บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

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.XT plus	Stable Micro System	England
13. Kjeldahl extraction	-	Gerhardt	Germany
14. Kjeldahl flask	-	Gerhardt	Germany
15. Minolta chroma meter	CR - 400	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 × 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

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. petroleum ether	Analytical reagent	Lab - scan
15. uranyl acetate	Analytical reagent	Merck
16. anhydrous sulfate	Analytical reagent	Merck

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อสารเคมี	เกรด	บริษัท
17. ferric chloride hydrate	Analytical reagent	Fisher
18. ammonium hydroxide	Analytical reagent	J.T.Baker
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. chloramines - 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	-	-

การทดลอง

สัตว์ทดลอง

ในการทดลองจะใช้โคขาวลำพูน และโคลูกผสมบราห์มันพื้นเมืองสายภาคกลางเลือด 50% จำนวนทั้งหมด 16 ตัว เป็นเพศผู้ทั้งหมด แบ่งเป็น 2 กลุ่มการทดลองสายพันธุ์ละ 8 ตัว เลี้ยงโคแบบขังคอกเดี่ยว แต่ละคอกมีขนาด 1 × 2 เมตร โดยมีพื้นที่โรงเรือนสำหรับให้หญ้าและน้ำสะอาด ทำวัคซีน FMD และถ่ายพยาธิ ทุก 6 เดือน ชั่งน้ำหนักทุกวันที่ 2 ของเดือน ด้วยเครื่องชั่งแบบตั้งพื้น ทำการเลี้ยงด้วยหญ้าแพงโกล่าโดยให้แบบเต็มที่ (*ad libitum*) อายุโคเฉลี่ยเริ่มต้นของโคขาวลำพูน 1 ปี 4 เดือน โคลูกผสมบราห์มันประมาณ 1 ปี 3 เดือนโดยใช้น้ำหนักเป็นเกณฑ์ในการเข้าฆ่าให้น้ำหนักเฉลี่ยอยู่ที่ 300 -

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

350 กิโลกรัม เมื่อได้น้ำหนักดังกล่าวจะทำการฆ่าและเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอกเพื่อนำไปศึกษาคุณภาพซากและเนื้อ โคทั้งหมดถูกเลี้ยงที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ชัยนาท จังหวัดชัยนาท

อาหารและการให้อาหาร

ใช้วิธีการตัดหญ้าแพงโกล่าสดให้กินทุกวัน อายุหญ้าประมาณ 40 - 45 วัน โดยตัดหญ้าสดจากแปลงในช่วงเวลาประมาณ 09.00 - 10.00 น. และนำมาให้โคกินในคอกทดลองอย่างเต็มที่ ชั่งน้ำหนักหญ้าสดที่ตัดมาทุกวันวางกองไว้หน้าคอก หลังจากชั่งหญ้าที่เหลือออกแล้วจะเริ่มให้หญ้าสดที่ตัดมาใหม่ โดยทยอยแบ่งให้กินวันละ 3 ครั้ง ในช่วงเช้า กลางวัน และเย็น สำหรับปริมาณหญ้าสดที่ตัดมาให้นั้นจะปรับปริมาณเพื่อให้โคได้กินหญ้าอย่างเพียงพอ โดยสังเกตดูจากหญ้าที่ให้ในแต่ละวันต้องมีหญ้าเหลือติดรางอาหารในตอนเช้าทุกวันวันละประมาณ 20 กก./วัน พื้นที่แปลงหญ้า 7 ไร่ แบ่งเป็นแปลงย่อย 44 แปลง ตัดแบบหมุนเวียน ในแต่ละรอบ หลังตัด 1 วัน ให้น้ำครั้งที่ 1 และให้ปุ๋ยยูเรียอัตรา 10 กก./ไร่ และปุ๋ย 16 - 16 - 8 อัตรา 10 กก./ไร่ เว้น 15 วันแล้วให้น้ำครั้งที่ 2 และให้ปุ๋ยยูเรียอัตรา 10 กก./ไร่ และปุ๋ย 16 - 16 - 8 อัตรา 10 กก./ไร่ ให้น้ำแบบสูบราด

การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ในการทดลองนี้ศึกษาคุณภาพเนื้อและคุณภาพซากของโคที่เลี้ยงด้วยหญ้าสด วางแผนการแบบ t - test เปรียบเทียบความแตกต่างสายพันธุ์ระหว่างลูกผสมบราห์มันและโคขาวลำพูนข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SAS version 6.12 (SAS, 1997)

การศึกษาคุณภาพซาก

เมื่อสัตว์ทดลองได้น้ำหนักตามที่กำหนดคือ น้ำหนักเฉลี่ยอยู่ที่ 300 - 350 กิโลกรัม ทำการชั่งน้ำหนักเพื่อบันทึกน้ำหนักที่ฟาร์ม น้ำหนักเมื่อมาถึงโรงฆ่า น้ำหนักมีชีวิตอดอาหาร 24 ชั่วโมงเมื่อทำการฆ่าแบบสากลตามวิธีของ สัญชัย (2550) จากนั้นทำการบันทึกน้ำหนักซากอุ่น (hot carcass weight) นำซากที่ได้ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 3 ± 1 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบันทึกน้ำหนักซากเย็น (cold carcass weight) วัดความยาวซาก (carcass length) ใช้สายวัดทำการวัดที่ตำแหน่งซี่โครงซี่แรกจนถึงกระดูก lumbar ทำการตัดแต่งซากโคแบบไทย และสากล ตามวิธีของ สัญชัย (2550) วัดความหนาไขมันสันหลังโดยใช้ probe บริเวณซี่โครงซี่ที่ 12 - 13 และวัดพื้นที่ หน้าตัดเนื้อสันพร้อมบันทึกน้ำหนักชิ้นส่วนที่ได้จากการตัดแต่งแบบไทยและสากล นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ซาก (dressing percentage) และเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนตัดแต่งต่างๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

$$\text{เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนตัดแต่ง} = \frac{\text{(น้ำหนักชิ้นส่วนตัดแต่ง)} \times 100}{\text{น้ำหนักมีชีวิต}}$$

เมื่อทำการตัดแต่งเสร็จเก็บกล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) บรรจุในถุงพลาสติกผนึกแบบสุญญากาศ (vacuum package) แล้วทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ˚C เพื่อรอการวิเคราะห์คุณภาพเนื้อต่อไป

การศึกษาคุณภาพเนื้อ (meat quality)

เก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) หลังจากนำซากไปแช่เย็นที่ 3 ˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์คุณภาพเนื้อ ซึ่งประกอบด้วย

1. วัดค่าความเป็นกรดด่างของกล้ามเนื้อ (muscle pH)

วัดค่าความเป็นกรดด่างของกล้ามเนื้อที่ 45 นาที และ 24 ชั่วโมงหลังสัตว์ตาย ที่บริเวณกล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) ระหว่างกระดูกซี่โครงซี่ที่ 12 และ 13 สำหรับกล้ามเนื้อสะโพก (*Semimembranosus*) วัดบริเวณเหนือกระดูก lumbar ประมาณ 2 นิ้ว ด้วยเครื่อง pH - meter (Model 191, Knick, D - Berlin, Germany) พร้อมทั้งบันทึกค่าที่วัดได้

2. สีเนื้อ (meat color)

วัดค่าสีของเนื้อที่ 48 ชั่วโมงหลังตัดแต่ง นำกล้ามเนื้อสันนอกออกจากถุงบรรจุที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ˚C ออกมาผึ่งในภาชนะเปิดทิ้งไว้ในตู้เย็นประมาณ 1 ชั่วโมงเพื่อให้เนื้อได้รับออกซิเจน จากนั้นทำการวัดค่าสีด้วยเครื่อง Minolta Chroma Meter (Model CR - 400, Minolta Camera Co., LTD., Osaka, Japan) บันทึกค่าความสว่าง (lightness, L*) ค่าสีแดง (redness, a*) และค่าสีเหลือง (yellowness, b*)

3. ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (shear force value)

นำเนื้อที่ต้มสุกที่ได้อุณหภูมิใจกลางประมาณ 75 ˚C หลังจากการหาเปอร์เซ็นต์การสูญ เสียจากการต้ม (boiling loss) เจาะตามแนวเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยเหล็กกลวงปลายคม (core) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.27 เซนติเมตร วัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อด้วยเครื่อง Texture analyser (model TA.XT *plus*, stable micro systems., Ltd., London, England) หัววัดกำลัง 5 kN ด้วยความ เร็ว 200 มิลลิเมตรต่อนาที อ่านเป็นค่าแรงสูงสุด (maximum force, N) และค่าพลังงาน (energy force, J)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ประเมินด้านการตรวจชิม (sensory evaluation)

นำกล้ามเนื้อสันนอกมาอบที่อุณหภูมิ 150 °C จนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อประมาณ 70 °C ตัดเนื้อให้มีขนาดเท่ากันด้วยเขียงที่มีลักษณะเป็นช่องขนาด 1 เซนติเมตร จากนั้นเสิร์ฟให้แก่ผู้ ตรวจชิม ซึ่งได้ผ่านการฝึกฝนการตรวจชิม (ไพโรจน์, 2535) จำนวน 9 คน ผู้ตรวจชิมจะได้รับแบบ สอบถามการตรวจชิมเนื้อ และฟังการบรรยายขั้นตอนการตรวจชิมโดยละเอียด ซึ่งการให้คะแนนการตรวจชิมจะพิจารณา 5 ลักษณะ คือ ความคงตัว (firmness) กลิ่น (odour) ความชุ่มฉ่ำ (juiciness) ความนุ่ม (tenderness) และความพอใจโดยรวม (acceptability) โดยมีการให้คะแนนตั้งแต่ 1 ถึง 9 ซึ่งหมายถึงความพอใจน้อยที่สุดไปจนถึงพอใจมากที่สุด ผู้ตรวจชิมจะได้รับน้ำ และขนมปังหลังจากทดสอบชิมเนื้อแต่ละชิ้น (ไพโรจน์, 2535)

5. องค์ประกอบทางเคมี (chemical composition)

นำกล้ามเนื้อสันนอกบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง Blender (Moulinex 645, Mexico) เพื่อใช้วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ความชื้น โปรตีน และไขมัน ด้วยวิธี Proximate analysis (Adapted from AOAC, 1995)

การวิเคราะห์หาความชื้น (moisture analysis)

1. นำถ้วยสำหรับใส่ตัวอย่างวิเคราะห์หาความชื้น (weighing bottle) ที่ล้างสะอาดอบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 100 - 102 °C นาน 1 ชั่วโมง และนำออกมาใส่ในโถดูด ความชื้น (desiccators) 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

การวิเคราะห์หาโปรตีน (protein analysis)

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดแล้ว 0.5 กรัม ใส่ในกระดาษชั่งตัวอย่าง แล้วนำใส่ใน kjeldahl flask
2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา (selenium reagent mixture) 2 กรัม แล้วเติม conc. sulfuric acid 15 ml
3. นำ kjeldahl flask เข้าเครื่องย่อยที่อุณหภูมิ 420 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนกระทั่งได้สาร ละลายสีเขียวใส แล้วทิ้งให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่น 50 ml เขย่าให้เข้ากัน
4. ตวงสารละลาย 4% boric acid 25 ml ใส่ Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml แล้วเติม screen methyl red indicator
5. นำ kjeldahl flask ต่อเข้าเครื่องกลั่น แล้วนำขวด Erlenmeyer flask ที่ใส่สาร ละลาย 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 ไตรเตรทจนสีของสาร ละลายเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีม่วง

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

การวิเคราะห์หาไขมัน (ether extract analysis)

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่บดแล้ว 2 กรัม อบที่ 100 °C 4 ชั่วโมง
2. นำขวดสำหรับหาไขมัน (round bottom) ที่ผ่านการล้างสะอาด ใส่หินกันระเบิดเล็กน้อย แล้วอบ 100 °C นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปใส่ในโถดูดความชื้น (desiccator) ปล่อยให้เย็น ทำการชั่งหาน้ำหนักที่ได้
3. นำตัวอย่างเนื้อที่ผ่านการอบ หรือผ่านการหาความชื้นแล้ว ห่อด้วยกระดาษไขมัน จากนั้นใส่ใน thimble alundum ที่สะอาด และแห้ง
4. ใส่ thimble alundum ลงใน sample containers แล้วต่อเข้ากับ holding clips ของเครื่องสกัดไขมันแบบ soxhlet extraction
5. ใส่ dichloromethane ลงในขวดหาไขมัน 250 ml แล้วนำต่อเข้ากับเครื่องสกัดไขมันให้สนิท
6. เปิดน้ำเย็นให้ไหลผ่าน condensor ตลอดเวลา
7. เปิดสวิทซ์ไฟโดยใช้ความร้อนสกัดนาน 16 ชั่วโมง ด้วยอัตราการกลั่น 2 - 3 หยดต่อวินาที
8. นำ thimble alundum ออกให้ความร้อนต่อ dichloromethane จะถูกกลั่น และถูกเก็บใน reclaming tube ส่วนไขมันที่ได้จะอยู่ในขวดสกัดไขมัน
9. นำขวดสกัดไขมันที่มีไขมันที่สกัดได้ อบที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 30 นาที แล้วเอาออกใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นภายหลังการสกัดคือน้ำหนักของไขมัน

การคำนวณหาปริมาณไขมัน

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

A = น้ำหนักขวดสกัดไขมัน + น้ำหนักไขมันหลังอบแล้ว

B = น้ำหนักขวดสกัดไขมัน

C = น้ำหนักตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. วิเคราะห์หาปริมาณคอลลาเจน (collagen content)

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

ขั้นตอนการแยก (Hill, 1969)

1. ชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอกที่บดแล้ว 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 ลงใน Erlenmeyer flask ทั้ง 2 ที่เตรียมไว้ในข้อ 6 แล้ว ปิดด้วยกระจกนาฬิกา ใส่ตู้อบที่อุณหภูมิ 105 ± 1°C 16 ชั่วโมง
2. กรองสารละลายที่ได้ผ่านกระดาษกรองใน Erlenmeyer flask
3. นำตัวอย่างที่ได้จากการย่อยกรองผ่านกระดาษกรองใส่ใน volumetric flask ขนาด 500 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 ml
4. ปิเปตสารละลายจากข้อ 3 มาใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml

ขั้นตอนการทำสี (AOAC, 1996)

1. ปิเปตสารละลายที่ได้ในขั้นตอนย่อย 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

สูตรในการคำนวณหาปริมาณคอลลาเจน

สมการ standard curve ดังนี้ h = (y + 0.0719) / 0.0457

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

H (กรัม/100 กรัม) = (2.5 × h) / mv

y = ค่าการดูดกลืนแสงตัวอย่าง

h = ปริมาณ hydroxyproline (µg/2ml)

H = ปริมาณ hydroxyproline (g/100g)

m = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

v = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ดูดมาทำละลาย (ml)

ปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ = H ของคอลลาเจนที่ละลายได้ × 7.52

ปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลาย = H ของคอลลาเจนที่ไม่ละลาย × 7.25

7. ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ (water holding capacity) (สัญชัย, 2551)

7.1 การสูญเสียน้ำขณะเก็บรักษา (drip loss)

นำกล้ามเนื้อสันนอก ชั่งน้ำหนักเริ่มต้น (Wd_1) ห่อด้วยผ้ากอซเก็บในถุงพลาสติก ให้ชิ้นเนื้ออยู่ห่างจากก้นถุงประมาณ 3 เซนติเมตร ผนึกปากถุงให้สนิทแขวนในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นเนื้อออกจากถุง ชั่งน้ำหนัก (Wd_2) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำ

จากสูตร

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

7.2 การสูญเสียน้ำจากการทำละลายน้ำแข็ง (thawing loss) **และการสูญเสียน้ำจากประกอบอาหาร** (cooking loss)

นำกล้ามเนื้อสันนอก ชั่งน้ำหนักเริ่มต้น (Wt_1) เก็บแบบสุญญากาศ (vacuum) ในถุง พลาสติกชนิดเย็นผนึกปากถุงให้สนิท เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 °C รอการวิเคราะห์ต่อไปจาก นั้นนำชิ้นเนื้อมาละลายน้ำแข็ง (thawing) ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ซับน้ำให้แห้งและชั่งน้ำหนัก (Wt_2) จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ได้เก็บแบบสุญญากาศในถุงร้อน ต้มในหม้อควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany) ให้อุณหภูมิน้ำเท่ากับ 80 °C ต้มจนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อประมาณ 75 °C วัดด้วย Thermocouple (T851, Consort, Belgium) ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ซับน้ำให้แห้งและชั่งน้ำหนัก (Wt_3) คำนวณเปอร์เซ็นต์การสูญ เสียน้ำขณะทำละลาย และเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำขณะประกอบอาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากสูตร

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

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

7.3 การสูญเสียน้ำขณะปิ้งย่าง (grilling loss)

นำกล้ามเนื้อสันนอกทำการชั่งน้ำหนัก (Wg_1) จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ย่างในหม้ออบ (convection oven) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 150 °C จนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อประมาณ 70 °C วัดด้วย thermocouple (306, Tecpel, Taiwan) และนำออกจากเตาย่าง ทำการชั่งน้ำหนัก (Wg_2) คำนวณเปอร์เซ็นต์การสูญเสียขณะปิ้งย่าง จากสูตร

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

8. วิเคราะห์หาค่าการหืน (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) (Rossell, 1994)

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดแล้ว 10 กรัม เติมน้ำกลั่น 70 ml
2. ปั่นใน blender ประมาณ 10 นาที
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 TBARSจากสูตร

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สูตรในการคำนวณค่า TBARS

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

O.D. = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

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

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 อุณหภูมิ65 °C
9. ดูดสารละลายข้อ 8 มา 50 ไมโครลิตร ใส่ใน screwed cap tube 13 × 100 mm เติม ferric acetate/uranyl acetate 5 ml เขย่าอย่างแรงด้วย vortex mixture นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,700 รอบ/นาที นาน 5 นาที
10. เตรียมหลอดอ่านขนาด 13 × 100 mm ชุดใหม่ แล้วเติม sulfuric acid reagent หลอดละ2 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 acetate/uranyl acetate 3 ml และ sulfuric acid reagent 2 ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สูตรในการคำนวณหาปริมาณคอเลสเตอรอล

$$\text{Cholesterol (mg/100g)} = \frac{\text{2 - propanol (ml)} \times \text{O.D. sample} \times \text{con. standard (mg/ml)} \times 100}{\text{O.D. standard} \times \text{sample weight}}$$

10. การวิเคราะห์หาปริมาณไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride analysis) (Bigg *et al.*, 1975)

1. สกัดไขมันตามวิธี AOAC (1995)
2. ทำไขมันที่สกัดได้จากเนื้อให้มีความเข้มข้น 50 mg/ml ด้วย 2 - propanol
3. ดูดสารละลายจากข้อ 2 มา 50 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 25 ml
4. เติม n - heptane 2 ml
5. เติม 2 - propanol 3.5 ml
6. เติม 40 mM sulfuric acid 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

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

A = ปริมาณ 2 - propanol (ml) ที่ใช้ละลายไขมัน

B = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

C = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

O.D.sample = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

O.D.standard = ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

11. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมัน (fatty acids analysis)

ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ การสกัดไขมัน การเตรียม fatty acid methyl ester (FAME) และการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC)

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 × 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. เติมสารลาย 0.5 M NaOH ใน methanol 4 ml เขย่า 30 วินาที
3. reflux จนได้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เวลาประมาณ 5 นาที ทั้งให้เย็น
4. เติม 20% boron - trifluoride ใน methanol 5 ml เขย่า 30 วินาที แล้ว reflux ต่ออีก 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
5. เทสารละลายที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 100 ml เติมสารละลาย NaCl อิ่มตัว 5 ml เขย่าให้เข้ากัน
6. เติม iso - octane (2, 2, 4 - trimethylpentane) 2 ml เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture 30 วินาที ทิ้งไว้ให้แยกชั้น
7. เก็บสารละลายชั้นบน 1 ml ใส่ใน microcentrifuge tube ที่มี sodium sulfate anhydrous ปริมาณ 1 mg แล้วปิด microcentrifuge tube ให้สนิทเก็บในตู้เย็นเพื่อรอการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนที่ 3 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC)

1. ดูดสารละลาย FAME ที่เตรียมไว้ 2 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) × concentration of fatty acid in standard (mg/ml) × iso - octane (ml) × chloroform (ml) × 100]/sample weight (g)

สถานที่ทำการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่
3. โรงฆ่าของศูนย์วิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม
4. ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ชัยนาท จังหวัดชัยนาท

ระยะเวลาในการทำวิจัย

ระยะเวลาในการทำวิจัยประมาณ 24 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved