

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ส่วนห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย

1. เข็มเบอร์ 22 และไซริงค์ (syringe) ขนาด 5 มม. สำหรับเก็บตัวอย่างเลือดไก่
2. หลอดทดลองมีฝาปิด (screw capped tube) ขนาด 16x100 มม.
3. ตู้อบไฟฟ้า (hot air oven)
4. โถดูดความชื้น (desicator) ที่บรรจุซิลิกาเจล (silica gel)
5. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียด (analytical balance) ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
6. เครื่อง Vortex mixer
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน (centrifuge)
8. Water bath
9. ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20 ถึง -8°C สำหรับเก็บตัวอย่างไข่ อาหาร และมูล
10. เครื่องวิเคราะห์สารเคมีในเลือดอัตโนมัติ (Automated chemistry analyzer) ยี่ห้อ MERCK รุ่น Mega สำหรับวิเคราะห์คอเลสเตอรอล (ภาพที่ 6)
11. เครื่อง Gas chromatography ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC-14B สำหรับวิเคราะห์กรดไขมัน (ภาพที่ 7)
12. เครื่อง Atomic absorption spectrophotometer ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น 3100 สำหรับหาปริมาณทองแดง (ภาพที่ 8)
13. Column DB-wax ยี่ห้อ J&W, ID = 0.25 mm, Length 30 m, Film thickness 0.25 μm

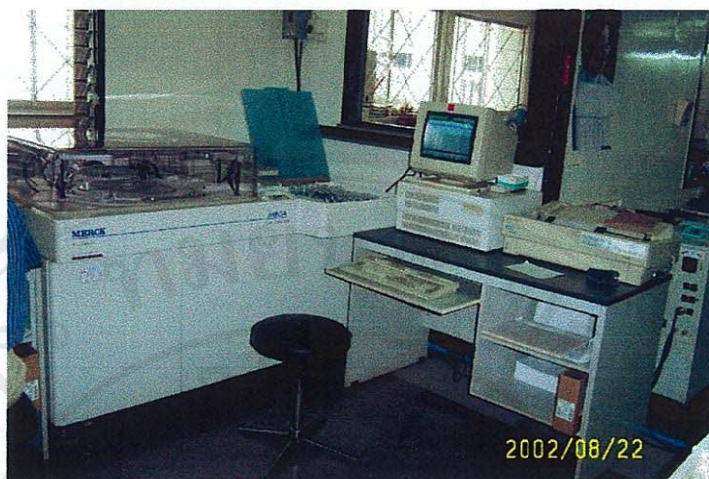


Fig. 6. Automated chemistry analyzer (MERCK; Mega)



Fig. 7. Gas chromatography (Shimadzu; GC-14B)



Fig. 8. Atomic absorption spectrophotometer (Perkin Elmer; 3100)

ส่วนฟาร์มทดลอง ประกอบด้วย

1. ไก่ไข่พันธุ์ Lohmann Tierzucht Brown Classic อายุ 25 สัปดาห์ จำนวน 294 ตัว
2. นกกระทาไข่พันธุ์ญี่ปุ่นอายุ 100 วัน จำนวน 420 ตัว
3. กรงตับทดลองไก่ไข่ ขนาด 24 x 40 x 36 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 147 ช่อง ใส่ช่องละ 2 ตัว ซึ่งอยู่ภายในโรงเรือนเดียวกัน
4. กรงทดลองนกกระทาแบบขังรวม ขนาดกรงละ 35 x 50 x 20 ซม. จุนกกรงละ 20 ตัว
5. เครื่องชั่งมี 4 ชนิด คือ
 - เครื่องชั่งน้ำหนักแบบไฮโดรลิก ใช้ชั่งอาหาร ขนาดชั่งได้สูงสุด 150 กก. ความละเอียดอ่านได้ 50 ก.
 - เครื่องชั่งน้ำหนักแบบสปริง ใช้ชั่งไก่ โดยดัดแปลงจากรองให้เป็นรูปกรวยสำหรับใส่ไก่แต่ละตัว ขนาดชั่งได้สูงสุด 3 กก. ความละเอียดอ่านได้ 10 ก.
 - เครื่องชั่งไฟฟ้า ใช้ชั่งน้ำหนักไข่ ขนาดชั่งได้สูงสุด 1.2 กก.
 - เครื่องชั่งน้ำหนักไข่ในน้ำ ดัดแปลงจากเครื่องชั่งชนิดแขวน เพื่อหาความถ่วงจำเพาะ (ถ.พ.) ของไข่แต่ละฟอง คำนวณ ถ.พ. จากสูตรต่อไปนี้

$$\text{ถ.พ.} = \frac{\text{น้ำหนักไข่ในอากาศ}}{\text{น้ำหนักไข่ในอากาศ} - \text{น้ำหนักไข่ในน้ำ}}$$

6. เครื่องผสมอาหารสัตว์ แบบเกลียวนอน ขนาด 60 กก.
7. ถังใส่อาหารพร้อมฝาปิด ขนาดบรรจุอาหารได้ถึงละ 10 กก.
8. เครื่องวัดความหนาเปลือกไข่ แบบ TelCock มีความละเอียดอ่านได้ 0.001 มม. วัดความหนาเปลือกไข่ตรงกึ่งกลางฟองจำนวน 2 ตำแหน่ง โดยลอกเยื่อหุ้มเปลือกไข่ออกก่อน แล้วจึงหาค่าเฉลี่ยความหนาเปลือกไข่ทั้งสองตำแหน่ง
9. เครื่องวัดความสูงไข่ขาว ยี่ห้อ TTS โดยวัดความสูงไข่ขาวบริเวณกึ่งกลางระหว่างขั้วไข่ทั้งสอง และห่างจากไข่แดงประมาณ 1 ซม. เพื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณ Haugh Unit
10. พัดวัดสีไข่ไก่ ใช้ของบริษัทโรช (Roche yolk color fan) มีค่าความเข้มของสีตั้งแต่เบอร์ 1 ถึง 15 ตามความเข้มของสีไข่แดงที่เพิ่มขึ้น

วิธีการทดลอง

แบ่งการวิจัยออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

• ส่วนห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย

- วิเคราะห์หาปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดไก่ ไข่ไก่ และไข่นกกระทา

- วิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดไขมันในไขไก่ และไขนกกกระทา
- วิเคราะห์หาปริมาณทองแดงในอวัยวะภายในและมูลของไก่ รวมทั้งในมูลของนกกกระทา รายละเอียดของวิธีวิเคราะห์ทั้ง 3 รายการข้างต้น แสดงไว้ในภาคผนวก ก.

● ส่วนฟาร์มทดลอง

แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 : ไก่ไข่

ใช้ไก่ไข่สายพันธุ์ Lohmann Tierzucht Brown Classic อายุ 25 สัปดาห์ จำนวน 294 ตัว เลี้ยงในกรงตบขนาดกรงละ 24x40x36 ซม. บรรจุไก่กรงละ 2 ตัว มีรางอาหารอยู่ด้านหน้า โดยในแต่ละเช้า (7 กรง) มีแผงไม้กระดานกันแยก เพื่อป้องกันมิให้ไก่ข้ามไปกินอาหารของกลุ่มอื่น ส่วนระบบน้ำให้แบบหยด (drew drop) เฉพาะของแต่ละกรงซึ่งมีไก่อยู่ 2 ตัว แขนงอยู่ด้านบนของกรง ไก่ทุกตัวได้รับน้ำและอาหารอย่างเต็มที่ (*ad libitum*) และได้รับแสงสว่างวันละ 17 ชั่วโมง แบ่งไก่ออกโดยสุ่มเป็น 7 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ซ้ำ (14 ตัว/ซ้ำ) ให้แต่ละกลุ่มได้รับอาหารทดลอง ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 อาหารควบคุม (ใช้น้ำมันปาล์มในสูตรอาหารระดับ 3%)
- กลุ่มที่ 2 และ 3 อาหารสูตรที่ 1 เสริมด้วยทองแดง (Copper, Cu) ในรูป Bioplex-copper[®] ระดับ 125 และ 250 มก. Cu /กก. อาหาร ตามลำดับ
- กลุ่มที่ 4 และ 5. อาหารสูตรที่ 1 เสริมด้วยโครเมียม (Chromium, Cr) ในรูป Biochrom[®] ระดับ 200 และ 400 มก. Cr /ตันอาหาร ตามลำดับ
- กลุ่มที่ 6 และ 7 อาหารสูตรที่ 1 เปลี่ยนจากใช้น้ำมันปาล์มไปเป็นน้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil) และน้ำมันลินซีด (linseed oil) ระดับ 3% เช่นเดียวกัน ตามลำดับ

Bioplex copper[®] และ Bio chrom[®] เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Alltech Biotechnology Co., Ltd. ซึ่งเป็นทองแดงที่อยู่ในรูป proteinate มีความเข้มข้นเท่ากับ 10% ส่วนโครเมียมจะเป็น trivalent chromium ที่แยกมาจากยีสต์ (yeast) มีความเข้มข้นเท่ากับ 5,000 มก./กก. ตามลำดับ (ภาพที่ 9) ส่วนน้ำมันพืชจากปาล์มและถั่วเหลืองซื้อจากท้องตลาดทั่วไป ซึ่งเป็นน้ำมันที่ผ่านการกรองให้บริสุทธิ์แล้ว ในขณะที่น้ำมันลินซีด ได้จากการนำเมล็ดลินซีดจากมูลนิธิโครงการหลวงเชียงใหม่ ไปสกัดน้ำมันออกแบบใช้แรงอัด (screw press) ซึ่งยังไม่ผ่านการกรองให้บริสุทธิ์ น้ำมันจากพืชทั้ง 3 ชนิด แสดงไว้ในภาพที่ 10

อาหารทดลองทุกกลุ่มมีโปรตีนระดับ 16%, 2.8 kcal ME/g. เหมือนกันหมด และอาหารกลุ่มควบคุมมีทองแดงปริมาณ 6.78 มก./กก. ทดลองเป็นเวลา 168 วัน (6 ช่วงการทดลอง ช่วง

ละ 28 วัน) ส่วนผสมของสูตรอาหารและคุณค่าทางโภชนาของอาหารสูตรควบคุม (กลุ่มที่ 1) แสดงไว้ในตารางที่ 4

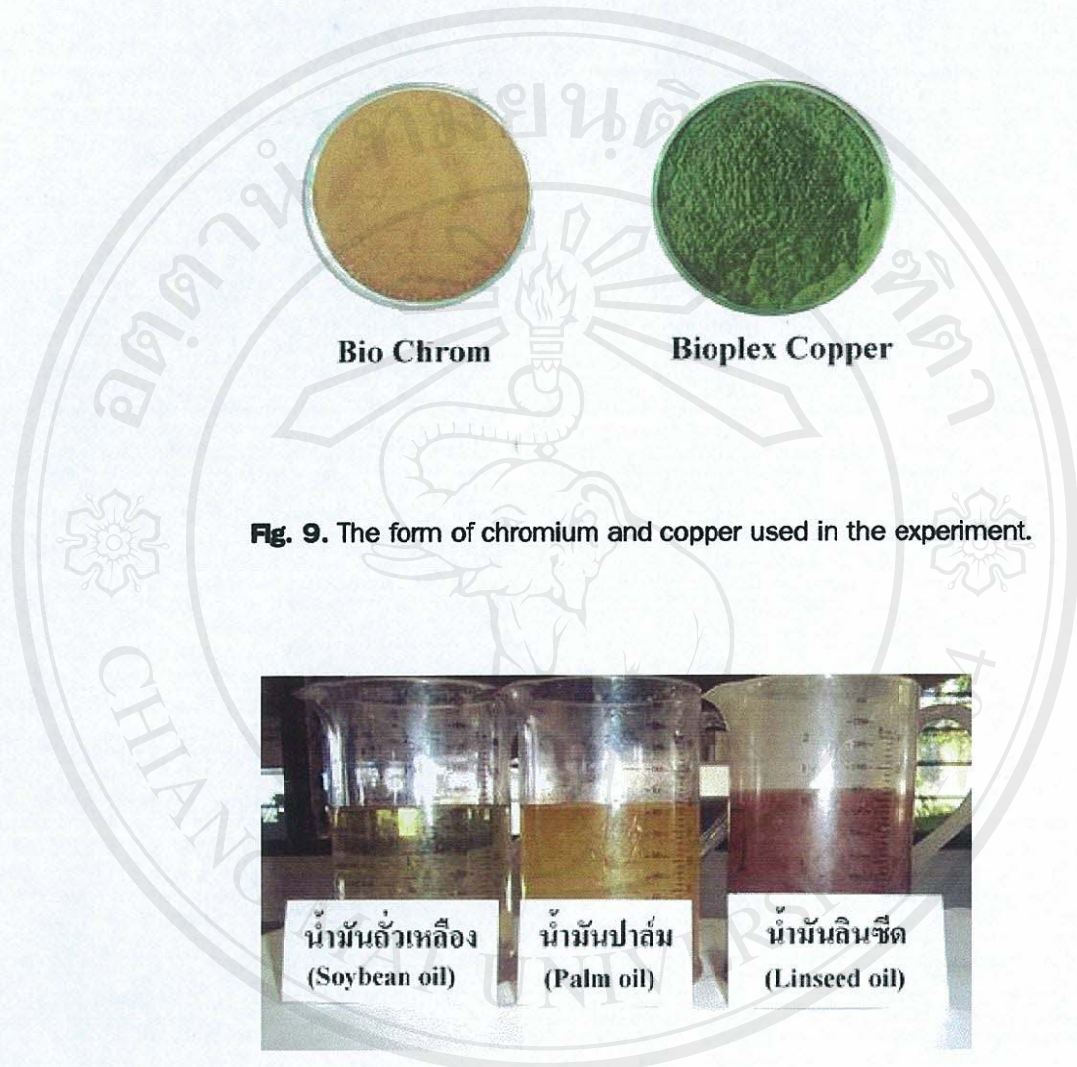


Fig. 9. The form of chromium and copper used in the experiment.

Fig. 10. Oils from soybean, palm and linseed.

ข้อมูลที่บันทึกประกอบด้วย ผลผลิตไข่บันทึกทุกวัน ปริมาณอาหารที่กินบันทึกเมื่อสิ้นสุดของแต่ละช่วงการทดลอง การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวไก่ซึ่งเป็นรายตัวเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง ส่วนคุณภาพไข่ ด้านน้ำหนักไข่และจำนวนไข่ในแต่ละเบอร์ (เกรด) บันทึกจากจำนวนไข่ทุกฟองใน 7 วันสุดท้าย (วันที่ 21-28) ของแต่ละช่วง ส่วนค่า Haugh unit ความหนาเปลือกไข่ และสีไข่แดง วัดจากไข่จำนวน 3 ฟอง/ซ้ำ ใน 3 วันสุดท้ายของแต่ละช่วง ส่วนอัตราการตาย การคั้ตทิ้งและอาการผิดปกติของไก่บันทึกทุกครั้งที่มีการตายหรือมีอาการผิดปกติ แล้วรายงานผลเมื่อสิ้นสุดการทดลอง สำหรับปริมาณคอเลสเตอรอลในซีรัมตรวจวัดจากเลือดที่เจาะจากเส้นเลือดดำใต้ปีกของไก่ในวันสุดท้ายของช่วงที่ 3 และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

(ช่วงที่ 6) ส่งวิเคราะห์ด้วยวิธี enzymatic ที่ห้องปฏิบัติการคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์สารเคมีในเลือดอัตโนมัติ (Automated chemistry analyzer : MERCK ; Mega) ส่วนคอเลสเตอรอลในไข่แดง บันทึกจากไข่ในวันสุดท้ายของทุกช่วง จำนวน 2 ฟอง/ซ้ำ ทำการสกัดไขมัน แล้วส่งวิเคราะห์โดยใช้วิธีการเดียวกันกับที่ทำในซีรัม องค์ประกอบของกรดไขมันชนิด palmitic, palmitoleic, stearic, oleic, linoleic, α -linolenic acid, eicosapentaenoic (EPA) และ docosahexaenoic (DHA) ในไข่แดงทำการวิเคราะห์ในช่วงที่ 3 และ 6 จำนวน 2 ฟอง/ซ้ำ ด้วยเครื่อง Gas chromatography (Shimadzu ; GC-14B) ปริมาณสารตกค้าง อันได้แก่ทองแดงในอวัยวะภายในได้จากการฆ่าไก่ในช่วงสุดท้ายจำนวน 1 ตัว/ซ้ำ แล้วเก็บหัวใจ ตับ กิ่ง และอาหารที่อยู่ในทางเดินอาหารตั้งแต่ส่วนต้นลำไส้เล็กจนถึงทวารหนัก ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer ตามวิธีการอ้างอิงโดย Anonymous (1982) ส่วนมูลไก่ สุ่มเก็บจากไก่จำนวน 2 ตัว/ซ้ำ ในวันสุดท้ายของการทดลอง โดยนำถาดปูดด้วยพลาสติกไปรองไว้ได้กรง เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำไปอบให้แห้ง แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer เช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์อวัยวะภายใน

TABLE 4. Feed formulation and chemical composition of experimental laying hen diets (Control group or Diet No. 1).

Ingredients	(kg)	Calculated chemical composition :	
		(% air dry basis)	
Yellow corn	55.90		
Defatted rice bran (15% CP)	10.00	CP	16.00
Soybean meal (44% CP)	19.15	ME (kcal/g)	2.82
Fish meal (55% CP)	2.50	CF	3.59
Palm oil ^{1/}	3.00	EE	5.60
Dicalcium phosphate (18% P)	0.89	Ca	3.45
Limestone	8.00	P, available	0.35
DL-Methionine	0.06	Lysine	0.89
Salt	0.25	Methionine	0.39
Vitamin and mineral premix ^{2/}	0.25	Cu (mg/kg)	6.78
Total	100.00	Feed price (Bt/kg) ^{3/}	6.80

^{1/} Substituted by soybean oil and linseed oil for diet No. 6 and 7, respectively.

^{2/} mg/kg feed unless otherwise noted : Vitamins; A 12,000 IU, D₃ 2,400 IU, E 8, K₃ 2, B₁ 1, B₂ 4, B₆ 3, B₁₂ 0.01, Nicotinic acid 15, Pantothenic acid 9.5, Folic acid 0.5, Biotin 0.09, Choline chloride 65.25; Minerals; Fe 60, Cu 6, Mn 60, Zn 40, I 0.35, Se 0.01; favoring agent 25 and preservative 6.25.

^{3/} Ingredient price (Bt/kg) : Corn 5.30, Defatted rice bran 4.00, Soybean meal 10.20, Fish meal 20.00, Palm oil 18.00, Dicalcium phosphate 13.00, Limestone 1.10, DL-methionine 120.00, Salt 2.00 and Vitamin-mineral premix 65.00

หลังจากสิ้นสุดการทดลองแล้ว (ครบ 6 ช่วงการทดลอง) ได้ขยายการศึกษาออกไปอีก แต่ให้ไก่ทุกตัว (จากทุกกลุ่ม) ได้รับอาหารสูตรควบคุม (กลุ่มที่ 1) ต่อไปอีก 28 วัน เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณคอเลสเทอรอลในเลือด ไข่แดง และแร่ธาตุในมูล โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือด ไข่ และมูลไก่ รวมทั้งวิธีการวิเคราะห์กระทำเช่นเดียวกับวิธีที่กล่าวมาข้างต้น

คำนวณค่าของทองแดงสะสมในร่างกาย (Cu retention) และคิดเป็นร้อยละของที่กินเข้าไป (% of intake) โดยใช้สูตร

$$\text{Cu retention (mg/d)} = (\% \text{Cu in feed} \times \text{g. feed intake}) - (\% \text{Cu in excreta} \times \text{g. excreta})$$

$$\text{Cu retention (\% of intake)} = \frac{\text{Cu retention (mg/d)}}{\text{Cu intake (mg/d)}} \times 100$$

การทดลองที่ 2 : นกกระทาไข่

ใช้นกกระทาไข่พันธุ์ญี่ปุ่น (Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*) จำนวน 420 ตัว อายุเริ่มทดลอง 100 วัน เลี้ยงบนกรงแบบขังรวมขนาดกรงละ 35x50x20 ซม. มีรางอาหารอยู่ด้านหน้าเฉพาะแต่ละกรง ส่วนรางน้ำยาวติดต่อกันตลอดอยู่ด้านหลังของกรง นกทุกตัวได้รับน้ำและอาหารอย่างเต็มที่ และได้รับแสงสว่างวันละ 17 ชั่วโมงเหมือนกัน แบ่งนกลทดลองออกโดยสุ่มเป็น 7 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ซ้ำ (20 ตัว/ซ้ำ) ให้อาหารวันละ 2 มื้อ คือ ที่เวลา 8.00 และ 16.00 น. นกในแต่ละกลุ่มได้รับอาหารทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 แต่มีระดับโปรตีน 22% ส่วน ME เท่ากับ 2.8 kcal/g. อาหารกลุ่มควบคุมมีทองแดงปริมาณ 9.17 มก./กก. ทดลองเป็นเวลา 84 วัน ส่วนผสมของสูตรอาหารและคุณค่าทางโภชนาของอาหารสูตรควบคุม (กลุ่มที่ 1) แสดงไว้ในตารางที่ 5

การบันทึกข้อมูลด้านผลผลิตไข่บันทึกทุกวัน ในขณะที่ปริมาณอาหารที่กินบันทึกเมื่อสิ้นสุดของแต่ละช่วง การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวนก ซึ่งแบบรวมเป็นซ้ำเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง คุณภาพไข่ด้านน้ำหนักไข่บันทึกจากจำนวนไข่ทุกฟองใน 7 วันสุดท้ายของแต่ละช่วง ส่วนความหนาเปลือกไข่ และสีไข่แดง บันทึกจากไข่จำนวน 4 ฟอง/ซ้ำใน 3 วันสุดท้ายของแต่ละช่วง สำหรับปริมาณคอเลสเทอรอลและกรดไขมันในไข่แดง บันทึกจากไข่ในวันสุดท้ายของทุกช่วงจำนวน 2 ฟอง/ซ้ำ ส่วนปริมาณสารตกค้างในมูลเก็บจากทุกกรง โดยใช้ถาดรองมูลของกรงนกกกระทาในวันสุดท้ายของการทดลอง (วันที่ 84) โดยมีวิธีการและใช้เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

TABLE 5. Feed formulation and chemical composition of experimental laying Japanese quail diets (Control group or Diet No. 1).

<i>Ingredients</i>	<i>(kg)</i>	<i>Calculated chemical composition :</i>	
		<i>(% air dry basis)</i>	
Yellow corn	47.53	CP	22.20
Defatted rice bran (15% CP)	3.00	ME (kcal/g)	2.80
Soybean meal (44% CP)	29.80	CF	3.49
Fish meal (55% CP)	8.00	EE	5.82
Palm oil ^{1/}	3.00	Ca	3.54
Dicalcium phosphate (18% P)	0.25	P, available	0.40
Limestone	7.82	Lysine	1.39
DL-Methionine	0.10	Methionine	0.52
Salt	0.20	Cu (mg/kg)	9.17
Vitamin and mineral premix ^{2/}	0.30	Feed price (Bt/Kg) ^{3/}	8.26
<i>Total</i>	100.00		

^{1/} Substituted by soybean oil and linseed oil for diet No. 6 and 7, respectively.

^{2/} mg/kg feed unless otherwise noted : Vitamins; A 14,400 IU, D₃ 2,880 IU, E 9.6, K₃ 2.4, B₁ 1.2, B₂ 4.8, B₆ 3.6, B₁₂ 0.012, Nicotinic acid 18, Pantothenic acid 11.4, Folic acid 0.6, Biotin 0.108, Choline chloride 78.3; Minerals; Fe 72, Cu 72, Mn 72, Zn 48, I 0.42, Se 0.012; favoring agent 35 and preservative 7.5.

^{3/} See Table 4.

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากทั้ง 2 การทดลอง ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design; CRD) และหาลำดับความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย Duncan's new multiple range test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Statistical analysis system (SAS) ตามคำแนะนำของมนต์ชัย (2544)

สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ และฟาร์มสัตว์ปีก ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ดำเนินการวิจัยระหว่างเดือน เมษายน 2545 - พฤษภาคม 2546