การใช้ประโยชน์ของคาโรทีนอยด์ในปลาคาร์พ

Utilization of Carotenoids in Fancy Carp (*Cyprinus carprio*)

บัณฑิต ยวงสร้อย[1] อรพินท์ จินตสถาพร [1] นนทวิทย์ อารีชนย์[1] และอรุณี อิงคากุล [2]

Bundit Yuangsoi[1], Orapint Jintasataporn[1],Nontavit Areechon[1] and Arunee Ingkakul[2]

[1] ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[1] Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University

[2] ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[2] Department of Biochemistry, Faculty of Science, Kasetsart University

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการใช้ประโยชน์ของคาโรทีนอยด์แอสตาแซนทิน และลูทีน ในปลาคาร์พขนาด 26.93 กรัมต่อตัว โดยให้กินอาหารโดยตรงเพียงครั้งเดียว (single dose administration) อาหารทดลองแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คืออาหารผสมแอสตาแซนทิน และ ลูทีน กำหนดให้มีความเข้มข้นของแอสตาแซนทิน และลูทีน 500 มิลลิกรัม หลังจากให้อาหารแล้วทำการเก็บตัวอย่างเลือดที่เวลา 15 และ 30 นาที 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96 และ120 ชั่วโมง วิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของแอสตาแซนทิน และลูทีน ในซีรั่ม ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) ร่วมด้วย TLC Scanner (densitometer) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ วิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลทางเภสัชจลศาสตร์ โดยกำหนดแบบจำลองทางเภสัชจลศาสตร์ เป็นแบบจำลองแบ่งหนึ่งส่วน (one – compartment model) เมื่อเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลศาสตร์ของปริมาณแอสตาแซนทิน และลูทีน พบว่ามีค่าความเข้มข้นสูงสุด (C max) 54.20 และ 78.40 µg/ml ที่เวลา (T max) 6 และ 24 ชั่วโมง ปริมาตรการกระจายตัวของคาโรทีนอยด์ (Vd) มีค่า 1958.80 และ 237.20ml/kg ส่วนอัตราการขับออกของคาโรทีนอยด์ (CL) มีค่า 8.92 และ 3.50 ml/hr/kg และมีค่าพื้นที่ใต้เส้นโค้ง (AUC) 5300.00 และ2082.90 µg-hr/ml ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปลาคาร์พที่ได้รับอาหารผสมแอสตาแซนทินมีความสามารถในดูดซึมและมีการกระจายในกระแสเลือดได้ดีกว่าลูทีน และยังพบว่าปลาคาร์พที่ได้รับอาหารผสมแอสตาแซนทินจะเกิด reductive metabolized เป็นลูทีน ส่วนปลาคาร์พที่ได้รับอาหารผสมลูทีน ปลาคาร์พสามารถที่จะเปลี่ยนลูทีนเป็นแอสตาแซนทินได้ ดังนั้นเมื่อปลาคาร์พที่ได้รับอาหารผสมลูทีนสามารถทำให้ปริมาณแอสตาแซนทินมีการสะสมในกระแสเลือดในตัวปลาสูงขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการแสดงออกของสีแดงที่ผิวหนังได้ต่อไป ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการผลิตอาหารสำหรับปลาคาร์พราคาถูกจากแหล่งวัตถุดิบที่เป็นคาโรทีนอยด์ชนิดลูทีน

Abstract

The utilization study of carotenoids which disposition of astaxanthin and lutein in fancy carp average weight 26.93 gram/fish. This study were divided 2 experiment diets, astaxanthin and lutein at a dose of 500 µg. Fish were feeding single dose administration and fish were not fed further meals. Blood sample were collected at 15, 30 min, 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96 and 120 after oral administration. The serum concentration of astaxanthin and lutein were determined by Thin layer chromatography (TLC) and carotenoid amount were determined directly from developed TLC plates using TLC scanner (densitometer). Astaxanthin and lutein concentration – time curves from serum were best fit to one - compartment pharmacokinetic model. The results shown that, after fed single dose the maximum concentration of free astaxanthin and lutein in serum (C max) were 54.20 and 78.40 µg/ml at T max 6 and 24 hr. The volume of distribution were 1958.80 and 237.20 ml/kg; the total body clearance were 8.92 and 3.50 ml/hr/kg and area under the curve (AUC) were 2082.90 and 5300.00 µg-hr/ml. It concluded that astaxanthin was absorbed well in fancy carp after oral administration. In addition, metabolized of carotenoids after oral administration shown that fancy carp fed with astaxanthin diet, fish was oxidized reductive metabolized to lutein . In the part of fancy carp fed with lutein diet, fish can be convert lutein to astaxanthin. Hence fancy carp was fed with diet contained lutein can increased astaxanthin concentration likewise astaxanthin's diet, led to display deep red colour on skin. Actually these available value were utilized for establishing formulated diet for fancy carp or ornamental fish diet from the feedstuffs as the lutein source .

Keywords : astaxanthin, lutein, pharmacokinetic parameters

คำนำ

ปลาคาร์พเป็นปลาสวยงามที่ได้รับความนิยมจากผู้เลี้ยงมาเป็นเวลานาน เนื่องจากปลาคาร์พที่มีสีสันสวยงาม ปลาที่มีสีสวยงาม และรูปร่างที่ได้มาตรฐานจะมีราคาสูง เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งใน และต่างประเทศ สีที่แสดงออกที่ผิวหนังของปลาสวยงามจะบ่งบอกถึงคุณภาพของปลาได้ ปลาที่มีสีสันสวยงาม จะเป็นที่ต้องการของตลาด และมีราคาสูง (paripatananont *et al.*, 1999) แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการเลี้ยงของผู้เลี้ยง พบว่าเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลานานปลาคาร์พจะมีสีซีดลง ดังนั้นการที่จะทำให้ปลาคาร์พมีสีสันที่เข้มและคงที่ จำเป็นต้องให้ความสำคัญในอาหารปลาคาร์พ ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องผสมคาโรทีนอยด์ลงไปในอาหาร เนื่องจากปลาคาร์พ และสัตว์ชั้นสูงไม่สามารถที่จะสังเคราะห์คาโรทีนอยด์ได้เองจำเป็นที่จะต้องได้รับจากอาหารโดยตรง (Goodwin, 1984) สีที่ผิวหนังของปลาจะแสดงออกโดยโครมา โตฟอร์ (chromatophores) ชนิด melanophores, xanthophores, erythrophores, irridophores, leucophores and

cyanophores) ซึ่งภายในโครมาโตฟอร์จะบรรจุด้วยเมลานิน หรือคาโรทีนอยด์ (e.g. astaxanthin, canthaxanthin, lutein และ zeaxanthin) ซึ่งจะมีการแสดงออกของสีที่บริเวณผิวหนังเป็นสีเหลือง ส้ม จนกระทั่งสีแดง ในสภาวะการผลิตอาหารในปัจจุบันที่มีราคาสูงจากการผสมคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ ส่งมีผลให้ต้นทุนในการผลิตอาหารเพิ่มสูงถึง 15 – 20 % (Torrissen, 1995) การศึกษาการใช้ประโยชน์ของคาโรทีนอยด์โดยศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลศาสตร์ สามารถบ่งบอกได้ว่าเมื่อมีการให้อาหารที่ผสมคาโร ทีนอยด์ไปแล้วเกิดการดูดซึม หรือเปลี่ยนแปลงในกระแสเลือด ซึ่งจะเป็นแนวทางในการพิจารณาถึงประสิทธิภาพของคาโรทีนอยด์ชนิดนั้น ๆ ได้ (Gibaldi and Perrier, 1982) มีการศึกษาเกี่ยวกับการดูดซึม และการขับออกของคาโรทีนอยด์ในปลาสวยงามค่อนข้างที่จะน้อย การศึกษาทางเภสัชจลศาสตร์จะทำการวัดปริมาณคาโรทีนอยด์ในเลือดหลังการผ่านกระบวนการย่อยโดยให้อาหารเพียงครั้งเดียวที่ระดับความเข้มข้นที่กำหนดไว้ ซึ่งในสัตว์ต่างชนิดกันจะมีความสามารถในใช้ประโยชน์ของคาโรทีนอยด์แต่ละชนิดได้แตกต่างกัน รวมทั้งมีความสามารถในการเปลี่ยน และสะสมคาโรทีนอยด์ได้แตกต่างกันด้วย โดยพบว่า ปลาคาร์พสามารถเปลี่ยน lutein หรือ zeaxanthin เป็น astaxanthin ได้ (Katayama *et al*., 1973)

ดังนั้นการศึกษาการใช้ประโยชน์ของคาโรทีนอยด์ชนิดแอสตาแซนทิน และลูทีน จากค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลศาสตร์จึงเป็นประโยชน์ในการพิจารณาถึงการเปลี่ยนแปลงของคาโรทีนอยด์ที่นำมาผสมในอาหารเพื่อเป็นแหล่งของคาโรทีนอยด์ เนื่องปลาคาร์พจะมีความสามารถในการใช้ประโยชน์ของคาโรทีนอยด์แต่ละชนิดได้แตกต่างกัน จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการผลิตอาหารปลาคาร์พราคาถูก จากแหล่งของคาโรทีนอยด์จากธรรมชาติ

อุปกรณ์ และวิธีการ

<u>ปลา และอาหารทดลอง</u>

การศึกษาการใช้ประโยชน์ของคาโรทีนอยด์ในปลาคาร์พ ทำการทดลองในปลาคาร์พรวมเพศที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 26.93 กรัม/ตัว ในตู้กระจกความจุ 20 ลิตร ก่อนเริ่มทำการทดลอง เลี้ยงด้วยอาหารที่คาโรทีนอยด์ต่ำเป็นเวลา 2 สัปดาห์ กำหนดปริมาณคาโรทีนอยด์ในอาหารทดลอง โดยให้ปลาแต่ละตัวได้รับอาหารทีมีปริมาณแอสตาแซนทิน 500 ไมโครกรัม/ตัว และลูทีน 500 ไมโครกรัม/ตัว แอสตาแซนทิน และลูทีนที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเกรดสำหรับอาหารสัตว์ โดยแอสตาแซนทินได้รับความอนุเคราะห์จาก BASF (Lucanthin pink; BASF, ประเทศไทย) และลูทีน ได้รับจากอนุเคราะห์จาก Kemin (Oro GLO Dry; Kemin Industries, ประเทศไทย) โดยจะมีการให้อาหารครั้งเดียว วิเคราะห์ชนิด และปริมาณคาโรทีนอยด์ในซีรั่มในแต่ละช่วงเวลาหลังจากให้อาหาร

<u>การเก็บตัวอย่าง</u>

ก่อนทำการทดลองจะอดอาหารปลาเป็นเวลา 3 วัน และวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของแอสตาแซนทิน และลูทีน ในซีรั่ม ที่เวลา 0 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเลือดจาก dorsal vein โดยเก็บตัวอย่างเลือดด้วยหลอดเก็บเลือดขนาด 2 มิลลิลิตร ที่ไม่เคลือบด้วย heparin ขนาดเข็ม 0.55 x 25 มิลลิเมตร โดยทำการเก็บ

ตัวอย่างเลือดที่เวลา 15 และ 30 นาที 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96 และ120 ชั่วโมง หลังจากให้อาหาร โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากปลา 4 ตัว ในแต่ละช่วงเวลา

<u>การสกัด และวิเคราะห์ปริมาณของคาโรทีนอยด์</u>

นำตัวอย่างเลือด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 300 x g ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแยกเอาส่วนของซีรั่มปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมเอทานอล 1 มิลลิลิตร เขย่า 30 วินาที และเติม เฮกเซน 2 มิลลิลิตร เขย่า 1 นาที แล้วทำการแยกส่วนของเฮกเซนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 300 x g ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนของเฮกเซนไประเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน (White *et al*., 2002)

การวิเคราะห์ชนิด และปริมาณของคาโรทีนอยด์ในซีรั่ม และอาหาร ใช้วิธี Thin Layer Chromatography บน TLC plated silica gel ขนาด 20 x 20 cm ความหนา 0.25 mm. (TLC plated silica gel 60, Merck, Germany) spot ตัวอย่างปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบน TLC plate ด้วยเครื่อง semi-automatic sample application ที่ควบคุมการสเปรย์ตัวอย่าง ด้วยแก๊สไนโตรเจนที่มีอัตราการไหล 4 ul/sec. (Linomat IV, CAMAG, Switzerland)

ใช้ developing mixture ในการแยกชนิดของคาโรทีนอยด์ด้วย diethyl ether : petroleum ether : acetone (75 : 15 : 10) จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณของคาโรทีนอยด์ โดยการแสกน spectrum ของคาโรทีนอยด์ที่เกิดขึ้นหลังจากการแยกด้วย TLC เปรียบเทียบกับคาโรทีนอยด์มาตรฐานแอสตาแซนทิน (Sigma) และสารมาตรฐานลูทีน (Chromadex, Canada) ด้วย TLC Scanner (densitometer) ตามวิธี Mantiri *et al*. (1996) แสกน spectrum ด้วย tungsten lamp ที่ความยาวคลื่น 450 nm (TLC Scanner, CAMAG, Switzerland)

<u>การเตรียมสารละลายคาโรทีนอยด์มาตรฐาน</u>

สารละลายคาโรทีนอยด์มาตรฐานตั้งต้น (stock standard solution) จะทำการเตรียมในภาวะที่มีแสงสลัว (หรือแสงสีเหลือง) หาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานด้วย UV / Vis Spectrum เพื่อหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (Maximum Absorbance : λ max) ที่ความยาวคลื่น 380 – 600 nm. และคำนวณความเข้มข้นโดยใช้กฎของ Beer's – Lambert's Law จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างสารมาตรฐานตั้งต้น ภายใต้แก๊สไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส สำหรับการเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับใช้เป็น working standard ที่ความเข้มข้นที่ต้องการ จะถูกเตรียมจากความเข้มข้นของ stock standard

<u>การสอบเทียบของวิธีการวิเคราะห์</u>

สามารถทำได้โดย Spiked ความเข้มข้นของสารละลายคาโรทีนอยด์มาตรฐาน astaxanthin และ lutein ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน ที่ 3 ระดับความเข้มข้นในตัวอย่างที่ไม่มีคาโรทีนอยด์ (sample blank) จำนวน 10 ซ้ำ และจากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณคาโรทีนอยด์ตามวิธีข้างต้น นำค่าความเข้มข้นที่ทำการ

วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่ทราบค่าแน่นอน จากนั้นคำนวณหาค่า Percentage recoveries เพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์

<u>การวิเคราะห์ทางเภสัชจลศาสตร์</u>

กำหนดแบบจำลองทางเภสัชจลศาสตร์ เป็นแบบจำลองแบ่งหนึ่งส่วน (one – compartment model) วิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลศาสตร์ของแอสตาแซนทิน และลูทีน จากความเข้มข้นของแอสตาแซนทิน และลูทีน ที่อยู่ในเลือดที่เวลาต่าง ๆ กัน หลังจากมีการให้อาหาร ด้วยโปรแกรมทางเภสัชจลศาสตร์ (Winnonlin, Ver 3.0 Phar-sight, Mountain View, CA, USA)

ผลและวิจารณ์

การศึกษาการใช้ประโยชน์ของคาโรทีนอยด์ในปลาคาร์พ โดยการให้อาหารโดยตรงเพียงครั้งเดียว ที่กำหนดให้อาหารมีความเข้มข้นของแอสตาแซนทิน และลูทีน 500 ไมโครกรัม เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณของแอสตาแซนทิน และลูทีน ในอาหาร ด้วยวิธี TLC ร่วมกับ TLC Scanner (densitometer) พบว่าอาหารที่ผสมแอสตาแซนทินมีปริมาณของแอสตาแซนทิน 439.54 $\pm$ 19.39 และอาหารผสมลูทีนมีปริมาณของลูทีน 488.82 $\pm$ 28.66 ไมโครกรัม

Table 1 Carotenoids composition in serum of initial fish and experiment diet

Compond	Astaxanthin (ppm)	Lutein (ppm)
Initial fish's serum	0.00	0.24 $\pm$ 0.07
Experiment diet		
Astaxanthin (500 µg)	439.54 $\pm$ 19.39	0.00
Lutein (500 µg)	0.00	488.82 $\pm$ 28.66

สำหรับการสอบเทียบของวิธีวิเคราะห์จากค่า เปอร์เซ็นต์ recovery จากวิธีการสกัด และการวิเคราะห์ชนิด และปริมาณด้วยวิธี TLC ร่วมกับ TLC Scanner (densitometer) โดยการ spiked สารมาตรฐานคาโรทีนอยด์ 2 ชนิด คือ แอสตาแซนทิน และลูทีน ที่ 3 ความเข้มข้นใน sample blank พบว่าเปอร์เซ็นต์ recovery ของวิธีการสกัด และการวิเคราะห์ชนิด และปริมาณ มีค่า recovery เฉลี่ยอยู่ในช่วง 87.96 – 98.44 % สำหรับแอสตาแซนทินที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ตามที่กำหนดไว้ พบว่ามีค่าเฉลี่ย 91.70 ส่วนเปอร์เซ็นต์ recovery ของลูทีนที่ความเข้มข้น 3 ระดับเช่นเดียวกันมีค่าเฉลี่ย 90.47 (ตารางที่ 2) ซึ่งเปอร์เซ็นต์ recovery ของแอสตาแซนทิน และลูทีน อยู่ในช่วงมาตรฐาน ของ The AOAC manual for the Peer Verified Methods program (1993) ที่กำหนดไว้ 80 – 110 % (ตารางที่ 3) ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า วิธีการสกัด และวิธีการวิเคราะห์ชนิด และปริมาณของคาโรทีนอยด์ ด้วยวิธี TLC ร่วมกับ TLC Scanner (densitometer) สามารถนำไปวิเคราะห์ได้จริง

Table 2 Recovery of carotenoids added to sample blank

Parameter	Astaxanthin (ppm)			Lutein (ppm)		
Added Conc.	0.3	1.0	2.0	0.2	1.50	3.0
Found Conc.	0.3 ± 0.06	0.88 ± 0.28	1.77 ± 0.14	0.19 ± 0.10	1.36 ± 0.11	2.64 ± 0.10
% recovery	98.44	88.22	88.44	92.85	90.61	87.96

Table 3 Analyte recovery at different concentrations

Active Ingred. (%)	Analyte ratio	Unit	Mean recovery (%)
100	1	100%	98-102
>=10	10-1	10%	98-102
>=1	10-2	1%	97-103
>=0.1	10-3	0.1 %	95-105
0.01	10-4	100 ppm	90-107
0.001	10-5	10 ppm	80-110
0.0001	10-6	1 ppm	80-110
0.00001	10-7	100 ppb	80-110
0.000001	10-8	10 ppb	60-115
0.0000001	10-9	1 ppb	40-120

Source : AOAC manual for the Peer Verified Methods program (1993)

<u>พารามิเตอร์ทางเภสัชจลศาสตร์ของคาโรทีนอยด์จากอาหารทดลอง (Parent diets)</u>

เมื่อเปรียบเทียบค่าเภสัชจลศาสตร์ ของปริมาณคาโรทีนอยด์ในซีรั่มหลังจากการให้อาหารที่ผสมแอสตาแซนทิน และลูทีน ที่ปริมาณ 500 ไมโครกรัม ที่เวลา 15 30 นาที 1 3 6 12 24 36 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเลือด และวิเคราะห์ชนิด และปริมาณของคาโรทีนอยด์ด้วย TLC ร่วมกับ TLC Scanner (densitometer) พบว่าปลาคาร์พที่ได้รับอาหารผสมแอสตาแซนทิน มีความเข้มข้นสูงสุดของแอสตาแซนทินในซีรั่ม (C max) 54.2 µg/ml ที่เวลา 6 ชั่วโมง (T max) ส่วนปลาคาร์พที่ได้รับอาหารผสมลูทีน มีความเข้มข้นสูงสุดของลูทีนในซีรั่ม (C max) 78.4 µg/ml ที่เวลา 24 ชั่วโมง (T max) ซึ่งอาจจะกล่าวได้ว่าปลาคาร์พที่ได้รับอาหารผสมแอสตาแซนทิน จะมีการดูดซึมได้เร็วกว่าอาหารผสมลูทีนเนื่องจากมีความเข้มข้นสูงสุดที่ตรวจพบในซีรั่มได้ที่ระยะเวลาสั้น

เมื่อเปรียบเทียบการกระจายตัวของคาโรทีนอยด์ในกระแสเลือด (Vd) พบว่าปลาคาร์พที่ได้รับอาหารผสมแอสตาแซนทินจะมีค่า 1958.8 ml/kg ส่วนปลาคาร์พที่ได้รับอาหารผสมลูทีนมีค่า Vd 237.2 ml/kg ซึ่งจะแสดงให้เห็นว่าปลาคาร์พที่ได้รับอาหารผสมแอสตาแซนทินมีการกระจายตัวของแอสตาแซนทินในกระแสเลือดได้มากกว่าปลาคาร์พที่ได้รับอาหารผสมลูทีน ซึ่งค่า Vd ที่มีค่าสูงจะบ่งบอกว่าสารนั้น ๆ มีความสามารถในการแพร่กระจายตัวได้ดี ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับค่า AUC โดยพบว่าปลาคาร์พที่ได้รับอาหารผสมแอสตาแซนทินมีค่า 5300.00 µg-hr/ml ส่วนปลาคาร์พที่ได้รับอาหารผสมลูทีนมีค่า AUC 2082.90 µg-hr/ml ซึ่งค่า AUC เป็นความสัมพันธ์ระหว่างระดับคาโรทีนอยด์ในซีรั่มกับเวลา ซึ่งมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับปริมาณคาโรทีนอยด์ที่ดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย ถ้าพื้นที่ใต้เส้นโค้ง (AUC) มีค่ามาก แสดงว่าคาโรทีนอยด์จะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้มาก ส่วนการขับออกของคาโรทีนอยด์ (CL) พบว่าปลาคาร์พที่ได้รับอาหารผสมแอสตาแซนทินมีค่าการขับออก 8.92 ml/hr/kg ส่วนปลาคาร์พที่ได้รับอาหารผสมลูทีนมีค่า 3.50 ml/hr/kg แสดงว่าแอสตาแซนทินในร่างกายจะถูกขับออก หรือเกิดกระบวนการ metabolized รวมถึงการสะสมในอวัยวะต่าง ๆ ได้มากกว่าลูทีน ซึ่งการขับออกนั้นจะเป็นการกำจัดคาโรทีนอยด์ออกไปจากระบบเลือดไม่ว่าจะเกิดโดยกระบวนการใด ๆ ก็ตาม ดังนั้นโดยภาพรวมอาจจะกล่าวได้ว่าหลังจากได้รับอาหารทดลอง ปลาคาร์พที่ได้รับอาหารผสมแอสตาแซนทิน ปลามีการดูดซึมแอสตาแซนทินได้ดีกว่าปลาคาร์พที่ได้รับอาหารผสมลูทีน เนื่องจากตรวจพบความเข้มข้นสูงสุดที่เวลา (T max) ที่สั้นกว่า ร่วมกับมีค่าทางเภสัชศาสตร์ Vd และ AUC ที่จะบ่งบอกถึงการกระจายตัวได้ดีในกระแสเลือด

Table 4 Pharmacokinetic parameters for astaxanthin and lutein derived from serum concentration – time data of fancy carp

Parameter	Unit	Parent diets	
		Astaxanthin (500 µg)	Lutein (500 µg)
Vd (area)/kg	ml/kg	1958.80	237.20
CL (area)/kg	ml/hr/kg	8.92	3.50
AUC (area)	µg-hr/ml	5300.00	2082.90
C max (obs)	µg/ml	54.20	78.40
T max (obs)	hr	6.0	24.0

Vd (area)/kg : volume of distribution calculations

CL (area)/kg : clearance calculations

AUC (area) : area under the serum concentration time curve

C max (obs) : maximum observed serum concentrations

T max : observed time at which C max was achieved

ในกระบวนการย่อย พบว่าคาโรทีนอยด์ที่เป็น polar carotenoids (xanthophylls) เช่น lutein, zeaxanthin, canthaxanthin และ astaxanthin จะเกาะอยู่รอบ ๆ emulsion ส่วน non-polar carotenoids (carotene) เช่น α และ β-carotene และ lycopene จะอยู่ภายใน emulsion ซึ่งพบว่า emulsion จะประกอบด้วย triacylglycerol core รอบ ๆ ประกอบด้วย monomolecular layer เช่น digested protein, polysaccharides และ lipids โดยเฉพาะ phospholipids ซึ่งพบว่าคาโรทีนอยด์ที่มีความเป็น polar สูงจะมีความสามารถในการดูดซึมได้ดีกว่าคาโรทีนอยด์ชนิด non-polar carotenoids การดูดซึมของคาโรทีนอย์เป็นแบบ passive diffusion โดยอาศัยความแตกต่างของความเข้มข้น (concentration gradient) และยังพบว่าการเพิ่มปริมาณไขมันในอาหารจะมีผลต่อการดูดซึมของคาโรทีนอยด์ดีขึ้น (Furr and Richard, 1997) จากผลการทดลองพบว่าแอสตาแซนทินมีการดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ดีกว่าลูทีน ปลาคาร์พสามารถใช้ประโยชน์ได้จากแอสตาแซนทินได้ดีกว่าลูทีน ในขณะที่แอสตาแซนทิน และลูทีน ในขณะที่เป็นคาโรทีนอยด์ในกลุ่ม xanthophylls เช่นเดียวกัน แต่จากรายงานของ Olsen and Baker (2006) ที่รายงานว่า ปลา atlantic salmon ที่ได้รับอาหาร 2 ชนิดคือ อาหารผสมแอสตาแซนทิน และอาหารผสมลูทีน ปลาที่ได้รับอาหารผสมแอสตาแซนทินจะมีการสะสมปริมาณของแอสตาแซนทินเพิ่มมากขึ้นที่บริเวณกล้ามเนื้อสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารผสมลูทีน แต่ปลาที่ได้รับอาหารผสมลูทีน ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแอสตาแซนทินที่บริเวณกล้ามเนื้อ กล่าวได้ว่าแอสตาแซนทินจะมีการการดูดซึม และสะสมที่อวัยวะ ต่าง ๆ ได้ดีกว่าลูทีน และหลังจากปลาย่อยอาหารที่มีคาโรทีนอยด์ ชนิด xanthophylls แล้วพบว่าเกาะอยู่บริเวณผิวด้านนอกของ emulsion สาเหตุที่การดูดซึมของแอสตาแซนทิน และลูทีนแตกต่างนั้นอาจเนื่องจากมี interaction ในช่วงการเปลี่ยนจาก emulsion เป็น micelles อาจมีต่อการดูดซึม (Olsen and Baker, 2006) ซึ่งยังขาดข้อมูลในการสนับสนุนในขณะนี้

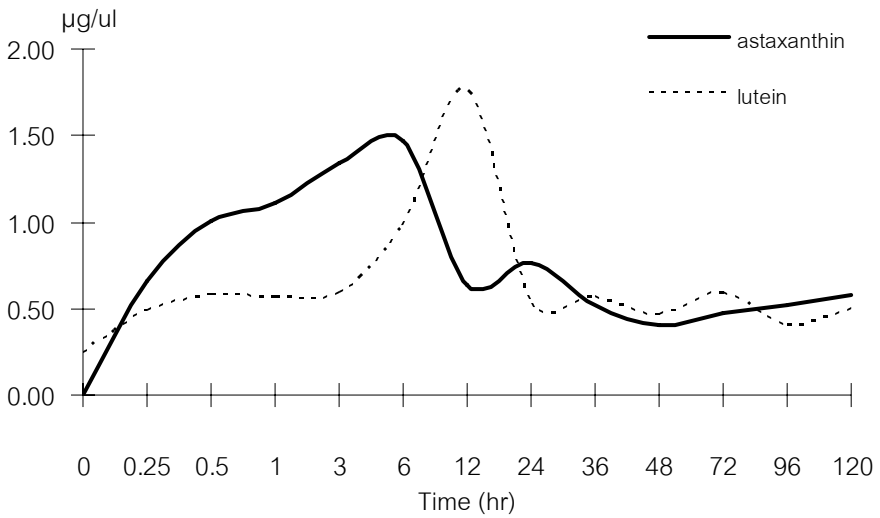

Figure 1 Serum astaxanthin and lutein concentration – time curve for fancy carp administration a single dose of astaxanthin 500 µg

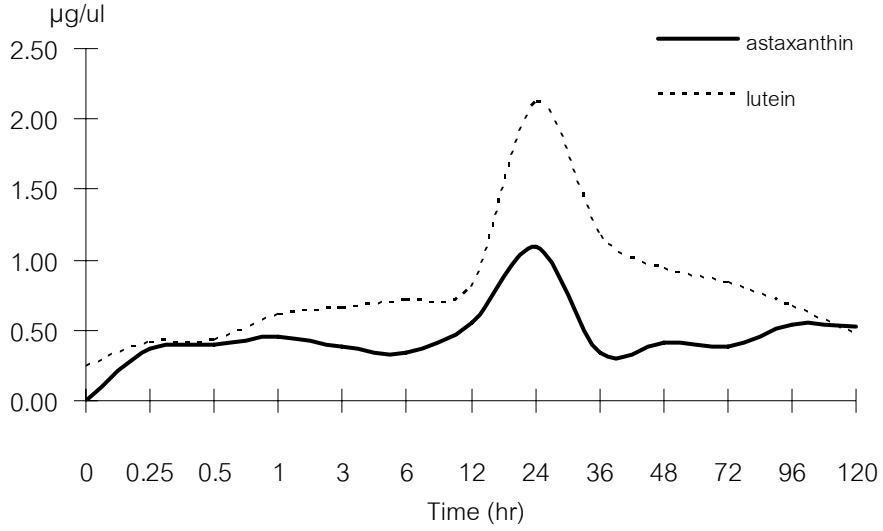

Figure 2 Serum astaxanthin and lutein concentration – time curve for fancy carp administration a single dose of lutein 500 µg

<u>พารามิเตอร์ทางเภสัชจลศาสตร์ของคาโรทีนอยด์จากอาหารทดลอง (Parent diets)</u>

เมื่อเปรียบเทียบค่าเภสัชจลศาสตร์ ของปริมาณคาโรทีนอยด์ในซีรั่มหลังจากการให้อาหารที่ผสมแอสตาแซนทิน และลูทีน ที่ปริมาณ 500 ไมโครกรัม ที่เวลา 15 30 นาที 1 3 6 12 24 36 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเลือด และวิเคราะห์ชนิด และปริมาณของคาโรทีนอยด์ด้วย TLC ร่วมกับ TLC Scanner (densitometer) หลังจากปลาคาร์พได้รับอาหารผสมแอสตาแซนทินแล้ว พบว่าแอสตาแซนทินจะเกิดกระบวนการ reductive metabolized ทำให้ได้ ลูทีน เกิดขึ้น โดยพบว่าปริมาณลูทีนที่เกิดขึ้นมีค่าความเข้มข้นสูงสุด (C max) 65.00 µg/ml ที่เวลา 12 ชั่วโมง (T max) ส่วนปลาคาร์พที่ได้รับอาหารผสมลูทีน พบว่าสามารถที่จะสังเคราะห์แอสตาแซนทินได้จากลูทีน แอสตาแซนทินที่เกิดขึ้นที่เวลา (T max) เดียวกันคือ 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของแอสตาแซนทินที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ metabolized ของปลาที่ได้รับอาหารผสมลูทีน กับปริมาณของแอสตาแซนทินจากการให้อาหารผสมแอสตาแซนทินโดยตรง พบว่าปริมาณของแอสตาแซนทินมีแนวโน้มใกล้เคียงกัน ซึ่งปริมาณแอสตาแซนทินที่เกิดจากได้รับอาหารผสมลูทีนมีค่า C max 40.90 µg/ml แต่ปลาที่ได้รับอาหารผสมแอสตาแซนทินโดยตรงมีค่า C max 54.2 µg/ml แต่จะมีความแตกต่างที่เวลาของความเข้มข้นสูงสุด T max โดย metabolized แอสตาแซนทินมีค่า 24 ชั่วโมง แต่แอสตาแซนทินจากปลาที่ได้รับอาหารแอสตาแซนทินโดยตรงมีค่า T max ที่ 6 ชั่วโมง ซึ่งอาจจะกล่าวได้ว่าปลาคาร์พที่ได้รับอาหารผสม ลูทีนสามารถที่จะเปลี่ยนลูทีนเป็นแอสตาแซนทินได้ แต่ต้องใช้เวลาที่นานมากขึ้นในการสะสมปริมาณแอสตาแซนทินในกระแสเลือด และที่อวัยวะ อื่น ๆ มีรายงานว่าการเลี้ยงปลาทองด้วย อาหารผสมลูทีน จะมีผล

ทำให้ผิวหนังบริเวณสีแดงเข้มเพิ่มขึ้น (Hirao *et al*., 1963) และ Hata and Hata (1972) รายงานว่าปลาทองมีความสามารถในการเปลี่ยนลูทีนเป็นแอสตาแซนทินได้ แต่พบว่าผิวหนังของปลาทองจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้มภายในเวลา 7 วัน และถ้าได้รับอาหารนานเป็นเวลา 30 วัน ผิวหนังจะเปลี่ยนเป็นสีแดงอมส้ม และ katayama *et al*. (1973) ยังรายงงานว่าปลาทอง และปลาคาร์พมีความสามารถในการเปลี่ยนลูทีนเป็นแอสตาแซนทินได้ เช่นเดียวกัน

Table 5 Pharmacokinetic parameters of metabolized for astaxanthin and lutein parent diets derived from serum concentration – time data of fancy carp

parameters	unit	lutein metabolited from Astaxanthin diet (500 µg)	Astaxanthin metabolited from Lutein diet (500 µg)
Vd (area)/kg	ml/kg	4349.40	810.40
CL (area)/kg	ml/hr/kg	35.94	1.27
AUC (area)	µg-hr/ml	516.8	14631.10
C max (obs)	µg/ml	65.00	40.9
T max (obs)	hr	12.00	24.00

Vd (area)/kg : volume of distribution calculations

L (area)/kg : clearance calculations

AUC (area) : area under the serum concentration time curve

C max (obs) : maximum observed serum concentrations

T max : observed time at which C max was achieved

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการใช้ประโยชน์ของคาโรทีนอยด์ในปลาคาร์พ โดยการให้อาหารโดยตรงเพียงครั้งเดียว โดยกำหนดให้อาหาร 2 ชนิด มีความเข้มข้นของแอสตาแซนทิน และ ลูทีน 500 ไมโครกรัม ตามลำดับ วิเคราะห์ชนิด และปริมาณของคาโรทีนอยด์ที่เกิดขึ้น ด้วยวิธี TLC ร่วมกับ TLC Scanner (densitometer) และเปรียบเทียบพารามิเตอร์ทางเภสัชจลศาสตร์หลังจากให้อาหารที่เวลา 15 30 นาที 1 3 6 12 24 36 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง พบว่าปลาคาร์พสามารถดูดซึมคาโรทีนอยด์ชนิแอสตาแซนทิน ได้ดีกว่าลูทีน และพบว่าหลังจากปลาคาร์พได้รับอาหารผสมลูทีน ปลาคาร์พสามารถเปลี่ยนลูทีนเป็นแอสตาแซนทินได้ วัตถุดิบที่เป็นแหล่งของคาโรทีนอยด์ชนิดลูทีน สามารถพบได้พืชใบเขียวทั่วไป ซึ่งอาจจะได้จากเศษเหลือใช้ทางเกษตรกรรม

ดังนั้นการผลิตอาหารปลาสวยงามโดยใช้วัตถุดิบจากเศษเหลือใช้ทางเกษตรกรรมจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการผลิตอาหารปลาสวยงามราคาถูก และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับเศษเหลือใช้ทางเกษตรอีกทางหนึ่ง

เอกสารอ้างอิง

AOAC. 1993. Peer verified methods program, Manual on policies and procedures, Arlinton, VA

Furr H.C. and Richard M.C. 1997. Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. Nutritional Biochemistry. 8 : 364 – 377.

Gibaldi M. and Perrier D. 1982. Pharmacokinetics 2 nd edn. Marcel Dekker Inc, New York. 457 pp.

Goodwin T.W. 1984. The biochemistry of the carotenoids. Volume II animals. Chapman and Hall. New york. 224 p.

Hata M. and M. Hata. 1972b. Carotenoid pigments in goldfish, V. Conversion of zeaxanthin to astaxanthin. Bulletin of the Japanese society of sciencific fisheries. 38 : 339 – 343.

Hirao S, R. Kikuchi and H. Taguchi. 1963. Carotenoid pigments in fish, II Effect of dietary carotenoid on body color of goldfish. Bulletin of the Japanese society of sciencific fisheries. 29 : 382 – 386.

Katayama T., K .Shintani and C.O. Chichester.1973. The biosynthesis of astaxanthin. Comp. Biochem. Physiol. 448 : 253 – 257.

Mantiri D.M.H., Genevieve N.S., Guy C., Jean-Paul T. Jose-Carlos G.M. and Rene C. 1996. Nature and metabolism of carotenoid pigments during the embryogenesis of the European lobster *Homarus gammarus*. Comp. Biochem. Physiol. 115A : 237 – 241.

Olsen R.E. and R.T.M Baker. 2006. Lutrin does not influence flesh astaxanthin pigmentation in the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture. 258 : 558 – 564.

Paripatananont T., J. Tangtrongpairoj, A. Sailasuta and N. Chansue. 1999. Effect of a astaxanthin on pigmentation of goldfish (*Carassius auratus*). Journal of the World Aquaculture Soc.30 :454-460.

Torrissen O.J. 1995. Strategies fo rsalmonid pigmentation. Journal of Applied Ichthyology, 11 : 276 – 281

White D.A., G.I Page, J. Swaile, A.J. Moody and S.J. Davies. 2002. Effect of esterification on the absorption of astaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).Aquaculture research, 33 : 343 – 350.