# ภาคผนวก ก

Prince of Songkla University
Pattani Campus

# การเตรียมสารเคมีและการคำนวณ

**1. การเตรียมสารละลายกรดไขมันมาตรฐานของ C8-C24**

1.1 การเตรียมสารละลายกรดไขมันมาตรฐานความเข้มข้น 10,000 mg/L

การเตรียมสารละลายกรดไขมันมาตรฐานของ C6-C24 ความเข้มข้น 10,000 mg/L ปริมาตร 10.00 mL เช่นตัวอย่าง การเตรียมสารละลายกรดไขมันมาตรฐานของ C6

จากสารละลายของ C8 1,000 mL มีเนื้อสาร 10,000 mg

ถ้าสารละลายของ C8 10.00 mL จะมีเนื้อสาร (10.00x10,000) /1,000 = 100 mg

ดังนั้น ชั่ง C8 0.1±0.05 g ละลายในไอโซโพรพานอล จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 10.00 mg

หมายเหตุ: C8-C24 ใช้ในปริมาณเท่ากันทุกตัว คือเท่ากับ 0.1±0.05 g

โดย C8-C17 ละลายในไอโซโพรพานอล และ C18-C24 ละลายในเฮปเทน

1.2 การเตรียมสารละลายกรดไขมันมาตรฐานความเข้มข้น 20, 40 และ 80 mg/L จากสารละลายกรดไขมันมาตรฐานความเข้มข้น 10,000 mg/L ดังตารางที่ ก-1

**ตารางที่ ก-1** การเตรียมละลายกรดไขมันมาตรฐาน

| ความเข้มข้น (mg/mL) | ปริมาตรของกรดไขมัน (mL) | ปริมาตรของกรดเฮปเทน (mL) |
|---|---|---|
| 20 | 0.03 | 1.38 |
| 40 | 0.06 | 1.26 |
| 80 | 0.12 | 1.02 |

**2. การเตรียมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์**

| | | |
|---|---|---|
| สูตรโมเลกุล | $H_2SO_4$ | |
| น้ำหนักมวลโมเลกุล | 98.08 | g/mol |
| ความหนาแน่น | 1.84 | kg/L |
| ความเข้มข้น | 18.76 | M |

วิธีการคำนวณ

จากสารละลาย $H_2SO_4$ 1,000 mL มี $H_2SO_4$ 1840 g

ถ้าสารละลาย $H_2SO_4$ 1.00 mL มี $H_2SO_4$ 1.84 g

Prince of Songkla University Pattani Campus

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| จาก | $H_2SO_4$ | 98.08 | g | คิดเป็น | 1 | mol |
| ถ้า | $H_2SO_4$ | 1840 | g | คิดเป็น | 18.76 | mol |

จากสมการ $C_1V_1 = C_2V_2$

$18.76V_1 = 0.1 \times 500$

$V_2 = 0.266$

ดังนั้น ต้องใช้กรดซัลฟิวริก 2.66 mLใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 500 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายกรดซัลฟิวริก 0.1 M

**3. การเตรียมสารละลาย Methanolic HCl เข้มข้น 2 โมลาร์ จำนวน 100.00 มิลลิลิตร**

| | | |
|---|---|---|
| สูตรโมเลกุล | HCl | |
| น้ำหนักมวลโมเลกุล | 36.46 | g/mol |
| ความเข้มข้น | 35.4% | w/v |

วิธีการคำนวณ

จากสารละลาย Methanolic HCl 1,000 mL มี HCl 2 mol

ถ้าสารละลาย Methanolic HCl 100.00 mL มี HCl (100.00x2)/1,000=0.20 mol

คิดเป็นกรัม จะได้ $0.20 \times 36.46 = 7.29$ g

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| จาก | HCl | 35.4 | g อยู่ในสารละลาย | 100.00 | mL |
| ถ้า | HCl | 7.29 | g อยู่ในสารละลาย | (7.29x100.00)/35.4=20.59 | mL |

ดังนั้น ไปเปตกรดไฮโดรคลอริก 20.59 mL ใส่ในขวดปรับปริมาตร 100.00 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

**4. การเตรียมสารละลาย A**

ละลาย $Na_2CO_3$ 6.0 g ในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1,000 mL

**5. การเตรียมสารละลาย B**

ละลาย $CuSO_4.5H_2O$ 1.5 g และ sodium citrate 3 g ในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 mL

Prince of Songkla University Pattani Campus

**6. การเตรียมสารละลาย C**

ผสมสารละลายรีเอเจนต์ A และ B ในอัตราส่วน A: B เท่ากับ 10.0: 0.2 (ควรเตรียมใหม่ทุกวัน)

**7. การเตรียมสารละลาย D**

เจือจาง 2N folin reagent ด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 72: 28 โดยปริมาตร

**8. การเตรียมสารละลาย 0.2M NaOH**

ละลาย NaOH 8.0 g ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1000 mL

**9. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA**

9.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 200 µg/mL

เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานจากซีรั่มวัว (Bovine Serum Albomine, BSA) ความเข้มข้น 200 µg/mL โดยละลาย ปริมาตร 100 mL

สารละลาย 1000 mL ต้องชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.2 g

ถ้าสารละลาย 100 mL ต้องชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.02 g

ดังนั้น ชั่ง BSA 0.02xx g ลงบนกระดาษอะลูมิเนียม นำ BSA ที่ชั่งได้ละลายด้วย 0.2 M NaOH ลงไปในชวดปรับปริมาตรขนาด 100.00 มิลลิลิตร เติม0.2M NaOH ลงไปละลาย BSA และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100.00 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 200 µg/mL

9.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 200, 100, 10, 55, 25,12.5 และ 6.25 µg/mL จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 200 µg/mL

**10. 4 N Sodium acetate buffer (pH 5.3)**

4 N Sodium acetate buffer (pH 5.3) ทำโดยการละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ด้วยกรดอะซิติก จากนั้นปรับ pH ด้วย 6 N NaOH และ 6 N HCl

Prince of Songkla University Pattani Campus

**11. สารละลายนินไฮดริน (Ninhydrin solution)**

ชั่งนินไฮดริน 2 g และ hydrindantin 0.3 g ละลายด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO) ปริมาตร 75 mL ในภาขนะที่มีฝาปิดขั้นตอนนี้ทำภายใต้แก๊สไนโตรเจน จากนั้นเติมโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 25 mL นำสารละลายผสมที่ได้ไปไล่อากาศด้วยแก๊สไนโตรเจน เป็นเวลาอย่างน้อย 2 นาที ปิดฝาทันที และเก็บที่ 4 °C (สารละลายนินไฮดรินควรเตรียมใหม่ทุกวัน) เก็บในขวดสีชา

**หมายเหตุ**: สาร DMSO เป็นสารที่มีฤทธิ์กัดกร่อนและมีกลิ่นเหม็น ควรเตรียมในตู้ควันและใช้ด้วยความระมัดระวัง

**12. การเตรียมสารละลายกรดซัลฟิวริก กรดอะซิติก และกรดฟอสฟอริก 2% V/V**

ถ่ายกรดจากขวดลงในบีกเกอร์ขนาด 25.00 mL ประมาณ 3.00 mL ใช้ปิเปตขนาด 5.00 mL ปิเปตกรดขึ้นมากลั้วปิเปตก่อน จากนั้นปิเปตกรดมา 2.00 mL ใส่ลงไปในขวดปรับปริมาตรขนาด 100.00 mL ที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ประมาณ 80 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100.00 mL

**13. การเตรียมสารละลายฟีนอล 5 % w/v**

ชั่งฟีนอลที่เป็นของแข็ง จำนวน 5.00 กรัมลงในบีกเกอร์ ใช้น้ำกลั่นประมาณ 30-50 mL ละลายฟีนอลจนของแข็งละลายเป็นสารละลายทั้งหมด ถ่ายสารละลายจากบีกเกอร์ลงไปในขวดวัดปริมาตร 100.00 mL ใช้น้ำกลั่นกลั้วบีกเกอร์อีกครั้งเพื่อชะสารละลายฟีนอลที่เกาะติดตามภาชนะออกมา ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100.00 mL

**14. การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส**

14.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 100.00 mL

สารละลาย 1,000.00 mL ต้องชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.10 g

ถ้าสารละลาย 100.00 mL ต้องชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.01 g

ดังนั้น ชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.01xx g ลงบนกระดาษอะลูมิเนียม นำน้ำตาลกลูโคสที่ชั่งได้ใส่ลงไปในชวดปรับปริมาตรขนาด 100.00 mL เติมน้ำกลั่นลงไปละลายน้ำตาลและปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100.00 mL จะได้สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 100 mg/L

14.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 1.00 g/L

Prince of Songkla University Pattani Campus

ปริมาตร 100.00 mL

ชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.1xxx g ลงบนกระดาษอะลูมิเนียม นำน้ำตาลกลูโคสที่ชั่งได้ใส่ลงไปในชวดปรับปริมาตรขนาด 100.00 mL เติมน้ำกลั่นลงไปละลายน้ำตาลและปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100.00 mL จะได้สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 1.00 g/L

14.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 10, 20, 40, 50 และ 80 mg/L จากสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 100 mg/L

**ตารางที่ ก-2** การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 10, 20, 40, 50 และ 80 mg/L

| หลอดที่ | สารละลายกลูโคส (µL) | น้ำกลั่น (µL) | ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (mg/L) |
|---|---|---|---|
| 1 | 0 | 1000 | 0 |
| 2 | 100 | 900 | 10 |
| 3 | 200 | 800 | 20 |
| 4 | 400 | 600 | 40 |
| 5 | 500 | 500 | 50 |
| 6 | 800 | 200 | 80 |

14.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 g/L จากสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 1 g/L

**15. การเตรียมสารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid**

ชั่งสาร 3,5-Dinitrosalicylic acid 10.00 g ลงในบีกเกอร์ ใช้น้ำกลั่นละลายสาร แล้ว ปรับปริมาตรสารโดยขวดวัดปริมาตรจนครบ 250.00 mL และชั่ง NaOH 16.00 g ละลายในน้ำกลั่น 200.00 mL ค่อยๆเติมสารละลายด่างทีละน้อยลงไปในสารละลายคนจนเข้ากันหมด อุ่นจนได้สารละลายใส เติม Potassium sodium tartrate ลงไปทีละน้อยจนครบ 300.00 g วางไว้จนสารละลายเย็นตัว ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1 .00 L เก็บในขวดสีชา

Prince of Songkla University Pattani Campus

**ตารางที่ ก-3** การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 g/L

| หลอดที่ | สารละลายกลูโคส (mL) | น้ำกลั่น (mL) | ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (g/L) |
|---|---|---|---|
| 1 | 0 | 1 | 0 |
| 2 | 0.2 | 0.8 | 0.2 |
| 3 | 0.4 | 0.6 | 0.4 |
| 4 | 0.6 | 0.4 | 0.6 |
| 5 | 0.8 | 0.2 | 0.8 |
| 6 | 1.0 | 0.0 | 1.0 |

**16. การคำนวณปริมาณสารชีวโมเลกุล**

วิธีการคำนวณหาปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างน้ำยางธรรมชาติก่อนและหลังการปั่นเหวี่ยง

**สมมุติ :** ชั่งตัวอย่างน้ำยาง 5.0345 กรัม แล้วปริมาตรสุดท้ายได้สารละลาย 10 mL ปิเปตสารละลายไป 1 mL ไปทำปฏิกิริยาตามวิธีฟีนอลกรดซัลฟิวริก ซึ่งหลังจากเติมสารทุกตัวครบได้ปริมาตรของสาร 7 mL จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร อ่านค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.32 (สมการเส้นตรง y = 0.0094x+0.0813)

**วิธีการ :**

-หาปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐาน (หาค่า X)

แทนค่า y= 0.32 ลงในสมการเส้นตรง y=0.0094x+0.0813

จะได้ 0.32 = 0.0094X+0.0813

X = (0.32-0.0813)/0.0094

X = 25.3936 mg/L

-หาปริมาณน้ำตาลที่อยู่ในสารละลาย 7 mL

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| สารละลาย 1000 | mL | มีน้ำตาล | 25.3936 | mL |
| ถ้าสารละลาย 7 | mL | มีน้ำตาล | (25.3936x7)/1000 = 0.1778 | mg |

Prince of Songkla University Pattani Campus

-หาปริมาณน้ำตาลที่อยู่ในสารละลาย 10 mL

สารละลาย 1.00 mL มีน้ำตาล 0.1778 mg

ถ้าสารละลาย 10.00 mL มีน้ำตาล (0.1778x10)/1 = 1.7776 mg

-หาปริมาณน้ำตาลที่อยู่ในน้ำยาง 5.0345 g แล้วเทียบกับ 100 g น้ำยาง

น้ำยาง 5.0345 g มีน้ำตาล 1.7776 mg

ถ้า น้ำยาง 100 g มีน้ำตาล (1.7776x100)/5.0345 = 35.3074 mg

--หาปริมาณน้ำตาลที่อยู่ในน้ำยาง 5.0345 g แล้วเทียบกับ % DRC = 60.2345

น้ำยางมีปริมาณเนื้อยาง 60.2345 g มีน้ำตาล 35.3074 mg

น้ำยางมีปริมาณเนื้อยาง 100.00 g มีน้ำตาล (35.3074×60.23450 = 58.6166 mg

หรือคิดเป็น 0.0586 g

**แสดงว่า** ถ้าน้ำยางมีปริมาณเนื้อยาง 100 g จะมีน้ำตาลอยู่ 0.0586 g

**สรุป** มีน้ำตาลในน้ำยาง 0.0586 %g/g DRC

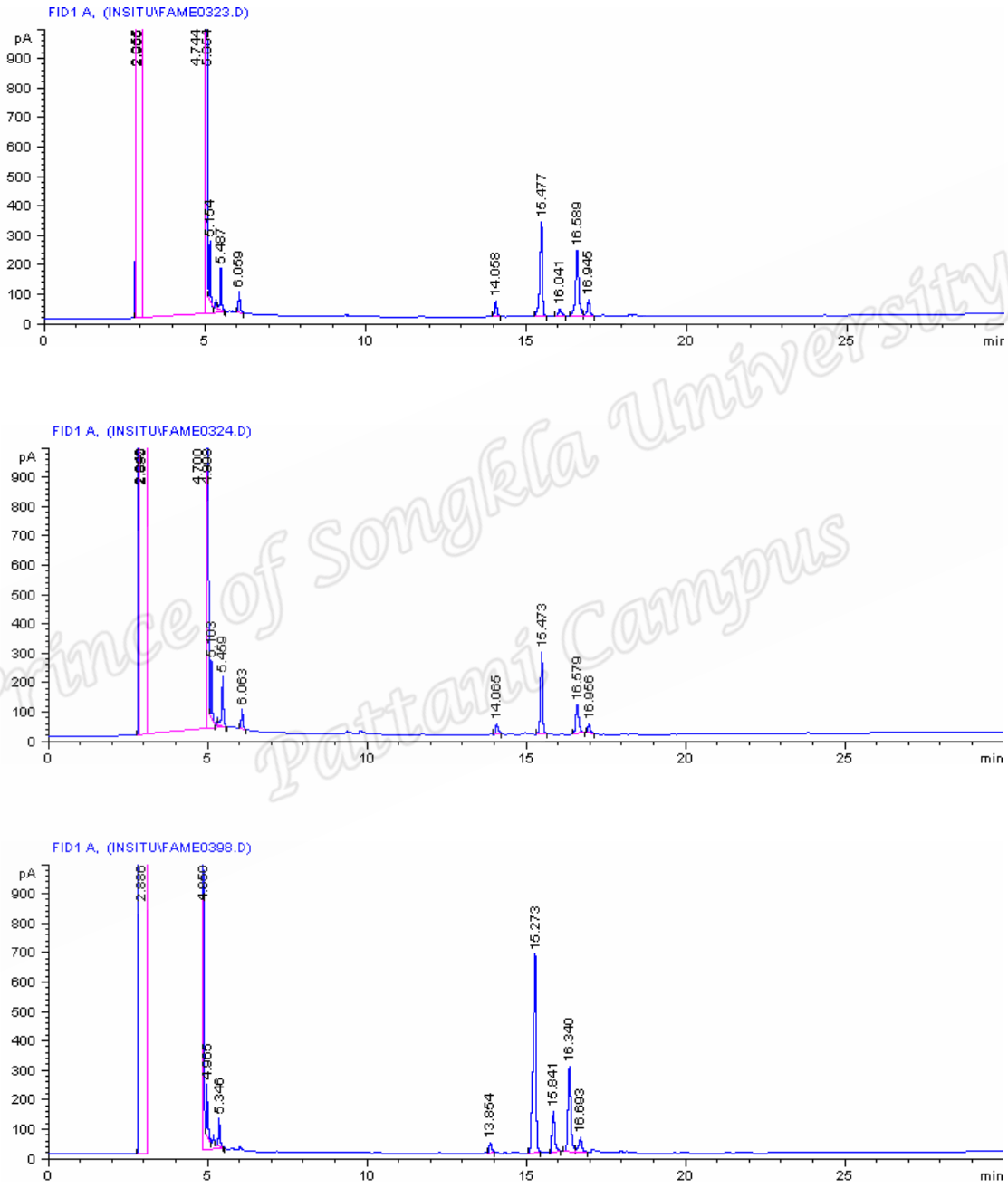
**หมายเหตุ:** การคำนวณปริมาณไลปิดและโปรตีนทำเช่นเดียวกับการคำนวณปริมาณน้ำตาล

Prince of Songkla University Pattani Campus

# ภาคผนวก ข

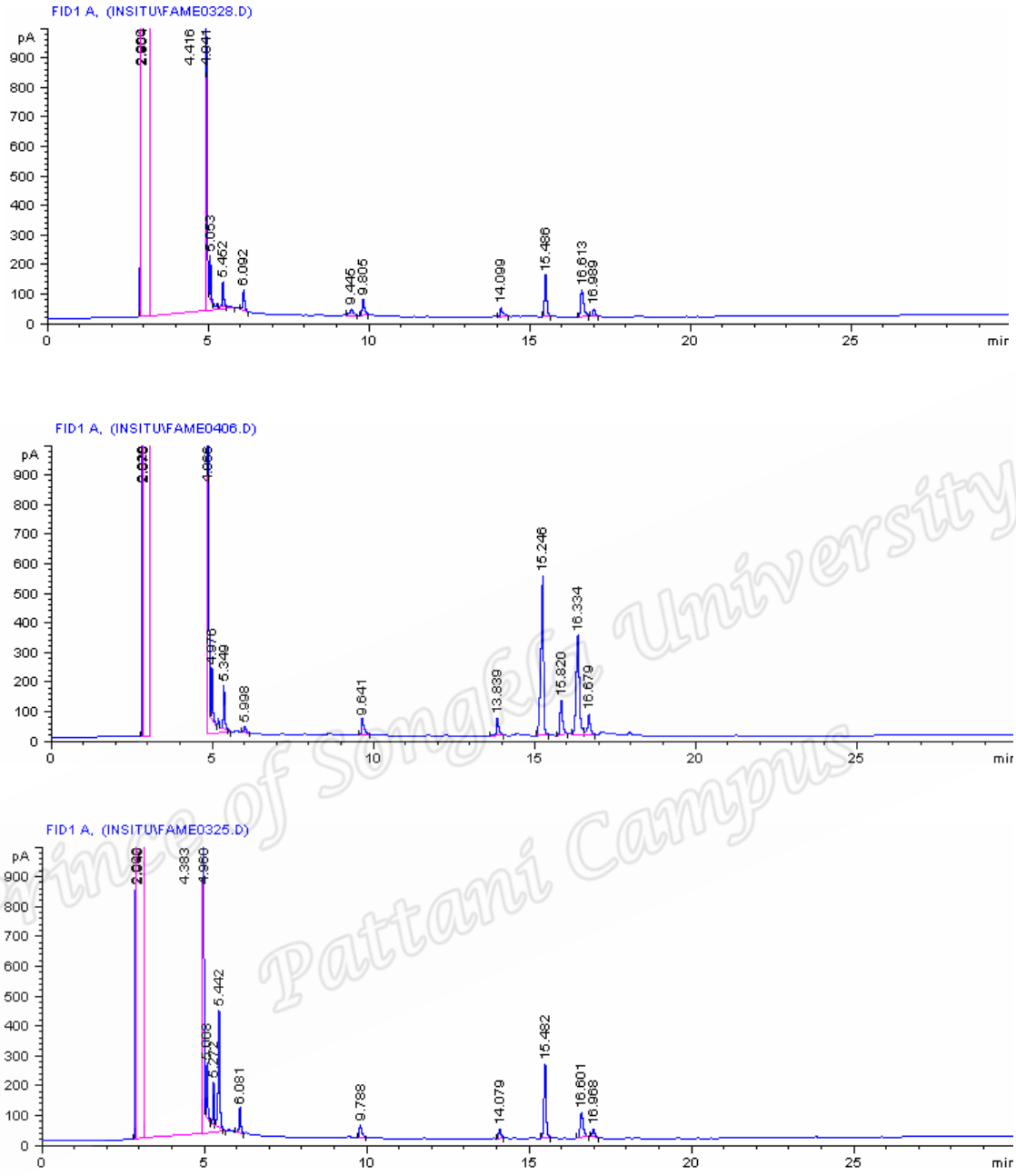
Prince of Songkla University
Pattani Campus

# โครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-FID




**รูปที่ ข-1** โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำยางสดจากจังหวัดสงขลา (บน) พัทลุง (กลาง) และชลบุรี (ล่าง)

Prince of Songkla University Pattani Campus




**รูปที่ ข-2** โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำยางข้นจากจังหวัดสงขลา (บน) พัทลุง (กลาง) และชลบุรี (ล่าง)

Prince of Songkla University Pattani Campus