บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubator shaker) รุ่น CA - 94549 Amerex Instruments, USA

2. เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง (digital pH meter) รุ่น PP – 50 บริษัท Metrohm, Switzerland

3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 บริษัท Spectronic Instrument, USA

4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Lambda 25 UV/VIS spctrometer บริษัท PerkinElmer Instrument, USA

5. เครื่องชั่งรุ่น PB 3002 และ AG 204 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland

6. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS – 325 บริษัท Tomy Seico Co., Ltd., Japan

7. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar flow รุ่น V3 – 4 บริษัท Dyer Instruments Inc., USA

8. ตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F 0535 บริษัท Sanyo Electronic Co., Ltd., Japan

9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น TW 20, บริษัท Julabo Labortechnik GMBH, Germany

10. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น 502P – 2 บริษัท PMC, USA

11. เครื่องผสมสาร (vortex) รุ่น VSM – 3 บริษัท Snelton Scientific Inc., USA

12. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) รุ่น KM – 15200 บริษัท Kubota, Japan

13. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan

- หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น RA228J บริษัท Kubota, Japan

14. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CHS บริษัท Olympus, Japan

15. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) บริษัท Mupid-2 Advance, Japan

16. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) รุ่น Schutzart บริษัท Memmert, Germany

17. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ Gel Documentation และโปรแกรม Quantity one version 4.4.1 บริษัท Bio – Rad, USA

18. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P20 P100 P200 P1000 และ P5000 บริษัท Gilson, France

19. แผ่นกรองไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose filter membrane) ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร บริษัท Millipore, USA

20. เครื่อง HPLC ชนิด Photodiode Array Detecter ของ Varian พร้อมด้วย คอลัมน์ Hypersil BDS C18 ของ Thermo Hypersil-Keystone

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. ทริปโตน (tryptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
2. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
3. เปปโตน (peptone) บริษัท Difco Laboratories, USA.
4. ผงสกัดจากเนื้อวัว (beef extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
5. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท E Merck, Germany
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Difco Laboratories, USA
7. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท BDH Chemical, AUS
8. กลีเซอรอล บริษัท Carlo ERBA, Italy
9. Methanol (HPLC grade)
10. Acetonitrile (HPLC grade)

11. Trizma base (tris[hydroxymethyl]aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) บริษัท Sigma, USA

12. EDTA (ethylenediaminetetraacetia acid) ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$) บริษัท Sigma, USA

13. ไมโครกรัม$SO_4.7H_2O$ บริษัท E Merck, Germany

14. $CaCl_2.2H_2O$ บริษัท Carlo ERBA, Italy

15. สารปฏิชีวนะ

- แอมพิซิลิน (ampicillin) บริษัท Sigma, USA
- คลอแรมฟินิคอล (chloramphenicol) บริษัท Sigma, USA
- เตตร้าไซคลิน (tetracycline) บริษัท Sigma, USA
- ฟูราโซลิโดน (ฟูราโซลิโดน) บริษัท Sigma, USA

16. อะกาโรสเจล (agarose gel) บริษัท IUAI, Japan

17. เรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI บริษัท Promega, USA

18 1 kb DNA ladder บริษัท Fermentas, USA

19. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit บริษัท Qiagen, Germany.

3.3 พลาสมิด

พลาสมิดที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 พลาสมิด

พลาสมิด	จีโนไทป์	เอกสารอ้างอิง
pGEM-3Zf (+/-)	Amp^r	บริษัท Promega, USA
pBluescrip-SK (+/-)	Cm^r	บริษัท Promega, USA
pBR322	Amp^r, Tet^r	บริษัท Promega, USA

3.4 การเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย

3.4.1 เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดกรองได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB (ภาคผนวก ก1) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กรณีที่ต้องเติมสารปฏิชีวนะ (ภาคผนวก ข2) เมื่อทำเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 1.5% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง

3.4.2 เลี้ยง *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) หรือ pBluescrip-SK(+/-) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (ภาคผนวก ก3) เมื่อต้องการกระตุ้นการคงอยู่ของพลาสมิดหรือเพื่อการเก็บรักษาเชื้อ และเมื่อต้องการสกัดพลาสมิด โดยเลี้ยงนาน 16-18 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.4.3 เก็บรักษาแบคทีเรียโดยเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดกรองได้ และ *E.coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 ตามลำดับ นำมาผสมกับกลีเซอรอล (ภาคผนวก ข1) ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอลเป็น 3:7 โดยปริมาตร บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน หรือที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี

การดำเนินการวิจัย

3.5.แยกและคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถทนต่อความเข้มข้นยาฟูราโซลิโดน (furazolidone, Fz) ในระดับต่าง ๆ

3.5.1 แยกแบคทีเรียจากธรรมชาติ โดยนำตัวอย่างดินและน้ำจากแหล่งธรรมชาติ 9 แห่ง ได้แก่

- ดินจากก้นบ่อกุ้ง จังหวัดนครปฐม
- ดินจากรอบบ่อกุ้ง จังหวัดนครปฐม
- ดินจากริมทะเล จังหวัดชลบุรี
- ดินจากใต้ต้นไผ่ จังหวัดเชียงใหม่
- ดินจากสนามหญ้า จังหวัดเชียงใหม่
- ดินจากใต้ต้นไม้ จังหวัดเชียงใหม่
- ดินจากภูเขา จังหวัดสระบุรี
- น้ำจากลำคลอง จังหวัดเชียงใหม่
- น้ำจากบ่อกุ้ง จังหวัดชลบุรี

โดยนำมาคัดแยกแบคทีเรียให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยนำตัวอย่างมาทำการทดลองดังนี้

ตัวอย่างน้ำ : เจือจางน้ำตัวอย่างเป็นลำดับ (serial dilution) จนได้ค่าการเจือจางเท่ากับ 10^{-4} แล้วดูดน้ำปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากหลอดทดลองที่มีค่าการเจือจางเท่ากับ 10^{-2} 10^{-3} และ 10^{-4} ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง nutrient agar plate (NA plate) (ภาคผนวก ก2) ที่มี

0.005% cyclohexamide (ภาคผนวก ข8) กระจายให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็งนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

ตัวอย่างดิน : ชั่งดินตัวอย่าง 0.5 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 4.5 มิลลิลิตร (ค่าการเจือจางเท่ากับ 10^{-1}) แล้วทำการเจือจางจนได้ค่าการเจือจางเท่ากับ 10^{-2} 10^{-3} และ 10^{-4} ต่อจากนั้นจึงทำตามขั้นตอนเช่นเดียวกับน้ำตัวอย่าง

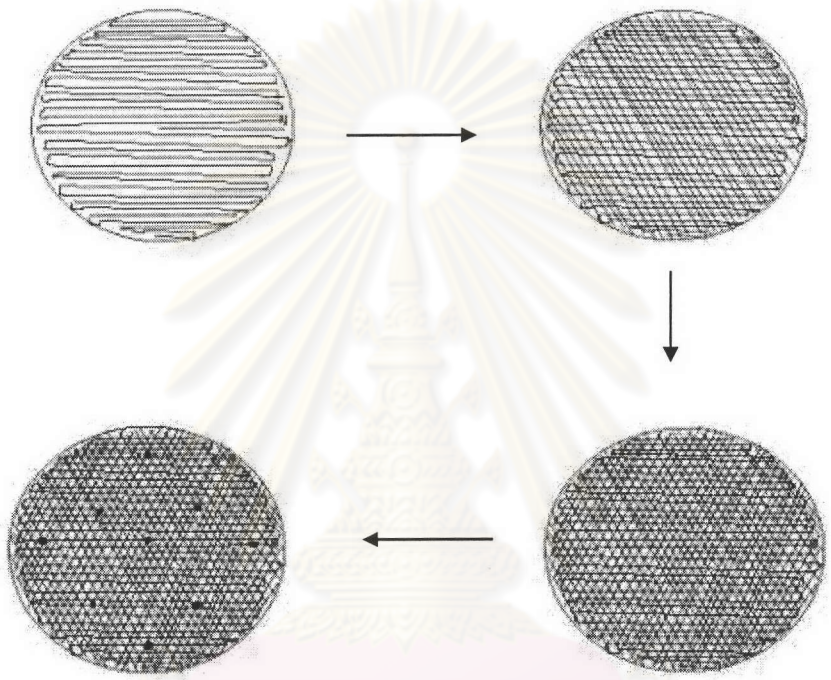
3.5.2 คัดกรองแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 3.5.1 และแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยามาคัดกรองหาแบคทีเรียที่ทนฟูราโซลิโดนที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว nutrient broth (NB) (ภาคผนวก ก1) ที่มี 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) ความเข้มข้น 0.0025% เป็น indicator (Bochner และ Savageau, 1976) ด้วยวิธี tube dilution (Tortora และคณะ, 2001) โดย

นำแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 3.5.1 และแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยามาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับความขุ่นให้มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.15 แล้วจึงปิเปต 100 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มีฟูราโซลิโดนความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข2) ที่มี TTC ความเข้มข้น 0.0025% (ภาคผนวก ข8) แล้วบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาสังเกตสีแดงของ reduced TTC (Formazan)

3.5.3 เลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถทนฟูราโซลิโดนได้ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดมาทดสอบความไวต่อยา ampicillin (Am 10 μg) chloramphenicol (C 30 μg) tetracycline (Te 30 μg) และ สารปฏิชีวนะกลุ่มต่าง ๆ ด้วยวิธี disk diffusion (Prescott และคณะ, 2003)

นำแบคทีเรียที่ทนฟูราโซลิโดนที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง NA บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ใช้ loop แตะโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียมากระจายในสารละลายเกลือ 0.9% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland (ภาคผนวก ข9) ต่อจากนั้นใช้สำลีพันปลายไม้ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงไปแล้วนำมา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Mueller Hinton (MH) (ภาคผนวก ข10) แสดงการ streak ดังรูปที่ 3.1 ต่อจากนั้นวางแผ่นยา Am (10μg) C (30μg) Te (30μg) และ สารปฏิชีวนะอื่นที่ใช้ในการรักษาสัตว์ ได้แก่ nitrofurantoin (300μg) clindamycin (2μg) cephalothin (30μg) ciprofloxacin (5μg) norfloxacin (10μg) sulfamethoxazole รวมกับ

trimethoprim (25μg) penicillin G (10 unit) oxacillin (1μg) piperacillin รวมกับ tazobactan (10μg) novobiocin (5μg) vancomycin (30μg) gentamicin (10μg) streptomycin (10μg) erythromycin (15μg) bacitracin (0.05 unit) และ amikacin (30μg) ลงบน plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำมาอ่านพื้นที่ใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น



รูปที่ 3.1 แสดงการ streak แบคทีเรียเพื่อการทำการทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะโดยวิธี disc sensitivity test (http://cosmos.ucdavis.edu)

3.6. เพิ่มความสามารถในการต้านยาแอมพิซิลิน หรือ เตตร้าไซคลิน หรือ คลอแรมฟินิคอล ในแบคทีเรียที่คัดกรองได้

การเพิ่มความสามารถในการต้านสารปฏิชีวนะ Amp หรือ Cm หรือ Tet ให้แก่แบคทีเรียที่คัดกรองได้จากข้อ 3.5 โดยการถ่ายโอนพลาสมิดที่มีความสามารถต้าน Amp หรือ Cm หรือ Tet เพื่อจะนำแบคทีเรียที่ได้นี้ไปใช้ในชุดตรวจสอบต่อไป

3.6.1 การสกัดพลาสมิด

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *Escherichia coli* DH5α ที่มีพลาสมิด pGEM-3Zf (+/-) ที่มียีนต้าน Amp *Escherichia coli* DH5α ที่มีพลาสมิด pBluescrip SK (+/-) ที่มียีนต้าน Cm และ *Escherichia coli* DH5α ที่มีพลาสมิด pBR322 ที่มียีนต้าน Amp และ Tet บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลอง เขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาสกัดพลาสมิด pGEM-3Zf (+/-) พลาสมิด pBluescrip SK (+/-) และพลาสมิด pBR322 ด้วย QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Germany)

สกัดพลาสมิดตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต โดยเลี้ยง *E.coli* สายพันธุ์ที่มีพลาสมิดที่ต้องการในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปั่นเก็บเซลล์โดยถ่ายใส่หลอดไมโครฟิวจ์ เทน้ำใสทิ้งแล้วแขวนลอยเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดจนกระทั่งของผสมเริ่มหนืดและใสขึ้นภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย N3 350 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมาจนเกิดเป็นตะกอนขาว นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตะกอนตกที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนน้ำใสลงใน QIAprep spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PB 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB 50-100 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที จะได้สารละลายพลาสมิดอยู่ในส่วนใส แล้วเก็บพลาสมิดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

วิเคราะห์ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของพลาสมิดที่สกัดได้โดย นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณค่า A_{260} ต่อ A_{280} ค่าที่เหมาะสมควรจะอยู่ในช่วง 1.8 – 2.0 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง

คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = A_{260} x 50 x dilution factor

3.6.2 การเตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ (competent cell) แบคทีเรียที่คัดกรองได้โดยวิธี Calcium chloride (Sambrook และ Russell, 2001)

เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่คัดกรองได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT (ภาคผนวก ก5) 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อ 700 ไมโครลิตร ไปยังอาหารเลี้ยวเชื้อเหลว 2YT 70 ไมโครลิตร ที่บรรจุใน armed flask ให้มีค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) ประมาณ 0.1-0.15 แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 ชั่วโมง (OD_{600} = 0.3-0.5) ระหว่างช่วงที่รอการเจริญของเชื้อให้ทำการเตรียมสารละลาย ไมโครกรัมSO_4/$CaCl_2$ (เตรียมก่อนใช้และสารละลายทุกชนิดที่ใช้เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ต้องแช่ในอ่างน้ำแข็ง) ดังนี้ ผสมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่เย็น 40 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย $CaCl_2$ 1 โมลาร์ ที่ปลอดเชื้อและเย็น 3.5 มิลลิลิตร ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งให้ได้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลาย ไมโครกรัมSO_4 1 โมลาร์ ที่ปลอดเชื้อและเย็น 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่เย็นเพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำเข็งก่อนจะใช้

เมื่อได้ค่า OD_{600} ตามที่ต้องการแล้วให้ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ปลอดเชื้อ 35 มิลลิลิตร ที่เย็น จำนวน 2 หลอด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง 4000 รอบต่อนาที นาน 6 นาที (ตั้งแต่ขั้นตอนนี้ต้องทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตลอด) เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติมสารละลาย ไมโครกรัมSO_4/$CaCl_2$ ที่เย็น 10.5 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์แต่ละหลอด กระจายตะกอนให้เข้ากันกับสารละลาย ไมโครกรัมSO_4/$CaCl_2$ (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) แช่หลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีตะกอนเซลล์และสารละลาย ไมโครกรัมSO_4/$CaCl_2$ ในอ่างน้ำแข็ง นาน 30-45 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย ไมโครกรัมSO_4/$CaCl_2$ ที่เย็น 3.5 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์แต่ละหลอดอีกครั้ง กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย ไมโครกรัมSO_4/$CaCl_2$ แช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 45 นาที ขึ้นไป แล้วเติมกลีเซลอลปลอดเชื้อ 875 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลอดและผสมให้เข้ากันเบา ๆ สุดท้ายทำการแบ่งใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ปลอดเชื้อที่เย็นประมาณหลอดละ 100 ไมโครลิตร แล้วเก็บคอมพีเทนต์เซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

3.6.3 การถ่ายโอนพลาสมิด pGEM-3Zf (+/-) หรือ พลาสมิด pBluescript SK (+/-) หรือ พลาสมิด pBR322 เข้าสู่แบคทีเรียที่คัดกรองได้โดยวิธี Heat Shock (Sambrook และ Russell, 2001)

ถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรียที่คัดกรองได้โดยทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ยกเว้นช่วงทำ heat shock ดังนี้ นำคอมพีเทนต์เซลล์แบคทีเรียที่คัดกรองได้ที่เก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส มาแช่ในอ่างน้ำแข็งให้ละลายช้า ๆ เมื่อเซลล์ละลายแล้วให้ใส่พลาสมิดลงในคอมพีเทนต์เซลล์ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำแข็งอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที เมื่อครบเวลาให้แช่ลงในอ่างน้ำแข็งทันทีนาน 2 นาที แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดเชื้อ และนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มี Amp 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ Cm 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ Tet + Amp 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3.6.4 การยืนยันผลการถ่ายโอนพลาสมิด (transformation)

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* DH5α ที่มีพลาสมิด pGEM-3Zf (+/-) *E. coli* DH5α ที่มีพลาสมิด pBluescript SK (+/-) *E. coli* DH5α ที่มี พลาสมิด pBR322 แบคทีเรียที่คัดกรองได้ แบคทีเรียที่คัดกรองได้ที่ถ่ายโอนพลาสมิด pGEM-3Zf (+/-) แบคทีเรียที่คัดกรองได้ที่ถ่ายโอนพลาสมิด pBluescript SK (+/-) และแบคทีเรียที่คัดกรองได้ที่ถ่ายโอนพลาสมิด pBR322 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB แล้วทำการสกัดพลาสมิดตามวิธีในข้อ 3.6.1 แล้วนำพลาสมิดที่ได้จาก *E. coli* DH5α ที่มีพลาสมิด pGEM-3Zf (+/-) *E. coli* DH5α ที่มีพลาสมิด pBluescript SK (+/-) *E. coli* DH5α ที่มีพลาสมิด pBR322 และ transformant bacteria ที่ถ่ายโอนพลาสมิด pGEM-3Zf (+/-) หรือ พลาสมิด pBluescript SK (+/-) หรือ พลาสมิด pBR322 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI (ตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยใช้บัฟเฟอร์และอุณหภูมิที่เหมาะสมกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ ตามที่ระบุไว้โดยบริษัทผู้ผลิต) แล้วนำพลาสมิดที่ได้มาทำเจลอิเลคโตรโฟริซิส (gel electrophoresis)

จากขั้นตอนนี้จะได้แบคทีเรียที่สามารถทน Fz, Fz และ Amp, Fz และ Cm, Fz และ Tet+Amp

3.7. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแบคทีเรียกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

3.7.1 ทำการทดลองหากราฟแสดงอัตราการเจริญ (growth curve) ของแบคทีเรียที่คัดกรองได้

3.7.2 นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่คัดกรองได้จากข้อที่ 3.4 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB 5 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นานเท่ากับช่วง late log phase ของแบคทีเรียนั้น จากข้อมูลในข้อ 3.7.1 เมื่อครบเวลานำแบคทีเรียที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเหลวนั้นมาทำการเจือจางเป็นสองเท่า (two fold serial dilution) ดังนี้ 1:2, 1:4 1:8 1:16 1:32 และ 1:64 และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของแต่ละค่าการเจือจาง จากนั้นนำแต่ละค่าการเจือจางไปทำการเจือจางต่อแบบ 10 เท่า (ten fold serial dilution) ดังนี้ 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} และ 10^{-6} แล้วปิเปตมา 100 มิลลิลิตร มากระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA ที่มีสาร Fz ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียของแต่ละค่าความเจือจางเพื่อคำนวณหาค่า CFU/มิลลิลิตร

3.7.3 สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร กับปริมาณแบคทีเรีย (CFU/มิลลิลิตร) ที่นับได้

3.8 การหาจุดสมมูลระหว่างจำนวนแบคทีเรียกับฟูราโซลิโดนความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.8.1 นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่คัดกรองได้จากข้อที่ 3.6 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB 5 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นานเท่ากับช่วง late log phase ของแบคทีเรียนั้น (จากข้อมูลในข้อ 3.7.1) จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วนำไปหาปริมาณแบคทีเรีย (CFU/มิลลิลิตร) จากกราฟที่ได้จากข้อ 3.7.3

3.8.2 ปรับปริมาณแบคทีเรียให้มีความเข้มข้น 10^9 CFU/มิลลิลิตร แล้วเจือจางให้ปริมาณแบคทีเรียลดลงทีละ 10 เท่า โดยทำการเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB และจะได้ความเข้มข้นแบคทีเรียดังนี้ 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 และ 10^1 CFU/มิลลิลิตร ใน NB 4.5 มิลลิลิตร แล้วเติมฟูราโซลิโดนให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง เติม TTC ความเข้มข้น 0.025% 0.5 มิลลิลิตร (เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้การมีชีวิตของแบคทีเรีย) บ่มต่อจนครบ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาสังเกตหลอดทดลองแรกที่ไม่มีสีแดงของ formazan ซึ่งเป็นหลอดที่แสดงว่าฟูราโซลิโดนที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถฆ่าแบคทีเรียจำนวนนั้นได้ และเลือกใช้ปริมาณแบคทีเรียที่ไม่สามารถมองเห็นสารสีแดงของ formazan หลอดแรก หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง มาทำการทดลองต่อไป

3.8.3 หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะ Amp Cm และ Tet ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือก (MIC, Minimum Inhibitory Concentration) ที่มี พลาสมิด pGEM-3Zf พลาสมิด pBluescript SK และ พลาสมิด pBR322 ตามลำดับ โดยปรับแบคทีเรียทั้งสามชนิดให้มีความเข้มข้น 1.11x 10^6 CFU/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารปฏิชีวนะ Amp Cm และ Tet ตามลำดับ ลงไปโดยให้มีความเข้มสุดท้ายเท่ากับ 0 16 32 64 128 256 และ 512 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง แล้วอ่านผลการทดลอง

3.9 การประเมินการเจริญของแบคทีเรียในสารมาตรฐานฟูราโซลิโดน แอมพิซิลิน เตตร้าไซคลิน และคลอแรมฟีนิคอล (kit evaluation)

เตรียมสารปฏิชีวนะต่าง ๆ ดังนี้

3.9.1 สารละลายมาตรฐาน Fz สำหรับใช้ในการทดสอบกับแบคทีเรีย

- stock standard solution Fz ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งฟูราโซลิโดน 0.003 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร และทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาใช้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน

- working standard solution Fz ความเข้มข้น 0.375, 0.75, 1.125, 1.5, 2.25, และ 3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในการเตรียมสารละลาย Fz ความเข้มข้นดังกล่าวจะใช้สูตรการคำนวณ

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

โดยกำหนดให้

C_1 = ความเข้มข้นของ stock Fz 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

C_2 = ความเข้มข้นของ working Fz ต่าง ๆ ที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของ stock Fz ที่ต้องใช้ในการเตรียม working Fz ต่าง ๆ

V_2 = ปริมาตรของ working Fz ที่ต้องการเตรียม (ปริมาตรสารละลาย Fz ทั้งหมดที่ต้องใช้ในการทดสอบ)

3.9.2 สารละลายมาตรฐาน Amp สำหรับใช้ในการทดสอบกับแบคทีเรีย

- stock standard solution Amp ความเข้มข้น 50,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งสาร Amp 1.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 20 มิลลิลิตร และทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาใช้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน

- working standard solution Amp ความเข้มข้น 375, 750, 1,125 และ 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในการเตรียมสารละลาย Amp ความเข้มข้นดังกล่าวจะใช้สูตรการคำนวณเช่นเดียวกับการคำนวณเตรียม working standard solution Fz

3.9.3 สารละลายมาตรฐาน Cm สำหรับใช้ในการทดสอบกับแบคทีเรีย

- stock standard solution Cm ความเข้มข้น 25,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งสาร Cm 0.5 กรัม ละลายใน absolute ethanol 20 มิลลิลิตร และทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาใช้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน

- working standard solution Cm ความเข้มข้น 187.5, 375, 562.5 และ 750 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในการเตรียมสารละลาย Cm ความเข้มข้นดังกล่าวจะใช้สูตรการคำนวณเช่นเดียวกับการคำนวณเตรียม working standard solution Fz

3.9.4 สารละลายมาตรฐาน Tet สำหรับใช้ในการทดสอบกับแบคทีเรีย

- stock standard solution Tet ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งสาร Tet 0.2 กรัม ละลายใน absolute ethanol 20 มิลลิลิตร และทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาใช้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน

- working standard solution Tet ความเข้มข้น 375, 750, 1,125 และ 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในการเตรียมสารละลาย Tet ความเข้มข้นดังกล่าวจะใช้สูตรการคำนวณเช่นเดียวกับการคำนวณเตรียม working standard solution Fz

ส่งสารมาตรฐาน stock standard solution ของ Fz Amp Cm และ Tet ที่เตรียมในข้อ 3.9.1 – 3.9.4 ไปวิเคราะห์ยืนยันความเข้มข้นด้วย HPLC ที่สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุ-สัตว์ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์

3.9.5 นำแบคทีเรียที่คัดกรองได้จากข้อ 3.5 มีคุณสมบัติตามข้อ 3.6 ความเข้มข้นของ TTC อุณหภูมิ และเวลา ที่เหมาะสมมาทดสอบกับสารมาตรฐานในข้อ 3.9.1 – 3.9.4 ทำการทดลองในปริมาตรสุทธิ 5 มิลลิลิตร

เตรียมสารปฏิชีวนะความเข้มข้น และปริมาตรต่าง ๆ ตามตารางในภาคผนวก จ โดยปริมาตรรวมของสารปฏิชีวนะที่ใส่เท่ากับ 0.6 มิลลิลิตร แล้วใส่แบคทีเรียที่เตรียมให้มีปริมาณที่เหมาะสมลงในหลอดทดลองที่มีสารปฏิชีวนะตามตารางในภาคผนวก จ ปริมาตร 3.9 มิลลิลิตร โดยมีปริมาตรรวมเท่ากับ 4.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำหลอดทดลองทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม TTC ความเข้มข้นสุดท้าย 0.0025% แล้วบ่มต่อจนครบเวลา 24 ชั่วโมง (ให้ผลเกิดสีแดงของ formazan ชัดเจน) (Bochner และ Savageau, 1976) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

ค่าควบคุมผลบวก (positive control) คือ แบคทีเรียที่คัดกรองได้ปริมาณที่เหมาะสม 3.9 มิลลิลิตร ร่วมกับสารละลาย Fz ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 0.6

มิลลิลิตร และค่าควบคุมผลลบ (negative control) คือ แบคทีเรียที่คัดกรองได้ปริมาณที่เหมาะสม 3.9 มิลลิลิตร ร่วมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 0.6 มิลลิลิตร

3.10 การทดสอบการตรวจหาฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์

3.10. ศึกษาเปอร์เซ็นการดูดซับฟูราโซลิโดนของอาหารสัตว์

ชั่งอาหารไก่และอาหารกุ้งชนิดละ 1 กรัม ลงในหลอดทดลองทำให้ปลอดเชื้อแล้ว เติม stock standard solution Fz ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนาน 15 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้นาน 5 นาที นำส่วนน้ำใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร กรองด้วยแผ่นกรองไนโตรเซลลูโลสขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วส่งวิเคราะห์ปริมาณสารที่เหลือที่กรมปศุสัตว์ พร้อมกับ stock standard solution Fz ที่ใช้

เมื่อทราบความเข้มข้นของฟูราโซลิโดนที่เหลือหลังจากถูกดูดซับด้วยอาหารสัตว์ จะนำมาทดสอบกับแบคทีเรีย CK ทดสอบตามวิธีการต่อไปนี้

การเตรียมฟูราโซลิโดนที่เหลือจากการดูดซับด้วยอาหารสัตว์

ชั่งอาหารไก่และอาหารกุ้งชนิดละ 1 กรัม ลงในหลอดทดลองทำให้ปลอดเชื้อแล้ว เติม stock standard solution Fz ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนาน 15 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้นาน 5 นาที น้ำใสทั้งหมดกรองด้วยแผ่นกรองไนโตร-เซลลูโลสขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วปิเปตสารละลายที่ได้ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองปลอดเชื้อที่มีผงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB เขย่าให้ละลายแล้วกรองผ่านแผ่นกรองไนโตรเซลลูโลสขนาด 0.45 ไมโครเมตร จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ที่มีฟูราโซลิโดนความเข้มข้นที่เหลือจากการดูดซับจากอาหารสัตว์ดังที่ได้จากการวิเคราะห์จากกรมปศุสัตว์ และนำมาเตรียมให้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ที่มีฟูราโซลิโดนความเข้มข้น 0.5 0.1 0.05 และ 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

เตรียมแบคทีเรีย CK CK-pGEM CK-pBR322 และ CK-pBC จำนวน 10^6 CFU/มิลลิลิตร ปิเปตแบคทีเรียทดสอบที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในไมโครฟิวจ์ปั่นด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวออกให้หมด

ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ที่มีฟูราโซลิโดนที่เตรียมไว้ข้างต้นปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร ลงในไมโครฟิวจ์ที่มีแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิด ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง แล้วจึงเติม 0.025% TTC ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มต่อจนครบเวลา 24 ชั่วโมง อ่านสีแดงของ formazan ที่เกิดขึ้น และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.11 ศึกษาปัจจัยแสงที่มีผลต่อการสลายตัวของฟูราโซลิโดน

เตรียมสารละลายมาตรฐานฟูราโซลิโดน โดยใช้น้ำปลอดประจุเป็นตัวทำละลายและปรับปริมาตรความเข้มข้นของฟูราโซลิโดนให้ได้ 5 10 15 20 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณฟูราโซลิโดนด้วย HPLC ที่ 365 นาโนเมตร โดยใช้คอลัมน์ Hypersil BDS C18 ใช้โมบายล์เฟส Methanol : H_2O : Acetronitrile (15:70:15) อัตราการไหล 1.1 มิลลิลิตรต่อนาที และปริมาตรที่ฉีดเข้า HPLC เท่ากับ 20 ไมโครกรัม (วัชรพรรณ โล่ทองคำ, 2547) แล้วนำผลที่ได้มาเขียนกราฟระหว่าง Peak area กับ ความเข้มข้นของฟูราโซลิโดน และหาค่า Linear regression

นำ stock standard solution Fz ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แบ่งใส่ขวดขนาดเล็กจำนวน 5 ขวด ขวดที่ 1 นำไปตั้งไว้ในตู้เขี่ยเชื้อเหมือนสภาวะที่ใช้ในการทำการทดลอง ขวดที่ 2 และ 3 นำไปตั้งภายใต้แสงนีออนนาน 30 นาที และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ ขวดที่ 4 และ 5 นำไปตั้งภายใต้แสงอาทิตย์นาน 30 นาที และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากนั้นนำทั้ง 5 ขวดมาวิเคราะห์หาปริมาณฟูราโซลิโดนด้วย HPLC แล้วนำผลที่ได้ไปเทียบหาความเข้มข้นของฟูราโซลิโดนกับกราฟมาตรฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย