล *Oreochromis nilotica* เป็นปลาเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากปลานิลสามารถเพาะเลี้ยงได้อย่างสมบูรณ์ทั้งระบบโดยไม่จำเป็นต้องจับพ่อแม่พันธุ์ทางธรรมชาติ และปลานิลปรับตัวได้ง่ายต่อสภาวะแวดล้อมของประเทศไทย การเลี้ยงปลานิลจึงสามารถพัฒนาเป็นระบบการเลี้ยงหนาแน่น มีผลผลิตที่แน่นอนและเพียงพอต่อการส่งออกไปยังต่างประเทศโดยมีมูลค่าการส่งออกถึงปีละไม่ต่ำกว่า 600 ล้านบาท ดังนั้นเพื่อลดการสูญเสียที่อาจเกิดระหว่างขั้นตอนการขนส่ง จึงทำการศึกษาวิธีการใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งลูกปลานิล โดยมีวัตถุประสงค์ลดการเคลื่อนไหวและขับถ่ายของเสียของลูกปลานิลขณะขนส่งและเพิ่มอัตราการรอดหลังจากการขนส่ง

วิธีการศึกษา

4.1 ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้ลูกปลานิลลดการเคลื่อนไหวเพื่อประโยชน์ในการขนส่ง : การขนส่งปลาจำลองสภาพการขนส่งภายในห้องปฏิบัติการ

4.1.1 สัตว์ทดลอง

ปลานิลดำ *Oreochromis nilotica* อายุ 23 วัน ขนาดลำตัวยาวประมาณ 3 เซนติเมตร น้ำหนักตัวประมาณ 0.40 กรัม จำนวน 200 ตัว เลี้ยงในถังไฟเบอร์ ปริมาตรน้ำ 1,000 ลิตร ให้อากาศตลอดการทดลองด้วยหัวทราย ตรวจวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ปริมาณแอมโมเนียและไนไตร์ต

4.1.2 การทดลอง

- เลี้ยงลูกปลานิลดำก่อนเริ่มทำการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อปรับลูกปลาให้คุ้นเคยกับสภาพของการทดลอง
- สุ่มเลือกลูกปลาจากถังไฟเบอร์ จำนวน 100 ตัวต่อถุง บรรจุน้ำปริมาตร 0.5 ลิตร
- ใส่สารละลายน้ำมันกานพลู 10% (เตรียมสารละลายน้ำมันกานพลูโดยน้ำมันกานพลู, eugenol 75-88%, 1 ส่วน ผสม 90% ethanol อีก 9 ส่วน) ปริมาตร 0.025 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 5 ppm) และ 0.04 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 8 ppm) ลงในถุงบรรจุปลาตามลำดับ
- อัดออกซิเจนและปิดถุงให้แน่นเช่นเดียวกับการบรรจุปลาขาย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- สังเกตพฤติกรรมการเคลื่อนไหวของลูกปลาภายในถุงเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง
- ตรวจวัดคุณภาพน้ำก่อนและหลังการทดลอง
- บันทึกจำนวนตัวปลาตายหลังการทดลอง และสังเกตพฤติกรรมของลูกปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลองต่อไปเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์

4.2 ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้ลูกปลานิลลดการเคลื่อนไหวเพื่อประโยชน์ในการขนส่ง : การขนส่งปลาลักษณะปฏิบัติจริงภายในฟาร์ม

4.2.1 **สัตว์ทดลอง**

ปลานิลดำ *Oreochromis nilotica* น้ำหนักตัวประมาณ 0.3 กรัม จำนวน 3,000 ตัว และ 5 กรัม จำนวน 1,000 ตัว เลี้ยงในบ่อปูนซีเมนต์ให้อากาศตลอดเวลาด้วยหัวทราย ตรวจวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ปริมาณแอมโมเนียและไนไตร์ต

4.2.2 **การทดลอง**

- อดอาหารก่อนเริ่มทำการทดลองเป็นเวลา 72 ชั่วโมง
- แบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม (กลุ่มปลานิลน้ำหนัก 0.3 กรัม และกลุ่มปลานิลน้ำหนัก 5 กรัม) บรรจุปลาตามลักษณะการขนส่งของฟาร์มในถุงขนาด 18 X 28 นิ้ว บรรจุน้ำ 5 ลิตร จำนวน 700 ตัว สำหรับปลาขนาด 0.3 กรัม และจำนวน 150 ตัว สำหรับปลาขนาด 5 กรัม
- กลุ่มทดลองสัมผัสน้ำมันกานพลูความเข้มข้น 5 และ 10 ppm และกลุ่มควบคุม แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้รับการสัมผัสสารที่ทางฟาร์มใช้ในการขนส่งปลา และกลุ่มที่ไม่ได้รับการสัมผัสสารใดๆ
- อัดออกซิเจนและปิดปากถุงให้แน่นเช่นเดียวกับการบรรจุปลาขาย
- สังเกตพฤติกรรมการเคลื่อนไหวของปลาในถุงพลาสติกเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และนับจำนวนปลาตายเมื่อสิ้นสุดการทดลอง
- ตรวจวัดคุณภาพน้ำก่อนและหลังการทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกปลานิลดำ

4.3.1 สัตว์ทดลอง

ปลานิลดำ *Oreochromis nilotica* อายุ 23 วัน ขนาดลำตัวยาวประมาณ 3 เซนติเมตร น้ำหนักตัวประมาณ 0.40 กรัม จำนวน 200 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม และกลุ่มทดลอง 9 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว จำนวน 2 ชุดการทดลอง เลี้ยงในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง ปริมาตรน้ำ 2 ลิตร อุณหภูมิน้ำ 28-30 องศาเซลเซียส ให้อากาศตลอดการทดลองด้วยหัวทราย ตรวจวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ปริมาณแอมโมเนียและไนไตร์ต

4.3.2 การทดลอง

- กลุ่มทดลองได้รับสารละลายน้ำมันกานพลู 10% โดยมีความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูขนาด 1, 2, 4, 8, 10, 15, 20, 40 และ 80 ppm และกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ไม่ได้รับการสัมผัสสารใดๆ
- สังเกตอาการและบันทึกจำนวนลูกปลาตายทุก 12 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษา

ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้ลูกปลานิลลดการเคลื่อนไหวเพื่อประโยชน์ในการขนส่ง : การขนส่งปลาจำลองสภาพการขนส่งภายในห้องปฏิบัติการ

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารละลายน้ำมันกานพลู พบว่าความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูสูงสุดที่ใช้ในการทดลองและลูกปลานิลไม่ตาย คือ ที่ระดับความเข้มข้น 8 ppm เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารละลายน้ำมันกานพลูโดยการสังเกตพฤติกรรมของลูกปลานิล พบว่าความเข้มข้น 5 ppm ลูกปลามีอาการเคลื่อนไหวมากกว่าความเข้มข้น 8 ppm ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุทำให้ค่าแอมโมเนีย (NH_3) และไนไตรต์ (NO_2^-) ในกลุ่ม 5 ppm มีระดับสูงกว่า 8 ppm แต่เนื่องจากผลการทดลองครั้งนี้มีลูกปลาตายมากถึง 20-35 เปอร์เซ็นต์ จึงได้ทำการทดลองซ้ำที่ 8 ppm อีกครั้ง และพบว่าระดับความเข้มข้น 8 ppm สามารถลดอัตราการตายของลูกปลานิลระหว่างการขนส่ง

การใส่สารละลายน้ำมันกานพลูขนาด 5 ppm และ 8 ppm ในถุงบรรจุลูกปลาสำหรับขนส่งเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าสารละลายน้ำมันกานพลูมีผลทำให้ลูกปลาลดการเคลื่อนไหว แต่ยังมีการขับถ่ายมากเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม คุณภาพน้ำในถุงบรรจุลูกปลาเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง แต่พบว่ากลุ่มทดลองในขณะขนส่งมีจำนวนลูกปลารอดชีวิตมากกว่ากลุ่มควบคุม (ตาราง 4.1)

ตารางที่ 4.1 คุณภาพน้ำที่ใช้บรรจุลูกปลานิล (0 ชั่วโมง) และหลังจากการขนส่งในถุงพลาสติกโดยไม่เปลี่ยนถ่ายน้ำ (12 ชั่วโมง) บรรจุลูกปลานิลจำนวน 90-100 ตัว / ถุงพลาสติกที่บรรจุน้ำ 0.5 ลิตร และอัดอากาศปิดปากถุง บันทึกอัตราการตายของลูกปลานิลหลังจากการขนส่งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู (ppm)	NH_3 (ppm)		NO_2^- (ppm)		อุณหภูมิของน้ำ (°C)		อัตราการตาย
	0 ชม.	12 ชม.	0 ชม.	12 ชม.	0 ชม.	12 ชม.	
กลุ่มควบคุม (n = 90)	0	0.25	0	0.05	29	27	20/90
กลุ่มทดลอง 5 ppm (n = 100)	0	0.25	0	0.05	28	26	35/100
กลุ่มทดลอง 5 ppm (n = 100)	0	0.25	0	0.05	28	26	33/100
กลุ่มทดลอง 5 ppm (n = 100)	0	0.25	0	0.05	28	26	28/100
กลุ่มทดลอง 8 ppm (n = 100)	0	0	0	0	28	26	23/100
กลุ่มทดลอง 8 ppm (n = 100)	0	0	0	0	28	26	21/10
กลุ่มทดลอง 8 ppm (n = 100)	0	0	0	0	28	26	20/100
กลุ่มทดลอง 8 ppm (n = 100)	0	0.25	0	0.05	30	28	2/100
กลุ่มทดลอง 8 ppm (n = 100)	0	0.25	0	0.05	30	28	1/100

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้ลูกปลานิลลดการเคลื่อนไหวเพื่อประโยชน์ในการขนส่ง : การขนส่งปลาลักษณะปฏิบัติจริงภายในฟาร์ม

การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้ลูกปลานิลลดการเคลื่อนไหวเพื่อการขนส่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการศึกษาโดยการบรรจุลูกปลาในถุงพลาสติกลักษณะเดียวกับการขนส่งจริงภายในฟาร์มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ประเมินประสิทธิภาพจากการลดอัตราการตายขณะขนส่ง **ปลานิลขนาด 0.3 กรัม** กลุ่มที่แช่สารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 10 ppm มีอัตราการตายขณะขนส่งต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม 5 ppm (อัตราการตาย 1.62%) และกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ใช้สารเคมีที่ทางฟาร์มใช้ในการขนส่งตามปกติ (อัตราการตาย 1.57%) และกลุ่มที่ไม่ใช้สารใดๆ (อัตราการตาย 2.10%) และเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดสมบูรณ์ (Relative Percent Survival, RPS) พบว่าการใช้สารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 10 ppm มีอัตราการรอดสมบูรณ์สูงกว่าความเข้มข้น 5 ppm และกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 4.2) การศึกษาใน **ปลานิลขนาด 5 กรัม** ไม่พบอัตราการตายในทุกกลุ่มการทดลอง (ตารางที่ 4.2) ตารางที่ 4.3 แสดงคุณภาพน้ำก่อนและหลังการทดลอง พบว่าปริมาณแอมโมเนียในน้ำสูงขึ้นทุกกลุ่มการทดลองภายหลังการขนส่งปลานิลเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในถุงบรรจุโดยไม่เปลี่ยนถ่ายน้ำ

ตารางที่ 4.2 อัตราการตายและค่า RPS ของปลานิลขนาด 0.3 และ 5 กรัม หลังจากการขนส่งในถุงพลาสติกโดยไม่เปลี่ยนถ่ายน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

กลุ่มทดลอง	ปลานิลขนาด 0.3 กรัม		ปลานิลขนาด 5 กรัม	
	อัตราการตาย (%)	RPS (%)	อัตราการตาย (%)	RPS (%)
น้ำมันกานพลู 5 ppm	1.62	23	0	NA
น้ำมันกานพลู 10 ppm	0.86	59	0	NA
Positive control	1.57	25	0	NA
Negative control	2.10	0	0	NA

Positive control : กลุ่มที่ใช้สารเคมีที่ทางฟาร์มใช้ในการขนส่งตามปกติ

Negative control : กลุ่มที่ใช้ไม่ใช้สารใดๆ

NA = not applicable

$$\text{RPS, Relative Percent Survival} = \left(1 - \frac{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ใช้สารสลบ}}{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ไม่ใช้สารใดๆ}}\right) \times 100$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 การทดลอบประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูโดยการขนส่งลูกปลานิล ขนาด 0.3 และ 5 กรัม แสดงคุณภาพน้ำก่อนและหลังจากการขนส่งเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยไม่เปลี่ยนถ่ายน้ำ

กลุ่มทดลอง	คุณภาพน้ำ			
	แอมโมเนีย (ppm)	ไนไตร์ต (ppm)	pH	อุณหภูมิ (°C)
ก่อนการทดลอง	0-0.25	0	7.6	29
หลังการทดลอง				
ลูกปลานิลขนาด 0.3 กรัม				
น้ำมันกานพลู 5 ppm	10	0	6.5	30
น้ำมันกานพลู 10 ppm	10	0	6.5	30
Positive control	10	0	6.5	30
Negative control	10	0	6.5	30
ลูกปลานิลขนาด 5 กรัม				
น้ำมันกานพลู 5 ppm	10	0	6.5	30
น้ำมันกานพลู 10 ppm	10	0	6.5	30
Positive control	10	0	6.5	30
Negative control	10	0	6.5	30

Positive control : กลุ่มที่ใช้สารเคมีที่ทางฟาร์มใช้ในการขนส่งตามปกติ

Negative control : กลุ่มที่ใช้ไม่ใช้สารใดๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกปลานิลดำ

ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกปลานิล ทดสอบโดยการสัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลูเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าลูกปลาแสดงอาการสงบระงับ ลดการเคลื่อนไหว จนกระทั่งเสียการทรงตัวตามปริมาณสารละลายน้ำมันกานพลูที่ได้รับ และระยะเวลาในการสัมผัสสาร (ตารางที่ 4.4) ตารางที่ 4.5 และ รูปที่ 4.1 แสดงความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่เป็นพิษต่อลูกปลา ทำให้ลูกปลาเริ่มตาย และความเข้มข้นที่ทำให้ลูกปลาตาย 50% (LC_{50}) วิเคราะห์โดย probit analysis แสดงระดับความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 11.45 ppm (ภาคผนวก 4.1)

ตารางที่ 4.4 ลักษณะการตอบสนองของลูกปลานิลหลังจากสัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลูโดยการแช่ในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง*

ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู (ppm)	เวลาที่ได้รับสาร	จำนวนตัวตาย (สะสม)	การตอบสนอง
80	1 นาที	20	สลบภายใน 1 นาที
40	5 นาที	20	สลบภายใน 5 นาที
20	30 นาที	20	สลบภายใน 30 นาที
15	30 นาที	3	
	4 ชม.	11	
	8 ชม.	16	
	12 ชม.	18	
	24 ชม.	18	ว่ายน้ำปกติ**
10	4 ชม.	4	
	8 ชม.	6	
	12 ชม.	8	
	24 ชม.	8	ว่ายน้ำปกติ**
8	12 ชม.	0	ลดการเคลื่อนไหวเมื่อได้รับสารเป็นเวลา 4 ชม. แต่ยังตอบสนองต่อการกระตุ้น
	24 ชม.	0	ว่ายน้ำปกติ**
4	12 ชม.	0	บางตัวลดการเคลื่อนไหว
	24 ชม.	0	ว่ายน้ำปกติ**
2	12 ชม.	0	
	24 ชม.	0	ว่ายน้ำปกติ**
1	12 ชม.	0	
	24 ชม.	0	ว่ายน้ำปกติ**
0	12 ชม.	0	
	24 ชม.	0	

* ลูกปลานิล อายุ 23 วัน น้ำหนักประมาณ 0.40 กรัม จำนวน 20 ตัว / กลุ่ม

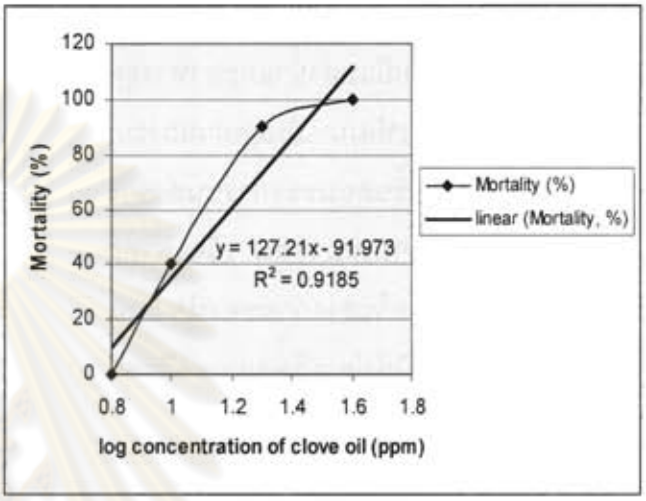
** น้ำมันกานพลูเป็นน้ำมันหอมระเหยซึ่งอาจหมดฤทธิ์เมื่อ 24 ชั่วโมง จึงทำให้ปลาว่ายน้ำกลับสู่สภาพปกติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกปลานิลดำ ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Lethal Concentration Dose 24 hr) (n=20)

ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู (ppm)	จำนวนปลาตาย
control	0
1	0
2	0
4	0
8	0
10	8
15	18
20	20
40	20
80	20

รูปที่ 4.1 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกปลานิลดำ ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูและจำนวนตายสะสม



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งปลาหมอสี

ปลาหมอสีเป็นปลาน้ำจืด อาศัยอยู่ในเขตร้อนเกือบทั่วโลกโดยเฉพาะทวีปแอฟริกาและอเมริกาใต้ ปลาหมอสีส่วนใหญ่มีสีสันสวยงามและขนาดเล็ก จึงเป็นที่นิยมของนักเลี้ยงปลาทั่วไป เนื่องจากประเทศไทยมีแหล่งน้ำและอาหารอุดมสมบูรณ์ สภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเลี้ยงปลาหมอสี ปัจจุบันจึงมีการพัฒนาเป็นอุตสาหกรรมการเพาะพันธุ์เพื่อขายปลาหมอสีให้แก่ลูกค้าในภูมิภาคต่างๆ ทั่วโลก และในขั้นตอนของการขนส่งจำเป็นจะต้องรักษาคุณภาพน้ำและสภาพแวดล้อมในระหว่างการขนส่งให้มีความเหมาะสม เนื่องจากการบรรจุปลาในถุงขนส่งจำเป็นต้องบรรจุอย่างหนาแน่น การเผาผลาญภายในร่างกายของปลาและการขับของเสียเป็นผลให้ระดับแอมโมเนียและความเป็นกรดเพิ่มสูงขึ้น ทำให้ปลาเกิดความเครียดและตายในที่สุด จากลักษณะนิสัยของปลาหมอสีเป็นปลาที่มีนิสัยดุร้าย ไม่ชอบอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม จึงทำให้มีการนำสารละลายน้ำมันกานพลูมาใช้ในปลาหมอสี โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดความสูญเสียระหว่างการขนส่งและศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารละลายน้ำมันกานพลูมาใช้เพื่อลดการเคลื่อนไหวและเมตาบอลิซึมของปลาหมอสี โดยไม่เป็นอันตรายต่อปลา

วิธีการศึกษา

5.1 ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้ปลาหมอสีลดการเคลื่อนไหวเพื่อประโยชน์ในการขนส่ง : การขนส่งปลาจำลองสภาพการขนส่งภายในห้องปฏิบัติการ (ปลาขนาดใหญ่)

5.1.1 สัตว์ทดลอง

ปลาหมอสี ขนาด 4 นิ้ว น้ำหนักประมาณ 20-30 กรัม จำนวน 10 ตัว เลี้ยงในถังไฟเบอร์ ปริมาตรน้ำ 40 ลิตร ให้อากาศตลอดการทดลองด้วยหัวทราย ตรวจวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ปริมาณแอมโมเนียและไนไตร์ต ก่อนทำการศึกษา

5.1.2 วิธีการทดลอง

- อดอาหารปลาหมอสีก่อนเริ่มทำการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- แบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม บรรจุปลาตามลักษณะการขนส่งของฟาร์มในถุงขนาด 6 X 14 นิ้ว บรรจุน้ำ 0.5 ลิตรต่อปลา จำนวน 1 ตัว

- กลุ่มทดลองได้สัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 6, 8 และ 10 ppm และกลุ่มควบคุม คือกลุ่มที่ไม่ได้รับการสัมผัสสารใด ๆ ทำการทดลอง 2 ชุด
- อัดออกซิเจนและปิดปากถุงให้แน่นเช่นเดียวกับการบรรจุปลาขณะขนส่ง
- สังเกตพฤติกรรมการเคลื่อนไหวของปลาในถุงพลาสติกในระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อพบปลาตายในถุงบันทึกเวลาและสิ้นสุดการทดลองในกลุ่มนั้นๆ
- ตรวจวัดคุณภาพน้ำก่อนและหลังการทดลอง
- ประเมินความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลัน (subacute toxicity) ของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อปลาจากลักษณะทางจุลกายวิภาคของเหงือกปลา โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างปลาในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม แช่ใน 10% formalin เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงหรือวิการของเนื้อเยื่อเหงือกปลาหลังจากสัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 4 ppm เป็นเวลา 48 ชั่วโมงติดต่อกัน

5.2 ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้ปลาหมอสีลดการเคลื่อนไหวเพื่อประโยชน์ในการขนส่ง : การขนส่งปลาจำลองสภาพการขนส่งภายในห้องปฏิบัติการ (ปลาขนาดเล็ก)

5.2.1 สัตว์ทดลอง

ปลาหมอสี ขนาด 2.5 นิ้ว น้ำหนักประมาณ 8-10 กรัม จำนวน 70 ตัว เลี้ยงในถังไฟเบอร์ปริมาตรน้ำ 40 ลิตร ให้อากาศตลอดการทดลองด้วยหัวทราย ตรวจวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ปริมาณแอมโมเนียและไนไตร์ต ก่อนทำการศึกษา

5.2.2 วิธีการทดลอง

- อดอาหารปลาหมอสีก่อนเริ่มทำการทดลองเป็นเวลา 72 ชั่วโมง
- แบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม (กลุ่มอดอาหารอย่างสมบูรณ์และไม่สมบูรณ์ก่อนทดลอง*) บรรจุปลาตามลักษณะการขนส่งของฟาร์มในถุงขนาด 6 X 14 นิ้ว บรรจุน้ำ 0.5 ลิตรต่อปลา จำนวน 7 ตัว
- กลุ่มทดลองอดอาหารอย่างสมบูรณ์ให้สัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 4, 6, 8 ppm และกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ไม่ได้รับการสัมผัสสารใด ๆ ส่วนกลุ่มทดลองไม่ได้อดอาหารอย่างสมบูรณ์ให้สัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 4, 6, 8, 10 ppm และกลุ่มควบคุม
- อัดออกซิเจนและปิดปากถุงให้แน่นเช่นเดียวกับการบรรจุปลาขณะขนส่ง

---

* อดอาหารสมบูรณ์ : ภายในถังเลี้ยงไม่มีอาหารและพืชน้ำ, อดอาหารไม่สมบูรณ์ : ภายในถังเลี้ยงมีพืชน้ำ

- สังเกตพฤติกรรมการเคลื่อนไหวของปลาในถุงพลาสติกในระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อพบปลาตายในถุงบันทึกเวลาและสิ้นสุดการทดลองในกลุ่มนั้นๆ
- ตรวจวัดคุณภาพน้ำก่อนและหลังการทดลอง

5.3 ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้ปลาหมอสีลดการเคลื่อนไหวเพื่อประโยชน์ในการขนส่ง : การขนส่งปลาลักษณะปฏิบัติจริงภายในฟาร์ม

5.3.1 **สัตว์ทดลอง**

ปลาหมอสี ขนาด 2.5 นิ้ว น้ำหนักประมาณ 8-10 กรัม จำนวน 500 ตัว ให้อากาศตลอดการทดลองด้วยหัวทราย ตรวจวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ปริมาณแอมโมเนียและไนไตร์ต ก่อนทำการศึกษา

5.3.2 **วิธีการทดลอง**

- อดอาหารปลาหมอสีก่อนเริ่มทำการทดลองเป็นเวลา 72 ชั่วโมง
- แบ่งการทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม บรรจุปลาลักษณะการขนส่งของฟาร์มในถุงขนาด 18 X 28 นิ้ว บรรจุน้ำ 4 ลิตรต่อปลา จำนวน 50 ตัว
- กลุ่มทดลองได้รับการสัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 0.5, 1, 1.5, 4 และ 6 ppm และกลุ่มควบคุม (ได้รับการสัมผัสสารที่ทางฟาร์มใช้ในการขนส่งปลา)
- อัดออกซิเจนและปิดปากถุงให้แน่นเช่นเดียวกับการบรรจุปลาขณะขนส่ง
- สังเกตพฤติกรรมการเคลื่อนไหวของปลาในถุงพลาสติกในระยะเวลา 24 ชั่วโมง และนับจำนวนปลาตายเมื่อสิ้นสุดการทดลอง
- ตรวจวัดคุณภาพน้ำก่อนและหลังการทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.4 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อปลาหมอสี : ปลาขนาดใหญ่

5.4.1 สัตว์ทดลอง

ปลาหมอสี ขนาด 4 นิ้ว น้ำหนักประมาณ 20-30 กรัม จำนวน 20 ตัว เลี้ยงในถังไฟเบอร์ปริมาตรน้ำ 40 ลิตร ให้อากาศตลอดการทดลองด้วยหัวทราย ตรวจวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ปริมาณแอมโมเนียและไนไตร์ต ก่อนทำการศึกษา

5.4.2 วิธีการทดลอง

- อดอาหารปลาหมอสีก่อนเริ่มทำการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- แบ่งการทดลองออกเป็น 11 กลุ่ม กลุ่มละ 1 ตัว ทดสอบในโหลแก้วบรรจุน้ำ 4 ลิตร อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ให้อากาศตลอดการทดลองด้วยหัวทราย
- กลุ่มทดลองได้รับการสัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นน้ำมันกานพลู 2, 4, 8, 10,15, 20, 40, 60, 80 และ 100 ppm กลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ไม่ได้รับการสัมผัสสารใด ๆ ทำการทดลอง 2 ชุด
- สังเกตอาการและบันทึกจำนวนปลาตายทุก 1 ชั่วโมง จนครบ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Probit analysis เพื่อประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลู ใช้เฉพาะความเข้มข้นของสารละลายน้ำมันกานพลูที่ปลอดภัยต่อปลาหมอสีในการศึกษาประสิทธิภาพในการขนส่งปลาหมอสี

5.5 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อปลาหมอสี : ปลาขนาดเล็ก

5.5.1 สัตว์ทดลอง

ปลาหมอสี ขนาด 2.5 นิ้ว น้ำหนักประมาณ 8-10 กรัม จำนวน 200 ตัว เลี้ยงในถังไฟเบอร์ปริมาตรน้ำ 40 ลิตร ให้อากาศตลอดการทดลองด้วยหัวทราย ตรวจวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ปริมาณแอมโมเนียและไนไตร์ต ก่อนทำการศึกษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.5.2 **วิธีการทดลอง**

- อดอาหารปลาหมอสีก่อนเริ่มทำการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- แบ่งการทดลองออกเป็น 9 กลุ่ม กลุ่มละ 7 ตัว ทดสอบในโหลแก้วบรรจุน้ำ 4 ลิตร อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ให้อากาศตลอดการทดลองด้วยหัวทราย
- กลุ่มทดลองได้รับการสัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 2, 5, 8, 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm กลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ไม่ได้รับการสัมผัสสารใด ๆ กลุ่มละ 3 ชุด
- สังเกตอาการและบันทึกจำนวนปลาตายทุก 1 ชั่วโมง จนครบ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Probit analysis เพื่อประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูและเลือกระดับความเข้มข้นที่ปลอดภัยและเหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพในการขนส่งปลาหมอสี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษา

ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้ปลาหมอสีลดการเคลื่อนไหวเพื่อประโยชน์ในการขนส่ง : การขนส่งปลาจำลองสภาพการขนส่งภายในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูในการลดการเคลื่อนไหวเพื่อประโยชน์ในการขนส่งปลาหมอสีขนาด 4 นิ้ว โดยการบรรจุถุงพลาสติกเพื่อการขนส่งเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (จำลองสภาพการขนส่งในห้องปฏิบัติการ) พบว่าสารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 6-10 ppm มีความปลอดภัยต่อปลาและไม่ทำให้ปลาตายขณะขนส่ง คุณภาพน้ำภายหลังการขนส่งปลาเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แสดงว่าปลากลุ่มที่ได้รับสารละลายน้ำมันกานพลูขณะขนส่งมีการขับถ่ายของเสียลดลง โดยพบว่าปริมาณของเสียในน้ำ ได้แก่ แอมโมเนีย และไนไตร์ตมีปริมาณต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 5.2) ดังนั้นความเข้มข้นสารละลายน้ำมันกานพลู 6-10 ppm เหมาะสมที่จะใช้เพื่อลดการเคลื่อนไหว มีความปลอดภัยต่อปลา และลดการขับของเสียในระหว่างการขนส่ง

การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการลดการเคลื่อนไหวเพื่อประโยชน์ในการขนส่งปลาหมอสีขนาด 2.5 นิ้ว โดยการบรรจุถุงพลาสติกเพื่อการขนส่งเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (จำลองสภาพการขนส่งในห้องปฏิบัติการ) พบว่าสารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 8-10 ppm ทำให้ปลาตายก่อนสิ้นสุด 24 ชั่วโมงของการขนส่ง (ตารางที่ 5.2 และรูปที่ 5.1) และพบว่าปลาที่อดอาหารโดยสมบูรณ์ก่อนการขนส่งจะมีความทนทานต่อสารละลายน้ำมันกานพลูและการขนส่ง มากกว่าปลาที่ไม่ได้อดอาหารอย่างสมบูรณ์ก่อนการขนส่งซึ่งพบว่าปลาตายใน 4 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 8 ppm (ตารางที่ 5.3 และรูปที่ 5.2)

การประเมินความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลัน (subacute toxicity) ของสารละลายน้ำมันกานพลู โดยการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของเหงือกปลาที่ได้รับสารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 4-6 ppm เป็นเวลา 48 ชั่วโมงติดต่อกัน พบว่าปลาหมอสี (ขนาด 4 นิ้ว และ 2.5 นิ้ว) ที่ได้รับการสัมผัสสารไม่แสดงวิการใดๆ ที่เหงือกปลา หรือความผิดปกติภายนอกของผิวหนังปลา (รูปที่ 5.3) ดังนั้นความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูขนาดที่ใช้ในการขนส่งปลาจากการศึกษานี้ (4-6 ppm เป็นเวลา $\leq$ 24 ชั่วโมง) จึงเป็นขนาดที่เหมาะสมในการใช้ลงบระงับปลาหมอสีเพื่อการขนส่งและมีความปลอดภัยต่อปลา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.1 คุณภาพน้ำก่อนและหลังการขนส่งปลาเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ปลากลุ่มที่ได้รับสารละลายน้ำมันกานพลูขณะขนส่ง มีการขับถ่ายของเสียลดลง ทำให้ปริมาณแอมโมเนีย ไนไตร์ต ในน้ำมีปริมาณต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

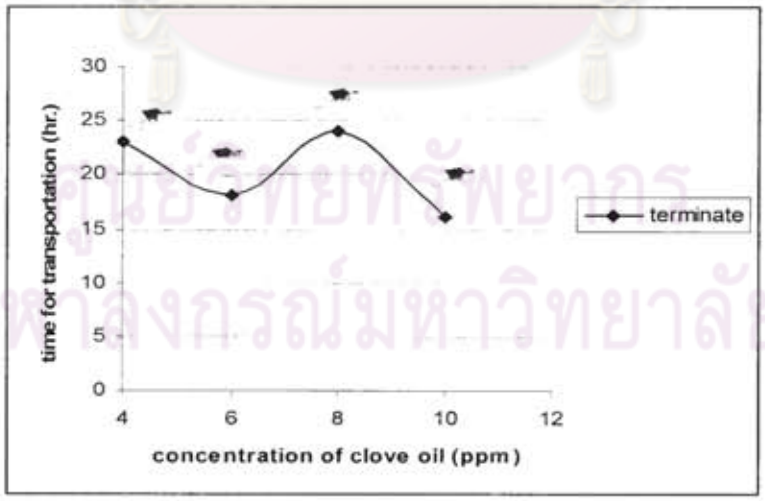
กลุ่มทดลอง	คุณภาพน้ำ			
	แอมโมเนีย (ppm)	ไนไตร์ต (ppm)	pH	อุณหภูมิ (^{o}C)
ก่อนการทดลอง	0	0	7.6	28.5
หลังการขนส่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง				
น้ำมันกานพลู 4 ppm	0.25	0	6.5	29
น้ำมันกานพลู 6 ppm	0.25	0.05	6.5	29
น้ำมันกานพลู 8 ppm	0	0.05	6.5	29
น้ำมันกานพลู 0 ppm (กลุ่มควบคุม)	0.5	0.05	6.5	29.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการสงบระงับเพื่อขนส่งปลาหมอสี (ขนาด 2.5 นิ้ว) การทดลองชุดแรก : ปลาที่อดอาหารอย่างสมบรูณ์ก่อนขนส่ง

ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู (ppm)	จำนวนปลาตาย (n=7)	ระยะเวลาสิ้นสุดการทดลอง (ชั่วโมง)
4	1	23
6	1	18
8	0	24
10	1	16
0 (กลุ่มควบคุม)	1	18

รูปที่ 5.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูและระยะเวลาการขนส่งปลาขนาด 2.5 นิ้วที่ผ่านการอดอาหารอย่างสมบรูณ์

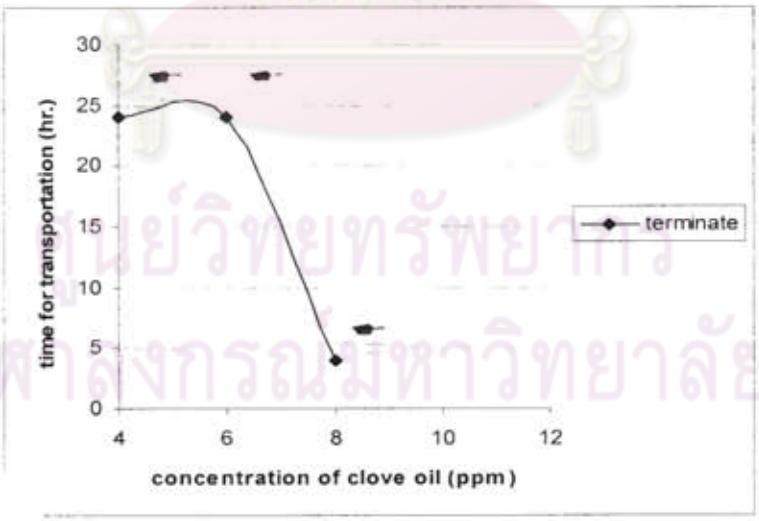


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการลงบระงับเพื่อขนส่งปลาหมอสี (ขนาด 2.5 นิ้ว) การทดลองชุดแรก : ปลาที่ไม่ได้อดอาหารอย่างสมบรูณ์ก่อนขนส่ง

ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู (ppm)	จำนวนปลาตาย (n=7)	ระยะเวลาสิ้นสุดการทดลอง (ชั่วโมง)
4	0	24
6	3	24
8	1	4
0 (กลุ่มควบคุม)	1	7

รูปที่ 5.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูและระยะเวลาการขนส่งปลาขนาด 2.5 นิ้วที่ไม่ผ่านการอดอาหารอย่างสมบรูณ์



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5.3 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของซี่เหงือก (gill filaments) ปลาหมอสีที่ได้รับสารละลายน้ำมันกานพลูโดยการแช่ (immersion bath) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ติดต่อกัน (ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 4-6 ppm) primary และ secondary gill filament แสดงลักษณะปกติ และไม่พบเซลล์อักเสบ (Hematoxylin & Eosin, 40X)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้ปลาหมอสีลดการเคลื่อนไหวเพื่อประโยชน์ในการขนส่ง : การขนส่งปลาลักษณะปฏิบัติจริงภายในฟาร์ม

การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการลดการเคลื่อนไหวในการขนส่งปลาหมอสีขนาด 2.5 นิ้ว โดยการบรรจุตามลักษณะการขนส่งจริงภายในฟาร์มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการขนส่งปลาหมอสีโดยการใช้สารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 1.5-6 ppm มีอัตราการตายขณะขนส่งต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ใช้สารเคมีที่ทางฟาร์มใช้ในการขนส่งตามปกติ) ตารางที่ 5.4 แสดงอัตราการตายและเปอร์เซ็นต์การรอดสมบรูณ์ (Relative Percent Survival, RPS) ของปลาหมอสีหลังจากขนส่งโดยใช้สารละลายน้ำมันกานพลูขนาดความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับการขนส่งตามลักษณะการปฏิบัติของฟาร์ม

คุณภาพน้ำหลังการทดลอง แสดงปริมาณแอมโมเนียในน้ำของกลุ่มที่ใช้สารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 4-6 ppm ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบคุณภาพน้ำในกลุ่มที่ใช้สารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 0.5-1.5 ppm และกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 5.5) ปริมาณแอมโมเนียสูงหลังจากทดลองการขนส่งปลาเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง อาจเนื่องจากจำนวนปลาที่บรรจุเป็นการนับโดยประมาณเท่านั้นจึงทำให้จำนวนปลาที่บรรจุจริงมีความหนาแน่นมากกว่าที่ควรจะเป็น Kaiser (2006) รายงานว่าสารละลายน้ำมันกานพลูมีผลในการยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียที่สามารถสลายแอมโมเนียในน้ำ ความเข้มข้น 0.5-1.0 ppm ยับยั้งการทำงานของ *Escherichia coli*, *Staphylococcus typhimurium* และ *Listeria monocytogenes* และ 0.25-0.3 ppm ยับยั้งการทำงานของ Stapylococcus, Micrococcus และ Bacillus (Burt, 2004) ดังนั้นการใส่สารเพื่อช่วยลดปริมาณแอมโมเนียจากการใช้สารละลายน้ำมันกานพลู เช่น zeolite หรือ clinoptiolite (Amend, 1982) อาจเพิ่มประสิทธิภาพการใช้สารละลายน้ำมันกานพลูสำหรับการขนส่งปลา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งปลาหมอสีขนาด 2.5 นิ้ว แสดงอัตราการตายและค่า RPS หลังจากการขนส่งเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในสารละลายน้ำมันกานพลูความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู (ppm)	อัตราการตาย (%)	RPS (%)
0.5	21.31	-15
1.0	27.27	-48
1.5	3.17	84
4	3.45	81
6	3.45	81
กลุ่มควบคุม*	18.46	NA

* กลุ่มที่ใช้สารเคมีที่ทางฟาร์มใช้ในการขนส่งตามปกติ

NA = not applicable

RPS, Relative Percent Survival $= \left(1 - \frac{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ใช้สารสลบ}}{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ไม่ใช้สารใดๆ}}\right) \times 100$

ตารางที่ 5.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งปลาหมอสีขนาด 2.5 นิ้ว แสดงคุณภาพน้ำก่อนและหลังการขนส่งเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยไม่เปลี่ยนถ่ายน้ำ

กลุ่มทดลอง	คุณภาพน้ำ			
	แอมโมเนีย (ppm)	ไนไตร์ต (ppm)	pH	อุณหภูมิ (°C)
ก่อนการทดลอง	0	0	7.3	28
หลังการทดลอง				
น้ำมันกานพลู 0.5 ppm	10	0.05	6.5	28
น้ำมันกานพลู 1.0 ppm	10	0.10	6.5	28
น้ำมันกานพลู 1.5 ppm	10	0.05	6.5	28
น้ำมันกานพลู 4.0 ppm	5	0.05	6.5	28
น้ำมันกานพลู 6.0 ppm	5	0.05	6.5	28
กลุ่มควบคุม*	10	0.05	6.5	28

* กลุ่มที่ใช้สารเคมีที่ทางฟาร์มใช้ในการขนส่งตามปกติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อปลาหมอสี

ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อปลาหมอสีขนาด 4 นิ้ว (20-30 กรัม) ทดสอบโดยการสัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลูเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปลาหมอสีแสดงอาการสงบระงับ ลดการเคลื่อนไหว จนกระทั่งเสียการทรงตัวและลดการหายใจ ตามปริมาณสารละลายน้ำมันกานพลูที่ได้รับ และระยะเวลาในการสัมผัสสาร (ตารางที่ 5.6) ตารางที่ 5.7 และรูปที่ 5.4 แสดงความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่เป็นพิษต่อปลาหมอสี และการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่ทำให้ปลาตาย 50% (LC_{50}) โดย probit analysis แสดงระดับความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 15.07 ppm (ภาคผนวก 5.1)

ตารางที่ 5.6 ลักษณะการตอบสนองของปลาหมอสี (ขนาด 4 นิ้ว) หลังจากสัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลูโดยการแช่ในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง*

ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู (ppm)	เวลาที่ได้รับสาร	จำนวนตัวตาย (สะสม)	การตอบสนอง
100	< 1 นาที	2	สลบทันทีที่ได้รับสารละลาย
80	< 1 นาที	2	สลบทันทีที่ได้รับสารละลาย
60	10 นาที	2	สลบภายใน 10 นาที
40	20 นาที	2	สลบภายใน 20 นาที
20	30 นาที	1	สลบภายใน 2 ชั่วโมง
	2 ชม.	2	
15	4 ชม.	1	
	12 ชม.	1	
	24 ชม.	1	ว่ายน้ำปกติ**
10	12 ชม.	0	ลดการเคลื่อนไหวเมื่อได้รับสารเป็นเวลา 2 ชม. แต่ยังตอบสนองต่อการกระตุ้น
	24 ชม.	0	ว่ายน้ำปกติ**
8	12 ชม.	0	เคลื่อนไหวน้อยมาก แต่ตอบสนองเมื่อมีการกระตุ้น
	24 ชม.	0	ว่ายน้ำปกติ**
4	12 ชม.	0	ลดการเคลื่อนไหว ว่ายน้ำช้าลง
	24 ชม.	0	ว่ายน้ำปกติ**
2	12 ชม.	0	
	24 ชม.	0	ว่ายน้ำปกติ**
0	12 ชม.	0	
	24 ชม.	0	ว่ายน้ำปกติ**

* ปลาหมอสีขนาด 4 นิ้ว จำนวน 2 ตัว

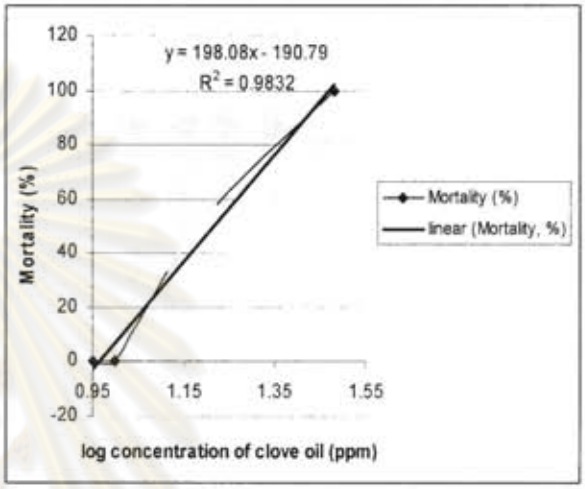
** น้ำมันกานพลูเป็นน้ำมันหอมระเหยซึ่งอาจหมดฤทธิ์เมื่อ 24 ชั่วโมง จึงทำให้ปลาว่ายน้ำกลับสู่สภาพปกติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.7 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อปลาหมอสีขนาด 4 นิ้ว (20-30 กรัม) ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (Lethal Concentration Dose 12 hr) (n=2)

ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู (ppm)	จำนวนปลาตาย
control	0
2	0
4	0
8	0
10	0
15	1
20	2
40	2
60	2
80	2
100	2

รูปที่ 5.4 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูปลาหมอสีขนาด 4 นิ้ว (20-30 กรัม) ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูและจำนวนตายสะสม



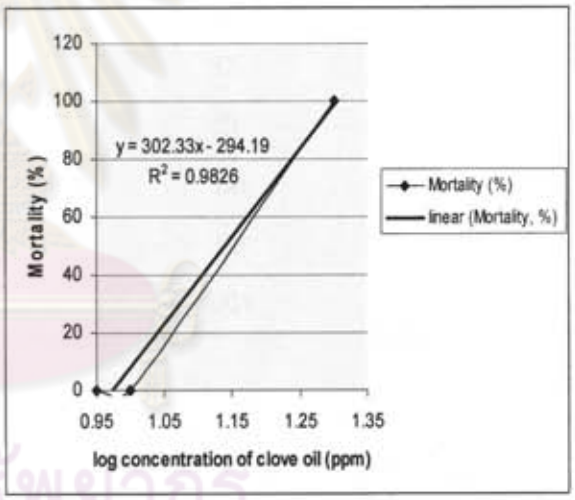
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อปลาหมอสีขนาด 2.5 นิ้ว (8-10 กรัม) ทดสอบโดยการสัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลูเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตารางที่ 5.8 และรูปที่ 5.5 แสดงความเข้มข้นของสารละลายน้ำมันกานพลูที่เป็นพิษต่อปลาหมอสี และการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่ทำให้ปลาตาย 50% (LC_{50}) โดย probit analysis แสดงระดับความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 16.31 ppm (ภาคผนวก 5.2)

ตารางที่ 5.8 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อปลาหมอสีขนาด 2.5 นิ้ว (8-10 กรัม) ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (Lethal Concentration Dose 12 hr) (n=21)

ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู (ppm)	จำนวนปลาตาย
control	0
2	0
5	0
8	0
10	0
20	21
30	21
40	21
50	21

รูปที่ 5.5 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูปลาหมอสีขนาด 2.5 นิ้ว (8-10 กรัม) ทดสอบระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูและจำนวนตายสะสม



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูเพื่อการสงบระงับปลาขนาดใหญ่

ศึกษาการใช้สารละลายน้ำมันกานพลูเพื่อสงบระงับปลาขนาดใหญ่ ได้แก่ ปลาเก๋า ปลานิลวัยเจริญพันธุ์และพ่อแม่พันธุ์ การสงบระงับปลาขนาดใหญ่มีความจำเป็นต่อการจัดการสัตว์น้ำ เช่น การผสมเทียม ชั่งน้ำหนัก วัดขนาด ทำเครื่องหมาย การขนส่ง และทำวัคซีน การฉีดยา หรือ งานวิจัย หากการจับบังคับไม่เหมาะสม เช่น ปลาไม่มีอาการสงบระงับอาจทำให้เกิดอันตรายต่อผู้ทำงานและปลาอาจบอบช้ำจากการจับบังคับ ทำให้มูลค่าทางเศรษฐกิจลดลงจากความเสียหายในขั้นตอนดังกล่าว การทดลองนี้จึงทำการศึกษาวิธีการใช้สารละลายน้ำมันกานพลูเพื่อลดการเคลื่อนไหวของปลา และศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายน้ำมันกานพลูที่เหมาะสมต่อการจัดการปลาขนาดใหญ่หรือพ่อแม่พันธุ์ปลา

วิธีการศึกษา

6.1 ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการสงบระงับปลาเก๋า

6.1.1 สัตว์ทดลอง

ปลาเก๋า *(Epinephalus malabaricus)* ขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 1 กิโลกรัม ความยาว 40 เซนติเมตร จำนวน 5 ตัว เลี้ยงในถังไฟเบอร์ปริมาตร 500 ลิตร น้ำทะเลความเค็ม 35 ppt ให้อากาศตลอดการทดลองด้วยหัวทราย ตรวจวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ปริมาณแอมโมเนียและไนไตร์ต

6.1.2 วิธีทดลอง

- เลี้ยงปลาเก๋าก่อนเริ่มทำการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อปรับปลาให้คุ้นเคยกับสภาพของการทดลอง
- เตรียมถังไฟเบอร์ บรรจุน้ำทะเลปริมาตร 25 ลิตร
- ใส่สารละลายน้ำมันกานพลู 10% (เตรียมสารละลายน้ำมันกานพลูโดยน้ำมันกานพลู, eugenol 75-88%, 1 ส่วน ผสม 90% ethanol อีก 9 ส่วน) ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 300, 400 และ 500 ppm ให้อากาศตลอดการทดลองด้วยหัวทราย
- นำปลาเก๋าใส่ลงในถังยาสลบที่เตรียมไว้ จับเวลาตั้งแต่เริ่มใส่สารจนกระทั่งถึงระดับที่ปลาสูญเสียการทรงตัวเพื่อประเมินระยะเวลาที่ทำให้ปลาสลบ (induction time)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- เมื่อปลาสลบในระดับที่ต้องการแล้ว นำปลาขึ้นมาชั่งน้ำหนักและวัดความยาว
- นำปลาเก๋าที่สลบใส่ลงในภาชนะที่บรรจุน้ำปริมาตร 25 ลิตรที่ไม่ใส่สารละลายน้ำมันกานพลู ใส่หัวทรายเพื่อให้อากาศ รอปลาฟื้นจากการสลบ และจับเวลาตั้งแต่เริ่มใส่ปลาลงในภาชนะจนถึงปลาเริ่มกลับมามีการทรงตัวและว่ายน้ำเป็นปกติ เพื่อประเมินระยะเวลาที่ปลาแสดงอาการกลับมาเป็นปกติสังเกตจากปลาเริ่มหยุดนิ่ง หายใจสม่ำเสมอและสีลำตัวเข้มใกล้เคียงก่อนได้รับยา (recovery time)

6.2 ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการสงบระงับปลานิลวัยเจริญพันธุ์

6.2.1 สัตว์ทดลอง

ปลานิลดำวัยเจริญพันธุ์ น้ำหนักตัวโดยเฉลี่ยประมาณ 120 กรัม จำนวน 15 ตัว เลี้ยงในระบบวิเคราะห์แบบน้ำนิ่งในถังไฟเบอร์ ปริมาตรน้ำ 1,000 ลิตร ให้อากาศตลอดการทดลองด้วยหัวทราย ตรวจวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ปริมาณแอมโมเนียและไนไตร์ต

6.2.2 วิธีการทดลอง

- ปรับสภาพปลาทดลองเป็นเวลา 48 ชั่วโมงก่อนเริ่มการทดลอง
- สุ่มเลือกปลาจากถังไฟเบอร์ บรรจุถังจำนวน 5 ตัว / ถัง / น้ำ 10 ลิตร
- กลุ่มทดลองได้รับสารละลายน้ำมันกานพลู10% (เตรียมสารละลายน้ำมันกานพลูโดยน้ำมันกานพลู, eugenol 75-88%, 1 ส่วน ผสม 90% ethanol อีก 9 ส่วน) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 25 ppm) 5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 50 ppm) และ 10 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 100 ppm)
- สังเกตพฤติกรรมการเคลื่อนไหวของปลา ตั้งแต่เริ่มสัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลูกระทั่งถึงระดับที่ปลาสูญเสียการทรงตัว ประเมินระยะเวลาที่ทำให้ปลาสลบ (induction time)
- นำปลาที่สลบใส่ลงในภาชนะที่บรรจุน้ำปริมาตร 10 ลิตรที่ไม่ใส่สารละลายน้ำมันกานพลู ใส่หัวทรายเพื่อให้อากาศ รอปลาฟื้นจากการสลบ และจับเวลาตั้งแต่เริ่มใส่ปลาลงในภาชนะจนถึงปลาเริ่มกลับมามีการทรงตัวและว่ายน้ำเป็นปกติ เพื่อประเมินระยะเวลาที่ปลาแสดงอาการกลับมาเป็นปกติสังเกตจากปลาเริ่มหยุดนิ่ง หายใจสม่ำเสมอและสีลำตัวเข้มใกล้เคียงก่อนได้รับยา (recovery time)

ผลการศึกษา

ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการสงบระงับปลาเก๋า

ความเข้มข้นของสารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 300, 400 และ 500 ppm สามารถลดการเคลื่อนไหวของปลาเก๋าอย่างรวดเร็วทำให้จับบังคับและชั่งน้ำหนัก ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 400-500 ppm เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสามารถเหนี่ยวนำให้ปลาลดการเคลื่อนไหวจนกระทั่งสลบภายในระยะเวลา 300 วินาที และฟื้นในเวลาไม่เกิน 60-250 วินาที (ตารางที่ 6.1)

อาการของปลาเก๋าเมื่อแช่อยู่ในสารละลายน้ำมันกานพลูพบว่า ระยะแรกแสดงอาการตื่นตัว ลำตัวสีเข้มขึ้นและเป็นแถบดำในแนวตั้ง แต่เมื่อถูกกระตุ้นหรือรบกวน ลายลำตัวจะมีสีอ่อนเป็นจุดสีน้ำตาลและแถบแนวตั้งจางลง เคลื่อนไหวมากขึ้นและหายใจเร็วขึ้น บางตัวแสดงอาการหายใจลำบาก หลังจากนั้นปลาค่อยๆ เคลื่อนไหวช้าลงจนสลบสามารถนำปลาไปชั่งน้ำหนักและวัดความยาว เมื่อปลาฟื้นตัวแสดงอาการตื่นตัว ว่ายน้ำไปมา ลำตัวสีอ่อน เมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่งปลาจะเริ่มลดการเคลื่อนไหวและแถบสีข้างลำตัวกลับเป็นสีปกติของปลา

ตารางที่ 6.1 การตอบสนองของปลาเก๋าต่อสารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงระยะเวลาตั้งแต่ปลาเริ่มสัมผัสสารจนกระทั่งปลาแสดงอาการสงบระงับ (induction time) และระยะเวลาที่ปลาฟื้นสู่ปกติหลังจากการเปลี่ยนถ่ายน้ำ (recovery time)

ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู (ppm)	Induction time (วินาที)	Recovery time (วินาที)	ขนาดปลา	
			น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (ซม.)
300	390	254	1200	38.5
400	179	120	1150	38.5
400	270	234	1000	35.5
500	150	191	1300	43
500	85	60	1300	43

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประสิทธิภาพของสารละลายน้ำมันกานพลูในการสงบระงับปลานิลวัยเจริญพันธุ์

ความเข้มข้นของสารละลายน้ำมันกานพลูเพื่อลดการเคลื่อนไหวปลานิลวัยเจริญพันธุ์เมื่อทดสอบที่ระดับความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 25, 50 และ 100 ppm พบว่าความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 50 ppm เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสามารถเหนี่ยวนำให้ปลานิลสลบและฟื้นภายใน 2 นาที (ตารางที่ 6.2) นอกจากนี้พบว่าสารละลายน้ำมันกานพลูที่ใช้ทดสอบสามารถทำให้ปลานิลสงบระงับหลังจากสัมผัสสารและฟื้นกลับสู่สภาพปกติเมื่อหยุดสัมผัสสารโดยไม่แสดงอาการระคายเคืองหรือภาวะความเครียดใดๆ

ตารางที่ 6.2 การตอบสนองของปลานิลวัยเจริญพันธุ์ต่อสารละลายน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงระยะเวลาตั้งแต่ปลาเริ่มสัมผัสสารจนกระทั่งปลาแสดงอาการสงบระงับหรือสลบ (induction time) และระยะเวลาที่ปลาฟื้นสู่สภาพปกติหลังจากการเปลี่ยนถ่ายน้ำ (recovery time)

ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู (ppm)	น้ำหนักตัว (กรัม)	Induction (นาที)	Recovery (นาที)		อุณหภูมิน้ำ (°C)
			พลิกตัว	เคลื่อนไหวปกติ	
100	200	1.03	3.29	5.09	28
	115	1.35	4.59	5.05	
	105	1.40	3.57	4.10	
	100	1.44	3.11	3.56	
	80	1.31	3.08	3.27	
50	135	2.27	1.46	2.48	28
	130	2.44	1.39	3.33	
	110	2.48	1.22	1.50	
	100	3.25	2.14	2.14	
	80	3.43	1.22	1.22	
25*	160	6.03	NA	2.11	28
	150	9.08	NA	0.20	
	135	9.39	NA	0.25	
	110	7.41	NA	0.30	
	85	5.03	NA	0.15	

* ความเข้มข้นระดับที่ทำให้ปลาลดการเคลื่อนไหวแต่ไม่หงายตัวหรือสูญเสียการทรงตัว

NA, Not available

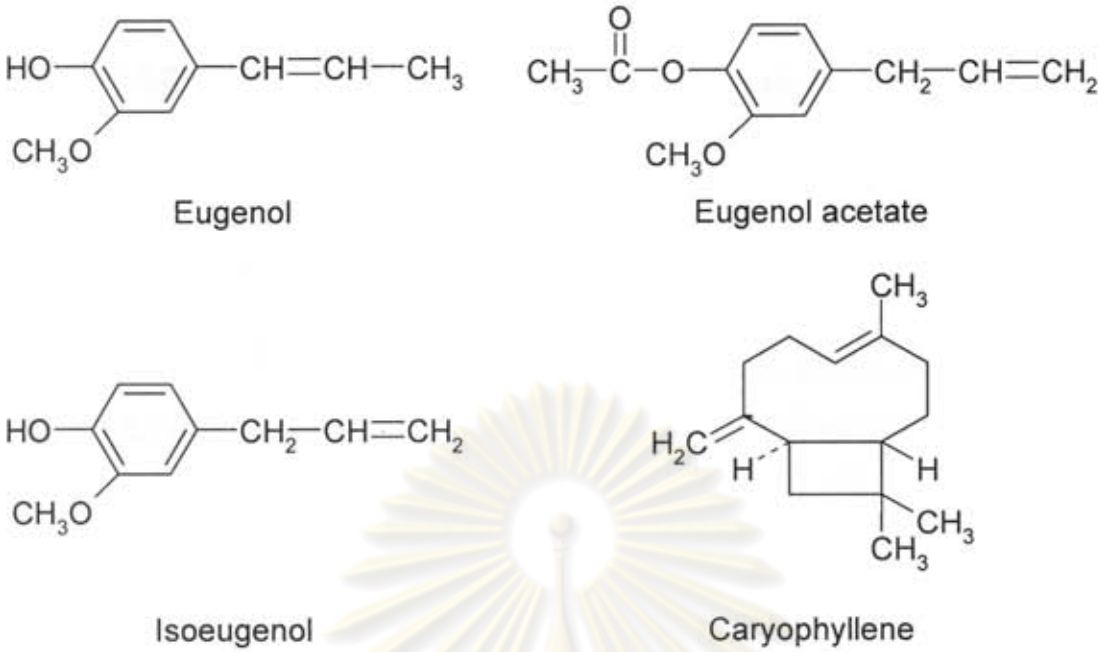
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 7

การควบคุมคุณภาพสูตรตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูพร้อมใช้

น้ำมันกานพลู มีฤทธิ์ทางชีวภาพทำให้สัตว์น้ำมีอาการเชื่องซึม สงบระงับ กล้ามเนื้อคลายตัว มีการเผาพลาญในร่างกายลดลง จนถึงทำให้สัตว์ซึมลึกและสลบได้นั้น พบว่ามีประโยชน์ในการจับ ควบคุม ลดความก้าวร้าว เคลื่อนย้าย ทำวัคซีน และขนส่งสัตว์น้ำ เพื่อการจัดการทางการเกษตรและการพาณิชย์ แต่เนื่องจากน้ำมันกานพลูมีคุณสมบัติที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้การกระจายตัวในน้ำไม่ดี และออกฤทธิ์ไม่สม่ำเสมอ การใช้น้ำมันกานพลูเพียงชนิดเดียวยังทำให้เกิดเป็นฟิล์มน้ำมันลอยปกคลุมที่ผิวน้ำ ไม่สะดวกในการนำมาใช้ได้ทันที การผสมน้ำมันกานพลูในเอทิลแอลกอฮอล์ในปริมาณสูงสามารถทำให้น้ำมันกานพลูเข้าเป็นเนื้อเดียวกับน้ำได้ แต่ปริมาณเอทิลแอลกอฮอล์ที่ใช้ ทำให้สัตว์น้ำมีอาการระคายเคือง มีการดิ้น สะบัดตัว และอาจเป็นแผลไหม้บริเวณผิวหนัง ด้วยเหตุนี้ คณะผู้วิจัยจึงศึกษาพัฒนาสารละลายน้ำมันกานพลูให้เป็นสูตรตำรับผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลูพร้อมใช้ สามารถละลายและกระจายตัวในน้ำได้ดี ไม่มีน้ำมันกานพลูลอยที่ผิวน้ำ รวมถึงไม่ระคายเคืองต่อสัตว์น้ำ โดยสูตรตำรับน้ำมันกานพลูที่พัฒนาขึ้น ประกอบด้วยน้ำมันกานพลูร่วมกับสารเพิ่มการละลายชนิดต่างๆ และสารช่วยอื่นๆ ในสูตรตำรับ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพเป็นที่ต้องการของเกษตรกรผู้ให้

สารสำคัญในน้ำมันกานพลูที่ทราบกันดีว่ามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่ สารประเภทฟีนอล (phenolic compounds) ซึ่งประกอบด้วยยูจีนอล (eugenol) ไอโซยูจีนอล (isoeugenol) ยูจีนอลอะซีเตต (eugenol acetate) และคาริโอฟิลลีน (caryophyllene) โครงสร้างของสารดังกล่าวข้างต้นแสดงดังรูปที่ 7.1 โดยพบว่าในน้ำมันกานพลูมียูจีนอลเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูงที่สุด จากการที่น้ำมันกานพลูมีการใช้กันอย่างแพร่หลายโดยเป็นส่วนประกอบในอาหาร ยา และเครื่องสำอาง สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม (มอก. 1680-2541) กำหนดให้น้ำมันกานพลูต้องมีปริมาณของยูจีนอลไม่น้อยกว่า 75% วิธีวิเคราะห์หาปริมาณยูจีนอลในน้ำมันกานพลูโดยส่วนใหญ่ใช้เทคนิคทางแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography, GC) ทั้งนี้เนื่องจากสารยูจีนอลสามารถระเหยได้ การวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยูจีนอลในสูตรตำรับยาสลบปลา (ตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูพร้อมใช้) ที่มีน้ำมันกานพลูเป็นองค์ประกอบ เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์



รูปที่ 7.1 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลที่พบในน้ำมันกานพลู

วิธีการศึกษา

7.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง

7.1.1 Standard Eugenol Solution

เตรียมโดยการชั่งสารมาตรฐานยูจีนอล (standard eugenol, lot no. 1078601, 100.4% purity) 30 มิลลิกรัม ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เจือจางและปรับปริมาตรด้วยเมธานอล (methanol AR grade) (ความเข้มข้นของสารยูจีนอลเท่ากับ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

7.1.2 Stock Internal Standard Solution (Stock Vanillin Solution)

เตรียมโดยการชั่งสารวานิลลิน (vanillin, internal standard) 1 กรัม ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางและปรับปริมาตรด้วยเมธานอล (ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

7.1.3 Vanillin Solution

เตรียมโดยการปิเปตสารละลายที่เตรียมขึ้นในข้อ 7.1.2 (stock internal standard solution or stock vanillin solution) จำนวน 1 มิลลิลิตรลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางและปรับปริมาตรด้วยเมธานอล (ความเข้มข้นของวานิลลินเท่ากับ 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

7.1.4 Standard Solution

เตรียมโดยการชั่งสารมาตรฐานยูจีนอล 30 มิลลิกรัม ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายที่เตรียมขึ้นในข้อ 7.1.2 (stock internal standard solution or stock vanillin solution) จำนวน 1 มิลลิลิตรลงใน volumetric flask จากนั้นเจือจางและปรับปริมาตรด้วยเมธานอล (ความเข้มข้นของสารยูจีนอลเท่ากับ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ ความเข้มข้นของวานิลลินเท่ากับ 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

7.1.5 Sample Solution

เตรียมโดยการปิเปตผลิตภัณฑ์ยาสลบปลา (ตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูพร้อมใช้)* 1 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายที่เตรียมขึ้นในข้อ 7.1.2 (internal standard stock solution) จำนวน 1 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางและปรับปริมาตรด้วยเมธานอล (ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ยาสลบปลาน้ำมันกานพลูเท่ากับ 40 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของวานิลลินเท่ากับ 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ทำการเตรียมตัวอย่างซ้ำ 2 ครั้ง (duplicate sample, sample A and B)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

* ผลิตภัณฑ์ยาสลบปลา หรือ ตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูพร้อมใช้ (lot no. B7CL00801/4) ซึ่งประกอบไปด้วยสารต่าง ๆ ได้แก่ น้ำมันกานพลูที่มีปริมาณเทียบเท่ายูจีนอล 5% (clove oil equivalent to eugenol 5%w/v), ethanol, propylene glycol, polyethylene glycol, BHT, BHA, MP, PP และ EDTA

7.2 การวิเคราะห์หาปริมาณยูจีนอลในผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลู

7.2.1 สภาวะของแก๊ส โครมาโตกราฟี

Column : Stabiwax® capillary column (Crossbond® Carbowax® - PEG, 0.25 mm x 30 m I.D., 0.25 µm df)

Carrier gas : Helium

Flow Rate : 1.5 มิลลิลิตร/นาที

Detection : Flame-Ionization Detector (FID)

Injection Volume : 1 ไมโครลิตร

Run Time : 7 นาที

Injector and Detector Temperature: 250 °C

Temperature Program : แสดงดังตารางที่ 6.1

ตารางที่ 7.1 Temperature Program ของการวิเคราะห์

อัตราการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (°C/min)	อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา (minutes)
0	160	1.50
20	200	0.00
40	220	3.00

7.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณยูจีนอล

1. ตรวจสอบ retention time ของสารยูจีนอล โดยการฉีดสารละลายที่เตรียมขึ้นในข้อ 7.1.1 (Standard Eugenol Solution) สู่แก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography, GC) บันทึก chromatogram
2. ตรวจสอบ retention time ของสารวานิลลิน โดยการฉีดสารละลายที่เตรียมขึ้นในข้อ 7.1.3 (vanillin solution) สู่ GC บันทึก chromatogram
3. ทดสอบความเหมาะสมของระบบ GC (system suitability) โดยการฉีดสารละลายที่เตรียมขึ้นในข้อ 7.1.4 (standard solution) จำนวน 6 เข็ม คำนวณหา peak area ratio

---

Gas Chromatography (Perkin-elmer, Autosystem XL) ต่อด้วย Flame-Ionization Detector (FID); Stabiwax® capillary column (Crossbond® Carbowax® - PEG, 0.25 mm x 30 m I.D., 0.25 µm df)

ระหว่างสารยูจีนอลและวานิลลิน จากนั้นคำนวณหาค่า percent relative standard deviation ของ peak area ratio ที่ได้ทั้ง 6 ค่า

4. วิเคราะห์หาปริมาณสารยูจีนอลในผลิตภัณฑ์โดยการฉีดสารละลายที่เตรียมขึ้นในข้อ 7.1.4 (standard solution) จำนวน 5 เข็ม จากนั้น ฉีดสารละลายที่เตรียมขึ้นในข้อ 5 (sample solutions, sample A และ B) โดยการฉีดตัวอย่างละ 3 เข็ม คำนวณหา peak area ratio ระหว่างสารยูจีนอลและวานิลลิน เฉลี่ยค่าที่ได้ (average peak area ratio) ของ standard และ sample คำนวณหาปริมาณสารยูจีนอลในผลิตภัณฑ์ และหาค่า % labeled amount (%LA) ของสารยูจีนอลในผลิตภัณฑ์

7.3 การคำนวณ

%RSD = (standard deviation of peak area ratio/average of peak area ratio) x 100

$$\%\text{ Content of Eugenol} = \frac{(\text{Peak area ratio of sample}) \times (\text{weight of standard}/25) \times (25/1) \times \%\text{st}}{\text{Peak area ratio of sample}}$$

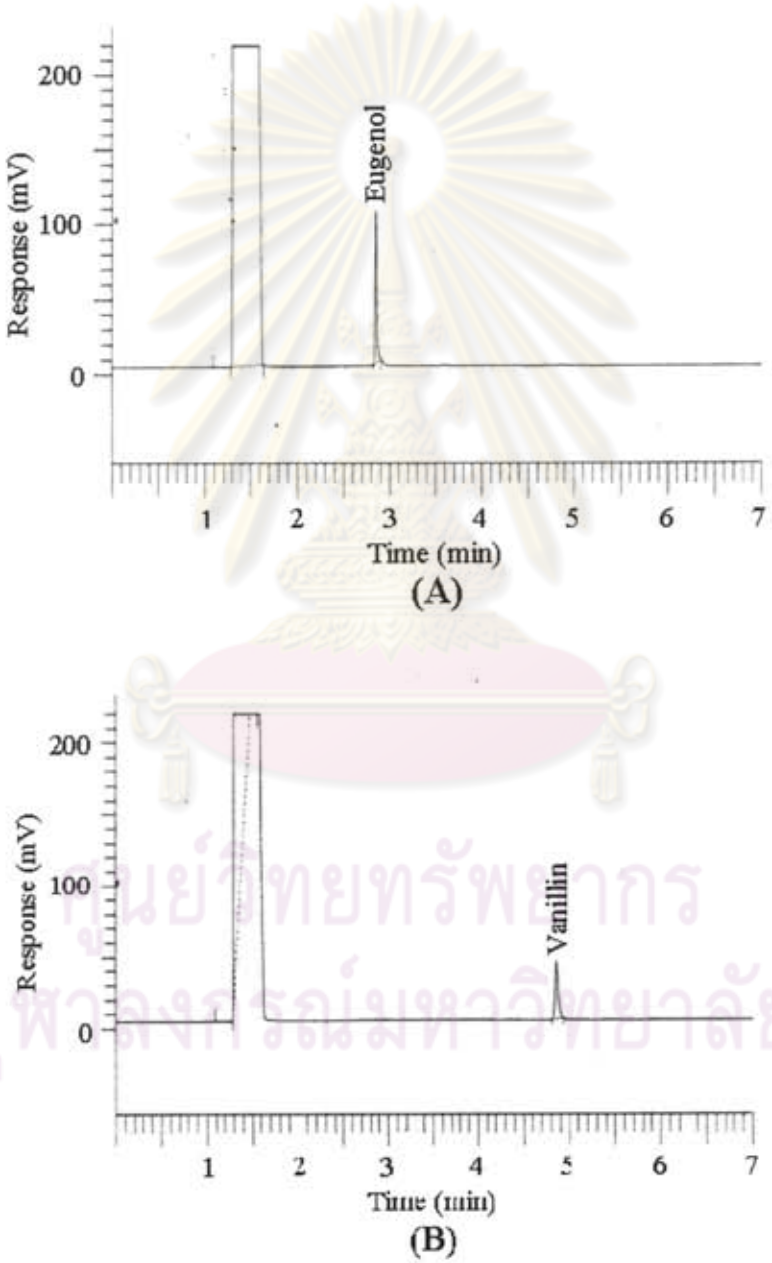
%LA of eugenol = %content of eugenol x (100/5)

ผลการศึกษา

GC chromatogram ของสารยูจีนอลและสารวานิลลิน แสดงในรูปที่ 7.2 โดยพบว่า พีคของยูจีนอลและวานิลลิน ปรากฏที่ 2.84 และ 4.84 นาทีตามลำดับ

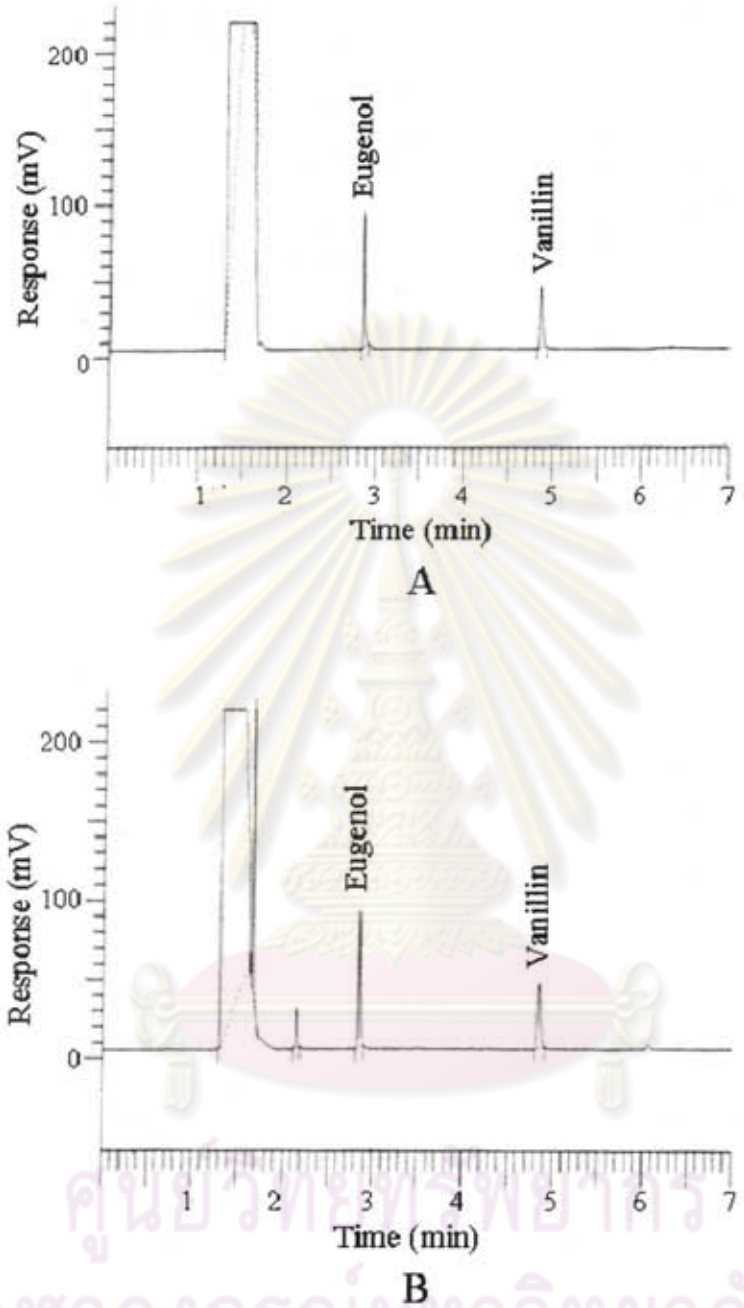
การทดสอบความเหมาะสมของระบบ GC (system suitability) โดยการฉีดสารละลายที่เตรียมขึ้นในข้อ 7.1.4 (standard solution) จำนวน 6 เข็ม ได้แสดงตัวอย่าง GC chromatogram ในรูปที่ 7.3 แสดงค่า peak area ของยูจีนอลและวานิลลิน พร้อมทั้งอัตราส่วนระหว่าง peak area ของสารยูจีนอลและวานิลลิน (peak area ratio) จากการตรวจสอบพบว่าค่า percent relative standard deviation ของ peak area ratio ทั้ง 6 ค่า ได้เท่ากับ 1.67% ซึ่งไม่มากกว่า 2% ถือได้ว่าระบบ GC ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์สามารถใช้ได้

GC chromatogram ของสารละลายที่เตรียมขึ้นในข้อ 7.1.4 (standard solution) และสารละลายที่เตรียมขึ้นในข้อ 7.1.5 (sample solutions, sample A และ B) แสดงในรูปที่ 7.3 ค่า peak area ratio ระหว่างสารยูจีนอลและวานิลลิน รวมถึงค่าเฉลี่ยค่าที่ได้ (average peak area ratio) พบว่าปริมาณยูจีนอลในผลิตภัณฑ์มีค่าเท่ากับ 4.78 และ 4.84 %w/v (เฉลี่ย 4.81%w/v) คิดเป็น %labeled amount (%LA) ของสารยูจีนอลในผลิตภัณฑ์เท่ากับ 96.57 และ 96.80% (เฉลี่ย 96.18%)



รูปที่ 7.2 โครมาโตแกรมของ eugenol solution (A) และ vanillin solution (B)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7.3 โครมาโตแกรมของ standard solution (A) และ sample solution (B)

ดังนั้นวิธี gas chromatograpgy ที่พัฒนาขึ้นสามารถแยกสารยูจีนอลออกจากสารอื่นๆ ในตำรับ โดยพีคที่เกิดบริเวณข้างหน้าของพีคยูจีนอล อาจเป็นพีคของสารอื่นๆ ในน้ำมันกานพลู เช่น ไอโซยูจีนอล (Isoeugenol) หรือ ยูจีนอล อะซีเตต (Eugenol acetate) เป็นต้น หรืออาจเป็นสารช่วยอื่นๆ ในสูตรตำรับ การใช้ internal standard สำหรับการวิเคราะห์ช่วยลดความคลาดเคลื่อนของวิธีวิเคราะห์โดยวานิลลินสามารถใช้เป็น internal standard โดยสามารถเกิดพีคได้ที่ retention time ที่เหมาะสม จากพีคของยูจีนอล โดยพีคของยูจีนอลและวานิลลินแยกออกจากกันอย่างชัดเจน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ยาสลบปลาที่มีส่วนผสมของน้ำมันกานพลูด้วยการวิเคราะห์หาปริมาณยูจีนอลในผลิตภัณฑ์ที่เตรียมขึ้น พบว่ามีปริมาณยูจีนอลเท่ากับ 4.81%w/v คิดเป็น % labeled amount (%LA) ของสารยูจีนอลในผลิตภัณฑ์เท่ากับ 96.18% ทั้งนี้จะเห็นได้ว่า %LA อยู่ระหว่าง 90-110% ซึ่งเป็นเกณฑ์ที่ยอมรับโดยทั่วไปในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสูตรตำรับ (assay) ดังนั้นการศึกษานี้ได้พัฒนาสูตรตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูพร้อมใช้เพื่อเป็นยาสลบสัตว์น้ำ และวิธีการเตรียม การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ยาสลบปลาให้เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 8

บทสรุปและข้อเสนอแนะงานวิจัย

น้ำมันกานพลู เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากพืช มีฤทธิ์ทางชีวภาพทำให้สัตว์น้ำมีอาการเชื่องซึม สงบระงับ กล้ามเนื้อคลายตัว มีการเผาผลาญในร่างกายลดลง จนถึงทำให้สัตว์ซึมลึกและสลบซึ่งเป็นประโยชน์สำหรับการจัดการสัตว์น้ำ เช่น การผสมเทียม ชั่งน้ำหนัก วัดขนาด ทำเครื่องหมาย การขนส่ง และงานเฉพาะทางสัตวแพทย์ เช่น การศัลยกรรมแต่งครีบปลา ทำวัคซีน การฉีดยา หรือ งานวิจัย เป็นต้น น้ำมันกานพลูสามารถสลายตัวด้วยกระบวนการทางชีวภาพ จึงเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและมีความปลอดภัยสำหรับผู้ใช้และสัตว์น้ำที่ได้รับยา แต่เนื่องจากน้ำมันกานพลูมีคุณสมบัติที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้การกระจายตัวในน้ำไม่ดี และออกฤทธิ์ไม่สม่ำเสมอ การใช้น้ำมันกานพลูเพียงชนิดเดียวยังทำให้เกิดเป็นฟิล์มน้ำมันลอยปกคลุมที่ผิวน้ำ ไม่สะดวกในการนำมาใช้ได้ทันที การใช้ตัวทำละลายเพื่อช่วยให้น้ำมันกานพลูเข้าเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ เช่น การผสมน้ำมันกานพลูในเอทิลแอลกอฮอล์ในปริมาณสูงสามารถทำให้น้ำมันกานพลูเข้าเป็นเนื้อเดียวกับน้ำได้ แต่ปริมาณเอทิลแอลกอฮอล์ที่ใช้ ทำให้สัตว์น้ำมีอาการระคายเคือง มีการดิ้น สะบัดตัว และอาจเป็นแผลไหม้บริเวณผิวหนัง การใช้ตัวทำละลายอื่นๆ เช่น โพลีเอทิลลีนไกลคอล 400 (polyethylene glycol 400) หรือ โพรพิลลีนไกลคอล (propylene glycol) เจือจางน้ำมันกานพลูให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ พบว่าตัวทำละลายดังกล่าวสามารถทำให้ได้สารละลายน้ำมันกานพลูที่มีลักษณะใสได้เฉพาะที่บางความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูเท่านั้น นอกจากนี้การใช้ตัวทำละลายทั้งสองชนิดนี้ในปริมาณที่สูงยังประสบปัญหาเช่นเดียวกับการใช้เอทิลแอลกอฮอล์คือ ทำให้สัตว์น้ำเกิดอาการระคายเคือง มีการดิ้น สะบัดตัว และอาจเป็นแผลไหม้บริเวณผิวหนัง เป็นต้น ดังนั้นการพัฒนาสูตรตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูเป็นยาสลบในสัตว์น้ำควรมีหลักเกณฑ์ดังนี้

(1) ผลิตภัณฑ์อยู่ในรูปพร้อมใช้ สามารถนำไปใช้ได้ทันที ใช้ได้สะดวก สามารถใส่ลงในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำหรือภาชนะที่มีสัตว์น้ำได้ทันทีโดยไม่ต้องมีการเจือจางก่อนใช้

(2) ผลิตภัณฑ์อยู่ในรูปสารละลายใส ไม่มีตะกอนขุ่น มีกลิ่นเฉพาะตัวของน้ำมันกานพลูเท่านั้น

(3) เมื่อเติมผลิตภัณฑ์ลงในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำหรือภาชนะที่มีสัตว์น้ำ ผลิตภัณฑ์สามารถกระจายตัวได้ดีในน้ำ

(4) ไม่ทำให้สภาพความเป็นกรด-ด่างของน้ำเปลี่ยนแปลงไป

(5) ผลิตภัณฑ์สามารถออกฤทธิ์ให้สัตว์ซึม ลดการเคลื่อนไหว กล้ามเนื้อคลายตัว การเผาผลาญในร่างกายลดลง จนถึงทำให้สัตว์ซึมลึกและสลบ

(5) ผลิตภัณฑ์ไม่ทำให้สัตว์น้ำเกิดอาการระคายเคือง ดิ้น สะบัดตัว หรือเป็นแผลไหม้บริเวณผิวหนัง สัตว์น้ำเข้าสู่สภาวะสงบระงับด้วยความสงบ ไม่ตื่นตกใจ

(6) ผลิตภัณฑ์สามารถออกฤทธิ์ได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม

(7) ผลิตภัณฑ์ปลอดภัยต่อสัตว์น้ำ ผู้ใช้ และผู้บริโภคสัตว์น้ำที่ได้รับผลิตภัณฑ์

การทดสอบประสิทธิภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์สารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้สัตว์น้ำสลบหรือสงบระงับ พบว่าระดับการสลบขึ้นกับความเข้มข้นของยาและระยะเวลาที่สัตว์น้ำสัมผัสกับผลิตภัณฑ์ การออกฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์อาจแตกต่างกันตามชนิดหรือน้ำหนักของสัตว์น้ำ จึงควรทดสอบผลิตภัณฑ์กับสัตว์น้ำชนิดนั้นๆ ก่อนนำไปใช้จริงเพื่อให้ได้ขนาด และระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้ยา ระยะเวลาที่เหนี่ยวนำให้สัตว์น้ำสลบขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นที่ใช้ เมื่อใช้ความเข้มข้นต่ำจะใช้ระยะเวลาเหนี่ยวนำประมาณ 10-20 นาที การสลบจะเร็วขึ้นหากใช้ความเข้มข้นสูง สัตว์น้ำที่ได้รับยาขนาดต่ำควรฟื้นภายใน 1 นาที สัตว์น้ำที่ได้รับยาขนาดทำให้สลบสามารถฟื้นภายใน 5-10 นาที การเปลี่ยนถ่ายสัตว์สู่น้ำสะอาดอาจเป็นวิธีการทำให้สัตว์น้ำฟื้นสู่สภาวะปกติและป้องกันการได้รับยาเกินขนาด นอกจากนี้การสังเกตพฤติกรรมของสัตว์ระหว่างที่ได้รับยาสามารถป้องกันไม่ให้สัตว์น้ำได้รับยาเกินขนาด

ระดับความลึกของการสลบในสัตว์น้ำจำแนกได้ 2 ระดับ (1) ซึม : สัตว์ลดการตอบสนองต่อสิ่งเร้า ปลาแผ่นปิดเหงือกเคลื่อนไหวช้าลง หอยเป๋าฮื้อหลุดจากแผ่นเกาะได้ง่าย (2) สูญเสียการทรงตัว : สัตว์ว่ายน้ำไม่มีทิศทาง ไม่เคลื่อนที่ ปลาหงายท้องและลดอัตราการขยับแผ่นปิดเหงือก หอยเป๋าฮื้อหลุดจากแผ่นเกาะ การออกฤทธิ์ของยาสลบจะลดลงจนหมดไปเมื่อย้ายสัตว์น้ำสู่น้ำสะอาด การได้รับยาสลบนานเกินไปมีผลต่อการกดระบบประสาทและทำให้สัตว์ตายได้ ควรสังเกตพฤติกรรมของสัตว์ระหว่างได้รับยา และต้องเคลื่อนย้ายสัตว์สู่น้ำสะอาดก่อนสัตว์หยุดการหายใจ

ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สารละลายน้ำมันกานพลูในการสงบระงับปลา ผลิตภัณฑ์สารละลายน้ำมันกานพลูสามารถใช้ทำให้ปลาซึมระหว่างการขนส่ง เพื่อป้องกันการเกิดบาดแผลจากพฤติกรรมก้าวร้าวหรือการเคลื่อนไหวมากเกินไปและลดการขับถ่ายของเสีย โดยมีขนาดการใช้ 2-20 มิลลิลิตร ของผลิตภัณฑ์สารละลายน้ำมันกานพลู ต่อน้ำ 10 ลิตร แตกต่างกันตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน ชนิด และขนาดของปลา

ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้กล้ามเนื้อเท้าของหอยเป๋าฮื้อคลายตัว ผลิตภัณฑ์สารละลายน้ำมันกานพลูสามารถใช้ทำให้กล้ามเนื้อเท้าของหอยเป๋าฮื้อคลายตัวและหลุดจากแผ่นเกาะเพื่อใช้ในการเก็บผลผลิตหรือเคลื่อนย้ายหอยเป๋าฮื้อ โดยมีขนาดการใช้ 2-4 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 10 ลิตร เพียงพอสำหรับการทำให้หอยเป๋าฮื้อหลุดจากแผ่นเกาะได้โดยง่าย หอยเป๋าฮื้ออาจสูญเสียการทรงตัว หลุดจากแผ่นเกาะ และหงายท้อง เมื่อได้รับยามากขึ้น นอกจากนี้การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สารละลายน้ำมันกานพลูในหอยเป๋าฮื้อยังแสดงว่าผลิตภัณฑ์สามารถออกฤทธิ์ได้ดีในน้ำเค็ม (≤ 40 ppt) เช่นเดียวกับการทดสอบในน้ำจืด (0 ppt)

การศึกษาความเป็นพิษของยา

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) ของผลิตภัณฑ์สารละลายน้ำมันกานพลูในปลาและหอยเป๋าฮื้อ เมื่อให้สัตว์ได้รับสารละลายน้ำมันกานพลูในการแช่ยา (immersion bath) เป็นเวลาตลอด 24 ชั่วโมง แสดงระดับความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่ทำให้สัตว์ตายครึ่งหนึ่งของจำนวนสัตว์ที่ใช้ทดสอบ (Lethal Concentration Dose 50%, LD_{50}) ดังนี้

สัตว์น้ำ	ขนาดหรือน้ำหนักตัว	LD_{50} (ppm)	สภาวะที่ทำการศึกษา
ปลากะพง (Sea bass) *Lates calcarifer*	1 กรัม	12.21	น้ำทะเล (ความเค็ม 35 ppt) 28 °C
ปลานิล (Nile tilapia) *Oreochromis nilotica*	0.40 กรัม	11.45	น้ำจืด 29 °C
ปลาหมอสี (Cichlid) *Herichthys spp.*	20-30 กรัม	15.07	น้ำจืด 29 °C
หอยเป๋าฮื้อ *Haliotis asinine* *Haliotis diversicolor*	8-12 มิลลิเมตร	13.18	น้ำทะเล (ความเค็ม 35 ppt) 28 °C

ppm = หนึ่งส่วนในล้านส่วน หรือ มิลลิลิตร / 1000 ลิตร

ppt = หนึ่งส่วนในพันส่วน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดสอบความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของผลิตภัณฑ์สารละลายน้ำมันกานพลูในปลาหมอสี โดยการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของเหงือกปลาหลังจากปลาให้ได้รับผลิตภัณฑ์ขนาดความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 5 ppm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการสัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลูไม่ทำให้เกิดความระคายเคือง หรือการอักเสบของเหงือกปลา แสดงว่าขนาดความเข้มข้นของสารละลายน้ำมันกานพลูที่แนะนำในการขนส่งปลาหมอสี (4 ppm) ไม่เป็นอันตรายต่อปลา

ข้อแนะนำ

- ควรทดสอบผลิตภัณฑ์สารละลายน้ำมันกานพลูกับสัตว์น้ำจำนวนหนึ่งก่อนใช้งานจริง เพื่อหาระดับการสลบและระยะเวลาในการแช่ยาที่เหมาะสม การแช่สัตว์น้ำในน้ำที่มียาสลบเป็นระยะเวลานานเกินหรือใช้ความเข้มข้นสูงมาก อาจทำให้สัตว์น้ำสลบลึกจนตายได้
- ใช้น้ำสะอาดและอุณหภูมิของน้ำใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่สัตว์ปรับตัวอยู่ก่อน
- หยดยาสลบลงในน้ำสะอาดก่อนใช้งานแต่ละครั้ง ไม่ควรผสมยาทิ้งไว้ เปลี่ยนน้ำและใส่ยาใหม่เมื่อมีสิ่งสกปรกหรือสิ่งขับถ่ายจากสัตว์น้ำ
- จับสัตว์น้ำด้วยความนุ่มนวลเพื่อไม่ให้สัตว์น้ำเครียด และพยายามหลีกเลี่ยงสัตว์จากการถูกแสงแดดหรือการกระทบกระเทือนระหว่างและหลังจากที่สัตว์ได้รับยา
- ขณะที่สัตว์น้ำฟื้นสู่ภาวะปกติ ควรจัดการสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการปรับตัว เช่น อุณหภูมิของน้ำใกล้เคียงกับอุณหภูมิของน้ำที่ผสมยา มีออกซิเจนในน้ำเพียงพอ เป็นต้น
- ควรอดอาหารสัตว์ก่อนการทำการขนส่ง เพื่อลดปริมาณของเสียจากสิ่งขับถ่าย
- กรณีที่ใช้ผลิตภัณฑ์สารละลายน้ำมันกานพลูในการจับบังคับพ่อ-แม่พันธุ์ ควรหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของสารละลายน้ำมันกานพลูในไข่หรือน้ำเชื้อ

ข้อควรระวัง

- จัดการให้มีออกซิเจนในน้ำอย่างเพียงพอระหว่างที่สัตว์น้ำได้รับยา การขาดออกซิเจนอาจทำให้สัตว์น้ำตายได้
- กรณีสัตว์น้ำได้รับยามากเกินไป ทำการย้ายสัตว์น้ำสู่น้ำสะอาดที่มีออกซิเจนอย่างเพียงพอจนกว่าสัตว์น้ำฟื้นสู่ภาวะปกติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การพัฒนาสูตรตำรับสารละลายน้ำมันกานพลูเป็นยาสลบในสัตว์น้ำ แสดงถึงการทดสอบประสิทธิภาพและการเตรียมผลิตภัณฑ์สารละลายน้ำมันกานพลูที่มีการควบคุมคุณภาพเพื่อใช้เป็นยาสงบระงับในสัตว์น้ำ ยาสลบสำหรับสัตว์น้ำมีความจำเป็นในการจัดการสัตว์น้ำอย่างมาก ช่วยลดอันตรายจากการขนส่งหรือการจับบังคับสัตว์น้ำที่อาจเกิดกับตัวสัตว์ เช่น บาดแผล ตายและอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน ผลการศึกษาแสดงว่า สารละลายน้ำมันกานพลูมีความเป็นพิษต่ำ มีขอบเขตปลอดภัยกว้าง และขนาดที่แนะนำในการใช้ไม่เป็นพิษเฉียบพลันหรือกึ่งเฉียบพลันในสัตว์น้ำ นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์สารละลายน้ำมันกานพลูเป็นสารสกัดจากธรรมชาติ มีความปลอดภัยต่อผู้ใช้ สามารถผลิตได้ในประเทศไทย ราคาไม่แพง มีประสิทธิภาพและสามารถใช้กับสัตว์น้ำสวยงามและสัตว์น้ำเพื่อการบริโภค สัตว์น้ำจืดและน้ำเค็ม สามารถใช้แทนยาสลบสัตว์น้ำที่มีราคาสูงและต้องนำเข้าจากต่างประเทศหรือสารเคมีอื่นๆ ที่ทำให้สัตว์น้ำสลบแต่เป็นอันตรายต่อผู้ใช้และผู้บริโภคสัตว์น้ำ การศึกษานี้เป็นการศึกษาการพัฒนาสูตรตำรับยาสัตว์จากสารสกัดสมุนไพร ซึ่งสามารถควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์และพัฒนาสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

นิจศิริ เรืองรังษี. 2542. เครื่องเทศ. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 81-88.

น้ำมันดอกกานพลู. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก. 1680-2541), สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, หน้า 1-4

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. 2541. น้ำมันดอกกานพลู. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม 1680-2541.1-2.

Amend, D.F., Croy, T.R., Groven, B.A., Jhonson, K.A., McCarthy, D.H. 1982. Transportation of fish in closed system: methods to control ammonia, carbon dioxie, pH, and bacterial growth. Trans. Am. Fish. Soc. 111: 603-611.

Bowser, P.R. 2001. Anesthetic options for fish. In: Resent Advances in Veterinary Anesthesia and Analgesia: Companion Animals. International Veterinary Information Service. [Online] Available : http:// www. Ivis.org

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. Int.J.Food microbial. 94:223-253.

Griffiths S.P., 2000 The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishs. Journal of fish biology(2000)57,1453-1467

Ghelardini, C., Galeotti, N., Cesare Mannelli, L.Di., Mazzanti, G. and Bartolini, A. 2001. Local anaesthetic activity of ß- caryophyllene. Il Farmaco. 56: 387-389.

Hseu, J., Yeh, S., Chu, Y. and Ting, Y. 1998. Comparison of Efficacy of Five Anesthetics in Goldlined Sea Bream, Sparus sarba. Acta Zoologica Taiwania 9(1):00-00. [Online] Available: http:// lifesci.zo.ntu.edu.tw

Munday, P.L. and Wilson, S.K. 1997. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentus amboinensis*, a coral reef fish. J. Fish Bio. 51:931-938.

Pirhonen, J and Schreck, C.B. 2003. Effects of anaesthesia with Ms-222, clove oil and Co2 on feed intake and plasma cortisol in steel head trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 220: 507-514.

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการเคลื่อนย้ายหรือขนส่งหอยเป๋าฮื้อ

ภาคผนวก 2.1 ระยะเวลาที่กล้ามเนื้อลูกหอยเป๋าฮื้อคลายตัว (นาที) หลังจากสัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลู ทดสอบที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 1-12 ไมโครลิตร/ลิตร

ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู (ppm)	1	2	5	8	10	12
ค่าเฉลี่ย (นาที)	34.27	25.13	27.73	16.16	16.40	17.57
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (นาที)	19.53	11.82	11.76	7.75	5.88	5.51

ภาคผนวก 2.2 ระยะเวลาที่ลูกหอยฟื้นตัว (นาที) หลังจากหยุดสัมผัสสารละลายน้ำมันกานพลู ทดสอบที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 1-12 ไมโครลิตร/ลิตร

ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู (ppm)	1	2	5	8	10	12
ค่าเฉลี่ย (นาที)	6.97	7	5.33	9.20	34.80	8.93
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (นาที)	10.37	5.09	5.11	16.98	27.40	7.72

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก 2.3 คุณภาพน้ำระหว่างการศึกษา การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการทำให้กล้ามเนื้อเท้าของลูกหอยเป๋าฮื้อคลายตัว

Conc.(ppm)	Temp(°C)	Salinity(ppt)	DO(mg/l)	pH	Ammonium(ppm)	Nitrite(ppm)	Alkalinity(ppm)
Day 0							
Control	26	33	5.8	8.3	0.25	0	150
Day 1							
Control	25.5	33	5.7	NA	NA	NA	NA
Tx. 1	25.5	33	5.7	NA	NA	NA	NA
1	25.5	33	5.6	NA	NA	NA	NA
Tx. 2	26	32	6.0	NA	NA	NA	NA
2	26	33	5.6	NA	NA	NA	NA
Tx. 5	25.5	33	5.5	NA	NA	NA	NA
5	26	33	5.6	NA	NA	NA	NA
Tx. 8	25.5	33	5.8	NA	NA	NA	NA
8	25.5	33	5.7	NA	NA	NA	NA
Tx. 10	25.5	33	5.5	NA	NA	NA	NA
10	25.5	33	5.9	NA	NA	NA	NA
Tx.12	25.5	33	5.8	NA	NA	NA	NA
12	25.5	33	5.6	NA	NA	NA	NA
Day 3							
Control	24.5	33	5.8	8.3	0.1	0	NA
Tx. 1	24.5	33	5.9	8.3	0	0	NA
1	24.5	33	5.8	8.3	0.25	0	NA
Tx. 2	24.5	33	5.8	8.3	2.0	0.25	NA
2	24.5	33	5.9	8.3	1.0	0	NA
Tx. 5	24.5	33	5.7	8.3	0.5	0	NA
5	24.5	33	5.9	8.3	1.0	0	NA
Tx. 8	24.5	33	5.8	8.3	0.25	0	NA
8	24.5	33	6.0	8.3	1.0	0	NA
Tx. 10	24.5	33	5.8	8.3	1.0	0	NA
10	24.5	33	6.1	8.3	1.0	0	NA
Tx.12	24.5	33	5.9	8.3	1.0	0	NA
12	24.5	33	5.9	8.3	1.0	0	NA

Conc. = concentration of clove oil, Temp = temperature, DO = dissolved oxygen, Control = non-treated control, Tx. = negative control (90% ethanol), NA = not available, Day 0 = ก่อนทำการทดลอง , Day 1 = หลังการทดลอง 1 วัน และ Day 3 = หลังการทดลอง 3 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก 2.4 คุณภาพน้ำระหว่างการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารละลายน้ำมันกานพลูต่อลูกหอยเป๋าฮื้อ

Conc. (ppm)	Temp (°C)	Salinity (ppt)	DO (mg/l)	pH	Ammonium (ppm)	Nitrite (ppm)	Alkalinity (ppm)
Control	27	32	5.7	8.3	0.25	0	120
10	27.5	33	5.7	8.0	0.5	0.05	150
13	26	32	6.1	8.0	0.25	0	NA
16	26	33	5.6	8.0	0	0	NA
19	26	33	5.8	8.0	0.25	0	NA
20	27	33	5.5	7.6	0.25	0	150
40	27	33	5.5	7.6	0.25	0	130

Conc. = concentration of clove oil, Temp = temperature, DO = dissolved oxygen และ NA = not available

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก 2.5 Probit analysis แสดงค่าความเข้มข้นระดับต่างๆ ของน้ำมันกานพลูที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อลูกหอยเป๋าฮื้อ ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

* * * * * * * * * * * * PROBIT ANALYSIS * * * * * * * * * * * *

DATA Information

6 unweighted cases accepted.
0 cases rejected because of missing data.
1 case is in the control group.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

---

* * * * * * * * * * * * PROBIT ANALYSIS * * * * * * * * * * * *

>Warning # 13527
>Parameter estimates did not converge in maximum number of iterations.

Number of iterations = 20
Optimal solution not found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
CONC	.44045	.05184	8.49682

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
-5.80774	.68565	-8.47038

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 32.585 DF = 4 P = .000

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

---

* * * * * * * * * * * * PROBIT ANALYSIS * * * * * * * * * * * *

Observed and Expected Frequencies

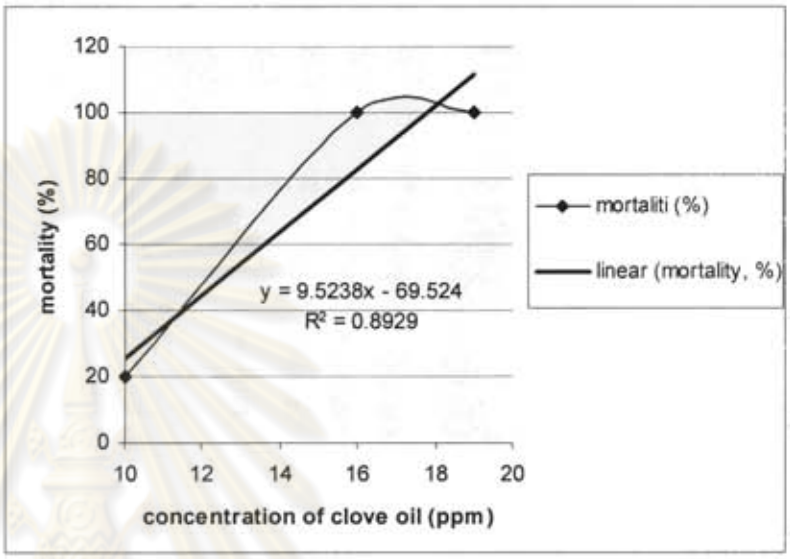
CONC	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.00	50.0	.0	.000	.000	3.2E-09
10.00	50.0	10.0	4.014	5.986	.08028
13.00	50.0	9.0	23.369	-14.369	.46739
16.00	50.0	50.0	44.621	5.379	.89242
19.00	50.0	50.0	49.739	.261	.99478
40.00	50.0	50.0	50.000	.000	1.00000

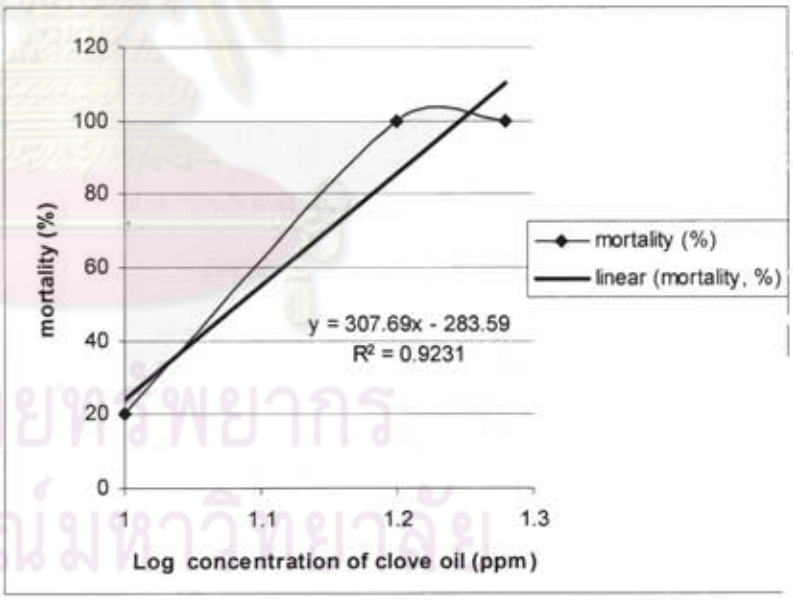
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

********** PROBIT ANALYSIS **********

Confidence Limits for Effective CONC

Prob	CONC	95% Confidence Limits Lower	Upper
.01	7.90409	-63.34891	10.87543
.02	8.52300	-54.23046	11.26413
.03	8.91567	-48.45551	11.52117
.04	9.21107	-44.11833	11.72162
.05	9.45135	-40.59596	11.89026
.06	9.65586	-37.60265	12.03858
.07	9.83518	-34.98239	12.17292
.08	9.99574	-32.64022	12.29716
.09	10.14177	-30.51388	12.41392
.10	10.27618	-28.56021	12.52503
.15	10.83269	-20.52125	13.03480
.20	11.27499	-14.22080	13.52862
.25	11.65445	-8.92764	14.06433
.30	11.99521	-4.33042	14.70162
.35	12.31097	-.30369	15.52545
.40	12.61060	3.15842	16.66604
.45	12.90050	5.98172	18.29591
.50	13.18580	8.10529	20.55490
.55	13.47110	9.59752	23.44523
.60	13.76099	10.63406	26.86185
.65	14.06062	11.38518	30.71344
.70	14.37639	11.96760	34.98157
.75	14.71715	12.45390	39.72978
.80	15.09660	12.89159	45.12096
.85	15.53890	13.31868	51.48814
.90	16.09541	13.78042	59.57513
.91	16.22983	13.88342	61.53691
.92	16.37585	13.99242	63.67101
.93	16.53641	14.10922	66.02063
.94	16.71573	14.23633	68.64811
.95	16.92025	14.37760	71.64847
.96	17.16053	14.53925	75.17783
.97	17.45592	14.73261	79.52210
.98	17.84860	14.98216	85.30454
.99	18.46750	15.36219	94.43166





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการเคลื่อนย้ายหรือขนส่งลูกปลากะพง

ภาคผนวก 3.1 Probit analysis แสดงค่าความเข้มข้นระดับต่างๆ ของน้ำมันกานพลูที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อลูกปลากะพง ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

* * * * * * * * * * * * PROBIT ANALYSIS * * * * * * * * * * * *

DATA Information

10 unweighted cases accepted.
1 cases rejected because of missing data.
0 cases are in the control group.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

---

* * * * * * * * * * * * PROBIT ANALYSIS * * * * * * * * * * * *

Parameter estimates converged after 13 iterations.
Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
CONC	.28460	.04707	6.04631

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
-3.47589	.58980	-5.89335

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 7.092 DF = 8 P = .527

Since Goodness-of-Fit Chi square is NOT significant, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

---

* * * * * * * * * * * * PROBIT ANALYSIS * * * * * * * * * * * *

Observed and Expected Frequencies

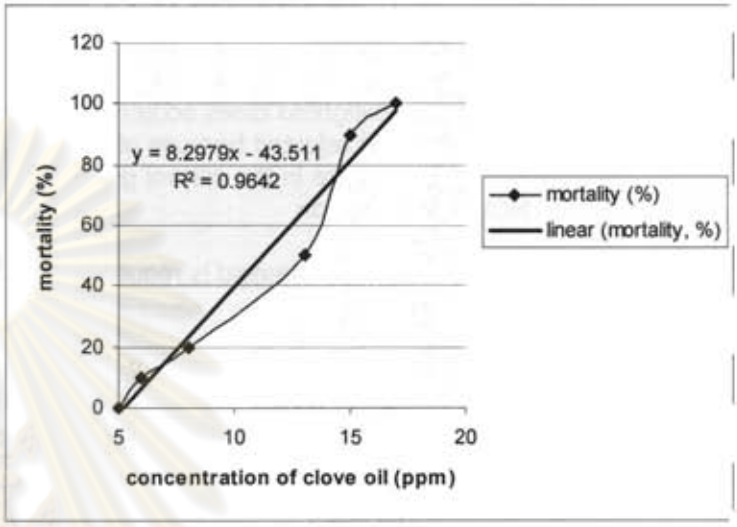
CONC	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
5.00	10.0	.0	.200	-.200	.02004
6.00	10.0	1.0	.385	.615	.03850
8.00	10.0	2.0	1.152	.848	.11524
9.00	10.0	2.0	1.802	.198	.18022
11.00	10.0	2.0	3.649	-1.649	.36492
13.00	10.0	5.0	5.886	-.886	.58857
14.00	10.0	5.0	6.944	-1.944	.69444
15.00	10.0	9.0	7.861	1.139	.78613
16.00	10.0	9.0	8.594	.406	.85941
17.00	10.0	10.0	9.134	.866	.91344

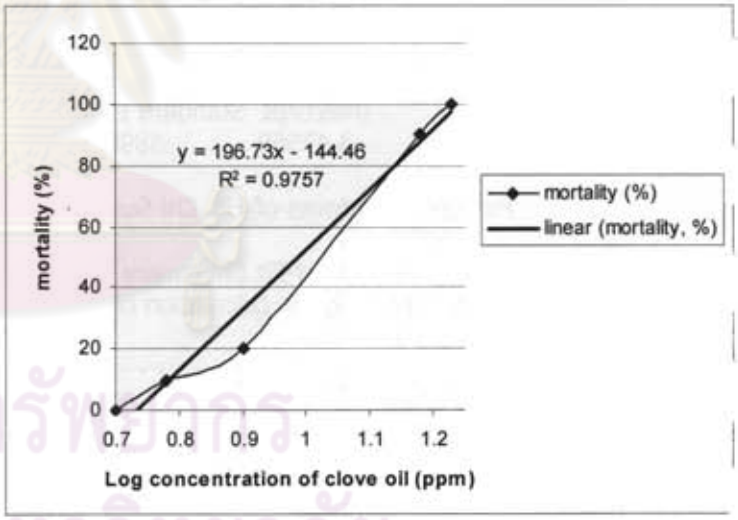
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

********** PROBIT ANALYSIS **********

Confidence Limits for Effective CONC

Prob	CONC	95% Confidence Limits Lower	Upper
.01	4.03920	-.03305	6.22010
.02	4.99704	1.35822	6.96946
.03	5.60476	2.23748	7.44837
.04	6.06193	2.89666	7.81088
.05	6.43380	3.43114	8.10746
.06	6.75032	3.88466	8.36131
.07	7.02784	4.28109	8.58510
.08	7.27633	4.63497	8.78656
.09	7.50232	4.95581	8.97078
.10	7.71035	5.25022	9.14127
.15	8.57163	6.45760	9.85872
.20	9.25615	7.39963	10.44649
.25	9.84341	8.19041	10.96814
.30	10.37078	8.88245	11.45470
.35	10.85947	9.50443	11.92486
.40	11.32320	10.07405	12.39159
.45	11.77185	10.60343	12.86488
.50	12.21339	11.10197	13.35312
.55	12.65493	11.57793	13.86394
.60	13.10359	12.03946	14.40508
.65	13.56731	12.49535	14.98554
.70	14.05600	12.95585	15.61718
.75	14.58338	13.43399	16.31764
.80	15.17063	13.94839	17.11567
.85	15.85515	14.52994	18.06392
.90	16.71644	15.24194	19.27675
.91	16.92446	15.41141	19.57218
.92	17.15045	15.59462	19.89403
.93	17.39894	15.79508	20.24891
.94	17.67647	16.01787	20.64634
.95	17.99299	16.27071	21.10087
.96	18.36486	16.56627	21.63638
.97	18.82202	16.92770	22.29664
.98	19.42974	17.40543	23.17707
.99	20.38758	18.15337	24.56976





ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งลูกปลานิล

ภาคผนวก 4.1 Probit analysis แสดงค่าความเข้มข้นระดับต่างๆ ของน้ำมันกานพลูที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อลูกปลานิล ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

********** PROBIT ANALYSIS **********

DATA Information

10	unweighted cases accepted.
0	cases rejected because of missing data.
1	case is in the control group.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

********** PROBIT ANALYSIS **********

>Warning # 13527

>Parameter estimates did not converge in maximum number of iterations.

Number of iterations = 20

Optimal solution not found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
CONC	.42069	.07870	5.34572
	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-4.81735	.87754	-5.48959

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 3.624 DF = 8 P = .889

Since Goodness-of-Fit Chi square is NOT significant, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Observed and Expected Frequencies

CONC	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.00	20.0	.0	.000	.000	.00000
1.00	20.0	.0	.000	.000	.00001
2.00	20.0	.0	.001	-.001	.00004
4.00	20.0	.0	.017	-.017	.00086
8.00	20.0	.0	1.465	-1.465	.07327
10.00	20.0	8.0	5.415	2.585	.27077
15.00	20.0	18.0	18.645	-.645	.93227
20.00	20.0	20.0	19.997	.003	.99984
40.00	20.0	20.0	20.000	.000	1.00000
80.00	20.0	20.0	20.000	.000	1.00000

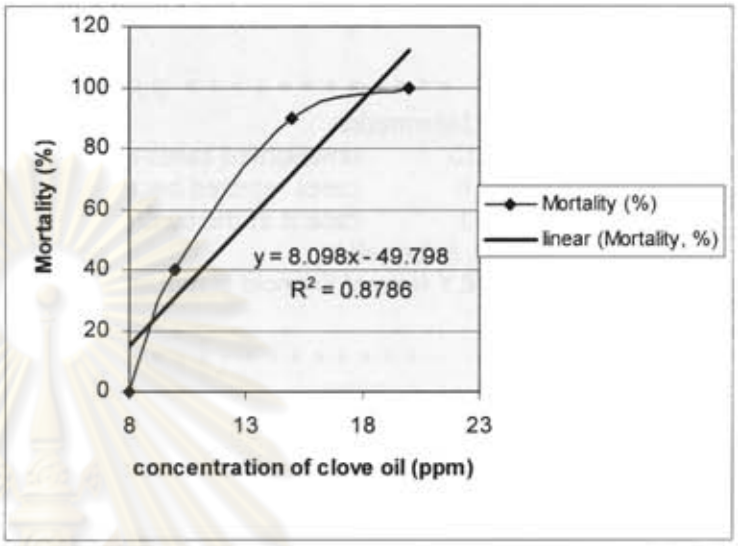
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

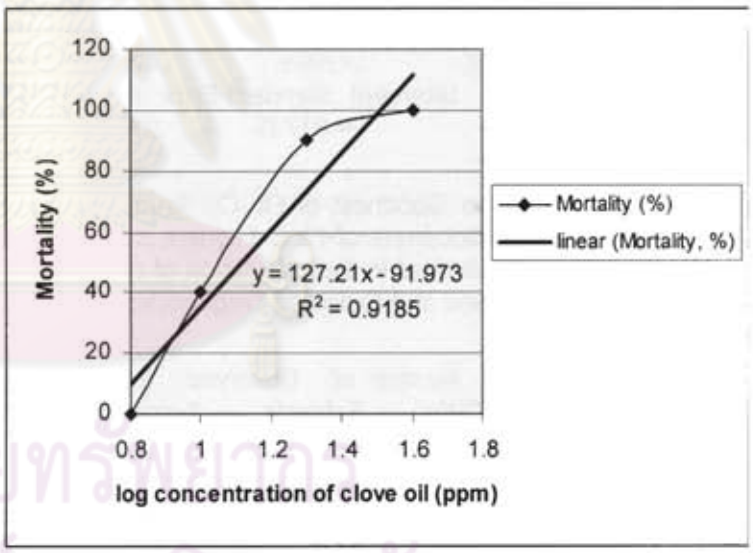
********** PROBIT ANALYSIS **********

Confidence Limits for Effective CONC

95% Confidence Limits

Prob	CONC	Lower	Upper
.01	5.92128	2.83035	7.48842
.02	6.56927	3.82019	7.99583
.03	6.98040	4.44362	8.32236
.04	7.28967	4.90962	8.57098
.05	7.54125	5.28641	8.77547
.06	7.75537	5.60526	8.95139
.07	7.94312	5.88324	9.10722
.08	8.11122	6.13072	9.24816
.09	8.26411	6.35451	9.37763
.10	8.40484	6.55933	9.49799
.15	8.98750	7.39285	10.01078
.20	9.45059	8.03425	10.43939
.25	9.84787	8.56520	10.82641
.30	10.20464	9.02367	11.19231
.35	10.53525	9.43092	11.54896
.40	10.84896	9.80054	11.90420
.45	11.15248	10.14224	12.26382
.50	11.45118	10.46361	12.63264
.55	11.74989	10.77113	13.01532
.60	12.05341	11.07079	13.41697
.65	12.36712	11.36863	13.84400
.70	12.69772	11.67137	14.30516
.75	13.05449	11.98745	14.81344
.80	13.45178	12.32893	15.38994
.85	13.91486	12.71601	16.07287
.90	14.49752	13.19044	16.94475
.91	14.63826	13.30336	17.15700
.92	14.79114	13.42542	17.38821
.93	14.95925	13.55893	17.64312
.94	15.14699	13.70727	17.92859
.95	15.36112	13.87555	18.25508
.96	15.61269	14.07215	18.63976
.97	15.92197	14.31242	19.11411
.98	16.33309	14.62971	19.74678
.99	16.98108	15.12585	20.74789





ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
การใช้สารละลายน้ำมันกานพลูในการขนส่งปลาหมอสี

ภาคผนวก 5.1 Probit analysis แสดงค่าความเข้มข้นระดับต่างๆ ของน้ำมันกานพลูที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อปลาหมอสีขนาด 4 นิ้ว ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

* * * * * * * * * * * * PROBIT ANALYSIS * * * * * * * * * * * *

DATA Information

10 unweighted cases accepted.
0 cases rejected because of missing data.
0 cases are in the control group.

MODEL Information
ONLY Normal Sigmoid is requested.

---

* * * * * * * * * * * * PROBIT ANALYSIS * * * * * * * * * * * *

Number of iterations = 20
Optimal solution not found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
CONC	.53858	.57773	.93224

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-8.12056	8.72456	-.93077

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = .017 DF = 8 P = 1.000

Since Goodness-of-Fit Chi square is NOT significant, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

---

* * * * * * * * * * * * PROBIT ANALYSIS * * * * * * * * * * * *

Observed and Expected Frequencies

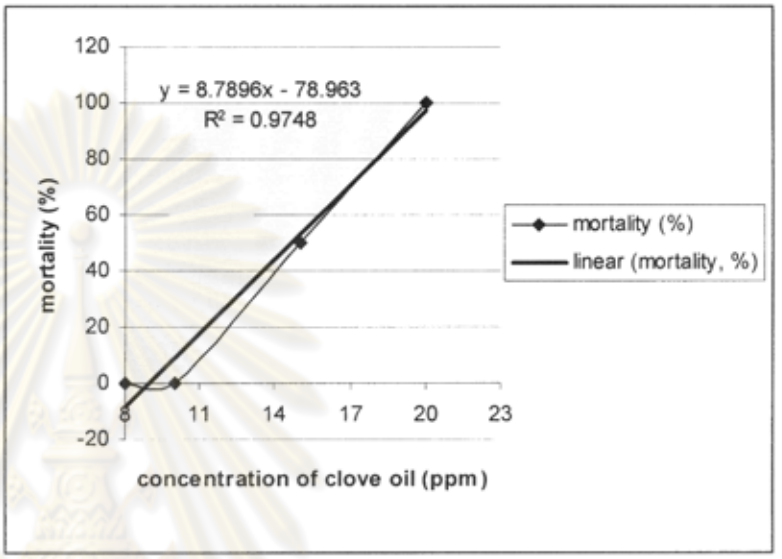
CONC	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
2.00	2.0	.0	1.8761E-12	-1.8761E-12	9.4E-13
4.00	2.0	.0	2.4280E-09	-2.4280E-09	1.2E-09
8.00	2.0	.0	.000	.000	.00007
10.00	2.0	.0	.006	-.006	.00312
15.00	2.0	1.0	.967	.033	.48333
20.00	2.0	2.0	1.992	.008	.99599
40.00	2.0	2.0	2.000	.000	1.00000
60.00	2.0	2.0	2.000	.000	1.00000
80.00	2.0	2.0	2.000	.000	1.00000
100.00	2.0	2.0	2.000	.000	1.00000

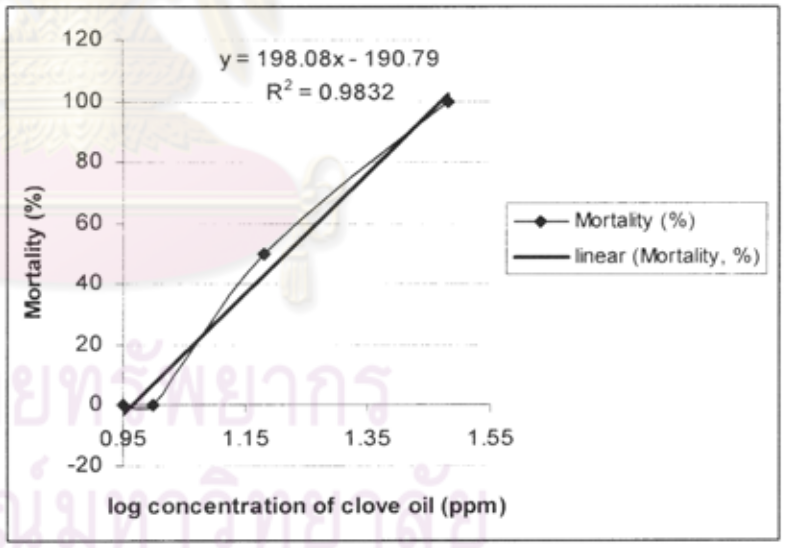
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

********** PROBIT ANALYSIS **********

Confidence Limits for Effective CONC

Prob	CONC	95% Confidence Limits Lower	Upper
.01	10.75824	.	.
.02	11.26438	.	.
.03	11.58551	.	.
.04	11.82709	.	.
.05	12.02359	.	.
.06	12.19084	.	.
.07	12.33749	.	.
.08	12.46880	.	.
.09	12.58821	.	.
.10	12.69814	.	.
.15	13.15326	.	.
.20	13.51497	.	.
.25	13.82528	.	.
.30	14.10396	.	.
.35	14.36219	.	.
.40	14.60723	.	.
.45	14.84431	.	.
.50	15.07762	.	.
.55	15.31094	.	.
.60	15.54802	.	.
.65	15.79306	.	.
.70	16.05129	.	.
.75	16.32996	.	.
.80	16.64028	.	.
.85	17.00199	.	.
.90	17.45711	.	.
.91	17.56703	.	.
.92	17.68645	.	.
.93	17.81776	.	.
.94	17.96441	.	.
.95	18.13166	.	.
.96	18.32816	.	.
.97	18.56973	.	.
.98	18.89086	.	.
.99	19.39700	.	.





ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก 5.2 Probit analysis แสดงค่าความเข้มข้นระดับต่างๆ ของน้ำมันกานพลูที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อปลาหมอสีขนาด 2.5 นิ้ว ทดสอบในระบบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

********** PROBIT ANALYSIS **********

DATA Information

8 unweighted cases accepted.
2 cases rejected because of missing data.
0 cases are in the control group.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

********** PROBIT ANALYSIS **********

Number of iterations = 20
Optimal solution not found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
CONC	.76385	5.31034	.14384

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
-12.46418	106.17559	-.11739

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = .052 DF = 6 P = 1.000

Since Goodness-of-Fit Chi square is NOT significant, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

********** PROBIT ANALYSIS **********

Observed and Expected Frequencies

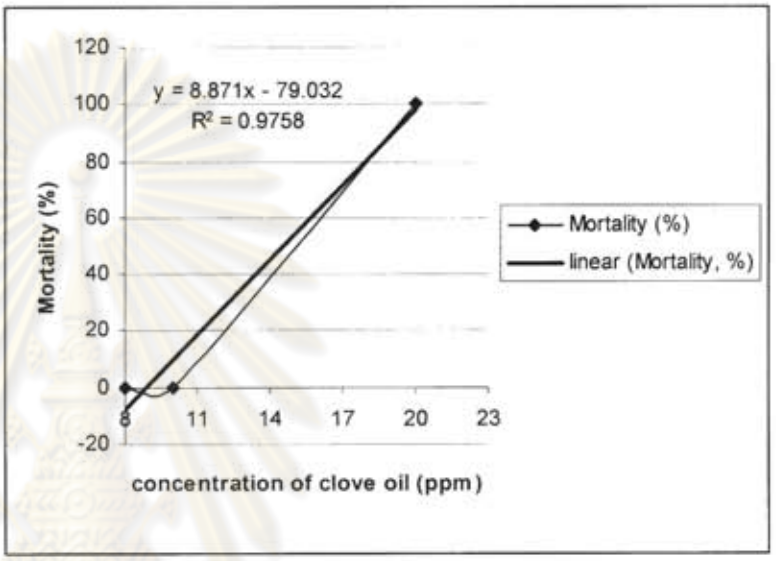
CONC	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
2.00	21.0	.0	8.0996E-27	-8.0996E-27	3.9E-28
5.00	21.0	.0	5.6531E-17	-5.6531E-17	2.7E-18
8.00	21.0	.0	2.2116E-09	-2.2116E-09	1.1E-10
10.00	21.0	.0	.000	.000	.00000
20.00	21.0	21.0	20.948	.052	.99754
30.00	21.0	21.0	21.000	.000	1.00000
40.00	21.0	21.0	21.000	.000	1.00000
50.00	21.0	21.0	21.000	.000	1.00000

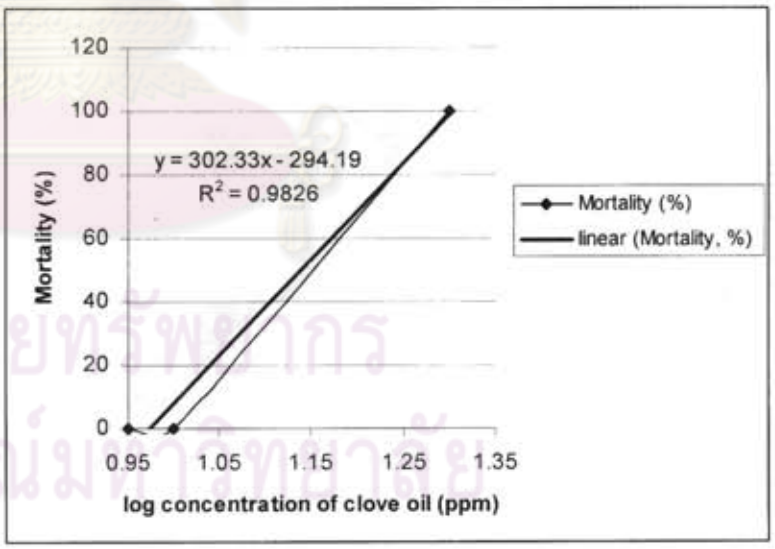
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

****** PROBIT ANALYSIS ************

Confidence Limits for Effective CONC

Prob	CONC	95% Confidence Limits Lower	Upper
.01	13.27203	.	.
.02	13.62890	.	.
.03	13.85533	.	.
.04	14.02566	.	.
.05	14.16421	.	.
.06	14.28214	.	.
.07	14.38554	.	.
.08	14.47812	.	.
.09	14.56232	.	.
.10	14.63983	.	.
.15	14.96073	.	.
.20	15.21577	.	.
.25	15.43457	.	.
.30	15.63106	.	.
.35	15.81314	.	.
.40	15.98591	.	.
.45	16.15307	.	.
.50	16.31758	.	.
.55	16.48210	.	.
.60	16.64926	.	.
.65	16.82203	.	.
.70	17.00411	.	.
.75	17.20060	.	.
.80	17.41940	.	.
.85	17.67444	.	.
.90	17.99534	.	.
.91	18.07285	.	.
.92	18.15705	.	.
.93	18.24963	.	.
.94	18.35303	.	.
.95	18.47096	.	.
.96	18.60951	.	.
.97	18.77984	.	.
.98	19.00627	.	.
.99	19.36314	.	.





ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย