ภาคผนวก

เทคนิคการผ่าตัดเจาะกระเพาะรูเมน (Ruminal fistulation)

เทคนิคการผ่าตัดเจาะกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้องมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาและรู้ล่วงหน้า เพราะชีวิตสัตว์ขึ้นอยู่กับการให้ยาชนิดต่างๆในช่วงที่ทำการผ่าตัดตลอดทั้งช่วงระยะเวลาที่ทำการผ่าตัดด้วย เป็นที่ทราบกันดีว่าสัตว์ที่ผ่านการผ่าตัดใส่กระบอกรูเมน (Rumen fistular) มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาการย่อยสลายอาหาร (degradability) นิเวศน์วิทยาในรูเมน (rumen ecology) รวมทั้งการศึกษาโภชนะที่ไหลผ่านออกจากกระเพาะรูเมน (by-pass nutrients) และง่ายต่อการสุ่มตัวอย่าง ตลอดทั้งการศึกษาวิจัยอื่นๆที่ต้องใส่หรือเติมสารลงไปเฉพาะที่

1. **การเตรียมสัตว์เข้ารับการผ่าตัด**

1.1 สัตว์ที่จะทำการผ่าตัดต้องได้รับการคัดเลือกตัวที่มีความแข็งแรง เป็นเพศผู้ที่มีอายุประมาณ 2 ปี น้ำหนักประมาณ 200-300 กิโลกรัม อยู่ในช่วงวัยเจริญพันธุ์ (mature) สัตว์ไม่ควรอ้วนเกินไปเพราะจะมีไขมันใต้ผิวหนังมากทำให้ผ่าตัดยาก

1.2 ทำการถ่ายพยาธิทั้งภายนอกและภายใน ให้วัคซีนป้องกันโรคที่สำคัญตลอดทั้งให้ไวตามิน A D_3 E เพื่อทำให้สัตว์มีร่างกายสมบูรณ์ในช่วงผ่าตัดและไม่มีโรคแทรกซ้อน

1.3 นำสัตว์มาขังคอกเดี่ยวอดน้ำและอาหารเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงก่อนทำการผ่าตัด เพื่อให้มีอาหารในกระเพาะน้อยที่สุด

1.4 ทำการโกนขนบริเวณที่จะทำการผ่าตัด อาบน้ำแปรงขนให้แห้ง แล้วราดทั่วตัวด้วยสารละลายน้ำยา savlon

2. การผ่าตัด (Surgery)

2.1 ทาทิงเจอร์ไอโอดีนให้ทั่วบริเวณที่ทำการโกนขนเพื่อผ่าตัด

2.2 วางยาสลบโดยใช้ rompun (Xylazine 20 mg/ml, Bayer Thai Co.,Ltd. Bankok) ทางกล้ามเนื้อ (Intermuscular) เพราะจะมีผลให้ยาออกฤทธิ์ได้ดีในช่วงเวลา 10-15 นาที ซึ่งหากฉีดเข้าเส้นเลือดดำยาจะออกฤทธิ์เร็วมากภายในเวลา 5 นาทีจะทำให้การเตรียมการไม่ทัน ปริมาณยาที่ให้จะฉีด 3 มิลลิลิตรในครั้งแรก และหลังจากนั้นประมาณ 30 นาทีฉีดเพิ่มอีกประมาณ 3 มิลลิลิตร

2.3 เมื่อยาเริ่มออกฤทธิ์สัตว์จะแสดงอาการส่งเสียงร้องเป็นครั้งคราว มีน้ำลายไหลออกจากปาก คอจะตกและโอนเอนไปมา ซึ่งต้องพยายามประคองให้สัตว์ได้นอนในทิศทางที่จะทำการผ่าตัดได้สะดวก

2.4 ทำเครื่องหมายบริเวณที่จะทำการผ่าตัด ซึ่งจะอยู่ทางสวาปด้านซ้ายของลำตัวสัตว์ ใช้ fistular ทาบวัดและวาดวงกลมตามกรอบด้านใน เพื่อไม่ให้แผลมีขนาดใหญ่เกินไป จะทำให้หลวมและรั่วซึมมีผลให้สภาวะรูเมนเปลี่ยนแปลงไป

2.5 ให้ยาระงับความเจ็บปวดเฉพาะที่โดยใช้ Xylocaine (ประกอบด้วย Lindocine hydrocholine 2%, OLIC (Thailand) Ltd., Bangkok) 50 มิลลิลิตร โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อเป็นจุดๆ ในระยะห่างประมาณ 1-2 นิ้ว ในแนวของสันหลังเพื่อบล็อกส่วนประสาทจากสันหลังและรอบๆ บริเวณที่จะผ่าตัดจะทำให้สัตว์ไม่ดิ้น

2.6 ใช้มีดผ่าตัดกรีดตามรอยที่ทำเครื่องหมายเอาไว้ โดยกรีดผ่าชั้นผิวหนัง (skin) และลอกแผ่นหนังออกมาก่อน หากมีเลือดไหลออกมามากควรใช้สำลีผ่านการฆ่าเชื้อเช็ดทำความสะอาด จากนั้นใช้กรรไกรแยกชั้นกล้ามเนื้อทั้งสามชั้นให้เป็นรูใหญ่เท่าขนาดบริเวณที่กรีดผิวหนัง โดยใช้มือช่วย อย่าใช้มีดผ่าตัดหรือกรรไกรตัดกล้ามเนื้อให้ขาดจากกัน เพราะจะทำให้แผลหายช้าและอาจตัดเส้นประสาทด้วย

2.7 หลังจากนั้นจะพบชั้นเนื้อเยื่อ peritoneal ในช่องท้อง และจะพบผนังด้านนอกของกระเพาะรูเมนจึงใช้มือดึงค่อยๆให้ผนังถูกยกขึ้น 2 จุด ใช้มีดกรีดตามแนวที่ยกขึ้นขนาดพอดีกับปากแผล ระวังอย่าให้ของเหลวหรือ digerta ไหลออกมาข้างนอกรูเมน เพราะอาจไหลลงช่องท้องของสัตว์ทำให้เกิดการติดเชื้อในช่องท้องของสัตว์ได้

2.8 ใช้เข็มเย็บผนังของกระเพาะรูเมนให้ยึดติดกับเนื้อเยื่อ peritoneal กล้ามเนื้อทั้งสามชั้น และผิวหนังให้แน่นสนิทด้วยไหมละลายเบอร์ 2 ทำการเย็บแผลให้เรียบร้อยทุกด้าน โดยแต่ละเข็มห่างกันประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วนำกระบอก fistular ที่เตรียมเอาไว้ใส่เข้าไป

2.9 ใช้ทิงเจอร์ไอโอดีนทารอบๆปากแผล และโรยยากันแมลงวัน ใช้สำลีพันรอบปากแผลใต้ fistular ไว้

3. การปฏิบัติหลังการผ่าตัด

3.1 ทำการฉีดวัคซีนป้องกันบาดทะยัก (tetanus antitoxin 1500 IU. 0.5 มิลลิลิตร/70 กิโลกรัมน้ำหนักตัว)

3.2 ฉีดยาปฏิชีวนะตามคำแนะนำของฉลากยา เช่น sotapen 5-10 มิลลิลิตร/70 กิโลกรัมน้ำหนักตัว

3.3 รักษาแผลให้แห้งและทำความสะอาดแผลทุกวัน จนกระทั่งแผลหายสนิท

3.4 จำกัดปริมาณอาหารที่ให้เพื่อป้องกันการตึงตัวของทางเดินอาหารมากเกินไปหลังการผ่าตัดและไม่ให้อาหารไหลออกมาจะทำให้แผลเปื่อยและหายช้า ควรให้อาหาร 80%ของปริมาณที่กินได้

3.5 หลังผ่าตัด 3 วันแรกควรดูแลสัตว์อย่างใกล้ชิด โดยเฉพาะตอนกลางคืน หากสัตว์มีอาการไข้ควรให้ยาลดไข้

3.6 สัตว์ที่ผ่านการผ่าตัดควรอยู่ในคอกขังเดี่ยวในสภาพที่สัตว์สามารถเคลื่อนไหวได้สะดวก จัดให้มีรางน้ำ รางอาหารพร้อมในคอก อาจนำสัตว์ไปออกกำลังกายบ้าง โดยการนำไปผูกล่ามในแปลงหญ้าแต่ไม่ควรปล่อยให้นอนแช่ปลักเพราะน้ำโคลนอาจไหลซึมเข้ากระเพาะรูเมนได้

การวิเคราะห์การย่อยสลายของอาหารสัตว์โดยเทคนิคถุงไนล่อน

(Nylon Bag Technique for Determination of Feed Degradation)

เทคนิคการใช้ถุงไนล่อนนี้เป็นเทคนิคที่ง่ายและสะดวก เหมาะสำหรับการศึกษาถึงข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับความสามารถในการย่อยได้ (digestibility) ของวัตถุแห้งและอินทรียวัตถุในรูเมน ซึ่งจัดว่าเป็นวิธีวิเคราะห์แบบ *in vivo* วิธีหนึ่ง เทคนิคการใช้ถุงไนล่อนครั้งแรกนั้นเริ่มด้วยการใช้ถุงผ้าไหม และนำไปแช่ไว้ในกระเพาะรูเมนของสัตว์ มีการทดลองในแกะที่ทำการผ่าตัดฝังท่อ cannula ที่กระเพาะรูเมน แต่ต่อมาได้เปลี่ยนมาใช้ ถุงเส้นใยวิทยาศาสตร์ ซึ่งมีความทนทานต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์ Mehrez and Orskov (1977) ได้เสนอแนะให้ใช้ถุงไนล่อนในการวิเคราะห์ประจำวัน เมื่อทดสอบอัตราการย่อยสลายของโปรตีนในอาหารพื้นฐานและอาหารเสริม อย่างไรก็ตามการใช้เทคนิคนั้นจะต้องมีความเข้าใจและระมัดระวังในเรื่องขนาดของถุงและขนาดของรูของถุงที่ใช้ เพื่อป้องกันไม่ให้อาหารที่มีขนาดเล็กมากเล็ดลอดออกมาได้ นอกจากนั้นยังต้องเอื้ออำนวยให้จุลินทรีย์สามารถผ่านเข้าออกถุงได้อย่างสะดวก และป้องกันการสะสมแก๊สในถุงที่จะทำให้ถุงลอยตัวขึ้นเหนือระดับของอาหารทำให้เกิดความผิดพลาดของค่าที่ได้รับ ควรใช้ถุงไนล่อนที่มีขนาดความห่างของรู (mesh size) ประมาณ 20-40 um โดยมีขนาดเนื้อที่ของรู (pore size) ระหว่าง 400-600 μm^2 ขนาดของถุงควรมีเนื้อที่ประมาณ 140 x 90 mm^2 โดยใช้กับตัวอย่างประมาณ 3-5 กรัม (DM) การเตรียมตัวอย่างใส่ถุงไนล่อนจะต้องใช้ตัวอย่างที่เหมือนกับตัวอย่างอาหารที่ควรจะตกเข้าสู่รูเมนโดยการกินของสัตว์เอง ตัวอย่างอาหารแห้งและพวกเมล็ดธัญพืชควรบดผ่านตะแกรงที่มีขนาด 2.5-3.0 um ส่วนพืชอาหารสัตว์สีเขียวหรือพวกที่มีน้ำมาก เช่นหญ้าหมัก การใช้เครื่องปั่น (mincer) ผ่านตะแกรงขนาด 5.0 um

ตำแหน่งของการจุ่มถุงในรูเมนควรใช้ถุงผูกติดกับเส้นไนล่อนขนาดพอเหมาะ โดยเส้นไนล่อนจะมีความยาวประมาณ 50 เซนติเมตร โดยผูกติดกับฝาปิดของกระบอกเจาะรูเมน ถุงที่ผูกติดนี้จะสามารถเคลื่อนตัวได้อย่างอิสระภายในรูเมนทั้งในระดับของของเหลวและของแข็ง ระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดของการจุ่มถุงไว้ในรูเมนเพื่อให้ได้ค่าที่อธิบายถึงอัตราการย่อยสลายนั้นขึ้นอยู่กับ

ลักษณะรูปแบบการย่อยสลายในช่วงเวลาต่างๆ ดังนั้นเป็นการยากที่จะเสนอแนะระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อใช้กับแหล่งอาหารทุกชนิด สำหรับการทดสอบแหล่งโปรตีนควรใช้ช่วงเวลาที่ 2, 6, 12, 24 และ36 ชั่วโมง ส่วนในหญ้าแห้ง ฟาง และแหล่งอาหารเยื่อใยต่างๆนั้นอาจยืดระยะเวลาออกไปจนถึง 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

การวิเคราะห์วัตถุแห้งโดยอบที่ 100 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง

1. **หลักการ** (Principle)

ความชื้นจะระเหยไปในระหว่างการอบแห้ง การหาค่าวัตถุแห้งทำโดยชั่งน้ำหนักสารที่เหลือแล้วนำมาหักลบกับน้ำหนักเริ่มต้น วิธีนี้ใช้สำหรับวิเคราะห์วัตถุแห้งในอาหารแห้งที่มีความชื้นต่ำกว่า 15% และมีสารที่ระเหยได้ต่ำ ตัวอย่างที่ทำแห้งโดยวิธีนี้ไม่เหมาะจะนำไปวิเคราะห์เยื่อใย ลิกนิน หรือ acids detergent insoluble nitrogen (ADIN) ต่อ เพราะอาจมีโปรตีนบางส่วนที่ถูกทำลายด้วยความร้อนในระหว่างการอบ กรดที่ระเหยได้และแอลกอฮอล์ในพืชหมักจะสูญเสียไประหว่างการอบด้วย

2. **อุปกรณ์**(Equipment)

2.1 ตู้อบชนิด forced air oven อุณหภูมิ 100 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส มีชั้นเป็นตะแกรงลวดเพื่อให้อากาศหมุนเวียนได้สะดวก เปิดช่องให้อากาศระบาย

2.2 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.3 ถ้วยชั่ง (aluminium dish) เส้นผ่าศูนย์กลาง 50 ม.ม. ลึก 40 ม.ม. พร้อมฝาปิด

2.4 โถดูดความชื้น (dessicator)

3. **วิธีการดำเนินการ** (Procedures)

3.1 อบถ้วยอลูมิเนียมพร้อมฝาที่อุณหภูมิ 100 $\pm$ 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง

3.2 ปิดฝาถ้วย นำมาใส่โถดูดความชื้น ปิดฝาโถทันที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องไม่เกิน 2-3 ชั่วโมง

3.3 ชั่งน้ำหนักถ้วยพร้อมฝา(w1) โดยเอาออกจากโถที่ละใบ และต้องปิดโถทุกครั้งที่เอาถ้วยออก

3.4 ใส่ตัวอย่างอาหาร 2 กรัมลงในถ้วย บันทึกน้ำหนักถ้วยพร้อมฝาและตัวอย่าง (w2)

3.5 เขย่าถ้วยเล็กน้อยเพื่อให้อาหารกระจายสม่ำเสมอและกระจายเต็มพื้นถ้วย

3.6 นำถ้วยพร้อมตัวอย่างเข้าตู้อบที่ได้เตรียมให้มีอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสแล้ววางฝาไว้ข้างๆถ้วยอบเป็นเวลา 12 ชั่วโมง นับจากอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

3.7 เอาตัวอย่างออกจากถ้วยโดยปิดฝาถ้วยให้สนิททุกใบ ใส่ในโถดูดความชื้น ปิดฝาโถให้สนิท ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องไม่เกิน 2-3 ชั่วโมง

3.8 ชั่งน้ำหนักถ้วยพร้อมฝาและตัวอย่างแห้ง(w3)

4. **การคำนวณ** (Calculations)

$$\% \text{ วัตถุแห้ง} = \frac{\text{น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างหลังอบ (w3) – น้ำหนักถ้วยเปล่า (w1)}}{\text{น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างก่อนอบ (w2) – น้ำหนักถ้วยเปล่า (w1)}}$$

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl Method

1. **หลักการ** (Principle)

เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในสารประกอบอินทรีย์ต่างๆซึ่งมีทั้งโปรตีนและสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่โปรตีนแต่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย โดยตัวอย่างจะถูกย่อยด้วยกรดกำมะถันเข้มข้น เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไนโตรเจนอินทรีย์ได้เป็นแอมโมเนียมซัลเฟต ในการช่วยย่อยจะเติมโซเดียมหรือโปแตสเซี่ยมซัลเฟต ลงไปเพื่อเพิ่มจุดเดือดของการย่อยให้สูงขึ้น และมีคอปเปอร์ซัลเฟตหรือเมอร์คิวริคออกไซด์เป็นคะตะไลส์เพื่อเร่งปฏิกิริยาให้เกิดเร็วขึ้น นำออกมาทำการกลั่นโดยตรงเพื่อไล่แอมโมเนียออกให้หมด จับก๊าซแอมโมเนียด้วยสารละลายกรดบอริค แล้วไตเตรทหาปริมาณแอมโมเนียด้วยสารละลายกรดกำมะถันมาตรฐาน

2. **อุปกรณ์** (Equipment)

2.1 Kjeldahl apparatus: digestion unit, distillation unit

2.2 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.3 บีเยศขนาด 100 มิลลิลิตร

2.4 แท่งแก้วคนสาร

2.5 บิวเรตต์

2.6 Volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.7 กรดซัลฟูริกเข้มข้น (98% nitrogen free, analytical grade)

2.8 สารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐาน 0.1 N (NaOH 2 กรัม ไตเตรทกับ H_2SO_4 ประมาณ 4.9 มิลลิลิตร)

2.9 สารละลาย NaOH (32%, nitrogen free)

2.10 NaOH

2.11 สารละลายกรดบอริก (2%)

2.12 Mixed catalyst (selenium)

2.13 Mixed Indicator

2.14 ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร

2.15 น้ำกลั่น

3. **วิธีการดำเนินการ (Procedures)**

3.1 ปิเปตสารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปชั่งด้วยเครื่องชั่งละเอียด จากนั้นเทใส่ในหลอดย่อย (E)

3.2 เติม Mixed catalyst 10 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น (98% nitrogen free, analytical grade) จำนวน 20 มิลลิลิตร (V1)

3.3 ทำการ Blank โดยเติม Mixed catalyst 10 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น (98% nitrogen free, analytical grade) จำนวน 20 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองย่อย (V2)

3.4 การย่อย Preheat นาน 10 นาที และย่อยจนใสประมาณ 30-45 นาที

3.5 ทิ้งให้อุ่นที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 20 นาที

3.6 การกลั่น: เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และสารละลาย NaOH (32%, nitrogen free) จำนวน 150 มิลลิลิตร

3.7 เตรียม Reciever: สารละลายกรดบอริก (2%) จำนวน 70 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask 250 มิลลิลิตร หยด Mixed Indicator 2 หยด จุ่มปลายท่อก๊าซแอมโมเนียลงใน Volumetric flask ให้ปลายท่ออยู่ต่ำกว่าระดับของสาร ทำการกลั่นนานประมาณ 3-4 นาที โดยใช้น้ำกลั่นล้างท่อและปลายท่อนำก๊าซ

3.8 การไตเตรต: นำตัวอย่างใน Volumetric flask มาทำการไตเตรตกับสารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐาน 0.1 N จนสารละลายเปลี่ยนสีเป็นสีแดง

4. **การคำนวณ (Calculations)**

$$\%N = \frac{(V1-V2) \times N \times 14.007 \times 100}{E\ (mg)}$$

% โปรตีน = %N x CF เมื่อ CF เป็นค่าคงที่ = 6.25

การวิเคราะห์เยื่อใยโดยสารฟอก (Detergent Fiber Analysis)

1. **หลักการ (Principle)**

การวิเคราะห์เยื่อใยหยาบ (Crude fiber) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีประมาณ (Proximate analysis) จะทำให้ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตหรือเยื่อใยไม่ถูกต้องแน่นอนเท่าที่ควร ทั้งนี้เนื่องจากเกิดการละลายเอาเยื่อใย โดยเฉพาะเฮไมเซลยูโลส (hemicelluloses) และลิกนิน (lignin) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ผลการวิเคราะห์ผิดพลาดได้ ในปี ค.ศ. 1960, Dr.P. J. Van Soest แห่งสถาบันวิจัยและส่งเสริมการเกษตร เมืองเบลท์สวิลล์ มลรัฐแมรี่แลนด์ สหรัฐอเมริกา ได้ทำการพัฒนาเทคนิคในการวิเคราะห์หาส่วนประกอบต่างๆของเยื่อใยให้ละเอียดยิ่งขึ้น เรียกว่าระบบการวิเคราะห์เยื่อใยโดยใช้สารฟอก (Detergent fiber Analysis) การวิเคราะห์เยื่อใยโดยใช้สารฟอกสามารถแยกส่วนประกอบของเซลออกเป็น 2 องค์ประกอบคือ

1. องค์ประกอบภายในเซล (cell content) ซึ่งเป็นส่วนที่สามารถย่อยสลายได้ง่ายโดยน้ำย่อยในตัวสัตว์ องค์ประกอบส่วนนี้ประกอบด้วย แป้ง น้ำตาล โปรตีนที่ละลายได้ง่าย ไขมันและอื่นๆ

2. องค์ประกอบส่วนที่เป็นเยื่อใยหรือผนังเซล (cell wall) เป็นส่วนที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของพืช มีความสามารถในการย่อยได้ต่ำประกอบด้วย เซลลูโลส (Celluloses) เฮไมเซลลูโลส (Hemicelluloses) ลิกนิน (Lignin) และโปรตีนที่ไม่ละลายได้ง่าย ซึ่งถูกยึดอยู่ภายในผนังเซล

ขั้นตอนการวิเคราะห์อาศัยการต้มตัวอย่างในสารฟอกที่มีฤทธิ์เป็นกลาง ซึ่งส่วนประกอบภายในเซลจะถูกละลายออกมาอยู่ในสารละลาย ขณะที่ส่วนที่เป็นเยื่อใยจะไม่ถูกสลายได้ซึ่งเรียกส่วนนี้ว่า เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารฟอกที่เป็นกลาง (Neutral detergent fiber, NDF) จะสังเกตได้ว่าการวิเคราะห์โดยวิธีนี้จะให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำกว่าการวิเคราะห์หาเยื่อใยหยาบ (CF) ที่เกิดการย่อยสลายของเฮไมเซลลูโลส (Hemicelluloses) ออกมาด้วยในระหว่างการต้ม

จากการวิเคราะห์ตามวิธีการของ Van Soest ทำให้ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายและได้พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ Acid detergent fiber, ADF ซึ่งทำให้เกิดการย่อยสลาย NDF ออกเป็น องค์ประกอบโดย เฮไมเซลลูโลส จะละลายอยู่ในสารฟอกที่เป็นกรดและส่วนที่ยังเหลือไม่ละลายได้แก่ โปรตีน เซลลูโลส ลิกนิน และBound nitrogen หลังจากนั้นเราก็สามารถทราบปริมาณลิกนินใน ADF โดยการใช้กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ละลายเซลลูโลสออกจากลิกนิน หรือ การใช้สารประกอบเปอร์แมงกาเนตในการ oxidation เพื่อสลายลิกนิน ปริมาณลิกนินในอาหารมี

ความสำคัญมากในด้านอาหารสัตว์ทั้งนี้เนื่องจากเป็นองค์ประกอบในพืชที่มีอิทธิพลหลักต่อการย่อยได้ของพืชอาหารสัตว์ ซึ่งลิกนินจะมีการสะสมในพืชสูงขึ้นเมื่อพืชอาหารสัตว์มีอายุมากขึ้น

การวิเคราะห์หาปริมาณสารเยื่อใย ด้วยเครื่องสกัดเยื่อใย ยี่ห้อ VELP รุ่น FIWE

1. **การเตรียม Glass crucible**

1.1. Glass crucible ก่อนใช้ครั้งแรกนั้นควรทำความสะอาด แล้วเช็ดให้แห้ง

1.2 นำไปอบที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-3 นาที โดยค่อยๆเพิ่มอุณหภูมิ แล้วทำให้เย็น (เพื่อให้ Glass crucible ปรับสภาพ)

1.3 เมื่อจะนำมาใช้ก็นำ Glass crucible นี้ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ทำให้เย็นในโถ Desiccators แล้วทำซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่

2. **การวิเคราะห์ Neutral Detergent Fiber, NDF**

2.1 สารเคมี (Reagents) Neutral detergent solution ประกอบด้วย

2.1.1 Sodium borate decahydrate ($Na_2B_4O_7$. 10 H_2O) 6.81 กรัม

2.1.2 Disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA, $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$) 18.61 กรัม

2.1.3 Sodium lauryl sulfate neutral ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) 30 กรัม

2.1.4 2- ethoxyethanol (Ethylene glycol monoethyl ether, Cellosolvee, $C_4H_{10}O_2$) 10 มล.

2.1.5 Disodium phosphate anhydrous (Na_2HPO_4) 4.56 กรัม

2.1.6 เตรียมน้ำกลั่น 1,000 ม.ล. เท Sodium borate และDisodium EDTA ลงในบีกเกอร์ และละลายด้วยน้ำกลั่นในขณะที่ให้ความร้อนเติมlauryl sulfate และ2- ethoxyethanol อีกส่วนหนึ่งละลาย Disodium phosphate ด้วยน้ำกลั่นในขณะที่ให้ความร้อนจนกระทั่งละลายดี ผสมส่วนผสมทั้งสองส่วนและละลายด้วยน้ำกลั่นที่เหลือควบคุมpHให้อยู่ระหว่าง 6.9-7.1

2.1.7 n-octanol (C8H18O) octilic alcohol

2.1.8 Sodium sulfite anhydrous (Na_2SO_3)

2.1.9 Acetone

3. **วิธีการดำเนินการ (Procedure)**

3.1 บดตัวอย่างอาหารผ่านตะแกรงขนาด 1 มม.

3.2 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 1 กรัมลงใน Glass crucible ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว

3.3 เติม Neutral detergent solution 100 มล. ที่อุณหภูมิห้องลงใน Glass crucible กับ 0.5 กรัมของ Sodium sulfite anhydrous และหยด n-octanol ประมาณ 3-5 หยด

3.4 ต้มให้เดือดนาน 60 นาที โดยการตั้งเวลาที่เครื่อง

3.5 กรอง โดยบิดลูกศรหน้าเครื่องไปยังตำแหน่ง vacuum เพื่อดูดเอา Neutral detergent solution ออก

3.6 ล้างของแข็งที่เหลืออยู่ 3 ครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ร้อน ครั้งละประมาณ 30 มล.โดยบิดลูกศรหน้าเครื่องไปยังตำแหน่ง pressure เพื่อที่ทำการพ่นอากาศเข้าไปทำให้เกิดการกวนผสม

3.7 ล้างด้วย Acetone อีก 3 ครั้งๆละประมาณ 25 มล. ขณะล้างบิดลูกศรหน้าเครื่องไปยังตำแหน่ง Pressure เพื่อที่ทำการพ่นอากาศเข้าไปทำให้เกิดการกวนผสม

3.8 นำ Glass crucible ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 ชั่วโมง หลังจากนั้นทิ้งให้เย็นใน desiccators

3.9 นำไปชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักคงที่

4. **การคำนวณ** (Calculation)

$$NDF\% = \frac{[(\text{น้ำหนัก Crucible+ น้ำหนักตัวอย่างที่เหลือ}) - \text{น้ำหนัก Crucible}]}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

การวิเคราะห์ Acid Detergent Fiber, ADF

1. **สารเคมี** (Reagents)

1.1 Acid Detergent Solution

- Cetyltrimethylammonium bromide technical grade ($C_{19}H_{42}BrN$)
- Sulfuric acid 1 N (H2SO4, 49.04 g/l) 1 ลิตร ละลายในขณะที่มีการคนให้เข้ากันดี

1.2 n-octanol (C8H18O) octilic alcohol

1.3 Acetone

2. **วิธีการดำเนินการ** (Procedure)

2.1 บดตัวอย่างอาหารผ่านตะแกรงขนาด 1 มม.

2.2 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 1 กรัมลงใน Glass crucible ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว

2.3 เติม Neutral detergent solution 100 มล. ที่อุณหภูมิห้องลงใน Glass crucible กับ 0.5 กรัมของ Sodium sulfite anhydrous และหยด n-octanol ประมาณ 3-5 หยด

2.4 ต้มให้เดือดนาน 60 นาที โดยการตั้งเวลาที่เครื่อง

2.5 กรอง โดยบิดลูกศรหน้าเครื่องไปยังตำแหน่ง vacuum เพื่อดูดเอา Acid detergent solution ออก

2.6 ล้างของแข็งที่เหลืออยู่ 3 ครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ร้อน ครั้งละประมาณ 30 มล.โดยบิดลูกศรหน้าเครื่องไปยังตำแหน่ง pressure เพื่อที่ทำการพ่นอากาศเข้าไปทำให้เกิดการกวนผสม

2.7 ล้างด้วย Acetone อีก 3 ครั้งๆละประมาณ 25 มล. ขณะล้างบิดลูกศรหน้าเครื่องไปยังตำแหน่ง Pressure เพื่อที่ทำการพ่นอากาศเข้าไปทำให้เกิดการกวนผสม

2.8 นำ Glass crucible ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 ชั่วโมง หลังจากนั้นทิ้งให้เย็นใน desiccators

2.9 นำไปชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักคงที่

3. **การคำนวณ** (Calculation)

$$\text{ADF\%} = \frac{[(\text{น้ำหนัก Crucible+ น้ำหนักตัวอย่างที่เหลือ}) - \text{น้ำหนัก Crucible}]}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

การวิเคราะห์หาปริมาณ Acid Detergent Lignin, ADL

1. **วิธีการดำเนินการ** (Procedures)

1.1 นำตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์เยื่อใย ADF (ทำต่อเนื่องจากการวิเคราะห์ADF) ใส่ลงในหลอด polyehylene

1.2 เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 72% (H_2SO_4) 40 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้ทั่ว แล้วนำมาแช่ในอ่างน้ำเย็น (Cool bath) นาน 3-4 ชั่วโมง และคนให้ทั่วเป็นครั้งคราวในช่วงเวลานั้น

1.3 นำมากรองลงในกรวยที่มี glass fiber filter รองรับ หรือใช้ gooch crucible โดยใช้เครื่องดูดอากาศช่วยในการกรอง ใช้น้ำร้อนล้างตะกอนที่เหลือให้หมดกรด และล้างด้วย acetone เป็นครั้งสุดท้ายด้วยปริมาณจำกัด

1.4 นำเข้าอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ในตู้อบตลอดคืน

1.5 นำออกจากตู้อบปล่อยให้เย็นในโถอบแห้ง และชั่งน้ำหนักคืน

1.6 นำตะกอนนี้เข้าเผาในเตาเผา (muffle) ที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส

1.7 นำออกจากเตาเผาปล่อยให้เย็นในโถอบแห้ง และชั่งน้ำหนักคืน

2. การคำนวณ (Calculations)

$$\% \text{ ADL} = \frac{[(\text{น้ำหนักcrucible+เยื่อใย ADF}) - \text{น้ำหนักcrucible}]}{\text{น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์}} \times 100$$

การวิเคราะห์เถ้า (Ash Content)

1. **หลักการ** (Principle)

ปริมาณเถ้า คือ ส่วนของสารอนินทรีย์ที่เหลืออยู่หลังจากที่สารอินทรีย์ถูกเผาไหม้ไปในเตาเผาที่มีอุณหภูมิสูง 500 องศาเซลเซียส องค์ประกอบของเถ้าได้แก่ โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม คลอรีน กำมะถัน แมกนีเซียม และฟอสฟอรัส ซึ่งพบในปริมาณมาก และแร่ธาตุที่พบปริมาณน้อย ได้แก่ เหล็ก ทองแดง สังกะสี ซีลีเนียม ไอโอดีน อลูมิเนียม ดีบุก และแมงกานีสเป็นต้น ในการวิเคราะห์เถ้าอุณหภูมิที่เผาไหม้สารอินทรีย์ต้องสูงเพียงพอที่จะทำให้เกิดการเผาไหม้อย่างสมบูรณ์ ต้องให้ความร้อนจนกระทั่งได้เถ้าที่มีสีสม่ำเสมอเป็นสีขาวหรือสีเทาไม่เป็นก้อนหรือไม่เหลือคาร์บอนที่เผาไหม้ไม่หมด ความคลาดเคลื่อนของปริมาณเถ้าเกิดได้จากการสลายของคาร์บอเนตที่เกิดอย่างต่อเนื่อง หรือการสูญเสียสารระเหยเช่น คลอไรด์ นอกจากนี้น้ำหนักเถ้าจะเปลี่ยนอย่างรวดเร็วเนื่องจากสามารถดูดความชื้นได้ดี วิธีนี้ใช้ได้กับตัวอย่างพืชและตัวอย่างอาหารทุกชนิด แต่ใช้สำหรับตัวอย่างอาหารเหลวหรืออาหารที่มีน้ำตาลสูงไม่ได้

2. **อุปกรณ์** (Equipment)

2.1 ถ้วยกระเบื้องเคลือบทรงเตี้ยขนาด 30 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิด เขียนเบอร์ด้วยหมึกทนไฟ

2.2 เตาเผา (Muffle furnance) ที่มีเครื่องควบคุมอุณหภูมิ

2.3 เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.4 โถดูดความชื้นที่มีท่อระบายอากาศได้

2.5 ตู้อบ

3. **วิธีการดำเนินการ** (Procedures)

3.1 อบถ้วยกระเบื้องเคลือบพร้อมฝาในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาใส่โถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งน้ำหนักถ้วยพร้อมฝา (W1)

3.2 ใส่ตัวอย่างประมาณ 1 กรัมลงในถ้วย บันทึกน้ำหนักละเอียดพร้อมถ้วยและฝา (W2)

3.3 นำไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นับหลังจากอุณหภูมิถึง 500 องศาเซลเซียส

3.4 ปล่อยให้อุณหภูมิเย็นลงต่ำกว่า 200 องศาเซลเซียส ปิดฝาถ้วย นำไปใส่ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งน้ำหนักถ้วยพร้อมเถ้า (W3)

4. การคำนวณ (Calculations)

$$\% \text{ เถ้า (DM basis)} = \frac{\text{น้ำหนักถ้วยและเถ้า (W3)} - \text{น้ำหนักถ้วยเปล่า (W1)} \times 100}{\text{น้ำหนักถ้วยและตัวอย่าง} - \text{น้ำหนักถ้วยเปล่า} \times \text{Lab DM}/100}$$

การประเมินการย่อยได้ของโปรตีนโดยใช้ Three step technique

การประเมินการย่อยได้ของโปรตีนในลำไส้เล็ก โดยใช้วิธีการของ Calsamiglia and Stern, 1995 ซึ่งสามารถแบ่งการทดลองเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การบ่มในกระเพาะรูเมน (Step 1 Ruminal incubation)

ขั้นตอนที่ 2 การย่อยด้วยเอมไซม์เปปซิน (Step 2 Pepsin-HCl digestion)

ขั้นตอนที่ 3 การย่อยด้วยเอนไซม์แพนครีเอทิน (Step 3 Pancreatin digestion)

1. **วิธีดำเนินการทดลอง**

1.1 การบ่มในกระเพาะรูเมน (Step 1 Rumen incubation)

1.1.1 นำตัวอย่างอาหารทั้ง 5 สูตรมาทำการบดผ่านตะแกรง ขนาด 1 มม.

1.1.2 นำถุงไนล่อนมาเขียนเบอร์ติดแล้วจึงนำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาทิ้งให้เย็นในโถอบความชื้นและทำการชั่งน้ำหนักถุงเปล่า บันทึกผล

1.1.3 ชั่งตัวอย่างอาหารใส่ลงในถุงไนล่อนประมาณ 5 กรัม โดยทำ 2 ซ้ำต่อตัวอย่าง และทำ 3 ซ้ำของสัตว์ทดลองที่ใช้

1.1.4 นำถุงไนล่อนที่มีตัวอย่างอาหารแล้วจุ่มลงในกระเพาะรูเมนของสัตว์ทดลอง ผ่านทางกระบอกเจาะกระเพาะ (rumen fistular) สัตว์ทดลองที่ใช้คือ กระบือเพศผู้อายุประมาณ 2 ปี น้ำหนักเฉลี่ย 250 กก. โดยเลี้ยงในคอกเดี่ยว กระบือจะได้รับอาหารในระดับเพื่อการดำรงชีพ (Maintenance) โดยได้รับอาหารข้น 0.2% ของน้ำหนักตัว และให้หญ้าแห้ง (หญ้ารูซี่) เป็นอาหารหยาบ โดยให้อาหารวันละ 2 ครั้งคือเวลา 08.00 น.และ16.00 น.โดยมีน้ำที่สะอาดให้กินตลอดเวลา

1.1.5 ทำการเก็บถุงไนล่อนที่เวลา 0, 2, 4, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปล้างโดยใช้เครื่องซักผ้าโดยใช้ระบบการซักระดับต่ำสุด และปล่อยให้น้ำล้นถังตลอดเวลาประมาณ 15 นาที และนำถุงไนล่อนไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

1.1.6 นำถุงไนล่อนออกจากตู้อบ และทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักถุงไนล่อน นำอาหารที่เหลือในถุงไปวิเคราะห์หาโปรตีนตามวิธีของ AOAC. (1975) และนำมาคำนวณหาค่าการย่อยได้ของวัตถุแห้ง และโปรตีนหยาบตามหนังสือของ เมธา (2533)

1.1.7 จากนั้นนำค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยได้ของวัตถุแห้งและโปรตีนหยาบที่คำนวณได้ตามระยะเวลาที่จุ่มในรูเมน นำข้อมูลเข้าเครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อคำนวณหาค่าประสิทธิภาพการย่อยสลาย (effective degradability) ที่ outflow rate 0.05 ตามสมการเอ็กซ์โปเนนเชียล $p = a+b\ (1-e^{-ct})$ ตามวิธีของ McDonald and Orskov (1979) ส่วนอัตราการชะล้างโดยน้ำ (washing loss) และค่าคงที่ของอัตราการย่อยสลาย (degradability rate constant) ของวัตถุแห้ง และโปรตีนหยาบโดยใช้ IFRU fit curve procedure

1.2 การย่อยด้วยเอมไซม์เปปซิน (Step 2 Pepsin-HCl digestion)

สารเคมี Pepsin Sigma P 7012 และการเตรียมสารละลาย pepsin

1.2.1 เตรียมสารละลาย 0.1 N HCl (HCl 9 ml เติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 CC.)

1.2.2 ชั่ง pepsin 1 g + 1 ลิตรของ 0.1 N HCl

1.2.3 ชั่งอาหารที่เหลือจากการบ่มในรูเมน โดยให้มี 15 mg N ใส่หลอด centrifuge ขนาด 50 ml เติม 10 ml 0.1 N HCl ที่ประกอบด้วย 1g/1 ของ pepsin, pH 1.9 เขย่าและบ่มไว้ 1 ชม. ใน 38 องศาเซลเซียส shaking waterbath

1.3 การย่อยด้วยเอนไซม์แพนครีเอทิน (Step 3 Pancreatin digestion)

สารเคมี pancreatin Sigma P 7545, Thymol Sigma T 0501, Trichloriacetic acid การเตรียมสารละลาย

1.3.1 0.5 M KH2PO4 buffer standardized at pH 7.8 เตรียมจาก 68 g เติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 CC

1.3.2 1 N NaOH เตรียมจาก 40 ml NaOH เติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 CC.

1.3.3 Pancreatin solution เตรียมจาก ชั่ง pancreatin 3 g เติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 CC.

1.3.4 50 ppm of thymol เตรียมจาก ชั่ง Thymal 0.05 g เติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 CC.

1.3.5 Trichloriacetic acid solution เตรียมจาก ชั่ง Trichloriacetic acid 50 g เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 CC.

1.3.6 สารละลาย pancreatin สำหรับ 1 ตัวอย่างให้เติม 0.5 ml of 1 N NaOH และเติม 13.5 ml of pancreatin จากนั้นเติม 1 ml thymol

1.3.7 หลังจากบ่มผ่านขั้นตอนที่ 2 ทำการเติม 0.5 ml ของ 1 N NaOH solution และ 13.5 ml ของ pancreatin solution (0.5M KH_2PO_4 buffer standardized at pH 7.8 ซึ่งมี 50 ppm. of thymol และ 3g/1 of pancreatin) เขย่าให้เข้ากัน และบ่มไว้ใน Shaking waterbath เป็นเวลา 24 ชม. และทำการเขย่าทุก 8 ชม

1.3.8 เมื่อครบ 24 ชม.เติม 3 ml ของ 100% (wt/vol.) Trichloriacetic acid เพื่อหยุดการทำงานของเอมไซม์ และแยกชั้นของโปรตีนที่ไม่ถูกย่อย

1.3.9 จากนั้นนำหลอดไปเขย่า แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

1.3.10 หลังจากนั้นนำไป centrifuge x 10,000 รอบ 15 นาที ดูดเอาส่วนที่เป็นของเหลวใส 5 ml นำไปวิเคราะห์หา Insoluble N นำตัวอย่างอาหารไปวิเคราะห์หาCP ตามวิธีของ Kjeldahl method (AOAC, 1985)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารแทนนิน (Condensed tannin)

1. **การเตรียม** Reagent

1.1 เตรียม HCl 8% ใน Methanol และเตรียม Vanillin 4% ใน Methanol

1.2 นำสารละลายทั้งสองชนิดผสมให้เข้ากันก่อนในอัตราส่วน 1:1 จะได้ Vanillin-HCl reagent

2. **การทำ** standard curve

2.1 เติม Catechin 100 มิลลิกรัม ใน Methanol 50 มิลลิลิตร

2.2 นำสารละลายจากข้อ 9.2.1 มาทำการเจือจาง จาก 1:1 จนถึง 1:10 เพื่อทำ standard curve

2.3 ไปเปตสารละลายในแต่ละ dilution 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง (ทำ 2 หลอดทดลอง)

2.4 เมื่อครบ 10 dilution (20หลอดทดลอง) เติม Vanillin-HCl reagent 5 มิลลิลิตร

2.5 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 9.2.4 ไปวัดค่า transmittance โดยใช้ spectrophotometer 555 mμ (525 mμ เมื่อใช้ filter) หลังจากที่เปิดเครื่องทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที

2.6 plot กราฟระหว่าง transmittance กับความเข้มข้นของ catechin

3. **วิเคราะห์หาสารแทนนิน**

3.1 ใส่ตัวอย่างอาหารที่ผ่านการบดแล้ว 1 กรัมลงใน flask 125 มิลลิกรัม

3.2 เติม Methanol 50 มิลลิลิตร ในแต่ละ flask

3.3 นำไปเข้าเครื่องเขย่านาน 24 ชั่วโมง

3.4 ไปเปตสารละลายที่ได้ 1 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลอดทดลอง 2 หลอด

3.5 เติม Vanillin-HCl reagent 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer เช่นเดียวกับการทำ standard curve แล้วนำค่าที่ได้มาเทียบกับ standard curve