บทที่ 3

วิธีการศึกษา

3.1 สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือ

3.1.1 สารเคมี

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

ชื่อสารเคมี	เกรด	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Acetic acid	Analytical Reagent	Sigma	China
3,5-Dinitrosalicylic acid	Analytical Reagent	Sigma	China
Glucose standard	Analytical Reagent	Ajax Finechem	Australia
Phenol	Analytical Reagent	Merck	Germany
Sodium hydroxide	Analytical Reagent	Ajax Finechem	Australia
Sodium potassium tartrate	Analytical Reagent	Ajax Finechem	Australia
Sulfuric acid	Analytical Reagent	Sigma	China
Sodium carbonate	Analytical Reagent	Sigma	China
Copper sulfate	Analytical Reagent	Sigma	China
2N Folin reagent	Analytical Reagent	Ajax Finechem	Australia
Bovine serum albumin standard	Analytical Reagent	Ajax Finechem	Australia

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ (ต่อ)

ชื่อสารเคมี	เกรด	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Analytical Reagent	Fluka	Netherlands
Sodium acetate	Analytical Reagent	Fluka	Netherlands
Aspartic acid standard	Analytical Reagent	Fluka	Netherlands
Octanoic acid (C_8)	Analytical Reagent	SUPELCO	USA
Decanoic acid (C_{10})	Analytical Reagent	SUPELCO	USA
Lauric acid (C_{12})	Analytical Reagent	SUPELCO	USA
Tetradecanoic acid (C_{14})	Analytical Reagent	SUPELCO	USA
Palmitic acid (C_{16})	Analytical Reagent	SUPELCO	USA
Heptadecanoic acid (C_{17})	Analytical Reagent	Fluka	Switzerland
Octadecanoic acid (C_{18})	Analytical Reagent	SUPELCO	USA
Eicosanoic acid (C_{20})	Analytical Reagent	SUPELCO	USA
Docosanoic acid (C_{22})	Analytical Reagent	SUPELCO	USA
Lignoceric acid (C_{24})	Analytical Reagent	SUPELCO	USA
Ammonia	Analytical Reagent	J.T. Baker	USA
Sodium sulfate	Analytical Reagent	Fluka	Netherlands
Isopropanol	Analytical Reagent	BDH	England
Hexane	Analytical Reagent	LAB-SCAN	Ireland
2,4-Dimethoxypropane (DMP)	Analytical Reagent	Fluka	Switzerland
Hydrochloric acid	Analytical Reagent	Fluka	Netherlands
Heptane	Analytical Reagent	Ajax Finechem	Australia

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ (ต่อ)

ชื่อสารเคมี	เกรด	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Ovalbumin standard	Analytical Reagent	Fluka	Netherland
Ninhydrin	Analytical Reagent	Alapacific	Australia
N-(tris(hydroxymethyl)-methyl)-2-amino ethanesulfonic	Analytical Reagent	Sigma	China
Ethanol	Analytical Reagent	Fluka	Netherland
Methyl red	Analytical Reagent	Ajax Finechem	Australia
Bromocresol green	Analytical Reagent	Ajax Finechem	Australia
Potassium hydroxide	Analytical Reagent	Fluka	Netherland
Formaldehyde	Analytical Reagent	Fluka	Netherland

3.1.2 อุปกรณ์

1) ไมโครไปเปต

ขนาด 200–1000 µL (Eppendorf, Germany)

ขนาด10-100 µL (Eppendorf, Germany)

2) จานกระเบื้อง

3) ชุดกรองสารลดความดัน

4) เครื่องแก้วสามัญ

3.1.3 เครื่องมือ

1) เครื่องผสม (Vortex Mixer) Fisher Scientic (USA)

2) เครื่องชั่ง (Analytical balance) Sartorious (Germany)

3) เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ Biochrom (USA)

4) เครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจน Foss (Germany)

5) เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductometer) Wissenschaftich-Technisch Werkstatten รุ่น Cond 315i (Singapore) หัววัด WTW Tetra Cond รุ่น 325 (Germany)

Prince of Songkla University Pattani Campus

6) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) EUTECH Insrument รุ่น pHWP-300 (Singapore) หัววัด WTW pH-electrode รุ่น Sen Tix 62 (Germany)

7) เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (Gas chromatography, GC) Hewlett Packard รุ่น HP6890, USA

8) เครื่องวิเคราะห์ความเสถียรเชิงกล Klaxon (Germany)

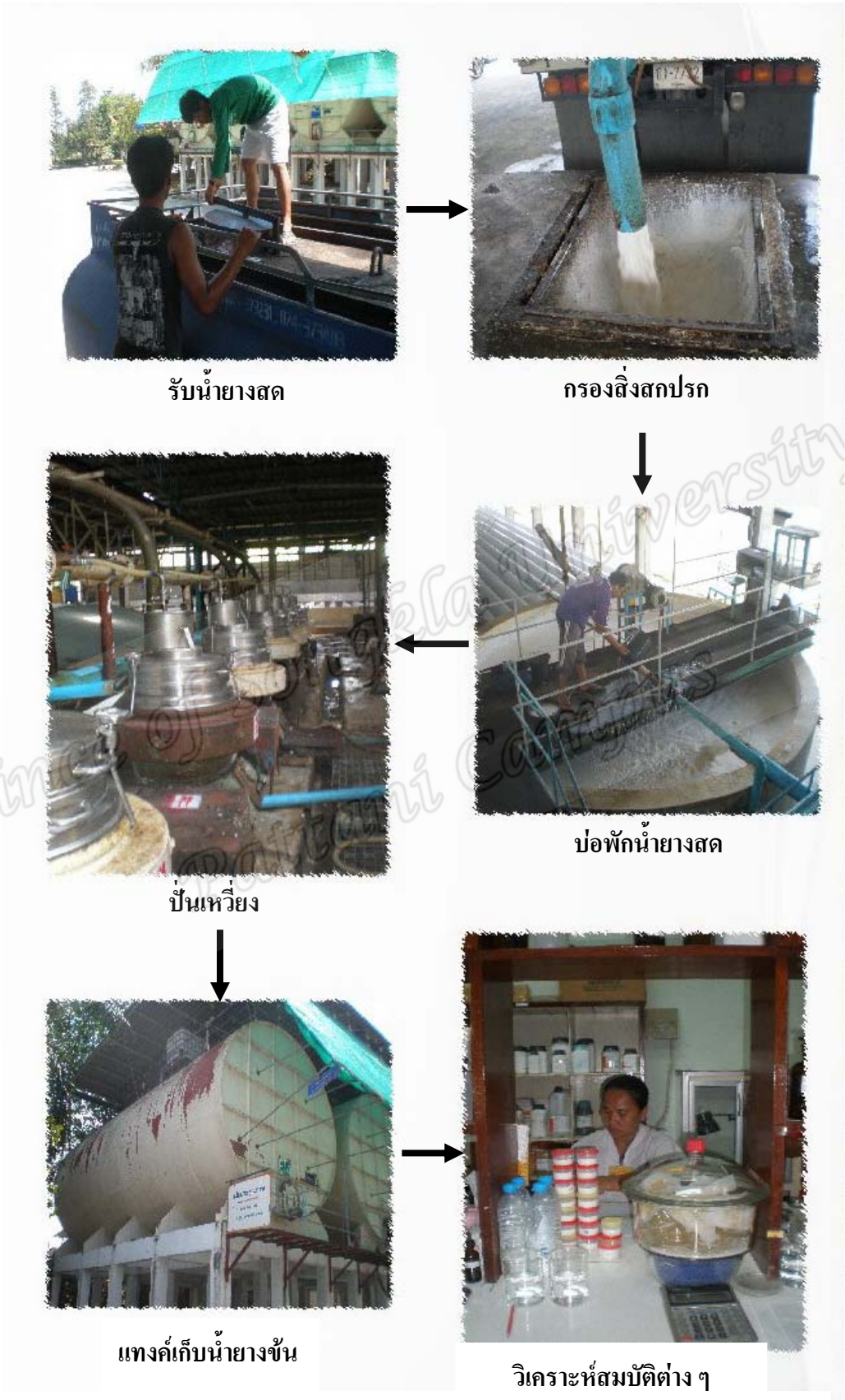
9) ชุดกลั่นกรดไขมันระเหยง่าย Clarkham (Germany)

10) เครื่องวัดความขุ่น (Turbidity meter) Lamotte รุ่น 2020i (USA)

3.2 การเก็บตัวอย่างน้ำยาง

การผลิตน้ำยางข้นจากน้ำยางสดโดยวิธีการปั่นเหวี่ยงมีขั้นตอนการผลิต ดังรูปที่ 3.1 น้ำยางสดจากสวนยางต้องมีการเติมสารเคมีรักษาสภาพน้ำยางป้องกันน้ำยางจับตัว เมื่อน้ำยางสดเข้าโรงงานผลิตน้ำยางข้น จะกรองผ่านตะแกรงกรองขนาด 40-80 เมช ลงสู่ถังรวมและนำตัวอย่างน้ำยางมาทดสอบหาปริมาณเนื้อยางแห้ง หลังจากนั้นผ่านแก๊สแอมโมเนียสู่น้ำยางในปริมาณไม่ต่ำกว่า 0.4% ของน้ำหนักน้ำยาง นอกจากนี้ยังมีการเติมสบู่แอมโมเนียมลอเรตในอัตราส่วนร้อยละ 0.02-0.05 โดยน้ำหนักน้ำยาง เพื่อเร่งความเสถียรของน้ำยาง และเติมเตตระเมทิลไทยูแรมไดซัลไฟด์ (Tetramethyl-thiuram disulfide, TMTD) สังกะสีออกไซด์ (Zine oxide, ZnO) เพื่อรักษาสภาพน้ำยางและป้องกันการย่อยสลายโดยแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำยางเพื่อลดการระเหยกรดไขมัน โดยจะใช้ ZnO และ TMTD ในอัตราส่วนเท่ากัน คือร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนักน้ำยาง ตั้งทิ้งไว้หนึ่งวันเพื่อให้น้ำยางที่ได้ตกตะกอนสิ่งแปลกปลอมออก นำมาทดสอบปริมาณแมกนีเซียม หากน้ำยางมีปริมาณแมกนีเซียมสูงมากกว่า 50 ppm ต้องเติมสารไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Diammonium phosphate, $(NH_4)_2PO_4$) เพื่อตกตะกอนโลหะแมกนีเซียม ตะกอนเหล่านี้จะถูกแยกออกจากน้ำยาง (เมื่อปั่นเป็นน้ำยางข้นแล้วควรมีแมกนีเซียมไม่เกิน 20 ppm) หลังจากนำน้ำยางไปปั่นเหวี่ยงได้น้ำยางข้นชนิด 60% เก็บรักษาสภาพด้วยแอมโมเนีย 0.7% เรียกน้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูง (High ammonia, HA) ถ้าใช้แอมโมเนีย 0.2% ร่วมกับสารช่วยรักษาน้ำยางอื่นเรียกว่าน้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียต่ำ (Low ammonia, LA)

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 3.1 กระบวนการผลิตน้ำยางข้น

การศึกษานี้ได้ทำการเก็บตัวอย่าง 2 ชนิด ได้แก่

1) น้ำยางสด หมายถึง น้ำยางซึ่งโรงงานรับซื้อจากชาวสวนมาเก็บไว้ในบ่อเก็บน้ำยางสดขนาด 12-80 ตัน โดยจะสุ่มเก็บจากบ่อใดบ่อหนึ่งในวันที่ทำการเก็บน้ำยางข้นได้เต็มบ่อ โดยปกติใช้เวลาประมาณ 3-5 วัน จึงจะรวบรวมน้ำยางได้เต็มบ่อ ในขั้นตอนนี้ทางโรงงานส่วนใหญ่จะทำการเติมแอมโมเนียในปริมาณน้อยประมาณ 0.20-0.40% ยกเว้นน้ำยางจากจังหวัดชลบุรีที่เติมในระดับ 0.70%

2) น้ำยางข้น หมายถึง น้ำยางหลังจากการปั่นเหวี่ยงและทางโรงงานได้ทำการเติมสารเคมีเพื่อรักษาสภาพเรียบร้อยแล้ว

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาแบ่งเป็น 2 ชุด ชุดแรกสำหรับการศึกษาการพัฒนาวิธีโดยใช้ตัวอย่างจากจังหวัดสงขลา ชุดที่สองสำหรับการติดตามการเปลี่ยนแปลงสารชีวโมเลกุลที่มีต่อความเสถียรเชิงกลใช้ตัวอย่างน้ำยางสดและข้นชนิดแอมโมเนียสูงจาก 3 จังหวัดคือ สงขลา พัทลุง และชลบุรี ซึ่งแต่ละโรงงานจากทุกจังหวัดมีกระบวนการผลิตที่ใกล้เคียงกัน

3.3 การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารชีวโมเลกุล

หากทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวเคมีในน้ำยางด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรีไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำยางได้โดยตรง เนื่องจากอนุภาคยางจะไปบดบังแสงที่จะถูกดูดกลืนทำให้ค่าที่วิเคราะห์ได้คลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง ดังนั้นต้องเตรียมน้ำยางให้อยู่ในรูปของซีรั่มก่อน โดยได้ทำการศึกษาวิธีการเตรียมซีรั่ม โดยการจับตัวก้อนยางด้วยวิธีทางกายภาพและการใช้สารเคมีชนิดต่าง ๆ ทั้งนี้เพื่อให้ได้ซีรั่มที่ไม่มีสารจับตัวเนื้อยางที่รบกวนวิธีการวิเคราะห์

3.3.1 การศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างซี่รั่มน้ำยาง

เบื้องต้นได้ทำการศึกษาการจับตัวเนื้อยางด้วยวิธีการทางกายภาพ ทั้งนี้เพื่อพยายามศึกษาหาวิธีที่ไม่มีการใช้สารเคมีใด ๆ ที่อาจรบกวนวิธีการวิเคราะห์ ได้แก่

1) การแช่แข็ง (Freezing) ที่อุณหภูมิ -20 ^{o}C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Subroto และคณะ (2002) ซึ่งใช้กับตัวอย่างน้ำยางธรรมชาติ

2) การให้ความร้อน (Heating) ที่อุณหภูมิ 70±5 ^{o}C จนกระทั่งเนื้อยางจับตัวกันเป็นก้อน ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Whitby และ Greenberg (1941) ซึ่งใช้กับตัวอย่างน้ำยางธรรมชาติ

3) การไดอะไลซีส (Dialysis) ดัดแปลงมาจากวิธีของ Saby และคณะ (2003) เป็นวิธีที่ใช้กับตัวอย่างยางมะม่วงซึ่งมีลักษณะคล้ายกับน้ำยางธรรมชาติ โดยการนำน้ำยาง 1.00xx g บรรจุลง

Prince of Songkla University Pattani Campus

ในถุงไดอะไลซิสขนาด 12,000-14,000 Da (CelluSep, USA) ที่ตัดให้มีความยาว 5 cm แช่ในบีกเกอร์ที่บรรจุน้ำกลั่น 800 mL วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยวางบนเครื่องกวนแบบใช้แท่งแม่เหล็กตลอดเวลาวางไว้เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

4) การจับตัวเนื้อยางด้วยสารเคมี (Chemical coagulation) ซึ่งเป็นวิธีการแยกเนื้อยางออกจากซีรั่ม โดยให้ประจุบวกของสารเคมีที่เติมลงไปจับกับประจุลบที่อยู่รอบผิวอนุภาคยาง ทำให้ยางจับตัวกันเป็นก้อนแยกออกจากซีรั่มได้ การศึกษานี้ได้ศึกษาสารเคมี 3 ประเภท ได้แก่ สารละลายกรดอ่อน สารละลายเกลือ และแอลกอฮอล์ ในการจับตัวด้วยแอลกอฮอล์ใช้เมทานอลในการจับตัว โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Whitby และ Greenberg (1941) แต่ซีรั่มที่ได้มีปริมาณน้อยมากเนื่องจากเมทานอลระเหยได้ง่าย แต่การจับตัวเนื้อยางด้วยกรดและเกลือได้ปริมาณซีรั่มที่เพียงพอในการนำไปใช้ในการวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลจึงเลือกใช้วิธีการจับด้วยเนื้อยางด้วยกรดและเกลือ ซึ่งมีรายละเอียดของวิธีการดังนี้

3.3.1.1 การจับตัวด้วยกรด (Acid coagulation)

การศึกษานี้เลือกศึกษากรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 2% โดยปริมาตร (2%CH_3COOH) ดัดแปลงมาจากวิธีของ Galli และคณะ (2004) ซึ่งใช้กับตัวอย่างน้ำยางธรรมชาติ โดยมีวิธีการทดลอง ดังนี้

1) ชั่งน้ำยาง 2.5000 g ใส่ในถ้วยกระเบื้อง

2) ค่อย ๆ หยด 2%CH_3COOH ปริมาตร 5 mL ลงที่ผิวหน้าของน้ำยาง (เขย่าถ้วยกระเบื้องเบา ๆ ด้วยมือขณะที่หยดกรด)

3) น้ำยางจะจับตัวเป็นก้อนและแยกออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนที่เป็นเนื้อยาง และส่วนที่เป็นซีรั่ม ใช้แท่งแก้วกดเนื้อยางเพื่อให้ซีรั่มออกมาให้มากที่สุด

4) กรองซีรั่มด้วยชุดกรองแบบลดความดันผ่านเยื่อกรองไนลอน (Nylon membrane) ขนาด 0.45 μm ใช้น้ำกลั่นกลั้วเยื่อกรองเพื่อให้ซีรั่มไหลลงสู่ขวดวัดปริมาตรทั้งหมด

5) วัดความขุ่นของซีรั่มด้วยเครื่องวัดความขุ่น เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการจับตัวเนื้อยางด้วย 2%CH_3COOH

6) ปรับปริมาตรซีรั่มที่กรองได้ด้วยน้ำกลั่นเป็น 50 mL

3.3.1.2 การจับตัวด้วยเกลือ (Salt coagulation)

การศึกษานี้ใช้แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 2% โดยปริมาตร (2%$CaCl_2$) วิธีการเตรียมเหมือนกับการจับตัว 2%CH_3COOH แต่เปลี่ยนจาก 2%CH_3COOH เป็น 2%$CaCl_2$

หมายเหตุ: เตรียมซีรั่มใหม่ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3.2 การศึกษาความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์

ในการพัฒนาวิธีการทดลองโดยการนำวิธีมาตรฐานที่มีอยู่แล้วหรือวิธีอื่น ๆ ที่เป็นที่นิยมใช้ในตัวอย่างอื่น ๆ มาใช้กับตัวอย่างน้ำยาง จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาว่าวิธีมีความน่าเชื่อถืออยู่ในระดับที่ยอมรับได้หรือไม่ โดยทั่วไปนิยมศึกษาค่าความแม่น (Accuracy) โดยดูจากร้อยละการกู้คืน (%Recovery) และค่าความเที่ยง (Precision) โดยดูจากค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation, % CV) ดังนี้

3.3.2.1 การศึกษาวิธีการวิเคราะห์สารประกอบไลปิด

การวิเคราะห์สารประกอบไลปิด ทำการวิเคราะห์ในสองรูปแบบ ได้แก่ ปริมาณไลปิดทั้งหมด (Total lipids) ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมเท่ากับ 8-24 อะตอม ดังนี้

3.3.2.1.1 การศึกษาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไลปิดทั้งหมด

ปริมาณไลปิดทั้งหมดวิเคราะห์โดยการสกัดด้วยชุดสกัดแบบซอกห์เลต (Soxhlet extraction) โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Ferraz และคณะ (2006) ซึ่งศึกษาปริมาณกรดไขมันในซีรั่มจากเลือดของคน (human serum) ดังนี้

1) ชั่งตัวอย่างน้ำยางประมาณ 1.00xx g ลงในกรวยที่ทำจากเซลลูโลส (Cellulose thimble) และต่อเข้ากับชุด ซอกห์เลต โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายปริมาตร 200 mL

2) สกัดที่อุณหภูมิประมาณ 80 °C เป็นเวลา 2, 4, 6, 8 และ 10 ชั่วโมง

3) วางขวดก้นกลมให้เย็นแล้วนำไประเหยเฮกเซนออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator

4) อบขวดก้นกลมที่อุณหภูมิ 100°C และชั่งน้ำหนักจนมีน้ำหนักคงที่

3.3.2.1.2 การศึกษาวิธีการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน

การศึกษาชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอน 8-24 อะตอม เป็นวิธีการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแบบขั้นตอนเดียว (Single-step transesterification) คือ การรวมเอาการสกัด การไฮโดรไลส์ และการทำให้กรดไขมันกลายเป็นเอสเทอร์เข้ามาอยู่ในขั้นตอนเดียวร่วมกับเทคนิค GC-FID ตามวิธีของวิไลรัตน์ และคณะ (2549) ในการศึกษาความน่าเชื่อถือของวิธีนี้ได้ศึกษาในสารมาตรฐาน และในตัวอย่างน้ำยาง มีขั้นตอน ดังนี้

ก. การศึกษากราฟมาตรฐาน

1) เตรียมสารละลายกรดไขมันมาตรฐานเข้มข้น 10,000 ppm ดังภาคผนวก ก

Prince of Songkla University Pattani Campus

2) ศึกษาหากราฟมาตรฐานของสารละลายเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมาตรฐาน โดยการเจือจางจากสารละลายกรดไขมันมาตรฐานเข้มข้น 10,000 µg/mL ให้ได้ความเข้มข้น 40, 80 และ 120 µg/mL ดังตารางที่ ก-1 (ภาคผนวก ก) ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีฝาปิด

3) เตรียมสารละลายผสม 2 M Methanolic HCl: Heptane: DMP: 0.1 M H_2SO_4 ในอัตราส่วน 1.500: 1.500: 0.330: 0.132 mL ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม เป็นเวลา 1 นาที

4) นำสารละลายผสมในข้อ 3) เติมลงในข้อ 2) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมเป็นเวลา 3 นาที

5) นำไปเป่าไล่อากาศด้วยแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 1 นาที แล้วรีบปิดฝาหลอดทันที

6) นำไปวางให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 75±5°C ในภาชนะที่บรรจุกลีเซอรีนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7) วางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

8) ดูดสารละลายส่วนใสชั้นบน (ชั้นเอสเทอร์ในสารละลายเฮปเทน) ใส่ใน vial ปิดฝาเก็บในตู้เย็นขณะรอการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ

9) นำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ ซึ่งมีสภาวะของเครื่อง ดังนี้

Name: Hewlett Packard HP 6890 series GC system

Column: Shimadzu CBP-5, 5% Methyl siloxane, 320°C Max, Capillary 25.0 m × 220 µm × 0.25 µm ID

Injector: 250°C, He (carrier gas 70.5 mL/min)

Detector: FID (Flame Ionization Detector), H_2 (35 mL/min) and Air (400 mL/min) Temperature 300°C

Oven Temperature Program: Initial 75°C hold 1 min increase 25°C/min to 200°C hold 1 min increase 25 °C/min to 300°C hold 5 min

Injection volume: 4 µL

ข. การศึกษาในตัวอย่างน้ำยาง

วิธีนี้สามารถนำน้ำยางมาใช้โดยไม่จำเป็นต้องเตรียมให้อยู่ในรูปของซีรั่ม แต่ควรเจือจางน้ำยางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก เพื่อป้องกันการหนืดของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่เตรียมได้ วิธีการทำเช่นเดียวกับการศึกษากราฟมาตรฐาน แต่ใช้น้ำยางที่เจือจางแล้ว 0.1xxx g แทนสารละลายมาตรฐาน และในขั้นตอนการให้ความร้อนเพิ่มเวลาเป็น 2 ชั่วโมง ส่วนขั้นตอนอื่น ๆ ทำเหมือนกันทั้งหมด

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3.2.2 การศึกษาวิธีการวิเคราะห์สารประกอบโปรตีน

การวิเคราะห์สารประกอบโปรตีนทำการศึกษาสองกลุ่มด้วยกัน คือ โปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่า 0.45 μm และอีกกลุ่มเป็นกรดอะมิโนที่มีอยู่ ณ เวลานั้น หากน้ำยางถูกเก็บไว้เป็นระยะเวลานาน โปรตีนโมเลกุลใหญ่น่าจะถูกสลายโดยกระบวนการไฮโดรไลซิส หรือโดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ จึงทำให้ปริมาณของโปรตีนที่มีขนาดเล็ก เช่น สายพอลิเปปไทด์ หรือกรดอะมิโนน่าจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น การศึกษานี้ได้ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์โปรตีนทั้งในรูปของโมเลกุลใหญ่และโมเลกุลเล็กสุดของโปรตีนที่ถูกย่อย คือกรดอะมิโน เพื่อตรวจติดตามการสลายตัวของโปรตีนในน้ำยางตั้งแต่เริ่มต้นจนมีค่าความเสถียรเชิงกลคงที่ โดยวิเคราะห์สารประกอบโปรตีน 4 รูปแบบ ได้แก่ การวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมดในรูปเจลดาห์ลไนโตรเจน (Total Kjeldahl Nitrogen, TKN) การวิเคราะห์ในรูปโปรตีนทั้งหมด (Total proteins) ที่มีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 0.45 μm โดยการทำปฏิกิริยาที่พันธะเปปไทด์และการทำปฏิกิริยาด้วยกรดอะมิโน และวิเคราะห์ในรูปกรดอะมิโน (Amino acids) ซึ่งมีวิธีการทดลองดังนี้

3.3.2.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในรูปเจลดาห์ลไนโตรเจน

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธีของเจลดาห์ล เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธี ASTM D 3533-90 (2003) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้อยู่กับตัวอย่างน้ำยางธรรมชาติและสามารถวิเคราะห์ในน้ำยางสังเคราะห์และกาวได้ด้วย มีรายละเอียดดังนี้

1) ชั่งตัวอย่างหนัก 0.1xxx g ใส่ในหลอดย่อยไนโตรเจนเติมเม็ดแก้ว (glass bead) และตัวเร่งปฏิกิริยา ($CuSO_4.5H_2O$: K_2SO_4 อัตราส่วน 7.5: 1.0 โดยมวล) จำนวน 0.2xxx g และเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc.H_2SO_4) 15 mL

2) นำไปย่อยด้วยชุดย่อยไนโตรเจน (Teactor Digestion) ที่อุณหภูมิ 375°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนได้สารละลายสีเขียวหรือสารละลายใสไม่มีสี ถ้าเป็นสีเหลืองอ่อนแสดงว่าการย่อยยังเกิดไม่สมบูรณ์ให้ทำการย่อยต่อ

3) ปิเปตสารละลายกรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยปริมาตร (4% H_3BO_3) 2.5 mL ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL

4) เติมน้ำกลั่นในหลอดย่อยโปรตีน 7.5 mL นำไปกลั่นหาปริมาณไนโตรเจนโดยปลายคอนเดนเซอร์จมอยู่ในสารละลาย 4% H_3BO_3 เพื่อจับแก๊สแอมโมเนียที่เกิดขึ้น

5) นำสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 โดยมวลต่อปริมาตร (40% NaOH) 80 mL หรือมากกว่าเติมลงไปช้า ๆ เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาที่รุนแรง จนกระทั่งเกิดสารละลายสีเขียวไหม้ ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาของแก๊สแอมโมเนียกับกรดบอริก กลั่นจนครบ 4 นาที

Prince of Songkla University Pattani Campus

6) นำสารละลายที่กลั่นได้ไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน 0.01 M H_2SO_4 จนได้สารละลายสีชมพู

7) ทำการวิเคราะห์สารละลายแบลงค์เช่นเดียวกับวิธีข้างต้นแต่ไม่เติมตัวอย่าง แล้วคำนวณหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างจากสูตร

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (\%)} \quad \frac{(V_1 \quad V_2) \quad M \quad 0.014}{W}$$

V_1 = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 เข้มข้น 0.01 M ที่ใช้ไทเทรตสารละลายตัวอย่าง (mL)
V_2 = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 เข้มข้น 0.01 M ที่ใช้ไทเทรตสารละลาย Blank (mL)
M = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 (mol/L)
W = น้ำหนักน้ำยางตัวอย่าง (g)

ปริมาณโปรตีน(%) = ปริมาณไนโตรเจน x 6.25

3.3.2.2.1 การศึกษาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยการทำปฏิกิริยาที่พันธะเปปไทด์

การศึกษาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยการทำปฏิกิริยาที่พันธะเปปไทด์ การศึกษานี้ได้เลือกใช้วิธีทดสอบมาตรฐาน 2 วิธี ได้แก่ วิธี MS 1932: 1998 และวิธี ISO 12243: 2003 เนื่องจากวิธีการวิเคราะห์ของทั้งสองวิธีสามารถวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนได้ในช่วงกว้าง (พร้อมศักดิ์, 2550) รายละเอียดของวิธีการมีดังนี้

1) วิธี MS 1392: 1998

ทำการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติที่มีชื่อว่า Test Method for The Analysis of Extractable Protein in Natural Rubber Products (MS 1392: 1998) มีวิธีการดังนี้

ก. การศึกษากราฟมาตรฐาน

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานโปรตีนอัลบูมินจากซีรั่มสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Bovine Serum Albumin, BSA) ความเข้มข้น 200 µg/mL

2) เจือจางสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 200, 100, 10, 55, 25, 12.5 และ 6.25 µg/mL จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 200 µg/mL

Prince of Songkla University Pattani Campus

3) ไปเปตสารละลายโปรตีนแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 4 mL ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 mL จากนั้นเติมสารรีเอเจนต์ C วิธีแสดงในภาคผนวก ก ปริมาตร 1.5 mL ผสมให้เข้ากันดี วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

4) เติมสารรีเอเจนต์ D ซึ่งเตรียมจากการเจือจาง 2 N Folin reagent (Ajax finechem, Australia) ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 72:28 โดยปริมาตร ปริมาณ 0.1 mL ในแต่ละหลอด ผสมด้วยเครื่องผสมวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

5) เตรียมสารละลายแบลงค์ โดยใช้ 0.2 M NaOH แทนสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

6) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 750 nm

8) นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) กับ ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (แกน x)

ข. การศึกษาในตัวอย่างน้ำยาง

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในน้ำยาง เตรียมตัวอย่างตามวิธีในข้อ 3.3.1.1 และไปเปตซีรั่มที่เตรียมได้ 4 mL ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 mL ทำการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษากราฟมาตรฐาน

2) วิธี ISO 12243: 2003

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยใช้วิธีมาตรฐานในการหาปริมาณโปรตีนในถุงมือยางคือ วิธี Medical gloves made from natural rubber latex–Determination of water– extractable protein using the modified Lowry method (ISO 12243:2003) มีวิธีการดังนี้

ก. การศึกษากราฟมาตรฐาน

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานโปรตีนอัลบูมินจากไข่ขาว (Ovalbumin) ความเข้มข้น 1,000 ppm

2) เจือจางสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 400, 200, 100, 50 และ 25 µg/mL จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1,000 µg/mL (ภาคผนวก ก)

3) ไปเปตสารละลายโปรตีนแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 4 mL ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 mL จำนวน 5 หลอด จากนั้นเติมสารรีเอเจนต์ C ปริมาตร 1.5 mL ผสมให้เข้ากันดีวางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

4) เติมสารรีเอเจนต์ D 1.5 mL ในแต่ละหลอด ผสมด้วยเครื่องผสม วางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

Prince of Songkla University Pattani Campus

5) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 750 นาโนเมตร

6) เตรียมสารละลายแบลงค์ โดยใช้ 0.1 M (*N*-tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-amino-ethanesulfonic acid hemisodium salt) (TES) แทนสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

7) นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) กับความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (แกน x)

ข. การศึกษาในตัวอย่างน้ำยาง

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในน้ำยาง เตรียมตัวอย่างตามวิธีในข้อ 3.3.1.1 วิธีการวิเคราะห์ทำเช่นเดียวกับการศึกษากราฟมาตรฐาน

3.3.2.2.3 การศึกษาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยการทำปฏิกิริยากรดอะมิโน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยการย่อยโปรตีนให้กลายเป็นกรดอะมิโนและทำปฏิกิริยากรดอะมิโนด้วยนินไฮดริน (Ninhydrin) โดยดัดแปลงมาจากวิธีที่วิเคราะห์กับกรดอะมิโนมาตรฐานของ Sun และคณะ (2006) ซึ่งเป็นการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีนินไฮดรินโดยศึกษากับกรดอะมิโนมาตรฐาน ในระบบปิดซึ่งมีวิธีการดังนี้

ก. การศึกษากราฟมาตรฐาน

การศึกษานี้เลือกใช้กรดแอสปาร์ติกเป็นกรดอะมิโนมาตรฐานเนื่องจากมีการรายงานว่าพบกรดอะมิโนนี้ในน้ำยางธรรมชาติและมีการใช้กรดอะมิโนนี้เป็นสารมาตรฐานในหลายรายงาน (Whitby and Greenberg, 1941)

1) ไปเปตสารละลายกรดแอสปาร์ติกความเข้มข้น 10-50 µg/mL ปริมาตร 1.00 mL ใส่หลอดทดลองที่มีฝาปิดขนาด 10.00 mL เติมสารละลายนินไฮดริน 1 mL

2) วางหลอดทดลองในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวางให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง

3) เติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 5 mL ผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่องผสม (Vortex mixer) เป็นเวลา 15 วินาที จะได้สารละลายสีม่วงคราม

4) นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

Prince of Songkla University Pattani Campus

ข. การศึกษาในตัวอย่างน้ำยาง

ทำเช่นเดียวกับการศึกษากราฟมาตรฐาน แต่เปลี่ยนจากสารละลายมาตรฐานเป็นซีรั่มน้ำยางที่ได้จากการจับตัวด้วย 2%CH_3COOH และได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการไฮโดรไลซ์โปรตีนให้กลายเป็นกรดอะมิโน 2 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิและเวลา

ข.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

1) นำซีรั่มที่เตรียมได้โดยการจับตัวด้วย 2%CH_3COOH จากข้อ 3.3.1.1 ปริมาตร 1 mL ปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วยน้ำกลั่น

2) ไปเปตซีรั่มจากข้อ 1) ปริมาตร 1 mL ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 mL ปิดฝาหลอด นำไปวางในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 30, 40, 50, 60 และ 70°C เป็นเวลา 30 นาที

3) ทำเช่นเดียวกับการศึกษากราฟมาตรฐานแต่ใช้ 2%CH_3COOH เป็นสารละลายแบลงค์

ข.2 เวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

1) นำซีรั่มที่เตรียมได้โดยการจับตัวด้วย 2%CH_3COOH จากข้อ 3.3.1.1 ปริมาตร 1 mL ปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วยน้ำกลั่น

2) ไปเปตซีรั่มจากข้อ 1) ปริมาตร 1 mL ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 mL ปิดฝาหลอด นำไปวางในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 65±70°C เป็นเวลา 0, 30, 60, 90, 120 และ 150 นาที

3) ทำเช่นเดียวกับการศึกษากราฟมาตรฐานแต่ใช้ 2%CH_3COOH เป็นสารละลายแบลงค์

3.3.2.2.4 การศึกษาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนที่มีอยู่ ณ เวลาใด ๆ

ก. การศึกษากราฟมาตรฐาน

การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยการทำปฏิกิริยาของกรดอะมิโน แต่ใช้สารละลายกรดแอสปาร์ติกที่ละลายใน 2%$CaCl_2$ และใช้ 2%$CaCl_2$ เป็นสารละลายแบลงค์

ข. การศึกษาในตัวอย่างน้ำยาง

การศึกษาในตัวอย่างน้ำยางใช้วิธีการเช่นเดียวกับการศึกษากราฟมาตรฐานแต่ใช้ซีรั่มที่เตรียมได้จากการจับตัวด้วย 2% $CaCl_2$ แทน

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3.2.3 การวิเคราะห์สารประกอบคาร์โบไฮเดรต

การศึกษาปริมาณคาร์โบไฮเดรตจะวิเคราะห์ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) โดยการย่อยคาร์โบไฮเดรตให้อยู่ในรูปน้ำตาลรีดิวซ์และวิเคราะห์ด้วยวิธีฟีนอล-กรดซัลฟิวริก (Phenol-sulfuric acid method) และวิธีกรด-3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-Dinitrosalicylic acid, DNS method) มีรายละเอียดดังนี้

3.3.2.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดได้ศึกษา 2 วิธี ได้แก่ วิธีฟีนอล-กรดซัลฟิวริกและวิธีกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก หรือที่นิยมเรียกว่า วิธี DNS

1) วิธีฟีนอล-กรดซัลฟิวริก

วิธีฟีนอล-กรดซัลฟิวริกซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Dubois และคณะ (1956) โดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ การศึกษานี้ใช้กลูโคสเป็นตัวแทนในการศึกษา

ก. การศึกษากราฟมาตรฐาน

การศึกษากราฟมาตรฐานด้วยวิธีฟีนอล-กรดซัลฟิวริก ได้ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสใน 2%CH_3COOH มีขั้นตอนดังนี้

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสใน 2%CH_3COOH ความเข้มข้น 100 mg/L จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 10, 20, 40, 50 และ 80 mg/L จากสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 100 mg/L ดังตารางที่ ก-2 (ภาคผนวก ก)

2) ไปเปตสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0-80 mg/L ปริมาตร 1.0 mL ใส่ในหลอดทดลอง เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5.0 mL ตามด้วยสารละลายฟีนอล 1.0 mL วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปวางในอ่างน้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 485 nm

3) นำข้อมูลที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐานโดยเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) กับค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (แกน x)

ข. การศึกษาในตัวอย่างน้ำยาง

การศึกษาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในน้ำยางโดยใช้ซีรั่มที่เตรียมได้โดยการจับตัวด้วย 2%CH_3COOH วิธีการวิเคราะห์ทำเช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐานและใช้ 2%CH_3COOH เป็นสารละลายแบลงค์

Prince of Songkla University Pattani Campus

2) วิธีกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก

วิธีกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิกเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Miller (1959)

ก. การศึกษากราฟมาตรฐาน

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสโดยใช้ 2%CH_3COOH เป็นตัวทำละลายความเข้มข้น 1.0 g/L แล้วเตรียมให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 g/L ดังตารางที่ ก-3 (ภาคผนวก ก)

2) ไปเปตสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 g/L ปริมาตร 1.0 mL ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DNS 1.0 mL ให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือด 5 นาที แช่หลอดในอ่างน้ำเย็น 5 นาที เติมน้ำกลั่น 10 mL วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 520 nm

ข. การศึกษาในตัวอย่างน้ำยาง

การศึกษาในน้ำยางโดยใช้ซีรั่มที่เตรียมได้โดยการจับตัวด้วย 2%CH_3COOH วิธีการวิเคราะห์ทำเช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐานและใช้ 2%CH_3COOH เป็นสารละลายแบลงค์

3.3.2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ก. การศึกษากราฟมาตรฐาน

ทำเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดแต่ใช้ 2%$CaCl_2$ แทน 2%CH_3COOH

ข. การศึกษาในตัวอย่างน้ำยาง

ทำเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดแต่ใช้ 2%$CaCl_2$ แทน 2%CH_3COOH

3.4 การติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลในน้ำยาง

การติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลในน้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูง โดยใช้ตัวอย่างน้ำยางจาก 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสงขลา พัทลุง และชลบุรี เพื่อให้ง่ายต่อการเข้าใจต่อไปจะขอใช้สัญลักษณ์แทนตัวอย่าง ดังนี้

SKFL_040509 หมายถึง น้ำยางสดจาก จ. สงขลา เก็บวันที่ 4 เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2552

SKHA_040509 หมายถึง น้ำยางข้นจาก จ. สงขลา เก็บวันที่ 4 เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2552

PLFL_170909 หมายถึง น้ำยางสดจาก จ. พัทลุง เก็บวันที่ 17 เดือนกันยายน พ.ศ. 2552

Prince of Songkla University Pattani Campus

PLHA_170909 หมายถึง น้ำยางข้นจาก จ. พัทลุง เก็บวันที่ 17 เดือนกันยายน พ.ศ. 2552

CBFL_150709 หมายถึง น้ำยางสดจาก จ. ชลบุรี เก็บวันที่ 15 เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2552

CBHA_150709 หมายถึง น้ำยางข้นจาก จ. ชลบุรี เก็บวันที่ 15 เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2552

การศึกษานี้ได้ทำการติดตามทั้งในตัวอย่างน้ำยางสดและน้ำยางข้นเป็นระยะเวลา 49 วัน โดยวิเคราะห์ทุก ๆ 7 วัน ซึ่งการทำการวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลในแต่ละครั้งได้ทำการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพเบื้องต้นทุกครั้ง

3.4.1 การติดตามการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีและกายภาพเบื้องต้นบางประการ

การติดตามการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีและกายภาพเบื้องต้นบางประการที่ได้ทำการวิเคราะห์ในการศึกษานี้เพื่อแสดงความสัมพันธ์ของข้อมูลที่วิเคราะห์ได้ โดยวิธีการทั้งหมดเป็นวิธีมาตรฐานที่อ้างถึงใน Blackley (1997) ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สมบัติทางเคมีและกายภาพเบื้องต้นที่ทำการศึกษา

การติดตามการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีและกายภาพบางประการ	วิธีการ
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	pH meter
ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity, EC)	Conductivity meter
ค่าความเป็นด่าง (Alkalinity)	ISO 705: 1994
ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid contents, TSC)	ISO 124: 1997
ปริมาณเนื้อยางแห้ง (Dry rubber contents, DRC)	ISO 126: 1972
ค่ากรดไขมันที่ระเหยได้ (Volatile fatty acid number, VFA no.)	ISO 127: 1995
ค่าโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide number, KOH no.)	ISO 506: 1992
ค่าความเสถียรเชิงกล (Mechanical stability time, MST)	ISO 35: 1989

3.4.2 การติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุล

3.4.2.1 การติดตามการเปลี่ยนแปลงของไลปิด

1) การติดตามการเปลี่ยนแปลงของไลปิดทั้งหมด ทำเช่นเดียวกับวิธีวิเคราะห์ในข้อ 3.3.2.1 ข้อ 1)

2) การติดตามการเปลี่ยนแปลงของชนิดและปริมาณของกรดไขมัน ทำเช่นเดียวกับวิธีวิเคราะห์ในข้อ 3.3.2.1 ข้อ 2) ข้อ ข

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.4.2.2 การติดตามการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน

1) การติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนทั้งหมดในรูปเจลดาห์ลไนโตรเจน ทำเช่นเดียวกับวิธีวิเคราะห์ในข้อ 3.3.2.2 ข้อ 1)

2) การติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยการทำปฏิกิริยาที่พันธะ-เปปไทด์ ทำเช่นเดียวกับวิธีวิเคราะห์ในข้อ 3.3.2.2 ข้อ 2) ข้อ ข

3) การติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยการทำปฏิกิริยากรดอะมิโนทำเช่นเดียวกับวิธีวิเคราะห์ในข้อ 3.3.2.2 ข้อ 3) ข้อ ข

4) การติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดอะมิโน ทำเช่นเดียวกับวิธีวิเคราะห์ในข้อ 3.3.2.2 ข้อ 4) ข้อ ข

3.4.2.3 การติดตามการเปลี่ยนแปลงของคาร์โบไฮเดรต

1) การติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ทำเช่นเดียวกับวิธีวิเคราะห์ในข้อ 3.3.2.3 ข้อ 1) ข้อ ข

2) การติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ทำเช่นเดียวกับวิธีวิเคราะห์ในข้อ 3.3.2.3 ข้อ 2) ข้อ ข

Prince of Songkla University Pattani Campus