ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก.1

1. การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบ อาหารทดลอง และซากปลาทดลอง(ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC, 1990)

1.1 การวิเคราะห์ความชื้น

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

คำนวณหาความชื้นด้วยสมการ

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

เมื่อ a = น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบแห้ง

b = น้ำหนักของตัวอย่างหลังอบแห้ง

w = น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบ

1.2 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 = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำหนักของตัวอย่างหลังการเผา

w = น้ำหนักของตัวอย่างก่อนเผา

1.3 การวิเคราะห์หาโปรตีน

สารเคมี

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

2. สารเร่งรวม (catalyst mixture): เตรียมโดย ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate, $CuSO_4$) 7 กรัม 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: เตรียมโดยละลายกรดเกลือ 9 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

5. กรดบอริค (boric acid, H_3BO_3) 4%: เตรียมโดย ต้มน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ให้ร้อนแล้วใส่กรดบอริคลงไป 4 กรัม คนจนละลายหมด เมื่อสารละลายเย็นลงแล้วจึงเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

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

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

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

การหาความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือมาตรฐาน

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

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

เมื่อ N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

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

1.4 การวิเคราะห์ไขมัน (ใช้เครื่อง Soxtec System HT6)

สารเคมี

1. สารละลายคลอโรฟอร์ม (chloroform)
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

1.5 การวิเคราะห์เยื่อใย (ใช้เครื่อง Fibertec system)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก 0.128 M: เตรียมโดยเจือจางกรดซัลฟูริกเข้มข้น 7 มิลลิลิตร ในน้ำปราศจาก อิออน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.223 M: เตรียมโดยชั่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 12.5125 กรัม ละลายในน้ำปราศจากอิออน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3. ออกทานอล (1-Octanol reinst)

4. อะซิโตน (actone)

วิธีการ

1. นำถ้วยกระเบื้องเคลือบ ไปอบที่อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ถ้าถ้วยกระเบื้องเคลือบสกปรกมากให้นำไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 ชั่วโมง

2. ชั่งน้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบ (W_1) ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 1-2 กรัม (W_2) ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบ นำไปใส่เข้าเครื่อง Fibertec system

3. เติมกรดซัลฟูริก ปริมาตร 150 มิลลิลิตร หยดออกทานอล 2-3 หยด เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดฟองขณะเดือด

4. เปิดเครื่อง และน้ำเข้าเครื่อง เปิดความร้อนจนสุดสเกล และเลื่อนวาล์วทุกตัวให้อยู่ในตำแหน่งปิด ต้มให้สารละลายเดือดเต็มที่ แล้วลดความร้อนลงเหลือประมาณ 4.5 ต้มนานประมาณ 30 นาที จากนั้นปิดเครื่องแล้วกรองสารละลายออกโดยเลื่อนปุ่มไปที่ Vaccunm

5. ล้างตัวอย่างด้วยน้ำอุ่น 3 ครั้ง โดยเติมน้ำอุ่นลงไปแล้วเลื่อนปุ่มไปที่ Vaccunm เพื่อกรองน้ำออก

6. เติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ประมาณ 150 มิลลิลิตร ทำเช่นเดียวกับข้อ 6.2.4-6.2.5

7. ย้ายถ้วยกระเบื้องเคลือบไปที่ cold extraction unit ล้างตัวอย่างด้วยอะซิโตนให้ท่วมตัวอย่างทิ้งไว้สักครู่ แล้วจึงกรองอะซิโตนออก

8. นำถ้วยกระเบื้องเคลือบ ไปอบที่อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส นานครึ่งชั่วโมง

9. นำถ้วยกระเบื้องเคลือบ ไปวางไว้ให้เย็นในโถอบแห้ง จึงชั่งน้ำหนัก (W_3) แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่งโมง

10. นำถ้วยกระเบื้องเคลือบ ไปวางไว้ให้เย็นในโถอบแห้ง จึงชั่งน้ำหนัก (W_4)

การคำนวณหาเยื่อใยด้วยสมการ

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

เมื่อ W_2 = น้ำหนักของตัวอย่าง

W_3 = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบ พร้อมตัวอย่างหลังการอบ

W_4 = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบ พร้อมตัวอย่างหลังการเผา

2. วิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (Bancroft, 1967)

สารเคมี

1. สารละลายบูแอง (Bouin's solution) เตรียมโดยใช้

ฟอร์มาลีน (formalin)	25 มิลลิลิตร
กรดพิคริคอิ่มตัว (saturated aqueous picric acid)	75 มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	5 มิลลิลิตร

ผสมเข้าด้วยกัน

2. สีย้อมฮีมาทอกซิลิน (haematoxylin) เตรียมโดยใช้

ฮีมาทอกซิลิน (haematoxylin crystal)	4 กรัม

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

ละลายอลัมลงในน้ำกลั่น เติมฮีมาทอกซิลินผสมจนกระทั่งละลายหมด จึงเติมโซเดียมไอโอเดทผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซิตริกและคลอรัลไฮเดรทผสมจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกันทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้งาน

3. สีย้อมอีโอซิน (eosin) เตรียมโดยใช้

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

ผสมเข้าด้วยกัน

การเตรียมตัวอย่าง

1. สลบปลาด้วยสารละลายควินาดีน (quinaldine) 50 ส่วนในล้านส่วน

2. ใช้กรรไกรผ่าตัดเปิดช่องท้องของปลาออก ตัดตับออกแล้วดองในน้ำยาบูแองทันที เก็บรักษาตัวอย่างในน้ำยาดองดังกล่าวเป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเก็บรักษาไว้ได้เป็นเวลานาน

ขั้นตอนการ dehydration และ embedding

1. ตบแต่งตัวอย่าง (trim) ที่ผ่านการดองแล้วให้มีขนาดพอเหมาะเพื่อสะดวกต่อการ embed และนำไปตัด section

2. นำตัวอย่างไปผ่านขั้นตอน dehydration ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
2	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1

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

3. นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนข้างต้นไป embed ด้วยพาราพลาสท์ จากนั้นนำ block ไปแช่ตู้เย็นเพื่อง่ายต่อการนำไปตัด section ต่อไป

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

5. ใช้แผ่นสไลด์ช้อนตัวอย่าง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อให้ตัวอย่างยึดติดแผ่นสไลด์ได้ดี

6. นำสไลด์ไปผ่านขบวนการย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน โดยมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	ไซลีน	2
2	ไซลีน	2
3	ไซลีน	2
4	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
5	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
6	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
7	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
8	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
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	แอบโซลูท แอลกอฮอล์	2
18	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
19	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
20	ไซลีน	2
21	ไซลีน	2
22	ไซลีน	2

7. เมาท์ (mount) ด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์ (permount) แล้วนำตัวอย่างไปศึกษาพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

3.1 การหาค่าฮีมาโตคริต (% haematocrit) (ตามวิธีของ Blaxhall และ Daisley, 1973)

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

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

3. วัดหาอัตราส่วนของปริมาตรเม็ดเลือดกับปริมาตรเลือดทั้งหมด นำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซนต์ฮีมาโตคริต จากสูตร

$$\% \text{ ฮีมาโตคริต} = \frac{\text{ปริมาตรของเม็ดเลือดอัดแน่น (มิลลิเมตร)} \times 100}{\text{ปริมาตรเลือดทั้งหมด (มิลลิเมตร)}}$$

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

สารเคมี

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

วิธีการ

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

2. นำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

3. ค่าที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับค่าฮีโมโกลบินมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น โดยใช้สารละลายเดรบกิ้นเป็นแบลงค์ (blank)

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

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

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

สารเคมี

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

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

วิธีการ

1. ดูดซีรัมมา 5 ไมโครลิตร ผสมรวมกับน้ำกลั่น 995 ไมโครลิตร

2. เติมสารละลายอัลคาไลด์คอปเปอร์ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เท่ากันแล้วทิ้งไว้ 10 นาที

3. เติมสารละลายโฟลิน 1:10 ลงไป 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน สังเกตสีของสารละลายที่เปลี่ยนแปลง

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

การเตรียมกราฟมาตรฐาน(standard curve) ของซีรัมโปรตีน

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

2. เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 0.9, 0.7, 0.5, 0.3, 0.1 และ0 มิลลิลิตร ตามลำดับ จะได้ความเข้มข้นของแอลบูมินในแต่ละหลอดเท่ากับ 50, 150, 250, 350, 450 และ 500ไมโครกรัม ตามลำดับ

3. นำแต่ละหลอดมาทำตามขั้นตอนของการหาซีรัมโปรตีนในเลือดดังที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น

4. นำค่าความเข้มข้นของแอลบูมิน และค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน โดยให้ค่าความเข้มข้นอยู่ในแกน X และค่าการดูดกลืนแสงอยู่แกน Y หาสมการสหสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linear regression) เพื่อใช้คำนวณค่าความเข้มข้นของโปรตีนรวมในเลือดจากค่าการดูดกลืนแสง

3.4 การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว (blood cell count) (ตามวิธีของ Blaxhall และ Daisley, 1973)

การนับเม็ดเลือดในตัวปลาได้ดัดแปลงวิธีการนับเม็ดเลือดในคนและสัตว์บกอื่นๆ มาใช้ซึ่งจะใช้ RBC-diluting pipette ในการเจือจาง ไม่ว่าจะนับเม็ดเลือดแดงหรือเม็ดเลือดขาวก็ตามมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ คือ

1. ใช้ RBC diluting pipette ดูดเลือด (ที่เจาะใหม่ๆ) ให้ถึงขีด 0.5 ถ้าเกินขีด 0.5 ให้ปรับโดยใช้กระดาษทิชชูค่อยๆ ซับออกอย่างระมัดระวัง แล้วเช็ดปลายปิเปตให้สะอาด

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

3. ใช้นิ้วชี้ปิดปลายปิเปตแล้วถอดสายยาง จากนั้นใช้หัวแม่มือกับนิ้วชี้ปิดปลายปิเปตทั้งสองข้างเขย่าไปมาในแนวนอน 2-3 นาที

4. หยดของเหลวในปิเปตทิ้งไป 3-4 หยด เพราะของเหลวส่วนนี้อยู่ในก้านไม่ได้ถูกนำไปผสมกับเลือดในกระเปาะของปิเปต

5. หยดของเหลวต่อไปลงในร่องของ haemacytometer ที่มี cover glass ปิดอยู่เรียบร้อย แล้วถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้นหรือของเหลวหยดโตเกินไปจนล้นขอบของ haemacytometer ให้ทำความสะอาดแล้วทำใหม่

6. วาง haemacytometer ลงบนพื้นโต๊ะ 2-3 นาที เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดลงไปเรียงบนพื้นสไลด์ นับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 20X-40X

7. จำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้ในวงกลมเล็กรวมกัน 5 ช่อง $\times 10^4$ และจำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ในวงกลมใหญ่ $\times$ 2,000 คือค่าของจำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวต่อ 1 mm^3

4. การวิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์ (Chien and Jeng, 1992)

1. นำตัวอย่างปลาทำให้แห้งด้วยความเย็น (Freeze-dry) เมื่อตัวอย่างแห้งดีแล้ว จึงนำมาบดให้ละเอียด

2. ชั่งน้ำหนักประมาณ 0.1 กรัม ลงในหลอดทดลองขนาด 50 ml และเติม อะซิโตน (acetone) 5 ml ให้ความร้อนด้วย hot plate ประมาณ 60 องศาเซลเซียส

3. เติมน้ำกลั่นประมาณ 5 ml เขย่าเล็กน้อย

4. เติมอีเธอร์ (ether) 20 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้อง จนสังเกตการแยกชั้นกันอย่างชัดเจน จึงดูดส่วนบนที่มีสีเขียวใสด้วยหลอดหยดใส่หลอดทดลองขนาด 25 ml และเติมอีเธอร์ลงไปในหลอดเติมอีกครั้งจนได้สารละลายใสไม่มีสี

5. นำสารละลายสีเขียวใสมาระเหยแห้งที่ตู้ควัน ประมาณ 1 ชั่วโมง

6. ปรับปริมาตร ด้วยเฮกเซน (hexane) ด้วยขวดปรับปริมาตร 25 ml

7. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงแบบสแกนคำนวณหาปริมาณคาโรทีนอยด์ต่อไป

ตัวอย่างวิธีการคำนวณ

นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณคาโรทีนอยด์

$A^{1\%}_{1cm}$ = 2150 (Sommer, 1992)

คาโรทีนอยด์ 1 กรัม ในเฮกเซน 100 มล. จะมีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 2150

เมื่อค่าดูดกลืนแสงมีค่าเท่ากับ 0.2150 แสดงว่า มีคาโรทีนอยด์ในเฮกเซน เท่ากับ 1 µg/มล.

เมื่อวัดค่าดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 0.11 แสดงว่ามีคาโรทีนอยด์เท่ากับ $\frac{1 \times 0.11}{0.2150}$ = 0.5116 µg/มล.

ดังนั้นเมื่อใช้เฮกเซน 25 มล. สกัดตัวอย่าง 0.05 กรัม ปริมาณคาโรทีนอยด์เท่ากับ 25 x 0.5116

เพราะฉะนั้น ปริมาณคาโรทีนอยด์มีค่าเท่ากับ 12.79 µg/ 0.05 กรัม

หรือ 0.256 มก./ ก.

หมายเหตุ

$A^{1\%}_{1cm}$ = 2150 หมายถึง การวัดค่าดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 2150 โดยใช้ light path 1 เซนติเมตร แสดงว่า สารนั้นมีความเข้มข้นของคาโรทีนอยด์ เท่ากับ 1%

ภาคผนวก ก.2

1. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ตามวิธีการของ Boyd and Tucker, 1992)

1.1 การวิเคราะห์ความเป็นด่างของน้ำ

สารเคมี

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

2. เมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์: เตรียมโดยละลายเมทิลออเรนจ์ 0.5 กรัม ในน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3. เมทิลเรด อินดิเคเตอร์: เตรียมโดยละลายเมทิลเรด 0.5 กรัม ในน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.2 นอร์มอล: เตรียมโดยค่อยๆ เทกรด ซัลฟูริกเข้มข้น 6 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น (ที่ต้มเดือดใหม่ๆ แล้วเปิดฝาทิ้งให้เย็น) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

5. สารละลายมาตรฐานโซเดียมคาร์บอเนต 0.2 นอร์มอล: เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนตซึ่งอบแห้งจำนวน 10.6 กรัม โดยอบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที หรือที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำให้เย็นในโถอบแห้ง จากนั้นละลายในน้ำกลั่นที่ต้มเดือดใหม่ๆ วางไว้ให้เย็นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลาย

1. ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. หยดเมทิลเรด อินดิเคเตอร์ 5 หยด เขย่าให้เข้ากันจะได้สารละลายสีเหลือง

3. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู

4. นำส่วนผสมทั้งหมดไปต้มจนเดือดเป็นเวลาประมาณ 3-5 นาที เพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้หมด สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอีกครั้ง

5. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกต่อไปจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยน เป็นสีชมพูอีกครั้งหนึ่ง

6. บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกทั้งหมดที่ใช้ไปในการคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก โดยใช้สูตร

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

หลังจากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.02 นอร์มอล โดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

เมื่อ N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

วิธีการ

1. นำตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. หยดฟีนอลฟ์ทาลีน อินดิเคเตอร์ 10 หยด เขย่าให้เข้ากัน

ก. ถ้าสารละลายใส ให้ทำข้อ 3 ต่อไป

ข. ถ้าสารละลายสีชมพู จะต้องไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกจนกระทั่งสารละลายสีชมพูนั้นหายไป บันทึกปริมาตรที่ใช้ไป (นำไปรวมกับปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ไปในข้อ 4) ทำต่อไปในข้อ 3

3. หยดเมทิลออเรนจ์ 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายสีเหลือง
4. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้ม จดปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริกที่ใช้ไปทั้งหมด

การคำนวณค่าความเป็นด่างของน้ำ โดยใช้สูตร

ค่าความเป็นด่างของน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

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

1.2 การวิเคราะห์ความกระด้างของน้ำ

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์ (buffer solution): เตรียมโดยละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 67.5 กรัม ในแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ปริมาตร 570 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้1 ลิตร

2. อีรีโอโครมแบล็กที (Eriochrome black T) อินดิเคเตอร์: เตรียมโดยละลายไฮดรอกซีลามีนไฮโดรคลอไรด์ (hydroxylamine hydrochloride, $H_2NOH.HCl$) 4.5 กรัม และอีรีโอโครมแบล็กที 0.50 กรัม ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรให้ได้100 มิลลิลิตร

3. สารละลายมาตรฐานแคลเซียม 0.01 โมลาร์: เตรียมละลายแอนไฮดราสคาร์บอเนต (anhydrous $CaCO_3$) ปริมาณ 1 กรัม ในกรดเกลือเจือจาง (1:1) แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรประมาณ 200 มิลลิลิตร จากนั้นต้มให้เดือดนาน 5-10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับค่าความเป็นกรดด่าง ของสารละลาย ให้ได้เท่ากับ 7 โดยใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3 นอร์มอล จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

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

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลาย

ดูดสารละลายสารละลายมาตรฐานแคลเซียม 0.010 โมล ปริมาตร 100 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติม อินดิเคเตอร์อีรีโอโครมแบล็กที 8 หยด เขย่าให้เข้ากัน นำมาไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ ที่ใช้ไป เพื่อนำมาคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ (โมล) โดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

เมื่อ N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

วิธีการ

1. นำตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ลิตร

2. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3. เติมอินดิเคเตอร์ อีรีโอโครมแบล็กที 8 หยด เขย่าให้เข้ากัน

4. นำมาไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน จดปริมาตรของสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ ทั้งหมดที่ใช้ไป

การคำนวณค่าความกระด้างของน้ำ โดยใช้สูตร

ค่าความกระด้างของน้ำ (มิลลิกรัม$CaCO_3$ ต่อลิตร)

$$= \frac{\text{ปริมาตรของอีดีทีเอ} \times \text{โมลาริตี้ของอีดีทีเอ} \times 100.1 \times 1,000}{\text{ปริมาตรของน้ำตัวอย่าง}}$$

1.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียในน้ำ

สารเคมี

1. สารละลายออกซิไดซิ่ง (oxidizing solution): ผสมน้ำยาซักผ้าขาว (มีคลอรีน 5%) 20 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร แล้วปรับค่าความเป็นกรดด่าง ให้อยู่ในช่วง 6.5-7 โดยใช้สารละลายกรดเกลือ (กรด 1 ส่วนต่อน้ำกลั่น 3 ส่วน) ควรเตรียมสารละลายออกซิไดซิ่งใหม่ ทุก 4-5 วัน

2. สารละลายฟีนอล: ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.5 กรัม และฟีนอล 10.0 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายเกลือโรเชล (Rochelle): ละลายเกลือโรเชล ($KnaC_4H_4O_6.4H_2O$) 50 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วต้มให้เดือดเพื่อไล่แอมโมเนียที่อาจปนเปื้อนในเกลือ จนปริมาตรสารละลายเหลือประมาณ 70 มิลลิลิตร จึงทำให้เย็น จากนั้นเติม $MnSO_4.H_2O$ 50 มิลลิกรัม แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย-ไนโตรเจน 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร: ขั้นแรกเตรียมสารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย-ไนโตรเจนทั้งหมด (total ammonia-nitrogen หรือ TAN) เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 1.9079 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง 5.0 มิลลิลิตร ของสารละลายมาตรฐาน TAN 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้สารละลายมาตรฐาน TAN 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ขั้นสุดท้ายเจือจาง 15 มิลลิลิตร ของสารละลายมาตรฐาน TAN 10 มิลลิกรัม

ลิตร ด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐาน TAN 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีการ

1. กรองน้ำตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง GF/C

2. ใช้ปิเปตดูดน้ำตัวอย่างที่ผ่านการกรอง หรือสารละลายมาตรฐาน TAN 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือน้ำกลั่นมา 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วฝาเกลียว

3. เติมสารละลายเกลือโรเชล 1 หยด เขย่าให้สารละลายเข้ากัน เติมสารละลายออกซิไดซิ่ง 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล 0.6 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากัน

4. ปล่อยน้ำตัวอย่างไว้นาน 15 นาที เพื่อให้เกิดสี

5. นำน้ำตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐาน ไปวัดค่าดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร

6. หาความเข้มข้นในน้ำตัวอย่าง ตามสูตรคำนวณดังนี้

$$Csp = \frac{Asp \times Csd}{Asd}$$

เมื่อ Csp = ความเข้มข้นของ TAN ในน้ำตัวอย่าง

Csd = ความเข้มข้นของ TAN ในสารละลายมาตรฐาน

Asp = ค่าการดูดกลืนแสงในน้ำตัวอย่าง

Asd = ค่าการดูดกลืนแสงในสารละลายมาตรฐาน

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์และไนเตรทในน้ำ

สารเคมี

1. copper-cadmium granules: ล้างเม็ดแคดเมียม น้ำหนัก 25 กรัม ด้วยสารละลายกรด HCl 6 N แล้วล้างด้วยน้ำเปล่า จากนั้นเติมสารละลาย $CuSO_4$ 2% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แกว่งเม็ดแคดเมียมจนสีฟ้าของสารละลาย $CuSO_4$ จางลง รินสารละลายทิ้งแล้วเติมใหม่ทำซ้ำจนกระทั่งเกิดตะกอนสีน้ำตาล จากนั้นจึงค่อยๆ ใช้น้ำเปล่าล้างเอาตะกอนออกไป นำแคดเมียมนี้ไปเติมใน reduction column

2. สารก่อสี (color reagent): เติม 85% phosphoric acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วเติม sulfanilamide 10 กรัม เมื่อ sulfanilamide ละลายหมดแล้ว จึงเติม

N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride 1 กรัม ละลายให้เข้ากันดี แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บสารละลายนี้ไว้ในขวดทึบแสง จะสามารถเก็บไว้ใช้ได้ถึง 1 เดือน

3. สารละลาย NH_4Cl-EDTA: ละลาย NH_4Cl 13 กรัม และ disodium EDTA 1.7 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของสารละลายนี้ด้วย NH_4OH เข้มข้น จนได้พีเอช 8.5 จึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

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

5. สารละลายกรด HCl 6 N: โดยเจือจางกรด HCl เข้มข้นกับน้ำกลั่นในปริมาตรที่เท่ากัน

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

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

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

เมื่อ N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายตั้งต้น

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายสุดท้าย

V_1 = ปริมาตรของสารละลายตั้งต้นที่จะนำไปเจือจาง

V_2 = ปริมาตรทั้งหมดของสารละลายสุดท้ายที่ต้องการ

8. สารละลายมาตรฐานไนไตรท์: ละลาย 1.232 กรัม $NaNO_2$ ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานไนไตรท์เข้มข้น 250 มิลลิกรัม NO_2-N/ลิตร นำสารละลายมาตรฐานนี้ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 50 มิลลิกรัม NO_2-N/ลิตร นำสารละลายมาตรฐานไนไตรท์ที่เตรียมได้ครั้งหลังนี้ไปเตรียมสารละลาย

มาตรฐานไนไตรท์ให้มีความเข้มข้นอย่างน้อย 6 ระดับ อยู่ในช่วง 0.00-0.50 มิลลิกรัม NO_2-N/ลิตร

วิธีการ

1. กรองน้ำตัวอย่างผ่านชุดกรองสุญญากาศ

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

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

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

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

6. เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากน้ำตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน จะทราบความเข้มข้นของไนไตรท์ในน้ำตัวอย่างน้ำ

7. หาความเข้มข้นของไนเตรทในน้ำตัวอย่างได้โดยนำความเข้มข้นของไนไตรท์ในน้ำตัวอย่างที่ผ่านการกรอง หักออกจากความเข้มข้นของไนไตรท์ในน้ำตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์