

### บทที่ 3

#### อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

##### 1. อุปกรณ์การทดลอง

###### 1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

ชื่อเครื่องมือ	โมเดล	บริษัท	ประเทศ
1. เครื่องชั่งไฟฟ้า (เทคนิค 4 ตำแหน่ง)	2842	Sarorius GmbH	สหพันธ์รัฐเยอรมัน
2. เครื่องเหวี่ยง	Megafuge	Heraeus	สหพันธ์รัฐเยอรมัน
3. ตู้อบ	DEV	Heraeus	สหพันธ์รัฐเยอรมัน
4. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ	109	Haldenwanger	สหพันธ์รัฐเยอรมัน
5. โถดูดความชื้น	GL 32	Glaswerk Wertheim	สหพันธ์รัฐเยอรมัน
6. หลอดทดลอง 2 มล.	-	Pyrex	สหรัฐอเมริกา
7. เตาต้มไฟฟ้า (Hot plate )	-	Gerhardt	สหพันธ์รัฐเยอรมัน
8. บีกเกอร์ ขนาด 50 ,100, 150 มล.	No.1000	Pyrex	สหรัฐอเมริกา
9. บีกเกอร์ ขนาด 200 มล.	No.1005	Pyrex	สหรัฐอเมริกา
10.ปิเปต ขนาด 1 , 2, 3, 4 , 5 ,10 50 และ 100 มล.	-	Volac	สหรัฐอเมริกา
11.วอลูเมตริก ฟลาสก์			
ขนาด 10 ,50 มล.	NS 12/12	SCHOTT	สหพันธ์รัฐเยอรมัน
ขนาด 100, 150 , 250 มล.	NS 14/23	SCHOTT	สหพันธ์รัฐเยอรมัน
12. กรวยแก้ว	-	Haldenwanger	สหพันธ์รัฐเยอรมัน
13. กระบอกตวงขนาด 50 และ 100 มล.	No.3022	Pyrex	สหรัฐอเมริกา
14. เครื่องชั่งน้ำหนัก	No.161840	Berkel	ไทย
15. หลอดทดลอง 1.2*10 <sup>3</sup>	No.9820	Pyrex	สหรัฐอเมริกา
16. ฟลาสก์ก้นกลมขนาด 50 มล.	-	Pyrex	สหรัฐอเมริกา
17. ตู้แช่แข็ง	-	-	สหพันธ์รัฐเยอรมัน
18. เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer	-	Perkin Elmer	สหรัฐอเมริกา

## 1.2 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	เกรด	ยี่ห้อ
1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น ( $H_2SO_4$ )	Analytical reagent	Merck
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	Analytical reagent	Merck
3. กรดไนตริก ( $HNO_3$ ) 70 %	Analytical reagent	Merck
4. น้ำกลั่น	Deionized	-
5. กรดเปอร์คลอริก ( $HClO_4$ )	Analytical reagent	Merck
6. แอมโมเนีย ( $NH_3$ ) 10 %	Analytical reagent	Merck
7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	Analytical reagent	Merck
8. โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (Sodium borohydride)	Analytical reagent	Fluka
9. ธาตุซีลีเนียมบริสุทธิ์ (Pure selenium 99.9 %)	Analytical reagent	Aldrich
10. สารซีลีเนียมคีเลต (Selenoglycine)	Analytical reagent	Adscodrug

## 1.3 สัตว์ทดลอง

คัดเลือกสุกรลูกผสมสายพันธุ์ (ลาร์จไวท์ x แลนด์เรซ x ดุรอก) จำนวน 48 ตัว (เพศผู้ 24 ตัว เพศเมีย 24 ตัว) น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 30 กิโลกรัม แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 สุกรลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปที่ไม่เสริมด้วยซีลีเนียมคีเลต (มีซีลีเนียม 0 ppm.)

กลุ่มที่ 2 สุกรลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปเสริมด้วยซีลีเนียมคีเลต (มีซีลีเนียม 0.15 ppm.)

กลุ่มที่ 3 สุกรลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปเสริมด้วยซีลีเนียมคีเลต (มีซีลีเนียม 0.30 ppm.)

กลุ่มที่ 4 สุกรลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปเสริมด้วยซีลีเนียมคีเลต (มีซีลีเนียม 0.60 ppm.)

## 1.4 คอกทดลอง

ภายในโรงเรียนสุกรทดลอง มีคอกย่อย 24 คอก แต่ละคอกมีขนาด 2 x 3 เมตรเท่ากัน ภายในคอกประกอบด้วยรางอาหาร และมีจ๊อบน้ำดื่มด้านหลังคอกทดลอง

### 1.5 อาหารสุกรทดลอง

สุกรทุกกลุ่มทดลองได้รับอาหารผสมสำเร็จรูปจากบริษัทที่ผลิตเป็นการค้า และนำมาเสริมด้วยซีลีเนียมทีเลต ที่ต่างระดับกัน (4 กลุ่มทดลอง) สูตรอาหารแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ

1.5.1 อาหารสุกรรุ่น (30 – 60 กิโลกรัม) มีโปรตีนไม่ต่ำกว่า 16 %

1.5.2 อาหารสุกรขุน (60 – 100 กิโลกรัม) มีโปรตีนไม่ต่ำกว่า 14 %

สำหรับระดับไขมันและความชื้นของอาหารทดลอง ทั้ง 2 ระยะ ไม่เกิน 12 และ 4 % ตามลำดับ สุกรได้รับอาหารแบบเต็มที (*ad libitum*) และมีน้ำสะอาดดื่มตลอดเวลา ส่วนประกอบของอาหารทดลองดังกล่าว มีดังนี้

#### สูตรอาหารสุกรรุ่น

1. ข้าวโพดป่น
2. รำละเอียด
3. ปลาช้ำ
4. กากถั่วเหลือง
5. ไคแคลเซียมฟอสเฟต
6. เกลือป่น
7. ฟอสฟอรัส
8. ไลซีน
9. เมทไธโอนีน

มีโปรตีนไม่ต่ำกว่า 16 %

มีไขมันไม่เกิน 12 %

มีความชื้นไม่เกิน 4 %

มีเถ้า 3-5 %

#### สูตรอาหารสุกรขุน

1. ข้าวโพดป่น
2. รำละเอียด
3. ปลาช้ำ
4. กากถั่วเหลือง
5. ไคแคลเซียมฟอสเฟต
6. เกลือป่น
7. ฟอสฟอรัส
8. ไลซีน
9. เมทไธโอนีน

มีโปรตีนไม่ต่ำกว่า 14 %

มีไขมันไม่เกิน 12 %

มีความชื้นไม่เกิน 4 %

มีเถ้า 3-5 %

## 2. วิธีการทดลอง

### 2.1 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) (Steel and Torrie, 1980) แบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม (treatment) แต่ละกลุ่มมี 3 ซ้ำ ๆ ละ 4 ตัว ซึ่งแต่ละกลุ่มใช้สุกรจำนวน 12 ตัว รวมใช้สุกรทั้งหมด 48 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 อาหารสำเร็จรูปไม่เสริมซีลีเนียมคีเลต (กลุ่มควบคุม)

กลุ่มที่ 2 อาหารสำเร็จรูปเสริมซีลีเนียม 0.15 ppm.

กลุ่มที่ 3 อาหารสำเร็จรูปเสริมซีลีเนียม 0.30 ppm.

กลุ่มที่ 4 อาหารสำเร็จรูปเสริมซีลีเนียม 0.60 ppm.

### 2.2 การศึกษาสมรรถภาพการผลิต

สุกรน้ำหนักเฉลี่ย 30 กิโลกรัม เลี้ยงในคอกจำนวน 2 ตัวต่อคอก โดยสุกรจะได้รับอาหารสำเร็จรูปที่เสริมซีลีเนียมตามระดับการทดลอง โดยสุกรอาหารแบ่งออกเป็นสุกรระยะรุ่น – ขุน ได้รับอาหารแบบเต็มที่ (*ad libitum*) และมีน้ำสะอาดดื่มตลอดเวลา ให้อาหารสุกรทุกวัน ๆ ละ 2 เวลา คือ เช้า เวลาประมาณ 8.00 น และเย็นเวลาประมาณ 16.00 น ทำการบันทึกอาหารที่ให้และที่เหลือค้างรังทุกวัน เพื่อนำมาคิดค่าปริมาณอาหารที่สัตว์กินได้ ค่าอัตราการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหาร สำหรับการปฏิบัติเลี้ยงดูอื่นๆ กระทำตามหลักการผลิตสุกรโดยทั่วไป (บุญลือ, 2536) ตลอดระยะเวลาการทดลอง ทำการชั่งน้ำหนักสุกรทุก 2 สัปดาห์ เพื่อเปลี่ยนอาหารให้ตรงกับโปรแกรมที่วางไว้ แล้วนำมาคำนวณหาสมรรถภาพการผลิตตามสูตรการคำนวณหาต่าง ๆ ดังสมการที่ 1, 2 และ 3

$$\text{ปริมาณอาหารที่กินต่อวัน} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่สัตว์กินทั้งหมด(กรัม)}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง(วัน)}} \dots\dots\dots(1)$$

(daily feed intake; g/d)

$$\text{การเจริญเติบโตต่อวัน} = \frac{\text{น้ำหนักสิ้นสุด(กรัม) - น้ำหนักเริ่มต้น(กรัม)}}{\text{จำนวนวันทดลอง(วัน)}} \dots\dots\dots(2)$$

(average daily gain; g/d)

$$\text{อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กินได้ทั้งหมด (กิโลกรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่ม (กิโลกรัม)}} \dots\dots\dots(3)$$

(feed conversion ratio)

### 2.3 การศึกษาการสะสมธาตุซีลีเนียมในพลาสมา

ทำการเจาะเลือดสุกรทุกตัว ก่อนเริ่มต้นการทดลอง และหลังจากเริ่มการทดลองทุก 30 วัน ทำการเจาะเลือดสุกรทุกตัวที่เส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) และรีบนำพลาสมานั้นมาเข้าเครื่องเหวี่ยงเพื่อให้ตกตะกอน เอาเม็ดเลือดแดงออก กรองเอาส่วนที่ใสเก็บแช่แข็งไว้จนกว่าจะนำตัวอย่างนั้นมาวิเคราะห์ โดยใช้สาร Trichloroacetic acid; TCA ผสมลงไปเพื่อทำให้โปรตีนตกตะกอนออกมา และจึงนำส่วนที่เหลือไปวิเคราะห์หาธาตุซีลีเนียมด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (AOAC, 1984)

2.4 การศึกษาการสะสมธาตุซีลีเนียมในอวัยวะภายใน (หัวใจ ตับ ปอด และไต) และในเนื้อแดง หลังสิ้นสุดการทดลอง จะทำการฆ่าสุกรทุกตัว และเก็บตัวอย่างอวัยวะภายใน และเนื้อแดงแช่แข็งทันที จนกว่าจะนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ โดยนำตัวอย่างมาหั่นเป็นชิ้นให้ละเอียด และอบให้แห้งที่อุณหภูมิประมาณ 100°C หลังจากนั้นจึงนำไปย่อยแบบเปียก (wet digestion) โดยใช้กรดไนตริก 70 % 8 มล. ผสมกับกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 2 มล. กับทุกตัวอย่าง (โดยใช้ตัวอย่างที่อบแห้งประมาณ 0.2 กรัม / ตัวอย่าง) จนได้สารละลายใสและนำไปเจือจาง (dilute) ด้วยกรดเกลือ 0.5 โมล เพื่อให้ได้สารละลาย 10 มล. จึงนำไปวัดค่าของธาตุซีลีเนียมด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (AOAC, 1984)

### 3. การวิเคราะห์ทางเคมี

วิเคราะห์หาซีลีเนียมในพลาสมา อวัยวะภายใน และเนื้อแดง โดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Atomic Absorption Spectrophotometer (AOAC, 1984) ตามคู่มือการใช้เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer ของชุนชาติ (2545)

#### 3.1 การเตรียม Selenium Standard Stock Solution

ละลายซีลีเนียมผงสีดำ (Black Selenium) ที่มีความบริสุทธิ์ 99.9 % ปริมาณ 0.10 กรัม ลงในกรดไนตริกเข้มข้น 70 % ประมาณ 5 มล. และนำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนซีลีเนียมละลายหมดแล้ว หลังจากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่น และเติมกรดซัลฟูริก 2.5 โมล 20 มล. จนได้สารละลายเท่ากับ 1000 มล. (บรรจุในภาชนะแก้ว)

#### 3.2 การเตรียม Working Solution

โดยการเจือจาง stock solution ด้วยน้ำกลั่นและกรดซัลฟูริก 2.5 โมล เพื่อให้ได้ working solution ที่มีระดับธาตุซีลีเนียมตามต้องการที่คาดว่าจะตรวจพบในตัวอย่างที่ทดลอง

### 3.3 การเตรียมตัวอย่างอวัยวะภายในและเนื้อแดง

นำตัวอย่างที่อบแห้งแล้ว ประมาณ 0.2 กรัม ใส่ลงในขวดแก้วกันกลม แล้วเติมกรดไนตริกเข้มข้น 70 % จำนวน 8 มล. หลังจากนั้นเติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น จำนวน 2 มล. ลงในตัวอย่าง แล้วจึงนำไปย่อยด้วย hot plate หรือ sand bath จนกระทั่งได้สารละลายสีจาง ๆ ระบายเอากรดเปอร์คลอริกออกให้หมดโดยสังเกตจากด้านสีขาจะค่อย ๆ หมดไป หลังจากนั้นจึงนำสารละลายที่ได้ไปเจือจางด้วยกรดเกลือ 0.5 โมลให้ได้เป็นสารละลายทั้งหมด 10 มล. แล้วแบ่งสารละลาย 3 – 4 มล. ไปวัดหาค่าธาตุซีลีเนียมด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer

### 3.4 การเตรียมตัวอย่างพลาสมา

นำพลาสมาที่เหวี่ยงเอาเม็ดเลือดแดงออกไปแล้ว ประมาณ 0.2 มล. มาเติมสาร Trichloroacetic acid (TCA) 10 % ลงในหลอดทดลอง ประมาณ 2 มล. แล้วนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่มีความเร็ว 3,700 รอบ นานประมาณ 10 นาที เพื่อให้โปรตีนตกตะกอน หลังจากนั้นจึงแยกเอาสารละลายใสด้านบน มาเติมแอมโมเนีย ความเข้มข้น 10 % ปริมาณ 0.5 มล. และเขย่าให้สารละลายเท่ากันดีแล้วจึงนำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายทั้งหมด 2 มล. หลังจากนั้นจึงนำไปวัดหาค่าธาตุซีลีเนียม ด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer

## 4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

4.1 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one way analysis of variance) (Steel and Torrie, 1980)

4.2 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significant Difference Test (LSD) (Steel and Torrie, 1980)

4.3 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม Statistical Package for the Social Science for Window (SPSS/FW) (กัลยา, 2542)

## 5. สถานที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

5.1 ฟาร์มสุกรทดลอง คณะสัตวศาสตร์ วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีเชียงใหม่ อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่

5.2 ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

5.3 ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่



## 6. ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2544 ถึง เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2545

ช่วงเวลาที่ปฏิบัติงานวิจัย	การดำเนินงานวิจัย
สิงหาคม 2544 – กุมภาพันธ์ 2545	เสาะสุกรและเก็บข้อมูลเกี่ยวกับสมรรถภาพการผลิต
กุมภาพันธ์ 2545 – เมษายน 2545	วิเคราะห์หาปริมาณธาตุซีลีเนียมในพลาสมา
เมษายน 2545 – สิงหาคม 2545	วิเคราะห์หาปริมาณธาตุซีลีเนียมในอวัยวะภายใน (หัวใจ ตับ ปอด ไต) และ เนื้อแดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
 Copyright © by Chiang Mai University  
 All rights reserved