ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาคผนวก 1 วิธีการวัดมิโมซินในตัวอย่างพืช (Hegarty *et al.*, 1964)

วิธีนี้ใช้กรด hydrochloric (HCl) เข้มข้น 0.2 N สกัด แล้วกำจัดสารรบกวนอื่น ๆ โดยการแยกด้วยโครมาโตรกราฟี แบบคอลัมน์ (column chromatography) ซึ่งบรรจุ cation exchange resin วิธีนี้เหมาะสำหรับวัดปริมาณมิโมซินในช่วง 10 - 160 ไมโครกรัม จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปแยกให้ได้สารมิโมซินบริสุทธิ์ด้วยการใช้ โครมาโตรกราฟี แบบกระดาษ (paper chromatography)

อุปกรณ์

1. คอลัมน์แก้ว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 ซม. ยาว 50 ซม.
1. HCl เข้มข้น 3 N, 0.2 N, 0.1 N
2. Cation-exchange resin คือ Dowex 50-X4 (100-200 wet mesh) รูป H^+
3. Ethanol 80%
4. สารละลาย 3 N NaOH
5. สารละลาย 2 N NH_4OH
6. กระดาษกรอง Whatman NO. 1 (for chromatography) 55x40 cm
7. กระดาษกรอง Whatman NO. 41
8. สารละลายผสม (solvent mixture) คือ Butanol : acetic acid : water (120 : 30 : 50 by volume)
9. Ferric chloride เข้มข้น 0.05 % ใน 0.02 N HCl
10. Standard mimosine
11. Spectrophotometer รุ่น UV - 1601 ยี่ห้อ Shimadzu พร้อม glass cuvette

วิธีการ

- **เตรียมสารละลาย**
  1. เตรียม 3 N HCl โดยตวงสารละลายกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น (37%, ถ.พ. 1.2) 250 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 ml
  2. เตรียม 0.2 N HCl โดยตวงสารละลาย HCl เข้มข้น 16.66 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 ml
  3. เตรียม 0.1 N HCl โดยตวงสารละลาย HCl เข้มข้น 8.33 ml ปรับ 1000 ml
  4. เตรียม 3 N NaOH โดยชั่ง NaOH 120 g ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5. เตรียม 2 N NH_4OH โดยตวงสารละลาย NH_4OH 133.33 มล ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร
6. เตรียมสารละลายผสม ผสม butanol, acetic acid และน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 120 : 30 : 50 ml
7. เตรียม Ferric chloride 0.05% โดยละลาย $FeCl_3.6H_2O$ 4 g ใน 0.02 N HCl 500 ml
8. เตรียมสารละลายมาตรฐานมิโมซิน โดยละลายมิโมซิน 100 mg ใน 0.1 N HCl 100 ml

การเตรียมคอลัมน์โครมาโตรกราฟี

1. ใส่ใยแก้ว หรือสำลี ที่ก้นคอลัมน์ กรณีที่คอลัมน์ไม่มีก้นกรอง ให้เติมน้ำกลั่นลงในคอลัมน์ในปริมาณสูงจากก้นคอลัมน์เล็กน้อย
2. ล้างเรซินด้วยน้ำกลั่นโดยเทน้ำลงในเรซิน คนแล้วทิ้งไว้ให้ตกตะกอน เทน้ำออก ทำซ้ำจนได้สีของน้ำใส
3. ใช้ปิเปตขนาด 10 มล. ดูดเรซินครั้งละ 1 มล.แล้วปล่อยลงในคอลัมน์ จนได้ความสูงของเรซินประมาณ 10 ซม.
4. ปิดส่วนบนของเรซินด้วยกระดาษกรองที่ตัดให้มีขนาดพอดีกับเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์ เพื่อป้องกันไม่ให้เรซินกระจายตอนเทสารละลายลงไป
5. ปล่อยน้ำจากคอลัมน์จนหมด
6. ล้างคอลัมน์ด้วย 3 N NaOH 25 ml ปล่อยให้ไหลออกจนหมด
7. ล้างด้วยน้ำกลั่นทีละ 20 มล. จนหมดฤทธิ์ด่าง (ประมาณ 3 ครั้ง) ทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส
8. เติม 3 N HCl 25 มล. ปล่อยให้ไหลออกจนหมด
9. ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำทีละ 20 มล. จนหมดฤทธิ์กรด ปล่อยน้ำไหลจนหมด

การสกัดสารมิโมซินจากตัวอย่างพืช

1. กรณีที่เป็นตัวอย่างพืชสดชั่งตัวอย่าง 1-5 กรัม แช่ใน 0.2 N HCl ปริมาณสารที่ใช้ คือ 50-100 มล./ 2 กรัมสด บดตัวอย่างกับ 0.2 N HCl ในโกร่ง (glass pistle or mortar) หลังจากนั้นปั่นแยก หรือกรองเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำ ล้างตะกอนจนเมื่อทดสอบด้วยสาร $FeCl_3$ ไม่มีสีม่วงเกิดขึ้น ปรับปริมาตรส่วนที่กรองได้ในปริมาณที่แน่นอน (แล้วแต่สารที่ใช้)
2. ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นพืชแห้ง ให้บดผ่านตะแกรงขนาด 1 มม. ถ้าเป็นส่วนของใบพืช ใช้ตัวอย่าง 0.5 กรัม แต่ถ้าเป็นส่วนของ เมล็ด ใช้ 0.2-0.5 กรัม แช่ใน 0.1 N HCl บดในโกร่งและทิ้งข้ามคืน ถ่ายสารละลาย+ตัวอย่างลงใน หลอดปั่นแยก ล้างส่วนที่ติดโกร่งด้วย 0.1

N HCl 5 มล. แล้วนำไปปั่นแยก กรอง ล้างตะกอนด้วย 0.1 N HCl 5 มล. แล้วนำไปปั่นแยกอีกครั้ง ถ่ายตะกอนจากหลอดลงในขวดรูปชมพู่ (cornical flask) ขนาด 50 มล. เติม 0.1 N HCl 20-30 มล. ปิดจุก และนำไปใส่เครื่องเขย่า นาน 5 ชม. นำไปปั่นแยกอีกครั้ง ล้างตะกอนด้วย 2x5 ml 0.1 N HCl นำส่วนที่กรองได้ทั้งหมดรวมกันปรับปริมาตรให้ได้ 200 มล. ด้วยน้ำกลั่น ซึ่งจะทำให้สารละลาย HCl เจือจางลงประมาณ 0.05 N

- **การแยกมิโมซินให้บริสุทธิ์** มี 2 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 แยกสารที่กรองได้ด้วย Ion-exchange resin chromatrography (Dowex 50-X4, H^+ form)

1. เทสารตัวอย่างสกัด 40 มล. ผ่านคอลัมน์ ปล่อยให้ไหลออกจนหมด
2. ล้างด้วยน้ำกลั่น 18 มล.
3. ใส่ ethanol 80% 18 มล. เพื่อล้างส่วนที่เป็น polyphenolic substance
4. ล้าง ethanol ด้วยน้ำกลั่น 15 มล. เพื่อไล่ส่วนของ ethanol และน้ำจากคอลัมน์ให้เร็วขึ้น อาจช่วยด้วยการใช้อากาศเป่าจากด้านบนคอลัมน์ โดยใช้แรงดันประมาณ 3 นิ้วของปรอท (3 inch of Hg)
5. ล้างส่วนของสารอินทรีย์ที่อยู่ในรูปของ cation ด้วย 2 N NH_4OH 15 มล. จะทำการเก็บสารละลายเมื่อส่วนของ NH_4OH (ซึ่งจะเห็นเป็นคราบสีน้ำตาลเข้ม) ไหลมาจนถึงระยะห่างจากส่วนก้นคอลัมน์ประมาณ 1 ซม. หลอดที่ใช้เก็บเป็นหลอดที่ทราบปริมาตรแน่นอนแล้ว ทำการเก็บสารละลายส่วนนี้จนสารละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์เป็นสีใส
6. นำส่วนของสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ไประเหยภายใต้อุณหภูมิ 40°C ที่มีการลดความดัน ระเหยจนสารมีปริมาตรลดลงเหลือ 1 มล. ล้างส่วนที่ติดข้างหลอดด้วย 1 หยดของ 2 N NH_4OH สารละลายที่เหลือต้องทราบปริมาตรที่แน่ชัดแล้ว ถ่ายลงใน หลอดตัวอย่างขนาดเล็กที่มีฝาปิด เก็บที่อุณหภูมิ 5 °C เพื่อรอวิเคราะห์

ขั้นตอนที่ 2 แยกสารละลายที่ได้ผ่านคอลัมน์ในขั้นตอนที่ 1 อีกครั้งด้วยกระดาษโครมาโตกราฟี

1. ดูดสารละลายตัวอย่าง และสารละลายมิโมซินมาตรฐาน มา 10 ไมโครลิตร ด้วย Micro pipette

2. จุดสารทั้ง 2 ลงบนกระดาษโครมาโตรกราฟี ห่างจากขอบกระดาษส่วนล่าง 1 นิ้ว ให้จุดของตัวอย่าง กับ มิโมซินห่างกันประมาณ 2 นิ้ว การจุดมิโมซินควบคู่กันไปเพื่อเทียบระยะห่างของสีมิโมซินที่แน่ชัด
3. จุ่มกระดาษลงในบีกเกอร์ที่มีสารละลายผสมอยู่ โดยวางกระดาษในแนวลาดเอียง ใช้กระดาษ 1 แผ่น ต่อสารละลายผสม 1 ที่ ทิ้งนาน ประมาณ 15 ซม. นำกระดาษออกทำให้แห้งในตู้ดูดควันที่อุณหภูมิห้อง
4. พ่นกระดาษเบา ๆ ด้วย 0.05 %$FeCl_3$ เพื่อดูสีที่เกิดขึ้น เมื่อกระดาษแห้งตัดส่วนของสีที่เหมือนมิโมซินมาตรฐาน ขนาดชิ้น 3/8 นิ้ว และส่วนที่ไม่มีตัวอย่างเพื่อทำเป็น blank ให้มีขนาดเท่ากัน
5. เติม 0.05 %$FeCl_3$ ลงในขวดที่มีแผ่นกระดาษที่ตัดไว้ (4) ให้ท่วมกระดาษ เก็บในที่มืด 15 นาที โดยเขย่า 2 ครั้ง ในช่วงเวลานี้
6. นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 nm โดยใช้ blank เป็นตัวปรับศูนย์ ดึงกระดาษออก ก่อนวัดประมาณ 30 วินาที

- การทำ standard curve **ของสารมิโมซิน**

1. ดูดสารละลายมิโมซินมาตรฐาน ด้วยปิเปต แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นของมิโมซิน เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 และ 0.8 มก.
2. นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นมาหยดลงบนกระดาษ ทำเช่นเดียวกับการแยกตัวอย่าง
3. นำสารละลายมิโมซินมาตรฐานที่แยกได้มาอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 nm
4. นำค่าการดูดกลืนแสงที่แต่ละความเข้มข้นของสารมิโมซินมาสร้างสมการรีเกรสชั่นเพื่อทำนายค่ามิโมซินของตัวอย่างที่แต่ละค่าการดูดกลืนแสง

$$Y = a + bX$$

โดย Y คือ ความเข้มข้นของมิโมซิน (mg)

a, b คือ ค่าคงที่

X คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ 535 นาโนเมตร

▫ วิธีการคำนวณปริมาณสารมิโมซิน

เนื่องจากในการทดลองนี้ใช้สารละลายในแต่ละขั้นตอน แตกต่างกัน ดังนี้

1. ใช้ตัวอย่าง 3 กรัม เติมสารละลายสกัด และกรองจนได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร
2. นำสารละลายที่กรองได้ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร มาผ่านคอลัมน์ เก็บสารละลายตัวอย่างหลังผ่านคอลัมน์แล้วทำให้เหลือ 1 มิลลิลิตร
3. ดูดสารละลาย ในข้อ 2. มา 10 ไมโครลิตร (หรือ 0.01 มิลลิลิตร) หยดบนกระดาษโครมาโตกราฟีเพื่อแยกสารละลายมิโมซินบริสุทธิ์

ดังนั้นการคำนวณจึงจำเป็นต้องนำปริมาตรแต่ละขั้นตอนมาคำนวณร่วมด้วย ดังนี้

สารละลายสุดท้าย 0.01 มล. มีปริมาณสารมิโมซิน Y มก. (ได้จากสมการรีเกรสชั่น)

" 1 มล. มีมิโมซิน $\frac{Y \times 1}{.01}$ มก. ซึ่งมาจากสารละลาย 40 มล.

สารละลายที่กรองได้ 40 มล. มีมิโมซิน $Y / 0.1$ มก.

" 200 มล. มีมิโมซิน $\frac{Y \times 200}{.01 \times 40}$ มก.

หรือ ตัวอย่าง 3 ก. มีมิโมซิน $\frac{Y \times 5}{.01 \times 1000}$ ก.

" 1 ก. มีมิโมซิน $\frac{Y \times 5}{10 \times 3}$ ก.

" 100 ก มีมิโมซิน $\frac{Y \times 5 \times 100}{30}$ %

" 100 ก.วัตถุแห้ง มีมิโมซิน $\frac{Y \times 50}{3} \times \frac{100}{DM}$ %DM

ภาคผนวก 2 วิธีวิเคราะห์เบต้าแคโรทีนในซีรั่ม

เนื่องจากเบต้าแคโรทีนมีความไวต่อแสง ดังนั้นอุปกรณ์ที่เก็บตัวอย่างควรป้องกันการถูกแสงด้วยการหุ้มด้วยกระดาษอะลูมิเนียมฟอยล์ หรือกระดาษสีดำและควรทำการเก็บ และเตรียมตัวอย่างอย่างรวดเร็ว โดยมีอุปกรณ์และวิธีการ ดังนี้

อุปกรณ์

- **สำหรับเก็บตัวอย่างเลือด**

1. หลอดฉีดยา ขนาด 20 มิลลิลิตร
2. เข็มฉีดยา เบอร์ 18 ยาว 1 นิ้ว
3. หลอดทดลองสำหรับใส่น้ำเลือด 15 มิลลิลิตร หุ้มด้วยกระดาษอะลูมิเนียมฟอยด์
4. หลอดพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่างซีรั่ม ขนาด 5 มิลลิลิตร หุ้มด้วยกระดาษอะลูมิเนียมฟอยด์
5. สำลี และเอธิลแอลกอฮอล์
6. ฉลากสำหรับติดรายละเอียดของโค
7. เครื่องเหวี่ยง (centrifuge)

- **สำหรับวิเคราะห์เบต้าแคโรทีน**

12. สารมาตรฐานเบต้าแคโรทีน
13. เอทธานอล 95% (AR)
14. Petroleum ether (AR) B.P.40-60^{o}C
15. Chloroform (AR)
16. หลอดทดลองฝาเกลียว (screw-cap test tube) ขนาด 5 มิลลิลิตร
17. ไมโครปิเปต ขนาด 500 ไมโครลิตร
18. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer)
19. Spectrophotometer รุ่น UV - 1601 ยี่ห้อ Shimadzu และ glass cuvette

วิธีการ

- **เก็บ และเตรียมตัวอย่างเลือด**

1. เจาะเลือดโคบริเวณเส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) ตัวละ 20 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองความจุ 15 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด ๆ ละ 10 มิลลิลิตร

2. นำหลอดตัวอย่างเลือดไปปั่นด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบ/นาที ประมาณ 30 นาที เพื่อให้เม็ดเลือดแดงตกตะกอน
3. แยกเก็บเฉพาะส่วนของน้ำซีรั่ม หลอดละ 5 มิลลิลิตร โดยแต่ละหลอดหุ้มภายนอกด้วยกระดาษอะลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันการถูกแสง จากนั้นนำหลอดซีรั่มทั้งหมดบรรจุลงในถุงสีดำ นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิต่ำกว่า - 10°C เพื่อรอวิเคราะห์ต่อไป

- **วิธีเตรียมสารละลายและวิเคราะห์**

1. ดูดตัวอย่างซีรั่มที่นำมาวางไว้ให้ละลายและมีอุณหภูมิเท่าห้องปกติ จำนวน 2 มล. ลงในหลอดที่หุ้มด้วยกระดาษฟอล์ยเพื่อป้องกันแสง
2. เติมเอทธานอล 2 มิลลิลิตร เพื่อตกตะกอนส่วนของโปรตีน ปิดฝาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vertex mixer ประมาณ 2-3 นาที
3. เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงนาน 10 นาที เพื่อแยกส่วนของเบต้าแคโรทีนออกจากสารละลายอื่น ๆ
4. ดูดเฉพาะส่วนบนที่เป็นสีเหลืองประมาณ 2 มิลลิลิตร ใส่ใน cuvette เพื่อนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตรมิเตอร์ โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นตัวปรับศูนย์
5. นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ได้ไปเทียบกับค่าตัวอย่างมาตรฐาน

- **การทำ standard curve ของสารเบต้าแคโรทีน**

1. นำตัวอย่างเบต้าแคโรทีน 20 มิลลิกรัม ละลายในคลอโรฟอร์ม 2-3 มิลลิลิตร ปรับด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร
2. ดูดน้ำยามาตรฐาน ข้อ 1. มา 1 มิลลิลิตร ปรับด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร
6. ดูดสารในข้อ 2. มา 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.25, 1.50, 1.75, 2.0 มิลลิลิตร ปรับด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีเบต้าแคโรทีน เท่ากับ 0.5, 1.0, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4 ไมโครกรัม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตรมิเตอร์ โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นตัวปรับศูนย์
3. นำค่าที่ได้มาสร้างสมการรีเกรสชั่นเพื่อใช้ทำนายค่าของตัวอย่าง นำค่าการดูดกลืนแสงที่แต่ละความเข้มข้นของสารเบต้าแคโรทีนมาสร้างสมการรีเกรสชั่น เพื่อทำนายค่าเบต้าแคโรทีนของตัวอย่างที่แต่ละค่าการดูดกลืนแสง

$$Y = a + bX$$

โดย Y คือ ความเข้มข้นเบต้าแคโรทีน (μg)

a, b คือ ค่าคงที่

X คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ 440 นาโนเมตร

□ **วิธีการคำนวณปริมาณสารเบต้าแคโรทีน**

ซีรั่ม 2 มล. มีปริมาณสารเบต้าแคโรทีน Y มคก. (ได้จากสมการรีเกรสชั่น)

" 5 มล. มีเบต้าแคโรทีน $\frac{Y \times 5}{2}$ มคก. ซึ่งมาจากเลือด 10 มล.

เลือด 100 มล. มีเบต้าแคโรทีน $\frac{Y \times 5 \times 100}{2 \times 10} = 25 \times Y$ มคก./100มล

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ภาคผนวก 3 ตัวอย่างอาหารผสมครบส่วนที่คำนวณโดยใช้ โปรแกรม Xration (สมคิด, 2542)

สูตรอาหารข้นที่ใช้ตลอดการทดลอง

Cow data

Number of cow	1.00	Milk yield(kg	23.00
Weight of cow	486.00	Milk fat(%)	3.80
Weight change(kg)	0.10	Streaming up	0.00
Age of cow(year)	7.00	Lactation no.	4.00

DAIRY CATTLE.RATION.Program.developed by Somkid Promma

Income over feed 164.11 Baht/day Prepare by Angthong
Income over feed 7.14 aht/kg milk

	DMI (kg)	UIP (kg)	TDN (kg)	CP (Kg)	Calcium (gm)	Phorphoru (gm)	Vit A (IU)
Required/day	15.50	0.92	11.10	2.58	91.32	58.07	36936.0
Provided/day	15.82	0.96	11.10	2.58	110.57	90.98	107963.4

FEED	Price (Baht/kg)	Amount (kg)	cost (Baht)
Grass silage	2.00	21.52	43.0
Ruzi grass hay	2.50	1.50	3.8
Rice bran	4.00	1.20	4.8
Whole cotton see	5.00	2.00	10.0
Calcium carbonat	1.00	0.06	0.1
Soybean meal	10.00	2.93	29.3
Ground corn	5.00	3.07	15.3
Minerals mix	15.00	0.36	5.4
Vitamins ADE	500.00	0.00	0.2
			111.9

CONCENTRATE

	Amount(%)	Kg/day
Ground corn	31.87	9.62
Soybean meal	30.49	
Minerals mix	3.74	
Vit(gm)	3.63	
Rice bran	12.48	
WCS	20.79	
$CaCO_3$	0.62	
Concentrate price (Baht/kg)		6.77
Fiber/DM(%)		26.77
DMI(%BW)		3.25
C:P ratio	1.22	1.00
R/C ratio	45.18	54.82

:NSC(%) = 26.48

Nutrients	content
TDN(%)=	72.62
CP(%)=	20.55
Ca(%)=	0.96
P(%)=	0.83
FIBER(%)=	14.59
VIT A (IU/kg)	3631.96
Cation-Anion Balance	25.96

ตัวอย่างสูตรอาหารที่ไม่ใช้ใบกระถินหมัก (กลุ่มควบคุม)

Cow data

Number of cow	1.00	Milk yield(kg)	20.00
Weight of cow	422.00	Milk fat(%)	3.80
Weight change(kg)	0.10	Streaming up	0.00
Age of cow(year)	3.00	Lactation no.	1.00

Prepare for Control No.85/41

* DAIRY CATTLE.RATION.Program.developed by Somkid Promma

Income over feed 135.12 Baht/day
Income over feed 6.76 Baht/kg milk

	Dry matte (kg)	UIP (kg (kg)	TDN (kg)	Protein (Kg)	Calcium (gm)	Phorphoru (gm)	Vit A (IU)
Required/day	14.80	0.81	10.45	2.31	82.81	52.90	32072.0
Provided/day	14.80	0.86	10.45	2.41	125.77	79.63	156974.4

FEED	Price (Baht/kg)	Amount (kg)	cost (Baht)
Grass silage	2.00	18.63	37.26
Ruzi grass hay	2.50	1.86	4.66
Cow concentrates	6.77	9.30	62.96
			104.88

CONCENTRATE		
	Amount(%)	Kg/day
		9.30
Fiber/DM(%)		22.20
DMI(%BW)		3.51
C:P ratio	1.58	1.00
R/C ratio	44.07	55.93
:NSC(%) =	29.59	
Cation-Anion Balance		
25.60		

ตัวอย่างสูตรอาหารที่ใช้ใบกระถิน 25%ในสูตรอาหารข้น

Cow data

Number of cow	1.00	Milk yield(kg)	18.60
Weight of cow	439.00	Milk fat(%)	3.80
Weight change(kg)	0.10	Streaming up	0.00
Age of cow(year)	5.00	Lactation no.	2.00

Prepare for No.34/39

* DAIRY CATTLE.RATION.Program.developed by Somkid Promma

Income over feed 131.91 Baht/day
Income over feed 7.09 Baht/kg milk

	Dry matte (kg)	UIP (kg (kg)	TDN (kg)	Protein (Kg)	Calcium (gm)	Phorphoru (gm)	Vit A (IU)
Required/day	12.90	0.79	9.80	2.21	77.49	49.53	33364.0
Provided/day	13.97	0.83	9.80	2.34	97.85	61.78	135234.8

FEED	Price (Baht/kg)	Amount (kg)	cost (Baht)
Grass silage	2.00	13.17	26.34
Ruzi grass hay	2.50	1.32	3.29
LGS	1.60	6.86	10.98
Cow concentrates	6.77	6.60	44.68
Ground corn	5.00	1.20	6.00
			91.29

CONCENTRATE

	Amount(%)	Kg/day
		7.80
Fiber/DM(%)		19.97
DMI(%BW)		3.18
C:P ratio	1.58	1.00
R/C ratio	50.31	49.69
:NSC(%) =	33.30	

Cation-Anion Balance
25.81

ตัวอย่างสูตรอาหารที่ใช้ใบกระถิน 50%ในสูตรอาหารข้น

Cow data

Number of cow	1.00	Milk yield(kg)	19.30
Weight of cow	466.00	Milk fat(%)	3.80
Weight change(kg)	0.10	Streaming up	0.00
Age of cow(year)	7.00	Lactation no.	4.00

Prepare for No.44/37

* DAIRY CATTLE.RATION.Program.developed by Somkid Promma

Income over feed 145.49 Baht/day
Income over feed 7.54 Baht/kg milk

	Dry matte (kg)	UIP (kg (kg)	TDN (kg)	Protein (Kg)	Calcium (gm)	Phorphorus (gm)	Vit A (IU)
Required/day	12.85	0.82	9.84	2.28	78.99	50.40	35416.0
Provided/day	14.45	0.87	9.84	2.47	75.51	46.81	132055.6

FEED	Price (Baht/kg)	Amount (kg)	cost (Baht)
Grass silage	2.00	11.03	22.06
Ruzi grass hay	2.50	1.10	2.76
LGS	1.60	14.91	23.86
Cow concentrates	6.77	4.20	28.43
Ground corn	5.00	1.80	9.00
			86.11

CONCENTRATE		
	Amount(%)	Kg/day
		6.00
Fiber/DM(%)		19.27
DMI(%BW)		3.10
C:P ratio	1.61	1.00
R/C ratio	63.05	36.95
:NSC(%) =	34.30	

Cation-Anion Balance
26.33

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางผนวก 1 ANOVA: ลักษณะ และคะแนนที่ประเมินทางกายภาพใบกระถินที่หมักระยะเวลาต่างกัน ในการทดลองที่ 1

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Odor	Between Groups	8.150	3	2.717	5.811	.007
	Within Groups	7.480	16	.468		
	Total	15.630	19			
Color	Between Groups	1.562	3	.521	1.548	.241
	Within Groups	5.380	16	.336		
	Total	6.942	19			
Texture	Between Groups	.310	3	.103	8.794	.001
	Within Groups	.188	16	.012		
	Total	.498	19			
Score	Between Groups	20.406	3	6.802	8.028	.002
	Within Groups	13.556	16	.847		
	Total	33.962	19			

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตารางผนวก 2 ANOVA: ปริมาณกรดอินทรีย์ (% ของวัตถุแห้ง) ของใบกระถินที่หมักระยะเวลาต่างกัน ในการทดลองที่ 1

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Acetic	Between Groups	3.132	3	1.044	2.030	.150
	Within Groups	8.228	16	.514		
	Total	11.360	19			
Lactic	Between Groups	20.782	3	6.927	6.080	.006
	Within Groups	18.230	16	1.139		
	Total	39.012	19			
Score	Between Groups	329.650	3	109.883	1.051	.397
	Within Groups	1673.425	16	104.589		
	Total	2003.075	19			

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตารางผนวก 3 ANOVA: องค์ประกอบทางเคมีของใบกระถินที่หมักระยะเวลาต่างกัน ในการทดลองที่ 1

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DM	Between Groups	5.022	4	1.255	2.109	.124
	Within Groups	10.121	17	.595		
	Total	15.143	21			
OM	Between Groups	.413	4	.103	1.188	.351
	Within Groups	1.476	17	.087		
	Total	1.888	21			
CP	Between Groups	4.253	4	1.063	5.384	.005
	Within Groups	3.357	17	.197		
	Total	7.611	21			
EE	Between Groups	.542	4	.136	1.273	.319
	Within Groups	1.809	17	.106		
	Total	2.351	21			
Ash	Between Groups	.413	4	.103	1.188	.351
	Within Groups	1.476	17	.087		
	Total	1.888	21			
NFC	Between Groups	31.096	4	7.774	1.568	.228
	Within Groups	84.283	17	4.958		
	Total	115.379	21			

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตารางผนวก 4 ANOVA: ปริมาณเยื่อใยต่าง ๆ ของใบกระถินที่หมักระยะเวลาต่างกัน ในการทดลองที่ 1

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
NDF	Between Groups	27.677	4	6.919	1.788	.178
	Within Groups	65.779	17	3.869		
	Total	93.456	21			
ADF	Between Groups	9.706	4	2.426	3.538	.028
	Within Groups	11.659	17	.686		
	Total	21.365	21			
ADL	Between Groups	5.377	4	1.344	6.429	.002
	Within Groups	3.554	17	.209		
	Total	8.931	21			
Hemicellulose	Between Groups	54.691	4	13.673	3.025	.047
	Within Groups	76.852	17	4.521		
	Total	131.543	21			
Cellulose	Between Groups	.901	4	.225	.411	.798
	Within Groups	9.315	17	.548		
	Total	10.216	21			

ตารางผนวก 5 ANOVA: ปริมาณเบต้าแคโรทีน และมิโมซิน ของใบกระถินที่หมักในระยะเวลาต่างกัน ในการทดลองที่ 1

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Carotene	Between Groups	1728.72	3	576.239	3.180	.053
	Within Groups	2899.72	16	181.232		
	Total	4628.43	19			
Mimosine	Between Groups	.006	3	.002	1.641	.220
	Within Groups	.021	16	.001		
	Total	.027	19			

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตารางผนวก 6 ค่าการย่อยได้ของวัตถุแห้ง ในการทดลองที่ 2

Cows	Feed offer			Feed ort			Total DM	Feces			Digestible	Digestibility
No.	Fresh	% DM	DM (g)	Fresh	% DM	DM (g)	Consumed (g)	Fresh	% DM	DM (g)	DM (g)	%
1	20000	35.22	7044	0	0	0	7044	11440	26.63	3046	3998	56075
2	20000	35.22	7044	0	0	0	7044	11560	26.51	3065	3979	56049
3	20000	35.22	7044	0	0	0	7044	12190	24.88	3033	4011	56094
4	20000	35.22	7044	2500	32.02	801	6244	11710	23.59	2762	3481	55076
Average	20000	35.22	7044	625	8.01	200	6844	111725	25.40	2977	3867	56.49

ตารางผนวก 7 ค่าการย่อยได้ของอินทรียวัตถุ ในการทดลองที่ 2

Cows	Feed offer			Feed ort			Total OM	Feces			Digestible	Digestibility
No.	DM	% OM	OM (g)	DM	% OM	OM (g)	Consumed (g)	DM	% DM	DM (g)	OM (g)	%
1	7044	91.70	6459	0	0	0	6459	3046	84.48	2574	3886	60.15
2	7044	91.70	6459	0	0	0	6459	3065	85.41	2618	3842	59.48
3	7044	91.70	6459	0	0	0	6459	3033	84.84	2573	3886	60.17
4	7044	91.70	6459	801	89.11	713	5746	2762	83.99	2320	3426	59.62
Average	7044	91.70	6459	200	22.28	178	6281	2977	84.68	2521	3760	59.85

ตารางผนวก 8 ค่าการย่อยได้ของโปรตีน ในการทดลองที่ 2

Cows	Feed offer			Feed ort			Total CP	Feces			Digestible	Digestibility
No.	DM	% CP	CP (g)	DM	% CP	CP (g)	Consumed (g)	DM	% CP	CP (g)	CP (g)	%
1	7044	22.23	1566	0	0	0	1566	3046	23.00	701	865	55.25
2	7044	22.23	1566	0	0	0	1566	3065	24.52	751	814	52.01
3	7044	22.23	1566	0	0	0	1566	3033	25.13	762	804	51.33
4	7044	22.23	1566	801	17.42	139	1426	2762	25.17	695	731	51.26
Average	7044	22.23	1566	200	4.36	35	1531	2977	24.46	727	804	52.46

ตารางผนวก 9 ค่าการย่อยได้ของไขมัน ในการทดลองที่ 2

Cows	Feed offer			Feed ort			Total EE	Feces			Digestible	Digestibility
No.	DM	% EE	EE (g)	DM	% EE	EE (g)	Consumed (g)	DM	% EE	EE (g)	EE (g)	%
1	7044	7.71	543	0	0	0	543	3046	5.50	168	376	69.15
2	7044	7.71	543	0	0	0	543	3065	5.26	161	382	70.32
3	7044	7.71	543	0	0	0	543	3033	5.19	157	386	71.02
4	7044	7.71	543	801	6.51	52	491	2762	5.29	146	345	70.24
Average	7044	7.71	543	200	1.63	13	530	2977	5.31	158	372	70.18

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตารางผนวก 10 ค่าการย่อยได้ของคาร์โบไฮเดรทที่ไม่ใช่เยื่อใย ในการทดลองที่ 2

Cows	Feed offer			Feed ort			Total NFC	Feces			Digestible	Digestibility
No.	DM	% NFC	NFC (g)	DM	% NFC	NFC (g)	Consumed (g)	DM	% NFC	NFC (g)	NFC (g)	%
1	7044	30.84	2172	0	0	0	2172	3046	0.60	18	2154	99.16
2	7044	30.84	2172	0	0	0	2172	3065	0.73	22	2150	98.97
3	7044	30.84	2172	0	0	0	2172	3033	1.88	57	2115	97.38
4	7044	30.84	2172	801	22.91	183	1989	2762	0.90	25	1964	98.75
Average	7044	30.84	2172	200	5.73	46	2127	2977	1.03	31	2096	98.56

ตารางผนวก 11 ค่าการย่อยได้ของเยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายดีเทอร์เจนท์ ในการทดลองที่ 2

Cows	Feed offer			Feed ort			Total NDF	Feces			Digestible	Digestibility
No.	DM	% NDF	NDF (g)	DM	% NDF	NDF (g)	Consumed (g)	DM	% NDF	NDF (g)	NDF (g)	%
1	7044	31.02	2185	0	0	0	2185	3046	53.87	1641	544	24.89
2	7044	31.02	2185	0	0	0	2185	3065	52.75	1617	568	26.02
3	7044	31.02	2185	0	0	0	2185	3033	52.09	1580	605	27.70
4	7044	31.02	2185	801	42.27	338	1847	2762	50.12	1385	496	25.03
Average	7044	31.02	2185	200	10.57	85	2100	2977	52.21	1556	545	25.91

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตารางผนวก 12 ค่าการย่อยได้ของยอดโภชนะรวม ในการทดลองที่ 2

Cows	% Nutrient in feed				% Digestibility				Digestible nutrient/100gDM				TDN
No.	CP	EE	NFC	NDF	CP	EE	NFC	NDF	CP	EE	NFC	NDF	%
1	22.23	7.71	30.84	31.02	55.25	69.15	99.16	24.89	12.28	5.33	30.58	7.72	62.58
2	22.23	7.71	30.84	31.02	52.01	70.32	98.97	26.02	11.56	5.42	30.52	8.07	62.35
3	22.23	7.71	30.84	31.02	51.33	71.02	97.38	27.70	11.41	5.48	30.03	8.59	62.35
4	22.23	7.71	30.84	31.02	51.26	7.24	98.75	25.03	11.39	5.42	30.45	7.76	61.80
Average	22.23	7.71	30.84	31.02	52.46	70.18	98.56	25.91	11.66	5.41	30.40	8.04	62.27

ตารางผนวก 13 ค่าการย่อยได้ของพลังงาน ในการทดลองที่ 2

Cows	Feed offer			Feed ort			Total GE	Feces			Digestible	Digestibility
No.	DM	GE	GE	DM	GE	GE	Consumed	DM	GE	GE	DE	DE
	(g)	Kcal/gDM	Kcal	(g)	Kcal/gDM	Kcal	Kcal	(g)	Kcal/gDM	Kcal	Kcal/d	Kcal/gDM
1	7044	5.06	35643	0	0	0	35643	3046	4.62	14075	21568	3.06
2	7044	5.06	35643	0	0	0	35643	3065	5.11	15660	19983	2.84
3	7044	5.06	35643	0	0	0	35643	3033	4.91	14891	20751	2.95
4	7044	5.06	35643	801	4.90	39	35603	2762	5.03	13895	21709	3.08
Average	7044	5.06	35643	200	1.23	10	35633	2977	4.92	14630	21003	2.98

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตารางผนวก 14 ค่าไนโตรเจนของโคที่กินใบกระถินหมักร่วมกับ 1%$NaHCO_3$ ของน้ำหนักสด เป็นอาหารเดี่ยว ในการทดลองที่ 2

Cow	Feed offer			Feed ort			Feces			Urine			Retained N
No.	DM (g)	N (%)	N (g)	DM (g)	N (%)	N (g)	DM (g)	N (%)	N (g)	Fresh (g)	N (%)	N (g)	(g/day)
1	7044	3.56	250.77	0	0	0	3046	3.68	112.09	10120	0.76	76.91	61.77
2	7044	3.56	250.77	0	0	0	3065	3.92	120.15	11266	0.55	61.96	68.66
3	7044	3.56	250.77	0	0	0	3033	4.02	121.93	10194	0.66	67.28	61.56
4	7044	3.56	250.77	801	2.79	22.35	2762	4.03	111.31	9970	0.67	66.80	50.31
Average	***7044***	***3.56***	***250.77***	***200***	0.70	5.59	***2977***	***3.91***	***116.37***	***10387.5***	***0.66***	***68.24***	***60.58***

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตารางผนวก 15 ANOVA: ปริมาณน้ำนม (กิโลกรัม) ก่อนการทดลอง ของโคทั้ง 3 กลุ่ม ในการทดลองที่ 3

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9.614	2	4.807	.280	.756
Within Groups	3559.891	207	17.198		
Total	3569.505	209			

ตารางผนวก 16 ANOVA: ปริมาณน้ำนม (กิโลกรัม) ของโคทั้ง 3 กลุ่ม เมื่อปรับค่าด้วยจำนวนวันที่ให้นม (DIM) น้ำหนักตัว (BW) อายุ (age) และลำดับที่ให้นม (Lactation No.) ในการทดลองที่ 3

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	81.568[a]	6	13.595	.447	.829
Intercept	110.234	1	110.234	3.627	.093
Treatments	6.336	2	3.168	.104	.902
DIM	4.142	1	4.142	.136	.722
BW	19.651	1	19.651	.647	.445
Age	.164	1	.164	.005	.943
Lactation No.	.236	1	.236	.008	.932
Error	243.156	8	30.395		
Total	4700.620	15			
Corrected Total	324.724	14			

a. R Squared = .251 (Adjusted R Squared = -.310)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางผนวก 17 ANOVA: ปริมาณน้ำนมที่ปรับให้มีไขมัน 4% (4%FCM, kg) ของโคทั้ง 3 กลุ่ม เมื่อปรับค่าด้วยจำนวนวันที่ให้นม น้ำหนักตัว อายุ และลำดับที่ให้นม ในการทดลองที่ 3

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	127.993[a]	6	21.332	1.017	.477
Intercept	150.974	1	150.974	7.196	.028
Treatments	24.407	2	12.204	.582	.581
DIM	.154	1	.154	.007	.934
BW	54.971	1	54.971	2.620	.144
Age	7.344	1	7.344	.350	.570
Lactation No.	4.239	1	4.239	.202	.665
Error	167.852	8	20.981		
Total	3730.809	15			
Corrected Total	295.844	14			

a. R Squared = .433 (Adjusted R Squared = .007)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางผนวก 18 ANOVA: ปริมาณไขมันนม (กิโลกรัม) ของโคทั้ง 3 กลุ่ม เมื่อปรับค่าด้วยจำนวนวันที่ให้นม น้ำหนักตัว อายุ และลำดับที่ให้นม ในการทดลองที่ 3

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.289[a]	6	.048	1.647	.251
Intercept	.287	1	.287	9.808	.014
Treatments	.066	2	.033	1.130	.370
DIM	.001	1	.001	.032	.862
BW	.141	1	.141	4.803	.060
Age	.029	1	.029	.977	.352
Lactation No.	.023	1	.023	.771	.405
Error	.234	8	.029		
Total	5.116	15			
Corrected Total	.523	14			

a. R Squared = .553 (Adjusted R Squared = .217)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางผนวก 19 ANOVA: ปริมาณโปรตีนในน้ำนม (กิโลกรัม) ของโคทั้ง 3 กลุ่มเมื่อปรับค่าด้วย จำนวนวันที่ให้นม น้ำหนักตัว อายุ และลำดับที่ให้นม ในการทดลองที่ 3

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.049[a]	6	.008	.281	.930
Intercept	.054	1	.054	1.864	.209
Treatments	.004	2	.002	.064	.939
DIM	.003	1	.003	.095	.766
BW	.017	1	.017	.589	.465
Age	.000	1	.000	.000	.985
Lactation No.	.000	1	.000	.012	.915
Error	.234	8	.029		
Total	4.246	15			
Corrected Total	.283	14			

a. R Squared = .174 (Adjusted R Squared = -.446)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางผนวก 20 ANOVA: ปริมาณน้ำตาลแลกโตสในน้ำนม (กิโลกรัม) ของโคทั้ง 3 กลุ่มเมื่อปรับค่าด้วย จำนวนวันที่ให้นม น้ำหนักตัว อายุ และลำดับที่ให้นม ในการทดลองที่ 3

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.199[a]	6	.033	.382	.872
Intercept	.204	1	.204	2.347	.164
Treatments	.009	2	.004	.051	.950
DIM	.005	1	.005	.056	.819
BW	.033	1	.033	.382	.554
Age	.000	1	.000	.000	.989
Lactation No.	.003	1	.003	.034	.858
Error	.695	8	.087		
Total	10.351	15			
Corrected Total	.894	14			

a. R Squared = .223 (Adjusted R Squared = -.361)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางผนวก 21 ANOVA: ปริมาณของแข็งทั้งหมดในน้ำนม (กิโลกรัม) ของโคทั้ง 3 กลุ่มเมื่อปรับค่าด้วย จำนวนวันที่ให้นม น้ำหนักตัว อายุ และลำดับที่ให้นม ในการทดลองที่ 3

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.431[a]	6	.239	.556	.755
Intercept	1.690	1	1.690	3.938	.082
Treatments	.162	2	.081	.189	.831
DIM	.000	1	.000	.000	.990
BW	.526	1	.526	1.225	.301
Age	.026	1	.026	.061	.812
Lactation No.	.005	1	.005	.012	.917
Error	3.433	8	.429		
Total	63.750	15			
Corrected Total	4.864	14			

a. R Squared = .294 (Adjusted R Squared = -.235)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตารางผนวก 22 ANOVA: ปริมาณของแข็งที่ไม่รวมไขมันในน้ำนม (กิโลกรัม) ของโคทั้ง 3 กลุ่ม เมื่อปรับค่าด้วย จำนวนวันที่ให้นม น้ำหนักตัว อายุ และลำดับที่ให้นม ในการทดลองที่ 3

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.512[a]	6	.085	.335	.900
Intercept	.578	1	.578	2.271	.170
Treatments	.029	2	.015	.058	.944
DIM	.001	1	.001	.005	.944
BW	.117	1	.117	.460	.517
Age	.000	1	.000	.000	.990
Lactation No.	.006	1	.006	.025	.878
Error	2.035	8	.254		
Total	33.163	15			
Corrected Total	2.547	14			

a. R Squared = .201 (Adjusted R Squared = -.398)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาววรรณา อ่างทอง
วัน เดือน ปีเกิด	15 พฤศจิกายน 2511
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษา ปีการศึกษา 2523 โรงเรียนวัดประชานาถ สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น ปีการศึกษา 2526 โรงเรียนภัทรญาณวิทยา สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย ปีการศึกษา 2529 โรงเรียนพระปฐมวิทยาลัย สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี ปีการศึกษา 2533 วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ) สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง
ประวัติการทำงาน	รับราชการในตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ สังกัดกลุ่มงานวิเคราะห์อาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ ปี 2535 - ปัจจุบัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University