บทที่ 3

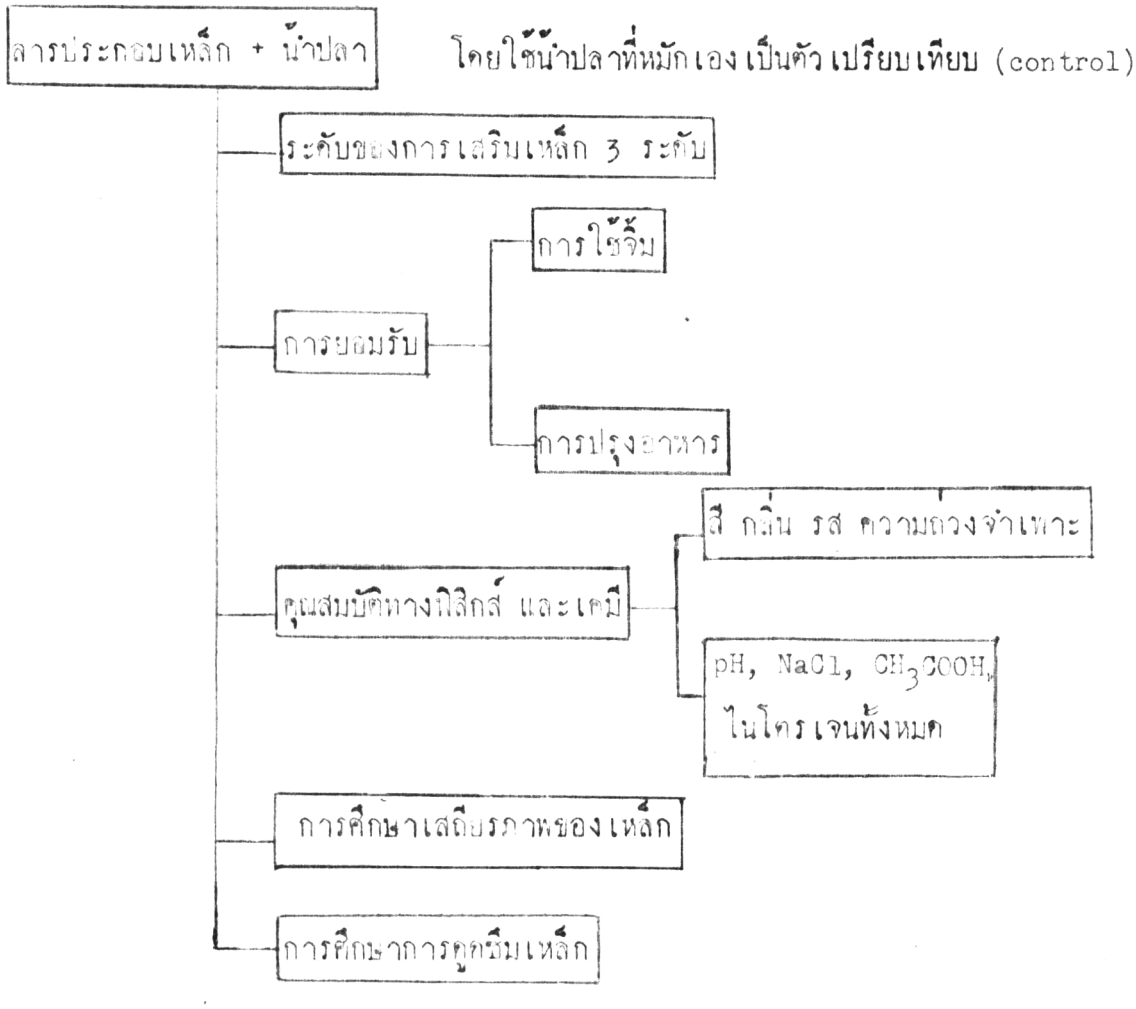
การทดลอง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

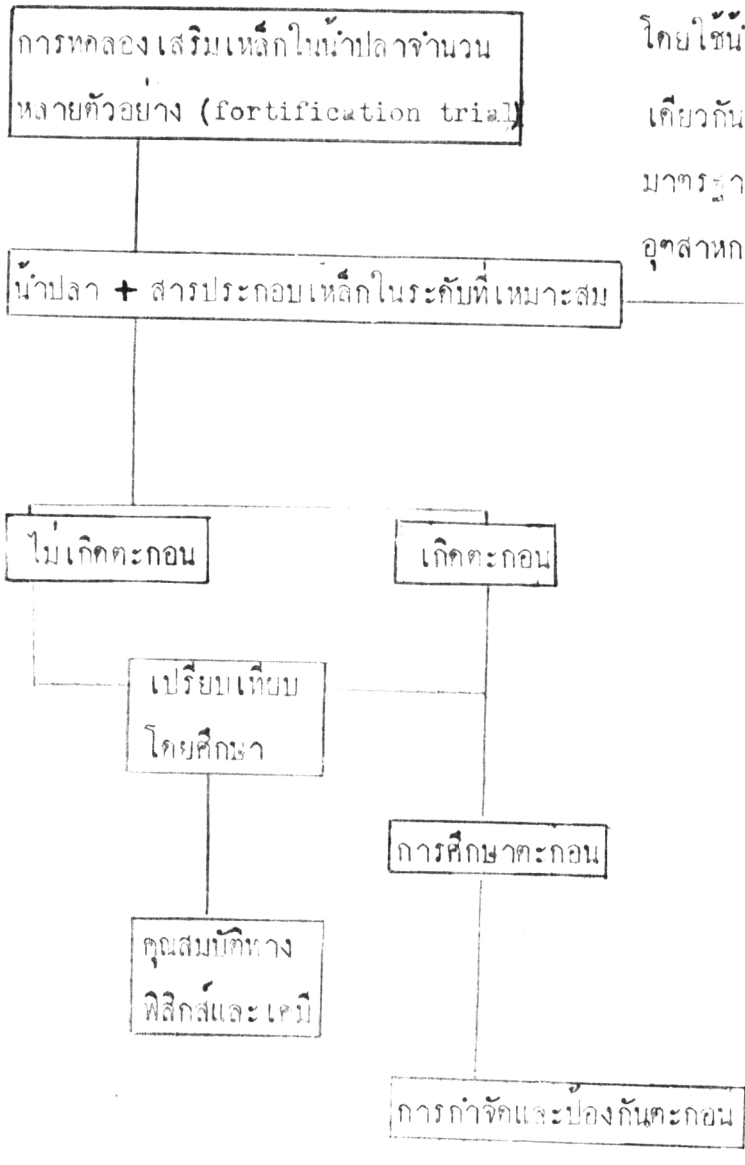
3.1 ขั้นตอนการทดลอง

ขั้นตอนการทดลอง จะมีเป็นขั้นตอนต่าง ๆ ดังแผนภูมิต่อไปนี้

ตอนที่ 1



ตอนที่ 2 การประยุกต์ (application)



โดยใช้น้ำปลาซึ่งหาซื้อจากท้องตลาดที่มีมาตรฐานเดียวกัน หรือ ใกล้เคียงกัน หรือต่ำกว่ามาตรฐาน ของกระทรวงสาธารณสุข และอุตสาหกรรม

3.1.1 การศึกษา และทดลองน้ำปลาที่หมักเอง

3.1.1.1 การเลือกชนิดและปริมาณของสารประกอบเหล็กที่เสริมในน้ำปลา

โดยจะทดลองเสริมสารประกอบเหล็ก 3 ชนิด คือ เหล็ก (II) ซัลเฟต เหล็ก (III) แอมโมเนียมซิเตรท เหล็ก (III)โซเดียมอีดีทีเอ ในระดับต่าง ๆ 3 ระดับ คือ 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัม ของเหล็กต่อมิลลิลิตรของน้ำปลา เสริมลงในน้ำปลาที่หมักเอง ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด อยู่ในช่วงมาตรฐานของน้ำปลาผสมเพื่อคัดสินสารประกอบเหล็กชนิดที่เมื่อเสริมในน้ำปลา แล้วมีคุณลักษณะทางฟิสิกส์ (physical apperance) เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค โดยทดสอบการยอมรับ (acceptability test) ของผู้บริโภคในการใช้จิ้ม และปรุงอาหาร เพื่อเลือกชนิดของสารประกอบเหล็ก และขนาดของจำนวนเหล็กที่เสริม

จากนั้นจะศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์ คือ สี กลิ่น รส ความถ่วงจำเพาะ ของน้ำปลาผสมเหล็กในระดับที่เลือกจากการยอมรับ และศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของน้ำปลาผสมเหล็กในระดับที่เลือกจากการยอมรับ คือ

- ความเป็นกรด–ด่าง (pH) ของน้ำปลา
- ปริมาณเกลือโซเดียมที่มีในน้ำปลา
- ปริมาณกรดอะซิติคที่มีในน้ำปลา
- ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่มีในน้ำปลา
- ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่มีในน้ำปลา

3.1.1.2 การวิเคราะห์เสถียรภาพของเหล็ก (iron stability) ที่ผสมในน้ำปลา

โดยหาปริมาณเหล็กที่มีในน้ำปลาที่ช่วงเวลาต่าง ๆ คือ 0 1 2 3 ..... 6 เดือน รวมทั้งการทดสอบเสถียรภาพของสีที่ช่วงเวลา 0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 เดือนตามลำดับ

3.1.1.3 การวิเคราะห์การดูดซึมเหล็ก (iron absorption) จากน้ำปลา

โดยวิเคราะห์การดูดซึมเหล็กจากน้ำปลาในสัตว์ทดลอง คือ หนู เพื่อยืนยันการเลือกใช้ชนิดและขนาดของสารประกอบเหล็ก รวมทั้งยืนยันคุณสมบัติของน้ำปลาว่าได้ผลดีเพียงใด

3.1.2 การศึกษา และทดลองน้ำปลาจำนวนหลายตัวอย่าง

เพื่อประยุกต์ (application) ในสภาพที่เป็นจริงในท้องตลาดของพื้นที่ เช่น ในหมู่บ้าน จึงได้ทดลองดังต่อไปนี้

3.1.2.1 การเสริมเหล็กลงในน้ำปลาจำนวนหลายตัวอย่างที่ได้แบ่งช่วงตัวอย่างของน้ำปลาตามปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและโซเดียมคลอไรด์

โดยทดลองแบ่งช่วงตัวอย่างของน้ำปลาตามปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และโซเดียมคลอไรด์ รวมทั้งที่ได้มาตรฐาน และไม่ได้มาตรฐาน แล้วจึงเติมเหล็กด้วยชนิดและขนาดที่ได้เลือกลงในน้ำปลาที่แบ่งช่วงไว้แล้ว เพื่อศึกษาว่าเวลาที่ใช้ในสภาพจริงนั้น มีปัญหาอย่างไร

3.1.2.2 การศึกษาตะกอนที่เกิดขึ้นในน้ำปลาภายหลังการเสริมเหล็ก

โดยทดลองแปรปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และน้ำเกลือของน้ำปลาก่อนและหลังเติมเหล็กในขนาดที่เลือกแล้ว เพื่อศึกษาว่าตะกอนที่เกิดขึ้นในน้ำปลาภายหลังการเสริมเหล็กเกิดเพราะเหตุใด และเกิดขึ้นได้อย่างไร

