ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก. 1

1. การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบ อาหารทดลอง ซากปลาทดลอง และมูลปลาทดลอง ตามวิธีการของ (AOAC, 1990)

1.1 การวิเคราะห์ความชื้น

1. นำขวดชั่งเข้าตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น
2. ชั่งและบันทึกน้ำหนักของขวดชั่งโดยละเอียด
3. ชั่งตัวอย่างใส่ขวดชั่งประมาณ 5 กรัม โดยบันทึกน้ำหนักอย่างละเอียด
4. นำตัวอย่างเข้าตู้อบ โดยใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง
5. นำตัวอย่างที่อบแล้วใส่โถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น บันทึกน้ำหนักของตัวอย่าง
6. ทำซ้ำตามข้อ 1 ถึง 5 จนกระทั่งน้ำหนักที่ได้คงที่ โดยน้ำหนักที่หายไป คือน้ำหนักของความชื้น

คำนวณ % ความชื้นด้วยสมการ

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

เมื่อ a = น้ำหนักของอาหารก่อนอบแห้ง

b = น้ำหนักของอาหารหลังอบแห้ง

w = น้ำหนักของอาหารก่อนอบ

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบ
2. นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนเถ้าเป็นสีขาว
3. นำเข้าโถอบแห้ง เพื่อให้ดูดความชื้น และเมื่อตัวอย่างอาหารเย็นดีแล้ว นำออกชั่งทันที

คำนวณ % เถ้าด้วยสมการ

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

เมื่อ a = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ

b = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำหนักของเถ้าภายหลังการเผา

w = น้ำหนักของอาหารก่อนเผา

1.3 การวิเคราะห์หาโปรตีน

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก (sulfuric acid, H_2SO_4) เข้มข้น 93-98 %

2. สารเร่งรวม (catalyst mixture) : เตรียมโดยชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต(copper sulfate, $CuSO_4$) 7 กรัม กับโพแทสเซียมซัลเฟต (potassium sulfate, K_2SO_4) 100 กรัม ผสมให้เข้ากัน

3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 45 % (Sodium hydroxide, NaOH) : เตรียมโดยละลาย 450 กรัม ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ชนิดเกล็ดลงในน้ำกลั่นให้ได้ ปริมาตร 1 ลิตร

4. สารละลายกรดเกลือ (hydrochloric acid, HCL) 0.1 นอร์มอล : เตรียมโดยละลายกรดเกลือ 9 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

5. กรดบอริค (boric acid, H_3BO_3) 4 % : เตรียมโดย ต้มน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ให้ร้อน แล้วใส่ผงกรดบอริคลงไป 4 กรัม ต้มจนละลายหมด ทิ้งไว้จนสารละลายเย็นลง แล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

6. อินดิเคเตอร์รวม (mixed indicator) : เตรียมโดยละลายเมทธิลเรด (methyl red) 0.2 กรัม ในแอลกอฮอล์ 95 % ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร และละลายเมทธิลีนบลู 0.2 กรัม ในแอลกอฮอล์ 95 % ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเมทธิลเรด 2 ส่วน ผสมกับสารละลายเมทธิลีนบลู 1 ส่วน เขย่าให้เข้ากัน

7. เมทิลออเรนซ์ อินดิเคเตอร์ (methyl orange indicator) : เตรียมโดยละลายเมทิลออเรนซ์ 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

8. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Na_2CO_3) 0.1 นอร์มอล : เตรียมโดยอบโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ 260 - 270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ชั่งสารมา 1.325 กรัม เติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร

วิธีการ

ก. ขั้นตอนการย่อย (digestion)

1. ชั่งตัวอย่างอาหารให้ได้น้ำหนักประมาณ 1 กรัม โดยชั่งด้วยกระดาษกรองที่ปราศจากสารไนโตรเจน แล้วใส่ขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีน

2. เติมสารเร่งรวม 10 กรัม เพื่อเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อย

3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 25 มิลลิลิตร

4. นำไปย่อยด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีน ที่อุณหภูมิ 375 องศาเซลเซียส กระทั่งสารละลายในขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีนใส ทิ้งไว้ให้เย็น

ข. ขั้นตอนการกลั่น (distillation)

1. เมื่อสารละลายเย็นดีแล้ว จึงเติมน้ำกลั่นลงไปให้ได้ปริมาตรประมาณ 300 มิลลิลิตร

2. ใส่ลูกแก้ว 2 ลูก เพื่อป้องกันการกระแทกของสารละลาย

3. ต่อขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเข้ากับเครื่องกลั่นที่มีขวดปากแคบวัดปริมาตร ซึ่งมีกรดบอริคอยู่ 40 มิลลิลิตร โดยให้ปลายของหลอดแก้วที่ต่อจากกระบอกแก้วควบแน่นจุ่มอยู่ในกรดบอริค เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในขวดแก้ววิเคราะห์ช้า ๆ จนกระทั่งสารละลายมีสีดำ

4. ใส่อินดิเคเตอร์ในกรดบอริค 2-3 หยด

5. ทำการกลั่นจนกระทั่งไม่มีแก๊สแอมโมเนียออกมา แล้วทำการกลั่นต่อไปอีก 10 นาที แล้วล้างปลายเครื่องกลั่นด้วยน้ำกลั่น นำขวดปากแคบวัดปริมาตรออกจากเครื่องกลั่น

ค. ขั้นตอนการไตเตรท (titration)

1. นำไปไตเตรทด้วยกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น (0.1 นอร์มอล) จนถึงจุดยุติ (end point) โดยใช้อินดิเคเตอร์รวม สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อน

2. จดปริมาตรของกรดเกลือไว้เพื่อคำนวณต่อไป

การคำนวณ

$$\% \text{ โปรตีน} = \frac{1.4 \times (V_1 - V_2) \times N \times 6.25}{w}$$

เมื่อ V_1 = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

V_2 = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบ

N = เป็นความเข้มข้นของกรดเกลือเป็นนอร์มอล

W = น้ำหนักตัวอย่างอาหาร

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือมาตรฐาน

ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 40 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติมเมทิลออเรนซ์ อินดิเคเตอร์ 2 - 3 หยด ทำการไตเตรตด้วยสารละลายกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล คำนวณความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือโดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

1.4 การวิเคราะห์หาไขมัน (ใช้เครื่อง Soxtec System HT6)

สารเคมี

1. สารละลายคลอโรฟอร์ม (chloroform)
2. เมทธานอล (methanol)

วิธีการ

1. อบถ้วยพร้อมลูกแก้วที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 8 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น

2. อบตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

3. ชั่งน้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้ว (w_1)

4. ชั่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ใส่กระดาษกรองประมาณ 1 - 2 กรัม (w_2) ห่อให้มิดชิด ใส่ลงในไส้กรอง (thimble) ที่เตรียมไว้นำไปใส่เข้าเครื่อง Soxtec System HT 6

5. นำถ้วยพร้อมลูกแก้วที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้วมาเติม คลอโรฟอร์ม : เมทานอลในอัตราส่วน 2 : 1 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วใส่เข้าเครื่องให้เรียบร้อย

6. เปิดเครื่องปรับอุณหภูมิไปที่ 160 องศาเซลเซียส เปิดน้ำเข้าเครื่อง เปิดวาล์ว เลื่อนปุ่มไปที่ boiling ต้มให้เดือด 30 นาที

7. เลื่อนปุ่มไปที่ rinsing เพื่อล้างตัวอย่าง 20 นาที

8. ปิดวาล์ว เปิดสวิทซ์อากาศ เลื่อนปุ่มไปที่ evaporation เพื่อให้สารระเหยออกไป 5 นาที

9. ปิดเครื่อง อากาศและน้ำ แล้วเลื่อนปุ่ม evaporation กลับที่เดิม นำถ้วยออกจากเครื่องแล้วนำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน

การคำนวณหา % ไขมัน

$$\% \text{ ไขมัน} = \frac{W_3 - W_1 \times 100}{W_2}$$

เมื่อ w_1 = น้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้ว

w_2 = น้ำหนักตัวอย่าง

w_3 = น้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้วและไขมันหลังอบ

1.5 การวิเคราะห์หาเยื่อใย

สารเคมี

1. 0.128 โมลของกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เตรียมโดย : เจือจางกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาณ 7 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

2. 0.223 โมลของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เตรียมโดย : ละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 12.5125 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

3. ออกทานอล (1-Octanol reinst, $C_8H_{18}O$)

4. อะซีโตน (acetone)

วิธีการ

1. นำถ้วยกระเบื้องเคลือบและนำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ไปอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสนาน 1 คืน (ถ้าถ้วยกระเบื้องเคลือบสกปรกมากให้นำไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 ชั่วโมง)

2. ชั่งน้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบ (W1) ชั่งตัวอย่างประมาณ 1-2 กรัม (W2) ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบ (ระหว่างนี้ควรอุ่น 0.128 โมลของกรดซัลฟูริกที่เตรียมไว้) จากนั้นนำไปใส่เข้าเครื่อง

3. เติม 0.128 โมลของกรดซัลฟูริกประมาณ 150 มิลลิลิตร (ประมาณขีดแรกของหลอดแก้ว) หยดออกทานอล 2-3 หยด เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดฟอง

4. เปิดเครื่องและนำเข้าเครื่อง เปิดความร้อนเต็มที่จนสุดสเกล และเลื่อนวาล์วทุกตัวให้อยู่ที่ตำแหน่ง closed ต้มให้สารละลายเดือดเต็มที่ แล้วลดความร้อนลงเหลือประมาณ 4.5 (ถ้ามีตัวอย่างติดข้างหลอดแก้ว ควรใช้ 0.128 โมลของกรดซัลฟูริกประมาณ 10-20 มิลลิลิตร ล้างให้หมด)

5. ต้มต่อไปอีกประมาณ 30 นาที จากนั้นปิดเครื่อง แล้วกรองสารละลายออกโดยเลื่อนปุ่มไปที่ vaccumn

6. ล้างตัวอย่างด้วยน้ำอุ่น 3 ครั้ง โดยเติมน้ำอุ่นลงไปแล้วเลื่อนปุ่มไปที่ vaccumn เพื่อกรองน้ำออก

7. เติม 0.223 โมลของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (ที่อุ่นแล้ว) ประมาณ 150 มิลลิลิตร ทำเช่นเดียวกับการสกัดด้วยกรดจนกระทั่งเสร็จสิ้นแล้วล้างด้วยน้ำอุ่น 3 ครั้ง

8. ย้ายถ้วยกระเบื้องเคลือบไปที่ cold extraction unit (เลื่อนปุ่มไปที่ closed) ล้างตัวอย่างด้วยอะซีโตน โดยเติมอะซีโตนให้ท่วมตัวอย่างทิ้งไว้สักครู่ แล้วกรองออกจนกว่าจะไม่มีสีเขียว

9. เอาถ้วยกระเบื้องเคลือบออกมาวางให้อะซีโตนระเหยออก แล้วจึงนำไปอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสนาน 1 คืน

10. นำถ้วยกระเบื้องเคลือบออกมาชั่ง (W3) แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

11. นำถ้วยกระเบื้องเคลือบมาชั่งหาน้ำหนักหลังจากการเผา (W4)

การคำนวณ

% เยื่อใย = (W3-W4) X 100 / W2

โดยที่ W2 = น้ำหนักของตัวอย่าง

W3 = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบพร้อมตัวอย่างหลังการอบ

W4 = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบพร้อมตัวอย่างหลังการเผา

ภาคผนวก ก. 2

1. การวิเคราะห์ปริมาณโครมิคออกไซด์ (ตามวิธีการของ Furukawa and Tsukahara, 1966)

1. ชั่งตัวอย่าง 50 ถึง 100 มิลลิกรัม ใส่ใน Kjeldahl flask
2. เติมกรดไนตริก (nitric acid) เข้มข้น 5 มิลลิลิตร นำไปย่อยประมาณ 20 นาที
3. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมกรดเปอร์คลอริค (perchloric acid) เข้มข้น 3 มิลลิลิตร นำไปย่อยอีกครั้งจนสารละลายสีเขียวเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือแดง ย่อยต่ออีก 10 นาที
4. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรสารละลายให้ครบ 100 มิลลิลิตร
5. นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่มีความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับน้ำกลั่น คำนวณค่าปริมาณโครมิคออกไซด์โดยใช้สมการ

$$y = 0.154X + 0.0004$$

เมื่อ y = ค่าการดูดกลืนแสง

X = ปริมาณโครมิคออกไซด์ (มิลลิกรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร)

ภาคผนวก ก. 3

1. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

(ตามวิธีการของ Boyd and Tucker, 1992)

1.1 การวิเคราะห์ค่าความเป็นด่างของน้ำ

สารเคมี

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

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

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

4. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.2 นอร์มอล : เตรียมโดยค่อยๆ เทกรดซัลฟูริกเข้มข้น 6 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น (ที่ต้มเดือดใหม่ ๆ แล้วเปิดผาทิ้งให้เย็น) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

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

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลาย

1. ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร

2. หยดเมทิลเรด อินดิเคเตอร์ 5 หยด เขย่าให้ผสมกันจะได้สารละลายสีเหลือง

3. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู

4. นำส่วนผสมทั้งหมดไปต้มจนเดือดเป็นเวลาประมาณ 3-5 นาที เพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้หมด สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอีกครั้ง

5. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกต่อไปจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอีกครั้งหนึ่ง

6. บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกทั้งหมดที่ใช้ไป

การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก (นอร์มอล)

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

หลังจากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.02 นอร์มอล โดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลาย ที่จะปรับค่า V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. หยดฟีนอลท์ทาลีน อินดิเคเตอร์ 10 หยด เขย่าให้ผสมกัน
   2.1 ถ้าสารละลายใส ให้ทำข้อ 3 ต่อไป
   2.2 ถ้าสารละลายสีชมพู จะต้องไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกจนกระทั่งสารละลายสีชมพูนั้นหายไป บันทึกปริมาตรที่ใช้ไป (นำไปรวมกับปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ไปในข้อ 4) ทำต่อไปในข้อ 3
3. หยดเมทิลออเรนจ์ 2-3 หยด เขย่าให้ผสมกันจะได้สารละลายสีเหลือง
4. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้ม จดปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริกทั้งหมดที่ใช้ไป

การคำนวณค่าความเป็นด่างของน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

$$\text{ความเป็นด่าง} = \frac{\text{ปริมาตรของกรดซัลฟูริกที่ใช้} \times \text{นอร์มอลิตี้ของกรดซัลฟูริก} \times 50 \times 1{,}000}{\text{ปริมาตรของน้ำตัวอย่าง}}$$

1.2 การวิเคราะห์ค่าความกระด้างของน้ำ

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์ (buffer solution) : เตรียมโดยละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 67.5 กรัม ในแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ปริมาตร 570 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาณครบ 1,000 มิลลิลิตร

2. อีริโอโครมแบล็กที (Eriochrome black T) อินดิเคเตอร์ : เตรียมโดยละลายไฮดรอกซีลามีน ไฮโดรคลอไรด์ (hydroxylamine hydrochloride, $H_2NOH.HCl$) 4.5 กรัม และอีริโอโครมแบล็กที 0.50 กรัม ในเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายมาตรฐานแคลเซียม 0.01 โมลาร์ : เตรียมโดยละลายแอนไฮดรอสคาร์บอเนต (anhydrous $CaCO_3$) ปริมาณ 1 กรัม ในกรดเกลือเจือจาง (1:1) แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรประมาณ 200 มิลลิลิตร จากนั้นต้มให้เดือดนาน 5-10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับ pH ของสารละลาย ให้ได้ pH เท่ากับ 7 โดยใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3 นอร์มอล จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

4. สารละลายมาตรฐานโซเดียมอีดีทีเอ (sodium EDTA) 0.01 โมลาร์ : เตรียมโดยชั่งอีดีทีเอ 4 กรัม และแมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloried, $MgCl_26H_2O$) 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลาย

ดูดสารละลายมาตรฐานแคลเซียม 0.010โมล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน เติมอินดิเคเตอร์ อีริโอโครมแบล็กที 8 หยด เขย่าให้ผสมกัน นำมาไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ ที่ใช้ไปเพื่อนำมาคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ (โมล) โดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลาย ที่จะปรับค่า V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน
3. เติมอินดิเคเตอร์ อีริโอโครมแบล็กที 8 หยด เขย่าให้ผสมกัน
4. นำมาไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน EDTA จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินจด ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน EDTA ทั้งหมดที่ใช้ไป

การคำนวณค่าความกระด้างของน้ำ (มิลลิกรัม $CaCO_3$ ต่อลิตร)

$$\text{ค่าความกระด้าง} = \frac{\text{ปริมาตรของ EDTA} \times \text{โมลาริตี้ของ EDTA} \times 100.1 \times 1{,}000}{\text{ปริมาตรของน้ำตัวอย่าง}}$$

1.3 แอมโมเนีย

สารเคมี

1. น้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนีย (ammonia–free distilled water) เตรียมได้โดยปล่อยน้ำกลั่นผ่านคอลัมน์ ซึ่งบรรจุ cation exchange resin ซึ่งเป็นกรดแก่

2. สารละลายออกซิไดซิ่ง (Oxidizing solution) : ผสมน้ำยาซักผ้าขาว (มีคลอรีน 5%) 20 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.5 - 7 โดยใช้สารละลายกรด HCl (กรด 1 ส่วนต่อน้ำกลั่น 3 ส่วน) เตรียม oxidizing solution ใหม่ ทุก 4 - 5 วัน

3. สารละลายฟีนอล : ละลาย NaOH 2.5 กรัม และฟีนอล 10.0 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายนี้ใหม่ทุก 4 – 5 วัน

4. สารละลายเกลือ Rochelle : ละลายเกลือโรเชล ($KNaC_4H_4O_6$. $4H_2O$) 50 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วต้มให้เดือดเพื่อไล่แอมโมเนียที่อาจปนเปื้อนในเกลือ จนปริมาตรสารละลายเหลือประมาณ 70 มิลลิลิตร จึงทำให้เย็น จากนั้นเติม $MnSO_4.2H_2O$ 50 มิลลิกรัม แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

5. สารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย – ไนโตรเจน 0.3 มิลลิกรัม/ลิตร : ขั้นแรกเตรียมสารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย – ไนโตรเจนทั้งหมด (total ammonia-nitrogen หรือ TAN) เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร โดยละลาย NH_4Cl 1.9079 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง 5.0 มิลลิลิตร ของสารละลายมาตรฐาน TAN 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้สารละลายมาตรฐาน TAN 10 มิลลิกรัม/ลิตร ขั้นสุดท้ายเจือจาง 15 มิลลิลิตร ของสารละลายมาตรฐาน TAN 10 มิลลิกรัม / ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

จนได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐาน TAN 0.3 มิลลิกรัม / ลิตร เตรียมสารละลายนี้ใหม่ทุกวัน

วิธีการ

1. ใช้ไปเปตดูดน้ำตัวอย่างที่ผ่านการกรอง หรือสารละลายมาตรฐาน TAN 0.300 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หรือน้ำกลั่น (blank) 10 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาดจุ 50 มิลลิลิตร แล้วคนด้วย magnetic stirer

2. ขณะที่คนน้ำตัวอย่าง เติมสารละลายเกลือโรเชลลงไป 1 หยด oxidizing solution 0.5 มล. และสารละลายฟีนอล 0.6 มิลลิลิตร

3. ปล่อยน้ำตัวอย่างให้อยู่นิ่งเป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เกิดสีได้เต็มที่

4. นำน้ำตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานไปวัดความเข้มแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร โดยใช้ blank ตั้งค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0

5. หาความเข้มข้นของ TAN ในน้ำตัวอย่างตามสูตรคำนวณดังนี้

Csp

เมื่อ Csp = ความเข้มข้นของ TAN ในน้ำตัวอย่าง

Csd = ความเข้มข้นของ TAN ในสารละลายมาตรฐาน

Asp = ค่าการดูดกลืนแสงในน้ำตัวอย่าง

Asd = ค่าการดูดกลืนแสงในสารละลายมาตรฐาน

1.4 ไนไตรท์และไนเตรท

สารเคมี

1) copper-cadmium granules : ล้างเม็ดแคดเมียม (ที่ร่อนแล้วค้างบนตะแกรงขนาด 40 - 60 mesh) น้ำหนัก 25 กรัม ด้วยสารละลาย HCl 6 นอร์มอล แล้วล้างด้วยน้ำเปล่า จากนั้นเติมสารละลาย $CuSO_4$ 2 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แกว่งเม็ดแคดเมียมจนสีฟ้าของสารละลาย $CuSO_4$ จางลง รินสารละลายทิ้งแล้วเติมสารละลาย $CuSO_4$ แกว่งเม็ดแคดเมียมอีกครั้ง ทำซ้ำจนกว่าจะเกิดตะกอนสีน้ำตาล จากนั้นจึงค่อยๆ ใช้น้ำเปล่าล้างเอาตะกอนออกไป นำแคดเมียมนี้ไปเติมใน reduction column

2) สารก่อสี (color reagent) : เติม 85 % phosphoric acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วเติม sulfanilamide 10 กรัม เมื่อ sulfanilamide ละลายหมดแล้วจึงเติม N-(1-naphthyl)- ethylenediamine dihydrochloride 1 กรัม ละลายให้เข้ากันดี แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บสารละลายนี้ไว้ในขวดทึบแสง จะสามารถเก็บไว้ใช้ได้ถึง 1 เดือน

3) สารละลาย NH_4Cl-EDTA : ละลาย NH_4Cl 13 กรัม และ disodium EDTA 1.7 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ของสารละลายนี้ด้วย NH_4OH เข้มข้น จนได้ pH 8.5 จึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

4) สารละลายเจือจาง NH_4Cl-EDTA : เจือจางสารละลาย NH_4Cl-EDTA (สารที่ 3) 300 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร

5) สารละลายกรด HCl 6 N : โดยเจือจางกรด HCl เข้มข้นกับน้ำกลั่นในปริมาตรที่เท่ากัน

6) สารละลาย $CuSO_4$ 2 % ละลาย $CuSO_4.5H_2O$ 20 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

7) สารละลายมาตรฐานไนเตรท : ละลาย KNO_3 0.7218 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ครบ 1 ลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 100 มิลลิกรัม NO_3 นอร์มอล/ลิตร ซึ่งสามารถเก็บไว้ใช้ได้นานถึง 6 เดือน เมื่อเติม $CHCl_3$ 2 มิลลิลิตร/ลิตร นำสารละลายมาตรฐานไนเตรทนี้ 100 มิลลิลิตร ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานไนเตรทเข้มข้น 10 มิลลิกรัม NO_3 นอร์มอล/ลิตร นำสารละลายมาตรฐานไนเตรทที่เตรียมครั้งหลังนี้ไปเตรียมสารละลายมาตรฐานไนเตรทให้มีความเข้มข้นอย่างน้อย 6 ระดับ อยู่ในช่วง 0.00-1.00 มิลลิกรัม NO_3 นอร์มอล/ลิตร ตามสูตรคำนวณดังนี้

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

โดย N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายตั้งต้น

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายสุดท้าย

V_1 = ปริมาตรของสารละลายตั้งต้นที่จะนำไปเจือจาง

V_2 = ปริมาตรทั้งหมดของสารละลายสุดท้ายที่ต้องการ

8) สารละลายมาตรฐานไนไตรท์ : ละลาย 1.232 กรัม $NaNO_2$ ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานไนไตรท์เข้มข้น 250 มิลลิกรัม NO_2^- นอร์มอล/ลิตร ซึ่งสามารถเก็บไว้ใช้ต่อไปได้โดยเติม $CHCl_3$ 1 มิลลิลิตร/ลิตร นำสารละลายมาตรฐานนี้ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 50 มิลลิกรัม NO_2^- นอร์มอล/ลิตร นำสารละลายมาตร

ฐานไนไตรท์ที่เตรียมได้ครั้งหลังนี้ไปเตรียมสารละลายมาตรฐานไนไตรท์ให้มีความเข้มข้นอย่างน้อย 6 ระดับ อยู่ในช่วง 0.00 - 0.50 มิลลิกรัม NO_2 นอร์มอล/ลิตร

วิธีการ

1. กรองน้ำตัวอย่างผ่านชุดกรองสูญญากาศ

2. ปรับ pH ของน้ำที่กรองแล้ว ให้อยู่ในช่วง pH 7 - 9 ด้วยกรด HCl หรือด่าง NaOH ที่เจือจาง

3. ผสมน้ำตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร กับสารละลาย NH_4Cl-EDTA 75 มิลลิลิตร แล้วเทให้ไหลผ่านคอลัมน์แคดเมียมในอัตรา 7 - 10 มิลลิลิตร/นาที ทิ้งน้ำตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ 25 มิลลิลิตรแรก เก็บตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ส่วนที่เหลือไปวัดความเข้มข้นของไนไตรท์ ภายใน 15 นาทีหลังจากผ่านคอลัมน์

4. นำน้ำตัวอย่างที่ต้องการวัดความเข้มข้นของไนไตรท์ (ทั้งน้ำตัวอย่างที่ผ่านการกรองและน้ำตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์แล้ว) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับสารก่อสี 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

5. ภายหลังเติมสารก่อสีอย่างน้อย 10 นาที แต่ไม่เกิน 2 ชั่วโมง นำสารละลายไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร

6. เขียนเส้นกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากน้ำตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน ก็จะทราบความเข้มข้นของไนไตรท์ในน้ำตัวอย่างนั้น

7. หาความเข้มข้นของไนเตรทในน้ำตัวอย่างได้ โดยนำความเข้มข้นของไนไตรท์ในน้ำตัวอย่างที่ผ่านการกรอง หักออกจากความเข้มข้นของไนไตรท์ในน้ำตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์

ภาคผนวก ก. 4

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

1.1 การหาค่าฮีมาโตคริต (% haematocrit) (ตามวิธีของ Blaxhall และ Daisley (1973)

1. นำเลือดที่เจาะได้ใหม่ๆ ใส่ในหลอดเล็กๆ สำหรับหาค่าฮีมาโตคริต (microhaematocrit capillary tube) ประมาณครึ่งหลอด อุดปลายด้านหนึ่งของหลอดด้วยดินน้ำมัน

2. ปั่นด้วยฮีมาโตคริตเซนตริฟิวจ์ (haematocrit centrifuge) ที่แรงเหวี่ยง 10,000 – 15,000 รอบต่อนาทีนานประมาณ 5 - 10 นาที

3. วัดหาอัตราส่วนของปริมาตรเม็ดเลือดกับปริมาตรเลือดทั้งหมด นำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริตจากสูตร

$$\%\ \text{ฮีมาโตคริต} = \frac{\text{ปริมาตรของ เม็ดเลือดอัดแน่น (มิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาตรของเลือดทั้งหมด (มิลลิลิตร)}} \times 100$$

1.2 การหาค่าฮีโมโกลบินรวม (total haemoglobin) (ตามวิธีของ Larsen and Sneizsko, 1961)

สารเคมี

สารละลายเดรบกิ้น (Drabkin's solution) : เตรียมโดยละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate, $NaHCO_3$) 1 กรัม โปแตสเซียมไซยาไนด์ (potassium cyanide, KCN) 0.05 กรัม และโปแตสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ (potassium ferricyanide, $K_3Fe(CN)_6$) 0.20 กรัม ในน้ำกลั่นที่กลั่น 2 ครั้ง จนได้ปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดทึบแสง มีอายุใช้งาน 6 เดือนที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการวิเคราะห์

1. ใช้ไมโครปิเปตขนาด 20 ไมโครลิตรดูดเลือดที่เจาะได้ใหม่ๆ มาผสมรวมกับสารละลายเดรบกิ้น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีแล้วทิ้งไว้อย่างน้อย 20 นาที

2. นำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

3. ค่าที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับค่าฮีโมโกลบินมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น โดยใช้สารละลายเดรบกิ้นเป็นแบลงค์ (blank)

4. เตรียมฮีโมโกลบินมาตรฐาน (standard haemoglobin) ที่มีความเข้มข้น 0, 4.5, 9 และ 18 กรัมต่อเดซิลิตร (g/dl) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

5 นำค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินมาตรฐาน และค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน โดยให้ค่าความเข้มข้นอยู่ในแกน X และค่าการดูดกลืนแสงอยู่แกน Y แล้วหาสมการสหสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linear regression) เพื่อใช้คำนวณค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในเลือด จากค่าการดูดกลืนแสง

1.3 การหาค่าโปรตีนรวมในซีรัมหรือพลาสมา (total serum or plasma protein) (ตามวิธีการของ Lowry และคณะ (1951)

สารเคมี

1. สารละลายอัลคาไลด์คอปเปอร์ (alkaline copper solution) : เตรียมโดยใช้ 1 % โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ใน 0.5 M NaOH 50 ส่วน ผสมกับ 1 % โซเดียมทารเตรต (sodium tartate, 0 $C_4H_4Na_2O_6$) 1 ส่วน และ 0.5 % คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$. $5H_2O$) อีก 1 ส่วน เก็บสารละลายผสมไว้ในขวดทึบแสง ถ้ามีตะกอนเกิดขึ้นให้เตรียมใหม่

2. สารละลายโฟลิน (folin reagent) 1 : 10 เตรียมโดยผสม folin ciocalteu reagent 1 ส่วนกับน้ำกลั่นที่กลั่น 2 ครั้ง 10 ส่วน เก็บไว้ในขวดทึบแสง

วิธีการวิเคราะห์

1. ดูดซีรั่มมา 5 ไมโครลิตร ผสมรวมกับน้ำกลั่น 995 ไมโครลิตร

2. เติมสารละลายอัลคาไลด์คอปเปอร์ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 10 นาที

3. เติมสารละลายโฟลิน 1:10 ลงไป 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน สังเกตสีของสารละลายที่เปลี่ยนแปลง

4. เมื่อครบ 5 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างเลือดปลาที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับค่าแอลบูมินมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นโดยใช้แบลงค์ (blank) ที่เตรียมขึ้นตามขั้นตอนนี้แต่ไม่เติมซีรัม

การเตรียมกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของซีรัมโปรตีน

1. ดูดสารละลายมาตรฐานแอลบูมิล (standard albumin) ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองหลอดละ 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ

2. เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 0.9, 0.7, 0.5, 0.3, 0.1 และ 0 มิลลิลิตร ตามลำดับ จะได้ความเข้มข้นของแอลบูมินในแต่ละหลอดเท่ากับ 50, 150, 250, 350, 450 และ 500 ไมโครกรัม ตามลำดับ