การย่อยสลายเพ็คตินจากฐานดอกทานตะวันโดยใช้รังสีแกมมาเพื่อเป็นสารลดปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้ในน้ำยางธรรมชาติ

นางสาวนงค์นุช แจ้งสว่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิวเคลียร์เทคโนโลยี ภาควิชานิวเคลียร์เทคโนโลยี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GAMMA RADIATION DEPOLYMERIZATION OF SUN FLOWER HEAD PECTIN FOR DECREASING OF ALLERGENIC NATURAL RUBBER LATEX PROTEIN CONTENTS

Miss Nongnuch Jangsawang

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Nuclear Technology

Department of Nuclear Technology

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การย่อยสลายเพ็คตินจากฐานดอกทานตะวันโดยใช้รังสีแกมมาเพื่อเป็นสารลดปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้ในน้ำยางธรรมชาติ
โดย	นางสาวนงค์นุช แจ้งสว่าง
สาขาวิชา	นิวเคลียร์เทคโนโลยี
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ชยากริต ศิริอุปถัมภ์

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. ดิเรก ลาวัณย์ศิริ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นเรศร์ จันทน์ขาว)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ชยากริต ศิริอุปถัมภ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ศิริวัฒนา บัญชรเทวกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อรรถพร ภัทรสุมันต์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวนงค์นุช แจ้งสว่าง: การย่อยสลายเพ็คตินจากฐานดอกทานตะวันโดยใช้รังสีแกมมาเพื่อเป็นสารลดปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้ในน้ำยางธรรมชาติ (GAMMA RADIATION DEPOLYMERIZATION OF SUN FLOWER HEAD PECTIN FOR DECREASING OF ALLERGENIC NATURAL RUBBER LATEX PROTEIN CONTENTS) อ.ที่ปรึกษา: รศ. ชยากริต ศิริอุปถัมภ์, 99 หน้า

ได้ทำการหาปริมาณรังสีที่เหมาะสมในการย่อยสลายเพ็คตินให้มีขนาดโมเลกุลลดลงเพื่อใช้เป็นสารลดปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้ในน้ำยางข้นธรรมชาติ เพ็คตินที่ใช้ในการทดลองสกัดจากฐานดอกทานตะวันด้วยสารสกัดคือน้ำกลั่น สารละลายกรดไฮโดรคลอริก พีเอช 2 และสารละลายกรดไฮโดรคลอริก พีเอช 4 ที่อุณหภูมิ 90°ซ นาน 60 นาที การสกัดด้วยน้ำกลั่นได้ผลผลิตต่อน้ำหลักสดมากที่สุดคือประมาณ 0.4% เมื่อฉายรังสีสารละลายเพ็คติน 5% ที่ปริมาณรังสี 2, 4, 6, 8 และ 10 กิโลเกรย์ จะได้เพ็คตินที่มีขนาดโมเลกุลเฉลี่ย โดยความหนืดเป็น 6.57×10^4 , 4.20×10^4, 3.03×10^4, 2.08×10^4 และ 1.36×10^4 ดาลตัน (Da) ตามลำดับ เมื่อนำสารละลายเพ็คตินที่มีขนาดโมเลกุลเล็กค่าต่าง ๆ เหล่านี้เติมลงน้ำยางข้นที่เจือจางด้วยน้ำเป็น 2 เท่าในปริมาณ 1, 0.5, 2.0 และ 2.5 ส่วนในเนื้อยาง 100 ส่วน (phr) กวนและทิ้งไว้ค้างคืนแล้วปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที ที่ 10°ซ 1 ชั่วโมงจะได้น้ำยางข้น เมื่อขึ้นรูปเป็นฟิล์มยางและนำไปทดสอบหาค่าโปรตีนก่อภูมิแพ้โดยวิธี ELISA ได้ผลว่าฟิล์มยางที่ได้จากการเติมเพ็คตินฉายรังสี 4 กิโลเกรย์ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 4.20×10^4 Da ปริมาณ 1.2 phr ในน้ำยางข้นและปั่นสามารถลดปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้ได้มากที่สุดคือลดลงจากฟิล์มยางควบคุม 80.26% และเหลือเพียง 1.5 ppm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา	นิวเคลียร์เทคโนโลยี	ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา	นิวเคลียร์เทคโนโลยี	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา	2549	

4670341121: MAJOR NUCLEAR TECHNOLOGY

KEYWORD: DEPOLYMERIZATION / PECTIN / NATURAL RUBBER LATEX / ALLERGENIC PROTEIN

NONGNUCH JANGSAWANG: GAMMA RADIATION DEPOLYMERIZATION OF SUN FLOWER HEAD PECTIN FOR DECREASING OF ALLERGENIC NATURAL RUBBER LATEX PROTEIN CONTENTS.THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF. CHYAGRIT SIRI-UPATHUM, 99 pp.

Determination of a suitable gamma radiation dose for depolymerization of pectin was conducted and used as an allergenic rubber latex protein scavenger. Pectin from sunflower head was extracted by water, HCl solution of pH 4 and HCl solution of pH 2 at 90° C for 60 minutes. Highest pectin yield was from water extraction, the yield was 0.4% of wet sunflower head. 5.0% pectin solution was gamma irradiated at 2, 4, 6, 8 and 10 kGy resulted in lowering of viscosity average molecular weight 6.57×10^4 , 4.20×10^4, 3.03×10^4, 2.08×10^4 and 1.36×10^4 Da respectively as determined by viscosity measurement. Irradiated pectin solutions were added into twice diluted concentrated latex at concentration of 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5 phr, stirred and left overnight prior to centrifuge at 8000 rpm for 60 minutes to obtain concentrated latex. Rubber films so obtained from the latex were analyzed for allergenic protein content by ELISA method. It was found that rubber films from adding of 4 kGy irradiated pectin at concentration of 1.5 phr showed lowest allergenic protein of 1.5 ppm, 80.26% decreased from the control latex.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department	Nuclear Technology	Student's signature.....
Field of study	Nuclear Technology	Advisor's signature.....
Academic Year	2006	

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ชยากริต ศิริอุปถัมภ์ ผู้ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ สำหรับข้อแนะนำ และคำปรึกษาที่ดี

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ นเรศร์ จันทน์ขาว ประธานกรรมการสอบ รองศาสตราจารย์ศิริวัฒนา บัญชรเทวกุล และผู้ช่วยศาสตรจารย์อรรถพร ภัทรสุมันต์ ผู้เป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้ตรวจสอบและให้คำแนะนำในการแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณพ่อแม่ที่ทั้งให้กำลังใจและสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณคุณอารักษ์ วิทิตธีรานนท์ ผู้ซึ่งเป็นผู้บังคับบัญชาที่ให้คำปรึกษาและตอบคำถามทุกๆคำถาม พร้อมทั้งให้คำแนะนำที่ดี ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนอุดหนุนงานวิจัย

ขอบคุณเพื่อน ๆ ทุกคนที่เป็นกำลังใจและช่วยเหลือกันมาตลอด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…… ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ…… จ

กิตติกรรมประกาศ…….... ฉ

สารบัญ……..... ช

สารบัญตาราง…… ญ

สารบัญภาพ…… ฌ

บทที่

1. บทนำ…… 1

1.1 ความเป็นมาของปัญหา……... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย…… 3

1.3 ขอบเขตของการวิจัย..... 4

1.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย…… 4

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ…… 4

1.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……... 5

2. ทฤษฎี…… 7

2.1ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับยางธรรมชาติ…… 7

2.1.1สมบัติทั่วไปของน้ำยางสด……... 8

2.1.2 โปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ…….. 10

2.1.3 โปรตีนก่อภูมิแพ้ในยางธรรมชาติ…… 11

2.2 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเพ็คติน…….. 16

2.2.1สารประกอบเพ็คติก……... 18

2.2.2 การสกัดเพ็คติน…… 25

2.2.2.1 การสกัดเพ็คตินจากวัตถุดิบต่าง ๆ…… 26

2.2.2.2 การสกัดเพ็คตินจากฐานดอกทานตะวัน…….. 29

2.2.3 การย่อยสลายเพ็คติน…… 30

2.2.3.1 ต้นกำเนิดรังสี…….. 31

2.2.3.2 ผลของรังสีต่อเพ็คติน…….. 31

บทที่ หน้า

2.2.3.3 ผลของรังสีต่อน้ำหนักโมเลกุลของเพ็คติน..... 33
2.2.4 การวัดขนาดโมเลกุลของเพ็คติน..... 33
2.2.4.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์..... 33
2.2.4.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์..... 35
2.2.4.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ด้วยวิธีการวัดความหนืด..... 35
2.3.ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับดอกทานตะวัน..... 38
2.3.1 ประเภทของดอกทานตะวัน..... 41
2.3.2 พันธุ์ของทานตะวันในประเทศไทย..... 41
2.3.3 การใช้ประโยชน์ทานตะวันในประเทศไทย..... 43

3. วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย..... 44
3.1 การสกัดเพ็คติน..... 44
3.1.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์..... 44
3.1.2 วิธีการดำเนินการวิจัย..... 44
3.2 การหาปริมาณ polygalacturonic acid ในฐานดอกทานตะวัน..... 47
3.2.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์..... 47
3.2.2 วิธีการดำเนินการวิจัย..... 47
3.3การฉายรังสีเพ็คติน..... 50
3.3.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์..... 50
3.3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย..... 50
3.4 การวัดขนาดโมเลกุลของเพ็คตินโดยใช้วิธี dilute solution viscosity 52
3.4.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์..... 52
3.4.2 วิธีการดำเนินการวิจัย..... 52
3.5 การทำฟิล์มยางโปรตีนต่ำ..... 56
3.5.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์..... 56
3.5.2 วิธีการดำเนินการวิจัย..... 57
3.6 วิธีการวิเคราะห์โปรตีนก่อภูมิแพ้โดยวิธี ELISA..... 59

บทที่ หน้า

4. ผลการทดลอง..... 61
4.1 ผลการสกัดเพ็คติน..... 61
4.2 ผลการหาปริมาณ polygalacturonic acid ในฐานดอกทานตะวัน..... 62
4.3 การฉายรังสีเพ็คติน..... 66
4.4 การวัดขนาดโมเลกุลเพ็คตินที่ผ่านการฉายรังสี..... 66
4.5 การขึ้นรูปฟิล์มยางโปรตีนต่ำ..... 69
4.6 ผลการทดสอบโปรตีนก่อภูมิแพ้ในฟิล์มยางโปรตีนต่ำ..... 70
5. สรุปผลการทดลอง..... 72
5.1 ผลการสกัดเพ็คตินด้วยเงื่อนไขต่างๆ..... 72
5.2 การหาปริมาณ polygalacturonic acid ในฐานดอกทานตะวัน..... 72
5.3 การฉายรังสีเพ็คติน..... 73
5.4 การวัดขนาดโมเลกุลเพ็คตินที่ผ่านการฉายรังสี..... 74
5.5 การขึ้นรูปฟิล์มยางโปรตีนต่ำ..... 74
5.6 การลดลงของโปรตีนก่อภูมิแพ้เมื่อใช้เพ็คตินฉายรังสีปริมาณต่าง ๆ 75
ข้อเสนอแนะ..... 76

รายการอ้างอิง..... 77

บรรณานุกรม..... 80

ภาคผนวก..... 81

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 99

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 โปรตีนก่อภูมิแพ้ในน้ำยางธรรมชาติ..... 13
2.2 แสดงพื้นที่ปลูกทานตะวันจำแนกตามแหล่งปลูกที่สำคัญของประเทศไทย…….. 42

3.1การเตรียมสารละลาย polygalacturonic acid มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ…….. 48
3.2 การเติมสารละลายเพ็คตินในน้ำยาง…… 58

4.1 ผลการสกัดเพ็คตินจากฐานดอกทานตะวันที่ความเข้มข้นของกรดต่างกัน..... 61
4.2 ปริมาณเป็นร้อยละของเพ็คตินจากน้ำหนักของวัตถุดิบจากฐานดอกทานตะวัน สกัดด้วยเงื่อนไขต่างกัน…… 62
4.3 ค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ…… 63
4.4 ปริมาณเพ็คตินทั้งหมดในฐานดอกทานตะวันโดยการสกัดฐานดอกด้วยเงื่อนไขต่างกันจากการวัดค่าดูดกลืนแสงครั้งที่1…… 64
4.5 ปริมาณเพ็คตินทั้งหมดในฐานดอกทานตะวันโดยการสกัดฐานดอกด้วยเงื่อนไขต่างกันจากการวัดค่าดูดกลืนแสงครั้งที่ 2……. 64
4.6 ร้อยละของปริมาณเพ็คตินทั้งหมดในฐานดอกทานตะวันสดจากการสกัดด้วยเงื่อนไขต่างกัน……. 65
4.7 ผลการวัดปริมาณรังสีสารละลายเพ็คติน 5 %..... 66
4.8 ผลการวัดขนาดโมเลกุลของเพ็คตินที่ฉายรังสี 2 kGy…….. 67
4.9 ผลการวัดขนาดโมเลกุลของเพ็คตินที่ฉายรังสี 4 kGy…….. 67
4.10 ผลการวัดขนาดโมเลกุลของเพ็คตินที่ฉายรังสี 6 kGy…… 67
4.11 ผลการวัดขนาดโมเลกุลของเพ็คตินที่ฉายรังสี 8 kGy…… 67
4.12 ผลการวัดขนาดโมเลกุลของเพ็คตินที่ฉายรังสี 10 kGy…….. 68
4.13 การเปลี่ยนแปลงของขนาดโมเลกุลเพ็คตินเมื่อฉายรังสีที่ปริมาณรังสีต่างๆ..... 68
4. 14 การหา % DRC ในครีมยางหลังจากปั่นน้ำยางผสมเพ็คตินด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง…….. 69
4. 15 ผลการวัดค่าดูดกลืนแสงของฟิล์มยางที่ 330 นาโนเมตร…….. 70

ตารางที่ หน้า

4. 16 ผลการหาค่าปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้ในฟิล์มยางที่ลดปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้ด้วยการเติมเพ็คตินด้วยวิธี ELISA…….. 71

5.1 ปริมาณ polygalacturonic acid ในสารละลายที่สกัดจากฐานดอกทานตะวันด้วยเงื่อนไขต่างกัน…… 72

5.2 ร้อยละของปริมาณของเพ็คตินที่สกัดจากฐานดอกทานตะวันด้วยเงื่อนไขต่าง ๆ ต่อปริมาณเพ็คตินทั้งหมดที่มีในวัตถุดิบสด…… 73

5.3 แสดงปริมาณรังสีเฉลี่ยและ Dose uniformity ในการฉายรังสีสารละลายเพ็คติน 5%..... 74

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

2.1 ภาพภาคตัดขวางของท่อน้ำยางจาก Electron micrograph RP คือ อนุภาคยาง ; L คือ ลูทอยด์; FW คือ อนุภาค Frey-Wyssling และ LVW คือผนังของท่อน้ำยาง (Scale bar = 1μm)…….. ... 7

2.2 โครงสร้างอนุภาคยาง..... 9

2.3 สูตรโครงสร้างของยางธรรมชาติ…… 9

2.4 แสดงโครงสร้างโดยรวมของ Hevein……. 15

2.5 แสดงโครงสร้างของ Hevein และส่วนที่เป็น Carbohydrate- binding regionที่เป็นวง Aromatic พวก Trp^{21} , Trp^{23} และ Try^{30}…….. 15

2.6 แสดงโมเลกุลของ MPD^{101} ใน Hevein ที่เชื่อมต่อกับ Residue อื่น ๆ ด้วยพันธะไฮโดรเจน (เส้นประ) เช่น น้ำ (W) …….. 16

2.7 ส่วนประกอบต่างๆของผนังเซลล์พืช..... 17

2 .8โมเลกุลของกรดเพคติก..... 18

2.9 โมเลกุลของ Pectinic acid……. 19

2.10 (a) สูตรโครงสร้างของกรดกาแลคทูโลนิก (Galacturonic acid) และ (b) โครงสร้างของเพ็คตินที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของกรดกาแลคทูโลนิก…… 19

2.11 (a) สูตรโครงสร้างของน้ำตาลรามโนส (Rhamnose) และ (b) การเกิดโครงสร้างซิกแซกของโมเลกุลเพ็คตินเนื่องจากการเข้ามาแทรกของน้ำตาลรามโนส……. 20

2.12 โครงสร้างของเพ็คตินที่เกิดการแทนที่ด้วยหมู่ methoxyl ในโมเลกุล……. 21

2.13 แสดงโครงสร้างของเพ็คตินที่หมู่คาร์บอกซิลถูก esterified…… 22

2.14 สูตรโครงสร้างของ HM pectin…… 22

2.15 สูตรโครงสร้างของ LM pectin…… 22

2.16 การแทนที่หมู่คาร์บอกซิลด้วยหมู่เอไมด์ในโครงสร้างของเพ็คติน..... 23

2.17 สูตรโครงสร้างของ Amidated pectin…….. 23

2.18 โมเดลของการที่โมเลกุลเกิดโครงข่ายสามมิติในการเป็นเจลของเพ็คติน บริเวณที่แรเงาคือบริเวณที่เกิด crystallization……. 25

2.19 แสดงตำแหน่งต่างๆบน Cannon - Ubbelohde Viscometer……. 35

2.20 ดอกทานตะวันพันธุ์ Supermane Sunflower…….. 37

รูปที่ หน้า

2.21 ดอกทานตะวันพันธุ์ Hopi Dye Sunflowers…….. 37
2.22 ดอกทานตะวันพันธุ์ Russian Mammoth Sunflowers…… 38

3.1 ดอกทานตะวันพันธุ์แปซิฟิกหลังจากนำเมล็ดออก……..45
3.2 ส่วนฐานของดอกทานตะวันที่นำมาสกัดเพ็คติน…… 46
3.3 สารมาตรฐาน polygalacturonic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ…… 49
3.4 เครื่อง UV-VIS- NIR SCANNING SPECTROPHOTOMETER ,SHIMADZU TCC 260 ……49
3.5 เครื่องฉายรังสีแกมมาจาก Co-60 Gammacell 220 excel สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ….. 51
3.5 การวางตัวอย่างสารละลายเพ็คตินในกระบอกฉายรังสีและการติดเครื่องวัดปริมาณรังสี.. 51
3.7 แสดงตำแหน่งต่างๆบน Cannon - Ubbelohde Viscometer……55
3.8 เครื่องปั่นยางด้วยความเร็วสูงและอุณหภูมิต่ำ…… 59
3.9 Plate ELISA สำหรับทดสอบโปรตีนก่อภูมิแพ้ในน้ำยางธรรมชาติ…… 60

4.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Polygalacturonic acid และค่าดูดกลืนแสง……... 63
4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดโมเลกุลของเพ็คตินและปริมาณรังสีแกมมา…….. 68

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาของปัญหา

มีรายงานการแพ้โปรตีนที่มาจากผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติซึ่งทำให้เกิดอาการแพ้ ทั้งอาการที่มีความรุนแรงน้อย เช่น การเกิดผื่นคันที่บริเวณที่สัมผัสกับยางโดยตรง หรือกรณีที่เกิดการแพ้แบบรุนแรง อาจเสียชีวิตได้ในกรณีที่เกิดการแพ้แบบเฉียบพลัน รายงานจากประเทศสหรัฐอเมริกา มีผู้ใช้ผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติแล้วเกิดอาการแพ้ 1100 รายและถึงกับเสียชีวิต 15 ราย ผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ ที่กล่าวถึงก็คือ ถุงมือผ่าตัด ถุงมือที่ใช้ในทางการแพทย์ ถุงมือที่ใช้ในงานบ้าน จุกนมเด็ก ลูกโป่ง ถุงยางอนามัย เป็นต้น แต่ที่ต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ คือผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับการดูแลผู้ป่วย

ด้วยเหตุนี้เองหลายประเทศที่นำเข้าผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติจะพยายามกำหนดมาตรฐานในเรื่องของปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติ ยกตัวอย่างเช่น องค์การอาหารและยา (FDA) ของประเทศสหรัฐอเมริกา ได้ประกาศให้ผู้ที่ใช้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ระมัดระวัง และถ้าเป็นไปได้ให้หลีกเลี่ยงการใช้ผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติเหล่านั้น โดยหาผลิตภัณฑ์ที่มาจากวัสดุแบบอื่นมาใช้ทดแทน ดังนั้นในฐานะที่ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตผลิตภัณฑ์ยางที่เกี่ยวกับการดูแลสุขภาพรายใหญ่ จึงต้องพยายามที่จะควบคุมคุณภาพของยางในเรื่องของปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้ ก่อนที่ผลิตภัณฑ์จากยางสังเคราะห์จะถูกนำมาใช้ทดแทน แล้วมีการส่งเสริมให้ใช้กันอย่างแพร่หลาย ถ้าเหตุการณ์เป็นเช่นนั้นจะไม่ส่งผลดีต่อประเทศไทยอย่างแน่นอน และด้วยเหตุที่ว่า ประเทศไทยมีตลาดที่ใช้ในการส่งออกผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติที่ค่อนข้างแคบ และจำกัดอยู่ไม่กี่ประเทศ ยกตัวอย่างเช่น ถุงมือยาง จะมีตลาดที่สำคัญคือประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศในกลุ่ม EU ในกรณีเช่นนี้เมื่อต้องพบกับมาตรการกีดกันทางการค้าที่กำหนดมาตรฐานของสินค้าที่จะนำเข้าเอาไว้สูง ผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติของประเทศไทย จึงต้องได้รับการพัฒนาอย่างเร่งด่วนเพื่อไม่ให้กระทบต่อการส่งออก

ยางธรรมชาติส่วนมากเป็นน้ำยางที่ได้มาจากต้นยาง Hevea Brazilliensis ซึ่งเป็นไม้ยืนต้น มีต้นกำเนิดที่ลุ่มแม่น้ำ อเมซอนในทวีปอเมริกาใต้ ประเทศบราซิล เป็นต้นไม้ที่ชอบอากาศร้อนชื้น และในปี 1876 Hemry Wickham ได้นำเมล็ดยางจากบราซิลไปยังลอนดอน ประเทศอังกฤษ จากนั้นก็ได้ส่งกล้ายางไปปลูกที่ศรีลังกา และจากศรีลังกาไปยังสิงคโปร์ในปี ค.ศ 1877 [1]และในปีเดียวกันได้นำปลูกในสวนหลังบ้านข้าหลวงใหญ่อังกฤษในมาเลเซีย มีการนำมาปลูกในเมืองไทยครั้งแรกในปี ค.ศ 1901 ที่จังหวัดตรัง ในปี ค. ศ.1908 หลวงราชไมตรี (ปูม ปุณศรี) ได้นำไปปลูกที่จังหวัดจันทบุรี ต่อมาได้แพร่ขยายไปทั่ว 14 จังหวัดภาคใต้ และ 3 จังหวัดของภาคตะวันออกคือ ระยอง จันทบุรี ตราด ทดลองปลูกยางในภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยศูนย์วิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร ที่จังหวัดบุรีรัมย์ สุรินทร์ และหนองคาย [2]ก่อนปี ค.ศ . 1921 มีการนำน้ำยางธรรมชาติมาใช้ประโยชน์ผลิตเป็นวัตถุสำเร็จรูปโดยตรงน้อยมาก ส่วนใหญ่ทำการเปลี่ยนรูปไปเป็นสถานะยางแห้งก่อน แล้วจึงแปรรูปเป็นวัตถุสำเร็จรูปในภายหลัง สาเหตุเนื่องจากน้ำยางเกิดการเน่าเสียและจับตัวเป็นก้อนเสียก่อนและไม่สะดวกในการขนส่ง ในปี ค.ศ 1791 de Fourcroy ได้พยายามแก้ปัญหาดังกล่าวโดยค้นพบว่าการเติมสารแอมโมเนียลงไปจะช่วยรักษาสภาพของน้ำยางข้นให้เก็บไว้ได้นาน

น้ำยางสดที่กรีดได้จากต้นยางมีลักษณะสีขาวข้นและมีเนื้อยางแห้ง (dry rubber) ประมาณ 30 % แขวนลอยอยู่ในน้ำ[3] และส่วนประกอบอื่นอยู่ด้วยเช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน เกลือแร่ และน้ำเป็นส่วนใหญ่ จากการศึกษาที่มีมาก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ในยางธรรมชาติ จะเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ ที่มีขนาดโมเลกุล 14 , 18 , 25.5 , 30 , 38 และ 52 kDa จากโครงสร้างของอนุภาคยาง โปรตีนที่อยู่ในส่วนที่ละลายน้ำได้ (water soluble) จะถูกกำจัดออกได้ด้วยการปั่นออก โปรตีนก่อภูมิแพ้ (allergenic proteins) ที่เป็นปัญหาคือโปรตีนที่ห่อหุ้มอนุภาคของยาง ซึ่งเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ แนวทางการแก้ไขปัญหาโปรตีนก่อภูมิแพ้ในผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติ มีวิธีการกำจัดโปรตีนได้หลายวิธีด้วยกัน ซึ่งมีวิธีการหลักๆ ดังนี้

1.วิธีทางเคมี

2.การกำจัดโดยการชะละลาย

3.การกำจัดด้วยวิธีทางชีวเคมี

สำหรับการกำจัดโปรตีนโดยวิธีทางเคมีนั้น ทำโดยการแช่ยางลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โปรตีนจะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยปฏิกิริยาเคมี ส่วนวิธีการชะละลายโปรตีนออกจากผิวยาง เช่น การใช้สารลดแรงตึงผิว หรือตัวทำละลายและใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลว ไล่โปรตีนออกจากเม็ดยาง และสำหรับการกำจัดด้วยวิธีทางชีวเคมีคือการใช้เอนไซม์ชนิด protiolytic เช่น ปาเปน (papain), ทริปซิน (Trypsin alcalase) ซึ่งจะไฮโดรไลท์โปรตีนให้เป็นพันธะเปปไทด์และกรดอะมิโนสายสั้น ๆทำให้ละลายน้ำได้

ในทางนิวเคลียร์ K . Makuuchi ได้ทำให้โปรตีนที่ละลายน้ำได้ในน้ำยาง เกิดการเสื่อมสลาย โดยการใช้ลำอิเล็คตรอนจากเครื่อง Electron Beam machine แบบพลังงานต่ำ แล้วแยกโปรตีน

ออกไปโดยการเติม water soluble polymer บางชนิดลงไป แล้วปั่นออกแต่สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ได้เสนอการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ ให้มีปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้ลดลง โดยการใช้คาร์โบไฮเดรตตัวหนึ่ง ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา เพื่อให้มีขนาดโมเลกุลที่เหมาะสมที่จะจับกับ allergenic protein ที่ละลายได้ในน้ำยางสด คาร์โบไฮเดรตที่กล่าวถึงคือ เพ็คติน (pectin)

เพ็คตินเป็นโพลีแซคคาไรด์เชิงเส้นที่เกิดขึ้นเองในเซลล์และเนื้อเยื่อของพืช แหล่งที่จะพบเพ็คตินมากคือ เปลือกผลไม้ตระกูลส้ม (citrus peel) และเปลือกแอปเปิ้ล (apple) และมีปริมาณหนึ่งใน Aloe vera leaves, sugar beet และส่วนฐานของดอกทานตะวัน (sun flower head) เนื่องจากประเทศไทยของเรามีวัตถุดิบในการผลิตเพ็คตินจำนวนมาก โดยเฉพาะ ของที่เหลือจากการแปรรูปผลผลิตทางการเกษตร ไม่ว่าจะเป็นกากหรือเปลือก ในกรณีของเปลือกผลไม้ตระกูลส้ม มีการนำไปแปรรูปให้มีมูลค่าที่สูงขึ้นด้วยการทำแยมผิวส้ม ซึ่งถ้าคำนึงการพัฒนาวิธีการนี้ไปในระดับอุตสาหกรรมแล้วเปลือกของผลไม้ตระกูลส้มจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเพ็คตินเพื่อใช้ในกรณีนี้ เนื่องจากยังมีแหล่งของวัตถุดิบที่เหมาะสมกว่า สำหรับงานวิจัยครั้งนี้จะใช้เพ็คติน ที่อยู่ในส่วนฐานของดอกทานตะวัน

สาเหตุที่นำเพ็คตินมาใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้ เนื่องจากเพ็คตินเป็นโพลีเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 20-400 kDa ซึ่งถือว่ามีขนาดเล็กและยังเป็นโพลีเมอร์ประเภทที่ฉายรังสีแล้วจะเกิดการ degrade ทำให้ได้โมเลกุลที่มีขนาดเล็กลง ดังนั้นจึงสามารถนำเพ็คตินมาฉายรังสีเพื่อให้มีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกับ allergenic protein คือ 14-52 kDa โดยจะมีการทดลองเพื่อหาปริมาณรังสีแกมมาที่ให้ขนาดโมเลกุลของเพ็คตินที่ต้องการ เมื่อเติมเพ็คตินลงในน้ำยางสด เพ็คตินจะไปล้อมจับโมเลกุลของ allergenic protein แล้วฟอร์มตัวกันเป็น สารประกอบเชิงซ้อน แล้วชะล้างออกมาโดยใช้เครื่องเหวี่ยงซึ่งจะได้น้ำยางข้นที่มีปริมาณโปรตีนต่ำ เพื่อนำไปขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ตามปกติ เช่น กรณีที่เป็นถุงมือยางที่ใช้ในทางการแพทย์จะต้องมีโปรตีนที่ก่อภูมิแพ้ไม่เกิน 120 ไมโครกรัม/ชิ้นหรือ20 ไมโครกรัม/กรัม

<u>วัตถุประสงค์ของการวิจัย</u>

เพื่อย่อยสลายเพ็คตินจากฐานดอกทานตะวันโดยรังสีแกมมาสำหรับใช้เป็นสารลดโปรตีนก่อภูมิแพ้ในน้ำยางธรรมชาติ

ขอบเขตของการวิจัย

1. หาเงื่อนไขที่เหมาะสมในการสกัดเพ็คตินจากฐานของดอกทานตะวัน โดยการใช้สารละลายที่เป็นกรด ด้วยกระบวนการไฮโดรไลซ์
2. ทดลองหาปริมาณรังสีแกมมาที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการลดขนาด (degrade) โมเลกุลของเพ็คตินให้ได้ขนาดของโมเลกุลที่ต้องการ เพื่อนำมาเป็นตัวจับโปรตีนก่อภูมิแพ้ในน้ำยางธรรมชาติ
3. หาเงื่อนไขที่เหมาะสมได้แก่ ปริมาณเพ็คตินและเวลาในการบ่มเพ็คตินกับน้ำยางเมื่อเติมสารละลายเพ็คตินที่ถูกลดขนาดโมเลกุลลงแล้วโดยรังสีแกมมาลงในน้ำยางข้นธรรมชาติ เพื่อให้โปรตีนที่ละลายน้ำได้ในน้ำยางถูกล้อมจับโดยเพ็คติน และชะล้างออกมาด้วยเครื่องปั่น (centrifuge) ระดับห้องปฏิบัติการ
4. การทดลองขึ้นรูปเป็นฟิล์มยางโดยการเทลงบนแผ่นแก้วมีขอบแล้วทิ้งให้แห้ง
5. ตรวจสอบปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในฟิล์มยางที่ได้จากข้อ 4 โดยวิธี Modified Lowry และ/หรือ ELISA

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. ศึกษาทฤษฎี ข้อมูล และผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
2. ทดลองสกัดเพ็คตินจากฐานของดอกทานตะวัน
3. หาปริมาณรังสีแกมมาที่เหมาะสมเพื่อใช้ลดขนาดโมเลกุลของเพ็คติน ให้ได้ขนาดตามต้องการ
4. นำเพ็คตินที่ได้จากการสกัดในข้อที่ 3 ทดลองจับกับโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติแล้วปั่นออก
5. นำน้ำยางไปขึ้นรูปเป็นฟิล์มยาง
6. ตรวจสอบโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในฟิล์มยาง
7. วิเคราะห์ผล สรุปผลการทดลอง และเขียนวิทยานิพนธ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้กรรมวิธีการลดโปรตีนก่อภูมิแพ้ในน้ำยางธรรมชาติโดยการใช้เพ็คตินที่ลดขนาดโมเลกุลแล้วเพื่อใช้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในทางการแพทย์

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. พรฤดี มุ่งสมานกูล ทำงานวิจัยเรื่องการชะละลายเม็ดยางธรรมชาติด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลว[13]งานวิจัยนี้ เกี่ยวกับการชะละลายโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลว ซึ่งเป็นเทคนิคการแยกสาร โดยใช้สมบัติของตัวทำละลายที่สภาวะวิกฤตซึ่งจะมีประสิทธิภาพในการแยกสารที่มีโมเลกุลต่ำออกจากสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเป็นสารไม่มีขั่ว มีการแพร่สูง ความหนืดต่ำ ทำให้สามารถแยกสารและเกิดการแยกวัฏภาคได้เร็ว จึงนำเทคนิคนี้มาใช้ในการลดปริมาณของไนโตรเจน หรือโปรตีนในเนื้อยางให้น้อยลงโดยคาร์บอนไดออกไซด์เหลว จะเข้าไปเกาะกลุ่มโมเลกุลพอลีเมอร์ไอโซพรีน และไล่น้ำที่มีโปรตีนละลายออกมา

2. วรรณพ วิเศษสงวน ทำงานวิจัยเรื่องสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดโปรตีนจากน้ำยางธรรมชาติโดยเอนไซม์[11]วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการขจัดโปรตีนออกจากน้ำยางข้น 60 % และน้ำยางสดโดยใช้เอนไซม์สองชนิดคือ ปาเปน และอัลคาเลส และศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของยาง DPNR ที่ผลิตได้ในระดับยางดิบ ยางผสมสารเคมี และยางวัลคาไนซ์ เปรียบเทียบกับยางควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการขจัดโปรตีนออกและยางแท่งทีทีอาร์

3. อลิสา วังใน ทำงานวิจัยเรื่องการตรึงรูปปาเปนบนไคตินเพื่อลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ[10]งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์ที่จะ ตรึงรูปปาเปนบนไคตินด้วยวิธีพันธะโคเวเลนต์ แล้วเลือกวิธีที่ดีที่สุดในการผลิตปาเปนตรึงรูปสำหรับลดโปรตีนในน้ำยาง

4. กิติพงษ์ หาญเจริญ ทำการวิจัยเรื่องการพัฒนาวิธีอิมมูโนแอสเสย์สำหรับตรวจวัดโปรตีนที่เป็นแอลเลอเจนในผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติ[8]งานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาอุบัติการณ์ของการพบอิมมูโนโกลบูลิน ชนิดอีที่จำเพาะ กับโปรตีนในน้ำยาง

5. ชโนวิทก์ ตู้บรรเทิง ทำการวิจัยเรื่องการชะละลายโปรตีนจากถุงมือยางธรรมชาติโดยใช้สารลดแรงตายใต้ความดัน[6]งานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการชะละลายโปรตีนออกจากถุงมือยางธรรมชาติโดยใช้สารลดแรงตึงผิวภายใต้ความดัน แ ละปรับสภาพความเป็นกรด-เบส และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เหลือในถุงมือยางธรรมชาติโดยวิธี Modified Lowry

6. ศิริวัลย์ บุญสุข ทำการวิจัยเรื่อง การพัฒนายางธรรมชาติโปรตีนแอลเลอเจนต่ำโดยกระบวณการสะพอนิฟิเคชั่น[5]งานวิจัยนี้เป็นการพยายามที่จะพัฒนายางธรรมชาติให้มีโปรตีนที่

ก่อให้เกิดภูมิแพ้ต่ำ ด้วยวิธี การสะพอนิฟิเคชั่นในสภาวะที่เหมาะสมและศึกษาคุณสมบัติ ต่างของยางที่ผ่านการสะพอนิไฟด์ หรือ SAP-NR ที่ผลิตได้ในระดับยางดิบและเปรียบเทียบกับยาง STR5L และเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนแอลเลอเจนในยางก่อนและหลังจากการสะพอนิไฟด์

7. กนกวรรณ อินสองใจ ทำการวิจัยเรื่องการเตรียมยางธรรมชาติโปรตีนต่ำโดยสะพอนิฟิเคชั่น[7]งานวิจัยนี้ เป็นความพยายามผลิตยางธรรมชาติโปรตีนต่ำโดยการทำปฏิกิริยาสะพอนิฟิเคชั่นน้ำยางสดและน้ำยางแอมโมเนียสูงจะถูกบ่มกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับสารลดแรงตึงผิวและโซเดียมไอดรอกไซด์ (NaOH)

8. พรรณสุนันท์ เจียรรุ่งเรือง ทำการวิจัยเรื่องการลดปริมาณโปรตีนของยางธรรมชาติโดยโปรตีเอส ร่วมกับพลังงานไมโครเวฟ[9]โดยงานวิจัยชิ้นนี้เป็นความพยายามที่จะพัฒนายางธรรมชาติโปรตีนแอลเลอเจนต่ำโดยการใช้เอนไซม์ร่วมกับพลังงานไมโครเวฟในการลดปริมาณโปรตีน และติดตามผลโดยวัดปริมาณโปรตีนและที่ติดตามผลการวัดปริมาณไนโตรเจนที่ลดลง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

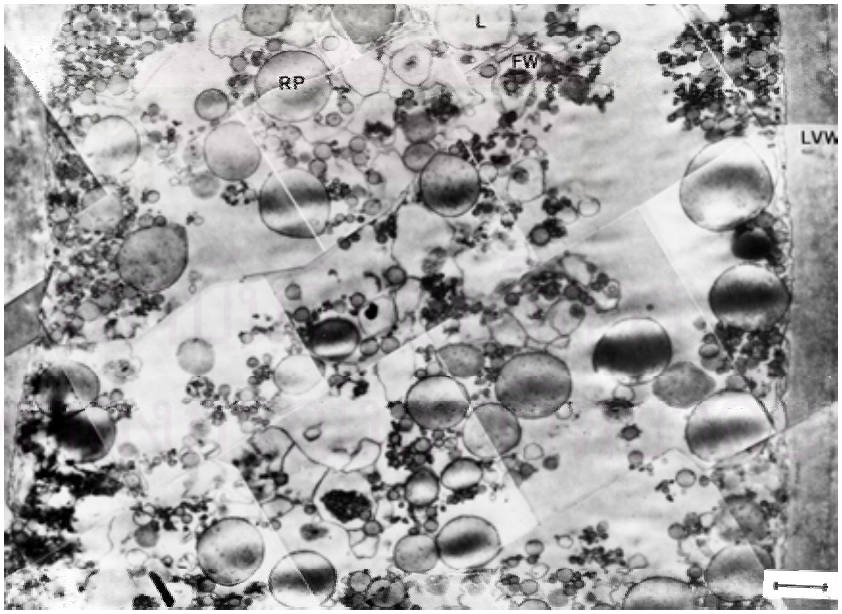
บทที่2

ทฤษฎี

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับยางธรรมชาติ

ต้นยางพารามีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Hevea Brasiliensis เป็นพืชพื้นเมืองของประเทศทางอเมริกากลางและใต้ และแถบทะเลแคริบเบียน ต้นยางพาราจะให้ของเหลวที่มีสีขาวขุ่นซึ่งเรียกว่า น้ำยางธรรมชาติ โดยทั่วไปน้ำยางธรรมชาติจะมีส่วนประกอบดังนี้

RUBBER HYDROCARBONS	93.7	%
NEUTRAL LIPIDS	2.4	%
GLYCOLIPIDS	1.0	%
PROTEINS	2.1	%
CARBOHYRATE	0.4	%
INORGANIC CONSTITUENTS	0.2	%
OTHER	0.1	%



รูปที่ 2.1 ภาพภาคตัดขวางของท่อน้ำยางจาก Electron micrograph ,RP คืออนุภาคยาง, L คือลูทอยด์, FW คืออนุภาค Frey-Wyssling และ LVW คือผนังของท่อน้ำยาง (Scale bar = 1 μm)

2.1.1 สมบัติทั่วไปของน้ำยางสด

น้ำยางสดมีลักษณะเป็นของเหลวสีขาวเหมือนน้ำนม มีสภาพเป็นคอลลอยด์ (colloid dispersion) หรือสารแขวนลอย (Suspension) ความหนาแน่น 0.975-0.980 g/ml มีค่า pH 6.5 – 7.0 น้ำยางสดมักเก็บไว้ได้ไม่นานก็จะเกิดการบูดคล้ายกับน้ำนมเนื่องจากจุลินทรีย์ที่ปะปนในน้ำยางจะย่อยสลายสารอินทรีย์ต่าง ๆในน้ำยางเกิดเป็นกรดและจะบูดเน่า ปกติแล้วน้ำยางสดจะมีปริมาณเนื้อยางแห้งเพียงร้อยละ 30-35 มักนำน้ำยางสดไปแปรรูปเป็นวัตถุดิบยางขั้นต้น เช่น น้ำยางข้น ยางแผ่นรมควัน ยางแผ่นผึ่งแห้ง ยางแท่ง STR XL และยางแท่ง STR 5L ก่อนแล้วจึงนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

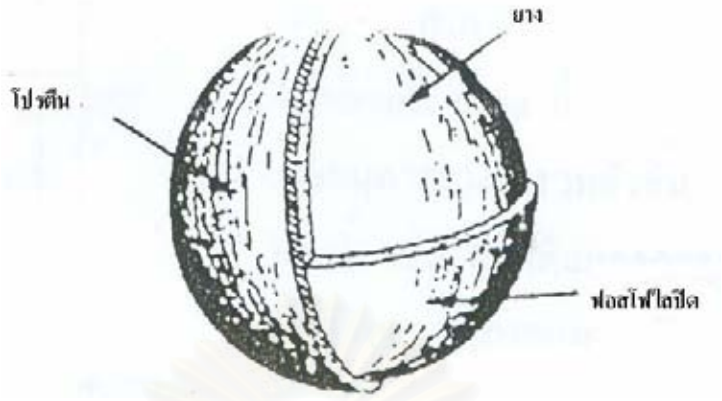
น้ำยางสดมีสภาพเป็นสารแขวนลอยเป็นสารละลายที่ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆดังนี้

- ส่วนที่เป็นเนื้อยางเป็นสารแขวนลอย (Disperse phas) ประกอบด้วยสารประกอบพวกไฮโดรคาร์บอน โดยที่อนุภาคของเนื้อยางมีทั้งที่เป็นทรงกลมและรูปรีคล้ายลูกแพร์ อนุภาคขนาดเล็กมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.02 – 0.03 ไมครอน ไม่ละลายน้ำ อนุภาคยางจะถูกห่อหุ้มด้วยชั้นของสารพวกไขมันและโปรตีน
- ส่วนที่ไม่ใช่ยางหรือส่วนของสารที่เป็นตัวกลาง (Dispersion medium) แบ่งออกเป็น 2 ส่วน

1. ส่วนที่เป็นน้ำหรือเรียกกันว่าเซรัม (Serum)[15]ประกอบด้วยสารต่างๆคือ คาร์โบไฮเดรต พวกแป้งและน้ำตาล รวมทั้งโปรตีนและกรดอะมิโนซึ่งจะอยู่ในส่วนที่เรียกว่า C-serum

2. ลูทอยด์และอนุภาคฟรี-วิสสิ่ง (Frey wising) ลูทอยด์เป็นส่วนที่เป็นของเหลวสีเหลือง เป็นอนุภาคที่มีเยื่อบางห่อหุ้ม มีขนาดใหญ่กว่าอนุภาคยางภายในเยื่อบางมีของเหลวที่เรียกว่า B-serum ที่ประกอบด้วยสารละลายกรด เกลือ โปรตีน น้ำตาลและพอลิฟีนอลออกซิเดสเป็นส่วนที่ทำให้ยางมีสีคล้ำเมื่อสัมผัสกับอากาศ อนุภาคฟรี-วิสสิ่งมีสีเหลืองเข้มและมีขนาดใหญ่กว่าอนุภาคยางและความหนาแน่นมากกว่ายาง ประกอบด้วยไขมันและสารแคโนตินอยด์ซึ่งทำให้มีสีเหลือง

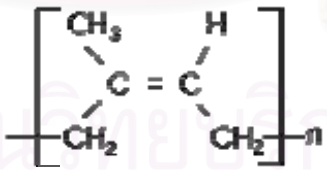
น้ำยางสดมีสภาพเป็นคอลลอยด์เป็นคอลลอยด์ชนิดไฮโดรโซล (hydrosol) คือมีสารที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ แต่มีความพิเศษกว่าไฮโดรโซลทั่ว ๆไปคือมีความก้ำกึ่งระหว่างความเป็นไฮโดรฟิลิก (Hydrophilic คือเกิดเป็นสารละลายได้ง่ายเมื่อมีน้ำเป็นตัวทำละลาย) มีความก้ำกึ่งระหว่างความเป็นไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic คือเป็นลักษณะที่ไม่ยอมรวมกับน้ำและเกิดเป็นสารละลายได้ยากเมื่อมีน้ำเป็นตัวทำละลาย) แต่โดยภาพรวมลักษณะไฮโดรโฟบิกจะเด่นกว่าความเป็นไฮโดรฟิลิก[15]



รูปที่ 2.2 โครงสร้างอนุภาคยาง[16]

น้ำยางถือเป็นสารคอลลอยด์ที่มีความซับซ้อนมาก เนื่องมาจากลักษณะของโพลิเมอร์ ยางธรรมชาติมีชื่อทางเคมี cis-1,4-polyisoprene กล่าวคือ มี isoprene (C_5H_8) โดยที่ n มีค่าตั้งแต่ 15-20,000 โพลิเมอร์ในรูปน้ำยางอาจแบ่งได้ดังนี้[16]

- ไวนีลโพลิเมอร์และพวกโคโพลิเมอร์ (vinyl polymer and copolymer) เช่นน้ำยางสังเคราะห์โพลีไวนิลอซีเตด
- ไดอีนโพลิเมอร์และพวกโคโพลิเมอร์ (diene polymer and copolymer) เช่น โคโพลิเมอร์ของคลอโรพรีนคือน้ำยางจากยางธรรมชาติโพลีไอโซพรีน
- โพลิเมอร์อื่น ๆ เช่น โพลีไอโซบิวทีลีนที่มีส่วนประกอบของโคโพลิเมอร์ไรซ์ไอโซพรีนเล็กน้อย



รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของยางธรรมชาติ

เนื่องจากส่วนประกอบของยางธรรมชาติเป็นไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นยางจึงละลายได้ดีในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น เบนซีน เฮกเซน เป็นต้น โดยทั่วไปยางธรรมชาติมีโครงสร้างการจัดเรียงตัวของโมเลกุลแบบอสัณฐาน (amorphous) แต่ในบางสภาวะโมเลกุลของยางสามารถจัดเรียงตัวค่อนข้างเป็นระเบียบที่อุณหภูมิต่ำหรือเมื่อถูกยืด มันจึงสามารถเกิดผลึก

(crystallize) ได้การเกิดผลึกเนื่องจากอุณหภูมิต่ำ (low temperature crystallization) จะทำให้ยางแข็งมากขึ้น แต่ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้น ยางก็จะอ่อนลงและกลับสู่สภาพเดิม ในขณะที่การเกิดผลึกเนื่องจากการยืดตัว (strain induced crystallization) ทำให้ยางมีสมบัติเชิงกลดี นั่นคือยางจะมีความทนทานต่อแรงดึง (tensile strength) ความทนทานต่อการฉีกขาด (tear resistance) และความทนทานต่อการขัดสี (abrasion resistance) สูง ลักษณะเด่นอีกอย่างของธรรมชาติคือ ความยืดหยุ่น (elasticity) ยางธรรมชาติมีความยืดหยุ่นสูง เมื่อแรงภายนอกที่มากระทำกับมันหมดไป ยางก็จะกลับคืนสู่รูปร่างและขนาดเดิม (หรือใกล้เคียง) อย่างรวดเร็ว ยางธรรมชาติยังมีสมบัติดีเยี่ยมด้านการเหนียวติดกัน (tack) ซึ่งเป็นสมบัติสำคัญของการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องอาศัยการประกอบ (assemble) ชิ้นส่วนต่างๆ เข้าด้วยกัน เช่น ยางรถยนต์ เป็นต้น

2.1.2 โปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ

น้ำยางธรรมชาติมีส่วนประกอบต่างๆทั้งที่ส่วนที่เป็นเนื้อยางและส่วนประกอบอื่นๆที่ไม่ใช่ยางไม่ว่าจะเป็น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และสารอนินทรีย์ เช่น แมกนีเซียม แคลเซียม เหล็ก สังกะสี ทองแดง เป็นต้น โปรตีนซึ่งเป็นหนึ่งในสารที่ไม่ใช่ยางมีอยู่ประมาณ 1.5 % หรือคิดเป็น 30-50 มิลลิกรัม/กรัมยางแห้งโดยที่สารโปรตีนที่มีอยู่ในน้ำยางทั้งหมด (100 %) แบ่งออกเป็น

- โปรตีนที่ห่อหุ้มอยู่ผิวรอบนอกอนุภาคยางมีอยู่ประมาณ 25 %
- โปรตีนที่อยู่ในชั้นน้ำ (serum) มีอยู่ประมาณ 50 %
- โปรตีนที่ปะปนอยู่ในส่วนของ สารลูทอยด์ มีอยู่ประมาณ 25 %

1. โปรตีนที่ห่อหุ้มอยู่ผิวรอบนอกอนุภาคยางในน้ำยางสด

โปรตีนที่อยู่ในส่วนนี้จะเกาะอยู่ที่ผิวของอนุภาคยาง และส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ ที่เหลือ (ประมาณ 1 มิลลิกรัม/ กรัมเนื้อยางแห้ง) สามารถละลายน้ำได้มีน้ำหนักโมเลกุล 14.0 – 66.0 kDa มีค่า Isoelectric point (pI) (เป็นค่า pH ที่ประจุรวมของโมเลกุลโปรตีนมีค่าเป็นศูนย์) เท่ากับ 3.5 – 6.0

2. โปรตีนที่อยู่ในชั้นน้ำ (serum) ของน้ำยางสด

โปรตีนที่อยู่ในชั้นน้ำหรือที่เรียกว่า ซีรั่ม เป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ ประกอบด้วย cationic และ anionic protein มีค่า pI เท่ากับ 3.5 – 9.5 มีขนาดโมเลกุลต่าง ๆ กัน เช่น ที่น้อยกว่า 14 kDa ก็เช่น Hevein ที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 5 kDa pI เท่ากับ 4.7 และที่มากกว่า 100 kDa โปรตีนที่อยู่ในส่วนนี้จะเป็นโปรตีนที่เป็น anionic protein ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 14 และ 66 kDa

3. โปรตีนที่อยู่ในน้ำยางข้น

น้ำยางข้นที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์ยาง ทำจากน้ำยางสดที่มีปริมาณเนื้อยางแห้ง (Dry rubber content : DRC) ประมาณ 25 – 45 % ให้มีปริมาณเนื้อยางแห้งประมาณ 60 % ในขั้นตอนการทำน้ำยางข้น เช่นการใช้เครื่องปั่นแยก จะทำให้โปรตีนยางบางส่วนสูญเสียไปกับซีรัมที่ถูกแยกออกไป ปริมาณของโปรตีนที่อยู่ในน้ำยางก็ลดลงจาก 30- 50 มิลลิกรัม/กรัมเนื้อยางแห้ง เป็น 16 – 26 มิลลิกรัม/กรัมเนื้อยางแห้ง โปรตีนเหล่านี้จะอยู่ทั้งในส่วนที่เป็นเนื้อยางและส่วนที่เป็นซีรัม โปรตีนที่เกาะอยู่ที่อนุภาคยางจะเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 14 และ 24 kDa แต่มีปริมาณลดลงจากน้ำยางสด ส่วนโปรตีนที่อยู่ในซีรัมจะเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 14 kDa โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่านี้ที่อยู่ในซีรัมยางเมื่อเทียบกับที่เป็นน้ำยางสดกับน้ำยางข้นจะมีปริมาณลดลงอย่างชัดเจน

2.1.3 โปรตีนก่อภูมิแพ้ในยางธรรมชาติ

ในจำนวนโปรตีนและพอลิเปปไทด์ทั้งหมดกว่า 200 ชนิดที่มีอยู่ในน้ำยางธรรมชาติ มีอยู่เพียงส่วนน้อยที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ซึ่งโปรตีนก่อภูมิแพ้ในน้ำยางธรรมชาติตามประกาศของ WHO-IUIS (International Union of Immunological Society Allergen Nomenclature Committee) มีดังตารางที่ 2.1 อาการแพ้คือการที่ผู้ป่วยมีปฏิกิริยาตอบสนองของ Immunoglobulin E (IgE) antibody ต่อโปรตีนเหล่านั้น[17]โดยที่รายละเอียดของโปรตีนก่อภูมิแพ้ในยางธรรมชาติมีดังนี้

2.1.3.1 Hev b 1 (rubber elongation factor)

Hev b 1 เป็นโปรตีนก่อภูมิแพ้หลักของผู้ป่วยที่เป็นโรค spina bifida หรือการผิดปกติทางระบบปัสสาวะแต่กำเนิดจะมีความเสี่ยงต่อการแพ้โปรตีนชนิดนี้มากถึง 60 – 80 %

2.1.3.2 Hev b 2 (1,3-beta-glucanase)

เป็นโปรตีนที่มีขนาด 36 kDa และเกิดปฏิกิริยาตอบสนองกับคนไข้ที่มีอาการแพ้โปรตีนจากยางธรรมชาติคิดเป็น 21 % สามารถตรวจหาโปรตีนชนิดนี้ได้โดยวิธี Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ใน 40 % ของการเกิดภาวะภูมิแพ้ยาง และผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า Hev b 2 เป็นสารก่อภูมิแพ้ที่สำคัญที่มีอยู่ในยางธรรมชาติ

2.1.3.3 Hev b 3 (22-27 kDa rubber particle protein)

มีการรายงานว่ามีโปรตีนก่อภูมิแพ้ในยางธรรมชาติที่มีขนาด 22 kDa มาตั้งแต่ปี 1993 โดย Alenius สารก่อภูมิแพ้ตัวนี้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองกับ IgE antibody ของผู้ป่วย Spina bifida ที่เป็นชาวอังกฤษ 83 % และ 67 % ที่เป็นชาวฟินแลนด์ และพบว่าเป็นโปรตีนก่อภูมิแพ้ที่สำคัญมากสำหรับผู้ป่วยโรคนี้

2.1.3.4 Hev b 4 (50 – 57 kDa microhelix protein complex)

โปรตีนก่อภูมิแพ้จากยางธรรมชาติที่มีความเป็นกรดขนาด 50 – 57 kDa นี้ พบว่าจะเกิดปฏิกิริยาตอบสนองกับ IgE antibody ของผู้ป่วยที่มีอาการแพ้ยาง สามารถทดสอบผลการตอบสนองของสารก่อภูมิแพ้ชนิดนี้ได้ด้วยวิธี Radioallergosorbent Test (RAST) Assay และ วิธี ELISA พบว่า Hev b 4 มีปฏิกิริยาตอบสนองกับ IgE antibody ของบุคลากรทางการแพทย์ 23–65 % และ 30–70 % กับผู้ป่วยโรค Spina bifida

2.1.3.5 Hev b 5 (acidic NRL protein)

เป็นโปรตีนที่มีความเป็นกรดมากที่สุดของโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติจากต้นยางเนื่องจากมีกรดกลูตามิก (Glutamic acid) มากและมีความคล้ายคลึงกับโปรตีนก่อภูมิแพ้ชนิด pKIWI501 ในผลกีวี ปฏิกิริยาตอบสนองกับ IgE antibody ของผู้ป่วยโรค Spina bifida 56 % และ 92 % กับบุคลากรทางการแพทย์ ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า Hev b 5 เป็นโปรตีนก่อภูมิแพ้ที่สำคัญสำหรับบุคลากรทางการแพทย์และผู้ป่วย Spina bifida

2.1.3.6 Hev 6.01 (Prohevein) , Hev b 6.02 (Hevein) และ Hev b 6.03 (Prohevein C Domain)

Hevein ถือว่าเป็นโปรตีนที่มีบทบาทมากที่อยู่ในน้ำยางธรรมชาติ พิจารณาจากการที่มีส่วนในการรวมตัวกันของยางและการป้องกันการเติบโตของ fungi ที่แผลของต้นยาง มีปฏิกิริยาตอบสนองกับ IgE antibody ของผู้ป่วยที่เป็นโรคภูมิแพ้ยาง และข้อมูลที่มีการศึกษาที่ผ่านมาชี้ให้เห็นว่า prohevein และ N-terminal hevein domain เป็นโปรตีนก่อภูมิแพ้หลักที่อยู่ในน้ำยางธรรมชาติ

2.1.3.7 Hev b 7 (patatin – like protein)

ได้มีการรายงานว่า IgE antibody ของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ยางมีปฏิกิริยาตอบสนองกับ Hev 7 ที่มีขนาดโมเลกุล 46 kDa ถึง 22% เป็นโปรตีนที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน patatin ที่อยู่ในมันฝรั่ง

2.1.3.8 Hev b 8 (profilin)

พบในพืชหลายชนิดสามารถระบุตัวได้เนื่องจากการที่เป็น IgE binding protein พบว่า profilin ในน้ำยางธรรมชาติจะเกาะเกี่ยวกับ IgE ที่อยู่ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ยางถึง 11% Hev b 8 เป็น minor NRL allergen

ตารางที่ 2.1 โปรตีนก่อภูมิแพ้ในน้ำยางธรรมชาติ

Species name	**Allergen name**	**Biochemical id or obsolete name**	**MW kDa SDS-PAGE**	**C: cDNA P: peptide sequence**	**Reference and/or accession number**
Hevea brasiliensis					
rubber (latex)	Hev b 1	elongation factor	58	P	123, 124
	Hev b 2	1,3-glucanase	34/36	C	125
	Hev b 3		24	P	126, 127
	Hev b 4	component of	100-	P	128
		microhelix complex	115		
	Hev b 5		16	C	U42640
	Hev b 6.01	hevein precursor	20	C	M36986, p02877
	Hev b 6.02	hevein	5	C	M36986, p02877
	Hev b 6.03	C-terminal fragment	14	C	M36986, p02877
	Hev b 7.01	hom: patatin from B-serum	42	C	U80598
	Hev b 7.02	hom: patatin from C-serum	44	C	AJ223038
	Hev b 8	profilin	14	C	see list of isoallergens
	Hev b 9	enolase	51	C	AJ132580
	Hev b 10	Mn superoxide dismut.	26	C	see list of isoallergens
	Hev b 11	class 1 chitinase		C	see list of isoallergens
	Hev b 12	lipid transfer protein	9.3	C	AY057860
	Hev b 13	esterase	42	P	P83269

ที่มา: http://www.allergen.org/List.htm **Allergen Nomenclature** International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature SubCommittee List of allergens as of June 02, 2005

2.1.3.9 Hev b 9 (enolase)

IgE antibody ของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ยางมีปฏิกิริยาตอบสนองกับ Hev 9 15% เป็น minor NRL allergen

2.1.3.10 Hev b 10 (manganese superoxide dismutase : MnSOD)

มีกรดอะมิโนอยู่ 206 ตัว เป็นกลุ่ม “Latex mould” ของสารก่อภูมิแพ้ในยางธรรมชาติ

2.1.3.11 Hev b 11 (class 1 chitinase)

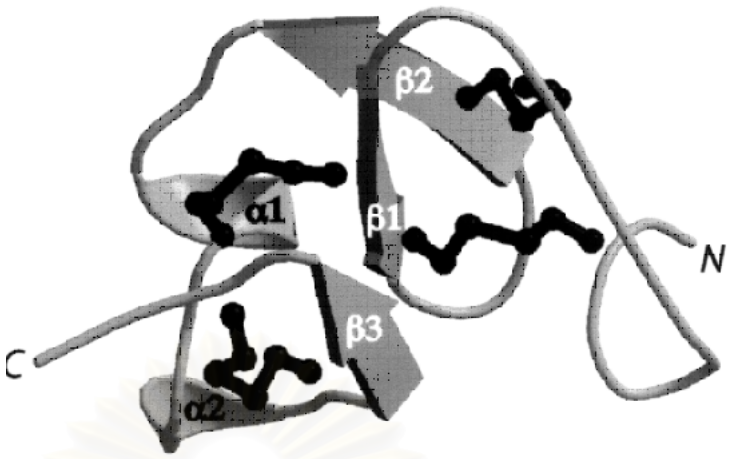
ถึงแม้ว่าจะมีชื่ออยู่ในประกาศโปรตีนก่อภูมิแพ้ในยางธรรมชาติ แต่ยังไม่มีข้อมูลที่จะยืนยันในตอนนี้ว่ามีความสามารถในการก่อให้เกิดอาการแพ้อย่างไร

จากข้อมูลข้างต้นจึงสรุปได้ว่าโปรตีนก่อภูมิแพ้หลักที่มีอยู่ในน้ำยางธรรมชาติ มีดังนี้

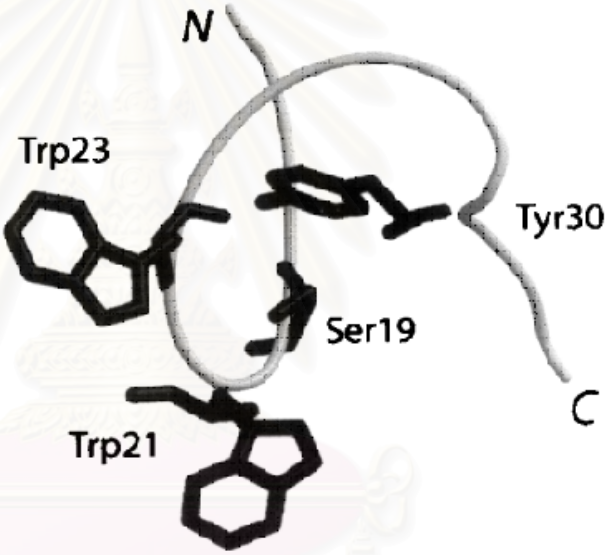
- Adult patients : Hev b 6.01, Hev b 6.02, Hev b 5 และ Hev b 2
- Children with spina bifida : Hev b 1 และ Hev b 3

การทดสอบโปรตีนทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติโดยทั่วไปจะใช้วิธี Modified Lowry ส่วนการทดสอบโปรตีนก่อภูมิแพ้ส่วนใหญ่จะใช้วิธี Skin prick test หรือ ELISA

ตัวอย่างลักษณะของโปรตีนก่อภูมิแพ้ในยางธรรมชาติ คือ Hev b 6.02 (Hevein) เป็นหนึ่งในโปรตีนซึ่งทำให้เกิดโรคภูมิแพ้ (Allergenic Protein) หลักที่มีอยู่ในน้ำยางธรรมชาติ และพบในผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ มีโครงสร้างที่แสดงถึงความเป็น Allergenicity และโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติจะทำให้เกิดโรคภูมิแพ้ชนิดที่ 1 (Type I Allergic reaction) Hevein เป็น lectin like Protein (Lectin คือสารพิษที่พืชสร้างขึ้นตามธรรมชาติเพื่อป้องกันพืชจากแมลงต่าง ๆ) จากการใช้ X ray technique ในการศึกษาโครงสร้างในส่วนที่เรียกว่า Carbohydrate - binding region ของ Hevein พบว่ามีพื้นมีเล็ก ๆ อยู่ 4 จุดในโครงสร้างโมเลกุล Hevein ดังรูปที่ 2.4 ส่วนที่สนใจคือ Carbohydrate – combinding site ซึ่งเป็นกลุ่มของ aromatic (aromatic patch) ซึ่งมีอยู่ 3 ตัวคือ Trp^{21}, Trp^{23} และ Tyr^{30} ดังรูปที่ 2.5 ที่ล้อมรอบด้วยสายโซ่ (Side chain)ของ Glu^{1}, Gln^{6}, Gln^{20} และ Glu^{29} และพบโมเลกุลของ MPD (m – Phenylene diamine) 2 ตัวที่บริเวณนี้ ซึ่งจะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ residue อื่น ๆ ดังรูปที่ 2.6 MPD^{101} (O2 MPD-NHE1 Trp^{21}) และ MPD^{102} (O4 MPD-OH Tyr^{30}) อีกด้านจะเป็นสายโซ่สำหรับ Residue 6 ตัวนี้คือ Glu^{1}, Leu^{11}, Pro^{13}, Ser^{26}, Glu^{29} และ Pro^{33}

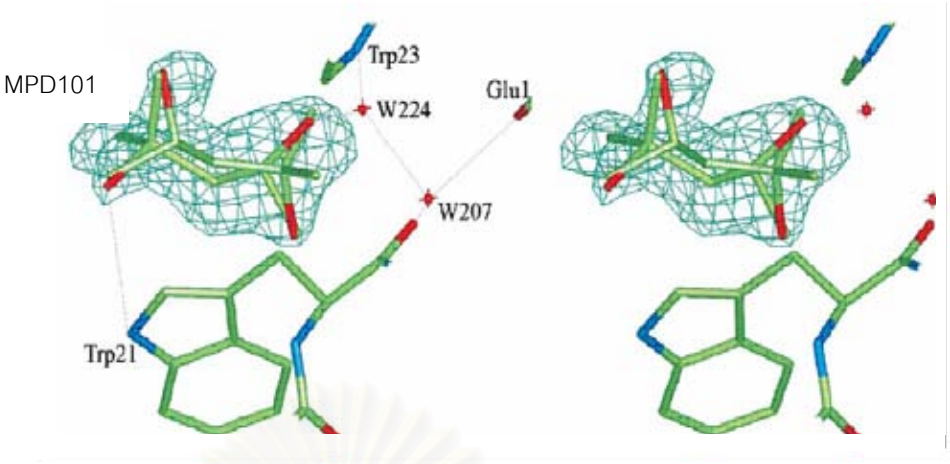


รูปที่ 2.4 แสดงโครงสร้างโดยรวมของ Hevein[18]



รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของ Hevein และส่วนที่เป็น Carbohydrate- binding region ที่เป็นวง Aromatic พวก Trp^{21}, Trp^{23} และ Tyr^{30} [18]

จากการวิเคราะห์โครงสร้างของ Hevein ในสารละลายพบว่าส่วนที่เป็น Sugar binding site จะเต็มไปด้วยโมเลกุลของ MPD และน้ำ 34 – 39 โมเลกุลจะพบอยู่ในบริเวณที่เป็น polar residue และมีอีก 5 ตัวที่ฝังตัวอยู่ในโครงสร้างโมเลกุล protein binding side ของสารก่อภูมิแพ้นั้นมีความเฉพาะเจาะจง โดยที่ Hevein จะเชื่อมต่อเฉพาะกับ Carbohydrate ส่วน allergen จากพืชอื่นเช่น Hev b 8 และ Bet v 2 จะเชื่อมต่อเฉพาะกับ actin[19]



รูปที่ 2.6 แสดงโมเลกุลของ MPD[101] ใน Hevein ที่เชื่อมต่อกับ Residue อื่น ๆ ด้วยพันธะไฮโดรเจน (เส้นประ) เช่น น้ำ (W)[19]

เมื่อพิจารณาจากตัวอย่างโปรตีนก่อภูมิแพ้ในยางธรรมชาติ Hevein จะเห็นว่าการที่โปรตีนพวกนี้มีส่วนที่เรียกว่า Carbohydrate binding site ซึ่งเป็นจุดที่สามารถนำมาใช้ในการเกาะเกี่ยวกับสารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่เติมลงในน้ำยางธรรมชาติได้ และจากข้อสันนิษฐานนี้จึงนำมาซึ่งการลดโปรตีนก่อภูมิแพ้ด้วยการเติมสารประเภทคาร์โบไฮเดรตเพื่อให้เกิดการเกาะเกี่ยวกันระหว่างสารประเภทคาร์โบไฮเดรตกับโปรตีนก่อภูมิแพ้ที่มีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกัน จึงนำมาซึ่งวิทยานิพนธ์นี้ โดยสารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ใช้คือ เพ็คติน (pectin)

2.2 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเพ็คติน

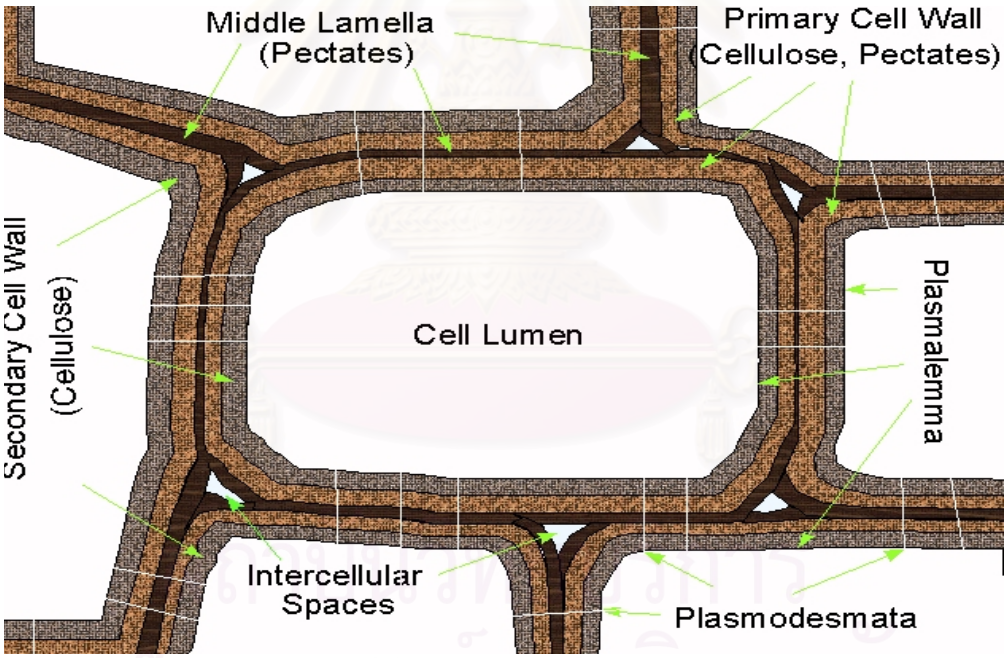
เพ็คตินเป็นพอลิแซคคาไลด์สกัดได้จากผนังเซลล์ของพืช ถูกค้นพบในปี 1790 โดย Vauquelin และในปี 1825 Henry Braconnot ได้ค้นพบความสามารถในการทำให้เกิดเจล (geleification) ของเพ็คติน และได้เรียกสารชนิดนี้ว่า “เพ็คติน” เพ็คตินมาจากคำในภาษากรีกที่มีความหมายว่า congeal คือ การเปลี่ยนจากนิ่มหรือเหลวเป็นของแข็ง หรือทำให้ข้นแข็ง[20]

เพ็คตินเป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรต ใช้ในการทำแยมผลไม้, เยลลี่, น้ำผลไม้, ขนมหวานและผลิตภัณฑ์พวกนมเปรี้ยวและโยเกิร์ต โดยแบ่งการใช้งานตามชนิดของเพ็คติน ดังนี้

- HM pectin (high methoxyl pectin) : ใช้ในการทำเยลลี่ที่มีน้ำตาลสูง (high-sugar jellies), แยม (jams), มาร์มาเลด (marmalades), นมเปรี้ยวและโยเกิร์ต
- LM pectin (low methoxyl pectins) : เยลลี่ที่เป็นอาหารควบคุมน้ำหนัก (dietetic jellies), แยม (jams) และมาร์มาเลด (marmalades)

เพ็คตินที่ใช้ในทางการค้าจะเป็นกาแลคทูโลโนไกลแคน (galacturoglycan) ที่มีส่วนประกอบของกลุ่ม methyl ester แต่เพ็คตินในธรรมชาติจะมีโครงสร้างที่ซับซ้อนกว่า ในผักและผลไม้มีปริมาณของเพ็คตินสูงที่สุด คือประมาณ 0.5-4 % ของน้ำหนักสด เพ็คตินเป็นสารประกอบที่ทำหน้าที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของเซลล์พืช อยู่ในบริเวณชั้น middle lamella ทำหน้าที่ยึดเหนี่ยวเซลล์เข้าด้วยกันโดยจะจับกับ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และไกลโคโปรตีนในผนังเซลล์พืช ผนังเซลล์ของพืชมีองค์ประกอบดังนี้

- Middle lamella เป็นผนังเซลล์ชั้นแรกที่ก่อตัวขึ้นระหว่างที่เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ ประกอบด้วยสารประกอบเพคติก (pectic compound) และโปรตีน
- Primary cell wall ผนังเซลล์ชั้นนี้สร้างขึ้นมาหลังจาก middle lamella ประกอบด้วยสารประกอบเพคติก (pectic compound), hemicellulose และ glycoprotein
- Secondary cell wall ถูกสร้างขึ้นเมื่อเซลล์ขยายตัวเต็มที่แล้ว จะประกอบด้วยเซลลูโลส, hemicellulose และ lignin



รูปที่2.7 ส่วนประกอบต่างๆของผนังเซลล์พืช

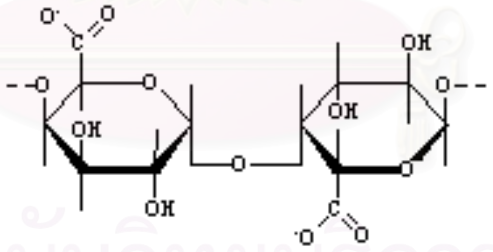
จะเห็นว่าสารประกอบเพคติกจะอยู่ในส่วนประกอบของผนังเซลล์ของพืช ทั้งใน middle lamella และ primary cell wall ซึ่งจะมีรูปแบบแตกต่างกันไปในแต่ละช่วงเวลาของการเจริญเติบโตของพืช

- สารประกอบเพคติกที่ปรากฏในตอนแรกของการเจริญเติบโตของพืชจะเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ คือ โปรโตเพ็คติน (protopectin) ดังนั้นเราจะพบโปรโตเพ็คตินมากในผลไม้ดิบหรือเนื้อเยื่อพืชที่กำลังเจริญเติบโต
- เมื่อผลไม้เริ่มสุกจะมีเอนไซม์โปรโตเพคติเนส (protopectinase) ซึ่งจะเปลี่ยนโปรโตเพ็คตินให้เป็นเพ็คตินที่ละลายน้ำได้ เซลล์เนื้อเยื่อของพืชก็จะหลวมตัวทำให้เนื้อเยื่อพืชอ่อนตัวลง ซึ่งก็คือการสุกของผลไม้
- เมื่อผลไม้สุกมากขึ้นเอนไซม์ในพืชก็จะย่อยสลายเพ็คตินทำให้ได้เมทานอลและกรดเพคติก

2.2.1สารประกอบเพคติก

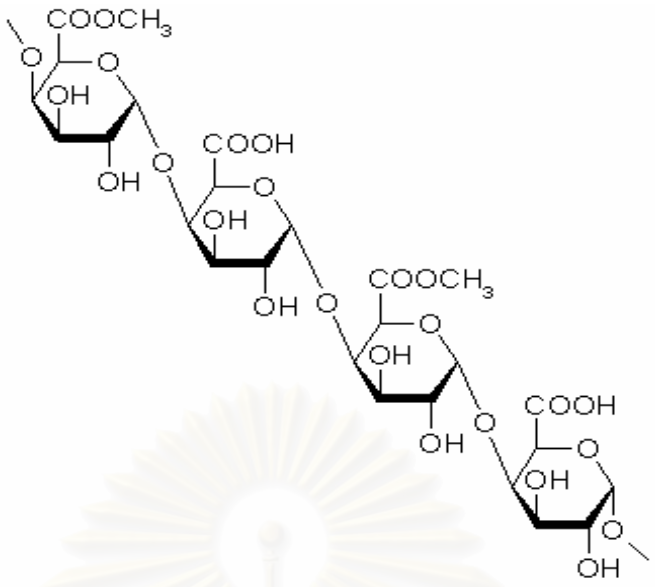
1. กรดเพคติก (pectic acid)

เป็นโพลีเมอร์ที่ประกอบด้วยกรดกาแลคทูโลนิก (galacturonic acid) ประมาณ 100 โมเลกุล โครงสร้างเป็นสายโซ่ตรงของ α-(1-4)- galacturonic acid เป็นส่วนประกอบหลักใน middle lamella แต่ก็พบบ้างใน primary cell wall เป็นสารที่ชอบน้ำ(hydrophilic)และละลายน้ำได้ (soluble) และทำปฏิกิริยากับน้ำได้ดี จะฟอร์มตัวเป็นเกลือและสะพานเกลือกับ Ca^{2+} และ Mg^{2+} เป็นเจลที่ไม่ละลายน้ำเนื่องจากหมู่คาร์บอกซิลในโมเลกุลของกรดกาแลคทูโลนิกเป็นกรดอ่อนและจะเป็นประจุลบหรือไม่ก็อยู่ในสถานะที่ไม่มีประจุ



รูปที่ 2 .8โมเลกุลของกรดเพคติก

2. Pectinic acid มีโครงสร้างเหมือน pectic acid แต่มีบาง residue ที่ถูก methylate[22]

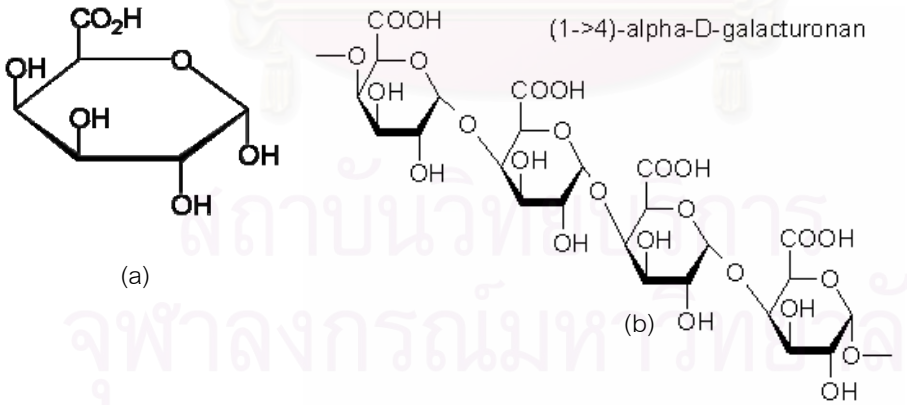


รูปที่ 2.9 โมเลกุลของ Pectinic acid

3.เพ็คติน

โครงสร้างของเพ็คติน

เพ็คตินเป็นโพลีเมอร์ชีวภาพ (Biopolymer) ประกอบด้วยสายโซ่ α-(1-4)- link - galacturonic acid ประมาณ 200 – 3000 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-(1,4) glycosidic เป็นสายโซ่ที่เป็นเหมือนกระดูกสันหลัง (backbone) ของโมเลกุลเพ็คติน ดังรูปที่ 4

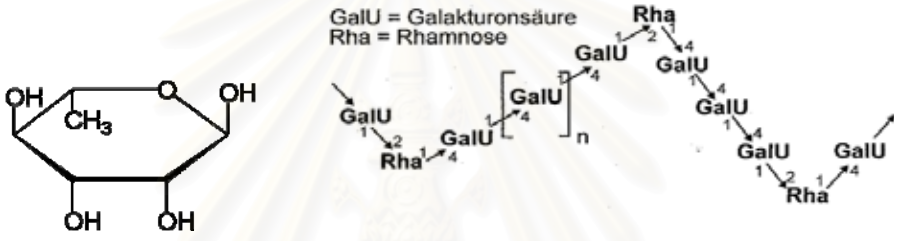


รูปที่ 2.10 (a) สูตรโครงสร้างของกรดกาแลคทูโลนิก (Galacturonic acid) และ (b) โครงสร้างของเพ็คตินที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของกรดกาแลคทูโลนิก[21]

สายโซ่ในส่วนนี้หน่วยของ galacturonic acid อาจถูกแทนที่ด้วย (1-2) - linked L-rhamnose ซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีอยู่ในธรรมชาติ การที่มี rhamnose เข้ามาแทรกในโมเลกุลให้เกิดพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างซิกแซก ดังรูปที่ 2.11 ในบริเวณที่มีน้ำตาลรามโนสอยู่นี้อาจมีสายโซ่ของน้ำตาล

โมเลกุลเดี่ยวตัวอื่น เช่น D-galactose, L-arabinose, D-xylose และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอื่น ๆเล็กน้อย เกาะเกี่ยวอยู่กับสายโซ่หลักแล้วแต่วัตถุดิบที่ใช้สกัดเพ็คติน โมเลกุลของเพ็คตินบริเวณที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเกาะเกี่ยวอยู่มากเรียก “hairy regions” ส่วนบริเวณที่มีสายโซ่ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเกาะอยู่น้อยจะเรียกว่า “smooth region” ด้วยเหตุนี้เราสามารถแบ่งชนิดของเพ็คตินออกเป็นพอลิแซคคาไลด์ 3 ชนิด ดังนี้

1.Homogalacturonan เป็นพอลิแซคคาไลด์ที่ประกอบด้วย หน่วยของ D - galacturonic acid monosaccharide ต่อกันเป็นสายยาว



(a) (b)

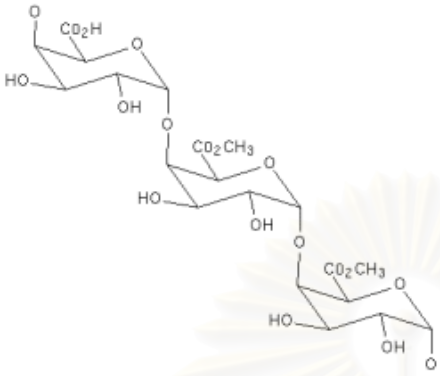
รูปที่ 2.11 (a) สูตรโครงสร้างของน้ำตาลรามโนส (Rhamnose) และ (b) การเกิดโครงสร้างซิกแซกของโมเลกุลเพ็คตินเนื่องจากการเข้ามาแทรกของน้ำตาลรามโนส[21][22]

2. Rhamnogalacturonan I เป็นพอลิแซคคาไลด์ที่ประกอบด้วย หน่วยของ D-galacturonic acid ต่อกันเป็นสายโซ่และมีหน่วยของ L- rhamnose เข้ามาแทรกพร้อมทั้งกิ่งก้านที่เป็นสายโซ่ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็น L- arabinose และ D - galactose 1- 20 หน่วย[23]

3.Rhamnogalacturonan II เป็นพอลิแซคคาไลด์ซึ่งมีกิ่งก้านซับซ้อนและมีสายโซ่ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจำนวนมาก เช่น D - xylose, L- fucose, D-glucuronic acid, D - apiose, 3 – deoxy - D-*manno*-2-octulosonic acid (Kdo) และ 3-deoxy-D-*lyxo*-2-heptulosonic acid (Dha) เกาะอยู่กับสายโซ่ของ poly-α-(1$\rightarrow$4)-D-galacturonic acid[23]

ในการสกัดเพ็คตินส่วนที่เป็น hairy region จะถูกทำลายที่เหลือคือ smooth region ที่มีหน่วยของ Galacturonic acid เป็นส่วนใหญ่และมีหน่วยของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอีกเล็กน้อยที่เกาะอยู่กับสายโซ่หลัก [24]

หมู่ carboxyl ของ galacturonic acid 80% ในโมเลกุลของเพ็คตินจะถูก esterified หรือแทนที่ด้วยหมู่เมธอกซิล (methoxyl ; - $COOCH_3$) ด้วยmethanol แต่ในทางธรรมชาติเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่มีอยู่ในเซลล์พืช หรือเอนไซม์จากเชื้อยีสต์และเชื้อรา ดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 โครงสร้างของเพ็คตินที่เกิดการแทนที่ด้วยหมู่ methoxyl ในโมเลกุล

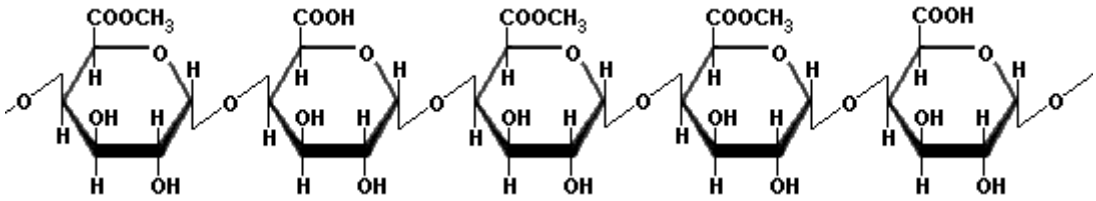
การแทนที่ของหมู่คาร์บอกซิลในเพ็คติน (Carboxyl Substitution in Pectin) ดูจากค่า Degree of Methoxylation (DM) [25]

Protopectin	16%
Normal pectin	8%
Low Methoxyl Pectin	2-4%

ค่าที่แสดงจำนวนหมู่คาร์บอกซิลที่ถูก esterified ด้วยเมทานอลคือ Degree of Esterification (DE) โดยที่จะคำนวนเป็นร้อยละของส่วนที่เป็น ester ต่อจำนวนหน่วยของกรดกาแลคทูโลนิกที่มีอยู่ทั้งหมด

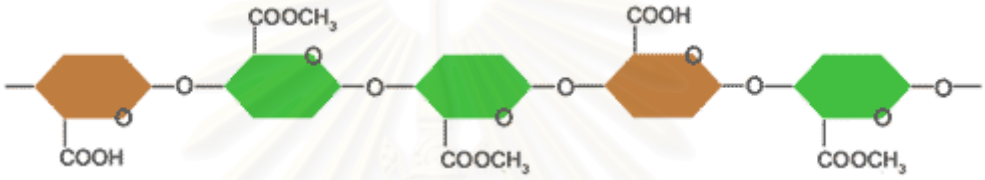
Protopectin	100%
Normal Pectin	50%
Low Methoxyl Pectin	12.5-25%

ตัวอย่างดังรูปที่ 2.13 เป็นโครงสร้างของเพ็คตินที่หมู่คาร์บอกซิลถูก esterified เป็น methoxyl (-$COOCH_3$) 3 ตัว ในทุก ๆ 2 ตัวของ หมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ดังนั้นเพ็คตินโมเลกุลนี้มีค่า Degree of esterification (DE) 60% โดยปกติจะเรียก เพ็คติน DE-60



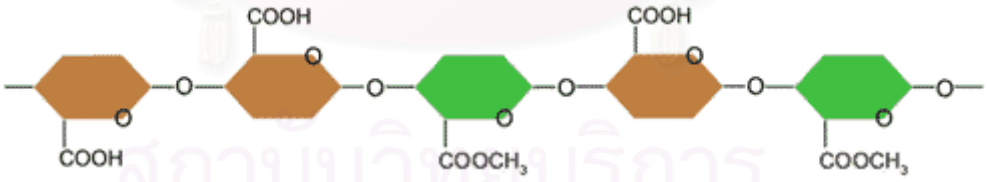
รูปที่ 2.13 แสดงโครงสร้างของเพ็คตินที่หมู่คาร์บอกซิลถูก esterified

- ถ้า % DE สูงกว่า 50 % จะเรียกเพ็คตินนั้นว่าเพ็คตินกลุ่มที่มีเมธอกซิล(– $COOCH_3$) สูงมี high methoxyl pectin (HM pectin) ดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 สูตรโครงสร้างของ HM pectin[24]

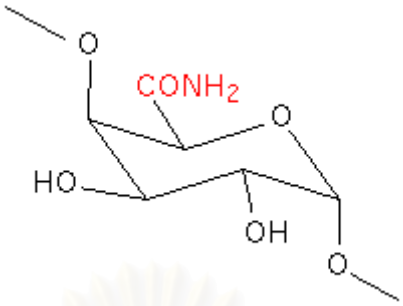
- ถ้า % DE ต่ำกว่า 50 % จะเรียกเพ็คตินนั้นว่าเพ็คตินกลุ่มที่มีเมธอกซิล(– $COOCH_3$) ต่ำ low methoxyl pectin (LM pectin) สามารถเกิดเจลได้ที่อุณหภูมิห้อง โดยต้องมีไอออนของโลหะบางชนิดช่วยในการเกิดเจล เช่น Ca^{2+} โดยใช้ปริมาณน้ำตาลเพียงเล็กน้อย หรือไม่ใช้เลย



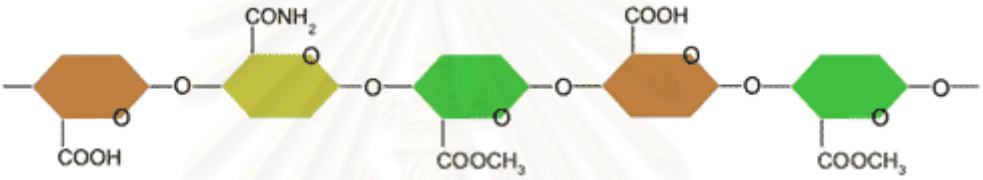
รูปที่ 2.15 สูตรโครงสร้างของ LM pectin[24]

เพ็คตินทางการค้าจะมีปริมาณหมู่กาแลคทูโรนิกประมาณ 75% โดยมีการแทนที่ด้วยหมู่เอสเทอร์ ระหว่าง 30-80% หากหมู่คาร์บอกซิล (-$COOCH_3$)ของ Galacturonic acid ถูกแทนที่ด้วยหมู่เอไมด์ (-NH_2) เนื่องจาก ammonia processing กลายเป็น carboxylic acid amide เพ็คตินที่ได้จะเรียกว่า เอมิเดดเพ็คติน (amidated pectin) ซึ่งการแทนที่นี้อาจเกิดได้สูงสุด 80% ดูได้จากค่า Degree of amidation (DA) เป็นค่าที่แสดงถึงเปอร์เซนต์ของหมู่คาร์บอกซิลที่เปลี่ยนรูปเป็น

amide โดย โดยที่ Amidated LM pectins จะมีค่า DA ประมาณ 15-25% และ Amidated pectins จะมีความไวต่อ Ca^{+2} เป็นพิเศษ



รูปที่ 2.16 การแทนที่หมู่คาร์บอกซิลด้วยหมู่เอไมด์ในโครงสร้างของเพ็คติน[24]



รูปที่ 2.17 สูตรโครงสร้างของ Amidated pectin

ปริมาณการถูกเอสเทอริไฟด์ของหมู่กาแลคทูโรนิกในโมเลกุลของเพ็คตินนั้นเกิดขึ้นได้หลายระดับ ตัวอย่างเช่นเพ็คตินที่มีค่า DE 50% คือเพ็คตินที่มีหมู่เมธิลในโมเลกุลของกาแลคทูโรนิคที่เป็นโครงสร้าง 50% ของจำนวนทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่า แม้เพ็คตินที่มีค่า DE เท่ากันแต่อาจมีการจัดเรียงตัวแตกต่างกันได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับกรรมวิธีในการสกัด วิธีและเวลาในการเอสเทอริไฟด์ ชนิดของพืช และตำแหน่งของเซลล์ที่นำมาสกัดจะทำให้เพ็คตินที่ได้มีคุณสมบัติต่างกัน

<u>สมบัติของเพ็คติน</u>

1.การละลาย

เพ็คตินสามารถละลายในน้ำเย็น แต่ละลายค่อนข้างช้าเนื่องจากผงเพ็คตินจับตัวกันเป็นก้อน เพ็คตินจะสามารถละลายได้ดีในน้ำอุ่น หรือน้ำที่มีอุณหภูมิมากว่า 60 °C ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) เช่น แอลกอฮอล์ หรือ อะซีโตน

2.ความหนืดของเพ็คติน

ในสารละลายพอลิเมอร์จะมีความหนืด เนื่องจากการที่สารละลายพอลิเมอร์เคลื่อนที่ซึ่งช้ามากกว่าการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย การเคลื่อนที่อย่างช้าๆของพอลิเมอร์ทำให้สารละลายทั้งหมดเคลื่อนที่ช้าตามไปด้วย ส่งผลให้สารละลายทั้งหมดมีความหนืดมากขึ้น และ

นอกจากนี้พอลิเมอร์ยังไปทำให้แรงภายในโมเลกุล (intermolecular forces) ต่ำลงไปด้วย ถ้ามีการกระทบกันเกิดขึ้นในอันตรกิริยาอันดับสอง (secondary interaction) ระหว่างพอลิเมอร์และโมเลกุลเล็กๆของตัวทำละลายจะไปผูกติดกับพอลิเมอร์ได้ ทำให้โมเลกุลของตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปกับพอลิเมอร์ด้วยความเร็วที่ช้าลงเช่นเดียวกันกับโมเลกุลของพอลิเมอร์[26]

โดยปกติสารละลายเพ็คตินจะมีความหนืดต่ำเมื่อเทียบกับสารประเภทเดียวกัน ความหนืดของเพ็คตินจะสูงขึ้นเมื่อมีการปรากฏขึ้นของ Ca^{2+} หรือไอออน 2+ ตัวอื่นๆและ LM pectin จะเกิดเป็นเจลเมื่อมีปริมาณของแคลเซียมมากพอ

ค่า pH ก็มีผลต่อความหนืดของสารละลายเพ็คติน เมื่อไม่มีแคลเซียมไอออนและ pH สูงอยู่ความหนืดของเพ็คตินจะลดลง หรืออาจบอกได้ว่าความหนืดของเพ็คตินจะสูงขึ้นเมื่อค่า pH ลดลง

การวัดความหนืดของสารละลายเพ็คตินทำให้เราสามารถหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของเพ็คตินได้โดยสารละลายต้องอยู่ในสภาพที่ไม่มีแคลเซียมไอออนและpH คงที่ เช่น 4 เพ็คตินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง จะทำให้สารละลายมีความหนืดสูงขึ้นด้วยเนื่องจากเมื่อพอลิเมอร์มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะทำให้พอลิเมอร์มี hydrodynamic volume โตขึ้นด้วย นั่นเป็นเพราะปริมาตรของสารละลายที่ขดม้วนตัวอยู่ในสารละลายมีขนาดใหญ่ขึ้น โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะมี secondary force ที่แข็งแรง ทำให้สามารถดึงเอาโมเลกุลของตัวทำละลายเข้ามารวมกับพอลิเมอร์ทำให้การเคลื่อนที่ของโมเลกุลตัวทำละลายช้าลง ดังนั้นเราจะสามารถทราบค่าน้ำหนักโมเลกุลของสารละลายได้ด้วยการวัดความหนืดของสารละลาย[26]

3.การทำปฏิกิริยากับ Hydrocolloid อื่นๆที่มีขั่วทางไฟฟ้า

เพ็คตินเป็นกรดโพลีกาแลคทูโลนิกและเป็นโมเลกุลที่เป็นสายโซ่ที่มีประจุลบที่ pH เป็นกลาง โดยที่ค่า pK- value ของเพ็คตินประมาณ 3.5 เพ็คตินจะเปลี่ยนเป็นประจุลบเมื่อทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน ที่ pH ต่ำกว่า isoelectric pH เพ็คตินจะเป็นเจลที่ pH ต่ำแต่สามารถยับยั้งการเกิดเจลของเพ็คตินได้ด้วยการเติมเกลือลงไป เมื่อเราเติมเพ็คตินลงในนมที่ pH ของน้ำนมคือ 6.6 จะเกิดการแยกชั้นขึ้นเป็นสองชั้น ที่ pH ต่ำเพ็คตินจะสามารถรวมตัวเข้ากับอนุภาคเคซีน (casein) ได้ทำให้เราสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ประเภทนมเปรี้ยวหรือโยเกิร์ตได้ แม้ว่าต้องใช้ความร้อนในการยืดอายุของผลิตภัณฑ์ แต่ในกรณีที่ไม่มีเพ็คตินโปรตีนในนมก็จะเกิดการรวมตัวกันจนเกิดการแยกชั้นของน้ำนม[27]

4.การเกิดเจล

การเกิดเจลของเพ็คตินเมื่อระบบมีการละลายและตกตะกอนสมบูรณ์ สายโซ่โมเลกุลที่ต่อกันอยู่เกิด crystallization ฟอร์มตัวกันเป็นโครงข่าย 3 มิติกับน้ำ, น้ำตาลและตัวละลายอื่น การฟอร์มตัวเป็นเจลของเพ็คตินจะเกิดขึ้นเมื่อเพ็คตินอยู่ในสถานะที่ละลายได้สมบูรณ์เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมีจะเป็นการลดการละลายได้ของเพ็คติน

รูปที่ 2.18 โมเดลของการที่โมเลกุลเกิดโครงข่ายสามมิติในการเป็นเจลของเพ็คติน บริเวณที่แรเงาคือบริเวณที่เกิด crystallization[27]

การเกิดเจลของสารเพคติก เพ็คตินจะฟอร์มตัวเป็นเยลลี่หรือแยม เมื่อมีน้ำตาลหรือกรด หรือกับ Ca^{2+} เพ็คตินจะเกิดเจลเมื่อมีกรดและน้ำตาล แต่ LM- pectin ไม่จำเป็นต้องมีน้ำตาลแต่ต้องมีแคลเซียมไอออนิก ส่วนกรดเพคติกจะฟอร์มตัวเป็น calcium pectate ที่ไม่ละลายน้ำ ปฏิกิริยานี้จะทำให้เนื้อเยื่อพืชรักษาสภาพไว้ได้ เช่น มะเขือเทศบรรจุกระป๋อง

2.2.2 การสกัดเพ็คติน

การสกัดเพ็คตินนั้นมีวิธีการสกัดและสารเคมีที่ใช้สกัดต่างๆกันซึ่งมีผลต่อเพ็คตินที่สกัดออกมาได้ เช่น

1.การสกัดด้วยน้ำ ไม่ว่าจะร้อนหรือเย็น หรือจะใช้สารละลายบัฟเฟอร์ เพ็คตินที่สกัดได้จะเป็นเพ็คตินที่ละลายน้ำได้ (water solution pectin)

2. กากที่ได้จากการสกัดข้างต้นเมื่อนำมาสกัดโดยใส่สารเร่งปฏิกิริยา (Chelating agent)ไม่ว่าจะร้อนหรือเย็น เช่น EDTA, ammonium oxalate เพ็คตินที่สกัดได้เป็น chelating soluble pectin

3. เมื่อนำกากจากจากข้อ 2 มาสกัดต่อด้วย 0.05 M sodium carbinate ไม่ว่าจะเย็นหรืออุณหภูมิห้อง เพ็คตินที่ได้จะเรียกว่า Carbonate-Soluble Pectin

4. นำกากจากข้อ 3 มาสกัดต่อด้วย Sodium Chloride หรือ acitic acid mixture เพ็คตินที่สกัดได้จะเรียก Pectin bound by oxidative coupling

5. กากที่ได้หลังจากสกัดเพ็คตินด้วย Chelating Agent แล้ว นำกากนั้นมาสกัดต่อด้วยกรดที่อุณหภูมิสูง เพ็คตินที่ได้จากการสกัดนี้จะเรียก Acid soluble pectin

6. นำกากที่สกัดได้ในข้อ 6 มาสกัดต่อที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสด้วย Sodium hydroxide จะเรียกเพ็คตินที่ได้จากการสกัดครั้งนี้ว่า Alkaline soluble pectin

2.2.2.1 การสกัดเพ็คตินจากวัตถุดิบต่าง ๆ

สกัดเพ็คตินจากเปลือกส้มวอชิงตัน [28]

เตรียมวัตถุดิบด้วยการดัดแปลงจากวิธีของ phatak โดยที่ใช้ เปลือกส้มวอชิงตันตากแห้ง (sun Dried) แล้วบดให้มีขนาด 50 mesh และสกัดน้ำมันออกโดยใช้ ปิโตรเลียมอีเทอร์และการตากแห้ง จากนั้นต้มใน water bath อุณหภูมิ 97 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อยับยั้ง pectic enzyme และเป็นการ Decolour และเอา carotenoid ออกโดยการแช่ผงผิวส้มเอาไว้ในน้ำจากนั้นค่อย ๆรินน้ำออก แล้วเปลี่ยนน้ำอีกแล้วรินออกจนกว่าน้ำจะไม่มีสี จากนั้นกรองผ่าน suction filter จากนั้นทำให้แห้งด้วยอุณหภูมิ 50 องศา และบดกรองผ่าน sieve ขนาด 50 mesh แล้วนำไปเข้าสู่ขั้นตอนการสกัดต่อไป

ทำการสกัดโดยใช้ 3 วิธี คือ

- กรดไฮโดรคลอลิก
- ammonium oxalate
- EDTA (Disodium ethylenediamine tetraacetic acid)

วิธีการคือ

1.1 การสกัดด้วยไฮโดรคลอริก

1.1.1 นำเปลือกส้มที่สกัดไขมันและบดแล้วมา 10 กรัม

1.1.2 เติม 0.003 HCl 250 ml (pH = 2.5) ต้มใน water bath 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

1.2 สกัดด้วย ammonium oxalate

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2.1 นำเปลือกส้มที่สกัดไขมันและบดแล้วมา 10 กรัม

1.2.2 เติม 0.25 % AO (w/v) 250 ml (pH = 3.5) ต้มใน water bath 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

1.3 สกัดด้วย EDTA

1.3.1 นำเปลือกส้มที่สกัดไขมันและบดแล้วมา 10 กรัม

1.3.2 เติม 0.01 N HCl 125 ml และ 0.5 % EDTA 125 ml ต้มใน water bath 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

หลังจากต้มด้วย solvent ต่าง ๆแล้วก็กรอง

↓

ทิ้งกาก

↓

เติม 0.1 M Na_3PO_4 เพื่อปรับ pH = 7.5 และเติม protease (เอนไซม์ย่อยโปรตีน) 5 mg แล้วอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 1 คืน

↓

ทิ้งกาก

↓

ตกตะกอนด้วยเอทานอล 95 % ปริมาตรเป็น 2 เท่าของปริมาตรสารตัวอย่าง

↓

กรอง

↓

นำตะกอนที่กรองได้มาอบแห้งที่50 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสกัดเพ็คตินจากใบเครือหมาน้อย[29]

ใช้ใบเครือหมาน้อย ล้างทำความสะอาดและทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง บดใบแห้งแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในถุงสุญญากาศเงื่อนไขในการสกัดคือ pH (3-7) และอุณหภูมิ (25-90 องศาเซลเซียส) โดยใช้น้ำกลั่น ซึ่งพบว่าเงื่อนไขที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดเพ็คติน คือที่อุณหภูมิห้อง (25-28 องศาเซลเซียส) และ pH = 3.8 - 4.0 โดยสัดส่วนของ Solid : water คือ 1 : 50 เป็นเวลา 60 นาที แล้วกรองผ่าน vacuum filter และ centrifuge 10000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ทำให้สารละลายมีความเข้มข้นมากขึ้นโดยการใช้วิธี rotary evaporator เพื่อให้ปริมาตรของสารละลายเหลือ ½ ของปริมาตรเดิม จากนั้นตกตะกอนด้วย ethanol 95% (w/v) (ในที่สุดความเข้มข้นของethanol จะประมาณ 70 %) จากนั้นอบแห้งในตู้สุญญากาศ แล้วบด ก็จะได้ crude extract powder

การสกัดเพ็คตินจากเอนปิโดของส้มโอ [12]

เตรียมวัตถุดิบ :

1. นำเปลือกส้มโอมาลอกผิวนอกออกให้เหลือเฉพาะเอนปิโด แล้วนำส่วนนั้นมาตีป่นด้วยเครื่องตีป่นอาหาร จนมีขนาดของชิ้นเอนปิโดหนาประมาณ 1-2 มิลลิเมตร
2. นำตัวอย่างที่ได้มาต้มในเอธานอล 95 % โดยที่สัดส่วนปริมาตรของ เอธานอล : ตัวอย่าง เป็น 1 : 1 โดยต้มจนเดือดเป็นเวลา 15 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์
3. แยกตัวอย่างออกจากเอธานอล แล้วล้างตัวอย่างด้วยเอธานอล 30 % โดยที่สัดส่วนปริมาตรของเอธานอล : ตังอย่าง = 1 : 1 3 ครั้ง เพื่อกำจัดน้ำตาลและกรดอินทรีย์
4. บีบเอธานอลออกจากตัวอย่างให้หมด แล้วเก็บโดยการแช่แข็ง

<u>การสกัด(Total crude pectin):</u>

- นำตัวอย่างที่ได้จากข้างบนไปวิเคราะห์หาความชื้น (ตามวิธีของ Rangana)

1. Sample 100 กรัม และน้ำกลั่น ซึ่งมีสัดส่วนเป็น 1 : 4 ปรับ pH = 2.0 โดย HCl 0.5 M
2. ต้มสกัดที่อุณหภูมิ 80 C เป็นเวลา 60 นาที กรองแยกสารละลายที่สกัดได้เอาไว้
3. เติมน้ำกลั่นลงในกากที่เหลือ โดยที่ปริมาตรของน้ำกลั่นที่ใช้ = ¼ ของปริมาตรที่ใช้สกัดครั้งแรก และปรับ pH = 2.0 ด้วย HCl 0.5 M แล้วกรองแยกกากทิ้ง
4. รวมสารละลายทั้งสองส่วนเข้าด้วยกันทิ้งให้เย็นที่ T ห้อง
5. ตกตะกอนสารละลายด้วย เอธานอล 95 % ปรับ pH = 0.7-1 ด้วย HCl 0.5 M สัดส่วนปริมาตรของเอธานอล : สารละลายตัวอย่าง = 1 : 1 ใช้เวลา 12 ชั่วโมง แล้วกรองแยกตะกอนที่สกัดได้เอาไว้

6. ตกตะกอนอีกครั้งด้วยเอธานอล 95% ปรับ pH = 0.7-1 ด้วย HCl 0.5 M สัดส่วนปริมาตรของเอธานอล : เพ็คตินตัวอย่าง = 1 : 1
7. ล้างตะกอนเพ็คตินด้วยเอธานอล 70% ซึ่งปรับ pH = 0.7-1 ด้วยสารละลาย HCl 0.5 M โดยล้าง 3 ครั้ง
8. ล้างตะกอนเพ็คตินด้วยเอธานอล 70% จนหมดอนุมูลคลอไรด์(Cl -)
9. อบแห้งตะกอนเพ็คตินที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักเพ็คตินคงที่
10. บดเป็นผลแล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 80 mesh

2.2.2.2 การสกัดเพ็คตินจากฐานดอกทานตะวัน

สกัดเพ็คตินจากฐานดอกทานตะวันที่แห้ง ไม่มีเมล็ด (Z Heliantrus annuus L, variety TC 3004-ATAR) สกัดโดยใช้วิธีของ Kim et al (1978 a, 1978 b) โดยการบดฐานดอกทานตะวัน แล้วสกัดด้วยน้ำ 25 ลิตร/น้ำหนักกิโลกรัมของฐานดอกทานตะวัน ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อเอาเม็ดสีต่างๆออก จากนั้นก็กรองแล้วนำกากมาสกัดต่อด้วยสารละลาย 0.75% ของ Sodium hexametaphosphate (SHMP) ที่ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้สัดส่วน ของแข็ง : สารละลาย เท่ากับ 20 : 1 ที่ pH 3.5 โดยใช้ HCl 6 N จากนั้นตกตะกอนสารละลายที่ได้ด้วยแอลกอฮอล์ที่มีสภาพเป็นกรดซึ่งเป็นวิธีของ Kim และตกตะกอนสารละลายอีกส่วนด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอลิก ซึ่งเป็นวิธีของ Lin พบว่าเพ็คตินที่สกัดได้มีค่า Degree of esterification (DE) 11% และเป็นเพ็คตินชนิด Low methoxyl pectin และมี anhydrogalacturonic acid สูงคือ 77-85 % และมี acetyl ต่ำคือประมาณ 2.3 – 2.6 % ค่าViscosity Average Molecular weight อยู่ในช่วง 39500 – 52000 [30]

ใช้ตัวอย่างดอกทานตะวันจาก 3 พันธุ์ คือ Armavirsky, Zaria และ Record ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีในประเทศอิหร่าน เริ่มต้นการสกัดโดยการอบแห้งฐานดอกทานตะวันแล้วบดร่อนผ่านตะแกรงขนาด 60 mesh จากนั้นสกัดเพ็คตินโดยใช้ 0.75 % Sodium hexametaphosphate ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส pH 5 เป็นเวลา 20 นาที ได้ yield ของเพ็คติน 10.67 , 11.53 และ 10.93 % ตามลำดับและพบว่าการล้างด้วย 0.6 N HNO_3 เป็นเวลา 10 นาที จะได้เพ็คตินที่มีคุณสมบัติดี[31]

- การเตรียมวัตถุดิบเป็นฐานดอกทานตะวันแห้ง(ที่ไม่มีเมล็ด)

มีขั้นตอนดังนี้[35]

ฐานดอกทานตะวันแห้งบด

↓

สกัดด้วย 60 % ethanol

↓

กรองเอาส่วนที่ไม่ละลายในแอลกอฮอล์ไว้

↓

สกัดด้วยน้ำ 85 องศาเซลเซียส

↓

กรองส่วนที่ไม่ละลายน้ำไว้

↓

สกัดด้วย 0.5% oxalic mixture (75 องศาเซลเซียส)

↓

กรองส่วนที่ละลายใน oxalic mixture ไว้

↓

ตกตะกอนด้วย 95% ethanol

↓

กรองตะกอนเพ็คตินไว้ได้ (Crude pectin)

ทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 1

ล้างด้วย ethanol 95 % และ acetone แล้วFreeze drying และบด

↓

Pectin I

ทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2

ล้างด้วย ethanol 60 %(ที่มีสภาพเป็นกรด) และ ethanol 95 % จากนั้น อบแห้ง

↓

PectinII

2.2.3 การย่อยสลายเพ็คติน

เนื่องจากรังสีเป็นเครื่องมือที่ดีในการใช้ปรับปรุงคุณสมบัติของพอลิเมอร์ ไม่ว่าจะเป็นการย่อยสลายหรือการทำให้เกิดการแตกหักของสายโซ่ (Degrade), Grafting และ Crosslink เหล่านี้เป็นการทำให้เกิดการใช้งานพอลิเมอร์ให้ได้ประโยชน์สูงสุด และเป็นการลดมลภาวะในสิ่งแวดล้อม เช่นเดียวกันกับสารเพ็คตินที่จะได้จากส่วนฐานของดอกทานตะวัน ก็ถือว่าเป็นสิ่งที่ได้มาจากของเสียที่เหลือจากการนำส่วนที่ต้องการคือ เมล็ดของทานตะวันออกไปแล้ว เมื่อนำส่วนที่เหลือซึ่งก็คือส่วนฐานของดอกมาสกัดด้วยวิธีการเฉพาะก็จะได้พอลิเมอร์ชีวภาพที่มีประโยชน์และ

นำไปใช้ต่อได้ การที่เพ็คตินเป็นพอลิเมอร์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก เมื่อนำมาย่อยสลายโมเลกุลด้วยรังสี ก็จะได้เพ็คตินที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลงกว่าเดิม และเพ็คตินที่ผ่านการตัดโมเลกุล (Degrade) ด้วยรังสี จนมีขนาดโมเลกุลเล็กนี้จึงเหมาะสมในการนำไปใช้ในการจับกับโปรตีนก่อภูมิแพ้ในน้ำยางธรรมชาติซึ่งเป็นโมเลกุลขนาดเล็กเหมือนกัน การย่อยสลายเพ็คตินนั้นเกิดได้ด้วยวิธีการทางธรรมชาติ หรือใช้เอนไซม์

2.2.3.1 ต้นกำเนิดรังสี

ต้นกำเนิดรังสีแกมมาที่ใช้ในงานด้านการปรับปรุงคุณสมบัติพอลิเมอร์ส่วนใหญ่ก็จะเป็นต้นกำเนิดรังสีจากธาตุ เช่น Co-60 ซึ่งได้จากการกระตุ้นธาตุโคบอลต์ Co-59 ด้วยนิวตรอนในเครื่องปฏิกรณ์ Co-60 สลายตัวให้รังสีแกมมา 2 พลังงานคือ 1.33 และ 1.17 MeV, Cs-137 ได้จากปฏิกิริยาฟิสชั่นในเครื่องปฏิกรณ์นิวเคลียร์ Cs-137 สลายตัวให้รังสีแกมมาพลังงาน 0.662 MeV เป็นต้น รังสีจากเครื่องกำเนิดรังสี เช่น เครื่องกำเนิดรังสีเอกซ์, ลำอิเล็กตรอนจากเครื่อง Accelerators

2.2.3.2 ผลของรังสีต่อเพ็คติน

จากการศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกหัก (degrade) ของพอลิแซคคาไลด์ด้วยรังสีนั้นมีการใช้เพ็คตินเป็นตัวแทนใน class ของ polyuronic acid และเป็นที่ทราบกันดีว่ารังสีที่ก่อให้เกิดไอออนนั้นทำให้พอลิเมอร์เกิดการ degrade ได้และพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ประกอบด้วยส่วนที่เป็น uronic acid คือ hyaluronic acid, alginic acid และ polygalacturonic acid จะไวต่อการเหนี่ยวนำให้อนุมูลอิสระ (free radical) ตัดพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ภายในสายโซ่พอลิเมอร์[56] พอลิเมอร์ที่มีส่วนของ uronic acid จะมีแนวโน้มในการเกิด depolymerization ด้วยรังสีซึ่งเป็นผลมาจากปฏิกิริยาของอนุมูลเฉพาะ (specific radical) ที่อยู่ในกระบวนการนี้ จากงานวิจัยต่างๆที่ผ่านมาพบว่าการฉายรังสีสารละลายเพ็คตินจะทำให้เกิดการแตกหักของสายโซ่โมเลกุลที่เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่มากกว่าการทำให้เกิด Deesterification ของหมู่ Carboxyl ที่ methylated เมื่อฉายรังสีสารละลายเพ็คตินก็ทำให้เกิด water radiolysis product ดังปฏิกิริยา

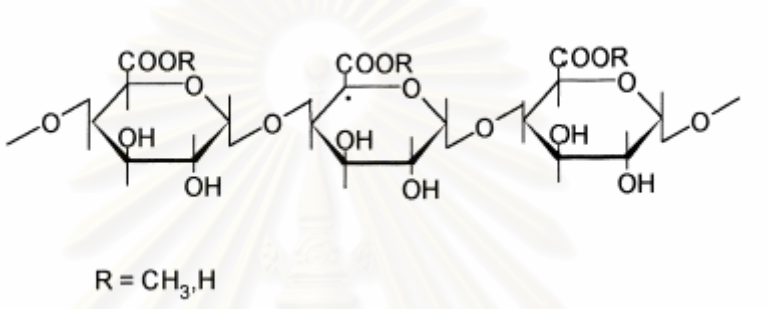
$$H_2O \rightarrow \cdot OH,\ e^-_{aq},\ \cdot H,\ H^+,\ H_2O_2,\ H_2$$

อนุมูลไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical ; ·OH) จะทำปฏิกิริยากับคาร์โบไฮเดรตโดยการแยก (abstraction) อะตอมไฮโดรเจนออกมา 1 ตัวจากที่ติดอยู่กับคาร์บอน ดังปฏิกิริยา

$$RH + \cdot OH\ (\cdot H) + H_2O\ (H_2)$$

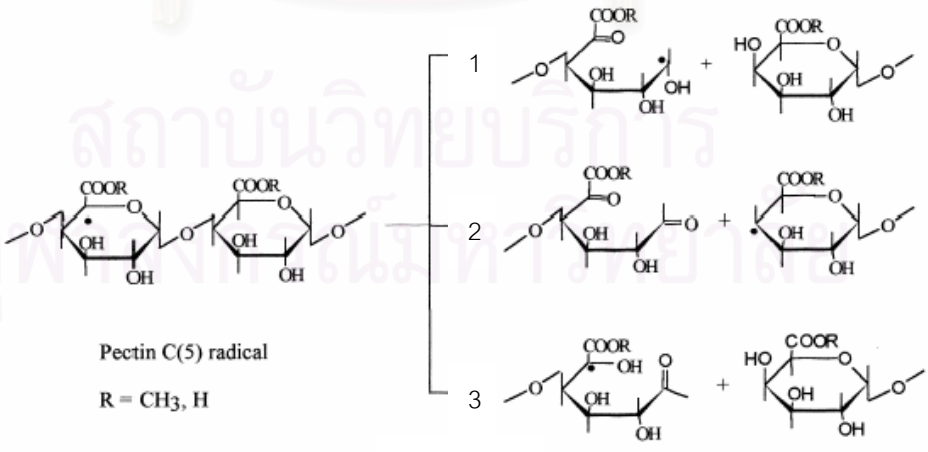
ปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอะตอมไฮโดรเจน (· H) กับคาร์โบไฮเดรตจะช้ากว่าอนุมูลไฮดรอกซิล (·OH) การที่ ·OH จะเลือกที่จะเข้าไปโจมตีคาร์โบไฮเดรตนั้นมีน้อยและปฏิกิริยาจะเป็นแบบสุ่ม

โดยชอบที่จะทำกับอะตอมคาร์บอน C(1) ในวงแหวนไพราโนส (Pyranose ring) ของกลูโคส อย่างไรก็ตามจากการศึกษาด้วย ESR ของ Gilbert ,King และThomas ในปี 1984 พบว่ามีหลักฐานที่จะบอกได้ว่า Galacturonan และ Galacturonan methyl ester ซึ่งก็คือเพ็คตินนั้นมีอนุมูลหลักที่ได้จากการแยกอะตอมไฮโดรเจนที่ตำแหน่ง Oxy- และ Carboxyl- function เช่น จากอะตอมคาร์บอน C (5)ในวงแหวนไพราโนส โครงสร้างของ C (5) - macroradical ดังรูปที่ 2.19 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่ามีถึง 80% ในปริมาณอนุมูลอิสระทั้งหมดใน Galacturonan และ methyl ester ของ Galacturonan ในที่ไม่มีออกซิเจน



รูปที่ 2.19 โครงสร้างของ C (5) - macroradical[32]

C (5) - radical จะจัดเรียงตัวใหม่โดยให้ C (1) radical เปิดวงแหวนไพราโนสด้วยการสร้าง Keto function ที่อะตอมคาร์บอนที่ตำแหน่ง C (5) ดังรูปที่ 2.20 ปฏิกิริยาที่ 1



รูปที่ 2.20 แผนผังการเกิดปฏิกิริยา [32]

ด้วยเหตุนี้จึงพอสรุปได้ว่า Radiolytical ที่จะทำให้เกิดการลดหมู่ (carbonyl) ในส่วนของ Galacturonic acid ของเพ็คตินซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ที่อะตอมคาร์บอน C(5) ปฏิกิริยาสุดท้ายของอนุมูล C(1) โดยการเกิดการจัดตำแหน่งใหม่จาก C(5) $\rightarrow$C(1) จะใกล้เคียงกับปฏิกิริยาของอนุมูล C(1)ที่เกิดขึ้นโดยตรงด้วยการที่อนุมูล $\cdot$ OH จะถูกโจมตีอะตอมของคาร์บอนที่ตำแหน่ง C(1) และการจัดรูปแบบใหม่ของอนุมูล C(1) ส่วนใหญ่จะเริ่มด้วยการแตกของพันธะไกลโคซิดิกและการ Degrade ของสายโซ่พอลิเมอร์ เหมือนที่เกิดขึ้นกับคาร์โบไฮเดรตตัวอื่น ๆ

ปฏิกิริยาที่น่าจะเป็นไปได้อีกก็คือการที่อนุมูล C(5) จะทำให้เกิดการตัดพันธะไกลโคซิดิกมากขึ้นดังรูปที่ 2.20 ปฏิกิริยาที่ 2 และ 3 ส่วนปฏิกิริยาอื่น ๆ ของคาร์โบไฮเดรตคือการที่ peroxyl radical ทำให้เกิด carbonyl product 2 ตัว และ oxyl radicalอีก 2 ตัว oxyl radical ที่ตำแหน่งอะตอมคาร์บอน C(5) นั้นเป็นแบบอย่างของ oxyl radical ตติยภูมิและพวกนี้อาจจะผ่านปฏิกิริยา β-fragmentation ซึ่งจะนำไปสู่การตัดพันธะไกลโคซิดิกของโมเลกุลคาร์โบไฮเดรต ดังนั้นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดอนุมูล C(5) ในวงแหวนไพราโนสของ Galacturonic acid ของเพ็คตินจะทำให้เกิดการ degrade อย่างรวดเร็วเมื่อมีการฉายรังสีสารละลายเพ็คติน

การเกิดการ degrade ของสายโซ่โพลีแซคคาไลด์ ทำให้ความหนืดของสารละลายเพ็คตินลดลง การฉายรังสีอาหารเพื่อฆ่าเชื้อโรคและยืดอายุการเก็บรักษาผักผลไม้จะมีผลต่อสารเพคติก ในการฉายรังสีมะเขือเทศสดจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจาก protopectin เป็นเพ็คติน ทำให้ความเต่งตึงของผิวมะเขือเทศลดลง ซึ่งให้ผลเหมือนกันในส้มและองุ่น

2.2.3.3 ผลของรังสีต่อน้ำหนักโมเลกุลของเพ็คติน

จากการวัดความหนืดของสารละลายเพ็คตินพบว่าความหนืดของสารละลายเพ็คตินจะลดลงเมื่อปริมาณรังสีสูงขึ้น และความหนืดสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (average molecular weight) ดังความสมการของ Mark-Houvink แต่การคำนวน viscosity average molecular weight จากสมการของ Hourdet และ Muller คือ $[\eta] = kM^{\alpha}$ เมื่อ k คือ 0.96×10^{-3} และ α คือ 1.07 ถ้าฉายรังสีในบริเวณที่มีอ๊อกซิเจน สารละลายเพ็คตินจะเกิดการแตกหักของสายโซ่โมเลกุลมากขึ้น เพ็คตินจะมีเกิดการแตกหักของสายโซ่พอลิเมอร์มากขึ้นเนื่องจากเกิด peroxyl radical ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อมี O_2 เพิ่มเข้ามาใน Carbohydrate radical

2.2.4 การวัดขนาดโมเลกุลของเพ็คติน

2.2.4.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ [33]

จากการที่พอลิเมอร์มีช่วงน้ำหนักโมเลกุลกว้าง คือน้ำหนักโมเลกุลในแต่ละสายโซ่โมเลกุลไม่เท่ากัน ดังนั้นเราจึงหาการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล และหาน้ำหนักโมเลกุลออกมาเป็นค่าเฉลี่ย (average molecular weight)

การหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ ซึ่งจะต้องหาในรูปของน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย ซึ่งมีอยู่ 2 วิธีการคือ การหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (number- average molecular weight) และการหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (weight –average molecular weight)

2.2.4.1.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (number- average molecular weight)

ถ้าสารพอลิเมอร์หนัก W กรัม ประกอบด้วย

- monomer N1 มีน้ำหนักโมเลกุล M1
- dimer N2 มีน้ำหนักโมเลกุล M2
- trimer N3 มีน้ำหนักโมเลกุล M3
- จนถึง imer Ni มีน้ำหนักโมเลกุล Mi

และให้ $\overline{M_n}$ เป็นน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน N เป็นจำนวนโมเลกุลทั้งหมด ซึ่งเท่ากับ ΣNi ดังนั้นความสัมพันธ์จะเป็น

$N\ \overline{M_n} = \Sigma NiMi = N_1M_1 + N_2M_2 + N_3M_3 + \ldots + N_iM_i$

$$\overline{M_n} = \frac{\sum N_i M_i}{N} = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N} \qquad 2.1$$

2.2.4.1.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (weight –average molecular weight)

ถ้าสารพอลิเมอร์หนัก W กรัม

- จนถึง imer Ni มีน้ำหนักโมเลกุล Mi

และให้ $\overline{M_w}$ เป็นน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน

$W\ \overline{M_w} = \Sigma w_iM_i = w_1M_1 + w_2M_2 + w_3M_3 + \ldots + w_iM_i$

$$M_w = \frac{\sum W_i M_i}{W} = \frac{\sum W_i M_i}{\sum W_i}$$

เมื่อ $W_i = \frac{N_i M_i}{N_0}$

และ N_o คือ เลขอโวคาโดร = 6.02×10^{23}

ได้ $$\overline{M_w} = \frac{\sum (N_i M_i)/N_0)/M_i}{\sum (N_i M_i / N_0)} = \frac{\sum N_i M_i^{\,2}}{\sum N_i M_i} \qquad 2.2$$

ในกรณีที่ใช้วิธีวัดความหนืดมาคำนวนหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย จะได้น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยจากความหนืด (Viscosity –average molecular weight): $\overline{M_v}$ คำนวณได้จาก

$$\overline{M_v} = \left[\frac{\sum N_i M_i^{\,1+a}}{\sum N_i M_i} \right]^{1+a} \qquad 2.3$$

เมื่อ a เป็นค่าคงที่ ของแต่ละระบบซึ่งได้จากการทดลอง และถ้า a = 1, $\overline{M_v}$ จะเท่ากับ $\overline{M_w}$ โดยทั่วไปค่า a จะอยู่ในช่วง 0.5-0.8 ดังนั้นค่า $\overline{M_v}$ จะน้อยกว่า $\overline{M_w}$ และมากกว่า $\overline{M_n}$ เสมอ เว้นแต่ว่าพอลิเมอร์มีการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลน้อย ค่า $\overline{M_v}$, $\overline{M_w}$ และ $\overline{M_n}$ จะใกล้เคียงกัน

2.2.4.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์

เนื่องจากพอลิเมอร์เป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลต่างๆ กันดังนั้นค่าของขนาดโมเลกุลจึงต้องเป็นค่าเฉลี่ย และสมบัติทางกายภาพของสารละลายพอลิเมอร์ ซึ่งมีส่วนสำคัญในการเลือกวิธีการในการหาน้ำหนักโมเลกุล การหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์สามารถใช้วิธีทางเคมี, ทางกายภาพด้วยการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชัน, ศึกษาคุณสมบัติคอลลิเกทิฟ (colligative propoty), การกระจายแสง (light scattering), วิธี Ultracentrifugation และการวัดความหนืดของสารละลายพอลิเมอร์ตัวกลาง วิธีการเหล่านี้ยกเว้นการวัดความหนืด จะให้ค่าออกมาเป็นค่าสัมบูรณ์ (absolute) คือสามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลได้โดยที่ไม่จำเป็นต้องเปรียบเทียบกับวิธีการอื่น ส่วนการวัดความหนืดของสารละลายนั้นค่าที่ได้เป็นค่าเทียบเคียง (relative) ที่ได้จากค่าความหนืดซึ่งสัมพันธ์กับขนาดโมเลกุล แต่วิธีการวัดความหนืดเป็นวิธีการที่นิยมกันมาก เพราะใช้เครื่องมือไม่มาก ไม่ยุ่งยากและสะดวก

2.2.4.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ด้วยวิธีการวัดความหนืด

เนื่องจากสารละลายพอลิเมอร์มีความหนืดมากกว่าตัวทำละลาย จึงสามารถวัดเปรียบเทียบได้ ความหนืดของสารละลายขึ้นอยู่กับ

- ธรรมชาติของตัวทำละลาย
- ชนิดของพอลิเมอร์
- น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์
- ความเข้มข้นของสารละลาย
- อุณหภูมิ

เครื่องมือที่ใช้หาน้ำหนักโมเลกุลโดยวัดความหนืดของสารละลาย คือ ออสท์วาลด์ วิสโคมิเตอร์ (Ostwald viscometer) และ อับเบโลฮด์ วิสโคมิเตอร์ (Ubbelohde vi scometer) การเตรียมสารละลายในการวัดน้ำหนักโมเลกุลพอลิเมอร์ด้วยการวัดความหนืด และเนื่องจากค่าที่ได้จากวิธีการนี้ไม่ใช่ค่าสัมบูรณ์ จึงเป็นวิธีที่ต้องหาค่าคงที่โดยผ่านความสัมพันธ์ร่วมกันกับค่าความหนืดที่แท้จริง (intrinsic viscosity ; η) และค่าน้ำหนักโมเลกุลที่วัดจากวิธีที่ให้ค่าที่สัมบูรณ์ ซึ่งสมการที่ใช้คือสมการของ Mark – Houwink

$$[\eta] = kM_v^{\alpha} \qquad 2.4$$

เมื่อ M_v คือน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยจากความหนืด (Viscosity average molecular weight) และค่า [η] คือ ค่าความหนืดที่แท้จริง (intrinsic viscosity) ส่วนค่า K และ α คือค่าคงที่ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพอลิเมอร์ ตัวทำละลาย และอุณหภูมิ ได้จากกราฟระหว่างค่า Log น้ำหนักโมเลกุล (Mw)กับ Log [η] เช่นการใช้ sodium phosphate buffer (0.1 M; pH = 7) เป็นตัวทำละลาย ค่า k = 0.3 mL/g และ a = 0.613 [35] เป็นต้น การน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีการนี้คือการปล่อยให้สารละลายพอลิเมอร์นั้นไหลผ่านหลอด ดังรูปที่ 2. แล้วจับเวลาที่สารละลายพอลิเมอร์เคลื่อนที่จากตำแหน่ง E ถึง F เวลาที่ได้คือ Efflux time ซึ่งค่านี้ต้องได้จากตัวทำละลายบริสุทธิ์ด้วยนอกจากสารละลายพอลิเมอร์ เพื่อนำมาใช้เปรียบเทียบในการคำนวณหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ด้วย กำหนดให้ค่า Efflux time ของตัวทำละลายบริสุทธิ์เป็น t_0 และค่า Efflux time ของสารละลายพอลิเมอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆเป็น t ซึ่งนำมาหาค่าความหนืดสัมพัทธ์ (Relative viscosity ; η_r) ดังสมการที่ 2.5

$$\eta_r = \frac{t}{t_0} \qquad 2.5$$

เมื่อ t คือค่า Efflux timeของสารละลายตัวอย่าง

t_0คือค่า Efflux time ของตัวทำละลายบริสุทธิ์

เนื่องจากเราไม่ได้พิจารณาค่า Efflux time ของตัวทำละลาย ดังนั้นเราจึงพิจารณาความแตกต่างของ Efflux time ของสารละลายตัวอย่างและตัวทำละลาย แล้วลบค่า Efflux time ของตัวทำละลาย (t_0)ออกจากค่า Efflux time ของสารละลายตัวอย่าง (t) ค่าที่ได้คือค่าความหนืดเฉพาะ (specific viscosity ; ηsp) ดังสมการที่ 2.6

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0} \qquad 2.6$$

รูปที่ 2.21 Cannon - Ubbelohde Viscometer

และเมื่อนำค่าความเข้มข้นของสารละลาย (C) ไปหารค่า ηsp จะได้ค่า reduced viscosity (ηred) ดังสมการที่ 2.7

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C} \qquad 2.7$$

ค่า η_{red} จะแตกต่างกันไปตามความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ เมื่อนำค่า η_{red} ของแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างอยู่ในแกน Y และ η_{red} อยู่ในแกน X กราฟความสัมพันธ์ที่ได้จะเป็นเส้นตรง ซึ่งเมื่อเราทำการ extraporate ไปที่ความเข้มข้นของสารละลายเป็น 0 โดยการลากกราฟต่อไปถึงแกน Y ค่าที่ได้นี้คือ intrinsic viscosity ; η หรือค่าความหนืดที่แท้จริง จากนั้นก็นำค่านี้ไปคำนวนน้ำหนักโมเลกุลตามสมการของ Mark – Houwink ส่วนค่าคงที่ K และ α นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของพอลิเมอร์และระบบของตัวทำละลายที่ใช้ ดังนั้นเมื่อเราแทนค่า η ลงในสมการก็จะได้ค่า viscosity average molecular weight ($\overline{M_v}$)

การหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีการหาค่าความหนืดที่แท้จริง (intrinsic viscosity) หรือ Dilute solution viscosity วิธีนี้จะมีความสัมพันธ์กับสารพอลิเมอร์เชิงเส้นเท่านั้น โดยอาศัยหลักการที่ว่าความหนืดของสารละลายพอลิเมอร์จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายและน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของพอลิเมอร์นั้น และต้องใช้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำเพื่อลดแรงกระทำระหว่างอนุภาคพอลิเมอร์ ถ้าสารละลายมีความเข้มข้นสูงไป โมเลกุลของพอลิเมอร์อาจจะเข้าไปใกล้กับจนอาจเกิดอันตรกิริยากับโมเลกุลอื่นได้ ทำให้ความหนืดสูงขึ้น เมื่อเกิดเหตุการณ์นี้ขึ้นเราจึงใช้สมการของ Mark – Houwink คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของสารละลายตัวอย่างได้ไม่ดีนัก

2.3.ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับดอกทานตะวัน

ดอกทานตะวันมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Helianthus annuus ชื่อแรกมาจากภาษากรีกที่มาจากคำว่า helio ซึ่งแปลว่า ดวงอาทิตย์ และคำว่า anthus แปลว่า ดอกไม้ สาเหตุที่ดอกไม้ชนิดนี้มีชื่อเรียกว่า ทานตะวัน เนื่องจากจะหันหน้าไปตามทิศทางของดวงอาทิตย์ ทานตะวันเป็นไม้เนื้ออ่อนตระกูลเดียวกันกับเบญจมาศ มีลำต้นตรงและมีขนปกคลุม ลำต้นส่วนใหญ่ไม่มีแขนง มีความสูงตั้ง 0.5-5 เมตร จำนวนใบบนต้นประมาณ 7-70 ใบ ดอกเป็นรูปจานเกิดอยู่บนตายอดของลำต้นหลัก หรือแขนงลำต้นมีเส้นผ่าศูนย์กลางของดอกอยู่ระหว่าง 6-37 เซนติเมตร ซึ่งขึ้นกับพันธุ์และสภาพแวดล้อม ดอกมีลักษณะเป็นแบบช่อดอก ดอกทานตะวัน 1 ดอกใหญ่ ประกอบด้วยดอกย่อยเป็นจำนวนมากซึ่งแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

1. ดอกย่อยที่อยู่รอบนอกจานดอก เป็นดอกที่ไม่มีเพศ (เป็นหมัน) มีกลับดอกสีเหลืองส้ม
2. ดอกย่อยที่อยู่ในจานดอก เป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีเกสรตัวผู้ที่พร้อมจะผสมได้ก่อนเกสรตัวเมียและสายพันธุ์ผสมเปิดส่วนใหญ่ผสมตัวเองน้อยมาก จึงต้องอาศัยแมลงเช่น ผึ้ง ในการช่วยผสมเกสร

กับดอกอื่นในต้นเดียวกันและต้นอื่น ในแต่ละจานดอกจะมีดอกย่อยอยู่ประมาณ 700-3,000 ดอก ในพันธุ์ที่ให้น้ำมัน ส่วนพันธุ์อื่น ๆ อาจมีดอกย่อยถึง 8,000 ดอก การบานหรือการแก่ของดอกจะเริ่มจากวงรอบนอกเข้าไปสู่ศูนย์กลางของดอก ดอกบนกิ่งแขนงจะมีขนาดเล็ก แต่ถ้าเป็นแขนงที่แตกออกมาตอนแรก ๆ ดอกจะมีขนาดใหญ่เกือบเท่ากับดอกบนลำต้นหลัก ส่วนใหญ่พันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้า มักจะเลือกต้นชนิดที่มีดอกเดี่ยว เพื่อความสมบูรณ์ของดอก และให้เมล็ดที่มีคุณภาพดี

ทานตะวันมีมากมายหลากหลายสายพันธุ์ เช่น Supermane Sunflowers, Tarhumara Sunflowers, Hopi Dye Sunflowers, Russian Mammoth Sunflowers, Oil Sunflowers, Sunbeam Sunflowers, Lion's Mane Sunflowers เป็นต้น

รูปที่ 2.22 ดอกทานตะวันพันธุ์ Supermane Sunflower

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.23 ดอกทานตะวันพันธุ์ Hopi Dye Sunflowers

รูปที่ 2.22 ดอกทานตะวันพันธุ์ Russian Mammoth Sunflowers

ประเทศไทยมีการส่งเสริมการปลูกทานตะวันเพื่อเป็นการค้ามาตั้งแต่ ปี 2531 โดยมีพื้นที่ปลูกประมาณ 7,500 ไร่ และค่อย ๆเพิ่มขึ้นจนถึง ปี 2536 มีพื้นที่ปลูกประมาณ 40,000 ไร่ จากนั้นพื้นที่ปลูกได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึง ปี 2547 มีพื้นที่ปลูกทานตะวันประมาณ 320,763 ไร่ ได้ผลผลิตรวมประมาณ 49,077 ตัน หรือประมาณร้อยละ 49 ของความต้องการภายในประเทศ ซึ่งปัจจุบันความต้องการใช้เมล็ดทานตะวันเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมมีประมาณ 1,000,000 ตัน/ปี ทำให้ต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศทุกปี ทั้งในรูปเมล็ดและน้ำมัน

แหล่งผลิตที่สำคัญ พื้นที่ปลูกทานตะวันแหล่งใหญ่ที่สุดของไทย อยู่ในแถบภาคกลางเช่นจังหวัด ลพบุรี สระบุรี ซึ่ง 2 จังหวัดนี้มีพื้นที่ปลูกประมาณร้อยละ 60 ของประเทศ

2.3.1 ประเภทของดอกทานตะวัน

ทานตะวันแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

1. ประเภทให้น้ำมันจะมีเมล็ดสีดำ มีปริมาณน้ำมันสูง กากเป็นอาหารสัตว์

2. ประเภทใช้เป็นอาหารว่าง หรือทำขนมหวาน เมล็ดมีสีลายขาวดำ โตกว่าพวกแรก เปลือกหนาไม่ติด กับเนื้อในเมล็ด เพื่อสะดวกในการกะเทาะแล้วใช้เนื้อในรับประทาน

2.3.2 พันธุ์ของทานตะวันในประเทศไทย

2.3.2.1. สายพันธุ์ผสมเปิด ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ปลูกกันมานานแล้ว ซึ่งในดอกจะมีจำนวนเรณูที่ติดกับก้านชูเกสร ตัวเมียน้อย ทำให้เกิดการติดเมล็ดด้วยการผสมตัวเองต่ำ ต้องอาศัยแมลงช่วยในการผสมเกสร

2.3.2.2. สายพันธุ์ลูกผสม ปัจจุบันมีพันธุ์ลูกผสมที่สามารถติดเมล็ดได้ดีโดยไม่ต้องอาศัยแมลงช่วยผสมเกสร เพราะในดอกมีละอองเรณูที่ก้านชูเกสรตัวเมียมากกว่าพันธุ์ผสมเปิด 3-4 เท่า จึงทำให้การติดเมล็ดด้วยตัวเองดีกว่าพันธุ์ผสมเปิด ปัจจุบันยังไม่มีการผลิตเมล็ดพันธุ์ทานตะวันในเมืองไทย ต้องนำเข้าจากต่างประเทศโดยบริษัทเอกชนที่เกษตรกรนิยมปลูกเช่นพันธุ์แปซิฟิค, พันธุ์จัมโบ้ และพันธุ์อัลดูเอล พันธุ์ลูกผสมมีลักษณะของจานดอกค่อนข้างใหญ่ กลีบดอกสีเหลืองสดใส ให้ปริมาณน้ำมันสูง แต่ไม่สามารถเก็บเมล็ดไว้ทำพันธุ์ต่อไปได้

2.3.2.3. สายพันธุ์สังเคราะห์ ทานตะวันสายพันธุ์สังเคราะห์เป็นพันธุ์ที่พัฒนาโดยกรมวิชาการเกษตร ซึ่งได้รับการรับรองพันธุ์แล้วคือพันธุ์เชียงใหม่ 1 เป็นพันธุ์ที่สามารถเก็บเมล็ดไว้ที่พันธุ์ต่อไปได้

ตารางที่ 2.2 แสดงพื้นที่ปลูกทานตะวันจำแนกตามแหล่งปลูกที่สำคัญของประเทศไทย

ภาค/จังหวัด	ปีการผลิต				
	2542	2543	2544	2545	2546
เหนือ	163,861	129,119	36,723	56,437	51,830
เชียงราย	4,353	3,046	1,370	4,800	8,150
นครสวรรค์	102,130	79,302	27,325	17,223	14,320
ตาก	1,500	1,101	-	-	1,500
อุทัยธานี	6,150	23,000	-	6,854	440
เพชรบูรณ์	49,728	22670	7,228	23,130	25,300
อุตรดิตถ์	-	-	400	3,350	1,700
พะเยา	-	-	400	1,080	420
ตะวันออก/เหนือ	1,540	1,400	150	150	450
นครราชสีมา	1,540	1,400	150	150	450
ตะวันออก	30,848	23,075	4,420	2,670	1,200
ปราจีนบุรี	1,600	5,000	-	-	-
สระแก้ว	29,248	18,075	4,420	2,670	1,200
ตะวันตก	3,635	1,995	95	3,520	1,250
สุพรรณบุรี	2,015	1,915	75	1,500	-
กาญจนบุรี	1,620	80	20	-	100
ราชบุรี	-	-	-	2,020	1,150
กลาง	325,396	265,776	185,593	250,049	130,035
สระบุรี	53,253	56,068	40,380	43,790	24,000
ลพบุรี	272,143	209,708	145,213	206,259	106,035
รวมทั้งประเทศ	**525,280**	**421,365**	**226,981**	**312,826**	**184,765**

ที่มา: ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักเศรษฐกิจการเกษตร

2.3.3 การใช้ประโยชน์ทานตะวันในประเทศไทย

2.3.3.1. เมล็ดทานตะวัน เป็นอาหารโดยตรง เช่น ขนม ใช้เมล็ดมาคั่วอบเกลือหรือนำเมล็ดที่สมบูรณ์มากะเทาะเปลือกเอาเนื้อไปปรุงแต่งรสชาด นอกจากนี้ในปัจจุบันนิยมนำเมล็ดทานตะวันมาแปรรูปเป็นอาหารหลากหลายรูปแบบเช่น คุกกี้, ข้าวตังหน้าตังและข้าวเกรียบทานตะวัน

2.3.3.2. ภาคอุตสาหกรรม น้ำมันทานตะวันสำหรับบริโภค ทำสบู่ อุตสาหกรรมฟอกสี เคลือบผิวผลไม้ ในลักษณะขี้ผึ้งเช่น ทำเทียนไข หรือเครื่องสำอางค์และนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น เนยเทียม น้ำมันสลัด ครีม และนมที่มีไขมัน จากการสกัดเมล็ดทานตะวันพบว่ามีส่วนประกอบของน้ำมันสูงถึงร้อยละ 40 ของน้ำหนัก โดยน้ำมันที่ได้จัดเป็นน้ำมันคุณภาพสูงเหมาะแก่การบริโภคโดยตรงประกอบกับทานตะวันเป็นพืชน้ำมันที่ปราศจากการตัดต่อยีนต์ ทำให้นิยมนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเพื่อส่งไปยังประเทศสหภาพยุโรป

2.3.3.3. กากเมล็ดทานตะวันใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ได้ถึงร้อยละ20 เพราะมีโปรตีนประมาณร้อยละ 33-34

2.3.3.4. นำไปทำ Lecithin เพื่อใช้ในทางการแพทย์ ในการลดโคเลสเตอรอลในคนไข้ ที่มีโคเลสเตอรอลในเส้นเลือด และยังสามารถป้องกันและต่อต้านสารเคมีที่เป็นพิษที่จะก่อให้เกิดมะเร็งในปาก ,ป้องกันการเกาะตัวของเกล็ดเลือดและเพิ่มการไหลเวียนของโลหิตให้ดีขึ้นด้วย

และมีรายงานการพบสารประกอบเพคติกในฐานดอกทานตะวัน ในปี 1940 Colin และ Lemoine ได้ค้นพบเพ็คตินชนิดพิเศษจากฐานดอกทานตะวัน และจากการศึกษาต่อมาทำให้เข้าใจคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของเพ็คตินนั้นมากขึ้นหลังจากนั้นก็ได้มีการศึกษาลักษณะเฉพาะทางด้านphysicochemical ของเพ็คตินจากฐานดอกทานตะวันกันมากขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การสกัดเพ็คติน[12]

3.1.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

3.1.1.1 ฐานดอกทานตะวัน พันธุ์แปซิฟิก จาก อ.บ้านหมอ จ. สระบุรี

3.1.1.2 เอทานอลเข้มข้น 95, 70 และ 30 %

3.1.1.3 น้ำกลั่น

3.1.1.4 กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 M

3.1.1.5 มีด

3.1.1.6 บีกเกอร์ขนาดต่างๆ

3.1.1.7 pH meter

3.1.1.8 ผ้าขาวบาง

3.1.1.9 แท่งแก้วคน

3.1.1.10 Hot plate

3.1.1.11 เทอร์โมมิเตอร์

3.1.1.12 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.1.1.13 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4

3.1.2 วิธีการดำเนินการวิจัย (ดังแผนภูมิที่ 3.1)

3.1.2.1 นำฐานดอกทานตะวันที่นำกลีบดอกและเม็ด รวมทั้งส่วนที่เป็นเปลือกสีเขียวออกจนหมด เหลือไว้แต่ส่วนที่เป็นสีขาว ล้างน้ำให้สะอาดหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋า

3.1.2.2 นำฐานดอกทานตะวันในข้อที่ 3.1.2.1 มา 25 กรัม ต้มในเอทานอลเข้มข้น 95 % โดยใส่เมทานอลปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักของดอกทานตะวัน ต้มจนเดือดเป็นเวลา 15 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

3.1.2.3 แยกส่วนของดอกทานตะวันออกจากเอทานอล แล้วล้างด้วยเอทานอลความเข้มข้น 30 % โดยใส่เอทานอลปริมาตร 1 เท่า ของน้ำหนักของฐานดอกทานตะวัน 3 ครั้ง เพื่อกำจัดน้ำตาลและกรดอินทรีย์ออกไป

รูปที่ 3.1 ดอกทานตะวันพันธุ์แปซิฟิกหลังจากนำเมล็ดออกแล้ว

3.1.2.4 บีบเอทานอลให้หมด เติมน้ำกลั่นเป็น 4 เท่า ต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

3.1.2.5 กรองแยกกากออกขณะที่ยังร้อนเก็บสารละลายที่ได้เอาไว้ เติมน้ำกลั่นปริมาตรเป็น 1 เท่าของกาก กวนให้เข้ากันแล้วกรองแยกกากออกอีกครั้ง เก็บสารละลายที่ได้ไปผสมกับที่ได้ในตอนแรก ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.1.2.6 ตกตะกอนสารละลายที่ได้ในข้อ 3.1.2.4 เอทานอลความเข้มข้น 95 % ปรับ pH = 0.7-1 ด้วย HCl 0.5 M สัดส่วนปริมาตรของเอธานอล : สารละลายตัวอย่าง = 1 : 1 คนอย่างแรง ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วกรองแยกตะกอนที่สกัดได้เอาไว้

3.1.2.7 ตกตะกอนอีกครั้งด้วยเอธานอล 95 % ปรับ pH = 0.7-1 ด้วย HCl 0.5 M สัดส่วนปริมาตรของเอธานอล : เพ็คตินตัวอย่าง = 1 : 1

3.1.2.8 ล้างตะกอนเพ็คตินด้วยเอธานอล 70 % ซึ่งปรับ pH = 0.7-1 ด้วยสารละลาย HCl 0.5 M โดยล้าง 3 ครั้ง จนหมดอนุมูลคลอไรด์

3.1.2.9 อบแห้งกระดาษที่ใช้กรองที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่

3.1.2.10 นำฐานดอกทานตะวันในข้อที่ 3.1.2.1 มา 25 กรัม ทำตามข้อที่3.1.2.2 - 3.1.2.3

3.1.2.11 บีบเอทานอลให้หมด เติมน้ำกลั่นเป็น 4 เท่า ปรับ pH เป็น 2.0 ด้วย HCl 0.5 M ต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

รูปที่ 3.2 ส่วนฐานของดอกทานตะวันที่นำมาสกัดเพ็คติน

3.1.2.12 กรองแยกกากออกขณะที่ยังร้อนเก็บสารละลายที่ได้เอาไว้ เติมน้ำกลั่นปริมาตรเป็น 1 เท่าของกากปรับ pH เป็น 2 ด้วย HCl 0.5 M กวนให้เข้ากันแล้วกรองแยกกากออกอีกครั้ง เก็บสารละลายที่ได้ไปผสมกับที่ได้ในตอนแรก ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.1.2.13 ทำตามตั้งแต่ข้อ 3.1.2.7 - 3.1.2.9

3.1.2.14 นำฐานดอกทานตะวันในข้อที่ 3.1.2.1มา 25 กรัม ทำตามข้อที่ 3.1.2.2 - 3.1.2.3

3.1.2.15 บีบเอทานอลให้หมด เติมน้ำกลั่นเป็น 4 เท่า ปรับ pH เป็น 4.0 ด้วย HCl 0.5 M ต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

3.1.2.16 กรองแยกกากออกขณะที่ยังร้อนเก็บสารละลายที่ได้เอาไว้ เติมน้ำกลั่นปริมาตรเป็น 1 เท่าของกากปรับ pH เป็น 4 ด้วย HCl 0.5 M กวนให้เข้ากันแล้วกรองแยกกากออกอีกครั้ง เก็บสารละลายที่ได้ไปผสมกับที่ได้ในตอนแรก ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.1.2.17 ทำตามตั้งแต่ข้อ 3.1.2.7 - 3.1.2.9

3.1.2.18 หาความหนาแน่นของฐานดอกทานตะวันโดยการ นำฐานดอกทานตะวันที่นำกลีบดอกและเม็ด รวมทั้งส่วนที่เป็นเปลือกสีเขียวออกจนหมด เหลือไว้แต่ส่วนที่เป็นสีขาว ล้างน้ำให้สะอาดตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาด 1 ซม. x 1 ซม. x1 ซม. จำนวน 10 ชิ้น ชั่งน้ำหนักของแต่ละชิ้น แล้วใช้สูตร $D = \frac{M}{V}$ เมื่อ M = น้ำหนัก (กรัม) และ V = ปริมาตร (cm^2) ก็จะได้ความหนาแน่นของฐานดอกทานตะวัน

เตรียมวัตถุดิบ (ฐานดอกทานตะวัน)

↓

ต้มในเอทานอล 95 % จนเดือดเป็นเวลา 15 นาที บีบเอทานอลออกให้หมด

↓

ต้มสกัดด้วยสารละลายที่ใช้สกัด (น้ำ, น้ำ pH 2, น้ำ pH 4) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที กรองแยกกากออกจากสารละลาย

↓

เติมสารละลายที่ใช้สกัดลงในกากอีกครั้ง จากนั้นกรองแยกกากออกจากสารละลาย

↓

ตกตะกอนสารละลายด้วยเอทานอล 95% ปรับ pH เป็น 0.7 – 1 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

↓

กรองตะกอนด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 แล้วตกตะกอนสารละลายซ้ำอีกครั้ง

↓

กรองตะกอนที่ได้ด้วยกระดาษกรองอันเดิม อบแห้งกระดาษกรองจนน้ำหนักคงที่

แผนภูมิที่ 3.1 ขั้นตอนการสกัดเพ็คตินจากฐานดอกทานตะวัน

3.2 การหาปริมาณ polygalacturonic acid ในดอกทานตะวัน[12]

3.2.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

3.2.1.1 ฐานดอกทานตะวัน พันธุ์แปซิฟิก จาก อ.บ้านหมอ จ. สระบุรี

3.2.1.2 เอทานอลเข้มข้น 95, 70 และ 30 %

3.2.1.3 น้ำกลั่น

3.2.1.4 กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 M

3.2.1.5 มีด

3.2.1.6 บีกเกอร์ขนาดต่างๆ

3.2.1.7 pH meter

3.2.1.8 ผ้าขาวบาง

3.2.1.9 แท่งแก้วคน

3.2.1.10 Hot plate

3.2.1.11 เทอร์โมมิเตอร์

3.2.1.12 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.2.1.13 polygalacturonic acid (Lab grade)

3.2.1.14 เอทานอลความเข้มข้น 95 % (Lab grade)

3.2.1.15 เอทานอลบริสุทธิ์ (reflux เอทานอล 95 % โดยการเติมผงสังกะสี 4 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วกลั่นแยกเอทานอลออกมาโดยกลั่น 2 ครั้ง)

3.2.1.16 กรดซัลฟูริกเข้มข้น

3.2.1.17 สารละลาย carbazol ความเข้มข้น 0.1 % (เตรียมโดยการละลายสารละลาย carbazol 100 มิลลิกรัม ในเอทานอลบริสุทธิ์ 100 มิลลิลิตร)

3.2.1.18 เครื่อง UV-VIS- NIR SCANNING SPECTROPHOTOMETER ,SHIMADZU TCC 260

3.2.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.2.2.1 นำฐานดอกทานตะวันที่นำกลีบดอกและเม็ด รวมทั้งส่วนที่เป็นเปลือกสีเขียวออกจนหมด เหลือไว้แต่ส่วนที่เป็นสีขาว ล้างน้ำให้สะอาดหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋า

3.2.2.2 เติมน้ำกลั่นเป็น 4 เท่า ต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

3.2.2.3 กรองแยกกากออกขณะที่ยังร้อนเก็บสารละลายที่ได้เอาไว้ เติมน้ำกลั่นปริมาตรเป็น 1 เท่าของกาก กวนให้เข้ากันแล้วกรองแยกกากออกอีกครั้ง เก็บสารละลายที่ได้ไปผสมกับที่ได้ในตอนแรก ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.2.2.4 ทำกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ Galacturonic acid โดยเตรียมสารละลาย polygalacturonic acid ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นของสารละลาย 5 ความเข้มข้นดังนี้

ตารางที่ 3.1 การเตรียมสารละลาย polygalacturonic acid มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ

หลอดที่	ปริมาตรของ 0.1 mg/ ml ของ polygalacturonic acid (ml)	ปริมาตรของน้ำกลั่น(ml)	ความเข้มข้นของ polygalacturonic acid (g/ml)
1	40	160	0.00002
2	80	120	0.00004
3	120	80	0.00006
4	160	40	0.00008
5	200	0	0.00010

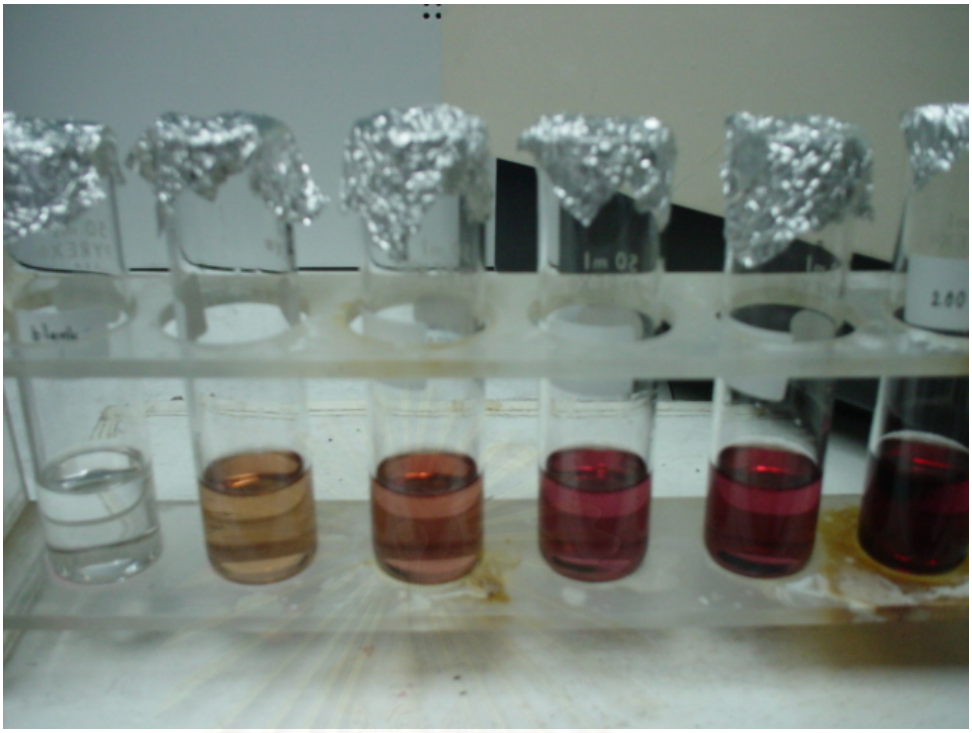
3.2.2.5 หาปริมาณเพ็คตินจากฐานดอกทานตะวัน ใช้สารละลายเพ็คตินแต่ละเงื่อนไขมา 2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นใน Volumetric flask ขนาด100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.2.2.6 ปิเปตสารละลายเพ็คตินมา 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 12 มิลลิลิตร(ขณะเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นควรแช่หลอดทดลองไว้ในน้ำแข็งอุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส) เขย่าหลอดทดลองให้สารเข้ากันดี

3.2.2.7 นำสารในข้อ 3.2.2.6 มาต้มในอ่างน้ำร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมสารละลาย carbazol reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 25 นาที (blank ไม่ต้องเติม Carbazole reagent แต่ใช้เอทานอลบริสุทธิ์ 1 มิลลิลิตร แทน)

3.2.2.8 นำสารละลายในข้อ 3.2.2.7 มาวัดค่าดูดกลืนแสงโดยใช้UV-spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยเริ่มตั้งแต่ สารละลาย polygalacturonic acid มาตรฐาน, Blank, สารละลายเพ็คตินตัวอย่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.3 สารมาตรฐาน polygalacturonic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

รูปที่ 3.4 เครื่อง UV-VIS- NIR SCANNING SPECTROPHOTOMETER ,SHIMADZU TCC 260

3.3 การฉายรังสีเพ็คติน

3.3.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

3.3.1.1 สารละลาย Crude pectin จากฐานดอกทานตะวัน

3.3.1.2 น้ำกลั่น

3.3.1.3 เครื่องชั่งอิเล็กทรอนิกส์ 4 ตำแหน่ง

3.3.1.4 บีกเกอร์

3.3.1.5 Hot plate & Stirrer

3.3.1.6 แท่งแม่เหล็ก

3.3.1.7 ขวดพลาสติกแบนฝาเกลียว

3.3.1.8 เครื่องฉายรังสีแกมมาจาก Co-60 Gammacell220excel สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ

3.3.1.9 เครื่องวัดปริมาณรังสี (Dosimeter) แบบRadiochromic film

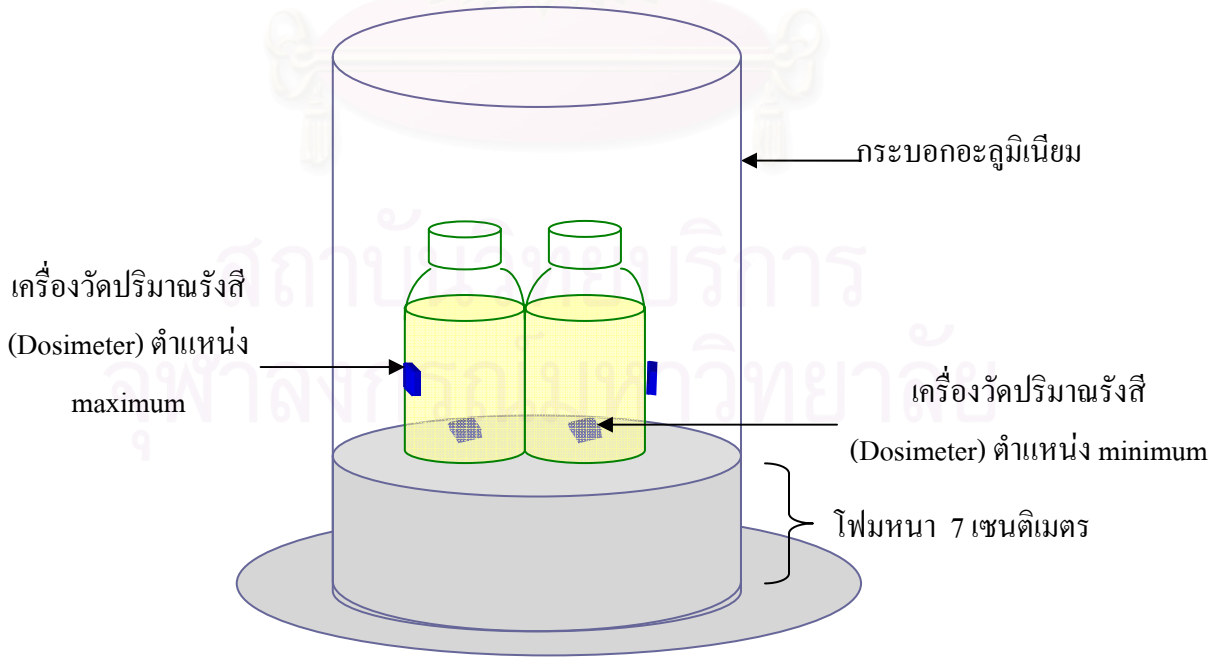
3.3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.3.2.1 เติมน้ำกลั่น 125 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 400 มิลลิลิตร ชั่งเพ็คตินผงหนัก 6.25 กรัม ค่อย ๆใส่เพ็คตินผงลงในบีกเกอร์บรรจุน้ำกลั่น พร้อมทั้งกวนช้าๆตลอดเวลา เป็นเวลา 1 คืน เมื่อเพ็คตินละลายหมดนำสารละลายที่ได้ใส่ในขวดพลาสติก ได้สารละลายเพ็คติน 5% โดยเตรียมทั้งหมด 5 ขวด เพื่อฉายรังสีที่ปริมาณรังสีต่างกัน

3.3.2.2 วางขวดบรรจุตัวอย่างสารละลายเพ็คตินจำนวน2 ขวดในกระบอกอลูมิเนียมที่มีโฟมรองก้นกระบอกหนา 7 เซนติเมตร โดยประกบขวดติดกัน ติดเครื่องวัดปริมาณรังสี (Dosimeter) ชนิด Radiochromic film ที่ตำแหน่งที่จะได้รับรังสีสูงที่สุด (maximum)และตำแหน่งที่จะได้รับรังสีน้อยที่สุด (minimum) เพื่อหาค่าปริมาณรังสีเฉลี่ยที่สารละลายเพ็คตินได้รับ

3.3.2.3 วางกระบอกอลูมิเนียมลงในช่องฉายของเครื่องฉาย Gammacell220excel ซึ่งให้รังสีแกมมาจาก Co-60 ของสำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ ฉายรังสีที่ปริมาณรังสี 2, 4, 6, 8และ 10 kGy

รูปที่ 3.5 เครื่องฉายรังสีแกมมาจาก Co-60 Gammacell 220 excel สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ



รูปที่ 3.6 การวางตัวอย่างสารละลายเพ็คตินในกระบอกฉายรังสีและการติดเครื่องวัดปริมาณรังสี

3.4 การวัดขนาดโมเลกุลของเพ็คตินโดยใช้วิธี dilute solution method ด้วย Viscometer

3.4.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

3.4.1.1 สารละลายเพ็คติน 5 % ที่ผ่านการฉายรังสีปริมาณรังสีต่างๆและที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสี

3.4.1.2 น้ำกลั่น

3.4.1.3 น้ำยาล้าง viscometer ($H_2SO_4 + K_2Cr_2O_7$)

3.4.1.4 Hot plate & Stirrer

3.4.1.5 แท่งแม่เหล็ก

3.4.1.6 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.4.1.7 กระบอกตวงขนาด 50, 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร

3.4.1.8 pipet ขนาด 0.2, 1, 5, 10 มิลลิลตร

3.4.1.9 บีกเกอร์ขนาดต่างๆ

3.4.1.10 ขวดแก้วหนาขนาด 50 มิลลิลิตร

3.4.1.11 volumetric Flask ขนาด 50, 500 และ 1000 ml

3.4.1.12 Cannon - Ubbelohde Viscometer

3.4.1.13 pH meter

3.4.1.14 ช้อนตักสาร

3.4.1.15 แท่งแก้วคน

3.4.1.16 นาฬิกาจับเวลา

3.4.1.17 water bath ใสขนาด 13 x 17 เซนติเมตร

3.4.1.18 water bath สำหรับแช่สารละลายตัวอย่าง

3.4.1.19 เทอร์โมมิเตอร์

3.4.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.4.2.1 เตรียมสารละลายเพ็คตินให้ได้ความเข้มข้น 0.025, 0.050, 0.075 และ 0.10 % ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากสารละลายเพ็คติน 5 % ที่ฉายรังสีแล้วที่ปริมาณรังสีต่างๆ โดยใช้ตัวทำละลาย (น้ำกลั่น) ใส่สารละลายที่ได้ลงในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 คืน

3.4.2.2 นำ สารละลายที่ใช้เป็นตัวทำละลายในข้อ 3.4.2.1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรใส่ลงขวดแก้วขนาดเดียวกับที่ใส่สารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ และนำสารละลายทั้งหมด (ทั้งตัวทำละลายและสารละลายเพ็คตินเจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ) แช่ลงใน water bath ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (ASTM D445)

3.4.2.3 เติมน้ำลงใน water bath ใสและปรับอุณหภูมิของน้ำให้เป็น 25 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งติดตั้งอุปกรณ์ต่างๆคือ ใส่ viscometer ลงไปใน water bath แนวตั้งตรงยึดให้แน่น พร้อมทั้งเทอร์โมมิเตอร์สำหรับวัดอุณหภูมิภายใน water bath

3.4.2.4 เริ่มทำการวัดความหนืดของสารละลายโดยเริ่มด้วยวัดความหนืดของตัวทำละลาย (น้ำกลั่น) โดยการปิเปตสารละลายดังกล่าวมา 15 มิลลิลิตร ใส่ลงใน viscometer ที่ปลายด้าน A ดังรูปที่ 3.2

3.4.2.5 ใช้นิ้วอุดตรงปลายด้าน B และใช้ลูกยางดูดที่ปลายด้านC จนสารละลายขึ้นมาถึงกระเปาะ D เอาลูกยางออก และปล่อยนิ้วที่อุดไว้ที่ปลายด้าน B ออก รอจนสารละลายไหลลงมาจนถึงจุด E จึงเริ่มจับเวลา จนสารละลายไหลลงมาถึงจุด F ก็หยุดเวลาแล้วบันทึก เวลาที่ได้นี้คือ efflux time เทสารละลายที่อยู่ใน viscometer ออกจนหมด จากนั้นเริ่มทำการทดลองใหม่ตั้งแต่ข้อ 3.4.2.4 อีก 2 ซ้ำ โดยใช้สารละลายเป็นตัวทำละลายในข้อ 3.4.2.4 ที่เหลือในขวดอีกครั้งละ 15 มิลลิลิตร จากนั้นบันทึกเวลา efflux time ที่ 2 และ 3 แล้วหาค่าเฉลี่ยทั้ง 3 ซ้ำ

3.4.2.6 เมื่อเทสารละลายที่เป็นตัวทำละลายออกหมดแล้ว จึงเริ่มทำการทำลองใหม่ตั้งแต่ข้อ 3.4.2.4 โดยเปลี่ยนจากสารละลายที่ใช้เป็นตัวทำละลายเป็นสารละลายเพ็คตินที่ยังไม่ได้ฉายรังสี ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในข้อ 3.4.2.1 โดยทดลองจากความเข้มข้นต่ำไปสูง บันทึกและคำนวณค่า efflux time เฉลี่ยของทุกความเข้มข้น

3.4.2.7 นำค่า efflux time ที่ได้มาหาค่า specific viscosity (η_{sp}) และค่า η_{sp} / C หรือ reduce viscosity (η_{red}) ดังสมการที่ 3.1 และ 3.2

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0} \qquad 3.1$$

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C} \qquad 3.2$$

3.4.2.8 นำค่า reduce viscosity (η_{red}) ที่ได้จากการคำนวณ มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า η_{red} กับค่าความเข้มข้นของสารละลาย (C) โดยที่แกน Y คือ η_{red} และแกน X คือความเข้มข้น ลากกราฟเส้นตรงที่ได้มาตัดที่แกน Y จุดตัดแกน Y (Y – intercept) คือค่า intrinsic viscosity [η]

3.4.2.9 นำค่าที่ได้จากข้อ 3.4.2.8 มาคำนวณขนาดโมเลกุลของเพ็คติน โดยใช้สมการ Mark Houwink – Sakurada คือ

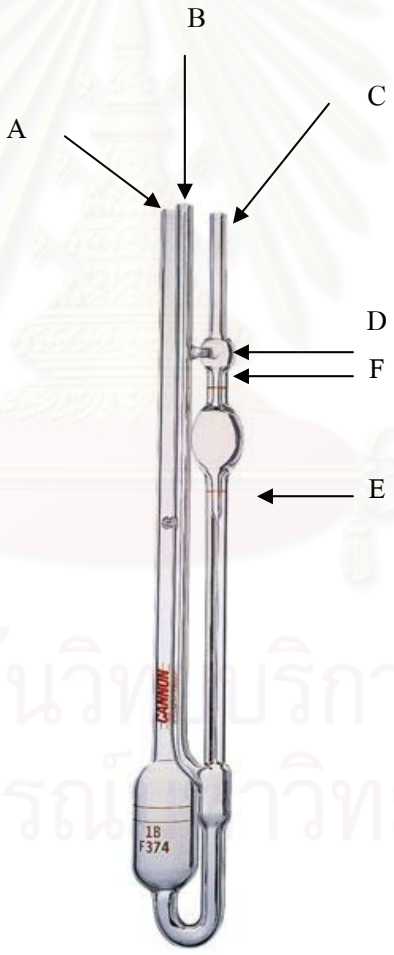
$$[\eta] = kM_v^{\alpha} \qquad 3.3$$

เมื่อ k = 0.96 x 10^{-3} และ a = 1.07 เมื่อแทนค่า K, a และ [η] ลงในสมการจะได้ค่าขนาดโมเลกุล (Viscosity average molecular weight) ของสารละลายเพ็คตินออกมา[32]

3.4.2.10 หลังจากใช้งาน Viscometer ควรทำความสะอาดด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นและโพแทสเซียมไดโครเมต (Conc.H_2SO_4 + $K_2Cr_2O_7$) โดยต้องแช่ไว้เป็นเวลาหลายชั่วโมงแล้วจึงเทออก

3.4.2.11 ล้าง Viscometer ด้วยน้ำสะอาดหลายๆครั้ง จากนั้นกลั้วด้วยน้ำกลั่น จากนั้นก็กลั้วด้วยสารละลายที่ใช้เป็นตัวทำละลายอีกก่อนที่จะทำการทดลองใหม่อีกครั้ง

3.4.2.12 เริ่มทำการทดลองใหม่ตั้งแต่ข้อ 3.4.2.4 ถึงข้อ 3.4.2.11 โดยใช้สารละลายเพ็คตินซึ่งฉายรังสีที่ปริมาณรังสี 2, 4, 6, 8 และ 10 kGy ตามลำดับจนครบทุกความเข้มข้น ของทุกปริมาณรังสี



รูปที่ 3.7 แสดงตำแหน่งต่างๆบน Cannon - Ubbelohde Viscometer หลอด A คือจุดที่เติมสารละลาย , หลอด B คือหลอดที่ต้องปิดขณะที่ใช้จุกยางดูดที่หลอด C และตำแหน่ง F คือจุดที่เริ่มจับเวลาและหยุดเวลาเมื่อสารละลายมาถึงจุด E

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 การขึ้นรูปฟิล์มยางโปรตีนต่ำ

3.5.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

3.5.1.1 น้ำยางธรรมชาติ 60.21 % ปั่นมาแล้ว 1 ครั้งจากบริษัทแพนเอเชีย

3.5.1.2 น้ำกลั่น

3.5.1.3 แอมโมเนีย 25 %

3.5.1.4 แอมโมเนีย 0.7 %

3.5.1.5 Triton X100 10 %

3.5.1.6 สารละลายเพ็คติน 5 %

3.5.1.7 กรดอะซีติก

3.5.1.8 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.5.1.9 บีกเกอร์

3.5.1.10 ตู้อบลมร้อน

3.5.1.11 บีกเกอร์

3.5.1.12 dessicator

3.5.1.13 แท่งแก้วคน

3.5.1.14 กระบอกตวง

3.5.1.15 ปิเปต

3.5.1.16 ขวดน้ำ

3.5.1.17 ขวด Nalgene 250 มิลลิลิตร

3.5.1.18 แผ่นแก้วมีขอบ

3.5.1.19 seive

3.5.1.20 เครื่องมือวัดระดับ

3.5.1.21 เครื่องปั่นความเร็วสูง (Refrigerated Centrifuge: RC)

3.5.1.22 parafilm

3.5.1.23 ขวดพลาสติก 125 มิลลิลิตร

3.5.1.24 Hot plate & Stirrer

3.5.1.25 แท่งแม่เหล็ก

3.5.1.26 เครื่องฉายรังสีแกมมาจาก Co-60 Gammacell220excel สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ

3.5.1.27 เครื่องวัดปริมาณรังสี (Dosimeter) Red perspex

3.5.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.5.2.1 ผสมยางให้มีเปอร์เซนต์ยางประมาณ 32.5 % โดยที่ยางจากบริษัท Pan Asia ผสมโดยการนำน้ำยาง 60.21 % มา134.94 มิลลิลิตร เติม 0.7 % NH_3 ให้ครบ 250 มิลลิลิตร ให้ได้ค่า DRC ประมาณ 30 %

3.5.2.2 นำน้ำยางธรรมชาติในข้อ 3.4.2.1 มาเติมสารละลายเพ็คติน 5 % ซึ่งฉายรังสีที่ปริมาณรังสี 2, 4, 6, 8 และ 10 kGy ที่ความเข้มข้น 1, 1.5, 2 และ 2.5 phr ในน้ำยาง

3.5.2.3 กวนน้ำยาง, Triton X100 และเพ็คตินไว้ด้วยกันเป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ในตู้เย็น 1 คืน

3.5.2.4 ปั่นน้ำยางจากข้อ 3.4.2.3 ด้วยเครื่องเครื่องปั่นความเร็วสูง (Refrigerated Centrifuge: RC)ที่อุณหภูมิ 10 C ° เป็นเวลา 60 นาที ความเร็ว 8000 รอบ/นาที

3.5.2.5 นำน้ำยางจากข้อ 3.4.2.4 แยกครีมยางออกจาก serum ด้วยการใช้ pipet ขนาดใหญ่ (25 ml) ปิดปลายด้วย parafilm สอดผ่านครีมยางซึ่งอยู่ด้านบนของขวดลงไปถึง serum แล้วเป่าหรือเคาะเบาๆเพื่อให้ parafilm หลุดออกไป แล้วดูดเอา serum ออกมาจนหมด

3.5.2.6 การหาค่าปริมาณยางแห้ง(Dry rubber content)ตาม ASTM D1076 โดยการชั่งยางหนัก ประมาณ 10 กรัม เติมน้ำกลั่นเพื่อให้ total solid มีประมาณ 25 %

3.5.2.7 เติมกรดอะซิติก 2% กวนให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้การรวมตัวกันสมบูรณ์

3.5.2.8 วางจานใส่ก้อนยางบน water bath ใช้ไอน้ำระเหยเป็นเวลา 15 – 30 นาที เพื่อระเหยซีรัมออก

3.5.2.9 ล้างก้อนยางที่ได้ด้วยน้ำไหลและบี้ให้แบน ให้มีความหนาเหลือประมาณ 2 มิลลิเมตร แล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส

3.5.2.10 เก็บก้อนยางที่แห้งแล้วให้ Desiccator ที่อุณหภูมิห้อง แล้วชั่งจนกระทั่งน้ำหนักก้อนยางคงที่ คำนวณ%ยางแห้ง (DRC) ตามสูตร

$$\% \text{ DRC} = (\text{น้ำหนักยางก้อนแห้ง/ น้ำหนักของตัวอย่างน้ำยาง}) \times 100 \qquad 3.4$$

3.5.2.11 หา % DRC ของครีมยางที่ดูด serum ออกแล้วจากข้อ 3.5.2.5 โดยการ ชั่งน้ำยางให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน (1-2 กรัม) บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน แล้วเติมแอมโมเนีย 0.7 % ลงไปเล็กน้อย จากนั้นเติมกรดอะซิติกเข้มข้น (Conc. CH_3COOH) ลงไป น้ำยางจับตัวกันเป็นก้อน นำก้อนยางไปชั่งบันทึกน้ำหนัก

ตารางที่ 3.2 การเติมสารละลายเพ็คตินลงในน้ำยาง

ปริมาณรังสีที่สารละลายเพ็คติน 5 %ได้รับ (Dose ; kGy)	ปริมาณเพ็คตินในน้ำยาง (phr)
2	1.0
	1.5
	2.0
	2.5
4	1.0
	1.5
	2.0
	2.5
6	1.0
	1.5
	2.0
	2.5
8	1.0
	1.5
	2.0
	2.5
10	1.0
	1.5
	2.0
	2.5

3.5.2.12 อบก้อนยางที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในตู้อบลมร้อน จนยางแห้งหมดทั้งก้อน (ไม่มีสีขาวขุ่นปรากฏ)ใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมงหรือมากกว่านั้น ชั่งน้ำหนักจนคงที่ บันทึกน้ำหนักของก้อนยางแห้ง จากนั้นคำนวณหา %DRC ในน้ำยางแต่ละขวด จากนั้นเติมแอมโมเนีย 0.7 % ลงไปให้น้ำยางมี % DRC ประมาณ 60 %

3.5.2.13 เทน้ำยางที่ได้จากข้อ 3.5.2.5 ลงในแผ่นแก้วมีขอบใช้น้ำยาง 60 % 25 มิลลิลิตร รวมกับแอมโมเนีย 0.7 % 15 ml ต่อ 1 plate โดยที่ทำ condition ละ 2 plateโดยที่ก่อนเท

ยางควรทำความสะอาด plate และที่ๆวาง plate ด้วยแอลกอฮอล์ 70% ก่อน เมื่อเทยางแล้วทิ้งไว้ให้แห้ง

รูปที่ 3.7 เครื่องปั่นยางด้วยความเร็วสูงและอุณหภูมิต่ำ

ใช้เวลาประมาณ 3-4 วัน แล้วลอกยางออกจาก plate แล้วตากให้แห้งเป็นเวลา 1 วัน

3.5.2.14 การอบฟิล์มยางที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำใส่ถุง ปิดปากถุงในสภาพสุญญากาศ เก็บไว้ใน Dessicator เพื่อรอทดสอบโปรตีนก่อภูมิแพ้ ด้วยวิธี ELISA

3.6 วิธีวิเคราะห์โปรตีนก่อภูมิแพ้โดยวิธี ELISA [INHIBITION ELISA (ASTM D6499-03)][34]

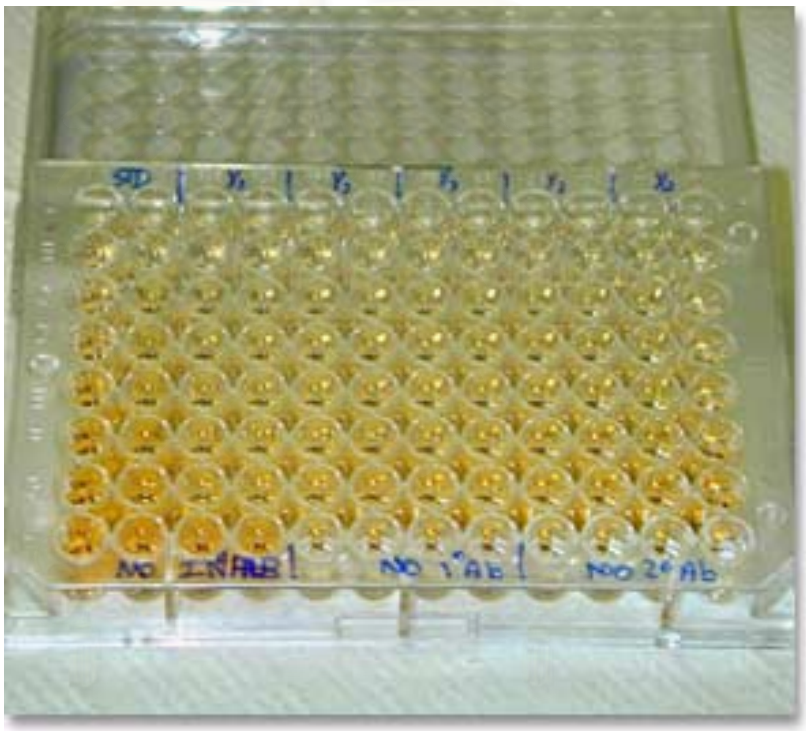
ELISA เป็นวิธีการทดสอบตามมาตรฐาน ASTM สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโปรตีนที่เป็นสารที่กระตุ้นการสร้าง antibody ในน้ำยางและผลิตภัณฑ์ ซึ่งการทดสอบโปรตีนก่อภูมิแพ้ในงานวิจัยนี้ได้ให้สถาบัน LEAP Testing Service .Donald Guthrie Foundation for Education & Research Inc .เป็นผู้ทดสอบ

3.6.1 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.6.1.1 ใช้ plate ELISA 2 plate อันแรกเป็น competition หรือ dilution plate และอีกอันคือ assay plate

3.6.1.2 สารโปรตีนมาตรฐานและที่สกัดจากผลิตภัณฑ์ ผสมกับ specific anti sera เจือจางเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ อยู่ใน competition plate เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ถ้ามีโปรตีนที่อยู่ในน้ำยางก็จะไปเชื่อมต่อกับ antibody ทำให้มันไม่สามารถไปเชื่อมต่อกับ antigen ในน้ำยางที่เคลือบอยู่ในหลุมของ assay plate ได้

3.6.1.3 แต่ละหลุมของ assay plate จะมีปริมาณ antigen ของน้ำยางเท่ากัน ปฏิกิริยาผสมจาก dilution plate จะเคลื่อนย้ายมาที่ assay plate



รูปที่ 3.8 Plate ELISA สำหรับทดสอบโปรตีนก่อภูมิแพ้ในน้ำยางธรรมชาติ [34]

3.6.1.4 ตัวอย่างที่มีปริมาณของโปรตีนของน้ำยางสูง โปรตีนเหล่านั้นก็จะไปเชื่อมต่อกับ antibody ที่ยังใช้ได้ ดังนั้นจะไม่มี antibody อิสระที่สามารถไปเชื่อมต่อกับ antigen ที่อยู่ใน assay plate ได้ สังเกตจากการที่ไม่มีสีเกิดขึ้นเลย ในทางกลับกันในตัวอย่างที่มีโปรตีนของน้ำยางน้อย ก็จะมีโมเลกุลของ antibody เล็กน้อยหรือไม่มีเลยที่จะเชื่อมต่อกับ antigen ด้วยเหตุนี้จึงไม่มี antibody อิสระที่จะไปเชื่อมต่อกับ antigen ที่เคลือบอยู่บน assay plate ก็จะเห็นสีเข้ม

3.6.1.5 หาปริมาณ antigen จากกราฟมาตรฐานที่สร้างจากโปรตีนในน้ำยางที่ทราบปริมาณ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการสกัดเพ็คติน

จากการสกัดเพ็คตินจากฐานดอกทานตะวันสดและแห้งซึ่งขั้นตอนการสกัดมีขั้นตอนหลักดังนี้

- การเตรียมฐานดอกทานตะวันที่จะนำมาสกัดเพ็คติน
- การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และกำจัดสิ่งเจือปนอื่นๆ
- การสกัดเพ็คตินโดยใช้ความร้อนและกรดไฮโดรคลอริก
- การตกตะกอนเพ็คตินด้วยแอลกฮอล์

ตารางที่ 4.1 ผลการสกัดเพ็คตินจากฐานดอกทานตะวันที่ความเข้มข้นของกรดต่างกัน

จำนวนครั้งการสกัด	ชนิดของสารที่ใช้สกัด	น้ำหนักเพ็คตินที่ได้ (กรัม)
1	น้ำกลั่น	0.0907
2		0.0792
3		0.1194
1	น้ำกลั่นปรับ pH เป็น 2 ด้วย 0.5 M HCl	0.0761
2		0.0528
3		0.0543
1	น้ำกลั่นปรับ pH เป็น 4 ด้วย 0.5 M HCl	0.0475
2		0.1000
3		0.1025

ตารางที่ 4.2 ปริมาณเป็นร้อยละของเพ็คตินจากน้ำหนักของวัตถุดิบจากฐานดอกทานตะวันจากการสกัดด้วยเงื่อนไขต่างกัน

เงื่อนไข	ปริมาณเพ็คตินที่สกัดได้ คิดเป็นร้อยละของน้ำหนักสดวัตถุดิบ
น้ำ ครั้งที่ 1	0.3621
น้ำ ครั้งที่ 2	0.3161
น้ำ ครั้งที่ 3	0.4761
pH 2 ครั้งที่ 1	0.3041
pH 2 ครั้งที่ 2	0.2105
pH2 ครั้งที่ 3	0.2164
pH 4 ครั้งที่ 1	0.1898
pH 4 ครั้งที่ 2	0.3987
pH4 ครั้งที่ 3	0.4084

จากการชั่งน้ำหนักดอกทานตะวัน (เฉพาะส่วนที่เป็นฐานดอกที่มีเพ็คตินอยู่) เพื่อหาค่าความหนาแน่น (D) ส่วนฐานดอกทานตะวันที่มาสกัดเพ็คติน โดยใช้สูตร $D = \frac{M}{V}$

$$D = \frac{M}{V}$$

เมื่อ M = น้ำหนัก (กรัม)

V = ปริมาตร (cm^2) ซึ่งก็คือ $1^3 = 1\ cm^2$

ใช้ตัวอย่าง 10 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างหนัก (เปียก) ดังนี้

0.50726, 0.55880, 0.4703, 0.5595, 0.4501, 0.5430, 0.6352, 0.5856, 0.5561 และ 0.2828 กรัม

แต่เนื่องจากตัวอย่างที่ 10 มีขนาดที่เล็กและมีน้ำหนักน้อยเกินไป จึงไม่นำมาคิด

ดังนั้น (น้ำหนักเปียก) เฉลี่ย 9 ตัวอย่าง คือ 0.5407 กรัม

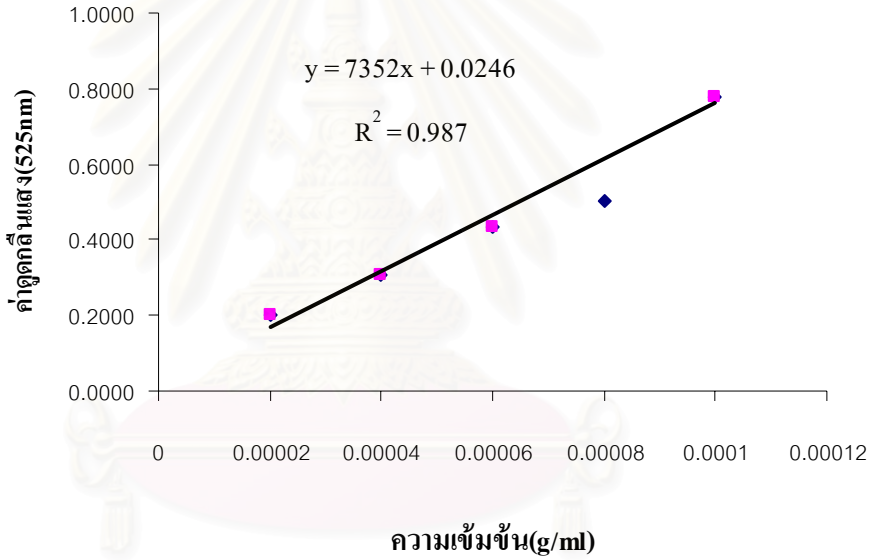
ความหนาแน่นของฐานดอกทานตะวัน = 0.5407 g/ cm^3

4.2 ผลการหาปริมาณ polygalacturonic acid ทั้งหมดในดอกทานตะวัน

จากการวิเคราะห์ปริมาณ polygalacturonic acid ในฐานดอกทานตะวัน ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 525 นาโนเมตร ของเครื่อง UV-spectrophotometer โดยการสร้างกราฟมาตรฐานของปริมาณ polygalcturonic acid ได้ผลดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.3 ค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆที่ 525 นาโนเมตร

ID	Absorbance.	ความเข้มข้น (g/ml)
1	0.1990	0.00002
2	0.3048	0.00004
3	0.4320	0.00006
4	0.5021	0.00008
5	0.7802	0.00010



รูปที่ 4.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Polygalacturonic acid และค่าดูดกลืนแสง

จากกราฟมาตรฐานจึงหาค่าความเข้มข้นของ polygalacturonic acid ในตัวอย่างสารละลายเพ็คตินที่มีอยู่ในฐานดอกทานตะวันด้วยการสกัด 2 เงื่อนไข ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ปริมาณเพ็คตินทั้งหมดในฐานดอกทานตะวันโดยการสกัดฐานดอกด้วยเงื่อนไขต่างกัน จากการวัดค่าดูดกลืนแสงครั้งที่ 1

เงื่อนไขการสกัดตัวอย่าง	จำนวนซ้ำ	ค่าดูดกลืนแสง (525 nm)	ปริมาณของเพ็คตินในสารละลายตัวอย่าง (กรัม)
น้ำกลั่น	1	0.7399	2.55
	2	1.1151	2.67
	3	0.9225	2.43
น้ำกลั่น pH = 2	1	0.9639	2.20
	2	0.5106	1.51
	3	0.4623	1.79

ตารางที่ 4.5 ปริมาณเพ็คตินทั้งหมดในฐานดอกทานตะวันโดยการสกัดฐานดอกด้วยเงื่อนไขต่างกัน จากการวัดค่าดูดกลืนแสงครั้งที่ 2

เงื่อนไขการสกัดตัวอย่าง	จำนวนซ้ำ	ค่าดูดกลืนแสง (525 nm)	ปริมาณของเพ็คตินในสารละลายตัวอย่าง (กรัม)
น้ำกลั่น	1	0.8027	2.78
	2	1.0532	2.52
	3	0.9150	2.41
น้ำกลั่น pH = 2	1	0.9745	2.23
	2	0.5759	1.72
	3	0.3878	1.48

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6 ร้อยละของปริมาณเพ็คตินทั้งหมดในฐานดอกทานตะวันสดจากการสกัดด้วยเงื่อนไขต่างกัน

เงื่อนไขการสกัดตัวอย่าง	จำนวนซ้ำ	น้ำหนักเพ็คตินเฉลี่ยจากการวัด 2 ครั้ง (กรัม)	น้ำหนักวัตถุดิบสดเฉลี่ย (กรัม)	ร้อยละของเพ็คตินต่อน้ำหนักสดวัตถุดิบ
น้ำกลั่น	1	2.6661	25.0927	10.6248
	2	2.5941	25.0503	10.3556
	3	2.4172	25.0446	9.6516
น้ำกลั่น pH = 2	1	2.2163	25.0965	8.8312
	2	1.6137	25.0910	6.4315
	3	1.6340	25.0720	6.5174

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การฉายรังสีเพ็คติน

ผลการฉายรังสีสารละลายเพ็คติน 5 % ในวันที่ 7 พฤศจิกายน 2549 ปริมาณรังสีที่ต้องการ คือ 2, 4, 6, 8 และ 10 kGy โดยใช้ Radiochromic film เป็น Dosimeter เป็นดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.7 ผลการวัดปริมาณรังสีสารละลายเพ็คติน 5 %

ปริมาณรังสีที่ต้องการ (kGy)	เวลาฉาย (วินาที)	ปริมาณรังสี (kGy)	ปริมาณรังสีเฉลี่ย (kGy)
2	610.85	2.13	2.16
		2.18	
4	1199.09	4.04	4.14
		4.24	
6	1787.32	6.06	6.11
		6.16	
8	2375.56	8.11	8.15
		8.18	
10	2963.79	10.10	10.08
		10.06	

4.4 การวัดขนาดโมเลกุลเพ็คตินที่ผ่านการฉายรังสี

เพ็คตินที่ไม่ได้ฉายรังสีมีน้ำหนักโมเลกุล 1.43 x 10^5 Da เมื่อนำมาฉายรังสีในสภาวะสารละลายคือสารละลายเพ็คติน 5 % ที่ปริมาณรังสี 2, 4, 6, 8 และ 10 kGy น้ำหนักโมเลกุลของเพ็คตินที่ปริมาณรังสีต่างๆแสดงดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.8 ผลการวัดขนาดโมเลกุล (Viscosity average molecular weight) ของเพ็คตินที่ฉายรังสี 2 kGy

จำนวนครั้ง	[η]	MW (Da)	MW average	% ผิดพลาดจาก MW เฉลี่ย
1	137.50	65,875.06	65,709.32	0.25
2	137.73	65,978.03		0.41
3	136.16	65,274.88		0.67

ตารางที่ 4.9 ผลการวัดขนาดโมเลกุล (Viscosity average molecular weight) ของเพ็คตินที่ฉายรังสี 4 kGy

จำนวนครั้ง	[η]	MW (Da)	MW average	% ผิดพลาดจาก MW เฉลี่ย
1	88.00	43,409.10	41,956.77	3.35
2	83.49	41,325.91		1.53
3	83.08	41135.29		2.00

ตารางที่ 4.10 ผลการวัดขนาดโมเลกุล (Viscosity average molecular weight) ของเพ็คตินที่ฉายรังสี 6 kGy

จำนวนครั้ง	[η]	MW (Da)	MW average	% ผิดพลาดจาก MW เฉลี่ย
1	58.31	29,549.85	30,270.95	2.44
2	60.00	30,348.05		0.25
3	57.25	29045.17		4.22

ตารางที่ 4.11 ผลการวัดขนาดโมเลกุล (Viscosity average molecular weight) ของเพ็คตินที่ฉายรังสี 8 kGy

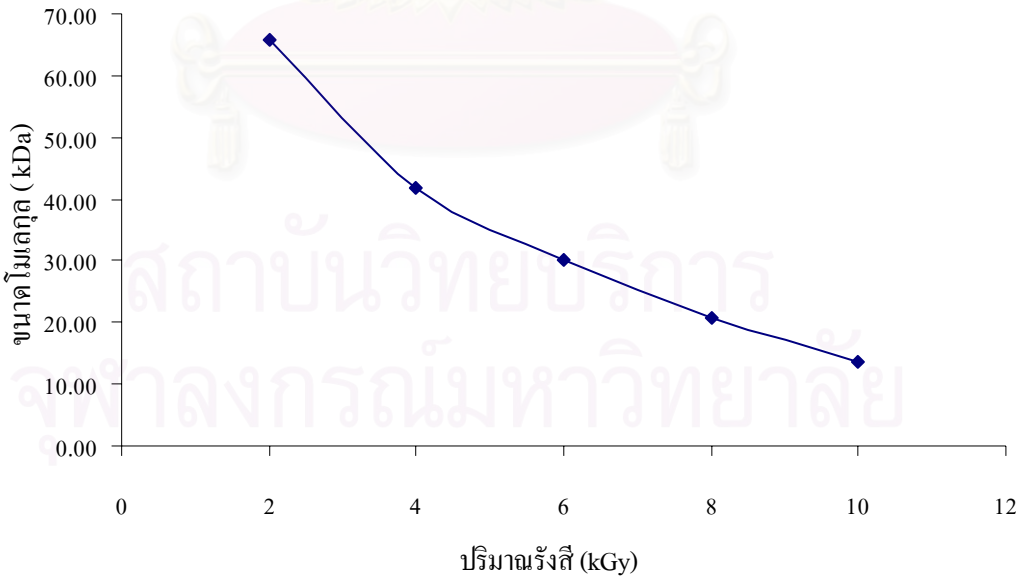
จำนวนครั้ง	[η]	MW (Da)	MW average	% ผิดพลาดจาก MW เฉลี่ย
1	43.00	22,228.66	20,770.23	6.56
2	38.36	19979.21		3.96
3	38.62	20,102.81		3.32

ตารางที่ 4.12 ผลการวัดขนาดโมเลกุล (Viscosity average molecular weight) ของเพ็คตินที่ฉายรังสี 10 kGy

จำนวนครั้ง	[η]	MW (Da)	MW average	% ผิดพลาดจาก MW เฉลี่ย
1	25.00	13,387.00	13,552.18	1.23
2	25.48	13,630.52		0.57
3	25.50	13,639.02		0.64

ตารางที่ 4.13 การเปลี่ยนแปลงของขนาดโมเลกุล (Viscosity average molecular weight) เพ็คตินเมื่อฉายรังสีที่ปริมาณรังสีต่างๆ

ปริมาณรังสี (kGy)	ขนาดโมเลกุล (Da)
2	65,709.32
4	41,956.77
6	30,270.95
8	20,770.23
10	13,552.18



รูปที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดโมเลกุลของเพ็คตินและปริมาณรังสีแกมมาที่ฉายรังสี

4.5 การขึ้นรูปฟิล์มยางโปรตีนต่ำ

จากการทำฟิล์มยางโปรตีนต่ำโดยการใส่เพ็คตินลงในน้ำยางที่นำยางที่มี % DRC 60.21 % มาเจือจางเป็น 32.5 % แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 8000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วแยกซีรัมออก พบว่าครีมยางที่เหลือมี % DRC ดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.14 การหา % DRC ในครีมยางหลังจากปั่นน้ำยางผสมเพ็คตินด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง

ปริมาณรังสี (kGy)	ปริมาณเพ็คติน (phr)	น้ำหนักน้ำยาง (g)	น้ำหนักยางก้อน (หลังอบ)	%DRC
control	0	0.7170	0.4974	69.37
2	1	0.8669	0.5710	65.86
	1.5	0.9946	0.6306	63.4
	2	0.8711	0.5446	62.52
	2.5	0.9896	0.6225	62.9
4	1	0.8669	0.5710	65.86
	1.5	0.9946	0.6306	63.4
	2	0.8711	0.5446	62.52
	2.5	0.9896	0.6225	62.9
6	1	1.0070	0.6574	65.28
	1.5	0.9199	0.4822	52.42
	2	1.0090	0.5588	55.38
	2.5	0.8395	0.4675	55.69
8	1	1.0140	0.6040	59.57
	1.5	0.8982	0.5248	58.43
	2	0.8120	0.4554	56.08
	2.5	1.0770	0.5761	53.49
10	1	0.8068	0.5348	66.29
	1.5	1.0986	0.6379	58.06
	2	0.9641	0.5772	59.87
	2.5	1.0560	0.7476	70.8

4.6 ผลการทดสอบโปรตีนก่อภูมิแพ้ในฟิล์มยางโปรตีนต่ำ

ในการส่งตัวอย่างฟิล์มยางเพื่อทดสอบปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้นั้นได้ทำการคัดเลือกฟิล์มยางโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 330 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างฟิล์มยางสูงสุด เพื่อเลือกตัวอย่างฟิล์มยางที่มีโปรตีนน้อยที่สุด ดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 ผลการวัดค่าดูดกลืนแสงของฟิล์มยางที่ 330 นาโนเมตร

ปริมาณรังสี (kGy)	ขนาดโมเลกุลเพ็คติน (Da)	ปริมาณเพ็คติน (phr)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 330 นาโนเมตร
control	-	0	0.8359
2	65,709.32	1.0	0.9668
		1.5	0.7753
		2.0	0.7489
		2.5	0.8214
4	41,954.77	1.0	0.7839
		1.5	0.7672
		2.0	0.9118
		2.5	0.7875
6	30,270.95	1.0	0.8025
		1.5	0.8390
		2.0	0.9069
		2.5	0.7850
8	20,770.23	1.0	1.0914
		1.5	0.9263
		2.0	0.8138
		2.5	1.0291
10	13,552.18	1.0	0.8843
		1.5	0.9799
		2.0	0.9367
		2.5	0.8858

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผลการวัดค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างฟิล์มยางที่ 330 นาโนเมตร ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างฟิล์มยางของเพ็คตินที่ฉายรังสี 2 kGy จนมีขนาดโมเลกุล 65,709.32 Da โดยเติมลงในยาง 2 phr ค่าดูดกลืนแสงที่ 330 นาโนเมตรเท่ากับ 0.7489 และ ตัวอย่างฟิล์มยางของเพ็คตินที่ฉายรังสี 4 kGy จนมีขนาดโมเลกุล 41,954.77 Da โดยเติมลงในยาง 1.5 phr ค่าดูดกลืนแสงที่ 330 นาโนเมตรเท่ากับ 0.7672 ซึ่งเมื่อทดสอบปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้ในตัวอย่างฟิล์มยาง ผลการทดสอบเป็นดังตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 ผลการหาค่าปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้ในฟิล์มยางที่ลดปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้ด้วยการเติมเพ็คตินด้วยวิธี ELISA

ตัวอย่าง			ปริมาณของโปรตีนก่อภูมิแพ้ (μg/g)
ปริมาณรังสีที่ฉายเพ็คติน (kGy)	ขนาดโมเลกุลเพ็คติน (Da)	ปริมาณเพ็คตินที่เติมลงในน้ำยาง (phr)	
control	143,000	0	7.6
2	65,709	2	4.6
4	41,954	1.5	1.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

5.1 การสกัดเพ็คตินด้วยเงื่อนไขต่างๆ

จากผลการสกัดเพ็คตินจากฐานดอกทานตะวันด้วยสารละลายที่ใช้สกัดที่มีเงื่อนไขต่างกันในเรื่องของ pH พบว่าการใช้น้ำกลั่นนั้นทำให้ได้ปริมาณของเพ็คตินสูงกว่าการใช้สารละลายที่เป็นกรด และจากวัตถุดิบ 25 กรัม ซึ่งมีปริมาณเพ็คติน (polygalacturonic acid) ทั้งหมด 2.56 กรัม (คิดเป็น 10.24 %) เมื่อผ่านขั้นตอนการสกัดจะได้ปริมาณเพ็คตินประมาณ 0.0964 กรัม หรือคิดเป็น 3.77 % ของเพ็คตินที่มีทั้งหมด

5.2 การหาปริมาณ polygalacturonic acid ในฐานดอกทานตะวัน

จากการวิเคราะห์ปริมาณ polygalacturonic acid ในฐานดอกทานตะวัน ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายที่ 525 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer โดยใช้สารละลายที่ผ่านการสกัดมาต่างกัน คือ สกัดด้วยน้ำกลั่นและน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 2 พบว่าปริมาณของ polygalacturonic acid ในสิ่งสกัดทั้ง 2 แบบ เป็นดังตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 ปริมาณ polygalacturonic acid ในสารละลายที่สกัดจากฐานดอกทานตะวันด้วยเงื่อนไขต่างกัน

เงื่อนไขการสกัดตัวอย่าง	น้ำกลั่น	น้ำกลั่น pH2
น้ำหนักเพ็คติน(กรัม)เฉลี่ย	2.42	1.63
ร้อยละ/น้ำหนักสดวัตถุดิบ(เฉลี่ย)	10.21	7.26

จะเห็นว่าสารละลายที่ได้จากการต้มฐานดอกทานตะวันโดยใช้น้ำและน้ำกลั่นด้วยความร้อนประมาณ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จะได้ปริมาณของ polygalacturonic acid ต่างกัน โดยที่การใช้น้ำกลั่นเพียงอย่างเดียวจะได้ปริมาณ polygalacturonic acid สูงกว่าการใช้สารละลายที่เป็นกรด หรืออาจกล่าวได้ในฐานดอกทานตะวันที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดหนัก 25 กรัมมีปริมาณ

เพ็คติน 2.42 กรัม หรือร้อยละ 10. 21 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของเพ็คตินที่สกัดได้กับปริมาณของเพ็คตินทั้งหมดที่มีในดอกทานตะวันที่หนักประมาณ 25 กรัม เป็นดังตารางที่ 5.2

ตารางที่ 5.2 ร้อยละของปริมาณของเพ็คตินที่สกัดจากฐานดอกทานตะวันด้วยเงื่อนไขต่าง ๆ ต่อปริมาณเพ็คตินทั้งหมดที่มีในวัตถุดิบสด

จำนวนครั้งการสกัด	ชนิดของสารที่ใช้สกัด	ร้อยละของปริมาณของเพ็คตินที่สกัดได้ต่อเพ็คตินทั้งหมดที่มีในวัตถุดิบ
1	น้ำกลั่น	3.7479
2		3.2727
3		4.9339
1	น้ำกลั่นปรับ pH เป็น 2 ด้วย 0.5 M HCl	3.1446
2		2.1818
3		2.2438
1	น้ำกลั่นปรับ pH เป็น 4 ด้วย 0.5 M HCl	1.9628
2		4.1322
3		4.2355

จากตารางที่ 5.2 จะเห็นว่าปริมาณเพ็คตินที่สกัดได้นั้นมีปริมาณโดยเฉลี่ยเพียงร้อยละ 3.32 ต่อปริมาณของเพ็คตินทั้งหมดที่มีในวัตถุดิบ (ฐานดอกทานตะวัน)

5.3 การฉายรังสีเพ็คติน

จากการวัดปริมาณรังสีแกมมาจาก Co-60 ที่ฉายให้กับสารละลายเพ็คติน โดยใช้ Radiochromic film เป็นเครื่องวัดปริมาณรังสี ปริมาณรังสีที่ต้องการคือ 2, 4, 6, 8 และ 10 kGy ในการวัดรังสีนั้นจะติด Dosimeter ที่ตำแหน่งที่ปริมาณรังสีสูงสุด (maximum) และปริมาณรังสีต่ำสุด (minimum) ที่ตัวอย่างสารละลายเพ็คติน พบว่าปริมาณรังสีเฉลี่ย (Dose average) และ Dose Uniformity ที่ตัวอย่างได้รับเป็นดังตารางที่ 5.3 จากผลการวัดปริมาณรังสีจะเห็นว่าปริมาณรังสีเฉลี่ยที่ตัวอย่างสารละลายเพ็คติน 5% ได้รับนั้นมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณรังสีที่ต้องการ ส่วนค่า Dose Uniformity ซึ่งแสดงถึงความแตกต่างของปริมาณรังสีที่สูงสุดต่ำสุดที่ตัวอย่างได้รับที่ไม่ควรสูงกว่า 1 นั้น จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเพ็คตินได้รับปริมาณรังสีใกล้เคียงกันทั้งขวดบรรจุ

ตารางที่ 5.3 แสดงปริมาณรังสีเฉลี่ยและ Dose uniformity ในการฉายรังสีสารละลายเพ็คติน 5%

ปริมาณรังสีที่ต้องการ (kGy)	ตำแหน่งการติดเครื่องวัดปริมาณรังสี	ปริมาณรังสีที่ได้จากการวัด (kGy)	ปริมาณรังสีเฉลี่ย (kGy)	Dose uniformity
2	ปริมาณรังสีต่ำสุด	2.13	2.16	1.02
	ปริมาณรังสีสูงสุด	2.18		
4	ปริมาณรังสีต่ำสุด	4.04	4.14	1.05
	ปริมาณรังสีสูงสุด	4.24		
6	ปริมาณรังสีต่ำสุด	6.06	6.11	1.02
	ปริมาณรังสีสูงสุด	6.16		
8	ปริมาณรังสีต่ำสุด	8.11	8.15	1.01
	ปริมาณรังสีสูงสุด	8.18		
10	ปริมาณรังสีต่ำสุด	10.10	10.08	1.00
	ปริมาณรังสีสูงสุด	10.06		

5.4 การวัดขนาดโมเลกุลเพ็คตินที่ผ่านการฉายรังสี

จากการวัดขนาดโมเลกุลของเพ็คตินที่ผ่านการฉายรังสีที่ปริมาณรังสี 2, 4, 6, 8 และ 10 kGy นั้นทำให้ขนาดโมเลกุลของเพ็คตินลดลง จากเดิมขนาดโมเลกุลของเพ็คตินที่ยังไม่ได้ผ่านการฉายรังสี 1.43×10^5 ดาลตัน เมื่อฉายรังสีที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 kGy แล้วทำให้ขนาดโมเลกุลของเพ็คตินลดลงเป็น เป็น 6.57×10^4, 4.20×10^4, 3.03×10^4, 2.08×10^4และ 1.36×10^4 ดาลตัน ตามลำดับ จะเห็นว่าเมื่อปริมาณรังสีสูงขึ้น ขนาดโมเลกุลของเพ็คตินจะลดลง

5.5 การขึ้นรูปฟิล์มยางโปรตีนต่ำ

การทำแผ่นยางโปรตีนต่ำด้วยการเติมสารละลายเพ็คตินที่มีขนาดโมเลกุลต่างๆกัน อันเนื่องมาจากการฉายรังสีเพื่อตัดสายโซ่โมเลกุลของเพ็คติน พบว่าการขนาดโมเลกุลของเพ็คตินที่เหมาะสมในการใช้จับกับโปรตีนก่อภูมิแพ้ในน้ำยางธรรมชาตินั้นคือ ขนาดโมเลกุล 4.20×10^4ดาลตัน โดยการฉายรังสีสารละลายเพ็คติน ที่ปริมาณรังสี 4 กิโลเกรย์ ซึ่งทำให้ปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้

ลดต่ำลงจากเดิม โดยปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้ในฟิล์มยางซึ่งทดสอบด้วยวิธี ELISA พบว่าแผ่นฟิล์มยางที่ไม่เติมสารละลายเพ็คตินมีปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้ 7.6 ไมโครกรัม/กรัม และเมื่อเติมสารละลายเพ็คติน ที่ผ่านการฉายรังสี 2 กิโลเกรย์ ปริมาณ 2 phr สามารถลดปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้ลงได้ร้อยละ 39.47 และเมื่อเติมสารละลายเพ็คติน ที่ผ่านการฉายรังสี 4 กิโลเกรย์ เพียง 1.5 phr ก็สามารถลดปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้ลงได้ถึงร้อยละ 80.26 จึงสรุปได้ว่าปริมาณรังสีที่เหมาะสมในการฉายรังสีเพื่อลดขนาดโมเลกุลของเพ็คติน เพื่อใช้เป็นสารลดโปรตีนก่อภูมิแพ้ในน้ำยางธรรมชาตินั้นคือ 4 กิโลเกรย์

5.5 การลดลงของโปรตีนก่อภูมิแพ้เมื่อใช้เพ็คตินฉายรังสีปริมาณต่าง ๆ

จากผลการทดสอบปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้ในฟิล์มยางด้วยวิธี ELISA พบว่าปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้ ในฟิล์มยางที่ไม่ได้เติมสารละลายเพ็คตินนั้นมีปริมาณน้อยกว่าที่กำหนดในมาตรฐานของ FDA คือ 20 ไมโครกรัม / กรัม เนื่องมาจากการนำน้ำยางธรรมชาติที่ผ่านการปั่นมาแล้ว 1 ครั้งมาเจือจางด้วยสารละลายแอมโมเนียอีกก็เป็นการลดปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้ลง อีกทั้งการปั่นยางด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงที่อุณหภูมิต่ำ (10 องศาเซลเซียส) ทำให้เนื้อยางและซีรัมแยกออกจากกันได้ดีมาก จนทำให้โปรตีนก่อภูมิแพ้ที่อยู่ในซีรัมถูกแยกออกไปได้มากเมื่อแยกเนื้อยางออกจากซีรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

1.จากผลการทดสอบปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้ด้วยวิธี ELISA พบว่าปริมาณของโปรตีนก่อภูมิแพ้ในฟิล์มยางที่ไม่ได้เติมเพ็คติน (control) มีปริมาณโปรตีนก่อภูมิแพ้ 7.6 ไมโครกรัม/กรัม ซึ่งน้อยกว่าที่กำหนดไว้ของ FDA คือน้อยกว่า 20 ไมโครกรัม/กรัม อาจจะเนื่องมาจากการปั่นยางใช้เวลามากไป ควรจะลดเวลาในการปั่นยางลงเป็น 40 – 50 นาที

2. ในการวัลคาไนซ์ยางด้วยการฉายรังสีหรือสารเคมี ก็สามารถทำให้เกิดโปรตีนที่มีขนาดเล็ก ซึ่งเป็นการเพิ่มโปรตีนก่อภูมิแพ้ขึ้นมาอีก ดังนั้นจึงควรเติมเพ็คตินหลังจากวัลคาไนซ์ยางแล้ว

3. การสกัดเพ็คตินจากฐานดอกทานตะวันนั้น ควรจะปรับเปลี่ยนวิธีการบางจุดเพื่อให้ได้ปริมาณเพ็คตินสูงขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

[1] Ballew Kinnaman. 1997 , A Brief Natural History of Latex Rubber Allergy[online]. Available from: http://www.Immune.Com/rubber/nr1.html

[2] สมพงศ์ สุขมาก,เสมอ สมนาค.2536. การปรับปรุงพันธุ์ยางพาราและยางพาราอีสาน. สถาบันวิจัยยาง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

[3] Natural rubber23 – 3 rd quarter 2001 ,Newsletter of the Rubber Foundation information Center for Natural Rubber- RUBBER-STICHTING 193

[4] Kertesz,Z.I.,The Pectic substances,Inter science Publisher.Inc.,London,1 st ed .,1951

[5] ศิริวัลย์ บุญสุข . 2542. การพัฒนายางธรรมชาติโปรตีนแอลเลอเจนต่ำโดยกระบวณการสะพอนิฟิ เคชั่น. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[6] ชโนวิทก์ ตู้บรรเทิง . 2541. การชะละลายโปรตีนจากถุงมือยางธรรมชาติโดยใช้สารลดแรงภายใต้ความดัน.วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

[7] กนกวรรณ อินสองใจ.2543 . การเตรียมยางธรรมชาติโปรตีนต่ำโดยสะพอนิฟิเคชั่น. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

[8] กิติพงษ์ หาญเจริญ . 2539. การพัฒนาวิธีอิมมูโนแอสเสย์สำหรับตรวจวัดโปรตีนที่เป็นแอลเลอเจนในผลิตภัณฑ์ ยางธรรมชาติ .วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตรชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

[9] พรรณสุนันท์ เจียรรุ่งเรือง . 2543. การลดปริมาณโปรตีนของยางธรรมชาติ โดยโปรตีเอสร่วมกับพลังงานไมโครเวฟ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

[10] อลิสา วังใน . 2538. การตรึงรูปปาเปนบนไคตินเพื่อลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาสาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

[11] วรรณพ วิเศษสงวน . 2535. สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดโปรตีนจากน้ำยางธรรมชาติโดยเอนไซม์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมีชีวภาพ คณะ

วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

[12] ธานี ตระกูลอินทร์ . 2533. ผลของโซเดียมเฮกซาเมตาฟอสเฟต และ เอทิลีน ดิเอมีน เทตราอะซีติกแอซิดต่อการสกัดเพ็คตินจากเปลือกส้มโอ . วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

[13] พรฤดี มุ่งสมานกูล . 2535. การชะละลายเม็ดยางธรรมชาติด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลว วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชา เคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

[14] Roy L.Whistler &James N.Bemiller.Carbohydrate Chemistry for food science.

[15] วราภรณ์ ขจรไชยกูล. แนะนำน้ำยาง .2525

[16] Blackley D.C.1966. High polymer Latices . Maclaren&Son L.td.London,p.221.

[17] H Alenius ,K Turjanmaa , T palosuo .(2002)Natural rubber latex allergy Occupational and Environmental Medicine 2002 ; 59 : 419-424

[18] Biochemical Journal (2003) Volume 376, 717-724 Available from :http://www.biochemj.org/bj/376/0717/bj3760717f03.htm

[19] C.A. Reyes-L_opez et al. Insights into a conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein). Biochemical and Biophysical Research Communications 314 (2004) 123–130 129

[20] Braconnot, Henri. Keppler, Frank et al. Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions. *Nature* 439, 187-190

[21] Available from :www.answers.com/topic/pectin

[22] Available from: www.forst.uni-muenchen.de/.../ALLGPAT/pectin.gif(b)

[23] Available from :www.lsbu.ac.uk/water/hypec.html

[24] IPPA International Pectin Producers Association.2001 . Available from: www.ippa.info

[25] Lecture of Oregon state University ,Available from: www.cfs.purdue.edu/class/f&n630/Virt_Class_2/pectin.htm

[26] วรรณวิมล ปาสานพันธ์ . 2546. การแยกโมเลกุลลำดับส่วนไคโตซานจากการฉายรังสีแกมมาโดยใช้วิธีเลือกการตกตะกอนด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม .วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชานิวเคลียร์เทคโนโลยี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

[27] CPKelco A Huber Company .GENU Pectin. United State. Available from: http://www.cpkelco.com/pectin/gelling_mechanism.html

[28] F.Kar ,N.Arslan . Effect of temperature and concentration on viscosity of orange peel pectin solution and intrinsic viscosity – molecular weight relationship .Carbohydrate polymer 40 (1999)277-284

[29] Jittra Singthonga, Steve W. Cuib,Suwayd Ningsanonda, H. Douglas Goff. Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krueo Ma Noy (Cissampelos pareira) pectin. Carbohydrate Polymers 58 (2004) 391–400

[30] M.T.Iglesias ,J.E.Lozano. extraction and characterization of sunflower pectin . Journal of food engineering 62 (2004)215-223

[31] Mohammad Ali Sahari , Ali Akbarian ,Manuchehr Hamedi . Effect of variety and acid washing method on extraction yield and quality of sunflower head pectin .Food Chemistry 83 (2003) 43–47

[32] H. Zegota, The effect of γ-irradiation on citrus pectin in N_2O and N_2O/O_2 saturated aqueous solutions . Food Hydrocolloids 13 (1999) 51-58

[33] ปรีชา พหลเทพ.2540.โพลีเมอร์(High Polymers). สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง

[34] David Kostyal, Ph.D .2006 :Available from :http://www.guthrie.org/AboutGuthrie/Research/LEAP/ELISA.asp

[35] D. Constenla and J.E. Lozano. Kinetic model of pectin demethylation **.** Latin America Applied Research

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บรรณานุกรม

[1] M.C.A Leitao,M.L Alacao Silva,M.I.N.Januario&H.G.Azinheira. Galacturonic acid in pectic substances of sunflower head residue : quantitative determination by HPLC .Carbohydrate Polymers 26 (1995)165-169

[2] D.P.Wiesenborn ,J .wang ,K.C Chang ,J.G. Schwarz. Comparison of continuous and batch process for pectin extraction from sunflower heads. Industrial Crops and Product 19(1999) 171 – 181 an Internationl Journal

[3] Susan M Tarlo . Occupational Aspects of Natural Rubber Latex Allergy . วารสารอายุรศาสตร์แห่งประเทศไทย 2544 ;17:136-140

[4] Braz. arch. Extraction of pectin from apple pomace. Food science and technology biol. technol. vol.48 no.2 Curitiba 2005

[5] Kim, W.J., Sosulski, F. & Campbell, S.J. (1978). Formulation and characteristics of low-ester gels from sunflower pectin. J. Food Sci., 43, 146-149.

[6] Lin, M.J.Y., Sosulski, F.W., Humbert, E.S. & Downey, R.K.(1975). Distribution and composition of pectins in sunflower plants. Can. J. Plant Sci., 55, 507-513.

[7] AlarcBo-Silva, M.L. (1990). Characterization of a pectin from sunflower head residues. Acta Alimentaria, 19(l),19-26.

[8] Alarcao-Silva, M.L., Curado, T.C. & Sousa, I.M.N. (1992).Geeficados hipocaloricos de urn sumo de uva por incor-pora@o de pectina corn baixo teor de metoxilo extraida de
residuos de girassol. In I *Jornadas das Zndtistrias Agro-Alimentares,* Lisboa (in press)

[9] Dakin MJ, Yentis SM, Latex allergy: a strategy for management, Anaesthesia 1998; 53: 774-81.

[10] ร.ศ ชยากริต ศิริอุปถัมป์ .การพัฒนาจากน้ำยางข้นธรรมชาติและยางแท่งธรรมชาติที่มีโปรตีนก่อภูมิแพ้ต่ำ. รายงานโครงการพัฒนานวัตกรรม , ธันวาคม 2545

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

รายงานผลการวัดปริมาณรังสี

(การกระจายของปริมาณรังสี)

ชื่อโครงการ การย่อยสลายเพ็คตินด้วยรังสีแกมมาเพื่อใช้เป็นสารลดโปรตีนก่อภูมิแพ้ในน้ำยางธรรมชาติ

ผู้ขอวัดปริมาณรังสี นงค์นุช แจ้งสว่าง (นักศึกษาป .โท นิวเคลียร์เทคโนโลยี)

วันที่ฉายรังสี 3 กุมภาพันธุ์ 2549

เครื่องฉายรังสี Gammacell 220 excell

ชนิดของเครื่องวัดปริมาณรังสี Film

ผลิตภัณฑ์ที่ฉายรังสี

ชื่อผลิตภัณฑ์ สารละลายเพ็คติน 1 %

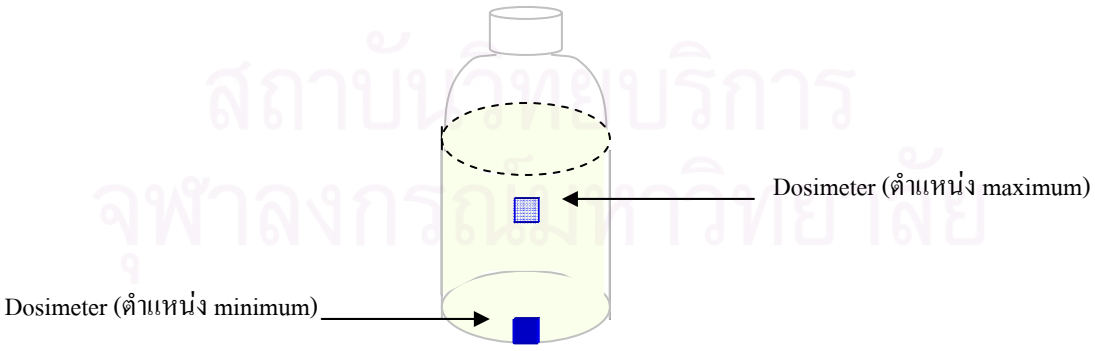
ภาชนะบรรจุ ขวดแก้วใสขนาด 50 ml

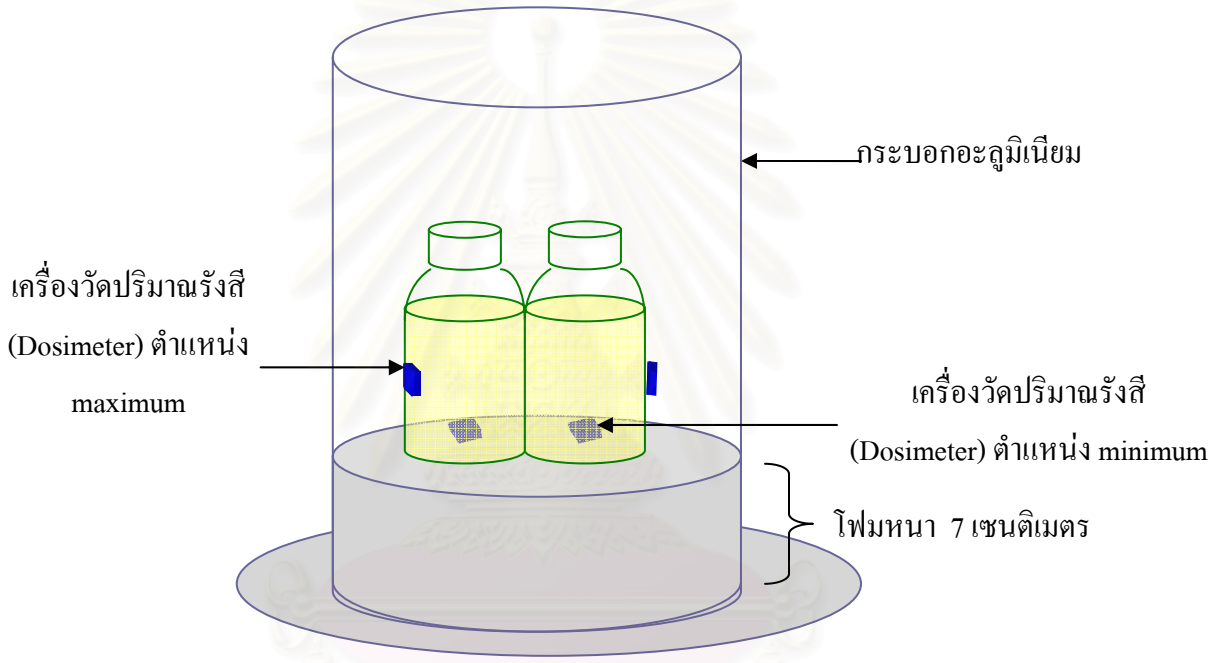
ลักษณะผลิตภัณฑ์ สารละลายเพ็คตินในขวดแก้วใส บรรจุลงในกระบอกอลูมิเนียม

รายละเอียดการฉายรังสี(7 พฤศจิกายน 2549)

- สารละลายเพ็คตินอยู่ในขวดพลาสติกสี่เหลี่ยมปริมาตร 125 ml ติด dosimeter ที่ตำแหน่ง maximum

เป่าลม





สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานผลการวัดปริมาณรังสี

ชื่อโครงการ/งาน การย่อยสลายเพ็คตินด้วยรังสีแกมมาเพื่อใช้เป็นสารลดโปรตีนก่อภูมิแพ้ในน้ำยางธรรมชาติ **(Solution 5 %)**

ผู้ของาน/หน่วยงาน นงค์นุช แจ้งสว่าง (นักศึกษาป .โท นิวเคลียร์เทคโนโลยี)

ชนิดของเครื่องฉายรังสี Gammacell 220 excell

ชนิดของเครื่องวัดปริมาณรังสี Film

วันที่ฉายรังสี 7 พฤศจิกายน 2549

อ้างถึง การกระจายของปริมาณรังสี (Dose Mapping) วันที่.....

เลขที่.....

ผลการวัดปริมาณรังสี

Required dose (kGy)	Code of Dosimeter	Actual Dose (kGy)	note
2	14H	2.13	610.85 วินาที
	15H	2.18	
4	16H	4.24	1199.09 วินาที
	17H	4.04	
6	18H	6.06	1787.32 วินาที
	19H	6.16	
8	20H	8.18	2375.56 วินาที
	21H	8.11	
10	22H	10.10	2963.79 วินาที
	23H	10.06	

ผู้ทำการวัด/ตรวจสอบผลการวัด .....

(นายอารักษ์ วิทิตธีรานนท์)

ภาคผนวก ข

ตัวอย่างการหาขนาดโมเลกุลของเพ็คตินที่ฉายรังสีที่สภาวะสารละลาย 2 kGy

จากข้อมูลตารางที่ 4.8 ข้อมูลจากการทดลองที่ 3 ผลการทดลองหาค่า efflux time และการหาค่า specific viscosity (η_{sp})และค่า reduced viscosity (η_r) แสดงดังตาราง ข.1

ตารางที่ ข.1 แสดงค่า ค่า efflux time และการหาค่า specific viscosity (η_{sp}) และค่า reduced viscosity (η_r) ของตัวอย่างเพ็คตินที่ผ่านการฉายรังสีที่สภาวะสารละลาย2 kGy จากข้อมูลการทดลองครั้งที่ 3 ตามตารางที่ 4.8

ความเข้มข้นของสารละลายเพ็คติน (g/ml)	Efflux time (วินาที)				η sp	η_{red}
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	(ml / g)	(ml / g)
0.0000	913	913	915	914		
0.00025	929	943	945	944	0.0329	131.7359
0.00050	964	963	965	964	0.0549	109.8966
0.00075	1015	972	967	985	0.0774	103.1809
0.00100	1010	981	1028	1006	0.1011	101.0559

จากค่า Efflux time ที่ได้นำมาคำนวณค่าความหนืดเฉพาะหรือ specific viscosity (η_{sp}) ตามสมการ

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0} \qquad \text{ข.1}$$

เช่น ที่ความเข้มข้น 0.00025 g/ml

$$\eta_{sp} = \frac{944 - 914}{914}$$

$$\eta_{sp} = 0.0329$$

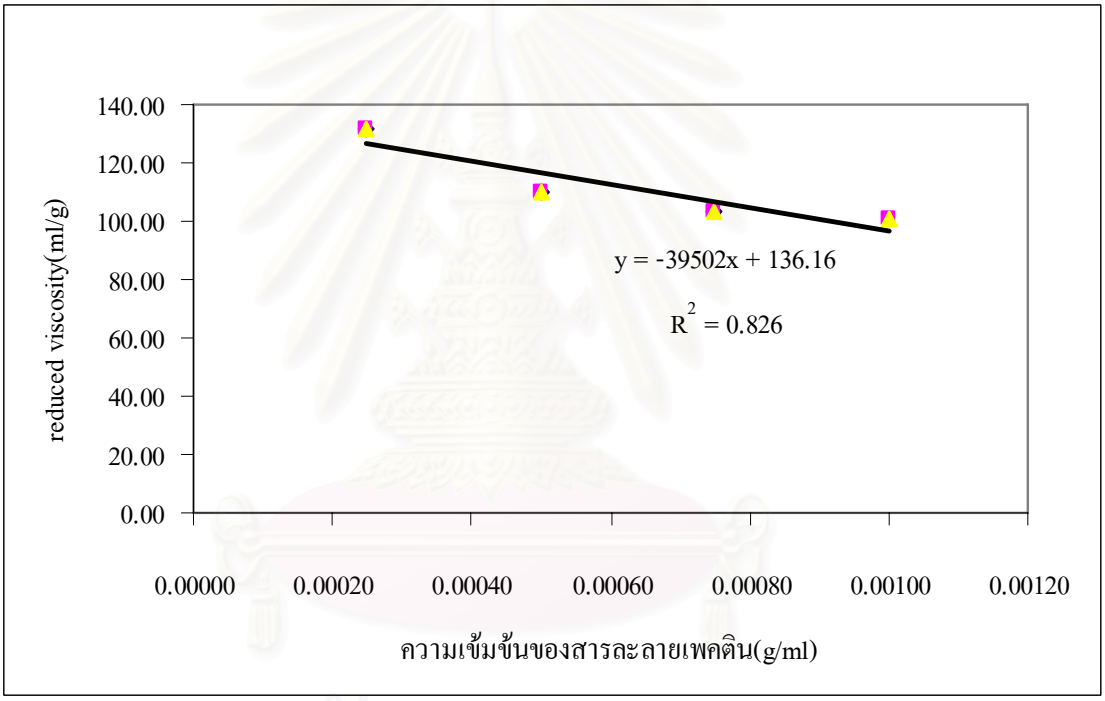
เมื่อ t คือค่า efflux timeที่ความเข้มข้นใด ๆ และ t_0 คือค่า efflux timeของตัวทำละลาย

และจากค่า specific viscosity (η_{sp}) นำมาคำนวณหาค่า reduced viscosity (η_r) ตามสมการ

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C} \qquad \text{ข.2}$$

$$\eta_{red} = 0.0329/0.00025 = 131.7359$$

จึงได้ผลการคำนวณค่า specific viscosity (η_{sp}) และ reduced viscosity (η_r) ดังตารางที่ ข.1 ซึ่งเมื่อนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเพ็คติน (C) และค่า reduced viscosity (η_r) ดังรูปที่ ข.1



รูปที่ ข.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเพ็คติน (C) และค่า reduced viscosity [η_r]

จากรูปที่ ข.1 เมื่อลากเส้นกราฟมาตัดแกน y โดยให้ค่าความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 0 จะเห็นว่ากราฟตัดแกน y ที่จุด 136.16 ml/g ตามสมการ y = -39502x + 136.16 ซึ่งจุดนี้คือ intrinsic viscosity [η] นำมาคำนวณค่าน้ำหนักโมเลกุลตามสมการของ Mark Houwink – Sakurada คือ

$$[\eta] = kM_v^{\alpha} \qquad \text{ข.3}$$

เมื่อ k = 0.96 x 10^{-3} และ a = 1.07 เมื่อเราแทนค่า K ,a และ [η] ลงในสมการจะได้

$$136.16 \text{ ml/g} = (0.96 \times 10^{-3} \text{ ml/g}) [M_w]^{1.07}$$

$$M_w = 65{,}274.88 \text{ Da}$$

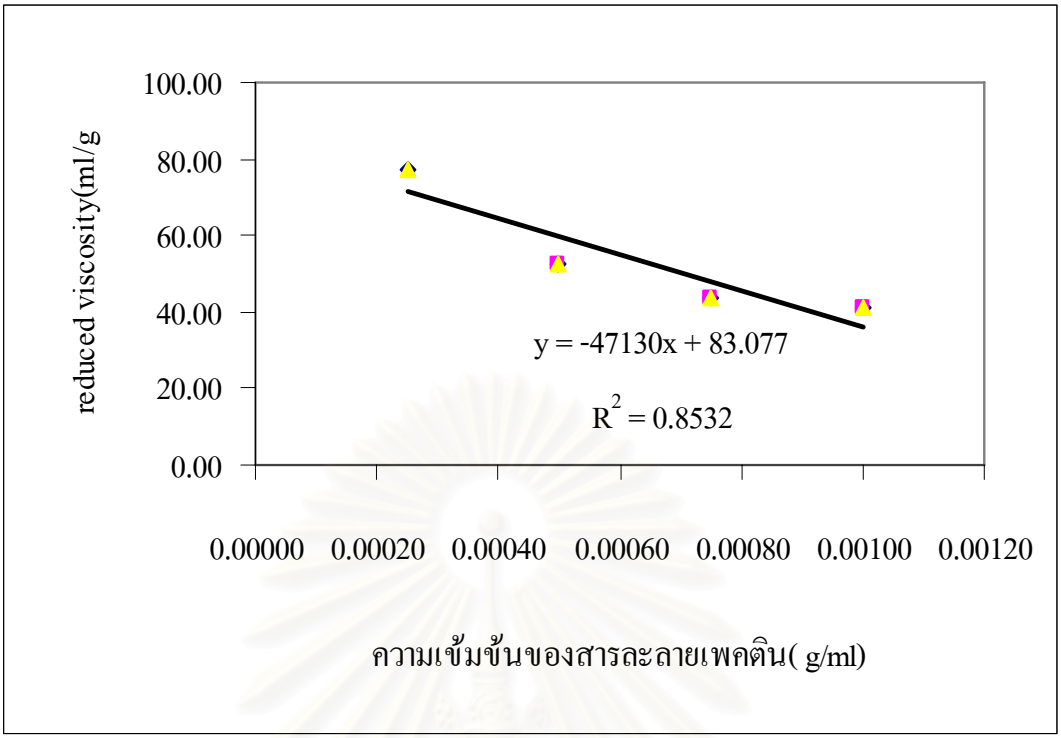
ตัวอย่างการหาขนาดโมเลกุลของเพ็คตินที่ฉายรังสีที่สภาวะสารละลาย 4 kGy

จากข้อมูลตารางที่ 4.9 ข้อมูลจากการทดลองที่ 3 ผลการทดลองหาค่า efflux time และการหาค่า specific viscosity (η_{sp})และค่า reduced viscosity (η_r) แสดงดังตาราง ข.2

ตารางที่ ข.2 แสดงค่า ค่า efflux time และการหาค่า specific viscosity (η_{sp}) และค่า reduced viscosity (η_r) ของตัวอย่างเพ็คตินที่ผ่านการฉายรังสีที่สภาวะสารละลาย 4 kGy จากข้อมูลการทดลองครั้งที่ 3 ตามตารางที่ 4.9

ความเข้มข้นของสารละลายเพ็คติน (g/ml)	Efflux time (วินาที)				η sp	η_{red}
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	(ml / g)	(ml / g)
0.0000	913	913	915	914		
0.00025	924	930	933	932	0.0193	77.1158
0.00050	935	938	941	938	0.0264	52.7892
0.00075	944	943	945	944	0.0328	43.7126
0.00100	952	953	948	951	0.0409	40.8666

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ข.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเพ็คติน (C) และค่า reduced viscosity [η_r]

จากรูปที่ ข.2 เมื่อลากเส้นกราฟมาตัดแกน y โดยให้ค่าความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 0 จะเห็นว่ากราฟตัดแกน y ที่จุด 83.077 ml/g ซึ่งจุดนี้คือ intrinsic viscosity [η] นำมาคำนวณค่าน้ำหนักโมเลกุลตามสมการของ Mark Houwink – Sakurada ได้ค่านำหนักโมเลกุลเป็น 41,135.29 Da

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

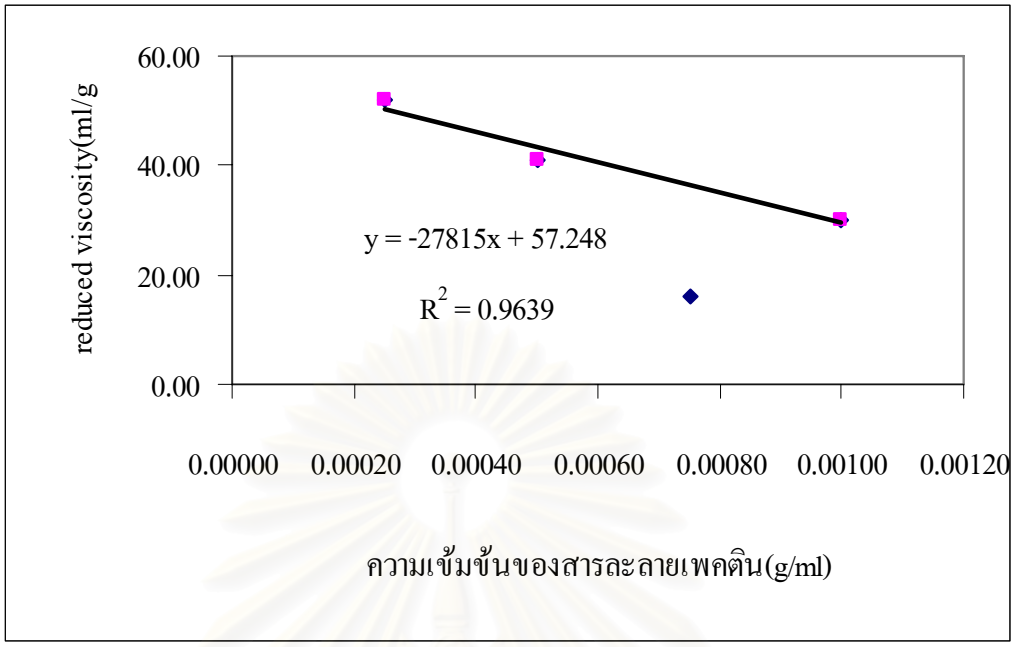
ตัวอย่างการหาขนาดโมเลกุลของเพ็คตินที่ฉายรังสีที่สภาวะสารละลาย 6 kGy

จากข้อมูลตารางที่ 4.10 ข้อมูลจากการทดลองที่3 ผลการทดลองหาค่า efflux time และการหาค่า specific viscosity (η_{sp}) และค่า reduced viscosity (η_r) แสดงดังตาราง ข.3

ตารางที่ ข.3 แสดงค่า ค่า efflux time และการหาค่า specific viscosity (η_{sp}) และค่า reduced viscosity (η_r) ของตัวอย่างเพ็คตินที่ผ่านการฉายรังสีที่สภาวะสารละลาย 6 kGy จากข้อมูลการทดลองครั้งที่ 3 ตามตารางที่ 4.10

ความเข้มข้นของสารละลายเพ็คติน (g/ml)	Efflux time (วินาที)				η_{sp}	η_{red}
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	(ml / g)	(ml / g)
0.0000	913	913	915	914		
0.00025	924	928	925	926	0.0130	51.8482
0.00050	934	931	925	933	0.0205	41.0088
0.00075	925	937	925	925	0.0119	15.8506
0.00100	943	940		942	0.0302	30.2095

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ข.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเพ็คติน (C) และค่า reduced viscosity [η_r]

จากรูปที่ ข.3 เมื่อลากเส้นกราฟมาตัดแกน y โดยให้ค่าความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 0 จะเห็นว่ากราฟตัดแกน y ที่จุด 57.248 ml/g ซึ่งจุดนี้คือ intrinsic viscosity [η] นำมาคำนวณค่าน้ำหนักโมเลกุลตามสมการของ Mark Houwink – Sakurada ได้ค่านำหนักโมเลกุลเป็น 29,045.17 Da

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

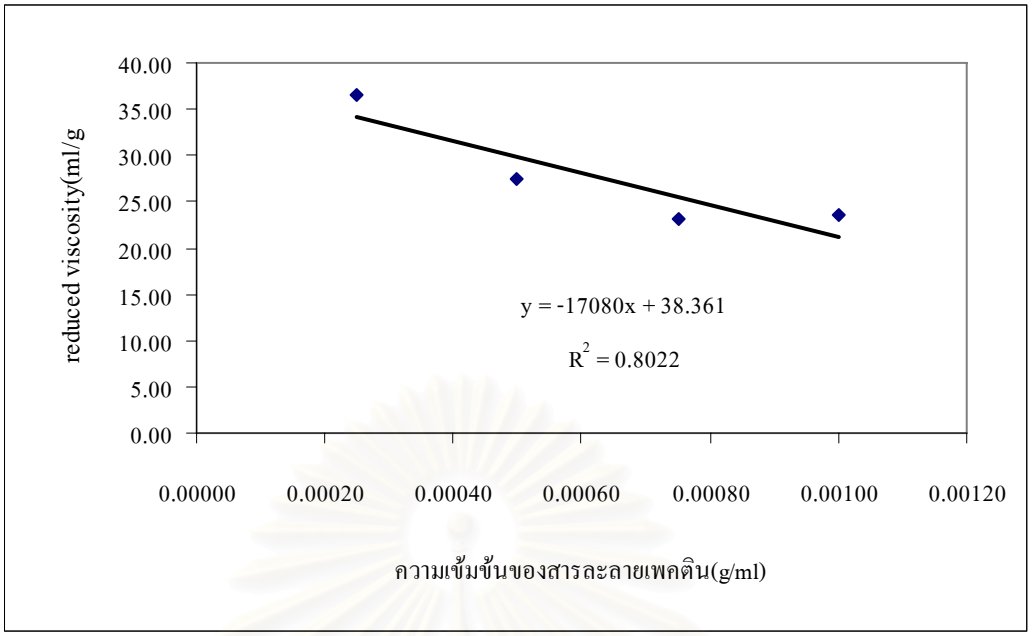
ตัวอย่างการหาขนาดโมเลกุลของเพ็คตินที่ฉายรังสีที่สภาวะสารละลาย 8 kGy

จากข้อมูลตารางที่ 4.11 ข้อมูลจากการทดลองที่ 2 ผลการทดลองหาค่า efflux time และการหาค่า specific viscosity (η_{sp})และค่า reduced viscosity (η_r) แสดงดังตาราง ข.4

ตารางที่ ข.4 แสดงค่า efflux time และการหาค่า specific viscosity (η_{sp}) และค่า reduced viscosity (η_r)ของตัวอย่างเพ็คตินที่ผ่านการฉายรังสีที่สภาวะสารละลาย 8 kGy จากข้อมูลการทดลองครั้งที่ 2 ตามตารางที่ 4.11

ความเข้มข้นของสารละลายเพ็คติน (g/ml)	Efflux time (วินาที)				η_{sp}	η_{red}
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	(dl / g)	(dl / g)
0.0000	913	913	915	914		
0.00025	923	921	922	922	0.0091	36.4571
0.00050	928	925	976	927	0.0137	27.4632
0.00075	957	932	928	930	0.0174	23.1668
0.00100	941	930	936	936	0.0237	23.6556

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ข.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเพ็คติน (C) และค่า reduced viscosity [η_r]

จากรูปที่ ข.4 เมื่อลากเส้นกราฟมาตัดแกน y โดยให้ค่าความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 0 จะเห็นว่ากราฟตัดแกน y ที่จุด 38.361 ml/g ซึ่งจุดนี้คือ intrinsic viscosity [η] นำมาคำนวณค่าน้ำหนักโมเลกุลตามสมการของ Mark Houwink – Sakurada ได้ค่านำหนักโมเลกุลเป็น 19979.21Da

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

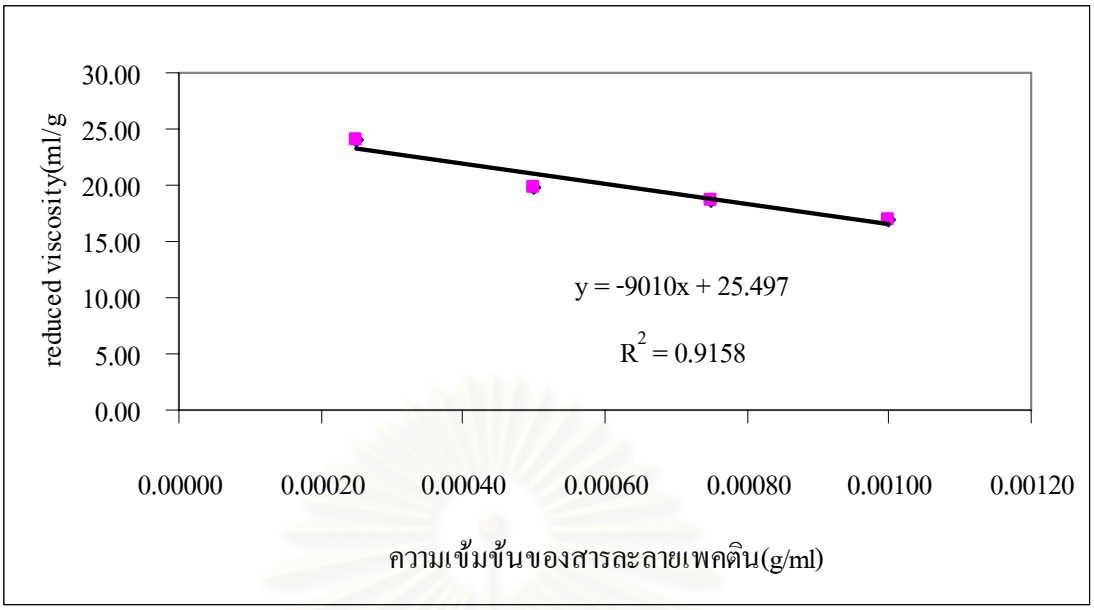
ตัวอย่างการหาขนาดโมเลกุลของเพ็คตินที่ฉายรังสีที่สภาวะสารละลาย 10 kGy

จากข้อมูลตารางที่ 4.12 ข้อมูลจากการทดลองที่ 3 ผลการทดลองหาค่า efflux time และการหาค่า specific viscosity (η_{sp}) และค่า reduced viscosity (η_r) แสดงดังตาราง ข.5

ตารางที่ ข.5 แสดงค่า ค่า efflux time และการหาค่า specific viscosity (η_{sp})และค่า reduced viscosity (η_r)ของตัวอย่างเพ็คตินที่ผ่านการฉายรังสีที่สภาวะของเหลว 10 kGy จากข้อมูลการทดลองครั้งที่ 3 ตามตารางที่ 4.12

ความเข้มข้นของสารละลายเพ็คติน (g/ml)	Efflux time (วินาที)				η_{sp}	η_{red}
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	(ml / g)	(ml / g)
0.0000	913	913	915	914		
0.00025	972	920	919	919	0.0060	24.0713
0.00050	934	922	924	923	0.0099	19.7932
0.00075	923	926	927	927	0.0140	18.6589
0.00100	928	928	932	929	0.0169	16.9411

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ข.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเพ็คติน (C) และค่า reduced viscosity [η_r]

จากรูปที่ ข.5 เมื่อลากเส้นกราฟมาตัดแกน y โดยให้ค่าความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 0 จะเห็นว่ากราฟตัดแกน y ที่จุด 25.497 ml/g ซึ่งจุดนี้คือ intrinsic viscosity [η] นำมาคำนวณค่าน้ำหนักโมเลกุลตามสมการของ Mark Houwink – Sakurada ได้ค่านำหนักโมเลกุลเป็น 13,639.02 Da

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

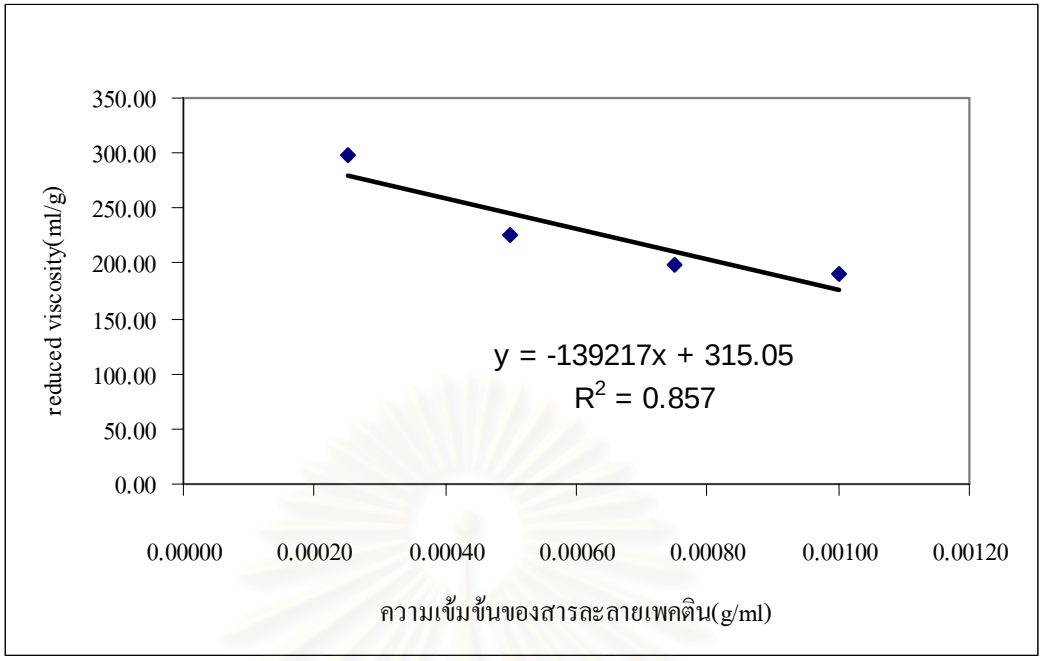
ตัวอย่างการหาขนาดโมเลกุลของเพ็คตินที่ฉายรังสีที่สภาวะของเหลว 0 kGy

ผลการทดลองหาค่า efflux time และการหาค่า specific viscosity (η_{sp})และค่า reduced viscosity (η_r) แสดงดังตาราง ข.6

ตารางที่ ข.6 แสดงค่า ค่า efflux time และการหาค่า specific viscosity (η_{sp})และค่า reduced viscosity (η_r)ของตัวอย่างเพ็คตินที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสี

ความเข้มข้นของสารละลายเพ็คติน (g/ml)	Efflux time (วินาที)				η sp	η red
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	(ml / g)	(ml / g)
0.0000	902.79	906.58	912.12	907.16		
0.00025	974.23	978.12	971.41	974.59	0.0743	297.2930
0.00050	1012.14	1015.93	1000.09	1,009.39	0.1127	225.3692
0.00075	1037.31	1048.69	984.27	1,043.00	0.1497	199.6504
0.00100	1059.93	1089.15	1089.09	1,079.39	0.1899	189.8519

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ข.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเพ็คติน (C) และค่า reduced viscosity [η_r]

จากรูปที่ ง.6 เมื่อลากเส้นกราฟมาตัดแกน y โดยให้ค่าความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 0 จะเห็นว่ากราฟตัดแกน y ที่จุด 315.05 ml/g ซึ่งจุดนี้คือ intrinsic viscosity [η] นำมาคำนวณค่าน้ำหนักโมเลกุลตามสมการของ Mark Houwink – Sakurada ได้ค่านำหนักโมเลกุลเป็น 142,968.8 Da

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

รายละเอียดของน้ำยางธรรมชาติจากบริษัทแพนเอเชีย

PBT
PAN ASIA BIOTECHNOLOGY CO.,LTD.

บริษัท แพนเอเชีย ไบโอเทคโนโลยี จำกัด
PAN ASIA BIOTECHNOLOGY CO.,LTD.
91 หมู่ 1 ตำบลละหาร 91 MOO 1 LAHARN ,
อำเภอปลวกแดง จังหวัดระยอง 21140 PLUAK DANG , RAYONG 21140
โทร. 0 - 3896-1753 - 4 โทรสาร: 0 - 3896-1755 TEL. 0 - 3896-1753 - 4 FAX : 0-3896-1755

DATE : 07 /02/49

QUALITY AND ANALYSIS CERTIFICATE

CONCENTRATED LATEX 60%

ATTN : ภาควิชานิวเคลียร์

Our Reference LOT NO. 031

Date of Production : 28 - 31 /ธ.ค. /48

EXPIRY DATE 31/พ.ค./49

Date of Testing : 30/ม.ค./49

Quantity : 30.00 KGS.

	HA	ISO Specifications	
		Type HA	Type LA
T.S.C. (Total Solid Content % by weight)	61.55	61.50 min	61.50 min
D.R.C (Dry Rubber Content % by weight)	60.21	60.00 min	60.00 min
Non Rubber Solid (%)	1.34	2.00 max	2.00 max
Alkalinity (% on total weight)	0.64	0.60 min	0.29 max
Alkalinity (% on total phase)	1.66		
M.S.T. (Mechanical Stability Time at 55% T.S.C.) in seconds	968	650 secs. Minimum	650 secs. Minimum
V.F.A. (Volatile Fatty Acid number)	0.046	0.20 max	0.20 max
PH	10.42		
KOH Number	0.65	1.00 max	1.00 max
	-	8 MAX	8 MAX
Magnesium content (PPM on Latex)	34.01	50 max	

(S. PANALEE)

AUTHORIZED SIGNATURE

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง ผลการทดสอบโปรตีนก่อภูมิแพ้ในฟิล์มยาง

Report for : CHYAGRIT SIRI-UPATHUM
DEPT NUCLEAR TECHNOLOGY, FACULTY OF ENGINEERING
CHULALONGKORN UNIVERSITY
254 PHYATHAI RD, PATUMWAN, BANGKOK, THAILAND 10330
662.2186.781, FAX 662.2186.770

Cert.# 1438.01

ACCREDITED

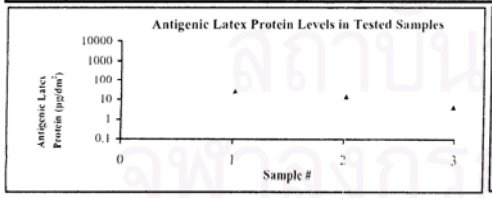
LEAP Testing Service

1/25/2007

ASTM D6499-03 Inhibition ELISA

Report Number: 5707

Sample #	LTS#	Sample Identification	Sample Weight (g)	Extract Volume (ml PBS)	Inhibition Assay Conc. (µg/ml)	Surface Area dm2	Antigenic Protein Concentration (µg/g)	Antigenic Protein Concentration (µg/dm2)
1	28819	Untreated Unvulcanized, NRL Film (SC1)	7.6	38	1.5	2.0	7.6	28.7
2	28820	Untreated, NRL Film, (St2)	6.8	34	0.9	2.0	4.6	15.5
3	28821	Untreated, NRL Film, (St4)	6.5	33	0.3	2.0	1.5	4.9



- Inhibition values are determined in µg/ml using duplicate values of at least 2 serial dilutions.
- Reporting limit of the assay = 0.03 µg/ml
- "-" indicates values (in µg/g or µg/dm2) are below the calculated reporting of the assay
- b.d. = below detection (reporting limit).

Donald Guthrie Foundation Education Research
1 Guthrie Square, Sayre, PA, USA 18840
TEL: (570) 882-4645 FAX: (570) 882-4666

Reported By: Approved By:

Tom Shay, B.S. David Kostyal, Ph.D.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนงค์นุช แจ้งสว่าง เกิดวันที่ 13 เมษายน พ.ศ 2523 ที่จังหวัดสุพรรณบุรี จบการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต จากภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ 2545 ผลงานทางวิชาการคือปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี เรื่องการทำ Dose mapping ภายในห้องฉายรังสีแกมมา ณ อาคารฉายรังสีแกมมา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยใช้ Thermoluminescent Dosimeter

ตำแหน่งหน้าที่ปัจจุบันคือนักวิทยาศาสตร์นิวเคลียร์ประจำห้องปฏิบัติการมาตรฐานการวัดปริมาณรังสีระดับสูง กลุ่มมาตรฐานการวัดรังสีและกัมมันตภาพรังสี สำนักสนับสนุนการกำกับดูแลความปลอดภัยจากพลังงานปรมาณู สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย