

เอกสารวิชาการฉบับที่ ๔/๒๕๖๔



Technical Paper No. 4/2021

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกรดโพรพิโอนิกในกระบวนการหมักน้ำปลา
Study on Propionic Acid in Fish Sauce during Fermentation

รุ่งนภา ว่องไวไพโรจน์
วิศรุต ศิริพรกิตติ
หัตทยา สีนหสกุลชัย
สุภาพร ศศิปภาโชติมา
สมยศ ราชนิยม

Roongnapa Wongwaipairote
Wissarout Siripornkitti
Hattaya Leelahasakulchai
Supaporn Sasipapachotima
Somyos Rachniyom

กองวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ

กรมประมง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Fisheries Industrial Technology
Research and Development Division
Department of Fisheries
Ministry of Agriculture and Cooperatives

เอกสารวิชาการฉบับที่ ๔/๒๕๖๔



Technical Paper No. 4/2021

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกรดโพรพิโอนิกในกระบวนการหมักน้ำปลา
Study on Propionic Acid in Fish Sauce during Fermentation

รุ่งนภา ว่องไวไพโรจน์
วิศรุต ศิริพรกิตติ
หัตทยา ลีฬหสกุลชัย
สุภาพร ศศิปภาโชติมา
สมยศ ราชนิยม

Roongnapa Wongwaipairote
Wissarout Siripornkitti
Hattaya Leelahasakulchai
Supaporn Sasipapachotima
Somyos Rachniyom

กองวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ

กรมประมง

๒๕๖๔

Fisheries Industrial Technology

Research and Development Division

Department of Fisheries

2021

รหัสทะเบียนวิจัย 60 1 0502 60051

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์	5
วิธีดำเนินการ	5
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	11
สรุปผลการทดลอง	23
ข้อเสนอแนะ	23
คำขอขอบคุณ	24
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก	28

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณกรดโพรฟิโอนิกในน้ำปลาที่เติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 4 ppm	13
2	ปริมาณกรดโพรฟิโอนิกในน้ำปลาที่เติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 10 ppm	14
3	ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงแบบทำซ้ำในเวลาเดียวกัน	15
4	ผลการทดสอบความเที่ยงแบบทำซ้ำในเวลาต่างกัน โดยเติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 10 ppm	16
5	คุณภาพวัตถุดิบปลากระตักที่ใช้ในการหมักน้ำปลา	21
ตารางผนวกที่		
1	ปริมาณกรดโพรฟิโอนิก และ Total nitrogen ในน้ำปลาจากตลาด	28
2	ปริมาณกรดโพรฟิโอนิก และ Total nitrogen ในน้ำปลาจากโรงงานอุตสาหกรรม	29
3	กรดโพรฟิโอนิกในน้ำปลา ก่อน-หลังผสมสารปรุงแต่งรส และ Total nitrogen หลังผสม	30
4	ปริมาณกรดโพรฟิโอนิกในน้ำปลาโอ่ง A1 โรง ก และโรง ข ระยะเวลาการหมัก 12 เดือน	30

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ขั้นตอนการสกัดกรดโพรฟิโอนิกในน้ำปลา วิธีที่ 1	7
2	ขั้นตอนการสกัดกรดโพรฟิโอนิกในน้ำปลา วิธีที่ 2	7
3	โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกรดโพรฟิโอนิกที่ความเข้มข้น 50 ppm	11
4	ช่วงของการใช้งานและความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐานกรดโพรฟิโอนิก	12
5	โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์กรดโพรฟิโอนิกในน้ำปลาที่ความเข้มข้น 4 ppm	13
6	ปริมาณกรดโพรฟิโอนิก และ Total nitrogen ในน้ำปลาจากตลาด	17
7	ปริมาณกรดโพรฟิโอนิก และ Total nitrogen ในน้ำปลาจากโรงงานอุตสาหกรรม	18
8	ปริมาณกรดโพรฟิโอนิกในน้ำปลา ก่อน-หลังผสมสารปรุงแต่งรส และ Total nitrogen ในน้ำปลาหลังผสม	19
9	ขั้นตอนการผลิตน้ำปลาในโรงงานอุตสาหกรรม	20
10	ปริมาณกรดโพรฟิโอนิกในน้ำปลาโอ่ง A1 โรง ก และโรง ข ระยะเวลาการหมัก 12 เดือน	22

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกรดโพธิ์โอนิกในกระบวนการหมักน้ำปลา

รุ่งนภา ว่องไวไพโรจน์^{1*}, วิศรุต ศิริพรภักดี¹, หัตยา สีสหสกุลชัย²,

สุภาพร ศศิภาโชติมา¹ และ สมยศ ราชนิยม¹

¹ กองวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ

² กองตรวจสอบคุณภาพสินค้าประมง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์กรดโพธิ์โอนิกในน้ำปลา สำหรับปริมาณกรดโพธิ์โอนิกในน้ำปลาที่วางจำหน่ายในตลาด และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกรดโพธิ์โอนิกในกระบวนการหมักน้ำปลา โดยการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์กรดโพธิ์โอนิกในน้ำปลาที่เหมาะสมด้วยการใช้สารละลาย Ethyl acetate:Phosphoric acid (100:1 v/v) 20 มิลลิลิตร สกัดน้ำปลา 20 มิลลิลิตร ในอ่างอัลตราโซนิกนาน 20 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC พบว่าเป็นวิธีที่แยกกรดโพธิ์โอนิกในน้ำปลาได้ดี สะดวกและรวดเร็ว โดยมีค่า %Recovery อยู่ในช่วงร้อยละ 81.10-104.20 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) เท่ากับ 4 ppm และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 10 ppm การสุ่มตัวอย่างน้ำปลาที่วางจำหน่ายจากตลาดจำนวน 24 ตัวอย่าง และจากโรงงานอุตสาหกรรม 5 แห่ง จำนวน 27 ตัวอย่าง พบกรดโพธิ์โอนิกในช่วง <10 ถึง 1,433.66±31.97 ppm และ 137.56±6.19 ถึง 1,022.44±24.25 ppm ตามลำดับ ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกรดโพธิ์โอนิกในน้ำปลาระหว่างกระบวนการหมักจากการทดลองในห้องปฏิบัติการและจากโรงงานอุตสาหกรรมจำนวน 2 แห่ง เป็นระยะเวลานาน 12 เดือน โดยเก็บตัวอย่างน้ำปลาวิเคราะห์กรดโพธิ์โอนิกในระหว่างการหมักทุกเดือน พบกรดโพธิ์โอนิกในน้ำปลาจากการทดลองหมักมีปริมาณน้อยกว่า 10 ppm ตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน ในขณะที่กรดโพธิ์โอนิกในน้ำปลาจากโรง ก และโรง ข มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักตั้งแต่เดือนที่ 1 เท่ากับ 18.02±0.82 ppm และ น้อยกว่า 10 ppm จนถึงเดือนที่ 12 เท่ากับ 321.84±0.75 ppm และ 23.16±0.18 ppm ตามลำดับ

คำสำคัญ: น้ำปลา, กรดโพธิ์โอนิก, หมักตามธรรมชาติ

* ผู้รับผิดชอบ: เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทร. 0 2940 6130 - 45

Study on Propionic Acid in Fish Sauce during Fermentation

Roongnapa Wongwaipairote^{1*}, Wissarout Siripornkitti¹, Hattaya Leelahasakulchai²,

Supaporn Sasipapachotima¹ and Somyos Ratchniyom¹

¹Fisheries Industrial Technology Research and Development Division

²Fish Inspection and Quality Control Division

Abstract

The objectives of this study were to develop the optimal condition of propionic acid determination in fish sauce, to survey the levels of propionic acid in commercial fish sauce at local market and to study the quantities of propionic acid changing during the fermentation. The developed method by extracting propionic acid from fish sauce with twenty millilitres of Ethyl acetate:Phosphoric acid (100:1, v/v), sonicating in the ultrasonic bath for 20 min and then injecting directly into the Gas Chromatography was simple and quick with good result of propionic acid extraction. The method was accurate with acceptable %recovery at 81.10-104.20, limit of detection (LOD) at 4 ppm and limit of quantitation (LOQ) at 10 ppm. The propionic acid was found in 24 fish sauce samples from local market and 27 fish sauce samples from 5 fish sauce manufactures ranging from <10 ppm to 1,433.66±31.97 ppm and 137.56±6.19 to 1,022.44±24.25 ppm, respectively. In addition, the propionic acid values in fish sauce naturally fermented in the laboratory for 12 months were all less than 10 ppm while those from factories A and B were 18.02±0.82 ppm and less than 10 ppm at the 1st month and increased to 321.84±0.75 ppm and 23.16±0.18 ppm at the 12th month, respectively.

Key words: fish sauce, Propionic acid, natural fermentation

*Corresponding author: Kaset-Klang, Chatuchak, Bangkok 10900, Tel. 0-2940-6130-45

E-mail: roongnapaw@dof.mail.go.th

คำนำ

น้ำปลาเป็นเครื่องปรุงรสที่อยู่คู่ครัวชาวไทยมาตั้งแต่โบราณและเป็นเครื่องปรุงหลักของอาหารไทยเกือบทุกชนิด กระบวนการผลิตเริ่มจากการผสมปลากับเกลือในอัตราส่วน 2:1 ถึง 5:1 โดยน้ำหนัก หมักในโองหรือบ่อหมักเป็นระยะเวลา 12-18 เดือน น้ำของเหลวที่ได้ไปผ่านการกรอง ได้น้ำปลาสีน้ำตาลแกมเหลืองแดง มีกลิ่นและรสชาติเฉพาะตัว และความเค็มมากกว่าร้อยละ 20 (กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ, 2553) จากกรรมวิธีในการผลิตน้ำปลาด้วยเครื่องมือและอุปกรณ์แบบดั้งเดิมในระดับพื้นบ้าน ได้พัฒนาสู่ระบบการผลิตน้ำปลาในระดับอุตสาหกรรมด้วยเทคโนโลยีทันสมัย ใช้เครื่องจักรอัตโนมัติในการบรรจุ มีการผสมสารปรุงแต่งต่าง ๆ เพื่อปรับให้ได้สี กลิ่นรส ตามความนิยมของผู้บริโภค โดยน้ำปลาแท้ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 203 (พ.ศ. 2543) หมายถึง น้ำปลาที่ได้จากการหมัก หรือย่อยปลาหรือส่วนของปลาที่เหลือจากการหมักตามกรรมวิธีการผลิตน้ำปลา มีไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen, TN) ไม่น้อยกว่า 9 กรัมต่อลิตร ส่วนน้ำปลาผสมเป็นน้ำปลาแท้ที่เจือจางหรือปรุงแต่งรสด้วยน้ำตาล น้ำเกลือ หรือผงชูรส มีไนโตรเจนทั้งหมดไม่น้อยกว่า 4 กรัมต่อลิตร น้ำปลาจัดเป็นสินค้าสำคัญที่มีศักยภาพในการผลิตเพื่อการส่งออกและเป็นสินค้าส่งออกที่มีมาตรฐานสากลกำหนด ประเทศไทยมีการผลิตและส่งออกน้ำปลาไปทั่วโลกตามความนิยมของอาหารไทยในต่างประเทศที่เพิ่มสูงขึ้น โดยในปี 2562 มีการผลิตเพื่อบริโภคในประเทศ 83,844,584 ลิตร มูลค่า 2,723,524,138 บาท และเพื่อการส่งออก 27,272,410 ลิตร มูลค่า 885,889,862 บาท (สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม, 2563)

น้ำปลาจัดอยู่ในกลุ่มผลิตภัณฑ์พื้นเมือง และมีคุณค่าทางอาหาร มีกลิ่นรสเฉพาะตัวซึ่งเกิดจากกรดไขมันที่ระเหยได้ (Volatile fatty acid) ได้แก่ กรดอะซิติก (Acetic acid) กรดโพรพิโอนิก (Propionic acid) กรดไอโซบิวทิริก (Isobutyric acid) กรดบิวทิริก (Butyric acid) กรดไอโซวาเลอริก (Isovaleric acid) และกรดวาเลอริก (Valeric acid) (Sanceda *et al.*, 1999) ส่วนการศึกษากลิ่นของน้ำปลาที่เกิดจากกรดไขมันที่ระเหยได้ของ Saisithi (1994) ระบุว่าสารที่ทำให้เกิดกลิ่นเฉพาะตัวของน้ำปลาจากปลากระตักของไทย ได้แก่ กรดฟอร์มิก (Formic acid) กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และกรดไอโซบิวทิริก กรดไขมันที่ระเหยได้เหล่านี้เกิดจากไขมันและเป็นสารประกอบสำคัญของกลิ่นรสเฉพาะตัวในน้ำปลา (Dougan and Howard, 1975; Ooshiro *et al.*, 1981; McIver *et al.*, 1982) โดยกรดโพรพิโอนิกทำให้เกิดกลิ่น Cheesy ในน้ำปลา (Shimoda *et al.*, 1996; Wichaphon *et al.*, 2011) ซึ่งจากการศึกษาของวีระสิทธิ์ และอนันต์ (2552) ที่ศึกษาการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ โดยหมักน้ำปลาในห้องทดลอง พบว่ากรดไขมันที่ระเหยได้มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้น ในสัปดาห์ที่ 24 ตรวจพบกรดอะซิติก 756 ppm กรดโพรพิโอนิก 262 ppm กรดไอโซบิวทิริก 53.4 ppm กรดบิวทิริก 756 ppm กรดไอโซวาเลอริก 204.3 ppm และกรดวาเลอริก 37.1 ppm

กรดโพรพิโอนิก (Propionic acid; $C_3H_6O_2$) หรือเรียกชื่ออื่นว่า Propanoic acid, Carboxyethane, Ethylformic acid, Ethanecarboxylic acid หรือ Methylacetic acid มีเลขระบบสากลสำหรับวัตถุเจือปนอาหาร คือ INS No. 280 ละลายได้ในน้ำและเอทานอล (JECFA, 2006) เป็นกรดอินทรีย์ในกลุ่ม Monocarboxylic acid สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ เกิดขึ้นได้ตามธรรมชาติ

ในกระบวนการหมักอาหารจากแบคทีเรียเฉพาะชนิด ยังไม่พบการทำให้เกิดการกลายพันธุ์และไม่พบการเป็นสารก่อมะเร็ง (EFSA ANS Panel, 2014) สามารถพบได้ในกระเพาะอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น วัว ควาย และพบในผลิตภัณฑ์เนยแข็งสวิส (Swiss cheese) มากถึงร้อยละ 1 (Doores, 2005) นอกจากนี้ กรดโพรพิโอนิกยังใช้เป็นสารกันเชื้อราในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้แก่ อาหารสัตว์ร้อยละ 52 ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ร้อยละ 18 ยากำจัดวัชพืชร้อยละ 16 ซึ่งใช้ในรูปเซลล์โลสอะซิเตตโพรพิโอเนตร้อยละ 10 และอื่น ๆ ร้อยละ 4 (Kirschner, 2009)

โดยทั่วไป การผลิตกรดโพรพิโอนิกในระดับอุตสาหกรรมที่ใช้ในกระบวนการหมัก เกิดจากแบคทีเรียหลายกลุ่ม เช่น *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Bacteriodes*, *Fusobacterium*, *Megasphaera*, *Selenomonas* และ *Veillonella* แต่มีเฉพาะกลุ่ม *Propionibacterium* ที่สามารถสร้างกรดโพรพิโอนิกได้จากน้ำตาลกลูโคส (Glucose) ซูโครส (Sucrose) และกลีเซอรอล (Glycerol) ผ่าน Dicarboxylic acid pathway ตามสมการ (1) และ (2)



สำหรับแบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* สามารถสร้างกรดโพรพิโอนิกได้จากกลีเซอรอล ผ่าน Dicarboxylic acid pathway ตามสมการ (2) และสร้างกรดโพรพิโอนิกได้จากอะลานีน (Alanine) ซีรีน (Serine) ทรีโอนีน (Threonine) และเมทไธโอนีน (Methionine) ผ่าน Acrylic acid pathway ตามสมการ (3) (Dishisha, 2013; Wang *et al.*, 2013; Gonzalez-Garcia *et al.*, 2017)



ประเทศไทยอนุญาตให้ใช้กรดโพรพิโอนิกได้ในปริมาณที่เหมาะสมในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่ผ่านกระบวนการกึ่งถนอมอาหาร และผลิตภัณฑ์ประเภทซอส (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2561) สาธารณรัฐประชาชนจีนอนุญาตให้ใช้กรดโพรพิโอนิกในปริมาณไม่เกิน 2,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในผลิตภัณฑ์ซีอิ๊ว (Soy Sauce) หรือซอสปรุงรสจากถั่วเหลือง (National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, 2014) สหภาพยุโรปอนุญาตให้ใช้ในขนมปังและผลิตภัณฑ์ในปริมาณ 1,000-3,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (EFSA ANS Panel, 2014) และพิจารณาเพิ่มเติมให้ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อ เนื้อสัตว์แปรรูป ปลาและผลิตภัณฑ์ ในปริมาณไม่เกิน 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (EFSA ANS Panel, 2016) ในปี 2559 กรมอาหารและยาของไต้หวันได้รายงานผลการสุ่มตรวจน้ำปลาที่นำเข้าจากประเทศไทยในช่วง 2 กรกฎาคม ถึง 25 พฤศจิกายน 2559 พบกรดโพรพิโอนิกเกินเกณฑ์มาตรฐานที่ไต้หวันกำหนด 600 ppm จำนวน 2 ตัวอย่าง โดยเชื่อว่าปริมาณที่ตรวจพบเกินเกณฑ์มาตรฐานนั้นแสดงว่าผู้ผลิตตั้งใจใส่เพิ่มลงไปในช่วงขั้นตอนการผสมสารปรุงแต่งรสน้ำปลาเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อรา

ข้อมูลจากงานวิจัยเกี่ยวกับกระบวนการหมัก ระบุว่ากรดโพรพิโอนิกเกิดขึ้นได้จาก น้ำตาลกลูโคส ไขมัน และกรดอะมิโน อย่างไรก็ตาม งานวิจัยต่าง ๆ เหล่านี้ เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการซึ่งผลที่ได้อาจมีความแตกต่างจากการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกรดโพรพิโอนิกในกระบวนการหมักน้ำปลาในห้องปฏิบัติการเปรียบเทียบกับในระดับอุตสาหกรรม และสุ่มตัวอย่างน้ำปลาใน

ตลาดและน้ำปลาที่พร้อมจำหน่ายจากโรงงานอุตสาหกรรมตรวจวิเคราะห์กรดโพรฟิโอนิกเพิ่มเติม เพื่อยืนยันการเกิดกรดโพรฟิโอนิกในกระบวนการหมักตามธรรมชาติ และนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาไปใช้ในการควบคุมกระบวนการผลิตน้ำปลา อย่างไรก็ตาม การตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดโพรฟิโอนิกในน้ำปลายังไม่มีวิธีมาตรฐานที่ชัดเจน ในงานวิจัยต่าง ๆ นิยมใช้วิธีการตรวจหากรดไขมันที่ระเหยได้ทั้งหมดซึ่งมีความซับซ้อนและใช้ระยะเวลาานาน (Dougan and Howard, 1975; Sanceda *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2010) วิธีการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันนี้ อาจให้ผลการตรวจพบในปริมาณที่แตกต่างกันได้ ในงานวิจัยนี้จึงพัฒนาวิธีให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์กรดโพรฟิโอนิกในน้ำปลาด้วย เพื่อลดขั้นตอนที่ซับซ้อนในการวิเคราะห์ ใช้เวลารวดเร็ว และได้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับหน่วยตรวจสอบที่เกี่ยวข้องในการกำหนดวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์กรดโพรฟิโอนิกในน้ำปลาต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีสกัดและสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์กรดโพรฟิโอนิกในน้ำปลา
2. เพื่อสำรวจหาปริมาณกรดโพรฟิโอนิกในน้ำปลาที่วางจำหน่ายและโรงงานผู้ผลิต
3. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกรดโพรฟิโอนิกในกระบวนการหมักน้ำปลา

วิธีดำเนินการ

1. วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1.1 วัสดุดิบ

1.1.1 ปลากระตัก ความยาว 6-8 เซนติเมตร จากเรือประมงในจังหวัดตราด ใส่น้ำแข็งเพื่อควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 3 องศาเซลเซียส และขนส่งทางรถยนต์มาที่กองวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีอุตสาหกรรม สัตว์น้ำ กรมประมง กรุงเทพมหานคร

1.1.2 เกลือทะเลชนิดเม็ด

1.1.3 น้ำปลาบรรจุขวดที่จำหน่ายในตลาด และน้ำปลาบรรจุขวดจากโรงงานอุตสาหกรรม

ในเขตภาคกลางและตะวันออก

1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1.2.1 เครื่องชั่งไฟฟ้า (Electronic balance) 4 ตำแหน่ง รุ่น LA230s ยี่ห้อ Sartorius

1.2.2 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) รุ่น PHM210 ยี่ห้อ Meterlab

1.2.3 อ่างอัลตราโซนิก (Sonicator bath) รุ่น B5210E ยี่ห้อ Branson

1.2.4 เครื่องผสมสารตัวอย่าง (Vortex mixer) รุ่น KMC-1300V ยี่ห้อ Vision

1.2.5 ชุดเครื่องระเหยแห้ง (Evaporator) (Rotary vacuum evaporator รุ่น Eyela N-1NW ยี่ห้อ Eyela, Vacuum controller รุ่น Aspirator A-35 ยี่ห้อ Eyela, Digital waterbath รุ่น SB-651 ยี่ห้อ Eyela)

1.2.6 เครื่องวิเคราะห์และแยกสาร (Gas Chromatography, GC) รุ่น GC-2010 ยี่ห้อ Shimadzu

1.2.7 คอลัมน์สำหรับแยกสาร NukolTM fused silica capillary column ขนาด 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m film thickness ยี่ห้อ Supelco ประเทศเยอรมัน

1.2.8 กระดาษกรองเบอร์ 1 ยี่ห้อ Whatman

1.2.9 โอ่งดินเผาเคลือบปริมาตร 50 ลิตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 34 เซนติเมตร สูง 47 เซนติเมตร

1.3 สารเคมี

1.3.1 สารมาตรฐาน Propionic acid ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) ยี่ห้อ Sigma-Aldrich

1.3.2 Ethyl acetate ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$) GC Grade

1.3.3 Phosphoric acid (H_3PO_4)

1.3.4 Dichloromethane (Methylene chloride - CH_2Cl_2) HPLC grade

1.3.5 Acetic acid (CH_3COOH)

2. วิธีการทดลอง

2.1 ศึกษาวิธีสกัดและสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์กรดโพธิ์โอนิกในน้ำปลา

ศึกษาวิธีวิเคราะห์กรดโพธิ์โอนิกในน้ำปลาที่เหมาะสม ซึ่งประกอบไปด้วยการหาวิธีการสกัด และหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องวิเคราะห์แยกสาร (Gas chromatography:GC) โดยกำหนดค่าร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ จากนั้น ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ (Validation of analytical method)

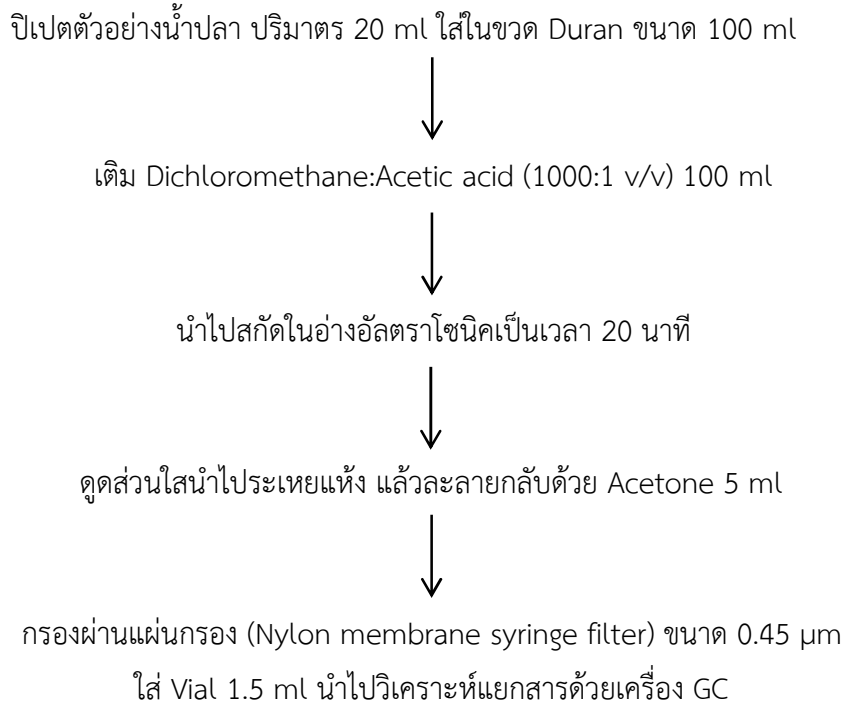
2.1.1 ปรับสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง GC เพื่อตรวจวิเคราะห์กรดโพธิ์โอนิก

เตรียมสภาวะเครื่อง GC โดยใช้โปรแกรม GC Solution 2010 ในการปรับสภาวะเครื่อง โดยฉีดสารละลายมาตรฐานกรดโพธิ์โอนิกที่ความเข้มข้น 50 ppm ใช้คอลัมน์สำหรับแยกสาร NukolTM fused silica capillary column 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m film thickness ยี่ห้อ Supelco ด้วยวิธี Flame ionization detector (FID) แล้วปรับสภาวะของเครื่องให้ได้ peak ของกราฟที่แยกชัดเจนไม่ซ้อนทับกับสารชนิดอื่น และระยะเวลาที่ทำให้กรดโพธิ์โอนิกเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (Retention time) เหมาะสม

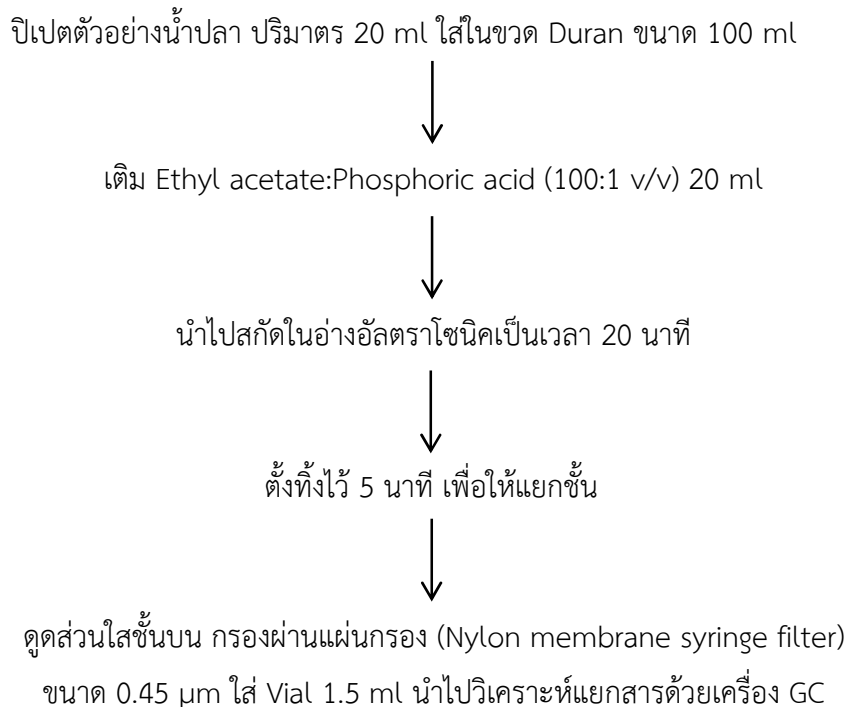
2.1.2 ทดสอบวิธีการสกัดกรดโพธิ์โอนิกในน้ำปลา

ทดสอบวิธีการวิเคราะห์เบื้องต้น (Preliminary step) โดยการเปรียบเทียบวิธีการสกัดกรดโพธิ์โอนิกในน้ำปลา 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 สกัดกรดโพธิ์โอนิกด้วย Dichloromethane:Acetic acid (1000:1 v/v) ดัดแปลงจากวิธีของ Azzam *et al.* (2010); Kim *et al.* (2018) ดังภาพที่ 1 และวิธีที่ 2 สกัด

กรดโพธิ์โอนิกด้วย Ethyl acetate:Phosphoric acid (100:1 v/v) ดัดแปลงจากวิธีของ Tonogai *et al.* (1983) ดังภาพที่ 2 เลือกวิธีที่ให้ผลร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) อยู่ในเกณฑ์การยอมรับในช่วงร้อยละ 70-110 (CODEX, 2014) และ HorRat มีค่าน้อยกว่า 2 (AOAC, 2016) นำไปใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการสกัดกรดโพธิ์โอนิกในน้ำปลา วิธีที่ 1



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการสกัดกรดโพธิ์โอนิกในน้ำปลา วิธีที่ 2

2.1.3 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) (ทิพวรรณ, 2549)

นำวิธีวิเคราะห์ที่ได้จากข้อ 2.1.2 มาตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ดังนี้

1) ทดสอบช่วงของการใช้งาน (Working range) และความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ตรวจวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานกรดโพธิ์ฟิโอนิกที่ความเข้มข้น 10, 40, 80, 100, 120, 160 และ 200 ppm ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เขียนกราฟระหว่างค่า Response เฉลี่ยที่ได้จากการวัดบนแกน y และความเข้มข้นบนแกน x หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ซึ่งใช้บอกความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของความเข้มข้นและ Response เกณฑ์การยอมรับคือค่า r ของกราฟที่ได้จะต้องไม่ต่ำกว่า 0.995 (American Public Health Association, 2017)

2) ตรวจหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณโดยประมาณ (Predicted Limit of Quantitation, Predicted LOQ)

เติมสารละลายกรดโพธิ์ฟิโอนิกลงใน Sample blank (ตัวอย่างน้ำปลาที่ผสมด้วยน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 25 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 และตรวจไม่พบกรดโพธิ์ฟิโอนิก) ให้มีความเข้มข้นของกรดโพธิ์ฟิโอนิกใน Sample blank เท่ากับ 4 ppm (จากการทดลองเบื้องต้น) นำตัวอย่างที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ตามวิธีการที่ได้จากข้อ 2.1.2 วิเคราะห์ 7 ซ้ำ คำนวณค่าเฉลี่ย (\bar{X}) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ค่า LOD ซึ่งเท่ากับ 3SD และ Predicted LOQ ซึ่งเท่ากับ 10SD

3) ตรวจยืนยันขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

เติมสารละลายกรดโพธิ์ฟิโอนิกลงใน Sample blank ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับ Predicted LOQ ที่คำนวณได้จากข้อ 2) นำตัวอย่างที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ตามวิธีการที่ได้จากข้อ 2.1.2 วิเคราะห์ 7 ซ้ำ คำนวณค่าเฉลี่ย %Recovery, HorRat และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตามสมการ (4), (5), (6) และ (7)

$$\%Recovery = \frac{\text{ความเข้มข้นของ Fortified sample blank} - \text{ความเข้มข้นของ Sample blank}}{\text{ความเข้มข้นที่ Fortified}} \times 100 \quad (4)$$

$$HorRat = RSD / \text{Predicted Horwitz RSD} \quad (5)$$

$$RSD (\%) = SD \times 100 / \bar{X} \quad (6)$$

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)} \quad (7)$$

$$C = \text{ค่าความเข้มข้นที่ศึกษา (Mass fraction)}$$

ถ้า %recovery มีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับในช่วงร้อยละ 70-110 (CODEX, 2014) และ HorRat มีค่าน้อยกว่า 2 (AOAC, 2016) แสดงว่าผลการวิเคราะห์มีความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยงแบบทำซ้ำในเวลาเดียวกัน (Precision-repeatability) ตามลำดับ ดังนั้น ความเข้มข้นที่วิเคราะห์คือค่า LOQ แต่ถ้า %Recovery และ/หรือ HorRat ไม่เป็นไปตามเกณฑ์ยอมรับ ให้เพิ่มความเข้มข้น และตรวจวิเคราะห์ใหม่ จนกว่าจะได้ความเข้มข้นที่มีความแม่นยำและความเที่ยง

4) ทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยงแบบทำซ้ำในเวลาเดียวกัน (Precision-repeatability)

เติมสารละลายกรดโพธิ์ฟอสฟอริกใน Sample blank ให้มีความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 40, 100 และ 180 ppm นำตัวอย่างที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ตามวิธีการที่ได้จากข้อ 2.1.2 โดยทำซ้ำในแต่ละระดับ 7 ซ้ำ คำนวณ %Recovery และ HorRat ตามสมการ (4)-(7) ถ้า %Recovery มีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับในช่วงร้อยละ 70-110 และ HorRat มีค่าน้อยกว่า 2 แสดงว่าผลการวิเคราะห์มีความแม่นยำและความเที่ยงตามลำดับ

5) ทดสอบความเที่ยงแบบทำซ้ำในเวลาต่างกัน (Precision-within laboratory reproducibility)

เติมสารละลายกรดโพธิ์ฟอสฟอริกใน Sample blank ให้มีความเข้มข้น 10 ppm นำตัวอย่างที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ตามวิธีการที่ได้จากข้อ 2.1.2 โดยทดสอบ 3 วัน ๆ ละ 7 ซ้ำ คำนวณ HorRat ตามสมการ (8), (9) และ (10) ผลที่ได้ต้องมี HorRat น้อยกว่า 2 ตามเกณฑ์ที่กำหนด

$$\text{HorRat} = \text{RSD} / \text{RSD}_R \quad (8)$$

$$\text{RSD} (\%) = \text{SD} \times 100 / \bar{X} \quad (9)$$

$$\text{RSD}_R (\%) = 2^{(1-0.5\log C)} \quad (10)$$

$$C = \text{ค่าความเข้มข้นที่ศึกษา (Mass fraction)}$$

2.2 ศึกษาปริมาณกรดโพธิ์ฟอสฟอริกในน้ำปลา

2.2.1 สํารวจปริมาณกรดโพธิ์ฟอสฟอริกในน้ำปลาที่วางจำหน่ายในท้องตลาด

สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำปลาจำนวน 24 ตัวอย่าง จากตลาดสด ตลาดขายส่ง ร้านขายของชำ ร้านขายของฝากและซูเปอร์มาร์เก็ต ในจังหวัดชลบุรี ระยอง สมุทรสาคร สมุทรสงคราม และกรุงเทพมหานคร ตัวอย่างละ 2 ขวด ตรวจวิเคราะห์ค่าทางเคมีตามข้อ 2.4

2.2.2 สํารวจปริมาณกรดโพธิ์ฟอสฟอริกในน้ำปลาของโรงงานอุตสาหกรรม

สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำปลาที่บรรจุขวดพร้อมจำหน่ายจากโรงงานอุตสาหกรรม 5 แห่งในจังหวัดสมุทรสงคราม จันทบุรี ระยอง และชลบุรี จำนวนรวม 27 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 ขวด และสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำปลาในระหว่างการบรรจุ ในขั้นตอนก่อนผสมสารปรุงแต่งรส และหลังผสมสารปรุงแต่งรสจากโรงงานอุตสาหกรรม 4 แห่ง จำนวน 20 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 ขวด ตรวจวิเคราะห์ค่าทางเคมีตามข้อ 2.4

2.3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกรดโพธิ์ฟอสฟอริกในกระบวนการหมักน้ำปลา

2.3.1 สํารวจกระบวนการผลิตน้ำปลาในโรงงานผลิตน้ำปลาระดับอุตสาหกรรม โดยการศึกษาและการสังเกตที่โรงงานจำนวน 2 แห่งในจังหวัดสมุทรสงคราม และจังหวัดระยอง

2.3.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกรดโพธิ์ฟอสฟอริกในกระบวนการหมักน้ำปลาที่หมักในห้องปฏิบัติการ (โถง A1) จำนวน 2 ซ้ำ ตามสูตรของกองวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ ในอัตราส่วนปลา:เกลือ เท่ากับ 3:1 โดยน้ำหนัก นำปลาเคล้ากับเกลือ บรรจุใส่โถงซึ่งรองกันโถงด้วยเกลือหนาประมาณ 1 นิ้ว อัดปลาให้แน่นและโรยเกลือปิดทับตัวปลาให้ทั่วหนาประมาณ 1 นิ้ว หลังจากนั้นปิดปากโถงด้วยตาข่ายไนลอน ปิดทับด้วยกระเบื้องลอนเพื่อกันน้ำเข้า และเปิดออกในระหว่างหมักปลาเพื่อตากแดดเป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง ทุก 2 สัปดาห์ เมื่อหมักครบ 1 เดือน ใส่ท่อ PVC สำหรับเก็บน้ำปลาจากกันโถงขนาด

เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ยาว 38 เซนติเมตร เจาะรูขนาด 0.5 เซนติเมตร ตามแนววงรอบของท่อ ที่ส่วนปลายของท่อจำนวน 3 แถว ๆ ละ 4 รู และหุ้มท่อด้วยผ้าขาวบาง กดท่อลงในโอ่งหมักน้ำปลาจน ปลายท่อถึงก้นโอ่งและส่วนบนของท่ออยู่เหนือระดับน้ำปลาในโอ่ง เมื่อหมักครบ 8 เดือน เริ่มเวียนน้ำปลา โดยการดูดน้ำปลาในท่อขึ้นมาใส่ลงบนกากปลาที่อยู่นอกท่อจนหมด ให้น้ำปลาจากด้านบนผ่านการกรองด้วย กากปลาเพื่อให้ความใสตามธรรมชาติ มีกลิ่นหอมและมีสีน้ำตาลแกมแดง ซึ่งจะเวียนน้ำปลาทุก 2 สัปดาห์จนครบ ระยะเวลาหมัก 12 เดือน

เก็บตัวอย่างวัตถุดิบปลากะตัก เกลือเม็ด และน้ำปลาในระหว่างการหมักทุกเดือน เป็นเวลา 12 เดือน ตรวจสอบวิเคราะห์ค่าทางเคมีตามข้อ 2.4

2.3.3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกรดโพธิโธนิคในกระบวนการหมักน้ำปลาจาก โรงงานผลิตระดับอุตสาหกรรม จำนวน 2 แห่ง (โรง ก และโรง ข) โดยสุ่มเก็บตัวอย่างวัตถุดิบปลากะตัก เกลือ เม็ดที่โรงงานใช้หมักน้ำปลา และน้ำปลาจากบ่อหมักในระหว่างการหมักทุกเดือน (บ่อเดิม) เป็นเวลา 12 เดือน โดยเก็บน้ำปลากันบ่อจากท่อ PVC ที่ฝังไว้ด้านข้างบ่อหมัก บ่อละ 2 ตัวอย่าง ตรวจสอบวิเคราะห์ค่าทางเคมี ตามข้อ 2.4

2.4 วิเคราะห์ค่าทางเคมี

2.4.1 ปลากะตัก

วิเคราะห์ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ตามวิธี Hasegawa (1987) ค่าความชื้น ไขมัน ตามวิธี AOAC (2016) ค่าเกลือตามวิธี FAO (1981) ปริมาณต่างระเหยได้ทั้งหมด (Total volatile basic nitrogen, TVB-N) โดยวิธี Modified conway microdiffusion (Siang and Kim, 1992) และกรดโพธิโธนิค ตามวิธี ในข้อ 2.1

2.4.2 เกลือเม็ด

ละลายเกลือเม็ดในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 25 (w/v) ก่อนนำไปวิเคราะห์ กรดโพธิโธนิค ตามวิธีในข้อ 2.1

2.4.3 น้ำปลา

กรองน้ำปลาด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เพื่อกำจัดตะกอนหรือเศษปลา และเขย่าตัวอย่าง ให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 1 นาที ก่อนนำไปวิเคราะห์ค่าทางเคมี โดยน้ำปลาในระหว่าง กระบวนการหมัก วิเคราะห์เฉพาะกรดโพธิโธนิคตามวิธีในข้อ 2.1 ส่วนน้ำปลาในกระบวนการผลิต ก่อน-หลัง ผสมสารปรุงแต่งรส และผลิตภัณฑ์น้ำปลา วิเคราะห์กรดโพธิโธนิคตามวิธีในข้อ 2.1 และปริมาณไนโตรเจน ทั้งหมด (Total nitrogen, TN) ตามวิธี AOAC (2016)

2.5 วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดอย่างสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย โดย Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปใน

การคำนวณทางสถิติ สำหรับปริมาณกรดโพธิ์โอนิกก่อน-หลังผสมสารปรุงแต่งรส ใช้โปรแกรมวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี t-Test

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. ผลการศึกษาวิธีสกัดและสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์กรดโพธิ์โอนิกในน้ำปลา

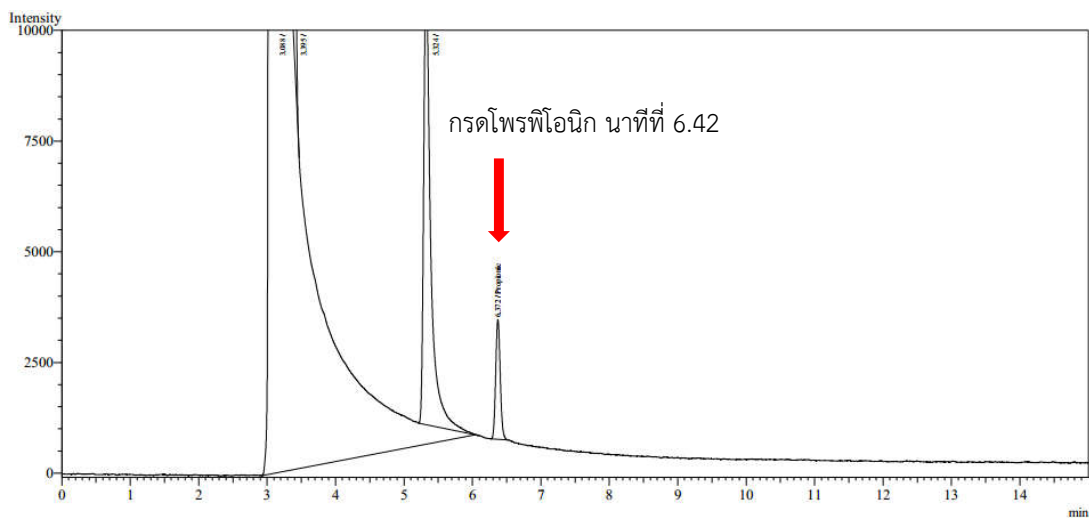
1.1 ผลการปรับสภาวะเครื่อง GC

ปรับสภาวะเครื่อง GC สำหรับวิเคราะห์แยกกรดโพธิ์โอนิก ใช้คอลัมน์สำหรับแยกสาร Nukol™ fused silica capillary column 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm film thickness ยี่ห้อ Supelco โดยฉีดสารละลายมาตรฐานกรดโพธิ์โอนิกความเข้มข้น 50 ppm ใช้ Helium เป็นแก๊สตัวพา (Carrier gas) ด้วยอัตราเร็ว (Flow rate) 0.59 ml/min ใช้ Nitrogen และ Air เป็น Make up gas ด้วยอัตราเร็ว 30 และ 400 ml/min ตามลำดับ และใช้ Hydrogen ที่อัตราเร็ว 40 ml/min ได้สภาวะของเครื่อง GC ในการวิเคราะห์แยกกรดโพธิ์โอนิกที่เหมาะสมสำหรับการทดลองต่อไปคือการฉีดแบบ Split ดังนี้

Split ratio	= 30:1
Injection volume	= 1.0 µl
Injection port temperature	= 220 °C

Column oven temperature control program กำหนดให้ใช้อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 150 °C เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นปรับอุณหภูมิขึ้นนาทีละ 10 °C จนถึง 185 °C และคงอุณหภูมิที่ 185 °C นาน 4.5 นาที รวมเวลาทั้งหมดในการฉีดแยกสารผ่านคอลัมน์ (Run time) นาน 15 นาที

เวลาที่กรดโพธิ์โอนิกเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (Retention time) และสามารถแยกออกจากสารประกอบอื่น ๆ ได้ชัดเจนที่ 6.42 นาที ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกรดโพธิ์โอนิกที่ความเข้มข้น 50 ppm

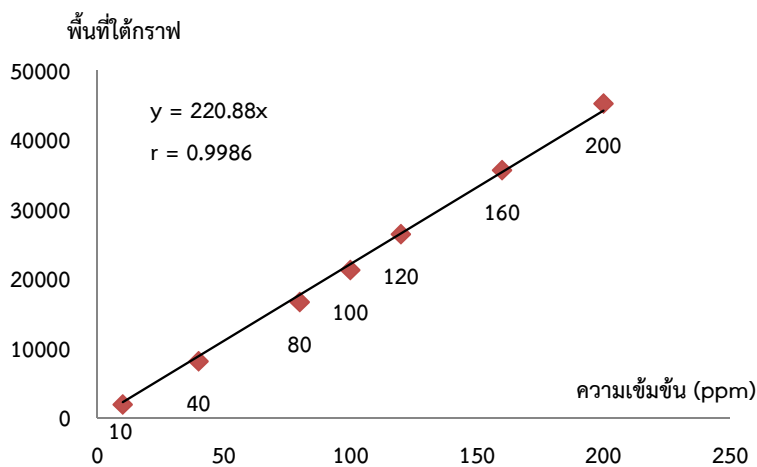
1.2 ผลการทดสอบวิธีการสกัด

การทดสอบวิธีการวิเคราะห์เบื้องต้น (Preliminary step) ในการเปรียบเทียบวิธีการสกัดกรดโพธิ์อินิกในน้ำปลา 2 วิธี ก่อนนำไปวิเคราะห์แยกสารด้วยเครื่อง GC พบว่า วิธีที่ 2 สกัดกรดโพธิ์อินิกได้ %Recovery อยู่ในช่วงร้อยละ 81.10-104.20 (เกณฑ์การยอมรับในช่วงร้อยละ 70-110) ดีกว่าวิธีที่ 1 ซึ่งได้ %recovery ออกนอกช่วง 70-110 คืออยู่ในช่วง 50-130 ซึ่งผลที่ได้เป็นไปในแนวทางเดียวกับ Tonogai *et al.* (1983) ที่ได้ทดสอบสารสกัดจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Methanol, Dichloromethane, Ethyl acetate, Ether และ Hexane พบว่า การใช้ Ethyl acetate ปรับ pH ด้วย Phosphoric acid จะให้ผลการสกัดที่ดีที่สุด ดังนั้นจึงนำวิธีที่ 2 ไปใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ต่อไป

1.3 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

1.3.1 ผลทดสอบช่วงของการใช้งาน (Working range) และความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ผลการฉีดสารละลายมาตรฐานกรดโพธิ์อินิก 7 ความเข้มข้นของช่วงการใช้งาน (Working range) ที่ 10, 40, 80, 100, 120, 160 และ 200 ppm โดยฉีดความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟระหว่างค่า Response เฉลี่ยที่ได้จากการวัดบนแกน y และความเข้มข้นบนแกน x ได้ $r = 0.9986$ ซึ่งสูงกว่า 0.995 แสดงว่า Response กับความเข้มข้นมีความสัมพันธ์เป็นสมการเชิงเส้นภายในช่วงความเข้มข้น 10-200 ppm ดังภาพที่ 4



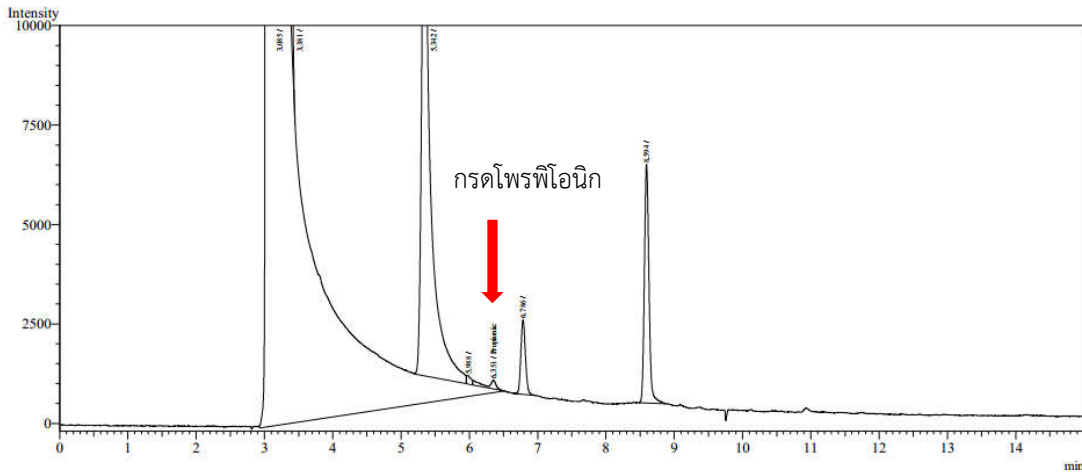
ภาพที่ 4 ช่วงของการใช้งานและความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐานกรดโพธิ์อินิก

1.3.2 ผลการตรวจหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) และ

ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณโดยประมาณ (Predicted Limit of Quantitation, Predicted LOQ)

โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ Sample blank ที่เติมสารมาตรฐานกรดโพธิ์อินิก ความเข้มข้น 4 ppm ดังภาพที่ 5 และผลวิเคราะห์ดังตารางที่ 1 โดยได้ค่า SD เท่ากับ 1.14 ค่า LOD และ Predicted LOQ เท่ากับสามเท่าและสิบเท่าของค่า SD ตามลำดับ ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{LOD} &= 3\text{SD} &= 3 \times 1.14 &= 3.42 \text{ ppm} \\ \text{Predicted LOQ} &= 10\text{SD} &= 10 \times 1.14 &= 11.40 \text{ ppm} \end{aligned}$$



ภาพที่ 5 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์กรดโพรพิโอนิกในน้ำปลาที่ความเข้มข้น 4 ppm

ตารางที่ 1 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกในน้ำปลาที่เติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 4 ppm

ซ้ำที่	1	2	3	4	5	6	7	ค่าเฉลี่ย
ความเข้มข้น ที่ได้ (ppm)	4.65	4.85	5.37	4.58	4.65	4.86	7.76	5.24

อย่างไรก็ตาม ในการวิจัยครั้งนี้ ไม่ได้ทดสอบว่าที่ความเข้มข้น 3.42 ppm จะสามารถตรวจพบกรดโพรพิโอนิกหรือไม่ ดังนั้น จึงใช้ความเข้มข้น 4 ppm ที่สามารถตรวจพบกรดโพรพิโอนิก เป็นค่า LOD ของวิธีการทดสอบนี้

1.3.3 ผลตรวจยืนยันขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

ผลวิเคราะห์ Sample blank ที่เติมสารมาตรฐานกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 10 ppm โดยวิเคราะห์ 7 ซ้ำ ดังตารางที่ 2 พบว่า มีค่า %Recovery อยู่ในช่วงร้อยละ 81.10-104.20 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ในช่วงร้อยละ 70-110 และมีค่า HorRat เท่ากับ 1.28 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับคือน้อยกว่า 2 ดังนั้น ความเข้มข้นที่ 10 ppm จึงเป็นความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถวัดได้โดยมีความเที่ยงและความแม่นยำ

ตารางที่ 2 ปริมาณกรดโพธิ์โอนิกในน้ำปลาที่เติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 10 ppm

ซ้ำที่	ความเข้มข้นที่ได้ (ppm)	%Recovery
1	9.96	99.60
2	8.89	88.90
3	8.11	81.10
4	8.95	89.50
5	10.42	104.20
6	10.39	103.90
7	10.33	103.30
ค่าเฉลี่ย	9.58	95.80
SD	0.92	
RSD	9.63	
C	9.58×10^{-6}	
Predicted		
Horwitz	7.52	
RSD		
HorRat	1.28	

1.3.4 ผลทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยงแบบทำซ้ำในเวลาเดียวกัน (Precision-repeatability)

ผลการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยงแบบทำซ้ำในเวลาเดียวกัน (Precision-repeatability) โดยทดสอบที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 40, 100 และ 180 ppm ดังตารางที่ 3 พบว่า มีค่า %Recovery อยู่ในช่วงร้อยละ 84.38-92.67, 84.56-90.52 และ 81.55-85.71 ตามลำดับ และมีค่า HorRat 0.57, 0.49 และ 0.42 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์มีความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยงแบบทำซ้ำในเวลาเดียวกัน (Precision-repeatability) เนื่องจาก %Recovery มีค่าอยู่ในเกณฑ์กำหนดซึ่งเท่ากับร้อยละ 70-110 และ HorRat มีค่าน้อยกว่า 2

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงแบบทำซ้ำในเวลาเดียวกัน

ซ้ำที่	40 ppm		100 ppm		180 ppm	
	ความ เข้มข้น ที่ได้ (ppm)	% Recovery	ความ เข้มข้น ที่ได้ (ppm)	% Recovery	ความ เข้มข้น ที่ได้ (ppm)	% Recovery
1	35.93	89.82	84.56	84.56	146.79	81.55
2	35.39	88.47	85.30	85.30	147.52	81.95
3	33.75	84.38	88.67	88.67	148.37	82.43
4	37.07	92.67	88.09	88.09	152.43	84.68
5	33.88	84.70	90.23	90.23	154.28	85.71
6	36.24	90.59	86.61	86.61	152.37	84.65
7	36.09	90.23	90.52	90.52	146.81	81.56
ค่าเฉลี่ย	35.48	88.69	87.71	87.71	149.80	83.22
SD	1.24		2.32		3.13	
RSD	3.50		2.64		2.09	
C	35.48×10^{-6}		87.71×10^{-6}		149.80×10^{-6}	
Predicted						
Horwitz	6.17		5.39		4.97	
RSD						
HorRat	0.57		0.49		0.42	

1.3.5 ผลการทดสอบความเที่ยงแบบทำซ้ำในเวลาต่างกัน (Precision-within laboratory reproducibility)

ผลการทดสอบที่ความเข้มข้น 10 ppm เป็นเวลา 3 วัน ๆ ละ 7 ซ้ำ พบว่า ค่า HorRat เท่ากับ 0.69 (ตารางที่ 4) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับคือน้อยกว่า 2 แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์มีความเที่ยงแบบทำซ้ำในเวลาต่างกัน

จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ตามข้อ 1.3.1-1.3.5 แสดงให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นเหมาะสมต่อการวิเคราะห์กรดโพธิโอนิกในน้ำปลาโดยมีช่วงการใช้งาน 10-200 ppm LOD เท่ากับ 4 ppm และ LOQ เท่ากับ 10 ppm

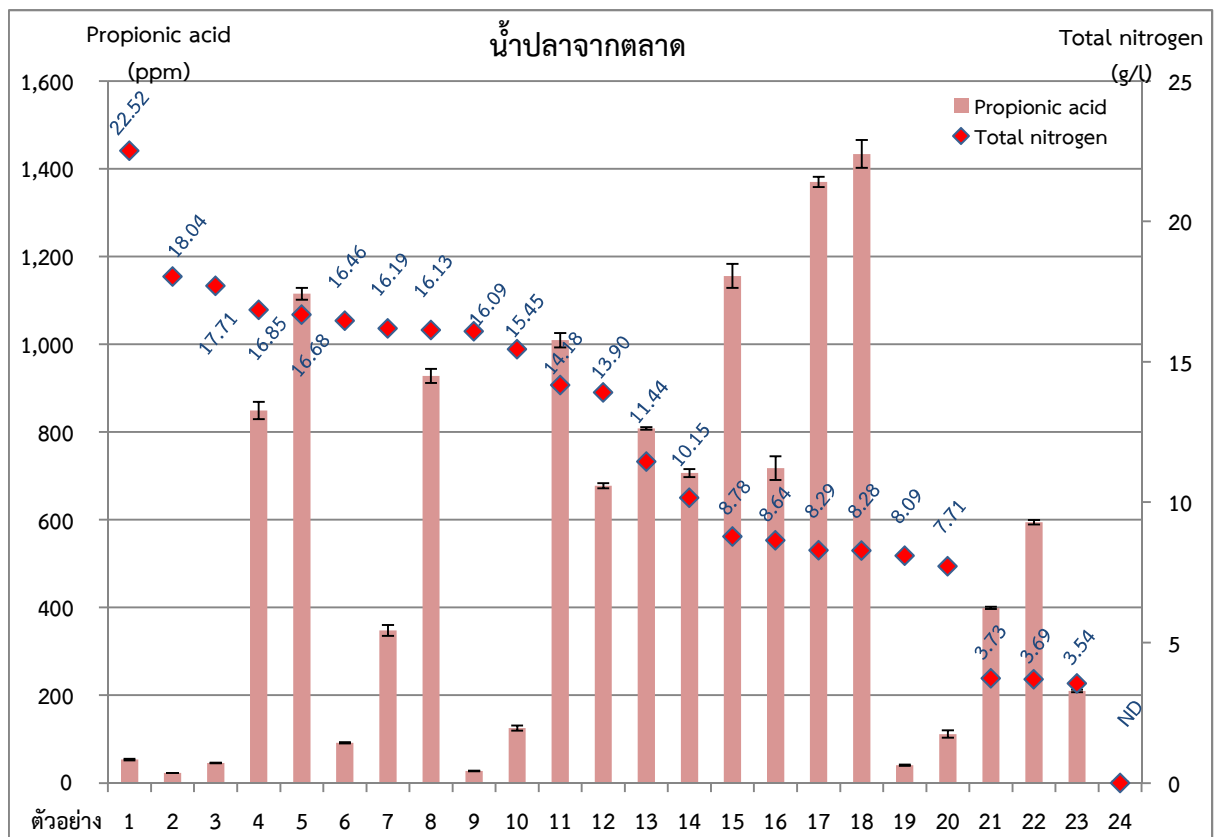
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความเที่ยงแบบทำซ้ำในเวลาต่างกัน โดยเติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 10 ppm

วันที่	ซ้ำที่	ความเข้มข้นที่ได้ (ppm)	%Recovery
1	1	9.50	95.00
	2	9.82	98.20
	3	9.33	93.30
	4	9.02	90.20
	5	10.37	103.70
	6	9.60	96.00
	7	10.49	104.90
2	1	8.45	84.50
	2	8.73	87.30
	3	8.30	83.00
	4	8.02	80.20
	5	9.22	92.20
	6	8.54	85.40
	7	9.33	93.30
3	1	8.44	84.40
	2	8.44	84.40
	3	8.81	88.10
	4	10.30	103.00
	5	9.68	96.80
	6	8.51	85.10
	7	9.27	92.70
ค่าเฉลี่ย		9.15	91.50
SD		0.72	
RSD		7.85	
C		9.15×10^{-6}	
RSD _R		11.47	
HorRat		0.69	

2. ผลการศึกษาปริมาณกรดโพธิ์โอนิกในน้ำปลา

2.1 ผลการสำรวจปริมาณกรดโพธิ์โอนิกในน้ำปลาที่วางจำหน่ายในท้องตลาด และน้ำปลาของโรงงานอุตสาหกรรม

2.1.1 น้ำปลาที่สุ่มตัวอย่างจากตลาด จำนวน 24 ตัวอย่าง เป็นน้ำปลาแท้ (TN มากกว่า 9 กรัมต่อลิตร) จำนวน 14 ตัวอย่าง มีปริมาณกรดโพธิ์โอนิกอยู่ในช่วง 23.07 ± 0.22 ถึง $1,115.08 \pm 13.42$ ppm และเป็นน้ำปลาผสม (TN อยู่ในช่วง 4-9 กรัมต่อลิตร) จำนวน 10 ตัวอย่าง มีปริมาณกรดโพธิ์โอนิกอยู่ในช่วงน้อยกว่า 10 ถึง $1,433.66 \pm 31.97$ ppm นอกจากนี้ยังพบน้ำปลาผสมที่ไม่ผ่านมาตรฐาน 1 ตัวอย่าง (ตัวอย่างหมายเลข 24) โดยตรวจไม่พบ TN และมีปริมาณกรดโพธิ์โอนิกน้อยกว่า 10 ppm ดังภาพที่ 6



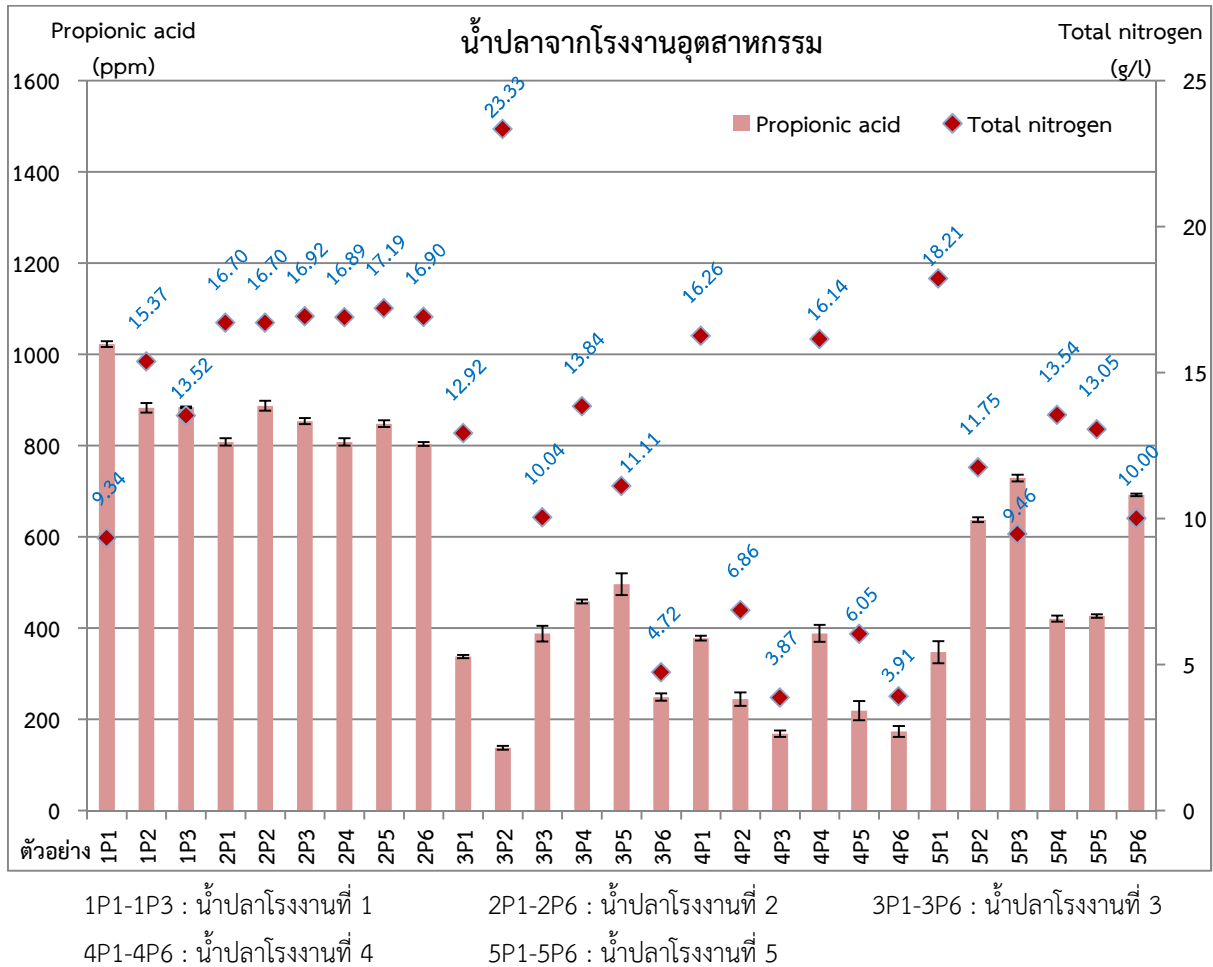
ตัวอย่าง 1-14 : น้ำปลาแท้ ตัวอย่าง 15-23 : น้ำปลาผสมที่ผ่านมาตรฐาน ตัวอย่าง 24 : น้ำปลาผสมที่ไม่ผ่านมาตรฐาน

ภาพที่ 6 ปริมาณกรดโพธิ์โอนิก และ Total nitrogen ในน้ำปลาจากตลาด

2.1.2 ผลการสำรวจปริมาณกรดโพธิ์โอนิกในน้ำปลาที่สุ่มตัวอย่างจากโรงงานอุตสาหกรรม 5 แห่ง จำนวน 27 ตัวอย่าง เป็นน้ำปลาแท้ (TN มากกว่า 9 กรัมต่อลิตร) จำนวน 22 ตัวอย่าง ตรวจพบกรดโพธิ์โอนิกอยู่ในช่วง 137.56 ± 6.19 ถึง $1,022.44 \pm 24.25$ ppm และเป็นน้ำปลาผสม (TN อยู่ในช่วง 4-9 กรัมต่อลิตร) จำนวน 5 ตัวอย่าง มีปริมาณกรดโพธิ์โอนิกอยู่ในช่วง 173.19 ± 3.85 ถึง 248.51 ± 6.71 ppm ดังภาพที่ 7

ผลการสำรวจ พบว่า น้ำปลาที่สุ่มตัวอย่างจากตลาดและโรงงานอุตสาหกรรม ตรวจพบกรดโพธิ์โอนิกในทุกตัวอย่าง ส่วนงานวิจัยของ วีระสิทธิ์ และอนันต์ (2552) ซึ่งสุ่มตรวจน้ำปลาที่วางจำหน่าย

ในตลาดและตรวจพบกรดโพรพิโอนิก 501.6 ppm เช่นเดียวกับ อรชรธรม และคณะ (2559) ที่ตรวจพบกรดโพรพิโอนิกในน้ำปลาจากตลาด 490.6 ppm Lee *et al.* (2010) ได้รายงานผลการตรวจวิเคราะห์กรดโพรพิโอนิกในน้ำปลา (Salted and fermented fish sauce) และปลาหมัก (Salted and fermented fish) ที่จำหน่ายในตลาดของสาธารณสุขรัฐเกาหลี่ ตรวจพบกรดโพรพิโอนิกในน้ำปลาที่ผลิตจากปลากระตักจำนวน 6 ตัวอย่าง จากจำนวนที่สุ่มตรวจ 7 ตัวอย่าง มีค่าน้อยกว่า 1 ถึง 45.9 ppm และตรวจพบกรดโพรพิโอนิกในปลาหมัก จำนวน 6 ตัวอย่างใน 18 ตัวอย่าง มีค่าน้อยกว่า 1 ถึง 37.7 ppm

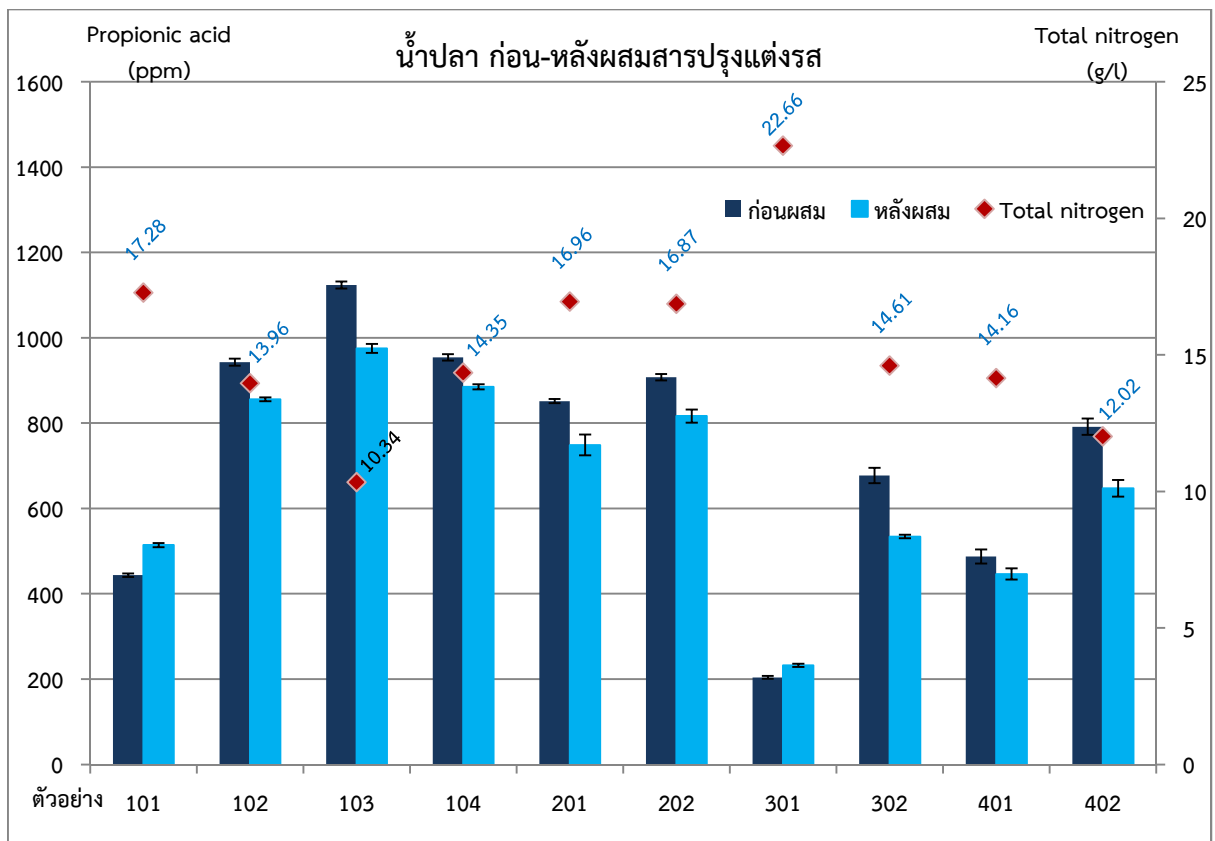


ภาพที่ 7 ปริมาณกรดโพรพิโอนิก และ Total nitrogen ในน้ำปลาจากโรงงานอุตสาหกรรม

จากผลการวิเคราะห์จะเห็นได้ว่าน้ำปลาที่สุ่มตัวอย่างจากตลาดและจากโรงงานอุตสาหกรรม ตรวจพบกรดโพรพิโอนิกในน้ำปลาจากตลาดจำนวน 23 ใน 24 ตัวอย่าง และพบในน้ำปลาจากโรงงานอุตสาหกรรมทุกตัวอย่าง (27 ตัวอย่าง) ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทดลองหมักน้ำปลาเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกรดโพรพิโอนิกในกระบวนการหมัก ต่อไป

2.1.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดโพรพิโอนิกในน้ำปลา ก่อน-หลังผสมสารปรุงแต่งรส จากภาพที่ 8 และตารางผนวกที่ 3 น้ำปลาในกระบวนการผลิตก่อนและหลังผสมสารปรุงแต่งรสจากโรงงานอุตสาหกรรม 4 แห่ง เป็นน้ำปลาแท้ (TN มากกว่า 9 กรัมต่อลิตร) จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่า น้ำปลาหลังผสมจำนวน 7 ตัวอย่างมีปริมาณกรดโพรพิโอนิกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) พบ 1 ตัวอย่าง แตกต่างกัน

อย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) คือ ตัวอย่างรหัส 401 จากการตรวจสอบรายการส่วนผสม พบว่า ไม่มีการเติมกรดโพรพิโอนิกในกระบวนการผลิตในทุกโรงงาน อย่างไรก็ตาม พบ 2 ตัวอย่าง (ตัวอย่างรหัส 101 และ 301) ที่มีปริมาณกรดโพรพิโอนิกเพิ่มขึ้นหลังผสมอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq 0.05$) จาก 443 และ 203 ppm เป็น 514 และ 231 ppm ตามลำดับ จากการตรวจสอบส่วนผสมพบว่า รหัส 101 เป็นน้ำปลาที่ไม่ได้มีการผสมสารปรุงแต่งรสใด ๆ และรหัส 301 เป็นน้ำปลาที่ผสมน้ำตาลทรายเพื่อปรุงแต่งรส โดยทั้ง 2 รหัสเป็นน้ำปลาแท้ที่มีความเข้มข้นของหัวน้ำปลามากโดยสังเกตได้จากปริมาณ TN ที่พบสูงกว่ารหัสอื่น ๆ ซึ่งจำเป็นต้องดำเนินการทดลองเพื่อสืบหาสาเหตุของการเพิ่มขึ้นของกรดโพรพิโอนิก หลังการผสมสารปรุงแต่งรสก่อนบรรจุขวดต่อไป



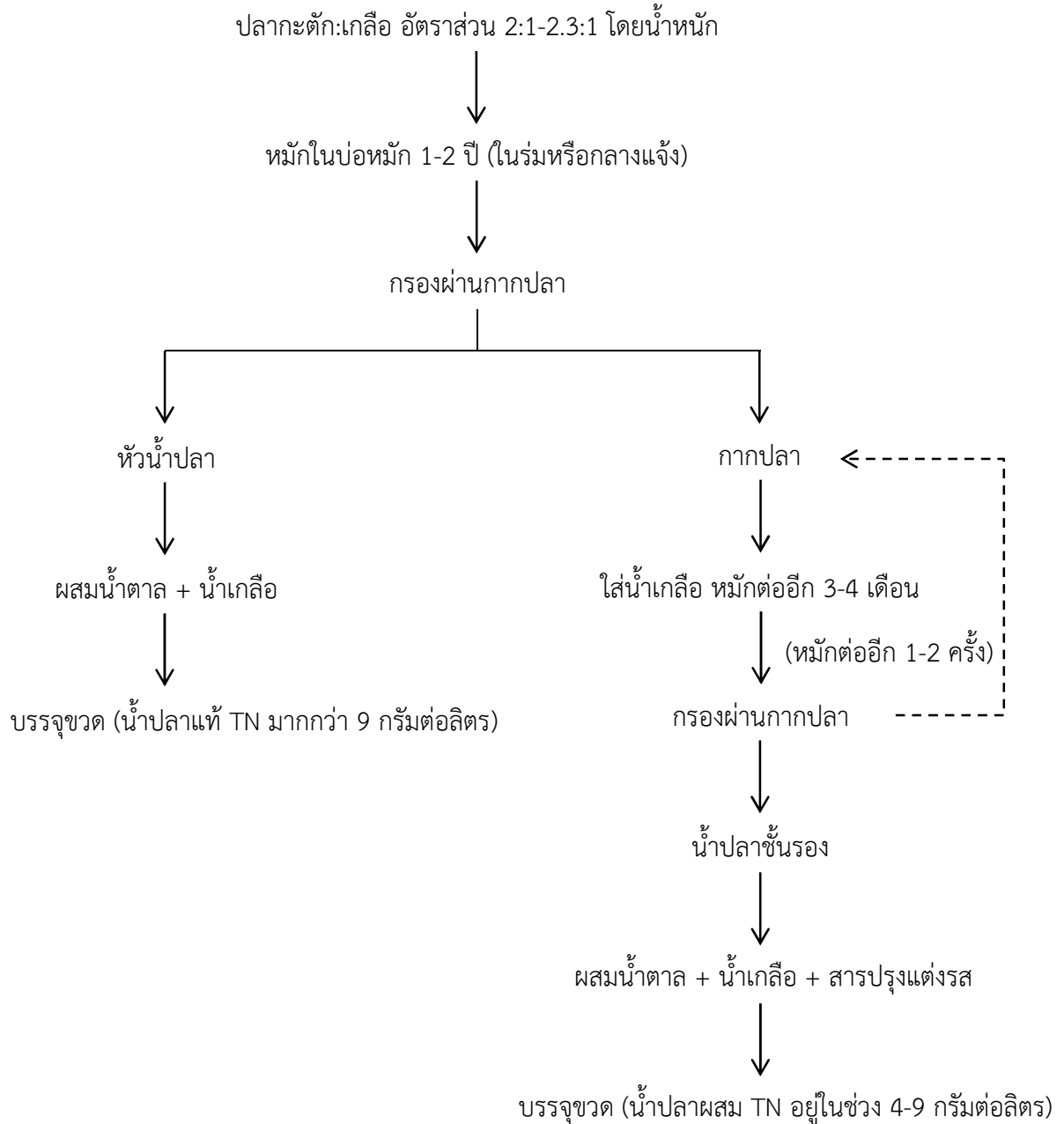
ตัวอย่าง 101-104 : น้ำปลาโรงงานที่ 1 ตัวอย่าง 201-202 : น้ำปลาโรงงานที่ 2 ตัวอย่าง 301-302 : น้ำปลาโรงงานที่ 3
ตัวอย่าง 401-402 : น้ำปลาโรงงานที่ 4

ภาพที่ 8 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกในน้ำปลา ก่อน-หลังผสมสารปรุงแต่งรส และ Total nitrogen ในน้ำปลาหลังผสม

2.2 ผลการสำรวจกระบวนการผลิตน้ำปลาในโรงงานผลิตน้ำปลาระดับอุตสาหกรรม

จากการสำรวจกระบวนการผลิตน้ำปลาในโรงงานอุตสาหกรรมจำนวน 2 แห่ง ในพื้นที่จังหวัดสมุทรสงครามและจังหวัดระยอง พบว่า ทั้ง 2 โรง ใช้ขั้นตอนการหมักแบบธรรมชาติ โดยใช้อัตราส่วนปลาต่อเกลือ 2:1-2.3:1 ระยะเวลาหมัก 1-2 ปี หลังจากนั้นกรองผ่านกากปลา ได้เป็นหัวน้ำปลา ส่วนกากปลานำไปหมักต่ออีก 3-4 เดือน ได้เป็นน้ำปลาชั้นรอง ตามขั้นตอนการผลิตดังภาพที่ 9 สุ่มตัวอย่างน้ำปลาจากโรง ก (บ่อหมักในร่ม) จำนวน 1 บ่อ และโรง ข (บ่อหมักกลางแจ้ง) จำนวน 1 บ่อ บ่อละ 2 ครั้ง เพื่อตรวจ

ติดตามการเปลี่ยนแปลงของกรดโพธิโอนิกในระหว่างการหมัก โดยโรง ก ผลิตจากปลากระตักสดและใช้สูตรการผลิต คือ ปลา:เกลือ เท่ากับ 2:1 โดยน้ำหนัก และโรง ข ผลิตโดยใช้ปลากระตักดองเกลื่อนาน 6-12 ชั่วโมง และใช้สูตรการผลิต คือ ปลา:เกลือ เท่ากับ 2.3:1 โดยน้ำหนัก



ภาพที่ 9 ขั้นตอนการผลิตน้ำปลาในโรงงานอุตสาหกรรม

2.3 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกรดโพธิโอนิกในกระบวนการหมักน้ำปลา

คุณภาพของปลากระตักที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักน้ำปลาจากโอง A1 ที่ทดลองหมักในห้องปฏิบัติการ โรง ก และโรง ข ดังตารางที่ 5 พบว่า ทั้ง 3 แห่งมีค่า pH ไม่ต่างกันแต่มีค่า TVB-N ต่างกันอยู่ในช่วง 23.36 ± 1.60 ถึง 36.24 ± 3.53 mg/100g อย่างไรก็ตาม พบว่า ค่า TVB-N ในช่วงดังกล่าวไม่ส่งผลต่อปริมาณกรดโพธิโอนิก ปลากระตักโรง ข มีความชื้นต่ำกว่าแต่มีปริมาณเกลือสูงกว่า A1 และโรง ก ($p \leq 0.05$) เนื่องจากการใส่เกลือในวัตถุดิบปลากระตักเพื่อชะลอการเน่าเสียแทนการใช้น้ำแข็ง โดยการใส่เกลือจะช่วยใน

การดึงน้ำออกจากเนื้อปลาและทำให้ปริมาณน้ำอิสระ (Water Activity) ที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตลดลง ซึ่งการใส่เกลือที่ร้อยละ 6-10 จะช่วยป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เนื้อปลาเน่าเสียและทำให้คงความสดของปลาได้นานขึ้น (Clucas and Ward, 1996) จากผลการวิเคราะห์ไขมัน พบว่าปลากะตักทั้ง 3 แห่ง มีปริมาณไขมันอยู่ในช่วงร้อยละ 1.53 ± 0.09 ถึง 2.91 ± 0.51 ซึ่งปลากะตักโรง ก มีปริมาณไขมันมากกว่าปลากะตักโรง ข และ A1 อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่ปลากะตักโรง ข และ A1 มีปริมาณไขมันแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยผลวิเคราะห์ไขมันในปลากะตักมีความใกล้เคียงกับพรรณทิพย์ และคณะ (2559) ที่ได้สุ่มตัวอย่างปลากะตักที่ใช้ในการผลิตน้ำปลาจากโรงงานอุตสาหกรรมจำนวน 4 โรง พบว่า มีปริมาณไขมันอยู่ในช่วงร้อยละ 0.87 ± 0.04 ถึง 2.14 ± 0.01 นอกจากนี้ ตรวจสอบไม่พบกรดโพธิโธนิคในปลากะตักทุกตัวอย่างจากทั้ง 3 แหล่ง และในการทดลองนี้ตรวจสอบไม่พบกรดโพธิโธนิคในเกลือเม็ดที่ใช้ในการหมักน้ำปลาจากทั้ง 3 แหล่งเช่นกัน ซึ่งแสดงว่าไม่มีการปนเปื้อนกรดโพธิโธนิคจากเกลือและสอดคล้องกับ Kim *et al.* (2018) ที่สุ่มตัวอย่างปลาสดในตลาดของสาธารณรัฐเกาหลีนำมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณกรดโพธิโธนิคจำนวน 142 ตัวอย่าง ตรวจสอบพบกรดโพธิโธนิคในปริมาณที่น้อยกว่า 10 ppm จำนวน 140 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างปลาแมคเคอเรล จำนวน 30 ตัวอย่าง ปลาทูน่าจำนวน 10 ตัวอย่าง ปลาจวดเหลือง จำนวน 20 ตัวอย่าง ปลา Filefish จำนวน 10 ตัวอย่าง ปลา Rockfish จำนวน 10 ตัวอย่าง ปลา Hairtail จำนวน 20 ตัวอย่าง ปลา Flatfish จำนวน 7 ตัวอย่าง ปลาไหล 10 ตัวอย่าง ปลา Cero จำนวน 5 ตัวอย่าง ปลาแซลมอน จำนวน 10 ตัวอย่าง และปลา Walleye Pollock จำนวน 8 ตัวอย่าง ซึ่งจากตัวอย่างทั้งหมดนั้น ตรวจสอบพบกรดโพธิโธนิคในปลา Walleye Pollock จำนวน 2 ตัวอย่าง อยู่ในช่วง 11.88-21.66 ppm

ตารางที่ 5 คุณภาพวัตถุดิบปลากะตักที่ใช้ในการหมักน้ำปลา

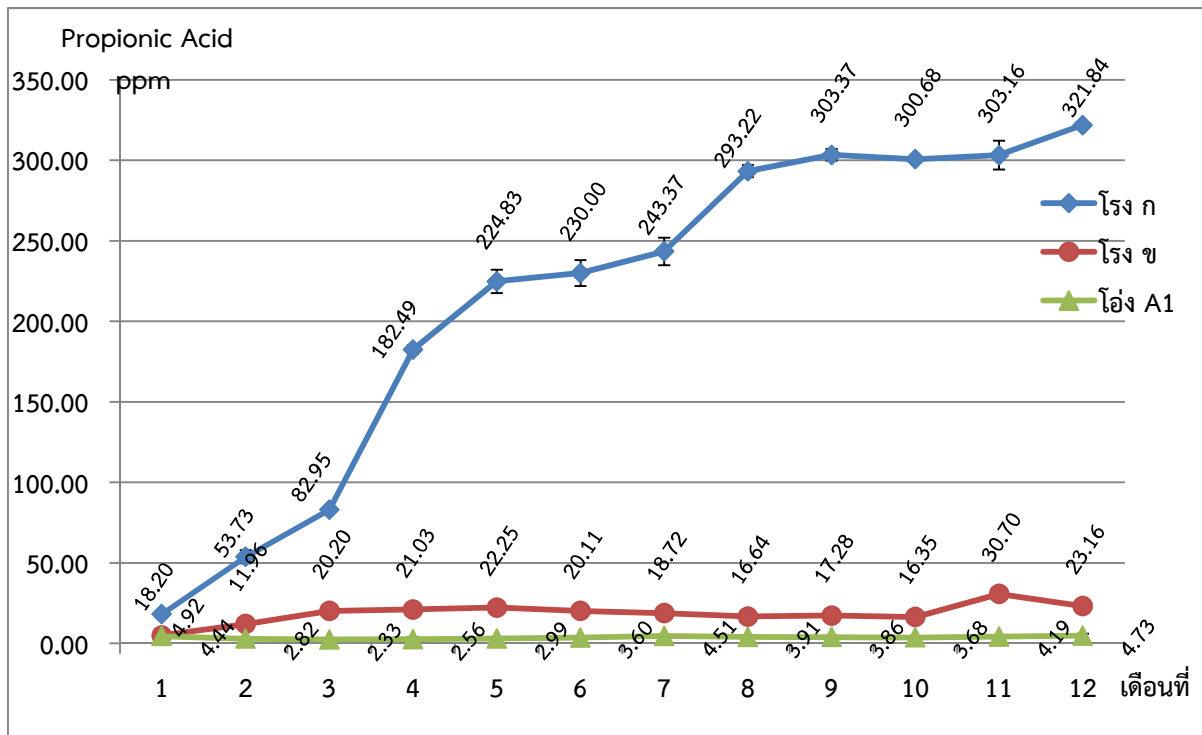
ปลา กะตัก	ความชื้น (ร้อยละ)	pH	เกลือ (ร้อยละ)	TVB-N (mg/100g)	ไขมัน (ร้อยละ)	กรด โพธิโธนิค (ppm)
โอง A1	72.20 ± 0.39^c	6.06 ± 0.01^b	10.69 ± 0.54^a	30.53 ± 3.11^b	1.53 ± 0.09^a	ND
โรง ก	67.82 ± 3.36^b	5.98 ± 0.10^{ab}	9.32 ± 1.38^a	36.24 ± 3.53^c	2.91 ± 0.51^b	ND
โรง ข	47.68 ± 0.92^a	5.90 ± 0.03^a	28.92 ± 5.81^b	23.36 ± 1.60^a	2.13 ± 0.35^a	ND

^{a,b,c}ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรยกกำลังต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ND = Not Detected

ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงกรดโพธิโธนิคในน้ำปลาดังภาพที่ 10 พบว่า เมื่อหมักน้ำปลาครบ 12 เดือน น้ำปลาโอง A1 มีปริมาณกรดโพธิโธนิคเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ในขณะที่น้ำปลาจากโรง ก และ โรง ข มีกรดโพธิโธนิคที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ปริมาณกรดโพธิโธนิคในน้ำปลาจากโรง ก มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก โดยในเดือนที่ 1 ตรวจสอบพบกรดโพธิโธนิคเท่ากับ 18.20 ± 0.82 ppm เพิ่มขึ้นเป็น 321.84 ± 0.75 ppm ในเดือนที่ 12 ในขณะที่โรง ข ปริมาณกรดโพธิโธนิคเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย โดยพบน้อยกว่า 10 ppm ในเดือนที่ 1 และเพิ่มขึ้นเป็น 23.16 ± 0.18 ppm ในเดือนที่ 12 (ตารางผนวกที่ 4) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของวีระสิทธิ์ และอนันต์ (2552) ทดลองหมักน้ำปลา

เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า กรดโพรพิโอนิกจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก จากเดือนที่ 1 ถึง 6 เท่ากับ 150 ppm ถึง 262 ppm ตามลำดับ อรวรรณ และคณะ (2559) ทดลองหมักน้ำปลาเป็นระยะเวลา 6 เดือน พบปริมาณกรดโพรพิโอนิก 252 ppm ในเดือนที่ 6 นอกจากนี้ Dougan and Howard (1975) สุ่มตัวอย่าง น้ำปลาจากบ่อหมักของโรงงานอุตสาหกรรมในประเทศไทยที่มีระยะเวลาการหมักแตกต่างกัน จำนวน 3 แห่ง พบว่า โรงที่ 1 ตรวจไม่พบกรดโพรพิโอนิกหลังจากการหมัก 2 เดือน และตรวจพบ 50 ppm และ 110 ppm เดือนที่ 6 และ 12 ตามลำดับ โรงที่ 2 ตรวจพบกรดโพรพิโอนิก ในเดือนที่ 3 และ 6 ปริมาณ 170 ppm และ 670 ppm ตามลำดับ โรงที่ 3 ตรวจพบกรดโพรพิโอนิกในเดือนที่ 6 และ 15 ปริมาณ 280 ppm และ 330 ppm ตามลำดับ โดยปริมาณกรดโพรพิโอนิกในน้ำปลาที่ตรวจพบมีความสัมพันธ์กับปริมาณไขมันในวัตถุดิบ ปลากระตัก ปลาที่มีไขมันสูงกว่าจะส่งผลให้พบกรดโพรพิโอนิกมากกว่า สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ding *et al.* (2020) ทดลองผลิตน้ำปลาจากปลาน้ำจืด 3 ชนิด ได้แก่ ปลาน้ำจืดในกลุ่มปลาตะเพียน (*Culter alburnus*) ปลาทองหรือ golden fish (*Carassius auratus*) และปลากดอเมริกันหรือ Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) โดยน้ำปลาที่ผลิตจากปลากดอเมริกันซึ่งมีไขมันมากที่สุดตรวจพบกรดโพรพิโอนิกในปริมาณที่สูงกว่า อย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Sanceda *et al.* (2001) ที่ทดลองเติมกรดลิโนเลอิก (Linoleic acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (C18) ลงไปก่อนเริ่มกระบวนการหมักน้ำปลา พบว่า ปริมาณของ กรดไขมันที่ระเหยได้เพิ่มขึ้นหลังการหมักเปรียบเทียบกับกรดอะมิโน ได้แก่ อะลานีน (Alanine) ไอโซลิวซีน (Isoleucine) ลิวซีน (Leucine) และวาเลีน (Valine) ก่อนเริ่มกระบวนการหมักน้ำปลาแล้วไม่พบ การเพิ่มขึ้นของกรดไขมันที่ระเหยได้



ภาพที่ 10 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกในน้ำปลาไร่่ง A1 โรง ก และโรง ข ระยะเวลาการหมัก 12 เดือน

สรุปผลการทดลอง

1. การตรวจวิเคราะห์กรดโพธิ์ฟอนิกในน้ำปลาได้สภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้สารละลาย Ethyl acetate:Phosphoric acid (100:1 v/v) 20 ml ในการสกัดน้ำปลา 20 ml ในอ่างอัลตราโซนิกนาน 20 นาที ให้ผลการสกัดที่รวดเร็วและแยกกรดโพธิ์ฟอนิกได้ดีที่สุด นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC โดยใช้คอลัมน์ Nukol™ fused silica capillary column 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm film thickness ในการแยกสาร ใช้ Helium เป็นแก๊สตัวพา (Carrier gas) ด้วยอัตราเร็ว (Flow rate) 0.59 ml/min ใช้ Nitrogen และ Air เป็น Make up gas ด้วยอัตราเร็ว 30 และ 400 ml/min ตามลำดับ และใช้ Hydrogen ที่อัตราเร็ว 40 ml/min Split ratio เท่ากับ 30:1, Injection volume เท่ากับ 1.0 µl, Injection port temperature เท่ากับ 220 °C เวลาตรวจวัด (Run time) 15 นาทีต่อตัวอย่าง สามารถแยกกรดโพธิ์ฟอนิกได้ดีที่ Retention time เท่ากับ 6.42 นาที

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) มีค่า LOD เท่ากับ 4 ppm, LOQ เท่ากับ 10 ppm ผลการตรวจยืนยันความแม่นยำ โดยการทดสอบที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 40, 100 และ 180 ppm และทำซ้ำในแต่ละระดับ 7 ซ้ำ ผลการทดสอบมีค่า %Recovery ร้อยละ 84.38-92.67, 84.56-90.52 และ 81.55-85.71 ตามลำดับ และมีค่า HorRat 0.57, 0.49 และ 0.42 ตามลำดับ และ %Recovery ของผลทดสอบความเที่ยงแบบทำซ้ำในเวลาต่างกันที่ความเข้มข้น 10 ppm เป็นเวลา 3 วัน ๆ ละ 7 ซ้ำ อยู่ในช่วงร้อยละ 80.20-104.90 และมีค่า HorRat เท่ากับ 0.69 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ดังนั้น วิธีที่พัฒนานี้จึงเหมาะสมต่อการวิเคราะห์กรดโพธิ์ฟอนิกในน้ำปลา

3. น้ำปลาที่วางจำหน่ายในตลาด จำนวน 24 ตัวอย่าง เป็นน้ำปลาแท้จำนวน 14 ตัวอย่าง มีปริมาณกรดโพธิ์ฟอนิกอยู่ในช่วง 23.07 ± 0.22 ถึง $1,115.08 \pm 13.42$ ppm และน้ำปลาผสม จำนวน 10 ตัวอย่าง มีปริมาณกรดโพธิ์ฟอนิกอยู่ในช่วงน้อยกว่า 10 ถึง $1,433.66 \pm 31.97$ ppm ส่วนน้ำปลาจากโรงงาน 5 แห่ง จำนวน 27 ตัวอย่าง เป็นน้ำปลาแท้ จำนวน 22 ตัวอย่าง มีปริมาณกรดโพธิ์ฟอนิกอยู่ในช่วง 137.56 ± 6.19 ถึง $1,022.44 \pm 24.25$ ppm และเป็นน้ำปลาผสม จำนวน 5 ตัวอย่าง มีปริมาณกรดโพธิ์ฟอนิก อยู่ในช่วง 173.19 ± 3.85 ถึง 248.51 ± 6.71 ppm

4. กรดโพธิ์ฟอนิกในน้ำปลาจากการทดลองหมักปลากระตักในโอ่ง A1 มีปริมาณน้อยกว่า 10 ppm ตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน ส่วนกรดโพธิ์ฟอนิกในน้ำปลาที่หมักในระดับอุตสาหกรรมจากโรง ก และ โรง ข มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักในเดือนที่ 1 เท่ากับ 18.02 ± 0.82 ppm และ น้อยกว่า 10 ppm จนถึงเดือนที่ 12 เท่ากับ 321.84 ± 0.75 ppm และ 23.16 ± 0.18 ppm ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความสดของปลากระตักมีผลต่อปริมาณกรดโพธิ์ฟอนิกหรือไม่ อย่างไร

2. ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับชนิดของจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการเกิดกรดโพธิ์ฟอนิกในน้ำปลา

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณบริษัท โรงงานน้ำปลาไทย (ตราปลาหมึก) จำกัด และบริษัทอุตสาหกรรมน้ำปลา ระยอง จำกัด ที่อนุเคราะห์ข้อมูลในการดำเนินงานวิจัย ช่วยในการจัดเก็บและนำส่งตัวอย่างน้ำปลาจาก บ่อหมักที่ตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงกรดโพธิ์อินิกทุกเดือนตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน และ บริษัทสินวารีพัฒนา จำกัด บริษัทน้ำปลารุ่งโรจน์ จำกัด และบริษัทน้ำปลาพิไชย จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ ทีมนักวิจัยในการเก็บข้อมูลในการดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณนางสาวจริยา ภูเจริญ นักวิชาการ ผลิตภัณฑอาหารชำนาญการพิเศษ กองตรวจสอบคุณภาพสินค้าประมง ที่ให้คำแนะนำในการพัฒนาวิธี วิเคราะห์และการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของ กองวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมสัตว์น้ำที่ช่วยสนับสนุนการวิจัยจนสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ. 2553. การผลิตน้ำปลาด้วยวิธีการหมักแบบธรรมชาติ, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 41 หน้า.
- ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กระทรวงสาธารณสุข, กรุงเทพฯ. 124 หน้า.
- ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 203 (พ.ศ. 2543) เรื่องน้ำปลา. ราชกิจจานุเบกษา. 2544. เล่มที่ 118. ตอนพิเศษ 6 ง, หน้า 55-60.
- ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 389 (พ.ศ. 2561) เรื่องวัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 5). ราชกิจจานุเบกษา. 2559. เล่มที่ 135. ตอนพิเศษ 178 ง, หน้า 1.
- พรณทิพย์ สุวรรณสาครกุล, วราทิพย์ สมบุญญฤทธิ และ อรวรรณ คงพันธ์. 2559. คุณภาพทางเคมีของ น้ำปลาจากการหมักตามธรรมชาติ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2559. กองวิจัยและพัฒนา อุตสาหกรรมสัตว์น้ำ, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 51 หน้า.
- วีระสิทธิ์ กัลยาภฤต และ อนันต์ บุญปาน. 2552. ผลของการใช้เอนไซม์ที่ชอบเกลือร่วมกับการหมักต่อ ปริมาณสารให้กลิ่นรสบางชนิดและองค์ประกอบทางเคมีบางประการในน้ำปลา. ใน เรื่องเติม การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 (สาขาอุตสาหกรรมเกษตร). กรุงเทพฯ. หน้า 596-603.
- สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. 2563. ข้อมูลสถิติสำหรับการจัดทำดัชนี อุตสาหกรรม. แหล่งที่มา <http://www.oie.go.th/view/1/สถิติอุตสาหกรรม/TH-TH>. 26 มีนาคม 2563.
- อรวรรณ พึ่งคำ, ณิชัฐรัฐ แพกุล, อติสรณ์ ดีเปรมจิต และ อนันต์ บุญปาน. 2559. การปรับปรุงกลิ่นและ รสชาติของน้ำปลาด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรีย. *Sci. & Tech. RMUTT. J.* 6(2): 147-156.

- American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation. 2017. 1020 Quality Assurance. In: Baird, B. R., A. D. Eaton and E. W. Rice (eds.). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23rd Edition. American Public Health Association. Washington, USA. pp. 1-11.
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). 2016. Official Methods of Analysis. 20th Edition. AOAC International, USA. 3172 pp.
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). 2016. Standard Method Performance Requirements (SMPR) Guidelines, Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC International. USA. 18 pages. http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf, January 19, 2020.
- Azzam, K. M. A., S. Bahruddin, N. H. Hashim, A. A. Rahim and K. M. Talib. 2010. Determination of Propionates and Propionic Acid in Bakery Products Using Gas Chromatography. *J. Int. Food Res.* 17: 1107-1102.
- CODEX. 2014. Guidelines for the Design and Implementation of National Regulatory Food Safety Assurance Programme Associated with the Use of Veterinary Drugs in Food Producing Animals. CAC/GL 71-2009. Codex Alimentarius International Food Standards. FAO/WHO Rome, Italy. 42 pp.
- Clucas, I.J. and A. R. Ward. 1996. Post-Harvest Fisheries Development: A Guide to Handling, Preservation, Processing and Quality. Natural Resources Institute, Chatham Maritime, Kent, UK. 443 pp.
- Ding, A., M. Zhu, X. Qian, L. Shi, H. Huang, G. Xiong, J. Wang and L. Wang. 2020. Effect of Fatty Acids on the Flavor Formation of Fish Sauce. *LWT-Food Science and Technology* 134. 10 pp.
- Dishisha, Tarek. 2013. Microbial Production of Bio-Based Chemicals a Biofinery Perspective. Doctoral Dissertation, Lund University. 62 pp.
- Doores, S. 2005. Chapter 4 Organic Acids. In: Davidson, P. M., J. N. Sofos, A. L. Branen (eds.). Antimicrobials in Food. Taylor & Francis Group. USA. pp. 91-142.
- Dougan, J. and G. E. Howard. 1975. Some Flavouring Constituents of Fermented Fish Sauce. *J. Sci. Food Agric.* 26: 887-894.
- EFSA ANS Panel (European Food Safety Authority, Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food). 2014. Scientific Opinion on the Re-evaluation of Propionic Acid (E280), Sodium Propionate (E281), Calcium Propionate (E282) and Potassium Propionate (E283) as Food Additives. *EFSA Journal.* 12 (7): 45 pp.

- EFSA ANS Panel (European Food Safety Authority, Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food). 2016. Safety of the Extension of Use of Sodium Propionate (E281) as a Food Additive. *EFSA Journal*. 14 (8): 13 pp.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 1981. The Prevention of Losses in Cured Fish. FAO Fisheries Technical Paper No. 219. FAO, Rome. 87 pp.
- Gonzalez-Garcia, R. A., T. McCubbin, L. Navone, C. Stowers, L. K. Nielsen and E. Marcellin. 2017. Microbial Propionic Acid Production. *Fermentation* 3 (21): 20 pp.
- Hasegawa, H. (ed). 1987. Laboratory Manual on Analytical Methods and Procedures for Fish and Fish Products. Southeast Asian Fisheries Development Center, Singapore. pp. A-3.1-A-3.2
- JECFA. 2006. JECFA Specification for Propionic Acid (E280). Online Edition: Combined Compendium of Food Additive Specifications. Available Source: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-additives/detail/en/c/348/>. May 1, 2020.
- Kim, D. B., G. J. Jang, M. Yoo, G. Lee, S. S. Yun, H. S. Lim, M. K. Kim and S. Lee. 2018. Sorbic, Benzoic and Propionic Acids in Fishery Products: a Survey of the South Korean Market. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 7 pp.
- Kirschner, M. 2009. Chemical profile: Propionic Acid. Available source: <https://www.icis.com/explore/resources/news/2009/03/30/9203721/chemical-profile-propionic-acid>. December 12, 2020.
- Lee, H. J., H. J. Ahn, C. S. Kang, J. C. Choi, H. J. Choi, K. G. Lee, J. I. Kim and H. Y. Kim. 2010. Naturally Occurring Propionic Acid in Foods Marketed in South Korea. *Food Control* 21: 217-220.
- Mclver, R. C., R. I. Brooks and G. A. Reineccius. 1982. Flavor of Fermented Fish Sauce. *J. Agric. Food Chem.* 30 (6): 1017-1020.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. 2014. National Food Safety Standard for Uses of Food Additives (GB2760-2014) Table A.1. 256 pp.
- Ooshiro, Z. T. Oka, H. Une, S. Hayashi and T. Itakura. 1981. Study on Use of Commercial Proteolytic Enzymes in Production of Fish Sauce. *Mem. Faculty of Fisheries, Kagoshima University*. 30: 383-394.
- Saisithi, S. 1994. Traditional Fermented Fish: Fish Sauce Production. In: Martin, A. M. (ed.). *Fisheries Processing*. Springer, Boston, Massachusetts. pp. 111-131.

- Sanceda, N., E. Suzuki and T. Kurata. 1999. Formation of Volatile Acids during Fermentation of Fish Sauce. *Flavor Chemistry of Ethnic Foods*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. pp. 41-53.
- Sanceda, N., E. Suzuki and T. Kurata. 2001. Development of Normal and Branched Chain Volatile Fatty Acids during the Fermentation Process in the Manufacture of Fish Sauce. *J. Sci. Food Agric.* 81: 1013-1018.
- Siang, N. C. and L. L. Kim. 1992. Laboratory Manual on Analytical Methods and Procedures for Fish and Fish Products 2nd Edition. Southeast Asian Fisheries Development Center, Singapore. pp. B3.1-3.7.
- Shimoda, M., R. R. Peralta and Y. Osajima. 1996. Headspace Gas Analysis of Fish Sauce. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3601-3605.
- Tonogai, Y., A. Kingkate, W. Thanissorn and U. Punthanapradet. 1983. Gas Chromatographic Determination of Propionic Acid and Sodium and Calcium Propionate in Bread and Cake. *J. Food Prot.* 46 (4): 284-286.
- Wang, Z., J. Sun, A. Zhang and S. T. Yang. 2013. Propionic Acid Fermentation. In: Yang, S. T., H. A. El-enshasy and N. Thongchul (eds.). *Bioprocessing Technology in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals and Polymers*. 1st Edition. John Wiley & Sons Inc., New Jersey. pp. 331-349.
- Wichaphon, J., C. Thongthai, A. Assavanig and S. Lertsiri. 2011. Volatile Aroma Components of Thai Fish Sauce in relation to Product Categorization. *J. Flavour Fragr.* 27: 149-156.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ปริมาณกรดโพรฟิโอดิก และ Total nitrogen ในน้ำปลาจากตลาด

รหัส	กรดโพรฟิโอดิก (ppm)	Total nitrogen (g/l)
1	53.43±1.75	22.52±0.58
2	23.07±0.22	18.04±0.05
3	45.40±0.78	17.71±0.10
4	848.85±19.77	16.85±0.20
5	1115.08±13.42	16.68±0.14
6	91.85±1.51	16.46±0.28
7	347.76±12.48	16.19±0.18
8	927.85±16.20	16.13±0.23
9	27.38±0.89	16.09±0.12
10	125.13±5.73	15.45±0.07
11	1009.23±16.25	14.18±0.28
12	677.64±5.82	13.90±0.71
13	808.19±2.70	11.44±0.11
14	706.48±9.19	10.15±0.13
15	1155.62±27.56	8.78±0.21
16	717.57±27.21	8.64±0.03
17	1369.69±11.52	8.29±0.45
18	1433.66±31.97	8.28±0.09
19	40.42±1.19	8.09±0.06
20	111.60±8.12	7.71±0.18
21	399.07±2.25	3.73±0.10
22	594.33±5.07	3.69±0.13
23	209.93±3.00	3.54±0.07
24	< 10	ND

ND = Not Detected

เป็นค่า $\bar{X} \pm SD$ ของการตรวจวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

ตารางผนวกที่ 2 ปริมาณกรดโพรฟิโอนิก และ Total nitrogen ในน้ำปลาจากโรงงานอุตสาหกรรม

รหัส	กรดโพรฟิโอนิก (ppm)	Total nitrogen (g/l)
1P1	1,022.44±24.25	9.34±1.34
1P2	882.63±4.19	15.37±0.10
1P3	883.79±23.80	13.52±0.31
2P1	807.66±7.32	16.70±0.22
2P2	887.12±8.32	16.70±0.14
2P3	853.45±8.20	16.92±0.06
2P4	807.80±6.54	16.89±0.13
2P5	847.77±1.89	17.19±0.50
2P6	803.33±10.89	16.90±0.18
3P1	337.42±5.22	12.92±0.10
3P2	137.56±6.19	23.33±0.45
3P3	387.65±18.50	10.04±0.11
3P4	457.86±17.19	13.84±0.10
3P5	495.85±6.77	11.11±0.20
3P6	248.51±6.71	4.72±0.02
4P1	377.55±4.15	16.26±0.08
4P2	243.95±5.40	6.86±0.15
4P3	168.20±2.78	3.87±0.06
4P4	387.97±3.60	16.14±0.10
4P5	218.44±7.39	6.05±0.05
4P6	173.19±3.85	3.91±0.01
5P1	346.97±10.46	18.21±0.10
5P2	637.25±14.99	11.75±0.23
5P3	728.87±12.10	9.46±0.11
5P4	420.43±4.24	13.54±0.44
5P5	426.11±7.76	13.05±0.14
5P6	691.53±21.02	10.00±0.09

เป็นค่า $\bar{X} \pm SD$ ของการตรวจวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

ตารางผนวกที่ 3 กรดโพรพิโอนิกในน้ำปลา ก่อน-หลังผสมสารปรุงแต่งรส และ Total nitrogen หลังผสม

ตัวอย่าง	กรดโพรพิโอนิก (ppm)		t	P-value	Total nitrogen (g/l)
	ก่อนผสม	หลังผสม			หลังผสม
101	443.64±4.04 ^b	514.02±4.61 ^c	-18.33	0.003*	17.28±0.12 ^d
102	942.76±8.14 ^h	855.88±4.59 ^g	14.69	0.005*	13.96±0.16 ^c
103	1,123.72±8.11 ⁱ	975.19±10.38 ⁱ	103.97	0.000*	10.34±0.10 ^a
104	954.28±7.59 ^h	885.04±6.07 ^h	9.92	0.010*	14.35±1.15 ^c
201	851.61±5.08 ^f	748.78±24.22 ^e	9.07	0.012*	16.96±0.28 ^d
202	907.66±7.26 ^g	816.73±15.38 ^f	11.72	0.007*	16.87±0.11 ^d
301	203.96±3.54 ^a	231.92±3.76 ^a	-11.19	0.008*	22.66±0.07 ^e
302	677.12±18.15 ^d	534.04±4.14 ^c	12.66	0.006*	14.61±0.12 ^c
401	487.36±16.18 ^c	446.4±13.34 ^b	2.65	0.118	14.16±0.69 ^c
402	791.56±19.32 ^e	647.1±19.65 ^d	8.31	0.014*	12.02±0.29 ^b

*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

a..i ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรยกกำลังต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวกที่ 4 ปริมาณกรดโพรพิโอนิกในน้ำปลาโอง A1 โรง ก และโรง ข ระยะเวลาการหมัก 12 เดือน

เดือนที่	ผลวิเคราะห์ Propionic Acid		
	A1	โรง ก	โรง ข
1	< 10	18.20 ± 0.82 ^a	4.92 ± 0.38 ^a
2	< 10	53.73 ± 4.08 ^b	11.96 ± 1.15 ^b
3	< 10	82.95 ± 1.03 ^c	20.20 ± 1.82 ^{ef}
4	< 10	182.49 ± 2.72 ^d	21.03 ± 0.29 ^{fg}
5	< 10	224.83 ± 7.28 ^e	22.25 ± 0.37 ^{gh}
6	< 10	230.00 ± 8.03 ^e	20.11 ± 0.46 ^{ef}
7	< 10	243.37 ± 8.61 ^f	18.72 ± 1.41 ^{de}
8	< 10	293.22 ± 3.83 ^g	16.64 ± 0.56 ^c
9	< 10	303.37 ± 3.60 ^h	17.28 ± 0.59 ^{cd}
10	< 10	300.68 ± 2.13 ^{gh}	16.35 ± 0.57 ^c
11	< 10	303.16 ± 8.95 ^h	30.70 ± 1.09 ⁱ
12	< 10	321.84 ± 0.75 ⁱ	23.16 ± 0.18 ^h

a..i ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรยกกำลังต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)