บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สารเคมี

สารเคมี	บริษัท	เกรด
Acetone	J.T.Baker	AR
2-amino-2-hydroxy methyl-1,3-propanedial (Tris, mw 121.1)	Sigma	AR
2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)	Sigma	AR
2-Thiobarbituric acid (TBA)	Sigma	AR
5,5'-dithiobis(2- nitrobenzoic acid) (DTNB)	Sigma	AR
disodium phosphate ($Na_2PO_4 . 2H_2O$)	Sigma	AR
Sulfuric acid (H_2SO_4)	Merck	AR
Diethyl ether ($CH_3CH_2OCH_2CH_3$)	BDH	AR
Ethyl acetate ($CH_3COOC_2H_5$)	Lab-Scan	AR
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Fisher Chemicals	AR
Gamma-Oryzanol	Tsuno rice fine chemicals Co., Ltd	Food grade
Glutathione ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$)	Sigma	AR
Hydrochloric acid (HCl)	Merck	AR
Hexane (C_6H_{14})	Fisher Scientific	HPLC
Isopropanol (CH_3CH (OH) CH_3)	Merck	HPLC
Malonaldehide bis (di) methyl acetate (MDA)	Sigma	AR
Metaphosphoric acid (HPO_3)	Merck	AR
Methanol (CH_3OH)	Fisher Chemicals	AR
Nitrogen gas	-	AR

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$)	Merck	AR
Sephadex LH20	Amercham	AR
Silica gel	Merck	AR
Sodium chloride (NaCl)	Merck	AR
Sodium citrate ($C_6H_5O_7Na_3$)	Merck	AR
Sodium hydroxide (NaOH)	Merck	AR
Standard γ-oryzanol	Restek	HPLC
Trolox	Sigma	AR
Tetramethoxy propane (TMP)	Sigma	AR
Trichloroacetic acid (TCA)	Merck	AR

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท	ประเทศ
Buchner funnel	-	-	ไทย
Centrifuge	Mistral300	MSE co.	England
Column Chromatography	2.5x25 cm	-	ไทย
Freeze dryer (Lyophilizer)	Alpha 1-2	Christ	Germany
Filter paper	#4	Whatman	England
Guard Column	-	Phenomenex	U.S.A.
High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	10A	Shimadzu	Japan
Ice box	-	-	-
Inertsil HPLC column (5μm, 150x4.6mm I.D.)	CN-3	GL- Science	Japan
Membrane filters	0.45μm	Gelman Sciences	U.S.A.
Microcuvette (polystyrene)	-	L.P.	German
Micropipette	Pipetman	Gilson	France
Needle	No. 20	Nippo	Thailand
Oven	ULE 400	Memmert	Germany

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Parafilm	-	American	USA
Rotary evaporator	R-124	BUCHI	Switzerland
Refrigerated centrifuge	6930	KUBOTA	Japan
Refrigerator (- 20 °C)	WCF-95L	Whirlpool	Thailand
Sonicator	ME-11	Mettle electronics Corp	U.S.A.
Spectrophotometer	UV-160A	Shimadzu	Japan
Plastic syringe (5 ml)	-	Nippo	Thailand
Vortex	K-500 GE	Labinco	USA
Water distiller	MAXIMA	ELGA	England
Weighting balance	2842	Sartorius	Germany
เครื่องบด Hammer mill	DCTH48	W. Kranich	USA

3.3 การทดลองที่ 1 วิธีการสกัดและการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ดังนี้

3.3.1 การประเมินค่าทางโภชนะของรำข้าว ได้แก่ ค่าวัตถุแห้ง โปรตีน ไขมัน พลังงาน และเยื่อใยในรำข้าว และอาหารทดลอง โดยวิธี proximate analysis (AOAC, 1998)

3.3.2 การสกัดสารและวิเคราะห์ปริมาณโปรแอนโธไซยานิดิน ด้วยวิธี proanthocyanicinin (butanol/HCl) assay (Dalzell and Kerven, 1998) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

ชั่งรำ 40 g + ascorbic acid 0.8 g+ 70% acetone 400 มล.

↓ เขย่า 30 นาทีภายใต้ภาวะแก๊สไนโตรเจน

กรองผ่าน GFA filter paper

↓

นำรำบนกระดาษกรองไปสกัดด้วย 70 % acetone อีก 3 รอบ

↓

เก็บรวบรวม สารละลายที่กรองได้ ไประเหย 70 % acetone ด้วยเครื่อง rotary evaporator

(ความดันจาก 400 จนถึง 100 มิลลิบาร์ ความเร็วรอบ 90 rpm และอุณหภูมิ 40 °C)

↓

นำตัวอย่างมาทำ back extraction 3 รอบ ด้วย diethyl ether โดยใช้ separating funnel

↓

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำตัวอย่างมาระเหยให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator
(ความดัน 250-75 mbar, ความเร็วรอบ 90 rpm และอุณหภูมิ 40 °C)

↓

ละลายของแข็งออกให้หมดด้วย 40 % ME-OH

↓

กรองตัวอย่างผ่าน GFB filter paper และ nylon membrane (0.45µm)

↓

เติมตัวอย่างลงในคอลัมน์ sephadex LH 20 จากนั้นเติม 40 % ME-OH 10 เท่า ของตัวอย่าง

↓ เก็บสารที่ถูกชะออกมา

เติม 70 % acetone 10 เท่าของตัวอย่าง

↓

เก็บตัวอย่างใส่ในขวดสีชา

↓

นำตัวอย่างมาระเหย 70 % acetone เครื่อง rotary evaporator
(ความดันจาก 400 จนถึง 75 มิลลิบาร์ ความเร็วรอบ 90 rpm และอุณหภูมิ 40 °C)

↓

นำตัวอย่างไปแช่ในตู้ -20 °C

นำตัวอย่างไป freeze dryer ด้วยเครื่อง lyophlizer
และบันทึกน้ำหนักผงสกัดโปรแอนโธไซยานิดิน

นำสารละลายที่ได้ไปผสมกับแป้ง
ข้าวเหนียว ที่ใช้เป็นสื่อสัดส่วน 1:2
ก่อนนำไปเข้าเครื่อง lyophilizer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.3 การสกัดและการวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-โอไรซานอล โดยใช้วิธีของ Xu and Godber (1999) และ Teltathum (2004) ซึ่งใช้เทคนิคแบบ reverse phase HPLC ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ก. การสกัด crude oil

ขั้นตอนการสกัดไขมันโดยรวมมีดังนี้

ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม + กรดแอสคอร์บิค 1 กรัม + hexane 35 มล. + ethyl acetate 15 มล.

↓

สกัดตัวอย่างโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60 °C ความเร็วรอบ 180 rpm นาน 40 นาที (ไม่ใช้ความดัน)

↓

เติมน้ำกลั่นอีก 25 มล. แล้วสกัดต่อ 10 นาที

↓

กรองตัวอย่าง แล้วนำส่วนที่เหลือด้านบนกระดาษกรองไปสกัดต่ออีก 2 รอบ

↓

เก็บรวบรวมสารสกัดที่ได้จากการกรองมาปั่นแยกน้ำมันที่ 4,100 g นาน 10 นาที

↓

เก็บสารละลายส่วนใสที่ได้มาแยกตัวทำละลายโดยใช้เครื่อง rotary evaporator (ภายใต้สภาพความดัน และอุณหภูมิ 60 °C ความเร็วรอบ 180 rpm)

↓

เก็บ crude oil ในขวดก้นกลมเพื่อนำไปสกัดแกมมาโอไรซานอลกึ่งบริสุทธิ์ต่อ

ข. การสกัดสารแกมมาโอไรซานอลกึ่งบริสุทธิ์ (semipurification of γ-oryzanol)

นำเจล silica 20 กรัม บรรจุลงในคอลัมน์แก้ว (2.5 cm x 25 cm) ละลายน้ำมันที่สกัดได้กับตัวทำละลาย (hexane/ethyl acetate 9:1) เติมผ่านลงในคอลัมน์ เพื่อไล่สารพวกไตรกลีเซอร์ไรด์ และไขมันอื่น ๆ ออกไป จากนั้นเติมตัวทำละลาย (hexane/ethyl acetate 7:3) เพื่อชะสารสกัดแกมมาโอไรซานอลกึ่งบริสุทธิ์ ซึ่งขั้นตอนการสกัดสารมีดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำน้ำมันสกัดละลายใน hexane/ethyl acetate สัดส่วน 9:1 จำนวน 50 มล. เติมลงในคอลัมน์

↓ ปล่อยสารที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง

เติมสารสกัด hexane/ethyl acetate สัดส่วน 7:3 จำนวน 50 มล.

↓

เก็บสารที่ผ่านคอลัมน์คือ สารสกัดแกมมาโอไรซานอลกึ่งบริสุทธิ์

↓

ล้างคอลัมน์โดยใช้ hexane/ethyl acetate สัดส่วน1:1 จำนวน 50 มล.

ค. การวิเคราะห์ปริมาณแกมมาโอไรซานอล

การวัดปริมาณแกมมาโอไรซานอลจะใช้ทคนิค reverse-phase HPLC โดยใช้คอลัมน์ Inertsil CN-3 (5μm , 150 x 4.6mm I.D.) อัตราการไหลผ่านคอลัมน์ 1.0 ml/min ภายใต้อุณหภูมิ 30 °C และใช้ระบบตรวจวัด UV ที่ความยาวคลื่น 320 nm โดยเปรียบเทียบปริมาณกับสารแกมมาโอไรซานอลบริสุทธิ์มาตรฐาน ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

นำสารสกัดแกมมาโอไรซานอลกึ่งบริสุทธิ์มาละลายกับตัวทำละลาย

hexane : isopropanol : acetic acid สัดส่วน 94:5:1

↓

กรองสารผ่านกระดาษกรอง (45μm x 45 mm)

↓

นำตัวอย่างจำนวน 2 μl ฉีดเข้าเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)

โดยปรับสภาวะเครื่อง HPLC เพื่อการวิเคราะห์แกมมาโอไรซานอลดังนี้ :

- Column : Inertsil CN-3 (5μm , 150 x 4.6mm I.D.)
- Flow rate : 1.0 ml/min
- Mobile phase : Hexane : Isopropanol : Acetic acid (94:5:1)
- Oven Temp. : 30 °C
- Detector : UV 320 nm
- Standard : γ-oryzanol 10 μl
- Sample volume : 2 μl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างสารสกัดและรำข้าว

สุ่มตัวอย่างสารสกัดโปรแอนโธไซยานิดิน แกมมา-โอไรซานอล รำข้าวขาวและรำข้าวเหนียวก่ำมาทดสอบฤทธิ์การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวัดการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) โดยใช้ 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS assay) (Re *et al.*, 1999 และ Leelarungrayub *et al.*, 2006) จากนั้นนำรำข้าวเหนียวก่ำที่เก็บไว้ในที่มืดสภาพต่างกัน 4 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1. บรรจุใส่ถุงพลาสติก รัดด้วยหนังยาง เก็บที่อุณหภูมิห้อง กลุ่มที่ 2, 3 และ 4 บรรจุถุงฟอยล์ผนึกแบบสุญญากาศ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 ℃ และ 4 ℃ ตามลำดับ วิเคราะห์ค่าสารต้านอนุมูลอิสระของรำข้าวเหนียวก่ำที่เก็บไว้ตามรูปแบบที่กำหนดในตาราง เป็นระยะเวลานาน 1 เดือน เพื่อศึกษาอายุของสารต้านอนุมูลอิสระในรำข้าวเหนียวก่ำ (Table 3.1)

หลักการ ABTS ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้น เมื่อทำปฏิกิริยากับ $K_2S_2O_8$ จะเกิด ABTS cation radical ($ABTS^{\bullet+}$) ซึ่งเป็นสารที่มีสีเขียวอมฟ้า ถ้าตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระก็จะให้อิเล็กตรอนแก่ $ABTS^{\bullet+}$ ส่งผลให้สีจางลง โดยทำการทดสอบเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Trolox (vitamin E analog) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลที่ได้จะแสดงในหน่วยของ Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

ละลาย ABTS ในน้ำให้ได้ความเข้มข้น 14 mM จำนวน 5 มล.
นำมาผสมกับ 2.45 mM $K_2S_2O_8$ 5 มล.

↓

ผสมให้เข้ากัน และวางไว้ในที่มืด (4 ℃) 8 – 12 ชั่วโมง

↓

เจือจาง $ABTS^{\bullet+}$ ด้วยน้ำกลั่นปราศจากอิออนให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 นาโนเมตร เท่ากับ 0.70 (± 0.02) (ตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน)

↓

นำ trolox ที่ความเข้มข้น 0-1.2 มิลลิโมลลาร์ (หรือสารสกัด) จำนวน 10 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ 990 ไมโครลิตร ใน คิวเวต

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ทันที
บันทึกค่าดูดกลืนแสงที่เวลาเริ่มต้น และที่เวลาสิ้นสุดปฏิกิริยา 3 นาที

↓

คำนวณหาค่าปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระ จากสูตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\% \text{ Absorbance reduction (734 nm)} = \frac{(\text{Initial absorbance} - \text{Final absorbance}) \times 100}{\text{Initial Absorbance}}$$

Table 3.1 Plan of an antioxidant activity assay in purple rice bran (Experiment)

Group of package	Temperature	ABTS assay
1. Normal (plastic bag)	Room Temperature	Every day
2. Vacuum (foil bag)	Room Temperature	3 days/time
3. Vacuum (foil bag)	25 ºC	Every week
4. Vacuum (foil bag)	4 ºC	Every week

3.4 การทดลองที่ 2 การศึกษาในสัตว์ทดลอง

3.4.1 สัตว์ทดลอง

ใช้ลูกสุกรผสม 3 สายพันธุ์ (Largewhite x Land race x Duroc) จำนวน 168 ตัว โดยมีเพศผู้ 84 ตัว และเพศเมีย 84 ตัว อายุ 21-25 วัน น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 7.5 กก.

3.4.2 ลักษณะคอกทดลอง

คอกทดลองเรียงติดกันเป็นแถว มี 2 แถวต่อ 1 ห้องทดลองในแต่ละแถวมีจำนวนคอกทดลอง แถวละ 6 คอกมีที่ให้น้ำแบบหัวจุ๊บอยู่ด้านหน้าคอกมีที่ให้อาหารแบบรางติดตั้งหน้าคอก ติดกับพื้นคอก (Figure 3.1)

Figure 3.1 Cage for 4 weaned pigs mean replicate (from Kittiwat farm).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.3 การวางแผนการทดลอง และการจัดการ

ก. วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design: CRD) (จรัญ, 2534) แบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 7 กลุ่ม แยกโดยการสุ่มขังกรงละ 4 ตัว แต่ละกลุ่มมี 6 ซ้ำให้อาหารและน้ำแบบเต็มที่ โดยในทุกสูตรอาหารจะถูกปรับให้มีโภชนะใกล้เคียงกัน และตรงตามความต้องการของสุกรตาม NRC (1998) ใช้อาหารทดลองทั้งหมด 7 สูตร คือ

สูตรที่1 (T1) :อาหารสูตรมาตรฐานของฟาร์ม (กลุ่มควบคุม) (GON 224 มก./กก.)

สูตรที่2 (T2) : อาหารสูตรมาตรฐานของฟาร์ม (GON 224 มก./กก.) เสริมแกมมา-โอไรซานอล (GON) 3,000 มก./กก. ของอาหาร

สูตรที่3 (T3) : อาหารสูตรมาตรฐานของฟาร์ม (GON 224 มก./กก.) เสริมสารสกัดโปรแอนโธไซยานิดิน (PA) 82 มก./กก. ของอาหาร

สูตรที่4 (T4) : อาหารสูตรมาตรฐานของฟาร์ม (GON 224 มก./กก.) เสริมแกมมา-โอไรซานอล (GON) 100 มก./กก.และสารสกัดโปรแอนโธไซยานิดิน (PA) 65 มก./กก. ของอาหาร

สูตรที่5 (T5) : อาหารสูตรมาตรฐานของฟาร์มที่ทดแทนรำข้าวด้วยรำข้าวเหนียวก่ำ 2% (GON 540 + PA 204 มก./กก. ของอาหาร)

สูตรที่6 (T6) : อาหารสูตรมาตรฐานของฟาร์มที่ทดแทนรำข้าวด้วยรำข้าวเหนียวก่ำ 4% (GON 1,080 + PA 408 มก./กก. ของอาหาร)

สูตรที่7 (T7) : อาหารสูตรมาตรฐานของฟาร์มที่ทดแทนรำข้าวด้วยรำข้าวเหนียวก่ำ 6% (GON 1,600 + PA 612 มก./กก. ของอาหาร)

หมายเหตุ

1. รำข้าวเหนียวก่ำ 1 กก. มี แกมมา-โอไรซานอล 2.4 % และ โปรแอนโธไซยานิน 1 % โดยสารแกมมา-โอไรซานอล จากบริษัท Tsuno rice fine chemicals Co., Ltd ส่วนสารสกัดโปรแอนโธไซยานิดินโดยรวม ได้ทำการสกัดจากรำข้าวเหนียวก่ำ โดยวิธี proanthocyanicinid (butanol/HCl) assay (Dalzell and Kerven, 1998)

2. โดยอาหารสูตรควบคุม คือสูตรอาหารที่ใช้ปกติในฟาร์มที่ทำการทดลอง ซึ่งมีรำข้าวขาว 2% การเสริมแกมมา-โอไรซานอลสกัดในอาหารแต่ละสูตรอ้างอิงจากปริมาณที่แนะนำให้ใช้ในคน ในลักษณะให้ผล ช่วยลดโอกาสเกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจ และโรคความดัน ที่ระดับ 450 มก./วัน (cited by Teltathum, 2004) และการเสริมสารสกัดโปรแอนโธไซยานิดินโดยรวม 250 มก./วัน อ้างอิงจากระดับที่แนะนำให้ใช้ในคน (Hertog *et al.*, 1993) (วิธีการคำนวณในภาคผนวก ข้อที่ 1)

3. สูตรที่ 4 อ้างอิงจากระดับแกมมา-โอไรซานอลที่แนะนำให้ใช้ในคนปกติ 300 มก./วัน กก. และโปรแอนโธไซยานิดิน 200 มก./วัน (วิธีการคำนวณในภาคผนวก ข้อที่ 1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. สำหรับสูตรที่ 5-7 จะถอนรำข้าวขาวออก และแทนที่ด้วยรำข้าวก่ำ 2 % 4 % และ 6 % ตามลำดับ และปรับค่าโภชนะ โดยเฉพาะค่าพลังงาน โปรตีน และเยื่อใย ใน phase เดียวกันให้มีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อคำนวณแล้วจะได้ แกมมา-โอไรซานอล 540 1, 080 และ1,600 มก./อาหาร 1 กก. ตามลำดับ และได้โปรแอนโธไซยานิน เท่ากับ 200 400 และ 600 มก./อาหาร 1 กก. ตามลำดับ อ้างอิงจากระดับที่เสริมในการทดลองของ Teltathum (2004)

ข. การจัดการด้านอาหาร

อาหารทดลองที่ใช้มีการผสมใหม่ทุกสัปดาห์ และการจัดการด้านอาหารของฟาร์ม ทำโดยจัดอาหารให้สอดคล้องกับสายพันธุ์และความต้องการในแต่ละช่วงอายุ (Phase Feeding) และโปรแกรมแบ่งเป็น 4 ช่วง (ตามมาตรฐานอาหารที่ใช้เลี้ยงสุกรของฟาร์มทดลอง) ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงตามปริมาณการกินอาหารของสุกร กล่าวคือ ให้สุกรแต่ละตัวได้รับอาหารครบถ้วนตามที่กำหนดไว้ในแต่ละช่วงอายุ โดย Phase 1 : 5 กก., Phase 2 : 8 กก. และ Phase 3 : 8 กก. หลังจากนั้นจะให้อาหาร Phase 4 จนสิ้นสุดการทดลองที่ 42 วัน โดยสุกรทุกตัวจะได้รับอาหารและน้ำอย่างเต็มที่ (*ad libitum*) ซึ่งแต่ละสูตรแสดงองค์ประกอบได้ตามตาราง (Table 3.2-3.5)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 3.2 Experimental diets and chemical composition of phase1* (continue)

Ingradients (%)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Broken rice	24.895	24.895	24.895	24.895	24.895	23	21
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[a]	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] Premix contained vitamins and minerals; 20% iron sulfate 0.07 kg diet.

* Phase feeding; phase 1= 5 kg/hd (around 10 days).

T1 = control; T2 = GON 3,000 mg/kg; T3 = PA 82 mg/kg; T4 = GON 100 mg/kg + PA 65 mg/kg; T5 = PRB 2 %; T6 = PRB 4 % and T7 = PRB 6 %.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 3.3 Experimental diets and chemical composition of phase 2* (continue)

Ingredients (%)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
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[a]	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] Premix contained vitamins and minerals; 20% iron sulfate 0.035 kg diet.

* Phase feeding; phase 2 = 8 kg/hd (around 14 days).

T1 = control; T2 = GON 3,000 mg/kg; T3 = PA 82 mg/kg; T4 = GON 100 mg/kg + PA 65 mg/kg; T5 = PRB 2 %; T6 = PRB 4 % and T7 = PRB 6 %.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 3.4 Experimental diets and chemical composition of phase 3* (continue)

Ingredients (%)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
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[a]	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] Premix contained vitamins and minerals; 20% iron sulfate 0.035 kg diet.

* Phase feeding of farm; phase 3 = 8 kg/hd (around 14 days).

T1 = control; T2 = GON 3,000 mg/kg; T3 = PA 82 mg/kg; T4 = GON 100 mg/kg + PA 65 mg/kg; T5 = PRB 2 %; T6 = PRB 4 % and T7 = PRB 6 %.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 3.5 Experimental diets and chemical composition of phase4*

Treatment	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
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[a]	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] Premix contained vitamins and minerals; 20% iron sulfate 0.035 kg diet.

* Phase feeding of farm; phase 4 = 7.5 kg/hd (around 5 days).

T1 = control; T2 = GON 3,000 mg/kg; T3 = PA 82 mg/kg; T4 = GON 100 mg/kg + PA 65 mg/kg; T5 = PRB 2 %; T6 = PRB 4 % and T7 = PRB 6 %.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.4 การบันทึกข้อมูลและการเก็บตัวอย่าง

โดยตัวอย่างรูปแบบของตารางที่ใช้บันทึกข้อมูลอาหาร และน้ำหนักแสดงได้ดังตาราง โดยข้อมูลอาหารที่บันทึกได้แก่ เบอร์ของอาหาร (Feed No.) เบอร์ห้อง และเบอร์คอก โดยในแต่ละห้อง จะมี 12 คอก แบ่งด้านซ้าย (A) 6 คอก และด้านขวา (B) 6 คอก ใน 1 ห้อง จะมีทุกทรีตเมนท์ ซึ่งตำแหน่งของคอกที่แบ่งให้แต่ละทรีตเมนท์เป็นไปโดยการสุ่ม สำหรับการบันทึกน้ำหนักจะชั่งเป็นรายตัว โดยบันทึกน้ำหนักตามเบอร์หูของสุกร (Pig No.) (Table 3.6)

Table 3.6 The data collection form.

Room No.	**7**	**Feed intake (Feed No. 120)**				
Cage No.	**TRT**	10/1/2549	11/1/2549	12/1/2549	13/1/2549	14/1/2549
1A	T1R1					
2A	T2R1					
3A	T6R1					
4A	T2R2					
5A	T3R2					
6A	T5R1					
1B	T4R2					
2B	T3R1					
3B	T1R2					
4B	T7R1					
5B	T5R2					
6B	T4R1					

T1R1		**Weight**						
Pig No.	เพศ	**W0**	**W1**	**W2**	**W3**	**W4**	**W5**	**W6**
0451-5	♂							
0251-4	♀							
1151-13	♂							
0551-7	♀							
Average								

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ก. บันทึกปริมาณอาหารที่กิน ทำการบันทึกปริมาณอาหารที่สุกรกินในแต่ละวัน โดยชั่งอาหารที่เหลือและเติมอาหารใหม่ทุกวัน สำหรับการคำนวณปริมาณอาหารที่สุกรกินในแต่ละวัน ทำโดยนำปริมาณอาหารที่กินเหลือในแต่ละวัน ไปลบออกจากปริมาณอาหารที่ให้สุกรกินในแต่ละวัน

ข. ชั่งน้ำหนักสุกรแต่ละตัว ทำการชั่งน้ำหนักทุกๆ สัปดาห์ เริ่มชั่งที่เวลา 14.00 น. โดยใช้ตะกร้าใส่สุกรก่อนวางลงบนตาชั่งขนาด 50 กก.

3.4.5 ขั้นตอนการศึกษา

1. ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารทุกครั้งที่มีการผสมอาหารใหม่ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี AOAC (1994) ซึ่งจะวิเคราะห์หาวัตถุแห้ง โปรตีนโดยรวม ไขมันโดยรวม เยื่อใยโดยรวม และ เถ้า

2. เก็บตัวอย่างเลือด (วันที่ 1 ของการทดลอง) หลังจากให้อาหารทดลองเก็บเลือดที่อายุทดลอง 2, 4 และ 6 สัปดาห์ (Figure 3.2) วัดปริมาณมาลอนไดออลดีไฮด์ (MDA) ด้วยวิธี Thiobarbituric acid – reactive substances ; TBARs assay (Buege and Aust., 1978) และวัดปริมาณสารในกลุ่มกลูตาไธโอน (GSH) ในเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี DTNB (Boyne and Ellman, 1972)

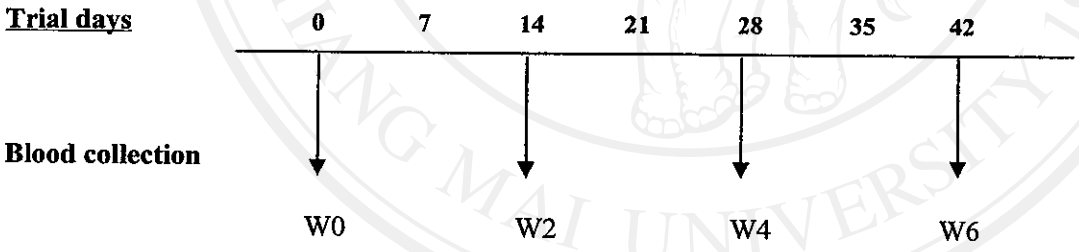

Figure 3.2 Program of blood collection in the experiment.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. นำข้อมูลที่บันทึกในขณะทดลองไปคำนวณหาปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ยต่อวัน น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน อัตราการแลกเนื้อ

ปริมาณการกินอาหาร (Average daily feed intake, ADFI) (กรัม/ตัว/วัน)

$$ADFI = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กิน (กรัม)}}{\text{จำนวนวัน x จำนวนตัว}}$$

อัตราการเจริญเติบโต (average dairy gain, ADG) (kg/d)

$$ADG = \frac{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (kg)}}{\text{ระยะเวลาที่เลี้ยง (d)}}$$

อัตราการแลกเนื้อ (feed conversion ratio, FCR)

$$FCR = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กิน (kg)}}{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (kg)}}$$

3.4.6 ศึกษาการยับยั้งการออกซิเดชันของกรดไขมัน และปริมาณกลูตาไธโอนในเม็ดเลือดแดง

ก. การวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ ด้วยวิธี Thiobarbituric acid – reactive substances ; TBARs assay

หลักการ การเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันจะเกิด MDA เมื่อทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid (TBA) จะได้สารสีชมพู วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องเสปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร (Buege and Aust., 1978; Leelarungrayub *et al.*, 2004)

ขั้นตอนการตรวจวัด

1. นำพลาสมา 0.1 มล. เติมสารละลาย Normal saline 0.45 มล.
2. เติมสารละลาย TBA 0.2 มล. จากนั้นเติม Trichloroacetic acid (TCA) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน
3. ต้มใน water bath 95-100 °C นาน 30 นาที
4. แช่ในน้ำเย็นเพื่อหยุดปฏิกิริยา ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 10 นาที
5. ดูดสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 nm
6. คำนวณความเข้มข้นของ MDA เทียบกับกราฟสารละลาย MDA มาตรฐานที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครโมลาร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข. การวัดปริมาณกลูตาไธโอน ด้วยวิธี dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB)

หลักการ การตรวจวัดGSH โดยใช้ 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) มาทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่มีหมู่ thiol group ทำให้สารละลายกลายเป็นสีเหลือง (ดังสมการ) และนำไปอ่านค่าด้วยเครื่องเสปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร (Boyne and Ellman, 1972; Leelarungrayub *et al.*, 2004)

GSH + DTNB ⟶ GSTNB + 2-nitro-,5-thiobenzoic acid (TNB)

GSH + GSTNB ⟶ GSSG + 2-nitro-,5-thiobenzoic acid (TNB) (Yellow)

ขั้นตอนการตรวจวัด

1. นำเลือดจำนวน 0.4 มล. เติมน้ำกลั่น 1.6 มล. ผสมให้เข้ากัน
2. เติม Precipitation solution solution 3 มล. เพื่อตกตะกอนโปรตีน
3. พักไว้ 5 นาที แล้วนำไปปั่นที่ 2000 g นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอน แยกส่วนใสมา 1 มล.
4. เติม phosphate buffer (pH 7.4) 4 มล. และสารละลาย DTNB 0.5 มล. ผสมให้เข้ากัน
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 นาโนเมตร ภายในเวลา 5 นาที และคำนวณหาความเข้มข้นเปรียบเทียบกับกลูตาไธโอนมาตรฐานมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 60 ไมโครโมล/ลิตร

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.5.1 นำข้อมูลจากการทดลองที่ 1 การวัดสารต้านอนมูลอิสระในรำข้าวเหนียวก่ำ และข้อมูลการทดลองที่ 2 การวัดสมรรถภาพการผลิตที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน ด้วยวิธี One-way ANOVA ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

3.5.2 เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากการวัดค่า MDA และ GSH ของลูกสุกรก่อนการทดลองมีค่าแตกต่างกัน ดังนั้นจึงนำ ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วม (analysis of covariance) ปรับค่าข้อมูลด้วยวิธี Transform แบบใส่รากที่ 2 (square root) และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธี LSD (least significant difference) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Figure 3.3 The 70% acetone was removed by evaporator (Central laboratory).

Figure 3.4 PA solution was filtered through sephadex LH 20 column (Central laboratory).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Figure 3.5 Freeze drying PA with lyophilizer (Department of animal science).

Figure 3.6 PA extract mixed with sticky rice powder (carrier) (Department of animal science).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

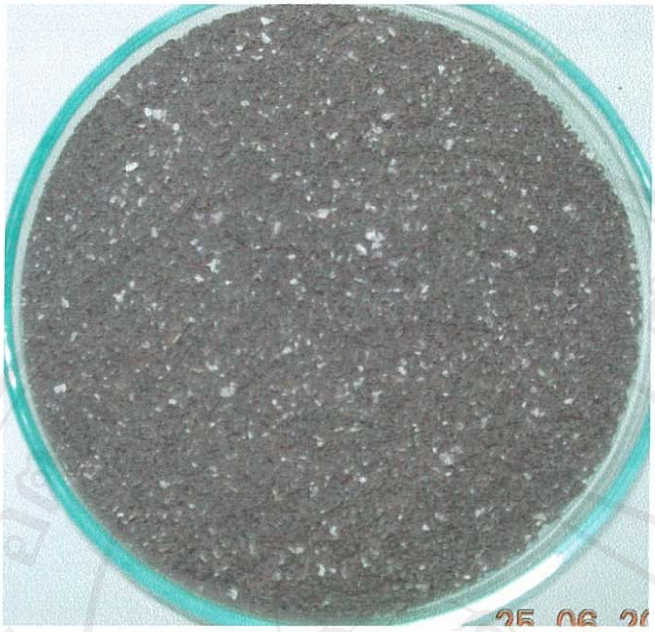

Figure 3.7 Purple rice bran for supplementation in experimental diet (Department of animal science).

Figure3.8 Gamma-oryzanol from Tsuno rice fine chemical Co. Ltd. (Japan). (Department of animal science)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved