บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และสารเคมี

1. สัตว์ทดลองและอุปกรณ์สำหรับเตรียมสัตว์ทดลอง

1.1 ปลาดุกพันธุ์ผสมขนาดความยาวประมาณ 25 ซม. น้ำหนักประมาณ 100 -150 กรัม

1.2 ตู้กระจกขนาด 36 x 36 x 60 ซม^3.

1.3 อาหารปลาสำเร็จรูปชนิดเม็ด

1.4 air pump และหัวทราย

2. เครื่องมือ (Materials)

2.1 Analytical balance (A 200S, Sartorius)

2.2 Magnetic stirrer (RC-2, Tokyo Rikakikai Co.,Ltd)

2.3 Oxygen meter (YSI Incoporated Co.,Inc.,USA)

2.4 Safeguard centrifuge (Clay Adams Co.,Inc.)

2.5 Standard pH meter (EA 920, Orion Research)

2.6 Thermometer

2.7 Tissue grinder (Wheaton CO.)

2.8 UV-visible recording spectrophotometer (UV-160A, Shimadsu)

3. สารเคมี (Reagents)

3.1 Acetic acid (E.Merck)

3.2 Acetylthiocholine iodide (Sigma Chemical Company)

3.3 Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) (E.Merck)

3.4 5:5 dithiobis-(2-nitrobenzoic)acid (DTNB) (Sigma Chemical Company)

3.5 Enzyme bovine cholinesterase (Sigma Chemical Company)

3.6 Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) (Farmitalia Carlo Erba)

3.7 94% w/w Methyl parathion (E.Merck)

3.8 Monopotassium hydrogen phosphate (KH_2PO_4) (E.Merck)

3.9 Potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$) (E.Merck)

3.10 Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) (E.Merck)

3.11 Sodium cyanide (NaCN) (E.Merck)

3.12 Sodium nitrite ($NaNO_2$) (E.Merck)

4. การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) 0.1 M, pH 8.0

เตรียมโดยการผสมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 M (14.2 กรัม/ลิตร) จำนวน 475 มล. กับสารละลายโมโนโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 M (13.6 กรัม/ลิตร) โดยค่อยๆ เติมสารละลายโมโนโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 M ลงไป เพื่อปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 8.0 สารละลายนี้เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°ซ ได้นาน 14 วัน

2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M, pH 7.0

เตรียมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 M (14.2 กรัม/ลิตร) 50 มล. ผสมกับสารละลายโมโนโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 M (13.6 กรัม/ลิตร) โดยค่อยๆ เติมสารละลายโมโนโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 M ลงไป เพื่อปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 สารละลายนี้เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°ซ ได้นาน 14 วัน

3. สารละลายสับสเตรท (substrate acetylthiocholine iodide solution)

เตรียมโดยการละลายอะเซทิลไธโอโคลีนไอโอไดด์ (acetylthiocholine iodide) 0.2167 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มล. สารละลายนี้เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°ซ ได้นาน 10-15 วัน

4. สารละลาย Dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB) 0.01 M

ละลาย DTNB 0.396 กรัมและโซเดียมไบคาร์บอเนต 0.15 กรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M, pH 7.0 จำนวน 50 มล. สารละลายนี้เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°ซ ได้นาน 14 วัน

5. สารละลายเอนไซม์มาตรฐาน (0.28 หน่วยสากล/มก.)

เตรียมโดยชั่ง bovine erythrocyte cholinesterase 0.01 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่น 10 มล. จะได้ปริมาณเอนไซม์ 0.28 หน่วยสากล ต่อ 1 มล. นำไปเจือจางต่อด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 0.0022, 0.0044, 0.0088, 0.0175, 0.035, 0.0467 และ 0.07 หน่วยสากล/มล. ตามลำดับ

6. สารละลายโปแตสเซียมเฟอริไซยาไนด์

เตรียมโดยละลายโปแตสเซียมเฟอริไซยาไนด์ 5 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มล. จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 20 % [20% ($K_3Fe(CN)_6$)] สารละลายนี้เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °ซ ได้นาน 7 วัน เมื่อต้องการใช้นำไปเจือจางต่อด้วยน้ำกลั่น โดยใช้อัตราส่วน 20% $K_3Fe(CN)_6$ 1 ส่วนต่อน้ำกลั่น 3 ส่วน เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 5 % $K_3Fe(CN)_6$

7. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.067 M, pH 6.6

เตรียมโดยการละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.2 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มล. และโมโนโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.1 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มล. ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 6.6 โดยการค่อยๆ เติมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตลงในสารละลายโมโนโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต สารละลายนี้เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °ซ ได้นาน 14 วัน เมื่อต้องการใช้นำไปเจือจางต่อด้วยน้ำกลั่นโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.067 M, pH 6.6 1 ส่วนต่อน้ำกลั่น 3 ส่วนจะได้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.017 M, pH 6.6 สำหรับใช้ในขั้นตอนการวัด

8. สารละลายโซเดียมไซยาไนด์ (10 % Sodium cyanide neutralized solution)

เตรียมโดยผสมโซเดียมไซยาไนด์ที่ได้จากการละลายโซเดียมไซยาไนด์ 2.5 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มล. กับกรดอะซิติก (acetic acid) ที่เตรียมจากการเจือจางกรดอะซิติกเข้มข้นจำนวน 3 มล. ด้วยน้ำกลั่นจนครบ 25 มล. การเตรียมต้องผสมกันอย่างระมัดระวังในตู้ควัน (hood) โดยการเติมกรดอะซิติกที่เจือจางแล้วลงในสารละลายโซเดียมไซยาไนด์ ในอัตราส่วนที่เท่าๆ กัน เมื่อผสมแล้วต้องใช้ภายในเวลา 1 ชั่วโมง

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 การเตรียมเลือด

ดูดเลือดปลาดุกพันธุ์ผสมกลุ่มละ 2-3 ตัว โดยดูดที่ caudal dorsal aorta สูงขึ้นจากโคนหางประมาณ 1-1.5 นิ้ว ทั้งในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม นำเลือดที่ได้ในแต่ละกลุ่มมารวมกันใส่ในขวดที่มี EDTA เลือดที่ได้จะนำไปวัดหาสมรรถนะของเอนไซม์โมลินเอสเทอเรส ปริมาณเมท-ฮีโมโกลบินและค่าทางโลหิตวิทยา

1.2 การเตรียมสมอง

ตัดเปิดกระโหลกปลาดุกพันธุ์ผสม กลุ่มละ 2-3 ตัว นำสมองของปลาที่ได้ มาบดรวมกันในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 (อัตราส่วนเนื้อสมอง : บัฟเฟอร์ = 10 มก. : 2 มล.) สมองที่เตรียมไว้นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -10°ซ จนกว่าจะนำมาศึกษา

2. การวัดสมรรถนะของเอนไซม์โมลินเอสเทอเรสในเลือดและสมอง

วัดสมรรถนะของเอนไซม์โมลินเอสเทอเรสในเลือดและสมอง โดยประยุกต์ใช้วิธีการของ Ellman และคณะ (1961) มีขั้นตอนการวัดดังนี้

2.1 การวัดสมรรถนะของเอนไซม์โมลินเอสเทอเรสในเลือด

2.1.1 นำเลือดที่เตรียมไว้มาเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 โดยใช้อัตราส่วนที่เหมาะสม โดยในที่นี้ใช้อัตราส่วนเลือด : บัฟเฟอร์ เป็น 1 : 300 หรือ 1 : 200 (เลือด 20 หรือ 30 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 6 มล.)

2.1.2 ใช้ปิเปตดูดเลือดที่เจือจางแล้ว 3 มล. ใส่ลงในคิวเวตต์ (cuvette) ทั้ง 2 หลอด โดยกำหนดให้หลอดหนึ่งเป็นหลอดตัวอย่าง (sample) และอีกหลอดเป็นแบลงค์ (blank)

2.1.3 เติม DTNB 25 ไมโครลิตร ลงในคิวเวตต์ทั้ง 2 หลอด ผสมให้เข้ากัน

2.1.4 นำคิวเวตต์ทั้ง 2 หลอด ไปวางในช่องวัดของเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ปรับความยาวคลื่นแสงอยู่ที่ 412 นาโนเมตร ปรับค่าเริ่มต้นที่ 0

2.1.5 เติมสารละลายสับสเตรท (acetylthiocholine iodide) 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดตัวอย่างผสมให้เข้ากัน

2.1.6 บันทึกการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (optical density) ภายในเวลา 10 นาที หาค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่เปลี่ยนไปต่อนาที (ΔA) แล้วนำไปคำนวณหาสมรรถนะเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในเลือด

การคำนวณหาค่าสมรรถนะเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในเลือด โดยประยุกต์ใช้วิธีการของ Harlin และ Ross (1990)

$$\text{ChE activity as } \mu\text{moles of substrate hydrolyzed/min/ml} = \Delta A/\text{min} \times 22.06$$

$$22.6 = [\,1000/(1.36 \times 10^{4} \times 1)\,] \times DF$$

โดย $1.36 \times 10^{4}\ M^{-1}cm^{-1}$ = extinction coefficient of yellow anion

1000 = conversion from mmoles/ml to μmoles/ml

1 = path length, cm

DF = dilution factor = 200 or 300

2.2 การวัดสมรรถนะของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในสมอง

2.2.1 ใช้ปิเปตดูดสมองที่บดเตรียมไว้แล้วมา 1 มล. แล้วเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ลงไปอีก 3 มล.

2.2.2 ใช้ปิเปตดูดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 จำนวน 2.6 มล. ใส่ในคิวเวตต์ ทั้ง 2 หลอด โดยกำหนดให้หลอดหนึ่งเป็นหลอดตัวอย่างและอีกหลอดเป็นแบลงค์

2.2.3 เติมสมองที่บดผสมในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 จำนวน 0.4 มล. ลงในคิวเวตต์ ทั้ง 2 หลอด

2.2.4 เติม DTNB 100 ไมโครลิตร ลงในคิวเวตต์ ทั้ง 2 หลอด ผสมให้เข้ากัน

2.2.5 นำคิวเวตต์ทั้ง 2 หลอด ไปวางในช่องวัดของเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วปรับความยาวคลื่นแสงที่ 412 นาโนเมตร ปรับค่าเริ่มต้นที่ 0

2.2.6 เติมสารละลายสับสเตรท (acetylthiocholine iodide) 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน

2.2.7 บันทึกการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (optical density) ภายในเวลา 6 นาที หาค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่เปลี่ยนไปต่อนาที (ΔA) แล้วนำไปคำนวณหาสมรรถนะเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในสมอง

การคำนวณหาสมรรถนะเอนไซม์ในสมอง โดยประยุกต์ใช้วิธีการของ Ellman และคณะ (1961)

$$R = \frac{\Delta A \times 10^2}{1.36(400/3120)\,Co}$$

$$= 5.74\,(10^2) \times \frac{\Delta A}{Co}$$

โดยที่ R = rate in μmoles of substrate hydrolyzed/min/g of tissue

ΔA = change in absorbance/min

Co = original concentration of tissue 1.25 mg/ml

$1.36 \times 10^4\ M^{-1}cm^{-1}$ = extinction coefficient of yellow anion

3. การตรวจวัดปริมาณเมทฮีโมโกลบิน

การตรวจหาปริมาณเมทฮีโมโกลบินโดยประยุกต์ใช้วิธีการของ Wedemayer และ Yasutake (1977) มีขั้นตอนดังนี้ คือ

3.1 ใช้ปิเปตดูดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.017 M, pH 6.6) จำนวน 9.9 มล. ใส่ลงในหลอดเซนติฟิวส์ แล้วเติมเลือดลงไป 0.1 มล. ผสมให้เข้ากันดี นำไปปั่นด้วยความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

3.2 ดูดส่วนที่เป็นฮีโมไลเสตก์ (hemolysate) มา 3 มล. นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 630 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.017 M, pH 6.6) เป็นแบลงก์ กำหนดให้ค่าที่วัดได้เป็นค่า A1 (ก่อนทำการวัดต้องปรับค่าเริ่มต้นที่ 0 ก่อน)

3.3 เติมสารละลายไซยาไนด์จำนวน 30 ไมโครลิตร ลงไปในคิวเวตต์ทั้ง 2 หลอด คือหลอดตัวอย่างและหลอดที่เป็นแบลงก์ ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 2 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง ค่าที่วัดได้เป็นค่า A2 ซึ่งในขั้นตอนนี้โซเดียมไซยาไนด์เปลี่ยนเมทฮีโมโกลบินเป็นไซยาโนเมท-ฮีโมโกลบิน (cyanomethemoglobin) และ ไม่ดูดกลืนแสงที่ 630 นาโนเมตร

3.4 ใช้ปิเปตดูดเลือดและ 5% $K_3Fe(CN)_6$ จำนวนอย่างละ 0.1 มล. เติมลงใน สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.017 M, pH 6.6) 9.8 มล. สำหรับหลอดที่เป็นหลอดตัวอย่าง ส่วนหลอดที่เป็นแบลงก์ เติม $K_3 Fe(CN)_6$ จำนวน 0.1 มล. ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.017 M, pH 6.6)

9.9 มล. ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 2 นาที เมื่อครบ 2 นาทีแล้ว ดูดสารละลายที่เตรียมไว้จากทั้ง 2 หลอดมา หลอดละ 3 มล. นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 630 นาโนเมตร ค่าที่วัดได้เป็นค่า A3 ซึ่งฮีโมโกลบินทั้งหมดเปลี่ยนไปเป็นเมทฮีโมโกลบิน 100 %

3.5 เติมสารละลายไซยาไนด์จำนวน 30 มล. ลงไปในคิวเวตต์ทั้งหลอดตัวอย่างและ หลอดที่เป็นแบลงค์ ที่เตรียมได้จากข้อ 3.4 ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 2 นาที วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 630 นาโนเมตร ค่าที่อ่านได้เป็นค่า A4 ในขั้นตอนนี้เมทฮีโมโกลบินเปลี่ยนเป็นไซยาโนเมทฮีโมโกลบิน 100 %

การคำนวณหาปริมาณเมทฮีโมโกลบิน

$$\text{เปอร์เซนต์เมทฮีโมโกลบิน (\% methemoglobin)} = \frac{(A1-A2)}{(A3-A4)} \times 100$$

4. การหาค่าทางโลหิตวิทยา

การหาค่าทางโลหิตวิทยาจากเลือดที่เตรียมไว้ โดยประยุกต์ใช้วิธีการของ Benjamin (1961) ทำการวัดหาค่าฮีมาโตคริต (Hct) ฮีโมโกลบิน (Hb) ตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC)และเม็ดเลือดขาว (WBC)

5. การหาความเที่ยงตรงของการตรวจวัดสมรรถนะเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสในเลือดและสมองของปลาดุกพันธุ์ผสม

ทำการวัดหาสมรรถนะเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสในเลือดและในสมอง จากปลาดุกพันธุ์ผสมหลายๆ ตัวที่นำมารวมกันเป็นตัวอย่างเดียว (pooled whole blood and brain) ทำการวัดทั้งหมด 20 ครั้ง นำค่าที่คำนวณได้มาหาค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (SE) และค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปร (%CV)

6. การหาค่าความเที่ยงตรงของการวัดหาปริมาณเมทฮีโมโกลบินในเลือดปลาดุกพันธุ์ผสม

ทำการตรวจวัดหาปริมาณเมทฮีโมโกลบินในเลือดปลาดุกพันธุ์ผสมหลายๆ ตัว ที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์ 12.5 มก./ลิตร นำมารวมกันเป็นตัวอย่างเดียว ทำการวัดทั้งหมด 20 ครั้ง นำค่าที่คำนวณได้มาหาค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (SE) และ ค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปร (%CV)

7. การหาเปอร์เซนต์รีโคเวอรี่ (% recovery) ของสมรรถนะเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในเลือดปลาดุกพันธุ์ผสม

นำเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสมาตรฐาน (bovine erythrocyte cholinesterase) มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0.0022, 0.0044, 0.0088, 0.0175, 0.035, 0.0467 และ 0.07 หน่วยสากล/มก. ตามลำดับ เติมลงในเลือดที่ผ่านการวัดสมรรถนะของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสแล้วโดยจะเติมสารละลายเอนไซม์มาตรฐานลงไป 50 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่เปลี่ยนแปลงไปในเวลา 10 นาที นำค่าสมรรถนะของเอนไซม์ที่ตรวจวัดได้หลังจากจากเติมเอนไซม์ที่ทราบค่าแล้วมาเปรียบเทียบกับสมรรถนะของเอนไซม์ที่ควรจะเป็น โดยคำนวณจาก

$$\text{เปอร์เซนต์รีโคเวอรี่ (\% recovery)} = \frac{\text{ค่าที่วัดได้}}{\text{ค่าที่ควรจะเป็น}} \times 100$$

ขั้นตอนการทดลอง

1. การเลี้ยงปลา

ปลาดุกพันธุ์ผสมขนาดความยาวประมาณ 25 ซม. น้ำหนัก 100-150 กรัม เลี้ยงในตู้กระจกขนาด 36 x 36 x 60 ซม^3 ความหนาแน่นของปลา 1 ตัว/ตู้/น้ำ 20 ลิตร pH 6.5-8.0, salinity = 0 กก./ลิตร, hardness 119 มก./ลิตร, alkalinity 53 มก./ลิตร, ammonia ≤ 0.02 มก./ลิตร , nitrite ≤ 0.001 มก./ลิตร มีหัวทราย และ air pump ช่วยเพิ่มออกซิเจนแก่ปลา ปริมาณออกซิเจนในน้ำ = 6.0-8.0 มก./ลิตร ก่อนการทดลองจะทำการแยกปลาออกมาเลี้ยงเพื่อให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขณะทำการทดลองจะงดให้อาหาร

2. การศึกษาผลของเมททิลพาราไธออนต่อสมรรถนะของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในเลือดและสมอง ค่าทางโลหิตวิทยา

2.1 แบ่งปลาออกเป็น 8 กลุ่ม กำหนดให้ปลาดุก 2-3 ตัว เป็น 1 ตัวอย่าง

กลุ่มที่1 กลุ่มควบคุม ให้ 95 % เอธานอล 2 มล./น้ำ 20 ลิตร
กลุ่มที่2 ให้เมททิลพาราไธออน 0.125 มก./ลิตร
กลุ่มที่3 ให้เมททิลพาราไธออน 0.25 มก./ลิตร
กลุ่มที่4 ให้เมททิลพาราไธออน 0.5 มก./ลิตร
กลุ่มที่5 ให้เมททิลพาราไธออน 1.0 มก./ลิตร

กลุ่มที่6 ให้เมททิลพาราไธออน 1.5 มก./ลิตร
กลุ่มที่7 ให้เมททิลพาราไธออน 2.0 มก./ลิตร
กลุ่มที่8 ให้เมททิลพาราไธออน 4.0 มก./ลิตร

ในแต่ละกลุ่มจะเลี้ยงปลา 1 ตัว/ตู้/น้ำ 20 ลิตร ในตู้กระจก 36 x 36 x 60 ซม^3. ก่อนทำการทดลองจะแยกเอาปลาออกมาเลี้ยงเพื่อให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมก่อนนาน 24 ชั่วโมง ปลาในกลุ่มทดลองจะได้รับเมททิลพาราไธออนความเข้มข้นต่างๆ ที่ได้เตรียมไว้ ส่วนในกลุ่มควบคุมจะได้รับแต่เอธานอล สังเกตอาการปลาก่อนที่จะสัมผัสกับเมททิลพาราไธออนและภายหลังสัมผัสกับสารเคมีแล้วที่เวลา 30 นาที, 2 ชั่วโมงและเมื่อครบ 24 ชั่วโมง ตามที่กำหนด นำปลามาเจาะเลือดเพื่อตรวจวัดหาสมรรถนะของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรส ค่าทางโลหิตวิทยาและแยกเอาสมองออกมาตรวจวัดหาสมรรถนะของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรส

3. การศึกษาผลของโซเดียมไนไตรท์ต่อปริมาณเมทฮีโมโกลบิน สมรรถนะของเอนไซม์โมลีนเอส-เทอเรสในเลือดและในสมอง ค่าทางโลหิตวิทยา

3.1 แบ่งปลาออกเป็น 9 กลุ่ม กำหนดให้ปลาคุก 2-3 ตัว เป็น 1 ตัวอย่าง

กลุ่มที่1 กลุ่มควบคุม
กลุ่มที่2 ให้โซเดียมไนไตรท์ 6.25 มก./ลิตร
กลุ่มที่3 ให้โซเดียมไนไตรท์ 12.5 มก./ลิตร
กลุ่มที่4 ให้โซเดียมไนไตรท์ 25 มก./ลิตร
กลุ่มที่5 ให้โซเดียมไนไตรท์ 50 มก./ลิตร
กลุ่มที่6 ให้โซเดียมไนไตรท์ 75 มก./ลิตร
กลุ่มที่7 ให้โซเดียมไนไตรท์ 100 มก./ลิตร
กลุ่มที่8 ให้โซเดียมไนไตรท์ 125 มก./ลิตร
กลุ่มที่9 ให้โซเดียมไนไตรท์ 150 มก./ลิตร

โดยในแต่ละกลุ่มจะเลี้ยงปลา 1 ตัว/ตู้/น้ำ 20 ลิตร ก่อนทำการทดลองจะแยกปลาออกมาเลี้ยงเพื่อให้ปลาคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมก่อน 24 ชั่วโมง นำโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ใส่ลงในตู้ปลาสำหรับกลุ่มทดลอง สังเกตอาการปลาก่อนที่จะสัมผัสกับโซเดียมไนไตรท์ที่เวลา 30 นาที, 2 ชั่วโมงและเมื่อสัมผัสกับสารเคมีครบ 24 ชั่วโมง ตามที่กำหนด หลังจากนั้นนำปลามาเจาะ

เลือดเพื่อตรวจวัดหาปริมาณเมทฮีโมโกลบิน สมรรถนะของเอนไซม์โซลีนเอสเทอเรส ค่าทางโลหิตวิทยาและ แยกเอาสมองออกมาตรวจหาสมรรถนะของเอนไซม์โซลีนเอสเทอเรส

4. การศึกษาผลร่วมกันของโซเดียมไนไตรท์และเมททิลพาราไธออน ต่อการเกิดภาวะเมทฮีโมโกลบินนีเมีย ค่าทางโลหิตวิทยา สมรรถนะของเอนไซม์โซลีนเอสเทอเรสทั้งในเลือดและสมอง

4.1 แบ่งปลาออกเป็น 7 กลุ่ม กำหนดให้ปลาคุก 2-3 ตัว เป็น 1 ตัวอย่าง

กลุ่มที่1 กลุ่มควบคุมให้ 95 % เอธานอล 2 มล./น้ำ 20 ลิตร
กลุ่มที่2 ให้โซเดียมไนไตรท์ 12.5 มก./ลิตร และ เมททิลพาราไธออน 0.25 มก./ลิตร
กลุ่มที่3 ให้โซเดียมไนไตรท์ 25 มก./ลิตร และ เมททิลพาราไธออน 0.25 มก./ลิตร
กลุ่มที่4 ให้โซเดียมไนไตรท์ 50 มก./ลิตร และ เมททิลพาราไธออน 0.25 มก./ลิตร
กลุ่มที่5 ให้โซเดียมไนไตรท์ 75 มก./ลิตร และ เมททิลพาราไธออน 0.25 มก./ลิตร
กลุ่มที่6 ให้โซเดียมไนไตรท์ 100 มก./ลิตร และ เมททิลพาราไธออน 0.25 มก./ลิตร
กลุ่มที่7 ให้โซเดียมไนไตรท์ 150 มก./ลิตร และ เมททิลพาราไธออน 0.25 มก./ลิตร

ในแต่ละกลุ่มจะเลี้ยงปลา 1 ตัว/ตู้ /น้ำ 20 ลิตร กลุ่มทดลองจะได้รับโซเดียมไนไตรท์และเมททิลพาราไธออนในความเข้มข้นต่างๆ ที่ได้เตรียมเอาไว้ สังเกตอาการปลาก่อนที่จะสัมผัสกับสารเคมี และภายหลังจากสัมผัสกับสารเคมีแล้วที่เวลา 30 นาที, 2 ชั่วโมงและเมื่อครบ 24 ชั่วโมง ตามที่กำหนด นำปลามาทำการเจาะเลือดเพื่อทำการตรวจวัดหาปริมาณเมทฮีโมโกลบิน สมรรถนะของเอนไซม์โซลีนเอสเทอเรส ค่าทางโลหิตวิทยาและแยกเอาสมองออกมาทำการตรวจวัดหาสมรรถนะของเอนไซม์โซลีนเอสเทอเรส

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

1. เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยใช้ unpaired Student's "t" test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2. ใช้ one-way ANOVA โดยวิธี Duncan 's multiple range test เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%