บทที่ 2

วิธีการทดลอง

การทดลองนี้แบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลอง การทดลองครั้งที่ 2 ทำขึ้นเพื่อยืนยันผลการทดลองที่ 1 การทดลองทั้ง 2 ครั้งใช้ปลาทดลองที่มีขนาดแตกต่างกันดังนี้คือ

การทดลองที่ 1 ใช้ปลาทดลองที่มีขนาดใหญ่กว่าการทดลองที่ 2 คือมีน้ำหนักเฉลี่ย 17 กรัม/ตัว เป็นเวลา 8 สัปดาห์

การทดลองที่ 2 ใช้ปลาทดลองที่มีขนาดเล็กกว่าการทดลองที่ 1 คือมีน้ำหนักเฉลี่ย 2.7 กรัม/ตัว เป็นเวลา 12 สัปดาห์

2.1การทดลองที่ 1

2.1.1 สถานที่และการเตรียมอุปกรณ์ในการเลี้ยงปลา

สถานที่ การทดลองทั้งสองได้ใช้ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์น้ำของสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา โดยการทดลองที่ 1 ใช้เวลาในการทดลอง 8 สัปดาห์ โดยเริ่มในเดือนมกราคม และสิ้นสุดในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2534 และการทดลองที่ 2 ใช้เวลาในการทดลอง 12 สัปดาห์โดยเริ่มในเดือนกรกฎาคม สิ้นสุดในเดือนตุลาคม 2535

ตู้เลี้ยงปลา ใช้ตู้กระจกขนาด 30 x 30 x 60 ลูกบาศก์เซนติเมตรจำนวน 15 ตู้ แต่ละตู้มีท่อน้ำเข้าและท่อน้ำออกอยู่ตรงข้ามกัน โดยมีอัตราการไหลถ่ายเทของน้ำนาทีละประมาณ 0.7 ลิตร และมีท่อลมติดตั้งอยู่เพื่อให้อากาศ น้ำทะเลที่ใช้ได้จากน้ำทะเลธรรมชาติที่มีความเค็มระหว่าง 29.0-30.5 ส่วนในพันซึ่งได้ผ่านเครื่องกรองทรายแล้ว

2.1.2 การเตรียมปลา

นำลูกปลากะพงขาวขนาด 2 นิ้วจากโรงเพาะฟักของสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง มาฝึกให้ยอมรับอาหารกึ่งบริสุทธิ์ เมื่อเริ่มทำการทดลองปลามีน้ำหนักเฉลี่ย 17 กรัม/ตัว ทำการคัดปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกัน 200 ตัว ทำการสุ่มนับชั่งใส่ตู้กระจกตู้ละ 10 ตัว พร้อมทั้งจดบันทึกน้ำหนักและจำนวนตัวเริ่มต้นของแต่ละตู้ สุ่มสูตรอาหารทดลองให้เข้ากับตู้โดยวิธีสุ่มตลอด (complete randomized design) พร้อมทั้งติดชื่อสูตรอาหารทดลองที่สุ่มได้ที่หน้าตู้

2.1.3 การเตรียมอาหารปลา

อาหารที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นอาหารกึ่งบริสุทธิ์ (semipurified) ที่มีคุณค่าทางโภชนาการต่างๆครบถ้วน คือมี โปรตีน 48.22 % ไขมัน 14.68 % ความชื้น 6.66 % และ เถ้า 3.37 % ยกเว้นปริมาณแคลเซียมแพนโตทีเนตซึ่งในอาหารของแต่ละสูตรมีปริมาณแตกต่างกัน 5 ระดับดังนี้คือ 0, 15, 30, 60 และ 90 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหารแห้ง

ทำการผสมวัสดุแห้งทั้งหมดของแต่ละสูตร ในเครื่องผสมแบบใบพายเป็นเวลา 7 นาที จากนั้นจึงใส่น้ำมันตับปลาและน้ำมันถั่วเหลือง เมื่อน้ำมันผสมกับวัสดุแห้งดีแล้วจึงใส่น้ำในอัตรา 600 มิลลิลิตร/กิโลกรัมอาหารแห้ง (สำหรับการทดลองที่ 1) และ 750 มิลลิลิตร/กิโลกรัมอาหารแห้ง น้ำที่ใส่เป็นน้ำที่มีมีแคลเซียมแพนโตทีเนตละลายอยู่ตามปริมาณในแต่ละสูตร เมื่อผสมเข้ากันดีแล้วจึงนำมาทำการอัดเม็ดด้วยเครื่องบดเนื้อ อัดออกมาเป็นเส้นแล้วหักให้เป็นเม็ดเก็บไว้ในตู้แช่แข็งทันที เพื่อลดการออกซิเดชั่นของวิตามินซี อาหารจะถูกนำออกจากตู้แช่แข็งเฉพาะส่วนที่จะใช้ในวันนั้น และเก็บไว้ในตู้เย็นระหว่างมื้อ อาหารเปียกนี้จะถูกทำขึ้นทุกๆ 3-5 วัน ครั้งละ 200 กรัม

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของอาหารทดสอบสำหรับการทดลองที่ 1

วัสดุ	สูตรที่(ชุดการทดลองที่)					
	1	2	3	4	5	
วิตามินฟรีเคซีน (vitamin free casein)	390	390	390	390	390	กรัม
เจลาติน(gelatin)	78	78	78	78	78	"
น้ำมันตับปลา(cod liver oil)	80	80	80	80	80	"
น้ำมันถั่วเหลือง(soybean oil)	80	80	80	80	80	"
เด็กซตริน(dextrin)	50	50	50	50	50	"
แอลฟาเซลลูโลส (ะ-cellulose)	151	151	151	151	151	"
วิตามินซี(vitamin C coated)	1	1	1	1	1	"
โซเดียมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (NaCMC)	50	50	50	50	50	"
เกลือแร่รวม(mineral mixture)	40	40	40	40	40	" (ตารางที่ 2)
กรดอะมิโนรวม (amino acid mixture)	70	70	70	70	70	" (ตารางที่ 3)
วิตามินรวมที่ไม่มีกรดแพนโตเทนิค (vitamin mixture)	10	10	10	10	10	" (ตารางที่ 4)
รวม	1000	1000	1000	1000	1000	"
กรดแพนโตเทนิค	0	15	30	60	90	(มิลลิกรัม /กิโลกรัมอาหารแห้ง

ตารางที่ 2 แสดงส่วนผสมของเกลือแร่รวม

เกลือแร่	ปริมาณ /อาหารแห้ง 1 กิโลกรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1.73(กรัม)
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรท ($MgSO_4.7H_2O$)	5.45 "
โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรท ($NaH_2PO_4.2H_2O$)	3.47 "
โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	9.54 "
แคลเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรท [$Ca(H_2PO_4)_2.H_2O$]	5.40 "
เฟอริกซิเตรต (Fe-citrate)	1.18 "
แคลเซียมแลคเตต (Ca-lactate)	13.01 "
โปแตสเซียมไอโอไดด์ (KI)	5.97(มิลลิกรัม)
อลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl)	5.97 "
คอปเปอร์คลอไรด์ (CuCl)	3.98 "
แมงกานิสซัลเฟต ($MnSO_4$)	31.84 "
โคบอลท์คลอไรด์ ($CoCl_2$)	39.79 "
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$)	119.40 "
รวม	40.00 กรัม

ตารางที่ 3 แสดงส่วนผสมของกรดอะมิโนรวม

กรดอะมิโน	ปริมาณ /อาหารแห้ง1กิโลกรัม	
แอล-ฟีนิลอะลานีน(L-phenylalanine)	6	(กรัม)
แอล-อาร์จินีนโมโนไฮโดรคลอไรด์(L-arginine.HCl)	13	"
แอล-ซีสเตอีน(L-cystein)	7	"
แอล-ทริปโตเฟน(L-tryptophane)	2	"
แอล-ฮิสติดีนโมโนไฮโดรคลลอไรด์โมโนไฮเดรท (L-histidine.HCl.H_2O)	2	"
ดีแอล-อะลานีน(DL-alanine)	13	"
แอล-แอสปาร์ติก(L-aspartic)	10	"
แอล-วาลีน(L-valine)	7	"
แอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์(L-Lysine.HCl)	6	"
ไกลซีน(Glycine)	4	"
รวม	70	กรัม

019188

ตารางที่ 4 แสดงองค์ประกอบของวิตามินรวม

วิตามิน	ปริมาณ(กรัม)
ไทอะมีนไฮโดรคลอไรด์(Thiamin HCl)	1.2500
ไรโบเฟลวิน(Riboflavin)	5.0000
ไพริดอกซิน(Pyridoxine)	1.2500
กรดนิโคตินิค(Nicotinic acid)	18.7500
อินโนซิทอล(Inositol)	50.0000
ไบโอติน(Biotin)	0.1250
กรดโฟลิก(Follic acid)	0.3750
วิตามินบี 12 (Vitamin B12)	0.0025
มีนาไดโอน(Menadione)	1.0000
โทโคเฟอรอลอะซีเทต(Tocopheral acetate)	10.0000
วิตามินเอดี3(Vitamin AD3)	0.5000
บีเอชที่(BHT)	0.2500
เด็กโตรสโมโนไฮเดรท(Dextrose monohydrate)	786.498
โคลีนคลอไรด์(Choline chloride)	125.000
	รวม 1000.00 กรัม

2.1.4 การทดลองและการศึกษา

การจัดการตู้ทดลอง อาหารทดลองแต่ละสูตรจะใช้เลี้ยงปลาทดลอง 3 ตู้ หรือ 3 ซ้ำ แต่ละตู้จะมีปลา 10 ตัว ทำการเลี้ยงปลาวันละ 2 ครั้ง เช้าเวลา 8.30-10.30 น. เย็นเวลา 15.30-17.00 น. โดยจะเลี้ยงจนปลาทุกตัวกินอิ่ม บันทึกปริมาณอาหารที่ปลากินในแต่ละวัน ทำการชั่งน้ำหนักปลาพร้อมทั้งบันทึกอาการผิดปกติทุก 2 สัปดาห์ ในระหว่างการให้อาหารในแต่ละวันทำการสังเกตอาการผิดปกติของปลาด้วย ทำการดูดมูลล้างตู้และถ่ายน้ำวันละครั้งในตอนเช้า และทำความสะอาดตู้อย่างดีทุกๆ 2 สัปดาห์เมื่อทำการชั่งน้ำหนักปลาตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์

การศึกษาการเติบโตและอัตราการรอด โดยชั่งน้ำหนักรวมและนับจำนวนปลาในแต่ละตู้ทดลองทุก 2 สัปดาห์ ทำโดยเตรียม 3 aminobenzoic acid ethyl ester 180 ส่วนในล้านส่วนในน้ำทะเล จากนั้นนำปลาจากแต่ละตู้มาแช่ในสารละลายนี้ รอจนปลาสลบดีแล้วจึงนำขึ้นมาซับน้ำออก แล้วจึงทำการชั่งน้ำหนักโดยเครื่องชั่งไฟฟ้าขนาด 2.8 กิโลกรัม จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาน้ำหนักเฉลี่ย นำผลต่างที่ได้มาคำนวณการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเฉลี่ยโดยคิดเป็นร้อยละดังสูตรต่อไปนี้

$$\frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ n} - \text{น้ำหนักเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ n-2}}{\text{น้ำหนักเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ n-2}} \times 100$$

การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารทดลอง โดยคำนวณจากน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นในแต่ละช่วงหารด้วยน้ำหนักอาหารแห้งที่ปลากินในช่วงนั้น X 100

การศึกษาทางด้านมิญชวิทยา เพื่อศึกษาอาการผิดปกติในระดับเซลของเหงือก เหงือกและตับ โดยเก็บตัวอย่างปลาชุดละ 3 ตัว/ครั้งทุกๆ 2 สัปดาห์ เนื้อเยื่อเหงือกจะถูกดองไว้ในน้ำยา Bouin's solution เนื้อเยื่อตับจะถูกแบ่งออกเป็น 3 ส่วนเก็บไว้ในน้ำยา Bouin's solution เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโดยทั่วไปของเซลตับโดยการ

ย้อมสี H&E และ Absolute alcohol เพื่อศึกษาปริมาณไกลโคเจนที่สะสมในตับโดยการย้อมสี Best's carmine ตามลำดับ เนื้อเยื่อที่ผ่านน้ำยา Bouin's solution และ Absolute alcohol จะถูกนำมาผ่านกระบวนการดังต่อไปนี้

1. แช่ใน 70 % ethyl alcohol 2 ชั่วโมง
2. แช่ใน 95 % ethyl alcohol 2 ครั้งๆละ 2 ชั่วโมง
3. แช่ใน Absolute alcohol 2 ครั้งๆละ 2 ชั่วโมง
4. แช่ใน Xylene 2 ครั้งๆละ 2 ชั่วโมง
5. แช่ใน Melted paraffin : Xylene 1:1 (ณ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง)
6. แช่ใน Melted paraffin 2 ชั่วโมง (ณ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
7. แช่ใน Melted paraffin ค้างคืน (ณ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง)
8. นำไป Embed พร้อมที่จะนำไปตัดโดยเครื่อง microtome และนำเนื้อเยื่อที่ตัดได้ติดกับสไลด์ เพื่อนำไปย้อมสี

การย้อมสี H&E

1. Deparafinization section ใน xylene 2 ครั้งๆละ 2 นาที
2. ล้าง xylene ออกใน absolute ethyl alcohol 2 ครั้งๆละ 2 นาที
3. นำ สไลด์ลงใน 95 % ethyl alcohol 2 ครั้งๆละ 2 นาที
4. ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลตลอด 5 นาที
5. ย้อมด้วย Harris's haematoxylin 10 นาที
6. ล้างด้วยน้ำประปา 1-2 นาที
7. Differentiate ใน 1 % acid alcohol 5 วินาที
8. ล้างน้ำประปา 2 นาที

9. Neutralize ด้วย saturated lithium carbonate 5-10 วินาที
10. ล้างน้ำประปา 2 นาที
11. ย้อมด้วย Eosin working solution 1 นาที
12. ล้างสี Eosin ด้วย 95 % ethyl alcohol 2 ครั้งๆละ 5-10 จุ่ม
13. Dehydrate ใน xylene 2 ครั้งๆละ 2 นาที
14. clear ใน xylene 2 ครั้งๆละ 2 นาที
15. Mount ด้วย permount

การย้อมสี Best's carmine

1. Deparafinization section ใน xylene 2 ครั้งๆละ 2 นาที
2. ล้าง xylene ออกใน absolute ethyl alcohol 2 ครั้งๆละ 2 นาที
3. นำ สไลด์ลงใน 95 % ethyl alcohol 2 ครั้งๆละ 2 นาที
4. นำ สไลด์ลงใน 70 % ethyl alcohol 2 ครั้งๆละ 2 นาที
5. ล้างด้วยน้ำประปา
6. ย้อมใน Harris's haematoxylin 15 นาที
7. Differentiate ใน 1% acid alcohol
8. ย้อมใน working carmine solution 20 นาที
9. ผ่านลงใน differentiating solution 2-3 นาที
10. ผ่านลงใน 80% ethyl alcohol อย่างรวดเร็ว
11. ลงใน 95% ethyl alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที
12. Dehydrate ใน absolute alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที
13. Clear ด้วย xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที
14. Mount ด้วย permount

การศึกษาทางด้านรัลหิตวิทยา โดยการเจาะเลือดจากเส้นเลือดใหญ่ใต้กระดูกสันหลังบริเวณครีบก้นด้วยเข็มฉีดยาขนาด 26-G ที่มีน้ำยาเฮปาริน (heparin) เคลือบอยู่

ในกระบอกฉีดยา นำเลือดที่ได้จากการเจาะมาหาปริมาณฮีโมโกลบิน ปริมาณเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และ ฮีมาโตคริต

-การหาปริมาณฮีโมโกลบิน ใช้วิธี cyanmethemogolbin method โดยนำตัวอย่างเลือดมา 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ Drabkin's solution ($NaHCO_3$ 1.0 กรัม, KCN 50 มิลลิกรัม, potassium ferricyanide ในน้ำกลั่น 0.1 มิลลิลิตร) 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที นำไปวัด O.D. ที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับ commercial standard

-การหาปริมาณเม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาว ทำโดยใช้ RBC diluting pipette ดูดตัวอย่างเลือดให้ถึงขีด 0.5 พอดี จากนั้นใช้ ปิเปตอันเดิมดูด diluting fluid (Yokohama's fluid) จนกระทั่งถึงขีด 101 ตรงปลายปิเปต แล้วเขย่าไปมาในแนวนอน 2-3 นาที หยดของเหลวในปิเปตทิ้งไป 3-4 หยด เนื่องจากของเหลวส่วนที่อยู่ในก้านไม่ได้ผสมกับเลือดในกระเปาะของปิเปต จากนั้นจึงหยดของเหลวลงในร่องของ haemacytometer ที่มี cover glass ปิดอยู่ 1 หยด ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น หรือของหยดเหลวมีขนาดโตเกินไปจนล้นขอบของ haemacytometer แล้วจึงทำการนับจำนวนเม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 20-40 เท่า จำนวนเม็ดเลือดแดงในช่องเล็กรวมกัน 5 ช่อง X 10^4 คือปริมาณเม็ดเลือดแดงต่อ 1 มิลลิลิตรและจำนวนเม็ดเลือดขาวในช่องใหญ่ทั้งหมด X 2000 คือปริมาณเม็ดเลือดขาวต่อ 1 มิลลิลิตร

-การหาปริมาณฮีมาโตคริต ทำโดยใช้หลอด heparinized capillary แตะเลือดตัวอย่าง ปล่อยให้แรงดัน capillary ดันเลือดตัวอย่างเข้าไปในหลอดประมาณ 2/3 ของหลอด แล้วนำไปปั่นใน microhematocrit centrifuge เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปอ่านค่า hematocrit โดยใช้ spiracrit

-การศึกษาปริมาณกรดแพนโตเทนิคที่สะสมในตับและการศึกษาอัตราส่วนน้ำหนักตับต่อน้ำหนักตัว เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 ทำการบันทึกน้ำหนักปลาทุกตัว

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แล้วทำการผ่าตัดปลาทุกตัว บันทึกน้ำหนักของตับปลาทดลองไว้ นำมาคำนวณหาค่าอัตราส่วนน้ำหนักตับต่อน้ำหนักตัว (hepatosomatic index) โดยใช้สูตร

$$\text{hepatosomatic index} = \frac{\text{น้ำหนักตับ}}{\text{น้ำหนักตัว}} \times 100$$

แล้วนำตับปลาที่ได้จากการผ่าตัดไปทำแห้งแบบแช่แข็งที่ -50 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะสุญญากาศ (freeze dried) จากนั้นจึงทำการส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดแพนโตเทนิคที่สะสมในตับ ที่สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม โดยทำการวิเคราะห์ตามวิธีการของ Freed (1966) ซึ่งมีหลักการโดยสังเขปดังนี้ ตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้งแล้วจะถูกนำมาสกัดเอากรดแพนโตเทนิคออก โดยใช้เอนไซม์อัลฟาเซลลูโลส และ Papain ใน acetate buffer ที่ pH 4.5 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่เชื้อ (inoculate) *Lactobacillus arabinosus* อบไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาไตเตรทด้วย 0.1 N NaOH โดยใช้ bromothymal blue เป็น indicator นำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน จะได้ค่าปริมาณกรดแพนโตเทนิคที่สะสมในหน่วย มิลลิกรัม/100 กรัม

การวิเคราะห์ทางสถิติ ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล และนำมาหาความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's new multiple range test โดยใช้โปรแกรม SPSS

2.2 การทดลองที่ 2

2.2.1 สถานที่และการเตรียมอุปกรณ์ในการเลี้ยงปลา

สถานที่ทดลองและการเตรียมอุปกรณ์ในการเลี้ยงปลาสำหรับการทดลองที่ 2 เหมือนกับการทดลองที่ 1

2.2.2 การเตรียมปลา

นำลูกปลากะพงขาวความยาว 2 เซนติเมตรจากโรงเพาะฟักของสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง มาฝึกให้ยอมรับอาหารสำเร็จและอาหารกึ่งบริสุทธิ์ เมื่อเริ่มทดลองปลามีน้ำหนักเฉลี่ยตัวละ 2.7 กรัม ทำการคัดปลาที่มีขนาดเดียวกันจำนวน 200 ตัวมาสุ่มนับชั่งใส่ตู้กระจก ตู้ละ 10 ตัว บันทึกน้ำหนักและจำนวนตัวเริ่มต้นของแต่ละตู้ สุ่มสูตรอาหารทดลองให้เข้ากับตู้โดยวิธีสุ่มตลอด พร้อมติดชื่อสูตรอาหารทดลองที่สุ่มได้ที่หน้าตู้

2.2.3 การเตรียมอาหารปลา

อาหารทดลองที่ใช้มี 5 สูตร ใช้วัสดุอาหารเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ต่างกันที่การทดลองที่ 2 มีปริมาณน้ำมันตับปลา 70 กรัม/กิโลกรัมอาหารแห้งและมีปริมาณวิตามินรวมที่ไม่มีกรดแพนโตเทนิค 20 กรัม/กิโลกรัมอาหารแห้ง และผสมน้ำ 750 มิลลิลิตร/กิโลกรัมอาหารแห้ง

2.2.4 การทดลองและการศึกษา

การจัดการตู้ทดลอง, การศึกษาการเติบโตและอัตราการรอด, การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารทดลอง, การศึกษาทางด้านมิญชวิทยา, การศึกษาทางด้านโลหิตวิทยา, การศึกษาปริมาณกรดแพนโตเทนิคที่สะสมในตับ, การศึกษาน้ำหนักตับต่อน้ำหนักตัว และการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้วิธีเดียวกับการทดลองที่ 1