ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.
วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ความชื้น (ตามวิธีการของ AOAC, 1990)

1. นำขวดชั่งเข้าตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น

2. ชั่งและบันทึกน้ำหนักของขวดชั่งโดยละเอียด

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

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

เมื่อ a = น้ำหนักของอาหารก่อนอบแห้ง

b = น้ำหนักของอาหารหลังอบแห้ง

w = น้ำหนักของอาหารก่อนอบ

2. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (ตามวิธีการของ AOAC, 1990)

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบ

2. นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนเถ้าเป็นสีขาว

3. นำเข้าโถอบแห้ง เพื่อให้ดูดความชื้น และเมื่อตัวอย่างอาหารเย็นดีแล้ว นำออกชั่งทันที

คำนวณ % เถ้าด้วยสมการ

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

เมื่อ a = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ

b = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำนักของเถ้าภายหลังการเผา

w = น้ำหนักของอาหารก่อนเผา

3. การวิเคราะห์หาโปรตีน (ตามวิธีการของ AOAC, 1990)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก (sulfuric acid, H_2SO_4) เข้มข้น 93 - 98 %

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

3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 45% (sodium hydroxide, NaOH): เตรียมโดย ละลาย 450 กรัม ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ชนิดเกล็ดลงในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

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

5. กรดบอริค (boric acid, H_3BO_3) 4%: เตรียมโดย ต้มน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ให้ร้อนแล้วใส่ผงกรดบอริคลงไป 4 กรัม ต้มจนละลายหมด ทิ้งไว้จนสารละลายเย็นลงแล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

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

7. เมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์ (methyl orange indicator): เตรียมโดยละลายเมทิลออเรนจ์ 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 ชั่งสารมา 1.325 กรัม เติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร

วิธีการ

ก. ขั้นตอนการย่อย (digestion)

1. ชั่งตัวอย่างอาหารให้ได้น้ำหนักประมาณ 1 กรัม โดยชั่งด้วยกระดาษกรองที่ปราศจากสารไนโตรเจนแล้วใส่ในขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีน

2. เติมสารเร่งรวม 10 กรัม เพื่อเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อย

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. ทำการกลั่นจนกระทั่งไม่มีแก๊สแอมโมเนียออกมาแล้วทำการกลั่นต่อไปอีก 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 เติมเมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์ 2 - 3 หยด ทำการไตเตรตด้วยสารละลายกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล คำนวณความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือโดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า N_2= ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า V_2= ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

4. การวิเคราะห์หาไขมัน (ใช้เครื่อง Soxtec System HT6)

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) ห่อให้มิดชิด ใส่ลงในไส้กรอง (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 นำถ้วยออกจากเครื่องแล้วนำไปอบที่ 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. การวิเคราะห์หาฟอสฟอรัส (ตามวิธีการของ AOAC, 1990)

สารเคมี

1. กรดสำหรับย่อยตัวอย่าง: เตรียมโดยการชั่งแอมโมเนียมเมตาวานาเดท (ammonium metavanadate, NH_4VO_3) 0.06 กรัมละลายในน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water)ซึ่งเดือดประมาณ 10 มิลลิลิตร วางไว้ให้เย็นแล้วจึงเทลงในส่วนผสมของกรดสองชนิดคือ กรดเปอร์คลอริค (perchloric, $HClO_4$) เข้มข้น (70-72%) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร และกรดไนตริก (nitric acid, HNO_3) เข้มข้น(65%) ปริมาตร 1,250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2. สารละลายวานาโดโมลิบเดท (vanadomolybdate): เตรียมโดย

2.1 นำแอมโมเนียมโมลิบเดท (ammonium molybdate): 40 กรัม ละลายในน้ำเดือดที่ปราศจากไอออนซึ่งมีปริมาตร 400 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ให้เย็น

2.2 นำแอมโมเนียมเมตาวานาเดท: 2 กรัม ละลายในน้ำเดือดที่ปราศจากไอออน ซึ่งมีปริมาตร 300 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ให้เย็น เติมกรดไนตริกเข้มข้น 160 มิลลิลิตร

2.3 ผสมสารละลายในข้อ 2.2 ลงในสารละลายในข้อ 2.1 ปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนให้ได้ 1000 มิลลิลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อนำไปใช้จะเจือจางสารละลายข้างต้นด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนในอัตราส่วน (วานาโดโมลิบเดท:น้ำ) 1 : 3

3. สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส (standard phosphorus) 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร : เตรียมโดยละลายโพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4) ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ปริมาณ 4.380 กรัม ในน้ำที่ปราศจากไอออนปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

4. เวิร์คกิ้ง สแตนดาร์ด ฟอสฟอรัส (working standard phosphorus) ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร: เตรียมโดยนำสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากข้อ 3) ปริมาตร 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมกรดเปอร์คลอริคเข้มข้น 20 % ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (กรดเปอร์คลอริคเข้มข้น 20 % เตรียมโดยละลายกรดเปอร์คลอริคเข้มข้น (70–72 %) ปริมาตร 282 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออนให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส ที่มีความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีการ

ก. ขั้นตอนการย่อย (digestion)

1. ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปริมาณ 200- 300 มิลลิกรัม ใส่ในขวดชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร

2. เติมกรดย่อย (จากข้อ 1 ในหัวข้อสารเคมี) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมง

3. นำไปย่อยบนแผ่นให้ความร้อน (hot plate) ค่อยๆปรับความร้อนให้ได้ 80 องศาเซลเซียส ระยะแรกจะเห็นควันสีน้ำตาล ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาของกรดไนตริกกับอินทรีย์คาร์บอน เมื่อควันสีน้ำตาลหมดปรับอุณหภูมิเป็น 190 องศาเซลเซียส จะสังเกตเห็นควันสีขาวของกรดเปอร์คลอริค การย่อยจะสิ้นสุดเมื่อสารละลายในขวดชมพู่ใส และเมื่อวางทิ้งไว้ให้เย็นแล้วหยดน้ำที่ปราศจากไอออนลงในสารละลายในขวดชมพู่จะได้สารละลายสีใส

4. ปรับปริมาตรของสารละลายในขวดชมพู่ด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

5.เก็บสารละลายที่ผ่านการย่อยแล้วไว้ในขวดพลาสติกขนาด 100 มิลลิลิตรเพื่อรอการนำไปวิเคราะห์ฟอสฟอรัส และแคลเซียม

ข. ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส

1. นำสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการย่อยแล้ว และเวิร์คกิ้ง สแตนดาร์ด ฟอสฟอรัส ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดขนาด 10 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลายวานาโดโมลิบเดท (1:3) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 20 นาที

3. นำสารละลายในหลอดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 420 นาโนเมตร โดยปรับค่าความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เท่ากับค่าความดูดกลืนแสงที่ 0 เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานโดยใช้สมการ

$$x = (y - 0.0146)/ 0.0096$$

เมื่อ y = ค่าการดูดกลืนแสง

x = ปริมาณฟอสฟอรัสในตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อลิตร)

นำค่าปริมาณฟอสฟอรัสจากสมการมาคำนวณหาเปอร์เซนต์ฟอสฟอรัสตามสูตร

$$\% \text{ ฟอสฟอรัส} = (X - B) \times V \times 100 / 1000 \times W$$

เมื่อ X = ปริมาณฟอสฟอรัสในตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อลิตร)

B = ปริมาณฟอสฟอรัสในน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน(มิลลิกรัมต่อลิตร)

V = ปริมาตรของตัวอย่างที่ปรับปริมาตรหลังจากการย่อย (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม)

หมายเหตุ

1. การตรวจสอบวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสในตัวอย่า สามารถทำการตรวจสอบได้โดยการนำตัวอย่างที่ทราบปริมาณฟอสฟอรัสที่แน่นอน ทำการย่อยและวิธีเคราะห์หาปริมาตรฟอสฟอรัสพร้อมกับชุดตัวอย่างที่ต้องการทราบค่า หากตัวอย่างที่ทราบ

ปริมาณฟอสฟอรัสที่แน่นอนไม่ได้ค่าตามที่กำหนดไว้ จะต้องทำการย่อยและวิธีเคราะห์ใหม่จนกว่าตัวอย่างที่ทราบปริมาณฟอสฟอรัสที่แน่นอนจะได้ค่าตามที่กำหนด

2. สำหรับสารละลายตัวอย่างที่ค่าความดูดกลืนแสงไม่อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐาน ให้ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่าง จนกว่าจะได้ค่าความดูดกลืนแสงที่อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐาน (เช่น ตัวปลาและกระดูกปลา ทำการเจือจางเป็น 4 เท่า) และต้องคูณจำนวนเท่าของการเจือจางในสูตรการคำนวณข้างต้น

6. การวิเคราะห์หาแคลเซียม (ตามวิธีการของ AOAC, 1990)

สารเคมี

1. สารละลายสตรอนเตียม (strontium reagent) 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร: เตรียมโดยละลาย สตรอนเตียมคลอไรด์ ($SrCl_2.6H_2O$) ปริมาณ 15.2146 กรัม ในเปอร์คลอริค 0.5 เปอร์เซ็นต์และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. สารละลายมาตรฐานแคลเซียม (standard calcium) ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร: เตรียมโดย ละลายแคลเซียมคาร์บอเนตที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ปริมาณ 2.4973 กรัม ด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน แล้วค่อยๆเติมกรดไนตริกเข้มข้นปริมาตร 12 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนจนครบ 1 ลิตร

3. เวิร์คกิ้ง สแตนดาร์ด แคลเซียม (working standard calcium) ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร: เตรียมโดยนำสารละลายมาตรฐานแคลเซียม 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากข้อ2) ปริมาตร 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายสตรอนเตียม 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. เจือจางสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการย่อยแล้ว (โดยใช้ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยแบบเดียวกับการวิเคราะห์หาฟอสฟอรัส) ด้วยสารละลายสตรอนเตียม 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะต้องเจือจางสารละลายตัวอย่างให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแคลเซียม

2. นำสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้วมาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer และ flame photometer

คำนวณหาเปอร์เซนต์แคลเซียมตามสูตร

% แคลเซียม = X x V x 100 / 1000 x W

เมื่อ X = ปริมาณแคลเซียมที่อ่านได้ในตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

V = ปริมาตรของตัวอย่างที่ปรับปริมาตรหลังจากการย่อย (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม)

กรณีที่มีการเจือจางตัวอย่างเนื่องจากความเข้มข้นของแคลเซียม ในสารละลายตัวอย่างสูงกว่าช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ต้องคูณจำนวนเท่าของการเจือจางในสูตรการคำนวณข้างต้น

7. การวิเคราะห์โครมิคออกไซด์ (ตามวิธีการของ Furukawa and Tsukahara, 1966)

1. ชั่งตัวอย่าง 50 ถึง 100 มก. ใส่ใน Kjeldahl flask

2. เติมกรดไนตริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร นำไปย่อยประมาณ 20 นาที

3. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมกรดเปอร์คลอริคเข้มข้น 3 มิลลิลิตร นำไปย่อยอีกครั้ง จนสารละลายสีเขียวเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือแดง ย่อยต่ออีก 10 นาที

4. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรสารละลายให้ครบ 100 มิลลิลิตร

5. นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับน้ำกลั่น คำนวณค่าปริมาณโครมิคออกไซด์โดยใช้สมการ

$$y = 0.2089x + 0.0032$$

เมื่อ y = ค่าการดูดกลืนแสง

x = ปริมาณโครมิคออกไซด์ (มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร)

8. วิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (Bancroft, 1967)

สารเคมี

1. สารละลายบูแอง (Bouin's solution) เตรียมโดยใช้

ฟอร์มาลีน (formalin)	25 มิลลิลิตร
กรดพิคริคอิ่มตัว (saturated aqueous picric acid)	75 มิลลิลิตร

กรดอะซิติกเข้มข้น	5	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 จากนั้นเติมกรดซิตริกและคลอรัลไฮเดรทผสมจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกันทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้งาน

3. สีย้อมอีโอซิน (eosin) เตรียมโดยใช้

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

ผสมเข้าด้วยกัน

การเตรียมตัวอย่าง

1. สลบปลาด้วยสารละลายควินาดีน (quinaldine) 50 ส่วนในล้านส่วน

2.ใช้กรรไกรผ่าตัดเปิดช่องท้องของปลาออก ตัดตับออกแล้วดองในน้ำยาบูแองทันที เก็บรักษาตัวอย่างในน้ำยาดองดังกล่าวเป็นเวลา 1 สัปดาห์ 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
ขั้นตอนที่	**สารละลาย**	**เวลา (ชั่วโมง)**
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. นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนในข้อ 2 ไป embed ด้วยพาราพลาสท์ จากนั้นนำ block ไปแช่ตู้เย็นเพื่อง่ายต่อการนำไปตัด section ต่อไป

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

5. ใช้แผ่นสไลด์ช้อนตัวอย่าง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อให้ตัวอย่างยึดติดแผ่นสไลด์ได้ดี

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
ขั้นตอนที่	**สารละลาย**	**เวลา (นาที)**
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. เมาท์ (mount) ด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์ (permount) แล้วนำตัวอย่างไปศึกษาพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์

9. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

9.1 การวิเคราะห์ค่าความเป็นด่างของน้ำ (ตามวิธีการของ Boyd and Tucker, 1992)

สารเคมี

1. ฟีนอลฟ์ทาลีน อินดิเคเตอร์ (phenolphthalein indicator): เตรียมโดยละลายฟีนอลฟ์ทาลีน (phenolphthalein) 0.5 กรัม ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % จนได้ปริมาณครบ 100 ลิตร

2. เมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์: เตรียมโดยละลายเมทิลออเรนจ์ 0.5 กรัม ในน้ำกลั่นที่กำจัดอิออนแล้ว จนได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

3. เมทิลเรด อินดิเคเตอร์: เตรียมโดยละลายเมทิลเรด 0.5 กรัม ในน้ำกลั่นที่กำจัดอิออนแล้ว จนได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

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

5. สารละลายมาตรฐานโซเดียมคาร์บอเนต 0.2 นอร์มอล: เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนตซึ่งอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที หรือที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้งทำให้เย็นในโถดูดความชื้นจำนวน 10.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ต้มเดือดใหม่ๆ ปิดฝาแล้วทำให้เย็น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลาย

1. ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร

2. หยดเมทิลเรด อินดิเคเตอร์ 5 หยด เขย่าให้ผสมกันจะได้สารละลายสีเหลือง

3. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู

4. นำส่วนผสมทั้งหมดไปต้มจนเดือดเป็นเวลาประมาณ 3-5 นาที เพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้หมด สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอีกครั้ง

5. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกต่อไปจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอีกครั้งหนึ่ง

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

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ลิตร
2. หยดฟินอลท์ทาลีน อินดิเคเตอร์ 10 หยด เขย่าให้ผสมกัน
   - 2.1 ถ้าสารละลายใส ให้ทำข้อ 3 ต่อไป
   - 2.2 ถ้าสารละลายสีชมพู จะต้องไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกจนกระทั่งสารละลายสีชมพูนั้นหายไป บันทึกปริมาตรที่ใช้ไป (นำไปรวมกันปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ไปในข้อ 4) ทำต่อไปในข้อ 3.
3. หยดเมทิลออเรนจ์ 2-3 หยด เขย่าให้ผสมกันจะได้สารละลายสีเหลือง
4. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้ม จดปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริกทั้งหมดที่ใช้ไป

การคำนวณค่าความเป็นด่างของน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

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

9.2 การวิเคราะห์ค่าความกระด้างของน้ำ (ตามวิธีการของ Boyd and Tucker, 1992)

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์ (buffer solution): เตรียมโดยละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 67.5 กรัม ในแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ปริมาตร 570 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาณครบ 1000 ลิตร

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

3. สารละลายมาตรฐานแคลเซียม 0.01 โมลาร์: เตรียมละลาย แอนไฮดรอสคาร์บอเนต (anhydrous $CaCO_3$) ปริมาณ 1 กรัม ในกรดเกลือเจือจาง (1:1) แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรประมาณ 200 มิลลิลิตร จากนั้นต้มให้เดือดนาน 5-10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับ pH ของสารละลาย ให้ได้ pH เท่ากับ 7 โดยใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3 นอร์มอล จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

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

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลาย

ดูดสารละลายสารละลายมาตรฐานแคลเซียม 0.010 โมล ปริมาตร 100 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน เติมอินดิเคเตอร์ อีรีโอโครมแบล็กที 8 หยด เขย่าให้ผสมกัน นำมาไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอที่ใช้ไปเพื่อนำมาคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ(โมล)โดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า N_2= ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า V_2= ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ลิตร

2. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน

3. เติมอินดิเคเตอร์ อีรีโอโครมแบล็กที 8 หยด เขย่าให้ผสมกัน

4. นำมาไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน EDTA จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน จดปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน EDTA ทั้งหมดที่ใช้ไป

การคำนวณค่าความกระด้างของน้ำ (มิลลิกรัม$CaCO_3$ ต่อลิตร)

$$\text{ค่าความกระด้าง} = \frac{\text{ปริมาตรของ EDTA X โมลาริตี้ของ EDTA X 100.1 X 1,000}}{\text{ปริมาตรของน้ำตัวอย่าง}}$$

9.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในน้ำ (ตามวิธีการของ Boyd and Tucker, 1992)

สารเคมี

1. สารละลายกรดกำมะถัน 5 นอร์มอล: เตรียมโดยเจือจางกรดกำมะถันเข้มข้นปริมาตร 70 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร

2. สารละลายโพแตสเซียมแอนติมอนิลทาเตรท (potassium antimonyl tartrate): เตรียมโดยละลาย $K(SbO)C_4H_4O_6H_2O$ ปริมาตร 20 กรัม ในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร

3. สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท: เตรียมโดยละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท 20 กรัมในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เก็บสารละลายนี้ในขวดพลาสติกไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. สารละลายกรดเอสคลอบิค (ascorbic acid) 0.1 โมล: เตรียมโดยละลายกรดเอสคลอบิค 1.7 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เก็บไว้ใช้ได้นาน 1 สัปดาห์)

5. สารก่อสี : ผสมสารละลาย 4 ชนิดแรกเข้าด้วยกันตามลำดับสัดส่วนดังนี้ (สารก่อสีจะเก็บไว้ได้ไม่เกิน 4 ชั่วโมง)

สารละลายกรดกำมะถัน	50	มิลลิลิตร
สารละลายโพแตสเซียม แอนติมอนิล ทาเตรท	5	มิลลิลิตร
สารละลายแอมโมเนียม โมลิบเดท	15	มิลลิลิตร
สารละลายกรดเอสคลอบิค	30	มิลลิลิตร

6. สารละลายมาตรฐานฟอสเฟต: โพแตสเซียมฟอสเฟต 0.2195 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานฟอสเฟตเข้มข้น 50 มิลลิกรัม P_4O ต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตเข้มข้น 50 มิลลิกรัม P_4O ต่อลิตรนี้มาปริมาตร 50 มิลลิกรัมแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิกรัม จะได้สารละลายมาตรฐานฟอสเฟตเข้มข้น 5 มิลลิกรัม P_4O ต่อลิตร แล้วน้ำไปเตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตให้มีความเข้มข้นอย่างน้อย 6 ระดับ อยู่ในช่วง 0.00 – 1.00 มิลลิกรัม P_4O ต่อลิตร

7. ฟีนอลฟ์ทาลีน อินดิเคเตอร์: เตรียมโดยละลายฟีนอลฟ์ทาลีน 0.5 กรัม ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

8. สารละลายกรดกำมะถัน 30 % : เตรียมโดยเติมกรดกำมะถันเข้มข้น 300 มิลลิลิตรลงในน้ำกลั่น 600 มิลลิลิตรปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

9. สารละลายโพแตสเซียม เปอร์ซัลเฟต (potassium persulfate) : เตรียมโดยละลายโพแตสเซียมเปอร์ซัลเฟต 10 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร (สารละลายนี้เตรียมใหม่ทุกครั้งที่วิเคราะห์)

10. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์: เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 80 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. ล้างเครื่องแก้วและขวดเตรียมสารละลายด้วยกรดเกลือ 50 % จากนั้นจึงล้างด้วยน้ำปะปา แล้วล้างน้ำสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น

2. นำตัวอย่างน้ำ และสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตที่มีความเข้มข้นระดับต่างๆ อย่างละ 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ลิตร

3. หยดฟีนอลท์ทาลีน อินดิเคเตอร์ 1 หยด เขย่าให้ผสมกัน ถ้าน้ำตัวอย่างเป็นสีชมพูให้เติมสารละลายกรดกำมะถัน 30 %ทีละหยดจนสีชมพูหายไป

4. เติมสารละลายกรดกำมะถัน 30 % ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายโพแตสเซียมเปอร์ซัลเฟต 10 มิลลิลิตร ปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วยกระดาษอะลูมิเนียม

5. นำไปนึ่งในหม้อนึ่ง (autoclave) ด้วยความดัน 15-20 psi หรือประมาณ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

6. เมื่อน้ำตัวอย่างเย็นแล้ว หยดฟีนอลท์ทาลีน อินดิเคเตอร์ 1 หยด จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ทีละหยดจนกระทั่งน้ำตัวอย่างเป็นสีชมพูอ่อน ปรับปริมาตรของน้ำตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตที่มีความเข้มข้นระดับต่างๆ ด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

7. นำน้ำตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตที่มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ อย่างละ 25 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่เติมสารก่อสี 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปล่อยไว้อย่างน้อย 10 นาที แต่ไม่เกิน 30 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 880 นาโนเมตร

8. เขียนเส้นกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตกับค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน

10. การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

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

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

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

3. วัดหาอัตราส่วนของปริมาตรเม็ดเลือดกับปริมาตรเลือดทั้งหมด นำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซนต์ฮีมาโตคริตจากสูตร

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

10.2 การหาค่าฮีโมโกลบินรวม (total haemoglobin)

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

วิธีการวิเคราะห์

1. ใช้ไมโครปิเปตขนาด 20 ไมโครลิตรดูดเลือดที่เจาะได้ใหม่ๆ มาผสมรวมกับ สารละลายเดรบกิ้น 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

10.3 การหาค่าโปรตีนรวมในซีรั่มหรือพลาสมา (total serum or plasma protein)

สารเคมี

1. สารละลายอัลคาไลด์คอปเปอร์ (alkaline copper solution): เตรียมโดยใช้ 1 % 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

วิธีการวิเคราะห์

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

3. นำแต่ละหลอดมาทำตามขั้นตอนของการหาซีรัมโปรตีนในเลือดดังที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น

4. นำค่าความเข้มข้นของแอลบูมิน และค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน โดยให้ค่าความเข้มข้นอยู่ในแกน X และค่าการดูดกลืนแสงอยู่แกน Y หาสมการสหสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linear regression) เพื่อใช้คำนวณค่าความเข้มข้นของโปรตีนรวมในเลือดจากค่าการดูดกลืนแสง

ภาคผนวก ข ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดและฟอสฟอรัสที่ใช้ได้ในอาหารทดลองแต่ละสูตร

สูตรอาหาร	ฟอสฟอรัสทั้งหมดในอาหาร (จากการวิเคราะห์) (กรดไฟติก + ฟอสฟอรัสที่ใช้ได้)	ฟอสฟอรัสในอนินทรีย์ฟอสเฟต		ฟอสฟอรัสในรูปกรดไฟติก[2]		ฟอสฟอรัสที่ใช้ได้
1	0.77	-		0.513		0.257
2	0.75	-		0.500		0.250
3	0.79	-		0.526		0.264
4	0.79	-		0.526		0.264
5	0.80	-		0.530		0.270
	(อนินทรีย์ฟอสเฟต + กรดไฟติก + ฟอสฟอรัสที่ใช้ได้)	ฟอสฟอรัสในอนินทรีย์ฟอสเฟต[1]	(กรดไฟติก + ฟอสฟอรัสที่ใช้ได้)	ฟอสฟอรัสในรูปกรดไฟติก[2]	(อนินทรีย์ฟอสเฟต + ฟอสฟอรัสที่ใช้ได้)	ฟอสฟอรัสที่ใช้ได้
6	0.92	0.092	0.828	0.552	0.368+0.092	0.46
7	0.89	0.081	0.809	0.533	0.351+0.081	0.432
8	0.87	0.076	0.794	0.529	0.34+0.076	0.416

[1]โมโนแคลเซียมฟอสเฟต 100 กรัม มีฟอสฟอรัส 20.07 กรัม เมื่อโมโนแคลเซียมฟอสเฟต 0.46 กรัม จะมีฟอสฟอรัส 0.092 กรัม
ไดแคลเซียมฟอสเฟต 100 กรัม มีฟอสฟอรัส 17.67 กรัม เมื่อไดแคลเซียมฟอสเฟต 0.46 กรัม จะมีฟอสฟอรัส 0.081 กรัม
ไตรแคลเซียมฟอสเฟต 100 กรัม มีฟอสฟอรัส 16.47 กรัม เมื่อไตรแคลเซียมฟอสเฟต 0.46 กรัม จะมีฟอสฟอรัส 0.092 กรัม

[2] 2 ใน 3 ของฟอสฟอรัสจากวัตถุดิบพืชทั้งหมดจะพบอยู่ในรูปของกรดไฟติก