3.1.2.3 การกำจัดและป้องกันตะกอนที่เกิดขึ้นในน้ำปลาภายหลังการเสริมเหล็ก

โดยทดลองแก้ไขตะกอนที่เกิดขึ้น คือ ความใส ที่เปลี่ยนแปลง และการเปลี่ยนแปลงอย่างอื่นที่ทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค แล้วจึงทดลองเพื่อการป้องกันตะกอนที่เกิดขึ้น เพื่อจะได้ทำให้ผู้บริโภคยอมรับ

3.2 สารเคมีและเครื่องมือ พร้อมอุปกรณ์

3.2.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	ชนิด	บริษัทผู้ผลิต
กรดไฮโดรคลอริค	Analar	Merck
กรดซัลฟูริค	Analar	Merck
กรดไฮโอไกลโคลิค	Analar	Fluka
โซเดียมไฮดรอกไซด์	Analar	Merck
บาโซฟีนานโทรลีน-ซัลโฟเนต	Lab	BDH. Chemical Ltd.
โซเดียมอะซิเตท	Analar	Riedel-Dehan AG.
โปตัสเซียมโครเมท	Analar	May & Baker Laboratory
โปตัสเซียมไฮโอไดด์	Analar	BDH. Chemicals Ltd.
ซิลเวอร์ไนเตท	Analar	BDH. Chemicals Ltd.
โลหะปรอทบริสุทธิ์	เกรด 1	Johnson Matthey Chemicals Limited.
แป้ง	Lab	May & Baker Laboratory Chemicals
แอมโมเนียมซัลเฟต	Analar	BDH. Chemicals Ltd.
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	Analar	Riedel-Dehan AG.
พินอลทาลีน	Lab	ห้างหุ้นส่วนจำกัด ไทยชัยนาการแพทย์
โปตัสเซียม ไฮโดรเจน พาทาเลท	Analar	BDH. Chemical Ltd.

3.2.1 สารเคมี (ต่อ)

ชื่อสารเคมี	ชนิด	บริษัทผู้ผลิต
เอธิลอัลกอฮอล	AR. Absolute	Merck
แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์	Analar	Merck
นินไฮดริน	Analar	Merck
แคทไอออน เอ็กซ์เชน เรซิน (Cation exchange resin) Dowex 50 w	Analar	Sigma Chemical Company
โลหะลวดเหล็ก (iron wire)	Analar	BDH. Chemicals Ltd.
เหล็ก 59 ไอโซโทป ในรูป เหล็ก (III) คลอไรด์	IFS 1	Amersham
เหล็ก (III) โซเดียมอีดีทีเอ	Analar	Sigma Chemical Company
เหล็ก (II) ซัลเฟต	Analar	Riedel-Dehan AG.
เหล็ก (III) แอมโมเนียมซิเตรท	Analar	BDH. Chemicals Ltd.
ของผสมซีลีเนียม	Analar	Riedel-Dehan AG.
น้ำตาลไหม้	Industrial and Pharmaceutical	Srichard United Dispensary Ltd. partnership

3.2.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ แบบ SP.1800A พร้อมคิวเว็ทท์ ควอทซ์ ขนาดกว้าง 10 มิลลิเมตร บริษัท Pye Unicam ประเทศอังกฤษ

2. เครื่องชั่งชนิดละเอียด แบบ H-16บริษัท E.Mettler เมือง ซูริค ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3. เครื่องวัดความเป็นกรด–ด่าง แบบ 7065 พร้อมอิเลคโทรด วัดความเป็นกรด–ด่าง บริษัท Electronic Instruments เมืองเซอร์รี ประเทศอังกฤษ

4. เครื่องผสม แบบ Vortex mixer บริษัท Lab Line Instruments รัฐอิลลินอยส์ ประเทศสหรัฐอเมริกา

5. เครื่องผสมพร้อมแม่เหล็ก บริษัท Sybron Corporation รัฐไอโอวา ประเทศสหรัฐอเมริกา

6. หลอดแก้ว Chromaflex column ขนาด 15 x 300 มม. บริษัท Kontes Glass เมืองไวน์แลนด์ ประเทศอังกฤษ

7. ปิเปตต์แบบอัตโนมัติ ขนาด 25 50 100 200 300 และ 500 ไมโครลิตร บริษัท Medical Laboratory Automation รัฐนิวยอร์ค ประเทศสหรัฐอเมริกา

8. ไฮโดรมิเตอร์ บริษัท Laboratory Glassware กรุงเทพฯ ประเทศไทย

9. เตาเผา แบบ Thermolyneชนิด 1500 บริษัท Sybron Corporation รัฐไอโอวา ประเทศสหรัฐอเมริกา

10. ตู้เย็น แบบ Philco ford ประเทศสหรัฐอเมริกา

11. เครื่องคำนวณแบบ Olivetti programma 101 ประเทศอิตาลี

3.3 สารตัวอย่าง

1. น้ำปลาตราต่าง ๆ 79 ตรา ราคาตั้งแต่ 2.50 บาท ถึง 7.00 บาท ดังมีรายชื่อ และราคา ในตารางภาคผนวกที่ 1

2. น้ำปลาที่หมักเอง ที่ตัก 72 ปี โรงพยาบาลศิริราช เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ

3.4 วิธีทำการทดลอง

3.4.1 การศึกษาและทดลองน้ำปลาที่หมักเอง เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ

โดยใช้น้ำปลาที่หมักเองที่คาดฟ้า ตึก 72 ปี โรงพยาบาลศิริราช ซึ่งมีวิธีทำโดยย่อดังนี้ ใช้ปลาเบญจพรรณ 3 ส่วน เกลือ 2 ส่วน เคล้ากัน หมักในโอ่งมังกร เป็นเวลา 1 ปี หลังจากเอาหัวน้ำปลาออก เติมน้ำเกลือต่อ ๆ ไป เป็นที่ 3 จะได้น้ำปลาผสมซึ่งในที่นี้ จะเรียกว่า น้ำปลาที่หมักเอง เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ โดยนำมาทดลอง ดังนี้ คือ

3.4.1.1 การเลือกชนิดและปริมาณของสารประกอบเหล็กที่เสริมในน้ำปลา

นำน้ำปลาที่หมักเองผสมกับสารประกอบเหล็ก 3 ชนิด (ในรูปของแข็ง) คือ เหล็ก (II) ซัลเฟต เหล็ก (III) แอมโมเนียมซิเตรท และเหล็ก (III) โซเดียมอีดีทีเอ ให้มีระดับ 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมเหล็ก ต่อมิลลิลิตรของน้ำปลา ดังตารางที่ 7 คือ

ตารางที่ 7 แสดงน้ำหนักของสารประกอบเหล็ก 3 ชนิด ที่จะมีเหล็กในระดับ 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมของเหล็ก ต่อมิลลิลิตรของน้ำปลา

ระดับของเหล็ก (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	เหล็ก(II) ซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	เหล็ก (III) แอมโมเนียมซิเตรท (กรัม/ลิตร)	เหล็ก (III) โซเดียมอีดีทีเอ (กรัม/ลิตร)
0.1	0.4978	0.4444	0.6573
0.5	2.4890	2.2220	3.2865
1.0	4.9780	4.4440	6.5730

จากนั้นได้ทดสอบคุณสมบัติด้านการยอมรับ (acceptability test) ของผู้บริโภคในการจิ้ม และปรุงอาหาร โดยใช้อาสาสมัครจำนวน 10 คน ซึ่งมีอาชีพต่าง ๆ เช่น แม่บ้าน นักวิทยาศาสตร์ อาจารย์ เป็นต้น ดูการยอมรับในแง่คุณสมบัติทางฟิสิกส์ ของน้ำปลาที่หมักเองผสมเหล็ก 3 ชนิด และ 3 ระดับ ได้แก่ สี กลิ่น รส และความใส

หลังจากนั้น ได้ศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์ และเคมี ของน้ำปลาที่หมักเอง ผสมเหล็กที่มีชนิดและระดับเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค โดยใช้ระดับความเชื่อมั่นที่มี $P < 0.05$ เมื่อคำนวณค่าทางสถิติ เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมในการเปรียบเทียบการทดลองที่ใช้ตัวอย่างน้ำปลาหลายตัวอย่างจากแหล่งต่าง ๆ โดยศึกษาดังต่อไปนี้

3.4.1.1 (ก) คุณสมบัติทางฟิสิกส์

การศึกษาเรื่องสี เพื่อเป็นตัวควบคุมในการเปรียบเทียบสีกับน้ำปลาภายหลังผสมเหล็กและน้ำปลาที่เก็บไว้นานหลายเดือน ก่อนและหลังการผสมเหล็ก เพราะต้องการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสีของน้ำปลาในสภาวะต่าง ๆ เช่น ผลของการเก็บไว้ ผลของการผสมเหล็กจะเปลี่ยนแปลงหรือเข้มขึ้นเพียงใด หรือไม่ ถ้าเปลี่ยนมีการเปลี่ยนแปลงมากหรือน้อยเท่าใด ถึงระดับที่ผู้บริโภคไม่ยอมรับประทานหรือไม่

การทดลองได้ใช้ประสาทตาของอาสาสมัครจำนวน 10 คน ซึ่งมีอาชีพต่าง ๆ เช่น แม่บ้าน นักวิทยาศาสตร์ อาจารย์ เป็นต้น เพื่อดูการยอมรับในแง่สีของน้ำปลาผสมเหล็ก และได้ใช้วิธีวัดความเข้มของสี โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ไม่เปลี่ยนสีตามเวลา ซึ่งทำได้โดยใช้คาราเมล ปริมาตร 1.58 มิลลิลิตร ละลายในน้ำ 1000 มิลลิลิตร จะมีสีน้ำตาลอมแดงคล้ายน้ำปลา แบ่งมาประมาณ 5 มิลลิลิตร นำมาหาความยาวคลื่นที่เหมาะสม (optimal wavelenth) โดยดูจาก absorption spectrum

สำหรับตัวอย่างน้ำปลาที่หมักเอง และน้ำปลาที่หมักเองผสมเหล็ก แบ่งมาประมาณ 5 มิลลิลิตร เพื่อนำมาหาความยาวคลื่นที่เหมาะสม โดยดูจาก absorption spectrum

จากค่า absorbance ที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม เพื่อเปรียบเทียบกับสารละลายสีคาราเมล และเปรียบเทียบกับน้ำปลาที่เก็บไว้นาน 1 1.5 2 2.5 3 เดือน ตามลำดับ

<u>การศึกษาเรื่องกลิ่นและรส</u> เพื่อเป็นตัวควบคุมไว้เปรียบเทียบ แสดงการยอมรับของผู้บริโภค ในแง่กลิ่น และรสของน้ำปลา ว่ายอมรับหรือไม่ เหมือนหรือแตกต่างไปจากน้ำปลาที่ไม่ได้เสริมเหล็กหรือไม่อย่างไร

การทดลองได้ใช้อาสาสมัครชุดเดียวกับการศึกษาเรื่องสี ทำการดมกลิ่น และชิมรสของน้ำปลาที่หมักเอง เปรียบเทียบกับน้ำปลาที่หมักเองที่ผสมเหล็ก โดยใช้ประสาทสัมผัส

<u>การศึกษาเรื่องความถ่วงจำเพาะ</u> เพื่อศึกษาความถ่วงจำเพาะของน้ำปลาที่หมักเอง เปรียบเทียบกับน้ำปลาหมักเองที่ผสมเหล็ก โดยใช้น้ำปลามีปริมาตรอย่างละ 25 มิลลิลิตร หาความถ่วงจำเพาะด้วยเครื่องมือหาความถ่วงจำเพาะขนาด 25 มิลลิลิตร ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง คือ 29°ซ

3.4.1.1 (ข) คุณสมบัติทางเคมี

เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของน้ำปลาที่หมักเองผสมเหล็ก ด้วยชนิดและปริมาณเหล็กที่เหมาะสมเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค เช่น ความเป็นกรด–ด่าง (pH) โซเดียมคลอไรด์ กรดอะซิติค เป็นต้น เพราะต้องการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำปลา

<u>การวิเคราะห์หาความเป็นกรด–ด่าง</u> แบ่งตัวอย่างน้ำปลาประมาณ 20 มิลลิลิตร มาวัดค่าความเป็นกรด–ด่าง ด้วยเครื่องมือวัดความเป็นกรด–ด่าง

<u>การวิเคราะห์หาปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีในน้ำปลา</u> โดยใช้วิธีของมอร์ (Mohr's method) (80) ซึ่งใช้ตัวอย่างน้ำปลา 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ด้วย deionized water เติม 5% ของโปตัสเซียมโครเมท จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำมาไตเตรท กับ 0.0143 โมลต่อลิตร ของซิลเวอร์ไนเตท จนกระทั่งถึง end point คือเปลี่ยนจากสารละลายสีเหลือง

มาเป็นสีน้ำตาลปนแดงที่ถาวร สำหรับ blank ใช้ deionized water100 มิลลิลิตร ทำเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำปลา คำนวณหาปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ ดังสูตร

$$\text{ppm. NaCl} = \frac{(X-Y)\ M \times 35.46}{\text{มล.สารตัวอย่าง}} \times 1650$$

X = ค่าเฉลี่ยของ มล.ของ $AgNO_3$ เมื่อไทเตรทกับน้ำปลา

Y = ค่าเฉลี่ยของ มล.ของ $AgNO_3$ เมื่อไทเตรทกับน้ำ

M = ความเข้มข้นของสารละลาย $AgNO_3$ (โมลต่อลิตร)

<u>การวิเคราะห์หากรดอะซิติคที่มีในน้ำปลา</u> เนื่องจากกลิ่นของน้ำปลาเกิดจากพวกกรดที่ระเหยได้ (volatile acid) ที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมน้อย และในการทำน้ำปลาโรงงานบางแห่งได้ใช้กรดน้ำส้มเพื่อการปรุงรส ในที่นี้จึงทดลองหาปริมาณกรดอะซิติคในน้ำปลาโดยวิธีไทเตรชันของ Vogel ซึ่งมีดังนี้ ใช้ตัวอย่างน้ำปลา 2.5 มิลลิลิตร ละลายให้เจือจางด้วย deionized water ทำให้เป็น 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติม 2–3 หยด ของสารละลายฟินอลชาลีน นำมาไทเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.13 โมลต่อลิตรจนกระทั่งถึง end point ได้สารละลายสีชมพูใสจดปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อใช้คำนวณปริมาณกรดทั้งหมดคำนวณเป็นกรดอะซิติคในน้ำปลา ดังสูตร

ปริมาณกรดทั้งหมดคำนวณเป็นกรดอะซิติค (กรัม/ลิตร) = 20.75 x ปริมาตรเฉลี่ยของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.13 โมลต่อลิตร

<u>การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด</u> เพื่อศึกษาถึงปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมดในน้ำปลา เพื่อทราบคุณภาพของน้ำปลาในการให้โปรตีนซึ่งสามารถใช้คำนวณหาปริมาณโปรตีนในน้ำปลาได้โดยใช้วิธีของเนสเลอร์ (Nessler's method) (82) ซึ่งใช้สารละลายมาตรฐานของแอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้น 0.13 โมลต่อลิตร นำมาเจือจางด้วย

deionized water ให้มีปริมาณของไนโตรเจนเป็น 0.28 0.56 0.84 1.12 1.40 1.68 1.96 และ 2.24 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ตัวอย่างน้ำปลานำมาเจือจางเป็น 1:19 ด้วย deionized waterทั้งสารละลายมาตรฐาน และตัวอย่างน้ำปลาที่เจือจางใช้ 1 มิลลิลิตร ในการ digest โดยมี 0.05 กรัมของของผสมซิลิเนียม เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการ digest ใช้กรดซัลฟูริคเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตร digest จนใส ทิ้งให้เย็น ใช้ deionized water ชะรอบ ๆ digestion flask และทำให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ใน volumetric flask ด้วย deionized water

แบ่งสารละลายมาตรฐาน และสารตัวอย่างมาอย่างละ 5 มิลลิลิตร เติม deionized water 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติม 1 มิลลิลิตรของสารละลายเนสเลอร์ (สารละลายของไอโอดีน โปตัสเซียมไอโอไดด์ ปรอท ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์) เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จึงนำมาวัดความเข้มของสี ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ 440 นาโนเมตร

คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ได้จากสูตร

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (กรัม/ลิตร)} = \frac{\text{absorbance}}{K}$$

K = absorbance ของสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อมิลลิลิตร

การวิเคราะห์หากรดอะมิโนในน้ำปลา เพื่อศึกษาถึงชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นที่มีในน้ำปลา เพื่อรู้คุณภาพของน้ำปลาในการให้กรดอะมิโน โดยส่งตัวอย่างน้ำปลา มีปริมาตรประมาณ 10 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์โดยได้รับความร่วมมือในการวิเคราะห์จากกองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและการพลังงาน

3.4.1.2 การวิเคราะห์เสถียรภาพของเหล็กที่ผสมในน้ำปลา

โดยศึกษาในน้ำปลาที่หมักเอง ซึ่งได้ผสมเหล็กและปริมาณเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค เพื่อศึกษาปริมาณเหล็กหลังจากเสริมในน้ำปลาว่ามีเสถียรภาพหรือไม่ เท่าเดิมหรือลดลงไปจากที่เสริมเข้าไปหรือไม่อย่างไร เมื่อช่วงเวลามากขึ้น โดยหาปริมาณเหล็กในช่วงเวลา 0 1 2 3 ..... 6 เดือนตามลำดับ โดยดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ของ AACC คือใช้สารละลายมาตรฐานของโลหะลวดเหล็ก (iron wire) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม ของเหล็กต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 1 2 4 และ 6 ไมโครกรัมเหล็กต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ด้วย deionized water ใช้สารตัวอย่างน้ำปลา 5 มิลลิลิตร และ blank ใช้ deionized water 5 มิลลิลิตร ทั้งสารละลายมาตรฐาน ทุกความเข้มข้น สารละลายตัวอย่าง และblank นำมาเติมกรดไฮโดรคลอริค อย่างละ 4 มิลลิลิตร เติม deionized water ให้ได้ปริมาตรประมาณ 40 มิลลิลิตร นำมาให้ความร้อนจนเดือด ซึ่งใช้เวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็น กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ชะด้วย deionized water ทำให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ใน volumetric flask ด้วย deionized water

แบ่งสารละลายมาตรฐาน สารละลายตัวอย่าง และ blank มา 2 มิลลิลิตร เติมกรดไธโอไกลโคลิค 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม 2 มิลลิลิตรของสารละลาย 0.025% บาโธฟีนานโทรลีน ซัลโฟเนต ใน 2.25 M โซเดียมอะซิเตทผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จึงนำมาวัดความเข้มของสีด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่มีความยาวคลื่น 546 นาโนเมตร

คำนวณหาปริมาณเหล็กที่มี ได้จากสูตร

$$\text{ปริมาณเหล็ก (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{absorbance}}{K}$$

K = absorbance ของสารละลายเหล็กมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมเหล็ก ต่อมิลลิลิตร

3.4.1.3 การวิเคราะห์การดูดซึมเหล็กจากน้ำปลา

เพื่อศึกษาความสามารถในการดูดซึมเหล็กที่ผสมลงในน้ำปลา โดยศึกษาในหนูเมื่อใช้น้ำปลาที่หมักเองเสริมเหล็กในรูปเหล็ก (III) โซเดียมอีดีทีเอ มีระดับ 1.0 มิลลิกรัมเหล็กต่อมิลลิลิตรของน้ำปลา โดยใช้วิธี

1. แบ่งหนู เป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว คือ กลุ่ม control และกลุ่มทดสอบ (test group)

2. ให้หนูอดอาหารตลอดคืน พอรุ่งเช้าคมยาให้หนูสลบ ใส่หนูใน stomuch tube

3. ให้สารละลายของเหล็กตามกลุ่ม ผ่านสายยาง ดังนี้

กลุ่ม control หนู 6 ตัว ให้เหล็ก 59 จำนวน 5 ไมโครคูรี่ เหล็ก (III) โซเดียมอีดีทีเอ 0.5 มิลลิลิตร (มีเหล็ก 0.86 มิลลิกรัม) และน้ำเปล่า 0.5 มิลลิลิตร

กลุ่มทดสอบ หนู 6 ตัว ให้เหล็ก 59 จำนวน 5 ไมโครคูรี่ เหล็ก (III) โซเดียมอีดีทีเอ 0.5 มิลลิลิตร (มีเหล็ก 0.86 มิลลิกรัม) และน้ำปลาที่หมักเอง 0.5 มิลลิลิตร

4. วัด radioactivity ทั่วตัวที่ Day 0 (D_0) เป็น Total administered dose

5. หลังจากนั้น 8 วัน วัด absorption อีกครั้งเป็น Day 8 (D_8) โดยใช้ Well Gamma Counter

3.4.2 การศึกษาและทดลองน้ำปลาจำนวนหลายตัวอย่าง

เพื่อประยุกต์ใช้ในสถานที่เป็นจริงในท้องตลาดของพื้นที่ โดยซื้อน้ำปลาตราต่าง ๆ 79 ตรา จากตลาดในกรุงเทพฯ พิจิตร พิษณุโลก เป็นต้น ซึ่งมีราคา ตั้งแต่ 2.50–7.00 บาท นำมาทดลองดังนี้

3.4.2.1 การเสริมเหล็กลงในน้ำปลาจำนวนหลายตัวอย่างที่ได้แบ่งช่วงตัวอย่างของน้ำปลาตามปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและโซเดียมคลอไรด์

1. ทดลองแบ่งช่วงตัวอย่างของน้ำปลาตามปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และโซเดียม

คลอไรด์ รวมทั้งที่ได้มาตรฐานและไม่ได้มาตรฐาน เพื่อศึกษาว่าเวลาใช้ในสภาพจริงนั้นมีปัญหาอย่างไร โดยปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด วิเคราะห์โดยวิธีของเนสเลอร์ (81) ดังกล่าวในหน้า 36 และหาปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ ใช้วิธีของมอร์ (80) ดังกล่าวในหน้า 35

2. เติมเหล็กลงในน้ำปลาที่แบ่งช่วงไว้แล้ว โดยใช้ชนิดและขนาดของเหล็กที่เลือกจากการทดลองใน 3.4.1 คือ ใช้เหล็ก (III) โซเดียมอีดีทีเอ ในรูปของแข็ง โดยปริมาณที่จะให้เหล็ก 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของน้ำปลา ซึ่งในน้ำปลา 750 มิลลิลิตร (หนึ่งขวดแม่โขง เติมเหล็ก (III) โซเดียมอีดีทีเอ จำนวน 0.4930 กรัม ผสมให้เข้ากัน

3. ศึกษาคุณสมบัติของน้ำปลาก่อนและหลังผสมเหล็ก เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติทั้งทางฟิสิกส์ และเคมีของน้ำปลาก่อนและหลังผสมเหล็กว่าแตกต่างกันหรือไม่ อย่างไร และเปรียบเทียบกับน้ำปลาที่หมักเอง

ก. คุณสมบัติทางฟิสิกส์

<u>การศึกษาเรื่องสี</u> เพื่อเป็นการเปรียบเทียบระหว่างน้ำปลาก่อนและหลังเติมเหล็กทั้ง 79 ตรา เพื่อต้องการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสีของน้ำปลาในสภาพต่าง ๆ เช่น ผลของการเก็บไว้นาน ผลของการผสมเหล็ก จะเปลี่ยนแปลง หรือสีเข้มขึ้นเพียงใดหรือไม่ ถ้าเปลี่ยนแปลงจะมีการเปลี่ยนแปลงมากน้อยเพียงใด ถึงระดับที่ผู้บริโภคไม่ยอมซื้อ และรับหรือไม่ โดยใช้อาสาสมัครจำนวน 10 คน ซึ่งมีอาชีพต่าง ๆ เช่น นักวิทยาศาสตร์ นักบัญชี แม่บ้าน แพทย์ เป็นต้น ดูความแตกต่างของสีของน้ำปลาก่อนและหลังเสริมเหล็กโดยใช้ประสาทตา และวัดความเข้มของสี ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานเป็นตัวควบคุมที่ไม่เปลี่ยนแปลงตามเวลา คือใช้คาราเมล 1.58 มิลลิลิตร ละลายในน้ำ 1000 มิลลิลิตร ได้สารละลายสีน้ำตาลแดงคล้ายน้ำปลา สำหรับตัวอย่างน้ำปลาแบ่งมาประมาณ 5 มล. เพื่อนำมาวัดความเข้มของสีที่ 360 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายสีคาราเมล

การศึกษาเรื่องกลิ่นและรส เพื่อศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคน้ำปลาในแง่กลิ่นและรสว่ายอมรับหรือไม่ เหมือนหรือแตกต่างไปจากน้ำปลาที่ไม่ได้เสริมเหล็กหรือไม่อย่างไร เพราะน้ำปลานั้นจะใช้ได้ต่อเมื่อผู้บริโภคยอมและเต็มใจที่จะรับประทาน การทดลองจะใช้อาสาสมัครชุดเดียวกับการทดลองเรื่องสี ทำการดมกลิ่น และชิมรสของน้ำปลา และหลังเติมเหล็กโดยใช้ประสาทสัมผัส

การศึกษาเรื่องความถ่วงจำเพาะ เพื่อศึกษาความถ่วงจำเพาะของน้ำปลาทั้ง 79 ตรา ว่าแตกต่างกันหรือไม่ อย่างไร อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน (เกณฑ์มาตรฐานไม่น้อยกว่า 1.2) หรือไม่ โดยทดลองหาความถ่วงจำเพาะของน้ำปลาที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เครื่องมือหาความถ่วงจำเพาะขนาด 25 มล.

ข. คุณสมบัติทางเคมี (Physical properties) เพื่อศึกษาถึงคุณสมบัติทางเคมีของน้ำปลาทั้ง 79 ตรา เช่น ความเป็นกรด–ด่าง เกลือโซเดียมคลอไรด์ กรดอะซิติค เป็นต้น เพราะต้องการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำปลา

การวิเคราะห์เรื่องความเป็นกรด–ด่าง เพื่อทราบความเป็นกรด–ด่าง เพราะน้ำปลาปรกติมี pH = 5–6 โดยแบ่งตัวอย่างน้ำปลาทั้ง 79 ตรา มาประมาณ 20 มล. เพื่อทดลองวัดความเป็นกรด–ด่าง ด้วยเครื่องมือวัดความเป็นกรด–ด่าง

การวิเคราะห์หาปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลาทั้ง 79 ตรา เพื่อต้องการรู้ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีในน้ำปลา 79 ตรา ว่าแตกต่างกันหรือไม่ เพื่อเป็นแนวทางในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นกับน้ำปลาบางตัวอย่าง โดยทดลองด้วยวิธีของมอร์ (80) ซึ่งวิธีการและปริมาตรของสารที่ใช้จะเป็นดังกล่าวแล้ว หน้า 35

การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติคในน้ำปลาทั้ง 79 ตรา เนื่องจากกลิ่นและรสของน้ำปลาส่วนหนึ่งจะเป็นผลเนื่องมาจากปริมาณอะซิติคที่มีในน้ำปลา จึงทดลองหาปริมาณกรดอะซิติคด้วยวิธีไทเตรชั่น ของ Vogel(80) ดังวิธีการดังกล่าว หน้า 36

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน เพราะน้ำปลาประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายหลายชนิด จึงศึกษาหาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่มีในน้ำปลา ซึ่งได้รับความร่วมมือจากกองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และการพลังงาน โดยส่งตัวอย่างน้ำปลาไปวิเคราะห์ ประมาณ 10 มล.

การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่มีในน้ำปลา เพื่อศึกษาถึงปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมดในน้ำปลา ซึ่งสามารถใช้คำนวณหาปริมาณของโปรตีนที่มีในน้ำปลาได้ เปรียบเทียบกับน้ำปลาที่หมักเอง และเปรียบเทียบกับน้ำปลาทั้ง 79 ตรา โดยใช้วิธีของเนสเลอร์ (81) ดังกล่าวหน้า 36

3.4.2.2 การศึกษาการตกตะกอนในน้ำปลาภายหลังการเสริมเหล็ก

เป็นการทดลองแปรปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และปริมาณน้ำเกลือของน้ำปลาที่ได้ผสมเหล็กในชนิดและขนาดที่เลือกแล้ว เพื่อศึกษาถึงกลไกของการเกิดปัญหาว่าเป็นเพราะเหตุใดและเกิดขึ้นได้อย่างไร เกี่ยวข้องกับปริมาณของไนโตรเจนและปริมาณของโซเดียมคลอไรด์หรือไม่ เพียงใด โดยทดลองดังนี้

- ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดแปรตั้งแต่ 4–26 กรัมต่อลิตร
- ปริมาณน้ำเกลือแปรตั้งแต่ 24–27%

3.4.2.3 การศึกษาตะกอนของน้ำปลาภายหลังการเสริมเหล็ก

เนื่องจากน้ำปลาเสริมเหล็ก 26 ตรา จะมีปัญหาเกิดขึ้น คือมีตะกอนสีขาว จึงพยายามที่จะวิเคราะห์ว่าตะกอนคืออะไร ประกอบด้วยอะไร ดังการทดลอง ต่อไปนี้

ก. ชั่งน้ำหนักตะกอนที่เกิดขึ้น เพื่อต้องการศึกษาดูว่าตะกอนเกิดขึ้นมากน้อยเพียงใดเมื่อเสริมเหล็กเพิ่มขึ้น โดยเลือกระดับการเสริมเหล็ก เป็น 0.1 0.5 และ 1.0 มก. เหล็กต่อ มล. น้ำปลาตามลำดับ

ข. การทดลองเพื่อวิเคราะห์ว่าตะกอนคืออะไร ประกอบด้วยอะไรบ้าง โดยปั่นแยกเอาตะกอนมาทดลองดังนี้

– หาปริมาณเหล็กที่มีในตะกอน เพื่อศึกษาว่าองค์ประกอบของตะกอนเป็นเหล็กมากน้อยเพียงใด เมื่อเทียบกับน้ำหนักตะกอนที่เกิดขึ้น และระดับของการเสริมเหล็ก โดยดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ของ AACC ดังกล่าวหน้า 38

– หาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในตะกอน เพื่อศึกษาว่าองค์ประกอบของตะกอนเป็นกรดอะมิโนมากน้อยแค่ไหน เมื่อเทียบกับจำนวนตะกอนที่เกิดขึ้น และปริมาณกรดอะมิโนในน้ำปลา ซึ่งได้รับความร่วมมือในการวิเคราะห์จากกองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี และการพลังงาน

– หาปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีในตะกอน เพื่อศึกษาถึงองค์ประกอบตะกอนว่าประกอบด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์มากน้อยแค่ไหน โดยใช้วิธีไทเตรชั่น ของมอร์ (80) ดังกล่าว หน้า 35

3.4.2.4 การกำจัดและป้องกันการตกตะกอนของน้ำปลาภายหลังการเสริมเหล็ก

ก. การกำจัดตะกอนที่เกิดในน้ำปลาภายหลังการเสริมเหล็ก สามารถทำได้โดยทดลองละลายตะกอนที่เกิดขึ้นในน้ำปลา 26 ตรา ด้วยกรดอะซิติคเข้มข้น 17 โมลต่อลิตร เพื่อละลายตะกอนที่เกิดในน้ำปลาเสริมเหล็ก โดยทดลองหยดกรดอะซิติคเข้มข้นลงในน้ำปลาเสริมเหล็ก ขนาด 750 มิลลิลิตร ที่มีตะกอนผสมให้เข้ากัน จดปริมาตรของกรดอะซิติคที่สามารถละลายตะกอนได้หมด และวัดความเป็นกรด–ด่าง ของน้ำปลาเสริมเหล็กนั้น

ข. การป้องกันการตกตะกอนในน้ำปลาเสริมเหล็ก เพื่อป้องกันไม่ให้มีการตกตะกอนเกิดขึ้น เมื่อเสริมเหล็กลงในน้ำปลาตราต่าง ๆ ด้วยระดับต่าง ๆ ที่ทดลองเป็น 0.1 0.5 1.0 1.5 2.0 มิลลิกรัมเหล็กต่อมิลลิลิตรน้ำปลา คือ น้ำปลา 1 ขวด 750 มิลลิลิตร ใช้เหล็ก (III) โซเดียมอีดีทีเอ เป็นจำนวน 0.4930 2.4648 4.9297 7.3946 และ 9.8594 กรัม ตามลำดับ โดยเตรียมสารประกอบเข้มข้นของเหล็ก

โซเดียมอีดีทีเอ ในน้ำผสมกับกรดอะซิติคเข้มข้นในปริมาณที่พอเหมาะที่จะกั้นการตกตะกอนของน้ำปลาที่เสริมเหล็กได้ เช่น ถ้าระดับการเสริมเหล็กในน้ำปลา เป็น 0.1 มิลลิกรัมของเหล็กต่อมิลลิลิตรของน้ำปลา จะต้องละลายเหล็ก(III) โซเดียมอีดีทีเอ 0.4930 กรัม ในน้ำ 5 มิลลิลิตร และเติมกรดอะซิติคเข้มข้น 0.75 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วจึงเสริมลงในน้ำปลา ดูว่ามีการตกตะกอนเกิดขึ้นหรือไม่