

ภาคผนวก

วิธีการวิเคราะห์หาโครมิกซ์ออกไซด์ในอาหารและมูล โดยวิธีการของ Bolin *et al.* (1952)

อุปกรณ์

1. เตาหย่อย (Kjeldahl Apparatus)
2. เตาหย่อยพลาสติก (Kjeldahl Flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร
3. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric Flask) ขนาด 50 100 และ 1000 มิลลิลิตร
4. กรวยกรอง (Funnel)
5. กระดาษกรอง (Filter Paper) เบอร์ 40
6. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย (Spectrophotometer)

สารเคมีที่ใช้

1. สารโซเดียมโมลิบเดต (Sodium Molybdate : $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
2. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 96 เปอร์เซ็นต์
3. กรดเปอร์คลอริก (HClO_4) ความเข้มข้น 70-72 เปอร์เซ็นต์

ขั้นตอนการเตรียมสารเคมี

สารละลายออกซิไดซิงรีเอเจนต์ (Oxidizing Reagent)

เตรียมสารที่ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยชั่งสารโซเดียมโมลิบเดต (Sodium Molybdate) ปริมาณ 11.75 กรัม ใส่ลงใน Flask ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจำนวน 150 มิลลิลิตร ลงไปแล้วนำ Flask ไปวางลงในอ่างน้ำแข็ง ต่อจากนั้นค่อยๆ ทำการเติมกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ที่ความเข้มข้น 96 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 150 มิลลิลิตร โดยทำการแบ่งใส่ 3 ครั้งๆ ละ 50 มิลลิลิตร (พักครั้งละ 5-10 นาที แล้วค่อยใส่ครั้งต่อไป) และในการเทควรค่อยๆ เทลงตามขอบของ Flask เมื่อเสร็จแล้วขั้นตอนต่อมาเติมกรดเปอร์คลอริก (HClO_4) ที่ความเข้มข้น 70-72 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 200 มิลลิลิตร โดยทำการแบ่งใส่ 3 ครั้งๆ ละ 50 มิลลิลิตร เช่นเดียวกัน เสร็จเรียบร้อยแล้วทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้

ขั้นตอนการวิเคราะห์

1. ขั้นตอนการย่อย

1.1 ชั่งตัวอย่างใส่เจตาห์พลาสติกขนาด 150 มิลลิลิตร โดยที่ชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 1.5 กรัม และชั่งตัวอย่างมูลประมาณ 0.5 กรัม

1.2 เติมน้ำตาลละลายออกซิไดซิงรีเอเจนต์ 12 มิลลิลิตร

1.3 นำไปย่อยบนเตาย่อยด้วยไฟขนาดปานกลางจนน้ำตาลละลายเป็นสีเหลืองหรือสีส้ม และมีไอน้ำเกาะที่บริเวณผิวด้านในของหลอด ทิ้งไว้สักครู่แล้วจึงนำออกมาใส่ช่องดูดควันทิ้งไว้ให้เย็น โดยที่ในขณะที่ย่อยจะทำการเขย่า Flask เป็นครั้งคราว เพื่อให้ตัวอย่างที่ติดอยู่รอบๆ Flask ถูกออกซิไดซิงรีเอเจนต์ย่อยจนสมบูรณ์

1.4 เติมกรดเปอร์คลอริก 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปย่อยต่ออีกครั้ง จนปรากฏไอน้ำเกาะที่บริเวณผิวด้านในของ Flask ทิ้งไว้สักครู่แล้วจึงนำออกมาใส่ช่องดูดควัน แล้วทิ้งไว้ให้เย็น

2. ขั้นตอนการปรับปริมาตร

เทสารละลายที่ได้จากการย่อยลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ทำการล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 3 - 4 ครั้ง แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้เย็น

3. ขั้นตอนการกรอง

นำสารละลายที่ปรับปริมาตรเรียบร้อยแล้วมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 40

4. ขั้นตอนการวัดค่าดูดกลืนแสง

นำสารละลายที่กรองเรียบร้อยแล้วไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ Blank (โดย Blank นั้นทำทุกขั้นเหมือนตัวอย่างแต่ไม่ได้ตัวอย่าง) โดยทำการปรับค่าการดูดกลืนแสงของ Blank ให้เป็นศูนย์ด้วยการ Set Auto Zero

5. ขั้นตอนการคำนวณ

จากวิธีการดังกล่าวสามารถคำนวณหาปริมาณโครมิกซ์ออกไซด์ในตัวอย่างและผลที่ได้จากการทดลอง ดังสมการ

$$\text{ปริมาณโครมิกซ์ออกไซด์ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{A \times EF \times \text{mlAl} \times 1000}{1000 \times W}$$

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

mlAl = ปริมาณของสารละลายที่ได้หลังจากขั้นตอนการปรับปริมาตร

W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ย่อย

EF = $\frac{\text{ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของโครมิกซ์ออกไซด์ระดับต่างๆ จากการทำ standard curve}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสง}}$

หมายเหตุ : (ค่า EF โดยปกติมีค่าอยู่ระหว่าง 389 – 400 มิลลิกรัมต่อลิตร)

วิธีการทดสอบตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อไวรัสฮิวมาตัส โดยวิธีการ Neutralizing Peroxidase Linked Assay (NPLA) มีขั้นตอน และวิธีการดังนี้ (วาสนา, 2543)

ทำการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณลำคอสุกร (Jugular Vein) เก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 10 มิลลิตรต่อตัว ใส่หลอดทดสอบตั้งทิ้งไว้ และนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Centrifuge) ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกส่วนของซีรัมนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนเข้าสู่การวิเคราะห์ขั้นต่อไป

NPLA เป็นวิธี Neutralize ที่ใช้ปริมาณไวรัสคงที่แต่เจือจางซีรัม แล้วเพาะลงในเซลล์เพาะเลี้ยงใช้ Peroxidase เป็น Indicator สามารถอ่านได้ด้วยตาเปล่า

1. อุ่นซีรัมที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

2. เจือจางซีรัมด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (Growth Medium) แบบ 2-fold ในหลุมเพาะเซลล์ชนิด 96 หลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร ทำ 2 แถวต่อ 1 ตัวอย่าง
3. ใส่เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร หลุมละ 100 TCID₅₀ (100 TCID₅₀/50 μ l) เขย่าให้เชื้อไวรัสและซีรัมเข้า กันประมาณ 20 วินาที
4. เติมเซลล์ PK-15 หรือ SK-6 ซึ่งย่อยแล้ว หลุมละ 100 ไมโครลิตร (2×10^5 cells/ml) ทุกหลุม
5. นำเข้า CO₂ Incubator ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 4-5 วัน
6. ดูด Media ทิ้งแล้ว ตรึงเซลล์ด้วย 4% Formaldehyde ใน 0.5 % PBS-Tween-20 ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15-20 นาที
7. ล้าง Plate 3 ครั้ง ด้วย 0.5% PBS-Tween-20
8. เติม Monoclonal แอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์สุกร หลุมละ 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30-60 นาที
9. ล้าง Plate 3 ครั้ง ด้วย 0.5% PBS-Tween-20
10. เติม Anti-mouse HRP Conjugate หลุมละ 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30-60 นาที
11. ล้าง Plate 3 ครั้ง ด้วย 0.5% PBS-Tween-20
12. เติม AEC Substrate หลุมละ 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15-30 นาที
13. ล้างด้วยน้ำเปล่า
14. ตรวจสอบด้วยตาเปล่า เซลล์ที่มีเชื้อไวรัสจะติดสีน้ำตาลแดง ในกรณีสงสัยให้นำไปส่องดูด้วย Microscope

การตรวจวัดการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

การวัดค่า Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARs) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Asakawa and Matsushita (1980) และ Uchiyama and Mihara (1978)

การวัดค่า TBARs เป็นดัชนีวัดการเปลี่ยนแปลงของสี (Colorimetric Method) ที่เกิดจากสารที่เป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน ที่สามารถบ่งบอกถึงคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้

โดยใช้ซีรัมจำนวน 100 μ l ทำปฏิกิริยากับส่วนผสมของ 2.2 % Trichloroacetic Acid (TCA) กับ 0.5 mM EDTA และ 0.8 % Sodium Dodecylsulfate (SDS) จากนั้นให้ทำปฏิกิริยากับ 0.2% Thiobarbituric Acid (TBA) ในน้ำเดือดเป็นเวลา 60 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000 rpm นาน 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสวัดความเข้มข้นของ TBARs โดยใช้ Spectrofluorometer ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร

DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) ดัดแปลงตามวิธีของ Ancerewicz *et al.* (1998) และ Papariello and Janish (1966)

การวัดค่า DPPH เพื่อบ่งบอกถึงความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดย DPPH เป็นโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนอิสระ หากสารใดมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีจะสามารถให้อิเล็กตรอนแก่สาร DPPH ได้มาก ส่งผลให้การวัดค่า DPPH ที่เป็นอิเล็กตรอนอิสระได้ลดลง

อุปกรณ์

เครื่อง Monitor X-band ESR (JEOLRX-2) TE001 cavity. Magnetic field 336.5 mT. ความถี่ 9.4 GHz. กำลัง 1 mW. Amplitude 100 KHz. ความเร็ว 5 mT/min.

วิธีการทดสอบ

ทำกราฟมาตรฐานของ DPPH โดยใช้ 2.5 mM DPPH ใน methanol และเจือจางด้วยน้ำกลั่น ลดสัดส่วนจนได้ความเข้มข้น 0.4 mM จากนั้นนำสารที่มีความเข้มข้นแต่ละหลอดมาวัดในเครื่อง Monitor X-band ESR (JEOLRX-2) TE001 cavity. อ่านค่าที่ได้และนำไปสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาสมการที่ได้ จากนั้นนำซีรุ่มที่จะทดสอบมา 50 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร นำมาอ่านค่าจากเครื่อง Monitor X-band ESR (JEOLRX-2) TE001 cavity. และนำค่าที่ได้ไปคำนวณตามสมการเพื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานของ DPPH

การตรวจวัดปริมาณของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด โดยวิธีการ Strained-slide Method (เกลียว, 2540)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. กระบอกฉีดยาและเข็มฉีดยา
2. แผ่นสไลด์
3. สีย้อม Wright-Giemsa
4. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

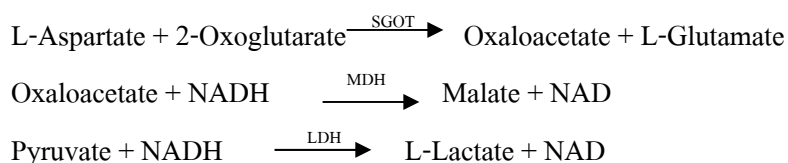
1. ทำการเจาะเลือดของสัตว์ทดลอง
2. หยดเลือดลงบน สไลด์แก้วให้ห่างจากปลายทางขวาประมาณ 0.5-0.8 ซม.
3. วางตัวไธสไลด์ลงบนสไลด์ รอให้เลือดกระจายตามขอบตัวสไลด์ให้ห่างจากขอบแต่ละข้างประมาณ 0.2 ซม. แล้วดันไปข้างหน้าด้วยความเร็วคงที่ เพื่อให้สเมียร์เลือดไม่ติดขอบสไลด์แก้ว สะดวกต่อการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว
4. สเมียร์เลือดบนสไลด์ที่ได้ให้แห้งอย่างรวดเร็ว จากนั้นย้อมด้วยสีย้อม Modified Wright Geimsa ทำการนับจำนวนเม็ดเลือดขาวด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง นับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดออกเป็นเปอร์เซ็นต์

การตรวจวัดเอนไซม์ที่บ่งบอกถึงความผิดปกติของตับ

เอนไซม์ซีรัมแกมมา - กลูตามิกออกซาโลอะซิติก ทรานซามิเนส (Serum Gamma-glutamic oxaloacetic transaminase : SGOT) โดยวิธีการของ International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)(1986)

SGOT เป็นเอนไซม์ที่บ่งบอกถึงความผิดปกติของตับ โดยหากค่านี้มีค่าสูง แสดงว่าเซลล์ตับถูกทำลาย เกิดการอักเสบของตับ หรือเกิดการรั่วของเอนไซม์ออกนอกเซลล์ตับเข้าสู่กระแสเลือด

หลักการทดสอบ เอนไซม์ SGOT จะเป็นตัว Catalyze ปฏิกิริยา Transamination ของ Aspartate กับ Ketoglutarate ให้ Glutamate และ Oxalacetate Dinitrophenylhydrazine จะ form Hydrazones กับ Keto- acids ที่มีอยู่ให้เกิด Oxaloacetate และถูกเปลี่ยนเป็น Malate และ L-Lactate ดังสมการ



วิธีการทดสอบ

นำซีรัมมาเจือจางด้วย Tris Buffer ความเข้มข้น 55 mmol/l จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับสาร reagent ที่เตรียมจาก

2-Oxoglutarate	13.2	mmol/l
L-Aspartate	220	mmol/l
MDA (microbial)	> 600	mmol/l
LDH (microbial)	> 1,000	mmol/l
NADH	> 0.18	mmol/l

โดยเตรียม reagent ที่ pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ที่เวลา 60 วินาที นำค่าที่ได้มาคำนวณตามสมการ

$$\text{Activity in } \mu\text{l} = \Delta \text{ Abs/min.} \times \text{Factor}$$

$$\text{เมื่อ} \quad \text{Factor} = \frac{\text{TV} \times 1,000}{63 \times \text{BV} \times \text{P}}$$

โดย TV = ปริมาตรของสารละลายทั้งหมดของซีรัมที่ทำปฏิกิริยากับ reagent (มิลลิลิตร)

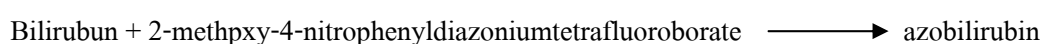
BV = ปริมาตรของซีรัมที่ทดสอบ (มิลลิลิตร)

P = ความสูงของคิวเวท (เซนติเมตร)

บิลิรูบิน (Bilirubin) โดยวิธีการของ Freitag (1987)

บิลิรูบิน คือผลผลิตจากการแตกหรือสลายตัวของเม็ดเลือดแดงในระบบหมุนเวียนโลหิต เป็นค่าที่บ่งบอกถึงความผิดปกติของตับ เนื่องจากตับจะทำหน้าที่ขับบิลิรูบินผ่านทางกระแสเลือด และขับออกทางน้ำดี หากค่านี้สูง แสดงว่าตับถูกทำลาย มีการทำงานผิดปกติ เกิดภาวะโลหิตจาง หรือดีซ่าน

หลักการทดสอบ คือ บิลิรูบินจะทำปฏิกิริยากับสาร diazoniumsalt เป็น azobilirubin ดังสมการ



วิธีการทดสอบ

นำซีรัมมาทำปฏิกิริยากับ diazoniumsalt ปริมาณ 10.4 ไมโครกรัม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 567 นาโนเมตร ที่เวลา 135 วินาที จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณตามสมการ

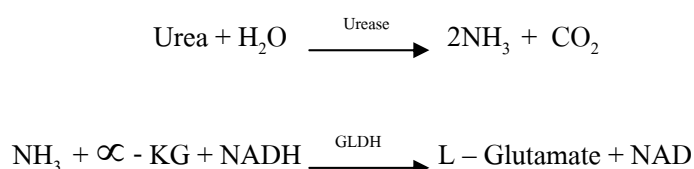
$$Y (\mu\text{mol/l : IU}) = 0.963x + 0.22 \quad (\text{เมื่อ } x \text{ คือค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้})$$

การตรวจวัดเอ็นไซม์ที่บ่งบอกถึงความผิดปกติของไต

BUN reagent (Urea reagent) โดยวิธีการของ Tiffany *et al.*, (1972)

ยูเรียเป็นผลผลิตจากเมตาบอลิซึมของโปรตีน และจะถูกขับออกโดยไต ระดับของยูเรียขึ้นอยู่กับ ปริมาณโปรตีนในอาหาร และสามารถบ่งบอกถึงความผิดปกติของไต การเกิดโรคไต ภาวะหัวใจล้มเหลวและการติดเชื้อโดย

หลักการทดสอบยูเรีย คือ ยูเรียจะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยน้ำเกิดเป็นแอมโมเนียและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นแอมโมเนียจะทำปฏิกิริยากับ α - KG (α - ketoglutarate) และ NADH (nicotinamide adenine dinucleotide) เกิดเป็น L - Glutamate ดังสมการ



วิธีการทดสอบ

นำซีรัมมาทำปฏิกิริยากับ reagent ที่เตรียมจาก

α - ketoglutarate	5.2 mmol/L
NADH	> 0.14 mmol/L
Urease	> 5,600 U/L
GLDH	> 400 U/L
Tris buffer	70 mmol/L

โดยเตรียม reagent ที่ pH 8.5 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาตัดค่าดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตรที่เวลา 30 วินาที (ไม่เกิน 60 วินาที) (A1) และที่ 90 วินาที (A2) และนำค่าที่ได้มาเข้าสมการเทียบกับสารละลายมาตรฐาน (Blank)

$$\text{Urea} = \frac{\Delta \text{ Abs/min of unknown } \times \text{ Calibrator Value}}{\Delta \text{ Abs/min of Calibrator}}$$

เมื่อ $\Delta \text{ Abs/min.} = (A2 - A1)$

$$\text{Calibrator Value} = 14.3 \text{ mmol/L Urea or } 40 \text{ mg/dL BUN}$$

Creatinine (ครีเอทีนีน) โดยวิธีการของ Fabing and Ertinghauson (1971)

เป็นสารที่เกิดจากการกำจัดสารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่ไม่ใช่กรดอะมิโนแต่ได้จากครีเอทีน (Creatine) ในไต โดยครีเอทีนเป็นสารที่พบในกล้ามเนื้อ ซึ่งเกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของพลังงานตามปกติอัตราการสลายของครีเอทีนจากกล้ามเนื้อค่อนข้างช้า ดังนั้น ครีเอทีนที่ถูกปลดปล่อยเข้าสู่กระแสเลือด จึงไม่สามารถบ่งบอกถึงการสลายของกล้ามเนื้อแต่อย่างใด แต่ค่าความเข้มข้นของครีเอทีนในซีรัมจะเป็นตัวบ่งบอกถึงการทำงานของไต โดยค่าความเข้มข้นเฉลี่ยในสัตว์ต่างๆ ไปจะมีความผันแปรระหว่างชนิดและสลายพันธุ์ของสัตว์

วิธีการทดสอบ

นำซีรัมมาทดสอบกับสาร reagent ที่เตรียมจาก

Picric Acid 10 mmol/L

Sodium Hydroxide 260 mmol/L

ที่ pH 13.0 ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

จากนั้นนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตรที่เวลา 60 วินาที (ไม่เกิน 120 วินาที) (A1) และที่ 180 วินาที (A2) นำค่าที่ได้มาเข้าสมการเทียบกับสารละลายมาตรฐาน (Blank)

$$\text{Creatinine} = \frac{\Delta \text{ Abs/min of unknown } \times \text{ Calibrator Value}}{\Delta \text{ Abs/min of Calibrator}}$$

เมื่อ $\Delta \text{ Abs/min.} = (A2 - A1)$

$$\text{Calibrator Value} = 0.44 \text{ mmol/L (5.0 mg/dL)}$$