ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

1. การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบ อาหารทดลอง และซากปลาทดลอง (ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC, 1990)

1.1 การวิเคราะห์ความชื้น

1. นำขวดชั่งเข้าตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น

2. ชั่งและบันทึกน้ำหนักของขวดชั่งโดยละเอียด

3. ชั่งตัวอย่างใส่ขวดชั่งประมาณ 3 กรัม และบันทึกน้ำหนัก

4. นำตัวอย่างเข้าตู้อบ โดยใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

5. นำตัวอย่างที่อบแล้วใส่โถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น แล้วบันทึกน้ำหนักของตัวอย่าง

6. ทำซ้ำตามข้อ 4 ถึง 5 จนกระทั่งน้ำหนักที่ได้คงที่ โดยน้ำหนักที่หายไป คือน้ำหนักของความชื้น

คำนวณหาความชื้นด้วยสมการ

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

เมื่อ a = น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบแห้ง

b = น้ำหนักของตัวอย่างหลังอบแห้ง

w = น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบ

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบ

2. นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนเถ้าเป็นสีขาว

3. นำถ้วยกระเบื้องเคลือบเข้าโถดูดความชื้น และเมื่อตัวอย่างเย็นดีแล้ว นำออกชั่งทันที ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

คำนวณหาเถ้าด้วยสมการ

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

เมื่อ a = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ

b = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำหนักของตัวอย่างหลังการเผา

w = น้ำหนักของตัวอย่างก่อนเผา

1.3 การวิเคราะห์หาโปรตีน

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก (sulfuric acid, H_2SO_4) เข้มข้น 93 – 98 เปอร์เซ็นต์

2. สารเร่งรวม (catalyst mixture): เตรียมโดย ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate, $CuSO_4$) 7 กรัม และโพแตสเซียมซัลเฟต (potassium sulfate, K_2SO_4) 100 กรัม ผสมให้เข้ากัน

3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 45 เปอร์เซ็นต์ (sodium hydroxide, NaOH): เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ ชนิดเกล็ด 450 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

4. สารละลายกรดเกลือ (hydrochloric acid, HCl) 0.1 นอร์มอล: เตรียมโดยละลายกรดเกลือ 9 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

5. กรดบอริค (boric acid, H_3BO_3) 4 เปอร์เซ็นต์: เตรียมโดย ต้มน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ให้ร้อนแล้วใส่กรดบอริคลงไป 4 กรัม คนจนละลายหมด เมื่อสารละลายเย็นลงแล้วจึงเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

6. อินดิเคเตอร์รวม (mixed indicator): เตรียมโดยละลายเมทธิลเรด (methyl red) 0.2 กรัม ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร และละลายเมทธิลีนบลู (methylene blue) 0.2 กรัม ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเมทธิลเรด 2 ส่วน ผสมกับสารละลายเมทธิลีนบลู 1 ส่วน เขย่าให้เข้ากัน

7. เมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์ (methyl orange indicator): เตรียมโดยละลายเมทิล-ออเรนจ์ 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

8. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Na_2CO_3) 0.1 นอร์มอล: เตรียมโดย อบโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ 260 - 270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ชั่งสารที่อบแล้ว 1.325 กรัม เติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร

การหาความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือมาตรฐาน

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

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

เมื่อ N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

วิธีการ

ก. ขั้นตอนการย่อย (digestion)

1. ชั่งตัวอย่างอาหารให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.5 กรัม โดยชั่งด้วยกระดาษกรองที่ปราศจากสารไนโตรเจนแล้วใส่ในหลอดแก้ววิเคราะห์โปรตีน

2. เติมสารเร่งรวม 3 กรัม เพื่อเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อย

3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร

4. นำไปย่อยด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีน ที่อุณหภูมิ 375 องศาเซลเซียส กระทั่งสารละลายในหลอดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเป็นสีเขียวใส ทิ้งไว้ให้เย็น

ข. ขั้นตอนการกลั่น (distillation)

1. เมื่อสารละลายเย็นลง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร

2. ใส่ลูกแก้ว 2 ลูก เพื่อป้องกันการกระแทกของสารละลายต่อหลอดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเข้ากับเครื่องกลั่นที่มีขวดปากแคบวัดปริมาตร ซึ่งมีกรดบอริค 40 มิลลิลิตรอยู่ โดย

ให้ปลายของหลอดแก้วที่ต่อจากกระบอกแก้วควบแน่นจุ่มอยู่ในกรดบอริค เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในหลอดแก้ววิเคราะห์ช้าๆ จนกระทั่งสารละลายมีสีดำ

3. หยดอินดิเคเตอร์รวมในกรดบอริค 2 – 3 หยด

4. ทำการกลั่นจนกระทั่งไม่มีแก๊สแอมโมเนียออกมา ทำการกลั่นต่อไปอีก 10 นาที แล้วล้างปลายเครื่องกลั่นด้วยน้ำกลั่น นำขวดปากแคบวัดปริมาตรออกจากเครื่องกลั่น

ค. ขั้นตอนการไตเตรท (titration)

1. ไตเตรทด้วยกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น (0.1 นอร์มอล) จนถึงจุดยุติ (end point) สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อน

2. บันทึกปริมาตรของกรดเกลือ เพื่อใช้คำนวณต่อไป

การคำนวณหาโปรตีนด้วยสมการ

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

เมื่อ V_1 = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

V_2 = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบ

N = เป็นความเข้มข้นของกรดเกลือเป็นนอร์มอล

W = น้ำหนักตัวอย่าง

1.4 การวิเคราะห์ไขมัน (ใช้เครื่อง Soxtec System HT6)

สารเคมี

ไตรคลอโรเอททีลีน

วิธีการ

1. อบถ้วยพร้อมลูกแก้ว ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 8 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น

2. อบตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

3. ชั่งน้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้ว (w_1)

4. ชั่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ใส่กระดาษกรองเบอร์ 1 ประมาณ 1 – 2 กรัม (w_2) ห่อให้มิดชิด ใส่ลงในไส้กรอง (thimble) ที่เตรียมไว้ นำไปใส่เข้าเครื่อง

5. นำถ้วยพร้อมลูกแก้วที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้วมาเติม ไตรคลอโรเอททีลีน ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วใส่เข้าเครื่อง

6. เปิดเครื่อง ปรับอุณหภูมิไปที่ 180 องศาเซลเซียส เปิดเครื่องทำความเย็น เปิดวาล์ว เลื่อนปุ่มไปที่ boiling ต้มให้เดือด 30 นาที

7. จากนั้นเลื่อนปุ่มไปที่ rinsing เพื่อล้างตัวอย่าง 20 นาที

8. ปิดวาล์ว เปิดสวิทซ์อากาศ เลื่อนปุ่มไปที่ evaporation เพื่อให้สารระเหย 5 นาที

9. ปิดสวิทซ์อากาศ และเครื่องทำความเย็น เลื่อนปุ่ม evaporation กลับตำแหน่งเดิม นำถ้วยออกจากเครื่อง อบที่ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

10. นำถ้วยออกมาใส่โถอบแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก (w_3)

คำนวณหาไขมันด้วยสมการ

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

เมื่อ w_1 = น้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้ว

w_2 = น้ำหนักตัวอย่าง

w_3 = น้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้วและไขมันหลังอบ

1.5 การวิเคราะห์เยื่อใย (ใช้เครื่อง Fibertec system)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก 0.128 M: เตรียมโดยเจือจางกรดซัลฟูริกเข้มข้น 7 มิลลิลิตร ในน้ำปราศจาก อิออน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.223 M: เตรียมโดยชั่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 12.5125 กรัม ละลายในน้ำปราศจากอิออน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3. ออกทานอล (1-Octanol reinst)

4. อะซิโตน (actone)

วิธีการ

1. นำถ้วยกระเบื้องเคลือบ ไปอบที่อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ถ้าถ้วยกระเบื้องเคลือบสกปรกมากให้นำไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 ชั่วโมง)

2. ชั่งน้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบ (W_1) ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 1-2 กรัม (W_2) ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบ นำไปใส่เข้าเครื่อง Fibertec system

3. เติมกรดซัลฟูริก ปริมาตร 150 มิลลิลิตร หยดออกทานอล 2-3 หยด เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดฟองขณะเดือด

4. เปิดเครื่อง และน้ำเข้าเครื่อง เปิดความร้อนจนสุดสเกล และเลื่อนวาล์วทุกตัวให้อยู่ในตำแหน่งปิด ต้มให้สารละลายเดือดเต็มที่ แล้วลดความร้อนลงเหลือประมาณ 4.5 ต้มนานประมาณ 30 นาที จากนั้นปิดเครื่องแล้วกรองสารละลายออกโดยเลื่อนปุ่มไปที่ Vaccunm

5. ล้างตัวอย่างด้วยน้ำอุ่น 3 ครั้ง โดยเติมน้ำอุ่นลงไปแล้วเลื่อนปุ่มไปที่ Vaccunm เพื่อกรองน้ำออก

6. เติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ประมาณ 150 มิลลิลิตร ทำเช่นเดียวกับข้อ 6.2.4-6.2.5

7. ย้ายถ้วยกระเบื้องเคลือบไปที่ cold extraction unit ล้างตัวอย่างด้วยอะซิโตนให้ท่วมตัวอย่างทิ้งไว้สักครู่ แล้วจึงกรองอะซิโตนออก

8. นำถ้วยกระเบื้องเคลือบ ไปอบที่อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส นานครึ่งชั่วโมง

9. นำถ้วยกระเบื้องเคลือบ ไปวางไว้ให้เย็นในโถอบแห้ง จึงชั่งน้ำหนัก (W_3) แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่งโมง

10. นำถ้วยกระเบื้องเคลือบ ไปวางไว้ให้เย็นในโถอบแห้ง จึงชั่งน้ำหนัก (W_4)

การคำนวณหาเยื่อใยด้วยสมการ

$$\text{เยื่อใย (\%)} = \frac{(W_3 - W_4) \times 100}{W_2}$$

เมื่อ W_2 = น้ำหนักของตัวอย่าง

W_3 = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบ พร้อมตัวอย่างหลังการอบ

W_4 = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบ พร้อมตัวอย่างหลังการเผา

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดและคาโรทีนอยด์

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

1.1 การหาค่าฮีมาโตคริต (% haematocrit) (ตามวิธีของ Blaxhall และ Daisley, 1973)

1. นำเลือดที่เจาะได้ใหม่ๆ ใส่ในหลอดเล็กๆ สำหรับหาค่าฮีมาโตคริต (microhaematocrit capillary tube) ประมาณครึ่งหลอด อุดปลายด้านหนึ่งของหลอดด้วยดินน้ำมัน

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

3. วัดหาอัตราส่วนของปริมาตรเม็ดเลือดกับปริมาตรเลือดทั้งหมด นำมาคำนวณหาค่า เปอร์เซนต์ฮีมาโตคริต จากสูตร

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

1.2 การหาค่าฮีโมโกลบินรวม (total haemoglobin) (ตามวิธีของ Larsen and Sneizsko, 1961)

สารเคมี

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

วิธีการ

1. ใช้ไมโครปิเปตขนาด 20 ไมโครลิตรดูดเลือดที่เจาะได้ใหม่ๆ มาผสมรวมกับสารละลายเดรบกิ้น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีแล้วทิ้งไว้อย่างน้อย 20 นาที

2. นำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

3. ค่าที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับค่าฮีโมโกลบินมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น โดยใช้สารละลายเดรบกิ้นเป็นแบลงค์ (blank)

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

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

1.3 การหาค่าโปรตีนรวมในซีรัมหรือพลาสมา (total serum or plasma protein)

(ตามวิธีของ Lowry และคณะ, 1951)

สารเคมี

1. สารละลายอัลคาไลด์คอปเปอร์ (alkaline copper solution): เตรียมโดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ใน 0.5 M NaOH 50 ส่วน ผสมกับ 1 % โซเดียมทารเตรต (sodium tartate,0 $C_4H_4Na_2O_6$) 1 ส่วน และ 0.5 % คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) อีก 1 ส่วน เก็บสารละลายผสมไว้ในขวดทึบแสง ถ้ามีตะกอนเกิดขึ้นให้เตรียมใหม่

2. สารละลายโฟลิน (folin reagent) 1:10 เตรียมโดยผสม folin ciocalteu reagent 1 ส่วนกับน้ำกลั่นที่กลั่น 2 ครั้ง 10 ส่วน เก็บไว้ในขวดทึบแสง

วิธีการ

1. ดูดซีรัมมา 5 ไมโครลิตร ผสมรวมกับน้ำกลั่น 995 ไมโครลิตร

2. เติมสารละลายอัลคาไลด์คอปเปอร์ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เท่ากันแล้วทิ้งไว้ 10 นาที

3. เติมสารละลายโฟลิน 1:10 ลงไป 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน สังเกตสีของสารละลายที่เปลี่ยนแปลง

4. เมื่อครบ 5 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างเลือดปลาที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับค่าแอลบูมินมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นโดยใช้แบลงค์ (blank) ที่เตรียมขึ้นตามขั้นตอนนี้แต่ไม่เติมซีรัม

การเตรียมกราฟมาตรฐาน(standard curve) ของซีรัมโปรตีน

1. ดูดสารละลายมาตรฐานแอลบูมิล (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. นำแต่ละหลอดมาทำตามขั้นตอนของการหาซีรัมโปรตีนในเลือดดังที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น

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

1.4 การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว (blood cell count) (ตามวิธีของ Blaxhall และ Daisley, 1973)

การนับเม็ดเลือดในตัวปลาได้ดัดแปลงวิธีการนับเม็ดเลือดในคนและสัตว์บกอื่นๆ มาใช้ซึ่งจะใช้ RBC-diluting pipette ในการเจือจาง ไม่ว่าจะนับเม็ดเลือดแดงหรือเม็ดเลือดขาวก็ตาม มีขั้นตอนดังต่อไปนี้ คือ

1. ใช้ RBC diluting pipette ดูดเลือด (ที่เจาะใหม่ๆ) ให้ถึงขีด 0.5 ถ้าเกินขีด 0.5 ให้ปรับโดยใช้กระดาษทิชชูค่อยๆ ซับออกอย่างระมัดระวัง แล้วเช็ดปลายปิเปตให้สะอาด

2. ใช้ปิเปตอันเดิมดูด diluting fluid (Yokoyama’s fluid) จนกระทั่งถึงขีด 101 ตรงปลายปิเปต

3. ใช้นิ้วชี้ปิดปลายปิเปตแล้วถอดสายยาง จากนั้นใช้หัวแม่มือกับนิ้วชี้ปิดปลายปิเปตทั้งสองข้างเขย่าไปมาในแนวนอน 2-3 นาที

4. หยดของเหลวในปิเปตทิ้งไป 3-4 หยด เพราะของเหลวส่วนนี้อยู่ในก้านไม่ได้ถูกนำไปผสมกับเลือดในกระเปาะของปิเปต

5. หยดของเหลวต่อไปลงในร่องของ haemacytometer ที่มี cover glass ปิดอยู่เรียบร้อยแล้วถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้นหรือของเหลวหยดโตเกินไปจนล้นขอบของ haemacytometer ให้ทำความสะอาดแล้วทำใหม่

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

7. จำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้ในวงกลมเล็กรวมกัน 5 ช่อง $\times 10^4$ และจำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ในวงกลมใหญ่ $\times$ 2,000 คือค่าของจำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวต่อ 1 mm^3

2. การวิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์ (Sommer *et al*., 1991a)

1. นำตัวอย่างปลาทำให้แห้งด้วยความเย็น (Freeze-dry) เมื่อตัวอย่างแห้งดีแล้ว จึงนำมาบดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน

2. ชั่งตัวอย่าง 0.3 – 1 กรัม

3. นำตัวอย่างใส่โกร่ง เติมน้ำให้ชื้น 10-20 หยด บดให้เข้ากัน

4. เติมอะซิโตนลงไปในโกร่งแล้วบดและทิ้งไว้ให้ตัวอย่างนอนก้นจากนั้นใช้หลอดดูดดูดสารละลายส่วนใสขึ้นมาใส่ในกรวยแยก

5. ทำตามข้อ 4 ซ้ำหลายๆ ครั้งด้วยอะซิโตน (ครั้งละ 10-15 มล.) จนกว่าจะไม่มีสีออกมาจากตัวอย่าง

6. เติม diethyl ether ลงในกรวยแยก (ปริมาตรเท่ากับอะซิโตนที่มีอยู่ในกรวยแยก) แกว่งกรวยแยกเบาๆ

7. เติมน้ำเกลือ (3 % NaCl) ลงไปเพื่อให้เกิดการแยกชั้น ทิ้งให้แยกชั้น แล้วไขส่วนน้ำด้านล่างทิ้งไป ล้างซ้ำอีก 2-3 ครั้ง

8. วัดปริมาตรของส่วน ether ทั้งหมดที่มีในกรวยแยก บันทึกปริมาตร

9. แบ่งส่วน ether 10-15 มล. ออกมากรองด้วยสำลี เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

10. นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง สแกนนิ่ง สเปคโตโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600-400 nm อ่านค่า OD สูงสุด บันทึกผล

11. คำนวณหาค่าคาโรทีนอยด์รวม ตามสูตร

ตัวอย่างวิธีการคำนวณ

นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณคาโรทีนอยด์

$A^{\%}_{1cm}$ = 2500

คาโรทีนอยด์ 1 กรัม ในอีเธอร์ 100 มล. จะมีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 2500

เมื่อค่าดูดกลืนแสงมีค่าเท่ากับ 0.2500 แสดงว่า มีคาโรทีนอยด์ในอีเธอร์ เท่ากับ 1 μg/มล.

เมื่อวัดค่าดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 0.11 แสดงว่ามีคาโรทีนอยด์เท่ากับ $\frac{1 \times 0.11}{0.2500}$ = 0.44 μg/มล.

ดังนั้นเมื่อใช้อีเธอร์ 25 มล. สกัดตัวอย่าง 0.05 กรัม ปริมาณคาโรทีนอยด์เท่ากับ 25 x 0.44

เพราะฉะนั้น ปริมาณคาโรทีนอยด์มีค่าเท่ากับ 11.00 μg/ 0.05 กรัม

หรือ 0.220 มก./ ก.

หมายเหตุ

$A^{\%}_{1cm}$ = 2500 หมายถึง การวัดค่าดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 2500 โดยใช้ light path 1 เซนติเมตร แสดงว่า สารนั้นมีความเข้มข้นของคาโรทีนอยด์ เท่ากับ 1%

สปอนนิฟิเคชัน

สำหรับการสปอนนิฟิเคชันนั้นจะใช้เพื่อทำลายคลอโรฟิลล์ ไขมันและน้ำมัน ที่จะมีผลไปรบกวนการทำโครมาโตกราฟฟี และทำลายเอสเธอร์ของคาโรทีนอยด์

ขั้นตอนการสปอนนิฟิเคชัน

1.นำสารลายคาโรทีนอยด์ที่สกัดได้และผ่านกรวยแยกเรียบร้อยแล้วไปผ่านกระบวนการระเหยแห้ง

2. เตรียมสารละลายโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้ KOH 6 กรัม ละลายในน้ำ 4 มิลลิลิตร

3. นำสารละลาย KOH 1 มิลลิลิตร ละลายในเอททานอล 10 มิลลิลิตร ซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นของ KOH สุดท้ายอยู่ที่ 5-6 เปอร์เซ็นต์

4. นำตัวอย่างที่ผ่านการระเหยแห้งแล้วโดยใส่ตัวอย่างในขวดรูปชมพู่ละลายด้วยเอททานอลที่ผสม KOH แล้วประมาณ 25 มิลลิลิตร ไล่อากาศในขวดด้วยไนโตรเจนและปิดฝา และเก็บไว้ในที่มืด 1 คืน

5. นำตัวอย่างจากข้อ 4 มาผ่านกระบวนการแยกเช่นเดียวกับการแยกคาโรทีนอยด์ นำส่วนที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง