บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิเคราะห์หาปริมาณฮีแมกกลูตินินในพืชผักและผลไม้ ใช้วิธี Agglutination ซึ่งดัดแปลงวิธีการของ Chen และคณะ (1977) นั้นต้องใช้อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. <u>อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์</u> มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1.1 Electric Analytical Balance H 311 (Mettler Instrument AG, Switzerland)

1.2 Centrifuge GS 100 (Clements, Australia)

1.3 Wrist-Action Shaker (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, USA.)

1.4 Blender ใช้ 3 ชนิด คือ

1.4.1 Tank & kunkel blender (Kika-werk, Germany)

1.4.2 Blender Mill 2 (Moulinex, France)

1.4.3 National (Matsushita Electric, Japan)

1.5 pH meter pH M 64 (Radio meter, Denmark)

1.6 Water Bath (Herreus, Germany)

1.7 Autoclave-Prestig, England

1.8 Hot air oven (Nicht-drechen, Germany)

1.9 Microtitration multi-well plate (Linbro/Teterlek, USA.)

1.10 Pasteur pipets (Kemble, USA.)

1.11 Micro-Selectapette (Clay Adams, Canada)

1.12 Micro-Selectapette pipette tips (Clay Adams, Canada)

1.13 Stir plate (Nuova, USA.)

1.14 Freeze dryer (Thermovac Industries Corp., Canada)

1.15 Votrex Mixer MA-1 (Torika Corp., Japan)

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.1 Standard Lectin (Sigma Chemical Company, USA.)

2.2 Standard Buffer pH 4.01 (Radio meter, Copenhagen, Denmark)

2.3 Standard Buffer pH 7.00 (Radio meter, Copenhagen, Denmark)

2.4 Trypsin (E. Merck, Germany)

2.5 Sodium Chloride AR Grade (E. Merck, Germany)

2.6 Di-Sodium Phosphate AR Grade (BDH, England)

2.7 Mono-Sodium Phosphate AR Grade (Carlo Erba, Italy)

2.8 Glucose Monohydrate AR Grade (Riedel-De Haen, Germany)

2.9 Citric Acid AR Grade (BDH, England)

2.10 Tri-Sodium Citrate AR Grade (BDH, England)

2.11 เลือดคนไทยหมู่โอ (Group O) จากสภากาชาดไทย กรุงเทพมหานคร

3. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์มีหลายชนิดดังนี้

3.1 Alsever's solution ซึ่งประกอบด้วยสารเคมีต่าง ๆ คือ

Glucose	2.05	กรัม
Tri-Sodium Citrate	0.8	กรัม
Mono Sodium Phosphate	0.055	กรัม
Sodium Chloride	0.42	กรัม

ละลายสารเคมีดังกล่าวข้างต้นในน้ำทำให้เป็น 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.1 โดยใช้ 10% (W/V) Citric acid นำสารละลายที่ได้ไป sterile ที่ความดัน 15 ปอนด์ นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

3.2 M/15 Sodium acid phosphate

ละลาย Mono Sodium phosphate 9.2 กรัมในน้ำ ทำให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

3.3 M/15 Di-Sodium phosphate

ละลาย Di-Sodium phosphate 9.5 กรัมในน้ำ ทำให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

3.4 Phosphate Buffered Saline pH 6.8

ตวงสารละลาย M/15 Sodium acid phosphate 500 มิลลิลิตร และสารละลาย M/15 Di-Sodium phosphate 500 มิลลิลิตรผสมกัน เติม Sodium chloride 4.8 กรัมคนให้เข้ากัน นำไปปรับ pH โดยใช้ pH meter ซึ่งได้ปรับค่า pH ไว้แล้วโดยใช้ Standard Buffer pH 4.01 และ pH 7.00 ถ้า pH ไม่ถึง 6.8 ให้เติม M/15 Di-Sodium phosphate ทีละหยดจนกว่าจะได้ pH 6.8 ถ้า pH เกิน 6.8 ให้เติม M/15 Sodium acid phosphate ทีละหยดจนกว่าจะได้ pH 6.8

3.5 Phosphate Buffered Saline pH 7.2

ตวงสารละลาย M/15 Sodium acid phosphate 300 มิลลิลิตร และสารละลาย M/15 Di-Sodium phosphate 700 มิลลิลิตรผสมกัน เติม Sodium chloride 4.5 กรัมคนให้เข้ากันนำไปปรับ pH ให้เป็น pH 7.2 โดยใช้ pH meter เช่นเดียวกับข้อ 3.4

3.6 0.9% Sodium Chloride Solution

ละลาย Sodium Chloride 9 กรัมในน้ำ ทำให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

3.7 0.1% Trypsin

ละลาย Trypsin 100 มิลลิกรัมในน้ำ 90 มิลลิลิตร ใส่ beaker นำไปทำให้ละลายด้วย Magnetic stirer ประมาณครึ่งชั่วโมง ถ่ายสารละลายใส่ขวด volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร

ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัยแบ่งออกเป็น 6 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้คือ

1. การเก็บตัวอย่าง
2. การเตรียมตัวอย่าง
3. การสกัดโปรตีน
4. การเตรียม 4% Red Blood Cell Suspension
5. การวิเคราะห์หาปริมาณฮีแมกกลูตินิน
6. การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นในตัวอย่าง

แต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดในการดำเนินการวิจัยดังต่อไปนี้

1. การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการวิจัยนี้ ได้มาจากตลาดใหญ่ ๆ ในกรุงเทพมหานคร เช่น ตลาดเทเวศน์ ตลาดคลองเตย ตลาดศรีย่าน ตลาดสามย่าน ตลาดราชวัตร ตลาดบางกะปิ และตลาดแฮปปี้แลนด์ ฯลฯ และจากต่างจังหวัด เช่น จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน ตาก ราชบุรี สระบุรี สงขลา ยะลา ภูเก็ต นครราชสีมา เป็นต้น

ตัวอย่างอาหารที่ใช้แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทคือ

1.1 ถั่วเมล็ดแห้ง บรรจุใส่ถุงพลาสติคจำพวก Polyester ปิดสนิท เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 15 ถึง 20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์หาปริมาณฮีแมกกลูตินิน และความชื้นในภายหลัง

1.2 ผักสด ผลไม้ และเมล็ดผลไม้สด จะต้องทำการวิเคราะห์หาปริมาณฮีแมกกลูตินินและความชื้นในทันทีที่ได้มา โดยจะต้องให้แล้วเสร็จภายในวันเดียวกันด้วย

2. การเตรียมตัวอย่าง

ด้วยวัตถุประสงค์ที่จะวิเคราะห์หาปริมาณฮีแมกกลูตินินในอาหารแต่ละประเภท ซึ่งผ่านกรรมวิธีในการหุงต้มที่แตกต่างกันนั้น ทำให้ต้องเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์แตกต่างกันตามลักษณะแห่งการบริโภคอาหารแต่ละชนิด ดังต่อไปนี้

2.1 ถั่วเมล็ดแห้ง มีการเตรียมตัวอย่างเป็น 4 ลักษณะคือ

2.1.1 นำมาบดให้ละเอียด ขนาดผ่านแร่งเบอร์ 100 ได้ด้วยเครื่องบดอาหาร (Blender)

2.1.2 นำมาต้มหรือคั่วหรือทอดตามแต่ชนิดของถั่วที่นิยมบริโภค แล้วนำมาบดให้ละเอียด

2.1.3 นำไปแช่น้ำในระยะเวลาแตกต่างกันเป็น 4 แบบคือ 1 วัน 2 วัน 3 วัน และ 4 วัน ตามลำดับ เมื่อครบกำหนดเวลาของแต่ละแบบแล้ว นำเมล็ดถั่วขึ้นจากน้ำ รอให้เสด็ดน้ำก่อนแล้วจึงนำไปบดให้ละเอียด

2.1.4 นำไปแช่น้ำไว้ 1 คืน แล้วนำมาเพาะเพื่อให้ได้ต้นอ่อนที่มีอายุได้ 1 วัน 2 วัน 3 วัน และ 4 วัน ตามลำดับ ก่อนที่จะนำมาบดให้ละเอียด เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฮีแมกกลูตินินต่อไป

2.2 ผักสด มีการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์เป็น 3 ลักษณะ คือ

2.2.1 นำมาบดให้ละเอียดก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฮีแมกกลูตินินทันที

2.2.2 นำมาลวกในน้ำเดือดนาน 1 นาที เอาผักลวกขึ้นจากน้ำ รอให้เสด็ดน้ำแล้วจึงนำไปบดให้ละเอียดก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฮีแมกกลูตินินต่อไป

2.2.3 นำมาต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที 10 นาที 15 นาที และ 20 นาที ตามลำดับ แล้วจึงนำไปบดให้ละเอียดเพื่อวิเคราะห์ฮีแมกกลูตินินต่อไป

2.3 ผลไม้สดและเมล็ดผลไม้สด มีการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์เป็น 2 ลักษณะ ดังนี้คือ

2.3.1 นำเนื้อผลไม้สดหรือเมล็ดผลไม้สดไปบดให้ละเอียดก่อนวิเคราะห์หาปริมาณฮีแมกกลูตินิน

2.3.2 นำเมล็ดผลไม้ไปต้ม หรือคั่วให้สุกตามลักษณะของเมล็ดผลไม้ที่นิยมบริโภคกัน แล้วจึงนำไปบดให้ละเอียดเพื่อวิเคราะห์ฮีแมกกลูตินินต่อไป

2.4 น้ำนมถั่วเหลือง มีการเตรียมตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองเพื่อการวิเคราะห์เป็น 3 ลักษณะ คือ

2.4.1 น้ำนมถั่วเหลืองที่เตรียมขึ้นเองด้วยวิธีเตรียมที่แตกต่างกันเป็น 2 แบบดังต่อไปนี้คือ

2.4.1.1 แช่เมล็ดถั่วเหลืองในน้ำเย็นค้างคืนไว้

2.4.1.2 แช่เมล็ดถั่วเหลืองในน้ำร้อน โดยนำน้ำเดือด 80 องศาเซลเซียส เทลงในชามเมล็ดถั่วเหลืองให้ท่วม แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง

ต่อจากนั้นนำเมล็ดถั่วเหลืองที่แช่ไว้ในหัวข้อ 2.4.1.1 และ 2.4.1.2 มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดอาหารโดยใช้อัตราส่วนของถั่วเหลืองที่แช่แล้ว 1 ส่วนต่อน้ำ 10 ส่วน ต่อจากนั้นนำถั่วที่บดแล้วมากรองด้วยผ้าขาวบาง นำน้ำที่กรองได้ไปต้มด้วยไฟอ่อน ๆ พร้อมกับคนก้นหม้อเสมอ เพื่อป้องกันไม่ให้ไหม้ก้นหม้อ เมื่อเดือดทั่วกันแล้วสัก 5 นาที จึงเติมน้ำตาลทรายให้มีรสหวานตามชอบ แล้วยกลงจากเตาไฟ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง ก่อนจะนำไปทำให้แห้งโดยวิธี freeze drying

2.4.2 น้ำนมถั่วเหลือง ซึ่งซื้อมาจากตลาดสดทั่วไป นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนจะนำไปทำให้แห้งโดยวิธี freeze drying เช่นกัน

2.4.3 น้ำนมถั่วเหลืองสำเร็จรูปชนิดบรรจุกล่อง Tetra Pak หรือที่เรียกว่าน้ำนมถั่วเหลืองแบบ UHT และชนิดบรรจุขวดขนาด 200 ถึง 240 มิลลิลิตร ที่ขายในแบบน้ำขวดแช่เย็น นำตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองสำเร็จรูปดังกล่าวมาทำให้แห้งด้วยวิธี freeze drying เช่นกัน

3. การสกัดโปรตีน

นำตัวอย่างอาหารแต่ละประเภทที่เตรียมไว้ในข้อ 2 มาสกัดเอาโปรตีนออกมาด้วยวิธีการซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Chen และคณะ (13) โดยใช้ตัวอย่างถั่วเมล็ดแห้งที่บดละเอียดแล้วจากข้อ 2 มาประมาณ 2.5 กรัม ส่วนผักสดและผลไม้ใช้ตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วหนักประมาณ 5 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตร แล้วเติม Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 6.8 จำนวน 20 มิลลิลิตร ส่วนตัวอย่างสดใช้ PBS 10 มิลลิลิตรต่อปริมาณตัวอย่าง 5 กรัม นำมาเขย่าด้วยเครื่อง Shaker ตลอดเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แล้วจึงกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 2 ของเหลวที่กรองได้คือสารสกัดโปรตีน นำไปทดสอบหาปริมาณฮีแมกกลูตินินตามวิธีการในข้อ 5 ต่อไป

4. การเตรียม 4% Red Blood Cell Suspension

นำเลือดคนไทยหมู่โอ ที่ได้รับจากสภากาชาดไทย มาเตรียมให้เป็น 4% Red Blood Cell Suspension ตามวิธีของ Liener และคณะ (43) โดยนำเลือด 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ผสมกับ Alsever's solution อีก 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Votrex Mixer แล้วจึงเติม Saline solution อีก 10.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Votrex Mixerดูดน้ำยาทิ้งไป 1.0 มิลลิลิตร จะได้ Red Blood Cell solution 10.0 มิลลิลิตรพอดี ต่อมาเติม 0.1% Trypsin solution จำนวน 1.0 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันด้วย Votrex Mixer อีกครั้ง ก่อนนำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 1500 × g นาน 10 นาที รินน้ำใสด้านบนของหลอดทดลองทิ้งไป เหลือแต่ตะกอนไว้ก้นหลอดทดลอง ล้างตะกอนด้วย Saline solutionครั้งละ 5.0 มิลลิลิตร 3 ครั้ง ตะกอนที่ได้คือเม็ดเลือดแดง (Erythrocyte) ที่ต้องการ แบ่งตะกอนมา 0.4 มิลลิลิตร เติมด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.2 ให้ได้ปริมาณรวมเป็น 10.0 มิลลิลิตร จะได้ 4% RBC Suspension สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ในข้อ 5

อนึ่งถ้าจะเขียนลำดับขั้นตอนของการเตรียม 4% RBC Suspension ตามวิธีของ Liener โดยย่อด้วยแผนภูมิจะได้ดังแผนภูมิต่อไปนี้

4% Red Blood Cell Suspension (43)

0.5 ml Blood

|

added 0.5 ml Alsever's solution

|

votrex mix

|

added 10.0 ml Saline solution

|

votrex mix

| 1.0 ml of solution discarded

10.0 ml RBC solution

|

added 1.0 ml Trypsin (0.1 %)

|

votrex mix

|

incubate at 37°C for 60 min.

|

Centrifuge at 1500 x g for 10 min.

|

residue | Supernatant (discard)

|

washed 3 times with 5.0 ml Saline solution

|

Erythrocyte

|

0.4 ml + PBS pH 7.2 → 10 ml suspension of 4% RBC

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. การวิเคราะห์หาปริมาณฮีแมกกลูตินิน (Hemagglutinating Acvitity, HA)

นำของเหลวที่กรองได้จากข้อ 3 มาหาปริมาณฮีแมกกลูตินินโดยใช้ Micro-titration multi-well plate ซึ่งมีลักษณะดังรูปที่ 11 ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

5.1 ใช้ Micro-Sclectapette ที่มี Pipette tip ดูดของเหลวที่กรองได้จากข้อ 3 จำนวน 75 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมของ Microtitration multi-well plate จำนวน 1 หลุม เติม PBS pH 6.8 จำนวน 75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วดูดส่วนผสมนี้ใส่หลุมที่ 1 และหลุมที่ 2 ของอีกแถวหนึ่งจำนวนหลุมละ 50 ไมโครลิตร

5.2 เติม PBS pH 6.8 จำนวน 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 2 ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดส่วนผสมที่ได้ออกจากหลุมที่ 2 จำนวน 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมที่ 3

5.3 เติม PBS pH 6.8 อีก 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมที่ 3 ผสมให้เข้ากัน ดูดส่วนผสมที่ได้ออกจากหลุมที่ 3 จำนวน 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมที่ 4

5.4 ทำเช่นเดียวกันนี้จนถึงหลุมที่ 12 ดังนั้นความเข้มข้นของสารสกัดโปรตีนในหลุมแรกจะเป็น 2 เท่าของหลุมถัดไป

5.5 เติม 0.9% Sodium Chloride solution และ 4% Red Blood Cell Suspension จากข้อ 4 อย่างละ 50 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม ตามลำดับ

5.6 ทำ Blank ในลักษณะเดียวกัน 2 หลุม โดยไม่ใส่ของเหลวที่กรองได้จากข้อ 3 หรือไม่ใส่ตัวอย่างนั่นเอง แต่ใช้ PBS pH 6.8 จำนวน 50 ไมโครลิตรแทน

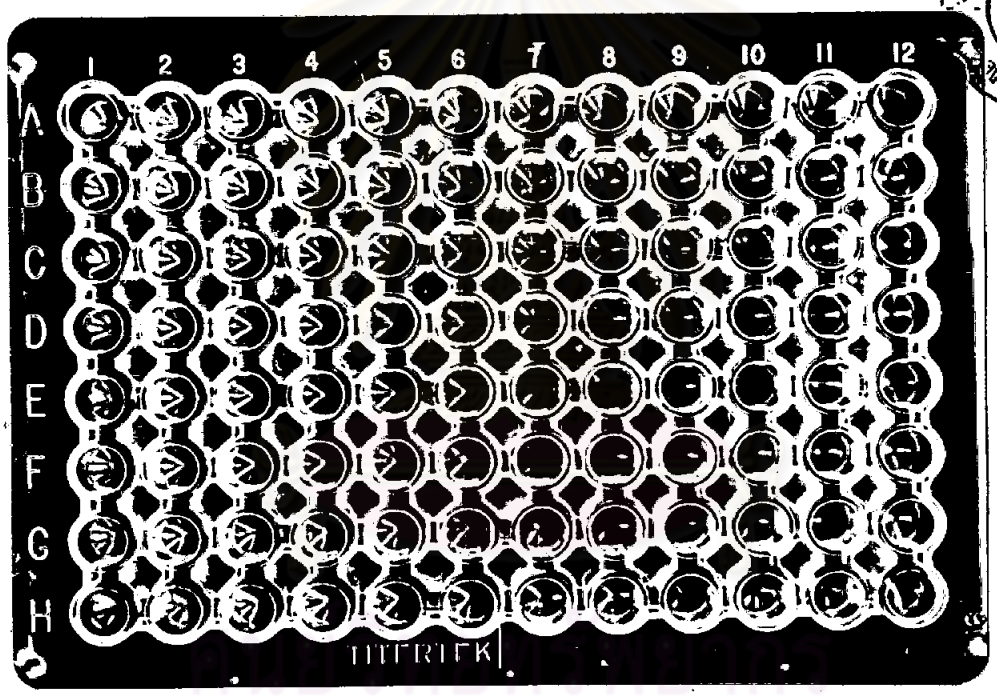
5.7 ปิด plate ให้สนิทด้วย acetate plate sealers เคาะ plate เบา ๆ ที่ด้านข้างเพื่อให้ของเหลวผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 1 ถึง 2 ชั่วโมง

5.8 วิธีอ่านผลโดยการดูลักษณะของเม็ดเลือดแดงที่ตกอยู่ที่ก้นหลุมหลังจากที่ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาโดยไม่มีการรบกวนเป็นเวลา 1 ถึง 2 ชั่วโมงแล้วดังนี้

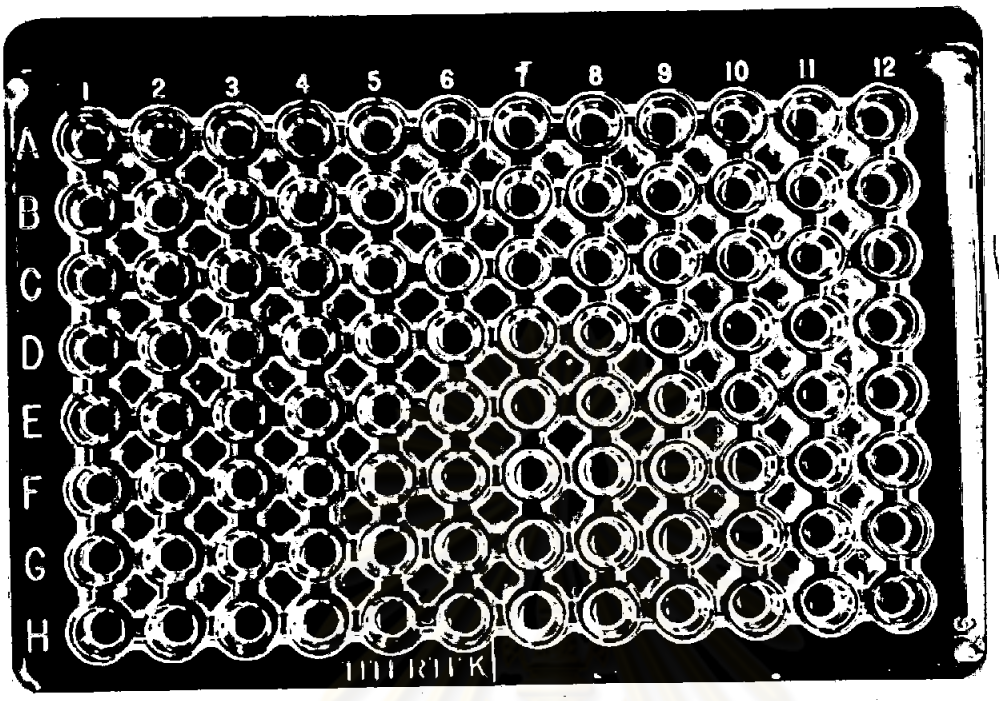
5.8.1 ถ้าเห็นเม็ดเลือดแดงรวมกันเป็นจุด หรือเป็นวงแหวนเล็ก ๆ อยู่ ณ ก้นหลุม แปลผลว่า Negative ดังแสดงไว้ในรูปที่ 12 ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายกับ Blank และเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นลักษณะเม็ดเลือดแดงเม็ดเล็ก ๆ กระจายทั่วไปเหมือนกับ Blank ดังแสดงไว้ในรูปที่ 13 และ 14

5.8.2 ถ้าเห็นเม็ดเลือดแดงแผ่เป็นแผ่นอยู่ ณ ก้นหลุม แปลผลว่าเป็น Positive ดังแสดงไว้ในรูปที่ 12 เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะเห็นเม็ดเลือดแดงจับกันเป็นกลุ่ม ดังแสดงไว้ในรูปที่ 15

5.9 ให้ถือว่าหลุมที่มี dilution ที่เจือจางที่สุด แต่ยังคงให้ผล Positive มีปริมาณฮีแมกกลูตินินเทียบเท่า 1 Unit (Pregent and Bourvillion, 1976) หลุมที่มีความเข้มข้นถัดขึ้นมาจะคิดเป็น 2 Unit, 4 Unit ตามลำดับ



รูปที่ 11 ภาพถาย Microtitration multi-well plate



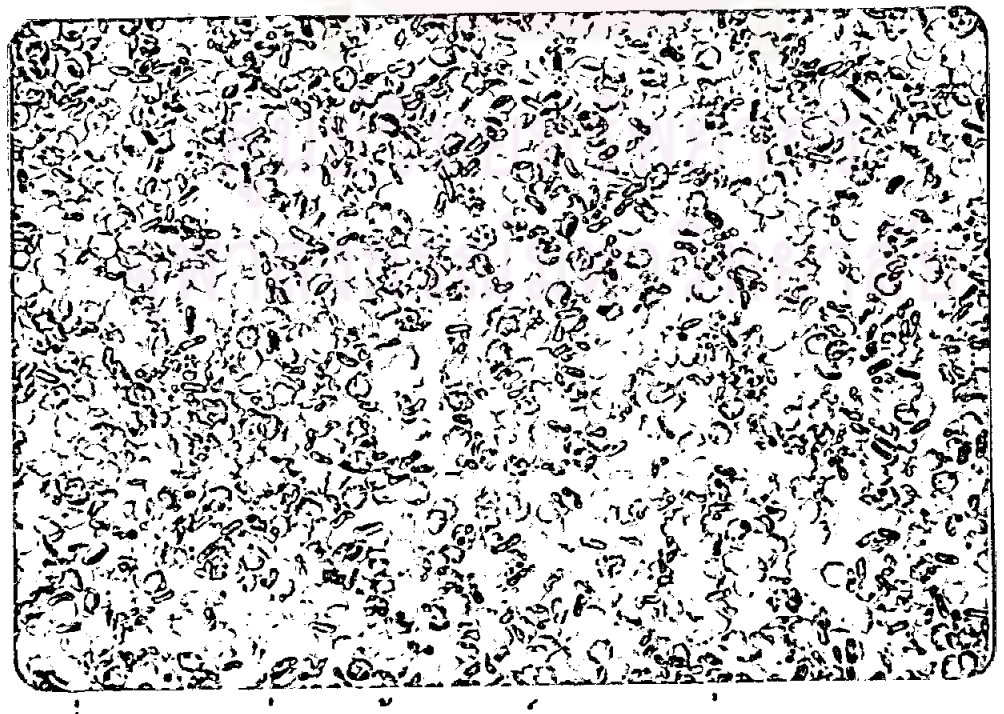
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 12 ภาพถ่ายผลการทดลองหา Hemagglutinin Activity

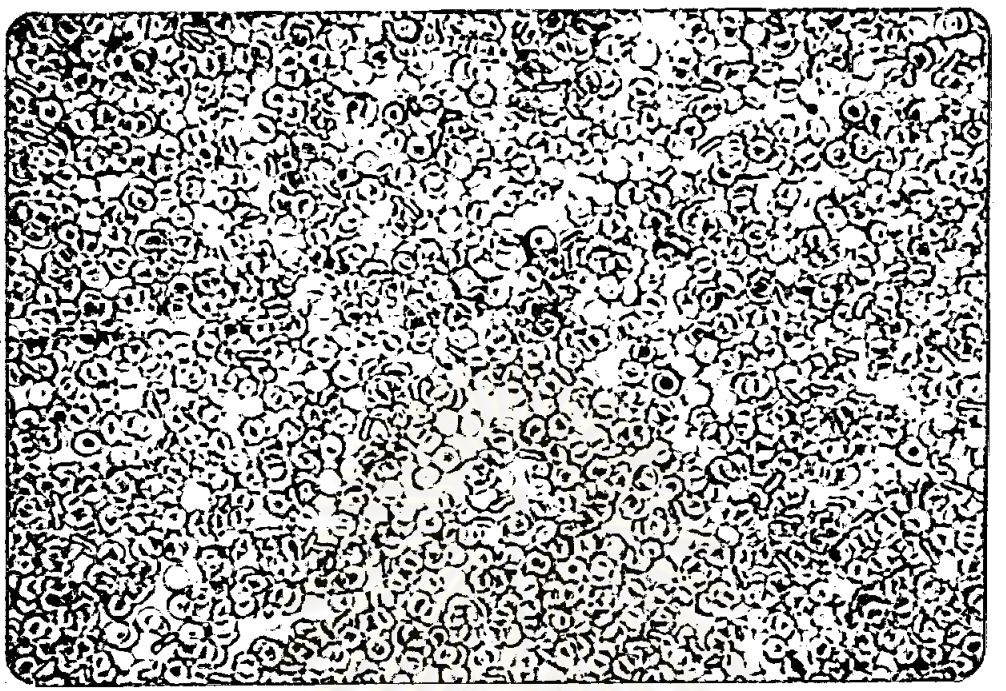
แถว A ถึง F จาก 1 ถึง 3 เป็น Positive Agglutination

แถว A ถึง F จาก 4 ถึง 12 เป็น Negative Agglutination

แถว G และ H จาก 1 ถึง 12 เป็น Blank



รูปที่ 13 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ขยาย 400 เท่าของ Blank



รูปที่ 14 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ขยาย 400 เท่าของ Negative Agglutination

รูปที่ 15 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ขยาย 400 เท่าของ Positive Agglutination

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวอย่างการอ่านผลตัวอย่างอาหารชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิด Positive agglutination จำนวน 9 หลุม

หลุมที่ 9 คิดเทียบว่ามีปริมาณ HA = 1 หรือ = 2^0 unit

หลุมที่ 8 คิดเทียบว่ามีปริมาณ HA = 2 หรือ = 2^1 unit

หลุมที่ 7 คิดเทียบว่ามีปริมาณ HA = 4 หรือ = 2^2 unit

หลุมที่ 6 คิดเทียบว่ามีปริมาณ HA = 8 หรือ = 2^3 unit

หลุมที่ 5 คิดเทียบว่ามีปริมาณ HA = 16 หรือ = 2^4 unit

หลุมที่ 4 คิดเทียบว่ามีปริมาณ HA = 32 หรือ = 2^5 unit

หลุมที่ 3 คิดเทียบว่ามีปริมาณ HA = 64 หรือ = 2^6 unit

หลุมที่ 2 คิดเทียบว่ามีปริมาณ HA = 128 หรือ = 2^7 unit

หลุมที่ 1 คิดเทียบว่ามีปริมาณ HA = 256 หรือ = 2^8 unit

สมมุติให้ n = จำนวนหลุมที่ให้ Positive agglutinating

ดังนั้นปริมาณ HA ในสารสกัดโปรตีน = 2^{n-1} unit

สูตรที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณฮีแมกกลูตินินในตัวอย่างอาหารต่อกรัม คือ

$$\text{ปริมาณ HA} = \frac{V \times 2^{n-1} \times 10^5}{25 \times S \times (100 - MT)}$$

V = ปริมาตรของ PBS pH 6.8 ที่ใช้สกัดโปรตีนเป็นมิลลิลิตร

n = จำนวนหลุมที่ให้ Positive agglutinating

S = น้ำหนักของตัวอย่างที่ชั่งเป็นกรัม

MT = ปริมาณความชื้นของตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ

ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณฮีแมกกลูตินินในตัวอย่างอาหาร

ตัวอย่างที่ใช้ (S) หนัก = 4.8633 กรัม

ปริมาตร PBS pH 6.8 ที่ใช้สกัดโปรตีนจากตัวอย่าง (V) = 20 มิลลิลิตร

ความชื้นของตัวอย่างร้อยละ (MT) = 10.08

จำนวนหลุมที่ให้ Positive agglutination (n) = 9 หลุม

แทนค่าต่าง ๆ ในสูตร HA $= \frac{V \times 2^{n-1} \times 10^5}{25 \times S \times (100 - MT)}$ unit/gm

$= \frac{20 \times 2^{9-1} \times 10^5}{25 \times 4.8633 \times (100 - 10.08)}$ unit/gm

$= 46.832$ unit/gm

ดังนั้นตัวอย่างอาหารนี้มีปริมาณฮีแมกกลูตินิน 46.832 Unit/gm

ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณฮีแมกกลูตินินในน้ำนมถั่วเหลือง

สมมติน้ำนมถั่วเหลือง 100 ml เมื่อทำ freeze drying แล้วหนัก 4.1869 กรัม

ถ้าใช้ตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองแห้งหนัก = 2.9834 กรัม

ทำให้เกิด Positive agglutination = 1 หลุม

ปริมาตรของ PBS pH 6.8 ที่ใช้ = 10 มิลลิลิตร

ความชื้นของตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ (MT) = 2.66

จะมีปริมาณฮีแมกกลูตินินตามสูตร HA $= \frac{V \times 2^{n-1} \times 10^5}{25 \times S \times (100 - MT)}$

แทนค่าในสูตร ปริมาณฮีแมกกลูตินิน $= \frac{10 \times 2^{1-1} \times 10^5}{25 \times 2.9834 \times (100 - 2.66)}$

$= 137.70$ unit/gm

นั่นคือตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองแห้งหนัก 1 กรัมมีฮีแมกกลูตินิน = 137.70 unit

ตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองแห้งหนัก 4.1869 กรัมมีฮีแมกกลูตินิน

$= \frac{137.70 \times 4.1869}{1}$ unit

= 576.5 unit

ดังนั้นน้ำนมถั่วเหลือง 100 มิลลิลิตรจะมีฮีแมกกลูตินิน 576.5 unit

6. การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นในตัวอย่าง

การหาปริมาณความชื้นในตัวอย่างอาหาร อาศัยหลักการระเหยของน้ำเมื่ออุณหภูมิของอาหารสูงขึ้น โดยมีลำดับขั้นตอนในการวิเคราะห์ ดังต่อไปนี้

6.1 ชั่งตัวอย่างประมาณ 6 ถึง 10 กรัม ใส่ในขวดชั่ง (weighing bottle) ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว

6.2 นำไปอบในตู้อบ (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำออกมาใส่ไว้ใน desicator เพื่อให้เย็นลงถึงอุณหภูมิห้องก่อนนำไปชั่งหาน้ำหนัก

6.3 นำตัวอย่างเดิมไปอบและชั่งซ้ำเหมือนเดิมอีก จนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่ จึงคำนวณหาปริมาณความชื้นเป็นร้อยละ ดังสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้นคิดเป็นร้อยละ} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างที่หายไปเมื่ออบแห้ง}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

ตัวอย่างการคำนวณ

น้ำหนักขวดชั่ง + ตัวอย่าง = 30.1742 กรัม

ถ้าน้ำหนักขวดชั่ง = 24.8722 กรัม

น้ำหนักตัวอย่าง = 5.3020 กรัม

น้ำหนักขวด + น้ำหนักตัวอย่างเมื่ออบแห้งแล้ว = 29.6890 กรัม

น้ำหนักตัวอย่างที่หายไปเมื่ออบแห้ง = 30.1742 - 29.6890 กรัม

$$\text{ปริมาณความชื้นคิดเป็นร้อยละ} = \frac{(30.1742 - 29.6890)}{5.3020} \times 100$$

$$= 9.15$$