



การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสลบ 3 ชนิด (MS-222, Benzocaine และ Clove oil) ในกบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*)

วรรณนา ศิริมานะพงษ์^{1,*} สุชาดา แซ่ตั้ง² กิตติกุล นามวงศ์พรหม² เขียวขวัญ พานบุตตะ² ทวีพร มิตรประยูร²
ปิยวรรณ แก้วขาว² และสุรรัตน์ ไมตรีมิตร²

¹หน่วยวิจัยและดูแลสุขภาพสัตว์น้ำทางสัตวแพทย์ ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกและการสาธารณสุข; ²คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170 ประเทศไทย

บทคัดย่อ: การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาสลบทั้ง 3 ชนิดในกบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*) โดยวางแผนการทดลองใช้สถิติแบบไร้พารามิเตอร์ (Non-parametric statistic) กำหนดกลุ่มการทดลองเป็นกบนาที่มีสุขภาพดี เพศผู้ อายุ 4 เดือน จำนวน 30 ตัว แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 3 กลุ่ม (10 ตัวต่อกลุ่ม) ดำเนินการทดลองโดยใช้ยาสลบทั้ง 3 ชนิดคือ Tricaine methanesulfonate (MS-222) Benzocaine และ Clove oil ในขนาดยาที่ถูกแนะนำว่ามีประสิทธิภาพในการนำสลบ 1,000 ppm, 300 ppm และ 350 ppm ตามลำดับจากนั้นเริ่มทำการจับเวลาตั้งแต่นำกบนาลงแช่ในยาสลบจนถึงตอนที่กบฟื้นจากยาสลบเพื่อหาระยะเวลาในการเหนี่ยวนำการสลบ ระยะเวลาในการสลบ และระยะเวลาในการฟื้นจากการสลบ จากผลการทดลองพบว่า ยาสลบที่แตกต่างกันมีผลต่อระยะเวลาในการสลบของกบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดย Tricaine methanesulfonate (MS-222) ให้ช่วงระยะเวลานำสลบและระยะเวลาในการสลบที่สั้นที่สุดเฉลี่ย 8.00 ± 3.50 นาที และ 50.00 ± 13.33 นาที ในส่วนของระยะเวลาในการฟื้นจากการนำสลบด้วย Clove oil ให้เวลาในการฟื้นจากการนำสลบสั้นที่สุดเฉลี่ยที่ 5.50 ± 1.58 นาที โดยแตกต่างจาก Benzocaine อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แต่เมื่อเทียบกับ Tricaine methanesulfonate (MS-222) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

คำสำคัญ: กบนา MS-222 Benzocaine Clove oil

*ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2563. 15(1): 43-55.

E-mail address: wanna.sir@mahidol.edu

A Comparison of 3 Anesthetic Agents (MS-222, Benzocaine, and Clove oil) in East Asian Bullfrog (*Hoplobatrachus rugulosus*)

Wanna Sirimanapong^{1,#}, Suchada Saetang², Kittikul Namwongprom²,
Choenkwan Pabutta², Taweeporn Mitprayoon², Piyawan Kaewkhao²,
and Sureerat Mitemit²

¹Veterinary Aquatic Animal Research Health Care Unit, Department of Clinical Science and Public Health;

²Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Salaya Sub-District, Phutthamonthon District,
Nakhon Pathom 73170, Thailand

Abstract: The objective of this study was to comparison of 3 anesthetic agents in East Asian Bullfrog (*Hoplobatrachus rugulosus*). The experiment was examined using a non-parametric statistic. All healthy male East Asian Bullfrogs with 4 months old was used in this study (n =30). The East Asian Bullfrogs were divided into 3 groups (10 frogs per group) with the different treatments; tricaine methanesulfonate (MS-222), benzocaine and clove oil by using efficacious dose; 1,000 ppm, 300 ppm and 350 ppm respectively. Times were count when dip the East Asian Bullfrog in anesthetic agent until the frogs were full recovery to determine induction, duration and recovery time. The results showed that there were significant differences on frog's anesthesia in each anesthetic agent ($P<0.05$). Tricaine methanesulfonate (MS-222) has short period about induction and duration time approximately 8.00 ± 3.50 and 50.00 ± 13.33 minutes respectively. While recovery time, clove oil has short period about 5.50 ± 1.58 minutes. The recovery time in clove oil group was significant difference from benzocaine group ($P<0.05$) but not significant difference from MS-222 group ($P>0.05$).

Keywords: East Asian Bullfrogs, MS-222, Benzocaine, Clove oil

[#]Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2020 15(1): 43-55.

E-mail address: wanna.sir@mahidol.edu

บทนำ

กบนา (*Hoplobatrachus rugulosa*) เป็น สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่พบอย่างแพร่หลายใน

ประเทศไทย ลำตัวค่อนข้างกลมรี มีขา 2 คู่ คู้หน้าสั้น คู้หลังยาว หัวมีส่วนกว้างมากกว่าความยาวจะงอยปากสั้นทู่ จมูก ตั้งอยู่บริเวณโค้งตอนปลายของจะงอย

ปาก นัยน์ตาโต และมีหนังตาปิดเปิดได้ ปากกว้างมี ฟันเป็นแผ่น ๆ อยู่บนกระดูกเพดาน ตัวผู้มีถุงเสียงอยู่ ใต้คางและจะมีขนาดเล็กกว่าตัวเมีย ขาคู่หน้าสั้น มี นิ้ว 4 นิ้ว ปลายนิ้ว เป็นตุ่มกลม ขาคู่หลังยาวมี 5 นิ้ว ระหว่างนิ้วมีหนังเป็นพังผืด สีของลำตัวด้านหลังเป็นสี เขียวปนน้ำตาลมี จุดสีดำกระจายเป็นประอยู่ทั่วตัว ตามธรรมชาติกบจะหากินอยู่ตามลำห้วย หนอง บึง และท้องนา กบจะกินปลา กุ้ง แมลงและสัตว์ขนาดเล็กเป็นอาหาร (Baorong and Mingzhang, 1994) โดยในประเทศไทยนั้น กบนานอกจากจะมีการเลี้ยง เพาะพันธุ์เพื่อทางเศรษฐกิจแล้ว ยังเป็นสัตว์ที่นิยมใช้ ในการทดลอง หรือการวิจัยกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีราคาถูกและหาซื้อได้ง่าย โดยในระหว่างการทดลองจะเกิดการจับบังคับ หรือการทำหัตถการ ซึ่งอาจจะส่งผลให้สัตว์เกิดความเครียด และความเจ็บปวดได้ จึงมีความจำเป็นที่จะมีการใช้ยาสลบใน กบเพื่อระงับความเครียด และความเจ็บปวดของตัว สัตว์ เพื่อให้ถูกต้องตามการหลักสวัสดิภาพสัตว์ซึ่ง ยาสลบที่นิยมใช้ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกประกอบ ไปด้วย Tricaine methanesulfonate (MS-222), Benzocaine, Clove oil, Isofurane และ Propofol (Mitchell, 2009)

Tricaine methanesulfonate หรือ MS-222 มีสูตรทางเคมีว่า $C_9H_{11}O_2N+CH_3SO_3H$ หรือที่รู้จัก กัน ในชื่ออื่นๆ เช่น เอทิล เอ็ม-อะมิโน เบนโซเอท (ethyl m-amino benzoate), ไตรเคน มีซิเลท (tricaine mesilate), เอ็ม-อะมิโนเบนโซอิก แอซิด (m-aminobenzoic acid), เอทิล เอสเตอร์เมทาเน ซัลโฟเนต (ethyl estermethanesulfonate) และ เมตาเคน (metacaine) โดย MS-222 เป็นอนุพันธ์ ของ Benzocaine นิยมใช้ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก อย่างแพร่หลายไปทั่วโลกทั้งเพื่อลดความเครียดขณะ

ขนส่ง การทำหัตถการเพื่อให้่ายต่อการจับบังคับ เช่น การผ่าตัด การเก็บตัวอย่างเลือด การทำวัคซีน เป็นต้น โดย MS-222 นั้นอยู่ในรูปแบบผง จึงต้อง นำไปผสมกับสารละลายเพื่อให้ได้ยาในรูปของ ของเหลวและให้ยาโดยวิธีทาง การแช่เพื่อให้มีการแพร่ ยาผ่านผิวหนัง (Topic Popovic et al., 2012) แต่ พบว่า MS-222 มีฤทธิ์เป็นกรด (pH 3.0) ซึ่งมีผลทำ ให้เกิดปัญหาในสัตว์ได้ เช่น การเกิดการระคายเคือง ที่เนื้อเยื่อ และมีฤทธิ์ไปบล้างประสิทธิภาพของยา ทำให้ยาไม่สามารถดูดซึมผิวหนังได้จึงจำเป็นต้องมี การปรับสภาพจากกรดให้มีฤทธิ์เป็นกลาง (pH 7.0-7.5) โดยใช้เบสในกลุ่มโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ ($NaOH$) (Mitchell, 2009) MS-222 นิยมใช้โดยวิธีการแช่ เพื่อให้ยามีการดูดซึมแพร่ผ่านผิวหนัง โดยยามีฤทธิ์ไป จับกับโซเดียมชาแนล (Na^+ channels) หรือไอออน ชาแนลอื่นๆ และไปทำการยับยั้งการส่งสัญญาณ ประสาท ได้มีการศึกษาการใช้ยา MS-222 ที่ระดับ ความเข้มข้น 1,000 และ 2,000 ppm ในกบ *Xenopus laevis* โดยวิธีการแช่ที่ระยะเวลา 20 นาที หลังจากนั้นทำการจับเวลานับระยะเวลาในการสลบ และทำการตรวจเช็คปฏิกิริยาตอบสนองต่างๆ ได้แก่ การพลิกกบให้อยู่ในท่านอนหงายเพื่อดูปฏิกิริยา ตอบสนองว่ามีการพลิกตัวกลับมาในท่าคว่ำหรือไม่ (Righting reflex) การตรวจดูพฤติกรรม การวัดอัตรา การเต้นของหัวใจและอัตราการหายใจ การดูการ ตอบสนองต่อความเจ็บ เช่น ใช้กรดหยดบริเวณ ด้านบน ของขา (Acetic acid test-AAT) และการใช้ ปากคืบหนีบริเวณขาเพื่อดูการชักขากลับ (Withdrawal reflex) พบว่า MS-222 ที่ระดับความ เข้มข้น 2,000 ppm นั้นให้ระยะเวลาในการสลบนาน กว่ายาที่ระดับ ความเข้มข้น 1,000 ppm และให้

ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาของการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นกลับมาช้ากว่า (Lalonde-Robert et al., 2012)

Benzocaine เป็นยาสลบที่มีการใช้ในสัตว์เลื้อยคลานสำหรับการตรวจร่างกายเพื่อวินิจฉัยและเพื่อใช้ในการวางยาสลบ ซึ่งระดับความเข้มข้นที่แนะนำสำหรับสัตว์เลื้อยคลานวัยโตเต็มวัยอยู่ระหว่าง 200-300 ppm (Cakir and Strauch, 2005) นิยมให้โดยวิธีการแช่ (Mitchell, 2009) โดยมีการวิจัยทดลองใช้ Benzocaine ในกบ Leopard น้ำหนัก 40 - 60 กรัม ที่ความเข้มข้น 200 ppm พบกบถูกเหนี่ยวนำเข้าสู่สภาวะสลบอย่างรวดเร็วและมีสภาวะหายใจช้า จนถึงกระทั่งหยุดหายใจที่เวลาเฉลี่ยประมาณ 2 ชั่วโมงเนื่องจาก Benzocaine สามารถละลายในไขมันได้ดี ดังนั้นจึงทำให้ยาสามารถถูกดูดซึมเข้าสู่อวัยวะที่มีไขมันเป็นส่วนประกอบ เช่น อวัยวะในส่วนหนึ่งของระบบประสาทส่วนกลางได้ดี (Cakir and Strauch, 2005) และนอกจากนี้ ยังมีการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาสลบ MS-222, Benzocaine และ Pentobarbital ในกบ Leopard frog (*Rana pipiens*) โดยใช้ MS-222 ที่ความเข้มข้น 200 ppm, Benzocaine ที่ความเข้มข้น 200 ppm และ Pentobarbital ที่ความเข้มข้น 300 ppm จากผลการทดลองพบว่า Benzocaine เหนี่ยวนำให้มีการสลบที่รวดเร็ว ในขณะที่ Pentobarbital เหนี่ยวนำให้มีการสลบที่ช้า แต่สารทั้งสองชนิดนี้ก็มีความจำเป็นต้องมีการช่วยฟื้นจากการสลบ ในขณะที่ MS-222 ที่ความเข้มข้น 200 ppm หรือน้อยกว่าทำให้การฟื้นสลบช้าแต่ก็แนะนำให้ใช้ในการสลบสำหรับ Leopard frogs (Cakir and Strauch, 2005)

Clove oil เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่กลั่นมาจากดอกไม้ ลำต้น และใบของต้นกานพลู (Clove oil tree; *Syzygium aromaticum* สามารถนำมาใช้สำหรับบรรเทาอาการปวดศีรษะ ขวดข้อ หรือเป็นยาชาเฉพาะที่กรณีทำหัตถการเกี่ยวกับฟันในมนุษย์ มีสารออกฤทธิ์ในกลุ่มของยูจินอล (eugenol; 4-allyl-2-methoxyphenol) และไอโซยูจินอล (iso-eugenol; 4-propenyl-2-methoxyphenol) ซึ่งเป็นอีกหนึ่งยาสลบที่นิยมใช้ในสัตว์น้ำ และสัตว์เลื้อยคลาน เพื่อให้ง่ายสำหรับการจับบังคับในกรณีขนส่ง การฉีดยาเพื่อทำการผสมพันธุ์ และการทำการผ่าตัด (Lalonde-Robert et al., 2012) โดยระดับความเข้มข้นที่แนะนำให้ใช้ในกบอยู่ที่ 318-350 ppm มีการให้ยา ผ่านทางการแช่ให้ซึมแพร่ผ่านทางผิวหนัง (Mitchell, 2009) หลังจากนั้น ยาจะถูกดูดซึมผ่านทางกระแสเลือด และออกฤทธิ์ที่ระบบประสาทส่วนกลาง (Javahery et al., 2012) ในส่วนของ Leopard frogs พบว่าสามารถเกิดการหายใจ และการเต้นของหัวใจ นอกจากนั้นในจำนวนครึ่งหนึ่งของกบที่ทำการทดลอง (6 ตัวจาก ทั้งหมด 12 ตัว) พบอาการ gastric prolapse สำหรับในกบ African clawed frogs พบการลอกหลุดของเนื้อเยื่อผิวหนัง (cutaneous necrosis) (Mitchell, 2009) นอกจากนี้ ยังพบพยาธิสภาพที่ท่อไตส่วนเมดูลา (medulla) และในกบบางส่วนพบว่ามีเนื้อตายที่ตับ (hepatic necrosis) และเกิดจุดเลือดออกที่เนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue hemorrhages) (Goulet et al., 2011)

โดยระหว่างการวางยาสลบสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเพื่อทำการประเมินระดับความลึกของการสลบ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวัดอัตราการเต้นของหัวใจด้วยใช้เครื่อง Ultrasonic Pulse

Doppler ทำการวัดโดยให้กบอยู่ในท่านอนหงาย และวางอุปกรณ์ไว้บริเวณกระดูกซี่โครงแขน (ventral pectoral girdle) ในระหว่างการประเมินสภาพสัตว์ ลำดับต่อมาที่ต้องประเมินคือการวัดอัตราการหายใจสามารถสังเกตได้จากการเคลื่อนไหวของ Gular sac (Throat sac) นอกจากนี้กบยังสามารถหายใจผ่านทางผิวหนังได้อีกทางหนึ่งอีกด้วย และวิธีสุดท้ายที่สามารถใช้ในการประเมินระดับการสลบในกบได้ คือการวัดปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น ตัวอย่างเช่น Palpebral blink reflex คือ การสัมผัสหนังตาล่างหรือบนของกบด้วยก้านสำลี กบจะตอบสนองด้วยการกระพริบตาซึ่งในระยะ surgical anesthesia กบจะไม่ตอบสนองต่อ reflex นี้ (Mitchell, 2009); Righting reflex คือ การวางกบให้อยู่ในท่านอนหงายบนผ้าที่ชุ่มน้ำแล้วสังเกตการที่กบสามารถพลิกตัวมาอยู่ในท่าปกติภายใน ระยะเวลา 1 นาที (Cakir and Strauch, 2005) ซึ่งหากอยู่ในสภาวะการสลบระดับตื้น (Light anesthesia) กบจะไม่มี การตอบสนองต่อ reflex นี้ (Amphibian Anesthesia); Withdrawal reflex คือ การใช้ปากคีบ (forceps) หนีบที่นิ้วของขาหลังกบนาน 2 วินาที หากกบอยู่ในสภาวะ surgical anesthesia กบจะไม่ดึงขากลับ และ Acetic acid test (AAT) คือ การหยดกรด acetic acid 20 ไมโครลิตร ไปที่ผิวหนังบริเวณต้นขาหลัง ใช้ความเข้มข้นที่ 5% 10% 20% และ 50% โดยจะทดสอบจากความเข้มข้นต่ำไปความเข้มข้นสูง ซึ่งกบจะตอบสนองโดยการชักขา กลับ จากนั้นหลังหยดกรด 1-2 วินาทีจึงล้างผิวหนังบริเวณนั้นด้วยน้ำสะอาด แต่ถ้ากบไม่ตอบสนองจะทดสอบโดยใช้กรดที่มีความเข้มข้นมากขึ้นตามลำดับ (Goulet et al., 2010) หากขณะวางยาสลบ พบกบเกิดสภาวะหยุดหายใจจะถูกนำมาช่วย

ฟื้นจากการสลบ โดยนำกบแช่ในน้ำสะอาดที่เปิดออกซิเจนไหลผ่านเพื่อช่วยเพิ่มปริมาณออกซิเจนในระบบหมุนเวียนเลือด นอกจากนี้จะทำการเพิ่มเมทาบอลิซึมโดยเพิ่มอุณหภูมิน้ำให้อยู่ในช่วงระหว่าง 28-30 องศาเซลเซียส

จากข้างต้นพบว่ามีการศึกษาการใช้ยาสลบชนิดต่างๆ ในกบหลายชนิดมากมาย ซึ่งล้วนแต่เป็นกบสายพันธุ์ต่างประเทศ แต่สำหรับในประเทศไทย เป็นการยากในการใช้กบเหล่านี้ในการวิจัยจึงมักมีการนิยมใช้กบที่สามารถหาได้ง่ายในพื้นที่นั้นๆ มาใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาซึ่งกบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*) ก็เป็นหนึ่งในตัวเลือกนั้นสำหรับการทำวิจัยในประเทศไทย แต่พบว่ายังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาสลบต่างๆ ในกบนาสายพันธุ์ไทย ดังนั้นด้วยข้อมูลต่างๆ ข้างต้นจึงเป็นที่มาของการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาสลบ 3 ชนิด คือ Tricaine methanesulfonate (MS-222) Benzocaine และ Clove oil ซึ่งเป็ดยาสลบที่มีความนิยมใช้มากในสัตว์น้ำ โดยทำการศึกษาระยะเวลาที่เหนียวน้ำให้สลบ (Induction time) ช่วงระยะเวลาการสลบ (Duration time) และระยะเวลาในการฟื้นจากการสลบ (Recovery time) เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการสลบกบนาและเป็นประโยชน์ในงานวิจัยอื่นๆ ต่อไปในอนาคต การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาสลบ 3 ชนิด คือ Tricaine methanesulfonate (MS-222) Benzocaine และ Clove oil ที่ส่งผลต่อการสลบในกบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*)

วิธีการดำเนินงาน

การเตรียมยาสลบสำหรับการทดลอง

สาร Tricaine methanesulfonate (MS-222) ในรูปแบบผง ความเข้มข้นที่ใช้คือ 1,000 ppm โดยสาร MS-222 เมื่อละลายน้ำจะมีสภาพเป็นกรด (pH ประมาณ 4.00-4.30) ดังนั้นจึงต้องปรับค่า pH ให้มีความเป็นกลาง (7.00-7.20) โดยใช้โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) ความเข้มข้น 1 M ส่วน Benzocaine ถูกเตรียมที่ความเข้มข้น 300 ppm โดยสาร Benzocaine จะถูกละลายด้วย 95% Ethanol ให้อยู่ในรูปแบบสารละลายก่อนนำไปใช้ และ Clove oil เตรียมที่ความเข้มข้น 350 ppm เนื่องจาก Clove oil ละลายน้ำได้ไม่ดี ดังนั้นต้องเตรียมสารละลายโดยใช้อัตราส่วน Clove oil ต่อ 95% Ethanol คือ 1:9 เป็นสารละลายตั้งต้นก่อนนำไปใช้

การเตรียมสัตว์ทดลอง

การใช้สัตว์ทดลองได้ผ่านการพิจารณาจาก Mahidol University-Institute Animal Care and Use Committee (MU-IACUC) รหัสโครงการ MU-IACUC 2017/012 กบนามาจากฟาร์มสาธิตการเพาะเลี้ยงที่มีมาตรฐานจำนวน 30 ตัว น้ำหนักเฉลี่ยโดยประมาณเท่ากับ 167.27 ± 35.68 กก.แต่ละตัวจะถูกนำมาตรวจสุขภาพเบื้องต้น ได้แก่ ชั่งน้ำหนัก วัดความยาว ตรวจดูความผิดปกติภายนอก ตรวจนับอัตราการเต้นของหัวใจและอัตราการหายใจ จากนั้นกบทั้งหมดจะถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว โดยแต่ละกลุ่มทดลองในยาต่างชนิดกัน ได้แก่ Tricaine methanesulfonate (MS-222), Benzocaine และ Clove oil ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm, 300 ppm และ 350 ppm ตามลำดับ

วิธีการทดลอง

หลังจากเตรียมตัวสัตว์เรียบร้อยแล้ว จะนำกบใส่ลงในบีกเกอร์ที่มียาสลบ Tricaine methane

sulfonate (MS-222) Benzocaine และ Clove oil ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm (Guenette and Lair, 2006), 300 ppm และ 350 ppm (Carpenter, 2012) ที่ผสมใน น้ำ 200 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร และเริ่มจับเวลาการทดลอง ตรวจวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ อัตราการเต้นของหัวใจ อัตราการหายใจ (Gular sac movement) การใช้สิ่งสัมผัสแตะที่หัวตาเพื่อทดสอบการกระพริบตา (Palpebral blink reflex) การพลิกกบให้อยู่ในท่านอนหงายเพื่อทดสอบการพลิกตัวกลับมาในท่าคว่ำหรือไม่ (Righting reflex) การทดสอบการตอบสนองต่อความเจ็บ เช่น ใช้กรดหยดบริเวณด้านบนของขา (Acetic acid test - AAT) โดยการหยดกรด acetic acid 20 ไมโครลิตร ไปด้านบนของผิวหนังที่บริเวณต้นขาหลัง ใช้ความเข้มข้นที่ 5%, 10%, 20%, และ 50% ตามลำดับ และการใช้ปากคีบหนีบบริเวณขาเพื่อทดสอบการชักขากลับ (Withdrawal reflex) ทำวัด อุณหภูมิ หู และ อุณหภูมิ น้ำ ด้วยค่าพารามิเตอร์ทั้งหมดจะทำการตรวจวัดในเวลาที่ 0, 5, 10, 15,..., ต่อเนื่องไปตลอดจนกว่ากบจะฟื้นจากการสลบ กบที่เข้าสู่ระดับการสลบจะถูกวัดค่าพารามิเตอร์เพื่อจัดเกณฑ์ในการจำแนกระดับการสลบแบ่งเป็นช่วงเหนี่ยวนำการสลบ (Induction time) ช่วงเวลาการสลบ (Duration time) และช่วงการฟื้นจากการสลบ (Recovery time) โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ Righting reflex เป็นเกณฑ์ในการจำแนก ได้แก่

ระดับสุดท้ายของการเหนี่ยวนำสลบ เมื่อทำการทดสอบโดย Righting reflex พบว่ากบไม่มีการพลิกตัวกลับมาในท่านอนคว่ำ (Ventral recumbency) (Righting reflex stage III)

ระดับสุดท้ายของการสลบ เมื่อทำการทดสอบ โดย Righting reflex พบว่ากบมีการพลิกตัวกลับช้ากว่าปกติ หรือมีการตื่นแต่ไม่มีการพลิกกลับ (Righting reflex stage II)

ระดับสุดท้ายของการฟื้นสลบ เมื่อทำการทดสอบทุกพารามิเตอร์ พบว่ากบเข้าสู่สภาวะปกติเหมือนขั้นแรกก่อนนำกบมาทดลอง

ขั้นตอนการตรวจสอบ (Stage of monitoring parameters)

ระยะที่ 1 มีปฏิกิริยาตอบสนองปกติต่อสิ่งกระตุ้น

ระยะที่ 2 มีความล่าช้าในการเกิดปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น

ระยะที่ 3 ไม่มีปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น เมื่อกบเข้าสู่ช่วงการฟื้นจากการนำสลบ (Recovery stage) นำกบไปบ่อพักพื้นที่มีระดับน้ำสูงกว่าระดับพื้นห้อง และให้ออกซิเจนไหลผ่านเพื่อช่วยในการฟื้นจากการนำสลบ และทำการตรวจวัดค่าพารามิเตอร์ทั้งหมดทุกๆ 5 นาที หลังจากพารามิเตอร์ทุกอย่างกลับสู่สภาวะปกติถือเป็นการสิ้นสุดการทดลอง

การคำนวณและการประเมินผล

ระยะเวลาเหนี่ยวนำสลบ (Induction time): ทำการจับเวลาตั้งแต่เริ่มแช่กบในยาสลบ จนถึงเวลาที่พบว่ากบไม่มี Righting reflex

ระยะเวลาการสลบ (Duration time): ทำการจับเวลาตั้งแต่พบว่ากบไม่มี Righting reflex จนกระทั่งกบบวกกลับมามี Righting reflex อีกครั้ง

ระยะเวลาการฟื้น (Recovery time): ทำการจับเวลาตั้งแต่พบว่ากบมี Righting reflex จนกระทั่งพบว่ากบบวกกลับมามี reflex ปกติทั้งหมด

การคำนวณและการวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ จะถูกนำมาทดสอบการกระจายแบบปกติ (Normal distribution) พบว่า ค่าทางสถิติดังกล่าวมีการกระจายตัวแบบอิสระ (free distribution) จึงนำมาวิเคราะห์ตามแบบแผนสถิติไร้พารามิเตอร์ (Non-parametric statistic) ตามวิธี Mann-Whitney test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละพารามิเตอร์ โดยการคำนวณทางสถิติทั้งหมดจะใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS statistics version 20.0 และค่าคำนวณทางสถิติทั้งหมดจะถูกกำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

ผลการทดลอง

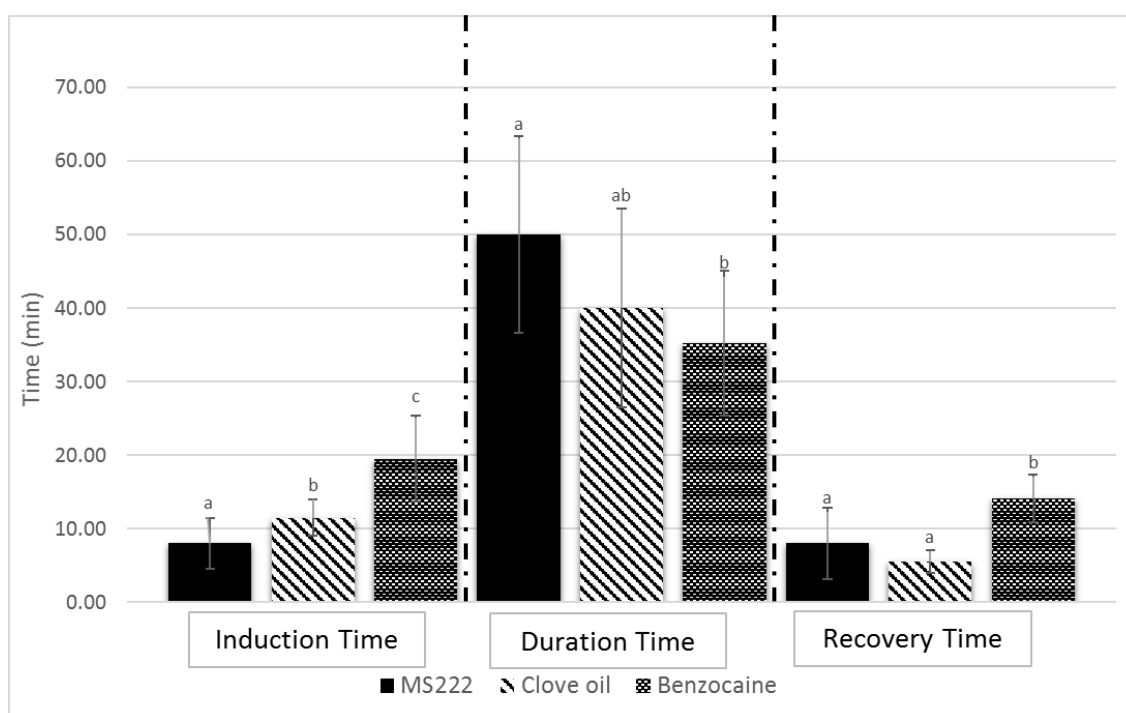
เมื่อพิจารณาระยะเวลาการเหนี่ยวนำการสลบ Tricaine methanesulfonate (MS-222) ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm นั้นให้ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำการสลบสั้นที่สุดที่ 8 ± 3.5 นาที ซึ่งใช้เวลาน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ Clove oil ที่ความเข้มข้น 350 ppm (11.50 ± 2.42 นาที) และ Benzocaine ที่ความเข้มข้น 300 ppm (19 ± 5.85 นาที) ถัดมา Tricaine methanesulfonate (MS-222) ให้ระยะเวลาการสลบที่ 50 ± 13.33 นาที ซึ่งยาวนานกว่า Benzocaine ที่ให้ระยะเวลาการสลบเพียง 35 ± 9.83 นาที อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ Clove oil ที่ใช้เวลาในการสลบ 40 ± 13.52 นาที นั้นพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 1

ในส่วนระยะเวลาการฟื้นจากการสลบ Benzocaine ให้ระยะเวลาในการฟื้นจากการสลบที่ยาวนานที่สุดที่ 14.10 ± 3.25 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับ Tricaine methanesulfonate (MS-222) และ Clove oil ที่ให้ระยะเวลาฟื้นจากการสลบเพียง

8±4.83 นาที และ 5.5±1.58 นาที ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาระหว่าง Tricaine methanesulfonate (MS-222) และ Clove oil พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 1

เมื่อพิจารณาถึงปฏิกิริยาตอบสนองของกบนาในช่วงระหว่างการให้ยาสลบ พบว่ากบที่ได้รับ Tricaine methanesulfonate (MS-222) นั้นมีการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นน้อยมาก จากการตรวจสอบการตอบสนองโดยใช้สิ่งสัมผัสตะบริเวณหัวตาเพื่อดูการกระพริบตา (Palpebral blink reflex) พบว่ากบแต่ละตัวค่อนข้างมีความหลากหลายในการตอบสนอง โดยพบมีการสูญเสียการตอบสนองที่ 10±8.05 นาที ลำดับถัดมา พบกบทุกตัวสูญเสียการตอบสนองต่อการคืบหนีบริเวณขาเพื่อดูการชักขากลับ

(Withdrawal reflex) โดยเริ่มปราศจากปฏิกิริยาตอบสนองที่ 5.5±2.84 นาที และเริ่มกลับมามีปฏิกิริยาตอบสนองอีกครั้งที่ 47.22±19.86 นาที ต่อมาคือการตอบสนองต่อกรดโดยการชักขากลับ (Acetic acid test (AAT) โดยพบว่ากบมีการตอบสนองต่อกรดอยู่ในช่วงความเข้มข้น 5 – 50 % นอกจากนี้ยังพบกบจำนวนหนึ่ง ($n=6$) ปราศจากการตอบสนองต่อกรด ความเข้มข้น 50% ที่เวลา 16.67±10.33 นาที สุดท้ายคือการตอบสนองการพลิกตัวกลับมาในท่าคว่ำหรือไม่ (Righting reflex) พบว่ากบมีการสูญเสียความสามารถในการพลิกตัวกลับที่ 19.50±10.39 นาที และกลับมามี Righting reflex อีกครั้งที่เวลา 46.50±15.47 นาที



รูปที่ 1 แสดงระยะเวลาเฉลี่ยของ Induction time, Duration time และ Recovery time ของ Tricaine methanesulfonate (MS-222), Clove oil และ Benzocaine ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm, 350 ppm และ 300 ppm ตามลำดับ ($n=10$), (Mean±SD) โดยตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)

ในส่วนของ Benzocaine พบมีการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นเป็นบางระยะ โดยเมื่อทำการดู Palpebral blink reflex พบมีการสูญเสียการตอบสนองที่เวลา 20.50 ± 4.38 นาติ โดยกบแต่ละตัวมีแนวโน้มการ สูญเสียปฏิกิริยาที่เวลาไม่ต่างกันมากนัก แต่พบว่าตลอดระยะเวลาการสลบ พบกบกลับมา มีปฏิกิริยา ตอบสนองเป็นระยะ ต่อมาเมื่อดู Withdrawal reflex พบว่ากบไม่มีการชักขากลับที่เวลา 16.00 ± 5.07 นาติ และกลับมามีปฏิกิริยาตอบสนองต่อการคืบหนี อีกครั้งที่เวลา 53.88 ± 15.16 นาติ เมื่อทำการทดสอบโดยวิธี Acetic acid test และสังเกตปฏิกิริยาการชักขากลับ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป กบมีการสูญเสียการตอบสนองต่อกรดที่ระดับความเข้มข้น 5% 10% และ 20% เพิ่มขึ้นตามลำดับความลึกของการสลบ แต่ไม่พบว่ามีกบที่มีการสูญเสียปฏิกิริยาตอบสนองต่อกรดที่ความเข้มข้นเหนือกว่า 20% ขึ้นไป ลำดับสุดท้ายเมื่อดู Righting reflex พบกบสูญเสียความสามารถในการพลิกตัวกลับมาที่เวลา 22.50 ± 5.40 นาติ และกลับมามี Righting reflex อีกครั้งที่เวลา 50.00 ± 13.12 นาติ

ส่วน Clove oil พบว่ายังมีการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นในระดับต่ำตลอดระยะเวลาการสลบ โดยพิจารณา ดู Palpebral blink reflex พบมีการสูญเสียการตอบสนองที่เวลา 17.00 ± 4.47 นาติ (n=5) แต่พบว่ากบอีกจำนวนหนึ่ง (n=5) ไม่พบการสูญเสีย Palpebral blink reflex โดยยังคงพบว่ามี การตอบสนองต่อก้านสำลีสที่สัมผัสบริเวณตาตลอดช่วงเวลาที่ทดลอง ส่วนการทดสอบ Withdrawal reflex พบกบสูญเสียปฏิกิริยาชักขากลับค่อนข้างเร็วที่เวลา 7.22 ± 5.65 นาติ และพบกบกลับมามีปฏิกิริยาตอบสนองเร็วเช่นกันที่ เวลา 20.00 ± 7.07 นาติ เมื่อทำการทดสอบ Acetic acid test และ

สังเกตปฏิกิริยาการชักขากลับ พบว่ากบจำนวน ครึ่งหนึ่ง (n = 5) มีการตอบสนองต่อกรดที่ความเข้มข้น 5% ตลอดช่วงเวลาการให้ยาสลบ และกบอีก ครึ่งหนึ่ง (n = 5) พบว่ามีการตอบสนองต่อกรดที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นไป 10%, 20% และ 50% ที่เวลา 5-15 นาติโดยเฉลี่ย และกลับมามีการตอบสนองต่อกรดที่ความเข้มข้น 5% อีกครั้งจนกระทั่งถึงเวลาสิ้นสุด การสลบ สุดท้ายเมื่อพิจารณา ดู Righting reflex พบว่า กบมีการสูญเสียความสามารถในการพลิกตัวกลับ ที่เวลา 17.50 ± 4.25 นาติ และกลับมามีปฏิกิริยาตอบสนองอีกครั้งที่เวลา 38.00 ± 12.29 นาติ และพบว่าเกิดการระคายเคืองที่ผิวหนังบริเวณใต้ท้อง

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่า Tricaine methane sulfonate (MS-222) ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm นั้นให้ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำการสลบสั้นที่สุดและให้ระยะเวลาการสลบที่นานที่สุด อีกทั้งการตอบสนองการต่อกระตุ้น (reflex) ต่างๆ พบว่ากบที่ถูกวางยาสลบด้วย Tricaine methanesulfonate (MS-222) จะมีการสิ้นสุดการตอบสนองต่อทุกการกระตุ้นเร็วที่สุดในช่วงเหนี่ยวนำการสลบ และไม่มี การปรากฏการตอบสนองใดๆ ตลอดช่วงที่สลบ เมื่อเปรียบเทียบกับ Benzocaine ความเข้มข้น 300 ppm และ Clove oil ความเข้มข้น 350 ppm ดังนั้น Tricaine methanesulfonate (MS-222) ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm จึงมีความเหมาะสมสำหรับการทำสลบในกบนาเพื่อทำหัตถการต่างๆ ที่ต้องใช้ระยะเวลานาน และอาจก่อให้เกิดความเจ็บปวดมาก เช่นการผ่าตัด (Downes, 1995) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาในกบสายพันธุ์ Leopard frog

(*Rana pipiens*) ที่ความเข้มข้นของ MS-222 ที่ 1,000 ppm (1 กรัม/ลิตร) พบว่าให้ผลดีที่สุดในการขจัดพิษที่สามารถทำสลบและคล้ยกรรมได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ Clove oil (255 มิลลิกรัม/ลิตร), Benzocaine cream (11.5 มิลลิกรัม; Orajel® cream), Lidocaine: Prilocaine (60 มิลลิกรัม อัตราส่วน 1:1 Emal® cream) (Guenette and Lair, 2006) แต่อย่างไรก็ตาม Tricaine methane sulfonate (MS-222) มีราคาค่อนข้างสูง

ในส่วนของ Clove oil ความเข้มข้น 350 ppm ให้ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำการสลบที่สั้น และให้ระยะเวลาการสลบนานในระดับกลาง แต่จะให้ระยะเวลาการฟื้นสลบที่เร็วที่สุด และในส่วนของการทดสอบการตอบสนองพบว่ายังมีการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นในระดับต่ำตลอดระยะเวลาการสลบ นอกจากนี้การแช่ด้วย Clove oil พบว่าผิวหนังบริเวณด้านท้องที่สัมผัสกับสารละลายสลบมีสีแดง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในกบ African Clawed frog (*Xenopus laevis*) หลังจากวางยาสลบด้วย Eugenol สามารถพบอาการผิวหนังลอกหลุด และมีเนื้อตายได้ (Ross et al., 2006) ดังนั้นการใช้ Clove oil ความเข้มข้น 350 ppm จึงเหมาะกับการทดลองหรือหัตถการที่ต้องใช้ระยะเวลานั้นๆ และไม่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดมาก เช่น การทำสลบเพื่อตรวจสุขภาพ การเอ็กซเรย์ เป็นต้น (Stetter, 2001) ซึ่งการใช้ Clove oil มีสาระสำคัญคือ Eugenol นั้นให้ผลในทิศทางเดียวกันกับการวางยาสลบกับสายพันธุ์ African clawed frogs (*Xenopus laevis*) ด้วย Eugenol 350 ppm (350 มิลลิกรัม/ลิตร) พบว่าสามารถสลบกบชนิดนี้ได้เพื่อการทำหัตถการสั้นๆ เท่านั้น (Goulet et al., 2010; Guénette et al., 2007)

Benzocaine ความเข้มข้น 300 ppm ให้ระยะเวลาการการเหนี่ยวนำการสลบที่นานที่สุด ให้ระยะเวลาการสลบที่สั้นที่สุด ให้ระยะเวลาการฟื้นสลบที่นานที่สุด และไม่พบว่ามีกบตัวใดที่มีการสูญเสียปฏิกิริยาตอบสนองต่อกรดที่ความเข้มข้นมากกว่า 20% อีกทั้งในขณะที่ทำการทดลองพบว่ากบมักหยุดหายใจในช่วงสลบ ดังนั้น Benzocaine ความเข้มข้น 300 ppm ไม่เหมาะกับการทำสลบกบเพื่อทำหัตถการที่ต้องใช้ระยะเวลานานและที่ก่อให้เกิดความเจ็บปวด โดยเฉพาะการผ่าตัด สอดคล้องกับการศึกษาการใช้ Benzocaine 200 ppm (200 มิลลิกรัม/ลิตร), MS-222 200 ppm (200 มิลลิกรัม/ลิตร) และ Pentobarbital 300 ppm (300 มิลลิกรัม/ลิตร) ในกบสายพันธุ์ Leopard frog (*Rana pipiens*) ซึ่งผลการทดลองพบว่า Benzocaine มีผลกระทบทำให้เกิดการหยุดหายใจในกบ และ Pentobarbital มีอัตราการหายใจลดลงมาก จึงจำเป็นต้องมีการช่วยฟื้นจากการสลบ ส่งผลทำให้ไม่ปรากฏช่วงเวลาในการฟื้นสลบจากยาทั้งสองชนิดเมื่อเปรียบเทียบกับยา MS-222 พบมีการเหนี่ยวนำสลบที่ดีกว่าและสามารถฟื้นจากการนำสลบได้ราบรื่นกว่าโดยไม่พบการหยุดหายใจ (Cakir and Strauch, 2005)

เมื่อเปรียบเทียบปฏิกิริยาต่อการตอบสนองการกระตุ้น (reflex) ต่อการกระตุ้นด้วยยาสลบทั้งสามชนิด ในส่วนของ Palpebral blink reflex พบว่า MS-222 พบว่าปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นสั้นที่สุด ถัดมาคือ Clove oil แต่พบว่ากบมีการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นเป็นช่วง ๆ ตลอดระยะเวลาที่ได้รับยาสลบ ซึ่งแตกต่างจากกบสายพันธุ์ Leopard frog (*Rana pipiens*) (Lafortune, et al., 2001) และลำดับสุดท้ายคือ Benzocaine ถึงแม้ว่า

จะมีการสูญเสียการตอบสนอง Palpebral blink reflex ต่อสิ่งกระตุ้นที่ซ้ำที่สุด แต่ไม่พบการตอบสนองนี้ตลอดระยะเวลาการได้รับยาสลบ สอดคล้องกับการศึกษาในกบสายพันธุ์ Clawed frog (*Xenopus laevis*) (Smith, et al., 2018)

เมื่อเปรียบเทียบการเกิด Withdrawal reflex พบว่า MS-222 นั้นสูญเสียปฏิกิริยาตอบสนองเร็วที่สุด ถัดมาคือ Clove oil แต่ก็พบว่ากบที่ได้รับ Clove oil กลับมามีปฏิกิริยาตอบสนองต่อการใช้ปาก คีบหนีบเร็วที่สุด เป็นไปได้ว่าการใช้ Clove oil ลดการตอบสนองต่อความเจ็บปวดได้น้อยมากจนอาจจะไม่สามารถลดการตอบสนองต่อความเจ็บปวดได้ซึ่งแตกต่างจากการใช้ MS-222 ที่สามารถลดการเจ็บปวดได้ (Ramlochansingh, et al., 2014) ในการลำดับสุดท้ายคือ Benzocaine ที่มีฤทธิ์ให้กบสูญเสียปฏิกิริยาตอบสนองได้ช้าที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบ Acetic acid test ต่อปฏิกิริยาการชัก ขากลับ พบว่ากบที่ได้รับ MS-222 มีแนวโน้มว่าสามารถทนต่อการตอบสนองความเจ็บที่ระดับสูงที่สุด โดยพบกบจำนวน 6 ตัว (n=10) ไม่มีการตอบสนองต่อกรดที่ความเข้มข้น 50% ในขณะที่ Clove oil พบว่ากบมีการตอบสนองต่อกรดที่ความเข้มข้นระดับต่ำ โดยร้อยละ 50 ของจำนวนกบ มีการตอบสนองต่อกรดความเข้มข้นมากที่สุดที่ 5% ตลอดระยะเวลาการทดลอง และพบกบอีกครั้งหนึ่งมีการตอบสนองต่อกรดความเข้มข้นที่สูงกว่านั้น (10%, 20% และ 50%) แต่ก็พบเพียงช่วงเวลาสั้นๆ ประมาณ 5-15 นาทีเท่านั้น ซึ่งแสดงว่า Clove oil ลดความเจ็บปวดได้น้อยเมื่อเทียบกับ MS-222 และ สอดคล้องกับการตรวจปฏิกิริยาตอบสนอง Withdrawal reflex สุดท้าย Benzocaine พบกบมีการตอบสนองต่อความเข้มข้นกรดแปรผันตามระดับ

ความลึกของการสลบ แต่พบว่าแนวโน้มเพิ่มการตอบสนองต่อกรดที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นค่อนข้างมีความหลากหลาย (Smith, et al., 2018)

ลำดับสุดท้าย เมื่อพิจารณา Righting reflex พบว่า Clove oil มีการสูญเสียปฏิกิริยาการพลิกกลับ ในระยะเวลาที่สั้นที่สุด แต่ก็พบว่ากบกลับมามีความสามารถในการพลิกตัวกลับเร็วที่สุดเช่นกัน ลำดับถัดมาคือ MS-222 และ สุดท้ายคือ Benzocaine พบว่ายาทั้งสองให้ช่วงเวลาในการสูญเสียการพลิกตัวกลับไม่แตกต่างกันมาก ต่อมาเพื่อพิจารณาค่าใช้จ่ายของยาสลบแต่ละชนิด พบว่า Clove oil นั้นราคาถูกที่สุด โดยมีราคาเฉลี่ย 5 บาท ต่อ 1 มิลลิลิตร ลำดับถัดมาได้แก่ Benzocaine ราคาเฉลี่ย 20 บาทต่อ 1 มิลลิลิตร และท้ายที่สุดคือ MS-222 ราคาเฉลี่ย 200 บาทต่อ 1 กรัม ซึ่งในการทดลองครั้งนี้เมื่อนำมาคำนวณค่าใช้จ่ายในส่วนของยาสลบที่ใช้พบว่า Clove oil ความเข้มข้น 350 ppm ใช้ไปทั้งสิ้น 7 มิลลิลิตร ต่อตัว รวมค่าใช้จ่ายสำหรับ Clove oil คือ 35 บาท ในขณะที่ Benzocaine ความเข้มข้น 300 ppm ใช้ไปทั้งสิ้น 6 มิลลิลิตรต่อตัว รวมค่าใช้จ่ายสำหรับ Benzocaine คือ 120 บาท และ สุดท้าย MS-222 ความเข้มข้น 1,000 ppm ใช้ไปทั้งสิ้น 0.2 g ต่อตัวรวมรวมค่าใช้จ่ายสำหรับ MS-222 คือ 400 บาท และกล่าวโดยสรุปคือ กบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*) สามารถสลบได้โดยการใช้ยาสลบทั้งสามชนิดนี้ หากแต่การเลือกใช้ยาสลบชนิดไหนก็ต้องขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์เป็นสำคัญรวมถึง ระยะเวลาการเหนี่ยวนำการสลบ ระยะเวลาการสลบ และระยะเวลาการฟื้นสลบที่ต้องการ ซึ่งในปัจจุบันรูปแบบการให้ยาสลบในกบนั้นค่อนข้างหลากหลายนอกจากการแช่แล้วยังมีการให้ยาสลบผ่านทางผิวหนังโดยตรง ผ่านทางช่องท้อง

หรือการดมยาสลบ ไม่ว่าจะให้ยาสลบในรูปแบบใดก็ตามสิ่งสำคัญคือการมีวิธีการติดตามประเมินสัตว์ตลอดระยะเวลาสลบที่ดี และลดข้อแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้นได้จากการวางยาสลบให้มากที่สุด (Mitchell, 2009)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดราชบุรี ที่สนับสนุนสัตว์ทดลองและสถานที่ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ หน่วยวิจัยและดูแลสุขภาพสัตว์น้ำทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับสารเคมี เครื่องมือและอุปกรณ์

เอกสารอ้างอิง

- Baorong, G. and C. Mingzhang. 1994. A Study of the Feeding and Breeding Habits of *Rana tigerina rugulosa*. J. Fujian. Teachers Univ. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotat-FJSZ403.016.htm
- Cakir, Y. and S. M. Strauch. 2005. Tricaine (MS-222) is a safe anesthetic compound compared to benzocaine and pentobarbital to induce anesthesia in leopard frogs (*Rana pipiens*). Pharmacol. Rep. 57: 467-474.
- Carpenter, J. W. 2013. Exotic Animal Formulary. 4th ed. Elsevier Health Sciences. 63-66.
- Downes, H. 1995. Tricaine anesthesia in Amphibia: a review. Bull. Assoc. Rep. Amp. Vet. 5: 11-16.
- Goulet, F., P. Hélie, and P. Vachon. 2010. Eugenol anesthesia in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) of different body weights. J. AM. Assoc. Lab. Ani. Sci. 49: 460-463.
- Goulet, F., P. Vachon, and P. Helie. 2011. Evaluation of the toxicity of eugenol at anesthetic doses in African clawed frogs (*Xenopus laevis*). Toxicol. Pathol. 39: 471-477.
- Guénette, S. A., P. Hélie, F. Beaudry, and P. Vachon. 2007. Eugenol for anesthesia of African clawed frogs (*Xenopus laevis*). Vet. Anaesth. Analg. 34: 164-170.
- Guenette, S. A., Lair, S. 2006. Anesthesia of the leopard frog, *Rana pipiens*: a comparative study between four different agents. J. Herpetol. Med. Sur. 16: 38-44.
- Javahery, S., H. Nekoubin, and A. H. Moradlu. 2012. Effect of anesthesia with clove oil in fish. Fish. Physiol. Biochem. 38: 1545-1552.
- Lalonde-Robert, V., F. Beaudry, and P. Vachon. 2012. Pharmacologic parameters of MS-222 and physiologic changes in frogs (*Xenopus laevis*) after immersion at anesthetic doses. J. AM. Assoc. Lab. Ani. Sci. 51: 464-468.
- Mitchell, M. A. 2009. Anesthetic considerations for amphibians. J. Exot. Pet. Med. 18: 40-49.

- Ramlochansingh, C., F. Branoner, B. P. Chagnaud, and H. Straka. 2014. Efficacy of tricaine methanesulfonate (MS-222) as an anesthetic agent for blocking sensory-motor responses in *Xenopus laevis* tadpoles. PLoS One. 9: e101606. doi: 10.1371/journal.pone.0101606.
- Ross, A., S. A. Guenette, P. Helie, and P. Vachon. 2006. Case of cutaneous necrosis in African clawed frogs *Xenopus laevis* after the topical application of eugenol. Can. Vet. J. 47: 1115-1117.
- Smith, B. D., K. J. Vail, G. L. Carroll, M. C. Taylor, N. D. Jeffery, T. H. Vemulapalli, and J. J. Elliott. 2018. Comparison of etomidate, benzocaine, and MS222 anesthesia with and without subsequent flunixin meglumine analgesia in African clawed frogs (*Xenopus laevis*). J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 57: 202-209.
- Steetter, M. D. 2001. Fish and amphibian anesthesia. Vet. Clin. North. Am. Exot. Anim. Pract. 4: 69-82.
- Topic Popovic, N., I. Strunjak-Perovic, R. Coz-Rakovac, J. Barisic, M. Jadan, A. Persin Berakovic, and R. Sauerborn Klobucar. 2012. Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia. J. Appl. Ichthyol. 28: 553-564.

