ภาคผนวก
วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารและองค์ประกอบทางเคมีของปลา (AOAC, 1985)

1.1 การวิเคราะห์ความชื้น

1.1.1 นำขวดชั่งเข้าตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น

1.1.2 ชั่งและบันทึกน้ำหนักของขวดชั่งโดยละเอียด

1.1.3 ชั่งตัวอย่างใส่ขวดชั่งประมาณ 5 กรัม โดยบันทึกน้ำหนักอย่างละเอียด

1.1.4 นำตัวอย่างเข้าตู้อบ อบโดยใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

1.1.5 นำตัวอย่างที่อบแล้วใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็นบันทึกน้ำหนัก

1.1.6 ทำซ้ำข้อ 1.1.4 – 1.1.5 จนกระทั่งน้ำหนักที่ได้คงที่โดยน้ำหนักที่หายไป คือ น้ำหนักของความชื้น

การคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้น

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

โดยที่ a คือ น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบแห้ง

b คือ น้ำหนักของตัวอย่างหลังอบแห้ง

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

1.2.1 ชั่งตัวอย่างน้ำหนักประมาณ 2 กรัม ใส่ถ้วยกระเบื้องเคลือบ บันทึกน้ำหนักโดยละเอียด

1.2.2 นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนเถ้าเป็นสีขาว

1.2.3 นำเข้าโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น นำออกมาชั่งน้ำหนักโดยละเอียด

การคำนวณเปอร์เซ็นต์เถ้า

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

โดยที่ a คือ น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ

b คือ น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำหนักของเถ้าหลังการเผา

w คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา

1.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

1.3.1 สารเคมี

สารละลายคลอโรฟอร์ม (chloroform) : เมทธานอล (methanol) อัตราส่วน 2 : 1

1.3.2 วิธีการ

(1) อบถ้วยสกัดไขมัน (cup) ที่มีลูกแก้ว 2 – 3 เม็ด และตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส อบจนแห้งแล้วตั้งทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

(2) ชั่งน้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วให้ได้น้ำหนักคงที่ (W_1)

(3) ชั่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ใส่กระดาษกรอง ประมาณ 1 – 2 กรัม (W_2) ห่อให้มิดชิดใส่ลงในไส้กรองสาร (thimble) ที่เตรียมไว้นำไปใส่เข้าเครื่องสกัดไขมัน

(4) นำถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วที่ชั่งไว้แล้วเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม : เมทธานอล 25 มิลลิลิตร แล้วใส่เข้าเครื่องสกัดไขมันให้เรียบร้อย

(5) เปิดเครื่องสกัดไขมัน ปรับอุณหภูมิไปที่ 160 องศาเซลเซียส เปิดน้ำเข้าเครื่อง เปิดวาล์ว เลื่อนปุ่มไปที่ boiling ต้มให้เดือด 30 นาที

(6) เลื่อนปุ่มไปที่ rinsing เพื่อล้างตัวอย่าง 20 นาที

(7) ปิดวาล์ว เปิดสวิทซ์อากาศ เลื่อนปุ่มไปที่ evaporation เพื่อให้สารระเหยออกไป 5 นาที

(8) ปิดเครื่อง ปิดอากาศและน้ำ แล้วเลื่อนปุ่ม evaporation กลับที่เดิม นำถ้วยสกัดไขมันออกจากเครื่องวางทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนแห้ง

(9) นำถ้วยสกัดไขมันออกมาใส่ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก (W_3)

การคำนวณเปอร์เซ็นต์ไขมัน

$$\text{ไขมัน (\%)} = \frac{(W_3 - W_1)}{W_2} \times 100$$

โดยที W_1 คือ น้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้ว

W_2 คือ น้ำหนักตัวอย่าง

W_3 คือ น้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วและตัวอย่างหลังการอบ

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

1.4.1 สารเคมี

(1) กรดซัลฟูริกเข้มข้น (sulfuric acid, H_2SO_4) 93 - 98 เปอร์เซ็นต์

(2) สารเร่งรวม (catalyst mixture) เตรียมโดยชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต (coppersulfate, $CuSO_4$) 7 กรัม กับโปแทสเซียมซัลเฟต (potassium sulfate, K_2SO_4) 100 กรัม ผสมให้เข้ากัน

(3) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH) 45 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 450 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

(4) สารละลายกรดเกลือ (hydrochloric acid, HCl) 0.1 นอร์มอล เตรียมโดยละลายกรดเกลือ 9 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร

(5) สารละลายกรดบอริค (boric acid, H_3BO_3) 4 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลายกรดบอริค 4 กรัมในน้ำกลั่น ต้มจนกระทั่งละลายหมดปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

(6) อินดิเคเตอร์รวม (mixed indicator) เตรียมโดยละลายเมทิลเรด 0.2 กรัม ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร และละลายเมทิลินบลู (methylene blue) 0.2 กรัมในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเมทิลเรด 2 ส่วน ผสมกับสารละลายเมทิลลินบลู 1 ส่วน เขย่าให้เข้ากัน

(7) สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Na_2CO_3) 0.1 นอร์มอล เตรียมโดยอบโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ 260 - 270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ชั่งสารดังกล่าวมา 1.325 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 250 มิลลิลิตร

(8) เมทิลออเรนซ์ อินดิเคเตอร์ (methyl orange indicator) เตรียมโดยละลายเมทิลออเรนซ์ 0.1 กรัมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

1.4.2 การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือมาตรฐาน

ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 40 มิลลิลิตร ลงในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติมเมทิลออเรนซ์ อินดิเคเตอร์ 2 - 3 หยด ทำการไตเตรทด้วยสารละลายกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล คำนวณความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือโดยใช้สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

$$\text{หรือนอร์มอลลิตี้ของกรดเกลือ} = \frac{\text{น้ำหนัก (กรัม) ของโซเดียมคาร์บอเนต} \times 1000}{\text{สารละลายกรดเกลือ (มิลลิลิตร)} \times 52.994}$$

1.4.3 วิธีการวิเคราะห์

ก. ขั้นตอนการย่อย (digestion)

(1) ชั่งตัวอย่างด้วยกระดาษชั่งสารที่ปราศจากไนโตรเจน ให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.5 กรัม บันทึกน้ำหนักโดยละเอียด ใส่ตัวอย่างลงในขวดวิเคราะห์โปรตีน

(2) เติมสารเร่งรวม 3 กรัม

(3) เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 10 มิลลิลิตร

(4) นำไปให้ความร้อนด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีนที่อุณหภูมิ 375 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารละลายในขวดวิเคราะห์ใส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

ข. ขั้นตอนการกลั่น (distillation)

(1) เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดวิเคราะห์

(2) ต่อขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเข้ากับชุดเครื่องกลั่นที่มีขวดรูปชมพู่บรรจุกรดบอริก 40 มิลลิลิตร โดยให้ปลายของท่อยางที่ต่อจากกระบอกแก้วควบแน่นจุ่มอยู่ในกรดบอริก เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในขวดวิเคราะห์อย่างช้าๆ จนกระทั่งสารละลายมีสีดำ

(3) ใส่อินดิเคเตอร์ลงในกรดบอริค 2 - 3 หยด

(4) ทำการกลั่นจนกระทั่งไม่มีก๊าซแอมโมเนียออกมา เมื่อกรดบอริคเปลี่ยนเป็นสีเขียวแล้วจึงทำการกลั่นต่อไปอีก 10 นาที จากนั้นนำขวดรูปชมพู่ออกจากเครื่องกลั่น

ค. ขั้นตอนการไตเตรท (titration)

(1) นำไปไตเตรทด้วยสารละลายกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน จนกระทั่งกรดบอริคเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อน

(2) บันทึกปริมาตรของกรดเกลือมาตรฐานที่ใช้เพื่อการคำนวณต่อไป

การคำนวณเปอร์เซ็นต์โปรตีน

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

โดยที่ V_1 คือ ปริมาตรของกรดเกลือที่ใช้ในการไตเตรทกับตัวอย่าง

V_2 คือ ปริมาตรของกรดเกลือที่ใช้ในการไตเตรทกับ blank

N คือ ความเข้มข้นของกรดเกลือ (นอร์มอล)

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง

2. วิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (ดัดแปลงจาก Humason, 1972; Bancroft, 1967)

2.1 สารเคมี

2.1.1 สารละลายบูแอง (Bouin's solution) เตรียมโดยใช้

ฟอร์มาลีน (formalin)	25	มิลลิลิตร
กรดพิคริค (saturated aqueous picric acid)	75	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	5	มิลลิลิตร

ผสมเข้าด้วยกัน

2.1.2 สีย้อมฮีมาทอกซิลิน (hematoxylin) เตรียมโดยใช้

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

ละลายอลัมลงในน้ำกลั่น เติมฮีมาทอกซิลินผสมจนกระทั่งละลายหมด จึงเติมโซเดียมไอโอเดทผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซิตริกและคลอรัลไฮเดรทผสมจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกันทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้งาน

2.1.3 สีย้อมอีโอซิน (eosin) เตรียมโดยใช้

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

ผสมเข้าด้วยกัน

2.2 การเตรียมตัวอย่าง

2.2.1 สลบปลาด้วยสารละลายควินาดีน (quinaldine) 50 ส่วนในล้านส่วน

2.2.2 ใช้กรรไกรผ่าตัดเปิดช่องท้องของปลาออก ตัดตับออกแล้วดองในน้ำยาบูแองทันที เก็บรักษาตัวอย่างในน้ำยาดองดังกล่าวเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเก็บรักษาไว้ได้เป็นเวลานาน

2.3 ขั้นตอนการ dehydration และ embedding

2.3.1 ตบแต่งตัวอย่าง (trim) ที่ผ่านการดองแล้วให้มีขนาดพอเหมาะเพื่อสะดวกต่อการ embed และนำไปตัด section

2.3.2 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

2.3.3 นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนในข้อ 4.3.2 ไป embed ด้วยพาราพลาสท์ จากนั้นนำ block ไปแช่ตู้เย็นเพื่อง่ายต่อการนำไปตัด section ต่อไป

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

2.3.5 ใช้แผ่นสไลด์ช้อนตัวอย่าง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน

2.3.6 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

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
17	แอบโซลูท แอลกอฮอล์	2
18	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
19	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
20	ไซลีน	2
21	ไซลีน	2
22	ไซลีน	2

2.3.7 mount slide ด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์ (permount) แล้วนำตัวอย่างไปศึกษาพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

3.1 การหาค่าฮีมาโตคริต (% haematocrit) (ตามวิธีของ Larsen and Sneizsko, 1961)

1.นำเลือดที่เจาะได้ใหม่ ๆ ใส่ในหลอดขนาดเล็ก ๆ สำหรับหาค่าฮีมาโตคริต (microhaematocrit capillary tube) ประมาณครึ่งหลอด อุดปลายด้านหนึ่งของหลอดด้วยดินน้ำมัน

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

3. วัดหาอัตราส่วนของปริมาตรเม็ดเลือดกับปริมาตรเลือดทั้งหมด นำมาคำนวณหาค่า % ฮีมาโตคริตจากสูตร

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

3.2 การหาค่าฮีโมโกลบินรวม (total haemoglobin) (ดัดแปลงจาก Lowry และคณะ ,1951)

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

วิธีการวิเคราะห์

1. ใช้ไมโครปิเปตขนาด 20 ไมโครลิตรดูดเลือดที่เจาะได้ใหม่ๆ มาผสมรวมกับ สารละลายเดรบกิ้น (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

3.3 การหาค่าโปรตีนรวมในซีรัมหรือพลาสมา (total serum or plasma protein) (ดัดแปลงจาก Blaxhall และ Daisley ,1973)

สารเคมี

1. สารละลายอัลคาไลด์คอปเปอร์ (Alkaline copper solution) : เตรียมโดยใช้ 1 % โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ใน 0.5 M NaOH 50 ส่วน ผสมกับ 1 % โซเดียมทารเตรต

($C_4H_4Na_2O_6$) 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

วิธีการวิเคราะห์

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 และ0 มิลลิลิตร ตามลำดับ จะได้ความเข้มข้นของแอลบูมินในแต่ละหลอดเท่ากับ 50, 150, 250, 350, 450 และ 500 ไมโครกรัม ตามลำดับ

3. นำแต่ละหลอดมาทำตามขั้นตอนการหาซีรัมโปรตีนในเลือดดังที่ได้กล่าวข้างต้น

4. นำค่าความเข้มข้นของแอลบูมิน และค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน โดยให้ค่าความเข้มข้นอยู่ในแกน X และค่าการดูดกลืนแสงอยู่แกน Y แล้วหาสมการสหสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linear regression) เพื่อใช้คำนวณค่าความเข้มข้นของโปรตีนรวมในเลือด จากค่าการดูดกลืนแสง