บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1.1 เครื่องมือ

ชื่อเครื่องมือ	โมเดล	บริษัท	ประเทศ
1. Balance (4 decimals)	CP2245	Sartorius	Germany
2. Distillation unit	K314	Buchi	Switzerland
3. Digestion unit	K424	Buchi	Switzerland
4. Fiber analysis apparatus	EV 26	Gerhardt	Germany
5. Kjeldahl distillation apparatus	K 26	Gerhardt	Germany
6. Oven	DEV	Heraeus	Germany
7. PH-meter	913	Knick	Germany
8. Spectrophotometer	DU7500	Beckman	Germany
9. Soxhlet apparatus	-	Gerhardt	Germany
10. Virtex mixer	G-560E	Scientific Industries	USA.
11. Waterbath	-	W. Krannich	Germany

3.1.2 ชื่ออุปกรณ์

ชื่ออุปกรณ์	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. Buchner Funnels	127-2a	Haldenwanger	Germany
5. Centrifuge	Megafuge 1.0	Hereous	Germany
6. Crucible	109-3	Haldenwanger	Germany
7. Cylinder No. 50, 100 ml.	No.3022	Pyrex	USA.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8. Desiccator	GL32	Glaswerk Wertheim	Germany
9. Erlenmeyer flask No. 250 ml.	No.4980	Pyrex	USA.
10. Micropipette 10-100 µl	p65602	Genex Beta	Germany
11. Micropipette 100-1000 µl	704180	Brand	Germany
12. Porcelain crucible	101/50	HCT	Germany
13. Round bottom 100 ml.	-	Schott	Germany
14. Testtube 10 ml.	No.9825	Pyrex	USA.
15. Testtube 100 ml.	-	Pyrex	USA.
16. Volumetric Flask 50 ml.	-	Schott	Germany
17. Volumetric Flask 100 ml.	-	Schott	Germany
18. Volumetric Flask 250 ml.	-	Schott	Germany
19. Volumetric Flask 1000 ml.	-	Schott	Germany
20. Volumetric Flask 2000 ml.	-	Schott	Germany
21. Weighing bottle	-	Brand	Germany

3.1.3 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	เกรด	ยี่ห้อ
1. Acetylacetone	Analytical Reagent	Sigma
2. Acetone	Analytical Reagent	Merck
3. Ammonium Acetate	Analytical Reagent	Merck
4. Boric acid	Analytical Reagent	Merck
5. Dextransulphate	Analytical Reagent	Sigma
6. Dichlorometane	Analytical Reagent	Merck
7. Ferricchloridehexahydrate	Analytical Reagent	Merck
8. Glacial Aceticacid	Analytical Reagent	Lab-scan
9. Hidrochloric acid	Analytical Reagent	Merck
10. Isopropanol	Analytical Reagent	Lab-scan
11. Magnesiumchloridehexahydrate	Analytical Reagent	Merck
12. n-heptane	Analytical Reagent	Merck
13. Potassium Hydroxide	Analytical Reagent	Merck

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

14. Selenium mixture	Analytical Reagent	Merck
15. Sodium hydroxide	Analytical Reagent	Merck
16. Sodium metaperiodate	Analytical Reagent	Sigma
17. Sodium methoxide	Analytical Reagent	Sigma
18. Standard Cholesterol	Analytical Reagent	Sigma
19. Sulfuric acid (Conc.)	Analytical Reagent	Merck
20. Triolein	Analytical Reagent	Sigma
21. Uranyl acetate	Analytical Reagent	

3.2 สัตว์ทดลอง อาหารทดลอง และการจัดการ

3.2.1 สัตว์ทดลอง ใช้สุกรคละเพศ แบ่งเป็นเพศเมียจำนวน 84 ตัวและเพศผู้ 84 ตัว ลูกผสม 3 สายพันธุ์ (Duroc × Large white × Landrace) ลูกสุกรหย่านมอายุเฉลี่ยหย่านม 21 วัน สูงสุด 24 วัน จำนวน 168 ตัว มีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นการทดลอง 7.52 $\pm$0.71 kg

3.2.2. ลักษณะคอกทดลอง คอกทดลองเป็นคอกอยู่ในห้องทึบมีการระบายอากาศแบบ Evaporative cooling system ยกพื้นสูง ขนาดคอกแต่ละคอกมีขนาด 1.3×1.5 m^2 ในคอกมีรางอาหารและมีจุ๊บน้ำ 2 หัว พื้นคอกมีลักษณะเป็นลวดถักด้วยพลาสติก ใน 1 ห้องมีจำนวนคอกรวม 12 คอก

3.3.3 ลักษณะการวางคอกทดลอง

T4R1	T5R1
T5R2	T3R2
T7R1	T2R2
T1R2	T6R1
T3R1	T2R1
T4R2	T1R1

T1R4	T5R4
T4R4	T7R4
T2R4	T3R4
T3R3	T6R3
T7R2	T4R3
T6R2	T5R3

T4R5	T6R6
T3R5	T5R6
T6R4	T7R6
T1R3	T2R5
T2R3	T1R5
T7R3	T3R6

T4R6	
T2R6	
T1R6	
T6R5	
T7R5	
T5R5	

3.2.3 การวางแผนการทดลองและการจัดสัตว์เข้าคอกทดลอง

3.3.3.1 การวางแผนการทดลอง วางแผนแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randommized desire, CRD) โดยมีอาหารทดลองเป็นปัจจัยหลัก อาหารที่ใช้ทั้งหมดมี 7 สูตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.3.2 วิธีจัดสัตว์เข้าทดลอง สุ่มลูกสุกรหย่านมอายุ 21 สัปดาห์ จำนวน 168 ตัวลงคอกทดลอง แบ่งการทดลองออกเป็น 7 ทรีทเมนต์ ทรีทเมนต์ละ 24 ตัว จำนวน 6 ซ้ำต่อทรีทเมนต์ โดย 1 คอก คิดเป็น 1 ซ้ำ และสุ่มลูกสุกรเข้าคอกจำนวน 4 ตัวต่อคอก แบ่งเป็นเพศผู้ 2 ตัวและเพศเมีย 2 ตัว

3.2.4 การจัดการด้านอาหาร อาหารที่ใช้ทดลองมี 7 สูตร ดังนี้

สูตรที่1 (T1) :อาหารสูตรมาตรฐานของฟาร์ม (กลุ่มควบคุม) (GON 224 mg/kg)

สูตรที่2 (T2) : อาหารสูตรมาตรฐานของฟาร์ม (GON 224 mg/kg) เสริมแกมมา-โอไรซานอล (GON) 3,000 mg/kg ของอาหาร

สูตรที่3 (T3) : อาหารสูตรมาตรฐานของฟาร์ม (GON 224 mg/kg) เสริมสารสกัดโปรแอนโธไซยานิดิน (PA) 82 mg/kg ของอาหาร

สูตรที่4 (T4) : อาหารสูตรมาตรฐานของฟาร์ม (GON 224 mg/kg) เสริมแกมมา-โอไรซานอล (GON) 100 mg/kg และสารสกัดโปรแอนโธไซยานิดิน (PA) 65 mg/kg ของอาหาร

สูตรที่5 (T5) : อาหารสูตรมาตรฐานของฟาร์มที่ทดแทนรำข้าวด้วยรำข้าวเหนียวก่ำ 2% (GON 540 + PA 204 mg/kg ของอาหาร)

สูตรที่6 (T6) : อาหารสูตรมาตรฐานของฟาร์มที่ทดแทนรำข้าวด้วยรำข้าวเหนียวก่ำ 4% (GON 1,080 + PA 408 mg/kg ของอาหาร)

สูตรที่7 (T7) : อาหารสูตรมาตรฐานของฟาร์มที่ทดแทนรำข้าวด้วยรำข้าวเหนียวก่ำ 6% (GON 1,600 + PA 612 mg/kg ของอาหาร)

หมายเหตุ

1. อาหารสูตรควบคุม คือสูตรอาหารที่ใช้ปกติในฟาร์มที่ทำการทดลองมีรำข้าวขาว 2%

2. การเสริมแกมมา-โอไรซานอลสกัดในอาหารแต่ละสูตรอ้างอิงจากปริมาณที่แนะนำให้ใช้ในคน ในลักษณะให้ผล ช่วยลดโอกาสเกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจ และโรคความดัน ที่ระดับ 450 mg/day (cited by Teltathum, 2004) และการเสริมสารสกัดโปรแอนโธไซยานิดินโดยรวม 250 mg/day อ้างอิงจากระดับที่แนะนำให้ใช้ในคน (Hertog *et al.*, 1993) (วิธีการคำนวณในภาคผนวก ก ข้อที่ 1-2)

3. อาหารทดลองสูตรที่ 4 อ้างอิงจากระดับแกมมา-โอไรซานอลที่แนะนำให้ใช้ในคนปกติ 300 mg/day และโปรแอนโธไซยานิดิน 200 mg/day ในคนน้ำหนัก 70 กก. ดังนั้นสุกร 16 กก. จะได้รับ 100 มก. และ 65 มก./อาหาร 1 กก. ตามลำดับ (วิธีการคำนวณในภาคผนวกที่ ก ข้อที่ 3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การใช้รำในอาหารปกติจะใช้รำข้าวขาว และในสูตรที่มีรำข้าวเหนียวก่ำ จะใช้รำข้าวเหนียวก่ำแทนที่รำข้าวขาว และปรับค่าโภชนะ โดยเฉพาะค่าพลังงานโปรตีน และเยื่อใยใน phase เดียวกันให้มีค่าใกล้เคียงกัน (วิธีการคำนวณในภาคผนวกที่ ก ข้อที่ 4)

ในทุกสูตรมีการแบ่งอาหารออกเป็นช่วงตามมาตรฐานการให้อาหารของฟาร์ม ระบบการให้อาหารของฟาร์มเป็นแบบ Phase Feeding โดยแบ่งเป็นอาหารรหัส 120, 140, 160 และ 200 ตามลำดับ ซึ่งแต่ละรหัสมีการใช้อาหารปริมาณ 5, 8, 8 และ 7.5 กก/ตัว ตามลำดับ ซึ่งอาหารแต่ละรหัสมีวัตถุดิบที่ใช้ ค่าโภชนะและมีระดับความเข้มข้นของสารสกัดโดยรวมโปรแอนโธไซยานิดินและแกมมาโอไรซานอลแตกต่างกัน ดังแสดงใน Table 3.1 การให้อาหารและน้ำให้สุกรกินเต็มที่ (ad libitum) ชั่งอาหารใส่หน้าคอกสุกร โดยชั่งใส่ถังปิดฝา มีการชั่งอาหารในช่วงเวลา 16.30 น. ของทุกวัน เพื่อบันทึกปริมาณอาหารที่สุกรกิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 สูตรอาหารที่ใช้ทดลอง

Table 3.1 Experimental diets and chemical composition of phase 1[a]

Treatment (%)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Feed compostion							
Broken rice	24.895	24.895	24.895	24.895	24.895	23.000	21.000
Dicalciumphosphate	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
Fish meal 62%	6	6	6	6	6	6	6
Full fat soybean 36%	30	30	30	30	30	30	30
Monodicalcium-phosphate 21%	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Limestone	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
Salt	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Tallow	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85
Sweet whey	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
Nuklospray K10	15	15	15	15	15	15	15
Premix[b]	2.505	2.505	2.505	2.505	2.505	2.505	2.505
Gamma-oryzanol	0	0.3	0	0.01	0	0	0
Proanthocyanidin	0	0	0.0082	0.0065	0	0	0
White rice bran	2	2	2	2	0	0	0
Purple rice bran	0	0	0	0	2	4	6
Total weight	100	100	100	100	100	100	100
Chemical composition							
Crude protein	23.24	23.24	23.24	23.24	23.28	23.43	23.58
Crude fat	10.07	10.06	10.06	10.06	10.10	10.37	10.64
Crude fiber	2.38	3.13	3.13	3.13	3.02	3.13	3.24

[a] Calculated feeding 5 kgs per pig, around 10 days

[b] Premix contained vitamins and minerals; 20% iron sulfate 0.07 kg diet.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 3.1 Experimental diets and chemical composition of phase 2 (continued)[a]

Treatment	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Feed compostion							
Broken rice	36.198	36.198	36.198	36.198	36.198	34	32
Corn	3	3	3	3	3	3	3
Dicalciumphosphate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Fish meal 62%	5	5	5	5	5	5	5
Full fat soybean 36%	35	35	35	35	35	35	35
Soybean meal 44%	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
Monodicalcium-phosphate 21%	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
Limestone	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Salt	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Tallow	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2
Molasses	1	1	1	1	1	1	1
Sweet whey	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Nuklospray K10	5	5	5	5	5	5	5
Premix	2.4025	2.4025	2.4025	2.4025	2.4025	2.4025	2.4025
Gamma-oryzanol	0	0.3	0	0.01	0	0	0
Proanthocyanidin	0	0	0.0082	0.0065	0	0	0
White rice bran	2	2	2	2	0	0	0
Purple rice bran	0	0	0	0	2	4	6
Total weight	100	100	100	100	100	100	100
Chemical composition							
Crude protein	21.87	21.87	21.87	21.87	21.91	22.06	22
Crude fat	10.28	10.28	10.28	10.28	10.31	10.58	10.85
Crude fiber	3.28	3.28	3.28	3.28	3.18	3.28	3.39

[a] Calculated feeding 8 kgs per pig, around 14 days

[b] Premix contained vitamins and minerals; 20% iron sulfate 0.035 kg diet.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 3.1 Experimental diets and chemical composition of phase 3 (continued)[a]

Treatment	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Feed composition							
Broken rice	32.7	32.7	32.7	32.7	32.7	32.7	30.7
Corn	10	10	10	10	10	10	10
Cassava	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1
Dicalciumphosphate	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Fish meal 62%	5	5	5	5	5	5	5
Full fat soybean 36%	35	35	35	35	35	35	35
Monodicalcium-phosphate 21%	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
Limestone	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
Salt	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Tallow	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Sweet whay	2	2	2	2	2	2	2
Nuklospray K10	1	1	1	1	1	1	1
Premix	2.55	2.55	2.55	2.55	2.55	2.55	2.55
Gamma-oryzanol	0	0.3	0	0.01	0	0	0
Proanthocyanidin	0	0	0.0082	0.0065	0	0	0
Wheat bran	2	2	2	2	2	0	0
White rice bran	2	2	2	2	0	0	0
Purple rice bran	0	0	0	0	2	4	6
Total weight	100	100	100	100	100	100	100
Chemical composition							
Crude protein	20.41	20.41	20.41	20.41	20.45	20.59	20.74
Crude fat	9.76	9.75	9.76	9.75	9.79	9.90	9.92
Crude fiber	3.28	3.28	3.28	3.28	3.18	3.28	3.39

[a] Calculated feeding 8 kgs per pig, around 14 days.

[b] Premix contained vitamins and minerals; 20% iron sulfate 0.035 kg diet.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 3.1 Experimental diets and chemical composition of phase 4 (continued)[a]

Treatment	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Feed composition							
Broken rice	5	5	5	5	5	5	5
Corn	46.3	46.3	46.3	46.3	46.3	46.3	46.3
Cassava	3.58	3.58	3.58	3.58	3.58	3.58	3.58
Fish meal 62%	5	5	5	5	5	5	5
Full fat soybean 36%	10	10	10	10	10	10	10
Soybean meal	18.5	18.5	18.5	18.5	18.5	18.5	18.5
Monodicalcium-phosphate 21%	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95
Limestone	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Salt	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Tallow	2	2	2	2	2	2	2
Premix	1.22	1.22	1.22	1.22	1.22	1.22	1.22
Gamma-oryzanol	0	0.3	0	0.01	0	0	0
Proanthocyanidin	0	0	0.0082	0.0065	0	0	0
Wheat bran	2	2	2	2	2	2	0
White rice bran	4	4	4	4	2	0	0
Purple rice bran	0	0	0	0	2	4	6
Total weight	100	100	100	100	100	100	100
Chemical composition							
Crude protein	19.60	19.59	19.60	19.59	19.64	19.68	19.73
Crude fat	6.46	6.46	6.46	6.46	6.49	6.56	6.67
Crude fiber	3.73	3.73	3.73	3.73	3.62	3.73	3.83

[a]Calculated feeding 7.5 kgs per pig, around 5 days.

[b] Premix contained vitamins and minerals; 20% iron sulfate 0.035 kg diet.[a] from calculation.

Abbreviations used: Control, farm standard diet (T1) ; GON, farm standard diet with 3,000 mg/kg gamma-oryzanol (T2) ; PA, farm standard diet with 82 mg/kg proanthocyanidin (T3) , GON+PA, farm standard diet with 100 mg/kg gamma-oryzanol and 65 mg/kg proanthocyanidin (T4) ; and 2 (T5) , 4 (T6) , 6% (T7) PRB were farm standard diet supplemented with 2, 4, 6% purple rice bran, respectively.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การบันทึกข้อมูลและการเก็บตัวอย่าง

3.4.1 บันทึกปริมาณอาหารที่สุกรกิน บันทึกอาหารที่สุกรกินรายวัน โดยชั่งน้ำหนักอาหารที่เหลือรายวันที่เวลา 16.30 น. ของทุกวัน และมีการใส่อาหารเพิ่มไว้ในปริมาณที่เท่ากันทุกวันจากนั้นทำการบันทึกและคำนวณการกินอาหารรายคอกและรายตัวเฉลี่ย ตามลำดับ ปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ยรายวันคิดจากสูตร

ปริมาณอาหารที่สุกรกินแต่ละวัน(กรัม/ตัว/วัน) = ปริมาณอาหารที่ให้ – ปริมาณอาหารที่เหลือ
จำนวนตัวสุกร

3.4.2 ชั่งน้ำหนักสุกรรายตัว ทำการชั่งน้ำหนักสุกรรายตัวรายคอกทุกสัปดาห์ ตั้งแต่อายุครบ 4, 5, 6, 7, 8, และ 9 สัปดาห์ตามลำดับ โดยมีการชั่งน้ำหนักในวันจันทร์และวันศุกร์ของทุกสัปดาห์ ขึ้นกับวันเริ่มต้นที่นำสุกรเข้าคอกทดลอง โดยสุกรที่เข้าวันจันทร์จะชั่งน้ำหนักรายสัปดาห์ในวันจันทร์ถัดไป และสุกรที่เข้าวันศุกร์จะชั่งน้ำหนักรายสัปดาห์ในวันศุกร์ถัดไป

3.4.3 การเก็บตัวอย่างอาหารเพื่อวิเคราะห์ ทำการเก็บตัวอย่างอาหารจากช่วงการผลิตอาหารในแต่ละครั้งที่มีการผลิตอาหาร สูตรละ 1 ตัวอย่าง และเก็บช่วงที่มีการเลี้ยงไปแล้ว (เก็บในคอก) 3 วัน มาเพื่อทำการวิเคราะห์ค่าโภชนะ

3.5 การศึกษาสมรรถภาพการผลิต

3.5.1 วัดปริมาณอาหารทั้งหมดที่สุกรกิน (total feed intake, TFI) ปริมาณอาหารทั้งหมดที่กินจะมีการบันทึกการใช้อาหารรายวัน รายคอก จากนั้นนำปริมาณอาหารที่ใช้ในคอกนั้นๆ มารวมกันใน 1 สัปดาห์ของการเลี้ยง

3.5.2 วัดปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ยต่อวัน (average daily feed intake, ADFI) คิดปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ยต่อตัวต่อวัน โดยนำปริมาณอาหารที่สุกรกินทั้งหมดตลอดสัปดาห์ มาหาค่าเฉลี่ยจะได้ตัวเลขปริมาณอาหารที่กินในแต่ละสัปดาห์แต่ละอายุของการเลี้ยง ตามสูตร

ปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ยต่อตัว = จำนวนอาหารที่กินสะสมใน 1 สัปดาห์
จำนวนสุกรในคอก

ปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ยต่อวัน = ปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ยต่อตัว
จำนวนวันใน 1 สัปดาห์(7 วัน)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.3 วัดน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นทั้งหมด (total weight gain, TWG) นำน้ำหนักตัวที่ชั่งครั้งแรกเมื่อเริ่มเข้าสู่การทดลองของสุกรแต่ละตัว ไปลบออกจากน้ำหนักตัวที่ชั่งครั้งสุดท้ายในแต่ละสัปดาห์จนสิ้นสุดการทดลอง โดยแบ่งคิดน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเป็นสัปดาห์ ซึ่งบ่งบอกน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นในแต่ละอายุ

3.5.4 วัดอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (average daily gain, ADG) นำน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นของสุกรแต่ละตัวไปหารด้วยจำนวนวันเลี้ยง จะได้ค่าเฉลี่ย ดังแสดงในสูตร

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (กรัม/วัน)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{จำนวนวันเลี้ยง (วัน)}}$$

3.5.5 วัดอัตราการเปลี่ยนอาหารหรืออัตราแลกเนื้อ (feed conversion ratio, FCR) นำปริมาณอาหารที่กินทั้งหมดของสุกรแต่ละตัว ตั้งแต่เริ่มการทดลองจนสิ้นสุดการทดลองหารด้วยน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในสูตร

$$\text{อัตราการเปลี่ยนอาหาร} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กิน(กก.)}}{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น(กก.)}}$$

3.6 การวัดปริมาณโคเลสเตอรอลโดยรวม โคเลสเตอรอลชนิดความแน่นสูงและไตรกลีเซออไรด์

3.6.1 การเก็บตัวอย่างเลือด เก็บตัวอย่างเลือดของลูกสุกรทุกสัปดาห์ โดยเก็บจำนวน 2 ตัวต่อคอก เก็บเลือดจากเส้นเลือด Jugular vein ในส่วนคอของลูกสุกร ติดกับหลอดอาหาร (trachea) โดยเก็บปริมาณ 5 cc. ต่อตัวต่อครั้งของการเก็บ เข็มที่ใช้ในการเก็บเบอร์ 21G. ความยาว 1 นิ้ว ตัวอย่างเลือดที่ได้จะเก็บในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) แล้วปิดฝาเก็บในถังน้ำแข็ง ทำการปั่นเลือดโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge) ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที จากนั้นทำการเก็บซีรั่มใส่ใน vial แล้วรักษาไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ -20°C เพื่อรอวิเคราะห์ต่อไป การเก็บตัวอย่างจะเก็บในสุกรตัวเดิมในทุกสัปดาห์ของการเลี้ยงและเก็บทุกซ้ำ ซ้ำละ 2 ตัว คิดเป็นจำนวน 12 ตัวต่อทรีทเมนต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6.2 การวัดปริมาณโคเลสเตอรอล (ดัดแปลงจาก Jung, 1975)

หลักการ

เติม Ferric acetate/uranyl acetate/acetic acid ลงในซีรั่ม Acetic acid จะตกตะกอนโปรตีน Uranyl acetate ช่วยให้การตกตะกอนโปรตีนสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และยังกำจัดบิลิรูบินโดยทำให้บิลลิรูบินตกตะกอนร่วมไปกับโปรตีน ส่วนน้ำกรองซึ่งมีโคเลสเตอรอลละลายอยู่มนกรดอะซิติค พร้อมทั้งมีเฟอริคอิออนอยู่ด้วยจะทำปฏิกิริยากับกรดกำมะถันเกิดสารประกอบสีม่วง ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 560 นาโนเมตร Ferrous sulfate ซึ่งละลายอยู่ใน Sulfuric acid reagent ช่วยให้สีที่เกิดมีความเข้มข้นสูงขึ้นและคงตัวอยู่ได้นานขึ้น

สารเคมี

1. Ferric acetate/uranyl acetate reagent
2. Sulfuric acid reagent
3. Standard Cholesterol (200 mg./100 ml.)

วิธีการ

1. เตรียมหลอดทดลองขนาด 13× 100 mm. สำหรับ Standard และ unknown
2. เติม Standard cholesterol 0.05 ml. ลงในหลอด Standard และ ซีรั่ม 0.05 ml. ลงในหลอด unknown
3. เติม Ferric acetate/uranyl acetate หลอดละ 5 ml.
4. เขย่าอย่างแรงให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที
5. เตรียมหลอดอ่านขนาด 13× 100 mm. สำหรับ Blank Standard และ unknown
6. ใส่ Sulfuric acid reagent ลงในหลอดทั้งสาม หลอดละ 1.5 ml.
7. Overlayer หลอด Standard ด้วย Supernate จากหลอด Standard 2 ml.
   Overlayer หลอด Unknown ด้วย Supernate จากหลอด Unknown 2 ml.
   Overlayer หลอด Blank ด้วย Supernate จากหลอด Unknown 2 ml.
8. ผสมให้เข้ากันทันทีด้วย Vortex mixer (อย่างน้อย 20 วินาที) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที
9. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 nm. โดยใช้หลอด Blank อ่าน 0 สีที่เกิดมีความคงตัวอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณ

$$\textbf{Total cholesterol} = \frac{Au}{As} \times 200 \text{ มก./ดล. ซีรั่ม}$$

Au หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (unknown)

As หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของ Standard cholesterol

3.6.3 การวัดปริมาณโคเลสเตอรอลชนิดความหนาแน่นสูง (Fineley *et al.*, 1978)

หลักการ

LDL และ VLDL ในซีรั่มจะตกตะกอนไปกับ sulphate polysaccharide ที่ pH เป็นกลาง และมี Mg++ อยู่ด้วย ปั่นแยกตะกอน นำส่วนใสมาหาปริมาณโคเลสเตอรอล

สารเคมีใช้ตกตะกอน

1. Dextran SO_4, Na salt (500,000 M.W) 0.02 mmol/L
2. $MgCl_2.4H_2O$ 1,000 mmol/L

วิธีการ

1. ดูดซีรั่ม 250 µl ใส่ในหลอด
2. ดูดน้ำยาตกตะกอน 25 µl ใส่ลงไป ผสมให้เข้ากันอย่างแรง ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
3. ปั่นที่ความเร็ว 1,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที
4. ดูดส่วนใส มาทำการหาปริมาณโคเลสเตอรอลต่อไป

การคำนวณ

HDL-C = Cholesterol ที่ตรวจวัดได้ × 1.10

(1.10 ได้มาจาก dilution factor ของซีรั่ม 250 µl ที่ถูกเจือจางเป็นปริมาตรทั้งหมด 275 µl)

3.6.4 การวัดปริมาณไตรกลีเซอไรด์ (Foster *et al.*, 1973)

หลักการ

สกัดไตรกลีเซอไรด์ด้วยสารละลายผสมของ Isopropanol กับ Heptane โดยมีกรดกำมะถันอยู่ด้วย ไตรกลีเซอไรด์จะออกมาอยู่ในชั้นของ heptane เมื่อนำมา Saponify ให้เป็นกลีเซอรอล และออกซิไดซ์ต่อให้ฟอร์มาลดีไฮด์ แล้วจึงหาปริมาณโดยใช้ปฏิกิริยาของ Hantzsch

สารเคมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. Heptane

2. Isopropanol

3. Sulfuric acid 40 mmol/l

4. Sodium alkoxide reagent 28 mmol/l

5. Sodium metaperiodate reagent 3 mmol/l

6. Acetylacetone solution 73 mmol/l

7. Stock triglyceride standard solution

8. Working triglyceride standard solution

วิธีการ

1. label หลอด 7 หลอด คือ Blank, Control, Unknown, Standard triglyceride 50, 100, 200, 300 และ 400 ตามลำดับ

2. เติมน้ำกลั่น 0.5 ml ในหลอด Standard ทั้ง 5 หลอดและหลอด Blank

3. เติม Working triglyceride standard solution ในหลอด standard หลอดละ 0.5 ml.

4. หลอด Control และ Unknown เติมตัวอย่าง 0.5 ml.

5. เติม heptane ทุกหลอด หลอดละ 2 ml.

6. เติม Isopropanol 3.5 ml. ในหลอด blank, control และ unknown

7. เติม Isopropanol 3.0 ml. ในหลอด standard

8. เติม Sulfuric acid 40 mmol/l จำนวน 1 ml. ลงในแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture นาน 20 วินาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

9. เตรียมหลอดใหม่อีก 7 หลอด เติม sodium alkoxide reagent ในแต่ละหลอด หลอดละ 2 ml. ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนที่ได้จากข้อ 8 มาเติมในแต่ละหลอด หลอดละ 0.2 ml. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture นำไปแช่ใน water bath อุณหภูมิ 60°C นาน 5 นาที

10. เติม Sodium metaperiodate reagent หลอดละ 1 ml. ผสมให้เข้ากัน

11. เติม Acetylacetone solution 1 ml. ในแต่ละหลอดและผสมให้เข้ากัน ด้วย vortex mixture นำไปแช่ใน water bath อุณหภูมิ 60°C นาน 20 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.7 การศึกษาความสูงของวิลไลในลำไส้เล็ก

3.7.1 การเก็บตัวอย่าง สุ่มสุกรที่ใช้ในการทดลอง ครั้งละ 7 ตัว ในแต่ละสูตรอาหาร สูตรละ 1 ตัว โดยสุ่มหลังจากสุกรหย่านมมาแล้ว 5, 7, 14 และ 35 วัน ดังนั้น ใช้สุกรทั้งหมด 28 ตัว ชั่งน้ำหนักสุกรก่อนสุ่มแล้วบันทึก

3.7.2 วิธีการเก็บตัวอย่าง ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างแบ่งได้ตามลำดับขั้นดังนี้ (Mekbungwan *et al.*, 2004)

1. ทำให้ตายอย่างสงบ (Euthanasia)
2. ล้างซากสุกรด้วยน้ำสะอาด
3. เตรียมอุปกรณ์ในการผ่าซาก
4. ทำการเปิดผ่าช่องท้อง
5. ทำการพลิกเอาพวงลำไส้หลบออกเพื่อหาส่วน Duodenum
6. เก็บลำไส้เล็กส่วน Duodenum
7. เก็บลำไส้เล็กส่วน Ileum
8. เก็บลำไส้เล็กส่วน Jejunum
9. เก็บลำไส้เล็กทั้ง 3 ส่วนไว้ในน้ำยาคงสภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.7.3 วิธีการเตรียมสไลด์เพื่อวัดความสูงของวิลไล (Mekbungwan *et al.*, 2004)

1. ตัดแบ่งลำไส้แต่ละส่วนแล้วล้างทำความสะอาดภายในท่อลำไส้ด้วยน้ำกลั่น

↓

2. ตัดแต่งลำไส้ให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาดประมาณ 1*2 ซม.

↓

3. เก็บตัวอย่างไว้ในน้ำยาคงสภาพ (Bouin's solution)

↓

4. ตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อให้มีขนาดประมาณ 1*2*0.5 ซม. แล้วนำใส่ในตลับ

↓

5. Dehydrate เนื้อเยื่อในตลับ ด้วยแอลกอฮอลล์ความเข้มข้นต่างๆ นาน 12 ชั่วโมง

↓

6. ทำการ Embedding ด้วยเครื่อง Embedding

↓

7. เทเจลาตินลงในตลับ แล้วนำไปผ่านน้ำแข็งให้ตลับแข็ง

↓

8. ตัดทำ section ด้วยเครื่อง Rotary microtome ให้มีความหนาประมาณ 5 ไมครอน

↓

9. นำเนื้อเยื่อที่ตัดได้ติดลงบนแผ่นสไลด์ นำไปวางลงบน Hot plate (55-60 ^{o}C) 24 ชม.

↓

10. ย้อมสี Hematoxylene และ Eosin

↓

11. ทำการ mounting (หยด permount) และปิดด้วยแก้วปิดสไลด์ ทิ้งให้แห้ง 1 คืน

↓

12. นำไปหาค่าความยาวของวิลไลด้วยกล้องจุลทรรศน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.7.4 วิธีการวัดความสูงและพื้นที่ของวิลไล วัดความสูงของวิลไล โดยทำการถ่ายรูปสไลด์ที่ได้จาก 3.7.3 ในแต่ละส่วนและแต่ละช่วงอายุ จากนั้นทำการวัดโดยใช้ โปรแกรม Adobe Acrobat 6.0 Professionnal ซึ่งในโปรแกรมที่ใช้วัดจะมีการเทียบหน่วยการวัดจากสเกลมาตรฐานโดยทั่วไปทุกครั้งที่มีการวัด การวัดจะวัดความสูงจากส่วนฐานเริ่มจาก crypts ไปยังยอดของวิลไล ทำการวัดความสูงของวิลไลในแต่ละส่วนของลำไส้ ส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนปลาย จำนวน 30 ตัวอย่างในแต่ละส่วน หน่วยที่ใช้ในการวัดวิลไลเป็น ไมโครเมตร การวัดพื้นที่จะวัดโดยวัดจากฐานขึ้นสู่ยอดเป็นลักษณะ 3 เหลี่ยม

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ วิเคราะห์ความแปรปรวนตามแผนการทดลองและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

3.8.1 ความสูงและพื้นที่ผิวของวิลไลรวมทั้งสมรรถภาพการผลิตด้วยวิธี Duncan 's new multiple range test

3.8.2 ระดับโคเลสเตอรอล โคเลสเตอรอลชนิดความหนาแน่นสูง และไตรกลีเซอไรด์ Transform ข้อมูลด้วย Square roots และวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธี Least square mean

3.9 สถานที่ทำการวิจัย

1. กิตติวัฒน์ฟาร์ม อ. สันทราย จ. เชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4. ห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.10 ระยะเวลาทำการวิจัย

ระยะเวลาทั้งหมด 12 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved