บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

ชื่ออุปกรณ์และเครื่องมือ	โมเดล	บริษัท	ประเทศ
1. ขวดก้นกลม 100 ml	-	Glaswerk wertheim	Germany
2. ขวดก้นกลม 250 ml	-	Duran	-
3. เครื่อง Centrifuge	Megafuge1.0	Heraeus	Germany
4. เครื่อง Gas chromatography	GC-14B	Shimadzu	Japan
5. เครื่อง Spectophotometer	DU 7500	Beckman	Germany
6. เครื่อง Vortex mixer	G-560E	Scientific Industries,Inc.	America
7. เครื่องกลั่นโปรตีน	-	Gerhardt	Germany
8. เครื่องปั่น	-	Moulinex	France
9. เครื่องสกัดไขมัน	-	Gerhardt	Germany
10. คอลัมน์	DB-Wax	J&W	America
11. โถดูดความชื้น	GL 32	Glaswerk Wertheim	Germany
12. โถดูดความชื้น	GL32	Glaswerk wertheim	Germany
13. ตู้อบ	DEV	Heraeus	Germany
14. หลอดทดลอง	-	Pyrex	Germany
15. Beaker 100 ml	No. 1000	Pyrex	USA
16. Beaker 250 ml	No. 1000	Pyrex	USA
17. Beaker 50 ml	No. 1000	Pyrex	USA
18. Beaker 500 ml	No. 1000	Pyrex	USA
19. Conduct-meter	LF196	WTW	Germany
20. Erlenmeyer flask	-	SCHOTT	Germany
21. Filter paper	No.1, 41	Whatman	UK
22. Instron	5565	Instron	England

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

23. Kjeidahl flask	-	Gerharde	Germany
24. Micropipette 100-1000µl	704180	Brand	Germany
25. Micropipette 10-100µl	cp65602	Genex Beta	Germany
26. Minolta chromameter	CR 300	Minolta	Japan
27. pH meter	913	Knick	Germany
28. Separate flask	-	SCHOTT	Germany
29. Texture Analyzer	TA.XT2	Stable Micro System	UK
30. Thimble	-	Whatman	England
31. Vacuum sealer	C15-HL	Food equipment	Germany
32. Volumetric flask 1,000 ml	-	SCHOTT	Germany
33. Volumetric flask 100 ml	-	SCHOTT	Germany
34. Volumetric flask 2,000 ml	-	SCHOTT	Germany
35. Volumetric flask 50 ml	-	SCHOTT	Germany
36. Water bath	-	W. Krannich	Germany

3.2 สารเคมี (เกรด Analytical reagents)

ชื่อสารเคมี	**บริษัท**
1. น้ำกลั่น	-
2. Acetic acid	Merck
3. Acetylacetone	Fluka
4. Ammonium acetate	BDH
5. anti-foaming agent	Fluka
6. Boric acid	Merck
7. 20% Boron trifluoride	Merck
8. Chloroform	Merck
9. Choramine-T-reagent	Merck
10. Conc. Sulfuric acid	Merck
11. Dichloromethane	Merck
12. 4-dimethylaminobenzaldehyde	Merck
13. Ethanol	Lab-Scan

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

14. FAME standard	Supelco
15. Ferric chloride	Merck
16. *n*-Heptane	Lab-Scan
17. Hydrochloric acid	Merck
18. Magnesium chloride	Merck
19. Methanol	Lab-Scan
20. Perchloric acid	Merck
21. Petrolium ether	Lab-Scan
22. Potassium hydroxide	Merck
23. Propa-2-ol	Lab-Scan
24. Sodium chloride	Merck
25. Sodium chloride	Merck
26. Sodium hydroxide	Merck
27. Sodium methoxide	Fluka
28. Sodium periodate	-
29. Sodium sulfate anhydrous	J.T.Baker
30. Thiobarbituric acid	BDH
31. 2,2,4 trimethyl pentane	Lab-Scan
32. Uranyl acetate	-

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 สัตว์ทดลอง

ไก่ที่ใช้ในการทดลองเลี้ยงคือ กลุ่มที่ 1 ไก่เบรส กลุ่มที่ 2 ไก่โรดไอแลนด์เรด กลุ่มที่ 3 ไก่แม่ฮ่องสอน เลี้ยงที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ โดยไก่จะได้รับน้ำและอาหารอย่างเต็มที่ (*ad libitum*) เลี้ยงจากอายุ 1 วัน จนถึง 16 สัปดาห์ อาหารที่ใช้เป็นอาหารสำเร็จรูปของไก่ไข่ แบ่งเป็น 3 ระยะ คือ

ไก่ไข่เล็ก ตั้งแต่อายุแรกเกิดจนถึง 6 สัปดาห์ เปอร์เซ็นต์โปรตีนประมาณ 19 เปอร์เซ็นต์

ไก่ไข่รุ่น อายุ 6-12 สัปดาห์ เปอร์เซ็นต์โปรตีนประมาณ 16 เปอร์เซ็นต์

ไก่ไข่สาวก่อนไข่ อายุ 12 จนถึง 16 สัปดาห์ เปอร์เซ็นต์โปรตีนประมาณ 13 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หลังจากนั้นสุ่มไก่ที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 240 ตัว แบ่งเป็นพันธุ์ละ 80 ตัวคือ เพศผู้ 40 ตัว และเพศเมีย 40 ตัว

Table 8 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**

3.3.2 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองในการศึกษาคุณภาพเนื้อและไขมัน แบบ 3x2 factorial โดยทำการทดลองแบบ Completely Random Design (CRD) (จรัญ, 2540) ซึ่งมีปัจจัยในการศึกษาคือ สายพันธุ์ (ไก่เบรส ไก่โรดไอแลนด์เรดและไก่แม่ฮ่องสอน) และเพศ (เพศผู้ และเพศเมีย)

3.4 การศึกษาทางด้านคุณภาพเนื้อ

ภายหลังจากการฆ่าไก่แล้วนำซากไก่ที่ผ่านการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาตัดแต่งและเก็บเนื้ออกและเนื้อสะโพกเพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.1 การวัดค่าสีเนื้อและหนัง (Meat and Skin color measurement)

แยกกล้ามเนื้ออก (*P. major*) และกล้ามเนื้อสะโพก (*P. minor*) ใส่ถุงพลาสติกผนึกปากถุงเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อออกจากถุงวางในภาชนะเปิดเก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำออกจากตู้เย็นวัดค่าสีด้วยเครื่อง Minolta Chroma Meter (CR-300,

Osaka) บันทึกค่าเฉลี่ย L* (ความสว่าง), a*(แดง-เขียว), b*(เหลือง-น้ำเงิน) และคำนวณหาค่า hue angle และ chroma (Le Bihan-Duval *et al*., 2003)

ค่า hue angle (H) คำนวณได้จากสูตร $H = \tan^{-1}(b^*/ a^*)$

ค่า chroma (C) คำนวณได้จากสูตร $C = (a^{*2} + b^{*2})^{½}$

3.4.2 การวัดค่าพีเอชของกล้ามเนื้อ (pH measurement)

วัดค่าพีเอชของกล้ามเนื้ออก (*P. major*) ภายหลังฆ่า 45 นาที ด้วยเครื่อง pH-meter (Model 191, Knick, D-Berlin) และบันทึกค่าพีเอช

3.4.3 การวัดค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity measurement)

วัดค่าการนำไฟฟ้าของกล้ามเนื้ออก (*P. major*) ภายหลังฆ่า 45 นาที ด้วยเครื่อง conductivity-meter (Model WTW) และบันทึกค่าการนำไฟฟ้า

3.4.4 วิธีการวิเคราะห์หาค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ (Water holding capacity)

การสูญเสียน้ำขณะเก็บรักษา (drip loss) (Honickel, 1987; อ้างโดย สัญชัย, 2543) วิธีการชั่งน้ำหนักกล้ามเนื้ออกและสะโพก (A) ห่อด้วยผ้าก๊อต เก็บรักษาไว้ในถุงพลาสติกชนิดเย็น และให้ระดับผ้าก๊อตอยู่ห่างจากก้นถุงประมาณ 2 เซนติเมตร ผนึกปากถุงให้สนิทเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นในลักษณะแขวน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ชั่งน้ำหนัก (B) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำขณะเก็บรักษาจากสูตร

