ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหาร และองค์ประกอบทางเคมีของปลา

1. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC,1985)

อุปกรณ์

1. เตาเผา (muffle fumace)
2. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (porcelain crucible)
3. โถดูดความชื้น (desicator)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิด 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ปิดสวิทช์เตาเผารอประมาณ 30–45 นาที เพื่อให้อุณหภูมิเตาเผาลดลงก่อน แล้วนำออกจากเตาเผาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

2. เผาซ้ำอีก ครั้งละประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1 – 3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน (ประมาณ 3 กรัม) ใส่ในถ้วยกระเบื้องซึ่งทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำไปเผาในตู้ควันจนหมดควัน แล้วจึงเข้าเตาเผาอุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส และกระทำเช่นเดียวกับข้อ 1–2

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

2. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 1985)

อุปกรณ์

1. ภาชนะสำหรับหาความชื้น

2. ตู้อบไฟฟ้า (electric oven)

3. โถดูดความชื้น (desicator)

4. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิด 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2–3 ชั่วโมงนำออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้น จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

2. กระทำเช่นเดียวกับข้อ 1 ซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1 – 3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1–2 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นซึ่งทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว

4. นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5–6 ชั่วโมง

5. นำออกจากตู้อบใส่ในภาชนะโถดูดความชื้น ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

6. อบซ้ำอีกครั้งประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นเดิม จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1–3 มิลลิกรัม

7. คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

การคำนวณ

ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

3. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC, 1985)

อุปกรณ์

1. โถดูดความชื้น (desicator)

2. ตู้อบไฟฟ้า (electric oven)

3. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิด 4 ตำแหน่ง

สารเคมี

สารละลายไตรคลอโรเอททิลีน (Trichloroethylene)

วิธีการ

1. อบถ้วยสกัดไขมัน (cup) ที่มีลูกแก้ว 2 – 3 เม็ด และตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส อบจนแห้งแล้วตั้งทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

2. ชั่งน้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วให้ได้น้ำหนักคงที่ (W_1)

3. ชั่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ใส่กระดาษกรอง ประมาณ 1 – 2 กรัม (W_2) ห่อให้มิดชิดใส่ลงในไส้กรอง (thimble) ที่เตรียมไว้นำไปใส่เข้าเครื่องสกัดไขมัน

4. นำถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วที่ชั่งไว้แล้วเติมสารละลายไตรคลอโรเอททิลีน 25 มิลลิลิตร แล้วใส่เข้าเครื่องสกัดไขมันให้เรียบร้อย

5. เปิดเครื่องสกัดไขมัน ปรับอุณหภูมิไปที่ 160 องศาเซลเซียส เปิดน้ำเข้าเครื่องเปิดวาล์ว เลื่อนปุ่มไปที่ boiling ต้มให้เดือด 30 นาที

6. เลื่อนปุ่มไปที่ rinsing เพื่อล้างตัวอย่าง 20 นาที

7. ปิดวาล์ว เปิดสวิทซ์อากาศเลื่อนปุ่มไปที่ evaporation เพื่อให้สารระเหยออกไป 5 นาที

8. ปิดเครื่อง ปิดอากาศและน้ำ แล้วเลื่อนปุ่ม evaporation กลับที่เดิม นำถ้วยสกัดไขมันออกจากเครื่องวางทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนแห้ง

9. นำถ้วยสกัดไขมันออกมาใส่ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก (W_3)

การคำนวณ

$$\text{ไขมัน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(W_3 - W_1)}{W_2} \times 100$$

โดยที่ W_1 คือ น้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้ว

W_2 คือ น้ำหนักตัวอย่าง

W_3 คือ น้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วและตัวอย่างหลังการอบ

4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีเจลดาล (AOAC, 1985)

อุปกรณ์

1. หลอดย่อยตัวอย่าง
2. หลอดกลั่นตัวอย่าง
3. เครื่อง Kjeltech ซึ่งประกอบด้วย เครื่องย่อย, เครื่องกลั่น และเครื่องจับไอกรด
4. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
5. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (sulfuric acid , $H_2 SO_4$) 93 – 98 เปอร์เซ็นต์

2. สารเร่งรวม (catalyst mixture) เตรียมโดยชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต coppersulfate, $CuSo_4$) 7 กรัม กับโปแทสเซียมซัลเฟต (potassium sulfate, K_2SO_4) 100 กรัม ผสมให้เข้ากัน

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH) 45 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 450 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

4. สารละลายกรดเกลือ (Hydrochloric acid, HCI) 0.1 นอร์มอล เตรียมโดยละลายกรดเกลือ 9 มิลลิเมตรในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร)

5. สารละลายกรดบอริค (boric acid, H_3BO_3) 4 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลายกรดบอริคในน้ำกลั่น ต้มจนกระทั่งละลายหมดปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

6. อินดิเคเตอร์รวม (mixed indicator) เตรียมโดยละลายเมทิลเรด 0.2 กรัมในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร และละลายเมทิลินบลู (methylene blue) 0.2 กรัม ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตรจากนั้นนำสารละลายเมทิลเรด 2 ส่วน ผสมกับสารละลายเมทิลลินบลู 1 ส่วน เขย่าให้เข้ากัน

7. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Na_2CO_3) 0.1 นอร์มอล เตรียมโดยอบโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ 260 – 270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ชั่งสารดังกล่าวมา 1.325 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 250 มิลลิลิตร

8. เมทิลออเรนซ์ อินดิเคเตอร์ (methyl orange indicator) เตรียมโดยละลายเมทิลออเรนซ์ 0.1 กรัมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือมาตรฐาน

ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 40 มิลลิลิตร ลงในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติมเมทิลออเรนซ์ อินดิเคเตอร์ 2 – 3 หยด ทำการไตเตรท ด้วยสารละลายกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล คำนวณความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือโดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

$$\text{หรือนอร์มอลลิตี้ของกรดเกลือ} = \frac{\text{น้ำหนัก (กรัม) ของโซเดียมคาร์บอเนต x 1000}}{\text{สารละลายกรดเกลือ (มิลลิลิตร) x 52.994}}$$

วิธีการ

ก. ขั้นตอนการย่อย (digestion)

1. ชั่งตัวอย่างด้วยกระดาษชั่งสารที่ปราศจากไนโตรเจน ให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.5 – 1 กรัม (ตัวอย่างของเหลวใช้ปริมาตร 10 – 15 มิลลิลิตร) ใส่ในหลอดย่อยโปรตีน และทำ แบลงค์ บันทึกน้ำหนักโดยละเอียด

2. เติมสารเร่งรวม 3 กรัม

3. เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 10 มิลลิลิตร

4. นำไปให้ความร้อนด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีน วางหลอดย่อยในเตาย่อย แล้วประกอบสายยางระหว่างฝาครอบเข้ากับเครื่องจับไอกรดและเปิดเครื่องจับไอกรด (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 15% เป็นตัวจับไอกรด)

5. ย่อยที่อุณหภูมิ 375 องศาเซลเซียส เวลา 90 – 120 นาที (สามารถเพิ่มเวลาในการย่อยได้จนได้สารละลายใส) เมื่อย่อยจนใสหรือได้สารละลายสีฟ้าหรือสีเขียวอมฟ้า ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ควัน

6. นำไปกลั่น

ข. ขั้นตอนการกลั่น

1. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดวิเคราะห์

2. ต่อขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเข้ากับชุดเครื่องกลั่นที่มีขวดรูปชมพู่บรรจุกรดบอริก 40 มิลลิลิตร โดยให้ปลายของท่อยางที่ต่อจากกระบอกแก้วควบแน่นจุ่มอยู่ในกรดบอริกเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในขวดวิเคราะห์อย่างช้า ๆ จนกระทั่งสารละลายมีสีดำ

3. ใส่อินดิเคเตอร์ลงในกรดบอริก 2 – 3 หยด

4. ทำการกลั่นจนกระทั่งไม่มีก๊าซแอมโมเนียออกมา เมื่อกรดบอริกเปลี่ยนเป็นสีเขียวแล้วจึงทำการกลั่นต่อไปอีก 10 นาที จากนั้นนำขวดรูปชมพู่ออกจากเครื่องกลั่น

ค. ขั้นตอนการไตเตรท (titration)

1. นำไปไตเตรทด้วยสารละลายกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนจนกระทั่งกรดบอริกเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อน

2. บันทึกปริมาตรของกรดเกลือมาตรฐานที่ใช้เพื่อการคำนวณต่อไป

การคำนวณ

โปรตีน (เปอร์เซ็นต์) = $1.4 (V_1 – V_2) N \times 6.25$

$$\frac{\quad}{W}$$

โดยที่ V_1 คือ ปริมาตรของกรดเกลือที่ใช้ในการไตเตรทกับตัวอย่าง

V_2 คือ ปริมาตรของกรดเกลือที่ใช้ในการไตเตรทกับ blank

N คือ ความเข้มข้นของกรดเกลือ (นอร์มอล)

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง

5. การวิเคราะห์หาโครมิคออกไซด์ (ตามวิธีการของ Furukawa and Tsukahara, 1966)

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

$$y = 0.4073x$$

เมื่อ y = ค่าการดูดกลืนแสง

x = ปริมาณโครมิคออกไซด์ (มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)

6. วิธีการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

6.1 แอมโมเนียรวม (ตามวิธีการของ Boyd and Tucker, 1992)

สารเคมี

การเตรียมสารเคมี ใช้น้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนีย (ammonia free distilled water)

1. สารละลายออกซิไดซิ่ง (oxidizing solution)

ผสมน้ำยาซักผ้าขาว (คลอรีน 5%) 20 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด – ด่าง ให้อยู่ในช่วง 6.0 ถึง 7.0 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริค (HCL, กรด 1 ส่วน : น้ำ 3 ส่วน) ควรเตรียมสารนี้ใหม่ ทุก 4 ถึง 5 วัน

2. สารละลายฟีนอล (phenol solution)

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2.5 และฟีนอล 10.0 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ควรเตรียมสารนี้ใหม่ ทุก 4 ถึง 5 วัน

3. เกลือโรเชล (rochell salt)

ละลายเกลือโรเชล ($KnaC_4H_4O_6.4H_2O$) 50 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้มให้สารละลายเหลือ 70 มิลลิลิตร (เพื่อกำจัดแอมโมเนียที่อาจปนเปื้อนอยู่ในเกลือ) วางทิ้งไว้ให้เย็น เติมแมงกานัสซัลเฟต ($MnSo_4.2\ H_2O$) 50 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรสารละลายให้ครบ 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย (total ammonia nitrogen, TAN)

เตรียมโดยชั่งแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 1.9079 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย TAN เข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไปเปต สารละลาย TAN เข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร และเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไปเปต สารละลายความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 15 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ไปเปตตัวอย่างน้ำที่ผ่านการกรองแล้ว หรือน้ำกลั่น (ใช้เป็น blank) หรือสารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย มา 10 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ 50 มิลลิลิตร

2. หยดเกลือโรเชล 1 หยด เติมสารละลายออกซิไดซิ่ง 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายฟีนอล 0.6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้อย่างน้อย 15 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์

3. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร คำนวณค่า TAN โดยใช้สมการ

$$\frac{C_1}{C_2} = \frac{A_1}{A_2}$$

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นของ TAN มาตรฐาน

C_2 = ความเข้มข้นของ TAN ตัวอย่างน้ำ

A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของ TAN มาตรฐาน

A_2 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำ

6.2 การวิเคราะห์หาไนไตรท์และไนเตรทในน้ำ (ตามวิธีการของ Clesceri *et al*, 1989)

สารเคมี

1. copper-cadmium granules

ล้างเม็ดแคดเมียม 25 กรัมด้วยกรดเกลือ 6 นอร์มอล แล้วล้างด้วยน้ำเปล่า เติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต เข้มข้น 2 %100 มิลลิลิตร แกว่งเม็ดแคดเมียม 5 นาที จนสีน้ำเงินของสาร

ละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเจือจางลง ทำซ้ำจนเกิดตะกอนสีน้ำตาล ล้างเม็ดแคดเมียมด้วยน้ำกลั่น นำเม็ดแคดเมียมนี้เติมใน reduction column

2. สารก่อสี (color reagent)

เติม 85% phosphoric acid 100 มิลลิลิตร และ sulfanilamide 10 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เมื่อสารละลายเข้ากันดี เติม N–(1-naphthyl)–ethylenediamine dihydrochloride 1 กรัม เมื่อละลายกันดีปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

3. สารละลาย NH_4Cl – EDTA เจือจาง

เติมสารเข้มข้นโดยละลาย NH_4Cl 13 กรัม และ disodium EDTA 1.7 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับพีเอช ด้วย NH_4OH เข้มข้น ให้ได้ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.5 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำสารที่เตรียมได้มาเจือจาง โดยตวงมา 300 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร

4. HCL 6 นอร์มอล

5. สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 2 %

เตรียมโดยละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 20 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

6. สารละลายมาตรฐานไนไตรท์

ละลาย $NaNO_2$ 1.232 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเข้มข้น 250 มิลลิกรัม NO_2 –N ต่อลิตร เติม $CHCL_3$ 1 มิลลิลิตร เพื่อให้เก็บไว้ได้นาน เจือจางสารละลายเข้มข้นนี้โดยดูดมา 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเข้มข้น 50 มิลลิกรัม NO_2 –N ต่อลิตร นำสารละลายที่เตรียมได้นี้ไปเตรียมสารละลายมาตรฐานไนไตรท์ให้มีความเข้มข้นอย่างน้อย 6 ระดับ อยู่ในช่วง 0.00-0.50 มิลลิกรัม NO_2 –N ต่อลิตร

7. สารละลายมาตรฐานไนเตรท

ชั่ง KNO_3 ที่อบแห้งแล้ว 0.7218 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 100 มิลลิกรัม NO_3 –N ต่อลิตร เติม $CHCL_3$ 2 มิลลิลิตร เพื่อให้เก็บไว้ได้นาน นำสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 100 มิลลิลิตร เจือจางในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 10 มิลลิกรัม NO_3 –N ต่อลิตร นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้นี้เจือจางให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.05 ถึง 1.0 มิลลิกรัม NO_2 –N ต่อลิตร

วิธีการ

การวิเคราะห์ไนไตรท์

1. ตวงตัวอย่างน้ำที่ผ่านการกรอง หรือสารละลายมาตรฐานไนไตรท์ 50 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารก่อสี 2 มิลลิลิตร

2. ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 10 นาที แต่ไม่ควรเกิน 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร

3. นำค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานมาเขียนกราฟ และคำนวณความเข้มข้นของไนไตรท์ในน้ำตัวอย่าง จากกราฟ

การวิเคราะห์ไนเตรท

1. นำตัวอย่างน้ำที่ผ่านการกรองมาปรับ พีเอช ให้อยู่ในช่วง 7 ถึง 9 ด้วยสารละลายกรดเกลือ หรือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง

2. ผสมตัวอย่างน้ำ 25 มิลลิลิตร กับ NH_4Cl – EDTA เจือจาง 75 มิลลิลิตร ไปผ่านคอลัมน์ โดยให้น้ำไหลผ่านคอลัมน์ในอัตรา 7-10 มิลลิลิตรต่อนาที ทิ้งน้ำที่ผ่านคอลัมน์ 25 มิลลิลิตรแรกเก็บตัวอย่างน้ำที่เหลือไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3. นำตัวอย่างน้ำที่ผ่านคอลัมน์ 50 มิลลิลิตร เติมสารก่อสี 2.0 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดสี 15 นาที แต่ไม่ควรเกิน 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับน้ำกลั่น

4. นำสารละลายมาตรฐานไนเตรทความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เจือจงไว้ มาผ่านคอลัมน์เช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำ เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นและค่าดูดกลืนแสง ใช้คำนวณความเข้มข้นของไนเตรทที่มีในตัวอย่างน้ำซึ่งค่าที่ได้จะเป็นค่าไนเตรทและไนไตรท์รวมกัน ดังนั้นความเข้มข้นของไนเตรทที่มีในน้ำตัวอย่างจะเท่ากับความเข้มข้นของไนไตรท์ในน้ำตัวอย่างที่ผ่านการกรอง หักออกจากความเข้มข้นของไนไตรท์ในน้ำตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์

การเตรียมคอลัมน์

อุดส่วนก้นคอลัมน์ด้วยใยแก้ว เติมน้ำลงไปให้เต็มคอลัมน์ แล้งค่อย ๆ เติมเม็ดแคดเมียมลงไปให้สูง 18.5 เซนติเมตร ให้น้ำท่วมเม็ดแคดเมียม เพื่อป้องกันไม่ให้เม็ดแคดเมียมสำผัสกับอากาศ ล้างคอลัมน์ด้วยสารละลาย NH_4Cl – EDTA เจือจาง 200 มิลลิลิตร โดยให้สารละลายไหลผ่าน 7-10 มิลลิลิตรต่อนาที ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ โดยใช้สารละลายไนไตรท์มาตรฐาน ถ้าคอลัมน์มีประสิทธิภาพน้อยกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ ต้องเตรียมเม็ดแคดเมียมใหม่

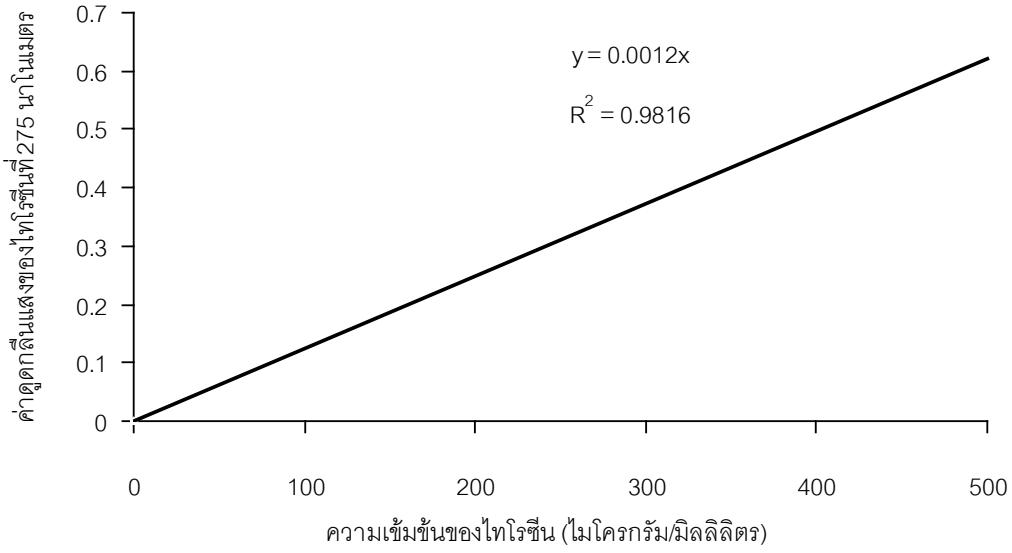
7. การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

1. ชั่งไทโรซีน 100 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้คือสารละลายไทโรซีนความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเก็บไว้เป็น stock solution

2. เจือจางสารละลายไทโรซีนให้อยู่ในช่วง 50- 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร

4เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ ไทโรซีนกับค่าดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร



ภาพภาคผนวกที่ ก 1 กราฟมาตรฐานไทโรซีน

8.การหาปริมาณโปรตีนจาก crude enzyme ด้วยวิธี Modified Lowry Method เทียบกับ กราฟมาตรฐานของ Bovine Serum Albumin (BSA)

วิธีการเตรียมสารเคมี

Alkaline copper solution (500 ml)

- 0.5% $CuSO_4.5H_2O$ 1 ส่วน (ชั่ง $CuSO_4.5H_2O$ 0.05 กรัม ละลายน้ำ 10 มิลลิลิตร)
- 1 % Sodium tartrate 1 ส่วน (ชั่ง Sodium tartrate 0.1 กรัม ละลายน้ำ 10 มิลลิลิตร)
- 1 % Na_2CO_3 ใน 0.5 M NaOH 50 ส่วน (NaOH 10 กรัม ละลายน้ำประมาณ 400 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม Na_2CO_3 5 กรัม, 0.5% $CuSO_4.5H_2O$ 10 มิลลิลิตร และ 1 % Sodium tartrate 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

หมายเหตุ: ใช้น้ำกลั่นต้ม และตั้งให้เย็นก่อนผสม **

- Folin phenol reagent (1: 10 v/v)

ดูด Folin phenol Reagent 1 มิลลิลิตร เติมน้ำ 10 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

- BSA 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง BSA 10 มิลลิกรัมละลายด้วยน้ำ DDW ประมาณ 8 มิลลิลิตร. และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้เจือจางด้วยน้ำ DDW ให้ได้ความเข้มข้นของโปรตีนในช่วงที่สามารถวัดได้

2. เติม Alkaline Copper Solution 2 ml และตั้งทิ้งไว้นาน 10 นาที

3. เติม Follin reagent (1:10 v/v) 3 ml และตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 nm

5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ BSA

วิธีการทำกราฟมาตรฐานของ BSA

1. เจือจาง BSA ให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการด้วยน้ำ DDW ดังนี้

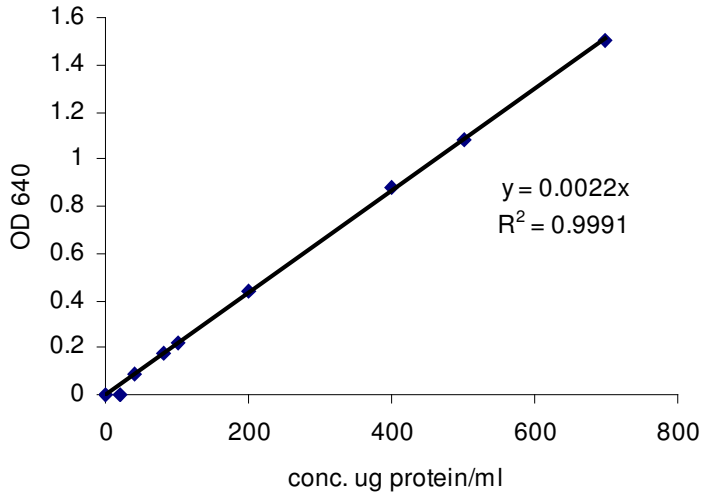
ความเข้มข้น (μg/ml)	BSA 1 mg/ml (μl)	น้ำ DDW (μl)
0	1000	0
20	980	20
40	960	40
80	920	80
100	900	100
200	800	200
400	600	400
500	500	500
700	300	700

2. นำหลอดทดลองในแต่ละความเข้มข้นเติม Alkaline copper solution 2 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้นาน 10 นาที

3. เติม Follin phenol reagent (1:10 v/v) 3 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร

5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟเส้นตรงเทียบกับค่าความเข้มข้นของ BSA และหาสมการของกราฟเส้นตรงนั้น



ภาพภาคผนวกที่ ก2 กราฟมาตรฐานของ BSA 1 mg/ml

Specific enzyme activity = Unit of enzyme activity /mg pt ที่ใช้

= μmol/ml/mgpt

ภาคผนวก ข

คุณภาพน้ำตลอดการทดลอง 8 สัปดาห์

สูตรอาหาร	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรด-ด่าง	ออกซิเจนที่ละลายน้ำ(มิลลิกรัม/ลิตร)	ไนไตรท์ (มก./ลิตร)	ไนเตรท (มก./ลิตร)	แอมโมเนียรวม (มก./ลิตร)
1	27.80– 28.20	6.90–7.15	5.05–5.26	0.06–0.08	1.25–1.50	0.07 – 0.09
2	27.70–28.00	6.89–7.10	5.02–5.23	0.06–0.07	1.13–1.37	0.11 – 0.12
3	27.70–28.10	6.84–7.10	5.00–5.25	0.04–0.05	1.09–1.29	0.06 – 0.10
4	27.60–28.00	6.91–7.12	5.18–5.32	0.05–0.06	1.18–1.27	0.09 - 0.11
5	27.60–28.00	6.94–7.16	5.04–5.26	0.04–0.06	1.11–1.20	0.08 - 0.12
6	27.80–28.10	6.89–7.13	5.15–5.30	0.03–0.05	1.05–1.21	0.07 – 0.09
7	27.80–28.20	6.96–7.06	5.09–5.26	0.03–0.05	1.03–1.12	0.09 – 0.12
8	27.80–28.20	6.90–7.15	5.05–5.26	0.06–0.08	1.25–1.50	0.07 – 0.09
9	27.80–28.00	6.92–7.05	5.11–5.25	0.05–0.07	1.11–1.27	0.06 – 0.08
10	27.80–28.10	6.95–7.05	5.14 –5.45	0.05–0.06	1.16–1.24	0.10 – 0.12
11	27.60–28.00	6.88–7.05	5.05–5.13	0.05–0.06	1.08–1.17	0.07 – 0.09
12	27.80–28.00	6.89–7.03	5.08–5.23	0.05–0.07	1.05–1.15	0.11 – 0.14
13	27.70–28.00	7.00–7.15	5.00 – 5.25	0.03–0.05	1.10–1.21	0.06 - 0.08
14	27.80–28.00	6.98–7.04	5.08 – 5.20	0.03–0.04	1.02–1.10	0.09 – 0.12

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์สถิติของผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ ค.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ระดับ pH ในกระเพาะอาหารปลากดเหลือง หลังกระตุ้นด้วยตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ระยะเวลาต่าง ๆ

Source	Sum of Squares	Df	Mean Squares	F Value	Pr > F
TRT	0.440	3	0.147	0.326	0.807
Error	0.495	11	0.450		
Corrected Total	5.391	14			

ตารางภาคผนวกที่ ค.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปอร์เซ็นต์โปรตีนที่เหลือในวัตถุดิบหลังการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากกระเพาะอาหารปลากดเหลือง

Source	Sum of Squares	Df	Mean Squares	F Value	Pr > F
TRT	643.877	3	214.626	204.452	0.0001
Error	19.945	19	1.050		
Corrected Total	663.823	22			

ตารางภาคผนวกที่ ค.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ระดับการย่อยสลายโปรตีนในวัตถุดิบ หลังการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากกระเพาะอาหารปลากดเหลือง

Source	Sum of Squares	Df	Mean Squares	F Value	Pr > F
TRT	65.240	3	21.747	39.651	0.0001
Error	10.421	19	0.548		
Corrected Total	75.661	22			

ตารางภาคผนวกที่ ค.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลากดเหลืองหลังได้รับอาหารทดลองที่มีโปรตีนจากถั่วเหลืองต้ม และกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันแทนที่โปรตีนจากปลาป่นที่ระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	Df	Mean Squares	F Value	Pr > F
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง	111.589	1	111.589	11.05	0.002
ระดับการแทนที่	534.093	6	89.015	8.81	0.000
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง x ระดับการแทนที่	129.139	6	21.523	2.13	0.083
Error	262.597	26	10.099		
Corrected Total	1037.420	39			

ตารางภาคผนวกที่ ค.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลากดเหลือง หลังได้รับอาหารทดลองที่มีโปรตีนจากถั่วเหลืองต้ม และกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันแทนที่โปรตีนจากปลาป่นที่ระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	Df	Mean Squares	F Value	Pr > F
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง	0.756	1	0.756	11.30	0.002
ระดับการแทนที่	3.048	6	0.508	7.59	0.000
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง x ระดับการแทนที่	0.849	6	0.141	2.11	0.085
Error	1.740	26	0.066		
Corrected Total	6.393	39			

ตารางภาคผนวกที่ ค.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) อัตราการรอดตายของปลากดเหลือง หลังได้รับอาหารทดลองที่มีโปรตีนจากถั่วเหลืองต้ม และกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันแทนที่โปรตีนจากปลาป่นที่ระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	Df	Mean Squares	F Value	Pr > F
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง	62.475	1	62.475	0.62	0.400
ระดับการแทนที่	273.151	6	45.525	0.45	0.800
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง x ระดับการแทนที่	886.506	6	147.751	1.46	0.200
Error	2638.722	26	101.489		
Corrected Total	3860.855	39			

ตารางภาคผนวกที่ ค.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) น้ำหนักอาหารที่ปลากินของปลากดเหลือง หลังได้รับอาหารทดลองที่มีโปรตีนจากถั่วเหลืองต้ม และกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันแทนที่โปรตีนจากปลาป่นที่ระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	Df	Mean Squares	F Value	Pr > F
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง	216.440	1	216.440	20.57	0.000
ระดับการแทนที่	729.840	6	121.640	11.56	0.000
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง x ระดับการแทนที่	111.534	6	22.306	2.12	0.093
Error	284.154	26	10.524		
Corrected Total	1341.971	39			

ตารางภาคผนวกที่ ค.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลากดเหลือง หลังได้รับอาหารทดลองที่มีโปรตีนจากถั่วเหลืองต้ม และกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันแทนที่โปรตีนจากปลาป่นที่ระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	Df	Mean Squares	F Value	Pr > F
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง	0.019	1	0.019	10.31	0.003
ระดับการแทนที่	0.019	6	0.003	1.73	0.154
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง x ระดับการแทนที่	0.026	6	0.004	2.33	0.062
Error	0.048	26	0.001		
Corrected Total	0.113	39			

ตารางภาคผนวกที่ ค.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนของปลากดเหลือง หลังได้รับอาหารทดลองที่มีโปรตีนจากถั่วเหลืองต้ม และกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันแทนที่โปรตีนจากปลาป่นที่ระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	Df	Mean Squares	F Value	Pr > F
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง	0.362	1	0.362	28.72	0.00
ระดับการแทนที่	0.143	6	0.023	1.90	0.110
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง x ระดับการแทนที่	0.168	6	0.028	2.22	0.07
Error	0.328	26	0.012		
Corrected Total	1.003	39			

ตารางภาคผนวกที่ ค.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ของปลากดเหลือง หลังได้รับอาหารทดลองที่มีโปรตีนจากถั่วเหลืองต้ม และกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันแทนที่โปรตีนจากปลาป่นที่ระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	Df	Mean Squares	F Value	Pr > F
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง	107.977	1	107.977	20.23	0.000
ระดับการแทนที่	58.725	6	9.787	1.83	0.131
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง x ระดับการแทนที่	28.022	6	4.670	0.88	0.526
Error	138.774	26	5.337		
Corrected Total	333.500	39			

ตารางภาคผนวกที่ ค.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนของปลากดเหลือง หลังได้รับอาหารทดลองที่มีโปรตีนจากถั่วเหลืองต้ม และกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันแทนที่โปรตีนจากปลาป่นที่ระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	Df	Mean Squares	F Value	Pr > F
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง	200.704	1	200.704	11.36	0.0024
ระดับการแทนที่	625.874	6	104.312	5.91	0.0005
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง x ระดับการแทนที่	229.527	6	38.254	2.17	0.0795
Error	459.242	26	17.663		
Corrected Total	1515.349	39			

ตารางภาคผนวกที่ ค.12 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ปริมาณโปรตีนของปลากดเหลือง หลังได้รับอาหารทดลองที่มีโปรตีนจากถั่วเหลืองต้ม และกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันแทนที่โปรตีนจากปลาป่นที่ระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	Df	Mean Squares	F Value	Pr > F
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง	0.101	1	0.101	0.15	0.698
ระดับการแทนที่	2.727	6	0.454	0.69	0.657
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง x ระดับการแทนที่	3.130	6	0.521	0.80	0.582
Error	17.055	26	0.655		
Corrected Total	23.014	39			

ตารางภาคผนวกที่ ค.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ปริมาณไขมันของปลากดเหลือง หลังได้รับอาหารทดลองที่มีโปรตีนจากถั่วเหลืองต้ม และกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันแทนที่โปรตีนจากปลาป่นที่ระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	Df	Mean Squares	F Value	Pr > F
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง	16.281	1	16.281	28.50	0.000
ระดับการแทนที่	69.622	6	11.603	20.31	0.000
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง x ระดับการแทนที่	8.828	6	1.471	2.58	0.043
Error	14.855	26	0.571		
Corrected Total	109.587	39			

ตารางภาคผนวกที่ ค.14 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ปริมาณเถ้าของปลากดเหลือง หลังได้รับอาหารทดลองที่มีโปรตีนจากถั่วเหลืองต้ม และกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันแทนที่โปรตีนจากปลาป่นที่ระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	Df	Mean Squares	F Value	Pr > F
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง	0.710	1	0.710	16.51	0.000
ระดับการแทนที่	0.451	6	0.075	1.75	0.149
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง x ระดับการแทนที่	0.689	6	0.114	2.67	0.037
Error	1.118	26	0.043		
Corrected Total	2.970	39			

ตารางภาคผนวกที่ ค.15 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ปริมาณความชื้นของปลากดเหลืองหลังได้รับอาหารทดลองที่มีโปรตีนจากถั่วเหลืองต้ม และกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันแทนที่โปรตีนจากปลาป่นที่ระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	Df	Mean Squares	F Value	Pr > F
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง	19.348	1	19.348	19.67	0.000
ระดับการแทนที่	56.928	6	9.488	9.65	0.000
ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง x ระดับการแทนที่	11.141	6	1.856	1.89	0.121
Error	25.572	26	0.983		
Corrected Total	112.991	39			