บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

ชื่ออุปกรณ์และเครื่องมือ	โมเดล	บริษัท	ประเทศ
1. เครื่อง Spectophotometer	DU 7500	Beckmann	Germany
2. เครื่อง Centrifuge	Megafuge1.0	Heraeus	Germany
3. เครื่อง Vortex mixer	G-560E	Scientific Industries,Inc.	USA
4. เครื่องสกัดไขมัน	-	Gerhardt	Germany
5. Balance (4 decimal)	2842	Sartorius GmBH	Germany
6. Beaker 50 ml.	No. 1000	Pyrex	USA
7. Beaker 100 ml.	No. 1000	Pyrex	USA
8. Beaker 250 ml.	No. 1000	Pyrex	USA
9. Beaker 500 ml.	No. 1000	Pyrex	USA
10. Block digest	-	-	-
11. Cylinder No. 10, 25 ml.	In 20 C	Witek	Germany
12. Cylinder No. 50, 100, 500 ml	No. 3022	Pyrex	USA
13. Column Prevail C18	AT99	Alltech	USA
14. Detector ELSD	2000ES	Alltech	USA
15. Distillation flask	-	Duran	-
16. Desicator	GL32	Glaswerk Wertheim	Germany
17. Erlenmeyer flask		Pyrex	USA
18. Filtrate paper	No.1, 41	Whatman	England
19. Filtrate paper 0.45 μm	-	Millipore	USA
20. Freezer	FC-27	Sharp	Thailand
21. Hot air oven	DEV	Heraeus	Germany
22. Hot plate thermolyne	Cimarec 3	Northern Chemical	Thailand

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

23 HPLC	1100	Agilent	USA
24. Micropipette 10-100µl	cp65602	Genex Beta	Germany
25. Micropipette 100-1000µl	704180	Brand	Germany
26. Round bottom 100 ml.	-	Glaswerk Wertheim	Germany
27. Round bottom 250 ml.	-	Duran	-
28. Suction pump	VDEO 530	W. Krannich	Germany
29. Test tube	-	Pyrex	Germany
30. Thimble	-	Whatman	England
31. Transfer pipette 5 ml	-	Pyrex	Germany
32. Transfer pipette 10 ml	-	Pyrex	Germany
33. Transfer pipette 15 ml	-	Pyrex	Germany
34. Vacuum sealer	DZ-400	SGS.	Thailand
35. Volumetric flask 50 ml.	-	Schott	Germany
36. Volumetric flask 100 ml.	-	Schott	Germany
37. Volumetric flask 500 ml.	-	Schott	Germany
38. Volumetric flask 1,000 ml.	-	Schott	Germany
39. Volumetric flask 2,000 ml.	-	Schott	Germany
40. Volume pipette 25 ml	-	Pyrex	Germany
41. Volume pipette 50 ml	-	Pyrex	Germany
42. Water bath	-	W. Krannich	Germany
43. Whatman No. 1	-	Whatman	England
44. Wide-Mouth Bottle 125 ml.	FEP	Nalgene	USA

3.2 สารเคมี (เกรด Analytical Reagent)

ชื่อสารเคมี	บริษัท
1. น้ำกลั่น	-
2. Acetic acid	Merck
3. Acetylacetone	Fluka
4. Ammonium acetate	BDH
5. anti-foaming agent	Fluka

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. Boric acid	Merck
7. Chloroform	Merck
8. Choramine-T-reagent	Merck
9. Conc. Sulfuric acid	Merck
10. Dichloromethane	Merck
11. Ethanol	Lab-Scan
12. FAME standard	Supelco
13. Ferric chloride	Merck
14. Hydrochloric acid	Merck
15. Magnesium chloride	Merck
16. Methanol	Lab-Scan
17. n-Heptane	Lab-Scan
18. Perchloric acid	Merck
19. Petrolium ether	Lab-Scan
20. Potassium Hydroxide	Merck
21. Propa-2-ol	Lab-Scan
22. Pumice stone	BDH
23. Sodium chloride	Merck
24. Sodium hydroxide	Merck
25. Sodium methoxide	Fluka
26. Sodium periodate	Merck
27. Sodium sulfate anhydrous	J.T.Baker
28. Uranyl acetate	Merck
29. Thiobarbituric acid	BDH
30. 1-propanol	Lab-Scan
31. 20% Boron trifluoride	Merck
32. 2,2,4 trimethyl pentane	Lab-Scan
33. 4-dimethylaminobenzaldehyde	Merck

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3. การทดลอง

3.3.1 สัตว์ทดลอง

ไก่ที่ใช้ในการทดลองเลี้ยงโดยได้รับน้ำและอาหารอย่างเต็มที่ (*ad libitum*) เลี้ยงจากอายุ 1 วัน จนถึง 16 สัปดาห์ ที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ กรมปศุสัตว์ อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่อาหารที่ใช้เป็นอาหารสำเร็จรูปของไก่ไข่ แบ่งเป็น 3 ระยะ คือ

ไก่ไข่เล็ก ตั้งแต่อายุแรกเกิดจนถึง 6 สัปดาห์ เปอร์เซ็นต์โปรตีน 19 เปอร์เซ็นต์

ไก่ไข่รุ่น อายุ 6-12 สัปดาห์ เปอร์เซ็นต์โปรตีน 16 เปอร์เซ็นต์

ไก่ไข่สาวก่อนไข่ อายุ 12 จนถึง 16 สัปดาห์ เปอร์เซ็นต์โปรตีน 13 เปอร์เซ็นต์

Table 5 Ingredients of laying hen diet in different periods

วัตถุดิบอาหารสัตว์ (กิโลกรัม)	อาหารไข่เล็ก	อาหารไก่ไข่รุ่น	อาหารไก่ไข่สาวก่อนไข่
ข้าวโพด	61.2	58.3	58.3
รำละเอียด	10	25	30
กากถั่วเหลืองป่น	18.8	7.2	2.6
ใบกระถินป่น	-	-	4
ปลาป่น	8	8	3
เปลือกหอย	-	0.5	0.8
ไดแคลเซียมฟอสเฟต	1	-	0.3
เกลือ	0.5	0.5	0.5
พรีมิกซ์สำหรับไก่ไข่แต่ละรุ่น	0.5	0.5	0.5
รวม	**100**	**100**	**100**

Table 6 Nutrients content of experimental diets.

ชนิด	Protein (%)[1]	Fat (%)[1]	Dry matter (%)[1]	Energy (cal/g)[2]
อาหารไก่ไข่เล็ก	18.6	6.86	90.58	3978
อาหารไก่ไข่รุ่น	16.4	6.35	91.29	3952
อาหารไก่ไข่สาวก่อนไข่	12.8	6.17	91.14	3953

[1] วิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

[2] วิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์ คณะผลิตกรรมทางการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

จากนั้นสุ่มไก่ที่เลี้ยงมาทั้งหมด 240 ตัว แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม ตามสายพันธุ์ กลุ่มละ 80 ตัว ในแต่ละกลุ่มแบ่งออกเป็นเพศผู้ 40 ตัว และเพศเมีย 40 ตัว โดยแบ่งออกเป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลุ่มที่ 1 ไก่เบรส

กลุ่มที่ 2 ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ ชี้ฟ้า

กลุ่มที่ 3 ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ ฟ้าหลวง

3.3.2 การวางแผนการทดลองทางสถิติ

3.2.1 วางแผนการทดลองในการศึกษาคุณภาพเนื้อเพื่อการบริโภค แบบ 3x2 factorial in CRD โดยมีปัจจัยในการทดลอง คือ สายพันธุ์ (เบรส ชี้ฟ้า และฟ้าหลวง) และเพศ (เพศผู้ และเพศเมีย)

3.2.2 วิเคราะห์ความแปรปรวนตามแผนการทดลองและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey' s W -- Procedure ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS for window (SAS, 1990)

3.3.3 วิธีการศึกษาคุณภาพเนื้อเพื่อการบริโภค (eating quality)

3.3.3.1 วิธีการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี (chemical composition)

นำตัวอย่างกล้ามเนื้ออกและสะโพกบดด้วยเครื่องเบลนเดอร์ (blender) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนะ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ความชื้น โปรตีน และไขมัน ด้วยวิธี proximate analysis (AOAC, 2000)

3.3.3.1.1 การวิเคราะห์หาโปรตีน (protein percentage)

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดแล้ว 0.5 กรัม ใส่ในกระดาษชั่งตัวอย่าง แล้วนำไปใส่ใน kjeldahl flask
2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา 2 กรัม (K_2SO_4 : $CuSO_4$; 20 :1) แล้วเติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น (conc. Sulfuric acid) จำนวน 15 มิลลิลิตร
3. นำ kjeldahl flask เข้าเครื่องย่อยที่อุณหภูมิ 420 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนกระทั่งได้สารละลายสีเขียวใส แล้วทิ้งให้เย็นเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
4. ตวงสารละลาย 4% boric acid 25 มิลลิลิตร ใส่ erlenmeyer flask No. 250 มิลลิลิตร แล้วเติม screen methylred indicator

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. นำ kjeldahl flask (จากข้อ 3) เข้าเครื่องกลั่นแล้วนำขวด erlenmeyer flask ที่ใส่สารละลาย 4% boric acid (จากข้อ 4) ต่อเข้ากับอีกปลายด้านหนึ่งของ condenser ของเครื่องกลั่น โดยให้ปลายท่อจุ่มลงในสารละลาย
6. เติม 40% sodium hydroxide ใส่ขวด kjeldahl flask 50 มิลลิลิตร แล้วเปิดน้ำให้ไหลผ่านตัว condenser แล้วจึงเปิดเครื่องกลั่น
7. กลั่นจนได้ปริมาตรของสารละลายในขวด erlenmeyer flask ประมาณ 200 มิลลิลิตร จากนั้น นำขวด erlenmeyer flask ที่มีแอมโมเนียที่เก็บในสารละลาย 4% boric acid มาไตรเตรทกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 *N* H_2SO_4 โดยไตเตรทจนสีของสารละลายเปลี่ยนสีจากสีเขียว เป็นสีม่วงอมเทา

การคำนวณหาปริมาณโปรตีน

$$\text{Protein percentage} = \left(\frac{(A-B) \times C \times E \times 0.014 \times 100}{D} \right)$$

A = จำนวนปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 *N* H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตเตรทกับตัวอย่าง (ml.)

B = จำนวนปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 *N* H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตเตรทกับ blank (ml.)

C = ความเข้มข้น (*N*) ของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4

D = น้ำหนักตัวอย่าง

E = kjeldahl factor (6.25)

3.3.3.1.2 การสกัดไขมัน (AOAC, 2000)

1. ชั่งน้ำหนักเนื้อที่บดแล้ว 2 กรัมอบที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 4 ชั่วโมง
2. นำบีกเกอร์สำหรับหาไขมันที่ผ่านการล้างสะอาด เช็ดให้แห้งแล้วอบที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 1 ชั่วโมง และใส่ในโถดูดความชื้น (dissicator) ปล่อยให้เย็น ทำการชั่งหาน้ำหนักที่ได้
3. นำตัวอย่างเนื้อที่ผ่านการอบหรือผ่านการหาความชื้นแล้ว ใส่ใน thimble ablundum ที่สะอาด และแห้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ใส่ thimble ablundum ลงใน sample containers แล้วต่อเข้ากับ holding clips ของเครื่องสกัดไขมันแบบ Soxhlet extraction
5. ใส่ dichloromethane ลงในบีกเกอร์ขนาด 30 มิลลิลิตร แล้วนำต่อเข้ากับเครื่องสกัดไขมันให้สนิท
6. เปิดน้ำเย็นให้ไหลผ่าน condenser ตลอดเวลา
7. เปิดสวิทซ์ไฟเครื่องสกัดไขมันโดยใช้ความร้อนสกัดนาน 16 ชั่วโมง ด้วยอัตราการกลั่น 2-3 หยด ต่อวินาที
8. นำ sample containers ออก แล้วนำ reclaiming tube ใส่แทนที่ ให้ความร้อน dichloromethane จะถูกกลั่น และถูกเก็บใน reclaiming tube ส่วนไขมันที่ได้จะอยู่ในบีกเกอร์
9. นำบีกเกอร์ที่มีไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 30 นาที แล้วนำออกใส่ในโถดูดความชื้นปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นภายหลังการสกัดคือน้ำหนักของไขมัน

การคำนวณหาปริมาณไขมัน

$$\text{Fat percentage} = \left(\frac{(A-B) \times 100}{C} \right)$$

A = น้ำหนักบีกเกอร์+น้ำหนักไขมันที่อบแล้ว

B = น้ำหนักบีกเกอร์

C = น้ำหนักตัวอย่าง

3.3.3.1.3 การวิเคราะห์หาความชื้น (moisture percentage)

วิธีการ

1. นำถ้วยสำหรับใส่ตัวอย่างวิเคราะห์หาความชื้น (weighing bottle) ที่ล้างสะอาดและเช็ดให้แห้ง อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 1 ชั่วโมง และนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้นปล่อยให้เย็นและชั่งน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดละเอียดแล้วจำนวน 2 กรัม ใส่ใน weighting bottle บันทึกน้ำหนักรวมทั้งหมด และอบที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 4 ชั่วโมง
3. นำถ้วยที่มีตัวอย่างออกจากตู้อบแห้ง ใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นชั่งน้ำหนักที่หายไป คือ ปริมาณความชื้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณหาปริมาณความชื้น

$$\text{Moisture percentage} = \left(\frac{(A-B) \times 100}{C} \right)$$

A = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

B = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

C = น้ำหนักตัวอย่าง

3.3.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณคอเลสเตอรอล (Jung *et al.*, 1975)

1. ทำการสกัดไขมันจากกล้ามเนื้ออกและสะโพกที่บดแล้ว (AOAC, 2000)
2. ละลายไขมันที่สกัดได้ด้วย Propa-2-ol ให้ได้ความเข้มข้น 50 mg/ml
3. ดูดสารละลายไขมันในข้อ 2 ปริมาตร 50 µl. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 25 ml.
4. เติม alcoholic KOH 33% ปริมาณ 10 ml.
5. ต้มใน water bath 45^{0}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น
6. เติม petrolium ether 5 ml. เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture
7. เทสารละลายทั้งหมดลงในกรวยแยกตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น
8. เก็บส่วนที่ละลายในชั้น petroleum ether แล้วนำไประเหยแห้งใน water bath 65^{0}C
9. เติม ferric acetate/uranyl acetate 5 ml. เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่อง vortex mixture
10. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,700 รอบ/นาที นาน 5 นาที
11. เตรียมหลอดขนาด 13 x 100 mm. แล้วเติม sulfuric acid reagent หลอดละ 2 ml.
12. ดูด supernatant จากหลอดในข้อ 10 ใส่หลอดในข้อ 11
13. ผสมให้เข้ากันทันทีด้วย vortex mixer อย่างน้อย 20 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที
14. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 nm โดยใช้หลอด blank อ่านค่าเป็นศูนย์
15. นำสารละลายคอเลสเตอรอลมาตรฐานมาทำตามข้อ 3-14

หมายเหตุ: หลอด blank จะเติมเฉพาะ ferric acetate/uranyl acetate 3 ml. และ sulfuric acid reagent 2 ml.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สูตรในการคำนวณหาปริมาณคอเลสเตอรอล

$$\textbf{Cholesterol level (mg/ 100g)} = \frac{A \times O.D.\ sample \times B \times 100}{O.D.\ standard \times C}$$

เมื่อ A คือ ปริมาณ 2-propanol (ml.) ที่ใช้ละลายไขมัน

B คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (mg/ml)

C คือ น้ำหนักไขมันที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อ (g)

O.D. sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

O.D. standard คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายคอเลสเตอรอลมาตรฐาน

3.3.3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณไตรกลีเซอร์ไรด์ (Bigg *et al.*, 1975)

1. สกัดไขมันตามวิธีของ AOAC (2000)
2. ละลายไขมันที่สกัดได้ให้มีความเข้มข้น 50 mg/ml ด้วย Iso-propanal
3. ดูดไขมันในข้อ 2 มา 50 µl ใส่หลอดทดลองขนาด 25 ml.
4. เติม N-Haptane 2 ml.
5. เติม Propa-2-ol 3.5 ml.
6. เติม Sulfuric acid 40 mM จำนวน 1 ml.
7. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture 20 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จนแยกชั้น
8. เตรียมหลอดทดลองอีกชุด แล้วเติม sodium alkoxide 2 ml.
9. ดูดสารละลายที่แยกชั้นส่วนบนในข้อ 7 มา 0.2 ml. ใส่ในหลอดข้อ 8
10. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60^{0}C เป็นเวลา 5 นาที
11. นำออกมาเติม sodium periodate 1 ml.
12. เติม acetyl acetone reagent 1 ml. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60^{0}C เป็นเวลา 20 นาที
13. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 420 nm
14. นำสารละลายไตรกลีเซอไรด์มาตรฐานมาทำตามข้อ 3-13

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\textbf{Triglyceride level (g/ 100g)} = \frac{A \times O.D.\ sample \times B \times 100}{O.D.\ standard \times C \times 1000}$$

เมื่อ A คือ ปริมาณ 2-propanol (ml.) ที่ใช้ละลายไขมัน

B คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (mg/ml)

C คือ น้ำหนักไขมันที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อ (g)

O.D. sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

O.D. standard คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไตรกลีเซอไรด์มาตรฐาน

3.3.3.4 การวิเคราะห์หาค่าการหืน thiobarbituric acid (TBA) (Rossell, 1994)

1. ชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อออกและกล้ามเนื้อสะโพกที่บดแล้ว 10 กรัม เติมน้ำกลั่น 70 ml.
2. ปั่นใน Waring blender ประมาณ 15 นาที
3. เทใส่ใน distillation flask แล้วล้าง blender ด้วยน้ำกลั่น 30 ml.
4. เติม 4 M HCl 2.5 ml.
5. เติม anti-foaming agent 1-2 หยด
6. ต่อเข้ากับชุดกลั่น แล้วกลั่นจนได้ของเหลว 50 ml.
7. ปิเปตสารละลายที่กลั่นได้ 5 ml. แล้วเติม TBA solution 5 ml.
8. ต้มในน้ำเดือด 35 นาทีทิ้งไว้ให้เย็น 10 นาที
9. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 nm
10. คำนวณค่า TBA number จากสูตร

หมายเหตุ: หลอด blank เติมน้ำกลั่น 5 ml. แทนสารละลายที่กลั่นได้ และ TBA solution 5 ml.

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

เมื่อ O.D. = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

3.3.3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณคอลลาเจนในกล้ามเนื้อ (AOAC, 2000; Hill, 1966)

วิธีการวิเคราะห์หาค่าคอลลาเจนที่ละลายได้และละลายไม่ได้ (soluble and insoluble collagen analysis)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนการแยก (Hill, 1966)

1. ชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อออกและสะโพกที่บดแล้ว 4 กรัม ใส่ในหลอด homogenize ขนาด 30 ml.
2. ใส่ strength ringer solution 8 ml.
3. Homogenize ด้วยความเร็ว 10,000 rpm นาน 1 นาที
4. ต้มใน water bath อุณหภูมิ 77 °C นาน 70 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น 1 ชั่วโมง
5. ปั่นเหวี่ยงที่ 5,200 g นาน 26 นาที
6. แยกส่วน supernatant ใส่ erlenmeyer flask ที่ 1 และส่วน residue ใส่ erlenmeyer flask ที่ 2

ขั้นตอนการย่อย (AOAC, 2000)

1. เติมกรด sulfuric acid 7 *N* 30 ml. ลงใน erlenmeyer flask ทั้ง 2 ที่เตรียมไว้ข้อ 6 และปิดด้วยกระจกนาฬิกา
2. อบที่อุณหภูมิ 105 ± 1 °C นาน 16 ชั่วโมง
3. นำตัวอย่างที่ได้จากการย่อยกรองผ่านกระดาษกรองใส่ใน volumetric flask ขนาด 500 ml. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 ml.

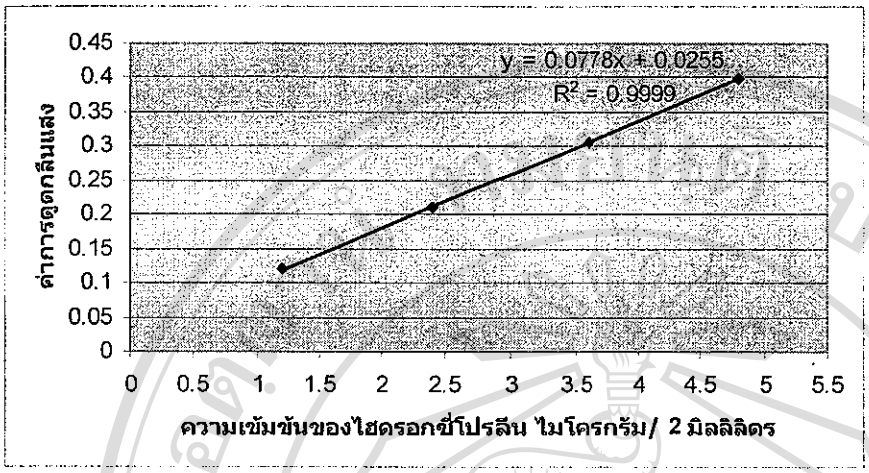
ขั้นตอนการทำให้เกิดสี (AOAC, 2000)

1. ปิเปตสารละลาย 30 ml. ใส่ใน Volumetric flask 100 ml. จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml.
2. ปิเปตสารละลายที่ได้ในข้อ 1. มา 2 ml. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 ml. ตัวอย่างละ 2 หลอดและทำ blank โดยการเติมน้ำกลั่น 2 ml. ใส่ในหลอดทดลอง
3. เติม oxidant solution 1 ml. เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ± 2 นาที
4. เติม color reagent หลอดละ 1 ml. เขย่าทันทีและปิดฝาหลอดให้สนิท
5. ต้มใน water bath อุณหภูมิ 60 ± 0.5 °C นาน 15 นาที
6. ทำหลอดให้เย็นโดยการเปิดน้ำให้ไหลผ่าน 3 นาที
7. ทำหลอดให้แห้งโดยการเช็ดหรือตั้งทิ้งไว้
8. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 558 ± 2 nm.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สูตรในการคำนวณหาปริมาณคอลลาเจน

สมการ standard curve ดังนี้ x = (y-0.0255)/0.0778 จากกราฟ



สูตร H (g/100g) = (2.5 x h)/mv

เมื่อ

y = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

x, h = ความเข้มข้นของ hydroxyproline (µg/2ml.)

H = ปริมาณ hydroxyproline (g/100g)

m = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

v = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้เจือจางเป็น 100 มิลลิลิตร (ml)

ปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ = H ของคอลลาเจนที่ละลายได้ x 7.52

ปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลาย = H ของคอลลาเจนที่ไม่ละลาย x 7.25

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.3.6 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน (adapt from Petritis *et al.*, 2002)

ขั้นตอน Hydrolysis

1. บด และชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้ออก หรือสะโพกประมาณ 100 มิลลิกรัม
2. นำตัวอย่างเนื้อใส่ลงในขวด Wide-Mouth Bottle ขนาด 125 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 6N HCl 5 มิลลิลิตร
3. ย่อย (Hydrolyze) ตัวอย่างด้วยเครื่อง Block digest ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. ระเหยแห้งตัวอย่างที่ย่อยแล้ว (hydrolyzate) ด้วยก๊าซไนโตรเจน
5. ละลาย และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านกระบวนการ Dionization pH 7.0 จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร (Millipore, Bedford, MA)
6. นำสารละลายในข้อ 5. 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนด้วยเครื่อง HPLC (Agilent 1100 Series; USA) โดยใช้เครื่อง detecter แบบ ELSD (Evaporative Light Scattering Detector; Alltech ELSD 2000ES; USA)

Mobile phase preparation

Eluent A: 5 mM NFPD (nonafluoropentanoic acid) in 0.7% TFA (trifluoroacetylated)

Eluent B: acetonitrile

Gradient condition : (Time, %B) = (6,0) (8,15) (25,35)

Column : Prevail C18, 250 mm i.d. 4.6 mm (Part No. 99210)

Flow rate : 1 ml/min

Detector : ELSD drift tube 60° C, N_2 flow 1.5 L/min

หมายเหตุ: 1. Hydrolyze ตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน Tryptophan โดยการเติมสารละลาย $Ba(OH)_2$ (sat.) 10 มิลลิลิตร แทน HCl ในข้อ 2

2. ใช้ amino acid standards (Pierce H; Water Corp., Milford, MA) ทำตามวิธีการในข้อ 5. เพื่อใช้เปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนแต่ละตัวในตัวอย่างเนื้อ

3.3.3.7 การตรวจชิม (sensory evaluation) (ไพโรจน์, 2535)

นำตัวอย่างกล้ามเนื้อออกและสะโพกย่างให้สุกโดยอุณหภูมิใจกลางชิ้นเนื้อเท่ากับ 80 °C จากนั้นตัดให้มีขนาดเท่าๆกันแล้วเสริฟให้ผู้ตรวจชิมซึ่งได้ผ่านการฝึกฝนการตรวจชิม (ไพโรจน์, 2535) จำนวน 6 ท่าน ผู้ตรวจชิมจะได้รับแบบสอบถามการตรวจชิมเนื้อและฟังบรรยายขั้นตอนการตรวจชิมโดยละเอียด ซึ่งการให้คะแนนพิจารณา 4 ลักษณะคือ ความนุ่ม (tenderness) กลิ่นและรสชาติ (flavor) ความชุ่มฉ่ำ (juiciness) และความพอใจโดยรวม (overall acceptability) โดยให้คะแนนซึ่งอยู่ในช่วง 1-9 คะแนน (1 = เหนียว กลิ่นและรสชาติไม่ดี แห้ง และไม่ชอบมาก; 9 = นุ่มที่สุด กลิ่นและรสชาติดีที่สุด ชุ่มฉ่ำที่สุด และมีความชอบมากที่สุด) ผู้ตรวจชิมจะได้รับน้ำและรับประทานผลไม้หลังจากทดสอบชิมเนื้อแต่ละชิ้น นำคะแนนที่ได้จากผู้ตรวจชิมทั้งหมดมาหาค่าเฉลี่ย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.3.8 การตรวจสอบการตกค้างของยาปฏิชีวนะในเนื้อสันในโดยชุดตรวจสอบสารต้านจุลชีพในเนื้อสัตว์ (CM-test) (โครงการพัฒนาชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในอาหาร และผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย, 2545)

1. ใช้กรรไกรตัดหลอดชุดตรวจสอบตามจำนวนที่ต้องการใช้ และเพิ่มอีก 1 หลอด เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุม (Negative control)
2. เขียนหมายเลขตัวอย่างบนหลอดชุดตรวจสอบ
3. คั้นน้ำเนื้อจากตัวอย่างเนื้อ (ประมาณ 15 กรัม) โดยห่อด้วยผ้าขาวบางและบีบด้วยคีมบีบกระเทียม
4. ใช้ปากคีบ (Forceps) คีบกระดาษกรองวงกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม. จุ่มหรือซับน้ำเนื้อ แล้วใส่ลงในหลอดชุดตรวจสอบ โดยให้กระดาษกรองสัมผัสกับผิวด้านบนอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดชุดตรวจสอบ
5. เตรียมหลอดควบคุม (Negative control) โดยใช้กระดาษกรองจุ่มน้ำเนื้อปลอดสารต้านจุลชีพซึ่งมีเตรียมให้ใช้ในกล่องชุดตรวจสอบ
6. ปิดฝาหลอดด้วยสติ๊กเกอร์วงกลม
7. อ่านผลหลังจากอบเพาะหลอดชุดตรวจสอบที่ 65±1 องศาเซลเซียส ประมาณ 3ชั่วโมง โดยนำหลอดควบคุม (Negative control) มาดูผลก่อน ถ้าสีของหลอดควบคุมเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหลอด ให้อ่านผลการทดสอบตัวอย่างทั้งหมดได้ แต่ถ้าสีของหลอดควบคุมยังไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหลอด ให้อบต่อและทำการการอ่านผลทุก 15 นาที

การอ่านผล

1. ถ้าสีของชุดตรวจสอบเป็นสีม่วง อ่านผลเป็นบวก (+ve) มียาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่าง
2. ถ้าสีของชุดตรวจสอบเป็นสีม่วงด้านบนและมีสีเหลืองด้านล่างประมาณครึ่งของส่วนสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อหรือสีม่วงจางลงแต่ไม่เป็นสีเหลือง อ่านผลสงสัยว่าเป็นบวก (±ve คือตัวอย่างมียาต้านจุลชีพในปริมาณต่ำกว่าความเข้มข้นของยาที่ชุดตรวจสอบสามารถตรวจพบ 100%)
3. ถ้าสีของชุดตรวจสอบเป็นสีเหลือง อ่านผลเป็นลบ (-ve) ตัวอย่างไม่มียาต้านจุลชีพหรือถ้ามีก็จะต่ำกว่าความเข้มข้นที่ชุดตรวจสอบสามารถตรวจพบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ถ้าสีของชุดตรวจสอบเป็นสีเหลืองด้านบนและมีสีม่วงข้างล่างแสดงว่าตัวอย่างไม่มีสารต้านจุลชีพ และการทดสอบยังไม่สิ้นสุด ควรอบชุดตรวจสอบต่อที่อุณหภูมิ 65±1 ต่ออีก 3-4 ชั่วโมง แล้วอ่านผลตามวิธีข้างต้น

ข้อระวัง

1. เก็บชุดตรวจสอบในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5- 15 องศาเซลเซียส (ห้ามแช่แข็ง) เนื่องจาก CM-Test เป็นชุดตรวจสอบที่ใช้แบคทีเรียเป็นองค์ประกอบสำคัญในการตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์ ดังนั้นประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอาจถูกกระทบด้วยปัจจัยสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเก็บรักษาซึ่งอาจเป็นผลให้ความแม่นยำ และความเที่ยงตรงของชุดตรวจสอบเบี่ยงเบนไป
2. สารสกัดเนื้อปลอดสารต้านจุลชีพเมื่อผสมน้ำแล้วควรเก็บในตู้แช่แข็ง
3. ควรใช้ชุดตรวจสอบก่อนหมดอายุตามที่ระบุไว้ในฉลาก
4. แบคทีเรียที่ใช้ไม่ใช่แบคทีเรียที่ก่อโรค แต่ควรทิ้งชุดตรวจสอบโดยการห่อให้มิดชิดก่อนทิ้งหรือเผาทำลาย

3.3.4 สถานที่ทำการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

3.5.1 ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่

3.5.2 สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร

3.5.4 ศูนย์วิจัย และบำรุงพันธุ์สัตว์สันป่าตอง จ.เชียงใหม่

3.3.5 ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย

ประมาณ 18 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved