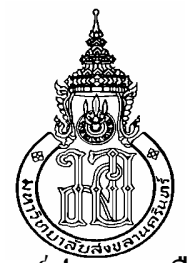


ผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อในปลาดุกพันธุ์ผสม [*Clarias macrocephalus* (Günther) x *Clarias gariepinus* (Burchell)]

Effect of Melamine on Growth Performance, Blood Components and Histological Changes in Hybrid Catfish, *Clarias macrocephalus* (Günther) x *Clarias gariepinus* (Burchell)

ปวีณา จันทร์เล็ก

Paweena Janlek

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Aquatic Science
Prince of Songkla University
2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อในปลาดุกพันธุ์ผสม [*Clarias macrocephalus* (Günther) x *Clarias gariepinus* (Burchell)]

ผู้เขียน นางสาวปวีณา จันทร์เล็ก

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กิจการ ศุภมาตย์.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.กิจการ ศุภมาตย์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา ตันติกิตติ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง)

.....กรรมการ

(ดร.จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์ ผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อในปลาดุกพันธุ์ผสม [*Clarias macrocephalus* (Günther) x *Clarias gariepinus* (Burchell)]

ผู้เขียน นางสาวปวีณา จันทร์เล็ก

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

ปีการศึกษา 2552

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของเมลามีนในอาหารต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อในปลาดุกพันธุ์ผสม โดยแบ่งการทดลองเป็น 7 ชุดการทดลอง ๆละ 3 ซ้ำ ใช้ปลาขนาดน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นประมาณ 4 กรัมต่อตัว จำนวน 30 ตัวต่อซ้ำ ให้อาหารวันละ 2 มื้อ ระยะเวลาในการทดลอง 12 สัปดาห์ โดยผสมเมลามีนลงในอาหารตามระดับความเข้มข้น 7 ระดับ คือ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าเมลามีนที่ผสมในอาหาร มีผลให้การเจริญเติบโตของปลาลดลงอย่างมีนัยสำคัญตามระดับของเมลามีนที่เพิ่มขึ้นในอาหาร และปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารซึ่งมีส่วนผสมของเมลามีนทุกระดับ มีความผิดปกติของสีลำตัว โดยมีลักษณะสีผิวลำตัวที่คล้ำ และดำขึ้น ค่าองค์ประกอบเลือด ได้แก่ ค่าฮีมาโตคริต ปริมาณเม็ดเลือดขาว ปริมาณโปรตีนในซีรัม และปริมาณฮีโมโกลบินรวม ของปลาที่ได้รับอาหารซึ่งมีส่วนผสมของเมลามีนมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของเหงือก ตับ และไตของปลาที่ได้รับอาหารซึ่งมีส่วนผสมของเมลามีน โดยมีความรุนแรงของการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นสัมพันธ์กับระดับของเมลามีนในอาหารที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่าที่บริเวณเหงือกเกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) และมีการแยกตัวของ epithelial cell ของ secondary lamellae ส่วนเนื้อเยื่อตับพบการเสื่อมสลายของเซลล์ตับบางส่วนทำให้เซลล์ไม่เกาะตัวกัน ขอบเขตของเซลล์ไม่ชัดเจน มีการตายของเซลล์ตับ และมีการขยายตัวของ sinusoid ลักษณะเนื้อเยื่อไตมีการเสื่อมสลายของ epithelial cell บริเวณท่อไต มีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (glomerrulus) และมีการตายของ haemopoietic tissue และจากการทดลองพบว่าระดับของเมลามีนในอาหารมีความสัมพันธ์ต่อการตกค้างของเมลามีนในเนื้อปลาดุกพันธุ์ผสม ซึ่งปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.5 – 3 เปอร์เซ็นต์ มีสารเมลามีนตกค้างในเนื้ออยู่ระหว่าง 63-450 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของเนื้อปลา

Thesis Title	Effect of Melamine on Growth Performance, Blood Components and Histological Changes in Hybrid Catfish [*Clarias macrocephalus* (Günther) x *Clarias gariepinus* (Burchell)]
Author	Ms. Paweena Janlek
Major Programme	Aquatic Science
Academic	2552

Abstract

The study was conducted to determine the effects of melamine on growth performance, blood components and histological changes in hybrid catfish [*Clarias macrocephalus* (Günther) x *Clarias gariepinus* (Burchell)]. The trial comprised 7 treatments with 3 replications each. Fingerling catfish with an initial weight of 4 g were released into fiber glass tanks with 30 fish/replication. Trial feeds were given twice daily for 12 weeks period. Melamine was mixed in the diets at 7 levels, 0%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5% and 3%, respectively. The results indicated that fish fed diets containing melamine had significantly decreased on growth performance reflected to melamine contents in the diets. Hybrid catfish received diets containing melamine showed abnormal body coloration, i.e., darkening body and pitch-black body coloration in all treatments. Blood components, i.e., hematocrit, white blood cell, serum protein and total hemoglobin of fish fed diets containing melamine were significantly decreased ($p<0.05$). Histological changes of gill, liver and kidney of fish fed diet containing melamine revealed severity symptoms which related with increasing levels of melamine in the diets. Histological finding included gill hyperplasia and lifting of the epithelium at the secondary lamellae. The liver showed partial degeneration of hepatocytes, dilation of sinusoid and necrosis. The kidney showed tubular degeneration of epithelial cell, shrinkage of glomerulus and necrosis of haemopoietic tissue. In conclusion, accumulated melamine in the fish flesh was corresponded to the levels of melamine in the diets. Fish fed diets containing 0.5-3.0 percent melamine had 63-450 mg melamine residue/kg fish flesh.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ สนับสนุน ช่วยเหลือ และให้คำปรึกษาที่ดีในการค้นคว้าวิจัย พร้อมให้โอกาสในการศึกษา และกรุณาอบรมสั่งสอน และคอยชี้แนะแนวทางในการทำงานอันก่อให้เกิดความรู้และข้อคิดที่เป็นประโยชน์แก่ข้าพเจ้า ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอระลึกถึงคุณความดีของรองศาสตราจารย์ ดร. กิจการ ศุภมาตย์ ผู้ที่กรุณาให้คำปรึกษา และคำแนะนำที่ดีในการทำงานวิจัย ตลอดจนได้ให้โอกาส ให้ความรู้ แนวทางปฏิบัติในการค้นคว้าวิจัยระหว่างที่ท่านยังมีชีวิตอยู่ และขออุทิศคุณงามความดีของงานวิจัยนี้ให้แก่ท่าน ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา ตันติกิตติ และดร.จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติม และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยและคณะทรัพยากรธรรมชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย และขอขอบพระคุณคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ทุกท่านที่ให้ความกรุณา ช่วยเหลือ และกรุณาให้คำสั่งสอน ให้ความรู้แก่ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาที่ข้าพเจ้าได้ศึกษา ณ ที่นี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ให้ความกรุณาให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์และช่วยอำนวยความสะดวกในระหว่างการทำการทดลองเป็นอย่างดีจนการทำวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณนเรศ ซ่วนซุก คุณสุนีย์ หวันเหล็ม คุณจิรวัฒน์ ทัดแก้ว คุณสุพัตรา อรุณรัตน์ คุณบุญกอบ วิริยพงศ์สุธี และคุณกิตติชนม์ อุเทนะพันธุ์ ที่คอยให้กำลังใจ ให้คำปรึกษา ให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ทำการวิจัย ตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ นักศึกษาปริญญาโท ที่คอยให้ความช่วยเหลือในขณะทำการทดลอง คอยเป็นกำลังใจ และให้คำปรึกษาขณะทำการทดลอง อันได้แก่ คุณนิวดี สาหีม คุณศิริญญา งามระลึก คุณอนุรักษ์ เขียวขจรเขต คุณอัครวิทย์ อิสสะโร คุณอชิรวิทย์ รุ่งเรือง คุณมณี ศรีชะนันท์ คุณนัทท์ นันทพงศ์ และคนอื่น ๆ ที่ไม่ได้กล่าวนาม

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ๆ และน้องๆ ของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจสำคัญในการศึกษา คอยให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนความรัก ความห่วงใย และเป็นกำลังสำคัญที่ทำให้ข้าพเจ้ามีความมุมานะพยายามจนประสบความสำเร็จในการศึกษาครั้งนี้

ปวีณา จันทร์เล็ก

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพ	(10)
บทที่	
1. บทนำ	1
1.1 บทนำต้นเรื่อง	1
1.2 ตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
1.2.1 เมลามีน (Melamine)	2
1.2.1.1 คุณสมบัติของเมลามีน	2
1.2.1.2 การสังเคราะห์ เมลามีน (melamine synthesis)	5
1.2.1.3 ลักษณะพยาธิวิทยาของสัตว์ที่ได้รับสารเมลามีน	6
1.2.2 ปลาดุกพันธุ์ผสม	8
1.2.2.1 ชีววิทยาของปลาดุกพันธุ์ผสม	8
1.2.2.2 ลักษณะทางอนุกรมวิธาน	9
1.2.2.3 ความต้องการสารอาหาร	10
1.2.2.4 ภาวการณ์ตลาด	11
1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย	12
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	13
2.1 วัสดุ	13
2.1.1 ปลาที่ใช้สำหรับการทดลอง	13
2.1.2 อาหารสำหรับอนุบาลลูกปลาก่อนเริ่มต้นการทดลอง	13
2.1.3 สารเคมี	13
2.2 อุปกรณ์	13
2.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงปลาทดลอง	13
2.2.2 อุปกรณ์เตรียมอาหารทดลอง	14
2.2.3 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลองและร่างกายปลา	14

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.4 อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบเลือด	15
2.2.5 อุปกรณ์ศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ	15
2.2.6 อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา	15
2.3. วิธีการทดลอง	16
2.3.1 การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง	16
2.3.2 การเตรียมปลาทดลอง	16
2.3.3 การเตรียมอาหารทดลอง	16
2.3.4 ขั้นตอนในการเตรียมอาหารทดลอง	17
2.3.5 แผนการทดลอง	21
2.3.6 การเก็บรวบรวมข้อมูล	21
2.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล	24
3. ผลการทดลอง	25
3.1 พฤติกรรมของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ	25
3.2 การเจริญเติบโต	30
3.2.1 น้ำหนักตัวเฉลี่ยปลาต่อตัว	30
3.2.2 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการรอดตาย และอัตราการเจริญเติบโตต่อตัวต่อวันของปลาดุกพันธุ์ผสม	32
3.2.3 อัตราการกินอาหาร อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และประสิทธิภาพการใช้โปรตีน	34
3.3 องค์ประกอบทางโภชนาการของปลาทั้งตัว	36
3.4 องค์ประกอบเลือดของปลาดุกพันธุ์ผสม	39
3.5 การศึกษาเมลามีนตกค้างในเนื้อปลา	41
3.6 การศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาของปลาดุกพันธุ์ผสม	42
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	53
5. สรุปผลการทดลอง	58

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
เอกสารอ้างอิง	58
ภาคผนวก ก.	65
ภาคผนวก ข.	76
ภาคผนวก ค.	92
ประวัติผู้เขียน	98

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
1. แสดงคุณสมบัติต่างๆ ของสารเมลามีน	4
2. แสดงปริมาณเมลามีนที่ทำให้เกิดการตายของสัตว์ครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ	7
3. ส่วนประกอบของวัตถุดิบในอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร	18
4. องค์ประกอบทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหารในการทดลอง	19
5. คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลองที่มีส่วนผสมของเมลามีนที่ระดับต่าง ๆ กัน	20
6. ลักษณะสีผิวของลำตัวของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองที่มีส่วนผสมของเมลามีนที่ระดับต่างๆ	25
7. การเจริญเติบโตของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนที่ระดับต่างๆ กันตลอดระยะเวลา 12 สัปดาห์	33
8. น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการกินอาหาร และ อัตราการรอดตายของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนที่ระดับ ต่างๆ กันตลอดระยะเวลา 12 สัปดาห์	35
9. อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์โปรตีนของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนที่ระดับต่างๆ กันตลอดระยะเวลา 12 สัปดาห์	37
10. องค์ประกอบทางเคมีของปลาดุกพันธุ์ผสมทั้งตัวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีนที่ระดับต่างๆ กันตลอดระยะเวลา 12 สัปดาห์	40
11. ค่าฮีมาโตคริต ปริมาณเม็ดเลือดแดง และปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนที่ระดับต่างๆ กันตลอดระยะเวลา 12 สัปดาห์	42
12. ผลการทดสอบปริมาณเมลามีนในเนื้อปลาดุกพันธุ์ผสม	43

รายการภาพ

ภาพที่	หน้า
1. สูตรโครงสร้างของเมลามีน	3
2. สูตรโครงสร้างของ Ammelide	3
3. สูตรโครงสร้างของ Ammeline	4
4. สูตรโครงสร้างของ Cyanuric acid	4
5. แสดงการจับตัวกันของ Melamine และ cyanuric acid	6
6. แสดงลักษณะสีลำตัวของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองชุดควบคุม (สูตรที่ 1 ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน) ลักษณะสีลำตัวปกติ	26
7. แสดงลักษณะสีลำตัวของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 2 (มีส่วนผสมของเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์)	26
8. แสดงลักษณะสีลำตัวของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 3 (มีส่วนผสมของเมลามีน 1 เปอร์เซ็นต์)	27
9. แสดงลักษณะสีลำตัวของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 4 (มีส่วนผสมของเมลามีน 1.5 เปอร์เซ็นต์)	27
10. แสดงลักษณะสีลำตัวของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 5 (มีส่วนผสมของเมลามีน 2 เปอร์เซ็นต์)	28
11. แสดงลักษณะสีลำตัวของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 6 (มีส่วนผสมของเมลามีน 2.5 เปอร์เซ็นต์)	28
12 แสดงลักษณะสีลำตัวของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 7 (มีส่วนผสมของเมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์)	29
13. แสดงเปรียบเทียบลักษณะสีลำตัวของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทั้ง 7 สูตร	29
14. แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองชุดควบคุม (สูตรที่ 1 ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน) ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกปกติ (H&E stained, Bar = 100 μm, 20x)	43
15. แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองชุดควบคุม (สูตรที่ 1 ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน) ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกปกติ (H&E stained, Bar = 50 μm, 40x)	43

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16.	แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) ที่Gill lamellae (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)	44
17.	แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) ที่Gill lamellae (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)	44
18.	แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 1 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) และ เกิดช่องว่างของเซลล์ที่ Gill lamellae (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)	45
19.	แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 1 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) และ เกิดช่องว่างของเซลล์ที่ Gill lamellae (H&E stained, Bar = 100 µm, 40x)	45
20.	แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 2 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) ที่ Gill lamellae มากขึ้น (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)	46
21.	แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 2 เปอร์เซ็นต์ มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ(hyperplasia) บริเวณ Gill lamellae และมีการแยกตัวของ epithelium cell (H&E stained, Bar = 100 µm, 40x)	46
22.	แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 2.5 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) ที่ Gill lamellae มากขึ้น (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)	47

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
23.	แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) ที่ Gill lamellae รุนแรงมาก (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)	47
24.	แสดงเนื้อเยื่อตับของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน ลักษณะเนื้อเยื่อตับปกติ (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)	48
25.	แสดงเนื้อเยื่อตับของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะเนื้อเยื่อตับปกติ (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)	48
26.	แสดงเนื้อเยื่อตับของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 1.5 เปอร์เซ็นต์) ลักษณะเนื้อเยื่อตับมีการตายของเซลล์บางส่วน ขอบเขตของเซลล์ไม่ชัดเจนเซลล์ และมีการเสื่อมสลายทำให้เซลล์ไม่เกาะตัวกัน (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)	49
27.	แสดงเนื้อเยื่อตับของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 2.5 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะเนื้อเยื่อตับมีการเสื่อมสลายของเซลล์บางส่วนทำให้เซลล์ไม่เกาะตัวกัน และมีการตายของเซลล์ตับ (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)	49
28.	แสดงเนื้อเยื่อตับของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะเนื้อเยื่อตับมีลักษณะของเซลล์ที่ผิดปกติโดยไม่มีไขมันสะสมในเซลล์ มีการขยายตัวของ Sinusoid และไม่เห็นขอบเขตของเซลล์ (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)	50
29.	แสดงเนื้อเยื่อไตของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน ลักษณะเนื้อเยื่อไตปกติ (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)	50
30.	แสดงเนื้อเยื่อไตของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะเนื้อเยื่อไตมีการเสื่อมสลายของ epithelium cell บางส่วน (และมีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (glomerulus) (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)	51

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
31.	แสดงเนื้อเยื่อไตของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 1 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะเนื้อเยื่อไตมีการเสื่อมสลายของท่อไตบางส่วน เริ่มมีการตายของอวัยวะสร้างเม็ดเลือด และมีการหดตัวของโกลเมอรูลัส(H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)	51
32.	แสดงเนื้อเยื่อไตของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 1.5 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะเนื้อเยื่อไตมีการเสื่อมสลายของท่อไตมากขึ้น มีการตายของอวัยวะสร้างเม็ดเลือดมากขึ้น และมีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)	52
33.	แสดงเนื้อเยื่อไตของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 2.5 เปอร์เซ็นต์ ไตมีการเสื่อมสลายของท่อไตที่รุนแรงขึ้น มีการตายของอวัยวะสร้างเม็ดเลือดมากขึ้น มีการหดตัวของโกลเมอรูลัส และมีการเสื่อมสลายของเซลล์เนื้อเยื่อไต (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)	52
34.	แสดงบริเวณที่จะนับจำนวนเม็ดเลือดแดง (R) และเม็ดเลือดขาว (W) บน haemacytometer	70

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

การปนเปื้อนสารเมลามีนในอาหาร นับเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลต่อสุขภาพของคนและสัตว์เป็นอย่างมาก ไม่นานมานี้ได้มีการตรวจพบการปลอมปนเมลามีน (melamine) ในอาหารสัตว์เลี้ยงซึ่งเป็นสาเหตุทำให้สุนัขและแมวตายเป็นจำนวนมากเนื่องจากภาวะไตวาย (Burns, 2007) ล่าสุดมีการตรวจพบการปลอมปนเมลามีนในอาหารสำหรับมนุษย์ มีรายงานการปลอมปนเมลามีนในนมผงสำหรับเด็กทารกในประเทศจีน ซึ่งเป็นเหตุให้เด็กเสียชีวิต 4 ราย และล้มป่วยอีก 6,244 ราย โดยตรวจพบการตกค้างของผลึกเมลามีนในไตเป็นเหตุให้เกิดอาการไตวาย (สำนักข่าวไทย, 2551) สหภาพยุโรปประกาศห้ามนำเข้าสินค้าจากประเทศจีน และให้มีการตรวจสอบปริมาณเมลามีนในสินค้า และผลิตภัณฑ์ที่นำเข้าจากจีนอย่างเข้มงวด หน่วยงานความปลอดภัยด้านอาหารประจำสหภาพยุโรป(European Food Safety Authority: EFSA) ได้เสนอให้มีการกำหนดค่าอนุโลมในการบริโภคเมลามีนต่อวันของมนุษย์และสัตว์ (Tolerable Daily Intake : TDI) ไว้ที่ระดับ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวต่อวัน เมลามีนเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตพลาสติกและปุ๋ยเพื่อการเกษตรกรรม มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ 66.67 เปอร์เซ็นต์ เมื่อคำนวณเป็นปริมาณโปรตีนจะสูงถึง 416.66 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าเป็นโปรตีนเทียมชนิดหนึ่ง เศษเหลือของเมลามีนจากการผลิต ถูกจำหน่ายในราคาถูกให้แก่โรงงานผู้ผลิตอาหารสัตว์เลี้ยง เพื่อนำไปบดเป็นผง และใช้เป็นโปรตีนเทียมผสมกับอาหารสัตว์ เมลามีนที่ปลอมปนในอาหารสัตว์จะละลายน้ำได้ 50-60 เปอร์เซ็นต์ขึ้นอยู่กับชนิด (เยาวมาลย์, 2550ก) ประกอบกับปัจจุบันราคาของวัตถุดิบที่เป็นแหล่งโปรตีนในการผลิตอาหารสัตว์ทั้งที่มาจากพืชและสัตว์ เช่น กากถั่วเหลือง ปลาป่น คอร์นกลูเตน วีทกลูเตน และอื่นๆ มีราคาที่สูงขึ้น จึงเป็นเหตุให้มีการหาแหล่งโปรตีนอื่นๆ ที่มีราคาถูกกว่าเพื่อต้องการที่จะลดต้นทุนในการผลิตลง โดยมีการใช้วัตถุที่มีแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนแท้ (non-protein nitrogen ; NPN) มาผสมในวัตถุดิบอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์โปรตีนให้สูงขึ้น แต่มีราคาทุนที่ต่ำลง ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนแท้ ได้แก่ ยูเรีย ไบยูเรต โมโนแอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นต้น (ชัยสิทธิ์, 2529) ซึ่งปลอมปนวัตถุดิบบางชนิดลงในอาหาร เพื่อต้องการให้อาหารมีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น เช่น ยูเรีย ขนไก่ไฮโดรไลซ์ และแหล่งของไนโตรเจนอื่นๆที่ไม่ใช่โปรตีน ซึ่งเป็นโปรตีนคุณภาพต่ำ

และสัตว์น้ำนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยเนื่องจากย่อยยากและมีสารอาหารที่สัตว์น้ำต้องการไม่ครบถ้วน อีกทั้งการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Proximate analysis) ไม่สามารถบ่งบอกการปลอมปนได้ เพราะค่าโปรตีนที่วิเคราะห์ได้เป็นการคำนวณปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่าง จึงไม่สามารถบ่งบอกคุณภาพของโปรตีนได้ (สุกัญญา, 2533; ศรีสกุล และคณะ, 2539 อ้างโดย ชุติมา และคณะ, 2548) โดยสารเมลามีนเป็นตัวเลือกหนึ่งของคนบางกลุ่มที่นำมาปลอมปนในวัตถุดิบ เนื่องจากเมลามีนมีราคาถูกกว่าเนื้อสัตว์ และส่วนผสมจากโปรตีนพืช ราคาของเมลามีนต่อ 1 กิโลกรัม จะถูกกว่าราคาโปรตีนที่มาจากธรรมชาติประมาณ 4-5 เท่า (OECD, 2002) เมลามีนที่ปลอมปนในอาหารจะส่งผลต่อสุขภาพของสัตว์ โดยพบว่าเมลามีนทำให้กระบวนการเมทาบอลิซึมของสัตว์ลดลง (US-FDA, 2007b) ในคน มีรายงานว่าการได้รับสารเมลามีนต่อเนื่องเป็นเวลานานมีโอกาสทำให้ระบบสืบพันธุ์ถูกทำลาย เกิดนิ่วในกระเพาะปัสสาวะ หรือไต (bladder or kidney stone) และนำไปสู่การเกิดมะเร็งของกระเพาะปัสสาวะ (bladder cancer) (วรรัตน์, 2550; HSDB, 2007) สำหรับการศึกษาพิษของเมลามีนในสัตว์น้ำยังไม่มีรายงาน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ปลาดุกพันธุ์ผสมเป็นปลาทดลอง เนื่องจากต้องการใช้เป็นตัวแทนของปลาในกลุ่มไม่มีเกล็ด โดยที่ปลาชนิดนี้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศ และเป็นที่นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย ทั้งเพื่อการบริโภคภายในประเทศและการส่งออก

1.2 ตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 เมลามีน (melamine)

เมลามีนเป็นสารเคมีที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติก และทัปเปอร์แวร์ สารกันความร้อน ยาฆ่าแมลง ผลิตปุ๋ย และผลิตภัณฑ์ตัวอื่นๆ (Anderson *et al*., 2007) เศษเหลือจากการผลิตของเมลามีนนั้น มักถูกจำหน่ายในราคาถูกให้กับโรงงานอุตสาหกรรมผู้ผลิตอาหารสัตว์ไม่ว่าจะเป็นอาหารสัตว์เลี้ยง สัตว์บก และสัตว์น้ำ เพื่อนำไปบดเป็นผง และใช้ผสมกับอาหารสัตว์ เมลามีนที่ปลอมปนในอาหารสัตว์จะละลายน้ำได้ 50-60 เปอร์เซ็นต์ขึ้นอยู่กับชนิด (เยาวมาลย์, 2550ก) โดยถือว่าเป็นโปรตีนเทียมชนิดหนึ่ง เพราะมีราคาถูกกว่าโปรตีนที่ได้จากเนื้อสัตว์และธัญพืชอีกด้วย โดยเมลามีนที่มีคุณภาพที่ได้มาตรฐานมีลักษณะเป็นผงสีขาว มีโปรตีนประมาณ 400-450 % ทนความร้อนและความเป็นกรดด่างได้ดี

เมลามีนที่มีการปลอมปนหรือผสมในวัตถุดิบอาหารสัตว์เป็นเศษเหลือจากอุตสาหกรรม ที่มีคุณภาพต่ำ ไม่ได้มาตรฐาน นำมาบดป่นเป็นผง และสามารถทำการตกแต่งให้มี

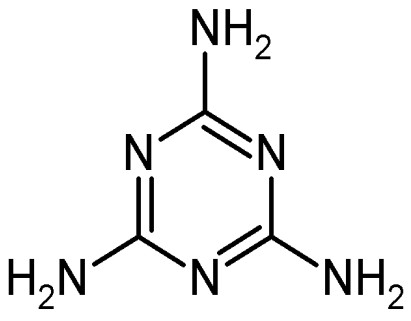
โปรตีนได้ตั้งแต่ 170-450 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิตว่านำผงเมลามีนมาผสมกับสารใด ทำให้เมลามีนที่ใช้ปลอมปนมีให้เลือกหลายระดับเปอร์เซ็นต์โปรตีน

1.2.1.1 ลักษณะโครงสร้างและคุณสมบัติของเมลามีน

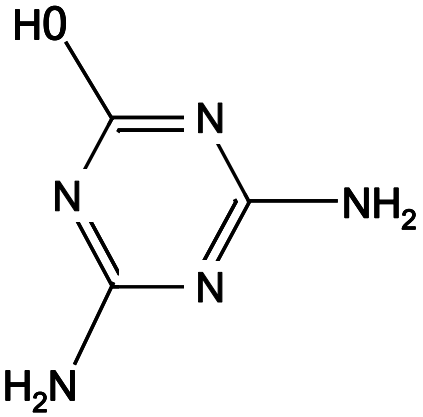
เมลามีน คือพลาสติกชนิดหนึ่งที่มีสารฟอร์มาลดีไฮล์หรือฟอร์มาลีนเป็นสารประกอบ (สุพล และคณะ, 2550) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ $C_3H_6N_6$ ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า 1,3,5, ไตรอาซีน 2,4,6, ไตรอามีน (1,3,5 Triazine 2,4,6 Triamine) ประกอบด้วยอนุพันธ์ 3 ชนิด ได้แก่ แอมมีลีน (ammeline) แอมมีไลด์ (ammelide) และกรดไซยานูริก (cyanuric acid) มีน้ำหนักโมเลกุล 126.12 กรัมต่อโมล มีไนโตรเจน 66.67 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็นปริมาณโปรตีนได้ 416.66 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นพวก non-protein nitrogen (NPN) เมลามีนมีลักษณะเป็นผงสีขาว ละลายน้ำได้น้อย ทนความร้อนและความเป็นกรดด่างได้ดี (เยาวมาลย์, 2550ก; OECD, 2002)

ammeline มีชื่อเรียก 4, 6-diamino-1, 3, 5-triazin-2(1*H*)-one, 9CI 4, 6-diamino-*s*triazin-2-ol, 8CI cyanuric acid diamide ammeline สูตรโมเลกุล $C_3H_5N_5O$ น้ำหนักโมเลกุล 127.105 กรัมต่อโมล มี N เป็นองค์ประกอบร้อยละ 55.10 มีลักษณะเป็นผลึกที่มีโซเดียมคาร์บอเนตเป็นองค์ประกอบ (Na_2CO_3) อยู่ในรูปเกลือ หากอยู่ในน้ำ จะไม่คงสภาพ

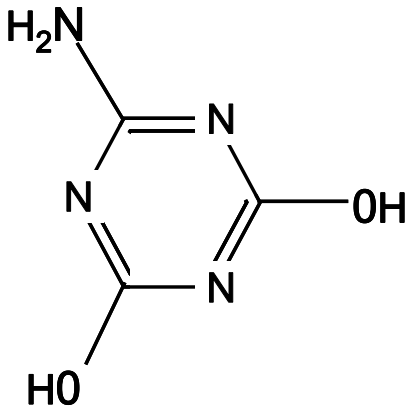
ammelide มีชื่อเรียก ammelide, melanuric acid, cyanuric acid monoamide 6-amino-1, 3, 5- triazine-2, 4(1*H*, 3H)-dione, 9CI มีสูตรโมเลกุล $C_3H_4N_4O$ น้ำหนักโมเลกุล128.09 กรัมต่อโมลมี N เป็น องค์ประกอบร้อยละ 43.74 มีลักษณะเป็นผงผลึกมีน้ำเป็นองค์ประกอบ (H_2O)



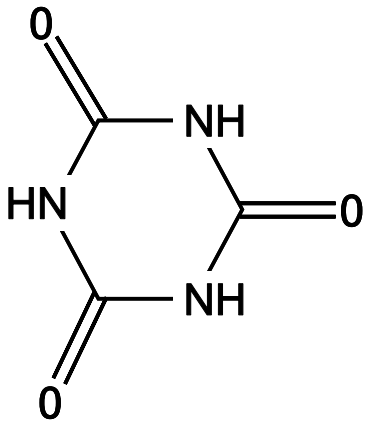
ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของเมลามีน
ที่มา : OECD (2002)



ภาพที่ 2 สูตรโครงสร้างของ ammelide
ที่มา : OECD (2002)



ภาพที่ 3 สูตรโครงสร้างของ ammeline
ที่มา : OECD (2002)



ภาพที่ 4 สูตรโครงสร้างของ cyanuric acid
ที่มา : OECD (2002)

cyanuric acid มีชื่อเรียก 1, 3, 5-triazine-2, 4, 6(1H, 3H, 5H)-trione, 9CI *s*-Triazine-2, 4, 6-triol, 8CI Isocyanuric acid Trihydroxycyanidine มีสูตรโมเลกุล $C_3H_3N_3O_3$ น้ำหนักโมเลกุล 129.075 กรัมต่อโมล มี N เป็นองค์ประกอบร้อยละ 32.55 มีลักษณะเป็น ผลึกแข็งสีขาวมีน้ำเป็นองค์ประกอบ +2 H_2O (H_2O) ไม่มีกลิ่น จุดหลอมละลาย 360 ° C ละลายได้ดีในเอธานอลร้อน ละลายได้ปานกลางในน้ำ มีความหนาแน่น 1.77

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติต่างๆ ของสารเมลามีน

คุณสมบัติของเมลามีน	**ลักษณะ**
IUPAC name	1,3,5 triazine 2,4,6 triamine
ชื่ออื่นๆ	Cyanurotriamide, Cyanurotriamine, Cyanuramide
สูตรโมเลกุล	$C_3H_6N_6$
น้ำหนักโมเลกุล	162.12 g/mol
ลักษณะที่ปรากฏ	White solid
ความหนาแน่น	1,574 Kg/m^3
จุดหลอมเหลว	250 ºC, 523 K, 482 F
การละลายน้ำ	3.1 g/l (20 ºC)

ที่มา : วรรัตน์ (2550)

การที่เมลามีนมีคุณสมบัติในการทนความร้อน ความเป็นกรดด่างได้ดีทำให้การตรวจสอบต้องใช้เทคนิคที่ต้องมีความเฉพาะ เช่น เอชพีเอลซี (HPLC: high performance liquid chromatography) หรือ แอลซีเอ็มเอส (LCMS: liquid chromatography mass spectrometer) (เยาวมาลย์, 2550ข; Anderson *et al*., 2007)

1.2.1.2 การสังเคราะห์ เมลามีน (melamine synthesis)

ปัจจุบันมีการนำยูเรีย มาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารเมลามีน ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมี ดังนี้

$$6\,(NH_2)_2\,CO \longrightarrow C_3H_6N_6 + 6NH_3 + 3CO_2$$

ยูเรีย เมลามีน + แอมโมเนีย + คาร์บอนไดออกไซด์

ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมี 2 ปฏิกิริยาและ 2 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 ปฏิกิริยา endothermic reaction ยูเรียเกิดการสลายตัว เป็น cyanic acid ดังนี้

$$(NH_2)_2\,CO \longrightarrow HCNO + NH_3$$

ยูเรีย cyanic acid + แอมโมเนีย

ขั้นตอนที่ 2 ปฏิกิริยา exothermic reaction โดย cyanic acid polymerizes เป็น เมลามีน และคาร์บอนไดออกไซด์

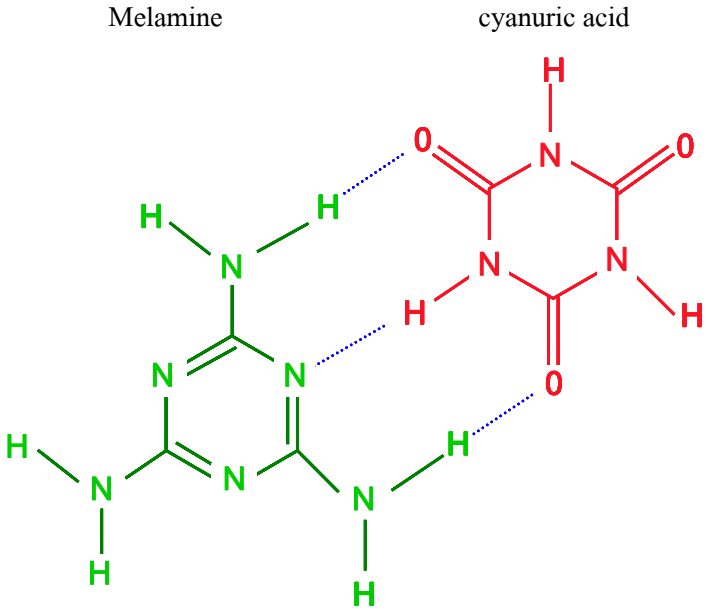
$$6HCNO \longrightarrow C_3H_6N_6 + 3CO_2$$

ในการผลิตเมลามีน จะมีแก๊สเกิดขึ้น ส่วนใหญ่จะเป็นแก๊สแอมโมเนีย ดังนั้นจึงมักทำการผลิตเมลามีนร่วมกันกับการผลิตยูเรียอยู่เสมอ เพื่อใช้แอมโมเนียเป็นสารตั้งต้นในการผลิตยูเรีย

เมลามีน และ cyanuric acid สามารถจับกันโดยอาศัยพันธะไฮโดรเจน โดยโมเลกุลของทั้งสองจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนฟอร์มเป็นเครือข่าย ในแนวราบเป็นกลุ่มๆ (a tile –likeplanar structure through molecular selfassembly) ดังแสดงในภาพที่ 5

มีรายงานว่า หาก เมลามีน และ cyanuric acid combined รวมกันแล้วพิษจะรุนแรงมากกว่าเดี่ยวๆ และเป็นสาเหตุของการเกิดพิษแบบเฉียบพลัน (US FDA, 2007a) และ การเป็นพิษแบบเรื้อรัง มีข้อมูลรายงานว่าการได้รับสารเมลามีน ต่อเนื่องเป็นเวลานานมีโอกาสทำให้ระบบ

สืบพันธุ์ถูกทำลาย เกิดนิ่วในกระเพาะปัสสาวะ หรือไต และนำไปสู่การเกิดมะเร็งของกระเพาะปัสสาวะในสุนัขที่ได้รับสารเมลามีนในอาหาร 3 เปอร์เซ็นต์ (30,000 ppm) เป็นเวลาหนึ่งปีน้ำปัสสาวะมีการเปลี่ยนแปลงดังต่อไปนี้ มีค่าความถ่วงจำเพาะลดลง ปัสสาวะมากขึ้น มีผลึกของเมลามีนออกมากับน้ำปัสสาวะ มีโปรตีน และเลือดปนออกมาโดยไม่ทราบสาเหตุ (HSDB, 2007)



ภาพที่ 5 แสดงการจับตัวกันของ melamine และ cyanuric acid ได้เป็น melamine cyanurate
ที่มา: เยาวมาลย์ (2550ข)

1.2.1.3 ลักษณะพยาธิวิทยาของสัตว์ที่ได้รับสารเมลามีน

สารเมลามีนที่สัตว์ได้รับเข้าไปจะถูกกรองโดยไต และตกตะกอนเป็นก้อนผลึกคล้ายคริสตัล ซึ่งจะไปกั้นและขัดขวางการทำงานในการกรองของไตและจะสะสมในส่วนปลายของหน่วยไต (distal tubule และ collecting duct) ทำให้ส่วนที่มีการสะสมดังกล่าวเกิดภาวะเนื้อเยื่อตาย และจะกระจายออกไปเรื่อยๆ ทำให้เกิดภาวะไตวายอย่างเฉียบพลันเป็นสาเหตุที่ทำให้สัตว์ตายอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังมีบางส่วนจะมีการตกตะกอนที่กระเพาะปัสสาวะ ทำให้เกิดการอุดตันของท่อทางเดินปัสสาวะ มีอาการเลือดออก หรือตกตะกอนขาวขุ่นปนออกมากับน้ำปัสสาวะ (วรรัตน์, 2550)

ผลกระทบต่อไก่เนื้อ เมื่อไก่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนปลอมปนเข้าไปจะมีอาการเกร็ง ผอม โทรม ไม่กินอาหาร กินน้ำมาก บริเวณอุ้งเท้าไก่จะเน่าเพราะมูลที่ขับถ่ายออกมาเหนียวมากและมีเมลามีนปนอยู่ ซึ่งจะเกาะติดทำให้เกิดการระคายเคืองและกัดกร่อนผิวหนังบริเวณอุ้งเท้า และหากไก่เนื้อได้กินอาหารที่มีเมลามีนปลอมปนอยู่ติดต่อกันนาน จะทำให้เกิดอาการไตวายและตายอย่างเฉียบพลัน เมื่อผ่าไตแล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า ไตบวมขยายใหญ่กว่าปกติ 3-4 เท่า ภายในเนื้อเยื่อไตจะมีเม็ดเมลามีนตกค้างอยู่จำนวนมาก นอกจากนี้ยังมีการพบการตกค้างของเมลามีนในม้าม ตับ และอัณฑะอีกด้วย (เยาวมาลย์, 2550ข; วรรัตน์, 2550)

สำหรับสุกร เมื่อได้รับอาหารที่มีเมลามีนปลอมปนเข้าไปจะมีอาการผอมซูบ ไม่กินอาหาร ตัวซีด กินน้ำมาก ตายแบบเฉียบพลันเพราะไตวาย ขี้จะแข็งเป็นเม็ดกระสุน ปัสสาวะมีกลิ่นเหม็นรุนแรง พื้นคอกสีขาวเนื่องจากการขับเมลามีนออกมากับปัสสาวะ ผิวหนังที่มีการสัมผัสเมลามีนที่มาจากปัสสาวะและมูล มีการอักเสบ เท้าเป็นแผลเน่าเปื่อย อาจจะเป็นมะเร็งได้ (ในสุกรจะเห็นผิวหนังเป็นจุดแดง) ถ้าสูดดมเอาเมลามีนเข้าไปจะทำให้โพรงจมูกอักเสบ และมักพบสุกรส่วนหนึ่งตายอย่างไม่ทราบสาเหตุ การแสดงอาการป่วยจะพบ 30–100 เปอร์เซ็นต์ แต่การตายจะพบ 20-80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่าซากจะพบไตแข็ง มีสีเหลืองผิวเป็นเม็ดน้อยหน่า และพบการตกค้างของเมลามีนใน ตับ และอัณฑะอีกด้วย ซึ่งที่ผ่านมาจะพบว่าการตายของสุกรนั้นส่วนหนึ่งมาจากสาเหตุที่มีการใช้วัตถุดิบอาหารสัตว์และโปรตีนทดแทนที่มีเมลามีนปลอมปน ส่วนในสัตว์น้ำนั้นมีรายงานในกลุ่มไม่มีเกล็ด (ปลาดุก) พบอาการผิวดำผิดปกติ ในปลานิลพบอาการโรคผิวด่าง และในกุ้งพบอาการหัวโต เพราะมีเมลามีนไปตกค้างอยู่ (เยาวมาลย์, 2550ก; US-FDA, 2007b)

สำหรับค่าความเป็นพิษเฉียบพลันจะวัดจากค่าที่ทำให้เกิดการตายของสัตว์ครึ่งหนึ่ง หรือเรียกว่า ค่า LD_{50} ซึ่งพบว่าสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีค่า LD_{50} ที่แตกต่างกันแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณเมลามีนที่ทำให้เกิดการตายของสัตว์ครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ

	Toxicity	ชนิด	ปริมาณ	อ้างอิง
LD_{50}	acute oral	F344 rat B6C3F1 mice	3,161 mg/kg 3,296 mg/kg	US-FDA, 2007b; OECD (2002)
LD_{50}	acute inhalation	rat	3,248 mg/m3	US-FDA, 2007b; OECD (2002)
LD_{50}	acute dermal	rabbit	>1,000 mg/kg	OECD (2002)

โดยในปี พ.ศ. 2545 มีรายงานการวิจัยพบว่า หากเสริมเมลามีนในอาหารแกะที่ระดับ 50 กรัมต่อตัวต่อวัน แกะจะตายภายใน 7-10 วันและถ้าเสริมในระดับ 10 กรัมต่อตัวต่อวัน

แกะจะตายภายใน 16-31 วัน เนื่องจากอาการไตวาย เพราะเม็ดเมลามีนไม่ย่อยสลาย แล้วไปอุดตันที่เนื้อเยื่อของไต ส่วนสุนัขที่ตายจากการกินอาหารที่ปลอมปนเมลามีนเมื่อนำไตไปตรวจพิสูจน์ก็พบเม็ดเมลามีนลักษณะคล้ายเม็ดคริสตัล อุดตันในเนื้อเยื่อของไตเช่นเดียวกัน (เยาวมาลย์, 2550ข)

เมลามีนที่นำมาปลอมปนหรือผสมในวัตถุดิบอาหารสัตว์เป็นเศษเหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติก หรือทัปเปอร์แวร์ ที่มีคุณภาพต่ำไม่ได้มาตรฐาน ซึ่งสามารถทำให้มีการตกแต่งให้มีโปรตีนได้ตั้งแต่ 170-450 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิตว่านำผงเมลามีนมาผสมกับสารใด ทำให้มีเมลามีนที่ใช้ปลอมปนมีให้เลือกได้หลายระดับเปอร์เซ็นต์โปรตีน เมลามีนที่ปลอมปนในอาหารสัตว์จะละลายน้ำได้ 50-60 เปอร์เซ็นต์ขึ้นอยู่กับชนิด และหลากสีสันส่งผลให้ตรวจวิเคราะห์หาเมลามีนที่ปลอมปนได้ยากมาก (เยาวมาลย์, 2550ข) นอกจากนี้แล้วยังพบไซโรมาซีนที่เป็นเมทาบอลิซึมบางส่วนของเมลามีน มีการตรวจพบเมลามีน และไซโรมาซีนรวมกัน มากถึง 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในเนื้อไก่ และในอาหารแม่ไก่ไข่ ระดับที่สูงที่สุด 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของไซโรมาซีน (Meek *et al*., 2003)

โดยเมลามีนที่ตรวจพบในเมืองไทยที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบอาหารมีหลากหลายชนิด ประกอบด้วยโพลียูเรียฟอร์มาลดีไฮด์ (ผงสีขาว) โพลีเมธิลคาร์บาไมล์ (ผงสีขาว) โพลียูเรียฟอร์มาลดีไฮด์ (UF) เมลามีนฟอร์มาลดีไฮด์ (MF) เมลามีนยูเรียฟอร์มาลดีไฮด์ (MUF) ซึ่งมีตั้งแต่สีเหลืองจนขาว ขาวเทา เทาและดำ เมลามีน(ผงสีขาว) และเมลามีนไซอนูเลท (เป็นรูปเกลือที่เกิดจากเมลามีนและกรดไซยานูริก) (เยาวมาลย์, 2550ก)

1.2.2 ปลาดุกพันธุ์ผสม

1.2.2.1 ชีววิทยาของปลาดุกพันธุ์ผสม

ปลาดุกพันธุ์ผสมหรือปลาดุกบิ๊กอุย (*Clarias macrocephalus* (Günther) x *Clarias gariepinus* (Burchell)) เป็นปลาที่ได้จากการผสมปรับปรุงพันธุ์ระหว่างปลาดุกอุย (*Clarias marcrocephalus*) และปลาดุกรัสเซีย (*Clarias gariepinus*) มีชื่อสามัญว่า hybrid catfish

แหล่งกำเนิดของปลาดุกอยู่ในเขตร้อนแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น อินเดีย ไทย พม่า ลาว กัมพูชา เวียดนาม อินโดนีเซีย หมู่เกาะบอร์เนียวและฟิลิปปินส์ (ศักดิ์ชัย, 2536) สำหรับประเทศไทย จะพบว่ามีอยู่ทั่วไปตามลำคลอง หนองบึง ทั่วทุกภาค โดยธรรมชาติปลาดุกจะอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำซึ่งมีพื้นดินเป็นโคลนตมที่มีน้ำจืดสนิท และแม้แต่ในแหล่งที่มีน้ำเพียงเล็กน้อยหรือในน้ำค่อนข้างกร่อย (กรมประมง, มปป.ข) พันธุ์ปลาดุกที่พบในประเทศไทย ได้แก่

1. *Clarias melanoderma* Bleeker มีชื่อไทยว่า ปลาดัก พบที่นครสวรรค์และพิจิตร ลักษณะเด่น คือ ด้านหน้าของก้านครีบแข็งของครีบอก หรือเงี่ยง เป็นหยักหรือเป็นหนามแหลมเห็นได้ชัด ลำตัวสีดำหรือสีเทาดำปนเหลือง

2. *Clarias batrachus* Linnaeus มีชื่อไทยว่า ปลาดุกด้าน ดุกเลา ดุกแดง ดุกเผือก พบทั่วๆไป ลำตัวมีสีเทาปนดำ ก้านแข็งของครีบอกเป็นปลายแหลมหยักทั้งสองด้าน ปลายกระดูกท้ายทอยแหลม

3. *Clarias macrocephalus* Günther มีชื่อไทยว่า ปลาดุกอุย พบทั่วๆไป รูปร่างลักษณะคล้ายกับปลาดุกด้านมาก ต่างกันตรงที่ปลายกระดูกท้ายทอยโค้งมน ลำตัวมีสีเทาปนดำและสีเหลือง

4. *Clarias teysmanni* Bleeker มีชื่อไทยว่า ปลามัด มด มอด พบที่จังหวัดนครศรีธรรมราช รูปร่างลักษณะโดยทั่วไปคล้ายกับปลาดุกด้าน แต่ลำตัวค่อนข้างเรียวยาวกว่า ลำตัวมีสีดำและมีจุดสีขาวเรียงเป็นแถวตามขวางชัดเจน

5. *Prophagorus nieuhofii* มีชื่อไทยว่า ปลาดุกลำพัน จัดอยู่ในตระกูลเดียวกันกับปลาดุกอุยหรือปลาดุกด้าน ลักษณะทั่วไปคล้ายกับปลาดุกอุย แต่ต่างกันที่มีครีบหลัง ครีบหางและครีบก้น เชื่อมติดกัน เป็นปลาที่อาศัยอยู่ในบริเวณป่าพรุที่รกทึบมีกระแสน้ำไหลเอื่อยๆ หรือเป็นแอ่งน้ำค่อนข้างนิ่ง (ศราวุธ และคณะ, 2538)

ปลาดุกที่นิยมเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย คือ ปลาดุกอุย และปลาดุกด้าน ต่อมาประมาณปี พ.ศ. 2528 มีเกษตรกรนำพันธุ์ปลาดุกเทศหรือปลาดุกรัสเซีย เข้ามาเลี้ยงในประเทศไทย เป็นปลาที่มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว มีความต้านทานโรคและสภาพแวดล้อมสูง เมื่อเจริญเต็มที่เป็นปลาที่มีขนาดใหญ่ แต่มีเนื้อเหลวและสีซีดขาว ไม่น่ารับประทาน ทางกลุ่มวิจัยเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด ได้ทำการเพาะขยายพันธุ์ปลาโดยนำมาผสมข้ามพันธุ์ระหว่างปลาดุกอุยเพศเมียผสมกับปลาดุกเทศเพศผู้ ผลปรากฏว่าลูกที่ได้มีอัตราการเจริญเติบโตรวดเร็ว ทนทานต่อโรคสูง และมีรสชาติอร่อย ทางกรมประมงให้ชื่อว่า “ปลาดุกอุย-เทศ” แต่ชาวบ้านมักเรียกว่าบิ๊กอุยหรืออุยบ่อ ส่วนการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างปลาดุกอุยเพศผู้กับปลาดุกอุยเพศเมียลูกที่ได้ไม่แข็งแรงและมีอัตราการรอดน้อย เมื่อเทียบกับการเพาะพันธุ์ที่ได้ปลาดุกอุย-เทศ (กรมประมง, มปป.ก)

1.2.2.2 ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

ปลาดุกพันธุ์ผสมหรือปลาดุกบิ๊กอุย เป็นปลาที่อยู่ในครอบครัว Clariidae ลักษณะทั่วไปเหมือนปลาดุกคือเป็นปลาไม่มีเกล็ด ลำตัวยาวเรียว ครีบหลังยาวไม่มีกระโดง ครีบท้องยาว

เกือบถึงโคนหาง มีอวัยวะช่วยในการหายใจ ซึ่งช่วยให้ปลาดุกบิ๊กอุย มีความอดทนสามารถอยู่พ้นน้ำได้นาน เพราะขนาดในตาของปลาดุกบิ๊กอุย จะดูเล็กผิดสัดส่วนหากเทียบกับขนาดของลำตัว มีหนวด 4 คู่ ซึ่งสามารถรับรู้ความรู้สึกต่างๆได้ดีฉะนั้นปลาดุกบิ๊กอุย จึงใช้หนวดมากกว่าใช้ตา เมื่อหาอาหารตามพื้นหน้าดิน โดยปกติแล้วปลาดุกมีนิสัยว่องไว ชอบกินอาหารประเภทเนื้อสัตว์ แต่ถ้านำมาเลี้ยงในบ่ออาจให้อาหารจำพวกพืช และสามารถฝึกนิสัยให้ปลาดุกบิ๊กอุย ขึ้นมากินอาหารบริเวณผิวหน้าได้ (กรมประมง, มปป.ข) ปลาดุกพันธุ์ผสมมีลักษณะคล้ายปลาดุกอุยและปลาดุกรัสเซีย ปลาดุกพันธุ์ผสม ในระยะวัยอ่อน มีลักษณะภายนอก นิสัยการกินอาหารคล้ายกับปลาดุกอุย โดยที่ผิวค่อนข้างเหลืองบริเวณลำตัวและหางมีจุดประสีขาว แต่เมื่อโตเต็มที่จุดประจะหายไป กะโหลกท้ายทอยแหลมเป็นหยัก 3 หยัก หัวมีขนาดใหญ่ เมื่อปลามีอายุ 3 สัปดาห์ขึ้นไป อัตราการเจริญเติบโตและลักษณะจะคล้ายกับปลาดุกรัสเซียมากขึ้น แต่เนื้อไม่เหลวเหมือนปลาดุกรัสเซีย ลักษณะเด่นของปลาดุกพันธุ์ผสม คือ ตัวโต เจริญเติบโตเร็ว มีความต้านทานต่อโรคสูง และเนื้อเยอะ มีสีเหลืองนวล รสชาติดี สามารถนำมาประกอบอาหารได้หลายประเภท (กรมประมง, มปป.ก)

1.2.2.3 ความต้องการสารอาหาร

โดยทั่วไปปลาดุกต้องการโปรตีนในอาหารมากถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ปลาขนาด 2-4 เซนติเมตร ต้องการโปรตีนในอาหาร 35-40 เปอร์เซ็นต์ ปลาขนาด 5-6 เซนติเมตรขึ้นไป ต้องการอาหารที่มีโปรตีน 25-30 เซนติเมตร ปลาพ่อแม่พันธุ์ต้องการโปรตีนในอาหาร 28-32 เปอร์เซ็นต์ (มะลิ, 2530) ปลาดุกพันธุ์ผสมหรือปลาดุกบิ๊กอุย เจริญเติบโตและให้ค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อได้ดีที่สุด เมื่อมีโปรตีนในอาหาร 41 เปอร์เซ็นต์ วิมล และคณะ (2536) ทำการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของคาร์โบไฮเดรตจากปลายข้าวดิบต่อไขมันในอาหารของปลาดุกพันธุ์ผสม และได้ข้อสรุปว่าอาหารที่มีโปรตีน 33 เปอร์เซ็นต์ พลังงานรวม 4,280-4,390 กิโลแคลอรีต่อกิโลกรัม ควรมีคาร์โบไฮเดรตจากปลายข้าว 50 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 4.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบเป็นสัดส่วนระหว่างคาร์โบไฮเดรตกับไขมันจะได้เท่ากับ 11.24:1 ทำให้ปลาดุกบิ๊กอุยมีการเจริญเติบโตดี จากการศึกษาของ Jauncey และ Ross (1982) พบว่าอาหารปลาดุกควรมีไขมัน 6-8 เปอร์เซ็นต์ สำหรับอาหารปลาดุกที่เลี้ยงในเขตร้อนอาจมีไขมันได้ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ (อำนวย, 2525) จากการทดลองของวิมล และพิศมัย (2538) พบว่าปลาดุกพันธุ์ผสมต้องการกรดไขมันที่จำเป็นทั้งกรดไลโนลินิก (linolenic)หรือโอเมกา 3 และกรดไลโนลิอิก (linoleic)หรือโอเมกา 6 แต่ต้องการโอเมกา 6 มากกว่าในสัดส่วน 1:1.25 จึงจะทำให้ปลาดุกพันธุ์ผสมขนาด 0.5-19 กรัมมีอัตราการเจริญเติบโตและมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีที่สุด พบมากในถั่วเหลืองและน้ำมันปลาที่เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ (เวียง, 2542) Boonyaratpalin และ Phromkunthong (2001) พบว่าการเสริมวิตามินซีในรูป ascorbyl

phosphate calcium 30 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของปลาดุกพันธุ์ผสมและช่วยป้องกันการขาดวิตามินซีได้

1.2.2.4 ภาวการณ์ตลาด

จากข้อมูลการส่งออกปลาน้ำจืดในปี 2545 พบว่าปริมาณการส่งออกของปลาดุกสูงถึง 1,073 ตัน โดยคิดเป็นมูลค่ากว่า 60 ล้านบาท และจากข้อมูลการส่งออกล่าสุดในปี 2551 พบว่าปริมาณการส่งออกของปลาดุก สูงถึง 5,992.5 ตัน โดยคิดเป็นมูลค่า 301.4 ล้านบาท (กองประมงต่างประเทศ, 2551) จะเห็นได้ว่าความต้องการบริโภคปลาดุก มีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ ทั้งนี้เนื่องจากปลาดุกเป็นปลาที่สามารถทนอยู่ได้ในสภาพที่มีน้ำน้อยๆ ผู้บริโภคจึงสามารถซื้อปลาสดได้อีกทั้งราคาของปลาดุกไม่สูงมากนัก โดยอยู่ในช่วง 22-35 บาทต่อปลา 1 กิโลกรัม ซึ่งปลาดุกนั้นสามารถจำหน่ายได้ทั้งในรูปปลามีชีวิตและอาหารแปรรูป เช่น เนื้อปลาดุกสด หรือแช่เย็น เนื้อปลาดุกบดแช่แข็ง ปลารมควัน ปลาตากแห้ง ปลาแช่แข็ง และอาหารกระป๋อง โดยจากข้อมูลการส่งออกเนื้อปลาดุกสด แช่เย็น หรือแช่แข็ง และเนื้อปลาดุกบดแช่แข็ง ในปี 2551 สูงถึง 320,380 กิโลกรัม คิดเป็นมูลค่า 27.3 ล้านบาท (กองประมงต่างประเทศ, 2551) ซึ่งตลาดส่งออกปลาดุกที่สำคัญ คือ สหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส ฮ่องกง ญี่ปุ่น และสิงคโปร์ (กรมประมง, 2551)

1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของเมลามีนในอาหารต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเหงือก ตับ และไต ของปลาดุกพันธุ์ผสม

2. เพื่อศึกษาการสะสมของเมลามีนในปลาดุกพันธุ์ผสม

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุ

2.1.1 ปลาที่ใช้สำหรับการทดลอง

นำปลาดุกพันธุ์ผสม ที่มีขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 1-2 กรัมต่อตัว จากฟาร์มเอกชนในจังหวัดพัทลุง มาอนุบาลและปรับสภาพ จนได้ปลาที่มีขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 3-5 กรัมต่อตัว

2.1.2 อาหารสำหรับอนุบาลลูกปลาก่อนเริ่มต้นการทดลอง

อาหารสำหรับใช้อนุบาลลูกปลาดุกพันธุ์ผสมก่อนเริ่มทดลอง เป็นอาหารทดลองชุดควบคุม (สูตรที่ 1) ซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการ คือมีระดับโปรตีน 35 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 8 เปอร์เซ็นต์ และมีพลังงาน 4,200 กิโลคาลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จนได้ปลาขนาดที่ต้องการ

2.1.3 สารเคมี

2.1.3.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของร่างกายปลาทดลองและวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการอาหารทดลอง แสดงในภาคผนวก ก.

2.1.3.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดพื้นฐานของปลาทดลอง แสดงในภาคผนวก ก.

2.1.3.3 สารเคมีสำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อเหงือก ตับ และไตของปลาทดลอง แสดงในภาคผนวก ก.

2.2 อุปกรณ์

2.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงปลาทดลอง

2.2.1.1 ถังพลาสติกขนาด 20x31x32 นิ้ว ความจุน้ำ 200 ลิตร จำนวน 21 ถัง

2.2.1.2 ถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 2 ถัง สำหรับใช้อนุบาลลูกปลาดุกพันธุ์ผสม

2.2.1.3 อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วย เครื่องให้อากาศ สายยาง และหัวทราย

2.2.1.4 อุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำ ได้แก่ สายยางขนาด 1 นิ้ว สำหรับเปลี่ยนถ่ายน้ำและเครื่องสูบน้ำ

2.1.5 อุปกรณ์เคลื่อนย้ายปลา ได้แก่ สวิงตักปลา ถังพลาสติก และกะละมังพลาสติก

2.2.2 อุปกรณ์เตรียมอาหารทดลอง

2.2.2.1 เครื่องมือเตรียมอาหาร (Hobart) Model A 200 T ประกอบด้วยชุดเครื่องผสมอาหารแบบมีใบพัด ชุดเครื่องอัดเม็ดอาหาร

2.2.2.2 เครื่องอบอาหาร

2.2.2.3 อุปกรณ์ชั่งตวงวัสดุอาหาร ได้แก่ เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius รุ่น Basic เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius รุ่น Research กระบอกตวง บีกเกอร์ ถาดเตรียมอาหาร และ ถุงพลาสติกบรรจุวัตถุดิบและอาหารทดลองที่เสร็จสิ้นตามขั้นตอน

2.2.2.4 ตู้เย็น เพื่อเก็บรักษาอาหารทดลองระหว่างรอนำไปใช้

2.2.3 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลองและร่างกายปลา

2.2.3.1 อุปกรณ์วิเคราะห์ความชื้น ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) ตู้อบ (hot air oven) โถดูดความชื้น (desiccators) เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.2.3.2 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ได้แก่ เครื่องย่อย (digestion apparatus) ของบริษัท Gerhardt รุ่น Kjeldatherm เครื่องกลั่น (distillation apparatus) ของบริษัท Gerhardt รุ่น Vapodest I หลอดย่อยโปรตีน (digestion tube) กระดาษชั่งตัวอย่างที่ปราศจากไนโตรเจน กระบอกตวง บีกเกอร์ บิวเรต และขวดรูปชมพู่

2.2.3.3 อุปกรณ์วิเคราะห์เถ้า ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) เตาเผา (muffle furnace) ของบริษัท Gallenkamp โถดูดความชื้น เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.2.3.4 อุปกรณ์วิเคราะห์ไขมันได้แก่ ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ไขมัน รุ่น Soxtec System HT6 ไส้กรองสาร ถ้วยสกัดสาร ตู้อบ โถดูดความชื้น เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.2.4 อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

2.2.4.1 อุปกรณ์เก็บเลือดปลา ได้แก่ เข็มขนาด 25G ยาว 1 นิ้ว และกระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร หลอดพลาสติก (microtube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.2.4.2 เครื่องสำหรับแยกซีรัม ได้แก่ เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ของบริษัท Beckman รุ่น Avanti™ 30 centrifuge

2.2.4.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ของบริษัท Shimada รุ่น UV 1201V

2.2.4.4 อุปกรณ์สำหรับนับเม็ดเลือด ได้แก่ ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) กล้องจุลทรรศน์

2.2.5 อุปกรณ์ศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

2.2.5.1 ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด

2.2.5.2 เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ของบริษัท Technicon Corporation รุ่น Autotechnicon Mono MOD. 2A

2.2.5.3 เครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อคือ ไมโครโตม (microtome) (Jung AG Heidelberg) ใบมีดตัดเนื้อเยื่อ (Leica, Disposable Microtome Blades) อ่างน้ำอุ่น (warm bath) และสไลด์ (microscope slides)

2.2.5.4 อุปกรณ์สำหรับเตรียมสไลด์ถาวร คือ ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ ชุดสำหรับใส่สีย้อม และแผ่นปิดสไลด์ (cover slip) ขนาด 40 X 60 มิลลิเมตร

2.2.5.5 เครื่องฝังชิ้นเนื้อ (embedding center)

2.2.5.6 เตาร้อน (hot plate)

2.2.5.7 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบของ Olympus รุ่น C-35 AD และบันทึกภาพโดยกล้อง cooled CCD (Olympus DP 71)

2.2.6 อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

ประกอบด้วย เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius รุ่น B 3100 S ถังสำหรับบรรจุน้ำ ขันพลาสติก กะละมังพลาสติก และสวิงช้อนปลาทดลอง

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1. การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

ใช้ถังพลาสติกขนาด 20x31x32 นิ้ว ความจุน้ำ 200 ลิตร (หน่วยการทดลอง) จำนวน 21 ถัง ทำความสะอาด และติดตั้งระบบให้อากาศแล้วเติมน้ำประปาที่ปราศจากคลอรีนให้ได้ปริมาตร 150 ลิตร ใช้ตะแกรงพลาสติกปิดด้านบนเพื่อป้องกันการกระโดดออกนอกถังทดลอง และเป็นการป้องกันการรบกวน ขณะทำการทดลองเตรียมบ่อคอนกรีตสำหรับพักน้ำเพื่อใช้ในการเปลี่ยนถ่ายน้ำ โดยมีการทำความสะอาดถังทดลอง สายอากาศ และหัวทรายให้อากาศตลอดการทดลอง ซึ่งมีการกำหนดให้มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ ในเวลา 14.00 น. ของทุกวัน โดยใช้น้ำประปาจากบ่อพักน้ำที่มีการตรวจสอบด้วย โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) ว่าปราศจากคลอรีน และผ่านการพักน้ำเป็นเวลา 2 วัน

2.3.2 การเตรียมปลาทดลอง

นำปลาดุกพันธุ์ผสม ที่ได้จากฟาร์มเอกชน ที่มีขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 1-2 กรัมต่อตัว มาอนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปวันละ 2 มื้อ ในสัปดาห์แรก หลังจากนั้นฝึกให้กินอาหารทดลอง (สูตรควบคุม) โดยให้วันละ 2 มื้อจนกระทั่งได้ขนาดทดลองมีขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 3-5 กรัมต่อตัว จากนั้นนำปลาดุกพันธุ์ผสมไปตรวจสุขภาพก่อนที่จะนำมาคัดเลือกปลาที่สุขภาพแข็งแรง และมีขนาดใกล้เคียงกัน จำนวน 30 ตัวต่อถัง ทำการปรับสภาพปลาให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมของถัง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นทำการชั่งน้ำหนักปลาเริ่มต้น ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius รุ่น B 3100 S โดยก่อนชั่งให้งดให้อาหารปลาก่อนเป็นเวลาครึ่งวัน และสลบด้วยน้ำมันกานพลูที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 50 ppm หลังจากนั้นให้ทำการชั่งน้ำหนักปลาเริ่มต้น และบันทึกผล

2.3.3 การเตรียมอาหารทดลอง

อาหารที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 7 สูตร คือ สูตรที่ 1 เป็นอาหารสูตรควบคุมไม่ใส่เมลามีน สูตรที่ 2-7 เป็นอาหารที่ผสมเมลามีนลงในอาหารตามระดับความเข้มข้นในแต่ละสูตรคือ 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กำหนดให้อาหารทุกสูตรมีสารอาหารในระดับที่ใกล้เคียงกัน คือมีระดับโปรตีน 35 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 8 เปอร์เซ็นต์ และมีพลังงาน 4,200 กิโลคาลอรี

ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม อาหารทุกสูตรมีส่วนประกอบของวัตถุดิบเหมือนกันแต่จะต่างกันที่ปริมาณเมลามีน โดยในสูตรที่ 2-7 มีการผสมเมลามีนลงไปและจะทำการลดปริมาณปลายข้าว (ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3) โดยอาหารทดลองที่ใช้เป็นอาหารเม็ดแบบจม เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร นำอาหารอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นจากนั้นจึงเก็บอาหารในถุงดำและแช่ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และส่งตรวจวิเคราะห์หาเมลามีนที่ศูนย์เครื่องมือกลาง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ โดยใช้เทคนิค Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (ภาคผนวก ข.)

2.3.4 ขั้นตอนในการเตรียมอาหารทดลอง

2.3.4.1 นำวัตถุดิบที่ใช้ในการทดลองร่อนผ่านตะแกรงขนาด 30 เมช (mesh) และนำวัตถุดิบที่ร่อนแล้วไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ตามวิธีการของ AOAC (1990) จากนั้นทำการสร้างสูตรอาหารโดยคำนวณอาหารทดลองทุกสูตร ให้มีระดับของโปรตีน ไขมัน และพลังงานเท่ากัน ดังแสดงในตารางที่ 3

2.3.4.2 ชั่งปลายข้าว รำ วิตามินผสม แร่ธาตุผสม และเมลามีนตามที่คำนวณไว้ในแต่ละสูตรอาหารดังที่แสดงในตารางที่ 3 ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ผสมให้เข้ากันในถุงพลาสติกใส แยกถุงไว้ในแต่ละชุดการทดลอง

2.3.4.3 ชั่งวัตถุดิบอื่นๆ ที่เหลือตามที่คำนวณไว้ในแต่ละสูตรอาหารที่แสดงในตารางที่ 3

2.3.4.4 นำส่วนผสมทั้งหมดที่ชั่งไว้ ยกเว้นน้ำมันและน้ำกลั่น ผสมเข้าด้วยกันด้วยเครื่องผสมอาหาร (Hobart) Model A 200 T เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมน้ำมันลงไป ประมาณ 10 นาที เมื่อส่วนผสมเข้ากันดีแล้วเติมน้ำกลั่นประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร

2.3.4.5 หลังจากวัตถุดิบอาหารผสมเข้ากันดีแล้ว ทำการเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหารผ่านแว่นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร โดยตัดเม็ดอาหารให้มีขนาดใกล้เคียงกัน

2.3.4.6 นำเม็ดอาหารที่ได้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นจากนั้นจึงเก็บอาหารในถุงดำ และเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3.4.7 นำอาหารทดลองไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ โปรตีน, ไขมัน, ความชื้น, เยื่อใย และเถ้าตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) ส่วนปริมาณไนโตรเจนฟรีเอ็กแทร็ก (nitrogen free extract, NFE) คำนวณจาก 100 – (%โปรตีน + %ไขมัน + %ความชื้น + %เยื่อใย + %เถ้า)

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของวัตถุดิบในอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร

วัตถุดิบ	สูตร1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4	สูตร 5	สูตร 6	สูตร 7
ปลาป่น	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5
เนื้อสัตว์ปีกป่น	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
กากถั่วเหลือง	35	35	35	35	35	35	35
ปลายข้าว	18	17.5	17	16.5	16	15.5	15
รำ	15	15	15	15	15	15	15
น้ำมันปลา	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
วิตามินผสม[1]	1	1	1	1	1	1	1
แร่ธาตุผสม[2]	3	3	3	3	3	3	3
MSP	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
เมลามีน	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3
รวม	100	100	100	100	100	100	100
โปรตีนรวม (%)	35.70	37.90	40.83	42.47	45.43	47.27	49.03
โปรตีนจริง (%)	35.70	35.08	35.04	34.99	34.95	34.91	34.87
โปรตีนเทียม (%)	0.00	2.67	5.45	7.04	10.12	11.95	13.32
เมลามีนในอาหารที่วิเคราะห์ได้ (%)	Not detected[3]	0.64	1.31	1.69	2.43	2.87	3.20

[1]วิตามินผสม (ปริมาณต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) ประกอบด้วย Thiamine (B_1) 10 มิลลิกรัม; Riboflavin (B_2) 20 มิลลิกรัม; Pyridoxine (B_6) 10 มิลลิกรัม; Cobalamin (B_{12}) 0.05 มิลลิกรัม; Retinal (A) 7,000 IU; Cholecalciferol (D_3) 4,000 IU; Phylloquinone (K_1) 80 มิลลิกรัม; Folic acid 5 มิลลิกรัม; Calcium pantothenate 40 มิลลิกรัม; Inositol 400 มิลลิกรัม; Niacin 150 มิลลิกรัม; Tocopherol (E) 60 มิลลิกรัม; Ascorbic acid (C) 500 มิลลิกรัม; Biotin 3 มิลลิกรัม

[2]แร่ธาตผสม (ปริมาณต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) ประกอบด้วย Na 3.304 มิลลิกรัม; Mg 25 มิลลิกรัม; K 76.471 มิลลิกรัม; Fe 8.842 มิลลิกรัม; Zn 0.664 มิลลิกรัม; Mn 0.329 มิลลิกรัม; Cu 0.069 มิลลิกรัม; Co 0.00199 มิลลิกรัม และ I 0.0098 มิลลิกรัม

[3]Not detected คือ ไม่พบเมลามีนจากตัวอย่างอาหารที่ส่งตรวจวิเคราะห์

ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหารในการทดลอง (% as fed basis[1])

วัตถุดิบอาหาร	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	NFE[2]
ปลาป่น	8.68±0.04	58.73±0.62	11.72±0.02	23.75±0.18	0.03±0.01	0.24±0.05
กากถั่วเหลือง	10.40±0.04	45.25±0.05	1.52±0.04	6.88±0.06	1.93±0.01	34.03±0.11
เนื้อสัตว์ปีกป่น	11.16±0.21	68.24±0.34	7.53±0.02	8.91±0.07	0.14±0.02	4.03±0.07
รำ	9.07±0.05	12.68±0.21	18.73±0.17	9.25±0.18	0.08±0.01	49.55±0.21
ปลายข้าว	11.44±0.07	8.28±0.24	1.19±0.04	0.87±0.03	0.42±0.03	77.81±0.32
เมลามีน	-	416.32±0.87	-	-	-	-

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

[2] NFE = Nitrogen free extract

ตารางที่ 5 คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลองที่มีส่วนผสมของเมลามีนที่ระดับต่าง ๆ กัน (% บนฐานของวัตถุแห้ง[1])

ชุดการทดลอง	เมลามีน (%)	คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลองที่มีส่วนผสมของเมลามีนที่ระดับต่าง ๆ กัน				
		โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	NFE[2]
1	0	35.70±1.11	8.74±0.21	12.19±0.05	0.778±0.016	37.54±0.28
2	0.5	37.90±0.70	8.68±0.16	12.37±0.08	0.776±0.014	36.11±0.21
3	1.0	40.83±1.03	8.63±0.17	12.36±0.10	0.774±0.021	32.12±0.18
4	1.5	42.47±0.84	8.52±0.17	11.81±0.08	0.772±0.013	32.11±0.23
5	2.0	45.43±0.84	8.45±0.22	12.05±0.06	0.770±0.012	28.53±0.28
6	2.5	47.27±0.81	8.49±0.11	11.67±0.05	0.768±0.013	27.71±0.18
7	3.0	49.03±0.88	8.40±0.23	11.64±0.05	0.766±0.016	26.02±0.22

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

[2] NFE = Nitrogen free extract

2.3.5 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) ระยะเวลาในการทดลอง 12 สัปดาห์ โดยเป็นการทดสอบระดับความเข้มข้นของเมลามีน 7 ระดับคือ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รวม 7 ชุดการทดลอง (treatment) แต่ละชุดการทดลองประกอบด้วย 3 ซ้ำ (replicate) ทำการสุ่มหน่วยการทดลองโดยการจับฉลาก มีหน่วยทดลองทั้งหมด 21 หน่วยทดลอง เมื่อเริ่มต้นการทดลองสุ่มตัวอย่างปลาจากถังอนุบาลมาชั่งน้ำหนัก เพื่อนำไปวิเคราะห์หาความชื้นในตัวปลา และนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธีการของ AOAC (1990) ดำเนินการทดลองโดยสุ่มปลาที่อนุบาลไว้ที่มีขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 3-5 กรัม/ตัว ลงในถังพลาสติก ถังละ 30 ตัว โดยให้อาหารวันละ 2 มื้อ คือ ช่วงเช้าเวลา 8.00 น. และช่วงเย็นเวลา 16.00 น. โดยให้ปลากินจนอิ่ม บันทึกน้ำหนักอาหารที่ให้ตลอดการทดลอง ก่อนให้อาหารช่วงเย็นให้ดูดตะกอนทำความสะอาดถังพลาสติกโดยวิธีกาลักน้ำแล้วเติมน้ำจากบ่อพักให้เท่าเดิมทุกครั้ง ในระหว่างการเลี้ยงมีการชั่งน้ำหนักปลาทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์ เพื่อตรวจสอบการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลา และเมื่อทำการทดลองครบ 12 สัปดาห์ ทำการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อทำการการศึกษาองค์ประกอบเลือด และทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือก ตับ และไต สำหรับศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของปลา

2.3.6 การเก็บรวบรวมข้อมูล

2.3.6.1 การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะที่แสดงออกของปลา

ในระหว่างการทดลอง สังเกตพฤติกรรมของปลาทุกชุดการทดลอง เช่น การว่ายน้ำ การยอมรับอาหาร และสังเกตลักษณะภายนอก เช่น สีของตัวปลา การตกเลือด การคดงอของครีบและกระดูก การเกิดบาดแผลบริเวณ ครีบ ผิวหนัง และอวัยวะภายนอกอื่น ๆ การใช้ยาและสารเคมีเพื่อป้องกันโรคดำเนินการตามสภาพของปลา และทำการถ่ายรูปปลาทั้งตัวเมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง

2.3.6.2 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

ดำเนินการชั่งน้ำหนักปลาทุก 2 สัปดาห์ เพื่อทราบน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นโดยการชั่งน้ำหนักรวมของปลาแต่ละซ้ำด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (งดให้อาหารก่อนชั่งน้ำหนัก 1

มื้อ) พร้อมจดบันทึกอาหารที่ปลากินทุกสัปดาห์ ในสัปดาห์ที่ 12 จะทำการชั่งน้ำหนักปลาทั้งหมดในแต่ละซ้ำ และนับจำนวนปลาที่เหลืออยู่ของทุกชุดการทดลอง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย (survival rate) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (% weight gain) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, SGR) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate) คำนวณตามวิธีของ Dupree และ Sneed (1966) และอัตราการกินอาหาร (rate of feed intake) คำนวณตามวิธีของ Yone และ Fujii (1975) ดังสมการ

1. อัตราการรอดตาย (survival rate)

$$\text{อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตัว)}}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มต้น (ตัว)}} \times 100$$

2. น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (% weight gain)

$$= \frac{\text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)} - \text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (กรัม)}}{\text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (กรัม)}} \times 100$$

3 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, SGR; เปอร์เซ็นต์ต่อวัน)

$$= \frac{(\ln \text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง(กรัม)} - \ln \text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง) (กรัม)}}{\text{ระยะเวลา (วัน)}} \times 100$$

4. อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate)

$$\text{อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากินทั้งหมด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นตลอดการทดลอง (กรัม)}}$$

5. อัตราการกินอาหาร (rate of feed intake)

$$\text{อัตราการกินอาหาร (เปอร์เซ็นต์ต่อตัวต่อวัน)} = \frac{F \times 100}{\frac{W_0 + W_1}{2} \times t \quad \frac{N_0 + N_1}{2} \times t}$$

F = น้ำหนักอาหารแห้งที่ปลากิน (กรัม)
W_0 = น้ำหนักปลาเฉลี่ยเริ่มต้น (กรัม)
W_1 = น้ำหนักปลาเฉลี่ยสุดท้าย (กรัม)
N_0 = จำนวนปลาเริ่มต้น (ตัว)
N_1 = จำนวนปลาสุดท้าย (ตัว)
t = ระยะเวลาที่ปลาได้รับอาหารทดลอง (วัน)

2.3.6.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปลา

สุ่มตัวอย่างปลาก่อนการทดลองจำนวน 20 ตัว นำไปวิเคราะห์หาความชื้นในตัวปลา โดยนำปลาทั้งตัวไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนแห้ง แล้วจึงนำไปใส่โถดูดความชื้นรอจนกว่าตัวปลาเย็น จึงชั่งน้ำหนักตัวปลาเพื่อวิเคราะห์ความชื้นของตัวปลา แล้วจึงบดตัวปลาให้ละเอียดและนำตัวอย่างปลาไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธีการของ AOAC (1990) เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มตัวอย่างปลาจากแต่ละถังพลาสติกๆละ 2 ตัว ไปวิเคราะห์หาความชื้น โปรตีน และไขมัน และนำค่าโปรตีนที่ได้ไปคำนวณประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio, PER) คำนวณตามวิธีการของ Zeitoun และคณะ (1973)

$$\text{ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน} = \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักโปรตีนที่ปลากิน (กรัม)}} \times 100$$

โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ ได้(productive protein value, %)

โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์(%)

$$= \frac{(\%\text{โปรตีนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง(กรัม)} - \%\ \text{โปรตีนปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง(กรัม)})}{\text{น้ำหนักโปรตีนที่ปลากินตลอดการทดลอง (กรัม)}} \times 100$$

2.3.6.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของปลา

สุ่มเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของปลา 2 ตัวในแต่ละซ้ำของชุดการทดลองเมื่อทำการทดลองครบ 12 สัปดาห์ โดยเก็บเนื้อเยื่อเหงือก ตับ และไต ดองเนื้อเยื่อในน้ำยาฟอร์มาลีนเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรักษาสภาพของเนื้อเยื่อ นำเนื้อเยื่อไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อโดยใช้เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน แล้วนำมาตัดด้วย

เครื่องไมโครโตม (sliding microtome) หนา 3 ไมครอน และย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin ตามวิธีของ ตามวิธีมาตรฐานของ Bancroft (1967) และHumason (1979) เพื่อนำไปทำสไลด์ถาวร และนำไปตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อโดยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (Olympus AX 70) และบันทึกภาพโดยกล้อง cooled CCD (Olympus DP 71)

2.3.6.5 การศึกษาองค์ประกอบเลือดของปลา

วิเคราะห์องค์ประกอบเลือดพื้นฐาน โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการสุ่มปลาจากชุดการทดลองๆละ 3 ตัว สลบด้วยน้ำมันกานพลูที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 50 ppm จากนั้นทำการเจาะเลือดบริเวณโคนหาง โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาขนาด 25G x 1 นิ้ว นำตัวอย่างเลือดที่เจาะได้ส่วนหนึ่งนำไปหาปริมาณเม็ดเลือดแดง ปริมาณเม็ดเลือดขาว และค่าฮีมาโตคริต โดยวิธีดัดแปลงมาจาก Blazhall และ Daisley (1973) และปริมาณฮีโมโกลบิน โดยวิธี Cyanmet-haemoglobin ของ Larsen และ Snieszke (1961) อีกส่วนนำไปใส่หลอดไมโครทิวประมาณ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส (serum) นำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในซีรัม โดยได้ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

2.3.6.6 การวิเคราะห์เมลามีนตกค้างในปลา

เก็บตัวอย่างปลาดุกพันธุ์ผสมหลังจากทำการทดลองครบ 12 สัปดาห์ จากนั้นทำการแล่เอาแต่เนื้อปลาชุดการทดลองละ 500 กรัม และส่งตรวจวิเคราะห์หาเมลามีนตกค้างในเนื้อที่ศูนย์เครื่องมือกลาง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา โดยใช้เทคนิค Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (ภาคผนวก ข.)

2.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูล โดยการใช้การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน ANOVA ด้วย CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (version 11.5)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ลักษณะของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ

เมื่อเลี้ยงปลาด้วยอาหารทดลองผ่านไป 2 สัปดาห์ พบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เริ่มมีลักษณะสีผิวของลำตัวที่คล้ำขึ้น และในสัปดาห์ที่ 4 เริ่มมีลักษณะสีลำตัวเป็นสีดำสนิท (ดังตารางที่ 6) ส่วนปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ มีสีผิวของลำตัวที่คล้ำขึ้นในสัปดาห์ที่ 3 และในสัปดาห์ที่ 6 สีลำตัวของปลามีสีดำสนิท และปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีสีผิวของลำตัวที่คล้ำในสัปดาห์ที่ 4 และมีสีผิวของลำตัวที่คล้ำตลอดการทดลอง ในขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 (อาหารสูตรควบคุม) ไม่พบความผิดปกติของสีของลำตัวตลอดการทดลอง (ดังภาพที่ 6 - 13)

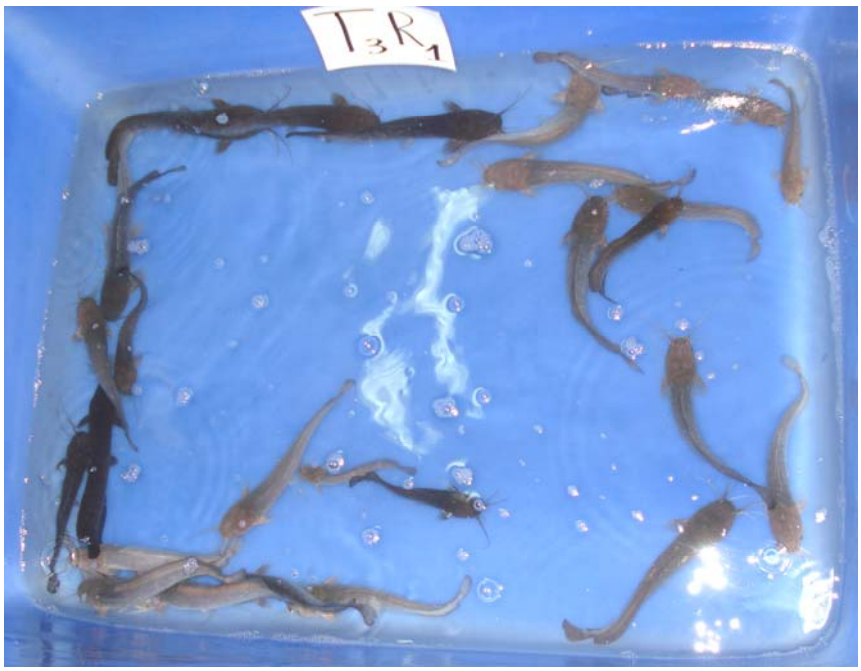
ตารางที่ 6 ลักษณะสีผิวของลำตัวของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองที่มีส่วนผสมของเมลามีนที่ระดับต่างๆ

ชุดการทดลอง	เมลามีน	สัปดาห์ที่ทำการทดลอง											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	0.5	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	1.0	-	-	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4	1.5	-	-	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5	2.0	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6	2.5	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
7	3.0	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

(-) สีผิวของลำตัวปกติ; (+) สีผิวของลำตัวที่คล้ำ; (++) สีผิวของลำตัวที่คล้ำขึ้น; (+++) สีผิวของลำตัวที่ดำสนิท

ภาพที่ 6 แสดงลักษณะสีลำตัวของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองชุดควบคุม (สูตรที่ 1 ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน) ลักษณะสีลำตัวปกติ

ภาพที่ 7 แสดงลักษณะสีลำตัวของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 2 (มีส่วนผสมของเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์) ลักษณะสีลำตัวมีสีคล้ำ 18.62±2.01 เปอร์เซ็นต์

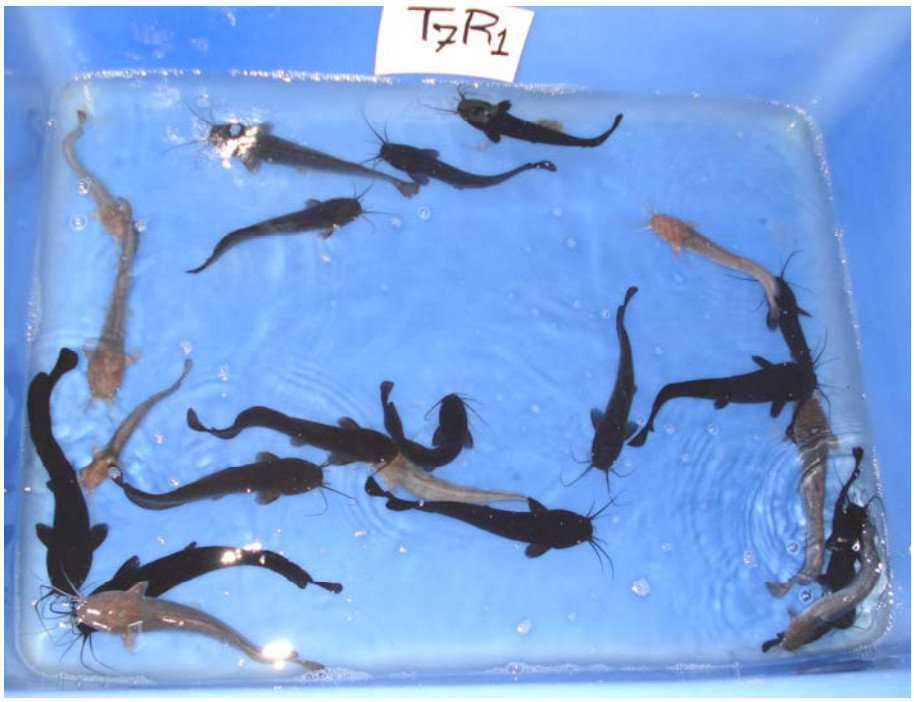


ภาพที่ 8 แสดงลักษณะสีลำตัวของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 3 (มีส่วนผสมของเมลามีน 1 เปอร์เซ็นต์) ลักษณะสีลำตัวมีสีคล้ำ 25.13±5.13 เปอร์เซ็นต์ และลำตัวมีสีดำ 17.09±6.40 เปอร์เซ็นต์

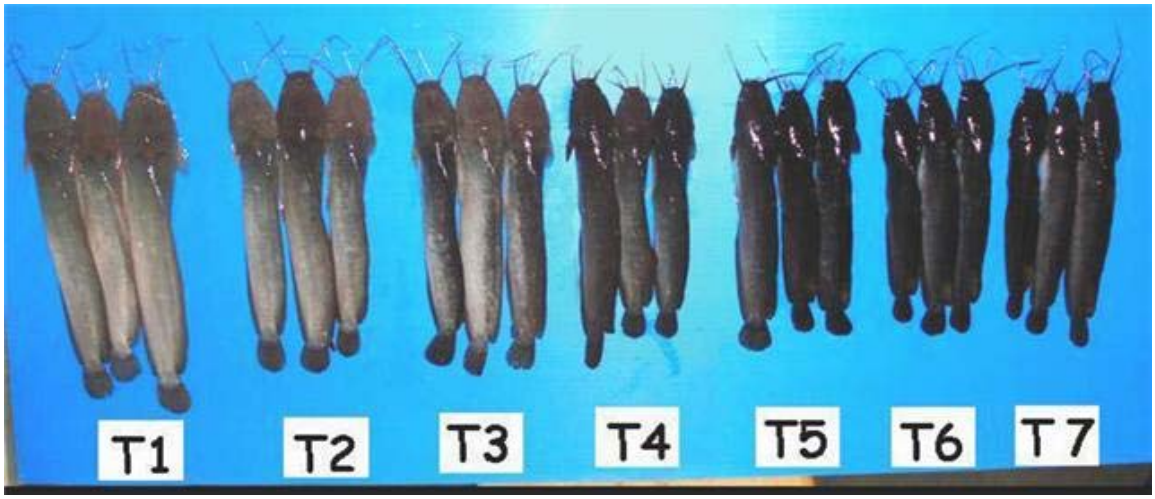
ภาพที่ 9 แสดงลักษณะสีลำตัวของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 4 (มีส่วนผสมของเมลามีน 1.5 เปอร์เซ็นต์) ลักษณะสีลำตัวมีสีคล้ำ 27.69±3.88 เปอร์เซ็นต์ และลำตัวมีสีดำ 25.35±6.51 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 10 แสดงลักษณะสีลำตัวของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 5 (มีส่วนผสมของเมลามีน 2 เปอร์เซ็นต์) ลักษณะสีลำตัวมีสีคล้ำ 31.56±8.02 เปอร์เซ็นต์ และลำตัวมีสีดำ 49.23±8.68 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 11 แสดงลักษณะสีลำตัวของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 6 (มีส่วนผสมของเมลามีน 2.5 เปอร์เซ็นต์) ลักษณะสีลำตัวมีสีคล้ำ 33.18±6.18 เปอร์เซ็นต์ และลำตัวมีสีดำ 54.51±9.46 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 12 แสดงลักษณะสีลำตัวของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 7 (มีส่วนผสมของเมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์) ลักษณะสีลำตัวมีสีคล้ำ 37.01±15.50 เปอร์เซ็นต์ และลำตัวมีสีดำ 54.98±10.16 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 13 แสดงเปรียบเทียบลักษณะสีลำตัวของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทั้ง 7 สูตร

3.2 การเจริญเติบโต

3.2.1. น้ำหนักตัวเฉลี่ยของปลาต่อตัว

ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงปลาดุกพันธุ์ผสมทั้งสิ้น 12 สัปดาห์ พบว่าน้ำหนักตัวเฉลี่ยของปลาต่อตัวเริ่มมีความแตกต่างกันในสัปดาห์ที่ 4 และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ในแต่ละชุดการทดลอง และเมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 12 พบว่าน้ำหนักตัวเฉลี่ยของปลาที่ได้รับอาหารทั้ง 7 สูตร ลดลงตามระดับของเมลามีนที่เพิ่มขึ้นในอาหาร โดยปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 (อาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน) มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 69.80±11.37 กรัมต่อตัว และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ ที่มีส่วนผสมของเมลามีนในอาหาร(อาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 7 (อาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์) ให้น้ำหนักเฉลี่ยที่ต่ำที่สุดคือ 43.36±4.15 กรัมต่อตัว ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 3, 4, 5 และ 6 (อาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 1, 1.5, 2 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวคือ 53.25±9.08, 51.70±4.38, 46.86±4.24 และ 45.28±5.13 กรัมต่อตัว ตามลำดับ ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การเจริญเติบโตของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนที่ระดับต่างๆ กันตลอดระยะเวลา 12 สัปดาห์ [1] (กรัมต่อตัว)

ชุดการทดลอง	เมลามีน	สัปดาห์ (กรัมต่อตัว)						
		0	**2**	**4**	**6**	**8**	**10**	**12**
1	0	4.01±0.02	7.48±0.37	13.07±1.05^{d}	21.06±2.51^{b}	33.79±2.49^{c}	52.16±8.50^{c}	69.80±6.89^{c}
2	0.5	4.00±0.02	7.38±0.57	12.07±0.98^{cd}	19.69±1.94^{b}	30.65±3.50^{bc}	45.53±4.84^{bc}	58.63±7.19^{b}
3	1.0	4.01±0.01	6.72±0.21	11.43±0.68^{bc}	18.49±1.21^{ab}	29.45±2.70^{bc}	40.60±4.12^{ab}	52.58±7.93^{ab}
4	1.5	4.00±0.02	6.79±0.53	11.73±1.01^{bc}	18.85±1.92^{ab}	30.08±3.27^{bc}	41.48±3.09^{ab}	51.70±4.38^{ab}
5	2.0	4.00±0.02	6.41±0.29	11.33±0.81^{ab}	18.29±0.63^{ab}	27.38±0.30^{ab}	37.65±1.76^{ab}	46.86±4.24^{a}
6	2.5	4.00±0.02	6.38±0.16	11.15±0.51^{ab}	18.12±0.93^{ab}	27.01±1.09^{ab}	35.82±4.58^{a}	45.28±5.13^{a}
7	3.0	4.00±0.01	5.95±0.11	9.88±0.36^{a}	16.63±0.49^{a}	24.69±0.35^{a}	33.85±2.68^{a}	43.36±4.15^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p>0.05)

3.2.2. น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการกินอาหาร และอัตราการรอดตาย

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลาดุกพันธุ์ผสม พบว่าปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลอง มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นลดลงตามระดับของเมลามีนที่เพิ่มขึ้นในอาหาร โดยปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 (อาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน) มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงที่สุด คือ 1,642.42±169.03 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ (อาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ที่มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลาดุกพันธุ์ผสมลดลงเมื่อระดับของเมลามีนในอาหารเพิ่มขึ้น ซึ่งมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นลดลงเรียงตามลำดับดังนี้ 1,364.30±183.53, 1,213.26±201.06, 1,191.52±103.81, 1,070.36±111.82, 1,031.20±134.21 และ 982.61±100.97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังตารางที่ 8

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลาปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าสอดคล้องกับน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นโดยมีค่าลดลงเมื่อระดับของเมลามีนในอาหารเพิ่มขึ้น ซึ่งปลาที่ได้รับอาหารในสูตรที่ 1 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุด คือ 5.09±0.28 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะอยู่ที่ 4.78±0.23 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ในขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารในสูตรที่ 7 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำที่สุด (p<0.05) คือ 4.25±0.17 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 3, 4, 5 และ 6 โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 4.32±0.21 ถึง 4.60±0.29 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ดังตารางที่ 8

อัตราการกินอาหารของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร พบว่าอัตราการกินอาหารไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 2.72±0.45 ถึง 3.21±0.38 เปอร์เซ็นต์ต่อตัวต่อวัน ดังตารางที่ 8

อัตราการรอดตายของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตรนี้พบว่าอัตราการรอดตายของปลาดุกพันธุ์ผสมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 87.77±3.85 ถึง 93.33±3.34 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการกินอาหาร และ อัตราการรอดตายของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนที่ระดับต่างๆ กันตลอดระยะเวลา 12 สัปดาห์ [1]

ชุดการทดลอง	เมลามีน (เปอร์เซ็นต์)	การเจริญเติบโตของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนที่ระดับต่างๆ กัน			
		น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น[2] (เปอร์เซ็นต์)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ[3] (เปอร์เซ็นต์ต่อวัน)	อัตราการกินอาหาร[4] (เปอร์เซ็นต์ต่อตัวต่อวัน)	อัตราการรอดตาย[5] (เปอร์เซ็นต์)
1	0	1,642.42±281.98^{c}	5.09±0.28^{c}	2.72±0.45^{a}	93.33±3.34^{a}
2	0.5	1,364.30±183.53^{b}	4.78±0.23^{bc}	2.87±0.35^{a}	88.89±8.39^{a}
3	1.0	1,213.26±201.06^{ab}	4.60±0.29^{ab}	2.74±0.27^{a}	92.22±5.09^{a}
4	1.5	1,191.52±103.81^{ab}	4.56±0.14^{ab}	2.82±0.17^{a}	92.22±1.9^{a}
5	2.0	1,070.36±111.82^{a}	4.39±0.17^{ab}	3.09±0.32^{a}	87.77±3.85^{a}
6	2.5	1,031.20±134.21^{a}	4.32±0.21^{ab}	3.21±0.38^{a}	87.78±8.39^{a}
7	3.0	982.61±100.97^{a}	4.25±0.17^{a}	3.10±0.17^{a}	90.00±3.33^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

[2] น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%) = (น้ำหนักสุดท้าย – น้ำหนักเริ่มต้น)/ น้ำหนักเริ่มต้น× 100

[3] อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (%) = (ln น้ำหนักสุดท้าย - ln น้ำหนักเริ่มต้น)/ วัน× จำนวนตัว

[4] อัตราการกินอาหาร (%ต่อตัวต่อวัน) = (น้ำหนักอาหาร × 100)/ (((น้ำหนักเริ่มต้น-น้ำหนักสุดท้าย)/ 2) × ((จำนวนปลาสุดท้าย – จำนวนปลาเริ่มต้น)/ 2) × ระยะเวลา)

[5] อัตราการรอดตาย (%) = ((จำนวนปลาสุดท้าย – จำนวนปลาเริ่มต้น)/ จำนวนปลาเริ่มต้น) × 100

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p>0.05)

3.2.3. อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์

ตลอดระยะเวลาทั้งสิ้น 12 สัปดาห์ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตรนี้ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 1.24±0.11 ถึง 1.56±0.21 ดังตารางที่ 9

ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนของปลาดุกพันธุ์ผสมลดลงตามระดับของเมลามีนที่เพิ่มขึ้นในอาหาร โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) พบว่ามีประสิทธิภาพการใช้โปรตีนของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตรอยู่ระหว่าง 1.21±0.21 ถึง 2.14±0.21 โดยปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 (อาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน)มีประสิทธิการใช้โปรตีนสูงที่สุด คือ 2.14±0.21 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ ที่มีส่วนผสมของเมลามีนในอาหาร (อาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) ซึ่งมีประสิทธิภาพการใช้โปรตีนลดลงเรียงตามลำดับดังนี้ 1.81±0.28, 1.79±0.15, 1.66±0.12, 1.38±0.23, 1.30±0.13 และปลาที่ได้รับอาหารในสูตรที่ 7 (อาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์) มีประสิทธิการใช้โปรตีนต่ำที่สุดคือ 1.21±0.21 ตามลำดับ ดังตารางที่ 9

โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ของปลาดุกพันธ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร ตลอดระยะเวลา 12 สัปดาห์ มีความแตกต่างของโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยพบว่าเมื่อระดับของเมลามีนที่เพิ่มขึ้นในอาหาร มีผลต่อโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ของปลามีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 (อาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน) มีโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์สูงที่สุด คือ 33.04±3.24 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 4, 5, 6 และ 7 (อาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) ซึ่งมีโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ลดลงตามระดับของเมลามีนที่เพิ่มขึ้นในอาหาร โดยโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ของปลาดุกพันธุ์ผสมอยู่ระหว่าง 17.44±3.71 ถึง 23.88±1.90 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนที่ระดับต่างๆ กันตลอดระยะเวลา 12 สัปดาห์ [1]

ชุดการทดลอง	เมลามีน (เปอร์เซ็นต์)	การใช้ประโยชน์จากอาหารของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนที่ระดับต่างๆ กัน		
		อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ[2]	ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน[3]	โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ได้[4] (เปอร์เซ็นต์)
1	0	1.24±0.11^{a}	2.14±0.21^{d}	33.04±3.24^{d}
2	0.5	1.37±0.19^{a}	1.81±0.28^{cd}	28.00±4.30^{cd}
3	1.0	1.30±0.09^{a}	1.79±0.15^{cd}	26.13±2.26^{cd}
4	1.5	1.33±0.10^{a}	1.66±0.12^{bc}	23.88±1.94^{bc}
5	2.0	1.51±0.17^{a}	1.38±0.23^{ab}	19.87±2.54^{b}
6	2.5	1.52±0.07^{a}	1.30±0.13^{ab}	18.85±1.90^{ab}
7	3.0	1.56±0.21^{a}	1.21±0.21^{a}	17.44±3.71^{a}

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

[2]อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ= น้ำหนักอาหารที่ปลากิน / น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น

[3]ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน = น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น /น้ำหนักโปรตีนที่ปลากิน

[4]โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ = (โปรตีนสุดท้าย - โปรตีนเริ่มต้น) / น้ำหนักโปรตีนตลอดการทดลอง × 100

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p>0.05)

3.3 องค์ประกอบทางเคมีของปลาทั้งตัว

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของปลาเมื่อเริ่มต้นทดลอง และส่วนประกอบทางเคมีของปลาทั้งตัวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง แสดงไว้ดังตารางที่ 9 พบว่าค่าความชื้น ปริมาณโปรตีน และปริมาณเถ้าของปลาดุกพันธุ์ผสมทั้งตัวมีค่าเพิ่มสูงขึ้น เมื่อมีปริมาณของเมลามีนในอาหารที่เพิ่มสูงขึ้น

ค่าความชื้นของปลาดุกพันธุ์ผสมทั้งตัวเมื่อเริ่มต้นการทดลองมีความชื้น 73.97±0.38 เปอร์เซ็นต์ หลังจากที่ปลาดุกพันธุ์ผสมได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตรมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) พบว่าเมื่อปริมาณของเมลามีนในอาหารเพิ่มสูงขึ้นมีผลทำให้ค่าความชื้นของปลาทั้งตัวเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน โดยมีค่าความชื้นอยู่ระหว่าง 72.89±0.54 ถึง 75.67±0.72 เปอร์เซ็นต์ ปลาที่ได้รับอาหารในสูตรที่ 7 (อาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์) มีความชื้นสูงที่สุดคือ 75.67±0.72 เปอร์เซ็นต์ และปลาที่ได้รับอาหารในสูตรที่ 1 (อาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน) มีความชื้นต่ำที่สุดคือ 72.89±0.54 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 10

ปริมาณโปรตีนของปลาดุกพันธุ์ผสมทั้งตัวเมื่อเริ่มต้นการทดลองมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 62.71±0.86 เปอร์เซ็นต์ หลังจากที่ปลาดุกพันธุ์ผสมได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร พบว่าปริมาณของเมลามีนในอาหารที่เพิ่มสูงขึ้นมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนของปลาทั้งตัวเพิ่มสูงขึ้น โดยปลาที่ได้รับอาหารในสูตรที่ 7 (อาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์) มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบสูงที่สุดคือ 58.68±0.86 เปอร์เซ็นต์ ปลาที่ได้รับอาหารในสูตรที่ 1 (อาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน)มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบต่ำที่สุดคือ 54.37±0.84 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตรมีปริมาณโปรตีนเป็นองค์ประกอบที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ดังตารางที่ 10

ปริมาณไขมันของปลาดุกพันธุ์ผสมทั้งตัวเมื่อเริ่มต้นการทดลองมีไขมันเป็นองค์ประกอบ 14.16±0.57 เปอร์เซ็นต์ หลังจากที่ปลาดุกพันธุ์ผสมได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร พบว่าปริมาณไขมันในปลาทั้งตัวมีแนวโน้มลดลงตามปริมาณของเมลามีนในอาหารที่เพิ่มสูงขึ้น โดยปลาที่ได้รับอาหารในสูตรที่ 1 (อาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน)มีไขมันเป็นองค์ประกอบสูงที่สุดคือ 27.04±0.56 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารในสูตรที่ 2, 3,4 และ 5 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 24.93±0.52 ถึง 25.98±0.48 เปอร์เซ็นต์ ปลาที่ได้รับอาหารในสูตรที่ 6 มีไขมันเป็นองค์ประกอบ 27.04±0.56 เปอร์เซ็นต์ และปลาที่ได้รับอาหารในสูตรที่ 7 (อาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์) มีไขมันเป็นองค์ประกอบต่ำที่สุดคือ 21.16±0.77 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 10

ปริมาณเถ้าของปลาดุกพันธุ์ผสมทั้งตัวเมื่อเริ่มต้นการทดลองมีเถ้าเป็นองค์ประกอบ 14.58±0.08 เปอร์เซ็นต์ หลังจากที่ปลาดุกพันธุ์ผสมได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร พบว่าเมื่อปริมาณของเมลามีนในอาหารที่เพิ่มสูงขึ้นมีผลทำให้ปริมาณเถ้าในปลาทั้งตัวเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน ซึ่งมีปริมาณเถ้าที่เป็นองค์ประกอบอยู่ระหว่าง 12.19±0.38 ถึง 15.26±0.78 เปอร์เซ็นต์ โดยปลาที่ได้รับอาหารในสูตรที่ 7 (อาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์) มีเถ้าเป็นองค์ประกอบสูงที่สุดคือ 21.16±0.77 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) กับปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองชุดควบคุม (อาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน) ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 องค์ประกอบทางเคมีของปลาดุกพันธุ์ผสมทั้งตัวที่ได้รับอาหารมีส่วนผสมของเมลามีนที่ระดับต่างๆ กันตลอดระยะเวลา 12 สัปดาห์ [1](%)

ชุดการทดลอง	เมลามีน (เปอร์เซ็นต์)	คุณค่าทางโภชนาการของปลาดุกพันธุ์ผสมทั้งตัว			
		ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
ปลาเริ่มต้น	I^0	73.97±0.38^{b}	62.71±0.86^{f}	14.16±0.57^{a}	14.58±0.08^{de}
1	0	72.89±0.54^{a}	54.37±0.84^{a}	27.04±0.56^{e}	12.19±0.38^{a}
2	0.5	72.96±0.43^{a}	55.09±0.72^{ab}	25.98±0.48^{d}	12.73±0.10^{ab}
3	1	74.18±0.27^{b}	55.64±0.93^{bc}	25.18±0.44^{d}	12.99±0.36^{abc}
4	1.5	74.84±0.36^{bc}	56.09±0.78^{cd}	25.31±0.76^{d}	13.25±0.40^{bc}
5	2	74.93±0.50^{bc}	56.82±0.72^{cd}	24.93±0.52^{d}	13.92±0.85^{cd}
6	2.5	75.26±0.69^{bc}	57.38±1.00^{d}	23.34±0.68^{c}	14.97±0.72^{e}
7	3	75.67±0.72^{c}	58.83±0.86^{e}	21.16±0.77^{b}	15.26±0.78^{e}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

I^0 คือ ปลาเริ่มต้นทดลอง

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p>0.05)

3.4. องค์ประกอบเลือดพื้นฐานของปลาดุกพันธุ์ผสม

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร แสดงในตารางที่ 11 พบว่า ค่าฮีมาโตคริต ปริมาณเม็ดเลือดขาว โปรตีนในซีรัม และปริมาณฮีโมโกลบินรวม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ในแต่ละชุดการทดลอง ปริมาณเม็ดเลือดแดง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) ดังตารางที่ 11

ค่าฮีมาโตคริตของปลาที่ได้รับอาหารในสูตรที่ 1 (อาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน) มีค่าสูงที่สุด คือ 43.91±1.91 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารในสูตรอื่นๆ คือ สูตรที่ 2-7 (อาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ดังตารางที่ 11

ปริมาณเม็ดเลือดแดงของปลาดุกพันธุ์ผสม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) โดยปริมาณเม็ดเลือดแดงมีค่าอยู่ระหว่าง $23.08\times 10^{6}\pm 1.86\times 10^{6}$ ถึง $25.08\times 10^{6}\pm 1.86\times 10^{6}$ เซลล์ต่อลบ มม. ดังตารางที่ 11

ปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร มีแนวโน้มที่จะลดลงเรื่อย ๆ ตามระดับของเมลามีนที่เพิ่มสูงขึ้นในอาหาร โดยปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 มีปริมาณเม็ดเลือดขาวมากที่สุด คือ $6.53\times 10^{5}\pm 0.62\times 10^{5}$ เซลล์ต่อลบ มม. ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ ที่มีส่วนผสมของเมลามีนในอาหาร ซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดขาวอยู่ระหว่าง $2.68\times 10^{5}\pm 0.20\times 10^{5}$ ถึง $3.78\times 10^{5}\pm 0.32\times 10^{5}$ เซลล์ต่อลบ มม. ดังตารางที่ 11

ปริมาณโปรตีนในซีรัมของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) พบว่ามีปริมาณลดลงตามระดับของเมลามีนที่เพิ่มสูงขึ้นในอาหาร โดยมีปริมาณโปรตีนในซีรัมมีค่าอยู่ระหว่าง 3.75±0.21 ถึง 4.60±0.14 กรัมเปอร์เซ็นต์ โดยปลาที่ได้รับอาหารในสูตรที่ 6 (อาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 2.5 เปอร์เซ็นต์)มีปริมาณโปรตีนในซีรัมน้อยที่สุดคือ 3.75±0.21 กรัมเปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 11

ปริมาณฮีโมโกลบินรวมของปลาดุกพันธุ์ผสม พบว่าปริมาณฮีโมโกลบินรวมมีค่าสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนในซีรัม โดยเมื่อปริมาณของเมลามีนในอาหารเพิ่มสูงขึ้นมีผลทำให้ปริมาณฮีโมโกลบินรวมลดลงเช่นเดียวกัน ซึ่งมีปริมาณฮีโมโกลบินรวมของปลาดุกพันธุ์ผสมอยู่ระหว่าง 5.71±3.20 ถึง 15.89±0.45 กรัมต่อเดซิลิตร โดยปลาที่ได้รับอาหารในสูตรที่ 7 (อาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์)มีปริมาณฮีโมโกลบินรวมน้อยที่สุดคือ 5.71±3.20 กรัมต่อเดซิลิตร ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ค่าฮีมาโตคริต ปริมาณเม็ดเลือดแดง และปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนที่ระดับต่างๆ กันตลอดระยะเวลา 12 สัปดาห์ [1]

ชุดการทดลอง	เมลามีน (เปอร์เซ็นต์)	องค์ประกอบเลือดของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนที่ระดับต่างๆ กัน				
		ฮีมาโตคริต[2] (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณเม็ดเลือดแดง[3] ($x10^6 cell/mm^3$)	ปริมาณเม็ดเลือดขาว[4] ($x10^5 cell/mm^3$)	โปรตีนในซีรัม [5] (กรัมเปอร์เซ็นต์)	ปริมาณฮีโมโกลบินรวม (กรัมต่อเดซิลิตร)
1	0	43.91 ± 1.91^{b}	24.88 ± 1.29^{a}	6.53 ± 0.62^{d}	4.20 ± 0.28^{ab}	12.60 ± 3.25^{b}
2	0.5	36.59 ± 2.52^{a}	23.18 ± 1.61^{a}	3.53 ± 0.35^{bc}	3.75 ± 0.21^{a}	14.49 ± 0.39^{bc}
3	1.0	34.28 ± 3.84^{a}	25.08 ± 1.86^{a}	3.78 ± 0.32^{c}	4.20 ± 0.43^{ab}	15.89 ± 0.45^{c}
4	1.5	34.41 ± 2.61^{a}	24.44 ± 1.72^{a}	3.19 ± 0.34^{ab}	4.60 ± 0.14^{b}	14.99 ± 1.02^{bc}
5	2.0	35.85 ± 1.55^{a}	24.01 ± 1.70^{a}	2.83 ± 0.32^{a}	4.25 ± 0.21^{ab}	14.82 ± 0.75^{bc}
6	2.5	34.58 ± 1.87^{a}	23.08 ± 1.86^{a}	2.79 ± 0.38^{a}	3.75 ± 0.64^{a}	6.35 ± 1.94^{a}
7	3.0	35.20 ± 1.83^{a}	23.15 ± 1.38^{a}	2.68 ± 0.20^{a}	3.80 ± 0.28^{a}	5.71 ± 3.20^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 6 ซ้ำ)

[2]ฮีมาโตคริต (%) = [ปริมาตรเม็ดเลือดอัดแน่น(mm)/ ปริมาตรเม็ดเลือดทั้งหมด(mm)]× 100

[3]ปริมาณเม็ดเลือดแดง = ปริมาณเม็ดเลือดแดงที่นับได้ในวงกลมเล็กรวมกัน 5 ช่อง $\times 10^4$

[4]ปริมาณเม็ดเลือดขาว = ปริมาณเม็ดเลือดขาวที่นับได้ในวงกลมใหญ่รวม 4 ช่องหาร 4 × 2,000

[5]จากการส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$)

3.5 การศึกษาปริมาณเมลามีนในเนื้อปลา

หลังจากทำการทดลองครบ 12 สัปดาห์ เมื่อทำการวิเคราะห์เมลามีนในเนื้อปลา พบว่าเนื้อปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 (ชุดควบคุม) ตรวจไม่พบเมลามีนในเนื้อปลา ส่วนเนื้อปลาที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 2 ถึงสูตรที่ 7 (อาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์) มีปริมาณเมลามีนเพิ่มขึ้นตามระดับของเมลามีนที่ผสมในอาหาร โดยอาหารทดลองสูตรที่ 2 ถึงสูตรที่ 7 มีสารเมลามีนตกค้างในเนื้ออยู่ระหว่าง 63-450 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของเนื้อปลา ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเมลามีนในเนื้อปลาดุกพันธุ์ผสม (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

ชุดการทดลอง	ปริมาณเมลามีน (mg/kg)
1	Not detected*
2	63.00
3	114.00
4	144.00
5	267.00
6	264.00
7	450.00

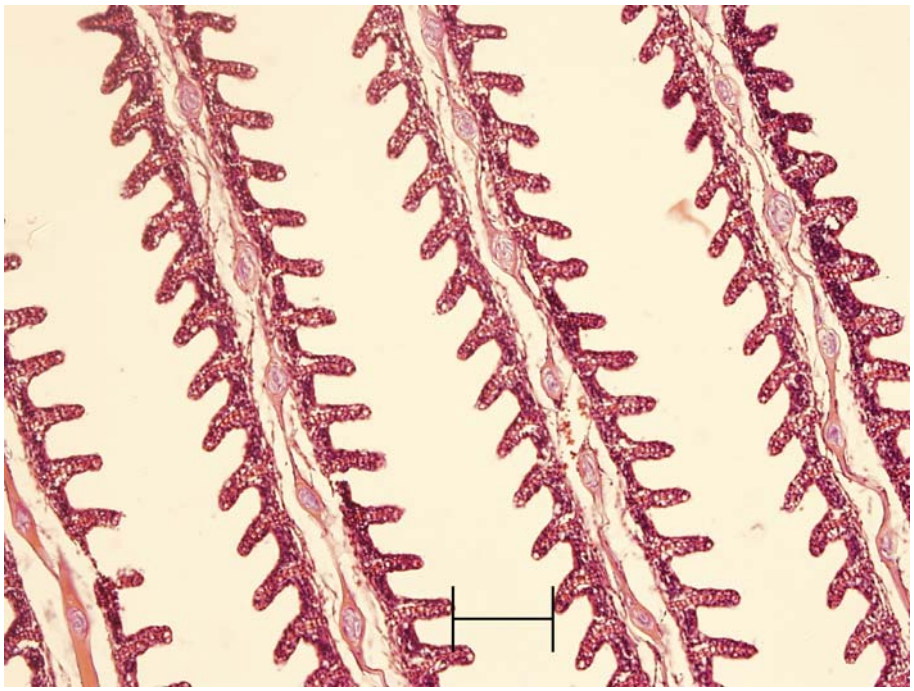
*หมายเหตุ Not detected คือ ไม่พบเมลามีนจากตัวอย่างเนื้อปลาที่ส่งตรวจวิเคราะห์

3.6 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของปลาดุกพันธุ์ผสม

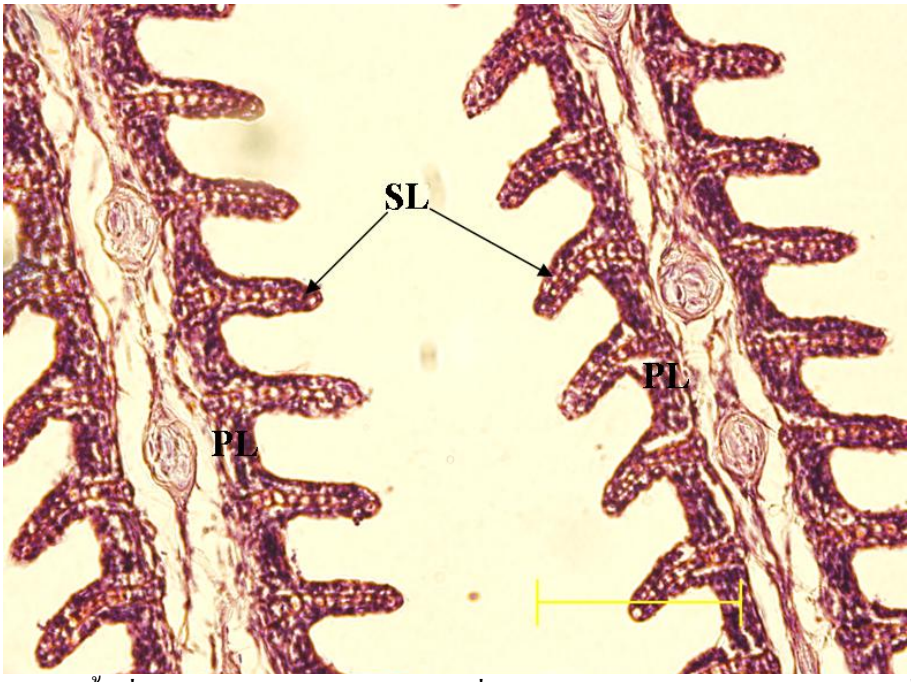
จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อเหงือก ตับ และไต ของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าเกิดความผิดปกติของเนื้อเยื่อเหงือกมากขึ้นเมื่อระดับของเมลามีนในอาหารเพิ่มขึ้น โดยเริ่มจากปลาที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 2 (อาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์) โดยมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) ที่ secondary lamellae บริเวณกิ่งเหงือก (gill lamellae) (ภาพที่ 16 และ 17) ส่วนปลาได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 3 (อาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 1 เปอร์เซ็นต์) มีการแยกตัวของ epithelium cell (epithelial lifting) (ภาพที่ 18 และ 19) และปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 5-7 (อาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์) มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) บริเวณกิ่งเหงือก ที่ secondary lamellae และมีการแยกตัวของ epithelium cell ซึ่งจะพบความผิดปกตินี้ควบคู่กัน (ภาพที่ 20 และ 21) และพบความรุนแรงมากขึ้นเมื่อระดับของเมลามีนในอาหารที่เพิ่มขึ้น

ในส่วนของเนื้อเยื่อตับ พบว่าปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 2 และ 3 ไม่พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับ (ภาพที่ 24 และ 25) แต่พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับในปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 4-6 โดยมีการเสื่อมสลายของเซลล์บางส่วนทำให้เซลล์ไม่เกาะตัวกัน และเห็นขอบเขตของเซลล์ไม่ชัดเจน (ภาพที่ 26 และ 27) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 7 มีลักษณะของเซลล์ที่ผิดปกติโดยไม่มีไขมันสะสมในเซลล์ มีการขยายตัวของ Sinusoid และไม่เห็นขอบเขตของเซลล์ (ภาพที่ 28)

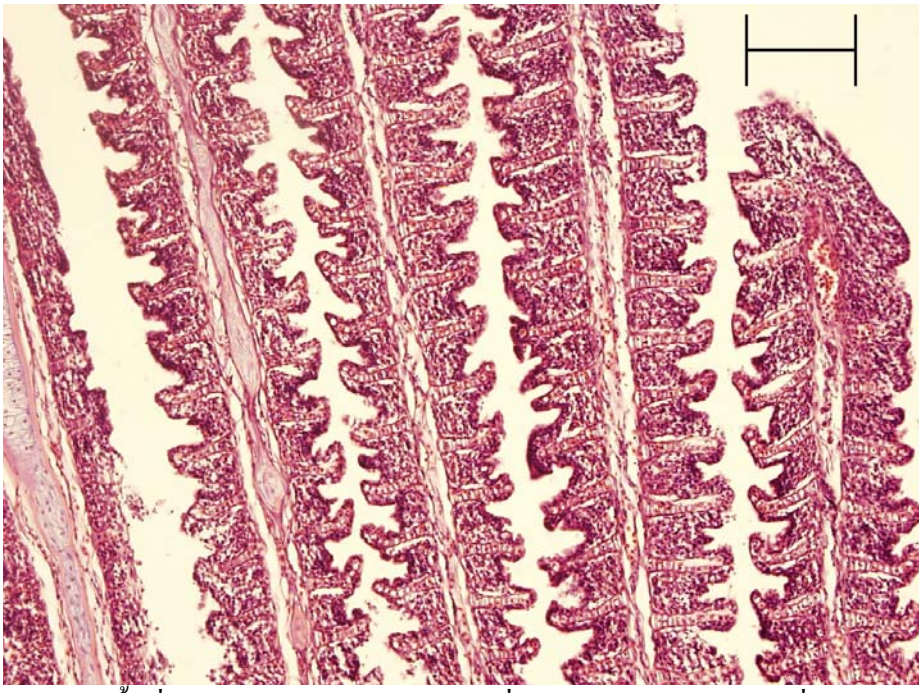
ในส่วนของเนื้อเยื่อไต พบมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเนื้อเยื่อไต ของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 2-7 โดยมีการเสื่อมสลายของ epithelium cell บางส่วนของท่อไต (ภาพที่ 30) มีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (Glomerulus) มีการตายของอวัยวะสร้างเม็ดเลือด(Haemopoietic tessue) (ภาพที่ 31, 32 และ 33) และการเสื่อมสลายของท่อไตบางส่วน และจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีความรุนแรงมากขึ้นตามระดับของเมลามีนในอาหารที่เพิ่มขึ้น



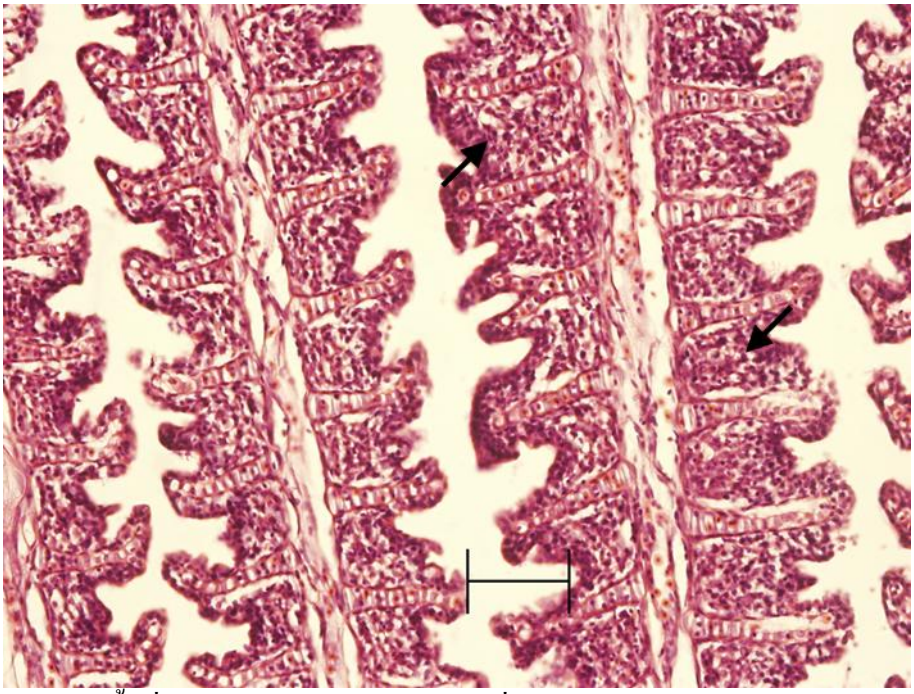
ภาพที่ 14 แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองชุดควบคุม (สูตรที่ 1 ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน) ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกปกติ (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)



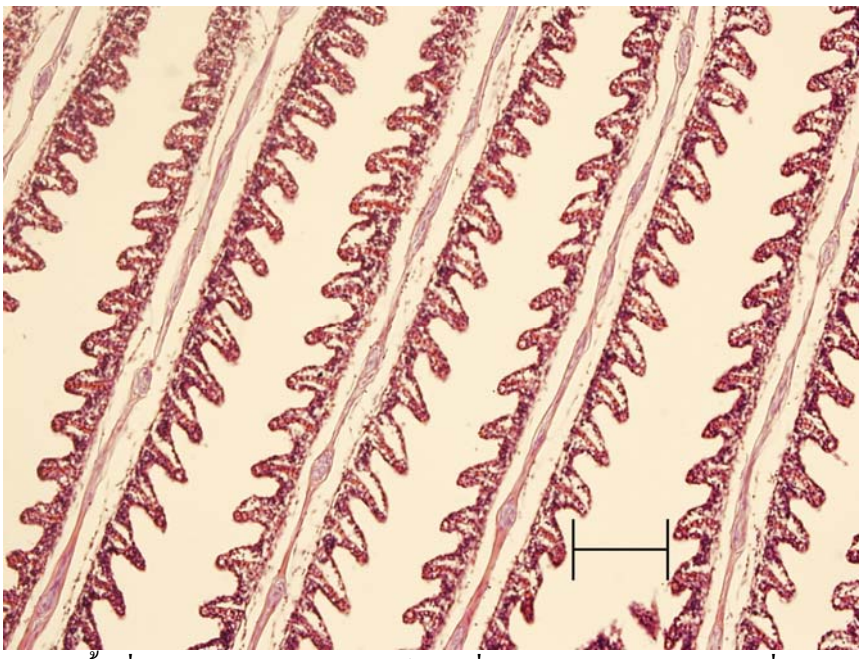
ภาพที่ 15 แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองชุดควบคุม (สูตรที่ 1 ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน) ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกปกติ (H&E stained, Bar = 100 µm, 40x) PL- primary lamellae; SL- secondary lamellae



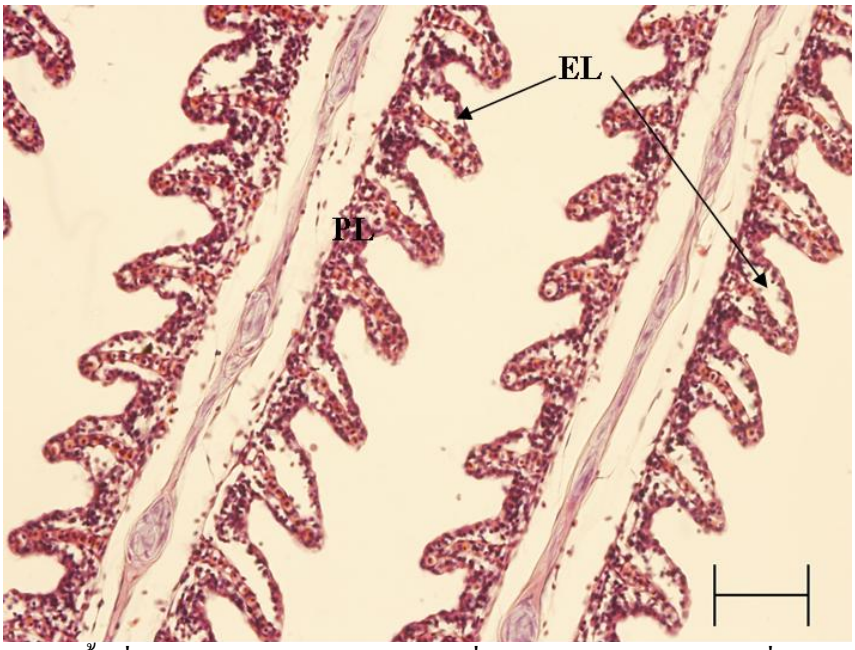
ภาพที่ 16 แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 2 (มีส่วนผสมของเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์) ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) ที่Gill lamellae (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)



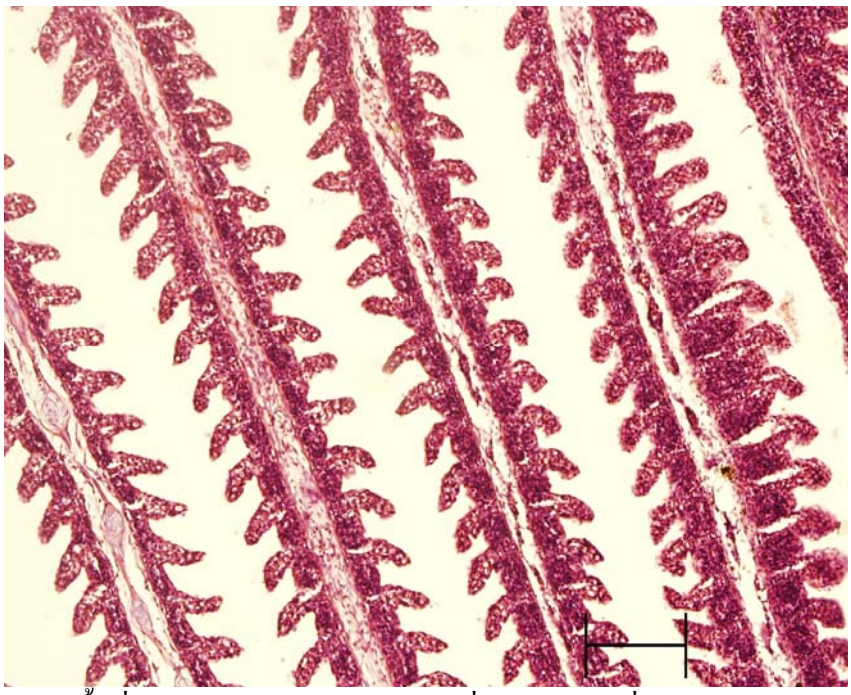
ภาพที่ 17 แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองมีส่วนผสมของเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) ที่Gill lamellae (ศรชี้) (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)



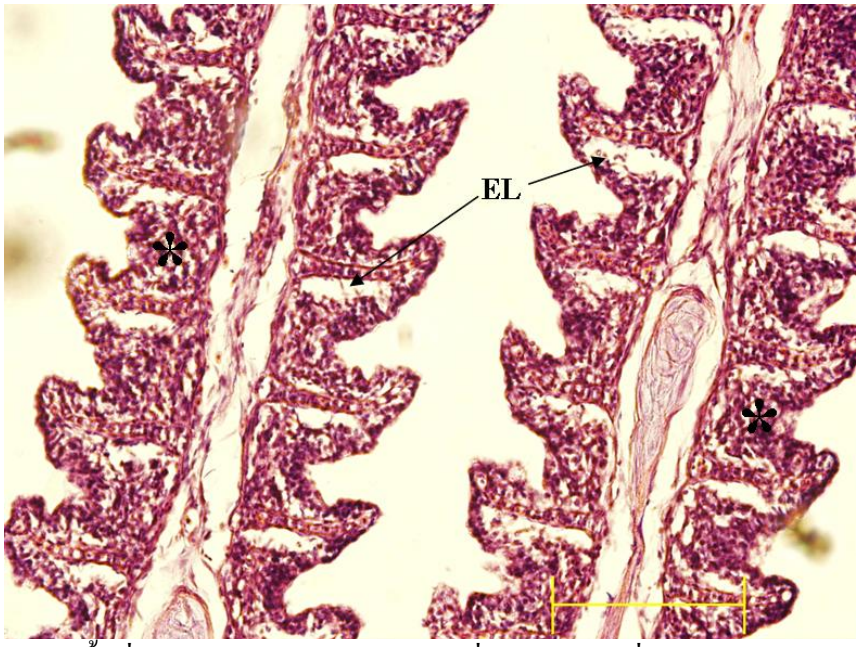
ภาพที่ 18 แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 3 (มีส่วนผสมของเมลามีน 1 เปอร์เซ็นต์) ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) และ เกิดช่องว่างของเซลล์ที่ Gill lamellae (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)



ภาพที่ 19 แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 3 (มีส่วนผสมของเมลามีน 1 เปอร์เซ็นต์) ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) และ เกิดช่องว่างของเซลล์ที่ Gill lamelae (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x) PL- primary lamellae; EL - epithelial lifting



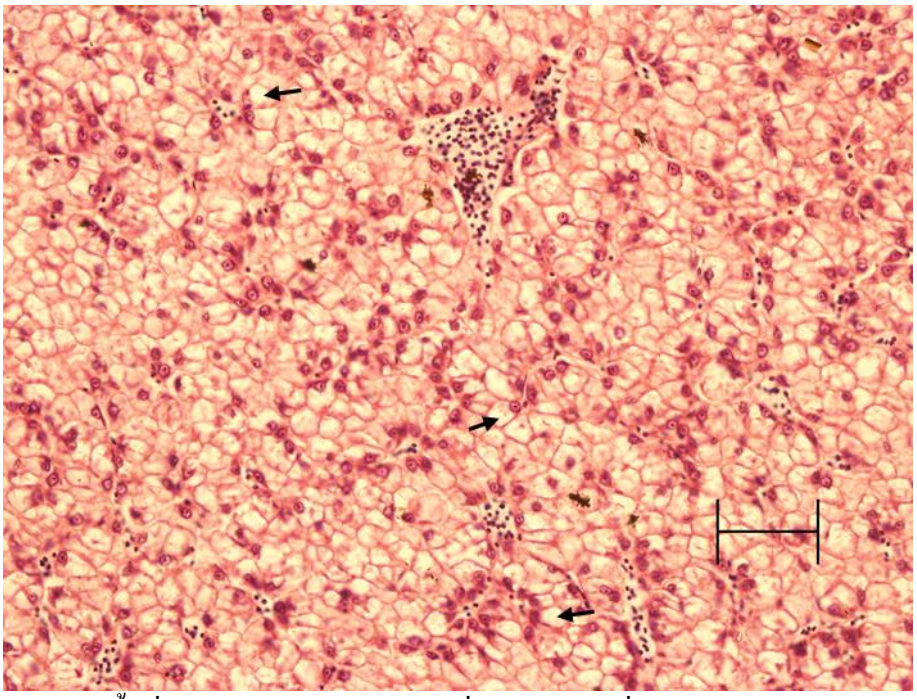
ภาพที่ 20 แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 2 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) ที่ Gill lamellae มากขึ้น (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)



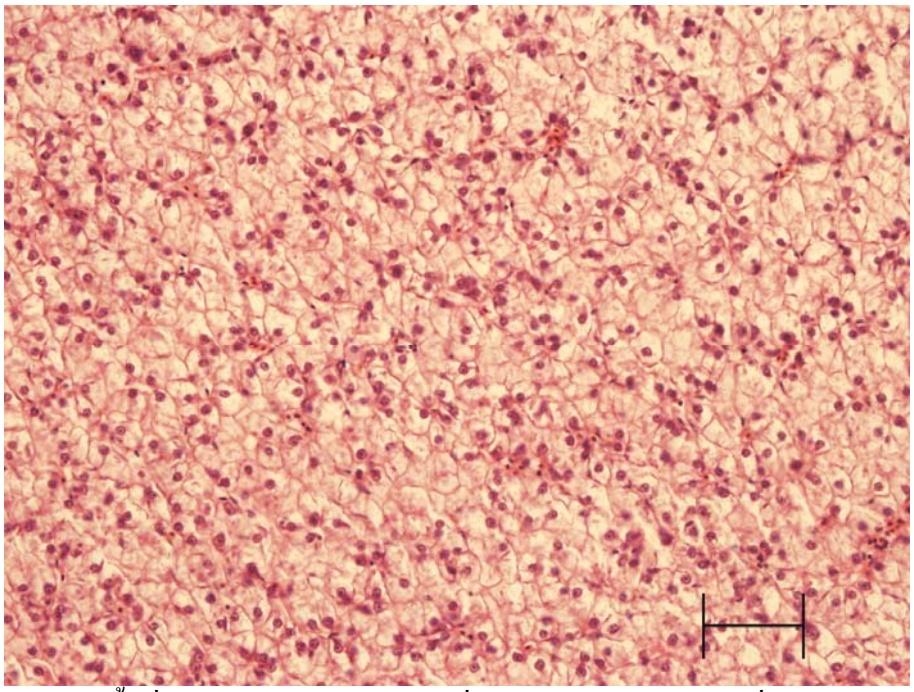
ภาพที่ 21 แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 2 เปอร์เซ็นต์ มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ(hyperplasia) บริเวณ Gill lamellae **(*)** และมีการแยกตัวของ epithelium cell (H&E stained, Bar = 100 µm, 40x) ; EL – epithelial lifting

ภาพที่ 22 แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 2.5 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) ที่ Gill lamellae มากขึ้น (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)

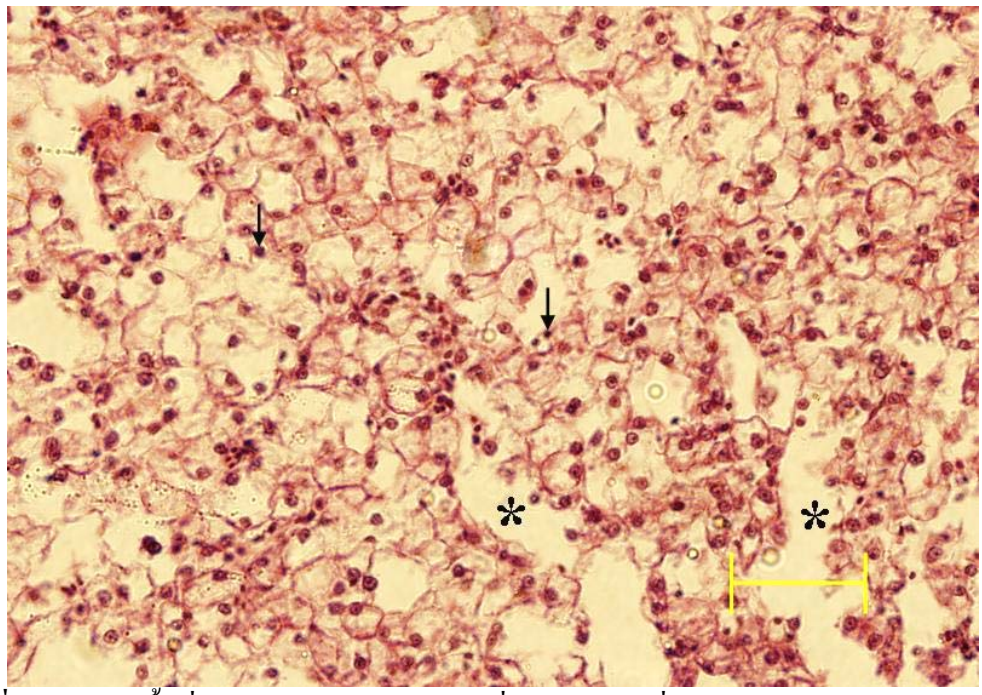
ภาพที่ 23 แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารมีส่วนผสมของเมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) ที่ Gill lamellae รุนแรงมาก (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)



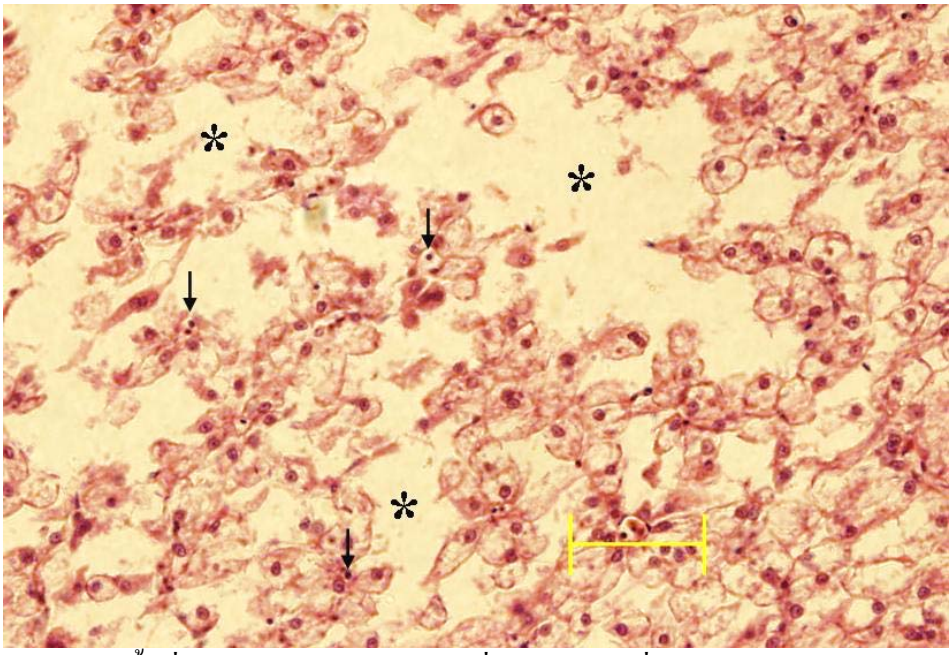
ภาพที่ 24 แสดงเนื้อเยื่อตับของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน ลักษณะเนื้อเยื่อตับปกติ (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)



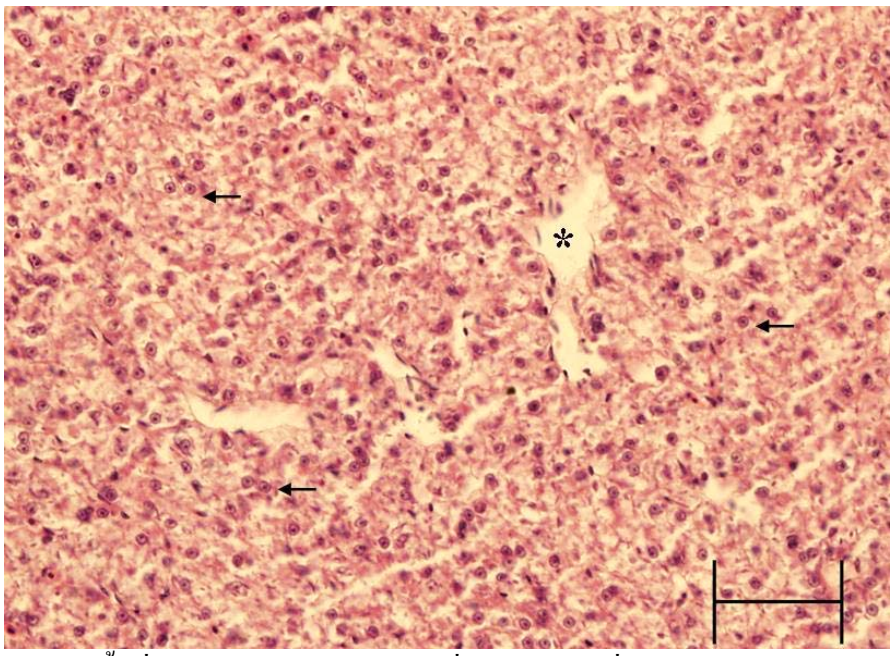
ภาพที่ 25 แสดงเนื้อเยื่อตับของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 2 (มีส่วนผสมของเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์) ลักษณะเนื้อเยื่อตับปกติ (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)



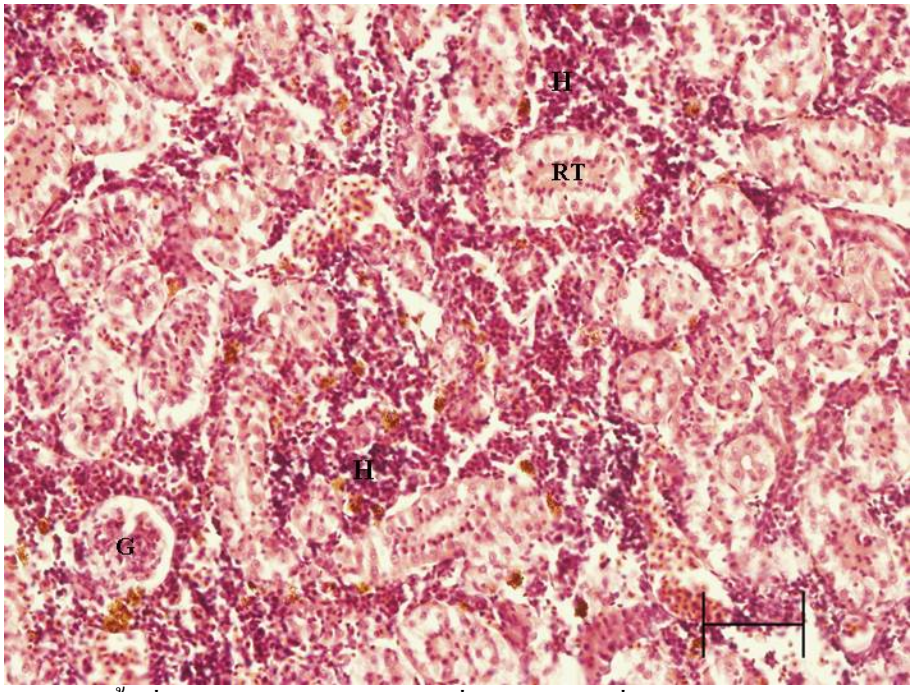
ภาพที่ 26 แสดงเนื้อเยื่อตับของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 1.5 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะเนื้อเยื่อตับมีการตายของเซลล์บางส่วน (ศรชี้) ขอบเขตของเซลล์ไม่ชัดเจน และมีการเสื่อมสลายทำให้เซลล์ไม่เกาะตัวกัน (*) (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)



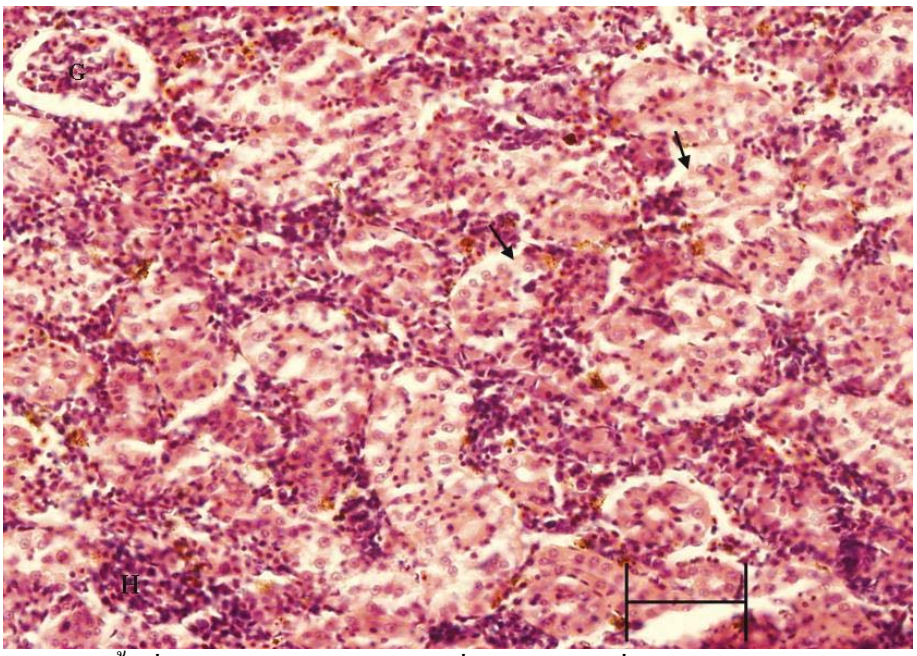
ภาพที่ 27 แสดงเนื้อเยื่อตับของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 2.5 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะเนื้อเยื่อตับมีการเสื่อมสลายของเซลล์บางส่วนทำให้เซลล์ไม่เกาะตัวกัน (*) และมีการตายของเซลล์ตับ (ศรชี้) (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)



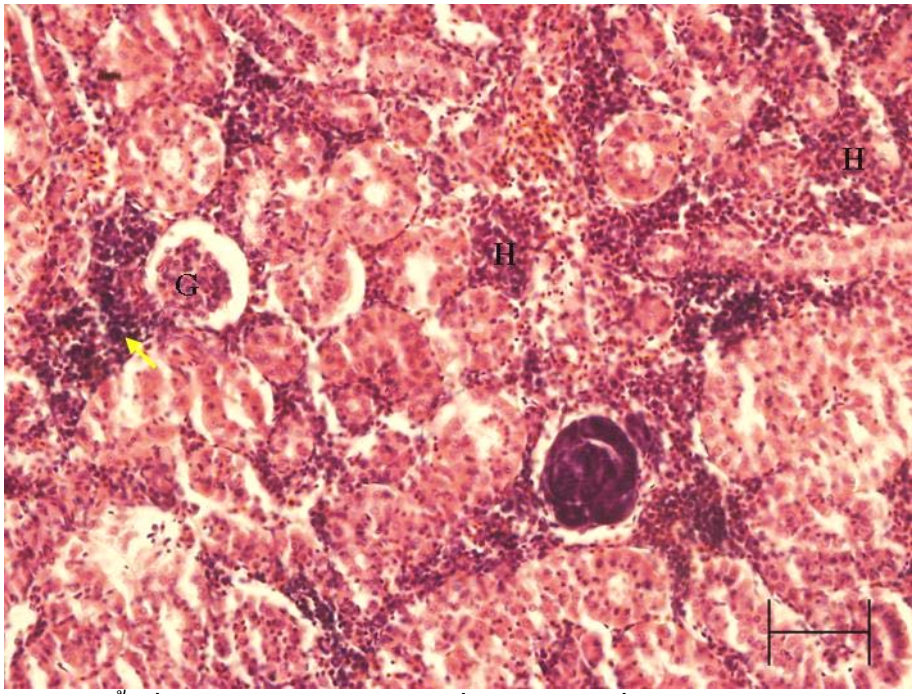
ภาพที่ 28 แสดงเนื้อเยื่อตับของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะเนื้อเยื่อตับมีลักษณะของเซลล์ที่ผิดปกติโดยไม่มีไขมันสะสมในเซลล์ (ศรชี้) มีการขยายตัวของ Sinusoidและไม่เห็นขอบเขตของเซลล์ (*) (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)



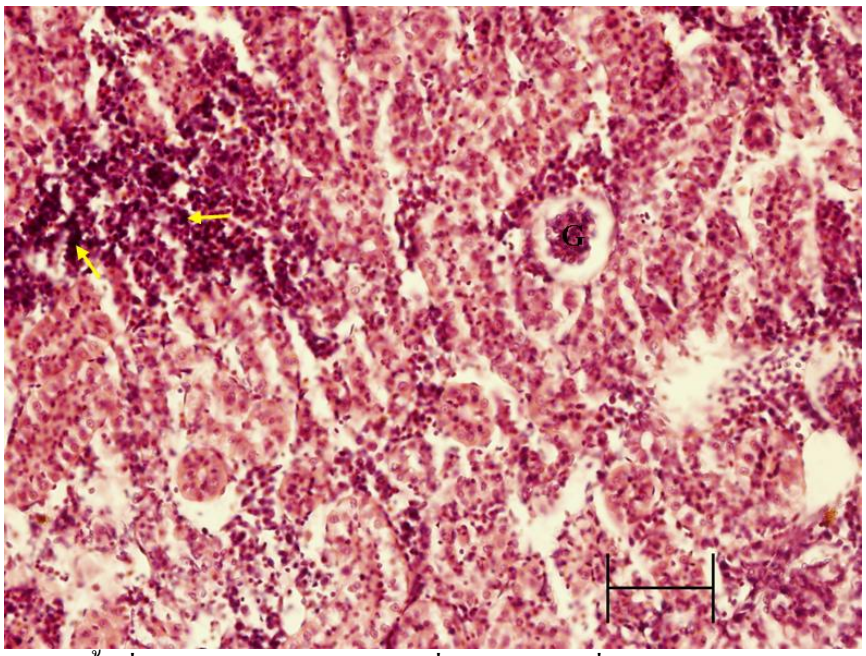
ภาพที่ 29 แสดงเนื้อเยื่อไตของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน ลักษณะเนื้อเยื่อไตปกติ (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x) G – Glomerulus; H – อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (Haemopoietic tissue); RT – renal tubules



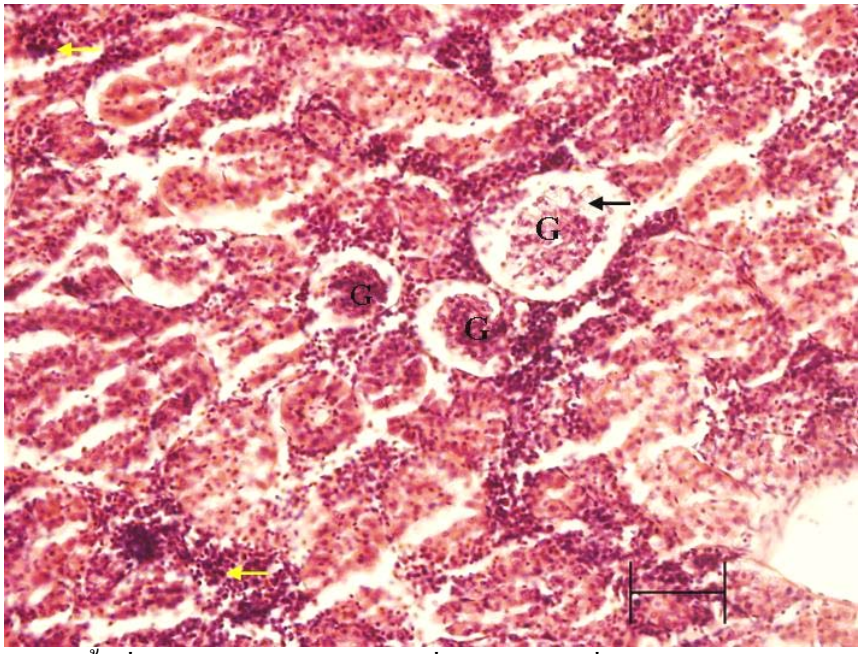
ภาพที่ 30 แสดงเนื้อเยื่อไตของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะเนื้อเยื่อไตมีการเสื่อมสลายของ epithelium cell บางส่วน (ศรชี้) และมีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (glomerulus) (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)



ภาพที่ 31 แสดงเนื้อเยื่อไตของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 1 เปอร์เซ็นต์) ลักษณะเนื้อเยื่อไตมีการเสื่อมสลายของท่อไตบางส่วน เริ่มมีการตายของอวัยวะสร้างเม็ดเลือด (ศรชี้) และมีการหดตัวของโกลเมอรูลัส(H&E stained, Bar = 50 µm, 40x) G – Glomerulus; H – อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (Haemopoietic tessue)



ภาพที่ 32 แสดงเนื้อเยื่อไตของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 1.5 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะเนื้อเยื่อไตมีการเสื่อมสลายของท่อไตมากขึ้น มีการตายของอวัยวะสร้างเม็ดเลือดมากขึ้น (ศรชี้) และมีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x) G – Glomerulus



ภาพที่ 33 แสดงเนื้อเยื่อไตของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 2.5 เปอร์เซ็นต์ ไตมีการเสื่อมสลายของท่อไตที่รุนแรงขึ้น มีการตายของอวัยวะสร้างเม็ดเลือดมากขึ้น (ศรชี้สีเหลือง) มีการหดตัวของโกลเมอรูลัส และมีการเสื่อมสลายของเซลล์เนื้อเยื่อไต (ศรชี้สีดำ) (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x) G – Glomerulus

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีนทุกระดับมีการเจริญเติบโต (น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย และน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น) และประสิทธิภาพการใช้อาหาร (อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ได้) ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน และมีแนวโน้มลดลงเมื่อมีระดับของเมลามีนในอาหารเพิ่มสูงขึ้น สาเหตุเกิดจากเมลามีนอาจเข้าไปมีผลต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมในร่างกายสัตว์ทำให้มีการเจริญเติบโตที่ลดลง และสัตว์น้ำไม่สามารถนำเมลามีนมาใช้ประโยชน์ได้เนื่องจากเมลามีนเป็นวัตถุที่มีแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนแท้ (non-protein nitrogen ; NPN) ซึ่งสอดคล้องกับ Smith และคณะ (1994) ที่รายงานว่าเมื่อเมลามีนเข้าสู่ร่างกายโดยการกิน จะถูกดูดซึมผ่านระบบทางเดินอาหารเข้าสู่กระแสเลือดแต่จะไม่ถูกนำมาเผาผลาญเป็นพลังงานที่ตับเหมือนกรดอะมิโนทั่วไป มีผลให้ปลามีการเจริญเติบโตที่ลดลง สังเกตได้จากอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ได้ของปลาซึ่งมีแนวโน้มที่ลดลงตามระดับของเมลามีนในอาหารที่เพิ่มขึ้น แต่สารเมลามีนไม่มีผลต่ออัตราการรอดตายของปลาดุกพันธุ์ผสม อาจเป็นเพราะว่าระดับของเมลามีนที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ยังมีความเข้มข้นที่ไม่มากพอที่จะทำให้ปลาดุกพันธุ์ผสมตายได้ นอกจากนี้ยังพบความผิดปกติของสีผิวบริเวณลำตัว ซึ่งเป็นผลมาจากการได้รับเมลามีน โดยปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีนตั้งแต่ 2 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไปสีผิวและลำตัวจะเริ่มเป็นดำหลังจากได้รับอาหารเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และจะดำสนิทในสัปดาห์ที่ 4 ภายหลังได้รับอาหาร ซึ่งเป็นเวลาเดียวกับที่ปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีนตั้งแต่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นระดับที่ต่ำสุดในการทดลองนี้แสดงความผิดปกติของสีผิวบริเวณลำตัว ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสีผิวบริเวณลำตัวที่เกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของรงควัตถุที่ผิวหนังของปลา โดย Parker (1934) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสีลำตัวของปลาในกลุ่มปลา catfish รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงของสีบริเวณลำตัวปลาเกิดจากปฏิกิริยาของฮอร์โมนที่ไปกระตุ้น หรือยับยั้งการทำงานของระบบประสาท ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้มีผลมาจากความเข้มข้น และการแพร่กระจายตัวของรงควัตถุซึ่งประกอบด้วย เซลล์เม็ดสี และเซลล์ที่มีการสร้างสารสี (chromatophores) โดยเซลล์ที่มีการสร้างสารสีที่เกี่ยวข้องกับสีของลำตัวปลา เช่น melanophores, erythrophores, xanthophores, leucophores, cyanophores and iridophores (Brown, 1973; Hawkes, 1974; Kelsh *et al*, 2000) ซึ่งเซลล์ที่มีการสร้าง

สารสีนี้จะทำงานรวมกับฮอร์โมนที่สร้างจากต่อมใต้สมอง (pituitary gland) และฮอร์โมนที่ผลิตมานี้จะมีอิทธิพลต่อการแพร่กระจายตัวของ รงควัตถุ melanophores ของ catfish (Zondek, 1935) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงการทำงานของรงควัตถุนี้ส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการการเปลี่ยนแปลงของสารอดีนาลีนอีกด้วย Bramowitz (1935) รายงานว่าการเกิดแถบสีดำ หรือการมีสีที่เข้มขึ้นของปลาในกลุ่ม catfish เกิดมาจากการทำลายการรับรู้ของ melanophore ทำให้ปลามีสีเข้มขึ้น จากการศึกษาของ Cardinaud (2004) รายงานว่า melanin-concentrating hormone มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของ สารรงควัตถุ melatonin ในmelanophores ของปลาและการเปลี่ยนแปลงของ melanin-concentrating hormone มีผลต่อการแพร่กระจายของ melanosomes โดยมีการกระตุ้นการเคลื่อนที่และการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสรอบ ๆ บริเวณดังกล่าว (Pissios and Maratos-Flier, 2003) จากการทดลองเป็นไปได้ว่าเมื่อปลาได้รับสารเมลามีนที่ผสมอยู่ในอาหารเข้าสู่ร่างกายแล้วมีผลต่อการการเปลี่ยนแปลงของ melanin-concentrating hormone ในตัวปลาโดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีผลยับยั้งหรือทำลายการรับรู้ของ melanophore ทำให้ปลามีสีเข้มขึ้น

สำหรับองค์ประกอบทางเคมีของซากปลาทั้งตัวที่ได้รับอาหารซึ่งมีส่วนผสมของเมลามีนที่ระดับต่างๆ พบว่าระดับของเมลามีนในอาหารมีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของซากปลาทั้งตัว โดยทำให้ปริมาณความชื้น ปริมาณโปรตีน และปริมาณเถ้าของซากปลามีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง การทดลองครั้งนี้ปริมาณโปรตีนในซากปลาที่เพิ่มขึ้นตามระดับของเมลามีนในอาหารนั้นส่วนหนึ่งเนื่องมาจากการที่มีสารเมลามีนตกค้างในเนื้อปลาดุกพันธุ์ผสม (การตกค้างที่ได้จากการนำเนื้อปลาไปวิเคราะห์) ปกติแล้วเมลามีนมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ 66.67 เปอร์เซ็นต์ เป็นเหตุให้การทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนซึ่งเป็นการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนนั้นพบว่ามีปริมาณโปรตีนที่เพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณของสารเมลามีนที่ตกค้างในตัวปลา ส่วนปริมาณไขมันในตัวปลาพบว่ามีปริมาณลดลงเมื่อระดับของเมลามีนในอาหารเพิ่มขึ้นแสดงให้เห็นว่าระดับของเมลามีนในอาหารมีความสัมพันธ์ผกผันกับระดับการสะสมไขมันในร่างกาย ทั้งนี้เกิดจากปลานำไขมันไปใช้ในกระบวนการเมทาบอริซึม เพื่อการเจริญเติบโตมากกว่าปกติ เนื่องจากปลาไม่สามารถที่จะนำค่าโปรตีนเทียมที่มีอยู่ในอาหาร (ที่มาจากสารเมลามีนในอาหาร) ไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้ เนื่องมาจากปฏิกิริยาการสลายกรดไขมัน (ß - oxidation) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการสลายไขมันเพื่อเกิดพลังงานขึ้นภายในร่างกายโดยอาศัยกระบวนการสร้างพลังงานที่เกิดขึ้นจากกรดไขมันที่สะสมอยู่รอบๆ ไมโตคอนเดรีย (extra-mitochondrial fatty acids) ภายในเซลล์โดยจำนวน 1 โมเลกุลของกรดไขมันจะถูกดึงเพื่อนำไปใช้โดยเอนไซม์ที่เกิดจาก 2 กระบวนการคือ เอทีพี – ไดรเวน เอสเทอร์ริฟิเคชั่น (ATP-driven esterification) กับ เอกซ์ตราไมโตรคอนเดรีย (extra-mitochondria) ผลที่ได้ทำให้เกิดผลผลิตคือ แฟตตีแอซิล – โคเอ (fatty acyl COA) ซึ่งเป็นผลผลิตที่ทำให้เกิดสูงนั่นเอง ซึ่งปฏิกิริยา

นี้เกิดขึ้นในวัฏจักรเครป (TCA cycle) จากการทดลองนี้ปลาที่ได้รับอาหารที่มีระดับของเมลามีนในอาหารเพิ่มขึ้นพบว่าปริมาณไขมันในตัวลดลง ซึ่งเป็นเหตุให้ปลาดุกพันธุ์ผสมมีการเจริญเติบโตลดลงดังที่กล่าวมาข้างต้น จากการทดลองพบว่าระดับของเมลามีนในอาหารมีความสัมพันธ์กับปริมาณเถ้าในตัวปลา โดยปริมาณเถ้าในตัวปลาแปรผันตรงกับระดับของเมลามีนในอาหาร กล่าวคือ ปริมาณเถ้าในตัวปลามีปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อระดับของเมลามีนในอาหารเพิ่มสูงขึ้น ในทำนองเดียวกับกับปริมาณความชื้นในตัวปลาที่มีปริมาณเถ้าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระดับของเมลามีนในอาหารเพิ่มสูงขึ้น เช่นเดียวกัน

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือด ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ชี้วัดสุขภาพของปลา พบว่าค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบินรวม โปรตีนในซีรัม และปริมาณเม็ดเลือดขาว มีแนวโน้มที่ลดลงเมื่อระดับของเมลามีนในอาหารเพิ่มสูงขึ้น และมีค่าต่ำกว่าปลาในชุดควบคุม โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณฮีโมโกลบินรวมต่ำกว่าชุดควบคุมถึง 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าปลาเกิดสภาวะเครียดและมีภูมิต้านทานลดลง (Mcleay and Gordon, 1977) นอกจากนี้การลดลงของปริมาณฮีโมโกลบินรวม ทำให้เซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ ภายในร่างกายได้รับออกซิเจนน้อยลง และจะส่งผลต่อกระบวนการต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ เนื่องจากฮีโมโกลบินเป็นโปรตีนที่มีมากที่สุดในเซลล์เม็ดเลือดแดงและทำหน้าที่สำคัญในการส่งออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ จากเซลล์เนื้อเยื่อหนึ่งไปยังอีกเซลล์เนื้อเยื่อหนึ่ง (พัชรี และคณะ, 2551) จากผลการศึกษาองค์ประกอบเลือดที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงที่มีความคล้ายคลึงกับการปนเปื้อนของสารพิษอื่นๆในอาหาร เช่นการปนเปื้อนของสารพิษที่ผลิตจากเชื้อราซึ่งส่งผลกระทบโดยตรงต่อสุขภาพของสัตว์และมนุษย์ จากการศึกษาของ Sahoo และ Mukherjee (2001) พบว่าอะฟลาทอกซินมีผลทำให้องค์ประกอบเลือดมีการเปลี่ยนแปลงโดยทำให้ปริมาณโปรตีนรวมในน้ำเลือดของปลายี่สกเทศลดลง และ อรอุษา (2546) ซึ่งทำการศึกษาผลของอะฟลาทอกซินบี$_1$ ในอาหารต่อปลานิลแดงแปลงเพศ พบว่าอะฟลาทอกซินบี$_1$ มีผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือด ปริมาณฮีโมโกลบินรวม และปริมาณพลาสมาโปรตีนลดต่ำลง นอกจากนี้ยังมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง เช่นเดียวกัน แต่ไม่มีผลต่อปริมาณเม็ดเลือดแดงของปลา ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณเม็ดเลือดแดงของปลาไม่มีความแตกต่างกัน แต่การที่ค่าฮีมาโตคริตที่ลดลงอาจเป็นผลมาจากเม็ดเลือดแดงมีขนาดเล็กลงจึงทำให้ค่าการอัดแน่นของเม็ดเลือดหรือค่าฮีมาโตคริตลดลง จะเห็นได้ว่าการลดลงของฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน และโปรตีนในซีรัม ในขณะที่เม็ดเลือดแดงยังมีค่าปกติอยู่ อาจเนื่องมาจากความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงได้ ซึ่งเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินน้อยกว่าปกติ ทั้งนี้ต้องมีการศึกษาถึงขนาดของเม็ดเลือดรวมด้วย (อานนท์, 2535)

จากการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลาดุกพันธุ์ผสมพบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน ก่อให้เกิดความผิดปกติของเนื้อเยื่อเหงือก โดยพบว่าเกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) ที่ secondary lamellae บริเวณซี่เหงือก (gill lamellae) รวมถึงมีการแยกตัวของ epithelial cell (epithelial lifting) ที่ secondary lamellae และมีการเสื่อมสลายของเซลล์เหงือก ซึ่งเหงือกปลาทำหน้าที่ได้หลายอย่าง เช่น การหายใจ รักษาสมดุลแร่ธาตุ ขับของเสียที่ประกอบด้วยไนโตรเจนออกมา และรักษาสมดุลกรด-เบส เป็นต้น (Cengiz and Unlu, 2006) ซึ่งการเกิดการแบ่งเซลล์มากผิดปกติและความผิดปกติที่เกิดขึ้นบริเวณเหงือกมีผลทำให้ลดพื้นที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซเพื่อใช้ในการหายใจของปลา (Fanta *et al*., 2003; Cengiz and Unlu, 2006) ทำให้ปลามีออกซิเจนไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ได้ไม่เพียงพอ ซึ่งจะส่งผลต่อกระบวนการเมทาบอลิซึม และการเจริญเติบโตของปลาต่อไป ในขณะที่ความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับ พบว่าลักษณะเนื้อเยื่อตับมีการเสื่อมสลายของเซลล์บางส่วนทำให้เซลล์ไม่เกาะตัวกัน และเห็นขอบเขตของเซลล์ที่ไม่ชัดเจน และปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะของเซลล์ที่ผิดปกติโดยไม่มีไขมันสะสมในเซลล์ มีการขยายตัวของ Sinusoid ไม่เห็นขอบเขตของเซลล์ รวมทั้งเกิดการตายและสลายตัวของเซลล์ตับ แสดงให้เห็นว่าเมลามีนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้มีผลทำให้ปลามีการเจริญเติบโตที่ลดลง และมีความคล้ายคลึงกับการรายงานการได้รับสารพิษอื่นๆ เช่น การรายงานของ NTP (1982) อ้างโดย อรอนงค์ (2548) ที่รายงานว่าสารพิษซีราลีโนนที่ปนเปื้อนในอาหารสำเร็จรูป และอาหารสัตว์นั้นสามารถลดประสิทธิภาพการทำงานของตับ และเปลี่ยนแปลงค่าพารามิเตอร์ในเลือดซึ่งผลจะคล้ายคลึงกันในสัตว์ชนิดต่างๆ นอกจากนี้ซีราลีโนนยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดเนื้องอกที่ตับเนื่องจากซีราลีโนนไปจับตัวกับเซลล์ตับทำให้เซลล์ตับถูกทำลายก่อให้เกิดมะเร็งตับตามมา และรายงานของ Ueno (1983) ที่พบว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับ เช่นการเสื่อมสลาย และการตายของเซลล์ตับทำให้การใช้ประโยชน์ของโภชนะในร่างกายมีประสิทธิภาพลดลงส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ตามมา และตามรายงานเกี่ยวกับสารพิษที่รายงานว่าตับที่ได้รับสารพิษมักจะพบการตายของเซลล์ในส่วนของไซโตพลาสซึมติดสีย้อมอีโอซินเพิ่มขึ้น เนื่องจากการสูญเสีย basophilic RNA ไมโตคอนเดียไม่เป็นระเบียบ และการเพิ่มจำนวนของ acidophilic group เนื่องจากการแตกหักของโครงสร้างโปรตีนเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ เซลล์ที่ตายจะมีนิวเคลียสเล็กกว่าและติดสีแน่นทึบของฮีมาทอกไซลิน (Hibiya, 1982; Wheater *et al*, 1985 อ้างโดย อรอุษา, 2546) ส่วนความผิดปกติของเนื้อเยื่อไตพบว่ามีการเสื่อมสลายของ epithelium cell มีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (Glomerrulus) มีการเสื่อมสลายของท่อไต และมีการตายของอวัยวะสร้างเม็ดเลือด แต่ไม่พบผลึกของเมลามีน ดังรายงานในสัตว์เลี้ยง เช่นสุนัขและแมวที่ล้มตาย จากภาวะไตวายเป็นจำนวนมากจากการปนเปื้อนสารเมลามีน

ในอาหาร (เยาวมาลย์, 2550ข; Burns, 2007) นอกจากนี้ Hack และ Tyl (1985) รายงานว่า เมลามีนทำให้เกิดนิ่วในหนูได้ โดยหนูวัยอ่อนที่เพิ่งหย่านมมีโอกาสที่จะเกิดนิ่วสูงกว่าหนูตัวเต็มวัยเนื่องจากระบบการขับถ่ายของเสียของหนูวัยอ่อนยังไม่มีประสิทธิภาพมากพอที่จะขับเมลามีนทิ้งได้ ซึ่งสอดคล้องกับการปนเปื้อนของเมลามีนในนมสำหรับเลี้ยงเด็กในประเทศจีนที่ทำให้เกิดการล้มป่วยและเสียชีวิตของเด็กในประเทศจีน เนื่องจากนมเป็นอาหารหลักสำหรับเด็กในวัยนี้และต้องบริโภคในแต่ละวันในปริมาณมากอีกทั้งระบบอวัยวะต่างๆ รวมทั้งระบบขับถ่ายและกำจัดของเสียยังพัฒนาไม่เต็มที่ (Chan *et al*., 2008) และในรายงานความเป็นพิษของเมลามีนในหนู rat และหนู mice พบว่าหนูทดลองที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนเป็นส่วนผสมในระดับที่มากกว่า 4,500 ppm นาน 2 ปีตรวจพบความผิดปกติของเนื้อเยื่อไต และกระเพาะปัสสาวะ พบก้อนแข็งคล้ายผลึกในกระเพาะปัสสาวะ (NTP, 1983) การศึกษาครั้งนี้ยังไม่เห็นอาการดังกล่าวชัดเจน ซึ่งอาจเนื่องมาจากระดับของเมลามีนในการทดลองครั้งนี้ยังมีความเข้มข้นไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดการตกตะกอนในไตหรือตับของปลาดุกพันธุ์ผสม

สำหรับการตกค้างของเมลามีนในปลาดุกพันธุ์ผสม พบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีนมีผลทำให้มีสารเมลามีนตกค้างในเนื้อปลาดุกพันธุ์ผสม ซึ่งระดับของเมลามีนในอาหารมีความสัมพันธ์ต่อการตกค้างของเมลามีนในเนื้อปลาดุกพันธุ์ผสม กล่าวคือระดับของเมลามีนในอาหารแปรผันตรงกับปริมาณการตกค้างของสารเมลามีนในเนื้อปลา โดยสารเมลามีนตกค้างในเนื้อปลาเพิ่มขึ้นเมื่อมีระดับของเมลามีนในอาหารเพิ่มขึ้น ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่าปลาที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 2 ถึงสูตรที่ 7 มีสารเมลามีนตกค้างในเนื้อ 63 - 450 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของเนื้อปลา ซึ่งอยู่ในระดับที่สูงกว่าค่ามาตรฐานที่หน่วยงานความปลอดภัยด้านอาหารประจำสหภาพยุโรป(European Food Safety Authority: EFSA) ได้เสนอให้มีการกำหนดค่าอนุโลมในการบริโภคเมลามีนต่อวันของมนุษย์และสัตว์ (tolerable daily intake : TDI) ไว้ที่ระดับ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวต่อวัน (mg/kg b.w. per day) ผลจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารเมลามีนมีผลต่อสุขภาพของปลา ซึ่งข้อมูลที่รายงานนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการจัดการวัตถุดิบของปลา เพื่อลดผลกระทบที่อาจจะเกิดขึ้นจากการปนเปื้อนของสารเมลามีนในอาหารสัตว์น้ำ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของเมลามีนในอาหารต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อในปลาดุกพันธุ์ผสม น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 4 กรัม เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ สามารถสรุปได้ดังนี้

1. เมลามีนมีผลต่อการเจริญเติบโตของปลาดุกพันธุ์ผสม โดยปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 2 ถึงสูตรที่ 7 (อาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์) มีการเจริญเติบโตที่ลดลงตามระดับของเมลามีนที่เพิ่มขึ้นในอาหาร เมื่อพิจารณาจากผลการเจริญเติบโต (น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ) และประสิทธิภาพการใช้อาหาร ได้แก่ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์

2. จากการศึกษาองค์ประกอบเลือด พบว่า ค่าองค์ประกอบเลือดของปลาดุกพันธุ์ผสม ได้แก่ ค่าฮีมาโตคริต ปริมาณเม็ดเลือดขาว ปริมาณโปรตีนในซีรัม และปริมาณฮีโมโกลบินรวม ของปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่มีส่วนผสมของเมลามีนมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ ปริมาณเม็ดเลือดแดง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$)

3. การศึกษาผลของเมลามีนต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของปลาดุกพันธุ์ผสม พบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน มีการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของเนื้อเยื่อเหงือก ตับ และไต ซึ่งความรุนแรงของการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นสัมพันธ์กับระดับของเมลามีนในอาหารที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่าบริเวณเหงือกเกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) และมีการแยกตัวของ epithelial cell ของ secondary lamellae ส่วนเนื้อเยื่อตับพบการเสื่อมสลายของเซลล์ตับบางส่วนทำให้เซลล์ไม่เกาะตัวกัน ขอบเขตของเซลล์ไม่ชัดเจน มีการตายของเซลล์ตับ และมีการขยายตัวของ sinusoid ลักษณะเนื้อเยื่อไตมีการเสื่อมสลายของ epithelial cell บริเวณท่อไต มีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (glomerulus) และมีการตายของ haemopoietic tissue

4. จากการทดลองนี้ พบว่า เมื่อปลาดุกพันธุ์ผสมได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีนมีผลทำให้มีสารเมลามีนตกค้างในเนื้อปลาดุกพันธุ์ผสม โดยสารเมลามีนตกค้างในเนื้อปลาเพิ่มขึ้นเมื่อมีระดับของเมลามีนในอาหารเพิ่มขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. มปป.ก. การเลี้ยงปลาดุกบิ๊กอุย. เอกสารและคำแนะนำ. กรุงเทพฯ: กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ฝ่ายเผยแพร่ กองส่งเสริมการประมง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กรมประมง. มปป.ข. ปลาที่เพาะเลี้ยงง่าย. เอกสารและคำแนะนำ. กรุงเทพฯ: กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ฝ่ายเผยแพร่ กองส่งเสริมการประมง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กองประมงต่างประเทศ. 2551. การส่งออกปลาน้ำจืด ปี 2545-2551. กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กองประมงต่างประเทศ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ชัยสิทธิ์ มาศเกษม. 2529. การเป็นพิษของยูเรียในโคและกระบือ. ว. แก่นเกษตร 14: 17-19.

ชุติมา ตันติกิตติ, เสาวนิต คูประเสริฐ, ระพีพรรณ เลาหบรรจง, มณี ศรีชะนันท์, อนุชิต อาจหาญ และกิจการ ศุภมาตย์. 2548. คุณภาพปลาป่นจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีและกล้องจุลทรรศน์. ว.สงขลานครินทร์ วทท. 27: 25-44.

พัชรี บุญศิริ, เปรมใจ อารีจิตรานุสรณ์, อุบล ชาอ่อน และ ปีติ ธุวจิตต์. 2551. ตำราชีวเคมี. ขอนแก่น: ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

มะลิ บุณยรัตผลิน. 2530. อาหารปลาดุก. ว.เกษตรวันนี้ 6: 47-82.

เยาวมาลย์ ค้าเจริญ. 2550ก. รอบรู้เรื่องเมลามีน. ว. ไก่ & สุกร 52: 21-26.

เยาวมาลย์ ค้าเจริญ. 2550ข. เมลามีนภัยร้ายในอาหารสัตว์ที่ผู้เลี้ยงต้องระวัง.วารสารสัตว์เศรษฐกิจ.ปีที่ 25 ฉบับที่ 568 ปักษ์แรกกันยายน 2550.หน้า 8-15.

วรรัตน์ เมธีวรกิจ. 2550. วันนี้คุณรู้จักเมลามีน (melamine) แล้วหรือยัง?. ว. สัตว์เศรษฐกิจ 25: 14-16.

วิมล จันทรโรทัย, ประเสริฐ สีตะสิทธิ์ และศิริพร ราชภักดี. 2536. อัตราส่วนสูงสุดของคาร์โบไฮเดรตจากปลายข้าวต่อลิปิดในอาหารปลาดุกลูกผสม. วิทยาสารเกษตรศาสตร์ (วิทยาศาสตร์) 28: 49-57.

เวียง เชื้อโพธิ์หัก. 2542. โภชนศาสตร์ และการให้อาหารสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศราวุธ เจ๊ะโส๊ะ, สุวิมล สี่หิรัญวงศ์ และพรพนม พรหมแก้ว. 2538. ชีววิทยาปลาดุกลำพัน. เอกสารฉบับที่ 5/2538. ปัตตานี: ศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดปัตตานี กองประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สุพล เลื่องยศลือชากุลม เดชฤทธิ์ นิลอุบล และธวัชชัย รอดสม. 2550. พิษของเมลามีนในสุกร. ว. สัตว์เศรษฐกิจ 25: 21-25.

สำนักข่าวไทย. 2551. ความคืบหน้าข่าวนมผงที่ผลิตในจีนปนเปื้อนสารเมลามีน. Available at http://news.mcot.net/politic/inside.php?value=bmlkPTE4NTc1Jm50eXBlPWNsaXA= เข้าถึงเมื่อวันที่ 15 มกราคม 2552.

อรอนงค์ บัณฑิต. 2548. ผลของสารพิษจากเชื้อราทีทูและซราลีโนนต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด และเนื้อเยื่อในกุ้งกุลาดำ และกุ้งขาว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อรอุษา อุสันโนน. 2546. ผลของอะฟลาทอกซินบี$_1$ ต่อปลานิลแดงแปลงเพศ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อานนท์ บุญยรัตเวช. 2535. โลหิตวิทยา: เม็ดเลือดแดง. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล.

อำนวย โชติญาณวงษ์. 2525. อาหารปลา. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Anderson, W.C., Turnispeed, S.B., Karbiwnyk, C.M. and Madson, M.R. 2007. Determination of melamine residues in catfish tissue by triple quadrupole LC-MS-MS with HILIC Chromatography. U.S. Food and Drug Administration, Animal drug research Center, Denver CO. Laboratory Information Bulletin LIB 4396. pp. 23.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis 15th ed. Washington:The Association of Official Analytical Chemists.

Bancrof, J.D. 1967. Histochemical Techniques. London : Butterworths.

Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W. 1973. Routine hematological methods for use with fish blood. J. Fish Biol. 5: 771-781.

Boonyaratpalin, M. and Phromkunthong, W. 2001. Bioavailability of ascorbyl phosphate calcium in hybrid catfish, *Clarias macrocephalus* (Gunther) x *Clarias gariepinus* (Burchell) feed. Aqua. Res. 32: 126-134.

Bramowitz, A. A. 1935. Regenration of chromatophore nerves. Proc. Nat. Acad. Sci. Washington, 21: 137.

Brown, F. A. 1973. Chromatophores and color change. In Prosser C.L. (eds.), Comparative animal phyiology. W.B. Saunders, Philadelphia, 915-950.

Burns, K. 2007. Events leading to the major recall of pet foods. J. Am. Vet. Med. Assoc. 230: 1600-1620.

Cardinaud, B., Darré-Toulemonde, F., Duhault, J., Boutin, J. A. and Nahon, J. L. 2004. Comparative analysis of melanin-concentrating hormone structure and activity infish mammals. J. Peptide. Sci. 25: 1623-1632.

Cengiz, E. and Unlu, E. 2006. Sublethal effect of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquito fish, *Gambusia affinis*: a microscopic study. Eviron. Toxicol. Pharmacol. 21: 246-253.

Chan, E.Y.Y., Griffiths, S.M. and Chan, C.W. 2008. Public-health risks of melamine in milk products. The Lancet 372: 1444-1445.

Dupree, H.K. and Sneed, K.P. 1966. Response of channel catfish fingerling to different levels of major nutrients in purified diets. U.S. Bureau of Sports Fish and Wildlife Tech. Pap. 9:1-21.

Fanta, E., Rios, S., Romao, F., Casagranda, S., Vianna, A. and Freiberger, S. 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. Ecotoxical. Environ. Saf. 45: 119-130.

Hack, H.D. and Tyl, R.W. 1985. The induction of bladder stones by terephthalic acid, dimethyl terephthalate, and melamine (2,4,6-triamino-s-triazine) and its relevance to risk assessment. Regul. Toxicol. Pharmacol. 5: 294-313.

Hawkes, J. W. 1974. The structure of the fish skin. II. The chromatophore unit. Call and Tissue Research. 149: 159-172.

Hibiya, T. 1982. An Atlas of Fish Histology Normal and Pathological Features. New York: Kodansha Ltd. 143p.

HSDB (Hazardous Substances Data Bank). 2007. Melamine: Human Health Effects. Available at URl:http://toxnet.nlm.nihgov/cgibin/sis/search/rdbs+hsdb:@term+@na+Melamine. เข้าถึงเมื่อวันที่ 20 ธันวาคม 2550.

Humason, G. 1979. Animal Tissue Techniques 4thed. San Fancisco : W.H. Freeman and Company.

Jantrarotai, W., Sitasit, P. and Rajchapakdee, S. 1994. The optimum carbohydrate to lipid ratio in hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*) diets containing raw broken rice. Aquaculture 127: 61-68.

Juancey, K.J. and Ross, B. 1982. A guide to tilapia feeds culture in the Indo-Pacific region. FAO Fish. Bio. Tech. Pap. No. 14.

Kelsh, R. N., Schmid, B. and Eisen, J. S. 2000. Genetic analysis of melanophore development in zebrafish embryos. Dev. Biol. 225: 277-293.

Larsen, H.M. and Snieszko, S.F. 1961. Modification of the microhematocrit technique with trout blood. Trans. Amer. Fish. Soc. 90: 139-142.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Meek, M.E., Bucher, J.R., Cohen, S.M., Dellarco, V., Hill, R.N., Lehman-McKeeman, L.D., Longfellow, D.G., Pastoor, T., Seed, J. and Patton, D.E. 2003. A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. Crit Rew. Toxicol. 33: 591-653.

Mcleay, D.J. and Gordon, M.R. 1977. Leucocrit: asimple hematogical technique for measuring concentration of pulpmill effluents. J. Fish Res. Board Can. 34: 2164-2175.

National Toxicology Program U.S.A. 1982. Technical on the Carcinogenesis Bioassay of zearalenone in F 344/N rat and B6C3F_I Mice (Feed Study). (NIH Publ. N83-1791), Research Triangle Park, N.C.

National Toxicology Program U.S.A. 1983. Technical on the Carcinogenesis Bioassay of melamine in F 344/N rat and B6C3F_1 Mice (Feed Study). (NIH Publ. N83-2501), Research Triangle Park, N.C.

OECD (Organization for economic co-operation and development). 2002. SIDS Analysis UNEP Publication: Melamine. Available at URL: http://www.inchem.org/document/sids/sids/108781.pdf. เข้าถึงเมื่อวันที่ 28 กันยายน 2550.

Parker, G. H. 1934. Color changes in the catfish Ameiurus in relation to neurohumors. Jour. Exper. Zoöl. 69: 199.

Pissios, P. and Maratos-Flier, E. 2003. Melanin-concentrating hormone: from fish skin to skinny mammals. Trends. Endocrinol. Metab. 14: 243-248.

Sahoo, P.K. and Mukherjee, S.C. 2001. Dietary intake of levamisole improves non-specific immunity and disease resistance of healthy and aflatoxin induced immuno-compromised of rohu, *Labeo rohita*. J. Appl. Aquacult. 11: 15-25.

Smith, J.L., Wishnok, J.S. and Deen, W.M. 1994. Metabolism and excretion of methyamines in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 125: 296-308.

Ueno, Y. 1983. Effect of Trichothecene Mycotoxins on Farm Animals. *In* Development in Food Science 4. Tokyo: Elsevier. 177-193.

US-FDA (U.S. Food and Drug Administration), 2007a. GC-MS Screen for the Presence of Melamine, Ammeline, Ammelide and Cyanuric Acid. Available at URL: http://www.fda.gov/cvm/GCMSMelamine.htm. เข้าถึงเมื่อวันที่ 28 กันยายน 2550.

US-FDA (U.S. Food and Drug Administration), 2007b. Interim melamine and analogues safety/risk assessment. Available at URL:http://cfsan.fda.gov/~dms/melamra.html. เข้าถึงเมื่อวันที่ 28 กันยายน 2550.

Wheater, P.R., Burkitt, H.G., Stevens, A. and Lowe, J.S. 1985. Basic Histopatology. New York: Churchill Livingstone. 217p.

Yone, Y. and Fujii, M. 1975. Studies on nutrition of red sea bream-XI : Effect of ω 3 fatty acid supplement in a corn oil diet on growth rate and feed efficiency. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 41 : 73-77.

Zeitoun, I.H., Jack, P.I., Halver, I.E. and Ullrey, D.E. 1973. Influence of salinity on protein requirement of rainbow trout and tilapia fingerling. J. fish. Res. Borrd Can. 30 : 1967-1873.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบ อาหารทดลอง ซากปลาทดลอง (ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC, 1990)

1.1 การวิเคราะห์ความชื้น

1. นำขวดชั่งเข้าตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น

2. ชั่งและบันทึกน้ำหนักของขวดชั่งโดยละเอียด

3. ชั่งตัวอย่างใส่ขวดชั่งประมาณ 3 กรัม และบันทึกน้ำหนัก

4. นำตัวอย่างเข้าตู้อบ โดยใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

5. นำตัวอย่างที่อบแล้วใส่โถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น แล้วบันทึกน้ำหนักของตัวอย่าง

6. ทำซ้ำตามข้อ 4 ถึง 5 จนกระทั่งน้ำหนักที่ได้คงที่ โดยน้ำหนักที่หายไป คือ น้ำหนักของความชื้น

คำนวณ % ความชื้นด้วยสมการ

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

เมื่อ a = น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบแห้ง (กรัม)

b = น้ำหนักของตัวอย่างหลังอบแห้ง (กรัม)

w = น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบ

2. นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนเถ้าเป็นสีขาว

3. นำถ้วยกระเบื้องเคลือบเข้าโถดูดความชื้น และเมื่อตัวอย่างเย็นดีแล้ว นำออกชั่งทันที ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

คำนวณ % เถ้าด้วยสมการ

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

เมื่อ a = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ

b = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำหนักของตัวอย่างหลังการเผา

w = น้ำหนักของตัวอย่างก่อนเผา

1.3 การวิเคราะห์หาโปรตีน

สารเคมี

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

2. สารเร่งรวม (catalyst mixture): เตรียมโดย ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate, $CuSO_4$) 7 กรัม และโพแทสเซียมซัลเฟต (potassium sulfate, K_2SO_4) 100 กรัม ผสมให้เข้ากัน

3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 45 % (sodium hydroxide, NaOH): เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ ชนิดเกล็ด 450 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 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 ให้ร้อนแล้วใส่กรดบอริคลงไป 4 กรัม คนจนละลายหมด เมื่อสารละลายเย็นลงแล้วจึงเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

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

7. เมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์ (methyl orange indicator): เตรียมโดยละลายเมทิลออเรนจ์ 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

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

การหาความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือมาตรฐาน

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

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

เมื่อ N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

วิธีการวิเคราะห์

ก. ขั้นตอนการย่อย (digestion)

1. ชั่งตัวอย่างอาหารให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.5 กรัม โดยชั่งด้วยกระดาษกรองที่ปราศจากสารไนโตรเจนแล้วใส่ในหลอดแก้ววิเคราะห์โปรตีน
2. เติมสารเร่งรวม 3 กรัม เพื่อเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อย
3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร
4. นำไปย่อยด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีน ที่อุณหภูมิ 375 องศาเซลเซียส กระทั่งสารละลายในหลอดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเป็นสีเขียวใส ทิ้งไว้ให้เย็น

ข. ขั้นตอนการกลั่น (distillation)

1. เมื่อสารละลายเย็นลง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร

2. ใส่ลูกแก้ว 2 ลูก เพื่อป้องกันการกระแทกของสารละลายต่อหลอดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเข้ากับเครื่องกลั่นที่มีขวดปากแคบวัดปริมาตร ซึ่งมีกรดบอริค 40 มิลลิลิตรอยู่ โดยให้ปลายของหลอดแก้วที่ต่อจากกระบอกแก้วควบแน่นจุ่มอยู่ในกรดบอริค เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในหลอดแก้ววิเคราะห์ช้าๆ จนกระทั่งสารละลายมีสีดำ

3. หยดอินดิเคเตอร์รวมในกรดบอริค 2 – 3 หยด

4. ทำการกลั่นจนกระทั่งไม่มีแก๊สแอมโมเนียออกมา ทำการกลั่นต่อไปอีก 10 นาที แล้วล้างปลายเครื่องกลั่นด้วยน้ำกลั่น นำขวดปากแคบวัดปริมาตรออกจากเครื่องกลั่น

ค. ขั้นตอนการไตเตรท (titration)

1. ไตเตรทด้วยกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น (0.1 นอร์มอล) จนถึงจุดยุติ (end point) สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อน

2. บันทึกปริมาตรของกรดเกลือ เพื่อใช้คำนวณต่อไป

การคำนวณหาโปรตีนด้วยสมการ

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

เมื่อ V_1 = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

V_2 = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบ

N = เป็นความเข้มข้นของกรดเกลือเป็นนอร์มอล

W = น้ำหนักตัวอย่าง

1.4 การวิเคราะห์ไขมัน (ใช้เครื่อง Soxtec System HT6)

สารเคมี

1. ไตรคลอโรเอททีลีน (trichloroetheline)

วิธีการวิเคราะห์

1. อบถ้วยพร้อมลูกแก้ว ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 8 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น

2. อบตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

3. ชั่งน้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้ว (w_1)

4. ชั่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ใส่กระดาษกรองเบอร์ 1 ประมาณ 1 – 2 กรัม (w_2) ห่อให้มิดชิด ใส่ลงในไส้กรอง (thimble) ที่เตรียมไว้ นำไปใส่เข้าเครื่อง

5. นำถ้วยพร้อมลูกแก้วที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้วมาเติม คลอโรฟอร์ม:เมทานอล ในอัตราส่วน 2 :1 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วใส่เข้าเครื่อง

6. เปิดเครื่อง ปรับอุณหภูมิไปที่ 160 องศาเซลเซียส เปิดเครื่องทำความเย็น เปิดวาล์ว เลื่อนปุ่มไปที่ boiling ต้มให้เดือด 30 นาที

7. จากนั้นเลื่อนปุ่มไปที่ rinsing เพื่อล้างตัวอย่าง 20 นาที

8. ปิดวาล์ว เปิดสวิทซ์อากาศ เลื่อนปุ่มไปที่ evaporation เพื่อให้สารระเหย 5 นาที

9. ปิดสวิทซ์อากาศ และเครื่องทำความเย็น เลื่อนปุ่ม evaporation กลับตำแหน่งเดิม นำถ้วยออกจากเครื่อง อบที่ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

10. นำถ้วยออกมาใส่โถอบแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก (w_3)

คำนวณหาไขมันด้วยสมการ

$$\text{ไขมัน (\%)} = \frac{w_3 - w_1}{w_2} \times 100$$

เมื่อ w_1 = น้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้ว

w_2 = น้ำหนักตัวอย่าง

w_3 = น้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้วและไขมันหลังอบ

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

2.1 การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว (blood cell count) (ตามวิธีของ Blaxhall and Daisley, 1973)

การนับเม็ดเลือดในตัวปลาได้ดัดแปลงวิธีการนับเม็ดเลือดในคนและในสัตว์บกอื่นๆ มาใช้ ซึ่งจะใช้ RBC – diluting pipette ในการเจือจางไม่ว่าจะนับเม็ดเลือดแดงหรือเม็ดเลือดขาวก็ตามมีขั้นตอนดังต่อไปนี้คือ

1. ใช้ RBC – diluting pipette ดูดเลือด (ที่เจาะใหม่) ให้ถึงขีด 0.5 ถ้าเกินขีด 0.5 ให้ปรับด้วยกระดาษทิชชู ค่อยๆซับอย่างระมัดระวังแล้วเช็ดปลายปิเปตให้สะอาด

2. ใช้ปิเปตอันเดิมดูด diluting fluid (Yogoyama's fluid) จนกระทั่งถึงขีด 101 ตรงปลายปิเปต

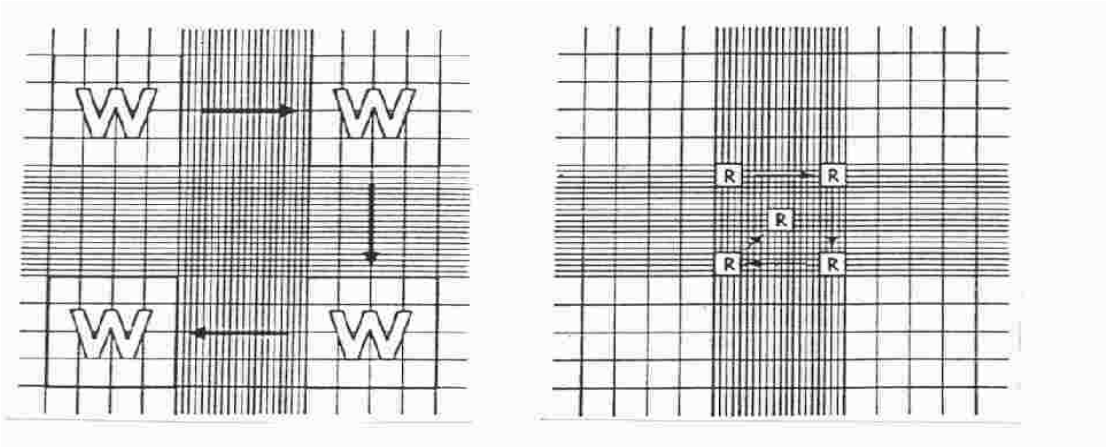
3. ใช้นิ้วชี้ปิดปลายปิเปตแล้วถอดสายยาง จากนั้นใช้หัวแม่มือกับนิ้วชี้ปิดปลายปิเปตทั้งสองข้างเขย่าไปมาในแนวนอน 2-3 นาที

4. หยดของเหลวในปิเปตทิ้งไป 3-4 หยด เพราะของเหลวของส่วนนี้อยู่ในก้านไม่ได้ถูกนำไปผสมกับเลือดในกระเปาะของปิเปต

5. หยดของเหลวลงไปในร่องของ haemacytometer ที่มี cover glass ปิดอยู่เรียบร้อยแล้ว ถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้น หรือของเหลวหยดโตเกินไปจนล้นขอบของ haematocytometer ให้ทำความสะอาดแล้วหยดใหม่

6. วาง haematocytometer ลงบนพื้นโต๊ะ 2-3 นาที เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดลงไปเรียงบนพื้นสไลด์ นับจำนวนภายในกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20x-40x

7. จำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้ในวงกลมเล็กรวมกัน 5 ช่อง คูณด้วย 10^4 และจำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ต่อหนึ่งวงกลมใหญ่คูณด้วย 2,000 คือค่าของจำนวนเม็ดเลือดแดงและขาวต่อ 1 mm^3



ภาพที่ 34 แสดงบริเวณที่จะนับจำนวนเม็ดเลือดแดง (R) และเม็ดเลือดขาว (W) บน haemacytometer

2.2 การหาค่าฮีมาโตคริต (% haematocrit) (ตามวิธีของ Larsen and Sneizsko, 1961)

ค่าฮีมาโตคริตเป็นอัตราส่วนผสมระหว่างปริมาณของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (packed cell volume) หลังจากการนำไปปั่นในอัตราเร็วตามเวลาที่กำหนดเทียบกับปริมาตรเลือดทั้งหมดคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

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

2. นำไปปั่นด้วย ฮีมาโตคริตเซนตริฟิวจ์ (haematocrit centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000-15,000 รอบต่อนาที นานประมาณ 5-10 นาที

3. นำไปวัดหาอัตราส่วนของปริมาตรเม็ดเลือดกับปริมาตรเลือดทั้งหมด นำมาคำนวณหาค่า % ฮีมาโตคริตจากสูตร

$$\% \text{ ฮีมาโตคริต} = \frac{\text{ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (มิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาณเลือดทั้งหมด (มิลลิลิตร)}} \times 100$$

2.3 การหาค่าโปรตีนรวมในซีรัมหรือพลาสมา (total serum or plasma protein) (ตามวิธีของ Lowry และคณะ, 1951)

สารเคมี

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

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

วิธีการวิเคราะห์

1. ดูดซีรัมมา 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 ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างเลือดปลาที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับค่าแอลบูลมินมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นโดนใช้แบลงค์ (blank) ที่เตรียมขึ้นตามขั้นตอนนี้แต่ไม่ได้เติมซีรัม

การเตรียมกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของโปรตีนรวมในซีรัม

1. ดูดสารละลายมาตรฐาน (standard albumin) ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 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 จะได้ความเข้มข้นของแอลบูลมินในแต่ละหลอดเท่ากับ 50, 150, 250, 350, 450 และ 500 ไมโครกรัม ตามลำดับ

3. นำแต่ละหลอดมาทำตามขั้นตอนของการหาโปรตีนรวมในซีรัมในเลือดดังที่กล่าวแล้วข้างต้น

4. นำค่าความเข้มข้นของแอลบูลมินและค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ได้เขียนกราฟมาตรฐาน โดยให้ค่าความเข้มข้นอยู่ในแกน X และค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในแกน Y แล้วหาสมการสหสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linear regression) เพื่อใช้คำนวณค่าความเข้มข้นของโปรตีนรวมในซีรัมในเลือดได้จากค่าการดูดกลืนแสง

2.4 การหาค่าฮีโมโกลบินรวม (total heamoglobin)

สารเคมี

สารละลายเดรบกิ้น (Drabkin's solution): เตรียมโดยการละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate, $NaHCO_3$) 1 กรัม โปแตสเซียมไซยาไนด์ (potassium cyanide, KCN) 0.05 กรัม และโพแตสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ (potassium ferriccyanide,$K_3Fe(CN)_6$) 0.20 กรัม ในน้ำกลั่นที่กลั่น 2 ครั้งจนได้ปริมาตรครบ 1,000 ลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดทึบแสง มีอายุการใช้งาน 6 เดือน (ควรเก็บในตู้เย็น)

วิธีการวิเคราะห์

1. ใช้ไมโครปิเปตขนาด 20 ไมโครลิตรดูดเลือดที่เจาะได้ใหม่ๆ มาผสมรวมกับ สารละลายเดรบกิ้น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีแล้วทิ้งไว้อย่างน้อย 20 นาที

2. นำส่วนใสมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

3. ค่าที่ได้จะนำมาเปรียบเทียบกับค่าฮีโมโกลบินมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น โดยใช้สารละลายเดรบกิ้นเป็น blank

4. นำค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินมาตรฐานและค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ได้เขียนกราฟมาตรฐาน โดยให้ค่าความเข้มข้นอยู่ในแกน X และค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในแกน Y แล้วหาสมการสหสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linear regression) เพื่อใช้คำนวณค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในเลือดได้จากค่าการดูดกลืนแสง

3. วิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ [Bancroft (1967) และHumason (1979)]

สารเคมี

1. สีย้อมฮีมาทอกซิลิน (haematoxylin) เตรียมโดยใช้

ฮีมาทอกซิลิน (haematoxylin crystal)	4 กรัม
โซเดียมไอโอเดท (sodium iodate)	0.8 กรัม
อลัม (potassium aluminium sulfate, alum)	100 กรัม
กรดซิตริก (citric acid)	4 กรัม
คลอรัลไฮเดรท (chloral hydrate)	200 กรัม
น้ำกลั่น	2,000 มิลลิลิตร

ละลายอลัมลงในน้ำกลั่น เติมฮีมาทอกซิลินผสมจนกระทั่งละลายหมด จึงเติมโซเดียมไอโอเดทผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซิตริกและคลอรัลไฮเดรทผสมจนกระทั้งเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้งาน

2. สีย้อมอีโอซิน (eosin) เตรียมโดยใช้

อีโอซิน (eosin Y.CI 45380)	1 กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ (ethyl aclohol)	1,000 มิลลิลิตร
กรดอะซิตริกเข้มข้น	5 มิลลิลิตร

ผสมเข้าด้วยกัน

การเตรียมตัวอย่าง

1. สลบด้วยน้ำมันกานพลูที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 50 ส่วนในล้านส่วน

2. ใช้กรรไกรผ่าตัดเปิดช่องท้องของปลาออก ตัดตับและไต ออกแล้วดองเนื้อเยื่อในน้ำยาฟอร์มาลีนเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

3. ใช้กรรไกรผ่าตัด ตัดเหงือกออกแล้วดองเนื้อเยื่อในน้ำยาฟอร์มาลีนเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

4. เมื่อดองเนื้อเยื่อในน้ำยาฟอร์มาลีนเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ครบ 72 ชั่วโมง แล้วนำเนื้อเยื่อเปลี่ยนไปดองในน้ำยาฟอร์มาลีนเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

5. แล้วนำเนื้อเยื่อเปลี่ยนไปดองในน้ำยาฟอร์มาลีนเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ได้ 2-3 เดือน

ขั้นตอนการ dehydration และ embedding

1. ตบแต่งตัวอย่างที่ผ่านการดองแล้วให้มีขนาดพอเหมาะเพื่อสะดวกต่อการนำไป embed และนำไปตัด section

2. นำตัวอย่างไปผ่านขั้นตอน dehydration ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
2	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
3	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
4	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
5	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
6	แอบโซลูท แอลกอฮอล์ (absolute alcohol)	1
7	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol)	1
8	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
9	ไซลีน (xylene)	1
10	ไซลีน	1
11	พาราพลาสท์ (paraplast)	1
12	พาราพลาสท์	1

3. นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนในข้อ 2 ไป embed ด้วยพาราพลาสท์ จากนั้นนำ block ไปแช่ตู้เย็นเพื่อง่ายต่อการนำตัวอย่างไปตัด section ต่อไป

4. ตบแต่งตัวอย่างใน block ให้มีขนาดตัวอย่างพอดีกับขนาดสไลด์ และ cover grass ปิดได้สนิท จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อไมโครโตม (microtome) ให้มีความหนาประมาณ 3-4 ไมครอน นำไปลอยในน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส

5. ใช้แผ่นสไลด์ช้อนตัวอย่างแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อให้ตัวอย่างยึดติดแผ่นสไลด์ได้ดี

6. นำสไลด์ไปผ่านกระบวนการย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน โดยมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	ไซลีน	2
2	ไซลีน	2
3	ไซลีน	2
4	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
5	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
6	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
7	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
8	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
9	น้ำกลั่น	1
10	สีฮีมาทอกซิลิน	12-20
11	น้ำปะปา	3
12	น้ำกลั่น	1
13	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
14	อีโอซิน	2
15	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	2
16	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	2
17	แอบโซลูท แอลกอฮอล์	2
18	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
19	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
20	ไซลีน	2
ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
21	ไซลีน	2
22	ไซลีน	2

7. เมาท์ (mount) ด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์ (permount) แล้วนำตัวอย่างไปศึกษาพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์

ภาคผนวก ข.

GC-MS Screen for the Presence of Melamine, Ammeline, Ammelide and Cyanuric Acid

(Version 2.1)

This method for Melamine, Ammeline, Ammelide and Cyanuric Acid should be regarded as interim. Because of the need to rapidly provide this information, the method has not undergone the rigorous internal and external validation required for an official method. The performance of the method may change when different equipment and supplies are used or when different sample matrices are encountered. The user should validate the performance of the method in their laboratory and pay particular attention to the recommended quality control elements. Users should document with their results the version or date of the method used.

PURPOSE:

This procedure was developed by PRLNW and FCC to screen various matrices for the presence of melamine and some related compounds at the established minimum reporting level (MRL) of 10 μg/g and above using gas chromatography/mass spectrometry. Samples are extracted using a mixture of acetonitrile/water/diethylamine and the analytes are subsequently converted to trimethylsilyl derivatives for analysis.

SCOPE:

This procedure has been evaluated using dry protein materials (wheat gluten, rice protein, corn gluten, and soy protein), wet and dry pet foods, and dry animal feeds. It is anticipated that the method will also be applicable to a variety of other matrices.

RESPONSIBILITY:

It is the responsibility of the analyst to note any modifications to or deviations from this procedure in the documentation associated with the analysis.

DEFINITIONS AND ACRONYMS:

TMS – trimethylsilyl

DEA – diethylamine

SAFETY CONSIDERATIONS:

Accepted safety measures should be employed when working with chemicals and pressurized gases. It is advisable to work in a fume hood whenever the procedure calls for the use of diethylamine and pyridine. Use caution with diethylamine as it is a volatile strong base and can cause chemical burns.

EQUIPMENT AND SUPPLIES:

1. Agilent 5975i GC-MS system equipped with a 30 m Agilent DB5-MS capillary column (or equivalent) or other mass spectrometer system.
2. Laboratory Centrifuge capable of applying 5000 g to 50 mL centrifuge tubes.
3. Pierce Reacti-therm / Reacti-Vap Sample Preparation System or other device suitable for evaporating solutions to dryness.
4. 50-mL polypropylene centrifuge tubes with screw caps.

REAGENTS AND STANDARDS:

1. Diethylamine (DEA), SigmaUltra, Sigma Chemical Co.
2. Pyridine, Certified A.C.S. Reagent, Fisher Scientific
3. Extraction Solvent: 10 / 40 / 50 : DEA / Water / Acetonitrile

Prepare a solution which consists of 10 parts (by volume) diethylamine, 40 parts water and 50 parts acetonitrile. Store in the dark. The solution turns yellow with time.

4. Silylating Reagent: BSTFA with 1% TMCS: bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide with 1% Trimethylchlorosilane (e.g. Sylon BFT, Supelco)
5. 2,6-Diamino-4-chloropyrimidine, CAS 156-83-2, 98%: Cat. C33204-5G, Aldrich

For use as an internal standard. Prepare a stock solution at 1.0 mg/mL in pyridine. For adding to sample extracts, dilute the stock solution in pyridine to a concentration of 5.0 µg/mL. Use of 2,6-Diamino-4-chloropyrimidine (DACP) as an internal standard is still undergoing evaluation. It is up to each laboratory to verify that their internal standard does not contain any of the analytes as impurities. The Aldrich standard has been found to be free of any analyte impurities.

6. Melamine, CAS 108-78-1, Cat. 240818-5G, Aldrich

Prepare a stock solution of 1.0 mg/mL in a mixture of 20 / 80: DEA / H2O (v/v)

7. Ammelide, CAS 645-93-2, Cat. A0645, TCI America

Prepare a stock solution of 1.0 mg/mL in a mixture of 20 / 80: DEA / H2O (v/v)

Brief sonication may be required to solubilize this standard.

8. Ammeline, CAS 645-92-1, Cat. A0676, TCI America

Prepare a stock solution of 1.0 mg/mL in a mixture of 20 / 80: DEA / H2O (v/v)

A modest amount of sonication may be required to solubilize this standard.

9. Cyanuric Acid, CAS 108-80-5, Cat. C0459, TCI America

Prepare a stock solution of 1.0 mg/mL in a mixture of 20 / 80: DEA / H2O (v/v)

Store stock solutions of standards in the refrigerator to retard hydrolysis. It has not been established how rapidly the solutions degrade but the potential does exist. Stock standards have sat on the benchtop at room temperature for three weeks and shown no evidence of degradation.

QC ELEMENTS:

A 1:1 (v/v) mixture of Sylon BFT and pyridine should be run at the onset of each analysis and then occasionally throughout the analysis to show that there is no carryover.

A method blank which consists of 20 mL of extraction solvent taken through the entire procedure including the addition of the internal standard should be evaluated to make sure that there is no contamination from the reagents, the nylon filter or the containers.

Condition the system at the beginning of each sample set by making two injections of the high standard (see below). These injections will not be used for semi-quantitation.

A low standard, which consists of each analyte at 0.10 µg/mL, should be analyzed at the beginning of the sample set to show that the necessary sensitivity is being attained by the instrument.

A high standard at 1.0 µg/mL of each analyte is analyzed at the beginning of the sequence and after all samples in the batch have been injected to provide a basis for semi-quantitative evaluation and to demonstrate whether the amount of drift during the analysis of the set of samples is tolerable.

A control sample which is representative of the type of samples which are being analyzed is fortified with each analyte (viz. melamine, ammelide, ammeline and cyanuric acid) at a level of 10 µg/g. Analysis of this spiked control sample must indicate that the compounds are present which serves to demonstrate effective system performance at the desired reporting level. See Sample Fortification, below.

PROCEDURE:

This procedure should be used with the GC operating in the splitless mode for greater sensitivity.

A. Extraction Procedure

Weigh out approximately 0.5 g of a representative portion of the sample into a 50mL polypropylene centrifuge tube.

Add 20 mL of extraction solvent (10:40:50 DEA : H_2O : Acetonitrile).

Mix well to thoroughly wet the entire sample.

Sonicate for 30 minutes.

Centrifuge for 10 minutes at 5000 g (or better).

Filter a portion of the supernatant using 0.45µm nylon filter discs (a two-stage or molecular weight cutoff filter may be used for difficult extracts). For example, a 2 mL filtered portion will allow 200 µL for the derivatization step and additional filtrate in the event that the derivatization needs to be repeated or if further work is necessary.

B. TMS-Derivatives

Sample Extracts:

Transfer 200 µL of filtrate from Step A to a GC vial.

Note: A smaller aliquot may be used provided that the necessary sensitivity level (10 µg/g of sample) is achieved. Reducing the amount of matrix present improves the general performance of the evaporation/derivatization step and saves wear and tear on the instrument.

Evaporate to dryness at 70°C (a low flow stream of dry air or nitrogen may be used).

Note: Taking the filtrate completely to dryness is a critical step in the derivatization process. The presence of water prevents formation of TMS derivatives of the analytes. If the internal standard response is much lower than usual (less than 30%), there may have been problems associated with the derivatization step. In addition, if the vial warms significantly to the touch after addition of the derivatization reagents, residual water was present and a new aliquot of filtrate must be prepared.

Add 200 µL pyridine.

Add 200 µL Sylon BFT.

Add 100 µL of the internal standard solution at 5.0 µg/mL in pyridine. This produces a concentration in the extract of 1.0 µg/mL. If you are not using the internal standard, then add 100 µL of pyridine.

Shake well or vortex to mix.

Incubate at 70°C for 45 minutes.

Ready for Injection.

Note: If insoluble material is observed at the bottom of the vial after 45 minute incubation, transfer liquid portion to another GC vial or filter before analysis.

C. Instrument Parameters

GC Conditions:

Column	30m DB-5MS 5% phenyl 95% dimethyl-polysiloxane
	ID: 0.25mm Film Thickness: 0.25 microns
Inlet Temperature	280°C
Detector Temperature	290°C
Injection Mode	Splitless
Injection Volume	1 µL
Carrier Gas Flow	He at 35 cm/sec (constant flow)
Oven Program	75°C (hold 1 minute) to 320°C at 15°C/minute (hold 2.67 min) for a total run time of 20 min.

Note: Alternate GC conditions may be used provided that adequate resolution is obtained between the target analytes. Any such deviations from the method must be noted in corresponding documentation. With small volume liners, some peak splitting has been observed under the above conditions. Using a higher starting temperature (100°C) alleviated the problem. To help overcome interferences, significant additional resolution may be obtained by decreasing the ramp to 4°C/min over the interval 150°C to 200°C, which will shift the retention times.

MS Conditions (Full Scan Mode):

Tune	Autotune (to maximize sensitivity across mass range)
	A +306V multiplier bump may be added after Autotuning
Acquisition parameters	EI; scan mode, 50-450 amu
Sampling Rate	2 (scan rate at ~3.6 scans/sec)
Threshold	100
Filament Delay	6 minutes
MS Temp	230°C (Source); 150°C (Quad)

If the sensitivity which is required to detect analyte spikes at 10 □g/g in the matrix cannot be achieved in full scan mode, use selected-ion monitoring (SIM) parameters below.

MS Conditions (SIM Mode): Select three or four ions to track: M, M+2, M-15 and another

Group	Start Time [a] (min)	Ions [b]					
		M [c]	M + 1	M + 2	M - 15	Other	Other
Urea / Biuret from di- and tri-TMS derivatives of urea [d]	6	276 (tri-tms) 204 (di-tms)			189 (di-tms) 261 (tri-tms)	171	
Cyanuric Acid	9	345 (100)[e]	346 (30)	347 (14)	330 (33)	188 (11)	

Ammelide	9.7	344 (100)	345 (30)	346 (14)	329 (50)	286 (7)	198 (28)
DACP (internal std.)	10.18	288	289	290	273	275	237
Ammeline	10.5	343 (100)	344 (30)	345 (14)	328 (115)	285 (30)	198 (27)
Melamine	11	342 (54)	343 (16)	344 (8)	327 (100)	285 (12)	197 (13)

[a] Start Times may need to be adjusted based upon the retention time of standards on your system.

[b] Dwell times should be adjusted to produce a cycle time of about 4 scans/sec

[c] M is the Molecular Ion for the tri - TMS derivative of the compound.

[d] Urea and Biuret are not formally part of the screen but they are related to the compounds of interest and may be detected

[e] Percent relative abundance with respect to the most abundant ion from directly silylated standards under Standard Spectrum Autotune. The relative abundances should be confirmed under the conditions of use by evaluating standards.

D. Peak Identification and Results

The approximate retention times of the tri-TMS derivatives are as follows (minutes):

Cyanuric Acid	9.2
Ammelide	10.0
DACP	10.3 (di-TMS derivative)
Ammeline	10.7
Melamine	11.2

These need to be confirmed on your system and the parameters above adjusted to fit. Figure 1 is a standard chromatogram showing the cyanuric acid tri-TMS derivative (9.2 minutes), ammelide tri-TMS derivative (10.0 minutes), ammeline tri-TMS derivative (10.7 minutes) and melamine tri-TMS derivative (11.2 minutes). Figures 2 through 5 represent the mass spectra of each of these compounds. Figure 6 represents the mass spectrum of 2,6-diamino-4-chloropyrimidine di-TMS derivative.

When full scan mode is used and the matrix is even somewhat complicated, it is usually necessary to examine tracings of individual ions (extracted ion chromatograms) to observe the analytes. The extracted ion chromatograms may be generated for each analyte (see SIM table above for appropriate ions) which will help simplify the process of confirming positive or negative results (i.e. pulling things out of the grass). Ideally, each of these analytes and the internal standard can be entered into the data analysis portion of the Chemstation software as a target compound. By entering the appropriate retention time, ion ratios and peak area for each compound, the software can calculate sample results automatically. Results can be reviewed using the "QEdit" view which also provides an excellent visual display for documentation of sample results (see Figure 7 for a sample QEdit report for melamine).

In full scan mode, the criteria for identification of target analytes include the agreement of the retention times with those of the standards to within 0.05 minute. Also, the mass spectra need to correspond to those of the standards with no significant peaks absent. There may be additional peaks present due to overlap with other components but this should be examined carefully.

In SIM mode, the criteria for identification of target analytes include the agreement of the retention times with those of standards to within 0.05 minute. Mass spectral confirmation of an analyte is based upon the ratios of the integrated areas for selected ions to the integrated area of the most abundant of the selected ions being tracked. The criterion is that each ratio (as a percentage) corresponds to that observed for a standard to within 10 units. Using melamine as an example, track the ions at 342 (M), 327 (M-15) and 343 (M+1), use the data in the table above as representative of a standard. For a peak nominally identified as melamine based upon retention time, the ratio of the area of peak (at 11.2 min) from m/z = 342 (M) to that of the area of the peak at m/z = 327 (M-15) needs to be between 44% and 64% while that of the ratio of the peak at m/z = 343 (M+1) to that of the area of the peak at m/z = 327 (M-15) needs to be between 6% and 26%.

E. Sample Fortification and Mixed Standard Preparation

A Mixed Standard Spiking solution is prepared by mixing portions of the stock standard solutions with 10/40/50 DEA/Water/Acetonitrile to create a solution which is 100 µg/mL of each analyte.

Spike Preparation

Weigh a 0.5 g portion of the matrix of interest into a 50 mL centrifuge tube. A previously analyzed, representative "blank" matrix may be used. If a representative matrix is not available, select one of the samples to be analyzed to use for spiking.

Add 50 µL (Low Spike) of Mixed Standard Spiking solution directly to the representative control sample and proceed with the method. The Low Spike must be observed to declare negatives as less than 10 µg/g. If it is not then negative samples will need to be re-analyzed.

A High Spike may also be prepared by adding 250 µL of Mixed Standard Spiking to another 0.5 g portion of the control. The High Spike provides an additional check in the event the Low Spike is not observed. The absence of the High Spike would serve as an indication of a major problem either with the sample preparation or the instrument.

High Standard

Dilute the Mixed Standard Spiking Solution to 10 µg/mL. Place 50 µL of this solution in a vial and take it through the derivatization reaction including the addition of the internal standard. This produces a High Standard at a concentration of 1.0 µg/mL of each analyte.

Low Standard

Dilute the Mixed Standard Spiking Solution to 1 µg/mL. Place 50 µL of this solution in a vial and take it through the derivatization reaction including the addition of the

internal standard. This produces a Low Standard at a concentration of 0.10 µg/mL of each analyte.

F. Reporting

In the event that the analytes were observed in the representative control sample that was fortified at 10 µg/g, and no analyte signals were observed in the samples at levels which approach those in the fortified control, then the samples are not contaminated with melamine, ammeline, ammelide or cyanuric acid at levels in excess of 10 µg/g.

When it is close (within 50%), consider preparing additional portions from those samples along with a couple of additional fortified controls.

If it is clear that one or more of the analytes are present in the samples (based on the identification criteria above) and at levels in excess of 10 µg/g, then a semi-quantitative estimate may be obtained by comparing analyte responses to those from standards as described below.

G. Obtaining a Semi-quantitative Estimate of Target Analytes

Choose an ion to use for estimating the amount of the target analyte (usually the molecular ion). Using the High Standard (1.0 µg/mL) which was run at the beginning of the set of samples and the High Standard that was run at the end of the set of samples, calculate the average peak area for the selected ion. Apply the following formula:

Concentration in Derivatized Test Sample Extract (µg/mL) = Area (Test Sample) / Average Area (Standard) X 1.0 µg/mL.

Then, Concentration in Sample (µg/g) = Concentration in Derivatized Test Sample Extract (µg/mL) X 0.50 mL X 20.0 mL / 0.20 mL X 1 / Sample Wt. (g)

If the internal standard areas are very different (> 20%) between the test sample and the standard then adjust the area of each analyte response by dividing by the integrated area of the internal standard (from its molecular ion). Use these ratios in place of the integrated areas

above. Consider re-analysis if the difference is extremely large since that may indicate a partially clogged syringe or other instrumental problem.

Finally, if the signal is more than 25 X larger than the signal from the standard, then prepare a new extract using 0.25 g of sample and 40 mL of the extraction solvent since the solubility limit for ammeline and ammelide in 10/40/50 DEA/water/acetonitrile is being approached.

As a general rule-of-thumb, the closer the analyte signal from the unknown is to the analyte signal from the standard, the better the estimate of the unknown concentration. So if more accurate numbers are required, prepare additional standards and re-analyze the samples in question.

H. Contacts for Further Technical Information

Jonathan Litzau, Forensic Chemistry Center (FCC), US FDA (513) 679-2700 Ext. 268
Email: jonathan.litzau@fda.hhs.gov

Greg Mercer, Pacific Regional Laboratory – Northwest (PRL-NW), US FDA (425) 483-4755
Email: greg.mercer@fda.hhs.gov(Primary contact for "QEdit" reporting option)

Kevin Mulligan, Forensic Chemistry Center (FCC), US FDA (513) 679-2700 Ext. 238
Email: kevin.mulligan@fda.hhs.gov

Table 1: Feasibility Study with Analytes Spiked At and Near the Action Level

		Average Percent Recovery (N=2, Range in Parentheses)			
Matrix	**Spiking Level(µg/g)**	**Cyanuric Acid**	**Ammelide**	**Ammeline**	**Melamine**
Wheat Gluten (a)	10	84 (16)	90 (20)	86 (23)	79 (10)
	50	87 (13)	88 (16)	86 (13)	74 (11)

Rice Protein (a)	10	98 (2)	101 (4)	96 (3)	96 (2)
	50	107 (1)	108 (3)	108 (1)	101 (0)
Wet Pet Food (a)	10	106 (1)	103 (5)	114 (13)	105 (6)
	50	107 (3)	107 (0)	111 (7)	106 (5)
Corn Gluten (b)	10	139 (86)	166 (96)	172 (105)	152 (93)
	50	103 (4)	103 (3)	98 (5)	90 (4)
Soybean Meal (b,c)	10	120 (44)	118 (8)	164 (150)	152 (76)
	50	97 (7)	90 (12)	90 (10)	88 (11)
Dry Cat Food Salmon Flavor (b)	10	158 (41)	142 (33)	134 (44)	126 (26)
	50	81 (3)	82 (4)	74 (5)	77 (5)

Notes:

(a) 0.5 g extracted into 20 mL of 10/40/50 DEA/H2O/CH3CN (v/v/v). 0.20 mL extract to 0.45 mL silylated preparation. Analysis using scan mode on a 5975i MSD. Extracted ion chromatograms were used to determine area response for molecular ions.

(b) 0.5 g extracted into 10 mL of 10/40/50 DEA/H2O/CH3CN (v/v/v). 0.20 mL extract to 0.45 mL silylated preparation. Analysis by SIM on an Agilent 5973 MSD.

(c) Rubbery precipitate in some final extracts that can clog the syringe

Figure 1: Standard chromatogram showing the TMS derivatives of target compounds

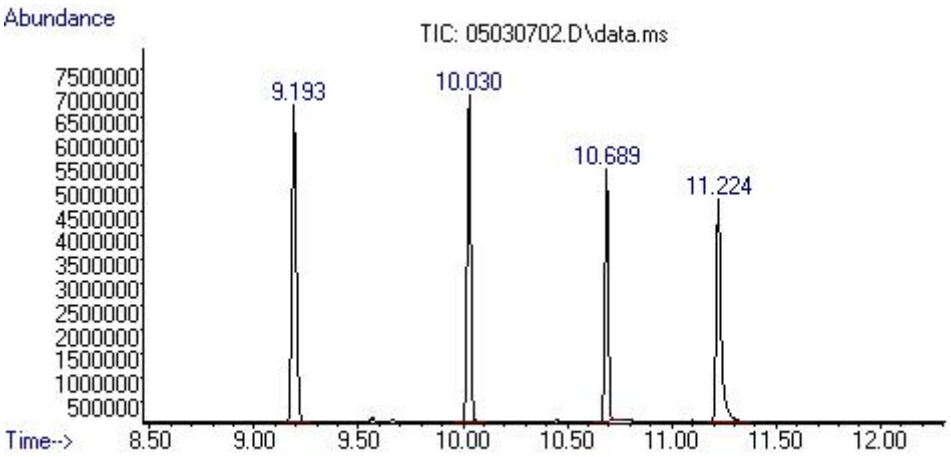


Figure 2: Cyanuric Acid tri-TMS derivative mass spectrum

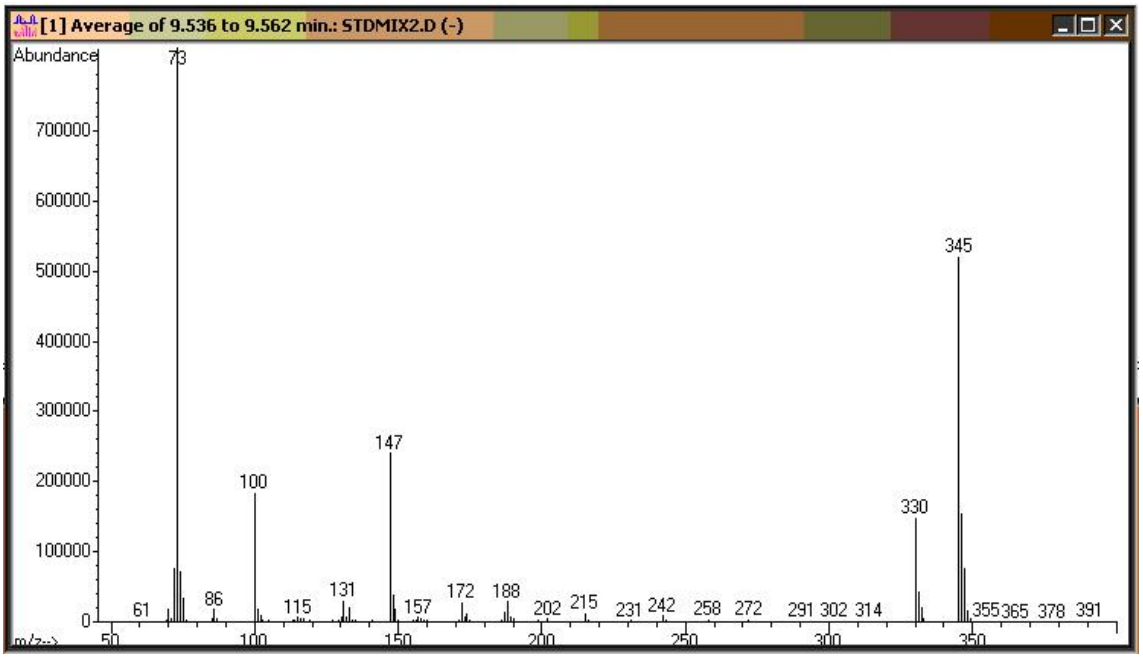


Figure 3: Ammelide tri-TMS derivative mass spectrum

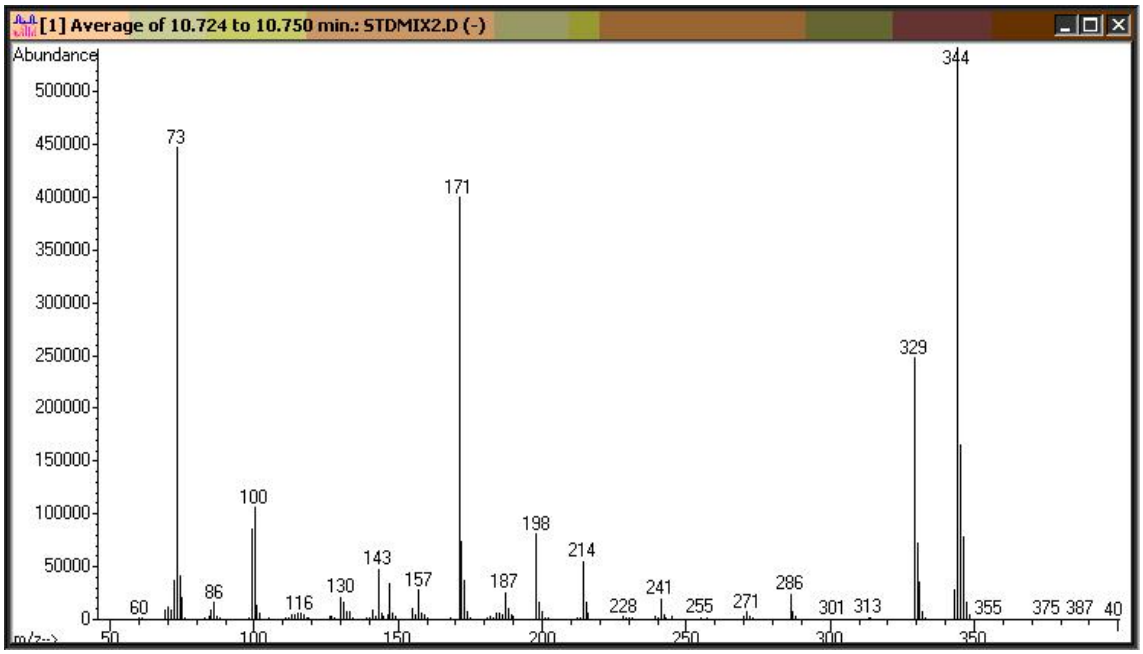


Figure 4: Ammeline tri-TMS derivative mass spectrum

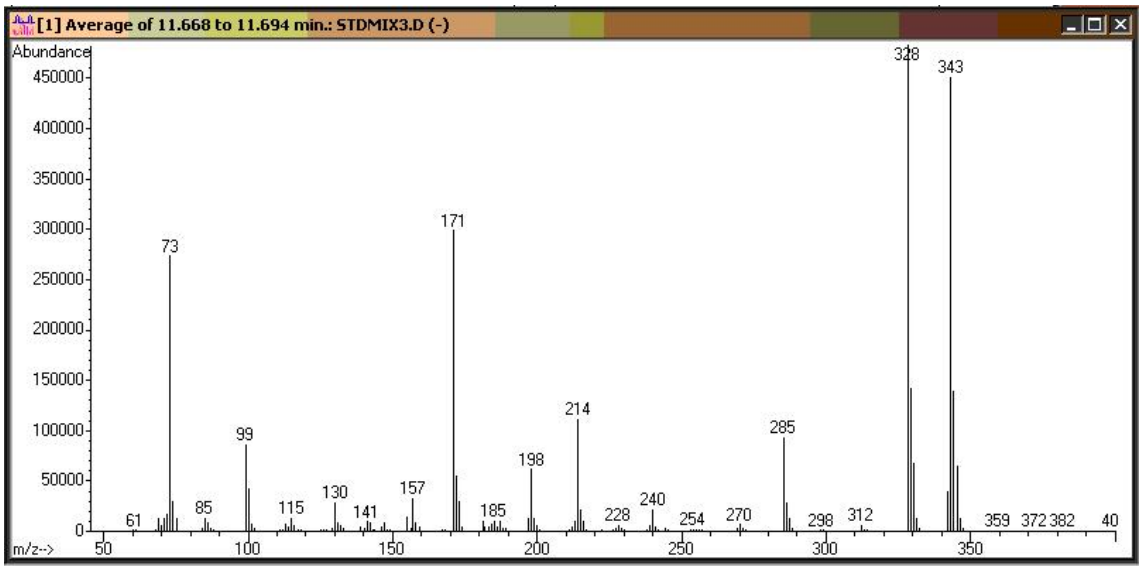


Figure 5: Melamine tri-TMS derivative mass spectrum

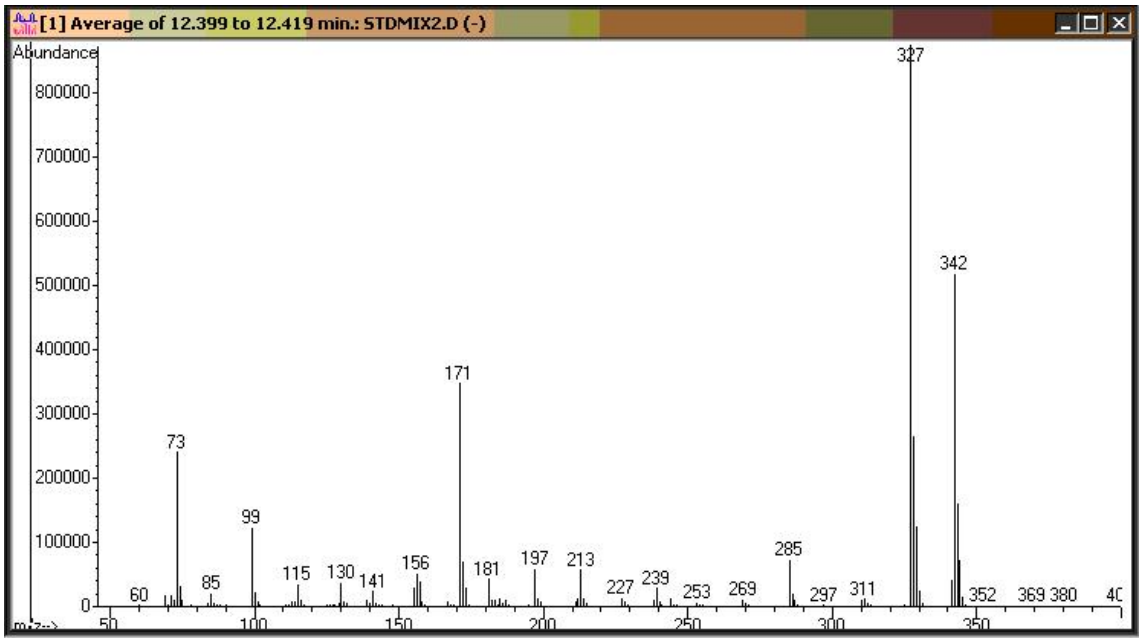


Figure 6: 2,6-Diamino-4-chloropyrimidine di-TMS derivative mass spectrum

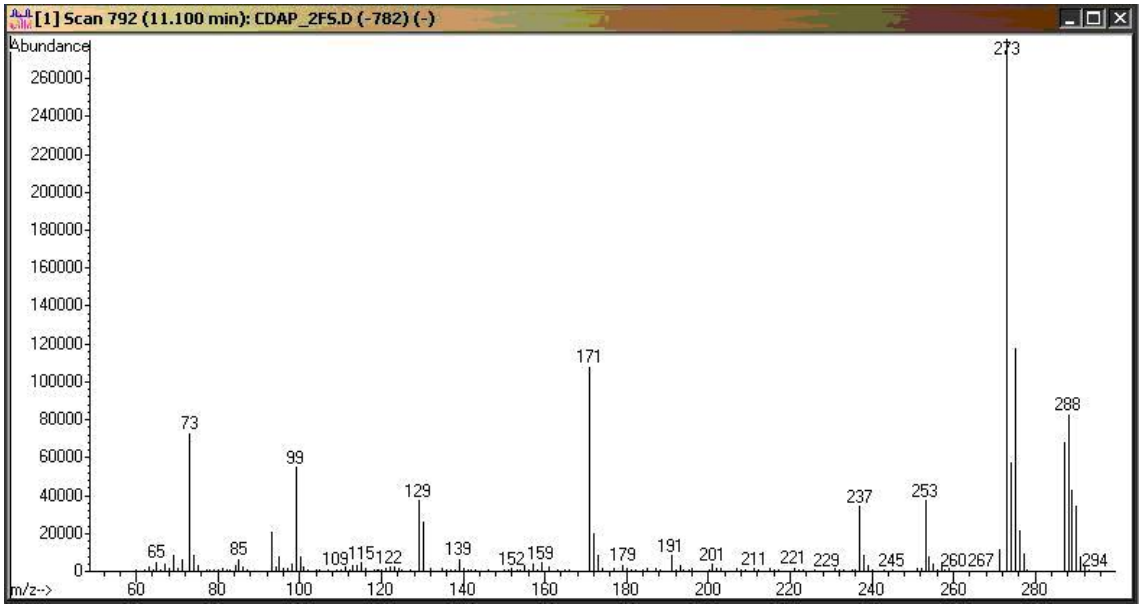
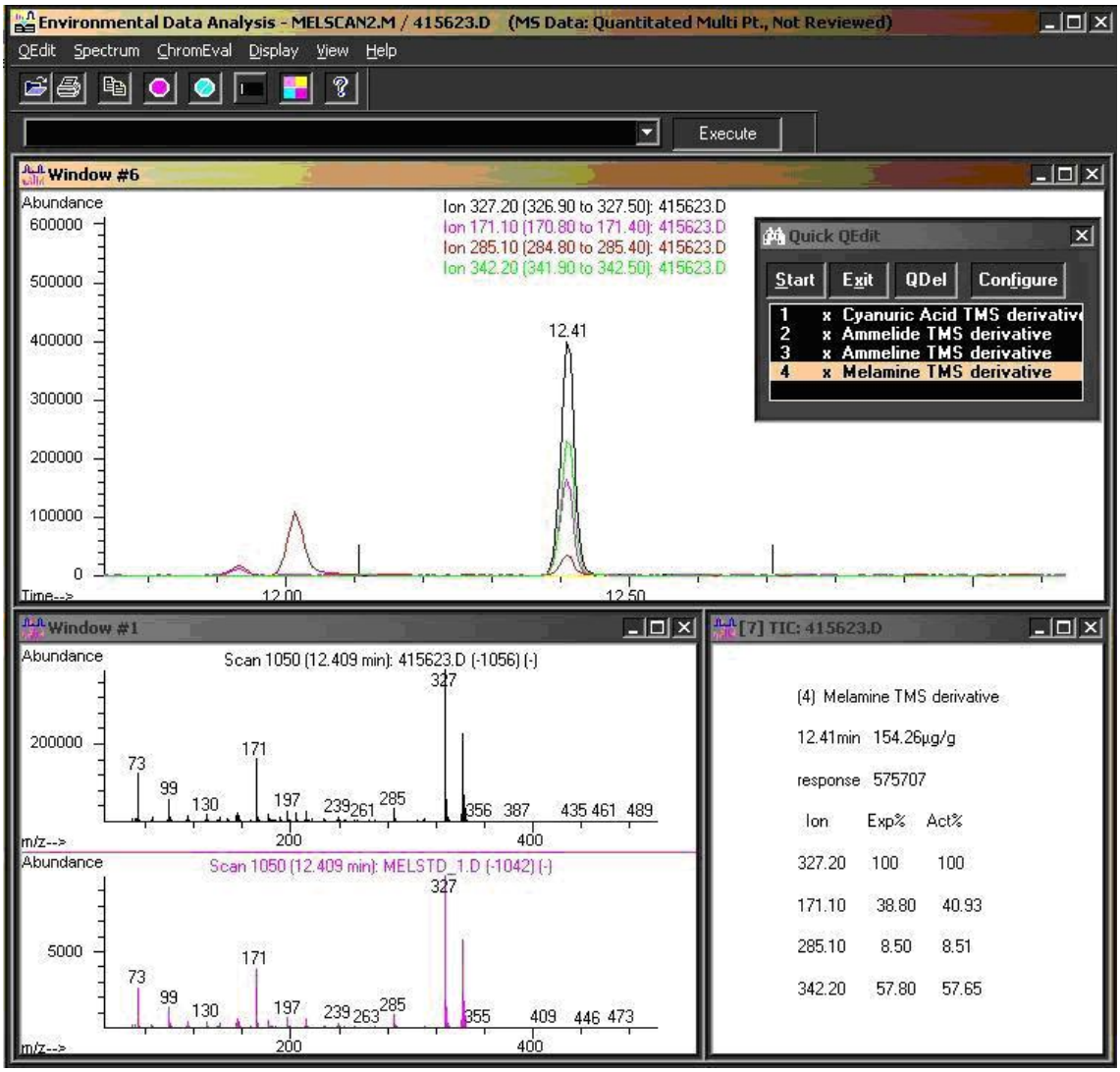


Figure 7:Example of a QEdit report for melamine



ภาคผนวก ค.

การวิเคราะห์สถิติของผลการทดลอง

1. ANOVA

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสัปดาห์ที่ 2

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.510	6	.918	7.038	.001
Within Groups	1.827	14	.130		
Total	7.337	20			

2. ANOVA

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสัปดาห์ที่ 4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16.870	6	2.812	4.301	.012
Within Groups	9.152	14	.654		
Total	26.022	20			

3. ANOVA

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสัปดาห์ที่ 6

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	34.195	6	5.699	2.383	.085
Within Groups	33.488	14	2.392		
Total	67.683	20			

4. ANOVA

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสัปดาห์ที่ 8

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	156.506	6	26.084	4.824	.007
Within Groups	75.704	14	5.407		
Total	232.210	20			

5. ANOVA

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสัปดาห์ที่ 10

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	703.688	6	117.281	5.348	.005
Within Groups	306.993	14	21.928		
Total	1010.681	20			

6. ANOVA

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสัปดาห์ที่ 12

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1514.483	6	252.414	7.270	.001
Within Groups	486.096	14	34.721		
Total	2000.579	20			

7. ANOVA

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	942546.478	6	157091.080	7.133	.001
Within Groups	308330.440	14	22023.603		
Total	1250876.918	20			

8. ANOVA

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.567	6	.261	6.714	.002
Within Groups	.544	14	.039		
Total	2.111	20			

9. ANOVA

อัตราการกินอาหาร

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.703	6	.117	1.495	.250
Within Groups	1.097	14	.078		
Total	1.800	20			

10 ANOVA

อัตราการรอด

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	94.141	6	15.690	.529	.777
Within Groups	414.896	14	29.635		
Total	509.037	20			

11. ANOVA

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.278	6	.046	2.292	.094
Within Groups	.283	14	.020		
Total	.561	20			

12. ANOVA

ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.001	6	.333	8.631	.000
Within Groups	.541	14	.039		
Total	2.541	20			

13. ANOVA

โปรตีนที่ใช้ประโยชน์ได้

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	566.273	6	94.379	10.712	.000
Within Groups	123.349	14	8.811		
Total	689.622	20			

14. ANOVA

ค่าฮีมาโตคริต

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	459.929	6	76.655	13.036	.000
Within Groups	364.577	62	5.880		
Total	824.506	68			

15. ANOVA

ปริมาณเม็ดเลือดแดง

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	210696250000.000	6	35116041666.667	1.315	.286
Within Groups	694153750000.000	26	26698221153.846		
Total	904850000000.000	32			

16. ANOVA

ปริมาณเม็ดเลือดขาว

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5166978125.000	6	861163020.833	55.877	.000
Within Groups	354471875.000	23	15411820.652		
Total	5521450000.000	29			

17. ANOVA

โปรตีนในซีรัม

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.262	6	.210	2.229	.146
Within Groups	.755	8	.094		
Total	2.017	14			

18. ANOVA

ฮีโมโกลบินรวม

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	440.090	6	73.348	19.381	.000
Within Groups	79.478	21	3.785		
Total	519.567	27			

19. ANOVA

โปรตีนในซากปลาทั้งตัว

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	210.514	7	30.073	4.587	.002
Within Groups	157.347	24	6.556		
Total	367.861	31			

20. ANOVA

ไขมันในซากปลาทั้งตัว

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	358.380	7	51.197	138.089	.000
Within Groups	5.932	16	.371		
Total	364.312	23			

21. ANOVA

เถ้าในซากปลาทั้งตัว

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	26.277	7	3.754	13.176	.000
Within Groups	4.558	16	.285		
Total	30.835	23			

22. ANOVA

ความชื้นในซากปลาทั้งตัว

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	14.518	6	2.420	8.455	.006
Within Groups	2.003	7	.286		
Total	16.522	13			

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวปวีณา จันทร์เล็ก

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4910620037

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ทางทะเล)	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง	2548

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ปวีณา จันทร์เล็ก มะลิ บุณยรัตผลิน และ วุฒิพร พรหมขุนทอง. 2552. ผลของเมลามีน (melamine) ต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในปลาดุกพันธุ์ผสม[*Clarias macrocephalus* (Günther) x *Clarias gariepinus* (Burchell)]. ว. การประมง. ฉบับที่ 4. 64 : 331-340.