บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมโปรตีนสกัดจากถั่วเขียวซีก

1.1 การเตรียมโปรตีนสกัดและการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในโปรตีนสกัดจากถั่วเขียวซีก

สกัดโปรตีนจากถั่วเขียวซีกกระเทาะเปลือกแล้ว (จากบริษัทไทยวาฟูดโปรดักส์) โดยการใช้วิธีบดแบบเปียก ในสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งดัดแปลงมาจาก วีรวิชญ์ (38) ตามขั้นตอนดังนี้

1.1.1 นำถั่วเขียวซีกแช่น้ำในอัตราส่วนถั่วเขียวซีกต่อน้ำเท่ากับ 1 กรัม ต่อ 15 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

1.1.2 บดด้วยเครื่องบด (Blender MX-311 N บริษัท National) แล้วบดให้ละเอียดยิ่งขึ้นด้วยเครื่องบดความเร็วสูง (Ultra-turax T25 บริษัท Junke & Kunkel Ika-Labortechnik) ที่ความเร็ว 24,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 1 นาที

1.1.3 ปรับพีเอช 9 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, G.R. ของบริษัท E.Merck) ความเข้มข้นร้อยละ 50

1.1.4 กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic stirrer, nuova 7 stirrer Thermolyne บริษัท Sybron Corporation)

เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

1.1.5 ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง

1.1.6 นำส่วนสารละลายมาปรับพีเอช 4.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, G.R. บริษัท E. Merck) ความเข้มข้น 6 นอร์แมล

1.1.7 นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge, Clements GS 100 ขนาดหัวเหวี่ยง 7 นิ้ว) ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตะกอนโปรตีนออก

1.1.8 นำตะกอนโปรตีนมากระจายตัวในน้ำ ปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 50

1.1.9 กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า ให้ตะกอนโปรตีนละลายหมด

1.1.10 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Macro Kjeldahl รายละเอียดการวิเคราะห์อยู่ในภาคผนวก ก.

1.2 <u>การเตรียมโปรตีนสกัดชนิดผงจากถั่วเขียวซีก</u>

สกัดโปรตีนตามวิธีในข้อ 1.1.1-1.1.9 ได้สารละลายโปรตีนความเข้มข้นประมาณร้อยละ 4 นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นกระจาย (Minispray dryer, Buchi 190) โดยใช้อุณหภูมิลมร้อนเข้า (inlet temperature) 190 องศาเซลเซียส อุณหภูมิลมร้อนออก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(outlet temperature) 90 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของลมเข้า 800 ลิตรต่อชั่วโมง (38) ขั้นตอนการเตรียมโปรตีนสกัดชนิดผงจากถั่วเขียวซีก แสดงไว้ในภาพที่ 1

ภาพที่ 1 การเตรียมโปรตีนสกัดชนิดผงจากถั่วเขียวซีก (38)

1.3 <u>การประเมินคุณค่าทางโภชนาการของผงโปรตีนสกัดจากถั่วเขียวซีกโดยวิธีทางเคมี (Chemical Analysis)</u> (39-41)

นำผงโปรตีนสกัดจากถั่วเขียวมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีดังนี้

1.3.1 วิเคราะห์ปริมาณความชื้น โดยการอบในตู้อบไฟฟ้า (Hot air oven method)

1.3.2 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Macro Kjeldahl

1.3.3 วิเคราะห์ปริมาณไขมันด้วยวิธี Rose-Gottlieb

1.3.4 วิเคราะห์ปริมาณเถ้า (Ash) โดยการเผาในเตาเผาเถ้า (Muffle furnance)

1.3.5 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและใยอาหาร ได้จากการคำนวณ โดยนำผลรวมขององค์ประกอบอื่น ๆ ที่วิเคราะห์ได้ในข้อ 1.3.1-1.3.4 มาหักออกจากค่า 100

รายละเอียดของวิธีวิเคราะห์อยู่ในภาคผนวก ก.

2. การเตรียมอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเขียว (สูตรที่ 1)

อาหารทางการแพทย์ควรมีการกระจายของพลังงานที่เหมาะสมกับความต้องการของร่างกาย คือ มีโปรตีนร้อยละ 15-20 ไขมันร้อยละ 30-35 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 45-55 ดังนั้นจึงเตรียมอาหารทางการแพทย์ โดยใช้อัตราส่วนโปรตีนสกัดจากถั่วเขียว 20 กรัม ไขมัน 20 กรัม คาร์โบไฮเดรต 60 กรัม และใช้เลซิทิน (Lecithin) 2.5 กรัม (ปริมาณ 0.5 กรัมต่อปริมาตรอาหารชงพร้อมบริโภค 100 มิลลิลิตร) เพื่อปรับปรุงการละลาย และความคงตัวของการแขวนตะกอนของผลิตภัณฑ์ (38) ส่วนประกอบของสารอาหาร และปริมาณวัตถุดิบที่ใช้เตรียมอาหารทางการแพทย์สูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเขียว แสดงในตารางที่ 2 และ 3

2.1 นำโปรตีนที่สกัดได้ตามวิธีในข้อ 1.1.1-1.1.7 (ให้มีปริมาณโปรตีน 20 กรัม) มากระจายตัวในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็นกลาง กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กให้โปรตีนละลาย นำมาปั่นผสมด้วยเครื่องบดปั่นความเร็วสูง พร้อมทั้งเติมสารต่าง ๆ ตามลำดับต่อไปนี้คือ เติมน้ำมันข้าวโพด (Corn oil, Mazola®) 16 กรัม น้ำมันเอ็มซีที (MCT Oil®, บริษัท Mead Johnson) 4 กรัม เลซิทิน (Lecithin, Lecimulthin®, บริษัท Lucas Meyer) 2.5 กรัม และมอลโตเด็กซ์ตริน (Maltodextrin, Fieldose PHS 17®, บริษัท Goodman Fielder) 60 กรัม ตามลำดับ ปั่นผสมให้เข้ากันเป็นอิมัลชัน (Emulsion) นำไปทำเป็นผงแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นกระจาย โดยให้อุณภูมิลมร้อนเข้า (Inlet temperature) 150 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิลมร้อนออก (Outlet temperature) 70 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของลมเข้า 800 ลิตรต่อชั่วโมง (38) ได้ผลิตภัณฑ์อาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเขียว (สูตรที่ 1)

ขั้นตอนการเตรียมอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเขียว (สูตรที่ 1) แสดงไว้ในภาพที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสารอาหารที่ใช้เตรียมอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเขียว (สูตรที่ 1)

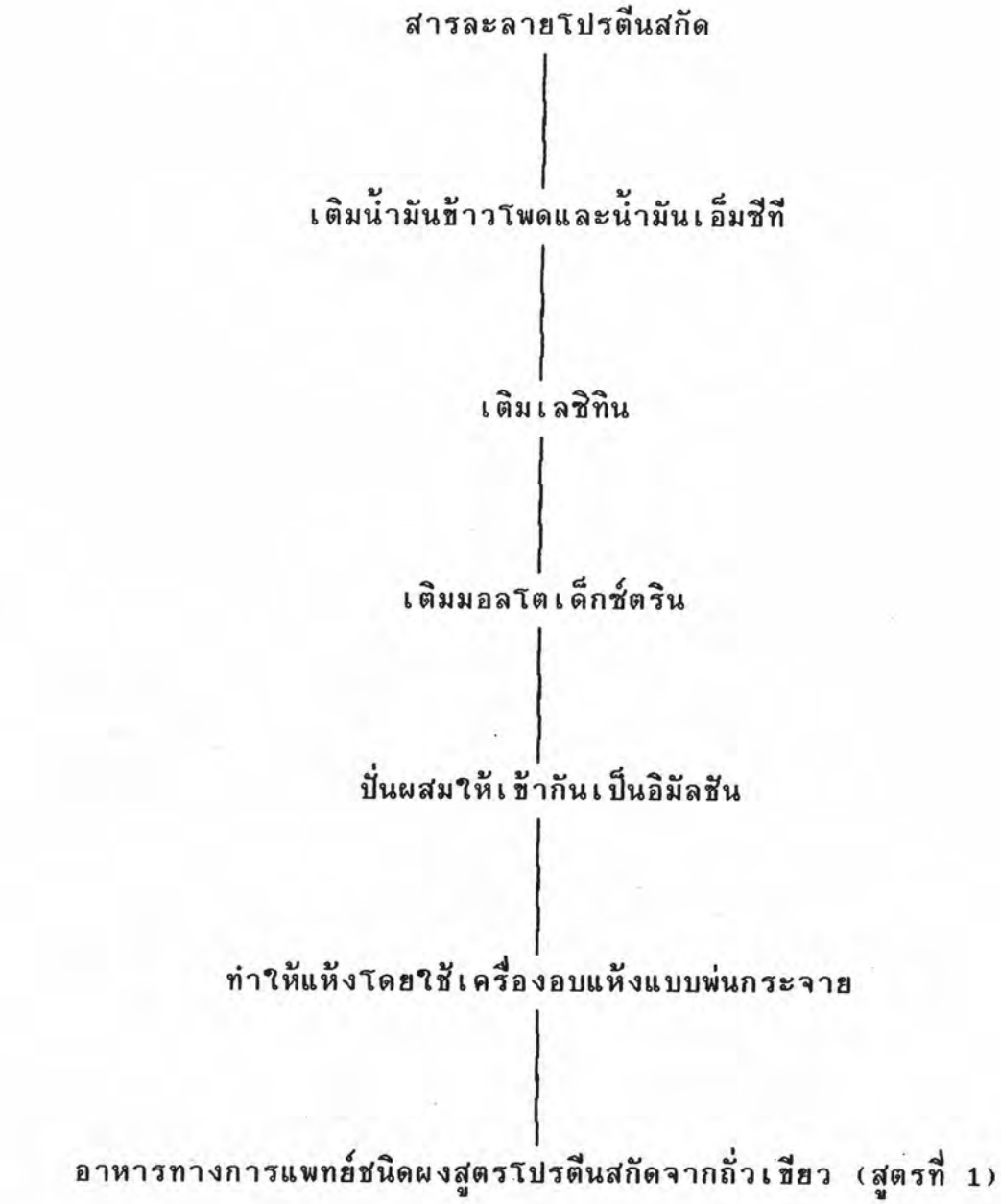
สารอาหาร	ปริมาณ (ร้อยละ)
โปรตีนสกัดจากถั่วเขียว	20
น้ำมันข้าวโพด	16
น้ำมันเอ็มซีที	4
มอลโตเด็กซ์ตริน	60
เลซิทิน	2.5*

* ใช้ปริมาณ 0.5 กรัมต่อปริมาตรอาหารชงพร้อมบริโภค (ความเข้มข้นพลังงาน 1 กิโลแคลอรี่ต่อมิลลิลิตร) 100 มิลลิลิตร

ตารางที่ 3 ปริมาณวัตถุดิบที่ใช้เตรียมอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเขียว (สูตรที่ 1)

วัตถุดิบ	ปริมาณ (กรัม)
ถั่วเขียวซีก	100
น้ำมันข้าวโพด	12.72
น้ำมันเอ็มซีที	3.18
มอลโตเด็กซ์ตริน	47.71
เลซิทิน	1.99

ภาพที่ 2 การเตรียมอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเขียว (สูตรที่ 1) (38)



3. การประเมินคุณค่าทางโภชนาการของอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเขียว (สูตรที่ 1) และเคซีน โดยวิธีทางเคมี (39-43)

นำอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเขียวสูตรที่ 1 ที่เตรียมได้ในข้อ 2 และเคซีน (Casein, Sigma) มาวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 1.3.1-1.3.5 และวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน โดยใช้เครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน (Amino acid analyzer, Beckman system 6300 series) รายละเอียดการวิเคราะห์โดยวิธีทางเคมีอยู่ในภาคผนวก ก.

นำปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นที่วิเคราะห์ได้ มาคำนวนค่าอะมิโนแอซิดสคอร์ (Amino acid score) โดย

$$\text{อะมิโนแอซิดสคอร์} = \frac{\text{ปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัม) ในโปรตีน 1 กรัม}}{\text{ปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัม) ชนิดเดียวกันในโปรตีนมาตรฐาน* 1 กรัม}}$$

* โปรตีนมาตรฐานของ FAO/WHO 1973 (44) แสดงในตารางภาคผนวก ฉ.

4. การปรับปรุงคุณภาพโปรตีนของอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเขียว (สูตรที่ 1)

กรดอะมิโนในอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเขียว (สูตรที่ 1) มีปริมาณกรดอะมิโนเมไทโอนีนและทรีโอนีนต่ำ เพื่อให้ปริมาณกรดอะมิโนใกล้เคียงกับปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนตามมาตรฐานของ FAO/WHO 1973 (44) จึงเตรียมอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเขียวสูตรต่าง ๆ โดยการปรับปรุงคุณภาพโปรตีนสกัดจากถั่วเขียวด้วยการเสริมกรดอะมิโนเมไทโอนีน และทรีโอนีน หรือเสริมกรดอะมิโน

เมไทโอนีน ทรีโอนีน และไลซีน ลงในอาหารทางการแพทย์สูตรที่ 1 ทำให้ได้อาหารทางการแพทย์สูตรที่ 2 และสูตรที่ 3 ตามลำดับ หรือผสมอาหารทางการแพทย์สูตรที่ 1 เข้ากับเคซีน ในอัตราส่วนโปรตีนเท่ากับ 1 ต่อ 1 แล้วจึงเสริมกรดอะมิโนเมไทโอนีน และทรีโอนีนทำให้ได้อาหารทางการแพทย์สูตรที่ 4

ปริมาณเคซีนและกรดอะมิโนเมไทโอนีน ทรีโอนีน และไลซีนที่ใช้เสริมลงในอาหารทางการแพทย์สูตรที่ 1 เพื่อเตรียมอาหารทางการแพทย์สูตรที่ 2,3 และ 4 ดังนี้

สูตรที่ 2 เตรียมโดยเสริมกรดอะมิโน

เมไทโอนีน 19.02 มิลลิกรัมต่อกรัมโปรตีน

ทรีโอนีน 11.16 มิลลิกรัมต่อกรัมโปรตีน

สูตรที่ 3 เตรียมโดยการเสริมกรดอะมิโน

เมไทโอนีน 19.28 มิลลิกรัมต่อกรัมโปรตีน

ทรีโอนีน 11.45 มิลลิกรัมต่อกรัมโปรตีน

ไลซีน ไฮโดรคลอไรด์ (Lysine HCl)

8.43 มิลลิกรัมต่อกรัมโปรตีน

สูตรที่ 4 เตรียมโดยการเสริมโปรตีนเคซีน และกรดอะมิโน

เคซีน 1.1745 กรัมต่อกรัมโปรตีน

(เคซีนมีโปรตีนร้อยละ 85.14, เคซีน 1.1745 กรัมมีโปรตีน 1 กรัม)

เมไทโอนีน 14.48 มิลลิกรัมต่อกรัมโปรตีน

ทรีโอนีน 8.63 มิลลิกรัมต่อกรัมโปรตีน

ส่วนประกอบของอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเขียวสูตรต่าง ๆ แสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเขียวสูตรต่าง ๆ

สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4
โปรตีนสกัดจากถั่วเขียว น้ำมันข้าวโพด น้ำมันเอ็มซีที มอลโตเด็กซ์ตริน เลซิทิน	สูตรที่ 1	สูตรที่ 1	สูตรที่ 1
-	+ เมไทโอนีน + ทรีโอนีน	+ เมไทโอนีน + ทรีโอนีน + ไลซีน	+ เคซีน + เมไทโอนีน + ทรีโอนีน

4.1 การประเมินคุณค่าทางโภชนาการของอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรที่ 2, 3 และ 4 โดยวิธีทางเคมี (Chemical Analysis) (39-43)

วิธีวิเคราะห์ เช่นเดียวกับข้อ 1.3.1-1.3.5 และวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนโดยใช้เครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน (Amino acid analyzer, Beckman system 6300 series) รายละเอียดการวิเคราะห์โดยวิธีทางเคมีอยู่ในภาคผนวก ก.

นำปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นที่วิเคราะห์ได้มาคำนวนค่าอะมิโนแอซิดสคอร์

5. <u>การประเมินคุณค่าทางโภชนาการของอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเขียว โดยการวิเคราะห์ทางชีวภาพ</u> (Biological assay) (39,45,46)

ศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรที่ 1,2,3 และ 4 ในหนูทดลอง โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานเคซีน (ANRC reference casein) เพื่อหาค่า Protein efficiency ratio (PER), Correct protein efficiency ratio (CPER), Relative protein efficiency ratio (RPER), Net protein ratio (NPR), Relative net protein ratio (RNPR), Biological value (BV), True digestibility (TD) และ Net protein utilization (NPU) ด้วยวิธีการดังนี้

5.1 <u>การหาค่า PER, CPER และ RPER</u>

5.1.1 เตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงหนูทดลอง โดยให้มีส่วนประกอบดังนี้ โปรตีนร้อยละ 10 ไขมัน (น้ำมันข้าวโพด, Mazola®) ร้อยละ 8 เกลือแร่ (Salt mixture) ร้อยละ 5 วิตามิน (Vitamin mixture) ร้อยละ 1 แอลฟา-เซลลูโลส (α-Cellulose) ร้อยละ 1 น้ำร้อยละ 5 และคาร์โบไฮเดรต (แป้งข้าวโพด, Maizena cornflour®, บริษัท CPC/Aji) ร้อยละ 70 เก็บอาหารที่เตรียมได้ในตู้เย็นที่อุณภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Macro Kjeldahl

รายละเอียดของอาหารสำหรับเลี้ยงหนูทดลองแสดงไว้ในภาคผนวก ข.

5.1.2 สัตว์ทดลองใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้ อายุ 21-23 วัน น้ำหนักระหว่าง 45-55 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศูนย์ศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล แยกเลี้ยงกรงละ 1 ตัว ในกรงมีที่รองรับอุจจาระปัสสาวะ (Metabolic cage) ในห้องปรับอากาศอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีแสงสว่างเวลากลางวัน 12 ชั่วโมง และมืดในเวลากลางคืน 12 ชั่วโมง แบ่งหนูทดลองเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว ให้มีน้ำหนักเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มต่างกันไม่เกิน 5 กรัม แต่ละกลุ่มเลี้ยงด้วยอาหารที่มีแหล่งของโปรตีนแตกต่างกันดังนี้

กลุ่มมาตรฐาน เลี้ยงด้วยอาหารโปรตีนมาตรฐาน (เคซีน)

กลุ่มทดลอง 1 เลี้ยงด้วยอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเขียว (สูตรที่ 1)

กลุ่มทดลอง 2 เลี้ยงด้วยอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเขียว เสริมด้วยกรดอะมิโนเมไทโอนีนและทรีโอนีน (สูตรที่ 2)

กลุ่มทดลอง 3 เลี้ยงด้วยอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเขียวเสริมด้วยกรดอะมิโนเมไทโอนีนทรีโอนีน และไลซีน (สูตรที่ 3)

กลุ่มทดลอง 4 เลี้ยงด้วยอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเขียว และเคซีน เสริมด้วยกรดอะมิโนเมไทโอนีน และทรีไอนีน (สูตรที่ 4)

หนูทดลองแต่ละกลุ่มได้รับอาหารและน้ำตลอดทั้งวัน เป็นเวลา 28 วัน บันทึกน้ำหนักตัวของหนูทดลองขณะเริ่มต้น น้ำหนักอาหารที่หนูแต่ละตัวได้รับ และน้ำหนักตัวของหนูทดลอง ทุก 5 วัน นำไปคำนวณหาค่า PER, CPER และ RPER ดังนี้

$$PER = \frac{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักของโปรตีนที่กิน (กรัม)}}$$

$$CPER = \frac{\text{PER ของกลุ่มทดลอง}}{\text{PER ของกลุ่มมาตรฐาน}} \times 2.5$$

$$RPER = \frac{\text{PER ของกลุ่มทดลอง}}{\text{PER ของกลุ่มมาตรฐาน}} \times 100$$

5.2 การหาค่า NPR และ RNPR

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองเพื่อหาค่า PER แต่เพิ่มกลุ่มหนูทดลองอีกหนึ่งกลุ่ม คือกลุ่มซึ่งเลี้ยงด้วยอาหารปราศจากโปรตีน (Zero protein group, กลุ่ม Z) ส่วนประกอบของอาหารมีดังนี้คือ ไขมัน (น้ำมันข้าวโพด, Mazola®) ร้อยละ 8 เกลือแร่ร้อยละ 5 วิตามินร้อยละ 1 แอลฟา-เซลลูโลสร้อยละ 1 น้ำร้อยละ 5 และคาร์โบไฮเดรต (แป้งข้าวโพด, Maizena cornflour®) ร้อยละ 80 ระยะเวลาที่ทดลอง 14 วัน

บันทึกน้ำหนักอาหารที่กินและน้ำหนักตัวหนูทดลองทุก 5 วัน นำมาคำนวณหาค่า NPR และ RNPR ได้ดังนี้

$$NPR = \frac{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นของกลุ่มทดลอง + น้ำหนักตัวที่ลดลงของกลุ่ม Z}}{\text{โปรตีนที่กินโดยกลุ่มทดลอง - โปรตีนที่กินโดยกลุ่ม Z}}$$

$$RNPR = \frac{\text{NPR ของกลุ่มทดลอง}}{\text{NPR ของกลุ่มมาตรฐาน}} \times 100$$

5.3 การหาค่า NPU, TD และ BV

ใช้เทคนิคสมดุลย์ไนโตรเจน (Nitrogen balance technique) โดยแบ่งกลุ่มหนูทดลองเช่นเดียวกับการหาค่า NPR เลี้ยงหนูทดลองเป็นเวลา 14 วัน บันทึกน้ำหนักตัวหนูทดลองขณะเริ่มต้น น้ำหนักอาหารที่กิน และน้ำหนักหนูทดลองทุก 5 วัน เก็บอุจจาระและปัสสาวะของหนูแต่ละตัวทุกวันตลอดการทดลองนำมารวบรวมไว้ในตู้เย็น วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในอุจจาระและปัสสาวะโดยวิธี Macro Kjeldahl นำมาคำนวณหาค่า TD, BV และ NPU ดังนี้

$$TD = \frac{\text{ปริมาณไนโตรเจนที่ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย}}{\text{ปริมาณไนโตรเจนที่กลุ่มทดลองกิน}} \times 100$$

$$= \frac{I - (F-F_o)}{I} \times 100$$

$$BV = \frac{\text{ปริมาณไนโตรเจนที่ร่างกายนำไปใช้ประโยชน์}}{\text{ปริมาณไนโตรเจนที่ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย}} \times 100$$

$$= \frac{I - (F-F_o) - (U-U_o)}{I - (F-F_o)} \times 100$$

$$NPU = \frac{\text{ปริมาณไนโตรเจนที่ร่างกายนำไปใช้ประโยชน์}}{\text{ปริมาณไนโตรเจนที่กลุ่มทดลองกิน}} \times 100$$

$$= \frac{I - (F-F_o) - (U-U_o)}{I} \times 100$$

$$NPU = \frac{BV \times TD}{100}$$

I = ปริมาณไนโตรเจนที่กลุ่มทดลองกิน

F = ปริมาณไนโตรเจนที่ขับออกทางอุจจาระของกลุ่มทดลอง

F_o = ปริมาณไนโตรเจนที่ขับออกทางอุจจาระของกลุ่ม Z

U = ปริมาณไนโตรเจนที่ขับออกทางปัสสาวะของกลุ่มทดลอง

U_o = ปริมาณไนโตรเจนที่ขับออกทางปัสสาวะของกลุ่ม Z

6. <u>การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ</u> (47,48)

ใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) นำค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละคู่มาทดสอบ Honestly Significant Difference Test (HSD Test)