การศึกษารูปแบบและความเข้มข้นที่เหมาะสมของวิตามินซีที่ใช้ในอาหารปลากดเหลือง (*Mystus nemurus* Cuv. & Val.)

Studies on Forms and Optimum Concentration of Vitamin C in Diets for Green Catfish (*Mystus nemurus* Cuv. & Val.)

สุภฎา คีรีรัฐนิคม

Suphada Kiriratnikom

หอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วิทยาเขตหาดใหญ่
ได้รับเมื่อ
19 ต.ค. 2543

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Aquatic Science

Prince of Songkla University

2541

เลขหมู่ QL639 .S74 2541 ส.2
Order Key 28932
BIB ID 149163
19 ต.ค. 2543

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษารูปแบบและความเข้มข้นที่เหมาะสมของวิตามินซีที่ใช้ในอาหารปลากดเหลือง (*Mystus nemurus* Cuv. & Val.)
ผู้เขียน	นายสุภฎา คีรีรัฐนิคม
สาขาวิชา	วาริชศาสตร์

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วุฒิพร พรหมขุนทอง)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. กิจการ ศุภมาตย์)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วุฒิพร พรหมขุนทอง)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. กิจการ ศุภมาตย์)

..... กรรมการ
(ดร. วิไลวรรณ เจริญคุณานนท์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประภาพร อุทารพันธุ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ก้าน จันทร์พรหมมา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษารูปแบบและความเข้มข้นที่เหมาะสมของวิตามินซีที่ใช้ในอาหารปลากดเหลือง (*Mystus nemurus* Cuv. & Val.)

ผู้เขียน นายสุภฎา ดีรีรัฐนิคม

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

ปีการศึกษา 2541

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้แบ่งเป็น 2 การทดลอง การทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาถึงผลของวิตามินซีรูปแบบต่างๆ ที่มีต่อปลากดเหลือง โดยทดลองเลี้ยงปลากดเหลืองขนาดปลานิ้ว (มีน้ำหนักเฉลี่ย 0.60-0.62 กรัม) ด้วยอาหารบริสุทธิ์ ซึ่งเสริมวิตามินซีรูปแบบต่างๆ ได้แก่ แอล-แอสคอบิค แอสิด (AsA), แอสคอบิล-2-ซัลเฟต (AS), แอสคอบิล-2-โพลีฟอสเฟต (APP), แอสคอบิล-2-โมโนฟอสเฟต-แมกนีเซียม (AMP), วิตามินซีเคลือบไขมัน (OC) และวิตามินซีเคลือบซิลิโคน (ScA) โดยเสริมวิตามินซีทุกรูปแบบให้มีเนื้อวิตามินซี 500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จากการทดลองพบว่า ปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีแสดงอาการขาดวิตามินซีหลังเลี้ยงไปได้ 4 สัปดาห์ ในขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีรูปแบบต่างๆไม่แสดงอาการขาดวิตามินซี หลังจากสัปดาห์ที่ 10 พบว่า น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตรารอดตายของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP และ AsA สูงที่สุด อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิของปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีรูปแบบต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีมีค่าเหล่านี้ต่ำที่สุดและแตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ จากการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้า รวมทั้งการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของเนื้อเยื่อเหงือก ตับ และไต เป็นสิ่งยืนยันถึงสภาวะการขาดวิตามินซีในปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินชนิดนี้ ปริมาณคอลลาเจนในกระดูกสันหลังของปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีรูปแบบต่างๆ มีค่าไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีมีปริมาณคอลลาเจนในกระดูกสันหลังต่ำและแตกต่างจากปลาในชุดการทดลองอื่นๆ ปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนในคอลลาเจนของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AsA และ AMP มีค่าสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ และมีค่าต่ำในปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า AMP เป็นแหล่งของวิตามินซีที่ดี สามารถช่วยเร่งการเจริญเติบโต อีกทั้ง

ยังป้องกันการขาดวิตามินซีในปลากดเหลืองได้ การทดลองที่ 2 ทำการทดลองเลี้ยงปลากดเหลืองขนาดปลานิ้ว (มีน้ำหนักเฉลี่ย 1.17-1.18 กรัม) ด้วยอาหารบริสุทธิ์ ซึ่งเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 15, 45, 100, 200 และ 500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (เสริม AMP 32.61, 97.83, 217.39, 434.78 และ 1,086.96 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) จากการทดลองพบว่า ปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP มีการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ อัตรารอดตายและการใช้อาหารอยู่ในเกณฑ์ดี ปริมาณวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าของปลามีค่าเพิ่มสูงขึ้นตามระดับ AMP ที่เสริมลงในอาหารโดยตรง ปริมาณคอลลาเจนในกระดูกสันหลังของปลามีค่าไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ขณะที่มีค่าต่ำที่สุดในปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP ปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนในคอลลาเจนไม่มีความแตกต่างกันระหว่างปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 45-500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (อาหารสูตรที่ 3-6) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP หรือเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 15 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (อาหารสูตรที่ 1 หรือ 2) มีค่าดังกล่าวต่ำกว่า จากการทดลองนี้พบความผิดปกติเนื่องจากการขาดวิตามินซีที่แสดงออกภายนอก และความผิดปกติทางเนื้อเยื่อวิทยาในส่วนเนื้อเยื่อเหงือก ตับ และไตของปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP หรือเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 15 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จึงสรุปได้ว่าควรเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 45 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เพื่อให้ปลากดเหลืองมีการเจริญเติบโตสูงสุดและป้องกันอาการขาดวิตามินซีที่แสดงออกภายนอกและในระดับเนื้อเยื่อได้

Thesis Title	**Studies on Forms and Optimum Concentration of Vitamin C in Diets for Green Catfish (*Mystus nemurus* Cuv. & Val.)**
Author	**Mr. Suphada Kiriratnikom**
Major Program	**Aquatic Science**
Academic Year	**1998**

Abstract

The present study is divided into two chapters. Chapter 1 describes the effects of various forms of vitamin C supplementation in diets for green catfish. Green catfish (0.60 - 0.62 g average intitial weight) were fed purified diets containing 500 mg/kg of ascorbic acid equivalent, supplied either as L-ascorbic acid (AsA), ascorbyl-2-sulfate (AS), ascorbyl-2-polyphosphate (APP), ascorbyl-2-monophosphate-magnesium (AMP), fat-coated vitamin C (OC) or silicone-coated vitamin C (ScA). Fish fed the ascorbate-free (basal) diet exhibited external signs of scurvy at 4 weeks, whereas such signs were not observed in fish fed other diets. After 10 weeks, weight gain and survival rates were highest in fish fed AMP and AsA. Feed conversion and protein efficiency ratios and apparent net protein utilization showed no significant differences among fish fed various forms of ascorbic acid-supplemented diets, and these values were significantly higher than in fish fed the ascorbate-free diet. Ascorbate concentrations in liver and head kidney and histopathology of gill, liver and kidney confirmed that fish fed the ascorbate-free diet were scorbutic. Vertebral collagen content was not significantly different among treatments using the various vitamin C forms. However, there was reduced vertebral collagen content, a sensitive indicator of vitamin C deficiency, in fish fed the ascorbate-free diet. Hydroxyproline content of vertebral collagen in fish fed AsA and AMP was higher than in fish receiving other treatments, and this value also was lower in fish fed the ascorbate-free diet. The study indicates that AMP has equimolar activity to AsA as an ascorbic acid source in promoting growth and preventing scurvy in green catfish.

Chapter 2 describes a study in which green catfish fingerlings (1.17-1.18 g average intitial weight) were fed purified diets supplemented with 15, 45, 100, 200 and 500 mg/kg of AsA molar equivalent, in the form of AMP (at 32.61, 97.83, 217.39, 434.78 and 1,086.96 mg/kg of AMP respectively). Once again, AMP-supplemented diets gave better growth, feed conversion rates, survival rates and feed utilization than those without such supplementation. Ascorbate concentrations in liver and head kidney were closely correlated with dietary AMP levels. Vertebral collagen contents were not significantly different among groups fed AMP-supplemented diets, and were lowest in fish fed without AMP supplementation. Hydroxyproline in vertebral collagen was not significantly different among fish fed diets supplemented with AMP in equimolar amounts of 45-500 mg AsA/kg (diets 3-6), but significantly higher than in fish receiving 15 mg AsA/kg or zero AMP supplementation (diets 2 and 1 respectively). External scorbutic symptoms and histopathological symptoms of gills, liver and kidney were observed in fish fed diets either lacking AMP or supplemented with AMP at 15 mg AsA/kg. The study indicates that 45 mg/kg of AsA molar equivalent supplied as AMP (97.83 mg AMP/kg) gave maximun growth and avoided gross and histological signs of vitamin C deficiency.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วุฒิพร พรหมขุนทอง ประธานกรรมการที่ปรึกษา ซึ่งให้โอกาสข้าพเจ้าในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ ที่สำคัญที่สุดยังให้ความกรุณาอย่างสูง ทั้งให้คำแนะนำ และปรึกษาในระหว่างการค้นคว้าวิจัย และการเขียนวิทยานิพนธ์ตลอดจนให้ความห่วงใย และเป็นกำลังใจที่สำคัญของข้าพเจ้าในการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงลงได้ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กิจการ ศุภมาตย์ กรรมการที่ปรึกษา ซึ่งนอกจากให้ความกรุณาแนะนำ และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ ยังให้ความกรุณาเอื้อเฟื้ออุปกรณ์สำหรับการวิจัยให้สำเร็จลุล่วงลงได้ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ จินตมาศ สุวรรณจรัส ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุติมา ตันติกิตติ และคณาจารย์ภาควิชาวาริชศาสตร์ทุกท่าน ซึ่งให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์แก่ข้าพเจ้าตลอดมา

ขอขอบพระคุณ ดร. วิไลวรรณ เจริญคุณานนท์ กรรมการผู้แทนภาควิชาวาริชศาสตร์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ประภาพร อุทารพันธุ์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำ และปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ ซึ่งได้ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ และเครื่องมือสำหรับการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ. ธีรสาสน์ คีรีรัฐนิคม และนาวาอากาศโท เจษฎา คีรีรัฐนิคม ซึ่งแนะนำประสบการณ์ในการทำวิจัย และให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้ามาโดยตลอด ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาวาริชศาสตร์ ซึ่งช่วยอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้ และยังเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้าได้เป็นอย่างดี ขอขอบคุณ คุณเทวีทรัพย์ ศรีนาค ซึ่งช่วยเหลือในด้านต่างๆ ตลอดจนตรวจทานต้นฉบับวิทยานิพนธ์ อีกทั้ง คุณรังสัญ รักกมล ซึ่งให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้าตลอดมา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สถานีประมงน้ำจืด กิ่งอำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา ซึ่งให้ความอนุเคราะห์พันธุ์ปลา ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยซึ่งให้ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนนักศึกษาปริญญาโท และปริญญาตรี ภาควิชาวาริชศาสตร์ ทุกท่านที่ช่วยเป็นกำลังใจตลอดมา คุณประโยชน์อันเกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ข้าพเจ้าขอมอบแด่บิดา มารดา คณาจารย์ผู้มีพระคุณ และประเทศชาติต่อไป

สุภฎา คีรีรัฐนิคม

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... (3)

Abstract ..... (5)

กิตติกรรมประกาศ ..... (7)

สารบาญ ..... (8)

รายการตาราง ..... (11)

รายการภาพ ..... (14)

ตัวย่อและสัญลักษณ์ ..... (16)

บทที่

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง 1

การตรวจเอกสาร 2

1. ปลากดเหลือง 2
2. ความสำคัญของวิตามินซี 4
3. ผลของวิตามินซีที่มีต่อปลา 8
4. ปฏิกิริยาการเสียสภาพและรูปแบบของวิตามินซีในอาหารปลา 16
5. ประสิทธิภาพของวิตามินซีรูปแบบต่างๆ และระดับความต้องการของปลา 20

วัตถุประสงค์ 30

2. วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ 31

วัสดุ 31

อุปกรณ์ 32

วิธีการ 34

1. การทดลองที่ 1 34
2. การทดลองที่ 2 43

สารบาญ (ต่อ)

หน้า

3. ผลการทดลอง 44

1. ผลการทดลองที่ 1 44

1.1 ความผิดปกติ และพฤติกรรมเนื่องจากการขาดวิตามินซี ของปลากดเหลือง 44

1.2 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ และอัตราการรอดตายของปลากดเหลือง 47

1.3 ปริมาณวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้า 54

1.4 ปริมาณคอลลาเจนและไฮดรอกซีโปรลีน 56

1.5 องค์ประกอบทางเคมีของร่างกายปลา 58

1.6 การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา 60

2. ผลการทดลองที่ 2 66

2.1 ความผิดปกติ และพฤติกรรมเนื่องจากการขาดวิตามินซี ของปลากดเหลือง 66

2.2 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ และอัตราการรอดตายของปลากดเหลือง 67

2.3 ปริมาณวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้า 75

2.4 ปริมาณคอลลาเจนและไฮดรอกซีโปรลีน 75

2.5 องค์ประกอบทางเคมีของร่างกายปลา 78

2.6 การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา 80

4. วิจารณ์ผลการทดลอง 86

1. วิจารณ์ผลการทดลองที่ 1 86

2. วิจารณ์ผลการทดลองที่ 2 90

5. สรุปผลการทดลอง 94

สารบาญ (ต่อ)

	หน้า
เอกสารอ้างอิง	95
ภาคผนวก	106
ก. วิธีการวิเคราะห์	106
ข. ตารางผลการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดลองที่ 1	123
ค. ตารางผลการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดลองที่ 2	127
ง. ค่าเฉลี่ยคุณภาพน้ำระหว่างช่วงการทดลอง	131
ประวัติผู้เขียน	134

รายการตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ผลการขาดวิตามินซีที่แสดงออกในปลาชนิดต่างๆ..... 10
2. ปริมาณที่เหลือ (%) ของวิตามินซีบางรูปแบบระหว่างกระบวนการผลิตอาหาร..... 19
3. ปริมาณที่เหลือ (%) ของวิตามินซีบางรูปแบบภายหลังกระบวนการผลิตอาหาร..... 19
4. ระดับความต้องการวิตามินซีของปลาแต่ละชนิด..... 28
5. ชนิดและปริมาณวัสดุอาหารสูตรพื้นฐาน..... 36
6. ปริมาณเนื้อของวิตามินซีรูปแบบต่างๆ ที่ใช้ผสมในอาหารสำหรับการทดลองที่ 1.. 37
7. ชนิดและปริมาณแร่ธาตุรวมที่ใช้ในอาหารทดลองสูตรพื้นฐาน..... 38
8. ชนิดและปริมาณวิตามินรวมที่ใช้ในอาหารทดลองสูตรพื้นฐาน..... 39
9. ปริมาณ AMP ที่ใช้ในอาหารทดลองแต่ละสูตร..... 43
10. น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) ของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซี รูปแบบต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์..... 49
11. น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ และอัตราการรอดตายของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีรูปแบบต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 51
12. อัตราการรอดตาย (%) ของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซี รูปแบบต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 52
13. ปริมาณวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าของปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซี รูปแบบต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 55
14. ปริมาณคอลลาเจน และไฮดรอกซีโปรลีนของปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซี รูปแบบต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 57
15. องค์ประกอบทางเคมีของร่างกายปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซี รูปแบบต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 59

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

16. น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) ของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริม AMP ระดับต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 70

17. น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ และอัตราการรอดตายของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริม AMP ระดับต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 72

18. อัตราการรอดตาย (%) ของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริม AMP ระดับต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 73

19. ปริมาณวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ระดับต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 76

20. ปริมาณคอลลาเจน และไฮดรอกซีโปรลีนของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ระดับต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 77

21. องค์ประกอบทางเคมีของร่างกายปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ระดับต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 79

ตารางผนวกที่ หน้า

ข 1 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%) ของปลากดเหลืองในการทดลองที่ 1 ทุกช่วง 2 สัปดาห์ 124

ข 2 ค่าเฉลี่ย FCR ของปลากดเหลืองในการทดลองที่ 1 ทุกช่วง 2 สัปดาห์ 125

ข 3 น้ำหนักอาหาร (กรัม) ที่ใช้เลี้ยงปลากดเหลืองในการทดลองที่ 1 ตลอดระยะเวลา 10 สัปดาห์ 126

ค 1 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%) ของปลากดเหลืองในการทดลองที่ 2 ทุกช่วง 2 สัปดาห์ 128

ค 2 ค่าเฉลี่ย FCR ของปลากดเหลืองในการทดลองที่ 2 ทุกช่วง 2 สัปดาห์ 129

ค 3 น้ำหนักอาหาร (กรัม) ที่ใช้เลี้ยงปลากดเหลืองในการทดลองที่ 1 ตลอดระยะเวลา 10 สัปดาห์ 130

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ง 1 ค่าเฉลี่ยคุณภาพน้ำทุกช่วง 2 สัปดาห์ ของการทดลองที่ 1	132
ง 2 ค่าเฉลี่ยคุณภาพน้ำทุกช่วง 2 สัปดาห์ ของการทดลองที่ 2	133

รายการภาพ

ภาพที่ หน้า

1. ปฏิกิริยาการสังเคราะห์วิตามินซีในร่างกายของสัตว์ 4
2. ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน (oxidation-reduction) ของวิตามินซี 5
3. วิตามินซีทำหน้าที่ในการสร้างคอลลาเจน 5
4. ปฏิกิริยาการเสียสภาพของวิตามินซี 17
5. ตำแหน่งในโครงสร้างของ AsA ที่ใช้ดัดแปลงสร้างเป็นวิตามินซีอนุพันธ์ 18
6. ลักษณะกระพุ้งแก้มกางออกมากกว่าปกติ และระยางค์สึกกร่อนของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี 45
7. ลักษณะขากรรไกรล่างหดสั้นของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี .. 45
8. เปรียบเทียบลักษณะของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีกับปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซี 46
9. น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) ต่อตัวของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีรูปแบบต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 50
10. อัตราการรอดตาย (%) ของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีรูปแบบต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 53
11. เนื้อเยื่อเหงือกปกติของปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซี 61
12. การแยกตัวของเซลล์บุผิวของ secondary lamellae ในปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี 61
13. เซลล์บุผิวของ secondary lamellae มีการเพิ่มจำนวนมากผิดปกติในปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี 62
14. เซลล์บุผิวของ secondary lamellae มีการโป่งบวม ในปลาที่ได้รับอาหารเสริม AS และ APP 62
15. เนื้อเยื่อตับปกติของปลาที่ได้รับวิตามินซีรูปแบบต่างๆ 63
16. การเกิดช่องว่างในเนื้อเยื่อตับของปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี 63
17. เนื้อเยื่อไตปกติของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AsA, APP, AMP, OC และ ScA 64

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

18. เซลล์บุผิวท่อไตเกิดการเสื่อมสภาพ สังเกตพบนิวเคลียสของเซลล์เริ่มตาย ในปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี 64
19. renal corpuscle เกิดการเสื่อมสภาพในปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี 65
20. เซลล์บุผิวของท่อไตเกิดการเสื่อมสภาพในปลาที่ได้รับอาหารเสริม AS 65
21. น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) ต่อตัวของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริม AMP ระดับต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 71
22. อัตราการรอดตาย (%) ของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริม AMP ระดับต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 74
23. ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกปกติของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP 81
24. เซลล์บุผิวของ primary lamellae เกิดการแบ่งตัวมากผิดปกติในปลา ที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP 81
25. เซลล์บุผิวของ secondary lamellae มีการโป่งบวมในปลาที่ได้รับอาหาร ไม่เสริม AMP 82
26. ลักษณะเนื้อเยื่อตับปกติของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มี เนื้อวิตามินซี 45 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม 82
27. การเกิดช่องว่างในเนื้อเยื่อตับของปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP 83
28. การเกิดช่องว่างในเนื้อเยื่อตับของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มี เนื้อวิตามินซี 15 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม 83
29. ลักษณะเนื้อเยื่อตับปกติของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มี เนื้อวิตามินซี 45 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม 84
30. การเสื่อมสลายของท่อไต (tubule degeneration) ในปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP 84
31. การบวมตัวของเซลล์บุผิว renal tubule ในปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ใน ปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 15 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม 85
32. fibrosis ในส่วน parietal epithelium ของ Bowman' s capsule ในปลาที่ได้รับ อาหารไม่เสริม AMP 85

ตัวย่อและสัญลักษณ์

AsA	=	L-ascorbic acid
ANPU	=	Apparent net protein utilization
AMP	=	Ascorbyl-2-monophosphate magnesium
AMP-Na	=	Ascorbyl-2-monophosphate sodium
AP	=	Ascorbyl-2-palmitate
APP	=	Ascorbyl-2-polyphosphate
AS	=	Ascorbyl-2-sulfate
b	=	Renal tubule
c	=	Glomerulus
EcA	=	Ethyl cellulose coated ascorbic acid
F	=	Fibrosis
FCR	=	Feed conversion rate
GCA	=	Glyceride coated ascorbic acid
H	=	Hyperplasia
kg	=	Kilogram
K_m	=	Michaelis constant
mg	=	Milligram
OC	=	Oil coated ascorbic acid
p	=	Parietal epithelium of Bowman' s capsule
PcA	=	Polymer coated ascorbic acid
PER	=	Protein efficiency ratio
PL	=	Primary lamellar
RER	=	Rough endoplasmic reticulum
ScA	=	Silicone coated ascorbic acid
SL	=	Secondary lamellar
v	=	Vacuoles

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนับเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารเพื่อสนองต่อความต้องการของประชากรโลกที่เพิ่มสูงขึ้น ดังเห็นได้จากปริมาณผลผลิตสัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มสูงขึ้นในแต่ละปี ผลผลิตจากการเลี้ยงปลาจัดเป็นส่วนสำคัญของผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั้งหมด (De Silva and Anderson, 1995) ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาแบบหนาแน่น (intensive system) ต้นทุนหลักมาจากค่าอาหารเกือบครึ่งหนึ่งของการลงทุนทั้งหมด การใช้อาหารที่มีสารอาหารเหมาะสมต่อความต้องการของปลาจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเลี้ยง และยังทำกำไรกับผู้เลี้ยงได้เพิ่มขึ้น (Boonyaratpalin, 1991)

วิตามินจัดเป็นสารอาหารที่ปลามีความต้องการในปริมาณน้อยมาก แต่จัดว่ามีความสำคัญสูง ปลาต้องได้รับในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อส่งผลให้มีสุขภาพสมบูรณ์เป็นปกติ วิตามินซีเป็นวิตามินละลายน้ำที่มีความสำคัญต่อปลา โดยปลาต้องการวิตามินซีในปริมาณค่อนข้างสูงเพื่อให้มีสุขภาพสมบูรณ์เป็นปกติ (Halver, 1989) แอล-แอสคอบิค แอสิด (L-ascorbic acid, AsA) เป็นวิตามินซีรูปแบบที่นิยมใช้ในอาหารสัตว์น้ำทั่วไป สามารถเกิดปฏิกิริยาเสื่อมสภาพได้ง่าย และละลายสูญเสียในน้ำระหว่างการให้อาหารสัตว์น้ำได้มาก (Soliman *et al.*, 1987; Khajarern and Khajarern, 1990a; Shiau and Hsu, 1994) จึงต้องมีการชดเชยการสูญเสีย โดยต้องเติมวิตามินซีลงในอาหารมากกว่าความต้องการของสัตว์น้ำ 4-5 เท่า (Tucker and Halver, 1986) ทำให้ต้องสูญเสียค่าใช้จ่ายมากขึ้น (Grant *et al.*, 1989) ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการศึกษาและพัฒนารูปแบบของวิตามินซีที่ใช้เสริมในอาหารสัตว์น้ำ โดยดัดแปลง AsA ให้อยู่ในสภาพที่มีความคงทนต่อการสูญเสียมากขึ้น ได้แก่วิตามินซีอนุพันธ์ (vitamin C derivative) และวิตามินซีเคลือบ (coated vitamin C) (Tucker and Halver, 1986) วิตามินซีดัดแปลงเหล่านี้มีคุณสมบัติแตกต่างกันทั้งในด้านประสิทธิภาพการนำไปใช้ (bioavailability) ในร่างกายของสัตว์น้ำ หรือการออกฤทธิ์ของวิตามินซี (Soliman *et al.*, 1986a; Dabrowski and Kock, 1989; El Naggar and Lovell, 1991; Shiau and Hsu, 1995) ตลอดจนความคงสภาพและราคาที่ต่างกัน (Soliman *et al.*, 1987; Skelbaek *et al.*, 1990;

Igarashi, 1994) จึงมีความจำเป็นต้องทำการศึกษาถึงรูปแบบของวิตามินซีที่มีความเหมาะสมตลอดจนระดับที่เพียงพอต่อความต้องการของสัตว์น้ำเพื่อส่งผลให้ประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสูงสุด (Chavez de Matinez, 1990)

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการตรวจสอบรูปแบบของวิตามินซี ชนิดเคลือบและอนุพันธ์เพื่อหารูปแบบที่มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในอาหารปลากดเหลือง ซึ่งเป็นปลาเศรษฐกิจที่มีราคาสูงและกำลังเป็นที่นิยมของตลาดทั้งในและต่างประเทศ (Khan *et al.*, 1990) จากนั้นจึงศึกษาหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของวิตามินซีรูปแบบนั้น ข้อมูลที่ได้รับจากการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ปริมาณวิตามินซีในเนื้อเยื่อตับและไตส่วนหน้า ปริมาณคอลลาเจน (collagen) และไฮดรอกซีโปรลีน (hydroxyproline) จากกระดูกสันหลัง ตลอดจนองค์ประกอบร่างกาย และเนื้อเยื่อวิทยาเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่ยืนยันถึงประสิทธิภาพของวิตามินซีรูปแบบนั้นๆ ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

การตรวจเอกสาร

1. ปลากดเหลือง

อนุกรมวิธานของปลากดเหลืองจัดจำแนกโดย Smith (1965) ดังนี้

Class Pisces

Subclass Teleostomi

Order Nematognathi

Family Bagridae

Genus *Mystus*

Species *Mystus nemurus* (Cuv. & Val.)

Common name green catfish, yellow mystus, freshwater catfish

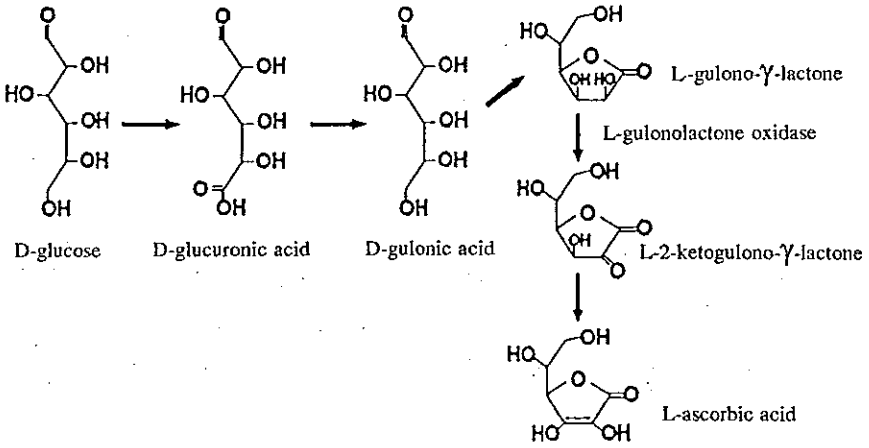
ปลากดเหลือง จัดเป็นปลาน้ำจืดไม่มีเกล็ด ลำตัวมีลักษณะกลมยาว ส่วนหัวค่อนข้างแบนเรียวเป็นรูปกระสวย (conical) กระดูกท้ายทอยยาวจรดโคนครีบหลัง ปากกว้าง ขากรรไกรแข็งแรง ประกอบด้วยฟันซี่เล็กๆ สั้น ปลายแหลมแบบ cardiform เป็นกลุ่มอยู่บนขากรรไกรล่าง ขากรรไกรบน และเพดานปาก ซี่กรอง (gill rakers) สั้นเล็กปลายแหลม จำนวน 15 ซี่ รอบปากมีหนวด 4 คู่ คือ บริเวณจมูก (nasal barbels) ขากรรไกรบน (maxillary barbels) ขากรรไกรล่าง (mental barbels) อย่างละ 1 คู่ ครีบหลังประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 1 ก้าน และก้านครีบอ่อน 7 ก้าน (D.I-7) มีครีบไขมันอยู่บนหลังตอนส่วนท้ายของลำตัว ตำแหน่งตรงข้ามกับครีบก้น ครีบก้นเป็นก้านครีบอ่อน 10-11 ก้าน ครีบหูเป็นครีบคู่ แต่ละข้างมีเงี่ยงแข็งและแหลมคม 1 คู่ และก้านครีบอ่อนข้างละ 9 ก้าน ครีบท้องประกอบด้วยก้านครีบอ่อน 6-7 ก้าน ครีบหางเว้าลึกแฉกบนยาวกว่าแฉกล่างประกอบด้วยก้านครีบอ่อน 16-17 ก้าน

ปลากดเหลืองพบแพร่กระจายทั่วไปในแหล่งน้ำจืดของทวีปเอเชียในเขตเอเชียตะวันตก ได้แก่ประเทศอินเดีย เนปาล ปากีสถาน บังคลาเทศ และในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ประเทศเมียนมาร์ ไทย ลาว กัมพูชา เวียดนาม มาเลเซีย และอินโดนีเซีย โดยพบอาศัยอยู่ในเขตพื้นท้องน้ำที่เป็นแอ่งหิน หรือดินแข็ง น้ำค่อนข้างใส กระแสน้ำไม่แรง นิสัยการกินอาหารของปลากดเหลืองจัดเป็นปลากินเนื้อ โดยจากการศึกษาองค์ประกอบอาหารที่พบในกระเพาะอาหารปลากดเหลือง พบว่าส่วนใหญ่เป็นปลาขนาดเล็ก 45-68 % ตัวอ่อนแมลงน้ำ 16.75-32.0 % กุ้งน้ำจืด 2.70-5.03 % ส่วนที่เหลือเป็นเศษพันธุ์ไม้น้ำและกรวดหิน จากรูปร่างลักษณะที่ปราดเปรียวของปลากดเหลือง พบว่าสามารถโฉบจับเหยื่อที่อยู่ผิวน้ำหรือกลางน้ำได้อย่างว่องไว (เฉิดฉัน และคณะ, 2538)

ปัจจุบันปลากดเหลืองเป็นที่ต้องการของตลาดสูงเนื่องจากเนื้อมีรสชาติดี เป็นที่นิยมในหมู่ผู้บริโภคทั้งตลาดภายในประเทศและต่างประเทศ (Khan *et al.*, 1990) โดยมีราคาสูง 80-100 บาทต่อกิโลกรัมสำหรับตลาดภายในประเทศ และส่งออกสู่ตลาดต่างประเทศในราคา 100-120 บาทต่อกิโลกรัม ซึ่งนับว่าสูงมากเมื่อเทียบกับปลาน้ำจืดชนิดอื่นๆ จัดได้ว่าปลากดเหลืองเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งในขณะนี้ (เฉิดฉัน และคณะ, 2538)

2. ความสำคัญของวิตามินซี

ปลาแตกต่างจากกลุ่มสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ สัตว์เลื้อยคลาน นก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินซีขึ้นเองได้ในร่างกาย ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์วิตามินซีเริ่มต้นจากดี-กลูโคส (D-glucose) และอาศัยเอนไซม์แอล-กูโลโนแลคโตน ออกซิเดส (L-gulonolactone oxidase) โดยสร้างจากสารตัวกลางที่มีชื่อว่าแอล-กูโลโนแลคโตน (L-gulonolactone) (ภาพที่ 1) (Friedrich, 1988; Combs, 1992) แต่ปลาส่วนใหญ่ขาดเอนไซม์นี้หรือมีอยู่ในปริมาณต่ำมาก (Soliman *et al.*, 1985) ดังนั้นจึงต้องรับวิตามินซีจากอาหารที่กินเข้าไป (Tucker and Halver, 1986)

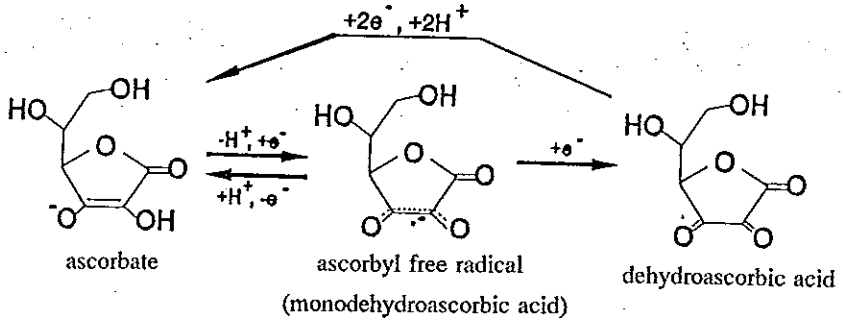


ภาพที่ 1 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์วิตามินซีในร่างกายสัตว์
ที่มา : Combs (1992)

เนื่องจากวิตามินซีในสภาพสารละลายมีคุณสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดีมาก (Friedrich, 1988) โดยถูกออกซิไดซ์เป็นดีไฮโดรแอสคอบิค แอซิด (dehydroascorbic acid) โดยมีโมโนดีไฮโดรแอสคอบิค แอซิด (monodehydroascorbic acid) เกิดขึ้นเป็นสารตัวกลาง ปฏิกิริยานี้สามารถเกิดขึ้นย้อนกลับไปมาได้ (ภาพที่ 2) ส่งผลให้ให้วิตามินซีมีคุณสมบัติในการถ่ายทอดอิเลคตรอน (electron transport) (Friedrich, 1988; Combs, 1992) วิตามินซีจึงมีหน้าที่สำคัญในปฏิกิริยาชีวเคมีหลายประการ ได้แก่

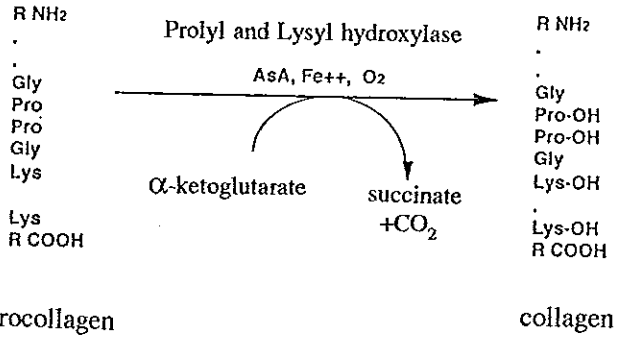
2.1 หน้าที่ในปฏิกิริยาไฮดรอกซีเลชัน (hydroxylation)

วิตามินซีมีหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ (co-factor) ของเอนไซม์ในปฏิกิริยาไฮดรอกซีเลชัน โดยทำหน้าที่รักษาอนุมูลเหล็กของเอนไซม์ให้อยู่ในสภาพรีดิวซ์ (Fe^{2+}) เพื่อให้เอนไซม์สามารถทำงานได้ (Combs, 1992) เช่นในปฏิกิริยาการสังเคราะห์โปรตีนคอลลาเจน ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของหลอดเลือดฝอย (capillaries) เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) เนื้อของกระดูก (bone matrix) และกระดูกอ่อน (cartilage) รวมถึงเส้นใยของเอ็นในร่างกายของปลา (Tucker and Halver, 1986) โดยวิตามินซีทำหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์โปรลีล ไฮดรอกซีเลส (prolyl hydroxylase) และไลซีล ไฮดรอกซีเลส (lysyl hydroxylase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาไฮดรอกซีเลชันโปรลีน (proline) และไลซีน (lysine) ให้อยู่ในรูปไฮดรอกซีโปรลีนและไฮดรอกซีไลซีน (hydroxylysine) (ภาพที่ 3) เพื่อใช้ในการสร้างคอลลาเจนที่สมบูรณ์ (mature collagen) (Stryer, 1988; Masumoto *et al.*, 1991)



ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาออกซิเดชัน - รีดักชัน (oxidation-reduction) ของวิตามินซี

ที่มา : Combs (1992)



ภาพที่ 3 วิตามินซีทำหน้าที่ในการสร้างคอลลาเจน

ที่มา : Masumoto *et al.* (1991)

นอกจากนี้วิตามินซียังทำหน้าที่สำคัญในปฏิกิริยาไฮดรอกซีเลชันอื่นๆ ได้แก่เป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ ซิก-เอ็น-ไตรเมทิล-แอล-ไลซีน ไฮดรอกซีเลส (6-N-trimethyl-L-lysine hydroxylase) และแกมมา-บิวไทโรบีเทน ไฮดรอกซีเลส (γ-butyrobetaine hydroxylase) ที่ใช้ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์คาร์นีทีน (carnitine) ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในระบบเมแทบอลิซึม (metabolism) ของไขมัน มีผลให้สามารถนำกรดไขมันเข้าสู่ปฏิกิริยาเบตา-ออกซิเดชัน (β-oxidation) ในไมโตคอนเดรีย (mitochondria) (Padh, 1990) วิตามินซีทำหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์โดปามีน-เบตา-โมโนออกซิจิเนส (dopamine-β-monooxigenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาสร้างนอร์อีพีเนพฟรีน (norepinephrine) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ขึ้นจากโดปามีน (dopamine) โดยทำหน้าที่ในการรักษาอนุมูลทองแดงของเอนไซม์ให้อยู่ในสภาพรีดิวซ์เพื่อให้เอนไซม์ทำงานได้ (Friedrich, 1988) นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ไฮดรอกซีฟีนิลไพรูเวทออกซิเดส (hydroxyphenyl pyruvate oxidase) และเอนไซม์โฮโมเจนทิเซท วัน,ทู-ไดออกซิจิเนส (homogentisate 1,2-dioxigenase) ซึ่งทำหน้าที่ในระบบเมแทบอลิซึมของไทโรซีน (tyrosine metabolism) อีกทั้งวิตามินซียังทำหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์เปปติดิล-ไกลซีน แอลฟา-เอมิเดชัน โมโนออกซิจิเนส (peptidyl-glysine α-amidation monooxigenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาแอลฟา-เอมิเดชัน (α-amidation) ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการสร้างเปปไทด์ ฮอร์โมน (peptide hormone) (Padh, 1990)

2.2 หน้าที่ในการเป็นสารป้องกันการหืน (antioxidant)

วิตามินซีสามารถทำหน้าที่ป้องกันการหืนจากการเกิดอนุมูลอิสระ (free redical) เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (superoxide anion) และ ไฮดรอกซิล เรดิคอล (hydroxyl redical) (Moser and Bendich, 1991; Combs, 1992) โดยทำหน้าที่ทำลายอนุมูลอิสระให้หมดไปได้โดยวิตามินซีจะให้อิเลคตรอนแก่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น (Padh, 1990)

2.3 หน้าที่ช่วยในการดูดซึมธาตุเหล็ก

วิตามินซีมีส่วนช่วยในการดูดซึมธาตุเหล็กเข้าสู่ร่างกาย โดยรีดิวซ์เหล็กในรูปเฟอร์ริก (ferric) ให้อยู่ในรูปเฟอร์รัส (ferrous) (Combs, 1992) ซึ่งเป็นรูปแบบที่สามารถดูดซึมเข้าสู่ลำไส้ได้ง่าย (Moser and Bendich, 1991)

2.4 ทำหน้าที่ในกระบวนการถ่ายทอดอิเลคตรอนของเซลล์ตับ (microsomal electron transport system)

กระบวนการถ่ายทอดอิเลคตรอนของเซลล์ตับ เช่นกระบวนการสร้างน้ำดี (bile acid) จากโคเลสเตอรอล (cholesterol) โดยเอนไซม์ เซเวน แอลฟา-ไฮดรอกซีเลส (7 α-hydroxylase) ต้องอาศัยออกซิเจน, NADPH, ไซโตโครม พี450 (cytochrome P450) และวิตามินซีในขั้นตอนการถ่ายทอดอิเลคตรอนของเอนไซม์ดังกล่าว (Combs, 1992; Murray *et al.*, 1996)

2.5 ทำหน้าที่ในกระบวนการสลายสารพิษ (detoxification)

ในกระบวนการสลายสารพิษ ซึ่งทำงานโดยระบบไซโตโครม พี450 (Tucker and Halver, 1986) วิตามินซีทำหน้าที่เป็นตัวป้องกันการออกซิไดซ์ (protective antioxidant) ป้องกันไซโตโครม พี450 มิให้ถูกทำลายลงเนื่องจากอนุมูลอิสระภายนอกเซลล์ (Friedrich, 1988; Combs, 1992)

2.6 ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกัน

วิตามินซีทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกัน โดยป้องกันเม็ดเลือดขาว (neutrophils) มิให้ถูกทำลายลงจากอนุมูลอิสระภายนอกเซลล์ (extracellular free radical) (Moser and Bendich, 1991) นอกจากนี้วิตามินซียังมีผลในการเพิ่มการทำงานของฟาโกซัยต์ (phagocyte) และเพิ่มกิจกรรม (activity) ของลิมป์โฟซัยต์ (lymphocyte) ที่จะมีผลให้แมคโครฟาจท์ (macrophage) มีการผลิตแอนติบอดี (antibody) มากขึ้น และยังทำให้การสังเคราะห์ลิวโคคอร์ติคอยด์ (leucocorticoid) จากต่อมหมวกไต (adrenal gland) มากขึ้น (Katabachi, 1969 อ้างโดย Boonyaratpalin *et al.*, 1989)

ด้วยหน้าที่ทางชีวเคมีหลายประการของวิตามินซีส่งผลให้สัตว์น้ำที่ได้รับวิตามินซีในอาหารมีอัตราการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ดี มีความสมบูรณ์เพศทั้งในด้านปริมาณความดกไข่ พัฒนาการของตัวอ่อน และอัตราการฟักของไข่ที่ดี (Masumoto *et al.*, 1991) ในด้านภูมิคุ้มกันโรคและความต้านทานต่อความเครียดที่เพิ่มมากขึ้น ตลอดจนการรักษาตัวของบาดแผลที่หายเร็วขึ้น (Halver, 1989; Jauncey *et al.*, 1985) และยังช่วยในการดูดซึมวิตามินและแร่ธาตุอื่นๆ รวมถึงช่วยให้การดูดซึมไขมันในร่างกายของสัตว์น้ำให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น (Masumoto *et al.*, 1991)

3. ผลของวิตามินซีที่มีต่อปลา

3.1 ผลทางด้านกายภาพของปลา

Andrews และ Murai (1975) รายงานการศึกษาในปลากดอเมริกัน (*Ictalurus punctatus*) ขนาด 14.5 กรัม ที่ขาดวิตามินซี พบว่าปลามีการเจริญเติบโตต่ำและประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำมาก มีการคดงอของกระดูกสันหลัง (broken back syndrome) แบบสโคลิโอซิส (scoliosis) เกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 10 ของการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาโดย Lim และ Lovell (1978) ในปลาชนิดเดียวกันที่มีขนาด 2.3 กรัม พบว่าปลาที่ขาดวิตามินซีมีการเจริญเติบโตต่ำกว่าปกติ และมีความผิดปกติของกระดูกสันหลัง ทั้งแบบสโคลิโอซิส และลอร์โดซิส (lordosis) นอกจากนี้ยังพบลักษณะผิดปกติภายนอก ได้แก่ ปลามีสีลำตัวเข้มขึ้น ครีบต่างๆสึกกร่อน ตกเลือด (hemorrhage) บริเวณครีบและรอบปาก Mahajan และ Agrawal (1980) รายงานการศึกษาในปลานวลจันทร์เทศ (Indian major carp, *Cirrhina mrigala*) พบว่าปลาที่ขาดวิตามินซีมีอัตราการตายสูง การเจริญเติบโตต่ำ รวมทั้งพบการคดงอของกระดูกสันหลังเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบลักษณะความผิดปกติอื่นๆ ได้แก่ เกล็ดหลุด ตกเลือดตามลำตัวและอวัยวะภายใน ซึ่งความผิดปกติดังกล่าวไม่พบในปลากลุ่มที่ได้รับวิตามินซีในอาหาร การศึกษาในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) โดย มะลิ และคณะ (2531) พบว่าลูกปลาขนาด 1.85 กรัม ที่ขาดวิตามินซีเป็นเวลานาน 10 สัปดาห์ มีการเจริญเติบโตต่ำกว่าปกติ รวมทั้งอัตราการรอดตายและประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำกว่าปกติด้วย ในปลาเรนโบว์เทราท์ (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*) ที่ขาดวิตามินซี พบว่าปลามีการเจริญเติบโตต่ำ และพบการคดงอของกระดูกสันหลัง (Dabrowski *et al.*, 1990) Chavez de Martinez (1990) รายงานถึงความผิดปกติในปลาซิคลิด (cichlid, *Cichlasoma urophthalmus*) ที่ขาดวิตามินซี โดยพบว่าปลามีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ และอัตราการตายสูง นอกจากนี้ปลายังมีสีลำตัวเข้มขึ้น ตกเลือดบริเวณกระดูกกระพุ้งแก้ม (operculum) ลูกตา หัว ครีบ และผิวหนัง อีกทั้งครีบสึกกร่อน เกล็ดหลุด ท้องบวม (swollen abdomen) มีพฤติกรรมเฉื่อยชา ตื่นกลัวแสง และกระดูกสันหลังคดงอ ลักษณะผิดปกติดังกล่าวยังพบในปลาชนิดอื่นเช่นกัน เช่นในปลากะรัง (*Epinephelus malabaricus*) (มะลิ และคณะ, 2536) ส่วนความผิดปกติเนื่องจากการขาดวิตามินซีในปลาเทอร์บอต (turbot, *Scophthalmus maximus*) Coustans และคณะ (1990) รายงานพบการสะสมไทโรซีนในเลือดสูง (tyrosinemia) และพบ

ผลึกของไทโรซีนในอวัยวะภายในโดยเฉพาะส่วนไต (renal granulomatous disease) ในปลาที่ขาดวิตามินซีเป็นระยะเวลานาน

3.2 ผลทางด้านความสมบูรณ์เพศของปลา

จากการศึกษาโดย Sandnes และคณะ (1984) พบว่า แม่ปลาเรนโบว์เทราท์กลุ่มที่ได้รับวิตามินซีในอาหารทั้งจากอาหารทดลองที่มีวิตามินซี 1,000 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และกลุ่มแม่ปลาที่ได้รับอาหารเชิงการค้าที่มีวิตามินซีครบถ้วน มีอัตราการฟักไข่สูง เมื่อเทียบกับแม่ปลากลุ่มที่ไม่ได้รับวิตามินซีในอาหาร Soliman และคณะ (1986a) ศึกษาถึงผลของวิตามินซีที่มีต่ออัตราการฟักไข่ อัตราการรอดตาย และการเจริญเติบโตของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) พบว่า แม่ปลาที่ได้รับวิตามินซีมีความสมบูรณ์ของรังไข่เกิดขึ้นรวดเร็วกว่า และอัตราการฟักไข่สูงกว่าแม่ปลาที่ขาดวิตามินซี นอกจากนี้ลูกปลาที่ได้จากแม่ปลาขาดวิตามินซีมีรูปร่างผิดปกติเป็นจำนวนมาก มีการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และอัตราการรอดตายต่ำกว่าลูกปลาที่ได้จากแม่ปลาที่ได้รับวิตามินซี

Tacon (1991) ได้ทำการรวบรวมผลของการขาดวิตามินซีที่แสดงออกภายนอกในปลาชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการขาดวิตามินซีที่แสดงออกในปลาชนิดต่างๆ

ที่มา : Tacon (1991)

ชนิดของปลา	ลักษณะผิดปกติ
ปลากลุ่มซัลโมนิด (salmonids)	การเจริญเติบโตลดต่ำ การสร้างคอลลาเจนไม่สมบูรณ์ เกิดการคดงอของกระดูกสันหลังแบบ สโคลิโอซิส และลอร์โดซิส อวัยวะภายในและครีบตกเลือด สีลำตัวดำคล้ำ ซี่เหงือก (gill filaments) บิดเบี้ยว การสมานตัวของบาดแผลช้า อัตราการตายสูง ความสมบูรณ์เพศลดลง
ปลากดอเมริกัน (channel catfish, *Ictalurus punctatus*)	การเจริญเติบโตลดต่ำ เกิดการคดงอของกระดูกสันหลังแบบสโคลิโอซิส และ ลอร์โดซิส เกิดการติดเชื้อได้ง่าย มีการตกเลือดทั้งส่วนอวัยวะภายในและอวัยวะภายนอก ครีบสึกกร่อน สีลำตัวดำคล้ำ พฤติกรรมเฉื่อยชา
ปลาเรด ซีบรีม (red sea bream, *Chrysophrys major*)	การเจริญเติบโตลดต่ำ
ปลาตูนา (*Anguilla japonica*)	การเจริญเติบโตลดต่ำ ครีบและส่วนหัวสึกกร่อน ขากรรไกรล่างสึกกร่อน
ปลาช่อน (*Channa punctata*)	เกิดการคดงอของกระดูกสันหลังแบบสโคลิโอซิส และลอร์โดซิส การเจริญเติบโตลดต่ำ โลหิตจาง ซี่เหงือกบิดเบี้ยว
ปลานิล (*Oreochromis niloticus*)	เกิดการคดงอของกระดูกสันหลังแบบสโคลิโอซิส และลอร์โดซิส การเจริญเติบโตลดต่ำลง การรักษาตัวของบาดแผลช้า ตกเลือดบริเวณอวัยวะภายในและภายนอก หางสึกกร่อน ตาโปน โลหิตจาง อัตราการฟักของไข่ต่ำ

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ที่มา : Tacon (1991)

ชนิดของปลา	ลักษณะผิดปกติ
ปลาดุกด้าน (*Clarias batrachus*)	เกิดการคดงอของกระดูกสันหลังแบบสโคลิโอซิส ตกเลือดที่บริเวณอวัยวะภายนอก ครีบสึกกร่อน สีลำตัวดำเข้ม
ปลานวลจันทร์เทศ (*Cirrhina mrigala*)	การเจริญเติบโตลดต่ำ อัตราการตายสูง เกิดการคดงอของกระดูกสันหลังแบบสโคลิโอซิส และลอร์โดซิส โลหิตจาง
ปลาเทอร์บอต (turbot, *Scophthalmus maximus*)	การเจริญเติบโตลดต่ำ มีการสะสมไทโรซีนในไต อัตราการตายสูง
ปลาซีกเดียว (plaice, *Pleuronectes platessa*)	การเจริญเติบโตลดต่ำ อัตราการตายสูง
ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)	การเจริญเติบโตลดต่ำ สีลำตัวดำเข้ม อัตราการตายสูง สูญเสียการทรงตัว ครีบหางสึกกร่อน ตกเลือดบริเวณเหงือก กระพุ้งแก้มหดสั้น จงอยปากหดสั้น ตาโปน ลำตัวสั้นลง เหงือกฉีกขาดง่าย
ปลาแมกซิกัน ซิคลิด (Mexican cichlid, *Cichlasoma urophthalmus*)	การเจริญเติบโตลดต่ำ อัตราการตายสูง สีลำตัวดำเข้ม กระพุ้งแก้มหดสั้น ตกเลือดบริเวณตา หัวและครีบ มีการสึกกร่อนของผิวหนังและครีบ เกล็ดหลุด ตาโปน ท้องบวม เกิดการคดงอของกระดูกสันหลังแบบสโคลีโอซิส และลอร์โดซิส กระดูกส่วนหัวผิดปกติ

3.3 ผลทางด้านภูมิคุ้มกัน ความต้านทานต่อความเครียด และการสมานตัวของบาดแผล

Boonyaratpalin และคณะ (1989) พบว่าปลากะพงขาวที่ได้รับวิตามินซีในปริมาณต่ำมีอัตราการตายสูงหลังจากฉีดเชื้อ *Streptococcus sp.* ขณะที่ปลาได้รับวิตามินซีในปริมาณสูงขึ้นมีอัตราการตายลดต่ำลงตามปริมาณวิตามินซีในอาหารที่มากขึ้น ผลจากการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับที่มีการศึกษาในปลากดอเมริกันของ Durve และ Lovell (1982) นอกจากนี้ปลาที่ขาดวิตามินซียังมีความต้านทานต่อความเครียดต่ำกว่าปกติ เช่นในปลาปากนกแก้วญี่ปุ่น (Japanese parrot fish, *Oplegnathus fasciatus*) ที่ขาดวิตามินซี มีความทนทานต่อความเครียดเนื่องจากการขาดออกซิเจนต่ำกว่าปกติ ภายหลังจากการขาดออกซิเจน ปลาที่ขาดวิตามินซีจะลอยหงายท้องขึ้นก่อนปลากลุ่มที่ได้รับวิตามินซีในระดับสูง (Ishibashi, 1991 อ้างโดย Masumoto *et al.*, 1991)

Juancey และคณะ (1985) ศึกษาถึงผลของวิตามินซีที่มีต่อการสมานตัวของบาดแผลในปลานิล พบว่า ปลาที่ได้รับวิตามินซี 1,250 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันขึ้นบริเวณบาดแผลภายใน 2 วัน ขณะที่ปลากลุ่มที่ขาดวิตามินซีเริ่มมีการสมานตัวของบาดแผลเกิดขึ้นช้ากว่า โดยเริ่มในวันที่ 3 อีกทั้งเนื้อเยื่อที่สร้างขึ้นเป็นเรคติคูล่าไฟเบอร์ (recticular fiber) เส้นบางๆ โดยมีเส้นใยคอลลาเจนสร้างขึ้นสมานตัวที่บาดแผลอยู่น้อยมากเมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซี

3.4 ผลด้านชีวเคมีและสรีรวิทยา

Wilson และ Poe (1973) พบว่าในกลุ่มปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี มีปริมาณคอลลาเจนและองค์ประกอบของไฮดรอกซีโปรลีนในกระดูกสันหลังต่ำกว่าในปลาที่ได้รับวิตามินซี อีกทั้งฤทธิ์ของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) ก็มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับวิตามินซีตามปกติ สอดคล้องกับการทดลองของ Sato และคณะ (1978) ซึ่งศึกษาในปลาแรนโบว์เทราท์ พบว่าปลาที่ขาดวิตามินซีมีอัตราส่วนไฮดรอกซีโปรลีนต่อโปรลีนต่ำกว่าปลาปกติ โดยการลดลงของอัตราส่วนดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ามีโปรลีนที่มิได้เกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซีเลชันเป็นไฮดรอกซีโปรลีนในปริมาณมากกว่าปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ปลาแรนโบว์เทราท์ที่ขาดวิตามินซีจะเกิดลักษณะกระดูกสันหลังคดงอมากกว่าการเลี้ยงในอุณหภูมิต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากคอลลาเจนที่สร้างขึ้นในสภาวะขาดวิตามินซีจะเกิดการสลายตัวได้มากที่อุณหภูมิสูง (Sato *et al.*, 1982)

Mustin และ Lovell (1992) ทำการศึกษาถึงผลการขาดวิตามินซีในปลากดอเมริกันขนาด 1.5 กรัม พบว่ากลุ่มปลาดังกล่าวมีปริมาณคอลลาเจนในกระดูกสันหลังต่ำกว่าปลาที่ได้รับวิตามินซีอย่างเห็นได้ชัดเจน ซึ่งคณะผู้ทำการศึกษาดังกล่าวให้ความเห็นว่าปริมาณคอลลาเจนในกระดูกสันหลังของปลาสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการขาดวิตามินซีที่ดี เช่นเดียวกันกับการศึกษาในปลานิล Shiau และ Hsu (1995) รายงานว่ากลุ่มปลาที่ขาดวิตามินซีมีปริมาณคอลลาเจนในกระดูกสันหลังต่ำกว่าปลาที่ได้รับวิตามินซีอย่างเห็นได้ชัดเจน โดยปลาที่ขาดวิตามินซีมีปริมาณคอลลาเจนในกระดูกสันหลัง 11.89 % ขณะที่ปลาที่ได้รับวิตามินซีตั้งแต่ระดับ 30 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมขึ้นไป มีปริมาณคอลลาเจนในกระดูกสันหลังอยู่ในช่วง 12.56-19.08 %

Lim และ Lovell (1978) พบว่า ปลากดอเมริกันขนาด 2.3 กรัม ที่ขาดวิตามินซีและกลุ่มปลาที่ได้รับวิตามินซีในอาหารในปริมาณต่ำ (น้อยกว่า 60 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) มีความเข้มข้นของวิตามินซีในตับที่ลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาของการขาดวิตามินซีที่นานออกไป อย่างไรก็ตามยังคงตรวจพบวิตามินซีในตับของปลาได้เล็กน้อยถึงแม้ว่าจะขาดวิตามินซีเป็นเวลานานถึง 18 สัปดาห์ ซึ่งในการศึกษานี้พบว่าความเข้มข้นของวิตามินซีในไตของปลามีค่าไม่สัมพันธ์กับระดับวิตามินซีที่ปลาได้รับจากอาหาร ขณะที่การศึกษาโดย Lovell และ El Naggar (1989) พบว่าความเข้มข้นของวิตามินซีในไตส่วนหน้าของปลากดอเมริกันมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณเนื้อวิตามินซีที่ปลาได้รับจากอาหาร เมื่อปลาได้รับอาหารที่เสริมวิตามินซีในปริมาณมาก จะส่งผลให้ความเข้มข้นของวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าสูงขึ้น อย่างไรก็ตามผลการศึกษาที่มีความแตกต่างกันดังกล่าวนี้อาจเกิดขึ้นเนื่องจากขนาดปลาที่แตกต่างกันและวิธีการศึกษาที่ต่างกัน นอกจากนี้ขนาดของไตส่วนหน้ามีขนาดเล็กและแยกออกมาศึกษาวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีได้ยาก (Skelbaek *et al.*, 1990)

Soliman และคณะ (1994) รายงานความเข้มข้นของวิตามินซีในอวัยวะต่างๆ ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีในระดับต่างๆ พบว่าอวัยวะทั้งหมดที่ศึกษา ได้แก่ รังไข่ เหงือก ลูกตา อัณฑะ ตับ สมอง หัวใจ ลำไส้ กล้ามเนื้อ และกระเพาะลมมีความเข้มข้นของวิตามินซีเพิ่มสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นของวิตามินซีในอาหารที่ปลาได้รับอย่างเห็นได้ชัด โดยพบว่าในกลุ่มปลาที่ขาดวิตามินซีไม่สามารถตรวจวัดปริมาณวิตามินซีได้ในหัวใจ และกระเพาะลม แต่ตรวจวัดได้ปริมาณต่ำในตับ และกล้ามเนื้อ (5.59 ไมโครกรัมต่อกรัม และ

4.89 ไมโครกรัมต่อกรัม) ขณะที่อวัยวะอื่นๆ ยังสามารถตรวจพบปริมาณวิตามินซีได้ในระดับสูง (16.20 ไมโครกรัมต่อกรัม ถึง 48.06 ไมโครกรัมต่อกรัม)

Alexis และคณะ (1989) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของวิตามินซีที่สะสมในเนื้อเยื่อปลากะพงยุโรป (European seabass, *Dicentrarchus labrax*) เมื่อปลาอยู่ในสภาวะที่ขาดวิตามินซีและต่อมาได้รับอาหารที่มีวิตามินซี พบว่าความเข้มข้นของวิตามินซีในตับจะมีค่าสูงขึ้นภายหลังการได้รับอาหารใหม่อย่างรวดเร็ว ขณะที่ผิวหนังและกล้ามเนื้อมีการเปลี่ยนแปลงระดับวิตามินซีเพิ่มขึ้นในอัตราช้ากว่า คณะผู้ทำการศึกษาให้ความเห็นว่าตับของปลาเป็นอวัยวะที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของวิตามินซีตามระดับวิตามินซีที่ปลาได้รับจากอาหารที่เห็นได้อย่างชัดเจนที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Tucker และ Halver (1984) ซึ่งกล่าวว่า อวัยวะหลักที่เป็นแหล่งสะสมวิตามินซีในร่างกายปลา ได้แก่ เลือด ตับ ไต และผิวหนัง โดยเมื่อทำการทดลองโดยใช้สารกัมมันตรังสีของวิตามินซี (vitamin C isotope) ผสมในอาหารให้แก่ปลา หลังจากนั้นจึงตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารกัมมันตรังสีของวิตามินซีในอวัยวะต่างๆ ของปลา พบว่า ความเข้มข้นของวิตามินซีในเนื้อเยื่อดังกล่าวจะมีปริมาณมากขึ้นตามระดับสารกัมมันตรังสีของวิตามินซีที่ปลาได้รับจากอาหารโดยตรง (Halver, 1985)

ในด้านผลของวิตามินซีที่มีต่อองค์ประกอบทางเคมีของร่างกายปลา Soliman และคณะ (1986b) รายงานว่าปลานิลขนาด 1.16-1.19 กรัม กลุ่มที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีมีปริมาณโปรตีนในร่างกายต่ำกว่ากลุ่มปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซี ขณะที่องค์ประกอบร่างกายอื่นๆ ได้แก่ ความชื้น ไขมันและเถ้า ไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้กลุ่มปลาที่ขาดวิตามินซีดังกล่าวยังมีประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิต่ำกว่ากลุ่มปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีอย่างเห็นได้ชัดเจน ขณะที่การศึกษาในปลาขนาด 1.01 กรัม ของ Soliman และคณะ (1994) พบว่าปลาที่ขาดวิตามินซีมีปริมาณความชื้นในร่างกายสูง แต่ปริมาณเถ้าและโปรตีนในร่างกายต่ำ

3.5 ผลการเปลี่ยนแปลงทางด้านเนื้อเยื่อของปลา

จากการศึกษาความผิดปกติเนื่องจากการขาดวิตามินซีที่แสดงออกในด้านเนื้อเยื่อของปลากดอเมริกัน Lim และ Lovell (1978) พบว่า ปลาที่ขาดวิตามินซีและได้รับวิตามินซีในปริมาณต่ำ (น้อยกว่า 30 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) มีความผิดปกติเกิดขึ้นในส่วนของเนื้อเยื่อเหงือก โดยพบว่าเส้นเหงือก (gill filament) มีการบิดตัวเสียรูปทรงไปจากปกติ

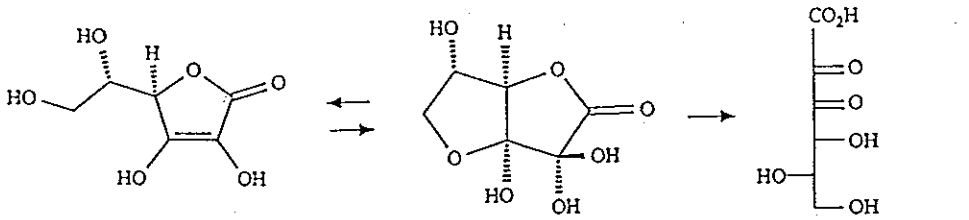
Phromkunthong และคณะ (1993a) ทำการศึกษาในปลากะรังที่ขาดวิตามินซี พบการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างผิดปกติ (hyperplasia) ที่บริเวณเซลล์บุผิว (epithelial cell) ของเหงือกทั้งในส่วน primary lamellae และ secondary lamellae ส่วนการศึกษาความผิดปกติในระดับเนื้อเยื่อเนื่องจากการขาดวิตามินซีในปลานิลของ Phromkunthong (1994) พบว่ากลุ่มปลาที่ได้รับวิตามินซีตั้งแต่ 0-210 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และอัตราการตายที่ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะภายนอกของปลาที่ขาดวิตามินซีไม่แตกต่างจากปลาที่ได้รับวิตามินซี แต่เมื่อทำการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาในปลาดังกล่าว พบว่าในกลุ่มปลาที่ขาดวิตามินซีมีการแสดงความผิดปกติในเนื้อเยื่อเหงือกให้เห็นอย่างชัดเจนกล่าวคือ เซลล์บุผิวขยายจำนวนเพิ่มมากขึ้นอย่างผิดปกติ ทั้งในส่วน primary lamellae และ secondary lamellae ที่บริเวณส่วนต่อระหว่าง lamella พบว่าเซลล์บุผิวของ primary lamellae มีการขยายจำนวนเพิ่มมากขึ้นจนกระทั่งสูงขึ้นหนึ่งส่วนสามถึงหนึ่งส่วนสองจากฐานของ secondary lamellae นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์บุผิวของ secondary lamellae มีการแยกตัวออกจากเนื้อเยื่อที่อยู่ข้างล่าง ซึ่งความผิดปกติของเนื้อเยื่อเหงือกปลานิลที่ขาดวิตามินซีที่พบอีกลักษณะได้แก่การบวมตัวของ lamellae บางส่วนและข้างในมีการคั่งของเลือด อาการผิดปกติทั้งหมดนี้จะส่งผลให้เกิดระยะห่างมากขึ้นระหว่างเลือดที่อยู่ในหลอดเลือดและน้ำที่มีออกซิเจนข้างนอก ส่งผลให้อัตราการแลกเปลี่ยนแก๊สและการดูดซึมออกซิเจนของปลาดังกล่าวมีอัตราต่ำ นอกจากนี้ยังส่งผลให้ปลาได้รับออกซิเจนในปริมาณที่ไม่เพียงพอกับความต้องการได้ ขณะที่ในปลาปกติที่ได้รับวิตามินซีครบถ้วนมีลักษณะเหงือกเรียงตัวตามปกติ จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนในปลากะรังที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี Phromkunthong และคณะ (1993a) พบว่าไมโตคอนเดรียที่พบในคลอไรด์เซลล์ (chloride cell) ในส่วนเมตริกซ์ของไมโตคอนเดรีย (mitochondrial matrix) มีความเข้มมากขึ้นและมีความหนาแน่นมากขึ้น (electron dense) เยื่อหุ้มไมโตคอนเดรียบางส่วนถูกทำลาย และไมโตคอนเดรียบวม พบช่องว่าง (vacuoles) ในไมโตคอนเดรีย การศึกษาในปลากะพงขาวโดย Phromkunthong และคณะ (1993b) พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีมีขนาดของเซลล์ตับเล็กลง เมื่อศึกษาองค์ประกอบภายในเซลล์ พบว่า ราฟ เอนโดพลาสมิก เรติคูลัม (rough endoplasmic reticulum, RER) ลดจำนวนลงและจัดเรียงตัวผิดปกติ ปริมาณไกลโคเจน (glycogen) ในตับลดลงและมีการสะสมไขมันมากผิดปกติเมื่อเทียบกับกลุ่มปลาที่ได้รับวิตามินซี

Alexis และคณะ (1997) รายงานพยาธิสภาพจากการขาดวิตามินซีของเนื้อเยื่อไตในปลากิลเฮด บรีม (gilthead bream, *Sparus aurata*) ในส่วนท่อไต (renal tubule) พบว่าเซลล์บุผิวด้านในท่อไต (endothelium cells) ถูกทำลายและหลุดลอกออกมาอยู่ในลูเมน (lumen) อีกทั้งท่อไตบางส่วนเสื่อมสภาพจนไม่พบเซลล์บุผิวอยู่ด้านใน นอกจากนี้บริเวณส่วน glomerulus ยังพบลักษณะ glumerulonephritis กล่าวคือพบว่าเซลล์บุผิวของ glomerulus ถูกทำลายลงและเกิดการสร้างเนื้อเส้นใย (fibrin) ขึ้นแทนที่ส่วนดังกล่าว โดยส่วนของเนื้อเส้นใยที่สร้างขึ้นอย่างผิดปกตินี้ติดสีแดงเมื่อทำการย้อมด้วยสีไตรโครม (trichrome) ด้านความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับของปลาที่ขาดวิตามินซี Phromkunthong และคณะ (1995) ทำการศึกษาในปลากะรังขนาด 4.55-4.85 กรัม ที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าเกิดพยาธิสภาพ ได้แก่การเกิดช่องว่าง (vacuolation) ภายในเซลล์ นิวเคลียสของเซลล์ถูกดันไปจนชิดอยู่ที่ขอบของเซลล์ อีกทั้งเซลล์ตับมีขนาดใหญ่ขึ้น ไม่สามารถสังเกตขอบเขตของเซลล์ได้ชัดเมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซี 200 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีเนื้อเยื่อตับเป็นปกติมองเห็นขอบเขตของเซลล์ชัดเจน

4. ปฏิกิริยาการเสียสภาพและรูปแบบของวิตามินซีในอาหารปลา

เนื่องจากวิตามินซีสามารถถูกออกซิไดซ์จาก AsA เป็นโมโนดีไฮโดรแอสคอบิค แอสิด และดีไฮโดรแอสคอบิค แอสิดได้ตามลำดับ (Moser and Bendich, 1991; Masumoto *et al.*, 1991) ซึ่งเมื่ออยู่ในสภาพชื้นดีไฮโดรแอสคอบิค แอสิดสามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) (Tolbert *et al.*, 1975) และเปลี่ยนเป็น 2, 3-ไดคีโต-แอล-กูโลนิค แอซิด (2, 3-diketo-L-gulonic acid) (Friedrich, 1988; Moser and Bendich, 1991) (ภาพที่ 4) ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีคุณสมบัติของวิตามินซี (Grant *et al.*, 1989; Masumoto *et al.*, 1991) ปฏิกิริยาดังกล่าวนี้ถูกเร่งให้เกิดเร็วขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูง ออกซิเจนมีปริมาณมาก ความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วงเป็นกลางและเป็นด่าง มีแสงสว่าง ไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated lipids) มีปริมาณมาก และมีโลหะกลุ่มทองแดงและเหล็กอยู่ในอาหาร (Hilton *et al.*, 1977; Soliman *et al.*, 1987; Wanninger, 1972 อ้างโดย Khajarern and Khajarern, 1990a) ทำให้ AsA ที่มีในอาหารสัตว์น้ำสูญเสียสภาพไปได้มาก Soliman และคณะ (1987) รายงานว่าปริมาณของวิตามินซีคงเหลืออยู่ในระหว่างการผสมอาหาร การผสมน้ำ การอัดเม็ด และการอบแห้งเท่ากับ 94.89 % 74.59 % 64.80 % และ 33.50 % ตามลำดับ โดยวิธีการผลิตอาหารที่ต้องผ่านความร้อนสูงเช่นวิธีเอกทรูชัน (extrusion) ซึ่งเป็นการผลิตอาหารเม็ดลอย มีผลให้วิตามินซีสูญเสียออก

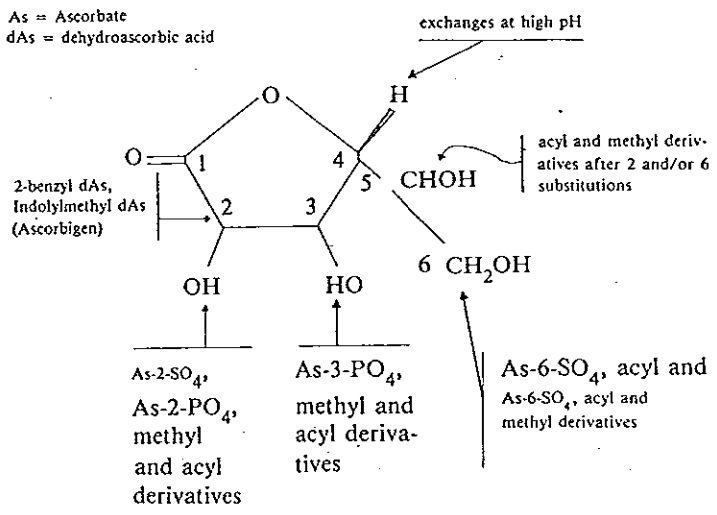
ไปได้มากกว่าวิธีการผลิตอาหารที่มีความร้อนต่ำกว่า เช่นวิธีเพลเลตติง (pelleting) ซึ่งเป็นการผลิตอาหารเม็ดจม นอกจากนี้ AsA สามารถละลายน้ำได้สูง มีผลให้ละลายออกจากอาหารสัตว์น้ำในระหว่างการให้อาหารได้มาก (Moser and Bendich, 1991) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารปลาชนิดลอยที่มีความพรุนและมีพื้นที่ผิวมาก Gadient และ Schai (1994) รายงานว่า AsA คงเหลืออยู่เพียง 20 % ในอาหารปลาชนิดลอย และคงเหลือ 34 % ในอาหารปลาชนิดจม ภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง ที่อาหารแช่อยู่ในน้ำ ดังนั้นจึงได้มีการประยุกต์ใช้วิตามินซีรูปแบบต่างๆ เพื่อป้องกันการสูญเสียสภาพ ทั้งการใช้สารเคลือบผลึกของวิตามินซี และการดัดแปลงให้อยู่ในรูปของวิตามินซีอนุพันธ์ ซึ่งสามารถทำได้โดยนำหมู่อนุพันธ์ทำปฏิกิริยากับ AsA ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งต่างๆ (ภาพที่ 5) ซึ่งเห็นได้ว่าวิตามินซีอนุพันธ์ที่ใช้ในอาหารปลาส่วนใหญ่เกิดจากการนำสารอนุพันธ์ทำปฏิกิริยากับคาร์บอนอะตอมที่ 2 ในโครงสร้างของ AsA



L-ascorbic acid L-dehydroascorbic acid 2,3-diketo-L-gulonic acid

ภาพที่ 4 ปฏิกิริยาการเสียสภาพของวิตามินซี

ที่มา : Moser และ Bendich (1991)



ภาพที่ 5 ตำแหน่งในโครงสร้างของ AsA ที่ใช้ดัดแปลงสร้างเป็นวิตามินซีอนุพันธ์

ที่มา : Tolbert และคณะ (1975)

กลุ่มวิตามินซีอนุพันธ์ที่มีรายงานใช้ในอาหารสัตว์น้ำ ได้แก่ แอสคอบิล-2-โพลีฟอสเฟต (ascorbyl-2-polyphosphate, APP) (Grant *et al.*, 1989; Volker and Fenster, 1994; Merchie *et al.*, 1996) แอสคอบิล-2-โมโนฟอสเฟตแมกนีเซียม (ascorbyl-2-mono phosphate-magnesium, AMP) (El Naggar and Lovell, 1991; Shiau and Hsu, 1995; Phromkunthong *et al.*, 1997) แอสคอบิล-2-ซัลเฟต (ascorbyl-2-sulfate, AS) (Murai *et al.*, 1978; Tucker and Halver, 1986; Abdelghany, 1996) แอสคอบิล-6-ปาล์มมิเตท (ascorbyl-6-palmitate, AP) (Soliman *et al.*, 1986b; Albrektsen *et al.*, 1988) กลุ่มวิตามินซีเคลือบ ได้แก่ วิตามินซีชนิดเคลือบเซลลูโลส (ethylcellulose coated, EcA) (Murai *et al.*, 1978; Skelbaek *et al.*, 1990) วิตามินซีชนิดเคลือบซิลิโคน (silicon coated, ScA) (Wahli *et al.*, 1995) วิตามินซีชนิดเคลือบไขมันหรือน้ำมัน (fat coated or oil coated, OC) (Khajarern and Khajarern, 1990a) วิตามินซีชนิดเคลือบกลีเซอไรด์ (glyceride coated, GCA) (Soliman *et al.*, 1986b; Skelbaek *et al.*, 1990) และวิตามินซีชนิดเคลือบโพลีเมอร์สังเคราะห์ (synthetic polymer coated, PcA) (Skelbaek *et al.*, 1990)

จากผลการศึกษาในด้านความคงสภาพในระหว่างกระบวนการผลิตอาหารสัตว์น้ำ และความคงทนต่อการละลายน้ำ พบว่า AsA มีความคงสภาพต่ำที่สุดและวิตามินซีชนิดอนุพันธ์มีความคงทนต่อการสูญเสียสภาพมากกว่าวิตามินซีชนิดเคลือบ (Gadient and Schai, 1994; Gadient and Fenster, 1994) โดย AS มีความคงทนสูงที่สุด (Soliman *et al.*, 1987)

(ตารางที่ 2) ขณะที่ APP และ AMP มีความคงทนรองลงมาตามลำดับ (Gadient and Schai, 1994) (ตารางที่ 3) ส่วนในกลุ่มวิตามินซีเคลือบพบว่า GCA และ EcA มีความคงทนในระหว่างกระบวนการผลิตที่มีความร้อนสูงได้ดีกว่า OC แต่จากการศึกษาความคงสภาพในระหว่างการแช่น้ำพบว่า GCA และ OC จะมีความคงสภาพสูงกว่า EcA (Soliman *et al.*, 1987; Khajarern and Khajarern, 1990b)

ตารางที่ 2 ปริมาณที่เหลือ (%) ของวิตามินซีบางรูปแบบระหว่างกระบวนการผลิตอาหาร
ที่มา : Soliman และคณะ (1987)

กระบวนการผลิต	รูปแบบของวิตามินซี		
	AsA	GCA	AS
การผสมวัสดุ (mixing)	94.89	98.99	96.78
การผสมน้ำ (water addition)	74.59	94.40	95.70
การอัดเม็ด (cold pelleting)	64.80	87.55	95.50
การอบแห้ง (drying)	33.50	58.10	94.70

ตารางที่ 3 ปริมาณที่เหลือ (%) ของวิตามินซีบางรูปแบบภายหลังกระบวนการผลิตอาหาร
ที่มา : Gadient และ Schai (1994)

การผลิต	รูปแบบของวิตามินซี			
	AsA	EcA	APP	AMP
วิธีเอกทรูชัน	53	48	98	78
วิธีเพลเลตติง	65	nd[1]	98	91

[1]ไม่สามารถตรวจวัดได้

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

5. ประสิทธิภาพของวิตามินซีรูปแบบต่างๆ และระดับความต้องการของปลา

Murai และคณะ (1978) ทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบผลการใช้ AsA, AS และ EcA ในปลากดอเมริกันขนาด 7.7-8.1 กรัม เป็นระยะเวลานาน 20 สัปดาห์ ด้วยวัสดุอาหารกึ่งบริสุทธิ์ (semipurified diet) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า กลุ่มปลาที่ได้รับ AsA และ EcA ในระดับที่มีเนื้อวิตามินซีตั้งแต่ 50 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ขึ้นไปมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด ขณะที่กลุ่มปลาที่ได้รับ AS ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซีเท่ากัน มีอัตราการเจริญเติบโตและความเข้มข้นของวิตามินซีในตับและเลือดต่ำกว่ากลุ่มปลาที่ได้รับอาหารเสริม AsA และ EcA คณะผู้ทำการศึกษาให้ความเห็นว่า EcA และ AsA สามารถใช้เป็นแหล่งของวิตามินซีในปลากดอเมริกันได้ดีไม่แตกต่างกัน โดยที่ AS มีประสิทธิภาพการใช้งานต่ำกว่าเมื่อเสริมลงในอาหารปลาในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซีเท่ากัน อย่างไรก็ตาม Benitez และ Halver (1982) ได้ตั้งสมมุติฐานถึงกลไกการดูดซึม AS ในร่างกายของปลาเรนโบว์เทราท์ว่า เอนไซม์แอสคอบิลซัลเฟตซัลโฟไฮโดรเลส (ascorbylsulfate sulfohydrolase) ที่พบในตับของปลาเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการดูดซึมวิตามินซีรูปแบบ AS ในร่างกายปลา โดยเอนไซม์นี้จะทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเปลี่ยน AS ให้กลายเป็น AsA เพื่อให้ปลาสามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ ซึ่ง Tucker และ Halver (1986) ได้รายงานผลการใช้ AS เสริมในอาหารปลาเรนโบว์เทราท์ว่าวิตามินซีรูปแบบดังกล่าวส่งผลให้ปลามีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากการใช้ AsA ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ผลดังกล่าวแตกต่างออกไปจากผลการศึกษาในปลากดอเมริกันของ Murai และคณะ (1978) และจากผลการศึกษาในปลานิลของ Soliman และคณะ (1986b) ซึ่งทดสอบผลของวิตามินซีรูปแบบต่างๆ ได้แก่ AsA, EcA, AS, โซเดียมแอสคอเบต, AP และ GCA ในระดับที่มีเนื้อวิตามินซี 1,250 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เท่ากันทุกสูตร พบว่าปลาที่ได้รับวิตามินซีทุกรูปแบบมีอัตราการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารและการรอดตายไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของวิตามินซีในอวัยวะต่างๆ พบว่ากลุ่มปลาที่ได้รับ AS มีความเข้มข้นของวิตามินซีในตับ ลำไส้ เหงือก สมอง ตา ถุงลม กล้ามเนื้อ หัวใจ รังไข่และอัณฑะต่ำกว่ากลุ่มปลาที่ได้รับวิตามินซีรูปแบบอื่นๆ อีกทั้งยังพบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริม AS มีปริมาณของไขมันในร่างกายต่ำกว่าปลากลุ่มอื่นๆ อย่างมาก ผลการทดลองนี้ต่างจากการศึกษาของ Abdelghany (1996) โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ AsA AS และ APP ในปลานิลเช่นกัน พบว่าอาหารเสริม AS และ APP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 5-50 มิลลิกรัม

ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าอาหารเสริม AsA ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซีเท่ากัน ทั้งในด้านการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และสามารถป้องกันอาการขาดวิตามินซีที่แสดงออกภายนอกได้ ในการศึกษานี้ พบว่ากลุ่มปลาที่ได้รับอาหารเสริม AsA 5 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม แสดงความผิดปกติภายนอกได้แก่ กระดูกสันหลังคดงอ สีลำตัวดำเข้ม กระพุ้งแก้มหดสั้นเกิดขึ้นที่ระยะ 10 สัปดาห์ของการทดลอง ขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีรูปแบบ AS และ APP ในระดับที่มีเนื้อวิตามินซี 5 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ไม่แสดงความผิดปกติใดๆเกิดขึ้น และจากการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในตับของปลา พบว่าไม่สามารถตรวจวัดปริมาณวิตามินซีในตับของปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี ส่วนปลาที่ได้รับ AsA มีความเข้มข้นของวิตามินซีต่ำกว่ากลุ่มปลาที่ได้รับ AS และปลาที่ได้รับอาหารเสริม APP มีความเข้มข้นของวิตามินซีในตับสูงที่สุด ผู้ทำการศึกษาครั้งนี้ได้ให้ความเห็นว่า AS และ APP มีประสิทธิภาพการใช้งานในปลานิลใกล้เคียงกัน

Albrektsen และคณะ (1988) ศึกษาถึงประสิทธิภาพของวิตามินซีรูปแบบ AP ในปลาเรนโบว์เทราท์วัยอ่อนเป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับ AsA โดยเสริมวิตามินซีแต่ละรูปแบบลงในอาหารทดลองแต่ละสูตรในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 600 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเท่ากัน และมีชุดควบคุมเป็นปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี พบว่าในระยะ 8 สัปดาห์แรกของการทดลอง กลุ่มปลาที่ได้รับอาหารเสริม AP มีการเจริญเติบโตและการตายสูงใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี แต่หลังจาก 8 สัปดาห์ของการทดลองไปแล้ว พบว่าการเจริญเติบโตและการรอดตายของปลาที่ได้รับ AsA และ AP มีค่าสูงไม่แตกต่างกัน ขณะที่ปลาชุดควบคุมที่ขาดวิตามินซีมีการเจริญเติบโตต่ำที่สุด เมื่อวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในปลาทั้งตัว พบว่า ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณวิตามินซีได้ในกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี และพบว่ากลุ่มปลาที่ได้รับอาหารเสริม AsA มีปริมาณวิตามินซีในร่างกายสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริม AP (64 ไมโครกรัมต่อกรัม ในปลาที่ได้รับอาหารเสริม AsA และ 55 ไมโครกรัมต่อกรัม ในปลาที่ได้รับอาหารเสริม AP) และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในตับ พบว่าไม่สามารถตรวจวัดปริมาณวิตามินซีได้ในกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริม AsA มีความเข้มข้นของวิตามินซีในตับ 156 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตับ 1 กรัม และมีค่า 118 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตับ 1 กรัม ในปลาที่ได้รับอาหารเสริม AP อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนในกระดูกสันหลังของปลา พบว่า ปลาที่ได้รับ AsA และ AP มี

ปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนไม่แตกต่างกัน จากการศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย AP ในลำไส้ของปลา พบว่าเอนไซม์ที่มีอยู่ในลำไส้ของปลาสามารถไฮโดรไลซ์ (hydrolyse) เปลี่ยน AP ให้เป็นวิตามินซีอิสระได้ ซึ่งคณะผู้ทำการศึกษาครั้งนี้ตั้งสมมุติฐานว่าในระยะแรกปลาอาจไม่มีเอนไซม์เฉพาะสำหรับไฮโดรไลซ์ AP และอาจต้องใช้เวลาปรับตัวในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์พิเศษดังกล่าว จึงมีผลให้การเจริญเติบโตและการรอดตายในระยะแรกต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริม AsA จนกระทั่งปลาสามารถปรับตัวสร้างเอนไซม์สำหรับย่อย AP ขึ้นในลำไส้ได้ จึงมีผลให้การเจริญเติบโตและการรอดตายของปลาเป็นปกติในภายหลัง

Dabrowski และ Kock (1989) ได้ศึกษาถึงการดูดซึมของ AS และการทำงานของเอนไซม์แอสคอบิลซัลเฟตซัลโฟไฮโดรเลสในลำไส้ของปลาเรนโบว์เทราท์ พบว่า AS ไม่สามารถถูกดูดซึมผ่านผนังลำไส้ของปลาได้ และสะสมรวมกับกากอาหารบริเวณปลายลำไส้ก่อนการขับถ่าย นอกจากนี้ปลาที่ได้รับอาหารเสริม AS ไม่มีปริมาณโปรตีนและเอนไซม์ที่บริเวณผนังลำไส้เพิ่มเป็นพิเศษจากกลุ่มปลาควบคุมที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี แสดงให้เห็นว่าบริเวณส่วนผนังลำไส้ของปลาเรนโบว์เทราท์ซึ่งเป็นส่วนที่ใช้ในการดูดซึมวิตามินซีไม่มีการทำงานของเอนไซม์แอสคอบิลซัลเฟตซัลโฟไฮโดรเลส แต่การที่ปลายังคงเจริญเติบโตได้ ตามรายงานของ Tucker และ Halver (1986) เนื่องมาจาก AS ที่มีในอาหารทดลองอาจเกิดไฮโดรไลซ์ด้วยปฏิกิริยาเคมีได้เองในระหว่างการเก็บรักษา จึงเป็นสาเหตุให้ปลาทดลองได้รับวิตามินซีเข้าสู่ร่างกาย และส่งผลให้มีความเข้มข้นของวิตามินซีในอวัยวะต่างๆ และการเจริญเติบโตสูงกว่าปลาในกลุ่มควบคุมที่ขาดวิตามินซี (Dabrowski *et al.*, 1990) จากการศึกษากลไกการดูดซึมวิตามินซีอนุพันธ์ฟอสเฟตโดย Dabrowski และคณะ (1994) ทำให้ทราบถึงกลไกการดูดซึม AMP และ APP ในลำไส้ของปลาเรนโบว์เทราท์ โดยพบว่าเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่มีอยู่ตามปกติในลำไส้ของปลาเรนโบว์เทราท์สามารถไฮโดรไลซ์วิตามินซีอนุพันธ์ฟอสเฟตให้เป็นวิตามินซีอิสระได้ โดยที่ค่า K_m (Michaelis constant: affinity constants for intestinal hydrolases) ของปฏิกิริยามีค่าสูงเมื่อเกิดการไฮโดรไลซ์ APP และมีค่าต่ำเมื่อไฮโดรไลซ์ AMP แสดงให้เห็นว่า APP มีประสิทธิภาพในการถูกไฮโดรไลซ์ในลำไส้ปลากดอเมริกันให้เป็นวิตามินซีอิสระได้ต่ำกว่า AMP

Wilson และคณะ (1989) ศึกษาการใช้ APP เปรียบเทียบกับการใช้ AS และ EcA เสริมลงในอาหารปลากดอเมริกันขนาด 91-95 กรัม เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า กลุ่มปลาที่

ได้รับ APP มีการเจริญเติบโตและความเข้มข้นของวิตามินซีในร่างกายสูงกว่ากลุ่มปลาที่ได้รับ AS และ EcA เมื่อเสริมวิตามินซีแต่ละรูปแบบลงในอาหารในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เท่ากัน อย่างไรก็ตาม พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริม AS มีความเข้มข้นของวิตามินซีในร่างกายต่ำที่สุด และไม่สามารถตรวจวัดปริมาณวิตามินซีในกลุ่มปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี เช่นเดียวกันกับการศึกษาโดย El Naggar และ Lovell (1991) ซึ่งเปรียบเทียบการใช้ AsA, AMP และ AS เสริมลงในอาหารปลากดอเมริกันที่ระดับต่างๆ พบว่า ปลาที่ได้รับ AsA และ AMP มีการเจริญเติบโตสูงไม่แตกต่างกันในทุกระดับความเข้มข้นของวิตามินซีที่เสริมในอาหารตั้งแต่ระดับ 11-132 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม แต่กลุ่มปลาที่ได้รับ AS มีการเจริญเติบโตต่ำกว่าปลากลุ่มอื่นๆ ทั้งที่ได้รับเนื้อวิตามินซีในระดับ 11-132 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเท่ากัน เมื่อวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าของปลาแต่ละกลุ่ม พบว่าความเข้มข้นของวิตามินซีในอวัยวะดังกล่าวของปลาทุกชุดการทดลองเพิ่มขึ้นตามปริมาณวิตามินซีที่เสริมลงในอาหารโดยตรง อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณากลุ่มปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีทั้ง 3 รูปแบบในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซีเท่ากัน พบว่ากลุ่มปลาที่ได้รับ AMP มีความเข้มข้นของวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าสูงที่สุด ขณะที่กลุ่มปลาที่ได้รับ AS มีความเข้มข้นของวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าต่ำที่สุด การศึกษาครั้งนี้คณะผู้ทำการศึกษาให้ความเห็นว่า AMP มีความคงทนต่อการเสียสภาพได้ดี จึงคงเหลืออยู่ในอาหารสูงและมีผลให้ปลาได้รับเนื้อวิตามินซีเข้าสู่ร่างกายได้มาก ส่วนอาหารที่เสริม AsA วิตามินซีอาจสูญเสียสภาพไปในกระบวนการเตรียมอาหารหรือละลายระหว่างการให้อาหารและคงเหลืออยู่ในอาหารน้อยจึงทำให้ปลาได้รับวิตามินซีในปริมาณต่ำกว่า ส่งผลให้ความเข้มข้นของวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าของปลากลุ่มนี้ต่ำกว่าปลาที่ได้รับ AMP ส่วน AS ถูกย่อยและดูดซึมในลำไส้ของปลาได้น้อย จึงมีผลให้ปริมาณวิตามินซีในตับและไตของปลามีค่าต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Shiau และ Hsu (1995) ซึ่งทดสอบประสิทธิภาพของวิตามินซีรูปแบบ AMP, AS และ AsA ในปลานิลพันธุ์ผสม (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) พบว่า ถึงแม้ปลาที่ได้รับ AS จะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างไปจากปลากลุ่มที่ได้รับ AsA และ AMP ในระดับที่ได้รับเนื้อวิตามินซีเท่ากัน แต่ในตับปลาที่ได้รับ AMP มีปริมาณวิตามินซีสูงกว่ากลุ่มปลาที่ได้รับ AsA และ AS ผลการศึกษาดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่าปลาสามารถดูดซึมนำ AMP เข้าสู่ร่างกายได้มีประสิทธิภาพมากกว่าการดูดซึม AS

Skelbaek และคณะ (1990) ทดสอบความคงสภาพของวิตามินซีเคลือบ 4 รูปแบบในอาหารปลาเรนโบว์เทราท์ โดยจัดเตรียมอาหารทดลองซึ่งเสริม AsA, GCA, EcA และ PcA ลงในอาหารในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซีเท่ากันทั้ง 4 สูตร จากนั้นทำการเก็บรักษาอาหารดังกล่าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และสุ่มตัวอย่างออกมาวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีที่เหลืออยู่ทุกระยะเวลา 3 เดือน พบว่าภายใน 3 เดือนแรก GCA และ EcA มีความคงสภาพในอาหารใกล้เคียงกับ AsA โดยมีปริมาณคงเหลืออยู่ในอาหารน้อยกว่า 10 % จากปริมาณเริ่มต้น ในขณะที่ PcA ยังมีปริมาณคงเหลืออยู่ในอาหารสูงมาก (72.6 %) และเมื่อเก็บรักษาอาหารต่อไปจนถึงระยะเวลา 9 เดือน พบว่า PcA สูญเสียออกไปเพียง 15 % จึงเลือกนำ PcA มาทดสอบประสิทธิภาพการใช้งานในปลาเรนโบว์เทราท์เปรียบเทียบกับ AsA โดยเสริมลงในอาหารให้มีปริมาณเนื้อของวิตามินซี 150 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเท่ากัน พบว่าการเจริญเติบโตของปลาทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน อีกทั้งเมื่อวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในตับของปลา พบว่า กลุ่มปลาที่ได้รับ AsA และ PcA มีความเข้มข้นของวิตามินซีในตับไม่แตกต่างกันในระยะเวลาการศึกษา 8 สัปดาห์ แสดงให้เห็นว่า PcA มีประสิทธิภาพการใช้งานในปลาเรนโบว์เทราท์ที่ดีไม่แตกต่างจาก AsA อีกทั้งยังมีความคงทนต่อการสูญเสียสภาพในระหว่างการเก็บรักษาที่ดีกว่า

Sato และคณะ (1991a) ศึกษาผลการใช้ AS เสริมลงในอาหารปลาเรนโบว์เทราท์เปรียบเทียบกับอาหารเสริม AsA ในระดับที่มีเนื้อวิตามินซีเท่ากันกับที่ระดับต่างๆ พบว่าการเจริญเติบโตไม่มีความแตกต่างกันในปลาแต่ละกลุ่ม โดยที่ค่าอัตราส่วนของไฮดรอกซีโปรลีนต่อโปรลีนในคอลลาเจนจากกระดูกและผิวหนังของปลามีค่าเป็นปกติเมื่อปลาได้รับวิตามินซีทั้งสองรูปแบบในระดับที่มีเนื้อวิตามินซีสูงกว่า 100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม แต่ปลากลุ่มที่ได้รับ AS มีความเข้มข้นของวิตามินซีในตับและเลือดต่ำกว่ากลุ่มปลาที่ได้รับ AsA ขณะที่การศึกษาประสิทธิภาพการใช้ AMP ซึ่งรายงานโดย Sato และคณะ (1991b) พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP มีความเข้มข้นของวิตามินซีในตับและเลือดสูงกว่ากลุ่มปลาที่ได้รับ AsA โดยที่มีการเจริญเติบโตและการรอดตายไม่แตกต่างกัน อีกทั้งมีค่าอัตราส่วนของไฮดรอกซีโปรลีนต่อโปรลีนในคอลลาเจนจากกระดูกและผิวหนังของปลาที่ไม่ต่างกันเมื่อเสริมวิตามินซีทั้งสองรูปแบบลงในอาหารในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ขึ้นไป

Mustin และ Lovell (1992) ศึกษาการใช้แอสคอบิลโมโนฟอสเฟตโซเดียม (ascorbyl-monophosphate-sodium, AMP-Na) เปรียบเทียบกับการใช้ AMP ในปลากดอเมริกันขนาด 1.5 กรัม พบว่าวิตามินซีทั้ง 2 รูปแบบมีประสิทธิภาพการใช้งานไม่แตกต่างกัน โดยระดับที่มีเนื้อวิตามินซี 15 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระดับที่เพียงพอที่จะทำให้การเจริญเติบโต ค่าฮีมาโตคริต (haematocrit) และปริมาณคอลลาเจนในกระดูกสันหลังของปลามีค่าไม่แตกต่างจากกลุ่มปลาที่ได้รับวิตามินซีในระดับที่สูงกว่า

Volker และ Fenster (1994) ศึกษาประสิทธิภาพของ APP เปรียบเทียบกับ AsA โดยจัดเตรียมอาหารทดลอง 2 สูตรซึ่งเสริมวิตามินซีแต่ละรูปแบบในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ทำการทดลองในปลาเรนโบว์เทราท์ขนาด 219 กรัม เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ โดยมีปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีเป็นชุดควบคุม พบว่ากลุ่มปลาที่ได้รับอาหารเสริม APP มีความเข้มข้นของวิตามินซีในตับสูงกว่ากลุ่มปลาที่ได้รับ AsA และปลาชุดควบคุมที่ขาดวิตามินซีมีความเข้มข้นของวิตามินซีในตับต่ำอย่างเห็นได้ชัด

Wahli และคณะ (1995) ศึกษาถึงประสิทธิภาพของ ScA ที่มีต่อความต้านทานการติดเชื้อ *Ichthyophthirius multifilis* ในปลาเรนโบว์เทราท์ โดยทดสอบเปรียบเทียบกับ APP ในระดับที่มีเนื้อวิตามินซี 50 และ 2,000 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเท่ากัน โดยมีกลุ่มปลาที่ไม่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีเป็นชุดควบคุม หลังจากที่ปลาได้รับอาหารทดลองแต่ละสูตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์ จึงใส่เชื้อดังกล่าวลงในตู้ทดลอง พบว่าที่ระยะเวลา 8 วันหลังจากติดเชื้อปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี ตลอดจนกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม ScA และ APP ในระดับที่มีเนื้อวิตามินซี 50 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีการตายสูง ขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารเสริม ScA และ APP ในระดับที่มีเนื้อวิตามินซี 2,000 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีการตายต่ำไม่แตกต่างกัน ดังนั้นคณะผู้ทำการศึกษาจึงให้ความเห็นว่า ScA และ APP มีประสิทธิภาพการใช้งานในด้านความต้านทานการติดเชื้อไม่แตกต่างกัน

Merchie และคณะ (1996) ศึกษาถึงประสิทธิภาพการใช้งาน AP เปรียบเทียบกับ APP ในลูกปลากะพงยุโรปวัยอ่อน โดยในการทดลองครั้งแรก จัดเตรียมอาหารทดลองที่มีความเข้มข้นของ AP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซีตั้งแต่ 0-650 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ให้กับปลา 4 กลุ่ม และเปรียบเทียบกับกลุ่มปลาที่ได้รับอาหารทดลองเสริม APP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 650 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ผลการทดลองพบว่าลูกปลากะพงยุโรปกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม AP ทุกระดับมีความเข้มข้นของวิตามินซีในร่างกายต่ำกว่ากลุ่มปลา

ที่ได้รับอาหารเสริม APP อย่างเห็นได้ชัด คณะผู้ทำการศึกษาสรุปว่า APP มีประสิทธิภาพการใช้งานได้ดีกว่า AP และเริ่มการทดลองชุดต่อมาโดยวางแผนการทดลองเพื่อศึกษาระดับความต้องการ APP ในปลากะพงยุโรป และปลาเทอร์บอตระยะวัยอ่อน จากผลการศึกษา พบว่า ระดับของ APP ที่เสริมลงในอาหารในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 20 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นปริมาณที่เพียงพอสำหรับส่งผลให้มีการเจริญเติบโต และระดับความเข้มข้นของวิตามินซีในร่างกายของปลาทั้งสองชนิดให้เป็นปกติได้

ด้านความต้องการวิตามินซีของปลา พบว่ามีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อความต้องการวิตามินซีของปลา ได้แก่ ชนิดของปลา ตัวอย่างเช่นการศึกษาในปลากดอเมริกัน พบว่ามีความต้องการวิตามินซีอย่างน้อย 60 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (Murai *et al.*, 1978) ขณะที่ปลาเรนโบว์เทราท์มีความต้องการอย่างน้อย 100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (Halver, 1989) ความแตกต่างของความต้องการวิตามินซีในปลาแต่ละชนิดดังกล่าวนี้ Dabrowski และคณะ (1994) ให้ความเห็นว่าปลาในกลุ่มที่อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีความอิ่มตัวของออกซิเจนสูง เช่นปลาเรนโบว์เทราท์ ต้องการวิตามินซีเพื่อใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระที่มีในร่างกายมากกว่ากลุ่มปลาที่อาศัยในสภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจนต่ำซึ่งมีการเกิดอนุมูลอิสระในปริมาณที่น้อยกว่า นอกจากนี้ความต้องการวิตามินซีของปลายังขึ้นกับอายุและขนาดของปลา เช่นในการศึกษาถึงระดับความต้องการวิตามินซีของปลากดอเมริกันโดย Andrews และ Murai (1975) พบว่าในปลาขนาด 14.5 กรัม ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 448-668 % ในระยะเวลา 16 สัปดาห์ มีความต้องการวิตามินซีในระดับต่ำที่สุด 25 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จึงเพียงพอที่จะส่งผลให้มีอัตราการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารเป็นไปตามปกติและไม่ต่างไปจากกลุ่มปลาที่ได้รับวิตามินซีในปริมาณที่สูงกว่า ในขณะที่กลุ่มปลาที่ขาดวิตามินซีมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำที่สุดในการศึกษารวมถึงมีประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ แต่ในการศึกษาด้วยระบบการศึกษาเดียวกันในปลาขนาดเล็ก (2.3 กรัม) ที่มีอัตราการเจริญเติบโต 2,537-3,940 % ในระยะเวลา 28 สัปดาห์ พบว่า ปลามีความต้องการวิตามินซีในปริมาณต่ำสุด 50 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ในการศึกษานี้คณะผู้ทำการศึกษาสังเกตพบว่าปลาขนาดเล็กที่ได้รับวิตามินซี 25 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และ 50 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันในระยะ 12 สัปดาห์แรก แต่เมื่อผ่านเข้าสู่สัปดาห์ที่ 16 จึงเริ่มพบความแตกต่างของอัตราการเจริญเติบโตระหว่างปลาทั้ง 2 กลุ่ม การศึกษาดังกล่าวนี้ชี้ชัดให้เห็นว่าในปลาขนาดเล็กที่มี

อัตราการเจริญเติบโตสูง (Tacon, 1991) มีความต้องการวิตามินซีในปริมาณสูงกว่าในปลาขนาดใหญ่ ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ว่าปลาขนาดเล็กต้องการวิตามินซีเพื่อใช้สร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในร่างกายมากกว่าปลาขนาดใหญ่ (Masumoto *et al.*, 1991) นอกจากนี้ความต้องการวิตามินซีของปลายังขึ้นกับสิ่งแวดล้อมที่ปลาอาศัย โดยปลาต้องการวิตามินซีมากขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเครียดสูง เช่นในสภาพที่มีออกซิเจนต่ำ (chronic hypoxic stress) ในปลาปากนกแก้วจุด (spotted parrot fish, *Oplegnathus punctatus*) ขนาด 2.4 กรัม ที่ขาดวิตามินซีจะแสดงอาการผิดปกติเกิดขึ้น โดยพบว่า มีการเจริญเติบโตลดต่ำลงในเวลา 6 สัปดาห์ของการศึกษา และเกิดการคดงอของกระดูกสันหลังแบบสโคลิโอซิสขึ้นในเวลา 8 สัปดาห์ต่อมา ขณะที่ในกลุ่มปลาที่ขาดวิตามินซีแต่ไม่อยู่ในสภาวะเครียดไม่แสดงความผิดปกติใดๆ ตลอดเวลาการศึกษา 21 สัปดาห์ (Ishibashi *et al.*, 1991 อ้างโดย Masumoto *et al.*, 1991)

Tacon (1991) ได้รวบรวมข้อมูลระดับความต้องการวิตามินซีของปลาแต่ละชนิดดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ระดับความต้องการวิตามินซีของปลาแต่ละชนิด

ที่มา : Tacon (1991)

ชนิดของสัตว์น้ำ	ระดับความต้องการวิตามินซี (มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม)
ปลากดอเมริกัน	60
ปลากดอเมริกัน	11*
ปลานิล	1,250
ปลาเรนโบว์เทราท์	100-150
ปลาชินุค ซัลมอล (chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*)	100-150
ปลาโคโฮ ซัลมอล (coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*)	50-80
ปลาแอตแลนติก ซัลมอล (Atlantic salmon, *Salmo salar*)	50**
ปลากะพงขาว	700-1,100
ปลาแมกซิกันซิคคลิด	40-110
ปลาลิ้นหมา (flounder, *Paralichthys olivaceus*)	60-100*
ปลาซีกเดียว	200

* ใช้วิตามินซีรูปแบบ AMP

** ใช้วิตามินซีรูปแบบ EcA

นอกจากนี้ระดับความต้องการวิตามินซีของปลายังขึ้นอยู่กับรูปแบบของวิตามินซีที่ใช้ เมื่อใช้วิตามินซีรูปแบบที่มีความคงทนต่อการเสียสภาพมากขึ้น และปลาสามารถดูดซึมนำไปใช้ในร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ค่าความต้องการวิตามินซีของปลาลดลง เช่นจากรายงานการศึกษาความต้องการวิตามินซีในปลากดอเมริกัน โดย Lim และ Lovell (1978) พบว่า ปลาดังกล่าวมีความต้องการ AsA อย่างน้อยที่สุด 60 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จึงเป็นระดับที่เพียงพอต่อความต้องการทั้งในด้านการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และการรักษาสภาพของเนื้อเยื่อให้เป็นปกติ ทั้งนี้เนื่องจากในกลุ่มปลาที่ได้รับวิตามินซี 30 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ตรวจพบว่าเส้นเหงือกมีการบิดตัวเสียรูป ถึงแม้ว่าปลากลุ่มนี้จะมีการเจริญเติบโตและการรอดตายที่เป็นปกติก็ตาม ขณะที่ Lovell และ El Naggar (1989) ศึกษาถึงความต้องการวิตามินซีรูปแบบ AMP ในปลาชนิดเดียวกัน พบว่า AMP ในระดับที่มีเนื้อวิตามินซี 11 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระดับที่เพียงพอสำหรับการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และรักษาความเข้มข้นของวิตามินซีในร่างกายให้เป็นปกติได้ การศึกษาดังกล่าวคล้ายกับการศึกษาความต้องการวิตามินซีในปลากะพงขาวขนาด 1.85 กรัม โดย Phromkunthong และคณะ (1994) พบว่า เมื่อใช้ AMP เป็นแหล่งของวิตามินซี ปริมาณที่เสริมลงในอาหาร 30 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระดับที่เพียงพอที่ทำให้ปลามีอัตราการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และอัตราการรอดตายสูงไม่แตกต่างจากกลุ่มปลาที่ได้รับ AMP ในระดับที่สูงกว่า ขณะที่การศึกษาในปลาชนิดเดียวกันที่มีขนาด 1.85 กรัม เท่ากัน โดยใช้ AsA เป็นแหล่งของวิตามินซีโดย Boonyaratpalin และคณะ (1989) พบว่า ปลามีความต้องการวิตามินซีที่สูงถึง 500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ขึ้นไปจึงจะมีผลให้การเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และอัตราการรอดตายเป็นปกติ ผลการศึกษาดังกล่าวทำให้เห็นได้ว่าสามารถลดปริมาณการใช้วิตามินซีในอาหารปลาลงไปมากเมื่อใช้วิตามินซีรูปแบบ AMP

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของวิตามินซีรูปแบบต่างๆ ที่มีต่อสรีรวิทยา ประสิทธิภาพการใช้อาหาร อัตราการรอดตาย องค์ประกอบของร่างกาย และเนื้อเยื่อวิทยาในปลากดเหลือง ทั้งนี้เพื่อหารูปแบบของวิตามินซีที่มีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุดที่จะใช้ผสมอาหารเพื่อเลี้ยงปลากดเหลือง

2. เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของวิตามินซีรูปแบบที่มีความเหมาะสมที่สุด (ซึ่งได้ผลมาจากการทดลองขั้นตอนที่ 1) เพื่อประยุกต์ใช้เสริมในอาหารผสมสำหรับเลี้ยงปลากดเหลือง

3. เพื่อศึกษาถึงพยาธิสภาพ การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาระหว่างปลากดเหลืองกลุ่มที่ได้รับอาหารที่ผสมวิตามินซีและปลากดเหลืองกลุ่มที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมวิตามินซี

4. เพื่อศึกษาระดับของวิตามินซี คอลลาเจนและไฮดรอกซีโปรลีนในเนื้อเยื่อและอวัยวะที่เกี่ยวข้องในปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารที่มีวิตามินซีรูปแบบต่างๆ และในระดับต่างๆ ซึ่งทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพการนำไปใช้ของวิตามินซีรูปแบบนั้นๆ ในสัตว์น้ำ

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การทดลองชุดที่ 1 และชุดที่ 2 มีวัสดุและอุปกรณ์เช่นเดียวกัน ได้แก่

วัสดุ

1. พันธุ์ปลากดเหลือง

ลูกปลากดเหลืองขนาดความยาว 2.5-3.0 เซนติเมตร นำมาจากสถานีประมงน้ำจืดสงขลา ตั้งอยู่ที่กิ่งอำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีระดับงานวิเคราะห์ (analytical grade) สำหรับใช้เตรียมอาหารทดลอง (ตารางที่ 5)

2.2 วิตามินซีรูปแบบต่างๆ ที่ใช้ในอาหารทดลองแต่ละสูตร (ตารางที่ 6)

2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในอวัยวะของปลา (ภาคผนวก ก)

2.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน (ภาคผนวก ก)

2.5 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโปรลีน (ภาคผนวก ก)

2.6 สารเคมีสำหรับการศึกษาด้านเนื้อเยื่อ (ภาคผนวก ก)

2.7 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของอาหารและองค์ประกอบร่างกายปลา (ภาคผนวก ก)

2.8 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ภาคผนวก ก)

2.9 สารเคมีสำหรับการตรวจสุขภาพและใช้เพื่อป้องกันและรักษาโรคปลาก่อนเริ่มการทดลอง ได้แก่ฟอร์มาลีน (formalin) และมาลาไคท์กรีน (malachite green)

3. อาหารสำหรับอนุบาลลูกปลาก่อนเริ่มการทดลอง

อาหารอนุบาลลูกปลาในระยะแรกก่อนเริ่มต้นการทดลองเตรียมตามวิธีการของวุฒิพรและคณะ (2540)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงปลาทดลอง

1.1 ถังไฟเบอร์กลาสกลม ปริมาตร 1.2 ลูกบาศก์เมตร

1.2 ตู้ทดลอง ตู้กระจกขนาด 100 × 50 × 47 เซนติเมตร ปิดด้านข้างและด้านหลังตู้ทดลองด้วยแผ่นพลาสติกสีทึบทั้ง 3 ด้านเพื่อลดการรบกวนปลาทดลองจากภายนอก ตู้ทดลองดังกล่าวจัดวางตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD)

1.3 อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วยเครื่องให้อากาศ สายยาง หัวทราย

1.4 อุปกรณ์ระบบเปลี่ยนถ่ายน้ำ ประกอบด้วยสายยางดูดตะกอน สายยางเปลี่ยนถ่ายน้ำ ปั๊มน้ำชนิดจุ่ม (submarine pump)

1.5 อุปกรณ์ขนย้ายปลา ได้แก่สวิงช้อนปลา ถังน้ำความจุ 20 ลิตร

2. อุปกรณ์เตรียมอาหารทดลอง

2.1 เครื่องเตรียมอาหาร ของ Kenwood รุ่น Chif ประกอบด้วยชุดเครื่องผสมอาหารแบบมีใบพัด และชุดเครื่องอัดเม็ดอาหารซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางหน้าแว่น 2 มิลลิเมตร

2.2 อุปกรณ์ชั่งตวงวัสดุอาหาร แร่ธาตุ และวิตามิน ได้แก่เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของ Sartorius รุ่น Research กระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ของ Sartorius รุ่น Basic ถาดเตรียมอาหาร และถุงโพลีเอทธิลีน

2.3 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เพื่อแช่แข็งอาหารทดลองระหว่างรอนำมาใช้

3. อุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพน้ำ

3.1 อุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (dissolve oxygen, DO) ได้แก่เครื่อง DO meter ของ YSI model 57

3.2 อุปกรณ์วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ได้แก่เครื่อง pH meter ของ Mettler Delta รุ่น 340

3.3 อุปกรณ์วัดอุณหภูมิน้ำ ได้แก่เทอร์โมมิเตอร์

3.4 อุปกรณ์เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ค่าความกระด้าง (hardness) และค่าความเป็นด่าง (alkalinity) ได้แก่ขวดรูปชมพู่ บิวเรต บีกเกอร์ ไปเปต และลูกยาง

4. อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ถังน้ำความจุ 15 ลิตร ถังพลาสติกขนาด 3 ลิตร และสวิงช้อนปลา

5. อุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในอวัยวะของปลา

สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ของ Shimadzu รุ่น UV 1201V ถังไนโตรเจนเหลว เครื่องมือผ่าตัด เครื่องบดเนื้อเยื่อ (homoginizer) หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร กรวยกรอง กระบอกตวง ไปเปต บิวเรต ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ และขวดวัดปริมาตร (volumetric flask)

6. อุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน

เครื่องเขย่าพร้อมอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ของ GLF รุ่น 1083 เครื่องกรองสูญญากาศพร้อมอุปกรณ์ ขวดรูปชมพู่ กระบอกตวง ไปเปต บีกเกอร์ ขวดชั่ง ตู้ดูดควัน ตู้อบ (hot air oven) ของ Memmert และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

7. อุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโปรลีน

สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร กระบอกตวง ไปเปต ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ ขวดวัดปริมาตร และหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ของ Tomy รุ่น SS320

8. อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบร่างกายของปลา

8.1 อุปกรณ์วิเคราะห์ความชื้น ได้แก่ขวดชั่ง (weighing bottle) ตู้อบ โถอบแห้ง (desiccator) และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

8.2 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ได้แก่หลอดย่อยโปรตีน (digestion tube) เครื่องย่อย (digestion apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Kjeldatherm เครื่องกลั่น (distillation apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Vapodest 1 กระบอกตวง บิวเรต และขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

8.3 อุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน ได้แก่ชุดเครื่องวิเคราะห์ไขมัน (fat extractor) ของ Gerhardt รุ่น Bonn ซึ่งประกอบด้วย เตาสกัดไขมัน กระบอกแก้วสกัดสาร (soxhlet tube) กระบอกแก้วควบแน่น (condenser) ไส้กรองสาร (thimble) ขวดสกัดสาร (extraction flask) ตู้อบ และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

8.4 อุปกรณ์วิเคราะห์เถ้า ได้แก่ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) เตาเผา (muffle furnace) ของ Gallenkamp และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

9. อุปกรณ์ศึกษาพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อ

ประกอบด้วยชุดอุปกรณ์ผ่าตัด ได้แก่กรรไกร และมีดผ่าตัด ขวดเก็บตัวอย่างขนาดความจุ 30 มิลลิลิตร เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ของ Technicon Corporation รุ่น Mod. 2A Autotechnicon Mono เครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อ ของ Jung AG Heidelberg ตู้อบ อ่างน้ำอุ่น (warm bath) เตาร้อน (hot plate) สไลด์ ตะเกียงแอลกอฮอล์ กล้องถ่ายภาพ ของ Olympus รุ่น BX 50 และ กล้องจุลทรรศน์ ของ Olympus รุ่น C-35 AD

วิธีการ

1. การทดลองที่ 1 : การศึกษาถึงประสิทธิภาพของวิตามินซีรูปแบบต่างๆ ที่มีต่อปลากดเหลือง (The Study on Bioavailability of Vitamin C Forms in Green Catfish, *Mystus nemurus* Cuv. & Val.)

1.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำปลากดเหลืองวัยอ่อนขนาดความยาว 2.5 เซนติเมตร จำนวน 800 ตัวอนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 1.2 ลูกบาศก์เมตร โดยใส่น้ำในถังให้ได้ปริมาตรความจุ 0.4 ลูกบาศก์เมตร เพื่อให้ลูกปลาปรับตัวเข้ากับสภาพการทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์ อนุบาลลูกปลาโดยใช้อาหารอัดเม็ดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ระหว่างการอนุบาลทำการป้องกันและ

รักษาการติดโรคจุดขาว (white spot disease) ซึ่งเกิดจากเชื้อปรสิต *Ichthyopthirius multifilis* ด้วยสารละลายมาลาไคท์กรีน 0.1 ส่วนในล้านส่วน ผสมกับสารละลายฟอร์มาลีน 25 ส่วนในล้านส่วน เป็นเวลา 3 วัน เมื่อกำจัดปรสิตหมดสิ้นจึงอนุบาลต่อไปจนกระทั่งลูกปลามีสุขภาพแข็งแรง ทำการชั่งน้ำหนักลูกปลาและนำลงตู้ทดลองเพื่อเริ่มฝึกลูกปลาให้ยอมรับอาหารทดสอบ ซึ่งเสริม AsA 500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลาก่อนการทดลอง 3 วัน

1.2 การเตรียมน้ำสำหรับใช้

น้ำประปาที่ใช้เลี้ยงปลาทำการเติมปูนแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) 50 กรัมต่อน้ำ 1,000 ลิตร เพื่อปรับคุณภาพน้ำให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมโดยมีค่าความเป็นด่าง และความกระด้างมากกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 6.5-7.5 พักน้ำเลี้ยงปลาดังกล่าวในบ่อพักน้ำเป็นเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ โดยมีการเติมอากาศด้วยเครื่องพ่นอากาศตลอดเวลาการพักน้ำ เพื่อให้สารคลอรีนในน้ำประปาสลายตัวหมดสิ้นก่อนใช้ ทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำก่อนและระหว่างทำการทดลองได้แก่ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าความกระด้าง และค่าความเป็นด่าง ตามวิธีการของ Boyd และ Tucker (1992) (คุณภาพน้ำตลอดช่วงการทดลองแสดงในภาคผนวก ข)

1.3 การเตรียมอาหารทดลอง

ชุดการทดลองที่ 1 เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของวิตามินซี 6 รูปแบบได้แก่แอล-แอสคอบิค แอสิด (AsA) วิตามินซีเคลือบไขมัน (OC) วิตามินซีเคลือบซิลิโคน (ScA) แอสคอบิลซัลเฟต (AS) แอสคอบิลโมโนฟอสเฟตแมกนีเซียม (AMP) และแอสคอบิลโพลีฟอสเฟต (APP) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นกลุ่มลูกปลาที่ได้รับอาหารซึ่งไม่เสริมวิตามินซี วิตามินซีแต่ละรูปแบบที่ใช้ทดสอบจะผสมลงในอาหารทดลองแต่ละสูตรในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเท่ากันทุกสูตร (500 mg equimolar ascorbic acid / kg diet) ดังแสดงในตารางที่ 6

การเตรียมอาหารทดสอบโดยแยกชั่งวิตามินและแร่ธาตุแต่ละชนิดอย่างละเอียดตามตารางที่ 7 และตารางที่ 8 บดแร่ธาตุทุกชนิดรวมกับวิตามินที่ละลายไขมัน ส่วนวิตามินที่ละลายน้ำจัดเตรียมเป็นสารละลายวิตามินรวม โดยนำลงละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ยกเว้นวิตามินซีแต่ละรูปแบบจะแยกละลายน้ำผสมลงในอาหารทดลองแต่ละสูตร แยกชั่งวัสดุอาหารบริสุทธิ์ที่ต้องใช้ในการเตรียมอาหาร

ทดสอบ (ตารางที่ 5) บรรจุวัสดุอาหารแต่ละชนิดแยกในถุงพลาสติกโพลีเอทิลีน จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นน้ำมันผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสมอาหาร เมื่อส่วนผสมวัสดุอาหารดังกล่าวผสมจนเป็นเนื้อเดียวกันจึงนำส่วนผสมที่เป็นน้ำมันผสมลงไป ผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันจากนั้นจึงเติมน้ำกลั่นและสารละลายวิตามินที่ละลายน้ำรวมทั้งเติมวิตามินซีแต่ละรูปแบบลงในอาหารแต่ละสูตร โดยให้มีปริมาตรน้ำรวมทั้งหมด 35 % ของน้ำหนักอาหาร จากนั้นจึงผสมวัสดุอาหารดังกล่าวด้วยเครื่องผสมอาหาร และอัดเม็ดอาหารจนมีลักษณะเป็นเส้นมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร นำอาหารทดสอบผ่านการเป่าลมจนกระทั่งหมาด เพื่อความสะดวกในการตัดเป็นท่อน จากนั้นบรรจุในถุงพลาสติกโพลีเอทิลีนและห่อภายนอกด้วยพลาสติกสีดำ เพื่อป้องกันแสงและนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสระหว่างรอการนำมาใช้

นำอาหารทดสอบที่ได้ผ่านการวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการ ได้แก่ปริมาณโปรตีน ไขมัน ความชื้น และเถ้าตามวิธีการของ AOAC (1985) พบว่า อาหารทดลองมีโปรตีน 33.30 ± 0.24 % ไขมัน 3.36 ± 0.28 % ความชื้น 15.30 ± 0.88 % และเถ้า 5.53 ± 0.06 %

ตารางที่ 5 ชนิดและปริมาณวัสดุอาหารสูตรพื้นฐาน

วัสดุอาหาร	ปริมาณในอาหาร (%)
เคซีน (vitamin free casein)	29.0
เด็กตริน (dextrin)	30.0
เซลลูโลส (cellulose powder)	18.5
คาร์บอกซี เมทิล เซลลูโลส (carboxy methyl cellulose)	3.0
เจลาติน (gelatin)	6.0
แร่ธาตุรวม	5.5
น้ำมันปลา	3.0
น้ำมันพืช	3.0
วิตามินรวม	2.0
รวม	100

ตารางที่ 6 ปริมาณเนื้อของวิตามินซีรูปแบบต่างๆ ที่ใช้ผสมในอาหารทดลองสำหรับการทดลองที่ 1

สูตรอาหาร	รูปแบบวิตามินซี	ปริมาณเนื้อของวิตามินซี (ascorbic acid activity) (%)	ปริมาณที่ใช้ในอาหาร (มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม)
1 (T_1)	control (D)	-	0
2 (T_2)	L-ascorbic acid (AsA)	100	500.00
3 (T_3)	ascorbyl-2-sulfate (AS)	48	1,041.67
4 (T_4)	ascorbyl-2-polyphosphate (APP)	25	2,000.00
5 (T_5)	ascorbyl-2-monophosphate-magnesium (AMP)	46	1,086.96
6 (T_6)	oil coated (OC)	90	555.56
7 (T_7)	silicone coated (ScA)	96	520.84

ตารางที่ 7 ชนิดและปริมาณแร่ธาตุรวมที่ใช้ในอาหารทดลองสูตรพื้นฐาน

ชนิดของแร่ธาตุ	กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม
$CaHPO_4.2H_2O$	20.7
$CaCO_3$	14.8
KH_2PO_4	10
KCl	0.1
NaCl	6
$MnSO_4.H_2O$	0.35
$FeSO_4.7H_2O$	0.5
$MgSO_4$	3
KIO_3	0.1
$CuSO_4.5H_2O$	0.03
$ZnCO_3$	0.15
$CoCl_2.6H_2O$	0.0017
$NaMoO_4.2H_2O$	0.0083
$Na_2SeO_3.5H_2O$	0.0002

ตารางที่ 8 ชนิดและปริมาณวิตามินรวมที่ใช้ในอาหารทดลองสูตรพื้นฐาน (สูตรที่ 1)

ชนิดของวิตามิน	ปริมาณในอาหาร 1 กิโลกรัม
วิตามิน เอ (vitamin A-palmitate)*	5,000 หน่วยสากล
วิตามิน ดี$_3$ (vitamin D_3; cholecalciferol)*	1,000 หน่วยสากล
วิตามิน อี (vitamin E; DL-∝-tocopherol)*	50 หน่วยสากล
วิตามิน เค$_1$ (vitamin K_1; phyloquinone)	10 มิลลิกรัม
โคลีน คลอไรด์ (choline chloride)	550 มิลลิกรัม
ไนอะซิน (nicotinic acid)	100 มิลลิกรัม
วิตามิน บี$_1$ (vitamin B_1; thiamine hydrochloride)	20 มิลลิกรัม
วิตามิน บี$_2$ (vitamin B_2; riboflavin)	20 มิลลิกรัม
วิตามิน บี$_6$ (vitamin B_6; pyridoxine hydrochloride)	20 มิลลิกรัม
กรดแพนโตเทนิค (D-pantothenic acid calcium salt)	50 มิลลิกรัม
ไบโอติน (biotin)	5 มิลลิกรัม
กรดโฟลิค (folic acid)	5 มิลลิกรัม
วิตามิน บี$_{12}$ (vitamin B_{12}; cyanocobalamin)	0.02 มิลลิกรัม
อินโนซิทอล (myo-inositol)	100 มิลลิกรัม

*หมายเหตุ

วิตามิน เอ (vitamin A-palmitate)	1,750	หน่วยสากล ต่อมิลลิกรัม
วิตามิน ดี (vitamin D_3; cholecalciferol)	40,000	หน่วยสากล ต่อมิลลิกรัม
วิตามิน อี (vitamin E; DL-∝-tocopherol)	1.1	หน่วยสากล ต่อมิลลิกรัม

1.4 แผนการทดลองและการเก็บรวบรวมข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD-completely randomized design) และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1980) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 7 ชุดการทดลอง (treatments) แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ (replications) โดยใช้ปลาทดลองจำนวน 30 ตัวต่อซ้ำ แต่ละตู้ทดลองบรรจุน้ำปริมาตร 110 ลิตร โดยมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลาในทุกตู้ เริ่มต้นการทดลองโดยชั่งน้ำหนักปลาด้วยวิธีการแทนที่น้ำก่อนปล่อยปลาลงตู้ทดลองในทุกๆซ้ำ ให้อาหารที่มีวิตามินซีแต่ละรูปแบบตามแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธีเดียวกันกับการฝึกให้ปลายอมรับอาหารทดสอบโดยให้ปลากินจนอิ่ม ดูดตะกอนทำความสะอาดตู้ทดลองและเติมน้ำใหม่ให้มีปริมาตรเท่าเดิมโดยทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 70-100 % ทุก 2 วัน

การเก็บรวบรวมข้อมูลประกอบด้วย

1.4.1 การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะภายนอก

ในระหว่างการทดลองทุกวัน สังเกตลักษณะผิดปกติภายนอกได้แก่สีของลำตัว การตกเลือด และการเกิดบาดแผลที่ผิวหนัง ครีบ อวัยวะภายนอกอื่นๆ รวมทั้งการคดงอของลำตัว บันทึกความผิดปกติของพฤติกรรมปลาในแต่ละกลุ่ม

1.4.2 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

ชั่งน้ำหนักปลาทุก 2 สัปดาห์ เพื่อทราบน้ำหนักของปลาที่เพิ่มขึ้นและคำนวณอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลา และบันทึกผลอัตราการรอดตายของปลาในแต่ละชุดการทดลอง

การคำนวณน้ำหนักปลาที่เพิ่มเฉลี่ยต่อตัว (% weight gain) อ้างตามวิธีการของ Halver (1972) โดยใช้สูตร

น้ำหนักปลาที่เพิ่มเฉลี่ยต่อตัว (% weight gain)

$$= \frac{(\text{น้ำหนักปลาสุดท้าย} - \text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น})}{\text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น}} \times 100$$

การคำนวณอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) อ้างตามวิธีการของ Dupree และ Sneed (1966) โดยใช้สูตร

$$\text{อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR)} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากิน}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}$$

การคำนวณอัตราการรอดตายอ้างตามวิธีการของ Halver (1972) โดยใช้สูตร

$$\text{อัตราการรอดตาย (\%)} = \frac{\text{จำนวนปลาที่เหลือ} \times 100}{\text{จำนวนปลาเริ่มต้น}}$$

1.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในเนื้อเยื่อ

เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าของปลาทุกชุดการทดลอง โดยสุ่มปลา 6 ตัวในแต่ละชุดการทดลองแช่เยือกแข็งด้วยไนโตรเจนเหลวเพื่อป้องกันการเสียสภาพของวิตามินซีก่อนการวิเคราะห์ ทำการตัดตับและแยกเฉพาะไตส่วนหน้าออกชั่งน้ำหนัก แยกบดแต่ละอวัยวะของปลาในแต่ละซ้ำรวมกันด้วยสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก 5 % ด้วยเครื่องบดเนื้อเยื่อ (homoginizer) และนำไปผ่านการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีตามวิธีของ Roe (1967) (วิธีการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก)

1.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนในกระดูกสันหลังของปลาโดยสุ่มปลา 10 ตัวในแต่ละซ้ำของทุกชุดการทดลอง ตัดแยกกระดูกสันหลังออกบันทึกน้ำหนักรวมและนำไปวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนตามวิธีของ Wilson และ Poe (1973) (วิธีการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก)

1.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโปรลีน

นำคอลลาเจนที่สกัดได้จากการวิเคราะห์คอลลาเจนที่มีในกระดูกสันหลังของปลาในแต่ละซ้ำของทุกชุดการทดลองมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนตามวิธีของ Woessner (1961) (วิธีการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก)

1.4.6 การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

ระหว่างการทดลองเมื่อพบปลาในชุดการทดลองใดที่แสดงอาการผิดปกติ ทำการเก็บตัวอย่างโดยตัดส่วนตับ เหงือกและไตดองด้วยน้ำยาบูแอง (Bouin' s solution) เป็นเวลา 1 สัปดาห์จึงเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นแอลกอฮอล์ 70 % ก่อนจะนำไปผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีการของ Bancroft (1967) และศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (วิธีการศึกษาแสดงในภาคผนวก ก)

1.4.7 การวิเคราะห์องค์ประกอบร่างกายปลา

สุ่มตัวอย่างปลาก่อนเริ่มการทดลองจำนวน 10 ตัว วิเคราะห์ความชื้นในร่างกายทันทีและสุ่มตัวอย่าง 80 ตัวเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของร่างกาย ได้แก่ปริมาณโปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธีการของ AOAC (1985) เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการสุ่มปลา 3 ตัวจากทุกชุดการทดลองทำการวิเคราะห์ความชื้นในร่างกายและสุ่มตัวอย่างปลา 20 ตัวจากทุกชุดการทดลอง วิเคราะห์องค์ประกอบร่างกายด้วยวิธีเดียวกันกับตัวอย่างปลาก่อนเริ่มต้นการทดลอง (วิธีการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก)

การคำนาณค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio, PER) โดยใช้สูตรอ้างมาจาก Zeitoun และคณะ (1973)

$$\text{ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน} = \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}{\text{น้ำหนักโปรตีนที่ปลากิน}}$$

การคำนวณการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (apparent net protein utilization, ANPU) โดยใช้สูตรอ้างมาจาก Robinson และ Wilson (1985)

$$\text{การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (\%)} = \frac{\text{โปรตีนของตัวปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง-โปรตีนของตัวปลาเมื่อเริ่มทดลอง}}{\text{น้ำหนักโปรตีนทีปลากินตลอดการทดลอง}} \times 100$$

2. การทดลองที่ 2 : การศึกษาระดับความต้องการแอสคอบิล-2-โมโนฟอสเฟตแมกนีเซียมในปลากดเหลือง (The Study on Ascorbyl-2-Monophosphate Mg Requirement of Green Catfish, *Mystus nemurus* Cuv. & Val.)

2.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำปลากดเหลืองวัยอ่อนขนาดความยาว 3.5 เซนติเมตร จำนวน 800 ตัว มาอนุบาลและจัดเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมสัตว์ทดลองในชุดการทดลองที่ 1

2.3 การเตรียมน้ำสำหรับทดลอง

น้ำประปาที่ใช้ในการทดลองที่ 2 จัดเตรียมเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

2.2 การเตรียมอาหารทดลอง

อาหารทดลองพื้นฐานเตรียมด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 โดยใช้ AMP ในปริมาณความเข้มข้น 6 ระดับ ดังตารางที่ 9

2.3 แผนการทดลองและการเก็บรวบรวมข้อมูล

ชุดการทดลองที่ 2 ประกอบด้วยชุดการทดลอง 6 ชุดแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองและเก็บรวบรวมข้อมูลทั้งหมดเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

ตารางที่ 9 ปริมาณ AMP ที่ใช้ในอาหารทดลองแต่ละสูตร

ชุดที่	ปริมาณ AMP ที่ใช้ในอาหาร (มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม)	ปริมาณเนื้อวิตามินซีที่ได้รับ (มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม)
1	0	0
2	32.61	15
3	97.83	45
4	217.39	100
5	434.78	200
6	1,086.96	500

บทที่ 3

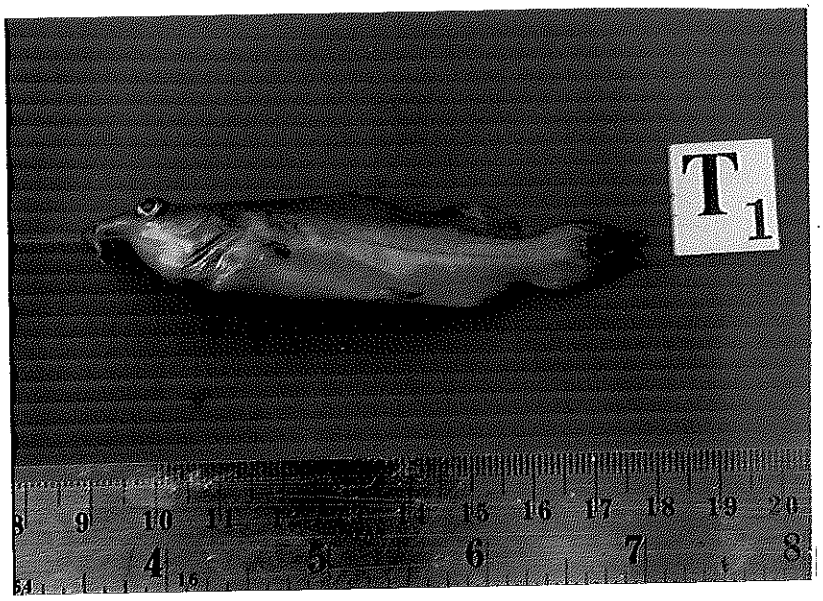
ผลการทดลอง

1. ผลการทดลองจากการทดลองที่ 1 (การศึกษาถึงประสิทธิภาพของวิตามินซีรูปแบบต่างๆ ที่มีต่อปลากดเหลือง)

1.1 ความผิดปกติและพฤติกรรมเนื่องจากการขาดวิตามินซีของปลากดเหลือง

เริ่มสังเกตพบความผิดปกติเกิดขึ้นในปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี (สูตรที่ 1) ในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง โดยพบว่าปลาในกลุ่มนี้บางตัวเกิดอาการช็อคในระหว่างการชั่งน้ำหนักหรือเปลี่ยนถ่ายน้ำและตายในที่สุด ลักษณะดังกล่าวไม่พบในปลาที่ได้รับวิตามินซีทุกรูปแบบ (ชุดการทดลองที่ 2-7) ต่อมาในสัปดาห์ที่ 5 เริ่มสังเกตพบความผิดปกติของปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีมากขึ้น กล่าวคือพบลักษณะการบิดงอและสึกกร่อนของระยางค์หนวด ตลอดจนระยางค์อื่นๆ ได้แก่ ครีบอก ครีบท้อง และหาง ปลาบางตัวมีกระพุ้งแก้มกางออกมากกว่าปกติ ตลอดจนมีการตกเลือดในบริเวณดังกล่าว (ภาพที่ 6) ในสัปดาห์ที่ 6 ของการทดลอง ความผิดปกติของปลากลุ่มนี้เพิ่มมากขึ้น โดยสีลำตัวของปลาดำเข้มมากกว่าปกติ ตาโปน ปลาบางตัวไม่สามารถควบคุมการทรงตัวได้ โดยสังเกตได้ว่าปลาว่ายน้ำอย่างไม่มีทิศทาง นอกจากนี้ยังมีพฤติกรรมเฉื่อยชา หลบซ่อนตามมุมตู้ทดลอง ปลาไม่มีการรวมฝูง ซึ่งต่างไปจากปลาที่ได้รับอาหารทดลองสูตรอื่นๆ ในสัปดาห์ที่ 7 ของการทดลอง พบว่ามีการสึกกร่อนของระยางค์หนวด และครีบต่างๆ เกิดขึ้นกับปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีทุกๆตัวในตู้ทดลองทั้ง 3 ซ้ำ นอกจากนี้พบว่าปลาบางตัวมีขากรรไกรล่างหดสั้นลงอย่างผิดปกติ (ภาพที่ 7) และตั้งแต่สัปดาห์ที่ 7 จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 10 พบว่าการรอดตายของปลาในกลุ่มนี้ต่ำมาก ปลามีการยอมรับอาหารน้อยมาก แตกต่างไปจากปลากลุ่มที่ได้รับอาหารที่เสริมวิตามินซีทุกรูปแบบ ซึ่งพบว่าปลาทุกตัวมีพฤติกรรมปกติ ตลอดจนไม่พบความผิดปกติของรูปร่างลักษณะภายนอกแต่อย่างใด ขนาดและรูปร่างของปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมวิตามินซีมีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่เสริมวิตามินซี (ภาพที่ 8)

ภาพที่ 6 ลักษณะกระพุ้งแก้มกางออกมากกว่าปกติและระยางค์สึกกร่อนของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี (T_1)



ภาพที่ 7 ลักษณะขากรรไกรล่างหดสั้นของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี (ศรชี้) (T_1)

ภาพที่ 8 เปรียบเทียบลักษณะปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี (T_1) กับปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซี (T_2)

1.2 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ และการรอดตายของปลากดเหลือง

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร ตลอดระยะเวลา 10 สัปดาห์ แสดงในตารางที่ 10 และภาพที่ 9 พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของปลาในแต่ละชุดการทดลองเริ่มมีความแตกต่างกันทางสถิติตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 และมีความแตกต่างกันจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 10 ($P<0.05$) โดยในช่วงสัปดาห์ที่ 2-4 ปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ปลาที่ได้รับอาหารเสริม AsA ขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารเสริม AS, APP, OC และ ScA มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวต่ำและใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี (D) ต่อมาในสัปดาห์ที่ 6 พบว่ากลุ่มปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีทุกรูปแบบมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวไม่แตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง ($P>0.05$) แต่แตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวต่ำที่สุด ($P<0.05$) และในช่วงสัปดาห์ที่ 8 จนถึงสัปดาห์ที่ 10 พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลาแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มโดยมีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มดังกล่าว ($P<0.05$) กลุ่มที่ 1 ได้แก่ปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสูงที่สุด (28.64±2.68 กรัม) กลุ่มที่ 2 ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวรองลงมา ได้แก่ปลาที่ได้รับอาหารเสริม AsA, AS, APP, OC และ ScA (20.52±3.72 - 24.75±4.25 กรัม) ส่วนปลากลุ่มที่ 3 ได้แก่ปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวต่ำที่สุด (8.41±0.43 กรัม)

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลาที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร พบว่ามีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง ($P<0.05$) (ตารางที่ 11) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 1,286.08±59.39 - 4,626.79±517.83 % โดยปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงที่สุด (4,626.79 ±517.83 %) รองลงมาได้แก่ปลากลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม AsA, APP และ OC ซึ่งมีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 3,982.73±718.90 - 3,609.95±996.70 % ส่วนกลุ่มที่มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นอยู่ในเกณฑ์ต่ำกว่านี้ได้แก่ปลาที่ได้รับอาหารเสริม ScA และ AS ซึ่งมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 3,385.80±450.39 - 3,304.80±643.64 % ขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นน้อยที่สุด (1,286.08±59.39 %)

ผลข้อมูลในด้านอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิของปลาที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร ซึ่งแสดงในตาราง

ที่ 11 พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีทั้ง 6 รูปแบบมีค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) โดยอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อมีค่าอยู่ในช่วง 1.81 ± 0.04 - 2.06 ± 0.09 ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนมีค่าอยู่ในช่วง 1.79 ± 0.03 - 2.03 ± 0.02 และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิมีค่าอยู่ในช่วง 26.50 ± 0.36 - 28.49 ± 1.12 % ส่วนปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีมีค่าดังกล่าวแตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีทุกรูปแบบ ($P<0.05$) โดยมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อสูงที่สุด (4.24 ± 0.78) มีค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีนต่ำที่สุด (0.85 ± 0.03) และมีค่าการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิต่ำที่สุด (8.60 ± 0.31 %)

อัตราการรอดตายของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตรตลอดระยะเวลาการทดลองซึ่งแสดงในตารางที่ 12 และภาพที่ 10 พบว่า ปลาเริ่มมีอัตราการรอดตายแตกต่างกันตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง ($P<0.05$) โดยในช่วง 2-4 สัปดาห์แรก พบว่าปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี ตลอดจนอาหารเสริม AS และ ScA มีอัตราการรอดตายต่ำแตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีรูปแบบอื่น ในช่วงสัปดาห์ที่ 4-6 พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริม AS, APP, OC และ ScA มีอัตราการรอดตายต่ำ แต่หลังจากสัปดาห์ที่ 6 เป็นต้นไป อัตราการรอดตายของปลาที่ได้รับอาหารทั้ง 4 สูตรนี้ไม่ลดลงมากนัก จากสัปดาห์ที่ 8 จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง พบว่าการรอดตายของปลาสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกัน ($P<0.05$) โดยในกลุ่มที่ 1 มีอัตราการรอดตายอยู่ในช่วง 82.22 ± 1.92 - 83.33 ± 6.66 % ได้แก่ปลาที่ได้รับอาหารทดลองเสริม AsA และ AMP ปลาที่ได้รับอาหารทดลองทั้งสองสูตรนี้มีอัตราการรอดตายไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) ส่วนกลุ่มที่ 2 ได้แก่กลุ่มที่มีอัตราการรอดตายอยู่ในช่วง 62.22 ± 5.09 - 55.56 ± 8.39 % ได้แก่ปลาที่ได้รับอาหารทดลองเสริม AS, OC, APP และ ScA ปลาที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 4 สูตรนี้มีอัตราการรอดตายไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) ส่วนกลุ่มที่ 3 ได้แก่ปลาที่ได้รับอาหารทดลองไม่เสริมวิตามินซีซึ่งมีอัตราการรอดตายต่ำที่สุด โดยมีค่า 45.55 ± 6.94 %

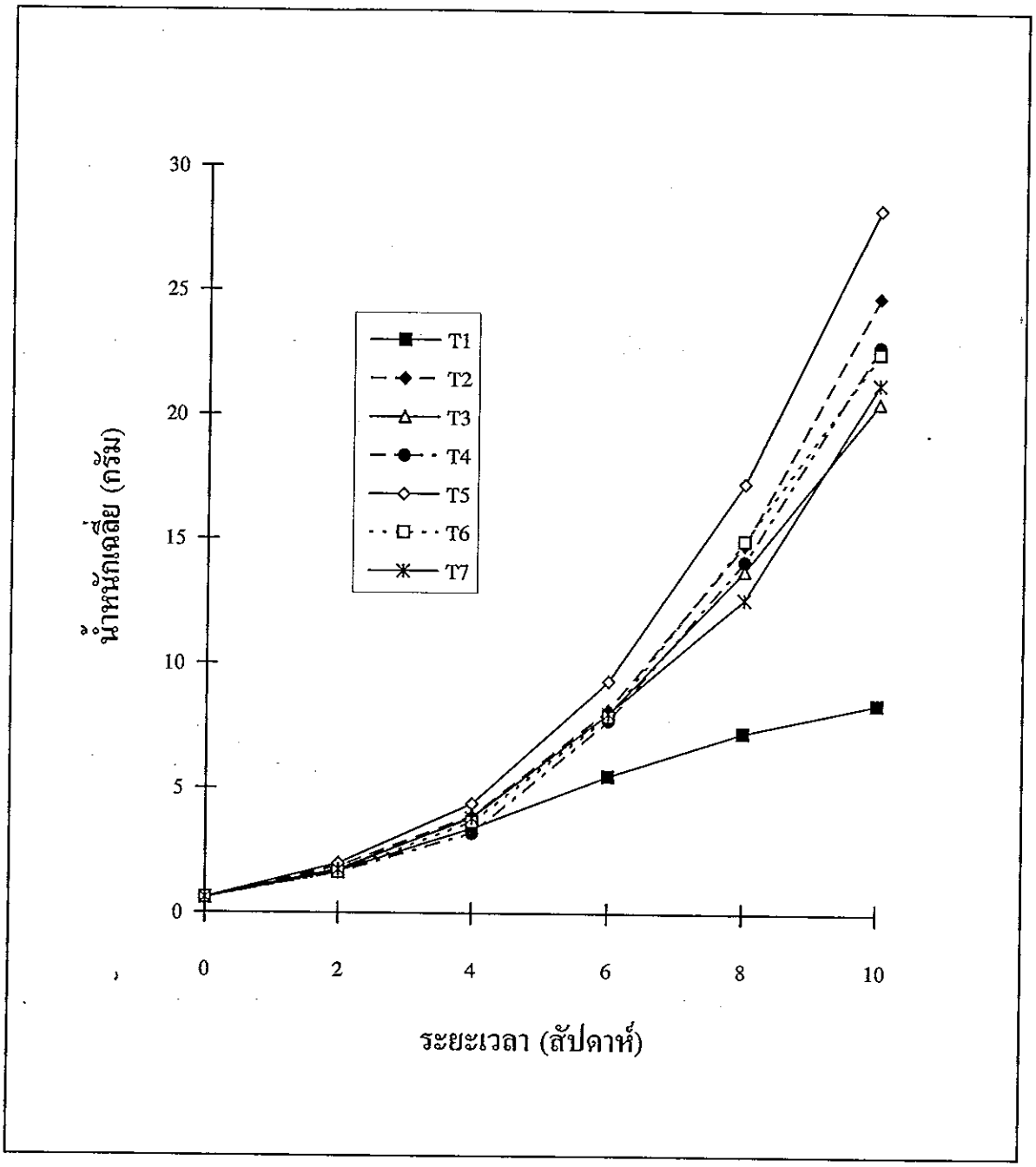
ตารางที่ 10 น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) ของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีรูปแบบต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ [1]

สูตรอาหาร	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)					
	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 8	สัปดาห์ที่ 10
D (T_1)	0.60 ± 0.01	1.68 ± 0.07^{ab}	3.41 ± 0.31^{ab}	5.51 ± 0.18^{a}	7.25 ± 0.29^{a}	8.41 ± 0.43^{a}
AsA (T_2)	0.60 ± 0.005	1.86 ± 0.04^{bc}	3.91 ± 0.25^{abc}	8.15 ± 1.05^{b}	14.80 ± 2.41^{bc}	24.75 ± 4.25^{bc}
AS (T_3)	0.60 ± 0.005	1.71 ± 0.13^{ab}	3.86 ± 0.48^{abc}	8.01 ± 1.26^{b}	13.73 ± 2.40^{bc}	20.52 ± 3.72^{b}
APP (T_4)	0.60 ± 0.01	1.62 ± 0.03^{a}	3.22 ± 0.15^{a}	7.73 ± 0.71^{b}	14.12 ± 1.43^{bc}	22.78 ± 3.24^{bc}
AMP (T_5)	0.60 ± 0.01	1.99 ± 0.09^{c}	4.40 ± 0.18^{c}	9.31 ± 0.46^{b}	17.27 ± 1.44^{c}	28.64 ± 2.68^{c}
OC (T_6)	0.61 ± 0.01	1.63 ± 0.08^{a}	3.67 ± 0.54^{ab}	7.91 ± 1.28^{b}	14.95 ± 3.29^{bc}	22.52 ± 5.55^{bc}
ScA (T_7)	0.61 ± 0.01	1.74 ± 0.20^{ab}	3.83 ± 0.45^{abc}	8.02 ± 0.52^{b}	12.60 ± 2.32^{b}	21.27 ± 2.82^{b}

D, ชุดควบคุมได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่าง 3 ซ้ำ

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)



ภาพที่ 9 น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) ต่อตัวของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซี รูปแบบต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์

ตารางที่ 11 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ และอัตราการรอดตาย ของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีรูปแบบต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ [1]

สูตรอาหาร	น้ำหนักที่เพิ่ม (%)	FCR	PER	ANPU (%)	อัตราการรอดตาย (%)
D (T_1)	1,286.08 ± 59.39^{a}	4.24 ± 0.78^{a}	0.85 ± 0.03^{a}	8.60 ± 0.31^{a}	45.55 ± 6.94^{a}
AsA (T_2)	3,982.73 ± 718.90^{bc}	1.88 ± 0.23^{b}	2.03 ± 0.02^{b}	28.44 ± 0.22^{b}	82.22 ± 1.92^{c}
AS (T_3)	3,304.80 ± 643.64^{b}	2.00 ± 0.28^{b}	1.95 ± 0.24^{b}	27.92 ± 3.37^{b}	58.89 ± 5.09^{b}
APP (T_4)	3,659.80 ± 580.10^{bc}	2.06 ± 0.09^{b}	1.79 ± 0.03^{b}	26.50 ± 0.36^{b}	61.11 ± 10.18^{b}
AMP (T_5)	4,626.79 ± 517.83^{c}	1.81 ± 0.04^{b}	1.95 ± 0.01^{b}	28.38 ± 0.28^{b}	83.33 ± 6.66^{c}
OC (T_6)	3,609.95 ± 996.70^{bc}	1.99 ± 0.30^{b}	1.97 ± 0.07^{b}	27.09 ± 1.07^{b}	62.22 ± 5.09^{b}
ScA (T_7)	3,385.80 ± 450.39^{b}	1.96 ± 0.18^{b}	1.94 ± 0.08^{b}	28.49 ± 1.12^{b}	55.56 ± 8.39^{ab}

D, ชุดควบคุมได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่าง 3 ซ้ำ

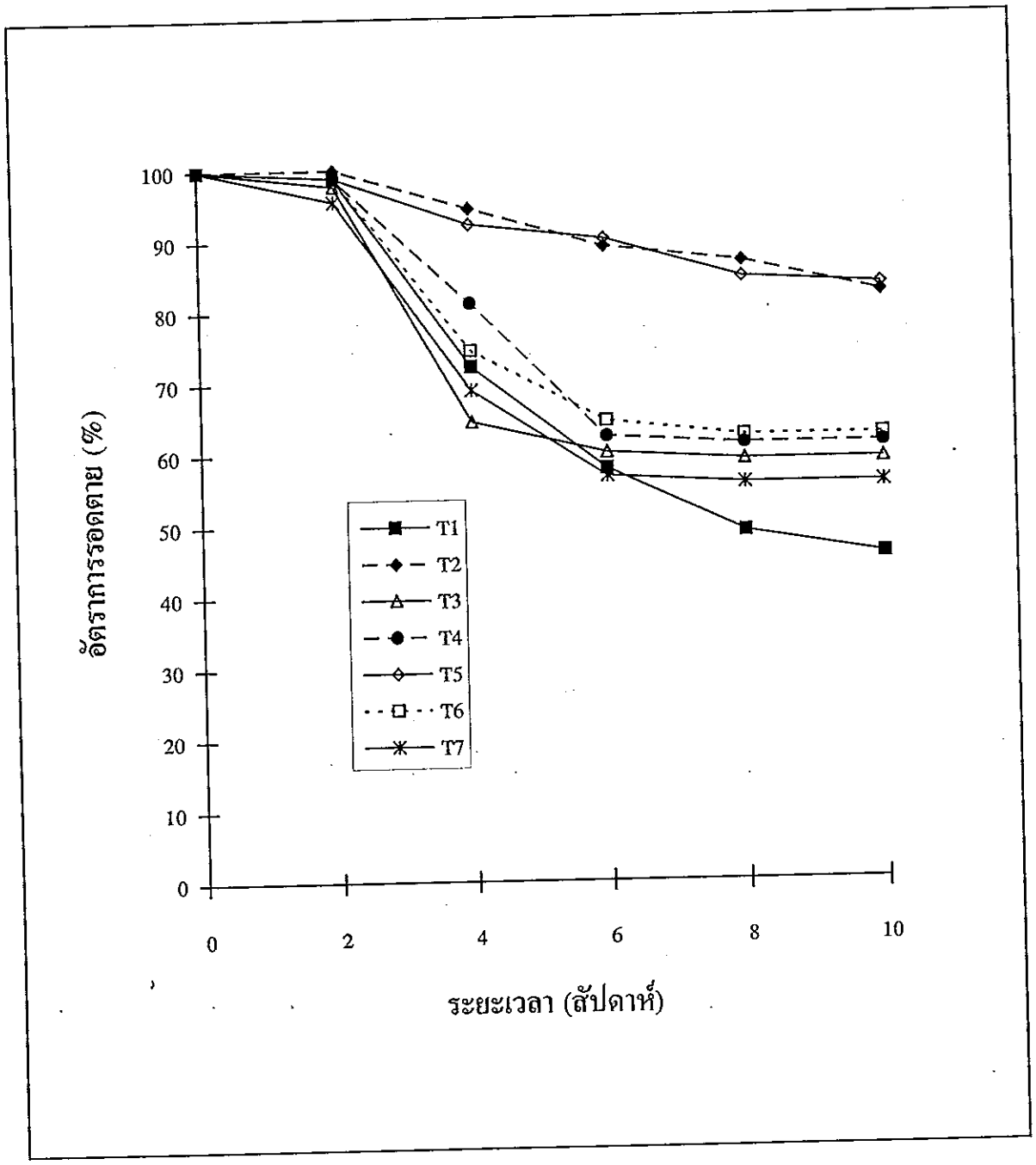
ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P>0.05$)

ตารางที่ 12 อัตราการรอดตาย (%) ของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีรูปแบบต่างๆ ทุกช่วง 2 สัปดาห์ [1]

สูตรอาหาร	อัตราการรอดตาย (%)				
	สัปดาห์ที่ 0-2	2-4	4-6	6-8	8-10
D (T_1)	98.89 ± 1.92	72.22 ± 1.92^{ab}	57.78 ± 1.92^{a}	48.82 ± 3.90^{a}	45.55 ± 6.94^{a}
AsA (T_2)	100 ± 0.00	94.44 ± 1.93^{c}	88.89 ± 5.09^{b}	86.67± 3.34^{c}	82.22 ± 1.92^{c}
AS (T_3)	97.78 ± 3.85	64.46 ± 6.94^{a}	60.00 ± 3.33^{a}	58.89 ± 5.09^{ab}	58.89 ± 5.09^{b}
APP (T_4)	98.89 ± 1.92	81.11 ± 10.18^{b}	62.22 ± 10.72^{a}	61.11 ± 10.18^{b}	61.11 ± 10.18^{b}
AMP (T_5)	98.89 ± 1.92	92.22 ± 1.92^{c}	90.00 ± 10.72b	84.44 ± 5.09^{c}	83.33 ± 10.18^{c}
OC (T_6)	98.89 ± 1.92	74.44 ± 8.39^{ab}	64.44 ± 5.09^{a}	62.22 ± 5.09^{b}	62.22 ± 5.09^{b}
ScA (T_7)	95.55 ± 3.85	68.89 ± 6.94^{a}	56.67 ± 8.82^{a}	55.56 ± 8.39^{ab}	55.56 ± 8.39^{ab}

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)



ภาพที่ 10 อัตราการรอดตาย (%) ของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีรูปแบบต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์

1.3 ปริมาณวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้า

ผลการวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารทดลองแต่ละสูตร แสดงในตารางที่ 13 พบว่าปริมาณวิตามินซีที่วิเคราะห์ได้จากตับและไตส่วนหน้าของปลากดเหลืองมีความสัมพันธ์กัน โดยปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมวิตามินซี มีปริมาณวิตามินซีทั้งในตับและไตส่วนหน้าต่ำที่สุด (ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณวิตามินซีได้ในตับ และตรวจวัดได้ 11.11 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักไต 1 กรัม) รองลงมาได้แก่ปลาที่ได้รับอาหารเสริม AS มีปริมาณวิตามินซีทั้งในตับและไตส่วนหน้า 0.01 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตับ 1 กรัม และ 29.99±2.08 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักไต 1 กรัม ซึ่งเป็นค่าที่ไม่แตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี ($P>0.05$) สำหรับปลาที่ได้รับอาหารเสริม OC และ ScA มีปริมาณวิตามินซีในตับใกล้เคียงกัน (มีค่า 36.02±0.97 และ 34.50±1.73 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตับ 1 กรัม ตามลำดับ) ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี และเสริม AS ในขณะที่ปริมาณวิตามินซีในไตส่วนหน้าของปลาที่ได้รับอาหารเสริม ScA สูงกว่า OC (81.84±1.88 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักไต 1 กรัม และ 67.83±1.51 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักไต 1 กรัม ตามลำดับ) ส่วนปริมาณวิตามินซีทั้งในตับและไตส่วนหน้าของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP และ APP มีค่าใกล้เคียงกันและเป็นค่าสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับวิตามินซีรูปแบบอื่นๆ กล่าวคือมีค่า 146.73±0.42 และ 145.88±1.97 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตับ 1 กรัม ตามลำดับ ส่วนปริมาณวิตามินซีในไตส่วนหน้ามีค่า 101.60±5.53 และ 96.85±1.37 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักไต 1 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AsA อยู่ในระดับปานกลาง (มีค่า 61.28±0.80 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตับ 1 กรัม และ 77.07±1.85 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักไต 1 กรัม ตามลำดับ)

ตารางที่ 13 ปริมาณวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าของปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีรูปแบบต่างๆเป็นเวลา 10 สัปดาห์ [1]

อาหารทดลอง	ปริมาณความเข้มข้นของวิตามินซี	
	ตับ (ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตับ 1 กรัม)	ไตส่วนหน้า (ไมโครกรัมต่อน้ำหนักไต 1 กรัม)
D (T_1)	ไม่สามารถตรวจวัดได้	11.11 ± 0.00^{a}
AsA (T_2)	61.28 ± 0.80^{c}	77.07 ± 1.85^{b}
AS (T_3)	0.01 ± 0.00^{a}	29.99 ± 2.08^{a}
APP (T_4)	145.88 ± 1.97^{d}	96.85 ± 1.37^{c}
AMP (T_5)	146.73 ± 0.42^{d}	101.60 ± 5.53^{c}
OC (T_6)	36.02 ± 0.97^{b}	67.83 ± 1.51^{a}
ScA (T_7)	34.50 ± 1.73^{b}	81.84 ± 1.88^{b}

[1] ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวเลขเหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P > 0.05$) ตัวเลขแต่ละค่าเป็นค่าเฉลี่ยจากปลา 6 ตัว

1.4 ปริมาณคอลลาเจน และไฮดรอกซีโปรลีน

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนในกระดูกสันหลังของปลา พบว่าปลากลุ่มที่ได้รับอาหารทดลองไม่เสริมวิตามินซีมีปริมาณคอลลาเจนต่ำที่สุด (14.64±0.39 %) และแตกต่างไปจากปลากลุ่มที่ได้รับอาหารทดลองสูตรอื่นๆ (17.28±0.63 - 18.97±0.62 %) ($P<0.05$) ขณะที่ปลากลุ่มที่ได้รับอาหารทดลองเสริมวิตามินซีทุกสูตรมีปริมาณคอลลาเจนไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 14)

ปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนของปลาที่ได้รับอาหารทดลองแต่ละสูตร พบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยปลาที่ได้รับอาหารทดลองไม่เสริมวิตามินซีมีค่าต่ำที่สุด ส่วนปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่เสริม AS, APP, OC และ ScA มีค่าไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) และเป็นค่าที่สูงกว่าปลากลุ่มแรก ขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารเสริม AsA และ AMP มีปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) และมีค่าสูงที่สุดเมื่อเทียบกับปลากลุ่มอื่นๆ

ตารางที่ 14 ปริมาณคอลลาเจน และไฮดรอกซีโปรลีนของปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีรูปแบบต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ [1]

อาหารทดลอง	คอลลาเจนในกระดูกสันหลัง (%)	ไฮดรอกซีโปรลีน (%)
D (T_1)	14.64 ± 0.39^{a}	6.29 ± 0.24^{a}
AsA (T_2)	17.37 ± 1.67^{b}	8.68 ± 0.30^{c}
AS (T_3)	17.92 ± 0.91^{b}	7.62 ± 0.09^{b}
APP (T_4)	17.28 ± 0.63^{b}	7.63 ± 0.18^{b}
AMP (T_5)	18.44 ± 0.51^{b}	8.36 ± 0.09^{c}
OC (T_6)	18.46 ± 0.99^{b}	7.99 ± 0.09^{b}
ScA (T_7)	18.97 ± 0.62^{b}	7.69 ± 0.28^{b}

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากตัวอย่าง 3 ซ้ำ

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวเลขเหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P > 0.05$)

1.5 องค์ประกอบทางเคมีของร่างกายปลา

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของปลาทั้งตัวได้แก่ เถ้า โปรตีน และไขมัน พบว่า การเสริมวิตามินซีแต่ละรูปแบบไม่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของร่างกายปลามากนัก อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณความชื้นในร่างกายของปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีมีค่าสูง แตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารทดลองเสริมวิตามินซีทุกรูปแบบ ($P<0.05$) เช่นเดียวกันกับปริมาณเถ้าซึ่งพบว่าปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีมีปริมาณเถ้าสูงที่สุดต่างจากปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีทุกรูปแบบ ($P<0.05$) อีกทั้งยังพบว่าปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีและปลาที่ได้รับอาหารเสริม APP มีปริมาณไขมันต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารทดลองสูตรอื่นๆ ($P<0.05$) (องค์ประกอบทางเคมีของร่างกายปลาแสดงไว้ในตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 องค์ประกอบทางเคมีของร่างกายปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีรูปแบบต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ [1]

อาหารทดลอง	องค์ประกอบร่างกายปลา			
	ความชื้น (%)	เถ้า (%)	ไขมัน (%)	โปรตีน (%)
*F^0	86.40 ± 0.11	14.54 ± 0.33	16.78 ± 0.25	60.40 ± 1.04
D (T_1)	81.04 ± 1.71^{a}	12.29 ± 0.24^{a}	28.30 ± 0.21^{a}	52.85 ± 0.09^{a}
AsA (T_2)	73.47 ± 1.77^{b}	10.69 ± 0.35^{c}	33.67 ± 0.06^{d}	52.20 ± 0.64^{a}
AS (T_3)	74.49 ± 1.06^{b}	11.83 ± 0.51^{ab}	30.25 ± 0.12^{b}	55.52 ± 0.62^{bc}
APP (T_4)	73.53 ± 1.40^{b}	11.26 ± 0.35^{bc}	27.56 ± 0.41^{a}	55.40 ± 0.33^{bc}
AMP (T_5)	73.16 ± 0.65^{b}	10.42 ± 0.51^{c}	32.27 ± 0.24^{c}	53.71 ± 0.50^{ab}
OC (T_6)	73.52 ± 1.17^{b}	10.46 ± 0.75^{c}	32.41 ± 0.44^{c}	52.40 ± 1.83^{a}
ScA(T_7)	74.09 ± 0.54^{b}	10.59 ± 0.03^{c}	29.95 ± 0.30^{b}	55.80 ± 0.60^{c}

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากตัวอย่าง 3 ซ้ำ

*F^0, องค์ประกอบทางเคมีของร่างกายปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวเลขเหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P > 0.05$)

1.6 การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

เหงือก

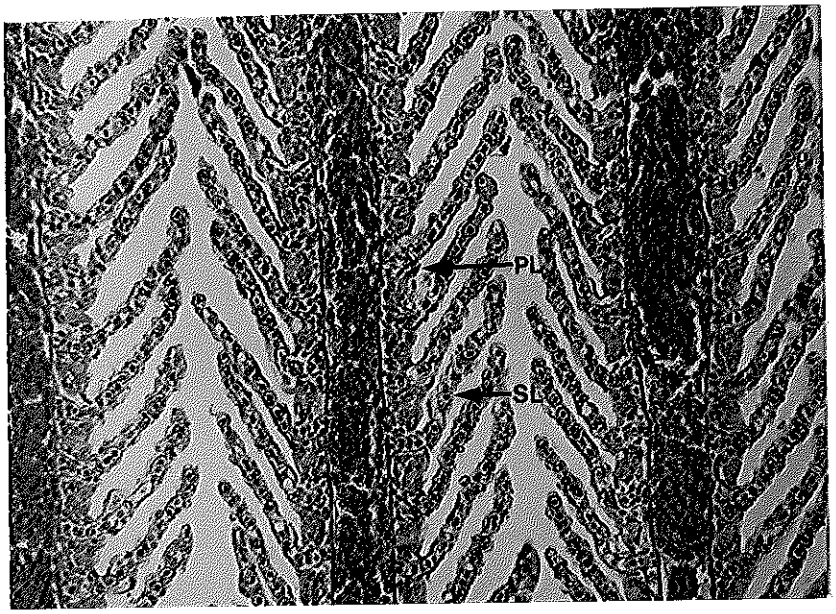
ตรวจไม่พบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกปลาที่ได้รับอาหารเสริม AsA, AMP, OC และ ScA (ภาพที่ 11) และตรวจพบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกได้ในปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี โดยพบว่าเกิดการแยกตัวของเซลล์บุผิวระบบหายใจ (respiratory epithelium) บริเวณ secondary lamellae อย่างรุนแรง โดยพบได้ในเกือบทุกเส้นเหงือก (ภาพที่ 12) นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์บุผิวของ secondary lamellae มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างผิดปกติ (hyperplasia) โดยการแบ่งตัวของเซลล์นี้ครอบคลุมส่วนของ secondary lamellae ทั้งหมด (ภาพที่ 13) นอกจากนี้พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกยังตรวจพบได้ในปลาที่ได้รับอาหารที่มี AS และ APP โดยพบว่ามีลักษณะความผิดปกติคล้ายคลึงกัน กล่าวคือส่วนเซลล์บุผิวของ secondary lamellae มีการโป่งบวม (ภาพที่ 14) แต่มีความรุนแรงน้อยกว่าในปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมวิตามินซี

ตับ

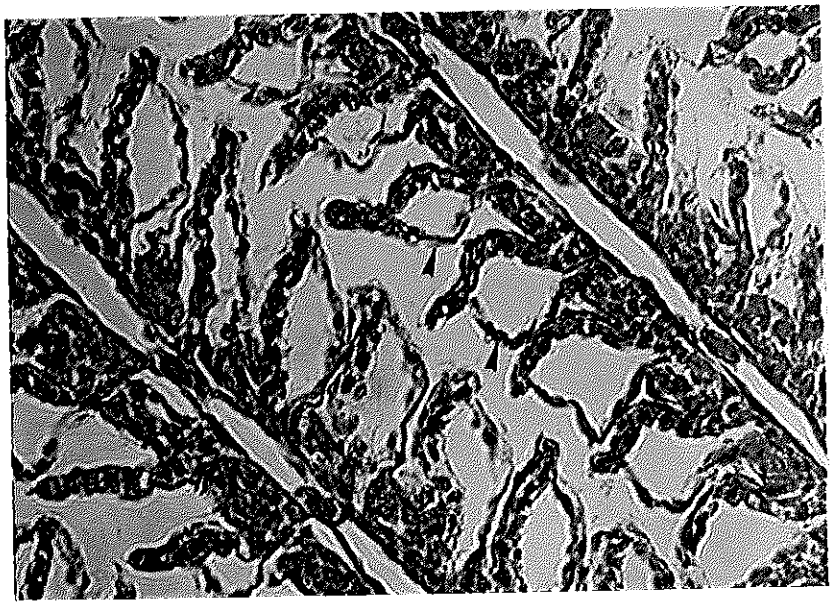
ตรวจไม่พบพยาธิสภาพของเซลล์ตับปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีทุกรูปแบบ (ภาพที่ 15) และสามารถตรวจพบพยาธิสภาพของเซลล์ตับเฉพาะในกลุ่มปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมวิตามินซี โดยพบว่าเกิดช่องว่าง (vacuole) ทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ขึ้นภายในตับเป็นจำนวนมากจนดันนิวเคลียส (nucleus) ไปชิดขอบของเซลล์ (ภาพที่ 16)

ไต

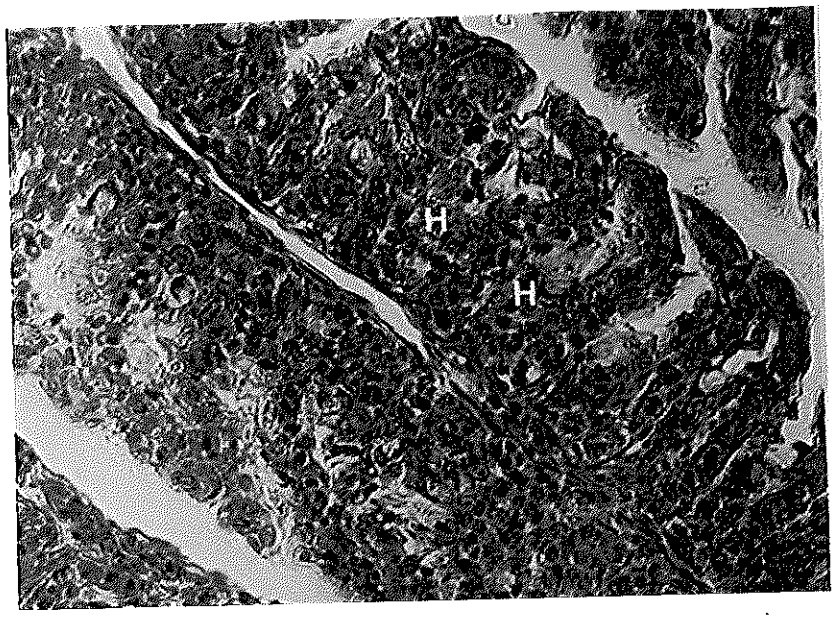
ตรวจไม่พบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไตในปลาที่ได้รับอาหารเสริม AsA, APP, AMP, OC และ ScA (ภาพที่ 17) และพบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไตได้ในปลากลุ่มที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมวิตามินซี โดยพบว่าเซลล์บุผิวของท่อไต (renal tubule) เกิดการเสื่อมสภาพ (degenerate) จนกระทั่งไม่สามารถสังเกตเห็นขอบเขตของเซลล์ได้ชัดเจน อีกทั้งยังพบว่านิวเคลียสของเซลล์เริ่มตาย (pycnotic nuclei) (ภาพที่ 18) นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนของ renal corpuscle เกิดการเสื่อมสภาพ โดยมีการเสื่อมสลายของ glomerulus สังเกตเห็นได้จากส่วนของ basement membrane ของ glomerulus มีรูปร่างไม่ชัดเจน และส่วนของ parietal epithelium ของ Bowman' s capsule เสื่อมสภาพ (ภาพที่ 19) พยาธิสภาพเหล่านี้ยังสามารถตรวจพบในปลาที่ได้รับอาหารเสริม AS (ภาพที่ 20)



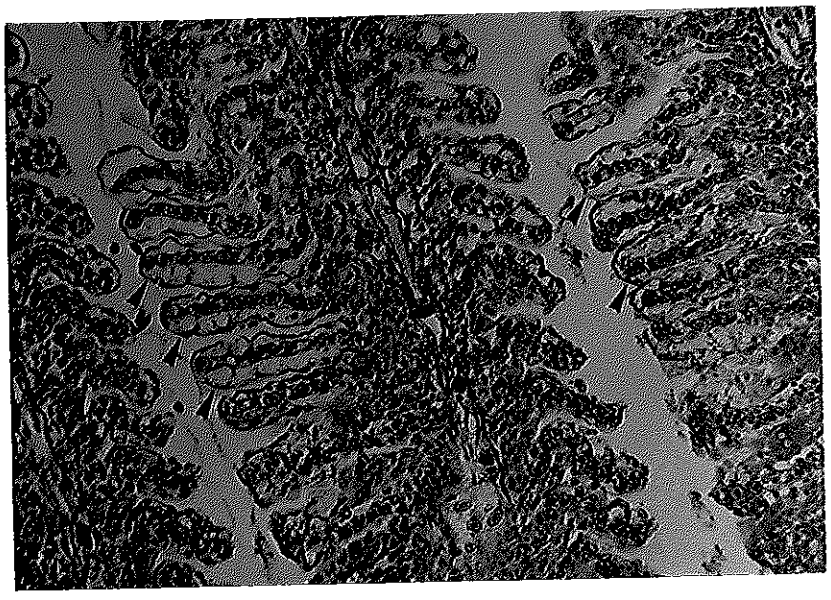
ภาพที่ 11 เนื้อเยื่อเหงือกปกติของปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซี (H & E, × 400)
(PL= primary lamellar, SL= secondary lamellar)



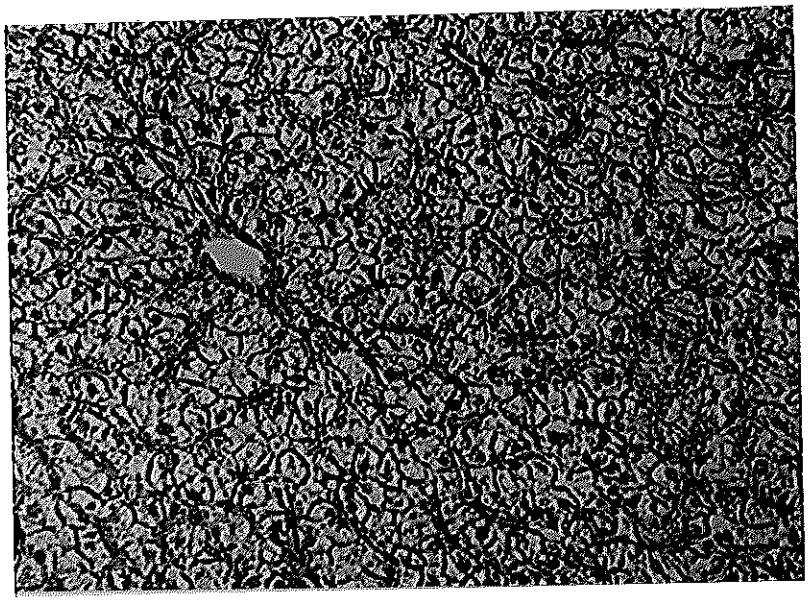
ภาพที่ 12 การแยกตัวของเซลล์บุผิวของ secondary lamellae ในปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี (ศรชี้) (H & E, × 400)



ภาพที่ 13 เซลล์บุผิวของ secondary lamellae มีการเพิ่มจำนวนมากผิดปกติในปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี (H & E, × 400) (H= hyperplasia)

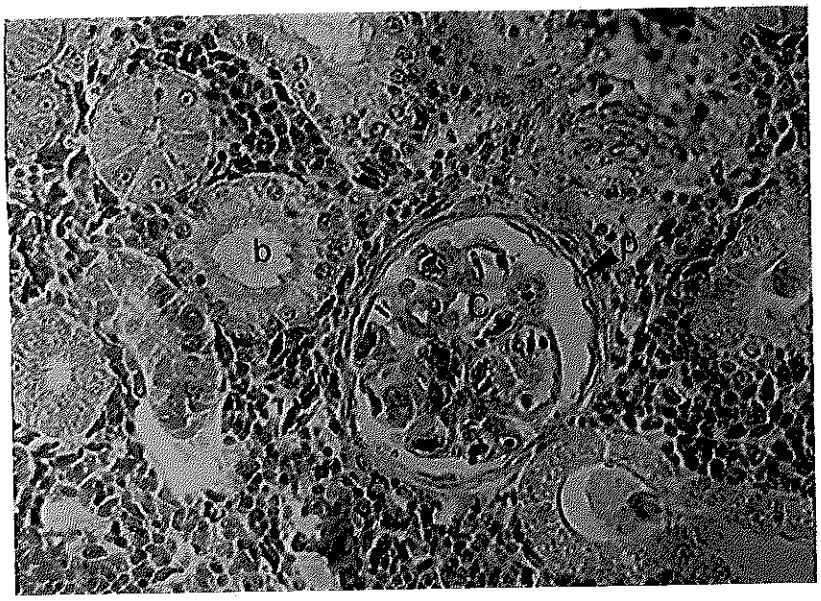


ภาพที่ 14 เซลล์บุผิวของ secondary lamellae มีการโป่งบวม ในปลาที่ได้รับอาหารเสริม AS และ APP (ศรชี้) (H & E, × 400)



ภาพที่ 15 เนื้อเยื่อตับปกติของปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีรูปแบบต่างๆ (H & E, × 200)

ภาพที่ 16 การเกิดช่องว่าง ในเนื้อเยื่อตับของปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี (H & E, × 200) (v= vacuoles)



ภาพที่ 17 เนื้อเยื่อไตปกติของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AsA, APP, AMP, OC และ ScA (H & E, × 400) (b= renal tubule, c= glomerulus, p= squamous parietal epithelium ของ Bowman' s capsule)

ภาพที่ 18 เซลล์บุผิวของท่อไตเกิดการเสื่อมสภาพ สังเกตพบนิวเคลียสของเซลล์เริ่มตาย (pycnotic nuclei) (ศรชี้) ในปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี (H & E, × 400)

ภาพที่ 19 renal corpuscle เกิดการเสื่อมสภาพ ในปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี (H & E, × 400) (ศรชี้แสดงส่วน parietal epithelium ของ Bowman' s capsule เสื่อมสภาพ)

ภาพที่ 20 เซลล์บุผิวของท่อไตเกิดการเสื่อมสภาพในปลาที่ได้รับอาหารเสริม AS (H & E, × 400) (ศรชี้แสดง pycnotic nuclei)

2. ผลการทดลองจากการทดลองที่ 2 (การศึกษาระดับความต้องการแอสคอบิล-2-โมโนฟอสเฟตแมกนีเซียมในปลากดเหลือง)

2.1 ความผิดปกติและพฤติกรรมของปลากดเหลืองเนื่องจากการขาดวิตามินซี

ผลจากการทดลองนี้ พบว่ากลุ่มปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP (ชุดการทดลองที่ 1) เริ่มแสดงอาการผิดปกติของรูปร่างลักษณะภายนอกเกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 5 ของการทดลอง สังเกตพบว่าปลาบางตัวมีการบิดงอของระยางค์โดยเฉพาะหนวด อีกทั้งระยางค์อื่นๆ ได้แก่ ครีบหลัง ครีบอก ครีบท้อง และครีบหางสึกกร่อน อย่างไรก็ตามพฤติกรรมของปลาในระยะนี้ยังคงเป็นปกติ ปลายังคงมีการรวมฝูงและยังยอมรับอาหาร ต่อมาในสัปดาห์ที่ 6 ของการทดลอง ความผิดปกติของลักษณะภายนอกเริ่มรุนแรงขึ้น ทั้งการสึกกร่อนของระยางค์ต่างๆ มีมากขึ้น สีลำตัวของปลาเริ่มดำคล้ำ ตาโปน กระดูกกระพุ้งแก้มหดสั้น และกางออกมากกว่าปกติ ปลาบางตัวเริ่มแยกออกจากฝูงและหลบซ่อนตามมุมตู้ทดลอง และมีอัตราการรอดตายต่ำ ซึ่งแตกต่างจากปลาในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม AMP ทุกระดับ (ชุดการทดลองที่ 2-6) ในช่วงสัปดาห์ที่ 7 ของการทดลอง อัตราการรอดตายของปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีลดลงมาก ปลาบางตัวช็อคและตายในระหว่างการเปลี่ยนถ่ายน้ำ การยอมรับอาหารของปลาลดลง อีกทั้งตรวจพบว่าขากรรไกรล่างของปลาบางตัวในกลุ่มที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีหดสั้นลงเช่นเดียวกับที่พบในการทดลองที่ 1 มีผลให้ปลาไม่สามารถกินอาหารได้ตามปกติ ในสัปดาห์ที่ 8 ของการทดลอง พบว่าการสึกกร่อนของระยางค์ต่างๆ เกิดขึ้นกับปลาทุกตัวในตู้ทดลองที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี จากสัปดาห์ที่ 9 จนถึงระยะสิ้นสุดการทดลอง พบว่าปลามีพฤติกรรมเซื่องซึม หลบซ่อนตามมุมตู้ ยอมรับอาหารน้อยมาก ขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ทุกระดับความเข้มข้น มีลักษณะภายนอกเป็นปกติ ตลอดจนมีพฤติกรรมการรวมฝูง และการยอมรับอาหารดี

2.2 การเจริญเติบโต น้ำหนักของปลาที่เพิ่มขึ้น อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ และการรอดตาย

ปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารทดลองทุกสูตรมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาของการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 16 และภาพที่ 21 โดยพบว่าน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลาเริ่มมีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง ($P<0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยในช่วง 4 สัปดาห์แรก พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP และกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 15-45 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (เสริม AMP 32.61-97.83 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 4.21±0.17 - 4.82±0.55 กรัม ขณะที่ปลากลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 100-500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (เสริม AMP 217.39-1,086.96 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 5.16±0.26 - 5.74±0.20 กรัม และปลากลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 15-200 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (เสริม AMP 32.61-434.78 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) ในช่วงสัปดาห์ที่ 6 พบว่า น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลากดเหลืองมีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง ($P<0.05$) โดยปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวต่ำที่สุด (6.43±0.36 กรัม) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 15-500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 8.88±0.27 - 10.37±0.70 กรัม ต่อมาในช่วงสัปดาห์ที่ 8 พบว่าปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวต่ำที่สุด (7.25±0.95 กรัม) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 15-45 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 14.46±0.93 - 15.98±1.13 กรัม ขณะที่ปลากลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 100-500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวไม่แตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง ($P>0.05$) (มีค่าอยู่ในช่วง 16.97±0.63 - 18.19±1.38 กรัม) และปลากลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 45, 100 และ 500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักต่อตัวไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 10 พบว่า น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลากดเหลืองมีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง ($P<0.05$) โดยแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP มีน้ำหนักต่อตัวต่ำที่สุด (8.02±0.86 กรัม) กลุ่มที่ 2 ได้แก่ปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 15 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว 23.23±2.19 กรัม และกลุ่มที่ 3 ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวอยู่ในช่วง 26.15±2.79 - 29.15±0.90 กรัม ได้แก่ปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 45-500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลาในการทดลองนี้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($P<0.05$) โดยพบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 45 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ขึ้นไปจนถึงระดับ 500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 2,129.20±244.61 - 2,370.06±276.76 % ขณะที่ปลากลุ่มที่ได้รับ AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 15 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่ำกว่า (1,868.93±185.53 %) ซึ่งไม่แตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 45 และ 500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม แต่แตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 100 และ 200 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ($P<0.05$) ขณะที่ปลากลุ่มที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่ำที่สุด แตกต่างไปจากปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ทุกระดับ (581.73±74.95 %) (ตารางที่ 17)

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลากลุ่มที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP มีค่า 2.86±0.69 ซึ่งสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ทุกระดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่ปลาทุกกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม AMP ตั้งแต่ระดับที่มีเนื้อวิตามินซี 15 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จนถึง 500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้ออยู่ในช่วง 1.51±0.05 - 1.71±0.05 และไม่แตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง ($P>0.05$) (ตารางที่ 17)

ค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) ของปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP มีค่า 1.29±0.03 ซึ่งแตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ทุกระดับ ($P<0.05$) โดยค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีนของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP มีค่าไม่แตกต่างกัน โดยอยู่ในช่วง 2.07±0.06 - 2.35±0.08 และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (ANPU) ของปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP มีค่า 10.93±3.02 % ซึ่งต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ทุกระดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ขณะที่ปลากลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม AMP มีค่าการใช้

ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิอยู่ในช่วง 28.19±4.75 - 32.63±2.85 % ซึ่งไม่แตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง (P>0.05) (ตารางที่ 17)

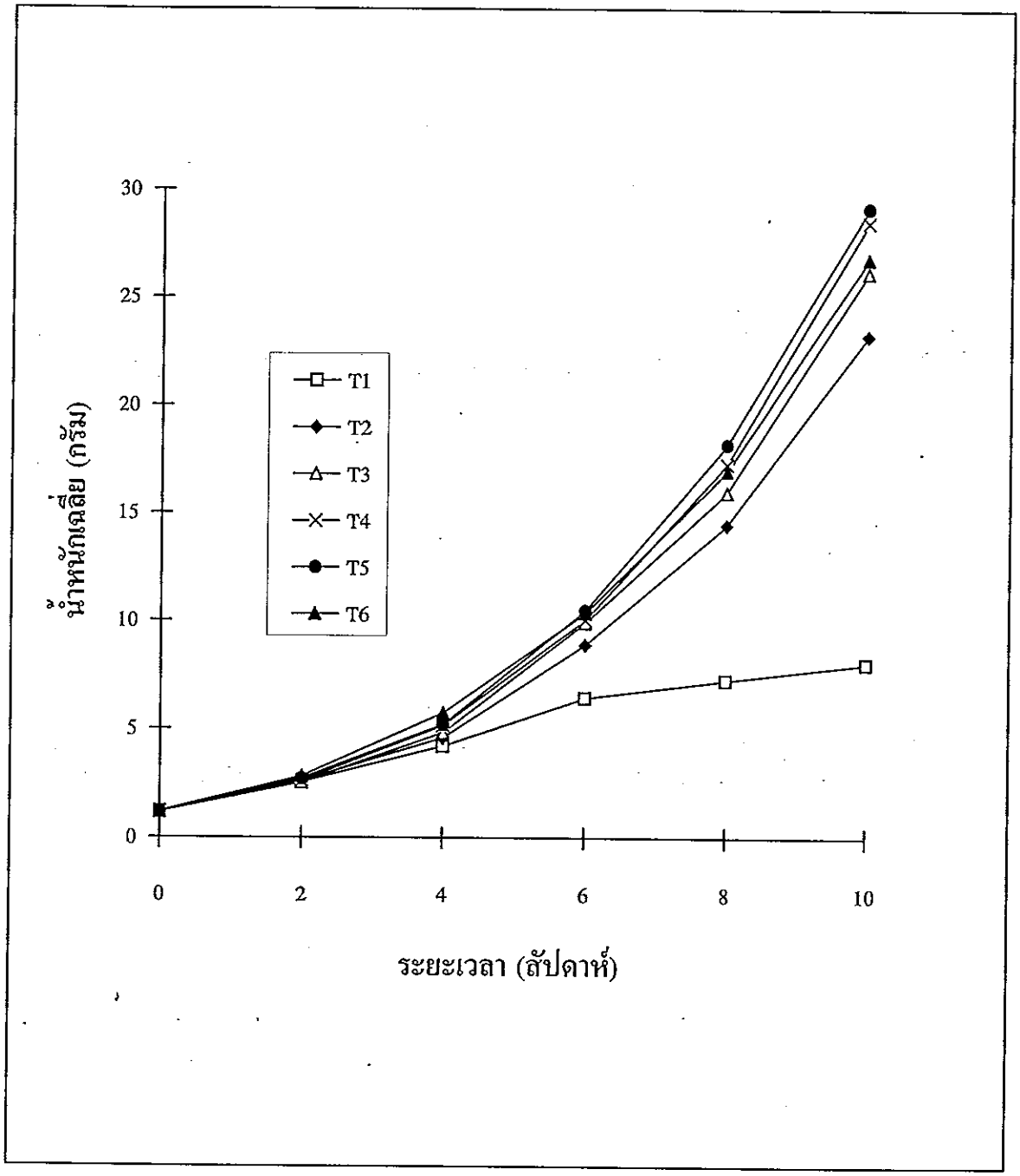
อัตราการรอดตายของปลาตลอดระยะการทดลองแสดงในตารางที่ 18 และภาพที่ 22 พบว่า เริ่มมีความแตกต่างกันตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ของการทดลอง (P<0.05) โดยพบว่าปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP มีอัตราการรอดตายต่ำที่สุด รองลงมาได้แก่ปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 15 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 45-500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง (P>0.05) จากระยะ 6 สัปดาห์จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง พบว่าอัตราการรอดตายของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 45 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมขึ้นไปมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณมากกว่านี้ (74.44±1.93 - 80±3.33 %) ขณะที่ปลาที่ได้รับ AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 15 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดตายที่ต่ำกว่า (63.33±14.53 %) และปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP มีอัตราการรอดตายต่ำที่สุด (52.22±8.39 %)

ตารางที่ 16 น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) ของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริม AMP ระดับต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ [1]

ปริมาณเนื้อวิตามินซี (มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม)	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)					
	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 8	สัปดาห์ที่ 10
0 (T_1)	1.18 ± 0.005	2.55 ± 0.10	4.21 ± 0.17^{a}	6.43 ± 0.36^{a}	7.25 ± 0.95^{a}	8.02 ± 0.86^{a}
15 (T_2)	1.18 ± 0.00	2.60 ± 0.21	4.59 ± 0.30^{ab}	8.88 ± 0.27^{b}	14.46 ± 0.93^{b}	23.23 ± 2.19^{b}
45 (T_3)	1.17 ± 0.005	2.53 ± 0.24	4.82 ± 0.55^{ab}	9.91 ± 1.76^{b}	15.98 ± 1.13^{bc}	26.15 ± 2.79^{bc}
100 (T_4)	1.18 ± 0.005	2.61 ± 0.09	5.16 ± 0.26^{bc}	10.04 ± 0.69^{b}	17.30 ± 1.50^{cd}	28.49 ± 3.38^{c}
200 (T_5)	1.18 ± 0.005	2.71 ± 0.38	5.20 ± 0.68^{bc}	10.48 ± 1.32^{b}	18.19 ± 1.38^{d}	29.15 ± 0.90^{c}
500 (T_6)	1.18 ± 0.005	2.82 ± 0.19	5.74 ± 0.20^{c}	10.37 ± 0.70^{b}	16.97 ± 0.63^{cd}	26.80 ± 1.44^{bc}

[1] ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่าง 3 ซ้ำ

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)



ภาพที่ 21 น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) ต่อตัวของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริม AMP ระดับต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์

ตารางที่ 17 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ และอัตราการรอดตาย ของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริม AMP ระดับต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ [1]

ปริมาณเนื้อวิตามินซี (มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม)	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%)	FCR	PER	ANPU (%)	อัตราการรอดตาย (%)
0 (T_1)	581.73 ± 74.95^{a}	2.86 ± 0.69^{a}	1.29 ± 0.03^{a}	10.93 ± 3.02^{a}	52.22 ± 8.39^{a}
15 (T_2)	1,868.93 ± 185.53^{b}	1.68 ± 0.27^{b}	2.15 ± 0.36^{b}	28.19 ± 4.75^{b}	63.33 ± 14.53^{ab}
45 (T_3)	2,129.20 ± 244.61^{bc}	1.52 ± 0.13^{b}	2.35 ± 0.21^{b}	32.63 ± 2.85^{b}	74.44 ± 1.93^{b}
100 (T_4)	2,320.69 ± 276.76^{c}	1.53 ± 0.22^{b}	2.34 ± 0.37^{b}	30.60 ± 4.76^{b}	74.44 ± 15.03^{b}
200 (T_5)	2,370.06 ± 76.09^{c}	1.51 ± 0.05^{b}	2.35 ± 0.08^{b}	31.55 ± 1.07^{b}	78.89 ± 5.09^{b}
500 (T_6)	2,177.74 ± 133.14^{bc}	1.71 ± 0.05^{b}	2.07 ± 0.06^{b}	28.59 ± 0.80^{b}	80.00 ± 3.33^{b}

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่าง 3 ซ้ำ

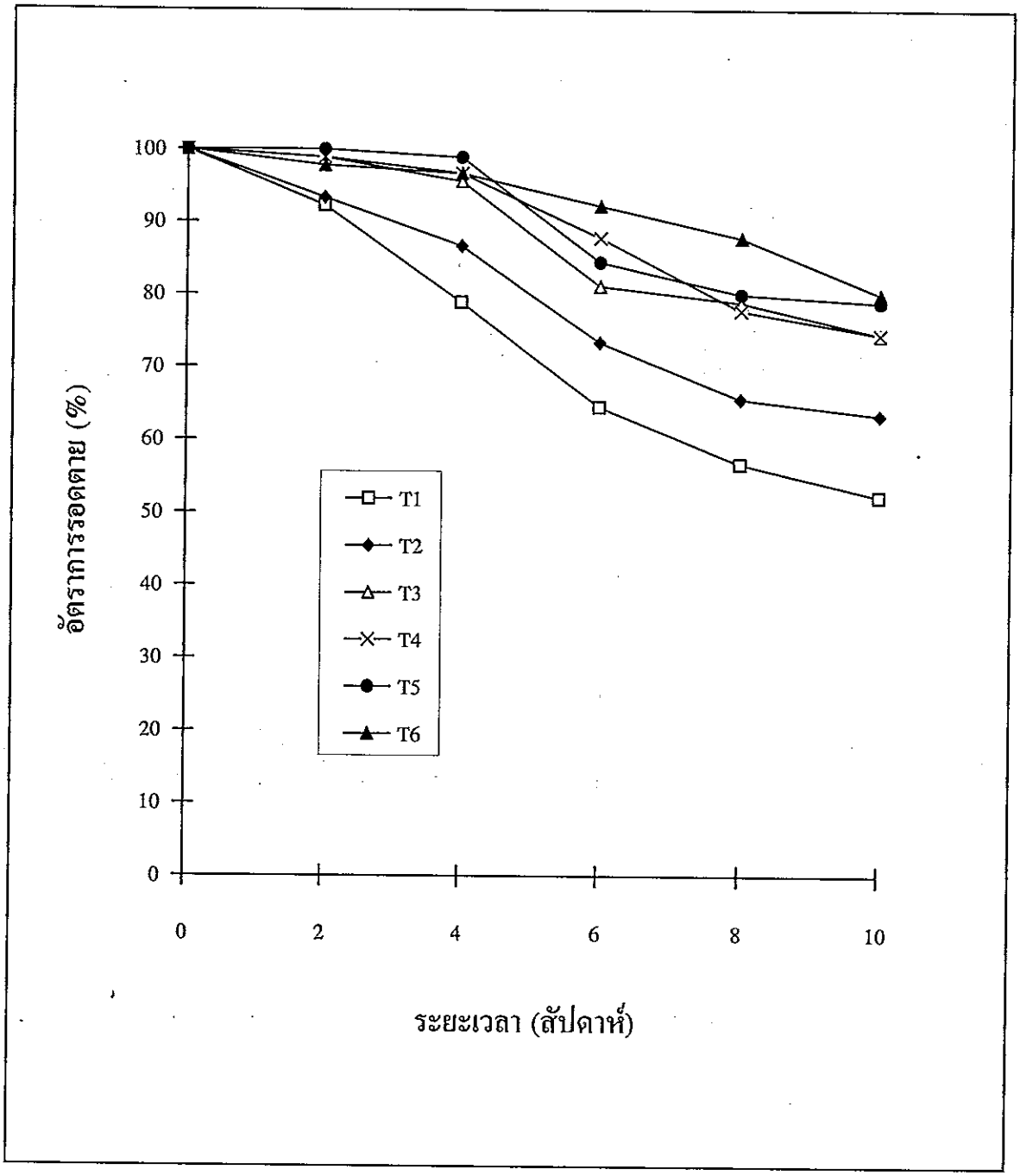
ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P>0.05$)

ตารางที่ 18 อัตราการรอดตาย (%) ของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริม AMP ระดับต่างๆ ตลอดช่วง 2 สัปดาห์[1]

ปริมาณเนื้อวิตามินซี (มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม)	อัตราการรอดตาย (%)				
	สัปดาห์ที่ 0-2	2-4	4-6	6-8	8-10
0 (T_1)	92.22 ± 1.82^{a}	78.89 ± 9.62^{a}	64.45 ± 6.94^{a}	56.67 ± 12.02^{a}	52.22 ± 8.39^{a}
15 (T_2)	93.33 ± 3.34^{a}	86.67 ± 12.02^{ab}	73.33 ± 16.67^{b}	65.55 ± 15.75^{ab}	63.33 ± 14.53^{ab}
45 (T_3)	98.89 ± 1.92^{b}	95.56 ± 1.93^{b}	81.11 ± 5.09^{bc}	78.89 ± 5.09^{bc}	74.44 ± 1.93^{b}
100 (T_4)	98.89 ± 1.92^{b}	96.67 ± 3.34^{b}	87.78 ± 8.39^{bc}	77.78 ± 13.88^{bc}	74.44 ± 15.03^{b}
200 (T_5)	100.00±0.00^{b}	98.89 ± 1.92^{b}	84.44 ± 1.93^{c}	80.00 ± 3.33^{bc}	78.89 ± 5.09^{b}
500 (T_6)	97.78 ± 1.92^{b}	96.67 ± 0.00^{b}	92.22 ± 1.92^{c}	87.78 ± 3.85^{c}	80.00 ± 3.33^{b}

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)



ภาพที่ 22 อัตราการรอดตาย (%) ของปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริม AMP ระดับต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์

2.3 ปริมาณวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้า

ปริมาณความเข้มข้นของวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ระดับต่างๆ (ตารางที่ 19) มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($P<0.05$) โดยพบว่าปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP มีความเข้มข้นของวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าต่ำที่สุด โดยมีค่า 4.96±0.57 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตับ 1 กรัม และ 20.48±6.54 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักไต 1 กรัมตามลำดับ ส่วนปลากลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม AMP มีปริมาณวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าเพิ่มสูงขึ้นตามความเข้มข้นของ AMP ในอาหารโดยตรง โดยมีค่าตั้งแต่ 12.43±0.42 - 190.81±1.35 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตับ 1 กรัม และ 43.46±2.67 - 154.18±1.15 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักไต 1 กรัม

2.4 ปริมาณคอลลาเจนและไฮดรอกซีโปรลีน

จากการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนในกระดูกสันหลังของปลาที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ พบว่าปลากลุ่มที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP มีปริมาณคอลลาเจนในกระดูกสันหลังต่ำที่สุด (15.78±0.76 %) และแตกต่างทางสถิติกับปลาชุดการทดลองอื่นๆ ทุกชุดการทดลอง ($P<0.05$) ปลากลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม AMP ทุกระดับ มีปริมาณคอลลาเจนในกระดูกสันหลังไม่แตกต่างกันทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($P>0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 18.76±0.34 - 20.28±0.72 % (ตารางที่ 20)

ปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนในปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP มีค่าต่ำที่สุด และมีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) กับปลาชุดการทดลองอื่นๆ ทุกชุดการทดลอง (4.70±0.24 %) ปลากลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 15 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และ 500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าสูงกว่ากลุ่มแรก ($P<0.05$) (6.59±0.39 % และ 6.96±0.28 % ตามลำดับ) สำหรับปลากลุ่มที่ได้รับอาหารทดลองเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 45 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จนถึง 200 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 7.16±0.28 % - 7.58±0.21 %

ตารางที่ 19 ปริมาณวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในระดับต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ [1]

ปริมาณเนื้อวิตามินซี (มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม)	ปริมาณความเข้มข้นของวิตามินซี	
	ตับ (ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตับ 1 กรัม)	ไตส่วนหน้า (ไมโครกรัมต่อน้ำหนักไต 1 กรัม)
0 (T_1)	4.96 ± 0.57[a]	20.48 ± 6.54[a]
15 (T_2)	12.43 ± 0.42[b]	43.46 ± 2.67[b]
45 (T_3)	39.21 ± 0.91[c]	76.68 ± 1.67[c]
100 (T_4)	101.44 ± 0.94[d]	107.41 ± 2.03[d]
200 (T_5)	127.57 ± 1.16[e]	125.96 ± 1.46[e]
500 (T_6)	190.81 ± 1.35[f]	154.18 ± 1.15[f]

[1] ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวเลขเหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P>0.05$) ตัวเลขแต่ละค่าเป็นค่าเฉลี่ยจากปลา 6 ตัว

ตารางที่ 20 ปริมาณคอลลาเจน และไฮดรอกซีโปรลีนของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ระดับต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ [1]

ปริมาณเนื้อวิตามินซี (มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม)	คอลลาเจนในกระดูกสันหลัง (%)	ไฮดรอกซีโปรลีน (%)
0 (T_1)	15.78 ± 0.76^{a}	4.70 ± 0.24^{a}
15 (T_2)	19.13 ± 0.62^{b}	6.59 ± 0.39^{b}
45 (T_3)	20.28 ± 0.72^{b}	7.58 ± 0.21^{d}
100 (T_4)	18.76 ± 0.34^{b}	7.33 ± 0.26^{cd}
200 (T_5)	20.08 ± 0.09^{b}	7.16 ± 0.28^{cd}
500 (T_6)	19.68 ± 1.47^{b}	6.96 ± 0.28^{bc}

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวเลขเหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P>0.05$) ตัวเลขแต่ละค่าเป็นค่าเฉลี่ยจากปลา 30 ตัว

2.5 องค์ประกอบทางเคมีของร่างกายปลา

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของร่างกายปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP พบว่าความชื้นในร่างกายมีค่า 83.44±2.92 % ซึ่งสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ทุกระดับที่มีความชื้นในร่างกายอยู่ในช่วง 74.78±2.20 - 76.32±2.06 % เช่นเดียวกันกับปริมาณเถ้าของปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP มีค่าสูงที่สุดโดยมีค่า 13.27±0.31 % ขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ทุกระดับมีปริมาณเถ้าอยู่ในช่วง 9.85±0.23 - 11.32±0.27 % ปริมาณเถ้าของปลามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) ระหว่างชุดการทดลอง นอกจากนี้ปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP มีปริมาณไขมันต่ำ (25.73±0.21 %) ซึ่งแตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ทุกระดับ ($P<0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 29.65±0.54 - 33.76±0.86 % ขณะที่ปริมาณโปรตีนของปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP มีค่า 57.75±0.49 % ซึ่งสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ทุกระดับ ($P<0.05$) ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 53.05±0.60 - 55.06±1.00 % (ข้อมูลองค์ประกอบร่างกายปลาแสดงในตารางที่ 21)

ตารางที่ 21 องค์ประกอบทางเคมีของร่างกายปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ระดับต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ [1]

ปริมาณเนื้อวิตามินซี (มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม)	องค์ประกอบร่างกายปลา			
	ความชื้น (%)	เถ้า (%)	ไขมัน (%)	โปรตีน (%)
*F^0	78.26 ± 0.53	13.15 ± 0.22	20.27 ± 0.91	56.18 ± 0.99
0 (T_1)	83.44 ± 2.92^a	13.27 ± 0.31^a	25.73 ± 0.21^a	57.75 ± 0.49^a
15 (T_2)	75.40 ± 0.94^b	11.00 ± 0.19^b	29.65 ± 0.54^b	53.05 ± 0.60^b
45 (T_3)	74.78 ± 2.20^b	10.10 ± 0.16^c	32.09 ± 0.47^d	54.73 ± 0.85^c
100 (T_4)	76.32 ± 2.06^b	11.32 ± 0.27^b	31.02 ± 0.44^c	54.88 ± 1.23^c
200 (T_5)	75.17 ± 3.70^b	9.85 ± 0.23^c	33.76 ± 0.86^e	53.82 ± 0.97^{bc}
500 (T_6)	75.13 ± 1.99^b	9.95 ± 0.01^c	32.40 ± 0.77^d	55.06 ± 1.00^c

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากตัวอย่าง 3 ซ้ำ

*F^0, องค์ประกอบทางเคมีของร่างกายปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวเลขเหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P>0.05$)

2.6 การศึกษาเนื้อเยื่อวิทยา

เหงือก

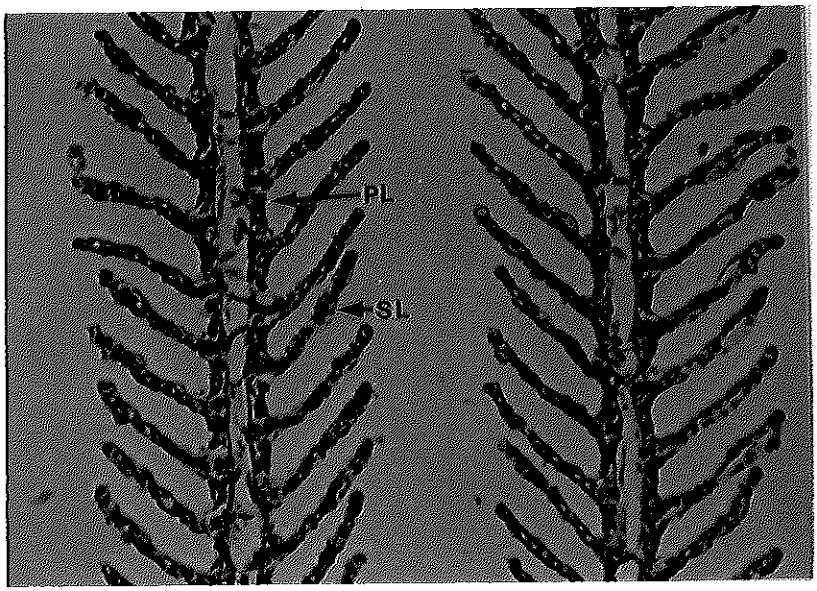
ปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ทุกระดับตรวจไม่พบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือก (ภาพที่ 23) สำหรับปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริม AMP พบพยาธิสภาพเกิดขึ้น โดยพบว่าเซลล์บุผิวของ primary lamellae เกิดการแบ่งตัวมากผิดปกติโดยประมาณ 1ใน 2 ถึง 2 ใน 3 ของความสูงของ secondary lamellae (ภาพที่ 24) อีกทั้งยังพบว่าส่วนของ respiratory epithelium ของ secondary lamellae บางส่วนมีการโป่งบวม (ภาพที่ 25)

ตับ

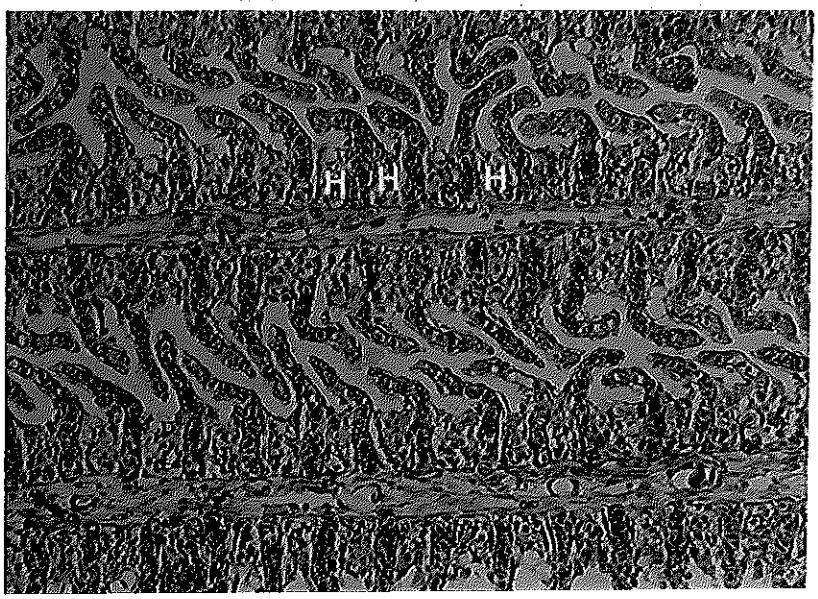
ปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 45 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมขึ้นไป ตรวจไม่พบพยาธิสภาพของเซลล์ตับ (ภาพที่ 26) ส่วนพยาธิสภาพของเซลล์ตับตรวจพบได้ในปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP คือพบช่องว่างเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 27) เช่นเดียวกันกับปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 15 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ก็พบการเกิดช่องว่างลักษณะเดียวกันแต่มีความรุนแรงน้อยกว่า (ภาพที่ 28)

ไต

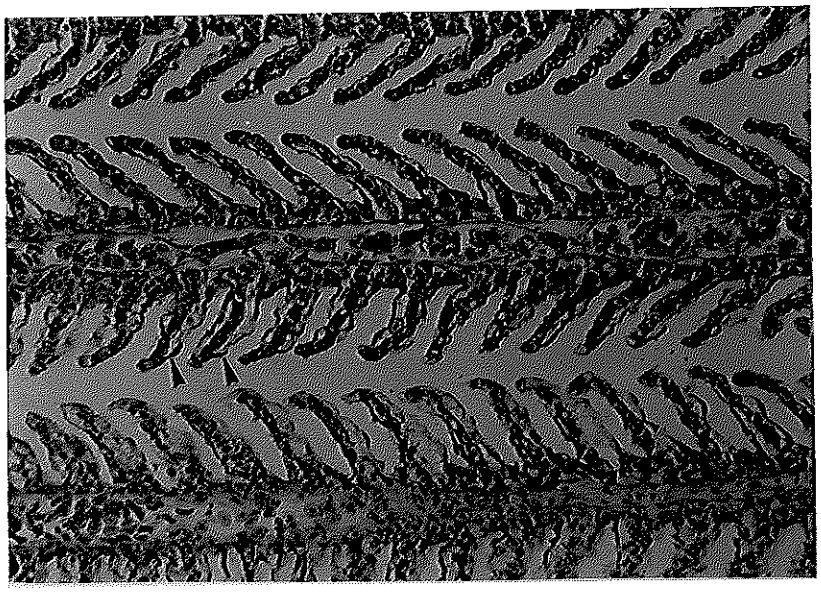
ปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 45 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมขึ้นไป ตรวจไม่พบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไต (ภาพที่ 29) แต่สามารถพบได้ในปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP โดยพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไตในส่วน renal tubule พบการเสื่อมสลายของเซลล์บุผิว มีผลให้ไม่สามารถระบุขอบเขตของเซลล์ได้ชัดเจน และอีกทั้งยังพบว่าเซลล์บุผิว renal tubule บางส่วนสลายตัวและหลุดออกมาอยู่ในลูเมน (ภาพที่ 30) และสามารถตรวจพบความผิดปกติของเซลล์บุผิวท่อไตได้ในปลากลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 15 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยพบว่าเซลล์บุผิวท่อไตเกิดการบวมตัว (ภาพที่ 31) ส่วนพยาธิสภาพของ glomerulus ตรวจพบได้เฉพาะในปลากลุ่มที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP เท่านั้น โดยพบการสร้างเนื้อเส้นใยอย่างผิดปกติ (fibrosis) เกิดขึ้นในส่วน parietal epithelium ของ Bowman's capsule โดยเซลล์บุผิวดังกล่าวถูกแทนที่ด้วยเนื้อเส้นใย (fibrous substance) จนล้อมรอบ glomerulus ไว้ทั้งหมด (ภาพที่ 32)



ภาพที่ 23 ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกปกติของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP (T_6) (H & E, × 200) (PL= primary lamellar, SL= secondary lamellar)

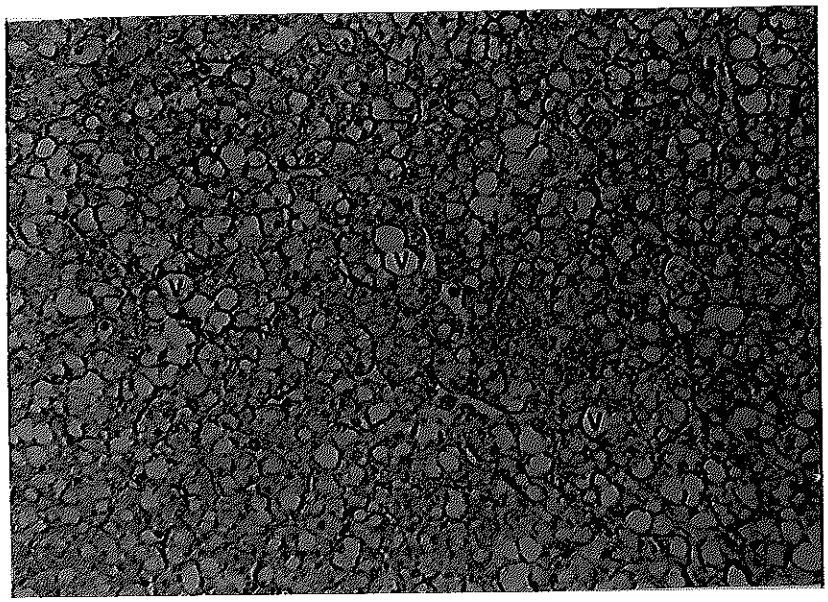


ภาพที่ 24 เซลล์บุผิวของ primary lamellae เกิดการแบ่งตัวมากผิดปกติในปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP (T_1) (H & E, × 200) (H= hyperplasia)

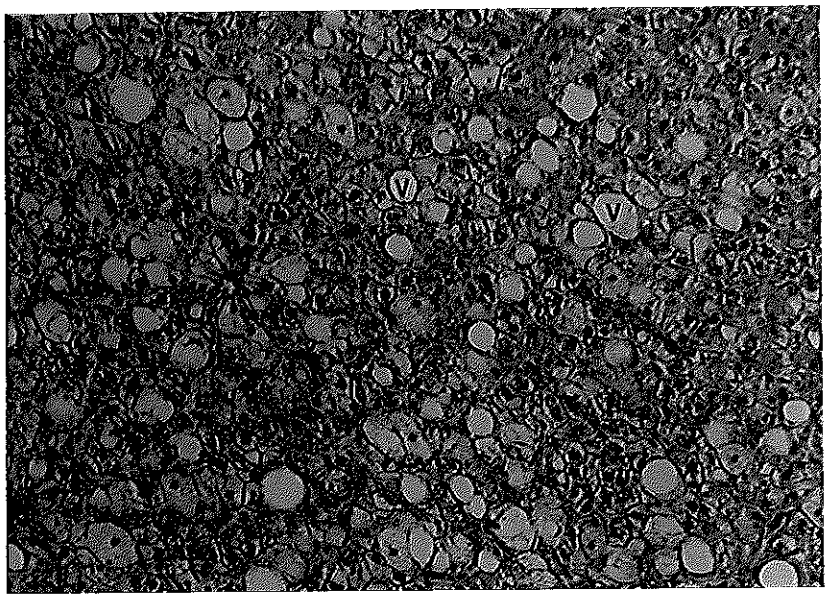


ภาพที่ 25 เซลล์บุผิวของของ secondary lamellae มีการโป่งบวมในปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP (T_1) (ศรชี้) (H & E, × 200)

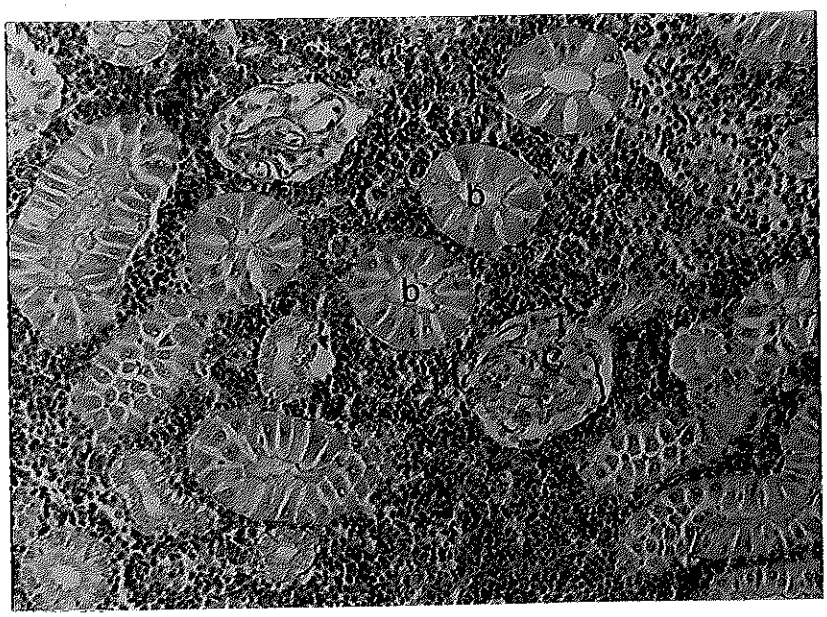
ภาพที่ 26 ลักษณะเนื้อเยื่อตับปกติของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 45 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (T_3) (H & E, × 200)



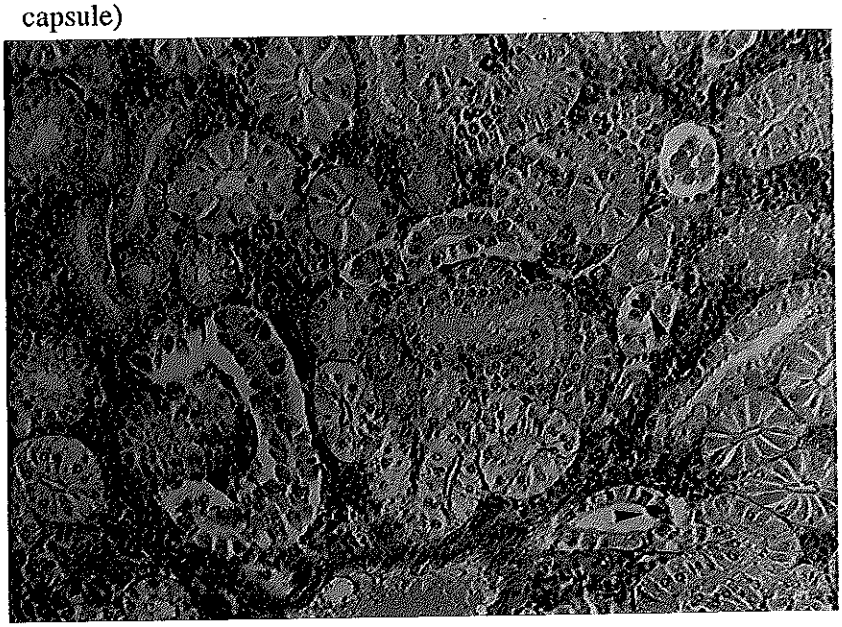
ภาพที่ 27 การเกิดช่องว่างในเนื้อเยื่อตับของปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP (T_1) (H & E, × 200) (v= vacuoles)



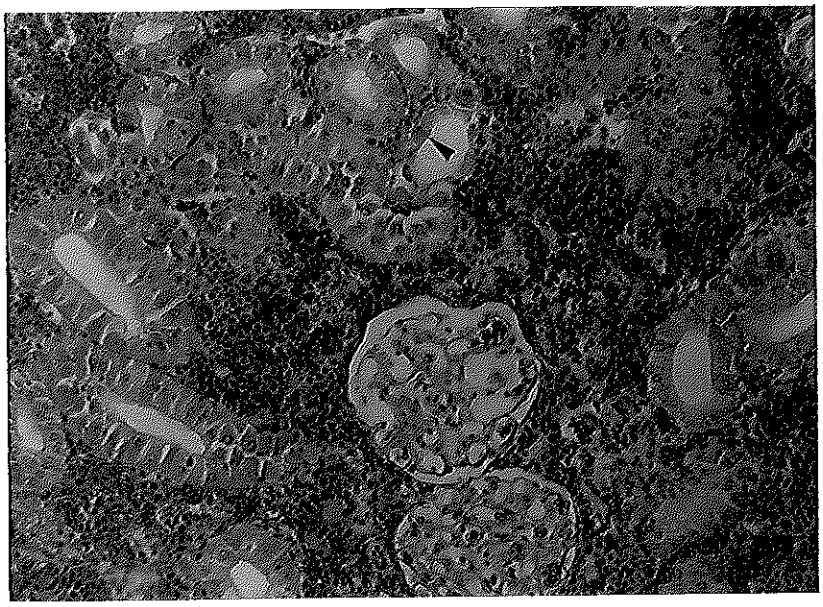
ภาพที่ 28 การเกิดช่องว่างในเนื้อเยื่อตับของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 15 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (T_2) (H & E, × 200) (v= vacuoles)



ภาพที่ 29 ลักษณะเนื้อเยื่อไตปกติของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 45 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (T_3) (H & E, × 200) (b= renal tubule, c= glomerulus, p= squamous parietal epithelium ของ Bowman' s capsule)



ภาพที่ 30 การเสื่อมสลายของท่อไต (tubule degeneration) ในปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP (T_1) (H & E, × 200) (ศรชี้แสดง pycnotic nuclei)



ภาพที่ 31 การบวมตัวของเซลล์บุผิว renal tubule ในปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 15 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (T_2) (ศรชี้) (H & E, × 200)

ภาพที่ 32 fibrosis (F) ในส่วน parietal epithelium ของ Bowman's capsule ในปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP (T_1) (H & E, × 200)

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. วิจารณ์ผลการทดลองที่ 1 (การศึกษาถึงประสิทธิภาพของวิตามินซีรูปแบบต่างๆ ที่มีต่อปลากดเหลือง)

ความผิดปกติด้านพฤติกรรมและลักษณะภายนอกที่ตรวจพบในปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีสอดคล้องกับที่มีรายงานในปลาชนิดอื่น ได้แก่ปลาดุก (Butthep *et al.*, 1985) ปลานิล (Juancey *et al.*, 1985; Soliman *et al.*, 1986b) ปลากดอเมริกัน (Lim and Lovell, 1978) กลุ่มปลาซัลมอน (Halver, 1989; Dabrowski *et al.*, 1990; Cho and Cowey, 1993) ปลาแมกซิกัน ซิคลิด (Chavez de Martinez, 1990) ปลาเทอร์บอต (Gouillou-Coustans and Guillaume, 1993) ปลากะพงขาว (Boonyaratpalin *et al.*, 1989) และปลากะรัง (มะลิ และคณะ, 2536) ความผิดปกติดังกล่าวได้แก่ การเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ ตกเลือดที่ระยางค์ สีลำตัวดำคล้ำ ระยางค์ต่างๆ สึกกร่อน ปลามีพฤติกรรมเซื่องซึม ความอยากกินอาหารลดลง และอัตราการตายสูง (Halver, 1989; Tacon, 1991) แสดงให้เห็นว่าปลากดเหลืองไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินซีหรืออาจสังเคราะห์ได้แต่ไม่เพียงพอจึงมีความจำเป็นต้องเสริมวิตามินซีลงในอาหารสำหรับเลี้ยงปลาชนิดนี้

เนื่องจากความเข้มข้นของวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าของปลาสามารถใช้เป็นดัชนีแสดงถึงปริมาณของวิตามินซีที่ปลาได้รับจากอาหารได้ดี (Halver, 1985; Alexis *et al.*, 1989; Skelbaek *et al.*, 1990) โดยความเข้มข้นของวิตามินซีในอวัยวะทั้งสองเพิ่มขึ้นตามระดับวิตามินซีที่ปลาได้รับจากอาหารโดยตรง (Lim and Lovell, 1978; Murai *et al.*, 1978; Soliman *et al.*, 1986b; Soliman *et al.*, 1994; Shiau and Hsu, 1995) จากการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าของปลา พบว่า AMP และ APP ให้ผลในการรักษาระดับความเข้มข้นของวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าของปลากดเหลืองได้ดีกว่า AsA โดยความเข้มข้นของวิตามินซีในตับปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP และ APP มีค่าสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริม AsA ถึง 2.5 เท่า และความเข้มข้นของวิตามินซีในไตส่วนหน้าของปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซี ทั้ง 2 รูปแบบมีค่าสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริม AsA 1.31 เท่า ในขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารเสริม AS มีความเข้มข้นของวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าต่ำมาก ทั้งนี้เนื่องจาก AMP และ APP มีความคงทนต่อการเสียสภาพได้ดีกว่า AsA โดยพบ

ว่า AsA คงเหลือเพียง 80 % เมื่อผ่านกระบวนการเตรียมอาหารและเก็บรักษา ในขณะที่ AMP และ APP มีความคงทนต่อการเสียสภาพสูง โดย AMP คงเหลืออยู่ถึง 99 % (El Nagger and Lovell, 1991) และ APP คงเหลืออยู่ 60-90 % หลังการเก็บรักษาไว้นานถึง 6 เดือน (Grant *et al.*, 1989) ดังนั้น AMP และ APP จึงคงเหลืออยู่ในอาหารที่ปลาได้รับในปริมาณที่มากกว่า AsA (Gadient and Fenster, 1994) นอกจากนี้ AMP และ APP มีองค์ประกอบของฟอสเฟต ซึ่งป้องกันวิตามินซีจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในระบบทางเดินอาหาร (Wilson *et al.*, 1989) หรืออาจช่วยเพิ่มการดูดซึมในลำไส้ของปลา (Lovell and El Naggar, 1989) การทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Grant และคณะ (1989), Wilson และคณะ (1989), El Nagger และ Lovell (1991) สาเหตุที่ความเข้มข้นของวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AS มีค่าต่ำมาก อาจเกิดขึ้นเนื่องจาก AS มีประสิทธิภาพการย่อยและดูดซึมในลำไส้ของปลากดเหลืองต่ำ (El Nagger and Lovell, 1991) ถึงแม้ว่า AS จะมีความคงทนต่อการเสียสภาพในกระบวนการผลิตอาหารสูงกว่าวิตามินซีรูปแบบอื่นๆ แต่เมื่อพิจารณาในแง่ของการออกฤทธิ์ พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริม AS มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการรอดตาย และความเข้มข้นของวิตามินซีในร่างกายต่ำกว่าปลาที่ได้รับวิตามินซีรูปแบบอื่นๆ (Murai *et al.*, 1978; Soliman *et al.*, 1986b; Dabrowski *et al.*, 1990; El Nagger and Lovell, 1991; Shiau and Hsu, 1995) จากรายงานในปลาเรนโบว์เทราท์ พบว่าปลาไม่สามารถนำ AS ไปใช้ในร่างกายได้ดี เนื่องจากขาดเอนไซม์แอสคอเบต-2-ซัลโฟไฮโดรเลสในลำไส้ (Dabrowski and Kock, 1989) แต่ที่ปลาไม่แสดงอาการขาดวิตามินซีเกิดขึ้นภายนอก เนื่องจาก AS บางส่วนอาจถูกไฮโดรไลซ์ (hydrolyse) เป็น AsA ได้ด้วยปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดขึ้นเองในอาหารสัตว์น้ำ(Tsujimura *et al.*, 1978 อ้างถึงโดย Dabrowski *et al.*, 1990) และ AsA ที่เกิดขึ้นนี้จะถูกปลานำไปใช้ในการรักษาสมดุลของเมแทบอลิซึมของร่างกาย เช่นใช้ในการสร้างคอลลาเจนก่อนนำไปใช้ประโยชน์อื่นๆ ทำให้เห็นว่าปลาไม่แสดงอาการขาดวิตามินซี (Murai *et al.*, 1978)

เมื่อพิจารณากลุ่มปลาที่ได้รับอาหารเสริม APP ถึงแม้ว่ามีความเข้มข้นของวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าสูง แต่พบว่าในระยะแรกของการศึกษามีการเจริญเติบโตและการรอดตายต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริม AsA ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาในปลาเรนโบว์เทราท์ (Grant *et al.*, 1989; Volker and Fenster, 1994) และปลากดอเมริกัน (Wilson *et al.*, 1989) ที่รายงานว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริม APP มีการเจริญเติบโต และการรอดตายที่ดี สาเหตุดัง

กล่าว อาจเป็นไปได้ว่าปลากดเหลืองต้องใช้เวลาเพื่อปรับตัวสร้างเอนไซม์พิเศษในการดูดซึม APP ซึ่งคล้ายกับสมมุติฐานการดูดซึมวิตามินซีรูปแบบ AP ในปลาเรนโบว์เทราท์จากรายงานของ Albrektsen และคณะ (1988) โดยในระยะแรกปลากดเหลืองอาจต้องใช้เวลาในการปรับตัวเพื่อสร้างเอนไซม์สำหรับย่อย APP ในลำไส้ และยังได้รับวิตามินซีในปริมาณที่ไม่เพียงพอ เป็นเหตุให้ปลามีการตายสูง และในเวลาต่อมาเมื่อปลาสามารถสร้างเอนไซม์ดังกล่าวขึ้นได้ ก็สามารถใช้วิตามินซีรูปแบบ APP ได้ดี จึงส่งผลให้มีความเข้มข้นของวิตามินซีในอวัยวะสูงขึ้น สำหรับปลาที่ได้รับอาหารเสริม OC พบว่าปลามีการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารเป็นปกติ เช่นเดียวกันกับผลการทดลองของ Phromkunthong (1995) ซึ่งรายงานว่าสามารถใช้ OC เสริมในอาหารสำหรับเลี้ยงปลากะรังได้ผลดี อย่างไรก็ตามพบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริม OC มีการรอดตายและปริมาณวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริม AsA ส่วน ScA ถึงแม้จะให้ผลในด้านการเจริญเติบโต และองค์ประกอบอื่นๆ อยู่ในเกณฑ์ดี เช่นเดียวกับรายงานของ Wahli และคณะ (1995) ซึ่งกล่าวว่า ScA มีประสิทธิภาพที่ดีในด้านภูมิคุ้มกันของปลา แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า อัตราการรอดตายของปลาที่ได้รับอาหารสูตรนี้อยู่ในเกณฑ์ต่ำใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซี

ลักษณะภายนอกของปลากดเหลือง ตลอดจนการเจริญเติบโตของปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมวิตามินซี พบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณคอลลาเจนและไฮดรอกซีโปรลีนในกระดูกสันหลัง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wilson และ Poe (1973), Sato และคณะ (1978), Mustin และ Lovell (1992) และการทดลองของ Shiau และ Hsu (1995) เนื่องจากวิตามินซีทำหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาไฮดรอกซีเลชันเพื่อการสร้างไฮดรอกซีโปรลีน และไฮดรอกซีไลซีนในคอลลาเจน (Stryer, 1988; Combs, 1992) การขาดวิตามินซีจึงมีผลให้คอลลาเจนที่สร้างขึ้นได้มีองค์ประกอบผิดปกติ ดังเห็นได้ว่าปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนในคอลลาเจนของปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีมีค่าน้อยกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซี เช่นเดียวกันกับผลการทดลองของ Wilson และ Poe (1973) เมื่อปลาสร้างไฮดรอกซีโปรลีนได้น้อย ยังผลให้การสร้างคอลลาเจนเกิดขึ้นได้น้อยกว่าปกติ (Halver, 1989) และไม่แข็งแรง (Stryer, 1988) การขาดวิตามินซีจึงมีผลให้คอลลาเจน ซึ่งเป็นโครงสร้างสำคัญของกระดูก และกระดูกอ่อน รวมถึงเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในร่างกายปลา (Halver, 1989) เกิดความไม่แข็งแรง (Masumoto *et al.*, 1991) ส่งผลให้ปลามีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ และเกิดความผิดปกติของลักษณะภายนอก ทั้งหลอดเลือดเปราะบาง เกิดการแตก

ร้าว เป็นเหตุให้เกิดการตกเลือดในอวัยวะต่างๆ และยังมีผลให้กระดูกสันหลังตลอดจนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีองค์ประกอบไม่แข็งแรง ก่อให้เกิดการบิดเบี้ยวเสียรูปไปจากปกติได้ นอกจากนี้ฤทธิ์ของเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีผลต่อรูปร่างและควบคุมการทำงานของเซลล์สร้างเนื้อกระดูก (osteoblast) มีค่าลดลงถึง 65 % (Wilson and Poe, 1973) จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่มีผลทำให้การสร้างกระดูกผิดปกติในปลาที่ขาดวิตามินซี

วิตามินซีมีความสำคัญในการรักษาสภาพของเนื้อเยื่อ และเซลล์ให้เป็นปกติ ดังเห็นได้จากปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารที่ขาดวิตามินซี เกิดพยาธิสภาพทั้งในส่วนเนื้อเยื่อเหงือก ตับ และไต ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในปลาชนิดอื่น ได้แก่ปลานิล (Soliman *et al.*, 1986 a,1986b; Phromkunthong *et al.*, 1994) ปลากิลเฮดบรีม (Alexis *et al.*, 1997) และปลากะพงขาว (Phromkunthong *et al.*, 1997) พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกมีผลให้ปลาไม่สามารถรับออกซิเจนจากน้ำได้ตามปกติ และตายในที่สุด (Phromkunthong, 1995) จากการตรวจพบช่องว่างในเซลล์ตับจำนวนมาก ถึงแม้ยังไม่สามารถระบุได้ว่าช่องว่างเหล่านี้คือไขมัน เนื่องจากในกระบวนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา ไขมันที่มีในเนื้อเยื่อจะถูกล้างออกโดยแอลกอฮอล์จนหมด อย่างไรก็ตามจากการศึกษาทางจุลทรรศน์อิเลคตรอนของ Phromkunthong (1995) ทำให้ทราบว่าช่องว่างจำนวนมากที่พบในเซลล์ตับอาจเป็นไขมัน ทั้งนี้เนื่องจากวิตามินซีมีความสำคัญในการสังเคราะห์คาร์นีทีน (carnitine) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีส่วนสำคัญในระบบเมแทบอลิซึมของไขมัน เมื่อกระบวนการดังกล่าวผิดปกติทำให้เกิดการสะสมของไขมันในเซลล์ตับได้ (Padh, 1990) จากการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อไตอาจมีผลให้สมดุลของน้ำในร่างกายปลาเสียไป ดังจะเห็นได้จากปริมาณความชื้นในตัวปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมวิตามินซีสูงกว่าปลาในชุดการทดลองอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Alexis และคณะ (1997)

จากผลการทดลองนี้กล่าวได้ว่า APM เป็นแหล่งของวิตามินซีอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพดีสำหรับใช้เสริมในอาหารปลากดเหลือง อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพื่อทราบถึงระดับของ AMP ที่เหมาะสม เพื่อใช้เสริมในอาหารสำหรับเลี้ยงปลากดเหลืองต่อไป

2. วิจารณ์ผลการทดลองที่ 2 (การศึกษาระดับความต้องการแอสคอบิล-2-โมโนฟอสเฟต แมกนีเซียมในปลากดเหลือง)

เมื่อพิจารณาจากข้อมูลที่ได้รับ ได้แก่ น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น อัตราการแลกเนื้อ และอัตราการรอดตาย แสดงให้เห็นว่าปลากดเหลืองสามารถใช้ AMP เป็นแหล่งของวิตามินซีได้ดี โดยสูตรอาหารที่เสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 45 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ถือว่าเพียงพอสำหรับใช้ผสมในอาหารของปลากดเหลือง การทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Mustin และ Lovell (1992) ซึ่งพบว่าปลากดอเมริกันสามารถใช้ AMP-Na ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกันกับ AMP และยังรายงานว่าอาหารเสริมวิตามินซีทั้งสองรูปแบบในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 15 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตและทำให้ปริมาณคอลลาเจนในกระดูกของปลาไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับวิตามินซีในปริมาณที่มากกว่านี้ นอกจากนี้จากการทดลองของ Lovell และ El Naggar (1989) พบว่า ปลากดอเมริกันซึ่งได้รับอาหารเสริม AMP มีการเจริญเติบโต และอัตรารอดที่ดี ขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP มีลักษณะผิดปกติเกิดขึ้นภายนอก ได้แก่ กระดูกสันหลังคดงอ และอัตราการรอดตายต่ำ ลักษณะของความผิดปกติเนื่องจากการขาดวิตามินซีของปลากดเหลืองในการทดลองนี้ พบเฉพาะกลุ่มที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP เท่านั้น แสดงให้เห็นว่า AMP มีประสิทธิภาพในด้านป้องกันการขาดวิตามินซีที่แสดงออกภายนอกของปลากดเหลืองได้ เช่นเดียวกับที่มีรายงานในปลาชนิดอื่น ได้แก่ปลาเรนโบว์เทราท์ (Sato *et al.*, 1991b; Dabrowski *et al.*, 1994) ปลานิลพันธุ์ผสม (Shiau and Hsu, 1995) ปลากะรัง (มะลิ และคณะ, 2536) และปลากะพงขาว (Phromkunthong *et al.*, 1994; Phromkunthong *et al.*, 1997)

ปริมาณวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าของปลากดเหลืองที่วิเคราะห์ได้จากทดลองนี้มีความสัมพันธ์กับปริมาณ AMP ที่ปลาได้รับจากอาหาร แสดงให้เห็นว่าอวัยวะทั้งสองสามารถใช้เป็นดัชนีแสดงสถานภาพของวิตามินซีในร่างกายของปลากดเหลืองได้ดี เช่นเดียวกับปลาเรนโบว์เทราท์ (Halver, 1985) ปลากดอเมริกัน (El Naggar and Lovell, 1991) และปลากะพงยุโรป (Alexis *et al.*, 1989) โดยที่ AMP ถูกเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสย่อยให้เป็น AsA ที่บริเวณลำไส้ของปลา ก่อนที่ปลาดูดซึม AsA ที่ย่อยได้นำไปใช้ประโยชน์ในร่างกายต่อไป (Dabrowski *et al.*, 1994)

ปริมาณคอลลาเจนในกระดูกสันหลังของปลาที่ได้รับ AMP มีค่าสอดคล้องกับการทดลองของ Shiau และ Hsu (1995) ซึ่งพบว่าปลานิลพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP เท่านั้นที่มีปริมาณคอลลาเจนในกระดูกสันหลังต่ำ ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ทุกระดับมีปริมาณคอลลาเจนไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้พบว่าคอลลาเจนในกระดูกสันหลังของปลากดเหลืองมีปริมาณมากกว่าปลาในการทดลองที่ 1 สาเหตุดังกล่าวอาจเนื่องมาจากการทดลองครั้งนี้เริ่มต้นด้วยการใช้ปลาที่มีขนาดใหญ่กว่าและอายุมากกว่าปลาในการทดลองที่ 1 ทั้งนี้ในร่างกายสัตว์ที่มีอายุมากจะมีปริมาณคอลลาเจนมากกว่าสัตว์ที่มีอายุน้อย (Stryer, 1988) ส่วนปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนในคอลลาเจนของปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 45-500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีค่าไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าการเสริม AMP ในอาหารที่มีปริมาณเนื้อวิตามินซี 45 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมขึ้นไป เป็นปริมาณที่เพียงพอสำหรับรักษาระดับไฮดรอกซีโปรลีนในกระดูกสันหลังของปลากดเหลืองได้ ปริมาณดังกล่าวต่ำกว่าที่มีรายงานในปลาเรนโบว์เทราท์โดย Sato และคณะ (1991b) รายงานว่า AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จึงมีผลให้อัตราส่วนของไฮดรอกซีโปรลีนต่อโปรลีนในกระดูกและผิวหนังของปลามีค่าไม่แตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณมากกว่านี้ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 15 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนในกระดูกสันหลังต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณมากกว่า

จากการศึกษาด้านเนื้อเยื่อวิทยา พบว่า AMP มีผลในการรักษาสภาพของเนื้อเยื่อปลากดเหลืองให้เป็นปกติ เช่นเดียวกับที่มีรายงานในปลากดอเมริกัน (Lim and Lovell, 1978) ปลาเรนโบว์เทราท์ (Halver, 1989) ปลากะพงขาว (Phromkunthong, 1995; Phromkunthong *et al.*, 1997) และปลากะรัง (Phromkunthong *et al.*, 1995) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP พบว่ามีพยาธิสภาพเกิดขึ้น ได้แก่บริเวณเหงือกมีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างผิดปกติ และการแยกตัวออกของเซลล์บุผิวบริเวณ secondary lamellae เช่นเดียวกันกับที่ตรวจพบในการทดลองที่ 1 พยาธิสภาพดังกล่าวนี้ยังอาจพบได้ในปลาที่อยู่ในสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่างสูง มีสารพิษหรือโลหะหนัก มีความเครียดเนื่องจากความร้อน ตลอดจนการติดเชื้อแบคทีเรียบางชนิด (Chevalier *et al.*, 1985) พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกดังกล่าวอาจมีผลให้ปลาไม่สามารถรับออกซิเจนจากน้ำได้เพียงพอ จึงทำให้อัตราการรอดตายของปลากลุ่มนี้ต่ำลง

(Phromkunthong, 1994) นอกจากนี้ยังพบช่องว่างในเนื้อเยื่อตับมากมาย เช่นเดียวกันกับที่พบในปลากะรังที่ขาดวิตามินซี (Phromkunthong *et al.*, 1995) ซึ่งพยาธิสภาพดังกล่าวยังตรวจพบในปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 15 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมอีกด้วย จึงมีความเป็นไปได้ว่าอาหารเสริม AMP ในระดับดังกล่าวอาจไม่เพียงพอสำหรับใช้ในการสังเคราะห์คาร์นีทีนซึ่งเป็นสารสำคัญในระบบเมแทบอลึซึมของไขมันในร่างกายปลา (Padh, 1990) ส่วนเนื้อเยื่อไต นอกจากพบการเสื่อมสภาพของเซลล์บุผิวท่อไตเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1 แล้ว ยังพบการสร้างเนื้อเส้นใยเกิดขึ้นอย่างผิดปกติบริเวณ glomerulus ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถตรวจพบได้ในปลากิลเฮดบรีม ที่ขาดวิตามินซีอีกด้วย (Alexis *et al.*, 1997) ซึ่งอาจมีผลให้ปลาไม่สามารถควบคุมสมดุลน้ำในร่างกายได้ตามปกติ จึงพบว่าปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีมีความชื้นในร่างกายสูงกว่าปลากลุ่มอื่นๆ มาก (Alexis *et al.*, 1997) นอกจากนี้ความผิดปกติของ glomerulus อาจมีผลให้ปลาไม่สามารถควบคุมการขับถ่ายยูเรีย (urea) ออกจากร่างกายได้ ส่งผลให้ยูเรีย-ไนโตรเจนในเลือด (blood urea nitrogen) มีปริมาณสูง (Robbins and Angell, 1971) จึงทำให้ปริมาณโปรตีนในร่างกายของปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริม AMP สูงกว่ากลุ่มปลาอื่นๆ

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าปลากดเหลืองที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 15 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดตาย และปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนในกระดูกสันหลังต่ำ ตลอดจนมีพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ และไต ดังนั้นจึงเป็นระดับที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการของปลากดเหลือง แต่การที่ปลายังมีการเจริญเติบโต และลักษณะภายนอกเป็นปกติ อธิบายได้ว่าปลากดเหลืองอาจนำ AMP ที่ได้รับไปใช้เพื่อรักษาระบบเมแทบอลิซึมของร่างกายให้เป็นปกติ ได้แก่การสร้างคอลลาเจน แต่ AMP ปริมาณน้อยที่ได้รับอาจไม่เพียงพอสำหรับใช้ในระบบชีวเคมีอื่นๆ ในร่างกาย เช่นการต้านทานต่อความเครียด จึงมีผลให้อัตราการตายของปลาที่ได้รับ AMP สูงกว่าปลากลุ่มอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Murai และคณะ (1978) ซึ่งพบว่าปลากดอเมริกันที่ได้รับ AsA ในปริมาณต่ำ (25 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) มีลักษณะภายนอก และการเจริญเติบโตเป็นปกติ แต่มีอัตราการรอดตาย และปริมาณวิตามินซีในตับและเลือดต่ำกว่าปลากลุ่มที่ได้รับวิตามินซีในปริมาณมากกว่า

จากการทดลองนี้สรุปได้ว่า การเสริม AMP ในอาหารที่มีปริมาณเนื้อวิตามินซี 45 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เพียงพอสำหรับปลากดเหลือง จะเห็นได้ว่าปลากดเหลืองมี

ความต้องการ AMP สูงเมื่อเปรียบเทียบกับปลากดอเมริกัน ตามรายงานของ Lovell และ El Naggar (1989) ที่ต้องการ AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซีเพียง 11 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเท่านั้น แต่ต่ำกว่าความต้องการ AMP ของปลาแรนโบว์เทราท์ตามรายงานของ Sato และคณะ (1991b) ซึ่งต้องการ AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซีสูงกว่า 100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จึงเป็นระดับที่ทำให้การเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย ปริมาณวิตามินซีในตับและเลือด ตลอดจนอัตราส่วนไฮดรอกซีโปรลีนต่อโปรลีนในกระดูกสันหลัง และผิวหนังมีค่าเป็นปกติ จากการทดลองนี้ ทำให้เห็นว่าสามารถใช้ AMP แทน AsA ในอาหารปลากดเหลืองได้ และสามารถลดปริมาณการใช้ลงไปได้ถึง 5.1 เท่า โดยวุฒิพร (2539) รายงานถึงความต้องการ AsA ของปลากดเหลืองขนาดปลานิ้วว่าสูงถึง 500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ทั้งนี้เนื่องจาก AMP มีความคงสภาพในระหว่างกระบวนการผลิตอาหารและการเก็บรักษาที่ดี มีปริมาณคงเหลืออยู่ในอาหารที่ปลาได้รับมาก (Gadient and Fenster, 1994) จึงไม่มีความจำเป็นต้องเสริมวิตามินซีลงในอาหารเพื่อชดเชยการสูญเสียในปริมาณที่มากกว่าความต้องการจริงของปลา 4-5 เท่า ตามคำแนะนำของ Halver และ Tucker (1984) เช่นเดียวกันกับการศึกษาในปลากะพงขาว Boonyaratpalin และคณะ (1989) รายงานระดับความต้องการ AsA ในปลาชนิดนี้ว่าสูงถึง 500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม แต่จากการศึกษาความต้องการ AMP ในปลากะพงขาว โดย Phromkunthong และคณะ (1994) พบว่าปลาดังกล่าวมีความต้องการ AMP ในอาหารเพียง 30 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเท่านั้น

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองที่ 1 ซึ่งเป็นการทดสอบประสิทธิภาพของวิตามินซี 6 รูปแบบ ได้แก่ AsA, AS, APP, AMP, OC และ ScA ทำให้ทราบว่า AMP มีประสิทธิภาพการใช้งานในปลากดเหลืองในด้านการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย ตลอดจนปริมาณวิตามินซีในตับและไตส่วนหน้าสูงที่สุด อีกทั้งยังมีผลให้อัตราแลกเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ ปริมาณคอลลาเจนและไฮดรอกซีโปรลีน ตลอดจนองค์ประกอบร่างกาย และเนื้อเยื่อวิทยาไม่แตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีรูปแบบอื่นๆ ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซีเท่ากัน ดังนั้นในการทดลองที่ 2 จึงศึกษาถึงระดับความต้องการ AMP ของปลากดเหลือง เพื่อให้ทราบถึงปริมาณ AMP ที่ใช้เสริมลงในอาหารสำหรับปลาชนิดนี้ ผลจากการทดลองที่ 2 ทำให้ทราบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 45 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีการเจริญเติบโต อัตราแลกเนื้อ อัตราการรอดตาย และข้อมูลอื่นๆ ไม่แตกต่างจากปลากลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม AMP ในปริมาณมากกว่า จึงสรุปได้ว่าควรใช้ AMP เสริมลงในอาหารสำหรับเลี้ยงปลากดเหลืองในปริมาณที่มีเนื้อวิตามินซี 45 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

อย่างไรก็ตามระดับความต้องการ AMP ของปลากดเหลืองจากการทดลองนี้ ได้จัดทำในระบบตู้ทดลองซึ่งควบคุมสิ่งแวดล้อมให้อยู่ในสภาพเหมาะสม ขณะที่ระบบการเลี้ยงปลาในสภาพของฟาร์มเลี้ยงอาจมีสภาพแวดล้อมที่ก่อให้เกิดความเครียดต่อปลามากกว่าในตู้ทดลอง เช่นความหนาแน่นในการปล่อย การเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำ การปนเปื้อนสารพิษจากอุตสาหกรรม ตลอดจนอาจมีการติดเชื้อจากธรรมชาติ ซึ่งมีผลให้ความต้องการ AMP ของปลาอาจสูงกว่านี้ได้

เอกสารอ้างอิง

เฉิดฉัน อมาตยกุล, มาโนชญ์ เบญจกาญจน์, วสันต์ ศรีวัฒนะ, สุรางค์ สุมโนจิตราภรณ์, ประดิษฐ์ ศรีภัทรประสิทธิ์, ศราวุธ เจะโส๊ะ, อนันต์ สี่หิรัญวงศ์, สุวิมล สี่หิรัญวงศ์, สุขาวดี กสิสุวรรณ และ วิศิษฏ์ ลีละวิวัฒน์. 2538. ปลากดเหลือง. กองประมงน้ำจืด. กรมประมง. กรุงเทพ. 56 หน้า.

มะลิ บุณยรัตผลิน, นันทิยา อุ่นประเสริฐ, ไพรัตน์ กอสุธารักษ์, วิษณุ โศธนะ และศิริมล ชุ่มสูงเนิน. 2531. ผลของระดับวิตามินซีที่เติมในอาหารต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพอาหาร และอัตรารอดของปลากะพงขาว. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 6 . สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. กรมประมง. สงขลา. 21 หน้า.

มะลิ บุณยรัตผลิน, จารุรัตน์ วรรณโกวัฒน์ และ ชูศักดิ์ บริสุทธิ์. 2536. แหล่งวิตามิน C จาก L-ascorbyl-2-phosphate-Mg ในอาหารปลากะรัง. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 17. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. กรมประมง. สงขลา. 12 หน้า.

วุฒิพร พรหมขุนทอง. 2539. ผลของวิตามินซีระดับต่างๆ ต่อการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตราการรอดตายของปลากดเหลือง (*Mystus nemurus*). ว.สงขลานครินทร์ วทท. 8 (4) : 413-420.

วุฒิพร พรหมขุนทอง, ประกอบ เส้งสีแดง และกิจการ ศุภมาตย์. 2540. ความต้องการวิตามินละลายน้ำในปลากดเหลือง(I) : ความต้องการวิตามินบี$_1$ วิตามินบี$_2$ วิตามินบี$_5$ และ วิตามินซี. ว.สงขลานครินทร์ วทท. 19 (3) : 337-349.

Abdelghany, A.E. 1996. Growth response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to dietary L-ascorbic acid, L-ascorbyl-2-sulfate, and L-ascorbyl-2-polyphosphate. *J.World.Aqua. Soc.* 27(4) : 449-455.

Albrektsen, S., Lie, O. and Sandness, K. 1988. Ascorbyl palmitate as a dietary vitamin C sources for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 71 : 359-368.

Alexis, M.N., Kalogeropoulos, N. and Argyropoulou, V. 1989. Ascorbic acid distribution in tissue of sea bass *Dicentrachus labrax* in relation to dietary levels and feeding peroid. Proc. Third Int. Symp. on Feeding and Nutr. in Fish. Aug. 28-Sept. 1. Toba. 401-409.

Alexis, M.N., Karanikolas, K.K. and Richards, R.H. 1997. Pathological finding owing to the lack of ascorbic acid in culture gilthead bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 151 : 209-218.

Andrews, J.W. and Murai, T. 1975. Studies on the vitamin C requirement of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. Nutr.* 105 : 557-561.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1985. Official Methods of Analysis. AOAC. Washington DC. 1263 p.

Bancroft, J.D. 1967. Histochemical Techniques. Butterworths. London. 348 p.

Benitez, L.V. and Halver, J.E. 1982. Ascorbic acid sulfate sulfohydrolase (C_2 sulfatase) : The modulator of cellular levels of L-ascorbic acid in rainbow trout. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79 : 5445-5449.

Boonyaratpalin, M. 1991. Asian seabass, *Lates calcarifer*. In : Handbook of Nutrient Requirements of fin fish (ed. R.P. Wilson) CRC Press. Boston. pp. 5-12.

Boonyaratpalin, S., Supamattaya, K., Direklbusarakom, S. 1989. Effect of vitamin C on growth, blood parameter and disease resistance in seabass (*Lates calcarifer* Bloch). National Institute of Coastal Aquaculture. Songkhla. 18 p.

Boyd, C.E. and Tucker, C.S. 1992. Water Quality and Pond Soil Analysis for Aquaculture. Alabama Agricultural Experiment Section, Auburn University, Alabama. 183 p.

Butthep, C., Sitasit, P. and Boonyaratpalin, M. 1985. Water-soluble vitamin essential for the growth of Clarias. In : Finfish Nutrition in Asia : Methodological Approaches to Research and Development (eds. C.Y. Cho, C.B. Cowey and T. Watanabe) International Developement Research Center, Ottawa, Canada, pp. 118-129.

Chavez de Martinez, M.C. 1990. Vitamin C requirement of Mexican native cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Aquaculture* 86 : 409-416.

Chevalier, G., Gauthier, L. and Moreau, G. 1985. Histopathological and electron microscopic studies of gill of brook trout, *Salvelinus fontinalis*, from acidified lakes. *Can. J. Zool.* 63 : 2062-2070.

Cho, C.Y. and Cowey, C.B. 1993. Utilization of monophosphate esters of ascorbic acid by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In : Fish Nutrition in Practice, Biarritz, 24-27 June 1991 (eds. S.J. Kaushik and P. Luquet), Institute National de la Recherche Agronomique, Paris, pp. 149-156.

Combs, G.F. 1992. The Vitamins Fundamental Aspects in Nutrition and Health. Division of Nutritional Sci. Cornell University. Ithaca. New York. 582 p.

Coustans, M.F., Guillaume, J., Metailler, R., Dugornay, O. and Messager, J.L. 1990. Effect of an ascorbic acid deficiency on tyrosinemia and renal granulomatous disease in turbot (*Scophthalmus maximus*) interaction with a slight polyvitaminosis. *Comp. Biochem. Physiol.* 97A (2) : 145-152.

Dabrowski, K. and Kock, G. 1989. Absorption of ascorbic acid and ascorbic sulfate and their interaction with minerals in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46 : 1952-1957.

Dabrowski, K., El-Fiky, N., Kock, G., Frigg, M and Wieser, W. 1990. Requirement and utilization of ascorbic acid and ascorbic sulfate in juvenile rainbow trout. *Aquaculture* 91 : 317-337.

Dabrowski, K., Matusiewicz, M. and Bloom, J.H. 1994. Hydrolysis, absorption and bioavailability of ascorbic acid esters in fish. *Aquaculture* 124 : 169-192.

De Silva, S.S. and Anderson, T.A. 1995. Fish Nutrition in Aquaculture. Chapman and Hall. London. 319 p.

Dupree, H.K. and Sneed, K.E. 1966. Response of channel catfish fingerling to different levels of major nutrients in purified diets. U.S. Bureau of Sports Fish and Wildlife Tech. Pap. No 9, 21 p.

Durve, V.S and Lovell, R.T. 1982. vitamin C and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39 : 948-951.

El Naggar, G.O. and Lovell, R.T. 1991. Effect of source and dietary concentration of ascorbic acid on tissue concentration of ascorbic acid in channel catfish. *J. World. Aqua. Soc.* 22(4) : 201-206.

Friedrich, W. 1988. Vitamins. Walter de Gruyter. New York. 1058 p.

Gadient, M. and Fenster, R. 1994. Stability of ascorbic acid and other vitamin in extruded fish feeds. *Aquaculture* 124 : 207-211.

Gadient, M. and Schai, E. 1994. Leaching of various vitamins from shrimp feed. *Aquaculture* 124 : 201-205.

Gouillou-Coustans, M.F. and Guillaume, J. 1993. Effect of a nonspecific stressor on the symptoms of ascorbic acid deficiency in turbot (*Scophthalmus maximus*). In " Fish Nutrition in Practice, Biarritz, 24-27 June 1991 (ed. by S.J. Kaushik and P. Luquet), Institute National de la Recherche Agronomique, Paris, pp. 209-214.

Grant, B.F., Seib, P.A., Liao, M.L. and Corpron,"K.E. 1989. Polyphosphated L-ascorbic acid : A stable form of vitamin C for aquaculture feeds. *J. World. Aqua. Soc.* 20(3) : 143-157.

Halver, J.E. 1972. Fish Nutrition. Academic Press. New York. 713 p.

Halver, J.E. 1989. Fish Nutrition. 2nd edition. Academic Press. New York. 798 p.

Halver, J.E. 1985. Recent advances in vitamin nutrition and metabolism in fish. Nutrition and Feeding in Fish. Academic Press. London. pp. 415-429.

Hilton, J.W., Cho, C.Y. and Slinger, S. J. 1977. Factor affecting the stability of supplemental ascorbic acid in practical trout diets. *J. Fish. Res. Board. Can.* 34 : 683-687.

Igarashi, I. 1994. Selection of ascorbic acid source for aquatic feeds in view of cost performance. Seminar on Aquaculture Feed and Disease Takeda Vitamin & Food Asia PTE. Ltd., Hua Hin, Thailand, Feb. 19 1994. pp. 17-34.

Juancey, K., Soliman, A. and Roberts, R.J. 1985. Ascorbic acid requirements in relation to wound healing in the culture tilapia *Oreochromis niloticus* (Trewavas). *Aqua. Fish.Manage.* 16 : 139-149.

Khajarern, J. and Khajarern, S. 1990a. Stability evaluation of coated ascorbic acid in shrimp premix. Takeda Chemical Industries Ltd. Tokyo. 5 p.

Khajarern, J. and Khajarern, S. 1990b. Stability of ethocel coated ascorbic acid in shrimp feeds during processing storage and leaching. Takeda Chemical Industries Ltd. Tokyo. 5 p.

Khan, M.S., Ambak, M.A., Ang, A.K. and Mohsin, A.K.M. 1990. Reproductive biology of a tropical catfish, *Mystus nemurus* Cuvier & Valenciennes, in Chenderoh reservoir, Malaysia. *Aqua. Fish. Manage.* 21 : 173-179.

Lim, C. and Lovell, R.T. 1978. Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Nutr.* 108 : 1137-1146.

Lovell, R.T. and El Naggar, G.O. 1989. Vitamin C activity for L- ascorbic acid, L-ascorbyl-2-sulfate and L-ascorbyl-2- phosphate Mg for channel catfish. Proceedings of the Third International Symposium on Feeding and Nutrition in Fish (eds. M. Takeda and T. Watanabe) Toba, Japan, Aug. 28-Sept. 1 1989. pp. 159-165.

Mahajan, C.L. and Agrawal, N.K. 1980. Nutritional requirement of ascorbic acid by Indian major carp, *Cirrhina mrigala*, during early growth. *Aquaculture* 19 : 37-48.

Masumoto, T., Hosokawa, H., and Shimeno, S. 1991. Ascorbic acid's role in aquaculture nutrition. Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop, Bangkok, Thailand, Sep.19-25 1991. pp. 10-14.

Merchie, G., Lavens, P., Storch, V. Ubel, U., Nelis, H., De Leenheer, A. and Sorgeloos, P. 1996. Influence of dietary vitamin C dosage on turbot (*Scophthalmus maximus*) and European sea bass (*Dicentrachus labrax*) nursery stages. *Comp. Biochem. Physiol.* 114A (2) : 123-133.

Moser, U. and Bendich, A. 1991. Vitamin C. In Handbook of Vitamins (ed. L.J. Machlin) 2nd edition, pp. 195-232, New York : Marcel Dekker.

Murai, T., Andrews, J.W. and Bauernfeind, J.C. 1978. Use of L- ascorbic acid, ethocel coated ascorbic acid and ascorbate-2- sulfate in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Nutr.* 108 : 1761-1766.

Murray, R. K., Granner, D. K. Mayes, P. A. and Rodwell, V. W. 1996. Harper 's Biochemistry. 24th edition, Prentice-Hall International, Inc. New Jersey. 868 p.

Mustin, W.G. and Lovell, R.T. 1992. Na-L-ascorbyl-2-monophosphate as a source of vitamin C for channel catfish. *Aquaculture* 105 : 95-100.

Padh, H. 1990. Cellular function of ascorbic acid. *Biochem. Cell. Biol.* 68 : 1166-1173.

Phromkunthong, W. 1994. Effect of vitamin C levels on growth performance, feed conversion rates, survival rates and histopathology of gill, liver and kidney of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus. Songklanakarin. J. Sci. Technol.* 16(2) : 113-124.

Phromkunthong, W. 1995. Studies on the Importance of Water-Soluble Vitamin in Diet of Three Teleost Fish (*Lates calcarifer*, *Epinephelus malabaricus*, *Brachydanio rerio*). Ph.D. Thesis. University of Heidelberg, Heidelberg, Federal Republic of Germany. 212 p.

Phromkunthong, W., Boonyaratpalin, M. and Verakunpiriya, W. (1993a). Histopathology of the gills of ascorbic acid deficient grouper, *Epinephelus malabaricus. Fish Pathol.* 28(4) : 151-159.

Phromkunthong, W., Storch, V. and Boonyaratpalin, M. (1993b). Effects of ascorbic acid on the ultrastructure of the hepatocytes of seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) (Pisces: Centropomidae). *Songklanakarin. J. Sci. Technol.* 15(2) : 137-145.

Phromkunthong, W, Storch, V., Supamattaya, K. and Boonyaratpalin, M. 1995. Effects of ascorbic acid deficiency on the gill and liver histopathology of grouper, *Epinephelus malabaricus.* In : Diseases in Asian Aquaculture II. Fish Health Section, Asian Fisheries Society. Manila. pp. 503-512.

Phromkunthong, W., Boonyaratpalin, M. and Storch, V. 1997. Different concentration of ascorbyl-2-monophosphate-magnesium as dietary sources of vitamin C for sea bass, *Lates calcarifer. Aquaculture* 151 : 225-243.

Phromkunthong, W., Storch, V. and Braunbeck, T. 1994 . Sexual dimorphism in the reaction of zebrafish (*Brachydanio rerio*) to ascorbic acid deficiency: Induction of steatosis in hepatocytes of male fish. *J. Appl. Ichtyol.* 10 : 146-153.

Robbins, S.L. and Angell, M. 1971. Basic Pathology. W.B. Saunders. Tokyo. 574 p.

Robinson, E.H. and Wilson, R.P. 1985. Nutrition and feeding. p. 323-404. In Channel catfish Culture. (ed. C.S. Tucker) Developments in Aquaculture and Fisheries Science, 15. Elsevier, Amsterdam.

Roe, J.H. 1967. Ascorbic acid. In The Vitamins. (eds. P. Gyogry and W.N. Pearson) Vol. VII, pp. 27-49, New York : Academic Press.

Sandnes, K., Ulgenes, Y., Braekkan,O.R. and Utne, F. 1984. The effect of ascorbic acid supplementation in broodstock feed on reproduction of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) *Aquaculture* 43 : 167-177.

Sato, M., Yoshinaka, R. and Ikeda, S. 1978. Dietary ascorbic acid requirement of rainbow trout for growth and collagen formation. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 44 (9) : 1029-1035.

Sato, M., Kondo, R., Yoshinaka, R. and Ikeda, S. 1982. Effect of dietary ascorbic acid levels on collagen formation in rainbow trout. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 48 : 553-556.

Sato, M., Hatano, Y. and Yoshinaka, R. 1991a. L-ascorbyl-2 sulfate as a dietary vitamin C source for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 57 (4) : 717-721.

Sato, M., Miyasaki, T. and Yoshinaka, R. 1991b. Utilization of L-ascorbyl-2-phosphate in rainbow trout as a dietary vitamin C source. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 57 (10) : 1923-1926.

Shiau, S.Y. and Hsu, T.S. 1994. Vitamin C requirement of grass shrimp, *Penaeus monodon*, as determined with L-ascorbyl-2-monophosphate. *Aquaculture* 122 : 347-357.

Shiau, S.Y. and Hsu, T.S. 1995. L-ascorbyl-2-sulfate has equal antiscorbutic activity as L-ascorbyl-2-monophosphate for tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus. Aquaculture* 133 : 147-157.

Skelbaek, T., Andersen, N.G., Winning, M. and Westergaard, S. 1990. Stability in fish feed and bioavailability to rainbow trout of two ascorbic acid forms. *Aquaculture* 84 : 335-343.

Smith, H. M. 1965. The Fresh-Water Fishes of Siam, or Thailand. T.F.H. Publications, Inc. New Jersey. 622 p.

Soliman, A.K., Jauncey, K. and Roberts, R.J. 1985. Qualitative and quantitative identification of L-gulonolactone oxidase activity in some teleosts. *Aqua. Fish. Manage.* 1 : 249-256.

Soliman, A.K., Jauncey, K. and Roberts, R.J. 1986a. The effect of dietary ascorbic acid supplementation on hatchability, survival rate and fry performance in *Oreochromis niloticus* (Peter). *Aquaculture* 59 : 197-208.

Soliman, A.K., Jauncey, K. and Roberts, R.J. 1986b. The effect of varying forms of dietary ascorbic acid on the nutrition of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 52 : 1-10.

Soliman, A.K., Jauncey, K. and Roberts, R.J. 1987. Stability of L-ascorbic acid (vitamin C) and its forms in fish feeds during processing, storage and leaching. *Aquaculture* 60 : 73-83.

Soliman, A.K., Jauncey, K. and Roberts, R.J. 1994. Water-soluble vitamin requirements of tilapia : ascorbic acid (vitamin C) requirement of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) *Aqua. Fish. Manage.* 25 : 269 - 278.

Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. 1980. Principles and Procedures of Statistics. 2nd edition. McGraw-Hill, New York. 633 p.

Stryer, L. 1988. Biochemistry. W.H. Freeman and Company. New York. 1089 p.

Tacon, A.G.J. 1991. Vitamin nutrition in shrimp and fish. Proceeding of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition workshop, Bangkok, Thailand, Sep.19-25. Republic of Singapore. pp. 10-41.

Tolbert, B.M., Downing, M., Carlson, R.W., Knight, M.K. and Baker, E.M. 1975. Chemistry and metabolism of ascorbic acid and ascorbic sulfate. *Ann. New York. Acad. Sci.* 258 : 48-69.

Tucker, B.W. and Halver, J.E. 1984. Ascorbate-2-sulfate metabolism in fish. *Nutr.Rev.* 42(5) : 173-179.

Tucker, B.W. and Halver, J.E. 1986. Utilization of ascorbate-2-sulfate in fish. *Fish Physio. Biochem.* 2(1-4) : 151-160.

Volker, L. and Fenster, R. 1994. Efficacy of ascorbyl-2-polyphosphate in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 124 : 213-217.

Wahli, T., Frishknecht, R., Schmitt, M., Gabaudan, J., Verlhac, V. and Meier, W. 1995. A comparison of the effect of silicone coated ascorbic acid and ascorbyl phosphate on the course of ichthyophthiriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 18 : 347-355.

Wilson, R.P. and Poe, W.E. 1973. Impaired collagen formation in the scorbutic channel catfish. *J. Nutr.* 103 : 1359-1364.

Wilson, R.P., Poe, W.E. and Robinson, E.H. 1989. Evaluation of L-ascorbyl-2-polyphosphate (AsPP) as a dietary ascorbic acid sources for channel catfish. *Aquaculture* 81 : 129-136.

Woessner Jr., J.F. 1961. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportion of this amino acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 93 : 440-447.

Zeitoun, I.H., Tack, P.I., Halver, J.E. and Ullrey, D.E. 1973. Influence of salinity on protein requirements of rainbow trout, *Salmo gairdneri* fingerling. *J. Fish. Res. Board Can.* 30 : 1867-1873.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี (ตามวิธีการของ Roe, 1967)

สารเคมี

1. สารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก (metaphosphoric acid, HPO_3) 5 %-กรดอะซิติก (glacial acetic acid, CH_3COOH) 10 %: เตรียมโดยชั่งกรดเมตาฟอสฟอริก 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น เติมกรดอะซิติกเข้มข้น 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารให้เป็น 1 ลิตร เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นและควรเตรียมใหม่ทุกสัปดาห์

2. สารละลาย 2-4 ไดไนโตรฟีนีลไฮดราซีน (2,4-dinitrophenylhydrazine, $(NO_2)_2 C_6H_3NHNH_2$): เตรียมโดยชั่ง 2-4 ไดไนโตรฟีนีลไฮดราซีน 2 กรัม ละลายลงในกรดซัลฟูริก (sulfuric acid, H_2SO_4) 9 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมไทโอยูเรีย (thiourea, NH_2CSNH_2) 4 กรัม ทำการกรองสารที่เตรียมได้ด้วยกระดาษกรอง เก็บรักษาในตู้เย็น สารนี้จะต้องปราศจากตะกอนเมื่อใช้

3. ผงถ่านหินผ่านการล้างกรด: เตรียมโดยชั่งโนริท (Norit) หรือผงถ่านหิน (activated charcoal) 200 กรัม ใส่ลงบีกเกอร์ เติมสารละลายกรดเกลือ (hydrochloric acid, HCl) 10 % ปริมาตร 1 ลิตร นำไปต้มจนเดือด กรองด้วยเครื่องกรองสูญญากาศ ล้างผงถ่านหินที่กรองได้ด้วยน้ำ 1 ลิตรและกรองอีกครั้ง จากนั้นนำไปทำการระเหยน้ำออกโดยอบในเตาอบอุณหภูมิ 110-120 องศาเซลเซียส

4. กรดซัลฟูริก 85 %: เตรียมโดยตวงกรดซัลฟูริกเข้มข้น (ความถ่วงจำเพาะ 1.84) ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ละลายลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. บดตัวอย่างเนื้อเยื่อในสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก 5 % - กรดอะซิติก 10 % โดยที่ปริมาตรของสารที่ใช้จะต้องเตรียมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของวิตามินซีอยู่ในช่วง 1-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เติมผงถ่านหินที่ผ่านการล้างด้วยกรดแล้ว 1 กรัมต่อตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว กรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1

3. ดูดสารที่กรองได้จากข้อ 2 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง 2 หลอด

4. เติมสารละลาย 2-4 ไดไนโตรฟีนีลไฮดราซีน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่เป็นตัวอย่าง โดยหลอดที่ทำเป็น blank ไม่ต้องเติมสาร

5. นำหลอดแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดทั้งหมดลงแช่ในอ่างน้ำแข็ง

6. ในขณะที่แช่หลอดทดลองในอ่างน้ำแข็ง เติมกรดซัลฟูริก 85 % ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทีละหยดอย่างช้า ๆ เพื่อมิให้อุณหภูมิของสารในหลอดทดลองสูงขึ้นเนื่องจากการเติมกรดที่เร็วเกินไป (การหยดกรด 5 มิลลิลิตร ควรใช้เวลานานประมาณ 1 นาที)

7. หลอดที่เป็น blank เติมสารละลาย 2-4 ไดไนโตรฟีนีลไฮดราซีน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

8. เขย่าหลอดทุกหลอดในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำหลอดทั้งหมดออกมาตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยตั้งค่า 100 % transmittance ผ่านหลอดที่เป็น blank

การเตรียม standard curve

ละลายแอล-แอสคอบิก แอสิด (L-ascorbic acid) 25 มิลลิกรัม ลงในสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก 5 % - กรดอะซิติก 10 % ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำสารละลายนี้มา 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก 5 % - กรดอะซิติก 10 % จนมีปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร (สารละลายนี้จะมีความเข้มข้นของวิตามินซี 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นทำการออกซิไดซ์ด้วยผงถ่านหินที่ผ่านการล้างกรดแล้ว และเจือจางเป็นชุดของสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 1-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนนำไปผ่านขั้นตอนการวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับตัวอย่าง

2. การวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน (ดัดแปลงจากวิธีการของ Wilson and Poe, 1973)

สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH) 0.1 นอร์มอล: เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร

2. 10 % โซเดียม อีดีทีเอ (Sodium EDTA, $(CH_2N(CN_2CO_2Na)CH_2CO_2H)_2$: เตรียมโดยละลายโซเดียม อีดีทีเอ 100 กรัม ลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร ทำการปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และสารละลายกรดเกลือจนมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5

3. อะซีโตน (acetone, CH_3COCH_3)

5. สารละลาย 1:1 เอทานอล (ethanol, C_2H_5OH) - อีเทอร์ (ether, $(C_2H_5)_2O$): เตรียมโดยตวงเอทานอล 500 มิลลิลิตร ผสมกับอีเทอร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

การเตรียมตัวอย่าง

ดึงกระดูกสันหลังสดออกจากตัวอย่างปลาโดยตัดเนื้อเยื่อที่ติดอยู่ออกให้มากที่สุด ทำการดึงเศษเนื้อเยื่อที่เหลือออก โดยจุ่มท่อนกระดูกสันหลังในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 - 10 นาที และแปรงเศษเนื้อเยื่อที่เหลือออกจนหมด แช่กระดูกดังกล่าวในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล เป็นเวลานานข้ามคืน แยกกระดูกออกเป็นข้อและอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทำการบดกระดูกดังกล่าวจนละเอียด

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. นำกระดูกที่บดแล้ว 1 กรัม สกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งเป็นการสกัดองค์ประกอบของเซลล์ที่ละลายในด่างออก

2. แยกส่วนกระดูกที่สกัดแล้วออก โดยการกรองด้วยเครื่องกรองสูญญากาศ

3. นำกระดูกที่ได้จากการกรองมาทำการสกัดด้วยสารละลาย 10 % โซเดียม อีดีทีเอ 3 ครั้ง โดยใช้เวลารวม 48 ชั่วโมงในเครื่องเขย่า การสกัดดังกล่าวสามารถลดปริมาณเถ้าและแร่ธาตุลงได้ถึง 96-100 %

4. ภายหลังการสกัดเถ้าและแร่ธาตุออก (demineralization) นำส่วนที่เหลือจากการสกัดล้างด้วยน้ำและล้างด้วยอะซีโตน

5. สกัดครั้งสุดท้ายด้วยสารละลาย 1:1 ของเอทานอล-อีเทอร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อแยกตัวทำละลายออกจะได้คอลลาเจนที่ไม่ละลาย (insoluble collagen) ทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และอบซ้ำจนกว่าชั่งน้ำหนักได้คงที่

3. การวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโปรลีน (ตามวิธีการของ Woessner, 1961)

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์: เตรียมโดยละลายกรดซิตริก โมโนไฮเดรท (citric acid monohydrate, $HO_2CCH_2C(OH)(CO_2H)CH_2CO_2H.H_2O$) 50 กรัม กรดอะซิติกเข้มข้น 12 มิลลิลิตร โซเดียมอะซิเตท ไตรไฮเดรท (sodium acetate trihydrate, $CH_3CO_2Na.3H_2O$) 120 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 34 กรัมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร

2. สารละลายคลอรามีน-ที (chloramine T, $C_7H_7ClNO_2SNa$): เตรียมโดยละลายคลอรามีน-ที 1.41 กรัม ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติมเมทิลเซลโลโซฟ (methyl cellosolve, $C_3H_8O_2$) 30 มิลลิลิตร และบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร

3. สารละลายกรดเปอร์คลอริก (perchloric acid, $HClO_4$): เตรียมโดยเจือจาง กรดเปอร์คลอริก 70 % ปริมาตร 27 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายพิโค-ไดเมทิลอะมิโนเบนซาดีไฮด์ (ρ-dimethylaminobenzaldehyde, $C_9H_{11}NO$): เตรียมก่อนใช้โดยเติมเมทิลเซลโลโซฟลงในพิโค-ไดเมทิลอะมิโนเบนซาดีไฮด์ 20 กรัม จนมีปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อน 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งละลายหมด

5. เมทิลเรด อินดิเคเตอร์ (methyl red indicator): เตรียมโดยละลายเมทิลเรด 0.02 กรัม ลงในแอลกอฮอล์ 95 % ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างคอลลาเจนที่ได้จากการสกัด 100 มิลลิกรัม บรรจุลงในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมกรดเกลือความเข้มข้น 6 นอร์มอล ไฮโดรไลซ์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส ทิ้งให้เย็น หยดเมทิลเรด อินดิเคเตอร์ จากนั้นปรับความเป็นกรด-ด่างของสารละลายคอลลาเจนดังกล่าวด้วยสารละลายกรดเกลือ และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จนกระทั่งอินดิเคเตอร์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (pH 6-7) เตรียมตัวอย่างดังกล่าวเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลายตัวอย่างเจือจางจนมีความเข้มข้นของไฮดรอกซีโปรลีนอยู่ในช่วงระหว่าง 1-5 ไมโครกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร บรรจุลงหลอดฝาเกลียว

2. นำตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง (จากข้อ 1) เติมสารละลายคลอรามีน-ที 1 มิลลิลิตร พร้อมเขย่า ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที

3. เติมสารละลายกรดเปอร์คลอริก 1 มิลลิลิตร เขย่าและทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที

4. เติมสารละลายพิโค-ไดเมทิลอะมิโนเบนซาดีไฮด์ 1 มิลลิลิตร เขย่าจนไม่มีตะกอนเหลืออยู่ จากนั้นแช่ลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

5. ทำให้สารตัวอย่างในหลอดเย็นลง โดยแช่ในอ่างน้ำปกติเป็นเวลา 5 นาที สารสีที่เกิดขึ้นมีความคงสภาพอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

6. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 557 นาโนเมตร

การเตรียม standard curve

การเตรียม standard curve มีขั้นตอนเช่นเดียวกับการวิเคราะห์สารตัวอย่างข้างต้น โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของไฮดรอกซีโปรลีนให้อยู่ในช่วง 0-5 ไมโครกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร บรรจุลงหลอดฝาเกลียวและผ่านขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ ตามปกติ

4. การวิเคราะห์องค์ประกอบอาหารและองค์ประกอบร่างกายของปลา (ตามวิธีการของ AOAC, 1985)

4.1 การวิเคราะห์ความชื้น

1. นำขวดชั่งเข้าตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น

2. ชั่งและบันทึกน้ำหนักของขวดชั่งโดยละเอียด

3. ชั่งตัวอย่างใส่ขวดชั่งประมาณ 5 กรัม โดยบันทึกน้ำหนักอย่างละเอียด

4. นำตัวอย่างเข้าตู้อบ อบโดยใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

5. นำตัวอย่างที่อบแล้วใส่โถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น บันทึกน้ำหนักของตัวอย่าง

6. ทำซ้ำตามข้อ 1-5 จนกระทั่งน้ำหนักที่ได้คงที่ โดยน้ำหนักที่หายไปคือน้ำหนักของความชื้น

คำนวณ % ความชื้นด้วยสมการ

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{(a - b)}{a} \times 100$$

a = น้ำหนักของอาหารก่อนอบแห้ง

b = น้ำหนักของอาหารหลังอบแห้ง

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

1. ชั่งตัวอย่างน้ำหนักประมาณ 2 กรัมใส่ลงถ้วยกระเบื้องเคลือบ บันทึกน้ำหนักโดยละเอียด

2. นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนเถ้าเป็นสีขาว

3. นำเข้าโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น นำออกมาชั่งน้ำหนักโดยละเอียด

คำนวณ % เถ้าด้วยสมการ

$$\% \text{ เถ้า} = \frac{(b - a)}{w} \times 100$$

a = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ

b = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำหนักของเถ้าหลังการเผา

w = น้ำหนักของอาหารก่อนเผา

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกข้มข้น 93-98 %

2. สารเร่งรวม (catalyst mixture): เตรียมโดยชั่งคอปเปอร์ ซัลเฟต (copper sulfate, $CuSO_4$) 7 กรัม กับโปแทสเซียม ซัลเฟต (potassium sulfate, K_2SO_4) 100 กรัม ผสมให้เข้ากัน

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 45 %: เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 450 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

4. สารละลายกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล: เตรียมโดยละลายกรดเกลือ 9 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร

5. สารละลายกรดบอริค (boric acid, H_3BO_3) 4 %: เตรียมโดยละลายกรดบอริค 4 กรัม ลงในน้ำกลั่น ต้มจนกระทั่งละลายหมด ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

6. อินดิเคเตอร์รวม (mixed indicator): เตรียมโดยละลายเมทิลเรด 0.2 กรัม ลงในแอลกอฮอล์ 95 % ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร และละลายเมทิลินบลู (methylene blue) 0.2 กรัม ลงในแอลกอฮอล์ 95 % ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเมทิลเรด 2 ส่วน ผสมกับสารละลายเมทิลินบลู 1 ส่วน เขย่าให้เข้ากัน

7. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Na_2CO_3) 0.1 นอร์มอล: เตรียมโดยอบโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ 260-270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ชั่งสารดังกล่าวมา 1.325 กรัม ละลายน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 250 มิลลิลิตร

8. เมทิลออเรนช์ อินดิเคเตอร์ (methyl orange indicator): เตรียมโดยละลายเมทิลออเรนช์ 0.1 กรัม ลงในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือมาตรฐาน

ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 40 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติมเมทิลออเรนช์ อินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ทำการไตเตรทด้วยสารละลายกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล คำนวณความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือโดยใช้สูตร $N_1V_1=N_2V_2$

หรือนอร์มอลลิตี้ของกรดเกลือ = $\frac{\text{น้ำหนัก (กรัม) ของโซเดียมคาร์บอเนต} \times 1000}{\text{สารละลายกรดเกลือ (มิลลิลิตร)} \times 52.994}$

วิธีการวิเคราะห์

ขั้นตอนการย่อย (digestion)

1. ชั่งตัวอย่างด้วยกระดาษชั่งสารที่ปราศจากไนโตรเจนให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.5 กรัม บันทึกน้ำหนักโดยละเอียด ใส่ตัวอย่างลงขวดวิเคราะห์โปรตีน

2. เติมสารเร่งรวม 3 กรัม

3. เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 10 มิลลิลิตร

4. นำไปให้ความร้อนด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีน ที่อุณหภูมิ 375 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารละลายในขวดวิเคราะห์ใส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

ขั้นตอนการกลั่น (distillation)

1. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในขวดวิเคราะห์

2. ต่อขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเข้ากับชุดเครื่องกลั่น ที่มีขวดรูปชมพู่บรรจุกรดบอริก 40 มิลลิลิตร โดยให้ปลายของหลอดแก้วที่ต่อจากกระบอกแก้วควบแน่นจุ่มอยู่ในกรดบอริก เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในขวดวิเคราะห์อย่างช้า ๆ จนกระทั่งสารละลายมีสีดำ

3. ใส่อินดิเคเตอร์ลงในกรดบอริก 2-3 หยด

4. ทำการกลั่นจนกระทั่งไม่มีก๊าซแอมโมเนียออกมา เมื่อกรดบอริคเปลี่ยนเป็นสีเขียว แล้วจึงทำการกลั่นต่อไปอีก 10 นาที จากนั้นนำขวดรูปชมพู่ออกจากเครื่องกลั่น

ขั้นตอนการไตเตรท (titration)

1. นำไปไตเตรทด้วยสารละลายกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน จนกระทั่งกรดบอริกเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อน

2. บันทึกปริมาตรของกรดเกลือมาตรฐานที่ใช้เพื่อการคำนวณต่อไป

การคำนวณ

$$\% \text{ โปรตีน} = \frac{1.4\,(V1 - V2)\,N \times 6.25}{W}$$

V1 = ปริมาตรของกรดเกลือที่ใช้ในการไตเตรทกับตัวอย่าง

V2 = ปริมาตรของกรดเกลือที่ใช้การไตเตรทกับ blank

N = ความเข้มข้นกรดเกลือ (นอร์มอล)

W = น้ำหนักตัวอย่าง

4.4 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

สารเคมี

ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane, CH_2Cl_2)

วิธีการวิเคราะห์

1. อบขวดสกัดสารเป็นเวลา 40 นาที และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น

2. บันทึกน้ำหนักที่แน่นอนของขวดสกัดสาร

3. ชั่งตัวอย่างด้วยกระดาษกรองให้ได้น้ำหนัก 3 กรัม บันทึกน้ำหนักที่แน่นอนบรรจุในไส้กรองสาร อุดไส้กรองด้วยสำลีแล้วอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น

4. บรรจุไส้กรองลงในกระบอกแก้วสกัดไขมัน ที่ต่อกับขวดสกัดที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน

5. เติมสารไดคลอโรมีเทนลงในกระบอกแก้วสกัดสารให้ล้นลงมาทางหลอดด้านข้าง เพื่อให้มีไดคลอโรมีเทนอยู่ในขวดสกัด

6. ต่อกระบอกแก้วควบแน่นเข้ากับกระบอกแก้วสกัดสารเพื่อใช้ควบแน่นต่อไป

7. เปิดเตาร้อนสกัดในอัตราควบแน่น 2-3 หยดต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

8. เมื่อไขมันถูกสกัดออกหมดจึงนำไส้กรองออก ระเหยสารเคมีที่ค้างอยู่ในกระบอกแก้วสกัดไขมันเทกลับลงในขวด ทำการกลั่นอีกครั้งเพื่อนำมาใช้งานใหม่ได้

9. อบขวดสกัดสารที่มีไขมัน ในเตาอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำให้เย็นในโถดูดความชื้น

10. ชั่งขวดสกัดสารเพื่อนำน้ำหนักไปใช้คำนวณต่อไป

การคำนวณ

$$\% \text{ ไขมัน} = \frac{(a - b)}{w} \times 100$$

a = น้ำหนักของขวดสกัดสารกับน้ำหนักของไขมันหลังอบแห้ง

b = น้ำหนักที่แน่นอนของขวดสกัดสาร

w = น้ำหนักของตัวอย่าง

5. วิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (ตามวิธีการของ Bancroft, 1967)

สารเคมี

1. สารละลายบูแอง (Bouin's solution): เตรียมโดยใช้

ฟอร์มาลิน (formalin)	25	มิลลิลิตร
กรดพิคริค (saturated aqueous picric acid)	75	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	5	มิลลิลิตร

ผสมเข้าด้วยกัน

2. สีย้อมฮีมาทอกซิลิน (haematoxylin): เตรียมโดยใช้

ฮีมาทอกซิลิน (haematoxylin crystal)	4	กรัม
โซเดียม ไอโอเดท (sodium iodate)	0.8	กรัม
อลัม (potasium aluminium sulfate, alum)	100	กรัม
กรดซิตริก (citric acid)	4	กรัม
คลอรัล ไฮเดรท (chloral hydrate)	200	กรัม
น้ำกลั่น	2,000	มิลลิลิตร

ละลายอลัมลงในน้ำกลั่น เติมฮีมาทอกซิลินผสมจนกระทั่งละลายหมด จึงเติมโซเดียมไอโอเดทผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซิตริก และคลอรัล ไฮเดรทผสมจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้งาน

3. สีย้อมอีโอซิน (eosin): เตรียมโดยใช้

อีโอซิน (eosin Y.Cl 45380)	1	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 70 % (ethyl alcohol)	1,000	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	5	มิลลิลิตร

ผสมเข้าด้วยกัน

การเตรียมตัวอย่าง

1. สลบตัวอย่างปลาด้วยสารละลายควินาลดีน (quinaldine) 50 ส่วนในล้านส่วน

2. ใช้กรรไกรผ่าตัดเปิดช่องท้องของปลาออก ตัดตับและไตส่วนท้ายออก ดองลงในน้ำยาบูแองโดยทันที เปิดช่องเหงือกตัดส่วนเหงือกออกอย่างระมัดระวังและดองในน้ำยาบูแอง เก็บรักษาตัวอย่างในน้ำยาดังกล่าวเป็นเวลา 1 สัปดาห์จึงเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นเอทิลแอลกอฮอล์ 70 % และสามารถเก็บรักษาไว้ได้เป็นเวลานาน

ขั้นตอน dehydration และ embedding

1. ตบแต่งตัวอย่าง (trim) ที่ผ่านการดองแล้วให้มีขนาดเหมาะสมเพื่อสะดวกต่อการ embed และ ตัด section

2. นำตัวอย่างไปผ่านขั้นตอน dehydration ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1	แอลกอฮอล์ 50 %	1
2	แอลกอฮอล์ 70 %	1
3	แอลกอฮอล์ 70 %	1
4	แอลกอฮอล์ 95 %	1
5	แอลกอฮอล์ 95 %	1
6	แอบโซลูท แอลกอฮอล์ (absolute alcohol)	1
7	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol)	1
8	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
9	ไซลีน (xylene)	1

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
10	ไซลีน	1
11	พาราพลาสท์ (paraplast)	1
12	พาราพลาสท์	1

3. นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนในข้อ 2 ไป embed ด้วยพาราพลาสท์ จากนั้นจึงนำ block ไปแช่ตู้เย็นเพื่อความสะดวกในการตัด section ต่อไป

4. ตบแต่ง block ให้มีขนาดเหมาะสมกับ slide และ cover glass จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (microtome) ให้มีความหนาประมาณ 3-4 ไมครอน แล้วลอยในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส

5. ใช้แผ่น slide ช้อนตัวอย่างที่สมบูรณ์ขึ้น อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อให้ตัวอย่างยึดติดแผ่น slide ได้ดี

6. นำตัวอย่างที่ติดแน่นบนแผ่น slide ไปผ่านขั้นตอนการย้อมสีฮีมาทอกซิลิน และอีโอซิน ตามขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	ไซลีน	2
2	ไซลีน	2
3	ไซลีน	2
4	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
5	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
6	แอลกอฮอล์ 95 %	1
7	แอลกอฮอล์ 70 %	1
8	แอลกอฮอล์ 50 %	1
9	แช่ในน้ำกลั่น	1
10	ฮีมาทอกซิลิน	20
12	แช่ในน้ำกลั่น	1
13	แช่ในน้ำประปา	1
14	แช่ในน้ำกลั่น	1

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
15	แอลกอฮอล์ 50 %	1
16	อีโอซิน	2
17	แอลกอฮอล์ 70 %	2
18	แอลกอฮอล์ 95 %	2
19	แอลกอฮอล์ 95 %	2
20	แอบโซลูท แอลกอฮอล์	2
21	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
22	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
23	ไซลีน	2
24	ไซลีน	2
25	ไซลีน	2

7. mount ด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์ (permount)

8. นำตัวอย่างไปศึกษาพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงต่อไป

6. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ตามวิธีการของ Boyd and Tucker, 1992)

6.1 การวิเคราะห์ค่าความเป็นด่างของน้ำ

สารเคมี

1. ฟีนอลฟ์ทาลีน อินดิเคเตอร์: เตรียมโดยละลายฟีนอลฟ์ทาลีน (phenolphthalein) 0.5 กรัม ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % จนได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

2. เมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์: เตรียมโดยละลายเมทิลออเรนจ์ 0.5 กรัม ในน้ำกลั่นที่กำจัดอิออนแล้ว จนได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

3. เมทิลเรด อินดิเคเตอร์: เตรียมโดยละลายเมทิลเรด 0.5 กรัม ในน้ำกลั่นที่กำจัดอิออนแล้ว จนได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.2 นอร์มอล: เตรียมโดยค่อยๆ เทกรดซัลฟูริกเข้มข้น 6 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น (ที่ต้มเดือดใหม่ๆ แล้วปิดฝาทิ้งให้เย็น) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

5. สารละลายมาตรฐานโซเดียมคาร์บอเนต 0.2 นอร์มอล: เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนตซึ่งอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที หรือที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำให้เย็นในโถดูดความชื้นจำนวน 10.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ต้มเดือดใหม่ๆ ปิดฝาแล้วทำให้เย็น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลาย

1. ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร

2. หยดเมทิลเรด อินดิเคเตอร์ 5 หยด เขย่าให้ผสมกันจะได้สารละลายสีเหลือง

3. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู

4. นำส่วนผสมทั้งหมดไปต้มจนเดือดเป็นเวลาประมาณ 3-5 นาที เพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้หมด สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอีกครั้งหนึ่ง

5. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกต่อไปจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอีกครั้งหนึ่ง

6. บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกทั้งหมดที่ใช้ไป

การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก (นอร์มอล)

$$\text{ความเข้มข้น (นอร์มอล)} = \frac{0.2 \times 25}{\text{ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้}}$$

หลังจากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.02 นอร์มอล โดยใช้สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

(N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ)

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. หยดฟีนอลท์ทาลีน อินดิเคเตอร์ 10 หยด เขย่าให้ผสมกัน

2.1 ถ้าสารละลายใส ทำต่อไปในข้อ 3

2.2 ถ้าสารละลายสีชมพู จะต้องไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกจนกระทั่งสีชมพูนั้นหายไป บันทึกปริมาตรที่ใช้ไป (นำไปรวมกับปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ไปในข้อ 4.) ทำต่อไปในข้อ 3.

3. หยดเมทิล ออเรนจ์ 2-3 หยด เขย่าให้ผสมกันจะได้สารละลายสีเหลือง

4. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้ม จดปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกทั้งหมดที่ใช้ไป

การคำนวณค่าความเป็นด่างของน้ำ

ความเป็นด่าง(มิลลิกรัม $CaCO_3$ ต่อลิตร) = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้×10

6.2 การวิเคราะห์ความกระด้าง

สารเคมี

1.สารละลายบัฟเฟอร์ (buffer solution): เตรียมโดยละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ (ammonium chloride, NH_4Cl) 67.5 กรัม ในแอมโมเนียมไฮดรอกไรด์ (ammonium hydroxide, NH_4OH) 570 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร

2. อินดิเคเตอร์ (indicator): เตรียมโดยละลายไฮดรอกซีลามีน ไฮโดรคลอไรด์ (hydroxylamine hydrochloride, $H_2NOH.HCl$) 4.5 กรัม และอีรีโอโครมแบล็กที (Eriochrome black T) 0.5 กรัม ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 % จนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายมาตรฐานโซเดียม อีดีทีเอ 0.01 โมลาร์: เตรียมโดยชั่งอีดีทีเอ 4 กรัม และแมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride, $MgSO_4$) 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร

4. สารละลายมาตรฐานแคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate, $CaCO_3$) 0.01 โมลาร์: เตรียมโดยนำแคลเซียมคาร์บอเนตไปอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 90 นาที ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น นำมา 1 กรัม ละลายในสารละลายกรดเกลือซึ่งเจือจาง

ด้วยน้ำกลั่น 50 % จนสารละลายใส หรือจนกระทั่งแคลเซียมคาร์บอเนตละลายหมด แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร ซึ่ง 1 มิลลิลิตร = 1 มิลลิกรัมของแคลเซียมคาร์บอเนต

วิธีการตรวจความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

1. ดูดสารละลายของมาตรฐานแคลเซียมคาร์บอเนตมา 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ลงไปประมาณ 1-2 มิลลิลิตรเขย่าให้ผสมกัน

3. หยดอินดิเคเตอร์ ลงไปประมาณ 6 หยด เขย่าให้ผสมกันจะได้สารละลายสีม่วงแดง

4. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน อีดีทีเอ จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนสีจากสีม่วงแดงเป็นสีน้ำเงิน

5. จดปริมาตรของอีดีทีเอที่ใช้ไป ปรับความเข้มข้นของสารละลาย โดยสูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างน้ำมา 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ลงไปประมาณ 1-2 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน

3. หยดอินดิเคเตอร์ลงไป 6 หยด เขย่าให้ผสมกันจะได้สารละลายสีม่วงแดง

4. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนสีจากสีม่วงแดงเป็นสีน้ำเงิน

5. บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ ที่ใช้ไป

การคำนวณความกระด้างของน้ำ

ค่าความกระด้างของน้ำ(มิลลิกรัม $CaCO_3$ ต่อลิตร) = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ×10

ภาคผนวก ข.

ตารางผลการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดลองที่ 1

ตารางภาคผนวกที่ ข 1 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%) ของปลากดเหลืองในชุดการทดลองที่ 1 ทุกช่วง 2 สัปดาห์ [1]

สูตรอาหาร	สัปดาห์ที่				
	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10
T_1	176.33±8.38^{ab}	102.92±10.76^{a}	62.89±18.63^{a}	31.84±9.60^{a}	16.04±6.66^{a}
T_2	206.63±8.76^{bc}	110.12±9.94^{a}	108.61±23.93^{b}	80.93±7.47^{c}	67.20±9.66^{b}
T_3	183.92±20.86^{ab}	125.06±17.08^{a}	107.78±23.49^{b}	71.12±9.85^{bc}	49.41±2.79^{b}
T_4	167.58±0.84^{a}	98.93±12.89^{a}	139.24±12.06^{b}	83.04±14.66^{c}	60.90±7.46^{b}
T_5	228.28±20.37^{c}	121.43±9.35^{a}	111.54±7.62^{b}	85.19±6.81^{c}	65.82±4.65^{b}
T_6	167.38±15.33^{a}	124.99±26.50^{a}	115.17±14.09^{b}	87.61±14.47^{c}	51.85±7.94^{b}
T_7	185.65±30.82^{ab}	120.33±10.17^{a}	111.12±30.36^{b}	56.61±21.94^{b}	71.21±29.84^{b}

[1] ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P > 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ข 2 ค่าเฉลี่ย FCR ของปลากดเหลืองในการทดลองที่ 1 ทุกช่วง 2 สัปดาห์[1]

สูตรอาหาร	สัปดาห์ที่				
	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10
T_1	1.28+0.03[a]	4.69+1.50[a]	4.31+1.65[a]	13.87+14.20[a]	8.69+4.26[a]
T_2	1.39+0.13[a]	2.87+0.62[a]	1.42+0.10[b]	1.56+0.15[b]	1.64+0.28[b]
T_3	1.42+0.32[a]	3.43+1.40[a]	1.71+0.47[b]	1.87+0.66[b]	1.61+0.19[b]
T_4	1.26+0.07[a]	4.06+0.72[a]	2.55+0.73[b]	1.85+0.09[b]	1.48+0.30[b]
T_5	1.25+0.12[a]	2.60+0.27[a]	1.29+0.09[b]	1.88+0.31[b]	1.58+0.09[b]
T_6	1.26+0.10[a]	3.62+0.76[a]	1.89+0.66[b]	1.84+0.45[b]	1.59+0.24[b]
T_7	1.33+0.32[a]	3.91+1.04[a]	1.97+0.51[b]	1.84+0.14[b]	1.34+0.23[b]

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P > 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ข 3 น้ำหนักอาหาร (กรัม) ที่ใช้เลี้ยงปลากดเหลืองในการทดลองที่ 1 ตลอดระยะเวลา 10 สัปดาห์

สูตรอาหาร	น้ำหนักอาหารที่ใช้ทั้งหมด (กรัม)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
T_1	390.70	451.25	362.81
T_2	1154.50	1116.70	1028.60
T_3	748.82	562.58	722.50
T_4	759.68	1066.20	645.73
T_5	1231.80	1235.80	1293.30
T_6	984.00	606.46	777.27
T_7	689.44	631.68	624.91

ภาคผนวก ค.

ตารางบันทึกผลการทดลองและผลทางสถิติของชุดการทดลองที่ 2

ตารางภาคผนวกที่ ค 1 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%) ของปลากดเหลืองในการทดลองที่ 2 ทุกช่วง 2 สัปดาห์ [1]

สูตรอาหาร	สัปดาห์ที่ 0-2	2-4	4-6	6-8	8-10
T_1	116.41±7.84^{a}	65.50±9.92^{a}	52.88±10.25^{a}	12.52±8.87^{a}	10.86±5.98^{a}
T_2	120.06±18.13^{a}	76.81±3.78^{b}	91.07±18.52^{b}	62.75±7.62^{b}	60.44±5.39^{b}
T_3	115.87±19.73^{a}	89.89±3.89^{c}	105.53±24.82^{b}	63.64±22.27^{b}	63.43±6.54^{b}
T_4	122.11±8.16^{a}	97.30±6.58^{cd}	94.60±7.85^{b}	72.26±2.99^{b}	64.43±8.38^{b}
T_5	129.66±32.50^{a}	92.21±2.26^{cd}	101.53±5.75^{b}	74.46±11.97^{b}	60.93±14.73^{b}
T_6	139.36±15.32^{a}	103.98±7.97^{cd}	80.81±11.63^{b}	64.38±17.03^{b}	57.88±3.16^{b}

[1] ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P > 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค 2 ค่าเฉลี่ย FCR ของปลากดเหลืองในการทดลองที่ 2 ทุกช่วง 2 สัปดาห์[1]

สูตรอาหาร	สัปดาห์ที่ 0-2	2-4	4-6	6-8	8-10
T_1	1.42±0.04[a]	2.19±0.44[a]	2.72±1.48[a]	6.32±1.97[a]	4.26±1.31[a]
T_2	1.43±0.17[a]	1.71±0.64[ab]	1.71±0.52[a]	2.07±0.58[b]	1.57±0.14[b]
T_3	1.26±0.05[a]	1.36±0.02[b]	1.48±0.27[a]	1.80±0.53[b]	1.52±0.15[b]
T_4	1.28±0.14[a]	1.34±0.09[b]	1.37±0.25[a]	2.04±0.55[b]	1.46±0.12[b]
T_5	1.20±0.03[a]	1.26±0.03[b]	1.47±0.18[a]	1.75±0.13[b]	1.49±0.06[b]
T_6	1.37±0.10[a]	1.34±0.05[b]	1.44±0.07[a]	1.88±0.16[b]	1.99±0.03[b]

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P > 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค 3 น้ำหนักอาหาร (กรัม) ที่ใช้เลี้ยงปลากดเหลืองในการทดลองที่ 2 ตลอดระยะเวลา 10 สัปดาห์

สูตรอาหาร	น้ำหนักอาหารที่ใช้ทั้งหมด (กรัม)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
T_1	277.23	203.00	263.00
T_2	792.01	542.45	565.98
T_3	853.51	708.91	936.75
T_4	1044.20	837.58	823.22
T_5	904.94	1001.60	1056.30
T_6	1085.40	980.75	1048.50

ภาคผนวก ง.

ตารางค่าเฉลี่ยคุณภาพน้ำระหว่างช่วงการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ ง 1 ค่าเฉลี่ยคุณภาพน้ำระหว่างช่วงการทดลองที่ 1

	สัปดาห์ที่ 0-2	สัปดาห์ที่ 2-4	สัปดาห์ที่ 4-6	สัปดาห์ที่ 6-8	สัปดาห์ที่ 8-10
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	7.14±0.10	7.05±0.09	7.03±0.17	7.11±0.07	6.89±0.10
ความเป็นด่าง (มิลลิกรัม $CaCO_3$ต่อลิตร)	32.67±5.42	41.33±5.56	30.19±4.77	44.67±8.33	37.62±7.66
ความกระด้าง (มิลลิกรัม $CaCO_3$ต่อลิตร)	50.28±6.11	63.09±4.55	57.95±4.85	69.81±4.32	60.49±4.30
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	27.49±0.25	27.72±0.46	27.02±0.17	27.01±0.13	27.02±0.27
ออกซิเจนละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	7.38±0.29	7.26±0.28	8.03±0.43	8.29±0.41	9.32±1.26

ตารางภาคผนวกที่ ง 2 ค่าเฉลี่ยคุณภาพน้ำระหว่างช่วงการทดลองที่ 2

	สัปดาห์ที่ 0-2	สัปดาห์ที่ 2-4	สัปดาห์ที่ 4-6	สัปดาห์ที่ 6-8	สัปดาห์ที่ 8-10
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	7.33±0.06	7.23±0.06	7.09±0.06	7.17±0.15	7.16±0.12
ความเป็นด่าง (มิลลิกรัม $CaCO_3$ ต่อลิตร)	34.56±3.51	29.83±4.27	23.61±2.43	29.19±3.87	33.22±6.91
ความกระด้าง (มิลลิกรัม $CaCO_3$ ต่อลิตร)	50.71±4.07	50.72±4.07	43.56+4.73	45.86+6.80	60.31±6.65
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	26.51±0.05	27.54±0.57	25.25±0.24	25.75±0.31	24.89±0.32
ออกซิเจนละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	6.68±0.23	6.64±0.23	6.64±0.35	6.47±0.58	6.96±0.33

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นายสุภฎา คีรีรัฐนิคม

วัน เดือน ปีเกิด 6 กรกฎาคม 2516

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการประมง)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2538