บทที่ 3

วิธีการดำเนินการทดลอง

การทดลองที่ 1

ศ.ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต และคณะ ในปี พ.ศ.2534 ได้ทำการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการใช้สารอาหารปริมาณน้อยอัน ได้แก่ โคลีน (Choline) วิตามินซี (Vitamin C) แอสตาแซนทีน (Astaxanthin) และ น้ำมันปลาทูน่า (Tuna Oil) เพื่อศึกษาการเพิ่มความสามารถในการต้านทานโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ โดยการเติมสารอาหารเหล่านี้ลงในอาหารสำเร็จรูปที่มีขายทั่วไปในท้องตลาด ปริมาณความเข้มข้นของสารอาหารปริมาณน้อยที่ใช้ คือ 600, 2,000, 200ส่วนในล้านส่วน และ 3 % น้ำหนักอาหาร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังให้อาหารสด คือ หอยกะพงสับร่วมกับอาหารสำเร็จรูป และอาหารสำเร็จรูปจากที่มาอื่น ได้อาหารทดลอง 10 สูตร ดังที่แสดงได้ในตารางที่ 3

<u>ระบบและวิธีการเลี้ยง</u>

เลี้ยงกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะ PL 15 ความหนาแน่นบ่อละ 75 ตัว หรือ 100 ตัวต่อตารางเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 0.017 กรัม ความยาว 1.50 เซนติเมตร เลี้ยงด้วยอาหารทดลอง 10 สูตร (ตารางที่ 3) สูตรละ 2 ซ้ำ วันละ 4 มื้อ เป็นเวลา 30 วัน ในบ่อไฟเบอร์กลมขนาด 200 ลิตรที่บรรจุน้ำ 150 ลิตร ระบบการเลี้ยงเป็นแบบปิด (Closed Recirculating System) โดยน้ำจะถูกสูบผ่านระบบกรองไหลเข้าสู่ท่อไปยังบ่อเลี้ยง ซึ่งควบคุมระดับน้ำให้อยู่ที่ 150 ลิตร โดยระบบน้ำล้น น้ำที่ล้นออกจะเข้าสู่ท่อกลางไหลสู่รางรองรับ และไหลไปตามท่อน้ำกลับไปยังบ่อเก็บ ผลการทดลองที่ศึกษา ได้แก่ น้ำหนัก และอัตราการรอด เมื่อเลี้ยงได้ 30 วัน

<u>การทดสอบความต้านทานโรคหัวเหลือง</u>

ให้กุ้งทดลองกินเนื้อกุ้งสับที่เป็นโรคหัวเหลืองตาย (ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ค้นคว้าวิจัยการเพาะเลี้ยงกุ้งเครือเจริญโภคภัณฑ์ จำกัด) เป็นเวลา 3 วัน เฉพาะมื้อเช้า หลังจากนั้นเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารแต่ละสูตรต่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จึงเก็บข้อมูลอัตราการตายของกุ้งทดลอง

ข้อมูลคุณภาพน้ำ

คุณภาพน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเป็น ดังนี้ ความเค็ม 28.5 ± 1.0 ส่วนในพันส่วน, อุณหภูมิ 28.0 ± 1.0 องศาเซลเซียสและปริมาณแอมโมเนียต่ำกว่า 0.1 ส่วนในล้านส่วน

ตารางที่ 3 อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำวัยรุ่น

สูตรอาหารที่	ส่วนประกอบที่สำคัญของชนิดอาหาร
1	Basal Diet 1 (อาหารสำเร็จรูปจากบริษัท ที่1)
2	Basal Diet 1 + Horse mussels
3	Basal Diet 1 + Choline 600 ppm
4	Basal Diet 2 (อาหารสำเร็จรูปจากบริษัทที่ 2)
5	Basal Diet 1 + Choline 600 ppm + Vitamin C 2000 ppm
6	Basal Diet 1 + Choline 600 ppm + Vitamin C 2000 ppm + Tuna oil 3%
7	Basal Diet 1 + Choline 600 ppm + Vitamin C 2000 ppm + Tuna oil 3% + Astaxanthin 200 ppm
8	Basal Diet 1 + Choline 600 ppm + Tuna oil 3% + Astaxanthin 200 ppm
9	Basal Diet 1 + Choline 600 ppm + Tuna oil 3%
10	Basal Diet 1 + Choline 600 ppm + Astaxanthin 200 ppm

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองที่ 2

จากการทดลองที่ 1 ดูผลของสารอาหารปริมาณน้อยแล้วเลือกสารที่ให้ผลดีมาใช้ในการทดลองที่ 2 แต่เป็นการศึกษาผลของสารนั้น ๆ โดยไม่ใช้ร่วมกัน เพื่อให้เห็นผลที่ชัดเจน ซึ่งมีวิธีการทดลองดังนี้

อาหารทดลองสูตรปกติชนิดเดียวกับการทดลองที่ 1 และสารอาหารปริมาณน้อยที่เลือกใช้ ได้แก่

Vitamin C Ascorbate 2 polyphosphate (Stay-C, บริษัทโรวิไทย จำกัด)

Astaxanthin Carophyll pink (Astaxanthin 8 % หุ้มด้วย gelatine, carbohydrates และ antioxidants) บริษัทโรวิไทย จำกัด

น้ำมันปลาทูน่า บริษัท ยูนิคอรด์ฟีด จำกัด

นำอาหารทดลองมาเติม วิตามินซี แอสตาแซนทีน และน้ำมันปลาทูน่าลงในไปปริมาณความเข้มข้น 2,000, 200 ส่วนในล้านส่วน และ 3 %น้ำหนักอาหาร ตามลำดับ นอกจากนี้ได้เพิ่มไข่แดงลงไปในสูตรอาหารที่เติมแอสตาแซนทีน กรรมวิธีการเตรียมอาหารได้แสดงในแผนภูมิ (Flow Chart) ในรูปที่ 2 จะได้อาหารทดลอง 5 สูตร ตามที่แสดงไว้ในตารางที่ 4

กุ้งทดลองได้ซื้อกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะ Postlarvae (PL) 30 จากฟาร์มแห่งหนึ่งในจังหวัดชลบุรีนำมาเลี้ยงด้วยอาหารทดลอง ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในบ่อกลมขนาด 200 ลิตร ความหนาแน่นกุ้ง PL ขนาดใหญ่บ่อละ 50 ตัว หรือ 67 ตัวต่อตารางเมตร น้ำหนัก 0.0700 - 0.1960 กรัม สูตรอาหารละ 2 ซ้ำและกุ้ง PL ขนาดเล็กบ่อละ 75 ตัว หรือ 100 ตัวต่อตารางเมตร มีน้ำหนักรวมอยู่ในช่วง 0.0146 - 0.0333 กรัม สูตรอาหารละ 2 ซ้ำเช่นเดียวกัน ในน้ำเลี้ยง 150 ลิตร เป็นเวลา 45 วัน การหมุนเวียนของน้ำเป็นแบบ closed recirculating system (เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1) โดยระบบหมุนเวียนน้ำนี้วันละ 12 ชั่วโมง ให้อาหาร 5 สูตร(ตารางที่ 4) ทดลองสูตรละ 2 ซ้ำต่อขนาดกุ้ง วันละ 5 มื้อ คือ 8.00 น. 11.00 น. 14.00 น. 17.00 น. และ 20.00 น. บันทึกผลอัตราการรอดความยาวเฉลี่ย และน้ำหนักเฉลี่ยหลังสิ้นสุดการเลี้ยง จากนั้นทดสอบความต้านทานโรคหัวหลือง

การทดสอบความต้านทานโรคหัวเหลือง

โดยวิธี Co-habitation นำเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองจากศูนย์ค้นคว้าวิจัยการเพาะเลี้ยงกุ้งเครือเจริญโภคภัณฑ์จำกัด ความเข้มข้น 1:50000 ฉีดเข้าบริเวณกล้ามเนื้อกุ้งใหญ่ปกติ ตัวละ 100 ไมโครลิตร เมื่อกุ้งตายนำมาสับเนื้อให้กุ้งวัยรุ่น ซึ่งเป็นกุ้งรุ่นเดียวกับกุ้งในบ่อทดลองกินเฉพาะมื้อเช้าเป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน รอจนกุ้งเริ่มมีการตายเกิดขึ้นแล้วจึงนำกุ้งหัวเหลืองที่มีชีวิตอยู่ใส่ในบ่อทดลองของกุ้ง PL ขนาดใหญ่ ซ้ำที่ 1 และบ่อทดลองของกุ้ง PL ขนาดเล็ก ซ้ำที่ 1บ่อละ 2 ตัว (กุ้งทดลอง 25 ตัว : กุ้งหัวเหลือง 2 ตัว) สำหรับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นกุ้งชุดเดียวกันจะให้กินเนื้อกุ้งใหญ่ปกติที่ไม่ได้ฉีดเชื้อหัวเหลือง ซึ่งจะนำกลุ่มนี้ใส่ในบ่อทดลองของกุ้ง PL ขนาดใหญ่ ซ้ำที่ 2 และบ่อทดลองของกุ้ง PL ขนาดเล็กซ้ำที่ 2 บ่อละ 2 ตัวเช่นเดียวกัน (กุ้งทดลอง 25 ตัว : กุ้งควบคุม 2 ตัว) เปลี่ยนการหมุนเวียนน้ำจากระบบ closed recirculating system เป็นการถ่ายเทน้ำแบบเปลี่ยนบางส่วน โดยน้ำที่ใช้แล้วจะทิ้งและเปลี่ยนน้ำใหม่ครั้งละ 50 % วันละ 2 ครั้ง คือเช้ากับเย็น บันทึกอัตราการตายสะสม และเก็บกุ้งที่ตายแช่ไนโตรเจนเหลว เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี, แอสตาแซนทีน และกรดไขมันต่อไป

ตารางที่ 4 อาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้ง PL 30

ชื่อย่อชนิดอาหาร	ส่วนประกอบที่สำคัญของชนิดอาหาร
VC	BASAL DIET + VITAMIN C 2000 ppm
AS	BASAL DIET + ASTAXANTHIN 200 ppm
BA	BASAL DIET
OIL	BASAL DIET + FISH OIL 3%
ASEGG	BASAL DIET + ASTAXANTHIN 200 ppm + EGG (one egg / 3 kilogram diet)

อาหารสำเร็จรูป

⇓

แบ่งชั่ง 5 ครั้ง ๆ ละ 3 กิโลกรัม เพื่อเติมสารอาหารต่างๆ จะได้อาหาร 5 สูตร

⇓

อาหารสูตรที่ 1 เติม Vitamin C 2,000 ส่วนในล้านส่วน

อาหารสูตรที่ 2 เติม Astaxanthin 200 ส่วนในล้านส่วน

อาหารสูตรที่ 3 เป็นอาหารสูตรปกติไม่เติมสารอาหาร

อาหารสูตรที่ 4 เติมน้ำมันปลาลงไป 3 % ของน้ำหนักอาหาร

⇓

นำอาหารแต่ละสูตรเข้าเครื่องผสมแบบแห้ง ทำการผสมสูตรละ 15 นาที

⇓

จากนั้นทำการอัดเม็ดด้วยเครื่อง ที่ความชื้น 16-18 % อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส

⇓อาหารเม็ด

อบไอน้ำ 90 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นอบแห้ง 105 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

⇓อาหารเม็ดแห้ง

อาหารสูตรที่ 5 อาหารสูตรปกติผ่านขบวนการต่างๆได้ออกมาเป็นเม็ดอาหาร แล้ว

เติม Astaxanthin ผสมไข่ไก่ (1ฟองต่อ3กิโลกรัมอาหาร)

⇓

เก็บในที่มืด อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส

รูปที่ 2 ขั้นตอนกรรมวิธีการทำอาหาร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์อาหารและเนื้อกุ้งทดลอง

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง ดังต่อไปนี้

1. ปริมาณความชื้นโดยใช้เครื่องหาความชื้น Sartorius Thermo Control

2. ปริมาณโปรตีนโดยใช้เครื่อง Gerhardt Kjeldatherm Digestion Unit และ Gerhardt Vapodast 1ทำการย่อยตัวอย่างและนำตัวอย่างที่เกิดการย่อยสมบูรณ์แล้วมาไตเตรทหาปริมาณแอมโมเนีย

3. ปริมาณไขมันโดยใช้เครื่อง Soxtherm Automatic ใช้ Petroleum ether เป็นตัวทำละลายในการสกัดไขมัน

4. ปริมาณเถ้าโดยใช้เตาเผาความร้อนสูง เผาตัวอย่างที่ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

5. ปริมาณเส้นใยโดยใช้ชุดวิเคราะห์เส้นใยของ Gerhaedt ใช้ตัวอย่างที่ผ่านการวิเคราะห์หาไขมันแล้วมาวิเคราะห์หาเส้นใยต่อ

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของทั้ง 5 รายการข้างต้นใช้วิธีของ AOAC (1980) รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก

6. ศึกษาหาปริมาณแอสตาแซนทีน ตามวิธีของ Weber (1990) จาก Roache-publication โดยบดอาหารทดลอง ชั่งน้ำหนักและใช้ MAXATASE เป็นเอ็นไซม์ในการย่อยสารเคลือบอนุภาคแอสตาแซนทีน และใช้ ethanol และ dichloromethane เป็นสารสกัดแอสตาแซนทีนจากตัวอย่างอาหาร ทำสารละลายตัวอย่างที่ได้ให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟี่ นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ฉีดเข้าเครื่อง High Pressure Liquid Chromatography (HPLC, Model: Water 501) คอลัมน์ที่ใช้ ภายในบรรจุด้วย LiChrosorb Si 60, 5 ไมครอน ยาว 125 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร สำหรับเนื้อกุ้งทดลองจะบด ชั่งน้ำหนัก ใช้ acetone เป็นตัวสกัดแอสตาแซนทีนจากเนื้อกุ้งทดลอง สารละลายตัวอย่างที่ได้ครึ่งหนึ่งจะนำมาระเหยแล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC สารละลายตัวอย่างที่เหลืออีกครึ่งหนึ่งจะนำมาผ่านขบวนการ Saponification เพื่อทำลายพันธะของหมู่ ester ที่จับกับกรดไขมัน จะได้แอสตาแซนทีนอิสระ (Astaxanthin free) ฉีดเข้าเครื่อง HPLC สารเคมีที่ใช้สกัดแอสตาแซนทีนจากอาหารทดลองและเนื้อกุ้งทดลองดังแสดงในตารางที่ 5 และวิธีการวิเคราะห์แสดงในแผนผัง (flow chart) รูปที่ 3 และ รูปที่ 4

การวิเคราะห์หาปริมาณแอสตาแซนทีน ทั้งในอาหารทดลองและเนื้อกุ้ง จะคำนวณหาปริมาณจากสารมาตราฐานแอสตาแซนทีน (Standard Astaxanthin) โดยชั่งผลึกแอสตาแซนทีนบริสุทธ์ประมาณ 3 มิลลิกรัม ละลายด้วย chloroform 10 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย n-Hexane ดูดสารละลายผสมนี้มา 5 มิลลิลิตรเติม chloroform 4 มิลลิลิตร และเจือจางด้วย n-Hexane จนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายมาตราฐานที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร

สภาวะเครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์หาแอสตาแซนทีน

คอลัมน์	เตรียมคอลัมน์ Lichrosorb Si 60 ด้วยการผ่านสารละลายกรด phosphoric ในmethanol (1กรัมต่อ100มิลลิลิตร) อัตราการไหลของสาร 1 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหลของสาร 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง
เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase)	n-hexane/acetone (HPLC grade) 86:14
อัตราการไหล	1.2 มิลลิลิตรต่อนาที
ความดัน	ประมาณ 80 bar
อุณหภูมิ	28 องศาเซลเซียส
ปริมาตรที่ฉีด	20 ไมโครลิตร
การตรวจค้น	VIS-detection ที่ 470 นาโนเมตร
เวลาในการแยกสาร	15 นาที

7. ศึกษาหาปริมาณกรดไขมันในอาหารและเนื้อกุ้งทดลอง วิธีการวิเคราะห์ดัดแปลงมาจากวิธีของ Artemia Reference Center (Sorgeloose et al., 1993) บดตัวอย่าง ชั่งน้ำหนัก ใช้ chloroform ใน methanol เป็นตัวสกัดไขมันในตัวอย่าง สารละลายตัวอย่างที่ได้จะนำมาผ่านขบวนการ esterification ให้ได้กรดไขมัน สารละลายตัวอย่างที่ได้จะนำไปฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatography (GC, FISON Model 800) Detector คือ Flame Ionized Detector (FID) คอลัมน์ที่ใช้คือ DB-WAX ยาว 30เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร สารเคลือบหนา 25 ไมครอน บริษัท J&W SCIENTIFIC สารเคมีต่างที่ใช้ในการสกัดไขมันจากตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 6 วิธีการวิเคราะห์แสดงในแผนผัง (flow chart) รูปที่ 5

สภาวะเครื่อง GC ในการวิเคราะห์หากรดไขมัน

อุณหภูมิเริ่มต้น 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 220 องศาเซลเซียส อัตราการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียสต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที

carrier gas (N_2)	2	มิลลิลิตรต่อนาที
makeup gas(N_2)	30	มิลลิลิตรต่อนาที
อุณหภูมิของinjector	250	องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของdetector	270	องศเซลเซียส

8. ศึกษาหาปริมาณวิตามินซีในอาหารและเนื้อกุ้งทดลอง โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Wang และคณะ (1988) บดตัวอย่าง ชั่งน้ำหนัก ใส่บัฟเฟอร์ คือ 0.13 M sodium acetate/0.2% DTT pH 4.8 เป็นสารสกัดวิตามินซีจากตัวอย่าง สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จะฉีดเข้าเครื่อง HPLC ใช้คอลัมน์ Nova-Pack C_{18} Spherical, 4 ไมครอน ยาว 300 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.9 มิลลิเมตร บริษัท Waters สารเคมีที่ใช้ในการสกัดวิตามินซี ดังแสดงในตารางที่ 7 วิธีการวิเคราะห์แสดงในแผนผัง (flow chart) รูปที่ 6

สภาวะเครื่อง HPLC ที่ใช้วิเคราะห์หาวิตามินซี

คอลัมน์	ปั๊มเฟสเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ Nova-Pack C_{18} ด้วยอัตราการไหล 0.8 มล.ต่อนาทีอย่างน้อย 1 ชั่วโมง
เฟสเคลื่อนที่	0.1 M sodium acetate/0.1mM EDTA/220 ไมโครลิตร n-octylamine pH4.0
อัตราการไหล	0.8 มิลลิลิตรต่อนาที
ความดัน	ประมาณ 110 บาร์
อุณหภูมิ	28 องศาเซลเซียส
ปริมาตรที่ฉีด	20 ไมโครลิตร
การตรวจค้น	UV detection ที่ 254 นาโนเมตร
เวลาในการแยกสาร	15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์แอสตาแซนทีน ในอาหารและเนื้อกุ้งทดลอง

สารเคมี	ประเภท
Chloroform	A.R.
n-Hexane	A.R.
Diethyl ether	A.R.
Dichloromethane	A.R.
MAXATASE	P440000 encapsulated (International Biosynthetics, Rijswijk, Netherland)
Silica gel 60	partical size 0.2-0.5 mm. for column chromatography
Absolute Ethanol	A.R.
Ortho-phosphoric acid 85%	A.R.
Methanol	A.R.
Astaxanthin crystal	RO 11-3741, Sealed under Argon
t-Butyl methyl ether	A.R.
Potassium hydroxide	A.R.
n-Hexane	HPLC grade
Acetone	HPLC grade
Magnesium sulfate hydrate 22.5-25 % H_2O	A.R.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดไขมัน ในอาหารและเนื้อกุ้งทดลอง

สารเคมี	ประเภท
Potassium chloride	A.R.
Chloroform	A.R.
Toluene	A.R.
Acetyl chloride	A.R.
Sodium sulphate	A.R.
Methanol	A.R.
Internal standard cis 11,14 eicosadienoate	Nu-Check-Prep U - 68 - M
GLC - standard GLC - 68 - B methylesters	Nu-Check-Prep
Nitrogen gas	Oxygen free
Hydrogen gas	
Air	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์วิตามินซี ในอาหารและเนื้อกุ้งทดลอง

สารเคมี	ประเภท
Dithiothreitol (DTT)	A.R.
Distilled water	
Methanol	A.R.
Acetic acid	A.R.
Disodium ethylene diaminetetra acetate (EDTA)	A.R.
L- Ascorbic acid	A.R.
Acid Phosphatase 150 mg solid 7 units/mg solid	P.A.
Sodium acetate	A.R.
n-Octylamine	A.R.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชั่งตัวอย่างอาหารที่บดแล้ว 10 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรที่ทราบน้ำหนัก

⇓

ใส่ MAXATASE 100 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร

⇓

อุ่นใน waterbath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 30 นาที

⇓

ปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนักอีกครั้ง จากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่างมา 10 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร

⇓

เติม ethanol 100 มิลลิลิตร เขย่า เติม dichloromethane จนได้ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

⇓

ทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ โดยนำตัวอย่างมา 25 มิลลิลิตร

⇓

ผ่านตัวอย่างลงในหลอดโครมาโตกราฟี่ ชะตัวอย่างด้วย n-hexane/ether (1:1) 120 มิลลิลิตร

⇓

รวบรวมตัวอย่างที่ถูกชะผ่านคอลัมน์ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร

⇓

ระเหยสารตัวอย่างที่รวบรวมได้ แล้วละลายตัวอย่างที่ได้ด้วย n-hexane/acetone (86:14)มิลลิลิตร

⇓

ฉีด HPLC

<u>รูปที่ 3</u> แผนผังแสดงวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ Astaxanthin ในอาหารทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชั่งตัวอย่างที่ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ มา 10 - 20 กรัม ใส่ magnesium sulfate hydrate ลงไปใน 5 กรัม

⇓

เติม Acetone 40 มิลลิลิตร บดส่วนผสมทั้งหมด กรอง แล้วเติม Acetone บดซ้ำอีก ทำซ้ำจนสารละลายที่กรองได้ไม่มีสี รวบรวมสารละลายที่กรองได้ วัดปริมาตร

⇓

นำสารละลายครึ่งหนึ่งมาทำการระเหยที่ 50 องศาเซลเซียส

⇓

ละลายตัวอย่างหลังระเหยด้วย n-hexane/acetone (86:14) ประมาณ 5 มิลลิลิตร

⇓

ฉีด HPLC

นำสารละลายที่เหลืออีกครึ่งหนึ่งมาระเหยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ละลายตัวอย่างหลังระเหยด้วย ethonal 60 มิลลิลิตร

⇓

t-butyl methyl ether 10 มิลลิลิตร และ 50% สารละลายpotassium hydroxide 5 มิลลิลิตร

⇓

นำสารละลายทั้งหมดไปทำการ reflux 30 นาที อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ทำให้เย็น

⇓

เทสารละลายทั้งหมดใส่กรวยแยกขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติม diethyl ether 100 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงและค่อยๆปล่อยกาซที่เกิดขึ้นออกมา

⇓

ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น หลังจากนั้นไขเอาชั้นน้ำออกมาทำการสกัดต่อ โดยเติม diethyl ether 100 มิลลิลิตร และ เขย่า อีก 2 ครั้ง

⇓

รวบรวมชั้นสารละลายที่ได้มาเติมน้ำกลั่น และ เขย่า ทำจน pH ของสารละลายเป็นกลาง ระเหยสารละลายetherที่เป็นกลาง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

⇓

เติมn-hexane/acetone (86:14)ละลายตัวอย่างที่ได้หลังระเหย นำไปฉีด HPLC

รูปที่ 4 แผนผังแสดงการวิเคราะห์หาปริมาณ Astaxanthin ในเนื้อกุ้งทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชั่งตัวอย่างแห้งที่บดแล้ว 1 กรัมใส่ในบีกเกอร์

⇓

เติม chloroform/methanol (2:1) 30 มิลลิลิตร ใส่แท่งแม่เหล็กตั้งบนmagnetic stirrer 10 นาที ทำซ้ำจนสารละลายที่ได้ไม่มีสี

⇓

วัดปริมาตร เทใส่กรวยแยก ใส่ 0.1M potassium chloride 20% ของปริมาตร

⇓

เขย่า1-2 นาที ตั้งทิ้งให้แยกชั้น แล้วไขเอาชั้นล่างมากรองผ่าน sodium sulphate

⇓

ระเหย เติม methanol/toluene 5 มิลลิลิตร flush ไนโตรเจน แช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส

⇓

นำน้ำมันที่ได้นี้ เติม 5% acetylchloride/methanol 5 มิลลิลิตร ตั้งในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส 60 นาที

⇓

ทิ้งให้เย็น เติม hexane และน้ำกลั่นอย่างละ 5 มิลลิลิตร ใส่ internal standard 0.2 มิลลิลิตร

⇓

เซนตริฟิว 5 นาที ที่ 4000 รอบ แยกเอาชั้น hexane ออกมา ทำซ้ำขั้นตอนเดิมอีก 3 ครั้ง

⇓

นำชั้น hexane ที่แยกได้ทั้งหมดมากรองผ่าน sodium sulphate แล้วนำไประเหย

⇓

ใส่ hexane 1 มิลลิลิตร ปิดฝาแช่เย็นจนกว่าจะนำมาฉีดเพื่อตรวจหาโดยเครื่อง GC

รูปที่ 5 แผนผังแสดงการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันในอาหารและเนื้อกุ้งทดลอง

ชั่งตัวอย่างอาหาร 0.5 กรัม ถ้าเป็นเนื้อ 5-10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์

⇓

ใส่ buffer (0.13M sodium acetate/0.2% DTT pH4.8) 10 มิลลิลิตร สำหรับอาหาร เขย่า เนื้อบดพร้อม buffer

⇓

sonicate 15 นาที ทิ้งให้เกิดการสกัดประมาณ 15 นาที แล้วกรอง

⇓

ดูดตัวอย่างที่กรองได้มา 3 มิลลิลิตร เติม enzyme 2 มิลลิลิตร เขย่า ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง

⇓

เซนตริฟิว 5 นาที 4000 รอบ

⇓

ฉีด HPLC

รูปที่ 6 แผนผังแสดงวิธีวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี ในอาหารและเนื้อกุ้งทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS-PC ในการวิเคราะห์โพรบิท หาช่วงเวลาที่เกิดการตายของกุ้งทดลองหัวเหลือง 50 เปอร์เซ็นต์ในสูตรอาหารต่าง ๆ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 16073770