$$\textbf{Drip loss (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

การสูญเสียน้ำขณะหลอมละลาย (thawing loss) และการสูญเสียน้ำจากการต้ม (boiling loss) วิธีการชั่งน้ำหนักกล้ามเนื้ออกและสะโพก (a) เก็บรักษาแบบสุญญากาศ (vacuum) ในถุงพลาสติกชนิดเย็นผนึกปากถุงให้สนิท เก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาหลอมละลายน้ำแข็ง (thawing) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำชิ้นเนื้อออกจากถุงซับน้ำให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก (b) จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ได้เก็บไว้ใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ถุงร้อนแบบสุญญากาศ ต้มในหม้อต้มที่ อุณหภูมิน้ำเท่ากับ 85 องศาเซลเซียส จนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อประมาณ 80 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 15-16 นาที ผึ่งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ซับน้ำให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก (c) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำขณะหลอมละลายและเปอร์เซ็นต์การสูญเสียจากการต้มจากสูตร

$$\textbf{Thawing loss (\%)} = \frac{a - b}{a} \times 100$$

$$\textbf{Boiling loss (\%)} = \frac{b - c}{b} \times 100$$

การสูญเสียน้ำจากการย่าง (grilling loss) วิธีการทำโดยนำกล้ามเนื้อออกและเนื้อสะโพกมาตัดแต่งไขมันและพังผืดออกให้หมด ทำการชั่งน้ำหนัก (d) จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ได้ย่างในหม้ออบให้ความร้อน (convection oven) ที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อประมาณ 80 องศาเซลเซียส และนำออกจากหม้ออบ ทำการชั่งน้ำหนักอีกครั้ง (e) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำจากการย่างตามสูตร

$$\textbf{Grilling loss (\%)} = \frac{d - e}{d} \times 100$$

3.4.5 แรงตัดผ่าน (Shear force) โดยใช้เครื่อง Instron 5565, 100 N tension

นำเนื้อที่ต้มสุกจากการหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียจากการต้ม (boiling loss) เจาะตามแนวเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยเหล็กกลวงชนิดกลม (core) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร วัดค่าแรงตัดผ่านด้วยเครื่อง Instron 5565 หัววัดกำลัง 5 kN (Warner Bratzler Shear) ด้วยความเร็ว 200 มิลลิเมตรต่อนาที โดยอ่านเป็นค่าแรงสูงสุด (maximum force, N) และค่าพลังงาน (energy force, J)

3.4.6 การประเมินผลทางประสาทสัมผัส (Sensory evaluation)

นำตัวอย่างกล้ามเนื้อออกและเนื้อสะโพกย่างให้สุก โดยวัดอุณหภูมิใจกลางชิ้นเนื้อเท่ากับ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นตัดให้มีขนาดเท่าๆ กันแล้วเสริฟให้ผู้ทดสอบชิมซึ่งได้ผ่านการฝึกฝนการทดสอบชิม (ไพโรจน์, 2535) จำนวน 6 คน ผู้ทดสอบชิมจะได้รับแบบสอบถามและฟังบรรยาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนการทดสอบชิมอย่างละเอียด ซึ่งประเมินโดยการให้คะแนนจาก 4 ลักษณะคือ ความนุ่ม (tenderness) กลิ่นและรสชาติ (flavor) ความชุ่มฉ่ำ (juiciness) และความพอใจโดยรวม (overall acceptability) โดยให้คะแนนซึ่งอยู่ในช่วง 1-10 คะแนน (1 = เหนียว กลิ่นและรสชาติไม่ดี แห้ง และไม่ชอบมาก; 10 = นุ่มที่สุด กลิ่นและรสชาติดีที่สุด ฉ่ำน้ำที่สุด และมีความชอบมากที่สุด) ผู้ทดสอบชิมได้รับน้ำและขนมปังจืดหลังจากทดสอบชิมเนื้อแต่ละชิ้น นำคะแนนที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย

3.4.7 การวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน (Collagen analysis) (Hill, 1966; AOAC, 1996)

วิธีการวิเคราะห์หาค่าคอลลาเจนที่ละลายได้และละลายไม่ได้ (soluble and insoluble collagen analysis)

ขั้นตอนการแยก (Hill, 1966)

1. ชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้ออกและสะโพกที่บดละเอียดแล้ว 4 กรัม ใส่ในหลอด homogenize ขนาด 30 มิลลิลิตร
2. ใส่ strength ringer solution 8 มิลลิลิตร
3. Homogenize ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที
4. ต้มใน water bath อุณหภูมิ 77 องศาเซลเซียส นาน 70 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น 1 ชั่วโมง
5. ปั่นเหวี่ยงที่ 5,200 รอบต่อนาที นาน 26 นาที
6. แยกส่วน supernatant ใส่ Erlenmeyer flask ที่ 1 และส่วน residue ใส่ Erlenmeyer flask ที่ 2

ขั้นตอนการย่อย (AOAC, 1996)

1. เติมกรด sulfuric acid 7 *N* 30 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask ทั้ง 2 ที่เตรียมไว้ข้อ 6 และปิดด้วยกระจกนาฬิกา
2. อบที่อุณหภูมิ 105 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง
3. นำตัวอย่างที่ได้จากการย่อยใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร
4. กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองลงใน Erlenmeyer flask
5. ปิเปตสารละลายจากข้อ 4 มาใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนการทำให้เกิดสี (AOAC, 1996)

1. ปิเปตสารละลายที่ได้ในขั้นตอนการย่อย 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 2 หลอดและทำ blank โดยการเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติม oxidant solution 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ± 2 นาที
3. เติม color reagent หลอดละ 1 มิลลิลิตร เขย่าทันทีและปิดฝาหลอดให้สนิท
4. ต้มใน water bath อุณหภูมิ 60 ± 0.5 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
5. ทำหลอดให้เย็นโดยการเปิดน้ำให้ไหลผ่าน 3 นาที
6. ทำหลอดให้แห้งโดยการเช็ดหรือตั้งทิ้งไว้
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 558 นาโนเมตร

สูตรในการคำนวณหาปริมาณคอลลาเจน

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

$$H \text{ (กรัม/100 กรัม)} = (2.5 \times h)/mv$$

y = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

h = ความเข้มข้นของ hydroxyproline (ไมโครกรัม/2 มิลลิลิตร)

H = ปริมาณ hydroxyproline (กรัม/100 กรัม)

m = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

v = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ดูดมาทำละลาย (มิลลิลิตร)

ปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ = H ของคอลลาเจนที่ละลายได้ x 7.52

ปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลาย = H ของคอลลาเจนที่ไม่ละลาย x 7.25

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.8 วิธีการวิเคราะห์หาส่วนประกอบทางเคมี (Chemical composition)

ตัวอย่างกล้ามเนื้อออกและเนื้อสะโพกบดด้วยเครื่องบดเพื่อวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์โปรตีน ไขมันและความชื้น ด้วยวิธี Proximate Analysis (AOAC, 1995) ดังนี้

3.4.8.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Protein analysis)

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดแล้ว 0.5 กรัม ใส่ในกระดาษชั่งตัวอย่างแล้วนำใส่ใน Kjeldahl flask
2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา (K_2SO_4 : $CuSO_4$; 20 : 1) จำนวน 2 กรัม แล้วเติม conc. Sulfuric acid 15 มิลลิลิตร
3. นำ Kjeldahl flask เข้าเครื่องย่อยที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนกระทั่งได้สารละลายสีเขียวใส แล้วปล่อยให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
4. ตวงสารละลาย 4% boric acid 25 มิลลิลิตร ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติม screen methylred indicator
5. เติม 40% sodium hydroxide จำนวน 50 มิลลิลิตร ใส่ขวด Kjeldahl flask (จากข้อ 3) นำ Kjeldahl flask เข้าเครื่องกลั่น แล้วนำขวด Erlenmeyer flask (จากข้อ 4) ต่อเข้ากับอีกปลายของ condenser ของเครื่องกลั่น โดยให้ปลายท่อจุ่มในสารละลาย แล้วเปิดน้ำให้ไหลผ่านตัว condenser แล้วจึงเปิดเครื่องกลั่น
6. กลั่นจนได้ปริมาตรของสารละลายในขวด Erlenmeyer flask ประมาณ 200 มิลลิลิตร จากนั้นนำขวด Erlenmeyer flask ที่มีแอมโมเนียในสารละลาย 4% boric acid มาไทเทรตกับสาระลายมาตรฐาน 0.1 N H_2SO_4 โดยไทเทรตจนสีของสารละลายเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีม่วงอมเทา

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์โปรตีน

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

A = จำนวนปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 0.1 N ที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = จำนวนปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 0.1 N ที่ใช้ในการไทเทรตกับ blank (มิลลิลิตร)

C = ความเข้มข้น (N) ของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4

D = น้ำหนักตัวอย่าง

E = kjeldahl factor (6.25)

3.4.8.2 การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น (Moisture analysis)

1. นำถ้วยสำหรับใส่ตัวอย่างวิเคราะห์หาความชื้น (weighting bottle) ที่ล้างสะอาดและเช็ดให้แห้ง อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงและนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้นปล่อยให้เย็นและชั่งน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดละเอียดแล้วจำนวน 2 กรัม ใส่ใน weighting bottle บันทึกน้ำหนักรวมทั้งหมดและอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักคงที่
3. นำถ้วยที่มีตัวอย่างออกจากตู้อบแห้ง ใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจึงชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่หายไปคือ ปริมาณความชื้น และสารที่ระเหยได้ทั้งหมด

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น

$$\textbf{Moisture percentage} = \frac{A - B}{C} \times 100$$

A = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

B = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

C = น้ำหนักตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.8.3 การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (Fat analysis)

1. ชั่งน้ำหนักเนื้อที่บดแล้ว 2 กรัม อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
2. นำขวดสกัดไขมันที่ผ่านการล้างสะอาด เช็ดให้แห้งแล้วอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และใส่ในโถดูดความชื้น (dissicator) ปล่อยให้เย็น ทำการชั่งหาน้ำหนักที่ได้
3. นำตัวอย่างเนื้อที่ผ่านการหาความชื้นแล้วใส่ใน thimble ablundum ที่สะอาดและแห้ง
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 จะถูกกลั่นและถูกเก็บใน reclaiming tube ส่วนไขมันที่ได้จะอยู่ในบีกเกอร์
9. นำบีกเกอร์ที่มีไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำออกใส่ในโถดูดความชื้นปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นภายหลังการสกัดคือน้ำหนักของไขมัน

การคำนวณเปอร์เซ็นต์ไขมัน

$$\textbf{Fat percentage} = \frac{A - B}{C} \times 100$$

A = น้ำหนักบีกเกอร์ + น้ำหนักไขมันที่อบแล้ว

B = น้ำหนักบีกเกอร์

C = น้ำหนักตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 การศึกษาคุณภาพไขมัน

3.5.1 การวิเคราะห์กรดไขมันอิสระ (Free fatty acid analysis)

ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่ การสกัดไขมันและการเตรียม fatty acid methyl ester (FAME) โดยบดกล้ามเนื้อออกและเนื้อสะโพก ทำการสกัดไขมันจากตัวอย่างกล้ามเนื้อโดยมีวิธีการดังนี้

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

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดละเอียดแล้ว 5 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายผสมระหว่าง chloroform และ methanol (อัตราส่วน 2 : 1) 60 มิลลิลิตร ปิดฝาเขย่าอย่างแรงเพื่อให้เกิดการสกัดที่สมบูรณ์ โดยใช้เวลา 15 นาที
3. กรองด้วย Butcher funnel ผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 ลงใน flask นำกากที่เหลือมาสกัดตามข้อ 2 อีกครั้งหนึ่ง
4. รวมสารละลายที่กรองได้ใส่ใน separate flask เติมน้ำกลั่น 12 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น
5. เก็บชั้นล่างของสารละลายใน flask ที่ทราบน้ำหนักแล้วนำไประเหยแห้งด้วย water bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส
6. ชั่งน้ำหนักไขมันหลังจากระเหยแห้ง แล้วละลายด้วย chloroform ให้ได้ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ขั้นตอนที่ 2 การเตรียม fatty acid methyl ester (FAME) (Morrison and Smith, 1964)

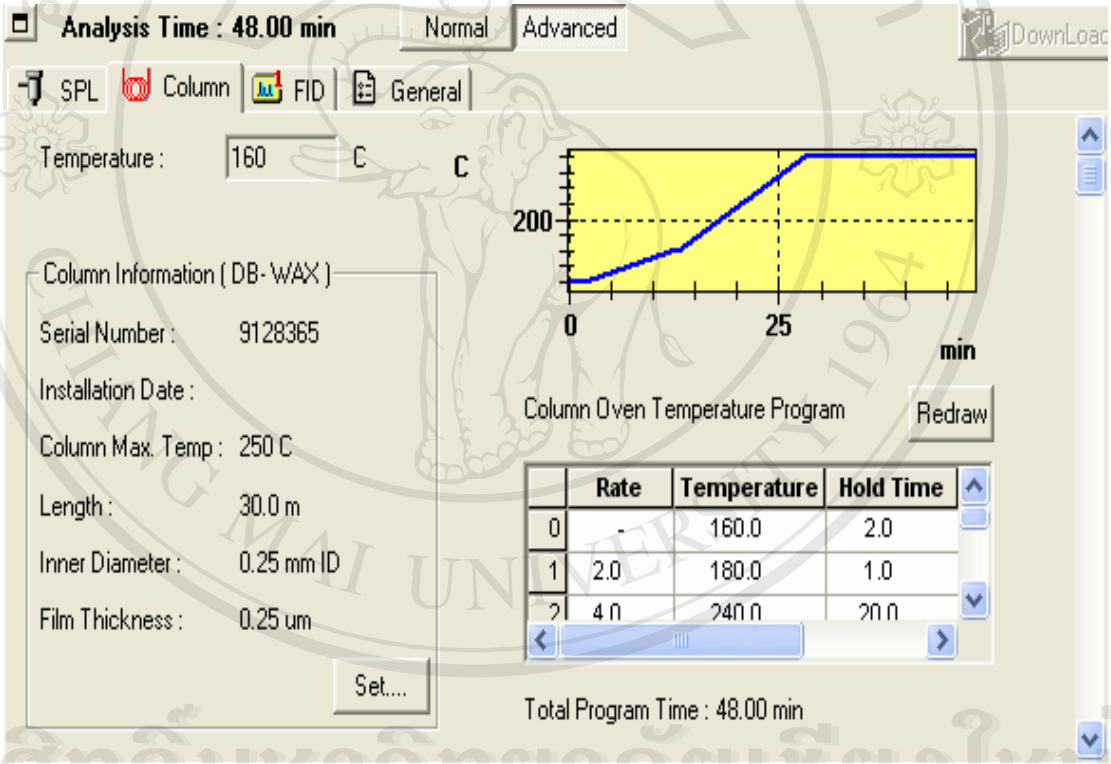
1. ดูดสารละลายที่สกัดได้ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย 0.5 M NaOH ใน methanol 4 มิลลิลิตร. แล้ว reflux เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปล่อยให้เย็น
3. เติม 20% boron-trifluoride ใน methanol 5 มิลลิลิตร. reflux ต่ออีก 2 นาที ปล่อยไว้ให้เย็น
4. เทสารละลายที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายเกลืออิ่มตัว (NaCl) จำนวน 5 มิลลิลิตร และ *Iso*-octane (2,2,4-trimethylpentane) จำนวน 2 มิลลิลิตร.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. เขย่าให้เข้ากัน 30 วินาที ทิ้งไว้ให้แยกชั้น
6. เก็บสารชั้นบน 1 มิลลิลิตร ใส่ใน vial ที่มี sodium sulfate anhydrous ปริมาณ 1 มิลลิกรัม ปิด vial ให้สนิทเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นเพื่อรอการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC)

ขั้นตอนที่ 3 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC)

1. ดูดสารที่ละลายได้จากขั้นตอนที่ 2 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง Gas chromatography (GC-14B, Shimadzu, Japan) โดยมี condition ดังนี้



2. การคำนวณเปอร์เซ็นต์กรดไขมันจากสมการ

fatty acid (%) = (area of fatty acid in sample/ total area of fatty acid) x 100

area of fatty acid in sample คือ พื้นที่ใต้กราฟของกรดไขมันแต่ละชนิดของตัวอย่าง

total area of fatty acid คือ พื้นที่ใต้กราฟของกรดไขมันทั้งหมด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

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

1. ทำการสกัดไขมันจากกล้ามเนื้อออกและเนื้อสะโพกที่บดละเอียดแล้วเช่นเดียวกับการสกัดไขมันเพื่อหาองค์ประกอบทางเคมี (AOAC, 1995)
2. ละลายไขมันที่สกัดได้ด้วย 2-propanol ให้ได้ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
3. ดูดสารละลายไขมันในข้อ 2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตร
4. เติม alcoholic KOH 10 มิลลิลิตร
5. ต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็น
6. เติม petroleum ether จำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture
7. เทสารละลายทั้งหมดลงในกรวยแยกปล่อยตั้งไว้ให้แยกชั้น
8. เก็บส่วนที่ละลายในชั้น petroleum ether แล้วนำไประเหยแห้งใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส
9. เติม ferric acetate/uranyl acetate 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่อง vortex mixture
10. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,700 รอบ/นาที นาน 5 นาที
11. เตรียมหลอดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร แล้วเติม sulfuric acid reagent หลอดละ 2 มิลลิลิตร
12. ดูด supernatant จากหลอดในข้อ 10 ใส่หลอดในข้อ 11
13. ผสมให้เข้ากันทันทีด้วย vortex mixer อย่างน้อย 20 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที
14. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยใช้หลอด blank อ่านค่าเป็นศูนย์
15. นำสารละลายคอเลสเตอรอลมาตรฐานมาทำตามข้อ 3-14

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สูตรในการคำนวณหาปริมาณคอเลสเตอรอล

$$\textbf{Cholesterol level (มิลลิกรัม/ 100 กรัม)} = \frac{\text{A x O. D. sample x B x 100}}{\text{O.D. standard x C}}$$

เมื่อ A คือ ปริมาตรของ 2-propanol (มิลลิลิตร) ที่ใช้ละลายไขมัน

B คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

C คือ น้ำหนักไขมันที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อ (กรัม)

O.D. sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

O.D. standard คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายคอเลสเตอรอลมาตรฐาน

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

1. สกัดไขมันตามวิธีของ AOAC (1995)
2. ละลายไขมันที่สกัดได้ให้มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วย *iso*-propanal
3. ดูดไขมันในข้อ 2 มา 50 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตร
4. เติม N-Haptane 2 มิลลิลิตร
5. เติม *iso*-propanal 3.5 มิลลิลิตร
6. เติม sulfuric acid 40 mM จำนวน 1 มิลลิลิตร
7. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture 20 วินาที ปล่อยตั้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จนแยกชั้น
8. เตรียมหลอดทดลองอีกชุด แล้วเติม sodium alkoxide ลงไป 2 มิลลิลิตร
9. ดูดสารละลายที่แยกชั้นส่วนบนในข้อ 7 มา 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดข้อ 8
10. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
11. นำออกมาเติม sodium periodate 1 มิลลิลิตร
12. เติม acetyl acetone reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
13. ปล่อยไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร
14. นำสารละลายไตรกลีเซอไรด์มาตรฐานมาทำตามข้อ 3-13

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Triglyceride content (กรัม/ 100 กรัม) = $\frac{\text{A x O. D. sample x B x 100}}{\text{O.D. standard x C x 1000}}$

เมื่อ A คือ ปริมาตรของ 2-propanol (มิลลิลิตร) ที่ใช้ละลายไขมัน

B คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

C คือ น้ำหนักไขมันที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อ (กรัม)

O.D. sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

O.D. standard คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไตรกลีเซอไรด์มาตรฐาน

3.5.4 การวิเคราะห์หาค่าการหืน Thiobarbituric acid (TBA) (Rossell, 1994)

1. ชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้ออกและกล้ามเนื้อสะโพกที่บดละเอียดแล้วจำนวน 10 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไป 70 มิลลิลิตร
2. ปั่นในเครื่องปั่นประมาณ 15 นาที
3. เทใส่ใน distillation flask แล้วล้าง blender ด้วยน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร
4. เติมสารละลายกรดเกลือ (HCl) ความเข้มข้น 4 M 2.5 มิลลิลิตร
5. เติม anti-foaming agent 1-2 หยด
6. ต่อเข้ากับชุดกลั่น แล้วกลั่นจนได้ของเหลวจำนวน 50 มิลลิลิตร
7. ปิเปตสารละลายที่กลั่นได้ 5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย TBA ลงไป 5 มิลลิลิตร
8. ต้มในน้ำเดือด 35 นาทีปล่อยให้เย็น 10 นาที
9. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร
10. คำนวณค่า TBA number จากสูตร

หมายเหตุ: หลอด blank เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และ TBA solution 5 มิลลิลิตร

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยทางด้านคุณภาพเนื้อและไขมันคือ สายพันธุ์ (ไก่เบรส ไก่โรดไอแลนด์เรด และไก่แม่ฮ่องสอน) และเพศ (เพศผู้ และเพศเมีย) ตามแผนการทดลองแบบ 3x2 factorial in CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's W-Procedure โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS for Window (SAS, 1990)

3.7 สถานที่ทำการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการกลางคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

3.8 ระยะเวลาในการทำวิจัย

18 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved