บทที่ 3
อุปกรณ์ และวิธีการ

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

ชื่อเครื่องมือ	โมเดล	บริษัท	ประเทศ
1. เครื่องวัดพื้นที่ผิว	LI 3100	-	-
2. Minolta chroma meter	CR 300	-	ญี่ปุ่น
3. เครื่อง Gas chromatography	GC-14B	Shimadzu	ญี่ปุ่น
4. คอลัมน์	DB-Wax	J&W	อเมริกา
5. เครื่อง Spectrophotometer	DU 7500	Beckman	เยอรมัน
6. เครื่องกลั่นโปรตีน	-	Gerhardt	เยอรมัน
7. เครื่อง Instron	5565	-	-
8. เครื่อง centrifuge	Magafuge 1.0	Heraeus	เยอรมัน
9. เครื่อง vortex mixer	G-560E	Scientific Industries, Inc.	อเมริกา
10. เครื่องสกัดไขมัน	-	Gerhardt	เยอรมัน
11. water bath	-	W. Krannich	เยอรมัน
12. ตู้อบ oven	DEV	Heraeus	เยอรมัน
13. เตาเผา	MR260E	Heraeus	เยอรมัน
14. เตาให้ความร้อน	-	Gehardt	เยอรมัน
15. เครื่องหาพลังงาน	-	IKA	อเมริกา
16. โถดูดความชื้น	GL32	Glaswerk wertheim	เยอรมัน
17. บีกเกอร์ 50 มล.	No. 1000	Pyrex	อเมริกา
18. บีกเกอร์ 100 มล.	No. 1000	Pyrex	อเมริกา
19. บีกเกอร์ 500 มล.	No. 1005	Pyrex	อเมริกา
20. ขวดก้นกลม 100 มล.	-	Glaswerk wertheim	เยอรมัน
21. ขวดก้นกลม 250 มล.	-	Duran	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ชื่อเครื่องมือ	โมเดล	บริษัท	ประเทศ
22. Thimble	-	Whatman	อังกฤษ
23. Volumetric flask 50 มล.	-	SCHOTT	เยอรมัน
24. Volumetric flask 100 มล.	-	SCHOTT	เยอรมัน
25. Volumetric flask 1,000 มล.	-	SCHOTT	เยอรมัน
26. หลอดทอลองขนาด 13x100 มม.	-	Pyrex	เยอรมัน

2. สารเคมี

ชื่อสารเคมี	เกรด	ยี่ห้อ
1. Dichloromethane	Analytical Reagent	Merck
2. Conc. Sulfuric acid	Analytical Reagent	Lab-Scan
3. Selenium mixture	Analytical Reagent	Merck
4. Chloroform	Analytical Reagent	Merck
5. Methanol	Analytical Reagent	Lab-Scan
6. Sodium Hydroxide	Analytical Reagent	Merck
7. 20% Boron trifluoride in methanol	Analytical Reagent	Merck
8. 2,2,4 trimethyl pentane	Analytical Reagent	Lab-Scan
9. Sodium chloride	Analytical Reagent	Merck
10. Sodium sulfate anhydrous	Analytical Reagent	J.T. Baker
11. Ferric chloride	Analytical Reagent	Merck
12. Magnesium chloride	Analytical Reagent	Merck
13. Uranyl acetate	Analytical Reagent	-
14. Phosphotungstic acid	Analytical Reagent	-
15. n-Heptane	Analytical Reagent	Lab-Scan
16. Propa –2-ol	Analytical Reagent	Lab-Scan
17. Sodium methoxide	Analytical Reagent	Fluka
18. Sodium periodate	Analytical Reagent	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ชื่อสารเคมี	เกรด	ยี่ห้อ
19. Acetylacetone	Analytical Reagent	Fluka
20. Potassium Hydroxide	Analytical Reagent	Merck
21. Petroleum ether	Analytical Reagent	Lab-Scan
22. น้ำกลั่น	Analytical Reagent	-
23. Hydrochloric acid	Analytical Reagent	Merck
24. anti-foaming agent	Analytical Reagent	Fluka
25. Thiobarbituric acid	Analytical Reagent	BDH
26. Glacial acetic acid	Analytical Reagent	J.T. Baker
27. Ammonium acetate	Analytical Reagent	BDH
28. Pure dry cholesterol	Analytical Reagent	Sigma

3. ระยะก่อนการทดลองจริง (Preliminary experimental period)

3.1 เก็บตัวอย่างอาหาร ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารสุกรขุนจากบริษัทต่างๆ จำนวน 4 บริษัท ได้แก่ บริษัทซีพี เบทาโกร ลีพัฒนา และสินเกษตรอุตสาหกรรมโภคภัณฑ์ จำกัด ฟาร์มเอกชนในเขตจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 6 แห่ง ได้แก่ วรพงษ์ฟาร์ม กิตติวัฒน์ฟาร์ม ฟาร์มสุกร ภาควิชาสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผาแดงฟาร์ม และฟาร์มสุกร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และฟาร์มเอกชนในเขตจังหวัดตาก 2 แห่ง ได้แก่ เสริมกสิกิจฟาร์ม และสมพงษ์ฟาร์ม เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันโอเมก้า-3 และโอเมก้า-6 ในตัวอย่างอาหารสุกรขุน และเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างω-6 : ω-3 ในสูตรอาหาร

3.2 อาหารทดลอง ทำการปรับอัตราส่วนระหว่าง ω-6 : ω-3 ในอาหารทดลองให้แคบลงจาก 11.38:1 เป็น 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 และ 1:1 โดยการเสริมน้ำมันปลาทูน่าที่ระดับ 0.05, 0.08, 0.12, 0.17, 0.24, 0.35, 0.53, 0.92 และ 2.0% ในสูตรอาหาร (Table 2 and 3)

หมายเหตุ : หลังจากวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดโอเมก้า-6 และโอเมก้า-3 ในสูตรอาหารสุกรขุนของบริษัท สินเกษตรอุตสาหกรรมโภคภัณฑ์ จำกัด และทราบอัตราส่วนระหว่าง ω-6 : ω-3 แล้ว จากนั้นจะทำการคำนวณปริมาณน้ำมันปลาที่ต้องเสริมในสูตรอาหารเพื่อปรับอัตราส่วน

ระหว่าง ω-6 : ω-3 ให้แคบลง โดยใช้ผลการวิเคราะห์กรดไขมันชนิดต่างๆ ในน้ำมันปลาทูน่า จาก บริษัท T.C.Union Agrotech จำกัด ซึ่งเป็นบริษัทที่จำหน่ายน้ำมันปลาทูน่าที่ใช้ในการทดลอง

3.3 สัตว์ทดลอง ทำการทดลองในสุกรลูกผสม 3 สายพันธุ์ (Large white x Land race x Duroc) จำนวน 20 ตัว (เพศเมีย 10 ตัว และเพศผู้ตอน 10 ตัว) น้ำหนักเฉลี่ย 60 กก. จากนั้นทำการสุ่มสุกร ออกเป็น 10 กลุ่ม กลุ่มละ 2 ตัว (เพศเมีย 1 ตัว และเพศผู้ตอน 1 ตัว) วางแผนการทดลองแบบสุ่ม ตลอด (CRD) สุกรแต่ละกลุ่มได้รับอาหารทดลองที่มีอัตราส่วนระหว่าง ω-6 : ω-3 เท่ากับ 11.38:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 และ 1:1 ในสูตรอาหาร ตามลำดับ (Table 3)

3.4 คอกทดลอง เป็นคอกเลี้ยงเดี่ยว มีรางอาหารอยู่ในคอกและให้น้ำสะอาดกินตลอดเวลา (Fig. 9)

3.5 การบันทึกผล ทำการบันทึกปริมาณอาหารที่กินทุกวัน และชั่งน้ำหนักทุก 2 สัปดาห์ ตั้งแต่ น้ำหนักเริ่มต้นจนถึงน้ำหนักสิ้นสุดการทดลอง เพื่อคำนวณอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (average daily gain; ADG) และอัตราแลกเนื้อ (feed conversion ratio; FCR) ของสุกรในกลุ่มต่างๆ เมื่อสุกร น้ำหนักตัวประมาณ 90 กก. จะทำการฆ่าและเก็บตัวอย่างไขมันสันหลังระหว่างซี่โครงที่ 10-15 เพื่อ วิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันโอเมก้า-6 และโอเมก้า-3 ในไขมันสันหลัง ตามวิธีของ Morrison and Smith, 1964 เพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่มีผลทำให้เกิดการสะสมกรดไขมันโอเมก้า-3 ในไขมันสันหลัง และไม่มีผลกระทบต่อปริมาณอาหารที่กินต่อวัน และอัตราการเจริญเติบโตของสุกร

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (ADG)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวเพิ่ม (กก.)}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง (วัน)}}$$

$$\text{อัตราการแลกเนื้อ (FCR)} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กินทั้งหมด (กก.)}}{\text{น้ำหนักตัวเพิ่ม (กก.)}}$$

Table 2 : Composition of preliminary experimental diet fed to pigs in finishing period (60-90 kg)

Ingredients	Tuna oil, %									
	0	**0.05**	**0.08**	**0.12**	**0.17**	**0.24**	**0.35**	**0.53**	**0.92**	**2.00**
Feed concentrate[1], kg	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
Ground corn, kg	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54
Rice bran, kg	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
Bone meal	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Tuna oil, g	0	50	80	120	170	240	350	530	920	2,000
Vitamin E(50), g	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
Mix antioxidant, g	1.602	1.386	1.308	1.272	1.250	1.236	1.226	1.218	1.212	-

[1] Sinkaset Industrial Pokphand Co., LTD

Table 3 : Fatty acids composition in preliminary experimental diet calculated from fatty acids profile of tuna oil (g/100 kg feed)

Fatty acids	Tuna oil, %									
	0	**0.05**	**0.08**	**0.12**	**0.17**	**0.24**	**0.35**	**0.53**	**0.92**	**2.00**
C18:2 (n-6)	695.22	695.47	695.62	695.82	696.08	696.45	696.98	697.88	699.85	705.22
C18:3 (n-3)	61.05	62.12	62.77	63.63	64.76	66.33	68.63	72.50	80.95	104.05
C20:4 (n-6)	ND	0.55	0.88	1.32	1.90	2.70	3.88	5.86	10.18	22.00
C20:5 (n-3)	ND	2.85	4.56	6.84	9.86	14.00	20.12	30.38	52.78	114.00
C20:6 (n-3)	ND	12.02	19.24	28.86	41.60	59.16	84.89	128.18	222.18	481.00
Total Ω-6	695.22	696.02	696.50	697.14	697.98	699.15	700.86	703.74	710.03	727.22
Total Ω-3	61.05	76.99	86.57	99.33	116.22	139.49	173.64	231.06	356.43	699.05
Ω-6:Ω-3 ratio	**11.38**	**9.04**	**8.04**	**7.01**	**6.00**	**5.01**	**4.03**	**3.04**	**1.99**	**1.04**

4. ระยะทดลองจริง (Experimental period)

4.1 สัตว์ทดลอง ทำการทดลองในสุกรลูกผสม 3 สายพันธุ์ (Large white x Land race x Duroc) จำนวน 40 ตัว (เพศเมีย 20 ตัว และเพศผู้ตอน 20 ตัว) น้ำหนักเฉลี่ย 30 กก. จากนั้นทำการสุ่มสุกรออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว (เพศเมีย 5 ตัว และเพศผู้ตอน 5 ตัว) ได้รับอาหารทดลองแตกต่างกัน 4 สูตร

4.2 คอกทดลอง เป็นคอกเลี้ยงเดี่ยว มีรางอาหารอยู่ในคอกและให้น้ำสะอาดกินตลอดเวลา

4.3 อาหารทดลอง แบ่งเป็นอาหารสุกรรุ่น (30-60 กก.) มีโปรตีนรวม 17% และสุกรขุน (60-90 กก.) มีโปรตีนรวม 15% ในแต่ละระยะแบ่งอาหารทดลองออกเป็น 4 สูตรดังนี้ (Table 4)

สูตรที่ 1 ประกอบด้วยหัวอาหาร และอาหารพื้นฐาน ได้แก่ ข้าวโพดบด รำละเอียด

สูตรที่ 2 ประกอบด้วยหัวอาหาร และอาหารพื้นฐานเสริมน้ำมันปลาทูน่า 1%

สูตรที่ 3 ประกอบด้วยหัวอาหาร และอาหารพื้นฐานเสริมน้ำมันปลาทูน่า 2%

สูตรที่ 4 ประกอบด้วยหัวอาหาร และอาหารพื้นฐานเสริมน้ำมันปลาทูน่า 3%

Figure 9 : The individual pens in preliminary and experimental period

Figure 10 : Tuna oil used to supplement in basal diet

Table 4 : Composition of experimental diets fed to pigs in 2 periods, growing period (30-60 kg) and finishing period (60-90 kg)

Ingredients	**Growing period**				**Finishing period**			
Tuna oil, %	**0**	**1**	**2**	**3**	**0**	**1**	**2**	**3**
Feed concentrate[1], kg	27	27	27	27	24	24	24	24
Rice bran, kg	20	20	20	20	22	22	22	22
Ground corn, kg	53	53	53	53	54	54	54	54
Bone meal, kg	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Tuna oils, g	0	1,000	2,000	3,000	0	1,000	2,000	3,000
Mixed antioxidants, g	1.218	1.418	1.618	1.818	1.218	1.418	1.618	1.818
Vitamin E(50), g	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0

[1] Sinkaset Industrial Pokphand Co., LTD.

4.4 แผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ 4 x 2 factorial ในแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (จรัญ, 2534)

4.5 การบันทึกข้อมูล

4.5.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหาร

สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารทดลอง เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (ความชื้น วัตถุแห้ง โปรตีน ไขมัน) โดยวิธี proximate analysis (AOAC, 1995) พลังงานในอาหาร (gross energy) โดยเครื่อง Adiabatic Bomb Calorimeter และปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดโอเมก้า-6 และโอเมก้า-3 ตามวิธีของ Morrison and Smith (1964)

4.5.2 การศึกษาด้านสมรรถภาพการผลิตของสุกร (performance) ทำการบันทึกน้ำหนักทุก 2 สัปดาห์ ตั้งแต่น้ำหนักเริ่มต้นจนถึงน้ำหนักสิ้นสุดการทดลอง และบันทึกปริมาณอาหารที่กินต่อวัน (daily feed intake) เพื่อคำนวณอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (average daily gain; ADG) และอัตราแลกเนื้อ (feed conversion ratio; FCR) ของสุกรในกลุ่มต่างๆ เมื่อสุกรน้ำหนัก 30, 60 และ 90 กก. ทำการเจาะเลือด เพื่อวิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอลในพลาสมา ตามวิธีของ Jung *et al.* (1975) ไตรกลีเซอร์ไรด์ ตามวิธีของ Biggs *et al.* (1975) และไลโปโปรตีน ตามวิธีของ Demacker *et al.* (1980)

4.5.3 การศึกษาด้านคุณภาพซาก (carcass quality) เมื่อสุกรน้ำหนักประมาณ 90 กก. ทำการอดอาหารประมาณ 8-12 ชม. และทำการฆ่าตามวิธีของ สัญชัย (2543) แล้วบันทึกน้ำหนักซากอุ่น (hot carcass weight) ไม่รวมน้ำหนักหัวสุกร จากนั้น แช่ซากในห้องเย็น (3 ± 1^{0}C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักซากเย็น (chill carcass weight) ไม่รวมน้ำหนักไต เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ซาก (dressing percentage) แนะนำโดย สัญชัย (2534) วัดความยาวซาก (Fig. 11) และความหนาไขมันสันหลัง 3 จุด (ตำแหน่งซี่โครงซี่แรก, ซี่สุดท้าย และกระดูกสะโพกข้อสุดท้าย) (Fig. 12)

$$\text{Dressing percentage} = \frac{(\text{น้ำหนักซากสด} - 3\% \text{ ของน้ำหนักซากสด}) \times 100}{\text{น้ำหนักมีชีวิต}}$$

หรือ Dressing percentage = $\frac{\text{น้ำหนักซากเย็น}}{\text{น้ำหนักมีชีวิต}} \times 100$

หมายเหตุ : น้ำหนักซากเย็น หมายถึง น้ำหนักซากที่ผ่านการแช่เย็นที่ $3 \pm 1\ ^{0}C$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
น้ำหนักมีชีวิต หมายถึง น้ำหนักตัวของสัตว์หลังจากอดอาหารเป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง

จากนั้นทำการตัดแต่งซากสุกรแบบไทย (Thai style cutting) (Fig. 13) แล้ววัดพื้นที่หน้าตัดเนื้อสัน (loin eye area) (Fig. 14) และความหนาไขมันสันระหว่างซี่โครงที่ 10-11 เพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์เนื้อแดง (lean cut percentage) จากซากสุกร โดยประเมินจากน้ำหนักซากสด (น้ำหนักซากอุ่น) ความหนาไขมันสันหลังระหว่างซี่โครงที่ 10-11 และพื้นที่หน้าตัดเนื้อสัน จากตารางการประเมินเปอร์เซ็นต์เนื้อแดง

Figure 11 : Measurement of carcass length

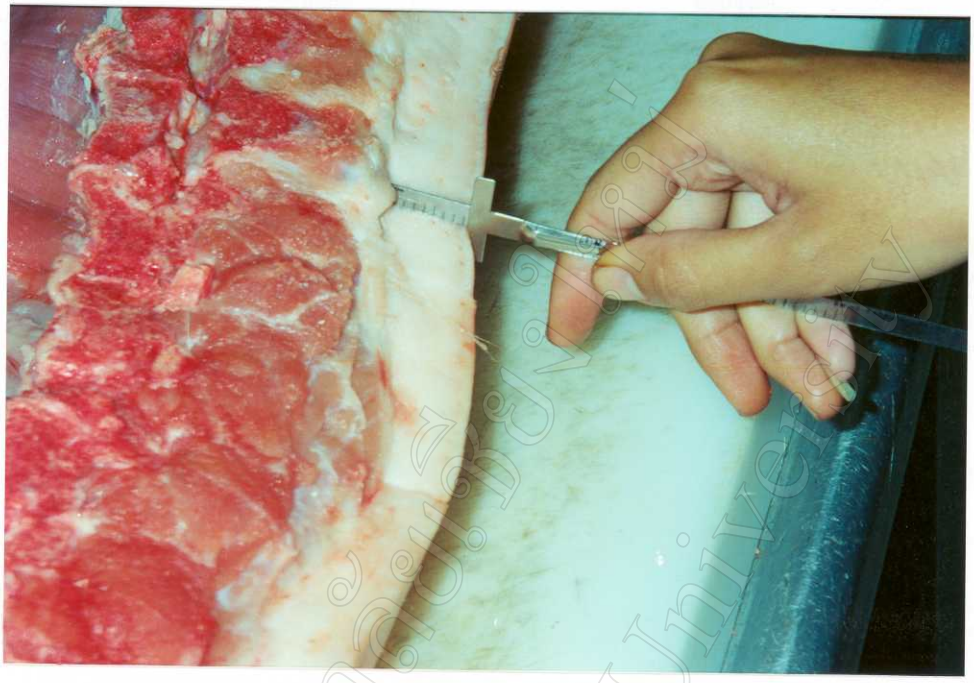

Figure 12 : Measurement of backfat thickness

Figure 13 : Thai style cutting of carcass

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

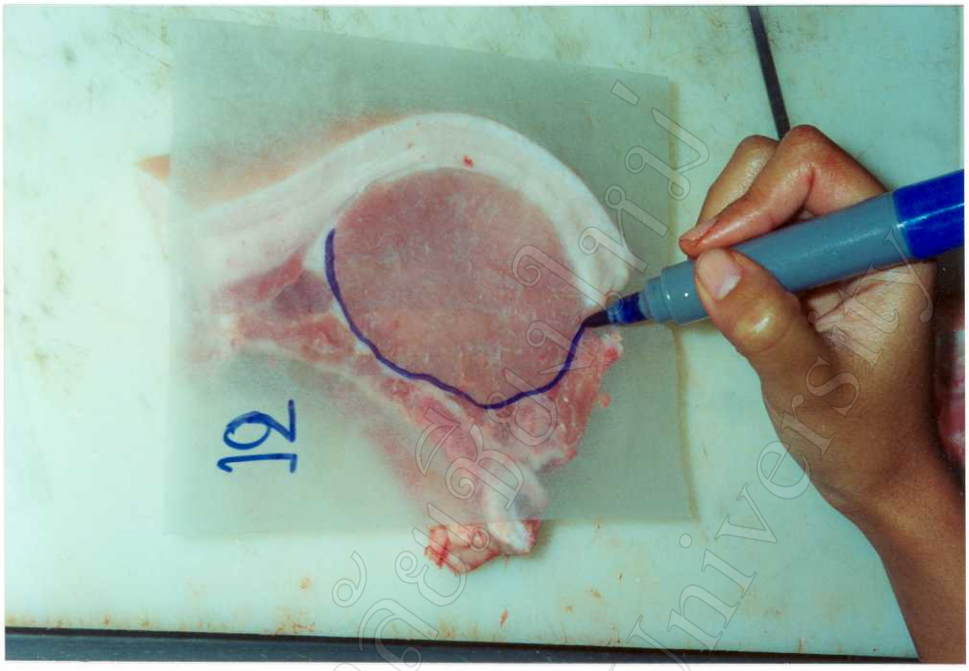

Figure 14 : Measurement of loin eye area by using translucent paper

4.5.4 การศึกษาด้านคุณภาพไขมัน (fat quality) หลังจากตัดแต่งซากสุกรแบบไทย ทำการเก็บตัวอย่างไขมันสันหลัง และเนื้อสันจากซากสุกรซีกซ้าย เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อ โดยวิธี proximate analysis (AOAC, 1995) วัดสี (L*, a*, b*) ของไขมันช่องท้อง (มันเปลว) และไขมันสันหลัง โดยเครื่อง Minolta chroma meter (Fig. 16 and 17) แนะนำโดย สัญชัย (2543) วิเคราะห์ปริมาณ กรดไขมันโอเมก้า-3 และโอเมก้า-6 ในเนื้อ และไขมัน โดยใช้เครื่อง Gas chromatography (Fig. 18) ตามวิธีของ Morrison and Smith (1964) วิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอลในเนื้อ และไขมันสันหลัง ตามวิธีของ Jung *et al.* (1975) และไตรกลีเซอร์ไรด์ ตามวิธีของ Biggs *et al.* (1975) วิเคราะห์ค่า Thiobarbituric acid number โดยวิธีของ Pearson cited by Rossell (1994) และวัดความแข็งของไขมัน (firmness) โดยใช้เครื่อง Instron (Model 5565) แนะนำโดย สัญชัย (2543) (Fig.22) ดังแสดงในตาราง

ตำแหน่งซี่โครง	คุณภาพเนื้อ	ตำแหน่งซี่โครง	คุณภาพไขมัน
6	Cholesterol	6-7	Cholesterol
9	Fatty acids	8-9	Fatty acids
11	Chemical composition	10-11	Fat color
12	TBA value	12-13	TBA value

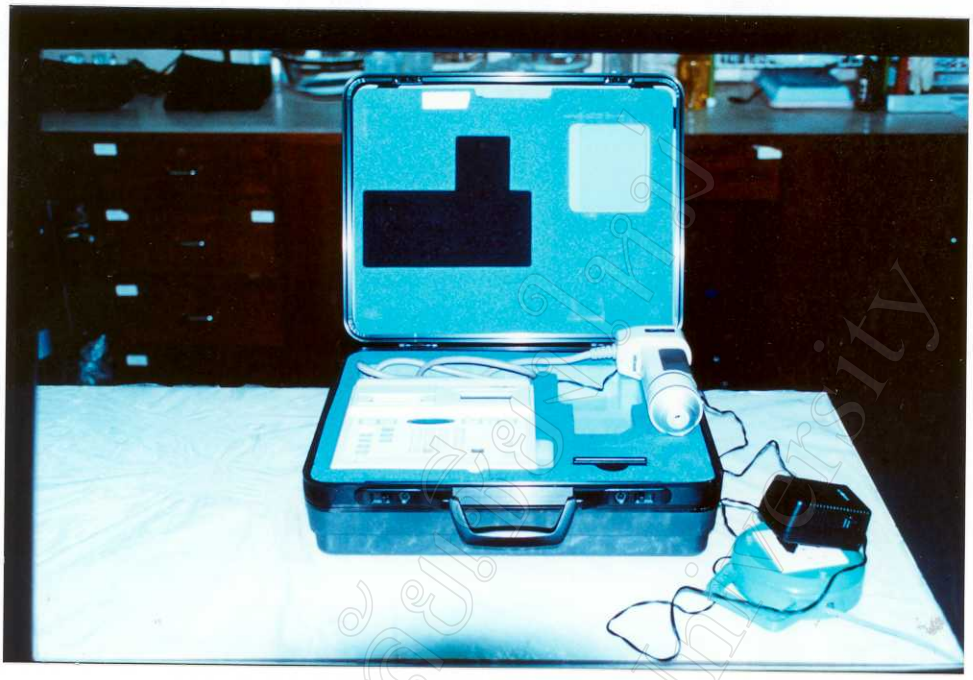

Figure 15 : Minolta chroma meter

Figure 16 : Measurement of perirenal fat color by Minolta chroma meter

Figure 17 : Measurement of backfat color by Minolta chroma meter

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดต่างๆ ในเนื้อ และไขมันสันหลัง

ขั้นตอนที่ 1 การสกัดไขมันจากตัวอย่าง (Folch *et al.*, 1957)

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อ หรือ ไขมัน 5 กรัม ใส่ลงใน round bottom flask 100 ml.
2. เติม chloroform : methanol (2:1) ลงไป 60 มล. เขย่าแรงๆ เพื่อให้การสกัดเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์
3. กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman # 1 ลงใน flask
4. นำกากที่ได้มาสกัดต่อด้วย chloroform : methanol (2:1) อีกครั้งหนึ่ง แล้วรวมสารละลายที่กรองได้
5. เติมน้ำกลั่น 0.2 เท่า ของสารละลายที่กรองได้ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น
6. เก็บชั้นล่างของสารละลายใน flask ที่ทราบน้ำหนัก แล้วนำไประเหยแห้งด้วย water bath 70^{0}C
7. ชั่งน้ำหนักไขมันหลังจากระเหยแห้ง แล้วละลายด้วย chloroform ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 30 มก./มล.

ขั้นตอนที่ 2 การเตรียม FAME (Morrison and Smith, 1964)

วิธีการ

1. ดูดสารละลายที่สกัดได้ 1 มล. ใส่ลงใน round bottom flask
2. ระเหยแห้งตัวอย่างให้แห้งภายใต้กระแสไนโตรเจน
3. เติม 0.5 M NaOH ใน methanol 4 มล. เขย่า 30 วินาที
4. Reflux จนได้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน 5 นาที, ทิ้งให้เย็น
5. เติม 20% boron-trifluoride ใน methanol 5 มล. เขย่า 30 วินาที
6. Reflux ต่ออีก 2 นาที, ทิ้งให้เย็น
7. เติมสารละลาย NaCl อิ่มตัว 3 มล. เขย่าให้เข้ากัน
8. เติม Iso-octane (2,2,4 – trimethylpentane) 1 มล. เขย่าให้เข้ากัน 30 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน
9. เก็บส่วนที่ละลายในชั้น Iso-octane
10. นำสารละลายส่วนล่างมาเติมสารละลาย NaCl อิ่มตัว 2 มล. เขย่าให้เข้ากัน
11. เติม Iso-octane 1 มล. เขย่าให้เข้ากัน 30 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน
12. รวมชั้น Iso-octane ที่เก็บได้ แล้วเติม sodium sulfate anhydrous ปริมาณเท่าปลายช้อนตักสาร
13. ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น
14. ดูดสารละลายส่วนใสใส่ใน vial แล้วปิดให้สนิท
15. ดูดสารละลายที่ได้ 1.0 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง GC

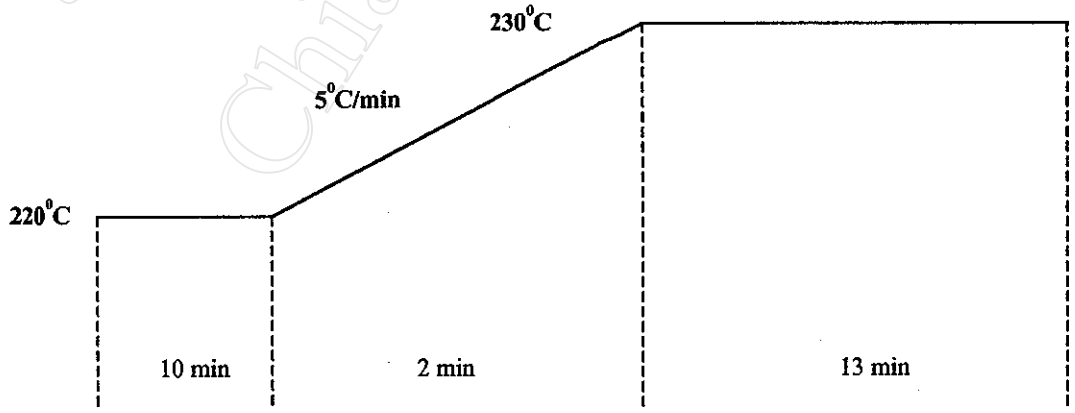

Figure 18 : Condition of oven for detecting fatty acids profile by GC (Injector temp. 280°C; Detector temp. 300°C)

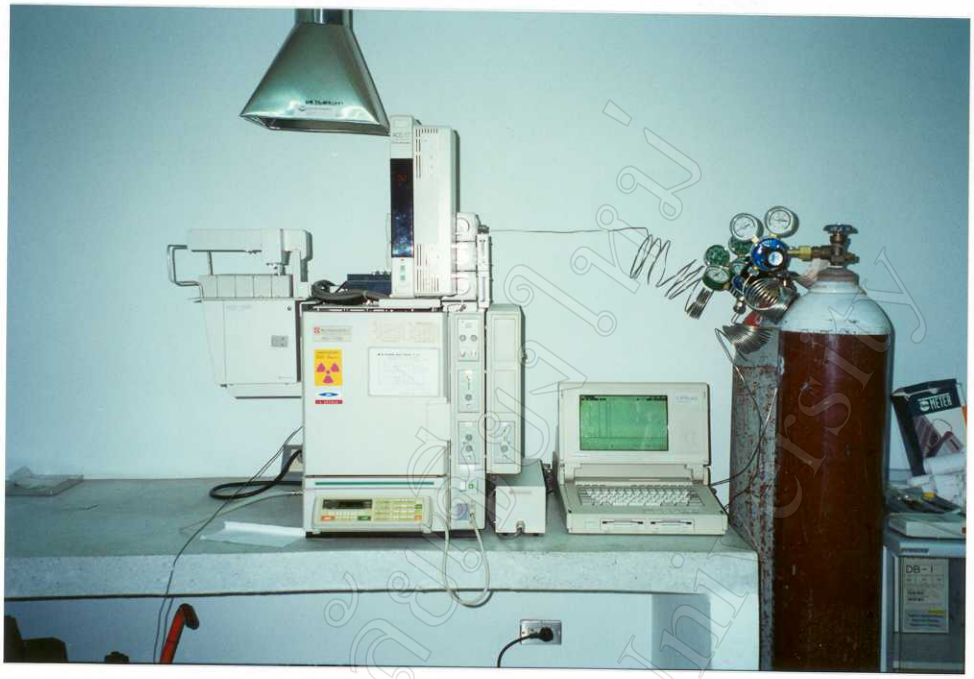

Figure 19 : Gas chromatography (Shimadzu GC – 14B) apparatus

Figure 20 : Separation of oil in solvent (chlorofom : methalnol, 2:1) by separating funnel

การวิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอล ไตรกลีเซอร์ไรด์ และไลโปโปรตีน ในพลาสมา

<u>การวิเคราะห์โคเลสเตอรอลในพลาสมา</u> (Jung *et al.*, 1975)

วิธีการ

1. ดูดพลาสมา 50 ไมโครลิตรใส่ใน screwed cap tube 13 x 100 มม.
2. เติม ferric acetate/uranyl acetate 5.0 มล. เขย่าอย่างแรงด้วย vortex mixture
3. นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 2,700 รอบ/นาที นาน 5 นาที
4. เตรียมหลอดอ่านขนาด 13 x 100 มม. ชุดใหม่ แล้วเติม sulfuric acid reagent หลอดละ 2.0 มล.
5. ดูด supernate จากหลอดเดิม 3.0 มล. มาใส่ในหลอดอ่านที่เติม sulfuric acid reagent
6. ผสมให้เข้ากันทันทีด้วย vortex mixer อย่างน้อย 20 วินาที แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที
7. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยใช้หลอด blank อ่านค่าเป็นศูนย์

<u>หมายเหตุ</u> : หลอด blank จะเติมเฉพาะ ferric acetate/uranyl acetate 3.0 มล. และ sulfuric acid reagent 2.0 มล.

สูตรการคำนวณ

$$\text{Total Cholesterol} = \frac{Au \times 250}{As}$$

เมื่อ Au คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

As คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายโคเลสเตอรอลมาตรฐาน

<u>การวิเคราะห์ HDL ในพลาสมา</u> (Demacker *et al.*, 1980)

วิธีการ

1. ดูดพลาสมา 250 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย phosphotungstic acid 25 ไมโครลิตร และ 2.5 mol/l $MgCl_2$ 5 ไมโครลิตร
3. เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 2,700 รอบต่อนาที นาน 15 นาที
4. เก็บส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณ HDL โดยใช้วิธีการเดียวกับการวิเคราะห์โคเลสเตอรอลในพลาสมา

สูตรการคำนวณ $HDL - C = \frac{Au \times Cs \times 1.12}{As}$

เมื่อ Au คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

As คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายโคเลสเตอรอลมาตรฐาน

Cs คือ ความเข้มข้นของสารละลายโคเลสเตอรอลมาตรฐาน

<u>การวิเคราะห์ไตรกลีเซอร์ไรด์ในพลาสมา</u> (Bigg *et al.*, 1975)

วิธีการ

1. ดูดพลาสมา 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 13 x 100 มม.
2. เติม N-Heptane 2.0 มล.
3. เติม isopropanol 3.5 มล.
4. เติมสารละลายกรดกำมะถัน 40 mmol/l 1.0 มล.
5. ผสมแต่ละหลอดให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer นาน 20 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จนน้ำยาแยกชั้น
6. เตรียมหลอดชุดใหม่ และเติม sodium alkoxide 2.0 มล.
7. ดูดสารละลายในชั้นบนของชุดแรก 0.2 มล. ลงในหลอดที่เตรียมไว้
8. เขย่าให้เข้ากันดี แล้วใส่ตู้ร้อน 60^{0}C นาน 5 นาที
9. เติม sodium periodate 1.0 มล. แล้วผสมให้เข้ากัน
10. เติม acetylacetone 1.0 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วใส่ในตู้ร้อน 60^{0}C นาน 20 นาที
11. ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดยอ่าน blank เป็นศูนย์

<u>หมายเหตุ</u> : หลอด blank จะเติมสารละลายทุกอย่าง แต่ไม่ใส่ตัวอย่างลงไป

สูตรการคำนวณ $VLDL = \frac{Triglyceride}{5}$

การวิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอล และไตรกลีเซอร์ไรด์ในเนื้อ และไขมันสันหลัง

<u>การวิเคราะห์โคเลสเตอรอลในเนื้อ และไขมันสันหลัง</u> (Jung *et al.*, 1975)

วิธีการ

1. ทำการสกัดไขมันจากเนื้อ หรือไขมันสันหลัง ตามวิธีของ Folch *et al.* (1957)
2. ดูดไขมันที่สกัดได้จากเนื้อ หรือไขมันสันหลังที่มีความเข้มข้น 50 มก./มล. ปริมาตร 50 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 25 มล.
3. เติม alcoholic KOH 10 มล.
4. นำไปต้มใน water bath 45^{0}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, ทิ้งให้เย็น
5. เติม petroleum ether 5 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture
6. เติมน้ำกลั่น 5 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture
7. เทสารละลายทั้งหมดลงในกรวยแยก, ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น
8. เก็บส่วนที่ละลาย ในชั้น petroleum ether แล้วนำไประเหยแห้งใน water bath 65^{0}C
9. ทำเช่นเดียวกับข้อ 2 – 7 ในการวิเคราะห์โคเลสเตอรอลในพลาสมา

<u>การวิเคราะห์ไตรกลีเซอร์ไรด์ในเนื้อ และไขมันสันหลัง</u> (Bigg *et al.*, 1975)

วิธีการ

1. ทำการสกัดไขมันจากเนื้อ หรือไขมันสันหลัง ตามวิธีของ Folch *et al.* (1957)
2. ดูดไขมันที่สกัดได้จากเนื้อ (ความเข้มข้น 50 มก./มล.) หรือไขมันสันหลัง (ความเข้มข้น 50 มก./มล. ที่เจือจาง 100 เท่า) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
3. ทำเช่นเดียวกับข้อ 2 – 11 ในการวิเคราะห์ไตรกลีเซอร์ไรด์ในพลาสมา

<u>หมายเหตุ</u> : การวิเคราะห์ไตรกลีเซอร์ไรด์ในไขมันสันหลัง จะทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 50 มก./มล. ด้วย iso propanol ในอัตราส่วน 1 : 100 ก่อนนำไปทำปฏิกริยาในขั้นตอนที่ 2 – 11

Figure 21 : Spectrophotometer DU 7500 apparatus

การวิเคราะห์หาค่า Thiobarbituric acid number ในเนื้อ และไขมันสันหลัง (Rossell, 1994)

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่น 70 มล.
2. นำไปปั่นใน Waring blender ประมาณ 15 วินาที
3. เทใส่ใน distillation flask แล้วล้าง blender ด้วยน้ำกลั่น 30 มล.
4. เติม 4M HCl 2.5 มล. (ปรับ pH = 1.5)
5. เติม anti-foaming agent 1-2 หยด
6. ต่อเข้ากับชุดกลั่น แล้วกลั่นจนได้ของเหลวประมาณ 50 มล.
7. ปิเปตสารละลายที่กลั่นได้ 5 มล. แล้วเติม TBA solution 5 มล.
8. นำไปต้มในน้ำเดือด 35 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น 10 นาที
9. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร

<u>หมายเหตุ</u> หลอด blank เติมน้ำกลั่น 5 มล. และ TBA solution 5 มล.

สูตรคำนวณ TBA number (mg malonaldehyde/kg sample) = 7.8 x O.D.

Figure 22 : Distillation apparatus for measuring of TBA number

การวัดค่าความแข็งของไขมัน (fat firmness) แนะนำโดย สัญชัย (2543)

วิธีการ

1. นำตัวอย่างไขมันสันหลังที่แช่เข็ง -20^{0}C มาละลาย (thawing) ที่อุณหภูมิ 4 ± 1^{0}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ทำการหลอมเหลวตัวอย่างไขมันสันหลังในเตาอบไมโครเวฟที่ 450 W เป็นเวลา 8-10 นาที
3. ดูดน้ำมันที่ได้ 10 มล. ใส่ในขวดแก้วขนาด 15 มล. แล้วนำไปแช่แข็งที่ -20^{0}C เพื่อรอการวัด (ทิ้งไว้ข้ามคืน)
4. ก่อนทำการวัด นำขวดน้ำมันมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 45 นาที จากนั้นนำไปแช่ใน ice bath อุณหภูมิ 4 ± 1^{0}C นาน 30 นาที
5. วัดความแข็งของไขมัน โดยใช้เครื่อง Instron (Model 5565) โดยใช้หัวตันขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. หัววัดกำลัง 100 นิวตัน (Puncture PS STUBS, England) และกำหนดระยะทางของหัววัดจากผิวหน้าของไขมันถึงใจกลางประมาณ 15 - 20 มม.
6. บันทึกค่าแรงที่ได้ในหน่วยนิวตัน (mN), พลังงาน (mJ) และระยะทาง (มม.)

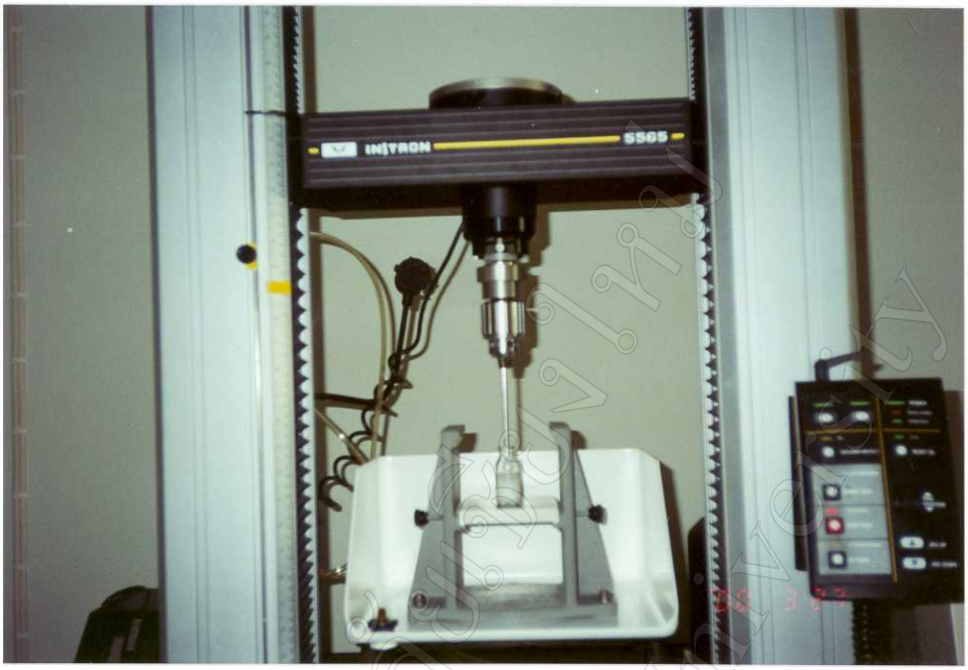

Figure 23 : Instron model 5565 apparatus for measuring fat firmness

5. สถานที่ทำการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

5.1 สถานีวิจัยและศูนย์ฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

5.1 ศูนย์ฝึกอบรมเทคโนโลยีเนื้อสัตว์แห่งชาติ (National Meat Technology and Training Center) ถ. ห้วยแก้ว ต. สุเทพ อ. เมือง จ. เชียงใหม่

5.1 ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

5.1 ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

5.1 ห้องปฏิบัติการกลาง คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

6. ระยะเวลาทำการวิจัย

ใช้เวลาประมาณ 18 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

7.1 ระดับโคเลสเตอรอล ไตรกลีเซอร์ไรด์ และไลโปโปรตีนชนิดต่างๆ ในพลาสมาของสุกร ทำการศึกษาใน 3 ปัจจัย ได้แก่ ระดับการเสริมน้ำมันปลาทูน่า 4 ระดับ น้ำหนักของสุกร 3 ระดับ และเพศของสุกร 2 ระดับ ซึ่งวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การทดลองแบบ 4 x 3 x 2 factorial ในแผนการทดลองแบบ CRD (จรัญ, 2534)

7.2 ข้อมูลทางด้านสมรรถภาพการผลิต คุณภาพซาก และไขมัน ทำการศึกษาใน 2 ปัจจัย ได้แก่ ระดับการเสริมน้ำมันปลาทูน่า 4 ระดับ และเพศของสุกร 2 ระดับ ซึ่งวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การทดลองแบบ 4 x 2 factorial ในแผนการทดลองแบบ CRD (จรัญ, 2534)

7.3 การศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาเนื้อ และไขมันสันหลัง ทำการศึกษาใน 3 ปัจจัย ได้แก่ ระดับการเสริมน้ำมันปลาทูน่า 4 ระดับ ระยะเวลาในการเก็บรักษา 4 ช่วง และเพศของสุกร 2 ระดับ ซึ่งวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การทดลองแบบ 4 x 4 x 2 factorial ในแผนการทดลองแบบ CRD (จรัญ, 2534)

7.4 วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลทางด้านสมรรถภาพการผลิต คุณภาพซาก เนื้อ และไขมันของสุกร โดยวิธีทดสอบ Levene's Test Homogeneity of Variance และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มการทดลองโดยวิธี Least Significant Design (LSD) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Windows (กัลยา, 2540)