บทที่ 3

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารละลาย

1.1 สารละลายของสารประกอบเหล็กที่ใช้เติมลงในข้าวคลุกปลาป่น

1.1.1 สารละลายโซเดียมเฟอร์ริคอีดีทีเอ [NaFe (III) EDTA]

เตรียมสารละลายโซเดียมเฟอร์ริคอีดีทีเอ ที่มีปริมาณเหล็ก 0.5 มก./มล. โดยการละลาย NaFe (III) EDTA (น้ำหนักโมเลกุล 367.06) 0.1643 ก. ในกรดเกลือเข้มข้น 0.1 โมล./ล. จำนวน 50 มล.

1.1.2 สารละลายแอมโมเนียม เฟอร์ริคซิเตรท (AFC)

เตรียมสารละลาย AFC ที่มีปริมาณเหล็ก 0.5 มก./มล. โดยการละลาย AFC (น้ำหนักโมเลกุล 248.197) 0.111 ก. ในกรดเกลือเข้มข้น 0.1 โมล./ก. จำนวน 50 มล.

1.1.3 สารละลายของเหล็กคอมเพล็กซ์ (Fe complex)

เตรียมสารละลาย Fe complex ที่มีปริมาณเหล็ก 0.5 มก./มล. โดยการละลาย $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (น้ำหนักโมเลกุล 278.02) 0.1245 ก. โซเดียมเฮกซา-เมตาฟอสเฟต (SHMP, ซึ่งเป็นสารผสมของ $(NaPO_3)_6$ ร้อยละ 88 และ $Na_4P_2O_7$ ร้อยละ 12 0.0996 ก. และ โซเดียมไบซัลเฟต ($NaHSO_4$) 0.0622 กรัม ในกรดเกลือ 0.1 โมล./ล จำนวน 50 มล.

1.1.4 สารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)

เตรียมสารละลาย $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ที่มีปริมาณเหล็ก 0.5 มล./มล. โดยการละลาย $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1245 ก. ในกรดเกลือ 0.1 โมล./ล.

จะเติมกัมมันตรังสีเหล็กลงไปในสารละลายของสารประกอบเหล็กเหล่านี้ก่อนใช้เติมลงในข้าวคลุกปลาป่น

1.2 การเตรียมสารละลายเฟอร์รัสแอสคอร์เบต

เตรียมสารละลายเฟอร์รัสแอสคอร์เบตที่มีปริมาณเหล็ก 3.0 มก./มล. โดยการละลาย $FeSO_4 . 7H_2O$ 0.0144 ก. และกรดแอสคอร์บิค 0.0189 ก. ในน้ำปราศจากเหล็ก จำนวน 10.0 มล.

สารละลายนี้ใช้เป็นสารละลายเหล็กมาตรฐาน (standard reference dose)

1.3 สารละลายสำหรับหาปริมาณเหล็กในซีรั่ม

ใช้สารละลาย bathophenanthroline ในการหาปริมาณเหล็กในซีรั่ม โดยเตรียมตามวิธีการของ International Committee for Standardization in Hematology (44)

ละลายโซเดียมอะซิเตท ($CH_3COONa.3H_2O$) 102.0 ก. และ disodium-4, 7-diphenyl 1, 10-phenanthroline disulphonate 125 มก. ในในน้ำปราศจากเหล็ก จำนวน 500 มล.

1.4 สารละลายสำหรับหาปริมาณฟอสเฟต

ใช้ Fiske and Subbarow Reducer ในการหาปริมาณฟอสเฟต โดยเตรียมตามวิธีของ Fiske และ Subbarow (45)

ละลายผลึกของ 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid 0.5 ก. ในสารละลายผสมของโซเดียมไบซัลไฟท์ ($NaHSO_3$) ที่เข้มข้นร้อยละ 15 (น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 195 มล. และโซเดียมซัลไฟท์ (Na_2SO_3) ที่เข้มข้นร้อยละ 20 (น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 5 มล.

1.5 สารละลายสำหรับหาปริมาณวิตามินซี

ใช้สารละลาย Cu^{2+}-biquinoline ในการหาปริมาณวิตามินซี โดยเตรียมตามวิธีการของ Shich และ Sweet (46)

ผสมสารละลายคิวปริกคลอไรด์ ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) 0.13 ก. ใน 0.01 โมล./ล. ฟอสเฟต-ซิตริค บัฟเฟอร์, pH 3.0, จำนวน 500 มล.) 100 มล. กับสารละลาย 2,2' biquinoline 0.35 ก. ในอะซีโตน 1 ล. จำนวน 300 มล.

1.6 สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน

ใช้สารละลายไบยูเรต (Biuret Reagent) ในการวัดปริมาณโปรตีนในอาหาร โดยเตรียมตามวิธีของ Garnal และคณะ (47)

ละลาย $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1.5 ก. ในน้ำกลั่น 600 มล. นำสารละลายที่ได้ไปเติมโซเดียมโปตัสเซี่ยมตราเตรท 1.0 ก. และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 300 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1 ล.

2. การให้อาหารทดลองแก่ประชากรตัวอย่าง

2.1 การแบ่งกลุ่มประชากรตัวอย่าง

แบ่งประชากรตัวอย่างทั้งหมดออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 12 คน กลุ่มที่ 1, 2 และ 3 เป็นกลุ่มที่ใช้ศึกษาเปรียบเทียบการดูดซึมเหล็กจากสารประกอบเหล็กชนิดต่าง ๆ ที่เติมลงไปในข้าวคลุกปลาป่น ส่วนกลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่ศึกษาถึงผลของนมถั่วเหลืองต่อการดูดซึมเหล็ก ตัวที่เลือกจากผลการทดลองกลุ่มที่ 1, 2 และ 3

สารประกอบเหล็กที่เติมลงไปในอาหารมีปริมาณเหล็ก 0.5 มก. โดยจะปิเปตสารละลายของสารประกอบเหล็กที่ต้องการและเติมกัมมันตรังสีเหล็กแล้ว จำนวน 1 มล. ใส่ลงไปในข้าวคลุกปลาป่น แล้วผสมก่อนให้ประชากรตัวอย่างรับประทาน

ตารางที่ 1 แสดงการให้ข้าวคลุกปลาป่นที่เติมสารประกอบเหล็กชนิดต่าง ๆ แก่ประชากรกลุ่มที่ 1, 2 และ 3

ตารางที่ 1. การเติมสารประกอบเหล็กและสารกัมมันตรังสีของเหล็กลงไปในข้าวคลุกปลาป่น สำหรับประชากรตัวอย่างในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3

วันที่	มื้อ	สารประกอบเหล็กที่เติม ลงในข้าวคลุกปลาป่น			สารกัมมันตรังสีที่ใช้ติดตาม
		กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	
1	A	NaFe (III) EDTA	AFC(1)	Fe complex(2)	^{55}Fe 5 μCi
2	B	AFC	Fe complex	NaFe (III) EDTA	^{59}Fe 2 μCi
14	C	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	^{55}Fe 5 μCi
15	R(3)	ferrous ascorbate	ferrous ascorbate	ferrous ascorbate	^{59}Fe 1 μCi

หมายเหตุ (1) AFC คือแอมโมเนียมเฟอร์ริคซิเตรท

(2) Fe complex คือคอมเพล็กซ์ของเฟอร์รัสซัลเฟต : โซเดียมเฮกซาเมตาฟอสเฟต : โซเดียมไบซัลเฟต เท่ากับ 5:4:2.5

(3) R คือ reference dose ของเฟอร์รัสแอสคอร์เบต กำหนดให้วันที่เริ่มการทดลองเป็นวันที่ 1

กลุ่มที่ 1–3 ซึ่งเป็นการศึกษาเปรียบเทียบการดูดซึมเหล็กจากสารประกอบเหล็กชนิดต่าง ๆ นั้น เราสามารถศึกษาเปรียบเทียบการดูดซึมของสารประกอบเหล็ก 2 ชนิด (คือชนิดที่เสริมลงในข้าวคลุกปลาป่นมื้อ A และ B) ภายในกลุ่มเดียวกัน การเปรียบเทียบการดูดซึมของสารประกอบเหล็กแต่ละชนิด (มื้อ A หรือมื้อ B) กับการดูดซึมของสารละลายเหล็กเฟอร์รัสซัลเฟต (มื้อ C) จะได้ค่าความสามารถในการดูดซึม (bioavailability) ของสารประกอบเหล็กชนิดนั้น ๆ (48) อาหารมื้อ R เป็นมื้อ reference dose ซึ่งจะใช้เปรียบเทียบศักยภาพการดูดซึมเหล็กจากสารประกอบเหล็กชนิดต่าง ๆ ในระหว่างตัวบุคคลซึ่งมีสถานภาพของเหล็ก (iron status) ของร่างกายแตกต่างกัน (49) ส่วนการใช้สารกัมมันตรังสี 2 ชนิด คือ เหล็ก–55 และเหล็ก–59 จะทำให้เราสามารถติดตามการดูดซึมสารประกอบเหล็ก 2 ชนิดได้ในคนเดียวกันและในการทดลองเดียวกัน

ตารางที่ 2 แสดงการให้นมถั่วเหลืองร่วมไปกับข้าวคลุกปลาป่นที่เติมสารประกอบเหล็กแก่ประชากรตัวอย่างกลุ่มที่ 4 สารประกอบเหล็กที่เติมลงในข้าวคลุกปลาป่นสำหรับประชากรตัวอย่างในกลุ่มนี้จะคัดเลือกจากสารประกอบเหล็กชนิดซึ่งมีการดูดซึมได้ดี โดยดูจากผลการทดลองของประชากรตัวอย่างกลุ่มที่ 1–3

ตารางที่ 2 การให้อาหารเติมเหล็ก แก่ประชากรตัวอย่างกลุ่มที่ 4 เพื่อศึกษาผลของนมถั่วเหลืองต่อการดูดซึมเหล็ก

วันที่	มื้อ	อาหารที่ให้ประชากรตัวอย่างรับประทาน	สารกัมมันตรังสีที่ใช้ติดตาม
1	A	ข้าวคลุกปลาป่นที่เติมสารประกอบเหล็ก x*	^{55}Fe 5 μCi
2	B	ข้าวคลุกปลาป่นที่เติมสารประกอบเหล็ก x* และนมถั่วเหลือง	^{59}Fe 2 μCi
14	C	ข้าวคลุกปลาป่นที่เติม $FeSO_4.7H_2O$	^{55}Fe 5 μCi
15	R	ferrous ascorbate	^{59}Fe 1 μCi

x* = สารประกอบเหล็กที่ได้รับการเลือกสรรจากผลการดูดซึมเหล็กในประชากรตัวอย่างกลุ่มที่ 1-3

กัมมันตรังสีในปริมาณที่ใช้นี้ได้รับการพิสูจน์และรับรองแล้วว่า ประชากรตัวอย่างจะได้รับรังสีต่ำกว่าปริมาณสูงสุดที่อนุญาต (maximal permissible dose, MPD) ของ NCRP (National Council on Radiation Protection and Measurement, U.S.A.) ซึ่งอนุญาตให้คนทั่วไปได้รับปริมาณกัมมันตรังสีไม่เกินปีละ 0.5 เรม

ตารางที่ 3 แสดงรายละเอียดทั่วไปเกี่ยวกับช่วงเวลาสะสม การกระจายและขนาดที่ปรากฏของสารกัมมันตรังสีของเหล็ก-55 และเหล็ก-59 ในร่างกายของประชากรตัวอย่าง

ตารางที่ 3 รายละเอียดเกี่ยวกับสารกัมมันตรังสีของเหล็กที่ประชากรตัวอย่างแต่ละคนจะได้รับ (โดยอาศัยข้อมูลของ Bathwell และคณะ (19)

รายละเอียด	เหล็ก-55	เหล็ก-59
ทางที่ได้รับสารกัมมันตรังสี	รับประทาน	รับประทาน
สารประกอบกัมมันตรังสี	$FeCl_3$	$FeCl_3$
ขนาดของสารกัมมันตรังสีที่ได้รับจากอาหาร	5 µCi	2 µCi
Sp. act. ของสารกัมมันตรังสี	4.21 mCi/mgFe	13.55 mCi/mgFe (1) 10.42 mCi/mgFe (2)
ครึ่งชีวิตของสารกัมมันตรังสี	2.6 ปี	45.6 วัน
ขนาดของสารกัมมันตรังสีที่จะสะสมในร่างกาย	0.5 µCi	0.2 µCi
ขนาดของสารกัมมันตรังสีที่ร่างกายได้รับ (3)		
ตลอดช่วงเวลาที่สารกัมมันตรังสีอยู่ในร่างกาย		
ต่อร่างกายทั้งหมด	17 millirads	57 millirads
ต่อระบบทางเดินอาหาร	20 millirads	66 millirads

1. ประชากรตัวอย่างกลุ่มที่ 1, 2 และ 3
2. ประชากรตัวอย่างกลุ่มที่ 4
3. ขนาดของสารกัมมันตรังสีที่ร่างกายได้รับ (Radiation dosage) นี้ Bothwell และคณะรวบรวมจาก International Committee II on Permissible Protection (ICRP) Publication 2:Report of Committee II on Permissible Dose for Internal Radiation Pergamon Press, New York, 1959 และ International Commission of Radiological Protection (ICRP) Publication 16 : Protection of Pateint in Radionuclide Investigation. Pergamon Press, Oxford, 1971. (19)

2.2 การให้อาหารมื้อทดลอง

อาหารมื้อทดลองที่ให้ประชากรตัวอย่างรับประทานเป็นอาหารมื้อเที่ยงโดยที่ประชากรตัวอย่างจะต้องงดอาหารและเครื่องดื่มทุกชนิดยกเว้นน้ำ ตั้งแต่ 22.00 น. ของวันก่อนวันที่จะมารับประทานอาหารทดลอง ในเวลา 7.00 น. ของวันที่ให้อาหารทดลองนั้น ให้ประชากรตัวอย่างรับประทานอาหารมื้อเช้าที่เหมือนกัน และมีปริมาณเท่ากันทุกคน อาหารมื้อนี้คือข้าวต้มและเกี๊ยมฉ่ายที่ไม่เติมสารกัมมันตรังสี หลังจากนั้นงดอาหารทุกชนิด ยกเว้นน้ำจนถึง 12.00 น. ให้รับประทานอาหารมื้อทดลอง หลังจากรับประทานอาหารแล้วห้ามรับประทานอาหารอื่น ๆ ยกเว้นน้ำ จนกระทั่ง 15.00 น. หลังจากนั้นจึงให้รับประทานได้ตามปกติ

วันที่ 1 ให้รับประทานอาหารมื้อทดลอง A วันที่ 2 ให้รับประทานอาหารมื้อทดลอง B วันที่ 14 ให้รับประทานอาหารมื้อทดลอง C และวันที่ 15 เวลา 7.00 น. ให้ดื่มอาหารมื้อ R (standard reference dose) คือ เพอร์รัสแอสคอร์เบต หลังจากดื่ม standard reference dose นี้แล้วให้งดอาหารอื่น ๆ ทุกชนิดยกเว้นน้ำเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงให้รับประทานได้ตามปกติ

3. การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดของประชากรตัวอย่างรวมทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 25 มล.

3.1 ตัวอย่างแรก เจาะเลือดเวลา 6.30 น. ของวันที่ 1 ของการวิจัย ก่อนให้ประชากรตัวอย่างรับประทานข้าวต้มและเกี๊ยมฉ่าย แบ่งเลือดที่เจาะครั้งนี้ออกเป็น 3 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 นำเลือด 3 มล. ใส่ในขวดที่มีเอทธิลินไดเอมีนเตทตระอะซิเตท (ethylene diamine tetraacetate ; EDTA) ซึ่งใช้เป็นสารกันการแข็งตัวของเลือด ในอัตราส่วน 1 มก./มล. เลือด ส่วนที่ 1 นี้ใช้นำไปหาปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb) และปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit ; Hct) ทันที

ส่วนที่ 2 นำเลือด 10 มล. ใส่ในหลอดทดลองและตั้งทิ้งไว้ให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4°ซ. ด้วยความเร็ว

1,000 x g. เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาแต่ซีรั่ม เก็บซีรั่มไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ. จนกว่าจะนำไปหาค่าปริมาณเหล็กในซีรั่ม และค่า total iron binding capacity (TIBC) ซึ่งจะทำภายใน 7 วัน หลังจากที่เก็บตัวอย่างเลือด

ส่วนที่ 3 นำเลือด 12 มล. ไปใส่ในขวดที่มีน้ำยา acid citrate dextrose [ACD; ประกอบด้วยกรดซิตริก 7.3 ก. โซเดียมอะซิเตต 22.0 ก. และเด็กซ์โตรส 24.5 ก. ละลายในน้ำกลั่น 1 ล. (8)] ซึ่งเป็นสารกันการแข็งตัวของเลือด โดยให้อัตราส่วนของ ACD : เลือด เท่ากับ 1.5 มล. : 10 มล. ส่วนที่ 3 นี้จะเก็บไว้ที่ 4°ซ. จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเหล็ก-55 และเหล็ก-59 ค่าที่วัดได้จะเป็นปริมาณกัมมันตรังสีของเหล็กเริ่มต้นก่อนให้ประชากรตัวอย่างรับประทานอาหารทดลอง

3.2 ตัวอย่างที่ 2 เจาะเลือดเวลา 6.30 น. ของวันที่ 14 ของการวิจัย โดยนำเลือดไปใส่ขวดที่มีน้ำยา ACD เช่นเดียวกับตัวอย่างเลือดที่เจาะครั้งแรก (ส่วนที่ 3) นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเหล็ก-55 และเหล็ก-59 ซึ่งจะทำในวันเดียวกับที่เจาะเลือด ค่าที่วัดได้จะเป็นปริมาณเหล็ก-55 และเหล็ก-59 ที่ประชากรตัวอย่างดูดซึมจากอาหารมื้อ A และ B

ตัวอย่างเลือดในครั้งนี้ไม่ได้นำไปหาปริมาณในซีรั่มและค่า TIBC เนื่องจากปริมาณเหล็กที่ประชากรตัวอย่างได้รับในการทดลองจะน้อยมากจึงไม่มีผลทำให้ค่าดังกล่าวเปลี่ยนแปลง (19)

3.3 ตัวอย่างที่ 3 เจาะเลือดเวลา 7.00 น. ของวันที่ 28 ของการวิจัย โดยนำเลือดไปใส่ขวดที่มีน้ำยา ACD เช่นเดียวกับตัวอย่างเลือดที่เจาะครั้งแรก (ส่วนที่ 3) นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเหล็ก-55 และเหล็ก-59 ซึ่งจะทำในวันเดียวกับวันที่เจาะเลือด ค่าที่ได้จะบอกถึงปริมาณเหล็ก-55 และเหล็ก-59 ที่ประชากรตัวอย่างได้รับเพิ่มจากอาหารมื้อ C และมื้อ R และใช้นำไปหาค่าศักยภาพของการดูดซึมเหล็กมาตรฐานกับค่า bioavailability

4. การศึกษาการดูดซึมเหล็กจากอาหาร

4.1 การหาปริมาณเหล็กในซีรั่ม

ทำตามวิธีการของ International Committee for Standardization in Hematology (44)

ปิเปตซีรั่ม 1.0 มล. ใส่ในหลอดทดลอง เติม 1.0 มล. ของสารละลายสำหรับตกตะกอนโปรตีน [กรดไตรคลอโรอะซิติคที่เข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในกรดเกลือ 1 โมล./ก. และกรดไธโอไกลโคลิกที่เข้มข้นร้อยละ 3 (ปริมาตร/ปริมาตร) 1.0 มล.] เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixer) 45 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที แล้วจึงนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 x g. เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้น ปิเปต 1.0 มล. ของสารละลาย บาโธฟีแนนโธรลีน (bathophenanthroline) ลงไปในส่วนน้ำใส 1.0 มล. เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที สารละลายที่ได้มีสีแดง นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร หาปริมาณเหล็กในซีรั่มโดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานของเหล็กที่เข้มข้น 1.0–5.0 มค.ก.

หลอด blank เติมสารละลายทุกอย่างยกเว้นซีรั่ม ทำให้มีปริมาตรเท่ากับหลอดสารละลายตัวอย่างด้วยน้ำปราศจากเหล็ก

4.2 การหาค่าของ Total Iron Binding Capacity (TIBC)

ทำตามวิธีการของ Committee for Standardization in Hematology (50)

ปิเปตซีรั่ม 1.0 มล. ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายเฟอร์ริคคลอไรด์ (มีปริมาณเหล็ก 6 มค.ก./มล.) ลงไป 2.0 มล. เขย่า แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเติมผงแมกนีเซียมคาร์บอเนตลงไป จำนวน 200 มก. ปิดหลอดทดลองด้วยพาราฟิล์ม นำหลอดทดลองทั้งหมดไปหมุนบนกระดานหมุน (rotate turntable) เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 x g. เป็นเวลา 15 นาที นำเอาแต่ส่วนน้ำใส ปริมาตร 1.0 มล. ไปหาปริมาณเหล็กด้วยสารละลายบาโธฟีแนนโธรลีน (bathophenanthroline) เช่นเดียวกับข้อ 4.1 (44)

หลอด blank เติมสารละลายทุกชนิดยกเว้นซีรั่ม ทำให้มีปริมาตรเท่ากับหลอดสารละลายตัวอย่างด้วยน้ำปราศจากเหล็ก

นำปริมาณเหล็กที่หาได้นี้ไปคำนวณหาค่าของ unsaturated iron binding capacity (UIBC) และความอิ่มตัวร้อยละของทรานสเฟอร์ริน ตามความสัมพันธ์ดังนี้คือ

UIBC (มค.ก.%) = TIBC (มค.ก.%) - ปริมาณเหล็กในซีรั่ม (มค.ก.%)

ความอิ่มตัวร้อยละของทรานสเฟอร์ริน = $\frac{\text{ปริมาณเหล็กในซีรั่ม (มค.ก.\%)}}{\text{TIBC (มค.ก.\%)}} \times 100$

4.3 <u>การหาปริมาณทรานสเฟอร์ริน</u>

ทำตามวิธีการของ Jacobs และ Worwood (51)

ปริมาณของทรานสเฟอร์รินจะบอกถึงปริมาณของตัวขนส่งเหล็กในซีรั่ม ทรานสเฟอร์ริน 1 โมเลกุล มีเหล็กเกาะอยู่ 2 อะตอม (52) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 90,000 ดาลตัน (51) ดังนั้นจึงสามารถคำนวณหาปริมาณทรานสเฟอร์รินจากค่าของ total iron binding capacity (TIBC) ได้เนื่องจากค่า TIBC บอกถึงปริมาณเหล็กทั้งหมดที่เกาะอยู่กับทรานสเฟอร์ริน

ปริมาณทรานสเฟอร์ริน (มก./มล.) = $\frac{\text{TIBC}}{1.25}$ (มค.ก/มล.)

ค่า 1.25 ได้จาก $\frac{55.85 \times 2 \times 10^3}{90,000}$

เมื่อน้ำหนักอะตอมของเหล็ก = 55.85

จำนวนอะตอมของเหล็กที่เกาะอยู่กับโมเลกุลของทรานสเฟอร์ริน = 2

ตัวเปลี่ยนหน่วยจาก มก. เป็น มค.ก = 10^3

น้ำหนักโมเลกุลของทรานสเฟอร์ริน = 90,000 ดาลตัน

4.4 <u>การหาปริมาณเหล็ก-55 และเหล็ก-59 ในเลือด</u>

ทำตามวิธีการของ Bothwell และคณะ (19) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Eakins และ Brown (53)

แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ

ก. <u>การเปลี่ยนเหล็กอินทรีย์ในเลือดให้อยู่ในรูปของเหล็กอนินทรีย์</u>

ปิเปตเลือดตัวอย่าง 10 มล. ใส่ใน k jeldahl digestion flask และใส่ลูกแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ลงไปด้วย 3 เม็ด เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 4.0 มล. และกรดไนตริกเข้มข้น 5.0 มล. ลงใน flask เริ่มย่อยเลือดตัวอย่างในกรดด้วยอุณหภูมิ 200 $\pm$ 10°ซ หลังจากที่ย่อยแล้วนาน 10 นาทีให้เพิ่มอุณหภูมิเป็น 300 $\pm$ 10°ซ

พร้อมทั้งหมุน flask ไปด้วย เมื่อเลือดตัวอย่างเปลี่ยนเป็นสีดำ และเริ่มเกิดควันสีขาวของซัลเฟอร์ไตรออกไซด์ให้เพิ่มอุณหภูมิเป็น 500 ± 10°ซ ย่อยเลือดต่อไปจนกระทั่งได้สารละลายสีน้ำตาลและไม่มีควันเกิดขึ้นอีก ตั้งสารละลายไว้ให้เย็นแล้วจึงเติมกรดไนตริกเข้มข้น 5.0 มล. ย่อยต่อไปที่อุณหภูมิ 500 ± 10°ซ. เป็นเวลา 30 นาที จนได้สารละลายสีเหลืองทองเมื่อตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมกรดไนตริกเข้มข้นลงไปอีก 5.0 มล. แล้วย่อยที่อุณหภูมิเดิมต่อไปอีก 1 ชั่วโมง จะได้สารละลายสีเหลืองอ่อน เมื่อตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนที่จะเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เข้มข้นร้อยละ 30 จำนวน 4.0 มล. ลงไปใน flask แล้วนำไปย่อยที่อุณหภูมิ 200°ซ. จะเกิดฟองมากมาย เมื่อฟองลดน้อยลงให้เพิ่มอุณหภูมิเป็น 500°ซ. แล้วย่อยต่อไปอีก 30 นาที จนได้สารละลายใสไม่มีสี และปรากฏตะกอนสีขาวของเหล็ก $FeSO_4$ เมื่อตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมกรดเกลือ (1 โมล/ล.) ลงไปใน flask จำนวน 10 มล. แล้วนำไปต้มต่อที่อุณหภูมิ 200°ซ. จะได้สารละลายสีเหลืองใสของเฟอร์ริคคลอไรด์ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นอีก

ข. <u>การตกตะกอนเหล็ก</u>

ถ่ายสารละลายทั้งหมด (ประมาณ 15 มล.) ลงในหลอดทดลองขนาด 100 มล. ที่เคลือบด้วยสารละลายซิลิโคน (ร้อยละ 1 ปริมาตร/ปริมาตร) ล้าง flask อีกครั้งด้วยน้ำปราศจากเหล็กจำนวน 10 มล. เอาสารละลายที่ได้รวมเข้ากับสารละลายครั้งแรก เติมสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (10 โมล/ล.) ลงไป 30 มล. เพื่อตกตะกอนเหล็ก ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในอ่างน้ำอุณหภูมิ 4°ซ. เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 2,600 x g เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งไป เหลือไว้แต่ตะกอนเหล็กสีน้ำตาลของเฟอร์ริคไฮดรอกไซด์ [$Fe(OH)_3$] ที่ก้นหลอด เติมกรดเกลือเข้มข้นลงไป 1.0 มล. เพื่อละลายตะกอนเหล็ก แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

ถ่ายสารละลาย $Fe(OH)_3$ ในกรดเกลือทั้งหมดประมาณ 2.0 มล. ลงในหลอดทดลองขนาด 50 มล. ที่เคลือบด้วยสารละลายซิลิโคน (ร้อยละ 1 ปริมาตร/ปริมาตร) และตกตะกอนเหล็กอีกครั้งด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (10 โมล/ล.) จำนวน 5.0 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,600 x g เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งไป ล้างตะกอนด้วยน้ำปราศจากเหล็ก 10 มล. เติมกรดฟอสฟอริคเข้มข้นจำนวน 0.5 มล. ลงไปในตะกอน $Fe(OH)_3$ ที่ล้างแล้ว เพื่อเปลี่ยน

สารประกอบเหล็กให้อยู่ในรูปเฟอร์ริคฟอสเฟต หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ (0.05 โมล/ล. ใน 95% เอธิลแอลกอฮอล) ลงไป 15 มล. เพื่อตกตะกอนเหล็กจากสารละลายของเหล็กในกรดฟอสฟอริคอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ให้เหล็กตกตะกอนเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,600 x g เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งไป เหลือแต่ตะกอนสีขาวของเกลือแอมโมเนียมของเฟอร์ริคฟอสเฟตคอมเพล็กซ์ [$NH_4H_2\{Fe(PO_4)_2\}.2H_2O$] ล้างตะกอนนี้ด้วย 95% เอธิลแอลกอฮอล 10 มล. นำตะกอนที่ล้างแล้วมาเติม aquasol 12 มล. เขย่าผสมจนตะกอนเหล็กมีลักษณะเป็นสารแขวนลอย (suspension) อยู่ใน aquasol แล้วจึงนำไปปั่นที่ 2,600 x g เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งไป

ค. <u>การวัดปริมาณเหล็กกัมมันตรังสี</u>

ตะตะกอนลงไปใน scintillation vial ซึ่งมี cab-o-sil (thixotropic gel powder) บรรจุอยู่ 0.75 กรัม ด้วย aquasol จำนวน 12 มล. เขย่าผสมตะกอนเหล็กกับ aquasol และ cab-o-sil จนเกิดลักษณะเป็นครีมแล้วจึงนำไปวัดปริมาณกัมมันตรังสีเบต้าของเหล็ก-55 และเหล็ก-59 ด้วยเครื่องวัดกัมมันตรังสีเบต้า (Liquid Scintillation Counter)

ปริมาณกัมมันตรังสีที่วัดได้ สามารถนำไปคำนวณหาการดูดซึมร้อยละของเหล็กได้โดยอาศัยความสัมพันธ์ดังนี้.-

$$\text{การดูดซึมร้อยละของเหล็ก} = \frac{\text{ปริมาตรเลือดในร่างกาย (มล.)} \times \text{กัมมันตรังสีในเลือดตัวอย่าง (dpm)} \times n \times 1.25}{\text{กัมมันตรังสีในสารมาตรฐาน (dpm)} \times \text{ปริมาตรเลือดตัวอย่าง (มล.)}} \times 1$$

เมื่อ n = จำนวนเท่าของการเจือจางสารมาตรฐาน

dpm = disintegration per minute

สารมาตรฐาน = สารกัมมันตรังสีเหล็กที่เติมลงไปในอาหารที่ให้ประชากรตัวอย่างรับประทาน ซึ่งจะนำมาทำให้เจือจางและวิเคราะห์หาปริมาณกัมมันตรังสีเช่นเดียวกับเลือดตัวอย่าง

1.25 ได้จาก $\frac{100}{80}$ โดยถือว่า ร้อยละ 80 ของเหล็กที่ดูดซึมจากอาหารนั้นจะปรากฏในกระแสเลือด

ปริมาตรเลือดในร่างกาย (blood volume) คำนวณจากความสัมพันธ์ ซึ่ง Suwanik และคณะ (54) ได้ให้ไว้ดังนี้

log ปริมาตรเลือดในร่างกาย = a + b(log น้ำหนักตัว − 1.5915)

สำหรับชายไทย ค่า a = 3.4733 b = 1.0282

5. การวิเคราะห์อาหารตัวอย่าง

นำอาหารตัวอย่าง คือข้าวคลุกปลาป่นที่บดละเอียด หรือนมถั่วเหลืองไปหาปริมาณฟอสเฟต ไฟเตต แคลเซี่ยม วิตามินซี เหล็ก โปรตีน และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ดังนี้ คือ

5.1 การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟต

ทำตามวิธีการของ Lindberg และ Ernster (45)

นำข้าวคลุกปลาป่น 5 ก. หรือนมถั่วเหลือง 5 มล. มาย่อยที่อุณหภูมิ 200°ซ. ในกรดไนตริก (ร้อยละ 35 ปริมาตร/ปริมาตร) 10 มล. และกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 5 มล. จนได้สารละลายใส ทิ้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วถ่ายสารละลายทั้งหมดลงใน volumetric flask ขนาด 100 มล. เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มล. ปิเปต 1.0 มล. ของสารละลายตัวอย่าง ที่เจือจางนี้ใส่หลอดทดลองแล้วนำไปเติมกรดกำมะถัน (5 โมล./ล.) จำนวน 0.4 มล. สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต (ร้อยละ 2.5 น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 0.8 มล. และสารละลาย Fiske and Subbarow Reducer จำนวน 0.4 มล. ตามลำดับ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 10 มล. เขย่าสารละลายทั้งหมดให้ผสมกันแล้วทิ้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จะได้สารละลายสีน้ำเงิน นำไปวัดความเข้มของการดูดแสงที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร หาปริมาณฟอสเฟตในตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานฟอสเฟต (NaH_2PO_4) ที่เข้มข้น 5.0–25.0 มก.

หลอด blank เติมสารละลายทุกอย่างยกเว้นสารละลายตัวอย่าง ทำให้มีปริมาตรเท่ากับหลอดสารละลายตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น

5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไฟเตท

ทำตามวิธีการของ Oberleas (55)

นำข้าวคลุกปลาป่น 5 ก. หรือนมถั่วเหลือง 10 มล. มาสกัด (extract) ไฟเตท โดยการแช่ด้วยสารละลายโซเดียมซัลเฟต (ร้อยละ 10 น้ำหนัก/ปริมาตร) ในกรดเกลือ (ร้อยละ 1.2 ปริมาตร/ปริมาตร) ให้อัตราส่วนของอาหาร : สารละลายโซเดียมซัลเฟต ในกรดเกลือ เท่ากับ 1:10 สำหรับข้าวคลุกปลาป่น หรือ 1:1 สำหรับนมถั่วเหลือง ใช้เวลาสกัด 2 ชั่วโมง กรองสารละลายที่ได้จากการสกัดผ่านกระดาษกรอง (Whatman No.1) นำส่วนใส 10 มล. มาตกตะกอนไฟเตทด้วยสารละลายเฟอร์ริคคลอไรด์ $FeCl_3$ 4 ก. ในกรดเกลือที่เข้มข้นร้อยละ 0.6 (ปริมาตร/ปริมาตร) 1 ล. จำนวน 5.0 มล. นำสารละลายไปต้มที่อุณหภูมิ 100°ซ. เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็น โดยการแช่ที่อุณหภูมิ 4°ซ. นำสารละลายไปปั่นที่ 1,200 x g. เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง และล้างตะกอนเฟอร์ริคไฟเตทที่ได้ด้วยสารละลายโซเดียมซัลเฟต (ร้อยละ 4 น้ำหนัก/ปริมาตร) ในกรดเกลือ (ร้อยละ 0.6 ปริมาตร/ปริมาตร) จำนวน 5.0 มล. 2 ครั้ง ละลายตะกอนเฟอร์ริคไฟเตท ด้วยกรดกำมะถันเข้มข้น 3.0 มล. หลังจากนั้นนำไปเติมกรดไนตริกเข้มข้น 1.0 มล. และย่อยที่อุณหภูมิ 200°ซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วทำให้สารละลายเจือจาง 1:4 ด้วยน้ำกลั่น นำไปหาปริมาณฟอสเฟตต่อไปด้วย Fiske and Subbarow Reducer ตามวิธีการของ Lindberg และ Ernster (45)

นำสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 1.0 มล. มาเติมกรดกำมะถัน (5 โมล./ล.) จำนวน 0.4 มล. สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต (ร้อยละ 2.5 น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 0.8 มล. และสารละลาย Fiske and Subbarow Reducer จำนวน 0.4 มล. ตามลำดับ แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 10 มล. เขย่าสารละลายทั้งหมดให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จะได้สารละลายสีน้ำเงิน นำไปวัดความเข้มของการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร หาปริมาณไฟเตทในสารละลายตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานไฟเตทที่เข้มข้น 5.0–25.0 มก.

หลอด blank เติมสารละลายทุกอย่าง ยกเว้นสารละลายตัวอย่าง ทำให้มีปริมาตรเท่ากับหลอดสารละลายตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น

5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซี่ยม

ตกตะกอนแคลเซี่ยมตามวิธีการของ Thomas และ Chamberlin (56) หาปริมาณแคลเซี่ยมฟอสเฟตด้วย Fiske and Subbarow Reducer ทำตามวิธีการของ Lindberg และ Ernster (45)

นำข้าวคลุกปลาป่น 5 ก. หรือนมถั่วเหลือง 5 มล. มาย่อยในกรดไนตริก (ร้อยละ 35 ปริมาตร/ปริมาตร) 10 มล. และกรดเปอร์คลอริคเข้มข้น 5 มล. ที่อุณหภูมิ 200°ซ. จนได้สารละลายใส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเจือจางสารละลายที่ได้ด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:10 นำสารละลายนี้มา 5.0 มล. ใส่ในหลอดทดลองที่มี methyl orange 1 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ ทำสารละลายให้เป็นกรดด้วยการเติมกรดเกลือ (ร้อยละ 18.5 ปริมาตร/ปริมาตร) ก่อนที่จะไปต้มให้เดือดที่อุณหภูมิ 100°ซ. แล้วตกตะกอนแคลเซี่ยมในรูปของแคลเซี่ยมออกซาเลท ด้วยสารละลายแอมโมเนียมออกซาเลท (ร้อยละ 4 น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 1.0 มล. ในสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (ร้อยละ 16 ปริมาตร/ปริมาตร) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ให้แคลเซี่ยมออกซาเลทตกตะกอนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกเอาแต่ตะกอนที่ 1,000 x g . นาน 10 นาที ล้างตะกอนแคลเซี่ยมออกซาเลทที่ได้ด้วยสารละลายแอมโมเนียมออกซาเลท (ร้อยละ 0.1 น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่เย็น จำนวน 5.0 มล. ละลายตะกอนด้วยกรดเกลือ (ร้อยละ 18.5 ปริมาตร/ปริมาตร) โดยการค่อย ๆ หยดกรดเกลือไปทีละหยดจนกระทั่งตะกอนละลายหมด แล้วระเหยกรดออกไปโดยการเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน ทำลายออกซาเลทด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ร้อยละ 30 ปริมาตร/ปริมาตร) จำนวน 0.5 มล. ที่ 100°ซ. เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนที่จะเติมน้ำกลั่นลงไป 5.0 มล.

เปลี่ยนสารละลายแคลเซี่ยมให้อยู่ในรูปแคลเซี่ยมไฮดรอกไซด์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (6 โมล./ล.) จำนวน 0.5 มล. ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วเปลี่ยนให้เป็นตะกอนแคลเซี่ยมฟอสเฟต ด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟต ($Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ ร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 0.5 มล. ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

นำไปปั่นแยกเอาตะกอนที่ 1,200 xg.. เป็นเวลา 10 นาที จะได้ตะกอนของแคลเซี่ยมฟอสเฟต ล้างตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายแอลกอฮอล (เอธิลแอลกอฮอล : เอมิลแอลกอฮอล : น้ำกลั่น เท่ากับ 58:10:32) 3 ครั้ง ครั้งละ 2.0 มล.

นำตะกอนแคลเซี่ยมฟอสเฟตไปหาปริมาณฟอสเฟตด้วย Fiske and Subbarow Reducerตามวิธีการของ Lindberg และ Ernsterโดยการเติมกรดกำมะถัน (5 โมล./ล.) จำนวน 0.4 มล. สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต (ร้อยละ 2.5 น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 0.8 มล. และสารละลาย Fiske and Subbarow Reducer จำนวน 0.4 มล. ตามลำดับ เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 10 มล. เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที สารละลายที่ได้มีสีน้ำเงิน นำไปวัดการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบปริมาณแคลเซี่ยมในสารละลายตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐานแคลเซี่ยม ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ที่เข้มข้น 0.1–0.5 มก.

หลอด blank เติมสารละลายทุกชนิดยกเว้นสารละลายตัวอย่าง ทำให้มีปริมาตรเท่ากับหลอดสารละลายตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น

5.4 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี</u>

ทำตามวิธีการของ Shichและ Sweet (46)

นำข้าวคลุกปลาป่น 1 ก. หรือนมถั่วเหลือง 1 มล. มาเติมฟอสเฟต–กรดซิตริคบัฟเฟอร์ (0.01 โมล./ล. pH 3.0)ในอัตราส่วนของอาหาร : บัฟเฟอร์ เท่ากับ 1:5 เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่า 1 นาที วิตามินซีในอาหารจะละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ นำไปปั่นแยกเอาส่วนน้ำใสที่ความเร็ว 1,000 xg . เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสจำนวน 1.0 มล. มาเติมสารละลาย Cu^{2+}-biquinoline จำนวน 20 มล. เติมบัฟเฟอร์จนได้ปริมาตร 25 มล. จะได้สารละลายสีม่วง นำไปวัดการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หาปริมาณวิตามินซี ได้โดยการเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานของ L-ascorbic acid ที่เข้มข้น 50–250 มก.

หลอด blank เติมสารละลายทุกอย่างยกเว้นสารละลายตัวอย่าง ทำให้มีปริมาตรเท่ากับสารละลายตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น

5.5 การวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กในอาหาร

การย่อยสลายสารอินทรีย์ทำตามวิธีการของ Bothwell และคณะ (19) ส่วนการหาปริมาณเหล็กด้วยสารละลายบาโธฟีแนนโทรลีน (bathophenanthroline) ทำตามวิธีการของ International Committee for Standardization in Hematology (44)

นำข้าวคลุกปลาป่น 1 ก. หรือนมถั่วเหลือง 1 มล. ใส่ใน Kjeldahl flask ขนาด 100 มล. และใส่ลูกแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ลงไปด้วย 3 เม็ด และย่อยในกรดกำมะถันเข้มข้น 5.0 มล. ที่อุณหภูมิ 300°ซ. จนได้สารละลายใส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ร้อยละ 30 ปริมาตร/ปริมาตร) 4.0 มล. แล้วนำไปย่อยที่อุณหภูมิ 200°ซ. จนได้สารละลายใสไม่มีสี หลังจากตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ถ่ายสารละลายทั้งหมดใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มล. ชะล้าง kjeldahl flask ด้วยกรดไฮโอไกลคลอริค 1 มล. แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3 มล. และน้ำปราศจากเหล็ก 40 มล. เทรวมเข้ากับสารละลายครั้งแรก เติมอินดิเคเตอร์ คือพารา-ไนโทรฟีนอล (ร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร) 1 หยด แล้วค่อย ๆ เติมแอมโมเนียม-ไฮดรอกไซด์เข้มข้นทีละนิด จนกระทั่งสารละลายมีสีเหลืองอ่อน เติมน้ำปราศจากเหล็กให้ปริมาตรครบ 100 มล. นำสารละลายนี้ไปหาปริมาณเหล็กในรูปของเฟอร์ริคซัลเฟตตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก International Committee for Standardization in Hematology (44)

นำสารละลายเฟอร์ริคซัลเฟต 5.0 มล. มาเติมสารละลาย Bathophenanthroline [ร้อยละ 0.2 (น้ำหนัก/ปริมาตร) disodium-4, 7-diphenyl-1, 10-phenanthroline disulphonate และร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) กรดไฮโอไกลคลอริค] จำนวน 0.2 มล. และ โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ (2 โมล./ล.) pH 4.75 จำนวน 1.0 มล. เขย่าผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิเป็นเวลา 15 นาที สารละลายที่ได้มีสีแดง นำไปวัดการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร หาปริมาณเหล็กในสารละลายตัวอย่างได้โดยการเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานเหล็กที่เข้มข้น 1.0–5.0 มค.ก.

หลอด blank เติมสารละลายทุกอย่างยกเว้นสารละลายตัวอย่าง ทำให้มีปริมาตรเท่ากับหลอดสารละลายตัวอย่างด้วยน้ำปราศจากเหล็ก

5.6 การสกัดโปรตีนและการหาปริมาณโปรตีน

การสกัดโปรตีนทำตามวิธีการของ Shibko และคณะ (57) ส่วนการหาปริมาณโปรตีนด้วยสารละลายไบยูเร็ท ทำตามวิธีการของ Gornal และคณะ (47)

นำข้าวคลุกปลาป่น (บดละเอียดและเจือจางด้วยน้ำกลั่น 1:6) จำนวน 1 มล. หรือนมถั่วเหลือง 1 มล. มาเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติค (ร้อยละ 70 น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 0.5 มล. เขย่าและตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่ 4°ซ. เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปั่นเอาแต่ตะกอนที่ 4°ซ. ด้วยความเร็ว 1,000 x g. เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติค (ร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร) 2.5 มล. 2 ครั้ง นำส่วนตะกอนไปเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.3 โมล./ล.) จำนวน 2.5 มล. แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อไฮโดรไลซ์เอาส่วน RNA ออกไป ตกตะกอนอีกครั้งด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติค (ร้อยละ 70 น้ำหนัก/ปริมาตร) 1.0 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ. เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเอาแต่ส่วนตะกอนที่ 4°ซ. ที่ความเร็ว 1,000 x g. เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนน้ำใสซึ่งเป็นส่วน RNA ออกไป ล้างตะกอนที่เหลือด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติค (ร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร) 2.5 มล. แล้วจึงนำตะกอนในสารละลายกรดไตรคลออะซิติค ไปไฮโดรไลซ์ เอาส่วน DNA ออกไปด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 90°ซ. เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วตกตะกอนโดยเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติค (ร้อยละ 70 น้ำหนัก/ปริมาตร) ลงไปอีก 0.5 มล. ให้ความเข้มข้นสุทธิของกรดไตรคลอโรอะซิติคเป็นร้อยละ 12 นำไปแช่ที่ 4°ซ. เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติค (ร้อยละ 1.5 น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 2.5 มล. ไฮโดรไลซ์โปรตีนด้วยการต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (1 โมล./ล.) จำนวน 5.0 มล. ที่อุณหภูมิ 100°ซ. เป็นเวลา 30 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 นำส่วนใสไปหาปริมาณโปรตีนด้วยไบยูเร็ตรีเอเจนต์ ตามวิธีการของ Gornal และคณะ (47)

นำส่วนใส 1.0 มล. ไปเติมไบยูเร็ทรีเอเจนต์ 2.0 มล. เขย่าให้สารละลายผสมกัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ได้สารละลายสีน้ำเงิน นำไปวัดความเข้มของการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หาปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างโดยการเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (Fraction V) ที่มีความเข้มข้น 1.0 – 5.0 มก.

หลอด blank เติมสารละลายทุกอย่าง ยกเว้นสารละลายตัวอย่าง ทำให้มีปริมาตรเท่ากับหลอดสารละลายตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น

5.7 การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

ทำตามวิธีการของ Krik (58)

นำข้าวคลุกปลาป่น 0.5 ก. หรือนมถั่วเหลือง 1 มล. มาย่อยสลายในกรดกำมะถันเข้มข้นจำนวน 10 มล. ที่อุณหภูมิ 350°ซ. 1 ชั่วโมง โดยใช้สารผสมซีลีเนียม 50 มล. เป็นตัวเร่งปฏิกริยา จะได้สารละลายใส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปจนปริมาตรครบ 100 มล. หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปใส่เครื่อง kjeldahl distilling unit เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ร้อยละ 40 น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 45 มล. ลงไป แล้วกลั่นเป็นเวลา 5 นาที ก๊าซแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจะถูกกลั่นออกมาและผ่านเข้าไปในสารละลายกรดบอริค (ร้อยละ 4 น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 25 มล. ที่บรรจุในreceiving flask โดยมีสารผสมอินดิเคเตอร์ ของ methylene blue กับ methyl red [ร้อยละ 1 ของ methylene blue (น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 5.4 มล. ผสมกับสารละลายอิ่มตัวของ methyl red ในเอธิลแอลกอฮอล์ที่เข้มข้นร้อยละ 95 จำนวน 54.6 มล.] อยู่ด้วย สารละลายของกรดบอริคเดิมจะมีสีม่วง และก๊าซแอมโมเนียจะเปลี่ยนสารละลายให้เป็นสีเขียว หลังจากกลั่น 5 นาทีแล้ว นำสารละลายแอมโมเนียไปไตเตรทกับสารละลาย กรดเกลือมาตรฐานที่เข้มข้น 1.0004 โมล./ล. จนกระทั่งสารละลายนั้นเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงตามเดิม

คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่มีอยู่ในสารละลายตัวอย่าง ดังนี้.-

$$\text{จำนวนโมลของกรดเกลือ} = \frac{N \times V}{1,000} = m$$

เมื่อ N = ความเข้มข้นของกรดเกลือ (โมล./ล.)

V = ปริมาตรของกรดเกลือที่ใช้ในการไตเตรท (มล.)

m = จำนวนโมลของกรดเกลือ (โมล)

จำนวนโมลของกรดเกลือนี้จะเท่ากับจำนวนโมลของปริมาณ NH_4^+ ที่มีอยู่ในสารละลาย ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด สามารถคำนวณได้จากสมการ

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด = m x 14.01

เมื่อน้ำหนักโมเลกุลของไนโตรเจน = 14.01

6. <u>สถิติที่ใช้ในการวิจัย</u> (59)

ค่าเฉลี่ยที่แสดงในผลการทดลองทั้งหมดเป็นค่าตัวกลางทางเลขคณิต ยกเว้นค่าเฉลี่ยของการดูดซึมร้อยละของเหล็กจะเป็นค่าตัวกลางเรขาคณิต เนื่องจากค่าการดูดซึมร้อยละของเหล็กจากสารประกอบเหล็กของประชากรตัวอย่างมีการกระจายสูง จึงเปลี่ยนค่าเหล่านี้เป็นค่า log ก่อนที่จะนำไปคิดค่าต่าง ๆ ทางสถิติ (60) การเปรียบเทียบระหว่างค่าทางสถิติของการทดลอง 2 การทดลองภายในกลุ่มเดียวกัน จะใช้ paired t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ส่วนต่างกลุ่มกันจะใช้ unpaired t-test และความสัมพันธ์ระหว่างการดูดซึมเหล็กจากสารประกอบชนิดต่าง ๆ กับ standard reference dose พิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ (correlation coefficient) โดยใช้สูตรดังนี้คือ

6.1 <u>ตัวกลางเลขคณิต</u>

$$\bar{x} = \frac{\text{ผลรวมของข้อมูลทั้งหมด}}{\text{จำนวนข้อมูลทั้งหมด}} = \frac{x_i}{n}$$

เมื่อ $\bar{x}$ = ตัวกลางเลขคณิต

x_i = ค่าตัวแปรอิสระ 1 ชุด

n = จำนวนข้อมูล

6.2 ตัวกลางเรขาคณิต

$$GM = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 \cdots\cdots x_n}$$

$$\log GM = \frac{1}{n}(\log x_1 + \log x_2 + \log x_3 + \cdots\cdots \log x_n$$

$$= \frac{\Sigma \log x}{n}$$

เมื่อ GM = ตัวกลางเรขาคณิต

x = ค่าผันแปรอิสระ 1 ชุด

n = จำนวนข้อมูล

6.3 Paired t-test

$$t = \frac{\bar{d}}{S_{\bar{d}}}$$

เมื่อ d = ผลต่างระหว่างค่าก่อนและหลังการทดลอง

$\bar{d}$ = ค่าเฉลี่ยของค่าผลต่าง = $\frac{\Sigma d}{n}$

S_d = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลต่าง = $\sqrt{\frac{(d - \bar{d})^2}{n - 1}}$

$S_{\bar{d}}$ = ความคลาดเคลื่อนของผลต่าง = $\frac{Sd}{\sqrt{n}}$

6.4 Unpaired t-test

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2 - \mu_1 - \mu_2}{\sqrt{\frac{S_p^2}{n_1} + \frac{S_p^2}{n_2}}}$$

เมื่อ $\bar{x}_1, \bar{x}_2$ = ค่าเฉลี่ยของ 1, 2

μ_1, μ_2 = ค่าเฉลี่ยของประชากรที่ 1, 2

S_p^2 = ค่าความแปรปรวนร่วม (pooled variance)

$$= \frac{(n_1 - 1)\, S_1^2 + (n_2 - 1)\, S_2^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)}$$

n_1, n_2 = จำนวนข้อมูลของตัวอย่างกลุ่มที่ 1, 2

S_1^2, S_2^2 = ค่าความแปรปรวนของตัวอย่างที่ 1, 2

6.4 สัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์

$$\text{สัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ } (r) = \frac{(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{(n - 1) S_x S_y}$$

เมื่อ x_i คือค่าผันแปรอิสระ 1 ชุด

y_i คือค่าผันแปรตาม 1 ชุด

n จำนวนค่าผันแปร หรือขนาดของตัวอย่าง

$\bar{x}$ ค่าเฉลี่ยของตัวแปร x

$\bar{y}$ ค่าเฉลี่ยของตัวแปร y

S_x ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวแปร x

S_y ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวแปร y

r สัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ที่ต้องการหาค่า

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย