สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การใช้สารสกัดเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกร (*Hylocereus undatus*) ต่อสีผิวของปลาหมอนกแก้ว (*Cichlasoma citrinellum* x *Vieja synspilum*)

APPLICATION OF BETALAIN EXTRACT FROM DRAGON FRUIT (*Hylocereus undatus*) PEEL FOR PIGMENT OF RED BLOOD PARROT CICHLID (*Cichlasoma citrinellum* x *Vieja synspilum*)

สิริพงษ์ วงศ์พรประทีป

SIRIPONG WONGPORNPRATEEP

T095074

วน.
สิ7311
2552

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 95074
วัน,เดือน,ปี 20 พ.ค. 2552

b 12075824
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-AG-081-001

APPLICATION OF BETALAIN EXTRACT FROM DRAGON FRUIT (*Hylocereus undatus*) PEEL FOR PIGMENT OF RED BLOOD PARROT CICHLID (*Cichlasoma citrinellum* x *Vieja synspilum*)

SIRIPONG WONGPORNPRATEEP

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FISHERIES SCIENCE

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2009

KMITL-2009-AG-081-001

COPYRIGHT 2009

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้สารสกัดเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกร (*Hylocereus undatus*) ต่อสีผิวของปลาหมอนกแก้ว (*Cichlasoma citrinellum* x *Vieja synspilum*)
นักศึกษา	นายสิริพงษ์ วงศ์พรประทีป
รหัสประจำตัว	48065901
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การประมง
พ.ศ.	2552
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. นงนุช เลาหะวิสุทธิ์

บทคัดย่อ

การทดลองเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ที่จะนำสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกรมาใช้เร่งพัฒนาสีผิวปลาหมอนกแก้ว แบ่งเป็น 2 การทดลอง การทดลองที่ 1 ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกร โดยเปรียบเทียบสารลดการเสื่อมสภาพ 3 ชนิด ได้แก่ กรดแอซิติก 1 %, บัฟเฟอร์ฟอสเฟต 1% และ กรดซิตริก 1% ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 3 ระดับได้แก่ -20, -10 และ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 35 และ 70 วัน ผลการทดลองพบว่าการใช้กรดแอซิติก 1 % ช่วยลดการเสื่อมสภาพของสารเบตาเลนได้ดีที่สุด โดยอุณหภูมิไม่มีผลต่อการเสื่อมสภาพอย่างมีนัยสำคัญทางทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ปริมาณเบตาเลนจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษา การทดลองที่ 2 เป็นการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกรต่อการเร่งสีผิวปลาหมอนกแก้ว โดยผสมสารสกัดจากเปลือกผลแก้วมังกร ที่ 0, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (มก./กก.) ในอาหารเม็ดให้ปลากินเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ โดยวัดสีผิวของปลาโดยใช้เครื่องวัดสีระบบ CIE L*a*b* (CIE LAB) พบว่าหลังจากเลี้ยงปลาด้วยอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน ค่าสีผิวของปลา (L* - ค่าความสว่าง, a* - ค่าสีแดง และ b* - ค่าสีเหลือง) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ค่าสีแดงของผิวหนังปลา (a*) ของปลาที่กินอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 0, 20, 30, 40 และ 50 มก./กก. เท่ากับ -0.73±0.51, 10.04±0.79, 11.86±1.30, 14.81±1.81 และ 14.93±1.14 ตามลำดับ ค่าสีแดงของผิวหนังปลาเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดเบตาเลนที่ผสมในอาหาร ($P<0.05$) ส่วนอัตรารอดของปลาที่กินอาหารผสมสารสกัดเบตาเลนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างชุดทดลอง รงควัตถุที่เกล็ดของปลาที่กินอาหารผสมสารสกัดเบตาเลนมีมากกว่าปลาที่ไม่กินอาหารผสมเบตาเลน ($P<0.05$) แต่ปลาที่กินอาหารผสมสารสกัดเบตาเลนระดับความเข้มข้นต่างกันพบรงควัตถุที่เกล็ดปลาไม่แตกต่างกัน หลังจาก 12 สัปดาห์เลี้ยงปลาด้วยอาหารไม่ผสมสารสกัด

เบตาเลนอีก 4 สัปดาห์ พบว่า ค่าสีผิวของปลาที่วัดได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดเบตาเลนเป็นเวลา 12 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามค่าสีผิวของปลาที่วัดได้สูงสุดคือกลุ่มที่กินอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 40 และ 50 มก./กก. และความเข้มข้นของสารสกัดเบตาเลนที่เหมาะสมสำหรับเร่งสีปลาหมอนกแก้ว คือ 40 มก./กก. เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Thesis Title	Application of Betalain Extract from Dragon Fruit (*Hylocereus undatus*) Peel for Pigment of Red Blood Parrot Cichlid (*Cichlasoma citrinellum* x *Vieja synspilum*)
Student	Mr. Siripong Wongpornprateep
Student ID	48065901
Degree	Master of Science
Program	Fisheries Science
Year	2009
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Nongnuch Laohavisuti

ABSTRACT

The study on betalain extract from dragon fruit (*Hylocereus undatus*) peel for enhancing color of red blood parrot cichlid was conducted. Two experiments were designed. In the first experiment, 3 kind of preservations (acetic acid 1%, buffer phosphate 1% and citric acid 1%) and 3 storage temperatures (-20, -10 and 5 C°) were compared. The lowest deterioration rate of betalain of betalain extract was found by using 1 % acetic acid. The storage temperature did not caused the significant effect during 70-days storage. However, the concentration of betalain extract was significant decreased as the period of storage ($P<0.05$). In the second experiment, the optimal dosage of betalain extract for enhancing pigmentation of red parrot cichlid (*Cichlasoma citrinellum* x *Vieja synspilum*) was determined by supplementing a series of diets containing 0, 20, 30, 40 and 50 mg betalain kg^{-1} for 12 weeks. The skin pigmentation of fish was measured by using chromameter with the system of CIE L*a*b* (CIE LAB). After 12 weeks, the skin color values (L*-lightness, a*-redness and b*-yellowness) of fish was significantly different when supplementing betalain in fish diet ($P<0.05$). The skin redness (a* values) of fish fed with 0, 20, 30, 40 and 50 mg betalain kg^{-1} were -0.73±0.51, 10.04±0.79, 11.86±1.30, 14.81±1.81 and 14.93±1.14, respectively. The skin redness was significantly increased as the concentration of betalain increased ($P<0.05$). The survival rate of fish fed diets with betalain was no significantly different among treatments ($P>0.05$). Fish was stimulated to produce more pigment on fish scale ($P<0.05$) when fed with the diet containing betalain under the microscope, but differ from fish did not feed with betalain diets) After 12 weeks, fish will be fed with the normal diet (0 mg/kg

betalain) for another 4 weeks, The skin color values was significantly lower than fish fed diet with betalain for 12 weeks ($P<0.05$). However, the skin color values of fish were highest ($P<0.05$) in fish fed with 40 and 50 mg betalain kg^{-1} . The optimal dosage of betalain for enhancing pigmentation in red blood parrot cichlid was 40 mg/kg. for 4 weeks in this experiment.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ที่ให้คำแนะนำ และคำปรึกษาในการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และขอบคุณน้องสาวที่ให้คำปรึกษาและให้การสนับสนุนที่สำคัญแก่ข้าพเจ้าตลอดมา

กราบขอบพระคุณ กรรมการสอบโครงร่างและรูปเล่มวิทยานิพนธ์ และคณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงทุกท่านที่ให้ความรู้ คำปรึกษา ตรวจสอบแก้ไข ตลอดจนสอบถามความก้าวหน้าวิทยานิพนธ์อย่างสม่ำเสมอ พร้อมแนะนำเทคนิควิธีค้นคว้าในการทดลองที่เป็นประโยชน์อย่างมาก

ขอบคุณ คุณลำพึง พุ่มจันทร์ คุณนิพนธ์ จิตตำนาน และคุณบุปผา จงพัฒน์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือในการเตรียมเครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ และคำแนะนำที่ดีตลอดมา

ขอบคุณ Dr. Jacques Gabaudan ที่ได้แนะนำเทคนิคการวัดสีด้วยวิธีต่างๆ และวิธีผสมสารสีในอาหารปลา

ขอบคุณพี่ๆเพื่อนและน้องๆปริญญาโท และตรี ที่คอยช่วยเหลือ และให้คำปรึกษาเสมอมา

สุดท้ายขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัยที่ได้ให้ทุนวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

หากวิทยานิพนธ์นี้มีคุณค่าและมีประโยชน์ต่อการศึกษาค้นคว้าของผู้ที่สนใจ ผู้เขียนขออุทิศให้บุพการีและผู้มีพระคุณทุกท่าน ส่วนความผิดพลาดและข้อบกพร่องใดๆ ผู้เขียนขอน้อมรับไว้แต่เพียงผู้เดียว

สิริพงษ์ วงศ์พรประทีป

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		III
กิตติกรรมประกาศ		IV
สารบัญ		V
สารบัญตาราง		IX
สารบัภาพ		X
บทที่ 1 บทนำ		
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	1.2 วัตถุประสงค์	2
	1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง		
	2.1 ปลาหมอนกแก้ว	3
	2.2 ปัจจัยที่ส่งผลให้ปลาเกิดสี	4
	2.2.1 melanins	4
	2.2.2 pteridines	5
	2.2.3 purines	5
	2.2.4 carotenoids	5
	2.3 เซลล์ที่ควบคุมเม็ดสีในปลา	5
	2.3.1 melanophores	5
	2.3.2 xanthophores และ erythophores	5
	2.3.3 iridophores	5
	2.3.4 lecophores	5
	2.4 การเร่งการพัฒนาสีผิวในปลา	5
	2.4.1 การใช้อาหารธรรมชาติ	6
	2.4.2 การใช้ฮอร์โมนเพศชาย	6
	2.4.3 การใช้แอสตาแซนทิน	6
	2.4.4 การฉีดเข้าตัวปลาโดยตรง	6

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
	2.4.5 การย้อมสีด้วยการขจัดเมือกปลา	7
2.5	สารสีในพืช	7
	2.5.1 กลุ่มอนุพันธ์ของ tetrapyprole	7
	2.5.2 กลุ่มอนุพันธ์ของ isoprenoid	7
	2.5.3 สารประกอบ *N*- Heterocyclic อื่นๆ ที่ไม่ใช่ tetrapyproles	7
	2.5.3.1 purines	7
	2.5.3.2 pterins	8
	2.5.3.3 betalain	8
	2.5.4 กลุ่มอนุพันธ์ของ benzopyran	8
	2.5.5 quinones	8
	2.5.6 melanins	8
2.6	สารเบตาเลน และ การสกัดสารเบตาเลนจากพืช	8
2.7	โครงสร้างทางเคมีของสารเบตาเลน	10
2.8	การสังเคราะห์เบตาเลน	11
2.9	การเก็บรักษาเบตาเลน	12
	2.9.1 ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)	12
	2.9.2 อุณหภูมิ	12
	2.9.3 ก๊าซออกซิเจน	13
2.10	สารลดการเสียสภาพ	13
	2.10.1 สารประเภทกรด	13
	2.10.2 สารประเภทน้ำตาล	14
	2.10.3 สารประกอบชนิดอื่นๆ	14
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง		15
3.1	สัตว์ทดลอง และพืชทดลอง	15

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี 15

3.3 วิธีดำเนินการ

3.3.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาวิธีการเก็บรักษาสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกร 16

3.3.2 การทดลองที่ 2 ระดับของสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกรที่เหมาะสมต่อการเร่งสีผิวปลาหมอนกแก้ว 18

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล 21

3.5 สถานที่ทำการวิจัย 21

3.6 ระยะเวลาในการทำวิจัย 21

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การทดลองที่ 1 วิธีการเก็บรักษาสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกร ... 22

4.1.1 การทดลองย่อยที่ 1 การทดลองประสิทธิภาพของสารป้องกันการเสียสภาพที่เหมาะสมสำหรับสารสกัดเบตาเลน 22

4.1.2 การทดลองย่อยที่ 2 การทดลองผลของอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาสารสกัดเบตาเลน 25

4.2 การทดลองที่ 2 ระดับของสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกรที่เหมาะสมการเร่งสีผิวปลาหมอนกแก้ว 26

4.2.1 ค่าความสว่าง (L) บริเวณลำตัวของปลาหมอนกแก้ว 27

4.2.2 ค่าความเข้มสีแดง (a) บริเวณลำตัวของปลาหมอนกแก้ว 29

4.2.3 ค่าความเข้มสีเหลือง (b) บริเวณลำตัวของปลาหมอนกแก้ว 33

4.2.4 ผลของสารสกัดเบตาเลนต่อการเจริญเติบโตของปลาหมอนกแก้ว 39

4.2.4.1 อัตรารอด (survival rate) ของปลาหมอนกแก้ว 39

4.2.4.2 อัตราเจริญเติบโต (growth rate) ของปลาหมอนกแก้ว 39

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.5 ผลของสารสกัดเบตาเลนจากแก้วมังกรต่อเนื้อเยื่อของปลาหมอนกแก้ว..... 40

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 45

บรรณานุกรม..... 47

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต..... 53

ภาคผนวก ข. การเตรียมสารเคมีและสีย้อมตัวอย่างเนื้อเยื่อ..... 55

ภาคผนวก ค. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ..... 57

ประวัติผู้เขียน..... 60

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงตัวอย่างชนิดพืชที่สามารถสร้างสารเบตาเลนได้.....	9
4.1	การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารเบตาเลน(มิลลิกรัม/ลิตร)ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสในการทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันการเสื่อมสภาพ 3 ชนิด.....	23
4.2	ปริมาณสารเบตาเลนที่เติมกรดแอซิติก 1 % และเก็บรักษาที่อุณหภูมิที่ต่างกันและระยะเวลาที่ต่างกัน (มิลลิกรัมต่อลิตร).....	25
4.3	การเปลี่ยนแปลงของระดับค่าความสว่าง (L) ของปลาหมอนกแก้วเมื่อได้รับเบตาเลน.....	29
4.4	การเปลี่ยนแปลงของระดับค่าสีแดง (a) ของปลาหมอนกแก้วเมื่อได้รับเบตาเลน.....	33
4.5	การเปลี่ยนแปลงของระดับค่าสีเหลือง (b) ของปลาหมอนกแก้วเมื่อได้รับเบตาเลน.....	36
4.6	การเปลี่ยนแปลงด้านการเจริญเติบโต และอัตรารอดของปลาหมอนกแก้วเมื่อได้รับอาหารผสมสารเบตาเลนที่สกัดจากเปลือกแก้วมังกร.....	40

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ปลาหมอนกแก้ว (*Cichlasoma citrinellum X Vieja synspilum*).....	4
2.2	โครงสร้างของ (a) betaxanthins, (b) betalamic และ (c) สารประกอบกรด betalamic เชื่อมกับ cyclo- DOPA (cyclo-3,4-dihydroxy – phenylalanine).....	10
2.3	ความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาการสังเคราะห์เบตาเลน กับเมลานิน.....	11
2.4	กระบวนการสังเคราห์สารเบตาเลน ใน *Beta vulgaris*.....	12
3.1	แบบจำลองสามมิติของการวัดสี ระบบ L*a*b.....	20
4.1	การเปลี่ยนรูปของเอทานอลเมื่อทำปฏิกิริยากับแอซิติก แอซิด.....	23
4.2	การเปลี่ยนรูปของสารประกอบแอมีน เมื่อถูกไฮโดรไลซ์.....	23
4.3	โครงสร้างของกรดซิตริก.....	24
4.4	ผลของการเติมกรดแอซิติก 1 %, สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 1% และ กรดแอซิตริก 1 % ในสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกแก้วมังกร ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส.....	24
4.5	ผลของการเติมกรดแอซิติก 1 % ในสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกแก้วมังกร ที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เก็บรักษาต่างกัน.....	26
4.6	ระดับค่าความสว่าง (L) ของสีผิวปลาเมื่อได้รับเบตาเลนเข้มข้นแตกต่างกัน (0, 20, 30, 40 และ 50 มก./กก.).....	28
4.7	ระดับค่าความเข้มของสีแดง (a) ของสีผิวปลาเมื่อได้รับเบตาเลนเข้มข้นแตกต่างกัน (0, 20, 30, 40และ 50 มก./กก.).....	32
4.8	ระดับค่าความเข้มของสีเหลือง (b) ของสีผิวปลาเมื่อได้รับเบตาเลนเข้มข้นแตกต่างกัน (0, 20, 30, 40และ 50 มก./กก.).....	35
4.9	การเปลี่ยนแปลงสีผิวของปลาหมอนกแก้วเมื่อได้รับสารสกัดเบตาเลนเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ในอัตรา (A) 0 มก./กก., (B) 20 มก./กก., (C) 30 มก./กก., (D) 40 มก./กก. และ (E) 50 มก./กก.....	37
4.10	การเปลี่ยนแปลงสีผิวของปลาหมอนกแก้วเมื่อได้รับสารสกัดเบตาเลนเป็นเวลา 12 สัปดาห์ และหยุดให้เบตาเลนเลี้ยงต่อ 4 สัปดาห์ด้วยอาหารไม่ผสมเบตาเลน ในอัตรา (A) 0 มก./กก., (B) 20 มก./กก., (C) 30 มก./กก., (D) 40 มก./กก. และ (E) 50 มก./กก.....	39

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.11	เกล็ดแบบ ctenoid ในปลาหมอนกแก้ว (formalin 10 % ; X 10).....	41
4.12	รงควัตถุสีเหลือง (P) ที่พบในปลาที่ได้อาหารไม่ผสมเบตาเลน (formalin 10 % ; X 10).....	42
4.13	เกล็ดที่ซ้อนทับกัน (Sc) บนชั้น epidermis ที่ปกคลุมไปด้วย squamous epithelium (S) บริเวณใกล้เคียงพบ globlet cells หรือ mucous cells (G) (formalin 10 % ; H&E ; X 40) (ชุดที่ไม่ให้อาหารผสมเบตาเลน).....	42
4.14	ชั้น epidermis (E) ที่คลุมเกล็ดทั้งด้านบนและล่างของเกล็ด (Sc) และชั้น dermis (D) ที่เป็นต้นกำเนิดของเกล็ด (formalin 10 % ; H&E ; X 40) (ชุดที่ไม่ให้อาหารผสมเบตาเลน).....	43
4.15	เกล็ดที่มีรงควัตถุติดอยู่ (P) (formalin 10 % ; X 10) (ชุดที่ให้อาหารผสมเบตาเลนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม).....	43
4.16	เกล็ด (Sc) ที่มีชั้น epidermis (Ep) ปกคลุม (กลุ่มทดลองที่ 5) (formalin 10 % ; H&E ; X 40) (ชุดที่ให้อาหารผสมเบตาเลนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1กิโลกรัม).....	44
4.17	เปรียบเทียบเกล็ดของปลาหมอนกแก้ว (A) กลุ่มที่ไม่ให้สารสกัดเบตาเลน กับ (B) กลุ่มที่ให้อาหารผสมเบตาเลนความเข้มข้น 50 มก./กก.พบรงควัตถุ (P) (formalin 10 % X 10).....	44

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การเลี้ยงปลาสวยงามเป็นงานอดิเรกเพื่อความเพลิดเพลิน เนื่องจากปลาสวยงามเหล่านี้มีรูปร่างและสีสันสวย เลี้ยงง่าย ใช้พื้นที่น้อย รวมทั้งไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางด้านกลิ่นและเสียงเช่นสัตว์เลี้ยงประเภทอื่นๆ ปัจจุบันการผลิตปลาสวยงามยังไม่เพียงพอกับความต้องการของตลาดโลก เนื่องจากมีผู้เพาะเลี้ยงปลาสวยงามเพื่อการส่งออกเพียงไม่กี่ประเทศเท่านั้น ทำให้ธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ . 2545 อ้างโดย กรมประมง. 2549 ได้รายงานมูลค่าการส่งออกปลาสวยงามและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง มูลค่ารวมของโลกมีสูงถึง 234 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ และมากกว่าร้อยละ 50 เป็นผู้ส่งออกจากประเทศในแถบเอเชีย โดยมีสิงคโปร์เป็นประเทศผู้ส่งออกปลาสวยงามรายใหญ่ที่สุดในโลก รองลงมา คือ ฮ่องกง และไทย ตามลำดับ มูลค่าการค้าปลาสวยงามในตลาดโลกมีอัตราขยายตัวเฉลี่ย 9-10% ต่อปี (อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล. 2542 ; บริษัทศูนย์วิจัยกสิกรไทย จำกัด. 2550) ถึงแม้ว่าการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามเป็นสินค้าส่งออกนำรายได้เข้าประเทศเป็นมูลค่าสูง แต่ยังมีปัญหาเรื่องสีสันของปลาที่มีลักษณะซีดทำให้ปลามีราคาถูก เมื่อเปรียบเทียบกับปลาจากต่างประเทศ โดยเฉพาะกลุ่มของปลาหมอนกแก้วที่จำเป็นต้องเร่งสีก่อนจำหน่าย เกษตรกรจึงแก้ไขปัญหาดังกล่าวด้วยการนำฮอร์โมนเพศผู้ ซึ่งหาได้ง่ายในประเทศ มาใช้ในการเร่งสีผิวของปลาให้แดงขึ้น แต่การใช้ฮอร์โมนเพศไม่สามารถคงทนในตัวปลาได้นานจำเป็นต้องให้ฮอร์โมนเพศอย่างต่อเนื่อง 2-3 วันต่อครั้ง ยังส่งผลข้างเคียงต่อปลา ทำให้ปลามีความเครียดสูง ตับโต ท้องกิ่ว และส่งผลถึงพฤติกรรมความก้าวร้าวในเพศผู้ที่สูงขึ้น ซึ่งการใช้ฮอร์โมนเพศดังกล่าวทำให้ปลามีอายุสั้น สุขภาพอ่อนแอและไม่สามารถใช้ในการผสมข้ามสายพันธุ์ต่อไปได้ เนื่องจากทำให้รังไข่ฝ่อเพราะผลจากฮอร์โมนเพศผู้ (พรรษา ศะศิสมิต. 2543) และการใช้ฮอร์โมนเพศเป็นเวลานาน ยังส่งผลต่อสุขภาพของเกษตรกรผู้ใช้อีกด้วย ต่อมาการทดลองใช้สารสีสังเคราะห์ เช่น ครอโรฟิลด์พิงค์ (แอสตาแซนทินแบบสังเคราะห์) มาผสมในอาหารเพื่อเร่งสีพบว่าได้ผลดี แต่แอสตาแซนทินมีราคาสูงเนื่องจากต้องนำเข้าจากต่างประเทศทำให้ต้นทุนในการผลิตปลาสวยงามเพิ่มขึ้น ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องหาสารสีชนิดอื่นมาทดแทนเพื่อลดต้นทุนการผลิตปลาหมอนกแก้ว ดวงใจ พวงแก้ว (2548)ได้ทดลองสกัดสารสีจากเปลือกผลแก้วมังกร (*Hylocercus undatus*) ที่มีโทนสีในช่วง ม่วง-แดง ผสมในอาหารสำเร็จรูปให้ปลากุหลาบแดงกินพบว่าสามารถทำให้ปลามีสีแดงเข้มมากขึ้น แต่สารสกัดเบตาเลนจากเปลือกแก้วมังกรเป็นสารที่มีการสลายตัวง่ายระหว่างการเก็บรักษาหากเก็บในสภาวะไม่

เหมาะสม (Cai *et al.* 2005 ; Strack *et al.* 2003 ; Stintzing *et al.* 2006) ดังนั้นการศึกษาวิธีการเก็บรักษาสารสกัด ปริมาณสารสกัดเบตาเลนและระยะเวลาการให้อาหารผสมเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกรที่เหมาะสมเพื่อเร่งสีผิวปลาหมอนกแก้ว รวมถึงการศึกษาผลของสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกร ต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อบริเวณผิวหนังของปลาหมอนกแก้วจะเป็นแนวทางในการพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงปลาสวยงามเพื่อเพิ่มมูลค่าในเชิงพาณิชย์ต่อไปได้ในอนาคต

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 ศึกษาวิธีการเก็บรักษาสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกรโดยใช้ สารเคมีและอุณหภูมิ

1.2.2 ศึกษาปริมาณสารสกัดเบตาเลนและระยะเวลาการให้อาหารผสมเบตาเลนที่เหมาะสมต่อการพัฒนาสีผิวของปลาหมอนกแก้ว

1.2.3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเนื้อเยื่อบริเวณผิวหนังของปลาหมอนกแก้วหลังได้รับสารเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกร

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 เกษตรกรผู้เลี้ยงปลาสวยงามจะสามารถใช้สารสกัดเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกรพัฒนาสีปลาโดยการทดแทนการใช้ฮอร์โมนเพศ และสารเร่งสีอื่นๆ ในการเร่งสีผิวของปลาหมอนกแก้ว และปลาชนิดอื่นๆได้

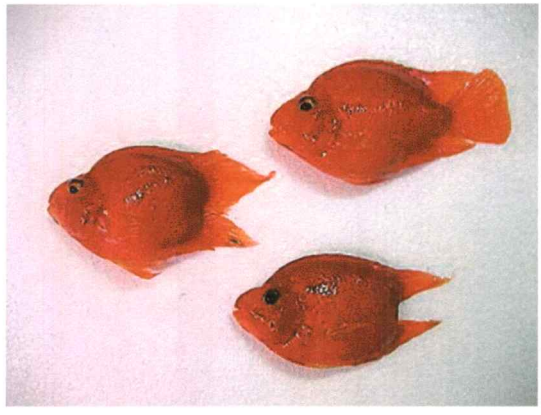
1.3.2 เพิ่มมูลค่าและยกระดับราคาสินค้าเกษตรที่ผลิตได้ในประเทศให้มีราคาสูงขึ้นทั้งปลาสวยงาม และผลแก้วมังกร เพื่อเป็นแนวทางพัฒนาสารสีจากพืชแหล่งอื่นๆ มาใช้ผลิตปลาสวยงามให้มีสีสวยขึ้น

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปลาหมอนกแก้ว

ปลาหมอนกแก้ว มีชื่อสามัญว่า red parrot cichlid หรือ love heart blood parrot cichlid, red blood parrot cichlid, purple blood parrot cichlid, red parrot, hybrid parrot cichlid (Gold-E. 2008) ชื่อที่นิยมเรียกกันมากที่สุด คือ blood parrot ปลาหมอนกแก้วเป็นปลาที่เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ของปลาหมอสีจากอเมริกาใต้สองสายพันธุ์ คือ *Cichlasoma citrinellum X Vieja synspilum* (Gold-E. 2005) ที่อยู่ในวงศ์ Cichlidae (Nelson. 1994 ; Bailey and Sandford. 1999) ซึ่งมีรายงานว่าพบครั้งแรกปี ค.ศ.1980 ในประเทศไต้หวัน (Yut1678. 2549)

พิชิต ไทยยืนวงษ์ (2543) รายงานว่าลูกผสมที่ได้มีรูปร่างได้ 2 ลักษณะ ได้แก่ ลำตัวสั้น หรือยาวเหมือนพ่อแม่ ปลาหมอนกแก้วจะมีลักษณะกระดูกสันหลังที่สั้นและยกตัวโก่งขึ้น ใบหน้างุ้มลง จะมีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมที่ด้านแหลมชี้ลงด้านล่าง ปากหุบปิดไม่สนิท ส่วนปลาหมอนกแก้วที่หุบปากได้สนิทจะมีชื่อทางการค้าว่า คิงคอง (Gold-E. 2005) นอกจากนี้ปลาหมอนกแก้วมักมีกระพุ้งแก้มปิดไม่สนิท คล้ายหายใจแรงตลอดเวลา เนื่องจากเป็นปลาที่ผสมข้ามสายพันธุ์ทำให้ในปลาเพศผู้เป็นหมันไม่สามารถผสมพันธุ์ได้ ส่วนในปลาเพศเมียจะวางไข่ตามปกติและสามารถผสมข้ามสายพันธุ์กับปลาในสกุลเดียวกันได้ (แฟนซีฟิช. ม.ป.ป.) ทำให้การผลิตปลาหมอนกแก้วต้องทำการผสมข้ามพันธุ์เท่านั้น ไม่สามารถทำการผสมพันธ์กันเองได้ แต่หากเลี้ยงปลาหมอนกแก้วเป็นกลุ่มจะพบพฤติกรรมการเข้าคู่ สร้างรังเพื่อวางไข่เหมือนปลาหมอสีปกติ แต่ไข่จะไม่เจริญเป็นตัวอ่อน นอกจากนี้ผลของการผสมข้ามพันธุ์ยังพบบริเวณข้อหาง (caudal peduncle) มักจะยกตัวขึ้นหรือชี้ลง เกษตรกรที่ผลิตปลาหมอนกแก้วจะตัดหางที่ผิดปกติดังกล่าวทิ้ง เมื่อแผลหายครีบหลังและครีบก้น จะยื่นลงมาแทนที่ ทำให้เกิดลักษณะคล้ายหัวใจ หรือที่เรียกว่า ปลาหมอนกแก้วเลิฟ (love parrot) (Anonymous. 2008a) ปลานกแก้วที่ผลิตจำหน่ายในตลาดปลาสวยงาม จะมีหลายเฉดสี ตั้งแต่ ขาว เหลือง ส้ม จนถึง แดงสด ซึ่งสีแดงสดจะเป็นสีที่ได้รับความนิยมและมีราคาขายสูงสุด



ภาพที่ 2.1 ปลาหมอนกแก้ว (*Cichlasoma citrinellum* x*Vieja synspilum*)
ที่มา : Gold-E (2005)

2.2 ปัจจัยที่ส่งผลให้ปลาเกิดสี

Lagler *et al.* (1963) และ Fujii (1993) รายงานว่าเม็ดสีของผิวหนังปลาสามารถแบ่งได้เป็น 4 ประเภทคือ

2.2.1 melanins เป็นเม็ดสีน้ำตาลหรือดำที่พบในปลา เกิดจาก tyrosine ถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ tyrosinase เปลี่ยนเป็น 3,4-ไดไฮดรอกซีฟีนิลอะลานิน (3,4-dihydroxyphenyalanine) จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็น dopaquinone แล้วจะมีการรวมตัวกันทางเคมีทำให้เกิด melanins ขึ้นและจะพบ melanins เกาะติดอยู่กับโปรตีน

2.2.2 pteridines เป็นสารประกอบที่สามารถละลายได้ในน้ำ เป็นกลุ่มสีที่อยู่ในโทนสว่าง เช่น เหลือง, แดง และน้ำตาล เซลล์ที่สร้าง pteridines จะเรียกว่า pterinosomes

2.2.3 purines เป็นเม็ดสีที่พบมากเป็นพิเศษ ในช่องท้องของปลา ลักษณะเป็นสีเงินสะท้อนแสง purines สามารถละลายน้ำได้ดี นอกจากนี้จะพบเป็นผลึกใสอยู่ในเซลล์ iridophores

2.2.4 carotenoids เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนไม่อิ่มตัว โมเลกุลมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ไมครอน ไม่สามารถละลายในน้ำแต่ละลายในไขมัน ปลาไม่สามารถสังเคราะห์ carotenoids ได้เอง ดังนั้น ปลาจึงได้รับ carotenoids จากพืชหรือสัตว์ที่เป็นอาหารโดยตรง และปลาสามารถเก็บเม็ดสีเหล่านี้ไว้ในตัวของมันเอง หรือเปลี่ยน carotenoids เป็นสารสีรูปอื่นได้ สามารถตรวจพบสารในกลุ่มนี้ได้หลายชนิด เช่น beta-carotene, lutein, astaxanthin, tunaxanthin และ zeaxanthin เป็นต้น

2.3 เซลล์ที่ควบคุมเม็ดสีในปลา

สีของปลาที่ปรากฏนั้น ประกอบด้วยเม็ดสีต่างๆ ทำหน้าที่ดูดซับ กระจาย และสะท้อนแสง การที่มีแต่เม็ดสีนั้นจะทำให้ปลาไม่สามารถเปลี่ยนสีได้ แต่ต้องมีเซลล์ chromatophores ที่ทำหน้าที่ควบคุมเม็ดสีเหล่านั้นให้เปลี่ยนไปมาตามต้องการในสถานการณ์ต่างๆ เช่น สืบพันธุ์ หลบหนีศัตรู ล่าเหยื่อ โดยเซลล์ chromatophores จะถูกควบคุมโดยกระแสประสาท โดยมากมักอยู่ในผิวหนังชั้น dermis ซึ่ง chromatophores ที่เชื่อมกับกระแสประสาทเหล่านี้ อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า dendritic chromatophores จำแนกได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ (Fujii. 1993)

2.3.1 melanophores พบในบริเวณที่มีสีเข้ม มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 ไมครอน

2.3.2 xanthophores และ erythophores พบมีขนาดเล็กกว่า melanophores พบบริเวณที่มีสีเหลือง และแดง ที่ผิวของปลาทำหน้าที่ดูดซับแสงแดดและเปลี่ยนเป็นสารจำพวกแคโรทีนอยด์และเทอริดีน

2.3.3 iridophores พบบนผิวหนังได้ทั่วไปในบริเวณที่มีสีเงินโดยมากบริเวณที่พบ iridophores จะไม่พบ chromatophores ชนิดอื่นๆอยู่ร่วมด้วย ลักษณะเป็นเกล็ดคริสตัลทำหน้าที่สะท้อนแสงออกจากผิวหนัง มีองค์ประกอบเป็นสารจำพวก purines, guanine, hypoxanthine และ uric acid

2.3.4 leucophores พบในปลากระดูกแข็งในกลุ่มปลา killifish, medeka และ guppy เพียงไม่กี่ชนิด ทำหน้าที่สะท้อนแสงเช่นเดียวกับ erythophores เซลล์มีรูปร่างกลมขนาดไม่แตกต่างกับชนิดอื่นๆ มากนัก

2.4 การเร่งการพัฒนาสีผิวในปลา

กลุ่มปลาสวยงามที่นิยมทำการเร่งสีก่อนจำหน่ายคือกลุ่ม cichlids ได้แก่ ปลาหมอสี ปลาปอมปาดัวร์ และปลาหมอนกแก้ว เนื่องจากในอาหารสดและอาหารสำเร็จรูปที่เกษตรกรเลือกใช้มักมีปริมาณสารสีในปริมาณน้อย การจะจำหน่ายต้องเลี้ยงเป็นเวลานาน เป็นการเพิ่มต้นทุนทั้งค่าอาหาร และแรงงาน จึงจำเป็นต้องมีการเร่งสีหรือที่เกษตรกรไทยนิยมเรียกวิธีนี้ว่าวิธีย้อมสีปลา เพื่อให้สามารถจำหน่ายได้พร้อมกันทุกตัว และมีราคาที่สูงขึ้น (กรมประมง. 2540 ; พรรษา ศะศิสมิต. 2543)

การเร่งสีผิวในปลาเป็นการทำให้สีผิวปลาเปลี่ยนสีจากสีเทาดำไปเป็นสีขาวหรือเหลืองส้ม (ลอกสี) วิธีการเร่งสีผิวในปลาแบ่งได้ 5 วิธี

2.4.1 การใช้อาหารธรรมชาติ

ในปลาปอมปาดัวร์ใช้ไข่กุ้งก้ามกรามเร่งสีลูกปลาขนาดความยาว 2 เซนติเมตร อายุประมาณ 30-45 วัน หรือใช้ตัวอ่อนริ้นน้ำจืด (หนอนแดง) กุ้งสด เนื้อปลาสด และหัวใจวัวปั่นละเอียด ในบางฟาร์มอาจมีการใส่น้ำผสมผงวุ้นเพื่อให้มีการจับตัวกันดีขึ้น(กรมประมง. 2540)

2.4.2 การใช้ฮอร์โมนเพศชาย

ปัจจุบันพบในรูปแบบของอาหารเม็ดเร่งสีสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมของฮอร์โมนเพศ หรือ อาจจะใช้ฮอร์โมนเพศมาคลุกกับอาหารสดให้ปลากิน เพื่อกระตุ้นให้ปลาเกิดสีได้เร็วกว่าปกติ (Gold-E. 2008) กรมประมง. 2540 ได้รายงานว่าในปลาปอมปาดัวร์นิยมใช้ฮอร์โมน fluoxymesterone ที่มีชื่อทางการค้าว่า Halotestin โดยผสมกับไข่กุ้งหมักทิ้งไว้ประมาณ 1 วัน ให้กินเป็นเวลา 3 สัปดาห์ก่อนจำหน่าย สำหรับในปลาหมอสีนิยมใช้ ฮอร์โมน testosterone ที่มีชื่อทางการค้าว่า mano ทำให้ปลาจะเกิดสีขึ้นเร็ว พรรษา ศะศิสมิต (2543) อธิบายว่า การใช้ฮอร์โมนเพศชายใช้ปริมาณ 5 แคปซูล ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมให้ปลากินทุกวันประมาณ1-2 สัปดาห์เพื่อควบคุมปลาทุกตัวในฝูงให้มีสีสันเข้มเท่ากัน

2.4.3 การใช้สารแอสตาแซนทิน

ในปลาหมอสีมีอัตราส่วนการผสมอาหารเม็ด 1 กิโลกรัม ต่อ คลอโรฟิลด์พิงค์ หรือ คลอโรฟิลด์เรด (chlorophyll pink and chlorophyll red ชื่อทางการค้าของแอสตาแซนทิน และแคนธาแซนทิน) 1 ช้อนชา ให้กินติดต่อกันจนกว่าสีจะเข้มขึ้นโดยใช้เวลาประมาณ 3-4 สัปดาห์ (อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล. 2544 ; พรรษา ศะศิสมิต. 2543) หรือการใช้หนอนแดง (ตัวอ่อนริ้นน้ำจืด) แช่ในแอสตาแซนทิน แล้วนำไปให้ปลากิน วันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น (กรมประมง. 2540)

2.4.4 การฉีดสีเข้าร่างกายปลาโดยตรง

ใช้สีสังเคราะห์ทำการฉีดเข้าที่ร่างกายปลา บริเวณใต้ผิวหนัง ทำให้ผิวของปลามีสีสดใส แต่เมื่อผู้เลี้ยงนำไปเลี้ยงชักระยะ สีจะซีดจางไปเรื่อยๆ ลักษณะของปลาที่ฉีดสี ที่บริเวณใต้ครีบหลังจะเป็นแนวสีแดงเข้มยาว Chen and Pandora (2008) ได้เรียกปลาฉีดสีไว้ว่า painted fish เรียกเข็มที่ใช้ฉีดสีปลาว่า hypodermic syringe และเรียกสีย้อมว่า dye วิธีนี้ใช้กันอย่างแพร่หลายสี เขียว สีน้ำเงิน สีเหลือง หรือสีม่วง หลังจากการฉีดสี สีจะซีดลงในช่วงเวลาประมาณ 1-3 เดือน นอกจากนี้วิธีดังกล่าวสามารถพบได้ในปลาแป้น (glass fish), ปลาแรด (giant gourami), ปลาหมอนกแก้ว (*Cichlasoma citrinellum* x*Vieja synspilum*) เป็นต้น (Anonymous. 2008b และ Gold-E. 2008)

2.4.5 ย้อมสีด้วยการขจัดเมือกปลา

การย้อมสีวิธีนี้จะทำโดยการนำปลามาแช่น้ำยาเคมีชนิดหนึ่งจำพวกกรด เพื่อขจัดเมือกปลาที่หุ้มอยู่ให้หลุดออก แล้วจุ่มปลาในสีผสมอาหารเมื่อครบกำหนด จึงนำไปแช่น้ำยาเร่งเมือก เพื่อให้เมือกมาดลุมทับสีที่ได้แช่ไว้ (Gold-E. 2008 ; Yut1678. 2549) วิธีการนี้จะพบเฉพาะปลาหมอนกแก้วเท่านั้น

2.5 สารสีในพืช

Gandia-Herreo *et al.* (2005) ได้จำแนกสารสีจากพืชเอาไว้ 6 กลุ่มดังนี้

2.5.1 กลุ่มอนุพันธ์ของ tetrapyrrole

พบโครงสร้างอนุพันธ์ของ tetrapyrrole เป็นเส้นตรง หรือ วง cyclic ในพืชจะสังเคราะห์สาร 2 กลุ่มคือ กลุ่ม chlorophylles ได้แก่ chlorophll a (เขียวแกมน้ำเงิน) และ chlorophll b (เขียว) กลุ่มของ bilins ซึ่งประกอบด้วย phytochrome (สีส้มแดง - แดง), phycocyanin (น้ำเงิน) และ phycoerythrin (เหลือง-ส้ม)

2.5.2 กลุ่มอนุพันธ์ของ isoprenoid

รู้จักกันในชื่อของ terpenoids ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่จะเปลี่ยนไปเป็นสารหลายชนิด เช่น ฮอร์โมน รงควัตถุ และ phytoalexins โดยกลุ่มของ isoprenoid สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่ quinones, carotenoids และ iridoids

2.5.3 สารประกอบ *N*- heterocyclic อื่นๆ ที่ไม่ใช่ tetrapyrroles

2.5.3.1 purines

พบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต เช่น deoxyribonucleic (DNA) และ ribonucleic acid (RNA) และสามารถพบ purines ในรูปอิสระ ได้เช่นกัน ซึ่งจะสะสมสารสี เช่นในปลา ที่มีการสะสมในรูปของ guanine , xanthin และ uric acid โดยจะอยู่ในรูปของ microcrystal หรือ granules ซึ่งจะให้สีขาว สีครีม หรือ สีเงิน

2.5.3.2 pterins

เป็นรงควัตถุในกลุ่ม *N*- heterocyclic ที่แพร่หลายมากที่สุด โดย พบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต มีสีขาว ครีม เหลือง และแดง ซึ่งพบในปีกของแมลง จำพวกผีเสื้อ ในลูกตาของสัตว์มีกระดูกสันหลัง

2.5.3.3 betalain

เป็นรงควัตถุที่พบในพืชดอกชั้นสูง มี betacyanins (สีเหลือง) และ betaxanthin (สีม่วง) เป็นองค์ประกอบ

2.5.4 กลุ่มอนุพันธ์ของ benzopyran

ประกอบด้วยสารประกอบ flavonoids และ phenolic มีโครงสร้างทางเคมี เป็นวงหลักได้แก่ aromatic 2 วง และ pyran อีก 1 วง ตัวอย่างสารประกอบในกลุ่มนี้คือ anthocyanins, aurones, chalones, flavonols, flavonols, flavans และ isoflavons

2.5.5 quinones

quinones เป็นกลุ่มรงควัตถุที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ทั้งจำนวนของสารประกอบโครงสร้างที่หลากหลาย โดยมีโครงสร้างหลัก เป็นวง aromatic, monocyclic หรือ polycyclic และมี *p*-hydroxyl 2 หมู่ โดย quinones สามารถพัฒนาไปทำงานในส่วนสำคัญของสิ่งมีชีวิต เช่น plastoquinones พบในchloroplast ทั้งในพืชชั้นสูง และสาหร่าย menaquinones พบในแบคทีเรีย anthraquinones พบในเชื้อรา เห็ด ไม้ดอก และแมลง ในรูปของ วิตามินเค (naphthoquinones)

2.5.6 melanins

เป็นโพลีเมอร์ ที่มี phenolic หรือ indolic monomers หลายชนิดเป็นองค์ประกอบ ซึ่งจะให้สี ดำ เทา และ น้ำตาล ทั้งในพืชและสัตว์ โดยมากมักเป็นโปรตีน และมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบร่วม

2.6 สารเบตาเลน และ การสกัดสารเบตาเลนจากพืช

สารเบตาเลนเป็นสารที่มีโครงสร้างหลักมาจากกรด เบตาลามิก ที่มีชื่อสูตรโครงสร้างว่า 1, 2, 4, 7, 7-pentasubstitute1,7-diazaheptamethin เดิมเบตาเลนถูกเรียกว่า caryophyllinenroth, rubenroth และ chromoalkaloids การเรียกชื่อสารเบตาเลนจะเกี่ยวข้องกับแหล่งที่มา เช่น betacayanins amaranthine- I มาจาก *Amaranthus tricolor* และ betanin มาจาก *Beta vulgaris* เป็นต้น

กลุ่มพืชที่สร้างสารเบตาเลน ได้แก่ อันดับ Carryophyllales และอันดับ Basidiomycetes บางชนิด (Cai *et al.* 2005 ; Stintzing and Carle. 2004) และพบมากในพืชวงศ์ Cactaceae ซึ่งเป็นกระบองเพชรประเภทเลื้อย (Cacti) ได้แก่สกุล Opuntia, Hylocereus และสกุล Mamillaria บางชนิด จะพบเบตาเลนบริเวณเนื้อเยื่อของดอกและผลปริมาณมาก (Mario. 1976 ; Stintzing and Carle. 2004) โดย Cai *et al.* (2005) กล่าวว่า สามารถใช้สารเบตาเลนในการจำแนกชนิดของพืชชั้นสูงได้ เนื่องจากจะพบเบตาเลนเฉพาะในอันดับ Caryophyllales เท่านั้น

ตารางที่ 2.1 แสดงตัวอย่างชนิดพืชที่สามารถสร้างสารเบตาเลนได้

อันดับย่อย (Suborder)	วงศ์ (Family)	ตัวอย่างชนิด (Example of genus)
Chenopodiineae	Achatocarpaceae	*Achatocars* sp.
	Aizoaceae	*Dorotheanthus* sp., *Mesembryanthenum* sp.
	Amaranthaceae	*Amaranthus* sp.(บีทรูท), *Iresine* sp. , *Gomphrena sp.*
	Basellaceae	*Basella* sp.
	Cactaceae	*Mammillaria* sp., *Opuntia* sp. (แก้วมังกร), *Pereskia* sp.
	Didiereaceae	*Didierea* sp.
	Halophytaceae	*Halophytum* sp.
	Hectorellaceae	*Hectolella* sp.
	Nyctaginaceae	*Bougainvillea* sp., *Mirabilis* sp.
	Phytilaccaceae	*Phytolacca* sp., *Gisekia* sp.
	Portulacaceae	*Portulaca* sp., *Claytonia* sp.
	Stegnospermataceae	*Stegnosperma* sp.
Caryophyllineae	Caryophyllaceae	*Dianthus* sp., *Silene* sp.
	Molluginaceae	*Mollugo* sp., *Limeurn* sp.

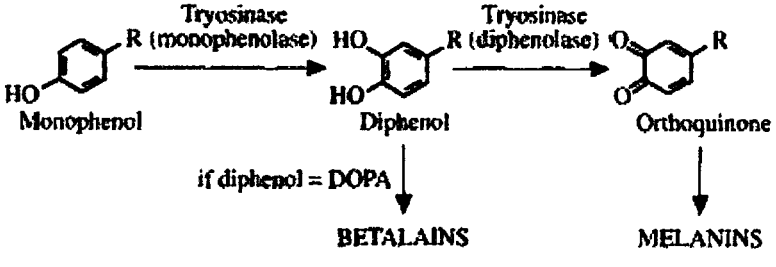
ที่มา : Zryd and Christinet (2003)

การสกัดเบตาเลนสามารถใช้น้ำ อะซีโตน คลอโรฟอร์ม หรือแอลกอฮอล์ในการสกัดสารได้ โดยมากจะนิยมใช้ เอธานอลความเข้มข้น 96 และ 97% ในการสกัดเบตาเลนจากผลบีทรูทและผล cacti (Strack *et al.* 2003 ; Mobhammer *et al.* 2005 ; Herbach *et al.* 2006 ; Whybraniec 2008) แต่ Kobayashi *et al.* (2000) และ Thimmaraju *et al.*(2003) ได้ใช้เมธานอล 80 และ 96 % ในการสกัดผลบีทรูท และผล christmas cactus ในขณะที่ ดวงใจ พวงแก้ว (2548) ทดลองสกัดเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกรโดยใช้เอธานอล 80% พบว่าได้ปริมาณสูงกว่าการใช้น้ำกลั่น สารสีที่สกัดได้ได้แก่แอนโทไซยานินและเบตาเลน สารสีทั้งสองจะมีลักษณะบางประการที่คล้ายคลึงกันโดยมีช่วง

นอกจากนี้ Gandia-Herrero *et al.* (2005b) ยังได้กล่าวถึงเบตาเลนที่สกัดได้ว่ามีโทนสีตั้งแต่ สีเหลืองอ่อน เหลืองเข้ม ส้ม แดง จนถึงม่วงแดง โดยสีที่เห็นนั้นเกิดจากโดยสีที่ปรากฏนั้น เกิดจากคุณสมบัติการสลับไปมาระหว่างพันธะคู่ของไอออน (resonance) โดยมีโครงสร้างหลัก 2 โครงสร้างดังนี้ betaxanthins (สีเหลือง) และ betacyanin (สีน้ำเงิน) ที่มีองค์ประกอบกรด betalamic กับ cyclo-DOPA (cyclo-3,4-dihydroxy-phenylalanine) การมาเกาะของ cyclo- DOPA ส่งผลให้เกิดขั้วสองขั้วที่วงแหวนอะโรมาติก ซึ่งจะเปลี่ยนค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ประมาณ 480-540 nm (สีแดง–ม่วงของ betacyanins ตัวอย่างเช่น betanidine - สีเหลืองของ betaxanthins เช่น miraxanthin)

2.8 การสังเคราะห์เบตาเลน

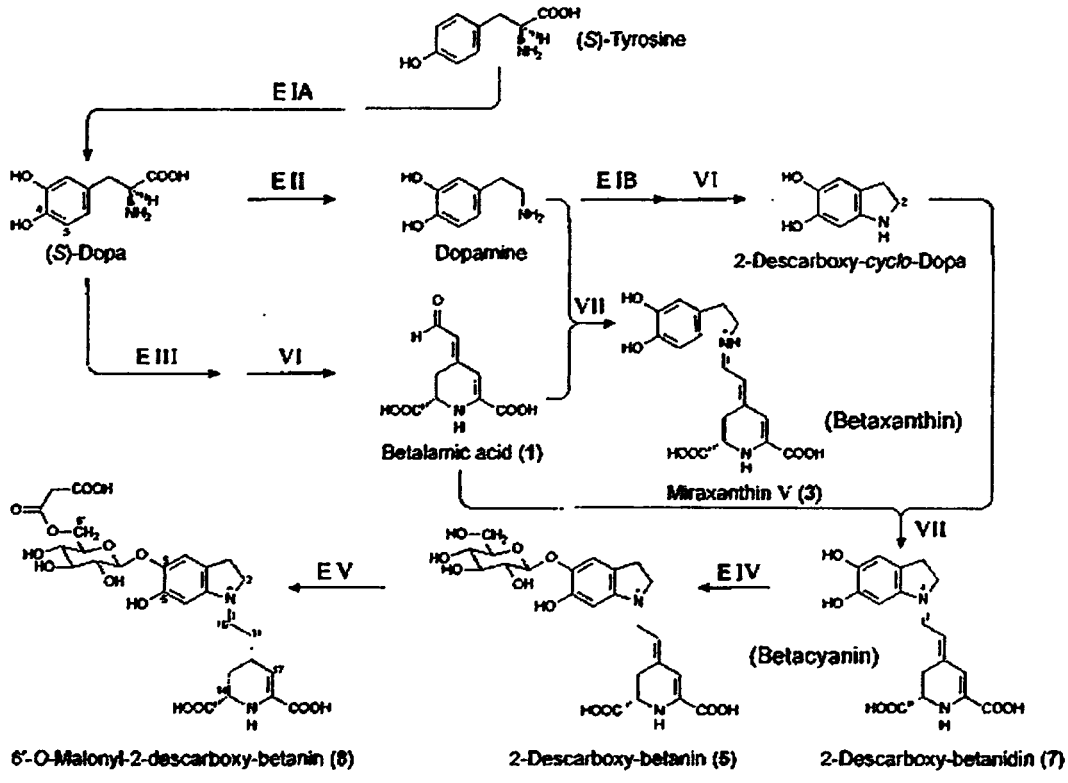
กลไกปฏิกิริยาในการสังเคราะห์เบตาเลนในพืชนั้นเริ่มจากกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) เป็นสารตั้งต้นซึ่งมีโครงร่างหลักเป็น phenyl group โดย โมโนฟีนอล tyrosine ทำปฏิกิริยากับ tyrosinase จะเปลี่ยนเป็น ไดฟีนอล และเปลี่ยนไปเป็นกรดเบตาลามิก เมื่อทำปฏิกิริยากับ DOPA-4,5 dioxygenase และหากไดฟีนอลรวมตัวกับ ไทโรซีเนส จะได้เป็น *O*-quinones ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายเม็ดสีเมลานิน ดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เบตาเลน กับเมลานิน
ที่มา : Muller *et al.* 1996

Kobayashi *et al.* (2000) ได้อธิบายการสังเคราะห์เบตาเลน ไว้ว่า tyrosine เมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ tyrosinase ยังรวมตัวกับ cyclo-DOPA โดยมี dopaquinone เป็นสาร intermediate โครงสร้างที่เป็นวงแหวนของ DOPA ตรงตำแหน่งพันธะที่ 4,5 จะแตกออกได้สารตัวกลางเป็น seco – DOPA แต่จะไม่เสถียรและจัดเรียงตัวใหม่เป็น betalamic acid ซึ่งเป็นสารที่ให้สีในเบตาเลน ซึ่งในขั้นตอนนี้จะใช้เอนไซม์ DOPA-4, 5 dioxygenase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา หลังจากนั้นกรดเบตาลามิกจะรวมตัวกับ dopamine กลายเป็นสารประกอบสีเหลืองที่เรียกว่า betaxanthin (480 nm) หรืออาจรวมตัวกับ cyclo- DOPA ให้สารสีม่วงแดงที่เรียกว่า betacyanin (540 nm) (Mobhammer *et*

al. 2005) cyclo - DOPA ผลิตสาร betacyanins ที่มีสีแดง- ม่วง ส่วนการรวมตัวกับกรดอะมิโน อื่นๆ จะผลิต betacyanins ที่ให้สีเหลือง



ภาพที่ 2.4 กระบวนการสังเคราะห์สารเบตาเลน ใน *Beta vulgaris*

ที่มา : Kobayashi *et al.* (2000) ; Kobayashi *et al.* (2001)

2.9 การเก็บรักษาสารเบตาเลน

เบตาเลนมีความเสถียรต่ำจะเสื่อมสภาพได้ง่ายเมื่อถูกแสงสว่าง ความร้อน ออกซิเจน ภาวะเป็นด่างที่สูง โลหะหนัก และ เอนไซม์บางชนิด Stintzing and Carle (2004) ได้อธิบายปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการเสื่อมสภาพดังนี้

2.9.1 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) เบตาเลนจะคงสภาพที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 3.5-7.0 หาก ค่าความเป็นกรด-ด่าง ลดลงต่ำกว่า 3.5 จะส่งผลให้ปริมาณสารเบตาแซนทิน และเบตาไซยานินที่ตรวจพบลดปริมาณลง เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่าง สูงกว่า 7.0 ปริมาณสารที่ตรวจพบก็จะลดปริมาณลงเช่นกัน (Stintzing and Carle . 2004)

2.9.2 อุณหภูมิ ส่งผลโดยตรงกับปริมาณของสาร เบตาเลน โดยอุณหภูมิที่สูงนั้นจะทำให้สีของสารละลายลดลง Stintzing and Carle (2004) รายงานว่าเมื่อลดอุณหภูมิลงสีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีแดงเพิ่มขึ้น และเมื่อสารเบตาเลนถูกแสงแดด อัตราเสื่อมสภาพของสารจะเพิ่มสูงขึ้น

ถึง 15.6% ที่ 15 องศาเซลเซียส และ Herbach *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษา โครงสร้างและความเสถียรของสารเบตาไซยานินที่สกัดจากแก้วมังกร (*Hylocereus polyrhizus*) โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 6 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าที่ 4 องศาเซลเซียสมีปริมาณสารเบตาไซยานินเหลือมากกว่าที่ 6 องศาเซลเซียส

2.9.3 ก๊าซออกซิเจน เมื่อสารเบตาเลนสัมผัสกับออกซิเจนจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของวง (cyclic) ที่เป็นโครงสร้างหลักทำให้วงแตกออกเพื่อเชื่อมพันธะคู่กับออกซิเจนแทน ทำให้คุณสมบัติของเบตาเลนเสื่อมไปประมาณ 25 % ภายใน 50 ชั่วโมง และอัตราเสื่อมสภาพของเบตาเลนเมื่อสัมผัสกับออกซิเจน นั้นพบว่า ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 พบว่าเสื่อมสภาพมากถึง 15 % เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่เก็บในไนโตรเจน (Thimmaraju *et al.* 2003)

2.10 สารลดการเสื่อมสภาพ

เนื่องจากสารเบตาเลนมีโครงสร้างหลักเป็นวงและมีคุณสมบัติเป็นสารประกอบ arenas คือ สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีส่วนประกอบแอโรแมติกในโมเลกุลเดียวกัน ซึ่ง อุดม ก๊กผล และคณะ (2543) ได้อธิบายปฏิกิริยาของสารประกอบ arenes เอาไว้ว่า เมื่อมีแสงหรือความร้อนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ปฏิกิริยาจะเกิดบนส่วนที่เป็น aliphatic แต่หากเกิดการทำปฏิกิริยากับพวกไอออน halide จะเกิดปฏิกิริยาที่เรียกว่า free radical ได้แก่ Cl_2 และ Br_2 ที่โดนแสงหรือความร้อนจะแตกตัวเป็นอะตอม เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ออกซิไดซ์อย่างต่อเนื่อง โดยดึงไฮโดรเจนอะตอมออกไปแล้วเข้าเกาะแทนที่ทำให้โครงสร้างหลักเปลี่ยนไป การเติมสารที่มีคุณสมบัติถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายกว่าสารเบตาเลนลงไปจะช่วยลดการเสื่อมสภาพของเบตาเลนลงได้ เนื่องจากสารที่เติมลงไปจะถูกออกซิไดซ์แทนที่สารเบตาเลน ทำให้สารเบตาเลนคงตัวได้นานขึ้น สารลดการเสื่อมสภาพที่ใช้กับสารสกัดเบตาเลนสามารถแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

2.10.1 สารประเภทกรด

Herbach *et al.* (2006) ทดสอบสารลดการเสื่อมสภาพ 3 ชนิด ได้แก่ กรดแอสคอบิก กรดไอโซแอสคอบิก และกรดซิตริก ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 1 % นำไปให้ความร้อน 85 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง และนำมาแช่เย็นที่ 10 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่ากรดแอสคอบิก 1 % มีประสิทธิภาพสูงสุดในทุกการทดลอง รองลงมาได้แก่ กรดแอสคอบิก 0.1 % และกรดไอโซแอสคอบิก 0.1 และ 1% ที่ให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติ และ Thimmaraju *et al.* (2003) ได้สกัดสารเบตาเลนจากรากบีทรูท (*Beta vulgaris*) พบว่าเติมกรดไฮโดรคลอริก กรดแอสคอบิก หรือกรดฟอร์มิกลงไปเพื่อควบคุม pH ให้อยู่ประมาณ 5.5-6.0 จะช่วยให้เบตาเลนมีความคงตัวได้ดีขึ้น

2.10.2 สารประเภทน้ำตาล

Stintzing and Carle (2004) ได้เติมน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส ร่วมกับการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็นกรดอ่อนๆ พบว่าช่วยลดการเสื่อมสภาพของสารเบตาเลนได้

2.10.3 สารประกอบชนิดอื่นๆ

Mueller *et al.* (1996) ได้เติมกลีเซอรอล 10 % ลงในสาร tyrosinase ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเบตาเลน ก่อนเก็บรักษาในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน พบว่าช่วยยืดอายุของสารได้ เนื่องจากช่วยป้องกันการแข็งตัวของสาร นอกจากนี้ยังทดลองเติมคอปเปอร์ซัลเฟต ลงในการทดลองเก็บรักษาสาร tyrosinase ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเทียบกับชุดทดลองที่ไม่ได้เติมคอปเปอร์ซัลเฟต พบว่าชุดที่ไม่ได้เติมคอปเปอร์ซัลเฟตมีปริมาณ tyrosinase ลดลงครึ่งหนึ่งภายใน 72 ชั่วโมง

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สัตว์และพืชทดลอง

3.1.1 ปลาหมอนกแก้วซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างสายพันธุ์ *Cichlasoma citrinellum* x *Vieja synspilum* อายุประมาณ 6 เดือน จำนวน 120 ตัว

3.1.2 ผลแก้วมังกรสายพันธุ์เนื้อขาวเปลือกแดง (*Hylocereus undatus*) ซื้อจากตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 อุปกรณ์

3.2.1.1 ตู้ปลาขนาด 230 ลิตร จำนวน 15 ตู้พร้อมชุดกรองน้ำ

3.2.1.2 เครื่องวัดสี (chromameter) ยี่ห้อ Konica Minolta รุ่น CR-10

3.2.1.3 เครื่องพิมพ์ความร้อน (thermal printer) ยี่ห้อ Seiko Instrument Inc. รุ่น DPU-414

3.2.1.4 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง

3.2.1.5 อาหารปลาชนิดเม็ดลอยน้ำสำหรับปลากินเนื้อยี่ห้อ คาร์กิลด์

3.2.1.6 เครื่องปั่นอาหาร (blender)

3.2.1.7 เครื่องกรองแบบสุญญากาศ ยี่ห้อ Emerson รุ่น S055JX PPZ-7714

3.2.1.8 กรวยกรองแบบสุญญากาศ (buchner funnel พร้อม sucktion flask) และกระดาษกรอง ยี่ห้อ Whatman เบอร์ 40 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 125 มิลลิเมตร

3.2.1.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ยี่ห้อ MILTON ROY รุ่น spectronic 401 และคิวเวตแบบแก้ว

3.2.1.10 ตู้เย็นสำหรับควบคุมอุณหภูมิ -10 และ 5 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Toshiba

3.2.1.11 ตู้เย็นสำหรับควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Brandt

3.2.1.12 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ยี่ห้อ HANNA รุ่น HI 9025

3.2.1.13 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ยี่ห้อ Hettich รุ่น Universal 16 R

3.2.1.14 ขวดไวออล (vial) ขนาด 5 มิลลิลิตร

3.2.1.15 เครื่องตัดชิ้นเนื้อ ยี่ห้อ Microm รุ่น HM 335E

3.2.1.16 เครื่องเตรียมเนื้อเยื่อ (tissue processor) ยี่ห้อ Leica รุ่น TP 1020

3.2.1.17 อ่างทำความร้อนชนิดควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Bio-optica รุ่น 17-2000

3.2.1.18 หม้อต้มพาราฟิน (paraffin bath) ยี่ห้อ Medax รุ่น 47311

3.2.1.19 เครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer) ยี่ห้อ Fisher Scientific รุ่น 77

3.2.1.20 แท่นทำความเย็น (cold plate) ยี่ห้อ Bio-optica รุ่น PF100

3.2.1.21 กล้องจุลทรรศน์ชนิดกำลังขยายต่ำและชนิดกำลังขยายสูง

3.2.2 สารเคมี

3.2.2.1 เอธานอล ความเข้มข้น 80% (A.R. grade)

3.2.2.2 กรดแอซิติก

3.2.2.3 สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (ภาคผนวก ก.)

3.2.2.4 กรดซิตริก

3.2.2.5 กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 10%

3.2.2.6 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น10%

3.2.2.7 น้ำกลั่น

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาวิธีการเก็บรักษาสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกร แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย ได้แก่

3.3.1.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันการเสื่อมสภาพที่เหมาะสมสำหรับสารสกัดเบตาเลน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design : CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ชุดการทดลอง (treatment) ที่ทดสอบ คือ สารป้องกันการเสื่อมสภาพของเบตาเลน 3 ชนิดได้แก่ กรดแอซิติก 1 % บัฟเฟอร์ฟอสเฟต (buffer phosphate) 1 % และ กรดซิตริก 1 %

การทดสอบดำเนินการโดย

(1) นำผิวเปลือกผลแก้วมังกรสดมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ โดยวิธี Maceration แบบประยุกต์ แช่เปลือกแก้วมังกรในตัวทำละลายเอธานอล 80 % ในอัตราส่วน 250 กรัม : 500 มิลลิลิตร นาน 30 นาที จากนั้นนำเปลือกแก้วมังกรไปปั่นให้ละเอียด ด้วยเครื่องปั่นอาหาร (blender) กรองส่วนของสารละลายออกด้วยผ้าขาวบาง และนำเปลือกไปปั่นซ้ำและกรองจนกระทั่งเปลือกผลแก้วมังกรไม่มีสี นำสารละลายที่กรองได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แบ่งสารเบตาเลนที่สกัดได้ออกเป็น 3 ขวด ขวดละ 500 มิลลิลิตร

(2) เตรียมสารลดการเสื่อมสภาพ 3 ชนิด ตามความเข้มข้นที่กำหนด (การเตรียมบัฟเฟอร์ฟอสเฟตแสดงในภาคผนวก ก.)

(3) ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างของสารละลายเบตาเลนที่ได้จากข้อ (1) ทั้ง 3 ขวด ให้เท่ากับ 6 โดยใช้กรดไฮโดรคลอลิกความเข้มข้น 10 % และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 % จากนั้นแยกเติมสารลดการเสื่อมสภาพ ขวดละ 1 ชนิดผสมให้เข้ากัน โดยให้แต่ละขวดมีคุณสมบัติดังนี้

ขวดที่ 1 สารสกัดเบตาเลนที่มีกรดแอซิติก เป็นองค์ประกอบ 1 %

ขวดที่ 2 สารสกัดเบตาเลนที่มีบัฟเฟอร์ฟอสเฟต เป็นองค์ประกอบ 1 %

ขวดที่ 3 สารสกัดเบตาเลนที่มีกรดซิตริก เป็นองค์ประกอบ 1 %

แบ่งสารสกัดเบตาเลนที่มีสารลดการเสียสภาพแต่ละขวดใส่ขวดไวออลจำนวน 15 ขวดต่อชนิดสาร เก็บรักษาสารสกัดดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 14, 21, 28 และ 35 วัน

(4) ตรวจสอบปริมาณสารเบตาเลนที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 538 nm ครั้งละ 3 ขวด ต่อชนิดของสารลดการเสียสภาพ บันทึกผลและนำไปคำนวณหาปริมาณสารเบตาเลนจากสูตร (Stingzing *et al.* 2006)

$$A = abc$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 538 nm

a = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของเบตาเลนที่ 538 nm มีค่าเท่ากับ 1,120

b = ความกว้างคิวเวต 1 เซนติเมตร มีค่าเท่ากับ 1

c = ปริมาณเบตาเลนในสารสกัดตัวอย่าง (กรัม)

ทดสอบทางสถิติเพื่อหาชนิดสารลดการเสื่อมสภาพที่ให้ผลดีที่สุด 1 ชนิดมาทดสอบการเสื่อมสภาพในการทดลองต่อไป

3.3.1.2 การทดลองผลของอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาสารสกัดเบตาเลน

จากข้อ 3.3.1.1 พบว่ากรดแอซิติก 1 % ให้ผลดีที่สุดในการป้องกันการเสื่อมสภาพของสารสกัดเบตาเลน ในการทดลองครั้งนี้จึงใช้กรดแอซิติก 1 % ผสมในสารสกัดเบตาเลน จัดกลุ่มทดลองแบบ 3x3 factorial in randomized complete block design (factorial in RCBD) จำนวน 3 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ปัจจัยแรกคือ อุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ อุณหภูมิ -20, -10 และ 5 องศาเซลเซียส และปัจจัยที่สองคือ ระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษา ได้แก่ 0, 35 และ 70 วัน เมื่อครบกำหนดระยะเวลาการเก็บรักษาในแต่ละอุณหภูมิ ตรวจวัดปริมาณสารเบตาเลนที่เปลี่ยนแปลงไป

95074

การเตรียมสารสกัดเบตาเลนที่มีกรดแอซิติก 1 % และการวัดปริมาณสารสกัดเบตาเลนดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.1

3.3.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาระดับของสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกรที่เหมาะสมต่อการเร่งสีผิวปลาหมอนกแก้ว

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design : CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ชุดการทดลอง (treatment) คือ ความเข้มข้นของสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกแก้วมังกร 5 ระดับ ได้แก่ 0, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่ออาหารปลา 1 กิโลกรัม (มก./กก.) ใช้ปลา 8 ตัวต่อซ้ำ ได้แก่

ชุดทดลองที่ 1 ชุดควบคุมเลี้ยงปลาด้วยอาหารเม็ดไม่ผสมสารสกัดจากเปลือกแก้วมังกร

ชุดทดลองที่ 2 ชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดที่ผสมสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกแก้วมังกร ความเข้มข้น 20 มก./กก.

ชุดทดลองที่ 3 ชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดที่ผสมสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกแก้วมังกร ความเข้มข้น 30 มก./กก.

ชุดทดลองที่ 4 ชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดที่ผสมสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกแก้วมังกร ความเข้มข้น 40 มก./กก.

ชุดทดลองที่ 5 ชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดที่ผสมสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกแก้วมังกร ความเข้มข้น 50 มก. / กก.

การทดลองดำเนินการโดย

(1) เตรียมสารสกัดจากเปลือกผลแก้วมังกรตามวิธีการในข้อ 3.3.1.1 โดยใช้เปลือกผลแก้วมังกรในปริมาณที่แตกต่างกันเพื่อให้น้ำสารสกัดที่ได้เป็น 0, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่ออาหารปลา 1 กิโลกรัม ตามที่กำหนด (ใช้เปลือกแก้วมังกร 0, 100, 150, 200 และ 250 กรัมต่อเอธานอล 80% ปริมาตร 500 มิลลิลิตรตามลำดับ) ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างของสารสกัดให้เท่ากับ 6 และปรับให้มีคุณสมบัติเป็นสารละลายกรดแอซิติกให้มีความเข้มข้น 1 %

(2) นำอาหารปลากินเนื้อชนิดเม็ด มาเกลี่ยบนถาดอะลูมิเนียม จำนวน 5 ถาด ถาดละ 500 กรัม ผสมสารสกัดจากเปลือกผลแก้วมังกรที่ได้จากข้อ (1) โดยการรินสารสกัดให้กระจายบนอาหาร และคลุกเคล้าให้เข้ากับอาหารเม็ดจนทั่ว อาหารทุกสูตรจะถูกนำไปผึ่งลมในที่ร่มเป็นเวลา 1 วันในห้องที่มีอากาศถ่ายเท เมื่ออาหารแห้งบรรจุในถุงพลาสติกปิดผนึกเพื่อลดการสัมผัสอากาศและนำเข้าเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

(3) เลี้ยงปลาในตู้กระจกขนาด 230 ลิตร ให้อาหารแก่ปลาวันละ 3% ของน้ำหนักตัวปลา โดยให้วันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) ดูดตะกอนที่พื้นตู้ทุก 2 วัน เปลี่ยนถ่ายน้ำ 30 % ทุกสัปดาห์ สุ่มชั่งน้ำหนักปลาหมอนกแก้วทุก 2 สัปดาห์ครั้งละ 3 ตัว (37.5%) เพื่อคำนวณน้ำหนักอาหารให้เหมาะสมกับน้ำหนักที่เปลี่ยนไปและชั่งน้ำหนักทุกตัวก่อนการเริ่มทดลอง และชั่งน้ำหนักอีกครั้ง เมื่อครบ 12 สัปดาห์

การบันทึกผล

(1) วัดการเจริญเติบโตของปลาหมอนกแก้ว ด้วยวิธีการชั่งน้ำหนักก่อนการทดลอง จากนั้นสุ่มตัวอย่างปลาหมอนกแก้วตู้ละ 3 ตัว นำมาชั่งน้ำหนัก ทุก 2 สัปดาห์ จนกระทั่งครบ 12 สัปดาห์ แล้วนำมาคำนวณหาอัตรารอด และน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นดังนี้

(1.1) อัตรารอด = $\frac{\text{จำนวนปลาที่เหลือหลังทดลอง x 100}}{\text{จำนวนปลาเริ่มต้นทดลอง}}$

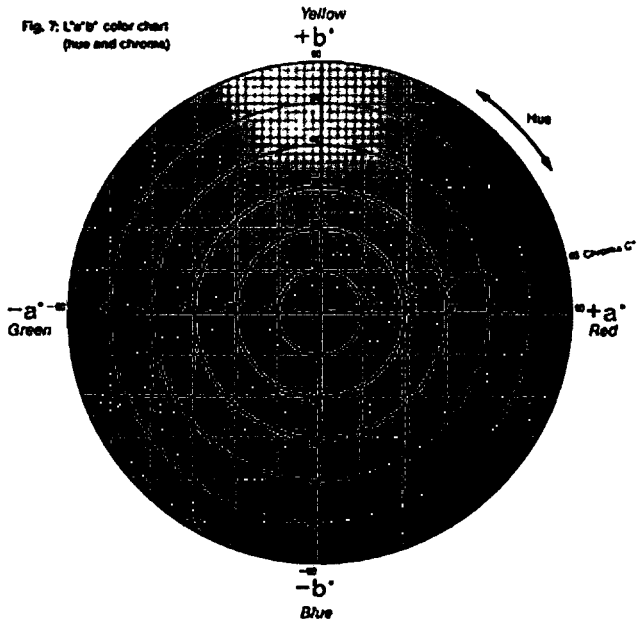
(1.2) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น = น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย – น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น

(2) วัดการเปลี่ยนแปลงของสีทุกๆ 2 สัปดาห์ ตั้งแต่เริ่มจนสิ้นสุดการทดลอง โดย สุ่มปลาซ้ำละ 3 ตัว มาสลบด้วยยาสลบ นำใส่ถุงพลาสติกและวัดสีบนลำตัวปลา โดยใช้เครื่องวัดสี (chromameter) วัดสีทั้งสองด้านของลำตัวปลา บริเวณกลางลำตัว ใต้ครีบหลัง ตลอดการเลี้ยง 16 สัปดาห์ เพื่อหาค่าของสีที่เปลี่ยนแปลงแบบ CIE L*a*b* (Van der Salm *et al.* 2004) วัดค่าของ " L", " a " และ " b " ซึ่งมีความหมายดังนี้

L แสดงถึงความสว่างของสี (Lightness) มีค่าระหว่าง 0 – 100 (สีดำถึงสีขาว)

a แสดงถึงค่าความเข้มของสีแดง (+) และ สีเขียว (-) มีค่าระหว่าง -100 ถึง + 100

b แสดงถึงค่าความเข้มของสีเหลือง (+) และ สีน้ำเงิน (-) มีค่าระหว่าง -100 ถึง + 100



ภาพที่ 3.1 แบบจำลองสามมิติของการวัดสี ระบบ L*a*b*
ที่มา : Van der Salm *et al.* 2004

(3) หลังจากสิ้นสุดการทดลอง สุ่มตัวอย่างปลาหมอนกแก้วชุดการทดลองละ 6 ตัว แบ่งไปศึกษาลักษณะเม็ดสีผิวภายนอกจำนวน 3 ตัว และแบ่งไปทำสไลด์ถาวรจำนวน 3 ตัว โดยมีรายละเอียดดังนี้

(3.1) การศึกษาเซลล์เม็ดสีภายนอก นำปลาไปแช่ใน buffer formalin 10% นาน 24 ชั่วโมง นำมาดึงเกล็ดบริเวณข้างลำตัว วางบนแผ่นสไลด์ เพื่อศึกษาเซลล์เม็ดสี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พร้อมบันทึกภาพ

(3.2) การศึกษาเนื้อเยื่อโดยการทำเป็นสไลด์ถาวร นำตัวอย่างปลามาทำให้สลบด้วยยาสลบเกินขนาด และตัดตัวอย่างผิวหนังพร้อมทั้งกล้ามเนื้อบริเวณข้างลำตัว ไปแช่ใน buffer formalin 10 % นาน 24 ชั่วโมง เปลี่ยนน้ำยาแล้วแช่ซ้ำ ต่อมาแช่น้ำยาย่อยกระดูก (decalcification solution) (ภาคผนวก ข.1.2) แล้วตัดชิ้นเนื้อแบ่งใส่ตลับใส่เนื้อเยื่อ ทำการล้างน้ำโดยให้น้ำไหลผ่านอย่างช้าๆ นาน 2-4 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างเนื้อเยื่อไปทำการขจัดน้ำ (dehydration) โดยผ่านขั้นตอนตามวิธีมาตรฐานของ Humason (1979) (ภาคผนวก ค.) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อปลาหมอนกแก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากสไลด์ที่ทำการย้อมสีแล้วพร้อมบันทึกภาพ

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple's Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

3.5 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการปลาสวยงาม ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.6 ระยะเวลาในการทำวิจัย

เดือนกันยายน 2549 – เดือนธันวาคม 2550

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การทดลองที่ 1 วิธีการเก็บรักษาสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกร

4.1.1 การทดลองย่อยที่ 1 การทดลองประสิทธิภาพของสารป้องกันการเสื่อมสภาพที่เหมาะสมสำหรับสารสกัดเบตาเลน

จากการเก็บรักษาของสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกร โดยการใช้สารช่วยลดการเสื่อมสภาพ 3 ชนิด ได้แก่ สารละลายกรดซิตริก 1% บัฟเฟอร์ฟอสเฟต 1% (buffer phosphate 1%) และสารละลายกรดแอซิติก 1% ที่สกัดเปลือกผลแก้วมังกรโดยใช้เอธานอลความเข้มข้น 80 %เป็นระยะเวลา 35 วัน ที่ 5 องศาเซลเซียส เพื่อหาชนิดสารที่เหมาะสมในการเก็บรักษาสารสกัดเบตาเลน พบว่าการเสื่อมสภาพของสารเบตาเลนที่สกัดได้จะมีอัตราเสื่อมสภาพอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่ง 35 วัน เมื่อพิจารณาแบ่งตามชนิดสาร เมื่อครบ 35 วัน สารป้องกันเสื่อมสภาพที่ได้ผลที่สุดคือ กรดแอซิติก 1 % มีค่าเฉลี่ยที่ 1.74±0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร จากค่าเริ่มต้น 1.92±0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดที่เสื่อมสภาพรองลงมาได้แก่ สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 1 % ที่ตรวจพบสารเบตาเลนมีค่าเฉลี่ยที่ 1.66±0.14 มิลลิกรัมต่อลิตร จากค่าเริ่มต้น 1.92±0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และ สารสกัดเบตาเลนที่เติมกรดซิตริก 1% ตรวจพบสารเบตาเลนน้อยที่สุด คือ มีค่าเฉลี่ย 1.61±0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร จากค่าเริ่มต้น 1.92±0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร จากตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าสารทั้งสามชนิดให้ประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันมากนัก แต่กรดซิตริก 1 % มีความสามารถลดการเสื่อมสภาพของสารสกัดเบตาเลนได้น้อยที่สุด สอดคล้องกับ Herbach *et al.* (2006) ที่ทดลองสารลดการเสื่อมสภาพของสารสกัดเบตาเลน โดยเปรียบเทียบกันระหว่าง กรดแอสคอบิก กรดไอโซแอสคอบิก และ กรดซิตริก พบว่าสารสกัดเบตาเลนที่เติมกรดแอสคอบิก มีประสิทธิภาพลดการเสื่อมสภาพได้ดีที่สุด รองลงมาคือ การเติมกรดไอโซแอสคอบิก และ การเติมกรดซิตริก มีประสิทธิภาพต่ำสุด การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบเบตาเลนเมื่อเติมสารป้องกันการเสื่อมสภาพทั้ง 3 ชนิดลงไปจะเกิดการเปลี่ยนแปลงบางส่วนดังนี้ การเติมแอซิติก ลงไปในเอธานอล จะกลายเป็นเอสเตอร์ ในรูปของ เอทิลเอทาโนเอต (เอมิลอะซีเทต) และในปฏิกิริยาจะเกิดน้ำเพียง 1 โมเลกุลจากปฏิกิริยาดังกล่าว (ภาพที่ 4.1) สาเหตุที่เบตาเลนที่ผสมกรดแอซิติกความเข้มข้น 1 % เหลือมากที่สุดเป็นเพราะเบตาเลนเป็นสารประกอบอะโรมาติก ที่แบ่งออกได้หลายรูป อาทิเช่น แอมีน ฟีนอล คาร์บอกซีลิก ส่งผลทำให้โครงสร้างมีความเสถียรน้อย สามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นได้โดยง่าย ทำให้คุณสมบัติเสื่อมไปบางส่วน ส่งผลให้อัตราการดูดกลืนแสงเปลี่ยนไป และยิ่งในโครงสร้างของสารในชุดแอมีน (ภาพที่ 2.2) เมื่อสัมผัสกับน้ำและแอลกอฮอล์ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย

ตารางที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารเบตาเลน(มิลลิกรัม/ลิตร)ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสในการทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันการเสื่อมสภาพ 3 ชนิด

อายุ (วัน)	กรดแอซิติก 1 %	บัฟเฟอร์ฟอสเฟต 1 %	กรดซิตริก 1 %
0	1.92±0.00[a]	1.92±0.00[a]	1.92±0.00[a]
1 ชั่วโมง	1.84±0.00[b]	1.82±0.00[b]	1.77±0.00[a]
14	1.79±0.00[b]	1.73±0.01[b]	1.66±0.02[a]
21	1.72±0.00[b]	1.71±0.15[b]	1.65±0.01[a]
28	1.77±0.01[b]	1.71±0.01[a]	1.67±0.02[a]
35	1.74±0.01[c]	1.66±0.01[b]	1.61±0.00[a]

* ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอน หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$)

$$CH_3COOH+CH_3CH_2OH \longrightarrow CH_3COOCH_2CH_3 + H_2O$$

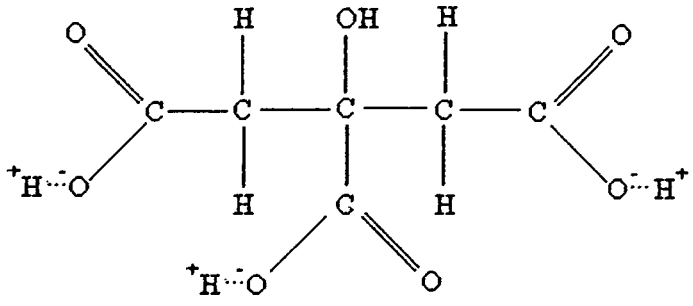
ภาพที่ 4.1 การเปลี่ยนรูปของเอธานอลเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดแอซิติก
ที่มา : กฤษณา ชุติมา (2538)

จึงถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย ซึ่ง primary amine เมื่อถูกออกซิไดซ์แล้วจะได้ secondary-amine และถูกออกซิไดส์ต่อเป็น hydroxylamine ดังภาพที่ 4.2

$$R_2NH + H_2O \longrightarrow R_2NOH + H_2$$

ภาพที่ 4.2 การเปลี่ยนรูปของสารประกอบแอมีน เมื่อถูกไฮโดรไลซ์
ที่มา : โสภณ เริงสำราญ และคณะ (2542)

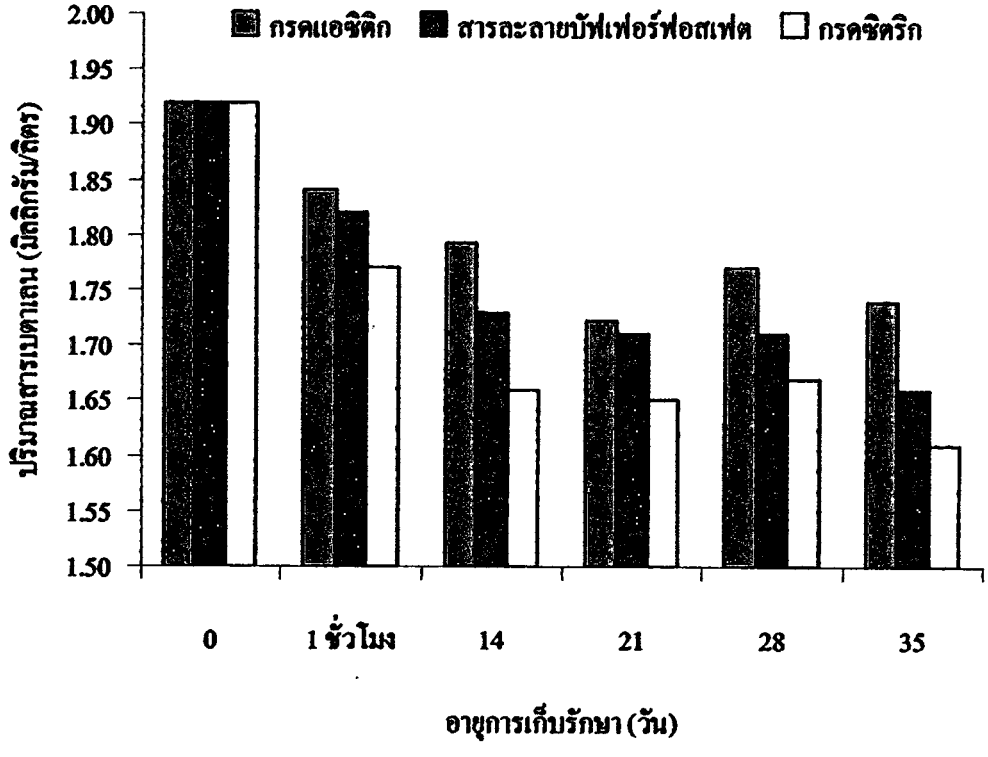
เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างกรดซิตริก (ภาพที่ 4.3) จะพบโครงสร้างหมู่ OH^- จำนวนมาก เมื่อเติมลงในสารอินทรีย์จะเกิดการแตกตัว และทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์เบตาเลนได้ นอกจากนี้ด้วยโครงสร้างที่มีอะตอมคาร์บอนเป็นจำนวนมาก ทำให้มีน้ำหนักโมเลกุลที่มาก เนื้อสารที่จะทำปฏิกิริยากับฟรีเรดดิคอล (ไอออนลบที่แตกตัวอย่างอิสระ) มีน้อยกว่ากรดแอซิติก ทำให้สารเบตาเลนในกรดซิตริก 1 % เหลือปริมาณเบตาเลนน้อยกว่าการเติมกรดแอซิติก



ภาพที่ 4.3 โครงสร้างของกรดซิตริก

ที่มา : Anonymous. (2008b)

แต่บัฟเฟอร์ฟอสเฟต มีส่วนผสมของน้ำกลั่นเป็นจำนวนมากทำให้เกิดการไฮโดรไลซ์เบตาเลน ส่งผลให้มีปริมาณเบตาเลนลดลง เช่นเดียวกับการเติมกรดซิตริก



ภาพที่ 4.4 ผลของการเติมกรดแอซิติก 1 %, สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 1% และ กรดซิตริก 1 % ในสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกแก้วมังกร ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

ดังนั้น การเติมกรดแอซิติก 1 % ในภาพที่ 4.4 เป็นสารช่วยลดการเสื่อมสภาพ ซึ่งมีคุณสมบัติในการลดการเสื่อมสภาพของสารเบตาเลนเหมาะสมกว่า บัฟเฟอร์ฟอสเฟต 1 % และ กรดซิตริก 1% ในการทดลองผลของอุณหภูมิต่อการเสื่อมสภาพของเบตาเลนในหัวข้อถัดไป

4.1.2 การทดลองย่อยที่ 2 การทดลองผลของอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาสารสกัดเบตาเลน

เมื่อพิจารณาถึงชนิดสารป้องกันการเสื่อมภาพที่ให้ผลดีที่สุดในการทดลองครั้งนี้ คือ กรดแอซิติก 1 % จากนั้นทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการป้องกันการเสื่อมสภาพของสารสกัดเบตาเลน ในอุณหภูมิ 3 ระดับ คือ -20, -10 และ 5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 70 วัน ให้ผลการศึกษาดังตารางที่ 4.2

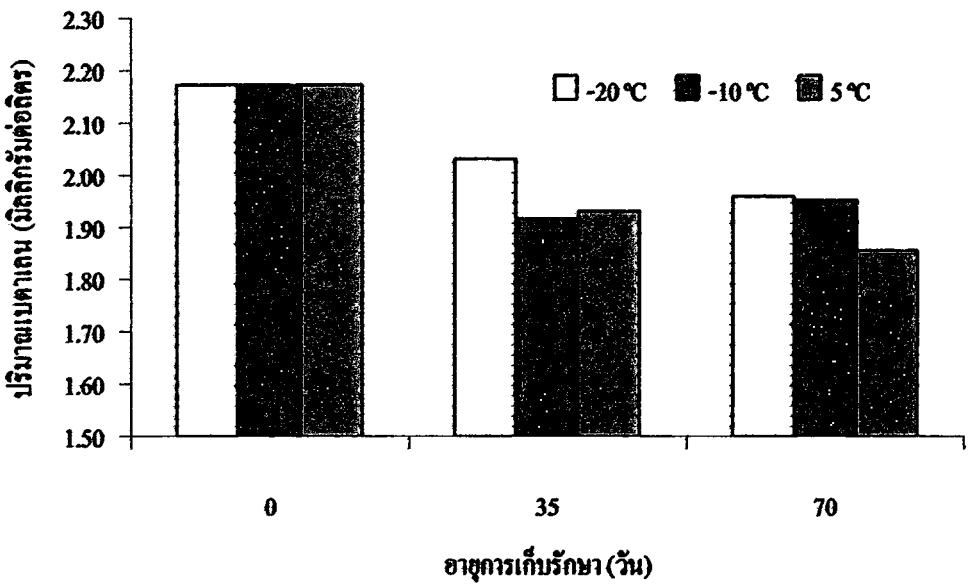
ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารเบตาเลนที่เติมกรดแอซิติก 1 % เก็บรักษาที่อุณหภูมิที่ต่างกัน และระยะเวลาที่ต่างกัน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

วัน	อุณหภูมิ (°C)			Mean ± SE
	-20°C	-10°C	5°C	
0	2.17±0.00	2.17±0.00	2.17±0.00	2.17±0.00^{b}
35	2.03±0.01	1.92±0.06	1.93±0.04	1.96±0.01^{a}
70	1.96±0.00	1.95±0.05	1.85±0.01	1.92±0.01^{a}
Mean ± SE	2.05±0.01^{a}	2.01±0.01^{ab}	1.98±0.01^{b}	

* ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอน หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$)

การเก็บรักษาสารเบตาเลนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ค่าเฉลี่ยเริ่มต้นการทดลองอยู่ที่ 2.17±0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อครบ 35 วันปริมาณสารเบตาเลนอยู่ที่ 2.03±0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง 70 วันมีค่า 1.96±0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนในชุดเก็บรักษาสารเบตาเลนที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 35 วันปริมาณสารเบตาเลนอยู่ที่ 1.92±0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และสิ้นสุดการทดลอง 70 วันมีค่า 1.95±0.05 ชุดการเก็บรักษาสารเบตาเลนที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 35 วันปริมาณสารเบตาเลนอยู่ที่ 1.93±0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง 70 วันมีค่า 1.85±0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร จากตารางที่ 4.2 จะเห็นว่าระยะเวลาในการเก็บรักษากับปริมาณเบตาเลนที่วิเคราะห์ได้นั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เช่นเดียวกับอุณหภูมิที่เก็บรักษาทั้งสามระดับนั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)เช่นกัน โดยที่ -20 องศาเซลเซียสมีประสิทธิภาพมากที่สุด ค่าเฉลี่ย 2.05±0.01 รองลงมาคือ

-10 องศาเซลเซียสมีค่า 2.01±0.01 และที่ 5 องศาเซลเซียสอยู่ที่ 1.98±0.01 สอดคล้องกับ ดวงใจ พวงแก้ว (2548), Cai *et al.* (2005) และ Gandia-Herrero *et al.* (2005b) ที่รายงานว่าเบตาเลนมีอัตราเสื่อมสภาพน้อยลงเมื่ออยู่ในอุณหภูมิต่ำ ถึงแม้ผลการทดลองที่อุณหภูมิ -20 ให้ผลดีที่สุด แต่ในการนำเบตาเลนไปใช้จริงของเกษตรกร อุณหภูมิดังกล่าวเกษตรกรไม่สามารถจัดเตรียมได้ ดังนั้น การเก็บรักษาเบตาเลนเพื่อลดการเสื่อมสภาพที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส จะมีความเหมาะสม เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่สามารถเก็บรักษาในตู้เย็นทั่วไป และให้ประสิทธิภาพในการลดการเสื่อมสภาพไม่แตกต่างมากนัก



ภาพที่ 4.5 ผลของการเติมกรดแอซิติก 1 % ในสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกแก้วมังกร ที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เก็บรักษาต่างกัน

4.2 การทดลองที่ 2 ระดับของสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกรที่เหมาะสมการเร่งสีผิวปลาหมอนกแก้ว

จากการศึกษาค่าการเปลี่ยนแปลงความเข้มสีของปลาหมอนกแก้ว ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบตาเลนที่ระดับความเข้มข้น 0, 20, 30, 40 และ 50 มก./กก. โดยวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของสีผิวบริเวณลำตัวด้วยเครื่องวัดสี (Chromameter) ซึ่งอ่านค่าในระบบ CIE L *a* b* ทุกๆ 2 สัปดาห์ จนกระทั่งครบ 12 สัปดาห์ โดยค่า L คือ ค่าความสว่างของค่าสี ค่า a* คือ ค่าความเข้มของสีแดง และค่า b* คือ ค่าความเข้มสีเหลือง

4.2.1 ค่าความสว่าง (L) บริเวณลำตัวของปลาหมอนกแก้ว

ผลของค่าความสว่างของผิวหนังบริเวณลำตัวของปลาหมอนกแก้ว พบว่าความสว่างของผิวปลาหมอนกแก้ว มีแนวโน้มลดลงจากสัปดาห์ที่ 2 จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง (ภาพที่ 4.8) เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ ค่าความสว่างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ของปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 0 (T1), 20 (T2), 30 (T3), 40 (T4) และ 50 (T5) มก./กก. ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 จนสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 4.3) ให้ผลดังนี้

ในสัปดาห์ที่ 2 ค่าความสว่างของผิวปลาหมอนกแก้ว ในแต่ละชุดการทดลองพบว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 50 มก./กก.มีค่าความสว่างน้อยที่สุด คือ 38.70±0.89 โดยมีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดทดลองที่ให้อาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 0, 20, 30 และ 40 มก./กก.

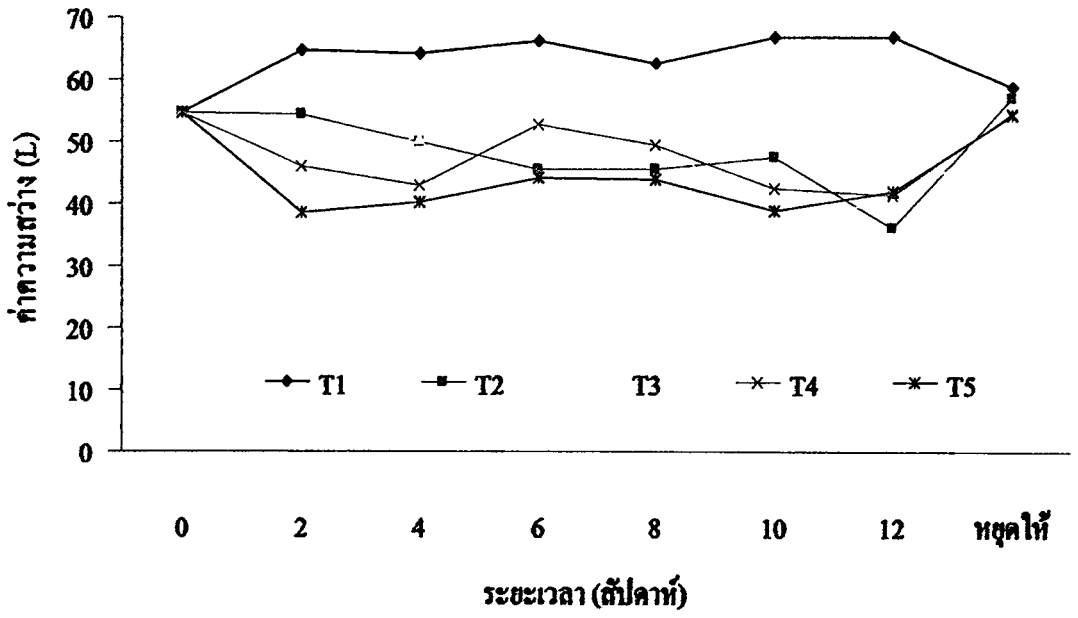
ในสัปดาห์ที่ 4 ค่าความสว่างของผิวปลาหมอนกแก้ว ในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 50 มก./กก.มีค่าความสว่างน้อยที่สุด คือ 40.29±1.39 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดทดลองที่ให้อาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 0, 20, 30 มก./กก. แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัด 40 มก./กก. ($P>0.05$)

ในสัปดาห์ที่ 6 และ 8 ค่าความสว่างของผิวปลาหมอนกแก้ว ในปลาที่เลี้ยงด้วยที่ให้อาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 50 มก./กก.มีค่าความสว่างน้อยที่สุด คือ 44.12±1.86 และ 43.82±1.74 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับชุดทดลองที่ให้อาหารผสมสารสกัดเบตาเลน ความเข้มข้น 20, 30 และ 40 มก./กก.ยกเว้นชุดทดลองที่ให้อาหารไม่ผสมสารสกัดเบตาเลน ($P<0.05$)

ในสัปดาห์ที่ 10 ค่าความสว่างของผิวปลาหมอนกแก้ว ในปลาที่เลี้ยงด้วยที่ผสมสารสกัดเบตาเลน ความเข้มข้น 50 มก./กก.มีค่าความสว่างน้อยที่สุด คือ 38.80±1.52 และให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับชุดทดลองที่ให้อาหารผสมสารสกัดเบตาเลน ความเข้มข้น 20, 30 และ 40 มก./กก.ยกเว้นชุดทดลองที่ให้อาหารไม่ผสมสารสกัดเบตาเลน ($P<0.05$)

ในสัปดาห์ที่ 12 ค่าความสว่างของผิวปลาหมอนกแก้วของปลาที่เลี้ยงด้วยที่ผสมสารสกัดเบตาเลน 40 มก./กก.มีค่าความสว่างน้อยที่สุด คือ 41.28± 3.02 แทนที่ชุดความเข้มข้น 50 มก./กก.แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบตาเลนความเข้มข้น 20, 30 และ 50 มก./กก. ยกเว้นชุดทดลองที่ให้อาหารไม่ผสมสารสกัดเบตาเลน ($P<0.05$)

หลังจากครบ 12 สัปดาห์ เลี้ยงปลาหมอนกแก้วในทุกชุดการทดลองด้วยอาหารไม่ผสมสารสกัดเบตาเลน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าค่าความสว่างของผิวหนังปลาหมอนกแก้วไม่แตกต่างอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างชุดทดลอง



ภาพที่ 4.6 ระดับค่าความสว่าง (L) ของสีผิวปลาเมื่อได้รับเบตาเลนเข้มข้นแตกต่างกัน (0, 20, 30, 40 และ 50 มก./กก.)

การเปลี่ยนแปลงค่าความสว่าง (L) ของผิวหนังปลาหมอนกแก้ว หลังจากให้ปลากินอาหารผสมสารสกัดจากเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกรที่ 0, 20, 30, 40 และ 50 มก. /กก. เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ภาพที่ 4.6) พบว่า ค่าความสว่างของผิวหนังปลาหมอนกแก้วที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่ผสมสารสกัดเบตาเลน ปลาหมอนกแก้วกินอาหารผสมสารเบตาเลนจะทำให้ให้สีผิวของปลาจะมีสีเข้มขึ้น ส่งผลให้ค่าความสว่าง (L) ลดลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาที่กินอาหารผสมที่ให้ปริมาณเบตาเลน 40 และ 50 มก./กก จะพบการลดลงของค่าความสว่าง (L)ได้อย่างชัดเจน และเมื่องดให้อาหารผสมสารเบตาเลนสีผิวของปลาจะปรับตัวให้สว่างขึ้นใกล้เคียงกันในทุกชุดการทดลอง เช่นเดียวกับ ธนากร แก้วละเอียด (2551) ที่ให้อาหารผสมสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกแก้วมังกร แก่ปลาหมอมาลาวีทอง (*Aulonacara* sp.) ในความเข้มข้น 0, 20, 40 และ 60% (เปลือกแก้วมังกร ต่อ ปริมาณเอธานอล) พบว่าระดับค่าความสว่างบนสีผิวของปลาหมอมาลาวีทอง เริ่มเปลี่ยนแปลงหลังจากได้รับอาหารผสมเบตาเลนในสัปดาห์ที่ 2 และแตกต่างมากขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาที่ได้รับอาหารผสมเบตาเลนที่นานขึ้น เมื่อครบ 10 สัปดาห์ พบว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้รับอาหารผสมเบตาเลนให้ค่าความสว่างมากที่สุดคือ 79.47±0.60 ปลาที่ได้รับเบตาเลน 20, 40, และ 60 % ตามลำดับซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ระหว่างชุดการทดลอง

ตารางที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงของระดับค่าความสว่าง (L) ของปลาหมอนกแก้วเมื่อได้รับเบตาเลน

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ชุดการทดลอง				
	T1	T2	T3	T4	T5
0	54.69±0.96^{a}	54.69±0.96^{a}	54.69±0.96^{a}	54.69±0.96^{a}	54.69±0.96^{a}
2	64.73±1.79^{d}	54.41±3.21^{c}	48.14±2.20^{b}	46.17±1.71^{b}	38.70±0.89^{a}
4	64.08±2.72^{c}	49.9±2.89^{b}	50.50±1.99^{b}	42.97±1.68^{a}	40.29±1.39^{a}
6	66.20±1.85^{c}	45.63±1.67^{a}	47.73±2.03^{a}	52.74±2.21^{a}	44.12±1.86^{a}
8	62.44±2.49^{b}	45.55±1.84^{a}	48.64±2.48^{a}	49.52±2.25^{a}	43.82±1.74^{a}
10	66.54±1.31^{c}	47.58±2.48^{b}	41.00±1.58^{a}	42.60±1.93^{ab}	38.80±1.52^{a}
12	66.57±2.70^{b}	36.00±0.59^{a}	38.94±1.28^{a}	41.28±3.02^{a}	41.92±1.89^{a}
*หลังทดลอง	58.51±1.16^{a}	57.03±1.67^{a}	53.33±1.68^{a}	54.57±2.24^{a}	54.21±0.40^{a}

* หมายถึง เมื่อครบ 12 สัปดาห์เลี้ยงต่อด้วยอาหารเม็ดไม่ผสมสารเบตาเลน ต่อไปอีก 4 สัปดาห์

** ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอน หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$)

และยังสอดคล้องกับ ไชยวัฒน์ ด้วงสุก (2550) ที่ให้อาหารผสมสารสกัดบตาเลนกับปลากุหลาบแดง ซึ่งค่าความสว่างจะมีความแตกต่างกัน ($P<0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง พบว่าปลาที่ได้รับอาหารผสมเบตาเลน 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 % มีค่าความสว่าง 52.56 ± 0.54 , 46.31 ± 0.84 , 45.62 ± 0.60 , 43.18 ± 0.90, 39.46 ± 1.05 และ 40.02 ± 0.73 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับทุกชุดการทดลอง

4.2.2 ค่าความเข้มสีแดง (a) บริเวณลำตัวของปลาหมอนกแก้ว

ผลของค่าความเข้มสีแดง (a) ของผิวหนังบริเวณลำตัวของปลาหมอนกแก้ว พบว่าความเข้มสีแดงของผิวปลาหมอนกแก้ว มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ที่ 2 จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ ค่าความเข้มสีแดงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 จนสิ้นสุดการทดลอง ที่ความเข้มข้น 0 (T1), 20 (T2), 30 (T3), 40 (T4) และ 50 (T5) มก./กก.ดังนี้

ในสัปดาห์ที่ 2 ค่าค่าความเข้มของสีแดง พบว่าปลาหมอนกแก้วที่ให้อาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 50 มก./กก.มีความเข้มของสีแดงมากที่สุด คือ 12.79±0.46 แตกต่างอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับชุดทดลองที่ให้อาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 0, 20, 30 และ 40 มก./กก.

ในสัปดาห์ที่ 4 ค่าความเข้มของสีแดง ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 50 มก./กก.(ชุดการทดลองที่ 5) มีความเข้มของสีแดงมากที่สุด คือ 16.17±0.56 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 0, 20, 30 ยกเว้นปลาที่เลี้ยงด้วยที่มีอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 40 มก./กก.(ชุดการทดลองที่ 4) ที่มีผลไม่แตกต่างกันทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง

ในสัปดาห์ที่ 6 และ 8 ค่าความเข้มของสีแดงของผิวปลาหมอนกแก้วที่ให้อาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 50 มก./กก.มีค่าความเข้มของสีแดงมากที่สุด คือ 15.20±0.68 และ 14.54±0.85 ตามลำดับ ซึ่งค่าความเข้มสีแดงทั้งสองนั้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับชุดทดลองที่ให้อาหารผสมสารสกัดเบตาเลน ความเข้มข้น 0, 20, 30 และ 40 มก./กก.

ในสัปดาห์ที่ 10 ค่าความเข้มของสีแดงของผิวปลาหมอนกแก้ว ในชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 50 มก./กก.มีค่าความเข้มของสีแดงมากที่สุด คือ13.32±0.55 และให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) กับชุดทดลองที่ให้อาหารผสมสารสกัดเบตาเลน ความเข้มข้น 30 และ 40 มก./กก.ยกเว้นชุดทดลองที่ผสมสารสกัดเบตาเลน ความเข้มข้น 0 และ 20 มก./กก.ที่แตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05)

ในสัปดาห์ที่ 12 ค่าความเข้มของสีแดงของผิวปลาหมอนกแก้ว ในชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมสารสกัดเบตาเลน ความเข้มข้น 50 มก./กก.มีค่าความเข้มของสีแดงมากที่สุด คือ 14.93± 1.14 ใกล้เคียงกับชุดความเข้มข้น 40 % (14.81±1.81) แต่ให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) กับชุดทดลองที่ให้อาหารผสมเบตาเลนความ 30 และ 40 มก./กก.แต่ให้ผลแตกต่างทางสถิติกับชุดทดลอง 0 และ 20 มก./กก.

หลังจาก 12 สัปดาห์ เลี้ยงปลาหมอนกแก้วในทุกชุดการทดลองด้วยอาหารไม่ผสมสารเบตาเลน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าค่าความเข้มของสีแดงในปลาหมอนกแก้วที่เคยให้อาหารผสมเบตาเลน 40 มก./กก.มีค่าความเข้มของสีแดงของผิวหนังปลาหมอนกแก้ว มากที่สุด คือ 6.38±1.6 รองลงมาคือปลาที่เคยให้อาหารผสมเบตาเลน 50 มก./กก.คือ 6.02±0.35 ที่ให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในชุดทดลองอื่นๆล้วนแต่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

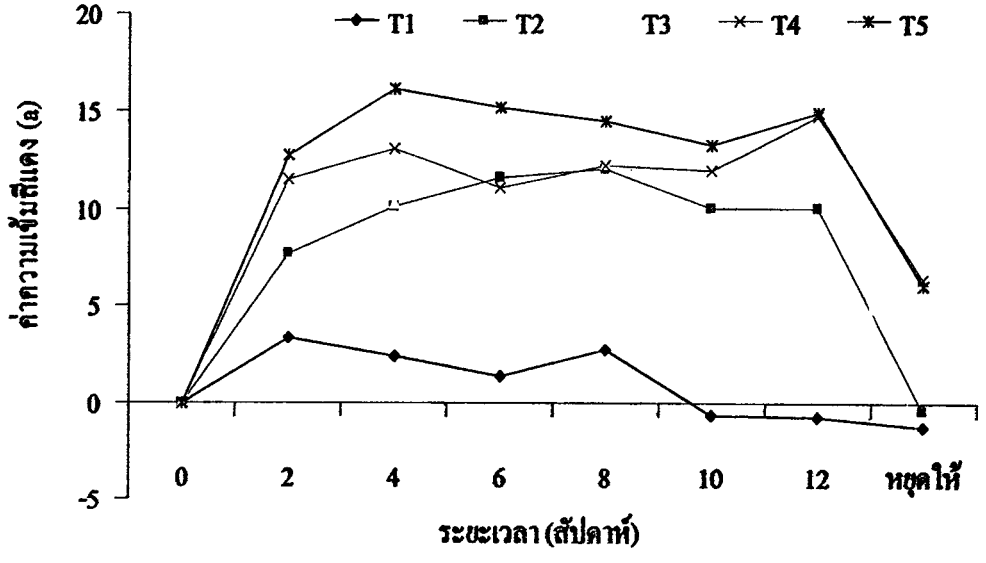
การเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มสีแดง (a) ของผิวหนังปลาหมอนกแก้ว หลังจากให้ปลากินอาหารผสมสารสกัดจากเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกรที่ 0, 20, 30, 40 และ 50 มก. /กก. เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ภาพที่ 4.7) พบว่า ค่าความเข้มสีแดงของผิวหนังปลาหมอนกแก้วที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่ผสมสารสกัดเบตาเลน ปลาหมอนกแก้วกินอาหารผสมสารเบตาเลนจะทำให้ให้สีผิวของปลาจะมีสีเข้มขึ้น ส่งผลให้ค่าความเข้มสีแดงเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาที่กินอาหารผสมที่ให้

ปริมาณเบตาเลน 40 และ 50 มก./กก จะพบการเพิ่มขึ้นของค่าความเข้มสีแดง (a) ได้อย่างชัดเจน และเมื่อเปลี่ยนอาหารเป็นไม่ผสมสารเบตาเลน พบว่าสีผิวของปลาจะปรับตัวให้สว่างขึ้นใกล้เคียงกันในทุกชุดการทดลอง

ปลาหมอนกแก้วที่ให้อาหารผสมเบตาเลนในอาหาร 40 และ 50 มก./กก.เริ่มพบการแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองอื่นๆตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นไป และในสัปดาห์ที่ 12 ปลาที่ได้รับเบตาเลน 50 มก. /กก. ปลาจะมีค่าความเข้มของสีแดงสูงที่สุดของทุกชุดการทดลอง หลังการทดลอง 4 สัปดาห์ได้สุ่มปลาขึ้นวัดการเปลี่ยนแปลงสีผิว พบว่าค่าความเข้มของสีแดง (a) ของชุดทดลองที่ให้อาหารผสมเบตาเลนในอาหาร 40 และ 50 มก./กก.ยังคงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองอื่นๆ และสามารถมองเห็นความแตกต่างได้ด้วยตาเปล่า สอดคล้องกับ ธนากร แก้วละเอียด (2551) ที่ให้อาหารผสมสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกแก้วมังกร แก่ปลาหมอมาลาวีทอง (*Aulonacara* sp.) ในความเข้มข้น 0, 20, 40 และ 60% (เปลือกแก้วมังกร ต่อ ปริมาณเอธานอล) พบการเปลี่ยนแปลงของค่าความเข้มสีแดงหลังจากได้รับอาหารผสมเบตาเลนในสัปดาห์ที่ 2 และแตกต่างมากขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาที่ได้รับอาหารผสมเบตาเลนที่นานขึ้น เมื่อครบ 10 สัปดาห์ ชุดที่ได้รับอาหารผสมเบตาเลน 0, 20, 40 และ 60 % มีค่าความเข้มสีแดงเท่ากับ 1.92± 0.2, 4.00±0.19, 5.13±0.2 ,6.18±0.3 , 6.66± 0.27 และ 6.95± 0.29 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เช่นเดียวกับ ไชยวัฒน์ ด้วงสุก (2550) ที่ศึกษาผลของสารเบตาเลนต่อสีผิวปลาหมอม้าลายเผือกว่า พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ของค่าความเข้มของสีแดงในชุดการทดลองที่ 5 เมื่อให้อาหารผสมเบตาเลน 50 % ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ โดยพบความแตกต่างในสัปดาห์ที่ 6 – 8 ส่วนในปลาทุหลาบแดงจะเริ่มพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ของค่าความเข้มของสีแดงในสัปดาห์ที่ 2 นอกจากนี้ในสัปดาห์ที่ 6 ชุดที่ให้อาหารผสมเบตาเลน 40 และ 50 % จะให้ค่าความเข้มของสีแดงสูงสุดมากกว่าชุดอื่นๆ จนสิ้นสุดการทดลอง (24.76±0.89 และ 26.03±1.14) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดควบคุม (0%) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับ Phumjan and Laohavisuti (2007) ได้ให้อาหารที่ผสมสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกแก้วมังกรแก่ปลา platy (*Xiphophorus maculatus*) ที่ระดับ 0, 15, 22.5, 30 และ 37.5 มก./กก. เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ปลา platy ที่ได้รับอาหารที่ผสมสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกแก้วมังกร 37.5 มก./กก.มีค่ามุมของสี (HUE) สูงสุด คือ 63.09±0.92 ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) กับปลาที่ให้อาหารที่ผสมสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกแก้วมังกร 0, 15, 22.5 และ 30 มก. / กก.

ปลาหมอนกแก้วเมื่อได้รับสารเบตาเลน จะมีการเปลี่ยนแปลงคือ สีผิวของปลาจะมีสีแดง (a) เข้มขึ้นตามระยะเวลาและปริมาณสารเบตาเลนที่ได้รับ สามารถสังเกตุเห็นได้ด้วยตาเปล่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งชุดการทดลองที่ให้ปริมาณเบตาเลน 40 และ 50 มก. /กก.ทำให้ปลาหมอนกแก้วมีการเปลี่ยนสีไปในโทนสีแดงมากที่สุด ขณะเดียวกันค่าความสว่าง (L) จะลดลงได้อย่างชัดเจน เมื่อ

สีผิวมีค่าสีแดงเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับผลการทดลองของชุดการทดลองที่ไม่เติมเบตาเลนลงในอาหาร พบว่า สีผิวปลามีค่าความสว่าง (L) สูงที่สุด ขณะเดียวกันสีผิวจะมีค่าความเข้มสีแดงต่ำสุด ดังภาพที่ 4.6 และ 4.7



ภาพที่ 4.7 ระดับค่าความเข้มของสีแดง (a) ของสีผิวปลาเมื่อได้รับเบตาเลนเข้มข้นแตกต่างกัน (0, 20, 30, 40และ 50 มก./กก.)

จึงสรุปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับค่าความสว่างและค่าความเข้มสีแดงของปลาหมอนกแก้ว เมื่อได้รับสารเบตาเลนนั้นเป็นส่วนผกผันกัน และปลาหมอนกแก้วสามารถสะสมสารเบตาเลนไว้ในร่างกายได้ เพราะค่าความเข้มสีแดงเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณและระยะเวลาที่ได้รับสารเบตาเลน และ แต่เมื่อเปลี่ยนอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเบตาเลน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสีผิวของปลาหมอนกแก้วมีค่าความเข้มสีแดงลดลง เนื่องจากเบตาเลนมีความเสถียรต่ำ สามารถเปลี่ยนรูปได้ง่าย เมื่ออยู่ในสภาวะไม่เหมาะสม

ตารางที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงของระดับค่าสีแดง (a) ของปลาหมอนกแก้วเมื่อได้รับเบตาเลน

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ชุดการทดลอง				
	T1	T2	T3	T4	T5
0	-0.82±0.17^{a}	-0.82±0.17^{a}	-0.82±0.17^{a}	-0.82±0.17^{a}	-0.82±0.17^{a}
2	3.34±0.91^{a}	7.68±1.52^{b}	9.61±0.86^{bc}	11.59±0.74^{cd}	12.79±0.46^{d}
4	2.43±1.28^{a}	10.19±1.42^{b}	10.34±0.93^{b}	13.16±1.01^{bc}	16.17±0.56^{c}
6	1.34±0.77^{a}	11.64±0.83^{b}	12.52±0.72^{b}	11.10±0.46^{b}	15.20±0.68^{c}
8	2.77±1.11^{a}	12.04±1.11^{a}	12.37±0.99^{b}	12.21±0.61^{b}	14.54±0.85^{c}
10	-0.63±0.51^{a}	10.11±0.93^{b}	12.42±0.67^{bc}	11.98±0.66^{bc}	13.32±0.55^{c}
12	-0.73±0.51^{a}	10.04±0.79^{b}	11.86±1.30^{bc}	14.81±1.81^{c}	14.93±1.14^{c}
*หลังทดลอง	-1.28±0.47^{a}	-0.34±0.21^{a}	-2.15±0.38^{a}	6.38±1.6^{b}	6.02±0.35^{b}

* หมายถึง เมื่อครบ 12 สัปดาห์เลี้ยงต่อด้วยอาหารเม็ดไม่ผสมสารเบตาเลน ต่อไปอีก 4 สัปดาห์

** ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอน หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$)

4.2.3 ค่าความเข้มสีเหลือง (b) บริเวณลำตัวของปลาหมอนกแก้ว

ผลของค่าความเข้มสีเหลือง (b) ของผิวหนังบริเวณลำตัวของปลาหมอนกแก้ว พบว่าความเข้มสีเหลืองของผิวปลาหมอนกแก้วมีการเปลี่ยนแปลงไปในแนวเดียวกันตลอดการทดลอง เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 จนสิ้นสุดการทดลอง ดังนี้

ในสัปดาห์ที่ 2 ค่าค่าความเข้มของสีเหลือง ในแต่ละชุดการทดลองยังไม่มีความแตกต่างกันอย่างเด่นชัด

ในสัปดาห์ที่ 4 ค่าความเข้มของสีเหลือง ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 50 มก./กก.มีความเข้มของสีเหลืองมากที่สุด คือ 14.99±1.22 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 0 และ 40 ยกเว้นปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 20, 30 และ 50 มก./กก.ที่ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($P>0.05$)

ในสัปดาห์ที่ 6 ค่าความเข้มของสีเหลืองของผิวปลาหมอนกแก้ว ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 40 มก./กก.มีค่าความเข้มของสีเหลืองมากที่สุด คือ 15.24±1.22 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 0 และ 20 มก./กก.

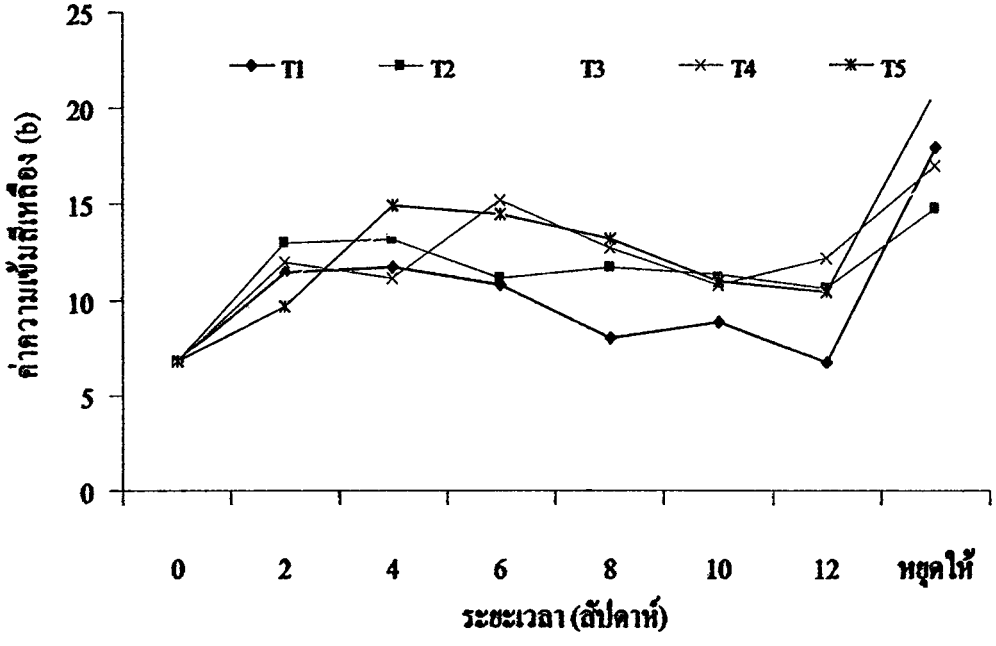
ในสัปดาห์ที่ 8 ค่าความเข้มของสีเหลืองของผิวปลาหมอนกแก้ว ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 30 มก./กก.มีค่าความเข้มของสีเหลืองมากที่สุด คือ 14.43±0.98 และทุกชุดการทดลอง (20, 40 และ 50 มก./กก.) ยังแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่ผสมสารสกัดเบตาเลน

ในสัปดาห์ที่ 10 ค่าความเข้มของสีเหลืองของผิวปลาหมอนกแก้ว ในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน ความเข้มข้น 30 มก./กก.มีค่าความเข้มของสีเหลืองมากที่สุด คือ 11.78±0.90 และให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 20, 40 และ 50 มก./กก.ยกเว้นปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่ผสมสารสกัดเบตาเลนที่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ในสัปดาห์ที่ 12 ค่าความเข้มของสีเหลืองของผิวปลาหมอนกแก้ว ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 40 มก./กก.มีค่าความเข้มของสีเหลืองมากที่สุด คือ 12.18± 0.23 แต่ให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับชุดทดลองให้อาหารผสมเบตาเลนที่ความเข้มข้น 20, 30 และ 50 มก./กก.แต่ให้ผลแตกต่างทางสถิติกับชุดทดลอง 0 และ 20 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

หลังจาก 12 สัปดาห์ เลี้ยงปลาหมอนกแก้วในทุกชุดการทดลองด้วยอาหารไม่ผสมสารเบตาเลน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าค่าความเข้มของสีเหลืองของผิวหนังปลาหมอนกแก้วในชุดทดลองที่เคยให้อาหารผสมเบตาเลนความเข้มข้น 40 มก./กก.มีค่าความเข้มของสีเหลืองมากที่สุด คือ 6.38±1.6 รองลงมาคือชุดทดลองที่เคยให้อาหารผสมเบตาเลนความเข้มข้น 50 มก./กก.คือ 6.02±0.35 ที่ให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในชุดทดลองอื่นๆล้วนแต่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อมองภาพโดยรวมของผลการศึกษาการเปลี่ยนสีผิวของปลาหมอนกแก้วหลังจากได้อาหารผสมสารเบตาเลนเป็นเวลา 12 สัปดาห์

การเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มสีเหลือง (b) ของผิวหนังปลาหมอนกแก้ว หลังจากให้ปลากินอาหารผสมสารสกัดจากเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกรที่ 0, 20, 30, 40 และ 50 มก. /กก. เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ภาพที่ 4.10) พบว่า ค่าความเข้มสีเหลืองของผิวหนังปลาหมอนกแก้วที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่ผสมสารสกัดเบตาเลน โดยแตกต่างกันตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 ปลาหมอนกแก้วกินอาหารผสมสารเบตาเลนจะทำให้ให้สีผิวของปลาจะมีสีเหลืองมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาที่กินอาหารผสมที่ให้ปริมาณเบตาเลน 40 และ 50 มก./กก



ภาพที่ 4.8 ระดับค่าความเข้มของสีเหลือง (b) ของสีผิวปลาเมื่อได้รับเบตาเลนเข้มข้นแตกต่างกัน (0, 20, 30, 40และ 50 มก./กก.)

สอดคล้องกับ ธนากร แก้วละเอียด (2551) ที่ให้อาหารผสมสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกแก้วมังกร แก่ปลาหมอมาลาวีทอง (*Aulonacara* sp.) ในความเข้มข้น 0, 20, 40 และ 60% (เปลือกแก้วมังกร ต่อ ปริมาณเอธานอล) พบการเปลี่ยนแปลงของค่าความเข้มสีเหลืองหลังจากได้รับอาหารผสมเบตาเลนในสัปดาห์ที่ 2 และแตกต่างมากขึ้น ตามระยะเวลาที่ได้รับอาหารผสมเบตาเลนที่นานขึ้น เมื่อครบ 10 สัปดาห์ ชุดที่ได้รับอาหารผสมเบตาเลน 0, 20, 40 และ 60 % มีค่าความเข้มสีเหลืองเท่ากับ 6.06± 0.41, 3.27±1.01, 2.76±1.08, 3.55±0.65, 3.86± 0.39 และ 4.32± 0.35 ตามลำดับ ซึ่งชุดการทดลองที่ได้รับเบตาเลน 0 กับ 20% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองที่ได้รับเบตาเลน 40 และ 60 % เช่นเดียวกับ ไชยวัฒน์ ด้วงสุก (2550) ที่ศึกษาผลของสารเบตาเลนต่อสีผิวปลาหมอม้าลายเผือก ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ของค่าความเข้มของสีเหลือง ในทุกชุดการทดลอง ตลอดการเลี้ยง 8 สัปดาห์ ส่วนในปลากุหลาบแดงจะเริ่มพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ของค่าความเข้มของสีเหลืองในสัปดาห์ที่ 2 เป็นต้นไป และในสัปดาห์ที่ 6 ชุดที่ให้อาหารผสมเบตาเลน 40 และ 50 % จะมีค่าความเข้มของสีเหลืองน้อยกว่าชุดอื่นๆ จนสิ้นสุดการทดลอง (21.25±0.15 และ 15.74±1.61) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดควบคุม (0 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) (25.56±0.49)

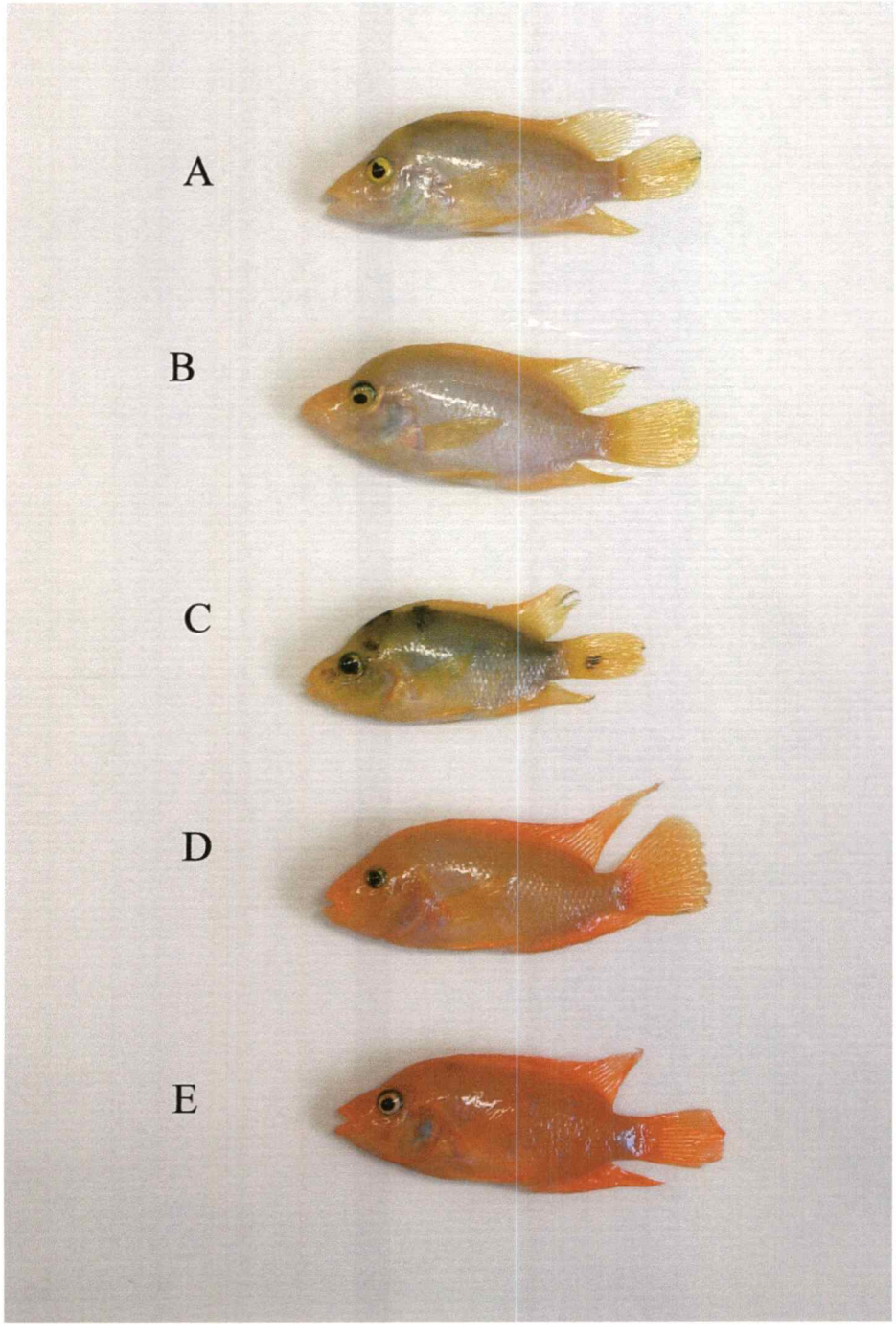
ตารางที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงของระดับค่าสีเหลือง (b) ของปลาหมอนกแก้วเมื่อได้รับเบตาเลน

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ชุดการทดลอง				
	T1	T2	T3	T4	T5
0	6.87±3.05^{a}	6.87±3.05^{a}	6.87±3.05^{a}	6.87±3.05^{a}	6.87±3.05^{a}
2	11.48±0.91^{ab}	13.00±0.84^{b}	11.07±1.77^{ab}	12.02±1.04^{ab}	9.67±0.86^{a}
4	11.69±1.01^{a}	13.16±0.70^{ab}	13.68±0.99^{ab}	11.19±1.34^{a}	14.99±1.22^{b}
6	10.83±1.23^{a}	11.20±0.91^{a}	14.65±1.32^{b}	15.24±1.22^{b}	14.46±0.99^{b}
8	8.00±1.13^{a}	11.73±0.98^{b}	14.43±0.98^{b}	12.70±1.17^{b}	13.20±1.16^{b}
10	8.84±1.05^{a}	11.32±1.17^{b}	11.78±0.90^{b}	10.82±0.76^{b}	11.02±1.33^{b}
12	6.69±0.577^{a}	10.58±0.48^{b}	11.47±0.51^{b}	12.18±0.23^{b}	10.42±0.99^{b}
*หลังทดลอง	17.91±1.92^{a}	14.73±4.30^{a}	16.60±1.90^{a}	17.02±1.41^{a}	20.83±2.38^{a}

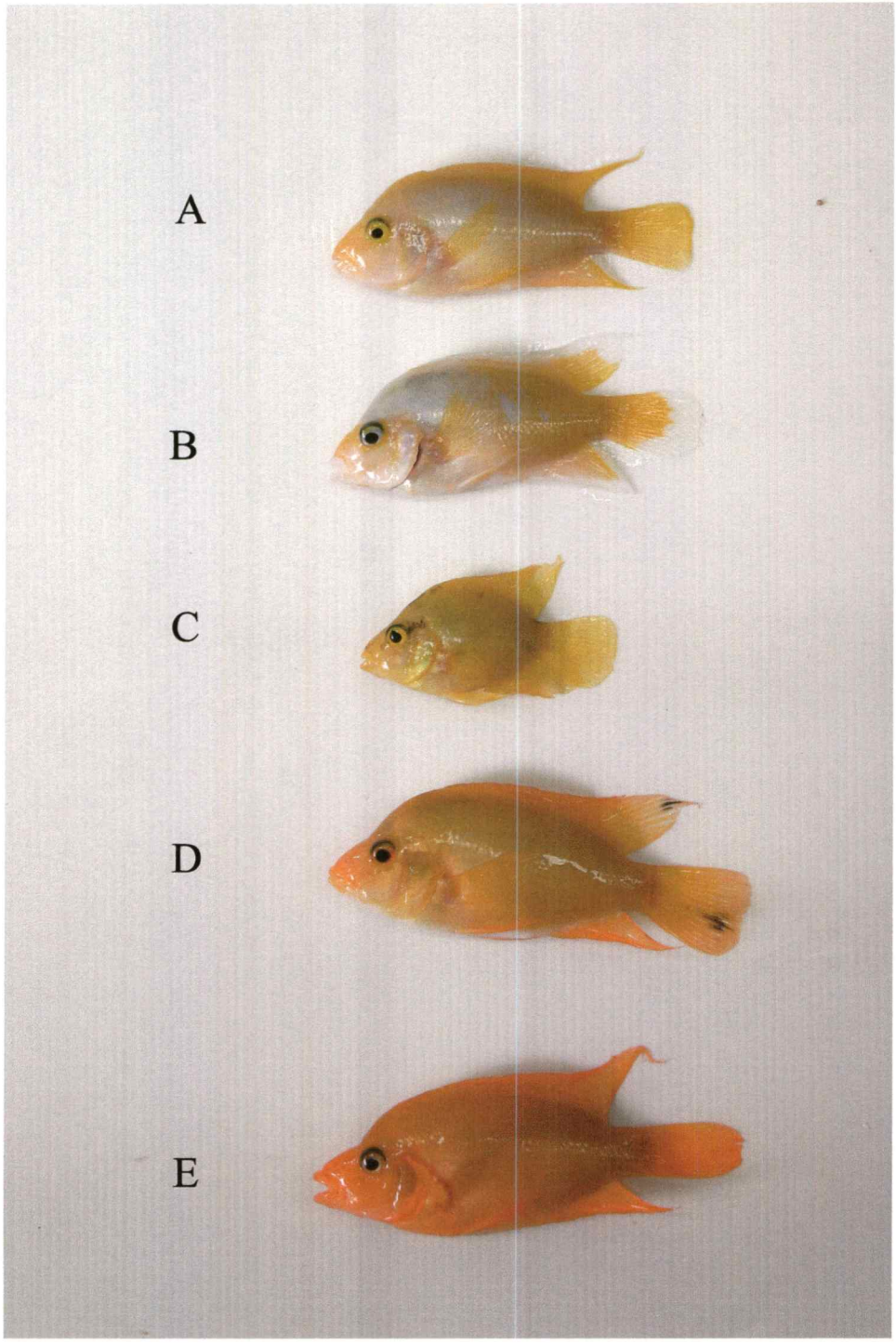
* หมายถึง เมื่อครบ 12 สัปดาห์เลี้ยงต่อด้วยอาหารเม็ดไม่ผสมสารเบตาเลน ต่อไปอีก 4 สัปดาห์

** ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอน หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ผลจากการให้สารเบตาเลนต่อปลาหมอนกแก้วจะเห็นได้ว่าปลาหมอนกแก้วที่ได้รับเบตาเลนนั้นมีสีที่เข้มขึ้นโดยดูได้จากค่าความสว่างที่ลดลงในชุดที่ได้รับเบตาเลนเทียบกับชุดควบคุม โดยมีค่าสอดคล้องกับค่าความเข้มสีแดง และค่าความเข้มสีเหลืองของปลาหมอนกแก้วมีการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกัน จากภาพที่ 4.10 ปริมาณค่าความเข้มสีเหลือง (b) ของทุกชุดการทดลอง ทั้งที่ได้และไม่ได้รับสารเบตาเลน จะมีการเพิ่มและลดในทิศทางเดียวกันตลอดการทดลอง อาจเป็นได้ว่าเบตาเลนไม่ส่งผลต่อสีผิวในโทนสีเหลืองเท่ากับโทนสีแดงที่แสดงผลได้เด่นชัดกว่า และเมื่อหยุดให้อาหารที่ผสมเบตาเลนเปลี่ยนมาใช้อาหารที่ไม่ผสมแอลกอฮอล์จะพบการเพิ่มขึ้นของค่าสีเหลืองในทุกชุดการทดลอง และมีค่าความเข้มสีเหลืองมากกว่าก่อนเริ่มการทดลองนั้น อาจเป็นผลมาจากแอลกอฮอล์ เพราะในทุกชุดการทดลองจะเติมเอธานอล 80% ลงไปในอาหารทุกชุดการทดลอง แต่ในการทดลองภายหลังครบ 12 สัปดาห์ไม่ได้เติมเอธานอล 80% ลงไปส่งผลให้ค่าสีเหลืองจึงปรากฏเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลอง(ภาพที่4.10)



ภาพที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงสีผิวของปลาหมอนกแก้วเมื่อได้รับสารสกัดเบตาเลนเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ในอัตรา (A) 0 มก./กก., (B) 20 มก./กก., (C) 30 มก./กก., (D) 40 มก./กก. และ (E) 50 มก./กก.



ภาพที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงสีผิวของปลาหมอนกแก้วเมื่อได้รับสารสกัดเบตาเลนเป็นเวลา 12 สัปดาห์ และหยุดให้เบตาเลนเลี้ยงต่อ 4 สัปดาห์ด้วยอาหารไม่ผสมเบตาเลน ในอัตรา (A) 0 มก./กก., (B) 20 มก./กก., (C) 30 มก./กก., (D) 40 มก./กก. และ (E) 50 มก./กก.

4.2.4 ผลของสารสกัดเบตาเลนต่อการเจริญเติบโตของปลาหมอนกแก้ว

จากการทดลองศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดเบตาเลนต่ออัตรารอด อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก และอัตราเจริญเติบโต ของปลาหมอนกแก้วเมื่อได้รับสารสกัดเบตาเลนที่ 0, 20, 30, 40 และ 50 มก./กก.เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

4.2.4.1 อัตรารอด (survival rate) ของปลาหมอนกแก้ว

ปริมาณสารสกัดเบตาเลนที่ผสมลงในอาหารไม่ส่งผลต่ออัตรารอดของปลาหมอนกแก้วอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยอัตรารอดของปลาหมอนกแก้วที่ได้รับสารสกัดเบตาเลน ที่ 0, 20, 30, 40 และ 50 มก./กก. มีอัตรารอดเท่ากับ 83.33±0.67, 83.33±0.88, 62.50 ± 1.15, 58.33±0.67 และ 83.33±0.67 (ตารางที่ 4.6)

4.2.4.2 การเจริญเติบโต (growth rate) ของปลาหมอนกแก้ว

เมื่อสิ้นสุดการทดลองปลาหมอนกแก้วมีน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ยเท่ากับ 23.60, 20.49, 22.85, 27.28 และ 26.86 ตามลำดับ ซึ่งปริมาณสาสกัดเบตาเลนที่ผสมในอาหารมีผลต่อการเจริญเติบโตของปลาหมอนกแก้ว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 40 มก. /กก. มีการเจริญเติบโตดีที่สุด แต่อาจด้วยอัตรารอดที่น้อย และมีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นที่สูงกว่ากลุ่มอื่นๆอยู่บ้าง เมื่อมีจำนวนน้อยลงอาจส่งผลให้เจริญเติบโตได้ดีกว่าชุดอื่นๆ และอัตรารอดของปลานั้นพบว่าสารสกัดเบตาเลนไม่ส่งผลต่อปลาหมอนกแก้วแต่อย่างใด เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ ทำให้มีน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ยมากกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ($P<0.05$) ซึ่งไม่สอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ที่พบว่าปลาที่กินอาหารผสมสารสกัดเบตาเลนไม่ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของปลา อาทิ เช่น ปลาหมอมาลาวีทอง (ธนากร แก้วละเอียด. 2551) ปลา Platy (Phumjan and Laohavisuti. 2007) ปลากุหลาบแดง และปลาหมอม้าลายเผือก (ไชยวัฒน์ ด้วงสุก. 2550) และการทดลองใช้สารสีกลุ่มแอสตาแซนทินที่ผสมลงในอาหารเลี้ยงปลาก็ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของปลาเช่นกัน ได้แก่ ปลาเรนโบว์เทร้า (Sommer *et al.* 1991 ; Amar *et al.* 2004) ปลาทอง (Paripatananont *et al.* 1999) ปลานิลแดง (ชลธิชา โชติสิทธิพงษ์. 2541) ปลากระแห (ดาราวรรณ ยุทธยงค์ และคณะ. 2546) และปลากระพงแดง (พิชญา ชัยนาค และคณะ. 2546)

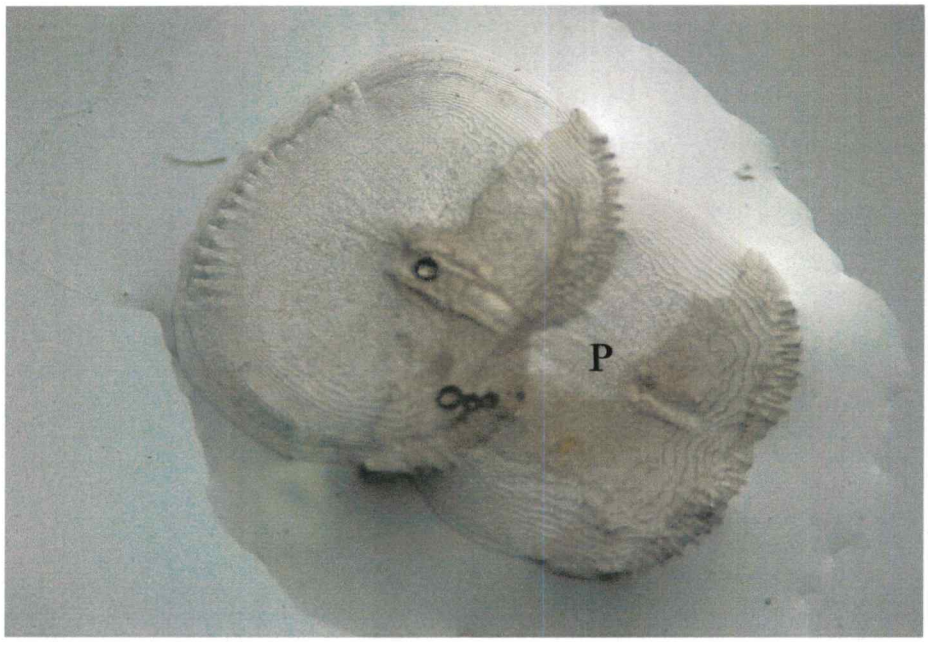
ตารางที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงด้านการเจริญเติบโต และอัตรารอดของปลาหมอนกแก้วเมื่อได้รับอาหารผสมสารเบตาเลนที่สกัดจากเปลือกแก้วมังกร

อาหารผสมเบตาเลน (%)	น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย (กรัม/ตัว)	น้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ย (กรัม/ตัว)	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ย (กรัม/ตัว)	อัตรารอด (%)
0	6.70±0.68 [a]	23.60±6.10 [ab]	13.23±1.25 [ab]	83.33±0.67 [a]
20	7.47±0.54 [a]	20.49±5.58 [a]	8.11±1.18 [a]	83.33±0.88 [a]
30	7.72±0.55 [a]	22.85±7.12 [ab]	11.67±2.68 [ab]	62.50±1.15 [a]
40	8.59±0.49 [a]	27.28±5.79 [b]	18.16±7.23 [b]	58.33±0.67 [a]
50	7.92±0.66 [a]	26.86±7.17 [ab]	11.70±4.34 [ab]	83.33±0.67 [a]

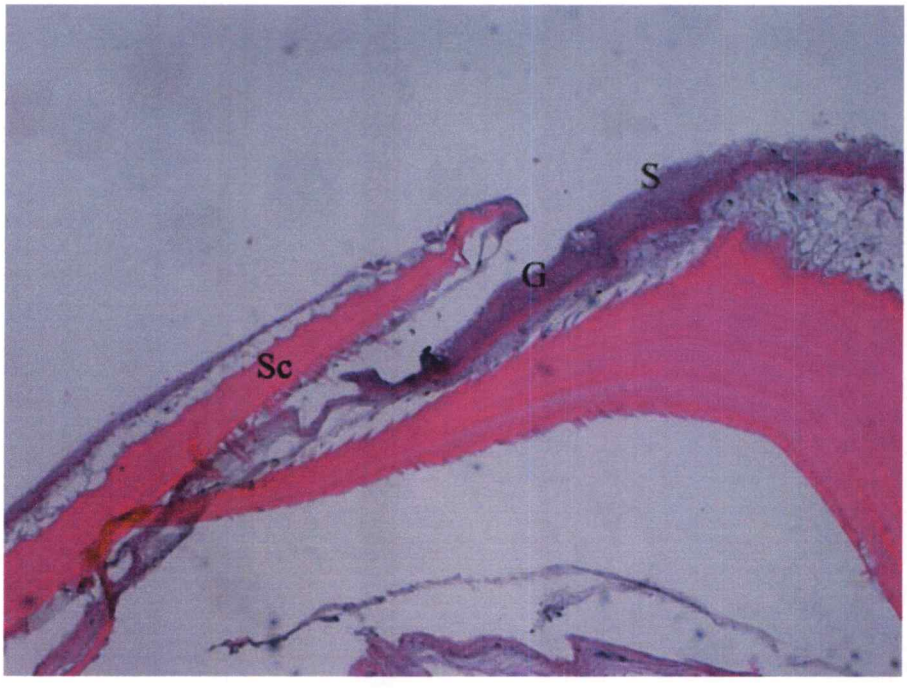
* ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$)

4.2.5 ผลของสารสกัดเบตาเลนจากแก้วมังกรต่อเนื้อเยื่อของปลาหมอนกแก้ว

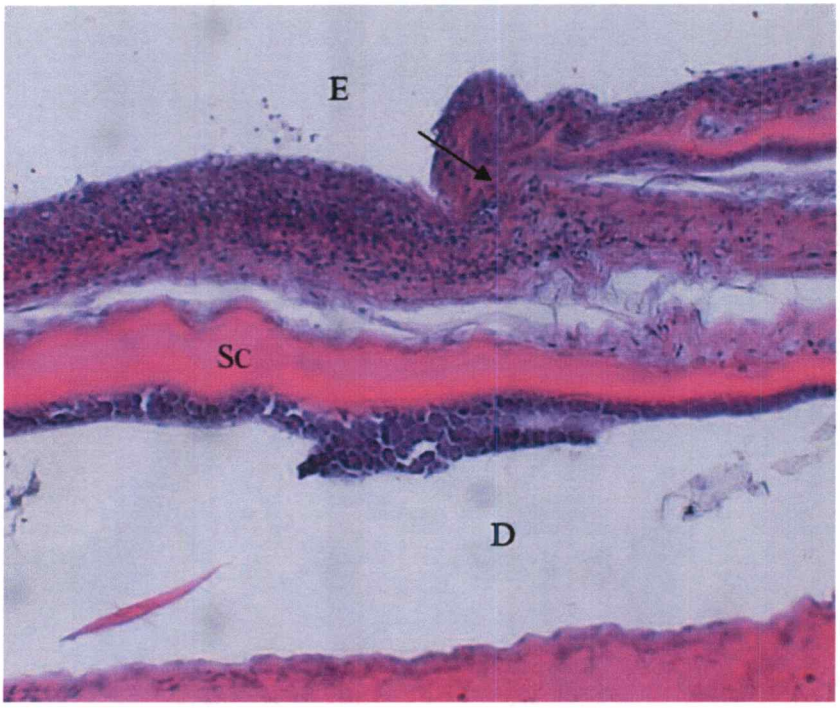
เมื่อสิ้นสุดการทดลองการศึกษาผลของสารสกัดเบตาเลนต่อสีผิวปลาหมอนกแก้ว สุ่มตัวอย่างปลาทุกตู้ ตู้ละ 6 ตัว แบ่งมาศึกษาโดยการนำเกล็ดบริเวณกึ่งกลางตัวปลาบริเวณ เส้นข้างตัวออกมาดูการสะสมรงควัตถุใต้เกล็ดจำนวน 3 ตัว และ แบ่งมาทำสไลด์ถาวร จำนวน 3 ตัว เพื่อตรวจเนื้อเยื่อบริเวณผิวหนังที่มีผลจากการให้ปลากินอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน พบว่าผิวหนังของปลาหมอนกแก้วประกอบด้วยชั้นต่างๆ ได้แก่ epidermis, dermis ในชั้น dermis พบเกล็ดแทรกอยู่ในชั้นนี้ และเกล็ดปลาหมอนกแก้วเป็นแบบ ctenoid (ภาพที่ 4.12 และ 4.13) คือโคนเกล็ดแทรกอยู่ในชั้น dermis และขอบเกล็ดจะเป็นหนามเล็กๆ แทรกอยู่ในชั้น dermis และโผล่ยื่นส่วนปลายเกล็ดเข้าไปในชั้น epidermis เช่นเดียวกับปลาที่มีเกล็ดชนิดอื่นๆ (ภาพที่ 4.14 และ ภาพที่ 4.15) ในส่วนของการนำเกล็ดมาดูการสะสมรงควัตถุด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดกำลังขยายต่ำ พบว่าเกล็ดของปลาหมอนกแก้วมีรงควัตถุสีเหลืองแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อระหว่างเกล็ด (ภาพที่ 4.16) ซึ่งปริมาณรงควัตถุในปลาหมอนกแก้ว จะกระจายตัวไม่แน่นอน บางส่วนมีปริมาณน้อยหรือไม่พบ และบางส่วนพบปริมาณรงควัตถุหนาแน่น ซึ่งไม่สามารถระบุได้ว่าส่วนใดพบรงควัตถุได้มากที่สุด ส่วนเกล็ดในภาพตัดขวางไม่พบเซลล์รงควัตถุแต่อย่างใด อาจจะเนื่องจากการทำสไลด์ถาวรต้องผ่านกระบวนการ dehydration โดยใช้แอลกอฮอลล์ ทำให้รงควัตถุดังกล่าวนี้ละลายในแอลกอฮอล์ได้ (ภาพที่ 4.17) จากการสะสมรงควัตถุบนเกล็ดพบว่า ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบตาเลน 50 มก. /กก. พบรงควัตถุสีเข้มกระจายมากกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่ผสมเบตาเลน(ภาพที่ 4.18) แต่ไม่สามารถนับจำนวนรงควัตถุได้ ซึ่งแตกต่างจาก Paripatananont *et al.* (1999) ได้ให้อาหารผสมแอสตาแซนทินแก่ปลาทองความเข้มข้น 0, 25, 50 75 และ 100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมและ



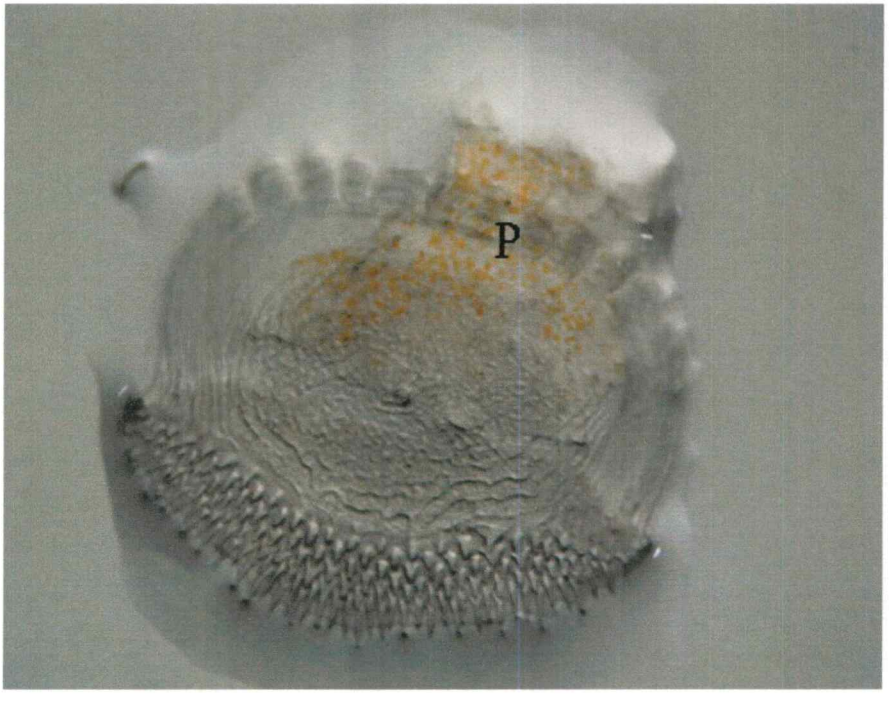
ภาพที่ 4.12 รงควัตถุสีเหลือง (P) ที่พบในปลาที่ได้อาหารไม่ผสมเบตาเลน (formalin 10 % ; X 10)



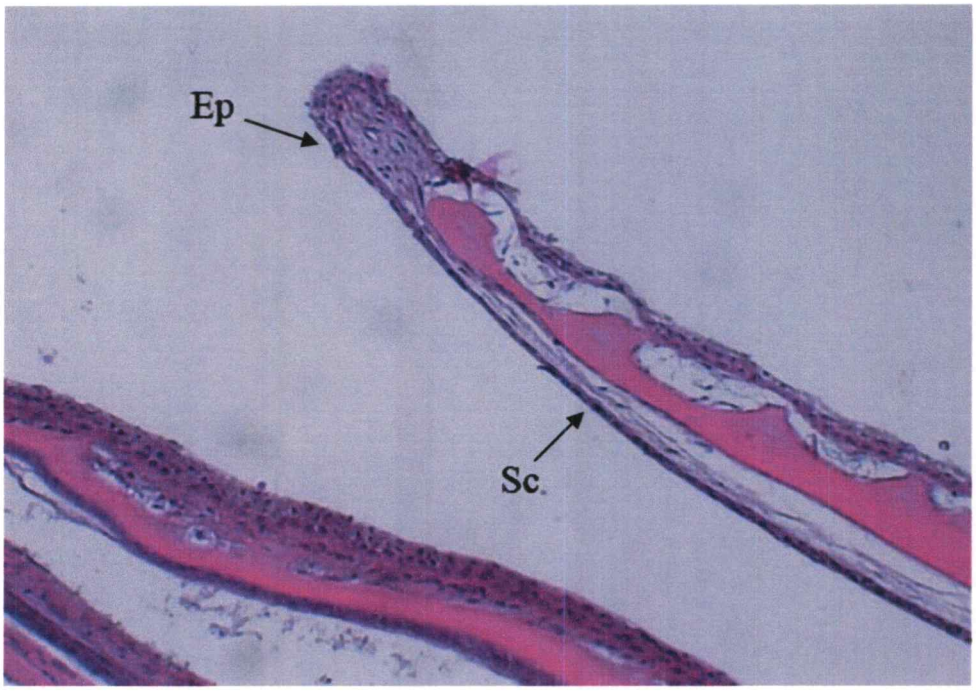
ภาพที่ 4.13 เกล็ดที่ซ้อนทับกัน (Sc) บนชั้น epidermis ที่ปกคลุมไปด้วย squamous epithelium (S) บริเวณใกล้เคียงพบ globlet cells หรือ mucous cells (G) (formalin 10 % ; H&E ; X 40) (ชุดที่ไม่ให้อาหารผสมเบตาเลน)



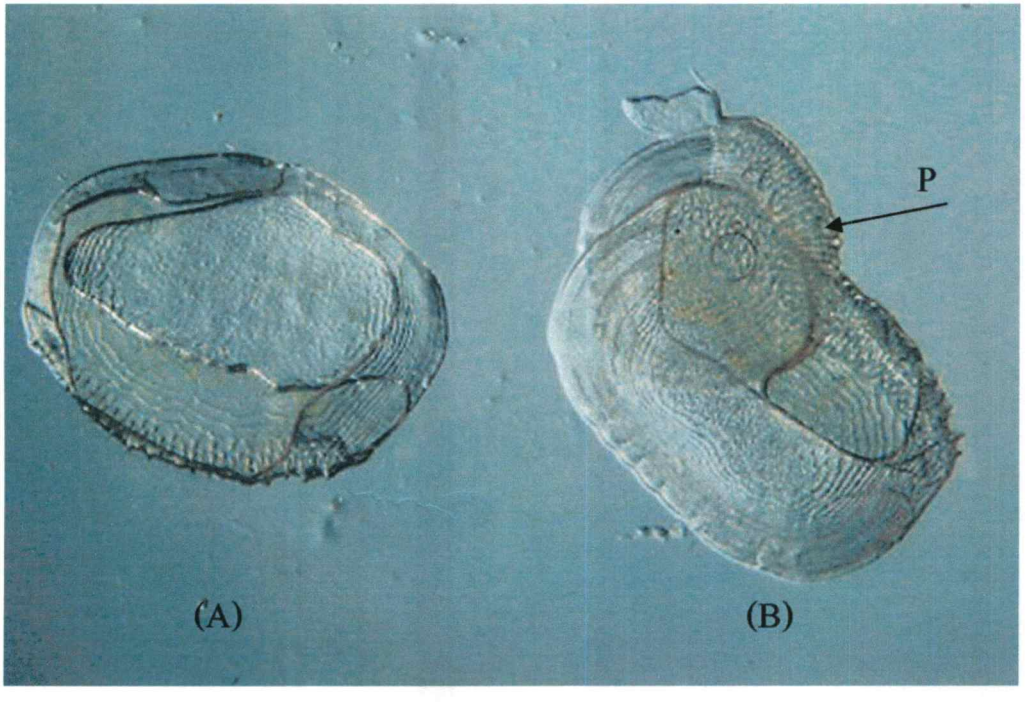
ภาพที่ 4.14 ชั้น epidermis (E) ที่คลุมเกล็ดทั้งด้านบนและล่างของเกล็ด (Sc) และชั้น dermis (D) ที่เป็นต้นกำเนิดของเกล็ด (formalin 10 % ; H&E ; X 40) (ชุดที่ไม่ให้อาหารผสมเบตาเลน)



ภาพที่ 4.15 เกล็ดที่มีรงควัตถุติดอยู่ (P) (formalin 10 % ; X 10) (ชุดที่ให้อาหารผสมเบตาเลนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม)



ภาพที่ 4.16 เกล็ด (Sc) ที่มีชั้น epidermis (Ep) ปกคลุม (กลุ่มทดลองที่ 5) (formalin 10 % ; H&E ; X 40) (ชุดที่ให้อาหารผสมเบตาเลนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม)



ภาพที่ 4.17 เปรียบเทียบเกล็ดของปลาหมอนกแก้ว (A) กลุ่มที่ไม่ให้สารสกัดเบตาเลน กับ (B) กลุ่มที่ให้อาหารผสมเบตาเลนความเข้มข้น 50 มก./กก.พบรงควัตถุ (P) (formalin 10 % X 10)

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันการเสื่อมสภาพ 3 ชนิด ได้แก่ กรดแอซิติก 1 % บัฟเฟอร์ฟอสเฟต 1 % และ กรดซิตริก 1 % พบว่า การใช้กรดแอซิติก 1 % ทำให้สารสกัดเบตาเลนเสื่อมสภาพน้อยที่สุด รองลงมาคือ บัฟเฟอร์ฟอสเฟต 1 % และกรดซิตริก 1 % ตามลำดับ ส่วนผลของอุณหภูมิเก็บรักษา ที่ -20, -10 และ 5 องศาเซลเซียส ร่วมกับระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษาที่ 0, 35 และ 70 วัน ระดับอุณหภูมิ และระยะเวลาส่งผลต่อปริมาณเบตาเลนที่เก็บรักษาซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยระดับอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียสจะเก็บรักษาสารสกัดเบตาเลนได้ดีที่สุด รองลงมาคือ -10 และ 5 องศาเซลเซียสตามลำดับ

การศึกษาการเร่งพัฒนาสีผิวในปลาหมอนกแก้วด้วยสารสกัดเบตาเลน พบว่าปลาหมอนกแก้วมีการพัฒนาสีผิวหลังได้รับอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน โดยเฉพาะค่าความเข้มสีแดง (a) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ในกลุ่มความเข้มข้น 50 มก. / กก. และให้ค่าสีแดง (a) สูงที่สุด เมื่อครบ 12 สัปดาห์เลี้ยงปลาหมอนกแก้วด้วยอาหารไม่ผสมสารสกัดเบตาเลน เลี้ยงต่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าค่าสีแดงของปลาในชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 40 และ 50 มก./กก. ยังคงมีค่าความเข้มสีแดงสูงที่สุด เช่นเดียวกับค่าความสว่าง (L) ที่ในกลุ่ม 40 และ 50 มก./กก. มีปริมาณต่ำที่สุดในทุกการทดลอง แสดงให้เห็นว่าปลาหมอนกแก้วมีการพัฒนาสีผิวให้เข้มขึ้นออกไปทางโทนสีแดงเป็นหลัก ส่วนค่าความเข้มสีเหลือง (b) ของปลาหมอนกแก้วที่วัดได้หลังสิ้นสุดการทดลองคือ กลุ่มที่ให้อาหารผสมเบตาเลน 40มก./กก.จะให้ค่าความเข้มสีเหลืองมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มที่ให้อาหารผสมเบตาเลน 50 มก./กก.เช่นเดียวกับเมื่อเปลี่ยนเป็นอาหารไม่ผสมเบตาเลน ค่าความเข้มสีเหลืองของปลาหมอนกแก้วทั้งสองกลุ่มข้างต้นยังคงมีมากกว่ากลุ่มทดลองอื่นๆ อาจกล่าวโดยสรุปการทดลองนี้ได้ว่า ปริมาณค่าความสว่าง (L) กับ ค่าความเข้มสีแดง (a) เป็นส่วนผกผันกัน

ส่วนการศึกษาทางเนื้อเยื่อของปลาหมอนกแก้ว โดยวิธีการนำเกล็ดมาตรวจสอบพบว่า ในปลาที่เลี้ยงด้วยผสมอาหารผสมสารสกัดเบตาเลน 50 มก./กก. สามารถพบรงควัตถุอยู่ได้เกล็ด ในชั้น dermis โดยกระจายเป็นกลุ่มๆ และไม่สม่ำเสมอกัน ตั้งแต่ช่วงกลางลำตัวไปถึงบริเวณคอดหางจะตรวจพบรงควัตถุได้มาก แต่บริเวณครีบอก และช่องท้องตรวจพบปริมาณที่น้อยหรือไม่พบรงควัตถุ

ในด้านการเจริญเติบโต ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบตาเลน 40 มก./กก.มีอัตราเจริญเติบโตดีที่สุด เนื่องจากปลาในชุดการทดลองนี้มีอัตรารอด 58.33 % ทำให้ความหนาแน่นของปลาลดลง ความเครียดจากผลของความหนาแน่นและปริมาณของเสียลดลง แต่อาจด้วยอัตรารอดที่น้อย และมีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นที่สูงกว่ากลุ่มอื่นๆอยู่บ้าง เมื่อมีจำนวนน้อยลงอาจส่งผลให้เจริญเติบโตได้ดีกว่า

กลุ่มอื่นๆ แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ (P>0.05) และอัตรารอดของปลา พบว่าสารสกัดเบตาเลนไม่ส่งผลต่อปลาหมอนกแก้วแต่อย่างใด

การเก็บรักษาสารเบตาเลน สามารถใช้กรดแอซิติก ผสมลงในสารสกัดเบตาเลนให้เป็นสารเบตาเลนที่มีกรดแอซิติก 1 % เป็นองค์ประกอบ ร่วมกับการเก็บในตู้เย็นที่ต่ำกว่าหรือเท่ากับ -10 องศาเซลเซียส เพื่อลดการเสื่อมสภาพของเบตาเลนได้ และในการเร่งสีผิวในปลานั้น สามารถใช้เบตาเลนที่สกัดด้วยเอธานอล 80 % ผสมลงในอาหารเม็ดที่ระดับ 40 มก. /กก. จะทำให้ปลาหมอนกแก้วจะให้ค่าความเข้มสีแดงสูงสุดที่ 4 สัปดาห์

ข้อเสนอแนะ

1. ในการเตรียมอาหาร การใช้เอธานอล 80 % นั้น จะทำให้อาหารมีความชื้นมากกว่า 10 % จะส่งผลต่อคุณภาพอาหารเป็นอย่างมาก อาจเกิดเชื้อราในอาหารได้ การเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นเอธานอล ความเข้มข้นสูงกว่าเช่น 95 % อาจช่วยให้อาหารมีความชื้นไม่สูงมาก เนื่องจากเอธานอลสามารถระเหยได้เร็ว ไม่ถูกอาหารดูดซับเอาไว้เหมือนน้ำ ซึ่งการเกิดไฮโดรไลซิสของน้ำต่อสารเบตาเลนหากเกิดน้อยลงส่งผลให้สามารถเก็บรักษาอาหารได้นานยิ่งขึ้น

2. การศึกษาครั้งต่อไปควรใช้สารสกัดเบตาเลนจากแก้วมังกรสายพันธ์อื่น เช่น สายพันธุ์เปลือกแดง- เนื้อแดง (*Hylocerereus costaricensis*) เปรียบเทียบกับพันธุ์เนื้อขาวเปลือกแดง (*H. undatus*) เพื่อดูปริมาณสารเบตาเลนที่สกัดได้ว่าชนิดใดสามารถเร่งสีปลาได้ดีกว่า โดยอาจใช้เนื้อแก้วมังกรพันธ์เนื้อแดง เปลือกแดงผสมลงในสูตรอาหารเพื่อเพิ่มคุณค่าของอาหารปลาให้สูงขึ้นได้

3. ควรศึกษาการใช้เปลือกผลแก้วมังกรอบแห้งในลักษณะผง เพื่อความสะดวกในฤดูกาลที่ไม่มีผลสดออกจำหน่าย และสะดวกต่อการเก็บรักษา และสะดวกในการใช้เป็นส่วนผสมอาหารปลา

4. ควรหาวิธีการศึกษาอื่นๆ เช่น ใช้เทคนิคการศึกษาเนื้อเยื่อในแบบต่างๆที่ไม่ส่งผลต่อปริมาณสารเบตาเลนที่สะสมในตัวปลา เพื่อศึกษาการสะสมเบตาเลนในกล้ามเนื้อ หรือบริเวณผิวของตัวปลา ควบคู่ไปกับการวัดสีผิวของปลาโดยใช้เครื่องวัดสี (chromameter)

บรรณานุกรม

กฤษณา ชุติมา. 2539. **หลักเคมีทั่วไป เล่ม 2.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

กรมประมง. 2540. **การทำธุรกิจปลาสวยงาม.** กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

กรมประมง. 2549. **"โครงการสำรวจข้อมูลตลาดปลาสวยงามและพรรณไม้น้ำ."** กรุงเทพฯ. เอกสารอัดสำเนา.

ชลธิชา โชติสิทธิพงษ์. 2541. "ผลของแอสตาแซนทินต่อการเจริญเติบโต อัตรารอดและความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *streptococcus* sp. ของปลานิลแดง". วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไชยวัฒน์ ด้วงสุก. 2550. " ผลของสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกแก้วมังกรเพื่อใช้ในการเร่งสีปลาหมอม้าลายเผือก (*Arcocentrus nigrofasciatus)* และ ปลากุหลาบแดง (*Xiphophorus maculates*) ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง.

ดวงใจ พวงแก้ว. 2548. "การสกัดสารเบตาเลนจากเปลือกแก้วมังกรเพื่อใช้ในการเร่งสีปลากุหลาบแดง." ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง.

ดาราวรรณ ยุทธยงค์, จูอะดี พงศ์มณีรัตน์ และสนธิพันธ์ ผาสุกดี. 2546. "ผลของแอสตาแซนทินในอาหารต่อสีปลากระแห". หน้า 45. ใน **การสัมมนาวิชาการประมงประจำปี 2546.** กรุงเทพฯ : กรมประมง.

ทรงศิลป์ พจน์ชนะชัย, ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์, อภิรดี อุทัยรัตนกิจ, อรพิน เกิดชูชื่น, ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์,วณิช ลิ่มโอภาสมณี, สุชาดา เสกสรรวิริยะ, ประพนธ์ ปราณโสภณ และ ฐิติมา คงรัตน์อาภรณ์. 2550. "อิทธิพลของ combined treatment ต่อปริมาณ carotenoids, vitamin C และ phenols ในผลแก้วมังกรฉายรังสีในระหว่างการเก็บรักษา." **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร.** 38(6) : 251-254.

ธนากร แก้วละเอียด. 2551. "การใช้สารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรในการเร่งสีปลาหมอมาลาวีทอง (*Aulonacara* sp.)". ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง.

บริษัทศูนย์วิจัยกสิกรไทย จำกัด. 2550, 17 มกราคม.“ธุรกิจค้าปลาสวยงาม ตลาดในประเทศเติบโตดี ส่งออกยังแข่งขันรุนแรง”. **กรุงเทพธุรกิจ.** หน้า 18.

ปาริฉัตร หยวกแฟง, นฤมล เผือกขาว และ อรนาถ สุนทรวัฒน์. 2550. “การหา degree of methyl esterification ของเพคตินจากเปลือกแก้วมังกร.” **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร.** 38(5) : 55-58.

พรรษา ศะศิสมิต. 2543. “สัมมนา การเพาะเลี้ยงปลาหมอสี.” **วารสารการประมง** 53(6) : 591-600.

พิชิต ไทยยืนวงษ์. 2544. “สายพันธุ์ปลาหมอสีในประเทศไทย และข้อเท็จจริงเกี่ยวกับปลาหมอฟรอนโตซ่า.” **วารสารการประมง** 54(3) : 227-241.

พิชญา ชัยนาค, ไวยพจน์ เครือเสน่ห์ และทวี จินดามัยกุล. 2544. ผลของแอสตาแซนทินต่อสีของปลากะพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus* Forskal). เอกสารวิชาการฉบับที่ 19/2544. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

แฟนซีฟิช. (ผู้รวบรวม). ม.ป.ป. **Cichlids crossbreed Thailand.** กรุงเทพฯ

วิษฐิดา จันทราพรชัย. ม.ป.ป. **“การวัดค่าคุณภาพด้านสี”** กรุงเทพฯ: ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. เอกสารอัดสำเนา.

วุฒิชัย จีนเมือง, พัณณิดา กิจกอบชัย, หิรัญรัตน์ สุวรรณที และ อรนาถ สุนทรวัฒน์. 2550. “เบตาเลนจากผลแก้วมังกรสองสายพันธุ์.” ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

โสภณ เรืองสำราญ, อมร เพชรสม, ศุภศร พัฒนอักษร และ สุรชัย พรภคกุล. 2542. **อินทรีย์เคมี II.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุปราณี ชินบุตร, กัลยา จำเริญรัตนะ และ ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2536. **เนื้อเยื่อของปลาช่อน.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุรพงษ์ โกสิยะจินดา. 2545. **แก้วมังกร พืชเศรษฐกิจ ผลไม้เพื่อสุขภาพ.** กรุงเทพฯ

อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล. 2542. **สภาวะการเลี้ยงปลาสวยงามในปัจจุบัน.** กรุงเทพฯ: กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล. 2544. สัมมนา “สายพันธุ์ปลาหมอสีในประเทศไทย และข้อเท็จจริงเกี่ยวกับปลาหมอฟรอนโตซ่า” .**วารสารการประมง** 54(3) : 227-241.

อุดม ก๊กผล, โสภณ เรืองสำราญ และ อมร เพชรสม. 2543. **อินทรีย์เคมี I**. พิมพ์ครั้งที่ 7. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Amar, E. C., Kiron, V., Satoh, S. and Watanabe, T. 2004. "Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products." **Fish & Shellfish Immunology**. 16 : 527 – 537.

Anonymous. 2008a. **Magazine publishes guide to cosmetic fish surgery**. [Online]. Available : http://www.practicalfishkeeping.co.uk/pfk/pages/item.php?news=957.

Anonymous. 2008b. **Acetic acid**. [Online]. Available : http://images.google.co.th/

Bailey, M. and Sandford, G. 1999. **Aquarium fish identifier encyclopedia** : London. Annes publishing limited.

Cai, Y. Z., Sun, M. and Corke, H. 2005. "Characterization and application of betalain pigments form plants of the Amaranthaceae." **Trends in food science & technology**. 16 : 370-376.

Chen, C. and Pandora, A. K. A. 2008. **Painted glass fish and other questionable practices.** [Online]. Available : http://badmanstripicalfish.com/artical.html.

Fujii, R. 1993. "Colouration and chromatophores."In Edvard, D. H. editor. 1993. **The physiology of fishes**. Boca Raton : CRC Press.

Gandia-Herrero, F., Garcia-Camona, F. and Escribano, J. 2005a. " A novelmethod using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection for the determination of betaxanthins." **Journal of chromatography A**. 1078 : 83-89.

Gandia-Herrero, F., Garcia-Camona, F. and Escribano, J. 2005b. "Fluorescent pigment: New perspectives in betalain research and applications." **Food research international**. 38 : 879-884.

Gold-E. 2005, **CrossBreed...Corner**. [Online]. Available : http://www.Fishroom.pantown .com .

Gold-E. 2008. **ครอสบรีดอะไร มีชื่อย่อว่า** B. P. [Online]. Available : http://www.fishroom.org /article/007.htm .

Gunasena, H. P. M., Pushpakumara , D. K. N. G. and Kariyawasam, M. 2008. **Dragon fruit *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton and Rose**. [Online]. Available : www.google.co.th.

Herbach, K. M., Rohe, M., Stintzing, F. C. and Carle, R. 2006. "Structural and Chromatic stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton & Rose) betacyaninsare effected by the juice matrix and selected additives". **Food research international.** 39 : 667-677.

Humason , G. L. 1979. "Animal tissue technique" อ้างโดย ชลอ ลิ้มสุวรรณ, ปวีณา กิจสวัสดิ์ และ สุปราณี ชินบุตร. 2530. **เนื้อเยื่อปลาคุกด้าน.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kirca, A., Ozkan , M. and Cemeroglu, B. 2007. " Effect of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins." **Food chemistry.** 101 : 212-218.

Kobayashi, N., Schmidt, J., Wray, V., Nimtz, M., Wray,V. and Schliemann, W. 2000. Betalains from Christmas cactus". **Phytochemistry.** 54 : 419-426.

Kobayashi, N., Schmidt, J., Wray, V. and Schliemann, W. 2001."Formation and occurrence of dopamine-derived betacyanins". **Phytochemistry.** 56 : 429-436.

Lagler, K. F., Bardech, J. E. and Miller, R. R. 1963. **Ichthyology** : New York. John Wiley and Sons.

Mario, P. 1976. **"Betalains."** 560- 834. In Goodwin, T.W. 1979. **Chemistry and biochemistry of plant pigments** : London. Academic press.

Mobhammer, M. R., Stintzing, F. C. and Carle, R. 2005. "Colour studies on fruit juice blends form *Opuntia* and *Hylocereus* cacti and betalain-containing medal solutions derived thereform". **Food research international.** 38 : 975-981.

Mueller, L. A., Hinz, U. and Zryd, J. P. 1996."The formation of betalamic acid and muscaflavin by recombination DOPA dioxygenase form *Amatia.*" **Phytochemistry.** 44 : 567-569.

Nelson, J. S. 1994. **Fishes of the World** 3rd: New York. John Wiley and Sons.

Paripatananont, T., Tangtrongpairoj, J., Sailasuta, A. and Chansue , N. 1999 " Effect of astaxanthin on the pigmentation of goldfish *Carrassius auratus.*" **Journal of the world aquaculture society.** 30 : 454-460.

Phumjan, L. and Laohavisuti, N. 2007. " Betalain extraction from Peeled Dragon Fruit for enhancing color in red platy (*Xiphophorus maculatus*)." 490-493. in **International**

conference on integration of science & technology for sustainable development. Bangkok.

Sommer, T. R., D'Souza , F. M. L. and Morrissy, N. M. 1991. "Pigmentation of adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using the green alga *Haematococcus pluvialis*. "**Aquaculture.** 106 : 63-74.

Stintzing, F. C. and Carle, R. 2004. "Functional properties of anthocyanins in plants, food, and in human nutrition." **Trends in food science & technology.** 15 : 19-38.

Stintzing, F. C. and Carle, R. 2006. "Characterisation of anthocyanin-betalain mixtures for food colouring by chromatic and HPLC-DAD-MS analyses." **Food chemistry.** 94 : 296-309.

Strack, D.,Vogt, T. and Schliemann,W. 2003."Recent advance in betalain." **Photochemistry.** 62 : 247-269.

Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N., Narayan, M. S. and Ravishankar, G. A. 2003. "Kinetics of pigment release from hairy root cultures of *Beta vulgaris* under the influences of pH, sonication, tempearature and oxygen stress." **Process biochemistry.** 38 : 1069 – 1076.

Van der salm A. L., Martinez, M., Flik, G. and Bonga, S. E. W. 2004. "Effect of husbandry conditions on the skin color and stress response of red porgy *Pagrus pagrus*." **Aquaculture.** 241 : 371-386.

Whybraniec, S. 2008. "Chromatographic investigation on acyl migration in betacyanins and their decarboxylated derivatives." **Journal of chromatography B.** 861 : 40-47.

Yut1678. 2549. "นกแก้ว...ครอสบรีดอมตะ." **Thaicrossbreed.** 1(7) : 22-28

Zryd, J. P. and Christinet , L. 2003. "**Betalain.**" Lausanne. : Dept. of Plant Molecular Biology University de Lausanne.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

การเตรียมสารเคมีสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต

ก.1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต

สารละลาย A

ละลายกรดซิตริก 96.10 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ได้ความเข้มข้น 0.5 โมล่าร์

สารละลาย B

ละลาย $Na_2HPO_4.12H_20$ ปริมาณ 179 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ได้ความเข้มข้น 0.5 โมล่าร์

นำมาผสมกันได้เป็น สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตความเข้มข้น 1 โมล่าร์

ภาคผนวก ข.
การเตรียมสารเคมีและสีย้อมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

ข.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับแช่ตัวอย่าง

ข.1.1 สารเคมีสำหรับดองตัวอย่าง (10 % buffer formalin)

1. 37-40 % Formalin
2. น้ำกลั่น
3. sodium phosphate, monobasic
4. sodium phosphate, dibasic

ข.1.2 สารเคมีสำหรับย่อยกระดูก (Decalcification solution)

1. aluminum chloride
2. hydrochloric acid
3. formic acid
4. น้ำกลั่น

ข.2 สีย้อมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

ข.2.1 การเตรียม Mayer's hematoxylin

1. hematoxylin crystals
2. sodium iodide
3. potassium aluminum sulfate
4. citric acid
5. chloral hydrate
6. น้ำกลั่น

ข.2.2 การเตรียม Eosin

1. eosin
2. 70% ethyl alcohol
3. glacial acetic acid

ภาคผนวก ค.
ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

ค.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

เนื่องจากเนื้อเยื่อปกติไม่สามารถนำมาทำการตัดดูโครงสร้างของเซลล์ได้ ดังนั้นเนื้อเยื่อที่นำมาศึกษาต้องผ่านขั้นตอนการขจัดน้ำ และผ่านขบวนการแทรกพาราฟินในเนื้อเยื่อ การเตรียมตัวอย่างมีขั้นตอนในการเตรียมดังนี้

ค.1.1 การขจัดน้ำภายในเนื้อเยื่อและแทรกพาราฟิน

นำตัวอย่างลูกปลากัดที่ทำการแช่ในน้ำยา buffer formalin 10 % นาน 24 ชั่วโมง มาแช่น้ำโดยให้น้ำไหลผ่านอย่างช้าๆนาน 2-4 ชั่วโมง และนำชิ้นเนื้อตัวอย่างใส่ใน ตลับใส่เนื้อเยื่อ ถ้าตัวอย่างมีขนาดใหญ่ ให้ทำการตัดแต่งชิ้นเนื้อเยื่อจนได้ขนาดที่พอเหมาะ กับขนาดของตลับใส่เนื้อเยื่อ หลังจากนั้นนำตัวอย่างผ่านขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. แช่ตัวอย่างใน 50 % แอลกอฮอล์ นาน 1 ชั่วโมง
2. แช่ตัวอย่างใน 70 % แอลกอฮอล์ นาน 1 ชั่วโมง
3. แช่ตัวอย่างใน 80 % แอลกอฮอล์ นาน 1 ชั่วโมง
4. แช่ตัวอย่างใน 95 % แอลกอฮอล์ นาน 1 ชั่วโมง
5. แช่ตัวอย่างใน 100 % แอลกอฮอล์(ครั้งที่ 1) นาน 1 ชั่วโมง
6. แช่ตัวอย่างใน 100 % แอลกอฮอล์(ครั้งที่ 2) นาน 1 ชั่วโมง
7. แช่ตัวอย่างใน 100 % แอลกอฮอล์(ครั้งที่ 3) นาน 1 ชั่วโมง
8. แช่ตัวอย่างใน bioclear (ครั้งที่ 1) นาน 1 ชั่วโมง
9. แช่ตัวอย่างใน bioclear (ครั้งที่ 2) นาน 1 ชั่วโมง
10. แช่ตัวอย่างใน melted paraffin (ครั้งที่ 1) นาน 1 ชั่วโมง
11. แช่ตัวอย่างใน melted paraffin (ครั้งที่ 2) นาน 1 ชั่วโมง
12. นำตัวอย่างใส่ในโมลสแตนเลส เติมพาราฟิน จนเต็ม ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใส่ในช่องแช่แข็ง เมื่อเย็นจนได้ที่แกะตัวอย่างออกจากกระทงโลหะจะได้แท่งพาราฟินที่มีเนื้อเยื่อปลาแทรกอยู่

ค.1.2 การย้อมสีตัวอย่าง

นำแท่งพาราฟินที่มีเนื้อเยื่อปลาอยู่ภายใน ไปทำการตัดด้วยเครื่องไมโครโตม ที่ความหนา 4-5 ไมครอน และวางบนแผ่นสไลด์ นำแผ่นสไลด์ที่ได้ไปย้อมสีตามขั้นตอนเทคนิคการย้อมสี hematoxylin และ eosin (H&E) ตามวิธีของ Humanson (1979) ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.	แช่ xylene I	3 นาที
2.	แช่ xylene II	3 นาที
3.	แช่ absolute alcohol I	2 นาที
4.	แช่ absolute alcohol II	2 นาที
5.	แช่ 95% alcohol	2 นาที
6.	แช่ 70% alcohol	2 นาที
7.	ให้น้ำไหลผ่านน้ำอย่างช้าๆ	5 นาที
8.	แช่ hematoxylin	3 นาที
9.	ให้น้ำไหลผ่านน้ำอย่างช้าๆ	5 นาที
10.	แช่ในน้ำที่เติม แอมโมเนีย 2-3 หยด	3 นาที
11.	ให้น้ำไหลผ่านน้ำอย่างช้าๆ	5 นาที
12.	แช่ 50% alcohol	2 นาที
13.	แช่ 70% alcohol	2 นาที
14.	แช่ eosin	6 นาที
15.	แช่ 95% alcohol	1 นาที
16.	แช่ absolute alcohol I	2 นาที
17.	แช่ absolute alcohol II	2 นาที
18.	แช่ absolute alcohol III	2 นาที
19.	แช่ xylene I	3 นาที
20.	แช่ xylene II	3 นาที
21.	แช่ xylene III	3 นาที
22.	ปิดกระจกสไลด์	

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – นามสกุล	นายสิริพงษ์ วงศ์พรประทีป
วัน เดือน ปีเกิด	30 เมษายน พ.ศ.2524 ที่กรุงเทพมหานครฯ
ที่อยู่	60 ถนนพหลโยธิน ตำบลประชาธิปัตย์ อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12130
ประวัติการศึกษา	2547 วิทยาศาสตรบัณฑิต (ประมง) คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์