ภาคผนวกที่ 1

การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ polyfructosan (PFS) (Fuhr,et al.,1955)

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน polyfructosan ไว้ที่ความเข้มข้น 0.0625,0.125,0.25,0.5 และ 1 mmol/l เตรียมจาก 25% inutest

2. เตรียม anthrone reagent

2.1 นำน้ำกลั่นปริมาตร 120 ml ใส่ flask 1 lite แช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา

2.2 เมื่อน้ำกลั่นเย็นจัดค่อยๆ เท H_2SO_4 ปริมาตร 300 ml ลงข้างๆ อย่างช้าๆ รอจนสารละลายเย็น

2.3 ผสม anthrone น้ำหนัก 0.756 g ลงในสารละลาย คนให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำเก็บในขวดสีชาแช่เย็น ซึ่งสารละลายเก็บได้ประมาณ 3 สัปดาห์

3.เจือจางตัวอย่าง urine ที่จะใช้วิเคราะห์ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:100 หลังจากสารละลายผสมกันแล้ว ดูดสารละลายปริมาตร 10 µl ใส่ในหลอดทดลอง และเช่นเดียวกันในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน PFS ของ urine ใช้สารละลายความเข้มข้นต่างๆที่เตรียมไว้ในปริมาตร 10 µl ใส่ในหลอดทดลอง หลังจากนั้นใส่สารละลาย anthrone ที่เตรียมไว้ปริมาตร 2 ml ผสมเข้าด้วยกัน

4.สำหรับสารละลายมาตรฐาน PFS ของ plasma และตัวอย่างของ plasma จะใช้สารปริมาตร 25 µl ผสมกับ 0.25M $ZnSO_4.7H_2O$ ปริมาตร 250 µl และ 0.5M NaOH ปริมาตร 100 µl ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวปริมาตร 250 µl ใส่หลอดทดลอง หลังจากนั้นใส่สารละลาย anthrone ที่เตรียมไว้ปริมาตร 5 ml ผสมให้เข้ากัน

5.นำสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างทั้งหมดแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 56^0C เป็นเวลา 10 นาที เสร็จแล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที

6.อ่านค่า transmission ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 620 นาโนเมตร

ภาคผนวกที่ 2

การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ para-aminohippuric acid (PAH) (Smith,et al., 1945)

1.การเตรียมสารละลายมาตรฐาน PAH ละลายในน้ำกลั่นโดยให้มีความเข้มข้น 0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.1 mg%

2.เตรียมสารเคมีที่จะใช้เป็นสาร reagent ได้แก่

0.2 N HCl

0.1 % sodium nitrite, $NaNO_2$

0.5 % ammonium sulphamate, $H_6N_2O_3S$

0.1 % N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride (N-1-NED)

3.2 % Trichloroacetic acid (TCA)

3.นำตัวอย่าง plasma ปริมาตร 50 µl ใส่ในหลอดทดลอง ซึ่งแต่ละหลอดมี 3.2% TCA ปริมาตร 1100 µl ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นดูดเอาเฉพาะของเหลวปริมาตร 1 ml มาใช้ทดลองต่อไป

4.นำ urine ปริมาตร 10 µl เจือจางครั้งแรกใน 3.2 % TCA ปริมาตร 1100 µl ผสมให้เข้ากันหลังจากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 10 µl เจือจางครั้งที่สองใน 3.2 %TCA ปริมาตร 1100 µl อีกครั้ง (ใช้ในกรณีที่อัตราการขับ urine เท่ากับ10 µl /100g / min แต่ถ้าอัตราการขับ urine สูงกว่านี้ การเจือจางครั้งที่สองจะใช้สารละลายปริมาตร 25 µl) จากนั้นผสมให้เข้ากัน แล้วดูดเอาสารละลายปริมาตร 100 µl ใส่ในหลอดทดลอง

5.สำหรับสารละลายมาตรฐานของ plasma และ urine ใช้สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ โดยใช้ปริมาตร 50 µl ใส่ในหลอดทดลองซึ่งมี 3.2 % TCA ปริมาตร 1100 µl อยู่จากนั้นผสมให้เข้ากัน

6. นำสารละลายมาตรฐาน, สารตัวอย่าง urine และสารตัวอย่าง plasma ที่เตรียมไว้มาทดลองต่อไป โดยแต่ละหลอดจะใส่สารละลาย 0.2N HCl ปริมาตร 200 µl และ 0.1% $NaNO_2$ ปริมาตร 100 µl ตามลำดับผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 3-5 นาที จากนั้นใส่สารละลาย 0.5% ammonium sulfamate ปริมาตร 100 µl ทิ้งไว้ 3-5 นาที จากนั้นใส่สารละลาย 0.1 % N-(1-naphthyl) ปริมาตร 100 µl ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15-60 นาที

7. อ่านค่า transmission ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร

ภาคผนวกที่ 3

การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ lithium

1.เตรียม lithium diluent ประกอบด้วย KCl 4.7 mmol/l, Triton-X 0.1 g/l ผสมในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้เข้ากัน

2.เตรียมสารละลายมาตรฐาน lithium โดยใช้ lithium chloride ละลายใน lithium diluent ให้ได้ความเข้มข้น 0, 0.018, 0.036, 0.072, 0.108, 0.144, 1.018 mmol/l นำสารละลายมาตรฐาน ปริมาตร 100 µl ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นผสมด้วย lithium diluent จนได้ปริมาตร 2 ml

3.นำตัวอย่าง plasma ปริมาตร 100 µl ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นผสมด้วย lithium diluent จนได้ปริมาตร 2 ml

4. นำตัวอย่าง urine ปริมาตร 100 µl ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นผสมด้วย lithium diluent จนได้ปริมาตร 2 ml

5. วิเคราะห์หาปริมาณ lithium ด้วยเครื่อง inductively coupled plasma-atomicemission spectrometer (ICP-AES) ที่ช่วงคลื่น 670.8 นาโนเมตร