สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

# การเสริมแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรือง (*Tagetes erecta* Linn.) ต่อการเจริญเติบโต สีผิว และ การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ในปลาทรงเครื่อง (*Epalzeorhynchos bicolor*)

# DIETARY SUPPLEMENTION OF CAROTENOID FROM MARIGOLD FLOWER (*Tagetes erecta* Linn.) ON GROWTH, COLORATION AND GAMETE DEVELOPMENT IN RED-TAILED SHARK (*Epalzeorhynchos bicolor*)

T132473

หทัยรัตน์ ญาณฤทธิ์

HATHAIRAT YANNARIT

ว.ท.
ห136ก
2556

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 132473
วัน,เดือน,ปี 18 ก.ค. 2557

b.12609781
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2556

KMITL-2013-AG-M-081-148

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# DIETARY SUPPLEMENTION OF CAROTENOID FROM MARIGOLD FLOWER (*Tagetes erecta* Linn.) ON GROWTH, COLORATION AND GAMETE DEVELOPMENT IN RED-TAILED SHARK (*Epalzeorhynchos bicolor*)

HATHAIRAT YANNARIT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FISHERIES SCIENCE

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2013

KMITL-2013- AG-M-081-148

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**COPYRIGHT 2013**

**FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **หัวข้อวิทยานิพนธ์** | การเสริมแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรือง (*Tagetes erecta* Linn.) ต่อการเจริญเติบโต สีผิว และการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ในปลาทรงเครื่อง (*Epalzeorhynchos bicolor*) |
| **นักศึกษา** | นางสาวหทัยรัตน์ ญาณฤทธิ์ |
| **รหัสประจำตัว** | 52641003 |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต |
| **สาขาวิชา** | วิทยาศาสตร์การประมง |
| **พ.ศ.** | 2556 |
| **อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์** | รศ.ดร. นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ |

## บทคัดย่อ

การเสริมแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรือง (*Tagetes erecta* Linn.) ต่อการเจริญเติบโต สีผิว และการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ในปลาทรงเครื่อง (*Epalzeorhynchos bicolor*) แบ่งเป็น 2 การทดลอง การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ผสมในอาหาร โดยนำอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 0, 25, 50, 75 และ 100 มก./กก. และเก็บรักษาอาหารที่อุณหภูมิห้อง 25±3 °C หลังการเก็บรักษาอาหาร นาน 12 สัปดาห์ วิเคราะห์ค่ากรดไทโอบาร์บิวทูริก (Thiobarbituric acid reactive substance: TBARS) ในอาหาร พบว่า อาหารผสมแคโรทีนอยด์ 100 มก./กก. มีค่าเฉลี่ย TBARS ต่ำสุด เท่ากับ 165.252±2.267 ไมโครกรัม MDA/กก.อาหาร ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ค่าเฉลี่ย TBARS และการทดลองที่ 2 ศึกษาอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองในอาหารที่ 0, 25, 50, 75 และ 100 มก./กก. ต่อการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงสีผิว ค่า TBARS ในเนื้อปลา และการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ปลาทรงเครื่อง พบว่า หลังจาก 12 สัปดาห์ การเจริญเติบโตของปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมแคโรทีนอยด์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ค่าการเปลี่ยนแปลงสีผิวบริเวณลำตัว วัดด้วยเครื่องวัดสี (Chromameter) อ่านค่าในระบบ CIE L*a*b* (L*-ค่าความสว่าง, a*-ค่าสีแดง, b*-ค่าสีเหลือง) พบว่า ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมแคโรทีนอยด์ มีค่าสีแดง (a*) และค่าสีเหลือง (b*) ของผิวหนังปลาไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ค่าความสว่าง (L*) มีความแตกต่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยค่าความสว่างของผิวหนังปลาลดลงตามความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ที่เพิ่มขึ้นในอาหาร ส่วนปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ 100 มก./กก. มีค่าเฉลี่ย TBARS เนื้อปลาต่ำสุดเท่ากับ 48.323±9.277 ไมโครกรัม MDA/กรัมเนื้อปลา ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาที่ได้รับอาหารผสมแคโรทีนอยด์ความเข้มข้น 25, 50, 75 และ 100 มก./กก. พบว่าปลาทรงเครื่องมีการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์ที่เพิ่มขึ้นในอาหาร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **Thesis** | Dietary supplementation of carotenoids from marigold flower (*Tagetes erecta* Linn.) on growth, coloration and gamete development in red-tailed shark (*Epalzeorhynchos bicolor*) |
| **Student** | Miss Hathairat Yannarit |
| **Student ID.** | 52641003 |
| **Degree** | Master of Science |
| **Program** | Fisheries Science |
| **Year** | 2013 |
| **Thesis advisor** | Assoc. Prof. Dr. Nongnuch Laohavisuti |


## ABSTRACT

This study was aimed to determine the optimum dietary supplementation of carotenoids from marigold flower (*Tagetes erecta* Linn.) on growth, coloration and gamete development in red-tailed shark (*Epalzeorhynchos bicolor*). Two experiments were conducted; the first experiment was performed to evaluate the antioxidant efficiency in fish feed supplemented with carotenoids from the marigold flower by determining the value of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS). Carotenoids were added to the basal feed at 0, 25, 50, 75 and 100 mg/kg diet and were then stored at room temperature (25±3 °C). After 12 weeks, the TBARS value (165.252±2.267 µg MDA/kg diet) was lowest in the fish diet supplemented with 100 mg carotenoids/kg diet. The second experiment was carried out to determine the optimum supplementation of carotenoids in the feed on growth, coloration, TBARS value of muscles as well as the histology of ovaries in red-tailed shark. The fish were fed with 0, 25, 50, 75 and 100 mg carotenoids /kg feed for 12 weeks. There were no significant differences in growth performance among the different treatments ($P>0.05$). The skin color of fish was measured by using chromameter with the system CIE L*a*b* (CIE LAB). All carotenoid-fed groups had significantly more light appearance (L*), ($P<0.05$) while redness (a*) and yellowness (b*) showed no statistically significant differences ($P>0.05$). The fish skin of lightness (L* values) significantly decreased as the concentrations of carotenoids were increased in the feed ($P<0.05$).



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The TBARS value of muscles from fish fed with carotenoids at a concentration of 100 mg/kg diets showed-the lowest TBARS value at 48.323±9.277 μg MDA/g muscles than other groups ($P<0.05$). In addition, the gamete histological studies of-fish fed dietary supplementation with carotenoid concentrations of 0, 25, 50, 75 and 100 mg/kg diet. The results showed that stage 6 of ovarian development significantly increased as the concentrations of carotenoids were increased in the feed ($P<0.05$).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ ที่คอยให้คำปรึกษาแนะนำ ให้กำลังใจ และ ช่วยเหลือในการวางแผนการวิจัยนี้ ทำให้วิทยานิพนธ์นี้ถูกต้องสมบูรณ์ พร้อมทั้งคำปรึกษา ข้าพเจ้าขอกราบพระคุณท่านอาจารย์เป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณท่าน รศ.ดร. สมชาย หวังวิบูลย์กิจ ผศ.ดร. อัจฉรี เรืองเดช ดร. อนัญญา เจริญพรนิพัทธ และ ดร. พิกุล จิรวาณิชไพศาล ที่ได้ให้ความกรุณาให้คำแนะนำ รวมถึงการตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ คุณบุปผา จงพัฒน์ ที่ช่วยแนะนำเทคนิคและวิธีการทำการทดลองให้สมบูรณ์แบบและถูกต้องแม่นยำ คอยให้คำปรึกษาแนะนำเป็นอย่างดี รวมถึงอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ในการทดลองต่างๆ และพี่ๆนักวิชาการในห้องปฏิบัติการที่คอยให้ความรู้และคำแนะนำในทุกๆเรื่อง

ขอขอบคุณเพื่อนๆพี่ๆปริญญาโท ที่คอยช่วยเหลือเวลาทำงานทดลอง ทั้งยังให้กำลังใจเป็นที่ปรึกษา คอยให้คำแนะนำ และเพื่อนคนอื่นทุกคนที่คอยให้กำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่คอยให้กำลังใจ ซึ่งเป็นกำลังใจที่สำคัญที่สุดของข้าพเจ้า และมอบโอกาสทางการศึกษาให้แก่ข้าพเจ้าโดยตลอดมา

หทัยรัตน์ ญาณฤทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ


หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... III

กิตติกรรมประกาศ..... V

สารบัญ..... VI

สารบัญตาราง..... IX

สารบัญภาพ..... X

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาของปัญหา..... 1

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์..... 2

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ..... 2

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3

2.1 ปลาทรงเครื่อง..... 3

2.2 ดอกดาวเรือง..... 4

2.3 แคโรทีนอยด์..... 5

2.3.1 แหล่งของสารแคโรทีนอยด์..... 5

2.3.1.1 แคโรทีนอยด์จากธรรมชาติ..... 6

2.3.1.2 แคโรทีนอยด์สังเคราะห์..... 6

2.3.2 โครงสร้างและชนิดของสารแคโรทีนอยด์..... 7

2.3.3 การดูดซึมและเมตาบอลิซึม..... 8

2.3.4 ชนิดของสารแคโรทีนอยด์..... 8

2.3.4.1 เบต้าแคโรทีน..... 8

2.3.4.2 แอสตาแซนทิน..... 9

2.3.4.3 ไลโคปีน..... 9

2.3.4.4 ลูทีนและซีแซนทิน..... 9

2.4 บทบาทของสารแคโรทีนอยด์ในปลา..... 10

2.4.1 การใช้แคโรทีนอยด์ในการเร่งสีปลา..... 10

2.4.2 การใช้แคโรทีนอยด์ในเพื่อกระตุ้นการสืบพันธุ์ของปลา..... 11



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)


หน้า

2.5 การเสื่อมคุณภาพของสารโภชนะในอาหารปลาจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน..... 13

2.6 สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant)..... 15

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 18

3.1 สัตว์และพืชทดลอง..... 18

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี..... 18

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง..... 19

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล..... 23

3.5 สถานที่ทำการวิจัย..... 23

3.6 ระยะเวลาการดำเนินงาน..... 23

บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 24

4.1 ศึกษาประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ผสมลงในอาหาร..... 24

4.2 ศึกษาระดับความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์ที่เหมาะสมในอาหารต่อการเจริญเติบโต การพัฒนาสีผิว และการเปลี่ยนแปลงลักษณะเนื้อเยื่อเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่อง..... 25

4.2.1 ผลของการให้อาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ต่อการเจริญเติบโตของปลาทรงเครื่อง..... 25

4.2.2 ผลของการให้อาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ต่อการเปลี่ยนแปลงสีผิวของปลาทรงเครื่อง..... 26

4.2.3 ผลของประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารแคโรทีนอยด์ในเนื้อปลาทรงเครื่อง..... 30

4.2.4 ผลของการให้อาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ต่อการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่อง..... 31

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 38

บทที่ 6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 43



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม..... 44

ภาคผนวก..... 49

ประวัติผู้เขียน..... 61



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง


ตารางที่ หน้า

4.1 ค่า TBARS ในอาหารที่ผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ก่อนการทดลองและสิ้นสุดการทดลอง ..... 24

4.2 การเจริญเติบโตของปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน ..... 25

4.3 ค่าความสว่าง (L*) ของสีผิวปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ความเข้มข้นต่างกัน ..... 27

4.4 ค่าความเข้มของสีแดง (a*) ของสีผิวปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ความเข้มข้นต่างกัน ..... 28

4.5 ค่าความเข้มของสีเหลือง (b*) ของสีผิวปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ความเข้มข้นต่างกัน ..... 29

4.6 ค่า TBARS ในเนื้อปลาที่ได้รับผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ..... 31

4.7 เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ..... 33

4.8 เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ..... 33

4.9 เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ..... 34



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า


1. ลักษณะทั่วไปของปลาทรงเครื่อง (*Epalzeorhynchos bicolor*)..... 3
2. ลักษณะทั่วไปของดอกดาวเรือง..... 5
3. โครงสร้างทางเคมีของ hydrogenated carotenoid derivatives..... 7
4. โครงสร้างทางเคมีของ oxygenated carotenoid derivatives..... 8
4.1 น้ำหนักการเจริญเติบโตของปลาทรงเครื่องเมื่อได้รับอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 มก./กก. เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์..... 26
4.2 ค่าความสว่าง (L*) ของสีผิวปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน..... 27
4.3 ค่าความเข้มสีแดง (a*) ของสีผิวปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน..... 28
4.4 ความเข้มสีเหลือง (b*) ของสีผิวปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน..... 29
4.5 ปลาทรงเครื่องที่ได้รับอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน..... 30
4.6 การพัฒนาของเซลล์ไข่ปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ มี 6 ระยะ ดังนี้ (A) ระยะที่ 1 ไข่มีขนาดเล็กอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม, (B) ระยะที่ 2 ไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงินเข้ม นิวเคลียสติดสีเทา ไม่พบ provitelline nucleoli, (C) ระยะที่ 3 ไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงินเข้ม นิวเคลียสสีชมพูภายในเริ่มเห็น provitelline nucleoli กระจายอยู่ในนิวเคลียส, (D) ระยะที่ 4 พบ euvitelline nucleoli ที่ขอบของนิวเคลียส, (E) ระยะที่ 5 ไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงินปนเทา ภายในมี yolk granules และ yolk vacuoles เพิ่มขึ้น และ (F) ระยะที่ 6 ไซโตพลาสซึมจะเต็มไปด้วย yolk granules ขนาดใหญ่ นิวเคลียสจะมีขนาดเล็กติดสีชมพู (formalin 10%; H&E)..... 32
4.7. เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่องในระยะที่ 1 ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์..... 34
4.8 เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่องในระยะที่ 2 ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์..... 35
4.9 เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่องในระยะที่ 3 ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์..... 35


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ (ต่อ)

**ภาพที่** **หน้า**

4.10 เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่องในระยะที่ 4 ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์..... 36
4.11 เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่องในระยะที่ 5 ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์..... 36
4.12 เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่องในระยะที่ 6 ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์..... 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามเป็นอีกหนึ่งธุรกิจที่สร้างรายได้ให้กับประเทศไทยและมีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น จากข้อมูลของสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืดแสดงถึงมูลค่าการส่งออกปลาสวยงามในปี พ.ศ. 2551 มีมูลค่าประมาณ 26 ล้านบาท แต่ในการผลิตยังไม่เพียงพอกับความต้องการของตลาดโลก เนื่องจากมีผู้เพาะเลี้ยงปลาสวยงามเพื่อการส่งออกเพียงไม่กี่ประเทศเท่านั้น ทำให้ธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว การเลี้ยงปลาสวยงามเป็นงานอดิเรกเนื่องจากปลาสวยงามเหล่านี้มีรูปร่างและสีสันสวยงาม เลี้ยงง่าย และใช้พื้นที่น้อย หนึ่งในนั้นคือ ปลาทรงเครื่อง (*Epalzeorhynchos bicolor*) เป็นปลาน้ำจืดขนาดเล็กที่อยู่ในกลุ่มปลาที่ออกลูกเป็นไข่ พบเฉพาะในประเทศไทยในบริเวณแม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำแม่กลอง และแม่น้ำบางปะกง แต่ในปัจจุบันพบน้อยมากในธรรมชาติ นับเป็นชนิดที่ใกล้สูญพันธุ์ (Endangered) (สมโภชน์ อัคคะทวีวัฒน์ และคณะ. 2540; คีรี กออนันตกุล และคณะ. 2546) แต่เนื่องจากปลาทรงเครื่องเป็นปลาที่มีสีสันสวยงามจึงได้มีการจับปลาเหล่านี้ส่งไปขายยังต่างประเทศโดยเฉพาะในทวีปยุโรป ทำให้ปลาเหล่านี้มีราคาแพงขึ้นและหาได้ยากจากธรรมชาติอีกด้วย ทำให้ปริมาณปลาที่จะส่งออกไปขายยังต่างประเทศนั้นไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงได้มีการใช้ฮอร์โมนเพื่อการผสมเทียม (สืบสิน สนธิรัตน. 2522) โดยการใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์จากสารเคมี พบว่าฮอร์โมนสังเคราะห์จากสารเคมีส่งผลกระทบต่อสุขภาพปลา ทำให้ปลาสุขภาพอ่อนแอ ความต้านทานโรคลดลง และไม่สามารถผสมพันธุ์ต่อไปได้ (สุริยัน เสมา. 2546) เกษตรกรได้เลี้ยงปลาทรงเครื่องไประยะหนึ่งจะพบปัญหาเรื่องสีสันของปลาที่มีลักษณะซีดทำให้ปลามีราคาถูก ต่อมามีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารสีในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ ได้แก่ เบต้าแคโรทีน แคนทาแซนทิน ซีแซนทิน และแอสตาแซนทินที่ได้จากมาจากแหล่งธรรมชาติ เช่น ยีสต์ แบคทีเรีย พืช และพวกครัสเตเชียน มาผสมในอาหาร ซึ่งมีคุณสมบัติในการเร่งสีผิวของปลา (Wang *et al.* 2006) แต่สารสีในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่ใช้ในปลาสวยงามมีราคาแพง จึงได้มีการศึกษาค้นคว้าสารสีแหล่งอื่นๆนำมาใช้ทดแทน พบได้ทั่วไปในพืช ผัก ผลไม้และดอกไม้ เช่น พริกแดง และ ดอกดาวเรือง (Buyukapar *et al.* 2007; Ezhill *et al.* 2008) ดังนั้นสารสีแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรือง จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้ทดแทนเพื่อลดต้นทุนการผลิตปลาทรงเครื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดอกดาวเรืองเป็นพืชดอกที่พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ ดอกมีสีเหลือง หรือ สีเหลืองส้ม ซึ่งประกอบด้วยสาร terpene, essential oils, flavonoids, sesquiterpenes และ carotenoid โดยเฉพาะสารแคโรทีนอยด์พบในกลีบดอกเป็นจำนวนมาก ซึ่งสารสีมีสีเหลือง ส้ม และส้มแดง (Lewis *et al.* 1998; Gong *et al.* 2012) สารแคโรทีนอยด์ที่พบในดอกดาวเรืองนั้นยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งทำหน้าที่ในการไปยับยั้งขบวนการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant) และยังมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ช่วยควบคุมระบบการทำงานของภูมิคุ้มกันโรคให้อยู่ในระดับปกติ (วีระศักดิ์ สามี. 2548; Rehulka. 2000) และสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองยังมีคุณสมบัติอื่น เช่น ลดการอักเสบ เป็นต้น (Gong *et al.* 2012) ดังนั้นการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ของสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองในอาหารและในเนื้อปลา และความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารแคโรทีนอยด์ในอาหารต่อการพัฒนาสีผิว การเจริญเติบโต และการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งการใช้สารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ได้จากธรรมชาติมาใช้ในการผสมอาหารนั้นไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของปลา และยังเป็นการลดต้นทุนการผลิตปลาสวยงามอีกด้วย

## 1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองในอาหาร

1.2.2 เพื่อศึกษาระดับของสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต การพัฒนาสีผิว ประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองในเนื้อปลา และการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่องเพศเมีย

## 1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทราบระดับความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์ที่เหมาะสมในอาหารต่อการเจริญเติบโต การพัฒนาสีผิว และการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่องเพศเมีย โดยใช้สารสีจากธรรมชาติมาทดแทนการใช้สารสีสังเคราะห์ที่มีราคาสูง

1.3.2 ทราบประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ผสมลงในอาหารและในเนื้อปลา เพื่อเป็นแนวทางการใช้ประโยชน์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากดอกดาวเรืองและเพิ่มมูลค่าดอกดาวเรืองให้มีมากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2
# งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 ปลาทรงเครื่อง

ปลาทรงเครื่อง (*Epalzeorhynchos bicolor*) เป็นปลาน้ำจืดขนาดเล็กที่อยู่ในวงศ์ปลาตะเพียน (Cyprinidae) มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย พบในแม่น้ำสายหลักทั่วทุกภาค เช่น แม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำแม่กลองและแม่น้ำบางปะกง เป็นต้น ลักษณะทั่วไปของปลาทรงเครื่อง คือ รูปร่างยาวเพรียว ลำตัวแบนข้าง หัวและปากเล็ก จะงอยปากสั้นทู่ ลำตัวสีดำหรือสีน้ำเงินเข้มปนดำ ด้านท้องมีสีจาง ยกเว้นครีบหางมีขนาดใหญ่และเว้าลึก เป็นแฉกสีแดงปนส้มเช่นเดียวกับครีบอก ขนาดความยาวเฉลี่ยประมาณ 9-10 เซนติเมตรและมีขนาดใหญ่สุดไม่เกิน 15 เซนติเมตร ปกติจะผสมพันธุ์วางไข่ในแหล่งน้ำธรรมชาติในระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงกันยายน เมื่อนำมาเลี้ยงในบ่อสามารถมีไข่แก่เต็มที่ได้ แต่จะไม่ผสมพันธุ์กันเอง ต้องใช้วิธีผสมเทียม ปลาทรงเครื่องจัดว่าเป็นปลาสวยงามที่สำคัญที่ส่งออกขายต่างประเทศด้วย เป็นปลาที่ได้รับความนิยมมากและมีแหล่งกำเนิดเฉพาะในประเทศไทยเท่านั้น (วันเพ็ญ มีนกาญจน์. 2528)

**ภาพที่ 1** ลักษณะทั่วไปของปลาทรงเครื่อง (*Epalzeorhynchos bicolor*)

ความแตกต่างระหว่างเพศ คือ ปลาเพศเมียจะมีความกว้างของลำตัวมากกว่าเพศผู้ ในฤดูสืบพันธุ์ ปลาเพศเมียจะมีไข่แก่สมบูรณ์ บริเวณส่วนท้องจะอูมเป่งและนิ่ม รูก้นจะบวมเล็กน้อย ส่วนปลาเพศผู้มีลำตัวเรียวยาว เมื่อบีบท้องเบาๆจะมีน้ำเชื้อสีขาวขุ่นไหลออกมา หลังจากฟักตัวให้ไข่แดงต้มสุกบดละเอียดเป็นอาหาร แล้วค่อยเปลี่ยนเป็นไรแดงแล้วย้ายลูกปลาลงอนุบาล จะมีการใช้ทางมะพร้าวหรือท่อพีวีซีทำเป็นที่หลบซ่อน เพื่อเพิ่มอัตรารอดตาย เนื่องจากพฤติกรรมของปลาทรงเครื่องชอบหลบซ่อนตัวในช่องหรือโพรงใต้น้ำ ปลาทรงเครื่องสามารถเลี้ยงร่วมกับปลาชนิดอื่นในตู้ปลาที่มีพรรณไม้น้ำ อุปนิสัยชอบแทะเล็มกินตะไคร่น้ำและเศษสารอินทรีย์ในตู้ปลา เป็นปลาสวยงามที่เป็นที่รู้จักกันดีทั่วโลก เพราะมีรูปร่างปราดเปรียวและว่องไว ลำตัวมีสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

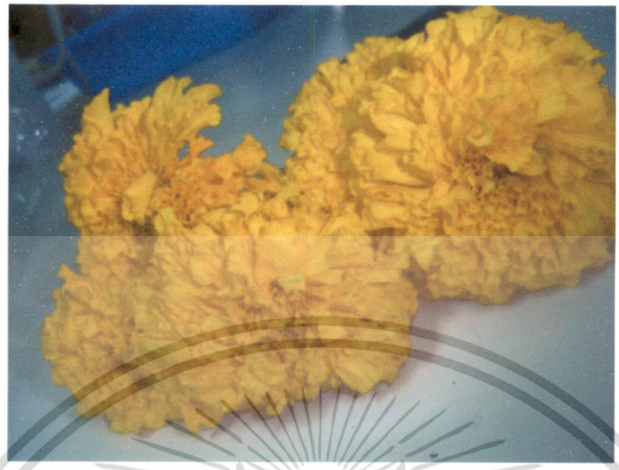
คล้ำตัดกับสีแดงของครีบหาง ทำให้มองดูสวยเด่นสะดุดตา (สมโภชน์ อัคคะทวีวัฒน์ และคณะ. 2540; ดีรี กออนันตกุล และคณะ. 2546; สุจินต์ หนูขวัญ และอรุณี รอดลอย. 2552) แต่ในปัจจุบันพบปลาทรงเครื่องได้น้อยมากในธรรมชาติ เนื่องจากถูกคุมคามถิ่นที่อยู่อาศัยและถูกจับไปเป็นปลาสวยงามและส่งไปขายยังต่างประเทศโดยเฉพาะในประเทศทวีปยุโรป ทำให้ปลาเหล่านี้มีราคาซื้อขายที่แพงขึ้นและหาได้ยากขึ้น เนื่องจากปริมาณปลาที่จะส่งออกไปขายไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงทำให้ปลาที่ขายกันในตลาดปลาสวยงามเป็นปลาที่เกิดจากการผสมเทียมด้วยการฉีดฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองของปลาไน (สืบสิน สนธิรัตน. 2522) ในปัจจุบันพบปลาทรงเครื่องทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ *E. bicolor*, *E. bicornis*, *E. frenatum*, *E. kalopterus* และ *E. munensis* เป็นต้น

## 2.2 ดอกดาวเรือง

ดอกดาวเรืองมีชื่อสามัญว่า Marigolds จัดอยู่ในวงศ์ Compositae ที่นิยมปลูกในปัจจุบันคือ *Tagetes erecta* Linn. กำเนิดในเม็กซิโก เป็นไม้ตัดดอกที่ปลูกง่าย โตเร็ว คงทนต่อสภาพแวดล้อม กลีบดอกมีสีเหลืองสดใส กลีบซ้อนกันแน่น สามารถตัดดอกได้ภายในระยะเวลาสั้นประมาณ 60-70 วัน ดาวเรืองที่นิยมปลูกในไทยมีอยู่ 2 ชนิด คือ ดาวเรืองดอกเล็ก ที่นิยมใช้ทำพวงมาลัย และดาวเรืองดอกใหญ่นิยมใช้ตัดดอกเพื่อปักแจกัน ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกดอกดาวเรือง อยู่ประมาณ 4,000 ไร่ แหล่งเพาะปลูกที่สำคัญอยู่ที่จังหวัดพะเยา ลำปาง นนทบุรี กรุงเทพฯ ราชบุรี สมุทรสาคร สุพรรณบุรี และอุดรธานี เป็นต้น นอกจากนี้ยังปลูกดาวเรืองเป็นไม้กระถางเพื่อประดับตกแต่งสถานที่ รวมทั้งปลูกดาวเรืองเพื่อส่งโรงงานอาหารสัตว์อีกด้วย (ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์. 2548.) ส่วนที่จะนำมาใช้คือส่วนของกลีบดอก เนื่องจากบริเวณส่วนของกลีบดอกมีสารสีที่ชื่อว่า แคโรทีนอยด์ เป็นจำนวนมาก ซึ่งแคโรทีนอยด์เป็นกลุ่มของสารสีที่พบในพืชให้สีเหลือง ส้ม และส้มแดง (Lewis *et al.* 1998) จึงมีการปลูกเพื่อเก็บดอกเพื่อเอาไปเป็นส่วนผสมของอาหารไก่ไข่เพื่อให้ไข่แดงมีสีแดงสวยทดแทนสารสังเคราะห์ ซึ่งเป็นแหล่งวัตถุดิบที่ให้สารสีที่สำคัญในอาหารสัตว์ปีก สุภาพร อิสริโยดม และคณะ (2538) จึงได้ศึกษาการใช้วัตถุดิบอาหารสัตว์จากธรรมชาติเป็นแหล่งให้สีในอาหารไก่ไข่ โดยใช้ดอกดาวเรืองแห้งเป็นแหล่งวัตถุดิบที่ให้สารสีที่สำคัญในอุตสาหกรรมสัตว์ปีก สำหรับดอกดาวเรืองมีปริมาณสารสีจำนวนมาก ซึ่งสามารถมีวิธีการสกัดสารสีที่ทำให้เพิ่มความเข้มข้นขึ้น และสารสีสกัดจากดอกดาวเรืองน่าจะสามารถใช้แทนสารสีสังเคราะห์ได้และทำให้ต้นทุนของสารสีดังกล่าวในอาหารลดลง จึงจัดเป็นแหล่งสารสีจากธรรมชาติที่น่าสนใจและทำการศึกษาทดลองในอาหารสัตว์ปีกเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด เป็นต้น สารแคโรทีนอยด์ที่พบในดอกดาวเรืองนั้นมีคุณสมบัติเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งทำหน้าที่ในการไปยับยั้งขบวนการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant) และยังมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันโรคให้อยู่ในระดับปกติ (Rehulka. 2000.)



**ภาพที่ 2** ลักษณะทั่วไปของดอกดาวเรือง

## 2.3 แคโรทีนอยด์

### 2.3.1 แหล่งของสารแคโรทีนอยด์

สารแคโรทีนอยด์ (carotenoids) เป็นชื่อเรียกทางเคมีของสารชนิดหนึ่ง ที่ถูกค้นพบจากธรรมชาติในพืชผักและผลไม้หลายชนิด และพบมากในพืชที่มีสีเหลือง และสีส้ม ซึ่งอยู่ในรูปของสารประกอบกลุ่มแคโรทีนอยด์ ที่เป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ (Ahmadi *et al.* 2006) แคโรทีนอยด์มีหลายชนิด เช่น อัลฟา-แคโรทีน เบต้า-แคโรทีน ลูทีอิน ซีแซนทิน และแอสตาแซนทิน เป็นต้น แคโรทีนอยด์ แต่ละชนิดต่างก็มีประโยชน์ที่แตกต่างกันและทำงานสนับสนุนกัน เพื่อให้ได้แคโรทีนอยด์ครบทุกชนิด เนื่องจากปลาไม่สามารถสังเคราะห์สารแคโรทีนอยด์เองได้ จึงต้องได้รับผ่านทางอาหารเข้าสู่ร่างกาย (Yanar *et al.* 2008) ในปัจจุบันมีการนำสารสีจากกลุ่มแคโรทีนอยด์มาใช้ในการเร่งสีปลาให้ปลามีสีสันสวยงาม เพื่อที่จะขายได้ในราคาสูงขึ้นและเป็นที่ต้องการของตลาด นอกจากแคโรทีนอยด์เป็นสารเร่งสีแล้ว ยังช่วยในเรื่องการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาโดยเฉพาะสารแอสตาแซนทิน ที่อยู่ในกลุ่มสารสีแคโรทีนอยด์ เช่น ปลาแซลมอน (Christiansen and Torrissen. 1997), ปลาเรนโบว์เทร้าท์ (Choubert *et al.* 1998; Ahmadi *et al.* 2006) และปลา cod (Sawanboonchun *et al.* 2008) แต่สารสีในกลุ่มแคโรที่นอยด์ที่นำมาใช้นั้นค่อนข้างมีราคาแพง จึงได้มีการนำสารแคโรทีนอยด์จากธรรมชาติมาใช้ เนื่องจากหาง่ายและราคาถูก จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการนำสารแคโรทีนอยด์จากธรรมชาติมาใช้ในวงกว้างขึ้น นฤมล อัศวเกศมณี (2549) กล่าวว่าแหล่งของสารแคโรทีนอยด์ที่นิยมใช้ในการเร่งสีปลาสวยงามมีด้วยกัน 2 แหล่ง ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.3.1.1 แคโรทีนอยด์จากธรรมชาติ** พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ ได้แก่

(1) แคโรทีนอยด์ที่ได้จากพืช ที่สำคัญคือ ชนิด zeaxanthin และ lutein ซึ่งให้สีเหลืองถึงสีแดง เช่น

(1.1) ข้าวโพด สารสีที่พบในข้าวโพด (corn gluten) มี xanthophyll 363 มก./กก. มีผลต่อการเกิดสีเข้มขึ้นของปลา ระดับการใช้ในอาหารสัตว์น้ำคือ ปลาดุกบิ๊กอุย 6.6-10% ในสูตรอาหาร ปลากดหลวง น้อยกว่า 6% ในสูตรอาหาร

(1.2) ดาวเรือง สารสีที่พบในดอกดาวเรืองมี xanthophyll 10.63 มก./กก. โดยมี lutein เป็นหลัก ระดับการใช้กลีบดอกดาวเรืองแห้งในอาหารสัตว์น้ำ ในปลาแฟนซีคาร์พ 5% ในสูตรอาหาร อย่างน้อย 6 สัปดาห์

(1.3) สาหร่าย Spirulina สารสีที่พบมี xanthophyll 5.78 มก./กก. โดยมี zeaxanthin เป็นหลัก ระดับการใช้ คือ ปลาแฟนซีคาร์พ 15% ในสูตรอาหาร อย่างน้อย 8 สัปดาห์ ปลาดุกอุย 5% และกุ้ง 5-10% ในสูตรอาหาร

(1.4) สาหร่าย Dunaliella สารสีชนิดที่พบมากคือ $\beta$-carotene และ luthin ระดับการใช้เพื่อเพิ่มสีในสัตว์น้ำอยู่ระหว่าง 8-15% ในสูตรอาหาร

(1.5) สาหร่าย Haematococcus ระดับที่ใช้ในปลาเรนโบว์เทร้าท์ 20-80 มก./กก. ของ carotenoid ในสาหร่าย ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมในการเร่งสีที่ 100 วัน

(2) แคโรทีนอยด์จากสัตว์ ที่สำคัญคือ xanthophyll ชนิด astaxanthin แหล่งของแคโรทีนอยด์จากสัตว์ที่นิยม คือ

(2.1) แกลบกุ้ง สารสีที่พบมี xanthophyll 80 มก./กก. ระดับการใช้แกลบกุ้งในอาหารสัตว์น้ำ ปลาแฟนซีคาร์พ 15% ในสูตรอาหารมีผลให้สดใสแวววาว

(2.2) น้ำมันจากปลา cod และปลา mackerel เป็นแหล่ง astaxanthin ที่สำคัญ

**2.3.1.2 แคโรทีนอยด์สังเคราะห์**

แคโรทีนอยด์สังเคราะห์ประกอบด้วย apocarotenoic acid ethyl ester, canthaxanthin และ astaxanthin มีชื่อทางการค้าว่า carophyll ซึ่งมี 4 ชนิด คือ

(1) carophyll yellow

(2) carophyll red นิยมใช้ในการเพิ่มสีผิวของปลา และครัสเตเซียน โดยเฉพาะการเพิ่มสีในกุ้ง

(3) carophyll orange

(4) carophyll pink นิยมใช้เพิ่มสีในกุ้งและปลา

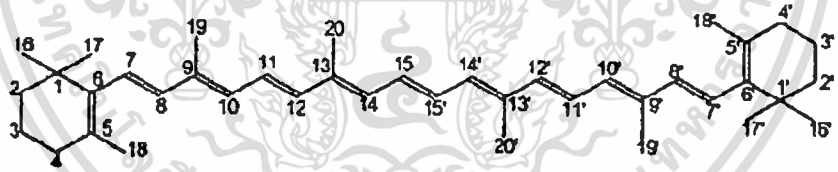
การใช้แคโรทีนอยด์ในกลุ่มปลาทอง และปลาคาร์พสีแดง ควรใช้ผสมอาหาร 1-4% ชนิดของแคโรทีนอยด์ที่นิยม คือ zeaxanthin, lutein, canthaxanthin และ astaxanthin หรือให้กลีบดอกดาวเรือง หรือสาหร่ายสไปรูลิน่า สำหรับในกลุ่มกุ้ง ปู ใช้แคโรทีนอยด์ผสมในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1-3% ชนิดของแคโรทีนอยด์ที่นิยมใช้ คือ β-carotene, astaxanthin, canthaxanthin หรือสไปรูลิน่า ระดับที่ใช้ในปลาเรนโบว์เทร้าท์ 80 มก./กก.

**2.3.2 โครงสร้างและชนิดของแคโรทีนอยด์**

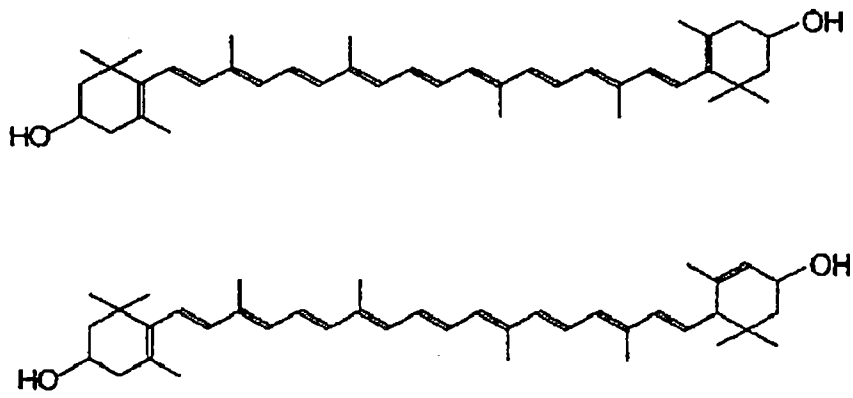
โครงสร้างของโมเลกุลของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยหน่วยไอโซพรีน (isoprene unit) โดยโมเลกุลของแคโรทีนอยด์อาจเป็นเส้นตรง ดังที่พบในไลโคปีน (lycopene) หรือเป็นวงแหวน (ring) ที่ปลายโซ่ของโมเลกุล ดังที่พบในเบต้าแคโรทีน (β-carotene) สามารถจำแนกแคโรทีนอยด์ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ hydrogenated และ oxygenated carotenoid derivatives โดยกลุ่ม hydrogenated carotenoid derivatives หรือกลุ่มแคโรทีน (carotene) เป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยด้วยสารไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) ทำให้เป็นสารไม่มีขั้วและละลายได้ในไขมัน ตัวอย่างแคโรทีนอยด์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เบต้าแคโรทีน และไลโคปีน เป็นต้น (ภาพที่ 3) ส่วนกลุ่มที่ 2 คือ กลุ่ม oxygenated carotenoid derivatives หรือกลุ่มแซนโทฟิล (xanthrophyll) นั้นมีอะตอมของออกซิเจนอยู่ในโมเลกุล จึงมีขั้วมากกว่าและละลายในไขมันได้น้อยกว่าแคโรทีนอยด์กลุ่มแรก (วีระศักดิ์ สามี. 2548; Rock. 1997) ตัวอย่างแคโรทีนอยด์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ลูทีน (lutein) ซีแซนทิน (zeaxanthin) และแอสตาแซนทิน (astaxanthin) เป็นต้น (ภาพที่ 4) แคโรทีนอยด์สามารถดูดกลืนพลังงานแสงอัลตร้าไวโอเลต และแสงสีขาว และทำให้แคโรทีนอยด์เป็นสารที่มีสีและมีคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Krinsky and Johnson. 2005)



**ภาพที่ 3** โครงสร้างทางเคมีของ hydrogenated carotenoid derivatives

**ที่มา :** Rodriguez-Amaya (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 4** โครงสร้างทางเคมีของ oxygenated carotenoid derivatives
**ที่มา:** Rodriguez-Amaya (2001)

**2.3.3 การดูดซึมและเมตาบอลิซึม**

โครงสร้างแคโรทีนอยด์มีพันธะคู่แต่ละพันธะที่อยู่ในสายโพลีอีน (polyene) สามารจัดเรียงโครงสร้างได้ 2 แบบคือ trans หรือ cis ซึ่งพบว่าจะทำให้โครงสร้างของแคโรทีนอยด์มีไอโซเมอร์เป็นจำนวนมากแต่ในธรรมชาติจะพบไม่กี่ไอโซเมอร์ (Krinsky and Johnson. 2005) เพราะโครงสร้างที่เป็น cis จะเสถียรน้อยกว่าโครงสร้างที่เป็น trans โครงสร้างของแคโรทีนอยด์ส่วนใหญ่จะอยู่ในลักษณะ all-trans ซึ่งโมเลกุลมักจะรวมกันเป็นกลุ่ม ทำให้ความสามารถในการละลาย และการดูดซึมน้อยกว่าไอโซเมอร์แบบ cis แคโรทีนอยด์ถูกดูดซึมที่ลำไส้พร้อมกับไขมันในอาหารและเข้าไปอยู่ในโคลไมครอน (chlomicron) เพื่อส่งต่อไปที่กระแสเลือด ความแตกต่างของโครงสร้างโมเลกุลของแคโรทีนอยด์แต่ละชนิดมีผลต่อการกระจายตัวของโมเลกุลไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ (Rock. 1997) เนื่องจากโมเลกุลของแคโรทีนอยด์มีความเป็นขั้วน้อยจึงมักพบแคโรทีนอยด์ในเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) ประมาณ 80-85% พบบางส่วนที่ตับ กล้ามเนื้อ ไต และอวัยวะสืบพันธุ์ ชนิดของแคโรทีนอยด์ที่พบมาก คือ เบต้าแคโรทีน แอลฟาแคโรทีน ลูทีน ซีแซนทิน ไลโคปีน และคริปโตแซนทิน เป็นต้น

**2.3.4 ชนิดของสารแคโรทีนอยด์**

**2.3.4.1 เบต้าแคโรทีน**

เบต้าแคโรทีนพบได้มากในพืชสีเหลือง และสีส้ม เช่น แครอท หัวผักกาด และมะเขือเทศ เป็นต้น เบต้าแคโรทีนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามินเอ (Ahmadi *et al.* 2006) ซึ่งวิตามินเอเป็นสารที่มีความสำคัญต่อการมองเห็น การสร้างสเปิร์ม การสร้างกระดูกและฟัน การซ่อมแซมเนื้อเยื่อ และสุขภาพของผิวพรรณ (Krinsky and Johnson. 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.3.4.2 แอสตาแซนทิน**

แอสตาแซนทินเป็นรงควัตถุสีแดง พบทั่วไปในสิ่งมีชีวิต เช่น พวกกุ้ง หอย สาหร่าย ชนิดต่างๆ ซึ่งจะนำมาผสมในอาหารเพื่อใช้ในการเร่งสีผิวของปลา (Wang *et al.* 2006) ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อประกอบอาหารจากสัตว์เหล่านี้จะเห็นเป็นสีแดงที่เปลือกกุ้ง หรือกระดองปู นอกจากกุ้งหอยแล้ว สีของปลาชนิดต่างๆก็มักจะเป็นสีของแอสตาแซนทินซึ่งเป็นสารแคโรทีนอยด์กลุ่มของแซนโทฟิล เพราะโครงสร้างโมเลกุลของแอสตาแซนทินมีอะตอมของออกซิเจนเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย และเป็นสารที่ละลายน้ำได้น้อยจึงมักเตรียมให้อยู่ในรูปแบบที่ผสมอยู่กับไขมัน มีการศึกษาผลของแอสตาแซนทินจากการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ในการป้องกันมะเร็ง โรคหัวใจ เป็นต้น ในการเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ พบว่า แอสตาแซนทินมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากกว่า แคนทาแซนทิน (canthaxanthin) เบต้า-แคโรทีน ซีแซนทิน ลูทิน และวิตามินอีสังเคราะห์ เป็นต้น และยังช่วยในเรื่องการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลา เช่น ปลาแซลมอน (Cristiansen and Torrissen. 1997), ปลาเรนโบว์เทร้าท์ (Choubert *et al.* 1998; Ahmadi *et al.* 2006;) และปลา cod (Sawanboonchun *et al.* 2008) เป็นต้น

**2.3.4.3 ไลโคปีน**

ไลโคปีนเป็นรงควัตถุที่มีสีส้มแดง พบมากในมะเขือเทศ และยังพบได้ในแตงโม องุ่น มะละกอ และฝรั่งสีแดง (Krinsky and Johnson. 2005) เป็นแคโรทีนอยด์ที่พบได้มากที่สุดในกระแสเลือด อาจพบที่บริเวณอื่นๆด้วย เช่น อัณฑะ ต่อมหมวกไต ตับ ต่อมลูกหมาก เต้านม ตับอ่อน และผิวหนัง เป็นต้น เนื่องจากไลโคปีนมีโครงสร้างโมเลกุลเป็นโซ่ตรง และเป็นสารที่ไม่มีขั้วจึงดูดซึมได้ไม่ดี แต่ถ้าผ่านการปรุงด้วยความร้อนแล้วจะดูดซึมดีขึ้น ดังเห็นได้จากการดูดซึมไลโคปีนจากมะเขือเทศสด ในระดับที่ต่ำกว่าจากมะเขือเทศที่ผ่านการปรุงแล้ว เนื่องจากการประกอบอาหารด้วยความร้อนจะทำให้ไลโคปีนที่อยู่ในรูป trans-lycopene เปลี่ยนเป็น cis-lycopene จะดูดซึมได้ดีกว่า trans-lycopene (วีระศักดิ์ สามี. 2548)

**2.3.4.4 ลูทีนและซีแซนทีน**

ลูทีนและซีแซนทินเป็นสารในกลุ่มแซนโทฟิล คือมีอะตอมออกซิเจนอยู่ในโมเลกุล โครงสร้างทางเคมีของลูทีนและซีแซนทินมีความเหมือนกันมาก แตกต่างกันเพียงพันธะคู่ที่อยู่บนวงแหวนที่อยู่ส่วนปลายเท่านั้น ซึ่งจะพบสะสมอยู่ในลูเทียของเรตินา โดยเกี่ยวข้องกับการมองเห็น ซึ่งแคโรทีนอยด์เหล่านี้ไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้จากร่างกาย แต่จะต้องรับจากอาหารที่มีแคโรทีนอยด์ปริมาณสูง พบมากในผักโขม บร็อคโคลี่ และถั่ว และยังสามารถพบลูทีนและซีแซนทินในไข่แดงอีกด้วย (Krinsky and Johnson. 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 บทบาทของสารแคโรทีนอยด์ในปลา

ปัจจุบันมีการนำสารสีจากกลุ่มแคโรทีนอยด์มาใช้ในการเร่งสีปลาให้ปลามีสีสันสวยงาม เนื่องจากสีของปลามีความสำคัญต่อตลาดสัตว์น้ำ เพื่อที่จะขายได้ในราคาสูงขึ้นและเป็นที่ต้องการของตลาด การผสมสารสีแคโรทีนอยด์ในต่างประเทศนิยมเสริมทั้งในปลาเศรษฐกิจที่ใช้เป็นอาหาร เพื่อให้มีสีสันน่ารับประทานและมีรสชาติดีขึ้น เช่น ปลาเทร้าท์ และปลาแซลมอน เป็นต้น ส่วนปลาสวยงามนิยมเสริมในปลาแฟนซีคาร์พ ปลาทอง ปลาออสการ์ ปลาปอมปาดัวร์ และปลาเสือสุมาตรา เป็นต้น (นฤมล อัศวเกศมณี. 2549) และเนื่องจากสารแคโรทีนอยด์จะสะสมอยู่ในผิวหนังและเซลล์สืบพันธุ์ จึงทำให้สารแคโรทีนอยด์มีบทบาทในการพัฒนาสีผิวและเซลล์สืบพันธุ์ที่พบในปลาเรนโบว์เทร้าท์และปลาแซลมอน เป็นต้น (Ahmadi *et al.* 2006; Sawanboonchun *et al.* 2008) แต่สารสีในกลุ่มแคโรที่นอยด์ที่นำมาใช้ในปลาสวยงามนั้นค่อนข้างมีราคาแพง ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาค้นคว้าสารสีจากแหล่งอื่น ๆมาใช้ เช่น จากในธรรมชาติที่ได้จากพวกพืช ผัก ผลไม้ และดอกไม้ เป็นต้น ซึ่งสารสีที่ได้จากธรรมชาตินั้นหาง่าย และราคาถูก จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการนำสารสีจากธรรมชาติมาใช้ในวงกว้าง

### 2.4.1 การใช้แคโรทีนอยด์ในการเร่งสีปลา

#### 2.4.1.1 การใช้แคโรทีนอยด์ในปลา

การที่ปลามีสีสันสวยงามนั้นเกิดจากสารแคโรทีนอยด์ที่สะสมในผิวหนังของปลา ซึ่งปลาไม่สามารถสังเคราะห์แคโรทีนอยด์เองได้ จำเป็นต้องได้รับจากอาหารที่กิน สารแคโรทีนอยด์ที่ใช้ในปลาสวยงาม ได้แก่ เบต้าแคโรทีน แอสตาแซนทิน ลูทีน และซีแซนทิน เป็นต้น ทิพย์วรรณ ปริพัฒนานนท์ และคณะ (2541) ทดลองเพื่อใช้แอสตาแซนทินผสมในอาหารเพื่อเร่งสีในปลาทอง ปริมาณที่ใช้คือ 0, 25, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (มก./กก.) พบว่าแอสตาแซนทินในปริมาณ 37-40 มก./กก. สามารถกระตุ้นการเกิดสีของปลาทองได้ดีที่สุด

ดาราวรรณ ยุทธยงค์ และคณะ (2546) ได้ทำการศึกษาการเสริมแอสตาแซนทินผสมในอาหารที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50, 100 และ 200 มก./กก. พบว่าการเสริมแอสตาแซนทินที่ความเข้มข้น 200 มก./กก. มีผลทำให้ครีบหางของปลากระแหมีสีแดงเข้มขึ้นมากที่สุด

อรพินท์ จินตสถาพร และคณะ (2548) ได้ศึกษาระดับความเหมาะสมของสารแคโรทีนอยด์ต่อความเข้มของสีปลาคาร์พ โดยใช้อาหารปลาคาร์พที่จำหน่ายในท้องตลาด 6 ชนิด (BRANDS) ที่มีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมแตกต่างกันคือ 5.37, 15.9, 43.2, 76.2, 96.2 และ 103.9 ไมโครกรัม/กรัม เลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปลาคาร์พที่เลี้ยงด้วยแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้น 96.2และ 103.9 ไมโครกรัม/กรัม มีการตอบสนองต่อการเพิ่มขึ้นของสีแดงมากกว่าปลาคาร์พกลุ่มอื่นๆ

Wang *et al.* (2006) ทดลองให้อาหารที่ผสมสารแคโรทีนอยด์ในปลา characins (*Hyphessobrycon callistus*) โดยใช้อาหารกลุ่มควบคุมที่ไม่ผสมสารแคโรทีนอยด์ อาหารที่ผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเบตาแคโรทีน อาหารผสมสารแอสตาแซนทิน และอาหารที่ผสมสารแอสตาแซนทินกับเบตาแคโรทีนในอัตราส่วน 1:1 ตามระดับความเข้มข้น คือ 0, 10, 20 และ 40 มก./กก. เลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองปลา characins ที่ได้รับอาหารผสมแอสตาแซนทินและอาหารที่ผสมแอสตาแซนทินกับเบตาแคโรทีนในอัตราส่วน 1:1 มีการสะสมแคโรทีนอยด์ที่บริเวณผิวหนังมากที่สุด ซึ่งสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารผสมเบตาแคโรทีน และอาหารกลุ่มควบคุมที่ไม่ผสมสารแคโรทีนอยด์ Yanar *et al.* (2008) ได้ทดลองให้อาหารที่ผสมสารแคโรทีนอยด์จาก alfafa ผง ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงปลาทอง (*Carassius auratus*) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 25 และ 40% alfafa/กก. และ แคโรทีนอยด์สังเคราะห์ apo-ester 60 มก./กก. เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองอาหารที่ผสมแคโรทีนอยด์จาก alfafa ผง ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 25 มก./กก. จะทำให้ผิวของปลาทองมีการสะสมแคโรทีนอยด์ได้สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารในกลุ่มควบคุม Choubert and Storebakken (1989) รายงานว่า สารจำพวกแอสตาแซนทินเป็นสารที่ทำให้เกิดสีในผิวหนังของปลา โดยปลาสามารถใช้สารแอสตาแซนทินได้ดีกว่าสารแคนทาแซนทิน 1.3 เท่า จึงกระตุ้นการเกิดสีของผิวหนังปลาได้ดี

ปลาเศรษฐกิจบางสายพันธุ์นั้นพบว่าสีของปลาที่ปรากฏจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ใช้ในการประเมินคุณภาพจากผู้บริโภค เช่น ปลาแซลมอน ปลาเรนโบว์เทร้า และปลา cod จึงได้มีการใช้สารแคโรทีนอยด์ผสมลงในอาหารปลาเพื่อช่วยให้สีของเนื้อปลาดูเป็นที่นิยมของผู้บริโภคมากขึ้น Buyukcapar et al. (2007) ได้ทดลองให้อาหารที่ผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ได้จากพริกแดง (red pepper) ที่ระดับความเข้มข้น 4.4, 6.6 และ 8.8%, ที่ได้จากดอกดาวเรือง (marigold flower) ที่ความเข้มข้น 1.6, 2.4 และ 3.2% และอาหารที่ผสมแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 100 มก./กก. ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงปลาเรนโบว์เทร้า เป็นเวลา 60 วัน พบว่าอาหารที่ผสมแอสตาแซทินสังเคราะห์ 100 มก./กก. มีปริมาณแคโรทีนอยด์สะสมในเนื้อปลาสูงถึง 6.42 มก./กก., พริกแดงที่ความเข้มข้น 8.8% มีปริมาณแคโรทีนอยด์สะสมในเนื้อปลาสูงถึง 6.37 มก./กก. และดอกดาวเรืองที่ความเข้มข้น 3.2% มีปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สะสมในเนื้อปลาสูงถึง 6.17 มก./กก. Kalinowski *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาในปลา red porgy ที่ได้รับอาหารที่ผสมสารแอสตาแซนทินที่สกัดจากเปลือกกุ้งที่ความเข้มข้น 40 มก./กก. พบว่าสารแอสตาแซนทินที่ผสมลงในอาหารจะทำให้สีผิวของปลา red porgy เปลี่ยนจากสีเทาเป็นสีชมพูอมแดงได้ ซึ่งทำให้เป็นที่นิยมของผู้บริโภคได้อีกด้วย

**2.4.2 การใช้สารแคโรทีนอยด์เพื่อกระตุ้นการสืบพันธุ์ของปลา**

สารสีจำพวกแคโรทีนอยด์ที่นิยมใช้กัน ได้แก่ สารแอสตาแซนทิน ที่สามารถสกัดได้จากแหล่งธรรมชาติ ซึ่งมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการเพาะเลี้ยงปลาแซลมอนและปลาเรนโบว์เทร้าเพื่อกระตุ้นให้ปลามีสีชมพู และยังมีการใช้เพื่อวัตถุประสงค์อื่น เช่น เพื่อกระตุ้นการผสมพันธุ์ การวางไข่ เพิ่มคุณภาพของไข่ ตลอดจนเพิ่มอัตรารอดและอัตราการปฏิสนธิในสัตว์น้ำได้ ในการทดลองของ Choubert *et al.* (1998) ได้ทำการศึกษาผลของการให้อาหารที่ผสม keto-carotenoids

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ประกอบด้วยแคนทาแซนทิน และ แอสตาแซนทิน) ต่อระบบสืบพันธุ์ในปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) เพศเมีย โดยแบ่งอาหารออกเป็น 3 ชุดการทดลอง คือ 1. ชุดการทดลอง A คือ อาหารในกลุ่มควบคุมและอาหารที่ผสมแคนทาแซนทิน 200 มก./กก. เป็นระยะเวลา 6 เดือน 2. ชุดการทดลอง B คือ อาหารในกลุ่มควบคุม, อาหารที่ผสมแคนทาแซนทิน 200 มก./กก. เป็นระยะเวลา 3 เดือน และอาหารที่ผสมแคนทาแซนทิน 200 มก./กก. เป็นระยะเวลา 6 เดือน และ 3. ชุดการทดลอง C คือ อาหารในกลุ่มควบคุม, อาหารที่ผสมแคนทาแซนทิน 100 มก./กก. เป็นระยะเวลา 6 เดือน, อาหารที่ผสมแอสตาแซนทิน 50 มก./กก. เป็นระยะเวลา 6 เดือน และอาหารที่ผสมแอสตาแซนทิน 100 มก./กก. เป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่าเมื่อให้อาหารที่ผสมแคนทาแซนทิน 200 มก./กก. เป็นระยะเวลา 3 เดือน จะช่วยพัฒนาไข่ในระยะที่มีตาสูงถึง 73.1% และเมื่อให้อาหารที่ผสมแอสตาแซนทิน 50 มก./กก. เป็นระยะเวลา 6 เดือน จะช่วยพัฒนาไข่ในระยะที่มีตาสูงถึง 59% เป็นต้น สารแคโรทีนอยด์ที่ผสมในอาหารนั้นสามารถช่วยกระตุ้นให้มีอัตราความสมบูรณ์เพศสูงขึ้นและเพิ่มคุณภาพของไข่อีกด้วย Ahmadi *et al.* (2006) ทดลองเลี้ยง ปลาเรนโบว์เทร้าเพศเมียด้วยอาหารที่ผสมแอสตาแซนทินที่ระดับความเข้มข้น 0.07, 12.46, 33.33, 65.06 และ 92.91 มก./กก. เป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่าปลาเรนโบว์เทร้าเพศเมียที่ได้รับอาหารผสมแอสตาแซนทินที่ความเข้มข้น 65.06 มก./กก. จะมีการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ที่สมบูรณ์และมีอัตราการปฏิสนธิสูงถึง 94.7±0.5 และมีการพัฒนาของไข่ในระยะที่มีตาสูงถึง 83.4±5.3 โดยที่ปลาเรนโบว์เทร้าเพศเมียที่ได้รับอาหารผสมแอสตาแซนทินจะสามารถผลิตไข่เพิ่มขึ้นในระดับความเข้มข้น 2.03-29.79 มก./กก. Sawanboonchun *et al.* (2008) ได้ศึกษาการให้อาหารที่ผสมสารแอสตาแซนทินที่ความเข้มข้น 73.7 มก./กก. ในปลา Atlantic cod (*Gadus morhua*, L.) เป็นระยะเวลา 2 เดือน จากการทดลองพบว่าปลา Atlantic cod มีอัตราการวางไข่เพิ่มขึ้น, ปริมาณไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิเพิ่มขึ้น และอัตราการปฏิสนธิเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ผสมสารแอสตาแซนทินในอาหาร และสารแอสตาแซนทินที่ปลาได้รับจากการผสมในอาหารจะถูกนำไปใช้ในการกระตุ้นการพัฒนารังไข่ในระหว่างที่ปลามีการเจริญเติบโต นอกจากนี้ไข่ปลาที่มีความเข้มข้นสารแคโรทีนอยด์สูงจะช่วยทำให้อัตราความสมบูรณ์เพศสูงขึ้น และยังมีประสิทธิภาพในการเพิ่มคุณภาพของไข่, เพิ่มอัตรารอดในระยะตัวอ่อนอีกด้วย (Christiansen and Torrissen. 1996; Choubert et al. 1998) นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มของสีปลาจะเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้รับจากการผสมลงในอาหาร และระยะเวลาในการกินอาหาร โดยปลานั้นจะดูดซึมสารแคโรทีนอยด์ที่บริเวณทางเดินอาหาร แล้วจะส่งไปตามอวัยวะต่างๆ และส่งผลให้อวัยวะต่างๆนั้นเกิดสีแตกต่างกันไป นอกจากนี้สารแคโรทีนอยด์จะเป็นสารเร่งสีแล้วยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งทำหน้าที่ในการไปยับยั้งขบวนการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant) และยังมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ช่วยควบคุมระบบการทำงานของภูมิคุ้มกันโรคให้อยู่ในระดับปกติ (Rehulka. 2000)

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.5 การเสื่อมคุณภาพของสารโภชนะในอาหารปลาจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน

การเสื่อมคุณภาพของสารโภชนะในอาหารนั้น เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีของกรดไขมันในอาหาร หรือเรียกว่า การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันในอาหาร เป็นการทำปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างออกซิเจนกับกรดไขมันในอาหาร ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพ เกิดกลิ่นหืน เปลี่ยนสี และสูญเสียคุณค่าทางอาหาร นอกเหนือจากการเสื่อมคุณภาพจากจุลินทรีย์แล้ว ทั้งนี้ปฏิกิริยาเคมีต่างๆสามารถเกิดขึ้นได้ตั้งแต่การเตรียมวัตถุดิบ ระหว่างกระบวนการแปรรูป การเก็บรักษา ซึ่งทำให้เกิดการเสียของอาหารเนื่องจากปฏิกิริยาทางเคมีที่สำคัญ คือ การเสียที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยปัญหาการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในอาหารนั้น พบได้ในอาหารทุกชนิดไม่ว่าจะเป็นคาร์โบไฮเดรต หรือโปรตีน ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นการเสื่อมเสียจากปฏิกิริยาทางเคมีที่สำคัญและพบบ่อยที่สุดในอาหารประเภทน้ำมันและไขมัน รวมทั้งอาหารที่มีไขมันและน้ำมันเป็นองค์ประกอบ โดยส่วนมากมักเกิดกับกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากกว่ากรดไขมันอิ่มตัว ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวมักมีจำนวนพันธะคู่มากกว่าหนึ่งพันธะในโครงสร้าง โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะถูก oxidized ที่ตำแหน่งพันธะคู่ จึงมีความว่องไวสูงจึงเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับออกซิเจนในบรรยากาศ ซึ่งจะทำให้เกิดการหืน (rancidity) (ศิวาพร ศิวเวช. 2546; สุริญญา โพธิดิษฐศิริ. 2547) และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาแบบลูกโซ่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวกับออกซิเจน โดยมีแสงและความร้อนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและสลายตัวเป็นอนุมูลอิสระ (free radical) ทำให้เกิดเป็นสารไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ซึ่งสารไฮโดรเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นนั้นจะสลายตัวเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กๆ ที่ทำให้มีกลิ่นหืนและเกิดเป็นอนุมูลอิสระเริ่มต้นของปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไปได้อีก (จรัส สว่างทัพ. 2548)

เวียง เชื้อโพธิ์หัก (2542) กล่าวว่าการเหม็นหืนของไขมัน หมายถึง การที่ไขมันมีกลิ่นผิดไปจากปกติเนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีเกิดขึ้นในไขมัน การเหม็นหืนของไขมันเกิดได้ 2 กรณี ดังนี้

2.5.1. กรณีพันธะเอสเทอร์ถูกทำลาย ในโครงสร้างเชิงซ้อนของไขมันมีพันธะเอสเทอร์ทำหน้าที่เชื่อมกรดไขมันและกลีเซอรอลยึดต่อเป็นโมเลกุลเดียวกัน โครงสร้างนี้ไม่อยู่ตัวเพราะพันธะเอสเทอร์ถูกทำลายโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสได้ง่ายด้วยความร้อน กรดและด่างและเอนไซม์ไลเปส (lipase) ผลจากปฏิกิริยาได้กลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระโมเลกุลสั้นซึ่งมีกลิ่นเหม็นหืน นอกจากนั้นกรดไขมันอิสระที่ได้จะเร่งให้น้ำทำปฏิกิริยากับไขมันเกิดเป็นกรดไขมันอิสระโมเลกุลสั้นมากขึ้นและมีกลิ่นแรงขึ้น การเหม็นหืนแบบนี้มักเกิดขึ้นจากการเก็บไขมันไม่ถูกวิธี เช่นเก็บในที่ที่มีความร้อนสูงเกินไป ภาชนะที่ใช้เก็บมีน้ำหลงเหลืออยู่ก่อนบรรจุหรือภาชนะไม่มีฝาปิดปล่อยให้ไขมันสัมผัสกับไอน้ำในอากาศตลอดเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 กรณีพันธะคู่ถูกทำลาย ไขมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันที่มีพันธะคู่ไม่อยู่ตัว พันธะคู่มักจะสลายตัวเป็นพันธะเดี่ยวได้ง่ายเมื่อทำปฏิกิริยากับสารอื่นโดยมีตัวเร่งที่เหมาะสม ผลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาทำให้ไขมันมีกลิ่นหืน ปฏิกิริยาที่เกิดอาจแยกได้ดังนี้

2.5.2.1 ออกซิเดชัน เป็นปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศ โดยมีอุณหภูมิเป็นตัวเร่ง ได้สารเปอร์ออกไซด์ซึ่งไม่อยู่ตัว และจะแตกตัวต่อเป็นกรดไขมันซึ่งไม่อยู่ตัวและจะแตกตัวต่อเป็นกรดไขมันในโมเลกุลสั้นและมีกลิ่นหืน

2.5.2.2 รีดักชัน เป็นปฏิกิริยาการรวมตัวของกรดไขมันไม่อิ่มตัวกับไฮโดรเจนเมื่อมีโลหะ เรียกว่า ปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจน ผลที่ได้จากปฏิกิริยาทำให้กรดไขมันไม่อิ่มตัวกลายเป็นกรดไขมันอิ่มตัวที่มีโมเลกุลสั้นและมีกลิ่นหืน

กลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในอาหาร แบ่งออกเป็น 3 ระยะ (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. 2554) คือ

ระยะเริ่มต้น (initiation) เป็นระยะที่กรดไขมันแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระ โดยมีแสงและอุณหภูมิเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังสมการ

$$RH + initiator \longrightarrow R\bullet + H\bullet$$

ระยะเพิ่มจำนวน (propagation) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับออกซิเดชันจนเกิดเป็นอนุมูลเปอร์ออกซี่ (peroxy radical; ROO•) แล้วทำปฏิกิริยาต่อกับกรดไขมันเกิดเป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide; ROOH) และอนุมูลอิสระ ซึ่งถ้ามีแสงและความร้อนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาต่อทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น และอนุมูลอิสระก็จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเป็นลูกโซ่ต่อเนื่องไปเรื่อยๆ

$$R\bullet + O_2 \longrightarrow ROO\bullet$$

$$ROO\bullet + RH \longrightarrow ROOH + R\bullet$$

ระยะสิ้นสุด (termination) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนั้นรวมตัวกันกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียร

$$R\bullet + R\bullet \longrightarrow RR$$

$$ROO\bullet + ROO\bullet \longrightarrow ROOR + O_2$$

กลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอาหารข้างต้น จะได้สารไฮโดรเปอร์ออกไซด์เป็นผลผลิตของปฏิกิริยา สารนี้เป็นสารไม่คงตัวจึงเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้โดยการสลายตัวหรือทำปฏิกิริยากับสารอื่นให้สารประกอบที่มีจำนวนคาร์บอนน้อยลง รวมถึงทำให้เกิดสารประกอบชนิดใหม่ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆกันได้แก่ อัลดีไฮด์และคีโตน สารเหล่านี้ระเหยง่ายและทำให้เกิดกลิ่นหืนในอาหารซึ่งเป็นผลให้รสชาติอาหารเสียไป (เพิ่มศักดิ์ ศิริวรรณ. 2533; จรัส สว่างทัพ. 2548) นอกจากนี้อาหารที่มีความหืนจะเป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำอย่างมาก คือ นำไปสู่การเกิดสภาวะ oxidative stress ในสัตว์น้ำ สภาวะดังกล่าวจะทำให้สัตว์น้ำไม่สามารถควบคุมและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ป้องกันปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับปกติที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายได้ ซึ่งจะทำให้สัตว์น้ำเกิดโรคต่างๆได้ และเป็นผลให้อัตราการเจริญเติบโตลดลง อัตรารอดต่ำ สีซีด เป็นต้น (Nakano *et al.* 1999)

ดังนั้นในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่กล่าวมาทั้งหมดนั้น จะลดปัญหาการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบสามารถทำได้โดยการเติมสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในอาหาร

## 2.6 สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant)

สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant) หรือสารต้านอนุมูลอิสระ หรือสารกันหืน เป็นสารประกอบที่ป้องกันหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ โดยสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระในปฏิกิริยา แล้วทำให้อนุมูลอิสระอยู่ในสภาพที่เสถียรไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้อีก โดยสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่นิยมใช้ในอาหารแบ่งออกเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจากการสังเคราะห์ (synthetic antioxidant) และมีการเติมลงในอาหาร เช่น butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), propyl gallate และ tertiary butylhydroquinone เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันในอาหาร อันเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติที่เปลี่ยนไป สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารสกัดจากธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในอาหาร (Pokorny & Gordon. 2001) ส่วนสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันอีกชนิดคือ สารที่ได้จากธรรมชาติ (natural antioxidant) นิยมใช้ในอาหาร เช่น วิตามินอี (tocopherols) พบมากทั้งในพืชและสัตว์ วิตามินอีเป็นโมเลกุลที่ละลายได้ดีในน้ำมันหรือลิพิด ช่วยปกป้องผนังเซลล์จากอนุมูลอิสระ นอกจากวิตามินอีแล้วยังพบว่ามีสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ได้จากธรรมชาติอื่นๆอีก เช่น วิตามินซี ฟลาโวนอยด์ เบต้าแคโรทีน และแคโรทีนอยด์ เป็นต้น (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ. 2549) สารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่เป็นสารประกอบฟีโนลิค สารกลุ่มนี้มีหลากหลายชนิด เช่น caffeic acid, gallic acid, acylated flavonoid-O-glycosides, methoxylated flavonoids และสารจำพวกฟลาโวนอยด์ โดยทั่วไปการสกัดสารประกอบฟีนอลิคมักใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งมีความแตกต่างกันตามแต่ลักษณะและองค์ประกอบของสารตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้สำหรับสกัดสารประกอบฟีนอลิค ได้แก่ น้ำ เอทานอล และเมทานอล เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันตามแต่ลักษณะและองค์ประกอบของสาร และมักจะประกอบด้วยสารหลายชนิดที่ทำงานเสริมกัน จึงทำให้สารต้านอนุมูลอิสระแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการทำงานสูง (Cetkovic *et al.* 2004; Gong *et al.* 2012) จึงทำให้สารต้านอนุมูลอิสระมีบทบาทที่สำคัญคือ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรคต่างๆและป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมคุณภาพในอาหาร จึงได้มีการพัฒนาสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติมาใช้ เช่น สารแคโรทีนอยด์ เป็นต้น

คุณสมบัติการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารแคโรทีนอยด์นั้นจะยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระและยับยั้งออกซิเจนอะตอมเดี่ยว (singlet oxygen) โดยจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนอะตอมเดี่ยว ได้เป็น ทริปเร็ทออกซิเจน (triplet oxygen) (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. 2554) ทำให้มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งปฏิกิริยาการยับยั้งอนุมูลอิสระจะเป็นการถ่ายเทอิเล็กตรอนหรือปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจน โดยสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระทำให้ขั้นตอนต่อเนื่องของปฏิกิริยาออกซิเดชันหยุดชะงักลง และเกิดอนุมูลอิสระออกซิเดชัน ซึ่งมีความคงตัวไม่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (Pokorny and Gordon. 2001) และสารแคโรทีนอยด์ที่นำมาใช้คุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ เบต้าแคโรทีน แอลฟ่าแคโรทีน แกรมม่าแคโรทีน และเบต้าคริปโตแซนทิน ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากพืช ยกตัวอย่างเช่น สารเบต้าแคโรทีนช่วยป้องกันการเกิดอนุมูลเปอร์ออกซิลที่เกิดจากปฏิกิริยาของคาร์บอนที่ไม่เสถียรภายในโครงสร้างของอัลคิล โดยเบต้าแคโรทีนจะทำหน้าที่ในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจากปฏิกิริยาลูกโซ่ที่เกิดขึ้นในระยะเพิ่มจำนวน (propagation) ให้ลดลง อย่างไรก็ตามสารแคโรทีนอยด์ชนิดอื่นที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารไลโคปีน ลูทีน แคนทาแซนทิน และซีแซนทิน ก็สามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ไม่ต่างกับสารเบต้าแคโรทีน เป็นต้น โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้จากพวกผัก เช่น กะหล่ำปลี ผักคะน้า และบร็อคโคลี่ ที่มีการนำมาผสมลงในอาหารของหนู พบว่าสามารถช่วยลดการเกิดสารอนุมูลอิสระและช่วยป้องกันเนื้อเยื่อของหนูไม่ให้ถูกทำลาย จากการได้รับรังสีเข้าไปในร่างกายของหนู เป็นต้น (Fang et al. 2002) จึงได้มีการศึกษาค้นคว้าถึงการนำสารแคโรทีนอยด์จากแหล่งธรรมชาติอื่นมาใช้ เช่น ดอกดาวเรือง เป็นพืชดอกที่พบได้ทั่วไป กลีบดอกมีสีเหลืองสดใสหรือสีส้ม และมีองค์ประกอบที่สำคัญ เช่น terpene, essential oils, sesquiterpenes, flavonoids และ carotenoids (Gong *et al.* 2012) เป็นต้น Cetkovic *et al.* (2004) ได้ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกดาวเรืองที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดจากดอกดาวเรืองที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายนั้น สามารถกำจัดอนุมูลเปอร์ออกซิลที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้ถึง 95% และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคสูงถึง 57.47 มก./ก. และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงถึง 18.62 มก./ก. ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต่อมา Gong *et al.* (2012) ได้ศึกษากิจกรรมของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกดาวเรืองที่ใช้เอทานอลและน้ำเป็นตัวทำละลาย โดยพบว่าสารสกัดจากดอกดาวเรืองที่มีน้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลายนั้น มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคสูงถึง 62.33 มก. gallic acid equivalents (GAE)/ก. และมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงถึง 97 มก. rutin equivalent (RE)/ก. เป็นต้น

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



นอกจากการนำดอกดาวเรืองมาใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระแล้ว ดอกดาวเรืองยังสามารถนำมาใช้เป็นสมุนไพรที่ใช้ในอุตสาหกรรมยา เช่น ลดการอักเสบ บรรเทาอาการปวด และยาระบาย เป็นต้น (Gong *et al.* 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

132473

# บทที่ 3
# วิธีการดำเนินการวิจัย

## 3.1 สัตว์และพืชทดลอง

3.1.1 ปลาทรงเครื่อง (*Epalzeorhychos bicolor*) น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 1.3-1.5 กรัม จำนวน 500 ตัวจากฟาร์มปลาสวยงามใน จังหวัดราชบุรี

3.1.2 ดอกดาวเรือง (*Tagetes erecta* Linn.) กลีบดอกสีเหลือง ซื้อจากตลาดสี่มุมเมือง จังหวัดปทุมธานี

## 3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 อุปกรณ์

3.2.1.1 ถังพลาสติกขนาด 160 ลิตร จำนวน 20 ถัง

3.2.1.2 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler รุ่น AG 204

3.2.1.3 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ OHAUS รุ่น ARC 1200

3.2.1.4 อาหารผงสำเร็จรูปชื่อทางการค้า นิวทรีน่าฟีด 8000 (โปรตีนไม่น้อยกว่า 40)

3.2.1.5 เครื่องบดอาหาร

3.2.1.6 เครื่องแก้ว

3.2.1.7 เครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) รุ่น Heidolph รุ่น laborat 4003

3.2.1.8 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ยี่ห้อ Thermo scientific Genysis 10 Vis

3.2.1.9 เครื่องวัดสี (Chromameter) ยี่ห้อ KONICA MINOLTA รุ่น CR-10

3.2.1.10 อ่างน้ำร้อน (water bath) ยี่ห้อ memmert รุ่น WB 14

3.2.1.11 เครื่องสกัดไขมัน ยี่ห้อ FAIC รุ่น BE 4250

3.2.1.12 เครื่องเขย่าสาร (shaking incubator) ยี่ห้อ LMS Scientific รุ่น VS-8480 SF

3.2.1.13 เครื่องกลั่นไนโตรเจน ยี่ห้อ Gerhardt 7620

3.2.1.14 ตู้เย็นสำหรับควบคุมอุณหภูมิ 4 °C ยี่ห้อ Mitsubishi รุ่น MR-F36E-GY

3.2.1.15 ตู้ดูดควัน (Hood) ยี่ห้อ TOPLAB

3.2.1.16 เครื่องอบ

3.2.1.17 กล้องจุลทรรศน์พร้อมชุดถ่ายภาพดิจิตอล ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น BX 51

3.2.1.18 กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ NIKON compound Model eclipse E 200

3.2.1.19 เครื่องเตรียมเนื้อเยื่อ (tissue processor) ยี่ห้อ Leica รุ่น TP 1020

3.2.1.20 เครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อ ยี่ห้อ Microm รุ่น HM 335E

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.21 อ่างลอยชั้นเนื้อเยื่อควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Bio Optica รุ่น Model 17-2000

3.2.1.22 หม้อต้มพาราฟิน (paraffin bath) ยี่ห้อ Medax รุ่น KV-8372

3.2.1.23 เครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer) ยี่ห้อ Fisher Scientific รุ่น Model 77

3.2.1.24 แท่นทำความเย็น (cold plate) ยี่ห้อ Bio Optica รุ่น PF 100

3.2.2 สารเคมี

3.2.2.1 กรดไทโอบาร์บิวทูริก (thiobarbituric acid)

3.2.2.2 กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid)

3.2.2.3 เอธานอล (ethanol)

3.2.2.4 บิวทิลเลต ไฮดรอกซีโทลูอีน (butylated hydroxytoluene; BHT)

3.2.2.5 ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether)

3.2.2.6 อะซีโตน (acetone)

3.2.2.7 ฟอร์มาลิน (formalin)

3.2.2.8 โซเดียมฟอสเฟต (sodium phosphate monobasic; $NaH_2PO_4.H_2O$)

3.2.2.9 โซเดียมไดฟอสเฟต (sodium phosphate dibasic; $Na_2HPO_4$)

3.2.2.10 กรดฟอร์มิก (formic acid)

3.2.2.11 เตตระเมท็อกซี่โพรเพน (Tetramethoxypropane; TMP)

## 3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ผสมลงในอาหาร

3.3.1.1 นำดอกดาวเรืองมาล้างให้สะอาด แล้วนำกลีบดอกมาทำให้มีขนาดเล็กด้วยกรรไกร จากนั้นนำไปอบด้วยเครื่องอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 2 วัน เมื่อแห้งแล้วนำมาบดร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มิลลิเมตร ทำให้ได้ผงดอกดาวเรือง จากนั้นนำผงดอกดาวเรืองเก็บบรรจุภัณฑ์ในถุงพลาสติกแบบไล่อากาศ สกัดหาสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองโดยใช้วิธีดัดแปลงจาก Mora *et al.* (2006) เพื่อตรวจสอบหาปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวม (total carotenoid content) ก่อนทำการทดลอง

3.3.1.2 การหาปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวมโดยวิธีดัดแปลงจาก Mora *et al.* (2006) ทำโดยชั่งผงดอกดาวเรือง 10 กรัม เติมสารสกัด 100 มิลลิลิตร ที่เตรียมจากปิโตรเลียมอีเทอร์ อะซีโตนและน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 15:75:10 และเติม butylated hydroxytoluene (BHT) 0.01% จากนั้นนำไปเขย่าเป็นเวลา 15 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนที่กรองได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 445 นาโนเมตร และใช้คิวเวตแก้วในการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นแบลงค์ (blank) และคำนวณปริมาณ

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารแคโรทีนอยด์จากผงดอกดาวเรือง (ภาคผนวก ก.) เพื่อนำผลที่ได้ไปกำหนดระดับผงดอกดาวเรืองที่ใช้ผสมในอาหารต่อไป

3.3.1.3 นำผงดอกดาวเรืองที่ได้จากข้อ 3.3.1.1 ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารแคโรทีนอยด์ตามวิธีการข้อ 3.3.1.2 จากนั้นนำผงดอกดาวเรืองที่ทราบปริมาณสารแคโรทีนอยด์มาผสมในอาหารปลาผงสำเร็จรูปที่มีชื่อทางการค้านิวทรีน่าฟีด (โปรตีน $\geq$ 40%, ไขมัน = 5%, กาก = 4% และ ความชื้น = 12%) โดยมีความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์ 5 ระดับ ได้แก่ 0, 25, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (มก./กก.) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้อาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เก็บอาหารบรรจุภัณฑ์ในถุงพลาสติกแบบไล่อากาศ ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ (replication) แต่ละซ้ำใช้อาหารจำนวน 10 กรัม เก็บที่อุณหภูมิห้องปกติ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองวัดค่ากรดไทโอบาร์บิวทูริก (thiobarbituric acid reactive substance : TBARS) ซึ่งใช้วัดระดับการเกิดออกซิเดชันของไขมันในอาหาร โดยนำอาหารไปบดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำมาชั่งให้ได้ 10 กรัม ใส่ในหลอดกลั่น แล้วเติม 50mM potassium phosphate 9 มิลลิลิตร BHT 1 มิลลิลิตร กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid, HCl) ความเข้มข้น 4N 1.25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างไปทำการกลั่นเป็นเวลา 5-6 นาที หลังจากกลั่นเสร็จเก็บตัวอย่างจำนวน 50 มิลลิลิตร โดยใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างลงในหลอดทดลองปริมาณ 5 มิลลิลิตร และเติมกรดไทโอบาร์บิวทูริก (thiobarbituric acid, TBA) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารตัวอย่างทั้ง 2 ให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 35 นาทีและทำการเขย่าทุกๆ 5 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 532 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของที่ตัวอย่างที่วิเคราะห์ TBARS ไปคำนวณหาค่ากรดบาร์บิวทูริกโดยแทนในสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของมัลลัลไดแอลดีไฮด์ (malondialdehyde : MDA) (ภาคผนวก ข.) แสดงผลเป็นไมโครกรัมมัลลัลไดแอลดีไฮด์ต่อกิโลกรัมอาหาร (ไมโครกรัม MDA/กก.อาหาร) พร้อมกับบันทึกผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาระดับความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์ที่เหมาะสมในอาหารต่อการเจริญเติบโต การพัฒนาสีผิว ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารแคโรทีนอยด์ในเนื้อปลา และพยาธิสภาพเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่อง

3.3.2.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design : CRD) เป็น 5 ชุดการทดลองๆ ละ 4 ซ้ำ ใช้ปลา 25 ตัวต่อซ้ำ มีระดับความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ต่างกัน คือ

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารควบคุมไม่ผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรือง

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารควบคุมผสมสารแคโรทีนอยด์ความเข้มข้น 25 มก./กก.

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารควบคุมผสมสารแคโรทีนอยด์ความเข้มข้น 50 มก./กก.

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารควบคุมผสมสารแคโรทีนอยด์ความเข้มข้น 75 มก./กก.

ชุดการทดลองที่ 5 อาหารควบคุมผสมสารแคโรทีนอยด์ความเข้มข้น 100 มก./กก.

3.3.2.2 การเตรียมอาหารโดยใช้อาหารผงสำเร็จรูปชื่อนิวทรีน่าฟีด (โปรตีนไม่น้อยกว่า 40) เป็นอาหารสูตรควบคุมโดยนำผงดอกดาวเรืองที่ได้จากข้อ 3.3.1.2 มาวิเคราะห์หาปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวมตามวิธีการในข้อ 3.3.1.3 แล้วผสมผงดอกดาวเรืองให้มีความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ที่ระดับ 0, 25, 50, 75 และ 100 มก./กก. ลงไปในอาหาร แล้วเติมน้ำ 60 เปอร์เซ็นต์ คลุกเคล้าให้ทั่ว จากนั้นนำไปอัดเม็ดแล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °C แล้วนำอาหารเก็บใส่ถุงพลาสติกให้มิดชิดและเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 °C

3.3.2.3 นำปลาทรงเครื่องมีน้ำหนักประมาณ 1.3-1.5 กรัมโดยฝึกให้กินอาหารควบคุมวันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ มาปรับสภาพในถังพลาสติก จากนั้นสุ่มปลาลงเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 160 ลิตร ใส่น้ำ 100 ลิตร และให้อาหารปลาวันละ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักปลา โดยให้อาหารวันละ 2 มื้อ เวลา 10.00 น. และ 16.00 น. เปลี่ยนถ่ายน้ำสัปดาห์ละ 1 ครั้ง

3.3.2.4 การบันทึกข้อมูล สุ่มปลาจากทุกชุดการทดลองๆละ 3 ซ้ำๆละ 5 ตัว ทำการชั่งน้ำหนักปลาและบันทึกน้ำหนักทุก 2 สัปดาห์ จนกระทั่งครบ 12 สัปดาห์ มาทำการคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate : SGR) และอัตรารอด ดังนี้

(1) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate : SGR) (%/วัน)

$$SGR = \frac{[(\ln \text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \ln \text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น})] \times 100}{\text{ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)}}$$

(2) อัตรารอด (%)

$$\text{อัตรารอด} = \frac{\text{จำนวนปลาที่เหลือหลังการทดลอง} \times 100}{\text{จำนวนปลาที่เริ่มต้นการทดลอง}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2.5 วัดสีผิวปลา เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการสุ่มปลาทรงเครื่องซ้ำละ 3 ตัว จากทุกชุดการทดลองมาสลบด้วยยาสลบ นำใส่ถุงพลาสติกและวัดสีผิวบริเวณลำตัวปลาด้วยเครื่องวัดสี (chromameter) วัดสีทั้งสองด้านของปลา เพื่อหาค่าของสีผิวที่เปลี่ยนแปลงแบบ CIE L*a*b* (Van de Salm et al. 2004) ซึ่งค่าต่างๆ มีความหมายดังนี้

L* แสดงถึงค่าความสว่าง มีค่าระหว่าง 0-100 (สีดำถึงสีขาว)

a* แสดงถึงค่า (+) สีแดง และ (-) สีเขียว

b* แสดงถึงค่า (+) สีเหลือง และ (-) สีน้ำเงิน

3.3.2.6 การศึกษาประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารแคโรทีนอยด์ในเนื้อปลา

(1) เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มปลาจากทุกชุดการทดลองๆละ 3 ซ้ำๆละ 10 กรัม มาวิเคราะห์การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในเนื้อปลา ทดลองโดยวัดค่ากรดไทโอบาร์บิวทูริก (TBARS) ซึ่งเป็นดัชนีชี้วัดการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย โดยใช้วัดระดับการเกิดออกซิเดชันในเนื้อปลา

(2) นำเฉพาะเนื้อปลาทั้งตัวไปบดให้ละเอียดให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำมาชั่งให้ได้ 10 กรัม ใส่ในหลอดกลั่น แล้วเติม 50 mM potassium phosphate 9 มิลลิลิตร BHT 1 มิลลิลิตร กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid, HCl) ความเข้มข้น 4N 1.25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างไปทำการกลั่นที่เครื่องกลั่นตัวอย่างเป็นเวลา 5-6 นาที

(3) หลังจากกลั่นเสร็จเก็บตัวอย่างจำนวน 50 มิลลิลิตร โดยใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างลงในหลอดทดลองปริมาณ 5 มิลลิลิตร และเติมกรดไทโอบาร์บิวทูริก (thiobarbituric acid, TBA) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารตัวอย่างทั้ง 2 ให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 35 นาทีและทำการเขย่าทุกๆ 5 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 532 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของที่ตัวอย่างที่วิเคราะห์ TBARS ไปคำนวณหาค่ากรดบาร์บิวทูริกโดยแทนในสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของมัลลัลไดแอลดีไฮด์ (malondialdehyde : MDA) แสดงผลเป็นไมโครกรัมมัลลัลไดแอลดีไฮด์ต่อกรัมเนื้อปลา (ไมโครกรัม MDA/กรัมเนื้อปลา) พร้อมกับบันทึกผล

3.3.2.7 ศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลาทรงเครื่อง

(1) ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปลา ที่เลี้ยงจากทุกชุดการทดลองๆละ 5 ตัว ทุก 4, 8 และ 12 สัปดาห์ โดยทำการผ่าเปิดช่องท้องและเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์แช่ในน้ำยา buffer formalin 10% นาน 24 ชั่วโมง เปลี่ยนน้ำยาแล้วแช่ซ้ำ นำใส่ตลับเนื้อเยื่อ โดยให้น้ำไหลผ่านอย่างช้าๆ นาน 2-4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างเนื้อเยื่อไปทำการขจัดน้ำ (dehydration) โดยผ่านขั้นตอนตามวิธีมาตรฐานของ Humason (1979)

(2) นำบล็อคพาราฟินที่มีเนื้อเยื่อเซลล์สืบพันธุ์ของปลาไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อที่ความหนา 4-5 ไมครอน และวางบนแผ่นสไลด์ นำแผ่นสไลด์ดังกล่าวไปย้อมสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามขั้นตอนของเทคนิคการย้อมสี hematoxylin & eosin ตามวิธีของ Humason (1979) การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่อง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การพัฒนาของไข่แบ่งเป็น 6 ระยะ ตามชลอ ลิ้มสุวรรณ และคณะ (2530) ได้แก่

(1) ระยะที่ 1 เป็นระยะที่ไข่ยังไม่เจริญ ไข่จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มมีขนาดเล็กมาก

(2) ระยะที่ 2 ไข่ระยะนี้จะมีขนาดใหญ่ขึ้น พบไซโตพลาสซึมรวมตัวกันอย่างหนาแน่น และนิวเคลียสติดสีเทา

(3) ระยะที่ 3 ไข่จะมีขนาดใหญ่ขึ้น เป็นระยะที่เริ่มเห็น provitelline nucleoli กระจายอยู่ในนิวเคลียส

(4) ระยะที่ 4 ไข่ระยะนี้จะมีขนาดใหญ่ขึ้น เป็นระยะที่พบ provitelline nucleoli ที่ขอบนิวเคลียส

(5) ระยะที่ 5 เป็นระยะที่ไข่กำลังเจริญ จะเห็นได้จาก follicular cell ที่ขอบนอกชัดเจนขึ้น

(6) ระยะที่ 6 เป็นระยะที่ไข่เจริญเต็มที่ ภายในเซลล์ไข่จะเต็มไปด้วย yolk granules นิวเคลียสมีขนาดเล็กติดสีชมพู

โดยเนื้อเยื่อเซลล์ไข่จะนำมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของไข่ในแต่ละระยะ ตามวิธี Weber *et al.* (2003)

$$\% \text{ การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของไข่} = \frac{\text{จำนวนไข่ในแต่ละระยะ X 100}}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}}$$

## 3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลอง ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan's new multiple's range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

## 3.5 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการหลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

## 3.6 ระยะเวลาดำเนินการ

เดือนกันยายน 2554 – เดือนธันวาคม 2555

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 4

# ผลการทดลอง

## 4.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ผสมลงในอาหาร

การศึกษาระดับประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่เหมาะสมในอาหาร โดยการเสริมสารแคโรทีนอยด์ความเข้มข้น 5 ระดับ ได้แก่ 0, 25, 50, 75 และ 100 มก./กก. โดยบรรจุภัณฑ์ลงในถุงแบบไล่อากาศ และนำอาหารเก็บในอุณหภูมิห้อง 25±3 °C เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า เมื่อสิ้นสุดการทดลองอาหารที่ความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์ 100 มก/กก. มีค่า TBARS ต่ำสุดเฉลี่ย 165.252±2.267 ไมโครกรัม MDA/กก. อาหาร และอาหารในกลุ่มควบคุมที่ไม่ผสมสารแคโรทีนอยด์ 0 มก./กก. มีค่า TBARS สูงสุดเฉลี่ย 958.679±2.267 ไมโครกรัม MDA/กก.อาหาร และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย TBARS ในอาหาร พบว่า อาหารที่ระดับความเข้มข้น 100 มก./กก. มีค่า TBARS ต่ำสุด รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 75, 50, 25 และ 0 มก./กก. มีค่าเท่ากับ 169.786±5.998 ไมโครกรัม MDA/กก.อาหาร, 176.587±2.267 ไมโครกรัม MDA/กก.อาหาร, 185.655±08.174 ไมโครกรัม MDA/กก.อาหาร และ 958.679±2.267 ไมโครกรัม MDA/กก.อาหาร ตามลำดับ ซึ่งทุกระดับความเข้มข้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

**ตารางที่ 4.1** ค่า TBARS ในอาหารที่ผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆก่อนการทดลองและสิ้นสุดการทดลอง

| ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ (มก./กก.) | ค่า TBARS (ไมโครกรัม MDA/กก.อาหาร) | |
|---|---|---|
| | ก่อนการทดลอง | สิ้นสุดการทดลอง |
| 0 | 299.001±4.534[a] | 958.679±2.267[a] |
| 25 | 296.734±7.853[a] | 185.655±8.174[b] |
| 50 | 285.400±9.068[a] | 176.587±2.267[bc] |
| 75 | 271.798±8.174[a] | 169.786±5.998[bc] |
| 100 | 287.667±5.998[a] | 165.252±2.267[c] |

*อักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาระดับความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์ที่เหมาะสมในอาหารต่อการเจริญเติบโต การพัฒนาสีผิว ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารแคโรทีนอยด์ในเนื้อปลา และการเปลี่ยนแปลงลักษณะเนื้อเยื่อเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่อง

### 4.2.1 ผลของการให้อาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ต่อการเจริญเติบโตของปลาทรงเครื่อง

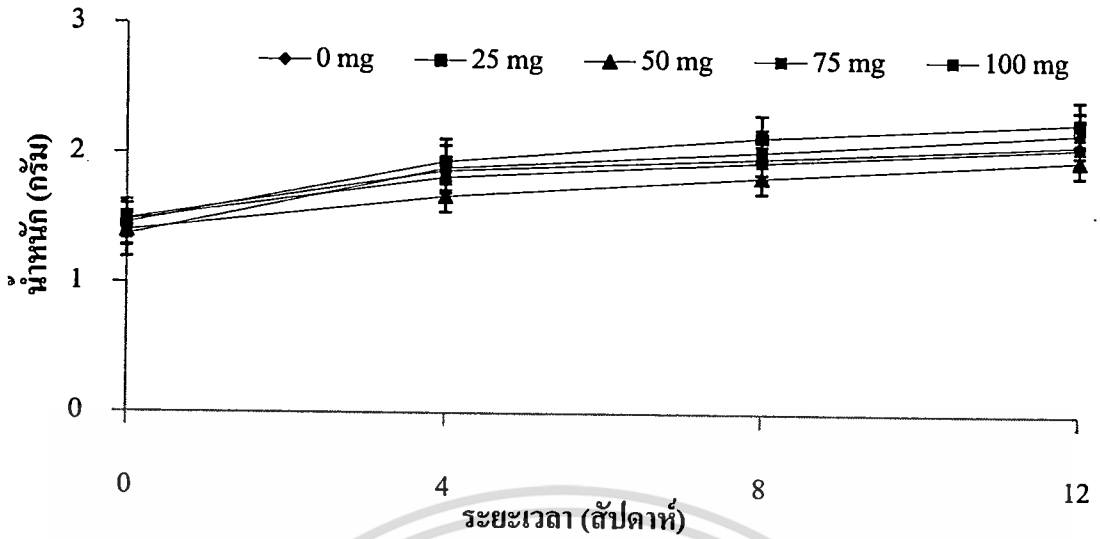
จากการทดลองศึกษาระดับความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์ในอาหาร ต่อการเจริญเติบโตของปลาทรงเครื่องเมื่อได้รับสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 มก./กก. เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ปลาทรงเครื่องมี น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อตัวต่อวัน และอัตรารอดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 1.49±0.05, 1.46±0.05, 1.40±0.05, 1.48±0.07 และ 1.37±0.05 กรัม ตามลำดับ และหลังจาก 12 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้ายของปลามีค่า 2.08±0.04, 2.25±0.08, 1.96±0.04, 2.06±0.03 และ 2.17±0.06 กรัม ตามลำดับ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.40±0.05, 0.51±0.08, 0.40±0.06, 0.40±0.06 และ 0.54±0.04 (%/วัน) และอัตรารอดเท่ากับ 96.43±2.70, 97.14±2.02, 96.43±2.14, 97.86±2.14 และ 94.29±2.61 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

**ตารางที่ 4.2** การเจริญเติบโตของปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ความเข้มข้นต่างกัน

| ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (มก./กก.) | น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม/ตัว) | | อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (%/วัน) | อัตราการรอดตาย (%) |
|---|---|---|---|---|
| | เริ่มต้น | สุดท้าย | | |
| 0 | 1.49±0.05[a] | 2.08±0.04[a] | 0.40±0.05[a] | 96.43±2.70[a] |
| 25 | 1.46±0.05[a] | 2.25±0.08[a] | 0.51±0.08[a] | 97.14±2.02[a] |
| 50 | 1.40±0.05[a] | 1.96±0.04[a] | 0.40±0.06[a] | 96.43±2.14[a] |
| 75 | 1.48±0.07[a] | 2.06±0.03[a] | 0.40±0.07[a] | 97.86±2.14[a] |
| 100 | 1.37±0.05[a] | 2.17±0.06[a] | 0.54±0.04[a] | 94.29±2.61[a] |

*อักษรที่ไม่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 4.1** น้ำหนักการเจริญเติบโตของปลาทรงเครื่องที่ได้รับอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 มก./กก. เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

**4.2.2 ผลของการให้อาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ต่อการเปลี่ยนแปลงสีผิวของปลาทรงเครื่อง**

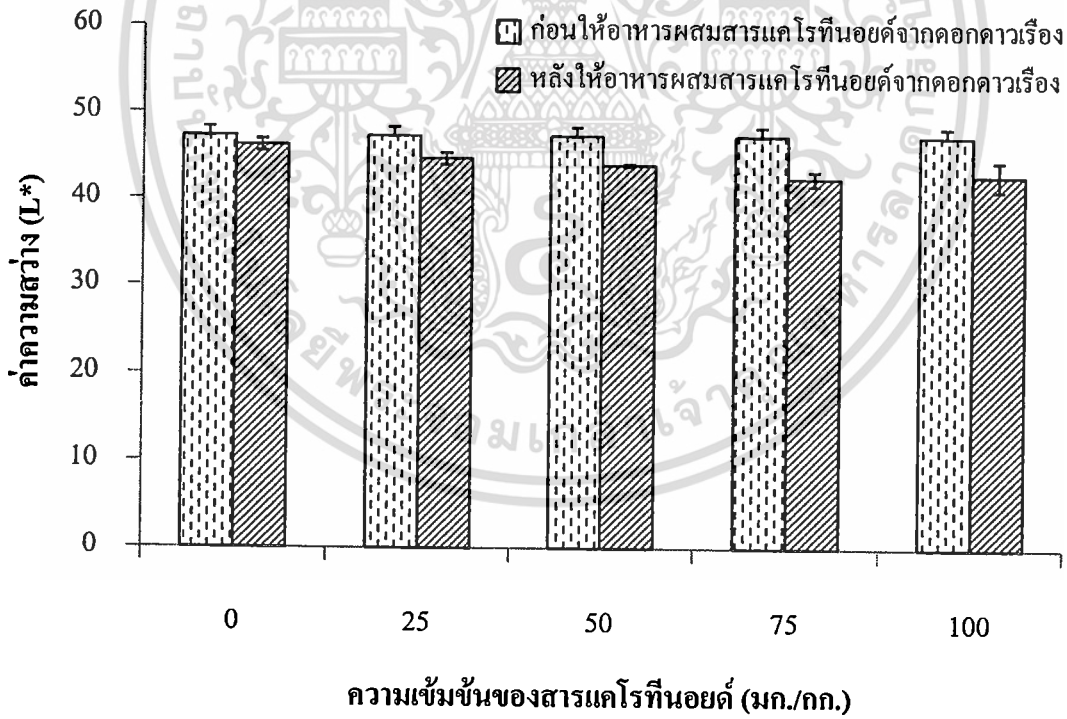
การศึกษาค่าการเปลี่ยนแปลงของสีผิวปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 มก./กก. โดยวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของสีผิวบริเวณลำตัวของปลาด้วยเครื่องวัดสี อ่านค่าในระบบ CIE L*a*b (CIELAB) ค่าการเปลี่ยนแปลงความเข้มสีของผิวปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 มก./กก. เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าค่าความสว่าง (L*) บริเวณลำตัวของปลาทรงเครื่องที่ได้รับอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ในความเข้มข้นต่างๆ มีแนวโน้มค่าความสว่างลดลง และเมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.2) และเมื่อครบ 12 สัปดาห์ ปลาทรงเครื่องที่ได้รับอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ความเข้มข้น 75 มก./กก. มีค่าความสว่างน้อยที่สุด คือ 42.42±0.82 และมีค่าความเข้มสีแดงและค่าความเข้มสีเหลืองน้อยที่สุดคือ 0.61±0.07 และ 0.01±0.10 ตามลำดับ โดยพบว่าค่าเข้มสีแดงและความเข้มสีเหลืองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 4.4 และ 4.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.3** ค่าความสว่าง (L*) ของสีผิวปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ความเข้มข้นต่างกัน

| ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (มก./กก.) | ก่อนให้อาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ | หลังให้อาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ |
|---|---|---|
| 0 | 47.28±0.08[a] | 46.19±0.69[a] |
| 25 | 47.28±0.08[a] | 44.64±0.68[ab] |
| 50 | 47.28±0.08[a] | 43.92±0.16[ab] |
| 75 | 47.28±0.08[a] | 42.42±0.82[b] |
| 100 | 47.28±0.08[a] | 42.77±1.67[b] |

*อักษรที่ไม่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)



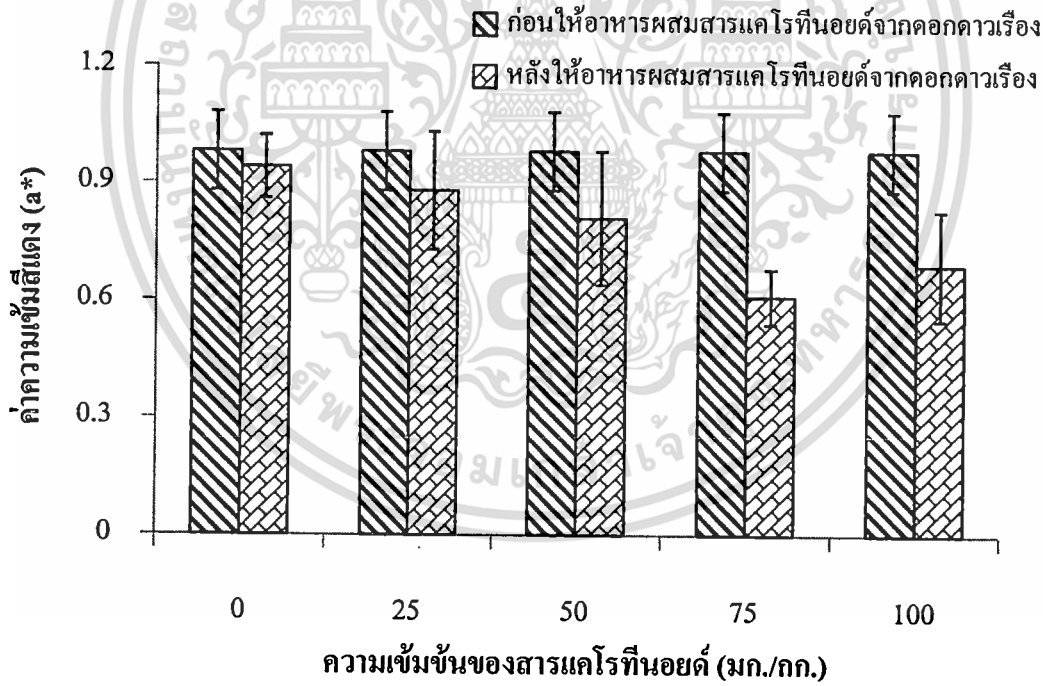

**ภาพที่ 4.2** ค่าความสว่าง (L*) ของสีผิวปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ความเข้มข้นต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.4** ค่าความเข้มสีแดง (a*) ของสีผิวปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

| ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (มก./กก.) | ก่อนให้อาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ | หลังให้อาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ |
|---|---|---|
| 0 | 0.98±0.10[a] | 0.94±0.08[a] |
| 25 | 0.98±0.10[a] | 0.88±0.15[a] |
| 50 | 0.98±0.10[a] | 0.81±0.17[a] |
| 75 | 0.98±0.10[a] | 0.61±0.07[a] |
| 100 | 0.98±0.10[a] | 0.69±0.14[a] |

*อักษรที่ไม่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)



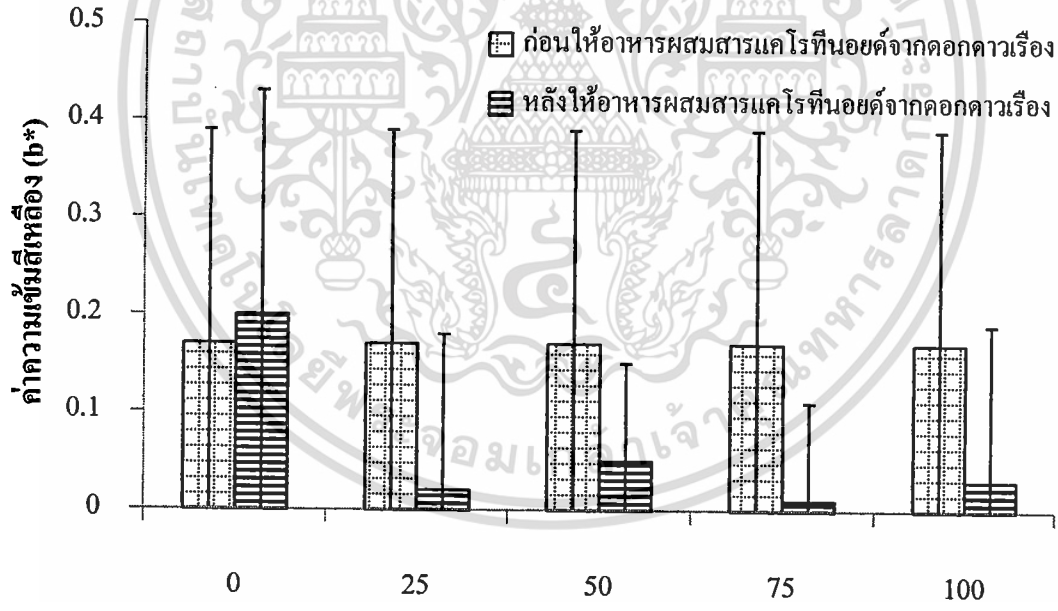

**ภาพที่ 4.3** ค่าความเข้มสีแดง (a*) ของสีผิวปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ความเข้มข้นต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.5** ค่าความเข้มสีเหลือง (b*) ของสีผิวปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

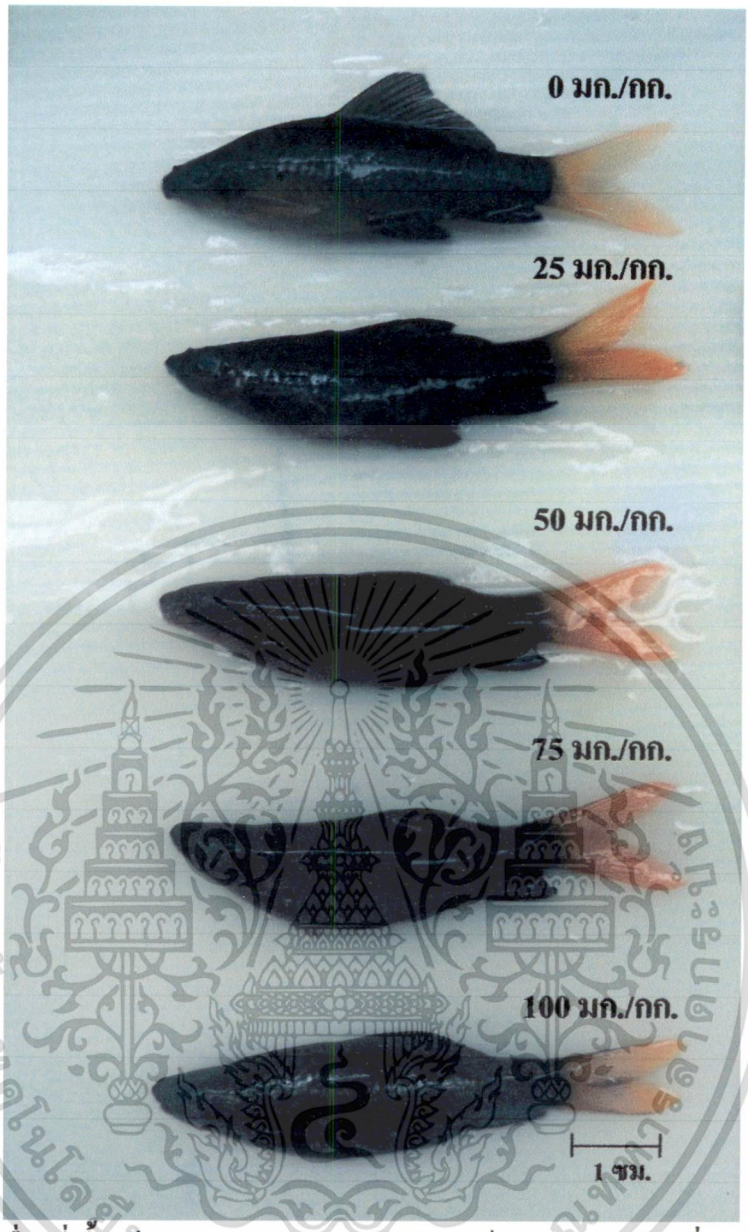
| ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (มก./กก.) | ก่อนให้อาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ | หลังให้อาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ |
|---|---|---|
| 0 | 0.17±0.22[a] | 0.20±0.23[a] |
| 25 | 0.17±0.22[a] | 0.02±0.16[a] |
| 50 | 0.17±0.22[a] | 0.05±0.10[a] |
| 75 | 0.17±0.22[a] | 0.01±0.10[a] |
| 100 | 0.17±0.22[a] | 0.03±0.16[a] |

*อักษรที่ไม่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)




**ภาพที่ 4.4** ค่าความเข้มสีเหลือง (b*) ของสีผิวปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 4.5** ปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ความเข้มข้นต่างกัน

**4.2.3 ผลของประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารแคโรทีนอยด์ในเนื้อปลาทรงเครื่อง**

เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำเนื้อปลาทรงเครื่องที่ได้รับอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 มก./กก. วิเคราะห์หาค่า TBARS ในเนื้อปลา พบว่า ปลาทรงเครื่องที่ได้รับอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้น 100 มก./กก. มีค่า TBARS ในเนื้อปลา ต่ำสุดเฉลี่ย 48.323±9.277 ไมโครกรัม MDA/กรัมเนื้อปลา และปลาที่ได้รับอาหารในกลุ่มควบคุมที่ไม่ผสมสารแคโรทีนอยด์ มีค่า TBARS ในเนื้อปลา สูงสุดเฉลี่ย 116.430±5.631 ไมโครกรัม MDA/กรัมเนื้อปลา และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย TBARS ในเนื้อปลา พบว่าปลาที่ได้รับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารที่ความเข้มข้น 100 มก./กก. มีค่า TBARS ในเนื้อปลาต่ำสุด รองลงมาคือ 75, 50, 25 และ 0 มก./กก. มีค่าเท่ากับ 86.633±2.128, 99.403±4.257, 107.917±3.686 และ 116.430±5.631 ไมโครกรัม MDA/กรัมเนื้อปลา ตามลำดับ ซึ่งทุกความเข้มข้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ตารางที่ 4.6)

**ตารางที่ 4.6** ค่า TBARS ในเนื้อปลาที่ได้รับผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อสิ้นสุด การทดลอง

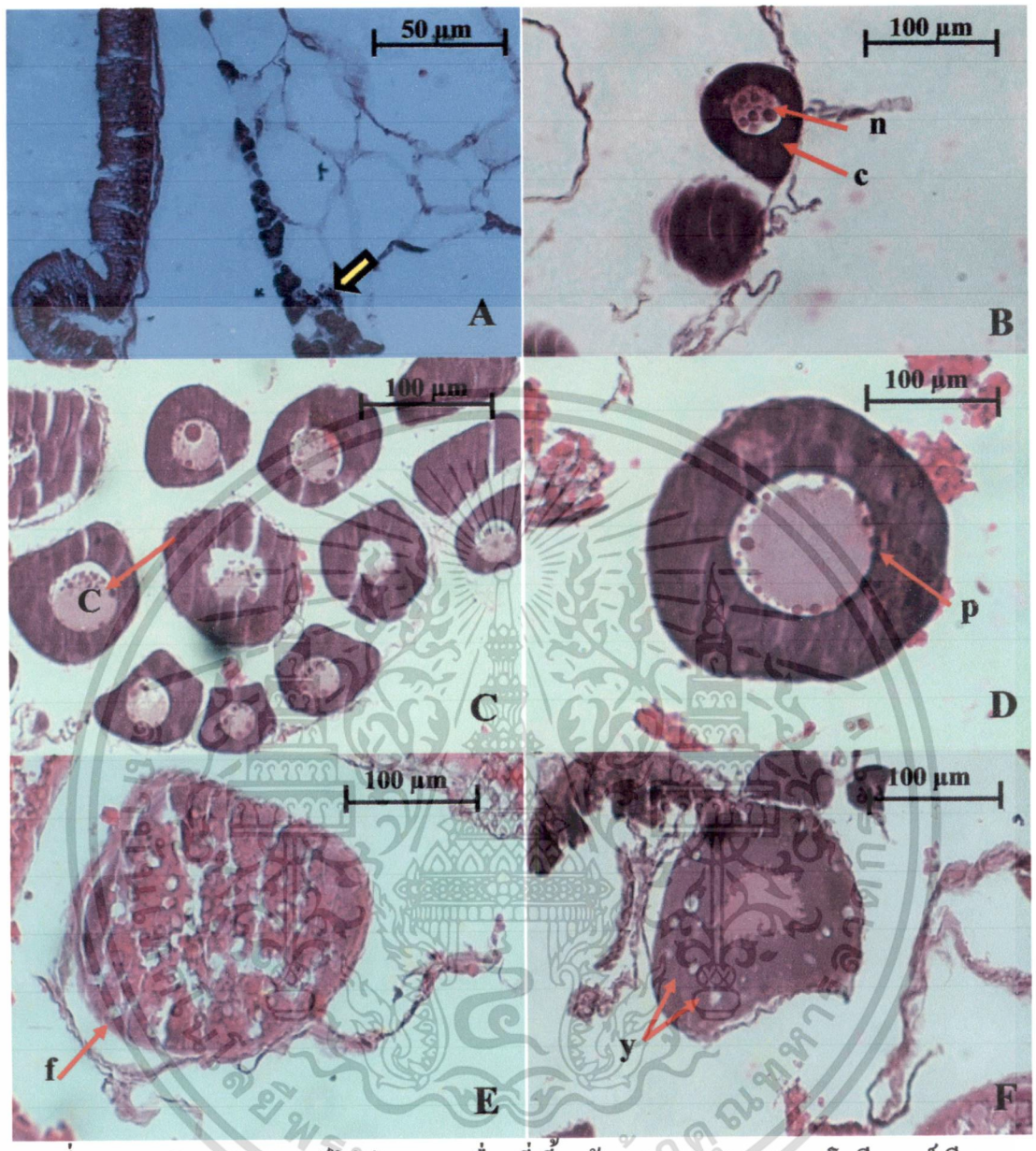
| ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ (มก./กก.) | ค่า TBARS (ไมโครกรัม MDA/กรัมเนื้อปลา) |
|---|---|
| 0 | 116.430±5.631[a] |
| 25 | 107.917±3.686[a] |
| 50 | 99.403±4.257[ab] |
| 75 | 86.633±2.128[b] |
| 100 | 48.323±9.277[c] |

*อักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

**4.2.4 ผลของการให้อาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ต่อการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่อง**

การศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่องที่ได้รับอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 มก./กก. เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อไข่ปลาทรงเครื่องมีการพัฒนา 6 ระยะ โดยเปอร์เซ็นต์การพัฒนาของไข่ที่ความเข้มข้นต่างๆแสดงในตารางที่ 4.7, 4.8 และ 4.9 ซึ่งปลาที่ได้รับอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้น 0 มก./กก. พบไข่ระยะที่ 1 มากที่สุด (P<0.05) ซึ่งมีค่าสูงสุดเท่ากับ 39.98±10.37 และในขณะที่ความเข้มข้น 100 มก./กก. พบไข่ระยะที่ 6 มากที่สุด (P<0.05) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 45.58±5.49 โดยการพัฒนาเซลล์ไข่ในระยะต่างๆของปลาทรงเครื่องแสดงในภาพที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 4.6** การพัฒนาของเซลล์ไข่ปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ มี 6 ระยะ ดังนี้ (A) คือ ระยะที่ 1 ไข่มีขนาดเล็กอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (ลูกศรชี้), (B) คือ ระยะที่ 2 ไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงินเข้ม (c) นิวเคลียสติดสีเทา (n) ไม่พบ provitelline nucleoli, (C) คือ ระยะที่ 3 ไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงินเข้ม นิวเคลียส (C) สีชมพูภายในเริ่มเห็น provitelline nucleoli กระจายอยู่ในนิวเคลียส, (D) คือ ระยะที่ 4 พบ euvitelline nucleoli ที่ขอบของนิวเคลียส (p), (E) คือ ระยะที่ 5 ไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงินปนเทา ภายในมี yolk granules และ yolk vacuoles เพิ่มขึ้น (f) และ (F) คือ ระยะที่ 6 ไซโตพลาสซึมจะเต็มไปด้วย yolk granules (y) ขนาดใหญ่ นิวเคลียสจะมีขนาดเล็กติดสีชมพู (formalin 10%; H&E)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.7** เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

| ระยะไข่ | ความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์ (มก./กก.) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 |
| ระยะที่ 1 | 36.42±4.88$^{c}$ | 32.63±13.81$^{b}$ | 9.37±2.57$^{a}$ | 8.07±1.32$^{a}$ | 3.02±1.24$^{a}$ |
| ระยะที่ 2 | 27.02±7.36$^{b}$ | 24.86±9.91$^{b}$ | 12.07±2.87$^{ab}$ | 9.33±2.06$^{ab}$ | 5.14±1.52$^{a}$ |
| ระยะที่ 3 | 12.94±3.20$^{a}$ | 15.74±3.43$^{b}$ | 12.87±2.38$^{a}$ | 10.73±3.24$^{a}$ | 6.14±0.87$^{a}$ |
| ระยะที่ 4 | 10.55±1.68$^{a}$ | 11.16±4.35$^{a}$ | 17.99±7.04$^{a}$ | 15.53±5.89$^{a}$ | 22.15±4.46$^{a}$ |
| ระยะที่ 5 | 9.06±2.08$^{b}$ | 9.81±5.27$^{b}$ | 20.37±6.18$^{ab}$ | 24.64±9.73$^{ab}$ | 29.96±3.92$^{a}$ |
| ระยะที่ 6 | 4.01±1.30$^{b}$ | 5.80±4.86$^{b}$ | 27.33±5.52$^{a}$ | 31.70±5.38$^{a}$ | 33.58±4.14$^{a}$ |

*อักษรที่ต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

**ตารางที่ 4.8** เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

| ระยะไข่ | ความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์ (มก./กก.) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 |
| ระยะที่ 1 | 37.32±2.58$^{c}$ | 22.89±6.20$^{b}$ | 5.58±1.54$^{a}$ | 5.21±2.82$^{a}$ | 3.04±0.66$^{a}$ |
| ระยะที่ 2 | 26.42±2.03$^{b}$ | 23.48±6.84$^{b}$ | 9.63±2.06$^{a}$ | 8.16±1.24$^{a}$ | 6.57±1.63$^{a}$ |
| ระยะที่ 3 | 11.01±1.50$^{a}$ | 18.07±6.45$^{a}$ | 13.71±2.43$^{a}$ | 9.27±4.61$^{a}$ | 7.57±1.50$^{a}$ |
| ระยะที่ 4 | 10.73±2.16$^{a}$ | 13.41±2.66$^{a}$ | 18.30±2.86$^{a}$ | 19.72±5.75$^{a}$ | 15.23±1.49$^{a}$ |
| ระยะที่ 5 | 8.98±0.60$^{b}$ | 15.44±4.48$^{ab}$ | 23.78±3.70$^{a}$ | 24.93±6.95$^{a}$ | 31.66±7.01$^{a}$ |
| ระยะที่ 6 | 5.54±1.03$^{b}$ | 6.72±2.94$^{b}$ | 29.01±3.59$^{a}$ | 32.72±5.78$^{a}$ | 35.93±6.58$^{a}$ |

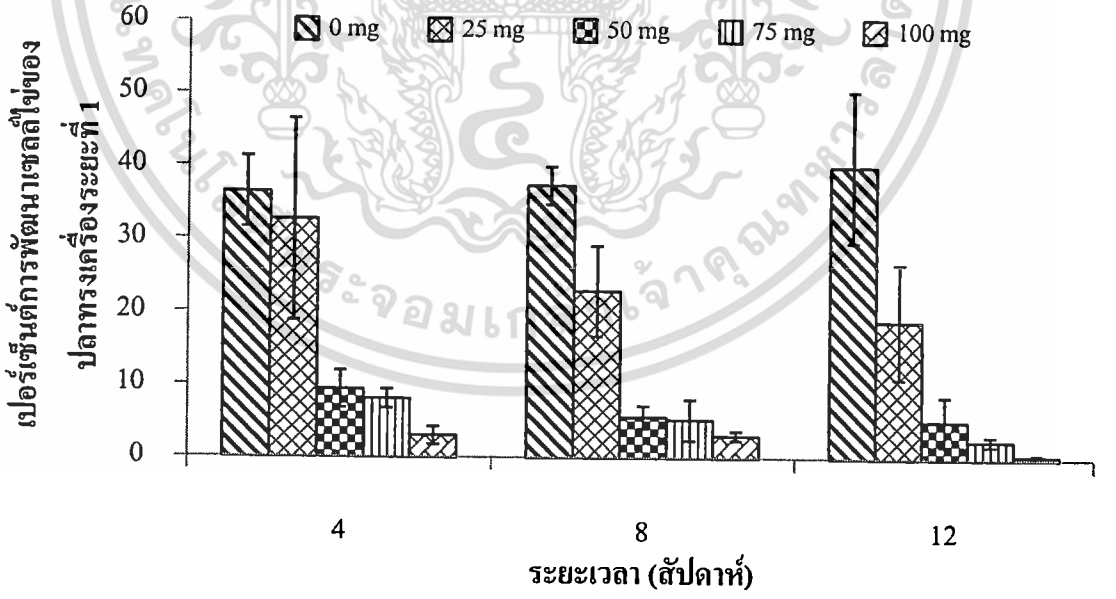
*อักษรที่ต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.9** เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์

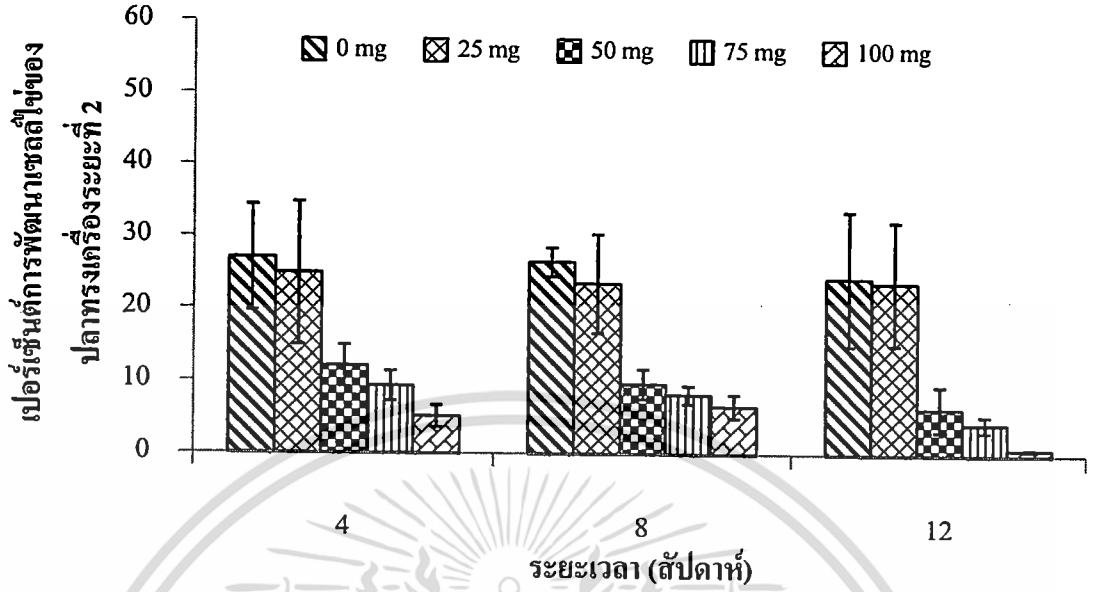
| ระยะไข่ | ความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์ (มก./กก.) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 |
| ระยะที่ 1 | 39.98±10.37$^{b}$ | 18.82±7.87$^{a}$ | 5.15±3.37$^{a}$ | 2.43±0.64$^{a}$ | 0.43±0.18$^{a}$ |
| ระยะที่ 2 | 24.26±9.31$^{b}$ | 23.62±8.54$^{b}$ | 6.33±3.12$^{ab}$ | 4.28±1.11$^{a}$ | 0.79±0.14$^{a}$ |
| ระยะที่ 3 | 12.53±6.25$^{a}$ | 16.86±7.32$^{a}$ | 14.85±7.30$^{a}$ | 13.16±1.35$^{a}$ | 0.96±0.41$^{a}$ |
| ระยะที่ 4 | 10.30±6.75$^{b}$ | 16.57±6.34$^{a}$ | 16.49±7.44$^{a}$ | 18.57±2.15$^{a}$ | 20.65±6.95$^{a}$ |
| ระยะที่ 5 | 8.89±6.48$^{a}$ | 13.81±7.16$^{a}$ | 23.92±11.66$^{a}$ | 24.15±5.63$^{a}$ | 31.60±4.36$^{a}$ |
| ระยะที่ 6 | 4.04±2.49$^{b}$ | 9.97±4.35$^{b}$ | 32.26±10.44$^{a}$ | 37.41±3.23$^{a}$ | 45.58±5.49$^{a}$ |

*อักษรที่ต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

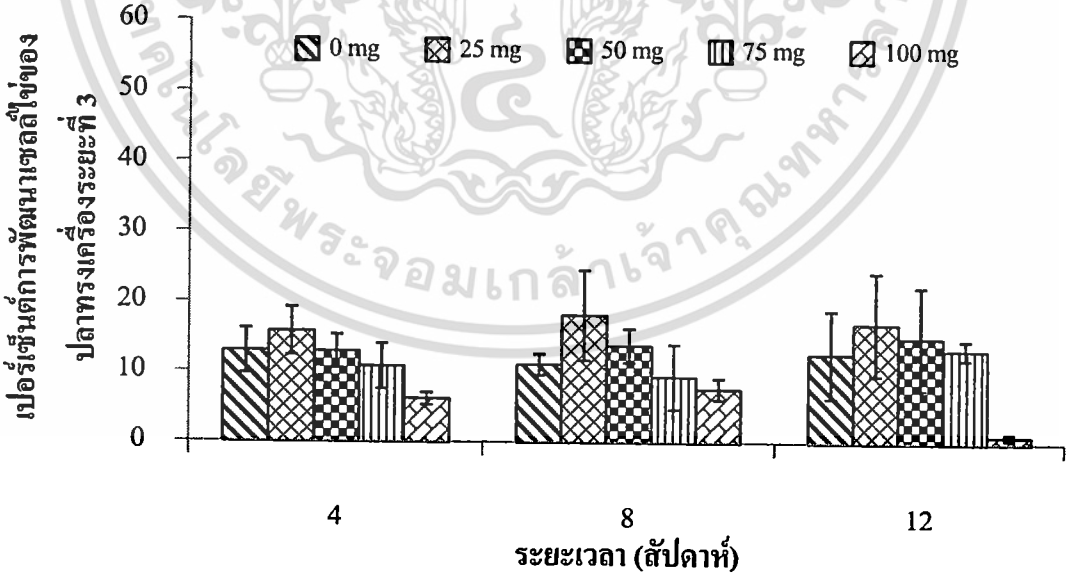



**ภาพที่ 4.7** เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่องในระยะที่ 1 ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

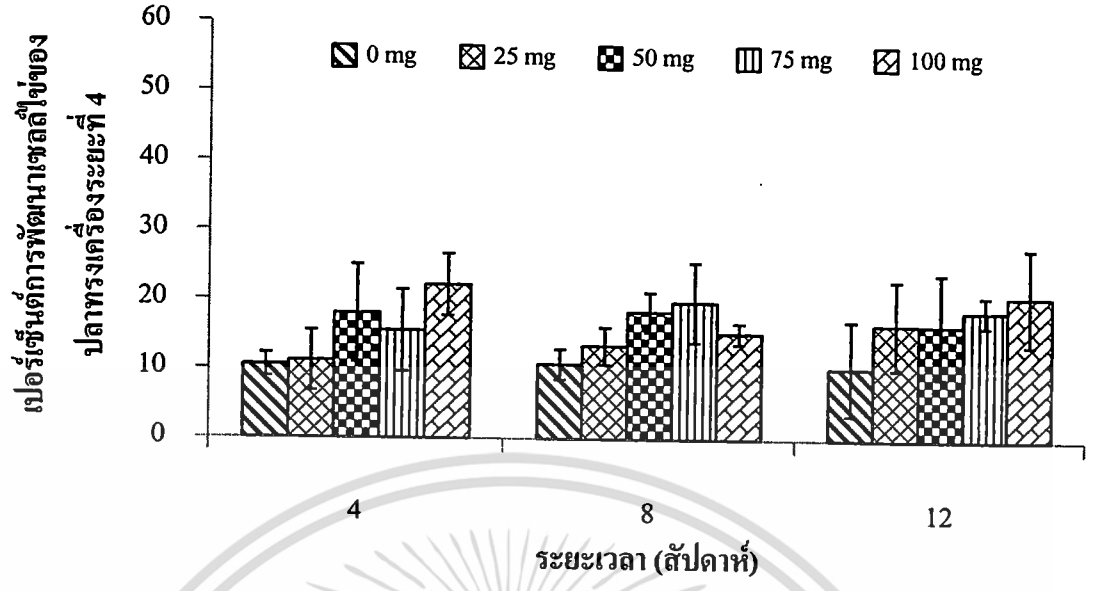



**ภาพที่ 4.8** เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่องในระยะที่ 2 ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์

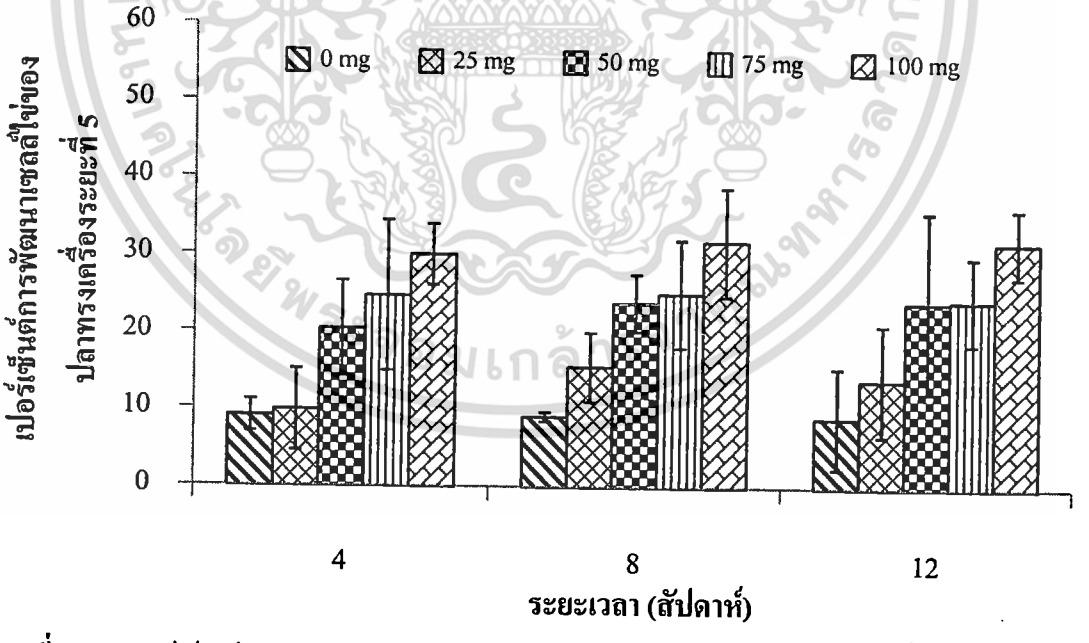



**ภาพที่ 4.9** เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่องในระยะที่ 3 ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

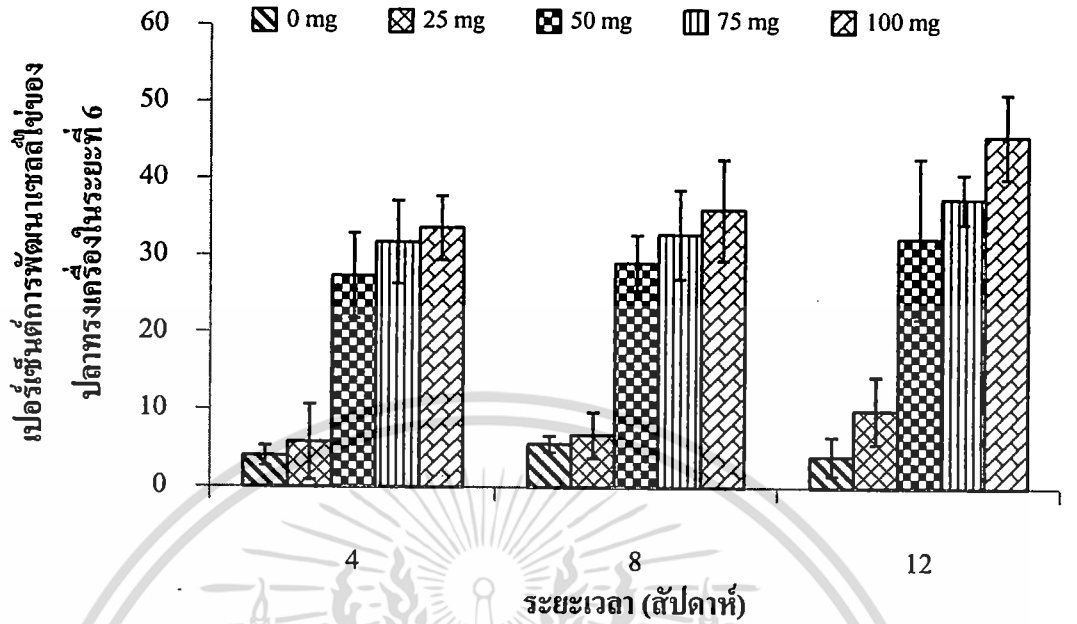



**ภาพที่ 4.10** เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่องในระยะที่ 4 ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์




**ภาพที่ 4.11** เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่องในระยะที่ 5 ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 4.12** เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่องในระยะที่ 6 ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5
# วิจารณ์ผลการทดลอง

## 5.1 การศึกษาประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ผสมลงในอาหาร

### 5.1.1 ผลของอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองต่อค่า TBARS ในอาหาร

ผลการศึกษาอาหารที่ผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 มก./กก. ศึกษาจากการประเมินสภาวะอนุมูลอิสระในอาหาร โดยใช้ตัวชี้วัดคือ ค่ากรดไทโอบาร์บิวทูริก (TBARS) ซึ่งใช้วัดระดับการเกิดออกซิเดชั่นของไขมันในอาหารแสดงผลเป็นปริมาณมัลลัลไดแอลดีไฮด์(malondialdehyde : MDA) ซึ่งเกิดเป็นอนุมูลอิสระที่มาจากขั้นตอนสุดท้ายในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอาหาร ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพ เกิดกลิ่นหืน เปลี่ยนสี และสูญเสียคุณค่าทางอาหาร โดยส่วนมากมักเกิดกับกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากกว่ากรดไขมันอิ่มตัว ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวมักมีจำนวนพันธะคู่มากกว่าหนึ่งพันธะในโครงสร้าง โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะถูก oxidized ที่ตำแหน่งพันธะคู่ จึงมีความว่องไวสูง และสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับออกซิเจนในบรรยากาศ ซึ่งจะทำให้เกิดการหืน (rancidity) ของอาหารและเกิดเป็นอนุมูลอิสระเริ่มต้นของปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไปได้อีก (ศิวาพร ศิวเวช. 2546; สุริญญา โพธิดิษฐศิริ. 2547) ผลจากการทดลองพบว่า อาหารที่ผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้น 100 มก/กก. มีค่า TBARS ในอาหารต่ำสุดเฉลี่ย 0.165±0.00 ไมโครกรัม MDA/กก.อาหาร และอาหารกลุ่มควบคุมที่ไม่ผสมสารแคโรทีนอยด์ มีค่า TBARS ในอาหารสูงสุดเฉลี่ย 0.959±0.00 ไมโครกรัม MDA/กก.อาหาร ซึ่งจากผลการทดลองของทุกระดับความเข้มข้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยในความเข้มข้น 100 มก./กก. พบค่า TBARS ในอาหารต่ำสุดนั้นเป็นผลมาจากสารแคโรทีนอยด์ไปช่วยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงทำให้ขั้นตอนต่อเนื่องของปฏิกิริยาของออกซิเดชันหยุดลง ค่า TBARS ในอาหารจึงต่ำ นอกจากนี้อาหารที่มีความหืนจะเป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำอย่างมาก คือ นำไปสู่การเกิดสภาวะ oxidative stress ในสัตว์น้ำ สภาวะดังกล่าวจะทำให้สัตว์น้ำไม่สามารถควบคุมและป้องกันปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับปกติที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายได้ ซึ่งจะทำให้สัตว์น้ำเกิดโรคต่างๆได้ และเป็นผลให้อัตราการเจริญเติบโตลดลง อัตรารอดต่ำ สีซีด เป็นต้น (Nakano *et al.* 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.2 การศึกษาระดับความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์ที่เหมาะสมในอาหาร ต่อการเจริญเติบโต การพัฒนาสีผิว ศึกษาประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารแคโรทีนอยด์ในเนื้อปลา และการเปลี่ยนแปลงลักษณะเนื้อเยื่อเซลล์สืบพันธุ์ของปลาทรงเครื่อง

### 5.2.1 ผลของการกินอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ต่อการเจริญเติบโตของปลาทรงเครื่อง

ผลการศึกษาการเลี้ยงปลาทรงเครื่องด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 มก./กก. เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ปลาทรงเครื่องมีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย และอัตราการรอดตายของทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) การทดลองของ Kalinowski *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาปลา red porgy ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคนทาแซนทินสังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 40 และ 100 มก./กก., สารแอสตาแซนทินที่ได้จากเปลือกกุ้งที่ความเข้มข้น 20 และ 40 มก./กก. และอาหารในกลุ่มควบคุมที่ไม่ผสมสารแคโรทีนอยด์ เป็นเวลา 105 วัน พบว่าน้ำหนักเริ่มต้น น้ำหนักสุดท้าย และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในระหว่างชุดการทดลอง (P>0.05) Yanar *et al.* (2008) ทดลองเลี้ยงปลาเรนโบว์เทร้าท์ด้วยอาหารผสมแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ความเข้มข้น 1.8%, พริกแดง 5% และแอสตาแซนทิน 70 มก./กก. เป็นเวลา 60 วัน พบว่า น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตรารอดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (P>0.05) ดาราวรรณ ยุทธยงค์ และคณะ (2546) ศึกษาผลของแอสตาแซนทินต่อสีของปลากระแหที่ระดับความเข้มข้นของแอสตาแซนทินที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 100 และ 200 มก./กก. เป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า อาหารผสมแอสตาแซนทินไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต และอัตรารอดของปลากระแห (P>0.05) รวมทั้งการทดลองของ Ezhil *et al.* (2008) ทดลองเลี้ยงปลาสอดแดงหางดาบด้วยอาหารผสมแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ระดับความเข้มข้น 0, 3, 4, 6, 8, และ 15 กรัม/อาหาร 100 กรัม พบว่าน้ำหนักเริ่มต้นและน้ำหนักสุดท้ายไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) และพบว่า อัตราการเจริญเติบโตมีค่าเท่ากับ 30.6±3.3, 12.2±0.2, 17.2±2.6, 18.5±1.1, -10.5±1.5, 17.4±0.6 และ 8.6±1.1 มิลลิกรัม/กรัม/วัน ตามลำดับ ซึ่งการให้ปลากินอาหารที่ผสมแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองนั้นไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของปลา เป็นไปได้ว่าสารแคโรทีนอยด์จัดว่าเป็นแหล่งของสารสีที่มีประสิทธิภาพสูงเมื่อมีการดูดซึมเข้าสู่ร่างกายจะถูกนำไปใช้ประโยชน์ในแง่ของการช่วยเพิ่มสีมากกว่าที่จะใช้เป็นแหล่งของสารอาหาร เนื่องจากสารแคโรทีนอยด์มีสารอาหาร เช่น โปรตีน และไขมันที่มีคุณค่าในปริมาณที่น้อย จึงได้มีการนำมาใช้เป็นแหล่งของสารสีเพียงอย่างเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**5.2.2 ผลการกินอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ต่อความเข้มของสีปลาทรงเครื่อง**

ผลการศึกษาต่อความเข้มของสีผิวบนลำตัวปลาทรงเครื่องที่ได้รับอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากผงดอกดาวเรืองที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 25-100 มก./กก. เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าปลาทรงเครื่องมีสีผิวเข้มขึ้นจึงทำให้มีค่าความสว่าง (L*) ลดลง ซึ่งเมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ค่าความเข้มสีแดง (a*) และค่าความเข้มสีเหลือง (b*) ของปลาทรงเครื่องที่ได้รับอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกชุดการทดลอง ($P>0.05$) Kalinowski *et al.* (2005) ทดลองเลี้ยงปลา red porgy ด้วยอาหารที่ผสมแคนทาแซนทินสังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 40 และ 100 มก./กก. และอาหารที่ผสมแอสตาแซนทินจากเปลือกกุ้งที่ความเข้มข้น 20 และ 40 มก./กก. เป็นระยะเวลา 105 วัน โดยทำการวัดสีบริเวณด้านข้างลำตัว, ด้านหน้าของครีบหลัง และด้านหน้าของครีบหาง พบว่า ค่าความสว่าง (L*) ในบริเวณผิวด้านข้างลำตัว, ด้านหน้าของครีบหลัง และด้านหน้าของครีบหาง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) Wathne *et al.* (1998) ได้ศึกษาปลาแซลมอนที่ได้รับอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้น 2.1 และ 41.4 มก./กก. พบว่าปลาแซลมอนมีค่าความสว่างเพิ่มขึ้น เนื่องจากปลาแซลมอนเป็นปลาที่มีสีสันและเมื่อได้รับอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จึงทำให้ค่าความสว่างเพิ่มขึ้นตามระดับสารแคโรทีนอยด์ที่เพิ่มขึ้นในอาหาร แต่ในขณะที่ปลาทรงเครื่องเป็นปลาที่มีสีเข้ม เมื่อได้รับอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ทำให้ค่าความสว่างลดลง ทำให้ปลามีสีเข้มขึ้น อย่างไรก็ตามปลาจะสามารถดูดซึมสารแคโรทีนอยด์ได้ดี และจะช่วยในการกระตุ้นการเกิดสีของผิวหนังปลาได้ ทั้งนี้ความเข้มของสีผิวปลาจะเพิ่มขึ้นตามลำดับความเข้มข้นของปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้รับจากการผสมลงในอาหาร และระยะเวลาในการกินอาหาร โดยปลานั้นจะดูดซึมสารแคโรทีนอยด์ที่บริเวณทางเดินอาหาร แล้วจะส่งไปตามอวัยวะต่างๆ เช่น เกล็ด เป็นต้น ทำให้เกล็ดมีสีเข้มขึ้นและเกิดสีแตกต่างกันไป นอกจากนี้ Choubert *et al.* (1998); Sawanboonchun *et al.* (2008) ยังรายงานว่าปลาไม่สามารถสังเคราะห์สารแคโรทีนอยด์เองได้จึงจำเป็นต้องได้รับผ่านทางอาหาร และเมื่อปลาได้รับอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จะถูกดูดซึมไปสะสมในอวัยวะส่วนต่างๆของร่างกายในระหว่างที่ปลามีการเจริญเติบโตอีกด้วย

**5.2.3 ผลของการกินอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ต่อค่า TBARS ในเนื้อปลา**

ผลการศึกษาการเลี้ยงปลาทรงเครื่องด้วยอาหารที่ผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 มก./กก. ต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของปลาทรงเครื่อง ศึกษาจากการประเมินสภาวะอนุมูลอิสระในเนื้อปลา โดยใช้ตัวชี้วัดคือ ค่ากรดไทโอบาร์บิวทูริก (TBARS) แสดงผลเป็นปริมาณมัลลัลไดแอลดีไฮด์ (malondialdehyde : MDA) ซึ่งใช้วัดระดับการเกิดออกซิเดชั่นในเนื้อปลา พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้น 100 มก./กก. มีค่า TBARS ในเนื้อปลาต่ำสุดเฉลี่ย 0.048±0.01 ไมโครกรัม MDA/กรัมเนื้อปลา และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลาที่ได้รับอาหารกลุ่มควบคุมที่ไม่ผสมสารแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มข้น 0 มก./กก. มีค่า TBARS ในเนื้อปลาสูงสุดเฉลี่ย 0.116±0.01 ไมโครกรัม MDA/กรัมเนื้อปลา ซึ่งทุกระดับความเข้มข้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ผลจากการทดลองพบว่าค่า TBARS ลดลงแตกต่างกันทางสถิติในทุกชุดการทดลอง ($P<0.05$) การลดลงของค่า TBARS ในเนื้อปลานั้นสัมพันธ์กับปริมาณความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์ที่เพิ่มขึ้นในอาหาร โดยที่ความเข้มข้น 100 มก./กก. พบปริมาณของมัลลัลไดแอลดีไฮด์ต่ำ แสดงว่าที่ระดับความเข้มข้นนี้ปลามีการดูดซึมและสะสมสารแคโรทีนอยด์ไว้ในเนื้อปลาได้มาก จึงพบปริมาณมัลลัลไดแอลดีไฮด์ต่ำสุด ทั้งนี้เมื่อเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันภายในร่างกายสารแคโรทีนอยด์ทำหน้าที่ป้องกันหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระให้หยุดชะงักลงและเกิดเป็นอนุมูลอิสระออกซิเดชัน โดยทำให้อนุมูลอิสระอยู่ในสภาพที่เสถียรซึ่งมีความคงตัวไม่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา ทำให้สารแคโรทีนอยด์มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงได้อีกด้วย (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. 2554; Pokony and Gordon. 2001)

**5.2.4 ผลของการกินอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ต่อเนื้อเยื่อเซลล์สืบพันธุ์ปลาทรงเครื่อง**

ผลของการศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (ovary) ของปลาทรงเครื่องที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 มก./กก. พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์ 100 มก./กก. พบไข่ที่มีการพัฒนาในระยะที่ 6 มากที่สุด และในขณะที่ระดับความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์ 0 มก./กก. พบไข่ที่มีการพัฒนาในระยะที่ 1 มากที่สุด Christiansen and Torrissen (1997) ได้ทำการศึกษาปลา Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) ที่มีการเลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมแอสตาแซนทินที่มีระดับความเข้มข้น 0 ถึง 14.7 มก./กก. พบว่าปลามีการพัฒนาของไข่มากที่สุด โดยตรวจสอบจากเส้นผ่านศูนย์กลางของไข่และจำนวนของไข่ที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสารแอสตาแซนทินที่ปลาได้รับนั้นจะไปกระตุ้นให้รังไข่มีการพัฒนาให้มีความสมบูรณ์มากกว่าไข่ของกลุ่มปลาที่ไม่ได้รับแอสตาแซนทิน Ahmadi *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาให้อาหารผสมสารแอสตาแซนทินในปลา rainbow trout ที่ระดับความเข้มข้น 92.9 มก./กก. ซึ่งจากการทดลองพบว่าสารแอสตาแซนทินจะไปกระตุ้นฮอร์โมนช่วยให้มีการพัฒนาของไข่มากขึ้น ซึ่งปลา rainbow trout ที่ได้รับอาหารที่ผสมแอสตาแซนทินนั้นจะไปกระตุ้นให้รังไข่มีการพัฒนาให้มีความสมบูรณ์และมีเปอร์เซ็นต์การฟักตัวของไข่มากกว่าไข่ของกลุ่มปลาที่ไม่ได้รับอาหารผสมสารแอสตาแซนทิน Sawanboonchun *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาให้อาหารที่ผสมสารแอสตาแซนทินที่ระดับความเข้มข้น 73.7 มก./กก. ในปลา Atlantic cod (*Gadus morhua*, L.) เป็นระยะเวลา 2 เดือน จากการทดลองพบว่าปลา Atlantic cod มีอัตราการวางไข่เพิ่มขึ้น ปริมาณไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิเพิ่มขึ้น และอัตราการปฏิสนธิเพิ่มขึ้นอีกด้วย จงกล พรมยะ และคณะ (2555) ได้ทำการศึกษาโดยให้อาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายสไปรูลิน่าสด 21% และสไปรูลิน่าผง 3% ในปลาแฟนซีคาร์ฟ เป็นเวลา 12 เดือน จากผลการทดลองพบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในเดือนที่ 7 ปลาแฟนซีคาร์ฟที่ได้รับอาหารผสมสไปรูลิน่าสด 21% และสไปรูลิน่าผง 3% มีดัชนีความสมบูรณ์เพศของปลาเพิ่มขึ้น มากกว่าปลาที่ได้รับอาหารในกลุ่มควบคุม ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งนี้ปลาที่กินอาหารที่ผสมสารแคโรทีนอยด์จะถูกดูดซึมไปสะสมในอวัยวะส่วนต่างๆของร่างกายและถูกนำไปใช้ในการกระตุ้นการพัฒนารังไข่ในระหว่างที่ปลามีการเจริญเติบโต นอกจากนี้ไข่ปลาที่มีความเข้มข้นสารแคโรทีนอยด์สูงจะช่วยทำให้อัตราความสมบูรณ์เพศสูงขึ้น และยังมีประสิทธิภาพในการเพิ่มคุณภาพของไข่ และเพิ่มอัตรารอดในระยะตัวอ่อน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 6
# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. อาหารที่ผสมแคโรทีนอยด์ในทุกระดับความเข้มข้นต่อค่า TBARS ในอาหาร พบว่าที่ความเข้มข้น 100 มก./กก. มีค่า TBARS ต่ำสุด ซึ่งพบปริมาณมัลลัลไดแอลดีไฮด์ต่ำสุด ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.165±0.00 ไมโครกรัม MDA/กก.อาหาร

2. ระดับความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์ในอาหารทุกระดับความเข้มข้นไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของปลาทรงเครื่อง

3. ปลาที่ได้รับอาหารที่ผสมสารแคโรทีนอยด์มีค่าความสว่างลดลงตามความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์ที่เพิ่มขึ้น ที่ระดับความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์ 25 มก./กก. ก็เพียงพอสำหรับการนำไปใช้ในอาหารเพื่อพัฒนาความเข้มของสีปลาทรงเครื่อง

4. ระดับความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์ต่อค่า TBARS ในเนื้อปลา พบว่าปลาในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์มีค่า TBARS สูงสุด 0.116±0.01 ไมโครกรัม MDA/กรัมเนื้อปลา และในขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ 100 มก./กก. มีค่า TBARS ต่ำสุด 0.048±0.01 ไมโครกรัม MDA/กรัมเนื้อปลา โดยที่ความเข้มข้น 100 มก./กก. พบปริมาณมัลลัลไดแอลดีไฮด์ต่ำ แสดงว่าที่ระดับความเข้มข้นนี้ปลามีการดูดซึมและสะสมสารแคโรทีนอยด์ไว้ในเนื้อปลาได้มาก จึงพบปริมาณของมัลลัลไดแอลดีไฮด์ต่ำสุด

5. ปลาทรงเครื่องที่กินอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์มีระยะการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียที่สูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 100 มก./กก. พบไข่ที่มีการพัฒนาในระยะที่ 6 มากที่สุด และในขณะที่ปลาในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับอาหารผสมสารแคโรทีนอยด์ พบไข่ที่มีการพัฒนาในระยะที่ 1 มากที่สุด

**ข้อเสนอแนะ**

ควรศึกษาการใช้สารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองต่อการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ในปลาทรงเครื่อง ที่มีการเปรียบเทียบการทดลองระหว่างสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองกับสารแคโรทีนอยด์จากแหล่งธรรมชาติชนิดอื่นๆ เพื่อศึกษาการพัฒนาความสมบูรณ์ของเซลล์สืบพันธุ์ เพื่อที่จะสามารถเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งในการกระตุ้นเซลล์สืบพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บรรณานุกรม


คีรี กออนันตกุล, ชวลิต วิทยานนท์, อภิชาติ เติมวิชชากร, ชัยศิริ ศิริกุล และ นิพนธ์ จันทร์ประทัด. 2546. **พรรณปลาในบึงบอระเพ็ด (ลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา).** กลุ่มวิจัยความหลาหลายทางชีวภาพสัตว์น้ำจืด. สำนักวิจัยและพัฒนาทรัพยากรประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 27.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ, ปวีณา กิจสวัสดิ์ และ สุปราณี ชินบุตร. 2530. **เนื้อเยื่อของปลาดุกด้าน.** คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 138 หน้า.

จงกล พรมยะ, บัญชา ทองมี และ ขจรเกียรติ ศรีนวลสม. 2555. "ผลของอาหารผสมสไปรูลิน่าต่อการเจริญเติบโต ความสมบูรณ์เพศ และระบบภูมิคุมกันในปลาแฟนซีคารฟ." วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง ปีที่ 6 ฉบับที่ 1 มกราคม-มิถุนายน. คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่.

เจนจิรา จิรัมย์ และ ประสงค์ สีหานาม. 2554. "อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ : แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา." หน้า 59-70. **วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์.**

จรัส สว่างทัพ. 2548. เอกสารประกอบคำสอนอาหารและการให้อาหารสัตว์ (Feed and Feeding). คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์.

ดาราวรรณ ยุทธยงค์, จูอะดี พงศ์มณีรัตน์ และ สนธิพันธุ์ ผาสุกดี. 2546. "ผลของแอสตาแซนทินในอาหารต่อสีปลากระแห." หน้า 45. ใน **การประชุมวิชาการประมงประจำปี 2546. กรุงเทพฯ** : กรมประมง.

ทิพย์วรรณ ปริพัฒนานนท์, จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, อัจฉริยา ไศละสูต และ นันทริกา ซันซื่อ. 2541. **"Effect of astaxanthin on pigmentation of goldfish."** รายงานผลงานวิจัย มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ประจำปี 2541. 16 หน้า.

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และ ณรงค์ กมลรัตน์. 2549. **การใช้สารแอสตาแซนทินเร่งสีในกลุ่มปลาออกลูกเป็นตัว.**เอกสารรายงานการวิจัยภาควิทยาศาสตร์การประมง, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ. 21 หน้า.

นฤมล อัศวเกศมณี. 2549. **อาหารและการให้อาหารปลา.** คณะเทคโนโลยีการเกษตร ม.ราชภัฏสงขลา.

ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์. 2548. **ไม้ตัดดอก.** บริษัท นาคา อินเตอร์มีเดีย จำกัด.

เพิ่มศักดิ์ ศิริวรรณ. 2533. **โภชนศาสตร์สัตว์ปีก.** เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

วันเพ็ญ มีนกาญจน์. 2528. **ปลาไทยในสถานแสดงพันธุ์ปลาน้ำจืด.** สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เกษตรกลางบางเขน กรุงเทพมหานคร. หน้า 39.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวียง เชื้อโพธิ์หัก. 2542. **โภชนศาสตร์สัตว์น้ำและการให้อาหารสัตว์น้ำ.** ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 255 หน้า.

วีระศักดิ์ สามี. 2548. แคโรทีนอยด์ : "โครงสร้างทางเคมีและกลไกที่มีผลต่อการทำหน้าที่ของร่างกาย." สาขาวิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. **Srinakharinwirot Journal of Pharmaceutical Science.** 10 (1) หน้า 58-66.

ศิวาพร ศิวเวช. 2546. **วัตถุเจือปนอาหาร.** นครปฐม : โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ.

สืบสิน สนธิรัตน. 2522. "การจัดทำเนียบทางอนุกรมวิธานของปลาในกลุ่มปลาทรงเครื่องในประเทศไทย." หน้า 493-496. ใน **การประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์และชีววิทยาแห่งชาติ ครั้งที่ 17 สาขาสัตว์ ณ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.** กรุงเทพฯ.

สมโภชน์ อัคคะทวีวัฒน์, สมพร ภูริพงษ์ และ กอบสิน ชื่นจำรูญ. 2540. **ภาพปลาและสัตว์ของไทย.**

สุจินต์ หนูขวัญ และ อรุณี รอดลอย. 2552. **100 ชนิดปลาสวยงามของไทย.** สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สุริญญา โพธิดิษฐศิริ. 2547. "การใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบ เปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันธรรมชาติในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตสาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุริยัน เสมา. 2546. เทคนิคการปรับปรุงคุณภาพปลาสวยงาม. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดปราจีนบุรี กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สุภาพร อิสริโยดม, ประทีป ราชแพทยาคม, ครวญ บัวคีรี และ วิไล สันติโสภาศรี. 2538. "การเสริมสารธรรมชาติบางชนิดในอาหารไก่ไข่." หน้า 34-38. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 33 สาขาสัตว์ สัตวแพทยศาสตร์.** กรุงเทพฯ.

อรพินท์ จินตสถาพร, บัณฑิต ยวงสร้อย, Stoner, G.R., ประเสริฐ สมิทธิวงศ์ และ Gabaudan, J. 2548. "ระดับเหมาะสมของคาโรทีนอยด์รวมต่อความเข้มข้นสีปลาคาร์ฟ (*Cyprinus carpio*)." ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 สาขาประมง.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โอภา วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจูง, จันทนา บุณยะรัตน์ และ มาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. 2549. **สารต้านอนุมูลอิสระ.** กรุงเทพฯ : พี.เอส.พริ้นท์. 200 หน้า.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ahmadi, M.R., Bazyar, A.A., Safi, S., Ytrestoyl, T. and Bjerkeng, B. 2006. "Effects of dietary astaxanthin supplementation on reproductive characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." **J. Appl. Ichtyol.** 22 : 388-394.

Buyukcapar, H.M., Yanar, M. and Yanar, Y. 2007. "Pigmentation of rainbow trout (*Oncorhychus mykiss*) with carotenoids from marigold flower (*Tagetes erecta*) and red pepper (*Capsicum annum*)." **Turk. J. Vet. Anim. Sci.** 31(1) : 7-12.

Cetkovic,G.S., Djilas, S.M., Canadanovic-Brunet, J.M. and Tumbas, V.T. 2004. "Antioxidant properties of marigold extracts." **Food Research International.** 37 : 643-650.

Choubert, G.; and T. Storebakken. 1989. "Dose response to astaxanthin andcanthaxanthin pigmentation of rainbow trout fed various dietary carotenoid concentrations." **Aquaculture** 81: 69-77.

Choubert, G., Blanc, J-M. and Poisson, H. 1998. "Effects of dietary keto-carotenoids (canthaxanthin and astaxanthin) on the reproductive performance of female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)." **Aquaculture Nutrition.** 4 : 249-254.

Christiansen, I. and Torrisen, O.J. 1997. "Effect dietary astaxanthin supplementation on fertilization and egg survival in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)." **Aquaculture.** 153 : 51-62.

Rodriguez-Amaya, D.B. 2001. **A guide to carotenoid analysis in food**. C.P. 6121, 13083-970 Campinas, SP.,Brazil.

Ezhil. J., Jeyanthi, C. and Narayanan, M. 2008. "Marigold as a carotenoid source on pigmentation and growth of red swordtail, *Xiphophorus helleri*." **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.** 8 : 99-102.

Fang, Y.Z., Yang, S. and Wu, G. 2002. "Free radicals, antioxidants and nutrition." **Nutrition.** 18 : 872-879.

Gong, Y., Liu, X., He, W.H., Xu, H.G., Yuan, F. and Gao, Y.X. 2012. "Investigation into the antioxidant activity and chemical composition of alcoholic extracts from defatted marigold (*Tagetes erecta* Linn.) residue." **Fitoterapia.** 83 : 481-489.

Humason, G.L. 1979. **Animal Tissue Techniques.** 4th. San Francisco : W H Freeman and Company.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kalinowski, C.T., Robaina, L.E., Fernandez-Palacios, H., Schuchardt, D. and Izquierdo, M.S. 2005. "Effect of different carotenoid sources and their dietary levels on red porgy (*Pagrus pagrus*) growth and skin colour." **Aquaculture.** 244 : 223-231.

Kiessling, A., Bakshish, D., Koppe, W. and Higgs, D. 2006. "Relationship between blood and muscle levels of astaxanthin in dorsal aorta cannulated Atlantic salmon." **Aquaculture.** 254 : 653-657.

Krinsky, N.I. and Johnson, E.J. 2005. "Carotenoid actions and their relation to health disease." **Molecular Aspects of Medicine.** 26 : 459-516.

Lewis, D.H., Bloor, S.J. and Schwin, K.E. 1998. "Flavonoid and carotenoid pigments in flower tissue of*Sandersonia aurantiaca* (Hook)." **Scientia Horticulture.** 72 : 179-192.

Mora, G.I., Arredondo-Figueroa, J.L., Ponce-Palafox, J.T., Barriga-Soca, I.A. and Vernon-Carter, J.E. 2006. "Comparison of red chilli (*Capsicum annuum*) oleoresin and astaxanthin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet pigmentation." **Aquaculture.** 258 : 487-495.

Nakano, T., Tomoaki, K., Sato, M. and Takeuchi, M. 1999. "Effects of astaxanthin rich red yeast (*Phaffia rhodozyma*) on oxidative stress in rainbow trout." **Archives of Biochemistry and Biophysics.** 1426 : 119-125.

Pokorny, Y.J. and Gordon, N.M. 2001. **Antioxidant in food practical applications.** USA : Woodhead Publishing Ltd.

Rehulka, J. 2000. "Influence of astaxanthin on growth rate, condition, and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*." **Aquaculture.** 190 : 27-47.

Rock, C.L. 1997. "Carotenoids : Biology and Treatment." **Phannacol. Ther.** 75(3) : 185-197.

Sawanboonchun, J., Roy, W.J., Robertson, D.A. and Gordon Bell, J. 2008. "The impact of dietary supplementation with astaxanthin on egg quality in Atlantic cod broodstock (*Gadus morhua*, L.)." **Aquaculture.** 283 : 97-101.

Van de salm, A.L., Martinez, M., Flik, G. and Bonga, S.E.W. 2004. "Effect of husbandary condition on the skin colour and sress response of red porgy *Pagrus pagrus*." **Aquaculture.** 241 : 371-386.

Wang, Y-J., Chien, Y-H. and Pan, C.H. 2006. "Effect of dietary supplementation of carotenoids on survival, growth, pigmentation and antioxidant capacity of characins, *Hyphessobrycon callistus*." **Aquaculture.** 261 : 641-648.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wathne, E., Bjerkeng, B., Storebakken, T., Vassvik, V. and Odland, A.B. 1998. "Pigmentation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed astaxanthin in all meals or in alternating meals." **Aquaculture.** 159 : 217-231.

Weber, L.P., Hill, R.L. and Janz, D.M. 2003. "Development estrogenic expose in zebrafish (Danio rerio):II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity." **Aquatic Toxicology.** 63 : 431-446.

Yanar, M., Ercen, Z., Hunt, A.O. and Buyukcapar, H.M. 2008. "The use of alfalfa, *Medicago sativa* as a natural carotenoid source in diets of goldfish, *Carassius auratus*." **Aquaculture.** 284 : 196-200.

Zhu, C., Bai, C., Sanahuja, G., Yuan, D., Farr, G., Nagvi, S., Shi, L., Capell, T. and Christou, P. 2010. "The regulation of carotenoid pigmentation in flowers." **Archives of Biochemistry and Biophysics.** 504 : 132-141.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก.
# การวิเคราะห์ปริมาณ Total carotenoid concentration ในดอกดาวรือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ก.การวิเคราะห์ Total Carotenoids Concentration ในดอกดาวเรือง**

การหาปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวมโดยวิธีดัดแปลงจาก Mora et al. (2006) ทำโดยชั่งผงดอกดาวเรือง 10 กรัม เติมสารสกัด 100 มิลลิลิตร ที่เตรียมจากปิโตรเลียมอีเทอร์ อะซีโตนและน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 15:75:10 และเติม butylated hydroxyanisole (BHA) หรือ butylated hydroxytoluene (BHT) 0.01% จากนั้นนำไปเขย่าเป็นเวลา 15 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนที่กรองได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 467-475 นาโนเมตร และใช้คิวเวตแก้วในการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นแบลงค์ (blank) และคำนวณปริมาณสารแคโรทีนอยด์จากผงดอกดาวเรือง เพื่อนำผลที่ได้ไปกำหนดระดับผงดอกดาวเรืองที่ใช้ผสมในอาหารต่อไป

การคำนวณ ที่ปริมาตร 100 ml.

E 1cm,1% = 1910

สารละลายแคโรทีนอยด์ ความเข้มข้น 1% จะวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 1910

วัดค่าดูดกลืนแสงได้ 1910 จะมีปริมาณสารละลายแคโรทีนอยด์ 1 ก./100 มล.

วัดค่าดูดกลืนแสงได้ (Abs ที่วัดได้) จะมีปริมาณสารละลายแคโรทีนอยด์

= ( Abs ที่วัดได้ X 1%)/1910 ก./มล.

สารสกัด 100 ml จะมีปริมาณของสารละลายแคโรทีนอยด์ = ( Abs ที่วัดได้ X 1)/1910 กรัม

วัดค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างเท่ากับ 0.6331 นำค่าการดูดลืนแสงไปแทนในสมการ จะได้

ในดอกดาวเรืองอบแห้ง 0.1 กรัม จะมีสารละลายแคโรทีนอยด์ ( A ที่วัดได้ X 1)/1910 ก.

ในดอกดาวเรืองอบแห้ง 100 กรัม จะมีสารละลายแคโรทีนอยด์ = 100*( A ที่วัดได้ X 1)/(1910*0.1)

= 100 X (0.6331 X 1)/(1910 X 0.1)ก.

= 0.03314 ก.

= 0.03314 X 1000 มก.

= 3.3314 มก./100 ก.น้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ข.

# วิธีการวิเคราะห์ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ในอาหารและในเนื้อปลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ข. 1 วิธีการวิเคราะห์ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ในอาหาร

เป็นวิธีการทดสอบการหืนของอาหารโดยการวัดค่ากรดไทโอบาร์บิวทูริก (thiobarbituric acid reactive substance : TBARS) ทำให้ทราบระดับการเกิดออกซิเดชันของไขมันในอาหาร โดยวัดความเข้มข้นของสีชมพูที่เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีของกรดไทโอบาร์บิวทูริกกับมัลลัลแอลดีไฮด์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ ขั้นที่ 2 ของปฏิกิริยา แสดงผลเป็นไมโครกรัมมัลลัลไดแอลดีไฮด์ (malondialdehyde : MDA) ต่อกิโลกรัมอาหาร

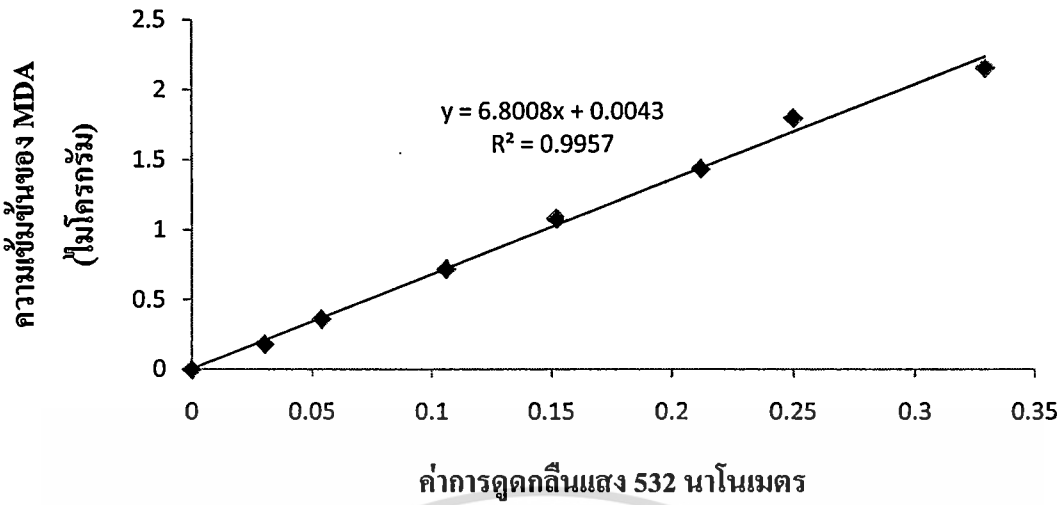
**การเตรียมสารเคมี**

1. TBA solution ละลายกรดไทโอบาร์บิวทูริก 1 กรัม ในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้นที่ปริมาตร100 มิลลิลิตร โดยอุ่นที่อุณหภูมิ (40-50 องศาเซลเซียส) แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น
2. HCl 4 โมล (331.13 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)
3. Butylated Hydroxytoluene (BHT) 0.2% ชั่ง BHT 0.2 กรัม ละลายในเอทานอล และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร
4. Potassium phosphate 50 mM ผสมสาร $K_2HPO_4.3H_2O$ 9.24 กรัม และ $KH_2PO_4$ 1.3 กรัม และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 7.4 ด้วย $KH_2PO_4$ 1 M
5. Stock MDA standard (100 µM) นำ Tetramethoxypropane (TMP) 17 ไมโครลิตร แล้วหยดด้วย HCl 5-8 หยด และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**วิธีการ**

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 10 กรัม นำไปบดให้ละเอียด ใส่ในหลอดสำหรับกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร
2. เติมสาร HCl 4 โมล จำนวน 1.25 มิลลิลิตร, เติม 50 mM potassium phosphate 9 มิลลิลิตร และเติม BHT 1 มิลลิลิตร แล้วต่อเข้ากับชุดกลั่น
3. กลั่นจนได้ของเหลว 50 มิลลิลิตร (ประมาณ 5 นาที หลังเดือด)
4. ใช้ปิเปตดูดของเหลวที่ได้จากการกลั่น 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีฝาปิดจำนวน 5 มิลลิลิตร และเติม TBA solution 5 มิลลิลิตร ปิดฝานำไปเขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มใน water bath อุณหภูมิ 95-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 นาที (เขย่าทุกๆ 5 นาที)
5. หลังครบ 35 นาที แล้วทำให้เย็นทันที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของมัลลัลไดแอลดีไฮด์ (malondialdehyde : MDA) ในอาหาร**

**ข. 2 วิธีการวิเคราะห์ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ในเนื้อปลา**

เป็นวิธีการทดสอบการหืนของเนื้อปลาโดยการวัดค่ากรดไทโอบาร์บิวทูริก (thiobarbituric acid reactive substance : TBARS) ทำให้ทราบระดับการเกิดออกซิเดชันในเนื้อปลา โดยวัดความเข้มข้นของสีชมพูที่เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีของกรดไทโอบาร์บิวทูริกกับมัลลัลแอลดีไฮด์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ ขั้นที่ 2 ของปฏิกิริยา แสดงผลเป็นไมโครกรัมมัลลัลไดแอลดีไฮด์ (malondialdehyde : MDA) ต่อกรัมเนื้อปลา

**การเตรียมสารเคมี**

1. TBA solution ละลายกรดไทโอบาร์บิวทูริก 1 กรัม ในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้นที่ปริมาตร100 มิลลิลิตร โดยอุ่นที่อุณหภูมิ (40-50 องศาเซลเซียส) แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น
2. HCl 4 โมล (331.13 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)
3. Butylated Hydroxytoluene (BHT) 0.2% ชั่ง BHT 0.2 กรัม ละลายในเอทานอล และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร
4. Potassium phosphate 50 mM ผสมสาร $K_2HPO_4.3H_2O$ 9.24 กรัม และ $KH_2PO_4$ 1.3 กรัม และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 7.4 ด้วย $KH_2PO_4$ 1 M
5. Stock MDA standard (100 μM) นำ Tetramethoxypropane (TMP) 17 ไมโครลิตร แล้วหยดด้วย HCl 5-8 หยด และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**วิธีการ**

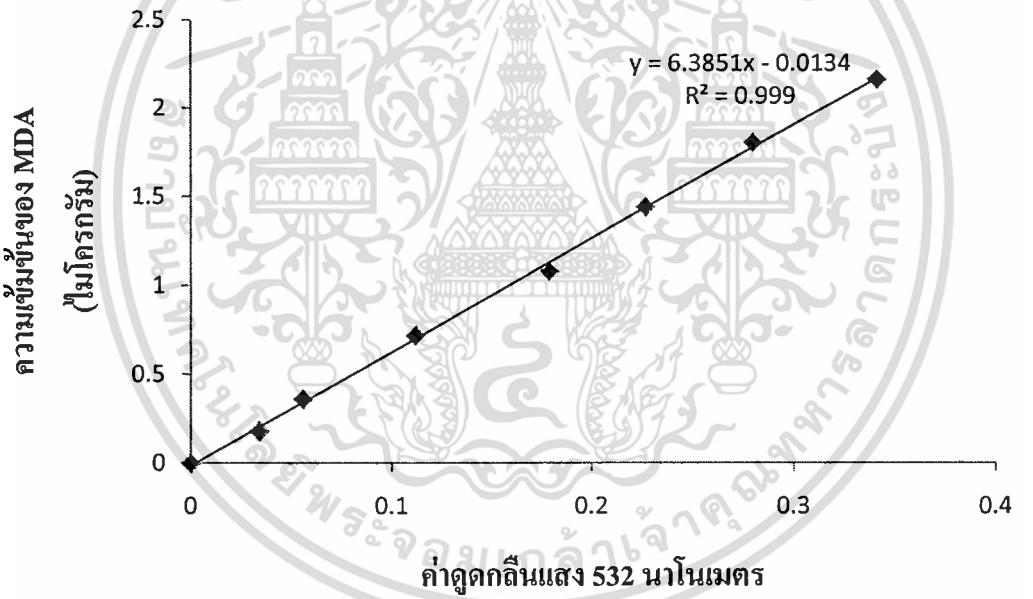
1. ชั่งตัวอย่างเนื้อปลา 10 กรัม นำไปปั่นให้ละเอียด ใส่ในหลอดสำหรับกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร

2. เติมสาร HCl 4 โมล จำนวน 1.25 มิลลิลิตร, เติม 50 mM potassium phosphate 9 มิลลิลิตร และเติม BHT 1 มิลลิลิตร แล้วต่อเข้ากับชุดกลั่น

3. กลั่นจนได้ของเหลว 50 มิลลิลิตร (ประมาณ 5 นาที หลังเดือด)

4. ใช้ปิเปตดูดของเหลวที่ได้จากการกลั่น 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีฝาปิดจำนวน 5 มิลลิลิตร และเติม TBA solution 5 มิลลิลิตร ปิดฝานำไปเขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มใน water bath อุณหภูมิ 95-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 นาที (เขย่าทุกๆ 5 นาที)

5. หลังครบ 35 นาที แล้วทำให้เย็นทันที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร




**ภาพที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของมัลลัลไดแอลดีไฮด์ (malondialdehyde : MDA) ในเนื้อปลา**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ค.
# ขั้นตอนการทำเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ค.1 สารเคมีที่ใช้แช่ตัวอย่าง

### ค.1.1 สารเคมีดองตัวอย่าง (10% buffer formalin)

| | | |
|---|---|---|
| 1. 37-40% formalin | 100 | มิลลิลิตร |
| 2. sodium phosphate, monobasic | 4 | กรัม |
| 3. sodium phosphate, dibasic | 6.5 | กรัม |
| 4. น้ำกลั่น | 900 | มิลลิลิตร |

ผสมเข้าด้วยกัน

### ค.1.2 สารเคมีย่อยกระดูก (decalcification soloution)

| | | |
|---|---|---|
| 1. $AlCl_3$ | 7 | กรัม |
| หรือ $AlCl_3.6H_2O$ | 12.67 | กรัม |
| 2. HCl | 8 | มิลลิลิตร |
| 3. formic acid | 5 | มิลลิลิตร |
| 4. น้ำกลั่น | 87 | มิลลิลิตร |

ผสมเข้าด้วยกันโดยนำ $AlCl_3$ ละลายในน้ำกลั่น หลังจากนั้นจึงเทกรดผสมลงไป

### ค.1.3 น้ำยาปรับสภาพความเป็นกรดเป็นด่างของเนื้อเยื่อ

1. 5% $Na_2SO_4$

## ค.2 ขั้นตอนการทำสไลด์เนื้อเยื่อ

### ค.2.1 การดองตัวอย่าง (fixation)

1. นำตัวอย่างปลาทรงเครื่องมาดองด้วย 10% formalin ในปริมาตร 15-20 เท่าของตัวอย่าง ดองนาน 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาแต่งให้มีขนาดเล็กลงใส่ใน cassette ที่เขียนชื่อกำกับไว้ ล้างผ่านน้ำไหลนานประมาณ 10 นาที แล้วจึงนำไปทำกระบวนการต่อไป

### ค.2.2 การขจัดน้ำและการแทรกพาราฟินภายในเนื้อเยื่อ

นำ cassette เนื้อเยื่อมาล้างโดยให้น้ำไหลผ่านช้าๆนาน 1-3 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างผ่านขั้นตอนการขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อ โดยใช้เครื่อง automatic tissue processor ดังต่อไปนี้

1. แช่ตัวอย่างใน 50% แอลกอฮอล์ นาน 0.5-1 ชั่วโมง
2. แช่ตัวอย่างใน 70% แอลกอฮอล์ นาน 0.5-1 ชั่วโมง
3. แช่ตัวอย่างใน 95% แอลกอฮอล์ I นาน 0.5-1 ชั่วโมง
4. แช่ตัวอย่างใน 95% แอลกอฮอล์ II นาน 0.5-1 ชั่วโมง
5. แช่ตัวอย่างใน 95% แอลกอฮอล์ III นาน 0.5-1 ชั่วโมง
6. แช่ตัวอย่างใน 100% แอลกอฮอล์ I นาน 0.5-1 ชั่วโมง
7. แช่ตัวอย่างใน 100% แอลกอฮอล์ II นาน 0.5-1 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. แช่ตัวอย่างใน 100% แอลกอฮอล์ III นาน 0.5-1 ชั่วโมง
9. แช่ตัวอย่างใน chloroform I นาน 1 ชั่วโมง
10. แช่ตัวอย่างใน chloroform II นาน 1 ชั่วโมง
11. แช่ตัวอย่างใน melted paraffin I นาน 1-1.5 ชั่วโมง
12. แช่ตัวอย่างใน melted paraffin II นาน 2 ชั่วโมง

**ค.3.3 การ embedding**

เลือก mold สแตนเลส ที่มีขนาดเหมาะสมกับตัวอย่างมาเติมพาราฟิน นำตัวอย่างออกจาก cassette ใส่ลงไปใน mold และปิดทับด้วย cassette เติมพาราฟินอีกเล็กน้อย แล้วนำไปแช่ตู้เย็นให้แข็งและแกะออกมาแต่ง block ให้มีขนาดที่เหมาะสมกับการตัด แล้วจึงนำตัวอย่างไปแช่เย็น

**ค.3.4 การตัดเนื้อเยื่อ**

นำ block ตัวอย่างที่แช่แข็งแล้วมาตัดด้วยเครื่องมือที่เรียกว่า microtome ที่ความหนาประมาณ 5-6 ไมครอน ลอยตัวอย่างในน้ำที่มีอุณหภูมิ 45-50 °C ใช้ slide ที่สะอาดช้อนเอาตัวอย่างที่สมบูรณ์ขึ้นมา ใช้ดินสอทำเครื่องหมายไว้ และนำไปวางไว้บนเครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer) อุณหภูมิ 45-50 °C นาน 1 วัน แล้วนำไปย้อมสีต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ง.
# สีย้อมเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ง.1 สีย้อมเนื้อเยื่อ

ง.1.1 การเตรียม Eosin (1% Eosin acqueous solution 1000 ml (Stock))

| | | |
|---|---|---|
| 1. Eosin 1% Y acqueous solution stock | 50 | มิลลิลิตร |
| 2. glacial acetic acid | 1 | มิลลิลิตร |
| 3. 95% alcohol | 120 | มิลลิลิตร |
| 4. น้ำกลั่น | 30 | มิลลิลิตร |

ผสมเข้าด้วยกัน และควรเตรียมก่อนใช้งาน 2-3 วัน

ง.1.2 haematoxylin (ใช้ haematoxylin สำเร็จรูป)

## ง.2 ขั้นตอนการย้อมสี Haematoxylin & Eosin

1. xylene I นาน 3-5 นาที
2. xylene II นาน 3-5 นาที
3. absolute alcohol I นาน 2 นาที
4. absolute alcohol II นาน 2 นาที
5. 95% แอลกอฮอล์ นาน 1-2 นาที
6. 70% แอลกอฮอล์ นาน 1-2 นาที
7. ล้างผ่านน้ำไหล 3-5 นาที
8. haematoxylin staining นาน 1-5 นาที
9. ล้างผ่านน้ำไหล 3-5 นาที
10. ล้างสีน้ำเงินของ haematoxylin ด้วยน้ำที่หยดแอมโมเนีย นาน 3-5 นาที
11. ล้างผ่านน้ำไหล 3-5 นาที
12. 70% แอลกอฮอล์ นาน 1-2 นาที
13. 95% แอลกอฮอล์ นาน 1-2 นาที
14. eosin (95% แอลกอฮอล์) นาน 1-3 นาที
15. absolute alcohol I นาน 2 นาที
16. absolute alcohol II นาน 2 นาที
17. absolute alcohol III นาน 2 นาที
18. xylene I นาน 2-3 นาที
19. xylene II นาน 2-3 นาที
20. xylene III นาน 2-3 นาที
21. ทำสไลด์ถาวร ด้วยน้ำยา permount

ผล : นิวเคลียส ติดสีน้ำเงิน และไซโตพลาสซึม ติดสีชมพูถึงแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ประวัติผู้เขียน

| | |
|---|---|
| ชื่อ-นามสกุล | นางสาวหทัยรัตน์ ญาณฤทธิ์ |
| วัน เดือน ปีเกิด | 21 มีนาคม 2530 ที่จังหวัดนนทบุรี |
| ที่อยู่ | 126/276 ซ.ติวานนท์ 14 ต.ตลาดขวัญ อ.เมือง จ.นนทบุรี 11000 |
| ประวัติการศึกษา | 2551 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้