ผลของโปรเจสเตอโรนที่เคลือบด้วยกรดพอลิแลคไทด์โคไกลโคไลด์ต่อการพัฒนารังไข่กุ้งขาวแวนนาไม *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931

นางสาวชนัดดา เกษมโชติช่วง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF PROGESTERONE IN POLY (LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) ACIDS MICROENCAPSULATION ON OVARIAN DEVELOPMENT OF PACIFIC WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931

Miss Chanudda Kasamechochoung

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Marine science

Department of Marine science

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkron University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของโปรเจสเตอโรนที่เคลือบด้วยกรดพอลิแลคไทด์โคไกลโคไลด์ต่อการพัฒนารังไข่กุ้งขาวแวนนาไม *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931
โดย	นางสาวชนัดดา เกษมโชติช่วง
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตรจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.อรพร หมื่นพล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยอนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เจริญ นิติธรรมยง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร.อรพร หมื่นพล)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรณพ วิยกาญจน์)

ชนัดดา เกษมโชติช่วง : ผลของโปรเจสเตอโรนที่เคลือบด้วยกรดพอลิแลคไทด์โคไกลโคไลด์ต่อการพัฒนารังไข่กุ้งขาวแวนนาไม *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 (EFFECTS OF PROGESTERONE IN POLY (LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) ACIDS MICROENCAPSULATION ON OVARIAN DEVELOPMENT OF PACIFIC WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ. ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ดร. อรพร หมื่นพล. 79 หน้า

การศึกษาผลของโปรเจสเตอโรนที่เคลือบด้วยกรดพอลิแลคไทด์โคไกลโคไลด์ต่อการพัฒนารังไข่แม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม การผลิตเม็ดแคปซูลเพื่อตรึงฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วย PLGA ใช้เทคนิค Oil-in-water single emulsion solvent evaporation ที่ความเข้มข้นของ PLGA 5, 7.5 และ 10 % ผลผลิตที่ได้ (% yield) เท่ากับ 92.76, 92.10 และ 91.77% และความสามารถในการตรึงฮอร์โมน (% Encapsulation efficiency) เท่ากับ 89.02, 94.06 และ 95.51% ซึ่งปริมาณผลผลิตและความสามารถในการตรึงฮอร์โมนไม่ต่างกัน จึงเลือกความเข้มข้น PLGA 5% ที่มีความสามารถในการตรึงฮอร์โมนเท่ากับ 89% และขนาดเม็ดอยู่ที่ 21-40 µm จากการศึกษาอัตราการปลดปล่อยฮอร์โมน (release rate) เม็ดแคปซูลสามารถปลดปล่อย P4 ได้มากที่สุดที่ pH 5.5 สูงกว่า pH 7.5 และ 9.5 อย่างมีนัยสำคัญ และปลดปล่อยฮอร์โมนสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 1 (9.46 %)

นำเม็ดแคปซูล PLGA-P4 ผสมเป็นวัตถุดิบอาหารที่มีปริมาณฮอร์โมนแตกต่างกัน 3 ระดับความเข้มข้น (0.1, 0.2 and 0.3 mg P4/kg feed) ให้เป็นอาหารแม่กุ้งขาวสลับกับอาหารมีชีวิต นาน 1 เดือน ฮอร์โมนจากเม็ดแคปซูลในอาหารทำให้ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดแม่กุ้งขึ้นสูงสุดในสัปดาห์แรก (476 pg/ml haemolymph) จากนั้นระดับฮอร์โมนในเลือดจะปรับลดลงจนเท่ากับกลุ่มควบคุม (35.91 pg/ml haemolymph) แต่ไม่พบว่าแม่กุ้งมีการพัฒนารังไข่ เมื่อมีการตัดตา พบว่าอาหารผสมเม็ดแคปซูล PLGA-P4 ที่ระดับฮอร์โมน 0.33 mgP4/g feed สามารถกระตุ้นให้แม่กุ้ง เกิดการพัฒนารังไข่ จากไข่อ่อนเป็นไข่แก่จนกระทั่งมีการวางไข่ได้ดีกว่าแม่กุ้งที่ได้รับฮอร์โมนระดับอื่น โดยที่ทุกกลุ่มการทดลองมีการพัฒนารังไข่และไข่ได้ดีกว่าแม่กุ้งที่กินอาหารธรรมชาติแต่เพียงอย่างเดียว

พบความสัมพันธ์เชิงบวกของความเข้มข้นของโปรเจสเตอโรนในเลือด กับการพัฒนารังไข่และไข่แม่กุ้งขาวแวนนาไม กล่าวคือ ระดับความเข้มข้นของโปรเจสเตอโรนในเลือดจะเพิ่มตามระยะไข่ที่เจริญขึ้น (32.58-58.30 pg/ml haemolymph วัดจากไข่ระยะที่ 1 ถึงไข่ระยะที่ 4 จากแม่กุ้งกลุ่มควบคุม) กลุ่มทดลองที่ให้ผลดีที่สุดในแง่ ความเร็วในการพัฒนาไข่และรังไข่ จำนวนแม่กุ้งวางไข่ คือกลุ่มฮอร์โมน 0.33 mgP4/g feed แม่กุ้งมีระดับโปรเจสเตอโรนในเลือดเมื่อมีไข่ระยะที่ 4 เท่ากับ 100.27 pg/ml haemolymph ซึ่งสูงเป็นสองเท่าของกลุ่มควบคุม จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า มีความเป็นไปได้ที่จะสามารถนำสเตียรอยด์ฮอร์โมนมาใช้กระตุ้นการพัฒนารังไข่ของแม่กุ้งผ่านทางอาหาร เพื่อทดแทนการตัดตา ทำให้เกิดการเพาะขยายพันธุ์กุ้งที่มีประสิทธิภาพสูงสุด

ภาควิชา.....วิทยาศาสตร์ทางทะเล.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....วิทยาศาสตร์ทางทะเล.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2550.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4872258323 :MAJOR MRINESCIENCE

WEY WORD: PLGA MICROENCAPSULE / WHITE SHRIMP / FEMALE BROODSTOCK / PROGESTERONE *Litopenaeus vannamei* / DIETS MATURATION

CHANUDDA KASAMECHOCHOUNG : EFFECTS OF PROGESTERONE IN POLY (LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) ACIDS MICROENCAPSULATION ON OVARIAN DEVELOPMENT OF PACIFIC WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SOMKIAT PIYA TIRATITIVORKUL., Ph.D. THESIS COADVISOR : ORAPORN MEUNPOL., Ph.D. 79 pp.

Effects of progesterone (P4) in PLGA microencapsulation on ovarian development of pacific white female broodstocks (*Litopenaeus vannamei*) were investigated in this study. The progesterone microspheres were prepared from various concentrations (5, 7.5 and10 %) of polylactide-co-glycolide acid (PLGA) using oil-in-water single emulsion solvent evaporation method. The highest yield (92.76%) was received from 5% PLGA with encapsulation efficiency of 89.02%. However, higher encapsulation efficiency (95.51%) was obtained from 10%PLGA, therefore 5% of PLGA was chosen for the mass production. The sizes of P4-PLGA microspheres were ranged between 21-40 µm with the highest hormone release at first hour in pH 5.5 buffer solutions (9.46 %).

Diets for female broodstock were formulated with three different hormone concentrations from PLGA –P4 microspheres (0.11, 0.22 and 0.33 mg P4/100g feed). Control shrimp were fed with only live diets (squids and green mussels) whereas the treatment groups were fed with 50% experimental diets and 50% live diets. Levels of progesterone in shrimp haemolymph were increased after first week intake of P4-PLGA diets (476 pg/ml haemolymph) and rapidly decreased to the same concentration as in control (35.91 pg/ml haemolymph) in the fourth week of rearing. During that time, the treated female broodstock displayed some signs of ovarian development but did not reaching final maturation. After a month of feeding, female broodstock of all groups were eyestalk-ablated. Females fed 0.33 mg P4/100g feed exhibited superiority on ovarian maturation and spawning than other treatments including control. However, number of eggs per gram females and egg diameter were not different significantly between treatments.

Positive relationship between P4 hormone concentrations in female haemolymph and ovarian development was demonstrated. Females with ovarian stage 1 had lower levels of P4 than females with ovarian stage 4 (32.58-58.30 pg/ml haemolymph measured from stage 1 to stage 4 of control females). When females were with fed 0.33 mg P4/100g feed, it was found that their P4 titres were almost two folds of the control group (100.27 pg/ml haemolymph). It can be concluded from this study that it was possible to enhance shrimp ovarian maturation by incorporating steroid hormones into feeds through microencapsulation technique. Ovarian stimulation by eyestalk ablation could be replaced by this innovation which was more effective and less harmful to the shrimp broodstock.

Department.....Marine science.....Student's signature.....Chanudda Kasamechochoung.....

Field of study.....Marine science.....Advisor's signature.....

Academic.....2007.....Co-advisor' signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่องไมโครเอนแคปซูเลชันของฮอร์โมนระบบสืบพันธุ์กุ้ง และการนำมาใช้เพื่อพัฒนาระบบสืบพันธุ์พ่อแม่พันธุ์กุ้งทะเล โดย ดร.อรพร หมื่นพล ซึ่งได้รับทุนจากศูนย์พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพ ปีงบประมาณ 2549

ขอขอบพระคุณ รองศาสตาจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และดร.อรพร หมื่นพล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือข้าพเจ้าในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล และรองศาสตาจารย์ ดร.พจน์ กุลวานิช ที่กรุณาให้คำแนะนำทางด้านเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน

ขอขอบพระคุณ รองศาสตาจารย์ ดร.เจริญ นิติธรรมยง และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรณพ วิยกาญจน์ ที่กรุณาเป็นประธาน และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.มณีวรรณ กมลพัฒนะ คุณวรรณวิภา สุทธิไกร คุณราตรี จินตนา และเจ้าหน้าที่โครงการใช้นิวเคลียร์เพื่อส่งเสริมกิจการผสมเทียมโคนมและกระบือปลัก คณะสัตว์แพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคุณอิศเรศ สิทธิมงคลชัย.และพี่ ๆ เฟิร์สฟาร์ม ต.ไม้ขาว อ.ถลาง จ.ภูเก็ต ที่ให้คำชี้แนะนำ และเอื้อเฟื้อเครื่องมือ และสถานที่ในการทดลอง

ขอขอบคุณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือ และสถานที่ในการทดลอง

ขอขอบคุณ คุณสุภาดี จันทร์จุงจิตต์ คุณวิชญา ก้านบัว และพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ที่ช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ครอบครัวเกษมโชติช่วง และจันทรแสงเจริญ ในความห่วงใย และเป็นกำลังใจคอยสนับสนุนให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทำให้วิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ณ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูป ..... ฏ

บทที่

1 บทนำ 1

2 สำรวจเอกสาร

กุ้งขาวลิโทพิเนียส แวนาไม 3

(*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931)

ปัจจัยต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ 5

สิ่งแวดล้อม 5

ชนิดและปริมาณของฮอร์โมน 6

โภชนาการ 10

ไมโครเอนแคปซูเลชัน (Microencapsulation) 13

Poly (lactide-co-glycolide) 14

วิธีการผลิตไมโครแคปซูล 15

Solvent evaporation 15

Phase separation 16

การใช้ฮอร์โมนในการกระตุ้นการเจริญพันธุ์ของกุ้ง 16

3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

วิธีการเตรียมเม็ดแคปซูล P4-PLGAในสารละลายPLGA 18

การทดสอบประสิทธิการตรึงฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 20

ภายในเม็ดแคปซูล P4-PLGA

ศึกษาลักษณะของเม็ดแคปซูล P4-PLGA ทางกล้องจุลทรรศน์ 22

อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy; SEM)

ศึกษาการปลดปล่อยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 23

บทที่ หน้า

3 **วิธีการดำเนินงานวิจัย**

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบและอาหาร 24

การคำนวณสูตรอาหารและการสร้างสูตรอาหาร 25

การเตรียมอาหาร 26

การดำเนินการทดลอง 26

การเตรียมบ่อทดลอง 26

การเตรียมสัตว์ทดลอง 27

การให้อาหาร 27

การบันทึกข้อมูลการทดลอง 28

ศึกษาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือด 28
แม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม

ศึกษาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือด 28
แม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไมหลังจากได้รับอาหารทดลอง

ศึกษาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือด 29
แม่กุ้งที่ระยะการพัฒนารังไข่ต่าง ๆ

วิธีการวัดปริมาณฮอร์โมนในเลือดกุ้งด้วย 29
เทคนิค เรดิโอ อิมมูโน เอส เส

ศึกษาการพัฒนารังไข่ภายนอกของแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม 30

ศึกษาความสามารถในการวางไข่ของแม่กุ้งและความดกไข่ 31

การวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของไข่กุ้ง 31

การวิเคราะห์ทางสถิติ 31

4 **ผลการทดลอง**

ผลการศึกษาการเตรียมแคปซูลฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 32
ที่เคลือบด้วยสารละลาย PLGA

ผลการศึกษาลักษณะของแคปซูลฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน. 34

ผลของการปลดปล่อยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 37
ออกจากแคปซูล P4-PLGA (Release rate)

ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหาร 38

การตรวจวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดแม่กุ้ง 38
หลังจากได้รับอาหารทดลอง

บทที่ หน้า

4 ผลการทดลอง

ผลของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดแม่กุ้ง 40
ที่ระยะการพัฒนารังไข่ต่าง ๆ

ผลของความสามารถในการพัฒนารังไข่ของแม่กุ้งหลังตัดตา 42

จำนวนแม่กุ้งที่วางไข่ 43

ความดกไข่ 44

เส้นผ่านศูนย์กลางของไข่กุ้ง 46

5 วิจารณ์ผลการทดลองและสรุป

วิจารณ์ผลการทดลอง 47

สรุปผลการทดลอง 51

ข้อเสนอแนะ 52

รายการอ้างอิง 53

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก 68

ภาคผนวก ข 76

ภาคผนวก ค 77

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 79

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	องค์ประกอบของอาหารแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม	25
3.2	ปริมาณฮอร์โมน P4 ภายในเม็ดแคปซูล P4-PLGA 0.5 gที่ระดับต่าง ๆ กัน	28
4.1	คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลองทั้ง 3 สูตร	38

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ไข่กุ้ง 4 ระยะ ตามพัฒนาการของรังไข่ และไข่	4
2.2	โครงสร้างโปรเจสเตอโรน	9
2.3	การเตรียมไมโครพาทิเคิลโดยวิธี oil-in-water single emulsion solvent evaporation	16
3.1	ขั้นตอนการเตรียมเม็ดแคปซูล P4-PLGA	20
3.2	ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพการตรึงฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนภายในเม็ดแคปซูล P4-PLGA	22
3.3	ขั้นตอนการทดสอบการปลดปล่อยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน	24
3.4	ลักษณะเม็ดอาหารสำเร็จรูป	26
3.5	ลักษณะบ่อทดลอง	27
3.6	วิธีการสังเกตการพัฒนารังไข่ ระยะไข่เริ่มเจริญ Early mature stage; ระยะที่ 2)	30
4.1	ประสิทธิภาพการผลิตแคปซูลและการตรึงฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่เคลือบด้วยPLGA	33
4.2	ลักษณะเม็ดแคปซูลฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน	35
4.3	ค่าเฉลี่ยและการกระจายของเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดแคปซูลฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน	36
4.4	การปลดปล่อยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากแคปซูล PLGA	37
4.5	ความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดแม่กุ้งที่ไม่ตัดตา	40
4.6	ความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดแม่กุ้งตัดตาที่มีการพัฒนาไข่ระยะที่ 1, 2, 3 และ 4	41
4.7	เปอร์เซ็นต์แม่กุ้งที่สามารถพัฒนารังไข่ครั้งแรก (ระยะที่ 1 และ 2) หลังตัดตา	43
4.8	เปอร์เซ็นต์แม่กุ้งที่ทำการวางไข่ทั้งหมด และจำนวนครั้งที่แม่กุ้งวางไข่	44
4.9	ความดกไข่ของแม่กุ้งวางไข่	45
4.10	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของไข่ เมื่อแม่กุ้งวางไข่	46

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) มีปริมาณมากถึง 99 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลของประเทศไทย (ชลอ ลิ้มสุวรรณ และพรเลิศ จันทร์รัชชกุล , 2548) เพราะกุ้งชนิดนี้ เป็นกุ้งที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว และสามารถเลี้ยงได้ในอัตราความหนาแน่นสูง โดยแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพ ปลอดโรคจะต้องนำเข้าจากต่างประเทศ แต่ในปัจจุบันพบว่าเกษตรกรไทยมีการพัฒนาลูกกุ้งจากบ่อดินขึ้นมาเป็นพ่อแม่พันธุ์ จุดด้อยคือพ่อแม่พันธุ์จากบ่อดินนี้มีการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ได้ไม่สมบูรณ์เท่าพ่อแม่พันธุ์กุ้งนำเข้า เนื่องจากความไม่เหมาะสมของ สิ่งแวดล้อม ฮอร์โมน และอาหาร (ขวัญเรือน ศรีภิรมย์, 2534; Harrison 1990) แต่สามารถปรับปรุงได้โดยการปรับอาหารที่เลี้ยงให้มีคุณภาพดีที่สุด

ทั่วไปแล้ว อาหารที่ให้ผลส่งเสริมการพัฒนาของรังไข่ของกุ้งได้ดีที่สุด คือแม่เพรียงทราย เนื่องจากคุณค่าทางโภชนาการที่สูงทั้งโปรตีนและกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เช่น โอเมก้า-3 (*n*-3 HUFA) และโอเมก้า-6 (*n*-6 HUFA) (Meunpol *et al*., 2005) และยังประกอบด้วยฮอร์โมนสืบพันธุ์หลายชนิด เช่น โปรเจสเตอโรน (เสาวลักษณ์ เอี่ยมไผ่, 2548) โพรสตราแกลนดิน อีทู (Prostaglandin E_2) (เอกชัย ดวงใจ, 2548) และ โพรสตราแกลนดิน เอฟทูแอลฟา (Prostaglandin $F_2\alpha$) (Poltana, 2005) แต่ข้อเสียของการใช้แม่เพรียง คือ แม่เพรียงมีปริมาณ และคุณค่าทางโภชนาการไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับฤดูกาลและแหล่งที่มา ทั้งยังอาจเป็นพาหะนำโรคสู่แม่พันธุ์กุ้ง (Piedad-Pascual, 1988)

จากการตรวจพบฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในแม่เพรียง ทำให้มีแนวคิดว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมาผสมอาหารพ่อแม่พันธุ์กุ้งแทนที่การใช้แม่เพรียงเป็นอาหาร เพื่อกระตุ้นการเจริญของไข่และรังไข่แม่กุ้ง อย่างไรก็ตามการผสมฮอร์โมนลงไปในอาหารโดยตรง อาจเกิดการสูญเสียฮอร์โมนในระหว่างกระบวนการผลิตและการละลายในน้ำ (Yu'fera *et al*., 2003) จึงนำเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน (microencapsulation) มาประยุกต์ใช้ ซึ่งงานวิจัยครั้งนี้ ได้เลือกใช้ Poly (lactide-co-glycolide) acids (PLGA) เป็นแคปซูล โดยวิธี oil in water single emulsion solvent evaporation ทำการเก็บกักฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และมีการให้อาหารผสมเม็ดแคปซูลฮอร์โมนแก่แม่พันธุ์กุ้งขาว จากนั้นทำการศึกษาผลของอาหารผสมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในรูปแคปซูล ต่อการพัฒนารังไข่แม่กุ้ง โดยมีสมมติฐานว่าแคปซูล PLGA เป็นตัวป้องกันการสูญเสียของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในอาหารผสม และทำให้ฮอร์โมนสามารถส่งผ่านเพื่อไปกระตุ้นการพัฒนาของรังไข่แม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไมได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาวิธีการผลิตแคปซูลฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และผลการตรึงฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในแคปซูลกรดพอลิแลคไทด์โคไกลโคไลด์ ที่ผลิตด้วยเทคนิค Oil-in-water single emulsion solvent evaporation

2. ศึกษาผลของอาหารสำเร็จรูปที่ผสมแคปซูลฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเป็นองค์ประกอบต่อการเจริญของรังไข่แม่กุ้งขาวแวนนาไม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้อาหารสำเร็จรูปที่ช่วยกระตุ้นการพัฒนารังไข่แม่กุ้งขาวแวนนาไม

บทที่ 2

สำรวจเอกสาร

2.1 **กุ้งขาวลิโทพีเนียส แวนนาไม** (Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931)

กุ้งขาวลิโทพีเนียสแวนนาไม เป็นกุ้งทะเลที่มีสายพันธุ์อยู่ในชายฝั่งทะเลแปซิฟิกของทวีปอเมริกากลาง และอเมริกาใต้ ที่ระดับความลึกจากเส้นแนวชายฝั่งลงไปประมาณ 72 เมตรหรือ 235 ฟุต พื้นท้องทะเลเป็นโคลน เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตและเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ กุ้งสายพันธุ์นี้เป็นกุ้งที่มีความแข็งแรง โตง่าย และสามารถเลี้ยงได้ในอัตราความหนาแน่นสูง จึงเป็นที่นิยมเพาะเลี้ยง ซึ่งปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่การเลี้ยงกุ้งสายพันธุ์นี้ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล (ชลอ ลิ้มสุวรรณ และพรเลิศ จันทร์รัชชกุล, 2548)

ลักษณะแม่พันธุ์กุ้ง

กุ้งขาวแวนนาไมตัวเมีย มีติ่งแบน ๆ ที่เป็นอวัยวะสืบพันธุ์ เรียกว่าทีไลคัม (Thelycum) ลักษณะเป็นแผ่นรูปคล้ายผีเสื้อกางปีก มีรูเปิดอยู่ตรงกลางยาวลงไปเป็นร่องเหมือนรังกระดุมเสื้อเชิ้ต อยู่ตรงกลางระหว่างขาว่ายน้ำคู่ที่ 1 กับขาเดินคู่ที่ 5 ซึ่งเป็นอวัยวะที่มีไว้สำหรับเก็บน้ำเชื้อของกุ้งตัวผู้ อวัยวะสืบพันธุ์ของกุ้งชนิดนี้เป็นแบบเปิด (opened thelycum) แตกต่างจากลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วย ซึ่งมีลักษณะเป็นแบบปิด (closed thelycum) ดังนั้นรูปแบบของการสืบพันธุ์และพฤติกรรมในการผสมพันธุ์จึงเป็นไปคนละลักษณะกับกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วย ซึ่งแม่พันธุ์กุ้งขาวที่มีขนาดตัว 30-60 กรัม จะวางไข่ประมาณ 60,000 ถึง 200,000 ฟอง (กมลศิริ พันธนียะ, 2546) ในเวลากลางคืนที่ระดับน้ำลึกประมาณ 30-60 มิลลิเมตรใกล้พื้นทราย โดยแม่กุ้งจะว่ายน้ำอย่างรวดเร็วอยู่ประมาณ 45-60 วินาที แล้วจึงเริ่มปล่อยไข่ออกทางช่องเปิดบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 การวางไข่นี้จะใช้เวลา 3-5 นาที สามารถสังเกตการวางไข่ จากคราบไขมันที่ลอยอยู่บริเวณใกล้เคียง (กมลศิริ พันธนียะ,2546)

การพัฒนาของรังไข่กุ้งขาว (รูปที่ 2.1) ใช้หลักการจำแนกเดียวกันกับกุ้งกุลาดำ แบ่งออกเป็น 4 ระยะ ตาม ชูศักดิ์ แสงธรรม (2541) ดังนี้

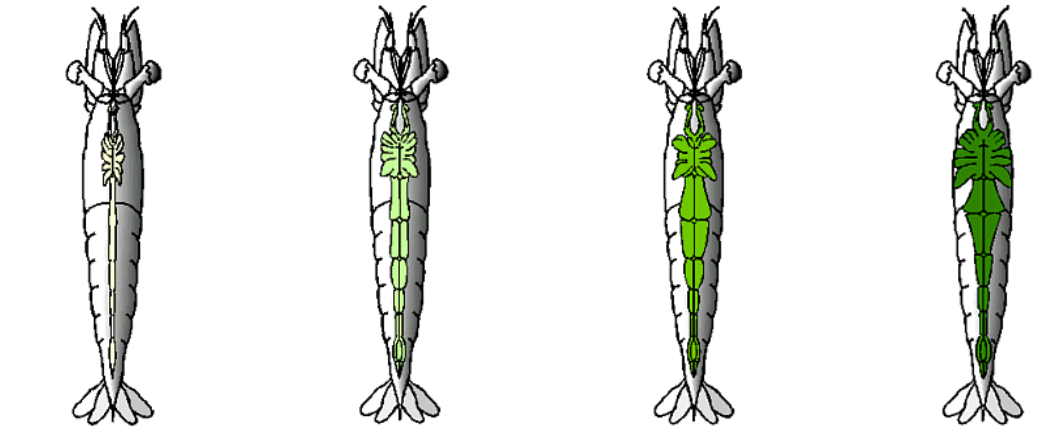
1. ระยะไข่ยังไม่พัฒนา (Immature; previtellogenic stage) เป็นระยะที่รังไข่มีลักษณะแบนใส มองจากเปลือกนอกหลังลำตัวจะไม่เห็น แต่เมื่อผ่าดูจะเห็นเป็นเนื้อเยื่อแถบยาวที่ไม่มีสี มองไม่เห็นฟองไข่ภายใน

2. ระยะไข่เริ่มเจริญ (Early mature; vitellogenic stage) เริ่มมองเห็นรังไข่จากเปลือกนอกหลังลำตัวเป็นแถบยาวมีขนาดใหญ่โดยเฉพาะส่วนหัวและส่วนกลางลำตัว เมื่อผ่าหลัง จะเห็นรังไข่เป็นสีน้ำตาลหรือเขียวปนเทา

3. ระยะไข่เจริญเต็มที่ (Mature; vitellogenic stage) เริ่มมองเห็นรังไข่จากเปลือกนอกหลังลำตัวชัดเจนขึ้นเป็นแถบยาวสีเข้มและหนา เนื่องจากรังไข่ขยายตัวมากขึ้นตั้งแต่ส่วนหัวจนถึงส่วนท้าย บริเวณส่วนท้องปล้องแรกเห็นรังไข่ขยายออกดูคล้ายรูปเพชร หรือผีเสื้อ (แผ่โค้งเป็นแฉกออกไปทางด้านข้าง) เมื่อผ่าหลัง จะเห็นรังไข่เป็นสีเขียวและภายในรังไข่มีกลุ่มไข่อยู่เต็ม

4. ระยะไข่สุก (Ripe stage; oocytes with cortical rod) สังเกตไข่บริเวณด้านหลังลำตัวเป็นลำทึบ สีเขียวแก่เกือบดำ (บริเวณส่วนท้องปล้องที่ 1-2) ขยายเต็มช่องท้อง ส่วนหลังเห็นแผ่โค้งเป็นแฉกชัดเจนและระยะนี้ พบว่ากุ้งพร้อมที่จะวางไข่

เมื่อกุ้งวางไข่หมด พบว่ารังไข่กุ้งจะแบนลีบ ดูภายนอกคล้ายรังไข่ระยะแรก เพียงแต่สีขุ่นเข้ม ถ้าไข่มีความสมบูรณ์แม่กุ้งจะวางไข่หมดในครั้งเดียว แต่ถ้าไข่ไม่สมบูรณ์แม่กุ้งจะวางไข่หลายครั้ง (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2534; Peixoto *et.al.*,2005)



รูปที่ 2.1 ระยะไข่กุ้ง 4 ระยะตามพัฒนาการของรังไข่ และไข่ (Australian Institute of Marine Science, 2000)

2.2 ปัจจัยต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์

การพัฒนาระบบสืบพันธุ์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น สิ่งแวดล้อม (Wasson *et.al*.,2000) ชนิดและปริมาณของฮอร์โมน และคุณค่าทางโภชนาการ (ขวัญเรือน ศรีภิรมย์, 2534; Harrison 1990; Meunpol *et al*., 2005)

ปัจจัยสิ่งแวดล้อม ที่มีผลต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์แม่พันธุ์กุ้งมีหลายปัจจัยด้วยกัน ได้แก่ แสง ความเค็ม และอุณหภูมิของน้ำ

แสง แม่พันธุ์กุ้งที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติจะได้รับปริมาณแสงไม่มากนัก เพราะเมื่อกุ้งถึงวัยเจริญพันธุ์จะเคลื่อนที่ไปอาศัยในทะเลที่ระดับความลึกประมาณ 72 เมตร (กมลศิริ พันธนียะ, 2546) เพื่อที่จะพัฒนาระบบสืบพันธุ์ โดยแสงมีผลต่อการหลั่งฮอร์โมนเซโรโทนินที่ก้านตาของครัสเตเซียน (Benzid *et al*., 2006) ดังนั้นในการเลี้ยงกุ้งจะต้องมีการควบคุมปริมาณแสงให้เหมาะสม เช่นการทดลองของ Aktas *et al*., (2003) พบว่าการเลี้ยงแม่กุ้งกุลาลาย (*Penaeus semisulcatus*) ภายใต้การให้แสง10 ชั่วโมง แม่กุ้งสามารถวางไข่ได้มากกว่าเมื่อได้รับแสง14 ชั่วโมง

ความเค็ม ระดับความเค็มส่งผลต่อกระบวนการสร้างไข่ของแม่กุ้ง (Bouchon *et al*., 1992) แม่กุ้ง *brown shrimp (Crangon crangon)* ที่อยู่ในน้ำเค็มต่ำ 5-15 psu ต้องใช้พลังงานในการปรับสมดุลอิออนระหว่างน้ำทะเลกับเลือดกุ้ง (osmoregulation) (Nagabhushanam and Joshi, 1986) ทำให้เหลือพลังงานไปใช้ในการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ได้น้อยกว่าเมื่อกุ้งอยู่ในน้ำความเค็มพอเหมาะ (25 psu) จึงทำให้มีการพัฒนารังไข่ช้า (Gelin *et al*., 2001) ระดับความเค็มที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนารังไข่แตกต่างกันในกุ้งแต่ละชนิด ในกุ้งขาวแวนนาไม Ogle (1992) รายงานว่าที่ระดับความเค็มต่ำที่สุดรังไข่กุ้งขาวจะสามารถพัฒนาและตกไข่ได้ คือ 20 psu

อุณหภูมิ อุณหภูมิมีผลต่อการกระตุ้นการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ และการวางไข่ของกุ้งหลายชนิด (Hoang *et al*., 2002) เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงระบบเผาผลาญ (metabolism) ต่าง ๆ ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะมีการทำงานเร็วขึ้น Aktas *et al*., (2003) รายงานว่า กุ้งกุลาลายที่ตัดก้านตาเมื่อนำมาเลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส สามารถพัฒนารังไข่ได้ถึงระยะที่ 4 และมีการวางไข่ได้ แต่แม่พันธุ์กุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสสามารถพัฒนารังไข่ได้ถึงระยะที่ 4 แต่ไม่มีการวางไข่

ฮอร์โมน เป็นสารเคมีที่ถูกสร้างจากต่อมไร้ท่อ ซึ่งทำหน้าที่ผลิต และควบคุมฮอร์โมน โดยฮอร์โมนจะหลั่งออกสู่ของเหลวที่อยู่นอกเซลล์ (extracelluar fluid) และขนส่งไปตามเลือดเพื่อไปออกฤทธิ์ควบคุมการทำงานที่อวัยวะเป้าหมาย (มนตรี จุฬาวัฒนทล และคณะ, 2542) ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของครัสเตเซียนแบ่งออกเป็น 6 ประเภท ได้แก่ เปปไทด์ หรือโปรตีนฮอร์โมน เอคไดสเตียรอยด์ เทอร์พีนอยด์ ฮอร์โมน โพรสตราแกลนดิน ไบโอเจนนิค เอมีน และเวอร์ทีเบรท ไทป์ สเตียรอยด์ ฮอร์โมน

1. เปปไทด์ หรือโปรตีนฮอร์โมน (peptide/protein hormone)

เปปไทด์ ฮอร์โมน เป็นกลุ่มฮอร์โมนที่มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวนต่าง ๆ กันทำให้ฮอร์โมนในกลุ่มนี้มีขนาดต่างกันมาก เช่น

1. ไวเทลโลเจเนซิส อินฮิบิติง ฮอร์โมน (Vitellogenesis Inhibiting Hormone : VIH) หรือ Gonad Inhibing Hormone (GIH) เป็นฮอร์โมนในกลุ่มเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 53-55 หน่วย ผลิตจากเอ็กซ์ ออแกน ที่อยู่ในก้านตากุ้ง (X-organ sinus gland) มีหน้าที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ (Fingerman, 1997)

2. ไวเทลโลเจเนซิส สติมิวเลติง ฮอร์โมน (Vitellogenesis Stimulating Hormone : VSH) ฮอร์โมนชนิดนี้สร้างมาจากสมอง (Brain) และทอราซิค แกงเกลีย (thoracic ganglia) มีหน้าที่เหนี่ยวนำการพัฒนารังไข่ โดยกระตุ้นให้รังไข่ ตับและตับอ่อนสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินในรังไข่ (Yano, 1998) เพื่อเป็นการสะสมอาหารสำหรับตัวอ่อน

3. ครัสเตเซียน ไฮเปอร์ไกลซีมิค ฮอร์โมน (Crustacean Hyperglycemic Hormone : CHH) เป็นเปปไทด์ฮอร์โมนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย มีซิสเทอีน (Cysteines) ทั้งหมด 6 หน่วย (Yang *et al*., 1997) ผลิตจากเอ็กซ์ ออแกน (Cooke and Sullivan, 1982) และเก็บสะสมในไซนัสแกลน (Sinus gland) ซึ่งพบฮอร์โมนชนิดนี้มากที่บริเวณนี้ (Huberman, 2000) มีหน้าที่ควบคุมกระบวนการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในการตอบสนองต่อปัจจัยทางกายที่เปลี่ยนแปลงไป (Keller and Sedlmeier, 1998) ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด (Keller and Orth, 1990)

2. เอคไดสเตียรอยด์ (Ecdysteroids)

เอคไดสเตียรอยด์เป็นฮอร์โมนที่สังเคราะห์จากคอเลสเตอรอล โดยวาย ออแกน (Y - organ) ทำการหลั่งฮอร์โมนเอคไดโซน (Ecdysone) และฮอร์โมนเอคไดโซนถูกลำเลียงโดยกระแสเลือดไปยังเนื้อเยื่อ และอวัยวะต่างๆ ที่เนื้อเยื่อชั้นนอก (epidremis) โดยเนื้อเยื่อชั้นนี้ฮอร์โมนเอคไดโซนจะถูกเปลี่ยนเป็น ฮอร์โมน20-ไฮดรอกซีเอคไดโซน (20-OH-ecdysone) โดยเอนไซม์ 20-ไฮโดรซีเลส (20-hydroxylase) ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นการลอกคราบ (Rudolph *et al*., 1992) การพัฒนาตัวอ่อน (Mu and LeBlanc, 2002b, 2004b) และควบคุมการสังเคราะห์ไวเทลลินในกุ้งแชบ๊วย (Auttarat *et al*., 2006) ฮอร์โมนชนิดนี้ทำงานร่วมกับฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบ (Molt-Inhibiting Hormone : MIH) ซึ่งปริมาณฮอร์โมนเอคไดสเตียรอยด์ขึ้นอยู่กับระยะต่าง ๆ ของการลอกคราบ โดยฮอร์โมนนี้เพิ่มขึ้นเมื่อระยะก่อนการลอกคราบ (premolt) และลดต่ำลงเมื่อเสร็จสิ้นการลอกคราบ (Huberman, 2000) ในช่วงที่ฮอร์โมนเอคไดสเตียรอยด์ลดต่ำลงฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบจะเพิ่มสูงขึ้น

3. เทอร์พีนอยด์ ฮอร์โมน (Terpenoid hormone)

เทอร์พีนอยด์ ฮอร์โมน ซึ่งฮอร์โมนหลักในกลุ่มนี้คือ เมธิล ฟานิสูเอท (Methyl farnesonate: MF) สร้างจากแมดิบูลา ออแกน (Mandibular organ; MO) ช่วยในการพัฒนารังไข่และการสร้างรังไข่ (Huberman, 2000) เช่น การบ่มไข่อ่อนของแม่กุ้งกุลาดำด้วย MF พบว่าไข่ของแม่กุ้งสามารถพัฒนาได้ถึงระยะไข่สุก (อาทิตย์ ไกรสุวรรณ์โสภิต, 2550) ซึ่งฮอร์โมนนี้ถูกยับยั้งโดยแมนดิบูลา ออแกน อินฮิบิธิง ฮอร์โมน (Mandibular organ-inhibiting hormone: MO-IH) เช่นการทดลองของ Tsukimura *et al*., (1993) เมื่อทำการตัดก้านตากุ้งมังกร พบว่า ระดับของ MF เพิ่มขึ้น

4. โพรสตราแกลนดิน (Prostaglandins; PG)

โพรสตราแกลนดิน สร้างจากทุกเซลล์ในร่างกาย แต่พบมากที่เซลล์สืบพันธุ์ โครงสร้าง PG มีหลายรูปแบบเช่น PGA PGB PGE PGF และPGH (Stanley-Samuelson, 1987) เป็นฮอร์โมนที่มีผลต่อการหดตัวของเนื้อเยื่อรังไข่ ทำให้เกิดการตกไข่ (Priddy and Killick, 1993) โดยพบว่าการสังเคราะห์ PG จะเพิ่มขึ้นในระยะก่อนการตกไข่ของกุ้ง crayfish (Spaziani *et al*., 1995) ช่วยในกระบวนการสร้างและสะสมไข่แดง (Spaziani *et al*., 1993) แต่ในกุ้ง *Penaeus japonicus* พบว่าฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ และ PGE_2 ในเลือดจะลดต่ำลงเมื่อไข่พัฒนาถึงระยะที่ 3 (Tahara and Yano, 2002)

5. ไบโอเจนนิค เอมีน (Biogenic amine)

ไบโอเจนนิค เอมีน ในสัตว์จำพวกครัสเตเซียนพบว่าไบโอเจนิค เอมีนมีการทำงานหลายรูปแบบ เช่นนิวโรทรานสมิทเตอร์ (Neurotransmitters) นิวโรโมดูเลเตอร์ (Neromodulators) และนิโรฮอร์โมน (Nerohormone) ฮอร์โมนในกลุ่มนี้ประกอบด้วย 5 – ไฮดรอกซีทริปทามีน หรือ ซีโรโทนิน (5-Hydroxytryptamine or Serotonin : 5HT) โดปามีน (Dopamine : DA) (Fingerman *et al*., 1994)

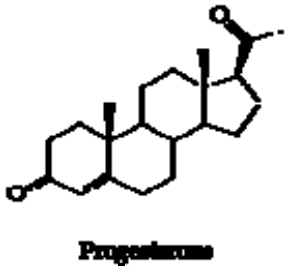
1. 5 – ไฮดรอกซีทริปทามีน หรือ ซีโรโทนิน (5-Hydroxytryptamine or Serotonin : 5HT) เป็นสารประกอบโมโนเอมีน (monoamine) เป็นฮอร์โมนที่มีผลต่อการพัฒนารังไข่ และการวางไข่ โดยทำหน้าที่ควบคุมการหลั่งของสาร โกแนด สติมูเลติง ฮอร์โมน (Gonad-Stimulating Hormone : GSH) (Fingerman, 1997) และกระตุ้นการหลั่งของฮอร์โมนผลิตสารสี ได้แก่ สารสีแดง (Red pigment dispersing hormone) และสารสีดำ (Black pigment dispersing hormone) (Rao and Fingerman, 1970) ซึ่งฮอร์โมนชนิดนี้จะยับยั้งฮอร์โมนเมธิล ฟาร์นีโซเอท (Methyl fasnesoate : MF) เช่น จากการศึกษาการพัฒนารังไข่ของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) เมื่อฉีดฮอร์โมนซีโรโทนินของ Meeratana *et al*. (2006) พบว่ารังไข่มีการพัฒนามากขึ้นเทียบกับน้ำหนักตัว (Ovarian index) เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมน

2. โดปามีน (Dopamine: DA) สังเคราะห์จากซีรีบรัล แกงเกลีย หรือ สมอง และ ทอราซิค แกงเกลีย ทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้ และเพศเมีย โดยฮอร์โมนนี้จะไปกระตุ้นการหลั่งสารโกแนด อินฮิบิติง ฮอร์โมน (Gonad- Inhibiting Hormone: GSH) (Fingerman, 1997)

6. เวอร์ทีเบรท ไทป์ สเตียรอยด์ ฮอร์โมน (Vertebrate – type steroid hormone)

เวอร์ทีเบรท ไทป์ สเตียรอยด์ เป็นฮอร์โมนที่สังเคราะห์จากคอเลสเตอรอล ประกอบด้วยคาร์บอน 21 อะตอม และมีโครงสร้างเป็นวง 5 เหลี่ยม 1 วง และ 6 เหลี่ยม 3 วง โดยสัตว์จะเปลี่ยนคอเลสเตอรอลเป็นฮอร์โมนกลุ่มนี้ได้ที่ รังไข่ ตับ และตับอ่อน (Shin and Liao, 1998) ซึ่งฮอร์โมนที่พบในกลุ่มนี้ได้แก่ โปรเจสเตอโรน (Progesterone: P4) เอสตราไดออล (Estradiol: E2) และเทสโทสเตอโรน (Testosterone: T) โดยพบว่าฮอร์โมน P4 เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ฮอร์โมนหลายชนิด ได้แก่ 17ß-เอสตราไดออล (17 ß-Estradiol) 17 α- ไฮดรอกซีโปรเจสเตอโรน (17 α-

hydroxyprogesterone: 17 α-OHP4) และเทสโทสเตอโรน (Summavielle *et al*., 2003) ซึ่งระดับของฮอร์โมนแต่ละชนิดแตกต่างกันตามระยะการพัฒนารังไข่ กล่าวคือ ในระยะไข่อ่อนมีระดับฮอร์โมน 17 ß-Estradiol สูง และปรับลดลงเมื่อระยะไข่สุก แต่ระดับฮอร์โมน P4 ในระยะไข่อ่อนมีระดับต่ำ และปรับเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนสูงสุดที่ระยะไข่สุก เช่น ในกุ้ง Indian spiny lobster (Kirubagaran *et al*., 2005) และปู Scylla serrata (Warrier *et al*., 2001)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างโปรเจสเตอโรน (Messer, 2000)

ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone: P4)

ฮอร์โมน P4 เป็นกลุ่มของสเตียรอยด์ ซึ่งไม่ละลายน้ำ (hydrophobic/lipophilic) สังเคราะห์จากคอเลสเตอรอล โดยคอเลสเตอรอลถูกเปลี่ยนเป็นเพรกนีโนโลน (pregnenolone) ด้วยเอนไซม์ P450 side-chain cleavage (P450 scc) จากนั้นเพรกนีโนโลนจะถูกเปลี่ยนเป็น P4 ด้วยเอนไซม์ 3 ß-hydroxysteroid hydrogenase (3 ß-HSD) โดยฮอร์โมน P4 มีโครงสร้างเป็นวง 5 เหลี่ยม 1 วง และ 6 เหลี่ยม 3 วง ประกอบด้วย คาร์บอน 21 อะตอม ในครัสเตเซียนฮอร์โมน P4 สร้างจาก รังไข่ ตับและตับอ่อน ทำหน้าที่กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ไข่ (oocytes) สร้างไข่แดง (yolk) (Fairs, 1990) และการพัฒนารังไข่ขั้นสุดท้าย (final maturation) (Nagahama *et al*., 1982) Meunpol *et al*. (2007) ทำการบ่มไข่ระยะ previtellogenic ของกุ้งกุลาดำด้วยฮอร์โมน P4 ที่ความเข้มข้น 1 ng/ml สามารถทำให้รังไข่ระยะไข่อ่อนพัฒนาถึงระยะที่มีคอติคอลรอด (cortical rod) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าไข่พร้อมที่จะถูกปล่อย นอกจากนั้นแล้วฮอร์โมน P4 ยังสามารถกระตุ้นการวางไข่ของครัสเตเซียนอีกด้วย เนื่องจากความสามารถในการกระตุ้นการหลั่งเยื่อเมือกและการหล่อลื่นของไข่ภายในท่อนำไข่ของฮอร์โมน P4 (Paolucci, 2002) ตัวอย่างเช่น ในเม่นทะเล (*Lytechinus variegatus*) ที่กินอาหารผสมฮอร์โมน P4 มีการวางไข่มากกว่าเม่นทะเลที่กินอาหารปกติ (Wasson *et al*., 2000)

กระบวนการสร้างและสะสมไข่แดง (Vitellogenesis)

กระบวนการสร้างและสะสมไข่แดงจะแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ การสร้างไวเทลโลเจเนซิสระยะที่ 1 และการสร้างไวเทลโลเจเนซิสระยะที่ 2 (Meusy and Charniaux-Cotton, 1984; Meusy and Payen, 1988)

การสร้างไวเทลโลเจเนซิสระยะที่ 1 (primary vitellogenesis) ระยะนี้จะเกิดขึ้นตลอดวงจรชีวิตของกุ้ง โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นหลายอย่างภายในเซลล์ไข่ เช่น การสร้างไรโบโซม (ribosome) เอนโดพลาสมิค เรติคูลัม (endoplasmic reticulum) และเซลล์ฟอลิเคิล (follicle cell) จะเกิดล้อมรอบเซลล์ไข่ (Quackenbush, 2001)

การสร้างไวเทลโลเจเนซิสระยะที่ 2 (secondary vitellogenesis) ระยะนี้เป็นการสร้างและสะสมไข่แดงเป็นผลให้เซลล์ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น ไข่แดงเป็นสารประเภทไลโพโปรตีน (Lipoprotein) ที่สร้างจากโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และ คาโรทีนอยด์ (Charniaux-Cotton, 1985) เพื่อเป็นแหล่งอาหาร และพลังงานสำหรับการพัฒนาตัวอ่อนในระยะนอเพลียส (nauplii) (Meusy and Charniaux-Cotton, 1984; Meusy and Payen, 1988) ไข่แดงถูกสร้างจากหลายอวัยวะ เช่นจากเซลล์ฟอลิเคิล ในกุ้ง *Penaeus japonicas* (Yano and Chinzei, 1987) รังไข่และตับอ่อน ในกุ้งขาว *Penaeus vannamei* (Quackenbush. 1991) ไข่แดงที่สร้างแล้วจะถูกขนส่งมายังรังไข่ทางเลือด (Charniaux-Cotton,1985; Quackenbush, 1991, 1994) การสร้างและสะสมไข่แดงกระตุ้นโดยฮอร์โมนหลายชนิดได้แก่ VSH (Yano, 1998), PG (Spaziani *et al*., 1993) และ P4 (Kirubagaran *et al*., 2005) และถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนจากก้านตา (Sinus gland X-organ complex) คือ VIS (vitellogenin inhibiting hormone) (Gohar *et al*., 1984; Soyez *et al*., 1987; Aguilar *et al*., 1992)

อาหารเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของแม่พันธุ์กุ้ง และคุณภาพของลูกกุ้งที่ผลิตได้ เพราะแม่กุ้งจะนำอาหารที่ได้ไปสร้างระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ ฮอร์โมน เซลล์สืบพันธุ์และอวัยวะสืบพันธุ์ กรดนิวคลิอิก และไข่แดง (Kanazawa and Teshima, 1971; Chang, 1989; Xu *et al*., 1994; Harrison, 1997) อาหารที่ให้แม่กุ้งแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ อาหารธรรมชาติ และอาหารสำเร็จรูป

อาหารธรรมชาติ โดยทั่วไปที่นำมาเลี้ยงแม่กุ้งได้แก่ หมึก หอย (Harrison, 1997; Naessens *et al*., 1997) และเพรียง (Middleditch *et al*., 1980) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างหมึกและแม่เพรียงพบว่า แม่เพรียงเป็นอาหารที่เกษตรกรนิยมนำมาเลี้ยงแม่กุ้ง เพื่อเป็นการส่งเสริมการพัฒนารังไข่ของกุ้ง เพราะแม่เพรียงอุดมไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ชนิด *n*-3 HUFA กรดอะราคิโดนิค (Arachidonic acid) (Meunpol et al., 2005) คอเลสเตอรอล (Cholesterol) ฟอสโฟไลปิด (Phospholipids) และกรดอะมิโนจำเป็น (Essential amino acids) (Chamberlain and Lawrence, 1981; Harrison, 1997) และยังประกอบด้วยฮอร์โมนที่มีผลต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของแม่กุ้งเช่น โปรเจสเตอโรน และ 17แอลฟา- ไฮดรอกซีโปรเจสเตอโรน (Meunpol et al., 2007) โพรสตราแกลนดิน อีทู (Prostaglandin E_2) (เอกชัย ดวงใจ, 2548) และ โพรสตราแกลนดินเอฟทูแอลฟา (Prostaglandin $F_2\alpha$) (Poltana, 2005)

อาหารสำเร็จรูป การใช้อาหารธรรมชาติมีข้อเสียเปรียบคือ ปริมาณ และคุณค่าทางโภชนาการไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับฤดูกาล และแหล่งที่มา ทั้งยังเป็นพาหะนำโรคสู่แม่กุ้ง จึงมีการพัฒนาอาหารสำเร็จรูปขึ้นแทนที่ เนื่องจากมีคุณภาพของสารอาหาร และปริมาณที่แน่นอน และสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก โดยส่วนใหญ่วัตถุดิบที่นำมาผลิตอาหารประกอบด้วย ปลาป่น ปลาหมึกป่น แม่เพรียงป่น โพลีคีต หอย สาหร่าย ยีสต์ เป็นต้น โดยนำมาผสมให้มีคุณค่าทางโภชนาการที่เหมาะสมตามความต้องการของพ่อแม่พันธุ์

โปรตีน และกรดอะมิโน (Protein and amino acids) ในช่วงที่แม่กุ้งพัฒนาระบบสืบพันธุ์จะมีความต้องการโปรตีน และกรดอะมิโนสูง เนื่องจากโปรตีนเป็นแหล่งอาหารที่นำไปสังเคราะห์ไข่แดง เปปไทด์ ฮอร์โมน (Peptide hormone) เซลล์สืบพันธุ์ (Gametes) และอวัยวะสืบพันธุ์ (Gonadal tissue) นอกจากนี้ยังช่วยให้ลูกกุ้งที่ได้มีสุขภาพแข็งแรง (Harrison, 1997) ซึ่งพบว่าถ้าแม่พันธุ์กุ้งที่มีความสมบูรณ์เพศดีมีปริมาณโปรตีนสะสมอยู่ในตับและรังไข่สูงกว่าแม่พันธุ์ที่มีความสมบูรณ์เพศต่ำ (Palacios *et al*., 2000)

ไขมัน (Lipids) เป็นสารอาหารที่มีผลต่อการพัฒนารังไข่ และระบบสืบพันธุ์ เมื่อกุ้งได้รับสารอาหารนั้นเข้าไปจะนำไปเก็บสะสมที่ตับอ่อน (Hepatopancreas) ในรูปของ ฟอสโฟไลปิด Hepatopancreatic neutral lipid ขณะที่แม่กุ้งมีการพัฒนารังไข่สารอาหารเหล่านี้จะถูกขนส่งไปยังรังไข่ (Harrison, 1997) เพื่อนำไปสร้างไวเทลลิน (Vitellin) (Xu *et al*., 1994) โดยอนุพันธ์ของไขมัน คือ *n*-3 HUFA และ *n*-6 PUFA เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ จากการทดลองของ ปริญญา ลีหานนท์ (2546) ทำการศึกษาการพัฒนาอาหารเม็ดที่มี

กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เพื่อความสมบูรณ์พันธุ์ของกุ้งกุลาดำเพศเมีย โดยอาหารทดลองที่ใช้เลี้ยงแม่กุ้งมีสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงชนิด AA (Arachidonic acid) : EPA (Ecosapentaenoic acids) : DHA (Docosahexaenoic acid) เท่ากับ 5:1:1 ซึ่งใกล้เคียงกับเพรียงที่ใช้เป็นอาหารธรรมชาติ คือ 5.8:5.6:1 พบว่า แม่กุ้งที่ได้รับอาหารธรรมชาติ และอาหารทดลองสลับกับอาหารธรรมชาติ สามารถพัฒนาความสมบูรณ์เพศได้ถึงระยะที่ 4 เช่นเดียวกันนอกจากนี้ Harrison (1997) ยังพบว่าสัตว์ในกลุ่มครัสเตเซียน และแมลง *n*-6 PUFA เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โพรสตราแกลนดิน อีทู ซึ่งเป็นฮอร์โมนกระตุ้นการพัฒนาระบบสืบพันธุ์

คอเลสเตอรอล (Cholesterol) มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ฮอร์โมนสืบพันธุ์ของครัสเตเซียน (Chang, 1989) เนื่องจากเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ฮอร์โมนสเตียรอยด์ (Steroid hormone) นอกจากนี้ยังพบว่าสารอาหารชนิดนี้มีส่วนช่วยในการพัฒนาคุณลักษณะของอวัยวะเพศ (Kanazawa and Teshima, 1971) พัฒนาไข่ และตัวอ่อนอีกด้วย (Malecha, 1983) เพราะฉะนั้นคอเลสเตอรอลที่ถูกเก็บสะสมไว้ที่ตับอ่อน และกล้ามเนื้อ จึงมีปริมาณไม่เพียงพอต่อความต้องการของแม่พันธุ์กุ้งจำเป็นต้องได้รับสารอาหารนี้จากอาหาร (Harrison, 1997)

คาร์โบไฮเดรต (Carbohydeates) เป็นแหล่งพลังงานที่ใช้ในการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ นอกจากนี้คาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในรูปของกลูโคซามีน (Glucosamine) จะเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ กรดนิวคลีอิก (Nucleic acids) และสารพวกไคติน ทำให้ตัวอ่อนกุ้งระยะ embryo พัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ larva ได้อย่างรวดเร็ว (Harrison, 1997)

วิตามิน เกลือแร่ และสารสี (Vitamins, Minerals and Carotenoid pigments) เป็นสารอาหารที่ถึงแม้ว่าแม่กุ้งต้องการในปริมาณน้อย แต่ขาดไม่ได้

วิตามินและเกลือแร่ เป็นสารที่เข้ามากระตุ้นให้ระบบสืบพันธุ์สมบูรณ์ และช่วยในการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะแรก (Harrison, 1997) ตัวอย่างเช่น บทบาทของวิตามินเอในการช่วยให้แม่พันธุ์กุ้งกุลาดำมีการพัฒนารังไข่ และการปล่อยไข่ได้มากขึ้น (Pangantihon-Kuhlmann *et al*., 1998)

สารสีจำพวกคาโรทีนอยด์ เป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ป้องการหืนของไขมันที่เป็นส่วนประกอบของไข่แดง (Harrison, 1997) เช่น จากการศึกษาผลของแอสตาแซนทิน (Astaxanthin) ที่ผสมในอาหารแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ พบว่าแม่พันธุ์ที่ได้รับอาหารผสมแอสตาแซนทินมีปริมาณของสารคาโรทีนอยด์ และแอสตาแซนทินสะสมอยู่ที่ตับอ่อน และรังไข่ จำนวนไข่ และ

จำนวนตัวอ่อนที่ได้มีปริมาณสูงกว่าแม่พันธุ์กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่ได้ผสมแอสตาแซนทิน (Menasveta *et al*., 1994)

ไมโครเอนแคปซูเลชัน (Microencapsulation)

ในการผลิตอาหารสำหรับแม่พันธุ์ สิ่งที่คำคัญคือคุณค่าทางโภชนาการต้องมีคุณค่าทางโภชนาการให้ใกล้เคียงกับอาหารธรรมชาติ โดยเฉพาะสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ฮอร์โมนสืบพันธุ์ ได้แก่คอเลสเตอรอล ที่กุ้งไม่สามารถผลิตขึ้นได้เอง จำเป็นต้องรับจากภายนอก คืออาหารเท่านั้น (Cuzon *et al.,* 1994) หรืออาจมีการเติมฮอร์โมนสืบพันธุ์ในกลุ่มสเตียรอยด์โดยตรง (Pelissero and Sumpter, 1992) แต่ในการผสมฮอร์โมนสู่อาหารโดยตรง อาจมีปัญหาการสูญสลายของฮอร์โมนในระหว่างกระบวนการผลิต และการที่เม็ดอาหารแช่ในน้ำ (Langdon, 2003; Yu'fera *et al*., 2003) จึงมีการพิจารณานำเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน (microencapsulation) ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนมาประยุกต์ใช้ เพื่อป้องกันการสูญเสียสารอาหารจากขบวนการต่างๆ (Langdon, 2003)

ไมโครเอนแคปซูเลชัน คือ กระบวนการเคลือบหรือห่อหุ้มสารแกน (Core material) อาจจะมีสถานะเป็นของแข็ง ของเหลว หรือก๊าซ อย่างบาง ๆ เพื่อป้องกัน core material จากสภาวะแวดล้อม เช่น ออกซิเจน ความชื้น และความร้อน และเพื่อควบคุมการปลดปล่อยของ core material โดยสารที่ใช้ในการเคลือบหรือห่อหุ้มขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสารประกอบขนาดเล็ก (Microparticle) และต้องไม่ทำปฏิกิริยาทางเคมีกับ core material โดยสารที่ใช้ห่อหุ้มส่วนใหญ่จะเป็นพอลิเมอร์ชนิดที่สลายตัวทางชีวภาพ (biodegradable polymer) และวิธีการที่ผลิต ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ห่อหุ้ม และcore material (Benoit *et al*., 1996)

พอลิเมอร์ที่สลายตัวทางชีวภาพ (Biodegradable polymer) แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ พอลิเมอร์ชีวภาพ (Natural polymer) และพอลิเมอร์สังเคราะห์ (Synthetic polymer)

1. พอลิเมอร์ชีวภาพ คือ สารที่สกัดจากธรรมชาติ เช่น ไคติน เป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างเป็นเส้นใย สกัดได้จากเปลือกของสัตว์ เช่น กุ้งและปู และเมื่อนำไคตินมาสกัดจะได้พอลิเมอร์ชีวภาพที่เรียกว่า ไคโตซาน (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์, ปีไม่ปรากฏ)

2. พอลิเมอร์สังเคราะห์ คือ พอลิเมอร์ที่เกิดจากการรวมตัวกันของสารโมเลกุลขนาดเล็ก

(Monomer) ด้วยพันธะโควาเลนต์ ได้แก่ กรดพอลิแลคติก (Poly lactic acid; PLA) กรดพอลิไกล-โคลิค (Poly glycolic acid; PLA) พอลิเอสทีลีนไกลคอล (poly (ethylene glycol); PEG) และพอลิแลคไทด์โคไกลโคไลด์ (Poly(lactide-co-glycolide); PLGA) (Lewis, 1990)

Poly (lactide-co-glycolide) หรือที่เรียกว่า PLGA เกิดจากการนำเอากรดแลคติก กับกรดไกลโคลิค มาทำปฏิกิริยารวมตัวกัน (copolymerization) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ (ester bond) PLGA เป็นพอลิเมอร์ที่สามารถสลายตัวได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ เพราะเมื่อ PLGA เข้าสู่ร่างกายจะแตกตัวด้วยปฏิกิริยา hydrolysis ได้เป็นกรดแลคติกและกรดไกลโคลิคซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดนี้จะพบได้ในภาวะปกติของร่างกาย ในกระบวนการเผาผลาญอาหารของสิ่งมีชีวิต สารชนิดนี้จึงไม่มีความเป็นพิษต่อร่างกาย ทำให้มีการนำสาร PLGA มาใช้ประโยชน์ทางเภสัช - กรรม สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่นิยมเคลือบด้วย PLGA ได้แก่ ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ยาต้านฤทธิ์สารเสพติด (narcotic antagonists) สารต้านมะเร็ง (anticancer) และฮอร์โมน (Lewis, 1990) ซึ่งลักษณะของแคปซูลที่ผลิตด้วย PLGA มีหลายรูปแบบ ได้แก่ ลักษณะทรงกลม (microsphere) (Wu, 2004; Freitas *et al*., 2003) ลักษณะเป็นแท่งสำหรับใช้ฝัง (implantable-rods) (Jimoh *et al*., 1995; Sampath *et al*., 1992) ลักษณะเป็นเส้นใย (fiber) (Dunn *et al*., 1982) ลักษณะเป็นเม็ดแบน ๆ (tablets) (Omelczuk and McGinity, 1993) ซึ่งแคปซูลที่มีลักษณะทรงกลมจะมีข้อดีกว่าลักษณะอื่น ๆ เช่น มีความสม่ำเสมอของขนาดและรูปร่าง สามารถใช้เคลือบcore material ได้หลายชนิด และสามารถควบคุมการปลดปล่อยของ core material (Wang *et al*., 2000; Wu, 2001) การขนส่ง core material ไปยังอวัยวะเป้าหมายทำได้หลายทาง เช่นการฝังภายใต้ชั้นผิวหนัง การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ การกิน (Alvarez *et al*., 2004)

PLGA สามารถนำมาเคลือบฮอร์โมนได้หลายชนิด เช่น แคปซูลฮอร์โมน FSH (Follicle stimulating hormone) (Jimoh *et al*., 1995) แคปซูลฮอร์โมนพาราไทรอยด์ (Anthony *et al*., 2005) แคปซูล leuprolide acetate เป็นฮอร์โมนสังเคราะห์ LH-RH (Lutenizing hormone – releasing analog) (Okada *et al*., 1989) แคปซูลฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Wu, 2004)

การใช้ประโยชน์แคปซูลฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่เคลือบด้วย PLGA ในสัตว์ พบในจำพวกสัตว์เคี้ยวเอื้อง ได้แก่ วัว และ ควาย มีการนำแคปซูลฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมาใช้ควบคุมวงจรการเป็นสัด โดยการฝังแคปซูลฮอร์โมนภายใต้ชั้นผิวหนังของสัตว์ที่เริ่มเป็นสาว ซึ่งจะช่วยให้เกิดการพัฒนา corpus luteum (Whisnant and Burns, 2002) แต่ในสัตว์น้ำยังไม่พบการรายงาน

วิธีการผลิตแคปซูล PLGA มีหลายวิธีได้แก่ solvent extraction, solvent evaporation, phase separation และ spray drying แต่วิธีที่นิยมใช้ในการผลิตคือ solvent evaporation และ phase separation (Benoit *et al*., 1996.)

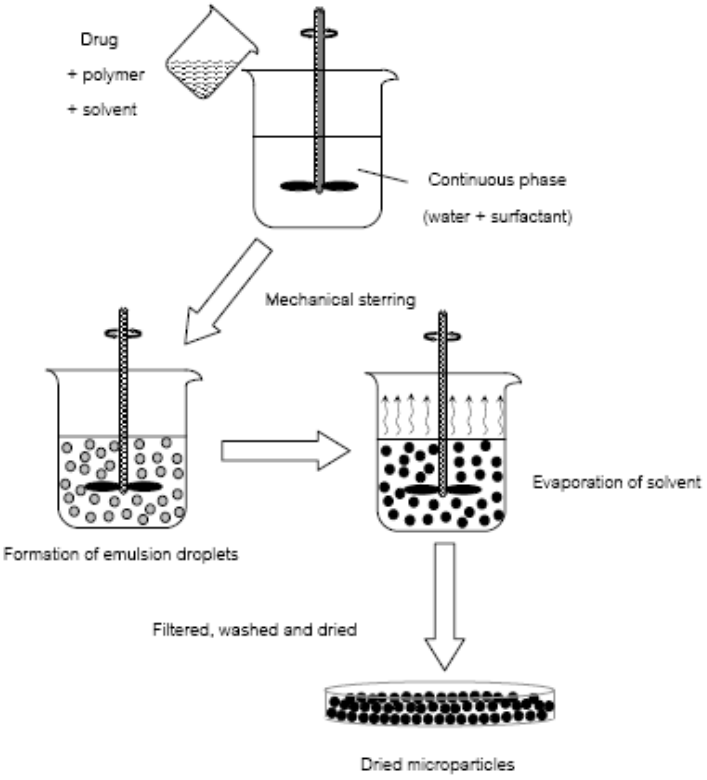
Solvent evaporation สามารถกระทำได้ 2 กระบวนการคือ

1. Single emulsification process จำแนกได้เป็น

1.1 oil in water emulsification เป็นเทคนิคที่สามารถทำได้ง่าย และเหมาะสมกับ core material ที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งมีขั้นตอนการผลิตดังนี้ นำพอลิเมอร์ละลายในสารละลายอินทรีย์ที่สามารถระเหยได้ ผสมสารที่ต้องการลงในสารละลายพอลิเมอร์ จากนั้นนำสารผสมใส่ลงในสารลดแรงตึงผิว สารผสมจะมีลักษณะเป็นหยดน้ำมัน (Emulsifier) ในขณะกวนตัวทำละลายพอลิเมอร์จะระเหยออก ทำให้หยดน้ำมันแข็งตัวเป็นเม็ดตกตะกอนอยู่ภายในสารลดแรงตึงผิว ทำการเก็บเม็ดโดยการกรอง หรือการเหวี่ยงแยกตัวอย่าง (centrifugation)

1.2 oil in oil emulsification เป็นเทคนิคที่ทำให้ core material ที่ละลายน้ำ คงอยู่ในไมโครพาทิเคิลได้สูง แต่ข้อเสียคือ การล้างน้ำมันออกจากผิวของไมโครพาทิเคิลทำได้ยาก และทำให้สูญเสียตัวยาบริเวณผิวของไมโครพาทิเคิลไป

2. Multiple emulsification เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กับ core material ที่ละลายน้ำได้ดี โดยการทำเป็นหยดน้ำมันเชิงซ้อนจะช่วยลดการสูญเสีย core material และการล้างไมโครพาทิเคิลทำได้ง่ายกว่าเทคนิค oil in oil



รูปที่ 2.3 การเตรียมไมโครพาทิเคิลโดยวิธี oil-in-water single emulsion solvent evaporation (วันดี รังสีวิจิตรประภา. 2459)

Phase separation (Coacervation) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการห่อหุ้ม core material ที่ละลายน้ำได้ดี เช่น โปรตีน เปปไทด์ และ วัคซีน เป็นต้น โดยมีหลักการการผลิตแคปซูลดังนี้ การทำให้สารละลายพอลิเมอร์เกิดปฏิกิริยารีดักชั่น โดยการเติมสารตัวกลาง เช่น การเติมเกลือ การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ หรือ pH การเติมสารละลายที่ไม่ใช่สารทำละลายของพอลิเมอร์ และการเติมพอลิเมอร์ชนิดอื่นที่ไม่เข้ากันกับพอลิเมอร์ที่มีในตัวกลาง ทำให้พอลิเมอร์ภายในสารละลายเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมจึงเกิดการตกตะกอนมาห่อหุ้ม core material

การใช้ฮอร์โมนในการกระตุ้นการเจริญพันธุ์ของกุ้ง

การกระตุ้นการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของแม่กุ้งที่ปฏิบัติกันทั่วไปในฟาร์มเลี้ยงใช้การตัดก้านตาหนึ่งข้าง เพื่อกำจัด X-organ-Sinus gland complex ที่เป็นแหล่งสร้างและสะสมฮอร์โมนยับยั้งการสืบพันธุ์ คือ ไวเทลโลเจเนซิส อินฮิบิติง ฮอร์โมน (Vitellogenesis Inhibiting Hormone) แต่การตัดก้านตา เป็นวิธีการที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพแม่กุ้ง ทำให้แม่กุ้งอ่อนแอ มีอัตรารอดต่ำ และทำให้ไม่สามารถใช้แม่กุ้งชุดเดิมได้อย่างต่อเนื่อง (Benzie, 1998) จึงได้มีการพัฒนาวิธีการกระตุ้นการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของแม่กุ้งที่มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพสูง เช่นการฉีด

ฮอร์โมนเข้าสู่ร่างกายกุ้งโดยตรง ฮอร์โมนที่ใช้ฉีดกระตุ้นแม่กุ้งมีหลายชนิด ได้แก่ ฮอร์โมนเซโรโทนินในกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อฉีดที่ความเข้มข้น 50 µg/ g weight สามารถกระตุ้นให้แม่กุ้งมีการพัฒนารังไข่ และวางไข่ได้มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมน (Vaca and Alfaro, 200) หรือ การฉีดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และ 17ß-เอสตราไดออล (17 ß-Estradiol) ให้แก่กุ้งกุลาดำ ที่ความเข้มข้น 0.01 µg/ g weight พบว่า แม่กุ้งมีค่า gonad index เพิ่มขึ้นกว่าแม่กุ้งที่ไม่ได้รับฮอร์โมน (ขวัญเรือน ศรีภิรมย์, 2534) อย่างไรก็ตามการฉีดฮอร์โมนเข้าสู่ร่างกายกุ้งมีข้อเสีย คือ ทำให้กุ้งเกิดความเครียด เนื่องจากการจับ และการฉีด และการที่กุ้งได้รับฮอร์โมนในปริมาณมากอย่างรวดเร็ว ก็อาจทำให้กุ้งปรับตัวไม่ทัน และเกิดการตายได้ นอกจากนั้นการฉีดฮอร์โมนเป็นวิธีการไม่เหมาะสมในการปฏิบัติจริงในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งที่ต้องทำงานกับแม่กุ้งจำนวนมากในคราวเดียวกัน เพราะต้องสูญเสียเวลาในการฉีดกระตุ้นแม่กุ้งครั้งละตัว นักวิจัยจึงมีการศึกษาหาวิธีการอื่นที่เหมาะสมในการกระตุ้นการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ด้วยฮอร์โมนกับแม่กุ้งจำนวนมากในคราวเดียว เช่นการให้ฮอร์โมนผ่านอาหาร ตัวอย่างเช่นการผสมสเตียรอยด์ในอาหารปลาเพื่อกระตุ้นการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์(Pelissero and Sumpter,1992) หรือการผสมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในอาหารเพื่อกระตุ้นการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ และการวางไข่ของเม่นทะเล (Lytechinus variegatus) (Wasson *et al*., 2000)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

การดำเนินการศึกษา

การวิจัยครั้งนี้แบ่งการทดลองเป็น 2 ขั้นตอนคือ

3.1. ศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลาย PLGA ที่ผลิตด้วยเทคนิค Oil-in-water single emulsion solvent evaporation ที่เหมาะสม และการปลดปล่อยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากแคปซูล

3.2. ทดสอบผลของอาหารสำเร็จรูปที่ผสมเม็ดแคปซูล P4-PLGAเป็นองค์ประกอบต่อการเจริญของรังไข่ และปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม

3.1 ศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลาย PLGA ที่ผลิตด้วยเทคนิค Oil-in-water single emulsion solvent evaporation ที่เหมาะสม และการปลดปล่อยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากแคปซูล

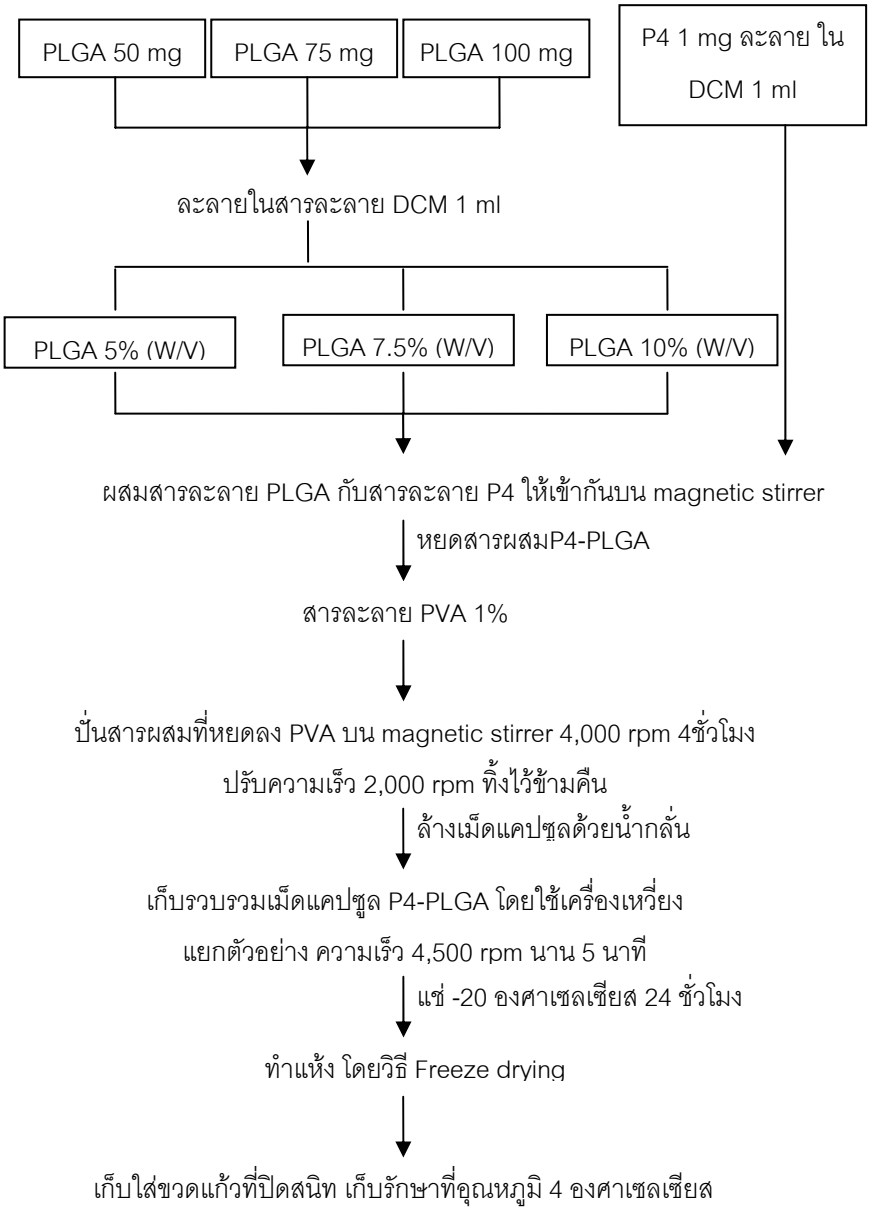
3.1.1 การหาความเข้มข้นของสารละลาย PLGA ที่เหมาะสม

(1) วิธีการเตรียมเม็ดแคปซูล P4-PLGAในสารละลาย PLGA

ผลิตเม็ดแคปซูล PLGA โดยใช้เทคนิค oil-in-water single emulsion solvent evaporationที่ดัดแปลงจากวิธีของ Yang. *et al*. (2000) โดยมีขั้นตอนการผลิตเม็ดแคปซูล PLGA ตามรูปที่ 3.1ซึ่งมีการผลิตดังนี้ ละลายกรดพอลิแลคไทด์โคไกลโคไลด์ (50:50 Poly (D,L-lactide-co-glycolide) Ester Terminated ; PLGA, Inherent viscosity rang 0.55-0.75 dl/g, Lactel Absorbable Polymes, USA) ในสารละลายไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane; DCM, Labscan Asia Co., Ltd., Thailand) ที่อัตราส่วนต่างๆกันคือ 50:1, 75:1 และ 100:1 (W/V) โดยเทียบเป็นความเข้มข้นของสารละลาย PLGA เท่ากับ 5%, 7.5% และ 10%(W/V) จากนั้นนำฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (P4) (Sigma, USA) ความเข้มข้น 1 mg/ml ใน DCM มาเติมลงไปในสารละลาย PLGA สารผสมระหว่าง P4, PLGA และ DCM จะถูกทำให้แข็งโดยการหยดสารผสมลงในสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinylalcohol; PVA; Sigma, USA) ที่มีความเข้มข้น 1 % (W/V) (ละลายในน้ำ) ในอัตราส่วนระหว่างสารละลาย P4-PLGA:PVA เท่ากับ 1:20 และผสมให้

เข้ากันด้วยเครื่อง magnetic stirrer (MS 115; HL Instrument, Thailand) ที่ความเร็ว 4,000 rpm นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นปรับระดับความเร็วเหลือ 2,000 rpm ทิ้งไว้ 1 คืน จะได้เม็ดแคปซูล P4-PLGA (หรือที่เรียกว่า P4-PLGA microspheres) ที่ผนังมีความแข็ง ล้างเม็ดแคปซูล P4-PLGA ด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว และรวบรวมเม็ดแคปซูล P4-PLGA โดยใช้เครื่องเหวี่ยงแยกตัวอย่าง (centrifuge; GX 16 Sigma , Germany) ที่ความเร็ว 4,500 rpm (2,173 g) 5 นาที จากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ทำแห้ง โดยวิธี Freeze- drying (Freeze dry system/ Freezone 4.5; Labconco, USA) ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส และความดัน133 × 10^{-3} mBAR เก็บเม็ดแคปซูล P4-PLGA ในขวดแก้วที่ปิดสนิท เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลผลิต (%Yields) ตามวิธีของ Wu (2004) ดังสมการที่ 3.1

$$\%\text{Yields} = \frac{\text{มวลของเม็ดแคปซูล P4-PLGAที่ผลิตได้ x 100}}{\text{มวลของ PLGA เริ่มต้น}} \quad \text{สมการที่ 3.1}$$



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมเม็ดแคปซูล P4-PLGA

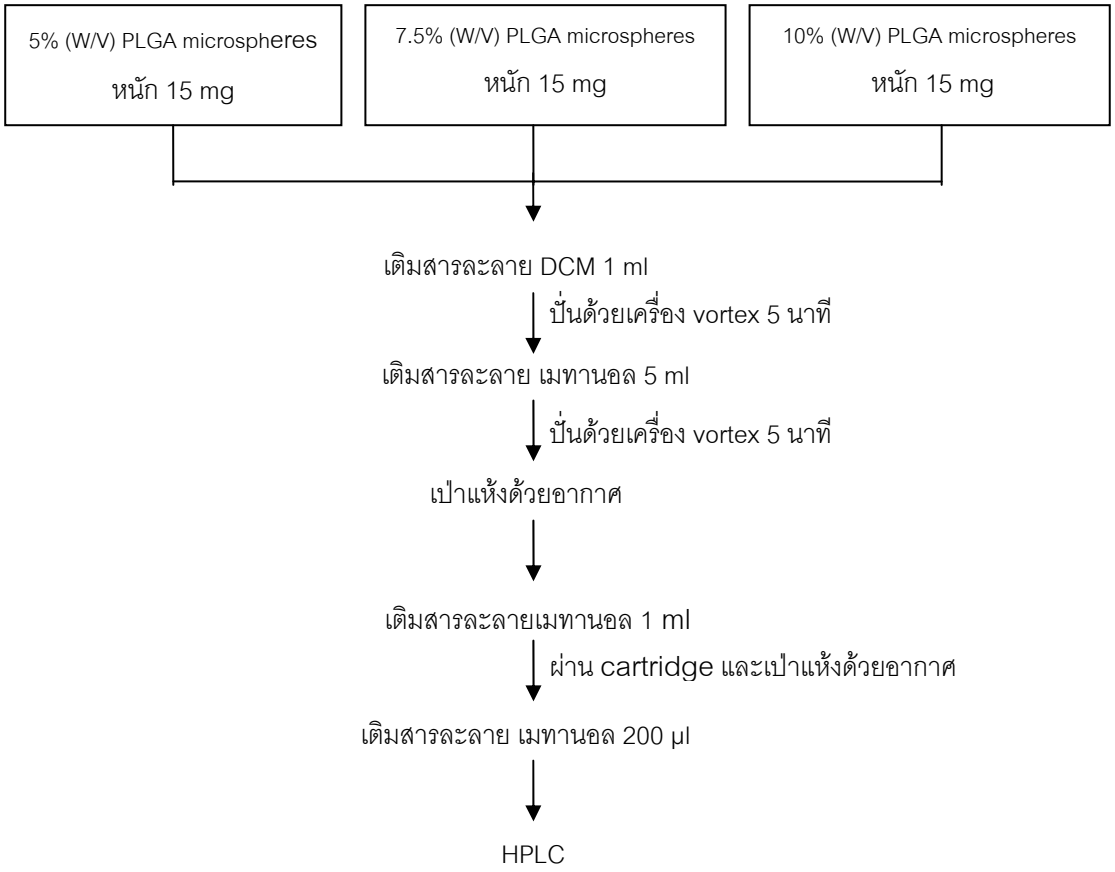
(2) การทดสอบประสิทธิภาพการตรึงฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนภายในเม็ดแคปซูล P4-PLGA

การทดสอบประสิทธิภาพการตรึงฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนตามวิธีของ Yang *et al.* (2000) นำเม็ดแคปซูล P4-PLGA (15 mg) ที่ผลิตด้วยสารละลาย PLGA ใน 3 ความเข้มข้นได้แก่ 5%, 7.5% และ 10%(W/V) มาละลายใน DCM 1 ml โดยใช้เครื่อง vortex (Vortex Genie 2; Scientific industries, INC., USA) ความเร็ว 6,000 rpm นาน 5 นาที จากนั้นเติมเมทานอล เพื่อทำละลาย P4 ปริมาณ 5 ml ผสมด้วยเครื่อง vortex นาน 5 นาที นำ P4 ที่ละลายในเมทานอลมาเป่าแห้งด้วย

อากาศ เติมเมทานอลกลับ 1 ml เพื่อทำละลาย P4 จากนั้นนำไปผ่าน cartridge ที่บรรจุคาร์บอน 18 (C18, Vertical Chromatography, Thailand) ด้วยวิธี Solid Phase Extraction (SPE) ขั้นตอนการกระตุ้นการทำงานของ C18 (activate cartridge) ล้าง cartridge ด้วย เมทานอล 5 ml 1 ครั้ง และล้างด้วยสารตัวพา (mobile phase; เมทานอลผสมกับน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 85:15 (V/V) 5 ml 1 ครั้ง บรรจุสารละลาย P4 ในเมทานอลลงใน cartridge จากนั้นชะล้าง (elute) P4 ออกจาก cartridge ด้วยสารละลาย เมทานอล ปริมาตร 1 ml 3 ครั้ง เป่าแห้งสารละลาย เติมเมทานอล 200 µl นำสารละลายไปฉีดเข้าเครื่อง Reverse-Phase (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC) เพื่อวิเคราะห์ P4 ตามวิธีของ Warrier *et al*. (2001) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

นำสารละลาย P4 ที่ผ่านการสกัดจาก SPE มาฉีดเข้าคอลัมน์ Prevail C-18 column ขนาด 0.46×15 เซนติเมตร (Vertical Chromatography, Thailand) โดยมีสารตัวพา (mobile phase) คือ เมทานอลผสมกับน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 85:15 (V/V) อัตราไหลของสารตัวพาเท่ากับ 1.0 ml/min ตรวจวัด peak ของ P4 ในตัวอย่างเปรียบเทียบกับ peak ของสารมาตรฐาน P4 ด้วยเครื่อง Dual λ Absorbance Detect (Water 2487, USA) ที่ความยาวคลื่น 254 nm (ดังรูปที่ 3.2) นำค่าที่ได้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการตรึง P4 ในเม็ดแคปซูล P4-PLGA (%Encapsulation Efficiency; %EE) ตามวิธีของ Wu (2004) ดังสมการที่ 3.2

$$\%\text{Encapsulation Efficiency} = \frac{\text{ปริมาณ P4 ที่ได้จากผลิตภัณฑ์} \times 100}{\text{ปริมาณ P4 เริ่มต้น}}$$ สมการที่ 3.2



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพการตรึงฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนภายในเม็ดแคปซูล P4-PLGA

(3) **ศึกษาลักษณะของเม็ดแคปซูล** P4-PLGA **ทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด** (Scanning electron microscopy; SEM)

นำตัวอย่างเม็ดแคปซูล P4-PLGA ที่ผลิตด้วยสารละลาย PLGA ทั้ง 3 ความเข้มข้น มาวางโรยบนแท่นอลูมิเนียมที่เคลือบบาง ๆ ด้วยทอง หนา 120 nm ในภาวะสูญญากาศ (Sah, 2000) ส่องตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เพื่อศึกษาลักษณะรูปทรง และขนาดของเม็ดแคปซูล P4-PLGA ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ การทดลองทำที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2 **ศึกษาการปลดปล่อยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน** (Release rate of progesterone hormone)

จากผลการศึกษาที่ 3.1.1 นำเม็ดแคปซูลที่มีความเหมาะสมสำหรับเป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารกระตุ้นแม่พันธุ์ มาศึกษาการปลดปล่อย P4 จากเม็ดแคปซูล P4-PLGA โดยนำเม็ดแคปซูล P4-PLGA ใส่ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer solution; PBS) ที่ pH แตกต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ 5.5, 7.5 และ 9.5 เป็นเวลาที่ 1, 2, 3 จนถึง 10 ชั่วโมง โดยขั้นตอนการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ มีดังนี้

เตรียมสารละลายโมโนโซเดียมฟอสเฟส ($NaH_2PO_4.2H_2O$, 0.2 M; Scharlau Chemie S.A., The European union) ปริมาณ 27.8 g ละลายในน้ำกลั่น 1 L สารละลายไดโซเดียมฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$, 0.2 M; Ajax Finechem, Australia) ปริมาณ 71.1 g ละลายในน้ำกลั่น 1 L นำสารละลายทั้งสองผสมกัน ปรับค่า pH ที่ต้องการด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH 100; YSI Environmental, China) โดยปรับสมดุลกรด-ด่างด้วยการเติมสารละลาย $NaH_2PO_4.2H_2O$ และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH, 0.1 M; Ajax Finechem, Australia)

นำเม็ดแคปซูล P4-PLGA หนัก 40 mg ใส่ขวดแก้วใส ขนาด 10 ml จากนั้นเติมสารละลาย PBS ที่ pH 5.5, 7.5 และ 9.5 ปริมาณ 1 ml นำไปใส่เครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 50 rpm เก็บตัวอย่างตามที่กำหนด ทั้งนี้ก่อนถึงเวลาที่กำหนดให้นำขวด vial ออกจากเครื่องเขย่า ทิ้งให้เม็ดแคปซูล P4-PLGA ตกตะกอน ดูดสารละลายใสออก จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ml นำเข้าเครื่องเขย่าและทำการทดลองต่อ ตามลำดับ (Wu, 2004) นำสารละลายใสกรองผ่าน cartridge โดยมีขั้นตอนดังนี้

ทำการกระตุ้นการทำงานของ cartridge ดังขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น บรรจุสารละลายใส PBS ที่เก็บได้ตามช่วงเวลาต่าง ๆ ลงใน cartridge โดยสารละลายตัวอย่างที่บรรจุ นั้นจะทำการดันทิ้ง (อัตราการไหล เท่ากับ 1.0 ml/min) และล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ml จากนั้นชะล้าง P4 ออกจาก cartridge ด้วยสารละลายเมทานอล 1 ml เก็บสารละลายเมทานอลที่ได้ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณการปลดปล่อย P4 ด้วยเทคนิค Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography ; HPLC (Warrier *et al.*, 2001) (ดังรูปที่ 3.3) นำค่าที่ได้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ปริมาณการปลดปล่อย P4 ในสารละลาย PBS (%Release rate) ดังสมการที่ 3.3

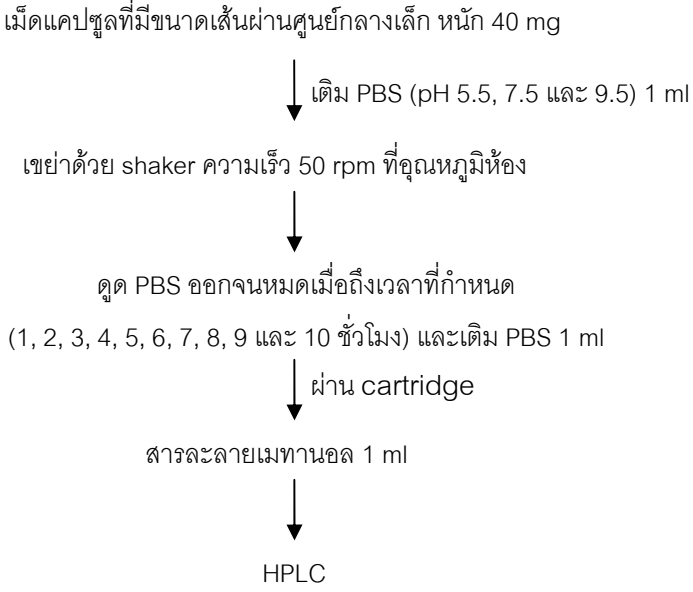
$$\% \text{ Release rate} = \frac{P4_{\text{ชั่วโมงที่ 1}} - P4_{\text{ชั่วโมงที่ 0}} \times 100}{P4_{\text{เริ่มต้น}}} \quad \text{สมการที่ 3.3}$$

โดยที่

$P4_{\text{ชั่วโมงที่0}}$ = ปริมาณ P4 ที่ปลดปล่อยในสารละลาย PBSชั่วโมงที่ 0

$P4_{\text{ชั่วโมงที่1}}$ = ปริมาณ P4 ที่ปลดปล่อยในสารละลาย PBS ที่ชั่วโมงที่ 1

$P4_{\text{เริ่มต้น}}$ = ปริมาณ P4 ภายในเม็ดแคปซูล P4-PLGA



รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการทดสอบการปลดปล่อยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน

3.2 การทดสอบผลของอาหารสำเร็จรูปที่ผสมเม็ดแคปซูล P4-PLGA เป็นองค์ประกอบต่อการเจริญของรังไข่แม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม

3.2.1 การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบและอาหาร ตามวิธี AOAC (1997)

ทำการวิเคราะห์คุณค่าของวัตถุดิบอาหาร และอาหารเม็ดสำเร็จรูป เพื่อหาคุณค่าทางโภชนาการดังนี้ วิเคราะห์หาปริมาณความชื้น โดยใช้ตู้อบความร้อน (hot air oven) วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี kjeldahl วิเคราะห์ปริมาณไขมัน ด้วยวิธี Ether extraction วิเคราะห์ปริมาณใยอาหาร ด้วยวิธี acid detergent และวิเคราะห์ปริมาณเถ้า ด้วยวิธี muffle furnace combustion

3.2.2 การคำนวณสูตรอาหารและการสร้างสูตรอาหาร

ใช้ผลการวิเคราะห์วัตถุดิบในการคำนวณสูตรอาหาร โดยกำหนดให้มีคุณค่าทางโภชนาการของอาหารเม็ดสำเร็จรูป ดังนี้ โปรตีน 52% ไขมันรวม 10.5% และความชื้น 20% ทั้งนี้ วัตถุดิบอาหารที่ใช้ได้แก่ ปลาป่น หมึกป่น เปลือกและหัวกุ้งป่น กากถั่วเหลืองป่น แป้งสาลี น้ำมันปลา คอเลสเตอรอล แร่ธาตุและวิตามิน (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1: องค์ประกอบของอาหารแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม

ชนิดของวัตถุดิบอาหาร	ปริมาณวัตถุดิบ (กรัม ต่อ100 กรัมอาหาร)
ปลาป่น	50
หมึกป่น	17
หัวกุ้งป่น	4
กากถั่วเหลืองป่น	8
แป้งสาลี	8
วีท กูลเตน	4
คอเลสเตอรอล	0.5
เลซิติน	0.5
วิตามินรวม*/ แร่ธาตุรวม**	2/2
วิตามินซี	0.5
น้ำมันปลา	3
แอสตาแซนทิน	0.9
เม็ดแคปซูล P4-PLGA	0.5

* องค์ประกอบวิตามินรวม คือ วิตามิน A, B, AB, E, K, B, B_1, B_2, B_6, B_{12}, ไนอะซิน, โฟลิค, กรดเทนโทเทนิค,
ไบโอติน, โคลีน

** องค์ประกอบแร่ธาตุรวม คือ เหล็ก, แมกนีเซียม, แมงกานีส, ไอโอดายน์, โพแทสเซียม, ซีลิเนียม, สังกะสี

3.2.3 การเตรียมอาหาร

นำวัตถุดิบอาหารที่บดละเอียดทั้งหมดมาผสมกัน ยกเว้นแป้งก่อนนำมาผสมต้องต้มให้สุกก่อน นำวัตถุดิบที่ผสมเข้ากันมาอัดผ่านเครื่องบดเนื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรู 4 มิลลิเมตร เม็ดอาหารที่ได้มีลักษณะเป็นทรงกระบอกเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร (รูปที่ 3.4) นำอาหารไปอบแห้งที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เม็ดอาหารที่ได้มีความชื้นสูง (moist pellet) (Meunpol *et al*., 2005) เก็บอาหารทดลองใส่ถุงที่ปิดสนิท ที่อุณหภูมิต่ำ (-10 องศาเซลเซียล) เพื่อรักษาคุณค่าของสารอาหาร

รูปที่ 3.4 ลักษณะเม็ดอาหารสำเร็จรูป

3.2.4 การดำเนินการทดลอง

ทำการทดลองเลี้ยงแม่กุ้งที่เฟิร์สฟาร์ม ต.ไม้ขาว อ.ถลาง จ.ภูเก็ต ระหว่างวันที่ 26 กันยายน 2550 และสิ้นสุดการทดลองวันที่ 6 พฤศจิกายน 2550 รวมระยะเวลาทั้งหมด 42 วัน

3.2.5 การเตรียมบ่อทดลอง

บ่อที่ใช้ในการทดลองเป็นบ่อไฟเบอร์ทรงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.73 เมตร ความสูงบ่อ 0.9 เมตร ปริมาตรน้ำที่ใช้เลี้ยงแม่กุ้ง 4.68 ตัน จำนวน 4 บ่อ ภายในบ่อทดลองกั้นด้วยอวนเพื่อแบ่งเป็น 2 ส่วน (รูปที่ 3.5) ทำการให้อากาศจากด้านล่างของพื้นบ่อ คลุมบ่อทดลองด้วยมุ้งเขียวเพื่ออำพรางแสง ปล่อยแม่พันธุ์กุ้งในอัตรา 50 ตัวต่อน้ำ 2.34 ลูกบาศก์เมตร ทำการทดลอง ชุดละ 1 บ่อ ปริมาณแม่พันธุ์ทั้งหมด 100 ตัว ระยะเวลาทดลอง 42 วัน ในแต่ละวันทำการดูดตะกอนเปลี่ยนถ่ายน้ำ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรน้ำเลี้ยง ทุกบ่อทดลอง และตวรจวัดคุณภาพน้ำภายในบ่อหลังจากที่เปลี่ยนถ่ายน้ำในตอนเช้า โดยควบคุมคุณภาพน้ำภายในบ่อทดลอง ดังนี้ pH 7.5-8

แอมโมเนียรวม <0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิอยู่ในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส ความเค็มประมาณ 30 พีพีที ความลึกน้ำที่ใช้ 90 %ของความสูงบ่อเลี้ยง

รูปที่ 3.5 ลักษณะบ่อทดลองสำหรับการเลี้ยงแม่กุ้งขาวด้วยอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ

3.2.6 การเตรียมสัตว์ทดลอง

แม่กุ้งขาวแวนนาไมจากเฟิร์สฟาร์ม ต.ไม้ขาว อ.ถลาง จ.ภูเก็ต ที่มีอายุประมาณ 7 เดือน จำนวน 400 ตัว ทำการสุ่มแม่กุ้ง 20 ตัว มาชั่งน้ำหนัก และวัดความยาว โดยน้ำหนักเฉลี่ยระหว่าง 32.79±3.43 กรัม ความยาวเฉลี่ยระหว่าง 15.52±0.64 เซนติเมตร ปรับสภาพกุ้งให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมของบ่อ และอาหารที่ใช้ในการทดลอง โดยผสมอาหารเม็ดร่วมกับอาหารธรรมชาติ โดยเพิ่มขึ้นทีละน้อย จนแม่กุ้งยอมรับอาหารทดลอง จากนั้นสุ่มแม่กุ้งลงในบ่อทดลอง และติดเครื่องหมายที่ก้านตา

3.2.7 การให้อาหาร

การทดลองครั้งนี้แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มทดลอง คือ อาหารผสมเม็ดแคปซูล P4-PLGA 0.5 g ต่อน้ำหนักอาหาร 100 g โดยเม็ดแคปซูล P4-PLGA ปริมาณดังกล่าว จะมีปริมาณ P4 ต่างกัน 3 ระดับ (ตารางที่ 3.2) เทียบกับอาหารธรรมชาติ ทำการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ดังนี้

1. อาหารธรรมชาติ ได้แก่ หมึกกล้วย (Splendid squid; *Loligo* sp.)และหอยแมลงภู่ (Green mussel; *Perna* sp.) 100 %เป็นชุดควบคุม (Control; C)
2. อาหารสูตรที่ 1 (D.1) คือ อาหารสำเร็จรูปที่ผสมเม็ดแคปซูล P4-PLGA

(0.11 mg P4 ต่อน้ำหนักอาหาร100 g) 50 % และอาหารธรรมชาติ 50 %

3. อาหารสูตรที่ 2 (D.2) คือ อาหารสำเร็จรูปที่ผสมเม็ดแคปซูล P4-PLGA (0.22 mg P4 ต่อน้ำหนักอาหาร100 g) 50 % และอาหารธรรมชาติ 50 %

4. อาหารสูตรที่ 3 (D.3) คือ อาหารสำเร็จรูปที่ผสมเม็ดแคปซูล P4-PLGA (0.33 mg P4 ต่อน้ำหนักอาหาร100 g) 50 % และอาหารธรรมชาติ 50 %

ตารางที่ 3.2 ปริมาณฮอร์โมน P4 ภายในเม็ดแคปซูล P4-PLGA 0.5 g ที่ระดับต่าง ๆ กัน

อาหารทดลอง	**ปริมาณ P4 ภายในเม็ดแคปซูล P4-PLGA 0.5 g**
อาหารสูตรที่ 1	0.11 mg P4 ต่อน้ำหนักอาหาร100 g
อาหารสูตรที่ 2	0.22 mg P4 ต่อน้ำหนักอาหาร100 g
อาหารสูตรที่ 3	0.33 mg P4 ต่อน้ำหนักอาหาร100 g

อาหารแม่พันธุ์กุ้งขาว: ชุดควบคุมจะให้อาหารธรรมชาติ 4 มื้อต่อวัน คือ 09.00 น. 13.00 น. 17.00 น. และ21.00 น. ปริมาณอาหารที่ให้ คือ 10 % ของน้ำหนักตัวกุ้ง

ชุดทดลองให้อาหารสำเร็จรูปสลับกับอาหารธรรมชาติ เวลาให้อาหารคือ 4 มื้อต่อวัน โดยอาหารสำเร็จรูปให้เวลา 09.00 น. และ 17.00 น. ปริมาณอาหารที่ให้ 5 % ของน้ำหนักตัวกุ้ง อาหารธรรมชาติให้เวลา 13.00 น. และ 21.00 น. ปริมาณอาหารที่ให้ 10 % ของน้ำหนักตัวกุ้ง และมีการปรับปริมาณอาหารให้เหมาะสมกับอัตราการกินอาหารของแม่พันธุ์กุ้ง

3.2.8 การบันทึกข้อมูลการทดลอง

การทดสอบผลของอาหารสำเร็จรูปที่ผสมเม็ดแคปซูล P4-PLGAเป็นองค์ประกอบต่อการเจริญของรังไข่แม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไมแบ่งการเก็บผลทดลองออกเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

(1) ศึกษาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม

(1.1) ศึกษาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไมหลังจากได้รับอาหารทดลอง

ทำการทดลองเลี้ยงแม่กุ้งด้วยอาหารทดลองทั้งหมด 4 ชุดทดลองข้างต้น ชุดการทดลองละ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 50 ตัว ทำการเก็บเลือดจากแม่กุ้งขาวแวนนาไม ที่ไม่มีการตัดก้านตาจำนวนซ้ำละ 5

ตัว หลังจากให้อาหารแม่กุ้งทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลานาน 4 สัปดาห์ (แม่กุ้งที่ดูดเลือดจะไม่นำกลับมาเลี้ยงในบ่อทดลอง) เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้น P4 ของแม่กุ้งแต่ละกลุ่มการทดลอง โดยดูดเลือดกุ้งบริเวณแอ่งเลือด ซึ่งอยู่ตรงกลางระหว่างโคนขาเดินคู่ที่ 5 กับโคนขาว่ายน้ำคู่ที่ 1 ปริมาณ 60-100 µl ใส่หลอดแก้ว ผสมกับ1% Na-EDTA 100 µl เก็บเลือดในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ P4 ด้วยเทคนิคเรดิโอ อิมมูโน เอสเส (Radioimmunoassay; RIA) (Kamonpatana *et a*l., 1979)

(1.2) ศึกษาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไมที่ระยะการพัฒนารังไข่ต่าง ๆ

นำแม่พันธุ์กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองเป็นระยะเวลานาน 1 เดือน จากการทดลองที่ (1.1) มาตัดก้านตา 50 ตัว โดยทำการทดลองชุดละ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 25 ตัว เก็บเลือดแม่กุ้งก่อนและหลังจากการตัดก้านตา โดยจะทำการเก็บเลือดกุ้งที่มีการพัฒนารังไข่ตั้งแต่ระยะที่ 0 (กุ้งไม่มีการพัฒนารังไข่) ถึง ระยะที่ 4 (ระยะไข่สุก) ระยะละ 10 ตัวเป็นระยะเวลานาน 10 วัน (แม่กุ้งที่ทำการดูดเลือดจะนำกลับมาเลี้ยงในบ่อทดลองต่อ) เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นฮอร์โมน P4 ที่ระยะรังไข่ต่างกัน ซึ่งวิธีการดูดเลือดเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ P4 ด้วยเทคนิค เรดิโอ อิมมูโน เอสเส (Radioimmunoassay; RIA)
(Kamonpatana *et a*l., 1979)

(1.3) วิธีการวัดปริมาณฮอร์โมนในเลือดกุ้งด้วย เทคนิคเรดิโอ อิมมูโน เอสเส (Radioimmunoassay; RIA) (Kamonpatana *et a*l., 1979)

ทำการสกัดตัวอย่างเลือดกุ้ง ด้วย ไดเอทิล อีเทอร์ (Diethyl ether) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 ปั่นส่วนผสมทั้งสองที่ความเร็ว 6,000 rpm ด้วย vortex นาน 90 วินาที เมื่อตัวอย่างแยกชั้นเก็บส่วนน้ำใสชั้นบน ทำแห้งด้วย Vacuum dryer นาน 1 ชั่งโมง นำตัวอย่างฮอร์โมนที่แห้งมาละลายด้วย Phosphate buffer solution (PBS) ปริมาตร 100 µl ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 1 คืน เติมAnti-Progesterone ปริมาตร 100 µl บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เติมสารกัมมันตรังสีทริเทรียม [(1,2,6,7-^{3}H)P4] ปริมาตร 100 µl บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 12 ชั่วโมง จากนั้นเติม ice-cold dextran-coated charcoal ปริมาตร 200 µl บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที และแยกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกตัวอย่าง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสด้านบนลง scintillation vials 10 ml เติม

สารละลาย Scintillation ปริมาตร 4 ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง และนำตัวอย่างวิเคราะห์ความเข้มข้นของ P4 ด้วยเครื่อง Liquid Scintillation Counter (Beckman, USA) คำนวณความเข้มข้นของ P4 โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของ P4 ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการโครงการใช้นิวเคลียร์เพื่อส่งเสริมกิจการผสมเทียมโคนม และกระบือปลัก คณะสัตว์แพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(2) ศึกษาการพัฒนารังไข่ภายนอกของแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม

นำแม่พันธุ์กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองเป็นระยะเวลานาน 1 เดือน จากการทดลองที่ (1.1) มาตัดก้านตา ทำการทดลองชุดละ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 25 ตัว ตรวจสอบแม่พันธุ์กุ้งจากลักษณะทางกายภาพในตอนเช้าที่มีการถ่ายน้ำว่าแม่กุ้งมีการพัฒนารังไข่หรือไม่เป็นระยะเวลา 10 วัน จากนั้นทำการจดบันทึก ซึ่งการสังเกตการพัฒนารังไข่ภายนอก โดยจำแนกตามวิธีของชูศักดิ์ แสงธรรม (2541) ดังนี้ (ลักษณะการสังเกตดังรูปที่ 3.6)

1. ระยะไข่อ่อน (Immature stage; ระยะที่ 1) เป็นระยะที่รังไข่มีลักษณะแบนใส ไม่สามารถมองเห็นจากเปลือกนอกหลังลำตัว แต่เมื่อผ่าดูจะพบเนื่อเยื่อแถบยาวที่ไม่มีสี ซึ่งทำให้มองไม่เห็นฟองไข่ภายในได้

2. ระยะไข่เริ่มเจริญ (Early mature stage; ระยะที่ 2) สามารถเริ่มมองเห็นจากเปลือกนอกหลังลำตัวเป็นแถบยาวมีขนาดใหญ่ขึ้นโดยเฉพาะส่วนหัวและส่วนกลางลำตัว เมื่อผ่ารังไข่จะเห็นเป็นสีน้ำตาลหรือเขียวปนเทา

3. ระยะไข่เจริญเต็มที่ (Mature stage; ระยะที่ 3) สามารถเริ่มมองเห็นจากเปลือกนอกหลังลำตัวชัดเจนขึ้นเป็นแถบยาวสีเข้มและหนา เนื่องจากรังไข่ขยายตัวมากขึ้นตั้งแต่ส่วนหัวจนถึงส่วนท้าย บริเวณส่วนท้องปล้องแรกจะเห็นรังไข่ขยายออกดูคล้ายรูปเพชร หรือผีเสื้อ (แผ่โค้งเป็นแฉกออกไปทางด้านข้าง) เมื่อผ่ารังไข่ออกดูจะเป็นสีเขียวและภายในมีกลุ่มไข่อยู่เต็ม

4. ระยะไข่สุก (Ripe stage; ระยะที่ 4) สังเกตไข่บริเวณด้านหลังลำตัวเป็นลำทึบ สีเขียวแก่เกือบดำขยายเต็มที่เต็มช่องท้องส่วนหลังเห็นแผ่โค้งเป็นแฉกชัดเจนและระยะนี้ พบว่ากุ้งพร้อมที่จะวางไข่

รูปที่ 3.6 ลักษณะรังไข่กุ้งระยะไข่เริ่มเจริญ (Early mature stage; ระยะที่ 2)

(2.1) ศึกษาความสามารถในการวางไข่ของแม่กุ้ง และความดกไข่

นำแม่พันธุ์กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองเป็นระยะเวลานาน 1 เดือน จากการทดลองที่ (1.1) มาตัดก้านตา ทำการทดลองชุดละ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 25 ตัว จากนั้นตรวจสอบแม่พันธุ์กุ้งจากลักษณะทางกายภาพในตอนเช้าที่มีการถ่ายน้ำว่าแม่กุ้งมีการพัฒนารังไข่ระยะไข่สุก (ไข่บริเวณด้านหลังลำตัวเป็นลำทึบ สีเขียวแก่เกือบดำขยายเต็มที่เต็มช่องท้องส่วนหลังเห็นแผ่โค้งเป็นแฉกชัดเจนและระยะนี้ พบว่ากุ้งพร้อมที่จะวางไข่) หรือไม่ โดยจะสังเกตบริเวณด้านหลังกุ้ง (ดังรูปที่ 3.6) ถ้ามีแม่กุ้งที่มีการพัฒนารังไข่ถึงระยะไข่สุก จะนำไปปล่อยไข่ในถังทรงกลมปริมาตร 500 ลิตร เพื่อนับจำนวนไข่ และชั่งแม่กุ้งตัวที่ปล่อยไข่ นำค่าที่ได้คำนวณหาความดกไข่ ตามวิธีของ Cavalli *et. al.* (1999) ดังสมการที่ 3.4

$$\text{ความดกไข่} = \frac{\text{จำนวนไข่กุ้งทั้งหมด}}{\text{น้ำหนักตัวแม่กุ้ง (กรัม)}} \qquad \text{สมการที่ 3.4}$$

(2.2) การวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของไข่กุ้ง

สุ่มวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของไข่กุ้ง จำนวน 100 ฟอง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 10 เท่า เทียบกับมาตรวัดของกล้องจุลทรรศน์ (YS100; Nikon, USA) ที่มีความละเอียด 1 ช่อง เท่ากับ 0.01 µm

3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่บันทึกของการทดลองที่ 3.1 และ 3.2 ทดสอบความแตกต่างทางสถิติ ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ Completely Randomized Design (CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างหน่วยทดลอง คือ Duncan's New -Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลาย PLGA ที่ผลิตด้วยเทคนิค Oil-in-water single emulsion solvent evaporation ที่เหมาะสม และการปลดปล่อยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากแคปซูล

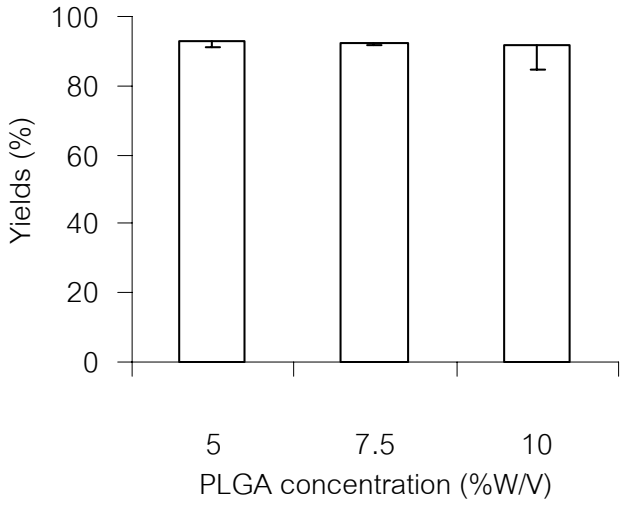
4.1.1 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลาย PLGA ที่ผลิตด้วยเทคนิค Oil-in-water single emulsion solvent evaporation ที่เหมาะสม

(1) ผลการศึกษาการเตรียมแคปซูลฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่เคลือบด้วยสารละลาย PLGA

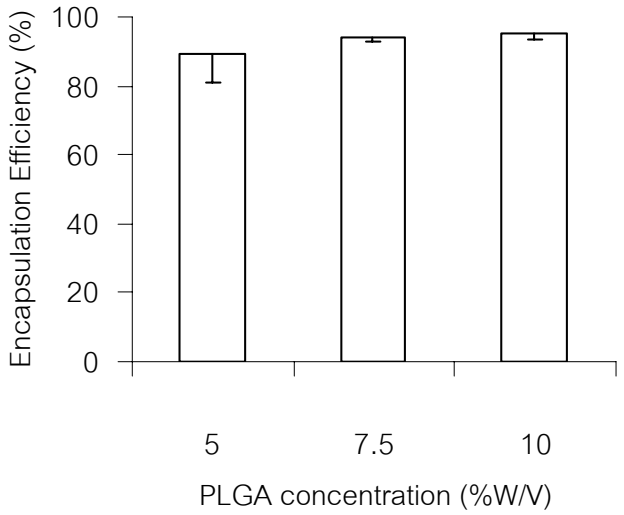
จากการศึกษาผลผลิตเม็ดแคปซูล P4-PLGA ที่เคลือบด้วยสารละลาย PLGA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (5%, 7.5% และ 10%, W/V) พบว่าผลผลิตแคปซูลที่ได้ (yield) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) โดยที่ 5% PLGA (92.76±1.68%) ให้ผลผลิตสูงสุด รองลงมา คือ 7.5% PLGA (92.10±0.21%) และ 10% PLGA (91.77±7.34%) ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.1A

จากการศึกษาประสิทธิภาพการกักเก็บ P4 ที่เคลือบด้วยความเข้มข้นของ PLGA ต่างกัน พบว่า แคปซูล P4 ที่ผลิตด้วยความเข้มข้นของ 10% PLGA สามารถกักเก็บ P4 ภายในแคปซูลได้มากที่สุด คือ 95.51±2.26% รองลงมา คือ แคปซูล P4 ที่ผลิตด้วยความเข้มข้นของ 7.5% PLGA และ5% PLGA คือ 94.06±1.03% และ 89.02±8.21% ตามลำดับ ซึ่งค่าทั้ง 3 พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p>0.05) ดังแสดงในรูปที่ 4.1B

(A)



(B)



* ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ (ค่าเฉลี่ย±SD)

รูปที่ 4.1 (A) ประสิทธิภาพการผลิตแคปซูลฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่เคลือบด้วยPLGA (B) ประสิทธิภาพการตรึงฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนภายในแคปซูล PLGA ที่ผลิตด้วยความเข้มข้นสารละลาย PLGA 5% 7.5% และ10% (W/V)

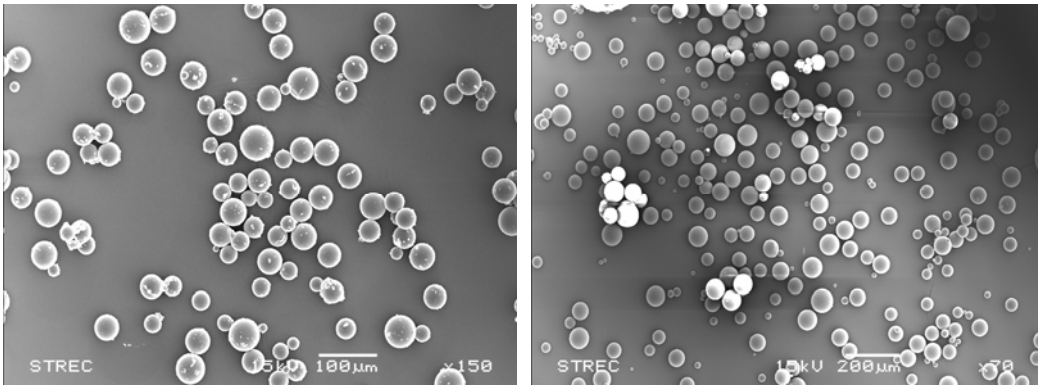
(2) ผลการศึกษาลักษณะของแคปซูลฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน

แคปซูลฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ผลิตด้วยความเข้มข้นของสารละลาย PLGA ที่แตกต่างกัน คือ 5% 7.5% และ 10% PLGA พบว่า เม็ดแคปซูลมีลักษณะทรงกลมผิวเรียบ ลักษณะทางกายภาพเป็นผงละเอียดสีขาวนวล (รูปที่ 4.3) ไม่แตกต่างกัน แต่มีผลต่อขนาดเส้น-ผ่านศูนย์กลางของเม็ดแคปซูล โดยที่ PLGA ที่ความเข้มข้นต่ำสุด จะให้เม็ดแคปซูลที่มีขนาดเล็กสุด เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PLGA ขนาดของแคปซูลจะเพิ่มตามด้วย ดังแสดงในรูปที่ 4.4A คือ ขนาดเม็ดแคปซูลเฉลี่ยของ 5% เท่ากับ 32.7±2.5 µm 7.5% เท่ากับ 53.4±3.6 µm และ 10% 64.3±3.3 µm ซึ่งขนาดของแคปซูลทั้ง 3 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

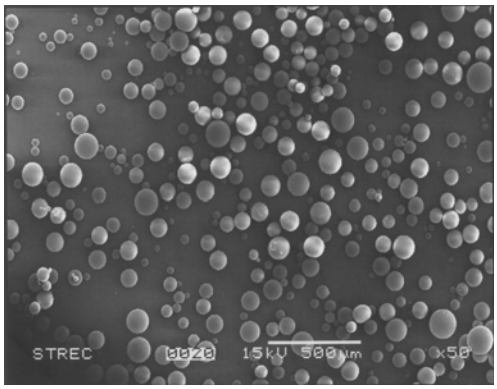
เมื่อวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคปซูล พบว่าการกระจายของขนาดแคปซูล แสดงดังรูปที่ 4.4B โดยเม็ดแคปซูลที่ผลิตด้วยความเข้มข้นทั้ง 3 มีขนาดเม็ดร่วมกันในช่วง 22-54 µm ซึ่ง 5% PLGA มีขนาดแคปซูลอยู่ในช่วง 0-60 µm โดยแคปซูลส่วนใหญ่มีขนาดอยู่ในช่วง 21-40 µm (69±11.14%) รองลงมาคือ 41-60 µm (17.33±13.32%) และ 0-20 µm (13.67±2.31%) ตามลำดับ

กลุ่มการทดลอง 7.5% PLGA มีขนาดแคปซูลอยู่ในช่วง 12-93 µm.โดยขนาดเม็ดแคปซูลส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 41-60 µm (55.33±3.21%) รองลงมาคือ 61-80 µm (22±2.65%) 21-40 µm (18.33±4.73%) และ 0-20 µm (3.33±1.53%) ตามลำดับ

กลุ่มการทดลอง 10% PLGA มีขนาดแคปซูลอยู่ในช่วง 21-120 µm โดยขนาดเม็ดส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 61-80 µm (40±7%) รองลงมาคือ 41-60 µm (23±2%) 21-40 µm (19.33±4.04%) 81-100 µm (14±3.61%) และ101-120 µm (3.67±2.31%) ตามลำดับ



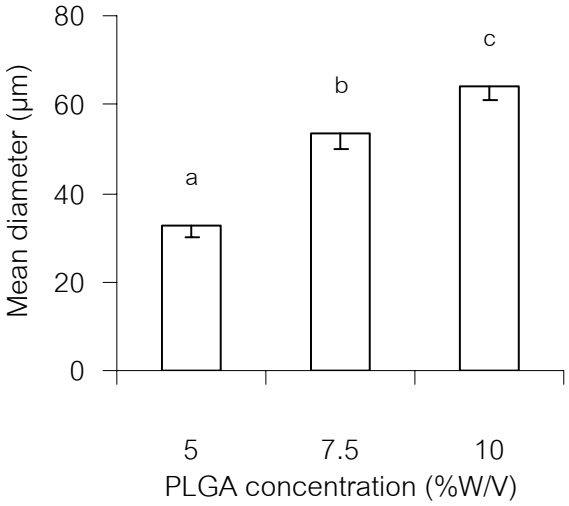
(A) (B)



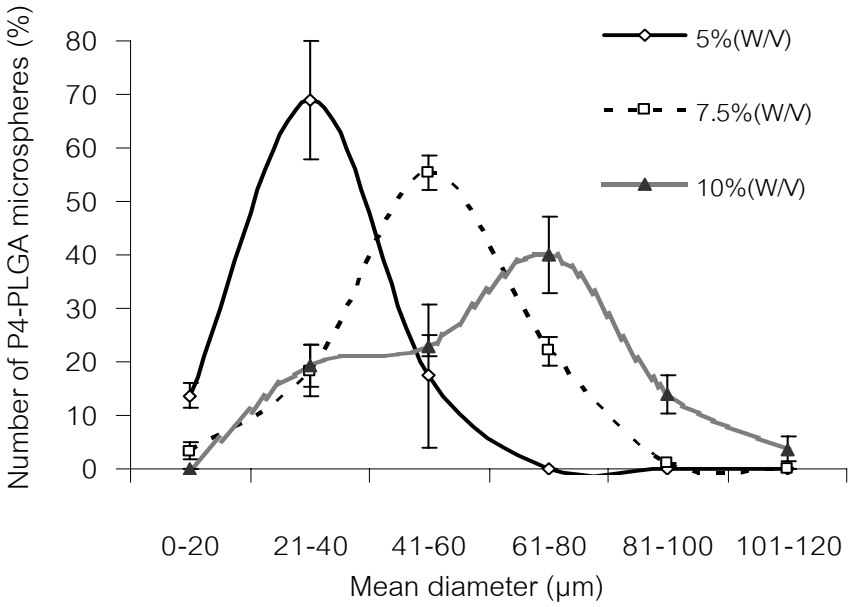
(C)

รูปที่ 4.2 ลักษณะเม็ดแคปซูลฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่เคลือบด้วยสารละลาย PLGA ที่ความเข้มข้น (A) 5% (B) 7.5% (C) 10% ซึ่งทำการส่องใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

(A)



(B)



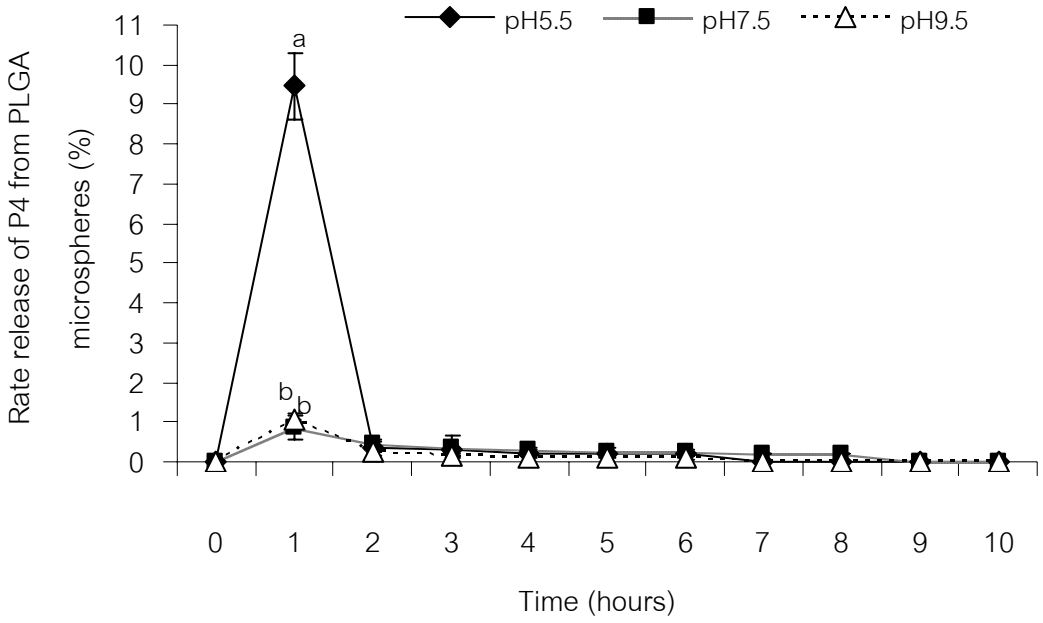
* ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ (ค่าเฉลี่ย±SD)

* อักษรที่แสดงเหนือกราฟแท่งที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

รูปที่ 4.3 (A) ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดแคปซูลฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่เคลือบด้วยสารละลาย PLGA (P4-PLGA microspheres) ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 5% 7.5% และ10% PLGA (W/V) (B) การกระจายของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดแคปซูล P4-PLGA

4.1.2 **ผลของการปลดปล่อยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนออกจากแคปซูล** P4-PLGA (Release rate)

การศึกษาอัตราการปลดปล่อยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนออกจากเม็ดแคปซูล PLGA ที่ผลิตด้วยสารละลาย PLGA ความเข้มข้น 5% W/V ในสารละลาย PBS ที่ pH 5.5, 7.5 และ 9.5 ซึ่งเป็นช่วง pH ที่พบอยู่ภายในระบบทางเดินอาหารครัสเตเซียน (Ceccaldi,1989) (รูปที่ 4.4) พบว่าแคปซูลในสารละลาย PBS ที่ pH ทั้ง 3 มีอัตราการปลดปล่อย P4 สูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 1 โดยที่ pH 5.5 แคปซูลสามารถปลดปล่อย P4 ได้สูง (9.46±0.84%) ต่างจากอัตราการปลดปล่อย P4 ของแคปซูลที่ pH 7.5 (0.85±0.30%) และ 9.5 (1.08±0.13%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (รูปที่ 4.5) หลังจากนั้นแคปซูลมีการปลดปล่อย P4 ออกมาน้อยมากเมื่อทำการตรวจวัดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 ถึง ชั่วโมงที่ 10



* ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ (ค่าเฉลี่ย±SD)

* อักษรที่แสดงเหนือกราฟแท่งที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

รูปที่ 4.4 การปลดปล่อยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากแคปซูล PLGA ที่ผลิตด้วยสารละลาย PLGA ความเข้มข้น 5% W/V ที่ pH 5.5, 7.5 และ 9.5

4.2 ผลของอาหารสำเร็จรูปที่ผสมแคปซูลฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเป็นองค์ประกอบต่อการเจริญของรังไข่ และปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดแม่กุ้งขาวแวนนาไม

4.1.1 ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหาร

จากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลองทั้ง 3 สูตร ด้วยวิธีวิเคราะห์ของ AOAC (1997) พบว่ามีคุณค่าทางโภชนาการดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลองทั้ง 3 สูตร หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ (ค่าเฉลี่ย±SD)

คุณค่าทางโภชนาการ	อาหารสูตรที่ 1 (D-1) 0.11 mgP4/100g feed	อาหารสูตรที่ 2 (D-2) 0.22 mgP4/100g feed	อาหารสูตรที่ 3 (D-3) 0.33 mgP4/100g feed
โปรตีน	51.80±0.84	51.50±0.10	52.64±0.15
ไขมัน	11.86±0.2	11.37±0.06	11.31±0.02
ใยอาหาร	2.56±0.24	2.79±0.01	2.83±0.08
เถ้า	16.19±0.26	16.14±0.2	16.17±0.08
ความชื้น	30.08±11.49	30.95±11.99	31.92±12.31

หมายเหตุ : ค่าโปรตีน, ไขมัน, ใยอาหาร และเถ้า วิเคราะห์จากอาหารที่ไม่มีความชื้น (Dry matter basis)

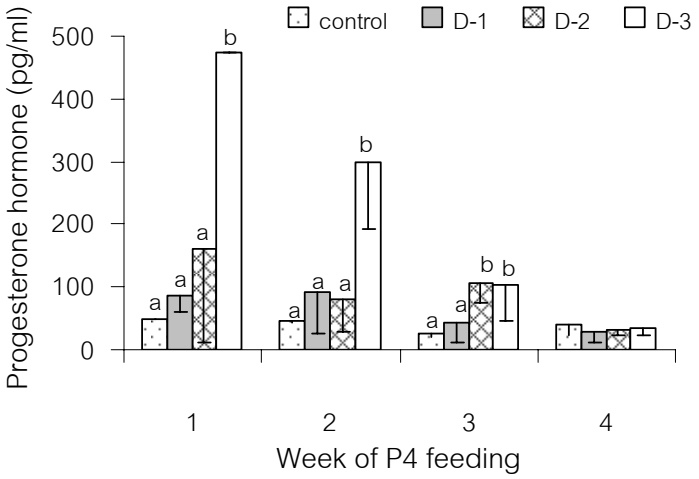
4.2.2 ผลการศึกษาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดแม่กุ้งทั้งที่ตัดก้านตา และไม่ตัดก้าน

(1) การตรวจวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดแม่กุ้งขาวแวนนาไมหลังจากได้รับอาหารทดลอง

การศึกษาความเข้มข้นของฮอร์โมนในเลือดของแม่กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลอง 4 สูตรเป็นเวลา 1 เดือน ทำการเก็บเลือดกุ้ง จำนวน 10 ตัว ทุก 1 สัปดาห์ พบว่า เมื่อไม่มีการตัดก้านตากุ้ง ไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมน P4 ในเลือดแม่กุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารควบคุม ในทางกลับกัน แม่

กุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมแคปซูล P4-PLGA ทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง มีระดับฮอร์โมน P4 ในเลือดสูงกว่าแม่กุ้งที่ได้รับอาหารกลุ่มควบคุม โดยที่ระดับฮอร์โมน P4 ในเลือดแปรผันไปตามความเข้มข้นฮอร์โมน P4 ในเม็ดแคปซูล (รูปที่ 4.5) กล่าวคือ ในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 แม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน P4 สูงสุด (0.33 mg P4/100 g feed) มีระดับฮอร์โมน P4 ในเลือด เท่ากับ 476±0.29 และ 297±104pg/ml ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าระดับของฮอร์โมนในแม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 0.22 mg P4/100 g feed (162±149 และ 82±53 pg/ml ตามลำดับ) และ 0.11 mg P4/100 g feed (85±24 และ 93±67 pg/ml ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) สัปดาห์ที่ 2 แม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน P4 สูงสุด (0.33 mgP4/g feed) วัดระดับฮอร์โมน P4 ในเลือด เท่ากับ 297±103 pg/ml สูงกว่าแม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 0.22 mg P4/100 g feed (82±53pg/ml) และ 0.11mg P4/100 g feed (93±67pg/ml) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) สัปดาห์ที่ 3 กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน P4 สูงสุด (0.33 mgP4/gfeed) วัดระดับฮอร์โมน P4 ในเลือด เท่ากับ 103±56 pg/ml สูงกว่าแม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 0.22 mg P4/100 g feed (107±33 pg/ml) และ 0.11 mg P4/100 g feed (43±32 pg/ml) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยระดับฮอร์โมน P4 ในเลือดแม่กุ้งจะลดระดับลงจากสัปดาห์ที่ 1 ทุกกลุ่มการทดลอง จนกระทั่งในสัปดาห์ที่ 4 ระดับฮอร์โมน P4 ในเลือดจะใกล้เคียงกับแม่กุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารควบคุม ซึ่ง ระดับฮอร์โมน P4 ในเลือดพบอยู่ในช่วง27.47±16.65 ถึง 40.92±19.34 pg/ml

แม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 0.11 และ 0.22 mg P4/100 g feed ไม่ทำให้ระดับฮอร์โมน P4 ในเลือดกุ้ง แตกต่างกับแม่กุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



* control คือ อาหารธรรมชาติ D-1 คือ อาหารสูตรที่ 1 D-2 คือ อาหารสูตรที่ 2 และ D-3 คือ อาหารสูตรที่ 3 (ทำการทดลองละ 10 ตัว)

* อักษรที่แสดงเหนือกราฟแท่งที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเปรียบเทียบแต่ละสัปดาห์ (ค่าเฉลี่ย±SD)

รูปที่ 4.5 ความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดแม่กุ้งที่ไม่ตัดก้านตาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลอง 4 สูตร

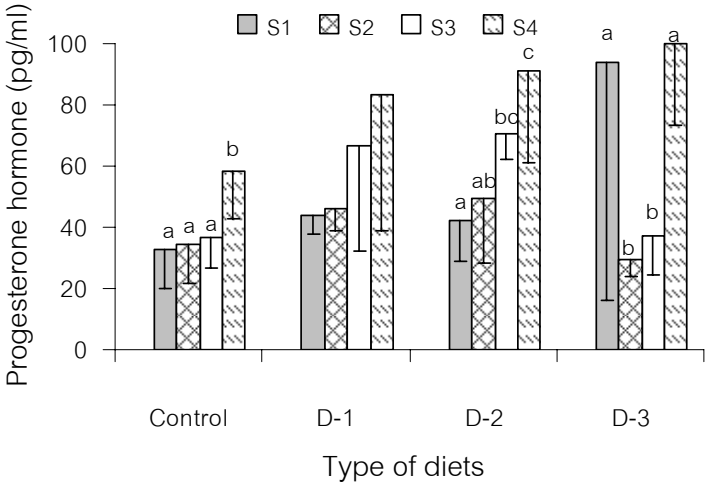
(2) ผลของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดแม่กุ้งขาวแวนนาไมต่อการพัฒนารังไข่ระยะต่าง ๆ

หลังตัดก้านตาแม่กุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมแคปซูล P4-PLGA ทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง จะมีการเปลี่ยนแปลงระดับของฮอร์โมน P4 ในเลือดมากกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.6) โดยพบว่าแม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 0.33 mg P4/100 g feed มีการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมน P4 ในเลือดมากกว่าแม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 0.11 และ 0.22 mg P4/100 g feed และกลุ่มควบคุม กล่าวคือ แม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 0.33 mg P4/100 g feed ระดับฮอร์โมน P4 จะขึ้นสูงระยะที่ 1 (94.07±77.68 pg/ml) จากนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อไข่พัฒนาในระยะที่ 2 (29.23±5.44 pg/ml) และ 3 (36.95±12.33 pg/ml) และเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อไข่พัฒนาในระยะที่ 4 (100.27±27.03 pg/ml) ซึ่งค่าความเข้มข้นของระดับฮอร์โมน P4 ในระยะที่ 1 และ 4 สูงกว่า ระยะที่ 2 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

แม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 0.22 mg P4/100 g feed ฮอร์โมน P4 ในเลือดจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจากไข่ระยะที่ 1 ถึงไข่ระยะที่ 4 (42.27±13.36, 49.53±21.31, 70.46±8.11 และ 91.30±30.06 pg/ml ตามลำดับ) ซึ่งระดับความเข้มข้นฮอร์โมน P4 ระยะที่ 3 และ 4 สูงกว่าระยะที่ 1 และ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

แม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 0.11 mg P4/100 g feed ฮอร์โมน P4 ในเลือดจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจากไข่ระยะที่ 1 ถึงไข่ระยะที่ 4 (44.07±6.06, 46.18±7.49, 66.71±34.46 และ 83.21±44.15 pg/ml ตามลำดับ) ซึ่งระดับความเข้มข้นฮอร์โมน P4 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

แม่กุ้งที่ได้รับอาหารควบคุมฮอร์โมน P4 ในเลือดค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจากไข่ระยะที่ 1 ถึงไข่ระยะที่ 4 (32.58±12.44, 34.55±12.63, 36.87±10.48 และ 58.30±15.25 pg/ml ตามลำดับ) ซึ่งระดับความเข้มข้นฮอร์โมน P4 ระยะที่ 4 สูงกว่าระยะที่ 1, 2 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



* control คือ อาหารธรรมชาติ D-1 คือ อาหารสูตรที่ 1 D-2 คือ อาหารสูตรที่ 2 และ D-3 คือ อาหารสูตรที่ 3

* S1 คือ การพัฒนารังไข่ระยะที่ 1, S2 คือ การพัฒนารังไข่ระยะที่ 2, S3คือ การพัฒนารังไข่ระยะที่ 3 และS4 คือ การพัฒนารังไข่ระยะที่ 4 (ทำการทดลองระยะไข่ชุดละ 10 ตัว)

* ค่าเฉลี่ย±SD

รูปที่ 4.6 ความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดแม่กุ้งตัดก้านตาที่มีการพัฒนาไข่ระยะที่ 1, 2, 3 และ 4 เลี้ยงด้วยอาหารทดลอง 4 สูตร

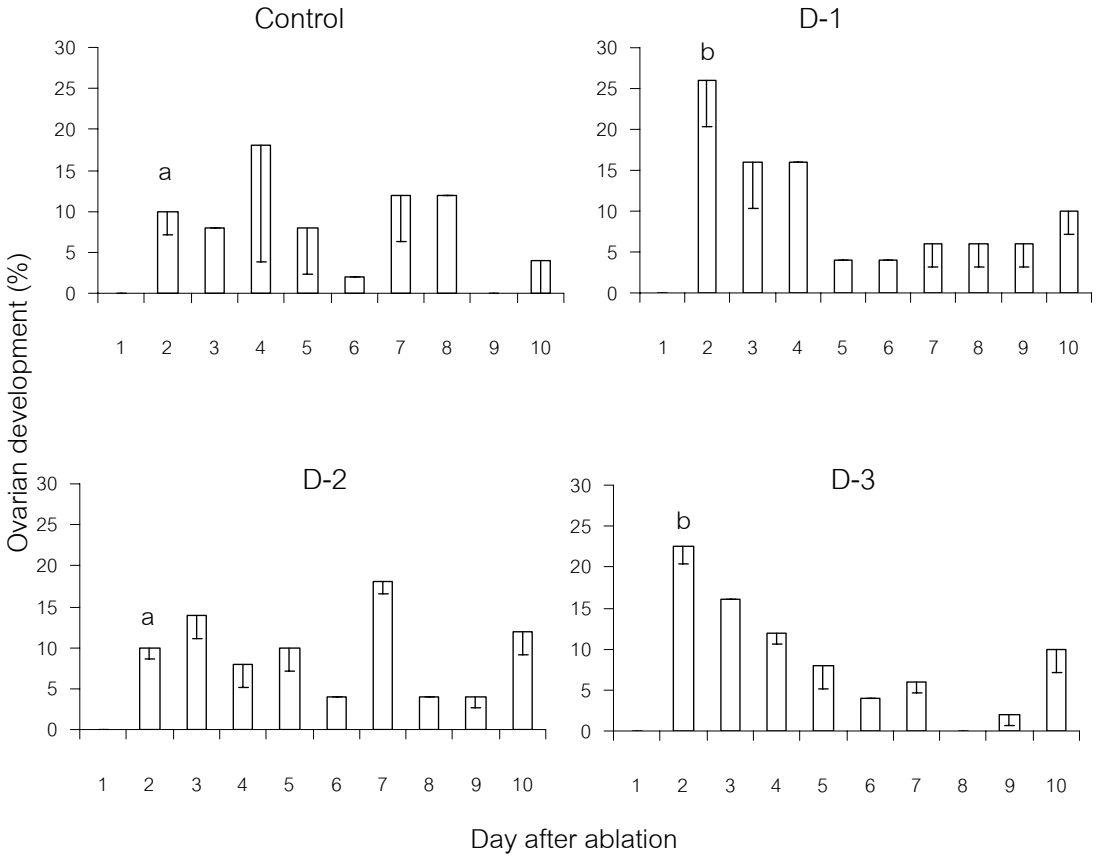
4.2.3 ความสามารถในการพัฒนารังไข่ และวางไข่ของแม่กุ้ง

(1) ผลของความสามารถในการพัฒนารังไข่ของแม่กุ้งหลังจากตัดก้านตา

แม่กุ้งทั้ง 4 กลุ่มการทดลองสามารถพัฒนารังไข่ได้หลังจากตัดก้านตา 2 วัน (รูปที่ 4.7) โดยที่แม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมแคปซูล 0.11 และ 0.33 mg P4/100 g feed มีจำนวนแม่กุ้งที่พัฒนารังไข่ได้สูงสุดไม่แตกต่างทางสถิติ เท่ากับ 26±5.66 และ 22±2.12% ตามลำดับ แม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมแคปซูล 0.22 mg P4/100 g feed มีจำนวนแม่กุ้งที่พัฒนารังไข่ได้เท่ากันกับกลุ่มควบคุมคือ 10±1.41% และ10±2.81% ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวนแม่กุ้งที่พัฒนารังไข่ได้น้อยกว่าแม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมแคปซูล 0.11 และ 0.33 mg P4/100 g feed อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

แม่กุ้งที่ได้รับอาหารควบคุมเริ่มมีการพัฒนารังไข่ได้ในวันที่ 2 หลังจากตัดก้านตา และเพิ่มขึ้นจนสูงสุดในวันที่ 4 หลังจากตัดก้านตา เท่ากับ 18±14.14% โดยแม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมแคปซูล 0.22 mg P4/100 g feed มีการพัฒนารังไข่สูงสุดในวันที่ 7 หลังจากตัดก้านตา เท่ากับ 18±1.41%

เมื่อสังเกตจากรูปที่ 4.7 พบว่าแม่กุ้งทุกกลุ่มทดลองหลังจากที่มีจำนวนแม่กุ้งพัฒนารังไข่ได้สูงสุด จำนวนแม่กุ้งที่พัฒนารังไข่จะลดลง และแม่กุ้งเริ่มมีการพัฒนารังไข่อีกครั้งในวันที่ 10 หลังจากตัดก้านตา



* control คือ อาหารธรรมชาติ D-1 คือ อาหารสูตรที่ 1 D-2 คือ อาหารสูตรที่ 2 และ D-3 คือ อาหารสูตรที่ 3

* อักษรที่แสดงเหนือกราฟแท่งที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าเฉลี่ย±SD)

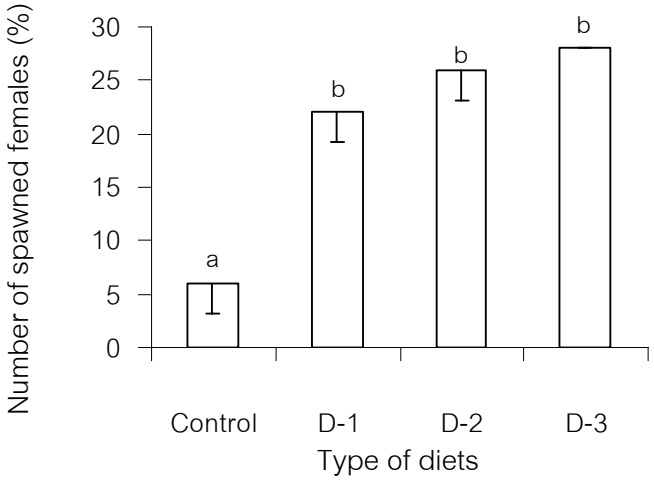
* ทำการทดลองชุดละ 2 ซ้ำ จำนวนกุ้งซ้ำละ 25 ตัว

รูปที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์แม่กุ้งที่สามารถพัฒนารังไข่ครั้งแรก (ระยะที่ 1 และ 2) หลังจากตัดก้านตาเป็นระยะเวลา 10 วัน

(2) จำนวนแม่กุ้งที่วางไข่

แม่กุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมแคปซูล P4-PLGA ทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง มีจำนวนแม่กุ้งที่วางไข่ได้มากกว่าแม่กุ้งที่ได้รับอาหารควบคุม (รูปที่ 4.8) โดยแม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 0.33 mgP4 /100 g feed สามารถวางไข่ได้มากที่สุด (28±0%) รองลงมาคือ แม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 0.22 mgP4 /100 g feed (26±2.83%) 0.11 mg P4/100 g feed (22±2.83%) และอาหารควบคุมวางไข่ได้น้อยที่สุด (6±2.83%) ซึ่งแม่กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารควบคุมมีจำนวนแม่กุ้งที่

วางไข่ได้น้อยกว่าอาหารทดลองอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) นอกจากนี้ยังพบว่าแม่กุ้งสามารถวางไข่ได้มากกว่า 1 ครั้ง กล่าวคือ แม่กุ้งที่ได้รับอาหารควบคุม อาหารผสมฮอร์โมน 0.22 mg P4/100 g feed และ 0.33 mg P4/100 g feed สามารถวางไข่ได้ 2 ครั้ง โดยแม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 0.33 mgP4 /100 g feed มีจำนวนแม่กุ้งที่พัฒนารังไข่ได้มากที่สุด คือ 2 ตัว (4%) รองลงมา คือ แม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 0.22 mgP4 /100 g feed เท่ากับ 1 ตัว (2%) และกลุ่มควบคุม เท่ากับ 1 ตัว (2%) และมีเพียงแม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 0.33 mgP4 /100 g feed เท่านั้นที่สามารถวางไข่ได้ 3 ครั้ง โดยมีจำนวนแม่กุ้งที่วางไข่ เท่ากับ 1 ตัว (2%)



* control คือ อาหารธรรมชาติ D-1 คือ อาหารสูตรที่ 1 D-2 คือ อาหารสูตรที่ 2 และ D-3 คือ อาหารสูตรที่ 3

* อักษรที่แสดงเหนือกราฟแท่งที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าเฉลี่ย±SD)

* ทำการทดลองชุดละ 2 ซ้ำ จำนวนกุ้งซ้ำละ 25 ตัว

รูปที่ 4.8 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแม่กุ้งวางไข่ เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารทั้งหมด 4 สูตร ระยะเวลา 10 วัน

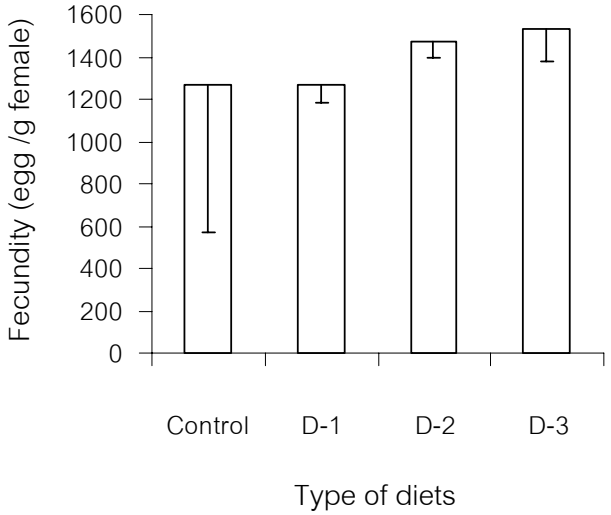
(2) ความดกไข่

แม่กุ้งที่ได้รับอาหารทั้ง 4 กลุ่มทดลอง มีปริมาณความดกไข่ไม่แตกต่างกัน ซึ่งกุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 0.33 mg P4/100 g feed มีความดกไข่มากที่สุด (1,530 ±153 ฟอง/กรัมน้ำหนักแม่กุ้ง) รองลงมาคือ อาหารผสมฮอร์โมน 0.22 mg P4/100 g feed (1,470±70 ฟอง/กรัม

น้ำหนักแม่กุ้ง) อาหารสูตรควบคุม (1,270±702 ฟอง/กรัมน้ำหนักแม่กุ้ง) และ อาหารผสมฮอร์โมน 0.11 mg P4/100 g feed (1,268±87 ฟอง/กรัมน้ำหนักแม่กุ้ง) ตามลำดับ (รูปที่ 4.9)

ปริมาณความดกไข่เมื่อแม่กุ้งปล่อยครั้งที่ 2 และ 3 พบว่ามีแนวโน้นที่ลดจำนวนลง กล่าวคือปริมาณความดกไข่เมื่อแม่กุ้งปล่อยครั้งที่ 2 จะพบที่ 3 กลุ่มการทดลอง คือ แม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 0.33 mg P4/100 g feed (1,524 ฟอง/กรัมน้ำหนักแม่กุ้ง) แม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน0.11 mg P4/100 g feed (1,266 ฟอง/กรัมน้ำหนักแม่กุ้ง) และอาหารควบคุม (1,076 ฟอง/กรัมน้ำหนักแม่กุ้ง)

ปริมาณความดกไข่เมื่อแม่กุ้งปล่อยครั้งที่ 3 จะพบเฉพาะแม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 0.33 mg P4/100 g feed เท่ากับ 676 ฟอง/กรัมน้ำหนักแม่กุ้ง



* control คือ อาหารธรรมชาติ D-1 คือ อาหารสูตรที่ 1 D-2 คือ อาหารสูตรที่ 2 และ D-3 คือ อาหารสูตรที่ 3

* ค่าเฉลี่ย±SD

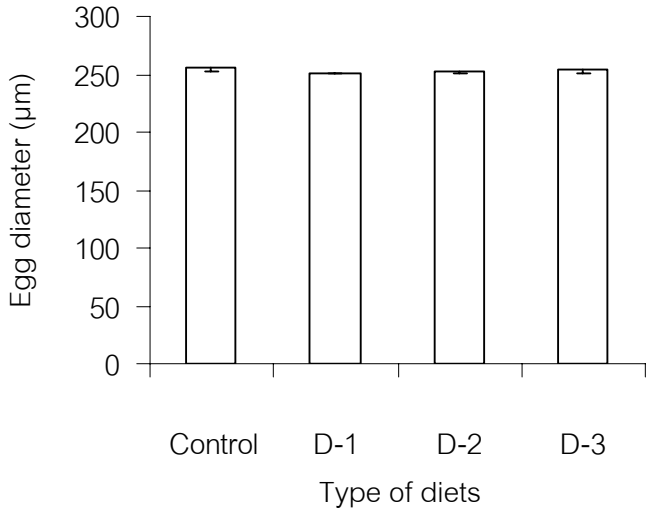
รูปที่ 4.9 ความดกไข่ของแม่กุ้งที่วางไข่ครั้งที่ 1 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารทั้งหมด 4 สูตร ระยะเวลา 10 วัน

(3) เส้นผ่านศูนย์กลางของไข่กุ้ง

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของไข่กุ้งทั้ง 4 กลุ่มการทดลองไม่ต่างกัน (*p>0.05*) โดยอาหารกลุ่มควบคุมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่ที่สุด เท่ากับ 255±2.33 µm รองลงมาคือ อาหารผสมฮอร์โมน 0.33 mg P4/100 g feed (253±2.80 µm) 0.11 mg P4/100 g feed (251±0.11 µm) และ 0.22 mg P4/100 g feed (251±1.47 µm) ตามลำดับ

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของไข่ที่ปล่อยครั้งที่ 2 และ 3 พบว่ามีแนวโน้มที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กลง กล่าวคือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของไข่ที่ปล่อยครั้งที่ 2 พบในแม่กุ้งที่ได้รับอาหารควบคุม (254 µm) อาหารผสมฮอร์โมน0.11 mg P4/100 g feed (248 µm) และ 0.33 mg P4/100 g feed (250±1.24 µm)

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของไข่ที่ปล่อยครั้งที่ 3 พบเฉพาะแม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 0.33 mg P4/100 g feed เท่ากับ 249 µm



* control คือ อาหารสูตรควบคุม D.1 คือ อาหารสูตรที่ 1, D.2 คือ อาหารสูตรที่ 2 และ D.3 คือ อาหารสูตรที่ 3

* ค่าเฉลี่ย±SD

รูปที่ 4.10 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของไข่ ซึ่งเลี้ยงด้วยอาหารทั้งหมด 4 สูตร ระยะเวลา 10 วัน

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

คุณภาพลูกกุ้งเป็นสิ่งที่สำคัญสำหรับอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยง โดยคุณภาพลูกกุ้งนั้นขึ้นอยู่กับคุณภาพและความสมบูรณ์ของแม่พันธุ์ ซึ่งอาหารเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลให้แม่พันธุ์กุ้งมีความสมบูรณ์ของการพัฒนารังไข่ ในปัจจุบันมีการปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารสำเร็จรูป ในการกระตุ้นการพัฒนารังไข่ เพื่อเป็นการเสริม หรือ ทดแทนอาหารธรรมชาติ เช่น การเสริมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในอาหารสำเร็จรูป ผลที่ได้พบว่ารังไข่มีการพัฒนารังไข่ได้ถึงระยะไข่สุก (ปริญญา ลีฬหานนท์, 2546) เพราะกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นสารตั้งต้นในการสร้างฮอร์โมน (Harrison, 1997) ซึ่งส่งผลทางอ้อมในการกระตุ้นรังไข่ทำให้มีระยะเวลานาน ไม่เหมือนกับการกระตุ้นฮอร์โมนโดยตรง ซึ่งการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนมีหลายวิธี ได้แก่ การตัดก้านตากุ้ง เพื่อลดระดับฮอร์โมนที่ยับยั้งการลอกคราบ และการฉีดฮอร์โมนเข้ากล้ามเนื้อ โดยฮอร์โมนที่นิยมฉีดเป็นกลุ่มสเตียรอยด์ ได้แก่ โปรเจสเตอโรน (P4) และ เอสตราไดออล (E_2) (Piyatiratitivorakul *et al*.,1994) 17α-OHP4 (Zapata *et al*., 2003) การฉีดฮอร์โมนเข้าสู่ร่างกายกุ้งโดยตรงมีข้อเสียหลายประการ เนื่องจากแม่กุ้งได้รับฮอร์โมนปริมาณมากโดยทันที อาจทำให้กุ้งเกิดความเครียดจากสารเคมีที่ได้รับเฉพาะจุด ต่างจากการได้รับฮอร์โมนจากอาหาร โดยฮอร์โมนจะค่อย ๆ เข้าสู่ระบบของกุ้งทีละน้อย กุ้งสามารถปรับตัวนำฮอร์โมนไปใช้ในระดับที่กุ้งต้องการ หากฮอร์โมนที่ให้มีมากเกินความต้องการกุ้งจะสามารถขับออกได้ หรือกุ้งสามารถเปลี่ยนฮอร์โมนที่ได้รับเป็นฮอร์โมนรูปอื่นที่เหมาะสมกับขบวนการพัฒนาระบบสืบพันธุ์มากกว่า นอกจากนั้นการให้ฮอร์โมนผ่านทางอาหาร สามารถใช้กระตุ้นกุ้งปริมาณมากในคราวเดียวกัน ดีกว่าการฉีดกระตุ้นที่ทำได้ครั้งละตัว

การผสมฮอร์โมน P4 ในอาหารนั้น มีความเป็นไปได้ แต่มีข้อเสียคือต้องใช้ฮอร์โมนปริมาณมากในการผสมอาหาร เพราะฮอร์โมนมีการสลายตัวเร็ว วิธีการแก้ไข้คือการนำเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน (microencapsulation) มาช่วย (Latha, 2000) ในการศึกษานี้ได้พิจารณาใช้ PLGA เคลือบฮอร์โมน เนื่องจาก มีความสามารถในการกักเก็บฮอร์โมน P4 ได้ดี (Wu, 2004) ส่วนใหญ่แคปซูลชนิดนี้นิยมนำมาใช้ในด้านเภสัชกรรม ในด้านการกระตุ้นระบบสืบพันธุ์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Whisnant and Burns, 2002) การผลิตวัคซีนป้องกันไวรัสที่ทำให้เกิด lymphocystis disease แก่ปลาลิ้นหมา (Tian, 2008) แต่ในกุ้งยังไม่มีรายงานถึงการนำแคปซูลฮอร์โมน P4-PLGA มาใช้ประโยชน์ในด้านใดมาก่อน

การผลิตแคปซูลจาก PLGA นิยมใช้วิธี oil-in-water single emulsion solvent evaporation เนื่องจากเหมาะสมสำหรับการเคลือบสารที่ไม่ละลายน้ำ ในที่นี้คือโปรเจสเตอโรน (P4) น้ำที่เป็นส่วนประกอบในกระบวนการ มีหน้าที่ทำให้ส่วนผสมของ P4-PLGA ขึ้นเป็นรูปแคปซูล

ความเข้มข้นของ PLGA ส่งผลต่อความสามารถในการตรึงฮอร์โมน และขนาดของเม็ดแคปซูล แคปซูล PLGA ที่ผลิตด้วยความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์สูง จะมีขนาดและความสามารถในการตรึงมากกว่าแคปซูล PLGA ที่ผลิตด้วยความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ต่ำ (Ghaderi et al., 1996; Schlicher et al., 1997; Lin and Vasavada, 2000) เพราะว่าสารละลายพอลิเมอร์ที่มีความเข้มข้นสูงจะมีความหนืดสูง ทำให้เกิดแรงยึดเกาะระหว่างกันได้ดีขึ้น การวิจัยครั้งนี้ได้ทดลองผลิตเม็ดแคปซูล P4-PLGA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ความเข้มข้นเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ PLGA ในการผลิตแคปซูล P4-PLGA พบว่า ไม่มีความแตกต่างของปริมาณผลผลิต และความสามารถในการตรึงฮอร์โมนจาก PLGA ทั้ง 3 ความเข้มข้น จึงเลือกใช้ PLGA ที่ 5% เพราะเป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดของ PLGA ความเข้มข้นของ PLGA ที่ 5% นี้ ได้ขนาดแคปซูลค่อนข้างสม่ำเสมอ ที่ขนาดประมาณ 21-40 μm และเมื่อศึกษาลักษณะแคปซูลใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดพบว่าเม็ดแคปซูลมีลักษณะทรงกลม ผิวเรียบเช่นเดียวกับการทดลองของ Krishnamachari et al. (2007) ซึ่งได้ศึกษาการพัฒนา pH และเวลาที่เหมาะสมในการขนส่ง สาร budsonide ไปยังลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ พบว่า ขนาดของเม็ดแคปซูล ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ โดยที่ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์สูงขนาดของเม็ดจะใหญ่กว่าเม็ดแคปซูลที่ผลิตด้วยความเข้มข้นของพอลิเมอร์ต่ำ แต่มีความสามารถในการตรึงฮอร์โมนได้ไม่ต่างกัน

ฮอร์โมนที่กักเก็บต้องสามารถปลดปล่อยออกมาจากแคปซูลในปริมาณความเข้มข้นและเวลาที่กำหนด เพื่อวัตถุประสงค์เฉพาะของงาน เช่น การศึกษาการให้วัคซีนแก่ปลาลิ้นหมา ผ่านทางแคปซูล PLGA (Tian, 2008) ตัวแคปซูลมีคุณสมบัติในการปกป้องการสลายตัวของวัคซีนก่อนที่สัตว์จะสามารถดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้ วัคซีนในแคปซูลจะค่อย ๆ ปลดปล่อยออกมาเป็นระยะเวลานานถึง 90 วัน หลังจากที่ให้กินอาหารวันแรก

อัตราการปลดปล่อยสารของแคปซูล ขึ้นกับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์กับสารที่ถูกห่อหุ้ม (core materials) (Lewis, 1990) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคปซูล และ pH (Freiberg and Zhu, 2004) กล่าวคือ อัตราการปลดปล่อยสูงจะเกิดเมื่อเม็ดแคปซูลมีความเข้มข้นของสารภายในสูง มีขนาดเม็ดแคปซูลเล็ก (Akhtar and Lewis, 1997; Sansdrap and Moes, 1997; Bezemer et al., 2000) และอยู่ในสภาวะที่ pH เป็นกรด (Lynn, et al., 2001) เม็ดแคปซูลที่ผลิตได้จากการทดลองนี้มีอัตราการปลดปล่อยฮอร์โมนสูงที่ pH 5.5

สอดคล้องกับค่า pH จริงที่พบในระบบทางเดินอาหารของครัสเตเซียน (Ceccaldi, L.,1989) การที่อัตราการปลดปล่อยฮอร์โมนสูงที่ pH เป็นกรด เนื่องจาก pH ที่เป็นกรดจะทำลายพันธะเอสเทอร์ของ PLGA (Faisant, 2002) การปลดปล่อยฮอร์โมนจากเม็ดแคปซูลที่ผลิตด้วย 5% PLGA มีการปลดปล่อยสูงสุดที่ชั่วโมงแรก ประมาณ 9.46% ใกล้เคียงกับอัตราการปลดปล่อยสาร budsonide จาก 0.5 %PLGA (Krishnamachari et al.,2007) ในชั่วโมงแรก ๆ สารที่ตรวจพบเป็นสารที่อยู่บริเวณผิวติดกับผนังด้านในแคปซูล มีการปลดปล่อยออกมาจากแคปซูลได้เร็วกว่าสารที่อยู่ใกล้กึ่งกลาง เราจึงพบอัตราการปลดปล่อยฮอร์โมนสูงในชั่วโมงแรก หลังจากนั้นการปลดปล่อยจะเป็นแบบค่อยเป็นค่อยไป ขึ้นกับองค์ประกอบของผนังแคปซูล โดยแคปซูลที่มีองค์ประกอบของกรดแลคติกและกรดไลโกลิค ในอัตราส่วน 50:50 สามารถปลดปล่อยสารจนหมดในเวลาเกือบ 2 เดือน (Lewis,1990)

การศึกษาต่อไปได้นำเม็ดแคปซูลผสมฮอร์โมน P4 มาผสมวัสดุอาหาร เพื่อทำอาหารเม็ดที่มีความชื้นสูงให้แก่แม่กุ้งขาวแวนนาไมกินเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าแม่กุ้งที่กินอาหารเม็ดแคปซูลมีการพัฒนาไข่และรังไข่ และจำนวนแม่กุ้งวางไข่ ดีกว่าแม่กุ้งที่กินปลาหมึกและหอยเพียงอย่างเดียว การแสดงออกของการสืบพันธุ์ (reproductive performances) ที่ดีเหล่านี้ในแม่กุ้งทดลอง มีความสัมพันธ์กับระดับฮอร์โมน P4 ในเลือด พบว่าแม่กุ้งทดลองมีระดับฮอร์โมน P4 ในเลือดสูงกว่าแม่กุ้งที่ได้รับอาหารธรรมชาติ ชี้ให้เห็นว่าฮอร์โมน P4 มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของการสืบพันธุ์ที่กล่าวข้างต้น

การพัฒนาไข่และรังไข่ของกุ้ง แบ่งเป็นสองช่วง คือ primary vitellogenesis และ secondary vitellogenesis ช่วง primary vitellogenesis เป็นการขยายขนาดเซลล์ การสะสมไข่แดงจะเริ่มในช่วง secondary vitellogenesis โดยการทำงานของฮอร์โมนหลายตัว รวมทั้งฮอร์โมน P4 แม่กุ้งที่ได้รับฮอร์โมนผ่านทางอาหารเม็ดแคปซูล สามารถพัฒนาไข่และรังไข่ได้เร็วกว่า และในเปอร์เซ็นต์ที่มากกว่าแม่กุ้งที่กินอาหารมีชีวิต นักวิจัยหลายกลุ่มได้ยืนยันบทบาทของฮอร์โมน P4 การสร้าง และสะสมไข่แดง vitellogenesis เช่นในกุ้ง Indian spiny lobster (Kirubagaran et al., 2005) กุ้งกุลาดำ (Meunpol et al., 2007) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า แม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 0.11 mgP4/100 g feed มีความเร็วในการพัฒนารังไข่สูง แสดงให้เห็นว่าระดับฮอร์โมนนี้เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้เกิดการพัฒนารังไข่ได้ แต่ไม่เพียงพอที่จะกระตุ้นให้เกิดการวางไข่ในบ่อเลี้ยง

เมื่อไข่พัฒนาเต็มที่ (final maturation) ก็จะเกิดการตกไข่ (ovulation) และวางไข่ (spawning) งานทดลองครั้งนี้ได้ทำการตรวจนับเปอร์เซ็นต์การวางไข่ เนื่องจากฮอร์โมน P4 มีผลต่อการทำงานของท่อนำไข่ คือการวางไข่ด้วย จากเอกสารอ้างอิงหลายฉบับ ได้รายงานถึงหน้าที่ที่

หลากหลายของฮอร์โมน P4 ต่อระบบสืบพันธุ์ เช่นการวางไข่ การวางไข่เป็นพฤติกรรมหนึ่งของแม่กุ้งที่มีความพร้อมเต็มที่ เป็นขบวนการที่อาศัยการควบคุมจากฮอร์โมนหลายตัว เช่น โพรสตาแกลนดิน (Penaeus japonicus) (Yano and Tamaka, 1984), เซอโรโทนิน (Penaeus monodon) (Wongprasert et al., 2006) และจากการตรวจพบ receptor โดยวิธี immunolocalization ของโปรเจสเตอโรนในท่อนำไข่ของ ปลาหมึกยักษ์ (Octopus vulgaris) (Di Cristo and Di Cosmo, 2007)

จากการทดลองนี้ยังพบว่าแม่กุ้งที่ได้รับอาหารทดลองมีแนวโน้มที่จะวางไข่ได้มากกว่า 1 ครั้งในรอบ 10 วัน ซึ่งจำนวนครั้งในการวางไข่ของกุ้งนั้นบ่งบอกได้ถึงปริมาณโปรตีนที่อยู่สะสมอยู่ในเลือด คือ ถ้าระดับโปรตีนในเลือดสูงแม่กุ้งจะสามารถวางไข่ได้หลายครั้ง (Palacios et al., 2000) การที่แม่กุ้งมีการวางไข่หลายครั้งนั้นจะมีแนวโน้มว่าความดกไข่ และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของไข่มีขนาดเล็กลง สอดคล้องกับรายงานของ Arcos et al. (2003) ที่ทดลองในแม่กุ้งขาวเช่นเดียวกัน พบว่าแม่กุ้งขาวมีไข่ และขนาดของไข่ลดลง สาเหตุอาจเป็นเพราะว่าแม่กุ้งมีระยะเวลาในการสะสมอาหาร โดยเฉพาะไขมันเพื่อผลิตไข่แดงไม่เพียงพอ (Harrison, 1990; Vázquez-Boucard, 1990; Browdy, 1992; Palacios et al., 2000) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของไข่กุ้ง เป็นตัวชี้วัดถึงอัตราการฟักและคุณภาพลูกกุ้ง ไข่ที่มีขนาดใหญ่จะมีอัตราการฟักสูง และคุณภาพลูกกุ้งที่ได้ดีกว่าไข่ขนาดเล็ก (Palacios et al., 1998) เนื่องจากไข่ที่มีขนาดใหญ่จะมีปริมาณไข่แดงที่สะสมอยู่มาก ทำให้ลูกกุ้งมีไข่แดงเป็นอาหารอย่างเพียงพอ (Clarke, 1993; Quackenbush, 2001)

ฮอร์โมนที่ผสมในอาหารสามารถส่งผ่านไปยังระบบของกุ้งได้จริง ในสัปดาห์แรก ฮอร์โมนในเลือดกุ้งกลุ่มทดลองมีปริมาณสูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่จะปรับตัวลดลงในสัปดาห์ต่อ ๆ มาจนเท่ากับกลุ่มควบคุม อาจเป็นเพราะมนโปรเจสเตอโรนที่ได้รับจากภายนอก ถูกควบคุมด้วย ovarian inhibiting hormone หลังการตัดก้านตาฮอร์โมน P4จึงมีอิสระในการออกฤทธิ์ โดยฮอร์โมน P4 ในเลือดกุ้งมีความสัมพันธ์กับการพัฒนารังไข่ของกุ้งขาว ฮอร์โมน P4 ในเลือดเพิ่มขึ้นตามการพัฒนารังไข่จากระยะไข่อ่อน จนกระทั่งสูงสุดเมื่อไข่พัฒนาถึงระยะไข่แก่ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมน P4 สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมน P4 ในเลือดช่วงพัฒนาไข่และรังไข่ ของครัสเตเซียนหลายชนิด ได้แก่ กุ้งกุลาดำ (เรณู ยาชิโร และยุพาพร ไชยสี, 2534; Quinitio, 1994; Meunpol et al., 2007) กุ้ง Indian spiny lobster (Kirubagaran et al., 2005) กุ้ง lobster; Homarus americanus (Couch et al., 1987) ปูก้ามดาบ Uca arcuata (Shin, 1992) ปู Scylla serrata (Warrier et al., 2001)

จากการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า แคปซูลที่ผลิตด้วย 5% PLGA สามารถเก็บกักฮอร์โมน P4 และสามารถปลดปล่อยฮอร์โมนอย่างค่อยเป็นค่อยไป ทำให้ฮอร์โมนในระบบของกุ้งมีระดับเพิ่มขึ้นอย่างเหมาะสม จนสามารถเกิดการพัฒนาไข่จนกระทั่งวางไข่ได้มากกว่ากุ้งที่กินอาหารมีชีวิต มีความเป็นไปได้ที่จะนำความรู้นี้มาผลิตอาหารสำเร็จรูปเพื่อกระตุ้นการพัฒนารังไข่ของแม่กุ้งแทนที่การตัดก้านตา ทำให้เกิดการเพาะขยายพันธุ์กุ้งที่มีประสิทธิภาพสูงสุด

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถผลิตเม็ดแคปซูลเพื่อตรึงฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยใช้กรดพอลิแลคไทด์โคไกลโคไลด์ (PLGA) ด้วยเทคนิค Oil-in-water single emulsion solvent evaporation ที่ความเข้มข้นของ PLGA 5, 7.5 และ 10 % ได้ผลผลิตเท่ากับ 92.76, 92.10 และ 91.77 % ตามลำดับ ความสามารถในการตรึงฮอร์โมน (%Encapsulation Efficiency) เท่ากับ 89.02, 94.06 และ 95.51 % ตามลำดับ เลือกความเข้มข้น PLGA 5% เนื่องจากมีความแปรปรวนขนาดเม็ดต่ำอยู่ที่ 21-40 μm โดยที่มีความสามารถในการตรึงฮอร์โมนไม่แตกต่างจากความเข้มข้นอื่น เม็ดแคปซูลสามารถปลดปล่อย P4 ได้มากที่สุดที่ pH 5.5 เมื่อเปรียบเทียบกับ pH 7.5 และ 9.5 โดยจะปลดปล่อยฮอร์โมนสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 1 เท่ากับ 9.46 % หลังจากนั้นฮอร์โมนแทบจะไม่มีการปลดปล่อยจนถึงชั่วโมงที่ 8

2. การทดสอบผลของอาหารสำเร็จรูปที่ผสมเม็ดแคปซูล P4-PLGA ต่อการเจริญของรังไข่แม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม พบว่าแม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมแคปซูล P4-PLGA ทั้ง 3 กลุ่ม มีฮอร์โมน P4 ในเลือดสูงกว่าแม่กุ้งกลุ่มควบคุม โดยที่ฮอร์โมน P4 ในเลือดแปรผันไปตามความเข้มข้นฮอร์โมน P4 ในอาหารที่แม่กุ้งได้รับ โดยระดับฮอร์โมนจะสูงในสัปดาห์ที่ 1 จากนั้นจะปรับระดับลดลงจนเกือบเท่ากันทุกกลุ่มการทดลอง ขณะที่ระดับฮอร์โมนของแม่กุ้งกลุ่มควบคุมแทบจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ

3. หลังจากตัดก้านตาระดับฮอร์โมน P4 ในเลือดจะเพิ่มขึ้นตามการพัฒนาของรังไข่จากไข่ระยะที่ 1 จนถึงระยะที่ 4 ซึ่งแม่กุ้งที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 3 กลุ่มมีความเข้มข้นของฮอร์โมนในเลือดสูงกว่าแม่กุ้งกลุ่มควบคุมสองเท่า เมื่อเปรียบเทียบไข่ระยะที่ 4 ของ 2 กลุ่มทดลอง คือ กลุ่มควบคุม (58.30 pg/ml) กับกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมน 0.33 mgP4/g feed (100.27 pg/ml)

4. ฮอร์โมน P4 ที่กุ้งได้รับจากอาหารผสมแคปซูลแสดงถึงความสัมพันธ์โดยตรงต่อการวางไข่ และการพัฒนารังไข่ แต่ไม่มีผลต่อความดกไข่และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง แม่กุ้งที่ได้รับอาหารฮอร์โมนสูงสุด (0.33 mgP4/g feed) มีการวางไข่เป็นเปอร์เซ็นต์สูงสุดเท่ากับ 28%ขณะที่แม่กุ้งควบคุมวางไข่ได้ 6% ซึ่งแม่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมนเริ่มมีการพัฒนารังไข่ได้เร็วกว่าและมากกว่ากลุ่มควบคุม

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาครั้งนี้ พบว่า สามารถปรับลดความเข้มข้นของสารละลาย PLGA จาก 5% ลงได้อีก โดยคำนึงจากความสามารถในการตรึงฮอร์โมนภายในแคปซูล
2. การเลี้ยงแม่กุ้งขาวควรเพิ่มพื้นที่ในการเลี้ยง เนื่องจากแม่กุ้งชนิดนี้ชอบการว่ายน้ำ

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กมลศิริ พันธนียะ. 2546, กุ้งขาวแวนาไม, ที่มา (www.nica.com), สืบค้นวันที่ 12 มกราคม 2551.

ขวัญเรือน ศรีภิรมย์. 2534. ผลของสเตียรอยด์ฮอร์โมนต่อการเจริญของรังไข่และการลอกคราบของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ และพรเลิศ จันทร์รัชชกุล. 2548. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: เมจิค พับบลิเคชัน.

ชูศักดิ์ แสงธรรม. 2541. การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. นนทบุรี: ฐานเกษตรกรรม.

มนตรี จุฬาวัฒนทล, ม.ร.ว.ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์, ยงยุทธ ยุทธวงศ์, ภิญโญ พานิชพันธ์, ประหยัด โกมารทัต, พิณทิพ รื่นวงษา, ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล, บุรชัย สนธยานนท์, สุมาลี ตั้งประดับกุล และมธุรส พงษ์ลิขิตมงคล. 2542. ชีวเคมี. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. ปีไม่ปรากฏ, Chitin-Chitosan, ที่มา (www. Thailaboline.com), สืบค้นวันที่ 4 กุมภาพันธ์ 2551.

ปริญญา ลีฟานนท์. 2546. การพัฒนาอาหารเม็ดที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เพื่อความสมบูรณ์พันธุ์ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* เพศเมีย. วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เรณู ยาชิโร และยุพาพร ไชยสีหา. 2534. ผลการฉีดสเตียรอยด์ฮอร์โมนต่อการพัฒนารังไข่ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* I: ระดับฮอร์โมนเพศในพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ กุลาดำ *Penaeus monodon*. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 9/2534. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงชายฝั่งจังหวัดสงขลา. 16 หน้า

วันดี รังสีวิจิตรประภา. 2549. ไมโครเอนแคปซูเลชั่น. เอกสารประกอบการบรรยาย วิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม 4. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. จังหวัดอุลบราชธานี.

วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2534. การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. กรุงเทพฯ: โครงการหนังสือชุมชน.

เสาวลักษณ์ เอี่ยมไผ่. 2548. ผลของสารสกัดโปรเจสเตอโรนและ 17 แอลฟา-ไฮดรอกซี - โปรเจสเตอโรนจากแม่เพรียงทราย *Perineris* sp. ต่อการเจริญของเซลล์ไข่กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* . วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อาทิตย์ ไกรสุวรรณ์โสภิต. 2550. โครงสร้างระดับเซลล์ของอวัยวะสร้างสารเซสควิเทอร์พีนอยด์และไอโคซานอยด์จากแม่เพรียงทราย และผลของสารสกัดเซสควิเทอร์พีนอยด์และไอโคซานอยด์ต่อการพัฒนารังไข่แม่กุ้งทะเล. วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกชัย ดวงใจ. 2548. การสกัดฮอร์โมนโพรสตราแกลนดินจากแม่เพรียงทราย และผลของสารสกัดฮอร์โมนต่อการพัฒนาของไข่แม่กุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิตภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

Aguilar, M. B., L. S. Quackenbush, D. T. Hunt, J. Shabanowitz, and A. Huberman. 1992. Identification, purification and initial characterization of the vitellogenesis-inhibiting hormone from the Mexican crayfish *Procambarus bouveri* (Ortmann). Comparative biochemistry and physiology. 102B: 491-498.

Akhtar, S. and Lewis, K.J. 1997. Antisense oligodeoxynucleotide delivery to cultured macrophages is improved by incorporation into sustained release biodegradable polymer microspheres. International Journal of Pharmaceutics. 151: 57–67.

Aktas, M., Kumlu, M. and Eroldogan O. T. 2003. Off -season maturation and spawning of *Penaeus semisulcatus* by eyestalk ablation and/or temperature–photoperiod regimes. Aquaculture. 228: 361–370.

Alvarez, V. L., O'Mahony, D. J.,Lambkin, I. J., Patterson, C. A. and Singleton, J. 2007. Active-transport peptides induce GIT transport of nanoparticles containing leuprolide and insulin in an *in* vivo rat model. BIO International Convention May 6-9, 2007: Boston Convention & Exhibition Center Boston, MA USA. Poster.

A.O.A.C. 1997. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists.13th edition. Washington, D.C.: Association of official analytical chemists.

Arcos, F. G., Ibarra, A. M., Palacios, E., Vazquez-Boucard, C.and Racotta, I. S. 2003. Feasible predictive criteria for reproductiveperformance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*: egg quality and female physiological condition. Aquaculture. 228: 335–349.

Anathony, T., Fomg, P., Goyal, A., Saltzman, W.M., Moss, R.L. and Breuer, C. 2005. Development of a parathyroid hormone-controlled release system as a potential surgical treatment for hypoparathyoidism. Pediatric surgery. 40: 81-85.

Auttarat J, Phiriyangkul P, Utarabhand P. 2006. Characterization of vitellin from the ovaries of the banana shrimp *Litopenaeus merguiensis*. Comparative biochemistry and physiology. 143: 27-36.

Australian institute of marine science., 2000. Manual for the determination of egg fertility in Penaeus monodon. Available from: www.aims.gov.au. [2008, March 10]

Benoit J.-P., Marchais H., Rolland H. and Velde V. V. 1996. Biodegradable microspheres: Advances in production technology. Benita S. Microencapsulation. 37-64. New York: Marcel Dekker.

Benzid, D., De Jong, L., Lejeusne, C., Chevaldonné, P. and Moreau, X. 2006. Serotonin expression in the optic lobes of cavernicolous crustaceans during the light–dark transition phase: Role of the lamina ganglionaris. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 335: 74-81.

Benzie, J.A.H. 1998. A review of the effect of genetics and environment on the maturation and larval quality of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. Aquaculture 155: 69-85

Bezemer, J.M., Radersma, R., Grijpma, D.W., Dijkstra, P.J., Feijen, J. and Van Blitterswijk, C.A. 2000 Zero-order release of lysozyme from poly (thylene glycol) / poly (butylene terephthalate) matrices. Journal of Controlled Release. 64: 179–192.

Bouchon, D., Souty-rosset, C., Mocquard, J.P., Chentoufi, A. and Juchault, P. 1992. Photoperiodism and seasonal breeding in aquatic and terrestrial Eumalacostraca Invertebrate Reproduction and Development. 22: 203-212.

Browdy, C.L. 1992. A review of the reproductive biology of Penaeus species: perspectives on conyrolled shrimp maturation systems for hight quality nauplii production. In Wyban. J., (Eds), Proceedings of the special session on shrimp farming, World Aquaculture Society, Orlando, Florida, USA, 22-51.

Cavalli, R.O., Lavens, P. and Sorgeloos, P. 1999. Performance of *Macrobrachium rosenbergii* broodstock fed diets with different fatty acid composition. Aquaculture. 179: 387-402

Ceccaldi, L.H. 1989. Anatomy and physiology of disgestive tract of crustaceans decapods reared in aquaculture. Aquacop. Ifremer. Actes de Colloque. 9: 243-259.

Clarke, A. 1993. Egg size and egg composition in polar shrimp (Caridea; Decapoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 168: 189-203.

Chamberlain, G.W. and Lawrence, A.L. 1981. Maturation, reproduction, and growth of Penaeus vannamei and P. sytlirostris fed natural diets. Journal of the World Mariculture Society. 12: 209-224.

Chang, E.S. 1989. Endocrine regulation of molting in crustacean. Reviews in Aquativ Science. 1: 131-157.

Charniaux-Cotton, H. 1985. Charniaux-Cotton, Vitellogenesis and its control in malacostracan crustacean. American Zoologist. 25:197–206.

Cooke, I.M.and Sullivan, R.E.. 1982. Hormones and neurosecretion. In: H.L. Atwood and D.C. Sandeman, (Eds), The Biology of Crustacea vol. 3, Academic Press, New York, USA, 205–289.

Couch, E.F., Hagino, N. and Lee, J.W. 1987. Changes in estradiol and progesterone immunoreactivity in tissues of the lobster, Homarus americanus, with developing and immature ovaries. Comparative biochemistry and physiology. 87A: 765-770.

Cuzon, G., Guillaume, J.. Cahu, C. 1994. Composition, preparation and utilization of feeds for Crustacea. Aquaculture. 124: 253-267.

Di Cristo, C. and Di Cosmo, A., 2007. Neuropeptidergic control of Octopus oviducal gland.Peptides. 28: 163-168.

Dunn, R.L., Lewis, D.H., Goodson, J.M. 1982. Monolithic fibers for controlled delivery of tetracycline. Proceed. 9th International Symp. Controlled Release Bioactive Mater. 9: 157-159.

Fairs, N.J., Quinlan, P.T. and Gonad, L.J. 1990. Changes in ovarian unconjugated and conjugated steroid titer during vitellogenesis in *Penaeus monodon*. Aquaculture. 89: 83-99.

Faisant, N., Siepmann J. and Benoit J.P. 2002. PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release, European Journal of Pharmaceutical sciences. 15: 355–366.

Fingerman, M., Nagabhushanam, R., Sarojini, R.and Reddy, P.S. 1994. Biogenic amine in crustaceans: identification, location and roles. Journal of Crustacean Biological. 14 (3): 413– 437.

Fingerman, M. 1997. Roles of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal maturation in decapod crustaceans. Invertebrate Reproduction and Development. 31: 47– 54.

Friberg, S. and Zhu, X.X. 2004. Polymer microspheres for controlled drug release. International Journal of Pharmaceutics. 282: 1-18.

Freitas, s., Walz, A., Merkle, H.P., and Gander, B. 2003. Solvent extraction employing a static micromixer: a simple, robust and versatile technology for the microencapsulation of proteins. Microencapsulation. 20 (1): 67-85.

Gelin, A., Crivelli, A.J.C., Rosecchi, E. and Kerambrun, P. 2001. The effect of salinity changes on the population structure and reproductive traits of *Crangon crangon* L. populations in the Camargue (Rhone delta, France). Ecoscience. 8: 8-17.

Ghaderi, R., Struesson, C., Carlfors, J. 1996. Effect of preparative parameters on the characteristics of poly(D,L-lactide-co-glocolide) microspheres made by the double emulsion method. International Journal of Pharmaceutics. 141: 205-216.

Gohar, M., C. Souty-Grosset, G. Martin, and P. Juchault. 1984. Mise en évidence d'une inhibition de la synthèse de la vitellogénine par un facteur neurohumoral (V.I.H.) chez le Crustacé Isopode terrestre *Porcellio dilatatus*. Brandt. C.R. Acad. Sc. Paris, Ser. III. 299:785-787.

Hall, D.H., Winfrey, V.P., Blaeuer, G., Hoffman, L.H., Furuta, T., Rose, K.L., Hobert, O. and Breenstien, D. 1999. Ultrastructural features of the adult hermaphrodite gonad of *Caenorhabditis elegans:* relations between the germline and soma. Developmental Biology. 212, 101-123.

Harrison, K.E. 1990. The role of the nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. Journal of Shell research. 9: 1-28.

Harrison, K.E. 1997. Broodstock nutrient and maturation diets. In: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.), Crustacean Nutrition, vol. 6, The World Aquaculture Sowiety, Baton Rouge, LA, 390-408.

Hoang, T., Leea, S.Y., Keenanb, P. and Marsdenc, G.E. 2002. Effect of temperature on spawning of *Penaeus merguiensis*. Journal of Thermal Biology. 27: 433–437

Huberman, A. 2000. Shrimp endocrinology. A review. Aquaculture. 191: 191-208.

Jimoh, G.A., Wise, L.D., Gressre, D.J., Foote, H.R., Rhodes, C.R., Underhill, H.L. and Trantolo, J.D. 1995. Pulsatile relesase of FSH for superovulation in cattle. Theriogenology. 43: 645-656.

Kanazawa, A. and Teshima, S. 1971. In vivo conversion of cholesterol to steroid hormones in the spring lobster, *Palinurus japonicus*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 37: 891–897.

Kamonpatanal, M., Van De Wiel, D.F.M., Koops, W., Dumtong, L., Ngramsuriyaroj, C. and Usanakornkul, S. 1979. Oestrus control and early pregnancy diagnosis in swamp buffalo: comparison of enzymeimmunoassay and radioummunoassay for plasma prodesterone. Theriogenology. 11: 399-409.

Keller, R. and Sedlmeier, D. 1998. A metabolic hormone in crustaceans: the hyperglycemic neuropeptide. In: H. Laufer and R.G.H. Downer, (Eds), Endocrinology of Selected Invertebrate Types,vol. II, A R Liss, New York, 315–326.

Keller, R. and Orth, H.P. 1990 Hyperglycemic neuropeptides in crustaceans. In: A. Epple, C.G. Scanes and M.H. Stetson, (Eds), Progress in Comparative Endocrinology, Wiley-Liss, New York, 265–271.

Kirubagaran, R., Peter, D, Dharani, G., Vinithkumar, N.V., Sreeraj, G. and Ravindran, M. 2005. Changes in vertebrate-type steroids and 5-hydroxytryptamine during ovarian recrudescence in the Indian spiny lobster, Panulirus homarus. New Zealand Jounal of Marine and freshwater research. 39: 527-537.

Krishnamachari, Y., Madan, P. and Lin, S. 2007. Development of pH-and time-dependent oral microparticles to optimize budesonide delivery to ileum and colon. International Journal of Pharmaceutics. 338(1-2): 238-247.

Langdon, C. 2003. Microparticle types for delivering nutrients to marine fish larvae. Aquaculture. 227: 259-275.

Latha, M. S., Lal, A. V, Kumary, T. V., Sreekumar, R. and Jayakrishnan, A. 2000. Progesterone release from glutaraldehyde cross-linked casein microspheres: In vitro studies and in vivo response in rabbits. Contraception. 61(5): 329-334.

Lewis, D.H. 1990. Controlled release of bioactive agents frome Lactide / Glycolide Polymer. Chasin, M.and Langer. R., Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems. 1-43. New York: Marcel Dekker.

Lin, Y.-H.E., Vasavada, R.C. 2000. Studies on microencapsulation of 5-fluorouracil with poly(ostho ester) polymers. Journalof Microencapsul. 17: 1-11.

Lynn, D., Amiji, M., Langer, R. 2001. pH-responsive polymer microspheres: rapid release of evcapsulated material within the rang of intracellular pH. Angewandte chemie international. Edition. 40: 1707-1710.

Malecha, S.R. 1983. Crustacean genetics and breeding: an overview. Aquaculture. 33: 395–413.

Meeratana, P., Withyachamnarnkul, B., Damrongphol, P., Wongprasert, K., Suseangtham, A. and Sobhon, P. 2006. Serotonin induces ovarian maturation in giant freshwater prawn broodstock, *Macrobrachium rosenbergii* de Man, Aquaculture. 260: 315–325.

Menasveta, P., Choosuwan, J., Piyatiratitivorakul, S., Fast, A.W. and Latscha, T. 1994. Effect of dietary astaxanthin on gonadal maturation and spawning of giant tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius). In: Proceedings of Asian Fisheries Forum, Singapore, October 1992. 713-716.

Messer, S.W. 2000. Esterogens Progesterone hormone replacement therapy oral contraceptives. Available from: www.neurosci.pharm.utoledo.edu. [2007, June 8]

Meunpol, O., Meejing, P. and Piyatiratitivorakul, S. 2005. Maturation diet based on fatty acid content for male *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. Aquacuture Research. 36: 1216 -1225.

Meunpol, O., Iam-Pai, S., Suthikrai, W.and Piyatiratitivorakul, S. 2007. Identification of progesterone and 17α-hydroxyprogesterone in polychaetes (*Perinereis* sp.) and the effects of hormone extracts on penaeid oocyte development in vitro. Aquaculture. 270-(1-4): 485-492.

Meusy, J. J., and Charniaux-Cotton, H. 1984. Endocrine control of vitellogenesis in Malacostraca crustaceans. In Engels, W. (Eds), Advances in invertebrate reproduction.3: 231–242.

Meusy, J. J., and G. G. Payen. 1988. Female reproduction in malacostracan Crustacea. Zoological Science. 5: 217-265.

Middleditch, B.S., Missler, S.R. and Hines, H.B. 1980. Metabolic profiles of penaeid shrimp: dietary lipids and ovarian maturation. Journal of Chromatography. 195: 359–368.

Mu, X. and LeBlanc, G.A. 2002b. Environmental antiecdysteroids alter embryo development in the crustacean Daphnia magna. Journal of Experimental Zoology. 292:287–292.

Mu, X. and LeBlanc, G.A. 2004b. Synergistic interaction of endocrine disrupting chemicals: model development using an ecdysone receptor antagonist and a hormone synthesis inhibitor. Environmental Toxicology and Chemistry. 23:1085-1091.

Naessens, E., Lavens, P., Gomez, L., L. Browdy, C., McGovern-Hopkins, K., Spencer, A. W., Kawahigashi, D. and Sorgeloos, P. 1997. Maturation performance of Penaeus vannamei co-fed Artemia biomass preparations. Aquaculture. 155: 87-101

Nagabhushanam, R. and Joshi, P.K. 1986. Effect of environmental factors on the ovarian development and spawning of the peneid peawn, Parapenaeopsis stylifera. Biology of Benthic Marine Organisms: Technics and Methods as Applied to the Indian Ocean. Balkema, Rotterdam, 56-60.

Ogle, J.T. 1992. A review of the current state of our knowledge concerning reproduction in open thelycum penaeid shrimp with emphasis on *Penaeus vannamei*. Invertebrate Reproduction and Development. 22: 267–274.

Okada, H., Heya, T., Igari, Y., Ogawa, Y., Toguchi, H. and Shimamoto, T. 1989. One-month release injectable midrospheres of leuprolide acetate inhibit steroidogenesis and genital organ growth in rat. International Journal of Pharmaceutics. 54: 231-239.

Omelczuk, M., McGinity, J.W. 1993. The influence of themal treatment on the physical-mechanical and dissolution properties of tablets containing poly(D,L-lactic acid). Pharmaceutical research. 10: 542-548.

Palacios, E., Ibarra, A.M., Ramirez, J.L., Portillo, G. and Racotta, I.S. 1998. Biochemical composition of eggs and nauplii in white pacific shrimo, *Penaeus vannamei* (Boone), in relation to physiological condition of spawners in a commercial hatchery. Aquacuture Research. 29: 183-189.

Palacios, E., Ibarra, A.M, Racotta I.S. 2000. Tissue biochemical composition in relation tomultiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus* v*annamei* broodstock. Aquaculture. 185: 353–371.

Pangantihon-Kuhlmann, M.P., Millamena, O. and Chern, Y. 1998. Effect of dietary astaxanthin and vitamin A on the reproductive performance of *Penaeus monodon* broodstock. Aquatic Living Resources. 11: 403-409.

Paolucci, M. 2002. Progesterone receptor: an evolutionary perspective. Trends in Comparative Biochemistry and Physiology. 9:185–190.

Peixoto, S., Coman, G.,Arnold S., Crocos, P. and Presto, N. 2005. Histological examination of final oocyte maturationand atresia in wild and domesticated Penaeusmonodon (Fabricius) broodstock. Aquaculture Research. 1-8.

Pelissero, C., Sumpter, J.P., 1992. Steroids and 'steroid-like' substances in fish diets, Aquaculture. 107: 283-301.

Piedad-Pascual, F. 1988 Shrimp nutrition and feed development in Southeast Asia. Paper presented during the Third Nutrition Workshop sponsored by International Development Center of Canada. July 6–10, 1988, Bangkok, Thailand.

Piyatiratitivorakul, S., K. Sripirom, P. Menasveta and Fast, A.W. 1994. Effects of steroid hormones on ovarian development and molting of pond-reared giant tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius). In:Proceedings of Asian Fisheries Forum, Singapore, October 1992, 928-931

Poltana, P. 2005. Development of the Polychaete *Perinereis nuntia brevicirrus* and its prostaglandin F_2 alpha content in the atokous stage. 10th international congress on invertebrate reproduction and development. Sunday 18th July 2004 to Friday 23rd July 2004, Newcastle upon Tyne, UK. Abstract.

Priddy, A.R. and Killick, S.R. 1993. Eicosanoids and ovulation. Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty acids. 49: 827.

Quackenbush, L.S. 1991. Regulation of vitellogenesis in penaeid Shrimp. *In* P. Deloach, W.J. Dougherty, and M.J. Davidson (eds.), Frontiers in shrimp research: 125-140.

Quackenbush, L. S. 1994. Lobster reproduction a review. Crustaceana. 67:82–94.

Quackenbush, L.S. 2001. Yolk Synthesis in the Marine Shrimp, *Penaeus vannamei*. American Zoolology. 41: 458-464.

Quinitio, E.T., Hara, A., Yamauchi, K. and Nakao, S. 1994. Changes in the steroid hormone and vittellogenin levels during the gametogenic cycle of the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Comparative biochemistry and physiology. 109C: 21-26.

Rao, K.R. and Fingerman, M. 1970. Action of biogenic amines on crustacean chromatophores: II. Analysis of the response of erythrophores in the fiddler crab, *Uca pugilator*, to indolealkylamines and an eyestalk hormone. Comparative Biochemistry and Physiology. 1: 117–126.

Rudolph, P.H., Spaziani, E. and Wang. W.L. 1992. General and Comparative Endocrinology. 88: 224–234.

Sah, H. 2000. Ethyl formate-alternative dispersed solvent useful in preparing PLGA microspheres. Internation Journal of Phamaceutics. 195: 103-113.

Sampath, S.S., Garvin, K., Robinson, D.H. 1992. Preparation and characterization of biodegradable poly(L-lactic acid) gentamicin delivery systems. International Journal of Pharmaceutics. 78: 165-174.

Sansdrap, P. and Moes, A.J. 1997. In vitro evaluation of the hydrolytic degradation of dispersed and aggregated poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. Journal of Controlled Release. 43: 47–58.

Schlicher, E.J.A.M., Postma, N.S., Zuidema, J., Talsma, H., Hennink, W.E. 1997. Preparation and characterization of poly(D,L- lactide-co-glocolide) microspheres containing desferrioxamine. International Journal of Pharmaceutics. 153: 235-245.

Shin, J.T. ans Liao, C.F. 1998. Conversion of cholesterol to sex steroid-like substances by tissues of Mictyris brevidactylus. Zoo. Stdu. 37: 102-110.

Shih, H.T., Mok, H.K., Chang, H.W. and Lee, S.C. 1992. Morphology of *Uca formosensis* Rathbun, 1921 (Crustacea:Decapoda: Ocypodidae), an Endemic Fiddler Crab from Taiwan,with Notes on its Ecology. Zoological Studies. 38: 164-177.

Spaziani, E.P., Hinsch, G.W. and Edwards, S.C. 1993. Changes in prostaglangin E_2 and $F_{2\alpha}$ during vitellogenesis in the Florida crayfish *Procambarus paeninsulanus*. J. Comp. Physiol.63: 541–545.

Spaziani, E.P., Hinsch, G.W. and Edwards, S.C. 1995. The effects of prostaglandin E_2 and prostaglandin $F_{2\square}$ on ovarian tissue in the Florida crayfish *Procambarus paenninsulanus*. Prostaglandins. 50: 189–200.

Soyez, D., J. E. Van Deijnen, and M. Martin. 1987. Isolation and characterization of a vitellogenesis-inhibiting factor from sinus glands of the lobster, *Homarus americanus*. J. Exp. Zool. 244: 479-484.

Stanley-Samuelson, D.W. 1987. Physiology roles of prostaglandins and other eicosanoids in invertebrates. Biological bulletin. 173: 92-109.

Summavielle, T., Monteiro, P.R.R., Reis Henriques, A.M. and Coimara, J. 2003. Invitro metabolism of steroid hormone by ovary and hepatopanceas of the crustacean Penaeid shrimp *Marsupenaeus japonicus*. Scientia marina. 67(3): 299-306.

Tahara, D. and Yano, I. 2002. Development of hemolymph prostaglandins assay systems and their concentration variations during ovarian maturation in the kuruma prawn, Penaeus japonicus. Aquaculture. 220, 791-800.

Tian, J., Sun, X., Chen, X., Yu, J., Qu, L. and Wang, L. 2008. The formulation and immunisation of oral poly(DL-lactide-co-glycolide) microcapsules containing a plasmid vaccine against lymphocystis disease virus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) International Immunopharmacology,

Tsukimura, B., F. I. Kamemoto, and D. W. Borst. 1993. Cyclic nucleotide regulation of methyl farnesoate synthesis by the mandibular organ of the lobster *Homarus americanus*. Journal of Experimental Zoology. 265:427-431.

Vaca, A.A. and Alfaro, J. 2000. Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Penaeus vannamei*, by serotonin injection. Aquaculture. 182: .373–385

Va´zquez-Boucard, C. 1990. Etude de la Reproduction Chez les Crevettes Peneides; Nature et Devenir de la Masse Vitelline: Aspects Fondamentaux et Applique´s. Centre d'Oce´anologie de Marseille, France. The`se de Doctorat. 171.

Wang, N., Wu, X.S., Li, C., Feng, M.F. 2000. Synthesis, Charaterization, biodegradation and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers: Part I. Synthesis and characterization. Journal Biomaterials Science.; Polymer. Edition. 11(3): 301-318.

Warrier, S.R., Tirumalai, R. and Subramoniam, T. 2001. Occurrence of vertebrate steroids, estradiol 17ß and progesterone in the reproducting female of the mud crab *Scylla serrata*. Comparative biochemistry and physiology. 130A: 283-294.

Wasson, K.M., Gower, B.A. and Watts, S.A. 2000. Respones of ovaries and testes of *Lytechinus variegates* (Echinodermata: Echinoidea) to dietary administration of estradiol, progesterone and testosterone. Marine biology. 137: 245-255.

Whisnant, C.S. and Burns, P.J. 2002. Evaluation of steroid microspheres for control of estrus in cows and induction of puberty in heifers. Theriogenology. 58: 1229-1235.

Wongprasert, K., Asuvapongpatana, S., Poltana, P. Tiensuwan, M. and Withyachumnarnkul, B. 2006. Serotonin stimulates ovarian maturation and spawning in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture. 261: 1447-1454.

Wu, X.S. 2001. Synthesis, Charaterization, biodegradation and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers: Part II. Biodegradation. Journal Biomaterials Science.; Polymer. Edition. 12(1): 21-34.

Wu, X.S. 2004. Synthesis, Charaterization, biodegradation and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers: Part III. Drug delivery application. Artificial cell, blood substitutes and biotechnology. 32 : 575-591.

Xu, X.L., Ji, W.J., Castell, S.D. and O'Dor, R.K. 1994. Effect of dietary lipids on fecundity hatchability and egg fatty acids composition of Chinese prawn (*Penaeus chinensis*) Marine Fisheries Research. 13: 13-19.

Yang, W.J., Aida, K.and Nagasawa, H., 1997. Amino Acid Sequences and Activities of Multiple Hyperglycemic Hormones From the Kuruma Prawn, *Penaeus japonicus*. Peptides. 18: 479-485.

Yang, Q. and Owusu-Ababio, G. 2000. Biodegradable progesterone microsphere delivery system for osteoporosis therapy. Drug Development and Industrial Pharmacy. 26(1): 61-70.

Yano, I., and Y. Chinzei. 1987. Ovary is the site of vitellogenin synthesis in Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Comparative biochemistry and physiology. 86B: 213-218.

Yano, I. 1998. Hormonal Control of Vitellogenesis in Penaeid Shrimp In: proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum Chiengmai, Thailand11-14 November 1998, 29-31.

Yu'fera, M., Kolkovski, S., Fema'ndez-Di'az, C., Rinchard, J., Lee, K.J. and Dabrowskic, K. 2003. Delivering bioactive compounds to fish larvae using microencapsulated diets. Aquaculture. 227: 277-291.

Zapata, V., Lo´pez Greco, L.S., Medesani, D.and Rodrı´guez, E.M. 2003.Ovarian growth in the crab Chasmagnathus granulata induced by hormones and neuroregulators throughout the year.In vivo and in vitro studies Aquaculture 224: 339–352.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ปริมาณสารอาหาร ด้วยวิธี AOAC, 1997

การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน

หลักการ

อีเทอร์ในบีกเกอร์ที่มีอาหารบรรจุอยู่จะถูกระเหยกลายเป็นไอโดยความร้อนหลังจากไอของอีเทอร์กระทบความเย็นจากเครื่องควบแน่นกลั่นตัวเป็นของเหลว ไหลผ่านตัวอย่างอาหาร พร้อมทั้งสกัดสารที่สามารถละลายได้ในอีเทอร์ออกมาด้วยจนกระทั่งขบวนการสกัดสิ้นสุด อีเทอร์จะถูกระเหยไปกักเก็บจนหมด จะเหลือแต่สิ่งที่อีเทอร์สกัดออกมาในบีกเกอร์ คือ ไขมัน (Crude Fat) หรือที่เรียกว่า Ether extract

อุปกรณ์

1. Petroleum ether 40-60 องศา (AR grade)
2. เครื่องสกัดไขมัน
3. บีกเกอร์ปากแบน ขนาด 100 cc
4. Extraction thimble
5. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
6. โหลดูดความชื้น
7. ตู้อบ

วิธีวิเคราะห์

1. นำบีกเกอร์ปากแบน ขนาด 100 cc ที่สะอาดไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโหลดูดความชื้น แล้วนำออกมาชั่งให้ได้น้ำหนักคงที่ ชั่งอาหารตัวอย่างในโหลดูดความชื้นแล้วนำออกมาชั่งให้น้ำหนักคงที่ ชั่งตัวอย่างอาหารให้ได้น้ำหนักคงที่ประมาณ 2-3 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (ระวังอย่าใช้มือจับ เพราะไขมันจากมือจะลงไปที่ตัวอย่าง) ใส่ลงใน Extraction thimble

2. เปิดเครื่องสกัดไขมัน ตั้งอุณหภูมิ และเวลาตามที่ต้องการสกัด เติม Petroleum ether ลงในบีกเกอร์ปากแบนที่ทราบน้ำหนักคงที่แล้วประมาณ 90 มิลลิลิตร (ให้เพียงพอสำหรับการกลั่น) นำอาหารไปใส่เครื่องสกัด 3-4 ชั่วโมง (เปิดเครื่องทำความเย็นด้วย)

3. นำบีกเกอร์ที่บรรจุอาหารไปติดตั้งกับเครื่องสกัด วางบนที่ heating plate ผลักปุ่มไปด้านหน้าที่ตำแหน่ง immersion จุ่มแช่ thimble ลงในสารละลายเป็นเวลา ประมาณ 30 นาที ยกตัวอย่างขึ้นจากสารทำละลายในขั้นตอน reflux washing เป็นเวลา 45 นาที กดลผลักปุ่มด้านหน้าไปที่ตำแหน่ง washing

4. เมื่อครบเวลา reflux washing ปิด valve ที่ condenser ไปที่ตำแหน่ง closed เพื่อที่เป็นการดูสารทำละลายกลับที่ส่วนล่างของ condenser glass

5. นำ thimber ออก แล้วนำบีกเกอร์ไปอบที่ตู้อบความร้อน อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปใส่ตู้ดูดความชื้น แล้งชั่งน้ำหนักจนน้ำหนักคงที่

การคำนวณปริมาณไขมัน

$$\text{ร้อยละไขมัน} = \frac{b - a \times 100}{w}$$

a คือ น้ำหนักบีกเกอร์

b คือ น้ำหนักบีกเกอร์และไขมันหลังอบ

w คือ น้ำหนักอาหารตัวอย่าง

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

หลักการ

วิธีหาปริมาณไนโตรเจนที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนซึ่งโดยทั่วไปโปรตีนประกอบด้วยไนโตรเจนประมาณร้อยละ 16 ดังนั้นเมื่อทราบปริมาณไนโตรเจนแล้วนำมาคูณกับแฟคเตอร์ 6.25 จะได้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ต้องการในอาหาร (crude protein) ซึ่งวิธีที่ใช้วิเคราะห์ เรียกว่าวิธี Kjeldahl โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ 3 ขั้นตอน คือ

1. การย่อย (digestion) ด้วยกรดกำมะถันเข้มข้น การเร่งปฏิกิริยา ไนโตรเจนในอาหารจะถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต

2. การกลั่น (distillation) เป็นการไล่แอมโมเนียจากแอมโมเนียมซัลเฟต โดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซต์ (NaOH) แอมโมเนียจะถูกกลั่นออกมาเพื่อนำไปทำปฏิกิริยากับกรดมาตรฐาน

3. การไตเตรด (titration) ด้วยสารละลายกรดมาตารฐานเป็นการหาปริมาณแอมโมเนียที่เกิดจากการกลั่น เพื่อนำไปคำนวณหาค่าไนโตรเจนทั้งหมด

อุปกรณ์

1. Kjeldahl flask
2. ชุดกลั่น erhardt vapodast 1
3. เครื่องย่อย erhardt kjeldatherm digestion unit
4. ชุดไตเตรท

สารเคมี

1. สารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น
2. สารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 เข้มข้น 0.5 นอร์มอล
3. K_2SO_4 100 กรัมและ $CuSO_4$ 7 กรัม
4. สารละลาย NaOH เข้มข้นร้อยละ 50
5. สารละลายBoric acid เข้มข้นร้อยละ 4
6. อินดิเคเตอร์ tashio

การเตรียมสารเคมี

1. สารเร่งปฏิกิริยาโปรตีน (Protein catalyst) K_2SO_4 100 กรัม ผสม $CuSO_4$ 7 กรัม

2. สารละลายBoric acid เข้มข้นร้อยละ 4 เตรียมจาก Boric acid 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

3. อินดิเคเตอร์ tashio เตรียมจาก methyl red : methylene blue สัดส่วน 3 ต่อ 2 โดนละลายmethyl red 1 กรัม ใน NaOH เข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 37 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 1 ลิตร ผสมกับสารละลาย methylene blue 1 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร

4. สารละลาย NaOH เข้มข้น 0.1 นอร์มอล เตรียมจากสูตร

$$V = (100 \times M \times N)/a \times p \times d$$

V คือ ปริมาตรของสารที่ใช้เตรียมสารละลาย 1 ลิตร
M คือ น้ำหนักโมเลกุลของสาร (40)
N คือ ความเข้มข้นหน่วยเป็นนอร์มอล
a คือ จำนวนอิเล็กตรอนของเบสที่ทำปฏิกิริยาได้ (1)
p คือ เปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์
d คือ ความหนาแน่นของสาร (0.9991)

5. สารละลาย NaOH เข้มข้นร้อยละ 50 เตรียมจาก NaOH หนัก 500 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

6. สารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น 0.5 นอร์มอล เตรียมจากสูตร

$$V = (100 \times M \times N)/a \times p \times d$$

V คือ ปริมาตรของสารที่ใช้เตรียมสารละลาย 1 ลิตร
M คือ น้ำหนักโมเลกุลของสาร (98.0716)
N คือ ความเข้มข้นหน่วยเป็นนอร์มอล
a คือ จำนวนโปรตอนของกรดที่ทำปฏิกิริยาได้ (1)
p คือ เปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์
d คือ ความหนาแน่นของสาร (1.841)

7. การเตรียม Na_2CO_3 เข้มข้น 0.5 นอร์มอล ชั่ง Na_2CO_3 26.5 กรัม อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เพื่อไล่ความชื้น ละลายในน้ำกลั่นอุ่นที่ต้มไล่ CO_2 ออกแล้ว 1 ลิตร

การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของกรด H_2SO_4 (Skoog and West, 1986)

1. เตรียมสารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น 0.5 นอร์มอล และ Na_2CO_3 เข้มข้น 0.5 นอร์มอล

2. ปิเปต Na_2CO_3 เข้มข้น 0.5 นอร์มอล 25 มิลลิลิตร ใส่ใน flask หยด methyl orange 2-3 หยดไตเตรตกับสารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น 0.5 นอร์มอล จนถึงจุดยุติ จะได้สีชมพูเหลือง

3. คำนวณหาความเข้มข้นของ H_2SO_4 จาก

$$N_{acid} = (N_{base} \times V_{base}) / V_{acid}$$

N_{acid} คือ ความเข้มข้นของสารละลาย H_2SO_4 หน่วยเป็นนอร์มอล

N_{base} คือ ความเข้มข้นของสารละลาย Na_2CO_3 หน่วยเป็นนอร์มอล

V_{base} คือ ปริมาตรของสารละลาย Na_2CO_3หน่วย เป็นมิลลิลิตร

V_{acid} คือ ปริมาตรของสารละลาย H_2SO_4หน่วยเป็นมิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน

1. การย่อยสลาย (digestion)

1. ชั่งตัวอย่างอาหารที่บดละเอียดประมาณ 2 กรัม ใส่ใน Kjeldahl flask

2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา และเติม conc. H_2SO_4 25 มิลลิลิตร

3. นำ Kjeldahl flask ตั้งบนเตาย่อยเริ่มจากไฟอ่อนไปจนถึง 380 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้สารละลายสีขาวใส

2. การกลั่น (distillation)

ต่อ Kjeldahl flask เข้ากับเครื่องกลั่น ให้ปลายด้านหนึ่งของ condenser จุ่มลงในขวดรูปชมพู่ ที่มี 4% boric acid 100 มิลลิลิตร ที่มีการหยดอินดิเคเตอร์ tashio 2-3 หยด กลั่นให้ได้ปริมาณสาร 300 มิลลิลิตร สารละลายในขวดรูปชมพู่จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเขียว (ในการกลั่นจะมีการเติมน้ำ 75-100 มิลลิลิตร และเรติม NaOH 90 มิลลิลิตร โดยเครื่อง)

3. การไตเตรต (titration)

นำสารละลายที่กลั่นมาไตเตรต ด้วยสารละลายมาตรฐาน H_2SO เข้มข้น0.5 นอร์มอล และบันทึกค่า นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

การคำนวณหาปริมาณโปรตีน

$$\text{ร้อยละโปรตีน} = \frac{1400 \times V_s \times N_s \times N_p}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)} \times 1000}$$

V_s คือ ปริมาตรของ H_2SO ที่ใช้ในการไตเตรต หน่วยเป็นมิลลิลิตร

N_s คือ ความเข้มข้นของสารละลาย H_2SO ที่ใช้ในการไตเตรด หน่วยเป็น นอร์มอล

N_p คือ แฟคเตอร์ของโปรตีน (6.25)

การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น

หลักการ

นำวัตถุที่ทราบน้ำหนักไปอบในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียล จากนั้นนำไปหาค่าน้ำหนักที่หายไปมาคำนวณค่าความชื้น

อุปกรณ์

1. crucible
2. ตู้อบความร้อน
3. โถดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการวิเคราะห์

1. บดอาหารที่จะทำการวิเคราะห์ให้ละเอียด
2. อบ crucible ในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียล นาน 2 ชั่วโมง นำไปใสในโถดูดความชื้นประมาณ 30-60 นาที ให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก และบันทึกค่า crucible
3. ชั่งน้ำหนักอาหารที่บดแล้ว 2-3 กรัม ใส่ใน crucible

4. นำ crucible ที่ใส่อาหารไปอบที่ตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียล นาน 2 ชั่วโมง นำไปใส่ในโถดูดความชื้นประมาณ 30-60 นาที ให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก และบันทึกค่า

การคำนวณหาค่าความชื้น

$$\text{ร้อยละความชื้น} = \frac{a - b \times 100}{w}$$

a คือ น้ำหนักตัวอย่างอาหารพร้อมถ้วยก่อนอบ

b คือ น้ำหนักตัวอย่างอาหารหลังอบ

w คือ น้ำหนักอาหารตัวอย่าง

การวิเคราะห์หาปริมาณใยอาหาร

หลักการ

นำอาหารที่สกัดไขมันออกแล้ว ไปย่อยด้วยสารละลายกรดเจือจางหลังจากนั้นอาหารจะถูกย่อยไปด้วยสารละลายด่างเจือจาง สารที่เหลืออยู่จะถูกกรองเก็บใน crucible แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียล น้ำหนักที่สูญหายไปในการเผา คือ ใยอาหารทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหาร เรียกว่า Crude fible

สารเคมี

1. 1.25% H_2SO_4
2. 1.25% KOH
3. n-Octanol

อุปกรณ์

1. บีกเกอร์ทรงสูง
2. กระดาษกรองขาดใหญ่
3. กรวยกรอง
4. โหลดูดความชื้น
5. ตู้อบความร้อน

6. เตาเผาความร้อนสูง

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างอาหารที่สกัดไขมันออกแล้ว (ทราบน้ำหนักอย่างละเอียด) มาใส่ลงในบีกเกอร์ทรงสูง

2. เติม 1.25% H_2SO_4 150 มิลลิลิตร และเติม n-Octanol 3-5 หยด ต้มบนhot plate ของเครื่องสกัดรอให้เดือดก่อนแล้วค่อยนับเวลาไปอีก 30 นาที

3. เติม 1.25% KOH 150 มิลลิลิตร และเติม n-Octanol 3-5 หยด ต้มบนhot plate ของเครื่องสกัดรอให้เดือดก่อนแล้วค่อยนับเวลาไปอีก 30 นาที

4. กรองสารละลายที่ย่อยแล้ว จากนั้นเอาตะกอนที่กรองได้ไปอบที่ตู้อบความร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียล นาน 1 ชั่วโมง (จนกว่าน้ำหนักคงที่)

5. นำตะกอนที่ได้ไปใส่ crucible ที่ทราบน้ำหนัก แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียล นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใส่โถดูดความชื้นจนเย็น แล้วชั่งน้ำหนักที่ได้เป็นน้ำหนักของเถ้า เมื่อนำน้ำหนักที่ได้ไปหักออกจากน้ำหนักที่ได้ในข้อ 4 จะได้น้ำหนักของใยอาหารที่ปราศจากเถ้า

การคำนวณปริมาณใยอาหาร

$$\text{ร้อยละใยอาหาร} = \frac{b - a \times 100}{W}$$

a คือ น้ำหนักเถ้าหลังเผา

b คือ น้ำหนักใยอาหารรวมเถ้าก่อนเผา

w คือ น้ำหนักอาหารตัวอย่าง

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer solution)

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 5.5, 7.5 และ 9.5

1. เตรียมสารละลายโมโนโซเดียมฟอสเฟส (Monobasic sodium phosphate : $NaH_2PO_4.2H_2O$, 0.2 M;) หนัก 27.8 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

2. สารละลายไดโซเดียมฟอสเฟต (dibasic sodium phosphate : $Na_2HPO_4.12H_2O$, 0.2 M) หนัก 71.1 กรัมในน้ำกลั้น 1 ลิตร

3. นำสารละลายทั้งผสมกันด้วยอัตราส่วนต่างกันตามตารางที่ 1 จากนั้นทำการปรับค่าพีเอชด้วยที่ต้องการด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ โดยปรับค่าเป็นกรด-ด่างด้วยการเติมสารละลาย $NaH_2PO_4.2H_2O$ 0.1 M NaOH

ตารางที่ 1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer solution) ที่ pH ต่าง ๆ

พีเอช (pH)	$NaH_2PO_4.2H_2O$ (ml)	$Na_2HPO_4.12H_2O$ (ml)
5.7	93.5	6.5
7.5	16	84
9.5	0	100

ภาคผนวก ค

วิธีการวิเคราะห์ Radioimmunoassay (RIA) (Kamonpatana *et al*., 1979)

วิธีการสกัดตัวอย่าง

1. นำเลือดแม่กุ้ง 150 µl สกัดด้วย Diethyl ether 1500 µl ปั่นด้วยความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 90 วินาที
2. แยกส่วนใสใส่ขวด vial ขนาด 10 ml และทำแห้งด้วย Vacuum dryer
3. เติม Phosphate buffer saline (PBS) p H 7.0 ปริมาณ 100 µl ทิ้งไว้ 1 คืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วยเทคนิค RIA

ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วยเทคนิค RIA

1. เตรียมสารมาตรฐานฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน ความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1,000 pg/50 ml

สารละลายฮอร์โมนตั้งต้นมีความเข้มข้น เท่ากับ 1 µg/ml Ethanol

สารละลาย A = 100 µl สารตั้งต้น + 5 ml ของ สารละลาย PBS

สารละลาย B = 2.5 ml สารละลาย A + 2.5 ml ของ สารละลาย PBS

สารละลาย C = 2.5 ml สารละลาย B + 2.5 ml ของ สารละลาย PBS

สารละลาย D = 2 ml สารละลาย C + 3 ml ของ สารละลาย PBS

สารละลาย E = 2.5 ml สารละลาย D + 2.5 ml ของ สารละลาย PBS

สารละลาย F = 2.5 ml สารละลาย E + 2.5 ml ของ สารละลาย PBS

สารละลาย G = 2ml สารละลาย F + 3 ml ของ สารละลาย PBS

สารละลาย H = 2.5 ml สารละลาย G + 2.5 ml ของ สารละลาย PBS

สารละลาย I = 2.5 ml สารละลาย B + 2.5 ml ของ สารละลาย PBS

สารละลาย J = - +5 ml ของ สารละลาย PBS

สารละลาย O= เติม สารละลาย PBS อย่างเดียว

2. ปิเปตสารมาตรฐาน 50 µl เติมสารละลาย PBS 50 µl ผสมให้เข้ากัน
3. เติม Anti-Progesterone (AS-P) 100 µl ในสารละลายตัวอย่าง และสารมาตรฐาน บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที

4. เติมสารกัมมันตภาพรังสี [(1, 2, 6. 7 ^{3}H) P4] 100 µl บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง

5. เติม ice-dentran-coated charcoal 200 µl และปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกสาร ความเร็ว 3,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที

6. เทส่วนใสด้านบนลงในขวด vial 10 ml และเติม Scintillation fuild 4 ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7. วิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนด้วยเครื่อง Liquid Scintillation Counter (Beckman, USA)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวชนัดดา เกษมโชติช่วง สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนชลกันยานุกูล จากนั้นได้เข้าศึกษาที่คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา สำเร็จการศึกษาได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตเมื่อปี พ.ศ.2547 และเข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2548