ใบรับรองปัญหาพิเศษ
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

เรื่อง การใช้ Benzocaine เป็นยาสลบในปลาหางนกยูง
Use of Benzocaine as an Anesthetic Agent for Guppy (*Poecilia recticulata*)

ชื่อนักศึกษา นายเทิดศักดิ์ ศรประสิทธิ์ชัย **รหัส** 41044232
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ดร. ปวีณา ทวีกิจการ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย
อาจารย์ที่ปรึกษา.....
(ดร. ปวีณา ทวีกิจการ)

ภาควิชารับรองแล้ว

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สมชาย หวังวิบูลย์กิจ)
หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
วันที่ 22 **เดือน** ม.ค. **พ.ศ.** 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

18759

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การใช้ Benzocaine เป็นยาสลบในปลาหางนกยูง
Use of Benzocaine as an Anesthetic Agent for Guppy (*Poecilia recticulata*)

T099368

โดย

นายเทิดศักดิ์ ศรประสิทธิ์ชัย รหัส 41044232

ปพ.
ท7139ก
2544
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
รับเมื่อ.....

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพมหานคร 10520

พ.ศ. 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การใช้ Benzocaine เป็นยาสลบในปลาหางนกยูง

Use of Benzocaine as an Anesthetic Agent for Guppy (*Poecilia recticulata*)

จากการทดลองวิเคราะห์พิษเฉียบพลันของ Benzocaine กับปลาหางนกยูง *(Poecilia reticulata)* ที่มีความยาว 3-4 เซนติเมตร และมีน้ำหนัก 0.32-0.52 กรัมโดยใช้วิธีของ Litchfield และ Wilcoxon (1949) พบว่าค่า 48 ชั่วโมง LC_{50} ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% ของ Benzocaine มีค่าเท่ากับ 39.5 (38.42 – 40.60) มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของ Benzocaine ที่ทำให้ปลาหางนกยูงสลบในระยะ Sedation เพื่อใช้ในการขนส่งภายใน 48 ชั่วโมง มีค่าอยู่ระหว่าง 11 -17 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปลาสามารถฟื้นตัวได้ภายในเวลา 20-35 วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ในการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้ สามารถที่จะสำเร็จมาได้ ต้องทำการทดลองข้ามปี ทำงานทั้งกลางวันและกลางคืน และปัญหาพิเศษเล่มนี้จะไม่สำเร็จไปได้ถ้าไม่มีอาจารย์ที่ปรึกษาอย่างอาจารย์ ปวีณา ทวีกิจการ ที่คอยให้คำแนะนำและในการทดลองตลอดจนการเขียนรูปเล่มปัญหาพิเศษ และขอขอบคุณเพื่อน ๆ ทุกคนที่ให้กำลังใจและความช่วยเหลือ รวมทั้งให้คำปรึกษาจนทำให้การทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอบคุณเป็นพิเศษสำหรับ นางสาวสุนิสา เพชรสนธิ์ ที่ช่วยทำการทดลอง

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณมารดาที่ให้การอบรมเลี้ยงดูเป็นอย่างดี ที่เป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าศึกษาเล่าเรียน จนจบการศึกษา

นายเทิดศักดิ์ ศรประสิทธิ์ชัย

10 พฤษภาคม 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญภาพ	III
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	11
ผลการทดลองและวิจารณ์	14
สรุปและข้อเสนอแนะ	19
เอกสารอ้างอิง	20
ภาคผนวก	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การนำเข้า benzocaine-hydrochloride (BH) และ neutralized benzocaine-hydrochloride (NBH) ทางเหงือกของปลาน้ำจืด 3 ชนิด	4
2	การนำเข้า benzocaine-hydrochloride (BH) และ neutralized benzocaine-hydrochloride (NBH) ทางผิวหนังของปลาน้ำจืด 3 ชนิด	5
3	ค่าการเปลี่ยนแปลงในเลือดของปลา rainbow trout เนื่องจากยาสลบ	7
4	ความเข้มข้นของ benzocaine และระยะเวลาที่ทำให้ปลาสลบในระยะที่ 1 (Sedation)	9
5	ระยะเวลาที่ปลาสลบ และระยะเวลาการกลับสู่ภาวะปกติ	10
6	แสดงจำนวนของปลาหางนกยูงที่สลบในระยะที่ 1 (Sedation) ในเวลา 48 ชั่วโมง และเวลาที่ใช้ในการฟื้นตัวสู่ภาวะปกติ	16
7	แสดงอัตรารอดตายหลังการทดลองเมื่อเลี้ยงต่อไป 2 สัปดาห์	18

ตารางผนวกที่		หน้า
1	การวิเคราะห์หาค่า LC_{50}	24
2	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ	26
3	แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ	28
4	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเป็นด่าง	29
5	แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณความเป็นกรดเป็นด่าง	31
6	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมโมเนีย	32
7	แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณแอมโมเนีย – ไนโตรเจน (มิลลิกรัม/ลิตร)	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของ Benzocaine	3
2	แสดงค่า 48 ชั่วโมง LC_{50} ของปลาหางนกยูง	17

ภาพผนวกที่		หน้า
1	แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ	27
2	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเป็นด่าง	30
3	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมโมเนีย	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ในการขนส่งปลาสวยงามไปยังตลาดต่างประเทศ การทำให้ปลามีการรอดตายมากที่สุดและสภาพของปลาสมบูรณ์ดีเมื่อถึงจุดมุ่งหมายปลายทางถือเป็นจุดมุ่งหมายสำคัญในการส่งออกปลาสวยงาม จากการตรวจเอกสารพบว่าการขนส่งจะประสบปัญหาหลายประการ เช่นเรื่องค่าขนส่งที่แพงแต่ขนส่งปลาได้จำนวนน้อย และอัตราการตายของปลาระหว่างการขนส่งที่สูงเกินมาตรฐานที่ลูกค้ารับได้ แนวทางในการแก้ปัญหาดังกล่าวได้มีการศึกษาถึงวิธีการต่างๆ เพื่อที่จะสามารถขนส่งปลาให้ได้จำนวนมากที่สุด โดยเฉพาะการขนส่งที่มีระยะทางไกลๆ และต้องใช้ระยะเวลานาน เช่นการขนส่งไปยังตลาดต่างประเทศซึ่งย่อมจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพและความสมบูรณ์ของปลา ซึ่งหลักการในการแก้ปัญหาดังกล่าวคือการทำให้สัตว์น้ำมีความเครียดน้อยที่สุดระหว่างการขนส่ง และในปัจจุบันมีการพัฒนาการขนส่งลำเลียงสัตว์น้ำโดยการใช้ยาสลบ ซึ่งเป็นวิธีการที่ดีและมีการใช้อย่างแพร่หลายในต่างประเทศ เนื่องจากสัตว์น้ำที่ขนส่งด้วยวิธีนี้ยังคงมีสุขภาพดีเช่นเดิมและสามารถขนส่งได้มากกว่าปกติ 2-3 เท่าเนื่องจากขณะที่ปลาสลบอยู่จะไม่มีการโต้ตอบกับสิ่งกระตุ้นภายนอก ปลาต้องการออกซิเจนน้อยลง และมีการขับถ่ายของเสียน้อยลง ยาสลบที่ใช้กันมีหลากหลายชนิดแต่ที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ Tricaine methanesulfonate (MS-222),Quinaldine sulphate, 2-Phenoxyethanol , Ethyl aminobenzoate หรือ Benzocaine ซึ่งสามารถใช้ได้ตามความเหมาะสมตามชนิดและขนาดของปลา แต่จากการตรวจเอกสารยังไม่พบการรายงานการใช้ยาสลบเหล่านี้ ในการขนส่งปลาหางนกยูงซึ่งเป็นปลาสวยงามที่มีมูลค่าการส่งออกเป็นอันดับต้น ๆ ของประเทศไทย ดังนั้นหากมีการศึกษาถึงการนำยาสลบแต่ละชนิดไปใช้อย่างเหมาะสม ผลการศึกษาที่ได้จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการค้าปลาสวยงามในอนาคตอย่างยิ่ง

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของยาสลบ Benzocaine ที่ทำให้ปลาตาย 50% ภายในเวลา 48 ชั่วโมง
2. ศึกษาความเข้มข้นของยาสลบ Benzocaine ที่เหมาะสมในการขนส่งปลาหางนกยูง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับพิษเฉียบพลันของ Benzocaine ต่อปลาหางนกยูง
2. เพื่อนำไปใช้ในการขนส่งปลาหางนกยูงให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

ปัจจุบันนี้มีการเติมสารเคมีหลายชนิดลงไปในน้ำที่ใช้ในการขนส่ง จุดประสงค์เพื่อลดความเครียดและเพิ่มอัตรารอดของปลา สารเคมีที่นิยมใช้โดยทั่วไปแบ่งได้เป็น 3 ประเภทได้แก่ กลุ่มยากล่อมประสาท (sedatives) สารที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพน้ำ (water quality stabilizer) และกลุ่มยาปฏิชีวนะ (antibiotic) กลุ่มยากล่อมประสาทที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายได้แก่ ควินอลดิน (quinaldine) ไตรเครนมีเทรนซัลโฟเนต (tricane methanesulfonate or MS-222) (อมรรัตน์ และคณะ,2544) สารที่ใช้ควบคุมคุณภาพน้ำให้คงที่ประกอบด้วย pH buffer , zeolite การใช้ยาปฏิชีวนะเป็นวิธีที่ต้องควบคุมตามกฎหมายซึ่งการใช้ควรพิจารณารอบคอบเป็นพิเศษเพื่อเป็นการป้องกันการดื้อยา ยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ได้แก่ oxytetracycline , acriflavine (อมรัตน์ และคณะ ,2544) ในการขนส่งลูกปลานิล พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Benzocaine ในการทำให้ลูกปลานิลสลบในระยะ sedation ในเวลา 24 ชั่วโมงคือ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร และระยะเวลาการฟื้นตัวภายในเวลา 55 วินาที จากการเปรียบเทียบโดยใช้ Benzocaine แบบอัดอากาศกับไม่อัดอากาศ พบว่า Benzocaine ที่อัดอากาศสมทบจะมีผลทำให้ลูกปลานิลมีการรอดตายมากขึ้น (Sommani and Siridanupatra , 2001) สำหรับวิธีการขนส่งปลาสวยงาม ปลาจะถูกบรรจุลงในถุงพลาสติกซึ่งเติมออกซิเจนบริสุทธิ์และรัดด้วยหนังยางหรืออาจใช้อุปกรณ์เครื่องจักรที่มีอุปกรณ์หนีบปากถุงก็ได้ โดยจะบรรจุถุงในลักษณะที่หลวมๆเพื่อป้องกันการขยายตัวของอากาศในกรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงของความดันอากาศเมื่ออยู่บนเครื่องบิน จากนั้นนำไปบรรจุในกล่องโฟมที่มีลักษณะเป็นฉนวนโดยในกล่องโฟมอาจบุด้านในด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์และปิดกล่องโดยใช้เทปใสปิดอีกครั้งหนึ่ง (อมรัตน์ และคณะ,2544) และจำนวนปลาที่บรรจุในถุงจะขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการขนส่งจากประเทศต้นทางถึงประเทศปลายทาง เช่นความหนาแน่นของปลาที่นิยมบรรจุถุงสำหรับการขนส่งปลาหางนกยูง (ขนาดถุง 42.5 X42.5X 25 ซม. บรรจุน้ำ 7 ลิตร) ขนาดความยาว 1.25 นิ้ว การบรรจุมาตรฐาน (48 ชั่วโมง) 400 ตัว การบรรจุหนาแน่น (72 ชั่วโมง) 300 ตัว และหากเป็นปลาเหยื่ออาจบรรจุความหนาแน่น 1,000-1,500 ตัวต่อถุง (อมรรัตน์ และคณะ,2544)

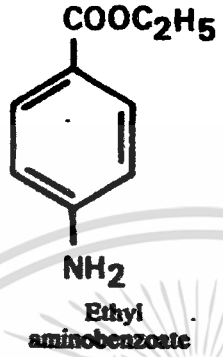
คุณสมบัติของ Benzocaine

Benzocaine นิยมเรียกกันหลายชื่อ แต่ที่รู้จักกันโดยทั่วไปได้แก่ Ethyl aminobenzoate, ρ-aminobenzoic acid ethyl ester , Ethyl ρ-aminobenzoate ซึ่งชื่อเหล่านี้เป็นชื่อทางการค้าของ Benzocaine (Merck and company , 1969) และยานี้มีการใช้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ โดย Benzocaine ที่ใช้ในมนุษย์ ส่วนใหญ่ใช้เพื่อบรรเทาความเจ็บปวด อาการคันจากแมลงกัดต่อย ใช้เป็นครีมรักษาอาการถูกแดดเผา (โดยมีส่วนประกอบ benzocaine 20%) ใช้เป็นยารักษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ริดสีดวงและอีกจุดมุ่งหมายหนึ่งคือ การใช้เป็นยาสลบ ส่วนในสัตว์จะนิยมใช้เพื่อการสลบเพียงอย่างเดียว

โครงสร้างของ Benzocaine คือ Ethyl ester ของ aminobenzoic acid ที่มี amine group ในตำแหน่ง para-substituted ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ Benzocaine
ที่มา : Merck and company, (1969)

ลักษณะโดยทั่วไปของ Benzocaine เป็นผงสีขาว มีน้ำหนักโมเลกุล 165.2 ละลายน้ำได้เล็กน้อย มีด้วยกัน 2 รูปแบบคือ Crystalline salt ซึ่งสามารถละลายได้ในน้ำ 0.4 g/L และรูป Free base from ซึ่งต้องละลายใน ethyl alcohol หรือ acetone ก่อนนำไปใช้ ส่วน Benzocaine hydrochloride คือรูปที่ละลายน้ำได้ดี และใช้เป็นส่วนผสมของยาในทางการแพทย์ (Iwama and Ackerman , 1994)

ระยะการสลบ

ระยะการสลบในปลาสามารถที่จะแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ (Ross ,1984)

ระยะที่ 1 Sadation ว่ายน้ำเฉื่อยชา หายใจช้าลง สูญเสียการตอบสนองจากการกระตุ้นภายนอกบางส่วน

ระยะที่ 2 Loss of equilibrium ว่ายน้ำเสียการทรงตัว หงายท้อง และว่ายน้ำกระตุกเป็นระยะ ในที่สุดจะหยุดว่ายน้ำ แต่ยังคงตอบสนองหากกระตุ้นที่บริเวณปลายคอดหาง

ระยะที่ 3 Loss of reflex activity หรือ Anesthesia ไม่ว่ายน้ำและไม่ตอบสนองกับการกระตุ้นจากภายนอก

ระยะที่ 4 Medullary collapse หยุดการหายใจ (ตาย)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การรับ benzocaine เข้าสู่ตัวปลา

การรับยาสลบเข้าสู่ตัวปลาประกอบด้วยปัจจัยทางด้านสรีระวิทยาและปฏิกิริยาของยาสลบที่มีต่อตัวปลาซึ่งอวัยวะหลักของการนำเข้ายาสลบคือ เหงือก แต่จากการทดลองของ Brown et al. (1972) ได้ทำการทดลองกับปลา electric eel โดยใช้ Quinaldine พบว่านอกจากเหงือกแล้วผิวหนังเป็นอีกอวัยวะหนึ่งที่นำเข้ายาสลบได้และรับได้เร็วกว่าที่เหงือก ซึ่งกระบวนการนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างได้แก่

1. **ความเข้มข้นของยาสลบ** ที่ความเข้มข้นสูงยาสลบสามารถซึมผ่านได้เร็วและมากกว่าที่ความเข้มข้นต่ำเนื่องจากที่ความเข้มข้นสูงจะมีความแตกต่างของยาสลบภายนอกและภายในตัวปลาต่างกันมาก จึงสามารถแพร่ผ่านได้เร็วกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ Ferreira et al.(1984) ได้ทดลองกับปลา *Cyprinus carpio* , *Orechromis mossabicus* และ *Salmo gairdeneri* พบว่าที่ความเข้มข้น 100mg/L สามารถวัดปริมาณยาสลบที่ผิวหนังและเหงือกในปลาทั้ง 3 ชนิดได้มากกว่าที่ 50 mg/L ดังตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 การนำเข้า benzocaine-hydrochloride (BH) และ neutralized benzocaine-hydrochloride (NBH) ทางเหงือกของปลาน้ำจืด 3 ชนิด

ยาสลบ	*C. carpio*		*O. mossambicus*		*S. gairdneri*	
	NBH	BH	NBH	BH	NBH	BH
อัตราการไหล 0.5 ml min^{-1}						
ยาสลบ 100 mg l^{-1}	70.41±0.91	47.54±4.33	58.41±2.91	30.39±2.17	79.41±2.24	50.24±1.66
ยาสลบ 50 mg l^{-1}	32.19±3.62	24.72±2.87	22.29±2.14	16.42±1.74	36.77±1.23	41.71±1.78
อัตราการไหล 1.0 ml min^{-1}						
ยาสลบ 100 mg l^{-1}	49.62±2.39	33.61±2.09	44.86±1.69	25.47±1.74	55.29±1.61	44.77±1.59
ยาสลบ 50 mg l^{-1}	18.14±1.77	13.43±1.58	14.37±1.09	8.29±0.88	19.81±1.17	14.29±1.26
ปริมาณไขมันทั้งหมดของเนื้อเยื่อเหงือก 1 g ($g l^{-1}$)	3.59±0.52		1.58±0.31		7.24±0.43	

ที่มา : Ferreira et al. (1984)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 การนำเข้า benzocaine-hydrochloride (BH) และ neutralized benzocaine-hydrochloride (NBH) ทางผิวหนังของปลาน้ำจืด 3 ชนิด

ความเข้มข้น / เวลาที่รับสาร	ชนิดปลา		
	C. carpio	*O. mossambicus*	*S. gairdneri*
BH conc. = 100 mg l^{-1}			
หลังจากได้รับ BH (mg l^{-1})			
1 นาที	4.35±0.29	1.52± 0.39	0.00±0.00
5 นาที	8.19±0.71	4.20±0.26	1.31±0.44
10 นาที	14.13 ±0.68	8.26 ±0.49	6.52±0.61
หลังจากได้รับ Neutralized BH (mg l^{-1})			
1 นาที	5.13±0.24	2.29±0.21	0.77±0.00
5 นาที	9.69±0.51	5.13±0.27	2.05±0.14
10 นาที	16.98±0.67	9.74±0.38	7.69±0.33
BH conc. = 50 mg l^{-1}			
หลังจากได้รับ BH (mg l^{-1})			
1 นาที	1.76± 0.41	0.81±0.19	0.00±0.09
5 นาที	3.93±0.31	1.79±0.18	0.48±0.09
10 นาที	6.82±0.57	3.87±0.51	3.12±0.37
หลังจากได้รับ Neutralized BH (mg l^{-1})			
1 นาที	2.11±0.27	1.04±0.18	0.21±0.06
5 นาที	4.16±0.46	1.86±0.23	0.65±0.18
10 นาที	8.09±0.47	4.09±0.64	3.39±0.42
Effective absorption area of skin pouches (cm^2)	18.22±0.41	18.57±0.39	17.82±0.37
Total lipid content of the skin (g l^{-1})	11.43±0.27	2.68±0.54	2.77±0.65
Skin thickness	0.64±0.04	0.71±0.05	0.83±0.06
Mass of 4 cm^2 skin (g)	0.28±0.02	0.33±0.02	0.41±0.04

ที่มา : Ferreira et al. (1984)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ระยะเวลาการสัมผัสกับสารละลายยาสลบ ถ้าอัตราการไหลผ่านของสารละลายยาสลบเร็ว การนำยาสลบเข้าเนื้อเยื่อจะต่ำกว่าที่อัตราการผ่านของสารละลายยาสลบช้า Ferreira et al. (1984) ได้ทดลองในปลา *C. carpio* , *O. mossambicus* และ *S. gairdneri* ถึงผลการรับยาสลบผ่านทางเหงือก พบว่าที่อัตราการไหลผ่านของสารละลายยาสลบที่เหงือกสูงจะสามารถรับยาสลบได้น้อยกว่าที่อัตราการไหลผ่านที่ต่ำในปลาทั้ง 3 ชนิด (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ยังกล่าวว่าการนำเข้ายาสลบผ่านทางผิวหนังจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ผิวหนังสัมผัสสารละลายยาสลบ ดังตารางที่ 2

3. ปริมาณไขมันในเนื้อเยื่อ Hunn and Allen (1974) รายงานว่า MS-222 จะผ่านเหงือกโดยการแพร่ ซึ่งจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว และเกี่ยวข้องกับความสามารถในการละลายในน้ำมันและความเข้มข้นของยาสลบ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ferreira et al. (1984) ที่ได้ทดลองในปลา 3 ชนิดคือ *C. carpio* , *O. Mossambicus* และ *S. gairdneri* พบว่าสามารถวัดปริมาณยาสลบที่ผิวหนังสูงสุดใน *C. carpio* เนื่องจากพบปริมาณไขมันในเนื้อเยื่อผิวหนังมากกว่าปลา *O. Mossambicus* และ *S. gairdneri* ตามลำดับ ดังตารางที่ 2

แต่ปลา *S. gairdneri* มีปริมาณไขมันในเนื้อเยื่อเหงือกสูงกว่ากว่าปลา *O .Mossambicus* และ *C. carpio* ทำให้ความสามารถในการรับยาสลบที่เหงือกสูงกว่าปลา *O. Mossambicus* และ *C. carpio* ตามลำดับดังตารางที่ 1

4. รูปแบบของสารเคมี พบว่าสารเคมีที่มีความเสถียร (neutralized) จะแตกตัวได้น้อยเมื่อละลายในน้ำ สามารถผ่านเข้าเซลล์ได้เร็วกว่าสารเคมีที่ไม่เสถียร (unneutralized) เนื่องจากสารเคมีที่ไม่เสถียร เมื่อละลายน้ำจะแตกตัวทำให้คุณสมบัติของสารละลายเปลี่ยนไป ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีระของปลา ซึ่งมีผลต่อการนำเข้าของยาสลบ (Ferreira et al.,1979)

จากการทดลองของ Ferreira et al. (1984) โดยใช้สารละลายยาสลบ neutralized-benzocaine-hydrochioride (NBH) และ benzocaine-hydrochioride (BH) ผ่านเหงือกปลาพบว่า neutralized-benzocaine-hydrochioride สามารถผ่านเหงือกปลาได้เร็วกว่า benzocaine-hydrochioride ดังตารางที่ 1 และ 2

ผลของ benzocaine ต่อการเปลี่ยนแปลงทางเลือด

จากการทดลองของ Soivio et al. (1977) ในปลา rainbow trout พบว่าระหว่างที่มีการสลบจะพบการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบในเลือดได้แก่

1. ค่า Haematocrit และ Haemoglobin มีค่าเพิ่มขึ้นแสดงให้เห็นว่า เม็ดเลือดแดงมีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้การไหลของเลือดผ่านเหงือกช้าลง มีการรวมกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดงในซี่เหงือก ส่งผลให้เกิดภาวะขาด O_2 ในร่างกายระหว่างที่มีการสลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ปริมาณ glucose ในเลือดมีค่าลดลงเล็กน้อย ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การเผาผลาญคาร์โบไฮเดรตได้รับผลกระทบน้อย

3. เกิดภาวะการขาด O_2 และค่า CO_2 เพิ่มขึ้นในเลือดอันเป็นผลมาจากมีการต้านการไหลเวียนของเลือดผ่านซี่เหงือก

4. ยาสลบทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง cationic imbalance ในน้ำเลือดซึ่งไปมีผลต่อกระบวนการรักษาสมดุลย์น้ำของเนื้อเยื่อ โดยเม็ดเลือดแดงจะดึง K^+ จากน้ำเลือด ทำให้ระดับ K^+ ในเลือดลดลงระหว่างที่มีการสลบ และการเพิ่มขึ้นของ Mg^{++} ในเลือด อาจเป็นผลสืบเนื่องจากการเสียสมดุลย์ osmotic

อย่างไรก็ตามพบว่าค่าการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะกลับสู่ภาวะปกติ ภายหลังจากฟื้นตัวแล้ว 4-12 ชั่วโมง

ตารางที่ 3 ค่าการเปลี่ยนแปลงในเลือดของปลา rainbow trout เนื่องจากยาสลบ

ค่า Parameter	Benzocaine		MS-222	
	0 นาที	15 นาที	0 นาที	15 นาที
Hct	0.239±0.014	0.318±0.023	0.276± 0.020	0.311±0.019
Hb g/l	66.1±3.3	78.9±4.4	81.7± 6.6	87.4±7.3
MCHC g/l	279±3	251±7	294±5	280±8
Lactate g/l	0.064± 0.016	0.121±0.026	-	-
Glucose g/l	0.539±0.071	0.515 ±0.028	0.562 ± 0.046	0.534±0.045
K^+ mEq/l	2.65±0.28	2.29±0.07	2.37± 0.11	1.93±0.08
Na^+ mEq/l	142.1±0.7	141.6±0.7	143.5±1.1	145.3±2.7
Mg^{++} mEq/l	1.37±0.06	1.47±0.05	1.34± 0.03	1.34±0.03
PH	-	-	7.86±0.05	7.59±0.10
Pco_2	-	-	3.1±0.2	4.7±0.2
Po_2	-	-	126.4±6.7	41.4± 8.3

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Soivio et al. (1977)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยที่ควรคำนึงถึงในการใช้ Benzocaine

1. ขนาดของปลา Iwama and Ackerman (1994) กล่าวถึงผลของ Benzocaine จะมีความสัมพันธ์กับขนาดของปลา โดยปลาขนาดเล็กจะใช้ปริมาณยาสลบที่ต่ำกว่าปลาขนาดใหญ่ Ross and Gedds (1979) ทดลองในปลานิลเต็มวัยและลูกปลานิลจะใช้ความเข้มข้น 100 และ 60 mg/L ตามลำดับ

2. อุณหภูมิของน้ำ Iwama and Ackerman (1994) กล่าวว่าความเป็นพิษของยาสลบที่ใช้ จะขึ้นกับอุณหภูมิของน้ำ โดยช่วงความปลอดภัยจะเป็นช่วงกว้างในน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำ เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำทำให้ยาสลบผ่านเข้าสู่ตัวปลาช้า แต่ที่อุณหภูมิสูงอัตราการหายใจเร็วขึ้นจึงรับยาได้เร็ว Gildrhus and Marking (1987) ได้ทดลองในปลา Rainbow trout และ Chinook salmon พบว่าความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อปลาดังกล่าวมีค่า 30 และ 35 mg/L ที่อุณหภูมิ 17 ^{o}C และที่ 7 ^{o}C ตามลำดับ

3. ชนิดของปลา ปลาแต่ละชนิดสามารถทนต่อยาสลบในปริมาณที่แตกต่างกันไป การทดลองใช้ยาสลบ Benzocaine ที่ความเข้มข้น 80-85 ppm สามารถทำให้ปลากัดสลบในระยะที่ 1 นาน 48 ชั่วโมง โดยปลาสามารถฟื้นตัวจากภาวะการสลบ ภายในเวลา 3-5 นาที (อรุณี และคณะ , 2542) และการขนส่งลูกปลานิลขนาด 2.4-3.4 ซม. ควรใช้ที่ความเข้มข้น 15 ppm (Sommanee and Siridanupatra , 2001) ซึ่งสามารถสลบได้นาน 24 ชม. และ ฟื้นตัวภายใน 55 วินาที Dowson and Gilderhus (1979) ทดลองในปลา Northern pike ขนาดเต็มในระยะ Sedationใช้ความเข้มข้น 100-200 mg/L

ความเข้มข้นของ Benzocaine และระยะเวลาที่ใช้

ความเข้มข้นของยาสลบที่ใช้เพื่อการศึกษาทางด้านสรีรวิทยาในห้องปฏิบัติการ หรือการติดเครื่องหมายจะใช้ความเข้มข้นของยาสลบที่ทำให้ปลาสลบในระยะที่ 2 (loss of equilibrium) Munday (1997) กล่าวว่า ปลาจะหมดความรู้สึกไม่ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น สามารถจับได้ด้วยมือเปล่า และปลาจะตกอยู่ที่ก้นแทงก์ ส่วนการสลบที่ใช้ในการขนส่ง นิยมใช้ที่ความเข้มข้นที่ทำให้ปลาสลบระยะที่ 1 (Sedation) ซึ่งมีผู้ทำการทดลองไว้ดังตารางที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของ benzocaine และระยะเวลาที่ทำให้ปลาสลบในระยะที่ 1 (Sedation)

ปลาที่ใช้ทดลอง	ระยะเวลาที่ปลาเริ่มสลบ	ความเข้มข้นของ Benzocaine	เอกสารอ้างอิง
Rainbow trout	3 min	50 mg/L	Dowson and Gilderhus (1979)
Brow trout	3 min	50 mg/L	Dowson and Gilderhus (1979)
Adult northern pike	3 min	100-200 mg/L	Dowson and Gilderhus (1979)
ลูกปลานวลจันทร์ทะเล	-	18-22 mg/L	Sommani et al. (1997)
ลูกปลานิล	20 min	15 mg/L	Sommani and Siridanupatra (2001)
ปลากัด	-	80-85 mg/L	อรุณี และคณะ (2542)

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Iwama and Ackerman (1994)

ส่วนค่าความเข้มข้นที่ทำให้ปลาตาย 50% (LC_{50}) ของ Benzocaine ในปลากัดที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงมีค่า 202 และ 212 mg/L และลูกปลานิล มีค่า 29.92-38.33 mg/L (Sommanee and Siridanupatra , 2001) และความเข้มข้นที่ทำให้ปลาตาย (Lethal dose) จากการทดลองกับปลา Bass , Cod และ Spawning salmon มีค่ามากกว่า 110 , มากกว่า 60 และ 35-40 mg/L ตามลำดับ (Gilderhus,1990,1991;Mattson and Riple,1989 อ้างโดย Iwama and Ackerman ,1994)

การกลับคืนสู่ภาวะปกติ

การใช้ยาสลบ Benzocaine ในการติดเครื่องหมาย (tagging) หรือการขนส่ง หลังจากที่เสร็จสิ้นการทำงานแล้วหรือปลาถึงมือผู้รับแล้ว จำเป็นที่จะต้องปรับสภาพของปลาให้กลับคืนสู่สภาวะปกติ สำหรับปลาที่ใช้ในการขนส่ง ก่อนที่จะปล่อยปลาลงสู่น้ำใหม่จะต้องมีการปรับอุณหภูมิของน้ำภายในและภายนอกถุงให้มีอุณหภูมิเท่ากัน ส่วนปลาที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อการศึกษาทางด้านสรีระวิทยา หรือทำการติดเครื่องหมายก็จะทำให้ปลากลับคืนสู่สภาวะปกติเช่นกัน โดยการนำปลาไปใส่ในน้ำสะอาดที่ไม่มียาสลบและมีการให้อากาศเพื่อให้น้ำไหลผ่านเหงือก และระยะเวลาในการกลับคืนสู่สภาวะปกติขึ้นอยู่กับระยะที่ปลาสลบ อุณหภูมิ ชนิดของปลา ขนาดของปลา และความเข้มข้นของยาสลบที่ใช้ Dowson and Gilderhus (1979) ดังตารางที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ระยะเวลาที่ปลาสลบ และระยะเวลาการกลับสู่ภาวะปกติ

ปลาที่ใช้ทดลอง	ความเข้มข้นของ benzocaine	ระยะเวลาที่ปลาเริ่มสลบ	การกลับสู่ภาวะปกติ	เอกสารอ้างอิง
Cod	40 mg/L	3 min	3.9-10.8 min	Mattson and Riple (1989)
Salmonid	41 mg/L	3 min	4.5-6.6 min	Yesaki (1988)
Rainbow trout	40 mg/L	4 min	8.5 min	Gilderhus and Marking (1987)
Salmonid	25-45 mg/L	1.5-3.5 min	4.5-10 min	Gilderhus (1989)
Bass	55-80 mg/L	3 min	<10 min	Gilderhus et al. (1991)
Carp	50-100 mg/L	1.2-3.5 min	2.2-3.1 min	Ferriera et al. (1979)
Tilapia	50-10 mg/L	1.6-6.5 min	2.2-2.9 min	Ferriera et al. (1979)
Spawning salmon	25-30 mg/L	<3 min	<10 min	Gilderhus (1990)
ปลากัด	80-85 mg/L	-	3-5 min	อรุณี และคณะ (2542)
ลูกปลานิล	15 mg/L	-	55 sec	Sommani and Siridanupatra (2001)

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Iwama and Ackerman (1994)

ข้อดีข้อเสียของ Benzocaine

ข้อดี 1. ราคาไม่แพงมาก

2. ปริมาณการใช้เมื่อเทียบกับ MS-222 จะต่ำกว่า และการกลับสู่ภาวะปกติได้เร็วใกล้เคียงกับ MS-222

3. Benzocaine ละลายน้ำได้ง่าย และไม่มีกลิ่นเมื่อเปรียบเทียบกับ Quinaldine ซึ่งจะไม่ละลายน้ำ และมีกลิ่นเหม็น เป็นอันตรายต่อผู้ใช้

ข้อเสีย 1. หาซื้อยาก

2. การใช้ Benzocaine สำหรับปลาในประเทศไทยยังขาดการศึกษาที่เหมาะสมกับขนาดและชนิดของปลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1.ปลาหางนกยูงตัวผู้ที่มีขนาดความยาว 3-4 เซนติเมตร และมีน้ำหนัก 0.32-0.52 กรัม

2.ตู้กระจกขนาด 15X30X15 เซนติเมตร

3.Hotplate

4.อุปกรณ์เครื่องแก้วและสารเคมีวิเคราะห์น้ำ

5.เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

6.DO meter YSI 550

7.Spectrophotometer MILTON ROY รุ่น Spectronic 20D

8.เครื่องชั่งน้ำหนัก

9.Hot air oven

10.ถังขนาด 100 ลิตร

11.Benzocaine บริษัท Sigma chemical co.

12. โหลพลาสติกขนาด 1 ลิตร

วิธีการ

แผนการทดลอง

ทำการหาค่า LC_{50} ที่ 48 ชั่วโมงตามวิธีของ Litchficeld & Wilcoxon (1949) โดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ดังนี้คือ

Preliminary test มีทั้งหมด 6 ระดับความเข้มข้น ๆ ละ 2 ซ้ำ ใส่ปลาตู้ละ 10 ตัวพร้อมกลุ่มควบคุม

Full-scale test มีทั้งหมด 6 ระดับความเข้มข้น ๆ ละ 2 ซ้ำ ใส่ปลาตู้ละ 10 ตัวพร้อมกลุ่มควบคุม

การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการขนส่งระยะ Sedation ทำในโหลขนาด 1 ลิตร โหลละ 1 ตัว ความเข้มข้นละ 20 ซ้ำ นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Chi-square

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมการทดลอง

1.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

โดยนำปลาหางนกยูงตัวผู้ขนาดความยาวเฉลี่ย 3-4 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 0.32-0.52 กรัม มาทำการปรับสภาพให้ชินภายในห้องปฏิบัติการ โดยเลี้ยงไว้ในบ่อซีเมนต์ขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.95×0.95×0.95 เมตร ให้อาหารสำเร็จรูปวันละ 2 ครั้ง ถ่ายน้ำสัปดาห์ละ 2 ครั้ง อย่างน้อย 2 สัปดาห์ และก่อนนำไปทดลองทำการงดอาหาร 2 วัน

1.2 การเตรียมน้ำเพื่อใช้ทดลอง

พักน้ำประปาไว้ในถังพลาสติกขนาด 100 ลิตร ทำการให้อากาศอย่างน้อย 1 วัน ก่อนนำมาใช้ทดลอง และทำการปรับความเค็มด้วยเกลือแกงที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

1.3 ภาชนะทดลอง ใช้ตู้กระจกขนาด 15×30×15 เซนติเมตร บรรจุน้ำ 4 ลิตร จำนวน 14 ตู้ และโหลพลาสติกขนาด 1 ลิตร จำนวน 100 อัน

1.4 การเตรียมยาสลบที่ใช้ในการทดลอง โดยคำนวณปริมาณยาสลบที่ใช้แต่ละความเข้มข้นในปริมาตรน้ำ 4 ลิตร นำมาละลายใน 95 เปอร์เซ็นต์ Ethyl alcohol โดยทำเป็น stock 5 มิลลิลิตร และจะใช้ปิเปตดูดสารละลายยาสลบใส่ลงตู้ที่ทดลอง ความเข้มข้นละ 2 มิลลิลิตร

2. วิธีดำเนินการทดลอง

2.1 ทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของ Benzocaine ที่ทำให้ปลาตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ 48 ชั่วโมง ตามวิธีการของ Litchficeld & Wilcoxon (1949) ในตู้กระจกขนาด 15x30x15 เซนติเมตร บรรจุน้ำปริมาตร 4 ลิตร โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ขั้นตอนคือ

2.1.1 Preliminary test เป็นการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ปลาตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่ทำให้ปลาตายเลย ทำการทดลองที่ระดับความเข้มข้น 6 ระดับ ๆ ละ 2 ซ้ำ ใส่ปลาตู้ละ 10 ตัว พร้อมกลุ่มควบคุม สังเกตและบันทึกอาการปลาและจำนวนปลาตายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง

2.2.2 Full-scale test เป็นการทดลองเพื่อหาระดับความเป็นพิษของ Benzocaine ต่อปลาหางนกยูงภายในช่วงความเข้มข้นที่ทำให้ปลาหางนกยูงตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ โดยจัดระดับความเข้มข้นให้เหมาะสมตามผลการทดลองในขั้นต้น จำนวน 6 ระดับและชุดควบคุมอีก 1 ชุด ซึ่งในแต่ละความเข้มข้นจะทำ 2 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว สังเกตอาการและบันทึกจำนวนการตายในเวลา 48 ชั่วโมง ปลาที่ตายจะถูกนำออกทันทีที่สังเกตเห็น โดยถือหลักเกณฑ์ว่าปลาที่ตายการเปิดปิดเหงือกจะหยุดเคลื่อนที่ และไม่มีการตอบสนองเมื่อถูกกระตุ้นจากภายนอก นอกจากนี้ทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ โดยวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO), ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH), อุณหภูมิ (Temperature), แอมโมเนีย (NH_3) ในน้ำที่ใช้ทดลองที่เวลาก่อนการทดลอง หลังใส่สารที่เวลา 1, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

2.2 ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการขนส่งในระยะที่ 1 (Sedation) โดยทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าความเข้มข้นที่ทำให้ปลารอดร้อยเปอร์เซ็นต์ จากการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน จากนั้นนำช่วงความเข้มข้นที่ทำให้ปลาสลบในระยะที่ 1 มาแบ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็น 4 ระดับความเข้มข้น ทำการทดลองในโหลพลาสติกบรรจุน้ำ 1 ลิตร ใส่ปลาโหลละ 1 ตัวในทุกระดับความเข้มข้น ๆ ละ 20 ตัว พร้อมกลุ่มควบคุม สังเกตและบันทึกการเข้าสู่ระยะการสลบที่ต้องการที่ระยะเวลา 10, 20, 30 นาที, 1, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง และระยะเวลาการกลับสู่ภาวะปกติ พร้อมทั้งค่าเฉลี่ยระยะเวลาที่ทำให้ปลาสลบและฟื้น จากนั้นนำปลาแต่ละความเข้มข้นไปเลี้ยงต่ออีก 2 สัปดาห์ เพื่อสังเกตอัตราการรอดตาย

การบันทึกข้อมูล

บันทึกอาการปลาที่สลบ และคุณสมบัติของน้ำได้แก่ วิเคราะห์ค่า DO , pH , temperature และ NH_3 ที่เวลาก่อนการทดลอง หลังใส่สารที่เวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง และบันทึกจำนวนปลาตาย

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองไปคำนวณหาค่า LC_{50} ของ Benzocaine โดยวิธีของ Litchficeld & Wilcoxon (1949) และการวิเคราะห์คุณภาพน้ำที่ใช้ในการทดลองโดยวิธีวิเคราะห์ของ APHA et al. (1992) โดยนำน้ำที่ใช้ในการทดลองมาวิเคราะห์คุณภาพที่เวลาก่อนการทดลอง หลังใส่สารที่เวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

นำข้อมูลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำในแต่ละชุดรวมทั้งจำนวนปลาหางนกยูงที่เหลือมาทำการ วิเคราะห์ข้อมูลโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Range test

สถานที่และระยะเวลาในการทดลอง

ทำการทดลองที่ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระยะเวลาในการทำการทดลองตั้งแต่ กรกฎาคม 2544 ถึง กุมภาพันธ์ 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาพิษเฉียบพลันของ Benzocaine ที่มีต่อปลาหางนกยูง

การทดลองใช้ Benzocaine ที่ระดับความเข้มข้น 33, 35, 38, 41, 44 และ 48 มิลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 48 ชั่วโมงพบว่า อัตราการตายของปลาหางนกยูงมีดังนี้ 15, 15, 35, 45, 95 และ100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางผนวกที่ 1) จากเปอร์เซ็นต์ของอัตราการตายดังกล่าวนำมาคำนวณค่า 48 ชั่วโมง LC_{50} ได้เท่ากับ 39.5 (38.42 – 40.60) มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ช่วงระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2) และจากการสังเกตพบว่า ในกลุ่มทดลองหลังจากที่ใส่ปลาลงในน้ำที่มียาสลบ 10 นาที ปลาแสดงอาการสลบระยะที่ 1 (sedation) ปลาส่วนใหญ่มีอาการว่ายน้ำอยู่กับที่ ๆ ระดับพื้นตู้ มีบางตัวขยับเคลื่อนที่บ้างเล็กน้อย เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง ปลาเริ่มสลบระยะที่ 2 (Loss of equilibrium) โดยปลาอยู่นิ่งหัวชี้ด้านบน บางตัวเริ่มตะแคงข้างราบลงกับพื้นตู้ และหลังการทดลอง 12 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 33 และ 35 มิลลิกรัมต่อลิตร พบทั้งปลาอยู่นิ่งที่ก้นตู้ บางตัวหัวชี้ขึ้น และบางตัวขยับตัวเคลื่อนที่เล็กน้อย แต่ที่ความเข้มข้น 38, 41, 44 และ 48 มิลลิกรัมต่อลิตร ปลาส่วนใหญ่นอนนิ่งหงายท้อง หัวชี้ และปลาที่ทดลองเริ่มตายระหว่างชั่วโมงที่ 12 และชั่วโมงที่ 24 ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้น 48 มิลลิกรัมต่อลิตร ปลาตายหมด 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ความเข้มข้นอื่นปลาที่รอดตายว่ายน้ำในลักษณะลอยหัว ในขณะที่กลุ่มควบคุมแม้จะพบอาการลอยหัวเช่นกันแต่มีการว่ายไปมามากกว่ากลุ่มทดลองและไม่มีปลาตาย ซึ่งอาการดังกล่าวน่าจะมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของยาสลบ โดยยาสลบมีผลทำให้ออกซิเจนลดลงมากกว่าในกลุ่มควบคุมและในกลุ่มทดลองเนื่องจากปลาขับเมือกออกมามากอาจเป็นอีกสาเหตุที่ทำให้ออกซิเจนลดลงต่ำกว่าในกลุ่มควบคุม

ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำที่ใช้ในการทดลอง คุณภาพของน้ำที่ก่อนการทดลองและสิ้นสุดการทดลอง พบว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำอยู่ในช่วง 0.05-7.43 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเมื่อเริ่มการทดลองปริมาณออกซิเจนมีค่า 7.43 มิลลิกรัมต่อลิตร และลดลงเรื่อย ๆ จนมีค่าเกือบศูนย์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางผนวกที่ 2) โดยในชั่วโมงที่ 12 มีแนวโน้มลดลงตามความเข้มข้นของยาสลบที่เพิ่มขึ้นและลดลงเรื่อย ๆ ตลอด 48 ชั่วโมงโดยลดลงมากที่สุดในช่วง 24 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 48 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกันทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางผนวกที่ 3) ส่วนค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ลดลงเล็กน้อยอาจเนื่องมาจากมีการใช้ออกซิเจนในน้ำและขับถ่ายคาร์บอนไดออกไซด์สู่น้ำ (ตารางผนวกที่ 4) เมื่อนำมาเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางผนวกที่ 5) ส่วนค่าแอมโมเนียพบว่าในกลุ่มการทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของยาสลบ และมีค่ามากที่สุดที่ 12 ชั่วโมง แต่หลังจาก 24 ชั่วโมงจะเริ่มลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากจนสิ้นสุดการทดลอง แอมโมเนียที่เพิ่มขึ้นน่าจะเป็นผลมาจากโครงสร้างของยาสลบ Benzocaine ที่มีหมู่อะมิโนในโครงสร้าง สำหรับกลุ่มควบคุมแอมโมเนียจะเพิ่มขึ้นจาก 0.017 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ก่อนการทดลองเป็น 0.287 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่กลุ่มการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 0.910-1.632 มิลลิกรัมต่อลิตร (ดังตารางผนวกที่ 6) เมื่อเปรียบเทียบกันทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ดังตารางผนวกที่ 7)

2. การทดลองหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Benzocaine ในการขนส่ง

การสลบในระยะที่ 1 (Sedation) เป็นระยะที่ปลามีอาการว่ายน้ำเฉื่อยชา หายใจช้าลง สูญเสียการตอบสนองบางส่วน มีประโยชน์มากเพื่อใช้ในการขนส่ง ซึ่งในการทดลองครั้งนี้เมื่อเทียบกับการศึกษาพิษเฉียบพลันพบว่าหลังจากที่นำปลาใส่ลงในสารละลายยาสลบปลาจะเข้าสู่ระยะการสลบที่ 1 (Sedation) ในเวลา 10 นาที และจะสลบในระยะนี้ไปตลอดการทดลอง และพบว่าความเข้มข้นของ Benzocaine ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการขนส่งปลาในเวลา 48 ชั่วโมง ได้แก่ความเข้มข้นในช่วง 11-17 มิลิกรัมต่อลิตร ซึ่งความเข้มข้นของ Benzocaine ระดับนี้เป็นความเข้มข้นที่ทำให้ปลาหางนกยูง สลบในระยะที่ 1 (Sedation) โดยปลาจะว่ายน้ำลักษณะเฉื่อยอยู่นิ่งกับที่ ในลักษณะสงบกว่ากลุ่มควบคุม (ตารางที่ 6) (ความเข้มข้นที่ได้เป็นความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองลดระดับความเข้มข้นจาก 33 มิลิกรัมต่อลิตรถึง 7 มิลิกรัมต่อลิตร) หลังจากการทดลอง นำปลาที่ได้ทดลองไปเลี้ยงต่ออีก 2 สัปดาห์ พบว่ามีอัตราการรอดตายที่ความเข้มข้น 11 และ 13 มิลิกรัมต่อลิตร มากที่สุดคือ 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการทดลองของ Sommani and Siridanupatra (2001) ที่ทำการทดลองใช้ Benzocaine ในการขนส่งลูกปลานิล พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้ลูกปลานิลสลบในระยะที่ 1 (Sedation) ในเวลา 24 ชั่วโมงคือ 15 มิลิกรัมต่อลิตร แต่มีค่าต่ำกว่ามากเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของ Arino and Sen (1994) ที่ทดลองใช้ Benzocaine กับปลา gillhead seabream ความเข้มข้น 57 มิลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2-3 วัน และพบปลาจะตายหลังจากการทดลองแล้ว 20 ชั่วโมง

3. การกลับคืนสู่ภาวะปกติ

การกลับคืนสู่ภาวะปกติของปลาหางนกยูงหลังจากการทดลอง โดยเมื่อใส่ปลาลงในน้ำใหม่ปลาจะว่ายอยู่นิ่งบริเวณผิวน้ำ หลังจากนั้นจึงว่ายน้ำเป็นปกติ พบว่าปลาหางนกยูงที่สลบในระยะที่ 1 จะใช้เวลาการฟื้นตัวอยู่ในช่วง 20 – 35 วินาที (ตารางที่ 6) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการทดลองของ Sommani and Siridanupatra (2001) ในลูกปลานิล ที่จะกลับสู่ภาวะปกติในเวลา 55 วินาที และมีค่าน้อยกว่าปลากัดที่ต้องใช้เวลา 3-5 นาที ในการฟื้นตัวกลับสู่ภาวะปกติ (อรุณี และ

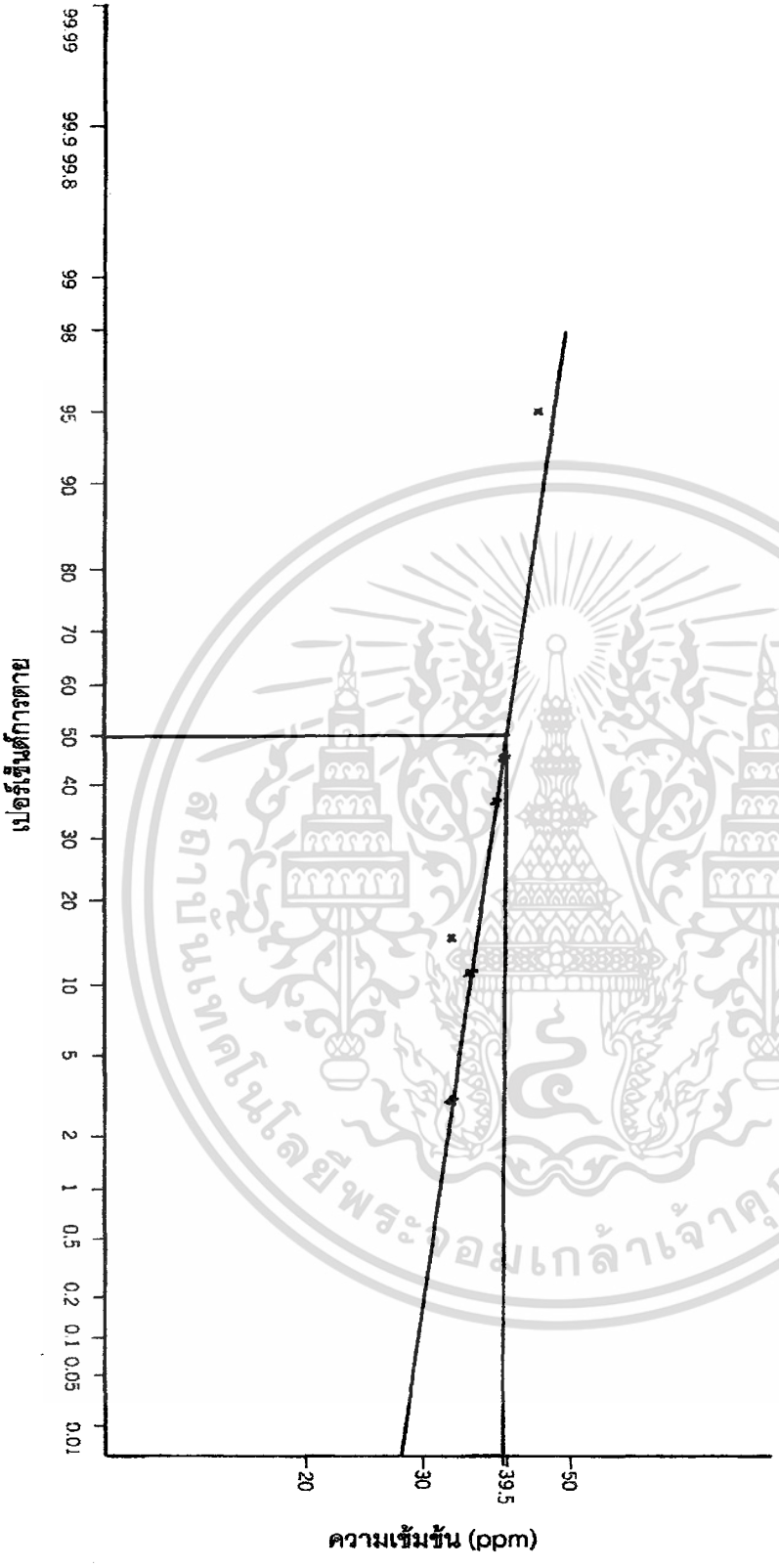
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะ, 2542) และจากการทดลองความเป็นพิษเฉียบพลันพบการฟื้นตัวมีค่าประมาณ 45 วินาที - 1 นาที 10 วินาทีในปลาที่สลบระยะที่ 2 (loss of equilibrium) และ 3 (loss of reflex activity) นอกจากนี้ Soivio et al. (1977) ทำการทดลองในปลา rainbow trout พบว่าระหว่างที่มีการสลบจะพบการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบในเลือด และการเปลี่ยนแปลงจะกลับสู่ภาวะปกติหลังจากนั้น 4-12 ชั่วโมง

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนของปลาหางนกยูงที่สลบในระยะที่ 1 (Sedation) ในเวลา 48 ชั่วโมง และเวลาที่ใช้ในการฟื้นตัวสู่ภาวะปกติ

ความเข้มข้น	ระยะเวลาในการสลบ									Recovery time
	นาที			ชั่วโมง						
	10	20	30	1	6	12	24	36	48	
11 ppm	4	7	9	15	20	20	20	20	20	20 วินาที
13 ppm	1	6	9	19	20	20	20	20	20	20 วินาที
15 ppm	0	9	13	19	20	20	20	20	20	25 วินาที
17 ppm	2	9	10	19	20	20	20	20	20	35 วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 แสดงค่า 48 ชั่วโมง LC_{50} ของปลาหางนกยูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

39868

ตารางที่ 7 แสดงอัตรารอดตายหลังการทดลองเมื่อเลี้ยงต่อไป 2 สัปดาห์

ความเข้มข้น	อัตรารอดตาย (ตัว)
11 ppm	19
13 ppm	19
15 ppm	17
17 ppm	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

จากการศึกษาการใช้ยาสลบ Benzocaine ในปลาหางนกยูง สรุปผลได้ดังนี้

1. ค่า 48 ชั่วโมง LC_{50} ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ของยาสลบ Benzocaine ที่มีต่อปลาหางนกยูง มีค่าเท่ากับ 39.5 (38.42 – 40.60) มิลิกรัมต่อลิตร

2. ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับขนส่งปลาหางนกยูง ในระยะที่ 1 (Sedation) ตลอดระยะเวลา 48 ชั่วโมง อยู่ในช่วง 11-17 มิลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อเปรียบเทียบกับอัตรารอดตาย ความเข้มข้นที่ 13 มิลลิกรัมต่อลิตรจะเหมาะสมที่สุด เพราะมีการรอดตายสูงที่สุดและเข้าสู่ระยะสลบที่ต้องการได้เร็วนอกจากนี้เป็นความเข้มข้นที่ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล , วันเพ็ญ มีนกาญจน์ , นนทรี ปานพรหมินทร์ และบุษกร บำรุงธรรม . 2544. การขนส่งปลาสวยงามไปตลาดต่างประเทศ. *วารสารการประมง*, 54(1) : 41-47.

อรุณี สมมณี , สถาพร เกิดเกรียงไกร และ นลิน อิงคไพโรจน์ . 2542 . ผลของ MS-222 และ Benzocaine ที่มีต่อการขนส่งปลากัด . วิทยาสารเกษตรศาสตร์ . 33(3) : 368-376.

APHA, AWWA and WPCF . 1980. Standard methods for the examination of water. 15th ed. American Public Health Association. Washington, D.C. 1134p.

Arino, E. and A. Sen. 1994. In-Vivo effects of the anesthetic, on liver microsomal cytochrome-P450 and mixed function on oxidase activition of gillhead seabream. Comp. Biochem. Physiol. C-Pharma. Toxicol. Endocrin. 109 : 339-404.

Brown, E. A. B., J. E. Franklin, E. Pratt and E. G. Trams. 1972. Contributions to the pharmacology of quinaldine uptake and distribution in the shark and comparative studies. Comp. Biochem. Physiol. 42A, 223-231. อ้างโดย Ferreira , J.T., H.J. Schoonbee. and G.L. Smit. 1984. The uptake of anesthetic benzocainehydrochloride by the gill and skin of three fresh water fish species. *J. Fish Biol.* 25 : 35-41.

Dowson, P.R. and P.A. Gilderhus. 1979. Efficacy of benzocaine as an anesthetic for rainbow trout,brow trout and adult northern pike. *Prog. Fish Cult..7*:288-292 อ้างโดย Merck and company . 1969. The merck index , 11th edition rahway , NewJersey , 1606 p.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ferriera, J.T., G.L. Smit, H.J. Schoonbee, and C.W. Holzapfel. 1979. Comparison of anesthetic potency of benzocaine hydrochloride and MS-222 in two freshwater species. *Prog. Fish Cult.* 41 : 161-163.

Ferreira , J.T., H.J. Schoonbee. and G.L. Smit. 1984. The uptake of anesthetic Benzocaine hydrochloride by the gill and skin of three fresh water fish species. *J.Fish Biol.* 25 : 35-41.

Gilderhus, P.A ., and L.L. Marking. 1987. Comparative effect of 16 anesthetic chemicals in rainbow trout. *N. Ameri. J. Fish Mgmt* . 7:288-292. อ้างโดย Iwama, G.K. and P.A. Ackerman. 1994. Anesthetics. *Biochem. Molecul. Biol. Fishes.* 3 : 1-14.

Gilderhus, P.A .1989. Effect of benzocaine and anesthetic for salmonid fishes. *N. Amer. J. Fish. Mgmt* . 9 : 150-153. อ้างโดย Iwama, G.K. and P.A. Ackerman. 1994. Anesthetics. *Biochem. Molecul. Biol. Fishes.* 3 : 1-14.

Gilderhus, P.A. 1990. Benzocaine as a fish anesthetic: efficacy and safety for spawning-phase salmon. *Prog. Fish Cult.* 52 : 189-191. อ้างโดย Iwama, G.K. and P.A. Ackerman. 1994. Anesthetics. *Biochem. Molecul. Biol. Fishes.* 3 : 1-14.

Gilderhus, P.A., E.A. Lemm, and L.C. Woods.1991. Benzocaine as an anesthetic for striped bass. *Prog. Fish Cult.* 53 : 105-107. อ้างโดย Iwama, G.K. and P.A. Ackerman. 1994. Anesthetics. *Biochem. Molecul. Biol. Fishes.* 3 : 1-14.

Hunn , J.B. and J.L. Allen. 1974. Movement of drugs across the gills of fishes. *Ann. R Pharm.* 14 : 47-55.

Iwama, G.K. and P.A. Ackerman. 1994. Anesthetics. *Biochem. Molecul. Biol. Fishes.* 3 : 1-14.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

Litchfield. J.T. and F. Wilcoxon. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmocol. Exp. Ther.* 96 : 99-113.

Mattson, N.S. and T.H. Riple. 1989. Metomidate , a better anesthetic for Cod in comparison with benzocaine , MS-222 , chlorobutanol and phenoxythanol. *Aquaculture.* 83 : 89-94.

McFarland, W.N. 1959. A study of the effect of anesthetics on the behavior and physiology of fish. *Pubs. Inst. Mar. Sci.* 6 : 23-55.

Merck and company . 1969. The merck index , 11th edition rahway , New Jersey , 1606 p.

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

Ross, L.G. and J.A. Geddes.1979. Sedation of warm water fish species in aquaculture research. *Aquaculture.* 16 : 183-186.

Ross, L.G. and B. Ross.1984. Anesthetic and sedative techniques for fish. Institute of Aquaculture , University of Stirling , Scotland. 35 p.

Swingle, H.S. 1969. Method for analysis of water, organic matter and pond bottom soils used in fisheries research. Auburn University. 119 pp.

Soivio, A., K. Nyholm and M. Huhti. 1977. Effects of anesthesia with MS-222 and benzocaine on the blood constituents of rainbow trout, *Salmo gairdneri. J. Fish Biol.* 10 : 91-101.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sommani , A., S. Kerdkriengkai and S. Srisangam. 1997. Effect of benzocaine in the transportation of *Orechromis niloticus* Linn. and *Chanos Chanos* forskal. *Silpakorn University Journal.* 17(1) : 217-225.

Sommani,A. and L. Siridanupatra. 2001. Effect of MS-222 and Benzocaine on the transportation of *Oreochromis niloticus* Linn. *วารสารการประมง*, 54(4) : 305-309.

Yesaki, T. 1988. A detailed description of the efficacy of five anesthetics on juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Dept. of Animal Science Report. University of British Columbia, Vancouver. 54p. อ้างโดย Iwama, G.K. and P.A. Ackerman. 1994. Anesthetics. *Biochem. Molecul. Biol. Fishes.* 3 : 1-14.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

สัญลักษณ์ที่ใช้

K = จำนวนระดับความเข้มข้นที่ใช้

n = K - 2 = degree of freedom ของ x^2

LC_{50} = ความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองตายไปครึ่งหนึ่ง

S = ค่าฟังก์ชั่นความเอียง

f_{LC50} = ค่าแฟกเตอร์ของ LC_{50} และ S

N = จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ และอยู่ระหว่างค่า LC_{16} และ LC_{84}

R = อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นสูงสุด และความเข้มข้นต่ำสุด

A = ค่าที่คำนวณมาจาก S และ R

ในการทดสอบ ถ้าค่า X^2 จากตารางมีค่ามากกว่า X^2 ที่คำนวณได้แสดงว่า ค่าการเบี่ยงเบนของจุดไปจากเส้นตรง มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ดังนั้น สามารถใช้เส้นตรงนี้ในการประมาณค่า LC_{50} ได้

ตารางผนวกที่ 1 การวิเคราะห์หาค่า LC_{50}

Conc.	Dead/test	O%	E%	O – E%	$\frac{(O-E)^2}{E(100-E)}$
33	3/20	15	3	-2	0.016
35	3/20	15	11	4	0.066
38	7/20	35	36	-1	0.014
41	9/20	45	63	-18	0.066
44	19/20	95	86	9	0.091
48	20/20	100	98	13	0.028
				X^2	0.281

$$X^2 = 0.281 \times \frac{\text{จำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมด}}{\text{ระดับความเข้มข้น}}$$

Degree of freedom, n = k – 2 = 6 – 2 = 4

X^2 จาตาราง เมื่อ n = 4 มีค่า 9.49

5.620 น้อยกว่า 9.49 ดังนั้นข้อมูลที่ได้ การกระจายของจุดแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

LC_{16} = 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

LC_{50} = 39.5

LC_{84} = 43

ได้จากการอ่านความเข้มข้นบนเส้นตรงคาดคะเนที่สร้างบน logarithmic probability paper ของการตายสะสมที่ 16, 50, 84 เปอร์เซ็นต์

$$S = \frac{LC_{84} / LC_{50} + LC_{50} / LC_{16}}{2}$$

$$= \frac{43/39.5 + 39.5/36}{2}$$

$$= \frac{1.089 + 1.097}{2}$$

= 1.093

$f_{LC50} = S^{2.77/\sqrt{N}}$

$= 1.093^{2.77/\sqrt{N}}$

$= 1.093^{0.309}$

= 1.028

ขีดจำกัดบน LC_{50} = $LC_{50} \times f_{LC50}$ = 39.5 × 1.028 = 40.60

ขีดจำกัดล่าง LC_{50} = LC_{50} / f_{LC50} = 39.5 / 1.028 = 38.42

LC_{50} ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% มีค่า = 39.5 (38.42 – 40.60)

R = ความเข้มข้นสูงสุด / ความเข้มข้นต่ำสุด = 48 / 33 = 1.454

$$A = \text{antilog} \frac{1.1 (\log S)^2}{\log R}$$

= antilog 0.010092422

= 1.023

$f_s = A^{10(K-1)/K\sqrt{N}}$

= 1.099

การคำนวณขีดจำกัดของ S ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ขีดจำกัดบน $S = S \times f_s$ = 1.20120

ขีดจำกัดล่าง $S = S / f_s$ = 0.99454

S แลช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ = 1.093(0.994-1.2012)

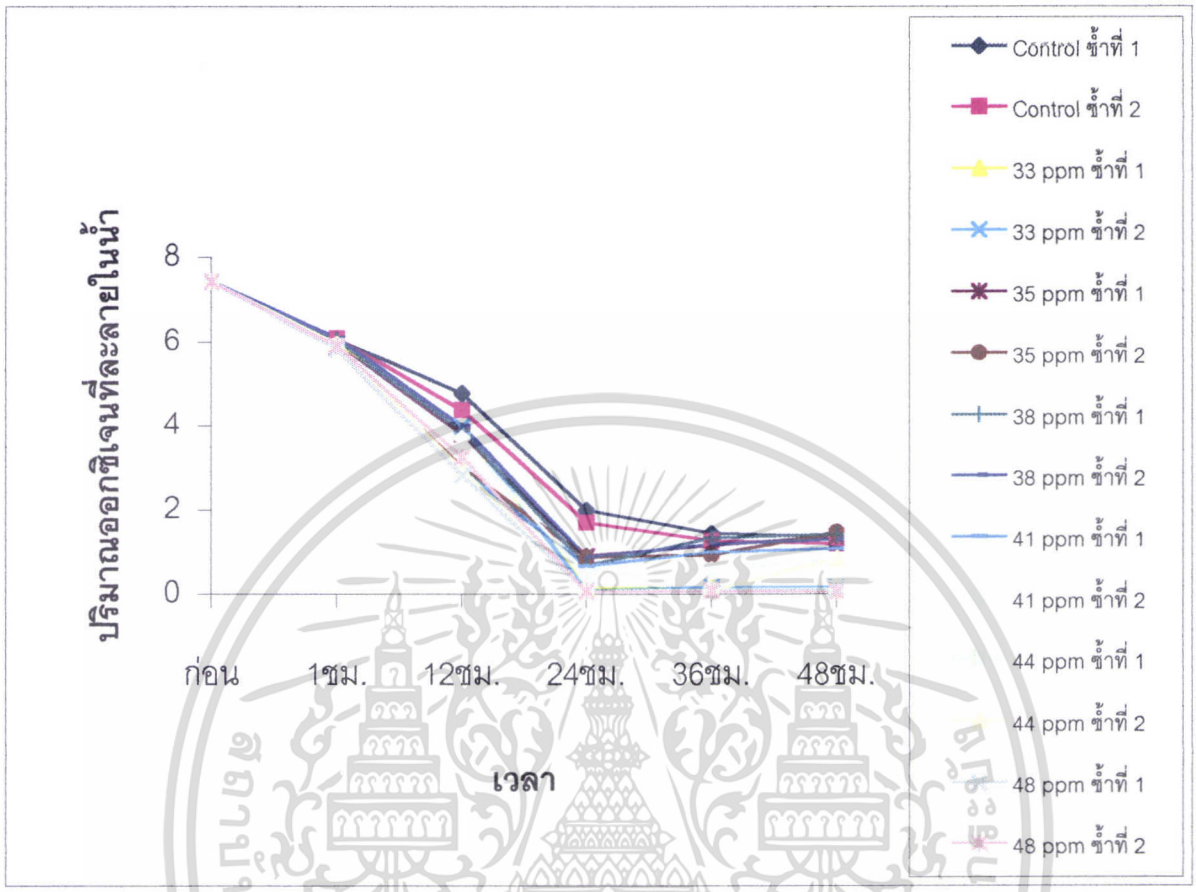
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ

กลุ่มการทดลอง	เวลา					
	ก่อนใส่สาร	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 12	ชั่วโมง 24	ชั่วโมงที่ 36	ชั่วโมงที่ 48
Control ซ้ำที่ 1	7.43	6.05	4.78	2.00	1.45	1.35
Control ซ้ำที่ 2	7.43	6.08	4.38	1.70	1.27	1.19
33 ppm ซ้ำที่ 1	7.43	6.00	3.89	0.14	0.14	0.11
33 ppm ซ้ำที่ 2	7.43	5.87	3.99	0.08	0.16	0.15
35 ppm ซ้ำที่ 1	7.43	5.89	3.80	0.90	1.15	1.37
35 ppm ซ้ำที่ 2	7.43	5.90	3.00	0.87	0.92	1.47
38 ppm ซ้ำที่ 1	7.43	6.04	3.89	0.67	1.33	1.42
38 ppm ซ้ำที่ 2	7.43	6.10	4.00	0.87	1.17	1.30
41 ppm ซ้ำที่ 1	7.43	5.94	2.95	0.66	0.99	1.07
41 ppm ซ้ำที่ 2	7.43	5.87	3.70	0.44	0.57	0.80
44 ppm ซ้ำที่ 1	7.43	5.90	2.92	0.07	0.10	0.13
44 ppm ซ้ำที่ 2	7.43	5.95	2.97	0.07	0.08	0.84
48 ppm ซ้ำที่ 1	7.43	5.82	2.82	0.07	0.08	0.10
48 ppm ซ้ำที่ 2	7.43	5.90	3.25	0.06	0.08	0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟผนวกที่ 1 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ

เวลา	ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร)						
	CON	33ppm	35ppm	38ppm	41ppm	44ppm	48ppm
ก่อน	7.43^{a}	7.43^{a}	7.43^{a}	7.43^{a}	7.43^{a}	7.43^{a}	7.43^{a}
1ชม.	6.06^{a}	5.93^{abc}	5.89^{bc}	6.07^{abc}	5.90^{abc}	5.92^{c}	5.85^{abc}
12ชม.	4.58^{a}	3.84^{a}	3.40^{abc}	3.94^{ac}	3.32^{abc}	2.9^{4bc}	2.03^{c}
24ชม.	1.80^{a}	0.11^{b}	0.88^{c}	0.77^{bcd}	0.55^{bce}	0.07^{bf}	0.06^{bg}
36ชม.	1.36^{a}	0.15^{b}	1.03^{ad}	1.25^{a}	0.78^{ab}	0.09^{cd}	0.08^{bd}
48ชม.	1.27^{a}	0.13^{b}	1.42^{a}	1.36^{a}	0.93^{ab}	0.48^{ab}	0.07^{bc}

หมายเหตุ

ค่าเฉลี่ยที่ไม่มีตัวอักษรเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P>0.05$) ส่วนค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

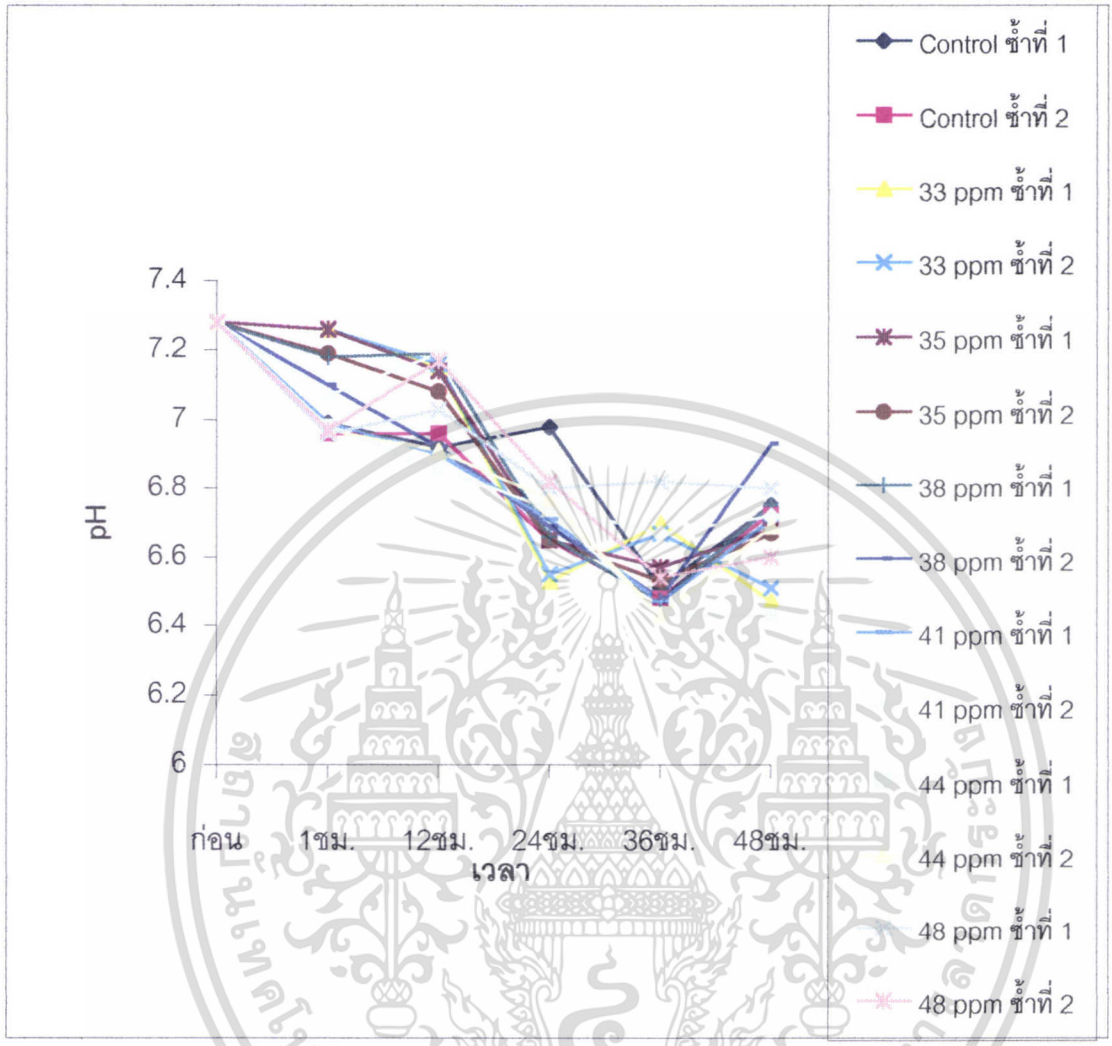
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 4 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเป็นด่างด่าง

	เวลา					
กลุ่มการทดลอง	ก่อนใส่สาร	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 12	ชั่วโมง 24	ชั่วโมงที่ 36	ชั่วโมงที่ 48
Control ซ้ำที่ 1	7.28	6.99	6.92	6.98	6.51	6.75
Control ซ้ำที่ 2	7.28	6.96	6.96	6.65	6.48	6.73
33 ppm ซ้ำที่ 1	7.28	7.26	7.15	6.53	6.70	6.47
33 ppm ซ้ำที่ 2	7.28	7.26	7.16	6.55	6.67	6.51
35 ppm ซ้ำที่ 1	7.28	7.26	7.14	6.65	6.57	6.68
35 ppm ซ้ำที่ 2	7.28	7.19	7.08	6.65	6.53	6.67
38 ppm ซ้ำที่ 1	7.28	7.18	7.19	6.66	6.47	6.75
38 ppm ซ้ำที่ 2	7.28	7.10	6.92	6.69	6.48	6.93
41 ppm ซ้ำที่ 1	7.28	6.99	6.90	6.71	6.47	6.71
41 ppm ซ้ำที่ 2	7.28	7.07	7.19	6.75	6.67	6.72
44 ppm ซ้ำที่ 1	7.28	6.98	6.86	6.74	6.43	6.43
44 ppm ซ้ำที่ 2	7.28	6.97	6.91	6.77	6.43	6.69
48 ppm ซ้ำที่ 1	7.28	6.96	7.03	6.80	6.82	6.80
48 ppm ซ้ำที่ 2	7.28	6.97	7.17	6.82	6.54	6.60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟผนวกที่ 2 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเป็นด่างด่าง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณความเป็นกรดเป็นด่าง

เวลา	CON	33	35	38	41	44	48
ก่อน	7.28[a]	7.28[a]	7.28[a]	7.28[a]	7.28[a]	7.28[a]	7.28[a]
1ชม.	6.97[a]	7.26[a]	7.22[a]	7.06[a]	7.03[a]	6.97[a]	6.96[a]
12ชม.	6.94[a]	7.15[a]	7.11[a]	7.05[a]	7.05[a]	6.88[a]	7.10[a]
24ชม.	6.93[a]	6.54[a]	6.65[a]	6.68[a]	6.73[a]	6.75[a]	6.81[a]
36ชม.	6.49[a]	6.68[a]	6.55[a]	6.47[a]	6.57[a]	6.43[a]	6.68[a]
48ชม.	6.74[a]	6.49[a]	6.67[a]	6.84[a]	6.71[a]	6.56[a]	6.70[a]

หมายเหตุ

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ(P>0.05)

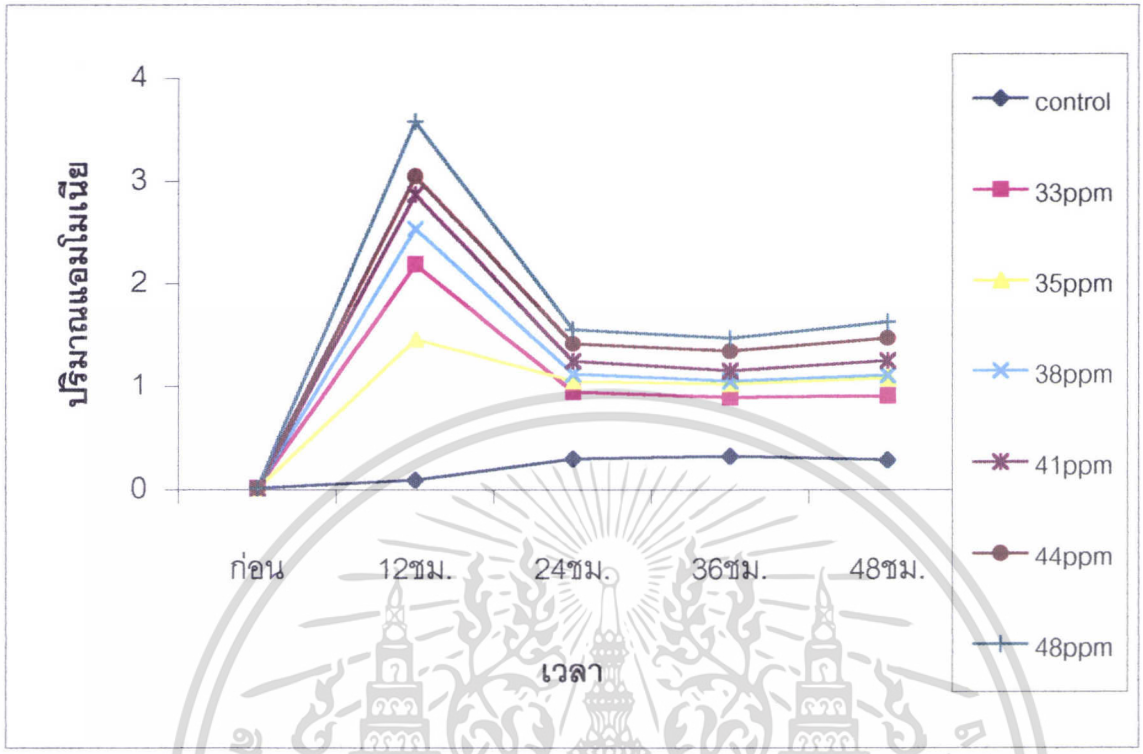
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมโมเนีย

กลุ่มการทดลอง	เวลา				
	ก่อนใส่สาร	ชั่วโมงที่ 12	ชั่วโมง 24	ชั่วโมงที่ 36	ชั่วโมงที่ 48
Control ซ้ำที่ 1	0.017902	0.189532	0.19096	0.21954	0.19811
Control ซ้ำที่ 2	0.017902	0.209182	0.18739	0.20525	0.16238
33 ppm ซ้ำที่ 1	0.017902	2.306359	1.034477	0.964809	1.002322
33 ppm ซ้ำที่ 2	0.017902	2.284923	1.07199	1.043408	1.03269
35 ppm ซ้ำที่ 1	0.017902	2.606467	1.134512	1.139871	1.200607
35 ppm ซ้ำที่ 2	0.017902	2.527867	1.082744	1.123794	1.180957
38 ppm ซ้ำที่ 1	0.017902	2.620757	1.214898	1.159521	1.239907
38 ppm ซ้ำที่ 2	0.017902	2.667203	1.238121	1.159521	1.193462
41 ppm ซ้ำที่ 1	0.017902	2.999464	1.348875	1.270275	1.331011
41 ppm ซ้ำที่ 2	0.017902	2.960164	1.361379	1.252412	1.389961
44 ppm ซ้ำที่ 1	0.017902	3.19239	1.506074	1.432833	1.581100
44 ppm ซ้ำที่ 2	0.017902	3.131654	1.543587	1.477492	1.588246
48 ppm ซ้ำที่ 1	0.017902	3.663987	1.682922	1.556091	1.738299
48 ppm ซ้ำที่ 2	0.017902	3.744667	1.650768	1.606109	1.741872

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟผนวกที่ 3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมโมเนีย



ตารางผนวกที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณแอมโมเนีย – ไนโตรเจน (มิลลิกรัม/ลิตร)

	ปริมาณแอมโมเนีย – ไนโตรเจน (มิลลิกรัม/ลิตร)						
เวลา	CON	33	35	38	41	44	48
ก่อน	0.017902 [a]	0.017902 [a]	0.017902 [a]	0.017902 [a]	0.017902 [a]	0.017902 [a]	0.017902 [a]
12ชม.	0.092176 [a]	2.18846 [a]	1.459986 [ab]	2.536799 [cd]	2.872633 [e]	3.054841 [f]	3.580029 [g]
24ชม.	0.29636 [a]	0.946052 [bc]	1.051447 [cd]	1.119329 [d]	1.247946 [ef]	1.417649 [f]	1.559664 [g]
36ชม.	0.32672 [a]	0.896928 [bcd]	1.024652 [cd]	1.05234 [d]	1.154162 [efg]	1.347982 [fg]	1.473919 [g]
48ชม.	0.28743 [a]	0.910325 [b]	1.083601 [cde]	1.109504 [de]	1.253305 [e]	1.477492 [f]	1.632905 [g]

หมายเหตุ

ค่าเฉลี่ยที่ไม่มีตัวอักษรเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P>0.05$) ส่วนค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้