ภาคผนวก ก. 1

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารและองค์ประกอบทางเคมีของปลา (AOAC, 1985)

1.1 การวิเคราะห์ความชื้น

1.1.1 นำขวดชั่งเข้าตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น

1.1.2 ชั่งและบันทึกน้ำหนักของขวดชั่งโดยละเอียด

1.1.3 ชั่งตัวอย่างใส่ขวดชั่งประมาณ 5 กรัม โดยบันทึกน้ำหนักอย่างละเอียด

1.1.4 นำตัวอย่างเข้าตู้อบ โดยใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

1.1.5 นำตัวอย่างที่อบแล้วใส่โถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น บันทึกน้ำหนักของตัวอย่าง

1.1.6 ทำซ้ำตามข้อ 1 ถึง 5 จนกระทั่งน้ำหนักที่ได้คงที่ โดยน้ำหนักที่หายไปคือ น้ำหนักของความชื้น

คำนวณ % ความชื้นด้วยสมการ

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

เมื่อ a = น้ำหนักของอาหารก่อนอบแห้ง

b = น้ำหนักของอาหารหลังอบแห้ง

w = น้ำหนักของอาหารก่อนอบ

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

1.2.1 ชั่งตัวอย่างอาหาร 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบ

1.2.2 นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนเถ้าเป็นสีขาว

1.2.3 นำเข้าโถอบแห้ง เพื่อให้ดูดความชื้น และเมื่อตัวอย่างอาหารเย็นดีแล้ว นำออกชั่งทันที

คำนวณ % เถ้าด้วยสมการ

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

เมื่อ a = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ

b = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำหนักของเถ้าภายหลังการเผา

w = น้ำหนักของอาหารก่อนเผา

1.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

1.3.1 สารเคมี

สารละลายคลอโรฟอร์ม (chloroform) : เมทธานอล (methanol) อัตราส่วน 2:1

1.3.2 วิธีการ

1. อบถ้วยพร้อมลูกแก้ว ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 8 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น

2. อบตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น

3. ชั่งน้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้ว (w_1)

4. ชั่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ใส่กระดาษกรองประมาณ 1 ถึง 2 กรัม (w_2) ห่อให้ มิดชิด ใส่ลงในไส้กรอง (thimble) ที่เตรียมไว้ นำไปใส่เข้าเครื่อง Soxtec System HT6

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

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

7. เลื่อนปุ่มไปที่ rinsing เพื่อล้างตัวอย่าง 20 นาที

8. ปิดวาล์ว เปิดสวิทซ์อากาศ เลื่อนปุ่มไปที่ evaporation เพื่อให้สารระเหยออกไป 5 นาที

9. ปิดเครื่องอากาศและน้ำ แล้วเลื่อนปุ่ม evaporation กลับที่เดิม นำถ้วยออกจากเครื่อง แล้วนำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

10. นำถ้วยออกมาใส่โถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก (w_3)

การคำนวณหา % ไขมัน

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

เมื่อ w_1 = น้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้ว

w_2 = น้ำหนักตัวอย่าง

w_3 = น้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้วและไขมันหลังอบ

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

1.4.1 สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (sulfuric acid, H_2SO_4) 93 ถึง 98 เปอร์เซ็นต์

2. สารเร่งรวม (catalyst mixture) เตรียมโดยชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต (coppersulfate, $CuSO_4$) 7 กรัม กับโปแตสเซียมซัลเฟต (potassium sulfate, K_2SO_4) 100 กรัม ผสมให้เข้ากัน

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

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

5. สารละลายกรดบอริค (boric acid, H_3BO_3) 4 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลายกรดบอริค 4 กรัมในน้ำกลั่น ต้มจนกระทั่งละลายหมด ทิ้งไว้จนสารละลายเย็นลงแล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

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

7. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Na_2CO_3) 0.1 นอร์มอล เตรียมโดยอบโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ 260 ถึง 270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ชั่งสารมา 1.325 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร

8. สารละลายเมทิลออเรนซ์ อินดิเคเตอร์ (methyl orange indicator) เตรียมโดยละลายเมทิลออเรนซ์ 0.1 กรัมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.4.2 การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือมาตรฐาน

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

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

$$\text{หรือนอร์มอลิตี้ของกรดเกลือ} = \frac{\text{น้ำหนักของโซเดียมคาร์บอเนต} \times 1000}{\text{สารละลายกรดเกลือ (มิลลิลิตร)} \times 52.994}$$

1.4.3 วิธีการวิเคราะห์

ก. ขั้นตอนการย่อย (digestion)

1. ชั่งตัวอย่างด้วยกระดาษชั่งสารที่ปราศจากไนโตรเจน ให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.5 กรัม บันทึกน้ำหนักโดยละเอียด ใส่ตัวอย่างลงในหลอดวิเคราะห์โปรตีน

2. เติมสารเร่งรวม 3 กรัม

3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร

4. นำไปย่อยด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีน ที่อุณหภูมิ 375 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารละลายในหลอดวิเคราะห์โปรตีนใส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

ข. ขั้นตอนการกลั่น (distillation)

1. เมื่อสารละลายเย็นดีแล้ว จึงเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในหลอดวิเคราะห์

2. ใส่ลูกแก้ว 2 ลูก เพื่อป้องกันการกระแทกของสารละลาย

3. ต่อหลอดวิเคราะห์โปรตีนเข้ากับเครื่องกลั่นที่มีขวดรูปชมพู่ บรรจุกรดบอริค 40 มิลลิลิตร โดยให้ปลายของท่อยางที่ต่อจากกระบอกแก้วควบแน่นจุ่มอยู่ในกรดบอริค เติมโซเดียม ไฮดรอกไซด์ลงในหลอดวิเคราะห์ช้า ๆ จนกระทั่งสารละลายมีสีดำ

4. ใส่อินดิเคเตอร์ในกรดบอริค 2 ถึง 3 หยด

5. ทำการกลั่นจนกระทั่งไม่มีแก๊สแอมโมเนียออกมาแล้วทำการกลั่นต่อไปอีก 10 นาที แล้วล้างปลายเครื่องกลั่นด้วยน้ำกลั่น นำขวดรูปชมพู่ออกจากเครื่องกลั่น

ค. ขั้นตอนการไตเตรท (titration)

1. นำสารละลายในขวดรูปชมพู่ไปไตเตรทด้วยสารละลายกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน จนกระทั่งกรดบอริคเปลี่ยนเป็นสีชมพู

2. บันทึกปริมาตรของกรดเกลือมาตรฐานที่ใช้เพื่อคำนวณต่อไป

การคำนวณเปอร์เซ็นต์โปรตีน

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

เมื่อ V_1 คือ ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

V_2 คือ ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทกับ blank

N คือ เป็นความเข้มข้นของกรดเกลือ (นอร์มอล)

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง

1.5 การวิเคราะห์หาเยื่อใย

สารเคมี

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

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

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

4. อะซีโตน (acetone)

วิธีการ

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

2. ชั่งน้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบ (W_1) ชั่งตัวอย่างประมาณ 1-2 กรัม (W_2) ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบ (ระหว่างนี้ควรอุ่น 0.128 โมล ของกรดซัลฟูริกที่เตรียมไว้) จากนั้นนำไปใส่เข้าเครื่อง

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

4. เปิดเครื่องและนำเข้าเครื่อง เปิดความร้อนเต็มที่จนสุดสเกล และเลื่อนวาล์วทุกตัวให้อยู่ที่ตำแหน่ง close ต้มให้สารละลายเดือดเต็มที่ แล้วลดความร้อนลงเหลือประมาณ 4.5 (ถ้ามีตัวอย่างติดข้างหลอดแก้ว ควรใช้ 0.128 โมลของกรดซัลฟูริกประมาณ 10-20 มิลลิลิตรล้างให้หมด)

5. ต้มต่อไปอีกประมาณ 30 นาที จากนั้นปิดเครื่อง แล้วกรองสารละลายออกโดยเลื่อนปุ่มไปที่ vaccumn

6. ล้างตัวอย่างด้วยน้ำอุ่น 3 ครั้ง โดยเติมน้ำอุ่นลงไปแล้วเลื่อนปุ่มไปที่ vaccumn เพื่อกรองน้ำออก

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

8. ย้ายถ้วยกระเบื้องเคลือบไปที่ cold extraction unit (เลื่อนปุ่มไปที่close) ล้างตัวอย่างด้วยอะซีโตนให้ท่วมตัวอย่างทิ้งไว้สักครู่แล้วกรองออกจนกว่าไม่มีสีเขียว

9. เอาถ้วยกระเบื้องเคลือบออกมาวางให้อะซีโตนระเหยออก แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน

10. นำถ้วยกระเบื้องเคลือบออกมาชั่ง (W_3) แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศา

———

เซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

11. นำถ้วยกระเบื้องเคลือบมาชั่งน้ำหนักหลังจากการเผา (W_4)

การคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์เยื่อใย} = \frac{(W_3 - W_4)}{W_2} \times 100$$

ภาคผนวก ก. 2

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในวัตถุดิบอาหาร (Folch, 1957; AOAC, 1990)

1.1 การสกัดไขมัน

1.1.1 สารเคมี

1. สารละลายคลอโรฟอร์ม (chloroform) : เมทธานอล (methanol) อัตราส่วน 2:1
2. กาซไนโตรเจนบริสุทธิ์

1.1.2 วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 3 - 5 กรัม (W_2) ใส่ในบีกเกอร์
2. เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม : เมทธานอล ประมาณ 25 เท่าของน้ำหนักตัวอย่าง ปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน
3. เติมน้ำกลั่นลงไป 25 มิลลิลิตร ปั่นต่อไปอีก 30 วินาที
4. เทส่วนผสมลงในกรวยแยก (separatory funnel) ขนาด 250 - 500 มิลลิลิตร
5. เขย่าให้เข้ากันอย่างแรงเป็นเวลา 2 - 3 นาที เป่าด้วยกาซไนโตรเจน 1 นาที
6. ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้นเป็น 3 ชั้น ชั้นล่างสุดเป็นส่วนผสมของไขมันละลายในคลอโรฟอร์ม ชั้นกลางเป็นตัวอย่างและน้ำ และชั้นบนสุดเป็นชั้นเมทธานอล
7. ไขเอาส่วนล่างที่เป็นไขมันละลายในคลอโรฟอร์มออกลงในบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (W_1)
8. นำไประเหยเอาคลอโรฟอร์มออกในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิเท่ากับ 65 องศาเซลเซียส
9. นำไขมันไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ประมาณ 4 - 5 ชั่วโมง จนแห้งแล้วจึงทำให้เย็นในโถดูดความชื้น และนำไปชั่งน้ำหนัก (W_3)
10. ละลายไขมันด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม : เมทธานอล ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้แช่แข็งไว้ใช้วิเคราะห์ต่อไป

การคำนวณเปอร์เซ็นต์ไขมัน

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

โดยที่ W_1 คือน้ำหนักบีกเกอร์

W_2 คือน้ำหนักตัวอย่าง

W_3 คือน้ำหนักบีกเกอร์และไขมันหลังการอบ

1.2 การเตรียมเมทธิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน

1.2.1 สารเคมี

1) ไอโซออกเทน (Iso-octane)

2) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมทธานอล ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล

3) สารละลายโบรอนไตรฟลูออไรด์ ในเมทธานอล ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

4) สารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว (ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 36 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร)

5) กาซไนโตรเจนบริสุทธิ์

1.2.2 วิธีการ

1) ชั่งตัวอย่างน้ำมัน 25 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดฝาเกลียว ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมทธานอล 1.5 มิลลิลิตร เป่าด้วยกาซไนโตรเจนบริสุทธิ์และปิดฝาหลอดให้แน่น แช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

2) ทำให้เย็นแล้วเติมสารละลายโบรอนไตรฟลูออไรด์ในเมทธานอล ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เป่าด้วยกาซไนโตรเจนบริสุทธิ์ และปิดฝาหลอดให้แน่นแช่ในน้ำเดือด 30 นาที

3) ทำให้เย็นทันทีโดยให้มีอุณหภูมิ 30 - 40 องศาเซลเซียส แล้วเติมไอโซออกเทน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ปั่นด้วยเครื่องเขย่านาน 30 วินาที

4) เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทันที ปั่นผสมด้วยเครื่องเขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น

5) ดูดสารละลายชั้นบน(ส่วนของไอโซออกเทน)ใส่ในหลอดที่สะอาดและแห้ง

6) สกัดสารชั้นล่างซ้ำอีกครั้งด้วยไอโซออกเทน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ปั่นผสมด้วยเครื่องเขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายชั้นบนใส่ในหลอดเดียวกับที่ได้ในข้อ 5 เป่าด้วยกาไนโตรเจนบริสุทธิ์และปิดฝาหลอดให้แน่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รอนำไปฉีดเข้าเครื่อง แกซโครมาโตกราฟี (gas chromatography, GC)

ภาคผนวก ก. 3

1 วิธีการสกัดไขมันออกจากวัตถุดิบอาหาร

1.1 สารเคมี

เอทธิลแอลกอฮอล์ หรือเฮกเซน

1.2 วิธีการ

1.2.1 ชั่งวัตถุดิบอาหาร 500 กรัม ใส่ในขวดก้นกลม (boiling flask) ขนาด 4 - 5 ลิตร

1.2.2 เติมเอทธิลแอลกอฮอล์ หรือเฮกเซน 2 - 3 เท่า ของวัตถุดิบอาหาร หรือประมาณ 2- 3 ลิตร

1.2.3 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 60 - 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

1.2.4 นำวัตถุดิบอาหารที่ผ่านการต้มมากรองด้วยผ้าขาวบาง

1.2.5 ทำซ้ำตามข้อ 1.2.2 - 1.2.4 อีก 6 ครั้ง

1.2.6 จากนั้นนำวัตถุดิบอาหารที่ได้มา suction ด้วยเครื่อง suction pump

1.2.7 นำวัตถุดิบอาหารผึ่งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำเข้าอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสจนแห้ง

1.2.8 วัตถุดิบอาหารที่ได้นำไปวิเคราะห์ปริมาณไขมันก่อนนำไปใช้ต่อไป

ภาคผนวก ก. 4

1. วิธีการเตรียมตัวอย่าง และวิธีการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (Bancroft, 1967)

1.1 สารเคมี

1.1.1 สารละลายบูแอง (Bouin's solution) เตรียมโดยใช้ฟอร์มาลีน (formalin) 25 มิลลิลิตร กรดพิคริค (saturated aqueous picric acid) 75 มิลลิลิตร กรดอะซิติกเข้มข้น5 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกัน

1.1.2 สีย้อมฮีมาทอกซิลิน (hematoxylin) เตรียมโดยใช้ฮีมาทอกซิลิน (hematoxylin crystal) 4 กรัมโซเดียมไอโอเดท (sodium iodate)0.8 กรัมอลัม (potassium aluminium sulfate, alum) 100 กรัมกรดซิตริก (citric acid)4 กรัมคลอรัลไฮเดรท (chloral hydrate)200 กรัมน้ำกลั่น 2,000 มิลลิลิตรละลายอลัมลงในน้ำกลั่น เติมฮีมาทอกซิลินผสมจนกระทั่งละลายหมด จึงเติมโซเดียมไอโอเดทผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซิตริกและคลอรัลไฮเดรท ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้งาน

1.1.3 สีย้อมฮีโอซิน (eosin) เตรียมโดยใช้อีโอซิน (eosin Y. Cl 45380)1 กรัมเอทิลเอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ (ethyl alcohol) 1,000 มิลลิลิตรกรดอะซิติกเข้มข้น5 มิลลิลิตรผสมเข้าด้วยกัน

1.2 การเตรียมตัวอย่าง

1.2.1 สลบปลาด้วยสารควินาดีน (quinaldine) 50 ส่วนในล้านส่วน

1.2.2 ใช้กรรไกรผ่าตัดเปิดช่องท้องของปลาออก ตัดตับออกแล้วดองในน้ำยาบูแองทันที เก็บรักษาตัวอย่างในน้ำยาดองดังกล่าวเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเก็บรักษาไว้ได้เป็นเวลานาน

1.3 ขั้นตอนการ dehydration และ embedding

1.3.1 ตัดแต่งตัวอย่าง (trim) ที่ผ่านการดองแล้วให้มีขนาดพอเหมาะ เพื่อสะดวกต่อการ embed และนำไปตัด section

1.3.2 นำตัวอย่างไปผ่านขั้นตอน dehydration ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ

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

1.3.3 นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนในข้อ 1.3.2 ไป embed ด้วยพาราพลาสท์ จากนั้นนำ block ไปแช่ตู้เย็นเพื่อง่ายต่อการตัด section ต่อไป

1.3.4 ตบแต่งตัวอย่างที่อยู่ใน block ให้มีขนาดพอดีกับขนาดสไลด์ และ cover grass ปิดได้สนิท จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อไมโครโตม (microtome) ให้มีความหนาประมาณ 3 – 4 ไมครอน นำไปลอยในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45 – 50 องศาเซลเซียส

1.3.5 ใช้แผ่นสไลด์ช้อนตัวอย่าง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

1.3.6 นำสไลด์ไปผ่านขบวนการย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโรซิน โดยมีขั้นตอนดังนี้

กระบวนการย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน

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

1.3.7 mount slide ด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์ (permount) แล้วนำตัวอย่างไปศึกษาพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์

ภาคผนวก ก. 5

1. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ Boyd และ Tucker (1992)

1.1 การวิเคราะห์ความเป็นด่างของน้ำ

สารเคมี

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

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

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

4. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.2 นอร์มอล : เตรียมโดยค่อยๆ เทกรดซัลฟูริกเข้มข้น 6 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น (ที่ต้มเดือดใหม่ๆ แล้วเปิดฝาทิ้งให้เย็น) ปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร

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

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลาย

1. ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร

2. หยดเมทิลเรด อินดิเคเตอร์ 5 หยด เขย่าให้ผสมกันจะได้สารละลายสีเหลือง

3. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู

4. นำส่วนผสมทั้งหมดไปต้มจนเดือดเป็นเวลาประมาณ 3-5 นาที เพื่อไล่กาซคาร์บอนไดออกไซด์ให้หมด สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอีกครั้ง

5. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกต่อไปจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอีกครั้ง

6. บันทึกปริมาตรสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกทั้งหมดที่ใช้ไป

การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก(นอร์มอล)

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

หลังจากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.02 นอร์มอล โดยใช้สูตร

N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า V_2 = ปริมาตรสารละลายที่ต้องการ

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. หยดฟีนอลท์ทาลีน อินดิเคเตอร์ 10 หยด เขย่าให้ผสมกัน
   2.1 ถ้าสารละลายใสให้ทำข้อ 3 ต่อไป
   2.2 ถ้าสารละลายเป็นสีชมพู จะต้องไตเตรดด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกจนกระทั่งสารละลายสีชมพูนั้นหายไป บันทึกปริมาตรที่ใช้ไป (นำไปรวมกับปริมาตรของสารละลายที่ใช้ไปในข้อ 4) ทำต่อไปในข้อ 3
3. หยดเมทิลออเรนจ์ 2-3 หยด เขย่าให้ผสมกันจะได้สารละลายสีเหลือง
4. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้ม จดปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริกทั้งหมดที่ใช้ไป

การคำนวณค่าความเป็นด่างของน้ำ(มิลลิกรัมต่อลิตร)

$$\text{ค่าความเป็นด่าง} = \frac{\text{ปริมาตรของกรดซัลฟูริกที่ใช้} \times \text{นอร์มอลลิตี้ของกรดซัลฟูริก} \times 50 \times 1{,}000}{\text{ปริมาตรของตัวอย่างน้ำ}}$$

1.2 การวิเคราะห์ความกระด้างของน้ำ

สารเคมี

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

2. อีรีโอโครมแบล็กที (eriochrome black T) อินดิเคเตอร์ : เตรียมโดยละลายไฮดรอกซีลามีน ไฮโดรคลอไรด์ (hydroxylamine hydrochloride, $H_2NOH.HCl$) 4.5 กรัม และอีรีโอโครมแบล็กที 0.50 กรัม ในเอทธิลแอลกอฮอร์ 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

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

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

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลาย

ดูดสารละลายมาตรฐานแคลเซียม 0.010 โมล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน เติมอินดิเคเตอร์อีรีโอโครมแบล็กที 8 หยด เขย่าให้ผสมกัน นำมาไตเตรทสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ ที่ใช้ไปเพื่อนำมาคำนวณความเข้นข้นของสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ (โมล) โดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
3. เติมอินดิเคเตอร์ อีรีโอโครมแบล็กที 8 หยด เขย่าให้ผสมกัน
4. นำมาไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน EDTA จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน จดปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน EDTA ทั้งหมดที่ใช้ไป

การคำนวณค่าความกระด้างของน้ำ (มิลลิลิตร $CaCO_3$ ต่อลิตร)

$$\text{ค่าความกระด้างของน้ำ} = \frac{\text{ปริมาตรของ EDTA} \times \text{โมลาริตี้ของ EDTA} \times 100 \times 1{,}000}{\text{ปริมาตรของตัวอย่างน้ำ}}$$

1.3 แอมโมเนีย

สารเคมี

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

2. สารละลายออกซิไดซิ่ง(oxidizing solution) : ผสมน้ำยาซักผ้าขาว (มีคลอรีน 5 เปอร์เซ็นต์) 20 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.5-7 โดยใช้สารละลายกรด HCl (กรด 1 ส่วนต่อน้ำกลั่น 3 ส่วน) เตรียมสารละลาย oxidizing solution ใหม่ทุก 4-5 วัน

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

4. สารละลายเกลือ Rochelle : ละลายเกลือโรเชล ($KnaC_4H_4O6.4H_2O$) 50 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วต้มให้เดือดเพื่อไล่แอมโมเนียที่อาจปนเปื้อนในเกลือ จนปริมาตรสารละลายเหลือประมาณ 70 มิลลิลิตร จึงทำให้เย็น จากนั้นเติม $MnSO_4.2H_2O$ 50 มิลลิกรัม แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

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

วิธีการ

1.ใช้ปิเปตดูดน้ำตัวอย่างที่ผ่านการกรอง หรือสารละลายมาตรฐาน TAN 0.300 มิลลิกรัม/ลิตร หรือน้ำกลั่น (blank) 10 มิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์ขนาดจุ 50 มิลลิลิตร แล้วคนด้วย magnetic stirer

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

3. ปล่อยน้ำตัวอย่างให้อยู่นิ่งเป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เกิดสีได้เต็มที่

4. นำน้ำตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานไปวัดความเข้มแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร โดยใช้ blank ตั้งค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0

5. หาความเข้มข้นของ TAN ในน้ำตัวอย่างตามสูตรคำนวณดังนี้

$$Csp = \frac{Asp}{Asd} Cds$$

เมื่อ Csp = ความเข้มข้นของ TAN ในน้ำตัวอย่าง

Csd = ความเข้มข้นของ TAN ในสารละลายมาตรฐาน

Asp = ค่าการดูดกลืนแสงในน้ำตัวอย่าง

Asd = ค่าการดูดกลืนแสงในสารละลายมาตรฐาน

1.4 ไนไตรท์และไนเตรท

สารเคมี

1. copper- cadmium granules : ล้างเม็ดแคดเมียม (ที่ร่อนแล้วค้างบนตะแกรงขนาด 40-60 mesh) น้ำหนัก 25 กรัม ด้วยสารละลาย HCl 6 นอร์มอล แล้วล้างด้วยน้ำเปล่า จากนั้นเติมสารละลาย $CaSO_4$ 2 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร แกว่งเม็ดแคดเมียมจนสีฟ้าของสารละลาย $CaSO_4$ จางลง รินสารละลายทิ้งแล้วเติมสารละลาย $CaSO_4$ แกว่งเม็ดแคดเมียมอีกครั้ง ทำซ้ำจนกว่าจะเกิดตะกอนสีน้ำตาล จากนั้นจึงค่อยๆ ใช้น้ำเปล่าล้างเอาตะกอนออกไป นำแคดเมียมนี้ไปเติมใน reduction column

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

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

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

5. สารละลายกรดเกลือ HCl 6 N : โดยเจือจางกรด HCl เข้มข้นกับน้ำกลั่นในปริมาตรที่เท่ากัน

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

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

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

โดย N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายตั้งต้น

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายสุดท้าย

V_1 = ปริมาตรของสารละลายตั้งต้นที่นำไปเจือจาง

V_2 = ปริมาตรทั้งหมดของสารละลายสุดท้ายที่ต้องการ

8. สารละลายมาตรฐานไนไตรท์ : ละลาย 1.232 กรัม $NaOH_2$ ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 250 มิลลิลิตร NO2 นอร์มอล/ลิตร ซึ่งสามารถเก็บไว้ใช้ต่อไปโดยเติม $CHCl_3$ 1 มิลลิลิตร/ลิตร นำสารละลายมาตรฐานนี้ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 50 มิลลิกรัม NO_2 นอร์มอล/ลิตร นำสารละลายมาตรฐานไนไตรท์ที่เตรียมได้ครั้งหลังนี้ไปเตรียมสารละลายมาตรฐานไนไตรท์ที่มีความเข้มข้นอย่างน้อย 6 ระดับ อยู่ในช่วง 0.00- 0.50 มิลลิกรัม NO_2 นอร์มอล/ลิตร

วิธีการ

1. กรองน้ำตัวอย่างผ่านชุดกรองสูญญากาศ

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

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

4. นำตัวอย่างน้ำที่ต้องการวัดความเข้มข้นของไนไตรท์ (ทั้งตัวอย่างน้ำที่ผ่านการกรองและน้ำตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์แล้ว) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับสารก่อสี 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

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

6. เขียนเส้นกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากน้ำตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน ก็จะทราบความเข้มข้นของไนไตรท์ในน้ำตัวอย่าง

7. หาความเข้มข้นของไนเตรทในน้ำตัวอย่างได้ โดยนำความเข้มข้นของไนไตรท์ในน้ำตัวอย่างที่ผ่านการกรองหักออกจากความเข้มข้นของไนไตรท์ในน้ำตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์

ตารางผนวก ข. 1 คุณภาพน้ำก่อนการทดลอง

สูตรอาหารที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรดเป็นด่าง	ออกซิเจนละลายน้ำ (มก./ล.)	การนำไฟฟ้า (ไมโครซีเมน/ซม.)	ความเป็นด่าง (มก./ล.)	ความกระด้าง (มก./ล.)	แอมโมเนีย (มก./ล.)	ไนไตรท์ (มก./ล.)	ไนเตรท (มก./ล.)
1	27.66±0.57	6.57±0.10	5.46±0.15	118.96±88.97	21.00±1.00	43.63±0.95	0.65±0.06	0.04±7.09	0.70±0.05
2	27.66±0.57	6.35±0.13	5.50±0.17	164.23±6.21	26.66±2.08	43.61±1.07	0.52±0.10	0.033±0.09	0.52±0.01
3	27.66±0.57	6.36±0.10	5.50±0.1	178.58±1021	2525±3.63	43.65±0.95	0.72±0.02	0.046±0.25	0.17±0.08
4	27.66±0.57	6.46±0.07	5.30±0.34	167.36±3.59	23.33±1.52	42.83±2.85	0.56±0.03	0.043±0.06	0.57±0.03
5	27.66±0.57	6.36±0.12	5.40±0.1	171.66±1.36	22.00±1.00	37.35±5.57	0.63±0.03	0.083±0.10	0.26±0.12
6	27.66±0.57	6.49±0.05	5.50±0.1	137.98±21.56	25.00±4.00	43.33±1.43	0.63±0.09	0.056±0.01	0.31±0.29
7	27.66±0.57	6.50±0.05	5.50±0.1	165.16±6.10	24.66±0.57	30.51±22.85	0.53±0.10	0.055±0.18	0.41±0.12
8	27.66±0.57	6.43±0.07	5.16±0.57	195.53±6.88	21.00±2.64	43.95±2.25	0.60±0.02	0.072±0.07	0.27±0.07
9	27.66±0.57	6.33±0.11	5.40±0.57	175.36±9.02	21.33±1.52	47.06±2.12	0.64±0.10	0.073±0.07	0.35±0.33
10	27.66±0.57	6.36±0.12	5.40±0.26	167.10±7.13	21.33±1.52	48.05±0.69	0.58±0.10	0.055±0.23	0.41±0.33

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย + ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

ตารางผนวก ข.2 คุณภาพน้ำระหว่างทำการทดลองเดือนที่ 1

สูตรอาหารที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรดเป็นด่าง	ออกซิเจนละลายน้ำ (มก./ล.)	การนำไฟฟ้า (ไมโครซีเมน/ซม.)	ความเป็นด่าง (มก./ล.)	ความกระด้าง (มก./ล.)	แอมโมเนีย (มก./ล.)	ไนไตรท์ (มก./ล.)	ไนเตรท (มก./ล.)
1	27.70±0.60	6.37±0.14	5.66±29.01	285.00±5.88	26.33±3.21	37.96±3.46	0.46±0.20	0.05±0.02	0.52±0.16
2	27.76±0.66	6.19±0.08	5.70±0.10	266.00±8.18	25.33±1.00	48.96±2.04	0.55±0.05	0.04±0.00	0.53±0.03
3	27.66±0.57	5.74±0.73	5.66±0.05	263.00±53.01	24.66±7.63	37.01±1.67	0.50±0.05	0.05±0.02	0.58±0.14
4	27.66±0.57	6.18±0.08	5.70±0.10	233.00±8.54	26.33±4.93	36.36± 1.51	0.62±0.01	0.04±0.02	0.52±0.15
5	27.76±0.66	5.10±2.29	8.91±2.08	251.76±96.02	21.52±8.77	32.58±15.18	0.47±0.20	0.04±0.02	0.49±0.20
6	27.66±0.57	6.14±0.25	5.80±0.10	245.66±9.86	28.33±3.21	40.80±12.39	0.46±0.12	0.03±0.01	0.46±0.10
7	27.66±0.57	6.32±0.12	5.76±0.05	248.66±11.93	31.33±1.00	58.40±2.68	0.50±0.04	0.03±0.02	0.47±0.16
8	27.70±0.60	6.16±0.22	5.66±0.05	230.33±15.37	29.66±4.72	55.71±5.24	0.48±0.05	0.08±0.03	0.63±0.22
9	27.66±0.12	6.13±0.12	5.70±0.12	229.23±0.12	25.33 ± 0.12	42.46±0.12	0.54±0.12	0.05±0.12	0.63±0.12
10	27.66±0.57	5.80±0.25	5.70±0.10	266.33±6.65	28.33±1.52	43.25±2.37	0.64±0.05	0.06±0.02	0.63±0.16

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ 3ซ้ำ

ตารางผนวก ข.3 คุณภาพน้ำระหว่างทำการทดลองเดือนที่ 2

สูตรอาหารที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรดเป็นด่าง	ออกซิเจนละลายน้ำ (มก./ล.)	การนำไฟฟ้า (ไมโครซีเมน/ซม.)	ความเป็นด่าง (มก./ล.)	ความกระด้าง (มก./ล.)	แอมโมเนีย (มก./ล.)	ไนไตรท์ (มก./ล.)	ไนเตรท (มก./ล.)
1	27.83±0.63	6.67±0.06	5.3±0.10	144.73±29.36	31.66±4.72	61.42±12.49	0.92±0.11	0.08±0.08	0.66±0.07
2	27.76±0.66	6.31±0.24	5.4±0.10	162.20±58.74	24.66±0.57	62.82±10.47	0.99±0.11	0.04±0.12	0.27±0.28
3	27.83±0.63	6.34±0.13	5.4±0.15	153.76±6.67	26.33±3.21	68.53±9.66	0.89±0.08	0.06±0.12	0.84±0.09
4	27.78±0.63	6.27±0.15	5.5±0.20	125.60±34.93	32.00±2.00	68.12±1.01	0.95±0.04	0.09±0.08	0.77±0.14
5	27.77±0.66	6.25±0.12	5.4±0.10	150.83±30.44	26.00±4.58	68.2±7.59	0.92±0.03	0.07±0.07	0.90±0.04
6	27.77±0.66	6.47±0.16	5.5±0.20	144.70±33.13	26.33±1.52	59.00±3.67	0.94±0.12	0.05±0.16	0.54±0.19
7	27.77±0.66	6.29±0.09	5.4±0.10	154.00±62.02	29.33±1.52	52.33±0.80	0.94±0.05	0.04±0.60	0.34±0.27
8	27.76±0.58	6.67±0.06	5.6±0.10	207.66±53.71	28.66±2.08	46.23±17.32	0.88±0.06	0.08±0.07	0.39±0.10
9	27.83±0.64	6.11±0.15	5.6±0.05	190.66±34.53	19.66±2.08	57.38±1.29	0.91±0.05	0.08±0.13	0.59±0.17
10	27.75±0.60	6.11±0.04	5.4±0.20	185.26±38.91	24.00±2.00	58.37±1.01	0.83±0.03	0.0±0.12	0.74±0.07

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย + ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

ตารางผนวก ข. 4 คุณภาพน้ำระหว่างทำการทดลองเดือนที่ 3

สูตรอาหารที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรดเป็นด่าง	ออกซิเจนละลายน้ำ (มก./ล.)	การนำไฟฟ้า (ไมโครซีเมน/ซม.)	ความเป็นด่าง (มก./ล.)	ความกระด้าง (มก./ล.)	แอมโมเนีย (มก./ล.)	ไนไตรท์ (มก./ล.)	ไนเตรท (มก./ล.)
1	27.66±0.57	6.40±0.05	5.43±0.05	183.00±1.25	22.33±0.57	41.27±0.96	0.85±0.02	0.06±0.05	0.80±0.08
2	27.66±0.57	6.16±0.07	5.40±0.10	212.00±2.64	25.33±0.57	43.28±1.92	0.96±0.04	0.09±0.00	0.79±0.02
3	27.66±0.57	6.26±0.07	5.50±0.10	169.93±2.76	21.66±0.57	35.46±0.96	0.96±0.02	0.05±0.06	0.93±0.00
4	27.66±0.57	6.20±6.26	5.46±0.05	229.00±2.64	24.5±0.50	36.45±0.96	0.89±0.01	0.03±0.47	0.90±0.01
5	27.66±0.57	5.80±0.10	5.50±0.10	190.00±3.32	23.23±0.20	45.37±0.22	0.92±0.13	0.08±0.08	0.88±0.05
6	27.66±0.57	6.15±0.02	5.46±0.20	186.10±5.91	20.40±0.92	45.12±1.66	0.91±0.06	0.08±0.06	0.51±0.07
7	27.66±0.57	6.03±0.15	58.50±0.10	245.00±5.29	20.00±0.00	49.10±0.12	0.94±0.00	0.08±0.04	0.75±0.05
8	27.66±0.57	6.39±0.01	5.60±0.10	238.66±2.09	32.00±0.00	44.17±0.96	0.94±0.01	0.07±0.07	0.50±0.00
9	27.66±0.57	6.31±0.03	5.50±0.10	231.66±2.88	30.66±0.57	42.64±0.49	0.91±0.00	0.07±0.08	0.49±0.03
10	27.66±0.57	6.19±0.06	5.50±0.10	258.66±1.52	18.66±0.57	46.77±0.60	0.85±0.01	0.07±0.04	0.84±0.03

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ

ตารางผนวก ข. 5 ราคาวัตถุดิบอาหารที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารทดลอง

วัตถุดิบ	ราคา/กิโลกรัม (บาท)	ราคา/100กรัม (บาท)
ปลาป่น	22.00	2.20
กากถั่วเหลือง	12.50	1.25
ข้าวโพดป่น	6.50	0.65
แป้งข้าวเจ้า	16.00	1.60
น้ำมันปลา	183.33	18.33
น้ำมันข้าวโพด	90.00	9.00
น้ำมันถั่วเหลือง	30.00	3.00
วิตามินและแร่ธาตุผสม	100.00	10.00
อัลฟา-สตาร์ท	25.00	2.25

ตารางผนวก ข. 6 องค์ประกอบของกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์) ในวัสดุอาหารทดลอง และปลาก่อนการทดลอง

ชนิดกรดไขมัน	วัสดุอาหาร			
	น้ำมันปลา	น้ำมันข้าวโพด	น้ำมันถั่วเหลือง	ปลาก่อนทดลอง
14:00	-	-	-	4.23
15:00	-	-	-	-
16:00	12.20	12.29	12.39	25.93
17:00	-	-	-	-
18:00	-	-	-	-
18:1n-3	-	-	-	-
18:1n-6	-	-	-	-
18:1n-7	-	-		-
18:1n-9	25.84	34.18	26.35	3.27
18:1n-10	-	-	-	-
18:1n-11	-	-	-	-
18:2n-6	-	62.01	50.93	3.94
18:2n-9	-	-	-	-
18:2n-3	49.16	-	-	-
18:3n-3	5.08	-	3.47	-
20:00	-	-	-	-
20:1n-9	-	-	-	-
20:2n-9	-	-	-	-
20:2n-7	-	-	-	-
20:3n-7	-	-	-	-
20:3n-9	-	-	-	-
20:2n-6	-	-	-	-
20:4n-6	-	-	-	-
20:3n-3	-	-	-	-
20:4n-3	-	-	-	-
20:5n-3	-	-	-	-
22:00	-	-	-	-
22:5n-6	-	-	-	-
22:5n-3	-	-	-	-