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-2010	Shimadzu	Japan
11. Hot plate thermolyne	Cimarec 3	Northern chemical	Thailand
12. Texture analyzer	TA-XT2i/50		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	4001/4	Thermo Spectronic	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
30. Refrigerator	SJ-N72U	Sharp	Thailand

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	Lab-scan
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 chloride hydrate	Analytical reagent	Fisher
18. ammonium hydroxide	Analytical reagent	J.T.Baker

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

19. glacial 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

ปลาเรนโบว์เทร้าต์ (Rainbow trout; *Oncorhynchus mykiss*) จำนวน 120 ตัว ทำการศึกษาโดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม แต่ละกลุ่มการทดลองมีการสุ่มปลาเรนโบว์เทร้าต์ในแต่ละบ่ออย่างเท่ากัน ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ปลาเรนโบว์เทร้าต์อายุ 10 เดือน จำนวน 60 ตัว

กลุ่มที่ 2 ปลาเรนโบว์เทร้าต์อายุ 12 เดือน จำนวน 40 ตัว

กลุ่มที่ 3 ปลาเรนโบว์เทร้าต์อายุ 24 เดือน จำนวน 20 ตัว

การเลี้ยงปลาเรนโบว์เทร้าต์ในทุกระยะ จะทำการเลี้ยงโดย หน่วยวิจัยประมงบนพื้นที่สูงดอยอินทนนท์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดเชียงใหม่ โดยงานวิจัยประมงบนที่สูง ศูนย์วิจัยประมงน้ำจืดเชียงใหม่ กม.31 ระดับความสูงจากน้ำทะเล 1293 เมตร เขตอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ เมื่อครบอายุแล้วจึงนำปลาเรนโบว์เทร้าต์ไปศึกษาคุณภาพซากและเนื้อต่อไป

ข้อมูลการเลี้ยงทั่วไป

การเลี้ยงปลาเรนโบว์เทร้าต์ในบ่อปูนซีเมนต์ขนาด 28 ตารางเมตร โดยมีน้ำไหลผ่านเข้า-ออกตลอดเวลา อัตราการไหลผ่านของน้ำ (water flow rate) ไม่น้อยกว่า 500 ลิตร/นาที โดยมีอุณหภูมิน้ำเฉลี่ยตลอดทั้งปี 18 °C อุณหภูมิต่ำสุดในฤดูหนาว 6 °C และอุณหภูมิสูงสุด 23 °C ที่เหนือระดับน้ำทะเลปานกลาง 1,290 เมตร

อาหารและการให้อาหาร

ให้อาหารปลาเรนโบว์เทร้าต์จะขึ้นอยู่กับขนาดของปลาและอุณหภูมิของน้ำ (ดังตาราง 3-1) จะแบ่งการให้อาหารออกเป็น สองช่วง คือ เช้า และเย็น ปริมาณเท่า ๆ กัน ซึ่งปริมาณอาหารจะขึ้นอยู่กับน้ำหนักตัวของปลาเรนโบว์เทร้าต์ในแต่ละช่วงอายุ จะทำการสุ่มชั่งน้ำหนัก และหาค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวทุก ๆ เดือน อาหารปลาเรนโบว์เทร้าต์ เป็นอาหารชนิดเม็ดสำเร็จรูปลอยน้ำขนาด 4 มิลลิเมตร

ข้อจำกัดในการให้อาหาร

1. เมื่อค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved Oxygen: DO) ต่ำกว่า 5 ppm จะทำการงดอาหารในระหว่างมื้อนั้น ๆ โดยปกติมักจะพบในช่วงฤดูร้อน

2. เมื่อเกิดเหตุการณ์น้ำป่าไหลหลาก จะทำให้น้ำขุ่น จะต้องทำการงดอาหารในระหว่างมื้อนั้น ๆ โดยปกติมักเกิดขึ้นในช่วงฤดูฝนและมักเกิดขึ้นในเวลาไม่นานน้ำจึงจะกลับมาใสตามปกติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 3-1 Feeding level (% of fish biomass) according to water temperature and size of fish (Leutritz and Lewis, 1980; Pornsopin, 2004)

Water temperature °C	Average weight of fish (g/fish)										
	0-0.17 g	0.18-1.5 g	1.50-5.15 g	5.15-12.3 g	12.3-23.7 g	23.7-39.8 g	39.8-61.4 g	61.4-92.1 g	92.1-130.9 g	130.9-179.66 g	179.66-up
10.00	5.2	4.3	3.4	2.7	2.0	1.7	1.4	1.2	1.1	1.0	0.9
10.56	5.4	4.5	3.5	2.8	2.1	1.7	1.5	1.3	1.1	1.0	0.9
11.11	5.4	4.5	6.6	2.8	2.1	1.7	1.5	1.3	1.1	1.0	0.9
11.67	5.6	4.7	3.8	2.9	2.2	1.8	1.5	1.3	1.1	1.1	1.0
12.22	5.8	4.9	3.9	3.0	2.3	1.9	1.6	1.4	1.3	1.1	1.0
12.78	6.1	5.1	4.2	3.2	2.4	2.0	1.6	1.4	1.3	1.1	1.0
13.33	6.3	5.3	4.3	3.3	2.5	2.0	1.7	1.5	1.3	1.2	1.0
13.88	6.7	5.5	4.5	3.5	2.6	2.1	1.8	1.5	1.4	1.2	1.1
14.44	7.0	5.8	4.8	3.6	2.7	2.2	1.9	1.6	1.4	1.3	1.2
15.00	7.3	6.0	5.0	3.7	2.8	2.3	1.9	1.7	1.5	1.3	1.2
15.56	7.5	6.3	5.1	3.9	3.0	2.4	2.0	1.7	1.5	1.4	1.3
16.11	7.8	6.5	5.3	4.1	3.1	2.5	2.0	1.8	1.6	1.4	1.3
16.67	8.1	6.7	5.5	4.3	3.2	2.6	2.1	1.8	1.6	1.5	1.4
17.22	8.4	7.0	5.7	4.5	3.4	2.7	2.1	1.9	1.7	1.5	1.4
17.78	8.7	7.2	5.9	4.7	3.5	2.8	2.2	1.9	1.7	1.6	1.5
18.33	9.0	7.5	6.1	4.9	3.6	2.9	2.2	2.0	1.8	1.6	1.5
18.89	9.3	7.8	6.3	5.1	3.8	3.0	2.3	2.0	1.8	1.6	1.6
19.44	9.6	9.1	6.6	5.3	3.9	3.1	2.4	2.1	1.9	1.7	1.6
20.00	9.6	9.4	6.9	5.5	4.0	3.2	2.5	2.1	2.0	1.8	1.7

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 3-2 Rainbow trout feed ingredients.

Ingredient	%
Fish meal	62
Corn gluten	10
Wheat flour	15
Premix	1.7
Tuna oil	7.3
Total	**100**

Table 3-3 Composition and characteristics of experimental diet

Chemical composition	%
Dry matter	6.64
Ether extract	12.15
Crude protein	42.63
Ash	12.65
Crude fiber	0.62

Table 3-4 Fatty acid profile of experimental diets (% of total fatty acid)

Criteria	**%**
C 14:0	3,126
C 14:1	0.800
C 15:0	5.133
C 15:1	0.322
C 16:0	23.279
C 16:1	1.131
C 17:0	0.557
C 17:1	7.627
C 18:0	23.448
C 18:1	14.903
C 18:2n6cis	0.260

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 3-4 Fatty acid profile of experimental diets (% of total fatty acid) (continue)

Criteria	%
C 18:2n6tran	1.367
C 18:3n6	0.546
C 18:3n3 (ALA)	0.163
C 20:0	0.274
C 20:1	0.399
C 20:3n3	3.595
C 20:3n6	0.289
C 20:4n6	0.070
C 20:5n3 (EPA)	0.991
C 21:0	0.570
C 22:1	0.091
C 22:2	0.736
C 22:6n3 (DHA)	9.908
C 24:0	0.247
C 24:1	0.167
SFA	56.635
MUFA	25.440
PUFA	17.925
PUFA:SFA	0.317
n-6 PUFA	2.532
n-3 PUFA	14.657
n-6:n-3	0.173
Total FA (mg/100 g fillet)	5804.687

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.2 การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วางแผนการทดลองในการศึกษาคุณภาพเนื้อปลาเรนโบว์เทร้าต์ แบบ 3 x 2 factorial โดยมีปัจจัยในการทดลอง คือ อายุ (10, 12 และ 24 เดือน ตามลำดับ) และชนิดของกล้ามเนื้อ (กล้ามเนื้อส่วนหลัง (dorsal fillet) และ กล้ามเนื้อส่วนท้อง (ventral fillet) ข้อมูลที่ได้จากการทดลองจะถูก

นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยโปรแกรม SAS version 6.12 (SAS, 2001)

3.4 การศึกษาคุณภาพซาก

เมื่อปลาเรนโบว์เทร้าต์อายุ ได้ตามต้องการคือ 10 12 และ 24 เดือน จึงนำปลาเรนโบว์เทร้าต์ทำให้สลบโดยแช่น้ำแข็ง หลังจากนั้น ทำการบันทึกน้ำหนักตัวปลาและฆ่า ล้วงเอาเครื่องในออก บันทึกน้ำหนักซาก และเครื่องใน และทำการวัดความยาวซากต่าง ๆ ได้แก่ ความยาวทั้งตัว (total length) ความยาวมาตรฐาน (standard length) ความยาว ส่วนหัว (head length) ความลึก (depth) และความหนาของลำตัว (thickness) (สุภาพร, 2542) จากนั้นนำซากบรรจุน้ำแข็งมายังห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์ และสัตว์น้ำ และนำซากแช่เย็นที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำซากมาตัดแต่ง แล้วจดบันทึกน้ำหนักส่วนต่าง ๆ เช่น น้ำหนักหัวและครีบ (head and fins weight) น้ำหนักกระดูก (bone weight) น้ำหนักหนัง (skinned weight) น้ำหนักกล้ามเนื้อส่วนหลัง (dorsal fillet weight) และน้ำหนักกล้ามเนื้อส่วนท้อง (ventral fillet weight) เป็นต้น

3.5 การศึกษาคุณภาพเนื้อ

เก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อส่วนหลัง (dorsal fillet) และ กล้ามเนื้อส่วนท้อง (ventral fillet) หลังจากนำซากแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์คุณภาพเนื้อ ซึ่งประกอบด้วย

3.5.1 การวัดค่าความเป็นกรดด่างของเนื้อ (muscle pH measurement)

วัดค่าความเป็นกรดด่างของกล้ามเนื้อที่ 5, 45 นาที และ 24 ชั่วโมงหลังตาย ที่บริเวณกล้ามเนื้อส่วนหลัง (dorsal fillet) และกล้ามเนื้อส่วนท้อง (ventral fillet) ด้วยเครื่อง pH-meter (Model 191, Knick, D-Berlin) และบันทึกค่า pH

3.5.2 การวัดค่าสีของเนื้อ (meat color measurement)

กล้ามเนื้อส่วนหลัง (dorsal fillet) และ กล้ามเนื้อส่วนท้อง (ventral fillet) 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*)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.3 การประเมินด้านการตรวจชิม (sensory evaluation)

นำกล้ามเนื้อส่วนหลังและส่วนท้องมาอบที่อุณหภูมิ 150 °C จนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อประมาณ 55°C ตัดเนื้อให้มีขนาดเท่ากันด้วยเขียงที่มีลักษณะเป็นช่องขนาด 1 เซนติเมตร จากนั้นเสิร์ฟให้แก่ผู้ตรวจชิม ซึ่งได้ผ่านการฝึกฝนการตรวจชิมจำนวน 6 คน ผู้ตรวจชิมจะได้รับแบบสอบถามการตรวจชิมเนื้อ และฟังการบรรยายขั้นตอนการตรวจชิมโดยละเอียด ซึ่งการให้คะแนนการตรวจชิมจะพิจารณา 5 ลักษณะ คือ ความคงตัว (firmness) กลิ่น (odour) ความชุ่มฉ่ำ (juiciness) ความนุ่ม (tenderness) และความพอใจโดยรวม (acceptability) โดยมีการให้คะแนนตั้งแต่ 1 ถึง 9 ซึ่งหมายถึง ความพอใจน้อยที่สุดไปจนถึงพอใจมากที่สุด ผู้ตรวจชิมจะได้รับน้ำ และขนมปังหลังจากทดสอบชิมเนื้อแต่ละชิ้น (Johansson *et al*., 2000 และไพโรจน์, 2535)

3.5.4 องค์ประกอบทางเคมี (chemical composition)

นำกล้ามเนื้อส่วนหลังและส่วนท้องแต่ละกลุ่มการทดลอง บดด้วยเครื่อง Blender (Moulinex 645, Mexico) เพื่อใช้วิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนะ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ความชื้น โปรตีน และไขมัน ด้วยวิธี Proximate analysis (AOAC, 1995)

3.5.4.1 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
4.

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

3.5.4.2 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

D = น้ำหนักตัวอย่าง

E = kjeldahl factor (6.25)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.4.3 การวิเคราะห์หาไขมัน (ether extract analysis)

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่บดแล้ว 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

การคำนวณหาปริมาณไขมัน

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

A = น้ำหนักขวดสกัดไขมัน + น้ำหนักไขมันหลังอบแล้ว

B = น้ำหนักขวดสกัดไขมัน

C = น้ำหนักตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.5 ปริมาณคอลลาเลน (collagen content)

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

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.6 ค่าการหืน (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 TBARS

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

O.D. = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

3.5.7 ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ (water holding capacity) (สัญชัย, 2551)

3.5.7.1 การสูญเสียน้ำขณะเก็บรักษา (drip loss)

นำกล้ามเนื้อส่วนหลังและส่วนท้อง ชั่งน้ำหนักเริ่มต้น (Wd_1) ห่อด้วยผ้ากอซเก็บในถุงพลาสติก ให้ชิ้นเนื้ออยู่ห่างจากก้นถุงประมาณ 2 เซนติเมตร ผนึกปากถุงให้สนิทแขวนในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นเนื้อออกจากถุง ชั่งน้ำหนัก (Wd_2) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำ จากสูตร

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

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

นำกล้ามเนื้อส่วนหลังและส่วนท้อง ชั่งน้ำหนักเริ่มต้น (Wt_1) เก็บแบบสุญญากาศ (vacuum) ในถุงพลาสติกชนิดเย็นผนึกปากถุงให้สนิท เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 °C รอการวิเคราะห์ต่อไป จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาละลายน้ำแข็ง (thawing) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ซับน้ำให้แห้งและชั่งน้ำหนัก (Wt_2) จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ได้เก็บแบบสุญญากาศในถุงร้อน ต้มในหม้อควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany) ให้อุณหภูมิน้ำเท่ากับ 80°C ต้มจนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อประมาณ 65 °C ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ซับน้ำให้แห้งและชั่งน้ำหนัก (Wt_3) คำนวณเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำขณะทำละลาย และเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำขณะประกอบอาหาร จากสูตร

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

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

3.5.7.3 การสูญเสียน้ำขณะปิ้งย่าง (grilling loss)

นำกล้ามเนื้อส่วนหลังและส่วนท้องทำการชั่งน้ำหนัก (Wg_1) จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ได้ห่อด้วยฟอยด์สองชั้นและย่างในหม้ออบ (convection oven) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 150 °C จนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อประมาณ 65 °C และนำออกจากเตาย่าง ทำการชั่งน้ำหนัก (Wg_2) คำนวณเปอร์เซ็นต์การสูญเสียขณะปิ้งย่าง จากสูตร

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

3.5.8 ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (shear force value)

นำเนื้อปลาเรนโบว์เทร้าต์ที่ต้มสุกจากการหาค่าการสูญเสียน้ำขณะประกอบอาหาร (cooking loss) และเนื้อดิบ ทำการวัดค่าแรงตัดผ่านด้วยเครื่อง Texture analyzer (TA-XT2i/50, UK) วัดด้วยความเร็ว 2.0 มิลลิเมตร/วินาที ด้วยความหนา 3 มิลลิเมตร ตัดด้วยใบมีดทำมุม 73 องศาโดยแปลผลเป็นค่าแรงตัดผ่านสูงสุด (maximum force, N) และค่าพลังงาน (energy, J)

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

วิธีการ

1. ทำการสกัดไขมัน ตามวิธีของ AOAC (1995)
2. นำไขมันที่สกัดได้มาละลายด้วย 2-propanol ให้มีความเข้มข้น 50 mg/ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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 supernatant 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

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

Au = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

As = ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายคอเลสเตอรอลมาตรฐาน

Cs = ค่าความเข้มข้นของสารละลายคอเลสเตอรอลมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.10 การวิเคราะห์หาปริมาณไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride analysis) (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

สูตรในการคำนวณหาปริมาณไตรกลีเซอไรด์

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

A = ปริมาณ 2-propanol (ml) ที่ใช้ละลายไขมัน

B = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

C = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

O.D.sample = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

O.D.standard = ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน

3.5.11 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมัน (fatty acids analysis)

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

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดแล้ว 5 g ใส่ลงในขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 100 ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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
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-2010, Shimadzu, Japan) ควบคุมด้วยโปรแกรม GC-Solution
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)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved