บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องมือ	โมเดล	บริษัท	ประเทศ
1. Beaker 50 ml.	No. 1000	Pyrex	USA.
2. Beaker 100 ml.	No. 1000	Pyrex	USA.
3. Beaker 500 ml.	No. 1005	Pyrex	USA.
4. Beaker 1000 ml.	-	Pyrex	USA.
5. Beaker 2000 ml.	-	Pyrex	USA.
6. Centrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus	Germany
7. Column	EC 150/4.6	Macherey-Nagel	Germany
8. Cylinder No. 25, 50 ml.	In 20 C	Witeg	Germany
9. Cylinder No. 100, 500 ml.	No. 3022	Pyrex	USA.
10. โถดูดความชื้น	GL 32	Glaswerk Wertheim	Germany
11. Fat extraction thimble	No. 2800258	Whatman	England
12. Freezer	FC-27	Sharp	Thailand
13. HPLC apparatus	MPD-2L	Shimadzu	Japan
14. Instron	5565	-	England
15. Minolta chroma meter	CR-300	-	Japan
16. Hot plate thermolyne	Cimarec 3	Northern chemical	Thailand
17. Conduct-meter	WTW	-	Germany
18. Oven DEV	Heraeus	-	Germany
19. pH meter	191	Knick	Germany
20. Round bottom 100 ml.	-	Glaswerk Wertheim	Germany
21. Round bottom 250 ml.	-	Duran	Germany
22. Soxhlet extraction	-	Gerhardt	Germany

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

23. Tube No. 13 x 100 mm.	-	Pyrex	USA.
24. Volumetric flask 50 ml.	-	SCHOTT	Germany
25. Volumetric flask 100 ml.	-	SCHOTT	Germany
26. Volumetric flask 1,000 ml.	-	SCHOTT	Germany
27. Vortex mixer	G-560 E	Scientific industries,Inc	USA.
28. Water bath	-	W. Krannich	Germany
29. Whatman No. 1, 40	-	Whatman	England
30. Thimble	-	Whatman	England

2. สารเคมี

ชื่อสารเคมี	เกรด	บริษัท
1. Anti-foaming agent	Analytical Reagent	Merck
2. Acetonitrile	Analytical Reagent	Lab-Scan
3. Calcium chloride	Analytical Reagent	Merck
4. Conc. Sulfuric acid	Analytical Reagent	Merck
5. Dichloromethane	Analytical Reagent	Lab-Scan
6. Sodium hydroxide	Analytical Reagent	Merck
7. Sodium chloride	Analytical Reagent	Merck
8. Sodium sulfate anhydrous	Analytical Reagent	Fisher
9. Ferric chloride	Analytical Reagent	Merck
10. Uranyl acetate	Analytical Reagent	-
11. Meta-Phosphoric acid	Analytical Reagent	Merck
12. 2-Methylpropan-2-ol (Butanol)	Analytical Reagent	Ajax-Finechem
13. Ethyl acetate	HPCL	Lab-Scan
14. n-Haptane	Analytical Reagent	Lab-Scan
15. Propa-2-ol	Analytical Reagent	Lab-Scan
16. Sodium methoxide	Analytical Reagent	Fluka
17. Sodium periodate	Analytical Reagent	-
18. Petroleum ether	Analytical Reagent	Lab-Scan

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

19. น้ำกลั่น	Analytical Reagent	-
20. Hydrochloric acid	Analytical Reagent	Merck
21. Thiobarbituric acid	Analytical Reagent	Fluka
22. Ammonium acetate	Analytical Reagent	Fisher

3. สัตว์ทดลอง

สุกรลูกผสม 3 สายพันธุ์ (Large White x Landrace x Duroc) จำนวน 50 ตัว (เพศเมีย 25 ตัว และเพศผู้ตอน 25 ตัว) น้ำหนักตัวเริ่มต้น 70 กิโลกรัม จากนั้นทำการสุ่มออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัวเลี้ยงในคอกขังเดี่ยว จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง นาน 33 วัน (น้ำหนักตัวประมาณ 100 กิโลกรัม) สุกรทุกตัวได้รับอาหารและน้ำอย่างเต็มที่ (*ad libitum*)

Table 5. Composition of experimental basal diet

Ingredients	**Percentage**
Corn	61.5
Rice bran oil	-
Rice bran	14
Soybean meal, 44%	20
Fish meal, 66%	1
L-Lysine	0.15
Lomolt (Dicalcium phosphate)	1.3
Limestone	1.5
Solt (NaCl)	0.39
Premix	0.25
Chemical composition	
ME, kcal/kg	3050
Moisture, %	10.08
Protein, %	15.68
Fat, %	5.78

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 5 แฟคทอเรียล ใน CRD (Completely Random Design: จรัญ, 2540) โดยแบ่งกลุ่ม การทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม ในแต่ละกลุ่มประกอบด้วย สุกรเพศผู้ตอน 5 ตัว เพศเมีย 5 ตัว เลี้ยงด้วยอาหารพื้นฐาน (NRC, 1998) โดยเสริมสารซัลบูทามอลในระดับต่างๆ กัน ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ไม่เสริมสารซัลบูทามอลในอาหาร (กลุ่มควบคุม)
กลุ่มที่ 2 เสริมสารซัลบูทามอลในระดับ 4 ppm
กลุ่มที่ 3 เสริมสารซัลบูทามอลในระดับ 8 ppm
กลุ่มที่ 4 เสริมสารซัลบูทามอลในระดับ 12 ppm
กลุ่มที่ 5 เสริมสารซัลบูทามอลในระดับ 16 ppm

5. การศึกษาด้านประสิทธิภาพการผลิต

บันทึกปริมาณอาหารที่กิน น้ำหนักตัวเริ่มต้น ชั่งน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นทุก 2 สัปดาห์ จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ข้อมูลที่ได้นำไปคำนวณหาปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ยต่อวัน น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน อัตราการแลกน้ำหนัก ประสิทธิภาพการใช้อาหาร นำสุกรเข้าฆ่าเพื่อศึกษาคุณภาพซาก และเนื้อ เมื่อน้ำหนักตัวประมาณ 100 กิโลกรัม โดยมีการงดใช้สารซัลบูทามอลก่อนฆ่า 5 วัน และเก็บตัวอย่างเนื้อ ตับ และไต มาวิเคราะห์หาสารตกค้าง

Figure 12. Pig pens (Individual) in this experiment

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อัตราการเจริญเติบโต (kg/d) = $\frac{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (kg)}}{\text{ระยะเวลาที่เลี้ยง (วัน)}}$

อัตราการแลกน้ำหนัก = $\frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กิน (kg)}}{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (kg)}}$

ประสิทธิภาพการใช้อาหาร = $\frac{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (kg) X 100}}{\text{น้ำหนักอาหารที่กิน (kg)}}$

6. การศึกษาด้านคุณภาพซาก

6.1. **น้ำหนักตัวมีชีวิต** : น้ำหนักตัวสัตว์ที่ชั่งก่อนฆ่า หลังจากอดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีน้ำสะอาดให้กินตลอดเวลา

6.2. **น้ำหนักซากอุ่น** : น้ำหนักซากสัตว์ภายหลังฆ่า โดยแยกเอาเลือด และอวัยวะภายในออกหมดแล้ว ยกเว้นไตที่ยังคงติดอยู่กับซาก

6.3. การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ซาก (dressing percentage) (สัญชัย, 2547)

Dressing percentage = $\frac{\text{(น้ำหนักซากสด – 3\% ของน้ำหนักซากสด) X 100}}{\text{น้ำหนักตัวมีชีวิต}}$

หรือเปอร์เซ็นต์ซาก = $\frac{\text{น้ำหนักซากเย็น X 100\%}}{\text{น้ำหนักตัวมีชีวิต}}$

6.4. **ความยาวซาก** : วัดความยาวจากตำแหน่งซี่โครงซี่แรกถึงหัวกระดูก lumbar

6.5. **ความหนาไขมันสันหลัง** : วัด 3 จุด คือที่บริเวณซี่โครงซี่แรก บริเวณซี่โครงซี่สุดท้าย และบริเวณกระดูก lumbar ข้อสุดท้าย การวัดรวมทั้งหนังด้วย จากนั้นนำทั้ง 3 ค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย

6.6. **พื้นที่หน้าตัดเนื้อสัน :** ตัดกล้ามเนื้อสันระหว่างซี่โครงที่ 10 กับ 11 ตามขวาง ใช้กระดาษลอกลายวัดขนาดพื้นที่หน้าตัดเนื้อสัน

6.7. **การวัดสัดส่วนของส่วนตัดเนื้อสัน :** แยกส่วนตัดเนื้อสันระหว่างซี่โครงที่ 11 และ 12 หนาประมาณ 1 นิ้ว เลาะแยกเนื้อ หนัง ไขมัน และกระดูก ทำการชั่งน้ำหนัก และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของส่วนตัดเนื้อสัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Figure 13. Slaughtering of pigs

6.8. **เนื้อแดง :** พิจารณาจาก การประเมินเปอร์เซ็นต์เนื้อแดงของซากสุกร จากน้ำหนักซากสด ความหนาไขมันสันหลัง (ตรงซี่โครงที่ตำแหน่ง 10 และ 11, ตำแหน่ง P_2) และพื้นที่หน้าตัดเนื้อสัน เปรียบเทียบจากตารางมาตรฐานการประเมินเปอร์เซ็นต์เนื้อแดง

7. การศึกษาด้านคุณภาพเนื้อ

ซากสุกรถูกแช่เย็น (chilled) ที่อุณหภูมิ 4° C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทำการศึกษาคุณภาพเนื้อตามวิธีของสัญชัย (2543)

7.1. การวัดความเป็นกรด-ด่างของกล้ามเนื้อ (muscle pH measurement)

วัดค่าความเป็นกรดเป็นด่างด้วยเครื่อง pH-meter (Model 191, Knick, D-Berlin) ที่ 45 นาที และ 24 ชั่วโมงหลังฆ่า 2 ตำแหน่ง ได้แก่ กล้ามเนื้อสันนอก (*longissimus dorsi*) ระหว่างซี่โครงที่ 13 และ 14 ลึกประมาณ 4 เซนติเมตร และบริเวณสะโพกที่กล้ามเนื้อ *semimembranosus* ลึกประมาณ 4-6 เซนติเมตร

7.2. การวัดค่าการนำไฟฟ้า (conductivity measurement)

วัดค่าการนำไฟฟ้าด้วยเครื่อง conductivity – meter (Model WTW) ที่ 45 นาที และ 24 ชั่วโมงหลังฆ่า 2 ตำแหน่ง ได้แก่ กล้ามเนื้อสันนอก (*longissimus dorsi*) ระหว่างซี่โครงที่ 13 และ 14 ลึกประมาณ 4 เซนติเมตร และบริเวณสะโพกที่กล้ามเนื้อ *semimembranosus* ลึกประมาณ 4- 6 เซนติเมตร เช่นเดียวกับการวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Figure 14. Measurement of pH-value on muscle.

7.3. การวัดค่าสีของเนื้อ (color measurement)

ใช้เนื้อตัวอย่างจากเนื้อสันนอก ใส่ถุงพลาสติกปิดผนึกปากถุงเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อออกจากถุงวางในภาชนะเปิดเก็บในตู้เย็น 1 ชั่วโมง วัดค่าสีด้วยเครื่อง Minolta Chloma Meter (CR-300, Osaka) บันทึกค่า

L* (ค่าความสว่างของสี, lightness) ระหว่าง 0-100

a* (แกนของสีเขียวไปถึงสีแดง, red-green index)

b* (แกนของสีเหลืองไปถึงสีน้ำเงิน, yellow-blue index)

7.4. การวัดค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ (water holding capacity)

7.4.1. การสูญเสียน้ำขณะเก็บ (drip loss)

โดยการเก็บตัวอย่างเนื้อสันนอกหนา 2.5 เซนติเมตร ซับให้แห้ง ตัดแต่งเนื้อเยื่อไขมันออก ชั่งน้ำหนักเนื้อ (W_1) จากนั้นห่อเนื้อด้วยผ้าก๊อส แล้วใส่ถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิทกันอากาศเข้า-ออก (sealed) โดยให้ผ้าก๊อสห่างจากก้นถุงประมาณ 2-3 เซนติเมตร แล้วใช้เชือกร้อยไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อตัวอย่างออกจากถุง ซับของเหลวที่ติดมากับเนื้อให้แห้ง แล้วชั่งน้ำหนักเนื้อ (W_2) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์จากการสูญเสียน้ำขณะเก็บ (สัญชัย, 2543)

การคำนวณ

%การสูญเสียน้ำ (drip loss) = (น้ำหนักเนื้อก่อนแช่เย็น – น้ำหนักเนื้อหลังแช่เย็น) X 100
น้ำหนักเนื้อก่อนแช่เย็น

หรือ $$\% \text{ Drip loss} = \left(\frac{W_2 - W_1}{W_1} \right) \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

7.4.2. ค่าการสูญเสียน้ำเนื่องจากการทำละลาย (thawing loss)

โดยนำเนื้อตัวอย่างชั่งน้ำหนักก่อนแช่แข็ง (W_1) เก็บแบบสุญญากาศ (vacuum) ในถุงพลาสติก ผนึกปากถุงในสนิท แล้วเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -18°C จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาละลายน้ำแข็ง โดยทิ้งไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ชั่งน้ำหนักเนื้อภายหลังจากการแช่แข็ง (W_2) คิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสีย

การคำนวณ

%การสูญเสียน้ำเนื่องจากการทำละลาย (thawing loss)

$$= \frac{(\text{น้ำหนักเนื้อก่อนแช่แข็ง} - \text{น้ำหนักเนื้อหลังแช่แข็ง}) \times 100}{\text{น้ำหนักเนื้อก่อนแช่แข็ง}}$$

หรือ $$\% \text{ Thawing loss} = \left(\frac{W_2 - W_1}{W_1} \right) \times 100$$

7.4.3. ค่าการสูญเสียน้ำเนื่องจากการปรุงอาหาร (cooking loss)

นำตัวอย่างเนื้อจากการทำ thawing loss มาชั่งน้ำหนัก (W_1) บรรจุในถุง vacuum ก่อนที่จะนำไปต้ม ใช้แท่งเหล็กที่วัดอุณหภูมิเนื้อเสียบไว้กับเนื้อ สอด probe วัดอุณหภูมิของเครื่อง digital thermometer (306, Tecpel, Taiwan) นำไปต้มในน้ำที่มีอุณหภูมิ 80°C จนกระทั่งอุณหภูมิใจกลางเนื้อประมาณ 71-72 °C ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนักชิ้นเนื้อ (W_2) คิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสีย

การคำนวณ

%การสูญเสียเนื่องจากการต้ม (cooking loss)

$$= \frac{(\text{น้ำหนักเนื้อก่อนต้ม} - \text{น้ำหนักเนื้อหลังต้ม}) \times 100}{\text{น้ำหนักเนื้อก่อนต้ม}}$$

หรือ $$\% \text{ Cooking loss} = \left(\frac{W_2 - W_1}{W_1} \right) \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

7.5. ค่าแรงตัดผ่านของเนื้อ (shear values)

นำเนื้อตัวอย่างที่ผ่านการวัดค่าการสูญเสียจากการปรุงอาหาร (cooking loss) มาเจาะตามแนวเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยเหล็กกลวงชนิดกลม (core) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติ

เมตร เจาะเนื้อตัวอย่างให้ได้ 5 ชิ้น นำมาวัดค่าแรงตัดผ่านด้วยเครื่อง TA.XT.plus Texture Analyser ด้วยใบมีด หัววัดกำลัง 5KN (Warner Bratzler Shear) ด้วยความเร็ว 10 mm./sec (สัญชัย, 2543) บันทึกค่าแรงที่ได้ (หน่วย นิวตัน (N) พลังงาน (Joule))

7.6. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (chemical composition)

นำเนื้อสันนอก เก็บที่อุณหภูมิ -20°C ด้วยเครื่อง blender เพื่อวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนะ (โปรตีน ไขมัน และความชื้น) ด้วยวิธี proximate analysis (AOAC, 1990) ดังนี้

7.6.1. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (crude protein)

หลักการ : ปริมาณโปรตีนรวมของตัวอย่าง คำนวณได้จากปริมาณไนโตรเจน คือ ตัวอย่างจะถูกย่อยด้วยกรดกำมะถันเข้มข้นในสภาพที่มีความร้อนโดยมีสารเร่งปฏิกิริยาจนได้สารละลายใส หลังจากทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไปทำการกลั่น แอมโมเนียจะถูกปลดปล่อยออกมา ทำการจับไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (ammonium hydroxide) ด้วยกรดบอริค (boric acid) ที่มีความเข้มข้น 4% แล้วนำไปไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 *N* H_2SO_4 จะทำให้ทราบจำนวนกรดและด่างที่ทำปฏิกิริยา นำค่าที่ได้มาคำนวณ % โปรตีน ตามสมการที่ 1

สารเคมี :

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4) 96-98%
2. สารเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ประกอบไปด้วย
   - โปแตสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4)
   - คอปเปอร์ซัลเฟต ($Cu_2SO_4.5H_2O$)
3. methyl red indicator
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 40%
5. กรดบอริค (boric acid) 4%

วิธีการ :

ขั้นตอนการย่อย ชั่งตัวอย่างเนื้อสดที่บดแล้ว 0.5 กรัม ใส่ในหลอดย่อย (digestion tube) จากนั้นใส่ selenium mixture ปริมาณเท่าปลายช้อน เติม conc. Sulfuric acid 15 ml. นำไปตั้งบนเครื่องย่อย (K424, Buchi, Switzerland) ปิดฝาหลอดย่อยต่อเข้ากับเครื่องดูดไอกรด ย่อยจนกระทั่งได้สารละลายใสใช้เวลาประมาณ 4 ชม. จากนั้นปิดเครื่องย่อยทิ้งไว้ให้เย็น

ขั้นตอนการกลั่น ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างสารละลายที่ติดขอบด้านบนในหลอดย่อย เติม Tashiro indicator 2-3 หยด นำหลอดย่อยต่อเข้ากับเครื่องกลั่น (K314, Buchi, Switzerland) นำขวดรูปชมพู่บรรจุสารละลายของ boric acid 4% ปริมาณ 40 มล. ที่เติม Tashiro indicator 2-3 หยด ไว้แล้วมาต่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เข้ากับปลายคอนเดนเซอร์โดยให้ปลายท่อจุ่มในสารละลายของ boric acid จากนั้นเปิดเครื่องกลั่น กดปุ่มเติมสารละลาย sodium hydroxide 40% ลงในหลอดย่อยประมาณ 70 มล. หรือจนกระทั่งสีของ indicator เปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเขียว จากนั้นกดปุ่มกลั่นจนกระทั่งได้สารละลายในขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ประมาณ 200 มล.

ขั้นตอนการไทเทรต นำขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลายที่ได้จากการกลั่นไปต่อเข้ากับชุดไทเทรต แล้วไทเทรตด้วยสารละลาย hydrochloric acid ความเข้มข้น 0.1 N จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีชมพู บันทึกปริมาณกรดที่ใช้ จากนั้นนำไปคำนวณตามสมการ

หมายเหตุ : หลอด blank จะเติมเหมือนกันทุกอย่าง แต่ไม่ได้ใส่ตัวอย่างลงไป

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์โปรตีน :

$$\% \text{ crude protein (CP)} = \left(\frac{\text{ml HCl(s)} - \text{ml HCl(b)} \times \text{N HCl} \times 0.014 \times 6.25}{W_S} \right) \times 100 \quad \text{..สมการที่ 1}$$

HCl(s) = ปริมาณของสารละลาย hydrochloric acid ที่ใช้ไทเทรตสารละลายตัวอย่าง

HCl(b) = ปริมาณของสารละลาย hydrochloric acid ที่ใช้ไทเทรตสารละลาย blank

N HCl = ความเข้มข้นของ hydrochloric acid ที่ใช้ไทเทรต

W_S = น้ำหนักตัวอย่างตัวอย่าง (ก.)

7.6.2. การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (ether extract)

หลักการ : นำตัวอย่างมาสกัดไขมันด้วยสารละลายอินทรีย์ (organic sovent) เช่น ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) ด้วยเครื่องมือที่เรียกว่า soxhlet extraction ซึ่งสารที่สกัดได้ จะเรียกว่า “ Ether extract”

สารเคมี : Dichloromethane

อุปกรณ์ - เครื่องสกัดไขมัน - ตัวอย่างเนื้อ
- เตาอบ - เครื่องชั่ง
- โถดูดความชื้น - thimble
- กระดาษกรองไขมัน

วิธีการ :

1. ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการอบมาแล้ว 3 กรัม (C)
2. นำบีกเกอร์สำหรับหาไขมันที่ผ่านการล้างสะอาด เช็ดให้แห้ง แล้วอบ 100°C นาน 1 ชั่วโมง และใส่ในโถดูดความชื้น (desicater) ปล่อยให้เย็น ทำการชั่งหาน้ำหนักที่ได้ (B)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ห่อตัวอย่างที่อยู่ในกระดาษกรองไขมันใส่ลงใน thimble ต่อเข้ากับ sample containers แล้วต่อเข้ากับ holding clips ของเครื่องสกัดไขมันแบบ soxhlet extraction
4. ใส่ dichloromethane ลงในบีกเกอร์ 30 ml. แล้วนำต่อเข้ากับเครื่องให้สนิท
5. เปิดน้ำเย็นให้ไหลผ่าน condenser ตลอดเวลา เปิดสวิทซ์ไฟโดยใช้ความร้อนสกัดนาน 14 ชั่วโมง
6. นำ sample containers ออก แล้วนำ reclaiming tube ใส่แทนที่ ให้ความร้อน dichloromethane จะถูกกลั่น และถูกเก็บใน reclaiming tube ส่วนไขมันที่ได้จะอยู่ในบีกเกอร์
7. นำบีกเกอร์ที่มีไขมันอบที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำออกใส่ในโถดูดความชื้นปล่อยให้เย็น ทำการชั่งน้ำหนัก (A)

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไขมัน

$$\% \text{ Fat} = \frac{(A - B)}{C} \times 100 \qquad \text{..... สมการที่ 2}$$

A = น้ำหนักบีกเกอร์ + น้ำหนักไขมันหลังอบแล้ว

B = น้ำหนักบีกเกอร์

C = น้ำหนักตัวอย่าง

7.6.3. การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น (moisture percentage) **หรือวัตถุแห้ง** (dry matter)

หลักการ : เมื่อนำตัวอย่างมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100°C จนน้ำหนักคงที่ น้ำหนักที่หายไปคือความชื้น

วิธีการ :

1. นำถ้วยสำหรับใส่ตัวอย่างวิเคราะห์หาความชื้น (weighting bottle) ที่ล้างสะอาดและเช็ดให้แห้ง อบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 100°C นาน 1 ชั่วโมง และนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้นปล่อยให้เย็นและชั่งน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดละเอียดแล้วจำนวน 2 g (C) ใส่ใน weighting bottle บันทึกน้ำหนักรวมทั้งหมด (A) และอบที่อุณหภูมิ 100°C นาน 4 ชั่วโมง
3. นำถ้วยที่มีตัวอย่างออกจากตู้อบแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ทำการชั่งน้ำหนัก (B)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น :

$$\% \text{ ความชื้น (Moisture)} = \frac{(A-B)\ X\ 100}{C} \quad \text{…….. สมการที่ 3}$$

% วัตถุแห้ง (Dry matter) = 100 - % ความชื้น

A = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ
B = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ
C = น้ำหนักตัวอย่าง

7.7. การศึกษาคุณภาพไขมันในเนื้อ

7.7.1. การวิเคราะห์หาปริมาณคอลเลสเตอรอล (adapted from Jung *et al*., 1975)

1. ทำการสกัดไขมันจากกล้ามเนื้อสันนอกที่บดแล้ว โดยวิธีการของ AOAC (1995) มาละลายด้วย 2-propanol เตรียมให้มีความเข้มข้น 50 มก./มล.
2. ดูดสารละลายไขมัน ปริมาตร 50 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 25 มล.
3. เติม alcoholic KOH 10 มล. แช่ใน water bath อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น
4. เติม petroleum ether 5 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture
5. เติมน้ำกลั่น 5 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น
6. เก็บส่วนที่ละลายในชั้น petroleum ether ใส่ในหลอดทดลอง แล้วนำไประเหยแห้งใน water bath ที่อุณหภูมิ 65°C
7. เติม ferric acetate/uranyl acetate 5 มล. เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่อง vortex mixture
8. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,700 รอบ/นาที นาน 5 นาที
9. เตรียมหลอดอ่านขนาด 13 x 100 มม. ชุดใหม่ แล้วเติม sulfuric acid reagent หลอดละ 2 มล.
10. ดูด supernate จากหลอดในข้อ 8 มา 3 มล. ใส่ในหลอดอ่านที่เติม sulfuric reagent
11. ผสมให้เข้ากันทันทีด้วย vortex mixer อย่างน้อย 20 วินาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที
12. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยใช้หลอด blank อ่านค่าเป็นศูนย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หมายเหตุ : 1. หลอด blank จะเติมเฉพาะ ferric acetate/uranyl acetate 3 มล. และ sulfuric acid reagent 2 มล.

2. นำค่าคอเลสเตอรอลที่ได้ คำนวณกลับเพื่อหาปริมาณคอเลสเตอรอลใน 100 กรัม ของเนื้อ

สูตรในการคำนวณหาปริมาณคอลเลสเตอรอล

$$\text{Cholesterol level} = (\text{mg}/100\text{g}) \frac{\text{Isopropanol (ml.) x O.D. sample x con standard (mg/ml) x 100}}{\text{O.D. standard x sample weight (g)}}$$

7.7.2. การวิเคราะห์หาปริมาณไตรกลีเซอไรด์ (Adapted from Jung *et al*., 1975)

1. ทำการสกัดไขมันจากกล้ามเนื้อสันนอกที่บดแล้ว ตามวิธีของ AOAC (1995)
2. เตรียมไขมันที่สกัดได้ ให้มีความเข้มข้น 50 มก./มล. ด้วย 2-propanol เช่นเดียวกับการวิเคราะห์คอเลสเตอรอล
3. ดูดไขมันในข้อ 2 มาปริมาตร 50 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 25 ml.
4. เติม N- Heptane ปริมาตร 2 มล.
5. เติม Iso- propanal ปริมตร 3.5 มล.
6. เติม sulfuric acid 40 mM จำนวน 1 มล.
7. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture นาน 20 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จนแยกชั้น
8. เตรียมหลอดทดลองอีกชุด แล้วเติม sodium alkoxide ปริมาตร 2 มล.
9. ดูดสารละลายที่แยกชั้นส่วนบนในข้อ 7 มา 0.2 มล. ใส่ในหลอดข้อ 8 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 5 นาที นำออกมาเติม sodium periodate ปริมาตร 1 มล.
10. เติม acetyl acetone reagent ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 20 นาที
11. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร

หมายเหตุ : คำนวณเปรียบเทียบกับสารละลายไตรกลีเซอไรด์มาตรฐาน แล้วคำนวณกลับเพื่อหาเป็นปริมาณไตรกลีเซอไรด์ใน 100 กรัมของเนื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สูตรในการคำนวณหาปริมาณไตรกลีเซอไรด์

$$\text{Triglyceride level (g/100g)} = \frac{\text{Isopropanol (ml.) x O.D. sample x con standard (mg/ml) x 100}}{\text{O.D. standard x sample weight (g) x 1000}}$$

7.7.3. การวิเคราะห์หาค่า thiobarbituric acid number (TBA number) ของตัวอย่างเนื้อ

หลักการ : ตัวอย่างเนื้อเมื่อทำให้มีสภาวะเป็นกรด แล้วนำไปกลั่นของเหลวที่ได้ เมื่อนำไปต้มกับ thiobarbituric acid reagent จะมีสีแดงเกิดขึ้น เนื่องจากปฏิกิริยาของกรดไขมันที่ถูกออกซิไดซ์ ดังนั้นความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะแปรโดยตรงกับความหืน (rancidity) ของไขมันที่เกิดขึ้น ซึ่งเกิดเป็นสารประกอบที่เรียกว่า malonaldehyde

วิธีการ : ตัวอย่างเนื้อที่เก็บที่อุณหภูมิ 4°C นาน 2 สัปดาห์ นำมาหาค่า TBA number ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Pearson, 1994 อ้างโดย Rossell, 1994

1. ชั่งตัวอย่างสันนอกที่บดแล้ว 10 กรัม เติมน้ำกลั่น 70 มล.
2. ปั่นผสมใน blender ประมาณ 15 นาที
3. เทใส่ใน distillation flask แล้วล้าง blender ด้วยน้ำกลั่น 30 มล.
4. เติม 4M HCL ปริมาตร 2.5 มล.
5. เติม anti – foaming agent จำนวน 1 – 2 หยด
6. ต่อเข้ากับชุดกลั่น แล้วกลั่นจนได้ของเหลวประมาณ 50 มล.
7. ปิเปตสารละลายที่กลั่นได้ 5 มล. แล้วเติม TBA salution 5 มล.
8. ต้มในน้ำเดือดนาน 35 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น 10 นาที
9. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร
10. คำนวณค่า TBA number จากสูตร

หมายเหตุ : หลอด blank เติมน้ำกลั่น 5 มล. และ TBA salution 5 มล.

สูตรในการคำนวณ :

TBA number (mg malondialdehyde/kg sample) = 7.8 x absorbance

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

8. การศึกษาการตกค้างของสารซัลบูทามอล

การศึกษาการตกค้างของสารซัลบูทามอลในเนื่อ ตับ และไต

ใช้การวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography) ตามวิธีของ ลัดดา (2545)

การเตรียม Mobile phase : 4% acetonitrite in water which contained 0.3% acetic acid

- เตรียม 0.3% acetic acid : โดยผสม acetic acid 6 มล. กับน้ำกลั่นเกรด HPLC โดยปรับปริมาตรให้ได้ 2,000 มล.
- นำสารละลาย acetic acid ที่เตรียมได้ 1,920 มล. ผสมกับ acetonitrite 80 มล.
- กรองสารละลายที่ได้ด้วยชุดกรองตัวทำละลาย (solvent suction) โดยใช้แผ่นกรองความละเอียด 0.45 ไมครอน

การเตรียมสารมาตรฐาน

Standard : Salbutamol

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน salbutamol โดยใช้น้ำ distillation water เป็นตัวทำละลายความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.1 µg/ml. โดยเตรียมในขวดสีชาขนาด 5 ml.

Figure 15. Homogeniser for residues analysis

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมสารตัวอย่าง

ตัวอย่างเนื้อสุกร ตัวอย่างละประมาณ 500 กรัม ตัดส่วนไขมันออก เนื้อเลือกส่วนที่เป็นเนื้อแดงหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ รวมถึงอวัยวะภายใน (ตับ, ไต) และบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อชั่งตัวอย่าง 4 g เก็บที่อุณหภูมิ 18 °C ก่อนการสกัด

1. นำตัวอย่างใส่ใน centrifuge bottle ขนาด 200 มล.
2. เติมสารละลาย metaphosphoric acid (5%) 40 มล. และ methylene chloride 10 มล.
3. ปั่นด้วยหัวปั่น Ultra Turrax (homogenizer) นาน 2 นาที
4. นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที
5. เทเฉพาะส่วนที่ใสใส่ใน separatory funnel ขนาด 250 มล. รอให้แยกชั้น แล้วทิ้งชั้น methylene chloride (ชั้นล่าง)
6. ปรับ pH ด้วย sodium carbonate (20%) ปริมาณ 5 มล. และ sodium hydroxide ความเข้มข้น 6 N ปริมาณ 3 มล.ให้ได้ pH 11-12 โดยใช้ pH meter
7. เติม sodium chloride จำนวน 7 กรัม เขย่าให้ละลาย
8. นำมาเขย่าต่อด้วยสารละลายผสม tert-butyl alcohol กับ ethylacetate (3:7) 2 ครั้ง ๆ ละ 80 มล. และ 70 มล. ตามลำดับ โดยเขย่านานครั้งละ 5 นาที ด้วยเครื่องเขย่า
9. กำจัดน้ำออก โดยกรองผ่านชั้น sodium sulfate เพื่อดึงน้ำออกจากสารละลายหลังจากนั้นเก็บส่วน organic solvent ใส่ใน round bottomed flask ขนาด 250 มล.
10. ระเหย organic solvent ให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator
11. ละลาย residue ด้วย ethylacetate 10 ml. ทำให้แห้งอีกครั้งด้วยเครื่อง rotary evaporator
12. ละลาย residue ด้วยน้ำกลั่น 2 มล. สำหรับตัวอย่างเนื้อ ส่วนตับ และไต ละลายด้วยน้ำกลั่น 4 มล. แล้วกรองสารละลายที่ได้ด้วย membrane fitter ขนาด 0.45 μm.

การวิเคราะห์สาร salbutamol เครื่อง HPLC ใช้สภาวะการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

column: MN (Macherey-Nagel) EC 150/4.6 NUCLEOSIL 100-5 C 18

detector: fluorescence detector

mobile phase: 4% acetonitrite in water which contained 0.3% acetic acid

flow-rate: 1.5 ml/min.

column oven: 40°C

excitation: 226 nm.

emission: 310 nm.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

9. การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดย Tukey's W-Procedure โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SAS for window (SAS, 1990)

Figure 16. High performance liquid chromatography (HPLC)

10. สถานที่ทำการวิจัย และรวบรวมข้อมูล

1. ฟาร์มเลี้ยงสัตว์ทดลอง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ต. แม่เหียะ อ. เมือง จ. เชียงใหม่
2. วิเคราะห์ทางเคมีที่ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ และห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ วิทยาเขตสะลวง อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

11. ระยะเวลาการวิจัย

ใช้ระยะเวลาดำเนินการ 24 เดือน