

บทที่ 2 วิธีการดำเนินการทดลอง

2.1 เครื่องมือและสารเคมี

2.1.1 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร (proximate analysis)

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ตู้อบแห้งและถ้วยสำหรับอบแห้ง โถดูดความชื้น เตาเผาและถ้วยสำหรับเผาถ้ำ เครื่องมือย่อยและกลั่นตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์โปรตีน ชุดสกัดไขมัน เครื่องระเหยสาร ขาดัง บิวเรต ตู้ดูดควัน ปีกเกอร์ ฟลาสก์ก้นกลม ฟลาสก์รูปชมพู Petroleum ether จุดเดือด 40-60°C สารละลายกรดซัลฟูริก (H₂SO₄) 1.25% สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1.25% สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 40% (w/v) กรดซัลฟูริกเข้มข้น 95 – 98% (H₂SO₄ conc., AR grade) สารเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) สารผสมระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO₄·5H₂O) และโปแตสเซียมซัลเฟต (K₂SO₄) อัตราส่วน 1:9 หรือ Kjeldahl catalyst tablets สารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล โซเดียมคาร์บอเนต (Na₂CO₃, AR grade) กรดบอริก 4% กรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.1 นอร์มอล (w/v) เมทิลเรด (methyl red, AR grade) โบรโมครีซอลกรีน (Bromogresol green, AR grade) เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) 96% เป็นต้น

2.1.2 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์กรดไขมัน

เครื่อง Gas liquid chromatography (Agilent Technologies 7820A) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Satorius), เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) Yamato ตู้อบ (Hot air oven) Yamato เครื่องสั่นสะเทือนด้วยคลื่นความถี่สูง (Sonicator) ที่บดต่อมได้สมองปลา (Hand homogenizer) หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง (Nalgene Centrifuge tube) คอลัมน์กรดไขมัน (HP-Innowax Agilent J&W) ปีกเกอร์ 50 มิลลิลิตร (Pyrex) กระดาษกรอง Whatman no.1 ตู้แช่แข็ง Freezer -40°C (Legaci refrigeration system) ปากคืบ บีเปต หลอดแก้ว กรวยแก้ว เมทานอล (Methanol, AR grade) คลอโรฟอร์ม (Chloroform, AR grade) เฮกเซน (n-hexane, AR grade) กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid, AR grade) สารกันหืน (Butylated hydroxytoluene (BHT), AR grade) โปแตสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride, AR grade) โปแตสเซียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (Potassium hydrogen carbonate, AR grade) โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulfate anhydrous, AR grade) สารมาตรฐานกรดไขมัน (PUFA No. 3, menhaden oil) (external standard) กรดไขมัน C17:0 free fatty acid (internal

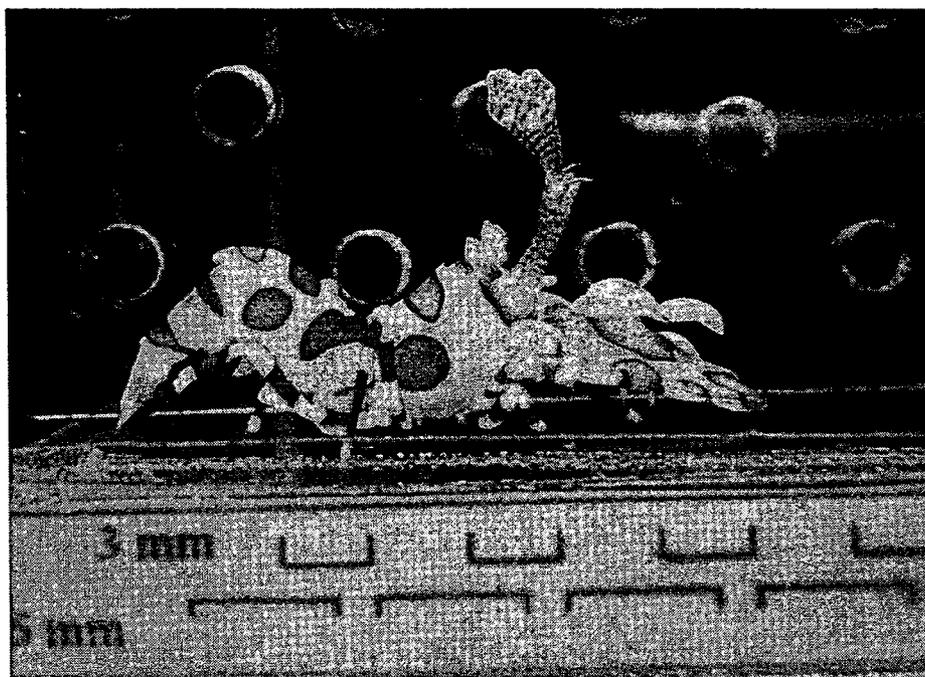
standard) กรดไขมันชนิดเดี่ยว ได้แก่ C20:0 methyl ester (external standard) และกรดไขมัน C22:0 methyl ester (external standard) ฮีเลียม ไนโตรเจน ไฮโดรเจนและออกซิเจน เป็นต้น

2.2 การดำเนินการทดลอง

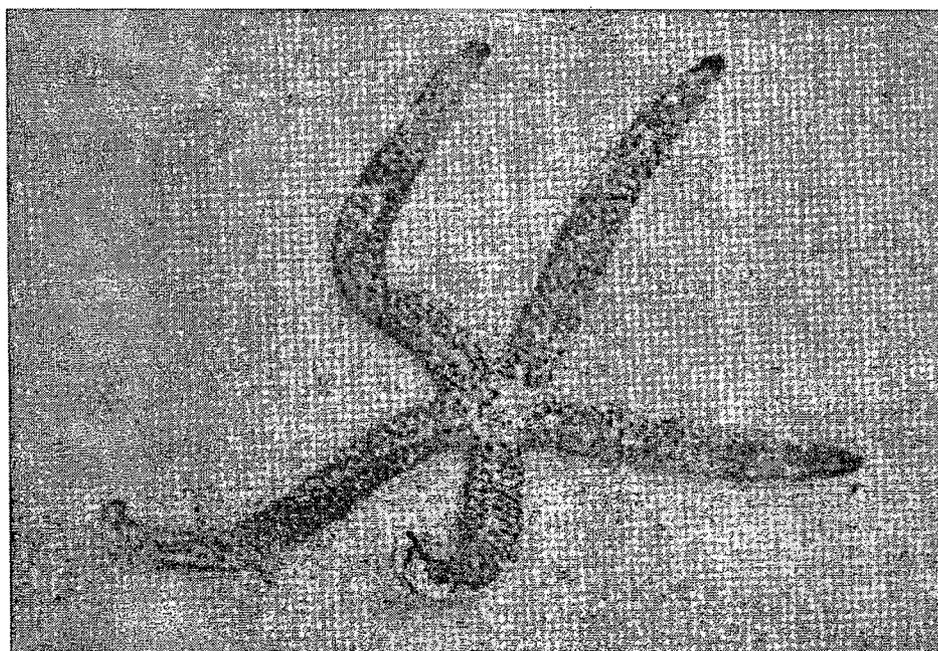
2.2.1 การทดลองที่ 1 การยอมรับอาหารทดแทนดาวแดงของกึ่งการตูน (*Hymenocera picta*) ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยง

2.2.1.1 การจัดเตรียมกึ่งการตูน กึ่งการตูนที่ใช้ในการทดลองได้มาจากการอนุบาลลูกกึ่งการตูนที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงจากระยะชูเอี้ยงจนกระทั่งลูกกึ่งการตูนคว่ำลงเกาะ ทำการอนุบาลลูกกึ่งการตูนในโรงเรือนสาธิตการเพาะเลี้ยงของสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา เมื่อลูกกึ่งการตูนอายุ 2 เดือนหลังลงเกาะทำการชั่งน้ำหนักและวัดความยาวโดยการถ่ายภาพเทียบกับไม้บรรทัดวัดที่มีสเกลบอกความยาว และนำมาวัดความยาวด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Image tool version 3 (IT3) จำนวน 15 ตัว ซึ่งกึ่งการตูนทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.23 ± 0.04 กรัมและความยาวเฉลี่ย 2.07 ± 0.15 เซนติเมตร (ภาพที่ 2.1)

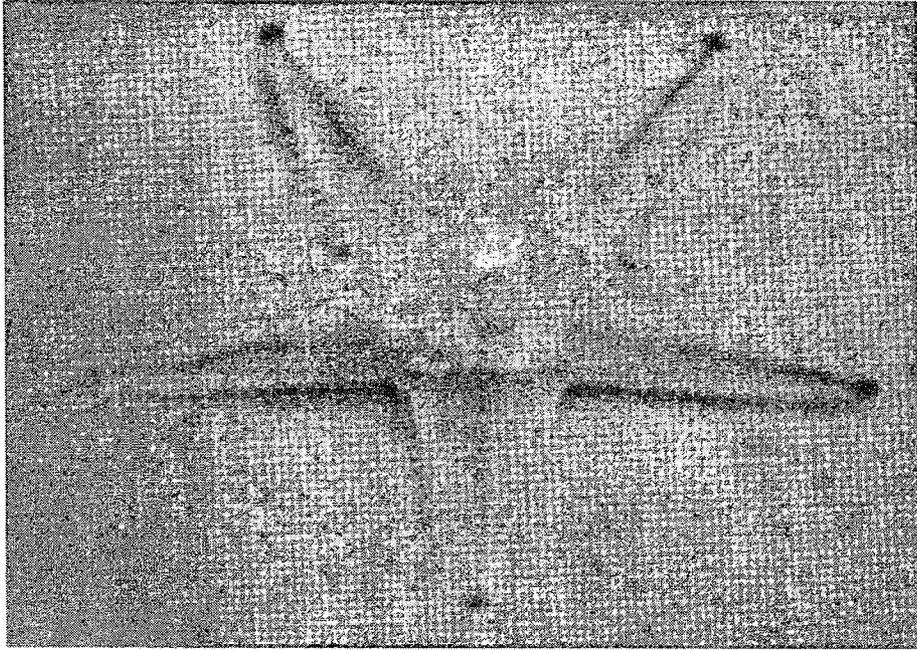
2.2.1.2 การจัดเตรียมชนิดอาหารทดลอง อาหารที่ใช้ในการทดลองได้แก่ ดาวแดง, *L. multiflora* (ภาพที่ 2.2) ดาวทราย, *Astropecten* sp. (ภาพที่ 2.3) ดาวแสงอาทิตย์, *L. maculata* (ภาพที่ 2.4) ดาวหมอนปีกเข็มหมุด, *C. novaeguineae* (ภาพที่ 2.5) และปลิงดำ, *H. leucospilota* (ภาพที่ 2.6) ซึ่งได้มาจากการตลาดสัตว์น้ำทะเลสวยงาม จตุจักร กรุงเทพฯ และจากชาวประมงชายฝั่งจังหวัดชลบุรี ทำการพักสัตว์ที่เป็นอาหารทดลองในถังที่มีระบบกรองและมีการหมุนเวียนน้ำตลอด 24 ชั่วโมง ณ โรงเรือนสาธิตการเพาะเลี้ยงสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จนกระทั่งทำการทดลอง



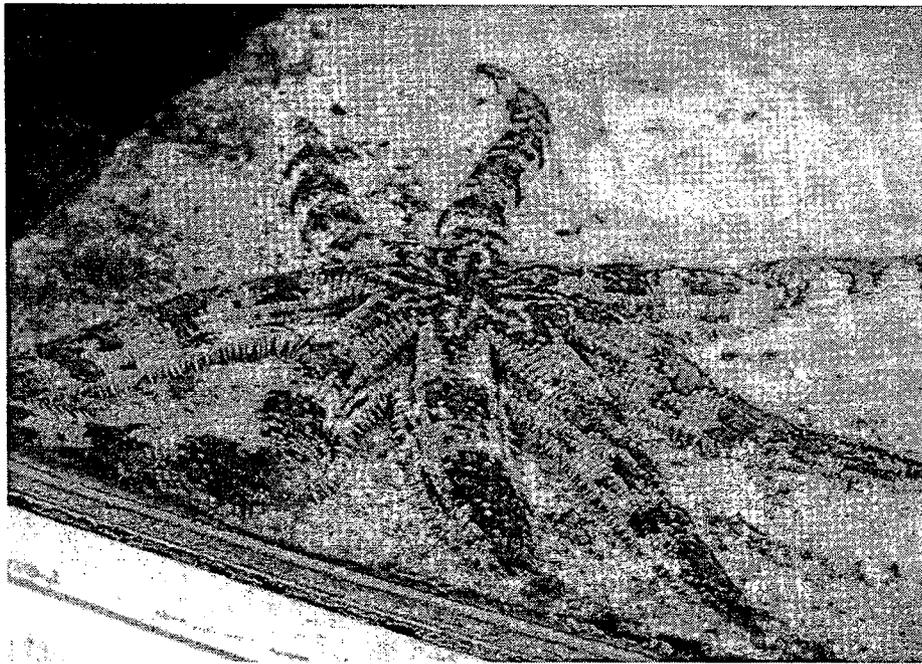
ภาพที่ 2.1 การวัดความยาวกึ่งการตั้งต้นที่ใช้ในการทดลองโดยการถ่ายภาพเทียบกับไม้บรรทัดที่มีสเกลบอกระยะก่อนนำมาวัดความยาวด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Image tool 3



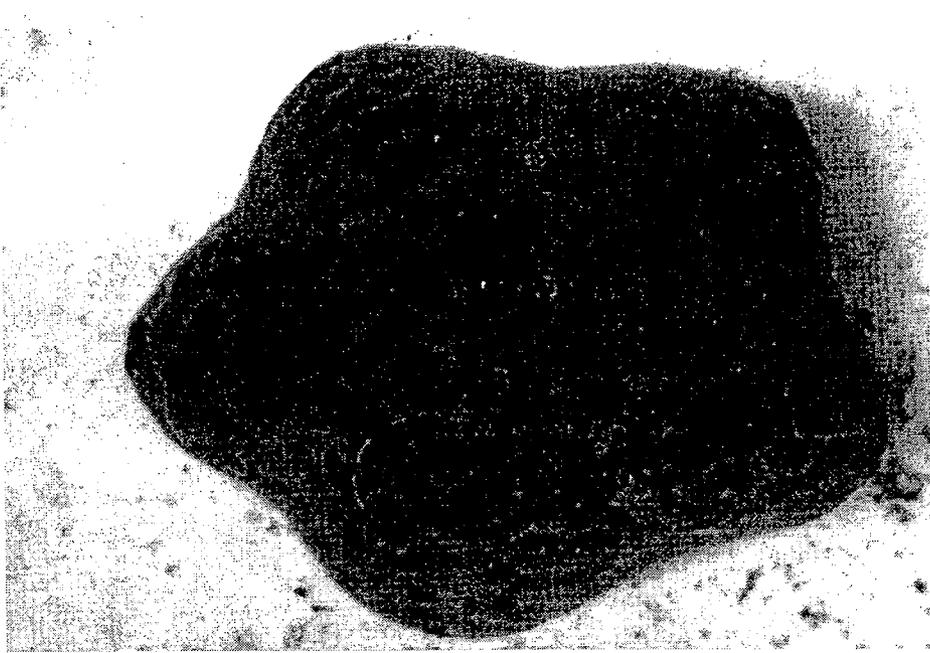
ภาพที่ 2.2 ดาวแดง *Linckia multiflora* ที่ใช้ในการทดลอง



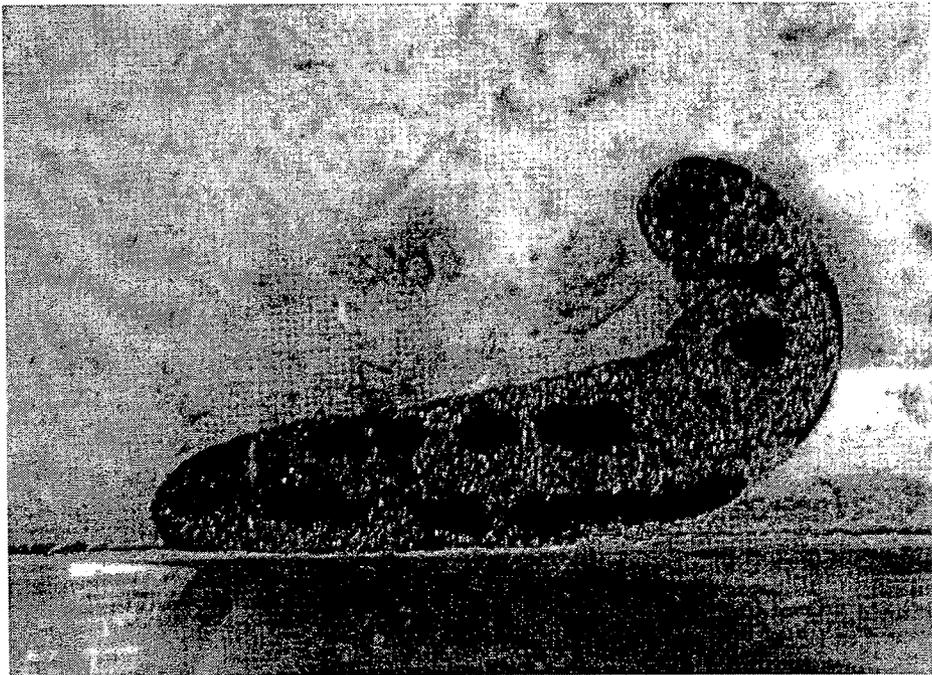
ภาพที่ 2.3 ดาวทราย *Astropecten* sp. ที่ใช้ในการทดลอง



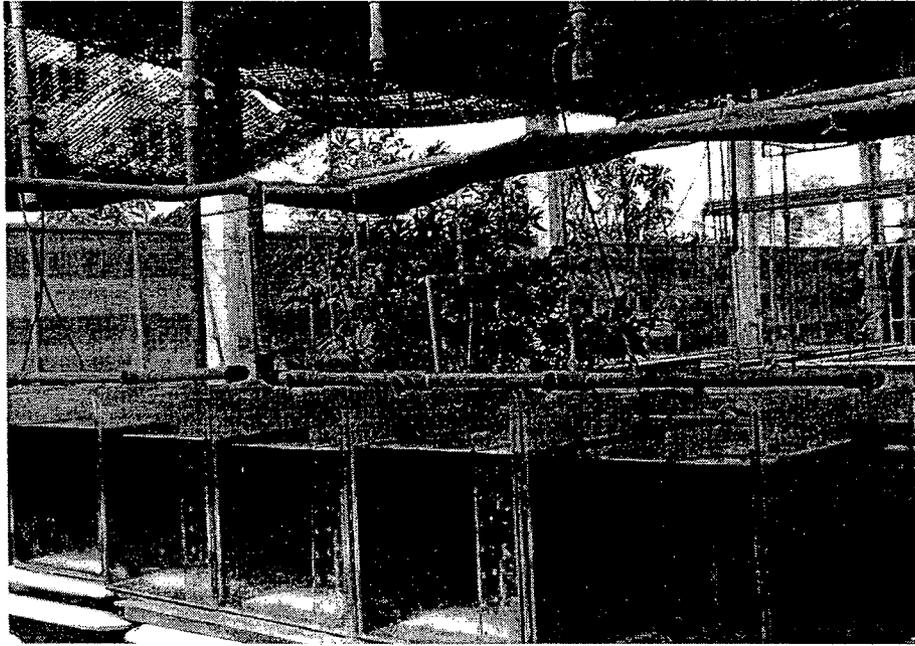
ภาพที่ 2.4 ดาวแสงอาทิตย์ *Luidia maculate* ที่ใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 2.5 ดาวหมอนปีกเข็มหมุด *Culcita novaeguineae* ที่ใช้ในการทดลอง



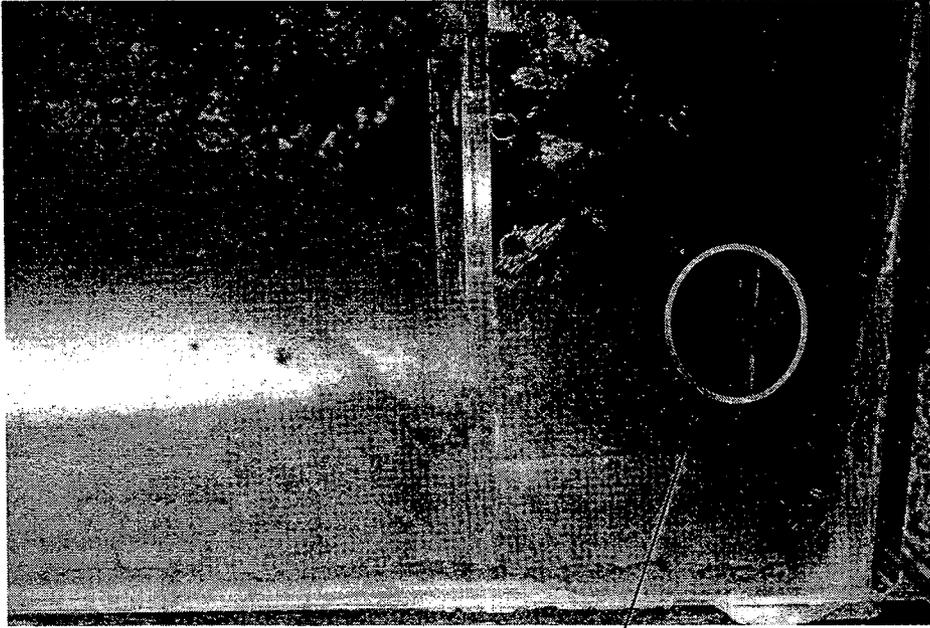
ภาพที่ 2.6 ปลิงดำ *Holothuria leucospilota* ที่ใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 2.7 ตู้สำหรับการทดลองที่ 1 ซึ่งเป็นตู้ที่ต่อเชื่อมกับระบบกรองภายนอกและมีการหมุนเวียนน้ำ 24 ชั่วโมง

2.2.1.3 การเตรียมตู้ทดลอง เตรียมตู้ทดลองขนาด $30 \times 35 \times 30$ ซม. บรรจุน้ำสูง 10 นิ้วจำนวน 5 ตู้ที่ต่อเชื่อมกับระบบกรองภายนอกที่มีการหมุนเวียนน้ำระหว่างตู้เลี้ยงและระบบกรองตลอด 24 ชั่วโมง และกั้นตู้ทดลองด้วยแผ่นอะคริลิกใสให้มีตู้ทดลองมีขนาด $25 \times 30 \times 30$ ซม. (ภาพที่ 2.7)

2.2.1.4 วิธีการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (5×3 Completely randomised design) เมื่อซังน้ำหนักและวัดขนาดความยาวกึ่งการตุนแล้ว แบ่งกึ่งการตุนออกเป็น 5 กลุ่มๆละ 3 ตัว (3 ซ้ำ) ดำเนินการทดลองครั้งละ 1 ซ้ำการทดลอง จนกระทั่งครบ 3 ซ้ำ ก่อนการทดลอง งดให้อาหารกึ่งการตุนเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายกึ่งการตุนมาใส่ตู้ทดลองจำนวน 1 ตัว/ตู้ และกั้นกึ่งการตุนให้อยู่มุมตู้ด้วยแผ่นอะคริลิกเป็นเวลาครึ่งชั่วโมงเพื่อให้กึ่งการตุนปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่(ภาพที่ 2.8) หลังจากนั้นจึงใส่อาหารทดลองพร้อมกันทุกตู้บริเวณกลางตู้ ยกแผ่นอะคริลิกออกจากตู้และบันทึกผลการทดลองทันที

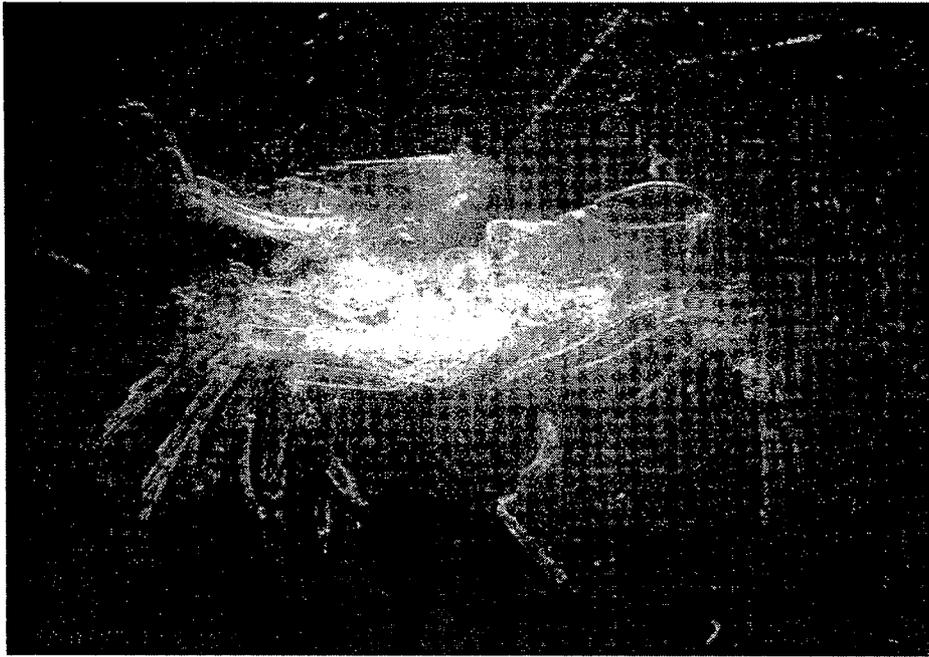


ภาพที่ 2.8 กุ้งการ์ตูนปรับตัวในตู้ทดลองก่อนการทดลอง

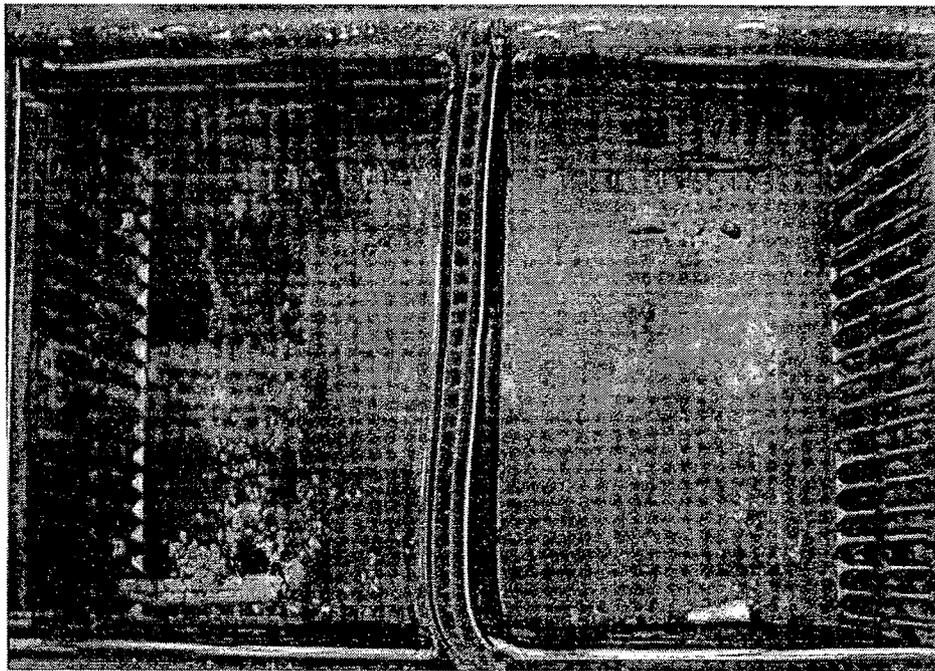
2.2.1.5 การบันทึกผลการทดลอง สังเกตและบันทึกพฤติกรรมการตอบสนองต่ออาหารของกุ้งการ์ตูน ด้วยกล้องบันทึกภาพเคลื่อนไหว (VDO, Cannon HD Legria HF 20) เป็นระยะเวลา 20 นาที จากนั้น สังเกตพฤติกรรมของกุ้งการ์ตูนต่อไปโดยการถ่ายภาพนิ่งด้วยกล้องระบบดิจิทัล (Olympus) จนกระทั่งครบ 3 ชั่วโมง ทิ้งอาหารไว้ในตู้เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงและทำการตรวจตอบการกินอาหารของกุ้งอีกครั้งที่ 24 ชั่วโมงหลังจากการทดลอง

2.2.2 การทดลองที่ 2 ผลของชนิดของอาหารที่ให้และความถี่ในการให้อาหารต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย การเจริญพันธุ์และจำนวนลูกกุ้งการ์ตูนแรกฟักของกุ้งการ์ตูนที่เกิดจากการเพาะเลี้ยง

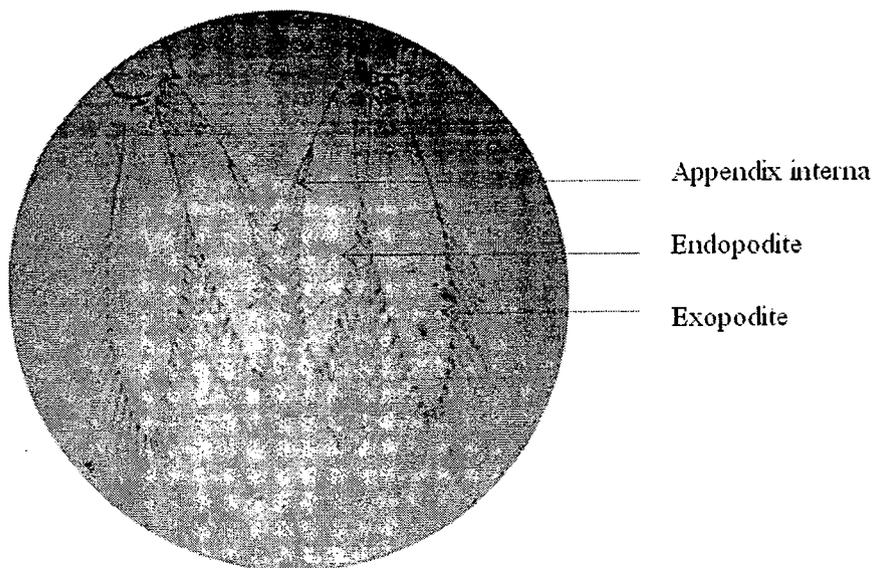
2.2.2.1 การจัดเตรียมกุ้งการ์ตูน จำแนกเพศกุ้งการ์ตูนจากคราบที่ลอกใหม่ของลูกกุ้งการ์ตูนอายุ 1 เดือน หลังลงเกาะ (ภาพที่ 2.9) ก่อนนำไปเลี้ยงแยกเพศผู้และเพศเมียในกล่องพลาสติกใส (ภาพที่ 2.10) ซึ่งวิธีการจำแนกเพศกุ้งการ์ตูนกระทำโดยการส่องดูอวัยวะ Appendix masculine ที่ขาว่ายน้ำคู่ที่ 2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งพบเฉพาะในกุ้งการ์ตูนเพศผู้แต่ไม่พบอวัยวะนี้ในกุ้งการ์ตูนเพศเมีย (ภาพที่ 2.11 - ภาพที่ 2.12) เมื่อกุ้งการ์ตูนอายุ 2 เดือน (ภาพที่ 2.13) ทำการชั่งน้ำหนักและวัดขนาดความยาว กุ้งการ์ตูนด้วยวิธีการเดียวกับที่ใช้ในการทดลองที่ 1 ก่อนนำไปใส่ในตู้ทดลองตู้ละ 1 คู่ จำนวน 18 คู่ (36 ตัว) เพื่อดำเนินการทดลองต่อไป



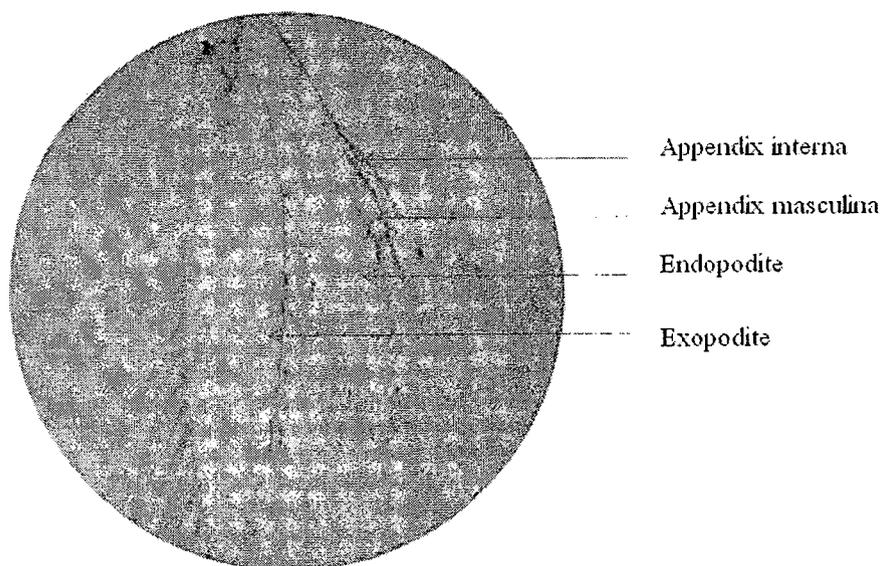
ภาพที่ 2.9 คราบลูกกึ่งการตุนที่ใช้ในการจำแนกเพศจากระยางค์ขาวน้ำคู้ที่ 2



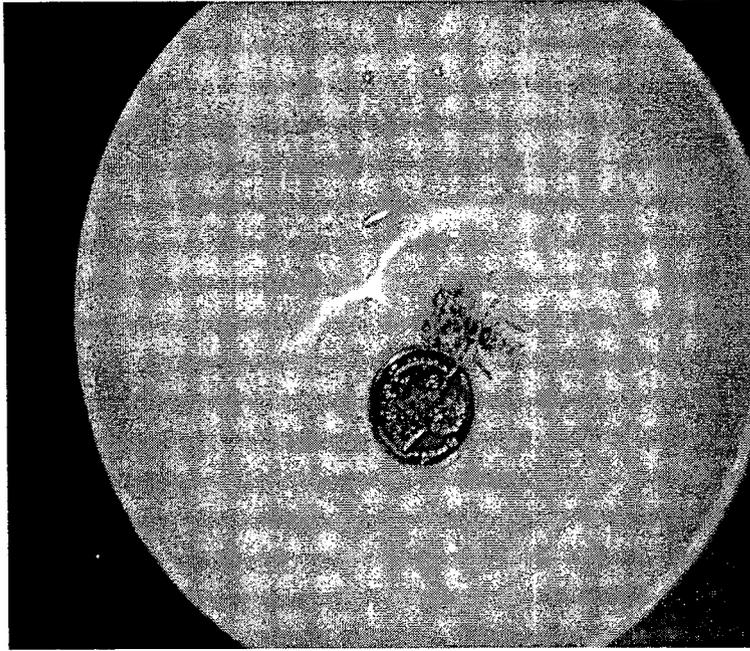
ภาพที่ 2.10 ลูกกึ่งการตุนแยกเลี้ยงในกล่องหลังการจำแนกเพศ



ภาพที่ 2.11 ขว่ายน้ำคู้ที่ 2 ของกึ่งการตุนเพศเมีย



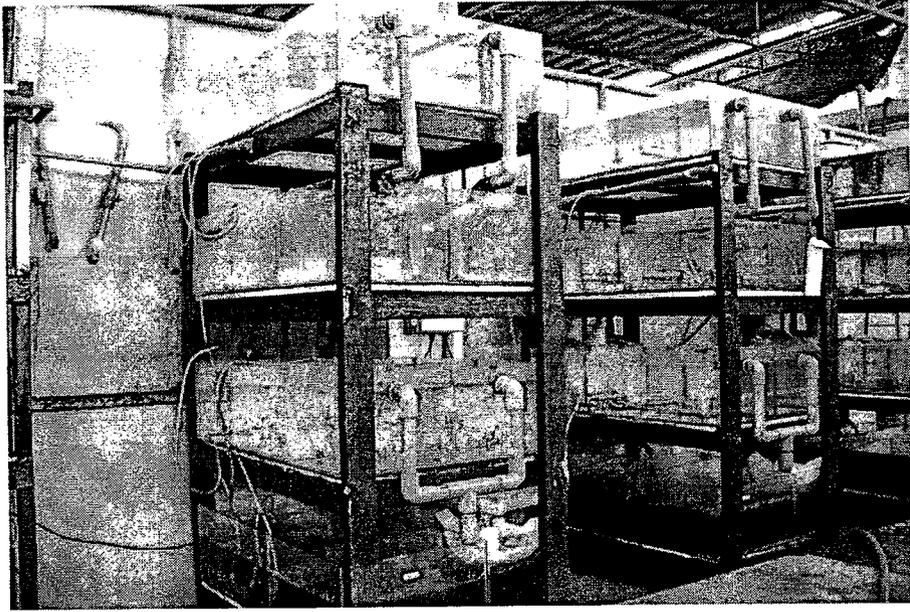
ภาพที่ 2.12 ขว่ายน้ำคู้ที่ 2 ของกึ่งการตุนเพศผู้



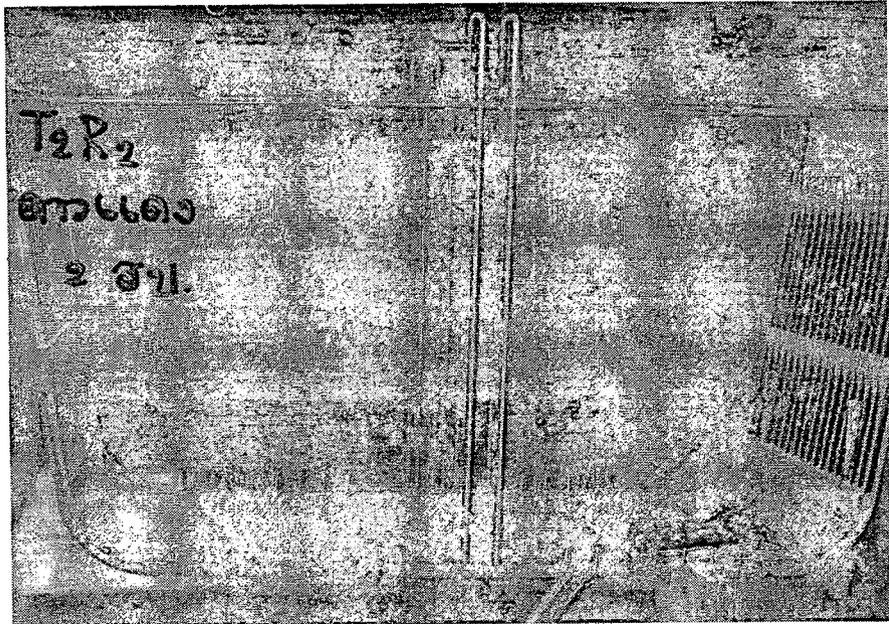
ภาพที่ 2.13 ขนาดลูกกึ่งการตุ่นจากการเพาะเลี้ยงเริ่มต้นทดลองอายุ 2 เดือน

2.2.2.2 การจัดเตรียมอาหารกึ่งการตุ่น อาหารที่ใช้ทดลองในการทดลองที่ 2 มี 2 ชนิดคือ ดาวแดงซึ่งได้มาจากตลาดสัตว์น้ำทะเลสวยงาม จตุจักร กรุงเทพฯ และดาวทรายได้มาจากชาวประมงชายฝั่งจังหวัดชลบุรี ทำการพักอาหารทดลองในถังที่ต่อเชื่อมกับระบบกรองที่มีการหมุนเวียนของน้ำตลอด 24 ชั่วโมง ณ โรงเรือนสาธิตเพาะเลี้ยง สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

2.2.2.3 การเตรียมตู้ทดลอง ทำการทดลองในตู้ทดลองขนาด 24x15x15 ซม. จำนวน 18 ตู้ (ภาพที่ 2.14) ที่ต่อเชื่อมทุกตู้เข้าด้วยกันด้วยระบบท่อน้ำเข้าและท่อน้ำออก และตู้ทดลองเหล่านี้ต่อเชื่อมกับระบบกรองนอกตู้ที่มีแบคทีเรียในระบบสมบูรณ์เพื่อให้กุ้งในตู้ทดลองทุกตู้อยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกัน ลูกกึ่งการตุ่นเริ่มต้นการทดลองมีขนาดเล็ก จึงทำการทดลองในกล่องพลาสติกที่แขวนติดกับผนังตู้ทดลองดังกล่าว (ภาพที่ 2.15) เป็นระยะเวลา 1 เดือน หลังจากนั้น จึงทำการทดลองในตู้ทดลองเป็นระยะเวลา 4 เดือน รวมระยะเวลาทดลองทั้งสิ้น 5 เดือน



ภาพที่ 2.14 ตู้สำหรับใช้ในการทดลองที่ 2 ต่อเชื่อมตู้ทุกตู้กับระบบกรองนอกตู้



ภาพที่ 2.15 ลูกกึ่งการตูนที่ทดลองในกล่องพลาสติกแขวนในตู้ทดลองในระยะ 1 เดือนแรกของการทดลอง

2.2.2.4 วิธีการทดลอง การทดลองนี้เป็นการทดลองต่อเนื่องจากการทดลองที่ 1 ซึ่งพบว่ากึ่งการคูณตอบสนองต่อดาวทรายในระยะเวลาสั้นที่สุด จึงเลือกดาวทรายมาทดลองเปรียบเทียบกับดาวแดงซึ่งเป็นอาหารธรรมชาติ (ชุดควบคุม) วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (6x3 Completely randomised design) โดยแบ่งกึ่งการคูณออกเป็น 6 ชุดการทดลอง จำนวน 3 ซ้ำ ชุดการทดลองประกอบด้วย

ชุดทดลองที่ 1 ให้กินดาวแดงมีชีวิตทุกวัน

ชุดทดลองที่ 2 ให้กินดาวแดงมีชีวิตทุกวัน 1 สัปดาห์เว้น 1 สัปดาห์

ชุดทดลองที่ 3 ให้กินดาวทรายมีชีวิตทุกวัน

ชุดทดลองที่ 4 ให้กินดาวทรายมีชีวิตทุกวัน 1 สัปดาห์เว้น 1 สัปดาห์

ชุดทดลองที่ 5 ให้กินดาวแดงแช่แข็งทุกวัน

ชุดทดลองที่ 6 ให้กินดาวทรายแช่แข็งทุกวัน

บันทึกผลการตายของกึ่งการคูณในแต่ละตู้ทุกวัน บันทึกผลการรอดตาย และเจริญเติบโตกึ่งการคูณในแต่ละชุดทดลองทุก 1 เดือน โดยการชั่งน้ำหนักทุกตัวครั้งละ 1 ตัวและวัดความยาวด้วยการถ่ายภาพเทียบกับไม้บรรทัดวัดที่มีสเกลบอกระยะและนำมาวัดความยาวด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 นอกจากนี้ บันทึกผลการเจริญพันธุ์ในแต่ละชุดทดลอง โดยทำการบันทึก จำนวนกึ่งการคูณวางไข่ อายุที่เริ่มวางไข่ครั้งแรก ระยะเวลาที่ใช้กึ่งการคูณพัฒนาการเป็นลูกกึ่งการคูณพร้อมฟัก และจำนวนลูกกึ่งแรกฟักที่ได้จากแม่กึ่ง

2.3 การตรวจวัดคุณภาพน้ำ

ทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำที่สำคัญ ได้แก่ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (Hach-senION6) อุณหภูมิ (Hach-senION2) ความเค็ม (Salino-refractometer ATAGO รุ่น S/mill-E) ความเป็นกรด-ด่าง (Hach รุ่น sen Ion2) ความเป็นด่าง (Alkalinity) ด้วยการไตเตรตกับสารละลายกรดมาตรฐาน (APHA, 1980) ปริมาณแอมโมเนียรวม ด้วยวิธี Phenolhypochlorite (Solórzana, 1969) ไนโตรต-ไนโตรเจน ด้วยวิธี Azo dye และไนเตรต-ไนโตรเจนด้วยวิธี Cadmium-reduction (Strickland and Parson, 1972) ทุก 2 สัปดาห์

2.4 การวิเคราะห์สารอาหาร

2.4.1 การวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร (proximate analysis ตามวิธี AOAC, 2000 และ คู่มือการวิเคราะห์ของเครื่องมือวิเคราะห์) ซึ่งวิธีการวิเคราะห์โดยย่อมีดังนี้

2.4.1.1 การวิเคราะห์ความชื้น (% moisture content) และน้ำหนักรีดแห้ง (dry matter)

ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในถ้วย crucible ที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแล้ว ทำการอบตัวอย่างในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

การคำนวณปริมาณความชื้นและน้ำหนักรีดแห้ง

% ความชื้น = $(W1 - W2) \times (100) / \text{น้ำหนักตัวอย่าง}$

% น้ำหนักรีดแห้ง = $100 - (\% \text{ ความชื้น})$

W1 คือ น้ำหนักถ้วยและตัวอย่างก่อนใส่ในตู้อบ

W2 คือ น้ำหนักถ้วยและตัวอย่างหลังอบแห้ง

2.4.1.2 การวิเคราะห์โปรตีน (Crude protein, CP) (Tecator Kjeltac TM 2300 analyser, Foss, Warrington, UK.) เป็นการวิเคราะห์โปรตีนจากปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่าง คำนวณจากปริมาณไนโตรเจนมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 16%

ขั้นตอนการย่อยตัวอย่าง (ทำในตู้ดูดควัน)

ใส่ตัวอย่างอาหารน้ำหนักรวมประมาณ 0.2 กรัมและใส่ Kjeldahl catalyst tablets 2 เม็ดลงในหลอดย่อยตัวอย่าง ใส่กรดซัลฟูริกเข้มข้น 12 - 15 มล/หลอดย่อยตัวอย่าง ทำการย่อยตัวอย่างที่อุณหภูมิที่ 420 °C ประมาณ 45 นาที จนกระทั่งตัวอย่างใส ตั้งพักไว้ในตู้ดูดควันให้อุณหภูมิในหลอดย่อยอาหารลดลงใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง

ขั้นตอนการกลั่นตัวอย่าง

เปิดเครื่องทำน้ำเย็นที่มีอุณหภูมิประมาณ 4-6 °C ที่ต่อเชื่อมกับเครื่องกลั่น ทำการอุ่นเครื่องกลั่นโดยการนำหลอดย่อยตัวอย่างที่มีปริมาตรน้ำ 70 มล มาใส่ในที่รองรับบนเครื่องกลั่นและต้มให้เดือด รองรับน้ำที่กลั่นได้ด้วยพลาสติกปูพุ่มจนกระทั่งได้ปริมาตร 150 มล. หลังจากนั้นทำการกลั่นตัวอย่างโดยการนำหลอดตัวอย่างมาใส่ในที่รองรับบนเครื่องกลั่น เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40% ปริมาตร 70 มล ลงในหลอดย่อยตัวอย่างและจึงทำการต้มและกลั่น รองรับน้ำที่กลั่นได้ด้วยพลาสติกปูพุ่มบรรจุกรดบอริกเข้มข้น 4% ปริมาตร 25 มล. กลั่นให้ได้ปริมาตรประมาณ 150 มล. หลังจากนั้นนำไปไตเตรทด้วยไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอลเพื่อหาปริมาณไนโตรเจน

การคำนวณปริมาณไนโตรเจน(%) = $14.01 \times (V1 - V2) \times N / \text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)} \times 10$

การคำนวณปริมาณโปรตีน (%) = % ไนโตรเจน $\times 6.25$

โดย 14.01 คือ น้ำหนักมวลโมเลกุลของไนโตรเจน

V1 คือ ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง (ml)

V2 คือ ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรท blank (ml)

N คือ ความเข้มข้นของกรดที่ใช้ไตเตรท (N)

10 คือ ค่าคงที่สำหรับแปลงเป็นค่า %

2.4.1.3 การวิเคราะห์ไขมัน (Crude lipid, CL)

อบพลาสติกก้นกลมที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักไว้ ชั่งตัวอย่างประมาณ 1-2 กรัม ในกระดาษกรองและใส่ลงใน cellulose thimble และนำไปใส่ในชุดสกัดไขมัน เต็ม petroleum ether (จุดเดือด 40 – 60°C) ประมาณ 150 มล ใส่ลงในพลาสติกก้นกลมที่ทราบน้ำหนักแล้ว ต่อพลาสติกก้นกลมเข้ากับชุดสกัดไขมันและทำการสกัดไขมันที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำสารสกัดในพลาสติกก้นกลมไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสาร

การคำนวณปริมาณไขมัน (%) = $(W3 - W2) \times 100 / W1$

W1 คือน้ำหนักตัวอย่าง W2 คือ น้ำหนักพลาสติก W3 คือ น้ำหนักพลาสติก + น้ำหนักไขมัน

2.4.1.4 การวิเคราะห์เถ้า (% Ash)

อบแห้งถ้วยกระเบื้องที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมงและชั่งน้ำหนักไว้ ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม ลงในถ้วยที่ทราบน้ำหนักแล้วและนำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 °C เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง

การคำนวณปริมาณเถ้า (%) = $(W3 - W2) \times 100 / W1$

W1 คือน้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา W2 คือ น้ำหนักถ้วย W3 คือ น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา

2.4.1.5 การวิเคราะห์หาคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ (Nitrogen free extract, NFE)

$\% \text{ NFE} = 100 - (\% \text{Moisture} + \% \text{Ash} + \% \text{CP} + \% \text{CL})$

2.4.2 การวิเคราะห์กรดไขมัน (Folch, 1957, Tocher & Harvie 1988) และตรวจวัดชนิดและปริมาณกรดไขมันด้วยเครื่อง gas liquid chromatography (Christie, 1993)

2.4.2.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

ชั่งน้ำหนักดาวแดงและดาวทราหยที่บั่นละเอียดประมาณ 1 กรัม ลงในหลอดแก้วสำหรับบั่นเหวี่ยง และใส่สารละลายคลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) ที่มีสารกันหืน (BHT) 0.01% (สัดส่วนสารละลาย:ตัวอย่าง ประมาณ 20:1) และแช่ไว้ในน้ำแข็งก่อนนำไปสกัดไขมัน

2.4.2.2 ขั้นตอนการสกัดไขมันในตัวอย่าง

นำหลอดแก้วที่มีตัวอย่างอยู่ในสารละลายคลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) มาบั่นตัวอย่างให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogeniser ประมาณ 5 นาที นำหลอดตัวอย่างไปแช่ไว้ในน้ำแข็งประมาณ 1 ชั่วโมง เติมสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.88% ปริมาตร 1/4 ส่วนของปริมาตรสารละลายลงในตัวอย่าง เขย่าและตั้งไว้ให้แยกชั้นในน้ำแข็งประมาณ 5 นาที

นำตัวอย่างไปบั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2500 rpm ประมาณ 5 นาที ปิดสารละลายชั้นบนทิ้ง กรองสารละลายส่วนล่างผ่านกระดาษกรอง Whatman no. 1 ลงในหลอดแก้วที่ทราบน้ำหนัก นำหลอดแก้วไประเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจนในตู้ดูดควันและนำไปใส่ไหลดูดความชื้นประมาณ 1 ชั่วโมงก่อนชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่ได้เป็นปริมาณไขมันทั้งหมด

ละลายไขมันด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) ที่มีสารกันหืน (BHT) 0.01% ให้มีความเข้มข้น 10 มก/มล (10,000 พีพีเอ็ม) เก็บสารละลายไว้ในขวดแก้วสีน้ำตาลขนาด 2 มล ที่อุณหภูมิ -40°C

2.4.2.3 ขั้นตอนการทำ transesterification

ปิเปตไขมันปริมาตร 0.1 มล. (ความเข้มข้น 1000 พีพีเอ็ม) ใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวขนาด 15 มล. และระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน เติมสารละลาย 1% กรดซัลฟูริกในเมทานอลปริมาตร 10 มล. (methylation reagent) และเติม internal standard (C17:0 free fatty acid) ปริมาตร 1 มล (ความเข้มข้น 1000 พีพีเอ็ม) ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน และนำไปใส่ตู้อบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง

นำตัวอย่างออกจากตู้อบ ตั้งทิ้งให้เย็นก่อนถ่ายใส่กรวยแก้วสำหรับสกัดและแยกสาร ชะสารที่ตกค้างในหลอดทดลองด้วย 5% โซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 5 มล และเทลงในกรวยแก้วเดิม เติมหะเสนปริมาตร 5 มล. ลงในกรวยแก้วและเขย่าประมาณ 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น เก็บชั้นเฮกเซนไว้ในกรวยแก้วใหม่ ทำ

การสกัดตัวอย่างในกรวยแก้วเติมซ้ำอีกครั้งด้วยเฮกเซนปริมาตร 5 มล. ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น รวมสารละลายชั้นเฮกเซนไว้ด้วยกัน

เติมสารละลาย 2% โปตัสเซียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ปริมาตร 40 มล. ลงในกรวยแก้ว เขย่าประมาณ 1 นาทีและตั้งไว้ให้แยกชั้น เก็บส่วนของเฮกเซน (ชั้นบน) โดยการกรองผ่านกรวยกรองที่บรรจุโซเดียมซัลเฟตปราศจากน้ำ (sodium sulfate anhydrous) ลงในหลอดแก้ว นำสารที่ได้ไประเหยแห้งด้วยแกสไนโตรเจน เติมเฮกเซนปริมาตร 1 มล. ลงในขวดแก้ว ปิดเตปสารละลายลงในขวดสีน้ำตาลขนาด 2 มล หลังจากนั้น นำไปฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟเพื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันหรือเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ -20 °C เพื่อรอการนำไปฉีดเข้าเครื่อง gas liquid chromatography

สภาวะที่ใช้ในการการจำแนกและการตรวจวัดชนิดและปริมาณกรดไขมันมีดังนี้

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (GC Agilent Technologies 7820A)

คอลัมน์ Column HP-Innowax Agilent J&W ขนาด 30 m. x 0.25 mm. x 0.25 μ m. (length x id x film thickness)

แก๊สเคลื่อนที่ แก๊สฮีเลียม อัตราการไหล 1.2 มล/นาที

อุณหภูมิเตาอบ 150 °C คงไว้ 0.5 min

150 °C \longrightarrow 170 °C (10 min, 5 °C/min)

170 °C \longrightarrow 190 °C (28 min, 3 °C/min)

อุณหภูมิช่องฉีดสาร 230 °C

อุณหภูมิเครื่องตรวจวัด 250 °C

เครื่องตรวจวัด ชนิด Flame Ionisation Detector (FID)

ชนิดการฉีด split 5:1

ปริมาตรฉีด 1 μ l

จำแนกและตรวจวัดชนิดกรดไขมันโดยการเปรียบเทียบเวลาของพีคสารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์กับเวลาของพีคสารมาตรฐานกรดไขมันแต่ละชนิด (external standard, PUFA No. 3, menhaden oil, Supelco, USA) ก่อนนำไปคำนวณหาปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดจากพื้นที่ใต้พีคของตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\% \text{กรดไขมัน} = 100 \times \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของกรดไขมัน}}{A}$$

$$A = \text{พื้นที่ใต้พีคกรดไขมันทั้งหมด} - (\text{พื้นที่ใต้พีคเฮกเซน} + \text{พื้นที่ใต้พีคBHT} + \text{พื้นที่ใต้พีค internal std})$$

2.4.3 การวิเคราะห์กรดอมิโน จำแนกวิเคราะห์กรดอมิโนตามวิธีวิเคราะห์ของ Cohen and Michaud (1993) ณ ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ อาคารปฏิบัติการวิจัยกลาง สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.5 การวิเคราะห์ผลการทดลอง วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนข้อมูลทางเดียว (One Way ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS version 17.0 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD

2.6 สถานที่ทำการทดลอง

โรงเรือนสาธิตการเพาะเลี้ยง งานวิจัยเพาะเลี้ยงสัตว์และพืชทะเล สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา