บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สถานที่และสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลอง ใช้แกะเพศผู้อายุประมาณ 6-12 เดือน จำนวน 5 ตัว น้ำหนักประมาณ 20-40 กก. และทุกตัวได้รับการถ่ายพยาธิด้วยยา Rametin ของบริษัท Bayer และตรวจสุขภาพก่อนเริ่มการทดลอง ตัดขนที่มีดินแห้งติดอยู่ออกให้หมด

กรงเลี้ยงแกะ มีขนาดกว้าง 1 เมตร ยาว 1.5 เมตร สูง 1 เมตร ที่พื้นกรงเป็นซี่ร่องให้อุจจาระและปัสสาวะผ่านลงข้างล่างได้ มีประตูด้านหนึ่ง อีกด้านหนึ่งเป็นช่องเปิดสูงจากพื้นกรงประมาณ 50 ซม. สำหรับแขวนกะบะใส่อาหารและน้ำ ใต้พื้นกรงมีถาดรองปัสสาวะซึ่งมีช่องให้ปัสสาวะไหลลงภาชนะที่รองรับข้างล่าง ส่วนภาชนะที่ใช้รองมูลทำด้วยตาข่ายไนลอนตาถี่วางอยู่บนถาดรองปัสสาวะอีกชั้นหนึ่ง

คอกเลี้ยงแกะ พื้นปูนซีเมนต์มีขนาดกว้าง 2.6 เมตร ยาว 4 เมตร แบ่งเป็น 3 ห้อง 2 ห้องใช้เป็นที่เลี้ยงแกะระยะเริ่มการทดลอง (preliminary period) ในแต่ละคอกมีกะบะใส่อาหารหยาบ เกลือ และถังน้ำ ส่วนคอกที่เหลือใช้เป็นที่เลี้ยงแกะระยะควบคุม (control period) มีกะบะหญ้าสด ถาดใส่อาหารข้น และถังน้ำ

อาหารที่ใช้เลี้ยงแกะ

แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

1. หญ้าขนสด ใช้เลี้ยงแกะระยะควบคุม
   อาหารข้น ประกอบด้วยกากถั่วเหลืองและข้าวโพดป่น ใช้เลี้ยงแกะระยะควบคุมร่วมกับหญ้าขนสด
2. หญ้าแห้ง (จากกรมการสัตว์ทหารบก) ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลองกลุ่มที่ 1
3. ผักตบชวาสด (จากบริเวณที่น้ำขังในกรุงเทพมหานคร) ใช้เลี้ยงแกะทดลองกลุ่มที่ 2

4. ผักตบชวาสดและหญ้าแห้ง ใช้เลี้ยงแกะทดลองกลุ่มที่ 3 ในแต่ละวันให้ผักตบชวาก่อนแล้วจึงให้หญ้าแห้ง

การทดลอง

แกะทดลองทั้ง 5 ตัวจะได้รับเงื่อนไขของการทดลองเหมือนกัน โดยแบ่งสัตว์ทดลองเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ให้สัตว์กินหญ้าแห้ง

กลุ่มที่ 2 ให้กินผักตบชวาสด

กลุ่มที่ 3 ให้กินผักตบชวาสดและหญ้าแห้ง

ก่อนเริ่มการทดลอง แกะจะได้รับการถ่ายพยาธิและตรวจสภาพดูว่าสัตว์ทุกตัวสมบูรณ์ดี กล่าวคือ สัตว์แข็งแรง ขนไม่ร่วง กีบเท้าปกติไม่เป็นแผล การเดินและยืนได้ปกติ เป็นต้น ตัดขนและทำความสะอาดแกะแล้วนำแกะระยะควบคุมเข้ากรงก่อนเริ่มเก็บตัวอย่าง 2-3 วันเพื่อให้แกะเคยชินกรงเสียก่อน ระยะควบคุมให้อาหารแกะด้วยหญ้าสดวันละ 3 กก. อาหารข้น 1 กก. และน้ำใน 24 ชั่วโมง สุ่มอาหารเก็บไว้วิเคราะห์ วันรุ่งขึ้นชั่งน้ำหนักแกะ น้ำหนักหญ้าสด อาหารข้นที่เหลือ มูลและตวงปริมาตรปัสสาวะ สุ่มมูลและปัสสาวะเก็บไว้เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณซีลีเนียม และโปรตีนหยาบต่อไป นำแกะกลับเข้ากรงแล้วเลี้ยงอาหารเหมือนเดิม วันรุ่งขึ้นดำเนินการเหมือนวันแรก เมื่อเก็บตัวอย่างในระยะควบคุม 2 วันสุดท้ายแล้ว เจาะเลือดแกะจากเส้นเลือดดำจูกูลาร์ (jugular vein) เพื่อวัดค่าฮีมาโตคริต (hematocrit) และวิเคราะห์หาปริมาณซีลีเนียมในซีรัมต่อไป

ต่อจากนั้นนำแกะเข้าสู่ระยะเริ่มการทดลอง โดยนำแกะออกจากกรงไปเลี้ยงในคอก เปลี่ยนอาหารเป็นอาหารที่จะใช้ทดลอง คือ กลุ่มที่ 1 ให้หญ้าแห้ง เกลือ และน้ำ กลุ่มที่ 2 ให้ผักตบชวาสด เกลือ และน้ำ กลุ่มที่ 3 เวลาเช้าให้ผักตบชวาสด 1 กก. ตอนบ่ายให้หญ้าแห้ง อาหารทุกอย่างให้อย่างเต็มที่ เลี้ยงแกะในช่วงระยะเริ่มการทดลองเป็นเวลานาน 11 วัน เพื่อให้สัตว์เคยชินกับอาหารที่ทดลอง และเป็นการไล่อาหารเก่าในลำไส้ออกหมด ระยะนี้ไม่ได้เก็บตัวอย่าง เมื่อสิ้นสุดระยะเริ่มการทดลองแล้ว เจาะเลือด และชั่งน้ำหนักแกะแล้วจึงนำแกะเข้าสู่ระยะทดลองต่อไป (experimental period)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 17031035

ระยะทดลองใช้เวลา 5 วัน นำแกะเข้ากรง ให้อาหารเหมือนระยะเริ่มการทดลอง เก็บตัวอย่างและดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับระยะควบคุม เป็นเวลา 5 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองแล้ว ชั่งน้ำหนักแกะเป็นน้ำหนักสุดท้าย และเจาะเลือด

หลังจากนั้นนำแกะออกจากกรงไปเลี้ยงในคอกพักแกะ โดยให้อาหารตามปกติเหมือนระยะควบคุมคือหญ้าสด อาหารข้น และน้ำ เป็นเวลาอย่างน้อย 10 วัน เพื่อให้แกะปรับสภาพเข้าสู่ปกติ และไล่อาหารเก่าในลำไส้ออกให้หมด หลังจากนั้นจึงนำแกะเวียนเข้าสู่การทดลองกลุ่มอื่นต่อไป

อนึ่ง เนื่องจากกรงที่ใช้ทดลองมีจำนวนเพียง 2 กรงเท่านั้น ดังนั้น ในช่วงระยะก่อนการทดลองของสัตว์ชุดแรกได้เตรียมแกะชุดที่ 2 เข้าสู่ระยะควบคุมเพื่อมิให้เป็นการเสียเวลา และเมื่อสิ้นสุดระยะควบคุมของแกะชุดที่ 2 ก็สามารถนำแกะชุดแรกเข้าสู่ระยะทดลองได้ทันที แต่ควรนำแกะเข้าสู่ระยะการทดลอง 2-3 วัน เพื่อให้แกะเคยชินกรงเสียก่อน เวียนสัตว์ทดลองเช่นนี้จนครบทุกตัวและทุกกลุ่มการทดลอง

<u>การบันทึกข้อมูลและเก็บตัวอย่าง</u>

ทำการบันทึกข้อมูลและเก็บตัวอย่างต่าง ๆ ดังนี้

1. บันทึกน้ำหนักอาหารหยาบ อาหารข้น และน้ำ ส่วนที่ให้กินและส่วนที่เหลือทุกวันของระยะควบคุมและระยะทดลอง
2. บันทึกน้ำหนักแกะระยะควบคุม 2 วันสุดท้าย, วันสุดท้ายของระยะเริ่มการทดลองและระยะทดลอง
3. เก็บตัวอย่างอาหารหยาบและอาหารข้น 2 วัน ของระยะควบคุม และ 3 วัน ของระยะทดลอง เพื่อวิเคราะห์ทำปริมาณน้ำหนักแห้งซีลีเนียม และโปรตีนหยาบ
4. บันทึกปริมาณมูลและปัสสาวะที่ขับออกมาทั้งหมด ทุกวันของระยะควบคุมและระยะทดลองเก็บตัวอย่างมูลและปัสสาวะ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักแห้ง ซีลีเนียม และโปรตีนหยาบต่อไป

การเก็บรักษาตัวอย่าง

พืชอาหารหยาบ อาหารข้น และมูลที่สุ่มนำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 °ซ. จนแห้งสนิท แล้วบดด้วยเครื่องบดที่มีตาข่ายขนาด 20 mesh เก็บใส่ขวดเก็บตัวอย่างอาหารไว้ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณซีลีเนียมและโปรตีนหยาบต่อไป

ซีรัม ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 10 มล. เข็มฉีดยาเบอร์ 10 เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำจูกูลาร์ โดยโกนขนบริเวณที่จะเจาะ จับหัวแกะเชิดและบิดเล็กน้อยไปทางด้านตรงข้ามกับบริเวณที่จะเจาะ ดูดเลือดใส่หลอดทดลองที่แช่กรด ล้างและอบแห้งแล้วตั้งหลอดเอียงเล็กน้อยทิ้งไว้ให้เลือดแข็งตัวอย่างน้อย 2 ชั่วโมง นำมาปั่นแยกเม็ดเลือดและซีรัมด้วยเครื่องปั่นแยกโดยใช้ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที นาน 10-15 นาที ดูดเอาซีรัม ชั้นใสข้างบนใส่หลอดพลาสติกโพลิโพไพลีน (Polypopylene) ที่แช่กรด ล้างและอบแห้งแล้ว ปิดฝาให้แน่น เก็บในตู้แช่แข็ง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณซีลีเนียมต่อไป

ปัสสาวะ สุ่มปัสสาวะใส่ขวดโพลิโพไพลีนขนาด 30 มล. เก็บในตู้แช่แข็ง เมื่อจะนำมาวิเคราะห์ให้เอาออกมาตั้งทิ้งไว้ให้ละลายหมดก่อน จึงเขย่าขวดให้ปัสสาวะผสมกันทั่วเสียก่อน แล้วค่อยดูดออกมา ซีรัมก็เช่นกัน

การวิเคราะห์ปริมาณซีลีเนียมและโปรตีนหยาบ

1. วิเคราะห์ปริมาณซีลีเนียมโดยวิธีของ Whetter และ Ullrey (1978) และ Olson และคณะ (1975) ด้วยเครื่อง spectrophotofluorometer
2. วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธีของ Technicon Instrument Corporation ด้วยเครื่อง auto-analyzer

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณซีลีเนียม

เครื่องแก้วที่ใช้ทั้งหมดต้องแช่กรดไนตริก 10% ค้างคืน แล้วนำขึ้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ก่อนนำไปล้างด้วยน้ำที่แยกแร่ธาตุออกแล้ว (deionized water) 1 ครั้ง แล้วอบแห้งในตู้อบเครื่องแก้ว เครื่องแก้วเหล่านี้แยกใช้จากการทดลองอื่น ปิดปากเครื่องแก้วด้วย

แผ่นอะลูมินัมเก็บเข้าตู้เพื่อป้องกันฝุ่น

เตาความร้อน (hot plate) ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ระหว่าง 50 °-400 °ซ. วางไว้ในตู้ควัน (hood)

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ปากแคบ ขนาด 125 มล.

กรวยแยก (separatory funnel) ใช้กรวยแยกรูปลูกแพร์ขนาด 500 มล. พร้อม Teflon stopcock

เครื่องเขย่า (rotating plating shaker) เครื่องเขย่าขวดรูปชมพู่ซึ่งมีที่ยึดจับขวดไว้ ควบคุมความเร็วให้ได้ 140 รอบต่อนาที

spectrophotofluorometer สามารถให้ความยาวคลื่นของ Excitation state ที่ 376 นาโนเมตร และวัดความยาวคลื่นของ Emission ที่ 518 นาโนเมตร ใช้หลอดวัด (cuvett) 2 หลอด ที่เป็นคู่กันตลอดการวัด fluorescence

เครื่องบด (grist mill) เครื่องบดตัวอย่างที่มีตาข่ายแยกขนาด 20

กรดไนตริก ใช้เกรดวิเคราะห์ (analytical grade)

hydroxylamine-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution เตรียมโดยละลาย disodium EDTA dihydrate 9 กรัมในน้ำ 900 มล. แล้วจึงผสมด้วย hydroxylamine hydrochloride 25 กรัม ผสมให้ละลายเข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

cresol red indicator เตรียมโดยละลาย o-cresolsulfonaphthalein 0.05 กรัม ในน้ำกลั่น 1 มล. หยด NH_4OH (1+1) ลงไป 1 หยด แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250 มล.

สารละลายซีลีเนียมมาตรฐาน เตรียมโดยใช้สารละลายซีลีเนียมไนเตรทเจือจางในน้ำที่แยกแร่ธาตุออกแล้ว

2,3-diaminonaphthalene (DAN) solution เตรียมในห้องค่อนข้างมืด หรือใช้ไฟแสงสีเหลือง ชั่ง DAN 5 มล.ต่อตัวอย่าง ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่วางแท่งแม่เหล็กหมุนไว้ (magnetic stirring bar) ละลาย DAN ด้วยกรดไฮโดรคลอริค 0.1 N 5 มล. ต่อตัวอย่าง นำไปวางบนแท่นหมุนด้วยความเร็วสูงสุดนาน 5 นาที จนกระทั่ง DAN ละลายหมด เติม cyclohexane 5 มก.ต่อตัวอย่าง แล้วนำขึ้นแท่นหมุนด้วยความเร็วสูงสุดนาน 5 นาที เพื่อสกัด DAN เทสารละลายในขวดใส่ในกรวยแยกรูปแพร์ ค่อย ๆ ปล่อยให้สารละลายชั้นล่าง (DAN ในกรดไฮโดรคลอริค) ไหลลงสู่ขวดรองรับ ส่วนที่เหลือในกรวยแยกทิ้งไป สารละลาย DAN ที่เตรียมไว้นี้ควรใช้ทันที

ไซโคลเฮกเซน (cyclohexane) ใช้เกรดวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่างก่อนการย่อย

พืชอาหาร และมูล เมื่อจะนำมาวิเคราะห์ให้นำมาอบที่อุณหภูมิ 65 °ซ. อีกครั้งนาน 5 ชั่วโมง เพื่อไล่ความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็นในโถอบแห้ง ตัดกระดาษไขมันขนาด 4 × 4 นิ้วฟุต เพื่อใช้รองตัวอย่างที่จะชั่ง ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม เทใส่ขวดรูปชมพู่ปากแคบขนาด 125 มล. ปิดด้วยกระจกนาฬิกา เพื่อนำไปย่อยด้วยกรดต่อไป

ปัสสาวะและซีรัม เอาออกจากตู้แช่แข็ง ตั้งทิ้งไว้ให้ละลายหมด ปิเปตเขย่าคว่ำขวดหรือหลอดให้ตัวอย่างผสมเข้ากันดีแล้วจึงดูดตัวอย่าง 1 มล. ใส่ขวดรูปชมพู่ปากแคบขนาด 125 มล. สำหรับปัสสาวะควรปิเปตมา 5 มล. แล้วไล่น้ำออกด้วย water bath อุณหภูมิที่ไม่เกิน 70 °ซ. จนเหลือปริมาตรประมาณ 1 มล. จึงนำไปย่อยด้วยกรดต่อไป

วิธีการย่อย (digestion) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณซีลีเนียม

1. ชั่งตัวอย่างพืชอาหารหรือมูล 1 กรัม ถ้าเป็นปัสสาวะหรือซีรัมปิเปตมา 1 มล. ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล. เติมกรดไนตริกเข้มข้นทั้งหมดประมาณ 6-8 มล. ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่าง ถ้าเป็นตัวอย่างที่มีสารอินทรีย์สูง ก็อาจเพิ่มกรดมากขึ้น แต่ถ้ามีสารอินทรีย์น้อยก็ลดปริมาณกรดลง เช่น พืชอาหารและมูลใช้กรดไนตริกทั้งหมด 10 มล. ถ้าเป็นปัสสาวะ

หรือซีรัมใช้ 8 มล. โดยแบ่งการเติมกรดเป็น 2 ครั้ง ครั้งแรกเติมกรดไนตริกเพียงครึ่งหนึ่งของกรดทั้งหมดที่จะเติม คือประมาณ 4-5 มล. ปิดด้วยกระจกนาฬิกา ตั้งทิ้งไว้ในตู้ควันค้างคืน วันรุ่งขึ้นจึงเติมกรดที่เหลือและเติมกรดเปอร์คลอริคเข้มข้นประมาณครึ่งหนึ่งของกรดไนตริกทั้งหมดคือประมาณ 4-5 มล.

2. นำขวดตัวอย่างที่เติมกรดแล้วนี้ไปอุ่นบนเตาความร้อนในตู้ควันด้วยอุณหภูมิประมาณ 50 - 70 °ซ. เพื่อให้ปฏิกิริยาค่อย ๆ เกิดขึ้นไม่รุนแรงเกินไป จนกระทั่งตัวอย่างถูกสลายแล้วจึงเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น แต่อย่าให้แรงเกินไปจนทำให้เกิดฟองเพราะแรงดันอาจไล่ซีลีเนียมออกไปนอกขวดได้ อุณหภูมิที่ใช้ประมาณ 80 - 90 °ซ. ซึ่งเพียงพอที่จะทำให้มีการกลั่นกลับ (reflux) ในขวดได้โดยไม่รุนแรงเกินไป ต้มจนกระทั่งสารละลายใสหรือไม่มีสีต้มไล่กรดไนตริกจนหมด จะสังเกตเห็นควันสีขาวของกรดเปอร์คลอริคเกิดขึ้น จึงยกลงจากเตา

3. หยดกรดไนตริก 1-2 หยด ลงในขวดที่ยกลงแล้ว ดูว่าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ดำ หรือเหลืองหรือไม่ ถ้าเปลี่ยนแสดงว่าสารอินทรีย์ยังถูกย่อยไม่หมด ให้เติมกรดไนตริกอีก 1-2 มล. แล้วยกขึ้นต้มอีกจนสารละลายใสและเกิดควันสีขาว จึงยกลงจากเตาทิ้งไว้ให้เย็น ถ้าสารละลายยังมีสีเหลืองอาจเป็นเพราะแร่ธาตุอื่น ซึ่งจะถูกจับด้วย EDTA

4. เมื่อแน่ใจแล้วว่าสารอินทรีย์ถูกย่อยหมดแล้ว จึงเติมกรดไฮโดรคลอริค ซึ่งมีความเข้มข้น (1 + 9) ลงไป 3 มล.ต่อตัวอย่าง ปิดด้วยกระจกนาฬิกา ยกขึ้นอุ่นอุณหภูมิ 50 °ซ. พอให้มีการกลั่นกลับประมาณ 20 นาที จึงยกลงตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

5. เติมสารละลาย EDTA ลงไป 10 มล.ต่อตัวอย่าง เขย่าขวด เติมสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น (1 + 1) ลงไปประมาณ 1 มล. หยดสารละลายครีซอลเรด 3 หยด เขย่าขวดให้สารละลายเข้ากัน จะเห็นสารละลายในขวดเป็นสีชมพูอมม่วง หยดแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (1 + 1) ทีละหยด ขณะหยดก็แกว่งขวดรอบตัวไปด้วย หยดจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอมส้ม ช่วงนี้ pH ของสารละลายประมาณ 2 ซึ่งเป็น pH ที่ DAN สามารถจับกับซีลีไนท์เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนได้ ถ้าหากหยดแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์มากเกินไปจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ให้หยกกรดไฮโดรคลอริก (1 + 9) ลงไปจนสารละลายเปลี่ยนกลับเป็นสีชมพูอมส้ม

ขั้นตอนต่อไปนี้ให้ทำในห้องค่อนข้างมืดหรือใช้ไฟแสงสีเหลืองก็ได้ และต้องทำต่อเนื่องไม่ควรทิ้งไว้นาน

6. เติมสารละลาย DAN ที่เตรียมไว้ 5 มล.ต่อตัวอย่าง เขย่าขวดแล้วตั้งใน water bath ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 50 °ซ. นาน 30 นาที แล้วจึงยกลงทำให้เย็น

7. เติมไซโคลเฮกเซน 6 มล.ต่อตัวอย่าง ปิดปากขวดด้วยพาราฟิล์มตั้งบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 100-140 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ช่วงนี้สารประกอบเชิงซ้อน Piazoselenol ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่าง DAN กับซีลีไนท์จะถูกสกัดเข้าไปอยู่ในไซโคลเฮกเซน

8. ยกขวดลงจากเครื่องเขย่า แล้วเติมน้ำกลั่นที่แยกแร่ธาตุออกแล้วจนถึงคอขวด ชั้นของไซโคลเฮกเซนจะถูกยกขึ้นที่ปากขวด ง่ายต่อการดูดออก ใช้ pasteur pipette ดูดชั้นไซโคลเฮกเซนใส่หลอดทดลองแก้วขนาด 5 มล. แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง Spectrophotofluorometer ด้วยความยาวคลื่นที่ Excitation 376 นาโนเมตร และ Emission 518 นาโนเมตร

การวิเคราะห์หาปริมาณทุกครั้งต้องทำ blank และสารละลายซีลีเนียมมาตรฐาน 1 ชุด โดยดำเนินขั้นตอนการย่อยเช่นเดียวกับตัวอย่างทุกขั้นเพียงแต่ใน blank และ standard ไม่มีตัวอย่าง สารละลายมาตรฐานควรเตรียมอย่างน้อย 4 ความเข้มข้น

<u>อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนรวม</u> (total nitrogen) ได้แก่

Auto-analyzer (Technicon Instrument Corporation) ใช้วิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนรวม

หลอดทดลองขนาด 75 มล.

เตาความร้อนที่ใช้ย่อยตัวอย่าง (block digestor)

<u>สารละลายที่ใช้ย่อยตัวอย่าง</u> (digestion mixture) ประกอบด้วย

โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) เกรดวิเคราะห์ 250 กรัม

ซีลีเนียมปน 2.5 กรัม

กรดซัลฟูริก (เข้มข้น) เกรดวิเคราะห์ 2,500 มล.

การเตรียม ชั่งโซเดียมซัลเฟต 250 กรัม ซีลีเนียม 2.5 กรัม และกรดซัลฟูริก 2,500 มล. ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 5 ลิตร นำไปวางบนเตาความร้อน ต้มจนเป็นสีขาวใส แล้วยกลงทำให้เย็น

สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ไนโตรเจนรวม

1. potassium sodium tartrate ประกอบด้วย

โปตัสเซียมโซเดียมตาเตรท ($KNaC_4H_4O.4H_2O$) 150 กรัม

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 20% 100 มล.

การเตรียม ละลายโปตัสเซียมโซเดียมตาเตรท 150 กรัมในน้ำกลั่น 400 มล. เขย่าให้ผสมกันทั่ว เติม 20% โซเดียมไฮดรอกไซด์ 100 มล. เขย่าให้เข้ากันแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. alkaline salicylate ประกอบด้วย

โซเดียมซาลิไซเลท (sodium salicylate) 140 กรัม

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (50% โดยน้ำหนัก) 70 มล.

การเตรียม ละลายโซเดียมซาลิไซเลท 140 กรัมในน้ำกลั่น 500 มล. เขย่าให้ผสมกันทั่ว เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 70 มล. และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3. sodium hypochlorite ใช้คลอรอกซ์ (clorox)

สารละลายมาตรฐาน เตรียม stock standard N-4000 มก.ต่อลิตร โดยละลายแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] 18.860 กรัม ด้วยน้ำกลั่นที่ต้มร้อนประมาณ 300 มล. เขย่าให้ละลายจนหมด และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

การเตรียมสารสำหรับเครื่อง auto-analyzer

ปริมาณสารที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 100 ตัวอย่าง ดังนี้

1. คลอรอกซ์ประมาณ 200 มล.
2. โปตัสเซียมโซเดียมตาเตรท 250 มล. เติม brif-35 ประมาณ 0.103 มล. เขย่าให้ผสมกัน
3. อัลคาไลน์ซาลิไซเลท ประมาณ 250 มล.

การย่อยตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนรวม

1. ชั่งตัวอย่างที่แห้งสนิท 0.2 กรัม ลงในหลอดทดลองขนาด 75 มล. ซึ่งปรับปริมาตรไว้ที่ 50 มล. ถ้าเป็นปัสสาวะใช้ปริมาณ 0.5 มล.
2. เติมสารละลายที่ใช้ย่อยลงไป 5 มล. นำไปย่อยใน block digestor ที่ตั้งในตู้ควัน ตั้งอุณหภูมิของเตาย่อยประมาณ 280 °ซ. ต้มไปจนกระทั่งสารละลายมีสีขาวใส ยกลงแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 12 ชั่วโมง
3. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 50 มล. เขย่าให้ผสมกันให้ทั่ว แล้วจึงกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เทใส่ขวดพลาสติกขนาด 100 มล. เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง auto-analyzer โดยวิธีของ Technicon Instrument Corporation

เวลาและสถานที่ที่ทำการทดลอง

ทำการทดลองที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แขวงปทุมวัน เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร ในช่วงระยะเวลาตั้งแต่กลางเดือนพฤศจิกายน 2527 ถึงปลายเดือนกุมภาพันธ์ 2528

การวิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อหาปริมาณซีลีเนียม กระทำที่ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และใช้เครื่อง Fluorometer ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนหยาบกระทำที่สถาบันวิจัยและพัฒนา ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพมหานคร

การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. การวิเคราะห์ผลการทดลอง เพื่อเปรียบเทียบสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของวัตถุแห้ง ซีลีเนียม โปรตีนรวม ระหว่างกลุ่มทดลองที่ให้อาหารต่าง ๆ กัน โดยวิธี upaired t-test
2. การวิเคราะห์ผลการทดลอง เพื่อเปรียบเทียบแกะระยะควบคุมและระยะทดลอง โดยวิธี paired t-test

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย