บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ เครื่องมือ

ชื่ออุปกรณ์ เครื่องมือ	โมเดล	บริษัท	ประเทศ
1. Minolta chroma meter	CR 300	Minolta Camera co., Ltd.	ญี่ปุ่น
2. เครื่อง Gas chromatography	GC – 14B	Shimadzu	ญี่ปุ่น
3. คอลัมน์ Gas chromatography	DB-Wax	J&W	อเมริกา
4. เครื่อง Spectrophotometer	DU 7500	Beckman	อเมริกา
5. เครื่องกลั่นโปรตีน	-	Gerhardt	เยอรมัน
6. เครื่อง Centrifuge	Magafuge 1.0	Heraeus	เยอรมัน
7. เครื่อง Vortex mixer	G-560E	Scientific Industries, Inc.	อเมริกา
8. เครื่องสกัดไขมัน	-	Gerhardt	เยอรมัน
9. water bath	-	W.Krannich	เยอรมัน
10. ตู้อบ oven	DEV	Heraeus	เยอรมัน
11. เตาให้ความร้อน	-	Gehardt	เยอรมัน
12. โถดูดความชื้น	GL32	Glaswerk wertheim	เยอรมัน
13. บีกเกอร์ 50 มล.	No.1000	Pyrex	อเมริกา
14. บีกเกอร์ 100 มล.	No.1000	Pyrex	อเมริกา
15. บีกเกอร์ 500 มล.	No.1000	Pyrex	อเมริกา
16. ขวดก้นกลม 100 มล.	-	Glaswerk wertheim	เยอรมัน
17. ขวดก้นกลม 250 มล.	-	SCHOTT	เยอรมัน
18. Thimble	-	Whatman	อังกฤษ
19. Volumetric flask 50 ml.	-	SCHOTT	เยอรมัน
20. Volumetric flask 100 ml.	-	SCHOTT	เยอรมัน
21. Volumetric flask 1,000 ml.	-	SCHOTT	เยอรมัน
22. หลอดทดลองขนาด 13 x 100 มม.	-	Pyrex	เยอรมัน
24. pH meter	191	Knick	เยอรมัน
25. Conduct-meter	WTW	-	เยอรมัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	เกรด	บริษัท
1. Dichloromethane	Analytical Reagent	Merck
2. Conc.Sulfuric acid	Analytical Reagent	Lab-Scan
3. Selenium mixture	Analytical Reagent	Merck
4. Chloroform	Analytical Reagent	Merck
5. Methanol	Analytical Reagent	Lab-Scan
6. Sodium Hydroxide	Analytical Reagent	Merck
7. 20% Boron trifluoride in methanol	Analytical Reagent	Merck
8. 2,2,4 trimethyl pentane	Analytical Reagent	Lab-Scan
9. Sodium chloride	Analytical Reagent	Merck
10. Sodium sulfate anhydrous	Analytical Reagent	J.T.Baker
11. Ferric chloride	Analytical Reagent	Merck
12. Magnesium chloride	Analytical Reagent	Merck
13. Uranyl acetate	Analytical Reagent	Merck
14. Phosphotungstic acid	Analytical Reagent	Merck
15. n – Heptane	Analytical Reagent	Lab-Scan
16. Propa-2-ol	Analytical Reagent	Lab-Scan
17. Sodium methoxide	Analytical Reagent	Fluka
18. Sodium periodate	Analytical Reagent	Merck
19. Acetyl acetone	Analytical Reagent	Fluka
20. Potassium hydroxide	Analytical Reagent	Merck
21. Petroleum ether	Analytical Reagent	Lan-Scan
22. น้ำกลั่น	-	-
23. Hydrochloric acid	Analytical Reagent	Merck
24. Anti-foaming agent	Analytical Reagent	Fluka
25. Thiobarbituric acid	Analytical Reagent	BDH
26. Glacial acetic acid	Analytical Reagent	J.T.Baker
27. Ammonium acetate	Analytical Reagent	BDH
28. Pure dry cholesterol	Analytical Reagent	Sigma

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 สัตว์ทดลอง และการวางแผนการทดลอง

ใช้ไก่ทดลองทั้งหมดจำนวน 240 ตัว ที่เลี้ยงจากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ ตั้งแต่อายุ 1 วันจนถึง 16 สัปดาห์ โดยได้รับอาหารและน้ำอย่างเต็มที่ (*ad libitum*) อาหารที่ใช้เป็นอาหารสำเร็จรูปทางการค้า โดยแบ่งเป็น 3 ระยะ คือ

ไก่เล็ก ตั้งแต่อายุแรกเกิดจนถึง 6 สัปดาห์ มีระดับโปรตีน 19 เปอร์เซ็นต์

ไก่รุ่น ตั้งแต่อายุ 6-12 สัปดาห์ มีระดับโปรตีน 16 เปอร์เซ็นต์

ไก่สาว ตั้งแต่อายุ 12-16 สัปดาห์ มีระดับโปรตีน 13 เปอร์เซ็นต์

วางแผนการทดลองแบบ 3 x 2 Factorial in CRD แบ่งไก่ออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 80 ตัว แต่ละกลุ่มแบ่งออกเป็นเพศผู้ 40 ตัว และเพศเมีย 40 ตัว ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ไก่พันธุ์เบรส กลุ่มที่ 2 ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ ชี้ฟ้า และกลุ่มที่ 3 ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ ฟ้าหลวง

3.4 การศึกษาคุณภาพซาก

นำไก่ทั้งหมดเข้าฆ่าที่ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อศึกษาคุณภาพซาก โดยการบันทึกคุณภาพซากแบบสากล (สัญชัย, 2547) ประกอบด้วย

3.4.1 น้ำหนักมีชีวิต

3.4.2 น้ำหนักซากอุ่น

3.4.3 น้ำหนักหัว แข้ง ขน เลือด และอวัยวะภายใน

3.4.4 น้ำหนักชิ้นส่วนเนื้อที่ได้จากการชำแหละ

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ซาก (dressing percentage) เปอร์เซ็นต์อวัยวะภายนอก (external organ percentage) เปอร์เซ็นต์อวัยวะภายใน (internal organ percentage) และเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนตัดแต่ง (retail cuts percentage) จากสูตรที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. เปอร์เซ็นต์ซาก (Dressing percentage) = $\left(\frac{\text{น้ำหนักซากเย็น (ไม่มีหัว คอ แข้ง และอวัยวะภายใน)}}{\text{น้ำหนักมีชีวิต}}\right) \times 100$

2. เปอร์เซ็นต์อวัยวะภายนอก (External organ percentage) = $\left(\frac{\text{น้ำหนักอวัยวะภายนอก}}{\text{น้ำหนักมีชีวิต}}\right) \times 100$

3. เปอร์เซ็นต์อวัยวะภายใน (Internal organ percentage) $= \left(\frac{\text{น้ำหนักอวัยวะภายใน}}{\text{น้ำหนักมีชีวิต}} \right) \times 100$

4. เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนตัดแต่ง (Retail cuts percentage) $= \left(\frac{\text{น้ำหนักชิ้นส่วนตัดแต่ง}}{\text{น้ำหนักซากเย็น}} \right) \times 100$

หมายเหตุ: น้ำหนักมีชีวิต หมายถึง น้ำหนักตัวของไก่หลังจากอดอาหารเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

น้ำหนักซากเย็น หมายถึง น้ำหนักซากที่ผ่านการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 45 นาที

3.5 การศึกษาคุณภาพเนื้อ

3.5.1 การวัดค่าความเป็นกรด เป็นด่างของกล้ามเนื้อ (muscle pH measurement)

วัดค่า pH ของกล้ามเนื้ออก (*P. major*) และกล้ามเนื้อสะโพก (*P. minor*) จากซากไก่หลังฆ่านาน 45 นาที และ 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง pH – meter (Model 191, Knick, D – Berlin) และบันทึกค่า pH

3.5.2 การวัดค่าการนำไฟฟ้า (conductivity value)

วัดค่าการนำไฟฟ้าของกล้ามเนื้ออก (*P. major*) และกล้ามเนื้อสะโพก (*P. minor*) จากซากไก่หลังฆ่านาน 45 นาที และ 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง conduct – meter (Model WTW, Germany) และบันทึกค่าการนำไฟฟ้า

3.5.3 สีของเนื้อ และสีของหนัง (meat and skin color)

แยกกล้ามเนื้ออก (*P. major*) และกล้ามเนื้อสะโพก (*P. minor*) ใส่ถุงพลาสติกผนึกปากถุง เก็บที่ 4° C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อออกจากถุงวางในภาชนะ เก็บในตู้เย็น 1 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าสีด้วยเครื่อง Minolta Chroma Meter (Model CR – 300, Minolta Camera Co., LTD., Osaka, Japan) บันทึกค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*) และค่าสีเหลือง-น้ำเงิน (b*)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.4 ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ (water holding capacity)

3.5.4.1 การสูญเสียน้ำ (drip loss)

ใช้กล้ามเนื้ออก และกล้ามเนื้อสะโพก หลังฆ่านาน 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักเริ่มต้น (Wd_1) ประมาณ 50-60 กรัม ห่อด้วยผ้าก๊อสเก็บในถุงพลาสติกชนิดเย็น และให้ชิ้นเนื้อห่างจากก้นถุงประมาณ 2 เซนติเมตร ผนึกปากถุงให้สนิท เก็บในตู้เย็นลักษณะแขวนที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ชั่งน้ำหนัก (Wd_2) คิดเป็นเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำ (drip loss) จากสูตร 5

5. Drip loss (%) $= \left(\frac{Wd_1 - Wd_2}{Wd_1} \right) \times 100$

3.5.4.2 การสูญเสียน้ำจากการทำละลายน้ำแข็ง (thawing loss) **และการสูญเสียน้ำจากการประกอบอาหาร** (cooking loss)

ใช้กล้ามเนื้ออก และ กล้ามเนื้อสะโพก หลังฆ่านาน 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักเริ่มต้น (Wt_1) ประมาณ 50-60 กรัม เก็บแบบสุญญากาศ (vacuum) ในถุงพลาสติกชนิดเย็นผนึกปากถุงให้สนิท เก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ –20 °C ประมาณ 1 สัปดาห์ จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาละลายน้ำแข็ง (thawing) ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ซับให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก (Wt_2) จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ได้เก็บในถุงร้อนแบบสุญญากาศ ต้มในหม้อต้มควบคุมอุณหภูมิ (Korimat) โดยอุณหภูมิน้ำเท่ากับ 80 °C ต้มจนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อ ประมาณ 71-72 °C ใช้เวลาประมาณ 15-16 นาที ผึ่งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ซับน้ำให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก (Wt_3) คำนวนเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำขณะทำละลาย (thawing loss) และเปอร์เซ็นต์การสูญเสียขณะประกอบอาหาร (cooking loss) จากสูตร 6 และ 7 ตามลำดับ

6. Thawing loss (%) $= \left(\frac{Wt_1 - Wt_2}{Wt_1} \right) \times 100$

7. Cooking loss (%) $= \left(\frac{Wt_2 - Wt_3}{Wt_2} \right) \times 100$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.4.3 ค่าการสูญเสียขณะปิ้งย่าง (grilling loss)

ใช้กล้ามเนื้อออก และ กล้ามเนื้อสะโพก หลังจากตัดแต่งไขมันและพังผืดออก ชั่งน้ำหนัก (Wg_1) ประมาณ 50-60 กรัม จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ได้ใส่ลงในหม้ออบให้ความร้อน (convection oven) ที่อุณหภูมิ 160 °C เวลา 10 นาที จนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อประมาณ 70 °C และนำออกจากหม้ออบ ทำการชั่งน้ำหนัก (Wg_2) คำนวณเปอร์เซ็นต์การสูญเสียขณะปิ้งย่าง จากสูตร (8)

8. Grilling loss (%) $= \left(\frac{Wg_1 - Wg_2}{Wg_1} \right) \times 100$

3.5.5 วิธีการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี (chemical composition)

นำตัวอย่างกล้ามเนื้อออกและสะโพกบดด้วยเครื่องปั่น (blender) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนะ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ความชื้น โปรตีน และไขมัน ด้วยวิธี proximate analysis (AOAC, 1995)

3.5.5.1 การวิเคราะห์หาโปรตีน (Protein analysis)

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดแล้ว 0.5 กรัม ใส่ในกระดาษชั่งตัวอย่าง แล้วนำไปใส่ใน kjeldahl flask
2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา 2 กรัม (K_2SO_4 : $CuSO_4$; 20 : 1) แล้วเติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น (conc. Sulfuric acid) จำนวน 15 มิลลิลิตร
3. นำ kjeldahl flask เข้าเครื่องย่อยที่อุณหภูมิ 420 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนกระทั่งได้สารละลายสีเขียวใส แล้วทิ้งให้เย็นเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
4. ตวงสารละลาย 4% boric acid 25 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติม screen methylred indicator
5. นำ kjeldahl flask (จากข้อ 3) เข้าเครื่องกลั่นแล้วนำขวด erlenmeyer flask ที่ใส่สารละลาย 4% boric acid (จากข้อ 4) ต่อเข้ากับอีกปลายด้านหนึ่งของ condenser ของเครื่องกลั่น โดยให้ปลายท่อจุ่มลงในสารละลาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. เติม 40% sodium hydroxide ใส่ขวด kjeldahl flask 50 มิลลิลิตร แล้วเปิดน้ำให้ไหลผ่านตัว condenser แล้วจึงเปิดเครื่องกลั่น
7. กลั่นจนได้ปริมาตรของสารละลายในขวด erlenmeyer flask ประมาณ 200 มิลลิลิตร จากนั้น นำขวด erlenmeyer flask ที่มีแอมโมเนียที่เก็บในสารละลาย 4% boric acid มาไตรเตรทกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 *N* H_2SO_4 โดยไตเตรทจนสีของสารละลายเปลี่ยนสีจากสีเขียว เป็นสีม่วงอมเทา

การคำนวณหาปริมาณโปรตีน

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

A = จำนวนปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 *N* H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตเตรทกับตัวอย่าง (ml.)

B = จำนวนปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 *N* H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตเตรทกับ blank (ml.)

C = ความเข้มข้น (*N*) ของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4

D = น้ำหนักตัวอย่าง

E = kjeldahl factor (6.25)

3.5.5.2 การวิเคราะห์หาไขมัน (Fat analysis)

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักเนื้อที่บดแล้ว 2 กรัมอบที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 24 ชั่วโมง
2. นำขวดสกัดไขมันที่ผ่านการล้างสะอาด เช็ดให้แห้งแล้วอบที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 1 ชั่วโมง และใส่ในโถดูดความชื้น (dissicator) ปล่อยให้เย็น ทำการชั่งหาน้ำหนักที่ได้
3. นำตัวอย่างเนื้อที่ผ่านการอบหรือผ่านการหาความชื้นแล้ว ใส่ใน thimble ablundum ที่สะอาด และแห้ง
4. ใส่ thimble ablundum ลงใน sample containers แล้วต่อเข้ากับ holding clips ของเครื่องสกัดไขมันแบบ Soxhlet extraction

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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 จะถูกกลั่น และถูกเก็บใน reclaiming tube ส่วนไขมันที่ได้จะอยู่ในบีกเกอร์
9. นำบีกเกอร์ที่มีไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 30 นาที แล้วนำออกใส่ในโถดูดความชื้นปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นภายหลังการสกัดคือน้ำหนักของไขมัน

การคำนวณหาปริมาณไขมัน

$$\textbf{Fat percentage} = \left(\frac{(A-B)}{C} \right) \times 100$$

A = น้ำหนักบีกเกอร์+น้ำหนักไขมันที่อบแล้ว

B = น้ำหนักบีกเกอร์

C = น้ำหนักตัวอย่าง

3.5.5.3 การวิเคราะห์หาความชื้น (Moisture analysis)

วิธีการ

1. นำขวดสำหรับใส่ตัวอย่างวิเคราะห์หาความชื้น (weighing bottle) ที่ล้างสะอาดและเช็ดให้แห้ง อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 1 ชั่วโมง และนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้นปล่อยให้เย็นและชั่งน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดละเอียดแล้วจำนวน 2 กรัม ใส่ใน weighting bottle บันทึกน้ำหนักรวมทั้งหมด และอบที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 4 ชั่วโมง
3. นำถ้วยที่มีตัวอย่างออกจากตู้อบแห้ง ใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นชั่งน้ำหนักที่หายไป คือ ปริมาณความชื้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณหาปริมาณความชื้น

$$\text{Moisture percentage} = \left(\frac{\text{A-B)}}{\text{C}} \right) \times 100$$

A = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

B = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

C = น้ำหนักตัวอย่าง

3.5.6 การวิเคราะห์คอเลสเตอรอล ตามวิธีของ Jung *et al.* (1975)

วิธีการ

1. ทำการสกัดไขมัน ตามวิธีของ AOAC (1995)
2. นำไขมันจากข้อ 1 มาละลายด้วย 2-propanol เตรียมให้มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
3. ดูดไขมันจากข้อ 2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตร
4. เติม alcoholic KOH 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มใน water bath อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำออกจาก water bath แล้วทิ้งให้เย็น
5. เติม petroleum ether 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture
6. เติมน้ำกลั่น 5 มล.เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture
7. เทสารละลายทั้งหมดลงในกรวยแยก ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น
8. เก็บส่วนที่ละลายในชั้น petroleum ether แล้วนำไประเหยแห้งใน water bath อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
9. ดูดสารละลายจากข้อ 8 มา 50 ไมโครลิตร ใส่ใน screwed cap tube 13 x 100 มิลลิเมตร เติม ferric-uranyl acetate 6 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงด้วย vortex mixture นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 2,700 รอบ/นาที นาน 5 นาที
10. เตรียมหลอดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ชุดใหม่ แล้วเติม sulfuric acid reagent หลอดละ 2 มิลลิลิตร
11. ดูด supernate จากหลอดในข้อ 9 ปริมาณ 3 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดในข้อ 10
12. ผสมให้เข้ากันทันทีด้วย vortex mixture อย่างน้อย 20 วินาที แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที
13. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยอ่านค่าดูดกลืนแสงของหลอด blank เป็นศูนย์ บันทึกค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หมายเหตุ : หลอด blank จะเติมเฉพาะ ferric-uranyl acetate 3 มิลลิลิตร และ sulfuric acid reagent 2.0 มิลลิลิตร

$$\textbf{Total cholesterol (mg/100g of sample)} = \left(\frac{Au}{As} \right) \times Cs$$

เมื่อ Au คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

As คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายคอเลสเตอรอลมาตรฐาน

Cs คือ ค่าความเข้มข้นของสารละลายคอเลสเตอรอลมาตรฐาน

3.5.7 การวิเคราะห์ไตรกลีเซอร์ไรด์ ตามวิธีของ Bigg *et al.* (1975)

วิธีการ

1. ทำการสกัดไขมัน ตามวิธีของ AOAC (1995)
2. นำไขมันจากข้อ 1 มาละลายด้วย 2-propanol เตรียมให้มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
3. ดูดสารละลายจากข้อ 2 มา 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตร
4. เติม N Haptane 2.0 มิลลิลิตร
5. เติม 2-propanol 3.5 มิลลิลิตร
6. เติมสารละลายกรดกำมะถัน 40 mmol / 1.0 มิลลิลิตร
7. ผสมแต่ละหลอดให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixture นาน 20 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จนแยกชั้น
8. เตรียมหลอดชุดใหม่และเติม sodium alkoxide 2 มิลลิลิตร
9. ดูดสารละลายในชั้นบนจากหลอดทดลองข้อ 7 มา 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่เตรียมไว้ในข้อ 8
10. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 5 นาที
11. เติม sodium periodate 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
12. เติม acetyl acetone reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ใส่ในตู้อบ 60 °C นาน 20 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

13. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดยอ่านค่าดูดกลืนแสงของหลอด blank เป็นศูนย์ บันทึกค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

หมายเหตุ : หลอด blank จะเติมสารละลายทุกอย่าง แต่ไม่ใส่ตัวอย่างลงไป

$$\textbf{Total triglyceride (g/100g of sample)} = \frac{A \times O.D.\ sample \times B \times 100}{O.D.\ standard \times C \times 1000}$$

A คือ ปริมาณ 2-propanol (ml.) ที่ใช้ละลายไขมัน

O.D. sample คือ ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

B คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

O.D. standard คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน

C คือ น้ำหนักตัวอย่าง (g.)

3.5.8 การวิเคราะห์หาค่า Thiobarbituric acid number ตามวิธีของ Rossell, (1994)

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อประมาณ 10 กรัม ใส่ใน blender เติมน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร
2. ปั่นประมาณ 15 วินาที เทใส่ใน distillation flask ล้าง blender ด้วยน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร เทลงใน distillation flask
3. เติม 4M HCl 2.5 มล. (ปรับ pH = 1.5)
4. เติม anti–foaming agent 1 – 2 หยด
5. ต่อ distillation flask เข้ากับชุดกลั่น กลั่นจนได้ของเหลวในขวดสีชา 50 มิลลิลิตร
6. ดูดสารละลายที่กลั่นได้ 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร แล้วเติม thiobarbituric acid solution 5 มิลลิลิตร
7. นำไปต้มใน water bath อุณหภูมิ 100 °C นาน 35 นาที นำออกจาก water bath แล้วทิ้งไว้ให้เย็น
8. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร โดยอ่านค่าดูดกลืนแสงของหลอด blank เป็นศูนย์ บันทึกค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

หมายเหตุ : หลอด blank เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แทนสารละลายที่กลั่นได้

สูตรคำนวณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

เมื่อ O.D. = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

3.5.9 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระ (free fatty acid analysis)

ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่ การสกัดไขมัน และการเตรียม fatty acid methyl ester (FAME) โดยบดกล้ามเนื้อออกและสะโพก ทำการสกัดไขมันจากกล้ามเนื้อตัวอย่างโดยมีวิธีการดังนี้

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

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อ 5 กรัม ใส่ใน round bottom flask ขนาด 100 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายผสมระหว่าง chloroform และ methanol (อัตราส่วน 2:1) 60 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วเขย่าอย่างแรง จนกระทั่งเกิดการสกัดอย่างสมบูรณ์ โดยใช้เวลา 15 นาที
3. กรองด้วย buchner funnel ผ่านกระดาษกรอง whatman #1 ลงใน flask นำกากที่เหลือมาสกัดตามข้อ 2 อีกครั้งหนึ่ง
4. รวมสารละลายที่กรองได้ใส่ใน separate flask เติมน้ำกลั่น 12 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น
5. เก็บสารละลายชั้นล่างใส่ลง flask ที่ทราบน้ำหนัก แล้วนำไประเหยแห้งใน water bath อุณหภูมิ 70°C
6. ชั่งน้ำหนักไขมันใน flask ที่ระเหยแห้งแล้ว จากนั้นละลายด้วย chloroform เพื่อปรับความเข้มข้นให้เป็น 30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

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

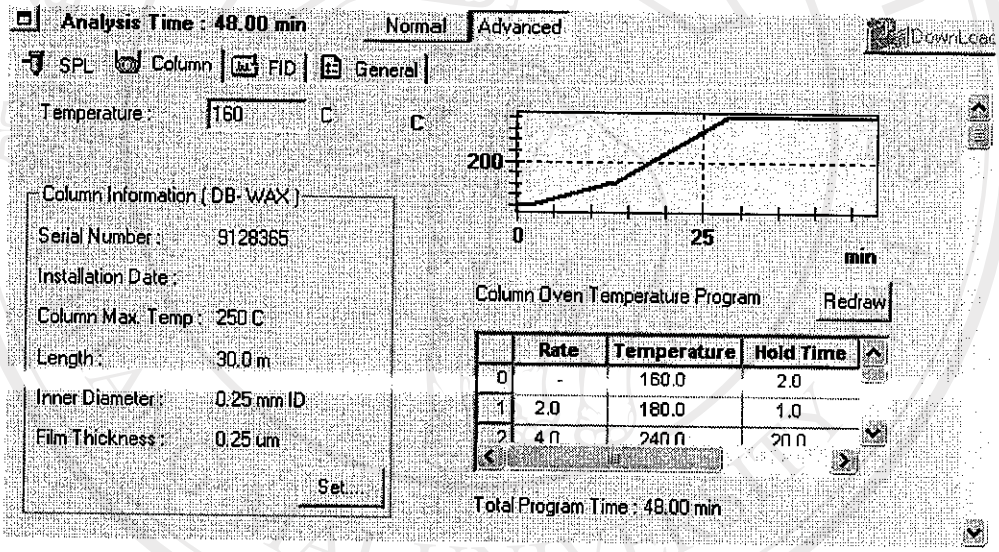
1. ดูดไขมันที่สกัดได้ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน round bottom flask ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย metanolic NaOH ความเข้มข้น 0.5 M 4 มิลลิลิตร เขย่า 30 วินาที แล้ว reflux จนได้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นาน 5 นาที ทิ้งให้เย็น
3. เติม 20% boron-trifluoride in methanol 5 มิลลิลิตร แล้ว reflux ต่ออีก 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. เทสารละลายที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายเกลืออิ่มตัว (NaCl) 5 มิลลิลิตร และ Iso-octane (2,2,4 – trimethylpentane) 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture 30 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น
5. เก็บสารละลายชั้นบน 1 มิลลิลิตร ใส่ใน vial ที่มี sodium sulfate anhydrous ปริมาณ 1 มิลลิกรัม ปิด vial ให้สนิทเก็บในตู้เย็นเพื่อรอการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatography

ขั้นตอนที่ 3 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC)

1. ดูดสารละลายที่ได้จากขั้นตอนที่ 2 ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง Gas chromatography (GC–14B, Shimadzu, Japan) โดยมี condition ดังนี้



2. คำนวณปริมาณกรดไขมันจากสมการ

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

area of fatty acid in sample คือ พื้นที่ใต้กราฟของกรดไขมันแต่ละตัวของตัวอย่าง

total area of fatty acid คือ พื้นที่ใต้กราฟของกรดไขมันทั้งหมด

3.5.10 ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (shear force value)

นำเนื้อที่ต้มสุกจากการหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียขณะประกอบอาหาร (cooking loss) เจาะตามแนวเส้นใยกล้ามเนื้อ ด้วยเหล็กกลวงชนิดกลม (core) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร วัดค่าแรงตัดผ่านด้วยเครื่อง Instron 5565 หัววัดกำลัง 5 kN (Warner Bratzer Shear) ด้วยความเร็ว 200 มิลลิเมตร/นาที โดยแปลผลเป็นค่าแรงสูงสุด (maximum force, N)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.11 การประเมินด้านการตรวจชิม (sensory evaluation) ตามวิธีของ ไพโรจน์, (2546) นำกล้ามเนื้อออก และ กล้ามเนื้อสะโพก หลังจากฆ่านาน 24 ชั่วโมง อบเนื้อที่อุณหภูมิ 160 °C เวลา 10 นาที จนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อประมาณ 70 °C ตัดให้มีขนาดที่เท่ากัน ด้วยเขียงที่มีลักษณะเป็นช่องขนาด 1 เซนติเมตร จากนั้นเสิร์ฟให้แก่ผู้ตรวจชิม ซึ่งได้ผ่านการฝึกฝนการตรวจชิม จำนวน 6 คน ผู้ตรวจชิมจะได้รับแบบสอบถามการตรวจชิมเนื้อและฟังการบรรยายขั้นตอนการทดสอบชิมโดยละเอียด ซึ่งการให้คะแนนจะพิจารณา 4 ลักษณะการตรวจชิม คือ ความนุ่ม (tenderness) กลิ่นและรสชาติ (flavor) ความชุ่มฉ่ำ (juiciness) และความพอใจโดยรวม (overall acceptability) โดยให้คะแนนแต่ละลักษณะซึ่งอยู่ในช่วง 1-9 คะแนน (1 = เหนียว/กลิ่นรสไม่ดี/แห้งและไม่ชอบมาก; 9 = นุ่มที่สุด/กลิ่นและรสชาติดีที่สุด/ชุ่มฉ่ำที่สุดมีความชอบมากที่สุด) ผู้ตรวจชิมจะได้รับน้ำและรับประทานผลไม้หลังจากทดสอบชิมเนื้อแต่ละชิ้น นำคะแนนที่ได้มาทำการบันทึกผล

3.6 วิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยลักษณะคุณภาพซาก และเนื้อ คือ สายพันธุ์ (เบรสชี้ฟ้า และฟ้าหลวง) และเพศ (เพศผู้ และเพศเมีย) ตามแผนการทดลองแบบ 3x2 factorial in CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey' s W – Procedure ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS for wir:dow (SAS, 1990)

3.7 สถานที่ทำการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

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

3.8 ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย

ระยะเวลาที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย 12 เดือน ตั้งแต่ พฤษจิกายน 2547 – พฤษจิกายน 2548

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved