บทที่ 3

วิธีการศึกษา

วิธีการศึกษา แบ่งออกเป็นสองส่วนหลัก ๆ คือส่วนที่หนึ่ง สารเคมี วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ และส่วนที่สองคือ วิธีการดำเนินการทดลอง

1) สารเคมี วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

ก. สารเคมี

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

ชื่อสารเคมี	เกรด	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
กรดอะซิติก (Acetic acid)	Analytical Reagent	Sigma	China
แอมโมเนีย (Ammonia)	Analytical Reagent	J.T. Baker	USA
เบนทอไนต์ (Bentonite)	Commercial grade	T.C.M	China
อัลบูมินของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Bovine serum albumin)	Analytical Reagent	Ajax Finechem	Australia
เบต้า- แคโรทีน (β –carotene)	Analytical Reagent	Sigma	USA
สารลดสี (Color reducing reagent)	Analytical Reagent	Ajax Finechem	Australia
ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)	Analytical Reagent	Fisher scientific	UK
ไดเอทิลอีเทอร์ (Diethylether)	Analytical Reagent	J.T. Baker	USA

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ (ต่อ)

ชื่อสารเคมี	เกรด	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
ไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Disodium hydrogen orthophosphate)	Analytical Reagent	Riedel-de-Haen	Netherland
โฟลิน (Folin reagent)	Analytical Reagent	Merck	Germany
กรดแกลลิก (Gallic acid)	Analytical Reagent	Sigma	China
เฮกเซน (Hexane)	Analytical Reagent	QRec	Malaysia
เมทานอล (Methanol)	Analytical Reagent	South city supplies	Thailand
กรดไนตริก (Nitric acid)	Analytical Reagent	J.T. Baker	USA
โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide)	Analytical Reagent	Ajax Finechem	Australia
โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate)	Analytical Reagent	VWR international	England
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Sodium dihydrogen phosphate)	Analytical Reagent	Riedel-de-Haen	Netherland
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)	Analytical Reagent	J.T. Baker	Malaysia
โทลูอีน (Toluene)	Analytical Reagent	J.T. Baker	USA
ไทโรซิเนส (Tyrosinase)	Analytical Reagent	Sigma	USA

ข. วัสดุอุปกรณ์

1) ไมโครไปเปต ขนาด 200–1000 µL (Eppendorf, Germany)

Prince of Songkla University Pattani Campus

2) จานกระเบื้อง เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.5 เซนติเมตร

3) เยื่อกรองไนลอน ขนาด 0.45 ไมครอน (Vertical, Thailand)

4) เครื่องแก้วสามัญ

5) จานรองสแตนเลส เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร

ค. เครื่องมือ

ตารางที่ 3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

ชื่อเครื่องมือ	**รุ่น**	**บริษัทผู้ผลิต**	**ประเทศ**
1) เครื่องเขย่า (Vortex Mixer)	232	Fisher Scientific	USA
2) เครื่องชั่ง (Analytical balance)	BT 224S	Sartorious	Germany
3) เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์	Libra S22	Biochrom	USA
4) ตู้อบ (Oven)	Isotemp	Fisher Scientific	USA
5) เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductometer)			
- ตัวเครื่อง	Cond 315i	Wissenschaftich- Technisch Werkstatten	Singapore
- หัววัด	325	WTW Tetra Cond	Germany
6) เครื่องวัดพีเอช (pH-meter)			
- ตัวเครื่อง	pHWP-300	EUTECH Insrument	Singapore
- หัววัด	Sen Tix 62	WTW pH-electrode	Germany
7) เครื่องอัลตราเซนตริฟิวจ์ หัวปั่น รัศมี 8 เซนติเมตร	Allegra 64R	BECKMAN	UK

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ (ต่อ)

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
8) เครื่องวัดสี (Colorimeter)	UltraScan XE	HunterLab	USA
9) เครื่องทดสอบความต้านทานต่อแรงดึง (Tensometer)	H 10KS	Hounsfield	UK
10) แผ่นสีมาตรฐานโลวิบอนด์ (Lovibond disc) เบอร์ 0-5 และ 5-14	-	Lovibond	UK

Prince of Songkla University Pattani Campus

รูปที่ 3.1 เครื่องเซนตริฟิวจ์

รูปที่ 3.2 เครื่องวัดสี

รูปที่ 3.3 เครื่องทดสอบความต้านทานต่อแรงดึง

รูปที่ 3.4 แผ่นสีมาตรฐานโลวิบอนด์

Prince of Songkla University Pattani Campus

2) วิธีดำเนินการทดลอง

การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บน้ำยางสด จากจังหวัดในภาคใต้ ของประเทศไทย พันธุ์ RRIM 600 จำนวน 5 ตัวอย่าง ระหว่างเดือนเมษายน-พฤศจิกายน พ.ศ. 2554 ตัวอย่างน้ำยางสดมีการรักษาสภาพด้วยสารละลายแอมโมเนีย ความเข้มข้นร้อยละ 0.7 โดยน้ำหนัก

3.1 สารที่ทำให้เกิดสีในน้ำยางธรรมชาติ

1) เตรียมสารละลายสารที่ทำให้เกิดสีในน้ำยาง ดังนี้

ก. สารละลายพอลิฟีนอล ใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) ความเข้มข้น 5×10^{-3} กรัมต่อลิตร

ข. สารละลายโปรตีน ใช้อัลบูมินของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Bovine serum albumin, BSA)

ความเข้มข้น 5×10^{-3} กรัมต่อลิตร

ค. สารละลายคาโรทีนอยด์ ใช้เบต้า-แคโรทีน (β –Carotene) ความเข้มข้น 5×10^{-3} กรัมต่อลิตร

ง. สารละลายยางธรรมชาติที่ผ่านการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอล (Dichloromethane-methanol extracted natural rubber) เตรียมโดย

- นำน้ำยางสดมาสกัดด้วยสารละลายผสมของไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล อัตราส่วน 2:1 ในกรวยแยก เขย่า 5 นาที ทิ้งไว้ให้แยกชั้น 30 นาที
- เลือกเอาเฉพาะส่วนของเนื้อยาง แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส
- ตัดชิ้นยางที่อบแห้งแล้ว เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วละลายในสารละลายโทลูอีนจนยางละลายหมดที่อุณหภูมิห้อง โดยสารละลายยางมีความเข้มข้น 5×10^{-3} กรัมต่อลิตร

2) นำสารละลายสารที่ทำให้เกิดสีในน้ำยาง ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นในช่วง 380-500 นาโนเมตร

3.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารที่ทำให้เกิดสีในน้ำยางธรรมชาติ

3.2.1 การวิเคราะห์ความเข้มข้นพอลิฟีนอล

ซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Turkmen *et al.* (2006) คือ ใช้สารละลายโซเดียม-คาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก แทนสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 35 โดยน้ำหนัก การวิเคราะห์พอลิฟีนอลนี้ใช้กรดแกลลิกเป็นตัวแทนในการศึกษา

3.2.1.1 การศึกษากราฟมาตรฐานและความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์พอลิฟีนอล

ก. การศึกษากราฟมาตรฐานของวิธีการวิเคราะห์พอลิฟีนอล

1) นำสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร

2) เติมสารละลายโฟลินความเข้มข้นร้อยละ 33 โดยปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด ผสมด้วยเครื่องเขย่าวางที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที

3) เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก

Prince of Songkla University Pattani Campus

ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด ผสมด้วยเครื่องเขย่าวางที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที

4) เตรียมสารละลายแบลงค์ โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

5) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 750 นาโนเมตร

6) เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (แกน x)

ข.การศึกษาขีดต่ำสุดของการตรวจวัดของวิธีการวิเคราะห์พอลิฟีนอล

ขีดต่ำสุดของการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) เป็นการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สนใจวิเคราะห์ที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องมืออย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่กำหนด โดยพิจารณาสัญญาณ และความแปรปรวนของสัญญาณแบลงค์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแบลงค์ จำนวน 21 ครั้ง แล้วคำนวณหาสัญญาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้จากสมการ 3.1

$$y_{LOD} = \bar{X}_B + 3S_B \quad (3.1)$$

เมื่อ

y_{LOD} = สัญญาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้

$\bar{X}_B$ = ค่าเฉลี่ยสัญญาณของแบลงค์

S_B = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณแบลงค์

เมื่อได้สัญญาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้แล้ว นำไปคำนวณหาค่าขีดต่ำสุดของการตรวจวัดได้ (LOD) จากสมการ 3.2

$$y_{LOD} = bx + a \quad (3.2)$$

เมื่อ

x = ค่าขีดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD)

y_{LOD} = สัญญาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้

a = จุดตัดแกน

b = ความชัน

Prince of Songkla University Pattani Campus

ค. การศึกษาความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์พอลิฟีนอล

ในการพัฒนาวิธีการทดลองโดยการนำวิธีมาตรฐานที่มีอยู่แล้วหรือวิธีที่เป็นที่นิยมใช้ในตัวอย่างอื่น ๆ มาใช้กับตัวอย่างน้ำยาง จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาว่า วิธีที่ใช้มีความน่าเชื่อถืออยู่ในระดับที่ยอมรับได้หรือไม่ โดยทั่วไปนิยมศึกษาค่าความแม่น (Accuracy) โดยดูจากร้อยละของการกู้-คืน (% Recovery) และค่าความเที่ยง (Precision) โดยดูจากค่าสัมประสิทธิ์-ความแปรปรวน (Coefficient of variation, % CV)

ค.1 การศึกษาความแม่นของวิธีการวิเคราะห์พอลิฟีนอล

1) ชั่งน้ำยางน้ำหนักประมาณ 0.5X กรัมใส่ในถ้วยกระเบื้อง (ในกรณีตัวอย่างน้ำยางที่หาร้อยละของการกู้คืน จะมีการเติมสารละลายกรดแกลลิกความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร)
2) ค่อย ๆ หยดกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงที่ผิวหน้าของน้ำยาง (เขย่าถ้วยกระเบื้องเบา ๆ ด้วยมือขณะที่หยดกรด)
3) น้ำยางจะจับตัวเป็นก้อนและแยกออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนที่เป็นเนื้อยาง และส่วนที่เป็นซีรั่ม ใช้แท่งแก้วกดเนื้อยางเพื่อให้ซีรั่มออกมาให้มากที่สุด
4) กรองซีรั่มด้วยเยื่อกรองไนลอน ขนาด 0.45 ไมครอน
5) นำซีรั่มที่ผ่านการกรองแล้วมาปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
6) เติมสารละลายโฟลินความเข้มข้นร้อยละ 33 โดยปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด ผสมด้วยเครื่องเขย่าวางที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที
7) เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 2 มิลลิลิตรในแต่ละหลอดผสมด้วยเครื่องเขย่าวางที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที
8) เตรียมสารละลายแบลงค์ โดยใช้น้ำกลั่น
9) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 750 นาโนเมตร

Prince of Songkla University Pattani Campus

10) ทำการคำนวณค่าร้อยละของการกู้คืน พิจารณาจากความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์ (พอลิฟีนอล)ที่คืนกลับมาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์ที่เติมลงไปในตัวอย่างน้ำยาง ดังสมการ 3.3

$$\%\text{Recovery} = \frac{C_1 - C_2}{C_A} \times 100 \qquad (3.3)$$

เมื่อ

C_1 = ความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์ ในตัวอย่างน้ำยางที่เติมสารละลายมาตรฐาน

C_2 = ความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์ ในตัวอย่างน้ำยางที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐาน

C_A = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ใช้เติมในตัวอย่างน้ำยาง

ค.2 การศึกษาค่าความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์พอลิฟีนอล

ค่าความเที่ยงพิจารณาจาก ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation, % CV) คำนวณดังสมการ 3.4

$$\%\text{CV} = \frac{\text{SD}}{\overline{\text{X}}} \times 100 \qquad (3.4)$$

เมื่อ

SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\overline{\text{X}}$ = ค่าเฉลี่ยของข้อมูล

3.2.1.2 การศึกษาปริมาณพอลิฟีนอลในตัวอย่างน้ำยางสด

1) ชั่งน้ำยางน้ำหนักประมาณ 0.5X กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้อง

2) ค่อย ๆ หยดกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงที่ผิวหน้าของน้ำยาง (เขย่าถ้วยกระเบื้องเบา ๆ ด้วยมือขณะที่หยดกรด)

3) น้ำยางจะจับตัวเป็นก้อนและแยกออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนที่เป็นเนื้อยาง และส่วนที่เป็นซีรั่ม ใช้แท่งแก้วกดเนื้อยางเพื่อให้ซีรั่มออกมาให้มากที่สุด

Prince of Songkla University Pattani Campus

4) กรองซีรั่มด้วยเยื่อกรองไนลอน ขนาด 0.45 ไมครอน

5) นำซีรั่มที่ผ่านการกรองแล้วมาปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

6) เติมสารละลายโฟลินความเข้มข้นร้อยละ 33 โดยปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด ผสมด้วยเครื่องเขย่าวางที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที

7) เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอดผสมด้วยเครื่องเขย่าวางที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที

8) เตรียมสารละลายแบลงค์ โดยใช้น้ำกลั่น

9) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 750 นาโนเมตร

10) คำนวณความเข้มข้นของพอลิฟีนอล ดังวิธีการคำนวณที่แสดงใน ภาคผนวก ก.

3.2.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นโปรตีน

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใช้วิธี MS 1392: 1998 มีสารละลายมาตรฐานโปรตีนอัลบูมินของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Bovine Serum Albumin, BSA) เป็นตัวแทนในการศึกษา

3.2.2.1 การศึกษากราฟมาตรฐานและความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์โปรตีน

ก.การศึกษากราฟมาตรฐานของวิธีการวิเคราะห์โปรตีน

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานโปรตีนอัลบูมินของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ความเข้มข้น 200, 100, 50, 25, 12.5และ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (วิธีการเตรียมดังแสดงใน ภาคผนวก ก)

2) ปิเปตสารละลายมาตรฐานโปรตีนแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติม สารรีเอเจนต์ C (สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก: สารรีเอเจนต์ B (คอปเปอร์ซัลเฟต 1.5 กรัม และ โซเดียมซิเตรท 3 กรัม ละลายในน้ำ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) อัตราส่วน 10:0.2) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

Prince of Songkla University Pattani Campus

3) เติมสารรีเอเจนต์ D (เจือจางน้ำยาโฟลินความเข้มข้น 2 นอร์มอล ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 72:28) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด ผสมด้วยเครื่องเขย่าวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

4) เตรียมสารละลายแบลงค์ โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ แทนสารละลายมาตรฐานโปรตีน

5) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 750 นาโนเมตร

6) เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) กับ ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (แกน x)

ข. การศึกษาขีดต่ำสุดของการตรวจวัดของวิธีการวิเคราะห์โปรตีน เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1 ข.

ค. การศึกษาความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์โปรตีน

ค.1 การศึกษาความแม่นของวิธีการวิเคราะห์โปรตีน

1) ชั่งน้ำยางสด น้ำหนักประมาณ 2.XX กรัม ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์

2) เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ในกรณีที่หาร้อยละการคืนกลับ จะมีการเติมสารละลายโปรตีน BSA ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แทนสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์) เซนตริฟิวจ์ ด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3) น้ำยางจะแยกออกเป็น 3 ส่วน โดยส่วนบนสุดเป็นเนื้อยาง ส่วนกลางเป็นซีรั่ม และ ส่วนก้นหลอดเป็นตม ดูดเอาส่วนซีรั่มปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 3.8 มิลลิลิตร

4) เติมสารรีเอเจนต์ C ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

5) เติมสารรีเอเจนต์ D ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด ผสมด้วยเครื่องเขย่าวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

Prince of Songkla University Pattani Campus

6) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 750 นาโนเมตร

7) ทำการคำนวณค่าร้อยละของการกู้คืน พิจารณาจากความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์ (โปรตีน) ที่คืนกลับมาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์ที่เติมลงไปในตัวอย่างน้ำยาง ดังสมการ 3.3

ค.2 การศึกษาค่าความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์โปรตีน

ค่าความเที่ยงพิจารณาจาก ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน เช่นเดียวกับ 3.2.1.1 ค.2 สมการ 3.4

3.2.2.2 การศึกษาหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างน้ำยางสด

1) ชั่งน้ำยางสด น้ำหนักประมาณ 2.XX กรัม ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์

2) เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (เซนตริฟิวจ์ ด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3) น้ำยางจะแยกออกเป็น 3 ส่วน โดยส่วนบนสุดเป็นเนื้อยาง ส่วนกลางเป็นซีรั่ม และ ส่วนก้นหลอดเป็นตม ดูดเอาส่วนซีรั่มปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 3.8 มิลลิลิตร

4) เติมสารรีเอเจนต์ C ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

5) เติมสารรีเอเจนต์ D ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด ผสมด้วยเครื่องเขย่าวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

6) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 750 นาโนเมตร

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.2.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นคาโรทีนอยด์

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์ใช้วิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย และมีสารละลายมาตรฐานเบต้า-แคโรทีนเป็นตัวแทนในการศึกษา

3.2.3.1. การศึกษากราฟมาตรฐานและความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์คาโรทีนอยด์

ก. การศึกษากราฟมาตรฐานของวิธีการวิเคราะห์คาโรทีนอยด์

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานเบต้า-แคโรทีนความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (วิธีการเตรียมดังแสดงใน ภาคผนวก ก) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2) เตรียมสารละลายแบลงค์โดยใช้สารละลายผสมเฮกเซนกับอีเทอร์ อัตราส่วน 95:5 แทนสารละลายมาตรฐานเบต้า-แคโรทีน

3) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 450 นาโนเมตร

4) เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) กับ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเบต้า-แคโรทีน (แกน x)

ข. การศึกษาขีดต่ำสุดของการตรวจวัดของวิธีการวิเคราะห์คาโรทีนอยด์ เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1 ข.

ค. การศึกษาความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์คาโรทีนอยด์

ค.1 การศึกษาความแม่นของวิธีการวิเคราะห์คาโรทีนอยด์

1) ชั่งน้ำยางสด น้ำหนักประมาณ 10.XX กรัม ใส่ในกรวยแยก (ในกรณีที่หาร้อยละการคืนกลับ จะมีการเติมสารละลายมาตรฐานเบต้า-แคโรทีน ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร)

2) เติมสารละลายผสมของไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล อัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่า 5 นาที วางทิ้งไว้ให้แยกชั้น 30 นาที ได้สารที่แยก 3 ส่วน คือ ส่วนบนเป็นสารที่ละลายน้ำ ส่วนกลางคือส่วนเนื้อยาง และส่วนล่างคือ ส่วนที่เป็นสารที่ละลายในสาร

Prince of Songkla University Pattani Campus

ละลายผสมไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล ไขเอาเฉพาะส่วนล่างออกมา ใส่ในหลอดทดลอง

3) ลดปริมาตรตัวทำละลายลงโดยเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน จนเหลือปริมาตรสารละลายประมาณ 5 มิลลิลิตร

4) เติมสารละลายผสมเฮกเซนกับอีเทอร์ อัตราส่วน 95:5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่า 1 นาที วางทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อให้แยกชั้น ดูดเอาเฉพาะส่วนบน

5) เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่า 1 นาที วางทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อให้แยกชั้น ดูดเอาเฉพาะส่วนบน

6) ไล่สารละลายออกหมดด้วยก๊าซไนโตรเจน

7) เติมสารละลายผสมเฮกเซนกับอีเทอร์ อัตราส่วน 95:5 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่า 1 นาที ด้วยเครื่องเขย่า

8) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 450 นาโนเมตร และสารละลายแบลงค์ ใช้สารละลายผสมเฮกเซนกับอีเทอร์ อัตราส่วน 95:5

9) ทำการคำนวณค่าร้อยละของการกู้คืน พิจารณาจากความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์ (คาโรทีนอยด์) ที่คืนกลับมาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์ที่เติมลงไปในตัวอย่างน้ำยาง ดังสมการ 3.3

ค.2 การศึกษาค่าความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์คาโรทีนอยด์

ค่าความเที่ยงพิจารณาจาก ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน เช่นเดียวกับ 3.2.1.1 ค.2 สมการ 3.4

3.2.3.2 การศึกษาหาปริมาณคาโรทีนอยด์ในตัวอย่างน้ำยางสด

1) ชั่งน้ำยางสด น้ำหนักประมาณ 10.XX กรัม ใส่ในกรวยแยก

2) เติมสารละลายผสมของไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล อัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่า 5 นาที วางทิ้งไว้ให้แยกชั้น 30 นาที ได้สารที่แยก 3 ส่วน คือ ส่วนบนเป็นสารที่ละลายน้ำ ส่วนกลาง

Prince of Songkla University Pattani Campus

คือส่วนเนื้อยาง และส่วนล่างคือ ส่วนที่เป็นสารที่ละลายในสาร ละลายผสมไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล ไขเอาเฉพาะส่วนล่าง ออกมา ใส่ในหลอดทดลอง

3) ลดปริมาตรตัวทำละลายลงโดยเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน จนเหลือปริมาตรสารละลายประมาณ 5 มิลลิลิตร

4) เติมสารละลายผสมเฮกเซนกับอีเทอร์ อัตราส่วน 95:5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่า 1 นาที วางทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อให้แยกชั้น ดูดเอาเฉพาะส่วนบน

5) เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่า 1 นาที วางทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อให้แยกชั้น ดูดเอาเฉพาะส่วนบน

6) ไล่สารละลายออกหมดด้วยก๊าซไนโตรเจน

7) เติมสารละลายผสมเฮกเซนกับอีเทอร์ อัตราส่วน 95:5 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่า 1 นาที ด้วยเครื่องเขย่า

8) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 450 นาโนเมตร และสารละลายแบลงค์ ใช้สารละลายผสมเฮกเซนกับอีเทอร์ อัตราส่วน 95:5

3.2.4 การวิเคราะห์แอคติวิตี้เอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส

3.2.4.1 การศึกษาแอคติวิตี้ของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสในน้ำยาง

ก. การสกัดเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสในน้ำยาง (Coseteng and Lee, 1987)

1) นำตัวอย่างน้ำยางจากต้นยาง 5 ต้น ต้นละ 5 กรัม เจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีพีเอชเท่ากับ 7 (วิธีเตรียมดังแสดงในภาคผนวก ก) จำนวน 2 ส่วน ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที ด้วยเครื่องเขย่า

2) เซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ซึ่งจะเห็นได้ว่าสามารถแยกส่วนประกอบของยางได้เป็น 3 ส่วน โดยส่วนบนสุดเป็นส่วนเนื้อยาง ส่วนกลางเป็นส่วนซีรั่ม และส่วนล่างสุดเป็นส่วนตม

Prince of Songkla University Pattani Campus

3) ดูดเอาซีรั่มส่วนกลางด้วยเข็มฉีดยา กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman 42 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ข. การศึกษาแอคติวิตี้ของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสในน้ำยาง (Liu *et al*., 2005)

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

$$\text{Catechol} + O_2 \xrightarrow{\text{Catechol Oxidase}} \textit{O}\text{-Benzoquinone} + H_2O$$

สภาวะการศึกษา : อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
พีเอชเท่ากับ 7.0
ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร
ความกว้างของเซลล์ เท่ากับ 1 เซนติเมตร

1) นำสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มี pH เท่ากับ 7 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมด้วยสารละลายไพโรแคทีคอล ความเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ (วิธีเตรียมดังแสดงในภาคผนวก ก) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร เป็นแบลงค์

2) นำสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มี pH เท่ากับ 7 ปริมาตร 1.9 มิลลิลิตร ผสมด้วยสารละลายไพโรแคทีคอล ความเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสสกัดหยาบจากน้ำยาง (จากข้อ 3.2.4.1 ก.) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร หลังทำปฏิกิริยาทันทีและหลังทำปฏิกิริยาที่เวลา 2 นาที ทำการคำนวณแอคติวิตี้ตามสมการ 3.5

$$\frac{\text{Unit}}{\text{mL enzyme}} = \frac{((\Delta Abs410nm/minTest) - (\Delta Abs410nm/minBlank)(df))}{0.001 \times 0.1} \qquad (3.5)$$

เมื่อ

df = อัตราส่วนการเจือจางเอนไซม์

0.001 = การเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ในเวลาหนึ่งนาที ต่อหนึ่งหน่วยเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส ที่มีปริมาณรวมในการทำปฏิกิริยา 3.0 มิลลิลิตร ที่พีเอชเท่ากับ 7 และอุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส)

0.1 = ปริมาณของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.2.4.2 การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสในน้ำยาง

1) นำสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีพีเอช เท่ากับ 7 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมด้วยสารละลายไพโรแคทีคอล ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร มีรีเอเจนต์แบลงค์คือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2) นำสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีพีเอช เท่ากับ7 ปริมาตร 1.9 มิลลิลิตร ผสมด้วยสารละลายไพโรแคทีคอล ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสสกัดหยาบจากน้ำยาง (จากข้อ 3.2.4.1 ก.) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร หลังทำปฏิกิริยาที่เวลา 1 นาที มีเอนไซม์แบลงค์ คือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.9 มิลลิลิตร ผสมด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสสกัดหยาบจากน้ำยาง (จากข้อ 3.2.4.1 ก.) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

3) หาจำนวนโมลของไพโรแคทีคอล ที่ถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์จากการทำงานของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส

3.2.5 การศึกษาปริมาณเนื้อยางแห้งในตัวอย่างน้ำยางสด

(Dry rubber content, DRC) (มาตรฐาน ASTM D 1076-80)

1) ชั่งน้ำยางลงไปในจานกระเบื้องประมาณ 10.0±0.5 กรัม (W_2) โดยใช้เครื่องชั่งละเอียด 0.0001 กรัม

2) เติมกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร ปริมาตร 80 มิลลิลิตร นำไปวางบนอ่างน้ำร้อนประมาณ 15-30 นาที

3) จับตัวเนื้อยาง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น นำยางที่ได้ไปรีด ให้ได้ความหนาไม่เกิน 2 มิลลิเมตร

4) นำแผ่นยางไปอบที่อุณหภูมิ 70±2 องศาเซลเซียส จนยางแห้งใส ไม่มีสีขาวขุ่น

5) วางให้เย็นในเดซิเคเตอร์ นำไปชั่ง

Prince of Songkla University Pattani Campus

6) อบต่ออีก 30 นาที วางให้เย็นในเดซิเคเตอร์นำไปชั่งน้ำหนัก (W_1) โดยน้ำหนักทั้ง 2 ครั้ง ไม่ควรแตกต่างกันเกิน 5 มิลลิกรัม

7) ทำการทดลองตัวอย่างเดิมซ้ำอีกครั้ง ผลต่างของชุดข้อมูลเดียวกันไม่ควรเกินร้อยละ 0.2

8) คำนวณหาปริมาณเนื้อยางแห้ง ตามสมการ 3.6

$$\%DRC = \frac{W_1}{W_2} \times 100 \qquad (3.6)$$

เมื่อ

W_1 = น้ำหนักที่แน่นอนของเนื้อยางแห้ง (กรัม)

W_2 = น้ำหนักน้ำยางที่ใช้ (กรัม)

3.3 การศึกษาอิทธิพลของแต่ละองค์ประกอบที่ทำให้เกิดสีต่อความเข้มสีในยาง

1) เตรียมสารละลายสารที่ทำให้เกิดสีในน้ำยางตามความเข้มข้นที่พบในน้ำยางดังนี้

ก. สารละลายพอลิฟีนอล ใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) ความเข้มข้น 5×10^{-4} กรัมต่อลิตร

ข. สารละลายโปรตีน ใช้อัลบูมินของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Bovine serum albumin, BSA) ความเข้มข้น 3×10^{-2} กรัมต่อลิตร

ค. สารละลายคาโรทีนอยด์ ใช้เบต้า-แคโรทีน (β –carotene) ความเข้มข้น 7×10^{-7} กรัมต่อลิตร

ง. สารละลายยางธรรมชาติที่ผ่านการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอล (Dichloromethane-methanol extracted natural rubber) เตรียมโดย

- นำน้ำยางสดมาสกัดด้วยสารละลายผสมของไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล อัตราส่วน 2:1
- เลือกเอาเฉพาะส่วนของเนื้อยาง แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส
- ตัดชิ้นยางที่อบแห้งแล้ว เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วละลายในสารละลายโทลูอีนจนยางละลายหมดที่อุณหภูมิห้อง โดยสารละลายเนื้อยางมีความเข้มข้น 9×10^{-1} กรัมต่อลิตร

จ. สารละลายตัวอย่างน้ำยาง (Natural rubber latex in toluene) เตรียมโดย

- นำตัวอย่างน้ำยางสด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

Prince of Songkla University Pattani Campus

- ตัดชิ้นยางที่อบแห้งแล้ว เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วละลายในสารละลายโทลูอีนจนยางละลายหมดที่อุณหภูมิห้อง โดยสารละลายตัวอย่างน้ำยางมีความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร

2) นำสารละลายสารที่ทำให้เกิดสีในน้ำยาง ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นในช่วง 380-500 นาโนเมตร

3.4 การศึกษาปริมาณสีของยาง

3.4.1 การศึกษาปริมาณสีของแผ่นฟิล์มน้ำยางธรรมชาติ

1) เทน้ำยางลงไปประมาณ 9.0±0.5 กรัม ในจานรองสแตนเลส แล้วเอียงให้น้ำยางกระจายทั่วทั้งจานรอง

2) อบที่อุณหภูมิ 70±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จนยางแห้งใส ไม่มีสีขาวขุ่น ความหนาประมาณ 2 มิลลิเมตร วัดความหนาโดยละเอียดโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิเปอร์

3) วางให้เย็นในเดซิเคเตอร์

4) แกะแผ่นฟิล์มออกจากจาน แล้วนำไปวิเคราะห์การดูดกลืนแสงสีเหลืองจากค่าดัชนีสีเหลือง (Yellowness index, YI E313) ด้วยเครื่องวัดสี (Colorimeter) ยี่ห้อ HunterLab รุ่น UltraScan XE (ภาคผนวก ก)

3.4.2 การศึกษาปริมาณสีของผลิตภัณฑ์จากน้ำยาง

เปรียบเทียบสีผลิตภัณฑ์หัวนมยางสำหรับขวดนมของยางพอลิไอโซพรีนสังเคราะห์และยางธรรมชาติ โดยผลิตภัณฑ์หัวนมยางพอลิไอโซพรีนสังเคราะห์ คือ ยี่ห้อ Pigeon และยางธรรมชาติ คือ ยี่ห้อ Nuebabe, Attoon และ Juju วิเคราะห์การดูดกลืนแสงสีเหลืองด้วยเครื่องวัดสี ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

3.5 การพัฒนาวิธีการลดสารที่ทำให้เกิดสีคล้ำในน้ำยางธรรมชาติ

3.5.1 วิธีการดูดซับโดยใช้สารเบนทอไนต์ที่ปรับสภาพผิวด้วยกรดไนตริกในรูปแบบสารแขวนลอยเป็นสารดูดซับ

1) ชั่งเบนทอไนต์ที่ปรับสภาพผิวด้วยกรดไนตริก (วิธีการปรับสภาพผิวแสดงในภาคผนวก ก) น้ำหนัก 0, 0.2X, 0.4X และ 0.6X กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร

Prince of Songkla University Pattani Campus

2) เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กเป็นเวลา 10 นาทีให้ได้สารแขวนลอยเบนทอไนต์

3) ชั่งน้ำยางสด น้ำหนักประมาณ 20.XX กรัม ใส่ลงไปในขวดรูปกรวยซึ่งบรรจุสารแขวนลอยเบนทอไนต์ แล้วผสมด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก ความเร็ว 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

4) นำน้ำยางไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

5) นำน้ำยางส่วนบนหลังผ่านการเซนตริฟิวจ์ไปวิเคราะห์สมบัติของน้ำยาง ได้แก่ ปริมาณพอลิฟีนอล โปรตีน แมกนีเซียม พีเอช ค่าการนำไฟฟ้า น้ำหนักที่สูญเสีย (Weight loss) และการดูดกลืนแสงสีเหลือง

3.5.1.1 ปริมาณพอลิฟีนอลในน้ำยางหลังดูดซับด้วยเบนทอไนต์ที่ปรับสภาพผิวด้วยกรด ไนตริกในรูปแบบสารแขวนลอย

ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.2

3.5.1.2 ปริมาณโปรตีนในน้ำยางหลังดูดซับด้วยเบนทอไนต์ที่ปรับสภาพผิวด้วยกรดไนตริกในรูปแบบสารแขวนลอย

ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.2

3.5.1.3 ปริมาณแมกนีเซียมในน้ำยางหลังดูดซับด้วยเบนทอไนต์ที่ปรับสภาพผิวด้วยกรดไนตริกในรูปแบบสารแขวนลอย

1) ชั่งน้ำยางสดประมาณ 1.XX±0.1 กรัม

2) เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3) นำสารละลายที่ได้มาปรับพีเอช ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ผสมแอมโมเนียมคลอไรด์และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ที่มีพีเอชมากกว่า 10

4) เติมสารละลายโพแทสเซียมไซยาไนด์ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร

5) นำมาเติมสารอิริโอโครม แบลค ทีในโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก ปริมาณ 0.1 กรัม เป็นอินดิเคเตอร์

6) นำมาไทเทรตด้วยสารละลายเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิด (Ethylene Diamine Tetraacetic acid, EDTA) ความเข้มข้น 0.005 โมลาร์ จนสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงแดงเป็นสีน้ำเงิน

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.5.1.4 ค่าพีเอชของน้ำยางหลังดูดซับด้วยเบนทอไนต์ที่ปรับสภาพผิวด้วยกรดไนตริกในรูปแบบสารแขวนลอย

ทำการวัดค่าพีเอชของน้ำยางโดยใช้เครื่องวัดพีเอช จุ่มเป็นเวลา 5 นาที

3.5.1.5 ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำยางหลังดูดซับด้วยเบนทอไนต์ที่ปรับสภาพผิวด้วยกรดไนตริกในรูปแบบสารแขวนลอย

ทำการวัดค่าการนำไฟฟ้าของน้ำยางโดยใช้เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า

3.5.1.6 น้ำหนักที่สูญเสียของน้ำยางหลังดูดซับด้วยเบนทอไนต์ที่ปรับสภาพผิวด้วยกรดไนตริกในรูปแบบสารแขวนลอย

1) ชั่งน้ำหนักถ้วยครูซิเบิ้ล โดยใช้เครื่องชั่งละเอียด 0.0001 กรัม
2) เทน้ำยางลงไป 1.XX กรัม (W_A)
3) อบที่อุณหภูมิ 70±5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จนยางใส ไม่มีสีขาวขุ่น
4) วางให้เย็นในเดซิเคเตอร์ นำไปชั่ง
5) นำไปเผาในเตาเผา (Furnace) ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
6) วางให้เย็นในเดซิเคเตอร์ นำไปชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน (W_B)
7) คำนวณหาค่าน้ำหนักที่สูญเสีย (Weight loss) จากสมการ 3.7

$$\% \text{ Weight loss} = \frac{W_A - W_B}{W_A} \times 100 \qquad (3.7)$$

เมื่อ

W_A = น้ำหนักน้ำยางที่เริ่มต้น (กรัม)

W_B = น้ำหนักที่แน่นอนของตัวอย่างหลังเผาด้วยเตาเผา (กรัม)

3.5.1.7 ปริมาณสีของฟิล์มน้ำยางหลังดูดซับด้วยเบนทอไนต์ที่ปรับสภาพผิวด้วยกรดไนตริกในรูปแบบสารแขวนลอย

ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.5.2 วิธีการดูดซับสารที่ทำให้เกิดสีในน้ำยางด้วยเบนทอไนต์ปรับสภาพผิวด้วยเฮกซะ-เดกซิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ ในรูปแบบสารแขวนลอยเป็นสารดูดซับ

ก. การเตรียมเบนทอไนต์ที่ผ่านการปรับสภาพผิวด้วยเฮกซะเดกซิลไตรเมทิล-แอมโมเนียมโบรไมด์ (Hexadecyl trimethyl ammonium bromide, HDTMA)

1) ชั่งเบนทอไนต์ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดไนตริก น้ำหนัก 20.XX กรัม
2) ทำให้เป็นกลาง โดยล้างน้ำกลั่น ประมาณ 8 ครั้ง ตรวจสอบด้วยเครื่องวัดพีเอช
3) เติมสารละลาย HDTMA ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 60 มิลลิลิตร
4) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
5) วางทิ้งให้ตะกอนเบนทอไนต์นอนก้นภาชนะ ค่อย ๆ รินเอาสารละลาย HDTMA ออก
6) ล้างด้วยน้ำกลั่น จำนวน 8 ครั้ง
7) นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
8) นำไปบดให้ละเอียดด้วยครกบดสารเคมี

ข. ปริมาณพอลิฟีนอลเมื่อใช้ผงเบนทอไนต์ที่ผ่านการปรับสภาพผิวด้วย HDTMA เป็นสารดูดซับในตัวอย่างน้ำยาง

1) ชั่งเบนทอไนต์ที่ผ่านการปรับสภาพผิวด้วย HDTMA น้ำหนัก 0, 0.1 กรัม
2) เติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร
3) ชั่งน้ำยางสด น้ำหนัก 5.XX กรัม แล้วผสม ให้เข้ากันด้วย เครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 นาที
4) นำน้ำยางไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
5) นำน้ำยางไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิฟีนอล ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.2

3.5.3 ประสิทธิภาพของชานอ้อยในการเป็นสารดูดซับสารที่ทำให้เกิดสีในน้ำยาง

สารดูดซับที่ใช้ในการศึกษาใช้ชานอ้อยที่ปรับสภาพผิวด้วยกรดไนตริก

ก.การเตรียมชานอ้อยที่ปรับสภาพผิวด้วยกรดไนตริก

1) ชั่งชานอ้อย (เฉพาะส่วนที่เป็นสีขาว) น้ำหนัก 50 กรัม
2) ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร จำนวน 3 ครั้ง (อัตราส่วนชานอ้อย: น้ำกลั่น คือ 1:20)

Prince of Songkla University Pattani Campus

3) แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร ปริมาตร 1 ลิตรเป็นเวลา 10 นาที กรองเอาเฉพาะชานอ้อยออกมา

4) แช่ในกรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ปริมาตร 1 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5) ล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร จนกระทั่งพีเอช ของน้ำล้างชานอ้อยเป็นกลาง ~ 7

6) นำชานอ้อยไปกรองด้วยตะแกรงและอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

7) นำชานอ้อยมาตัดให้มีความยาวเท่ากับ 1 เซนติเมตร

ข.ประสิทธิภาพของชานอ้อยที่ผ่านปรับสภาพด้วยกรดไนตริกในการดูดซับสารที่ทำให้เกิดสีในน้ำยาง

ข.1. ปริมาณพอลิฟีนอลหลังดูดซับด้วยชานอ้อยที่ผ่านปรับสภาพด้วยกรดไนตริก

1) นำสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 0.020 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2) เติมชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพผิวด้วยกรดไนตริก น้ำหนัก 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัม

3) กวนให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก ด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

4) นำไปกรองชานอ้อยออกด้วยตะแกรง

5) นำสารละลายมากรองผ่านเยื่อไนลอนขนาด 0.45 ไมครอน

6) นำสารละลายที่ผ่านการกรองมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

7) เติมสารละลายโฟลินความเข้มข้นร้อยละ 33 โดยปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด ผสมด้วยเครื่องเขย่าวางที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที

8) เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด ผสมด้วยเครื่องเขย่าวางที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที

9) เตรียมสารละลายแบลงค์ โดยใช้น้ำกลั่น แทนสารละลายมาตรฐานกรด

Prince of Songkla University Pattani Campus

แกลลิก

10) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 750 นาโนเมตร

ข.2. ปริมาณพอลิฟีนอลในน้ำยางหลังดูดซับด้วยชานอ้อยที่ผ่านปรับสภาพด้วยกรดไนตริก

1) ชั่งน้ำยางสด น้ำหนัก 10.XX กรัม
2) เติมชานอ้อย น้ำหนัก 0 และ 0.05 กรัม
3) กวนให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก ด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
4) นำไปกรองชานอ้อยออกด้วยตะแกรง
5) นำน้ำยางไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
6) ชั่งน้ำยางส่วนบนที่ผ่านการเซนตริฟิวจ์น้ำหนัก 0.5X กรัมใส่ในถ้วยกระเบื้อง
7) ค่อย ๆ หยดกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงที่ผิวหน้าของน้ำยาง (เขย่าถ้วยกระเบื้องเบา ๆ ด้วยมือขณะที่หยดกรด)
8) น้ำยางจะจับตัวเป็นก้อนและแยกออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนที่เป็นเนื้อยาง และส่วนที่เป็นซีรั่ม ใช้แท่งแก้วกดเนื้อยางเพื่อให้ซีรั่มออกมาให้มากที่สุด
9) กรองซีรั่มด้วยเยื่อกรองไนลอน ขนาด 0.45 ไมครอน
10) ปิเปตซีรั่มที่ผ่านการกรองแล้วมาปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
11) เติมสารละลายโฟลินความเข้มข้นร้อยละ 33 โดยปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด ผสมด้วยเครื่องเขย่าวางที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที
12) เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอดผสมด้วยเครื่องเขย่าวางที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที

Prince of Songkla University Pattani Campus

13) เตรียมสารละลายแบลงค์ โดยใช้น้ำกลั่น

14) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 750 นาโนเมตร

3.5.4 ประสิทธิภาพการลดสีของแผ่นฟิล์มน้ำยางด้วยสารลดสี

ศึกษาประสิทธิภาพของสารลดสี (Color reducing agent, CRA) ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส ทำการประเมินโดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงสีเหลืองของแผ่นฟิล์มน้ำยาง

3.5.4.1 การลดสีของแผ่นฟิล์มน้ำยางด้วยสารลดสี

1) ชั่งน้ำยางสดน้ำหนัก 9.XX กรัม

2) เติมสารละลายสารลดสี ความเข้มข้น 0, 0.002, 0.020 และ 0.040 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3) กวนให้เข้ากันด้วยแท่งแก้วคน เป็นเวลา 30 วินาที วางทิ้งไว้ 10 นาที

4) เทน้ำยางมา 6.xx กรัม ในจานรองสแตนเลส

5) อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6) วัดสีฟิล์มยางแห้งด้วยเครื่องวัดสี

3.5.4.2 การลดสีของแผ่นฟิล์มน้ำยางด้วยสารลดสีร่วมกับสารดูดซับ

1) ชั่งน้ำยางสดใส่ในบีกเกอร์จำนวน 8 บีกเกอร์ ๆ ละ 9.XX กรัม

2) เติมสารเคมีลงไปในบีกเกอร์น้ำยาง ดังนี้

- บีกเกอร์ที่ 1-6 เติมสารละลายสารลดสี ความเข้มข้น 0, 0.005, 0.010, 0.015, 0.020 และ 0.040 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- บีกเกอร์ที่ 6 และ 7 เติมสารละลายสารลดสี ความเข้มข้น 0.010 และ 0.020 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ร่วมกับเบนทอไนต์ปรับสภาพผิวด้วยกรดไนตริกบีกเกอร์ละ 0.2X กรัม

3) กวนให้เข้ากันด้วยแท่งแก้วคน เป็นเวลา 30 วินาที วางทิ้งไว้ 10 นาที

4) เซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

5) เทน้ำยางมา 6.XX กรัม ในจานรองสแตนเลส

6) อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7) วัดสีฟิล์มยางแห้งด้วยเครื่องวัดสี

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.6 การศึกษาสมบัติเชิงกลแผ่นฟิล์มน้ำยางข้นจากการจุ่ม

1) ชั่งน้ำยางสด น้ำหนัก 900 กรัม

2) เติมสารละลายลดสี CRA ความเข้มข้น 0, 0.010 และ0.015 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3) เซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

4) เลือกเอาเฉพาะชั้นยาง ปรับปริมาณของแข็งทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณของแข็งเท่ากับร้อยละ 62 โดยน้ำหนัก และปรับปริมาณแอมโมเนียให้ได้เท่ากับร้อยละ 0.7 โดยน้ำหนัก

5) นำน้ำยางข้นมาเตรียมเป็นน้ำยางคอมเปาด์ จากสูตรในตารางที่ 3.3 (Siti Maznah *et al*., 2008) ผสมส่วนผสมเป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก ความเร็ว 50 รอบ/นาที

ตารางที่ 3.3 สูตรน้ำยางคอมเปาด์

สารเคมี	**Dry weight (phr)**
61.5% น้ำยางข้น	100
10% KOH	0.3
50% S	1.5
50% ZnO	0.25
50% ZDEC	1.5
50% Winstay-L	1.0

*phr = ส่วนในยางหนึ่งร้อยส่วน (parts per hundred of rubber)

6) นำน้ำยางคอมเปาด์ เตรียมเป็นแผ่นฟิล์มยางจากการจุ่ม โดยนำหลอดทดลองจุ่มลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 5 วินาที ยกขึ้นและนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

7) จุ่มหลอดทดลองลงในน้ำยางคอมเปาด์เป็นเวลา 5 วินาที จำนวน 2 ครั้ง อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทาแป้งทัลคัม แล้วม้วนยางออกจากหลอด

8) นำแผ่นฟิล์มยางจากการจุ่ม ไปตัดเป็นชิ้นตัวอย่าง แล้วนำไปทดสอบสมบัติเชิงกล

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตามมาตรฐาน ASTM D412 คือ ความต้านทานต่อแรงดึง (Tensile strength) มอดุลัส (Modulus) และความสามารถในการยืดจนขาด (Elongation at break)

3.7 การทดสอบสียางพอลิไอโซพรีนแห้งด้วยเครื่องเปรียบเทียบสีโลวิบอนด์ (ASTM D3157-84)

ในกระบวนการผลิตยางแท่งจากน้ำยางมีการจัดชั้นมาตรฐานยาง โดยเปรียบเทียบความเข้มของสียางด้วยสีของโลวิบอนด์ (Lovibond) มาตรฐาน ดังนั้นนอกเหนือจากการใช้เทคนิคสเปก-โทรโฟโตเมตรี การศึกษานี้จึงต้องการทำการศึกษาเปรียบเทียบสียางพอลิไอโซพรีนสังเคราะห์และยางธรรมชาติด้วยเทคนิคการสังเกตแถบสีมาตรฐานโลวิบอนด์ด้วยอีกวิธีหนึ่ง

1) การเตรียมตัวอย่างยางพอลิไอโซพรีนแห้งดังนี้

ก. ยางพอลิไอโซพรีนสังเคราะห์ (Synthetic polyisoprene rubber)ในรูปแบบยางแห้ง ซึ่งไม่ได้ระบุน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ย (ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณชัยอรุณ วุฒิชาญ)

ข. ยางธรรมชาติที่ผ่านการสกัดด้วยสารละลายไดคลอโรมีเทนและเมทานอล (Dichloromethane-methanol extracted natural rubber) เตรียมโดย

-นำน้ำยางธรรมชาติสด 100 กรัม มาสกัดด้วย สารละลายผสมของไดคลอโรมีเทนกับเมทานอลอัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กเป็นเวลา 5 นาที วางทิ้งให้แยกชั้น 30 นาที ได้สาร 3 ส่วน โดยเนื้อยางจะจับตัวอยู่ตรงกลาง

-นำส่วนของเนื้อยางมากดและรีดแผ่นยางให้ได้ความหนาประมาณ 2 มิลลิเมตร แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ค. ยางธรรมชาติแห้ง (Natural rubber) เตรียมให้อยู่ในรูปยางแผ่นโดย

-นำน้ำยางธรรมชาติสดประมาณ 100 กรัม จับตัวเนื้อยางด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ให้น้ำยางจับตัวประมาณ 15-30 นาที

-จับตัวเนื้อยาง กดและรีดแผ่นยางให้ได้ความหนาประมาณ 2 มิลลิเมตร แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ง. ยางธรรมชาติที่ผ่านการเติมสารลดสี CRA (Colour reducing agent treated natural rubber) ในรูปแบบยางแผ่นเตรียมโดย

Prince of Songkla University Pattani Campus

-ในนำน้ำยางธรรมชาติสดประมาณ 90 กรัม เติมสารละลายลดสี CRA ความเข้มข้น 0.015 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันด้วยแท่งแก้วคน เป็นเวลา 30 วินาที วางทิ้งไว้ 10 นาที

-จับตัวเนื้อยางด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ให้น้ำยางจับตัวประมาณ 15-30 นาที

-จับตัวเนื้อยาง กดและรีดแผ่นยางให้ได้ความหนาประมาณ 2 มิลลิเมตร แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

2) นำตัวอย่างยางแห้งน้ำหนักประมาณ 30 กรัม นำมาบดให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องบดยางสองลูกกลิ้ง ให้ได้แผ่นหนาประมาณ 3.2-3.6 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส)

3) ตัดตัวอย่างยางด้วยกรรไกรให้ได้ขนาดใกล้เคียงกับขนาดเบ้า น้ำหนักประมาณ 0.3 กรัม แล้วนำแผ่นเซลโลเฟน (cellophane sheet) มาประกบชิ้นตัวอย่างยาง และนำไปอัดด้วยเบ้าชิ้นทดสอบมาตรฐาน ความหนาเท่ากับ 1.4-1.8 มิลลิเมตร ความร้อนที่ใช้อัดเบ้าพิมพ์เท่ากับ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

4) แกะแผ่นตัวอย่างยางชิ้นทดสอบออกจากแผ่นเซลโลเฟน แล้วนำชิ้นทดสอบมาวางตรงตำแหน่งเครื่องสำหรับเปรียบเทียบสีกับสีมาตรฐานโลวิบอนด์ อ่านค่าเบอร์สีมาตรฐานโลวิบอนด์ที่ให้สีเปรียบเทียบตรงกับชิ้นทดสอบ ตรงตำแหน่งช่องเล็กๆ ทางขวามือของเครื่อง

Prince of Songkla University Pattani Campus