บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

ชื่ออุปกรณ์และเครื่องมือ	โมเดล	บริษัท	ประเทศ
1. Beaker 50 ml	No. 1000	Pyrex	USA
2. Beaker 100 ml	No. 1000	Pyrex	USA
3. Beaker 500 ml	No. 1000	Pyrex	USA
4. Centrifuge	Magafuge 1.0	Heraeus	Germany
5. Column	DB-Wax	J&W	USA
6. Desiccator	GL 32	Glaswerk Wertheim	Germany
7. Distillation flask	-	Durun	Germany
8. Fat extraction thimble	No. 2800258	Whatman	England
9. Freezer	FC-27	Sharp	Thailand
10. Gas chromatography	GC-14B	Shimadzu	Japan
11. Hot plate thermolyne	Cimarec 3	Northern chemical	Thailand
12. Instron	5565	Instron, Ltd.	England
13. Kjeldahl extraction	-	Gerhardt	Germany
14. Kjeldahl flask	-	Gerhardt	Germany
15. Minolta chroma meter	CR-300	Minolta Camera Co., Ltd.	Japan
16. Oven	DEV	Heraeus	Germany
17. pH meter	191	Knick	Germany
18. Round bottom 100 ml	-	Glaswerk Wertheim	Germany
19. Round bottom 250 ml	-	Durun	Germany
20. Soxhlet extraction	-	Gerhardt	Germany
21. Spectrophotometer	DU 7500	Beckman	USA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

22.Titration	NW 2.5 mm	Brand	Germany
23. Tube No.13 x 100 mm	-	Pyrex	Germany
24. Volumetric flask 50 ml	-	SCHOTT	Germany
25. Volumetric flask 100 ml	-	SCHOTT	Germany
26. Volumetric flask 1000 ml	-	SCHOTT	Germany
27. Vortex mixer	G-560 E	Scientific industries, Inc	USA
28. Water bath	-	W. Krannich	Germany
29. Whatman No. 1, 14	-	Whatman	England

3.2 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	**เกรด**	**บริษัท**
1. selenium reagent mixture	Analytical reagent	Merck
2. conc. sulfuric acid	Analytical reagent	Merck
3. boric acid	Analytical reagent	Merck
4. sodium hydroxide	Analytical reagent	Merck
5. sulfuric acid	Analytical reagent	Fisher
6. dichloromethane	Commercial grade	BSB General group, Ltd.
7. hydrochloric acid	Analytical reagent	Merck
8. anti foaming agent	Analytical reagent	Fluka
9. thiobarbituric acid	Analytical reagent	Fluka
10. acetic acid	Analytical reagent	Merck
11. 2-propanol	Analytical reagent	Fisher
12. potassium hydroxide	Analytical reagent	Merck
13. absolute alcohol	Analytical reagent	Liquoe Distillery organization
14. petrolium ether	Analytical reagent	Lab-scan
15. uranyl acetate	Analytical reagent	Merck
16. anhydrous sulfate	Analytical reagent	Merck
17. ferric choride hydrate	Analytical reagent	Fisher

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

18. ammonium hydroxide	Analytical reagent	J.T.Baker
19. gracial acetic acid	Analytical reagent	Merck
20. n-heptane 95%	Analytical reagent	Lab-scan
21. sodium methylate	Analytical reagent	Fluka
22. sodium metaperiodate	Analytical reagent	Merck
23. ammonium acetate	Analytical reagent	Fisher
24. acetylacetone	Analytical reagent	Laboratory Rasayan
25. chloroform	Analytical reagent	Lab-scan
26. methanol	Analytical reagent	Merck
27. 20% boron trifluoride in methanol	Analytical reagent	Lab-scan
28. 2,2,4 trimethyl pentane	Analytical reagent	Lab-scan
29. sodium chloride	Analytical reagent	Merck
30. sodium sulfate anhydrous	Analytical reagent	Fisher
31. chloramine-T-reagent	Analytical reagent	Merck
32. 1-propanol	Analytical reagent	Fisher
33. 4-dimethylaminobenzaldehyde	Analytical reagent	Merck
34. perchloric acid	Analytical reagent	Merck
35. น้ำกลั่น	-	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การทดลอง

3.3.1 สัตว์ทดลอง

กระบือที่ใช้ในการขุนเป็นกระบือปลัก (swamp buffalo) อายุ 1 ปี จำนวน 12 ตัว มีน้ำหนักตัวเริ่มต้นก่อนทำการขุนเฉลี่ย 203 ± 19 กิโลกรัม ก่อนเริ่มทำการขุนจะถ่ายพยาธิและให้วิตามินกระบือทุกตัวจากนั้นนำกระบือเข้าคอกแบบขังเดี่ยว โดยแบ่งกระบือออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว กลุ่มที่ 1 ได้รับอาหารข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว และกลุ่มที่ 2 ได้รับอาหารข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว การให้อาหารจะให้อาหารข้นร่วมกับหญ้ากินนีสีม่วงสด โดยให้หญ้ากินนีสีม่วงสดคิดเป็นวัตถุแห้งวันละ 1.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวในทั้ง 2 กลุ่ม การให้อาหารจะให้อาหารหยาบและอาหารข้น วันละ 2 ครั้ง โดยแบ่งให้ในช่วงเช้า 60 เปอร์เซ็นต์และช่วงบ่ายอีก 40 เปอร์เซ็นต์และในตอนเย็นจะเก็บอาหารที่เหลือออกชั่งน้ำหนักและจดบันทึกไว้ ทำการขุนกระบือจนกระทั่งกระบือมีน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ย 422 ± 51 กิโลกรัม โดยใช้ระยะเวลาในการขุน 350 วัน จึงนำกระบือไปศึกษาคุณภาพซากและเนื้อต่อไป

Table 7 Composition and characteristics of the diets.

	Diets[1]			
	1	2	3	Guinea
Ingredients (kg)				
Corn	20	20	20	-
Casava meal	60	65	70	-
Soybean meal	15	10	5	-
Molasses	2.5	2.5	2	-
Urea	1	1	1.5	-
Salt	0.4	0.4	0.4	-
Shelled corn	0.5	0.5	0.4	-
Sulfur	0.1	0.1	0.1	-
Premix	0.5	0.5	0.5	-
Sodium bicabornate	-	-	0.1	-
Chemical composition (% dry mater)				
Dry matter	86.37	86.68	87.31	92.69
Crude protein	12.21	10.41	10.13	7.69
Ether extract	1.52	3.09	1.65	2.08
Acid detergent fiber	3.28	3.59	3.85	32.35
Ash	81.51	81.59	81.69	82.93

[1] 1, 2, 3 was fed for swamp buffaloes weight at 150-250, 251-350 and 351-550 kg, respectively

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 8 Fatty acid profile of experimental diets in three periods.

Fatty acid	Diets[1]		
	1	2	3
C 8:0	0.345	0.173	0.086
C 10:0	0.734	0.367	0.183
C 12:0	14.457	7.229	3.614
C 14:0	4.496	2.248	1.124
C 15:0	0.010	0.005	0.003
C 16:0	18.844	9.422	4.711
C 16:1	0.147	0.073	0.037
C 17:0	0.046	0.023	0.012
C 17:1	0.012	0.006	0.003
C 18:0	2.076	1.038	0.519
C 18:1	31.017	15.509	7.754
C 18:2 n-6c	26.524	13.262	6.631
C 18:3 n-6	0.000	0.000	0.000
C 18:3n-3	0.196	0.098	0.049
C 20:0	0.360	0.180	0.090
C 20:1	0.718	0.359	0.179
C 20:3 n-6	0.018	0.009	0.004
Total SFA	41.368	20.684	10.342
Total MUFA	31.894	15.947	7.973
Total PUFA	26.738	13.369	6.685
PUFA : SFA	0.646	0.323	0.162
n-6 PUFA	26.542	13.271	6.635
n-3 PUFA	0.196	0.098	0.049
n-6 : n-3	135.133	67.567	33.783

[1] 1, 2, 3 was fed for swamp buffaloes weight at 150-250, 251-350 and 351-550 kg, respectively

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.2 การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วางแผนการทดลองในการศึกษาคุณภาพเนื้อกระบือ แบบ 2 x 4 factorial โดยมีปัจจัยในการทดลอง คือ อาหาร (อาหารข้น 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว) และชนิดของกล้ามเนื้อ ซึ่งได้แก่ กล้ามเนื้อไหล่ (*Infraspinatus*, IF) กล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*, LD) กล้ามเนื้อลูกดิ่ง (*Semitendinosus*, ST) และกล้ามเนื้อใบพาย (*Biceps femoris*, BF) ข้อมูลที่ได้จากการทดลองจะถูกนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยโปรแกรม SAS Version 6.12 (SAS, 2001)

3.4 การศึกษาคุณภาพซาก

นำกระบือทั้งหมดเข้าฆ่าที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ตาก โดยทำการอดอาหารก่อนฆ่าประมาณ 24 ชั่วโมง ชั่ง และบันทึกน้ำหนักมีชีวิต จากนั้นทำการฆ่ากระบือแบบสากล ตามวิธีของสัญชัย (2550) ภายหลังฆ่าทำการชั่ง และบันทึกน้ำหนักซากอุ่น (hot carcass weight) อวัยวะภายนอก และอวัยวะภายใน จากนั้นนำซากกระบือซีกขวามาตัดแต่งซากแบบไทยตามวิธีของสัญชัย (2550) ทำการชั่งและบันทึกน้ำหนักชิ้นส่วนที่ได้จากการตัดแต่งแบบไทย สำหรับซากกระบือซีกซ้ายจะถูกนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 3±1°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการชั่งและบันทึกน้ำหนักซากเย็น (chilled carcass weight) และวัดความยาวซาก (carcass length) โดยวัดจากตำแหน่งซี่โครงซี่แรกถึงหัวกระดูก lumbar โดยใช้สายวัด จากนั้นทำการตัดแต่งซากแบบสากลตามวิธีของ สัญชัย (2550) วัดพื้นที่หน้าตัดเนื้อสัน และความหนาไขมันสันหลังบริเวณระหว่างกระดูกซี่โครงซี่ที่ 12-13 จากนั้นชั่งและบันทึกน้ำหนักชิ้นส่วนที่ได้จากการตัดแต่งแบบสากล นำค่าที่บันทึกได้ทั้งจากการตัดแต่งแบบไทยและสากล คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ซาก เปอร์เซ็นต์อวัยวะภายนอก เปอร์เซ็นต์อวัยวะภายใน และเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนตัดแต่งต่าง ๆ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ซาก} = \frac{\text{(น้ำหนักซากเย็น) x 100}}{\text{น้ำหนักมีชีวิต}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์อวัยวะภายนอก} = \frac{\text{(น้ำหนักอวัยวะภายนอก) x 100}}{\text{น้ำหนักมีชีวิต}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์อวัยวะภายใน} = \frac{\text{(น้ำหนักอวัยวะภายใน) x 100}}{\text{น้ำหนักมีชีวิต}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนตัดแต่ง = (น้ำหนักชิ้นส่วนตัดแต่ง) x 100
น้ำหนักมีชีวิต

3.4.1 การตัดแต่งซากแบบไทย (Thai cutting style)

นำซากกระบือซึกขวามาตัดแต่งซากแบบไทย โดยตัดแยกเอาเนื้อสันในออก จากนั้นแยกขาหน้าออกจากลำตัวเลาะเอาเนื้อแดงออกจากขาหน้า เลาะเนื้อแดงบริเวณไหล่ และเลาะเอาเสือร้องไห้ออก จากนั้นตัดแยกขาหลังออกจากลำตัวเลาะเอากล้ามเนื้อสะโพกและเนื้อน่องออกจากกระดูก เซาะเนื้อสันนอกออกจากกระดูกสันหลัง แล้วเลาะเอากระดูกซี่โครงออกทีละซี่จนหมด จึงตัดเนื้อใต้ซี่โครงออก จากนั้นทำการตัดแต่งเนื้อที่ได้เป็น เนื้อแดง เศษเนื้อ เอ็นพังผืด ไขมัน และกระดูก (สัญชัย, 2550) นำชิ้นส่วนที่ได้ชั่งน้ำหนักและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนตัดแต่ง

3.4.2 การตัดแต่งซากแบบสากล (standard USDA cutting style)

นำซากกระบือซึกซ้ายที่ผ่านการแช่เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 3±1°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาตัดแต่งซากแบบสากล โดยแบ่งซากกระบือออกเป็น 2 ส่วน คือเสี้ยวหน้า (forequarter) และเสี้ยวหลัง (hindquarter) โดยตัดผ่าระหว่างซี่โครงที่ 12 และ 13 ซึ่งซากเสี้ยวหน้าจะถูกแบ่งออกเป็น 5 ส่วนคือ ไหล่ (chuck) ยอดอก (brisket) ขาหน้า (fore shank) สันหลัง (rib) และพื้นอก (plate) และซากเสี้ยวหลังถูกแบ่งออกเป็น 5 ส่วนคือ ไขมันหุ้มไต (kidney knob) พื้นท้อง (flank) สันสะเอว (short loin) สันสะโพก (sirloin) และขาสะโพก (round) (สัญชัย, 2550) จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ได้ชั่งน้ำหนักและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนตัดแต่ง

หลังจากทำการตัดแต่งซากแล้วจึงทำการเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* (LD), *Infraspinatus* (IF), *Semitendinosus* (ST) และ *Biceps femoris* (BF) บรรจุในถุงพลาสติกผนึกแบบสุญญากาศ (vacuum package) จากนั้นเก็บเนื้อไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอการวิเคราะห์คุณภาพเนื้อต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 การศึกษาคุณภาพเนื้อ

3.5.1 การวัดค่าความเป็นกรดด่างของเนื้อ (muscle pH measurement)

วัดค่า pH หลังฆ่า 45 นาที และ 24 ชั่วโมง ที่บริเวณกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* (LD) และกล้ามเนื้อ *Semimembranosus* (SM) ด้วยเครื่อง pH – meter (Model 191, Knick, D - Berlin) และบันทึกค่า pH

3.5.2 การวัดสีเนื้อ (meat color measurement)

ตัดกล้ามเนื้อ *Infraspinatus* (IF), *Longissimus dorsi* (LD), *Semitendinosus* (ST) และ *Biceps femoris* (BF) หนาประมาณ 1 นิ้ว ใส่ถุงพลาสติกผนึกปากถุงเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อออกจากถุงวางในภาชนะเปิดเก็บในตู้เย็น 1 ชั่วโมง ทำการวัดสีด้วยเครื่อง Minolta Chroma Meter (Model CR – 300, Minolta Camera Co., LTD., Osaka, Japan) บันทึกค่าความสว่าง (lightness, L*) ค่าสีแดง (redness, a*) และค่าสีเหลือง (yellowness, b*)

3.5.3 ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ (water holding capacity)

3.5.3.1 การสูญเสียน้ำขณะเก็บรักษา (drip loss)

ตัดกล้ามเนื้อ IF, LD, ST และ BF หนาประมาณ 1 นิ้ว ชั่งน้ำหนักเริ่มต้น (Wd_1) ห่อด้วยผ้าก๊อสเก็บในถุงพลาสติก ให้ชิ้นเนื้ออยู่ห่างจากก้นถุงประมาณ 2 เซนติเมตร ผนึกปากถุงให้สนิทแขวนในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นเนื้อออกจากถุง ชั่งน้ำหนัก (Wd_2) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำ จากสูตร

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

3.5.3.2 การสูญเสียน้ำจากการทำละลายน้ำแข็ง (thawing loss) และการสูญเสียน้ำจากการประกอบอาหาร (cooking loss) โดยใช้กล้ามเนื้อ IF, LD, ST และ BF หนาประมาณ 1 นิ้ว ชั่งน้ำหนักเริ่มต้น (Wt_1) เก็บแบบสุญญากาศ (vacuum) ในถุงพลาสติกชนิดเย็นผนึกปากถุงให้สนิท เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C รอการวิเคราะห์ต่อไป จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาละลายน้ำแข็ง (thawing) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ซับน้ำให้แห้งและชั่งน้ำหนัก (Wt_2) จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ได้เก็บแบบสุญญากาศในถุงร้อน ต้มในหม้อควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany) ให้อุณหภูมิน้ำเท่ากับ 80°C ต้มจนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อประมาณ 70°C ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ซับน้ำให้แห้งและชั่งน้ำหนัก (Wt_3) คำนวณเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำขณะทำละลาย และเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำขณะประกอบอาหาร จากสูตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

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

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

3.5.3.3 การสูญเสียน้ำขณะปิ้งย่าง (grilling loss) นำกล้ามเนื้อ IF, LD, ST และ BF หนาประมาณ 1 นิ้ว ตัดแต่งไขมันและพังผืดออก ทำการชั่งน้ำหนัก (Wg_1) จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ได้ย่างในหม้ออบ (convection oven) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 150°C จนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อประมาณ 70°C และนำออกจากเตาย่าง ทำการชั่งน้ำหนัก (Wg_2) คำนวณเปอร์เซ็นต์การสูญเสียขณะปิ้งย่าง จากสูตร

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

3.5.4 ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (shear force value)

นำเนื้อที่ต้มสุกจากการหาค่าการสูญเสียน้ำขณะประกอบอาหาร (cooking loss) เจาะเนื้อตามแนวเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยเหล็กกลวงชนิดกลม (core) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร วัดค่าแรงตัดผ่านด้วยเครื่อง Instron 5565 (Instron, Ltd., England) หัววัดกำลัง 5 kN (Warner Bratzler Shear) วัดด้วยความเร็ว 200 มิลลิเมตร/นาที โดยแปลผลเป็นค่าแรงสูงสุด (maximum force, N) ค่าพลังงาน (energy, J) และระยะทาง (extension, mm)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.5 การประเมินด้านการตรวจชิม (sensory evaluation)

นำกล้ามเนื้อ IF, LD, ST และ BF หนาประมาณ 1 นิ้วมาอบที่อุณหภูมิ 150°C จนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อประมาณ 70°C ตัดเนื้อให้มีขนาดเท่ากันด้วยเขียงที่มีลักษณะเป็นช่องขนาด 1 เซนติเมตร จากนั้นเสิร์ฟให้แก่ผู้ตรวจชิม ซึ่งได้ผ่านการฝึกฝนการตรวจชิมจำนวน 6 คน ผู้ตรวจชิมจะได้รับแบบสอบถามการตรวจชิมเนื้อ และฟังการบรรยายขั้นตอนการตรวจชิมโดยละเอียด ซึ่งการ

ให้คะแนนการตรวจชิมจะพิจารณา 4 ลักษณะ คือ ความนุ่ม (tenderness) ความชุ่มฉ่ำ (juiciness) กลิ่นและรสชาติ (flavor) และความพอใจโดยรวม (overall acceptability) โดยให้คะแนนอยู่ในช่วง 1 - 9 คะแนน (1 = เหนียว กลิ่นรสไม่ดี แห้ง และไม่ชอบมาก ; 5 = นุ่ม มีกลิ่นและรสชาติดี ชุ่มฉ่ำ และมีความพอใจ ; 9 = นุ่มที่สุด กลิ่นและรสชาติดีที่สุด ชุ่มฉ่ำดีที่สุด และมีความชอบที่สุด) ผู้ตรวจชิมจะได้รับน้ำ และขนมปังหลังจากทดสอบชิมเนื้อแต่ละชิ้น (ไพโรจน์, 2535)

3.5.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (chemical composition)

นำกล้ามเนื้อ IF, LD, ST และ BF บดด้วยเครื่อง blender (Moulinex 645, Mexico) เพื่อใช้วิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนะ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ความชื้น โปรตีน และไขมัน ด้วยวิธี Proximate analysis (AOAC, 1995)

3.5.6.1 การวิเคราะห์หาความชื้น (moisture analysis)

วิธีการ

1. นำถ้วยสำหรับใส่ตัวอย่างวิเคราะห์หาความชื้น (weighing bottle) ที่ล้างสะอาดอบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 100-102°C นาน 1 ชั่วโมง และนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นและชั่งน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดละเอียดแล้วจำนวน 2 กรัม ใส่ใน weighing bottle บันทึกน้ำหนักรวมทั้งหมด และอบที่อุณหภูมิ 100°C 4 ชั่วโมง
3. นำถ้วยที่มีตัวอย่างออกจากตู้อบ ใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่หายไป คือ ปริมาณความชื้น

การคำนวณหาปริมาณความชื้น

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

A = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

B = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

C = น้ำหนักตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.6.2 การวิเคราะห์หาโปรตีน (protein analysis)

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดแล้ว 0.5 กรัม ใส่ในกระดาษชั่งตัวอย่าง แล้วนำใส่ใน kjeldahl flask
2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา 2 กรัม (K_2SO_4 : $CuSo_4$; 20 : 1) แล้วเติม conc. sulfuric acid 15 ml
3. นำ kjeldahl flask เข้าเครื่องย่อยที่อุณหภูมิ 420°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนกระทั่งได้สาร ละลายสีเขียวใส แล้วทิ้งให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่น 50 ml เขย่าให้เข้ากัน
4. ตวงสารละลาย 4 % boric acid 25 ml ใส่ erlenmeyer flask No. 250 ml แล้วเติม screen methylred indicator
5. นำ kjeldahl flask ต่อเข้าเครื่องกลั่น แล้วนำขวด erlenmeyer flask ที่ใส่สารละลาย 4 % boric acid ต่อเข้ากับอีกปลายของ condenser ของเครื่องกลั่น โดยให้ปลายท่อจุ่มในสารละลาย
6. เติม 40 % sodium hydroxide ใส่ขวด kjeldahl flask 50 ml แล้วเปิดน้ำให้ไหลผ่านตัว condensor แล้วจึงเปิดเครื่องกลั่น
7. กลั่นจนได้ปริมาตรของสารละลายในขวด erlenmeyer flask ประมาณ 200 ml จากนั้นนำขวด erlenmeyer flask ที่มีแอมโมเนียที่เก็บในสารละลาย 4 % boric acid มาไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 *N* H_2SO_4 ไตรเตรทจนสีของสารละลายเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีม่วงอมเทา

การคำนวณหาปริมาณโปรตีน

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

A = จำนวนปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 0.1 *N* ที่ใช้ในการไตรเตรทกับตัวอย่าง (ml)

B = จำนวนปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 0.1 *N* ที่ใช้ในการไตรเตรทกับ blank (ml)

C = ความเข้มข้น (*N*) ของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

D = น้ำหนักตัวอย่าง

E = kjeldahl factor (6.25)

3.5.6.3 การวิเคราะห์หาไขมัน (fat analysis)

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักเนื้อที่บดแล้ว 2 กรัม อบที่ 100°C 4 ชั่วโมง
2. นำขวดสำหรับหาไขมัน (round bottom) ที่ผ่านการล้างสะอาด แล้วอบ 100°C นาน 1 ชั่วโมง และใส่ในโถดูดความชื้น (disiccator) ปล่อยให้เย็น ทำการชั่งหาน้ำหนักที่ได้
3. นำตัวอย่างเนื้อที่ผ่านการอบ หรือผ่านการหาความชื้นแล้ว ใส่ใน thimble alundum ที่สะอาด และแห้ง
4. ใส่ thimble alundum ลงใน sample containers แล้วต่อเข้ากับ holding clips ของเครื่องสกัดไขมันแบบ soxhlet extraction
5. ใส่ dichloromethane ลงในขวดหาไขมัน 30 ml แล้วนำต่อเข้ากับเครื่องสกัดไขมันให้สนิท
6. เปิดน้ำเย็นให้ไหลผ่าน condensor ตลอดเวลา
7. เปิดสวิทซ์ไฟโดยใช้ความร้อนสกัดนาน 16 ชั่วโมง ด้วยอัตราการกลั่น 2-3 หยดต่อวินาที
8. นำ sample containers ออก แล้วนำ reclaming tube ใส่แทนที่ ให้ความร้อน dichloromethane จะถูกกลั่น และถูกเก็บใน reclaming tube ส่วนไขมันที่ได้จะอยู่ในขวดสกัดไขมัน
9. นำขวดสกัดไขมันที่มีไขมันที่สกัดได้ อบที่อุณหภูมิ 100°C นาน 30 นาที แล้วเอาออกใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นภายหลังการสกัดคือน้ำหนักของไขมัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณหาปริมาณไขมัน

$$\text{Fat percentage} = \left(\frac{(A - B)}{C} \right) \text{x100}$$

A = น้ำหนักขวดสกัดไขมัน + น้ำหนักไขมันหลังอบแล้ว

B = น้ำหนักขวดสกัดไขมัน

C = น้ำหนักตัวอย่าง

3.5.7 การวิเคราะห์หาปริมาณคอลลาเจนในกล้ามเนื้อ (collagen analysis)

วิธีการวิเคราะห์หาค่าคอลลาเจนที่ละลายได้และละลายไม่ได้ (soluble and insoluble collagen analysis) (Hill, 1969 ; AOAC, 1996) มีวิธีการดังนี้

ขั้นตอนการแยก (Hill, 1969)

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดแล้ว 4 กรัม ใส่ในหลอด homogenize ขนาด 30 ml
2. ใส่ strength ringer solution 8 ml
3. Homogenize 10,000 rpm 1 นาที
4. ต้มใน water bath 77°C 70 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น 1 ชั่วโมง
5. ปั่นเหวี่ยงที่ 5,200 g 26 นาที
6. แยกส่วน supernatant ใส่ erlenmeyer flask และส่วน residue ใส่ erlenmeyer flask เช่นเดียวกัน

ขั้นตอนการย่อย (AOAC, 1996)

1. เติมกรด sulfuric acid 7 *N* 30 ml ปิดด้วยกระจกนาฬิกา ใส่ตู้อบที่อุณหภูมิ 105 ± 1°C 16 ชั่วโมง
2. นำตัวอย่างที่ได้จากการย่อยกรองผ่านกระดาษกรองใส่ใน volumetric flask ขนาด 500 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ

ขั้นตอนการทำสี (AOAC, 1996)

1. ปิเปตสารละลายที่ได้ในขั้นตอนแรก 2 ml ใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 10 ml ตัวอย่างละ 2 หลอด และทำ blank โดยการเติมน้ำกลั่น 2 ml ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติม oxidant solution 1 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ± 2 นาที
3. เติม color reagent หลอดละ 1 ml เขย่าทันที และปิดฝาหลอดให้สนิท
4. ต้มใน water bath อุณหภูมิ 60 ± 0.5°C 15 นาที
5. ทำหลอดให้เย็นโดยการเปิดน้ำให้ไหลผ่าน 3 นาที
6. ทำหลอดให้แห้งโดยการเช็ดหรือตั้งทิ้งไว้
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 558 ± 2 nm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สูตรในการคำนวณหาปริมาณ hydroxyproline

H, mg/g = (h x 2.5 x 1000)/m

h = hydroxyproline, g/2 ml อ่านค่าจาก standard curve

m = weight sample, g

นำเอาส่วน ที่ละลายได้ คูณด้วย 7.52 และส่วนที่ไม่ละลาย คูณด้วย 7.25

3.5.8 การวิเคราะห์หาค่าการหืน (Thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) (Rossell, 1994)

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดแล้ว 10 กรัม เติมน้ำกลั่น 70 ml
2. ปั่นใน Waring blender ประมาณ 15 วินาที
3. เทใส่ใน distillation flask แล้วล้าง blender ด้วยน้ำกลั่น 30 ml
4. เติม 4 M HCl 2.5 ml
5. เติม anti-foaming agent 1-2 หยด
6. ต่อเข้ากับชุดกลั่น แล้วกลั่นจนได้ของเหลวประมาณ 50 ml
7. ปิเปตสารละลายที่กลั่นได้ 5 ml แล้วเติม TBA solution 5 ml
8. นำไปต้มใน water bath อุณหภูมิ 100°C นาน 35 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น
9. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร
10. คำนวณค่า TBA number จากสูตร

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

สูตรในการคำนวณค่า TBA number

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

O.D. = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.9 การวิเคราะห์หาปริมาณคอเลสเตอรอล (cholesterol analysis) (Jung *et al*., 1975)

วิธีการ

1. ทำการสกัดไขมัน ตามวิธีของ AOAC (1995)
2. นำไขมันที่สกัดได้มาละลายด้วย 2-propanol ให้มีความเข้มข้น 50 mg/ml
3. ดูดไขมันจากข้อ 2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 25 ml
4. เติม alcoholic KOH 10 ml แล้วนำไปต้มใน water bath อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น
5. เติม petroleum ether 5 ml เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture
6. เติมน้ำกลั่น 5 ml เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture
7. เทสารละลายทั้งหมดลงในกรวยแยก ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น
8. เก็บส่วนที่ละลายในชั้น petroleum ether แล้วนำไประเหยแห้งใน water bath อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
9. ดูดสารละลายข้อ 8 มา 50 ไมโครลิตร ใส่ใน screwed cap tube 13 x 100 mm เติม ferric -uranyl acetate 5 ml เขย่าอย่างแรงด้วย vortex mixture นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,700 รอบ/นาที นาน 5 นาที
10. เตรียมหลอดอ่านขนาด 13 x 100 mm ชุดใหม่ แล้วเติม sulfuric acid reagent หลอดละ 2 ml
11. ดูด supernate จากหลอดในข้อ 9 ปริมาณ 3 ml ใส่ในหลอดอ่านที่เติม sulfuric reagent
12. ผสมให้เข้ากันทันทีด้วย vortex mixer อย่างน้อย 20 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที
13. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยอ่านค่าดูดกลืนแสงของหลอด blank เป็นศูนย์ บันทึกค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

หมายเหตุ : หลอด blank จะเติมเฉพาะ ferric - uranyl acetate 3 ml และ sulfuric acid reagent 2 ml

สูตรในการคำนวณหาปริมาณคอเลสเตอรอล

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Au = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

As = ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายคอเลสเตอรอลมาตรฐาน

Cs = ค่าความเข้มข้นของสารละลายคอเลสเตอรอลมาตรฐาน

3.5.10 การวิเคราะห์หาปริมาณไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride analysis) ตามวิธีของ Bigg *et al.* (1975)

วิธีการ

1. สกัดไขมันตามวิธี AOAC (1995)
2. ทำไขมันที่สกัดได้จากเนื้อให้มีความเข้มข้น 50 mg/ml ด้วย isopropanol
3. ดูดสารละลายจากข้อ 2 มา 50 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 25 ml
4. เติม N-heptane 2 ml
5. เติม isopropanol 3.5 ml
6. เติม sulfuric acid 40 mM 1 ml
7. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture 20 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จนแยกชั้น
8. เตรียมหลอดอ่าน 1 ชุด เติม sodium alkoxide 2 ml
9. ดูดสารละลายที่แยกชั้นในส่วนบนของข้อ 7 จำนวน 0.2 ml ใส่ลงในหลอดอ่านที่เตรียมไว้
10. เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปใส่ตู้อบอุณหภูมิ 60°C นาน 5 นาที
11. เติม sodium periodate 1 ml ผสมให้เข้ากัน
12. เติม acetyl acetone 1 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วนำเข้าตู้อบ 60°C นาน 20 นาที
13. ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 420 nm โดยอ่านค่า blank เป็นศูนย์

หมายเหตุ : หลอด blank เติมสารละลายทุกอย่างยกเว้นตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สูตรในการคำนวณหาปริมาณไตรกลีเซอไรด์

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

A = ปริมาณ 2-propanol (ml) ที่ใช้ละลายไขมัน

B = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

C = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

O.D.sample = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

O.D.standard = ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน

3.5.11 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมัน (fatty acid analysis)

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

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดแล้ว 5 g ใส่ลงในขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 100 ml
2. เติม chloroform : methanol (2 : 1) 60 ml ปิดฝาแล้วเขย่าอย่างแรงเพื่อให้เกิดการสกัดที่สมบูรณ์
3. กรองด้วย Buchner funnel ผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 ลงใน flask นำกากที่ได้มาสกัดต่อด้วย chloroform : methanol (2 : 1) 60 ml อีกครั้ง
4. รวมสารละลายที่กรองได้ใส่ใน separate flask เติมน้ำกลั่น 12 ml ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น
5. เก็บสารละลายชั้นล่างใส่ลง flask ที่ทราบน้ำหนัก แล้วนำไประเหยแห้งด้วย water bath ที่อุณหภูมิ 70°C
6. ชั่งน้ำหนักไขมันหลังจากระเหยแห้ง แล้วละลายด้วย chloroform ปรับความเข้มข้นให้เป็น 30 mg/ml (น้ำหนักไขมัน x 33.33)

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

1. ดูดสารละลายที่สกัดได้ 1 ml ใส่ลงในขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 250 ml
2. ระเหยให้แห้งภายใต้กระแสไนโตรเจน
3. เติมสารลาย 0.5 M NaOH ใน methanol 4 ml เขย่า 30 วินาที
4. reflux จนได้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เวลาประมาณ 5 นาที ทั้งให้เย็น
5. เติม 20 % boron – trifluoride ใน methanol 5 ml เขย่า 30 วินาที แล้ว reflux ต่ออีก 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
6. เทสารละลายที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 100 ml เติมสารละลาย NaCl อิ่มตัว 3 ml เขย่าให้เข้ากัน
7. เติม Iso–octane (2, 2, 4 – trimethylpentane) 1ml เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture 30 วินาที ทิ้งไว้ให้แยกชั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8. เก็บสารละลายชั้นบน 1 ml ใส่ใน vial ที่มี sodium sulfate anhydrous ปริมาณเท่าปลายช้อนตักสาร แล้วปิด vial ให้สนิทเก็บในตู้เย็นเพื่อรอการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC)

ขั้นตอนที่ 3 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC)

1. ดูดสารละลาย FAME ที่เตรียมไว้ 1 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง GC (GC-14B, Shimadzu, Japan) ควบคุมด้วยโปรแกรม GC-Solution โดยมี condition ดังนี้
2. คำนวณปริมาณกรดไขมันแต่ละตัวจากสมการ

   mg of fatty acid/100 g of sample = [(area of fatty acid in sample/area of fatty acid in standard) x concentration of fatty acid in standard (mg/ml) x Iso-octane (ml) x chloroform (ml) x 100]/sample weight (g)

3.5.12 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน (amino acid analysis) (Liu *at al.,* 1995 and Lourdes *et al*., 2006)

ขั้นตอน Hydrolysis และ derivatization

1. นำตัวอย่างกล้ามเนื้อ LD (*longissimus dorsi*) มาบดและชั่งประมาณ 100 mg
2. นำตัวอย่างใส่ในขวด wide – mouth bottle ขนาด 125 ml จากนั้นเติม 6 N HCl 5 ml
3. ย่อยตัวอย่างด้วยเครื่อง heating block ที่อุณหภูมิ 110°C นาน 22 ชั่วโมง
4. เติม internal standard ลงในตัวอย่างที่ผ่านการย่อยแล้ว จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านกระบวนการ deionized แล้วนำไปกรอง
5. นำตัวอย่างที่กรองได้มาเติม AccQ – fluor derivatization buffer และ AccQ – fluor reagent
6. นำตัวอย่างมาให้ความร้อนด้วยเครื่อง heating block ที่อุณหภูมิ 55°C นาน 10 นาที จากนั้นนำตัวอย่างสารละลาย 5 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (Water Alliance 2695) โดยใช้เครื่อง detector แบบ fluorescence (EX : 250, EM : 395 nm) ใช้คอลัมน์ Hypersil Gold (4.6*150 mm particle size 3 μ) ควบคุมอุณหภูมิที่ 35 ± 1°C ค่าที่ได้จะถูกนำมาคำนวณโดยใช้โปรแกรม Millenium Version 4.02

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved