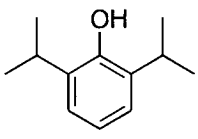
บทที่ 1

บทนำ

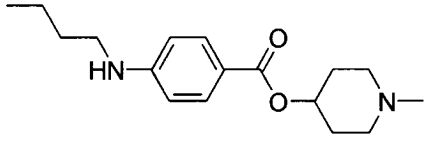
1.1 ที่มาของปัญหา

อุตสาหกรรมการส่งออกสัตว์น้ำ ไม่ว่าจะเป็นกุ้งสด ปลาสด สัตว์น้ำประเภทครัสเตเชีย รวมทั้งปลาสวยงามหรือพันธุ์ปลาชนิดต่างๆ นับเป็นอุตสาหกรรมหนึ่งที่มีความสำคัญในระดับประเทศ โดยเฉพาะการส่งออกสัตว์น้ำเพื่อการบริโภค โดยข้อมูลจากศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร โดยความร่วมมือจากกรมศุลกากร ได้รายงานมูลค่าการส่งออกสินค้าสำคัญในปี 2551 ได้แก่ ปลาสด แช่เย็น แช่แข็ง มูลค่า 8,953 ล้านบาท กุ้งสด แช่เย็น แช่แข็ง มูลค่า 42,755 ล้านบาท ปลาหมึกสด แช่เย็น แช่แข็ง มูลค่า 12,531 ล้านบาท สัตว์น้ำประเภทครัสเตเชีย มูลค่า 3,420 ล้านบาท ปลามีชีวิตและพันธุ์ปลา มูลค่า 894 ล้านบาท [1] การส่งออกดังกล่าวในเชิงพาณิชย์ต้องคำนึงถึงคุณภาพของสินค้าทั้งในด้านกายภาพและชีวภาพ เพื่อตอบรับต่อความต้องการของผู้บริโภค เช่น สภาพความสดใหม่ของสินค้า ปลอดจากโรคและสารปนเปื้อน มีคุณภาพผ่านมาตรฐานที่ประเทศคู่ค้ากำหนด ในปัจจุบัน การส่งออกสัตว์น้ำมีชีวิตและพันธุ์ปลาสวยงามหรือปลาหายาก ไม่ว่าจะเพื่อการบริโภค หรือเพื่อการเพาะเลี้ยง เป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับการส่งออกสัตว์น้ำในลักษณะแช่เย็นหรือแช่แข็ง ในกรณีเพื่อการบริโภคเชื่อกันว่าสัตว์น้ำที่ยังมีชีวิต จะสามารถรักษาคุณภาพความสดและโภชนาการของสินค้าได้ดีกว่า และมีรสชาติดีกว่าสินค้าแช่เย็น และแช่แข็ง อย่างไรก็ตามเนื่องจากจะต้องผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น การคัดเลือกคุณภาพ การให้วัคซีนหรือยาบางชนิด รวมทั้งกระบวนการขนส่ง อาจทำให้เกิดภาวะเครียดอันไม่พึงประสงค์ขึ้นในสัตว์น้ำได้ ซึ่งมีผลทำให้สัตว์ดังกล่าว ไม่มีชีวิตชีวา อ่อนแอ มีความต้านทานโรคต่ำลง จนกระทั่งเจ็บป่วยและเสียชีวิตได้ แนวทางในการแก้ไขแนวทางหนึ่งคือการใช้สารที่ออกฤทธิ์เป็นสารบรรเทาความเจ็บปวด ยาชาเฉพาะที่ หรือยาสลบ เพื่อลดสภาวะเครียดให้ลดน้อยลงในระหว่างกระบวนการขนส่ง ตัวอย่างสารประเภทนี้บางชนิด ได้แก่ tricane methanesulfonate (Finquel หรือ MS222), metomidate, benzocaine, ketamine hydrochloride, quinaldine sulfate, propanidid, phenoxyethanol และ clove oil ดังแสดงโครงสร้างใน**ภาพ 1.1** สารเหล่านี้บางชนิดได้ถูกนำมาใช้เป็นยาชาเฉพาะที่หรือยาสลบในสัตว์น้ำชนิดต่างๆ เช่น ปลาเรนโบว์เทร้าท์ (rainbow trout) [2], ปลาแซลมอนแอตแลนติก (atlantics salmon) [3], ปลาซิลเวอร์เพิร์ช (silver perch) [4], ปลาไน (common carp) [5], ปลา fathead minnows [6], และปลาหมึก (common octopus) [7] เป็นต้น โดยเฉพาะ MS222 เป็นสารเพียงชนิดเดียวที่ผ่านการรับรองโดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA) ส่วนสารชนิดอื่นๆ ที่ใช้นั้นยังไม่มีรายงานการรับรองดังกล่าว ในขณะที่ยูจีนอล (2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol) นั้นเป็นน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากพืชธรรมชาติ เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันที่สกัดได้จากดอกกานพลู (*Eugenia caryophyllus Bullock & Harrison MYRTACEAE*) ซึ่งมีรายงานว่ามีฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่ (local anesthetic) [2-7] ในตำรายาไทยใช้ดอกตูมแห้งแก้ปวดฟัน โดยใช้ดอก 5-8 ดอก

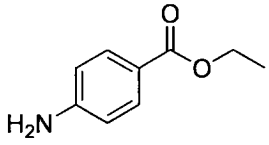
แช่เหล้าเอาสำลีชุบอุดรูฟัน นอกจากนี้ยังใช้ผสมในยาอมบ้วนปาก ดับกลิ่นปาก [8] และได้รับการรายงานว่าเป็นสารที่มีความปลอดภัย (generally regarded as safe) [9] นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้เตรียมสารชนิดนี้เป็นยาสลบในสัตว์น้ำของ ผศ. ดร. ดวงดาว ฉันทศาสตร์ ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้คิดค้นตำรับยาสลบสัตว์น้ำจากน้ำมันกานพลู ซึ่งมีสารยูจีนอลเป็นส่วนประกอบหลัก โดยมีคุณสมบัติเป็นยาสลบปลาได้แทนสารเคมีอันตราย และได้พัฒนาน้ำมันกานพลูให้เป็นผลิตภัณฑ์ สำหรับใช้เป็นยาสลบสัตว์น้ำได้ประมาณ 10 ชั่วโมง เพื่อทดแทนสารเคมีที่ก่อให้เกิดปัญหาสารตกค้างในชุดโครงการ "การจัดการผลผลิตสัตว์น้ำและพืชน้ำ" และ "การใช้สมุนไพรในการผลิตสัตว์" ของสกว. ฝ่ายเกษตร ดังนั้นผู้วิจัยจึงเห็นว่าสารในกลุ่มของยูจีนอลน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ในการประยุกต์ใช้เป็นยาชาเฉพาะที่หรือยาสลบในสัตว์น้ำ เนื่องจากว่ายูจีนอลเป็นสารสกัดจากธรรมชาติมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์ สามารถหาได้ง่ายในประเทศไทย และมีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อนจึงน่าจะสามารถทำการสังเคราะห์ยูจีนอล และปรับปรุงโครงสร้างเพื่อให้ได้อนุพันธ์ของมันได้ไม่ยากนัก โดยคาดว่าการปรับปรุงโครงสร้างบางส่วนของยูจีนอลจะได้อนุพันธ์ที่มีผลต่อสมบัติการเป็นสารบรรเทาความเจ็บปวด ยาชาเฉพาะที่หรือยาสลบต่อสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่ให้ประสิทธิภาพแตกต่างกัน



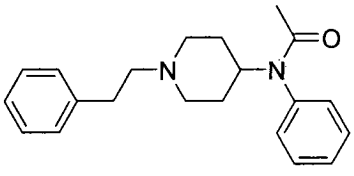
Propofol



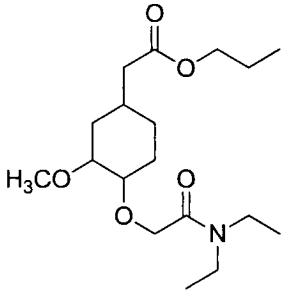
Paridocain



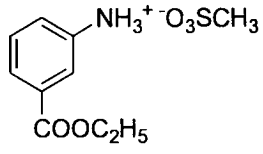
Benzocaine



Fentanyl

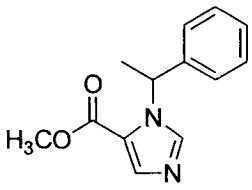


Propanidid

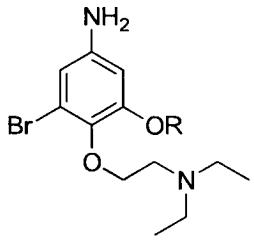


tricane methanesulfonate

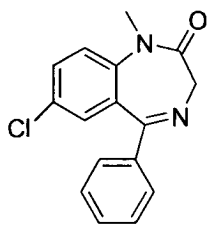
(MS222)



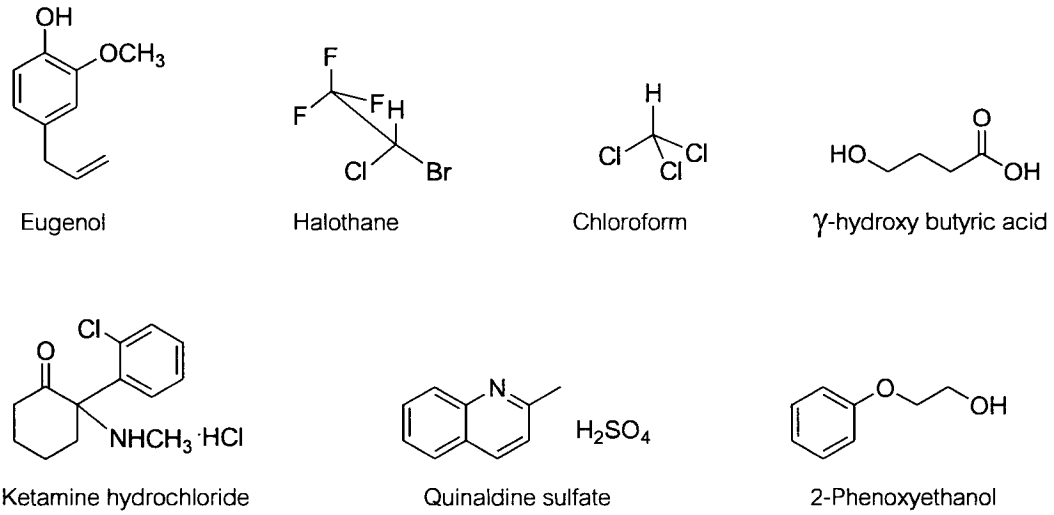
Metomidate



Procaine derivatives



Diazepam (Valium)



ภาพ 1.1 ตัวอย่างโครงสร้างของยาชาเฉพาะที่ หรือยาสลบบางชนิด

งานวิจัยนี้สนใจศึกษาวิธีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอลจากอนุพันธ์ของสารประเภทฟีนอลและอื่นๆ โดยทำปฏิกิริยากับแอลลิลเฮไลด์ ด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดต่างๆ แนวทางในการออกแบบโมเลกุลต้องการให้สารอนุพันธ์มีส่วนที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน และส่วนที่เป็นไฮโดรโฟบิก เพื่อให้เกิดอันตรกิริยากับนิวโรทรานสมิตเตอร์รีเซพเตอร์ ดังที่เคยมีรายงานไว้โดย Sandorfy [10] โดยคาดว่าสารประเภทนี้น่าจะสามารถนำไปใช้เป็นสารออกฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่ในอุตสาหกรรมการขนส่งสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีชีวิตได้ ซึ่งผลเบื้องต้นนี้จะสามารถนำไปต่อยอดในงานวิจัยเพื่อหาฤทธิ์ในการใช้เป็นยาชาหรือยาสลบในสัตว์น้ำต่อไป ถ้าได้ผลของการออกฤทธิ์ที่ยาวนานขึ้น ก็จะสามารถลดต้นทุนในการนำเข้ายาชาหรือยาสลบจากต่างประเทศ หรือผลิตเป็นสารสำคัญในเชิงพาณิชย์ต่อไปได้

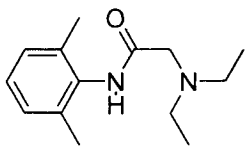
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review) และเอกสารอ้างอิง

- ข้อมูลทางเภสัชวิทยาของสารที่ออกฤทธิ์สลบปลา

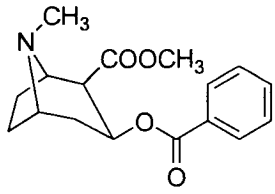
ยาชา (Local anesthetic agents) [11] เป็นยาที่ยับยั้งการนำกระแสไฟฟ้าผ่านผนังของเส้นประสาทและกล้ามเนื้อ โมเลกุลของยาชาที่ใช้ในมนุษย์มักประกอบด้วย aromatic ring ต่อกับส่วน tertiary amine ด้วย intermediate chain ซึ่งอาจเป็นกลุ่มเอสเทอร์ หรือเอไมด์ จึงจัดเป็นยาชากลุ่ม aminoester หรือ aminoamide ส่วนที่เป็น aromatic ring เป็นส่วนที่ละลายไขมันได้ดี (lipophilic) ในขณะที่ส่วน tertiary amine เป็นส่วนที่ละลายน้ำได้ดี (hydrophilic)

ความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างกับการออกฤทธิ์ของยา [12] ที่มีการใช้ในทางคลินิกประกอบด้วย

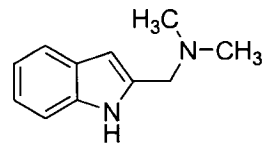
1. อะตอมของคาร์บอน sp^2 ซึ่งมีหมู่แอลคิลและหมู่เอริลเชื่อมต่อโดยตรง หรือผ่าน heteroatom ดังปรากฏในโครงสร้างของยาชากลุ่ม lidocaine
2. ถ้าหมู่เอริลเชื่อมต่อโดยตรงกับอะตอมคาร์บอน sp^2 ดังปรากฏในโครงสร้างของยาชากลุ่มโคเคน ฤทธิ์ทำให้ชาสัมพันธ์กับหมู่แอลคิลที่มาต่อ
3. ถ้าหมู่แอลคิลเชื่อมต่อโดยตรงกับอะตอมคาร์บอน sp^2 ดังปรากฏในโครงสร้างของยาชากลุ่มไอโซกรามีน ฤทธิ์ทำให้ชาต้องการการจับของหมู่เอริลผ่านตัวเชื่อมไนโตรเจน



Lidocaine



Cocaine



Isogramine

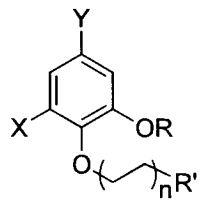
อย่างไรก็ตาม การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างกับการออกฤทธิ์ของยาชานี้โดยส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษายาชาสำหรับใช้ในมนุษย์ ยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างกับการออกฤทธิ์ของยาชาในสัตว์น้ำ โดยยูจีนอลเป็นยาชาเฉพาะที่ชนิดหนึ่งซึ่งสามารถใช้ในมนุษย์ได้ ในขณะเดียวกันพบว่าสามารถออกฤทธิ์กับสัตว์น้ำได้เช่นกัน ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างกับการออกฤทธิ์ของยาชาในสัตว์น้ำ โดยเริ่มต้นจะทำการดัดแปลงให้ได้อนุพันธ์ของยูจีนอลในส่วนต่างๆ โดยอิงข้อมูลบางส่วนจากอนุพันธ์ของยาชาต่างๆ ที่ใช้ในมนุษย์

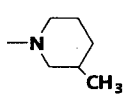
สำหรับสารยูจีนอล อนุพันธ์ของยูจีนอล และสารกลุ่มอัลคอกซีอะนิลีน (alkoxyaniline) ได้ถูกสังเคราะห์และนำมาทดสอบฤทธิ์ทางยาทั้งที่ใช้เป็นยาชาเฉพาะที่ ยาสลบในสัตว์น้ำ รวมทั้งความเป็นพิษ ดังงานวิจัยที่รวบรวมต่อไปนี้

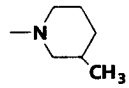
ในปี ค.ศ. 1961 R. O. Clinton และคณะ [13] สนใจศึกษาสารที่มีฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่และยาสลบโดยต้องการหาสารที่ให้ประสิทธิภาพที่ดีกว่า procaine ซึ่งเป็นยาสลบที่นิยมใช้ กลุ่มวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารในกลุ่ม alkoxy-dialkylaminoalkoxyanilines โดยสังเคราะห์อนุพันธ์ทั้งหมด 16 ตัว (สาร **1-16**) และนำไปศึกษาฤทธิ์ยาสลบกับหมู (anaesthetic activity) ศึกษาความเป็นพิษกับหนู (toxicity) และศึกษาการระคายเคืองกับกระต่าย (irritancy) ผลที่ได้พบว่ามีสาร 2 ชนิดคือ **7** กับ **8** เท่านั้นที่ให้ประสิทธิภาพด้อยกว่า procaine ส่วนสารอื่นๆ ที่เหลือมีประสิทธิภาพดีกว่า การศึกษาผลของโครงสร้างที่มีต่อฤทธิ์เป็นยาสลบกับความเป็นพิษได้ข้อสรุปดังนี้

1. ผลของความยาวของโซ่ข้างที่ตำแหน่ง 5-alkoxy (สาร **1-5**) พบว่าความยาวของโซ่ข้างที่เพิ่มขึ้นจะเพิ่มทั้งฤทธิ์ของยาสลบและความเป็นพิษ โดยให้ประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น 3.5 เท่าและ 60 เท่าสำหรับหมู่ methoxy และหมู่ hexoxy ตามลำดับ

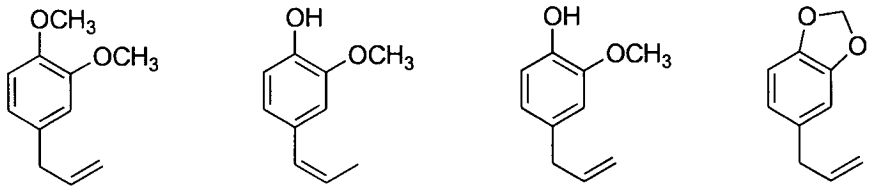
2. การแทนที่หมู่ $-NH_2$ ด้วย $-NHCOCH_3$ ทำให้ฤทธิ์เป็นยาสลบและความเป็นพิษลดลงอย่างมาก
3. การแทนที่หมู่ Br บนวงเบนซีนด้วย Cl (สาร **1** กับ **9** และ **2** กับ **10**) ไม่มีผลต่อฤทธิ์การเป็นยาสลบ



หมายเลขสาร	โครงสร้าง				
	Y	X	R	*n*	R'
1	$-NH_2$	Br	$-CH_3$	2	$-N(C_2H_5)_2$
2	$-NH_2$	Br	$-C_2H_5$	2	$-N(C_2H_5)_2$
3	$-NH_2$	Br	$-C_3H_7$	2	$-N(C_2H_5)_2$
4	$-NH_2$	Br	$-C_4H_9$	2	$-N(C_2H_5)_2$
5	$-NH_2$	Br	$-C_6H_{13}$	2	$-N(C_2H_5)_2$
6	$-NH_2$	Br	$-CH_2C_6H_5$	2	$-N(C_2H_5)_2$
7	$-NHCOCH_3$	Br	$-C_2H_5$	2	$-N(C_2H_5)_2$
8	$-NHCOCH_3$	Cl	$-CH_3$	2	$-N(C_2H_5)_2$
9	$-NH_2$	Cl	$-CH_3$	2	$-N(C_2H_5)_2$
10	$-NH_2$	Cl	$-C_2H_5$	2	$-N(C_2H_5)_2$
11	$-NH_2$	Cl	$-CH_3$	2	$-N(CH_3)_2$
12	$-NH_2$	Cl	$-CH_3$	3	$-N(CH_3)_2$
13	$-NH_2$	Cl	$-CH_3$	3	$-N(C_2H_5)_2$
14	$-NH_2$	Cl	$-CH_3$	2	

15	$-NH_2$	Cl	$-CH_3$	3	
16	$-NH_2$	Cl	$-C_2H_5$	3	$-N(C_2H_5)_2$

ในปี ค.ศ. 2000 I. G. Sipes และคณะ [14] ได้ศึกษาสาร 4 ชนิด ได้แก่ eugenol, methyleugenol, isoeugenol และ safrole ในด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ซึ่งใช้วิธีวัดการปลดปล่อยสาร lactate dehydrogenase (LDH) และความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม (genotoxicity) ซึ่งใช้วิธี unscheduled DNA synthesis (UDS) assay โดยทำการทดลองกับหนู ผลการทดลองพบว่า methyleugenol และ safrole ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่เป็นสาเหตุทำให้เกิด UDS ที่ความเข้มข้นระหว่าง 10 – 500 μM ส่วน isoeugenol และ eugenol พบว่าเป็นพิษต่อเซลล์โดยค่า LC_{50}s พบที่ประมาณ 200-300 μM แต่ไม่ทำให้เกิด UDS นอกจากนี้เมื่อทดลองกระตุ้นทางชีวภาพ (bioactivation) ด้วยสาร methyleugenol และ safrole พบว่าสารทั้งสองมีแนวโน้มเป็นพิษต่อเซลล์และเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมเพิ่มขึ้น



Methyleugenol Isoeugenol Eugenol Safrole

ภาพ 1.2 โครงสร้างของ methyleugenol, isoeugenol, eugenol และ safrole

ในปี ค.ศ. 2004 M. A. Kildea และคณะ [4] ทำการตรวจวัดการสะสมและการหายไปของสาร eugenol ในเนื้อเยื่อปลาซิลเวอร์เพิร์ชหลังถูกทำให้สลบ ผลจากการศึกษาพบว่าการทำให้ปลาสลบในครั้งแรกด้วยน้ำมันกานพลู (clove oil) หลังการฟื้นสลบปลาเป็นเวลา 48 ชั่วโมงสามารถกำจัดสาร eugenol ออกจากเนื้อเยื่อปลาให้อยู่ในระดับที่ตรวจวัดไม่พบ แต่เมื่อปลาถูกทำให้สลบเป็นครั้งที่สอง แม้ว่าจะทำการฟื้นสลบปลาเป็นเวลา 1 อาทิตย์พบว่ายังสามารถตรวจพบสาร eugenol ในเนื้อเยื่อปลาที่ค่าเฉลี่ย 0.32 $mg.kg^{-1}$ นอกจากนี้การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการสะสมและการหายไปของ eugenol ในการทดลองมีการใช้สาร 2 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบกันคือ น้ำมันกานพลู 50 $mg.kg^{-1}$ น้ำมันกานพลู 15 $mg.kg^{-1}$ AQUI-S™ 15 $mg.kg^{-1}$ และชุดควบคุม ผลที่ได้ (**ตาราง 1.1**) พบว่าความเข้มข้นและอุณหภูมิมีผลต่อการสะสมของ eugenol ส่วนการศึกษาการหายไปของยาสลบปลาพบว่าที่อุณหภูมิสูงการหายไปของสารที่เนื้อเยื่อปลาเกิดขึ้นได้เร็วกว่า

ตาราง 1.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการสะสมและการหายไปของยาสลบปลา

ชนิดของยาสลบ	การสะสมของยาสลบ		การหายไปของยาสลบ	
	T สูง	T ต่ำ	T สูง	T ต่ำ
น้ำมันกานพลู 50 $mg.kg^{-1}$	มาก	น้อย	เร็ว	ช้า
น้ำมันกานพลู 15 $mg.kg^{-1}$	น้อย	มาก	เร็ว	ช้า
AQUI-S^{TM} 15 $mg.kg^{-1}$	น้อย	มาก	เร็ว	ช้า

ในปี ค.ศ. 2005 J. Velisek และคณะทำการศึกษาผลของการใช้น้ำมันกานพลูเป็นยาสลบในปลาคาร์พ [5] และปลาเรนโบว์เทร้าท์ [15] โดยทำการวัดค่า haematological profiles และ biochemical profiles ในเลือดปลา รวมทั้งติดตามผลกระทบต่อปลาหลังจากผ่านการทำให้สลบ ผลการศึกษาปริมาณน้ำมันกานพลูที่ทำให้เกิดพิษฉับพลันในปลาเรนโบว์เทร้าและปลาคาร์พดังแสดงใน**ตาราง 1.2**

ตาราง 1.2 ผลการศึกษาปริมาณการเกิดพิษฉับพลันของน้ำมันกานพลูต่อปลาเรนโบว์เทร้าและปลาคาร์พ

ความเป็นพิษของน้ำมันกานพลู	ปลาเรนโบว์เทร้า (หน่วยความเป็นพิษ $mg.L^{-1}$)	ปลาคาร์พ (หน่วยความเป็นพิษ $mg.L^{-1}$)
LC_{50} ที่ 10 นาที	81.1	74.3
$LC_{0.1}$ ที่ 10 นาที	63.9	51.6
$LC_{99.9}$ ที่ 10 นาที	100.1	110.1
LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง	14.1	18.1
$LC_{0.1}$ ที่ 96 ชั่วโมง	12.5	15.45
$LC_{99.9}$ ที่ 96 ชั่วโมง	16.2	19.8

ผลการศึกษาสรุปได้ว่าน้ำมันกานพลูไม่มีผลต่อ haematological และ biochemical profiles ในเลือด ของปลาทั้งสองชนิด โดยปริมาณความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่เหมาะสมคือ 30 $mg.L^{-1}$ นอกจากนี้สิ่งที่พบต่างกันคือ

กรณีของปลาเรนโบว์เทร้าจะพบการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของกลูโคสและแอมโมเนีย พบการลดลงของ AST หลังการสลบไป 10 นาที นอกจากนี้พบว่าปลา 20% เกิด sporadic ectasia ที่เหงือกหลังจากสลบ 24 ชั่วโมง ส่วนกรณีของปลาคาร์พพบการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของกลูโคสและฟอสเฟตหลังจากปลาสัมผัสน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 30 $mg.L^{-1}$ เป็นเวลา 10 นาที และยังพบว่าปลาเกิด capillary ectasia ที่เหงือกทันทีที่สัมผัสน้ำมันกานพลู

ในปี ค.ศ. 2006 D. Palic และคณะ [6] ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยดังต่อไปนี้คือ ความเข้มข้นของ plasma cortisol และการเกิด neutrophil function จากการใช้สาร 3 ชนิดเปรียบเทียบกัน ได้แก่ tricaine methanesulfonate (MS-222), metomidate hydrochloride (MTMD) และ eugenol (EUG) ความเข้มข้นของสารในการทดลองเป็นดังนี้ MS-222 75 $mg.L^{-1}$, EUG 30 $mg.L^{-1}$ และ MTMD 4 $mg.L^{-1}$ ปลา fathead minnows ที่ใช้ศึกษาถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่ม SA มีการเติมสารทำให้สลบ กับกลุ่ม S ไม่มีการเติมสารทำให้สลบ ผลการทดลองสรุปได้ดัง**ตาราง 1.3** โดยพบว่า eugenol และ MTMD เป็นสารที่ช่วยป้องกันการเกิดภาวะเครียดในปลา

ตาราง 1.3 ผลการศึกษาหาชนิดของยาสลบปลาที่ช่วยลดภาวะเครียดในปลา fathead minnows

การเปลี่ยนแปลงหลังทำให้เกิดความเครียดเป็นเวลา 30 นาที	ปลากลุ่ม S	ปลากลุ่ม SA		
		SA MS-222	SA EUG	SAMTMD
ความเข้มข้นของ plasma cortisol	เพิ่มขึ้น	เพิ่มขึ้น	คงที่	คงที่
Neutorphil function	เพิ่มขึ้น	เพิ่มขึ้น	คงที่	คงที่

ในปี ค.ศ. 2007 Dong-Won Seol และคณะ [7] นำน้ำมันกานพลูไปใช้ในการสลบปลาหมึกยักษ์ โดยทำการศึกษาผลของอุณหภูมิ (15, 20 และ 25 °C) และความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู (50, 100, 150, 200, 250 และ 300 $mg.L^{-1}$) ที่มีต่อเวลาที่ใช้ในการทำให้สลบและการฟื้นจากสลบของปลาหมึก ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นกับอุณหภูมิมีผลต่อเวลาในการสลบและการฟื้นอย่างมีนัยสำคัญคือ เวลาที่ใช้ในการสลบจะลดลงเมื่อความเข้มข้นและอุณหภูมิเพิ่มขึ้น ส่วนเวลาที่ใช้ในการฟื้นจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นและอุณหภูมิลดลง การทดลองที่ผ่านมาไม่พบการตายของปลาหมึก ความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการสลบและฟื้นจากสลบอย่างรวดเร็วคือที่ 200 $mg.L^{-1}$

ในปี ค.ศ. 2007 P. Vachon และคณะ [2] สนใจศึกษา pharmacokinetic study ของสาร eugenol ในปลาเรนโบว์เทร้าท์ การทดลองทำการแช่ปลาจำนวน 30 ตัวที่มีความยาวและน้ำหนักใกล้เคียงกันลงในสารละลายของ eugenol ที่ความเข้มข้น 75 $mg.L^{-1}$ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากฟื้นสลบปลาอย่างดี ปลาแต่ละตัวจะถูกจับแยกกันอยู่ในถังน้ำที่มีการให้ก๊าซออกซิเจนตลอดเวลา จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดตามเวลาที่กำหนดคือ ก่อนแช่น้ำยาให้สลบ หลังแช่ในถังออกซิเจนที่เวลา 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 และ 48 ชั่วโมง ตัวอย่างเลือดที่ได้นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค mass spectrometry ผลของ pharmacokinetic study มีค่าดังนี้ C_{max} 10.53 μg/mL, AUC_{0-t} 16.55 μg

h/mL, $AUC_{0\text{-}inf}$ 17.04 μg h/mL และครึ่งชีวิต 12.14 ชั่วโมง จากผลที่ได้แสดงว่า eugenol สามารถถูกดูดซึมและกำจัดออกจากตัวปลาได้ง่ายโดยการแช่ปลาในอ่างที่อุณหภูมิ 4 °C และการที่ eugenol มีครึ่งชีวิตที่นานจะทำให้เกิดการสะสมของ eugenol ในปลาเมื่อมีการทำให้สลบซ้ำหลายๆ ครั้ง

ในปี พ.ศ. 2550 ฏิลก วงศ์เสถียร และธีระพงศ์ โปธา [16] ทำการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูที่จะมีผลต่อระยะเวลาการสลบและฟื้นสลบในปลาทอง ได้แก่ ปลาทองพันธุ์หัวสิงห์ ออรันดา และโคเมท คละเพศอย่างละ 30 ตัว โดยปลาจะถูกแช่ในน้ำที่มีน้ำมันกานพลูที่ 3 ความเข้มข้นคือ 25, 50 และ 100 ppm ณ อุณหภูมิของน้ำ 26.6 °C ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำเท่ากับ 4.6 ppm และ pH ของน้ำเท่ากับ 6.75 ผลการทดลองแสดงดัง **ตาราง 1.4** พบว่าการใช้น้ำมันกานพลูที่ 100 ppm ทำให้ระยะเวลาการเข้าสู่ระดับการสลบขั้นที่ 3 ระดับที่ 2 เร็วกว่าและทำให้ระยะเวลาการเข้าสู่ระดับการฟื้นขั้นที่ 5 นานกว่าที่ความเข้มข้น 50 และ 25 ppm อย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างที่ความเข้มข้น 50 และ 25 ppm ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทุกกลุ่มการทดลอง

ตาราง 1.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่มีต่อระยะเวลาในการสลบและฟื้นตัวของปลาทองโคเมท

ความเข้มข้น (ppm)	เวลาในการสลบเข้าสู่ขั้นที่ 3 ระดับ 2 (นาที)	เวลาในการฟื้นเข้าสู่ขั้นที่ 5 (นาที)
25	18.5	8.5
50	10	10
100	4.5	14

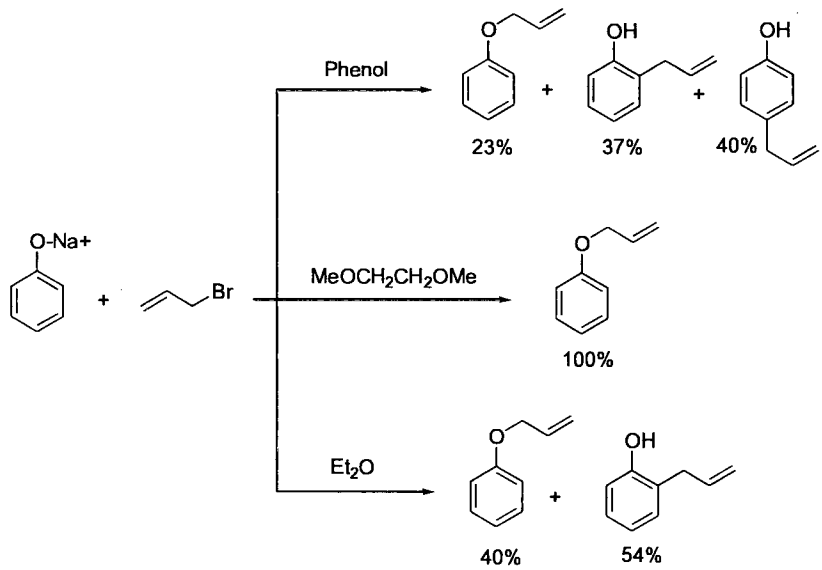
ในปี พ.ศ. 2550 สุรชัย พิกุลแก้วและคณะ [17] ศึกษาเปรียบเทียบระยะเวลาและพฤติกรรมการสลบและการฟื้นสลบของปลาบึก 60 ตัว ระหว่างการใช้น้ำมันกานพลูกับสาร MS-222 ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 $mg \cdot L^{-1}$ ผลการศึกษาพบว่าการใช้น้ำมันกานพลูในทุกความเข้มข้นเหนี่ยวนำให้เกิดการสลบที่ระดับ 3 โดยเวลาที่ใช้จะน้อยลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูสูงขึ้น สำหรับการใช้ MS-222 พบว่าที่ความเข้มข้น 100 เท่านั้นที่ทำให้เกิดการสลบที่ระดับ 3 นอกจากนี้พฤติกรรมในการสลบของปลาบึก เมื่อใช้น้ำมันกานพลูจะแสดงอาการกระวนกระวายมากกว่าเมื่อใช้ MS-222 และปลาบึกที่ได้รับขนาดของยาสูงจะมีระยะเวลาการฟื้นสลบที่นานกว่า

จากงานวิจัยที่กล่าวมาทั้งหมด จะเห็นได้ว่าสารยูจีนอลนั้นมีศักยภาพสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสลบและช่วยป้องกันการเกิดภาวะเครียดในสัตว์น้ำได้หลายชนิด เช่นเดียวกับสารในกลุ่มเดียวกัน ได้แก่ MS-222, metomidate hydrochloride, alkoxy-dialkylaminoalkoxyanilines แต่ยังไม่มีรายงานการสังเคราะห์สารอนุพันธ์เพื่อทดสอบการสลบในปลา ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยออกแบบโครงสร้างด้วยข้อมูลจากสารเหล่านี้ เพื่อให้ได้สารอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ลดการสะสมในเนื้อเยื่อ และมีราคาถูกลง

- งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ยูจีนอลและสารที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ยูจีนอลส่วนใหญ่จะเป็นปฏิกิริยา *C*-allylation ของอนุพันธ์ของฟีนอล โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดต่างๆ ดังต่อไปนี้

ในปี ค.ศ.1962 N. Kornblum และคณะ [18] ได้ทำการศึกษาตัวทำละลายที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา alkylation ของ ambident anion จากการศึกษาจะใช้ sodium phenoxide ทำปฏิกิริยากับ allyl bromide หรือ allyl chloride ใน phenol พบว่า สามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เป็น *C*-allylation ที่ตำแหน่ง *ortho* ร้อยละ 37 และที่ตำแหน่ง *para* ร้อยละ 40 และเมื่อใช้ตัวทำละลายเป็น 1,2-dimethoxyethane จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น *O*-allylation และเมื่อใช้ diethyl ether เป็นตัวทำละลายจะได้ *O*-allylation ร้อยละ 40 และ *C*-allylation ที่ตำแหน่ง *para* ร้อยละ 54 ดัง**ภาพ 1.3**

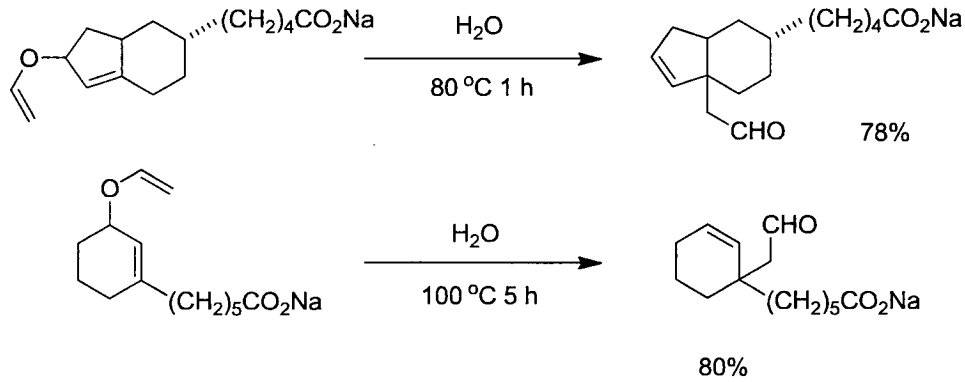


ภาพ 1.3 ปฏิกิริยา alkylation ของ sodium phenoxide ของ Kornblum และคณะ

ในปี ค.ศ.1979 S. Akaboli และคณะ [19] ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยา allylation ของ sodium phenoxide โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น crown ethers และ polymers บางชนิด เช่น 18-crown-6-benzo-18-crown-6, benzo-15-crown-5, poly(vinylmonobenzo-15-crown-5) และ poly(vinyl-monobenzo-18-crown-6) และพบว่าเมื่อใช้ poly(vinylmono-benzo-15-crown-5) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เป็น *C*-allylation ร้อยละ 7 และ *O*-allylation ร้อยละ 93 ในขณะที่เมื่อใช้ benzo-15-crown-5 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เป็น *C*-allylation ร้อยละ 17 และ *O*-allylation ร้อยละ 73 ซึ่งในการศึกษานี้จะใช้ sodium phenoxide ทำปฏิกิริยากับ allyl chloride ในตัวทำละลายน้ำ

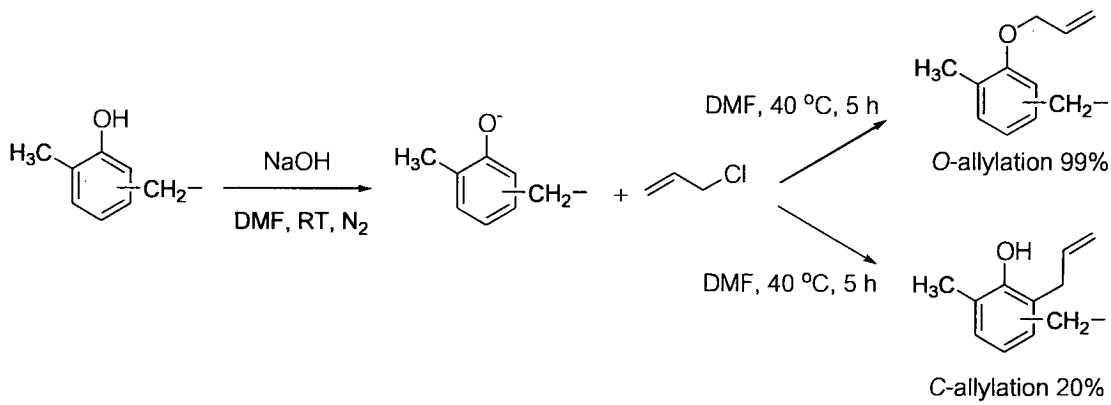
ในปี ค.ศ. 1989 P. A. Grieco และคณะ [20] ได้ทำการศึกษาการปรับปรุงโครงสร้างด้วยปฏิกิริยา Claisen rearrangement ในตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าน้ำและตัวทำลายอินทรีย์มีอิทธิพลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา Claisen

rearrangement ซึ่งในการสังเคราะห์ต้องใช้อุณหภูมิ 80 ถึง 100 °C และได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น *C*-allylation ร้อยละ 78 และ 80 ตามลำดับ ดัง**ภาพ 1.4**



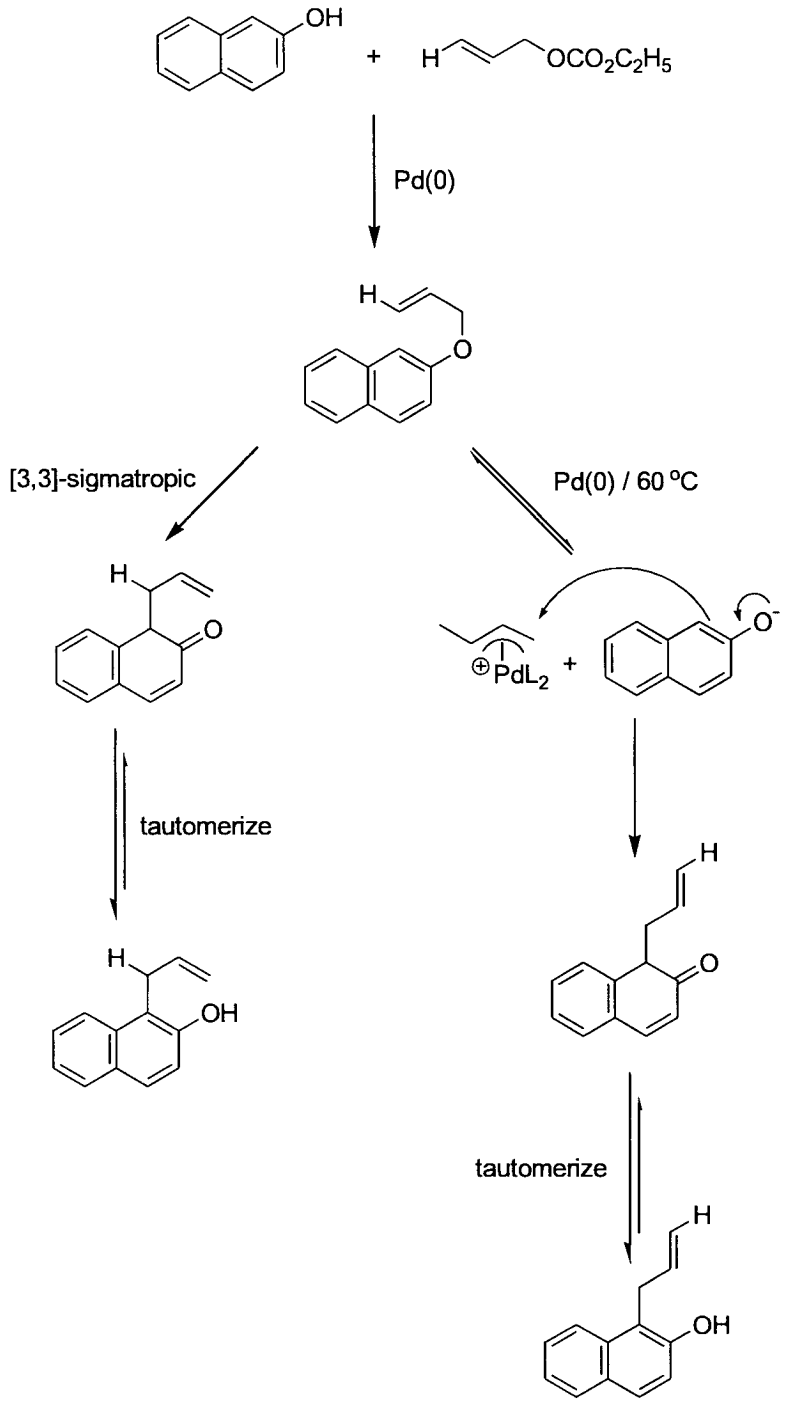
ภาพ 1.4 ปฏิกิริยา Claisen rearrangement โดย Paul A. Grieco และคณะ

ในปี ค.ศ. 1989 Z. K. Liao และคณะ [21] ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยา polyallylation ของ *o*-cresol novolac เพื่อศึกษา regioselectivity ในการเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ระหว่าง *O*-allylation กับ *C*-allylation พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น *O*-allyation ของ *o*-cresol novolac ได้ร้อยละ 99 เมื่อเปรียบเทียบกับ *C*-allylation ได้ร้อยละ 20 ซึ่งในการสังเคราะห์จะใช้ *o*-cresol novolac ทำปฏิกิริยากับ sodium hydroxide ใน DMF ที่อุณหภูมิประมาณ 45-50 °C ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน เพื่อให้ได้ polyphenoxides เป็นสารตั้งต้น จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ allyl chloride เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ดัง**ภาพ 1.5**



ภาพ 1.5 ปฏิกิริยา polylallylation ของ o-cresol novolac ของ Z. K. Liao และคณะ

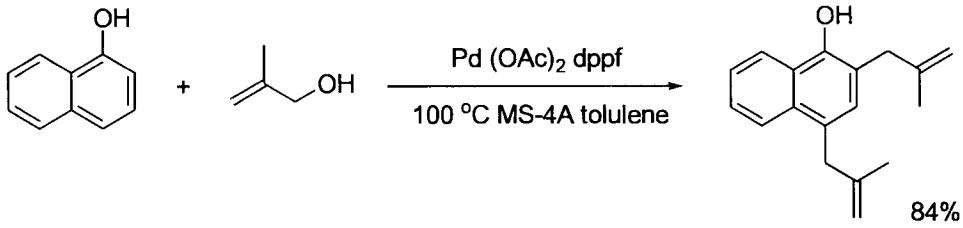
ในปี ค.ศ. 1995 C. Goux และคณะ [22] ได้ทำการศึกษาผลของ stereoselectivity และ regioselectivity ในการเตรียมปฏิกิริยา allylic etherification โดยใช้พาลลาเดียม (palladium) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าเกิดการแทนที่ของหมู่ allyl ที่ตำแหน่ง *ortho* ของ 1-allylnaphthalen-2-ol โดยผ่านปฏิกิริยา Claisen rearrangement ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาต้องใช้อุณหภูมิที่สูงและถูกควบคุมโดย stereo-selectivity เนื่องจากมีอิทธิพลจาก steric effect และ electronic factor



ภาพ 1.6 ปฏิกิริยา allylation โดยใช้ Pd เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ของ Catherine Goux และคณะ

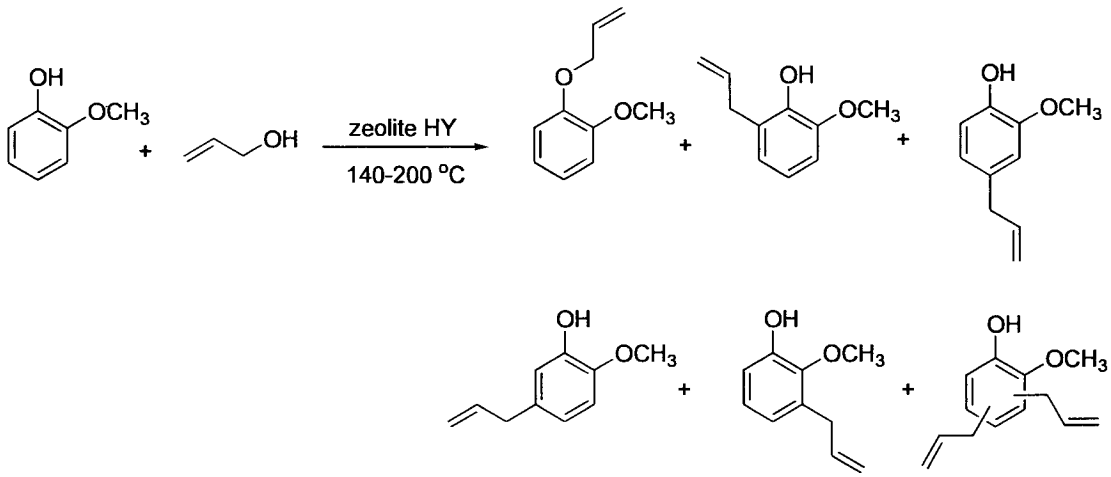
ในปี ค.ศ. 1996 Y. Tada และคณะ [23] ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยา *C*-allylation ของ α-naphthols ทำปฏิกิริยากับ allylic alcohol โดยใช้ palladium acetate และ 1,1'-Bis(diphenyl- phosphino)ferrocene (dppf) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาใน toluene ภายใต้สภาวะที่กลาง พบว่าสามารถสังเคราะห์ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น *C*-allylation ของ 1- และ 2-

naphthol โดยมีการแทนที่ของหมู่แอลลิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 4 นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้ 2,6-dihydroxynaphthalene ทำปฏิกิริยากับ allyl alcohol ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น *C*-allylation เช่นกัน



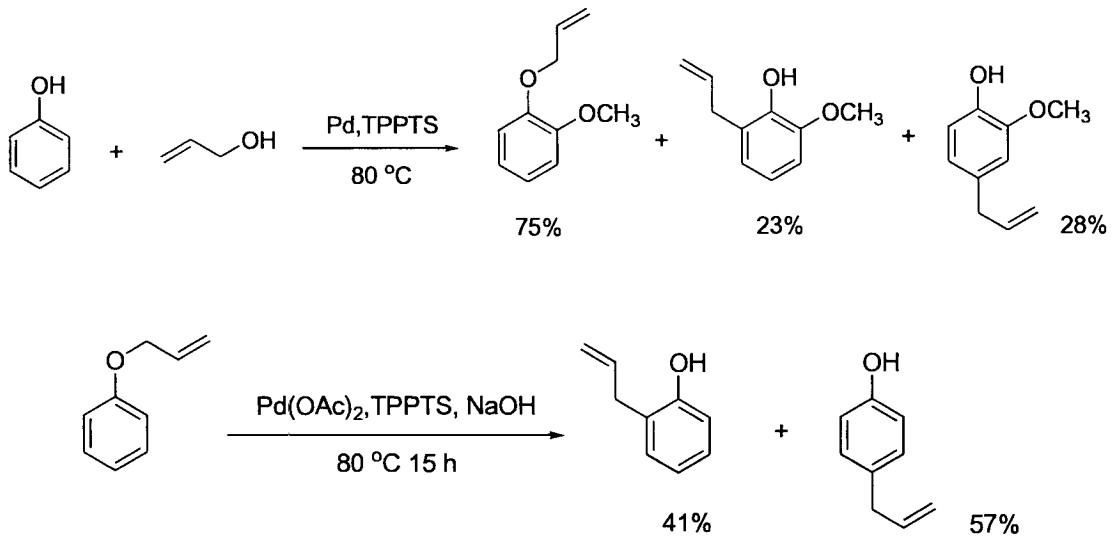
ภาพ 1.7 ปฏิกิริยา 1-และ 2-naphthol กับ allylic alcohol ของ Yuzuki Tada

ในปี ค.ศ. 2005 S. M. Kumbar และคณะ [24] ได้ศึกษาการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ไม่ใช้พาลลาเดียมได้แก่ zeolite ชนิดต่างๆ ในการสังเคราะห์ monoallyl guaiacol โดยใช้ allyl alcohol กับ guaiacol อัตราส่วน 1 ต่อ 4 ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน และอุณหภูมิสูงประมาณ 140-200 °C พบว่าเมื่อใช้ zeolite HY ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์สูงสุดถึงร้อยละ 46 เมื่อเปรียบเทียบกับ zeolite H-beta ร้อยละ 28 H-mordenite ร้อยละ 15 และ HZSM-5 ร้อยละ 4



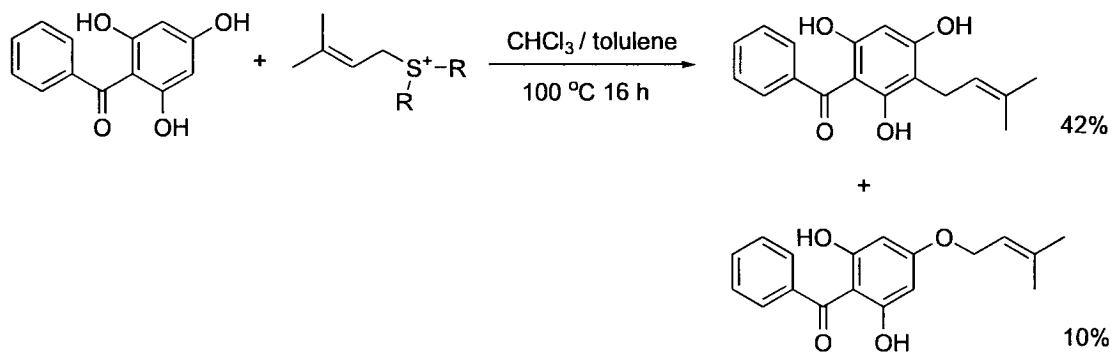
ภาพ 1.8 ปฏิกิริยาที่ใช้ zeolite ชนิดต่างๆ เป็นตัวเร่งปฏิกิยา ของ S.M. Kumbar และคณะ

ในปี ค.ศ. 2006 E. Kuntz และคณะ [25] ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยา *C*-allylation ของ phenol guaiacol โดยใช้ allyl alcohol ในตัวทำละลายน้ำ แทนการใช้ allyl halide โดยใช้ palladium-(m-sulfonatophenyl)phosphine trisodium salt complex (Pd(0)TPPTS) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าสามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เป็น *C*-allylation ของ electron-rich phenol หรือ guaiacol มากกว่า *O*-allylation อย่างจำเพาะเจาะจง และได้ศึกษาการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเดียวกันร่วมกับ NaOH และ allyl aryl ether ในปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชันของ *O*-allylation product ให้เปลี่ยนเป็น *C*-allylation product โดยผ่าน Claisen rearrangement จะให้เปอร์เซนต์ conversion ที่สูง



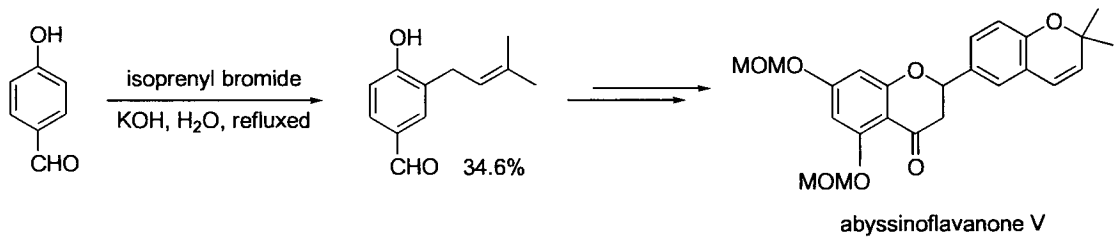
ภาพ 1.9 ปฏิกิริยา allylation ของ phenol กับ allyl alcohol และปฏิกิริยา Claisen rearrangement ของ Emile Kuntz

ในปี ค.ศ. 2007 S. Brajeul และคณะ [26] ได้ศึกษาการใช้ allyl source ชนิดอื่นๆ นอกเหนือ จาก allyl halide หรือ allyl alcohol คือ dihexyl(3-methylbut-2-enyl)sulfonium ซึ่งในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ benzoylphloroglucinol โดยใช้ sulfonium salts เช่น prenyl, geranyl และ iso-lavandulyl ในตัวทำละลายผสมของ tolulene และ chloroform พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น *C*-prenylation ร้อยละ 42 และ *O*-prenylation ร้อยละ 10



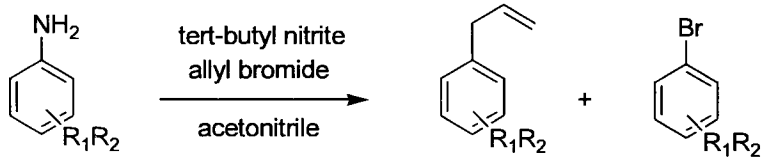
ภาพ 1.10 ปฏิกิริยา allylation ของ Solenn Brajeul และคณะ

และในปี ค.ศ. 2008 Jin Hui Yang และคณะ [27] ได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์สารabyssinoflavanone V โดยเริ่มจาก 4-hydroxybenzaldehyde และ 2,4,6-trihydroxyacetophe-none พบว่าสามารถได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น *C*-prenylation ได้ถึงร้อยละ 34.6 ดัง**ภาพ 1.11**



ภาพ 1.11 ปฏิกิริยา allylation ในการสังเคราะห์ abyssinoflavanone V ของ Jin Hui Yang

Frejd และคณะได้รายงานการวิจัยในปี 2002 [28] ว่าสามารถแทนที่หมู่อะมิโนด้วยหมู่แอลลิล โดยการใช้ tert-butylnitrite เป็นรีเอเจนต์ โดยไม่ต้องใช้โลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าสามารถสังเคราะห์อนุพันธ์ของ allyl aromatic ได้ผลิตภัณฑ์ที่มี percent yield สูง ดัง**ภาพ 1.12**



ภาพ 1.12 ปฏิกิริยา allylation ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ allyl benzene ของ Frejd

จากงานวิจัยที่กล่าวมาทั้งหมด จะเห็นว่าปฏิกิริยา allylation ของอนุพันธ์ของเบนซีนนั้น มีการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาหลายชนิด เช่น palladium catalyst, zeolite HY, potassium hydroxide, sulfonium salt derivatives และ basic catalysts เป็นต้น พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมักจะเป็น *O*-allylation มากกว่า *C*-allylation แสดงให้เห็นถึง chemoselectivity ของปฏิกิริยาดังกล่าว ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการสังเคราะห์ยูจีนอลโดยเริ่มจากอนุพันธ์ของฟีนอลกับ allyl halide หรือ allyl alcohol โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดต่างๆ และคาดให้เกิดผลิตภัณฑ์ชนิด *C*-allylation เป็นผลิตภัณฑ์หลักเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป้าหมายเป็นยูจีนอล และจะใช้เป็นปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นต้นแบบในการศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอลต่อไป รวมทั้งการดัดแปรหมู่ฟังก์ชันตำแหน่งอื่นๆ ของยูจีนอล ได้แก่ หมู่ไฮดรอกซี โดยการเปลี่ยนให้เป็นหมู่อื่นที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้เช่นเดียวกัน และดัดแปรหมู่แอลลิล โดยการเปลี่ยนให้เป็นหมู่อื่นที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกเช่นเดียวกับแอลลิล ซึ่งคาดว่าน่าจะได้อนุพันธ์ชนิดต่างๆ ของยูจีนอลจำนวนมากเพื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ในการสลบสัตว์น้ำต่อไป

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล
2. ทดสอบฤทธิ์การสลบในสัตว์น้ำเศรษฐกิจของอนุพันธ์ของยูจีนอลที่สังเคราะห์ขึ้น
3. ปรับปรุงและพัฒนาโครงสร้างของอนุพันธ์ของยูจีนอล เพื่อให้ได้ฤทธิ์การสลบในสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่ดีที่สุด

เอกสารอ้างอิงบทที่ 1

[1] ข้อมูลกรมส่งเสริมการส่งออก, สืบค้นเมื่อวันที่ 2 เมษายน 2552, จาก http://www2.ops3.moc.go.th/export/recode_export_rank/report.asp.

[2] Guenette, S. A.; Uhland, F. C.; Helie, P.; Beaudry, F.; Vachon, P.; Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquaculture*, **2007**, 266, 262-265.

[3] Iversen, M.; Finstad, B.; McKinley, R. S.; Eliassen, R. A.; The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S™ and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts and their potential stress-reducing capacity, *Aquaculture*, **2003**, 221, 549-566.

[4] Kildea, M. A.; Allan, G. L.; Kearney, R. E.; Accumulation and clearance of the anaes-thetics clove oil and Aqui-S™ from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*), *Aquaculture*, **2004**, 232, 265-277.

[5] Velisek, J.; Svobodova, Z.; Piackova, V.; Groch, L.; Nepejchalova, L.; Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Vet. Med. – Czech*, **2005**, 50(6), 269-275.

[6] Palic, D.; Herolt, D. M.; Andreasen, C. B.; Menzel, B. W.; Roth, J. A.; Anesthetic efficacy of tricane methanesulfonate, metomidate and eugenol: Effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820), *Aquaculture*, **2006**, 254, 675-685.

[7] Seol, D.-W.; Lee, J.; Im, S.-Y.; Park, I.-S., Clove oil as an anaesthetic for common octopus (*Octopus minor*, Sasaki), *Aquaculture Research*, **2007**, 38, 45-49.

[8] วุฒิ วุฒิธรรมเวช, สารานุกรมสมุนไพร รวมหลักเภสัชกรรมไทย, สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ, 2540, 102.

[9] U.S. Department of health and human services, Food and drug administration, Center for veterinary medicine, Concerns related to the use of clove oil as an anesthetic for fish, 2007.

[10] Sandorfy, C., Hydrogen bonding and anaesthesia, *Journal of Molecular structure*, **2004**, 708, 3-5.

[11] วรรณา สมบูรณ์วิบูลย์ และคณะ, วิสัญญีวิทยาพื้นฐาน, ภาควิชาวิสัญญีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, เท็กซ์ แอนด์เจอร์นัล พับลิเคชั่น, 2544, 125.

[12] เฉลิม ทรายอินทร์, ยาชา เล่ม 1 (Medicinal chemistry Series, Volume 1: Local Anesthetics), ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2545.

[13] Luduena, F. P.; Hoppe, J. O.; Page, D. F.; Clinton, R. O., Local anaesthetic studies with some alkoxy-dialkylaminoalkoxyanilines, *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, **1961**, 3, 3, 545-553.

[14] Burkey, J. L.; Sauer, J.-M.; McQueen, C. A.; Sipes, I. G., Cytotoxicity and genotoxicity of methyleugenol and related congeners – a mechanism of activation for methyleugenol, *Mutation Research*, **2000**, 453, 25-33.

[15] Velisek, J.; Svobodova, Z.; Piackova, V., Effects of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Acta Vet. Brno*, **2005**, 74, 139-146.

[16] Wongsathein, D.; Potha, T. ; Anesthetic and recovery times of clove oil as anesthetic in goldfish (*Carassius auratus* Linn.), *KKU. Vet. J.*, **2007**, 17(3), 1-11.

[17] Songkaew, A.; Chokboonmongkol, C.; Khattiya, R.; Wongsathein, D.; Mengumpun, K.; Pikulkeaw, S., Induction time and behavior of anesthesia and recovery in Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas*) after anesthetized with clove oil and tricane methanesulfonate (MS-222), *J. Thai Vet. Med. Assoc.*, **2007**, 58(2), 12-21.

[18] Kornblum, N.; Berrigan, P. J.; Le Noble, W. J.; Solvation as a Factor in the Alkylation of Ambident Anions: The Importance of the Hydrogen Bonding Capacity of the Solvent, **1962**, 85, 1141-1147.

[19] Akabori, S.; Miyanotol, S.; Tanabe, H.; Allylation of Phenoxides by Crown Ethers and their Polymers. *Journal of Polymer Science*, **1979**, 17, 3933-3987.

[20] Grieco, P. A.; Brandes, E. B.; McCann, S.; Cjark , J. D.; Water as a Solvent for the Claisen Rearrangement: Practical Implication for Synthesis Organic Chemistry. *Journal of Organic Chemistry*, **1989**, 54, 5849-5851.

[21] Liao, Z. K.; Wang, C. S.; The study of the polyallylation reaction of *o*-cresol novolac and the regioselectivity of *O*-allylation vs *C*-allylation. *Polymer Bulletin*, **1989**, 22, 9-14.

[22] Goux, C.; Massacret, M.; Lhoste, P.; Sinou, D.; Stereo-and Regioselectivity in Palladium-Catalyzed Allylic Etherification. *Organometallics*, **1995**, 14, 4585-4593.

[23] Tada, Y.; Satake, A.; Shimizu, I.; Yamamoto, A.; Palladium-Catalyzed C-allylation of Naphthols by Direct Use of Allylic Alcohols under Neutral Conditions. *Chemistry Letters*, **1996**, 1021-1022.

[24] Kumbar, S. M.; Shanbhag, G. V.; Halligudi, S. B.; Synthesis of monoallyl guaiacol *via* allylaton using HY zeolite. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2005**, 244, 278-282.

[25] Kuntz, E.; Amgoune, A.; Lucas, C.; Godard, G.; Palladium TPPTS catalyst in water:C-allylation of phenol and guaiacol with allyl alcohol and novel isomerisation of allyl ethers of phenol and guaiacol. *Journal of molecular catalysis*, **2005**, 244, 124-138.

[26] Brajeul, S.; Delpech, B.; Marazano, C.; Sulfonium salts as prenyl, geranyl and iso-lavandulyl transfer agents towards benzoylphloroglucinol derivatives. *Tetrahedron Letters*, **2007**, 48, 5597-5600.

[27] Yang, J. H.; Zhao, Y. M.; Bin Ji, C.; First total synthesis of (±)-abyssinoflavanone V. *Chinese Chemical Letter*, **2008**, 19, 658-660.

[28] Ek, F.; Axelsson, O.; Wistrand, L.-G.; Frejd, T., Aromatic allylation via diazotization: Metal-free C-C bond formation, *Journal of Organic Chemistry*, **2002**, 67, 6376-6381.