

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สูตรสารละลายนิวทรัลบัฟเฟอร์ฟอร์มาลีน (Neutral Buffer Formalin Solution)

- | | |
|--|---------|
| - ฟอร์มาลีน (37 – 40 % ฟอร์มาลดีไฮด์) | 100 ml. |
| - น้ำกลั่น | 900 ml. |
| - Sodium Phosphate Monobasic (NaH_2PO_4) | 4 g. |
| - Sodium Phosphate Dibasic Anhydrous (Na_2HPO_4) | 6.5 g. |

ส่วนผสมนี้เก็บไว้ได้นานไม่มีกำหนด

สูตรสารละลายกรดฟอร์มิกโซเดียมซิเตรต (Formic Acid - Sodium Citrate Solution)

สารละลาย A

- | | |
|----------------------------------|---------|
| - โซเดียมซิเตรต (Sodium Citrate) | 50 g. |
| - น้ำกลั่น | 250 ml. |

สารละลาย B

- | | |
|--|---------|
| - กรดฟอร์มิก , 90 % (Formic Acid , 90 %) | 125 ml. |
| - น้ำกลั่น | 125 ml. |

ใช้ในอัตราส่วนผสม 1 : 1

สูตรสีอีโอซิน

1% Stock Alcoholic Eosin

- | | |
|--------------------------|--------|
| - Eosin Y, Water Soluble | 1 g. |
| - น้ำกลั่น | 20 ml. |
| - แอลกอฮอล์ 95 % | 80 ml. |

Working Solution

- | | |
|------------------------|--------|
| - Eosin Stock Solution | 1 ส่วน |
| - 80 % แอลกอฮอล์ | 3 ส่วน |

ก่อนใช้ เติม 1 - 1.5 ml ของกรดแอซิดิกเข้มข้น ต่อ 100 ml. คนให้เข้ากัน

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการศึกษาทางไมโครเทคนิค

ขั้นตอนการศึกษาทางไมโครเทคนิค

1. เก็บตัวอย่างมาทำการผ่าช่องท้องแล้วตัดชิ้นเนื้อใส่ในน้ำยา Neutral Buffer Formalin Solution โดยเริ่มจากตับ ไตและเหงือก ตามลำดับ ในการตัดชิ้นเนื้อ เริ่มแรกอาจจะยังไม่สามารถตัดเป็นชิ้นเล็กได้ อาจตัดให้ใหญ่หน่อย แล้วใส่ลงในน้ำยา Neutral Buffer Formalin Solution โดยไม่ต้องนำเนื้อเยื่อล้างน้ำก่อน ทิ้งไว้ในน้ำยา Neutral Buffer Formalin Solution ประมาณ 10 – 15 นาที พอชิ้นเนื้อเริ่มแข็งก็นำชิ้นเนื้อมาตัดให้มีขนาดไม่มากกว่า 4 mm. และเปลี่ยนน้ำยา Neutral Buffer Formalin Solution ใหม่ และให้มีปริมาตรของน้ำยาประมาณ 20 – 25 เท่าของเนื้อเยื่อ ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง
2. นำเนื้อเยื่อใส่ใน Cassetts ล้างด้วยน้ำประปา
3. นำ Cassetts ที่ใส่เนื้อเยื่อเหงือกใส่ลงในน้ำยา Decalcification เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วล้างน้ำประปา 15 นาที
4. นำ Cassetts ทั้งหมดไปเข้าเครื่อง Automatic Tissue Processor ที่ตั้งโปรแกรมไว้ เมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอนการในเครื่อง Automatic Tissue Processor เนื้อเยื่อก็น่าจะมีพาราฟินแทรกตัวอยู่
5. นำเนื้อเยื่อที่แช่อยู่ในพาราฟินหลอมเหลวมาวางลงในกระถางโลหะ แล้วหยดพาราฟินให้เต็มกระถางโลหะด้วยเครื่องหยดพาราฟิน เสร็จแล้วนำกรอบพลาสติกแข็งเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าที่เรียกว่า Embedding Ring ใช้ครอบบนกระถางอีกทีหนึ่ง เมื่อทำเป็นบล็อกแล้วกรอบพลาสติกนี้จะใช้เป็นที่ยึดเวลาใส่ในเครื่องไมโครทอม นำไปวางไว้ที่เครื่องทำความเย็น รอจนกระทั่งบล็อกแข็งตัวดี
6. นำบล็อกมาตัดแต่งเสียก่อน โดยตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู แล้วนำไปตัดด้วยเครื่อง Microtome ให้มีความหนาประมาณ 3 – 4 ไมครอน แล้วนำไปลอยในอ่างน้ำอุ่น 45 – 50 องศาเซลเซียส แล้วใช้แผ่นสไลด์ซ้อนขึ้นมาวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ ทิ้งไว้ข้ามคืน หากนำสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อแผ่นบางลอยบน 50 % แอลกอฮอล์ก่อนนำไปลอยในอ่างลอยเนื้อเยื่อ จะช่วยให้เนื้อเยื่อแผ่ยิด เรียบขึ้นแล้วจึงใช้แผ่นสไลด์ซ้อนขึ้นมาวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ ทิ้งไว้ข้ามคืน
7. นำสไลด์มาย้อมสี Hematoxylin & Eosin และยิดเนื้อเยื่อด้วยน้ำยา Permount ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์

ขั้นตอน Automatic Tissue Processor

น้ำยาที่ใช้คือน้ำและช่วยให้พาราฟินแทรกตัวเข้าไปในเนื้อเยื่อในเครื่อง Automatic Tissue Processor เรียงตามลำดับ ดังนี้

50% Ethanol	20 นาที
70% Ethanol	30 นาที
95% Ethanol	30 นาที
95% Ethanol	30 นาที
100% Eanol	30 นาที
100% Eanol	30 นาที
100% Ehanol	60 นาที
Xlene	30 นาที
Xlene	60 นาที
Paraffin	1 ชั่วโมง
Paraffin	2 ชั่วโมง

ขั้นตอนการย้อมสีและเวลาที่ใช้

Xylene	5 นาที
Xylene	5 นาที
Absolute Ethanol	3 นาที
Absolute Ethanol	2 นาที
95 % Ethanol	2 นาที
70 % Ethanol	2 นาที
Running Tap Water	3 นาที
Harris's Solution	3 นาที
Running Tap Water	3 นาที
Eosin-Solution	7 นาที
95 % Ethanol	2 นาที
Absolute Ethanol	2 นาที
Absolute Ethanol	2 นาที
Absolute Ethanol	2 นาที
Xylene	2 นาที
Xylene	2 นาที
Xylene	2 นาที

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ค่าความเป็นพิษของ 96h – LC₅₀

การวิเคราะห์ค่าความเป็นพิษของ 96h – LC₅₀

ตารางที่ 10 วิธีการคำนวณค่าความเอียงและจุดตัดแกนดังตามวิธีแบบโปรบิท

Concentrate (ml / L)	X 1 + log C	r	n	P (r / n)	Y*	Y
5	0.699	0	10	-	-	2.40
10	1.000	3	10	0.3	4.48	4.00
15	1.176	6	10	0.6	5.25	5.10
20	1.301	7	10	0.7	5.52	5.60
25	1.398	9	10	0.9	6.28	6.28
30	1.477	10	10	-	-	6.70

ตารางที่ 11 แสดงการคำนวณครั้งที่ 1

X	Y	W	WX	WX ²	WXY	WY	WY ²	Y
0.699	2.057	0.398	0.278	0.194	0.572	0.819	1.684	2.810
1.000	4.584	4.386	4.386	4.386	20.105	20.105	92.163	4.328
1.176	5.251	6.343	7.460	8.772	39.169	33.307	174.896	5.215
1.301	5.523	5.579	7.258	9.443	40.087	30.813	170.179	5.845
1.398	6.282	3.359	4.696	6.565	29.500	21.101	132.558	6.333
1.477	7.174	2.077	3.068	4.531	22.008	14.900	106.895	6.732
		22.142	27.146	33.891	151.441	121.045	678.375	

$$S_{xx} = 33.891 - (27.146)^2 / 22.142$$

$$= 0.611$$

$$S_{xy} = 151.441 - (27.146)(121.045) / 22.142$$

$$= 3.08$$

$$S_{yy} = 678.375 - (121.045)^2 / 22.142$$

$$= 16.651$$

$$\bar{y} = 121.045 / 22.142$$

$$= 5.467$$

$$\bar{x} = 27.146 / 22.142$$

$$= 1.226$$

$$\hat{b} = 3.08 / 0.611$$

$$= 5.04$$

$$\hat{a} = 5.467 - 5.04 (1.226)$$

$$= -0.712$$

$$y = -0.712 + 5.04x$$

การทดสอบแบบ X^2 ทดสอบความเป็นเส้นตรง

$$\begin{aligned} X^2 &= S_{yy} - S_{xy}^2 / S_{xx} \\ &= 16.651 - (3.08)^2 / 0.611 \\ &= 1.125 \end{aligned}$$

$\therefore (1-\alpha) 95\%$ ค่า $X^2_{0.05} (4) = 9.5$ แสดงว่าผลการทดลองของ $\hat{m}$ ไม่เบี่ยงเบนไปจากเส้นตรง

$$\begin{aligned} \therefore \hat{m} &= (5 - \hat{a}) / \hat{b} \\ &= (5 + 0.712) / 5.04 \\ &= 1.133 \end{aligned}$$

ค่ามัธยฐานของความทนต่อพิษ จะเท่ากับ

$$\begin{aligned} TL_m &= \text{antilog} (1.133) \\ &= 13.583 \end{aligned}$$

ผลตามทฤษฎีของฟิเลอร์ (Fieller's theorem)

$$\begin{aligned} V_{11} &= \sum Wx^2 / (S_{xx} \sum W) \\ &= 33.891 / (0.611) (22.142) \\ &= 2.505 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} V_{12} &= \bar{x} / S_{xx} \\ &= 1.226 / 0.611 \\ &= 2.007 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} V_{22} &= 1 / S_{xx} \\ &= 1 / 0.611 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &= 1.637 \\
 g &= (1.96)^2 V_{22} / b^2 \\
 &= (1.96)^2 (1.637) / (5.04)^2 \\
 &= 0.248
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 m_L, m_U &= \frac{(\hat{m} - g \frac{V_{12}}{V_{22}}) \pm \frac{1.96}{b} \sqrt{V_{11} - 2\hat{m}V_{12} + \hat{m}V_{22} - g(V_{11} - \frac{V_{12}^2}{V_{22}})}}{1 - g} \\
 &= \frac{1.133 - \frac{0.248(2.007)}{1.637} \pm \frac{1.96}{5.04} \sqrt{2.505 - 2(1.133)(2.007) + (1.133)^2(1.637) - 0.248(2.505 - \frac{2.007^2}{1.637})}}{1 - 0.248} \\
 &= 0.491, 1.714
 \end{aligned}$$

∴ (1-α) 95 % ของค่ามัธยฐานของความทนพิษ เท่ากับ antilog (0.491) ถึง antilog (1.714) ได้
3.097 mg/l ถึง 51.761 mg/l

ค่า Variance ของ $\hat{m}$

$$\begin{aligned}
 V(\hat{m}) &= \frac{1}{5.04^2} \left[\frac{1}{22.142} + \frac{(1.133 - 1.226)^2}{0.611} \right] \\
 &= 0.002301
 \end{aligned}$$

∴ ช่วงความเชื่อมั่น (Variance) ของ $\hat{m}$ จะเท่ากับ

$$\begin{aligned}
 m_L, m_U &= 1.133 \pm 1.9 \sqrt{0.002301} \\
 &= 1.133 \pm 0.094 \\
 &= 1.039, 1.227
 \end{aligned}$$

∴ (1-α) 95 % ของค่ามัธยฐานของความทนพิษ เท่ากับ antilog (1.039) ถึง antilog (1.227) ได้
10.940 mg/l ถึง 16.866 mg/l

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ค่าความเป็นพิษของ 96h – LD₅₀

การวิเคราะห์ค่าความเป็นพิษของ 96h – LD₅₀

ตารางที่ 12 วิธีการคำนวณค่าความเอียงและจุดตัดแกนดังตามวิธีแบบโปรบิท

Concentrate (mg / kg fish)	X 1 + log C	r	n	P (r / n)	Y*	Y
0.5	0.699	0	10	-	-	2.40
1.0	1.000	2	10	0.2	4.16	3.95
2.0	1.301	6	10	0.6	5.25	5.60
3.0	1.477	9	10	0.9	6.28	6.55
4.0	1.602	10	10	1.0	-	7.10

ตารางที่ 13 แสดงการคำนวณครั้งที่ 1

X	Y	W	WX	WX ²	WXY	WY	WY ²	Y
0.699	2.057	0.398	0.278	0.194	0.572	0.819	1.684	2.506
1.000	4.171	4.386	4.386	4.386	18.294	18.294	76.304	3.970
1.301	5.223	5.579	7.258	9.443	37.910	29.139	152.194	5.434
1.477	6.192	2.375	3.508	5.181	21.721	14.706	91.060	6.291
1.602	7.506	1.103	1.767	2.831	13.263	8.279	62.143	6.899
		13.841	17.197	22.035	91.76	71.237	383.385	

$$S_{xx} = 22.035 - (17.197)^2 / 13.841$$

$$= 0.668$$

$$S_{xy} = 91.76 - 17.197 (71.237) / 13.841$$

$$= 3.25$$

$$S_{yy} = 383.385 - (71.237)^2 / 13.841$$

$$= 16.742$$

$$\bar{y} = 71.237 / 13.841$$

$$\begin{aligned}
 &= 5.147 \\
 \bar{x} &= 17.197 / 13.841 \\
 &= 1.242 \\
 \hat{b} &= 3.25 / 0.668 \\
 &= 4.865 \\
 \hat{a} &= 5.147 - 4.865 (1.242) \\
 &= -0.895 \\
 y &= -0.895 + 4.865x
 \end{aligned}$$

การคำนวณที่ 2

x	y	w	wx	wx ²	wxy	wy	wy ²	y
0.699	2.146	0.498	0.348	0.243	0.747	1.069	2.293	2.489
1.000	4.171	4.386	4.386	4.386	18.294	18.294	76.304	3.975
1.301	5.249	5.005	6.512	8.471	34.179	26.271	137.898	5.460
1.477	6.282	3.359	4.961	7.328	31.167	21.101	132.558	6.329
1.602	7.338	1.544	2.473	3.963	18.150	11.330	83.139	6.946
		14.792	18.68	24.391	102.537	78.065	432.192	

$$\begin{aligned}
 S_{xx} &= 24.391 - (18.68)^2 / 14.792 \\
 &= 0.801 \\
 S_{xy} &= 102.537 - 18.68 (78.065) / 14.792 \\
 &= 3.953 \\
 S_{yy} &= 432.192 - (78.065)^2 / 14.792 \\
 &= 20.203 \\
 \bar{y} &= 78.065 / 14.792 \\
 &= 5.278 \\
 \bar{x} &= 18.68 / 14.792 \\
 &= 1.263 \\
 \hat{b} &= 3.953 / 0.801 \\
 &= 4.935
 \end{aligned}$$

$$\hat{a} = 5.273 - 4.935(1.263)$$

$$= -0.96$$

$$y = -0.96 + 4.935x$$

การทดสอบความเป็นเส้นตรง

$$x^2 = S_{yy} - S_{xy}^2 / S_{xx}$$

$$= 20.203 - (3.953)^2 / 0.801$$

$$= 0.695$$

$$\therefore (1-\alpha)95\% \quad x_{0.05(3)}^2 = 7.8$$

$$\hat{m} = (5 - \hat{a}) / b - 1$$

$$= (5 + 0.96) / 4.935 - 1$$

$$= 0.208$$

$$\therefore TL_m = \text{antilog}(0.208)$$

$$= 1.614 \text{ mg/kg}$$

ผลตามทฤษฎีของฟิเชอร์ (Fieller's theorem)

$$V_{11} = \sum Wx^2 / (S_{xx} \sum w)$$

$$= 24.391 / (0.801)(14.792)$$

$$= 2.059$$

$$V_{12} = \bar{x} / S_{xx}$$

$$= 1.263 / 0.801$$

$$= 1.541$$

$$V_{22} = 1 / S_{xx}$$

$$= 1 / 0.801$$

$$= 1.248$$

$$\text{และ } g = (1.96)^2 V_{22} / b^2$$

$$= (1.96)^2 (1.248) / (4.935)^2$$

$$= 0.197$$

$$m_L, m_U = \frac{(\hat{m} - g \frac{V_{12}}{V_{22}}) \pm \frac{1.96}{b} \sqrt{V_{11} - 2\hat{m}V_{12} + \hat{m}^2 V_{22} - g(V_{11} - \frac{V_{12}^2}{V_{22}})}}{1 - g}$$

$$= \frac{0.208 - \frac{0.197(1.541)}{1.248} \pm \frac{1.96}{4.935} \sqrt{2.059 - 2(0.208)(1.541) + (2.08)^2(1.248) - 0.197(2.059 - \frac{1.541^2}{1.248})}}{1 - 0.197}$$

$$= -0.638, 0.550$$

$$\therefore m_L, m_U = -1.638, -0.45$$

$\therefore (1-\alpha)95\%$ ของค่ามัธยฐานของความทนพิษ เท่ากับ antilog (-1.638) ถึง antilog (-0.45) ได้
0.023 mg / kg ถึง 0.355 mg / kg

ค่า Variance ของ $\hat{m}$

$$\begin{aligned} V(\hat{m}) &= \frac{1}{4.935^2} \left[\frac{1}{14.792} + \frac{(0.208 - 1.263)^2}{0.801} \right] \\ &= 0.041(0.068 + 1.390) \\ &= 0.06 \end{aligned}$$

$\therefore$ ช่วงความเชื่อมั่น(Variance) ของ $\hat{m}$ จะเท่ากับ

$$\begin{aligned} m_L, m_U &= 0.208 \pm 1.96 \sqrt{0.06} \\ &= 0.208 \pm 0.480 \\ &= -0.272, 0.688 \end{aligned}$$

$\therefore (1-\alpha)95\%$ ของค่ามัธยฐานของพิษ จะเท่ากับ antilog (-0.272) ถึง antilog (0.688) ได้ 0.534
mg / kg ถึง 4.875 mg / kg