บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

3.1.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	เกรด	ยี่ห้อ
1.กรดคีโตกลูตาริก (Ketoglutaric acid)	Analytical reagent	Abbott spectrum
2.กรดซัลฟุริกเข้มข้น (Conc.Sulfuric acid)	Analytical reagent	BDH
3.กรดไนตริกเข้มข้น (Conc.Nitric acid)	Analytical reagent	BDH
4.กรดเบนโซอิก (Benzoic acid)	Analytical reagent	Merck
5.กรดพิคริก (Picric acid)	Analytical reagent	Abbott spectrum
6.กรดฟอสฟอริก 85% (85 % Phosphoric acid)	Analytical reagent	BDH
7.กรดฮัยโดรคลอริก (Hydrochroric acid)	Analytical reagent	BDH
8.แคดเมียม ซัลเฟต (Cadmium sulfate)	Analytical reagent	Merck
9.จีแอลดีเอช (GLDH)	Analytical reagent	Abbott spectrum
10.ซิงค์ ซัลเฟต (Zinc sulfate)	Analytical reagent	Merck
11.โซเดียม อะซิเตต (Sodium acetate)	Analytical reagent	Merck
12.โซเดียม เอซายด์ (Sodium azide)	Analytical reagent	Abbott spectrum
13.โซเดียม ฮัยดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)	Analytical reagent	Merck
14.ไดอะเซติล มอนนอกซิม (Diacetyl monoxime)	Analytical reagent	Merck
15.ไธโอเซมิคาร์บาไซด์ (Thiosemicarbazide)	Analytical reagent	Merck
16.น้ำกลั่น	Deionized water	-
17.แบเรียม ฮัยดรอกไซด์ (Barium hydroxide)	Analytical reagent	Merck
18.ปรอท	Analytical reagent	Merck
19.พูไมซ์ สโตน (Pumice stone)	Analytical reagent	BDH
20.โพแทสเซียม ไอโอไดด์ (Potassium iodide)	Analytical reagent	M & B
21.โพแทสเซียม ซัลเฟต (Potassium sulfate)	Analytical reagent	Merck
22. โพแทสเซียม ไดซัลไฟด์ (Potassium disulfide)	Analytical reagent	Merck

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ชื่อสารเคมี	เกรด	ยี่ห้อ
23.เฟอร์ริก คลอไรด์ (Ferric choride.6H_2O)	Analytical reagent	Merck
24.เมธิล เรด (Metyl red)	Analytical reagent	Merck
25.เมอร์คิวริก ออกไซด์ (Mercuric oxide)	Analytical reagent	Merck
26.ยูรีเอส	Analytical reagent	Sigma
27.ยูเรีย	Analytical reagent	Sigma
28.สังกะสี (Zinc granule)	Analytical reagent	Merck
29.สารละลายแป้ง 1 %	Analytical reagent	BDH
30.เอ็นเอดีเอช (NADH)	Analytical reagent	Abbott spectrum
31.แอนฮัยดรัส อีเธอร์ (Anhydrous ether)	Analytical reagent	Merck

3.1.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

ชื่อเครื่องมือ	โมเดล	บริษัท	ประเทศ
1.เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (Autoanalyzer)	Abbott Spectrum CCx	ABBOTT Laboratories Ltd.	อเมริกา
2.เครื่องกลั่นโปรตีน	315	Buchi	สวิสเซอร์แลนด์
3.เครื่องชั่งไฟฟ้า (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)	2842	Sarorius GmBH	เยอรมัน
4.เครื่องเซนตริฟิวส์	Megafuge 1.0	Heraeus	เยอรมัน
5.เครื่องไตเตรท	NW 2.5 mm	Brand	เยอรมัน
6.เครื่องย่อยโปรตีน	12	Buchi	สวิสเซอร์แลนด์
7.เครื่องย่อยเยื่อใย	EV26	Gerhardt	เยอรมัน
8.เครื่องวอร์เทกซ์ (Vortex mixer)	G-560E	Scientific Industries , Inc.	อเมริกา
9.เครื่องสกัดไขมัน	EV1	Gerhardt	เยอรมัน
10.เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)	SP30	Pye Unicam	อังกฤษ
11.ซัคชั่น ปั๊ม (Suction pump)	VDE0530	W.Krannich	เยอรมัน
12.ตู้อบ (Oven)	DEV	Heraeus	เยอรมัน
13.เตาเผา (Muffle furnace)	MR260E	Heraeus	เยอรมัน
14.ถ้วยกระเบื้องเคลือบ	109	Haldenwanger	เยอรมัน

ชื่อเครื่องมือ	โมเดล	บริษัท	ประเทศ
15.โถดูดความชื้น (Desicator)	GL32	Glaswerk wertheim	เยอรมัน
16.ธิมเบิล (Fat extraction thimble)	NO.2800258	Whatman	อังกฤษ
17.บีกเกอร์ขนาด 150 มล.	NO.1000	Pyrex	อเมริกา
18.บีกเกอร์ขนาด 400 มล.	NO.1060	Pyrex	อเมริกา
19.ฟลาสก์ขนาด 500 มล.	NO.26500	Kimax	อเมริกา
20.ฟลาสก์ขนาด 1000 มล.	NO.27060	Kimax	อเมริกา
21.ภาชนะแก้วพร้อมฝาปิด	50/12	Pyrex	อเมริกา
22.ไมโครปิเปต (Micropipet) ขนาด 1,000 ไมโครลิตร	G210035L	Gilson	ฝรั่งเศส
23.วอลูเมทริกซ์ ฟลาสก์ขนาด 100 มล.	NS12/12	SCHOTT	เยอรมัน
24.วอลูเมทริกซ์ ฟลาสก์ขนาด 250 มล.	NS14/23	SCHOTT	เยอรมัน
25.วอลูเมทริกซ์ ฟลาสก์ขนาด 500 มล.	NO.28013	Kimax	อเมริกา
26.วอลูเมทริกซ์ ฟลาสก์ขนาด 1000 มล.	NS24/29	SCHOTT	เยอรมัน
27.หลอดทดลองขนาด 1.2 × 10 ซม.	No.9820	Pyrex	อเมริกา
28.หลอดทดลองขนาด 1.5 × 15 ซม.	No.9820	Pyrex	อเมริกา

3.2 วิธีการวัดยูเรียไนโตรเจนในเลือด และครีเอตินิน

3.2.1 การวัด BUN ด้วยวิธีใช้ปฏิกิริยาไดอะเซติล มอนนอกซิม (Wybenga *et al.*, 1971)

หลักการ :

ไดอะเซติล มอนนอกซิมในกรด ถูกไฮโดรไลส์ เป็นสารประกอบไดอะเซติล ที่ไม่คงตัว แล้วทำปฏิกิริยากับยูเรีย ได้เป็นโครโมเจน ไดเอไซด์ (Chromogen Diazine) โดยไธโอเซมิคาร์บา-ไซด์ และ Fe^{3+} ช่วยทำให้สีเข้มขึ้นเป็นสีแดง

สารเคมี :

1. BUN Color Reagent

ละลายไดอะเซติล มอนนอกซิม 1.25 กรัม ในวอลูเมทริกซ์ ฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร ใส่น้ำกลั่นลงไป 500 มล. เขย่าจนละลายหมด เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

2. BUN Acid Reagent

ละลายแคดเมียม ซัลเฟต 2 กรัม ในน้ำกลั่น 300 มล. และกรดซัลฟูริกเข้มข้นจำนวน 100 มล. ในวอลูเมทริกซ์ ฟลาสก์ ขนาด 1 ลิตร ปล่อยให้เย็นเติมไธโอเซมิคาร์บาไซด์ 0.5 กรัม และ Ferric Chloride reagent 1 มล. เขย่าให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

3. Ferric chloride reagent

ละลายเฟอริก คลอไรด์ (Ferric chloride 6 H_2O) 15 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มล. แล้วเติมกรดฟอสฟอริก 85% จำนวน 300 มล.

4. Stock BUN Standard 1 ก./ดล.

ละลายยูเรีย (ซึ่งอบแห้งแล้วที่ 120 องศาเซลเซียส แล้วปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น) จำนวน 2.1333 กรัม ในกรดเบนโซอิก 1 % ในวอลูเมทริกซ์ ฟลาสก์ 100 มล. แล้วเติมกรดเบนโซอิก 1 % ให้ครบ 100มล.

5. BUN Standard 30, 70, 100, 150 มก./ดล.

เจือจาง Stock standard BUN จำนวน 3 , 7, 10 และ 15 มล. โดยใช้วอลูเมทริกซ์ ฟลาสก์ ขนาด 100 มล. ด้วยกรดเบนโซอิก 1 %

6. ใช้หลอดแก้วขนาด 18 x 150 มล.เตรียม Blank สารละลายมาตรฐาน (Standard) และตัวอย่างที่ต้องการวัด (Unknown) ดังแสดงด้านล่างนี้

วิธีทำ:

	Blank (มล.)	**Standard** (มล.)	**Unknown** (มล.)
น้ำกลั่น	0.05	-	-
BUN standard 30, 70, 100, 150 มก./ดล.	-	0.05	-
Serum	-	-	0.05
BUN color reagent	5.00	5.00	5.00
BUN acid reagent	1.00	1.00	1.00

ผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที ทำให้เย็น โดยแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ 520 nm. ใช้ Blank ตั้งให้เป็น 0

วิธีคำนวณ:

$$\text{ค่า BUN (มก./ดล.)} = \frac{\text{Absorbance unknown}}{\text{Absorbance standard}} \times \text{ความเข้มข้นของ Standard *}$$

<u>หมายเหตุ</u> * คือความเข้มข้นของ Standard ที่ใช้คำนวณจะเป็น 30, 70, 100 หรือ 150 มก./ดล. ค่าใดค่าหนึ่งที่มีค่า ดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับของ Unknown

3.2.2 การวัด BUN ด้วยวิธีใช้ยูรีเอส และ Nesslerization โดยตรง (วีกูล และกนกนาถ , 2525)

หลักการ :

ยูรีเอสจะไฮโดรไลส์ยูเรียในเลือดให้เป็นแอมโมเนีย คาร์บอเนต แล้ววัดแอมโมเนียที่เกิดขึ้น โดยวัดสีที่เกิดจากน้ำยา Nessler's

สารเคมี :

1.สารเคมีในการเตรียม Protein-free filtrate

1.1 แบเรียมฮัยดรอกไซด์ 9.5 มล.

1.2 ซิงซัลค์เฟต 9.5 มล.

2. เอนไซม์ยูรีเอส

เตรียมฟลาสก์ที่ล้างด้วยกรดไนตริกเข้มข้นแล้วล้างด้วยน้ำ ใส่ Permutit 15 กรัม แล้วเติมกรดอะซิติก 2 % จำนวน 200 มล.เขย่าให้เข้ากัน เทน้ำที่อยู่ข้างบนทิ้งไป แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ถึง 3 ครั้ง จากนั้นเติมกรดกำมะถัน 0.5 มิลลิโมล/ลิตร ลงไป 50 มล. เติมถั่วเหลืองสดบดลงไป 30 กรัม (อาจใช้เมล็ดแตงโมแทนถั่วเหลืองซึ่งได้ผลดีพอกัน) เขย่าเบาๆประมาณ 1 ชั่วโมง เติมกลีเซอรอล 100 มล. ผสมให้เข้ากัน กรองด้วยกระดาษกรองก้นจีบ แต่อาจใช้เวลานาน หากกรองด้วยผ้าก๊อซจะเร็วขึ้น

3. น้ำยา Nessler's

เตรียมได้โดยละลายโปแตสเซียมไอโอไดด์ 75 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มล. เติมไอโอดีน 56.5 กรัม ลงไปคนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมโลหะปรอทบริสุทธิ์ 75 กรัม เขย่าให้เข้ากัน (ช่วงนี้จะเกิดความร้อนขึ้นควรแช่ภาชนะในน้ำที่ไหลตลอดเวลา) เขย่าไปเรื่อยๆจนสีจางลงเป็นสีเหลืองอ่อน รินเอาน้ำที่อยู่ตอนบนออกห้ามกรอง แบ่งน้ำยาส่วนหนึ่งมาทดสอบด้วยการหยดสารละลายแป้ง 1 % ลงไป 1 หยด หรือมากกว่าเล็กน้อย ถ้าไม่เกิดสีน้ำเงินแสดงว่าในน้ำยามี Mercurous compound เกินอยู่มากให้เติมน้ำยาไอโอดีน ซึ่งมีส่วนผสมไอโอดีนไอโอไดด์อยู่ จนกระทั่งมีสีฟ้าของไอโอดีนส่วนเกินเล็กน้อย จากนั้นเติมน้ำให้ครบ 500 มล. เก็บไว้ได้นานตลอดไป หากเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

Working solution ของ Nessler's ทำได้โดยตวงน้ำยา Nessler's ข้างต้น 200 มล. เติมลงในน้ำยาโซเดียม ฮัยดรอกไซด์ 10 % ที่เทียบมาตรฐานแล้ว จำนวน 975 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้หลายๆวันจนใส นำน้ำยาส่วนที่ใสมาใช้ และควรป้องกันน้ำยาไม่ให้สัมผัสคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศ

วิธีทำการทดสอบคุณภาพน้ำยา Nessler's ถ้าน้ำยา Nessler's ขุ่น ซึ่งเกิดขึ้นเพราะน้ำยาเป็นด่างมากเกินไปทดสอบได้โดยไตเตรตด้วยกรด HCl 1 N กรดดังกล่าว 20 มล. จะทำปฏิกิริยาเป็นกลางกับน้ำยา Nessler's 11 ถึง 11.5 มล. นั่นคือน้ำยา Nessler's มีความเข้มข้น 1.74 ถึง 1.8 N ต้องไตเตรตน้ำยานี้อย่างน้อยเดือนละครั้ง

4. น้ำยายูเรียมาตรฐาน

ละลายยูเรีย 0.1286 กรัม ในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 200 มล. ความเข้มข้นของน้ำยา 5 มล. มียูเรียไนโตรเจน 1.5 มก.

5. Working standard

ปิเปตน้ำยายูเรียมาตรฐานมา 5 มล. ใส่ลงใน วอลูเมทริกซ์ ฟลาสก์ เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มล. น้ำยานี้ 2 มล. จะมียูเรียไนโตรเจน 0.03 มก.

หมายเหตุ น้ำยามาตรฐานทั้ง 2 ชนิดนี้ (ข้อ 4 และข้อ 5) ต้องเก็บไว้ในตู้เย็น

6. น้ำยาบัฟเฟอร์สำหรับเจือจางน้ำยามาตรฐาน

ละลายโซเดียมอะซิเตต 100 กรัมในน้ำกลั่น แล้วเติมกรดอะซิติก 10 % จำนวน 11 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 500 มล.

วิธีทำ:

ขั้นตอนที่ 1 การทำ Calibration curve จัดตั้งหลอดทดสอบ 6 หลอด แล้วเติมน้ำยาต่างๆ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบ Working standard กับ BUN ที่ความเข้มข้นต่างๆ

หลอดที่	Working standard (มล.)	บัฟเฟอร์ (มล.)	เทียบเท่ายูเรียไนโตรเจนในเลือด (มก./100มล.)
1	1.00	8.80	7.50
2	1.50	8.30	11.25
3	2.00	7.80	15.00
4	2.50	7.30	18.75
5	3.00	6.80	22.50
6	3.50	6.30	26.25

ที่มา : วีกูล และกนกนาถ , 2525

ขั้นตอนที่ 2 การเตรียมตัวอย่างจากเลือด

1. ปิเปตซีรั่ม 1 มล. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มล. แล้วเติมน้ำยายูรีเอส 3 หยดผสมให้เข้ากัน

2. ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที โดยเขย่าเป็นครั้งคราว

3. เติมแบเรียมฮัยดรอกไซด์ 9.5 มล.แล้วเติมซิงค์ซัลเฟต 9.5 มล. ผสมให้เข้ากัน เพื่อเตรียม Protein-free filtrate

4. นำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

5. ใช้ปิเปต ดูดน้ำที่กรองได้ 4 มล. ใส่ในหลอด Colorimeter tube

6. เติมน้ำกลั่น 6 มล. แล้วเติมน้ำยา Nessler's 1 มล.

7. ผสมให้เข้ากันแล้วอ่านค่าดูดกลืนแสง ที่ช่วงคลื่น 500 nm.

8. เติมยูรีเอส 3 หยด ลงไปในหลอดน้ำยามาตราฐานแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 30 นาที หลังจากนั้น เติมน้ำยา Nessler's 1 มล.เขย่าให้เข้ากัน แล้วอ่าน ค่าดูดกลืนแสง ทันทีที่ช่วงคลื่น 500 nm เสร็จแล้วนำค่าไปเขียนกราฟ (ใช้กระดาษกราฟธรรมดา) หาค่าความเข้มข้นตามแกนนอน และค่า ดูดกลืนแสง ตามแกนตั้ง

9. อ่านค่า Unknown โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน

3.2.3 การวัด BUN ด้วยวิธีอัตโนมัติโดยใช้เครื่อง Autoanalyzer Abbott spectrum CCx (CCx Abbott spectrum : Reagent , 1992)

หลักการ :

ยูเรียในตัวอย่างซีรั่ม ถูกย่อยด้วยยูรีเอส เป็นแอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นแอมโมเนียจะทำปฏิกิริยากับ α–Ketoglutarate พร้อมกับการเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ NADH โดยมี Glutamate dehydrogenase (GLDH) ช่วย จะได้ Glutamate และ NAD^+ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 364/652 nm. การเกิดปฏิกิริยาจะเป็นสัดส่วนโดยตรง ต่อปริมาณของแอมโมเนียที่ปลดปล่อยออกมา ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณเริ่มต้นของยูเรียในตัวอย่าง ดังสมการข้างล่าง

$$\text{Urea} + H_2O \xrightarrow{\text{Urease}} 2\,NH_4^+ + CO_2$$

$$NH_4^+ + \text{NADH} + H^+ + \alpha\text{-Ketoglutarate} \xrightarrow{\text{GLDH}} \text{Glutamate} + NAD^+$$

ในทางปฏิบัติได้ใช้สารละลาย Coenzyme และสารละลาย Enzyme/Substrate (Abbott Spectrum) ผสมกันละลายในบัฟเฟอร์ที่มี Enzyme Stabilizer โดยมีความเข้มข้นของสารต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงความเข้มข้นของ Buffers และEnzyme stabilizers

สาร	หน่วย
	mmol/L
Ketoglutaric acid	8.0
NADH	0.7
Sodium azide	0.1%
	U/L
Urease	≥ 85,000
Glutamate dehydrogenase	≥ 25,000

ที่มา : CCx Abbott spectrum : Reagent , 1992

3.2.4 การวัดครีเอตินิน โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ Abbott spectrum CCx (CCx Abbott spectrum : Reagent , 1992)

หลักการ :

เมื่อครีเอตินินทำปฏิกิริยากับอัลคาไลน์พิเครต (Alkaline picrate) จะเกิดสารประกอบที่มีสีดูดกลืนแสงที่ 516 nm.

Creatinine + Alkaline Picrate ⟶ Colored Complex

สารเคมี :

1. Picric acid 0.03 M
2. Sodium hydroxide 0.10 M

Alkaline Buffer (เป็นสารละลายสำเร็จรูปยี่ ห้อ Abbott spectrum reagent ในที่นี้ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นหลัก) ประกอบด้วย Surfactants และองค์ประกอบอื่นที่ไม่รบกวนปฏิกิริยาเพื่อให้กระบวนการวัด ครีเอตินินเกิดประสิทธิภาพสูงสุด

การเตรียมสารละลาย (Abbott sprectrum creatinine reagent) มีขั้นตอนดังนี้ :

1.ค่อยๆเท Alkaline Buffer ออกจาก Vial ใส่ลงใน Vial ของสารละลาย Picrate

2.ปิดฝา Vial แล้วเขย่าเบาๆ ให้เข้ากันได้เป็น Creatinine working reagent

3.เปิดฝาพลาสติกของ Reagent cartridge ออก

4.รินสารละลาย Creatinine working reagent ใส่ลงใน Reagent cratridge แล้วปิดฝา

5.เขียน วัน เวลาของสารละลายที่เตรียมไว้บน Cartridge

6.เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ทำแถบสีแดงไว้เป็นเครื่องหมายสำหรับการเก็บที่อุณหภูมิห้อง) ที่อุณหภูมิ 15 ถึง 30 องศาเซลเซียส สามารถเก็บไว้ได้ 30 วัน เมื่อปิดฝาแน่น และเก็บได้ 14 วัน ถ้าเปิดฝาไว้

3.3 วิธีการใช้เครื่องอัตโนมัติ Abbott spectrum CCx (เกรียงศักดิ์, 2539)

1.ต่อสายท่อน้ำจากก๊อกเพื่อเข้าเครื่อง ใช้ความดันประมาณ 5 ถึง 7 psi

2.เสียบปลั๊กไฟ

3.เติมน้ำปลอดอิออนในขวดพลาสติกใต้ Sample tray ให้ถึงขอบ Reservoir level ปิดฝาขวดให้แน่นอย่าให้อากาศเข้า

4.ตรวจสอบ Probe ทุกอันเข้าที่เรียบร้อยไม่มีอะไรติดค้างเปิดฝาครอบต่างๆ ออกก่อน

5.เปิดสวิทช์ไฟเครื่องจะเริ่มทำงานโดยตรวจสอบระบบการทำงานของคอมพิวเตอร์ Robot และ Photometer รอจนเครื่องหยุดทำงาน น้ำจะไหลเข้ามาใน Incubator ของช่องที่ใส่ Cuvette

6.ใส่ Cuvette ทั้ง 8 ช่องถ้าใส่ไม่หมดอุณหภูมิจะไม่คงที่

7. ดูที่จอภาพถ้ามี ERROR กด HOME ROBOTIC ให้ทำงานใหม่ จนกว่าเครื่องจะ OK ทั้งหมด

8. พิมพ์วันที่, เดือน, ปี และเวลา

9. กด EXIT เพื่อเลื่อนไปที่จอ Main Menu (เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ แสดงดังภาพที่ 19)

ขั้นตอนการทำงาน

1 เตรียมตัวอย่างใส่ Sample cups ประมาณ 300 ถึง 500 ไมโครลิตร (500 ไมโครลิตร ดีที่สุด ถ้ามากไป Sensor จะทำงานได้ไม่ดี)

2.วาง Sample cups ลงในถาดใส่ตัวอย่าง (Sample tray) โดยกำกับหมายเลขตัวอย่างลงบนแผนที่ถาด

3.นำถาดที่ใส่ตัวอย่างเรียบร้อยแล้วใส่ในเครื่อง, ปิดฝาครอบให้ถูกต้อง

4.แตะจอภาพ หรือกดที่ PATIENT SAMPLES

และ SELECT

5.จอภาพจะเปลี่ยนไปที่หน้า PATIENT SAMPLES

พิมพ์ CAR# เช่น CAR#1 (ใช้ได้ 1 ถึง 6)

POS# เช่น POS#/R1 ถึง 48

NAME ชื่อตัวอย่าง หรือ PANEL (กลุ่มทดสอบ (Test) ที่กำหนดไว้)

PID (Patient identification) หรือ H.N.

SID (Sample identification) สำหรับเรียกผลรายที่ต้องการดูโดยเฉพาะ

6.แตะจอภาพตรงรายการที่ต้องการวิเคราะห์ เช่น ครีเอตินิน ถ้าเป็น PANEL ก็พิมพ์แต่โค้ดที่กำหนดของแต่ละ PANEL

7.กด NEXT SAMPLE เพื่อป้อนตัวอย่างเบอร์ต่างๆ เข้าเครื่องจะเห็นมุมล่างซ้ายมือของจอที่มีตัวเลขเคลื่อนที่จากเบอร์หนึ่ง จนถึง เบอร์สุดท้าย

8.กด REVIEW & RUN จอจะเปลี่ยนไปที่

REVIEW & RUN

กด SAMPLE LOADLIST

และ REVIEW จอจะเปลี่ยนไปที่

SAMPLE LOADLIST

เพื่อตรวจสอบดูว่ามี Sample บรรจุในถาดครบตามจำนวน

9.กด Calibrator Loadlist ให้จอเปลี่ยนไปที่

CALIBRATOR LOADLIST

ถ้ามีไฟขึ้นที่ MCC. WATER หรือ Standard ใด ให้วาง MCC หรือ ฯลฯ ที่ช่องด้านในของถาดตามเบอร์ที่บอกไว้เมื่อวางแล้ว แตะจอที่ LOAD NOW เพื่อเปลี่ยนเป็น ON BOARD

10.กด Reagent Loadlist จอจะภาพเปลี่ยนไปที่

REAGENT LOADLIST

ซึ่งจะบอกให้วาง Reagent ไว้ที่ช่องใดของถาดใส่ Reagent เมื่อวางตามช่องแล้ว ให้แตะจอที่ LOAD NOW เพื่อเปลี่ยนเป็น ASSIGNED

11.กด EXIT

12.กด RUN ขณะเครื่องกำลังทำงานในจอภาพด้านบนซ้ายจะปรากฏคำว่า RUNNING หรือ READING

ในขณะที่เครื่องกำลังทำงานอยู่ หากต้องการเพิ่มรายการด่วนให้ดำเนินการตามขั้นตอนต่อไปนี้

1.จากจอภาพ **ABBOTT SPECTRUM (Software version)**

กด PATIENT SAMPLES

กด SELECT

2.จอภาพจะเปลี่ยนเป็น **PATIENT SAMPLES**

กด STAT

กด ชื่อ Test ที่ต้องการ

กด NEXT SAMPLE

3. จอภาพจะเปลี่ยนเป็น **STAT SAMPLE SCREEN**

และบอกตำแหน่งที่จะต้องทำ Sample ไปวาง

ปกติตำแหน่งที่ให้วาง Sample จะเป็นที่วงในของถาด เช่น ตำแหน่งที่ 64

อย่าเพิ่งวางจนกว่า Robotic จะหยุดทำงาน

เมื่อป้อน STAT ครบตามต้องการแล้วให้กด **PROCEED** จอภาพจะเปลี่ยนเป็น **REVIEW& RUN** ถ้ามีรายการด่วนต่อไปให้กด NEXT STAT เพื่อป้อนข้อมูลต่อไป

4.**REVIEW& RUN**

ตรวจสอบน้ำยาที่ใช้โดย

กด REAGENT LOADLIST

กด REVIEW

จอจะปรากฏเป็น **REAGENT LOADLIST**

ซึ่งจะบอกว่าให้ว่าง Reagent ทำอะไร ที่ช่องไหนของถาดใส่ Reagent

โดยจะบอกว่า LOAD NOW

เมื่อวาง Reagent ตามตำแหน่งที่ถูกต้องแล้วใช้มือแตะที่ LOAD NOW เพื่อเปลี่ยนเป็น ASSIGNED ทุกครั้ง

5.กด CALIBRATOR LOADLIST จอจะเปลี่ยนเป็น

CALIBRATOR LOADLIST

ซึ่งจะบอกให้ใส่ MCC หรือ น้ำกลั่น หรือ Standard ที่ช่องไหนของถาดใส่ Sample (วงใน)

โดยมีคำว่า LOAD NOW เมื่อวาง MCC ฯลฯ ตามตำแหน่งที่ถูกต้องแล้ว ก็ใช้นิ้วแตะ LOAD NOW เพื่อเปลี่ยนเป็น ON BOARD

6.กด EXIT จอจะเปลี่ยนเป็น

REVIEW& RUN

พิมพ์เบอร์ Carousel ที่ ENTER SAMPLE CAROUSEL NUMBER

7.รอจน Sample arm robotics หยุดทำงานชั่วขณะที่วาง Sample ตามช่อง No ที่เครื่องกำหนดไว้

8. กด RUN (เมื่อเปลี่ยนถาดใหม่ต้องกด Cuvette change + shift)

การปิดเครื่อง

1.เปลี่ยนจอคอมพิวเตอร์ให้อยู่ที่ Main menu

คือที่ ABBOTT SPECTRUM (Software version)

2.ใช้ผ้าก๊อซ ชุบน้ำกลั่นเช็ด Probes ต่างๆ อย่างระมัดระวัง อาจใช้แอลกอฮอล์ก็ได้

3.ปิดไฟเครื่อง, ดึงปลั๊กออก

4.ปิดน้ำจากก๊อก, ดึงท่อพลาสติกแช่ในถังน้ำ

5.ปลด Cuvettes นำ Samples , Calibrators และ Reagents ต่างๆ ออกให้หมด Reagents ต่างๆ ต้องปิดฝาให้แน่น เก็บในอุณหภูมิห้องหรือตู้เย็นตามที่กำหนดข้างขวด

6.ใช้ลูกยางดูดในช่องใส่ Cuvette ออกให้หมด และใช้ผ้าก๊อซที่สะอาดชุบน้ำกลั่นเช็ดเลนส์ที่วัด ค่าดูดกลืนแสง ให้สะอาด และซับน้ำออกให้แห้ง

7.ปิดฝาครอบ และคลุมเครื่องให้เรียบร้อย

ภาพที่ 19 แสดงเครื่องอัตโนมัติ (Abbott Spectrum CCx) สำหรับวัดค่า BUN และครีเอตินิน

3.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารอาหารในสูตรอาหาร (Proximate analysis)

3.4.1 การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นหรือวัตถุแห้ง(Dry matter) (A.O.A.C. , 1984)

หลักการ :

เมื่อนำตัวอย่างอาหารมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 135 ± 2 องศาเซลเซียส น้ำหนักที่หายไปคือความชื้น

วิธีการ :

1.นำภาชนะเปล่าๆไปอบที่อุณหภูมิ 135 ± 2 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำมาชั่ง

2.ใส่ตัวอย่างอาหารลงในภาชนะที่มีฝาปิด 2 กรัม เขย่าอาหารให้กระจายตัวสม่ำเสมอในภาชนะ เปิดฝาภาชนะออก แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 135 ± 2 องศาเซลเซียส ใช้เวลาอบ 2 ชั่วโมง จากนั้นให้ปิดฝาภาชนะอบให้สนิท

3.นำตัวอย่างออกจากตู้อบ ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักอีกครั้ง

การคำนวณ :

$$\% \text{ วัตถุแห้ง} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างอาหาร หลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างอาหาร ก่อนอบ}} \times 100$$

3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า (Ash) (A.O.A.C. , 1984)

หลักการ :

วัตถุแห้งที่มีในอาหารประกอบด้วยอินทรียวัตถุ และอนินทรียวัตถุ ปริมาณอนินทรียวัตถุหาได้โดยนำตัวอย่างอาหารไปเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส จนกระทั่งคาร์บอนสลายตัวไปหมด กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนที่เหลือจะเป็นอนินทรียวัตถุ หรือเถ้า ซึ่งจะนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุต่อไป โดยคำนวณได้จากผลต่างระหว่างน้ำหนักตัวอย่างกับน้ำหนักเถ้า

วิธีการ :

1.นำถ้วยกระเบื้องเคลือบไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ขณะที่อุณหภูมิของเตาเผายังร้อนอยู่ ห้ามนำถ้วยกระเบื้องออกจากเตาเผา เพราะจะทำให้ถ้วยกระเบื้องแตกได้ ควรทิ้งให้เย็นลง จึงนำมาใส่โถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก

2.ใส่ตัวอย่างอาหารลงไป 2 กรัม

3.นำไปเผาต่อในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักอีกครั้ง

การคำนวณ :

$$\text{น้ำหนักเถ้าเมื่อคิดเป็น \% วัตถุแห้ง} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้า}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเมื่อคิดเป็นวัตถุแห้ง}} \times 100$$

3.4.3 การวิเคราะห์หาโปรตีนรวม (Crude protein) (A.O.A.C. , 1984)

หลักการ :

ปริมาณโปรตีนรวม (Crude protein) ในอาหาร คำนวณได้จากปริมาณไนโตรเจน ในที่นี้วิเคราะห์แบบ Kjeldahl โดยตัวอย่างอาหารจะถูกย่อยด้วยกรดกำมะถันเข้มข้น เมื่อเติมด่างโซเดียมฮัยดรอกไซด์ลงไป แล้วทำการกลั่น แอมโมเนียจะถูกปลดปล่อยออกมา แล้วเก็บด้วยกรดมาตราฐาน นำกรดที่เก็บแอมโมเนียไปไตเตรทด้วยด่างมาตรฐาน จะทำให้ทราบจำนวนกรด และด่างที่ทำปฏิกิริยา ก็จะสามารถคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนได้ โดยคูณด้วย 6.25 จะได้ค่าโปรตีนรวม

สารเคมี :

1. 97 – 98% Conc. H_2SO_4 25 มล.
2. HgO 0.7 กรัม

3. K_2SO_4 15 กรัม

5. 4% K_2S 25 มล.

6. 45% NaOH

7. Zn granules

8. Methyl red indicator 5-7 หยด (ละลาย Me red 1 กรัม ในแอลกอฮอล์ 200มล.)

9. HCl 0.1 N

10. NaOH 0.1 N

วิธีการ:

1.ชั่งตัวอย่างอาหาร 2.2 กรัม ใส่ลงใน Kjeldahl flask เติม HgO 0.7 กรัม โพแทสเซียม ซัล-เฟต 15 กรัม และกรดซัลฟุริกเข้มข้นจำนวน 25 มล. ถ้าตัวอย่างมากกว่า 2.2 กรัม ให้เพิ่มกรดซัลฟุริก 10 มล.ต่อตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น 1 กรัม แล้วเขย่า หรือหมุนหลอดให้กรดซัลฟุริกทำปฏิกิริยากับตัวอย่างอาหาร

2.นำไปตั้งบนเครื่องย่อย ต่อท่อสายยางเชื่อมกับหลอดนำไอกรดเข้ากับเครื่องดูดไอกรด เริ่มต้นใช้ความร้อนต่ำนาน 15 นาที แล้วจึงเร่งไฟให้มีความร้อนสูงขึ้น ทำการต้มสารละลายในหลอดจนใส ประมาณ 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นปิดเครื่อง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

3.เติมน้ำเย็น (อุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส) ลงไปประมาณ 200 มล. ใส่อินดิเคเตอร์ 5 ถึง 7 หยด สารละลายซัลไฟด์ 25 มล. และเม็ดสังกะสีอีกเล็กน้อยเพื่อป้องกันการเดือดรุนแรง

4.นำไปกลั่นโดยใส่ฟลาสก์เข้ากับเครื่องกลั่น Buchi ที่ปลายคอนเดนเซอร์ (Condenser) จุ่มในบีกเกอร์ ที่มีสารละลายกรดกรดมาตราฐาน HCl 0.1 N และอินดิเคเตอร์ 5 ถึง 7 หยด เปิดปุ่มให้ NaOH 45% ไหลลงไปในหลอดในปริมาณเพียงพอที่จะทำให้สารละลายเปลี่ยนเป็นด่าง (อาจรวมสารละลายซัลไฟด์ กับสารละลายโซเดียม ฮัยดรอกไซด์ ก่อนเติมลงฟลาสก์) ดำเนินการกลั่นทันทีจนกระทั่งสารละลายในบีกเกอร์ที่ใส่กรดไว้มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 150 มล. ลดบีกเกอร์ลง ปิดเครื่องกลั่น ชะปลายคอนเดนเซอร์ด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย

5.นำสารละลายในบีกเกอร์ไปไตเตรท ด้วย NaOH เข้มข้น 0.1 N จนเป็นกลาง

การคำนวณ :

%N ในวัตถุแห้ง = [(มล. HCl มาตราฐาน × ความเข้มข้นของ HCl) – (มล NaOH มาตรฐาน × ความเข้มข้นของ NaOH)] × 1.4007 / จำนวนกรัมของตัวอย่าง

% Crude protein ในวัตถุแห้ง = %N × 6.25

3.4.5การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน(Ether extract) (A.O.A.C. , 1984)

หลักการ :

การวิเคราะห์หาปริมาณไขมันโดยประมาณ จากการสกัดด้วยอีเธอร์

สารเคมี :

Anhydrous ether

Pumice stone 2 เม็ด

วิธีการ :

1.ชั่งตัวอย่างอาหาร 2 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรองใส่ลงในธิมเบิล ใส่ลงในหลอดที่ต่อเข้ากับคอนเดนเซอร์

2.ชั่งน้ำหนักขวดก้นกลมที่มีพูไมซ์ สโตนอยู่ 2 เม็ด ซึ่งได้อบในตู้อบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชม.ไว้แล้ว

3.เติมอีเธอร์ลงในขวดก้นกลม ต่อเข้ากับเครื่องกลั่น ดำเนินการกลั่นเป็นเวลา 4 ชม.ที่อัตราการกลั่น 5 ถึง 6 หยด/วินาที หรือ 16 ชม.ที่อัตราการกลั่น 2 ถึง 3 หยด/วินาที

4.ทิ้งให้เย็นลงในโถดูดความชื้น แล้วจึงชั่งน้ำหนัก น้ำหนักของขวดที่เพิ่มขึ้นหลังกลั่นแล้ว คือน้ำหนักของไขมันรวม

การคำนวณ :

$$\text{ไขมันเมื่อคิด\% ของวัตถุแห้ง} = \frac{\text{น้ำหนักไขมัน (กรัม)}}{\text{น้ำหนักวัตถุแห้ง (กรัม)}} \times 100$$

3.4.6 การวิเคราะห์หาปริมาณเยื่อใย(Crude fibre) (A.O.A.C. , 1984)

หลักการ :

ส่วนของตัวอย่างอาหารหลังถูกย่อยด้วย 1.25% H_2SO_4 และ 1.25% NaOH หลังการกรองและการเผา คือ ปริมาณเยื่อใยรวม

สารเคมี :

1. 1.25% H_2SO_4 200 มล.

2. 1.25% NaOH 200 มล.

3. Pumice stone 0.25 - 0.5 กรัม

วิธีการ :

1.ชั่งตัวอย่างอาหาร 2 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 600มล. อย่าให้มีกระดาษปนเปื้อนลงไป

2.ใส่พูไมส์ สโตน 0.25 ถึง 0.5 กรัม แล้วเติมกรดกำมะถัน 1.25% ที่อุ่นไว้ลงไป 200 มล.

3.นำไปต้ม (แบบ Reflux) ด้วยความร้อนขนาดกลาง จนเดือดเป็นเวลา 30 นาที

4.เทตัวอย่างที่ต้มแล้วผ่านกระดาษกรอง ล้างตะกอนให้หมดจากบีกเกอร์ด้วยน้ำร้อน 40 ถึง 50 มล. 4 ครั้ง เทผ่านกระดาษกรอง ระหว่างกรองเปิดซัคชั่น ปั๊มตลอดเวลา กรองต่อจนแห้ง

5.นำส่วนที่เหลือจากการล้างมาใส่ลงในบีกเกอร์ เติมด่าง NaOH 1.25% ที่อุ่นไว้ 200 มล.ลงในบีกเกอร์

6.นำไปต้ม (แบบ Reflux) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำมากรอง

7.ล้างตะกอนด้วยน้ำร้อน 25 ถึง 30 มล. 1 ครั้ง (ใช้เวลากรอง 3 ถึง 5 นาที/ตัวอย่าง) กรองให้แห้ง

8.เทตัวอย่างที่เหลือลงในถ้วยกระเบื้องเคลือบ นำถ้วย + ตัวอย่าง เข้าอบที่ 130 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชม. หรือ ที่ 110 องศาเซลเซียส ตลอดคืน ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก

9.จากนั้นนำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 $\pm$ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชม. ทิ้งไว้ให้เย็นลงในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักอีกครั้ง ห้ามนำถ้วยกระเบื้องออกจากเตาเผาจนกระทั่งอุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 250 องศาเซลเซียส เพราะจะทำให้ภาชนะแตก หากเย็นลงอย่างรวดเร็ว

การคำนวณ :

น้ำหนักเยื่อใย = (ถ้วย + กาก ก่อนเผา) – (ถ้วย + กาก หลังเผา)

$$\%\text{เยื่อใย (เมื่อคิดเป็น\%ของวัตถุแห้ง)} = \frac{\text{น้ำหนักเยื่อใย (กรัม)}}{\text{น้ำหนักวัตถุแห้ง (กรัม)}} \times 100$$

3.5 การศึกษาค่า BUN

ได้แบ่งการศึกษาออกเป็น 4 หัวข้อคือ

3.5.1 การศึกษาผลกระทบของวิธีวิเคราะห์ต่อค่าBUN

3.5.2 การศึกษาผลกระทบของการเจาะเลือดลูกสุกรต่อการเจริญเติบโต

3.5.3 ศึกษาการประเมินคุณภาพสูตรอาหารด้วยการวัดค่า BUN ในลูกสุกร

3.5.4 ศึกษาความสัมพันธ์ของค่า BUN ระหว่างลูกสุกร และหนูพันธุ์สเปรด ดอว์เลย์

3.5.1 การศึกษาผลกระทบของวิธีวิเคราะห์ต่อค่าBUN

วิธีการ:

นำตัวอย่างเลือดจากลูกสุกรหย่านม ที่ได้รับอาหารสูตรเดียวกัน 30 ตัวอย่าง โดยเก็บเลือดหลังจากได้รับอาหารแล้ว 5 ชั่วโมง มาแยกวิเคราะห์ค่า BUN ด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

1.วิธีแบบปกติ โดยใช้ปฏิกิริยาไดอะเซติล มอนนอกซิม (Wybenga *et al.* , 1971 ดังอธิบายในข้อ 3.2.1)

2.วิธีใช้ยูรีเอส(วีกูล และกนกนาถ , 2535 ดังอธิบายในข้อ 3.2.2)

3.วิธีการใช้เครื่องอัตโนมัติ(Abbott Spectrum CCx ; Reagent , 1992 ดังอธิบายในข้อ 3.2.3)

นอกจากนี้ได้วัดระดับครีเอตินินในเลือดจากทุกตัวอย่างด้วยการใช้เครื่องอัตโนมัติ (Abbott Spectrum CCx ; Reagent , 1992 ดังอธิบายในข้อ 3.2.4)

3.5.2 การศึกษาผลกระทบของการเจาะเลือดลูกสุกรต่อการเจริญเติบโต

วิธีการ:

แบ่งลูกสุกรหย่านมคละเพศ อายุ 30 วัน จำนวน 200 ตัว เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ กลุ่มที่ 1 มี 50 ตัว ไม่ได้รับการเจาะเลือด กลุ่มที่ 2 มี 150 ตัว ถูกเจาะเลือดเพื่อนำมาวัดค่า BUN ทั้งหมด โดยลูกสุกรทั้งกลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 จะถูกจัดออกเป็น 5 กลุ่ม ทุกกลุ่มมีน้ำหนักเฉลี่ยใกล้เคียงกัน ให้แต่ละกลุ่มได้รับอาหารในแต่ละสูตร รวม 5 สูตร (ดังแสดงในตารางที่ 6) แล้ววัดอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (ADG) และอัตราแลกเนื้อ (FCR) ของลูกสุกรทุกกลุ่ม

3.5.3 ศึกษาการประเมินคุณภาพสูตรอาหารด้วยการวัดค่า BUN ในลูกสุกร

วิธีการ :

นำลูกสุกรกลุ่มที่ 2 จำนวน 150 ตัว มาทำการวัดค่า BUN เพื่อประเมินคุณภาพสูตรอาหาร 5 สูตร (จากตารางที่ 6) แล้วเปรียบเทียบกับค่า ADG และ FCR

อาหาร :

ลูกสุกรจะได้รับอาหารสำเร็จรูปที่ผลิตเป็นการค้าในท้องตลาดต่างกัน 5 สูตร แสดงดังตารางที่ 6 ให้น้ำ และอาหารเต็มที่ (*Ad libitum*) โดยนำสูตรอาหารที่จะประเมินมาเลี้ยงสุกร ก่อนเก็บตัวอย่างเลือด 7 วัน เพื่อให้สุกรปรับตัวกับอาหาร

ตารางที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบอาหารลูกสุกรหย่านม 5 สูตรที่จำหน่ายในท้องตลาด

ทรีทเมนท์	% DM	% CP	% CF	% EE	% Ash	%NFE
1*	90.49	16.71	2.60	5.02	2.82	63.34
2	91.20	20.43	3.57	6.75	2.80	57.65
3	90.78	21.83	3.63	6.90	2.83	55.59
4	89.57	19.64	3.33	7.50	2.82	56.28
5**	89.23	18.29	3.12	5.65	2.86	59.31

หมายเหตุ * หมายถึง Negative control (เนื่องจากมีโปรตีนต่ำสุด)

** หมายถึง Positive control (เนื่องจากเป็นที่นิยมในท้องตลาด ให้อัตราการเจริญเติบโตสูง)

การเก็บตัวอย่างเลือด :

ทำเก็บตัวอย่างเลือดหลังงดน้ำ และอาหาร 5 ชั่วโมง (Eggum , 1970) ในทุกกลุ่มที่ 1 กลุ่มละ30 ตัว สัปดาห์ละ 1 ครั้ง จนครบ 3 สัปดาห์ ทำการเก็บตัวอย่างเลือดประมาณ 5 มิลลิลิตร จากเส้นเลือดใหญ่ Anterior Venacava (แสดงดังภาพที่ 20) ปั่นแยกซีรั่มออกจากเม็ดเลือดที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นนำไปเก็บไว้ในช่องแช่แข็งของตู้เย็น เพื่อเตรียมไว้สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

ภาพที่ 20 แสดงการเจาะเลือดลูกสุกร

การวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด :

ทำการวัดระดับยูเรีย และครีเอตินินในเลือด ด้วยเครื่องอัตโนมัติ(Abbott Spectrum CCx)

3.5.4 ศึกษาความสัมพันธ์ของค่า BUN ระหว่างลูกสุกร และหนูพันธุ์สเปรก ดอว์เลย์

วิธีการ :

ใช้หนูพันธุ์ สเปรค ดอว์เลย์ จากฟาร์มสัตว์ทดลอง ของภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (แสดงดังภาพที่ 21) จำนวน 450 ตัว แบ่งเป็น 5 ทรีทเมนท์ๆ ละ 90 ตัว สำหรับการเลี้ยงด้วยอาหารของลูกสุกรหย่านม 5 สูตร แบ่งหนูเป็น 3 ช่วงอายุ คืออายุที่ 1 ถึง 2 เดือน 2 ถึง 3 เดือน และ 3 เดือนขึ้นไป ทุกช่วงอายุ มีกลุ่มละ 30 ตัว คละเพศ

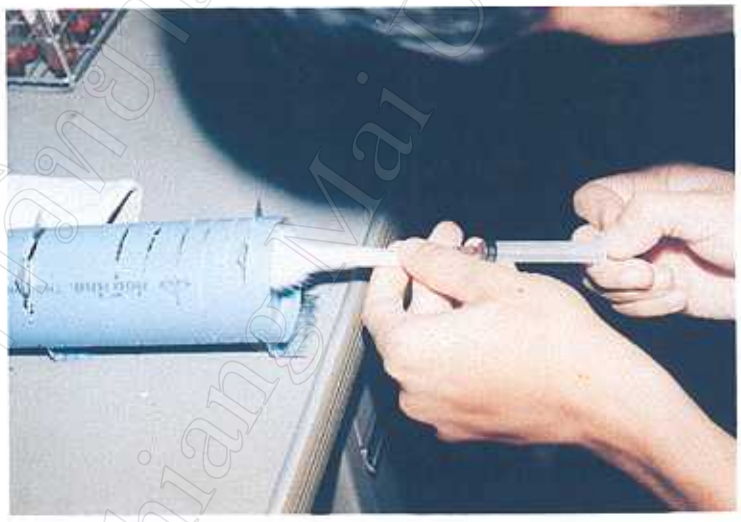
ภาพที่ 21 แสดงสภาพการเลี้ยงหนูในโรงเรือน

อาหาร :

หนูในทุกช่วงอายุจะได้รับอาหารที่มีสูตรเดียวกับลูกสุกรหย่านม สำหรับแต่ละทรีทเมนท์ให้น้ำ และอาหารเต็มที่ (*Ad libitum*) โดยนำสูตรอาหารที่จะประเมินมาเลี้ยงหนู ก่อนเก็บตัวอย่างเลือด 7 วัน เพื่อให้หนูปรับตัวกับอาหารทุกครั้ง

การเก็บตัวอย่างเลือด :

เก็บตัวอย่างเลือดหลังงดน้ำ และอาหาร 5 ชั่วโมง (Eggum , 1970) กลุ่มละ30 ตัว ตัวละ 1 ครั้ง สัปดาห์ละ 1 ครั้ง หลังจากได้รับอาหาร 7, 10, 15, 20, 25 และ 30 วัน หนูที่เก็บตัวอย่างเลือดไปแล้วจะไม่นำมาเจาะเลือดซ้ำอีกโดยเก็บตัวอย่างเลือดประมาณ 1 มิลลิลิตร จากเส้นเลือดที่หาง (แสดงดังภาพที่ 22) แช่ช่องแข็งของตู้เย็นหลังปั่นแยกซีรั่มที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 3 นาที เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป



ภาพที่ 22 แสดงการเจาะเลือดหนู

การวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด :

ทำการวัดระดับยูเรีย และครีเอตินินในเลือดด้วยเครื่องอัตโนมัติ (Abbott Spectrum CCx)

3.6 การทดสอบสมการ

นำค่า BUN ของหนู และลูกสุกรหย่านม ที่เลี้ยงด้วยอาหารชนิดเดียวกันจากข้อ 3.5.3 และ 3.5.4 มาหาความสัมพันธ์ แล้วสร้างสมการประเมินค่า BUN ของลูกสุกรหย่านมจากค่า BUN ของหนูหลังจากนั้นใช้หนูสเปรด ดอว์เลย์ อายุ 2 ถึง 3 เดือน และลูกสุกรหย่านมอย่างละ 10 ตัว เลี้ยงด้วยอาหารชนิดเดียวกันเป็นเวลา 7 วัน วัดค่า BUN และครีเอตินิน ของทั้งหนู และลูกสุกรหย่านม แล้วนำค่า BUN ที่ได้มาทดสอบความแม่นยำของสมการ

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูล โดยหา Mean , S.D. , Correlation และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างทรีทเมนท์ด้วยการทำ F-test และ L.S.D. โดยการใช้โปรแกรม SPSS (ธวัชชัย , 2538)

3.8 สถานที่ทำการทดลอง

1.ฟาร์มสัตว์ทดลอง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2.ฟาร์มสุกร คณะสัตวศาสตร์ วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีเชียงใหม่
3.ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4.ห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.9 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

เริ่มทำการวิจัยตั้งแต่ เดือน มกราคม 2539 และสิ้นสุดการวิจัย เดือนมกราคม 2540