รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

คณิต ไชยาคำ, ก่อเกียรติ กูลแก้ว, ธนาวุฒิ กล่าวเกลี้ยง, วาลุกา กฤตรัชตนันต์ และธวัชชัย ทองน้อย, 2541. **การเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อเป็นพ่อแม่พันธุ์ในบ่อดินที่จังหวัดสตูล**. ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสตูล. กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. กรมประมง. กรุงเทพ. 21 หน้า

ทวี จินดามัยกุล, 2533. **การทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำจากนากุ้งให้มีไข่แก่**. เอกสารวิชาการฉบับที่ 32/2533 ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งภูเก็ต กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. กรมประมง. กรุงเทพ. 16 หน้า.

นิเวศน์ เรืองพานิช สุจินต์ มณีวงศ์ ธิดา เพชรมณี และฐานันดร์ ทัตตานนท์, 2524. **การทดลองเร่งกุ้งกุลาดำให้มีไข่แกในบ่อ**. สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดสงขลา. กรมประมง.

ปิยะพงศ์ โชติพันธ์, 2528. **การเลี้ยงกุ้ง**. สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ. 78 หน้า.

ประจวบ หลำอุบล, 2543. **เสวนาวิชาการเรื่องกุ้ง**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ไพฑูรย์ อรรฆยานนท์ และทวี จินดามัยกุล. 2540. **ศึกษาการเลี้ยงแม่กุ้งบีบตาให้มีไข่แก่และผสมพันธุ์โดยใช้อาหารสดร่วมกับอาหารเม็ดที่เสริมด้วยวิตามินอีในระดับต่าง ๆ**. เอกสารวิชาการฉบับที่ 17/2540 ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งภูเก็ต กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. กรมประมง. กรุงเทพ. 9 หน้า.

บพิธ จารุพันธุ์ และนันทพร จารุพันธุ์, 2540. **สัตววิทยา**. ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ. 458 หน้า.

บรรจง เทียนส่งรัศมี, 2521. **หลักการเลี้ยงกุ้งทะเล**. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ. 117 หน้า.

บรรจง เทียนส่งรัศมี, 2533. การเร่งกุ้งกุลาดำ (Penaeus monodon) ให้วางไข่ในบ่อโดยการบีบตา. **วารสารการประมง**. 33(2): 199-212.

ประจวบ หลำอุบล, 2543. **เสวนาวิชาการเรื่องกุ้ง**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ. 155 หน้า.

มะลิ บุญยรัตผลิน, 2530. **อาหารและการให้อาหารกุ้งกุลาดำ**. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ. กรมประมง. กรุงเทพ. 63 หน้า.

เรณู ยาชิโร, วิชัย วัฒนกุล และนิเวศน์ เรืองพานิช, 2535. **ผลของการฉีดสเตอรอย์ฮอร์โมนต่อการพัฒนารังไข่ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon***. เอกสารวิชาการฉบับที่ 15/2535 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. กรมประมง. กรุงเทพ.

เรณู ยาชิโร และสมิง ทรงถาวรทวี, 2539. **การเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อเป็นพ่อแม่พันธุ์โดยวิธีลดความหนาแน่นและการย้ายบ่อ**. เอกสารวิชาการฉบับที่ 14/2539 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. กรมประมง. กรุงเทพ. 9 หน้า.

สกนธ์ แสงประดับ, 2534. **ผลของอาหาร แหล่ง และขนาดของแม่พันธุ์ที่มีต่อการพัฒนารังไข่และการวางไข่ ของกุ้งกุลาดำ (Penaeus monodon Fabricius)**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต วิทยาศาสตร์ทางทะเล. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพ.

สิทธิโชค จันทร์ย่อง, 2545. **ผลของความเค็มต่างระดับและเกลือแร่บางชนิดต่อการพัฒนารังไข่และการวางไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ**. วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต วิทยาศาสตร์ทางทะเล. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ.

สมบูรณ์ หลาวประเสริฐ, 2528. **การเร่งกุ้งกุลาดำให้มีไข่แก่โดยวิธีการบีบตา**. รายงานวิชาการฉบับที่ 8/2528 สถานีประมงน้ำกร่อย จังหวัดระยอง. กองประมงน้ำกร่อย กรมประมง.

สมบูรณ์ หลาวประเสริฐ และพิทักษ์ พลขันธ์, 2527. **เปรียบเทียบการสร้างไข่ของกุ้งกุลาดำตัดตาที่เลี้ยงในบ่อกลางแจ้งและที่ร่ม**. เอกสารวิชาการฉบับที่ 8/2527 สถานีประมงน้ำกร่อยจังหวัดระยอง กองประมงน้ำกร่อย. กรมประมง. กรุงเทพ. 28 หน้า.

สุพล ตั่นสุวรรณ, 2541. **การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อดินให้เป็นพ่อแม่พันธุ์**. เอกสารวิชาการฉบับที่ 8/2541 สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดปัตตานี กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. กรมประมง. กรุงเทพ. 24 หน้า.

สุพล ตั่นสุวรรณ และนิเวศน์ เรืองพานิช, 2541. **ผลของความเค็มต่อการพัฒนาของรังไข่และการผสมพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ได้จากบ่อเลี้ยง**. เอกสารทางวิชาการฉบับที่ 17/2541 สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดปัตตานี กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. กรมประมง. กรุงเทพ. 14 หน้า.

ศักดิ์ชัย โชติคุณ, เกรียงศักดิ์ เผด็จภัย และสุพจน์ ณ บางช้าง, 2528. **เปรียบเทียบผลการตัดตากุ้งกุลาดำจากนากุ้งและจากธรรมชาติ**. วารสารการประมง. 38(4):285-293.

อนุตรา อัครจามร, 2534. **การศึกษาทางเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำ**. วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต วิทยาศาสตร์การประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ.

อินเทคค์เวฟ, 2547. เพาะเลี้ยงแม่เพรียง อีกทางเลือกอาหารแม่กุ้งไทย. **อินเทคค์เวฟ**. 3 มค. 2547. หน้า 19.

ภาษาอังกฤษ

Alava, V.R. , Kanazawa, A., Teshima, S., Koshio, S., 1993. Effect of dietary vitamin A, E and C on the ovarian davelopment of *Penaeus japonicus*. **Nippon Suisan Gakkaishi** 59(7):1235-1241. cited after Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J. and Sorgeloos, P., 2001b. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. **Aquculture**. 202: 1-21.

Alava, V.R. and Lim, C., 1983. The quantitative dietary protein requirements of *Penaeus monodon* juveniles in a controlled environment. **Aquacuture**.30:53-61.

Albores, F.V.and Ochoa, J.L., 1992. Variation of pH, sodium and potassium concentration in the haemolymph of sub-adult blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) according to size. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 102 : 1-5.

Anggoro, S. and Prayitno, S.B., 1999. **Osmotic works, Na-K-ATPase activity and feed efficiency of tiger shrimp juveniles (*Penaeus monodon* Fabricius)**. Available from : Http://www.undip.ac.id/journal/june1999/463_496.html,May 27.

A.O.A.C., 1990. Official methods of Analysis. **Association of Aggricultural Chemist**. Washington,D.C.

Aranyakananda, P.and Lawrence, A.L., 1994. Effects of ingestion rate on dietary protien and energy requirements of *Penaeus vannamei* and the optimal protein to energy ratio. **Memorias 2 Simposio en Nutricion Acuicola**. Monterrey, Mexico, p.1-19. cited after Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J. and Sorgeloos, P., 2001b. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. **Aquculture**. 202: 1-21.

Bautiata, M.N., 1986. The response of *Penaeus monodon* juveniles to varying protein/energy ratios in test diets. **Aquaculture**.53:229-242.

Beard, T.W. and Wickins, J.F., 1980. Breeding of *Penaeus monodon* Fabricius in laboratory recirculation systems. **Aquaculture**. 25: 79-89.

Benzie, J.A.H., 1997. A review of the effect of genetics and environment on the maturation and larval quality of the gient tiger prawn *Penaeus monodon*. **Aquaculture**. 155: 69-85.

Bray, W.A.and Lawrence, A.L., 1992. Reproduction of *Penaeus* species in captivity. In : Fast, A., Lester, L.J.(Eds.), **Marine Shrimp Culture: Principles and Practices**. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp.93-170.

Bray, W.A., Lawrence, A.L., Lester L.J., 1990. Reproduction of eyestalk-ablated *Penaeus stylirostris* fed various levels of total dietary lipid. **Journal of the World Aquaculture Society**. 21: 41-52.

Cahu, C.L.,Guillaume, J.C., Stephan, G., Chim, L., 1994. Influence of phospholipid and highly unsaturated fatty acid on spawning rate and egg tissue composition in *Penaeus vannamei* fed semi-purified diets. **Aquaculture**. 126: 159-170.

Cahu, C.L., Cuzan, G., Quazuguel, P., 1995. Effect of the highly unsaturated fatty acids, slpha-tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 112: 417-424.

Caillouet, A.C., Jr., 1972. Ovarian maturation induced by eye ablation in pink shrimp *Penaeus duorarum* Burkenroad. **Journal of the World Mariculture Society**. 3: 205-225.

Chamberlain, G.W., 1988. **Stepwise investigation of environmental and nutritional requirements for reproduction of penaeid shrimp**. PhD. Dissertation, Department of Wildlife and Fisheries Science, Texas A&M University, TX, USA. cited after Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J. and Sorgeloos, P., 2001b. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. **Aquculture**. 202: 1-21.

Chamberlain, G.W.and Lawrence, A. L., 1981. Maturation, Reproduction and growth of *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris* fed natural diets. **Journal of the World Mariculture Society**. 12: 209-224.

Chen, H.Y., 1993. Recent advances in nutrition of *Penaeus monodon*. **Journal of the World Aquaculture Society**. 24(2): 231-240.

Clarke, A., Brown, J.H., Holmes, L.J.,1990. The biochemical composition of eggs from *Macrobrachium rosenberii* in relation to embryonic development. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 96:505-511.

Colvin, P.M., 1976. The effect of select seed oils on the fatty acid composition and growth of *Penaeus indicus*. **Aquaculture**. 8:81-89.

Coutteau, P., Pinon, E. and Balcazar,Y., 1998. Effect of a commercial maturation diet on broodstock performance of *Penaeus vannamei* in a commercial hatchery. **1st Latin American Shrimp Culture Congress and Exhibition**, Panama City, Panama. Abstract.

Crocos, P.J. and Kerr, J.D., 1986. Factors affecting induction of induction of maturation and spawning of the tiger prawn, *Penaeus esculentus*(Haswell) under laboratory conditions. **Aquculture**. 58: 203-204.

D'Abramo, L.R., 1990. Crustacean lipid requirement. In: J. Castell and K. Corprin (Editors). **Proceedings of the IWGCN Crustacean Nutrition Workshop**. Halifax. NS. Canada. 16-17 June.42-48. cited after Marsden, G.E., McGuren, J.J., Hansford, S.W., Burke, M.J., 1997. A moist artificial diet for prawn broodstock: its effect on the variable reproductive performance of wild caught *Penaeus monodon*. **Aquaculture**. 149: 145-156.

D'Abramo, L.R., 1997. Triacylglycerol and fatty acids. In : Halver, E. (Ed.), **Crustacean Nutrion, vol. 6**, World Aquaculture Society, Baton Rouge, L.A., pp.71-84.

Dall, W., Smith, D.M., Moore, L.E., 1995. Carotenoids in the tiger prawn *Penaeus esculentus* during ovarian maturation. **Mar biol**. 123(3). 435-441.

Deshimaru, O., 1982. Protein and amino acid nutrition of the prawn, *Penaeus japonicus*. In **Proceedings of the Second International Conference in Aquaculture Nutrition**. Rehboth Beach.

Deshimaru, O., Kuroki, K., 1974. Studies on a purified diet for prawn. II. Optimum contents of cholesterol and glucosamine in the diet. **Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries**. 40: 421-424.

Deshimaru, O.and Yone, Y., 1978. Effect of dietary carbohydrate sources on the growth and feed efficiency of prawn. **Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries**. 44: 1161-1163.

Emmerson, W.D., 1983. Maturation and growth of ablated and unablated *Penaeus monodon* Fabricius. **Aquculture**. 32: 235-241.

Fenucci, J.L., Lawrence, A.L., Zein-Eldin, Z.P., 1981. The effects of fatty acid and shrimp mmeal composition of prepared diets on growth of juvenile shrimp, *Penaeus stylirostris*. **Journal of the World Mariculture Society**.12:315-324.

Guary, J.C., Kayama, M., Murakami, Y., Ceccaldi, H.J., 1976. The effect of a fat-free diet and compounded diets supplemented with various oil on moult, growth and fatty acid composition of prawn, *Penaeus japonicus* Bate. **Aquaculture**. 7: 245-254.

Hall, M.R., Mastro, R., Prestwich, G., 1999. Horminal modulation of spawner quality in *Penaeus monodon*. Book of Abstracts, World Aquaculture '99. **World Aquaculture Society**, Sydney, Australia, p.308, Abstract.

Hall, M.R.., Yong, N. and Kenway, M., 2000. **Manual for the determination of egg fertility in *Penaeus monodon***. Available form : http://www.aims.gov.au/pages/research/mdef-00.html ,May 24.

Harrison, K.E., 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. **Journal of Shellfish Research**. 9: 1-28.

Harrison, K.E., 1997. Broodstock Nutrition and Maturation Diets. In Advances in World Aquaculture Vol. 6:Crustacean Nutrition. **World Aquacuture Society**. pp.390-408.

He, H., Lawrence, A.L., Liu, R., 1992. Evaluation of dietary essentiality of fat-soluble vitamins A, D, E and K for penaeid shrimp (*Penaeus vannamei*). **Aquaculture**. 103: 177-185.

Hillier, A.G., 1984. Artificial conditions influencing the maturation and spawning of subadult *Penaeus monodon* (Fabricius). **Aquaculture**. 36: 179-184.

Humason, G.L. 1979. **Animal Tissue Techniques**. 4th ed. W.H. Freem and Company, San Francisco. 661p.

Jeckel, W.H., Moreno, J.E.A., Moreno, V.J., 1989. Biochemical composition, lipid classes and fatty acid in the ovary of the shrimp *Pleoticus muelleri* Bate. **Comp. Biochem. Physiol**. 92B(2): 271-276.

Jerlov, N.G., 1970. Light:general introduction. In : O. Kine (ed.), **Marine ecology**, pp.95-102. London. Wiley Interscience.

Jones, D.A., Kanazawa, A., Ono, K., 1979. Studies on the nutritional requirements of the larval stages of *Penaeus japonicus* using microencapsulated diets. **Marine Biology**.54:261-267.

Kanazawa, A., 1982. **Control of ovarian maturation and spawning of aquatic animals**. Suisangaku Series No.39, Koseisha-Koseikaku, Tokyo, pp. 80-89.

Kanazawa, A., 1989. Maturation diets. Oral Presention, **1st session of "Nutrition in Crustaceans"**. Advances in Tropical Aquaculture. Tahiti, February 20- March 4. Abstract only. cited afte Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J., Sorgeloos, P., 2001b. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. **Aquaculture**.202: 1-21.

Kanazawa, A., Chim, L., Laubier, L., 1988. Tissue uptake of radioactive cholesterol in the prawn *Penaeus japonicus* Bate during ovarian maturation. **Aquatic Living Resour**. 1: 85-91.

Kanazawa, A., Tanaka, N., Teshima, S., Kashiwada, K., 1971. Nutritional requirements of prawn. II. Requirement for sterols. **Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries**. 37:211-215.

Kanazawa, A., Teshima, S., Ono, K., 1979a. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fattyacids. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 63b: 295-298.

Kanazawa, A., Teshima, S., Tokiwa, S., Kayama, M. and Hirata, M., 1979b. Essential fatty acids in the diet of prown- II.Effects of docosahexaenoic acids on growth. **Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries**. 45:1151-1153.

Kanazawa, A., Tokiwa, S., Kayama, M., HiRata, M., 1977. Essential fatty acids in the diet of prown- I.Effects of linoleic and linolenic acids on growth. **Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries**. 43:1111-1114.

Kawahigashi, D.K., 1998. Overview of commercial maturation technology in the Western hemisphere. **Recife Brazil LAC WAS Conference Proceeding, vol. 98,** Anais de Aquicultura, Brazil, pp.381-392.

Kurata, H., 1975. Culture of kuruma shrimp : In **Culture of Marine Life**. Japan Internation of Cooperation Agency Government of Japan. 15-50. อ้างถึงใน บรรจง เทียนส่งรัศมี, 2521. **หลักการเลี้ยงกุ้งทะเล**. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ. 117 หน้า.

Laufer, H., Biggers, W.L. and Ahl, J.S.B., 1998. Stimulation of ovarian maturation in the crayfish *Procambarus clarkii* by methyl farnesoate. **Gen. Comp. Endocrinol.** 111. 113 – 118.

Laubier-Bonichon, A. and Laubiue, A., 1979. Reproduction controlee chez la crevette *Penaeus japonicus*. In : T.V.R. Pillay and W. Dill (eds.), **Advances in aquaculture**, pp. 273-277. Fishing News Books Ltd., Surrey (in French with English abstract). cited after Primavera, J.H., 1984. **A Review of Maturation and Reproduction in Closed Thelycum Penaeids**. SEAFDEC Aquaculture Department. pp.47-64.

Lee, D.L., 1971. Studies on the protein utilization related to growth in *Penaeus monodon* Fabricius. **Aquaculture**.1:1-13.

Levine, D.M. and Sulkin, S.D., 1984. Nutritional significance of long-chain polyunsaturated fatty acid to the zoeal development of the brachyuran crab, Eurypanopeus depressus (Smith). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol**. 81: 211-223.

Lim, C., Ako, H., Brown, C.L., Hahn, K., 1997. Growth response and fatty acid composition of jovenile *Penaeus vannamei* fed different sources of dietary lipid. **Aquaculture**.151: 143-153.

Lovell, T., 1989. **Nutrition and feeding of fish**. New York. Van Nostrand Reinhold. 260 pp.

Lubzens, E. Khayat, M., Ravid, T.Funkenstein, B. and Tietz, A., 1995. Lipoproteins and lipid accumulation within the ovaries of penaeid shrimp. Isr. **J. Aquacult.-Bamidgeh** 47 (3-4). 185-195. cited after **Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J., Sorgeloos, P., 2001b. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. Aquaculture**.202: 1-21.

Lytle, J.S., Lytle, T.F., Ogle, J.T., 1990. Polyunsaturated fatty acid profiles as a comparative tool in assessing maturation diets of *Penaeus vannamei.* **Aquaculture**. 89: 287-299.

Marsden, G.E., McGuren, J.J., Hansford, S.W., Burke, M.J., 1997. A moist artificial diet for prawn broodstock: its effect on the variable reproductive performance of wild caught *Penaeus monodon*. **Aquaculture**. 149: 145-156.

Medina A., Vila, Y., Mourente, G., Rodriguez, A., 1996. A comparative study of the ovarian development in wild and pond-reared shrimp *Penaeus kerathurus* (Forskal, 1775). **Aquaculture**. 148: 63-75.

Mendoza, E.C., 1982. **Quantitative dietary lipid requirement of *Penaeus monodon* juveniles in a control environment**. M.S. Thesis, College of Fisheries, University of the Philippines in the Visayas.

Mendoza, R., Revol, A., Fauvel, C., Patrois, J. and Guillaume, J.-C., 1997. Influence of squid extracts on the triggering of secondary vitellogenesis in *Penaeus vannamei* . **Aquacult. Nutr**.3: 55-63.

Merchie, G., Kontara, E., Lavens, P., Robles, R., Kurmaly, K., Sorgeloos, P., 1998. Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). **Aquacult. Res**. 29: 579-585.

Middleditch, B.S., Missler, S.R., Hines, H.B., McVey, J.B., Brown, A., Ward, D.G.and Lawrence, A.L., 1980. Metabolic profiles of penaeid shrimp: dietary lipids and ovarian maturation. **Journal of Chromatography**. 195: 359-368.

Millamena, O.M.,1989. Effect of fatty acid composition of broodstock diet on tissue fatty acid patterns and egg fertilisation and hatching in pond reared *Penaeus monodon*. **Asian Fisheries Society**. 2: 127-134. cited after Marsden, G.E., McGuren, J.J., Hansford, S.W., Burke, M.J., 1997. A moist artificial diet for

prawn broodstock: its effect on the variable reproductive performance of wild caught *Penaeus monodon*. **Aquaculture**. 149: 145-156.

Millamena, O.M., Pudadera, R.A., Catacutan, M.R.,1984. Variations in tissue lipid content and fatty acid composition during maturation of unablated and ablated *Penaeus monodon*. First Intl. **Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps,**Iloilo City, Philipines, 4-7 Dec. 1984 (abstract). cited after Primavera, J.H., 1984. **A Review of Maturation and Reproduction in Closed Thelycum Penaeids**. Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps. SEAFDEC Aquacuture Department. p47-64.

Millamena, O.M., Primavera, J.H., Pudadera, R.A., Caballero, R.V., 1986. The effect of diet on the reproductive performance of pond-reared *Penaeus monodon* Fabricius Broodstock. The First Asian Fisheries Forum. **Asian Fisheries Society**. p593-596.

Millamena, O.M., Pudadera, R.A., Catacutan, M.R.,1993. Tissue lipid content and fatty acid composition during ovarian maturation of ablated *Penaeus monodon*. **The Israeli Journal of Aquaculture**. 45: 120-125.

Morris, R.J., 1973. Relationships between the sex and degree of maturation of marine crustaceans and their lipid composition. **J. Mar. Biol. Assoc**.53:27-37.

Mourente, G., 1996. In vitro metabolism of C-14-polyunsaturated fatty acids in midgut gland and ovary cells from *Penaeus kerathurus* Forskal at the beginning of sexual maturation. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 115: 255-266.

Naessens, E., Lavens, P., Gomez, L.,Browdy, C.L., McGovern-Hopkins, K., Spencer, A.W., Kawahigashi, D., Sorgeloos, P., 1997. Maturation performance of *Penaeus vannamei* co-fed *Artemia* biomass preparations. **Aquaculture**.155: 87-101.

New, M.B., 1976. A review of dietary studies with shrimp and prawns. **Aquaculture**. 9: 101-144.

Palacios, E., Ibarra, A.M., Ramirez, J.L., Portillo, G., Racotta, I.S., 1998. Biochemical composition of eggs and nauplii in White Pacific Shrimp *Penaeus vannamei*

(Boone), in relation to the physiological condition of spawners in a commercial hatchery. **Aquaculture Research**. 29: 183-189.

Palacios, E., Ibarra, A.M., Racotta, I.S., 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. **Aquaculture**. 185: 353-371.

Primavera, J.H., 1978. Induced maturation and spawning in five-month-old *Penaeus monodon* Fabricius by eyestalk ablation. **Aquaculture**. 13: 355-359.

Primavera, J.H., 1984. **A Review of Maturation and Reproduction in Closed Thelycum Penaeids**. Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps. SEAFDEC Aquacuture Department. pp.47-64.

Primavera, J.H. and Caballero, 1992. Light color and ovarian maturation in unablated and ablated giant tiger prawn *Penaeus monodon* (Fabricius). **Aquaculture**. 128 : 255-260.

Pudadera, R.A. and Primavera, J.H., 1981. Effect of light quality and eyestalk ablation on ovarian maturation in *Penaeus monodon*. **J. Biol**., 10: 231-240.

Ravid, T., Tietz, A., Khayat, M., Boehm, E., Michelis, R., Lubzens, E., 1999. Lipid accumulation in the ovaries of a marine shrimp *Penaeus semisulcatus* (De Haan). **J. Exp. Biol**. 202: 1819-1829.

Read, G.H.L., 1981. The response of *Penaeus indicus* (Crustacea:Penaeidea) to purified and compounded diets of varying fatty acid composition. **Aquaculture**. 24: 245-256.

Read, G.H.L. and Caulton, M.S., 1980. Changes in mass and chemical composition during the molt cycle and ovarian development in inmature and mature *Penaeus indicus* Milne Edwards. **Comp. Biochem. Physiol**. 66: 431-437.

Rees, J.F., Cure, K., Piyatiratitivorakul, S., Sorgeloos, P., Menasveta, P., 1994. Highly unsaturated fatty acid requirement of *Penaeus monodon* postlarvae: an experimental approach based on Artemia enrichment. **Aquaculture**. 177: 157-163.

Shiau, S.Y.and Lung, C.Q., 1993. Estimation of the vitamin B requirement of the grass shrimp *Penaeus monodon*. **Aquaculture**. 24: 245-256.

Sire, M.F., Lutton, C., Vernier., J.M., 1981. New views on intestinal absorption of lipids in teleostean fishes : An ultrastructural and biochemical study in the rainbow tout. **Journal of Lipid Research**.22: 81-94.

Stickney, R.R.and Andrews., J.W., 1971. Combined effects of dietary lipids and environmental temperature on growth, metabolism and body composition of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Journal of Nutrition**. 101: 1703-1710.

Tan-Fermin, J.D., Pudadera, R.A., 1989. Ovarian Maturation Stage of the Wild Giant Tiger Prawn, *Penaeus monodon* Fabricius. **Aquaculture**, 77: 229-242.

Teshima, T., Kanazawa., A., Koshio, S., Horinouchi, K., 1988. Lipid metabolism in destalked prawn *Penaeus japonicus* : induced maturation and accumulation of lipids in the ovaries. **Nippon Suisan Gakkaishi**. 54: 1123-1129. cited after Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J. and Sorgeloos, P., 2001b. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. **Aquculture**. 202: 1-21.

Teshima, T.and Kanazawa., A., 1971. Biosynthesis of sterols in the lobster, *Panulirus japonica*, the prawn, *Penaeus japonicus*, and the crab, *Penaeus trituberculatus*. **Comp. Biochem**. 35:597-602.

Teshima, S.and Kanazawa, A., 1983. Variation in lipid compositions during the ovarian maturation of the prawn. **Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries**. 49(6):957-962.

Teshima, S., Kanazawa, A., Sasada, H., Kawasaki, M., 1982. Requirements of the larval prawn *Penaeus japonicus* for cholesterol and soybean phospholipids. **Mem. Fac. Fish**., Kagoshima Univ. 31: 193-199.

Verstraete, P., De La Mora, B. and Lavens, P., 1995. Maturation of *Penaeus vannamei* by using dry pellets as a partial substitute of the natural diet. Larvi'95, **Gent, European Aquaculture Society**, Special Publication, vol.24. 76-78. cited after Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J. and Sorgeloos, P., 2001b. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. **Aquculture**. 202: 1-21.

Wehrtmann, I.S. and Graeve, M., 1998. Lipid composition and utilization in developing eggs of two tropical marine caridean shrimps (Decapoda: Caridae: Alpheidae, Palaemonidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**. 121: 457-463.

Wouter, R., Gomez, L., Lavens, P., Calderon, J., 1999. Feeding enriched Artemia biomass to *Penaeus vannamei* broodstock : its effect on reproductive performance and larval quality. **Journal of Shellfish Research**. 18: 651-656.

Wouter, R., Molina, C., Lavens, P., Calderon, J., 2001a. Lipid composition and vitamin content of wild female *Litopenaeus vannamei* in different stages of sexual maturation. **Aquaculture**. 198: 307-323.

Wouters, R., Piguave, X., Bastidas, L., Calderon, J., Porgeloos, P., 2001b. Ovarian maturation and haemolymphatic vitellogenin concentration of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed increasing levels of total dietary lipids and HUFA. **Aquaculture Research**. 32: 573-582.

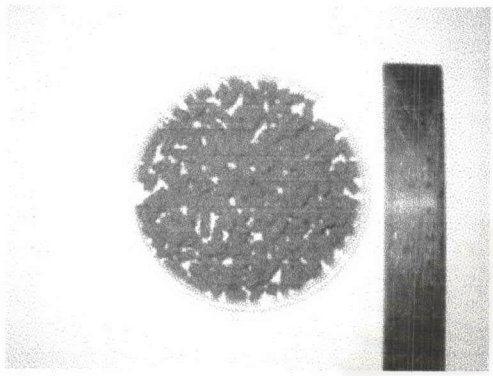
Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J., Sorgeloos, P., 2001c. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. **Aquaculture**.202: 1-21.

Xu, X.L., Ji, W.L., Castell, J.D., O'Dor, R.K., 1994. Influence of dietary lipid sources on fecundity, egg hatchability and fatty acid composition of Chinese prawn (*Penaeus chinensis*) broodstock. **Aquaculture**.119: 359-370.

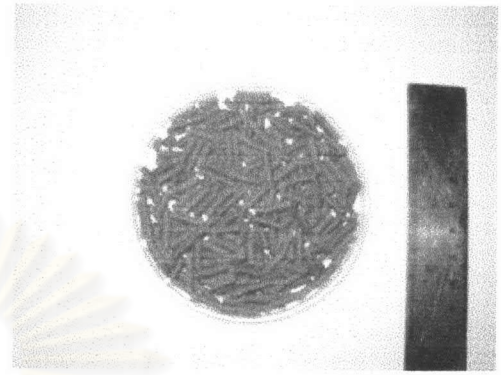
Yano, I. 1984. Induction of rapid spawning in kuruma prawn *Penaeus japonicus* through unilateral eyestalk enucleation. **Aquaculture**. 40: 265-268.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก



ก.



ข.

ค.

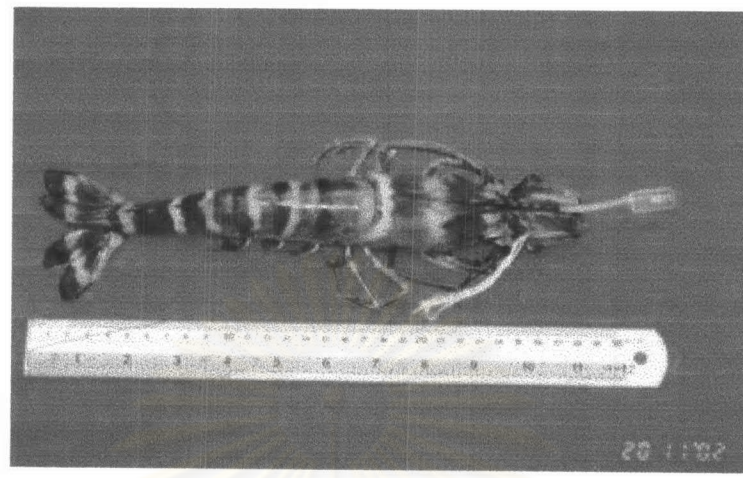
รูปที่ 2 ลักษณะของอาหารที่ใช้ในการทดลอง

ก. อาหารเม็ดทดลอง

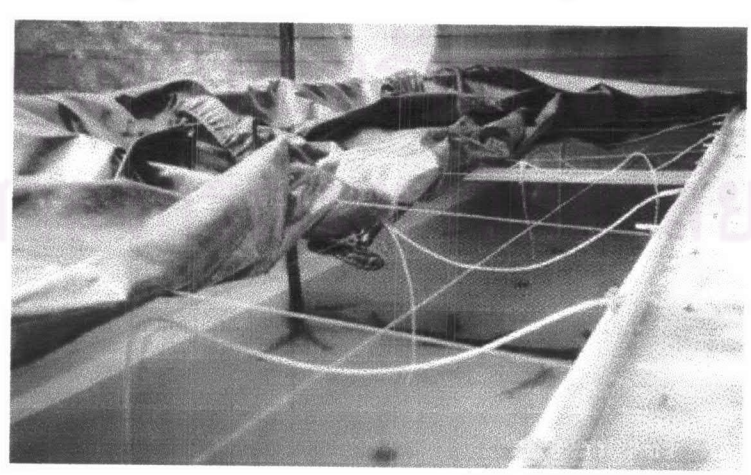
ข. อาหารสำหรับพ่อแม่พันธุ์ตามท้องตลาด

ค. อาหารธรรมชาติ(หมึก หอย และเพรียง)

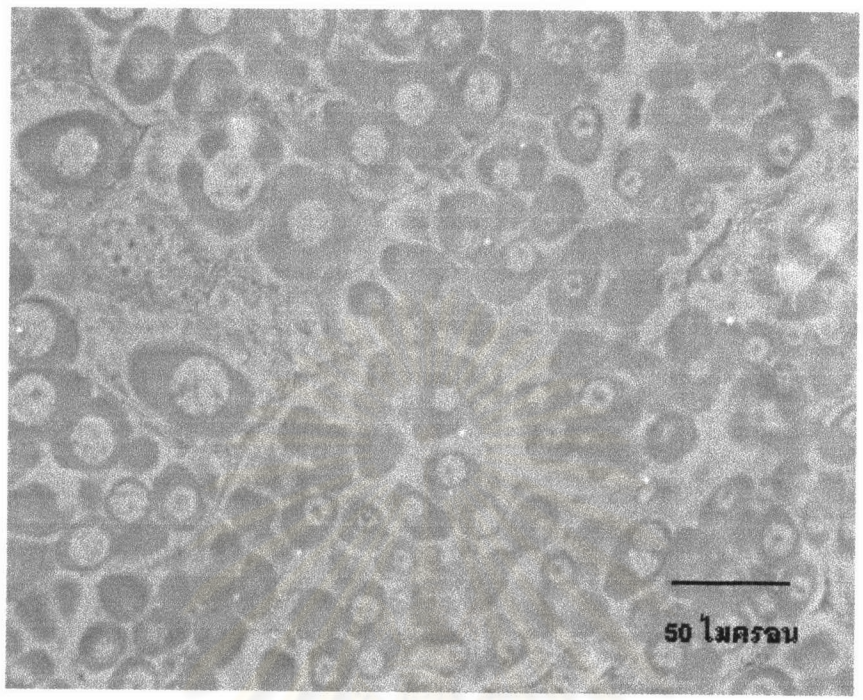
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



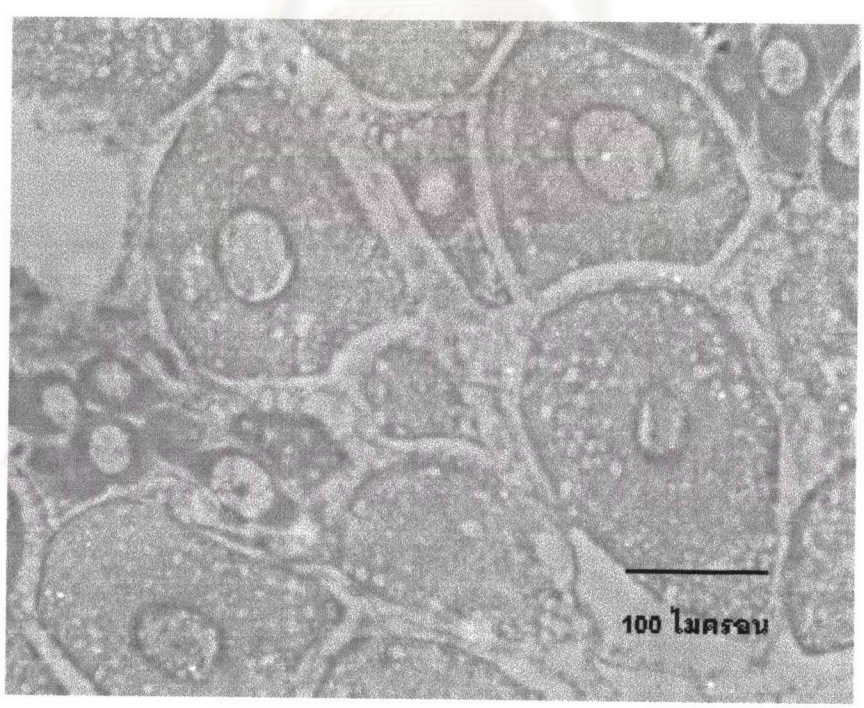
รูปที่ 3 ลักษณะติดเครื่องหมายบนกุ้งทดลอง



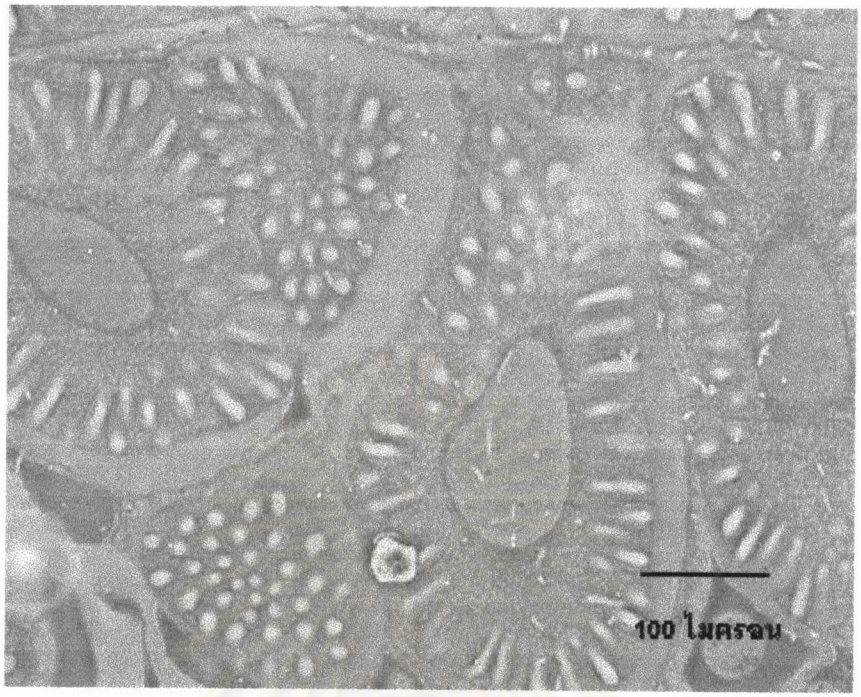
รูปที่ 4 ลักษณะของบ่อที่ใช้ทดลอง



รูปที่ 5 ลักษณะของไข่ในระยะ previtellogenin



รูปที่ 6 ลักษณะของไข่ในระยะ vitellogenin



รูปที่ 7 ลักษณะของไข่ในระยะ corticle rod

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 34 ปริมาณของวัสดุอาหารที่ใช้ในการสร้างอาหารทดลอง

วัสดุอาหาร	ปริมาณที่ใช้ (เปอร์เซ็นต์)
ปลาป่น	41
หมึกป่น	12
หัวกุ้งป่น	8
กากถั่วเหลืองป่น	8
แป้งสาลี	8
โซเดียมอัลจิเนต	4
แคลเซียมคลอไรด์	2
คลอเรสเตอรอล	0.5
เรซิติน	0.5
วิตามินรวม	2
แร่ธาตุรวม	2
AA oil	7
EPA oil	3
Fish soluble	1
วิตามินซี	0.5
แอสตร้าแซนทีน	0.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 35 แหล่งของวัสดุอาหารที่ใช้ในการทดลอง

วัสดุอาหาร	แหล่งที่มา
- ปลาป่น หมึกป่น กากถั่วเหลือง หัวกุ้งป่น แป้ง คลอเรสเตอรอลและเรซิติน	บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด
- โซเดียมและแคลเซียม	บริษัท รวมเคมี 1986 จำกัด
- Fish soluble วิตามินซี วิตามินและแร่ธาตุรวม	บริษัท โคเดล จำกัด
- AA oil	Vedovar, Netherland
- EPA oil และแอสตร้าแซนทิน	บริษัท โรวิไทย จำกัด

วิธีวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ

การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น

<u>สารเคมีและอุปกรณ์</u>

1. crusible
2. ตู้อบ (Hot oven)
3. โถดูดความชื้น (dessicator)

<u>วิธีทดลอง</u>

1. ชั่ง crusible ที่แห้งสนิท จากนั้นใส่ตัวอย่างน้ำหนักประมาณ 2 กรัม บันทึกน้ำหนักก่อนการทดลอง
2. นำ crusible ที่บรรจุตัวอย่างเข้าตู้อบ โดยใช้อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง
3. นำ crusible ที่บรรจุตัวอย่างออกมาใส่โถดูดความชื้น เมื่อ crusible เย็นแล้วนำมาชั่งน้ำหนักหลังการทดลอง

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนการทดลอง} - \text{น้ำหนักหลังการทดลอง}}{\text{น้ำหนักอาหาร}} * 100$$

การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า

สารเคมีและอุปกรณ์

1. crusible
2. เตาเผา (Furnace muffle)

วิธีการทดลอง

1. ชั่ง crusible ที่แห้งสนิท จากนั้นใส่ตัวอย่างน้ำหนักประมาณ 2 กรัม บันทึกน้ำหนักก่อนการทดลอง
2. นำ crusible ที่บรรจุตัวอย่างเข้าเตาเผา โดยใช้อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง
3. นำ crusible ที่บรรจุตัวอย่างออกมาใส่โถดูดความชื้น เมื่อ crusible เย็นแล้วนำมาชั่งน้ำหนักหลังการทดลอง

$$\% \text{ เถ้า} = \frac{\text{น้ำหนักหลังการทดลอง}}{\text{น้ำหนักก่อนการทดลอง}} * 100$$

การวิเคราะห์หาปริมาณเส้นใย

สารเคมีและอุปกรณ์

1. เครื่อง Gerhardt ซึ่งประกอบด้วย plate, บีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร, round condencer
2. สารละลายกรด sulphuric 0.3 N
3. สารละลาย sodium hydroxide 0.3 N
4. 95 % ethyl alcohol
5. crusible

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างแห้งที่สกัดไขมันออกแล้ว ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดลงไป 200 มิลลิลิตร จากนั้นต่อ round condencer เข้ากับบีกเกอร์เพื่อรักษาระดับของกรดให้คงที่ขณะย่อยซึ่งใช้เวลาประมาณ 30 นาที
2. กรองส่วนผสมผ่านกระดาษกรองชนิดที่ไม่มีเถ้า ซึ่งรู้น้ำหนักที่แน่นอน ล้างส่วนที่ติดบนกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่นจนหมดความเป็นกรด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ล้างส่วนที่ติดอยู่บนกระดาษกรองด้วยสารละลาย sodium hydroxide 200 มิลลิลิตร จากนั้นย่อยต่อไปอีก 30 นาที
4. กรองส่วนผสมด้วยกระดาษกรองแผ่นเดิม แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดความเป็นด่าง จากนั้นนำไปล้างด้วย alcohol 100 มิลลิลิตร
5. นำกระดาษกรองและตัวอย่างที่ติดอยู่ไปอบแห้ง แล้วใส่ใน crusible เพื่อหาปริมาณเถ้าที่เหลืออยู่
6. ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก crusible

$$\% \text{ ปริมาณเส้นใย} = \frac{\text{น้ำหนักที่หายไประหว่างเผาเถ้า (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} * 100$$

การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน

สารเคมีและอุปกรณ์

1. Soxtherm Automatic
2. กระดาษกรอง Whatman No.1
3. thimble
4. Petroleum ether

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างแห้ง 2 กรัม แล้วห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 โดยห่อ 2 ชั้น
2. ใส่ห่อตัวอย่างใน thimble ซึ่งบรรจุในขวดสกัดที่แห้งสนิทและทราบน้ำหนักที่แน่นอน
3. เติม Petroleum ether ซึ่งใช้เป็นตัวสกัด ประมาณ 80 มิลลิลิตร ลงในขวดสกัด
4. นำขวดสกัดไขมันไปประกอบกับเครื่อง soxtherm ควบคุมอุณหภูมิ silicone oil ซึ่งเป็นตัวถ่ายเทความร้อนให้กับอุปกรณ์ที่ใช้สกัดไว้ที่ 150 องศาเซลเซียส
5. ปล่อยให้เกิดการสกัดเป็นเวลา 4 – 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการระเหย Petroleum ether ออกจากส่วนไขมันที่สกัดได้ แล้วอบขวดสกัดไขมันที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือจนน้ำหนักคงที่
6. เมื่อขวดสกัดเย็นลงแล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

$$\% \text{ ปริมาณไขมัน} = \frac{\text{ปริมาณไขมันที่สกัดได้ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} * 100$$

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

สารเคมีและอุปกรณ์

1. Gerhardt Kjeldatherm Digestion Unit
2. Gerhardt Vapodest 1
3. digestion tube
4. catalyst (ส่วนผสมของ K_2SO_4 และ Se ในอัตราส่วน 1000:1)
5. H_2SO_4
6. 4% boric acid
7. tashiro indicator
8. 50% NaOH solution
9. สารละลาย standard H_2SO_4 0.5 N

โดยในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน มี 3 ขั้นตอน คือ

1. การย่อยตัวอย่างอาหารให้อยู่ในรูปสารละลาย
2. การหาปริมาณโปรตีนโดยใช้การกลั่นสารละลายที่ได้จากข้อหนึ่ง
3. การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของกรด H_2SO_4

1. การย่อยตัวอย่างอาหาร (Kjeldatherm digestion)

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 2 กรัม ใส่ใน digestion tube
2. เติม catalyst 10.01 g ลงไปแล้วเติม H_2SO_4 เข้มข้น 25 ml.
3. นำ digestion tube ใส่ใน rack แล้วนำ rack ไปใส่ใน Kjeldatherm digestion block พร้อมทั้งประกอบท่อดูดควันระบบสูญญากาศทิ้งให้เกิดการย่อยจนได้สารประกอบสีดำ ประมาณ 20 นาที
4. เริ่มตั้งอุณหภูมิเครื่อง Kjeldatherm digestion block ไว้ประมาณ 100 องศาเซลเซียสแล้วเพิ่มอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ทุกๆประมาณ 15-20 นาที จนอุณหภูมิถึง 380 องศาเซลเซียส
5. ปล่อยให้เกิดการย่อยจนสมบูรณ์(โดยสีของสารละลายใน digestion tube จะขึ้นกับชนิดของ catalyst ในการย่อยโดยใช้ Se เป็น catalyst จะได้สารละลายสีเหลือใส)
6. ปล่อยทิ้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิลดลงจนถึงอุณหภูมิห้อง

7. เติมน้ำกลั่นลงไปใน digestion tube ให้น้ำใน tube มีปริมาณมากพอที่จะนำไปใช้กลั่นได้ (เติมประมาณ 100-150 ml.)

2. <u>การกลั่นสารละลายเพื่อนำไปหาโปรตีน</u>

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. เปิดเครื่องมือ vapodest 1 โยกคันโยกมาอยู่ตำแหน่ง fill เพื่อปล่อยน้ำเข้าสู่ boiler จนได้ระดับน้ำประมาณ 6/10 ของ boiler แล้วโยกคันโยกมาอยู่ที่ตำแหน่ง stand by น้ำใน boiler จะเริ่มเดือด ไม่ควรเติมน้ำมากไปเพราะเวลาน้ำเดือดจะล้นเข้าไปอยู่ใน digestion tube
2. เติม 4% boric acid 100 ml. ลงใน erlenmeyer flask 1ขนาด 500 ml. หยด tashiro indicator ลงไป 5-6 หยด จะได้สารละลายสีม่วง
3. วาง flask ที่มี boric acid ไว้ในตำแหน่งที่มี drainage tube โดยปล่อยให้ปลาย drainage tube จุ่มอยู่ในสารละลาย boric acid ตลอดเวลา นำ digestion tube ที่มีตัวอย่างที่ dilute แล้วไปวางบน clamp โดยให้ส่วนปลายเปิดของ tube แนบสนิทกับ cone-shaped rubber stopper
4. เมื่อน้ำเริ่มเดือดเป็นไอให้กดปุ่ม " added NaOH" เพื่อให้ 50% NaOH solution ไหลเข้าสู่ digestion tube สารละลายใน digestion tube จะเกิดฟองแก๊สขึ้น กดปุ่ม added NaOH ไปเรื่อยๆ จนไม่เกิดฟองขึ้น (สารละลายใน digestion tube จะขุ่นมีตะกอน) เติม 50% NaOH ให้มากเกินพออีกประมาณ 10 ml. ถ้าในตัวอย่างอาหารมีสารประกอบไนโตรเจนมาก สีของสารละลาย boric acid + tashiro indicator จะเริ่มเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเขียว ในขั้นตอนนี้จะต้องปล่อยให้น้ำไหลเข้า condenser ตลอดเวลาเพื่อให้แก๊ส NH_3ควบแน่นลงสู่ flask ที่บรรจุ boric acid
5. โยกคันโยกมาที่ตำแหน่ง distillation เพื่อให้ ไอน้ำเข้าไปใน digestion tube และปล่อยให้เกิดการกลั่นจนได้สารละลายใน flask ที่มี boric acid อยู่มีปริมาณ ประมาณ 300 ml.
6. เมื่อกลั่นจนได้ปริมาตร เป็น 300 ml แล้วให้โยกคันโยกมาที่ตำแหน่ง stand by
8. ถอด digestion tube ออก นำ flask ที่มี boric acid +tashiro indicator ไป titrate กับสารละลาย standard H_2SO_4 ความเข้มข้นประมาณ 0.5 N จนถึงจุดยุติสารละลายใน flask จะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงอ่อน

3. <u>การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของกรด H_2SO_4 (Skoog and West, 1986)</u>

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. เตรียมสรละลาย NaOH 1.0 N, Standard $C_8H_5KO_4$ 0.4 สารละลาย H_2SO_4 0.5 N
2. ปิเปตสารละลาย NaOH 1N มา 10 ml. เติม Phenopthalene 2-3 หยด นำไปไตเตรทกับ Standard $C_8H_5KO_4$ 1.4 N ที่จุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนจากชมพู เป็น ใสไม่มีสี แล้วคำนวณความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลาย NaOH โดยใช้สมการ

$$N_{NaOH} = (N_{pa} * V_{pv}) / V_{NaOH}$$

โดยที่ N_{NaOH} = normality of NaOH

N_{pa} = normality of $C_8H_5KO_4$

V_{NaOH} = ปริมาตรของ $C_8H_5KO_4$ ในการไตเตรท

3. ปิเปตสารละลาย NaOH ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนแล้วจากข้อ 2 10 ml. เติม Phenopthalene 2-3 หยด นำไปไตเตรทกับสารละลาย H_2SO_4 สารละลายจะเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นใส ไม่มีสี คำนวณความเข้มข้นของสารละลาย โดยใช้สมการ

$$N_{acid} = (N_{base} * V_{base}) / V_{acid}$$

โดยที่ N_{acid} = ความเข้มข้นของสรละลาย H_2SO_4 เป็น normal

V_{acid} = ปริมาตรของสารละลาย H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตเตรท

N_{base} = ความเข้มข้นของสารละลาย NaOH ที่เป็น normal

V_{base} = ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ (10 ml.)

การคำนวณหาปริมาณโปรตีน

$$\% \text{ protein} = \frac{Vs * Ns * 6.25 * 1.4 * 100}{\text{wt. of sample}}$$

โดยที่ Ns = ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกที่ใช้ titrate

Vs = ปริมาตรของกรดที่ใช้ในการ titrate เป็น ml

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การสกัดและการแยกชนิดของน้ำมันปลา

การสกัดน้ำมันปลา

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้

1. ตัวอย่างปลาสดหรือแช่แข็งที่ละลายแล้ว
2. Chloroform , methanol
3. Buchner funnel
4. Diatomaceous earth หรือกระดาษกรองเบอร์ 1
5. Sodium sulfate anhydrous
6. Separatory funnel
7. Homogenizer
8. Suction pump
9. Rotary Evaporator
10. 0.88% KCl

<u>การสกัดน้ำมันปลา</u>

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. ชั่งน้ำหนักเนื้อปลา 10 กรัม ลงในโถปั่นหรือหลอดปั่นขนาด 100 มล.
2. เติม chloroform 10 มล. methanol 20 มล. และน้ำให้อัตราส่วน 1: 2 : 0.8 เมื่อคิดรวมกับน้ำในเนื้อปลา ปั่นละเอียดด้วย homogenizer ที่ 12,500 rpm 2 นาที
3. เติม chloroform 10 มล. ปั่น 30 นาที
4. เติมน้ำกลั่น 10 มล. ปั่น 30 นาที
5. กรองผ่าน Buchner funnel ด้วย diatomaceous earth หรือ ใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 ฉีดล้างส่วนที่ค้างอยู่ในโถปั่นและกระดาษกรองด้วย Chloroform
6. นำส่วนที่กรองได้ เทลงในกรวยแยก (Separatory funnel)
7. ขูดส่วนบนของ diatomaceous earth ที่มีเนื้อปลาค้างอยู่หรือถ้าเป็นกระดาษกรองทำการตัดให้เป็นชิ้นเล็กก่อนใส่ลงไปพร้อมกับเนื้อปลาลงในโถปั่น เติม chloroform 10 มล. ปั่น 1 นาที

8. กรองนำส่วนที่กรองได้เทรวมลงในกรวยแยกอันแรก แล้วเติม 0.88% KCl ลงไป 1ใน 4 ของปริมาตรทั้งหมด เขย่าให้เข้าดี ทิ้งไว้ให้แยกชั้นอย่างน้อย 6 ชั่วโมง
9. ไขส่วน chloroform ชั้นล่างออก ใส่ใน flask ที่มีจุกแก้ว เติม sodium sulfate anhydrous ลงไปเล็กน้อยไล่อากาศออกไปด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วปิดจุกแก้ว เก็บไว้ในที่ไม่มีแสงสว่าง 20-30 นาที
10. สังเกตลักษณะสารละลายที่ได้ต้องใส ถ้าไม่ใส ต้องเติม sodium sulfate anhydrous ลงไปอีกเล็กน้อย จากนั้น กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เทส่วนที่กรองได้ใส่ใน volume metric flask ขนาด 50 มล. ปรับปริมาตรด้วย chloroform จากนั้นไล่อากาศออกด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วปิดให้สนิท
11. ดูดส่วนที่กรองได้ไล่ลงในขวดแก้วก้นกลมหรือขวดแก้วรูป pear ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วนำไประเหย chloroform ออกใน Rotary evaporator
12. ชั่งน้ำหนักและหาปริมาณน้ำมันที่สกัดได้คำนวณเป็นร้อยละของตัวอย่างสดและแห้ง

การเตรียมตัวอย่างอาหารและน้ำมันเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมัน

การสกัดน้ำมัน

<u>สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้</u>

1. Chloroform
2. Methanol
3. Buchner funnel
4. กระดาษกรองเบอร์ 1
5. Sodium sulfate anhydrous
6. Separatory funnel
7. Homogenizer
8. Suction pump
9. Rotary Evaporator
10. 0.88% KCl

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการทดลอง

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 10 กรัม ลงในโถปั่นหรือหลอดปั่น ขนาด 100 มิลลิลิตร
2. เติม Chloroform 10 มิลลิลิตร Methanol 20 มิลลิลิตร และน้ำให้ได้อัตราส่วน 1:2:0.8 เมื่อคิดรวมกับน้ำในตัวอย่าง ปั่นละเอียดด้วย Homogenizer ที่ 12,500 rpm 2 นาที
3. เติม Chloroform 10 มิลลิลิตร ปั่น 30 วินาที
4. เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ปั่น 30 วินาที
5. กรองผ่าน Buchner funnel ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ฉีดล้างส่วนที่ค้างอยู่ในโถปั่น และบนกระดาษกรองด้วย Chloroform
6. นำส่วนที่กรองได้ เทลงในกรวยแยก (Separatory funnel)
7. ตัดกระดาษกรองที่ใช้กรองมาตัดให้เป็นชิ้นเล็กก่อนใส่ลงไปพร้อมกับตัวอย่างในโถปั่น เติม Chloroform 10 มิลลิลิตร ปั่น 1 นาที
8. กรอง นำส่วนที่กรองได้เทรวมลงในกรวยแยกอันแรก แล้วเติม 0.88 % KCl ลงไป 1 ใน 4 ของปริมาณทั้งหมด เขย่าให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ให้แยกชั้นอย่างน้อย 6 ชั่วโมง
9. ไขส่วน Chloroform ชั้นล่างออก ใส่ใน flask ที่มีจุกแก้ว เติม Sodium sulfate anhydrous ลงไปเล็กน้อย ไล่อากาศออกด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วปิดจุกแก้ว เก็บไว้ในที่ไม่มีแสงสว่าง 20 – 30 นาที
10. สังเกตลักษณะ สารละลายที่ได้ต้องใส ถ้าไม่ใส่ให้เติม Sodium sulfate anhydrous ลงไปอีกเล็กน้อย จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เทส่วนที่กรองได้ใส่ Volume metric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Chloroform จากนั้นไล่อากาศออกด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วปิดให้สนิท
11. ดูดส่วนที่กรองได้ไล่ลงในขวดแก้วก้นกลมหรือขวดแก้วรูป pear ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วนำไประเหย Chloroform ออกใน Rotary Evaporator
12. ชั่งน้ำหนักและหาปริมาณน้ำมันที่สกัดได้คำนวณเป็นร้อยละของตัวอย่างสดและแห้ง

การทำน้ำมันให้บริสุทธิ์ (ใช้กับตัวอย่างน้ำมันเช่น น้ำมันปลา)

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้

1. phosphoric acid
2. NaOH
3. เครื่อง Centrifuge

วิธีการทดลอง

1. นำน้ำมันตัวอย่างทำการกำจัดยางตะกอน (Degumming) ด้วยการเติม phosphoric acid เข้มข้น 80% เป็นเวลา 10 นาที
2. นำน้ำมันที่ผ่านการ Degumming แล้ว มาเติมด้วย NaOH 20 องศาโบเม ทิ้งไว้ 20 นาที จากนั้นนำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,000 – 6,000 rpm 5 – 10 นาที แยกเอาน้ำมันออก ล้างด้วยน้ำร้อนในอัตราส่วน 10% นาน 10 นาที แล้วนำไป Centrifuge แยกส่วนเอาน้ำมันออกมา

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันของ marine oils โดย GLC

นิยาม

วิธีนี้ใช้วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันใน marine oils และ marine oil ester โดยใช้ capillary column gas liquid chromatography

ขอบเขต

วิธีนี้ใช้หาองค์ประกอบของกรดไขมันใน marine oils และ marine oil ester โดยเปรียบเทียบในรูปของร้อยละของพื้นที่ (area %) และใช้หาปริมาณ EPA และ DHA เป็น mg/g โดยใช้ fused sillica capillary column ที่เคลือบด้วย bonded polyglycol เป็นของเหลวอยู่ภายใน และใช้ Tricosanoic acid (C23 : 0) เป็น internal standard วิธีนี้ใช้วิเคราะห์ตัวอย่าง marine oil หรือ marine oil ester และในรูปของ EPA หรือ DHA บรรจุแคปซูล

อุปกรณ์

1. เครื่อง gas chromatography (GC) พร้อมอุปกรณ์ประกอบ ซึ่งสามารถใช้กับระบบ Capillary ได้ โดยสามารถตั้ง split ratio ได้ มีหัววัดแบบ flame ionization detector (FID) และสามารถตั้งโปรแกรมอุณหภูมิได้
2. Capillary Column เป็น fused sillica ความยาวไม่น้อยกว่า 25 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2-0.35 มล. เฟสของเหลวควรเป็น bonded polyglycol
3. Carrier gas เป็นไฮโดรเจน หรือ ฮีเลียม 99.99% หรือบริสุทธิ์มากกว่า
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิหรือ heating block
5. หลอดแก้วมีฝาเกลียว ขนาด 16X125 มิลลิเมตร

6. ขวดบรรจุตัวอย่างพร้อมฝาเกลียว ขนาดอย่างน้อย 2 มิลลิเมตร
7. Volumetric pipettes ขนาด 1 และ 2 มิลลิเมตร
8. Volumetric flask ขนาด 25 และ 100 มิลลิเมตร
9. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
10. แก๊สไนโตรเจนปราศจากน้ำ

สารเคมี

1. Tricosanoic acid (C23:0) เป็น internal standard (เตรียมโดยชั่ง C23:0 10 มิลลิกรัม ละลายใน Iso-octane AR grade(2,24 Trimethylpentane) 0.5 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดแก้วมีฝาเกลียวหลอดละ 50 ไมโครลิตร โดยใช้ Microsyringe ขนาด 100 ไมโครลิตร นำไประเหยไล่ตัวทำละลายออกด้วยแก๊สไนโตรเจน ปิดฝาให้สนิท แช่แข็งในตู้เย็น
2. 0.5 N NaOH ใน Methanol (เตรียมโดยการชั่ง Sodium hydroxide AR grade 1 กรัม เติม Methanol AR grade 50 มิลลิลิตร กวนด้วย magnetic stirror โดยใส่ในบีกเกอร์ ขนาดใหญ่ที่มีน้ำเป็นตัวช่วยระบายความร้อนอยู่ภายใน)
3. 12% Borotrifluoride ใน Methanol AR grade
4. Iso-octane AR grade
5. Saturated Sodium Chloride (เตรียมโดยละลาย Sodium Chloride 36 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร โดยให้ความร้อนเล็กน้อย)
6. Hexane
7. Methanol

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการทดลอง

การเตรียม Methyl ester ของกรดไขมัน

การหา Area Percentages

1. ชั่งเตรียมน้ำมันตัวอย่าง 10 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว
2. เติม 0.5 NaOH ใน Methanol จำนวน 1 มิลลิลิตร ไล่อากาศออกด้วยแก๊สไนโตรเจน ปิดฝาเขย่า 10 วินาที
3. Reflux ในน้ำเดือด 30 นาที หรือจนได้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

4. ทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง เติม Borontrifluoride ใน Methanol 2 มิลลิลิตร ไล่อากาศด้วยแก๊สไนโตรเจนปิดฝา เขย่า 10 วินาที Reflux ในน้ำเดือด 20 วินาที
5. หลังจากทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง เติม Hexane 1 มิลลิลิตร ปิดฝา ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer เติม Saturated sodium chloride 3 มิลลิลิตร ปิดฝา เขย่าให้เข้ากันดี แล้วทิ้งไว้ให้แยกชั้น
6. ดูดผิวบนใส่ในขวด vial ขนาด 4-5 มิลลิลิตร ที่มีฝาชั้นในเป็น ซิลิโคนปิดสนิท
7. ฉีดตัวอย่าง 1-2 ไมโครลิตร ลงใน Gas chromatography

<u>การหาปริมาณ DHA และ EPA หน่วยมิลลิกรัม ต่อน้ำมัน 1 กรัม</u>

1. ชั่งน้ำมันตัวอย่าง 10 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวปิดและมีสาร internal standard อยู่ 0.1 มิลลิกรัม
2. เติม 0.5 N NaOH ใน Methanol จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ไล่อากาศด้วยไนโตรเจน ปิดฝา
3. Reflux จนได้สารละลายเนื้อเดียวกัน 20 วินาที ในน้ำเดือด
4. ทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง เติม Borotrifluoride ใน Methanol 2 มิลลิลิตร ไล่อากาศออกด้วยไนโตรเจน ปิดฝา เขย่า 10 วินาที Reflux 20 วินาที ในน้ำเดือด
5. ทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง เติม 0.1 มิลลิลิตร Hexane ไล่อากาศด้วยไนโตรเจน ปิดฝา เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer เติมน้ำเกลืออิ่มตัว 30 มิลลิลิตร ไล่อากาศออกด้วยไนโตรเจน เขย่า 30 วินาที
6. ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จะเห็นการแยกชั้น ดูดส่วนบนของชั้น Hexane ใส่ในหลอดฝาเกลียวที่สะอาด ไล่อากาศออกด้วยไนโตรเจน แล้วปิดฝา
7. ฉีดตัวอย่าง 1 – 2 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง GC ที่เตรียมไว้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ Methyl esterด้วย Gas Chromatography

column : Capillary Column DB Wax 30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 microns

Injection temperature : 250°C

Detecter temperature : 300°C

Column temperature : Temperature program

	Rate (°C/min)	Temperature (°C)	Time (min)
Initial temperature		170	2
Final temperature	5	240	9

Split ratio : 1:20

<u>สูตรการคำนวณ</u>

1. Area Percentages

$$\text{Area \% fatty acids} = \frac{100\ A_x}{(A_T)-(A_I)}$$

โดยที่

A_x = พื้นที่ของ Fatty acid "X"

A_T = พื้นที่ของโครมาโตรแกรมทั้งหมด

A_I = พื้นที่ของ Hexane

2. ปริมาณ DHA และ EPA หน่อยมิลลิกรัมต่อน้ำมัน 21 กรัม

$$\text{DHA หรือ EPA, mg/g} = \frac{(A_x)\ (W_{IS})\ (CF_x)\ X\ 1000}{(A_{IS})\ (W_S)\ (1.04)}$$

โดยที่

(A_x) = พื้นที่ของ Fatty acid "X"

(A_{IS}) = พื้นที่ของ Internal Standard

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(CF_x) = Theoretical correction factor ของ DHA (0.97) หรือ EPA (0.99)

(W_{IS}) = น้ำหนักของ Internal Standard ที่เติมลงไปหน่วยเป็น มิลลิกรัม

(W_S) = น้ำหนักของน้ำมันตัวอย่างหน่วยมิลลิกรัม

ตารางที่ 36 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดไขมัน

สารเคมี	แหล่งที่มา
Reference standard GLC 68B methylester	NU CHECK PRER, INC., USA.
Eicosapentaenoic acid (C 20:5)	NU CHECK PRER, INC., USA.
Internal standard Tricosanoic acid (C23:0)	NU CHECK PRER, INC., USA.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 37 Reference standard GLC 68B methylester

Chain	Fatty acid	% by weight
C14:0	METHYL MYRISTATE	3.0
C14:1	METHYL MYRIDSTTOLEATE	1.0
C16:0	METHYL PALMITATE	10.0
C16:1	METHYL PLAMITOLEATE	2.0
C18:0	METHYL STEARATE	15.0
C18:1	METHYL OLEATE	25.0
C18:2	METHYL LINOLEATE	10.0
C18:3	METHYL LINOLENATE	4.0
C20:0	METHYL ARACHIDATE	2.0
C20:1	METHYL 11 - EICOSENOATE	2.0
C20:2	METHYL 11,14 EICOSADIENOATE	2.0
C20:3	METHYL HOMOGRAMMALINOLENATE	4.0
C20:4	METHYL ARACHIDONATE	4.0
C22:0	METHYL BEHENATE	4.0
C22:1	METHYL ERUCATE	2.0
C22:6	METHYL DOCOSAHEXAENOATE	4.0
C24:0	METHYL LIGNOCERATE	2.0
C24:1	METHYL NERVONATE	4.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ขั้นตอน automatic processor (Humason, 1979)

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1	50% alcohol I	1
2	50% alcohol II	1
3	70% alcohol I	1
4	70% alcohol II	1
5	95% alcohol I	1
6	95% alcohol II	1
7	100% alcohol I	1
8	100% alcohol II	1
9	chroloform I	1
10	chroloform II	1
11	paraffin I	1 ½
12	paraffin II	1 ½

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมสารเคมีและวิธีการย้อมสี

Hematoxylin และ Eosin (H&E) (Humason, 1979)

การเตรียม Mayer' s hematoxylin

hematoxylin crystals	4.0 g
น้ำกลั่น	2000 ml
sodium iodate	0.8 g
potassium หรือ ammonium alum	200.0 g
citric acid	4.0 g
chloral hydrate	200.0 g

ละลาย alum ในน้ำกลั่น แล้วเติม hematoxylin ลงไป คนให้ละลาย จึงเติม sodium iodate ผสมให้เข้ากัน เติม citric acid และ chloral hydrate คนให้เข้ากัน เขย่าจนสารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกันได้สีแดงอมม่วง (red-dish violet) ควรทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้

การเตรียม Eosin

eosin Y, CI 45380	3.0 g
70% ethyl alcohol	1000 ml
glacial acetic acid	5 ml

ผสมเข้าด้วยกัน แล้วเติม glacial acetic acid 2-3 หยดก่อนใช้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการย้อม

- xylene I	3 min
- xylene II	3 min
- xylene III	3 min
- 100% ETOH I	3 min
- 100% ETOH II	3 min
- 95% ETOH I	3 min
- 95% ETOH II	3 min
- 80% ETOH I	3 min
- 80% ETOH II	3 min
- 50% ETOH	3 min
- Distilled wt.	3 min
- Hematoxylin	7 min
- Dw run tap wt.	10 min
- Eosin	3 – 5 min
- 95% ETOH I	3 min
- 95% ETOH II	3 min
- 100% ETOH I	3 min
- 100% ETOH II	3 min
- xylene I	3 min
- xylene II	3 min
- xylene III	3 min

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายปริญญา ลีฬหานนท์ เกิดเมื่อวันที่ 21 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2521 จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนเบญจมราชรังสฤษฎ์ จังหวัดฉะเชิงเทรา จากนั้นศึกษาต่อโดยสำเร็จการศึกษาปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เมื่อปีการศึกษา 2542

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย