

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดย Kjeldahl method
catalyst mixture

K_2SO_4 449.0 กรัม

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1.3 กรัม

methyl red indicator

methyl red ($C_{15}H_{15}N_3O_2$) 1.0 กรัม

95% ethyl alcohol 100.0 มล.

ละลาย methyl red ใน 95% ethyl alcohol แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง
Whatman No.1 เก็บในขวดสีชาที่มีฝาปิดสนิท

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

สารละลายคลอโรฟอร์ม : เมทานอล (2:1)

$CHCl_3$ 200.0 มล.

CH_3OH 100.0 มล.

สารละลายคลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ (86 : 14 : 1)

$CHCl_3$ 86.0 มล.

CH_3OH 14.0 มล.

distilled water 1.0 มล.

3. digestion acid ที่ใช้ในการย่อยแคลเซียมและฟอสฟอรัส

conc. HNO_3 1250.0 มล.

conc. $HClO_4$ 250.0 มล.

NH_4VO_3 60.0 มก.

ผสม conc. HNO₃ กับ conc. HClO₄ แล้วจึงเติม NH₄VO₃ ที่ละลายในน้ำร้อนที่
ปราศจากอิออน ปริมาตร 10 มล.

4. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม

buffer reagent

buffer reagent ประกอบด้วย ethanolamine มี NaCN (0.012%) เป็นสาร
ป้องกันเปลี่ยนแปลงคุณภาพ

color reagent

color reagent ประกอบด้วย O – cresolphthalein และ 8 – hydroxyquinoline

5. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส

vanadomolybdate reagent

(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 40.0 กรัม

NH₄NO₃ 2.0 กรัม

conc. HNO₃ 160.0 มล.

5.1 ละลาย (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O ในน้ำร้อนที่ปราศจากอิออนประมาณ 200 มล.
ทิ้งไว้ให้เย็น

5.2 ละลาย NH₄NO₃ ในน้ำเดือดประมาณ 300 มล. วางทิ้งให้เย็น เติม conc. HNO₃

ใส่สารละลายในข้อ 5.2 ลงในสารละลายในข้อ 5.1 ปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจาก
อิออนเป็น 1000 มล. ใส่ขวดสีชา เก็บในตู้เย็น เมื่อจะใช้วิเคราะห์ต้องเจือจางด้วยน้ำที่ปราศจาก
อิออนในอัตราส่วน 1:3 (vanadomolybdate reagent : น้ำ)

6. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน

redried solution

ethanol 200 µl

water 200 µl

triethylamine 100 µl

derivatizing solution

ethanol	140 μ l
water	20 μ l
triethylamine	20 μ l
phenylisothiocyanate	20 μ l

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีก่อนใช้

derivatized amino acid diluent

Na_2HPO_4	0.355 กรัม
Acetonitrile	5.0 มล.

ละลาย Na_2HPO_4 ในน้ำกลั่นปริมาตร 400 มล. ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วยสารละลาย $5\text{N.H}_3\text{PO}_4$ แล้วจึงปรับปริมาตรเป็น 500 มล. ด้วยน้ำกลั่น แบ่งสารละลายที่ได้มา 475 มล. ผสมกับ Acetonitrile ปริมาตร 25 มล.

7. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดยูริก

phosphotungstic acid solution

sodium tungstate	50.0 กรัม
85% phosphoric acid	40.0 มล.
$\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	32.0 กรัม

ละลาย sodium tungstate และ 85% Phosphoric acid ในน้ำกลั่นที่ปราศจากฟอสฟอรัส ปริมาตรประมาณ 300 มล. Reflux เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มล. ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากฟอสฟอรัส เติม $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ เมื่อละลายดีแล้ว เก็บใส่ขวดที่บดแสงไว้ในตู้เย็น เมื่อจะใช้งานแบ่งสารละลายที่ได้มา 1 ส่วนผสมกับน้ำกลั่นที่ปราศจากฟอสฟอรัส 9 ส่วน

8. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณ triglyceride

chromotropic acid reagent

chromotropic acid (disodium salt)	1.14 กรัม
conc. H_2SO_4	300.0 มล.

8.1 ละลาย chromotropic acid ในน้ำกลั่น 5 มล.

8.2 ผสม conc. H_2SO_4 ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 150 มล. อย่างช้าๆ โดยมีน้ำหล่อเย็น

ภาชนะอยู่ตลอดเวลา จนอุณหภูมิต่ำลงถึงอุณหภูมิห้อง

เติมสารละลายใน 8.2 ลงในสารละลายใน 8.1 อย่างช้าๆ โดยมีน้ำหล่อเย็นภาชนะอยู่ตลอดเวลา เมื่ออุณหภูมิต่ำลงถึงอุณหภูมิห้อง กรองสารละลายที่ได้ด้วยใยแก้วเพื่อแยกส่วนที่ไม่ละลายออก เก็บในขวดแก้วที่บดแสง เก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ $-10^{\circ}C$

9. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณ cholesterol

modified Liebermann – Burchard reagent

acetic anhydride, free of HCl 100.0 มล.

conc. H_2SO_4 5.0 มล.

acetic acid 50.0 มล.

แช่เย็น acetic anhydride อุณหภูมิต่ำกว่า $10^{\circ}C$ ในขวดที่มีฝาปิด เติม conc.

H_2SO_4 ผสมให้เข้ากันดี แช่เย็นไว้อีก 9 นาที แล้วเติม acetic acid ผสมให้เข้ากันดี

ทำให้อุ่นขึ้นจนถึงอุณหภูมิห้อง ใช้ภายใน 1 ชั่วโมง

alcoholic KOH (เตรียมก่อนใช้ทันที)

33% KOH 6.0 มล.

absolute ethanol 94.0 มล.

เตรียม 33% KOH (w/w) โดยใช้ KOH 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 20 มล.

absolute ethanol ที่ใช้จะต้องเป็น ethanol denatured with methanol

10. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้โดย Lowry's method

alkali copper solution

1% $CuSO_4$ 1.0 มล.

2% $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ 1.0 มล.

2% Na_2CO_3 ใน 0.1N.NaOH 100.0 มล.

ใช้ 2% Na_2CO_3 ใน 0.1N.NaOH ผสมให้เข้ากันดีกับ 2% $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ แล้วเติม

1% $CuSO_4$ อย่างช้าๆ ระวังอย่าให้ขุ่น

11. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในตัวอย่างวัตถุอาหารไก่กระหง

โดย High performance liquid chromatographic technique

Column : Pico-Tag column for amino acid analysis

Mobile phase : Eluent A and Eluent B

Eluent A มีองค์ประกอบและขั้นตอนการเตรียมดังนี้

1. ชั่ง Sodium acetate trihydrate ปริมาณ 19.0 กรัม
2. เติม Milli-Q water 100 มล.
3. เติม Triethylamine 0.5 มล.
4. เติม Stock EDTA solution 200 μ l. ผสมให้เข้ากันจนมั่นใจว่า Triethylamine ละลายหมด
5. ปรับ pH เป็น 6.40 ด้วย Acetic acid
6. กรองสารละลายที่ได้ด้วย Triton-free filter (P/N 85147)
7. ตวงสารละลายที่ได้ 940 มล. เติมด้วย Acetonitrile 60 มล.
8. Degas โดยการ Sonicate เป็นเวลา 20 วินาที

Eluent B มีองค์ประกอบและขั้นตอนการเตรียมดังนี้

1. ตวง Acetonitrile 600 มล. และ Milli-Q water 400 มล. ผสมให้เข้ากัน
2. เติม Stock EDTA solution 200 μ l.
3. Degas โดยการ Sonicate เป็นเวลา 20 วินาที

Stock EDTA solution มีองค์ประกอบและขั้นตอนการเตรียมดังนี้

1. ชั่ง EDTA ปริมาณ 100 มก.
2. เติม Milli-Q water 100 มล.
3. Sonicate จนละลายหมด

Flow rate : 1.0 มล. / นาที

Column temperature : 40.0⁰ ซ.

Injection volume : 10 μ l.

Detector wavelenght : 254 nm.

Standard gradient table for amino acid analysis

<u>Time</u>	<u>Flow</u>	<u>%A</u>	<u>%B</u>	<u>Curve No.</u>
Initial	1.0	100	0	*
10.0	1.0	54	46	5
10.2	1.0	0	100	6
11.7	1.0	0	100	6
12.0	1.5	0	100	6
12.2	1.5	0	100	6
12.5	1.5	100	0	6
20.0	1.5	100	0	6
20.5	1.0	100	0	6

การคำนวณปริมาณกรดอะมิโน

Assumption ; response factor of internal standard = response factor of unknown

Final concentration of internal standard in digested solution = 1.0 $\mu\text{mole/ มล.}$

$$\frac{\text{Area of internal standard}}{\text{Amount of internal standard}} = \frac{\text{Area of unknown}}{\text{Amount of unknown}}$$

ดังนั้น Amount of unknown (mole) = $\frac{\text{Amount of internal standard} \times \text{area of unknown}}{\text{Area of internal standard}}$

Amount of unknown (กรัม) = $\frac{\text{Amount of internal standard} \times \text{area of unknown} \times \text{MW. Of unknown}}{\text{Area of internal standard}}$

Molecular weight of amino acid

ชนิด	Molecular weight
Aspartic acid	133.10
Glutamic acid	147.13
Serine	105.09
Glycine	75.07
Histidine	155.16
Arginine	174.20
Threonine	119.12
Alanine	89.09
Proline	115.13
Tyrosine	181.19
Valine	117.15
Methionine	149.21
Cysteine	121.16
Isoleucine	131.17
Leucine	131.17
Phenylalanine	165.19
Lysine	146.19

12. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างวัตถุบอาหารไก่กระทง

โดย Gas-liquid chromatographic technique

Column : HP – innowax (crosslinked polyethylene glycol)

30 m. x 0.32 mm. x 0.50 μ m. Film thickness

GAS : Helium

Injection volume : 1 μ l. (Split ratio 0.0:1)

Inlet temperature : 250⁰ ซ

Detector : Flame ionized detector

Detector temperature : 275⁰ ซ

Temperature programe for fatty acid methyl ester

Initial temperature 150⁰ ซ

Initial time 1 นาที

	Rate(⁰ ซ / นาที)	Final temperature(⁰ ซ)	Final time (นาที)
Level 1	15.0	200	15
Level 2	5.0	255	30
Level 3	0.0		

Next run time 60.33 นาที

การคำนวณปริมาณกรดไขมัน : Area normalization

$$\text{Amount of unknown} = \frac{\text{Area of unknown} \times \text{Amount of internal standard}}{\text{Area of internal standard}}$$

13. การประเมินคุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหารสัตว์

ขั้นตอนการป้อนวัตถุดิบอาหารให้กับไก่ทดลอง

1. ชั่งน้ำหนักวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่จะป้อนตามปริมาณที่กำหนด (ประมาณ 40 กรัม) ลงในถ้วยอลูมิเนียมที่แห้งสะอาด

2. นำไก่ออกจากกรงขังเดี่ยว ทำการชั่งและบันทึกน้ำหนักตัวไก่ทดลอง

3. นำไก่ที่ชั่งน้ำหนักแล้วไปใส่อุปกรณ์บังคับไก่สำหรับป้อนอาหาร

4. เติมน้ำลงในวัตถุดิบที่จะป้อนจนวัตถุดิบเปียกพอหมาดๆ เพื่อให้สะดวกในการป้อน

5. ใช้มือปั้นวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่จะป้อนให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.7-1.0 ซม.

เป็นแท่งยาวประมาณ 2-3 ซม.

6. จับไก่เข้าปากและแหงนคอขึ้นเล็กน้อยแล้วนำวัตถุดิบที่ปั้นไว้ใส่ลงไปคอไก่

7. ป้อนวัตถุดิบอาหารสัตว์จนหมด

8. นำไก่ออกจากอุปกรณ์บังคับไก่ แล้วนำไก่มาใส่อุปกรณ์ในการเก็บมูลและปัสสาวะ

9. นำไก่กลับเข้ากรงขังเดี่ยว

หมายเหตุ : ขณะป้อนอาหารถ้าไก่มีอาการอาหารติดคอให้หยุดป้อนอาหาร และรีบให้น้ำไก่กินทันที

ส่วนประกอบของวัตถุดิบอาหารสัตว์ในสูตรอาหารไก่ไข่

วัตถุดิบอาหารสัตว์	ปริมาณ (กิโลกรัม)
ข้าวโพด	60.50
กากถั่ว	17.63
ปลาป่น	12.00
เปลือกหอย	7.50
Dicalcium phosphate	1.50
วิตามินและเกลือแร่รวม	0.50
Sodium chloride	0.25
น้ำมันปาล์ม	0.05
DL - Methionine	0.07