ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ความชื้น (ตามวิธีการของ AOAC, 1985)

1. นำขวดชั่งเข้าตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น
2. ชั่ง และบันทึกน้ำหนักของขวดชั่งโดยละเอียด
3. ชั่งตัวอย่างใส่ขวดชั่งประมาณ 5 กรัม โดยบันทึกน้ำหนักอย่างละเอียด
4. นำตัวอย่างเข้าตู้อบ โดยใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง
5. นำตัวอย่างที่อบแล้วใส่โถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น บันทึกน้ำหนักของตัวอย่าง
6. ทำซ้ำตามข้อ 1 ถึง 5 จนกระทั่งน้ำหนักที่ได้คงที่ โดยน้ำหนักที่หายไปคือน้ำหนักของความชื้น

คำนวณ % ความชื้นด้วยสมการ

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{(a - b)}{w} \times 100$$

เมื่อ a = น้ำหนักของอาหารก่อนอบแห้ง
b = น้ำหนักของอาหารหลังอบแห้ง
w = น้ำหนักของอาหารก่อนอบ

2. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (ตามวิธีการของ AOAC, 1985)

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบ
2. นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนเถ้าเป็นสีขาว
3. นำเข้าโถอบแห้ง เพื่อให้ดูดความชื้น และเมื่อตัวอย่างอาหารเย็นดีแล้ว นำออกชั่งทันที

คำนวณ % เถ้าด้วยสมการ

$$\% \text{เถ้า} = \frac{(b - a)}{w} \times 100$$

เมื่อ a = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ

b = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำหนักของเถ้าภายหลังการเผา

w = น้ำหนักของอาหารก่อนเผา

3. การวิเคราะห์หาโปรตีน (ตามวิธีการของ AOAC, 1985)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น 93 - 98 %

2. สารเร่งรวม (catalyst mixture)

ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) 7 กรัม กับโปแตสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 100 กรัม ผสมให้เข้ากัน

3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 45% (NaOH)

โดยละลาย 450 กรัม ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ชนิดเกล็ดลงในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

4. สารละลายกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล

ละลายกรดเกลือ 9 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

5. กรดบอริค (H_3BO_3) 4%

ต้มน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ให้ร้อน แล้วใส่ผงกรดบอริคลงไป 4 กรัม ต้มจนละลายหมด ทิ้งไว้จนสารละลายเย็นลง แล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

6. อินดิเคเตอร์ผสมระหว่าง เมทธิลเรด และเมทธิลีนบลู

ละลายเมทธิลเรด 0.2 กรัม ในแอลกอฮอล์ 95% ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร และละลายเมทธิลีนบลู 0.2 กรัม ในแอลกอฮอล์ 95% ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเมทธิลเรด 2 ส่วน ผสมกับสารละลายเมทธิลีนบลู 1 ส่วน เขย่าให้เข้ากัน

7. เมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์ (methyl orange indicator)

ละลายเมทิลออเรนจ์ 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

8. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 0.1 นอร์มอล

อบโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ 260 - 270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ชั่งสารมา 1.325 กรัม เติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร

วิธีการ

ก. ขั้นตอนการย่อย (digestion)

1. ชั่งตัวอย่างอาหารให้ได้น้ำหนักประมาณ 1 กรัม โดยชั่งด้วยกระดาษกรองที่ปราศจากสารไนโตรเจนแล้วใส่ในขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีน

2. เติมสารเร่งรวม 10 กรัม เพื่อเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกริยาการย่อย

3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 25 มิลลิลิตร

4. นำไปย่อยด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีน ที่อุณหภูมิ 375 องศาเซลเซียส กระทั่งสารละลายในขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีนใส ทิ้งไว้ให้เย็น

ข. ขั้นตอนการกลั่น (distillation)

1. เมื่อสารละลายเย็นดีแล้ว จึงเติมน้ำกลั่นลงไปให้ได้ปริมาตรประมาณ 300 มิลลิลิตร

2. ใส่ลูกแก้ว 2 ลูก เพื่อป้องกันการกระแทกของสารละลาย

3. ต่อขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเข้ากับเครื่องกลั่นที่มีขวดปากแคบวัดปริมาตร ซึ่งมีกรดบอริค 40 มิลลิลิตรอยู่ โดยให้ปลายของหลอดแก้วที่ต่อจากกระบอกแก้วควบแน่นจุ่มอยู่ในกรดบอริค เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในขวดแก้ววิเคราะห์ช้าๆ จนกระทั่งสารละลายมีสีดำ

4. ใส่อินดิเคเตอร์ในกรดบอริค 2 - 3 หยด

5. ทำการกลั่นจนกระทั่งไม่มีแก๊สแอมโมเนียออกมา แล้วทำการกลั่นต่อไปอีก 10 นาที แล้วล้างปลายเครื่องกลั่นด้วยน้ำกลั่น นำขวดปากแคบวัดปริมาตรออกจากเครื่องกลั่น

ค. ขั้นตอนการไตเตรท (titration)

1. นำไปไตเตรทด้วยกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น (0.1 นอร์มอล) จนถึงจุดยุติ (end point) โดยใช้อินดิเคเตอร์รวม สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อน

2. จดปริมาตรของกรดเกลือไว้เพื่อคำนวณต่อไป

การคำนวณ

$$\% \text{ โปรตีน} = \frac{1.4 \times (V_1 - V_2) \times N \times 6.25}{W}$$

เมื่อ V_1 = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

V_2 = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบ

N = เป็นความเข้มข้นของกรดเกลือเป็นนอร์มอล

W = น้ำหนักตัวอย่างอาหาร

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือมาตรฐาน

ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 40 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติมเมทิลออเรนซ์ อินดิเคเตอร์ 2 - 3 หยด ทำการไตเตรตด้วยสารละลายกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล คำนวณความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือโดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

4. การวิเคราะห์หาไขมัน (ใช้เครื่อง Soxtec System HT6) (ตามวิธีการของ AOAC, 1985)

สารเคมี

1. สารละลายคลอโรฟอร์ม (chloroform)

2. เมทธานอล (methanol)

วิธีการ

1. อบถ้วยพร้อมลูกแก้ว ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 8 ชั่วโมงทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น

2. อบตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

3. ชั่งน้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้ว (w_1)

4. ชั่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ใส่กระดาษกรองประมาณ 1 - 2 กรัม (w_2) ห่อให้มิดชิดใส่ลงในไส้กรอง (thimble) ที่เตรียมไว้ นำไปใส่เข้าเครื่อง Soxtec System HT6

5. นำถ้วยพร้อมลูกแก้วที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้วมาเติม คลอโรฟอร์ม : เมทานอล ในอัตราส่วน 2 : 1 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วใส่เข้าเครื่องให้เรียบร้อย

6. เปิดเครื่อง ปรับอุณหภูมิไปที่ 160 องศาเซลเซียส เปิดน้ำเข้าเครื่อง เปิดวาล์ว เลื่อนปุ่มไปที่ boiling ต้มให้เดือด 30 นาที

7. เลื่อนปุ่มไปที่ rinsing เพื่อล้างตัวอย่าง 20 นาที

8. ปิดวาล์ว เปิดสวิทซ์อากาศ เลื่อนปุ่มไปที่ evaporation เพื่อให้สารระเหยออกไป 5 นาที

9. ปิดเครื่อง อากาศและน้ำ แล้วเลื่อนปุ่ม evaporation กลับที่เดิม นำถ้วยออกจากเครื่อง แล้วนำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน

10. นำถ้วยออกมาใส่โถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก (w_3)

การคำนวณหา % ไขมัน

$$\% \text{ ไขมัน} = \frac{w_3 - w_1}{w_2} \times 100$$

เมื่อ w_1 = น้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้ว

w_2 = น้ำหนักตัวอย่าง

w_3 = น้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้วและไขมันหลังอบ

5. การคำนวณหาค่าอัตราการรอดตายและการเจริญเติบโต

คำนวณหาอัตรารอดตาย (%)

$$= \frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง x 100}}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มต้น}}$$

คำนวณหาน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain %)

$$= \frac{[\text{น.น.ปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น.น.ปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}] \text{ x } 100}{\text{น.น. ปลาเมื่อเริ่มต้น}}$$

คำนวณอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate) ตามวิธีการของ Dupree และ Sneed (1966)

$$= \frac{\text{น.น.อาหารที่ปลากินทั้งหมด}}{\text{น.น.ปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}$$

คำนวณหาค่าดัชนีตับต่อตัว (Hepatosomatic Index) ตามวิธีของ Anwar และ Jafri (1995)

$$= \frac{\text{น้ำหนักตับปลา}}{\text{น้ำหนักตัวปลา}} \times 100$$

6. การศึกษาองค์ประกอบเลือด

6.1 การหาค่าฮีมาโตคริต (% haematocrit) (ดัดแปลงจาก Blaxhall and Daisley, 1973)

1. นำเลือดที่เจาะได้ใหม่ๆใส่ในหลอดเล็กๆสำหรับหาค่าฮีมาโตคริต(microhaematocrit capillary tube) ประมาณครึ่งหลอด อุดปลายด้านหนึ่งของหลอดด้วยดินน้ำมัน

2. ปั่นด้วยฮีมาโตคริตเซนตริฟิวจ์ (haematocrit centrifuge) ที่แรงเหวี่ยง 10,000 – 15,000 รอบต่อนาที นานประมาณ 5 – 10 นาที

3. วัดหาอัตราส่วนของปริมาตรเม็ดเลือดกับปริมาตรเลือดทั้งหมด นำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริตจากสูตร

$$\% \text{ ฮีมาโตคริต} = \frac{\text{ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (มิลลิเมตร)}}{\text{ปริมาตรเลือดทั้งหมด (มิลลิเมตร)}} \times 100$$

6.2 การหาค่าฮีโมโกลบินรวม (total haemoglobin) (ตามวิธีของ Larsen and Snieszko, 1961)

สารเคมี

สารละลายเดรบกิ้น (Drabkin's solution) : เตรียมโดยละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 1 กรัม โปแตสเซียมไซยาไนด์ (KCN) 0.05 กรัม และโปแตสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ ($K_3Fe(CN)_6$) 0.20 กรัม ในน้ำกลั่นที่กลั่น 2 ครั้ง จนได้ปริมาตรครบ 1,000 ลิตร เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดทึบแสง มีอายุใช้งาน 6 เดือนที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการ

1. ใช้ไมโครปิเปตขนาด 20 ไมโครลิตรดูดเลือดที่เจาะได้ใหม่ๆ มาผสมรวมกับสารละลายเดรบกิ้น (Drabkin's solotion) 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีแล้วทิ้งไว้อย่างน้อย 20 นาที

2. นำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

3. ค่าที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับค่าฮีโมโกลบินมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น โดยใช้เดรบกิ้นเป็นแบลงค์ (blank)

4. เตรียมฮีโมโกลบินมาตรฐาน (standard haemoglobin) ที่มีความเข้มข้น 0, 4.5, 9 และ 18 กรัมต่อเดซิลิตร (gm/dl) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

5. นำค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินมาตรฐาน และค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน โดยให้ค่าความเข้มข้นอยู่ในแกน X และค่าการดูดกลืนแสงอยู่แกน Y แล้วหาสมการสหสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linear regression) เพื่อใช้คำนวณค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในเลือด จากค่าการดูดกลืนแสง

6.3 การหาค่าโปรตีนรวมในซีรัมหรือพลาสมา (total serum or plasma protein) (ดัดแปลงจากวิธีของ Lowry *et al*., 1951)

สารเคมี

1. สารละลายอัลคาไลด์คอปเปอร์ (Alkaline copper solution) : เตรียมโดยใช้ 1 % โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ใน 0.5 M NaOH 50 ส่วน ผสมกับ 1 % โซเดียมทาร์เตรต ($C_4H_4Na_2O_6$) 1 ส่วน และ 0.5 % $CuSO_4.5H_2O$ อีก 1 ส่วน เก็บสารละลายผสมไว้ในขวดทึบแสง ถ้ามีตะกอนเกิดขึ้นให้เตรียมใหม่

2. Folin reagent 1:10 เตรียมโดยผสม Folin ciocalteu reagent 1 ส่วนกับน้ำกลั่นที่กลั่น 2 ครั้ง 10 ส่วน เก็บไว้ในขวดทึบแสง

วิธีการ

1. ดูดซีรัมมา 5 ไมโครลิตร ผสมรวมกับน้ำกลั่น 995 ไมโครลิตร

2. เติม alkaline copper solution 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เท่ากันแล้วทิ้งไว้ 10 นาที

3. เติม folin reagent 1:10 ลงไป 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน สังเกตสีของสารละลายที่เปลี่ยนแปลง

4. เมื่อครบ 5 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร

ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างเลือดปลาที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับค่าแอลบูมินมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นโดยใช้แบลงค์ (blank) ที่เตรียมขึ้นตามขั้นตอนนี้แต่ไม่เติมซีรัม

การเตรียมกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของซีรัมโปรตีน

1. ดูดสารละลายมาตรฐานแอลบูมิน (standard albumin) ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองหลอดละ 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ

2. เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 0.9, 0.7, 0.5, 0.3, 0.1 และ 0 มิลลิลิตร ตามลำดับ จะได้ความเข้มข้นของแอลบูมินในแต่ละหลอดเท่ากับ 50, 150, 250, 350, 450 และ 500 ไมโครกรัม ตามลำดับ

3. นำแต่ละหลอดมาทำตามขั้นตอนของการหาซีรัมโปรตีนในเลือด ดังที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น

4. นำค่าความเข้มข้นของแอลบูมิน และค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน โดยให้ค่าความเข้มข้นอยู่ในแกน X และค่าการดูดกลืนแสงอยู่แกน Y หาสมการสหสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linear regression) เพื่อใช้คำนวณค่าความเข้มข้นของโปรตีนรวมในเลือด จากค่าการดูดกลืนแสง

6.4 การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว (Blood cell count) (ตามวิธีของกิจการ, 2538)

สารเคมี

Diluting fluid (Yokoyama's fluid)

วิธีการ

1. ใช้ RBC diluting pipette ดูดเลือด (ที่เจาะใหม่ๆ) ให้ถึงขีด 0.5 ถ้าเกินให้ปรับโดยใช้กระดาษทิชชูค่อยๆซับอย่างระมัดระวัง แล้วเช็ดปลายปิเปตให้สะอาด

2. ใช้ปิเปตอันเดิมดูด diluting fluid (Yokoyama's fluid) จนถึงขีด 101 ตรงปลายปิเปต

3. ใช้นิ้วชี้ปิดปลายปิเปตแล้วถอดสายยาง จากนั้นใช้นิ้วหัวแม่มือกับนิ้วชี้ปิดปลายปิเปตทั้งสองข้าง เขย่าไปมาในแนวนอน 2-3 นาที

4. หยดของเหลวในปิเปตทิ้งไป 9-4 หยด เพราะของเหลวเหล่านี้อยู่ในก้าน ไม่ได้ถูกนำไปผสมกับเลือดในกระเปาะของปิเปต

5. หยดของเหลวหยดต่อไปลงในร่องของ haemacytometer ที่มี cover glass ปิดอยู่เรียบร้อยแล้ว ถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้นหรือของเหลวหยดโตเกินไปจนล้นขอบของ haemacytometer ให้ทำความสะอาดแล้วทำใหม่

6. วาง haemacytometer ลงบนพื้นโต๊ะ 2-3 นาที เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดลงไปเรียงบนพื้นสไลด์ นับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 20X-40X

7. จำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้ในวงกลมเล็กรวมกัน 5 ช่อง คูณ 5 X 10 X 200 X 1,000 และจำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ในวงกลมใหญ่ 4 ช่อง หาร 4 X 10 X 200 X 1,000 คือค่าของจำนวนเม็ดเลือดแดงและขาวต่อ 1 ลบ.ซม.

7. วิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (ตามวิธีของ Humason, 1972; Bancroft, 1967)

สารเคมี

1. ฟอร์มาลีน (formalin) 10%

ฟอร์มาลีน (formalin)	10 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	90 มิลลิลิตร

ผสมเข้าด้วยกัน

2. สีย้อมฮีมาทอกซิลิน (haematoxylin) เตรียมโดยใช้

ฮีมาทอกซิลิน (haematoxylin crystal)	4 กรัม
โซเดียมไอโอเดท (sodium iodate)	0.8 กรัม
อลัม (potasium aluminium sulfate, alum)	100 กรัม
กรดซิตริก (citric acid)	4 กรัม
คลอรัลไฮเดรท (chloral hydrate)	200 กรัม
น้ำกลั่น	2,000 มิลลิลิตร

ละลายอลัมลงในน้ำกลั่น เติมฮีมาทอกซิลินผสมจนกระทั่งละลายหมด จึงเติมโซเดียมไอโอเดทผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซิตริก และคลอรัลไฮเดรทผสมจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกันทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้งาน

3. สีย้อมอีโอซิน (eosin) เตรียมโดยใช้

อีโอซิน (eosin Y.Cl 45380)	1 กรัม
เอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ (ethyl alcohol)	1,000 มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	5 มิลลิลิตร

ผสมเข้าด้วยกัน

การเตรียมตัวอย่าง

1. สลบปลาด้วยสารละลายควินาดีน (quinaldine) 50 ส่วนในล้านส่วน

2.ใช้กรรไกรผ่าตัดเปิดช่องท้องของปลาออก ตัดตับออกแล้วดองในน้ำยาฟอร์มาลิน 10 % ทันที เก็บรักษาตัวอย่างในน้ำยาดองดังกล่าวเป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเก็บรักษาไว้ได้เป็นเวลานาน

ขั้นตอนการ dehydration และ embedding

1. ตบแต่งตัวอย่าง (trim) ที่ผ่านการดองแล้วให้มีขนาดพอเหมาะเพื่อสะดวกต่อการ embed และนำไปตัด section

2. นำตัวอย่างไปผ่านขั้นตอน dehydration ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
2	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
3	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
4	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
5	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
6	แอบโซลูท แอลกอฮอล์ (absolute alcohol)	1
7	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol)	1
8	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
9	ไซลีน (xylene)	1
10	ไซลีน	1
11	พาราพลาสท์ (paraplast)	1
12	พาราพลาสท์	1

3. นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนดึงน้ำออก ไป embed ด้วยพาราพลาสท์ จากนั้นนำ block ไปแช่ตู้เย็นเพื่อง่ายต่อการนำไปตัด section ต่อไป

4. ตบแต่งตัวอย่างที่อยู่ใน block ให้มีขนาดพอดีกับขนาดสไลด์ และ cover glass ปิดได้สนิท จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อไมโครโตม (microtome) ให้มีความหนาประมาณ 3 - 4 ไมครอน นำไปลอยในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45 - 50 องศาเซลเซียส

5. ใช้แผ่นสไลด์ช้อนตัวอย่าง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน

6. นำสไลด์ไปผ่านขบวนการย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน โดยมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	**สารละลาย**	**เวลา (นาที)**
1	ไซลีน	2
2	ไซลีน	2
3	ไซลีน	2
4	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
5	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
6	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
7	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
8	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
9	น้ำกลั่น	1
10	ฮีมาทอกซิลิน	20
11	น้ำประปา	1
12	น้ำกลั่น	1
13	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
14	อีโอซิน	2
15	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	2
16	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	2
17	แอบโซลูท แอลกอฮอล์	2
18	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2

19	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
20	ไซลีน	2
21	ไซลีน	2
22	ไซลีน	2

7. mount slide ด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์ (permount) แล้วนำตัวอย่างไปศึกษาพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์

8. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ตามวิธีการของ Boyd and Tucker, 1992)

8.1 การวิเคราะห์ค่าความเป็นด่างของน้ำ

สารเคมี

1. ฟีนอล์ฟทาลีน อินดิเคเตอร์ (phenolphthalein indicator): เตรียมโดยละลายฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphthalein) 0.5 กรัม ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % จนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. เมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์: เตรียมโดยละลายเมทิลออเรนจ์ 0.5 กรัม ในน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3. เมทิลเรด อินดิเคเตอร์: เตรียมโดยละลายเมทิลเรด 0.5 กรัม ในน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.2 นอร์มอล: เตรียมโดยค่อยๆ เทกรดซัลฟูริกเข้มข้น 6 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น (ที่ต้มเดือดใหม่ๆ แล้วเปิดฝาทิ้งให้เย็น) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

5. สารละลายมาตรฐานโซเดียมคาร์บอเนต 0.2 นอร์มอล: เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนตซึ่งอบแห้งจำนวน 10.6 กรัม โดยอบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที หรือที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำให้เย็นในโถอบแห้ง จากนั้นละลายในน้ำกลั่นที่ต้มเดือดใหม่ๆ วางไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลาย

1. ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. หยดเมทิลเรด อินดิเคเตอร์ 5 หยด เขย่าให้เข้ากันจะได้สารละลายสีเหลือง

3. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู

4. นำส่วนผสมทั้งหมดไปต้มจนเดือดเป็นเวลาประมาณ 3-5 นาที เพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้หมด สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอีกครั้ง

5. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกต่อไป จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอีกครั้งหนึ่ง

6. บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกทั้งหมดที่ใช้ไป

การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก (นอร์มอล)

$$\text{ความเข้มข้น (นอร์มอล)} = \frac{0.2 \times 25}{\text{ปริมาตร(มิลลิลิตร)ของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้}}$$

หลังจากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.02 นอร์มอล โดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

วิธีการ

1. นำตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. หยดฟีนอลฟ์ทาลีนอินดิเคเตอร์ 10 หยด เขย่าให้เข้ากัน

2.1 ถ้าสารละลายใส ให้ทำข้อ 3 ต่อไป

2.2 ถ้าสารละลายสีชมพู จะต้องไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกจนกระทั่งสารละลายสีชมพูนั้นหายไป บันทึกปริมาตรที่ใช้ไป (นำไปรวมกับปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ไปในข้อ 4) ทำต่อไปในข้อ 3.

3. หยดเมทิลออเรนจ์ 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายสีเหลือง

4. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้ม จดปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริกที่ใช้ไปทั้งหมด

การคำนวณค่าความเป็นด่างของน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

ค่าความเป็นด่าง

$$= \frac{\text{ปริมาตรของกรดซัลฟูริกที่ใช้} \times \text{นอร์มอลิตี้ของกรดซัลฟูริก} \times 50 \times 1{,}000}{\text{ปริมาตรของน้ำตัวอย่าง}}$$

8.2 การวิเคราะห์ค่าความกระด้างของน้ำ (ตามวิธีการของ Boyd และ Tucker, 1992)

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์ (buffer solution): เตรียมโดยละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 67.5 กรัม ในแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ปริมาตร 570 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

2. อีรีโอโครมแบล็กที (Eriochrome black T) อินดิเคเตอร์ : เตรียมโดยละลายไฮดรอกซีลามีน ไฮโดรคลอไรด์ (hydroxylamine hydrochloride, $H_2NOH.HCl$) 4.5 กรัม และอีรีโอโครมแบล็กที 0.50 กรัม ในเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายมาตรฐานแคลเซียม 0.01 โมลาร์: เตรียมละลายแอนไฮดราสคาร์บอเนต (anhydrous $CaCO_3$) ปริมาณ 1 กรัม ในกรดเกลือเจือจาง (1:1) แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรประมาณ 200 มิลลิลิตร จากนั้นต้มให้เดือดนาน 5-10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับค่าความเป็นกรดด่างของสารละลาย ให้ได้เท่ากับ 7 โดยใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3 นอร์มอล จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

4. สารละลายมาตรฐานโซเดียมอีดีทีเอ (sodium EDTA) 0.01 โมลาร์: เตรียมโดยชั่งอีดีทีเอ 4 กรัม และแมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride, $MgCl_26H_2O$) 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลาย

ดูดสารละลายสารละลายมาตรฐานแคลเซียม 0.010 โมล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมอินดิเคเตอร์ อีรีโอโครมแบล็กที 8 หยด เขย่าให้เข้ากัน นำมาไตเตรทด้วยสารละลายมาตร

ฐานอีดีทีเอ จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอที่ใช้ไป เพื่อนำมาคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ (โมล) โดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

เมื่อ N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

วิธีการ

1. นำตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ลิตร
2. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
3. เติมอินดิเคเตอร์ อีรีโอโครมแบล็กที 8 หยด เขย่าให้เข้ากัน
4. นำมาไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน จดปริมาตรของสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ ทั้งหมดที่ใช้ไป

การคำนวณค่าความกระด้างของน้ำ (มิลลิกรัม $CaCO_3$ ต่อลิตร)

$$\text{ค่าความกระด้าง} = \frac{\text{ปริมาตรของอีดีทีเอ} \times \text{โมลาริตี้ของอีดีทีเอ} \times 100.1 \times 1{,}000}{\text{ปริมาตรของน้ำตัวอย่าง}}$$

9. การศึกษาปริมาณอะฟลาทอกซินบี$_1$ที่ตกค้าง (ตามวิธีการของ AOAC, 1988)

วิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินที่สะสม โดยวิธี Contamination Branch method (CB) และหาปริมาณโดยใช้ Thin Layer Chromatography (TLC) โดยชั่งตัวอย่างมูลปลา และเนื้อปลาที่ผ่านการแช่แข็งแห้ง และบดละเอียดมา 50 กรัม ผสมกับซีไลท์ (celite) 25 กรัม น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร และ คลอโรฟอร์ม 200 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 190 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกรองส่วนผสมทั้งหมด และตวงมา 40 มิลลิลิตร เพื่อทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่บรรจุซิลิกาเจลไว้ภายใน จากนั้นล้างไขมัน สี และโปรตีนออกจากตัวอย่างด้วยอีเทอร์ 30 มิลลิลิตร และเฮกเซน 30 มิลลิลิตร ชะอะฟลาทอกซินออกจากคอลัมน์ด้วยคลอโรฟอร์ม 4 ส่วน ต่ออะซีโตน 1 ส่วน ปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วนำไป

ระเหยแห้ง และละลายด้วยคลอโรฟอร์ม 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหยดลงบนทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin layer chromatography: TLC) 5 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับอะฟลาทอกซินมาตรฐาน ตัวอย่างที่มีอะฟลาทอกซินปนเปื้อนจะมีจุดเรืองแสงสีฟ้า และสีเขียวขึ้นบริเวณเดียวกับอะฟลาทอกซินมาตรฐาน AFB_1, AFG_1 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร AFB_2, AFG_2 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน B_2 : CH_3CN (98:2) โดยใช้ Diethylether : MeOH : H_2O (96:3:1) และ $CHCl_3$: acetone (9:1) เป็นน้ำยาดีวีลอปปิ้ง จากนั้นหาปริมาณโดยใช้ densitometer ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร แล้วนำพื้นที่ใต้กราฟมาคำนวณหาปริมาณอะฟลาทอกซินที่มีในตัวอย่าง