

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131
รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางชีวเคมีของน้ำเชื้อปลากระพงขาว
ที่เก็บแช่เย็น และเก็บแช่แข็ง

Change in biochemical composition of seabass (*Lates calcarifer*) milt
prepared by chilled storage and cryopreservation technique

โดย

ผศ.ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

ผศ.ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

รศ.ดร. วีรพงษ์ วุฒิพันธุ์ชัย

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ได้รับเงินอุดหนุนทุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

งบประมาณปี 2552

14 พ.ค. 2555

3 0 2 5 9 3

๙๕๐๕๒๘๒

เรือนริการ

17 ก.ค. 2555

บทคัดย่อ

ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) เป็นปลาที่มีความทางเศรษฐกิจของประเทศไทย การแช่แข็งเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว การแช่แข็งทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์สเปิร์มเป็นผลให้การเคลื่อนที่ และการปฏิสนธิของสเปิร์มลดลง รวมทั้งเกิดความเสียหายกับเชื้อเซลล์ ความเสียหายต่อเชื้อเซลล์นี้อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมัน สเปิร์มที่ถูกแช่แข็งจะมีความไวต่อ reactive species (RS) และการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันที่เชื้อเซลล์ ซึ่งจะทำให้หน้าที่ของสเปิร์มเสียไปในที่สุด ระบบเอนไซม์ต้านออกซิเดชันในน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม และสเปิร์ม ได้แก่ เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), และ glutathione peroxidase (GPx) ซึ่งทำให้เกิดการต้านการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน และช่วยรักษาการมีชีวิตรอดและการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม หลังจากน้ำเชื้อปลากะพงขาวถูกเก็บแช่แข็ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีการเคลื่อนที่ลดลง ทำการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของกรดไขมันจากสเปิร์มของน้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็ง โดยการแยกชนิดของลิพิดในลิพิดรวมด้วยเทคนิค silica gel column chromatography และวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในส่วนฟอสโฟลิพิดโดยเทคนิค Gas Chromatography พบว่ากรดไขมันอิ่มตัวหลักในสเปิร์มปลากะพง คือ palmitic acid (C16:0) ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบมากคือ docosahexaenoic acid (DHA; C22:6n3) องค์ประกอบและปริมาณของกรดไขมันจากสเปิร์มของน้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็ง มี palmitic acid เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่มี tricosanoic acid (C23:0), DHA (C22:6n3), docosapentaenoic acid (DHA; C22:5n6) และ elaidic acid (C18:1n9t) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่งผลให้อัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวหลังจากแช่แข็งมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้กิจกรรมของเอนไซม์ SOD ในสเปิร์มของน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งมีค่าสูงขึ้นกว่าสเปิร์มของน้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ CAT และ GPx ของสเปิร์มจากน้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ต้านออกซิเดชัน SOD อาจเกิดขึ้นเพื่อป้องกันความเสียหาย
จากการแช่เย็น

ABSTRACT

Seabass (*Lates calcarifer*) is an economically important food fish in Thailand. Cryopreservations are valuable technique that facilitates seabass hatchery operation. Its can induce cellular injury resulting in the irreversible loss of motility and fertilization as well as structural damage to the plasma membranes. The damage of membrane may be manifested by the change in its lipid composition. Moreover, cryopreserved sperm are highly susceptible to reactive species and particularly to lipid peroxidation in the plasma membrane. These attacks ultimately result in the impairment of sperm function. Enzymatic antioxidant defense mechanisms in seminal plasma and spermatozoa include superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) which described as the defense functioning mechanism against the lipid peroxidation maintaining sperm motility and viability. After cryopreservation for 24 h, decrease in the percentage of sperm from milt of seabass exhibiting total motility was observed. The fatty acid composition of sperm from chilled-storage milt was compared with sperm from fresh milt. The total lipids were separated by silica column chromatography technique and fatty acid composition of phospholipids was determined by Gas Chromatography (GC). The most abundant of saturated fatty acid was palmitic acid (C16:0). While the most abundant of unsaturated fatty acid was docosahexaenoic acid (DHA; C22:6n3). There was a significant increase ($P<0.05$) in the palmitic acid (C16:0) proportion in frozen milt compared with that in fresh milt, while the proportion of tricosanoic acid (C23:0) and unsaturated fatty acid, DHA (C22:6n3), docosapentaenoic acid (DHA; C22:5n6), and elaidic acid (C18:1n9t) were decreased significantly after freezing. Consequently, the ratio of unsaturated/ saturated fatty acid was greatly decreased in frozen milt. Moreover, an antioxidant enzyme activity of SOD was significantly increased

while CAT and GPx activities showed no difference between fresh and cryopreserved milt. In conclusion, the increase in SOD enzyme activity might protect sperm from cryo- injury.

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี ภาควิชาเคมี และภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย รวมทั้งสถานที่สำหรับเลี้ยงปลากระพง ขอขอบคุณคุณอิทธิพันธ์ ทัค ศรี และคุณ สำหรับการดูแลและเก็บน้ำเชื้อ รวมทั้งทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา

นอกจากนี้ขอขอบคุณ นางสาวพัชรี คล้ายวัฒนะ นิสิตคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิค

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
ABSTRACT	3
กิตติกรรมประกาศ	5
สารบัญ	6
บทนำ	7
ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	12
วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง	40
ผลการทดลอง	51
อภิปรายผลการทดลอง	69
บรรณานุกรม	73

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปลากะพงขาว เป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศในแถบเอเชียแปซิฟิก และประเทศไทย ทั้งนี้เพราะว่าปลากะพงเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว เลี้ยงได้ทั้งน้ำจืด และน้ำเค็ม อีกทั้งมีราคาดี สามารถทำรายได้ให้แก่ผู้เลี้ยงเป็นอย่างดี ทำให้มีการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวกันอย่างแพร่หลายในประเทศ หลังจากประสบความสำเร็จในการผสมเทียม และการอนุบาลปลาชนิดนี้ในประเทศไทย โดยนักวิชาการประมงสถานีประมงทะเล จังหวัดสงขลา เมื่อปี 2516 (สวัสดี และสุจินต์, 2516-2517) ในปัจจุบันลูกพันธุ์ปลากะพงขาวที่เกษตรกรนำมาใช้ในการเลี้ยงได้มาจากการเพาะพันธุ์ในโรงเพาะฟักเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งไม่ว่าจะเป็นการเพาะพันธุ์ปลาด้วยวิธีเลียนแบบธรรมชาติ หรือการผสมเทียมต่างก็ต้องมีการนำพ่อแม่พันธุ์ปลาเข้ามาภายในโรงเพาะฟัก ปัญหาหนึ่งที่มีักพบในการเพาะพันธุ์ปลากะพงขาวก็คือ การแยกเพศพ่อแม่พันธุ์ปลากะพงขาวเพื่อนำมาเพาะพันธุ์ทำได้ยากลำบาก เพราะลักษณะเพศภายนอกมีความคล้ายคลึงกันมาก อีกทั้งในบางครั้งพ่อแม่พันธุ์มีน้ำเชื้อน้อย เมื่อแม่พันธุ์มีความพร้อมผสมพันธุ์วางไข่จึงมีความจำเป็นต้องมีการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่เย็น และการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวเพื่อนำน้ำเชื้อที่แช่เย็น หรือแช่แข็งมาผสมเทียมกับไข่ปลากะพงขาวเมื่อแม่พันธุ์มีความพร้อมในภายหลัง อย่างไรก็ตามก็มีรายงานการศึกษาจำนวนมากที่แสดงว่าคุณภาพน้ำเชื้อของปลาหลายชนิดมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ซึ่งมีผลทำให้อัตราการปฏิสนธิ หรืออัตราการฟักมีค่าต่ำ เช่นพ่อแม่พันธุ์ปลาที่นำมาไว้ในโรงเพาะฟักมีปริมาณน้ำเชื้อที่รีดได้ (expressible milt) ลดลง (Vuthiphandchai and Zohar, 1999) หรือคุณภาพของน้ำเชื้อปลาลดลงในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (Rana, 1995; Suquet *et al.*, 1998) เป็นต้น นอกจากนี้ น้ำเชื้อของปลาที่รีดออกมาใหม่ๆ หรือน้ำเชื้อสด (freshly collected milt or undiluted milt) จากพ่อแม่พันธุ์ปลาหลายๆชนิดก็มีคุณภาพลดต่ำลงเร็วมาก ต้องนำน้ำเชื้อมาผสมเทียมกับไข่

ปลาทันที หรืออย่างมากไม่เกิน 3 ชั่วโมงหลังจากการรีดน้ำเชื้อออกจากพ่อพันธุ์ไปเก็บในตู้เย็นต้องนำน้ำเชื่อนั้นมาผสมเทียมกับไข่ทันที เพราะว่าถ้าปล่อยน้ำเชื้อในตู้เย็นไว้นานเกินไปจะไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ (Billard *et al.*, 1995) ซึ่งก็เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้มีการพัฒนาการวิจัยเพื่อแช่เย็น หรือแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยเทคนิคที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ได้โดยที่คุณภาพน้ำเชื้อ ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด

ด้วยเหตุที่ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อของปลากะพงขาวที่เก็บแช่เย็น หรือเก็บแช่แข็งว่ามีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางชีวเคมีของน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม (seminalplasma) หรือสเปิร์ม (spermatozoa) ว่าเป็นอย่างไรบ้าง เช่น มี antioxidant enzyme, protein หรือองค์ประกอบของกรดไขมัน (lipid composition) อะไรบ้างที่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากนำน้ำเชื้อไปแช่เย็น หรือแช่แข็ง ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ปลากะพงขาว โดยทราบว่าองค์ประกอบชีวเคมีใดที่น่าจะเป็น limiting factor ของคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงขาว นอกจากนี้การที่ทราบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่รีดออกมาใหม่ๆ หรือน้ำเชื้อสดก็จะทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์นำไปใช้ในการพัฒนาวิธีการผสมเทียมต่อไป

โดยทั่วไปการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อยืดระยะเวลาการเก็บรักษาที่สเปิร์มสามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ สามารถทำได้ใน 2 ลักษณะได้แก่ การเก็บรักษาในระยะเวลานสั้น (short-term storage) โดยเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม (diluted milt) นำมาเก็บรักษาในถังน้ำแข็งหรือในตู้เย็นที่อุณหภูมิสูงกว่า 0 องศาเซลเซียสเล็กน้อย (0-4 องศาเซลเซียส) ก็สามารถยืดระยะเวลาที่สเปิร์มสามารถปฏิสนธิกับไข่ออกไปได้นานขึ้นหลายสัปดาห์ ส่วนอีกวิธีหนึ่งเป็นการเก็บรักษาในระยะเวลายาว (long-term storage) ทำโดยการนำเอาน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (sperm extender) พร้อมกับใส่สารที่ป้องกันไม่ให้เซลล์เป็นอันตรายในระหว่างการแช่แข็ง (cryoprotectant) แล้วจึงเอาไปบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อพร้อมกับลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ก่อนที่จะเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ซึ่งสามารถรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อได้เป็นเวลานานเป็นปี (กฤษณ์ มงคลปัญญา,

2536) ดังนั้นโครงการวิจัยเรื่องนี้จึงมุ่งศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อของปลากะพงขาวว่าองค์ประกอบทางชีวเคมีที่สำคัญจะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไรบ้างเมื่อนำน้ำเชื้อปลากะพงขาวมาแช่เย็น หรือแช่แข็งเพื่อประโยชน์ในการพัฒนาประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบไขมันและกรดไขมัน กิจกรรมของ antioxidant enzyme ในน้ำเชื้อปลากะพงขาวสด
2. เพื่อวิเคราะห์หาผลกระทบที่เกิดจากการแช่แข็งของน้ำเชื้อปลากะพงขาวต่อปริมาณ องค์ประกอบไขมันและกรดไขมัน กิจกรรมของ antioxidant enzyme

1.3 ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การเก็บรักษาน้ำเชื้อของสัตว์มีประโยชน์ทั้งในด้านการรักษาสายพันธุ์และด้านการค้า วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อกระทำโดยการแช่แข็ง อย่างไรก็ตามการแช่แข็ง มีผลกระทบต่อ integrity ของเยื่อเซลล์สเปิร์ม ซึ่งส่งผลต่อการ fertilization และยังมีผลต่อการมีชีวิตรอดของสเปิร์ม อัตราส่วนของไขมันชนิดต่างๆ และองค์ประกอบกรดไขมันของเยื่อเซลล์สเปิร์มเป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนด freezability ของ สเปิร์ม การแช่แข็งและการทำให้ละลายมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์สเปิร์ม ดังนั้นองค์ประกอบของไขมันอาจใช้เป็นเครื่องหมายในการพยากรณ์ความสามารถของน้ำเชื้อปลาแต่ละชนิดที่จะมีชีวิตรอด หลังจากการแช่แข็งและการละลาย รวมทั้งความสามารถในการ fertilization หลังการละลาย

สเปิร์มของสัตว์หลายชนิด รวมทั้งปลา มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน ในปริมาณสูง ทำให้มี โอกาสที่จะได้รับความเสียหายจากการเกิด lipid peroxides มากขึ้น ความเป็นพิษของ lipid peroxides ทำให้สเปิร์มไม่เคลื่อนที่ (immotile) และกระบวนการหายใจ (respiratory) ลดลง lipid peroxides ยังทำความ

เสียหายให้แก่เยื่อเซลล์ โดยเฉพาะบริเวณ acrosome ซึ่งมีความสำคัญในการ fertilization นอกจากนี้ยังทำให้รูปร่างของ สเปิร์มผิดปกติ สาร antioxidant เช่น glutathione, ascorbic acid และ α -tocopherol และ เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ antioxidant เช่น Superoxide dismutase, Catalase, Glutathione peroxidase, Glutathione reductase ที่มีอยู่ในน้ำเชื้อมีความสำคัญในแง่ของการกำจัดอนุมูลอิสระจะช่วยลดการเกิด lipid peroxides และลดความเสียหายของสเปิร์ม ทั้งยังมีผลต่อการ fertilization การศึกษาปริมาณสารต่างๆ ที่ช่วยลดการเกิดอนุมูลอิสระและ lipid peroxides รวมทั้งองค์ประกอบของไขมันในน้ำเชื้อปลากะพงขาวซึ่งเป็นปลาเศรษฐกิจ ในสภาพก่อนและหลังการเก็บในสภาพแช่แข็ง ทำให้ได้ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของสารเหล่านี้เพื่อนำมาใช้ในการพัฒนาสูตรอาหาร เพื่อให้ได้พ่อพันธุ์ที่มีน้ำเชื้อที่สมบูรณ์แข็งแรง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้ทราบข้อมูลด้านการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางชีวเคมี ได้แก่ ปริมาณองค์ประกอบไขมัน และกรดไขมัน กิจกรรมของ antioxidant enzyme (Superoxide dismutase, Catalase) ของน้ำเชื้อปลากะพงขาวก่อนและหลังแช่แข็ง หน่วยงานด้านประมงและผู้ประกอบการเพาะพันธุ์ปลากะพงขาวสามารถนำเอาความรู้ที่ได้จากการวิจัยไปใช้เพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ เช่น ถ้าทราบว่าคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่ลดลงนั้นเกิดจากองค์ประกอบทางชีวเคมีตัวใดก็สามารถพัฒนาสูตรอาหารพ่อพันธุ์ โดยพิจารณาเพิ่มสารอาหารที่จำเป็นบางตัวเข้าไปทดแทนองค์ประกอบทางชีวเคมีของน้ำเชื้อเพื่อให้ไม่มีผลต่อการเพาะพันธุ์

1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการวิเคราะห์ห่อองค์ประกอบทางชีวเคมี ได้แก่ ปริมาณองค์ประกอบไขมันและกรดไขมัน กิจกรรมของ antioxidant enzyme (Superoxide dismutase, Catalase) ของน้ำเชื้อปลาทะพงขาวสด เปรียบเทียบกับองค์ประกอบทางชีวเคมีของน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลาย

บทที่ 2

ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎี

2.1.1 น้ำเชื้อปลา (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

ศัพท์ภาษาอังกฤษ ที่ใช้เรียกน้ำเชื้อปลามีใช้อยู่ 2 คำ คำแรกเหมือนกับที่ใช้เรียกน้ำเชื้อสัตว์ทั่วไป คือคำว่า “ซีเมน” (Semen) ส่วนอีกคำหนึ่งคือคำว่า “มิลท์” (Milt) ใช้เรียกน้ำเชื้อของปลาโดยเฉพาะ ดังนั้น จึงพบว่าในรายงานที่เป็นภาษาอังกฤษบางฉบับใช้คำว่า “ซีเมน” และบางฉบับใช้คำว่า “มิลท์” ตามความ นิยมของผู้เขียนรายงาน

น้ำเชื้อปลาที่อยู่ในอณฑะ หรือที่รีดออกมาสดๆ และสะอาดจะมีสีขาวคล้ายน้ำนม แต่จะข้น เหนียวและมีกลิ่นคาวจัด ถ้าน้ำเชื้อปลาที่รีดได้มีสีอื่นเจือปน เช่น สีคล้ายน้ำเลือดหรือสีเหลืองแสดงว่า น้ำเชื้อนั้นปนเปื้อนด้วยเลือดหรือสิ่งขับถ่ายอื่นๆ และเป็นน้ำเชื้อที่มีคุณภาพที่ไม่ดีไม่เหมาะแก่การเก็บ รักษา และถ้าหากใช้น้ำเชื้อนั้นผสมกับไข่เพื่อการเพาะขยายพันธุ์ก็อาจเป็นเหตุให้ไข่ปลานั้นมีอัตราการ ผสมและฟักออกเป็นตัวได้น้อยกว่าการใช้น้ำเชื้อปลาที่ไม่มีการปนเปื้อน

น้ำเชื้อที่หลังออกมาระหว่างการผสมพันธุ์นั้นอาจจะประมาณปริมาตรต่อการหลังแต่ละครั้งได้ โดยการใช้มือกรีดที่ผนังท้องของปลา และใช้หลอดทดสอบที่มีปริมาตรบอกความจุ เช่น Graduate centrifuge tube เป็นอุปกรณ์สำหรับวัดปริมาตรได้ และยังสะดวกเมื่อต้องการเจือจางน้ำเชื้อสดด้วย น้ำยาใดก็ได้ในอัตราส่วนที่ต้องการ เพราะน้ำเชื้อสดบรรจุอยู่ในหลอดที่มีมาตรบอกความจุไว้แล้ว อย่างไรก็ตามหากเป็นปลาขนาดใหญ่ เช่น ปลาน้ำจืดน้ำเชื้อได้ปริมาณมากหลายร้อยมิลลิลิตรจะใช้ ภาชนะขนาดใหญ่ เช่น บีกเกอร์ ที่มีปริมาตรบอกความจุจะเหมาะสมกว่า ทั้งนี้เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ เชื้อที่ติดค้างอยู่ในภาชนะ เมื่อมีการถ่ายน้ำเชื้อจากภาชนะหนึ่งไปสู่อีกใบหนึ่ง

ปริมาตรของน้ำเชื้อที่รีดได้จากปลาและความหนาแน่นของตัวอสุจิในน้ำเชื้อนั้น มีความผัน

แปรไปตามชนิดของปลา ซึ่งอาจสืบเนื่องมาจากความแตกต่างของพฤติกรรมและแหล่งน้ำที่ใช้ในการผสมพันธุ์และวางไข่ ปริมาตรของน้ำเชื้อและความหนาแน่นของตัวอสุจิของปลาตัวเดียวกันชนิดเดียวกัน อาจแตกต่างกันได้ตามฤดูกาลและช่วงระยะเวลาในฤดูผสมพันธุ์ ตัวอย่าง เช่น ในปลาเรนโบว์เทราท์ น้ำเชื้อจะมีความหนาแน่นของตัวอสุจิสูงเพิ่มขึ้นในระยะต้นของฤดูผสมพันธุ์และคงที่ในระยะต่อมา

น้ำเชื้อปลากล้านำมาปั่นแยก จะแยกได้ 2 ส่วน เช่นเดียวกับน้ำเชื้อสัตว์เช่น โค-กระบือ คือ ประกอบด้วย ส่วนที่เป็นอสุจิ (Spermatozoa) และเป็นของเหลว (Seminal plasma)

2.1.2 การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

คุณลักษณะสำคัญอีกประการหนึ่งของตัวอสุจิ เมื่ออสุจียังอยู่ในตัวปลาหรือเมื่อรีดน้ำเชื้อสด ออกมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ตัวอสุจิของปลาทั่วไปยังไม่มีการเคลื่อนที่ (Immotile) แต่เมื่อน้ำเชื้อปลาผสมกับน้ำขณะผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ หรือเมื่อนำเอาหยดเล็กๆ ของน้ำเชื้อผสมกับหยดน้ำบนแผ่นกระจกสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะพบว่าตัวอสุจิถูกกระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่อย่างรุนแรงอันเป็นผลเนื่องมาจากการเจือจาง แต่การเคลื่อนที่ดังกล่าวจะสิ้นสุดลงอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาประมาณไม่เกิน 1 นาที ดังนั้นการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อปลาโดยใช้อัตราการผลิตที่เป็นหลักจึงต้องกระทำภายในทันทีทันใดที่น้ำเชื้อปลาผสมกับน้ำบนกระจกสไลด์ และเมื่อเจือจางน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำยาเจือจาง (Extender) ใดๆ ก็ตาม น้ำยาชนิดนั้นจะต้องไม่กระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ทั้งนี้เพื่อเป็นการเก็บรักษาให้ตัวอสุจิมีชีวิตและมีความสามารถในการผสมกับไข่ได้ผลใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสด

2.1.3 การประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538)

การประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ เป็นการประเมินปริมาณเชื้อตัวผู้ที่ยังมีชีวิตอยู่และสามารถจะเข้าผสมกับไข่ได้ตลอดจนความแข็งแรงของเชื้อตัวผู้เหล่านั้นทำได้หลายวิธีดังนี้

2.1.3.1 การประเมินการเคลื่อนที่ (Motility estimation) ทำได้โดยการนำตัวอย่างน้ำเชื้อซึ่งเจือจางด้วยน้ำไปหยดลงบนแผ่นสไลด์ อาจปิดหรือไม่ปิดกระจกก็ได้ จากนั้นนำมาส่องดูด้วยกล้อง

จุลทรรศน์ในการประเมินพิจารณาได้เป็น 2 ประเด็นคือ พิจารณาวามีเชื้อตัวผู้จำนวนกี่เปอร์เซ็นต์ที่มีการเคลื่อนที่ (Motility estimation) และพิจารณาว่าเชื้อตัวผู้ที่เคลื่อนที่นั้นเคลื่อนที่อย่างปราดเปรียวมากน้อยเพียงใด การพิจารณาในแง่ของเปอร์เซ็นต์เชื้อตัวผู้ที่เคลื่อนที่ทำได้โดยนับเชื้อตัวผู้ทุกตัวที่ปรากฏในกล้อง หรือสูมนับเชื้อตัวผู้ครั้งละ 10 ตัว นับตัวที่เคลื่อนที่และไม่เคลื่อนที่จากนั้นเลื่อนแผ่นสไลด์ แล้วสูมนับอีก 10 ตัว ไปเรื่อยๆ จนครบ 100 ตัว หนึ่งการนับต้องทำอย่างรวดเร็ว เพราะในสภาพที่มีออกซิเจนน้อยเชื้อตัวผู้จะตายเร็วมาก ส่วนการประเมินความปราดเปรียวจะทำให้สะดวกขึ้นหากใช้เฮงกิง ดรอปเทคนิค (Hanging drop technique) เข้าช่วยในการประเมินต้องสมมติระดับของการเคลื่อนที่ขึ้นก่อนเช่น แบ่งระดับการเคลื่อนที่ของเชื้อตัวผู้ออกเป็น 10 ระดับ โดยที่ 1 หมายถึงเชื้อที่อ่อนแอที่สุด ส่วน 10 หมายถึงเชื้อที่เคลื่อนที่ปราดเปรียวที่สุด

2.1.3.2 ตรวจสอบตัวเป็น-ตัวตายด้วยการย้อมสี (Live-dead staining) สีพิเศษบางชนิดเมื่อย้อมแล้วเชื้อตัวผู้ที่ตายจะดูดซับสี ในขณะที่ตัวเป็นจะไม่ดูดซับ ทำให้สังเกตความแตกต่างได้ชัดเจนโดยทั่วๆ ไป นิยมใช้สีอีโอซิน นิโกรซิน (Eosin-Nigrosin) และอีโอซิน ฟาสท์กรีน (Eosin-Fast Green FCF) การประเมินคุณภาพด้วยวิธีนี้จะต้องทำด้วยความรวดเร็วและการนับต้องแม่นยำมาก อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่ามักจะมียูเรียที่ตายระหว่างเตรียมสไลด์อย่างน้อยๆ ประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์

2.1.3.3 การตรวจสอบอัตราการปฏิสนธิ (Fertilizing ability) ทำโดยผสมน้ำเชื้อที่ต้องการตรวจสอบกับไข่ปลาชนิดเดียวกันที่เพิ่งรีดมาสดๆ แล้วตรวจสอบอัตราการปฏิสนธิ วิธีการนี้ต้องใช้เวลา แต่ให้ผลถูกต้องที่สุด แต่อย่างไรก็ตามมีสิ่งที่จะต้องคำนึงถึง คือ ไข่ปลาที่นำมาใช้ในการทดสอบต้องมีคุณภาพดี และการนับจำนวนไข่ที่ได้รับการผสมจะเริ่มนับได้หลังจากปล่อยให้ไข่เจริญพัฒนาไปจนถึงระยะที่สามารถมองเห็นความแตกต่างระหว่างไข่ที่ได้รับการผสม และไม่ได้รับการผสมอย่างชัดเจน โดยทั่วไปจะเริ่มนับเมื่อถึงระยะที่บลาสโตพอร์ปิดหากเริ่มนับเร็วเกินไปอาจจะนับไข่เสียบางส่วนเป็นไข่ดีได้ เพราะในภูมิอากาศเขตร้อนทั้งไข่ที่ได้รับการผสมและไข่ไม่ได้รับการผสมจะมีการแบ่งเซลล์

เหมือนกันจนถึงระยะหนึ่ง ไข่ที่ไม่ได้รับการผสมจะหยุดแบ่งเซลล์

2.1.4 การเก็บรักษาน้ำเชื้อ (พลชาติ ผิวเณร, 2546)

การเก็บระยะสั้น (Short, Chilled storage) เป็นการเก็บน้ำเชื้อในตู้เย็นหรือถังน้ำแข็ง ในอุณหภูมิสูงกว่า 0 องศาเซลเซียสเล็กน้อย สามารถเก็บได้ในสภาพน้ำเชื้อเข้มข้นหรือเจือจางด้วยสารละลายที่เหมาะสมกับปลาแต่ละชนิด การเก็บรักษาน้ำเชื้อในลักษณะนี้สามารถเก็บได้หรือไม่ขึ้นอยู่กับสารละลายที่ใช้ ชนิดปลา คุณภาพน้ำเชื้อและเทคนิคในการเก็บรักษา

น้ำยาที่ใช้ในการเจือจางน้ำเชื้อปลา มีมากมายหลายสูตร ซึ่งพิจารณาจากส่วนประกอบทางเคมีของน้ำยาเหล่านี้จะพบว่ามีคุณสมบัติดังนี้ คือ

1. สูตรน้ำยาเหล่านี้จะประกอบไปด้วยไอออนต่างๆใกล้เคียงกับที่ปรากฏในน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม และน้ำยานั้นมีแรงดันออสโมติกใกล้เคียงที่สุดกับแรงดันออสโมติกของน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม
2. น้ำยาดังกล่าวจะประกอบด้วยสารเคมีที่ทำหน้าที่ควบคุมความเป็นกรด-ด่างเป็นแหล่งพลังงาน และสารเคมีบางตัวทำหน้าที่เป็นยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์
3. การปรับปรุงสูตรน้ำยาบางสูตรบางครั้งไม่ได้อาศัยทฤษฎีหรือการทดลองใดๆ แต่เป็นการกระทำจากผลการลองผิดลองถูกเป็นเกณฑ์
4. สูตรน้ำยาเหล่านี้ยังประกอบด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือหลายชนิดรวมกัน ในกรณีที่ต้องการเจือจางเพื่อการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

2.1.5 ลิพิด (Lipid) (มนตรี จุฬาววัฒนทล และคณะ, 2543)

ลิพิด (Lipid) เป็นชีวโมเลกุลที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกระดับ ขนาดเล็กเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนหรือคาร์โบไฮเดรตประเภทโพลีแซกคาไรด์ โครงสร้างทางเคมีของลิพิดค่อนข้างหลากหลาย แต่สิ่งที่มีเหมือนกัน คือ จะมีส่วนของโครงสร้างที่เป็นไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีขั้ว ซึ่งจะแสดงคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity) และมีผลทำให้สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว (Non-polar) เช่น

Choroform , Hexane และ Diethyl ether เป็นต้น ลิพิดสามารถจำแนกตามคุณสมบัติได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

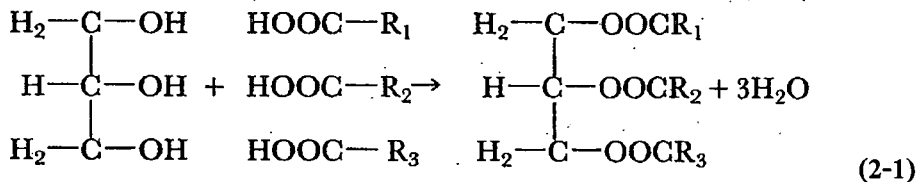
1. ลิพิดส่วนที่มีขั้ว (Polar) ที่มีประจุหรือไม่มีประจุในโครงสร้างด้วย ทำให้มีคุณสมบัติชอบน้ำ (Hydrophilicity) ลิพิดกลุ่มนี้สามารถทำหน้าที่เป็นตัวกลางทำให้ลิพิดที่ไม่ชอบน้ำสามารถกระจายตัวอยู่ในน้ำได้ ตัวอย่างลิพิดพวกนี้ได้แก่ ฟอสโฟลิพิดชนิดต่าง ๆ เช่น เลซิทิน (Lecitin) ฟอสโฟกลีเซอไรด์ (Phosphoglyceride) และสฟิงโกลิพิด (Sphingolipid) เป็นต้น สมบัติของลิพิดเหล่านี้ จึงมีความสำคัญต่อการทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของเซลล์เมมเบรนและการนำไปใช้ประโยชน์เป็นสารลดแรงตึงผิว (Surfactants) หรือสารที่ใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifying agents)

2. ลิพิดส่วนที่ไม่มีขั้ว (Non-Polar) เป็นชนิดสายตรง เช่นพวกเอซิลกลีเซอรอล (Acylglycerol) เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoid) คอลเลสเตอรอล (Cholesterol) สเตอรอยด์ (Steroid) และวิตามินที่ละลายได้ในไขมัน คือ วิตามินเอ ดี อี เค ลิพิดกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเป็นกลาง (Neutral lipid) มีความไม่ชอบน้ำสูง และมักรวมตัวกันเอง ในร่างกายพบลิพิดเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (Plasma membrane) เซลล์ไขมัน (Adipocytes) จะพบอยู่ในรูปของไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerols) หรืออาจถูกส่งไปในพลาสมา ในรูปของไลโปโปรตีน (Lipoprotein)

2.1.6.1 หน้าที่และประโยชน์ของลิพิดในร่างกาย (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2539)

ลิพิดในร่างกายที่เป็นแหล่งให้พลังงานที่สำคัญในเซลล์สิ่งมีชีวิต คือ ไขมัน ซึ่งไขมัน 1 กรัม ให้พลังงาน 9 กิโลแคลอรี ทั้งเป็นแหล่งที่ให้กรดไขมันจำเป็นที่ร่างกายสร้างไม่ได้ (Essential fatty acid) ได้แก่ กรดไลโนเลอิก กรดไลโนเลนิก และกรดอะราชิโดนิก เป็นแหล่งสะสมพลังงานของร่างกายซึ่งจะเก็บสะสมไว้ในเนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนังซึ่งจะทำหน้าที่ปรับอุณหภูมิให้แก่ร่างกาย เป็นตัวช่วยการดูดซึมของวิตามินที่ละลายในไขมัน เช่น เอ ดี อี เค นอกจากนี้ยังเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ เรียกว่าลิพิดเมมเบรน (Lipid membrane) มีสมบัติ คือ จะยอมให้สารผ่านเข้าออกได้เฉพาะบางสารเท่านั้น เรียกสมบัตินี้ว่า เยื่อเลือกผ่าน (Semipermeable membrane) ลิพิดที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมพลังงานเกือบทั้งหมด

(นิวทรัลลิพิด) จะอยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์ หรือไตรเอซิลกลีเซอรอล ซึ่งได้จากปฏิกิริยา Esterification ของกลีเซอรอล และกรดไขมันจำนวน 3 โมเลกุล ดังสมการ 2-1 ส่วนลิพิดที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้แก่ ฟอสโฟลิพิด



2.1.6 กรดไขมัน (พจน์ ศรีบุญถือ และคณะ, 2543)

กรดไขมัน (Fatty acid) คือ กรดแอลิฟาติกคาร์บอน (Aliphatic carboxylic acid) โครงสร้างโมเลกุลประกอบขึ้นจาก สายไฮโดรคาร์บอนและมีหมู่คาร์บอกซิลเป็นหมู่ฟังก์ชัน ในธรรมชาติจะพบกรดไขมันอิสระน้อยมาก เพราะส่วนใหญ่กรดไขมันจะรวมตัวกับแอลกอฮอล์ด้วยพันธะเอสเทอร์เป็นไขมันต่าง ๆ ลักษณะที่สำคัญของกรดไขมันที่พบในธรรมชาติ คือ

1. เป็นกรด โมโนคาร์บอกซิลิก (Monocarboxylic) หมายถึง กรดไขมันที่มีหมู่คาร์บอกซิล

(Carboxyl group or carboxylic group , -COOH) เพียงหมู่เดียวในโมเลกุล

2. สายไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbon) เป็นสายยาวที่ไม่มีการแตกแขนง จำนวนอะตอมคาร์บอนของกรดไขมันมักจะเป็นเลขคู่

2.1.6.1 การจำแนกชนิดของกรดไขมันตามจำนวนคาร์บอน

กรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอน 3-4 อะตอม จัดเป็นกรดไขมันชนิดสายสั้น (Short chain fatty acid) คาร์บอน 6-10 อะตอม เป็นกรดไขมันชนิดสายกลาง (Medium chain fatty acid) และคาร์บอน 12-16 อะตอม เป็นกรดไขมันชนิดสายยาว (Long chain fatty acid)

2.1.6.2 การจำแนกชนิดของกรดไขมันตามสมบัติของสายไฮโดรคาร์บอน

กรดไขมันสามารถจำแนกชนิดตามสมบัติของสายไฮโดรคาร์บอน เป็น 2 ชนิด คือ กรดไขมัน

อิ่มตัว (Saturated fatty acid) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid) ข้อมูลดังแสดงตามตารางที่ 2-1

ก. กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid) หมายถึง กรดไขมันที่สายไฮโดรคาร์บอนเป็นอัลเคน (Alkane) ซึ่งประกอบด้วย อะตอมของคาร์บอนและไฮโดรเจนที่เชื่อมกันด้วยพันธะเดี่ยวทั้งหมด กรดไขมันอิ่มตัวพบมากในไขมันสัตว์ ชนิดที่พบมากที่สุดคือ กรดปาล์มิติก (Palmitic acid) มีคาร์บอน 16 อะตอม กรดไขมันอิ่มตัวจากแหล่งต่าง ๆ มีขนาดหรือจำนวนคาร์บอนไม่เท่ากัน เช่น กรดไขมันขนาดเล็ก (C_{12} - C_{14}) พบในน้ำมันวัว และสัตว์เคี้ยวเอื้องต่าง ๆ ส่วนกรดไขมันขนาดใหญ่ (C_{20} - C_{28}) พบในเนื้อเยื่อสมองหรือในไข กรดไขมันที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยที่สุด ได้แก่ กรดอะซิติก (C_2) กรดบิวทิริก (C_4) เป็นกรดไขมันที่ละลายได้ดีในน้ำและระเหยได้ง่าย กรดไขมันที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 6-10 อะตอม ละลายได้เพียงเล็กน้อย ส่วนกรดไขมันที่มีคาร์บอน 12 อะตอมขึ้นไป จะไม่ละลายน้ำ กรดไขมันที่คาร์บอนน้อยกว่า 10 อะตอม เป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง กรดไขมันที่มีคาร์บอนสูงกว่า 10 อะตอม จะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง การเรียกชื่อกรดไขมันอิ่มตัวมี 2 ระบบ คือชื่อสามัญและชื่อตามระบบ ชื่อสามัญเป็นชื่อที่ตั้งโดยผู้ที่ค้นพบ ส่วนชื่อระบบเป็นการนับจำนวนคาร์บอนในโมเลกุลของกรดไขมันเป็นภาษากรีกแล้วเปลี่ยนเสียงลงท้ายเป็น -oic acid (ตารางที่ 2-1)

ข. กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid) คือ กรดไขมันที่สายไฮโดรคาร์บอนเป็นอัลคีน (Alkene) ซึ่งมีอะตอมคาร์บอนบางอะตอมเชื่อมกันด้วยพันธะคู่ ในธรรมชาติจะพบกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวมากกว่าชนิดอิ่มตัว และมักพบพันธะคู่ระหว่างคาร์บอนอะตอมที่ 9 และ 10 กรดไขมันไม่อิ่มตัวสามารถจำแนกตามโครงสร้างและจำนวนพันธะคู่ในโมเลกุลได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

- กรดไขมันที่มี 1 พันธะคู่ อาจเรียกว่า กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated fatty acid) เป็นกรดไขมันที่มีพันธะคู่เพียงหนึ่งแห่งในโมเลกุล เช่น กรดปาล์มิโตเลอิก (Palmitoleic acid, $C_{16}:1$) และกรดโอเลอิก (Oleic acid, $C_{18}:1$) เป็นต้น

- กรดไขมันที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 คู่ เรียกว่า กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acid) เป็นกรดไขมันที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะในโมเลกุล เช่น กรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2) และกรดอะราชิไดนิก (Arachidonic acid, C20:4) ในธรรมชาติพันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวอยู่ห่างกับ 3 คาร์บอนอะตอมเสมอ

- ไอโคซานอยด์ เป็นอนุพันธ์กรดไขมันชนิดที่มีมากกว่า 1 พันธะคู่ และมีจำนวนคาร์บอน 20 อะตอม (Eicosa = 20) สารพวกไอโคซานอยด์เกิดจากการย่อยกรดไขมันด้วยเอนไซม์ Cyclooxygenase แล้วให้ผลิตภัณฑ์ที่มีวงแหวนคาร์บอนตรงกลางโมเลกุล เรียกรวม ๆ ว่า พรอสทานอยด์ (Prostanoid) ซึ่งจำแนกออกได้เป็นพรอสตาแกลนดิน (Prostaglandin) พรอสตาแกลนไซคลิก (Prostaglandin) และ thromboxane (Tromboxane)

ตารางที่ 2-1 ตัวอย่างชนิดของกรดไขมันที่พบในแหล่งต่าง ๆ (ดาวัลย์ ฉิมภู, 2550)

สัญลักษณ์	ชื่อตามระบบ	ชื่อสามัญ	จุดหลอมเหลว (°C)	แหล่งที่พบ
กรดไขมันอิ่มตัว				
4:0	Butanoic acid	Butyric acid	-7.9	เนย ไขมันนม
6:0	Hexanoic acid	Caproic acid	-15.0	น้ำมันมะพร้าว
12:0	Dodecanoic acid	Lauric acid	44.0	น้ำมันมะพร้าว
14:0	Tetradecanoic acid	Myristic acid	52.0	น้ำมันมะพร้าว
16:0	Hexadecanoic acid	Palmitic acid	63.0	น้ำมันพืช
18:0	Octadecanoic acid	Stearic acid	70.0	ไขมันสัตว์
20:0	Eicosanoic acid	Arachidic acid	76.0	น้ำมันถั่วลิสง
กรดไขมันไม่อิ่มตัว				
16:1 ⁹	9-hexadecenoic acid	Palmitoleic acid	-1.0	น้ำมันปาล์ม
18:1 ⁹	9-Octadecenoic acid	Oleic acid	13.4	น้ำมันมะกอก
18:2 ^{9,12}	9,12-Octadecadienoic acid	Linoleic acid	-5.0	น้ำมันถั่วเหลือง
18:3 ^{9,12,15}	9,12,15-Octadecatrienoic acid	Alpha-Linolenic acid	-17.0	น้ำมันข้าวโพด
18:3 ^{6,9,12}	6,9,12-Octadecatrienoic acid	Gamma-Linolenic acid	-11.0	น้ำมันข้าวโพด
20:4 ^{5,8,11,14}	5,8,11,15-Eicosatetraenoic acid	Arachidonic acid	- 49.5	ไขมันสัตว์

20:5	^{5,8,11,14,17}	5,8,11,14,17-Eicosatetraenoic acid	EPA	-54.0	น้ำมันปลา
22:6	^{4,7,10,13,16,19}	4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic	DHA	-	น้ำมันปลา
24:1	¹⁵	15-Tetracosenoic acid	Nervonic acid	39.0	ไขมันสัตว์

2.1.7 เยื่อหุ้มเซลล์ (Plasma membrane) (รัชฎา แก่นสาร, 2542)

ในวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต สิ่งแรกของการพัฒนาคือการสร้างเยื่อบาง ๆ หนาประมาณ 5-8 นาโนเมตร เพื่อห่อหุ้มเซลล์หรือล้อมรอบโมเลกุลที่ละลายน้ำได้เอาไว้ เยื่อชีวภาพ (Biological membrane) ที่ห่อหุ้มเซลล์พืชเรียกว่าผนังเซลล์ (Cell wall) ส่วนเยื่อชีวภาพที่ห่อหุ้มเซลล์สัตว์ เป็นเยื่อหุ้มเซลล์ โดยทั่วไปเรียกว่าเยื่อพลาสมา (Plasma membrane) หรือเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) เพื่อห่อหุ้มไซโตพลาสซึมของเซลล์เอาไว้ แยกส่วนประกอบข้างในมิให้สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมรอบๆ ได้ง่ายนักและยังยินยอมให้สิ่งที่อยู่ภายในหลอมรวมกันเป็นก้อนที่มีความเข้มข้นสูง โมเลกุลและไอออนที่อยู่ภายในมีจำนวนและความเข้มข้นแตกต่างกันซึ่งต่างไปจากสิ่งแวดล้อมที่อยู่รอบ ๆ มัน ตัวอย่างเช่น ปลาทะเล จะมีไอออนอนินทรีย์ต่างจากน้ำทะเล ปลามีโปรตีน กรดนิวคลีอิก น้ำตาล และกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ ส่วนน้ำทะเลไม่มีสิ่งเหล่านี้เลย แต่น้ำกลับมีโมเลกุลง่าย ๆ พวกคาร์บอน ไฮโดรเจนและอะตอมออกซิเจนอยู่ในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ เมื่อปลานั้นตายลง ส่วนประกอบอินทรีย์ดังกล่าวข้างต้นจะสลายไปเหลือแต่ซาก ซึ่งในที่สุดก็จะกลับมาสมดุลกับสิ่งแวดล้อม

2.1.7.1 โครงสร้างและคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์

เยื่อหุ้มเซลล์เป็นเยื่อชีวภาพที่เป็นแผ่น มีหน้าที่สำคัญหลายอย่าง ได้แก่ เป็นรั้วกั้นแบ่งเซลล์ ทำให้ส่วนประกอบภายในและภายนอกเซลล์แตกต่างกัน ควบคุมการส่งผ่านสารเข้าออกจากเซลล์ และมีความไว (Sensitivity) ต่อการกระตุ้น ทั้งนี้เพราะเยื่อหุ้มเซลล์เป็นส่วนแรกที่จะได้รับผลกระทบเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายหรือความเป็นกรดด่างของน้ำนอกเซลล์ นอกจากนี้เยื่อหุ้มเซลล์ส่วนหนึ่งยังทำหน้าที่เป็นตัวรับ จัดจำสัญญาณและตอบสนองต่อสัญญาณพิเศษที่มาจากสิ่งแวดล้อม

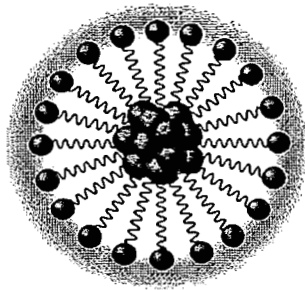
นั้น หน้าที่ดังกล่าวเกิดขึ้นจากส่วนประกอบต่าง ๆ ของเยื่อหุ้มเซลล์นั่นเอง ซึ่งได้แก่ โปรตีนร้อยละ 20-80 ไขมันร้อยละ 30-40 คาร์โบไฮเดรตต่ำกว่าร้อยละ 10 ดังตารางที่ 2-2 ส่วนประกอบของโมเลกุลอินทรีย์จะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับหน้าที่ของแต่ละส่วนเป็นสำคัญ

ตารางที่ 2-2 ส่วนประกอบของเยื่อชีวภาพ (รัชฎา แก่นสาร, 2542)

เยื่อหุ้มเซลล์	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	คาร์โบไฮเดรต (%)	อัตราส่วน โปรตีน : ไขมัน
เยื่อหุ้มเซลล์				
• เซลล์ตับหนู	46	54	2-4	0.85:1.0
• เซลล์เม็ดเลือดแดงของคน	49	43	8	1.13:1.0
• อะมีบา	52	42	4	1.23:1.0
เยื่อหุ้มนิวเคลียสของเซลล์ตับหนู	59	35	20	1.68:1.0
เยื่อชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย	52	48	2-4	1.10:1.0
เยื่อชั้นในของไมโทคอนเดรีย	76	24	1-2	1.10:1.0
เยื่อไมอิลิน	18	79	3	1.00:4.38

ชั้นไขมัน (Lipid bilayer)

โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีสภาพใกล้เคียงธรรมชาติมากที่สุด เรียกว่า Fluid mosaic model ที่สมมุติโดยนักวิทยาศาสตร์ชื่อ โจนาธาน ซิงเกอร์ และการ์ท นิคอลสัน ในปี ค.ศ. 1972 เนื่องจากมีไขมันและโปรตีนฝังใน และเรียงตัวไม่เท่ากันคล้ายกระเบื้องเซรามิก เยื่อชีวภาพยังมีโครงสร้างกึ่งเหลว (Quasi-fluid structure) ทั้งไขมันและโปรตีนฝังใน สามารถเคลื่อนไหวภายในชั้นไขมันได้ เมื่อศึกษาถึงรายละเอียดของไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ประกอบด้วย ฟอสโฟลิพิด (Phosphoglyceride ซึ่งประกอบด้วยคาร์บอน 16-18 อะตอม มีทั้งไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว อีกชนิดหนึ่งคือ Sphingomyelin พบมากในสมอง และสามารถละลายน้ำได้เล็กน้อย) โกลโคลิพิดอยู่ด้านนอก และคลอเลสเตอรอลในอัตราส่วน 70:5:25 ตามลำดับ โดยแต่ละโมเลกุลของไขมันมี 2 ขั้ว (Amphiphatic molecule) คือด้านที่มีประจุ (Polar end) จะ



รูปที่ 2-3 แสดงโครงสร้าง Micelle

(ที่มา : <http://www.oasmia.se/html/upl/323/Micellbild.png> สืบค้นเมื่อวันที่ 17 มี.ค. 2552)

ไขมันเป็นตัวกำหนดความเหลวของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยถ้าเยื่อเซลล์มีกรดไขมันอิ่มตัวซึ่งเป็นกรดไขมันที่มีพันธะเดี่ยวปริมาณมาก จะทำให้ไซไฮโดรคาร์บอนเป็นเส้นตรง เรียงชิดกันและอัดแน่น ทำให้เยื่อเซลล์มีความเหลวน้อยลงและมีลักษณะเป็นผลึกเจด แต่ถ้าเยื่อเซลล์มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งมีพันธะคู่ จะทำให้สายไฮโดรคาร์บอนส่วนหางเกิดการพับงอในตำแหน่งที่เป็นพันธะคู่ สายไฮโดรคาร์บอนเรียงตัวห่างกัน ทำให้เยื่อเซลล์มีความเหลวมาก ดังรูป 2-5 (ก) นอกจากนี้คลอเลสเตอรอลยังเป็นตัวรักษาสภาพความเป็นของเหลวของเยื่อหุ้มเซลล์ไว้ ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นเหนือจุดเปลี่ยน (Transition state) เยื่อหุ้มเซลล์จะกลายเป็นของเหลว ถ้าอุณหภูมิลดลงต่ำกว่าจุดเปลี่ยน เยื่อหุ้มเซลล์จะกลายเป็นผลึกเจด ทั้งสองกรณีล้วนเป็นอุปสรรคต่อการทำงานของเซลล์ คลอเลสเตอรอลจึงมีบทบาทสำคัญในการควบคุมความเหลวของเยื่อหุ้มเซลล์อีกด้วย ประการที่สอง ไขมันทำหน้าที่เป็นสิ่งกีดขวางกั้นการแพร่ของน้ำและสารที่ละลายน้ำได้ แต่ยินยอมให้โมเลกุลที่ละลายไขมันได้ เช่น O_2 , CO_2 แอลกอฮอล์ แพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปได้ง่าย อาจกล่าวได้ว่า ไขมันเป็นตัวกำหนดสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของโปรตีน

โปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Membrane protein)

โมเลกุลของโปรตีนซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าโมเลกุลไขมันจะสอดแทรกอยู่ระหว่างโมเลกุลของไขมัน โปรตีนประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำเช่นเดียวกับไขมัน จะวางเรียงตัวประกอบเป็นเยื่อหุ้มเซลล์อยู่ 2 ลักษณะดังนี้ คือ (1) วางแทรกอยู่ในชั้นไขมันอาจสอดทะลุทั้ง 2 ชั้นของไขมัน

302593

63๙-๙๒
๓๕๙๑
๒๕๕๒
๓-๓

(Transmembrane protein) หรือมีปลายทะลุออกมาด้านใดด้านหนึ่งของชั้นไขมันเพียงด้านเดียว เรียกว่า โปรตีนฝังใน (Integral protein) ได้แก่โมเลกุลของอิมมูโนโกลบูลิน เป็นต้น (2) โปรตีนจะวางอยู่ด้านนอกของชั้นไขมัน อาจจะเกาะอยู่กับโปรตีนฝังในส่วนที่ขอบน้ำอย่างหลวม ๆ มักจะอยู่ด้านในไซโตพลาสซึม เรียกโปรตีนผิว (Peripheral protein) ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ โดยโปรตีนที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์มีจำนวนแตกต่างกันตั้งแต่ 6-8 ชนิด ในซาร์โคพลาสมิตรีคูลัมจนถึง 100 ชนิดในเยื่อหุ้มเซลล์ โดยอาจทำหน้าที่ต่าง ๆ กันคือ เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยา เป็นช่องทางและตัวพาสารโมเลกุลใหญ่และมีประจุเข้าเซลล์ เป็นปั๊ม เป็นโครงสร้างช่วยยึดออร์แกเนลล์ต่าง ๆ เข้าไว้ด้วยกัน เป็นแอนติเจนในระบบภูมิคุ้มกัน และเป็นตัวรับ (Receptor) สำหรับโมเลกุลหลายชนิดที่จะส่งต่อข่าวสารไปยังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ทุกอันต่างก็มีโปรตีนแตกต่างกันออกไปตามโครงสร้างเฉพาะ

2.1.7.2 หน้าทีของเยื่อหุ้มเซลล์

แม้ว่าเยื่อหุ้มเซลล์จะมีองค์ประกอบย่อยและคุณสมบัติแตกต่างกันออกไป แต่ทุกชนิดจะมีหน้าที่สำคัญอยู่ 3 ประการ ข้อแรกคือ การขนส่งสาร (Transport) เยื่อหุ้มเซลล์เป็นเยื่อเลือกผ่าน (Semipermeable membrane) กั้นการไหลเข้าออกของสารจากเซลล์และออร์แกเนลล์ การขนส่งสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เกี่ยวข้องกับทั้งไขมันและโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ ประการที่สองเกี่ยวข้องกับโปรตีน คือ การเร่งปฏิกิริยาต่าง ๆ เกิดขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ ประการที่สามคือ คุณสมบัติในการเป็นตัวรับ Ligand ที่มาตามกระแสโลหิตเมื่อจะเข้าสู่เซลล์จะจับกับตัวรับอย่างจำเพาะแล้วเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองทางชีวเคมีภายในเซลล์

2.1.8 การสกัดและการแยกชนิดลิพิด (ประดิษฐ์ มีสุข, 2538)

ตัวถูกละลาย (Solute) ต่าง ๆ สามารถละลายได้ในตัวทำละลาย (Solvent) ต่างกัน คุณสมบัตินี้จะนำมาใช้เป็นหลักในการแยกตัวถูกละลายออกจากสารละลายได้โดยการสกัด ซึ่งเป็นการสกัดตัวถูกละลาย โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมเป็นเนื้อเดียวกัน

เนื่องจากตัวถูกละลายอาจจะละลายในตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันได้ เมื่อให้

สารละลายนั้นมีตัวทำละลายที่ไม่ผสมกันเป็นเนื้อเดียวกัน 2 ชนิด หลังจากเขย่าแล้ว ตัวถูกละลายจะมีอยู่ในตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิดนั้นในปริมาณที่มากน้อยแตกต่างกัน อัตราส่วนของความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่ละลายในตัวทำละลายในหน่วยโมลต่อลิตร เรียกว่า Distribution coefficient ซึ่งอัตราส่วนนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด และความเข้มข้นทั้งหมดของตัวถูกละลาย ดังนั้นการสกัดจึงเป็นการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายออกจากตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่ง ด้วยอุปกรณ์ที่เรียกว่า กรวยแยก โดยการสกัดนั้นจำเป็นต้องเลือกตัวทำละลายด้วย คือ สารที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกันยอมละลายในตัวทำละลายที่คล้ายคลึงกัน

เมื่อสกัดตัวถูกละลายได้แล้วนั้น ถ้าจำเป็นต้องแยกตัวละลายนั้นออกจากกันก็สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี หรือ ซินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ซึ่งเป็นกระบวนการแยกสารเคมีที่ละลายได้ในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ เมื่อสารนั้นรวมกันอยู่ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของสารเคมีชนิดต่าง ๆ ในตัวทำละลายซึ่งมีอัตราเร็วต่างกัน อันเป็นผลมาจากสารแต่ละชนิดจำแนกตัวเองในเฟสเคลื่อนที่ และเฟสคงที่ได้ไม่เท่ากัน คอลัมน์โครมาโทกราฟีภายในบรรจุด้วยตัวดูดซับชนิดที่เหมาะสมต่อการแยกสารนั้น เช่น ซิลิกาเจล ซึ่งในการทดลองนี้ ใช้ซิลิกาเจล จี-60 ซึ่งมีรูพรุนที่เล็กมากและเหมาะสมต่อการแยกผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้

2.1.9 ทฤษฎีและกระบวนการแยกสารทาง 2.1.10 โครมาโทกราฟี (ประดิษฐ์ มีสุข, 2538)

โครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารตัวอย่าง (Separation) ซึ่งมีส่วนประกอบหลายชนิด ด้วยการใส่สารลงในตัวกลางที่มีคุณสมบัติในการดูดซับสารตัวอย่างไว้ได้ หรือโดยวิธีอื่น แล้วผ่านของเหลวหรือก๊าซไปตามตัวกลางดูดซับ (Absorbent) ที่ทำหน้าที่แยกสารผสมออกจากกัน เรียกว่า ตัวแยกหรือเฟสที่อยู่กับที่ (Stationary phase) โดยตัวพาหรือเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ซึ่งจะชะสารต่าง ๆ ออกมาด้วยอัตราเร็วต่าง ๆ กัน อัตราการเคลื่อนที่ของสารจะเป็นไปตามทิศทางการชะ ขึ้นอยู่กับแรงดึงดูดระหว่างตัวกลางและตัวพาสารที่แยกจะมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลาย และมีความสามารถ

ในการดูดซับบนตัวดูดซับต่างกัน โดยพบว่า สารใดละลายได้ดีและดูดซับได้น้อย สารนั้นจะเคลื่อนที่ได้เร็ว ในทางตรงกันข้าม สารใดละลายได้น้อยและดูดซับได้ดี สารนั้นก็เคลื่อนที่ได้ช้า เนื่องจากสารแต่ละสารมีความสามารถในการละลายและดูดซับได้ต่างกัน จึงทำให้อัตราการเคลื่อนที่ (อัตราการกระจาย) ของสารแต่ละชนิดต่างกัน

2.1.9.1 เทคนิคThin layer chromatography (Thin layer chromatography) (ภาควิชาเคมี, 2547)

เทคนิคThin layer chromatography เป็นกระบวนการแยกสารที่ผสมกัน โดยใช้เครื่องมือที่เป็นแผ่นแก้วฉาบด้วยตัวดูดซับชนิดที่เหมาะสมโดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของสาร ซึ่งมีอัตราเร็วในการเคลื่อนที่แตกต่างกัน อันเป็นผลมาจากความสามารถของตัวดูดซับที่มีต่อสารแต่ละชนิดไม่เท่ากัน สารที่มีโครงสร้างแตกต่างกันจะเคลื่อนที่ไปบนแผ่น TLC ด้วยระยะทางแตกต่างกัน อัตราส่วนระยะทางที่สารเคลื่อนที่ไปกับระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ เรียกว่า R_f

โดยค่า R_f ของสารนั้นจะมีค่าคงที่และขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ชนิดตัวทำละลาย ตัวดูดซับ ความหนาของตัวดูดซับและปริมาณของสารที่แยก ดังนั้นในการทดสอบสาร ถ้าสารสองชนิดมีค่า R_f เท่ากันบนแผ่น TLC ในระบบตัวทำละลายชนิดหนึ่ง ต้องนำมาทดสอบอีกครั้งโดยเปลี่ยนระบบตัวทำละลาย ถ้ายังเท่ากัน แสดงว่าสารทั้งสองเป็นสารชนิดเดียวกัน เทคนิค TLC จะต้องจุดสารละลายที่ต้องการแยกให้มีขนาดเล็กที่สุดลงบนตัวดูดซับที่ฉาบอยู่บนแผ่นแก้ว สำหรับตัวดูดซับนี้มีหลายชนิดที่นิยมใช้กันมากมาย คือ ซิลิกาและอลูมิเนียมออกไซด์ โดยสามารถเตรียมแผ่น TLC ให้มีความหนาตามต้องการ (ตารางที่ 2-2)

ตารางที่ 2-3 น้ำหนักของตัวดูดซับและปริมาตรน้ำที่ใช้ในการเตรียมแผ่น TLC (ประสิทธิ์ มีสุข, 2538)

ความหนาของตัวดูดซับ (ไมครอน)	น้ำหนักตัวดูดซับ	น้ำ (mL)
150	3.0	6.0
150	3.0	6.0
375	3.0	15.0
500	10.0	18.0

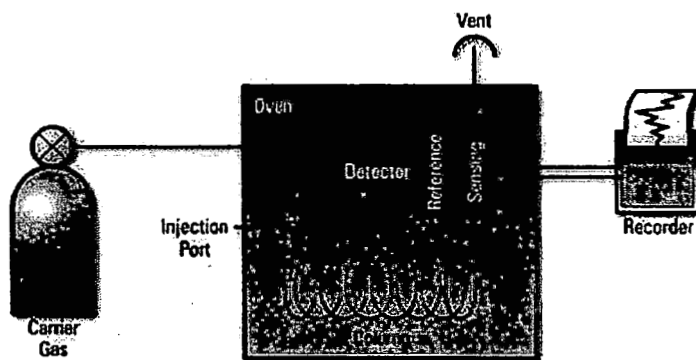
ข้อดีของเทคนิค TLC นี้ คือ สะดวก รวดเร็ว ประหยัด ใช้ปริมาณสารน้อย สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้

หลาย ๆ ตัวอย่างในเวลาเดียวกัน เทคนิค TLC ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพ โดยปกติจะใช้เทคนิคนี้ในการตรวจหาจำนวนชนิดของสารจากคอลัมน์โครมาโทกราฟี

2.1.9.2 เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (พิทักษ์ สุตรอนันต์, 2548)

เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคทางโครมาโทกราฟีชนิดหนึ่งที่มีแก๊สเป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) โดยเฟสคงที่ (Stationary phase) อาจเป็นของแข็ง (Gas-solid chromatography : GSC) หรือ ของเหลว (Gas-liquid chromatography : GLC) ที่เคลือบติดอยู่กับสารดูดซับที่เหมาะสม สำหรับแก๊สโครมาโทกราฟี ของเหลวที่ใช้จะถูกเคลือบไว้ที่ผิวด้านในของคอลัมน์หรือเคลือบที่ผิวของของแข็งแล้วบรรจุในคอลัมน์ สารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์จะต้องเปลี่ยนสถานะเป็นไอ (ระเหย) ได้โดยไม่สลายตัว ดังนั้น ถ้าสารตัวอย่างเป็นแก๊สที่อุณหภูมิห้อง ก็สามารถนำมาวิเคราะห์ได้ สารตัวอย่างจะถูกของผสมกับแก๊สตัวพา (Carrier gas) แล้วเข้าไปในคอลัมน์ ดังนั้นสารที่ต้องการวิเคราะห์จะกระจายตัวระหว่างตัวพากับของเหลวที่เป็นเฟสคงที่ (Stationary phase) เมื่อสารดังกล่าวแยกออกมาทางด้านปลายคอลัมน์จะผ่านเข้าเครื่องตรวจวัด (Detector) และถูกบันทึกพร้อมบ่งเวลาที่สารนั้นออกมา (Retention time)

6. องค์ประกอบของเครื่องมือในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี แสดงดังรูป 2-4



รูปที่ 2-4 องค์ประกอบของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

(ที่มา : <http://www.oilanalysis.com/backup/200207/GasChroma-Fig2.jpg>)

สืบค้นเมื่อวันที่ 12 กุมภาพันธ์ 2552)

1. แก๊สที่ใช้บรรจุแก๊สพา (Carrier gas) เพื่อพาไอของสารตัวอย่างผ่านเข้าไปยังคอลัมน์ แก๊สที่นิยมใช้ได้แก่ ไนโตรเจน ฮีเลียม และอาร์กอน เป็นต้น
2. ส่วนที่ใช้ควบคุมการไหลของแก๊สต่าง ๆ (Flow controller)
3. คอลัมน์ (Column) การแยกสารจะเกิดขึ้นภายในคอลัมน์ คอลัมน์จึงเป็นส่วนสำคัญที่สุดที่ใช้สำหรับแยกสาร
4. ส่วนที่จะฉีดสารตัวอย่างเข้าไป (Injection port)
5. ชุดตรวจวัด (Detector) เป็นส่วนที่ใช้สำหรับตรวจวัดสารแต่ละชนิดที่ถูกแยกออกจากคอลัมน์
6. ส่วนที่ใช้ควบคุมอุณหภูมิ (Temperature controller) ให้กับคอลัมน์ ชุดตรวจวัด และส่วนฉีดสาร
7. ส่วนที่ใช้ประมวลผล และข้อมูลต่าง ๆ ได้แก่ อินทิเกรเตอร์ เครื่องบันทึกโครมาโตแกรมหรือ Data processor หรือ คอมพิวเตอร์

ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างโดยใช้เทคนิค GC นั้น จะต้องเลือกสภาวะต่าง ๆ ของการวิเคราะห์ และจัดสภาวะของเครื่อง GC ให้เรียบร้อย แล้วจึงนำสารตัวอย่างฉีดเข้าที่ส่วนฉีดสาร สารจะกลายเป็นไอ แล้วถูกพาเข้าไปในคอลัมน์ด้วยแก๊สพา (Carrier gas) จะทำให้ได้สัญญาณเกิดขึ้น ซึ่งสามารถเขียนออกมาเป็นโครมาโตแกรมด้วยเครื่องบันทึกข้อมูล หรือต่อเข้ากับเครื่องพิมพ์ หรือ อินทิเกรเตอร์ ก็จะทำให้ผู้วิเคราะห์สามารถทราบองค์ประกอบของสารตัวอย่างได้

- แก๊สตัวพา (Carrier gas)

เป็นแก๊สที่ใช้สำหรับพาสารตัวอย่างที่ถูกทำให้เป็นไอหรือแก๊สแล้วที่ Injection port ให้เข้าสู่คอลัมน์ต่อไป แก๊สตัวพานี้จะต้องมีการควบคุมอัตราการไหล (Flow rate) ให้คงที่เสมอ โดยสามารถเลือกใช้อัตราการไหลให้เหมาะสมได้ตามต้องการ อัตราการไหลของแก๊สพามีส่วนสำคัญต่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องควบคุมให้คงที่

แก๊สตัวพาที่ใช้โดยทั่วไป ได้แก่ แก๊สไนโตรเจน ฮีเลียม หรือแก๊สไฮโดรเจน ลักษณะที่ดีของแก๊สตัวพาควรจะเป็นแก๊สที่มีการแพร่กระจายและมีมวลโมเลกุลต่ำ มีสมบัติเฉื่อย เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยากับสารตัวอย่างหรือตัวทำละลายหรือเฟสคงที่ ราคาไม่แพง สามารถจัดหาได้ง่ายและมีความบริสุทธิ์สูง และเป็นแก๊สที่เหมาะสมสำหรับใช้กับดีเทคเตอร์ แก๊สควรทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยให้ผ่านท่อที่บรรจุด้วยตัวดักจับโมเลกุลเพื่อช่วยขจัดแก๊สตัวพาที่ออกจากไอน้ำหรือไอน้ำมันได้

นอกจากนี้ ประสิทธิภาพของคอลัมน์ (Column efficiency) ยังขึ้นอยู่กับ การเลือกอัตราการไหลของแก๊สตัวพา ซึ่งคอลัมน์แต่ละชนิดจะมีอัตราการไหลที่เหมาะสมที่สุด (Optimum flow rate) ต่าง ๆ กัน

7 ระบบฉีดสาร (Injector)

ระบบแก๊สโครมาโทกราฟีต้องเป็นระบบปิด เพื่อป้องกันการรั่วไหลของแก๊สบริเวณที่พาตัวอย่างเข้าสู่ระบบของแก๊สโครมาโทกราฟี จะเรียกว่า Injector หรือ Injection port ซึ่งปลายด้านหนึ่งจะเชื่อมต่อกับคอลัมน์และการฉีดสารตัวอย่างจะต้องใช้ไซริงจ์แทนเข็มผ่านซิลิโคนเซปตัม (Silicone septum) ที่ทำหน้าที่ป้องกันการรั่วไหลของแก๊สและในบริเวณนี้แก๊สตัวพาจะเคลื่อนที่จากระบบซัพพลายเพื่อนำไอของตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์

เมื่อของเหลวหรือของแข็งถูกนำเข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี สารตัวอย่างจะถูกทำให้ระเหยโดยรวดเร็วในห้องฉีด (Injection block) ซึ่งมีอุณหภูมิตั้งไว้ให้มากกว่าอุณหภูมิของคอลัมน์ 30-35 องศาเซลเซียส สำหรับงานที่ใช้คอลัมน์มาตรฐาน สารตัวอย่างจะถูกนำมาละลายในตัวทำละลาย (Solvent) ที่เหมาะสมและฉีดเข้าเครื่องครั้งละ 0.5-1 ไมโครลิตร สำหรับคอลัมน์แบบคาปิลลารีจะต้องฉีดสารเข้าเครื่องในปริมาณต่ำกว่านี้มาก เนื่องจากการพัฒนาคอลัมน์ชนิดคาปิลลารี (Capillary column) ให้มีประสิทธิภาพการแยกสาร ได้ซับซ้อนมากขึ้น จึงพัฒนาระบบฉีดสารที่เหมาะสมกับคอลัมน์เหล่านี้มากขึ้น ปัจจุบันระบบฉีดสารใช้ไซริงจ์ (Syringe) มี 2 แบบที่สำคัญ คือ

1. ระบบฉีดตรง (Direct injection) เป็นวิธีการที่ไอของสารตัวอย่าง (รวมทั้งตัวทำละลาย) จะถูก

พาเข้าไปในคอลัมน์ทั้งหมด มักนิยมใช้ระบบนี้กับแพ็คเกจคอลัมน์ (Pack column) หรือคาปิลลารีคอลัมน์ขนาดใหญ่ เพราะมีความจุมากและรองรับสารที่ถุกฉีดได้ทั้งหมด

2. ระบบฉีดสารแบบ Split / Splitless ในระบบนี้สามารถเลือกปริมาณของไอตัวอย่างที่จะเข้าสู่คอลัมน์ได้ จะใช้ปริมาตรทั้งหมด (Splitless) เมื่อตัวอย่างมีความเข้มข้นต่ำหรือจะใช้ปริมาตรเพียงบางส่วน ซึ่งส่วนที่เหลือจะถูกปล่อยไป (Split) เมื่อตัวอย่างมีความเข้มข้นสูง ระบบการฉีดแบบนี้เหมาะกับคาปิลลารีแบบคอลัมน์โดยเฉพาะขนาดเล็กและขนาดกลาง เพราะมีความจุต่ำ

- คอลัมน์ (Column) และตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Oven)

คอลัมน์ถือเป็นหัวใจสำคัญของเครื่อง GC กล่าวคือ กระบวนการแยกของสารตัวอย่างเกิดขึ้นในคอลัมน์ คอลัมน์มีองค์ประกอบที่สำคัญ 2 ส่วน คือ ภาชนะบรรจุที่เป็นหลอดหรือท่อ บรรจุสารที่มีคุณสมบัติในการดูดซับ ทำหน้าที่เป็น Stationary phase เครื่อง GC สามารถแบ่งตามประเภทของคอลัมน์เป็น 2 ประเภท คือ

1. Packed Columns คือ คอลัมน์ที่มีลักษณะเป็นหลอดแก้วหรือโลหะเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5-3.5 มิลลิเมตร บรรจุ Stationary phase หรือสารตัวแยกที่มีลักษณะเป็นของเหลวเหนียวข้นเคลือบอยู่บนผิวของแข็ง ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดเล็ก ๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.15-0.25 มิลลิเมตร

2. Wall Coat Open Tubular Capillary Column หรือ Capillary Column คือ คอลัมน์ที่มีลักษณะเป็นท่อแก้ว โลหะ หรือโพลีเมอร์บางชนิด ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่า 1 มิลลิเมตร บรรจุตัวแยกเคลือบเป็นฟิล์มบาง ๆ อยู่บนผนังภายในของท่อ Capillary column ซึ่งอาจมีความยาว 25-100 เมตร สามารถแยกและวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีปริมาณเพียงเล็กน้อยได้ ดังนั้น Capillary column จึงมีประสิทธิภาพในการแยกสูงกว่าเมื่อเทียบกับ Packed column

คอลัมน์ที่นิยมใช้กันมากคือ Capillary column ที่มีการบรรจุเฟสคงที่โดยอาศัยการไหลผ่านท่อกลวงที่มีขนาดเล็กมาก (0.1-0.53 มิลลิเมตร) และมีความยาวมากถึง 40 เมตร ปัจจุบันนิยมใช้ Capillary

column ก้นมาก เนื่องจากมีประสิทธิภาพการแยกที่สูง

- อุณหภูมิของคอลัมน์ (Column Temperature)

อุณหภูมิของคอลัมน์มีส่วนสำคัญอย่างมากต่อการแยกสารตัวอย่าง หรือค่า Partition coefficient คือ ถ้าเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์ขึ้น จะทำให้องค์ประกอบของสารตัวอย่างมีการเคลื่อนที่เร็วขึ้น และช่วยทำให้การวิเคราะห์เร็วขึ้นด้วย ซึ่งขนาดคอลัมน์และอุณหภูมิในการแยกแสดงดังตารางที่ 2-4 โดยทั่วไปแล้ว การทำให้อุณหภูมิของคอลัมน์ลดลงจะช่วยในการแยก (Resolution) ขององค์ประกอบต่าง ๆ ดีขึ้น ดังนั้นจึงควรเลือกใช้อุณหภูมิของคอลัมน์ให้เหมาะสม คือ การแยกที่ดีและ retention time ไม่นานเกินไป อุณหภูมิที่เลือกใช้มักจะเป็นอุณหภูมิของจุดเดือดโดยเฉลี่ยของสารตัวอย่างนั้น หรือเลือกใช้อุณหภูมิที่ต่ำสุดและสูงสุดที่สารนั้นจะเปลี่ยนสถานะเป็นแก๊ส มิฉะนั้นสารที่มีสถานะเป็นของเหลว อาจจะสลายตัวแล้วระเหยออกไปทำให้เปอร์เซ็นต์ส่วนที่เป็นของเหลวเปลี่ยนไป ในที่สุดคอลัมน์อาจจะเสียได้

ตารางที่ 2-4 ขนาดคอลัมน์และอุณหภูมิในการแยก (ที่มา : Agilent Technology, 2002-2003)

เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)	ยาว (ซม.)	ฟิล์ม (ไมโครเมตร)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
0.10	10	0.10	20-250/260
0.10	10	0.10	20-240/250
0.10	10	0.10	20-250/260
0.10	10	0.10	20-250/260
0.32	10	0.10	20-240/250

- ชุดตรวจวัด (Detector)

ทำหน้าที่ตรวจวัดสัญญาณองค์ประกอบของสารตัวอย่างที่เคลื่อนที่ออกมาจากปลายคอลัมน์

หลักการทำงานที่สำคัญคือ ดีเทคเตอร์จะต้องมีการตอบสนองต่อสารอินทรีย์แตกต่างกันจากการตอบ

สนองต่อแก๊สตัวพา จึงจะเกิดสัญญาณขึ้นมาได้ สัญญาณดังกล่าวจะถูกขยายและส่งไปยังส่วนบันทึกผล และประมวลผลต่อไป

- เฟรมไอออไนซ์เซชันดีเทคเตอร์ (Frame Ionization Detector : FID)

FID เป็นดีเทคเตอร์ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจพบสารประกอบอินทรีย์ หลักการของ FID คือ แก๊สไฮโดรเจนจะถูกจุดให้ติดไฟด้วยตัวให้ความร้อนไฟฟ้าซึ่งอยู่ใกล้ ๆ กับตัวจุดไฟ (Flame jet) ส่วนอากาศที่ผ่านเข้าไปทำหน้าที่สองอย่าง คือ ช่วยการเผาไหม้ของไฮโดรเจนและช่วยพาแก๊สที่เผาไหม้ ออกไป แก๊สพาและสารตัวอย่างที่ออกมาจากคอลัมน์จะเข้าสู่เปลวไฟ จะทำให้สารเหล่านั้นเกิดไอออไนเซชันได้เป็นอิเล็กตรอนและไอออนบวก อิเล็กตรอนจะวิ่งผ่านไปยังตัวจุดไฟ ไอออนบวกจะเคลื่อนที่ไปยังอิเล็กโทรด สัญญาณที่เกิดขึ้นจะถูกส่งไปยังอิเล็กโทรมิเตอร์และบันทึกสัญญาณด้วยเครื่องบันทึกได้โครมาโตแกรม โดยมีการประยุกต์ใช้ FID อย่างกว้างขวางในการวิเคราะห์กลุ่มไฮโดรคาร์บอน แอลกอฮอล์ อัลดีไฮด์ คีโตนและชีวโมเลกุลบางกลุ่ม และเนื่องจากเป็นดีเทคเตอร์ที่มีความไวค่อนข้างสูง ไม่ซับซ้อนและตอบสนอง (Response) ในช่วงความเข้มข้นที่กว้างกว่าจึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ อย่างแพร่หลาย แต่ดีเทคเตอร์กลุ่มนี้ก็ไม่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารบางกลุ่มเช่นกลุ่ม Chlorinated

ข้อควรปฏิบัติในการใช้ FID เนื่องจากการเผาไหม้ใน FID จะมีไอน้ำเกิดขึ้น เพื่อป้องกันการเกิดการกลั่นตัวของไอน้ำจึงควรตั้งอุณหภูมิของชุดตรวจวัดให้สูงกว่า 100 องศาเซลเซียส โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อสารตัวอย่างเป็นพวกสารประกอบคลอรีน ผลจากการเผาไหม้จะก่อให้เกิดการผุกร่อนได้ง่าย สภาพไวของสารจะเสียไปด้วย บางครั้งสารประกอบพวกที่มีโมเลกุลใหญ่ ๆ การเผาไหม้ไม่ค่อยสมบูรณ์ ทำให้เกิดเขม่าอุดตันที่ตัวจุดไฟได้ จึงต้องใช้อุณหภูมิของชุดตรวจวัดให้สูงขึ้น

- ระบบบันทึกผลและการประมวลผล

ผลที่ได้จากการทำงาน โดยระบบแก๊สโครมาโทกราฟี คือ โครมาโทกราฟีซึ่งเป็นการบันทึกสัญญาณจากการตอบสนองของดีเทคเตอร์กับเวลาสัญญาณที่เพิ่มขึ้นจากสัญญาณพื้นฐาน (Baseline) และ

เป็นจุดสูงสุดหรือพีค (Peak) จะเป็นตัวบ่งชี้ถึงสารอินทรีย์ที่ถูกตรวจจับได้ หลังจากได้โครมาโตแกรม แล้วระบบประมวลผลต้องทำการอินทิเกรตข้อมูลจากพีค ข้อมูลที่สำคัญคือ พื้นที่ใต้พีค (Peak area) และความสูงของพีคและนำข้อมูลเหล่านี้ไปใช้ในการทำปริมาณวิเคราะห์ตาม โปรแกรมสำเร็จรูปที่มีอยู่ในระบบแก๊สโครมาโตกราฟี

- การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี

1. สมบัติจำเพาะของสารเมื่อวิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี คือค่า Retention time: RT การที่จะดูว่าในของผสมนั้นมีสารที่ต้องการอยู่หรือไม่ อาจทำได้โดยการเปรียบเทียบค่า RT โดยตรงกับสารมาตรฐานที่ทดลองเองหรือจากค่าที่ทราบกันคืออยู่แล้วในแต่ละสภาวะมาตรฐานนั้น ๆ แต่โดยเหตุที่ RT ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ดังนั้นการเปรียบเทียบค่านี้อาจมีข้อผิดพลาดหรือข้อจำกัดบางอย่างได้ และผู้ใช้เครื่องมือคนละคนจึงทำได้ยาก ดังนั้นการคำนวณ RT โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานจึงนิยมทำกันมากกว่า ข้อมูลจากแก๊สโครมาโตกราฟีเพียงอย่างเดียวเป็นเพียงเครื่องบ่งชี้ให้ทราบอย่างคร่าว ๆ ว่า สารที่ยังไม่ทราบนั้นควรเป็นสารชนิดใดเท่านั้น จึงต้องทำการวิเคราะห์โดยวิธีอื่นเพิ่มเติม เช่น Infrared, Ultraviolet, Nuclear magnetic resonance และ Mass spectrometry นับเป็นวิธีที่สำคัญที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวสูง และถูกต้องทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ สามารถต่อกับเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีเพื่อวิเคราะห์พร้อม ๆ กันได้ด้วย

2. การวิเคราะห์เชิงปริมาณ การวิเคราะห์ต้องหาว่าช่วงใดมีความถูกต้องเที่ยงตรงก่อน เช่น ต้องตรวจสอบดูว่ามีการตอบสนองเพิ่มเป็นสัดส่วนเป็นเส้นตรงกับการเพิ่มปริมาณของสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หรือไม่ ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ควรมีการตอบสนอง (คือ พีคสูงหรือพื้นที่ใต้พีคเพิ่มขึ้น) อย่างน้อยมากกว่าสัญญาณที่รบกวน 5 เท่า บางกรณีมีความผิดพลาดอาจเนื่องมาจากเทคนิคการสุ่มตัวอย่าง บวกกับความผิดพลาดอื่นๆ อาจทำให้เกิดปัญหาในการวิเคราะห์ยิ่งขึ้น การใช้ peak area จะแก้ไขความผิดพลาดเนื่องจากเทคนิคการฉีดสารตัวอย่างเข้าเครื่องและสภาวะต่าง ๆ ของ

เครื่องที่เปลี่ยนแปลงและจะถูกต้องในกรณีที่เป็นพืชไม่สมมาตร

2.1 การทำปริมาณวิเคราะห์โดยอินเทอร์เนลสแตนดาร์ด (Internal Standardization : IS) คือ การเติมสารมาตรฐานลงไปในตัวอย่างไม่ ซึ่งเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการที่จะให้ผลถูกต้องและเชื่อถือได้ในการวิเคราะห์โดยแก๊สโครมาโตกราฟี วิธีการนี้ทำโดยการเติมสารมาตรฐานที่เหมาะสมลงไปแล้วทำตามวิธีหรือกระบวนการตั้งแต่ต้นจนถึงสุดท้าย แล้วเขียนกราฟของอัตราส่วนที่ตรวจวัดโดยดีเทคเตอร์ กับอัตราส่วนของมวลสารตัวอย่างและของ IS ที่เติมลงไป ในการเลือก IS จะต้องมีความสมบัติมีลักษณะใกล้เคียงกับสารที่ต้องการทราบค่ามากที่สุด ทั้งโครงสร้างและสมบัติ แยกออกจากสารที่ต้องการทราบอย่างชัดเจนเมื่อฉีดเข้าเครื่องและมี Retention time ใกล้เคียง ๆ กัน มีความเสถียรทางเคมี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสถานะที่ใช้วิเคราะห์และไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง หรือสิ่งที่บรรจุในคอลัมน์ IS สามารถที่จะขจัดปัญหาที่จะมีผลต่อ Reproducibility ของการวัดเมื่อเติม IS ลงไปแล้ว ไม่ว่าจะเกิดการระเหย สารหก ไปบ้างก็ไม่ทำให้ผลผิดไป และจะมีผลอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อสถานะที่ปรับไว้ของเครื่องเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย และไม่ขึ้นกับปริมาณของสารที่ฉีดเข้าเครื่อง ยิ่งไปกว่านั้น วิธีที่ใช้ IS สามารถตรวจสอบและคำนวณหาปริมาณของทุกขั้นตอนในการเตรียมสารตัวอย่างว่าสูญเสียเล็กน้อยแค่ไหนได้ด้วย

2.2 การทำปริมาณวิเคราะห์โดยวิธีเ็กเทอร์เนลสแตนดาร์ด (External Standardization : ES) การทำปริมาณวิเคราะห์โดยวิธีนี้ เป็นการเปรียบเทียบสัญญาณที่เกิดจากการตรวจวัดของดีเทคเตอร์ต่อสารตัวอย่าง กับกราฟมาตรฐาน โดยทั่วไปปริมาณการตอบสนองจะอยู่ในรูปพื้นที่พีคหรือความสูงของพีค ปัจจัยที่สำคัญที่ต้องควบคุมคือ เทคนิคการฉีดต้องคงที่ ต้องรอให้สัญญาณจากดีเทคเตอร์คงที่ (Baseline คงที่) จึงทำการวิเคราะห์ เพราะการเปลี่ยนแปลงของ Baseline ทำให้พื้นที่พีคเปลี่ยนแปลงได้

2.1.10 การป้องกันอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2550)

กลไกที่สำคัญที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล ได้แก่

2.1.10.1 เอนไซม์ที่ป้องกันการออกซิเดชัน (antioxidant defense enzyme)

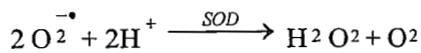
ในระดับเซลล์เอนไซม์เป็นกลไกสำคัญแรกที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่

ในสมดุล เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่

เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase ; SOD) เอนไซม์ SOD จะ

ทำหน้าที่ขจัดอนุมูลอิสระเริ่มต้นที่ เกิดขึ้นในร่างกาย คือ อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($O_2^{\cdot -}$)

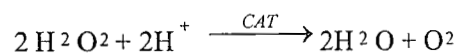
โดยการเปลี่ยน $O_2^{\cdot -}$ ให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์



เอนไซม์คาตาเลส (catalase ; CAT) เอนไซม์คาตาเลสเป็นเอนไซม์ซึ่งอยู่ในเปอร์ออกซิ

โซม มีฮีม คือ ferriprotoporphyrin เป็นองค์ประกอบ เอนไซม์คาตาเลสทำหน้าที่เปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์

ไซด์ไปเป็นโมเลกุลของน้ำกับออกซิเจน



เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase ; GPx) เอนไซม์เปอร์

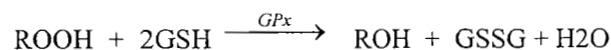
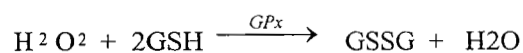
ออกซิเดสจะมีธาตุซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบสำคัญอยู่ในโครงสร้างของเอนไซม์ GPx ทำหน้าที่เร่ง

ปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ ลิพิดเปอร์ออกไซด์ (ROOH) และ

ไฮโดรเจนเปอร์ไซด์ โดยมีการออกซิไดส์กลูตาไทโอน ร่วมในปฏิกิริยาคด้วย เป็นการสลายไฮโดรเจน

เปอร์ออกไซด์ไม่ให้เกิดปฏิกิริยาเฟนตัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ เอนไซม์นี้ปกป้องเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูก

ด้วยนมไม่ให้ถูกทำลายหรือเสียหายจากภาวะที่ร่างกายถูกออกซิไดส์หรือมีอนุมูลอิสระมากเกินไป



2.1.10.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง เพื่อกำจัด

อนุมูลให้หมดไป หรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อ

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิเคราะห์ปริมาณ โปรตีนของน้ำเชื้อปลา Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) ที่แช่แข็งที่ -80°C โดยวิธี SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis พบว่ามีการสูญเสียโปรตีนจากสเปิร์ม ในขณะที่น้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์มมีปริมาณ โปรตีนเพิ่มมากขึ้นแม้ในน้ำเชื้อที่ผสม cryoprotectant ได้แก่ glycerol และ DMSO แสดงถึงความเสียหายของเยื่อเซลล์สเปิร์มที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง การเก็บ และการละลาย (Yoo et. Al., 1987)

ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการแช่เย็นหรือแช่แข็ง คือ องค์ประกอบของกรดไขมันที่เยื่อเซลล์ ซึ่งมีรายงานวิจัยหลายฉบับที่พบว่า กระบวนการแช่เย็นและแช่แข็งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง องค์ประกอบและปริมาณกรดไขมันที่เยื่อเซลล์ ในปี 1996 Labbé และคณะ ได้ทำการศึกษาผลของ อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเรนโบว์เทราท์ซึ่งทำการศึกษาความสามารถในการต้านทานต่อการแช่แข็ง โดยการนำปลาและสเปิร์มมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 8 และ 18 องศาเซลเซียส ในฤดูผสมพันธุ์ และย้ายมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียสเมื่อเริ่มเข้าสู่ฤดูวางไข่เป็นเวลา 42 วันขึ้นไป ซึ่งพบว่าน้ำเชื้อแช่เย็นของปลาเรนโบว์เทราท์ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส มีอัตราการปฏิสนธิของสเปิร์มดีที่สุด คือ 60-80% ซึ่งมากกว่าปลาเรนโบว์เทราท์ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส (20-30%) นอกจากนี้ได้ ทำการศึกษาความสัมพันธ์ขององค์ประกอบลิพิดที่เปลี่ยนแปลงไปภายหลังจากการแช่แข็ง พบว่า การที่ เยื่อเซลล์มีอัตราส่วนของคลอเลสเทอรอล / ฟอสโฟลิพิด ต่ำนั้น มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการ ต้านทานต่อการแช่แข็งของสเปิร์ม ($p < 0.002$) โดยน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาที่ถูกเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 องศา เซลเซียส มีอัตราส่วนของคลอเลสเทอรอล / ฟอสโฟลิพิด ต่ำกว่าน้ำเชื้อของปลาที่ถูกเลี้ยงที่ 8 องศา เซลเซียส เนื่องจากเกิดการปรับตัวเพื่อรักษาสภาพความเหลวของเยื่อหุ้มเซลล์ที่อุณหภูมิต่ำไว้ เพื่อให้ สเปิร์มได้รับความเสียหายน้อยลง ดังนั้นการนำปลาเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง และย้ายมาเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ ในฤดู ผสมพันธุ์ จะช่วยปรับปรุงให้สเปิร์มมีความต้านทานต่อการแช่แข็งได้

Liu และคณะ (1997) รายงานการเพิ่มปริมาณ ascorbic acid ในน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์มของปลา rainbow trout ที่ได้รับ ascorbic acid (ในรูปของ ascorbyl monophosphate) เพิ่มกับอาหาร ในกลุ่มปลาที่มีปริมาณ ascorbic acid ต่ำสุด สามารถตรวจวัดปริมาณการเกิด lipid peroxides ได้สูงสุด แสดงถึงความสัมพันธ์ของ ascorbic acid ในการลดการเกิด lipid peroxide

การแช่แข็งเซลล์สเปิร์มหมามีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบและปริมาณกรดไขมันในเยื่อเซลล์สเปิร์ม โดยพบว่าอัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสเปิร์มจากน้ำเชื้อสด โดยกรดไขมันที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น คือ Palmitic acid (18:0 n-9) และ Linoleic acid (C18:2 n-6) ในขณะที่กรดไขมันที่มีปริมาณลดลงมักจะเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน เช่น Arachidonic acid (C20:4 n-6), DPA (C22:5 n-6) และ DHA (C22:6 n-3) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเหล่านี้ อาจเนื่องมาจากการลดลงของกรดไขมันไม่อิ่มตัว หรือการสูญเสียกรดไขมันไม่อิ่มตัวไป เนื่องมาจากความเครียดจากกระบวนการแช่แข็ง ที่เป็นผลทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อเซลล์และเกิด Lipid peroxidation (Cerolini และคณะ, 2001)

ในปีเดียวกันนี้ Kim และคณะ (2001) ได้รายงานผลการวิเคราะห์กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อเซลล์และ Immature oocyte ของวัวในสภาวะสดและแช่เย็น พบว่ามีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของ Arachidonic acid ใน Immature oocyte ที่ผ่านการแช่แข็ง

Zaniboni และ Cerolini (2009) ได้ทำการแช่เย็นน้ำเชื้อของไก่อวลงใน Extender ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวลดลงร้อยละ 35 และ 29 ตามลำดับ โดยกรดไขมันที่มีสัดส่วนลดลง ได้แก่ Palmitic acid (C16:0), Stearic acid (C18:0) และ Oleic acid (C18:1 n-9) ในขณะที่เดียวกันกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่ม n-3 และ n-6 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงนี้ส่งผลให้อัตราส่วนระหว่างกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวมีอัตราส่วนเพิ่มขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้อาจเกี่ยวข้องกับการสูญเสีย

คุณภาพของสเปิร์มที่ผ่านการแช่เย็น

การลดอุณหภูมิให้ต่ำลงเพื่อการแช่เย็นหรือแช่แข็งน้ำเชื้อนั้น มีผลทำให้เยื่อเซลล์สเปิร์มเกิดการเปลี่ยนแปลงไป โดยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความเหลวลดลงทำให้เกิดความเสียหายกับเยื่อเซลล์ได้ ซึ่งสัมพันธ์กับองค์ประกอบลิพิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ที่เป็นตัวกำหนดความเหลวของเยื่อหุ้มเซลล์นั้น โดยพบว่าการมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในปริมาณสูงจะทำให้เยื่อเซลล์สเปิร์มมีความเหลวเพิ่มขึ้นและทำให้สเปิร์มนั้นมีความสามารถในการต้านทานต่อความเย็นได้ ซึ่งมีการศึกษาในสัตว์สปีชีส์ต่าง ๆ ที่ช่วยสนับสนุนสมมติฐานนี้ได้เป็นอย่างดี ในปี 2004 Miller และคณะ ได้ทำการศึกษาขององค์ประกอบกรดไขมันในสเปิร์มจากท่อพักอสุจิส่วนต้นและท่อพักอสุจิส่วนท้ายของสัตว์จำพวกจิงโจ้ 3 สปีชีส์ คือ จิงโจ้ (*Macropus giganteus*) โคอาล่า (*Phascolarctos cinereus*) และวอมแบท (*Vombatus ursinus*) โดยทำการสกัดลิพิด แล้วจึงทำปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชันและเมทิลเอชัน จากนั้นตรวจสอบโดยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่าสเปิร์มจากท่อพักอสุจิส่วนต้นของสัตว์ทั้ง 3 สปีชีส์ มีอัตราส่วนระหว่างกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับสเปิร์มในท่อพักอสุจิส่วนท้าย ในขณะที่สเปิร์มจากท่อพักอสุจิส่วนท้ายของโคอาล่า จิงโจ้ และวอมแบท มีอัตราส่วนระหว่างกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวประมาณ 7.6, 5.2 และ 1.9 ตามลำดับ ซึ่งมีอัตราส่วนที่สูงกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสปีชีส์อื่น ๆ และพบว่ากรดไขมันที่พบมากที่สุดinosเปิร์มจากท่อพักอสุจิส่วนท้าย คือ ดีเอชเอ (DHA ; 22:6 , n-3) โดยวอมแบทและโคอาล่ามีดีเอชเอในระดับที่สูงกว่าสเปิร์มจิงโจ้ และสัตว์จำพวกจิงโจ้เหล่านี้ยังมีระดับดีเอชเอสูงกว่าสเปิร์มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสปีชีส์อื่น ๆ อีกด้วย จึงทำให้สเปิร์มของวอมแบทและโคอาล่ามีความสามารถในการต้านทานต่อการแช่แข็งในระดับที่ดีกว่าสเปิร์มจิงโจ้ และทนต่อความเย็นได้ดีกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสปีชีส์อื่น ๆ

ในปี 2005 Miller และคณะก็ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบขององค์ประกอบกรดไขมันในสเปิร์มสุนัขจิ้งจอกเงิน (*Vulpes vulpes*) ที่สามารถเก็บรักษาโดยการแช่แข็งได้สำเร็จกับสเปิร์มสุนัขจิ้งจอก

น้ำเงิน (*Alopes lagopus*) ที่ยังไม่สามารถเก็บรักษาได้โดยวิธีการแช่แข็ง โดยทำการเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของกรดไขมันในสเปิร์มสุนัขจิ้งจอกเงินกับสเปิร์มสุนัขจิ้งจอกน้ำเงิน โดยการสกัดลิพิด ทำปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชันและเมทิลเลชัน จากนั้นวิเคราะห์โดยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่าเยื่อเซลล์สเปิร์มสุนัขจิ้งจอกเงินมีระดับกรดโคโคซะเพนตะอีโนอิก (DPA; 22:5, n-6) และกรดโคโคซะเฮกซะอีโนอิก (DPA; 22:6, n-3) ในปริมาณสูงสุดและสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเยื่อเซลล์สเปิร์มสุนัขจิ้งจอกน้ำเงิน

เอนไซม์หลักที่ใช้ในการต้านออกซิเดชันในน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์มและเซลล์สเปิร์มปลาชนิดต่างๆ คือ superoxide peroxidase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) และ catalase (CAT) (Chen et al., 2010; Lahnsteiner et al., 2010; Lahnsteiner and Mansour, 2010) นอกจากนี้ในสเปิร์มของปลา brown trout (*Salmo trutta f.fario*) ยังพบระบบต้านออกซิเดชันที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น uric acid, glutathione, ascorbic acid และ tocopherol (Lahnsteiner et al., 2010)

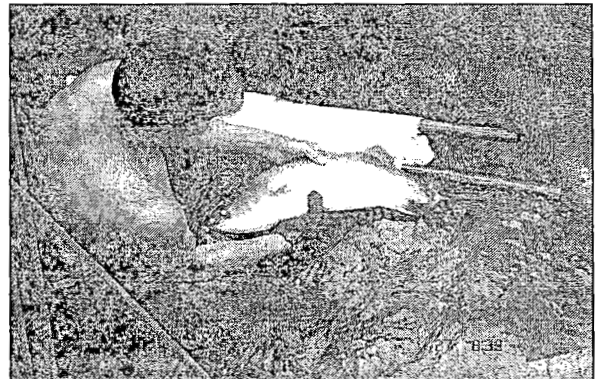
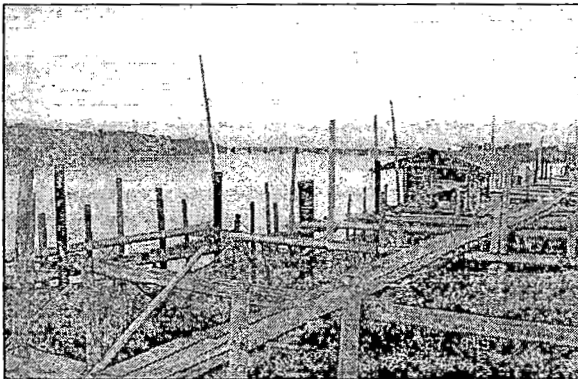
บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง

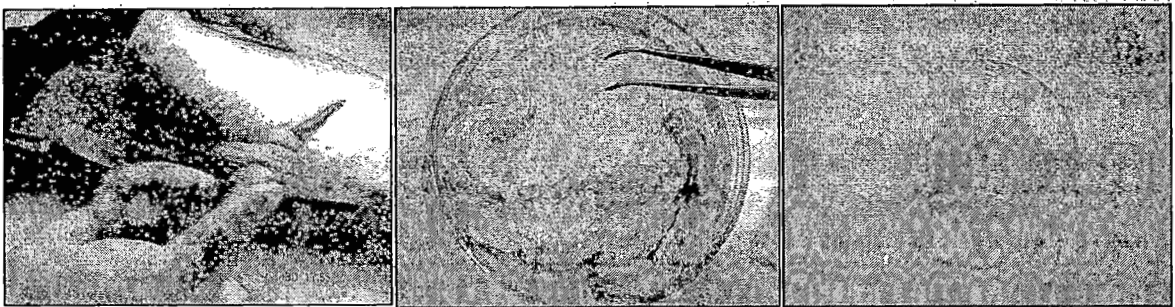
3.1.1 การรวบรวมน้ำเชื้อปลากะพงขาว

รวบรวมปลากะพงขาวเพศผู้ จากกะชังปลาบริเวณแม่น้ำบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ปลาที่มีอายุประมาณ 3 ปี ยาวประมาณ 60-70 cm น้ำหนักเฉลี่ย 3.2 kg หลังจากนั้นนำปลาไปพักในบ่อพัก (1.50 m × 3.0 m × 1.50 m) ที่โรงเพาะเลี้ยง ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประมาณ 2 สัปดาห์



จากนั้นปลาถูกสลบด้วยยาสลบแล้วจึงผ่าเพื่อเก็บน้ำเชื้อ เนื่องจากน้ำเชื้อมีปริมาณน้อยหรือไม่สามารถที่จะรีดออกด้วยมือได้ การผ่าปลากะทำที่บริเวณท้องปลา โดยมีวิธีดังนี้ ใช้มีดผ่าตัดกรีดลงบริเวณท้องและนำถุงน้ำเชื้อออกมารองด้วยผ้าขาวบาง ซึ่งลักษณะของน้ำเชื้อมีกลิ่นคาว มีสีขาว เทปัด และข้นมาก นำน้ำเชื้อจะถูกรีดออกมาเพื่อตรวจสอบ ความหนาแน่นของสเปิร์ม (sperm concentration) และ การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (sperm motility) น้ำเชื้อสด หรือน้ำเชื้อที่รีดออกมาใหม่ๆ (freshly collected milt) รวบรวมจากตัวผู้ 6 ตัว (pooled samples) ได้น้ำเชื้อรวมประมาณ 22 ml น้ำเชื้อจะ

ถูกดูดด้วย syringe ก่อนนำไปรวมในภาชนะ น้ำเชื้อถูกแบ่งออกเป็น 2 ชุดๆ ละ 3 ตัวอย่าง ชุดแรก คือน้ำเชื้อปลากะพงขาวสดก่อนแช่แข็ง หรือน้ำเชื้อชุดควบคุม และชุดที่ 2 เป็นน้ำเชื้อที่จะนำไปแช่แข็ง โดยนำน้ำเชื้อสดปริมาตร 1 mL (1.25×10^{10} เซลล์/ mL) ไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ก่อนแยกส่วนน้ำใสส่วนบนออกจากตะกอนเซลล์สเปิร์ม และนำสเปิร์มไปทำการประเมินองค์ประกอบทางชีวเคมีได้แก่ ปริมาณองค์ประกอบไขมันและกรดไขมัน กิจกรรมและปริมาณของ antioxidant enzyme (Catalase, Glutathione peroxidase)



น้ำเชื้อสด หรือน้ำเชื้อที่รีดออกมาใหม่ๆ (freshly collected milt) มาเจือจางในสารละลาย Ringer solution ในอัตราส่วนที่เหมาะสม คือ 1:1 แล้วจึงผสม DMSO ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10% และปล่อยให้ไว้ให้เกิดสภาพสมดุลของสารละลาย (equilibrium) ประมาณ 30 นาที ก่อนที่จะถูกรวบรวมไว้ในหลอด cryovial ขนาด 2.0 ml การแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวจะทำโดยกระบวนการที่พัฒนาขึ้นมา (วีรพงศ์ วุฒิพันธ์ชัย, ข้อมูลยังไม่ตีพิมพ์) และเก็บน้ำเชื้อไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำน้ำเชื้อออกมาละลาย ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 0.5 นาทีให้กลับคืนสภาพของเหลว ทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม จากนั้นนำน้ำเชื้อที่มีปริมาณสเปิร์มเท่ากับ 1.25×10^{10} เซลล์ มาปั่นเหวี่ยงที่ 3000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนแยกส่วนน้ำใสส่วนบนออกจากตะกอนเซลล์สเปิร์ม และปั่นล้างตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ PBS 1 ครั้ง ก่อนนำไปสกัดลิพิดรวมทำการประเมินองค์ประกอบทางชีวเคมีได้แก่ ปริมาณองค์ประกอบไขมัน และกรดไขมัน กิจกรรมของ antioxidant enzyme (Superoxide dismutase, Catalase) ของสเปิร์มจากน้ำเชื้อชุดควบคุมและน้ำเชื้อแช่

แข็ง

3.1.3 การตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

การตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะนำสเปิร์มผสมกับ 0.8% NaCl และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า ซึ่งจะตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มก่อนแช่แข็งและหลังจากแช่แข็ง

3.1.4 การสกัดลิพิดรวมจากเซลล์สเปิร์มปลากระพง (ดัดแปลงวิธีของ Folch และคณะ, 1957)

จากนั้นเติมตัวทำละลายที่ประกอบด้วยคลอโรฟอร์ม : เมทานอล ในอัตราส่วน 2:1 (v/v) และ 0.002% BHT (w/v) ปริมาตร 10 mL ลงในตะกอนสเปิร์ม จำนวน 1.25×10^{10} เซลล์ แล้วจึงทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Sonicator ก่อน จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม : น้ำ ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ปริมาตร 2.5 mL แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้เกิดการแยกชั้น จึงดูดสารละลายส่วนบนซึ่งเป็นชั้นน้ำทิ้งและนำสารละลายชั้นล่างซึ่งเป็นคลอโรฟอร์มที่มีลิพิดรวมละลายอยู่มาเติมเมทานอล : น้ำ ในอัตราส่วน 10:9 (v/v) ปริมาตร 2 mL แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ก่อนเก็บสารละลายชั้นล่างมาเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจนเพื่อระเหยตัวทำละลายออกจนแห้ง ซึ่งน้ำหนัก และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสภายใต้สภาวะบรรยากาศไนโตรเจนเพื่อทำการทดสอบในขั้นต่อไป

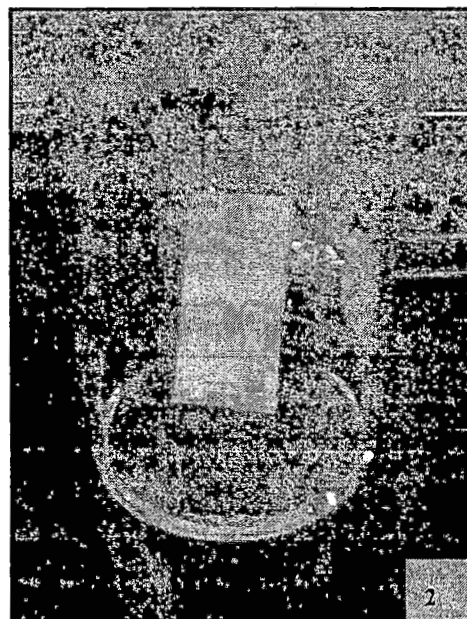
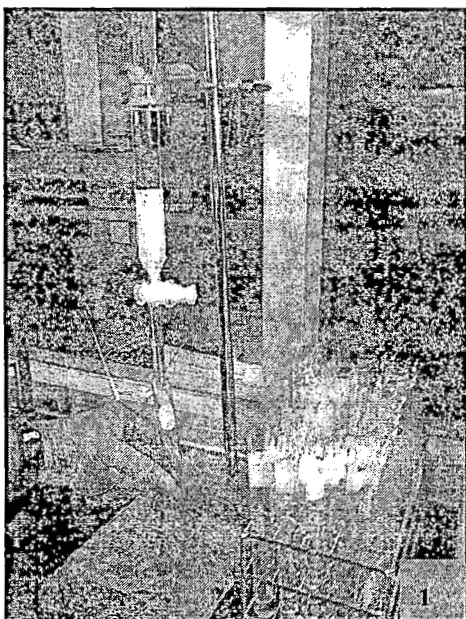
3.1.5 การแยกชนิดลิพิดด้วยเทคนิค silica gel column chromatography (ดัดแปลงวิธีของ Rouser และคณะ, 1976)

การแยกด้วยเทคนิคนี้จะใช้คอลัมน์ แก้วขนาด 2.5 ซม × 40 ซม. และ ใช้ silicic acid 6 กรัม ละลายใน ไดคลอโรมีเทน เป็นตัวดูดซับ ระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการชะลิพิด คือ ไดคลอโรมีเทน 240 ml, อะซิโตน 360 ml และเมทานอล 240 ml ตามลำดับ โดยการชะของลิพิดรวมจะออกมาตามความมีขั้วสารที่ถูกชะออกมาจะใส่ไว้ในหลอดทดลองขนาด 15 ml จำนวน 13 หลอด ซึ่งไตรเอซิลกลีเซอรอลจะถูก

ชะออกด้วยไดคลอโรมีเทน ส่วนของคลอเลสเทอรอลจะถูกชะออกด้วยอะซิโตน และส่วนของฟอสโฟลิปิดจะถูกชะด้วยเมทานอลตามลำดับ และตรวจสอบผลจากการชะออกของลิพิดรวมที่ละลายด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ ไดคลอโรมีเทน และขุ่นลงใน 10 % กรดซัลฟูริกและให้ความร้อน โดยใช้ลิพิดมาตรฐาน (ไตรเอซิลกริเซอรอล, คลอเลสเทอรอล และฟอสโฟลิปิด) เป็นตัวเปรียบเทียบ และยืนยันผลด้วยเทคนิค NMR อีกครั้ง โดยเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของลิพิดมาตรฐาน ทำการระเหยตัวทำละลายทั้งสามให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) และ ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) จากนั้นชั่งน้ำหนักของส่วนไตรเอซิลกริเซอรอล, คลอเลสเทอรอล และฟอสโฟลิปิด ก่อนเก็บที่อุณหภูมิ-80°C ภายใต้สภาวะบรรยากาศไนโตรเจน เพื่อทำการทดสอบในขั้นต่อไป

3.1.6 การวิเคราะห์ลิพิดด้วยเทคนิคเรซินเลเซอร์โครมาโตกราฟี (ดัดแปลงจากวิธีของ Ruiz และคณะ, 2004)

นำลิพิดรวมที่สกัดได้ หยดลงบนแผ่น TLC ก่อนนำไป develop ในระบบตัวทำละลาย ไดคลอโรมีเทนที่ปิดฝาจนเกิดการอึมตัว จนกระทั่งตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปจนเกือบถึงจุดสูงสุดของแผ่น TLC จากนั้นยกแผ่น TLC ขึ้น ปล่อยให้แห้งแล้วจึงตรวจสอบตำแหน่งไตรเอซิลกริเซอรอล, คลอเลสเทอรอล และฟอสโฟลิปิด โดยการสเปรย์ด้วยกรดซัลฟูริก 10% และให้ความร้อน



3.1.7 การทำทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (transesterification) ของกรดไขมัน (ดัดแปลงวิธีของ

Morrison และคณะ, 1964)

นำฟอสโฟลิพิดของปลากระพงที่แยกได้จากการทำ column chromatography จำนวน 10 mg ใส่งในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียว จากนั้นเติม 14% Borontrifluoride (v/v) ในเมทานอลปริมาตร 1 mL เป่าด้วยแก๊สไนโตรเจนและปิดฝาให้สนิท บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ทำให้เย็นโดยผ่านน้ำ แล้วจึงเติมเฮกเซน ปริมาตร 1 mL และน้ำปริมาตร 0.5 mL เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3000 g เป็นเวลา 15 นาที ให้เกิดการแยกชั้นอย่างชัดเจน ดูดชั้นเฮกเซน ซึ่งอยู่ชั้นบนมาเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมวิเคราะห์หองค์ประกอบกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีต่อไป นอกจากนี้นำตัวอย่างฟอสโฟลิพิดผสม Internal standard คือ Nonadecanoic acid (C19:0) จำนวน 0.2 mg ซึ่งเป็นกรดไขมันมาตรฐานเพื่อใช้เปรียบเทียบในการหาปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์โดยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี จากนั้นทำทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ตามวิธีการที่กล่าวมาข้างต้นเช่นเดียวกัน

3.1.8 การวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณกรดไขมัน โดยเครื่อง Gas chromatography

กรดไขมันมาตรฐานที่ใช้ประกอบด้วย อินเทอร์นัลสแตนดาร์ด (Internal standard) ได้แก่ Nonadecanoic acid (C19:0) และเอกซ์เทอร์นัลสแตนดาร์ด (External standard) ได้แก่ Fatty Acid Methyl Ester mix standard (FAME mix standard) ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันในรูปเมทิลเอสเทอร์ 37 ชนิด และ Docosapentaenoic acid methyl ester (DPA; C22:5n6) นีดกรดไขมันมาตรฐาน และกรดไขมันในรูปเมทิลเอสเทอร์จากฟอสโฟลิพิดตัวอย่างทั้งที่เติมและไม่เติม Internal standard เข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดลอง

คอลัมน์	Capillary Column ยาว 30.0 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 μm เคลือบด้วย Polyethylene Glycol x หน้า 320 μm		
ปริมาตรที่ฉีด	2 μL		
แก๊สพา	แก๊สฮีเลียม		
Injector	Split ที่อุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียส		
Oven	ความดันที่ 13.94 psi (ความดันคงที่)		
โดยอุณหภูมิเริ่มต้นที่	100 $^{\circ}\text{C}$ คงที่ 5 นาที	เพิ่มขึ้นในอัตราเร็ว 5 $^{\circ}\text{C}/\text{นาที}$	
ถึง	150 $^{\circ}\text{C}$ คงที่ 5 นาที	เพิ่มขึ้นในอัตราเร็ว 1.5 $^{\circ}\text{C}/\text{นาที}$	
ถึง	180 $^{\circ}\text{C}$ คงที่ 5 นาที	เพิ่มขึ้นในอัตราเร็ว 1.5 $^{\circ}\text{C}/\text{นาที}$	
ถึง	210 $^{\circ}\text{C}$ คงที่ 35 นาที	เพิ่มขึ้นในอัตราเร็ว 1.5 $^{\circ}\text{C}/\text{นาที}$	
รวมเวลา 95 นาที			
Detector	Flame Ionization Detector (FID) ที่อุณหภูมิ 220 $^{\circ}\text{C}$ แก๊สไฮโดรเจน มีอัตราการไหล 40 mL ต่อนาที และอากาศมีอัตราการไหล 400 mL ต่อนาที แก๊สไนโตรเจนมีอัตราการไหล 40 mL ต่อนาที		

3.1.9 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและแปลผลโครมาโตแกรม

การวิเคราะห์ผลเชิงคุณภาพ สามารถระบุชนิดของกรดไขมัน โดยการเปรียบเทียบค่า Retention time (RT) ของกรดไขมันจากสารตัวอย่าง กับค่า RT ของกรดไขมันมาตรฐาน FAME Mix Standard และ DPA โดยพิจารณาจากค่า RT ที่เท่ากัน หรือใกล้เคียงกัน ร่วมกับลักษณะความสูงจะทำให้ทราบชนิดกรดไขมันของสารตัวอย่างได้

3.1.10 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (ดัดแปลงวิธีของ McNair และคณะ, 1969)

โดยการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันในสารตัวอย่าง ซึ่งการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันเป็นน้ำหนักจริงเป็นร้อยละของกรดไขมันแต่ละชนิดเปรียบเทียบกับน้ำหนักไขมันตัวอย่าง โดยสามารถคำนวณได้จากความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟ (Area ratios) ของกรดไขมันชนิดนั้น ๆ เปรียบเทียบกับกรดไขมันที่ใช้เป็น Internal standard (การทดลองนี้ใช้ C19:0) ซึ่งทราบปริมาณแน่นอน สามารถคำนวณได้จากสูตรดังต่อไปนี้

1. การคำนวณปริมาณกรดไขมัน (Unknow) เป็น มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง (mg/g Dry weight)

$$= \frac{(\% \text{ Area fatty acid Unknow} \times \text{น้ำหนัก Internal standard (mg)})}{(\% \text{ Area Internal standard} \times \text{น้ำหนัก ตัวอย่าง (g)})}$$

2. การคำนวณร้อยละกรดไขมัน Unknow ต่อ กรดไขมันทั้งหมด (% of Total Fatty Acid)

$$= \frac{\text{ปริมาณกรดไขมัน Unknow (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)}}{\text{ปริมาณกรดไขมันทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)}} \times 100$$

$$\text{ปริมาณกรดไขมันทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)*}$$

*ปริมาณกรดไขมันทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)

$$= \frac{(\% \text{ Area ไขมันทั้งหมด} ** \times \text{น้ำหนัก Internal standard (mg)})}{(\% \text{ Area Internal standard} \times \text{น้ำหนัก ตัวอย่าง (g)})}$$

$$(\% \text{ Area Internal standard} \times \text{น้ำหนัก ตัวอย่าง (g)})$$

** % Area กรดไขมันทั้งหมด = ผลรวมของ % Area กรดไขมันทั้งหมด

3.1.11 การทดสอบกิจกรรม (activity) ของ antioxidant enzyme

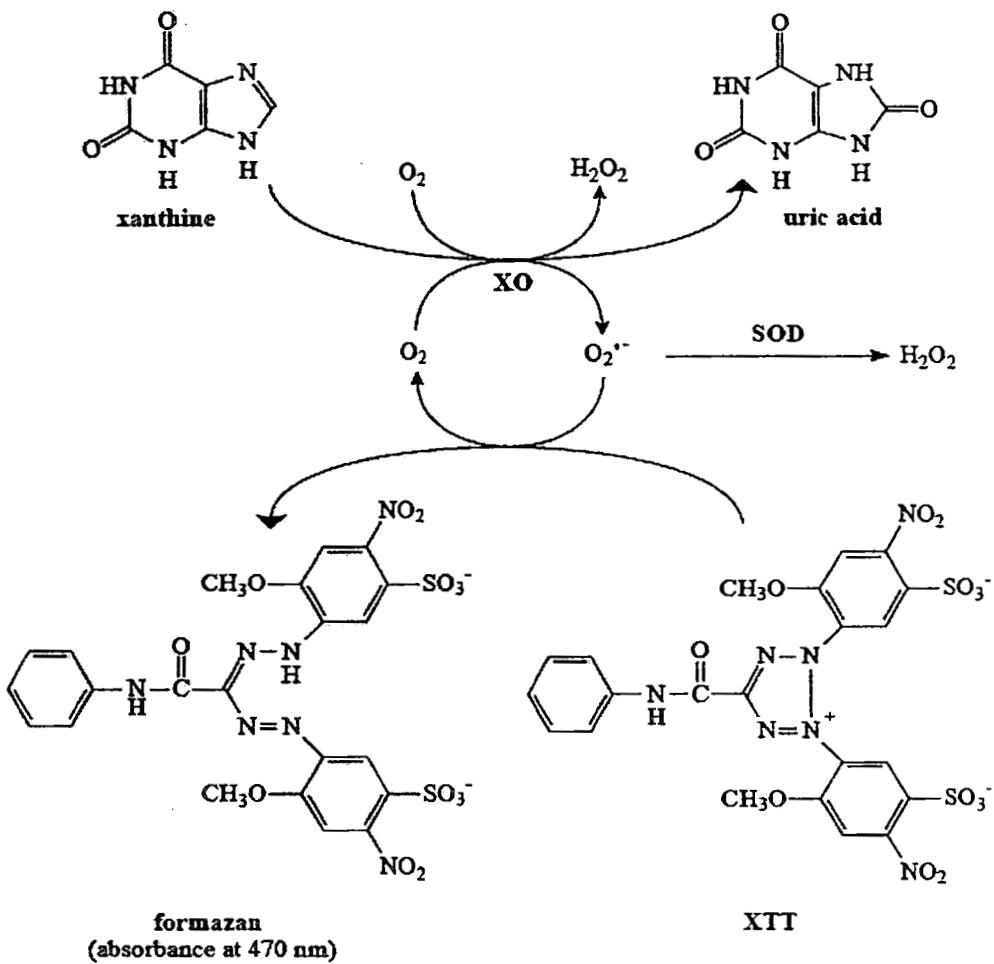
ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ จากสเปิร์มของน้ำเชื้อสด และสเปิร์มที่แช่แข็ง โดยการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อ แล้วดูน้ำส่วนบนซึ่งเป็นน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์มทิ้ง ก่อนปั่นล้างสเปิร์มด้วยบัฟเฟอร์ HBSS ที่ 3000 g ที่ 4 °C นาน 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย HBSS ในหลอดเก็บสเปิร์ม และทำให้เซลล์แตกโดย

การ sonication บนน้ำแข็ง หลังจากนั้นนำหลอดปั่นเหวี่ยงที่ 3000 rpm ที่ 4 °C นาน 30 นาที เก็บน้ำใส ส่วนบนใสหลอดเก็บที่ -80 °C เพื่อทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ หาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่างโดยวิธี Bradford

3.1.11.1 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Superoxide dismutase

การตรวจสอบ activity ของ superoxide dismutase โดยดัดแปลงวิธีของ Ukada et al. (1997)

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase โดยดูจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรีดิวซ์ XTT (3'-{1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium}-bis(4-methoxy-6-nitro)(Sigma) โดย superoxide anion



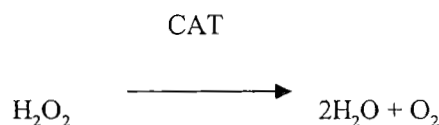
ในการทดสอบจะใช้ปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 255 µl โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย 50mM

sodium carbonate buffer pH 9.4 , 0.2 mM xanthine (pH 9.4), 0.1 mM EDTA และ 0.75 mM XTT จากนั้น เติมสารละลายเอนไซม์จากข้อ 3.1.10 ของน้ำเชื้อปลากระพงขาวสด และน้ำเชื้อปลากระพงขาวแช่แข็ง 24 ชั่วโมง ปริมาตร 10 μ l และปรับปริมาตรด้วย 50mM sodium carbonate buffer pH 9.4 ก่อนเติม 8.5 μ l ของ xanthine oxidase (XO) (60 mU/ml) เพื่อเริ่มปฏิกิริยา ซึ่งจะวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 470 nm โดยจะวัดทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 20 นาทีโดยใช้เครื่อง microplate reader (Versamax, Molecular Device, สหรัฐอเมริกา) หนึ่งยูนิตของกิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase ถูกให้คำนิยามว่าจำนวนปริมาณที่เอนไซม์สามารถยับยั้งการเกิดสีของ formazan ได้ 50% กิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase จำนวนได้จากสมการดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(\Delta A_{470\text{nm}/\text{min}})^{\text{control}} - (\Delta A_{470\text{nm}/\text{min}})^{\text{sample}}}{(\Delta A_{470\text{nm}/\text{min}})^{\text{control}}} \times 100$$

3.1.11.2 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Catalase

วิธีการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ catalase (CAT) คัดแปลงมาจากวิธีที่รายงานโดย Latchoumycandane et al. (2002) โดยใช้ Hydrogen peroxide เป็นสารตั้งต้น การทำงานของเอนไซม์ catalase จะเปลี่ยน hydrogen peroxide เป็นออกซิเจนและน้ำ กิจกรรมของเอนไซม์ catalase สามารถตรวจสอบจากการลดลงของ hydrogen peroxide ที่ความยาวคลื่น 240 nm ทุกๆ 1วินาที เป็นเวลา 3นาที



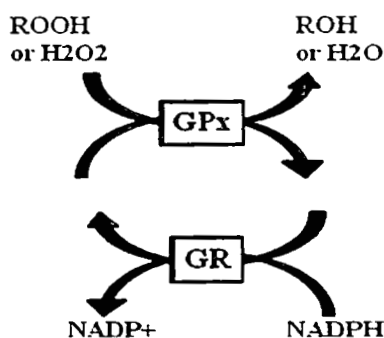
ในปฏิกิริยาประกอบด้วย 2.4 ml ของ 50 mM Sodium phosphate buffer pH 7.0 ที่ผสม 0.1% tritonX-100 และใส่ 20 μ l ของตัวอย่างคือส่วน supernatant ของน้ำเชื้อปลากระพงขาวสด และน้ำเชื้อปลากระพงขาว

แช่แข็ง 24 ชั่วโมง และเติม HBSS 30 μl (blank เติม HBSS 50 μl) จากนั้นเติม 10 μl ของ 19 mM hydrogen peroxide เพื่อเริ่มปฏิกิริยาโดยใช้เครื่อง UV-visible spectrophotometer (Agilent technologies, สหรัฐอเมริกา) หนึ่งยูนิตของเอนไซม์ถูกให้คำนิยามคือปริมาณเอนไซม์ catalase ที่สามารถเปลี่ยน 1 μmol ของ hydrogen peroxide เป็นออกซิเจนและน้ำได้ในเวลา 1 นาที โดยค่า extinction coefficient ของ hydrogen peroxide มีค่าเท่ากับ $0.00436 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ กิจกรรมของเอนไซม์ catalase คำนวณได้จากสมการ ดังนี้

$$\text{Catalase activity (U/ml)} = \frac{\Delta A_{240}/\text{min}}{0.00436 \mu\text{M}^{-1}} \times \text{ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา} \times \text{sample dilution} \times 1000$$

ปริมาตรของเอนไซม์

3.1.11.3 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Glutathione Peroxidase



การตรวจสอบกิจกรรมของ Glutathione Peroxidase โดยใช้วิธีการทดสอบของ Li et al., (2000)

โดยใช้ tert-Butyl hydroperoxide (t-BuO₂H) เป็นสารตั้งต้นในการทดสอบจะใช้ปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 0.8 ml โดยในปฏิกิริยาจะประกอบด้วย 280 μl ของ 50 mM Potassium phosphate buffer pH 7.8, 5.6 μl ของ 0.1M EDTA, 5.6 μl ของ 0.1 M NaN₃, 112 μl ของ 50 mM Glutathione (GSH), 4.4 μl ของ 2.4 U/ml Glutathione reductase และใส่ 10 μl ของตัวอย่างคือส่วน supernatant ของน้ำเชื้อสดของปลากะพงขาว และที่น้ำเชื้อปลากะพงขาวแช่แข็ง 24 ชั่วโมง และเติม HBSS 70 μl (blank จะใส่

HBSS 80 μ l) ปรับปริมาตรด้วย 50 mM Potassium phosphate buffer pH 7.8 ปริมาตร 432.4 μ l จากนั้นใส่ 80 μ l ของ 15mM NADPH ทิ้งไว้ 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และเติม 80 μ l ของ 15 mM tert- Butyl hydroperoxide (t-BuO₂H) เพื่อเริ่มปฏิกิริยา วัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ 340 nm ทุกๆ 1 วินาที เป็นเวลา 3 นาที โดยใช้เครื่อง UV-visible spectrophotometer หนึ่งยูนิตของกิจกรรมของเอนไซม์ Glutathione peroxidase มีค่าเท่ากับจำนวนโปรตีนที่สามารถออกซิไดซ์ NADPH ได้ 1 μ m ต่อนาที คำนวณปริมาณ NADPH โดยค่า extinction coefficient ของ NADPH มีค่าเท่ากับ 0.00622 μ M⁻¹cm⁻¹ กิจกรรมของเอนไซม์ Glutathione peroxidase (GPx) คำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\text{GPx activity (U/ml)} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{0.00622 \mu\text{M}^{-1}} \times \text{ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา} \times \text{sample dilution} \times 1000$$

3.1.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของน้ำเชื้อตัวอย่างจำนวน 3 หลอด แต่ละหลอดวิเคราะห์ 3 ครั้ง ใช้โปรแกรม SPSS (Statistical Package for Social Science Version 13.0) ในการวิเคราะห์ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดในสเปิร์มของตัวอย่างน้ำเชื้อ ปลากะพงขาวชุดควบคุมและชุดแช่แข็ง โดยใช้การทดสอบทางสถิติ คือ t-test แบบ Independent sample t-test ที่ความเชื่อมั่น 95% (P<0.05)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์ความหนาแน่นของสเปิร์ม และการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

น้ำเชื้อที่นำมาวิเคราะห์มีความหนาแน่นของสเปิร์มเท่ากับ 1.25×10^{10} เซลล์/ml และการวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่เก็บแช่แข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่ามีอัตราการเคลื่อนที่เท่ากับ $51.84 \pm 5.0\%$ เมื่อเทียบกับสเปิร์มของน้ำเชื้อสดซึ่งเคลื่อนที่ได้ $100 \pm 0\%$

4.2 การสกัดลิพิดรวม

การสกัดลิพิดรวมจากสเปิร์มปลากะพงขาวโดยใช้คลอโรฟอร์ม: เมทานอล ในอัตราส่วน 2:1 (v/v) ได้ปริมาณลิพิดรวมดังตารางที่ 1 ดังนี้

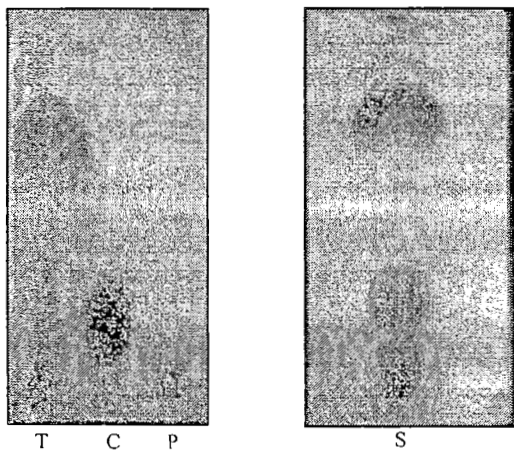
เวลาที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อ (ชั่วโมง)	ปริมาณลิพิดรวม (กรัม)
0	0.1156 ± 0.0211
24	0.1102 ± 0.0192

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง

4.3 การแยกลิพิดรวมด้วยเทคนิค Silica column chromatography และตรวจสอบด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC)

ในการแยกลิพิดรวมด้วยเทคนิค Silica column chromatography โดยระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการชะลิพิดรวมของน้ำเชื้อปลากะพงขาว คือ ไดคลอโรมีเทน, อะซิโตนและ เมทานอล ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองลิพิดรวมของน้ำเชื้อปลากะพงขาวจะถูกชะออกมาตามหัวโดยที่ ไตรเอซอลกรีเซอรอลมีหัวน้อยที่สุดจะถูกชะด้วยไดคลอโรมีเทนออกมาก่อนจากนั้นจะเป็นคลอเลสเทอรอลซึ่งมีหัวปานกลางจะถูก

จะออกมาและตัวสุดท้ายคือฟอสโฟลิพิดซึ่งมาช้ามากที่สุดจะถูกชะออกมาด้วยเมทานอล จากนั้นตรวจสอบผลจากการชะกรดไขมันด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ ไคคลอโรมีเทน และใช้ 10 % กรดซัลฟูริกและให้ความร้อนโดยจะใช้ลิพิดรวมมาตรฐาน(ไตรเอซิลกรีเซอรอล, คลอเลสเทอรอล และฟอสโฟลิพิด) เป็นตัวเปรียบเทียบเพื่อยืนยันชนิดของไขมันที่ถูกชะออกมา ลิพิดแต่ละชนิดจะมีอัตราการเคลื่อนที่ที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับความสามารถของตัวดูดซับที่มีต่อลิพิดแต่ละชนิดนั้น ซึ่งอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่กับระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ หรือค่า R_f ของลิพิดแต่ละชนิด แสดงผลดังรูปที่ 4-1 ผลการทดสอบตัวอย่างของลิพิดรวมในน้ำเชื้อปลากะพงขาว พบว่าส่วนของไตรเอซิลกรีเซอรอลอยู่ตำแหน่งสูงที่สุดของแผ่น TLC ส่วนของคลอเลสเทอรอลจะอยู่ตำแหน่งกลางของแผ่น TLC และส่วนของฟอสโฟลิพิดอยู่ที่ตำแหน่งล่างสุดของแผ่น TLC พิจารณาจากค่า R_f พบว่าส่วนของไตรเอซิลกรีเซอรอลมีค่า R_f เท่ากับ 0.852 ส่วนของคลอเลสเทอรอลมีค่า R_f เท่ากับ 0.2941 และส่วนของฟอสโฟลิพิดมีค่า R_f เท่ากับ 0.0588 แสดงผลดังตารางที่ 4-1



รูปที่ 4-1 ผลของ TLC ของลิพิดมาตรฐาน

T คือ ไตรเอซิลกรีเซอรอลมาตรฐาน

C คือ คลอเลสเทอรอลมาตรฐาน

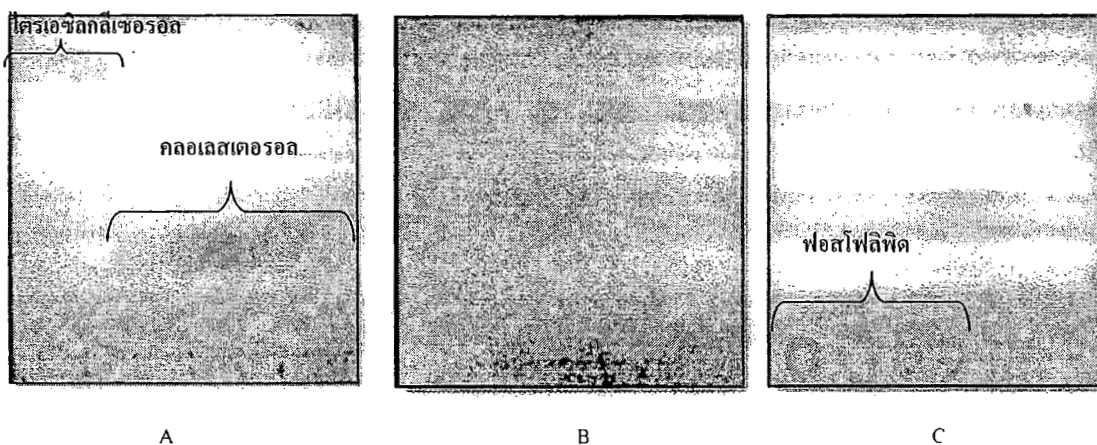
P คือ ฟอสโฟลิพิดมาตรฐาน

S คือ ลิพิดรวมจากน้ำเชื้อตัวอย่าง

ตารางที่ 4-1 แสดงผลของค่า R_f ของลิพิดในน้ำเชื่อมปลากะพงขาว

ชนิดของลิพิด	ค่า R_f
ไตรเอซิลกรีเซอรอล	0.8529
คลอเลสเทอรอล	0.2941
ฟอสโฟลิพิด	0.0588

จากนั้นนำลิพิดแต่ละ fraction ที่แยกได้จากน้ำเชื่อมแต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์โดย TLC พบว่า หลอดที่ 1-2 เป็นไตรเอซิลกรีเซอรอล หลอดที่ 3-7 เป็นคลอเลสเทอรอล และฟอสโฟลิพิด พบในหลอดที่ 16-20 ดังแสดงในรูปที่ 4-2 ก่อนทำการระเหยตัวทำละลายและชั่งน้ำหนักของส่วนไตรเอซิลกรีเซอรอล, คลอเลสเทอรอล และฟอสโฟลิพิด ตารางที่ 4-2 แสดงน้ำหนักของลิพิดแต่ละชนิดที่ได้จากน้ำเชื่อมตัวอย่าง



รูปที่ 4-2 แสดงผลจาก TLC ของลิพิดน้ำเชื่อมปลากะพงขาวที่แยกด้วยเทคนิค Silica column chromatography

A คือ ผลของ TLC ที่ใช้ไดคลอโรมีเทนในการชะกรดไขมันของน้ำเชื่อมปลากะพงขาวพบว่ามีทั้งไตรเอซิลกรีเซอรอลและคลอเลสเทอรอล

B คือ ผลของ TLC ที่ใช้อะซิโตนในการชะกรดไขมันของน้ำเชื่อมปลากะพงขาว

C คือ ผลของ TLC ที่ใช้เมทานอลในการชะกรดไขมันมาตรฐาน พบว่าเป็นส่วนของฟอสโฟลิพิด

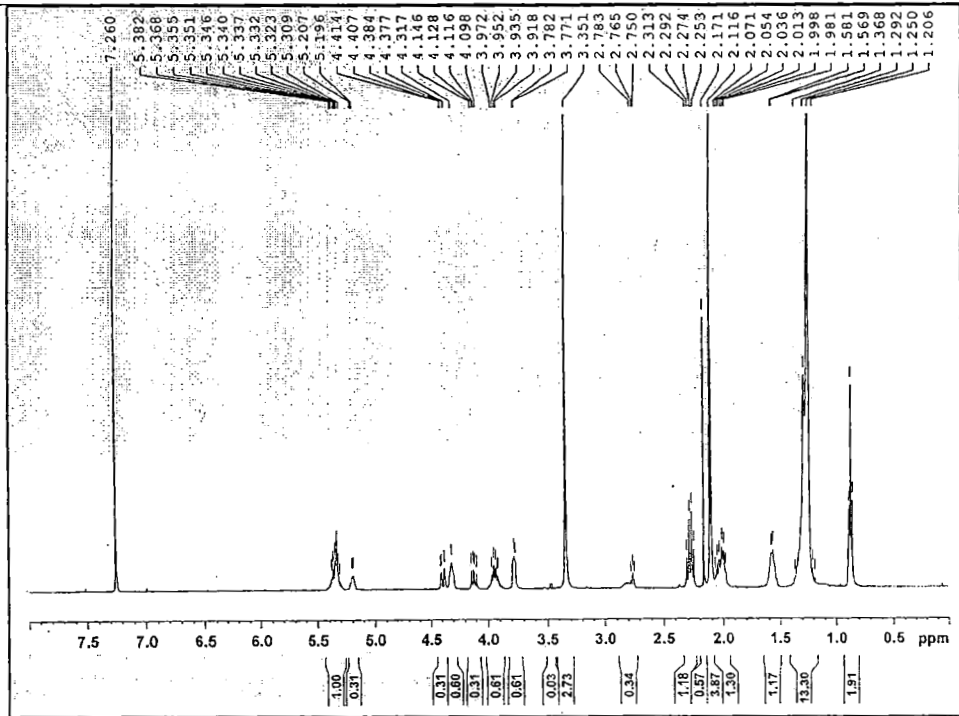
ตารางที่ 4-2 แสดงผลน้ำหนักของลิพิดที่ถูกชะทั้ง 4 ส่วน

ส่วนของตัวทำละลายที่ถูกชะ	น้ำหนักของลิพิด(กรัม)	
	น้ำเชื่อมสด	น้ำเชื่อม แข็งแรง 24 ชั่วโมง
ส่วนของไตรเอซิลกลีเซอรอลที่ถูกชะด้วยไดคลอโรมีเทน	0.0520±0.0165	0.0105±0.0034
ส่วนของคลอเลสเทอรอลที่ถูกชะด้วยไดคลอโรมีเทน	0.0100±0.0021	0.0043±0.0012
ส่วนของคลอเลสเทอรอลที่ถูกชะด้วยอะซิโตน	0.0053±0.0011	0.0182±0.0014
ฟอสโฟลิพิดที่ถูกชะด้วยเมทานอล	0.0150±0.0013	0.0125±0.0014
รวม	0.0823±0.0210	0.0125±0.0014

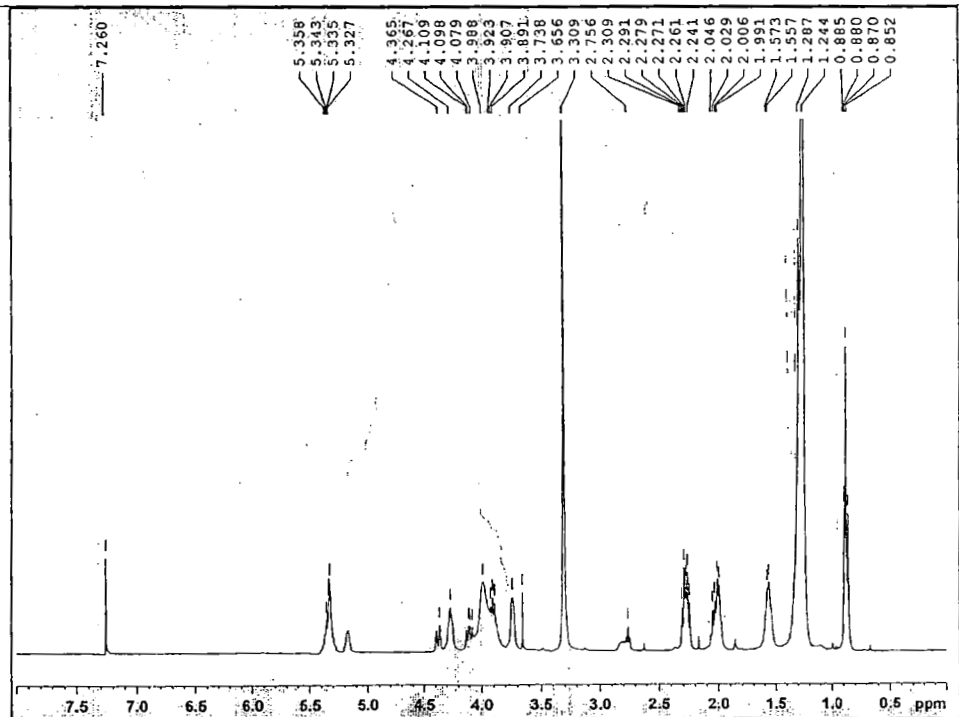
หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง

จากนั้นนำไตรเอซิลกลีเซอรอล, คลอเลสเทอรอล และฟอสโฟลิพิดจากตัวอย่างที่แยกได้ด้วยเทคนิค Silica column chromatography มาทำการยืนยันผลอีกครั้งด้วย NMR เปรียบเทียบกับลิพิดมาตรฐาน (รูปที่ 4-3 ถึง 4-5) พบว่าสเปกตรัมของไตรเอซิลกลีเซอรอล, คลอเลสเทอรอล และฟอสโฟลิพิดที่แยกด้วยเทคนิค silica gel column chromatography ไม่แตกต่างจากสเปกตรัมของลิพิดมาตรฐาน จากนั้นเปรียบเทียบผลสเปกตรัมของฟอสโฟลิพิดของตัวอย่างน้ำเชื่อมปลากระพงขาวที่แยกด้วยเทคนิค silica gel column chromatography ผลการทดลองพบว่าสเปกตรัมของฟอสโฟลิพิดของน้ำเชื่อมปลากระพงขาว ไม่แตกต่างจากสเปกตรัมของฟอสโฟลิพิดมาตรฐาน ดังแสดงผลในรูปที่ 4-6 จากนั้นจึงนำส่วนฟอสโฟลิพิดของน้ำเชื่อมปลากระพงขาว ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อเซลล์สเปิร์มไปวิเคราะห์กรดไขมัน

สเปกตรัมNMR ของฟอสโฟลิพิดมาตรฐานที่ไม่ได้โหนดลงคอลัมน์

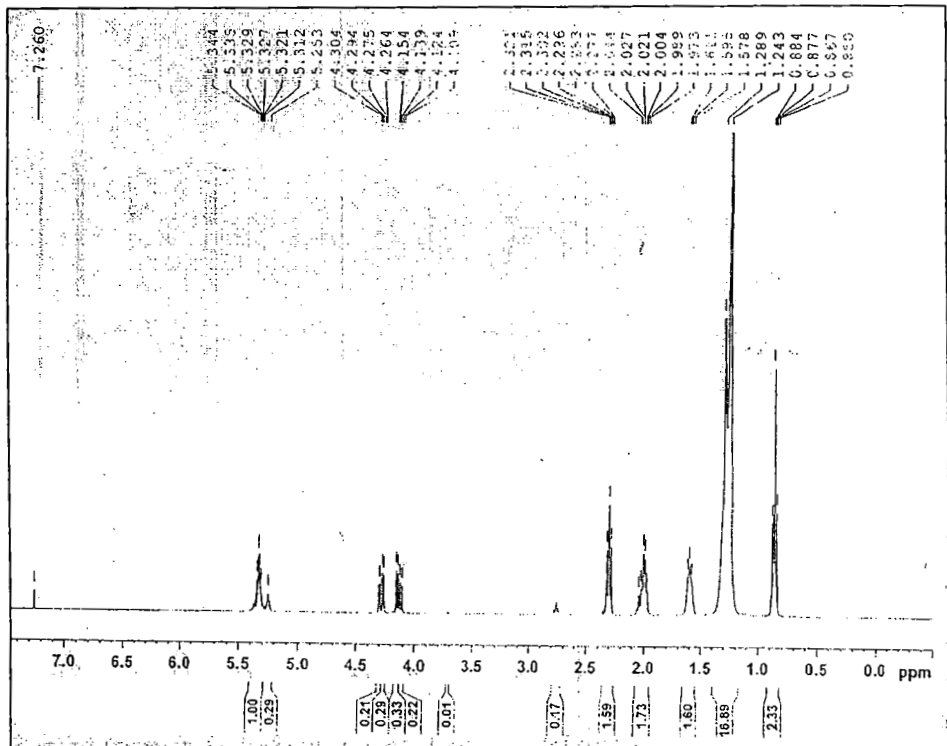


สเปกตรัมNMR ของฟอสโฟลิพิดมาตรฐานที่ชะจากคอลัมน์

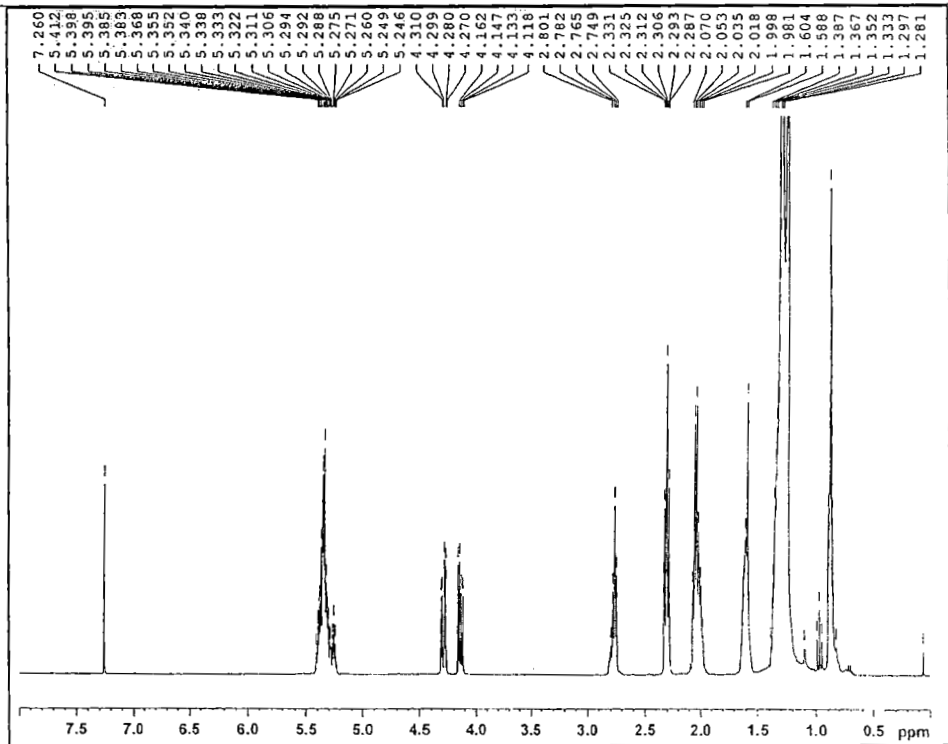


รูปที่ 4-3 แสดงสเปกตรัมNMR ของฟอสโฟลิพิดมาตรฐาน

สเปกตรัม NMR ของ ไดเอซิลกริเซอรอลมาตรฐานที่ไม่ได้ไหลคลงคอลัมน์

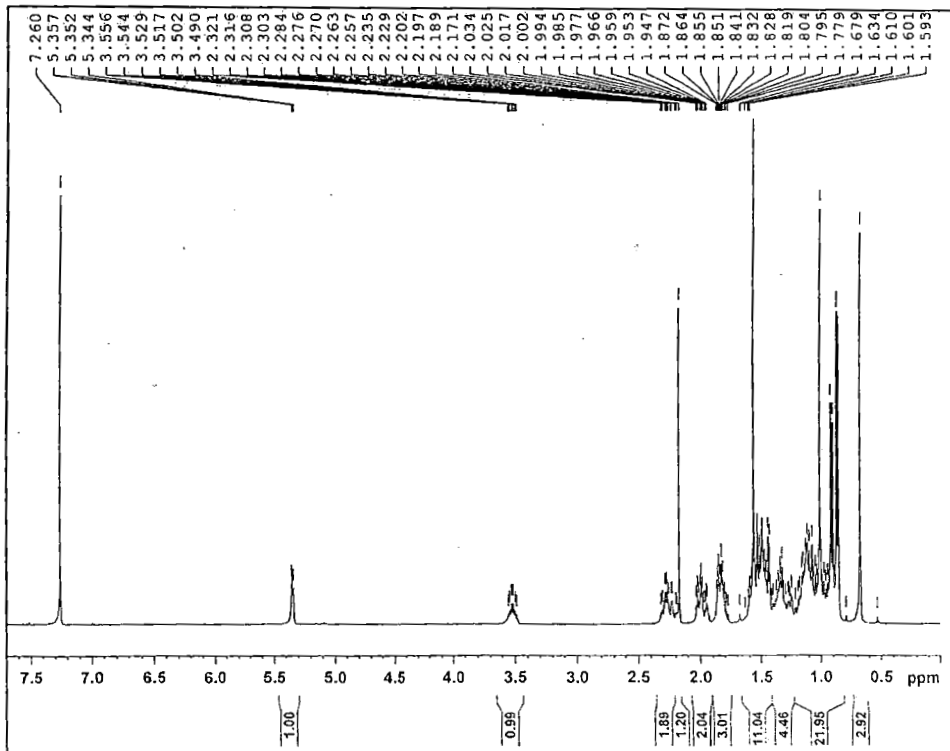


สเปกตรัม NMR ของ ไดเอซิลกริเซอรอลมาตรฐานที่ชะจากคอลัมน์

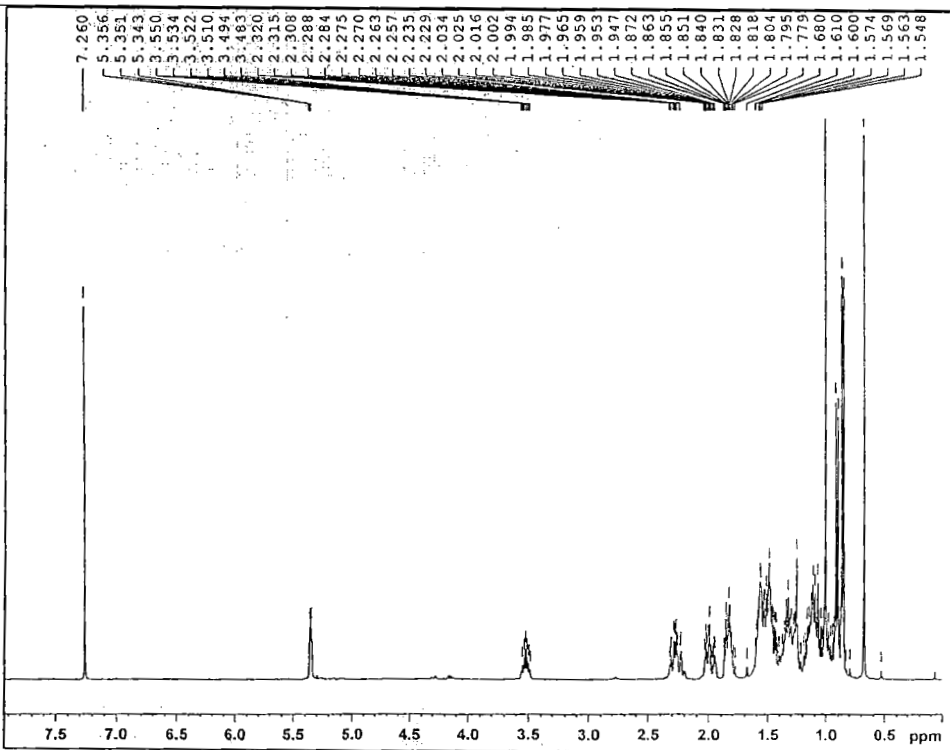


รูปที่ 4-4 แสดงสเปกตรัม NMR ของ ไดเอซิลกริเซอรอลมาตรฐาน

สเปกตรัม NMR ของคลอเลสเตอรอล มาตรฐานที่ไม่ได้ไหลคลงคอลัมน์

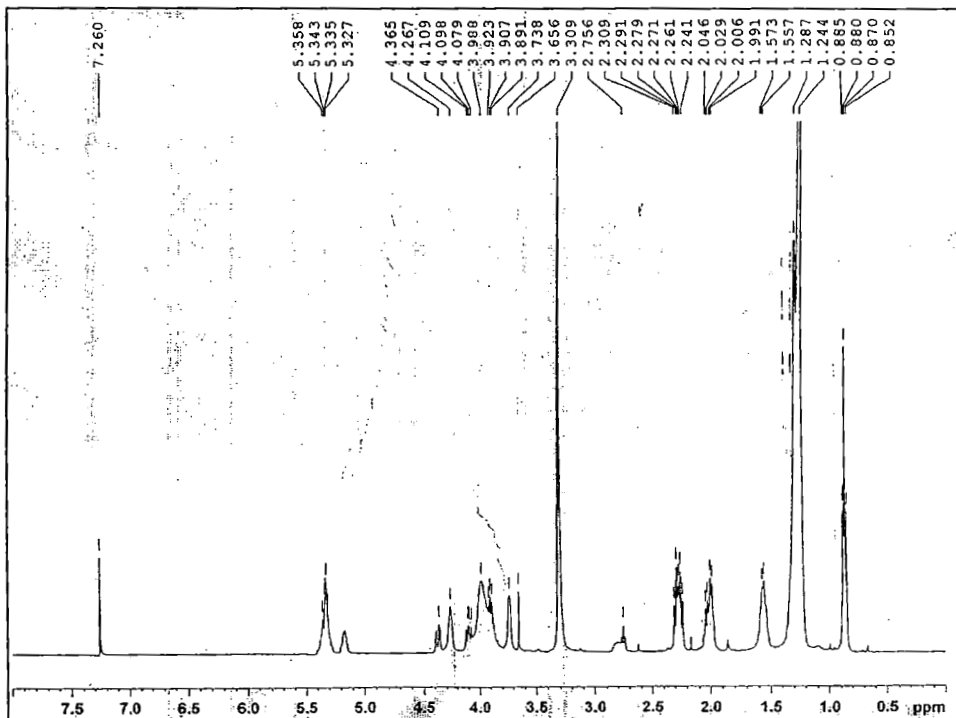


สเปกตรัม NMR ของคลอเลสเตอรอลมาตรฐานที่ชะจากคอลัมน์

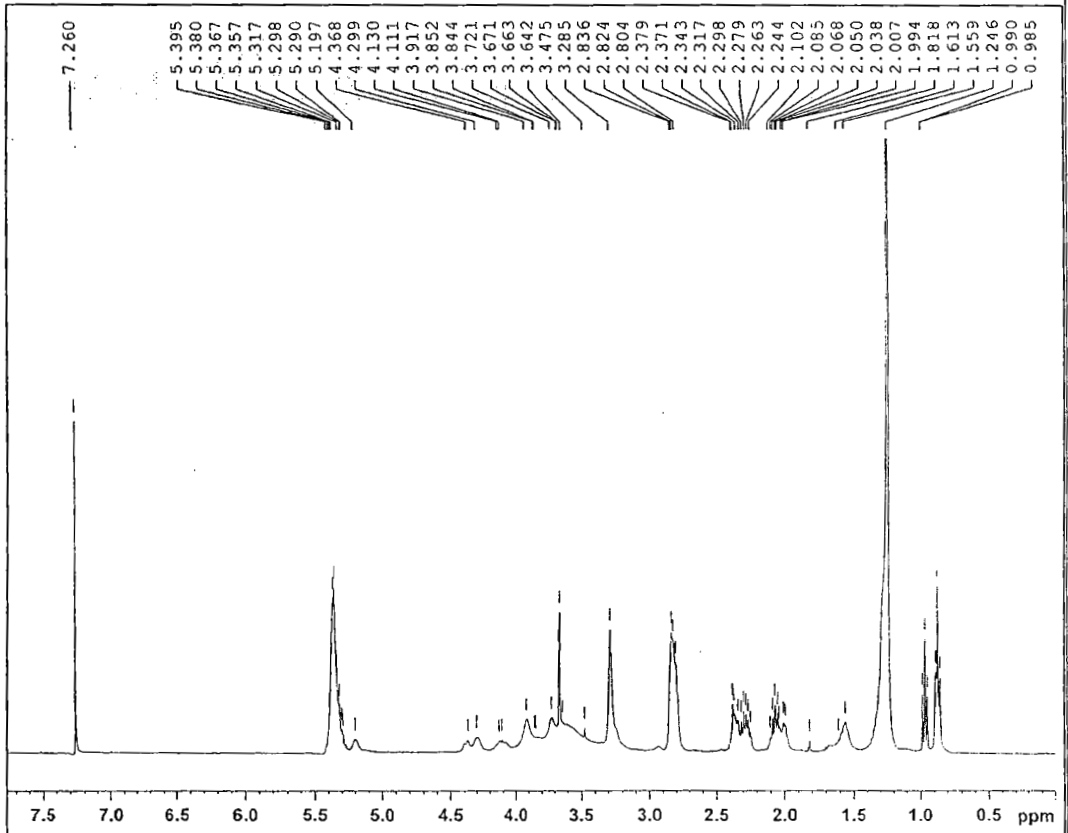


รูปที่ 4-5 แสดงสเปกตรัม NMR ของคลอเลสเตอรอล มาตรฐาน

สเปกตรัม NMR ของฟอสโฟลิพิดมาตรฐานที่ชะจากคอลัมน์



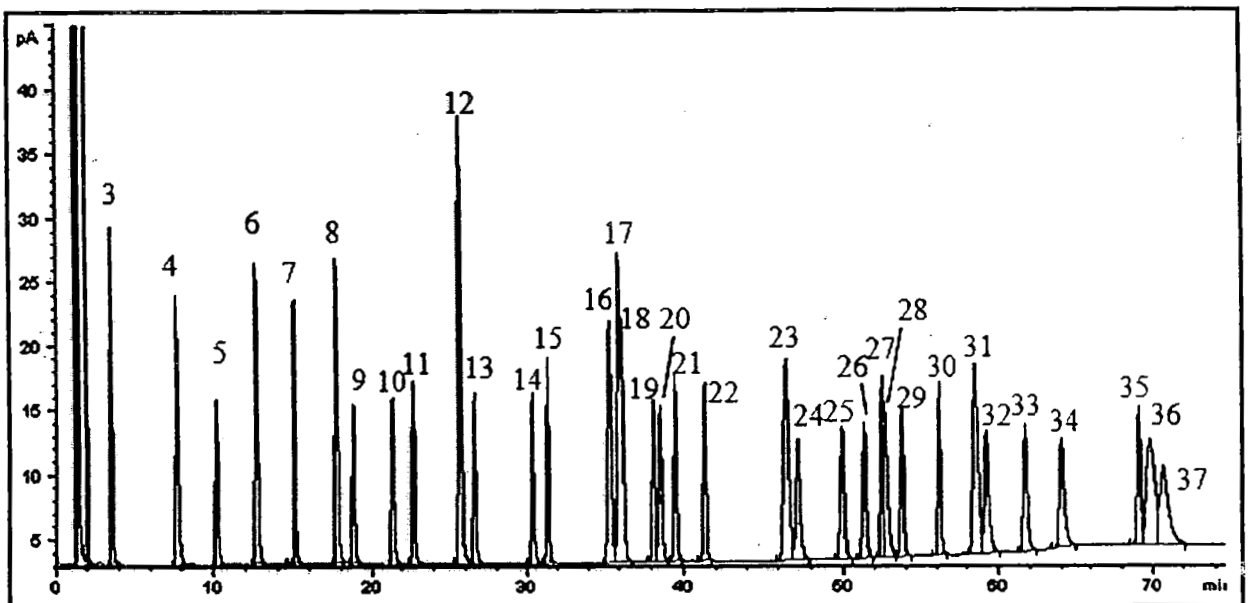
สเปกตรัม NMR ของฟอสโฟลิพิดจากตัวอย่างสเปิร์มปลากะพงที่ชะจากคอลัมน์



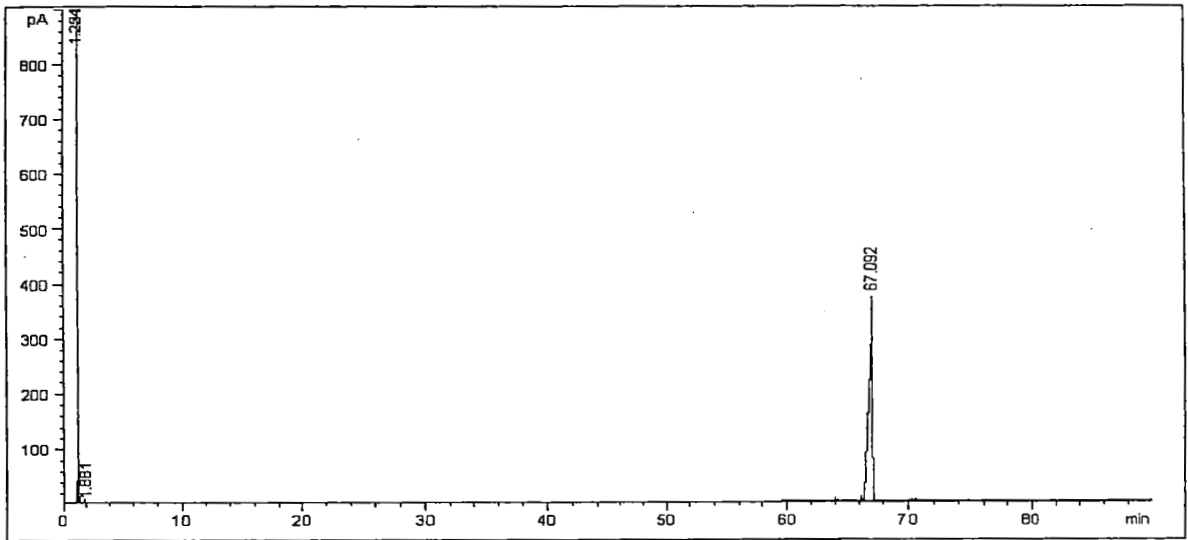
รูปที่ 4-6 แสดงสเปกตรัม NMR ของฟอสโฟลิพิดจากตัวอย่างสเปิร์มปลากะพงขาว

4.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณกรดไขมันโดยเครื่อง Gas chromatography

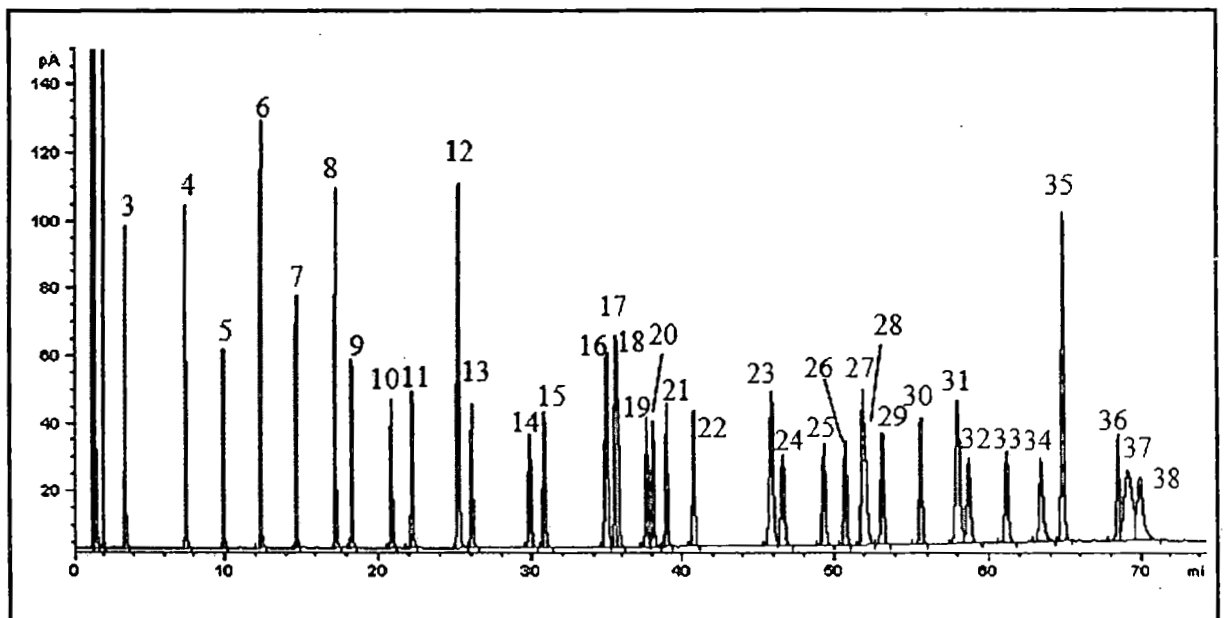
จากการแยกสกัดด้วยเทคนิค Silica column chromatography แล้ว นำเพียงส่วนของฟอสโฟลิพิดมาวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบกรดไขมัน โดยจะนำมาทำ Transesterification เพื่อวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของกรดไขมันโดยเครื่อง Gas Chromatography ซึ่งจากการวิเคราะห์กรดไขมันมาตรฐานโดยสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี การวิเคราะห์กรดไขมันมาตรฐาน 39 ชนิด ได้ดังแสดงในรูปที่ 4-7 ถึง 4-11 และแสดงค่า Retention time (RT) ในตารางที่ 4-3



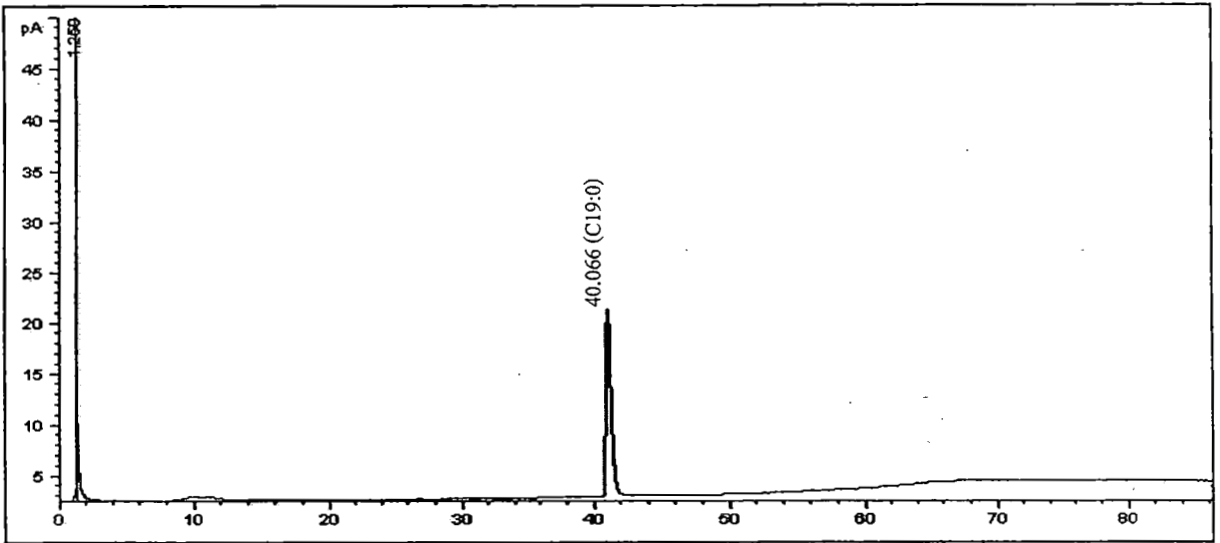
รูปที่ 4-7 แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันมาตรฐาน FAME mix standard



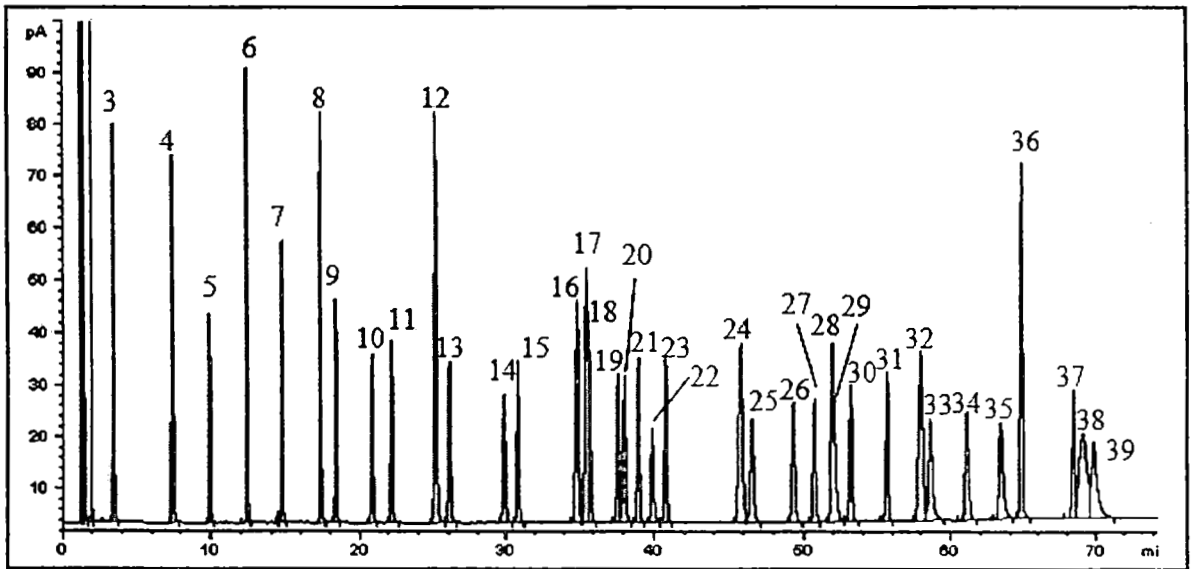
รูปที่ 4-8 แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันมาตรฐาน DPA



รูปที่ 4-9 แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันมาตรฐาน FAME mix standard และ DPA



รูปที่ 4-10 แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันมาตรฐาน Nonadecanoic acid (C19:0) ซึ่งเป็น internal standard



รูปที่ 4-11 แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันมาตรฐาน FAME mix standard, DPA และ nonadecanoic acid

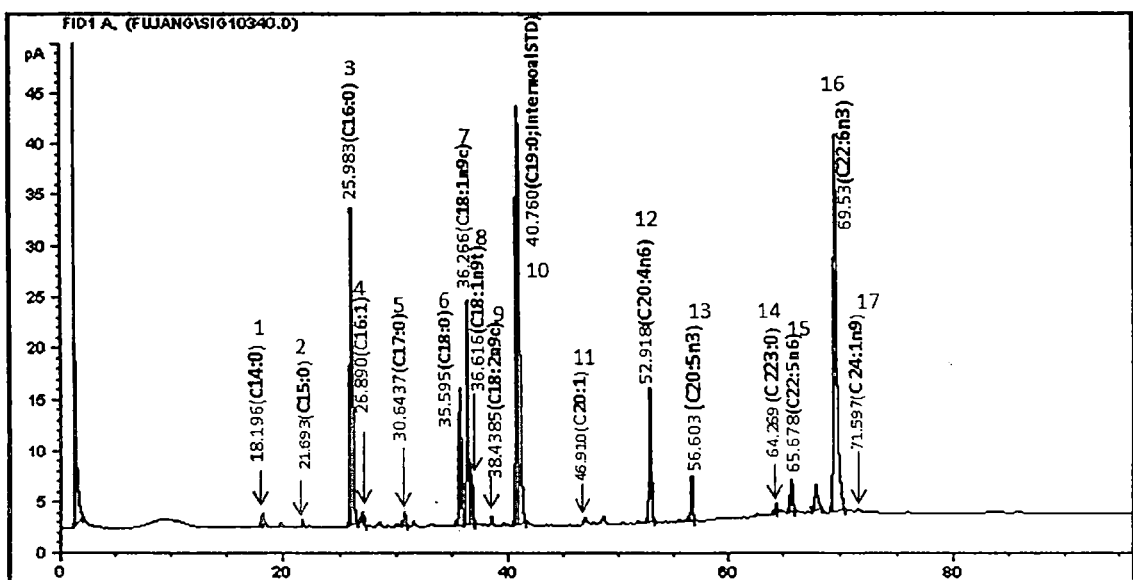
ตารางที่ 4.3 Retention time ของกรดไขมันมาตรฐาน

ลำดับ	กรดไขมัน	สูตรอย่างย่อ	Retention time
1	Butyric acid methyl ester	C4:0	NI
2	Caproic acid methyl ester	C6:0	NI
3	Caprylic methyl ester	C8:0	3.409
4	Capric acid methyl ester	C10:0	7.366
5	Undecanoic acid methyl ester	C11:0	9.861
4	Lauric acid methyl ester	C12:0	12.339
3	Undecanoic acid methyl ester	C11:0	14.694
8	Myristic acid methyl ester	C14:0	17.278
9	Myristoleic acid methyl ester	C14:1	18.304
10	Pentadecanoic acid methyl ester	C15:0	20.799
11	cis- 10 Pentadecanoic acid methyl ester	C15:1	22.138
12	Palmitic acid methyl ester	C16:0	25.131
12	Palmitoleic acid methyl ester	C16:1	26.034
10	Heptadecanoic acid methyl ester	C17:0	29.799
15	cis- 10 Heptadecanoic acid methyl ester	C17:1	30.784
10	Stearic acid methyl ester	C18:0	34.839
17	Oleic acid methyl ester	C:18:1n9c	35.464
10	Elaidic acid methyl ester	C18:1n9t	35.641
19	Linolelaidic acid methyl ester	C18:2 n6t	37.583
10	Linoleic acid methyl ester	C18:2 n6c	38.025
21	Linolenic acid methyl ester	C18:3 n6	38.960
21	Nonadecanoic acid methyl ester	C19:0	34.839
23	Linolenic acid methyl ester	C18:3 n3	40.742
24	Arachidic acid methyl ester	C20:0	45.803
25	Cis- 111-Eicosenoic acid methyl ester	C20:1	46.542
26	Cis-11,14-Eicosadienoic acid methyl ester	C20:2	49.310

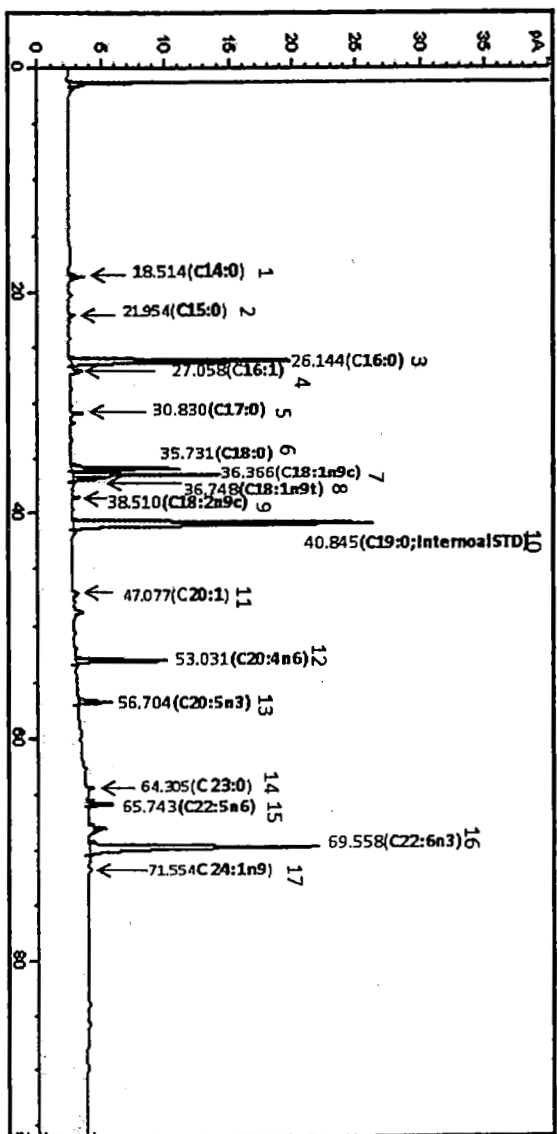
ลำดับ	กรดไขมัน	สูตรอย่างย่อ	Retention time
27	cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid methyl ester	C20:3 n6	50.707
28	Heneicosanoic acid methyl ester	C21:0	51.869
29	Arachidonic acid methyl ester	C20:4 n6	52.001
30	cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid methyl ester	C20:3 n6	53.106
30	Cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid methyl ester	C20:5n3	50.707
32	Behenic acid methyl ester	C22:0	57.941
32	Erucic acid methyl ester	C22:1n9	58.590
34	Cis-13,16-Docosadienoic acid methyl ester	C22:2	61.081
35	Tricosanoic acid methyl ester	C22:0	63.373
36	Docosapentaenoic acid methyl ester	22:5n6	64.834
37	cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid methyl ester	C22:6 n3	68.420
38	Lignoceric acid methyl ester	C24:0	69.091
39	Nervonic acid methyl ester	C24:1	69.825

การวิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบกรดไขมันในสเปิร์มปลากะพงขาวตัวอย่าง ทำได้โดย นำโครมาโตแกรมของตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับค่า RT กับโครมาโตแกรมของกรดไขมันมาตรฐานในรูปแบบทิลเอสเทอร์ (FAME mix standard) โดยพิจารณาจากค่า RT ที่มีความใกล้เคียงกัน ก็จะทราบชนิดของกรดไขมันที่พบในสเปิร์มปลากะพงขาวแต่ละตัวอย่าง ซึ่งพบว่า กรดไขมันที่พบในตัวอย่างสเปิร์มปลากะพงขาวมีทั้งหมด 16 ชนิด ดังตารางที่ 4-4 และคำนวณปริมาณกรดไขมันได้โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันในสารตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับ Internal standard (C19:0) ที่ทราบน้ำหนัก โดยแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน ซึ่งพบว่า กรดไขมันอิ่มตัวที่พบ

มากที่สุดคือ palmitic acid (C16:0) รองลงมาคือ stearic acid (C18:0) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวที่พบมากที่สุดคือ Oleic acid (C:18:1n9c) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนที่พบมากที่สุดคือ docosahexaenoic acid (DHA; C22:6n3) โดยเมื่อพิจารณาผลการเปรียบเทียบระหว่างน้ำเชื้อควบคุม กับน้ำเชื้อที่แช่แข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ากรดไขมันอิ่มตัว tricosanoic acid (C23:0) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวชนิด elaidic acid (C18:1n9t) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนชนิด DHA (C22:6n3) กับ DPA (22:5n6) ในสเปิร์มจากน้ำเชื้อแช่แข็งมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อควบคุม (ตารางที่ 4 ; $p < 0.05$) ในขณะที่กรดไขมันอิ่มตัว palmitic acid (C16:0) มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อควบคุม ส่งผลให้ผลรวมของกรดไขมันอิ่มตัวเพิ่มขึ้นเมื่อทำการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ผลรวมของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนลดลงเมื่อทำการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นจึงทำให้อัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวมีปริมาณลดลงเมื่อทำการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่ 4-12 แสดง โครมาโตแกรมของกรดไขมันในสเปิร์มปลาทะเลพงขาวชุดควบคุม



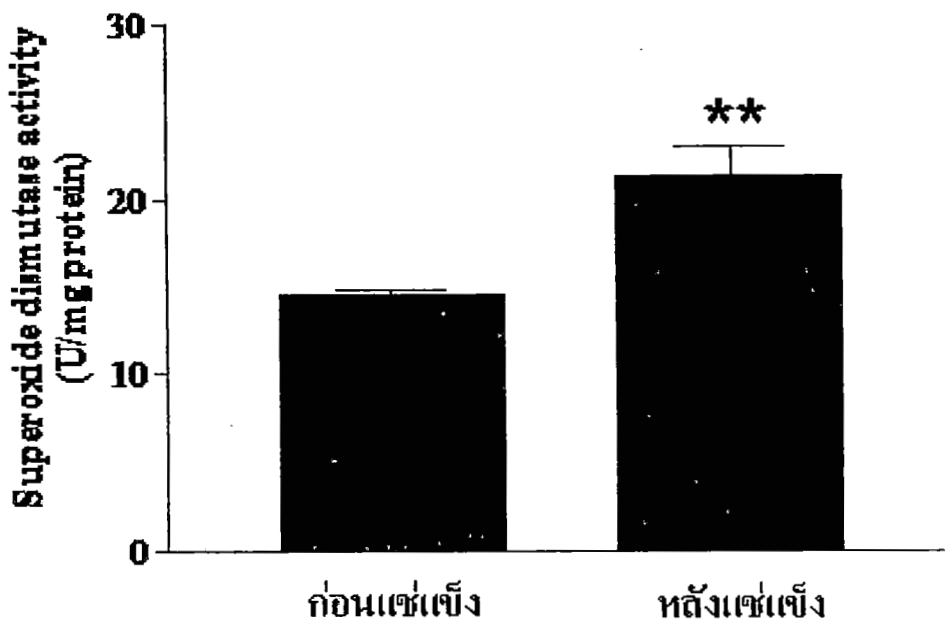
รูปที่ 4-13 แสดงโครมาโทแกรมของกรดไขมันในสเปิร์มปลาทะเลที่แช่แข็ง

ตารางที่ 4.4 แสดงองค์ประกอบและปริมาณของกรดไขมันที่พบในสเปิร์มปลากระพงขาวควบคุมและน้ำเชื้อแช่แข็ง

กรดไขมัน	น้ำเชื้อควบคุม	น้ำเชื้อแช่แข็ง	ระดับนัยสำคัญทางสถิติ
กรดไขมันอิ่มตัว			
ผลรวมของไขมันอิ่มตัว	32.04±2.26	37.69±1.55	p =0.023
C14:0	0.35±0.04	0.38±0.04	p=0.827
C14:0	0.25±0.04	0.25±0.02	p=0.861
C14:0	20.64±3.82	25.91±1.13	p =0.000
C14:0	0.78±0.03	0.74±0.06	p =0.279
C18:0	9.36±1.23	9.87±0.50	p =0.478
C14:0	0.66±0.06	0.54±0.05	p =0.000
กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว			
ผลรวมของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว	18.27±0.88	17.20±0.42	p =0.132
C16:1	0.82±0.12	0.82±0.04	p =0.986
C18:1n9c	13.56±0.69	12.92±0.20	p =0.316
C18:1n9c	3.12±0.16	2.71±0.10	p =0.001
C16:1	0.47±0.05	0.47±0.05	p =0.001
C16:1	0.29±0.04	0.27±0.07	p =0.244
กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน			
ผลรวมของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน	49.70±1.44	45.11±1.25	p =0.014
C18:2n6c	0.47±0.05	0.47±0.05	p =0.215
C13:2n6c	8.38±0.43	7.90±0.08	p =0.160
C20:5n3 (EPA)	2.39±0.13	2.24±0.03	p =0.116
C22:5n6 (DPA)	2.22±0.12	1.89±0.08	p =0.001
C22:6n3 (DHA)	36.23±1.77	32.64±1.20	p =0.012
อัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัว/กรดไขมันอิ่มตัว	2.13±0.22	1.66±0.11	p =0.030

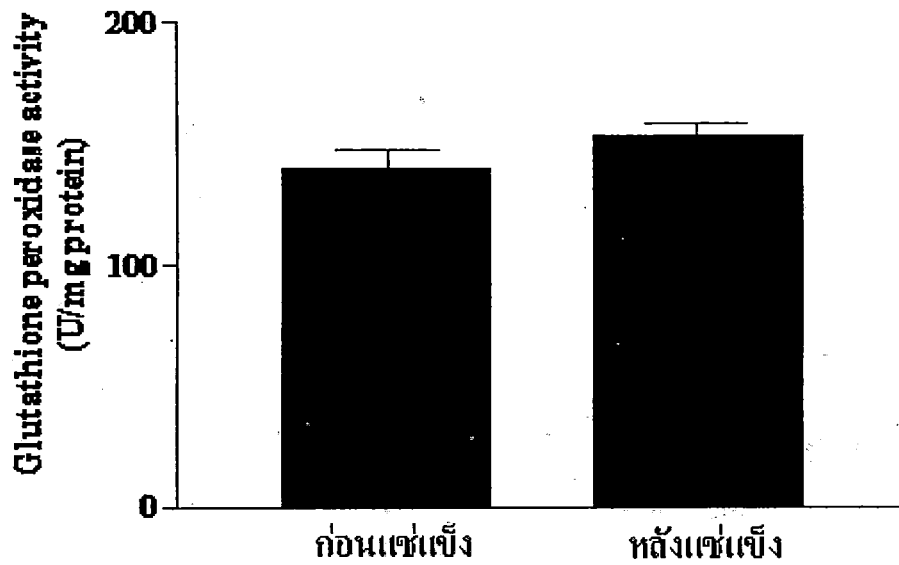
4.5 กิจกรรมของเอนไซม์ต้านออกซิเดชัน

เมื่อนำเซลล์สเปิร์มจากน้ำเชื้อก่อนแช่แข็งและหลังแช่แข็งนาน 24 ชั่วโมง มาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ต้านออกซิเดชันต่างๆ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ของสเปิร์มจากน้ำเชื้อก่อนแช่แข็งมีค่าเท่ากับ 14.53 ± 0.23 U/mg protein ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ SOD ของสเปิร์มจากน้ำเชื้อหลังแช่แข็งมีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) คือ เท่ากับ 21.32 ± 1.71 U/mg protein (รูปที่ 4-14) กิจกรรมของเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) ของสเปิร์มจากน้ำเชื้อก่อนแช่แข็งมีค่าเท่ากับ 139.96 ± 7.72 U/mg protein ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ GPx ของสเปิร์มจากน้ำเชื้อหลังแช่แข็งมีค่าเท่ากับ 153.88 ± 5.27 U/mg protein (รูปที่ 4-15) ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ catalase (CAT) ของสเปิร์มจากน้ำเชื้อก่อนแช่แข็งมีค่าเท่ากับ 154.49 ± 7.19 U/mg protein ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ CAT ของสเปิร์มจากน้ำเชื้อหลังแช่แข็ง เท่ากับ 159.72 ± 17.16 U/mg protein (รูปที่ 4-16)

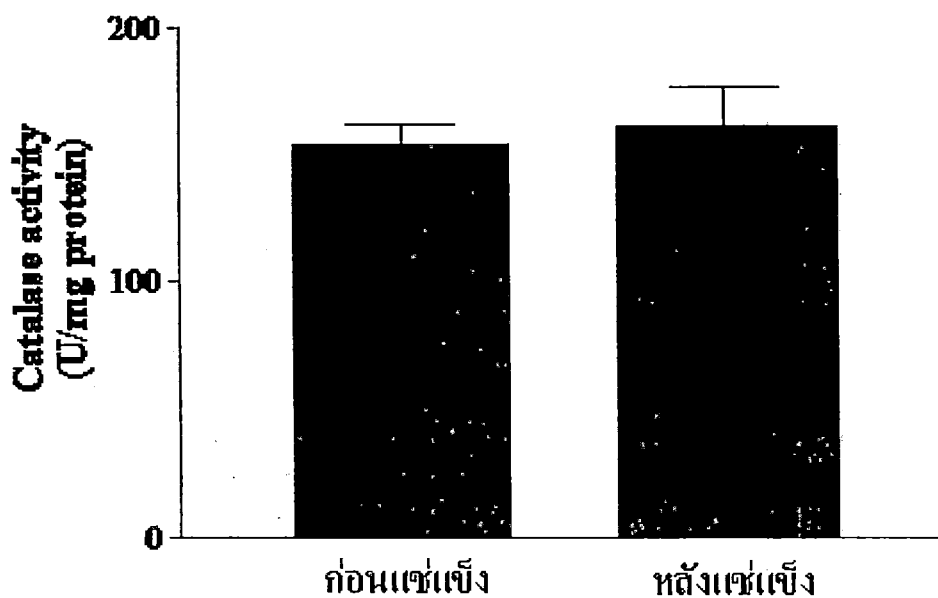


รูปที่ 4-14 กิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ของเซลล์สเปิร์มจากน้ำเชื้อก่อนแช่แข็งและหลังแช่แข็งนาน 24 ชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง

**($P < 0.01$) ก่อนแช่แข็ง vs หลังแช่แข็ง



รูปที่ 4-15 กิจกรรมของเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) ของเซลล์สเปิร์มจากน้ำเชื้อก่อนแข่งและหลังแข่งนาน 24 ชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง



รูปที่ 4-16 กิจกรรมของเอนไซม์ catalase (CAT) ของเซลล์สเปิร์มจากน้ำเชื้อก่อนแข่งและหลังแข่งนาน 24 ชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้รายงานการศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบและปริมาณกรดไขมันของเซลล์สเปิร์มปลากะพงขาวที่แช่แข็งและละลาย การใช้เทคโนโลยีการแช่แข็งนั้นจะเป็นประโยชน์สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อให้อยู่ได้ในระยะเวลาที่ยาวนาน แต่ปัญหาหนึ่งที่มักพบภายหลังจากการนำน้ำเชื้อที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งมาผสมเทียม พบว่าน้ำเชื้อมีคุณภาพต่ำลง ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การผสมเทียมไม่ประสบผลสำเร็จ การเก็บน้ำเชื้อในอุณหภูมิต่ำจะมีผลให้การรอดชีวิตและการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลง เช่น สเปิร์มของหมู (Cerolini และคณะ, 2001) สเปิร์มของม้าพ่อพันธุ์ (Brinsko และคณะ, 2005) และสเปิร์มของไก่วง (Zaniboni และ Cerolini, 2009) ผลการศึกษาของเรายืนยันการศึกษาเหล่านี้โดยพบว่าสเปิร์มปลากะพงที่ผ่านการแช่แข็งนาน 24 ชั่วโมง มีการเคลื่อนที่ลดเหลือ 51.84 ± 5.0 % หลังการแช่แข็ง

การเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งนี้มีผลกระทบต่อความสมบูรณ์ (integrity) ของเยื่อเซลล์สเปิร์ม และเกิดความเสียหายต่อเซลล์ ส่งผลให้การรอดชีวิตของเซลล์ (cell viability) การเคลื่อนที่ (motility) และความสามารถในการปฏิสนธิ (fertilization) ลดลง (Bailey et al., 2000) ซึ่งเหตุการณ์ที่การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและความสามารถในการปฏิสนธิลดลงหลังการแช่แข็งนี้เรียกว่า cold shock (Waterhouse et al., 2006) ลิพิดที่เป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อเซลล์สเปิร์ม คือฟอสโฟลิพิด (Lenzi et al., 1996) ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อความเหลว (fluidity) ของเยื่อเซลล์ (Sanucka และ Kurpisz, 2004) และเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ที่จะมีผลต่อความสามารถในการปฏิสนธิของสเปิร์ม (Park และ Lynch, 1992; Zaniboni และ Cerolini, 2009) ความเสียหายของเยื่อเซลล์อาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันที่เยื่อเซลล์ มีรายงานหลายฉบับที่แสดงให้เห็นว่าการแช่แข็งเซลล์สเปิร์มมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมัน (Cerolini et al., 2001; Chakrabarty et al., 2007; Zaniboni and

Cerolini, 2009) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของกรดไขมันในเซลล์สเปิร์มซึ่งเป็นปัจจัยที่กำหนดความเหลวของเยื่อเซลล์ และมีผลกระทบต่อการรอดชีวิต และการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม การวิเคราะห์องค์ประกอบจากฟอสโฟลิพิดที่แยกได้จากสเปิร์มปลากะพงขาวก่อนแช่แข็งกับหลังแช่แข็ง พบกรดไขมัน 16 ชนิด โดยกรดไขมันชนิดไขมันอิ่มตัวหลักได้แก่ palmitic acid (C16:0) ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาในสเปิร์มของปลาไน (อรณี กุนตง, 2551) ปลากะพงยุโรป (*Dicentrarchus labrax*) (Bell และคณะ, 1996) และปลาเรนโบว์เทราท์ (Labbé และ Meisse, 1996) ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบมากในปลากะพงขาวได้แก่ docosahexaenoic acid (DHA; C22:6n3) และ oleic acid (C18:1n9c) ซึ่งแตกต่างจากปลากะพงยุโรปและปลาเรนโบว์เทราท์เนื่องจากในสเปิร์มของปลาสองชนิดนี้พบกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนได้แก่ eicosapentaenoic acid (C20:5 n-3) และ docosahexaenoic acid (C22:6 n-3) ซึ่งการพบกรดไขมันหรือปริมาณกรดไขมันที่แตกต่างกันไปในนั้นขึ้นอยู่กับแหล่งการเจริญเติบโตของปลาแต่ละชนิด พันธุกรรม อาหาร สภาพแวดล้อม อุณหภูมิของน้ำ ความเป็นกรดหรือเบสเป็นต้น ซึ่งอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้ปลากะพงขาวมีชนิดของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนที่แตกต่างจากปลาหรือสัตว์ชนิดอื่นๆ ได้ การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของสเปิร์มจากน้ำเชื้อปลากะพงขาวพบว่าสัดส่วนของกรดไขมันอิ่มตัว ได้แก่ palmitic acid (C16:0) มีมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) หลังจากทำการแช่แข็ง และสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ได้แก่ DHA (C22:6n3) และ DPA (C22:5n6) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) หลังจากทำการแช่แข็ง ดังนั้นจึงส่งผลทำให้อัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4 ; $p < 0.05$) โดยการลดลงของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายยาวอาจเกิดจากผลกระทบจากการแช่แข็งและการละลายส่งผลให้เกิดภาวะความเครียดกับเยื่อเซลล์สเปิร์มทำให้เกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน และทำให้เซลล์สเปิร์มสูญเสียความสามารถในการเคลื่อนที่ เนื่องจากในขณะที่เซลล์ถูกเก็บที่อุณหภูมิต่ำ พบว่าเซลล์สเปิร์มยังคงมีกระบวนการเมแทบอลิซึม (Zaniboni และ Cerolini, 2009; Chen et al., 2010)

นอกจากนี้เซลล์สเปิร์มสามารถแลกเปลี่ยนกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบกับสิ่งแวดล้อม เช่น สารละลายหรือบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการแช่แข็งได้ (Cerolini และคณะ, 2001)

ในขณะที่มีการแช่แข็ง น้ำเชื้อจะสัมผัสกับ cold shock และออกซิเจนในอากาศ ทำให้ไวต่อการเกิดภาวะความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เนื่องจากมีการผลิต reactive species (RS) มากขึ้น (Lahnsteiner et al., 2010; Nair et al., 2006; Chen et al., 2010) ส่งผลให้เกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันเพิ่มขึ้น เนื่องจากเยื่อเซลล์สเปิร์มมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง มีผลทำให้เยื่อเซลล์สเปิร์มเกิดความเสียหาย และนำไปสู่การลดลงของการเคลื่อนที่และความสามารถในการปฏิสนธิของสเปิร์ม ในขณะที่เซลล์ที่ถูกเก็บที่อุณหภูมิต่ำ พบว่าเซลล์สเปิร์มยังคงมีกระบวนการเมแทบอลิซึม (Zaniboni และ Cerolini, 2009) ระบบต้านออกซิเดชันภายในสเปิร์มจะทำงานเพื่อควบคุมปริมาณ reactive species ที่เกิดขึ้น เพื่อป้องกันความเสียหายจากออกซิเดชันที่จะเกิดขึ้นกับเซลล์ โดยเอนไซม์หลักที่ใช้ในการต้านออกซิเดชันในน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์มและเซลล์สเปิร์ม คือ superoxide peroxidase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) และ catalase (CAT) (Gadea et al., 2004; Lahnsteiner et al., 2010; Lahnsteiner and Mansour, 2010) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ระบบเอนไซม์ต้านออกซิเดชันในเซลล์สเปิร์มของปลากะพงขาว คือ SOD, GPx และ CAT โดยเอนไซม์ SOD ในเซลล์สเปิร์มมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเมื่อน้ำเชื้อผ่านการแช่แข็ง แต่กิจกรรมของเอนไซม์ GPx และ CAT ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเซลล์สเปิร์มผ่านการแช่แข็ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาในสเปิร์มของปลา brown trout (*Salmo trutta fario*) ซึ่งถูกเก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีกิจกรรมของเอนไซม์ต้านออกซิเดชันไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อก่อนแช่แข็ง ในขณะที่มีปริมาณลิพิดเปอร์ออกซิเดชันเพิ่มขึ้น โดยพบว่าระบบต้านออกซิเดชันหลักในสเปิร์มและน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์มของปลา brown trout เป็น uric acid ไม่ใช่เอนไซม์ต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิด (Lahnsteiner et al., 2010) ผลการศึกษาของเราจึงมีความแตกต่างจากรายงานของ Chen และคณะ (2010) ที่พบว่า การแช่แข็งสเปิร์มของ

ปลา red seabream (*Pagrus major*) ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ SOD และ CAT ลดลงตามระยะเวลาที่เก็บแช่แข็ง จาก 1-73 เดือนแต่มีปริมาณลิพิดเปอร์ออกซิเดชันเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษามีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามควรจะมีการศึกษาปริมาณการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในน้ำเชื้ก่อนและหลังแช่แข็ง รวมทั้งองค์ประกอบการต้านออกซิเดชันอื่นๆ เพิ่มเติม

ผลการทดลองที่ได้สามารถสรุปได้ว่าองค์ประกอบของกรดไขมันจากสเปิร์มของน้ำเชื้อปลากระพงขาวที่ผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมงไป palmitic acid (C16:0) ในน้ำเชื้อแช่แข็งมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อก่อนแช่แข็ง กับส่วนปริมาณกรดไขมันที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังจากแช่แข็ง ได้แก่ tricosanoic acid (C23:0), DHA (C22:6n3), docosapentaenoic acid (DHA; C22:5n6) และ elaidic acid (C18:1n9t) ส่งผลให้อัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวหลังจากแช่แข็งมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ต้านออกซิเดชัน superoxide peroxidase มีการเพิ่มขึ้นในสเปิร์มของน้ำเชื้อปลากระพงขาวที่ผ่านการแช่แข็ง ส่วนเอนไซม์ glutathione peroxidase และ catalase ไม่เปลี่ยนแปลงดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาหรือปรับปรุงวิธีในการแช่แข็งและละลายเพื่อให้ได้น้ำเชื้อที่มีคุณภาพและสามารถนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ปลากระพงขาวได้

บรรณานุกรม

- กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ดาวัลย์ ฉิมภู. 2550. ชิวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิธิยา รัตนปิ่นนธ์. 2539. เลี้ยงอาหาร. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ประดิษฐ์ มิสุข. 2538. คู่มือปฏิบัติการเคมีอินทรีย์และชีวเคมีเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : โอเคียนสโตร์.
- พจน์ ศรีบุญถือ. 2543. ตำราชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 3. ขอนแก่น : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พลชาติ ผิวณ. 2546. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำในรูปเชื้อแช่แข็ง. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์สัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ.
- พิทักษ์ สุตรอนันต์. 2548. การแยกและการหาปริมาณกรดอะซิติก กรดบิวทิริก อะซีโตนบิวทานอล และเอธานอลโดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี. เอกสารประกอบการสอนเทคนิคทางชีวเคมี 1 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- มนตรี จุฬาวัดฒนทล. 2543. ชิวเคมี. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- รัชฎา แก่นสาร. 2542. ชิวเคมี. กรุงเทพฯ : บริษัทประชุมช่าง.
- สวัสดิ์ วงศ์สมนึก และสุจินต์ มณีวงศ์. 2516. การทดลองเพาะพันธุ์ปลากะพงขาว *Lates calcarifer* (BLOCH) โดยวิธีผสมเทียม. รายงานผลการปฏิบัติงานทางวิชาการประจำปี 2516-2517. สถาบันประมงทะเลสงขลา กรมประมง.
- อรณี กุนตง. 2551. การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำเชื้อปลาไนที่เก็บแช่เย็น. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

อุทัยรัตน์ ฌ นคร .2531. การเพาะขยายพันธุ์ปลา. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์.

Bailey, J.E., Bilodeau, J.F., Cormier, N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging
and capacitating phenomenon. *J Androl* 21: 1-7.

Billard, R., Cosson, J., Crim, L.W. and Suquet, M. (1995). Sperm physiology and quality. In:
Broodstock management and egg and larval quality. Edited by N.R. Bromage and R.J. Roberts.
Blackwell Science, London, pp. 25-52.

Bolodeau JF., Chatterjee S., Sirard MA., Gagnon C. 2000. Levels of antioxidant defense are decreased
in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev.* 55: 282-288.

Brinsko, S.P., Varner, D.D., Love, C.C., Blanchard, T.L., Day, B.C., Wilson, M.E. 2005. Effect of
feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen.
Theriogenology. 63: 1519-1527.

Cerolini S., Maldjian A., Pizzi F., Gliozzi TM. 2001. Changes in sperm quality and lipid composition
during cryopreservation of boar semen. *Reproduction.* 121:395-401.

Cerolini, S. et. al. 2001. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation
of boar semen. *Reproduction* 121 : 395-401.

Chakrabarty, J., Banerjee, D., Pal, D., De, j., Ghosh, A., Majumder, G.C. 2007. Shedding off
specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. *Cryobiology*, 54:
27-54.

Chen, Y.K., et al., 2010. Effect of long-term cryopreservation on physiological characteristics,
antioxidant activities and lipid peroxidation of red seabream (*Pagrus major*) sperm.

Cryobiology, 61: 189-193.

Folch, J., Lees, M. and Stanley SGH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *Journal of Biology and chemistry* 226 : 38-45.

Kankofer M, Kolm G, Aurich J, Aurich C. 2005. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 degrees C. *Theriogenology*. 63: 1354-1365.

Kim, J.Y. et. al. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction* 122 : 131-138.

Labbe, C. and Maisse, G. 1996. Influence of rainbow trout thermal acclimation on sperm cryopreservation : relation to change in the lipid composition of the plasma membrane. *Aquaculture*. 145 : 281-294.

Lahnsteiner and Mansour N. 2010. A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, cyprinidae and Lotidae for improving semen storage techniques. *Aquaculture*. 307:130-140.

Lahnsteiner, F. et al. 2010. Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) semen. *Animal Reproduction Science*. 119: 314-321.

Latchoumycandane, C., K.C. Chitra, P.P. Mathur. 2002. The effect of methoxychlor on the epididymal antioxidant system of adult rats. *Reproductive Toxicology*. 16: 161-

Lenzi, A. Picardo, M., Gandini, L., Dondero, F. 1996. Lipids of sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acid considered as markers of sperm function to possible scavenger

Suquet, M., Dreanno, C., Dorange, G., Normant, Y., Quemener, L., Gaignon, J.L. and Billard, R. 1998.

The ageing phenomenon of turbot spermatozoa: effects on morphology, motility and concentration, intracellular ATP content, fertilization, and storage capacities. *Journal of Fish Biology* 52: 31-41.

Vuthiphandchai, V. and Zohar, Y. 1999. Age-related sperm quality of captive striped bass, *Morone saxatilis*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 30: 65-72.

Waterhouse, K.E., Hofmo, P.O., Tverdal, A., Miller Jr, R.R. 2006. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction research*, 131: 887-894.

Yoo BY., Ryan MA., Wiggs AJ. 1987. Loss of protein from spermatozoa of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) because of cryopreservation. *Can J Zool*. 65:9-13.

Zaniboni, L., Cerolini, S. 2009. Liquid storage of turkey semen: changes in quality parameters, lipid composition and susceptibility to induced in vitro peroxidation in control, n-3 fatty acids and alpha-tocopherol rich spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. 112 :51-65.