ภาคผนวก ก

สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์คุณค่างทางโภชนาการของอาหารทดลอง

1. 1 การวิเคราะห์ความชื้น ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990)

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. ตัวอย่างที่อบแล้วใส่โถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น บันทึกน้ำหนักของตัวอย่าง

6. ทำซ้ำตามข้อ 1 ถึง 5 จนน้ำหนักที่ได้คงที่ โดยน้ำหนักที่หายไปคือน้ำหนักของความชื้น

คำนวณ % ความชื้นด้วยสมการ

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

เมื่อ a = น้ำหนักของอาหารก่อนอบแห้ง

b = น้ำหนักของอาหารหลังอบแห้ง

w = น้ำหนักของอาหารก่อนอบ

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990)

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบ

2. นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนเถ้าเป็นสีขาว

3. นำเข้าโถอบแห้ง เพื่อให้ดูดความชื้น และเมื่อตัวอย่างอาหารเย็นดีแล้ว นำออกชั่งทันที

คำนวณ % เถ้าด้วยสมการ

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

เมื่อ a = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ

b = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำหนักของเถ้าภายหลังการเผา

w = น้ำหนักของอาหารก่อนเผา

1.3 การวิเคราะห์หาโปรตีน ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น 93 – 98 เปอร์เซ็นต์

2. สารเร่งรวม (catalyst mixture)

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

3. โซเดียมไฮดรอกไซด์45 เปอร์เซ็นต์ (NaOH) ละลาย 450 กรัม ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ชนิดเกล็ดลงในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

4. สารละลายกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล ละลายกรดเกลือ 9 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

5. กรดบอริค (H_3BO_3) 4 เปอร์เซ็นต์ ต้มน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ให้ร้อน แล้วใส่ผงกรดบอริคลงไป 4 กรัม ต้มจนละลายหมดทิ้งไว้จนสารละลายเย็นลง แล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

6. อินดิเคเตอร์ผสมระหว่าง เมทธิลเรด และเมทธิลีนบลู ละลายเมทธิลเรด 0.2 กรัม ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร และละลายเมทธิลีนบลู 0.2 กรัม ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 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 อบโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ260 – 270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ชั่งสารมา1.325 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 มิลลิลิตรอยู่โดยให้ปลายของหลอดแก้วที่ต่อจากกระบอกแก้วควบแน่นจุ่มอยู่ในกรดบอริคเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในขวดแก้ววิเคราะห์ช้า ๆ จนกระทั่งสารละลายมีสีดำ

4. ใส่อินดิเคเตอร์ในกรดบอริค 2 –3 หยด

5. ทำการกลั่นจนไม่มีก๊าซแอมโมเนียออกมา แล้วทำการกลั่นต่อไปอีก 10 นาที แล้วล้างปลายเครื่องกลั่นด้วยน้ำกลั่น นำขวดปากแคบวัดปริมาตรออกจากเครื่องกลั่น

ค. ขั้นตอนการไตเตรท (titration)

1. นำไปไตเตรทด้วยกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น0.1 นอร์มอล จนถึงจุดยุติ (end point) โดยใช้อินดิเคเตอร์รวม สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อน

2. จดปริมาตรของกรดเกลือไว้เพื่อคำนวณต่อไป

การคำนวณ

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

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 ทำการไตเตรทด้วยสารละลายกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล คำนวณความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือโดยใช้สูตร

$$N_1 V_1 = N_2 V_2$$

1.4 การวิเคราะห์หาไขมัน (ใช้เครื่อง Soxtec System HT6) ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990)

สารเคมี

1. สารละลายคลอโรฟอร์ม (chloroform)

2. เมทธานอล (methanol)

วิธีการ

1. อบถ้วยพร้อมลูกแก้วที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 8 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น

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 เปิดสวิทซ์อากาศเลื่อนปุ่มไปที่ evaporation เพื่อให้สารระเหยออกไป 5 นาที

9. ปิดเครื่อง อากาศและน้ำ แล้วเลื่อนปุ่ม evaporation กลับที่เดิม นำถ้วยออกจากเครื่องแล้วนำไปอบที่100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน

10. นำถ้วยออกมาใส่โถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก (w_3)

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไขมัน

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

เมื่อ w_1 = น้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้ว

w_2 = น้ำหนักตัวอย่าง

w_3 = น้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้วและไขมันหลังอบ

2. การคำนวณหาค่าอัตราการรอดตายและการเจริญเติบโตตามวิธีการของ Jantrarotai และคณะ (1994)

- การคำนวณหาอัตรารอดตาย (เปอร์เซ็นต์) โดยสมการ

$$\text{อัตรารอดตาย (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} \times 100}{\text{จำนวนกุ้งเมื่อเริ่มต้น}}$$

- การคำนวณน้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อตัว (เปอร์เซ็นต์ weight gain) โดยสมการ

$$\text{น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มเฉลี่ยต่อตัว (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(\text{น้ำหนักกุ้งสุดท้าย} - \text{น้ำหนักกุ้งเริ่มต้น}) \times 100}{\text{น้ำหนักกุ้งเริ่มต้น}}$$

- การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, SGR) โดยสมการ

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวต่อวัน)} = \frac{(\ln \text{น้ำหนักสุดท้าย} - \ln \text{น้ำหนักกุ้งเริ่มต้น}) \times 100}{\text{เวลา (วัน)}}$$

- ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน (กรัมต่อตัวต่อวัน)

$$= \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กุ้งกินทั้งหมด / จำนวนกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{เวลา (วัน)}}$$

- การคำนวณอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate) คำนวณตามวิธีการของ Dupree และ Sneed (1966)

$$= \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กุ้งกินทั้งหมด}}{\text{น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้น}}$$

3. การศึกษาองค์ประกอบเลือด

3.1 การนับปริมาณเลือดทั้งหมด (Total haemocyte count) ตามวิธีการของ กิจการ (2538)

สารเคมี

trypan blue 0.15 เปอร์เซ็นต์ : ละลาย trypan blue 0.15 กรัม ในสารละลาย NACl 2.5 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร คนให้ละลายโดยวางบน magnetic stirrer นาน 6-12 ชั่วโมง และกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 แบ่งใส่หลอดพลาสติกหลอดละ 0.45 มิลลิลิตร

วิธีการ

ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาขนาด 25 G ความยาว 12 มิลลิเมตร เจาะเลือดกุ้งบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดเลือด 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย trypan blue 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดพลาสติก นับเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมดโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วคำนวณเป็นเซลล์ต่อมิลลิลิตรจากสูตร

ปริมาตรของฮีมาไซโตมิเตอร์ = กว้าง $\times$ยาว $\times$ สูง

= 1mm $\times$1 mm $\times$ 0.1 mm

= 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (mm^3)

จำนวนเซลล์เม็ดเลือด/ลูกบาศก์มิลลิเมตร = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้

จำนวนเซลล์เม็ดเลือด/มิลลิลิตร = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้ $\times 10^4$

3.2 การแยกชนิดเซลล์เม็ดเลือด (differential cell counts)ด้วยเทคนิคการย้อมสีเบงกอลโรสตามวิธีการของ Sritunyalucksana และคณะ (2005)

สารเคมี

1. 10 เปอร์เซ็นต์ ฟอร์มาลิน ใน 0.45 โซเดียมคลอไรด์
2. 1.2 เปอร์เซ็นต์ เบงกอลโรส ใน 50 เปอร์เซ็นต์เอทธานอล
3. สีย้อมฮีมาทอกไซลิน
4. เอทธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์
5. ไซลีน
6. น้ำยาเปอร์เม้าท์

วิธีการ

1. ใช้เข็มฉีดยาดูดเลือดกุ้งบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดเลือด 25 ไมโครลิตร ผสมรวมกับฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ 25 ไมโครลิตร อัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วดูดเลือด 20 ไมโครลิตร ใส่หลอดพลาสติกที่บรรจุสีเบงกอลโรส 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที นำมาเกลี่ยบนสไลด์ที่สะอาดปล่อยให้แห้งสนิท หลังจากนั้นนำสไลด์มาย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลิน 7 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำประปาประมาณ 10-15 นาที ตามด้วยขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์โดยการแช่สไลด์ในเอทธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที และ 100 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที และแช่ในไซลีน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เมื่อเสร็จขั้นตอนการย้อมแล้วหยดน้ำยาเปอร์เม้าท์บนสไลด์แล้วปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์นำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์นับจำนวนเซลล์ กรานูลจากทั้งหมด 200 เซลล์ ต่อ 1 สไลด์ เซลล์กรานูลจะพบกรานูลติดสีแดงเข้มในไซโตพลาสซึม ขณะที่เซลล์ไฮยาลินจะไม่พบกรานูลและไซโตพลาสซึมติดสีชมพูอ่อน

3.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ดัดแปลงจาก Soderhall และคณะ (1988)

สารเคมี

เตรียม 2x M-199 โดยละลาย M-199 (Gibco BRL) ในน้ำ deionized 450 มิลลิลิตร คนให้ละลายและกรองผ่านเมมเบรนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางรู 0.22 ไมโครเมตร ใส่ขวด เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วเตรียมเป็น K-199 พีเอช 7.6 100 มิลลิลิตร ตามส่วนผสมที่ดัดแปลงจาก Itami และคณะ (1992) ดังรายละเอียด

1. K-199 pH 7.6

M-199	50	มิลลิลิตร
HEPES	23.8	มิลลิกรัม
$MgCl_26H_2O$	33	มิลลิกรัม
$MgSO_47H_2O$	30	มิลลิกรัม
NaH_2PO_4	0.5	มิลลิกรัม
NaCl	110	มิลลิกรัม
$CaCl_22H_2O$	9	มิลลิกรัม
L-glutamine	0.1	มิลลิกรัม

เติมน้ำ deionized จนครบ 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.6 กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ขวดเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

2. L-cysteine 3 เปอร์เซ็นต์ (เตรียมก่อนใช้ในแต่ละครั้ง)

ละลาย L-cysteine 30 กรัม ในสารละลาย K-199 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.4 กรองผ่านเมมเบรนที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางรูขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ขวดเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.cacodylate buffer (CAC buffer)

ละลาย $C_2H_6A_sNaO_2.3H_2O$ (Cacodylic acid sodium salt trihydrate) 1.07 กรัม ในน้ำ deionized ปลอดเชื้อ 500 มิลลิลิตร เติม CaCl (calcium chloride) 0.37 กรัม ปั่นให้ละลายแล้วจึงเติม MgCl (magnesium chloride) 5.08 กรัม ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ใส่ขวดเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

4. Trypsin

ละลาย trypsin (1:250) 0.001 กรัม ใน CAC buffer 1 มิลลิลิตร

5. L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)

ละลาย L-DOPA 0.003 กรัม ใน CAC buffer 1 มิลลิลิตร

วิธีการ

ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาขนาด 24 G ความยาว 12 มิลลิเมตร ดูดสารละลาย L-cysteine 0.2 มิลลิลิตร เจาะเลือดกุ้งบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดพลาสติกโดยใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดขึ้นลงเบา ๆ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ที่ 3,590 ×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย K-199 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร 2 ครั้ง เพื่อล้างเซลล์เม็ดเลือด แล้วเติม CAC buffer 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บในไนโตรเจนเหลว

นำเม็ดเลือดที่ได้มาทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่องอัลตร้าโซนิกส์ฮอโมจิไนซ์เซอร์ที่แอมพลิจูด (amplitude) ระดับ 30 เป็นเวลา 20 วินาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8,497 ×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใส (HLS) มาวิเคราะห์ทันที โดยเติมสารละลาย trypsin 0.2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร เติม HLS 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ 2 นาที จึงเติมสารละลาย CAC buffer 1.8 มิลลิลิตร รอให้เกิดปฏิกิริยา 2 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสดงทุก 2 นาที จนกระทั่งค่าที่ได้ลดลง สำหรับหลอดเทียบ (blank) ใช้สารละลาย CAC buffer 0.2 มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสคำนวณได้จากสูตร

กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส = ยูนิต/นาที (0.001) * โปรตีนในHLS 0.2 มิลลิลิตร

= ยูนิต/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน

* 0.001 เป็นค่าที่กำหนดเอง

ยูนิต (unit) หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในการเปลี่ยน L-DOPA ไปเป็นโดปามีน (dopamine) โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงภายในเวลา 1 นาที

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในซีรัม ดัดแปลงจาก Lowry และคณะ (1951)

สารเคมี

1. สารละลาย BSA มาตรฐาน

ละลาย bovine serum albumin 1.0 มิลลิกรัม ในน้ำ deionized 10 มิลลิลิตร และเจือจางสารละลายข้างต้นด้วยน้ำ deionized ในหลอดทดลองให้มีความเข้มข้น 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการ

เติมสารละลาย HLS ที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกในข้อ 6.2 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตรที่มีน้ำ deionized 0.36 มิลลิลิตร เติม alkaline copper reagent 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งให้เกิดปฏิกิริยานาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ตัวเทียบใช้น้ำ deionized 0.4 มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง แล้วคำนวณปริมาณโปรตีน โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin; BSA)

สำหรับซีรัมเตรียมโดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาขนาด 24 G ความยาว 12 มิลลิเมตร ที่ไม่บรรจุสารป้องกันเลือดแข็งตัวเจาะเลือดกุ้งที่โคนขาเดินคู่ที่ 3 ให้ได้ 0.2-0.3 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง บดเลือดที่แข็งตัวด้วยแท่งบดพลาสติก แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8,497 × g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แยกส่วนใสสำหรับวิเคราะห์โปรตีน โดยเติมซีรัม 5 ไมโครลิตร ลงในน้ำ deionized 395 ไมโครลิตร แล้วเติมสารต่าง ๆ สำหรับทำปฏิกิริยาวัดค่าการดูดกลืนแสง และคำนวณปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin; BSA)

4.สารเคมีวิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการศึกษาพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตามวิธีของ Bancroft (1967) และ Humason (1972)

สารเคมี

น้ำยาดองเดวิดสัน (Davidson's fixative) Bell และ Lightner (1988)

95% ethyl alcohol	330	มิลลิลิตร
100% formalin (formaldehyde 37–39%)	220	มิลลิลิตร
glacial acetic acid	115	มิลลิลิตร
tap water	335	มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. สีย้อมฮีมาทอกซิลิน (haematoxylin) เตรียมโดยใช้

ฮีมาทอกซิลิน (haematoxylin 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

ละลายอลัมลงในน้ำกลั่นเติมฮีมาทอกซิลินผสมจนกระทั่งละลายหมดจึงเติมโซเดียมไอโอเดทผสมให้เข้ากันจากนั้นเติมกรดซิตริกและคลอรัลไฮเดรทผสมจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกันทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้งาน

2. สีย้อมอีโอซิน (eosin) เตรียมโดยใช้

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

ผสมเข้าด้วยกัน

การเตรียมตัวอย่าง

ฉีดน้ำยาดองเดวิดสันบริเวณหัวใจ ตับ ส่วนหัว กล้ามเนื้อลำตัวให้ทั่ว แล้วตัดตัดส่วนหัวกุ้งออกเป็นสองซีกนำกล้ามเนื้อลำตัวตัดตามขวางดองในขวดที่บรรจุน้ำยาดองเดวิดสันโดยให้น้ำยาท่วมตัวอย่างเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำยาดองซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ทั่วถึง ตัวอย่างที่นำมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อคือ เนื้อเยื่อตับอ่อน (hepatopancreatic tissue) ต่อมน้ำเหลือง

(lymphoid cell) เหงือก (gill) และ กล้ามเนื้อ (muscle) หลังจาก 72 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีของ Humason(1979)

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. นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนดึงน้ำออกไป embed ด้วยพาราพลาสท์ จากนั้นนำ block ไปแช่ตู้เย็นเพื่อง่ายต่อการนำไปตัด section ต่อไป

4. ตบแต่งตัวอย่างที่อยู่ใน block ให้มีขนาดพอดีกับขนาดสไลด์ และ cover glass ปิดได้สนิท จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อไมโครโตม (microtome) ให้มีความหนาประมาณ 3 – 5 ไมครอน นำไปลอยในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45 –50 องศาเซลเซียส

5. ใช้แผ่นสไลด์ช้อนตัวอย่าง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

6. นำสไลด์ที่อบแล้วไปผ่านขบวนการย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซินโดยมีขั้นตอนดังนี้

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	2
14.	อีโอซิน	4
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

5. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ตามวิธีการของ Boyd และ Tucker (1992)

5.1 การวิเคราะห์ค่าความเป็นด่างของน้ำ

สารเคมี

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

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

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

4. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.2 นอร์มอล : เตรียมโดยค่อย ๆ เทกรดซัลฟูริกเข้มข้น 6 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น (ที่ต้มเดือดใหม่ ๆ แล้วปิดฝาทิ้งไว้ให้เย็น) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

5. สารละลายมาตรฐานโซเดียมคาร์บอเนต 0.2 นอร์มอล : เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนตซึ่งอบแห้งจำนวน 10.6 กรัม โดยอบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที แล้วทำให้เย็นในโถอบแห้ง จากนั้นละลายในน้ำกลั่นที่ต้มเดือดใหม่ ๆ วางไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลาย

1. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. หยดเมทิลเรด อินดิเคเตอร์ 5 หยด เขย่าให้เข้ากันจะได้สารละลายสีเหลือง

3. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู

4.นำส่วนผสมทั้งหมดไปต้มจนเดือดเป็นเวลาประมาณ 3-5 นาที เพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้หมดสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอีกครั้ง

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 ถ้าสารละลายสีชมพูจะต้องไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกจนกระทั่งสารละลายสีชมพูนั้นหายไปบันทึกปริมาตรที่ใช้ไป(นำไปรวมกับปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ไปในข้อ 4) ทำต่อไปในข้อ 3.

3. หยดเมทิลออเรนจ์ 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายสีเหลือง

4. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งสารละลายปลี่ยนเป็นสีส้ม จนปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริกที่ใช้ไปทั้งหมด

การคำนวณค่าความเป็นด่างของน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิต)

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

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ ข. 1 การเตรียมสารพิษทีทูในอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ

สูตรอาหาร	ความเข้มข้น T-2 toxin (พีพีเอ็ม)	Stock T-2 toxin 140 พีพีเอ็ม (กรัม/อาหาร 5 ก.ก.)	ปริมาณแป้งสาลีที่ใช้เจือจาง (กรัม/อาหาร 5 ก.ก.)
1	0	0	1,000.000
2	0.1	3.571	996.429
3	1.0	35.71	964.290
4	2.0	71.42	928.572

ตารางภาคผนวกที่ ข. 2 การเตรียมสารพิษซีราลีโนนในอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ

สูตรอาหาร	ความเข้มข้น ZEN (พีพีเอ็ม)	Stock ZEN 160 พีพีเอ็ม (กรัม/อาหาร 5 ก.ก.)	ปริมาณแป้งสาลีที่ใช้เจือจาง (กรัม/อาหาร 5 ก.ก.)
1	0	0	1,000.00
2	0.1	3.125	996.875
3	0.5	15.625	984.375
4	1.0	31.250	968.750

ตารางภาคผนวกที่ ข. 3 ส่วนประกอบและปริมาณวัตถุดิบในอาหารแต่ละสูตรของการทดลองสารพิษทีทูและซีราลีโนน

ส่วนประกอบ (ก./อาหาร1000 ก.)	สูตรอาหาร						
	1	2	3	4	5	6	7
ปลาป่น	260	260	260	260	260	260	260
หมึกป่น	100	100	100	100	100	100	100
หัวกุ้งป่น	100	100	100	100	100	100	100
กากถั่วเหลือง	100	100	100	100	100	100	100
แป้งสาลี	200	199.2858	192.8572	171.4289	199.375	196.875	193.75
แป้งข้าวเจ้า	71.8	71.8	71.8	71.8	71.8	71.8	71.8
วีทกลูเตน	60	60	60	60	60	60	60
เลซิติน	20	20	20	20	20	20	20
น้ำมันปลา : น้ำมันถั่วเหลือง	40	40	40	40	40	40	40
วิตามินรวม[1]	5	5	5	5	5	5	5
แร่ธาตุรวม[2]	20	20	20	20	20	20	20
โคลีนคลอไรด์	3	3	3	3	3	3	3
โคเลสเตอรอล	5	5	5	5	5	5	5
ซีโอไลท์	15	15	15	15	15	15	15
BHT	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
สารพิษทีทู*	0	0.7142	7.1428	28.5714	-	-	-
สารพิษซีราลีโนน**	0	-	-	-	0.6250	3.1250	6.250
รวม	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
ความเข้มข้นของสารพิษ (พีพีเอ็ม)	0	0.1	1.0	2.0	0.1	0.5	1.0

[1] วิตามินรวม (mg 100 g dry diet^{-1} unless indicated otherwise) : thiamine 22.5; riboflavin 20.16; nicotinic acid 36.7; Ca-pantothenate 24.0; inositol 98; biotin 0.5; folic acid 1.68; vitamin B12 0.005; menadione 13.28; vitamin A 1150 IU; vitamin D_3 230 IU; BHT 1; PABA 20; cellulose 89.88. [2] แร่ธาตุรวม (g 100 g diet^{-1}) ประกอบด้วย $KH_2PO_4$1; $CaHPO_4.2H_2O$ 1.0; $NaHPO_4.2H_2O$ 1.5; KCl 0.5.

*T- 2 toxin ในแป้งสาลีเข้มข้น 140 พีพีเอ็ม **ZEN ในแป้งสาลีเข้มข้น 160 พีพีเอ็ม

ตารางภาคผนวกที่ ข. 4 ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลองที่มีสารพิษทีทูระดับต่าง ๆ โดยการวิเคราะห์[1]

ระดับสารพิษทีทู (พีพีเอ็ม)	ส่วนประกอบ (เปอร์เซ็นต์)			
	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
0	6.6±0.05	39.65±1.84	9.73±0.21	12.33±0.15
0.1	6.90±0.60	39.91±0.09	10.20±0.13	12.30±0.05
1.0	8.02±0.11	39.51±0.38	10.60±0.04	12.30±0.07
2.0	6.00±0.02	41.70±0.50	10.32±0.60	12.11±0.06

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

ตารางภาคผนวกที่ ข. 5 แสดงส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลองที่มีสารพิษซีราลีโนนระดับต่าง ๆ โดยการวิเคราะห์[1]

ระดับสารพิษซีราลีโนน (พีพีเอ็ม)	ส่วนประกอบ (เปอร์เซ็นต์)			
	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
0	6.6±0.05	39.65±1.84	9.73±0.22	12.34±0.15
0.1	7.43±0.13	40.94±0.43	12.14±0.04	12.15±0.04
0.5	7.36±0.08	40.95±0.15	13.30±0.45	13.31±0.45
1.0	5.82±0.04	42.22±0.50	13.30±1.51	13.30±1.51

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)