บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องมือ	โมเดล	บริษัท	ประเทศ
1. Kjeldahl distillation apparatus	K 26	Gerhardt	Germany
2. pH-meter	913	Knick	Germany
3. Muffle furnace	MR260E	Heraeus	Germany
4. Centrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus	Germany
5. Vacuum sealer	C15-HL	Food equipment	Germany
6. Spectrophotometer	DU7500	Beckman	Germany
7. Condenser	WK1000	mgw LAUDA	Germany
8. Hot plate	EV1	Gerhardt	Germany
9. Fiber analysis apparatus	EV26	Gerhardt	Germany
10. Shaker	3017	GFL	Germany
11. Balance (4 decimal)	CP2245	Sartorius	Germany
12. Desiccator	GL32	Glaswerk Wertheim	Germany
13. Suction pump	VDE0530	W. Krannich	Germany
14. Micropipette 10-100 µl	Cp65602	Genex Beta	Germany
15. Micropipette 100-1000 µl	704180	Brand	Germany
16. Pipette pump 25 ml	2500	Glasfirn	Germany
17. Cylinder No. 10, 25 ml	In20C	Witeg	Germany
18. Oven	DEV	Heraeus	Germany
19. Polysealer	210E	Muster Mfg	Germany
20. Titration unit	NW 2.5 mm	Brand	Germany
21. Crucible	109-3	Haldebwanger	Germany

22. Porcelain crucible	101/50	HCT	Germany
23. Buchner Funnels	127-2a	Haldewanger	Germany
24. Weighing bottle	-	Brand	Germany
25. Soxhlet apparatus	-	Gerhardt	Germany
26. Reflux apparatus	-	W. Krannich	Germany
27. Round bottom 100 µl	-	Schott	Germany
28. Round bottom 250 µl	-	Schott	Germany
29. Volumetric flask 100 ml	-	Schott	Germany
30. Volumetric flask 250 ml	-	Schott	Germany
31. Volumetric flask 1000 ml	-	Schott	Germany
32. Volumetric flask 2000 ml	-	Schott	Germany
33. Water bath	-	W. Krannich	Germany
34. Distillation unit	K314	Buchi	Switzerland
35. Digestion unit	K424	Buchi	Switzerland
36. Balance (3 decimal)	P163	Metter	Switzerland
37. Balance (4 decimal)	AB204-S	Mettler Toledo	Switzerland
38. Column fatty acid	FAMEWAX	Restek	USA.
39. Vortex mixer	G-560E	Scientific Industries	USA.
40. Suction flask	No.27060	Kimax	USA.
41. Para film	PM-996	SFI	USA.
42. Erlenmeyer flask 250 ml	No.4980	Pyrex	USA.
43. Erlenmeyer flask 500 ml	No.26500	Kimax	USA.
44. Cylinder 50, 100 ml	No.3022	Pyrex	USA.
45. Beaker 50 ml	No.1000	Pyrex	USA.
46. Beaker 100 ml	No.1000	Pyrex	USA.
47. Beaker 500 ml	No.1005	Pyrex	USA.
48. Minolta Chroma meter	CR-300	Konica-Minolta	Japan
49. Test tube 10 ml	No.9825	Pyrex	USA.
50. Test tube 100 ml	-	Pyrex	USA.

51. Melting point apparatus	SMP10	Stuart	UK
52. Filtrate paper	No.1, 41	Whatman	UK
53. Alundum extraction thimbles	No.2800258	Whatman	UK
54. Gas Chromatography	GC-14B	Shimadzu	Japan
55. Convection oven	720	MARA	Japan
56. Freezer	FC-27	Sharp	Thailand
57. Digital thermometer	306	Tecpel	Taiwan
58. Texture Analyser	TA.XT2	Stable Micro Systems	UK

3.2 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	เกรด	บริษัท
1. Glacial acetic acid	Analytical Reagent	Merck
2. Acetylacetone	Analytical Reagent	Fluka
3. Ammonium acetate	Analytical Reagent	BDH
4. Anti-foaming agent	Analytical Reagent	Fluka
5. Boric acid	Analytical Reagent	Merck
6. 20% boron trifluoride	Analytical Reagent	Merck
7. Chloroform	Analytical Reagent	Merck
8. Chloramine-T-reagent	Analytical Reagent	Merck
9. Copper sulfate	Analytical Reagent	-
10. Deionized water	-	-
11. Diatomaceous earth	-	Merck
12. Dichloromethane	Analytical Reagent	Merck
13. 4-dimethylaminobenzaldehyde	Analytical Reagent	Merck
14. Ethanol	Analytical Reagent	Lab Scan
15. FAME standard 37 components	Analytical Reagent	Supelco
16. Ferric chloride	Analytical Reagent	Merck
17. n-Heptane	Analytical Reagent	Lab Scan

18. Hydrochloric acid	Analytical Reagent	Merck
19. Magnesium chloride	Analytical Reagent	Merck
20. Methanol	Analytical Reagent	Lab Scan
21. Perchloric acid	Analytical Reagent	Merck
22. Petroleum ether	Analytical Reagent	Lab scan
23. Potassium hydroxide	Analytical Reagent	Merck
24. Potassium sulfate	Analytical Reagent	-
25. Propa-1-ol	Analytical Reagent	Lab Scan
26. Propa-2-ol	Analytical Reagent	Lab Scan
27. Pumice stone	-	BDH
28. Screen methyl red indicator	-	-
29. Sodium chloride	Analytical Reagent	Merck
30. Sodium hydroxide	Analytical Reagent	Merck
31. Sodium methoxide	Analytical Reagent	Fluka
32. Sodium periodate	Analytical Reagent	Merck
33. Sodium sulfate anhydrous	Analytical Reagent	J.T.Baker
34. Conc. Sulfuric acid	Analytical Reagent	Lab Scan
35. Thiobarbituric acid	Analytical Reagent	BDH
36. Uranyl acetate	Analytical Reagent	Merck
37. 2,2,4 trimethyl pentane	Analytical Reagent	Lab Scan

3.3 แผนการทดลอง

การทดลองใช้สุกรลูกผสม 3 สายพันธุ์ (Duroc × Large White × Landrace) น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 30±2.5 กิโลกรัม จำนวน 30 ตัว คละเพศ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว สุกรทั้งหมดจะทำการแยกคอกขังเดี่ยวและสุ่มให้สุกรได้รับอาหารทดลอง ทั้งหมด 3 สูตรคือ สูตรที่ 1 (T1) เป็นสูตรควบคุม (control) ซึ่งเป็นอาหารฐาน (basal diet) สูตรที่ 2 (T2) มีปลายข้าวขาวเป็นส่วนผสม และสูตรที่ 3 (T3) มีปลายข้าวเหนียวก่ำเป็นส่วนผสม โดยแบ่งเป็น 3 ระยะการเลี้ยงได้แก่ สุกรรุ่น (growing period) มีน้ำหนักระหว่าง 30–47 กิโลกรัม สุกรขุนระยะที่ 1 (growing-finishing period) มีน้ำหนักระหว่าง 47–79 กิโลกรัม และสุกรขุนระยะที่ 2 (finishing period) มีน้ำหนักระหว่าง 79–100 กิโลกรัม

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เลี้ยงสุกรจนมีน้ำหนักตัวสุดท้ายเมื่อสิ้นสุดการทดลองเฉลี่ย 100 กิโลกรัมโดยมีอาหารและน้ำให้กินตลอดเวลา (*ad libitum*) เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุกรทั้งหมดจะถูกฆ่า ตัดแต่งและเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) ระหว่างซี่โครงที่ 6–14 เพื่อนำมาวิเคราะห์คุณภาพโดยวิธีทางเคมีต่อไป

3.4 อาหารทดลอง

อาหารทดลองจะถูกปรับระดับโปรตีน พลังงาน วิตามิน และแร่ธาตุ ให้เหมาะสมตามความต้องการของสุกรในแต่ละระยะการเลี้ยง 3 ระยะ ได้แก่ สุกรรุ่น (growing period) มีน้ำหนักระหว่าง 30–47 กิโลกรัม สุกรขุนระยะที่ 1 (growing-finishing period) มีน้ำหนักระหว่าง 47–79 กิโลกรัม และสุกรขุนระยะที่ 2 (finishing period) มีน้ำหนักระหว่าง 79–100 กิโลกรัม โดยอ้างอิงจาก NRC (1998) และสูตรอาหารทั้งหมด 3 สูตรคือ สูตรที่ 1 (T1) เป็นสูตรควบคุม (control) ซึ่งเป็นอาหารฐาน (basal diet) สูตรที่ 2 (T2) มีปลายข้าวขาวเป็นส่วนผสม และสูตรที่ 3 (T3) มีปลายข้าวเหนียวก่ำเป็นส่วนผสม โดยมี องค์ประกอบของโภชนะและองค์ประกอบของกรดไขมันดังแสดงในตารางที่ 5 และ 6

Table 5 Compositions (as-fed basis) of experimental diets (%)

Ingredients	Growing period			Growing-finishing period			Finishing period		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Corn	46.8	0	0	50	0	0	54.4	0	0
Rice bran	1	14	14	1	15.7	15.7	1	17	17
Cassava chip	14.5	1	1	15.9	1	1	16	1.4	1.4
White broken rice	0	50	0	0	53.2	0	0	55	0
Purple broken rice	0	0	50	0	0	53.2	0	0	55
Soybean meal	27.5	24.8	24.8	24	21	21	23	22	22
Vegetable oil	3	3	3	2.3	2.1	2.1	0	0	0
Fish meal	5	5	5	4.8	5	5	3	2	2
Dicalcium phosphate	0.9	0.9	0.9	0.7	0.7	0.7	0.5	0.5	0.5
Limestone	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
Salt	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35

Table 5 Compositions (as-fed basis) of experimental diets (%) (continued)

Ingredients	Growing period			Growing-finishing period			Finishing period		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Premix	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Lysine	0	0	0	0	0	0	0.7	0.7	0.7
Total	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**
Analyzed chemical composition									
Dry matter, %	89.0	88.8	88.9	91.1	90.9	90.5	90.5	90.4	90.1
Crude protein, %	20.2	20.3	20.6	19.03	18.8	18.76	17.6	17.4	17.4
Ether extract, %	9.22	9.33	9.47	6.95	7.11	7.10	5.42	5.27	5.48
Crude fiber, %	3.42	3.02	3.27	3.32	3.33	3.41	4.01	3.92	4.10
Ash, %	7.18	6.8	7.14	6.18	6.24	6.26	6.11	5.86	6.00
Gross energy, kcal/kg.	3650	3645	3670	3606	3618	3682	3587	3614	3603

T1 = control, T2 = white broken rice and T3 = purple broken rice

Table 6 Fatty acid compositions (% of total fatty acid) of experiment diets

Criteria	Growing period			Growing-finishing period			Finishing period		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
C14:0	0.60	0.59	0.58	0.69	0.52	0.64	0.62	0.58	0.65
C15:0	0.10	0.09	0.09	0.07	0.10	0.11	0.10	0.11	0.11
C16:0	22.9	23.6	23.6	22.9	22.1	21.6	22.4	22.3	21.1
C17:0	0.16	0.16	0.17	0.19	0.22	0.22	0.18	0.16	0.17
C18:0	2.40	2.39	2.25	2.57	2.53	2.36	2.34	2.25	2.27
C20:0	1.38	1.44	1.90	0.89	1.91	1.97	1.03	1.98	1.99
C16:1	0.73	0.71	0.67	0.70	0.66	0.79	0.71	0.70	0.65
C17:1	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.07	0.06	0.06	0.07
C18:1	27.3	25.9	25.8	27.6	26.9	25.3	26.9	26.1	25.2
C20:1	0.36	0.31	0.34	0.33	0.37	0.32	0.32	0.33	0.37
C20:2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Table 6 Fatty acid compositions (% of total fatty acid) of experiment diets (continued)

Criteria	Growing period			Growing-finishing period			Finishing period		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
C18:2 n-6	39.5	40.4	40.2	39.5	40.2	42.2	40.7	41.0	42.8
C18:3 n-6	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.06
C20:3 n-6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C20:4 n-6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C18:3 n-3	2.58	2.53	2.55	2.67	2.52	2.49	2.71	2.59	2.69
C20:3 n-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C20:5 n-3	0.09	0.08	0.07	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08	0.07
C22:6 n-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total SFA	28.1	28.8	29.1	27.9	28.01	27.5	27.2	27.9	26.8
Total MUFA	28.7	27.3	27.1	29.0	28.3	26.8	28.3	27.5	26.5
Total PUFA	42.1	43.9	43.8	43.2	43.7	45.7	44.5	44.6	46.6
PUFA:SFA ratio	1.53	1.53	1.51	1.55	1.56	1.67	1.64	1.60	1.74
Total n-6	40.4	41.3	41.1	40.4	41.1	43.1	41.6	41.9	43.8
Total n-3	2.67	2.61	2.63	2.75	2.61	2.57	2.80	2.67	2.77
n-6:n-3 ratio	15.2	15.9	15.6	15.7	15.7	16.8	14.9	15.7	15.8

T1 = control, T2 = white broken rice and T3 = purple broken rice

ND = Not detected; SFA = Saturated fatty acid; MUFA = Mono unsaturated fatty acid; PUFA = Poly unsaturated fatty acid.

3.5 การวิเคราะห์ทางเคมีและการบันทึกข้อมูล

3.5.1 การศึกษาคุณภาพเนื้อ (meat quality)

3.5.1.1 การวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อ (pH)

หลักการ เมื่อสัตว์ถูกฆ่า ร่างกายจะเปลี่ยนการทำงานจาก aerobic เป็น anaerobic metabolism เกิดการสลายไกลโคเจนที่สะสมในกล้ามเนื้อ ทำให้เกิดการสะสมกรดแลคติกในกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น ค่า pH ในเนื้อจึงลดลง ดังนั้นการวัดค่า pH ของเนื้อใน 45 นาทีหลังสัตว์ตาย (pH_1)

สามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดอัตราการเกิด glycolysis ได้ และการวัด pH ของเนื้อที่ 24 ชั่วโมงหลังสัตว์ตาย (pH_u) ใช้ในการบ่งชี้ถึงคุณภาพเนื้อได้ (สัญชัย, 2553)

วิธีการ วัดค่า pH จากกล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) จากซากสุกรที่เวลา 45 นาที (pH_1) และ 24 ชั่วโมง (pH_u) ด้วยเครื่องมือ pH-meter (WTW pH340, Germany)

3.5.1.2 การวัดค่าสีของเนื้อ (color)

หลักการ สารสีในกล้ามเนื้อ (haem protein) ประกอบไปด้วย myoglobin 80-90% และ hemoglobin 10-20% ธรรมชาติเนื้อจะมีสีแดงม่วง (reduced myoglobin) แต่เมื่อสัมผัสกับออกซิเจนสามารถทำให้เนื้อมีสีแดงสด (oxymyoglobin) โดยคงสภาพเป็นเวลา 30-45 นาที (สัญชัย, 2553)

วิธีการ นำตัวอย่างเนื้อสันนอกหลังจากการตัดแต่งที่ 24 ชั่วโมงหลังฆ่า บรรจุในถุงพลาสติก เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อออกจากถุงวางในภาชนะเปิด เก็บไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการวัดค่าสีของเนื้อด้วยเครื่อง Minolta Chroma Meter (CR-300, Konica Minolta, Japan) บันทึกค่าความสว่าง (lightness, L*) ค่าความเป็นสีแดง (redness, a*) และค่าความเป็นสีเหลือง (yellowness, b*)

3.5.1.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของโภชนะในเนื้อ (chemical composition)

เตรียมตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอก โดยทำการบดละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ (meat chopper, Moulinette, Moulinex, France) จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความชื้น โปรตีน และไขมันโดยวิธี proximate analysis (AOAC, 1996)

1) การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (moisture)

หลักการ วัดน้ำหนักที่หายไปจากการระเหยของน้ำที่ประกอบอยู่ในตัวอย่าง โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้นก่อนนำไปอบด้วยความร้อน และชั่งน้ำหนักที่เหลืออีกครั้งหลังผ่านการอบ น้ำหนักที่หายไปคือน้ำหนักของน้ำที่ระเหยออกไป น้ำหนักที่เหลือคือน้ำหนักของวัตถุแห้ง (dry matter) (พันทิพา, 2546)

วิธีการ

1. นำถ้วยสำหรับใส่ตัวอย่างวิเคราะห์หาความชื้น (weighing bottle) ที่ล้างสะอาดและเช็ดให้แห้ง อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงและนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นและชั่งน้ำหนัก

2. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดละเอียดแล้วจำนวน 2 กรัม ใส่ใน weighing bottle บันทึกน้ำหนักรวมทั้งหมดและอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักคงที่

3. นำถ้วยที่มีตัวอย่างออกจากตู้อบแห้ง ใส่ลงในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจึงชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่หายไปคือ ปริมาณความชื้น และสารที่ระเหยได้ทั้งหมด

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น

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

A = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

B = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

C = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

2) การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (crude protein)

หลักการ เป็นการวิเคราะห์หาโปรตีนอย่างหยาบตามวิธีของ Kjeldahl โดยวิเคราะห์หาค่าไนโตรเจนที่ประกอบอยู่ในตัวอย่างทั้งหมด ยกเว้น ไนเตรท (NO^{-3}) และไนไตรท์ (NO^{-2}) และทำการเปลี่ยนค่าไนโตรเจนให้เป็นโปรตีนโดยการคูณด้วยค่า factor (ปรับปรุงจาก AOAC, 1990 อ้างโดย พันทิพา, 2546) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ

2.1) การย่อย (digestion) เป็นการย่อยสารประกอบไนโตรเจนทั้งหมดให้อยู่ในรูปแอมโมเนีย โดยการต้มด้วยกรดซัลฟุริคเข้มข้นที่อุณหภูมิสูง

$$\text{Biological sample} + H_2SO_4 \longrightarrow NH_3 + CO_2 + SO_2 + NO_2$$

$$2NH_3 + H_2SO_4 \longrightarrow (NH_4)_2SO_4$$

2.2) การกลั่น (distillation) เป็นขั้นตอนในการปลดปล่อยแอมโมเนีย-ไนโตรเจน ที่ถูกจับไว้ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต ให้หลุดเป็นแก๊สแอมโมเนียและแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ในสภาวะที่เป็นด่าง โดยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป แก๊สเหล่านี้จะถูกจับในรูปของเกลือบอเรต (แอมโมเนียมบอเรต) โดยการต่อท่อแก๊สผ่านเครื่องควบแน่น โดยให้ปลายท่อจมอยู่ในกรดบอริค

$$(NH_4)_2SO_4 + 2NaSO_4 \longrightarrow Na_2SO_4 + 2NH_3 + 2H_2O$$

$$2NH_3 + 2H_2O \longrightarrow 2NH_4OH$$

$$NH_4OH \longrightarrow H_3BO_3 \longrightarrow NH_4B(OH)_4$$

2.3) การไทเทรต (titration) เป็นการวัดปริมาณไนโตรเจนที่อยู่ในรูปแอมโมเนียมบอเรต โดยนำมาแลกเปลี่ยนกับกรดมาตรฐาน ในอัตราส่วน กรดมาตรฐาน: แอมโมเนียมบอเรต 1:1 หรือ 1:2 ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดมาตรฐานที่ใช้ ซึ่งปริมาณของกรดมาตรฐานที่ถูกใช้ในการไทเทรตจะบ่งบอกถึงปริมาณแอมโมเนียหรือไนโตรเจนที่กลั่นได้

$2NH_4B(OH)_4 + H_2SO_4 \longrightarrow (NH_4)_2SO_4 + 2H_3BO_3 + 2H_2O$

หรือ $NH_4B(OH) + HCl \longrightarrow NH_4Cl + H_3BO_3 + H_2O$

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดแล้ว 0.5 กรัม ใส่ในกระดาษชั่งตัวอย่าง แล้วนำใส่ในหลอดย่อย (Kjeldahl flask)

2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา (K_2SO_4 : $CuSO_4$; 20 : 1) จำนวน 2 กรัม แล้วเติม conc. sulfuric acid 15 มิลลิลิตร

3. นำ Kjeldahl flask เข้าเครื่องย่อยที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จนกระทั่งได้สารละลายสีเขียวใส แล้วปล่อยให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

4. ตวงสารละลาย 4% boric acid 25 มิลลิลิตร ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติม screen methyl red indicator

5. เติม 40% sodium hydroxide จำนวน 50 มิลลิลิตร ใส่ขวด Kjeldahl flask (จากข้อ 3) นำ Kjeldahl flask เข้าเครื่องกลั่น แล้วนำขวด Erlenmeyer flask (จากข้อ 4) ต่อเข้ากับอีกปลายของ condenser ของเครื่องกลั่น โดยให้ปลายท่อจุ่มในสารละลาย แล้วเปิดน้ำให้ไหลผ่านตัวเครื่องและ condenser แล้วจึงเปิดเครื่องกลั่นไนโตรเจน

6. กลั่นจนได้ปริมาตรของสารละลายในขวด Erlenmeyer flask ประมาณ 200 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้จะมีสีเขียวใส จากนั้นนำขวด Erlenmeyer flask ที่มีแอมโมเนียในสารละลาย 4% boric acid มาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 N H_2SO_4 โดยไทเทรตจนสีของสารละลายเปลี่ยนสีจากสีเขียวใสเป็นสีม่วงอมเทา

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์โปรตีน

$$\textbf{Protein percentage (\%CP)} = \frac{(A-B) \times C \times E \times 0.014 \times 1000}{D}$$

A = จำนวนปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 0.1 N ที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = จำนวนปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 0.1 N ที่ใช้ในการไทเทรตกับ blank (มิลลิลิตร)

C = ความเข้มข้น (N) ของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4

D = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

E = Kjeldahl factor (6.25)

3) การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (ether extract)

หลักการ ในสภาพธรรมชาติไขมันที่ประกอบอยู่ในมวลสารชีวภาพ มักอยู่รวมกับสารอื่นที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกัน โดยรวมเรียกว่าไลปิด (lipids) นั่นคือไม่ละลายน้ำแต่ละลายในสารละลายอินทรีย์ (organic solvents) จึงสามารถใช้สารชะทำลายหรือสกัดไขมันออกจากตัวอย่างโดยตรง ด้วยเครื่อง Soxhlet extractor โดยวิธีการ reflux และแยกสารสกัดไลปิดในแต่ละรอบด้วยวิธี siphoning (พันทิพา, 2546)

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างเนื้อที่บดละเอียดแล้ว 2 กรัม อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2. นำขวดสกัดไขมันที่ผ่านการล้างสะอาด เช็ดให้แห้งแล้วอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และใส่ในโถดูดความชื้น (desiccator) ปล่อยให้เย็น ทำการชั่งหาน้ำหนักที่ได้

3. นำตัวอย่างเนื้อที่ผ่านการหาความชื้นแล้วใส่ใน alundum extraction thimble ที่สะอาดและแห้ง

4. ใส่ alundum extraction thimble ลงใน sample containers แล้วต่อเข้ากับ holding clips ของเครื่องสกัดไขมันแบบ soxhlet extraction

5. ใส่ dichloromethane ลงในบีกเกอร์ขนาด 30 มิลลิลิตร แล้วนำต่อเข้ากับเครื่องสกัดไขมันให้สนิท

6. เปิดน้ำเย็นให้ไหลผ่าน condenser ตลอดเวลา

7. เปิดสวิตช์ไฟเครื่องสกัดไขมัน ใช้ความร้อนสกัดนาน 16 ชั่วโมง ด้วยอัตราการกลั่น 2-3 หยดต่อวินาที

8. นำ sample containers ออก แล้วนำ reclaiming tube ใส่แทนที่ ให้ความร้อน dichloromethane จะถูกกลั่นและถูกเก็บใน reclaiming tube ส่วนไขมันที่ได้จะอยู่ในบีกเกอร์

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

9. นำบีกเกอร์ที่มีไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำออกใส่โถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นภายหลังการสกัดคือน้ำหนักของไขมันในเนื้อ

การคำนวณเปอร์เซ็นต์ไขมัน

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

A = น้ำหนักบีกเกอร์ + น้ำหนักไขมันที่อบแล้ว (กรัม)

B = น้ำหนักบีกเกอร์ (กรัม)

C = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

3.5.1.4 ค่าการสูญเสียน้ำของเนื้อขณะทำการเก็บรักษา (drip loss)

หลักการ แขวนเนื้อไว้ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส เพื่อให้โมเลกุลของเนื้อไม่สามารถอุ้มน้ำไว้ได้ และหยดออกไปด้วยแรงโน้มถ่วงของโลก

วิธีการ นำตัวอย่างกล้ามเนื้อที่ได้จากการตัดแต่งที่ 24 ชั่วโมงหลังฆ่ามาซับให้แห้ง ชั่งน้ำหนักเนื้อ (W_1) ห่อด้วยผ้าก๊อซ บรรจุลงถุงพลาสติก โดยให้เนื้ออยู่สูงจากถุงประมาณ 2-3 เซนติเมตร แขวนในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างออกจากถุง ซับให้แห้งแล้วชั่งน้ำหนักเนื้อ (W_2) เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำของเนื้อ

การคำนวณ

$$\textbf{\% drip loss} = \frac{[W_1 - W_2] \times 100}{W_2}$$

3.5.1.5 ค่าการสูญเสียน้ำจากการละลายน้ำแข็ง (thawing loss)

หลักการ การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งขนาดเล็กที่มีรูปร่างไม่แน่นอนอยู่ระหว่างเซลล์ของเนื้อ (extracellular space) เมื่อมีการละลายน้ำแข็งอย่างช้า ๆ โมเลกุลของน้ำจะไหลออกจากเซลล์ แต่โมเลกุลของน้ำบางส่วนสามารถถูกจับไว้โดยโปรตีนและเกลือที่อยู่ในเนื้อ ดังนั้นหากโปรตีนในผลิตภัณฑ์สูญเสียสภาพจะทำให้การจับกับโมเลกุลของน้ำที่ละลายออกมาลดลง ค่า thawing loss จึงสูงขึ้น (James and James, 2002)

วิธีการ นำตัวอย่างมาซับให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก (W_1) จากนั้นบรรจุลงในถุงพลาสติกแบบสุญญากาศ (vacuum package) เก็บรักษาโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ เมื่อถึงเวลานำตัวอย่างเนื้อมาทำละลายในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำออกจากถุงมาซับให้แห้งและชั่งน้ำหนักภายหลังการทำละลาย (W_2) เพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำของเนื้อขณะทำละลาย

การคำนวณ

$$\textbf{\% thawing loss} = \frac{[W_1 - W_2] \times 100}{W_2}$$

3.5.1.6 ค่าการสูญเสียน้ำหนักของเนื้อขณะทำการปรุงสุก (cooking loss)

หลักการ ในระหว่างการปรุงสุก โปรตีนในเนื้อจะสูญเสียสภาพ ความร้อนจะทำให้โครงสร้างระดับเซลล์ถูกทำลายจนไม่สามารถอุ้มน้ำไว้ได้ โมเลกุลของน้ำที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular water) และระหว่างเซลล์ (extracellular water) จะไหลออกออกมา นอกจากนี้การสูญเสียน้ำขณะปรุงสุกจะขึ้นอยู่กับรูปร่าง ขนาดของชิ้นเนื้อ และอุณหภูมิที่ใช้ในการปรุงสุก (Honikel and Hamm, 1999)

วิธีการ การวัดการสูญเสียน้ำขณะปรุงสุกของเนื้อ บันทึกน้ำหนักแรก (W_1) ของตัวอย่างซึ่งได้จากการทำ thawing loss ตามวิธีการในข้อ 2.2 ทำการสอด probe ที่ใช้วัดอุณหภูมิของเครื่อง digital thermometer (306, Tecpel, Taiwan) เข้าในส่วนใจกลางเนื้อ แล้วนำไปย่างด้วยหม้ออบไฟฟ้า (convection oven, 720, MARA, Japan) ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส จนกระทั่งอุณหภูมิใจกลางเนื้อเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างออกมาผึ่งให้เย็น แล้วชั่งน้ำหนัก (W_2) เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำของเนื้อ จากนั้นนำเนื้อที่ได้จากการปรุงสุกไปประเมินทางด้านประสาทสัมผัสต่อไป

การคำนวณ

$$\textbf{\% cooking loss} = \frac{[W_1 - W_2] \times 100}{W_2}$$

3.5.1.7 การวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (shear force value)

หลักการ การตัดสินด้านความนุ่มของเนื้อด้วยวิธีการทางประสาทสัมผัสหรือการประเมินด้านการตรวจชิมเนื้อมีความแปรปรวนเนื่องจากความสามารถในการรับรู้ทางประสาท

สัมผัสของผู้ประเมินแต่ละคนแตกต่างกันไป จึงมีการนำเครื่องมือที่ใช้ในการวัดค่าแรงการตัดผ่านเนื้อเพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการอ้างอิงการประเมินความนุ่มของเนื้อ ลักษณะการทำงานของเครื่องมือเป็นการเลียนแบบการตัดเนื้อให้ขาดด้วยฟันหน้าของมนุษย์ ค่าที่ได้จากการตัดผ่านแสดงเป็นค่าแรงสูงสุดในการตัดผ่านชิ้นเนื้อ (maximum shear force) มีหน่วยเป็นนิวตัน (N) และพลังงานที่ใช้ในการตัดผ่าน (energy) มีหน่วยเป็นมิลลิจูล (mJ) (Chrystall, 1999)

วิธีการ นำตัวอย่างเนื้อที่ได้จากการวัดค่าการสูญเสียจากการปรุงสุกโดยวิธีการต้ม (boiling loss) ใช้หัวเจาะกลวง (core)ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.27 เซนติเมตร เจาะตามแนวยาวของเส้นใยกล้ามเนื้อ ตัวอย่างละ 5 ชิ้น ทำการตัดตัวอย่างเนื้อด้วยเครื่อง Texture Analyzer (TA.XT2, London, UK) โดยใช้หัวตัดแบบ Warner-Bratzler shear ใช้ความเร็วในการวัด 2 มิลลิเมตร/วินาที ด้วยหัววัดกำลัง 5 kN ระยะทาง 3 เซนติเมตร บันทึกค่าแรงสูงสุดที่ใช้ในการตัดผ่านและพลังงานที่ใช้ในการตัดผ่าน (สัญชัย, 2553)

3.5.1.8 การวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน (collagen analysis) (Hill, 1966; AOAC, 1996)

หลักการ ปริมาณของคอลลาเจนและโครงสร้างของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ที่ห่อหุ้มกลุ่มของเส้นใยกล้ามเนื้อแต่ละกลุ่มให้รวมเป็นมัดกล้ามเนื้อ (perimysium) เป็นปัจจัยหลักในการใช้ตัดสินความเหนียวของเนื้อ (Liu *et al.*, 1995) โดยเนื้อที่มีปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ (soluble collagen) สูง เนื้อจะมีความนุ่ม ส่วนเนื้อที่มีปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลาย (insoluble collagen) สูงเนื้อจะมีความเหนียว โดยการวิเคราะห์หาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่พบเฉพาะในคอลลาเจน (Greaser, 2009)

วิธีการ

1) ขั้นตอนการแยก (Hill, 1966)

1. ชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอกที่บดละเอียดแล้ว 4 กรัม ใส่ในหลอด homogenize ขนาด 30 มิลลิลิตร
2. ใส่ strength ringer solution 8 มิลลิลิตร
3. Homogenize ด้วยความเร็ว 10,000-รอบต่อนาที นาน 1 นาที
4. ต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 77 องศาเซลเซียส นาน 70 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น 1 ชั่วโมง

5. ย้ายส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงในหลอด centrifuge ที่เตรียมไว้ ทำการปรับสมดุลน้ำหนักก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง

6. ปั่นเหวี่ยง ที่ 5,200 รอบต่อนาที นาน 26 นาที

7. จากนั้นแยกส่วน supernatant ใส่ลงใน Erlenmeyer flask อันที่ 1 (soluble) ส่วน residue ใส่ลงใน Erlenmeyer flask อันที่ 2 (insoluble)

2) ขั้นตอนการย่อย (AOAC, 1996)

1. เติมกรด sulfuric acid 7 N 30 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask ทั้ง 2 ที่เตรียมไว้ในข้อที่ 7 แล้วปิดด้วยกระจกนาฬิกา

2. นำเข้าอบที่อุณหภูมิ 105±1 องศาเซลเซียส เพื่อทำการย่อย นาน 16 ชั่วโมง

3. กรองตัวอย่างที่ได้จากการย่อยด้วยกระดาษ Whatman No.1 ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร

4. ปิเปตสารละลายในข้อ 3 ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

5. เก็บรักษาไว้ในขวดสีชา

3) ขั้นตอนการทำให้เกิดสี (AOAC, 1996)

1. ปิเปตสารละลายที่ได้จากการย่อยในขั้นตอนที่ 2.7.2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 2 หลอด และทำ blank โดยการเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

2. เติม oxidant solution 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20±2 นาที

3. เติม color reagent หลอดละ 1 มิลลิลิตร เขย่าทันทีและปิดฝาหลอดให้สนิท

4. ต้มใน water bath อุณหภูมิ 60±0.5 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. ทำหลอดให้เย็นโดยการเปิดน้ำให้ไหลผ่าน 3 นาที

6. ทำให้หลอดแห้งโดยการเช็ดหรือตั้งทิ้งไว้

7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 558 นาโนเมตร

3.5.1.9 การประเมินทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation)

หลักการ เป็นวิธีการประเมินโดยให้ผู้ทดสอบชิมที่ผ่านการฝึกฝนมาแล้วตัดสินคุณภาพของผลิตภัณฑ์ทางด้านความนุ่ม (tenderness) สี (color) กลิ่น(odor) รสชาติ (tastes) ความ

ชุ่มฉ่ำ (juiciness) และความพอใจโดยรวม (overall acceptability) เป็นต้น โดยให้คะแนนตามลักษณะที่พิจารณาได้ (สัญชัย, 2553)

วิธีการ นำตัวอย่างเนื้อที่ได้จากการหาค่า cooking loss มาตัดให้มีขนาด 1 x 1 เซนติเมตร และตรวจชิมโดยผู้ตรวจชิมที่ได้รับการฝึกฝนมาแล้วจำนวน 10 คน โดยมีขั้นตอนดังนี้ (ไพโรจน์, 2545)

1. ในการทดสอบชิมแต่ละครั้ง จะต้องเตรียมความพร้อมในส่วนของพื้นที่สำหรับการตรวจชิม การวางแผนการจัดการห้องตรวจชิม ที่นั่งของผู้ตรวจชิมแต่ละท่าน แสงไฟและความสว่างของห้องตรวจชิม อุปกรณ์สำหรับการตรวจชิม น้ำดื่ม และช่วงเวลาในการตรวจชิม ควรจะเป็นช่วงเวลาเดียวกันในแต่ละวัน ซึ่งเป็นช่วงเวลา 10.00-10.30 น.

2. ผู้ทดสอบชิมจะได้รับแบบฟอร์มในการให้คะแนนสำหรับการตรวจชิมเนื้อ ซึ่งประกอบด้วย 4 ลักษณะคือ ความคงตัว (firmness) ความนุ่ม (tenderness) รสชาติ (flavor) และความชุ่มฉ่ำ (juiciness) รวมถึงประเมินความพอใจโดยรวม (overall acceptability)

ก่อนการตรวจชิม ผู้ทดสอบชิมจะต้องดื่มน้ำก่อน และรับประทานขนมปัง 1 ชิ้น เพื่อเป็นการล้างปากทุกครั้งก่อนการตรวจชิมตัวอย่างต่อไป จากนั้นจึงเริ่มให้คะแนนในแต่ละลักษณะ

3.5.1.10 การวิเคราะห์หาค่าการหืน (Thiobarbituric acid reactive substance; TBARS)

หลักการ ไขมันที่อยู่ในเนื้อจะเกิดการออกซิเดชัน โดยเฉพาะกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ซึ่งมีความไวต่อการเกิดออกซิเดชัน อัตราเร็วของการเกิดออกซิเดชันจะเพิ่มขึ้นตามจำนวนพันธะคู่ที่เพิ่มขึ้น เมื่อกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวถูกออกซิไดซ์ด้วยออกซิเจนหรืออนุมูลอิสระ จะทำให้เกิดอนุมูลอิสระใหม่ต่อเนื่องไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) และเมื่ออนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระตัวอื่นจะเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นสารที่มีความเสถียรมากขึ้น ทำให้เกิดกลิ่นและรสชาติที่ผิดปกติ เช่น hexanal pentanal และ malondialdehyde (MDA)

ค่า TBARS ใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดออกซิเดชันของไขมันในเนื้อและผลิตภัณฑ์จากเนื้อ โดยการวัดการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง MDA และ สารละลาย thiobarbituric acid (TBA) (Irwin and Hedges, 2004) เมื่อสารละลาย TBA ทำปฏิกิริยากับ MDA จะเกิดสารประกอบที่มีสีแดง (red chromogen) ซึ่งนำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 358 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องมือ spectrophotometer

วิธีการ (Rossell, 1994)

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดละเอียดแล้วจำนวน 10 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไป 70 มิลลิลิตร
2. เทลงโถปั่น (blender) แล้วปั่นในเครื่องปั่น ประมาณ 15 นาที
3. เทใส่ใน distillation flask แล้วล้าง blender ด้วยน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร
4. เติมสารละลายกรดเกลือ (HCl) ความเข้มข้น 4 M 2.5 มิลลิลิตร
5. เติม anti-foaming agent 1-2 หยด หินกันระเบิด 3 เม็ด
6. ต่อเข้ากับชุดกลั่น แล้วกลั่นจนได้ของเหลวจำนวน 50 มิลลิลิตร
7. ปิเปตสารละลายที่กลั่นได้ 5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย TBA ลงไป 5 มิลลิลิตร
8. ต้มในน้ำเดือด 35 นาที ปล่อยให้เย็น 10 นาที
9. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร
10. คำนวณค่า TBA number จากสูตร

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

การคำนวณ

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

3.5.1.11 การวิเคราะห์ปริมาณคอเลสเตอรอลในเนื้อ (cholesterol content)

หลักการ การหาระดับคอเลสเตอรอลในผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี Colorimetric มีหลายวิธี แต่มีหลักการเหมือนกันคือ การทำปฏิกิริยาของคอเลสเตอรอลจะเกิดที่ตำแหน่งพันธะคู่ และหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ซึ่งคอเลสเตอรอลสามารถทำปฏิกิริยากับกรดเข้มข้นทำให้เกิดสารที่มีสีคือ กรด cholestadiene sulfonic โดยมีการใช้ acetic acid และ acetic anhydride เป็นตัวทำละลายและ dehydrating agent

วิธีการ (ดัดแปลงจาก Jung *et al.*, 1975)

1. ทำการสกัดไขมันจากตัวอย่างเนื้อ โดยวิธีการที่ดัดแปลงจาก AOAC (1996) เก็บและบันทึกน้ำหนักของไขมัน
2. ละลายไขมันด้วย isopropanol ให้เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของ isopropanol ที่เติม เท่ากับ น้ำหนักไขมัน (กรัม) x 20)
3. ดูดสารละลายไขมันปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตร
4. เติม alcoholic KOH 10 มิลลิลิตร

5. นำไปอุ่นใน water bath 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6. เติม petroleum ether 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture

7. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture ตั้งปล่อยไว้ให้แยกชั้น

8. เก็บส่วนที่ละลายในชั้น petroleum ether แล้วนำไประเหยแห้งใน water bath 65 องศาเซลเซียส

9. เติม ferric acetate/uranyl acetate 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงด้วย vortex mixture

10. เตรียมหลอดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ชุดใหม่ เติม sulfuric acid reagent หลอดละ 2 มิลลิลิตร

11. ดูด supernatant จากหลอดเดิม 3 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดอ่านที่เติม sulfuric acid reagent

12. ผสมให้เข้ากันทันทีด้วย vortex mixture ประมาณ 20 วินาที แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที

13. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยใช้หลอด blank อ่านค่าเป็นศูนย์

หมายเหตุ : หลอด blank เติมเฉพาะ ferric acetate/uranyl acetate 3 มิลลิลิตร และ sulfuric acid reagent 2 มิลลิลิตร

การคำนวณ

$$\textbf{Cholesterol level (mg/100g)} = \frac{I \times A \times C \times 100}{B \times W}$$

I = ปริมาตรของ isopropanol (มิลลิลิตร) ที่ใช้ปรับความเข้มข้นไขมันให้ได้ 50 ไมโครลิตร

A = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

B = ค่าการดูดกลืนแสงของ cholesterol standard

C = ความเข้มข้นของ standard (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

3.5.1.12 การวิเคราะห์ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในเนื้อ (triglyceride content)

หลักการ ไตรกลีเซอร์ไรด์สามารถสกัดออกมาได้เมื่อไขมันผ่านกระบวนการ saponification ซึ่งจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอล โดยกลีเซอรอลจะถูกออกซิไดซ์ได้โดย periodate กลายเป็นสาร formaldehyde จากนั้น formaldehyde จะทำปฏิกิริยากับ acetylacetone โดยมีแอมโมเนียมไอออนอยู่ด้วย เกิดสารละลาย lunitine ที่มีสีเหลือง มีคุณสมบัติเรืองแสงได้ สามารถตรวจวัดหาค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

วิธีการ (ดัดแปลงจาก Biggs *et al.*, 1975)

1. ทำการสกัดไขมันจากตัวอย่างเนื้อ โดยวิธีการที่ดัดแปลงจาก AOAC (1996) เก็บและบันทึกน้ำหนักของไขมันไว้
2. ดูดไขมันที่สกัดได้จากผลิตภัณฑ์ (ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
3. เติม n-Heptane 2 มิลลิลิตร
4. เติม isopropanol 3.5 มิลลิลิตร
5. เติมสารละลาย sulfuric acid reagent 40 ไมโครโมล จำนวน 1 มิลลิลิตร
6. ผสมแต่ละหลอดให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixture นาน 20 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จนสารละลายแยกชั้น
7. เตรียมหลอดชุดใหม่ เติม sodium alkoxide reagent 20 มิลลิลิตร
8. ดูดสารละลายในชั้นบนสุดของชุดแรก 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่เตรียมไว้
9. เขย่าให้เข้ากันโดย vortex mixture แล้วบ่มในตู้อบ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที
10. เติม sodium metaperiodate reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
11. เติม acetylacetone reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วใส่ในตู้อบ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที
12. ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดยอ่าน blank เป็นศูนย์

การคำนวณ

$$\textbf{Triglyceride level (กรัม/100กรัม)} = \frac{I \times A \times C \times 100}{B \times W \times 100}$$

I = ปริมาตรของ isopropanol (มิลลิลิตร) ที่ใช้ปรับความเข้มข้นไขมันให้ได้ 50 ไมโครลิตร

A = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

B = ค่าการดูดกลืนแสงของ triglyceride standard

C = ความเข้มข้นของ standard (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

3.5.1.13 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในเนื้อ (fatty acid composition)

หลักการ ไขมันที่สกัดได้จากตัวอย่าง จะถูกนำไปผ่านกระบวนการ saponification และtransferification โดยการ reflux ด้วย methanolic sodium hydroxide จากนั้นเข้าสู่กระบวนการ methylation ของกรดไขมันโดยการ reflux ด้วย boron-trifluoride และ methanol แล้วปรับความเข้มข้นด้วย iso-octane และเติม sodium sulfate anhydrous เพื่อดูดความชื้น ซึ่ง fatty acid methyl esters ที่ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง gas chromatography เปรียบเทียบกับกราฟของ standard

วิธีการ

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

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อ 5 กรัม ใส่ลงใน round bottom flask ขนาด 100 มิลลิลิตร คลี่ตัวอย่างให้กระจายอยู่ทั่วก้นขวด เพื่อเพิ่มพื้นที่สัมผัสมากขึ้น

2. เติมสารละลายผสมระหว่าง chloroform และ methanol (อัตราส่วน 2:1) ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท แล้วเขย่าอย่างแรง จนกระทั่งสกัดไขมันออกจากเนื้อได้อย่างสมบูรณ์

3. กรองด้วย Buchner funnel ผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 ลงใน flask จากนั้นนำกากที่ได้จากการกรองมาสกัดอีกครั้งหนึ่งตามขั้นตอนในข้อที่ 2

4. รวมสารละลายที่กรองได้ใส่ลงใน separate flask เติมน้ำกลั่น 12 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น สารละลายส่วนบนคือน้ำกับ methanol ส่วนชั้นล่างเป็น chloroform กับ ไขมัน

5. เก็บสารละลายชั้นล่างลง flask ที่ทราบน้ำหนักแล้วนำไประเหยแห้งใน water bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

6. ชั่งน้ำหนักไขมันที่ได้ ละลายด้วย chloroform เพื่อปรับความเข้มข้นให้เป็น 30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (น้ำหนักไขมัน x factor 33.33)

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

1. ดูดสารละลายที่สกัดได้ 1 มิลลิลิตร มาใส่ลงใน round bottom flask

2. เติมสารละลาย 0.5 M NaOH ใน methanol 4 มิลลิลิตร แล้ว reflux นาน 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

3. เติม 20% boron-trifluoride 5 มิลลิลิตร แล้ว reflux 2 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

4. เทสารละลายที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายเกลืออิ่มตัว (NaCl) 5 มิลลิลิตร และ iso-octane (2,2,4-trimethylpentane) 2 มิลลิลิตร

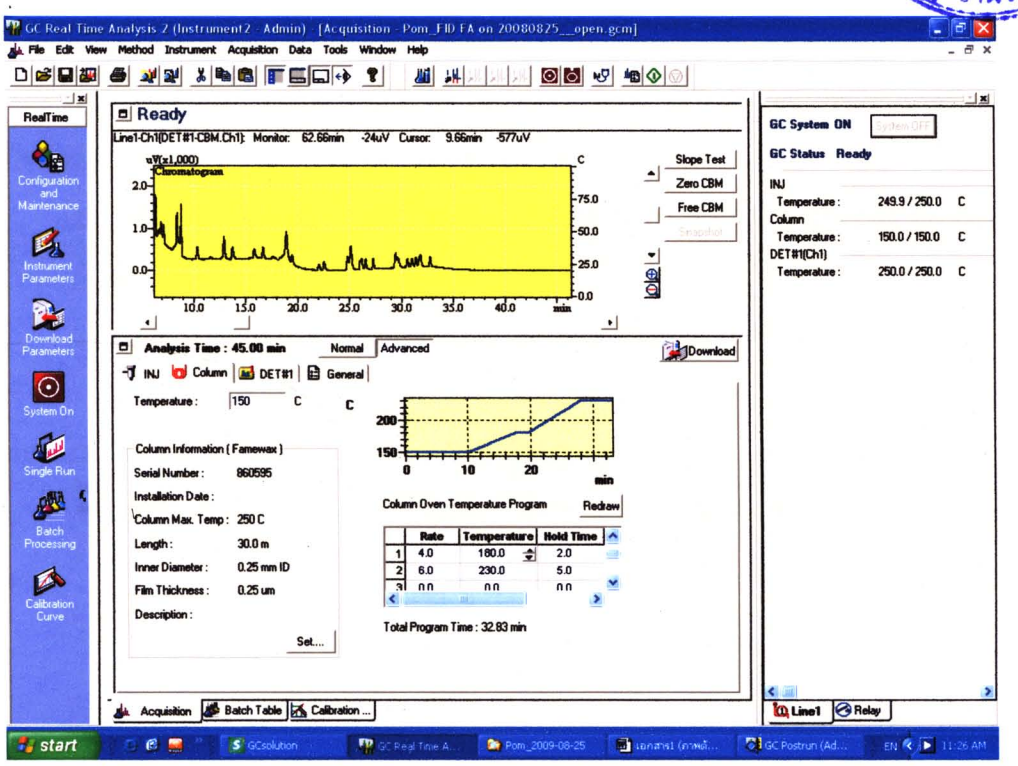
5. เขย่าด้วย vortex mixture 30 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

6. เก็บสารละลายชั้นบน 1 มิลลิลิตร ใส่ใน vial ที่มี sodium sulfate anhydrous (ปริมาณเท่าปลายช้อนตักสาร) ปิด vial ให้สนิท (พันโดย parafilm - M) เก็บในตู้เย็นเพื่อรอการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง gas chromatography

ขั้นตอนที่ 3 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC)

1. ดูดสารละลาย FAME ที่เตรียมได้ 2 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง GC (GC-14B, Shimadzu, Kyoto, Japan) ควบคุมด้วยโปรแกรม GC-Solution

หมายเหตุ : ควรฉีด standard เพื่อนำมาเปรียบเทียบลักษณะและพื้นที่ใต้กราฟก่อนฉีดตัวอย่างสัปดาห์ละครั้งเป็นอย่างน้อย



การคำนวณ

$$\textbf{Fatty acid (mg/100g)} = \frac{A \times D \times I \times C \times 100}{B \times W}$$

A = พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่าง

B = พื้นที่ใต้กราฟของ fatty acid standard

C = ปริมาตรของ chloroform (มิลลิลิตร)

D = ความเข้มข้นของ fatty acid standard (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

I = ปริมาตรของ iso-octane (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการศึกษานี้วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีปัจจัยในการทดลอง คือ สูตรอาหาร 3 สูตร นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ด้วยโปรแกรม SAS (version 6.12, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)

3.7 สถานที่ใช้ในการทดลองและเก็บรวบรวมข้อมูล

1) ศูนย์วิจัย สาธิตและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2) ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3) ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.8 ระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษา

ใช้เวลาในการศึกษา ทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลองประมาณ 12 เดือน