ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบ อาหารทดลอง และซากกุ้งทดลอง (ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC, 1990)

1.1 การวิเคราะห์ความชื้น

1. นำ crucible เข้าตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น

2. ชั่งและบันทึกน้ำหนักของ crucible โดยละเอียดด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3. ชั่งตัวอย่างใส่ crucible ประมาณ 3 กรัม และบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (w)

4. นำตัวอย่างเข้าตู้อบ โดยใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

5. นำตัวอย่างที่อบแล้วใส่โถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น แล้วบันทึกน้ำหนักของตัวอย่าง

6. ทำซ้ำตามข้อ 4 ถึง 5 จนกระทั่งน้ำหนักที่ได้คงที่ (b) โดยน้ำหนักที่หายไป คือน้ำหนักของความชื้น

คำนวณหาความชื้นด้วยสมการ

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

เมื่อ a = น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบแห้ง

b = น้ำหนักตัวอย่างหลังอบแห้ง

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

1. นำถ้วยกระเบื้องเคลือบหรือ crucible เข้าตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น

2. ชั่งและบันทึกน้ำหนักของ crucible โดยละเอียดด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (a)

3. ชั่งตัวอย่างใส่ crucible ประมาณ 3 กรัม และบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (w)

4. นำตัวอย่างไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนเถ้ากลายเป็นสีขาว

5. นำตัวอย่างที่เผาเสร็จแล้วใส่ในโถดูดความชื้น เมื่อตัวอย่างเย็นดีแล้ว นำไปชั่งทันทีด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (b)

คำนวณหาเปอร์เซนต์เถ้าด้วยสมการ

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

เมื่อ a = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบหรือ crucible

b = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำหนักตัวอย่างหลังการเผา

w = น้ำหนักของตัวอย่างก่อนเผา

1.3 การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์โปรตีนรวม

สมการย่อย: โดยใช้กรดกำมะถันเข้มข้นย่อย มีปฏิกิริยาเกิดขึ้นดังสมการ

$$\text{โปรตีนแท้} + H_2SO_4 \text{ Conc.} \longrightarrow (NH_4)_2SO_4$$

$$\text{สารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน} + H_2SO_4 \text{ Conc.} \longrightarrow (NH_4)_2SO_4$$

สมการการกลั่น: โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ไล่แก๊สแอมโมเนียออกจากแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วใช้กรดบอริคจับก๊าซแอมโมเนียไว้

$$(NH_4)_2SO_4 + 2\ NaOH \longrightarrow Na_2SO_4 + 2NH_3 + 2H_2O$$

$$(NH_4)_2B_4O_7 + 2\ N^+ + 5\ H_2O \longrightarrow 2NH_4^+ + 4H_3BO_3$$

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องย่อยโปรตีน (Gerhardt รุ่น Kjeldatherm)
2. ชุดเครื่องกลั่นโปรตีน (Gerhardt รุ่น Vapodest 1)
3. หลอดย่อยโปรตีน
4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. กระดาษชั่งสาร
6. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask), บิวเรต ขนาด 50 มล. พร้อมขาตั้ง

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4) 93 - 98 เปอร์เซ็นต์
2. สารเร่งรวม (catalyst mixture) เตรียมโดยชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) 7 กรัม กับโปแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 100 กรัม ผสมให้เข้ากัน
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 45 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 450 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร
4. สารละลายกรดเกลือ (HCl) 0.1 นอร์มอล เตรียมโดยละลายกรดเกลือ 9 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร

<u>การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือมาตรฐาน</u>

ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล 40 มิลลิลิตร ลงในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติมเมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ทำการไตเตรทด้วยสารละลาย กรดเกลือ 0.1 นอร์มอล (จากสารละลายสีเหลืองเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง หรือจนสีไม่เปลี่ยน)

คำนวณความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือโดยใช้สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

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

หมายเหตุ ควรทำ 3 ซ้ำเพื่อให้ได้ค่าที่แน่นอน

5. สารละลายกรดบอริค (boric acid, H_3BO_3) 4% เตรียมโดยละลายกรดบอริค 4 กรัมในน้ำกลั่น ต้มจนกระทั่งละลายหมดปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร
6. อินดิเคเตอร์รวม (mixed indicator) เตรียมโดยละลายเมทิลเรด 0.2 กรัมในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร และละลายเมทิลินบลู

(methylene blue) 0.2 กรัมในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเมทิลเรด 2 ส่วน ผสมกับสารละลายเมทิลินบลู 1 ส่วน เขย่าให้เข้ากัน

7. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Na_2CO_3) 0.1 นอร์มอล เตรียมโดย อบโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ 260 - 270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ชั่งสารดังกล่าวมา 1.325 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร

8. เมทิลออเรนจ์อินดิเคเตอร์ (methyl orange indicator) เตรียมโดย ละลายเมทิลออเรนจ์ 0.1 กรัมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

ก. ขั้นตอนการย่อย

1.ชั่งตัวอย่างด้วยกระดาษชั่งสารที่ปราศจากไนโตรเจน ให้ได้น้ำหนัก 0.5 กรัม ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง บันทึกน้ำหนักโดยละเอียด (w) ใส่ตัวอย่างลงในหลอดวิเคราะห์โปรตีน

2. เติมสารเร่งรวม 3 กรัม

3. เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 10 มิลลิลิตร

4. นำไปให้ความร้อนด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีนที่อุณหภูมิ 375 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารละลายในขวดวิเคราะห์ใส (สีเขียวมรกต) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

ข. ขั้นตอนการกลั่น

1. นำหลอดโปรตีนที่เย็นและมีสารละลายตัวอย่างเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

2. ต่อขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเข้ากับชุดเครื่องกลั่นที่มีขวดรูปชมพู่บรรจุกรดบอริค 40 มิลลิลิตร (ใส่อินดิเคเตอร์รวม 2 - 3 หยด) โดยให้ปลายของท่อยางที่ต่อจากกระบอกแก้วควบแน่นจุ่มอยู่ในกรดบอริค เติม 45 % NaOH ลงในขวดวิเคราะห์อย่างช้าๆ จนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะเห็นสารละลายมีสีดำ

3. ทำการกลั่นจนกระทั่งไม่มีก๊าซแอมโมเนียออกมา เมื่อกรดบอริคเปลี่ยนเป็นสีเขียวแล้วจึงทำการกลั่นต่อไปอีก 10 นาทีจากนั้นนำขวดรูปชมพู่ออกจากเครื่องกลั่น

ค. ขั้นตอนการไตเตรท (titration)

1. นำไปไตเตรทด้วยสารละลายกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน จนกระทั่งกรดบอริคเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อน

2. บันทึกปริมาตรของกรดเกลือมาตรฐานที่ใช้เพื่อคำนวณต่อไป

หมายเหตุ ทำ blank โดยใช้กระดาษชั่งสารอย่างเดียวและทำการย่อยและกลั่นเหมือนตัวอย่างทุกขั้นตอน

การคำนวณ

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

เมื่อ

V_1 = ปริมาตรของกรดเกลือที่ใช้ในการไตเตรทกับตัวอย่าง

V_2 = ปริมาตรของกรดเกลือที่ใช้ในการไตเตรทกับ blank

N = ความเข้มข้นของกรดเกลือ (นอร์มอล)

W = น้ำหนักตัวอย่าง

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันรวม

อุปกรณ์

1. ชุดวิเคราะห์ไขมัน (Soxtec System HT6)
2. ถ้วยสกัดไขมัน (cup) และลูกแก้ว
3. ไส้กรองสาร (thimble)
4. โถดูดความชื้น
5. ตู้อบ

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) ห่อให้มิดชิดใส่ลงในไส้กรองสารที่เตรียมไว้นำไปใส่เข้าเครื่องสกัดไขมัน

4. นำถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วที่ชั่งไว้แล้วเติมสารละลายไตรคลอโรเอททิลีน 25 มิลลิลิตร แล้วใส่เข้าเครื่องสกัดไขมัน

5.เปิดเครื่องสกัดไขมัน ปรับอุณหภูมิไปที่ 180 องศาเซลเซียส เปิดน้ำเข้าเครื่อง เปิดวาล์ว เลื่อนปุ่มไปที่ boiling ต้มให้เดือด 30 นาที

6.เลื่อนปุ่มไปที่ rinsing เพื่อล้างตัวอย่าง 20 นาที

7.ปิดวาล์ว เปิดสวิทซ์อากาศ เลื่อนปุ่มไปที่ evaporation เพื่อให้สารระเหยออกไป 5 นาที

8.ปิดเครื่อง ปิดอากาศและน้ำ แล้วเลื่อนปุ่ม evaporation กลับที่เดิม นำถ้วยสกัดไขมันออกจากเครื่องวางทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนแห้ง

9.นำถ้วยสกัดไขมันมาใส่ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก (W_3)

การคำนวณ

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

โดยที่ W_1 คือ น้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้ว

W_2 คือ น้ำหนักตัวอย่าง

W_3 คือ น้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วและตัวอย่างหลังการอบ

2. การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของปลาป่น

2.1 การตรวจหาปริมาณเกลือ (AOAC, 1990)

สารเคมี

1. 0.1 N Silver nitrate solution

เตรียมโดยอบ $AgNO_3$ ในเตาอบที่อุณหภูมิ 105 – 110 ^{o}C นาน 2 ชั่วโมงชั่ง $AgNO_3$ ที่ผ่านการอบแล้วน้ำหนักแน่นอน 8.4945 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตร ให้ได้ 500 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร และเก็บในขวดสีชา

2. 0.1 N Potassium thiocyanate solution

เตรียมโดยละลาย KSCN 3.5 กรัม ด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร standardize KSCN sol. โดยการปิเปตสารละลาย 0.1 N

$AgNO_3$ 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลาย $FeNH_4(SO_4)_2$ 5 มิลลิลิตร เติมกรดไนตริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร แล้วไตเตรทด้วยสารละลาย KSCN

3. กรดไนตริกเข้มข้น (Conc. nitric acid)

4. 5 % Ferric alum indicator

เตรียมโดยละลาย $FeNH_4(SO_4)_2.12\ H_2O$ 5 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

อุปกรณ์

1. hot plate, ตู้ดูดควัน
2. Burette ขนาด 50 มิลลิลิตร
3. ไปเปตขนาด 5 มิลลิลิตร และ 10 มิลลิลิตร และกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างน้ำหนักแน่นอนในช่วง 1-2 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่
2. เติมสารละลาย 0.1 N $AgNO_3$ 10 – 20 มิลลิลิตร (V_1) เขย่าให้เข้ากัน
3. เติมกรดไนตริกเข้มข้นปริมาณ 10 มิลลิลิตร
4. ต้มสารผสมในตู้ควันประมาณ 10 นาที แล้วทิ้งให้เย็น
5. กรองสารละลายที่ได้ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น
6. เติมสารละลาย $FeNH_4(SO_4)_2.12\ H_2O$ ลงไป 5 มิลลิลิตร แล้วไตเตรทด้วย 0.1 N KSCN จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีชมพูอ่อน ๆ และบันทึกจดปริมาตรที่ใช้ไตเตรท (V_2)

การคำนวณ

$$\% \text{ เกลือ} = \frac{5.8 \times [(V_1 \times N)\ AgNO_3 - (V_2 \times N)\ KSCN]}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณรวมของไนโตรเจนที่ระเหยได้ (TVN) ด้วยวิธีการกลั่น (MgO Distillation Method) (AOAC, 1990)

สารเคมี

1. MgO
2. Boric acid (1% with bromocresol green / methyl red indicator)

ละลาย boric acid 50 g ในน้ำกลั่น 4 ลิตร ผสม 50 มิลลิลิตร bromocresol green (50 mg bromocresol green ละลายใน 50 มิลลิลิตร ethanol) และ 35 มิลลิลิตร methyl red (35 mg methyl red ละลายใน 35 มิลลิลิตร ethanol) และเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 5 ลิตรและผสมให้เข้ากัน

3. 0.03 N H_2SO_4

ดูด H_2SO_4 เข้มข้น 0.9 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และหาความเข้มข้นที่แน่นอนด้วย 0.03 N Na_2CO_3 โดยชั่งผง Na_2CO_3 0.3975 g (ที่ผ่านการอบที่ 180°C 1 ชั่วโมง)

การหาความเข้มข้นของ 0.03 N H_2SO_4

ดูดสารละลาย 0.03 N Na_2CO_3 20 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เติมเมทิลออเรนจ์อินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ทำการไตเตรทด้วย 0.03 N H_2SO_4 ที่เตรียมได้ จนสารละลายมีสีส้ม และคำนวณความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริก โดยใช้สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

4. น้ำกลั่น และ deionized water (free of CO_2)

อุปกรณ์

1. หลอดและเครื่องกลั่นโปรตีน
2. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
3. ไปเปตและบิวเรต

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างปลาป่นที่รู้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 5 กรัม ลงในหลอดกลั่นโปรตีน
2. ผสม MgO 1.5 g และน้ำ deionized water 50 มิลลิลิตร
3. ต่อหลอดกลั่นโปรตีนเข้ากับชุดเครื่องกลั่นที่มีขวดรูปชมพู่บรรจุ 1 % boric acid กลั่นนาน 15 นาที

4. ไตเตรทสารละลายจากสีเขียวไปเป็นสีเทาด้วย 0.03 N H_2SO_4
5. ทำการวิเคราะห์หาค่า blank โดยใช้น้ำ deionized water แทนตัวอย่าง

การคำนวณ

$$mgN/100\ g = \frac{(V \times N \times 14.01) \times 100}{w}$$

เมื่อ V = ปริมาตรของ 0.03 N H_2SO_4 ที่ใช้ไทเตรตตัวอย่าง - blank
N = ความเข้มข้นของ 0.03 N H_2SO_4
w = น้ำหนักของตัวอย่าง
14.01 = น้ำหนักโมเลกุลของ N

2.3 การวิเคราะห์หาค่า Thiobarbituric acid (TBA) (Buege and Aust, 1978)

สารเคมี

0.0375 % TBA (15% trichloroacetic acid และ 0.25 N HCl) โดยละลายผง TBA ปริมาณ 0.0375 g ในสารละลายที่มี 15% trichloroacetic acid และ 0.25 N HCl 100 มิลลิลิตรให้เข้ากัน

อุปกรณ์

1. เตาไฟฟ้า
2. หลอดฝาเกลียว
3. บีกเกอร์
4. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
5. Micropipette
6. Water bath
7. Spectrophotometer

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างที่มีน้ำหนักแน่นอนประมาณ 1 กรัม ในสารละลาย TBA ปริมาณ 5 มิลลิลิตร
2. ต้มสารละลายผสมในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที

3. ทำให้เย็นโดยน้ำไหล

4. เหวี่ยงแยกสารละลายที่ความเร็วรอบ 3600 xg เป็นเวลา 20 นาที

5. วัดค่า OD ที่ 532 nm (หากสารละลายที่ได้ขุ่น ควรทำการทดลองใหม่ เพราะจะส่งผลให้ผลการทดลองผิดพลาดได้)

6. คำนวณปริมาณ TBARS (thiobarbituric reactive substances) ในรูปของ malonaldehyde โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน รายงานค่า TBARS เป็น mg malonaldehyde/kg sample โดยกราฟมาตรฐานใช้สารละลาย MDA solution ซึ่งมีระดับความเข้มข้นของสารละลายแตกต่างกัน

การเตรียมสารละลาย MDA solution เพื่อทำ standard TBARS

1 mg/ml ⟶ ชั่ง 0.1 g ใน 100 ml = 1000 µg/ ml

↓

เจือจางเป็น 10 µg/ml โดย ดูดสารละลายมา 1 ml และปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

↓

นำสารละลายที่ได้มาเจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

Conc.(µg/ml)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0
MDA (µl)	0	50	100	150	200	250	300	350	400
Water (µl)	1,000	950	900	850	800	750	700	650	600

↓

ผสม 5 ml ของ TBA solution เขย่าให้เข้ากัน และต้มที่ $100^{o}C$

↓

ทำให้เย็น และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm และนำค่าที่ได้สร้างกราฟ เพื่อหาค่าสมการของกราฟ

การคำนวณ (รายงานค่าเป็น mg malonaldehyde / kg sample)

$$\text{ความเข้มข้น} = \frac{\text{ค่า OD ที่ได้} = X\ \mu g/ml\ (X\ mg/1{,}000\ ml)}{\text{ค่าความชันที่ได้จากกราฟ (m)}}$$

แสดงว่าสารละลาย 1,000 ml มี malonaldehyde X mg (เทียบ 1 g = 1 ml)

ถ้ามีตัวอย่างสารละลาย TBA 5 ml +น้ำหนักปลาป่น Z g = Y ml มีmalonaldehyde = $\frac{X \times Y}{1{,}000}$ mg

จากตัวอย่าง Z g มี malonaldehyde อยู่ $\frac{X \times Y}{1,000}$ mg

ถ้ามีตัวอย่าง 1,000 g มี malonaldehyde = $\frac{X \times Y}{Z}$ mg malonaldehyde / kg sample

2.4 การวิเคราะห์หาค่า Peroxide Value (PV) (IUPAC,1979)

สารเคมี

1. Methanol, Chloroform

2. Peroxide value solvent: ผสม glacial acetic 300 มิลลิลิตร กับ 200 มิลลิลิตร Chloroform

3. 0.01 N sodium thiosulphate

4. สารละลายอิ่มตัวโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI sat.)

ละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ปริมาณมากเกินพอในน้ำต้มใหม่ ๆ แล้วเก็บในที่มืดและทดสอบก่อนใช้ โดยเติมสารละลายผสมกรดแอซิติกและคลอโรฟอร์มอัตราส่วน 3 : 2 ในปริมาณ 0.5 – 30 มิลลิลิตรแล้วหยดน้ำแป้งลงไป 2 – 3 หยด ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินให้ทิ้งไปและเตรียมใหม่

5. 1% น้ำแป้ง

ชั่ง soluble starch 1 กรัม ละลายในน้ำเล็กน้อยเทลงในน้ำต้มเดือด 100 มิลลิลิตรแล้วต้มต่อ 1 นาที วางให้เย็นและเก็บในที่มืดและเย็น

วิธีการสกัดไขมัน ดัดแปลงจากวิธี Bligh and Dyer Methodการสกัดไขมัน

1.ชั่งตัวอย่างปลาป่นตามปริมาณไขมันที่ต้องการโดยเทียบกับ % ไขมันในแต่ละตัวอย่างลงในหลอดสำหรับโฮโมจีไนส์ ขนาด 200 มิลลิลิตร (ในการทดลองใช้ Blender)

2. ปรับปริมาณน้ำในตัวอย่างให้มีปริมาตรเท่ากับ 16 มิลลิลิตร เช่นปลาป่นความชื้น 1% ปริมาณ 2 กรัม ต้องเติมน้ำ 16 มิลลิลิตร

3. ปิเปตคลอโรฟอร์ม 20 มิลลิลิตร และเมทธานอล 40 มิลลิลิตร แล้วโฮโมจีไนส์ เป็นเวลา 2 นาที (ระหว่างการโฮโมจีไนส์จะต้องแช่หลอดที่บรรจุตัวอย่างและสารละลายผสมในน้ำผสมน้ำแข็ง)

4. ปิเปตคลอโรฟอร์ม อีก 20 มิลลิลิตร และโฮโมจีไนส์อีก 30 วินาที

5. เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร และโฮโมจีไนส์ต่ออีก 30 วินาที

6. กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง whatman No.1 (เครื่องปั๊มสุญญากาศ)

7. เทสารละลายที่ได้ลงในกรวยแยก (separatory funnel) ขนาด 250 – 500 มิลลิลิตร

8. เขย่าให้เข้ากันอย่างแรงเป็นเวลา 2 – 3 นาที

9. ตั้งทิ้งให้สารละลายแยกชั้น (ทำในที่มืด หรือห่อ foil เพื่อป้องกันไขมันเกิดออกซิเดชัน) โดยจะแยกเป็น 3 ชั้น ชั้นล่างสุดจะเป็นส่วนผสมของไขมันละลายในคลอโรฟอร์ม ชั้นกลางเป็นปลาและน้ำ ส่วนชั้นบนจะเป็นชั้นของเมทธานอล

10. ไขเอาส่วนล่างที่เป็นคลอโรฟอร์มและไขมันออกลงในบีกเกอร์ที่รู้น้ำหนักแล้ว

11. นำไประเหยเอาคลอโรฟอร์มออกในน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิเท่ากับจุดเดือดของคลอโรฟอร์มเพื่อ ความรวดเร็วใช้เครื่องระเหย (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิของ water bath $40^{\circ}C$

12. หาปริมาณไขมันรวมในตัวอย่างปลาป่นแต่ละแหล่งโดยทำการสกัดไขมันตั้งแต่ข้อ 1 – 10 แล้วนำไปอบที่ $80^{\circ}C$ นาน 1 ชั่วโมงหรือจนกว่าสารละลายคลอโรฟอร์มหมดไปแล้วจึงชั่งหาเปอร์เซ็นต์ไขมัน

13. ชั่งน้ำหนักของไขมันและคลอโรฟอร์มที่ได้จากข้อ 10 แล้วเทียบหาน้ำหนักไขมันจริง ๆ โดยเทียบกับเปอร์เซ็นต์ไขมันจากข้อ 11 แล้วนำไปทดลองหาค่า peroxide และ FFA ต่อไป

วิธีการวิเคราะห์ค่า PV

1. ชั่งตัวอย่างน้ำมัน 0.5–1.0 กรัมที่สกัดได้จากวิธี Bligh and Dyer method ลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. เติม peroxide value solvent 25 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากันดี

3. เติม 1 มิลลิลิตร Potassium iodide อิ่มตัว ปิดจุก แล้วเขย่านาน 1 นาที แล้วตั้งเก็บในที่มืด 5 นาที เติมน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร

4. เติมน้ำแป้ง 1% 0.5 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง แล้วไตเตรทด้วย 0.01 N sodium thiosulphate จนสีม่วงจางหายไป

5. ทำค่า blank โดยไม่มีสารตัวอย่างด้วยวิธีการเดียวกัน

การคำนวณ

$$\text{Peroxide value (mill-equivalents/100g)} = \frac{(S-B) \times N \times 100}{W}$$

เมื่อ S = ค่า มิลลิลิตร ของ sodium thiosulphate ไตเตรทตัวอย่าง

B = ค่า มิลลิลิตร ของ sodium thiosulphate ไตเตรท blank

N = Normality ของ thiosulphate

W = น้ำหนักตัวอย่างเป็นกรัม

2.5 การหาค่าของกรด (Acid Value) (Uchiyama, 1973)

สารเคมี

1. N/50 KOH ethanol (0.02 N KOH ใน ethyl alcohol)

เตรียมโดยชั่ง KOH 5.6 กรัม ละลายในน้ำและทำปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ใช้สารละลายนี้ 20 มิลลิลิตรทำให้ปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วย ethanol

2. n-Hexane

3. 1 % phenolphthalein ใน ethanol เป็น indicator เตรียม phenolphthalein 1 กรัม ละลายใน ethanol 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ใช้สารละลายไขมันจากวิธีการสกัดไขมันด้วยวิธี Bligh and Dyer Method ให้มีน้ำหนักไขมันประมาณ 0.1 – 1 กรัม ใส่ใน erlenmeyer flask

2. เติม n – Hexane ปริมาณ 10 เท่าของปริมาตรที่ใช้ตามข้อ 1 และหยด phenolphthalein indicator 1 – 2 หยด

3. ไตเตรทสารละลายนี้ด้วย N/50 KOH ethanol end point จะเป็นสีชมพูคงที่อยู่เป็นเวลาประมาณ 30 วินาที

4. Blank ทำเช่นเดียวกัน โดยใช้สารละลาย C-M ปริมาณเท่ากับข้อ 1

การคำนวณ

$$\text{Acid Value} = \frac{56.1 \times N \text{ of KOH } (V_S - V_B)}{W_S}$$

เมื่อ N of KOH = normality ของ KOH

V_S = ปริมาตรของ KOH ที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

V_B = ปริมาตรของ KOH ที่ใช้ไตเตรทแบลงค์

W_S = น้ำหนักของไขมัน

2.6 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระ (Free Fatty Acid, FFA) (Uchiyama, 1973)

$$FFA = \frac{\text{Acid Value} \times \text{MW of Oleic acid} \times 10/1000}{\text{Mol.MW of KOH}}$$

$$= \frac{\text{Acid Value} \times 282.27 \times 1/100}{56.11}$$

โดยปกติ FFA คำนวณในรูปของ Oleic acid โดย 0.1 N KOH จำนวน 1 มิลลิลิตร = 0.0282 g oleic acid ดังนั้น Acid Value จึงมีค่าเท่ากับ 2 FFA

2.7 การวิเคราะห์ค่า Anisidine value (IUPAC, 1979)

อุปกรณ์

1. หลอดทดลองขนาด 10 มล. พร้อมฝาปิด
2. Volumetric flaskขนาด 25 มล.
3. Autopipette ขนาด 1 มล.
4. Spectrophotometer
5. Glass cells ขนาด 1.00

สารเคมี

1. Iso – octane
2. Glacial acetic acid
3. *p*- Anisidine

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 0.5-4 กรัม ใส่ใน Volumetric flaskขนาด 25 มล. ละลายและเจือจางด้วย Iso – octane (ตัวอย่างจะต้องสะอาดและแห้ง)

2. นำสารละลายตัวอย่างไปวัดด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ 350 นาโนเมตร (A_b) โดยใช้ solvent เป็น blank

3. ใช้ autopipette ดูดสารละลายไขมัน 5 มล. ใส่ในหลอดทดลอง 1 หลอด และเติม Iso–octane ปริมาตร 5 มล. ลงในหลอดทดลองหลอดที่ 2

4. ใช้ autopipette ดูด *p*- Anisidine ปริมาตร 1 มล. เติมลงในหลอดทดลองทั้ง 2 หลอด เขย่าให้เข้ากัน

5. วางทิ้งไว้ 10 นาที นำสารละลายที่ได้ทั้ง 2 หลอดไปวัดด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ 350 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายในหลอดที่ 2 เป็น blank (A_s)

การคำนวณ

$$AnV = \frac{25 \times (1.2\ A_s - A_b)}{M}$$

เมื่อ A_s = ค่า OD ที่วัดได้จากหลอดที่ผสม *p*- Anisidine

A_b = ค่า OD ที่วัดสารละลายของน้ำมันตัวอย่าง

M = น้ำหนักตัวอย่างน้ำมัน (กรัม)

3. การวิเคราะห์หาปริมาณอีทอกซิควินในปลาป่น (AOAC, 1998)

อุปกรณ์

1. Micro centrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร
2. Volumetric pipette ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. Vortex
4. Centrifuge
5. ขวด vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
6. กระดาษกรอง 0.2 ไมโครเมตร
7. ขวด Duran ขนาด 1 ลิตร
8. เครื่อง HPLC (High performance liquid chromatography)

สารเคมี

1. Acetonitrile
2. Ammonium acetate

วิธีการ

1. ชั่งปลาป่น 0.06 – 0.1 กรัม ใส่ใน micro centrifuge tube

2. ดูด acetonitrile 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีปลาป่น ปิดฝาให้แน่น

3. เขย่าให้ผสมกันด้วย vortex นาน 1 นาที วางทิ้งไว้ 20 นาที แล้วเขย่าด้วย vortex อีกครั้งนาน 1 นาที

4. ทำให้ตกตะกอนโดยการ centrifuge ที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

5. กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรองรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร

6. เตรียมสารละลายอีทอกซิควินมาตรฐาน ให้มีความเข้มข้น 400 300 200 100 80 20 10 และ 0.1 ppm

7. นำตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งมี condition ดังนี้

Column : C_{18} ขนาด 250 x 4.6 นาโนเมตร

Mobile phase : Acetonitrile : Ammonium acetate = 70:30

Detector : Fluorescence

- Excitation 360 nm

- Emission 432 nm

Temperature : 35 องศาเซลเซียส

Flow rate : 1.3 ไมโครลิตร ต่อ นาที (Pressure = 145 bar)

Injection volumn : 20 ไมโครลิตร

การคำนวณ

ปริมาณอีทอกซิควิน (ppm) = (C x 1.5 x F) / W

เมื่อ C = จาก LC curve (ppm)

F = dilution factor

W = weight of sample (g)

4. การตรวจสอบด้วยวิธี Feed microscopic technique (เยาวมาลย์ ค้าเจริญ, 2546)

4.1 การทดสอบการเสื่อมสภาพของปลาป่น

สารเคมี

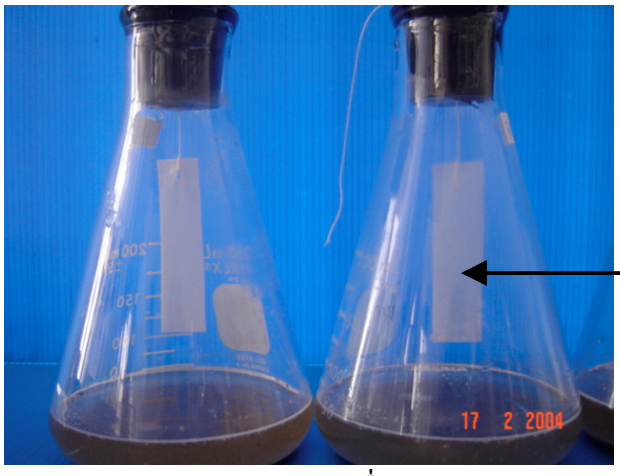
1. 10% H_2SO_4
2. สารละลายอิ่มตัวเลดอะซิเตท

อุปกรณ์

1. ขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร พร้อมจุกคอร์ก
2. กระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 4 ขนาดกว้าง 0.5 ยาว 2 นิ้ว
3. ตู้อบ

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างปลาป่นประมาณ 1–2 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เติม 10% H_2SO_4 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่
3. จุ่มกระดาษกรองเบอร์ 4 ที่ชุบด้วยสารละลายอิ่มตัวของเลดอะซิเตท (lead acetate) โดยให้กระดาษกรองห้อยอยู่ตรงกลางของฟล๊าสค์ (ภาพที่ 2) ปิดจุกคอร์กให้สนิท และฉีดน้ำที่บริเวณปากขวดเพื่อป้องกันไม่ให้ก๊าซออกมาได้
4. แล้วนำไปตั้งทิ้งไว้ในห้องที่มีอากาศค่อนข้างร้อนหรืออบที่อุณหภูมิ 45° C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ถ้ากระดาษกรองมีสีดำเกิดขึ้นทันทีหรือภายใน 2 ชั่วโมง แสดงว่าปลาป่นที่ทดสอบนั้นเสื่อมสภาพแล้ว นำไปใช้เลี้ยงสัตว์ไม่ได้



การตรวจสอบความเสื่อมในปลาป่น

4.2 การตรวจสอบสารนันโปรตีนไนโตรเจน (Non Protein Nitrogen)

สารเคมี

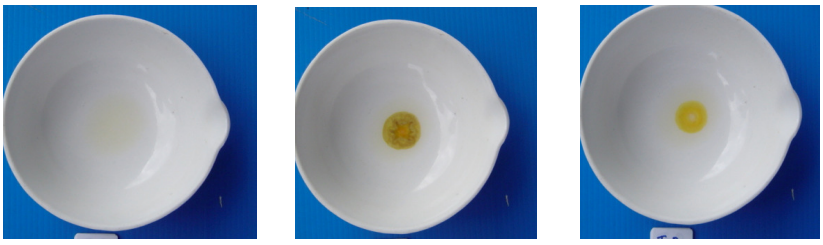
สารละลายเมอคิวริคโปตัสเซียมไอโอไดด์ : ชั่ง 1.25 กรัม เมอคิวริคคลอไรด์ (mercuric chloride) เติมน้ำลงไปละลาย 5 มิลลิลิตร แล้วใส่โปตัสเซียมไอโอไดด์ (potassium iodide) 3.5 กรัม เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (12 กรัม โซเดียมไฮดรอกไซด์ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 4–5 กรัม ใส่ลงไปในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 60–80 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 2–3 นาที แล้วกรองเอาน้ำเพื่อใช้ในการทดสอบ

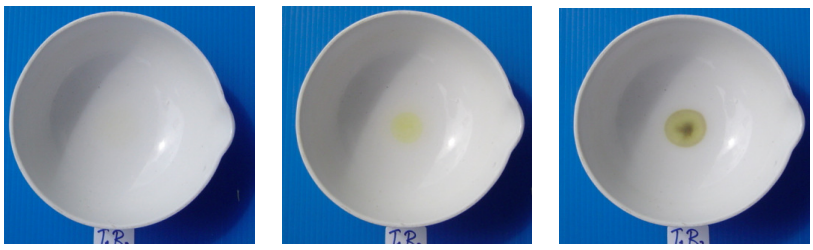
2. หยดตัวอย่างที่ทดสอบ 3–5 หยด ลงในถาดหลุมเคลือบสีขาว 3–5 หยด

3. หยดสารละลายเมอคิวริคโปตัสเซียมไอโอไดด์ 2–3 หยด ถ้ามีตะกอนสีเหลืองแสดเกิดขึ้นแสดงว่าสารตัวอย่างมีสารนันโปรตีนไนโตรเจนปนปลอมยิ่งพบตะกอนแสดมากแสดงว่ามีนันโปรตีนปลอมปนมาก แต่ถ้ามีตะกอนสีแสดเกิดขึ้นเล็กน้อย แสดงว่าตัวอย่างปลาป่นนั้นเสื่อมคุณภาพเก็บไว้นานหรือกระบวนการผลิตไม่ได้มาตรฐาน ซึ่งจะทำให้โปรตีนเสื่อมสลายเกิดนันโปรตีนไนโตรเจน



ก่อนหยดสารทดสอบ หยดสารทดสอบ หลังหยดสารทดสอบ

ผลการตรวจสอบเป็นบวก



ก่อนหยดสารทดสอบ หยดสารทดสอบ หลังหยดสารทดสอบ

ผลการตรวจสอบเป็นลบ

ผลการตรวจสอบนันโปรตีนไนโตรเจนในปลาป่น

4.4 การตรวจสอบขนไก่ไฮโดรไลซ์ในปลาป่น

สารเคมี

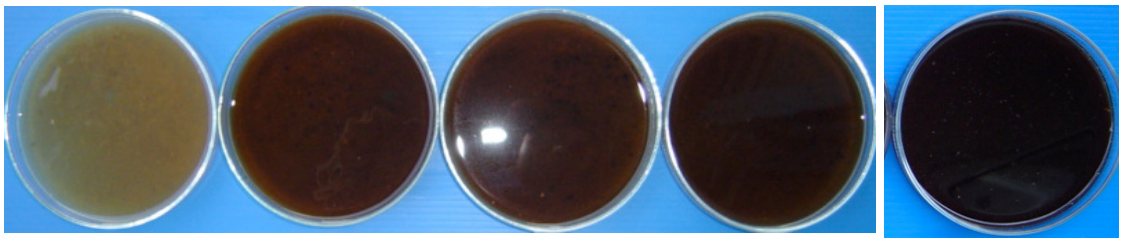
1. สารละลายเอ: สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10%
2. สารละลายบี: ละลาย 50 กรัมเลดอะซิเตตในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติมกรดน้ำส้มเข้มข้น (glacial acetic acid) 20 มิลลิลิตร คนให้ผสมกันแล้วค่อยๆ เติมกลีเซอรอล (glycerol) 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรทั้งหมดให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

อุปกรณ์

1. จานเลี้ยงเชื้อ (plate)
2. ขนไก่ไฮโดรไลซ์

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ 2 ชุด พร้อมทั้งตัวอย่างขนไก่ไฮโดรไลซ์ ซึ่งใช้เป็นตัวอย่างมาตรฐานในการทดสอบเปรียบเทียบ
2. ใส่สารละลายเอ ประมาณ 10-15 มิลลิลิตร ลงในจานทดสอบทั้ง 2 ชุด หมุนจานทดสอบให้สารละลายเอผสมกับตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ 10 นาที
3. เติมสารละลายบี ในจานทดสอบชุดที่ 2 ประมาณ 10-15 มิลลิลิตร ส่วนจานชุดที่ 1 ให้ใส่น้ำกลั่นแทน หมุนจานทดสอบให้สารละลายผสมกัน ทิ้งไว้ 10 นาที
4. สังเกตสีที่เกิดขึ้นในระหว่างที่ตั้งทิ้งไว้ในจานทั้ง 2 ชุด เปรียบเทียบกันและเปรียบเทียบกับจานที่ใส่ขนไก่ไฮโดรไลซ์ด้วย จานขนไก่ไฮโดรไลซ์ชุดที่ 2 ที่เติมสารละลายบี จะเกิดสีน้ำตาลดำเข้มขึ้นเรื่อยๆ ส่วนจานชุดที่ 1 ที่ไม่เติมสารละลายบี จะไม่เปลี่ยนสีหลังจากตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วให้เปรียบเทียบตัวอย่างปลาป่นที่ทดสอบในจานชุดที่ 1 และ 2 ถ้าจานชุดที่ 2 มีสีน้ำตาลเข้มกว่าชุดที่ 1 แสดงว่าปลาป่นที่ทดสอบมีขนไก่ไฮโดรไลซ์ปลอมปน



Blank T_1R_1 T_2R_2 T_3R_3 T_1+ ขนไก่ 10%

ผลการตรวจสอบขนไก่ไฮโดรไลซ์ในปลาป่น

5. วิธีการศึกษาพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตามวิธีของ Bancroft (1967) และ Humason (1972)

สารเคมี

1. น้ำยาดองเดวิดสัน (Davidson's fixative) Bell และ Lightner (1988)

95% ethyl alcohol	330	มิลลิลิตร
100% formalin (formaldehyde 37–39%)	220	มิลลิลิตร
glacial acetic acid	115	มิลลิลิตร
tap water	335	มิลลิลิตร

2. สีย้อมฮีมาทอกซิลิน (haematoxylin) เตรียมโดยใช้

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

ละลายอลัมลงในน้ำกลั่นเติมฮีมาทอกซิลินผสมจนละลายหมดจึงเติมโซเดียมไอโอเดทผสมให้เข้ากันจากนั้นเติมกรดซิตริกและคลอรัลไฮเดรทผสมจนเป็นเนื้อเดียวกันทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้งาน

3. สีย้อมอีโอซิน (eosin) เตรียมโดยใช้

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

การเตรียมตัวอย่าง

ฉีดน้ำยาดองเดวิดสันบริเวณหัวใจ ตับอ่อน ส่วนหัว กล้ามเนื้อลำตัวให้ทั่วแล้วตัดส่วนหัวกุ้งออกเป็นสองซีกนำกล้ามเนื้อลำตัวตัดตามขวางดองในขวดที่บรรจุน้ำยาดองเดวิดสันโดยให้น้ำยาท่วมตัวอย่างเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำยาดองซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ทั่วถึง ตัวอย่างที่นำมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อคือ เนื้อเยื่อตับอ่อน (hepatopancreatic tissue) เพียงชนิดเดียว ดองทิ้งไว้ไม่ควรเกิน72 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีของ Humason (1972 ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1) ขั้นตอนการ dehydration และ embedding

1. ตบแต่งตัวอย่าง (trim) ที่ผ่านการดองแล้วให้มีขนาดพอเหมาะเพื่อสะดวกต่อการ embed และนำไปตัด section บรรจุลงใน cassett สำหรับเนื้อเยื่อ

2. นำตัวอย่างไปผ่านขั้นตอน dehydration ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

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

3. นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนดึงน้ำออกแล้วไป embed ด้วยพาราพลาสท์ โดยใส่ใน mold และประกบด้วย embedding ring จากนั้นนำ block ไปแช่ตู้เย็นเพื่อง่ายต่อการนำไปตัด section ต่อไป

4. ตบแต่งตัวอย่างที่อยู่ใน block ให้มีขนาดพอดีกับขนาดสไลด์ และ cover glass ปิดได้สนิท จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อไมโครโตม (microtome) ให้มีความหนาประมาณ 3– 5 ไมครอน นำไปลอยในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45–50 องศาเซลเซียส

5. ใช้แผ่นสไลด์ช้อนตัวอย่าง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

6. นำสไลด์ที่อบแล้วไปผ่านกระบวนการย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน โดยมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	ไซลีน	2
2	ไซลีน	2
3	ไซลีน	2
4	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
5	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
6	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
7	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
8	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
9	น้ำกลั่น	1
10	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	แอบโซลูท แอลกอฮอล์	2
18	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
19	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
20	ไซลีน	2
21	ไซลีน	2
22	ไซลีน	2

7. mount slide ด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์ (permount) ปิดทับด้วย cover glass แล้วนำตัวอย่างไปศึกษาพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางสถิติของผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ ข. 1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของการทดลองที่ 1

1.1 ความแปรปรวนของโปรตีนในปลาป่นที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆ กัน

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	58.62186458	3.90812431	13.08	<.0001
Error	32	9.56073333	0.29877292		
Corrected Total	47	68.18259792			

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ETHQ	1	0.53130208	0.53130208	1.78	0.1918
Temp	1	1.13775208	1.13775208	3.81	0.0598
ETHQ*Temp	1	0.00316875	0.00316875	0.01	0.9186
Time	3	38.95792292	12.98597431	43.46	<.0001
ETHQ*Time	3	12.03685625	4.013228542	13.43	<.0001
Temp*Time	3	4.39373958	1.46457986	4.90	0.0065
ETHQ*Temp*Time	3	1.56112292	0.52037431	1.74	0.1782

1.2 ความแปรปรวนของไขมันในปลาป่นที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆ กัน

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	2.88736667	0.19249111	35.16	<.0001
Error	32	0.17520000	0.00547500		
Corrected Total	47	3.06256667			

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ETHQ	1	0.08003333	0.08003333	14.62	0.0006
Temp	1	0.00040833	0.00040833	0.07	0.7865
ETHQ*Temp	1	0.00067500	0.00067500	0.12	0.7278
Time	3	2.24536667	0.74845556	136.70	<.0001
ETHQ*Time	3	0.32403333	0.10801111	19.73	<.0001
Temp*Time	3	0.20375833	0.07125278	13.01	<.0001
ETHQ*Temp*Time	3	0.02309167	0.00769722	1.41	0.2591

1.3 ความแปรปรวนของเถ้าในปลาป่นที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆ กัน

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	7.86546667	0.52436444	10.02	<.0001
Error	32	1.67460000	0.05233425		
Corrected Total	47	9.54006667			

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ETHQ	1	0.16567500	0.16567500	3.17	0.0847
Temp	1	0.00083333	0.00083333	0.02	0.9004
ETHQ*Temp	1	0.00367500	0.00367500	0.07	0.7927
Time	3	7.26088333	2.42029444	46.25	<.0001
ETHQ*Time	3	0.05854167	0.01951389	0.37	0.7731
Temp*Time	3	0.10081667	0.03360556	0.64	0.5935
ETHQ*Temp*Time	3	0.27504167	0.09168056	1.75	0.1762

1.4 ความแปรปรวนของความชื้นในปลาป่นที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆ กัน

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	495.5073479	33.0338232	3684.07	<.0001
Error	32	0.2869333	0.0089667		
Corrected Total	47	495.7942813			

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ETHQ	1	0.5786021	0.5786021	64.53	<.0001
Temp	1	27.5578521	27.5578521	3073.37	<.0001
ETHQ*Temp	1	1.4595188	1.4595188	162.77	<.0001
Time	3	438.5266563	146.1755521	16302.1	<.0001
ETHQ*Time	3	0.4482396	0.1494132	16.66	<.0001
Temp*Time	3	25.9739563	8.6579854	965.57	<.0001
ETHQ*Temp*Time	3	0.9625229	0.3208410	35.78	<.0001

1.5 ความแปรปรวนของค่า PV ในปลาป่นที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆ กัน

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	83.99639167	5.59975944	161.67	<.0001
Error	32	1.10840000	0.03463750		
Corrected Total	47	85.10479167			

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ETHQ	1	20.98807500	20.98807500	605.94	<.0001
Temp	1	1.56240833	1.56240833	45.11	<.0001
ETHQ*Temp	1	0.02707500	0.02707500	0.78	0.3832
Time	3	26.51304167	8.83768056	255.15	<.0001
ETHQ*Time	3	24.55364167	8.18454722	236.29	<.0001
Temp*Time	3	8.40940833	2.80313611	80.93	<.0001
ETHQ*Temp*Time	3	1.94274167	0.64758056	18.70	<.0001

1.6 ความแปรปรวนของค่า TBARS ในปลาป่นที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆ กัน

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	17435.49679	1162.36645	3769.40	<.0001
Error	32	9.86780	0.30837		
Corrected Total	47	17445.36459			

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ETHQ	1	2614.58641	2641.58641	8478.77	<.0001
Temp	1	88.50901	88.50901	287.02	<.0001
ETHQ*Temp	1	36.15741	36.15741	117.25	<.0001
Time	3	11838.17889	3946.05963	12796.6	<.0001
ETHQ*Time	3	2472.78116	824.26039	2672.97	<.0001
Temp*Time	3	361.22196	120.40732	390.47	<.0001
ETHQ*Temp*Time	3	24.06196	8.02065	26.01	<.0001

1.7 ความแปรปรวนของค่า AnV ในปลาป่นที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆ กัน

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	1831.404231	122.093615	429.55	<.0001
Error	32	9.095467	0.284233		
Corrected Total	47	1840.499698			

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ETHQ	1	412.6027688	412.6027688	1451.63	<.0001
Temp	1	47.1042188	47.1042188	165.72	<.0001
ETHQ*Temp	1	0.1716021	0.1716021	0.60	0.4429
Time	3	926.1304896	308.7101632	1086.12	<.0001
ETHQ*Time	3	405.8915229	135.2971743	476.01	<.0001
Temp*Time	3	21.5286729	7.1762243	25.25	<.0001
ETHQ*Temp*Time	3	17.9749562	5.9916521	21.08	<.0001

1.8 ความแปรปรวนของค่า FFA ในปลาป่นที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆ กัน

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	3056.083581	203.738905	3541.75	<.0001
Error	32	1.840800	0.057525		
Corrected Total	47	3057.924381			

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ETHQ	1	84.402552	84.402552	1467.23	<.0001
Temp	1	258.680102	258.680102	4496.83	<.0001
ETHQ*Temp	1	0.188752	0.188752	3.28	0.0795
Time	3	1984.955023	661.651674	11502.0	<.0001
ETHQ*Time	3	484.958756	161.652919	2810.13	<.0001
Temp*Time	3	236.925073	78.975024	1372.88	<.0001
ETHQ*Temp*Time	3	5.973323	1.991108	34.61	<.0001

1.9 ความแปรปรวนของค่า TVN ในปลาป่นที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆ กัน

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	58.62186458	3.90812431	13.08	<.0001
Error	32	9.56073333	0.29877292		
Corrected Total	47	68.18259792			

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ETHQ	1	0.53130208	0.53130208	1.78	0.1918
Temp	1	1.13775208	1.13775208	3.81	0.0598
ETHQ*Temp	1	0.00316875	0.00316875	0.01	0.9186
Time	3	38.95792292	12.98597431	43.46	<.0001
ETHQ*Time	3	12.03685625	4.01228542	13.43	<.0001
Temp*Time	3	4.39373958	1.46457986	4.90	0.0065
ETHQ*Temp*Time	3	1.56112292	0.52037431	1.74	0.1782

1.10 ความแปรปรวนของ ค่า L^* ของปลาป่นที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆ กัน

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	28.20250000	1.88016667	112.19	<.0001
Error	32	0.53626667	0.01675833		
Corrected Total	47	28.73876667			

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ETHQ	1	0.07363333	0.07363333	4.39	0.0441
Temp	1	8.70403333	8.70403333	519.39	<.0001
ETHQ*Temp	1	1.33333333	1.33333333	79.56	<.0001
Time	3	11.13321667	3.71107222	221.45	<.0001
ETHQ*Time	3	0.13115000	0.04371667	2.61	0.0686
Temp*Time	3	5.87951667	1.95983889	116.95	<.0001
ETHQ*Temp*Time	3	0.94761667	0.31587222	18.85	<.0001

1.11 ความแปรปรวนของ ค่า a^* ของปลาป่นที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆ กัน

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	3.16784792	0.21118986	89.87	<.0001
Error	32	0.07520000	0.00235000		
Corrected Total	47	3.24304792			

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ETHQ	1	0.01725208	0.01725208	7.34	0.0107
Temp	1	1.69876875	1.69876875	722.88	<.0001
ETHQ*Temp	1	0.02210208	0.02210208	9.41	0.0044
Time	3	0.66685625	0.22228542	94.59	<.0001
ETHQ*Time	3	0.04068958	0.01356319	5.77	0.0028
Temp*Time	3	0.71287292	0.23762431	101.12	<.0001
ETHQ*Temp*Time	3	0.00930625	0.00310208	1.32	0.2850

1.12 ความแปรปรวนของ ค่า b^* ของปลาป่นที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆ กัน

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	36.86805833	2.45787056	75.93	<.0001
Error	32	1.03586667	0.03237083		
Corrected Total	47	37.90392500			

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ETHQ	1	0.53340833	0.53340833	16.48	0.0003
Temp	1	20.15020833	20.15020833	622.48	<.0001
ETHQ*Temp	1	0.46807500	0.46807500	14.46	0.0006
Time	3	5.48550833	1.82850278	56.49	<.0001
ETHQ*Time	3	0.64217500	0.21405833	6.61	0.0013
Temp*Time	3	8.45930833	2.81976944	87.11	<.0001
ETHQ*Temp*Time	3	1.12937500	0.37645833	11.63	<.0001

1.13 ความแปรปรวนของ ค่า ΔE^*_{ab} ของปลาป่นที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆ กัน

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	30.43000	2.76636364	99.90	<.0001
Error	24	0.664600	0.02769167		
Corrected Total	35	31.0946000			

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ETHQ	1	0.3969000	0.3969000	14.33	0.0009
Temp	1	21.40604444	21.40604444	773.01	<.0001
ETHQ*Temp	1	0.00250000	0.00250000	0.09	0.7664
Time	2	4.88701667	2.44350833	88.24	<.0001
ETHQ*Time	2	0.17735000	0.08867500	3.20	0.0585
Temp*Time	2	1.80067222	0.90033611	32.51	<.0001
ETHQ*Temp*Time	2	1.75951667	0.87975833	31.77	<.0001

1.14 ความแปรปรวนของปริมาณ Ethoxyquin ในปลาป่นที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆ กัน

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	39794.49678	5684.92811	14423.6	<.0001
Error	16	6.30627	0.39414		
Corrected Total	23	39800.80305			

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ETHQ	1	6255.21882	6255.21882	15870.5	<.0001
Temp	3	30929.71995	10309.90665	26157.9	<.0001
ETHQ*Temp	3	2609.55802	869.85267	2206.95	<.0001

ตารางภาคผนวกที่ ข. 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของการทดลองที่ 2

2.1 ความแปรปรวนของน้ำหนักกุ้งกุลาดำเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

Source	Df	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Between groups	4	15.619	3.905	29.124	.000
Within groups	25	3.352	.134		
Total	29	18.971			

2.2 ความแปรปรวนของน้ำหนักอาหารที่กิน

Source	Df	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Between groups	4	68.567	17.142	24.830	.000
Within groups	25	17.259	0.690		
Total	29	85.826			

2.3 ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์น้ำหนักกุ้งกุลาดำที่เพิ่มขึ้นต่อวัน เมื่อเลี้ยงนาน 60 วัน

Source	Df	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Between groups	4	2256634	564158.554	14.819	.000
Within groups	25	951780.4	38071.214		
Total	29	3208415			

2.4 ความแปรปรวนของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 60 วัน

Source	Df	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Between groups	4	3.620	.905	17.755	.000
Within groups	25	1.274	.051		
Total	29	4.894			

2.5 ความแปรปรวนของอัตราการแลกอาหารเป็นเนื้อของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 60 วัน

Source	Df	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Between groups	4	1.444	.361	5.446	.003
Within groups	25	1.657	.066		
Total	29	3.100			

2.6 ความแปรปรวนของประสิทธิภาพการใช้โปรตีนของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 60 วัน

Source	Df	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Between groups	4	.170	.042	5.760	.002
Within groups	25	.184	.073		
Total	29	.354			

2.7 ความแปรปรวนของการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 60 วัน

Source	Df	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Between groups	4	297.334	74.333	6.088	.001
Within groups	25	305.245	12.210		
Total	29	602.579			

2.8 ความแปรปรวนของอัตราการรอดตายของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 60 วัน

Source	Df	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Between groups	4	120.533	30.133	.492	.741
Within groups	25	1530.667	61.227		
Total	29	1651.200			

2.9 ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์โปรตีนของกุ้งกุลาดำเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

Source	Df	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Between groups	4	3.178	.794	.599	.667
Within groups	25	33.174	1.327		
Total	29	36.352			

2.10 ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ไขมันของกุ้งกุลาดำเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

Source	Df	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Between groups	4	2.779	.238	1.035	.409
Within groups	25	16.919	.230		
Total	29	19.698			

2.11 ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์เถ้าของกุ้งกุลาดำเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

Source	Df	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Between groups	4	6.625	1.656	3.555	.020
Within groups	25	11.648	.466		
Total	29	18.273			

2.12 ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ความชื้นของกุ้งกุลาดำเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

Source	Df	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Between groups	4	1.990	.497	2.098	.111
Within groups	25	5.926	.237		
Total	29	7.915			

ภาคผนวก ค

อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ห้องเก็บปลาป่น องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ อุณหภูมิน้ำและคุณภาพน้ำ

ตารางภาคผนวกที่ ค. 1 อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) และความชื้นสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์) ของห้องที่เก็บรักษาปลาป่นที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 4.5 เดือน

	0-1.5 เดือน		1.5-3 เดือน		3-4.5 เดือน	
	ต่ำสุด	สูงสุด	ต่ำสุด	สูงสุด	ต่ำสุด	สูงสุด
อุณหภูมิ (°ซ)	29	32	27	29	27	31
ความชื้นสัมพัทธ์ (%)	65	81	69	84	72	82

ตารางภาคผนวกที่ ค. 2 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตอาหารทดลองบนฐานของน้ำหนักแห้ง [1]

วัตถุดิบ	องค์ประกอบทางเคมี (%)			
	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
ปลาป่นชุดควบคุม	2.75 ± 0.10	72.21±0.92	11.66 ±0.08	18.06±0.29
ปลาป่นสูตรที่ 2	4.29±0.19	70.32±0.80	11.32±0.23	18.28±0.59
ปลาป่นสูตรที่ 3	8.95±0.24	70.64±0.64	11.17±0.10	18.68±0.65
ปลาป่นสูตรที่ 4	12.36±0.33	69.76±0.99	11.29±0.18	18.79±0.14
ปลาป่นสูตรที่ 5	8.78±0.18	68.45±0.75	11.28±0.35	18.48±0.51
หมึกป่น	2.74 ± 0.04	80.05 ± 0.00	6.45 ± 0.36	7.43 ± 0.10
หวีดกลูเท่น	7.52 ± 0.08	76.46 ± 0.26	2.94 ± 0.44	1.22 ± 0.11
แป้งสาลี	8.35 ± 0.06	9.35 ± 0.02	0.79 ± 0.18	0.75 ± 0.15
แป้งข้าวเจ้า	8.67 ± 0.13	7.78 ± 0.01	0.85 ± 0.21	0.82 ± 0.01

[1] ค่าเฉลี่ยของ 3 ซ้ำ ± SD

ตารางภาคผนวกที่ ค. 3 อุณหภูมิของน้ำ (องศาเซลเซียส) ในตู้ทดลองที่ใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำในรอบวัน เป็นระยะเวลา 60 วัน

ระยะเวลา	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)					
	เช้า (7.00 น.)		เที่ยง (12.00 น.)		กลางคืน (23.00 น.)	
	ต่ำสุด	สูงสุด	ต่ำสุด	สูงสุด	ต่ำสุด	สูงสุด
22 มีนาคม - 21 เมษายน 2548	28	29	30	32	29	31
22 เมษายน - 21 พฤษภาคม 2548	27.5	29	29.5	32	28.5	31

ตารางภาคผนวกที่ ค. 4 คุณภาพน้ำในตู้ทดลองในระหว่างการเลี้ยงกุ้ง[1]

วันที่	pH	ความเค็ม (ส่วนในพันส่วน)	อัลคาไลน์นิตี้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	แอมโมเนียรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ไนไตรท์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
23 มีนาคม 2548	8.03	37	138	0.06	0.05
11 เมษายน 2548	7.95	35	130	0.08	0.05
25 เมษายน 2548	7.93	36	134	0.42	0.04
17 พฤษภาคม 2548	7.83	35	130	0.22	0.10
ค่าที่เหมาะสม (กุ้งทะเล)	7.8-8.5	10-35	80-150	ไม่เกิน 1.00	ไม่เกิน 0.10

[1] วิเคราะห์ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสตูล