

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎี

2.1.1 ความเสถียรของน้ำยาง (Latex stability)

ความเสถียรของน้ำยาง คือ การที่น้ำยางสามารถรักษาสภาพการเป็นคอลลอยด์ได้ เนื่องจากโปรตีนที่ผิวอนุภาคยางและประจุลบของหมู่คาร์บอกซิเลต (Carboxylate, RCOO^-) ซึ่งโปรตีนในน้ำยางบางส่วนจะถูกดูดซับอยู่ที่ผิวอนุภาคยาง รวมตัวเป็นชั้นหรือเปลือกห่อหุ้ม (Hydrate protein envelope) อนุภาคยางไว้ ทำให้อนุภาคยางไม่รวมตัวกัน ส่วนประจุลบจะก่อให้เกิดการผลักกันระหว่างอนุภาคยางทำให้น้ำยางคงสภาพเป็นของเหลวอยู่ได้ ดังนั้นเมื่อมีการทำลายชั้นโปรตีนที่ห่อหุ้มอนุภาคยางและ/หรืออนุภาคลบของคาร์บอกซิเลตจะทำให้น้ำยางเกิดการเสถียรภาพ (Blackley, 1997) การติดตามการสูญเสียสภาพของน้ำยางทำได้หลายวิธี เช่น การวัดความหนืดของน้ำยางที่เปลี่ยนแปลงไปตามกาลเวลา การถือเอาเวลาที่น้ำยางจับตัวกันเป็นก้อน และการวัดความเสถียรเชิงกล เป็นต้น ซึ่งการวัดความเสถียรเชิงกลเป็นวิธีหลักที่ใช้ติดตามการสูญเสียสภาพของน้ำยาง เนื่องจากใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่น ๆ โดยความเสถียรเชิงกล (Mechanical Stability Time, MST) หมายถึงระยะเวลา (วินาที) ที่น้ำยางมีความเสถียรต่ออิทธิพลทางกล ค่าความเสถียรเชิงกล เป็นสมบัติที่บ่งบอกถึงความเสถียรของน้ำยางต่อการเคลื่อนย้าย การกวน การบีบ หรือการกระทำทางกลโดยวิธีอื่น ๆ (วารสาร, 2549)

2.1.2 สารชีวโมเลกุลในน้ำยางธรรมชาติ

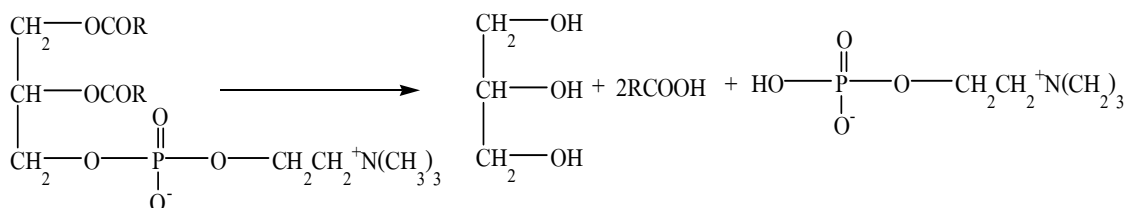
น้ำยางมีส่วนประกอบที่สำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นเนื้อยางประมาณ 35% และส่วนที่ไม่ใช่เนื้อยางประมาณ 65% ดังตารางที่ 1.1

1) ส่วนที่เป็นเนื้อยางซึ่งเป็นอนุภาคที่แขวนลอยอยู่ในน้ำยางเป็นสารประกอบพวกไฮโดรคาร์บอน มีความหนาแน่น 0.92 g/mL เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ มีเส้นผ่านศูนย์กลาง $0.02\text{-}0.03 \mu\text{m}$ ไม่ละลายน้ำ รูปทรงมีทั้งทรงกลมและทรงรีคล้ายลูกแพร์ ในสภาพน้ำยางสดเนื้อยางจะถูกห่อหุ้มด้วยชั้นของสารกลุ่มไขมันและโปรตีน

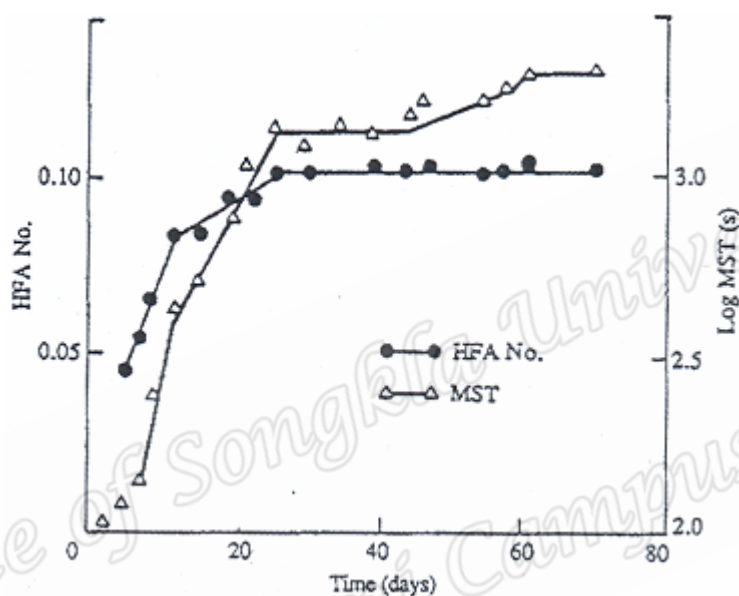
2) ส่วนที่ไม่ใช่เนื้อเยื่ออย่างมีองค์ประกอบแรกเป็นส่วนที่เป็นน้ำหรือซีรัม (Serum) มีความหนาแน่นประมาณ 1.02 g/mL ประกอบด้วยสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และกรดอะมิโน สำหรับองค์ประกอบส่วนที่สองคือ ส่วนของลูทอยด์เป็นอนุภาคกลมมีเยื่อบางห่อหุ้มอยู่ขนาดใหญ่กว่าอนุภาคของยาง มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-5 μm ภายในเยื่อบางประกอบด้วยส่วนที่เรียกว่า บี-ซีรัม (B-serum) ซึ่งมีสารละลายกรด กลีเซอ โปรตีน น้ำตาล และเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสอยู่ ส่วนนี้เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้น้ำยางมีสีคล้ำเมื่อสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศ ของเหลวในลูทอยด์มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 5.5 ลูทอยด์จะบวมพองและแตกออก เมื่อเติมน้ำลงไปให้น้ำยางเป็นผลให้น้ำยางมีความหนืดเพิ่มขึ้น (บุญธรรม, 2530)

2.1.2.1 ไลปิด (Lipids)

ไลปิดในน้ำยางแบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกอยู่ระหว่างผิวของอนุภาคยางและโปรตีน ส่วนใหญ่เป็นสารพวกฟอสโฟไลปิดชนิดแอลฟาเลซิทิน (α -Lecithin) ทำหน้าที่ยึดโปรตีนให้เกาะอยู่บนผิวอนุภาคยาง ส่วนที่สองอยู่ในซีรัม โดยในสภาวะที่น้ำยางเป็นด่าง เช่น มีแอมโมเนียอยู่ประมาณร้อยละ 0.6 ขึ้นไป ฟอสโฟไลปิดจะถูกไฮโดรไลซ์เป็นกรดไขมันที่มีโมเลกุลยาว (Long chain fatty acid) ได้แก่ กรดสเตียริกและกรดโอเลอิก เป็นต้น ดังรูปที่ 2.1 ซึ่งจะรวมตัวกับแอมโมเนียแล้วเกิดเป็นเกลือของกรดไขมัน โดยเกลือของกรดไขมันที่เกิดขึ้นนี้จะถูกดูดซับอยู่รอบผิวของอนุภาคยางส่งผลให้น้ำยางมีความเสถียรเพิ่มขึ้น กรณีที่แอมโมเนียมีปริมาณน้อย (ประมาณร้อยละ 0.2) การไฮโดรไลซิสจะเกิดขึ้นน้อย การเพิ่มความเสถียรของน้ำยางจึงจำเป็นต้องเพิ่มสบู่หรือสารอื่นที่ช่วยในการเก็บรักษาน้ำยางลงไป (บุญธรรม, 2530) จากงานวิจัยของวารภรณ์ (2549) ได้มีการศึกษาผลของการเติมเกลือของกรดไขมันลงในน้ำยางขึ้นเพื่อให้ได้ค่าความเสถียรเชิงกลตามต้องการ พบว่าน้ำยางขึ้นที่เตรียมใหม่ ๆ จะมีค่าความเสถียรเชิงกลต่ำ และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 2-3 สัปดาห์แรกหลังการผลิต เมื่อเก็บไว้นาน ๆ จะมีค่าคงที่ การเพิ่มค่าความเสถียรเชิงกลนี้เป็นผลมาจาก การเพิ่มขึ้นของสบู่ของกรดไขมันโซ่ยาว (High fatty acid soap) ที่เกิดจากการไฮโดรไลซิสของสารไลปิด (ส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม phospholipids และ glycolipids) ในขณะที่เก็บน้ำยางขึ้น ดังรูปที่ 2.2 เห็นได้ว่าเวลาเพิ่มขึ้นจำนวน natural HFA soap จะเพิ่มขึ้นและจะคงที่ภายในเวลาประมาณ 3-8 สัปดาห์ โดย natural HFA soap จะถูกดูดซับที่ผิวอนุภาคยางทำให้ประจุลบบนอนุภาคยางเพิ่มขึ้น ทำให้แรงผลักระหว่างอนุภาคยางเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ความเสถียรของน้ำยางเพิ่มขึ้น



รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสของฟอสโฟไลปิด (Blackley, 1997)



รูปที่ 2.2 ผลของ natural HFA soaps ต่อค่า MST ของน้ำยางชันสายพันธุ์ RRIM 701

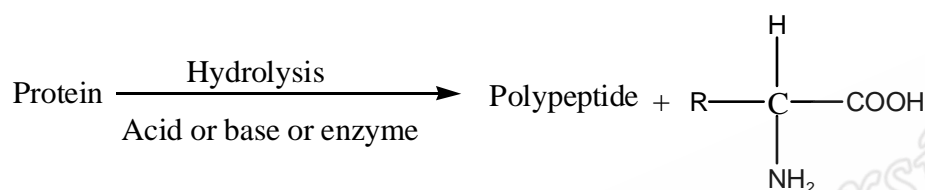
(วารสาร, 2549)

2.1.2.2 โปรตีน (Proteins)

สารโปรตีนที่มีอยู่ในน้ำยางทั้งหมด สามารถแบ่งได้เป็น 3 ส่วน ได้แก่ โปรตีนที่ห่อหุ้มอยู่ผิวรอบนอกอนุภาคยางร้อยละ 25 โปรตีนที่อยู่ในชั้นน้ำร้อยละ 50 และโปรตีนที่ปะปนอยู่ในส่วนของสารลูทอยด์มีอยู่ร้อยละ 25 (สุรศักดิ์, 2532) ที่อยู่บริเวณผิวของอนุภาคยางนี้จะมีส่วนประกอบของกำมะถัน (Cystine disulphide linkage) อยู่ประมาณร้อยละ 5 ดังนั้นขณะที่น้ำยางเสียสภาพจะเกิดการบดเน่า โดยโปรตีนในส่วนนี้จะสลายตัวให้สารประกอบพวกไฮโดรเจนซัลไฟด์ และสารเมอแคปแทน (Mercaptan) จึงทำให้เกิดกลิ่นเหม็นขึ้น ส่วนโปรตีนและกรดอะมิโนที่อยู่ในซีรัมของน้ำยางเป็นโปรตีนประเภทอัลฟาไกลูโบลิน ซึ่งมีความว่องไวตรงผิวของโมเลกุล (Surface active) มีจุดไอโซอิเล็กตริก (Isoelectric point, pI) หลายค่า ซึ่งจุดไอโซอิเล็กตริกคือ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ประจุสุทธิของกรดอะมิโนมีค่าเท่ากับศูนย์ เนื่องจากประจุบวกและประจุลบของกรดอะมิโนมี

ปริมาณเท่ากันพอดี โปรตีนที่มีค่า pI สูงสามารถละลายตัวให้ประจุบวกได้ เป็นเหตุให้น้ำยางเสียสภาพ

การสูญเสียสภาพของน้ำยางอาจเกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่สลายโปรตีน เรียกว่า โกลแอกกูเลส เมื่อสารนี้ทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่ห่อหุ้มผิวของอนุภาคยางจนเกิดการสลายตัวไป ทำให้ผิวของอนุภาคยางเกิดการเสียสภาพอนุภาคยางเกิดการรวมตัวกันเป็นก้อน โปรตีนสามารถเกิดการไฮโดรไลซิสกลายเป็นพอลิเปปไทด์และกรดอะมิโน ดังรูปที่ 2.3



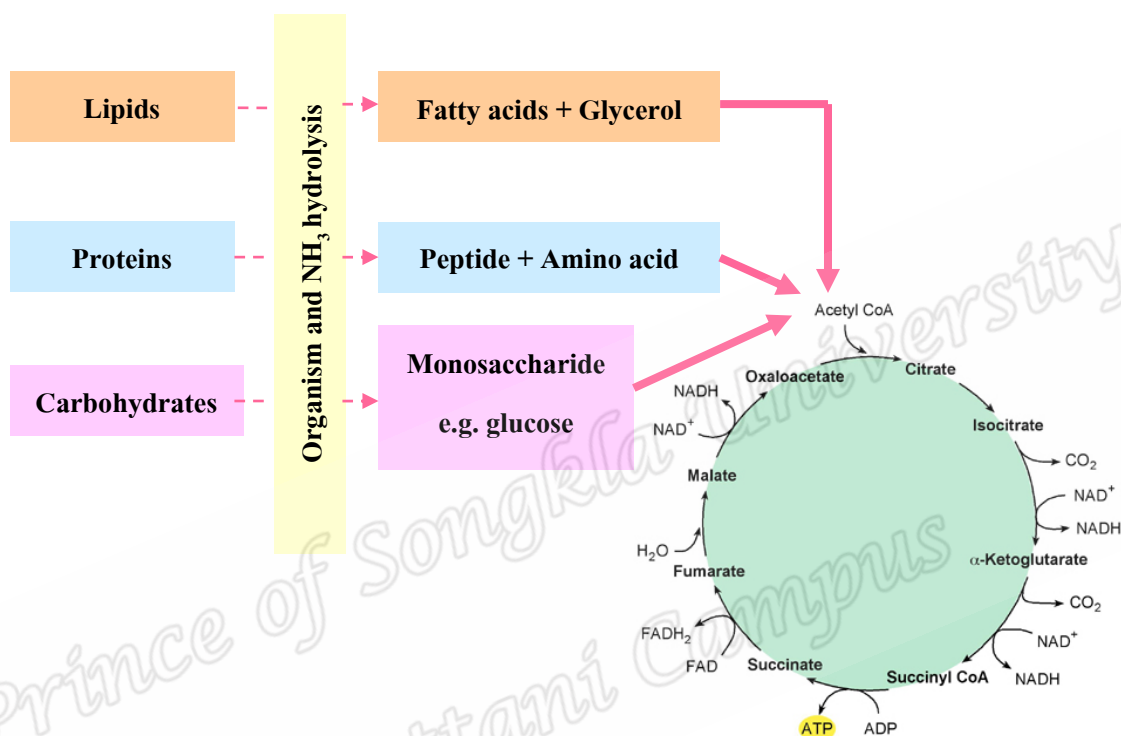
รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของโปรตีน (Blackley, 1997)

2.1.2.2 คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates)

สารคาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่ที่พบในน้ำยางธรรมชาติเป็นพวก 1-เมทิลลิโนซิลิทอล (1-methylinositol) หรือที่เรียกว่า คิวบราซิทอล (Quebrachitol) มีอยู่ประมาณร้อยละ 1 ในน้ำยาง และยังมีคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น ๆ อีกประมาณเล็กน้อย ได้แก่ กลูโคส ซูโครส กาแลคโตส และ ฟรุคโตส เป็นต้น โดยคาร์โบไฮเดรตเหล่านี้มีผลต่อสมบัติของน้ำยางเพียงเล็กน้อย กล่าวคือ หากมีการรักษาสภาพน้ำยางไม่ดีพอ ทำให้คาร์โบไฮเดรตถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดไขมันระเหยง่าย (Volatile fatty acids, VFAs) กรดไขมันที่ระเหยได้ที่เคยมีรายงานพบในน้ำยาง ได้แก่ กรดฟอร์มิก (Formic acid) กรดอะซิติก (Acetic acid) กรดมาลิก (Malic acid) กรดซักซินิก (Succinic acid) และกรดโพรพิโอนิก (Propionic acid) ซึ่งกรดเหล่านี้มีผลทำให้น้ำยางเสียสภาพเกี่ยวกับเรื่องนี้ Galli และคณะ (2002) พบว่าน้ำยางชั้นที่ไม่มีการรักษาสภาพที่ดีพอจะมีปริมาณกรดซักซินิกในอัตราส่วนที่สูงกว่ากรดมาลิก และได้เสนอให้ใช้อัตราส่วนของปริมาณกรดซักซินิกต่อกรดมาลิก (Succinic acid to malic acid ratio) เป็นดัชนีในการบอกสภาพการรักษา น้ำยางชั้น โดยหากอัตราส่วนดังกล่าวสูงกว่า 0.60 แสดงถึงน้ำยางชั้นไม่มีการรักษาสภาพที่ดีพอ

คาดว่าสารชีวโมเลกุลทุกตัวที่มีอยู่ในน้ำยางธรรมชาติ น่าจะมีผลต่อความเสถียรเชิงกล เนื่องจากเมื่อสารเหล่านี้ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยจุลินทรีย์และ/หรือแอมโมเนียที่เติมลงไป ในน้ำยาง สารเหล่านี้ก็จะเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ (Kreb's cycle) หรือวัฏจักรกรดซิตริก (Citric acid cycle) หรือ

วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid, TCA) กลายเป็นกรดไขมันสั้น ๆ วัฏจักรเครบส์ เป็นปฏิกิริยาร่วมกันสุดท้าย ในการสลายสารอาหารต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ กรดไขมัน กรดอะมิโน และ กลูโคส และสารตัวกลางในวัฏจักรเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลอื่น ๆ อีก ดัง รูปที่ 2.4



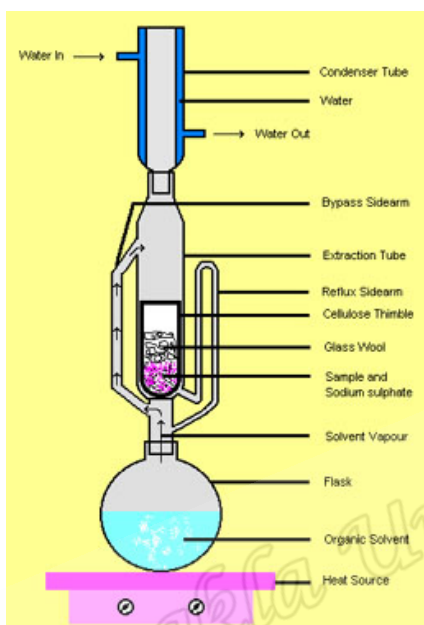
รูปที่ 2.4 วัฏจักรเครบส์ (ดัดแปลงจาก www.chemistry.about.com, 2553)

2.1.3 ปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้อง

2.1.3.1 การสกัดแบบซอกซ์เลต (Soxhlet extraction)

การสกัดแบบซอกซ์เลตเป็นการสกัดแบบต่อเนื่อง โดยอาศัยตัวทำละลาย (Solvent) ช่วยละลายเอาสารที่ต้องการออกมาจากตัวอย่าง การสกัดแบบนี้ต้องใช้เวลาและสิ้นเปลืองตัวทำละลาย โดยทั่วไปนิยมใช้กับตัวอย่างที่เป็นของแข็ง เช่น การสกัดไขมันจากเมล็ดฝ้าย รัชูปี้ช และขึ้นยงธรรมชาติ เป็นต้น ลักษณะของเครื่องมือแสดงดังรูปที่ 2.5 หลักการทำงานของวิธีการสกัดแบบซอกซ์เลตคือ เมื่อให้ความร้อนไของตัวทำละลายออกจากขวดก้นกลม (Round bottom flask) จะลอยขึ้นไปตามแขน (Bypass sidearm) แล้วกลั่นตัวตกลงมาผ่านสารที่ต้องการสกัดซึ่งอยู่ในภาชนะเซลลูโลสที่เรียกว่า ธิมเบิล (Cellulose thimble) พร้อมทั้งสกัดเอาสารที่ต้องการออกจากตัวอย่างจนตัวทำละลายเต็มธิมเบิลแล้วจึงไหลออกมาตามแขนของซูดรีฟลักซ์ (Reflux sidearm) ซึ่งทำหน้าที่ไซ

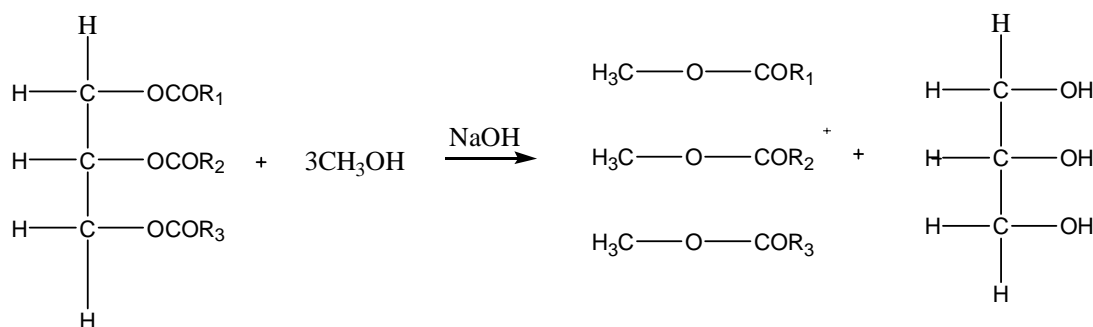
ฟอนเอาตัวทำละลายลงมาสู่ขวดก้นกลมอีกครั้ง การสกัดจะวนเวียนอยู่เช่นนี้เรื่อย ๆ โดยตัวทำละลายที่ระเหยขึ้นไปผ่านแขน (Bypass sidearm) นั้นเป็นตัวทำละลายที่บริสุทธิ์ (วัลลีย์, 2532)



รูปที่ 2.5 เครื่องมือการสกัดแบบซอกซ์เลต (<http://whale.wheelock.edu/bwcontaminants/analysis.html>, 2553)

2.1.3.2 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (Transesterification reaction)

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาเคมีระหว่างไตรกลีเซอไรด์ของไขมันหรือน้ำมันกับแอลกอฮอล์ แล้วก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์เอสเตอร์ของกรดไขมันและกลีเซอรอล โดยทางทฤษฎีมวลสารสัมพันธ์ของปฏิกิริยาเคลื่อนย้ายหมู่เกิดเอสเตอร์สมบูรณ์ต้องประกอบด้วยอัตราส่วนโมลของสารตั้งต้นเท่ากับ 3:1 ระหว่างแอลกอฮอล์กับกลีเซอไรด์ แต่ในทางปฏิบัติพบว่าปฏิกิริยานี้อยู่ในสมดุลและสามารถผันกลับได้ ดังนั้นถ้าต้องการผลิตภัณฑ์เอสเตอร์ของกรดไขมันมากขึ้นต้องเพิ่มจำนวนโมลของแอลกอฮอล์มากขึ้นด้วย เพื่อผลักดันให้สภาวะสมดุลเคลื่อนเข้าใกล้ผลิตภัณฑ์มากที่สุด ปฏิกิริยาเคลื่อนย้ายหมู่ของเอสเตอร์สามารถเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาต่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Ma และ Hanna, 1999) ทั้งนี้เนื่องจากสามารถเป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิและความดันต่ำ ได้ผลผลิตมากผลข้างเคียงและเวลาการผลิตน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรด ดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของกรดไขมัน

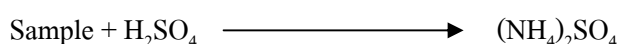
ตารางที่ 2.1 กรดไขมันที่พบในธรรมชาติ (ดาวัลย์, 2548)

สัญลักษณ์	ชื่อตามระบบ	ชื่อสามัญ	สูตรโครงสร้าง
กรดไขมันอิ่มตัว			
C12:0	Dodecanoic acid	Lauric acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
C14:0	Tetradecanoic acid	Myristic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
C16:0	Hexadecanoic acid	Palmitic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
C18:0	Octadecanoic acid	Stearic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
C20:0	Eicosanoic acid	Arachidic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
C22:0	Docosanoic acid	Behenic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$
C24:0	Tetracosanoic acid	Lignoceric acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$
กรดไขมันไม่อิ่มตัว			
C16:1	9-Hexadecenoic acid	Palmitoleic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
C18:1	9-Octadecenoic acid	Oleic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
C18:2	9,12-Octadecadienoic acid	Linoleic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
C18:3	9,12,15-Octadecatrienoic acid	-Linoleic acid	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
C18:3	6,9,12-Octadecatrienoic acid	-Linoleic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$
C20:4	5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid	Arachidonic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
C20:5	5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid	EPA	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_5(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
C24:1	15-Teracosenoic acid	Nervonic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$

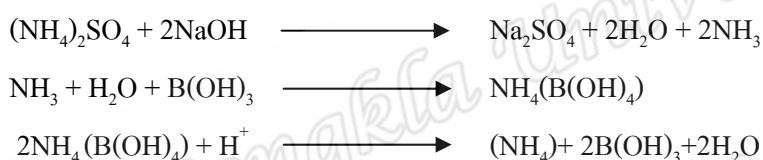
2.1.3.3 ปฏิกริยาการหาไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen kjeldahl reaction)

เนื่องจากโปรตีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนจึงทำได้โดยการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดด้วยวิธีเจลดาล์ (Kjeldahl nitrogen analysis) ซึ่งเป็นวิธีทั่วไปที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในรูปของไนโตรเจน

ขั้นตอนแรกตัวอย่างจะถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริกที่อุณหภูมิสูงโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น ทองแดง โปรท หรือซีลีเนียม และเติมเกลือโซเดียม หรือโพแทสเซียม เพื่อเพิ่มอุณหภูมิของปฏิกิริยา หลังจากการย่อยแล้วไนโตรเจนจะถูกจับอยู่ในรูปของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตดังสมการ

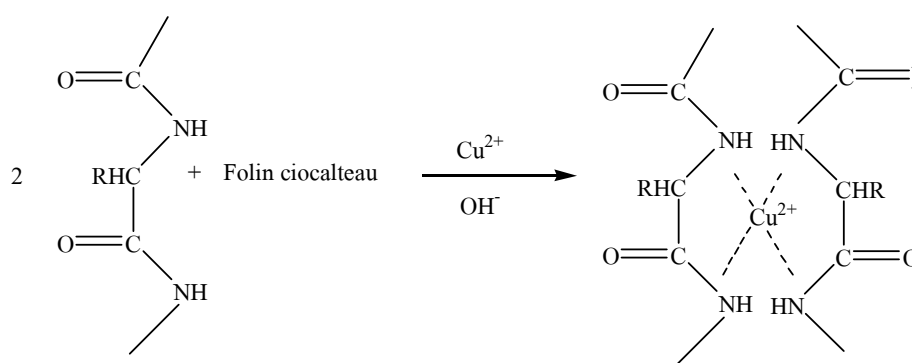


แอมโมเนียมซัลเฟตจะทำปฏิกิริยากับสารละลายด่างที่มากเกินไปเกิดเป็นแก๊สแอมโมเนีย และถูกไล่ออกมาในระหว่างการกลั่น และแก๊สแอมโมเนียจะถูกจับด้วยกรดบอริก จากนั้นนำไปไทเทรตกับกรดที่ทราบความเข้มข้น (Harris, 1948)



2.1.3.4 ปฏิกริยาลาวรี (Lowry reaction)

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีลาวรี (Lowry method) เป็นการพัฒนาวิธีมาจากวิธีไบยูเรต (Biuret) ทำให้ได้ความไว (Sensitivity) มากขึ้น สามารถวัดได้ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่ำๆ ลงไปถึง $5 \mu\text{g/mL}$ โดยมีหลักการกว้าง ๆ คือ ปลายไนโตรเจนที่อยู่ทีพันธะเปปไทด์จะจับตัวกับไอออนของทองแดง (Cu^{2+}) ภายใต้สภาวะที่เป็นด่างทำให้ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน (Lowry, 1951) จากหลักการข้างต้นคาดว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นน่าจะเป็นดังรูปที่ 2.7

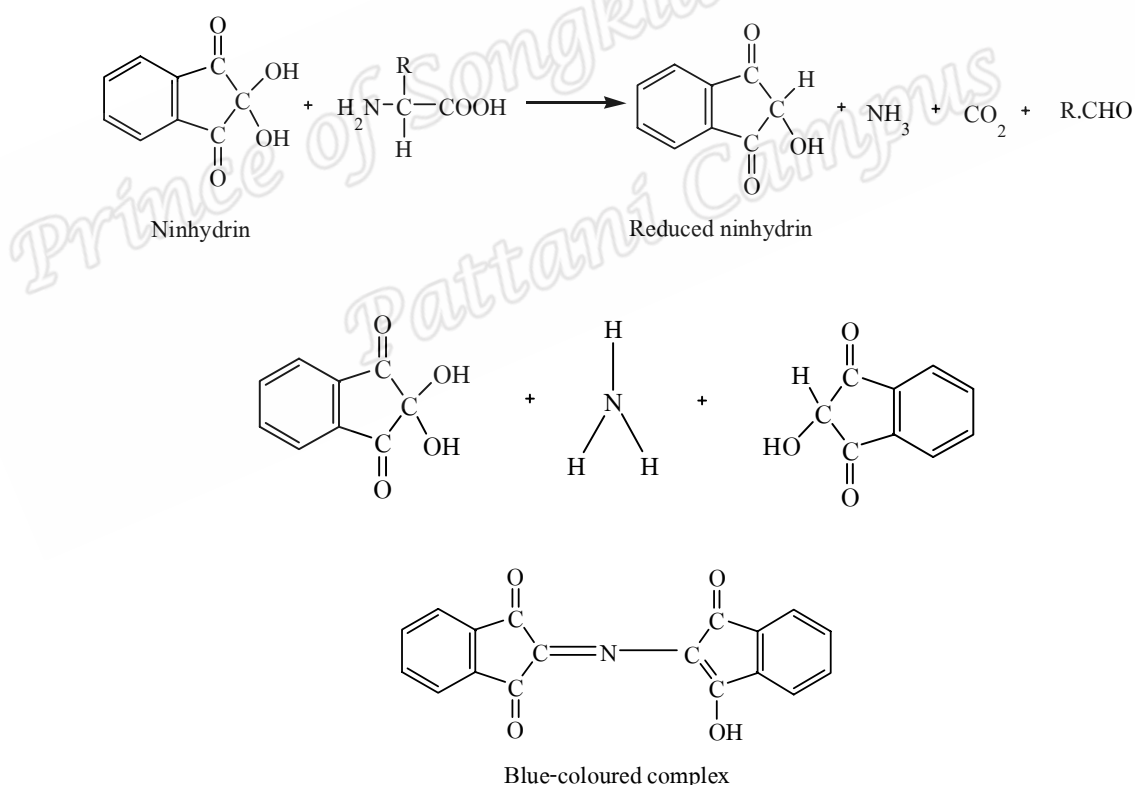


รูปที่ 2.7 ปฏิกริยาลาวรี

วิธีลวามีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) สำหรับค่า pH ของสารละลายที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 10-10.5 สารที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธีนี้ เช่น อนุพันธ์ของกรดอะมิโนบางชนิด ยา ไขมัน น้ำตาล กลีโกล เป็นต้น วิธีนี้มีสารรบกวน (Interfering substances) หลายชนิด เช่น ไอออนของแอมโมเนีย สารพวกฟีนอลิก กลีเซอรอล น้ำตาลต่างๆ เช่น กลูโคสและซูโครส เป็นต้น ควรกำจัดหรือเจือจางก่อนทำการวิเคราะห์ (Lowry, 1951)

1.3.5 ปฏิกิริยานินไฮดริน (Ninhydrin reaction)

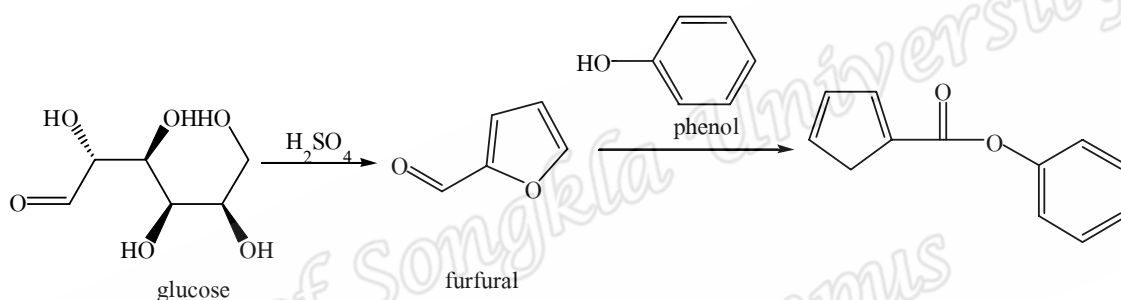
หมู่ฟังก์ชันของกรดอะมิโนและโปรตีนสามารถตรวจสอบได้โดยปฏิกิริยาทางเคมี ได้แก่ การทดสอบนินไฮดริน (Ninhydrin test) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบหมู่แอลฟา-อะมิโน โดยการรีดิวซ์นินไฮดรินแล้วนินไฮดรินที่ถูกรีดิวซ์จะทำปฏิกิริยากับนินไฮดรินอีกหนึ่งโมเลกุล เมื่อให้ความร้อนในสภาวะที่เป็นกรด (pH 3-4) ได้สารประกอบเชิงซ้อนสีม่วงคราม (Blue-purple) ปฏิกิริยาแสดง ดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 ปฏิกิริยานินไฮดริน (Plumer, 1987)

2.1.3.6 ปฏิกิริยาฟีนอล-กรดซัลฟิวริก (Phenol-sulfuric acid reaction)

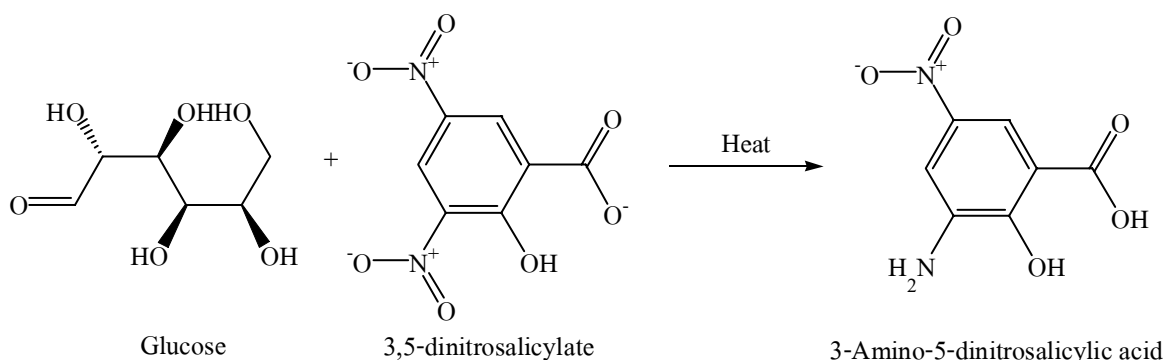
การหาปริมาณน้ำตาลทั้งที่มีอยู่เดิมและที่ได้จากการย่อยสารประกอบคาร์โบไฮเดรต สามารถทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริกแล้วเกิดเป็นสารประกอบเฟอิวราลได้ หลักการของวิธีการนี้ คือ กรดซัลฟิวริกเข้มข้นสลายพันธะไกลโคซิดิกในสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ให้แตกออกเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อไปเป็นสารประกอบเฟอิวราลและอนุพันธ์ต่าง ๆ ของสารประกอบเฟอิวราล (มนตรี, 2530) สารประกอบที่เกิดขึ้นเหล่านี้จะสามารถรวมกันกับ สารฟีนอลเกิดเป็นอนุพันธ์ของเอสเทอร์ (Fryhle, 2003) ได้สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำตาลสามารถ ดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 480-490 นาโนเมตร จากข้อมูลข้างต้นคาดว่าปฏิกิริยาของวิธีการนี้ น่าจะได้ดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 ปฏิกิริยาของวิธีฟีนอล-กรดซัลฟิวริก (ดัดแปลงจาก มนตรี, 2530 และ Fryhle, 2003)

2.1.3.7 ปฏิกิริยาของกรด-3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก

วิธี กรด-3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) เป็นวิธีที่ใช้ในการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ในตัวอย่างสารที่สกัดมาได้ โดยสารละลาย DNS ซึ่งมีหมู่ไนโตร 2 หมู่ มีลักษณะสีเหลือง เมื่อหมู่ไนโตร 1 หมู่ถูกรีดิวซ์โดยหมู่แอลดีไฮด์ของน้ำตาลโดยมีความร้อนและสารละลายต่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะทำให้สารละลาย 3,5-dinitrosalicylate กลายเป็น 3-amino-5-nitrosalicylic acid ที่มีสีส้ม-แดง (มนตรี, 2530) ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 520-540 นาโนเมตร จากข้อมูลข้างต้นคาดว่าปฏิกิริยาของวิธีการนี้ได้สมการดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 ปฏิกริยาของวิธี DNS (Plummer, 1967)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.2.1 การวิเคราะห์ไลปิด

Dupont และคณะ (1976) ได้ทำการแยก Intact lutoids จากน้ำยางพารา (*Hevea brasiliensis*) และทำให้บริสุทธิ์โดย Sucrose density gradient พบไลปิดของเยื่อหุ้มอนุภาคลูทอยด์ (lutoid membranes) ส่วนใหญ่กว่า 80% ประกอบด้วยกรดฟอสฟาติก (Phosphatidic acid) และไม่พบองค์ประกอบของไนโตรเจนฟอสโฟไลปิด (Nitrogen phospholipids) สำหรับกรดไขมันของเยื่อหุ้มลูทอยด์ที่ตรวจพบ ได้แก่ C14, C16, C18:0, C18:1, C18:2 และ C18:3

Pendle และ Gorton (1985) ศึกษาผลของสบู่ของกรดไขมันต่อความเสถียรของน้ำยาง พบสบู่ของกรดไขมันซึ่งสามารถเพิ่มความเสถียรของน้ำยางได้ เนื่องจากที่ผิวของอนุภาคยางมีการดูดซับสบู่ของกรดไขมัน ทำให้ประจุที่ผิวของอนุภาคยางเพิ่มขึ้น ความเสถียรของอนุภาคยางจึงเพิ่มขึ้นด้วย โดยใช้สบู่ที่มีความยาวโซ่คาร์บอนที่เหมาะสม คือจำนวนคาร์บอน 10-12 ตัว

Browse และคณะ (1986) ศึกษาวิธีการวิเคราะห์หากรดไขมันในใบพืชที่มีน้ำมันโดยนำเนื้อเยื่อพืชสดมาเติมเมทานอลิกไฮโดรคลอริกและสกัดด้วยเฮกเซนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง สารที่ได้แยกเป็น 2 ชั้น แล้วดูชั้นบนซึ่งเป็นชั้นของเอสเทอร์ของกรดไขมันฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

Garcés และ Mancha (1992) ศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันและกรดไขมันแล้วเตรียมเป็นเมทิลเอสเทอร์จากเนื้อเยื่อพืชสดแบบขั้นตอนเดียว โดยนำเนื้อเยื่อพืชสด คือ เมล็ดทานตะวัน ใบอ่อนของผักโขม และผลมะกอก มาให้ความร้อนพร้อมกับตัวทำละลายผสม ซึ่งประกอบด้วย เมทานอล: เฮปแทน: เบนซีน: 2,2-ไดเมทอกซีโพรเพน: กรดซัลฟิวริก ที่อัตราส่วน 37: 36: 20: 5: 2 โดยปริมาตร เมทานอล: โทลูอีน: 2,2-ไดเมทอกซีโพรเพน: กรดซัลฟิวริก ที่อัตราส่วน 39: 34: 20: 5: 2 โดยปริมาตร และ เมทานอล: เฮปแทน: เตตระไฮโดรฟูแรน: 2,2-ไดเมทอกซีโพรเพน: กรดซัลฟิวริก ที่อัตราส่วน 31: 42: 20: 5: 2 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สำหรับ

เนื้อเยื่อพืชสดและ 1 ชั่วโมง สำหรับน้ำมัน จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง สารที่ได้แยกเป็น 2 ชั้น คุดูชั้นบนซึ่งเป็นชั้นของเอสเทอร์ของกรดไขมันติดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี พบวิธีนี้สามารถใช้ได้กับเมล็ด ใบและผล ที่มีทั้งน้ำและน้ำมันเป็นองค์ประกอบ

Kawahara และคณะ (2000) ศึกษาลักษณะของกรดไขมันที่เชื่อมต่อกับยางธรรมชาติ และบทบาทของกรดไขมันที่เชื่อมต่อกับอนุภาคยาง พบน้ำยางจากต้นยางพาราประกอบด้วยกรดไขมัน โข่ยยาว 2 กลุ่ม คือ กรดไขมันที่เชื่อมต่อกับปลายโซ่ของโมเลกุลของยางและกรดไขมันอิสระ ในส่วนของน้ำยาง ได้ทำการศึกษาส่วนประกอบและบทบาทของกรดไขมันโดยใช้เทคนิคโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์แก๊สโครมาโทกราฟี และดีฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริเมตรี พบว่าเป็นกรดไขมันกลุ่มเดียวกัน ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว คือ C_{10} - C_{22} และทำการศึกษาผลของกรดไขมันต่อพฤติกรรมการตกผลึกของโมเลกุลของยาง โดยนำกรดไขมัน เช่น เดคาโนอิก (C_{10}) ไมริสโทอิก (C_{14}) และสเตียโรอิก (C_{18}) ทำปฏิกิริยาไฮโดรโบเรชันร่วมกับปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันด้วย แอซิดคลอไรด์กับซิส-1,4-พอลิไอโซพรีนสังเคราะห์ (ไออาร์) ที่ตำแหน่ง 3,4-ไอโซเมอริก พบผลของกรดไขมันที่เชื่อมต่อกับสามารถไปเร่งพฤติกรรมการตกผลึกของโมเลกุลยางแบบจำลองและยางธรรมชาติ โดยยางไออาร์ที่เชื่อมต่อกับกรดไขมันกลุ่มไมริสโทอิก จะเกิดการตกผลึกอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ -25°C โดยมีลักษณะเหมือนกับการผสมกรดพาล์มิติกลงไป

Lie Ken Jie และคณะ (1981) ศึกษาพบว่ากรดไขมันในส่วนของไตรกลีเซอรอลภายในน้ำยางธรรมชาติประกอบด้วยกรดฟอรานอยด์ 97%

Mehe และคณะ (2006) ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันคารานจา (*Pongamia pinata*) ด้วยเมทานอลสำหรับการผลิตไบโอดีเซล ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาประกอบด้วย ความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยา อัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ และอัตราเร็วของการผสม เพื่อให้การผลิตเมทิลเอสเทอร์ของน้ำมันคารานจามีประสิทธิภาพดีที่สุด การตรวจสอบคุณภาพของเมทิลเอสเทอร์ในปฏิกิริยาการผสมโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) และโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ ($^1\text{H NMR}$) การเตรียมเมทิลเอสเทอร์จากคารานจาได้ร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 97-98

Ruiz-Lopez และคณะ (2003) ศึกษาวิธีการสกัดและวิเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอล และกรดไขมันในเนื้อเยื่อพืชในขั้นตอนเดียว โดยนำเนื้อเยื่อพืช คือ เมล็ดทานตะวัน เมล็ดถั่วเหลือง ผลมะกอก และผลโอ๊ก มาสกัดไตรกลีเซอไรด์ (Triacylglycerides, TAG) ก่อนด้วยตัวทำละลายผสม คือ 33.3% โขเดียมคลอไรด์ ในเมทานอล และ 66.6% เฮปแทน โดยปริมาตร แล้วเตรียมเป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid methyl esters, FAMES) โดยให้ความร้อนพร้อมกับตัวทำละลายผสม ซึ่งประกอบด้วย เมทานอล: โทลูอีน: ไคเมทอกซีโพรเพน: กรดซัลฟิวริก ที่อัตราส่วน

39: 34: 20: 5 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง สารที่ได้แยกเป็น 2 ชั้น คูดชั้นบนซึ่งเป็นชั้นของเอสเทอร์ของกรดไขมันฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี และพบว่าการสกัด TAG เกิดไม่สมบูรณ์ในตัวอย่างที่มีปริมาณ โปรตีนสูง แต่สามารถใช้ได้กับตัวอย่างที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ

Qian และคณะ (2008) ได้ทำการทดลองหาเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันในเมล็ดฝ้าย โดยอาศัยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้ค่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา วิธีการนี้เป็นวิธีการแบบสั้น ๆ โดยการไฮโดรไลซิสเมล็ดฝ้ายด้วยเมทานอลในโซเดียมไฮดรอกไซด์และรีฟลักซ์เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอาส่วนที่เป็นของแข็งไปล้างด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์และวางให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำส่วนที่ได้ไปสกัดด้วยเฮกเซนโดยใช้การสกัดแบบซอกซ์เลต (Soxhlet extraction) จะได้ส่วนที่เป็นน้ำมันออกมา

Lilitchan และคณะ (2008) ได้ทำการสกัดไขมันทั้งหมดจากรำข้าวโดยใช้การสกัดแบบซอกซ์เลตซึ่งใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นตัวทำละลาย และทำการสกัดเป็นเวลานาน 16 ชั่วโมง ที่ 2-3 หยดต่อวินาที จากนั้นนำตัวทำละลายที่ได้ไประเหยออก ส่วนที่เหลือนำไปอบที่อุณหภูมิ 100°C วางให้เย็นและชั่งน้ำหนัก พบปริมาณร้อยละไขมันทั้งหมดเท่ากับ 21.30 ± 0.38 โดยน้ำหนักตัวอย่าง

วิลไรตัน และคณะ (2549) พัฒนาการเตรียมเอสเทอร์แบบขั้นตอนเดียว เพื่อใช้วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสบู่หรือกรดไขมันที่มีอยู่เดิมในน้ำยารักษาโรคผิวหนัง ตรวจสอบเอสเทอร์ของกรดเฮกซาโนอิก (C6) กรดออกทานอิก (C8) กรดปาล์มมิติก (C16) และกรดออกตะเตคาโนอิก (18) ในปริมาณ 0.05-0.09, 0.06-0.11, 0.04-0.07 และ 0.08-0.11 กรัมต่อหนึ่งร้อยกรัมตัวอย่างน้ำยารักษาตามลำดับ

2.2.2 การวิเคราะห์โปรตีน

Leowus และคณะ (1986) ศึกษาการแยกเอนไซม์ L-myo-inositol-1-phosphate synthase ที่อยู่ในซีรัมของน้ำยางพารา และสามารถแยกเอนไซม์นี้ออกจากน้ำยางได้โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

Siler และ Cornish (1995) ศึกษาโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ สายพันธุ์ PB 206 โดยวิธีการเจือจางน้ำยางในน้ำที่อัตราส่วน 1:9 โดยปริมาตร แล้วตกตะกอนด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต และใช้โปรตีนไข่ขาวเป็นสารละลายมาตรฐาน จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 652 nm พบปริมาณโปรตีน 2.5-1.5 $\mu\text{g/g}$ น้ำยาง และมีร้อยละของการดูดกลืนในช่วง 93.20-104.80

Subroto และคณะ (2001) ศึกษาชนิดและปริมาณของโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ (*Hevea brasiliensis*) ในส่วนของลูทอยด์ (Lutoid) โดยวิเคราะห์ด้วยวิธีเอนไซม์ พบ microhelical protein, 1,3- β -glucanase, hevamine, hevein precursor, hevein precursor (C-terminal domain) และ hevein ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 55, 35, 25, 19, 14 และ 5 kDa ตามลำดับ

Rogero และคณะ (2003) สกัดโปรตีนจากน้ำยางธรรมชาติในส่วนซีรัมที่ผ่านการฉายรังสี (แกมมา) โคบอลต์-60 และสกัดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 โดยใช้โปรตีนซีรัมจากสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Bovine serum albumin, BSA) เป็นสารละลายมาตรฐาน และวิเคราะห์โดยใช้เครื่องยิววิสิเบิลสเปกโทรมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 562 nm พบปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ 0.11 mg/g น้ำยาง

Prelló และคณะ (2004) ศึกษา myo-inositol ในตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะ โดยเตรียมสารตัวอย่างผ่าน anion-exchange resin แล้วนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้คอลัมน์ Aminex HPX-87C ซึ่งมีหมู่ ammonium เป็นตัวดึง myo-inositol และใช้ milli-Q water เป็นเฟสเคลื่อนที่ พบ myo-inositol มีความเข้มข้นเท่ากับ 138 และ 461 μ g/L ตามลำดับ

Parra และคณะ (2005) วิเคราะห์โปรตีนที่ละลายน้ำในถุงมือที่ทำจากน้ำยางธรรมชาติ โดยการวัดค่าไนซ์น้ำยางธรรมชาติด้วยรังสี (แกมมา) โคบอลต์-60 จากนั้นเติมพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง และใช้โปรตีนโอวัลบูมินความเข้มข้น 0.1% เป็นสารละลายมาตรฐาน วิเคราะห์โดยใช้เครื่องยิววิสิเบิลสเปกโทรมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 280 nm พบมีโปรตีนที่ละลายน้ำได้ 0.409 mg/g และยังพบอีกว่าการฉายรังสีมีผลให้ปริมาณสารสกัดโปรตีนเพิ่มขึ้นแต่การเติมพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้ตามด้วยการปั่นเหวี่ยงให้ปริมาณสารสกัดโปรตีนลดลง

Kolarich และคณะ (2006) ศึกษาชนิดของสารที่ทำให้เกิดโรคภูมิแพ้ที่ผิวหนัง ซึ่งพบอยู่ในน้ำยางพารา คือ Lecithinase homolog (Hev. b4) จากส่วน บี-ซีรัม มีองค์ประกอบที่เป็น glycosylated protein และ carbohydrate moiety ในปริมาณสูง ซึ่งเมื่อทั้งสองส่วนนี้มารวมตัวกันจะก่อให้เกิด Immunoglobulin E (IgE) เมื่อสวมใส่ผลิตภัณฑ์พวกถุงมือที่ทำจากยางพาราจึงทำให้เกิดอาการแพ้

Wititsuwannakul และคณะ (2007) ศึกษาโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายเลกติน (*Hevea latex lectin-like protein, HLL*) ในส่วนของลูทอยด์ในน้ำยางธรรมชาติสายพันธุ์ RRIM 600 โดยปั่นแยกด้วยเครื่องอัลตราเซนทริฟิวจ์ ที่แรงเหวี่ยง $49,000 \times g$ เป็นเวลา 45 นาที นำส่วนกันหลุด (ลูทอยด์) ล้างด้วย Tris-buffer saline (TBS) จากนั้นสกัดด้วย Triton X-100 แล้วปั่นแยกเอาส่วนใสไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลฟิวเทรชัน พบ HLL มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 17 kDa

Saby และคณะ (1999) วิเคราะห์ส่วนของเหลวของยางมะม่วงในตัวอย่างยางมะม่วงอินเดียโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 3000×g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกได้เป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นของเหลวและส่วนที่ไม่เป็นของเหลว นำส่วนที่เป็นของเหลวเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C สกัดด้วย diethyl ether ตรวจวัดด้วย GC-MS พบสารที่ให้กลิ่นซึ่งมีองค์ประกอบของโมโนเทอร์ปีน (Monoterpenes) ocimene และ limonene

Saby และคณะ (2003) วิเคราะห์สารชีวโมเลกุลในตัวอย่างยางมะม่วง (Sap mango) โดยปั่นเหวี่ยงที่ 3000xg จากนั้นนำส่วนใสมาตกตะกอนด้วย 70% แอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และปั่นเหวี่ยงที่ 2000×g จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดและน้ำตาลอิสระด้วยวิธีฟีนอล-กรดซัลฟิวริก (Phenol-sulfuric acid) โดยใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford วิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) ในเอทานอล 80% เป็นสารมาตรฐาน และวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ฟอสฟิโนลออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดส พบปริมาณโปรตีน 2.0-3.5 mg/ml น้ำตาลอิสระ 0.45 mg glucose equivalent/mg กรดฟีนอลิกทั้งหมด 0.049-0.127 mg/ml และการทำงานของเอนไซม์ฟอสฟิโนลออกซิเดส 147-214 U/mg protein และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 401-561 U/mg protein

Sansatsadeekul และ Sakdapipanich (2005) ศึกษาที่มาของสมบัติคอลลอยด์ของอนุภาคยางธรรมชาติพบว่าโปรตีนและฟอสฟอลิปิดได้ห่อหุ้มอนุภาคของน้ำยางไว้แล้วย่อยโปรตีนด้วย 0.04% proteolytic enzyme วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าน้ำยางสดมีโปรตีน 4.30% น้ำยางข้นมีโปรตีน 0.96% และโปรตีนที่สามารถสกัดได้จากอนุภาคยางมีขนาด 14.5 และ 29 kDa

พร้อมศักดิ์ (2550) เปรียบเทียบวิธีการทดสอบมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำจากผลิตภัณฑ์ที่เตรียมจากน้ำยางธรรมชาติ เนื่องจากค่าที่วิเคราะห์ได้แต่ละวิธีทดสอบมาตรฐานมีความแตกต่างกัน และมีข้อได้เปรียบเกี่ยวกับผลการทดสอบที่ได้ว่ามีความถูกต้องแม่นยำเพียงใด โดยเปรียบเทียบวิธีการทดสอบมาตรฐาน 5 วิธี ได้แก่ ASTM D5712-95 ASTM D5712-99 MS 1392-1998 EN 455-3: 2000 และ ISO 12243: 2003 พบว่า วิธีทดสอบมาตรฐาน ISO 12243: 203 และ MS 1392-1998 มีความไวต่อโปรตีนมากที่สุด

2.2.3 การวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรต

Hullar และคณะ (1966) ศึกษาชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ ในน้ำยางที่มีการเติมแอมโมเนียลงไปเพื่อรักษาสภาพของน้ำยาง โดยใช้การแยกแบบโครมาโทกราฟีซึ่งใช้เฟสอยู่กับที่เป็นผงถ่านมะพร้าว แล้วนำสารที่แยกได้ ไปวิเคราะห์หาชนิดของคาร์โบไฮเดรต พบ 1-O-methyl-L-inositol (quebrachitol), L-inositol, myo-inositol, 1-O-β-D-galactopyranosyl-D-myo-inositol (galactosinol), O-β-D-galactopyranosyl-(1→6)-O-β-D-galactopyranosyl-(1→1)-D-glyceritol (digalactosylglyceritol) และ raffinose

Galli และคณะ (2002) ศึกษาปริมาณกรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ ซึ่งเกิดจากกระบวนการย่อยคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในน้ำยาง โดยแบคทีเรีย ในส่วนชีรั่มจากตัวอย่างน้ำยางธรรมชาติ โดยเตรียมตัวอย่างแบบการจับตัวเป็นก้อน (Coagulation) ด้วยกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตร และวิเคราะห์ตัวอย่างที่เตรียมได้ด้วยเทคนิค Capillary electrophoresis พบน้ำยางที่ไม่เติมสารแอมโมเนียเพื่อรักษาสภาพจะมีปริมาณของกรดซัคซินิกสูงแต่มีกรดมาลิกต่ำ และเสนอให้ใช้สัดส่วนของกรดซัคซินิกต่อกรดมาลิก เป็นดัชนีบ่งบอกคุณภาพของน้ำยาง ถ้าค่าสัดส่วนที่ออกมามีค่าน้อยกว่า 0.6 แสดงว่ามีการรักษาสภาพน้ำยางที่ดี

Lefebvre และคณะ (2002) ศึกษาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้แก่ กลูโคส มอลโทส และฟรุคโทส ในระหว่างการหมักแป้งด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้เครื่องตรวจวัดชนิดหักเหแสง พบกลูโคส มอลโทส ฟรุคโทส และซูโครส ปริมาณ 1.2, 2.5 และ 1.2 g/100 g ตัวอย่าง ตามลำดับ

Ni และคณะ (2003) ศึกษากลูโคส ฟรุคโทส และแลคโทส ในตัวอย่างอาหารโดยใช้เทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี ที่ถูกพัฒนาขึ้นมา โดยใช้สาร potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$) เป็นสารออกซิแดนซ์ ร่วมกับ 1.5 M NaOH ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่อุณหภูมิ 80°C แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm พบความเข้มข้นในช่วงที่เป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของกลูโคส ฟรุคโทส และแลคโทส ในช่วงความเข้มข้น 2.96-66.7, 3.21-67.1 และ 4.66-101 mg/L ลำดับ

Guinard และคณะ (2005) ทดลองหาชนิดของคาร์โบไฮเดรตในในตัวอย่างใบพล้อปปรา (*Populus euphratica*) โดยวิธีการสกัดด้วยเอทานอล 80% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 3000×g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่สกัดได้ไประเหยแบบลดความดัน และเจือจางด้วยน้ำ 1 mL กรองผ่านกระดาษกรอง 0.45 μm แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค high-performance anion-exchange chromatography ร่วมกับ electrospray mass spectroscopy พบน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโทส กาแลคโตส