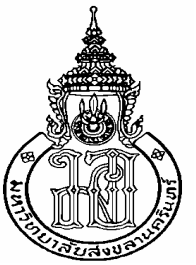


ผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร องค์ประกอบเลือด และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อในปลากะพงขาว

Effects of melamine on growth performance, feed efficiency, blood components and histological changes in seabass, *Lates calcarifer* (Bloch)

ธานินทร์ เกตุประกอบ

Tanin Kateprakob

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
2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร องค์ประกอบเลือด และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อใน ปลากะพงขาว *Lates calcarifer* (Bloch)

ผู้เขียน นายธานินทร์ เกตุประกอบ

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ดร.สุภฎา คีรีรัฐนิคม)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประภาพร อุทารพันธุ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สถาพร ดิเรกบุษราคม)

.....กรรมการ
(ดร.สุภฎา คีรีรัฐนิคม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร องค์ประกอบเลือด และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อใน ปลากะพงขาว *Lates calcarifer* (Bloch)

ผู้เขียน นายธานินทร์ เกตุประกอบ

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

ปีการศึกษา 2554

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของเมลามีนในอาหารต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อในปลากะพงขาว โดยแบ่งการทดลองเป็น 6 ชุดการทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ ใช้ปลาขนาดน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นประมาณ 7.5 กรัมต่อตัว จำนวน 20 ตัวต่อซ้ำ ในถังที่มีปริมาตรน้ำ 193 ลิตร ให้อาหารวันละ 2 มื้อ ทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ โดยผสมเมลามีนลงในอาหารตามระดับความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, และ 0.8 เปอร์เซ็นต์ (M 0 %, M 0.1 %, M 0.2 %, M 0.4 %, M 0.6 % และ M 0.8 %) ตามลำดับ ให้อาหารวันละ 2 มื้อ ระยะเวลาในการทดลอง 8 สัปดาห์ ผลการศึกษา พบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ผสมเมลามีนที่ระดับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ทำให้การเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำกว่าปลาในชุดทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นอกจากนี้ค่า blood urea nitrogen (BUN) ของปลาที่ได้รับอาหารที่ผสมเมลามีนตั้งแต่ระดับ 0.2 - 0.8 เปอร์เซ็นต์ มีค่าต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม ส่วนค่าโซเดียม โปแตสเซียม และคลอไรด์ของปลาที่ได้รับอาหารที่ผสมเมลามีน มีค่าสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม ผลขององค์ประกอบของตัวปลาที่ได้รับอาหารผสมเมลามีนระดับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าไขมันต่ำ แต่เถ้ามีปริมาณสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ผสมเมลามีนในชุดทดลองอื่น ๆ และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าเหงือกของปลาที่ได้รับอาหารที่ผสมเมลามีนระดับ 0.6 เปอร์เซ็นต์ มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (hyperplasia) ที่ gill lamellar และพบการแบ่งเซลล์มากผิดปกติอย่างรุนแรงขึ้น (severe hyperplasia) เมื่อปลาได้รับอาหารที่ผสมเมลามีนสูงขึ้นที่ระดับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ เนื้อเยื่อตับเกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ตับ และมีการหดตัวของนิวเคลียส (pyknotic nuclei) ของปลาที่ได้รับอาหารที่ผสมเมลามีนที่ระดับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนของเนื้อเยื่อไตพบว่าเกิดการเสื่อมสลายของท่อไต และมีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (glomerrulus) ของปลาที่ได้รับอาหารที่ผสมเมลามีนที่ระดับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของปลาที่ได้รับอาหารที่ผสมเมลามีนทุกระดับ

Thesis Title	Effects of melamine on growth performance, feed efficiency, blood components and histological changes in seabass, *Lates calcarifer* (Bloch)
Author	Mr. Tanin Kateprakob
Major Program	Aquatic Science
Academic Year	2011

Abstract

The study was conducted to determine the effects of melamine on growth performance, blood components and histological changes in seabass, *Lates calcarifer* (Bloch). The trial comprised 6 treatments with 4 replications each. Fingerling seabass with an initial average weight of 7.5 g were released into fiber glass tanks 193 liters of water with 20 fish/replication. Trial feeds were given twice daily for 8 a week period. Melamine was mixed in the diets at 6 different followied by 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, and 0.8 % (M 0 %, M 0.1 %, M 0.2 %, M 0.4 %, M 0.6 % and M 0.8 %) respectively. The results indicated that the fish which received a diet with 0.8 % melamine showed the worst growth performance, and feed efficiency ($p<0.05$). Furthermore blood urea nitrogen (BUN) of fish fed with 0.2 % melamine to 0.8 % gave lower value compared to the control group. Sodium, potassium and cholride in fish fed on melamine diets gave higher value than fish which received the control diet. The chemical composition of whole body in fish which received 0.8 % melamine indicated low fat but a higher level of ash content compared to the rest and the control group ($p<0.05$). Histopathological studies found that fish fed on 0.6 % melamine diet showed gill hyperplasia and lifting of gill lamellae. severe hyperplasia was diet fed and lifting of epithelial of gill lamellae in fish fed on 0.8 % melamine. The alteration of hepatocytes in form of cell degeneration and pyknotic nuclei were found in fish fed on 0.8 % melamine diet. The kidney showed tubular degeneration and shrinkage of glomerulus in fish fed on 0.8 % melamine. There was no changes in the stomach tissue of fish fed on melamine diet.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ แนะนำ ตรวจทานแก้ไข ให้ข้อเสนอแนะ และติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินการจัดทำวิทยานิพนธ์ ตลอดทั้งได้ให้แนวทาง และข้อคิดต่างๆ ที่เป็นประโยชน์แก่ข้าพเจ้าเป็นอย่างมาก

ขอขอบพระคุณ ดร. มะลิ บุณยรัตผลิน ที่ปรึกษากรมประมง ที่กรุณาให้คำปรึกษาจนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.สุภฎา คีรีรัฐนิคม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะในการทำวิจัย ตลอดจนแนวทางในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ประภาพร อุทารพันธุ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สถาพร ดิเรกบุษราคม ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ และให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์

ขอขอบพระคุณ อาจารย์นิรุทธ์ สุขเกษม อาจารย์อัจฉริยา สุวรรณสังข์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทิพย์ ค้าของ และอาจารย์คุณนิธี ลีลารัศมี อาจารย์ในโปรแกรมวิชาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต สถาบันที่ข้าพเจ้าสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี ท่านทั้งหลายได้ให้ความรู้ และอบรมสั่งสอน ให้แง่คิด คำปรึกษา และแนะนำในการศึกษา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กิจการ ศุภมาตย์ และภาควิชาวาริชศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณ คุณนัทท์ นันทพงศ์ คุณประวิทย์ ชูช่วย คุณอานูวี บากา และคุณจิรวัฒน์ ทัดแก้ว ที่ได้ให้คำปรึกษา และแนะนำแนวทางต่างๆ ในระหว่างทำการทดลอง ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นักศึกษาปริญญาโท ที่ไม่ได้กล่าวนาม ซึ่งทุกคนค่อยให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้การวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ท้ายสุดนี้ ข้าพเจ้าขอน้อมรำลึกถึงพระคุณบิดา และมารดา ที่ให้โอกาสในการศึกษา และสนับสนุนด้านการเงิน ตลอดจนญาติพี่น้อง ซึ่งอยู่เบื้องหลังแห่งความสำเร็จของข้าพเจ้า ที่ให้ความรัก ความห่วงใย และเป็นกำลังใจตลอดมา

ธานินทร์ เกตุประกอบ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
สารบัญตาราง	(9)
สารบัญภาพ	(10)
สัญลักษณ์ และคำย่อ	(14)
บทที่ 1	1
1.1 บทนำต้นเรื่อง	1
1.2 ตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
1.2.1 ปลากะพงขาว	4
1.2.1.1 ชีววิทยาของปลากะพงขาว	4
1.2.1.2 ลักษณะทั่วไป	5
1.2.1.3 การสืบพันธุ์วางไข่	5
1.2.1.4 การแพร่กระจาย	6
1.2.1.5 อุปนิสัย	6
1.2.1.6 การกินอาหาร	6
1.2.1.7 ความสำคัญด้านเศรษฐกิจ	7
1.2.1.8 ระดับความต้องการสารอาหารของปลากะพงขาว	7
1.2.1.8.1 ความต้องการโปรตีน	7
1.2.1.8.2 ความต้องการไขมัน	8
1.2.1.8.3 ความต้องการคาร์โบไฮเดรต	8
1.2.1.8.4 ความต้องการวิตามิน	8
1.2.1.8.5 ความต้องการแร่ธาตุ	10
1.2.2 เมลามีน (Melamine)	11
1.2.2.1 คุณสมบัติของเมลามีน	11
1.2.2.2 การสังเคราะห์เมลามีน	13

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
1.2.2.3 กลไกการเกิดพิษของเมลามีนในสัตว์	13
1.2.2.4 ความเป็นพิษของเมลามีนและสารอนุพันธ์	14
1.2.2.5 การปนเปื้อนเมลามีนในวัตถุดิบอาหารสัตว์	18
1.2.2.6 สถานการณ์การปนเปื้อนเมลามีนในอาหารสัตว์	19
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	21
2.1 วัสดุ	21
2.1.1 ปลาที่ใช้สำหรับการทดลอง	21
2.1.2 อาหารสำหรับอนุบาลลูกปลาก่อนเริ่มต้นการทดลอง	21
2.1.3 สารเคมี	21
2.2 อุปกรณ์	21
2.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงปลาทดลอง	21
2.2.2 อุปกรณ์เตรียมอาหารทดลอง	22
2.2.3 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการ ของอาหารทดลองและตัวปลา	22
2.2.4 อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบเลือด	23
2.2.5 อุปกรณ์ศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ	23
2.2.6 อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา	23
2.3 วิธีการทดลอง	24
2.3.1 การเตรียมอุปกรณ์ทดลอง	24
2.3.2 การเตรียมปลาทดลอง	24
2.3.3. การเตรียมอาหารทดลอง	24
2.3.4 ขั้นตอนในการเตรียมอาหารทดลอง	25
2.3.5 การวางแผนการทดลอง	29
2.3.6 การเก็บรวบรวมข้อมูล	29
2.3.6.1 การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะที่แสดงออกของปลา	29
2.3.6.2 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา	29

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.6.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปลา	31
2.3.6.4 การศึกษาผลของเมลามีนต่อองค์ประกอบเลือดปลา	31
2.3.6.5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของปลา	32
2.3.6.6 การวิเคราะห์เมลามีนในอาหารทดลอง	32
2.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล	33
บทที่ 3 ผลการทดลอง	34
3.1 การตรวจสอบพฤติกรรม และลักษณะภายนอก	34
3.2 การเจริญเติบโต	35
3.2.1 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลาที่ได้รับอาหารต่าง ๆ	35
3.2.2 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการกินอาหาร และการรอดตาย	37
3.2.3 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ	39
3.3 ส่วนประกอบทางโภชนาการของตัวปลา	41
3.4 องค์ประกอบเลือดของปลากะพงขาว	43
3.5 การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของปลากะพงขาว	45
บทที่ 4 วิจารณ์ผลการทดลอง	61
บทที่ 5 สรุป	65
เอกสารอ้างอิง	66
ภาคผนวก (ก)	75
1. การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบ อาหาร และปลาทดลอง	75
2. การวิเคราะห์เมลามีนในอาหารทดลอง	79
3. วิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการศึกษาพยาธิสภาพเนื้อเยื่อ	80
ภาคผนวก (ข) การวิเคราะห์สถิติของผลการทดลอง	84
ประวัติผู้เขียน	91

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความต้องการและอาการขาดวิตามินของปลากะพงขาว	9
2	รายงานความเป็นพิษของเมลามีนในสัตว์ทดลอง	17
3	ส่วนประกอบของวัตถุดิบอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร	26
4	คุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร	27
5	คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร	28
6	น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร ระยะเวลา 8 สัปดาห์	36
7	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการกินอาหาร และการรอดตาย ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร	38
8	อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์ จากโปรตีนสุทธิ ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร	40
9	ส่วนประกอบทางโภชนาการของปลากะพงขาวที่รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร	42
10	องค์ประกอบเลือดของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร	44

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	ลักษณะของปลากะพงขาว	4
2	สูตรโครงสร้างทางเคมีของเมลามีน ($C_3H_6N_6$) และอนุพันธ์ 3 ชนิด	12
3	การรวมตัวของ melamine และ cyanuric acid เป็น melamine cyanurate	14
4	การจับกันของ melamine และ cyanuric acid ในรูปของเครือข่ายแนวราบ	15
5	ปลากะพงขาวสิ้นสุดการทดลอง	34
6	แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน (สูตรที่ 1) ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกปกติ (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)	46
7	แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.1 % (สูตรที่ 2) ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกปกติ (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)	46
8	แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.2 % (สูตรที่ 3) ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกปกติ (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)	47
9	แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.4 % (สูตรที่ 4) ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกปกติ (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)	47
10	แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.6 % (สูตรที่ 5) มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) ที่ส่วนปลายของซี่เหงือก (secondary lamellar) (ศรชี้) (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)	48
11	แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.8 % (สูตรที่ 6)) ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกมีการแบ่งเซลล์มากผิดปกติ (severe hyperplasia) ที่ gill lamellar (ศรชี้สีดำ) เกิดการแยกตัวของ epithelial lifting (ศรชี้สีเหลือง) และเกิด fusion ของ lamellar (ศรชี้น้ำเงิน) (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)	48
12	แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน lumen ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน (สูตรที่ 1) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)	49

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน lumen ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.1 % (สูตรที่ 2) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 μm, 20x)	49
14	แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน lumen ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.2 % (สูตรที่ 3) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 μm, 20x)	50
15	แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน lumen ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.4 % (สูตรที่ 4) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 μm, 20x)	50
16	แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน lumen ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.6 % (สูตรที่ 5) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 μm, 20x)	51
17	แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน lumen ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.8 % (สูตรที่ 6) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 μm, 20x)	51
18	แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน peritoneal cavity ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีมีส่วนผสมของเมลามีน (สูตรที่ 1) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 μm, 20x)	52
19	แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน peritoneal cavity ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.1 % (สูตรที่ 2) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 μm, 20x)	52
20	แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน peritoneal cavity ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.2 % (สูตรที่ 3) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 μm, 20x)	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน peritoneal cavity ของปลากะพงขาว ที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.4 % (สูตรที่ 4) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)	53
22	แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน peritoneal cavity ของปลากะพงขาว ที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.6 % (สูตรที่ 5) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)	54
23	แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน peritoneal cavity ของปลากะพงขาว ที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.8 % (สูตรที่ 6) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)	54
24	แสดงเนื้อเยื่อตับของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน (สูตรที่ 1) ลักษณะเนื้อเยื่อตับปกติ (H&E stained, Bar = 10 µm, 40x)	55
25	แสดงเนื้อเยื่อตับของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.1 % (สูตรที่ 2) ลักษณะเนื้อเยื่อตับปกติ (H&E stained, Bar = 10 µm, 40x)	55
26	แสดงเนื้อเยื่อตับของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.2 % (สูตรที่ 3) ลักษณะเนื้อเยื่อตับปกติ (H&E stained, Bar = 10 µm, 40x)	56
27	แสดงเนื้อเยื่อตับของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.4 % (สูตรที่ 4) ลักษณะเนื้อเยื่อตับปกติ (H&E stained, Bar = 10 µm, 40x)	56
28	แสดงเนื้อเยื่อตับของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.6 % (สูตรที่ 5) ลักษณะเนื้อเยื่อตับปกติ (H&E stained, Bar = 10 µm, 40x)	57
29	แสดงเนื้อเยื่อตับของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.8 % (สูตรที่ 6) เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ตับบางส่วน ทำให้เซลล์ไม่เกาะตัวกันเป็นรูปของเซลล์ (ศรชี้สีดำ) และการหดตัวของนิวเคลียสหดตัว (pyknotic nuclei) (ศรชี้สีเหลือง) (H&E stained, Bar = 10 µm, 40x)	57
30	แสดงเนื้อเยื่อไตของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน (สูตรที่ 1) ลักษณะเนื้อเยื่อไตปกติ (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)	58
31	แสดงเนื้อเยื่อไตของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.1 % (สูตรที่ 2) ลักษณะเนื้อเยื่อไตปกติ (H&E stained, Bar = 10 µm, 40x)	58

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
32	แสดงเนื้อเยื่อไตของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.2 % (สูตรที่ 3) ลักษณะเนื้อเยื่อไตปกติ (H&E stained, Bar = 50 μm, 40x)	59
33	แสดงเนื้อเยื่อไตของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.4 % (สูตรที่ 4) ลักษณะเนื้อเยื่อไตปกติ (H&E stained, Bar = 50 μm, 40x)	59
34	แสดงเนื้อเยื่อไตของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.6 % (สูตรที่ 5) ลักษณะเนื้อเยื่อไตปกติ (H&E stained, Bar = 50 μm, 40x)	60
35	แสดงเนื้อเยื่อไตของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.8 % (สูตรที่ 6) เนื้อเยื่อไตเกิดการเสื่อมสลายของท่อไต (ศรชี้สีดำ) และมีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (glomerrulus) (ศรชี้สีเหลือง) (H&E stained, Bar = 50 μm, 40x)	60

สัญลักษณ์ และคำย่อ

%	เปอร์เซ็นต์
C	carbon dioxide
FW	molecular weight
H	hydrogen
IUPAC	international Union of Pure and Applied chemistry
LD_{50}	lethal dose 50%
M	melamine
N	nitrogen
O	oxygen
pKa	การแปลงค่าคงที่การแตกตัวของกรด (acid dissociation constant)
ppm	part per million
rpm	revolutions per minute
BUN	blood urea nitrogen
Cr	creatinine
Na	sodium
K	potassium
Cl	chloride

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

เมลามีน คือ สารชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมผลิตพลาสติก โดยมีการนำเมลามีนผสมกับฟอร์มาลีนเพื่อทำเป็นผลิตภัณฑ์ เช่น จานเมลามีน ถุงพลาสติก พลาสติกสำหรับห่ออาหาร และเมลามีนยังเป็นส่วนประกอบที่อยู่ในอุตสาหกรรมเม็ดสีเป็นหมึกพิมพ์สีเหลือง น้ำยาทำความสะอาด และปุ๋ย การที่โครงสร้างเมลามีนมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ 66.67 เปอร์เซ็นต์ เมื่อคำนวณเป็นปริมาณโปรตีนจะสูงถึง 416.66 เปอร์เซ็นต์ จึงถือได้ว่าเมลามีนเป็นโปรตีนเทียมชนิดหนึ่ง (เยาวมาลย์ และสาโรชน์, 2550; Baynes *et al*., 2008) เมลามีนถูกปลอมปนลงในวัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ เนื่องจากมีราคาถูกกว่าวัตถุดิบอาหารจากสัตว์ ซึ่งราคาของเมลามีนต่อ 1 กิโลกรัม จะถูกกว่าราคาโปรตีนที่มาจากธรรมชาติอยู่ประมาณ 4-5 เท่า จึงมีการปลอมปนมาในวัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารหลักของสัตว์ (OECD, 2002) ในส่วนอาการของพิษที่เกิดจากเมลามีนต่อมนุษย์ หากสูดดมหรือสัมผัสที่ผิวหนังจะเกิดการอักเสบและระคายเคือง จากรายงานการได้รับเมลามีนโดยการบริโภคต่อเนื่องเป็นเวลานานส่งผลให้ระบบสืบพันธุ์ถูกทำลาย เกิดนิ่วในกระเพาะปัสสาวะ หรือในไต จากการรายงานของ Chinese Milk Scandal (2008) อ้างโดย สุชาตา ชินะจิตร (2552) พบทารกในประเทศจีนป่วยด้วยอาการไตวาย เช่นเดียวกับการรายงานของ Chan *et al*., (2008) พบเด็กในประเทศจีนเสียชีวิต 4 คน เนื่องจากได้รับนมที่มีการปลอมปนเมลามีน โดยมีการตรวจพบผลึกตกค้างในไต และมีเด็กกว่า 53,000 คน ทั้งชาวจีน ฮ่องกง ไต้หวัน และมาเก๊า ป่วยเป็นนิ่วในไตจากสารเมลามีน นอกจากนี้เมลามีนยังเป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (bladder cancer) แต่จากการรายงานของ HSDB (2007a) พบว่าเมลามีนไม่จัดว่าเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogenicity) ในมนุษย์ จากการตรวจสอบของคณะกรรมการอาหารและยาสหรัฐ (FDA) พบการปนเปื้อนของเมลามีนในสินค้าอาหารสัตว์เลี้ยงที่นำเข้าจากจีน ส่งผลให้สุนัขและแมวในสหรัฐและแอฟริกาใต้ล้มป่วยและตายเป็นจำนวนมาก ในทวีปยุโรปหน่วยงานความปลอดภัยด้านอาหารประจำสหภาพยุโรป (EFSA) ได้ออกมาตรการให้ประเทศสมาชิกทั้ง 27 ประเทศ ตรวจเข้มการปนเปื้อนของสารเมลามีนในสินค้า อาทิ กลูเท่นจากข้าวสาลี กลูเท่นจากข้าวโพด กลูเท่นจากถั่ว ข้าวเจ้าโปรตีนสูง และรำข้าว ที่นำเข้าจากประเทศที่สาม โดยเฉพาะสินค้า

ที่นำเข้าจากจีน หลังจากตรวจพบสินค้าที่มีการใช้เมลามีนผสมในอาหารสำเร็จรูป เช่น ขนมปัง เส้นพาสต้า พิซซ่า และอาหารสำหรับเด็ก (นิตยสารธุรกิจสัตว์น้ำ, 2550)

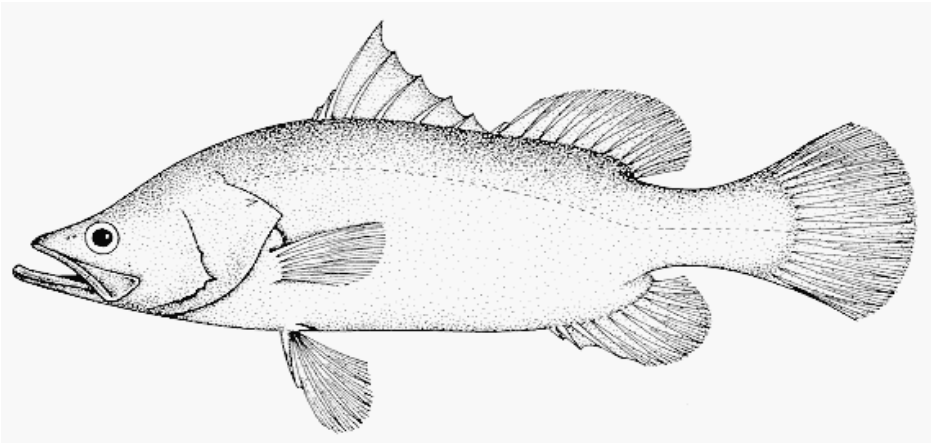
ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำประสบปัญหาราคาอาหารสัตว์น้ำมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารมีราคาสูงขึ้น และมีแนวโน้มปริมาณที่ไม่เพียงพอกับความต้องการใช้ โดยเฉพาะปลาป่นและกากถั่วเหลืองซึ่งเป็นวัตถุดิบที่นิยมใช้มากที่สุด (FAO, 2006) เนื่องจากปริมาณโปรตีนในอาหารเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อคุณภาพและราคาของอาหาร ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการปลอมปนวัตถุดิบให้มีโปรตีนเพิ่มขึ้น ส่งผลให้วัตถุดิบอาหารมีมูลค่าเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยมีการลักลอบนำเมลามีนใส่ในวัตถุดิบอาหารสัตว์น้ำเพื่อทำให้โปรตีนเพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับบทความใน นิตยสารธุรกิจสัตว์น้ำ (2550) รายงานว่ากระทรวงเกษตรของจีนลงพื้นที่ตรวจบริษัทผู้ผลิตอาหารสัตว์และฟาร์มเลี้ยงสัตว์ถึง 250,400 แห่ง พบอาหารสัตว์ปนเปื้อนสารเมลามีนกว่า 3,500 ตัน และเมื่อสอบสวนยังพบว่าเกษตรกรจีนได้ใช้สารเมลามีนเติมลงในอาหารสัตว์ตั้งแต่เมื่อ 5 ปีที่แล้ว โดยเริ่มจากอาหารสัตว์น้ำเป็นอันดับแรก ภายหลังนำมาเติมลงในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ประเภทอื่น ในประเทศไทยพบความเป็นพิษของเมลามีนที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์บก เช่น ในสุกรพบว่าสุกรมีลักษณะผอม ตาค่อนข้างบวม ปัสสาวะมีกลิ่นเหม็นรุนแรง พื้นคอกสีขาวจากการขับเมลามีนออกมากับปัสสาวะ ผิวหนังที่มีการสัมผัสเมลามีนจะเป็นมะเร็ง (ภาณุวัฒน์ และกิตติกร, 2551) ซึ่งจากการรายงานของ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ (2554) กรมปศุสัตว์ได้จัดทำโครงการตรวจหาระดับการปนเปื้อนของเมลามีนในปลาป่น ปลา และกระดูกปลาป่น เนื่องจากเมลามีนสามารถทำให้สัตว์ป่วยเป็นโรคเกี่ยวกับไต หากได้รับติดต่อกันจนสะสมในระดับเกิดอันตราย โดยสำนักคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศไทย ได้มีการกำหนดค่ามาตรฐานการปนเปื้อนของเมลามีนไม่เกิน 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในอาหารคน และหน่วยงานความปลอดภัยด้านอาหารประจำสหภาพยุโรป (EFSA) ได้เสนอให้กำหนดค่าอนุโลมในการบริโภคต่อวันของมนุษย์และสัตว์ (Tolerable Daily Intake ;TDI) ไว้ที่ระดับ 0.50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/ตัว/วัน (สมาคมผู้เลี้ยงสุกรแห่งประเทศไทย, 2550) ในส่วนของสัตว์น้ำมีการศึกษาระดับของของเมลามีนที่ทำให้เกิดพิษ เช่น ปวีณา และคณะ (2552) พบว่าปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารผสมของเมลามีนที่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไปถึง 3.0 เปอร์เซ็นต์ มีสีผิวของลำตัวที่คล้ำขึ้น ค่าองค์ประกอบเลือดต่ำกว่าชุดควบคุม มีการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อเหงือกอย่างรุนแรง เกิดการตายของเซลล์ตับ ส่วนของเนื้อเยื่อไตมีการเสื่อมสลายที่ epithelium cell บางส่วนของท่อไต และมีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (Glomerrulus) เช่นเดียวกับการทดลอง นัทท์ และวุฒิพร (2554) พบว่าปลานิลแดงที่ได้รับอาหารผสมของเมลามีนที่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไปถึง 3.0 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของเนื้อเยื่อไตมีการเปลี่ยนแปลง โดยเกิดการเสื่อมสลายของ epithelium cell บางส่วนของท่อไต

มีการเสื่อมสลายของโกลเมอรูลัส (Glomerrulus) และท่อไตบางส่วน จะพบว่ามีความรุนแรงตามระดับของเมลามีนที่เพิ่มสูงขึ้น

จากข้อมูลการศึกษาผลของเมลามีนในอาหารปลาดุกพันธุ์ผสม และปลานิลแดงข้างต้น มีการผสมเมลามีนในอาหารระดับต่ำสุดที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ไปจนถึง 3 เปอร์เซ็นต์ การทดลองในครั้งนี้ จึงมีการผสมเมลามีนในอาหารปลากะพงขาวในปริมาณที่ต่ำกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อศึกษาผลของการได้รับพิษจากเมลามีนที่ต่ำกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ ทั้งด้านการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อในส่วนต่างๆ ของปลากะพงขาว ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ทำการเลี้ยงปลากะพงขาว ให้ทราบถึงอาการของปลากะพงขาวที่ได้รับพิษจากเมลามีนที่ปนเปื้อนในอาหาร

1.2 ตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 ปลากะพงขาว



ภาพที่ 1 ลักษณะของปลากะพงขาว
ที่มา : De Bruin และคณะ (1995)

1.2.1.1 ชีววิทยาของปลากะพงขาว

อนุกรมวิธานของปลากะพงขาว

Phylum Chordata

Class Pisces

Subclass Teleostomi

Order Perciformes

Suborder Percoidei

Family Centropomidae

Genus *Lates*

Species : *calcarifer*

ชื่อสามัญ: seabass, white seabass, silver seabass, giant perch, plamer, cock-up, barramundi, (Rabanal *et al.,* 1992) และ giant seaperch (กรมประมง, 2531)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Lates calcarifer* (Bloch)

1.2.1.2 ลักษณะทั่วไป

ปลากะพงขาวมีลักษณะลำตัวยาว (elongate) และหนา แบนข้างเล็กน้อย บริเวณไหล่โค้งมนปากกว้าง ริมกระดูกแก้มหยัก กระดูกริมฝีปากบนยาวเลยตา มีฟันแบบ villiform เป็นแถวๆที่คอหอยไม่มีฟัน มีซี่ฟัน (serrata) บนตำแหน่ง pre - operculum ครีบหลังมี 2 อัน แยกกันเห็นได้ชัด ก้านครีบแข็งอันที่ 3 จะยาวที่สุด มีตาขนาดกลางไม่มีเยื่อไขมันหุ้ม แผ่นปิดเหงือกมีขนาดใหญ่ที่ขอบหลังเป็นหนามแหลม 4 ซี่ เกล็ดบริเวณลำตัวค่อนข้างใหญ่ ที่บริเวณฐานครีบหลังและครีบก้นมีเกร็ดเล็กๆปกคลุม สีในตัวเต็มวัยเป็นสีเทา หลังมีสีเทาหรือสีเทาปนเขียว ส่วนท้องมีสีน้ำเงินแกมเหลือง (บรรจง, 2517) บริเวณด้านข้างของลำตัวมีสีเงิน ครีบก้นครีบหางมีสีเทาปนดำบางๆ ครีบหลังมี 2 ตอน ตอนแรกอยู่ตรงตำแหน่งของครีบท้อง มีก้านครีบแข็งแหลมคมขนาดใหญ่ 7-8 ก้าน เชื่อมต่อกันเป็นเยื่อบางๆ ครีบหลังตอนที่ 2 แยกจากตอนแรกชัดเจน มีก้านครีบแข็ง 1 ก้าน ก้านครีบอ่อนมีปลายแตกแขนง 10-11 ก้าน ครีบอกและครีบหูยาวไม่ถึงรูก้น ข้อหางสั้น เส้นข้างลำตัวโค้งไปตามแนวสันหลัง มีเกล็ดบนเส้นข้างลำตัว 52-61 เกล็ด (กรมประมง, 2531)

1.2.1.3 การสืบพันธุ์วางไข่

ในธรรมชาติปลากะพงขาวจะวางไข่ในช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนมิถุนายนบริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเลอ่าวไทย ซึ่งฤดูผสมพันธุ์จะเริ่มขึ้นกลางฤดูร้อน โดยปลาที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์เดินทางจากแหล่งน้ำจืดสู่แหล่งน้ำกร่อยและจะไปอาศัยอยู่ในทะเลจนถึงฤดูวางไข่จะอพยพกลับเข้ามายังปากแม่น้ำหรือปากทะเลสาบเพื่อผสมพันธุ์ ความเค็มของน้ำประมาณ 25-32 ส่วนในพันส่วน ลูกปลาที่ได้จะลอยตัวที่ผิวน้ำและล่องลอยตามกระแสน้ำเข้าไปอาศัยในบริเวณแอ่งน้ำตามชายฝั่งรวมทั้งบริเวณป่าชายเลนที่น้ำทะเลท่วมถึง (สุจินต์ และคณะ, 2524) การนำพ่อแม่พันธุ์มาเพาะพันธุ์ในบ่อเพาะพันธุ์ จะใช้แม่พันธุ์ปลาที่มีอายุ 3 ปีขึ้นไป และมีขนาดน้ำหนักตั้งแต่ 3.5 กิโลกรัม การผสมพันธุ์จะเริ่มตั้งแต่เดือนเมษายน-ตุลาคม ใกล้เคียงกับปลาในธรรมชาติ พ่อแม่พันธุ์ปลาจะผสมพันธุ์ระหว่างแรม 3 ค่ำ ถึงแรม 5 ค่ำ เวลา 18.00 ถึง 23.00 น. ไข่ที่ถูกผสมจะลอยขึ้นสู่ผิวน้ำ ส่วนไข่ที่ไม่ได้รับการผสมจะจมลงสู่ก้นบ่อ ไข่จะฟักเป็นตัวภายในเวลา 12-17 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของน้ำ ลูกปลาที่ฟักออกเป็นตัว จะมีขนาดความยาวประมาณ 1.5 มิลลิเมตร มีถุงอาหารรูปไข่ขนาดใหญ่ และมีหยดน้ำมันอยู่ส่วนหน้าสุด เมื่ออยู่ในน้ำนิ่ง ลักษณะการทรงตัวของลูกปลา ลำตัวยาวแบนข้างและมีเม็ดสีกระจายไม่เป็นระเบียบ (สุพจน์, 2528)

1.2.1.4 การแพร่กระจาย

ในประเทศไทยพบปลากะพงขาวแพร่กระจายอยู่ทุกจังหวัดชายทะเล ทั้งในอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามัน มักอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่ไม่ห่างไกลออกไปจากฝั่งมากนัก พบชุกชุมบริเวณปากแม่น้ำลำคลองและปากทะเลสาบ ปลากะพงขาวสามารถอพยพเคลื่อนย้ายไปมาระหว่างแหล่งน้ำจืดและแหล่งน้ำเค็ม (semi-migration) จัดเป็นปลาประเภทสองน้ำ เป็นปลาเขตร้อนพบกระจายตามชายฝั่งทะเลและหมู่เกาะของประเทศในภูมิภาคอินโดแปซิฟิก และภูมิภาคอินโดออสเตรเลีย หรือระหว่างละติจูดที่ 50 - 165 องศาใต้ และยังแพร่กระจายขึ้นไปถึงตอนใต้ของประเทศจีน ตลอดจนถึงฝั่งทะเลตอนเหนือของทวีปออสเตรเลีย ซึ่งปัจจัยที่จำกัดการแพร่กระจายตามแถบต่างๆของโลก ได้แก่ ความเค็มของน้ำทะเล อุณหภูมิของน้ำซึ่งมีผลต่อการฟักตัวของไข่และการมีชีวิตอยู่รอดของลูกปลาวัยอ่อน (สวัสดิ์ และสุจินต์, 2517)

1.2.1.5 อุปนิสัย

เป็นปลาที่มีนิสัยก้าวร้าว ว่ายน้ำได้เร็ว บางครั้งจะกระโดดลอยพ้นน้ำ ปกติจะว่ายน้ำอืดอาดเชื่องช้า แต่เวลาตกใจหรือล่าเหยื่อจะว่ายน้ำได้เร็วมาก ส่วนใหญ่จะหลบซ่อนตัวอยู่ตามแนวหินหรือตอไม้ ตอนเล็กๆ จะอยู่รวมเป็นฝูงใหญ่ในเขตน้ำกร่อย แต่เมื่อโตก็จะอพยพไปอยู่ในทะเล ชอบออกหากินในช่วงที่มีกระแสน้ำไหลเอื่อยๆ (สุรศักดิ์, 2543) ปลากะพงขาววัยรุ่นมักไม่รวมฝูง นอกจากในฤดูผสมพันธุ์วางไข่จึงจะรวมเป็นกลุ่มเล็กๆ (กรมประมง, 2536)

1.2.1.6 การกินอาหาร

ปลากะพงขาวเป็นปลากินเนื้อ โดยธรรมชาติชอบกินสัตว์น้ำขนาดเล็กกว่าเป็นอาหาร เช่นปลา กุ้ง ปลาหมึก เป็นต้น (สุรศักดิ์, 2543) ถ้าเป็นอาหารที่ไม่มีชีวิตจะชอบอาหารที่นุ่มมากกว่าแข็งและเป็นปลาที่ตื่นตกใจง่าย จึงไม่ชอบขึ้นมากินอาหารตามผิวน้ำแต่จะกินอาหารที่กำลังเคลื่อนจมลง ไม่ชอบกินอาหารที่ตกถึงพื้นบ่อ อาหารที่ให้ได้แก่ ปลาเป็ดสด เช่นปลาหลังเขียวสับเป็นชิ้นเล็กๆ อาหารผสมแบบเปียกและอาหารเม็ดแบบแห้ง เวลาให้อาหารจึงต้องให้อย่างช้าๆ และให้เป็นเวลานานประมาณ 15 นาที (กรมประมง, 2536)

1.2.1.7 ความสำคัญในด้านเศรษฐกิจ

ปลากะพงขาวเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว เนื้อมีรสชาติดี ราคาแพง หาพันธุ์ปลาได้ง่ายทั้งจากธรรมชาติและการเพาะพันธุ์ มีการเพาะเลี้ยงกันมาก ราคาค่อนข้างแพง มีการเลี้ยงในบ่อดินและในกระชัง จากสถิติในปี พ.ศ. 2551 ผลผลิตปลากะพงขาวส่วนใหญ่ได้จากการเลี้ยงในกระชัง 85 เปอร์เซ็นต์ และ 15 เปอร์เซ็นต์ได้จากการเลี้ยงในบ่อดิน (กรมประมง, 2554) โดยอัตราผลผลิตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในแต่ละปี จากข้อมูลปี พ.ศ. 2551 มีผลผลิตปริมาณ 12,814 ตัน (กรมประมง , 2554) และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงปี พ.ศ. 2553 มีผลผลิตประมาณ 14,736 ตัน และมีการคาดการว่าในปี พ.ศ. 2554 จะมีผลผลิตเพิ่มขึ้นประมาณ 17,300 ตัน และสถานการณ์การค้าใน ปี พ.ศ. 2553 ไทยส่งออกปลากะพงขาวออกต่างประเทศปริมาณ 267.62 ตัน มูลค่า 17.6 ล้านบาท ประเทศที่นิยมนำเข้าปลากะพงขาว เช่น จีน อิตาลี มาเลเซีย สิงคโปร์ และรัสเซีย (Monthly Report, 2554)

1.2.1.8 ระดับความต้องการสารอาหารของปลากะพงขาว

1.2.1.8.1 ความต้องการโปรตีน

Glencross (2004) รายงานว่าลูกปลากะพงขาวมีความต้องการปริมาณโปรตีนที่ระดับ 45 - 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปลากะพงขาววัยรุ่นระดับโปรตีนรวมที่เหมาะสมในอาหารปลากะพงขาวตัวเต็มวัย 40 - 45 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Wong and Chon, 1989 อ้างโดย สุภาพร, 2549) และมีการศึกษาระดับโปรตีนที่เหมาะสมต่อปลากะพงขาว เช่น วิเชียร และคณะ (2531) ศึกษาระดับโปรตีนและไขมันที่เหมาะสมในอาหารปลากะพงขาว เป็นอาหารผสมที่มีโปรตีน 3 ระดับคือ 45, 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ แต่ละระดับมีไขมัน 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมที่มีโปรตีน 50 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 15 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตดีที่สุด มีค่า FCR เท่ากับ 1.11 และ PER เท่ากับ 1.81 ซึ่งต่อมา วิเชียร และคณะ (2532) ได้ทำการศึกษาระดับโปรตีนและไขมันที่เหมาะสมโดยทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ใช้อาหารที่มีโปรตีน 3 ระดับ คือ 45, 48 และ 51 เปอร์เซ็นต์ แต่ละระดับมีไขมัน 13 และ 18 เปอร์เซ็นต์ และมีอาหารผสมอีก 1 สูตร ซึ่งมีระดับโปรตีน 54 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 13 เปอร์เซ็นต์ เป็นอาหารเปรียบเทียบ พบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีน 46.71 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 15.64 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตดีที่สุด สอดคล้องกับ Sakaras และคณะ (1989) รายงานว่า ระดับโปรตีนรวมและไขมันที่เหมาะสมในอาหารของปลากะพงขาววัยอ่อน คือ 45 และ18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

1.2.1.8.2 ความต้องการไขมัน

จากการรายงานของ สุนิตย์ และคณะ (2547) อาหารสำเร็จรูปที่ใช้เลี้ยงปลากะพงขาวต้องมีปริมาณไขมัน 12 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการรายงานของ Glencross (2004) ที่รายงานว่าปริมาณไขมันรวมที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตปลากะพงขาวอยู่ในช่วง 9 ถึง 13 เปอร์เซ็นต์ และไขมันควรมีกรดไขมันที่จำเป็นกลุ่ม ω 3 HUFA ที่เพียงพอต่อความต้องการของปลา เช่นการทดลองของ จารุรัตน์ และคณะ (2531) ศึกษาความต้องการกรดไขมันที่จำเป็นกลุ่ม ω 3 HUFA (ω 3 highly unsaturated fatty acid) ของปลากะพงขาววัยรุ่นในน้ำกร่อย โดยอาหารทดลองมีกรดไขมัน ω 3 HUFA 4 ระดับ คือ 0.46, 0.88, 1.72 และ 2.70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีไขมันจากปลาป่นและน้ำมันตับปลาหมึกเป็นแหล่งกรดไขมันที่จำเป็น ปลากะพงขาวที่ใช้ในการทดลองมีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 1.3 กรัม ทดลองต่อเนื่องเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารซึ่งมี ω 3 HUFA 1.72 เปอร์เซ็นต์ หรือประมาณ 13 เปอร์เซ็นต์ ของไขมันทั้งหมดบนฐานน้ำหนักอาหารแห้ง ให้ผลการเจริญเติบโตดีที่สุด ประสิทธิภาพอาหารสูงและปราศจากอาการของโรคขาดกรดไขมันที่จำเป็น ซึ่งกรดไขมันที่จำเป็นกลุ่ม ω 3 HUFA พบมากในน้ำมันปลา

1.2.1.8.3 ความต้องการคาร์โบไฮเดรต

Glencross (2004) รายงานว่าคาร์โบไฮเดรตระดับ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของปลากะพงขาว ซึ่งคาร์โบไฮเดรตเป็นสารอาหารที่ให้พลังงาน จึงใช้เป็นแหล่งพลังงานในอาหารปลา และยังสามารถเป็นสารเชื่อมประสานเพื่อความคงรูปของเม็ดอาหารได้ และเนื่องแหล่งพลังงานที่เป็นคาร์โบไฮเดรตมีราคาที่ถูก จึงมีการนำคาร์โบไฮเดรตมาใช้แทนแหล่งพลังงานจากไขมันมาใช้เพื่อลดต้นทุน แต่ไม่ควรใช้คาร์โบไฮเดรตผสมให้ปลากะพงขาวมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ (สุภาพร, 2549)

1.2.1.8.4 ความต้องการวิตามิน

วิตามินที่ปลากะพงขาวมีความต้องการ ได้แก่ ไรโบฟลาริน (riboflavin) ไพริดอกซิน (pyridoxine) กรดแพนโทเทนิค (pantothenic acid) อินโนซิทอล (inositol) วิตามินซี (ascorbic acid) ไทอามีน (thiamine) และวิตามินอี (tocopherols) ซึ่งมีการศึกษาความต้องการวิตามิน เช่น การทดลองของ Boonyaratpalin และคณะ (1994) โดยศึกษาความต้องวิตามินซี โดยเสริมวิตามินซี (ascorbic acid) ที่ระดับ 500-700 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในอาหารปลากะพงขาว พบว่าปลาที่ได้รับวิตามินซีมีการเจริญเติบโตปกติ แตกต่างจากปลาเลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่เสริมวิตามินซี ซึ่งมีการเจริญเติบโตลดลงเนื่องจากการขาดวิตามินซี และมีการศึกษาระดับวิตามินในอาหารปลา

กะพงขาวของ Boonyaratpalin และคณะ (1989) โดยการเสริมอินโนซิทอล (inositol), ไนอาซิน (niacin), โคลีน (choline) และวิตามินอี ในอาหารที่ระดับต่างๆ พบว่าหากปลากะพงขาวขาดวิตามินดังกล่าว ส่งผลต่อการเจริญเติบโตลดลง อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และการอดตายสูงขึ้น ส่วนการศึกษาการโดยใช้อาหารกึ่งบริสุทธิ์ (Boonyaratpalin and Wanakowat, 1993) ในปลากะพงขาว พบว่าไทอามีน (thiamine), กรดแพนโตเทนิค (pantothenic), อินโนซิทอล (inositol), และวิตามินอี มีความจำเป็นที่ทำให้การเจริญเติบโตเป็นปกติ และในการศึกษาเพิ่มเติมกับอาหารกึ่งบริสุทธิ์พบว่าการเสริมไพริดอกซิน (pyridoxine) ที่ 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในอาหารปลากะพงขาว ทำให้การเจริญเติบโตเป็นปกติ และการเสริมที่ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทำให้ระดับเม็ดเลือดขาวเพิ่มสูงขึ้น (Wanakowat *et al*., 1989) และการรายงานของ Boonyaratpalin และคณะ (1994) ปลากะพงขาวได้รับอาหารที่มีกรดแพนโตเทนิค (pantothenic)ที่ระดับ 15 มิลลิกรัม/กิโลกรัมในอาหาร ทำให้การเจริญเติบโตเป็นปกติ ต่างจากปลาที่ไม่รับได้รับอาหารที่มีกรดแพนโตเทนิค (pantothenic) ส่งผลให้มีการตายทั้งหมดในสัปดาห์ที่ 6 ของการทดลอง การศึกษาระดับของวิตามินรวม (premix) จากการศึกษาของ สุพจน์ และคณะ (2533) ทำการทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวด้วยวิตามินรวมระดับต่างๆ กัน โดยเลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมวิตามินรวม 0.5 ถึง 2.0 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการเจริญเติบโตไม่มีความต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) และระดับวิตามินรวมในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของลูกปลากะพงขาวคือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปลามีความต้องวิตามินปริมาณน้อย แต่หากปลาได้รับวิตามินไม่เพียงพอต่อต้องความต้องการของร่างกายจะมีผลเสียต่อปลา เช่นการรายงานของ Glencross (2004) เมื่อปลากะพงขาวได้รับวิตามินไม่เพียงพอ จะมีการเจริญเติบโตลดลง อัตราการตายสูง และการพัฒนาของร่างกายผิดปกติ (ดังตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความต้องการและอาการขาดวิตามินของปลากะพงขาว (Glencross, 2004)

วิตามิน	**ความต้องการ (mgs/kg diet)**	**ลักษณะอาการขาดวิตามิน**
Thiamine	-	การเจริญเติบโตลดลง, อัตราการตายสูง, มีภาวะเครียด
Riboflavin	-	ว่ายน้ำควงสว่าน, ตาเป็นต้อ
Pyridoxine	5 – 10	ว่ายน้ำควงสว่าน, อัตราการตายสูง
Pantothenic acid	15 – 90	อัตราการตายสูง
Nicotinic acid	-	มีการตกเลือดที่ครีบและครีบกร่อน, เหงือกติดกันไม่เป็นซี่, อัตราการตายสูง

วิตามิน	ความต้องการ (mgs/kg diet)	ลักษณะอาการขาดวิตามิน
Inositol	-	การเจริญเติบโตลดลง, การพัฒนากระดูกผิดปกติ
Ascorbic acid (Vitamin C)	25 – 30 700	ตกเลือดที่เหงือก, เกล็ดบางและผิดรูป, กระดูกคดงอ, กระดูกเปาะบาง, การพัฒนาของกล้ามเนื้อลดลง, การพัฒนาของเหงือกผิดปกติ
Vitamin E	-	กล้ามเนื้อพัฒนาผิดรูป, มีภูมิต้านทานลดลง

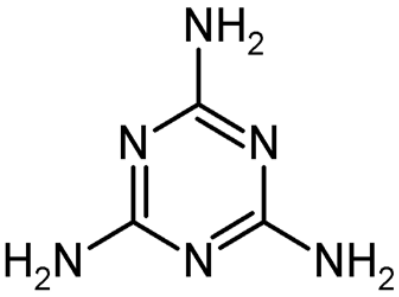
1.2.1.8.5 ความต้องการแร่ธาตุ

แร่ธาตุเป็นสารอนินทรีย์ที่ร่างกายต้องการ เพื่อนำมาใช้ในการเจริญเติบโต การดำรงชีวิต และกระบวนการเมทาบอลิซึมของร่างกายให้เป็นปกติ ซึ่งมีแร่ธาตุ 9 ชนิดที่มีความจำเป็นสำหรับปลา ได้แก่ แคลเซียม, ฟอสฟอรัส,โพแตสเซียม,โซเดียม, คลอไรด์, แมกนีเซียม, ทองแดง, เหล็ก, สังกะสี (วุฒิพร, 2541) แต่ในการศึกษาปริมาณของแร่ธาตุที่ปลากะพงขาวต้องการมีน้อย เนื่องจากปลากะพงขาวยอมรับอาหารบริสุทธิ์ (purified diet) น้อย แร่ธาตุที่มีการศึกษาในปลากะพงขาว คือ ฟอสฟอรัส โดยมะลิ และจูอะดี (2533) ศึกษาความต้องการฟอสฟอรัสในอาหารปลากะพงขาว เลี้ยงปลาด้วยอาหารทดลอง 4 สูตร ซึ่งมีระดับฟอสฟอรัสรวมทั้งหมดอยู่เท่ากับ 1.54, 1.64, 1.74 และ 1.94 เปอร์เซ็นต์ จากการเติมโมโนโซเดียมฟอสเฟต 0, 0.5, 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารที่มีปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนและมีแร่ธาตุรวมที่ปราศจากฟอสฟอรัส พบว่าปลากะพงขาวต้องการปริมาณฟอสฟอรัสที่ระดับ 0.65 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทำประสิทธิภาพอาหารและประสิทธิภาพโปรตีนเป็นปกติ สอดคล้องกับการรายงายของ Glencross (2004) ปริมาณฟอสฟอรัสที่ปลากะพงขาวต้องการอยู่ที่ 0.55 ถึง 0.65 เปอร์เซ็นต์ และการเสริมโมโนโซเดียมฟอสเฟตปริมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดการใช้ปลาป่นในสูตรอาหารเลี้ยงปลากะพงขาวได้ และการเสริมโมโนโซเดียมฟอสเฟตทำให้ฟอสเฟตในตัวปลา ในส่วนของแร่ธาตุอื่นๆ จากการทดลองของ จุไลวรรณ (2551) พบว่าการเสริมซีลีเนียมในรูปของซีลีโนเมทไธโอนีน 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในอาหารปลากะพงขาว ทำให้การเจริญเติบโตดีที่สุด และมีภูมิต้านทานสูงขึ้น แตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และการทดลองของ Fountoulaki และคณะ (2010) ศึกษาผลของระดับสังกะสีในอาหารปลากะพงขาว โดยมีระดับสังกะสี 30, 70, 110 และ 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่าอาหารที่มีสังกะสี 148 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระดับที่เหมาะสมในปลากะพงขาว

1.2.2 เมลามีน (Melamine)

1.2.1.1 คุณสมบัติของเมลามีน

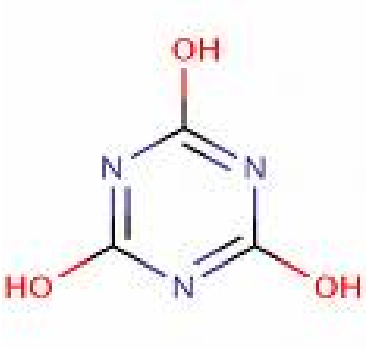
เมลามีน (melamine) เป็นเบสอินทรีย์ มีสูตรทางเคมีว่า $C_3H_6N_6$, และชื่อทางสหภาพเคมีบริสุทธิ์และเคมีประยุกต์ระหว่างประเทศ (IUPAC) ว่า 1,3,5-triazine-2,4,6-triamine (Anonymous, 2007) เป็นสารเคมีที่สำคัญในอุตสาหกรรมเรซิน และพลาสติก (Anderson *et al*., 2007; Baynes *et al*., 2008) คุณลักษณะที่สำคัญของเมลามีน คือ เป็นผงละเอียดสีขาว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 126.12 ดาลตัน ละลายน้ำได้น้อย ทนต่อความเป็นกรด-ด่างได้ดี มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบโดยน้ำหนักประมาณ 66.67 เปอร์เซ็นต์ เมื่อคำนวณเป็นปริมาณโปรตีนจะสูงถึง 416.66 เปอร์เซ็นต์ มีความเป็นขั้วเนื่องจากอิทธิพลของหมู่เอไมน์ (NH_2) ที่แขนทั้ง 3 ข้าง (NTP, 1983 อ้างโดย Baynes *et al*., 2008) และมีค่า pK_a เท่ากับ 9 สลายตัวในดินได้ช้า (Shelton *et al*., 1997) และไม่มีพิษที่ก่อให้เกิดความผิดปกติทางพันธุกรรม (nongenotoxic) (Hack and Tyl, 1985) ซึ่งในอุตสาหกรรมกระบวนการผลิตเมลามีนจะใช้ยูเรียเป็นสารตั้งต้นซึ่งผลผลิตที่ได้ คือ เมลามีน แอมโมเนีย และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (IARC, 1999) และมีการนำเมลามีนมาใช้ในการผลิตโฟมทำความสะอาดพื้นผิว วัสดุเคลือบผิว (laminate) แผ่นฟอร์ไมกา กาว จานชาม ไวท์บอร์ด ยาฆ่าแมลง (pesticides) ปุ๋ย และผลิตภัณฑ์ตัวอื่นๆ (Nemil *et al*., 2005; Anderson *et al*., 2007) เมลามีนประกอบด้วยอนุพันธ์ 3 ชนิด (ภาพที่ 2) ได้แก่ แอมมีลีน แอมมีไลด์ และกรดไซยานูริก (เยาวมาลย์, 2550ก) ในทางปศุสัตว์จัดเมลามีนเป็นไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (non-protein nitrogen - NPN) Newton และ Utley (1978) การที่โครงสร้างของเมลามีนมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบโดยน้ำหนักถึง 66.67 เปอร์เซ็นต์ ปัจจุบันจึงมีการปลอมปนเมลามีนลงในวัตถุดิบที่นำมาผลิตเป็นอาหารสัตว์น้ำ เพื่อหวังผลให้มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น เนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในวัตถุดิบหรือผลิตภัณฑ์ต่างๆ จะวิเคราะห์ในรูปของไนโตรเจน (Wiles *et al*., 1998) อีกทั้งปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์เมลามีนที่ปลอมปนในอาหารมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและค่าใช้จ่ายสูง (เยาวมาลย์, 2550ก ; Anderson *et al*., 2007)



Melamine $C_3H_6N_6$

FW. = 126.12 g/mol

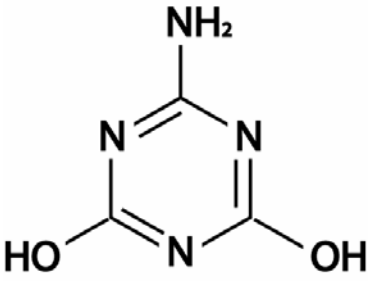
N = 66 %



Cyanuric acid $C_3H_3N_3O$

FW. = 129.075 g/mol

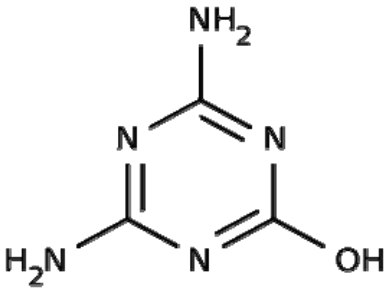
N = 32.55 %



Ammelide $C_3H_4N_4O_2$

FW. = 128.09 g/mol

N = 43.74 %



Ammeline C_3H_5N

FW. = 127.125g/mol

N = 55.10 %

ภาพที่ 2 สูตรโครงสร้างทางเคมีของเมลามีน ($C_3H_6N_6$) และอนุพันธ์ 3 ชนิด

ที่มา : OECD (2002); Chen และคณะ (2006)

1.2.2.2 การสังเคราะห์เมลามีน

การผลิตเมลามีนในปัจจุบันเกิดจากการนำยูเรียมาเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ (Wikipedia The Free Encyclopedia, 2009) โดยทำปฏิกิริยา ดังนี้

$$6(NH_2)_2CO \longrightarrow C_3H_6N_6 + 6NH_3 + 3CO_2$$

ยูเรีย เมลามีน + แอมโมเนีย + คาร์บอนไดออกไซด์

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะมี 2 ปฏิกิริยาและ 2 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 ปฏิกิริยา endothermic reaction โดยให้อุณหภูมิ 170 ^{0}C ยูเรียจะเกิดการสลายตัวเป็น cyanuric acid ดังนี้

$$(NH_2)_2CO \longrightarrow HCNO + NH_3$$

ยูเรีย กรดไซยานูริค + แอมโมเนีย

ขั้นตอนที่ 2 ปฏิกิริยา exothermic reaction โดยให้อุณหภูมิ 325 - 350 ^{0}C จะทำให้ cyanuric acid polymerizes เป็นเมลามีน และคาร์บอนไดออกไซด์ ดังนี้

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

cyanuric acid polymerizes เมลามีน + คาร์บอนไดออกไซด์

1.2.2.3 กลไกการเกิดพิษของเมลามีนในสัตว์

ความเป็นพิษของเมลามีนในสัตว์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป และจากข้อมูลทางการศึกษาด้านความเป็นพิษของเมลามีนแสดงให้เห็นว่า เมลามีนเป็นสารเมตาบอไลต์เฉื่อย (inactive or inert) ซึ่งหมายถึงไม่อยู่ในสภาพที่จะเปลี่ยนรูปไปเป็นสารตัวอื่นได้ง่าย (US FDA, 2007a) เมื่อได้รับเมลามีนเข้าสู่ร่างกายโดยการกิน เมลามีนจะถูกดูดซึมผ่านทางระบบทางเดินอาหารเข้าสู่กระแสเลือด แต่ไม่ถูกนำมาเผาผลาญเหมือนโปรตีนโดยทั่วไป (Smith *et al*., 1994)

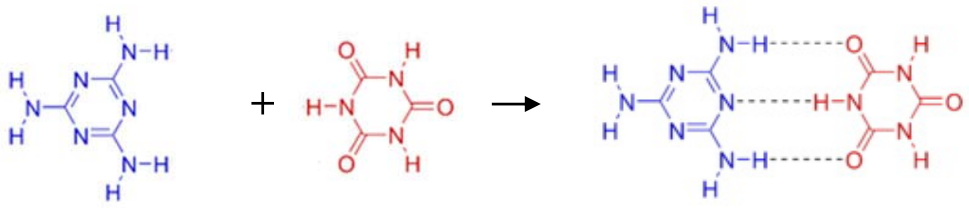
จากนั้นจะเข้าสู่กระบวนการกำจัดของเสียที่ไต ซึ่งเมลามีนจะไปขัดขวางระบบการทำงานในการกรองของไตและจะสะสมในส่วนปลายของหน่วยไต (distal tubule & collecting duct) ตกตะกอนเป็นผลึกคล้ายคริสตัล (crystal) ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณที่มีการสะสมเกิดภาวะเนื้อเยื่อตายและลุกลามไปยังเนื้อเยื่อบริเวณอื่นๆ เป็นสาเหตุของภาวะไตวายเฉียบพลันที่ทำให้สัตว์ตายอย่างรวดเร็ว (คณะทำงานวิเคราะห์ปัญหาด้านอาหารในภาวะเร่งด่วน (วปด.), 2550) นอกจากนี้ยังเกิดการตกตะกอนที่กระเพาะปัสสาวะ ทำให้เกิดการอุดตันของท่อทางเดินปัสสาวะ มีอาการตกเลือด เมลามีนบางส่วนจะถูกขับทิ้งปะปนออกมากับน้ำปัสสาวะ โดยจะเห็นน้ำปัสสาวะมีสีขาวขุ่น (วรรัตน์, 2550)

1.2.2.4 ความเป็นพิษของเมลามีนและสารอนุพันธ์

ความเป็นพิษในสัตว์แตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ และความทนทานต่อพิษของสัตว์แต่ละชนิด เนื่องเมลามีนเป็นสารเมตาโบไลท์ที่เฉื่อย (inactive or inert) ซึ่งหมายถึงไม่อยู่ในสภาพที่พร้อมเปลี่ยนรูปไปเป็นสารตัวอื่นได้ง่าย สัตว์จะขับถ่ายหรือกำจัดสารเมลามีนที่ได้รับจากการกินเข้าไป และขับออกมาในสภาพเดิมที่กินตั้งแต่แรก (Anonymous, 2007; US FDA, 2007a) ความเป็นพิษของเมลามีนที่แสดงออกในสัตว์สามารถแยกออกได้เป็น 2 แบบ

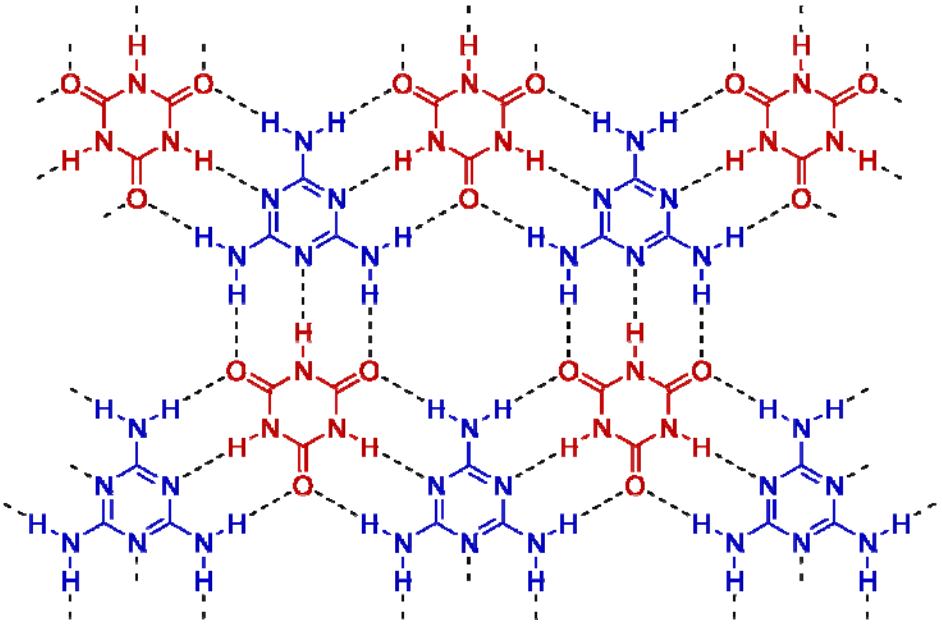
1.2.2.4.1 ความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (acute toxicity)

melamine และ cyanuric acid สามารถจับกันโดยอาศัยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) โดยโมเลกุลของทั้งสองจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ดังแสดงใน ภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การรวมตัวของ melamine และ cyanuric acid เป็น melamine cyanurate
ที่มา : เยาวมาลย์ (2550ก); Anonymous (2007)

มีรายงานว่า หาก melamine และ cyanuric acid combined รวมกันแล้วพิษจะรุนแรงมากกว่าเดี่ยวๆ และเป็นสาเหตุของการเกิดพิษแบบเฉียบพลัน (US FDA, 2007b) melamine cyanurate โดยทั่วไปใช้เป็นสารทนไฟ โดยค่า LD_{50} ของหนู rat และ หนู mice ที่ได้รับเกลือ melamine cyanurate ผ่านทางกระเพาะอาหาร มีค่า 4.1 กรัม/กก.ของน้ำหนักตัว ส่วนการให้ผ่านทางการสูดดมมีค่า LD_{50} เท่ากับ 3.5 กรัม/กก.ของน้ำหนักตัว ในขณะที่ค่า LD_{50} ของ melamine มีค่าเท่ากับ 6.0 และ 4.3 กรัม/กก.ของน้ำหนักตัว และ cyanuric acid มีค่า 7.7 และ 3.4 กรัม/กก.ของน้ำหนักตัว ในหนู rat และหนู mice ตามลำดับ โดย melamine cyanurate เป็นในรูปของเครือข่ายแนวราบเป็นกลุ่มๆ ดังภาพที่ 4 ซึ่งทำให้เกิดเป็นโมเลกุลที่ใหญ่ ส่งผลให้เกิดพิษต่อระบบการทำงานของไตเร็วขึ้น (US FDA, 2007a) ในสุกรที่ได้รับอาหารที่ปนเปื้อนเมลามีน พบว่าไตมีลักษณะจุดเลือดออกที่ชั้นนอกและชั้นในของไต และสุกรทุกตัวตายด้วยอาการไตวายเฉียบพลัน เมื่อตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไต พบว่ามีเนื้อเยื่อไตอักเสบ (severe chronic difuse interstitial nephritis) และพบลักษณะคล้ายผลึกสีน้ำตาล (melamine cyanurate) เกาะติดอยู่ที่ท่อไต (diffuse crystal like fill in tubules) (เยาวมาลย์, 2550ก)



ภาพที่ 4 การจับกันของ melamine และ cyanuric acid ในรูปของเครือข่ายแนวราบ

ที่มา: Wikimedia commons (2009)

1.2.2.4.2 การเป็นพิษแบบเรื้อรัง (chronic toxicity)

HSDB (2007b) รายงานว่าสุนัขที่ได้รับสารเมลามีนในอาหาร 3 เปอร์เซ็นต์ (30,000 ppm) เป็นเวลาหนึ่งปี น้ำปัสสาวะมีการเปลี่ยนแปลงดังต่อไปนี้ มีค่าความถ่วงจำเพาะลดลง ปัสสาวะมากขึ้น แต่มีผลึกของเมลามีนออกมากับน้ำปัสสาวะมีโปรตีนและเลือดปนออกมาโดยไม่ทราบสาเหตุ เช่นเดียวกับการรายงานของ NTP (1983) พบว่าหนู rats และ mice ที่ได้รับเมลามีน เกินกว่า 10,000 ppm ติดต่อกัน 14 วัน เมื่อตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยาพบผลึกสีขาวในกระเพาะปัสสาวะและไต สอดคล้องกับข้อมูลของ Anonymous (2007) รายงานว่าการได้รับสารเมลามีนต่อเนื่องเป็นเวลานานมีโอกาสทำให้ระบบสืบพันธุ์ถูกทำลาย เกิดนิ่วในกระเพาะปัสสาวะหรือไต นอกจากนี้ยังนำไปสู่การเกิดมะเร็งของกระเพาะปัสสาวะ และ เยาวมาลย์ (2550ก) รายงานว่าไก่เนื้อที่ได้รับอาหารที่ปนเปื้อนเมลามีน ส่งผลให้ไตเกิดอาการบวมมีใหญ่กว่าปกติ 3-4 เท่า บริเวณอุ้งเท้าไก่จะเน่า เพราะมูลที่ขับถ่ายออกมาเหนียวมากจึงเกาะติดทำให้เกิดการระคายเคืองกับอุ้งเท้าไก่ สอดคล้องกับการรายงานของ ภาณุวัฒน์ และกิตติกร (2551) ที่พบว่าสุกรที่ได้รับอาหารที่ปนเปื้อนเมลามีน มีลักษณะผอม ตาค่อนข้างบวม ปัสสาวะมีกลิ่นเหม็นรุนแรง พื้นคอกสีขาวเนื่องจากการขับเมลามีนออกมากับปัสสาวะ ผิวหนังที่มีการสัมผัสเมลามีนจะเป็นมะเร็ง และรายงานของ ปริญทิพย์ และคณะ (2551) พบว่ากบขุนที่ได้รับอาหารที่ปนเปื้อนเมลามีนจะมีการขยายใหญ่และสะสมน้ำในช่องท้อง พบจุดเลือดออกและเนื้อตายกระจายทั่วตับและไต ไตเกิดการขยายใหญ่และมีสีเข้มกว่าปกติทั้งสองข้าง นอกจากนี้พบการอักเสบของเนื้อเยื่อหัวใจ ไต และตับ

ตารางที่ 2 รายงานความเป็นพิษของเมลามีนในสัตว์ทดลอง (ดัดแปลงจาก NTP, 1983)

ระยะเวลาทดลอง	สัตว์ทดลอง : ความเข้มข้นของเมลามีนที่ได้รับ	ความผิดปกติของสัตว์ทดลอง
ได้รับทางปากเพียงครั้งเดียว (Single dose study)	Male และ female rats : 2,150, 3,160, 4,640, 6,810 และ 10,000 ppm น้ำหนักตัว โดยผสมเมลามีนลงในน้ำมันข้าวโพดแล้วกรอกปากผ่านทางท่อ Male mice : 1,470, 2,150, 3,160, 4,640, 6,810, 10,000 และ 14,700 ppm น้ำหนักตัว โดยผสมเมลามีนลงในน้ำมันข้าวโพดแล้วกรอกปากผ่านทางท่อ	หนูทดลองทั้ง 2 ชนิด (rats และ mice) ที่ได้รับเมลามีนเกินกว่า 6,810 มก./กก. น้ำหนักตัว ตายทั้งหมด ยังพบผลึกสีขาวในระบบทางเดินอาหารของหนูทดลองทั้ง 2 ชนิดที่ได้รับเมลามีนในทุกระดับความเข้มข้น โดยจะพบมากเมื่อระดับของเมลามีนที่ได้รับเพิ่มสูงขึ้น
14 วัน	Rats: 0, 5,000, 10,000, 15,000, 20,000 และ 30,000 ppm ในอาหาร Mice: 0, 5,000, 7,500, 10,000, 12,500, 15,000 และ 30,000 ppm ในอาหาร โดยให้กินจนอิ่ม	ไม่พบการตายในหนูทดลองที่ได้รับเมลามีนทุกระดับ แต่พบว่าน้ำหนักตัวของหนูทดลองที่ได้รับเมลามีนเกินกว่า 15,000 ppm ในอาหาร ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวในชุดควบคุม (ไม่ใส่เมลามีน) นอกจากนี้ยังตรวจพบผลึกสีขาวในกระเพาะปัสสาวะและไตในหนูทดลองที่ได้รับเมลามีนเกินกว่า 10,000 ppm ในอาหาร
13 สัปดาห์	การทดลองที่ 1 (rats and mice): 0, 6,000, 9,000, 12,000, 15,000 และ 18,000 ppm ในอาหาร การทดลองที่ 2 : 0, 10,000, และ 18,000 ppm ในอาหาร; 0, 10,000 และ 18,000 ppm ในอาหาร และ 1 % ammonium chloride ในน้ำดื่ม (เฉพาะ rats)	การทดลองที่ 1 หนูทดลองทั้ง 2 ชนิดที่ได้รับเมลามีน 18,000 ppm ในอาหาร มีอัตราการกินอาหารลดลง 10-20 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ตรวจพบก้อนแข็งที่มีลักษณะคล้ายผลึกในกระเพาะปัสสาวะ และพบการตกเลือดในลำไส้ การทดลองที่ 2 หนูทดลองทั้ง 2 ชนิดที่ได้รับเมลามีน 18,000 ppm ในอาหาร + 1% ammonium chloride ในน้ำดื่ม มีน้ำหนักตัวและอัตราการกินอาหารลดลง นอกจากนี้ยังตรวจพบก้อนแข็งที่มีลักษณะคล้ายผลึกในกระเพาะปัสสาวะ แต่หนูทดลองที่ได้รับอาหารที่ไม่ใส่เมลามีน + 1% ammonium chloride ในน้ำดื่ม ไม่พบลักษณะผิดปกติ

ระยะเวลาทดลอง	สัตว์ทดลอง : ความเข้มข้นของเมลามีนที่ได้รับ	ความผิดปกติของสัตว์ทดลอง
2 ปี	Female rats : 0, 4,500 และ 9,000 ppm ในอาหาร Male rats, male และ female mice: 0, 2,250 และ 4,500 ppm ในอาหาร โดยให้กินจนอิ่ม	ในสัปดาห์ที่ 20 เป็นต้นไปพบว่า น้ำหนักตัวของหนูทดลองที่ได้รับเมลามีนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม อัตราการกินอาหารลดลง 2-3 เปอร์เซ็นต์ ในหนูทดลองที่ได้รับเมลามีนเกินกว่า 4,500 ppm ในอาหารตรวจพบความผิดปกติของเนื้อเยื่อในส่วนของไตและกระเพาะปัสสาวะ

1.2.2.5 การปนเปื้อนเมลามีนในวัตถุดิบอาหารสัตว์

1.2.2.5.1 การปนเปื้อนเมลามีนในวัตถุดิบอาหาร

จากการรวบรวมข้อมูลพอสรุปได้ว่าการปนเปื้อนเมลามีนในวัตถุดิบอาหารสัตว์ เช่น wheat gluten, corn gluten เกิดเนื่องจากสาเหตุ 2 ประการคือ

(1) ผู้จำหน่ายวัตถุดิบอาหารสัตว์จงใจใส่ในวัตถุดิบเพื่อเพิ่มโปรตีนในวัตถุดิบ (US FDA, 2007a) รวมทั้งการใส่ในแหล่งโปรตีนโดยตรง เช่น ปลาป่น กากถั่วเหลือง (Fraser, 2007a; 2007b) ซึ่งสอดคล้องกับ Martin (2007) ที่รายงานว่าบริษัทผู้ผลิตเมลามีน 3 รายเปิดเผยว่ามีบริษัทที่ผลิตอาหารสัตว์มาติดต่อขอซื้อสารเคมี cyanuric acid เพื่อนำไปผสมกับวัตถุดิบหรือนำไปผสมในอาหารสัตว์เพื่อทำให้อาหารที่คุณภาพต่ำดูมีคุณภาพดีมีโปรตีนสูง วัตถุดิบที่มีรายงานการตรวจพบการปนเปื้อน ได้แก่ วัตถุดิบที่เป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่นำเข้าจากประเทศจีน เช่น rice gluten, rice protein, rice protein concentrate, corn gluten, corn, corn by products, soy protein, soy gluten, proteins (EFSA, 2007)

(2) การใส่เพื่อเพิ่มความสามารถหรือเพิ่มประสิทธิภาพของสารประสานเม็ดหรือสารเหนียวในการอัดเม็ดอาหารซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Acheson (2007) ที่ยืนยันว่าเมลามีนเป็นส่วนประกอบของ aquabond, aquatect 2 และ xtrabond ซึ่งเป็นสารประสานเม็ดใช้ในการผลิตอาหารสัตว์น้ำ และสัตว์บก ระดับของสารเมลามีนในสารประสานเม็ดแต่ละยี่ห้อ โดยมีค่าตั้งแต่ 31,000 ppm ขึ้นไป และมีสาร cyanuric acid ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของเมลามีน ที่ระดับ 17- 20 ppm (US FDA, 2007a)

จากรายงานของ US FDA (2007a) ถึงปริมาณการปนเปื้อนในสินค้าประเภทสารประสานเม็ด (binding agents) ที่ใช้ในการอัดเม็ดอาหารเลี้ยงสัตว์พวกโค แพะ แกะ กุ้งและปลาซึ่งเป็นปริมาณที่คำนวณจากอัตราการใช้ในสูตรอาหาร ซึ่งการใช้ xtrabond ในอาหารสัตว์บกจะใช้ใน

ระดับไม่เกิน 50 ppm ส่วนสารประสานเม็ด aquabond และ aquatect 2 ใช้ในอัตรา 2 - 4 ปอนด์/ตัน หรือ 1 - 1.5 กิโลกรัมต่อ ตัน ส่วนระดับของเมลามีนและสารอนุพันธ์ ในอาหารกุ้งและปลาจะอยู่ประมาณ 230 - 460 ppm ตามลำดับ

1.2.2.5.2 การปนเปื้อนเมลามีนในอาหารเนื่องจากการนำเอาวัตถุดิบที่มีเมลามีนปนเปื้อนมาใช้เป็นส่วนประกอบของสูตรอาหาร หรือการนำเอาผงเมลามีนมาผสมในอาหารโดยตรง จากรายงานของ EFSA (2007) แจ้งว่า มีการใช้เมลามีนผสมในอาหารสำเร็จรูป เช่น ขนม ปัง เส้นพาสต้า พิซซ่า และอาหารสำหรับเด็ก

1.2.2.6 สถานการณ์การปนเปื้อนเมลามีนในอาหารสัตว์

US FDA (2007a) รายงานว่าบริษัท menu food บริษัทเนสเล่ย์ และบริษัท hill's pet nutrition ซึ่งเป็นบริษัทผลิตอาหารสัตว์รายใหญ่ของสหรัฐได้เรียกคืนอาหารสัตว์ภายใต้ฉลากสินค้าที่แตกต่างกันถึง 100 กว่าชนิด ปริมาณ 60 ล้านกระป๋อง เนื่องจากได้รับการร้องเรียนจากลูกค้าว่าสัตว์เลี้ยงที่กินอาหารของบริษัทเจ็บป่วยและล้มตายจำนวนมาก จากการตรวจพบว่าอาหารสัตว์ของทั้ง 2 บริษัทดังกล่าว พบมีส่วนผสมของ wheat gluten ซึ่งมีการปลอมปนสารเมลามีน เมื่อสอบสวนพบว่าบริษัทที่ผลิตอาหารสัตว์เลี้ยงดังกล่าวนำเข้า wheat gluten จากประเทศจีน ซึ่งหน่วยงานความปลอดภัยด้านอาหารประจำสหภาพยุโรป (EFSA) ได้เสนอให้กำหนดค่าอนุโลมในการบริโภคต่อวันของมนุษย์และสัตว์ (tolerable daily intake ;TDI) ไว้ที่ระดับ 0.50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/ตัว/วัน (สมาคมผู้เลี้ยงสุกรแห่งประเทศไทย, 2550) กรมประมงมีการวางมาตรการเข้มงวดในการควบคุมการปนเปื้อนสารเมลามีนในอาหารสัตว์น้ำที่ผลิตในประเทศไทย และอาหารสัตว์น้ำที่นำเข้าจากต่างประเทศ (กรมประมง, 2551) ซึ่งอาจทำให้สัตว์น้ำได้รับพิษจากเมลามีนในอาหารสัตว์น้ำ มีการรายงานของ เยาวมาลย์ (2550ข) พบว่าเมื่อปลาดุกได้รับอาหารที่มีการปลอมปนเมลามีนผิวหนังจะเปลี่ยนเป็นสีดำ เช่นเดียวกับการศึกษาของ ปวีณา และคณะ (2552) พบว่าปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีนตั้งแต่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป มีสีผิวของลำตัวที่คล้ำขึ้น เกิดการตายของเซลล์ตับ ส่วนของเนื้อเยื่อไตมีการเสื่อมสลาย และสอดคล้องกับการศึกษาของ นัทท์ และวุฒิพร (2554) พบว่าปลานิลแดงที่ได้รับอาหารผสมเมลามีนตั้งแต่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ส่วนของเนื้อเยื่อไตมีการเสื่อมสลายอย่างรุนแรงตามระดับของเมลามีนที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ นพดล (2552) พบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารที่ผสมเมลามีน 0.25 เปอร์เซ็นต์ และกรดไซยานูริค 0.25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตัดเนื้อเยื่อส่วนไตมาตรวจ พบผลึกสีเหลืองน้ำตาลอ่อนแทรกกระจายอยู่ในไต และกรวยไต อีกทั้งพบการตายของเยื่อบุผิวท่อไตอย่างรุนแรง

นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อปลาได้รับเมลามีนทำให้เกิดการตกค้างภายในตัวปลาเช่นการรายงานของ Reimschuessel และคณะ (2009) ที่ศึกษาการตกค้างของเมลามีนในเนื้อปลากดอเมริกันและปลาเรนโบว์ เทร้าท์ ภายหลังได้รับเมลามีน 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (single oral dose) พบว่าปริมาณเมลามีนที่สะสมในเนื้อปลาจะมีค่าสูงสุดในวันที่ 1 (12.73 และ 12.26 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ในปลากดอเมริกันและปลาเรนโบว์เทร้าท์ตามลำดับ และจะมีค่าลดลงต่ำกว่า 2.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ภายในวันที่ 7 ในปลากดอเมริกันและภายใน 14 วันในปลาเรนโบว์เทร้าท์ สอดคล้องกับการศึกษาของ นัทท์ และวุฒิพร (2554) พบว่าปริมาณเมลามีนที่ตกค้างในเนื้อของปลานิลแดงที่ได้รับอาหารที่ผสมเมลามีน และจะเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณเมลามีนที่ปลาได้รับจากอาหาร โดยมีค่าอยู่ในช่วง 65 - 332 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อปลาได้รับอาหารที่มีปริมาณเมลามีน 0.5 - 3.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และจากการทดลอง ปวีณา และคณะ (2552) ที่พบเมลามีนตกค้างในเนื้อปลาดุกพันธุ์ผสม 63 - 450 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อปลาได้รับอาหารที่ผสมเมลามีน 0.5 - 3.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบว่าปลาดุกพันธุ์ผสมได้รับอาหารที่ผสมเมลามีน 0.5 - 3.0 เปอร์เซ็นต์ ทำให้สีผิวและลำตัวคล้ำขึ้น ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของรงควัตถุที่ผิวหนังของปลา โดยเมื่อปลากินเมลามีนเข้าไปจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ melanin – concentrating hormone ในตัวปลา ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีผลไปยับยั้งหรือทำลายการรับรู้ของ melanophore จึงเกิดเปลี่ยนแปลงของรงควัตถุ melanin ทำให้ปลามีสีเข้มขึ้น สอดคล้องกับ Cardinaud และคณะ (2004) ที่รายงานว่า melanin – concentrating hormone มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของรงควัตถุ melanin ใน melanophore ของปลา โดย melanin – concentrating hormone มีผลต่อการแพร่กระจายของ melanosomes ซึ่งไปกระตุ้นการเคลื่อนที่และการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสรอบ ๆ บริเวณเซลล์ผิวหนัง (Pissios and Maratos-Flier, 2003)

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุ

2.1.1 ปลาทดลอง

ใช้ปลากะพงขาวน้ำหนักเฉลี่ย 0.5 กรัม/ตัว จำนวน 3,000 ตัว โดยนำมาจากศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จ.สตูล อนุบาลและปรับสภาพในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 1,000 ลิตร จนได้น้ำหนักเฉลี่ย 7.5 กรัม

2.1.2 อาหารสำหรับอนุบาลลูกปลาก่อนเริ่มต้นการทดลอง

อาหารสำหรับอนุบาลลูกปลากะพงขาวก่อนเริ่มต้นการทดลอง ให้อาหารเม็ดสูตรควบคุมซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการคือ โปรตีน 45 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 12 เปอร์เซ็นต์ โดยให้วันละ 2 ครั้ง

2.1.3 สารเคมี

2.1.3.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาทดลอง และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง แสดงในภาคผนวก ก.

2.1.3.2 สารเคมีสำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อเหงือก ตับ ไต กระเพาะอาหารของปลาทดลอง แสดงในภาคผนวก ข.

2.2 อุปกรณ์

2.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงปลาทดลอง

2.2.1.1 ถังไฟเบอร์กลาสทดลองขนาดความจุน้ำ 276 ลิตร จำนวน 21 ถัง

2.2.1.2 ถังไฟเบอร์กลาสขนาด 1,000 ลิตร

2.2.1.3 อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วย สายยาง หัวทราย

2.2.1.4 อุปกรณ์ถ่ายน้ำ และอุปกรณ์ขนย้ายปลา ได้แก่ สายยาง สวิงตักปลา ถังพลาสติก

2.2.2 อุปกรณ์เตรียมอาหารทดลอง

2.2.2.1 เครื่องมือเตรียมอาหาร (hobart mixer A 200 T) ประกอบด้วยชุดเครื่องผสมอาหารแบบมีใบพัด ชุดอัดเม็ดอาหาร หม้อผสมอาหาร

2.2.2.2 ตู้อบอาหาร ถาดสำหรับอบอาหาร

2.2.2.3 อุปกรณ์ชั่งวัสดุอาหาร ได้แก่ เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง กระบอกตวง บีกเกอร์ ถาดเตรียมอาหาร

2.2.2.4 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อเก็บอาหารทดลอง และตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อเก็บเนื้อปลาระหว่างการทดลองระหว่างรอนำไปใช้

2.2.3 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลองและตัวปลา

2.2.3.1 อุปกรณ์วิเคราะห์ความชื้น ได้แก่ ขวดชั่ง ตู้อบ โถดูดความชื้น เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.2.3.2 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ได้แก่ เครื่องย่อย เครื่องกลั่น หลอดย่อยโปรตีน กระบอกตวง บีกเกอร์ บิวเรต ขวดรูปชมพู่

2.2.3.3 อุปกรณ์วิเคราะห์เถ้า ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ เตาเผา โถดูดความชื้น เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.2.3.4 อุปกรณ์วิเคราะห์ไขมันได้แก่ ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ไขมัน ไส้กรองสาร ถ้วยสกัดสาร ตู้อบ โถดูดความชื้น เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.2.3.4 อุปกรณ์วิเคราะห์เยื่อใย ได้แก่ ชุดเครื่องมือวิเคราะห์เยื่อใย รุ่น fibertec system ถ้วยแก้ว (glass crucible) เบอร์ 1 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 (micro tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.2.4.2 เครื่องสำหรับแยกซีรัม ได้แก่ เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (beckman, avanti^{TM} 30 centrifuge)

2.2.5.อุปกรณ์ศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

2.2.5.1 ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด

2.2.5.2 เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ของ 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

2.2.5.4 อุปกรณ์สำหรับเตรียมสไลด์ถาวร คือ ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (memmert) ชุดสำหรับใส่สีย้อม และแผ่นปิดสไลด์

2.2.5.5 เครื่องเอ็มเบดดิ้ง (embedding center)

2.2.5.6 เตาร้อน (hot plate)

2.2.5.7 กล้องถ่ายภาพของ olympus รุ่น AX 70 และกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบของ olympus รุ่น C-35 AD

2.2.6 อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

2.2.6.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง

2.2.6.2 ถังสำหรับบรรจุน้ำ

2.2.6.3 ขันพลาสติก

2.2.6.4 สวิงช้อนปลา

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การเตรียมอุปกรณ์ทดลอง

เตรียมถังไฟเบอร์กลาสขนาด 1,000 ลิตร สำหรับอนุบาลปลาทดลอง การทดลองทำในถังไฟเบอร์กลาสทดลองขนาด 65x85x50 เซนติเมตร ความจุน้ำ 276 ลิตร ทำความสะอาดและติดตั้งระบบให้อากาศ จากนั้นเติมน้ำประปาที่ปราศจากคลอรีนให้ได้ปริมาตร 193 ลิตร

2.3.2 การเตรียมปลาทดลอง

นำปลากะพงขาวน้ำหนักเฉลี่ย 0.5 กรัม/ตัว จำนวน 3,000 ตัว โดยนำมาจากศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จ.สตูล มาอนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 1,000 ลิตร ให้อาหารเม็ดสูตรควบคุมซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการคือ โปรตีน 45 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 12 เปอร์เซ็นต์ และมีพลังงาน 3,900 กิโลคาลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัม วันละ 2 ครั้ง เวลา 9.00 น. และ 16.00 น. เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน เมื่อปลาที่อนุบาลไว้มีน้ำหนักเฉลี่ย 7.5 กรัม/ตัว (จากการสุ่มชั่ง) คัดปลาใส่ถังละ 20 ตัว ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (ก่อนชั่งน้ำหนักงดให้อาหารปลาเป็นเวลา 1 วัน) บันทึกข้อมูลน้ำหนักปลาเริ่มต้นเพื่อนำไปคำนวณการเจริญเติบโต จากนั้นให้กินอาหารทดลองสูตรที่ 1 (ไม่เสริมการเมลามีน) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นสุ่มเก็บตัวอย่างปลาจากถังไฟเบอร์กลาสจำนวน 15 ตัว เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในตัวปลาได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และเถ้า ตามวิธีการมาตรฐานของ AOAC (1990)

2.3.3 การเตรียมอาหารทดลอง

อาหารทดลองมีทั้งหมด 6 สูตร สูตรที่ 1 เป็นสูตรควบคุมไม่ผสมเมลามีน สูตรที่ 2-6 มีการผสมเมลามีนตามระดับความเข้มข้นในแต่ละสูตร คือ เมลามีน 0.1 เปอร์เซ็นต์, เมลามีน 0.2 เปอร์เซ็นต์, เมลามีน 0.4 เปอร์เซ็นต์, เมลามีน 0.6 เปอร์เซ็นต์ และเมลามีน 0.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กำหนดให้อาหารทุกสูตรมีระดับโปรตีน 45 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 12 เปอร์เซ็นต์และมีพลังงาน 3,900 กิโลคาลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยมีส่วนประกอบวัตถุดิบอาหารที่เหมือนกัน ได้แก่ ปลาป่น หัวกุ้งป่น แป้งข้าวเจ้า กากถั่วเหลือง วีทกลูเท่น แป้งสาลี น้ำมันปลา น้ำมันถั่วเหลือง วิตามินรวม และแร่ธาตุรวม

2.3.4 ขั้นตอนในการเตรียมอาหารทดลอง

2.3.4.1 นำวัตถุดิบที่ใช้ไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการและสร้างสูตรอาหาร โดยคำนวณให้มีระดับโปรตีน และไขมัน เท่ากันทุกสูตรคือ โปรตีน 45 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 12 เปอร์เซ็นต์ และมีพลังงาน 3,900 กิโลคาลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

2.3.4.2 ชั่งวัตถุดิบอาหารที่ผ่านการร่อนจากตะแกรง ขนาด 30 เมช (mesh) ส่วนน้ำมันปลา น้ำมันถั่วเหลือง วิตามินรวม และแร่ธาตุรวม ชั่งแยกใส่ถุงไว้ตามแต่ละสูตร

2.3.4.3 นำสารเมลามีนไปบด แล้วผสมกับแป้งข้าวเจ้าให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมด ได้แก่ ปลาป่น หัวกุ้งป่น กากถั่วเหลือง วีทกลูเท่น แป้งสาลี วิตามินรวม แร่ธาตุรวมมาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหารประมาณ 10 นาที หลังจากนั้นจึงเติมน้ำมันปลา และน้ำมันถั่วเหลือง ผสมต่ออีกประมาณ 5 นาที แล้วเติมน้ำกลั่นประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร

2.3.4.4 นำวัตถุดิบอาหารที่ผสมกันดีแล้วเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหาร ผ่านหน้าแว่นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร โดยตัดเม็ดอาหารให้มีขนาดใกล้เคียงกัน

2.3.4.5 นำอาหารที่อัดเม็ดแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.3.4.6 บรรจุอาหารที่ผ่านการอบแล้วในถุงพลาสติก เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในการทดลอง

2.3.4.7 นำอาหาร 100 กรัม ไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ (ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และเถ้า) ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) ส่วนปริมาณไนโตรเจนฟรีเอ็กแทร็ก (nitrogen free extract, NFE) โดยคำนวณจาก 100 – (% ความชื้น + % โปรตีน + % ไขมัน + % เถ้า + % เยื่อใย) และคำนวณหาไนโตรเจนในอาหาร

2.3.4.8. เก็บอาหาร 100 กรัม เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเมลามีนในอาหาร โดยส่งวิเคราะห์ที่บริษัท ห้องปฏิบัติการลาง (ประเทศไทย) จำกัด ด้วยเครื่อง gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS)

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของวัตถุดิบอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร (เปอร์เซ็นต์ในน้ำหนักแห้ง)

วัตถุดิบ	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4	สูตร 5	สูตร 6
ปลาป่น	46	46	46	46	46	46
กากถั่วเหลือง	7	7	7	7	7	7
แป้งข้าวเจ้า	2.68	2.58	2.48	2.28	2.08	1.88
หัวกุ้งป่น	12	12	12	12	12	12
หวีดกลูเท่น	8	8	8	8	8	8
แป้งสาลี	11	11	11	11	11	11
น้ำมันปลา	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
น้ำมันถั่วเหลือง	3	3	3	3	3	3
วิตามินรวม[1]	2	2	2	2	2	2
แร่ธาตุรวม[2]	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8
บีเอชที	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
เมลามีน	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8
รวม	100	100	100	100	100	100
โปรตีนรวม (%)	44.94	45.34	45.74	46.53	47.32	48.12
โปรตีนจริง (%)	44.94	44.94	44.93	44.92	44.91	44.89
โปรตีนเทียม (%)	0	0.4	0.81	1.61	2.41	3.23
เมลามีนในอาหารที่วิเคราะห์ได้ (%)	0	0.10	0.24	0.43	0.56	0.90

[1]Vitamin premix (mg/1 kg feed) : Thiamine (B_1) 10; Riboflavin (B_2) 20; Pyridoxine (B_6) 10; Cobalamin (B_{12}) 0.05; Retinal (A) 4 (7,000 IU); Cholecalciferol (D_3) 0.1 (4,000 IU); Phylloquinone (K_1) 80; Folic acid 5; Calcium pantothenate 40; Inositol 400; Niacin 150; Tocopherol (E) 60 (66 IU); Ascorbic acid (C) 500; Biotin 3; Vitamin A (vitamin A-palmitate) 1,750 IU/mg; Vitamin D (vitamin D_3; cholecalciferol) 40,000 IU/mg; Vitamin E (vitamin E; DL-α-tocopherol) 1.1 IU/mg

[2]Mineral premix (mg/1 kg feed) : Na 3.304; Mg 25; K 76.471; Fe 8.842; Zn 0.664; Mn 0.329; Cu 0.069; Co 0.00199; I 0.0098; Se 0.025

ตารางที่ 4 คุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหารทดลอง (% บนฐานน้ำหนักแห้ง)[1]

วัตถุดิบอาหาร	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	NFE[2]
ปลาป่น	7.67 ± 0.02	64.45 ± 0.43	10.05 ± 0.02	20.93 ± 0.20	0.91 ± 0.03	3.65 ± 0.65
กากถั่วเหลือง	5.87± 0.19	43.04 ± 0.15	2.43 ± 0.20	7.07 ± 0.06	3.53 ± 0.05	43.93 ± 0.25
แป้งข้าวเจ้า	9.74 ± 0.12	6.55 ± 0.18	1.00 ± 0.01	0.28 ± 0.00	4.88 ± 0.01	87.30 ± 0.17
หัวกุ้งป่น	8.83 ± 0.04	36.23 ± 0.60	5.68 ± 0.19	40.03 ± 0.83	5.84 ± 0.05	12.22 ± 0.06
หวีดกลูเท่น	7.78 ± 0.18	80.11 ± 0.38	1.53 ± 0.17	0.96 ± 0.03	0.50 ± 0.06	16.90 ± 0.49
แป้งสาลี	9.88 ± 0.01	12.37 ± 0.22	0.55 ± 0.19	0.66 ± 0.06	1.18 ± 0.06	85.23 ± 0.04
เมลามีน	0 ± 0.00	403.20 ± 0.64	0 ± 0.00	0 ± 0.00	-	-

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ)

[2]nitrogen free extract

ตารางที่ 5 คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลอง (% บนฐานน้ำหนักแห้ง) [1]

สูตรอาหาร	เมลามีน (%)	คุณค่าทางโภชนาการของอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีนที่ระดับต่างๆ					
		ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	NFE[2]
1	(M 0)	5.53 ± 0.07	45.61 ± 0.17	12.64 ± 0.05	17.28 + 0.09	5.77 ± 0.06	18.71 ± 0.02
2	(M 0.1)	3.47 ± 0.17	46.84 ± 0.17	12.49 ± 0.24	17.40 + 0.21	5.85 ± 0.04	17.43 ± 0.37
3	(M 0.2)	3.53 ± 0.18	48.78 ± 0.46	12.42 ± 0.14	17.16 + 0.14	6.06 ± 0.02	15.59 ± 0.71
4	(M 0.4)	2.48 ± 0.03	50.68 ± 0.07	12.79 ± 0.25	17.30 + 0.24	6.48 ± 0.05	12.75 ± 0.25
5	(M 0.6)	5.03 ± 0.05	51.94 ± 0.02	12.14 ± 0.55	17.45 + 0.03	6.31 ± 0.03	12.15 ± 0.55
6	(M 0.8)	4.60 ± 0.14	52.34 ± 0.62	12.13 ± 0.52	17.49 + 0.07	6.35 ± 0.05	11.70 ± 0.07

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ 4 ซ้ำ)

[2] nitrogen free extract

2.3.5 การวางแผนการทดลอง

ศึกษาผลของเมลามีนระดับต่างๆ ในอาหารปลากะพงขาว โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) แบ่งเป็น 6 ชุดการทดลองๆ ละ 4 ซ้ำ อาหารทดลองมีทั้งหมด 6 สูตรซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการที่ใกล้เคียงกันคือ โปรตีน 45 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 12 เปอร์เซ็นต์ และมีพลังงาน 3,900 กิโลคาลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ประกอบด้วย

สูตรที่ 1 สูตรควบคุม ไม่ใส่เมลามีน (M 0 %)
สูตรที่ 2 สูตรควบคุม + เมลามีน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (M 0.1 %)
สูตรที่ 3 สูตรควบคุม + เมลามีน 0.2 เปอร์เซ็นต์ (M 0.2 %)
สูตรที่ 4 สูตรควบคุม + เมลามีน 0.4 เปอร์เซ็นต์ (M 0.4 %)
สูตรที่ 5 สูตรควบคุม + เมลามีน 0.6 เปอร์เซ็นต์ (M 0.6 %)
สูตรที่ 6 สูตรควบคุม + เมลามีน 0.8 เปอร์เซ็นต์ (M 0.8 %)

2.3.6 การเก็บรวบรวมข้อมูล

2.3.6.1 การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะที่แสดงออกของปลา

ทำตารางบันทึกข้อมูลในระหว่างการทดลองเพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทุกวัน โดยสังเกตพฤติกรรมของปลาเช่น การว่ายน้ำ การกินอาหาร และลักษณะผิดปกติภายนอกของปลาที่อาจเกิดขึ้นเช่น การเปลี่ยนแปลงของสีลำตัว การตกเลือด และการบวมบริเวณส่วนต่างๆ บันทึกข้อมูลที่ได้จากการสังเกต

2.3.6.2 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

ชั่งน้ำหนักรวมของปลาทุก 2 สัปดาห์ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (งดให้อาหารก่อนชั่งน้ำหนัก 1 มื้อ) เพื่อนำข้อมูลน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นไปคำนวณค่าการเจริญเติบโต บันทึกจำนวนปลาที่เหลืออยู่ของทุกชุดการทดลอง ตลอดจนจบการทดลอง นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณ

เปอร์เซ็นต์การรอดตาย (survival rate) เปอร์เซ็นต์การรอดตาย $= \frac{\text{จำนวนปลาสิ้นสุดการทดลอง (ตัว)}}{\text{จำนวนปลาเริ่มต้นการทดลอง (ตัว)}} \times 100$

การเจริญเติบโต คำนวณตามวิธีของ Dupree และ Sneed (1966) จากสมการ

เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain, WG) (เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{\text{น้ำหนักปลาสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)} - \text{น้ำหนักปลาเริ่มต้นการทดลอง (กรัม)}}{\text{น้ำหนักปลาเริ่มต้นการทดลอง (กรัม)}} \times 100$$

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, SGR) (เปอร์เซ็นต์/วัน) จากสมการ

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

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate) คำนวณตามวิธีของ Dupree และ Sneed (1966) จากสมการ

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

อัตราการกินอาหาร (rate of feed intake) (เปอร์เซ็นต์ต่อตัวต่อวัน) คำนวณตามวิธีของ Yone และ Fujii (1975) จากสมการ

$$\text{อัตราการกินอาหาร} = \frac{F \times 100}{\frac{W_0 + W_1}{2} \times \frac{N_0 + N_1}{2} \times T}$$

F = น้ำหนักอาหารแห้งที่ปลากิน (กรัม)

W_0 = น้ำหนักปลาเฉลี่ยเริ่มต้น (กรัม)

W_1 = น้ำหนักปลาเฉลี่ยสุดท้าย (กรัม)

N_0 = จำนวนปลาเริ่มต้น (กรัม)

N_1 = จำนวนปลาสุดท้าย (กรัม)

T = ระยะเวลาที่ปลาได้รับอาหารทดลอง (วัน)

2.3.6.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปลา

สุ่มตัวอย่างปลาก่อนการทดลองจำนวน 15 ตัว นำไปวิเคราะห์หาความชื้นในตัวปลา (เก็บทันทีหลังคัดปลาลงถัง) และนำตัวอย่างปลาไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน และเถ้าตามวิธีการของ AOAC (1990) เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มตัวอย่างปลาจากแต่ละถังๆ ละ 3 ตัว ไปวิเคราะห์หาความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า จากนั้นนำค่าโปรตีนที่ได้ไปคำนวณประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio, PER) ตามวิธีการของ Zeitoun และคณะ (1973) จากสมการ

ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio, PER)

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

การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (apparent net protein utilization, ANPU) ตามวิธีการของ Robinson และ Wilson (1985) จากสมการ

การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ

$$= \frac{(\%\text{โปรตีนเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \%\ \text{โปรตีนเมื่อเริ่มต้นการทดลอง})}{\text{น้ำหนักโปรตีนที่ปลากินตลอดการทดลอง (กรัม)}} \times 100$$

2.3.6.4 การศึกษาผลของเมลามีนต่อองค์ประกอบเลือดปลา

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 สุ่มปลาถังละ 3 ตัว สลบด้วยน้ำมันกานพลูความเข้มข้น 50 ppm สังเกตอาการจนปลาไม่เคลื่อนไหว เจาะเลือดบริเวณโคนหางด้วยเข็มขนาด 25Gx1 ใส่หลอดไมโครทิวบ์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm (รอบต่อนาที) เป็นเวลา 15 นาที เก็บเฉพาะตัวอย่างซีรัม (serum) เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณ blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr) และแร่ธาตุที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของไต ได้แก่ โซเดียม (Na) คลอไรด์ (Cl) และโปแตสเซียม (K) ด้วยเครื่อง beckman CX-3 delta ในการวิเคราะห์ จะส่งวิเคราะห์ที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2.3.6.5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของปลา

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 สุ่มปลาถังละ 3 ตัว จากแต่ละชุดการทดลอง เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อในส่วนของเหงือก กระเพาะอาหาร ตับ และไต ตรวจสอบความผิดปกติภายนอกของเนื้อเยื่อ เช่น การตกเลือด สี และขนาด พร้อมบันทึกข้อมูล จากนั้นรักษาสภาพของเนื้อเยื่อในน้ำยาฟอร์มาลีน 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเปลี่ยนน้ำยารักษาสภาพเป็นแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ จนกว่าจะถึงขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ นำตัวอย่างเนื้อเยื่อทั้งหมดผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อโดยเครื่อง automatic tissue processor ฝังในพาราพลาสต์ ตัดด้วยเครื่องไมโครโตม (sliding microtome) หนา 3 ไมครอน ตามวิธีมาตรฐานของ Humason (1979) และย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin เพื่อนำไปทำสไลด์ถาวร ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อโดยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ

2.3.6.6 การวิเคราะห์เมลามีนในอาหารทดลอง

การส่งตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเมลามีนในอาหารทดลองใช้เทคนิค gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) โดยมีกระบวนการดังนี้

2.3.6.6.1 ฉีดตัวอย่างอาหารเข้าเครื่อง gas chromatography แยกองค์ประกอบของสารที่ระเหยกลายเป็นไอในอุณหภูมิที่เหมาะสม

2.3.6.6.2 ตัวอย่างอาหารจะเริ่มเข้าไปใน column ที่อยู่ใน oven องค์ประกอบของตัวอย่างจะถูกแยกออกมาจาก column ด้วยอุณหภูมิที่ทำให้สารระเหย แต่ต้องไม่ให้เกิดการสลายตัว

2.3.6.6.3 ตัวอย่างอาหารจะเข้าไปส่วน detector ส่วนที่ตรวจวัดว่ามีปริมาณสารเมลามีน

2.3.6.6.4 ตัวอย่างอาหารจะเข้าไปในเครื่อง mass spectrometry ซึ่งโมเลกุลขององค์ประกอบที่ถูกแยกออกมาจากสารตัวอย่างจะถูกไอออไนซ์ในสภาวะสุญญากาศ

2.3.6.6.5 จากนั้นเครื่องจะตรวจออกมาเป็นเลขมวลเปรียบเทียบจากฐานข้อมูลอ้างอิง แล้วแปลผลออกมาเป็นปริมาณเมลามีนที่มีอยู่ในอาหาร (ศูนย์บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์, 2552) ซึ่งการวิเคราะห์เมลามีนอาหารทดลอง จะส่งวิเคราะห์ที่บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

2.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (version 17.0) ช่วยในวิเคราะห์ข้อมูล

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การตรวจสอบพฤติกรรม และลักษณะภายนอก

T_1 T_2 T_3 T_4 T_5 T_6

(M 0 %) (M 0.1 %) (M 0.2 %) (M 0.4 %) (M 0.6 %) (M 0.8 %)

ภาพที่ 5 ปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารผสมเมลามีนระดับต่าง ๆ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

การตรวจสอบพฤติกรรม และลักษณะภายนอกของปลากะพงขาวทดลองตลอดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์ พบว่าปลาที่ได้รับอาหารผสมเมลามีนสูตรที่ 6 (M 0.8 %) ปลามีพฤติกรรมไม่ยอมรับอาหาร ทำให้ปลามีการเจริญเติบโตด้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่รับอาหารสูตรอื่น ๆ (ดังภาพที่ 5) และพบว่าเกล็ดของปลาที่รับอาหารที่ผสมของเมลามีนทุกระดับ (M 0.1 % – M 0.8 %) มีความบางและหลุดจากตัวปลาได้ง่ายกว่าเกล็ดปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 (M 0 %)

3.2 การเจริญเติบโต

3.2.1. น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลาที่ได้รับอาหารต่าง ๆ

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีการผสมเมลามีนระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เลี้ยง และเริ่มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 จนถึงสัปดาห์ที่ 8 โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 6 (M 0.8 %) มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว 29.04 $\pm$ 2.03 กรัมต่อตัว มีค่าน้อยกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ (ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 42.40 $\pm$ 1.19 ถึง 44.64 $\pm$ 1.76 กรัมต่อตัว (ดังแสดงในตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร ระยะเวลา 8 สัปดาห์[1]

สูตรอาหาร	เมลามีน (%)	สัปดาห์ (กรัมต่อตัว)				
		0	**2**	**4**	**6**	**8**
1	(M 0)	7.53 ± 0.02^{a}	13.14 ± 1.07^{b}	22.00 ± 0.86^{b}	32.07 ± 0.75^{b}	42.40 ± 1.19^{b}
2	(M 0.1)	7.52 ± 0.01^{a}	13.47 ± 0.17^{b}	22.77 ± 1.21^{b}	33.73 ± 1.70^{b}	44.60 ± 2.23^{b}
3	(M 0.2)	7.52 ± 0.01^{a}	13.81 ± 0.27^{b}	22.97 ± 1.16^{b}	33.79 ± 1.93^{b}	44.53 ± 3.06^{b}
4	(M 0.4)	7.52 ± 0.01^{a}	13.46 ± 0.59^{b}	22.60 ± 1.29^{b}	32.63 ± 1.78^{b}	44.56 ± 2.48^{b}
5	(M 0.6)	7.53 ± 0.01^{a}	13.76 ± 0.52^{b}	22.71 ± 0.85^{b}	33.08 ± 1.35^{b}	44.64 ± 1.76^{b}
6	(M 0.8)	7.52 ± 0.01^{a}	11.07 ± 0.42^{a}	16.22 ± 0.68^{a}	22.25 ± 1.27^{a}	29.04 ± 2.03^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ 4 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ ที่มีตัวอักษร เหมือนกันกำกับไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ($p > 0.05$)

3.2.2 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการกินอาหาร และการรอดตาย

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีการผสมเมลามีนระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปลาที่ได้รับอาหารผสมเมลามีนสูตรที่ 6 (M 0.8 %) มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น 286.19 $\pm$ 26.68 เปอร์เซ็นต์ มีค่าน้อยกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 463.28 $\pm$ 16.39 ถึง 492.97 $\pm$ 32.96 เปอร์เซ็นต์ (ดังแสดงในตารางที่ 7)

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีการผสมเมลามีนระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปลาที่ได้รับอาหารผสมเมลามีนสูตรที่ 6 (M 0.8 %) มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.97 $\pm$ 0.06 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน มีค่าน้อยกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 1.25 $\pm$ 0.02 ถึง 1.28 $\pm$ 0.05 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน (ดังแสดงในตารางที่ 7)

อัตราการกินอาหารของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีการผสมเมลามีนระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ทุกชุดการทดลองโดยมีค่าอยู่ในช่วง 2.54 $\pm$ 0.23 ถึง 2.72 $\pm$ 0.18 เปอร์เซ็นต์ต่อตัวต่อวัน (ดังแสดงในตารางที่ 7)

การรอดตายของปลากะพงขาวที่รับอาหารที่ได้มีการผสมเมลามีนระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ทุกชุดการทดลอง โดยมีค่าอยู่ในช่วง 98.75 $\pm$ 2.50 ถึง 100.00 $\pm$ 0.00 เปอร์เซ็นต์ (ดังแสดงในตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการกินอาหาร และการรอดตาย ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร[1]

สูตรอาหาร	เมลามีน (%)	การเจริญเติบโตของปลาที่ได้รับอาหารที่ผสมเมลามีน			
		น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (เปอร์เซ็นต์ ต่อวัน)	อัตราการกินอาหาร (เปอร์เซ็นต์ต่อตัวต่อวัน)	การรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)
1	(M 0)	463.28 ± 16.39^{b}	1.25 ± 0.02^{b}	2.72 ± 0.18^{a}	100.00 ± 0.00^{a}
2	(M 0.1)	492.16 ± 29.08^{b}	1.28 ± 0.04^{b}	2.54 ± 0.23^{a}	100.00 ± 0.00^{a}
3	(M 0.2)	492.01 ± 40.77^{b}	1.28 ± 0.05^{b}	2.64 ± 0.24^{a}	100.00 ± 0.00^{a}
4	(M 0.4)	492.97 ± 32.96^{b}	1.28 ± 0.04^{b}	2.60 ± 0.21^{a}	100.00 ± 0.00^{a}
5	(M 0.6)	492.66 ± 23.97^{b}	1.28 ± 0.04^{b}	2.61 ± 0.10^{a}	98.75 ± 2.50^{a}
6	(M 0.8)	286.19 ± 26.68^{a}	0.97 ± 0.06^{a}	2.60 ± 0.22^{a}	97.50 ± 5.00^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ 4 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ ที่มีตัวอักษร เหมือนกันกำกับไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ($p > 0.05$)

3.2.3 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีการผสมเมลามีนระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปลาที่ได้รับอาหารผสมเมลามีนสูตรที่ 6 (M 0.8 %) มีค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ 1.44 ± 0.13 มีค่ามากกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 1.11 ± 0.07 ถึง 1.23 ± 0.12 (ดังแสดงในตารางที่ 8)

ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีการผสมเมลามีนระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปลาที่ได้รับอาหารผสมเมลามีนสูตรที่ 6 (M 0.8 %) มีค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีน 1.80 ± 0.09 มีค่าน้อยกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 2.79 ± 0.10 ถึง 2.92 ± 0.13 (ดังแสดงในตารางที่ 8)

การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีการผสมเมลามีนระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปลาที่ได้รับอาหารผสมเมลามีนสูตรที่ 6 (M 0.8 %) มีค่าการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ 28.12 ± 2.17 เปอร์เซ็นต์ มีค่าน้อยกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 37.17 ± 4.27 ถึง 42.19 ± 2.86 เปอร์เซ็นต์ (ดังแสดงในตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ ของปลาที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร[1]

สูตรอาหาร	เมลามีน (%)	การใช้ประโยชน์จากอาหารของปลาที่ได้รับอาหารที่ผสมเมลามีน		
		อัตรากาเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ	ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน	โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ได้ (%)
1	(M 0)	1.23 ± 0.12^{a}	2.81 ± 0.07^{b}	37.17 ± 4.27^{b}
2	(M 0.1)	1.11 ± 0.07^{a}	2.92 ± 0.13^{b}	42.19 ± 2.86^{c}
3	(M 0.2)	1.16 ± 0.07^{a}	2.89 ± 0.18^{b}	39.91 ± 2.16^{bc}
4	(M 0.4)	1.12 ± 0.04^{a}	2.84 ± 0.14^{b}	39.60 ± 0.48^{bc}
5	(M 0.6)	1.16 ± 0.03^{a}	2.79 ± 0.10^{b}	40.50 ± 2.27^{bc}
6	(M 0.8)	1.44 ± 0.13^{b}	1.80 ± 0.09^{a}	28.12 ± 2.17^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ 4 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ ที่มีตัวอักษร เหมือนกันกำกับไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ($p > 0.05$)

3.3 ส่วนประกอบทางโภชนาการของตัวปลา

ผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่ผสมเมลามีนระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปลาที่ได้รับอาหารผสมเมลามีนมีค่าความชื้น ค่าโปรตีน และค่าเถ้าสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 (M 0%) ส่วนค่าไขมันปลาที่ได้รับอาหารผสมเมลามีนสูตรที่ 6 (M 0.8 %) มีไขมันในตัวน้อยกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่อื่นๆ (ดังแสดงในตารางที่ 9)

ความชื้นของตัวปลา พบว่ามีค่า อยู่ในช่วง 69.62 $\pm$ 0.26 ถึง 71.22 $\pm$ 0.64 เปอร์เซ็นต์ ปลาที่ได้รับอาหารผสมเมลามีนสูตรที่ 6 (M 0.8 %) มีความชื้นในตัว 71.22 $\pm$ 0.64 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่อื่นๆ (ดังแสดงในตารางที่ 9)

โปรตีนของตัวปลา พบว่าปลาที่ได้รับอาหารผสมเมลามีนทุกระดับ มีค่าโปรตีนในตัวปลาอยู่ในช่วง 64.83 (10.37) $\pm$ 0.58 ถึง 67.54 (10.81) $\pm$ 0.62สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 (M 0) ที่มีค่า 62.11 (9.94) $\pm$ 0.14 เปอร์เซ็นต์ (ดังแสดงในตารางที่ 9)

ไขมันของตัวปลา พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 18.44 $\pm$ 0.31 ถึง 20.41 $\pm$ 0.56 เปอร์เซ็นต์ ปลาที่ได้รับอาหารผสมเมลามีนสูตรที่ 6 (M 0.8 %) มีไขมันในตัว 18.44 $\pm$ 0.31 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่อื่นๆ (ดังแสดงในตารางที่ 9)

เถ้าของตัวปลา พบว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีการผสมเมลามีนทุกระดับ มีค่าเถ้าในช่วง 16.18 $\pm$ 0.25 ถึง 18.74 $\pm$ 0.09 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 (M 0 %) ที่มีค่า 15.65 $\pm$ 0.04 เปอร์เซ็นต์ (ดังแสดงในตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 สวนประกอบทางโภชนาการของปลากะพงขาวที่รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร (เปอร์เซ็นต์บนฐานของวัตถุแห้ง) [1]

สูตรอาหาร	เมลามีน (%)	คุณค่าทางโภชนาการของปลาทดลอง			
		ความชื้น (%)	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	เถ้า (%)
ปลาเริ่มต้น	I^0	75.44 $\pm$ 0.53	64.78 (10.93) $\pm$ 0.35	15.37 $\pm$ 0.41	16.16 $\pm$ 0.27
1	(M 0)	69.93 $\pm$ 0.46^{a}	62.11 (9.94) $\pm$ 0.14^{a}	19.79 $\pm$ 0.15^{b}	15.65 $\pm$ 0.04^{a}
2	(M 0.1)	69.62 $\pm$ 0.26^{a}	64.83 (10.37) $\pm$ 0.58^{b}	20.16 $\pm$ 0.19^{b}	16.18 $\pm$ 0.25^{b}
3	(M 0.2)	70.00 $\pm$ 0.18^{ab}	65.60 (10.50) $\pm$ 0.59^{bc}	20.08 $\pm$ 0.31^{b}	16.26 $\pm$ 0.39^{bc}
4	(M 0.4)	70.75 $\pm$ 0.63^{bc}	66.21 (10.59) $\pm$ 0.44^{c}	20.25 $\pm$ 0.31^{b}	16.44 $\pm$ 0.24^{bc}
5	(M 0.6)	69.99 $\pm$ 0.61^{ab}	67.54 (10.81) $\pm$ 0.62^{d}	20.41 $\pm$ 0.56^{b}	16.65 $\pm$ 0.32^{c}
6	(M 0.8)	71.22 $\pm$ 0.64^{c}	66.08 (10.57) $\pm$ 0.58^{c}	18.44 $\pm$ 0.31^{a}	18.74 $\pm$ 0.09^{d}

I^0 แสดงคุณค่าทางโภชนาการของปลากะพงขาวเริ่มต้นการทดลอง

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย$\pm$ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ 4 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ ที่มีตัวอักษร เหมือนกันกำกับไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ (p> 0.05)

ในวงเล็บเป็นปริมาณไนโตรเจน

3.4 องค์ประกอบเลือดของปลากะพงขาว

องค์ประกอบเลือดของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่ผสมเมลามีนระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ โดยใช้วิธีการแยกเอาซีรัม (serum) เพื่อวิเคราะห์ พบว่าปริมาณ blood urea nitrogen (BUN) ปลาที่รับอาหารผสมเมลามีนตั้งแต่สูตรที่ 3 – 6 (M 0.2 % – M 0.8 %) มีค่าต่ำกว่าปลาที่รับอาหารสูตรที่ 1 (M 0 %) ส่วนค่า Na^+, K^+ และ Cl^- ของปลาที่รับอาหารผสมของเมลามีนทุกระดับ มีค่าสูงกว่าปลาที่รับอาหารสูตรที่ 1 (M 0 %) และสูตรที่ 2 (M 0.1 %) แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) (ดังแสดงในตารางที่ 10)

ค่า blood urea nitrogen (BUN) ในซีรัมของปลาที่ได้รับอาหารผสมของเมลามีนตั้งแต่สูตรที่ 3 – 6 (M 0.2 % – M 0.8 %) มีค่าในช่วง 6.15 $\pm$ 0.07 ถึง 6.70 $\pm$ 0.14 (5-23 mg%) เป็นสูตรที่มีค่าต่ำกว่าปลาที่รับอาหารสูตรที่ 1 (M 0 %) และสูตรที่ 2 (M 0.1 %) ที่มีค่า 7.05 $\pm$ 0.49 และ 7.05 $\pm$ 0.78 (5-23 mg%) ตามลำดับ ส่วนค่าแร่ธาตุในซีรัม พบว่าค่าโซเดียม (Na^+) ของปลาที่ได้รับอาหารผสมของเมลามีนทุกระดับ มีค่าอยู่ระหว่าง 147.35 $\pm$ 0.49 ถึง 164.90 $\pm$ 3.54 (136-146 mmol/L) มีค่าสูงกว่าปลาที่รับอาหารสูตรที่ 1 (M 0 %) ที่มีค่า 147.35 $\pm$ 0.49 (136-146 mmol/L) ค่าโปแตสเซียม (K^+) ของปลาที่ได้รับอาหารผสมของเมลามีนทุกระดับ มีค่าอยู่ระหว่าง 1.04 $\pm$ 0.01 ถึง 1.12 $\pm$ 0.08 (3.5-5.1 mmol/L) มีค่าสูงกว่าปลาที่รับอาหารสูตรที่ 1 (M 0 %) ที่มีค่า 1.04 $\pm$ 0.01 (3.5-5.1 mmol/L) และค่าคลอไรด์ (Cl^-) ของปลาที่ได้รับอาหารผสมของเมลามีนทุกระดับ มีค่าอยู่ระหว่าง 124.00 $\pm$ 0.00 ถึง 139.65 $\pm$ 1.77 (98-106 mmol/L) มีค่าสูงกว่าปลาที่รับอาหารสูตรที่ 1 (M 0 %) ที่มีค่า 124.00 $\pm$ 0.00 (98-106 mmol/L) (ดังแสดงในตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 องค์ประกอบเลือดของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร[1]

สูตรอาหาร	เมลามีน (%)	BUN (5-23 mg %)	Cr	Na^+ (136 - 146 mmol/L)	K^+ (3.5 - 5.1 mmol/L)	Cl^- (98 - 106 mmol/L)
1	(M 0)	7.05 ± 0.49^a	Pending	147.35 ± 0.49^a	1.04 ± 0.01^a	124.00 ± 0.00^a
2	(M 0.1)	7.05 ± 0.78^a	Pending	164.90 ± 3.54^a	1.08 ± 0.05^a	139.30 ± 3.54^a
3	(M 0.2)	6.30 ± 1.13^a	Pending	162.95 ± 1.06^a	1.19 ± 0.03^a	138.00 ± 2.26^a
4	(M 0.4)	6.15 ± 0.07^a	Pending	163.95 ± 1.20^a	1.17 ± 0.02^a	139.65 ± 1.77^a
5	(M 0.6)	6.70 ± 0.14^a	Pending	160.90 ± 1.70^a	1.12 ± 0.08^a	136.55 ± 1.48^a
6	(M 0.8)	6.65 ± 0.64^a	Pending	160.90 ± 8.77^a	1.20 ± 0.16^a	133.65 ± 9.65^a

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ ที่มีตัวอักษร เหมือนกันกำกับไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ($p > 0.05$)

Pending ไม่สามารถวิเคราะห์ค่าออกมาได้

3.5 การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของปลากะพงขาว

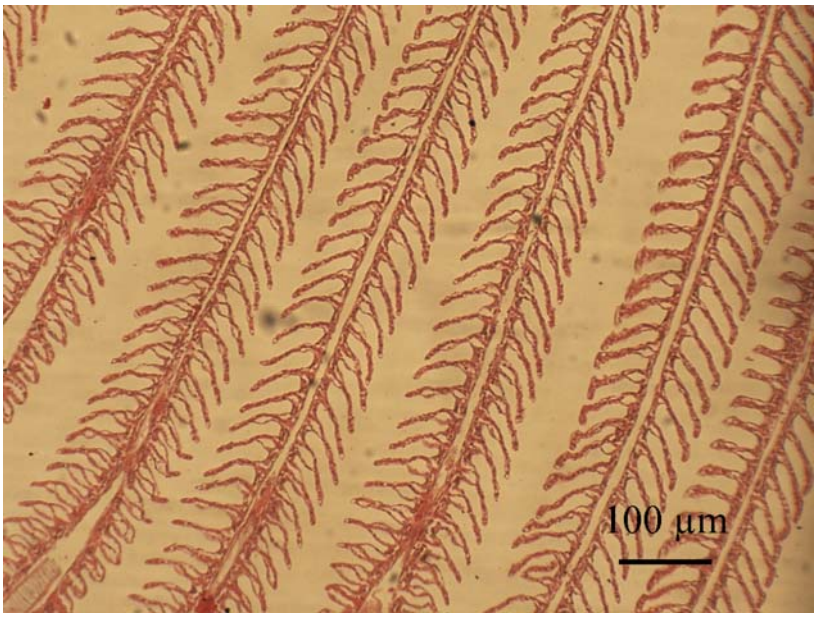
การเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่ผสมเมลามีนระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปลาที่รับอาหารผสมเมลามีนสูตรที่ 6 (M 0.8 %) ส่งผลให้เนื้อเยื่อเหงือก ตับ และไต มีการเปลี่ยนแปลงแตกต่างจากปลาที่รับอาหารสูตรอื่น ๆ

เหงือก พบว่าปลาที่รับอาหารผสมเมลามีนสูตรที่ 5 (M 0.6 %) เริ่มมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) ที่ส่วนปลายของซี่เหงือก (secondary lamellar) (ดังภาพที่ 10) และปลาที่รับอาหารผสมเมลามีนสูตรที่ 6 (M 0.8 %) มีการแบ่งเซลล์มากผิดปกติอย่างรุนแรง (severe hyperplasia) ที่ซี่เหงือก (gill lamellar) เกิดการแยกตัวของ epithelial lifting และเกิด fusion ของซี่เหงือก (gill lamellar) (ดังภาพที่ 11) แตกต่างจากปลาที่รับอาหารสูตรอื่น ๆ ซึ่งมีลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกปกติ (ดังภาพที่ 6 - 9)

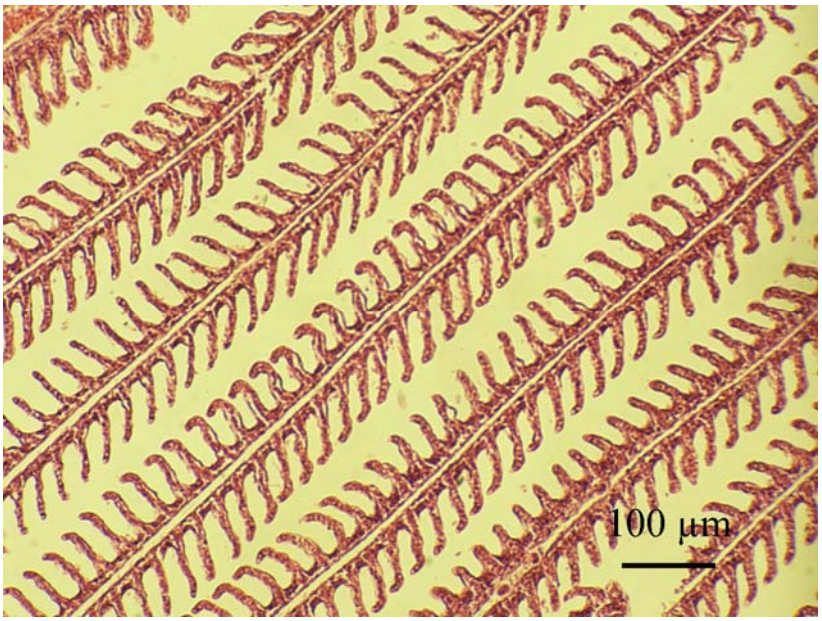
กระเพาะอาหาร พบว่าไม่มีความผิดปกติของเนื่อเยื่อทั้งกระเพาะอาหารส่วน lumen (ดังภาพที่ 12 - 17) และกระเพาะอาหารส่วน peritoneal cavity (ดังภาพที่ 18 - 23) ในปลาที่รับอาหารทุกชุดการทดลอง

ตับ พบว่าปลาที่ได้รับอาหารผสมเมลามีนสูตรที่ 6 (M 0.8 %) ส่งผลให้เนื้อเยื่อตับเกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ตับบางส่วน ทำให้เซลล์ไม่เกาะตัวกันเป็นรูปของเซลล์ และพบการหดตัวของนิวเคลียส (pyknotic nuclei) (ภาพที่ 29) แตกต่างจากปลาที่รับอาหารสูตรอื่น ๆ ซึ่งมีลักษณะเนื้อเยื่อตับปกติ (ดังภาพที่ 24 - 28)

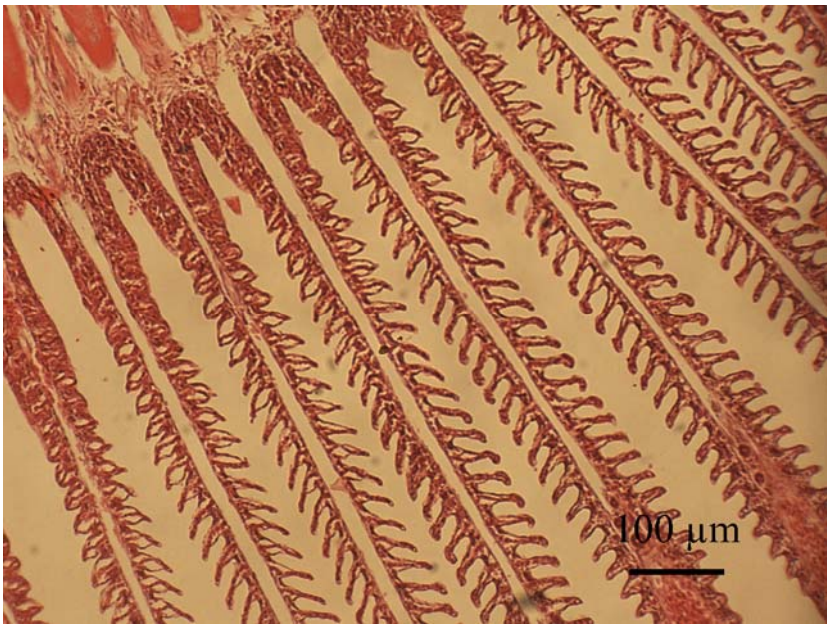
ไต พบว่าปลาที่รับอาหารผสมเมลามีนสูตรที่ 6 (M 0.8 %) ไตเกิดการเสื่อมสลายของท่อไต และมีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (glomerrulus) (ดังภาพที่ 35) แตกต่างจากปลาที่รับอาหารสูตรอื่น ๆ ซึ่งมีลักษณะเนื้อเยื่อไตปกติ (ดังภาพที่ 30 - 34)



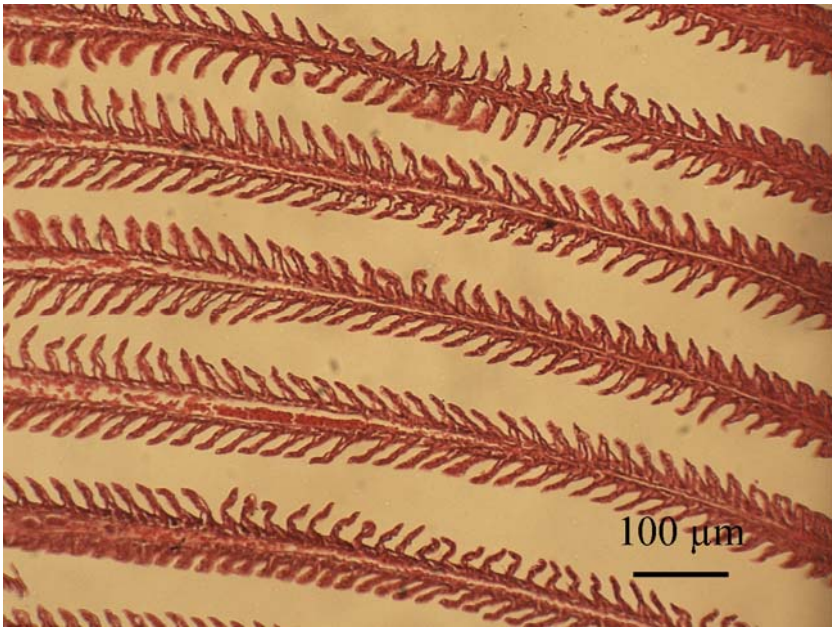
ภาพที่ 6 แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน (สูตรที่ 1) ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกปกติ (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)



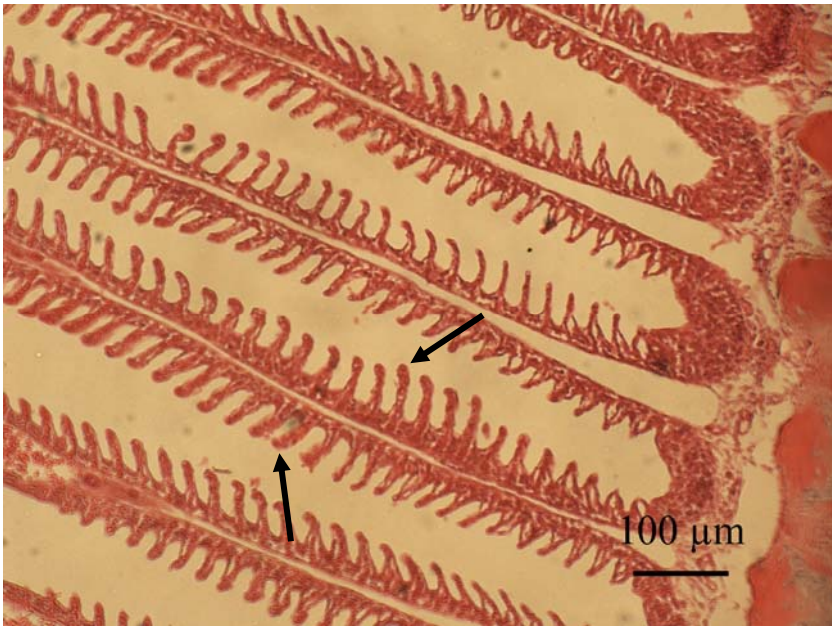
ภาพที่ 7 แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.1 % ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกปกติ (สูตรที่ 2) (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)



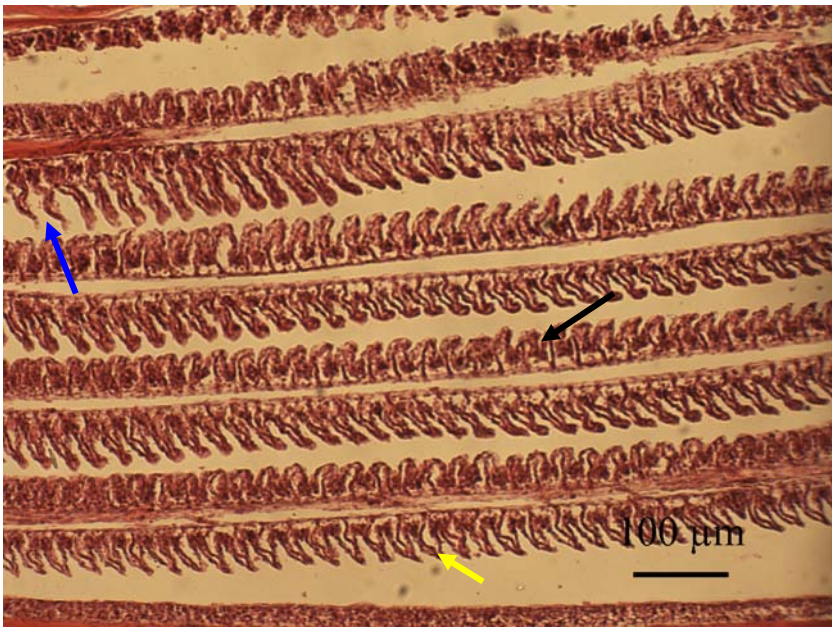
ภาพที่ 8 แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.2 % ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกปกติ (สูตรที่ 3) (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)



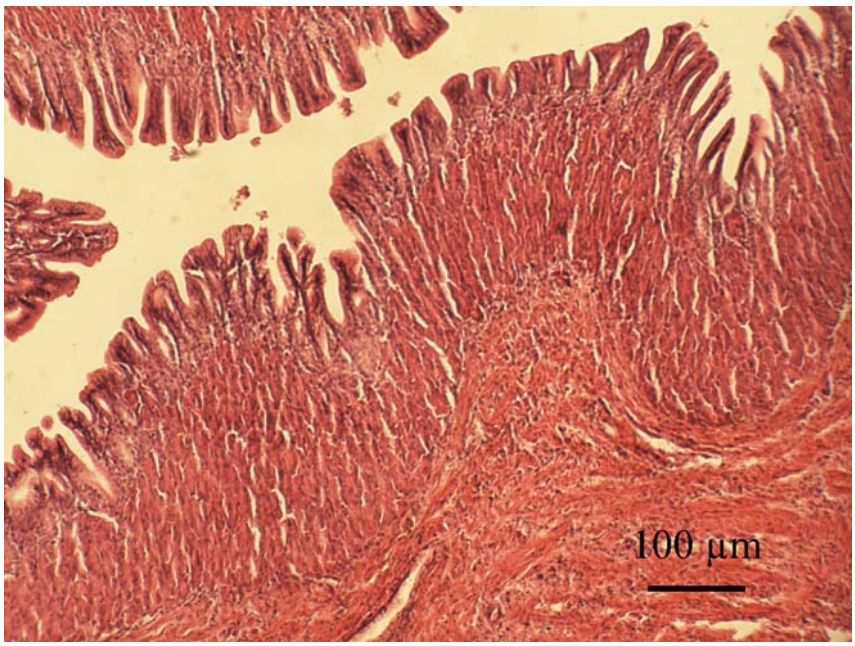
ภาพที่ 9 แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.4 % ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกปกติ (สูตรที่ 4) (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)



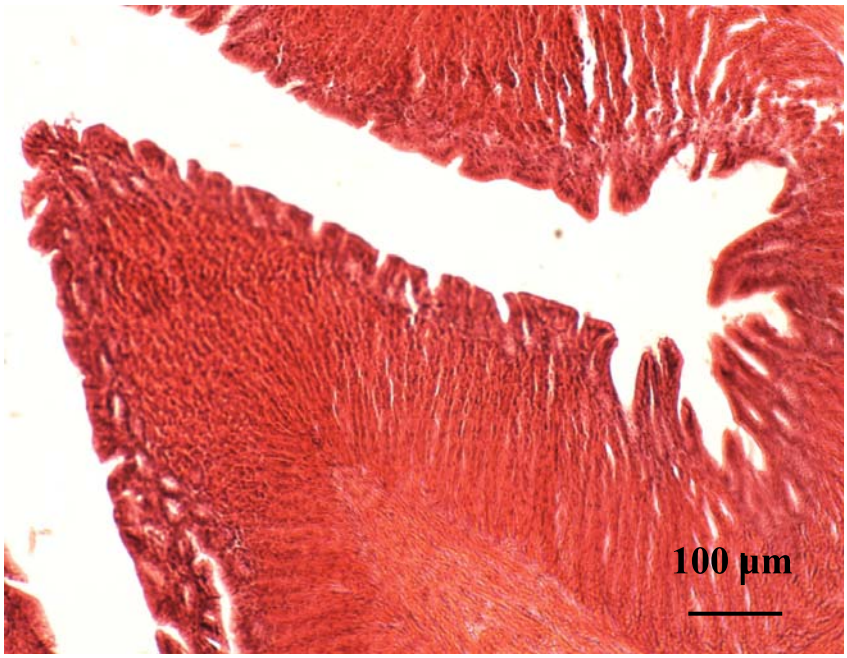
ภาพที่ 10 แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.6 % (สูตรที่ 5) มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) ที่ส่วนปลายของซี่เหงือก (secondary lamellar) (ศรชี้) (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)



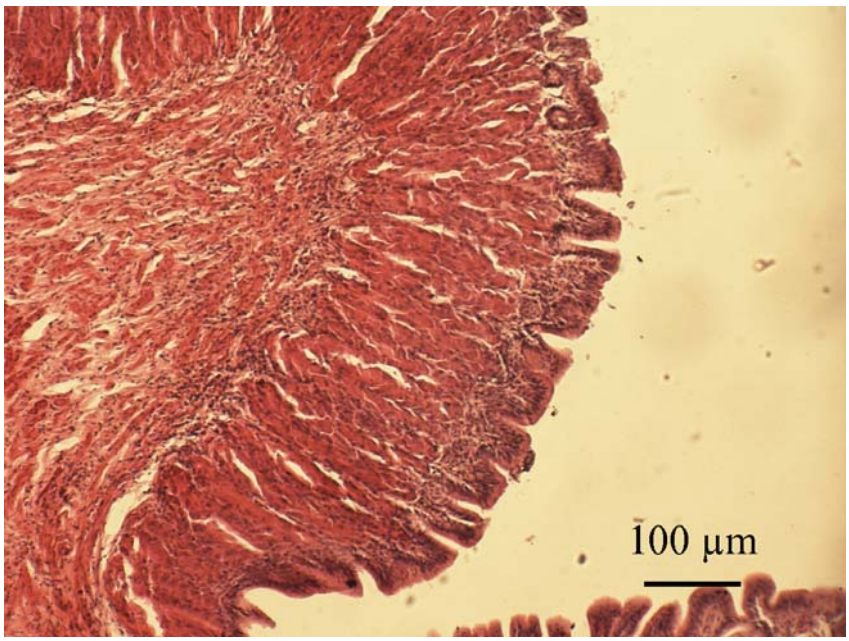
ภาพที่ 11 แสดงเนื้อเยื่อเหงือกของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.8 % (สูตรที่ 6) ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกมีการแบ่งเซลล์มากผิดปกติอย่างรุนแรง (severe hyperplasia) ที่ gill lamellar (ศรชี้สีดำ) เกิดการแยกตัวของ epithelial lifting (ศรชี้สีเหลือง) และเกิด fusion ของ lamellar (ศรชี้น้ำเงิน) (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)



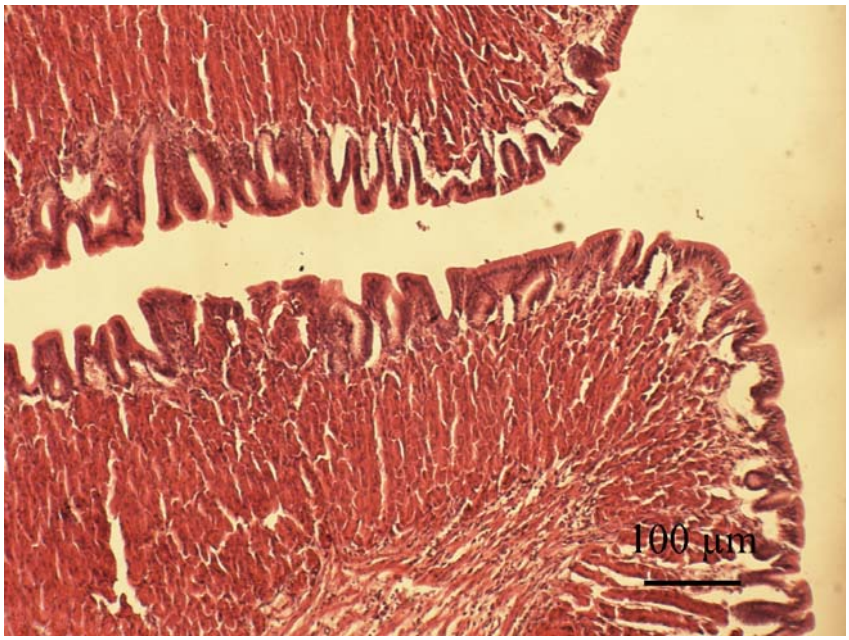
ภาพที่ 12 แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน lumen ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (สูตรที่ 1) (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)



ภาพที่ 13 แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน lumen ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.1 % (สูตรที่ 2) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)

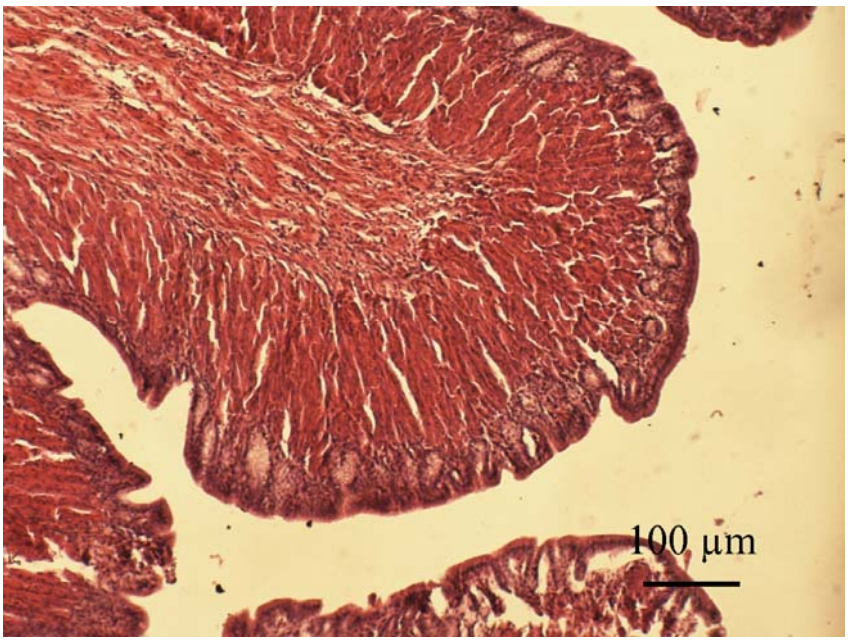


ภาพที่ 14 แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน lumen ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.2 % (สูตรที่ 3) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)

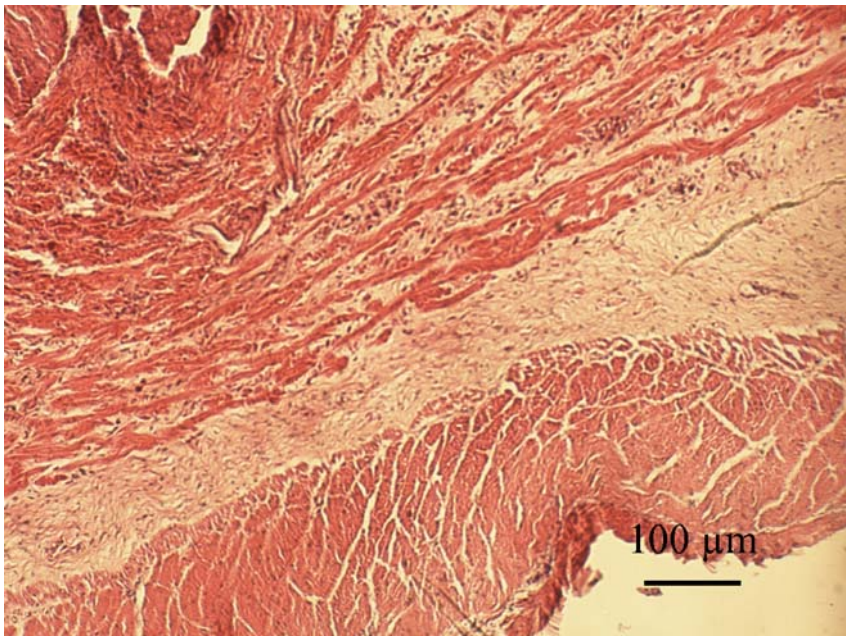


ภาพที่ 15 แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน lumen ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.4 % (สูตรที่ 4) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)

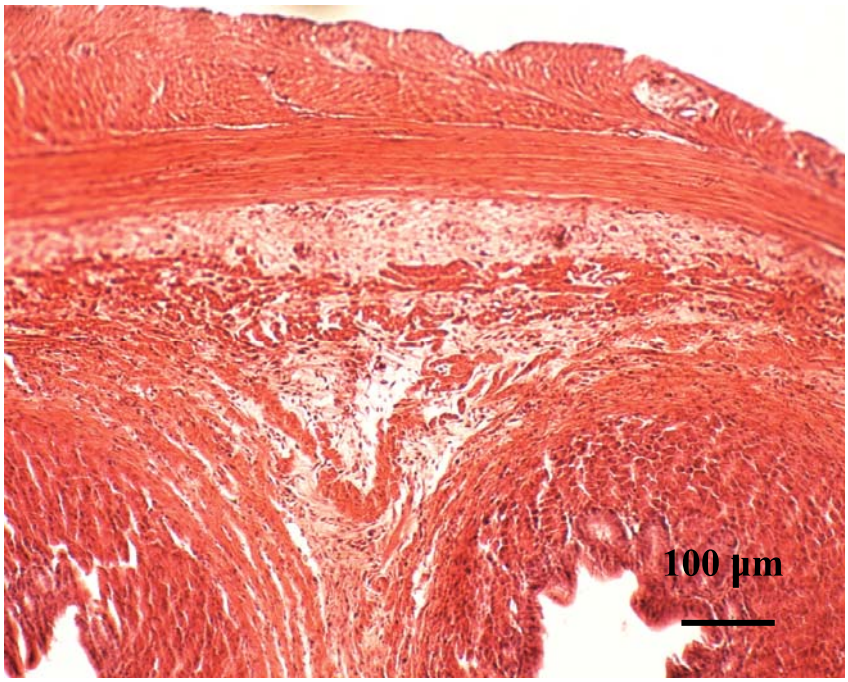
ภาพที่ 16 แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน lumen ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.6 % (สูตรที่ 5) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)



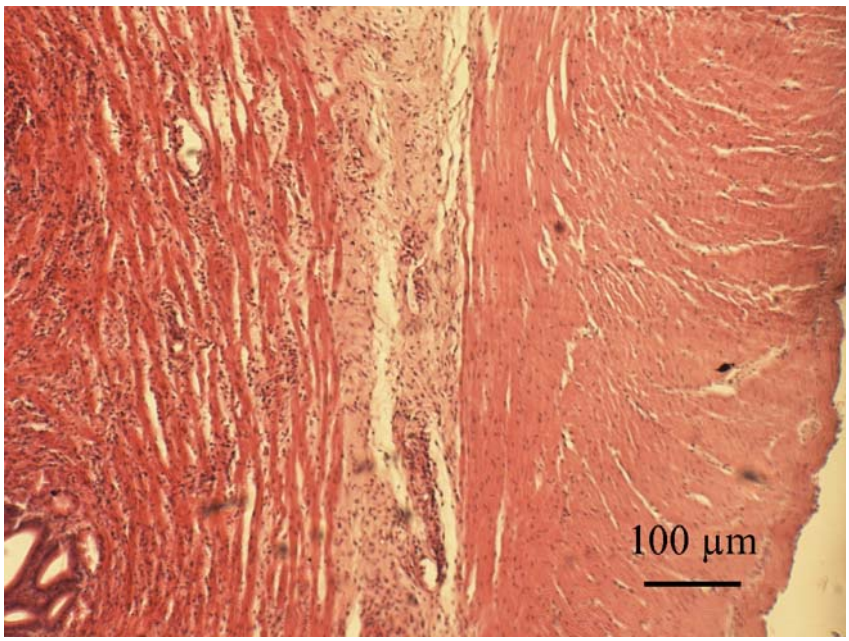
ภาพที่ 17 แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน lumen ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.8 % (สูตรที่ 6) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)



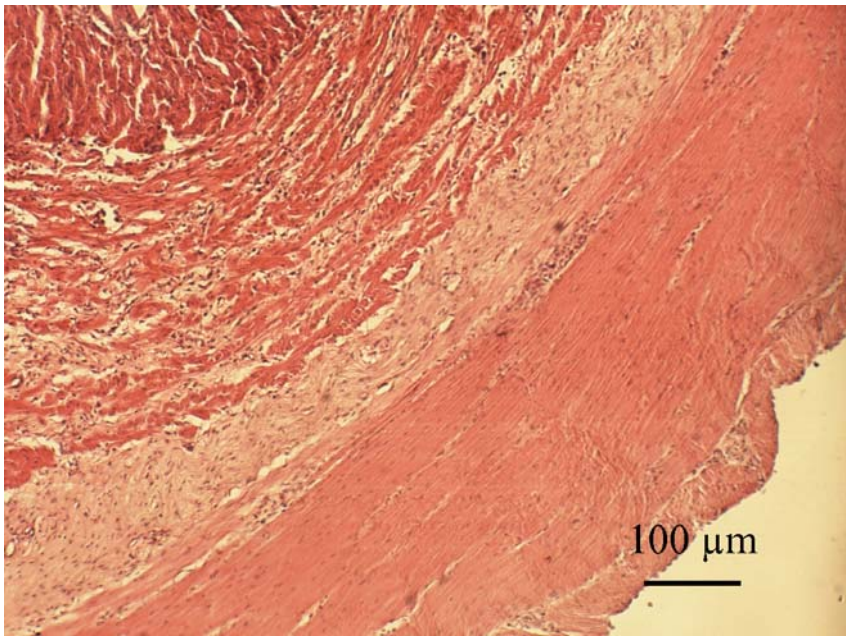
ภาพที่ 18 แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน peritoneal cavity ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน (สูตรที่ 1) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 µm, 40x)



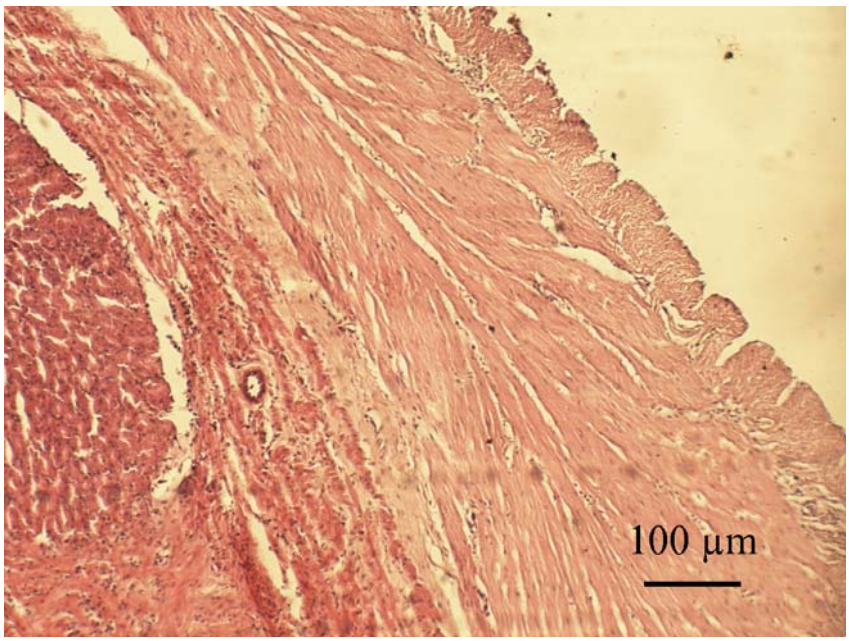
ภาพที่ 19 แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน peritoneal cavity ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.1 % (สูตรที่ 2) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)



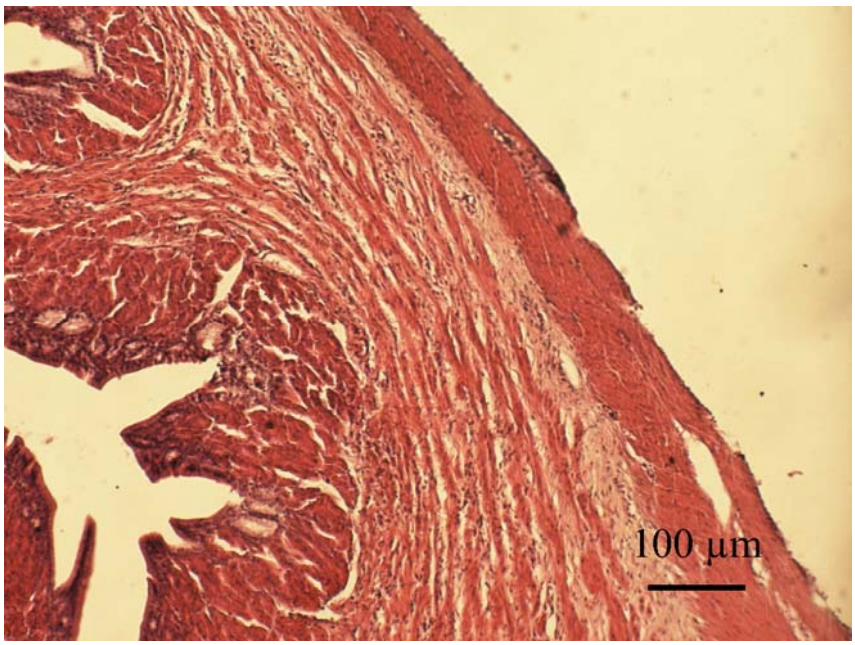
ภาพที่ 20 แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน peritoneal cavity ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.2 % (สูตรที่ 3) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)



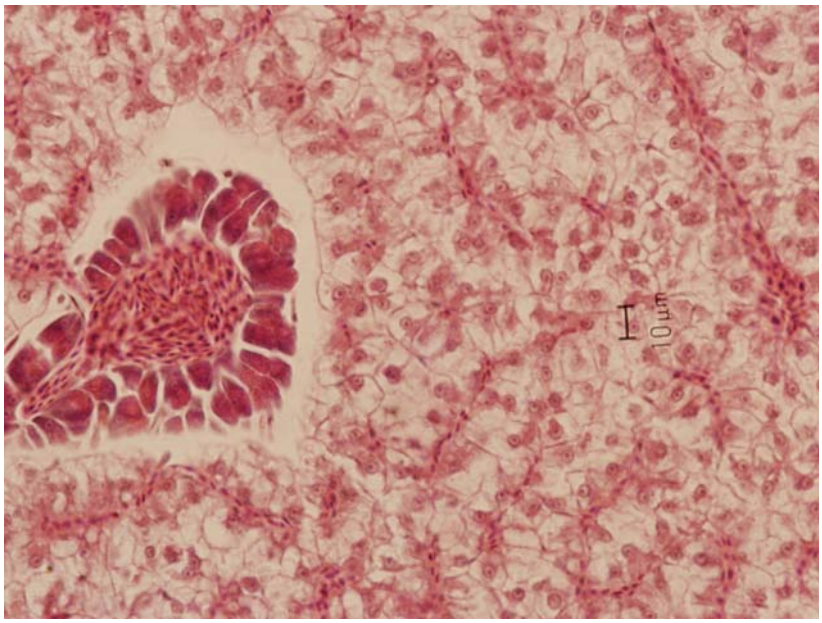
ภาพที่ 21 แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน peritoneal cavity ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.4 % (สูตรที่ 4) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)



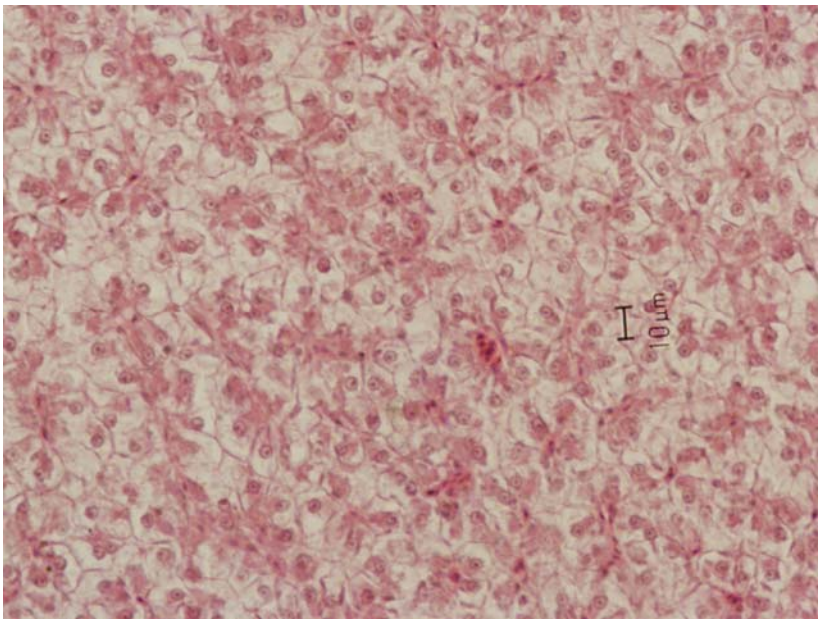
ภาพที่ 22 แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน peritoneal cavity ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.6 % (สูตรที่ 5) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)



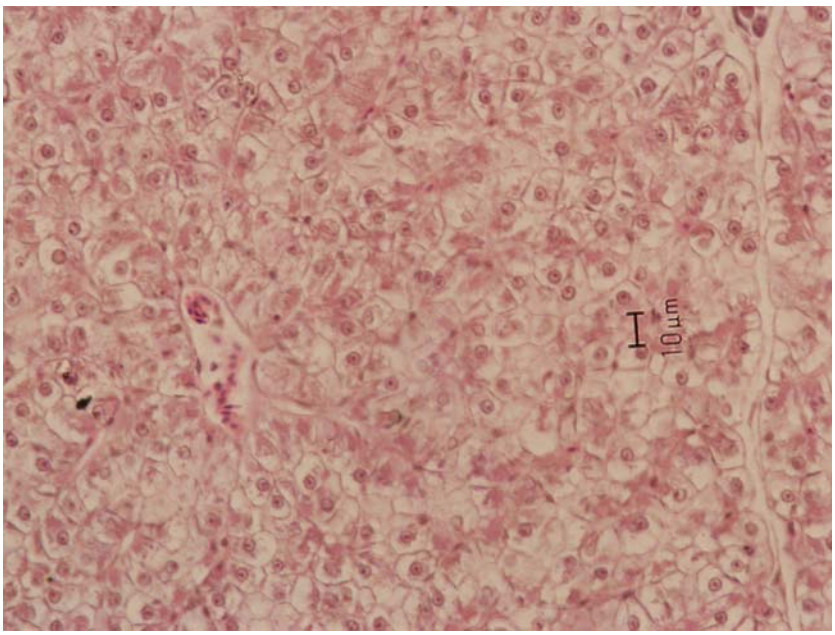
ภาพที่ 23 แสดงเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน peritoneal cavity ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.8 % (สูตรที่ 6) ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติ (H&E stained, Bar = 100 µm, 20x)



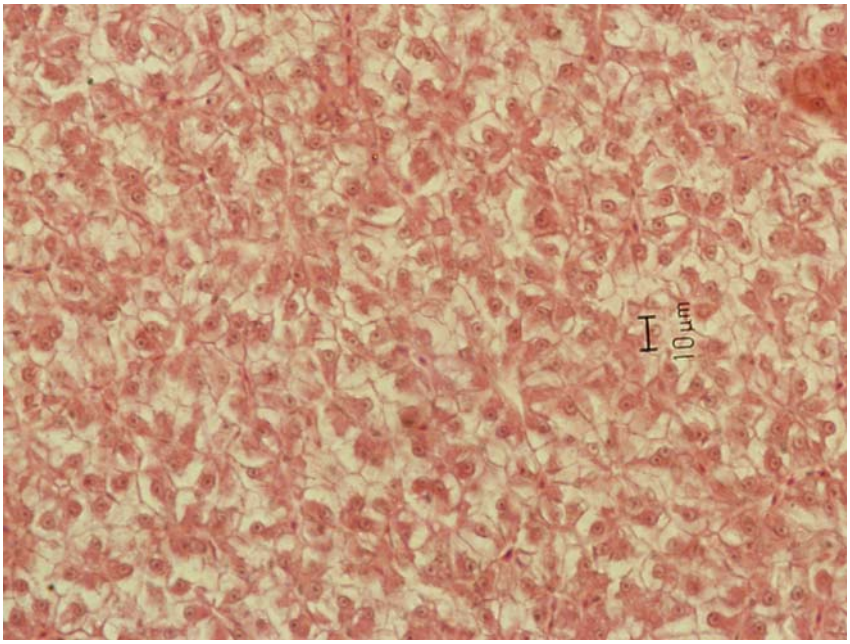
ภาพที่ 24 แสดงเนื้อเยื่อตับของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน (สูตรที่ 1) ลักษณะเนื้อเยื่อตับปกติ (H&E stained, Bar = 10 µm, 40x)



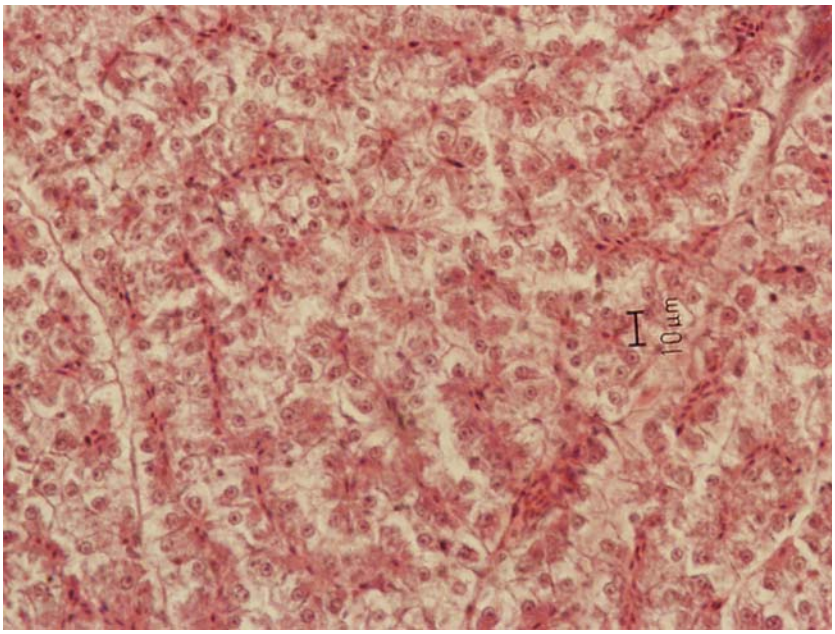
ภาพที่ 25 แสดงเนื้อเยื่อตับของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.1 % (สูตรที่ 2) ลักษณะเนื้อเยื่อตับปกติ (H&E stained, Bar = 10 µm, 40x)



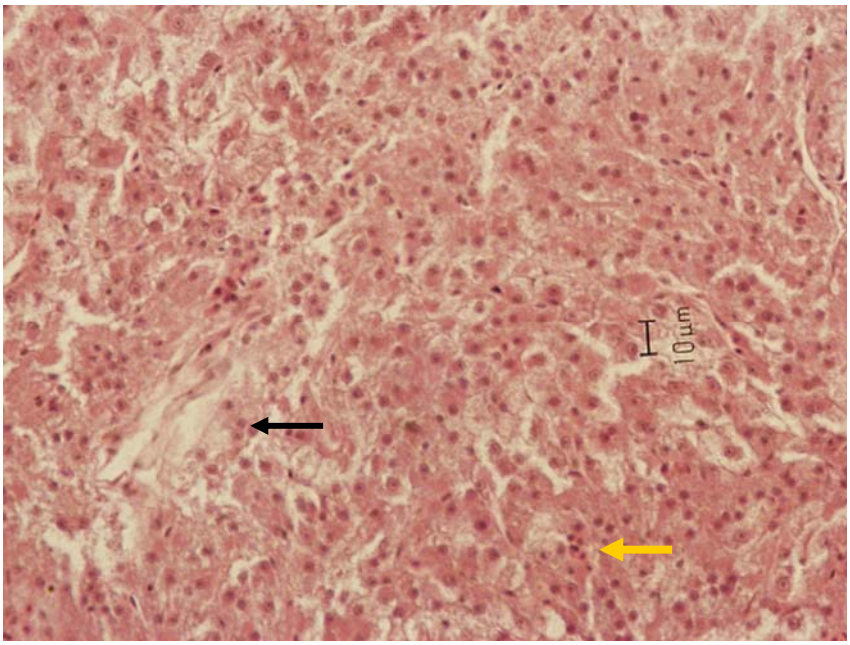
ภาพที่ 26 แสดงเนื้อเยื่อตับของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.2 % (สูตรที่ 3) ลักษณะเนื้อเยื่อตับปกติ (H&E stained, Bar = 10 µm, 40x)



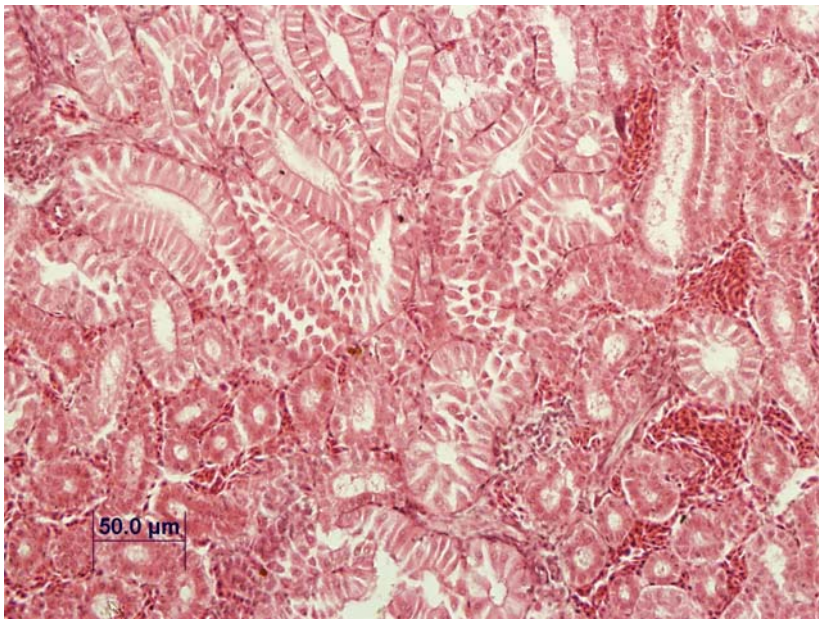
ภาพที่ 27 แสดงเนื้อเยื่อตับของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.4 % (สูตรที่ 4) ลักษณะเนื้อเยื่อตับปกติ (H&E stained, Bar = 10 µm, 40x)



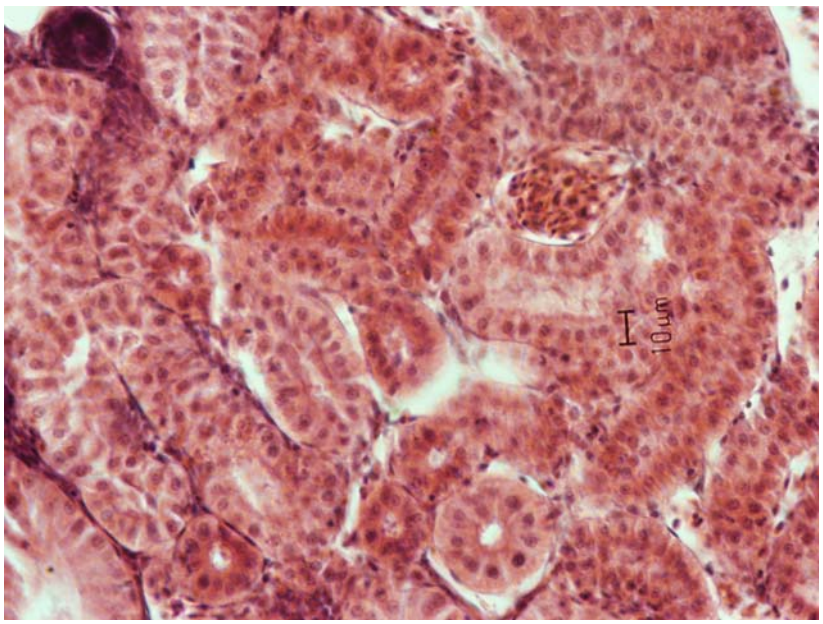
ภาพที่ 28 แสดงเนื้อเยื่อตับของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.6 % (สูตรที่ 5) ลักษณะเนื้อเยื่อตับปกติ (H&E stained, Bar = 10 µm, 40x)



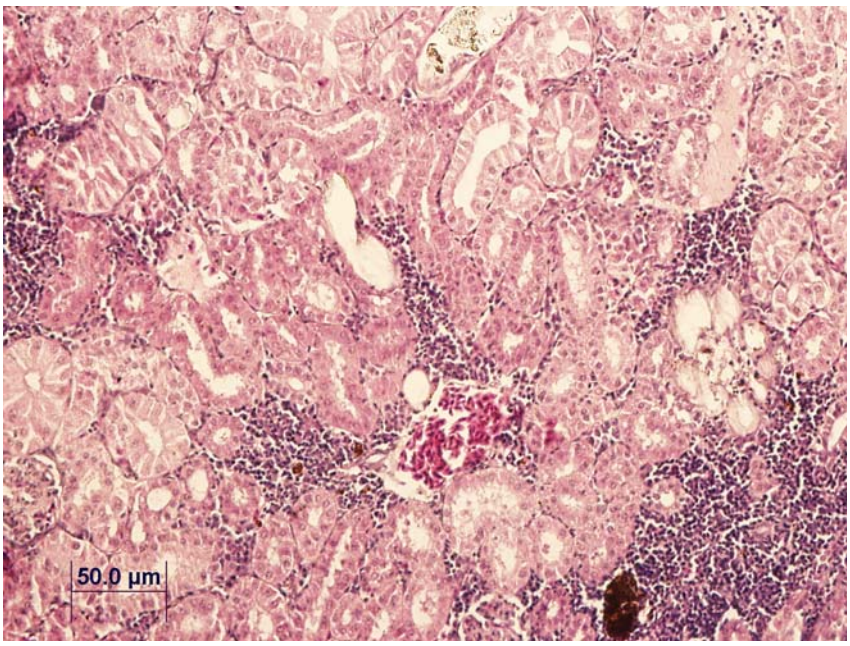
ภาพที่ 29 แสดงเนื้อเยื่อตับของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.8 % (สูตรที่ 6) เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ตับบางส่วน ทำให้เซลล์ไม่เกาะตัวกันเป็นรูปของเซลล์ (ศรชี้สีดำ) และพบการหดตัวของนิวเคลียส (pyknotic nuclei) (ศรชี้สีเหลือง) (H&E stained, Bar = 10 µm, 40x)



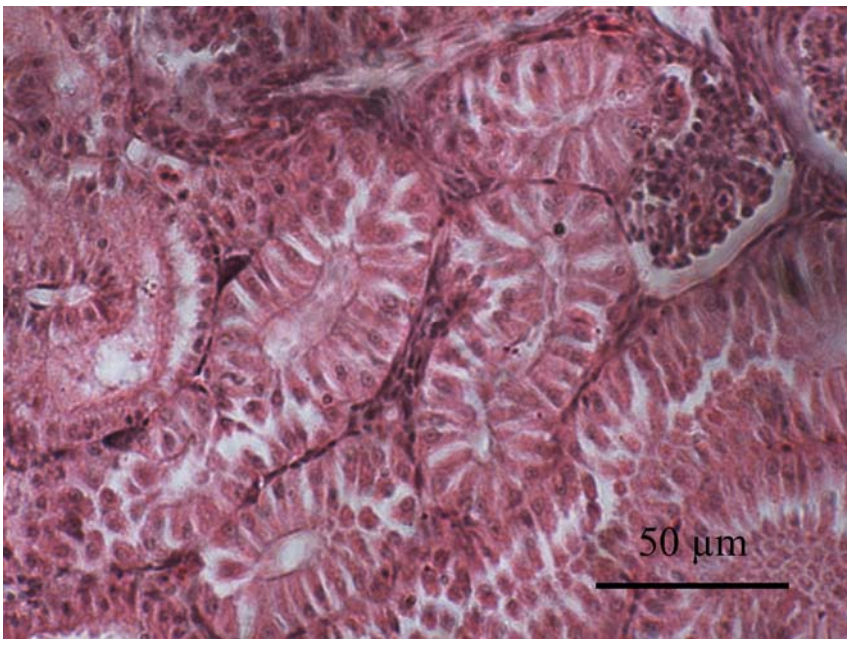
ภาพที่ 30 แสดงเนื้อเยื่อไตของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของเมลามีน (สูตรที่ 1) ลักษณะเนื้อเยื่อไตปกติ (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)



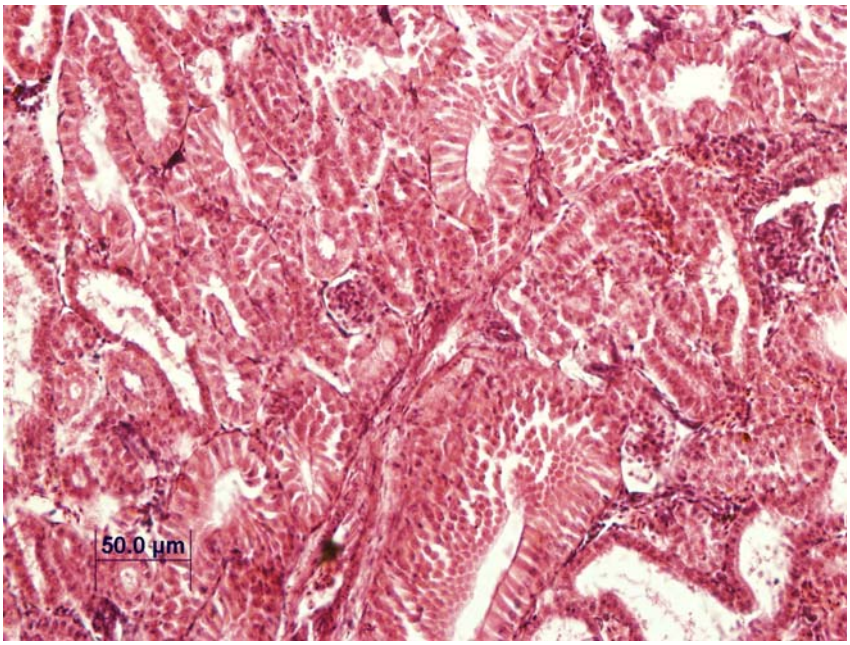
ภาพที่ 31 แสดงเนื้อเยื่อไตของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.1 % (สูตรที่ 2) ลักษณะเนื้อเยื่อไตปกติ (H&E stained, Bar = 10 µm, 40x)



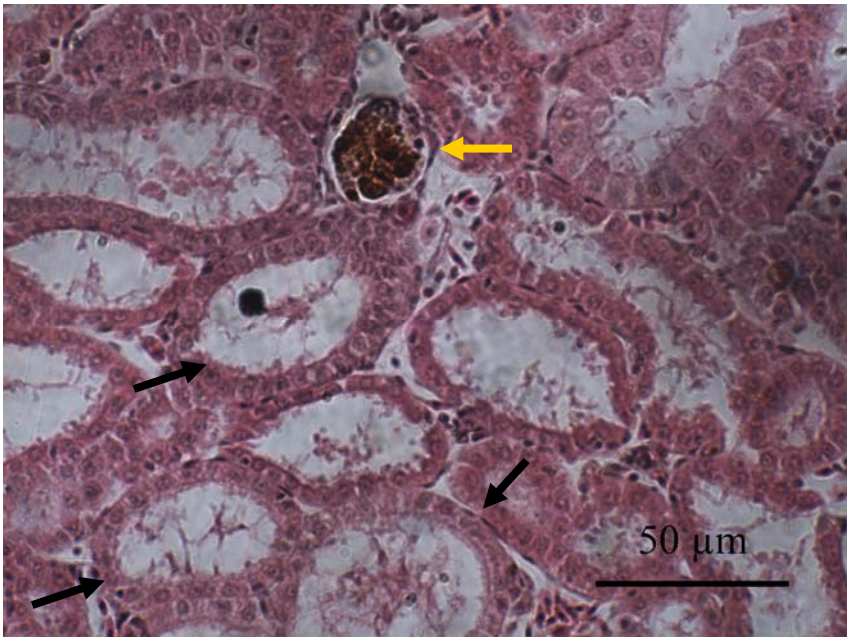
ภาพที่ 32 แสดงเนื้อเยื่อไตของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.2 % (สูตรที่ 3) ลักษณะเนื้อเยื่อไตปกติ (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)



ภาพที่ 33 แสดงเนื้อเยื่อไตของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.4 % (สูตรที่ 4) ลักษณะเนื้อเยื่อไตปกติ (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)



ภาพที่ 34 แสดงเนื้อเยื่อไตของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.6 % (สูตรที่ 5) ลักษณะเนื้อเยื่อไตปกติ (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)



ภาพที่ 35 แสดงเนื้อเยื่อไตของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.8 % (สูตรที่ 6) เนื้อเยื่อไตเกิดการเสื่อมสลายของท่อไต (ศรชี้สีดำ) และมีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (Glomerrulus) (ศรชี้สีเหลือง) (H&E stained, Bar = 50 µm, 40x)

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร องค์ประกอบเลือด และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อในปลากะพงขาว, *Lates calcarifer* (Bloch) พบว่า การผสมเมลามีนในอาหารปลากะพงขาวที่ระดับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ทำให้มีการเจริญเติบโต (น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโต) และประสิทธิภาพการใช้อาหาร (ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ) ต่ำกว่าปลากะพงขาวชุดทดลองอื่น ๆ แตกต่างกับการทดลองของ ปวีณา และคณะ (2552) ที่ศึกษาระดับของเมลามีนในอาหารที่ส่งผลต่อปลาดุกพันธุ์ผสม และการทดลองของ นัทท์ และวุฒิพร (2554) ที่ศึกษาระดับของเมลามีนในอาหารที่ส่งผลต่อปลานิลแดง พบว่าที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีนที่ตั้งแต่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ทำให้ปลามีค่ามีการเจริญเติบโต (น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว และน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น) และประสิทธิภาพการใช้อาหาร (ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ) ต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมเมลามีน แต่จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าปลากะพงขาวต้องได้รับอาหารผสมเมลามีนที่ระดับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ จึงส่งผลให้ปลากะพงขาวมีการเจริญเติบโต และมีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำลง ทั้งนี้เกิดจากการที่ปลาไม่สามารถใช้ประโยชน์จากเมลามีนได้ สอดคล้องกับการรายงานของ Smith และ คณะ (1994) ที่รายงานว่าเมื่อเมลามีนเข้าสู่ร่างกายสัตว์โดยการกิน จะถูกดูดซึมผ่านทางเดินอาหารจะเข้าสู่กระแสเลือด แต่ไม่ถูกนำเผาผลาญเป็นพลังงานที่ตับเหมือนกับกรดอะมิโนทั่วไป สัตว์จึงไม่สามารถใช้ประโยชน์แหล่งโปรตีนที่มาจากเมลามีนเพื่อการเจริญเติบโตได้ เช่นเดียวกับการรายงานของ เยาวมาลย์ และสาโรชน์ (2550) และ Baynes *et al*. (2008) ที่รายงานว่าสารเมลามีนเป็นโปรตีนเทียมชนิดหนึ่ง เมื่อสัตว์ได้รับแหล่งโปรตีนที่มาจากเมลามีน จึงไม่สามารถใช้ประโยชน์จากเมลามีนในด้านการเจริญเติบโตได้ และนอกจากนี้ยัง พบว่าปลากะพงขาวได้รับอาหารผสมเมลามีนในระดับที่ต่ำกว่า 0.8 เปอร์เซ็นต์ จะไม่ส่งผลในด้านการเจริญเติบโต แต่มีผลต่อองค์ประกอบเลือดปลา

สำหรับส่วนประกอบทางโภชนาการของตัวของปลากะพงขาวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าการผสมเมลามีนในอาหารที่ระดับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลต่อส่วนประกอบทางโภชนาการของตัวของปลา โดยทำให้ปริมาณความชื้น ไนโตรเจน และเถ้าของตัวของปลา มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปลากะพงขาวชุดทดลองอื่นๆ สอดคล้องการทดลองของ ปวีณา และคณะ (2552) พบว่าปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีผสมของเมลามีนตั้งแต่ระดับ 1.0 เปอร์เซ็นต์

ขึ้นไป ส่งผลต่อส่วนประกอบทางโภชนาการของตัวของปลา โดยปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นซึ่งส่วนหนึ่งมาจากการที่มีเมลามีนตกค้างในตัวปลา เพราะการวิเคราะห์โปรตีนจะเป็นการหาปริมาณไนโตรเจน จากการที่มีเมลามีนตกค้างในตัวปลาทำให้มีไนโตรเจนสูงขึ้น และเมื่อนำมาคำนวณเป็นปริมาณโปรตีนจึงส่งผลให้มีโปรตีนสูงขึ้น ส่วนปริมาณไขมันในตัวปลากะพงขาวที่รับอาหารผสมเมลามีนระดับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณต่ำกว่าปลาชุดทดลองอื่นๆ เพราะการผสมเมลามีนในอาหารที่ระดับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อระดับการสะสมไขมันในร่างกาย เนื่องจากปลาจะนำอาหารที่ได้กินผ่านกระบวนการย่อยแล้วจะได้สารอาหาร ได้แก่ โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต แล้วจะถูกดูดซึมที่บริเวณผนังลำไส้เข้าสู่กระแสเลือดเพื่อนำไปยังเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของร่างกาย เพื่อใช้ในกระบวนการเมแทบอลึซึม (Metabolism) ทั้งด้านการเจริญเติบโตและเป็นพลังงาน (De Silva and Anderson, 1995) จากนั้นจะสำรองพลังงานในรูปของไขมัน หากปลาได้รับอาหารที่มีโปรตีนและไขมันที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และจากการสังเกตปลาทดลองไม่ยอมรับอาหารที่ผสมเมลามีน 0.8 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเมลามีนเป็นพิษต่อสัตว์ (Anonymous, 2007; US FDA, 2007a) แล้วเมื่อปลารับสารพิษเข้าไปโดยการกิน ปลาต้องใช้พลังงานจำนวนมากในการกำจัดสารพิษที่สะสมภายในร่างกาย สารอาหารที่ปลาได้รับจึงถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานเพื่อใช้ในการกำจัดสารพิษมากกว่านำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต รวมทั้งปลาไม่สามารถใช้ประโยชน์จากเมลามีนในด้านการเจริญเติบโตได้ นอกจากจะเป็นสาเหตุให้การเจริญเติบโตลดลง (Di Giulio and Hinton, 2008) ยังส่งผลให้ปลาไม่มีสารอาหารเพียงพอต่อการสะสมเป็นพลังงานสำรองในรูปของไขมันในร่างกาย ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ไขมันในตัวปลาน้อยลง จึงส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ความชื้นและเถ้าในตัวปลาสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมเมลามีน

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดของปลากะพงขาวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยใช้วิธีการแยกเอาซีรัมเพื่อวิเคราะห์ พบว่าค่า blood urea nitrogen (BUN) ในซีรัมของปลาที่รับอาหารผสมเมลามีนตั้งแต่ 0.2 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป มีค่าต่ำกว่าค่าปกติของปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม (ที่ไม่มีการผสมเมลามีน) คล้ายคลึงกับการทดลองของ ปวีณา และคณะ (2552) พบว่าปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีนที่ระดับ 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลเสียต่อสุขภาพปลา โดยพบว่าองค์ประกอบเลือดมีปริมาณฮีโมโกลบินรวมต่ำกว่าชุดควบคุมถึง 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าปลาเกิดสภาวะเครียดและมีภูมิต้านทานลดลง (Mcleay and Gordon, 1977) ในส่วนของค่า โซเดียม โปเตสเซียม และคลอไรด์ ในซีรัมของปลาที่รับอาหารผสมเมลามีนตั้งแต่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป มีค่าสูงกว่าค่าปกติของปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม (ที่ไม่มีการผสมเมลามีน) ทั้งนี้เนื่องจากระบบการทำงานของไตผิดปกติ เนื่องจากไตปลามีหน้าที่กำจัดของเสียและช่วยควบคุมปริมาณเกลือแร่ในร่างกาย (คุณนิธี, 2549) เมื่อปลาได้รับพิษจากเมลามีนที่ผสมใน

อาหาร จึงส่งผลให้ค่าแร่ธาตุในซีรัมพิ่มสูงขึ้น คล้ายคลึงกับการทดลองของ ปวีณา และคณะ (2552) พบว่าปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีนที่ระดับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ส่งผลให้เนื้อเยื่อไตมีการเสื่อมสลายของ epithelium cell มีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (glomerrulus) และมีการเสื่อมสลายของท่อไต และการทดลองของ นัทท์ และวุฒิพร (2554) ปลานิลแดงที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีนที่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ส่งผลให้เนื้อเยื่อไตมีการเสื่อมสลายของ epithelium cell มีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (glomerrulus) และคล้ายคลึงกับรายงานของ นพดล (2552) พบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารที่ผสมเมลามีน 0.25 % และกรดไซยานูริค 0.25 % เมื่อตัดเนื้อเยื่อส่วนไตมาตรวจ พบผลึกสีเหลืองน้ำตาลอ่อนแทรกกระจายอยู่ในไต และกรวยไต อีกทั้งพบการตายของเยื่อบุผิวท่อไตอย่างรุนแรง

การเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของปลากะพงขาวทดลอง พบว่าการผสมเมลามีนในอาหารปลากะพงขาวที่ระดับ 0.6 เปอร์เซ็นต์ มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) ที่ส่วนปลายของปลายซี่เหงือก (secondary lamellar) เมื่อปลาได้รับอาหารที่ผสมเมลามีนสูงขึ้นที่ระดับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ เกิดการแบ่งเซลล์มากผิดปกติอย่างรุ่นแรง (severe hyperplasia) ที่บริเวณซี่เหงือก (gill lamellar) เกิดการแยกตัวของ epithelial lifting และเกิด fusion ของซี่เหงือก (gill lamellar) เนื่องเมลามีนเป็นพิษต่อสัตว์ (Anonymous, 2007; US FDA, 2007a) เมื่อปลาได้รับสารพิษจากอาหารเข้าสู่ร่างกายสารพิษนั้นจะถูกขับทิ้งทางมูลและเหงือกเป็นหลัก (Di Giulio and Hinton, 2008) จึงส่งผลให้เกิดความผิดปกติของเนื้อเยื่อเหงือก ซึ่งเหงือกปลาทำหน้าที่ในการหายใจ รักษาสมดุลแร่ธาตุ ขับของเสียที่ประกอบด้วยไนโตรเจนออกมา และรักษาสมดุลกรด - เบส (Cengiz and Unlu, 2006) เมื่อเกิดการแบ่งเซลล์มากผิดปกติบริเวณเหงือกมีผลทำให้ลดพื้นที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซเพื่อใช้ในการหายใจของปลา (Cengiz and Unlu, 2006; Fanta *et al*, 2003) ทำให้ปลามีออกซิเจนไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ได้ไม่เพียงพอ จึงส่งผลเสียต่อกระบวนการเมทาบอลิซึม และการเจริญเติบโตของ ในส่วนของตับของปลากะพงขาวทดลอง พบว่าการผสมเมลามีนในอาหารปลากะพงขาวที่ระดับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับ โดยมีการเสื่อมสลายของเซลล์ทำให้เซลล์ไม่เกาะตัวกัน และเห็นขอบเขตของเซลล์ที่ไม่ชัดเจน สอดคล้องกับการทดลองของ ปวีณา และคณะ (2552) พบว่าปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีนที่ระดับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับ (การเสื่อมสลายของเซลล์บางส่วนทำให้เซลล์ไม่เกาะตัวกัน และเห็นขอบเขตของเซลล์ที่ไม่ชัดเจน) และคล้ายคลึงกับการรายงานของ Ueno (1983) ที่พบว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับ เช่นการเสื่อมสลายหรือการตายของเซลล์ตับทำให้การใช้ประโยชน์ของโภชนะในร่างกายมีประสิทธิภาพลดลง ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ตามมา นอกจากนี้ยังพบการหดตัวของนิวเคลียส (pyknotic

nuclei) ในเซลล์ตับปลากะพงขาวทดลองเนื่จากการได้รับพิษจากเมลามีน คล้ายคลึงกับการทดลองของ อรอุษา (2546) เมื่อปลานิลแดงได้รับอาหารที่ผสมอะฟาทอกซินบี$_1$ ที่ระดับ 2,500 พีพีบี พบการหดตัวของนิวเคลียสหดตัว (pyknotic nuclei) และเซลล์ตายเป็นจำนวนมาก ส่งผลทำให้ปลามีการเจริญเติบโตลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผสมอะฟาทอกซินบี$_1$ ในส่วนของไต พบว่าการผสมเมลามีนในอาหารปลากะพงขาวที่ระดับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไต โดยเกิดการเสื่อมสลายของท่อไต และมีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (glomerrulus) สอดคล้องกับการทดลองของ ปวีณา และคณะ (2552) พบว่าปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีนที่ระดับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ส่งผลให้เนื้อเยื่อไตมีการเสื่อมสลายของ epithelium cell มีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (glomerrulus) และมีการเสื่อมสลายของท่อไต และสอดคล้องกับการทดลองของ นัทท์ และวุฒิพร (2554) ปลานิลแดงที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีนที่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ส่งผลให้เนื้อเยื่อไตมีการเสื่อมสลายของ epithelium cell มีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (glomerrulus) จากการทดลองการผสมเมลามีนในอาหารปลากะพงขาว ในระดับที่ตั้งแต่ 0.1 - 0.6 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ไม่ส่งผลให้ต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไต แต่พบว่าการผสมเมลามีนในอาหารทุกระดับส่งผลให้กระบวนการทำงานของไตผิดปกติ เพราะการได้รับพิษจากเมลามีนทั้งนี้เนื่องจากไตปลามีหน้าที่กำจัดของเสีย และช่วยควบคุมปริมาณเกลือแร่ในร่างกาย (คุณนิธี, 2549) เมื่อทำการแยกซีรัมในเลือดปลากะพงขาวทดลอง นำมาวิเคราะห์ค่า blood urea nitrogen (BUN) พบว่าปลาที่รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีนตั้งแต่ 0.2 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป มีค่าต่ำกว่าปลาที่รับอาหารชุดควบคุม (ที่ไม่มีการผสมเมลามีน) ในส่วนค่าโซเดียม โปรเตสเซียม และคลอไรด์ พบว่าปลาที่รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีนตั้งแต่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป มีค่าสูงกว่าปลาที่รับอาหารชุดควบคุม (ที่ไม่มีการผสมเมลามีน) สอดคล้องกับการศึกษาของ เยาวนิตย์ และจารุรัตน์ (2527) พบว่าปลากะพงขาวที่ไตสวนหน้าเสื่อมลง ทำให้ไม่สามารถขับแร่ธาตุบางส่วนออกจากร่างกายได้อย่างปกติ เกิดการสะสมของแร่ธาตุ โดยปลาที่เป็นโรคไตจะมีฟอสฟอรัสในไตสูงกว่าปลาปกติ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร องค์ประกอบเลือด และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อในปลากะพงขาว *Lates calcarifer* (Bloch) เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ สามารถสรุปได้ดังนี้

1. การผสมเมลามีนในอาหารปลากะพงขาวที่ระดับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ปลามีอัตราการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลง นอกจากนี้ทำให้มีค่าของความชื้น โปรตีน และเถ้าในตัวปลาสูงขึ้น ส่วนค่าไขมันในตัวปลาลดลง

2. การผสมเมลามีนในอาหารปลากะพงขาวตั้งแต่ 0.2 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปส่งผลให้ค่า blood urea nitrogen (BUN) ในซีรัมต่ำลง และการผสมเมลามีนในอาหารปลากะพงขาวตั้งแต่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ส่งผลให้มีค่าแร่ธาตุ (Na^+, K^+ และ Cl^-) ในซีรัมเพิ่มสูงขึ้น

3. การผสมเมลามีนในอาหารปลากะพงขาวที่ระดับ 0.6 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เนื้อเยื่อเหงือกมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มาก ผิดปกติ (hyperplasia) ที่ gill lamellar และการผสมเมลามีนในอาหารปลากะพงขาวที่ระดับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ เกิดการแบ่งเซลล์มากผิดปกติอย่างรุนแรง (severe hyperplasia) ที่บริเวณซี่เหงือก (gill lamellar) เกิดการแยกตัวของ epithelial lifting และเกิด fusion ของซี่เหงือก (gill lamellar) และยังส่งผลให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ตับบางส่วนทำให้เซลล์ไม่เกาะตัวกันเห็นขอบเขตของเซลล์ที่ไม่ชัดเจนและพบการหดตัวของนิวเคลียส (pyknotic nuclei) ส่วนเนื้อเยื่อไตเกิดการเสื่อมสลายของท่อไต และมีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (glomerrulus) ในส่วนของเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. 2531. การเลี้ยงปลากะพงขาว. ฝ่ายประมงสารนิเทศ กองส่งเสริมประมง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 62 หน้า.

กรมประมง. 2536. การเลี้ยงปลาน้ำกร่อย. สำนักพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการประมง. กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 43 หน้า.

กรมประมง. 2554. ผลผลิตการเลี้ยงปลาน้ำกร่อย จำแนกตามชนิดและประเภทการเลี้ยง เป็นรายจังหวัด ปี 2551. สถิติการประมง 2551. เข้าถึงได้ URL : http://www.fisheries.go.th/it-stat/data_2551/menu_2551.htm. (เข้าถึงเมื่อ 28/5/2554).

กรมประมง. 2551. ประมงมั่นใจ! อาหารสัตว์น้ำปลอดสารเมลามีน. เข้าถึงได้ URL: http://www.nicaonline.com/webboard/index.php?topic=9781.0. (เข้าถึงเมื่อ 2/1/2552).

คณะทำงานวิเคราะห์ปัญหาด้านอาหารในภาวะเร่งด่วน (วปด.). สำนักคุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร. 2550. การตรวจพบสารเมลามีนและสารที่เกี่ยวข้อง (melamine-related contaminant) ในอาหารสัตว์. เข้าถึงได้ http://webdb.dmsc.moph.go.th/itc_food/a_fd_1_00t.asp?id=373. (เข้าถึงเมื่อ 2/9/2550).

คุณนิธี ลีลารัศมี. 2549. เอกสารประกอบการสอน รายวิชามีนวิทยา. คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต. หน้า 133 – 141.

จารุรัตน์ บูรณะพาณิชย์กิจ, มะลิ บุณยรัตผลิน, ทะเคะชิ วาตานาเบ, ธิดา เพชรมณี และ เรณู ยาชิโร. 2531. ความต้องการกรดไขมันที่จำเป็นของปลากะพงขาววัยรุ่น (*Lates calcarifer*). เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2531. สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 21 หน้า.

จุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์. 2551. ผลของซีลีเนียมต่อการเจริญเติบโตและระบบภูมิคุ้มกันโรคจากเชื้อ Streptococcus ในปลากะพงขาว (*Litopenaeus vannamei* goone, 1798) ว การประมง. 61 : 334 – 343.

นพดล พิพารัตร์. 2551. เมลามีนในปลานิล. นิตยาสาร Aquabiz Magazine. 15 : 2 หน้า 22 – 24.

นัทท์ นันทพงศ์ และวุฒิพร พรหมขุนทอง. 2554. ผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาในปลานิลแดงแปลงเพศ *(Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*). การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาครั้งที่ 12 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 28 มกราคม 2554 จังหวัดขอนแก่น.

เข้าถึงได้ URL : http://gsbooks.gs.kku.ac.th/54/grc12/files/bmo14.pdf (เข้าถึงเมื่อ 18/5/2554). 10หน้า.

นพดล พิฬารัตร์. 2551. เมลามีนในปลานิล. นิตยาสาร Aquabiz Magazine. 15 : 2 หน้า 22 – 24.

นิตยสารธุรกิจสัตว์น้ำ. 2550. อียูเดินเอาอย่างสหรัฐ สั่งคุมเข้มเมลามีน.เข้าถึงได้ URL:http://www.buildboard.com/viewtopic.php?topic=76402&id=790&forum=5966. (เข้าถึงเมื่อ 7/5/2550).

บรรจง เทียนส่งรัศมี. 2517. หลักการทำฟาร์มในทะเล. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 139 หน้า.

ปริญทิพย์ วงศ์ไทย, วิศณุ บุญญาวิวัฒน์, ธีราภรณ์ พูลพิพัฒน์ และภัทรา มูลจิตร, 2551. ผลกระทบของเมลามีนต่อฟาร์มกบขุน : รายงานสัตว์ป่วย. ภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 7 หน้า.

ปวีณา จันทร์เล็ก, มะลิ บุณยรัตผลิน และวุฒิพร พรหมขุนทอง. 2552. ผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในปลาดุกพันธุ์ผสม. ว.การประมง. 61 : 4 หน้า 331 - 340.

ภาณุวัฒน์ แย้มสกุล และกิตติกร บุณศรี, 2551. พิษของเมลามีน(Melamine)ที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์. หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ สถาบันบริการสุขภาพสัตว์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 6 หน้า.

มะลิ บุณยรัตผลิน และจูอะดี พงศ์มณีรัตน์. 2533. ความต้องการฟอสฟอรัสในอาหารปลากะพง-ขาว. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 4/2533. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 20 หน้า.

เยาวนิตย์ ดนยดล และจารุรัตน์ บูรณะพานิชย์กิจ. 2527. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางระบบเลือดในปลากะพงขาวที่ป่วนโรคไต เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 15/2527. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ค หน้า.

เยาวมาลย์ ค้าเจริญ. 2550ก. รอบรู้เรื่องเมลามีน. ว. สาส์นไก่ & สุกร 52, 21 - 25.

เยาวมาลย์ ค้าเจริญ. 2550ข. เมลามีน (Melamine) ภัยร้ายในอาหารสัตว์ที่ผู้เลี้ยงต้องระวัง. ว. สัตว์เศรษฐกิจ 25 : 8 - 12.

เยาวมาลย์ ค้าเจริญ และสาโรชน์ ค้าเจริญ. 2550. วิธีตรวจเช็คการปลอมปนเมลามีนและอนุพันธ์เมลามีน (Melamine and amine – derivatives) หรือ ยูเรียฟอร์มาลดีไฮด์ปลอมปนในอาหารสัตว์. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 96 หน้า.

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

วิเชียร สาคเรศ, มะลิ บุณยรัตผลิน และ นันทิยา อุ่นประเสริฐ. 2532. ระดับโปรตีนและพลังงานที่เหมาะสมในอาหารปลากะพงขาว-II. รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2533. กองประมงน้ำกร่อย กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 298 - 307.

วุฒิพร พรหมขุนทอง. 2541. โภชนาศาสตร์สัตว์น้ำ. เอกสารคำสอน วิชา 530-433. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 221 หน้า

ศูนย์บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์ .2552. แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิทรี (Gas Chromatography - Mass Spectrometry). เข้าถึงได้ URL: http://www.kmitl.ac.th/sisc/GC-MS/main.html. (เข้าถึงเมื่อ 25/10/ 2552)

สมาคมผู้เลี้ยงสุกรแห่งประเทศไทย. 2550. EU กำหนดค่าอนุโลมในการบริโภคเมลามีน (Melamine) ต่อวันของมนุษย์และสัตว์. เข้าถึงได้ URL:www.thaipigs.igetweb.com/index.php?mo=3&art=36310. (เข้าถึงเมื่อ 23/5/2552).

สวัสดิ์ วงศ์สมนึก และสุจินต์ มณีวงศ์. 2517. การทดลองเลี้ยงปลากะพงขาว (*Lates calcarifer,* Bloch) ด้วยอาหารสำเร็จรูป. รายงานผลการปฏิบัติงานทางวิชาการ ประจำปี 2516 – 2517. สถานีประมงทะเลสงขลา กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 29 – 30.

สุจินต์ มณีวงศ์, นิเวศน์ เรืองพานิช, ธิดา เพชรมณี และฐานันดร์ ทัตตานนท์. 2524. การเพาะพันธุ์ปลากะพงขาว. สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งแห่งชาติ จังหวัดสงขลา กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 24 หน้า.

สุชาตา ชินะจิตร. 2552. เมลามีน – เรื่องราวที่ถูกเปิดเผย (ตอน 2). ฐานความรู้เรื่องความปลอดภัยด้านสารเคมี. เข้าถึงได้ URL:www.trf.or.th/dept_3/upload/counttrack.asp?ma_filerefer=ART3-06102008-1000000056.doc -. (เข้าถึงเมื่อ 7/5/2552).

สุพจน์ จึงแย้มปิ่น. 2528. การศึกษาผลผลิตของลูกปลากะพงขาวที่อนุบาลในบ่อดิน. เอกสารวิชาการฉบับที่ 16/2528. สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งแห่งชาติ จังหวัดสงขลา กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 11 หน้า.

สุพจน์ จึงแย้มปิ่น, มะลิ บุณยรัตผลิน และนิวัติ อนุรักษ์ชนะชัย. 2533. การทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวด้วยไวตามินรวมระดับต่างๆ กัน. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 2/2533.

สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 19 หน้า.

สุนิตย์ โรจนพิทยากุล, เจนจิตต์ คงกำเนิด และอัตรา ไชยมงคล. 2547. การเลี้ยงปลากะพงขาว *Lates calcarifer* (Bloch) ด้วยอาหารสำเร็จรูปที่มีระดับโปรตีนต่ำสลับกับอาหารที่มีระดับโปรตีนปกติ ต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร. เอกสารวิชาการฉบับที่ 9/2547. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 3.

สุภาพร มหันต์กิจ. 2549. การใช้วัสดุเหลือจากโรงงานแปรรูปสัตว์น้ำเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นในอาหารปลากะพงขาว (*Lates calcarifer,* Bloch). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร-มหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 105 หน้า.

สุรศักดิ์ วงศ์กิตติเวช. 2543. สารานุกรมปลาไทย. กรุงเทพฯ : เอพซัพพลาย. 200 หน้า.

สำนักสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์. 2554. การตรวจหาสารเมลามีนและอนาล็อกในปลาป่น.ข่าวปศุสัตว์ Livestock News.เข้าถึงได้ URL : http://www.dld.go.th/vrd_np/dldnews/3-54/3.pdf .(เข้าถึงเมื่อ 17/5/2554).

อรอุษา อุสันโนน. 2546. ผลของอะฟลาทอกซินบี$_1$ ต่อปลานิลแดงแปลงเพศ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 64 – 79.

Acheson, D. 2007. US FDA Press Conference on Recall of Products Tainted with Melamine FTS-HHS US FDA May 30, 2007 [online]. Available URL: http://www.US FDA.gov/consu-mer/updates/petfoodrecallup.html. (accessed 12/8/2007).

Anderson, W.C, Turnispeed, S.B., Karbiwnyk, C.M. and Madson, M.R. 2007. Determination

Anonymous. 2007. Melamine. [online]. Available URL : http://en.wikipedia.org/wiki/Melamine. (accessed 1/8/2007).

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. Official Methods of Analysis 15th Edition. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists. 194 p.

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

Baynes, R.E., Smith, G., Mason, S.E., Barrett, E., Barlow, B.M. and Riviere, J.E. 2008. Pharmacokinetics of melamine in pigs following intravenous administration. Food Chem.Toxicol. 46 : 1196 – 1200.

Boonyaratpalin, M., Boonyaratpalin, S., Supamataya, K., 1994. Ascorbyl-phosphate-Mg as a dietary vitamin C sources for seabass (*Lates calcarifer*). In: The Third Asian Fisheries

Forum (L.M. Chou, A.D. Munro, T.J., Lam, T.W. Chen, L.K.K. Cheong, J.K. Ding, K.K. Hooi, V.P.E. Phang, K.F. Shim, C.H. Tan Eds.), Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 725-728.

Boonyaratpalin, M., Unprasert, N., Buranapanidgit, J., 1989. Optimal supplementary vitamin C level in seabass fingerling diet. In: The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture (M. Takeda and T. Watanabe Eds.). Tokyo University of Fisheries, Tokyo, Japan, pp. 149-157.

Boonyaratpalin, M., Wanokowat, J., 1993. Effect of thiamine, riboflavin, pantothenic acid and inositol on growth, feed efficiency and mortality of juvenile seabass. In: Fish Nutrition in Practice (S.J. Kaushik and P. Luget Eds.). Biarritz, France. pp. 819-828.

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

Caridnaud, B., Darre-Toulemonde, F., Duhault, J., Boutin, J. A. and Nahon, J. L. 2004. Comparative analysis of melanin – concentrating hormone structure and activity in fish mammals. J. Peptide. Sci. 25 : 1632 - 1632

Catacutan, M.R. and Coloso, R.M., 1997. Growth of juvenile Asian seabass, (*Lates calcarifer*), fed varying carbohydrate and lipid levels. Aquaculture 149, 137-144.

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.

Chen, C., Yeh, C.W. and Chen, J.D. 2006. Syntheses, structures and thermal properties of two new copper (II) melamine complexes. Polyhedr. 25 : 1307 – 1312.

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

De Bruin, G.H.P., B.C. Russell and A. Bogusch, 1995. FAO species identification field guide for fishery purposes. The marine fishery resources of Sri Lanka. Rome : FAO. 400 p.

De Sliva, S.S and Anderson, T.A. 1995. Fish Nutrtion in Aquaculture. Chapman & Hill : Loondon, pp. 17 – 45.

Di Giulio, R.T. and Hinton, D.E. 2008. The toxicology of fishes. New York: CRC Press. 1071 p.

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. No. 9. 182 p.

EFSA. (European Food Safety Authority). 2007. EFSA/contam/634 EFSA´s provisional statement on a request from the European commission related to melamine and structurally related compounds such as cyanuric acid in protein-rich ingredients used for feed and food question N° EFSA-Q-2007-093. [online]. Available URL : http://cc.msnscache.com/cache.aspx?q=8339288095763&lang=en-MY&mkt=en-my&form=cvre. (accessed 8/9/2007).

FAO (Food and Agriculture Organization). 2006. Use of Fishery Resources as Feed Inputs to Aquaculture Development: Trends and Policy Implications. FAO Fisheries Circular No. 1018. Rome: FAO. 360 p.

Fountoulaki, E., Morgane, H., Rigos, G., Antigoni, V., Mente, E., Sweetman, J. and Nengas, I. 2010. Evaluation of zinc supplementation in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juvenile diets. Aquaculture. 41: 208–216.

Frazer, S. 2007a. Canadian Food Inspection Agency demands Certificate of Analysis for vegetable protein concentrate products and amino acids. [online]. Available URL : http://www. aquafeed.com/article.php?id=1930&sectionid=1. (accessed 1/9/2007).

Frazer, S. 2007b. Melamine from Chinese wheat gluten cause of pet food contamination. [online]. Available URL:http://www.aquafeed.com/article.php?id=1880&sectionid=1. (accessed 8/9/2007).

Glencross, B. 2004. The nutritional management of barramundi. Fisheries research contract report. No. 8. 40 pp.

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.

HSDB (Hazardous Substances Data Bank). 2007a. Melamine: Human Health Effects. [online]. Available URL : http://toxnet.nlm.nih.gov/cgibin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@na+Melamine. (accessed 22/9/2008).

HSDB. (Hazardous Substances Data Bank). 2007b. Melamine: Animal Toxicity Studies. Hazardous Substances Data Bank (HSDB). [online]. Available URL : http://toxnet. nlm. (accessed 26/12/2008).

Humason, G.L. 1979. Animal Tissue Techniques. 4th Editions. San Francisco: W.H. Freeman and Company. 69 p.

IARC (International Agency for Research on Cancer). 1999. Some chemicals that cause tumours of the kidney, or urinary bladder in rodents and some other substances. IARC Monogr. Eval. Carcinogen. Risks. Hum. 73 : 329 - 338.

Martin, A. 2007. Poison used in China is found in U.S.-made animal feed. International Herald Tribune May 31, 2007. [online]. Available URL : http://www.iht.com/article/2007/05/31/business/food.1-65273.php?page=1. (accessed 13/8/2007).

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.

Monthly Report. 2554. สิ้นค้าปลากะพงขาว & ผลิตภัณฑ์. รายงานสถานการณ์สิ้นค้าปลากะพงขาว.[online]. Available URL : http://fishco.fisheries.go.th/fisheconomic/kapong_fish.html. (accessed 11/5/2010).

Nemli, G., Yıldız, S. and Gezer, E.D. 2005. Effects of melamine raw paper weight, varnish type and the structure of continuous pressed laminate (CPL) on the physical, mechanical properties and decay resistance of particleboard. Int. Biodeter. Biodegr. 56 : 166–172.

Newton, G L. and P.R., Utley. 1978. Melamine as a dietary nitrogen source for ruminants. J. Anim. Sci. 47 : 1338 - 1344.

NTP (National Toxicology Program). 1983. Carcinogenesis Bioassay of Melamine (CAS NO. 108-78-1) in F344/N Rats and B6C3F1 mice (feed study). Technical Report Series no.245. 173 p.

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). 2002. SIDS Analysis UNEP Publication: Melamine. [online]. Available URL: http://www.inchem.org/document/sids/sids/ 108781.pdf. (accessed 22/9/2008).

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

Rabanal, H. R., Combs, G. F. and Soesanto, V. 1992. Introduction to the taxonomy, biology and fishery of the giant seaperch or seabass *(Lates calcarifer).* Proceedings of South China Sea Fisheries Development and Coordination Program Report of Course on Seabass Spawning and Larval Rearing, Songkhla Thailand, 1 – 20 June 1992, pp. 2 – 8.

Reimschuessel, R., Evans, E., Andersen, W.C., Turnipseed, S.B., Karbiwnyk, C.M., Mayer, T.D., Nochetto, C., Rummel, N.G. and Gieseker, C.M. 2009. Residue depletion of melamine and cyanuric acid in catfish and rainbow trout following oral administration. J. vet. Pharmacol. Therap. 33, 172–182.

Robinson, E.H. and Wilson, R.P. 1985. Nutrition and feeding. *In*: Channel Catfish Culture. (ed. Tucker, C.S.). Development in Aquaculture and Fisheries Science. Amsterdam: Elsevier. pp. 323 - 404.

Sakaras,W., Boonyaratpalin, M. and Unprasert, N. 1989. Optimum dietary protein energy ratio in seabass feed ll. Technical Paper No.8 Rayong Brackishwater Fisheries Station, Thailand. 20 pp.

Shelton, D.R., Karns, J.S., McCarty, G.W. and Durham, D.R. 1997. Metabolism of Melamine by *Klebsiella terragena*. Appl. Environ. Microbiol. 63 : 2832 – 2835.

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

Tacon, A.G. and Metian, M. 2008. Aquaculture Feed and Food Safety. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1140 : 50 - 59.

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

US FDA. (United States Food and Drug Administration). 2007a. FDA and US FDA investigate tainted animal feed. [online]. Available URL : http://www.US FDA.gov/consumer/update/taintedfeed043007.html. (accessed 26/8/2007).

US FDA. (United States Food and Drug Administration). 2007b. GC-MS Method for Screening and Confirmation of Melamine and Related Analogs. [online]. Available URL : http://www.US FDA .gov/cvm/GCMSscreen.htm. (accessed 26/8/2007).

USDA FSIS. (United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service). 2007. Cyromazine and Melamine. [online]. Available URL : http://www.fsis.usda.gov/Ophs/clg/Cyromazine.pdf LVD July (1991). (accessed 30/7/2007).

Wanakowat, J., Boonyaratpalin, M., Pimolindja, T, Assavaaree, M., 1989. Vitamin B6 requirement of juvenile seabass *Lates calcarifer*. In: The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture (M. Takeda and T. Watanabe Eds.), Tokyo University of Fisheries, Tokyo, Japan, pp. 141-147

Wikimedia Commons. 2009. File:Melamine-cyanuric acid complex color.png. [online]. Available URL : http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Melamine-cyanuric_acid_complex_color.png. (accessed 20/5/2009).

Wikipedia The Free Encyclopedia. 2009. Cyanuric acid. [online]. Available URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Cyanuric_acid. html (accessed 11/10/2009).

Wiles, P.G., Gray, I.K. and Kissling, R.C. 1998. Routine analysis of proteins by Kjeldahl and Dumas methods: review and interlaboratory study using dairy products. J. AOAC Int. 81 : 620 -632.

Yone, Y. and Fujii, M. 1975. Studies on nutrition of red seabream-XI: Effect of w3 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, J.E. and Ullrey, D.E. 1973. Influence of salinity on protein requirement of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerling. Fish. Res. Board Can. 30 : 1867-1873.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบ อาหาร และปลาทดลอง

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 คือน้ำหนักของความชื้น

คำนวณหาความชื้นด้วยสมการ

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

เมื่อ a = น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบแห้ง

b = น้ำหนักของตัวอย่างหลังอบแห้ง

w = น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบ

2 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบ

2. นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนเถ้าเป็นสีขาว

3. นำถ้วยกระเบื้องเคลือบเข้าโถดูดความชื้น และเมื่อตัวอย่างเย็นดีแล้ว นำออกชั่งทันทีด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

คำนวณหาเถ้าด้วยสมการ

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

เมื่อ a = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ

b = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำหนักของตัวอย่างหลังเผา

w = น้ำหนักของตัวอย่างก่อนเผา

3 การวิเคราะห์หาโปรตีน และไนโตรเจน

สารเคมี

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

2. สารเร่งรวม (catalyst mixture): เตรียมโดย ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate, $CuSO_4$) 7 กรัม และโพแตสเซียมซัลเฟต (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: เตรียมโดยละลาย กรดเกลือ 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

วิธีการ

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

การคำนวณหาไนโตรเจนในตัวอย่าง

$$\text{ไนโตรเจน (\%)} = \frac{P \times N}{100}$$

เมื่อ P = โปรตีน

N = ไนโตรเจน (โปรตีนมีไนโตรเจน = 16 เปอร์เซ็นต์)

4 การวิเคราะห์ไขมัน (เครื่อง Soxtec System HT6)

สารเคมี

1. สารละลายไตรคลอโรเอททีลีน (Trichroloethylene)
2. เมทธานอล (methanol)

วิธีการ

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

การวิเคราะห์เมลามีนในอาหารทดลอง

การส่งตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเมลามีนในอาหารทดลองใช้เทคนิค Gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) โดยมีกระบวนการดังนี้

1. ฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง Gas chromatography แยกองค์ประกอบของสารที่ระเหยกลายเป็นไอในอุณหภูมิที่เหมาะสม

2. ตัวอย่างจะเริ่มเข้าไปใน Column ที่อยู่ใน Oven องค์ประกอบของตัวอย่างจะถูกแยกออกมาจาก Column ด้วยอุณหภูมิที่ทำให้สารระเหย แต่ต้องไม่ให้เกิดการสลายตัว

3. ตัวอย่างเข้าไปส่วน Detector ส่วนที่ตรวจวัดว่ามีสารที่เราสนใจในปริมาณเท่าใด

4. ตัวอย่างจะเข้าไปในเครื่อง mass spectrometry ซึ่งโมเลกุลขององค์ประกอบที่ถูกแยกออกมาจากสารตัวอย่างจะถูกไอออไนซ์ในสภาวะสุญญากาศ

5. จากนั้นเครื่องจะตรวจออกมาเป็นเลขมวลเปรียบเทียบจากฐานข้อมูลอ้างอิง แล้วแปลผลออกมาเป็นชื่อสารประกอบนั้นๆ ว่าเป็นสารชนิดใดและมีปริมาณเท่าไร (ศูนย์บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์, 2552)

วิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการศึกษาพยาธิสภาพเนื้อเยื่อ, ตามวิธีของ Bancraft (1967) และ Humason (1979)

สารเคมี

1. น้ำยาดอง 10% ฟอร์มาลีน (formalin) เตรียมโดยใช้

100% formalin (formaldehyde 37-39%)	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
เก็บที่อุณหภูมิห้อง		

2. 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

โดยละลายอลัมลงในน้ำกลั่นเติมฮีมาทอกซิลินผสมจนกระทั่งละลายหมดจึงเติมโซเดียมไอโอเดทผสมให้เข้ากันจากนั้นเติมกรดซิตริกและคลอรัลไฮเดรทผสมจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้งาน

3. สีย้อมอีโอซิน (eosin) เตรียมโดยใช้

อีโอซิน (eosin Y.Cl 45380)	1	กรัม
เอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1,000	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	5	มิลลิลิตร
ผสมเข้าด้วยกัน		

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1. สลบปลาด้วยน้ำมันกานพลูที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 50 ส่วนในล้านส่วน

1.2. ใช้กรรไกรผ่าตัดเปิดช่องท้องของปลาออก จากนั้นใช้มีดผ่าตัด ตัดเอาส่วนกระเพาะอาหาร ตับ และไต ดองฟอร์มาลีนความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

1.3. ใช้กรรไกรผ่าตัดส่วนเหงือก ดองฟอร์มาลีนที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

1.4. หลังจากดองฟอร์มาลีนความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 72 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็นแฮลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์

1.5. หลังจากดองในแฮลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์ 72 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็นแฮลกอ-ฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

1.6. หลังจากดองในแฮลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 72 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็นแฮลกอ-ฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (การปรับความเข้มข้นของแฮลกอฮอล์เพื่อดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ) เมื่อเนื้อเยื่อถูกดองอยู่ในแฮลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ จะเก็บไว้ได้นาน 2 – 3 เดือน

2 การ dehydration และ embedding

2.1. ตบแต่งตัวอย่าง (trim) ที่ผ่านการดองแล้วให้มีขนาดพอเหมาะเพื่อสะดวกต่อการ embed และนำไปตัด section

2.2. นำตัวอย่างไปผ่านขั้น dehydration ด้วยเครื่องเตรียมเนื้ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่งโมง)
1.	แฮลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
2.	แฮลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
3.	แฮลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
4.	แฮลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
5.	แอบโซลูท แอลกอฮอล์ (absolute alcohol)	1
6.	ไอโอโพลพิล แอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol)	1
7.	ไอโซโพลพิล แฮลกอฮอล์	1
8.	ไซลีน (xylene)	1
9.	ไซลีน	1
10.	พาราพลาสท์ (paraplast)	1
11.	พาราพลาสท์	1

2.3. นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนดึงน้ำออกไป embed ด้วยพาราพลาสท์ จากนั้นนำ block ไปแช่ตู้เย็นเพื่อง่ายต่อการนำไปตัด section ต่อไป

2.4. ตบแต่งตัวอย่างที่อยู่ใน block ให้มีขนาดพอดีกับขนาดสไลด์ และ cover glass ปิดได้สนิท จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อไมโครโตม (microtome) ให้มีความหนาประมาณ 3 ไมครอน น้ำไปลอยในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส (เพื่อให้แผ่นเนื้อเยื่อขยายตัว)

2.5. ใช้แผ่นสไลด์ช้อนตัวอย่าง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.6. นำสไลด์ที่อบแล้วไปผ่านขบวนการย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน

3. การย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน

ขั้นตอนดังนี้	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.	ฮีมาทอกซิลิน	20
11.	น้ำประปา	1
12.	น้ำกลั่น	1
13.	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	2
14.	อีโอซิน	4
15.	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	2
16.	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	2
17.	แอลโซลูท แอลกอฮอล์	2
18.	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
19.	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
20.	ไซลีน	2
21.	ไซลีน	2
22.	ไซลีน	2
23.	ไซลีน	2

7. mount slide ด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์ (permount) แล้วนำตัวอย่างไปศึกษาพยาธิสภาด้วยกล้องจุลทรรศน์

ภาคผนวก ข.

การวิเคราะห์สถิติของผลการทดลอง

1. ANOVA

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสัปดาห์ที่ 2

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	22.531	6	3.755	12.129	.000
Within Groups	6.502	21	.310		
Total	29.032	27			

2. ANOVA

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสัปดาห์ที่ 4

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	143.249	6	23.875	23.906	.000
Within Groups	20.973	21	.999		
Total	164.221	27			

3. ANOVA

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสัปดาห์ที่ 6

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	411.944	6	68.657	29.942	.000
Within Groups	48.153	21	2.293		
Total	460.097	27			

4. ANOVA

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสัปดาห์ที่ 8

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	788.648	6	131.441	28.942	.000
Within Groups	95.374	21	4.542		
Total	884.022	27			

5. ANOVA

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	139070.915	6	23178.486	29.100	.000
Within Groups	16726.895	21	796.519		
Total	155797.811	27			

6. ANOVA

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.324	6	.054	33.175	.000
Within Groups	.034	21	.002		
Total	.358	27			

7. ANOVA

อัตราการกินอาหาร

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.079	6	.013	.322	.918
Within Groups	.854	21	.041		
Total	.933	27			

8. ANOVA

อัตราการรอดตาย

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	23.214	6	3.869	.867	.535
Within Groups	93.750	21	4.464		
Total	116.964	27			

9. ANOVA

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.302	6	.050	7.782	.000
Within Groups	.136	21	.006		
Total	.438	27			

10. ANOVA

ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	513.158	5	102.632	14.960	.000
Within Groups	123.490	18	6.861		
Total	636.648	23			

11. ANOVA

โปรตีนที่ใช้ประโยชน์ได้

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	340.100	5	68.020	9.712	.000
Within Groups	126.068	18	7.004		
Total	466.168	23			

12. ANOVA

ความชื้นในปลาทั้งตัว

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.182	6	1.364	5.470	.002
Within Groups	5.236	21	.249		
Total	13.418	27			

13. ANOVA

โปรตีนในซากปลาทั้งตัว

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	67.624	6	11.271	38.319	.000
Within Groups	6.177	21	.294		
Total	73.801	27			

14. ANOVA

ไขมันในซากปลาทั้งตัว

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.621	6	1.770	11.710	.000
Within Groups	3.174	21	.151		
Total	13.795	27			

15. ANOVA

เถ้าในซากปลาทั้งตัว

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	23.564	6	3.927	52.935	.000
Within Groups	1.558	21	.074		
Total	25.122	27			

16. ANOVA

Blood urea nitrogen (BUN)

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.957	6	.660	1.054	.466
Within Groups	4.380	7	.626		
Total	8.337	13			

17. ANOVA

โซเดียม (Na)

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	641.600	6	106.933	1.153	.423
Within Groups	649.280	7	92.754		
Total	1290.880	13			

18. ANOVA

คลอไรด์ (Cl)

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.059	6	.010	.767	.619
Within Groups	.090	7	.013		
Total	.149	13			

19. ANOVA

โปแตสเซียม (K)

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	509.654	6	84.942	.900	.543
Within Groups	660.855	7	94.408		
Total	1170.509	13			

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายธานินทร์ เกตุประกอบ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5110620011

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)	มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต	2550

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

การเผยแพร่ในการประชุมวิชาการ

ธานินทร์ เกตุประกอบ และวุฒิพร พรหมขุนทอง. 2554. ผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และองค์ประกอบเลือดในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*). การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาครั้งที่ 12 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 28 มกราคม 2554 จังหวัดขอนแก่น. หน้า 125.