



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การศึกษาโครงสร้างของยางธรรมชาติ
เพื่อพัฒนาคุณภาพยางธรรมชาติ”

“Structural characterization of natural rubber
to improve its quality”

โดยรศ.ดร.จิตต์ลัดดา ศักดาภิพาณีย์ และคณะ

สิงหาคม พ.ศ. 2549

สัญญาเลขที่ RSA4680009

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การศึกษาโครงสร้างของยางธรรมชาติ
เพื่อพัฒนาคุณภาพยางธรรมชาติ”

“Structural characterization of natural rubber
to improve its quality”

หัวหน้าโครงการ	รศ.ดร. จิตต์ลัดดา ศักดาภิพาณิชย์
หน่วยงาน	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6 แขวงทุ่งพญาไท กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์	0-28893116 โทรสาร 0-28893116
e-mail address	scjtp@mahidol.ac.th

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

รายงานโครงการวิจัยประจำปี ที่ 3

ทุนพัฒนานักวิจัย ปี 2546

(15 สิงหาคม 2546 ถึงวันที่ 14 สิงหาคม 2549)

โครงการ การศึกษาโครงสร้างของยางธรรมชาติ
เพื่อพัฒนาคุณภาพยางธรรมชาติ

(Structural characterization of natural rubber to improve its quality)

หัวหน้าโครงการ รศ. ดร. จิตต์ลัดดา ศักดาภิพาณิชย์

หน่วยงาน ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6
แขวงทุ่งพญาไท กรุงเทพฯ ๑๐๔๐๐

โทรศัพท์ 0-28893116 โทรสาร 0-28893116

e-mail address scjtp@mahidol.ac.th

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(งานวิจัยยังไม่เสร็จสมบูรณ์ โปรดอย่านำไปใช้อ้างอิง)

สัญญาเลขที่ RSA4680009

โครงการ: การศึกษาโครงสร้างของยางธรรมชาติเพื่อพัฒนาคุณภาพยางธรรมชาติ

รายงานความก้าวหน้าของโครงการในรอบ 36 เดือน

โครงการ: การศึกษาโครงสร้างของยางธรรมชาติเพื่อพัฒนาคุณภาพยางธรรมชาติ

ระยะเวลาโครงการ 15 สิงหาคม 2546 ถึงวันที่ 14 สิงหาคม 2549

ชื่อหัวหน้าโครงการ รศ. ดร.จิตต์ลัดดา ตักดาภิพาณิชย์

รายงานในช่วงตั้งแต่ 15 สิงหาคม 2546 ถึงวันที่ 14 สิงหาคม 2549

Executive summary**การศึกษาโครงสร้างของยางธรรมชาติ
เพื่อใช้ปรับปรุงคุณภาพยางธรรมชาติและพัฒนยางชนิดพิเศษ**

ยางธรรมชาติเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยองค์ประกอบหลายชนิด โดยเมื่อถึงเวลาถึงแก่กรรม ก็จะเกิดปฏิกิริยาเคมีและฟิสิกส์อื่น ๆ ดังนั้นความแปรผันเหล่านี้จะเป็นต้นเหตุเบื้องต้นของความไม่แน่นอนของน้ำหนักหรืออย่างแห้ง ซึ่งสิ่งนี้จะนำไปสู่ความยากลำบากในการผลิตผลิตภัณฑ์ยางให้ได้ดี นอกจากนี้ยังมีตัวแปรที่สำคัญในการทำให้งานมีความสอดคล้องกันที่ไม่แน่นอน คือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลยางระหว่างเก็บน้ำยาง ตัวอย่างเช่นการเกิดโครงสร้างร่างแห (branching) และเจล (gel) ดังนั้นการศึกษาในหัวข้อนี้เน้นที่จะเข้าใจโครงสร้างพื้นฐานทางเคมีรวมถึงสมบัติทางเคมีอื่น ๆ ซึ่งนำไปสู่การเข้าใจกลไกการเกิดโครงสร้างร่างแหและเจลรวมถึงปรากฏการณ์การแข็งตัวของยางระหว่างการเก็บ (storage-hardening) ซึ่งข้อมูลพื้นฐานทางเคมีต่าง ๆ จะนำไปสู่การคิดค้นหาวิธีที่จะผลิตยางที่มีความสอดคล้องกันที่แน่นอน นอกจากนี้ยังทำให้สามารถปรับปรุงคุณภาพและสมบัติบางประการของยางธรรมชาติให้สามารถนำไปใช้ทดแทนยางสังเคราะห์บางประเภทได้

ยางที่ได้จากต้นที่เจริญวัยที่มีอายุต่างๆ กัน จะมีสมบัติทางเคมีและกายภาพคล้ายคลึงกันมาก อนุภาคยางมีขนาดตั้งแต่ 0.2-3 μm ลักษณะกลม ซึ่งอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจะมีลักษณะเป็นรูปลูกแพร์ อนุภาคยางมีความเสถียรดีมากที่ pH 9 จากการศึกษาลักษณะของอนุภาคยางโดยเทคนิค OM และ SEM พบว่าอนุภาคยางมีการจับตัวหลังจากการสกัดชั้นโปรตีนและฟอสฟอลิปิดออกทั้งนี้เนื่องมาจากการสูญเสียสมบัติการเป็นคอลลอยด์ของอนุภาคยาง โปรตีนที่ผิวอนุภาคยางจะมีขนาดเล็กกว่าโปรตีนที่พบในชั้นซีรัมในขณะที่โปรตีนที่ได้จากต้นยางอายุต่างกันจะมีความแตกต่างกันในน้ำหนักโมเลกุล จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอนุภาคยางขนาดต่างๆ ที่ได้จากการบินส่วนครีมน้ำยางที่ความเร็วยาวต่างกันและสมบัติพื้นฐาน พบว่ายางอนุภาคเล็กขนาดต่ำกว่า 250 nm ประกอบด้วยโมเลกุลยางที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและต่ำ ในขณะที่ยางอนุภาคใหญ่ขึ้นจะประกอบไปด้วยโมเลกุลยางที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ปริมาณเอสเทอร์ซึ่งเป็นค่าบ่งชี้ถึงปริมาณไขมันและฟอสฟอลิปิดในโมเลกุลยาง พบว่ายางอนุภาคเล็กจะมีค่าต่ำกว่ายางอนุภาคใหญ่ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปลายสายโซ่ของโมเลกุลยางในยางอนุภาคใหญ่เป็นปลายปิดเกิดพันธะกับหมู่เอสเทอร์ของไขมันแต่ในยางอนุภาคเล็กจะเป็นโมเลกุลสายโซ่ตรง นอกจากนี้การศึกษาโครงสร้างที่ปลายสายโซ่ (ปลายแอลฟา) ของยางธรรมชาติโดยวิธีการทำปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อพันธะเอสเทอร์ด้วยเอนไซม์ไลเปส ฟอสฟาเตสและฟอสโฟไลเปส แล้วทำการวิเคราะห์โครงสร้างโดยใช้ ^1H -, ^{13}C - และ ^{31}P -NMR และน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค GPC พบว่าหมู่ปลายของโมเลกุลยางคาดว่าเป็นหมู่ฟอสเฟตและไดฟอสเฟตที่ติดกับโมเลกุลของฟอสฟอลิปิดโดยพันธะแอมไนด์และพันธะไฮโดรเจน นอกจากนี้ยังพบหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่คาร์บอกซิลในยางธรรมชาติโดยเทคนิค TMTD ซึ่งคือออกไซด์ (ZnO) และไดเอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (DHAP) เป็นเหตุกำเนิดเพิ่มเติมของการเกิดสายโซ่ยางแบบกึ่งในน้ำยางสดและน้ำยางแอมโมเนียที่ถูกเก็บเป็นเวลานาน อีกทั้งการศึกษาโครงสร้างทางด้านปลายเริ่มต้นของยางธรรมชาติโดยการวิเคราะห์โครงสร้างของยางที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและโพลีพรีนอลที่แยกได้จากยาง shootings และ fresh BF ด้วยเทคนิค NMR พบว่าโพลีพรีนอลที่สกัดได้จากการตกตะกอนยางด้วยตัวทำละลายแล้วนำตัวทำละลายมาแยกผ่านคอลัมน์และยางโมเลกุลต่ำที่สกัดได้จากการปั่นล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวมีโครงสร้างที่ปลายเริ่มต้นประกอบด้วยหมู่ไดเมทิลแอลลิลและทรานส์ไอโซพรีนสองหมู่ แสดงให้เห็นว่าสารเริ่มต้นของการสังเคราะห์ยางในต้นพารา คือ ทรานส์-ทรานส์-ฟาร์เนซิลไดฟอสเฟตเหมือนในกรณีของโพลีพรีนอลชนิดสองทรานส์ไอโซพรีน อย่างไรก็ตาม ปลายเริ่มต้นที่เรียกว่าปลายไอเมกานี ไม่สามารถตรวจวัดได้ในยางที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงของยางที่ปั่นล้างและยางที่มีโมเลกุลต่ำที่ได้จากส่วนต่างๆ ของต้นพาราและยางที่ปราศจากโปรตีนจากการย่อยด้วยเอนไซม์ ทั้งนี้สามารถสนับสนุนได้ว่ามีการดัดแปลงที่หมู่ไดเมทิลแอลลิลโดยปฏิกิริยาทางเอนไซม์หรือทางเคมีบนผิวอนุภาคยางในขั้นตอนการต่อเติมสายโซ่ให้ได้โมเลกุลที่ยาวขึ้นและในกระบวนการจับตัวน้ำยาง จากการศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการ degrade สรุปได้ว่า non-rubber component มีผลต่อการ degrade ของยางและออกซิเจนช่วยในการ degrade ส่วนวิธีเตรียมยางเหลวที่เหมาะสมที่สุดและใช้เวลาไม่นานคือ 5% DPNR, 1% $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ และ 2% v/v propanal ที่อุณหภูมิ 75°C จากการศึกษาการแข็งตัวของยางธรรมชาติระหว่างการเก็บภายใต้สภาวะแรง พบว่าค่าการอ่อนตัวหลังจากการเร่งและปริมาณเจลของยางแห้งที่ได้จากน้ำยางสด (FNR) ยางที่ผ่านจากการปั่นล้าง ยางที่ผ่านการกำจัดโปรตีน มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมากหลังจากผ่านการเร่งภายใต้สภาวะความชื้นต่ำ แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงค่าเหล่านี้ในยางที่ผ่านการกำจัดไขมันเอสเทอร์ด้วยวิธีทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันและยางโปรตีนต่ำที่ผ่านการกำจัดไขมันเอสเทอร์ด้วยวิธีทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน แสดงให้เห็นว่าหมู่ไขมันเอสเทอร์ในยางธรรมชาติมีผลอย่างมากต่อการเกิดโครงสร้างร่างแหของยางธรรมชาติภายใต้สภาวะความชื้นต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับ การเกิดสายโซ่แบบกึ่งกันโดยโปรตีน การเกิดโครงสร้างร่างแหของยางหลังจากการเก็บเป็นเวลานานของยางธรรมชาติพบว่าเป็นโครงสร้างแบบเจล อ่อน (soft-gel) ซึ่งสามารถละลายพันธะได้หมดโดยวิธีทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน และทำลายพันธะบางส่วนโดยการเติมเอทานอลลงในสารละลายโกลูอินของยาง สรุปได้ว่าการเกิดโครงสร้างร่างแหส่วนใหญ่เกิดจากการเกิดโมเชลล์ระหว่างหมู่ฟอสโฟลิปิดและบางส่วนเกิดจากพันธะไฮโดรเจนโดยโปรตีนที่ปลายสายโซ่โมเลกุลยาง ยางธรรมชาติที่มีความบริสุทธิ์สูงและมีสมบัติแปรปรวนน้อยสามารถเตรียมได้โดยปฏิกิริยาซาปอนนิฟิเคชันของน้ำยางสด ตามด้วยการล้างยางก้อนจับตัวผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในสารละลายไฮดรอกไซด์ ส่วนที่สกัดได้จากยางที่ผ่านการซาปอนนิฟิเคชัน (SAP-NR) และยาง SAP-NR ที่ผ่านการล้าง นำมาวิเคราะห์โดยวิธี ELISA ด้วยชุดเครื่องมือ พบว่าปราศจากโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้และโปรตีนที่ละลายน้ำได้ ยาง SAP-NR ที่ได้สามารถเกิดการแข็งตัวตามธรรมชาติในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับ FNR แสดงว่ายางธรรมชาติที่ได้มีสมบัติคงที่หรือเปลี่ยนแปลงน้อย

Structural characterization of natural rubber to improve its quality

Jitladda Sakdapipanich*

Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama IV Road, Bangkok 10400, Thailand

Abstract—Natural rubber (NR) latex shows considerable variation in composition and colloidal structure as the result of biological, geometric, climatic and other influences. These varieties originate the inconsistency in the properties of latex and solid rubber, which are the causes of difficulties in processing latex to well-defined products with uniform properties. Another point should be concerned as a major point affecting the inconsistency of NR is the change in the structure of NR such as the branching and gel formations during storage. Therefore, this project will be an attempt to elucidate the fundamental knowledge on microstructure and other chemical properties for improving the consistency of NR.

It was found that rubbers from regularly tapped mature trees with different ages of rubber trees showed similar in chemical and physical properties. The particle size of NR was 0.2-3 μm , which the larger particle size was in pear-shape. The highest stability of rubber particles was observed at pH 9. By OM and SEM techniques, rubber particles were aggregated after removal of protein and phospholipids layers due to the loss of colloidal properties. It was found that protein on rubber particles was smaller size than that in serum phase, whereas the protein obtained from different ages of rubber trees showed the different in molecular weight. The relationship between rubber particle sizes obtained by different centrifugation speed of rubber cream and their properties was elucidated. The small rubber particles (SRP; size < 250 nm), was found to compose of both low and high number-average molecular weight (M_n) rubber molecules, while larger rubber particles (LRP; size >250 nm), mainly consisted of low M_n rubber molecules. The ester content in SRP was lower than that of LRP, indicating that LRP contains mainly rubber molecules terminated with a functional group containing fatty acid ester groups and SRP is mainly consisted of linear molecule. The microstructure of terminating-end (α -terminal) was elucidated by selective decomposition of ester linkages with enzymatic reactions using lipase, phosphatase and phospholipases followed by a combination with ^1H -, ^{13}C - and ^{31}P -NMR analyses and molecular weight by GPC. The α -terminal of rubber molecule was postulated to be mono- and diphosphate groups linking to phospholipids by Mg^{2+} and hydrogen bonding. Mg^{2+} , tetramethylthiuram disulfide (TMTD), zinc oxide (ZnO) and diammonium hydrogenphosphate (DAHP) were the origin of additional branching-points in long-storage fresh and commercial high-ammonia lattices. In addition, the structure of initiating-end (ω -terminal) in *Hevea* rubber was analyzed by using polyprenols isolated from *Hevea* shootings and fresh BF as well as low molecular weight rubbers. By NMR analyses, polyprenol and low molecular weight (MW) fraction of washing the cream fraction from fresh latex with surfactant (WRP) showed the presence of dimethylallyl group and two-*trans* isoprene units. This finding suggested that the initiating species of NR is *trans,trans*-FPP, as in the case of two-*trans* polyprenol. The storage-hardening (SH) of the purified NR was analyzed under accelerated low humidity conditions. The fatty acid ester groups was found to play the most important role in the gel formation and SH of rubber under low humidity condition. Base on the transesterification and ethanol/toluene mix solvent treatment, the gel phase in NR is mainly originated from micelle formation between phospholipids and partly formed from hydrogen bonding by proteins in rubber chains. Highly purified NR was prepared by saponification of latex with NaOH followed by soaking the coagulum in aqueous NaOH. The extract from saponified NR (SAP-NR) and soaked SAP-NR was confirmed to be free from allergic proteins and no extractable protein by ELISA method with FIT Kit. SAP-NR showed a small extent of SH compare to FNR, suggesting the high consistency properties NR.

Keywords— natural rubber, initiating-end, terminating-end, branching, storage-hardening

Outputs

1. Tarachiwin, L., Sakdapipanich, J. T. and Y. Tanaka, *Rubber Chem. Technol.*, 2003, 76(5), 1177
2. Tarachiwin, L., Sakdapipanich, J. T. and Tanaka, Y., *Rubber Chem. Technol.*, 2003, 76(5), 1185.
3. Yunyongwattanakorn, J., Sakdapipanich, J.T., Kawahara, S. and Tanaka, Y. *Rubber Chem. Technol.*, 2003, 76(5), 1241.
4. Tarachiwin, L., Sakdapipanich, J.T., *Biomacromolecules*, 2005, 6, 1851.
5. Tarachiwin, L., Sakdapipanich, J.T., *Biomacromolecules*, 2005, 6, 1858.

ผลงานวิจัยที่ทำในรอบปี

(1) วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาโครงสร้างพื้นฐานของยางธรรมชาติที่ยังไม่เป็นที่ชัดเจนทั้งหมดที่ติดอยู่ที่ปลายเริ่มต้นและปลายท้ายของโมเลกุลยาง รวมถึงสมบัติคอลลอยด์ของน้ำยางธรรมชาติด้วย
2. เพื่อศึกษาถึงผลของหมู่ฟังก์ชันที่อยู่บนโมเลกุลที่มีต่อสมบัติทางกายภาพโดยทั่วไปของยางธรรมชาติ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของยางธรรมชาติระหว่างการเก็บทั้งในรูปของน้ำยางและยางแห้ง
3. เพื่อศึกษาหลักการเกิดโครงสร้างแบบร่างแห (branching) และการเกิดเจล (gel) ในน้ำยางและยางแห้ง ซึ่งทำให้เกิดสมบัติที่ไม่แน่นอนซึ่งนำไปสู่ความลำบากในการใช้น้ำยางและยางธรรมชาติ

(2) การดำเนินงานในรอบสามปีที่ผ่านมา

ในรอบปีแรก

ขั้นตอนที่ 1 รวบรวมตัวอย่างน้ำยางธรรมชาติสดจากแหล่ง พันธุ์ และอายุต่าง ๆ ทำการศึกษาโครงสร้างระดับโมเลกุล การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล สมบัติพื้นฐานทางเคมีต่าง ๆ และปริมาณส่วนที่ไม่ใช่ยางด้วยเทคนิคทางการวิเคราะห์ต่าง ๆ

ขั้นตอนที่ 2 ขั้นตอนการเตรียมยางให้มีความบริสุทธิ์ (purification) และการตัดส่วนที่เป็นโปรตีน ซึ่งคาดว่าจะควรอยู่ที่ตำแหน่งเริ่มต้นของโมเลกุลยางโดยใช้โปรตีโอไลติกเอนไซม์ แล้วทำการวิเคราะห์ชนิดและน้ำหนักโมเลกุลของ protein ที่มีพันธะอยู่บนโมเลกุลยางโดยใช้เทคนิคทางชีวเคมี

ขั้นตอนที่ 3 การศึกษาโครงสร้างของหมู่ปลายแอลฟาของยางธรรมชาติโดยวิธีการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ไลเปส ฟอสฟาเตส และฟอสโฟไลเปส

ขั้นตอนที่ 4 การศึกษาการเกิดเจลในยางธรรมชาติ : ผลของสารเติมแต่ง TMTD/ZnO และ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

ในรอบปีที่สอง

ขั้นตอนที่ 5 การศึกษาลักษณะและพฤติกรรมของผิวอนุภาคอย่างที่มีเมมเบรนต่าง ๆ กันโดยใช้เทคนิคทาง Optical และ Transmitting electron microscopy และดูความแตกต่างขนาด particle size และความมีประจุที่ผิวอนุภาคอย่างโดย Particle size analyzer และ Zeta sizer analyzer

ขั้นตอนที่ 6 ศึกษาผลของยางที่มีขนาดอนุภาคต่าง ๆ กันกับสมบัติทางเคมีเนื่องจากอนุภาคยางธรรมชาติมีการกระจายตัวอยู่ในช่วง 0.05-3 ไมครอน ดังนั้น อนุภาคที่มีขนาดต่างกันอาจมีลักษณะของเมมเบรนที่ห่อหุ้มอยู่ที่ผิวแตกต่างกันออกไป สามารถทำการทดลองได้โดยปั่นแยกน้ำยางสดด้วยความเร็วรอบต่าง ๆ กันเพื่อให้ได้อนุภาคยางขนาดต่าง ๆ กัน

ขั้นตอนที่ 7 การศึกษาโครงสร้างของหมู่ปลายโอเมก้าของยางธรรมชาติโดยวิเคราะห์โครงสร้างทางโมเลกุลของยางโมเลกุลต่ำและโพลีฟีนอลที่ได้จากยางธรรมชาติรวมทั้งการวิเคราะห์หาจำนวนไนโตรเจนอะตอมต่อหนึ่งสายโซ่ของยางที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ

ขั้นตอนที่ 8 การศึกษาอัตราการเกิดปฏิกิริยาของน้ำยางเป็นวิธีทางอ้อมที่จะพัฒนาวิธีการรักษาความแปรปรวนของน้ำยางโดยการศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อการเตรียมยางเหลวจากยางธรรมชาติด้วยการวิเคราะห์การลดลงของน้ำหนักโมเลกุลหรือความหนืด

ในรอบปีที่สาม

ขั้นตอนที่ 9 การศึกษาผลของส่วนที่ไม่ใช่ยางที่มีต่อการเกิดการแข็งขึ้นตามธรรมชาติและเจลของยางธรรมชาติที่ผ่านการเร่งภายใต้อุณหภูมิต่าง ๆ โดยศึกษาการเพิ่มขึ้นของปริมาณเจลหรือความหนืดมูนิ

ขั้นตอนที่ 10 ศึกษาวิธีการเตรียมยางธรรมชาติที่มีความบริสุทธิ์สูง โดยปฏิกิริยาซาปอนนิฟิเคชันและการวิเคราะห์ปริมาณส่วนที่ไม่ใช่ยางเช่น โปรตีนและไขมันในยาง SAP-NR ที่เตรียมได้ เพื่อเลือกชนิดชั้นที่เหมาะสมในการลดปริมาณโปรตีนและไขมันในยางที่ผ่านการทำปฏิกิริยาซาปอนนิฟิเคชัน

ขั้นตอนที่ 11 ศึกษาและวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ ปริมาณเจลและปรากฏการณ์การแข็งขึ้นตามธรรมชาติของยาง SAP-NR ที่เตรียมได้ก่อนและหลังการเก็บภายใต้สภาวะเร่งความชื้นต่ำ เพื่อที่จะ ปรับปรุงวิธีการควบคุมสภาพของยางธรรมชาติให้มีสมบัติที่สม่ำเสมอ

รายละเอียดงานวิจัย

ขั้นตอนที่ 1 การศึกษาตัวอย่างน้ำยางธรรมชาติสดจากแหล่ง พันธุ์ และอายุต่างๆ ทำการศึกษาโครงสร้างระดับโมเลกุล การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล สมบัติพื้นฐานทางเคมีต่าง ๆ และปริมาณส่วนที่ไม่ใช่ยางด้วยเทคนิคทางการวิเคราะห์ต่าง ๆ

วัตถุดิบที่ใช้

1.1 ศึกษาจากต้นยางพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีปลูกโดยทั่วไปในประเทศไทยจากสองแหล่งเพาะพันธุ์

- น้ำยางสดที่รักษาสภาพด้วยแอมโมเนีย 0.6% v/v ต่างสายพันธุ์ จำนวน 4 สายพันธุ์โดยได้รับจากศูนย์วิจัยยางจังหวัดฉะเชิงเทรา ได้แก่ พันธุ์ RRIM 600, GT1, RRIM 2025* และ RRIM 2027*

*พันธุ์ที่กำลังเริ่มนิยมปลูกเนื่องจากมีรายงานจากทางมาเลเซียว่าสามารถให้น้ำยางในปริมาณที่มาก ได้แก่ RRIM 2025 และ RRIM 2027

- น้ำยางสดที่รักษาสภาพด้วยแอมโมเนีย 0.6% v/v ต่างสายพันธุ์ จำนวน 5 สายพันธุ์โดยได้รับจากสวนยางที่จังหวัดชลบุรี ได้แก่ พันธุ์ RRIM 600, GT1, PB 24, PB 28/59 และ PC

1.2 ศึกษาจากต้นยางสายพันธุ์เดียวกันแต่มีอายุพันธุ์ที่แตกต่างกัน

- น้ำยางจากต้นยางสายพันธุ์ RRIM 600 ที่มีอายุต่าง ๆ กันดังนี้
1 เดือน, 3 เดือน, 7 เดือน, 3 ปี และ 17 ปี

การวิเคราะห์สมบัติพื้นฐาน

- Dry rubber content และ Total solid content
- ขนาดอนุภาคและการกระจายตัวของขนาดอนุภาค โดยเครื่อง Particle size
- ปริมาณไนโตรเจนโดยใช้เครื่อง Nitrogen analyzer
- ปริมาณเอสเทอร์ โดยใช้เครื่อง FT-IR Spectrometer

- ปริมาณเก่าโดยใช้วิธีการเผาที่ 550 °C เป็นเวลา 180 นาที
- น้ำหนักโมเลกุลและการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลโดยเครื่อง Gel Permeation Chromatography (GPC)
- การทนต่อแรงดึง (Tensile strength)
- น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE
- ปริมาณเจล โดยหาปริมาณยางที่ไม่ละลายในตัวทำละลาย Toluene

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลองตอนที่ 1

1.1 ศึกษาจากต้นยางสายพันธุ์ต่าง ๆ จากสองแหล่งเพาะพันธุ์

จากการวิเคราะห์ปริมาณยางแห้ง เนื้อยาง ส่วนที่ไม่ใช่ยางและขนาดของอนุภาคยางที่ได้จากน้ำยางสดสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยได้รับจากศูนย์วิจัยยางจะเชิงเทราและสวนยางจังหวัดชลบุรี พบว่าน้ำยางสดที่ได้จากแต่ละสายพันธุ์มีปริมาณเนื้อยางอยู่ในช่วงประมาณ 30-40% และยางแห้งที่ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่พบว่ายางที่ได้จากสายพันธุ์ GT1 และ RRIM 600 จากศูนย์วิจัยยางจะเชิงเทราจะมีปริมาณ non-rubber components (NRC) ที่สูงกว่าสายพันธุ์อื่นมากในขณะที่ยางที่ได้จากสวนยางจังหวัดชลบุรี สายพันธุ์ GT1 และ PB 28/59 มีค่า NRC ที่สูงกว่าสายพันธุ์อื่น เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบสายพันธุ์เดียวกันจากแหล่งปลูกที่แตกต่างกัน พบว่าปริมาณเนื้อยางที่ได้จากศูนย์วิจัยยางจะเชิงเทรานั้นมากกว่าที่ได้จากจังหวัดชลบุรี อย่างไรก็ตามค่า NRC ของยางสายพันธุ์ GT1 ที่ได้จากทั้งสองแหล่งมีปริมาณสูงเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ RRIM 600 ซึ่งจากการสังเกตด้วยสายตาพบว่าลักษณะสีของน้ำยางสดที่ได้จากสายพันธุ์ GT 1 มีสีเหลืองมากกว่าสายพันธุ์อื่น นอกจากนี้ยังพบว่าขนาดของอนุภาคยางที่ได้จากแต่ละสายพันธุ์ของทั้งสองแหล่งปลูกมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก

ศึกษาปริมาณสารประกอบที่ไม่ใช่ยางในน้ำยางสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้รับจากศูนย์วิจัยยางจะเชิงเทรา พบว่าในน้ำยางแต่ละสายพันธุ์มีปริมาณสารที่ไม่ใช่ยางจำพวกไขมัน (แสดงได้ด้วยข้อมูลปริมาณเอสเทอร์) โปรตีน (แสดงได้ด้วยข้อมูลปริมาณไนโตรเจน) และเถ้าไม่แตกต่างกันมากนัก ยกเว้นยางที่ได้จากสวนยางที่ชลบุรี สายพันธุ์ PB 28/59 และ PC มีปริมาณกรดไขมันในรูปเอสเทอร์ที่สูงกว่าสายพันธุ์อื่น อีกทั้งปริมาณเถ้าของน้ำยางที่ได้จากชลบุรีมีปริมาณเถ้าที่สูงกว่าที่ได้จากศูนย์วิจัยยางจะเชิงเทราประมาณ 1 เท่า ผลของน้ำหนักโมเลกุลพบว่ายางแต่ละสายพันธุ์ในแหล่งเดียวกันมีน้ำหนักโมเลกุลที่ไม่แตกต่างกันมากนัก ยกเว้นกรณีของยางที่ได้จากสายพันธุ์ GT 1 และ RRIM 2025 นั้นมีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำกว่าสายพันธุ์อื่น ในขณะที่ยางที่ได้จากสวนยางชลบุรี ยางสายพันธุ์ GT 1 และ PB 24 จะมีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าสายพันธุ์อื่น ผลจากการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของยางที่ได้จากน้ำยางสดจากต่างสายพันธุ์ทั้งสองแหล่งปลูกพบว่าการกระจายตัวของยางจากทุกสายพันธุ์มีลักษณะเป็นแบบ bimodal เช่นเดียวกัน โดยจะมี

ปริมาณน้ำหนักโมเลกุลต่ำและสูงที่ใกล้เคียงกันยกเว้นยางที่ได้จากสายพันธุ์ GT 1 จะมีปริมาณน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่มากกว่าสายพันธุ์อื่นอย่างเห็นได้ชัด เมื่อพิจารณาจากสายพันธุ์เดียวกันจากสองแหล่งที่แตกต่าง พบว่า น้ำหนักโมเลกุลที่ได้มีความแตกต่างกันมากซึ่งสังเกตได้ชัดในยางสายพันธุ์ GT 1 ซึ่งอาจจะส่งผลกระทบต่อสมบัติต่างๆได้

จากการศึกษาค่าความทนทานต่อแรงยืดของยางที่ได้จากน้ำยางสดพันธุ์ต่างๆ จากแหล่งปลูกที่แตกต่างกัน พบว่ายางที่ได้จากน้ำยางสดสายพันธุ์ RRIM 2027 จากศูนย์วิจัยยางจะเชิงเทรามีความทนทานต่อแรงดึงสูงมากกว่าสายพันธุ์อื่น รองลงมาคือ RRIM 2025 ส่วน GT 1 และ RRIM 600 นั้นมีค่าใกล้เคียงกัน ทั้งนี้เนื่องมาจากปริมาณของสารที่ไม่ใช่ยางในน้ำยางนั้นมีความแตกต่างกัน และน้ำหนักโมเลกุลที่ได้ไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงส่งผลให้สมบัติกายภาพนี้ต่างกัน ในขณะที่ยางที่ได้จากสายพันธุ์ PB 28/59 และ PC จากสวนยางชลบุรี สามารถทนแรงยืดได้มากกว่าเนื่องจากยางทั้งสองสายพันธุ์มีปริมาณไขมันสูงกว่าสายพันธุ์อื่นซึ่งเป็นตัวช่วยให้เกิดผลึกขึ้นระหว่างที่ยางถูกยืดทำให้ทนแรงดึงได้มากขึ้น ในขณะที่สายพันธุ์อื่นจะมีค่าต่ำกว่าเนื่องจากมีปริมาณไขมันที่ต่ำกว่า เมื่อพิจารณาค่าการทนต่อแรงยืดของยางสายพันธุ์เดียวกันที่ได้จากแหล่งที่ต่างกัน พบว่า ยางที่ได้จากศูนย์วิจัยยางจะเชิงเทรานั้นมีค่าการทนต่อแรงดึงที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับยางที่ได้จากสวนยางชลบุรี ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากต้นยางที่จะเชิงเทราอาจถูกดำเนินการทำวิจัยบางอย่างอยู่ ซึ่งอาจมีผลต่อสมบัติพื้นฐานของโมเลกุลยาง การศึกษาอย่างต่างสายพันธุ์และยางสายพันธุ์เดียวกันจากแหล่งที่ต่างกัน พบว่าการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล ปริมาณยางและส่วนที่ไม่ใช่ยาง รวมทั้งสมบัติพื้นฐานทางเคมีมีความแตกต่างกันซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อสมบัติทางกายภาพของยางนั้นๆ ในการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

1.2 ศึกษาจากต้นยางสายพันธุ์เดียวกันแต่มีอายุพันธุ์ที่ต่างกัน

จากการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของยางจากต้นยางอายุต่างๆ กัน พบว่ายางที่ได้จากต้นยางอ่อนอายุ 1 และ 3 เดือนนั้นมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน โดยน้ำหนักโมเลกุลจะเพิ่มขึ้นเมื่ออายุต้นยางมากขึ้น แต่จะอยู่ในช่วงที่ไม่แตกต่างกันมากนัก (สังเกตได้จากน้ำหนักโมเลกุลของยางจากต้นยางอายุ 7 เดือน และ 3 ปีมีค่าใกล้เคียงกัน) แต่เมื่อต้นยางเจริญเติบโตเต็มที่พบว่า น้ำหนักโมเลกุลจะเพิ่มขึ้นอย่างมากและจะมีการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลที่กว้างขึ้นด้วย การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของต้นยางอายุต่างๆ กัน เป็นแบบ bimodal โดยมีจุดยอดพีคทั้งสองที่ตำแหน่ง 2.0×10^6 และ 1.2×10^5 ซึ่งอัตราส่วนของทั้งสองพีคไม่เท่ากัน ซึ่งพบว่าอัตราส่วนนี้จะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออายุของต้นยางมากขึ้นซึ่งหมายความว่ายางที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีปริมาณมากขึ้นเมื่ออายุของต้นยางมากขึ้นเมื่อเทียบกับยางที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำอย่างเห็นได้ชัดเจน ซึ่งอาจเนื่องมาจากการที่เอนไซม์ที่ควบคุมการสังเคราะห์ยางและการเข้าทำปฏิกิริยา polymerization ต่างกันเมื่ออายุของต้นยางต่างกัน

จากการวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคจากต้นยางอายุต่างๆ กัน พบว่า น้ำยางที่ได้จากต้นยาง แก่นนั้นมีการกระจายตัวของขนาดอนุภาคแบบ skewed unimodal โดยมีขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ยเท่ากับ $0.938\ \mu\text{m}$ ในขณะที่น้ำยางที่ได้จากต้นยางอ่อนอายุ 7 เดือน และ 3 ปีนั้นจะมีการกระจายตัวของขนาดอนุภาคแบบ unimodal โดยมีขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ยที่เล็กกว่าซึ่งเท่ากับ $0.195\ \mu\text{m}$ และ $0.545\ \mu\text{m}$ ตามลำดับ ในทางกลับกันยางที่ได้จากต้นยางอ่อนอายุ 1 และ 3 เดือนจะมีขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ยเท่ากับ 0.284 และ 0.280 ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าขนาดอนุภาคของยางที่ได้นั้นมีความแตกต่างกันขึ้นกับอายุของต้นยาง โดยในต้นยางที่อายุต่างกันจะมีกลไกการสังเคราะห์ยางที่ซับซ้อนต่างกัน ยางจากต้นยางอ่อนประกอบด้วยอนุภาคยางที่มีขนาดเล็กกว่าอนุภาคยางจากต้นยางแก่ดังนั้นจึงยากต่อการจับตัวยาง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากน้ำยางที่ได้จากต้นยางอ่อนนั้นมีส่วนประกอบของน้ำตาลอยู่เป็นจำนวนมาก และมีเนื้อยางที่น้อยกว่า

จากการวิเคราะห์ปริมาณเจล เอสเทอร์ และไนโตรเจนที่มีอยู่ในยางที่ได้จากต้นยางสายพันธุ์ RRIM 600 ที่มีอายุต่างๆ กัน พบว่าตัวอย่างยางทั้งหมดมีปริมาณเจลที่ต่ำมากคืออยู่ในช่วงประมาณ 1-3% เท่านั้น ซึ่งจัดว่าเป็นลักษณะเฉพาะของยางที่เพิ่งทำการกรีดจากต้น ซึ่งพบว่าถ้าทำการเก็บน้ำยางไว้เป็นเวลานาน ปริมาณเจลจะเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาที่ทำการเก็บ โดยปกติแล้วถ้าทำการเก็บน้ำยางที่ทำการถนอมด้วยแอมโมเนียร่วมกับ TMTD/ZnO หรือน้ำยางชั้นที่ขายในทางการค้าไว้เป็นเวลา 1 เดือน ปริมาณเจลจะเพิ่มขึ้นถึง 50% ส่วนปริมาณเอสเทอร์ที่ได้จากยางที่กรีดได้จากต้นยางอ่อนนั้นมีค่ามากกว่าที่ได้จากต้นยางแก่ อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบปริมาณกรดไขมันในรูปเอสเทอร์ต่อ 1 สายโซ่โมเลกุลของยางกับระดับของการเกิดปฏิกิริยา Polymerization (Degree of Polymerization) พบว่ามีปริมาณกรดไขมันในรูปเอสเทอร์ต่อ 1 สายโซ่โมเลกุลของยางเป็นประมาณ 1.5 - 2 โมเลกุล โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่ออายุต้นยางเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจนนอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณไนโตรเจนมีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อต้นยางมีอายุมากขึ้น จากผลไนโตรเจนที่แตกต่างกันนี้ทำให้มีข้อสันนิษฐานที่เชื่อมโยงกับกระบวนการสังเคราะห์น้ำยาง กล่าวคือในกระบวนการสังเคราะห์น้ำยางนั้นมีเอนไซม์บางกลุ่มที่เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการสังเคราะห์ยาง เนื่องจากเอนไซม์คือกลุ่มโปรตีนชนิดหนึ่งดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ยาง แตกต่างกันระหว่างยางจากต้นอ่อนและยางที่โตเต็มที่แล้ว ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์โปรตีนที่ติดอยู่กับผิวของอนุภาคยางที่ได้จากยางต่างๆ โดยทำการปั่นแยกส่วนของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ก่อนแล้วจึงนำยางที่แยกได้มาวิเคราะห์พบว่าแถบโปรตีนที่ได้จากผิวยางต้นยางอ่อนอายุ 3 เดือนและ 7 เดือนนั้นส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลส่วนใหญ่ประมาณ 65 kDa ในขณะที่ยางจากต้นยางแก่จะมีแถบโปรตีนที่ผิวยางส่วนใหญ่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27 และ 14 kDa ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่าโปรตีนที่ผิวของอนุภาคยางจากต้นยางอ่อนและต้นยางแก่นั้นเป็นโปรตีนต่างชนิดกัน อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาโปรตีนจากยางอนุภาคขนาดเล็กและขนาดใหญ่ที่ได้จากต้นยางแก่ พบว่าทั้งยางขนาดอนุภาคใหญ่และเล็กจะมีแถบโปรตีนที่ 14 และ 27 kDa เช่นเดียวกัน แต่อัตราส่วนความเข้มของแถบโปรตีนทั้งสองจะไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่ายางอนุภาคเล็ก

และใหญ่ที่ได้จากต้นยางแก่นี้จะมีโปรตีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ยางแบบเดียวกัน แต่มีอัตราส่วนที่ต่างกัน ซึ่งความแตกต่างของอัตราส่วนนี้ส่งผลต่อบทบาทการควบคุมการสร้างยางที่มีขนาดอนุภาคที่ต่างกัน จากผลการทดลองนี้ทำให้ทราบว่านอกจากโปรตีนจะเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมน้ำหนักโมเลกุลในต้นยางที่อายุต่างกันแล้ว ยังมีบทบาทสำคัญในการควบคุมขนาดของอนุภาคยางด้วย

ขั้นตอนที่ 2 ขั้นตอนการเตรียมยางให้มีความบริสุทธิ์ (purification) และการตัดส่วนที่เป็นโปรตีน ซึ่งคาดว่าจะควรอยู่ที่ตำแหน่งเริ่มต้นของโมเลกุลยางโดยใช้โปรตีโอไลติกเอนไซม์ แล้วทำการวิเคราะห์ชนิดและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่มีพันธะอยู่บนโมเลกุลยางโดยใช้เทคนิคทางชีวเคมี

วัตถุดิบที่ใช้

- น้ำยางสดที่เติมสารรักษาสภาพ Triton® X-100 0.2%w/v ได้รับจากสวนยางของบริษัทไทยรับเบอร์ จำกัด (ชลบุรี)
- น้ำยางสดที่ไม่เติมสารเคมีใดๆ

วิธีการทดลอง

1. การปั่นยางเพื่อเตรียมยางที่มีความบริสุทธิ์สูง

ทำการปั่นแยกส่วนที่เป็นครีมนอกจากน้ำยางสดด้วยความเร็ว 14,000-19,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40-60 นาที (ถือว่าการปั่นครั้งที่ 1) นำส่วนที่เป็นครีมมาทำการกระจายตัวในสารละลาย Triton® X-100 หรือ SDS (Sodium dodecyl sulphate) และทำการกระจายตัวยางในสารละลาย Triton® X-100 และปั่นต่อ อีก 3 ครั้ง

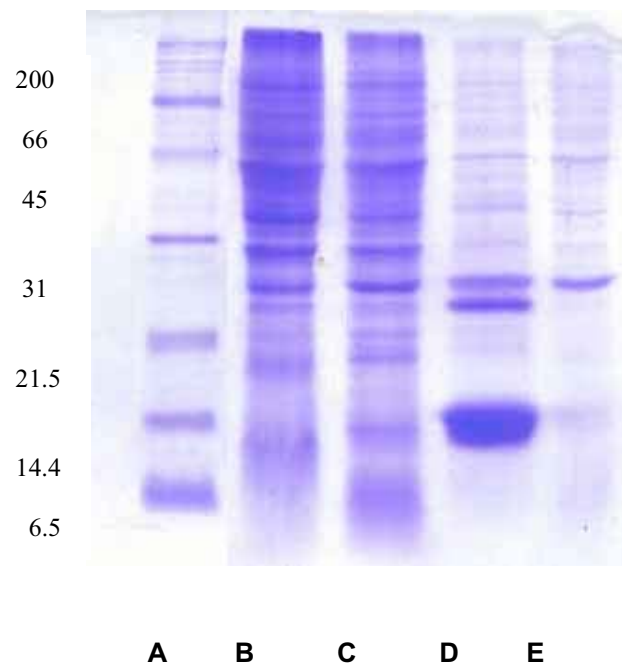
2. การสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์

เตรียมน้ำยางสดให้ได้ปริมาณน้ำยางที่มีความเข้มข้นประมาณ 20-30% ของน้ำหนัวยางแห้งต่อน้ำยาง 100 มิลลิลิตรและทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โปรตีเอส (KP 3939 จากบริษัท KaO) ที่ทำการละลายในสารละลาย Triton® X-100 หรือ SDS เข้มข้นประมาณ 0.2-0.5% โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการปั่นแยกด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที นำส่วนครีมมาละลายในน้ำกลั่นและทำการปั่นแยกอีกครั้งหนึ่งเป็นเวลา 30 นาที

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลองตอนที่ 2

จากการปั่นน้ำยางสด (RRIM600) ที่ความเร็วรอบสูงจำนวนหลายครั้ง พบว่าปริมาณส่วนที่ไม่ใช่ยางโดยเฉพาะโปรตีนจะลดลงซึ่งสามารถสังเกตได้จากปริมาณค่าไนโตรเจน ซึ่งลดลงจาก 0.7% โดยน้ำหนักเป็น 0.3, 0.2, 0.15 และ 0.1 เมื่อทำการปั่นในรอบที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ แต่ปริมาณเอสเทอร์ของกรดไขมันไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ในขณะที่การสกัดโปรตีนจากน้ำยางสดโดยย่อยด้วยเอนไซม์จะให้ผลของปริมาณไนโตรเจนลดลงจาก 0.7% เป็น 0.08%

เมื่อทำการวิเคราะห์โปรตีนที่ถูกกำจัดออกมาละลายอยู่ในชั้นน้ำชีรัมภายหลังการปั่นและการใช้เอนไซม์ในการตัดโปรตีนที่ติดที่โมเลกุลยาง ได้ผลแสดงในรูปที่ 2.1 โดยจะเห็นว่าโปรตีนที่ถูกกำจัดออกมาละลายอยู่ในชั้นน้ำชีรัมภายหลังการปั่นครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ไม่มีความแตกต่างกันนัก โดยมีแถบของโปรตีนที่พบร่วมกันที่ 27, 30, 33 และ 45 KDa แต่สำหรับโปรตีนที่ถูกกำจัดออกมาละลายอยู่ในชั้นน้ำชีรัมภายหลังการใช้เอนไซม์ในการตัดโปรตีนที่ติดที่โมเลกุลยางเมื่อใช้ SDS และ Triton[®] X-100 ในการสกัดร่วม พบแถบที่แตกต่างกันชัดเจน คือที่ 14.6, 25 และ 27 KDa โดยจะพบในกรณีแรกเท่านั้น แต่ในกรณีหลังจะพบแถบโปรตีนที่ 27 KDa จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า โปรตีนที่ติดอยู่ที่บนโมเลกุลยางที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์น่าจะเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14.6, 25 และ 27 KDa อย่างไรก็ตามต้องทำการศึกษารายละเอียดต่อไป



รูปที่ 2.1 SDS-PAGE gel image (15% gel)

● Molecular weight marker (kDa)

- (โปรตีนที่ถูกกำจัดออกมาละลายอยู่ในชั้นน้ำซีรัมหลังการปั่นครั้งที่ 1
- (โปรตีนที่ถูกกำจัดออกมาละลายอยู่ในชั้นน้ำซีรัมหลังการปั่นครั้งที่ 2
- (โปรตีนที่ถูกกำจัดออกมาละลายอยู่ในชั้นน้ำซีรัมหลังการใช้เอนไซม์ในการตัดโปรตีนที่ติดที่โมเลกุลยาง เมื่อใช้ SDS ในการสกัดร่วม
- (โปรตีนที่ถูกกำจัดออกมาละลายอยู่ในชั้นน้ำซีรัมหลังการใช้เอนไซม์ในการตัดโปรตีนที่ติดที่โมเลกุลยาง เมื่อใช้ Triton[®] X-100 ในการสกัดร่วม

ขั้นตอนที่ 3 การศึกษาโครงสร้างของหมู่ปลายโมเลกุล (หรือปลายด้านแอลฟา) ของยางธรรมชาติโดยวิธีการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ไลเปส ฟอสฟาเตส และฟอสโฟไลเปส

วัตถุดิบที่ใช้

น้ำยางสดที่เติมสารรักษาสภาพ Triton[®] x-100 0.2%w/v ได้รับจากสวนยางของบริษัทไทยรับเบอร์ จำกัด (ชลบุรี)

วิธีการทดลอง

1. การกำจัดโปรตีนออกจากน้ำยางธรรมชาติโดยวิธีการใช้เอนไซม์

เตรียมน้ำยางสดเข้มข้นประมาณ 20% ของน้ำหนักยางแห้งต่อน้ำยาง 100 มิลลิลิตรและทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โปรตีเอสเข้มข้นประมาณ 0.5% โดยน้ำหนักเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2. การทำปฏิกิริยาระหว่างน้ำยางที่ปราศจากโปรตีนและเอนไซม์ชนิดต่างๆ

นำน้ำยางปราศจากโปรตีนผสมกับไลเปสที่สกัดได้จาก *candida rugosa* มาบ่มที่ 37°C และค่า pH 7.2 เป็นเวลาตั้งแต่ 0-72 ชั่วโมง ที่อัตราส่วนระหว่างไลเปสต่อน้ำยางตั้งแต่ 0-10 โดยน้ำหนัก

นำฟอสโฟไลเปส A₂ ที่ได้จาก *bovine pancreas* และฟอสโฟไลเปส B จาก *Vibrio species* มาผสมกับน้ำยางสดปราศจากโปรตีนและทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่ค่า pH 8 เป็นเวลา 3 วัน นอกจากนี้ นำฟอสโฟไลเปส C จาก *C. Perfringe* และ D จาก peanut มาทำปฏิกิริยากับน้ำยางสดปราศจากโปรตีนเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30°C และที่ค่า pH 7.3 และ 5.6 ตามลำดับ

นำสารละลายยางที่ปราศจากโปรตีนที่มีความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักมาทำการเติมเทเพอวิทอแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ซึ่งใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและนำสารละลายนี้ไปทำปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 10% โดยน้ำหนักของ alkaline phosphatase ที่ได้จาก bovine Intestinal Mucosa ในน้ำ หลังจากนั้นทำการคนสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 45 ชั่วโมง

3. การสกัดกรดไขมันอิสระด้วยอะซีโตน

ทำได้โดยวิธีการสกัดแยกด้วยอะซีโตนโดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า ซอกเลตเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนและนำมาทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

4. การกำจัดกรดไขมันที่ติดกับโมเลกุลยาง

ปฏิกิริยานี้สามารถทำได้โดยการทำให้ปฏิกิริยาระหว่างสารละลายยางที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักกับโซเดียมเมทอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ และทำการกวนอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

วิธีการวิเคราะห์

1. การตรวจวัดหาปริมาณเอสเทอร์ของกรดไขมัน : สามารถหาได้จากสัดส่วนความเข้มข้นของการดูดกลืนแสงของหมู่คาร์บอกซิลที่ปรากฏที่ 1739 cm^{-1} ต่อหมู่แอลคีนของโมเลกุลยางที่ 1664 cm^{-1} และค่าความเข้มข้นที่เปลี่ยนแปลงไปของปริมาณเอสเทอร์

2. การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลโดยเทคนิค GPC

3. การวิเคราะห์หาค่าความหนืด และค่าคงที่ฮักกินส์โดยใช้ viscometry

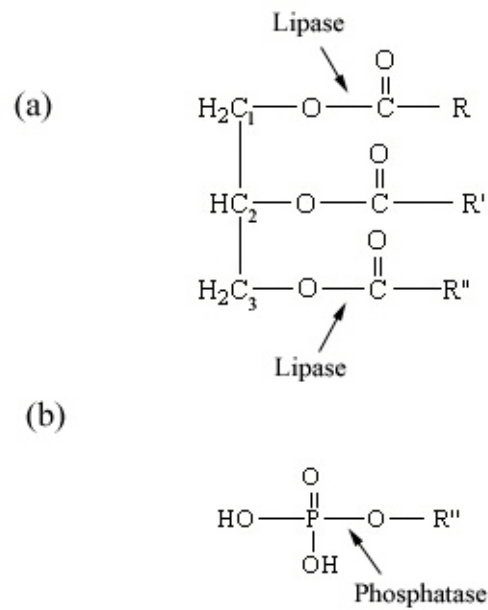
4. การวิเคราะห์หาโครงสร้างโดยใช้เทคนิค ^1H -, ^{13}C - และ ^{31}P -NMR: การวัด ^1H -, ^{13}C - และ ^{31}P -NMR ทำได้ที่ความถี่ 750, 188 และ 303 MHz และที่อุณหภูมิ 50°C โดยใช้ตัวทำละลาย

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลองตอนที่ 3

ในการทดลองนี้ได้ทำเพื่อพิสูจน์และตรวจสอบว่ามีฟอสโฟลิปิดที่ปลายสายโซ่โมเลกุล ซึ่งทำได้โดยการศึกษาคอนฟอร์เมชันที่เปลี่ยนแปลงไป หลังจากทำปฏิกิริยาไลเปส ฟอสฟาเตส และ ฟอสโฟไลเปส เอนไซม์เหล่านี้มีความสามารถสูงในการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ โมโนฟอสเฟตและฟอสโฟลิปิด ตามลำดับ

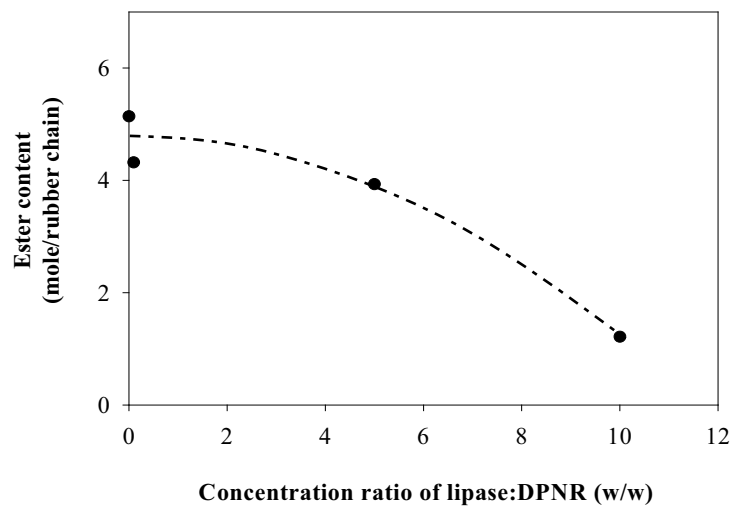
3.1 การย่อยสลายไขมันจากยางที่ปราศจากโปรตีนด้วยไลเปสและฟอสฟาเตส

ไลเปสสามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ของไตร, ได และโมโนกลีเซอไรด์ ที่ตำแหน่ง C1 และ C3 ของสารประกอบกลีเซอรอลในขณะที่ฟอสฟาเตสสลาย พันธะ monophosphate ดังแสดงในภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 ตำแหน่งของกลีเซอรอลและโมโนฟอสเฟตเอสเทอร์ที่สามารถย่อยสลายด้วย

(a) ไลเปส และ (b) ฟอสฟาเตส



รูปที่ 3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของหมู่เอสเทอร์ในยางปราศจากโปรตีน (DPNR) ต่อความเข้มข้นของไลเปส

รูปที่ 3.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของหมู่เอสเทอร์ในยางปราศจากโปรตีน (DPNR)

ต่อความเข้มข้นของไลเปส จะพบว่าปริมาณของหมู่เอสเทอร์ลดลงจาก ~5 โมล เป็น ~1.5% โมลต่อสายโซ่ ยางเมื่อความเข้มข้นของไลเปสเพิ่มขึ้น การลดลงของปริมาณเอสเทอร์แสดงให้เห็นว่ามีสารประกอบที่เป็น acylglycerol ในยาง แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณของเอสเทอร์ไม่ได้ลดลงเป็นศูนย์แม้จะใช้ปริมาณไลเปสมาก ก็ตาม ซึ่งสามารถอธิบายได้โดยความจริงที่ว่าไลเปสไม่สามารถย่อยสลายหมู่เอสเทอร์ที่ตำแหน่ง C₂ ได้ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าพบสารประกอบประเภท acylglycerol ในยางธรรมชาติ

นอกจากนี้จากสเปกตรัม FTIR จะสังเกตได้ว่า C=O stretching ของหมู่เอสเทอร์ของไลเปสเกิดการเปลี่ยนแปลงจาก 1743-1710 cm⁻¹ หลังจากทำปฏิกิริยากับไลเปสซึ่งแสดงให้เห็นว่าไลเปสในการทดลองนี้ สามารถที่จะย่อยสลายฟอสโฟลิปิดได้แต่ยังไม่สมบูรณ์ รวมถึงการทำปฏิกิริยากับฟอสฟาเตสในการทดลองนี้ไม่สามารถจะย่อยสลายได้หมดเช่นกัน

การทำปฏิกิริยากับไลเปสและฟอสฟาเตสอาจทำให้เกิดการย่อยสลายของจุดกำเนิดกิ่งก้านซึ่งสามารถพิสูจน์ได้จากการลดลงของน้ำหนักโมเลกุล ปริมาณกิ่งก้าน และค่า Huggin's *K*'constant ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.1.

ตารางที่ 3.1 แสดงค่าเอสเทอร์ความหนืด และน้ำหนักโมเลกุลของยางที่ทำปฏิกิริยากับไลเปส เปรียบเทียบกับยางปราศจากโปรตีน (DPNR) และทรานเอสเทอร์รีฟายด์ยางปราศจากโปรตีน (TE-DPNR) รวมถึงยางที่ทำปฏิกิริยากับฟอสฟาเตส

ค่าความหนืดของยางที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับไลเปสมีค่าต่ำกว่ายาง DPNR แต่มีค่าสูงกว่ายาง TE-DPNR นอกจากนี้ค่า Huggin's *K*' ของยาง DPNR มีค่าลดลงจาก 0.47 เป็น 0.23 หลังจากที่ทำปฏิกิริยากับไลเปส ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจุดกำเนิดกิ่งก้านได้ถูกทำลายเพื่อเกิดเป็นโมเลกุลเดี่ยวหลังจากทำปฏิกิริยากับไลเปส การลดลงของน้ำหนักโมเลกุลแสดงให้เห็นว่าหมู่เอสเทอร์ที่ตำแหน่ง C₁ ของฟอสโฟลิปิด มีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิดกิ่งก้านของยางธรรมชาติ

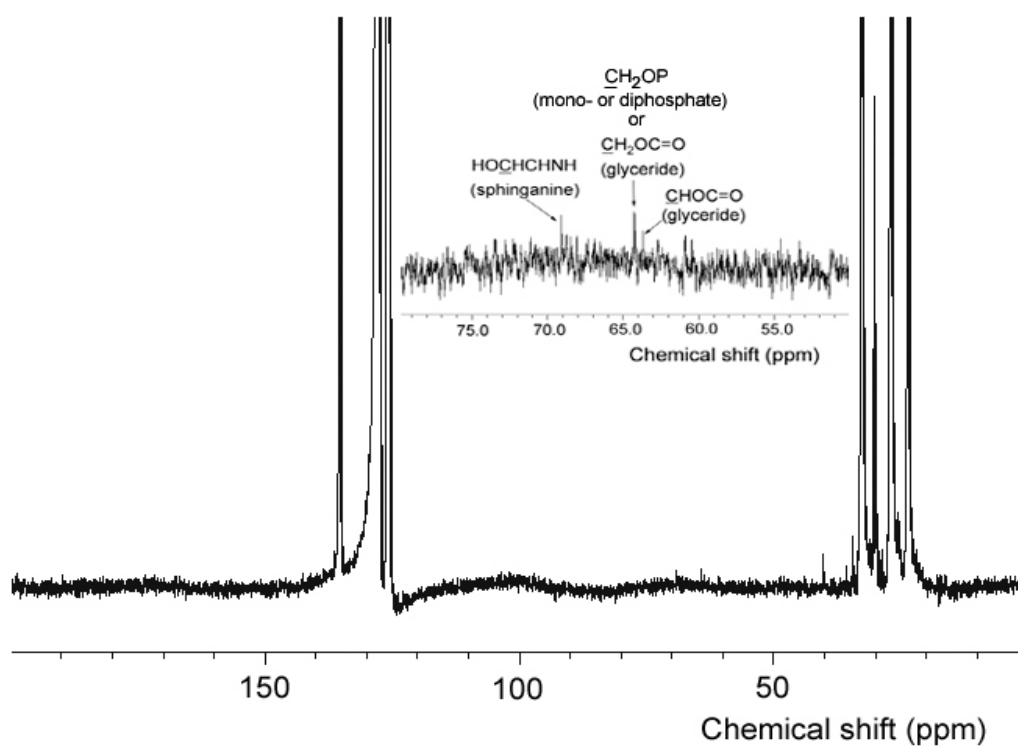
จากผลที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ฟอสฟาเตสย่อยสลายพันธะโมโนฟอสเฟตเอสเทอร์ ซึ่งรวมถึงในโมเลกุลฟอสโฟลิปิดที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่ที่มีชีวิต เช่น กรดฟอสฟาติก เป็นที่น่าสังเกตว่าการทำปฏิกิริยากับฟอสฟาเตส มีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลและค่าความหนืดของยางปราศจากโปรตีนมีค่าลดลง ถึงแม้ว่าค่าที่ได้จะมีค่าสูงกว่ายางที่ทำการกำจัดไขมันออกโดยปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์รีฟเคชัน และยางที่ทำปฏิกิริยากับไลเปส การลดลงของค่าเหล่านี้แสดงให้เห็นว่ามีหมู่โมโนฟอสเฟตที่เป็นปัจจัยในการเกิดกิ่งก้านในยางซึ่งคาดว่าจะเกิดจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสายโมเลกุลยางต้องประกอบไปด้วยโครงสร้างแบบกิ่งก้านสาขา

ตารางที่ 3.1 แสดงค่าเอสเทอร์ความหนืด และน้ำหนักโมเลกุลของยางที่นำปฏิกิริยากับไลเปสเปรียบเทียบกับยางปราศจากโปรตีน (DPNR) และทรานเอสเทอร์รีไฟด์ยางปราศจากโปรตีน (TE-DPNR) รวมถึงยางที่ทำปฏิกิริยากับฟอสฟาเตส

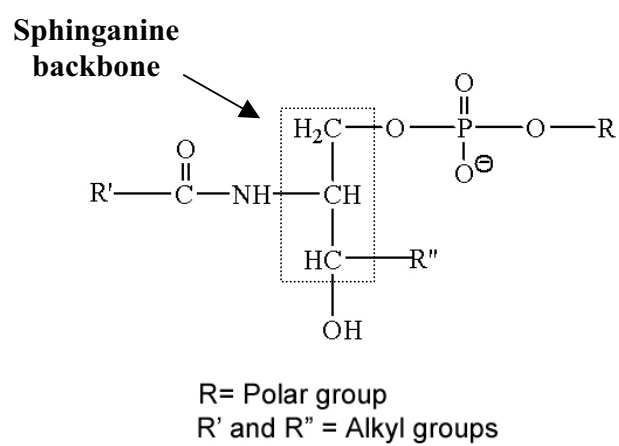
สมบัติ	AE-DPNR	TE-DPNR	Lipase treated DPNR (10:1)	Phosphatase treated DPNR (10:1)
Ester content (mmol/kg rubber)	31.3 (5.09)*	~0	16.2 (1.59)	18.5 (2.14)
$[\eta]$	5.12	3.08	3.75	3.47
k'	0.47	0.43	0.23	0.35
$\bar{M}_v (\times 10^5)$	7.92	3.87	5.10	4.12
$\bar{M}_n (\times 10^5)$	1.93	1.18	0.97	1.16
$\bar{M}_w (\times 10^5)$	4.34	2.71	3.27	3.64
$\bar{M}_w / \bar{M}_n$	3.84	3.94	3.04	3.58

ข้อสังเกต ค่าในวงเล็บคือค่าปริมาณเอสเทอร์ในหน่วยโมลต่อหนึ่งสายโซ่โมเลกุลยาง

นอกจากนี้การตรวจสอบโครงสร้างของยางปราศจากโปรตีนโดยวิธีนิวเคลียร์แมกนีติกเรโซแนนซ์พบว่า มีสัญญาณที่ 63.7 และ 64.7 ppm แสดงถึงสัญญาณคาร์บอนของเมไทน์ (-CH-) และเมทิลีน (-CH₂-) ของหมู่กลีเซอไรด์ในฟอสโฟลิปิดซึ่งต่ออยู่กับหมู่คาร์บอกซิล หรืออาจจะเป็นสัญญาณของหมู่เมทิลีนซึ่งต่ออยู่กับหมู่โมโนหรือไดฟอสเฟตสัญญาณคาร์บอนที่เกิดขึ้นที่ 62.9 ppm แสดงถึงหมู่เมทไทน์ที่ต่ออยู่กับหมู่ไฮดรอกซิลในสเปกตรัมของ ¹³C-NMR ที่แสดงไว้ในรูปที่ 3.2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาจจะมีฟอสโฟลิปิดที่ประกอบด้วย ไนโตรเจนและไฮดรอกซิลในโมเลกุลยางดังภาพที่ 3.2



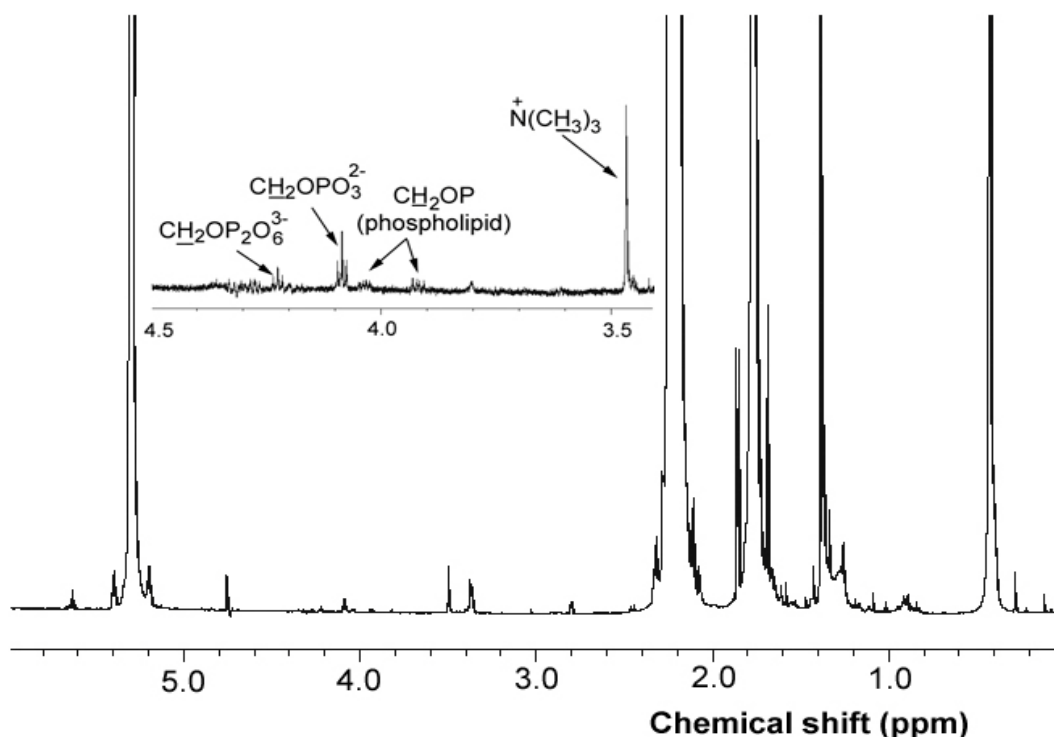
รูปที่ 3.2 ^{13}C -NMR spectrum ของยาง DPNR ที่วัดใน C_6D_6 ที่ 188 MHz



ภาพที่ 3.2 โครงสร้างทางเคมีของ phosphosphingolipid

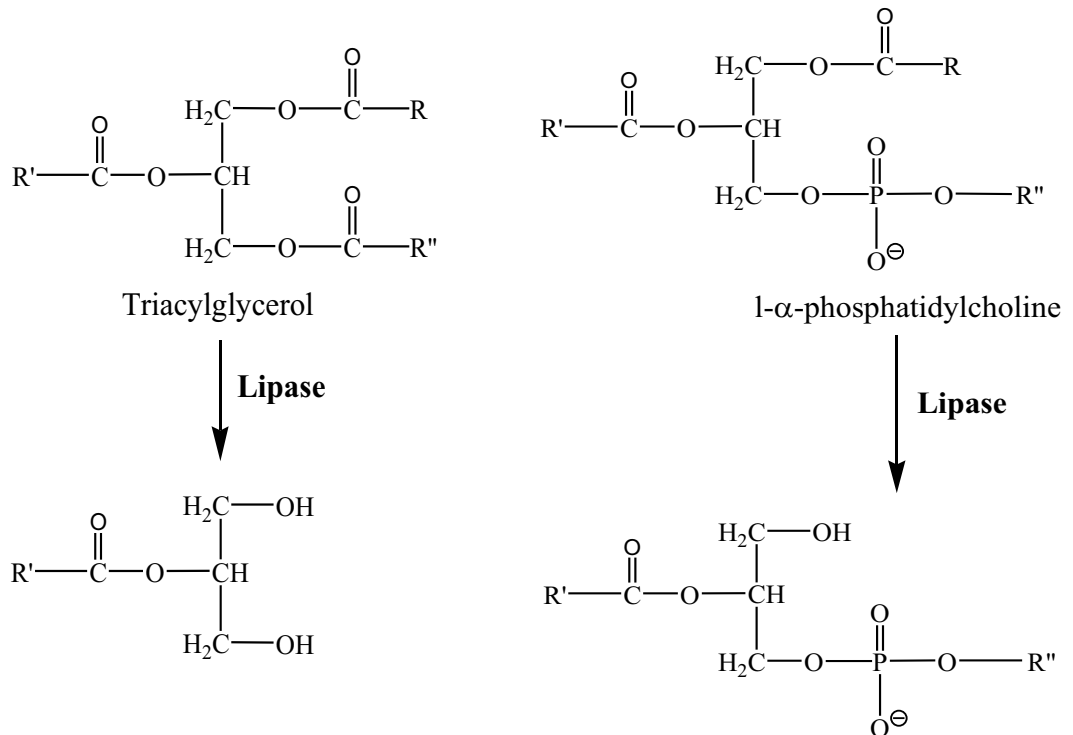
ฟอสโฟลิปิดที่ติดอยู่กับโมเลกุลยางสามารถยืนยันได้โดย $^1\text{H-NMR}$ ซึ่งแสดงในรูปที่ 3.3 สัญญาณโปรตอนที่เกิดขึ้นที่ 3.49 ppm แสดงถึงโปรตอนในหมู่เมทิล ($-\text{CH}_3$) ซึ่งติดอยู่กับไนโตรเจนอะตอมของหมู่โคลีน (Choline) ของฟอสโฟลิปิด อีกทั้งสัญญาณเล็กๆที่ปรากฏที่ 3.92 และ 4.04 ppm คำนวณอาจเป็นโปรตอนของหมู่เมทิลที่ไม่สมมาตรที่ติดอยู่กับหมู่ฟอสเฟต ($-\text{CH}_2\text{OP}-$) ในฟอสโฟลิปิด เป็นที่น่าสังเกตว่าโปรตอนเนื่องจากหมู่ฟอสเฟตและไดฟอสเฟตสามารถถูกตรวจพบใน $^1\text{H-NMR}$ เพิ่มเติมที่ 4.09 ppm ซึ่งแสดงถึงเมทิลีนโปรตอน ($-\text{CH}_2-$) ที่ C-4 ของสายโมเลกุลยางซึ่งติดอยู่กับหมู่ฟอสเฟต สัญญาณโปรตอนปรากฏที่ 4.22 ppm ซึ่งว่าเป็นเมทิลีนโปรตอนที่ติดอยู่กับหมู่ไดฟอสเฟต ($-\text{CH}_2\text{OPP}$)

จากผลของ $^1\text{H-}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ แสดงให้เห็นว่าสายโมเลกุลของยางประกอบไปด้วยโมโนหรือไดฟอสเฟตที่ปลายสายโซ่ การเกิดขึ้นของหมู่โมโนฟอสเฟตคาดว่าเกิดจากการแตกสลายของโมเลกุลไดฟอสเฟต เนื่องจากความไม่เสถียรของโมเลกุลไดฟอสเฟต



รูปที่ 3.3 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของยาง DPNR ที่วัดใน C_6D_6 ที่ 750 MHz

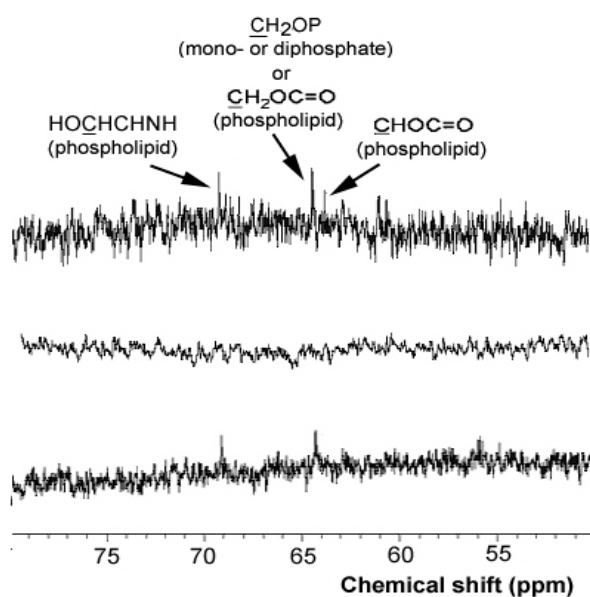
โครงสร้างของ triacylglycerol และ phospholipid ภายหลังทำปฏิกิริยากับไลเปส สามารถแสดงได้ดังภาพที่ 3.3



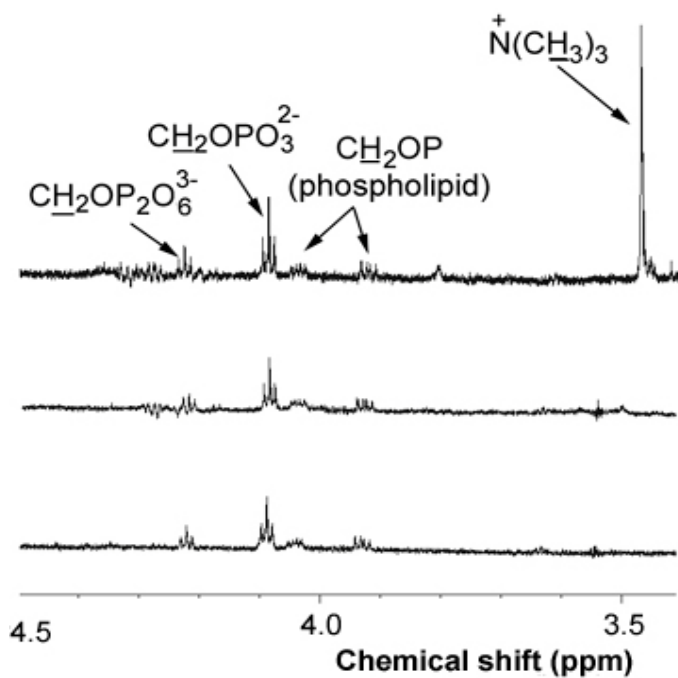
ภาพที่ 3.3 โครงสร้างของ triacylglycerol และ phospholipid ภายหลังทำปฏิกิริยากับไลเปส

รูปที่ 3.4 และ 3.5 แสดงภาพขยายของตำแหน่งสัญญาณที่ปลายสายโซ่ (ปลายแอลฟา) ใน ^{13}C -NMR และ ^1H -NMR spectra ของยาง DPNR ก่อนและหลังทำปฏิกิริยากับไลเปสและฟอสฟาเตส จาก ^{13}C -NMR spectrum จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าสัญญาณของฟอสโฟลิปิดหายไปเมื่อทำปฏิกิริยากับ DPNR กับไลเปส แต่ยังคงอยู่เมื่อทำปฏิกิริยากับฟอสโฟไลเปส นอกจากนี้ยังพบสัญญาณโปรตอนของหมู่เมทิลีนที่ติดอยู่กับหมู่โมโนและไดฟอสเฟตหลังจากที่ยางได้ทำปฏิกิริยากับไลเปสซึ่งแสดงให้เห็นว่าฟอสโฟลิปิดไม่ได้ติดอยู่กับโมเลกุลยางโดยตรง ผลการทดลองนี้สนับสนุนการที่มีหมู่ acylglycerol หรือฟอสโฟลิปิดติดอยู่กับโมเลกุลยางธรรมชาติ

สำหรับ**รูปที่ 3.5** ก็สามารรถสังเกตเห็นการหายไปของสัญญาณฟอสโฟลิปิดที่ตำแหน่ง 3.49 แต่ยังคงพบสัญญาณของหมู่โมโนและไดฟอสเฟต ผลการทดลองนี้ก็สนับสนุนว่ามีหมู่โมโนและไดฟอสเฟต ติดอยู่ที่ปลายโมเลกุลยางในขณะที่ฟอสโฟลิปิดอาจจะเพียงแค่เกิดการเชื่อมโยงที่ปลายโมเลกุลยางผ่านพันธะบางประเภท สำหรับกรณียางภายหลังทำปฏิกิริยากับฟอสฟาเตส จะเห็นว่าการพบสัญญาณโปรตอนที่เกิดเนื่องจากหมู่เมทิลีนที่ติดอยู่กับหมู่โมโนและไดฟอสเฟตถึงแม้จะได้ถูกทำปฏิกิริยากับฟอสฟาเตสแล้ว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสายโซ่ยางไม่ได้ติดโดยตรงกับหมู่ฟอสเฟต โดยพันธะโมโนฟอสเฟตธรรมดา แต่อาจจะเป็นหมู่โมโนและไดฟอสเฟตที่มีการโครงสร้างที่ถูกปรับเปลี่ยนไป เช่นที่ตำแหน่งไฮดรอกซิลในหมู่ฟอสเฟต



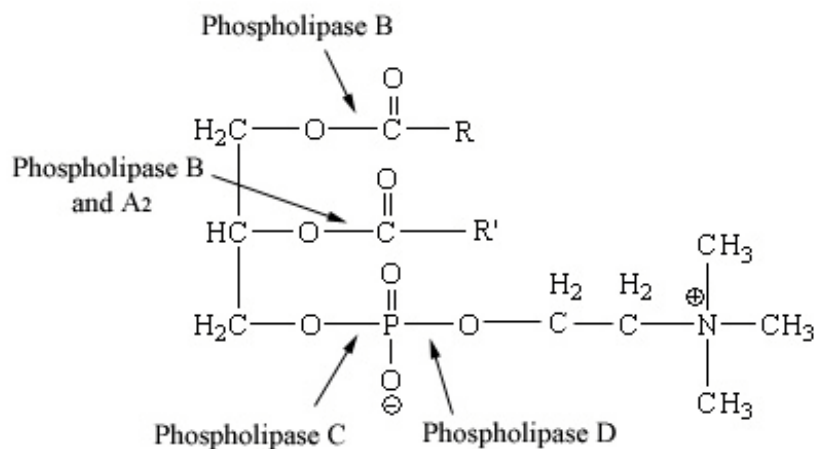
รูปที่ 3.4 เปรียบเทียบ ^{13}C -NMR spectra ในช่วง α -terminal ของยาง DPNR ก่อนและหลังทำปฏิกิริยาด้วยไลเปส



รูปที่ 3.5 เปรียบเทียบ ^1H -NMR spectra ในช่วง α -terminal ของยาง DPNR ก่อนและหลังทำปฏิกิริยาด้วยฟอสฟาเตส

3.2 การย่อยสลายไขมันจากยางที่ปราศจากโปรตีนด้วยฟอสโฟไลเปส

ภาพที่ 3.4 แสดงตำแหน่งที่ถูกย่อยสลายของโมเลกุลฟอสโฟลิปิด (L- α -phosphatidylcholine) โดยฟอสโฟไลเปสได้



ภาพที่ 3.4 โครงสร้างทางเคมีของ L- α -phosphatidylcholine และตำแหน่งที่สามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยฟอสโฟไลเปส

ตารางที่ 3.2 แสดงปริมาณเอสเทอร์ น้ำหนักโมเลกุลและค่าความหนืดของยางหลังจากที่ทำปฏิกิริยากับฟอสโฟไลเปส จะเห็นได้ว่าปริมาณเอสเทอร์ลดลงอย่างชัดเจนจาก 6.1 เป็น 1.6, 2.2 และ 3.0 มิลลิต่อสายโซ่ยางหลังจากทำปฏิกิริยาฟอสโฟไลเปส A₂, C, และ D ตามลำดับ

น้ำหนักโมเลกุลและค่าความหนืดของน้ำยางที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับฟอสโฟไลเปสลดลงประมาณหนึ่งในสองถึงหนึ่งในสาม ในขณะที่ค่าไม่เปลี่ยนแปลงมากนักเมื่อทำปฏิกิริยากับฟอสโฟไลเปส D ซึ่งผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าหมู่เอสเทอร์ที่ตำแหน่ง C1 และ C2 ของฟอสโฟลิปิดเกี่ยวข้องกับการเกิดกึ่งกันรวมทั้งหมู่ฟอสเฟตด้วย ในขณะที่หมู่คลอรีนไม่มีผลมากนักต่อการเกิดกึ่งกัน

นอกจากนี้จะสังเกตเห็นว่าค่า k' ของยางปราศจากโปรตีนมีค่าสูงกว่าน้ำยางที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับฟอสโฟไลเปส B และ C เมื่อนำมาพิจารณาควบคู่กับการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลและความหนืด จะ

แสดงให้เห็นผลชัดเจนว่า กิ่งก้านบางส่วนในยางสามารถจะแตกสลายได้โดยการทำปฏิกิริยากับฟอสโฟไลเปส B และ C ซึ่งฟอสโฟไลเปสทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถที่จะทำลายโครงสร้าง micelle ที่เกิดขึ้นในยางได้

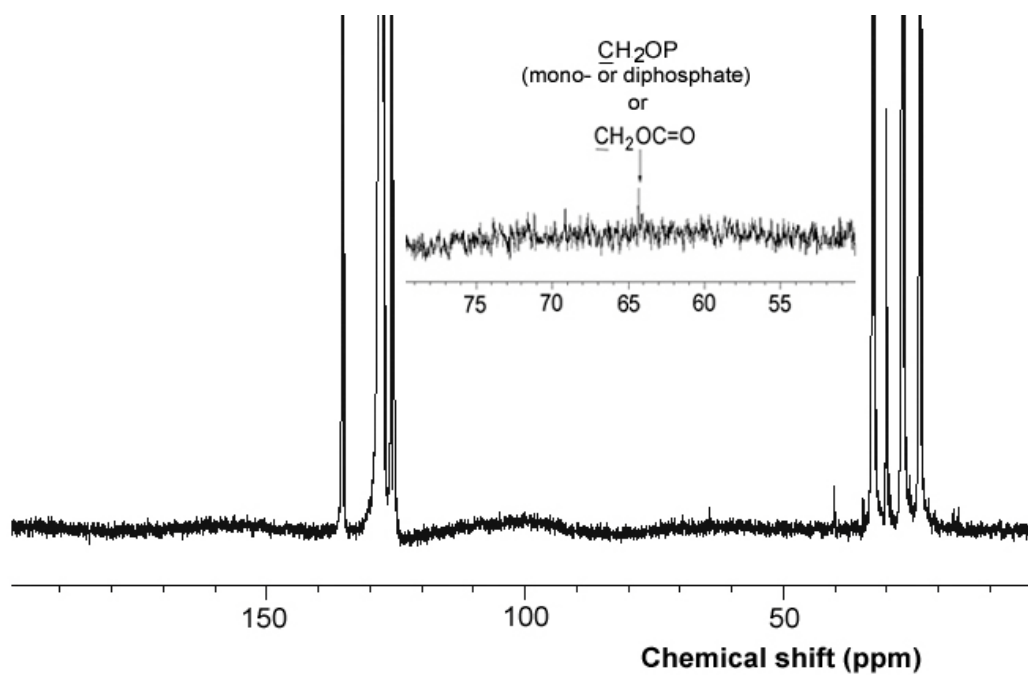
ตารางที่ 3.2 ปริมาณเอสเทอร์ น้ำหนักโมเลกุลและค่าความหนืดของยางหลังจากที่ทำปฏิกิริยากับฟอสโฟไลเปส

		Concentration ratio of phospholipase:DPNR (w/w)						
		A ₂		B		C		D
		1:50	1:5	1:100	1:50	1:5	1:50	1:5
Ester content (mole/chain)			25.5					
	31.3	34.9	(1.62)	28.8	21.9	21.2	30.4	17.7
	(6.05) [*]	(1.97)	)	(4.41)	(2.17)	(2.25)	(5.54)	(3.03)
$\bar{M}_n (\times 10^5)$	1.93	0.56	0.63	1.53	0.99	1.06	1.82	1.72
$\bar{M}_w (\times 10^5)$	4.34	4.29	5.21	3.88	5.22	4.41	8.35	7.40
$\bar{M}_w/\bar{M}_n$	3.84	7.62	8.19	2.52	4.43	4.94	4.60	4.31
$[\eta]$	5.12	-	-	3.33	3.25	3.40	4.28	4.00
$\bar{M}_v (\times 10^5)$	7.92	-	-	4.32	4.17	4.45	6.15	5.59
k'	0.47	-	-	0.19	0.25	0.29	0.42	0.47

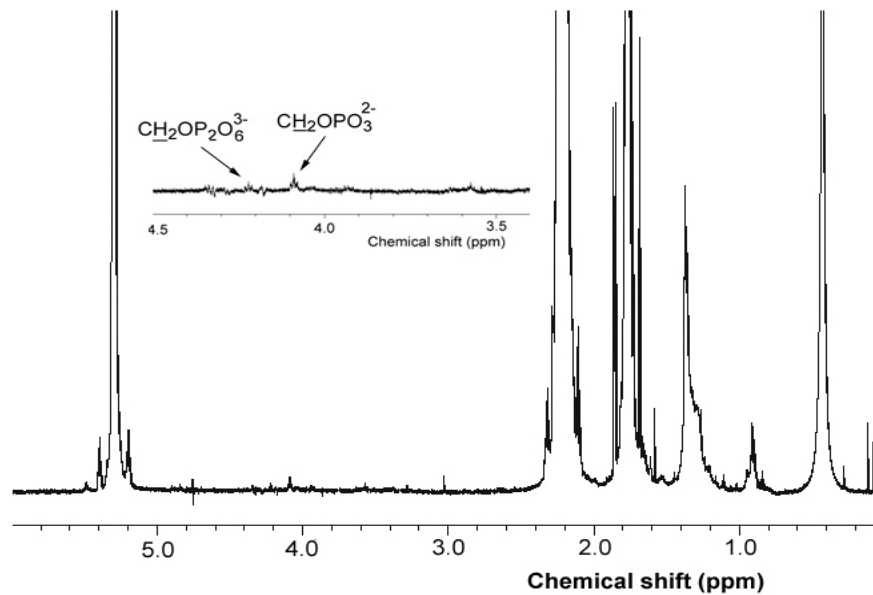
ข้อสังเกต ค่าในวงเล็บคือค่าปริมาณเอสเทอร์ในหน่วยโมลต่อหนึ่งสายโซ่โมเลกุลยาง

จากนั้นทำการวัดโครงสร้างของยางหลังจากการทำปฏิกิริยากับฟอสโฟไลเปส B และ C พบว่า สัญญาณคาร์บอนที่ตำแหน่ง 63.1 ppm ของเมทไธนคาร์บอนในโมเลกุลของฟอสโฟลิปิดได้หายไปหลังจากทำปฏิกิริยากับฟอสโฟไลเปส B ในสเปกตรัมของ ¹³C-NMR แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าสเปกตรัมโปรตอน

ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณยกเว้นเพียงการหายไปของสัญญาณโปรตอนที่อยู่กับหมู่คลอรีนเท่านั้น แสดงให้เห็นว่าการทำลายพันธะเอสเทอร์โดยฟอสโฟไลเปส สามารถจะย่อยสลายฟอสโฟลิปิดที่ติดอยู่ที่หมู่ปลายของยางได้ดังแสดงในรูปที่ 3.6 และ 3.7 ตามลำดับ

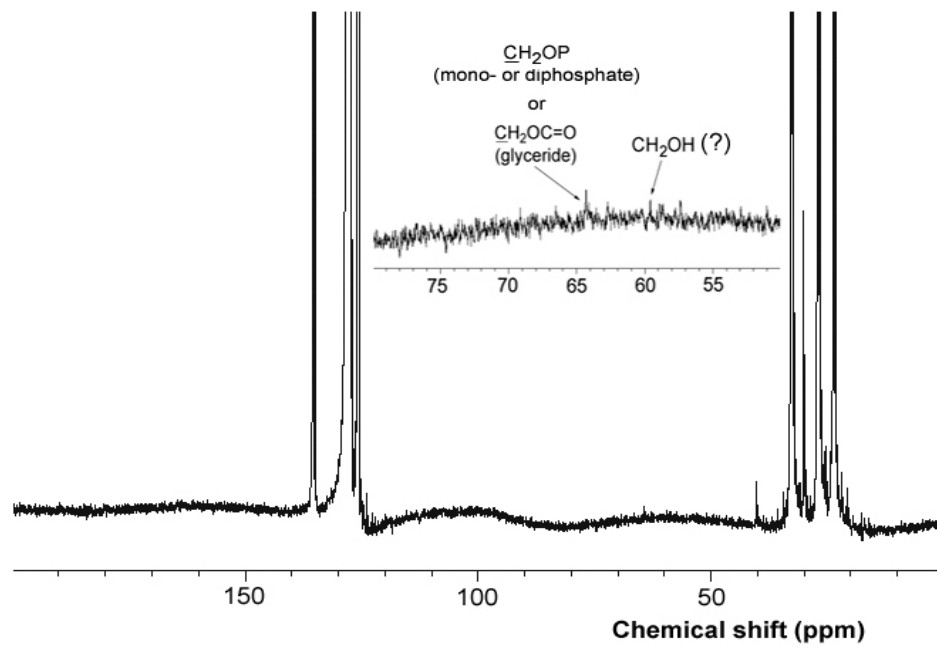


รูปที่ 3.6 ^{13}C -NMR spectrum ^1H -NMR ของยาง DPNR หลังจากการทำปฏิกิริยากับฟอสโฟไลเปส B

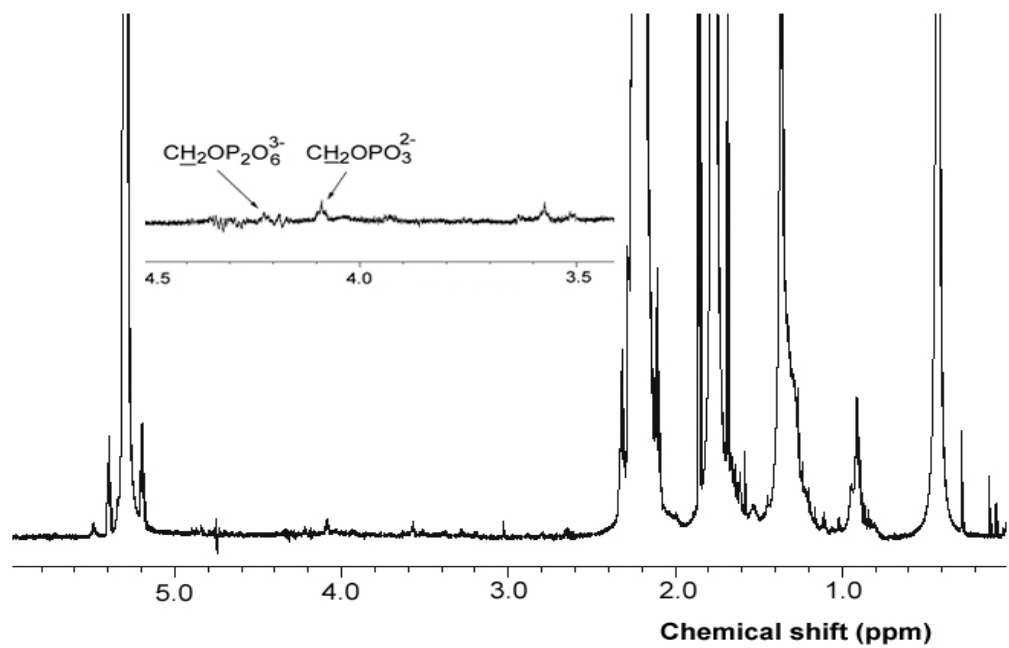


รูปที่ 3.7 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของยาง DPNR หลังจากการทำปฏิกิริยากับฟอสโฟไลเปส B

ในขณะที่ยางที่ทำปฏิกิริยากับฟอสโฟไลเปส C จะไม่พบสัญญาณคาร์บอนของหมู่เมทไธนที่ติดกับหมู่ไฮดรอกซิลของฟอสโฟลิปิดในสเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ดังแสดงในรูปที่ 3.8 ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่าการทำลายหมู่ฟอสเฟตของฟอสโฟลิปิดช่วยเพิ่มสมบัติการละลายของฟอสโฟลิปิด โดยการทำลายแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุล นอกจากนี้การพบสัญญาณคาร์บอนที่ 64.7 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณที่เกิดเนื่องจากหมู่เมทิลลีนที่ติดกับหมู่โมโนหรือไดฟอสเฟตแสดงให้เห็นว่ามีหมู่โมโนหรือไดฟอสเฟตที่ตำแหน่งปลายของสายโซ่โมเลกุลยาง **รูปที่ 3.9** แสดงโครงสร้างของยางที่ทำปฏิกิริยาด้วยฟอสโฟไลเปส C ในสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ จะเห็นว่าสัญญาณโปรตอนเนื่องจากฟอสโฟไลปิดที่ตำแหน่ง 3.92 และ 4.04 ได้หายไป แต่สัญญาณเนื่องจากหมู่ฟอสเฟตและไดฟอสเฟตที่ต่อโดยตรงกับสายโซ่โมเลกุลยางยังคงอยู่ การค้นพบนี้สนับสนุนข้อสันนิษฐานที่ว่าฟอสโฟลิปิดไม่ได้ติดกับสายโซ่อย่างตำแหน่งแอลฟาโดยตรง

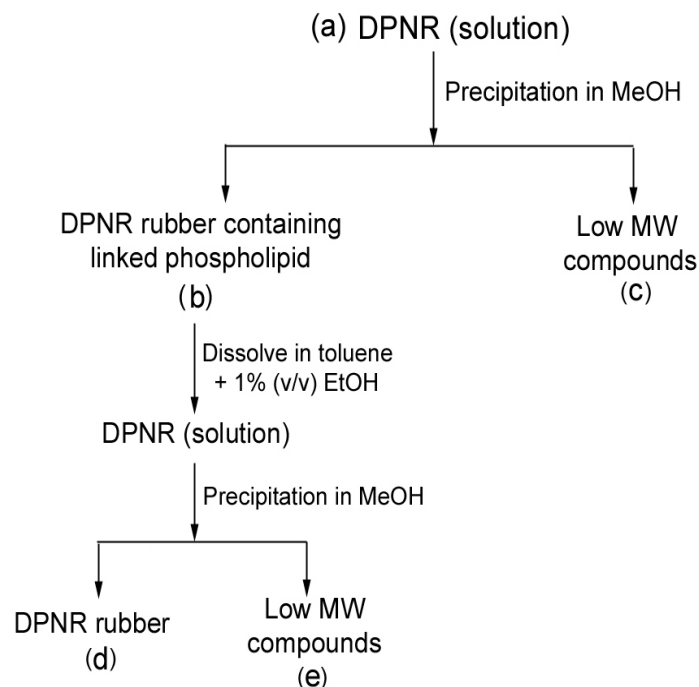


รูปที่ 3.8 ^{13}C -NMR ของยาง DPNR ภายหลังทำปฏิกิริยากับฟอสโฟไลเปส C



รูปที่ 3.9 $^1\text{H-NMR}$ ของยาง DPNR ภายหลังทำปฏิกิริยากับฟอสโฟไลเปส C**3.3 การวิเคราะห์หมู่ฟอสโฟลิปิดในยางธรรมชาติโดยปฏิกิริยาเคมี**

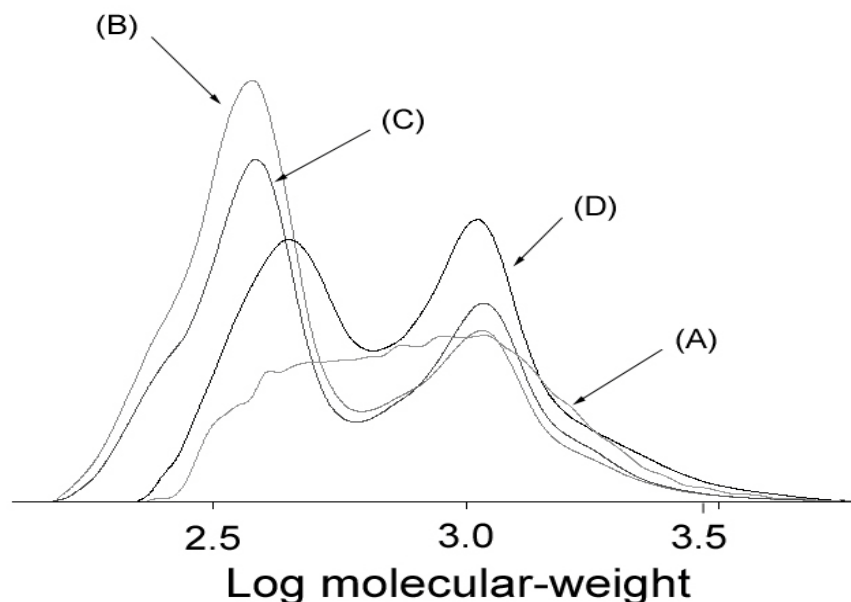
จากผลการศึกษาข้างต้นโดยเทคนิค NMR แสดงให้เห็นว่ามีพันธะโมโนและไดฟอสเฟตรวมทั้งฟอสโฟลิปิดในยางที่ปราศจากโปรตีน โดยที่หมู่เหล่านี้ยังคงอยู่แม้ว่ายางปราศจากโปรตีนจะได้ทำปฏิกิริยากับไลเปส ฟอสฟาเตสหรือฟอสโฟลิปิดแล้วก็ตาม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาจจะมีแรงกระทำระหว่างหมู่ฟอสเฟตและโมเลกุลของฟอสโฟลิปิด ในขณะที่สามารถสันนิษฐานได้ว่าโมเลกุลฟอสโฟลิปิดติดอยู่กับหมู่ฟอสเฟตที่หมู่ปลายแอลฟาของสายโซ่ข้างโดยพันธะไฮโดรเจน โดยพันธะไฮโดรเจนนี้สามารถจะถูกทำลายได้โดยการเติมสารละลายมีขั้วประมาณเล็กน้อยลงในสารละลายยาง ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการแตกสลายของโมเลกุลฟอสโฟลิปิดที่จับกลุ่มกันอยู่ให้เป็นโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งอาจจะสามารถแยกออกจากยางได้โดยการตกตะกอนสารละลายยางในสารละลายเมทานอล ขั้นตอนการย่อยสลายพันธะไฮโดรเจนโดยสารละลายที่มีขั้วได้ถูกแสดงไว้ในภาพที่ 3.5



ภาพที่ 3.5 ขั้นตอนการย่อยสลายพันธะไฮโดรเจนโดยสารละลายยางในโทลูอินด้วย 1% (v/v) เอทานอล

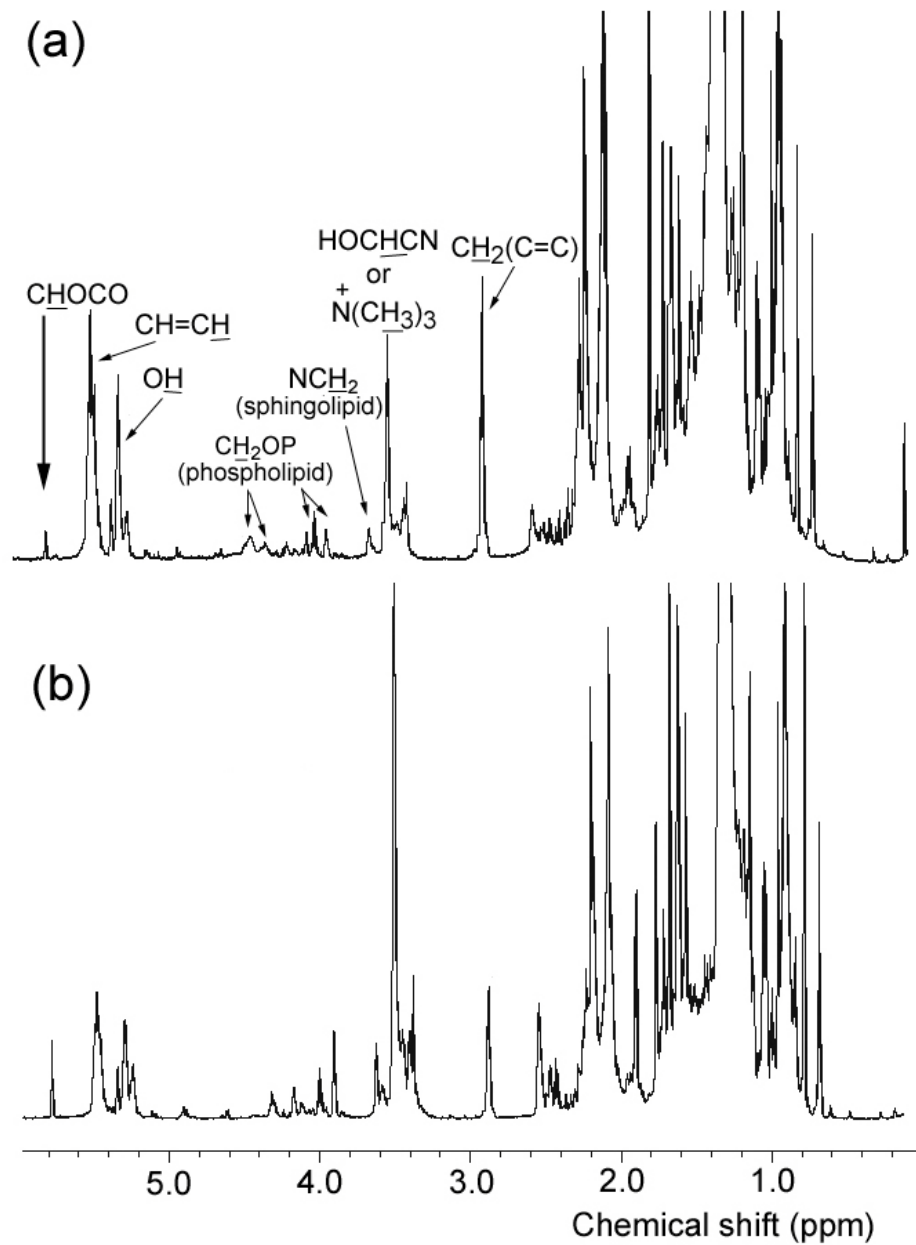
แต่จากการวัดโครงสร้างของยางส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่ได้จากการตกตะกอนสารละลายยางในเมทานอล จะสังเกตเห็นสัญญาณของฟอสฟอลิปิดที่ 64.3, 69.14 และ 71.1 ppm แสดงให้เห็นถึงความไม่สมบูรณ์ในการย่อยสลายโครงสร้าง micelle ของฟอสฟอลิปิดด้วยเอทานอล นอกจากนี้ได้มีการรายงานว่าโลหะที่มีประจุเช่น แคลเซียมหรือแมกนีเซียมไอออนสามารถทำปฏิกิริยาหรือเกิดแรงดึงดูดทางไฟฟ้าอันเนื่องมาจากการจับในฟอสฟอลิปิดได้ ซึ่งหากอ้างอิงจากการศึกษานี้สามารถจะกล่าวได้ว่าฟอสฟอลิปิดที่เหลืออยู่ในยางอาจเกิดจากการที่ฟอสฟอลิปิดต่ออยู่กับปลายสายโซ่ยาวโดยแมกนีเซียมไอออนซึ่งจะได้ทำการศึกษาต่อไป

ถ้าการเกิดกึ่งกำในโมเลกุลยางเกิดจากพันธะไฮโดรเจน การเติมสารละลายเอทานอลลงในสารละลายยางอาจช่วยแยกฟอสฟอลิปิดอิสระออกจากโมเลกุลของยางได้โดยเทคนิค GPC สำหรับโครมาโตแกรม GPC ของยางน้ำหนักโมเลกุลต่ำได้แสดงในรูปที่ 3.10 เป็นที่น่าสังเกตว่าสารประกอบน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่แยกออกมาได้จาก ยางธรรมชาติแสดงลักษณะการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลเหมือนกับสารที่สกัดแยกได้จากยางธรรมชาติที่มีการเติม 1% เอทานอล ซึ่งแสดงให้เห็นชัดเจนว่าฟอสฟอลิปิดโมเลกุลเดี่ยวและฟอสฟอลิปิดที่รวมตัวกันจำนวนไม่มากสามารถแยกตัวออกจากโมเลกุลยางได้โดยวิธี GPC ในคอลโรฟอร์ม



รูปที่ 3.10 GPC โครมาโตแกรมของ (A) L- α -phosphatidylcholine และ (B), (C) และ (D) ยางน้ำหนักโมเลกุลต่ำ โดยที่ (B) precipitation from toluene solution, (C) precipitation from toluene solution

containing 1% (v/v) ethanol, and (D) re-precipitation from toluene solution containing 1% (v/v) ethanol.

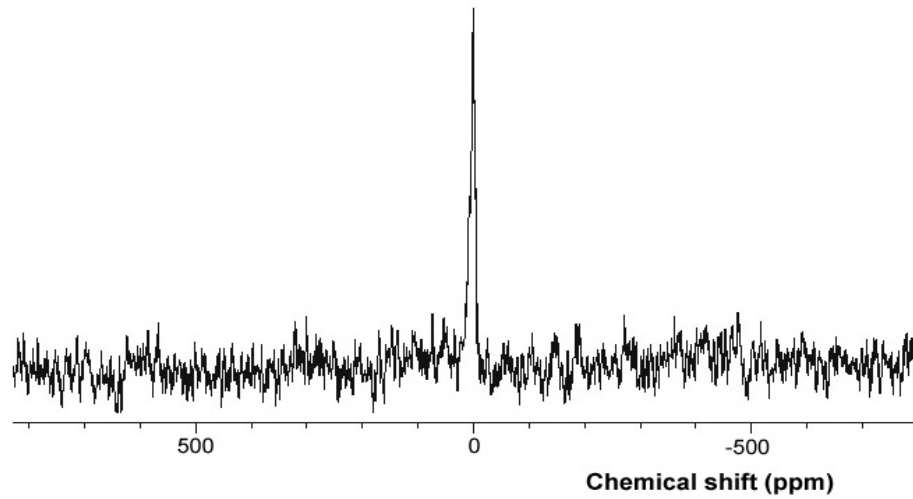


รูปที่ 3.11 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบโมเลกุลต่ำที่ได้จากการตกตะกอนสารละลายยางใน (a) เอทานอล และ (b) สารละลายยางที่มีการเติมเอทานอล

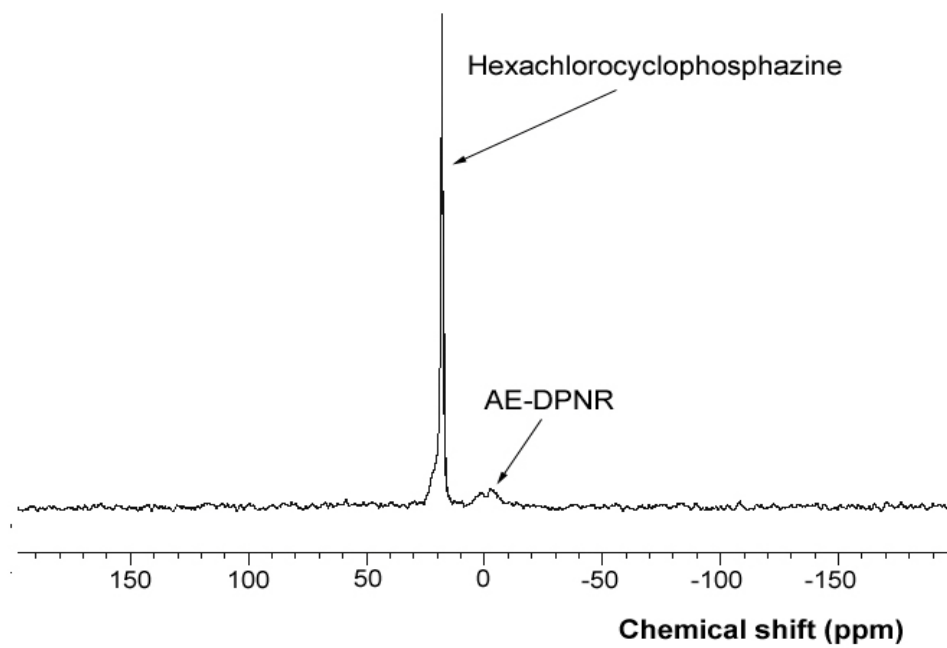
รูปที่ 3.11 แสดงสเปกตรัมของโปรตอนของสารประกอบโมเลกุลต่ำที่ได้จากการตกตะกอนสารละลายยางในเอทานอล และสารละลายยางที่มีการเติมเอทานอล จากสเปกตรัมนี้แสดงให้เห็นว่ามีสัญญาณโปรตอนเนื่องจากสารประกอบฟอสโฟลิปิดเป็นจำนวนมาก ดังตัวอย่างเช่น สัญญาณที่ปรากฏที่ 2.89 และ 5.50 ppm แสดงถึงหมู่เมทิลที่ติดอยู่กับพันธะคู่ของฟอสโฟลิปิดและเมทิลโปรตอน ตามลำดับ สัญญาณที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจนที่ 3.50 ppm แสดงถึงโปรตอนของหมู่เมทิลที่ติดอยู่กับอะตอมไนโตรเจนของหมู่คอลีนของฟอสโฟลิปิด จากผลดังกล่าวแสดงอย่างชัดเจนว่าสารน้ำหนัโมเลกุลต่ำที่สกัดได้จากยางธรรมชาติประกอบไปด้วยฟอสโฟลิปิดซึ่งมีอะตอมไนโตรเจนและหมู่ไฮดรอกซิล

3.4 การตรวจสอบปริมาณฟอสฟอรัสที่พบในยางธรรมชาติโดยวิธี $^{31}\text{P-NMR}$ แบบการวัดในสถานะของแข็ง (solid state NMR)

การวิเคราะห์หมู่ฟอสเฟตของโมโนหรือไดฟอสเฟตและฟอสโฟลิปิดสามารถยืนยันได้จากผลของการวัด $^{31}\text{P-NMR}$ ดังแสดงในรูปที่ 3.12 สเปกตรัมของยางปราศจากโปรตีนแสดงสัญญาณฟอสฟอรัสที่กว้างปรากฏที่ 1.6 ppm ในขณะที่สัญญาณฟอสฟอรัสของฟอสโฟลิปิดที่ทราบชนิดเช่น PA และ PC แสดงสัญญาณที่ 0.83 และ 2.13 ppm ตามลำดับ อีกทั้งสัญญาณ $^{31}\text{P-NMR}$ ของบิวเทอร่าพรีนอล-18 ที่ผ่านการเติมฟอสฟอรัส (phosphorylated buteraprenol-18) พบที่ 1.56 และ 8.38 ppm สำหรับหมู่โมโนฟอสเฟตและไดฟอสเฟตตามลำดับ การพบสัญญาณของฟอสฟอรัสในยางธรรมชาติปราศจากโปรตีน ที่กว้างคาดว่าอาจมาจากการซ้อนทับกันของสัญญาณระหว่างหมู่โมโนและไดฟอสเฟต ซึ่งเป็นหลักฐานที่ชี้ว่ามีการพบหมู่ฟอสเฟตในยางธรรมชาติ การวิเคราะห์เชิงปริมาณของฟอสฟอรัสอะตอมในยางสามารถทำได้โดยวัดค่าความเข้มสัมพันธ์ (relative intensity) ของสัญญาณฟอสฟอรัสที่พบในยางธรรมชาติปราศจากโปรตีนต่อสัญญาณที่พบในเฮกซะคลอโรไซโคลออสฟาซีนซึ่งใช้เป็นสารอ้างอิง พบว่าสายโซ่ยาว 1 สายโซ่ประกอบไปด้วยฟอสโฟลิปิดประมาณ 2 โมเลกุลที่ปลายสายโซ่ตำแหน่งแอลฟา ดังแสดงในรูปที่ 3.13



รูปที่ 3.12 ^{31}P -NMR spectrum ของยาง DPNR ที่ผ่านการกำจัดไขมันอิสระโดยการสกัดด้วยอะซิโตน



รูปที่ 3.13 Solid-state ^{31}P -NMR spectrum ของยาง DPNR ที่ผ่านการกำจัดไขมันอิสระโดยการสกัดด้วยอะซิโตน ที่ผสม hexachlorocyclophosphazine

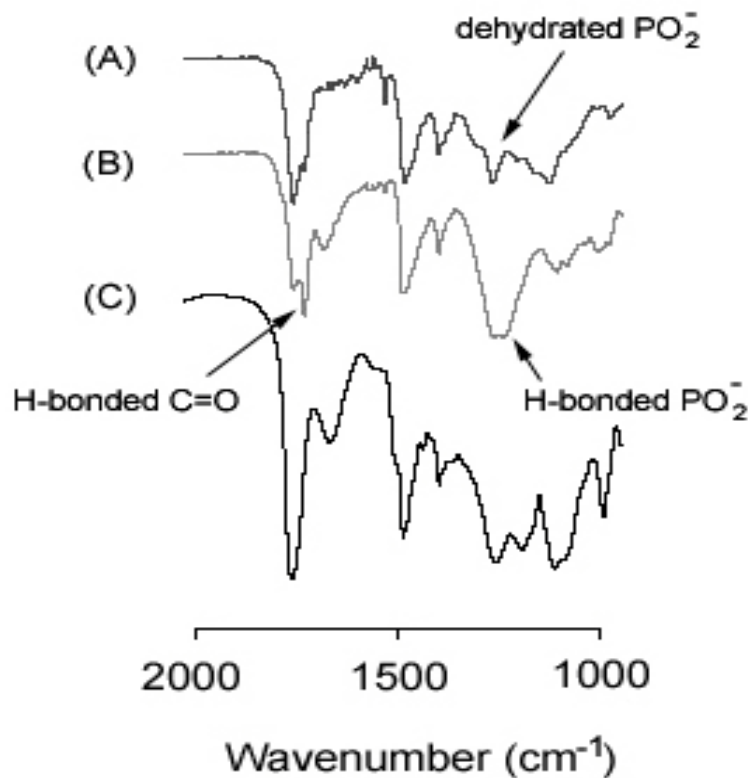
3.5 การเกิดโครงสร้างแบบกึ่งก้อนและเจลในยางธรรมชาติโดยการรวมตัวกันของฟอสโฟลิปิด

ได้มีการรายงานว่าส่วนเจลที่เกิดขึ้นในยางธรรมชาติ เกิดจากจุดกำเนิดโครงสร้างร่างแห 2 ลักษณะ ประการแรกคือโครงสร้างร่างแหที่เกิดจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของโปรตีน และประการที่สองคือเกิดเนื่องจากฟอสโฟลิปิด ซึ่งได้มีการค้นพบว่าลักษณะรูปร่าง (morphology) ของการรวมกลุ่มของไขมันขึ้นอยู่กับความเข้มข้น สัดส่วนขององค์ประกอบและอุณหภูมิ ฟอสโฟลิปิดส่วนมากไม่สามารถละลายได้ทั้งในสารละลายที่มีขั้วและไม่มีขั้วโดยเกิดการรวมตัวแบบ liposome และ reverse micelle ตามลำดับ หมู่เอไมต์สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้กับโมเลกุลข้างเคียง โดยมีน้ำเป็นตัวกลาง ในทางตรงกันข้าม ในกรณีที่ไม่มีน้ำหมู่เอไมต์จะสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลของฟอสโฟลิปิดเองได้ ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น อาจกล่าวได้ว่าจุดกำเนิดกึ่งก้อนในยางธรรมชาติเกิดจากพันธะไฮโดรเจนซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากโมเลกุลของฟอสโฟลิปิดรวมทั้งอาจเกิดจากพันธะไอออนิก

ได้มีการศึกษาผลของพันธะไฮโดรเจนและแมกนีเซียมไอออนที่เกิดจากฟอสโฟลิปิดและมีผลต่อการเกิดกึ่งก้อนในยางธรรมชาติโดยการเติมสารละลายเอทานอลและไดเอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตลงในสารละลายยางและน้ำยางตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าลักษณะการกระจายตัวของน้ำหนัโมเลกุลของยางที่ทำการเติมเอทานอลมีค่าที่แคบกว่ายางที่ไม่ได้ทำการเติมเอทานอลแต่มีค่าใกล้เคียงกับยางที่ทำการเอาไขมันออกโดยวิธีทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน นอกจากนี้ น้ำหนัโมเลกุลของยางที่ทำการเติมเอทานอลยังมีค่าลดลงอีกด้วย ในทางตรงกันข้ามการเติมไดเอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตลงในน้ำยางมีผลเพียงเล็กน้อยต่อการลดลงของน้ำหนัโมเลกุลซึ่งแสดงให้เห็นว่าแมกนีเซียมไอออน มีผลเพียงเล็กน้อยต่อการเกิดกึ่งก้อนในน้ำยางปราศจากโปรตีน ซึ่งพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของฟอสโฟลิปิดเป็นปัจจัยหลักในการเกิดกึ่งก้อนของยางธรรมชาติ

ดังนั้น จึงได้ทำการวิเคราะห์เพื่อตรวจหาแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลเนื่องมาจากพันธะไฮโดรเจนโดยเทคนิคทาง FT-IR จากรูปที่ 3.15 จะเห็นได้ว่า FTIR สเปกตรัมของสารน้ำหนัโมเลกุลต่ำที่จะสกัดได้จาก การตกตะกอนสารละลายยางที่ผ่านการเติมเอทานอลมีลักษณะใกล้เคียงกับฟอสโฟลิปิดชนิดเลซิติน ซึ่งแสดงให้เห็นชัดเจนว่าฟอสโฟลิปิดเป็นส่วนประกอบหนึ่งในยางธรรมชาติซึ่งอาจจะปนอยู่ทั้งในรูปที่ต่ออยู่กับโมเลกุลยางหรืออย่างที่เป็นอิสระ เป็นที่น่าสังเกตว่ามีตำแหน่งค่าการดูดกลืนแสงเกิดขึ้นใหม่ที่ประมาณ 1713 cm^{-1} ในสารน้ำหนัโมเลกุลต่ำทั้งที่แยกได้จากยางธรรมชาติปราศจากโปรตีนและยางที่ทำการเติมเอ

ทานอล ซึ่งตำแหน่งการดูดกลืนค่านี้แสดงให้เห็นชัดเจนว่ามีพันธะไฮโดรเจนเกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของฟอสโฟลิปิด อย่างไรก็ตามค่าความเข้มของการดูดกลืนแสงที่ตำแหน่งนี้ของสารโมเลกุลต่ำที่ได้จาก



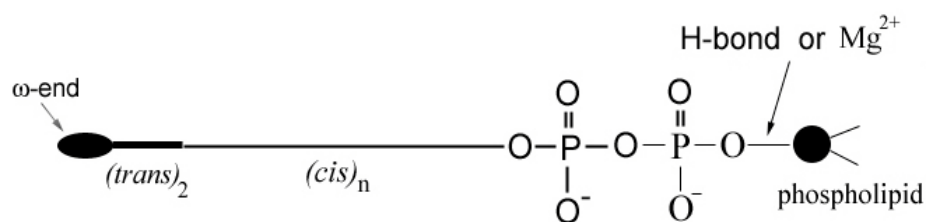
รูปที่ 3.15 FTIR spectra ขององค์ประกอบที่มีน้ำหนัโมเลกุลต่ำที่สกัดได้จาก (A) DPNR solution including 1% (v/v) ethanol, (B) DPNR solution, and (C) 1- α -phosphatidylcholine (PC) ในช่วง 1000-2000 cm^{-1} .

สารละลายที่มีการเติมเอทานอลมีค่าต่ำกว่าค่าที่ได้ของสารละลายที่ไม่มีเติมเอทานอลซึ่งแสดงให้เห็นชัดเจนว่าพันธะไฮโดรเจนบางส่วนถูกทำลายโดยเอทานอล นอกจากนี้ยังพบตำแหน่งการดูดกลืนแสงของ O-P-O ที่ 1219 และ 1240 cm^{-1} ในสารน้ำหนัโมเลกุลต่ำที่สกัดได้จากยางปราคจากโปรตีน ซึ่งตำแหน่งแรกจะไม่สามารถพบได้ในฟอสโฟลิปิดตัวอย่างและสารน้ำหนัโมเลกุลต่ำที่สกัดแยกได้จากสารละลายยางที่ทำการเติมเอทานอล จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าฟอสโฟลิปิดที่พบในยาง

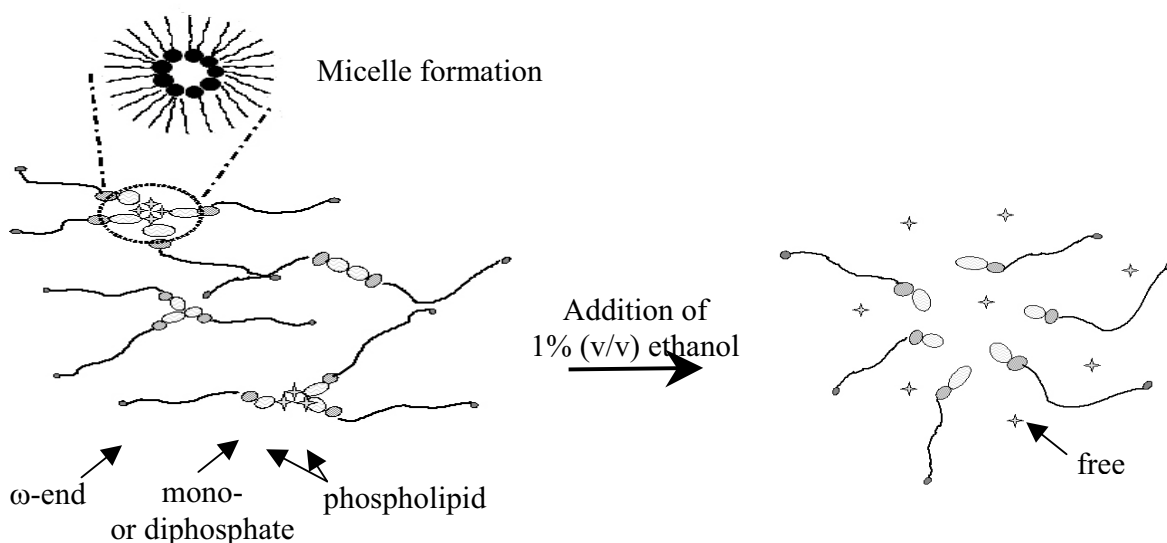
ธรรมชาติ รวมตัวกันอยู่โดยพันธะไฮโดรเจนซึ่งเกิดระหว่างหมู่ฟอสเฟตและหมู่คาร์บอกซิลในโมเลกุลฟอสโฟลิปิด

จากผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้สามารถสรุปได้ว่าตำแหน่งปลายแอลฟาของยางธรรมชาติประกอบไปด้วยหมู่ฟังก์ชันสองชนิด กล่าวคือ ประกอบไปด้วยโมโนฟอสเฟตและไดฟอสเฟต ซึ่งทั้งสองหมู่นี้ติดต่อกับโมเลกุลของฟอสโฟลิปิดด้วยพันธะไฮโดรเจนเป็นส่วนใหญ่ และบางพันธะต่อกันด้วยพันธะไอออนิก จุดกำเนิดกึ่งกันเกิดจากฟอสโฟลิปิดที่ต่ออยู่กับสายโซ่ยาวหรือฟอสโฟลิปิดโมเลกุลอิสระซึ่งฟอสโฟลิปิดสามารถที่จะรวมตัวกันได้ด้วยการเกิดโครงสร้างแบบ micelle โดยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ที่มีขั้วในโมเลกุลของฟอสโฟลิปิด การเติมเอทานอลปริมาณเล็กน้อยลงไปในสารละลายยางจะสามารถทำลายพันธะไฮโดรเจนได้ทำให้เกิดเป็นสายโซ่โมเลกุลยางสายโซ่ตรง

โครงสร้างของหมู่ฟังก์ชันที่ปลายสายโซ่ของโมเลกุลยางและการเกิดกึ่งกันได้แสดงในรูปที่ 3.16 และ 3.17 ตามลำดับ



รูปที่ 3.16 โครงสร้างที่เป็นไปได้ของหมู่ฟังก์ชันที่ปลายสายโซ่ของโมเลกุลยาง



รูปที่ 3.17 โครงสร้างที่เป็นไปได้ของกิ่งก้านสาขาที่เกิดจากหมู่ฟังก์ชันที่ปลายสายโซ่ของโมเลกุลยาง รวมถึงโครงสร้างภายหลังที่ถูกทำลายโดยการเติมเอทานอล

ขั้นตอนที่ 4 การศึกษาการเกิดเจลในยางธรรมชาติ : ผลของสารเติมแต่ง TMTD/ZnO และ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

วัตถุดิบที่ใช้

น้ำยางสดที่เติมสารรักษาสภาพ Triton[®] x-100 0.2%w/v ได้รับจากสวนยางของบริษัทไทยรับเบอร์ จำกัด (ชลบุรี)

วิธีการทดลอง

1. การกำจัดโปรตีนโดยใช้เอนไซม์

น้ำยางชั้นจากโรงงานอุตสาหกรรม (Commercial HA-latex) ที่มีการเติม $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ แต่ไม่มีเตตระเมทิลไทยแรมไดซัลไฟด์ (TMTD) และซิงค์ออกไซด์ (Zinc Oxide) นำมาทำการกำจัดโปรตีนด้วยการใช้ 0.04% protease (KP 3939, KaO comp). ใน 0.05% Triton X-100 โดยปริมาตรที่ 37°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการปั่นแยก 2 ครั้ง ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที (rpm) เป็นเวลา 30 นาที ยางแห้งที่ได้จากการจับตัวของน้ำยางด้วยเมทานอลและทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศที่ 50°C

2. การทำปฏิกิริยาของน้ำยางกับ TMTD/ZnO

บด TMTD และ ZnO โดยใช้ ball-mill เป็นเวลา 3 วันเพื่อทำให้เป็นสารแขวนลอยที่มีความเข้มข้น 30% (นน./ปริมาตร) ใน 1% สารละลาย SDS เติมของผสมระหว่าง TMTD/ZnO (1:1) ลงในน้ำยางชั้นและน้ำยางชั้นที่ทำการกำจัดโปรตีน (DPHA-latex) เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.05% และ 1% หลังจากนั้นทำการคนแบบต่อเนื่องเป็นเวลา 1 สัปดาห์และเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 23 สัปดาห์ น้ำยางแห้งเตรียมได้โดยการจับตัวน้ำยางด้วยเมทานอลและทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ ที่ 50°C

3. การทำปฏิกิริยาของน้ำยางกับ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

เติม 0.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) TMTD/ZnO ลงในน้ำยางสดที่ทำการเติม 0.6% โดยปริมาตร (PRD-FL-latex) เพื่อเป็นสารฆ่าแบคทีเรีย เติม $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ที่ความเข้มข้น 1, 3, 5 และ 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ลงใน PRD-FL-latex ที่เก็บได้เป็นเวลา 3 สัปดาห์และมีปริมาณเจล = 15% และนำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 20°C ด้วยการคนเป็นเวลา 1 สัปดาห์ และทำการปั่นแยกยางโดยใช้ Centrifuge ที่ 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำส่วนครีมไปละลายน้ำที่มี triton x-100 ประมาณ

0.5% และนำไปปั่นแยกอีกครั้งหนึ่ง หลังจากนั้นนำไปจับตัวด้วยเมทานอลและอบให้แห้งที่ 50°C ภายใต้สุญญากาศ

วิธีวิเคราะห์

1. การหาปริมาณเจล : ทำได้โดยละลายยางแห้งในสารละลายโทลูอีนให้มีความเข้มข้น 0.1% และทำการเก็บไว้ในที่มีดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้น นำสารละลายยางมาทำการปั่นแยกส่วนเจลออกที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที จากนั้นนำส่วนเจลมาทำการจับตัวโดยใช้เมทานอลและทำให้แห้งที่ 50°C

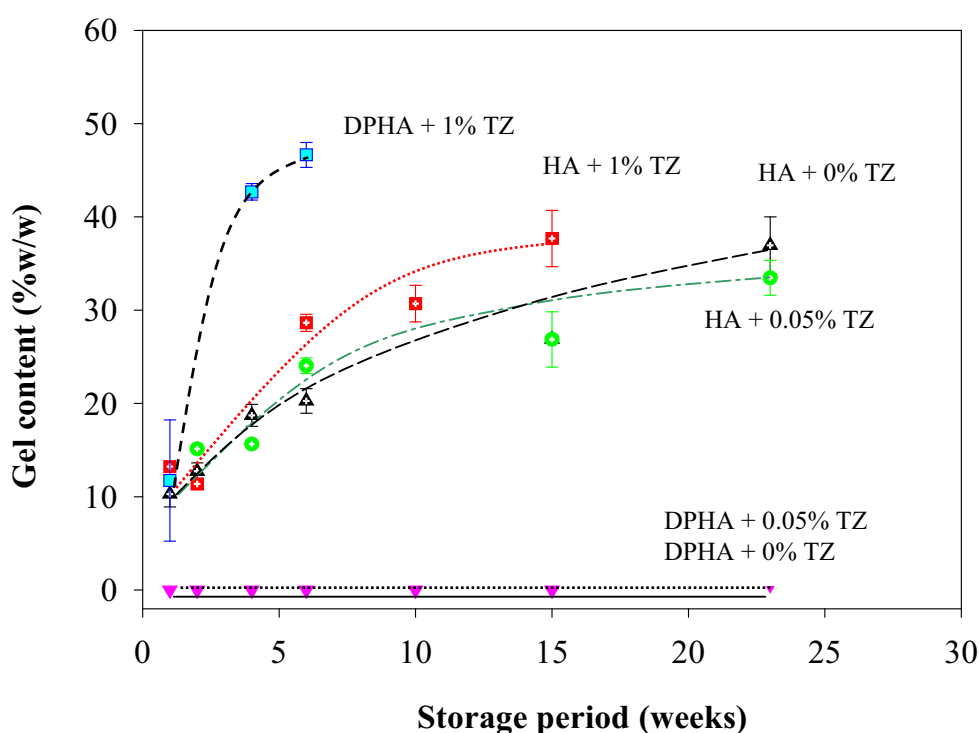
2. การหาปริมาณไนโตรเจน : สามารถหาได้จากการใช้เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน ซึ่งมีความละเอียดสูง 0.001% โดยชั่งยางน้ำหนักประมาณ 0.25 g ลงในถ้วยอลูมิเนียมและนำไปบรรจุในเครื่องวิเคราะห์ทำการทดลองซึ่งประมาณ 3 ครั้ง ค่าไนโตรเจนคำนวณได้จากโปรแกรมที่มีในเครื่อง

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลองตอนที่ 4

4.1. ผลของ TMTD/ZnO (TZ) ต่อการเกิดเจลในน้ำยางชั้นที่ได้จากโรงงาน

รูปที่ 4.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเจลในน้ำยางชั้นและน้ำยางชั้นปราศจากโปรตีนหลังจากทำการเก็บโดยเป็นเวลา 23 สัปดาห์หลังจากที่ทำการเติม TMTD/ZnO (TZ) ในปริมาณที่แตกต่างกัน จากกราฟจะเห็นว่าปริมาณเจลของน้ำยางที่ไม่มีการเติม TMTD/ZnO เพิ่มขึ้นจาก 10% เป็น 35% ภายใน 23 สัปดาห์ ซึ่งให้ผลคล้ายกับการเติม TMTD/ZnO เข้มข้น 0.05% ลงในน้ำยางชั้น แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นนี้ที่ไม่มีผลต่อการเกิดเจลในน้ำยาง อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TMTD/ZnO เป็น 1% จะพบการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของปริมาณเจลเป็น 30% ภายใน 15 สัปดาห์ ในทางเดียวกัน ปริมาณเจลที่เกิดขึ้นหลังจากการเก็บน้ำยางชั้นปราศจากโปรตีนเป็นเวลา 23 สัปดาห์ให้ผลคล้ายคลึงกับน้ำยางชั้น กล่าวคือน้ำยางชั้นและน้ำยางชั้นปราศจากโปรตีนที่ทำการเติม 0.05% TMTD/ZnO มีปริมาณเจลที่ต่ำซึ่งให้ค่าใกล้เคียงกับน้ำยางที่ไม่ได้เติม TMTD/ZnO อย่างไรก็ตามปริมาณเจลจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อมีการเติม 1% TMTD/ZnO ในน้ำยางชั้นปราศจากโปรตีนโดยเพิ่มขึ้นจาก 10% เป็น 40% ภายใน 3 สัปดาห์ และเพิ่มขึ้นเป็น 47% ภายใน 6 สัปดาห์

จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่าการเติม TMTD/ZnO ที่ความเข้มข้นประมาณ 1% สามารถเร่งการเกิดเจลทั้งในน้ำยางชั้นและน้ำยางชั้นปราศจากโปรตีน ยกเว้นที่ความเข้มข้นของ TMTD/ZnO ต่ำมากๆ



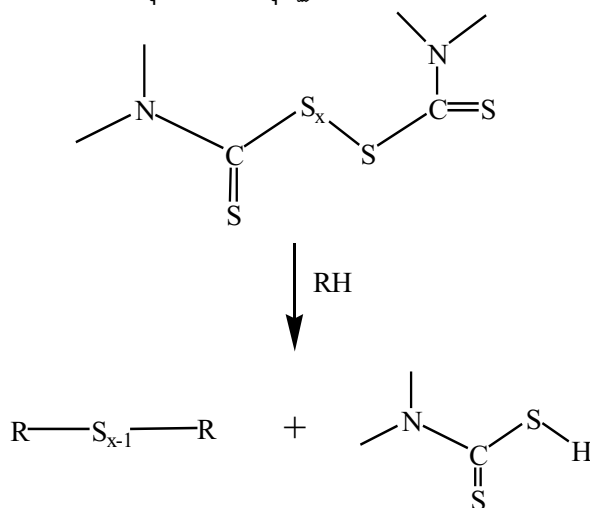
รูปที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเจลในน้ำยางชั้นและน้ำยางชั้นปราศจากโปรตีนหลังจากทำการเก็บ โดยเป็นเวลา 23 สัปดาห์หลังจากที่ทำการเติม TMTD/ZnO

4.2. ผลของโปรตีนต่ออัตราการเกิดเจลของ TMTD/ZnO

ได้มีการรายงานว่าการกำจัดโปรตีนโดยวิธีการใช้เอนไซม์สามารถลดปริมาณเจล อันเกิดเนื่องจากการทำลายจุดกำเนิดของกิ่งก้านซึ่งเชื่อว่ามาจากโปรตีน เป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณเจลของน้ำยางชั้นปราศจากโปรตีนมีค่าสูงกว่าของน้ำยางชั้นหลังจากเติม 1% TMTD/ZnO แล้ว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเกิด

เจลในน้ำยางชั้นที่ผ่านการเติม TMTD/ZnO เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างสายโซ่ยางและซัลเฟอร์ในโมเลกุลของ TMTD เท่านั้น โดยที่โปรตีนมีผลเพียงเล็กน้อยในการยับยั้งอัตราการเกิดปฏิกิริยา

จากผลการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเกิดตัวเร่งปฏิกิริยาของสายโซ่ซัลเฟอร์โดยกลไกแบบ radical ซึ่งจะไปทำปฏิกิริยากับโมเลกุลยาง สมมุติฐานการเกิดโครงสร้างร่างแห ได้แสดงในภาพที่ 4.1



Here RH refers rubber hydrocarbon.

ภาพที่ 4.1 โครงสร้างสมมุติฐานของการเกิดโครงสร้างร่างแหที่เกิดจากตัวเร่งปฏิกิริยา TMTD

จากการทดลองหาปริมาณเจลของน้ำยางชั้นที่มีการเติมและไม่เติม TMTD/ZnO ซึ่งเก็บไว้เป็นเวลา 15 สัปดาห์ พบว่ามีค่าคงที่แม้จะมีการกำจัดโปรตีนออกโดยดูได้จากการลดลงของปริมาณไนโตรเจนจาก 0.15-0.17% เป็น 0.023-0.024% ซึ่งเป็นหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่าโปรตีนไม่มีความสำคัญในการเกิดเจลของน้ำยางชั้นและยังแสดงให้เห็นว่าเจลที่เกิดขึ้นในน้ำยางชั้นที่ได้จากโรงงานไม่ใช่เจลแบบอ่อน (soft-gel) ซึ่งเกิดจากโปรตีน

ตาราง 4.1 ปริมาณเจลของยางที่ได้จากน้ำยางชั้นและน้ำยางชั้นปราศจากโปรตีนที่ได้จากโรงงาน ซึ่งวัดในสารละลายโทลูอีนและโทลูอีนที่มีการเติม 1% เอทานอล

ตัวอย่าง ^a	ปริมาณเจล (% นน/นน) ^d
HA + 0% TZ ^b	34.8 (19.1)
HA + 0.05% TZ ^b	34.8 (20.8)

DP[HA + 0% TZ] ^c	25.7 (24.8)
DP[HA + 0.05% TZ] ^c	28.2 (29.2)

* a DP[HA + 0.05% TZ] หมายถึง การกำจัดโปรตีนของน้ำยางชั้นที่มีการเติม 0.05% TMTD/ZnO

* b เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 23 สัปดาห์ก่อนการวัด

* c เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 สัปดาห์ก่อนการวัด

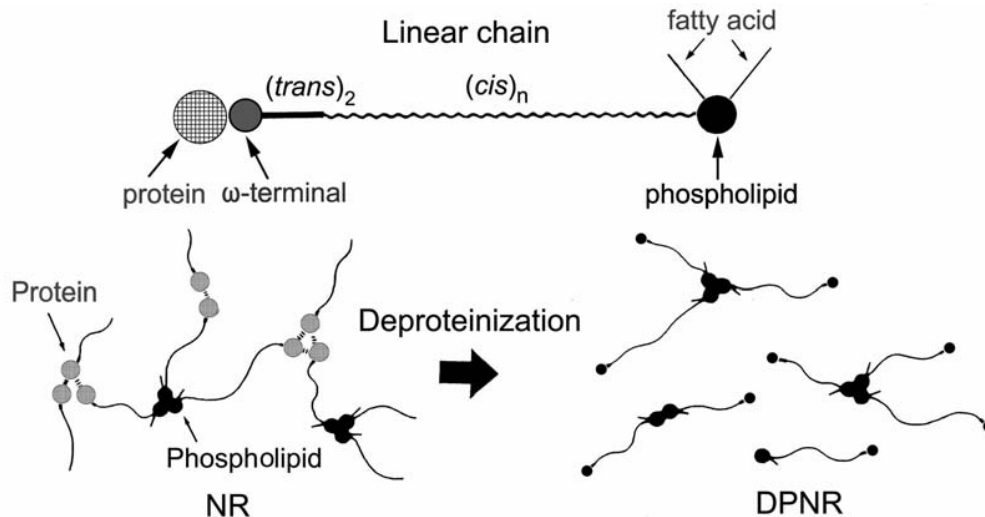
ตาราง 4.1 แสดงปริมาณเจลที่หาได้จากการเติม 1% (โดยปริมาตร) เอทานอลลงในสารละลายโพลูอื่น ที่ใช้ในการละลายตัวอย่างยางที่ได้จากน้ำยางชั้นจากโรงงาน และน้ำยางชั้นปราศจากโปรตีน

ได้มีรายงานว่าส่วนของเจลในยางธรรมชาติที่เรียกว่าเจลแบบอ่อน (soft gel) สามารถละลายได้โดยการเติมตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น เอทานอลลงในสารละลายยาง จากตารางเห็นได้ชัดเจนว่าปริมาณเจลในน้ำยางชั้นจากโรงงาน ทั้งที่มีการเติมและไม่เติม 0.05% TMTD/ZnO ลดลงจาก 35% เป็น 20% เมื่อมีการเติมเอทานอลลงในสารละลายยาง

ในทางตรงข้าม ปริมาณเจลของน้ำยางชั้นปราศจากโปรตีนหลังจากทำการเก็บเป็นเวลา 15 สัปดาห์ มีค่าเท่ากับปริมาณเจลของยางที่มีการเติม 1% เอทานอล ลงในสารละลายโพลูอื่นแสดงให้เห็นว่าส่วนของเจลที่เกิดขึ้นในน้ำยางชั้นปราศจากโปรตีนที่ผลิตจากโรงงานอุตสาหกรรม ไม่ใช่เจลแบบอ่อน

4.3. การเกิดกึ่งก้านและเจลในน้ำยางชั้นที่ได้จากโรงงาน

จากการวิจัยผลข้างต้นพบว่าปริมาณเจลของน้ำยางชั้นจะเพิ่มขึ้นหลังจากเก็บไว้เป็นเวลานาน อย่างไรก็ตามปริมาณเจลจะลดลงหลังจากมีการเติมเอทานอล จากผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเจลที่เกิดขึ้นในน้ำยางชั้นที่ผลิตจากโรงงานหลังจากทำการเก็บรักษา พบว่าบางส่วนเกิดเป็นเจลแบบอ่อนที่เกิดจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีน และฟอสโฟลิปิดที่ปลาย ω - และ α - ตามลำดับและยังประกอบไปด้วยเจลแบบแข็งโดยพันธะเคมี การค้นพบนี้สนับสนุนความคิดที่ว่าส่วนของเจลในน้ำยางชั้นที่ได้จากโรงงานประกอบด้วยเกิดการเกิดโครงสร้างร่างแหอย่างน้อย 2 สมมติฐาน อย่างแรกคือโครงสร้างร่างแหที่เกิดจากพันธะไฮโดรเจนโดยโปรตีนและที่เกิดจากหมู่ฟังก์ชันที่ปลายสายโซ่โมเลกุลยาง ซึ่งสามารถถูกทำลายได้โดยการเติมตัวทำละลายที่มีปริมาณเล็กน้อยลงในสารละลายยาง หรือการกำจัดโปรตีนโดยใช้เอนไซม์และวิธีการทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน อย่างไรก็ตามโครงสร้างและกลไกการเกิดโครงสร้างร่างแหที่เกิดจากหมู่ฟังก์ชันที่ปลายสายโซ่โมเลกุลสันนิษฐานว่าอาจเกิดจากพันธะไอออนิกหรือการรวมตัวกันของหมู่ฟอสเฟตดังแสดงในภาพที่ 4.2 หรืออาจเกิดเนื่องจากพันธะทางเคมีที่เกิดจากสารเติมแต่งที่มีอยู่ในน้ำยางชั้นจากโรงงาน เช่น TMTD/ZnO หรือ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$



ภาพที่ 4.2 โครงสร้างสมมติของเจลในยางธรรมชาติ

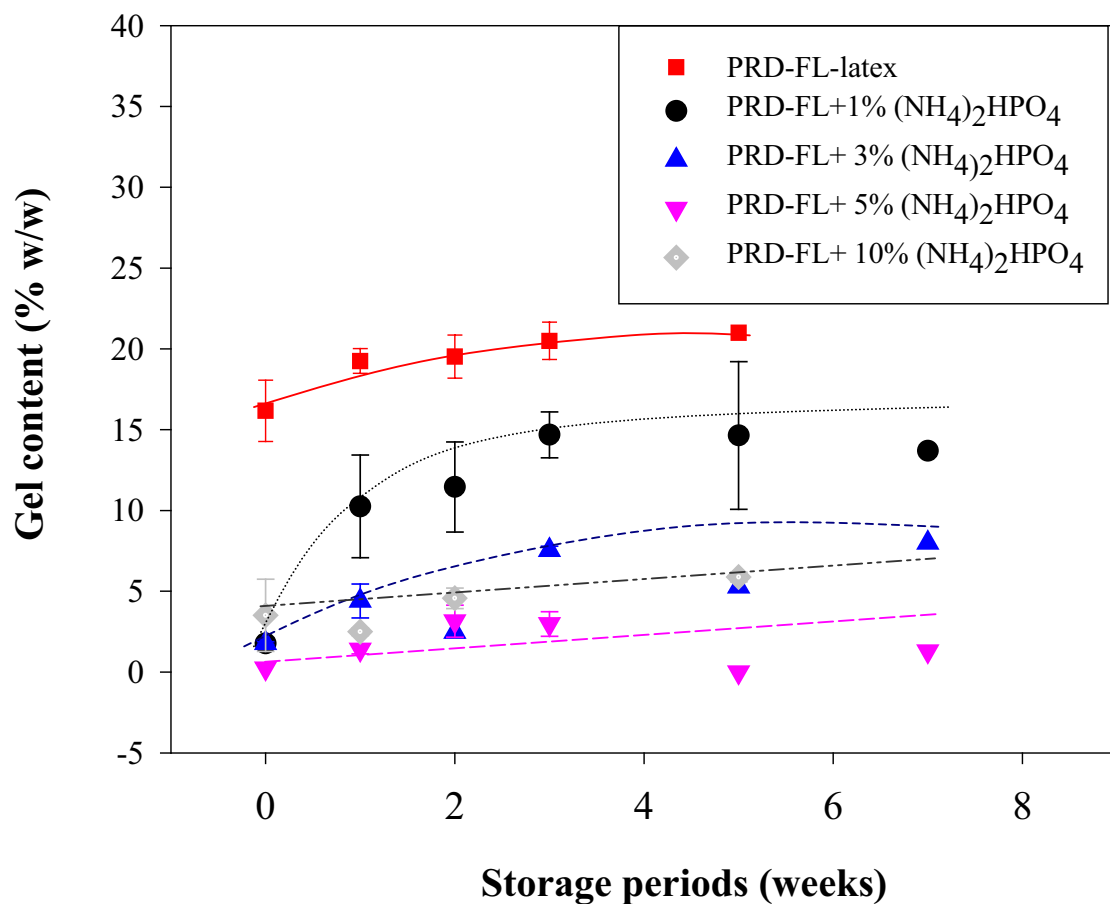
โดยปกติส่วนเจลในน้ำยางชั้นที่ผลิตจากโรงงานที่เกิดขึ้นระหว่างการเก็บรักษาสามารถเกิดจากปฏิกิริยาโครงสร้างร่างแหได้ ดังต่อไปนี้

- 1) พันธะเคมีโดยพันธะคาร์บอน-คาร์บอน และพันธะคาร์บอน-ออกซิเจนระหว่างสายโซ่ยาง
- 2) พันธะไอออนิกโดยโลหะที่มีอยู่ในน้ำยาง
- 3) พันธะไฮโดรเจน

ความน่าจะเป็นอย่างแรกเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้มากที่สุดของสายโซ่ยาง แม้ว่าจะมีหมู่ฟังก์ชันในน้ำยางอยู่น้อยก็ตาม เช่น อัลดีไฮด์ แล็กโตนและอีพอกไซด์ ซึ่งสันนิษฐานว่าจะเป็นสาเหตุให้เกิดการแข็งตัวของยางธรรมชาติที่เกิดขึ้นระหว่างการเก็บรักษา ในทางตรงข้าม ความน่าจะเป็นลำดับที่สองและสามเป็นปฏิกิริยาที่เกิดจากหมู่ฟังก์ชันที่ปลายสายโซ่ยางทั้งสองด้าน ได้มีการพิสูจน์พบว่าโครงสร้างร่างแหที่เกิดขึ้นโดยโปรตีน สามารถจะทำการกำจัดออกไปได้โดยวิธีการกำจัดโปรตีน และโครงสร้างร่างแหที่เกิดจากฟอสโฟลิปิดสามารถแยกสลายได้โดยวิธีทรานเอสเทอร์ิฟิเคชัน ในขณะที่ซาปอนนิฟิเคชันสามารถย่อยสลายทั้งโปรตีนและฟอสโฟลิปิด

ในการเตรียมน้ำยางชั้นในโรงงานอุตสาหกรรม ได้มีการเติม $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ลงไปในน้ำยางชั้นเพื่อลดปริมาณ Mg^{2+} หลังจากนั้นจะทำการป้องกันการบูดเน่าด้วยแอมโมเนีย (PRD-FL-latex) ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาผลของ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเกิดเจลในน้ำยางที่มีการเติมแอมโมเนียดังแสดงในรูปที่ 4.2 ซึ่งแสดงให้เห็นได้ชัดเจนว่าปริมาณเจลของน้ำยางสดที่ทำการเติมแอมโมเนียลดลงจาก 15% เป็น 4% หลังจากการเติม $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ แต่เมื่อทำการเก็บน้ำยางไว้เป็นเวลา

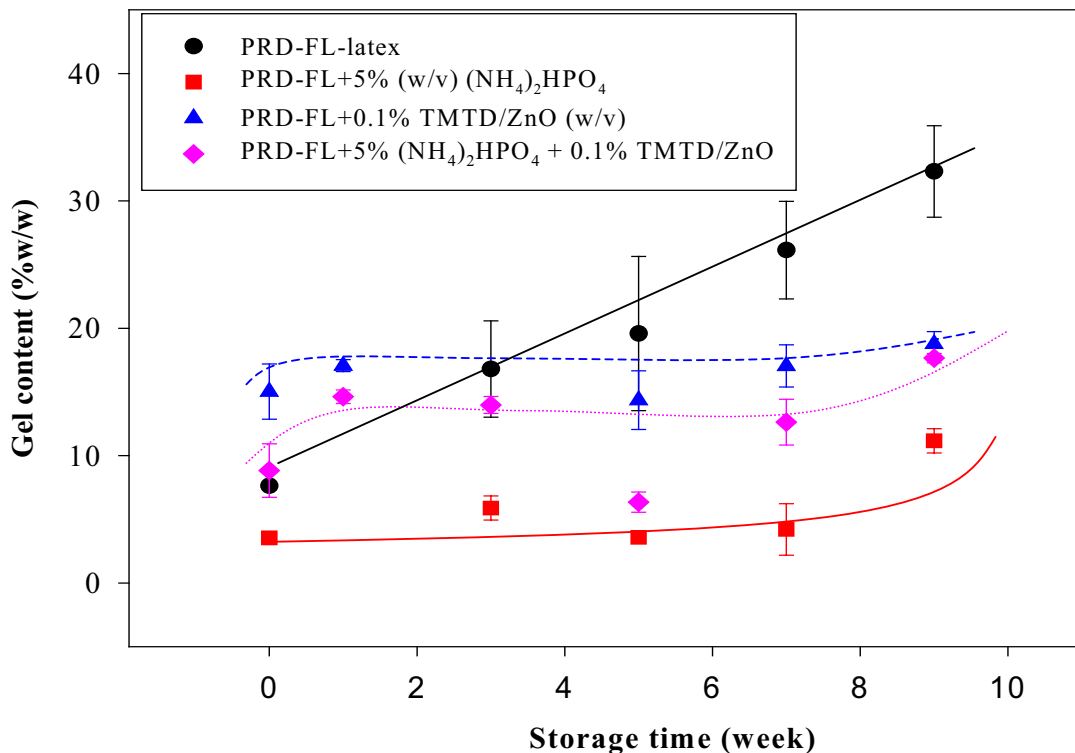
นานปริมาณเจลที่พบจะเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นของ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ เพิ่มขึ้นเป็น 10% ปริมาณเจลที่ได้จะมากกว่าที่พบในความเข้มข้น 5% เมื่อน้ำยางถูกเก็บรักษาไว้เป็นเวลานาน ซึ่งแสดงให้เห็นชัดเจนว่าความเข้มข้นของ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ที่มากเกินไปสามารถทำให้เกิดโครงสร้างร่างแห ในน้ำยางสดที่มีการเติมแอมโมเนียและในน้ำยางข้นที่ได้จากโรงงานได้ด้วย



รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเจลกับความเข้มข้นของ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 7 สัปดาห์

จากนั้นได้ทำการศึกษาผลของ TMTD/ZnO และ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ที่มากเกินไปต่อการเกิดเจลในน้ำยางสดที่มีการเติมแอมโมเนียระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลานาน ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ปริมาณเจลของยางจากน้ำยางสดที่มีการเติมแอมโมเนียเพิ่มขึ้นจาก 5% เป็น 30% หลังจากการเก็บเป็นเวลา 9 สัปดาห์ แต่

เมื่อมีการเติม 5% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ลงในน้ำยางปริมาณเจลจะลดลงจาก 5% เป็น 3% และทำให้ไม่มีการเกิดเจลเป็นเวลา 7 สัปดาห์ แต่หลังจากนั้นปริมาณเจลจะเพิ่มขึ้นเป็น 10%



รูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเจลในน้ำยางที่เติม TMTD/ZnO และ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

การลดลงของปริมาณเจลหลังจากการเติม $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ แสดงให้เห็นว่าการเกิดเจลในน้ำยางเกี่ยวข้องกับพันธะไอออนิกที่เกิดจาก Mg^{2+} ที่พบในน้ำยางธรรมชาติ อย่างไรก็ตามส่วนของเจลในน้ำยางสดที่มีการเติม $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ เพิ่มขึ้นหลังจากทำการเก็บน้ำยางเป็นเวลานานมากกว่า 9 สัปดาห์ แสดงให้เห็นว่ามีกลไกการเกิดโครงสร้างร่างแหอย่างอื่นซึ่งเกิดอย่างช้าๆ ระหว่างการเก็บรักษาน้ำยาง

นอกจากนี้การเติม 0.1% TMTD/ZnO ลงในน้ำยางสดที่มีการเติมแอมโมเนียทำให้มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณเจลในระยะแรกของการเก็บรักษาจาก 15% เป็น 18% ภายใน 1 สัปดาห์หลังจากนั้นจะไม่มีการเพิ่มขึ้น ในขณะที่การเติม 0.1% TMTD/ZnO ลงในน้ำยางสดที่มีการเติมแอมโมเนียและผ่านการเติม 5% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ส่งผลให้มีการเพิ่มของปริมาณเจลเช่นเดียวกับน้ำยางที่ไม่มีการเติม TMTD/ZnO และน้ำยางที่มีการเติม 0.1% TMTD/ZnO ผลการทดลองนี้สนับสนุนความคิดที่ว่าโครงสร้างร่างแหที่เกิดขึ้นในน้ำยางชั้นที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรมบางส่วนเป็นผลมาจาก TMTD/ZnO และ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ที่เติมลงไปในน้ำยางซึ่ง TMTD/ZnO จะเร่งการเกิดเจลในระยะต้นของการเก็บในขณะที่ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ จะมีผลต่อการเกิด

เจลในน้ำยางที่มีการเกิดเป็นเวลานาน จากผลการทดลองทั้งหมด แสดงให้เห็นว่า Mg^{2+} , TMTD/ZnO และ $(NH_4)_2HPO_4$ เป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดเจลสำหรับน้ำยางชั้นที่ได้มาจากโรงงานที่มีการเก็บไว้เป็นเวลานาน

ในรอบปีที่สอง

ขั้นตอนที่ 5 การศึกษาลักษณะและพฤติกรรมของผิวอนุภาคยางที่มีเมมเบรนต่างๆ กันโดยใช้เทคนิคทาง Optical และ Transmitting electron microscopy และดูความแตกต่างขนาด particle size และความมีประจุที่ผิวอนุภาคยางชนิดต่างๆ โดย Particle size analyzer และ Zeta sizer analyzer

ตัวอย่างยาง

- ยางธรรมชาติ
- ยางที่ทำการปั่นด้วยความเร็วสูง (Centrifuged latex)
- ยางที่ปราศจากโปรตีนโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ (Deproteinized latex)
- ยางที่ปราศจากโปรตีนและฟอสฟอลิปิดโดยการทำปฏิกิริยาดับเบส (Saponified latex)
- ยางอนุภาคเล็ก (Small rubber)
- น้ำยางที่ได้จากการสังเคราะห์โพลีไอโซพรีน

วิธีเตรียมตัวอย่างน้ำยางชนิดต่างๆ แสดงไว้ในรูปที่ 5.1

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมยางที่ปราศจากโปรตีนโดยการย่อยด้วยเอนไซม์

ทำได้โดยเติม 1% w/v SDS และ 0.04% w/v proteolytic enzyme ลงในน้ำยางที่มีเนื้อยาง 30% ปริมาตร 2000 มิลลิลิตร และทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกเอาส่วนครีมของยาง

2. การเตรียมยางที่ปราศจากโปรตีนและฟอสฟอลิปิด

ทำได้โดยการทำปฏิกิริยาในน้ำยางที่ปราศจากโปรตีนที่เตรียมได้ในข้อ 1 ด้วย NaOH 1% w/w ที่ 70°C นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกเอาส่วนครีมของยาง

3. การเตรียมฟอสฟอลิปิด

ทำได้โดยตัดชั้นยางที่ปราศจากโปรตีนเป็นชั้นเล็กๆ แล้วนำไปแช่ไว้ในตัวทำละลายผสมของ คลอโรฟอร์มและเมทานอลที่มีอัตราส่วน 1:2 หลังจากนั้นประมาณ 1 อาทิตย์ นำตัวทำละลายผสมที่ได้ไป ทำการระเหยให้แห้งเพื่อให้ได้สารฟอสโฟลิปิด

4. การเตรียมสารผสมระหว่างฟอสโฟลิปิดและโพลีสไตรีนสังเคราะห์

เตรียมได้โดยอาศัยหลักการ emulsion polymerization โดยการตมน้ำกลั่นประมาณ 10 ml ให้ได้ อุณหภูมิประมาณ 80°C จากนั้นเติมฟอสโฟลิปิดที่ละลายในน้ำกลั่น 20 ml และ Triton® X-100 ที่ละลายใน น้ำกลั่น 5 ml ทำการผสมประมาณ 10 นาที หลังจากนั้นเติม styrene monomer แล้วทำผสมต่ออีก 10 นาที จากนั้นเติม KPS ในน้ำประมาณ 5 ml เพื่อเป็น initiator ในการเกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่ง ขนาดอนุภาคที่ได้ประมาณ 90 nm

5. การเตรียมสารผสมระหว่างฟอสโฟลิปิดกับยางอนุภาคเล็ก

ทำได้โดยผสมน้ำยางที่มีเนื้อยาง 5% w/v กับฟอสโฟลิปิดในปริมาณที่ต่างๆ กันดังแสดงไว้ในตารางที่ 5.1 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งขนาดอนุภาคที่ได้ประมาณ 169 nm

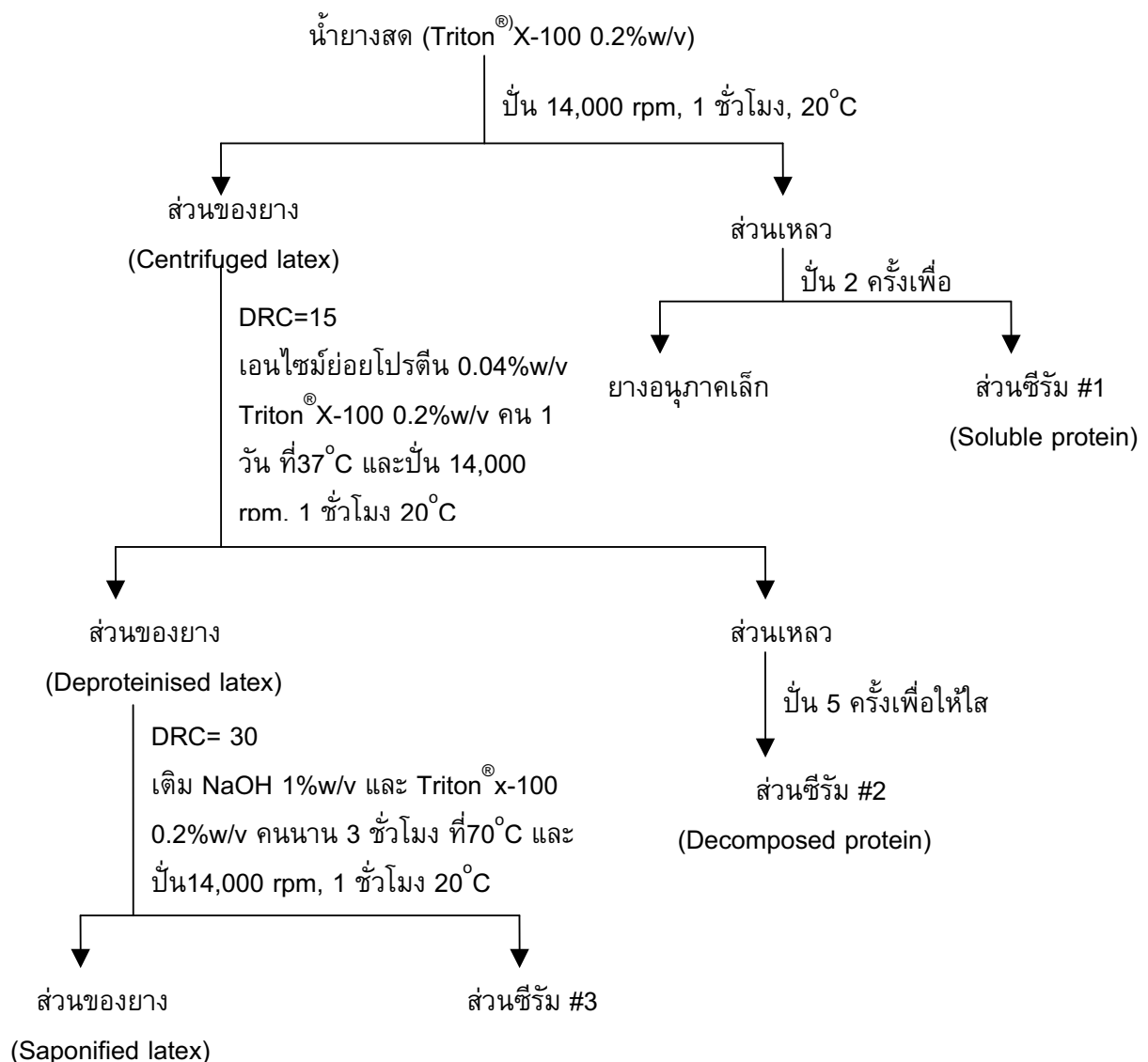
ตารางที่ 5.1 อัตราส่วนผสมของอนุภาคยางกับฟอสโฟลิปิดที่ปริมาณต่างๆ

Emulsion	Small NR latex (g)	Phospholipid 5%w/v (g)
1	2.5118	0.0023
2	2.5077	0.0071
3	2.5241	0.0142
4	2.5601	0.0261
5	2.5125	0.0495

วิธีวิเคราะห์

- วัดปริมาณ Dry rubber content
- วัดค่า Zeta potential ของคอลลอยด์น้ำยาง
- วัดขนาดอนุภาคคอลลอยด์น้ำยาง
- วัดโครงสร้างและสมบัติพื้นฐานด้วยเทคนิค FT-IR และ NMR

- ส่องด้วยกล้อง Optical Microscope (OM) Scanning Electron Microscope (SEM) และ Transmission Electron Microscope (TEM)
- วัดปริมาณไนโตรเจนและเอสเทอร์
- วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วย Bio-Rad protein assay และ SDS-PAGE
- Gas Chromatography-mass spectrometer



รูปที่ 5.1 แผนผังขั้นตอนการเตรียมยางชนิดต่างๆ

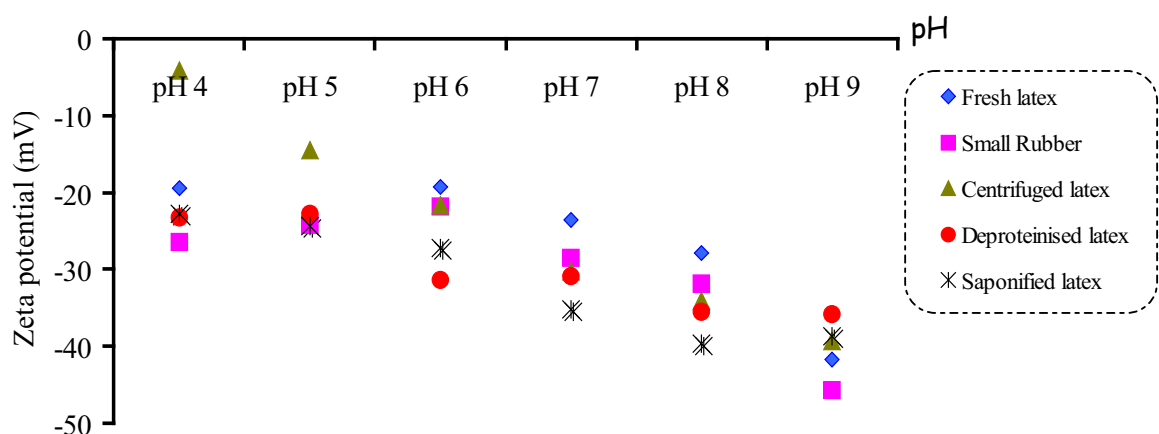
ผลการทดลองและการวิเคราะห์ผลการทดลองตอนที่ 5

5.1 ขนาดของอนุภาคยางธรรมชาติและยางที่ทำการสกัดโปรตีนและฟอสโฟลิปิด

น้ำยาง *Hevea* โดยทั่วไปประกอบด้วยอนุภาคยางที่มีลักษณะกลมขนาดเล็ก ซึ่งบางครั้งแรงดึงดูดระหว่างอนุภาคเป็นผลให้เกิดการรวมตัวกันเป็นกลุ่มหรือเป็นสายยาว ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่น้ำยางสดโดยส่วนใหญ่จะประกอบด้วยอนุภาคยางที่มีลักษณะกลมขนาดเล็กและมีบางส่วนที่รวมกันเป็นกลุ่มอยู่ด้วย เมื่อเก็บน้ำยางเป็นระยะเวลานาน การรวมกันของอนุภาคก็จะมีมากขึ้น ทำการวิเคราะห์ขนาดอนุภาคยางชนิดต่างๆ ที่เตรียมได้

จากผลการทดลองพบว่า ขนาดอนุภาคยางธรรมชาติในส่วนที่เป็นยางจะมีขนาดใหญ่กว่าในส่วนซีรัม และพบว่าขนาดของอนุภาคยางเพิ่มขึ้นหลังสกัดโปรตีนและฟอสโฟลิปิดออก อธิบายได้ว่า อนุภาคยางอาจรวมตัวกันเพราะปราศจากโปรตีนและฟอสโฟลิปิด (ขาดเสถียรภาพ) หรืออาจเกิดจากอนุภาคยางที่มีขนาดเล็กกว่ามีค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคสูงกว่า

จากผลการทดลองขั้นต้น พบว่าเสถียรภาพของอนุภาคยางในน้ำยางจะเปลี่ยนไปขึ้นอยู่กับวิธีการเก็บรักษาและสภาพน้ำยาง ซึ่งสามารถวัดได้จากค่า Zeta potential โดยนำน้ำยางจากต้นยาง *Hevea brasiliensis* ที่ผ่านกระบวนการต่างๆ และเก็บรักษาสภาพน้ำยางไว้ด้วย Triton® X-100 ภายใต้ค่า pH ต่างๆ โดยให้มีค่า ionic strength คงที่ และค่า pH อยู่ในช่วงระหว่าง 4.0-9.0 ดังรูปที่ 5.2



รูปที่ 5.2 ค่า zeta potential ของสารตัวอย่างที่มี ionic strength เป็นสารละลาย NaCl 0.150 M

จากรูปที่ 5.2 สามารถสรุปผลได้ดังต่อไปนี้

1. พบว่าค่า zeta potential มีค่าลบเพิ่มขึ้นเมื่อค่า pH ที่สูงขึ้น โดยคาดว่าน้ำยางสดส่วนใหญ่จะประกอบด้วยฟอสโฟลิปิด, คาร์โบไฮเดรต, โปรตีน และธาตุโลหะประจุต่างๆ ซึ่งมีผลต่อค่า zeta potential ดังนั้นน้ำยางสดจึงมีค่า zeta potential สูงสุด
2. ในการทดลองวัดค่าประจุที่ผิวของอนุภาคยางเพื่อตรวจสอบเสถียรภาพโดยอ้างอิงจากค่า Zeta potential ที่วัดได้ ดังนั้นเพื่อลดความเสี่ยงในการมีประจุในอนุภาคยางจึงเลือกใช้สาร Triton® X-100 ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีประจุ (ค่า zeta potential = -2.8 mV) จึงไม่ส่งผลต่อค่า zeta potential ของสารตัวอย่าง
3. เมื่อทำการปั่นแยกชั้นซีรัม (ชั้นน้ำ) ออกไป เป็นผลให้สูญเสีย soluble protein รวมถึงประจุของโลหะ ทำให้ค่า zeta potential ของน้ำยางที่ผ่านการปั่นด้วยความเร็วสูงตามทฤษฎีที่ได้นำจะต่ำกว่าน้ำยางสด ในทางกลับกัน ผลการทดลองที่ได้พบว่าค่า zeta potential ของทั้งสองสารตัวอย่างมีค่าใกล้เคียงกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเกิดไฮโดรไลซิสของฟอสโฟลิปิดที่เกิดจากองค์ประกอบทางเคมีที่ช่วงรอยต่อของอนุภาคยางกับน้ำที่มีการเปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาที่เก็บน้ำยางชั้นไว้
4. น้ำยางสดที่ผ่านกระบวนการ Deproteinization จะมีปริมาณไนโตรเจนลดลง เนื่องจากเปปไทด์สายยาวถูกตัดโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนร่วมกับสาร surfactant ค่า zeta potential จึงลดต่ำลง แต่ยังคงเหลือฟอสโฟลิปิดและเปปไทด์สายสั้นอยู่ซึ่งสามารถสกัดออกได้ในกระบวนการ Saponification ด้วยสาร NaOH/Triton® X-100 ในสารละลาย จึงน่าจะเป็นสาเหตุทำให้ค่า zeta potential ของ Deproteinized latex มีค่ามากกว่า Saponified latex แต่ผลที่ได้จริงพบว่า ค่า Zeta potential ของ Saponified latex มีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จาก deproteinized latex ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากประจุของไฮดรอกไซด์ไอออนที่ยังคงเหลือในน้ำยางหลังจากทำปฏิกิริยาด้วยเบส

5.2 ปริมาณไนโตรเจนและเอสเทอร์ของยาง

จากผลการทดลองข้างต้น พบว่าปริมาณโปรตีนและฟอสโฟลิปิดมีส่วนสำคัญต่อสมบัติการเป็นคอลลอยด์ของน้ำยาง ดังนั้นจึงตรวจวัดปริมาณโปรตีนและฟอสโฟลิปิดที่มีอยู่ในน้ำยางชนิดต่างๆ จากผลการปั่นน้ำยางที่ผสม Triton® x-100 สามารถลดจำนวนโปรตีนในยางธรรมชาติได้ สิ่งเหล่านี้ยังชี้ให้เห็นถึงจำนวนโปรตีนที่มีอยู่อีกมากรอบอนุภาคยาง บางส่วนของยางที่เกิดการรวมตัวหลังการปั่นในครั้งแรก แสดงถึงโปรตีนที่ผิวอนุภาคทำให้เกิดเสถียรภาพของคอลลอยด์ อนุภาคยางจะอยู่อย่างไมเสถียรเมื่อโปรตีนถูก

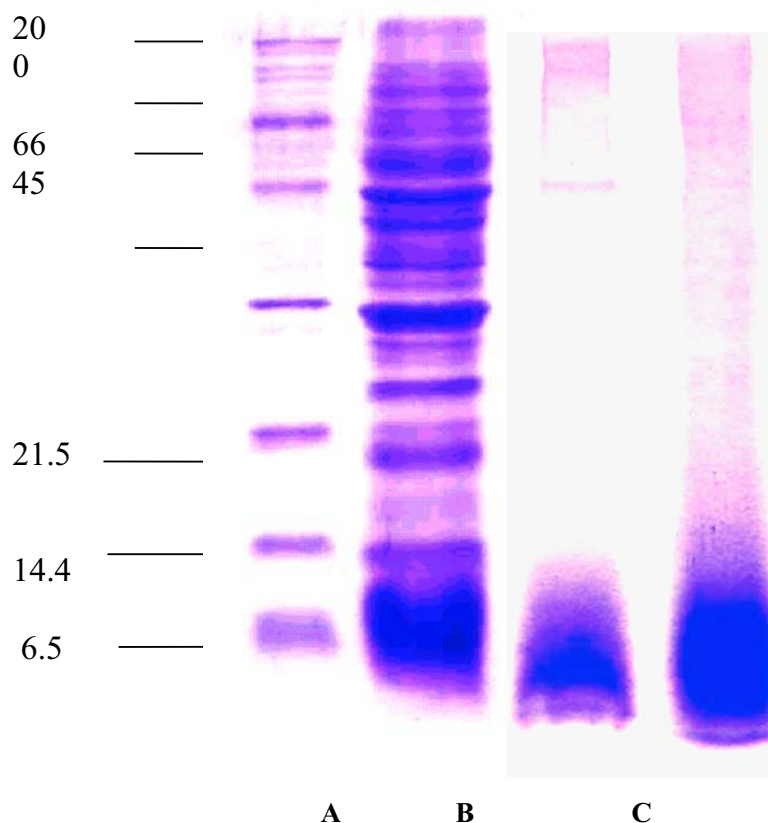
สกัดออก ดังนั้นการใช้สาร surfactant (Triton® x-100) จะเป็นผลทำให้โปรตีนส่วนมากถูกสกัดออกไปได้ เนื่องจากสาร surfactant จะเข้าไปแทนที่โปรตีนที่ติดผิวอนุภาคและยังทำให้น้ำยางมีความเสถียร ซึ่งผลการวัดปริมาณไนโตรเจน อาจกล่าวสรุปได้ว่าการสกัดโปรตีนออกจากยางธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือการใช้เอนไซม์ตัดโปรตีนแล้วตามด้วยการปั่นแยก เอนไซม์จะไปตัดโปรตีนที่อยู่ล้อมรอบอนุภาคให้เป็นสายเปปไทด์ตามด้วยการแยกโปรตีนออกโดยการปั่น ดังนั้นการผสมกันของสาร surfactant และ เอนไซม์ KP 3939 เป็นวิธีที่มีเหมาะต่อการลดปริมาณโปรตีน นอกจากนี้ยังพบว่า ยางอนุภาคเล็กที่ได้จากชั้นซีรัม (small rubber) จะมีปริมาณไนโตรเจนมากกว่าน้ำยางสดจากต้นอย่างชัดเจนประมาณ 2.00 และ 0.68 %w/v ตามลำดับ ปริมาณไนโตรเจนที่สูงเช่นนี้อาจเป็นเพราะมีสารที่เป็นองค์ประกอบของไนโตรเจนและเกลือนินทรีย์ในส่วนซีรัม หลังการปั่นแยกส่วนของน้ำยางสดออก โปรตีนที่ละลายน้ำจะมาอยู่ที่ส่วนซีรัม ในกรณีเช่นนี้ส่วนของยางหลังปั่นแยกจึงมีปริมาณไนโตรเจนต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยางสดที่เก็บจากต้นยาง ส่วนของยางที่ผ่านกระบวนการ Deproteinization ก็มีปริมาณไนโตรเจนต่ำกว่าน้ำยางสดซึ่งเป็นผลจากโปรตีนถูกเอนไซม์สกัดออกไป

จากนั้นทำการวัดปริมาณโปรตีนที่อยู่ในชั้นน้ำซีรัมหลังจากผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น ปั่นแยกยางด้วยความเร็วสูง deproteinization และ saponification โดยการวัดชนิดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bio-Rad protein assay ดังแสดงไว้ในรูปที่ 5.4 และ ในตารางที่ 5.4 ตามลำดับ

จากรูปจะพบว่า โปรตีนที่มีอยู่ในน้ำยางสดจากชั้นซีรัมแสดงโดยแถบ B ใน SDS-PAGE มีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในช่วง 10 kDa ไปจนถึงมากกว่า 200 kDa จากการปั่นแยกน้ำยางสดที่ไม่มีการเติมสารใดๆ พบว่า แยกได้อย่างน้อย 3 ส่วนประกอบด้วย ส่วนยาง ซีรัม และลู่ทอยด์ ซึ่งโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 30, 33, 45 kDa เป็นโปรตีนที่คาดว่าจะมาจากส่วนของลู่ทอยด์ แต่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 30 kDa ส่วนใหญ่จะมาจากส่วนซีรัม และโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 30 และ 33 kDa จะมาจากส่วนของยาง ซึ่งอาจตั้งสมมติฐานได้ว่าโปรตีนเหล่านี้มีขั้วเพราะอยู่ในชั้นซีรัม

ตารางที่ 5.4 แสดงปริมาณโปรตีนที่ได้ในส่วนซีรัมหลังจากการผ่านกระบวนการต่างๆ พบว่า การปั่นแยกด้วยความเร็วสูงกับ surfactant สามารถแยกโปรตีนออกจากยางได้มาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนส่วนใหญ่จะละลายอยู่ในชั้นซีรัมและลู่ทอยด์ หลังจากการทำ deproteinization และ saponification ซึ่ง

สามารถย่อยโปรตีนที่ติดอยู่กับอนุภาคยางได้ พบว่ามีปริมาณโปรตีนที่ได้น้อยกว่าเริ่มต้นมากและโปรตีนที่
ย่อยออกมาในชั้นซีรัมจะเป็นโปรตีนสายสั้นๆ ดังแสดงได้จากโปรตีนแถบ C และ D ใน SDS-PAGE



รูปที่ 5.4 เจล SDS-PAGE (15% เจล) ของโปรตีนจากยางธรรมชาติและส่วนซีรัม;

- : สายละลายโปรตีนมาตรฐาน (Standard protein)
- : Soluble protein ที่อยู่ในชั้นซีรัมหลังจากการปั่นด้วยความเร็วสูง
- : Decomposed protein ที่อยู่ในชั้นซีรัมหลังจากการทำ deproteinization
- : Serum protein หลังผ่านกระบวนการ saponification

เจล : Separating gel 15% Stacking gel 4%

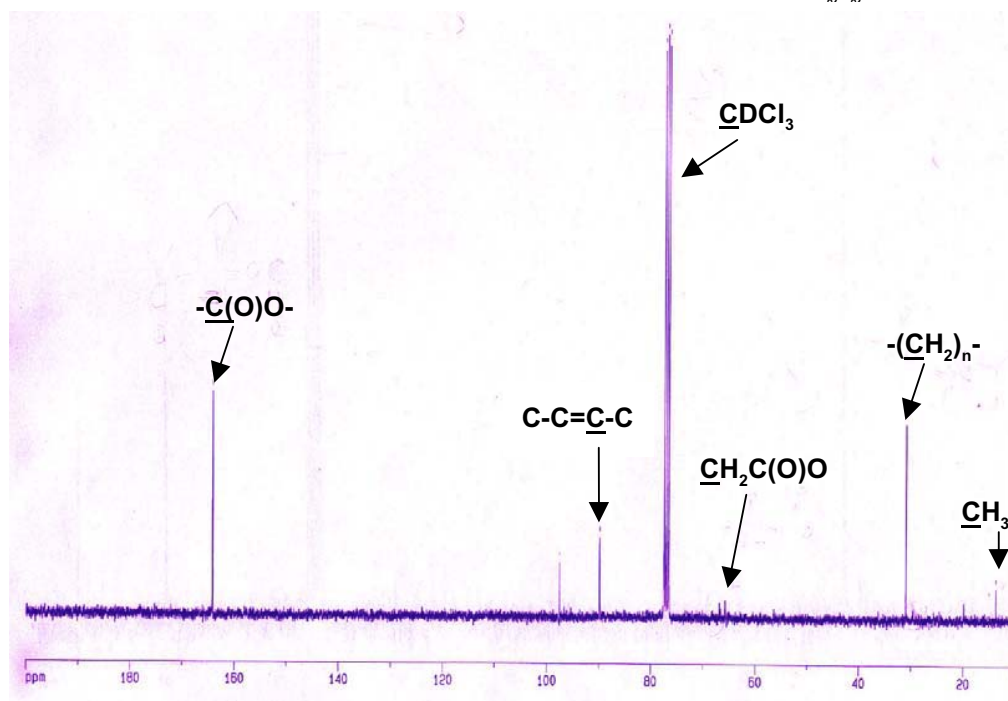
ปริมาณกระแสไฟฟ้า : 25 mA/เจล สีย้อม : Coomassie Brilliant Blue R-250

ตารางที่ 5.4 ปริมาณโปรตีนในส่วนซีรัม

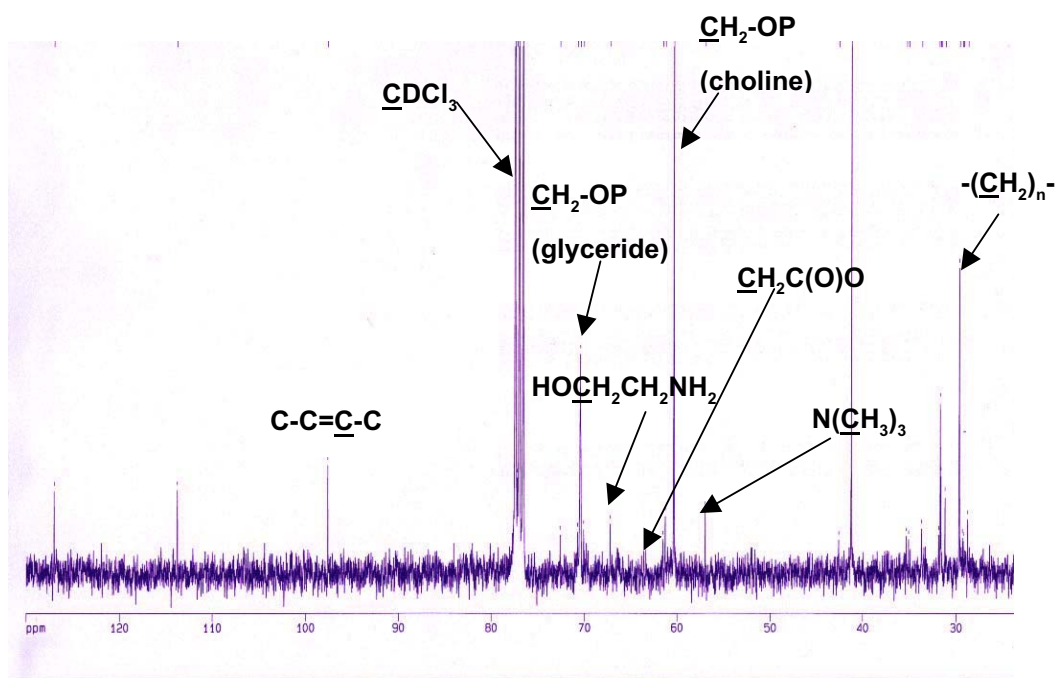
Sample	Quantitation of protein (μg)
Serum#1 (Soluble protein)	19.45
Serum #2 (Decomposed protein)	2.09
Serum #3	1.91

นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณเอสเทอร์ของกรดไขมันในยางธรรมชาติซึ่งสามารถแบ่งได้ถึงฟอสโฟลิปิดอิสระ (Free Phospholipid), ฟอสโฟลิปิดที่ติดผิวยาง (Linked Phospholipid) และเอสเทอร์ของกรดไขมันทั่วไปที่อยู่ในน้ำยาง ซึ่งเป็นผลที่คำนวณได้จากการวัดปริมาณเอสเทอร์ของยางเทียบกับปริมาณเอสเทอร์ของสารละลายมาตรฐานจากสเปกตรัม FT-IR พบว่า เมื่อนำน้ำยางสดมาผ่านกระบวนการ Deproteinization ปริมาณเอสเทอร์ ที่ได้จะต่ำกว่า Centrifuged latex แต่อย่างไรก็ตามปริมาณเอสเทอร์ใน Deproteinized latex ยังคงมีอยู่ในปริมาณที่มาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การทำ deproteinization ไม่สามารถกำจัดฟอสโฟลิปิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่เมื่อนำ Deproteinized latex มาผ่านกระบวนการ Saponification พบว่าปริมาณเอสเทอร์ที่ได้มีค่าเข้าใกล้ศูนย์เพราะฟอสโฟลิปิดที่ติดอยู่กับอนุภาคยางถูกสกัดออกไป อย่างไรก็ตาม ฟอสโฟลิปิดหรือกรดไขมันอิสระยังคงมีอยู่ในยางที่ได้จาก saponified latex และ Small rubber ดังจะสังเกตได้จากพีกที่มีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งจาก 1738 cm^{-1} เป็น 1730 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีกคาร์บอนิลของกรดไขมันอิสระ ทั้งนี้อาจเนื่องจากปฏิกิริยา Saponification เกิดได้ไม่สมบูรณ์

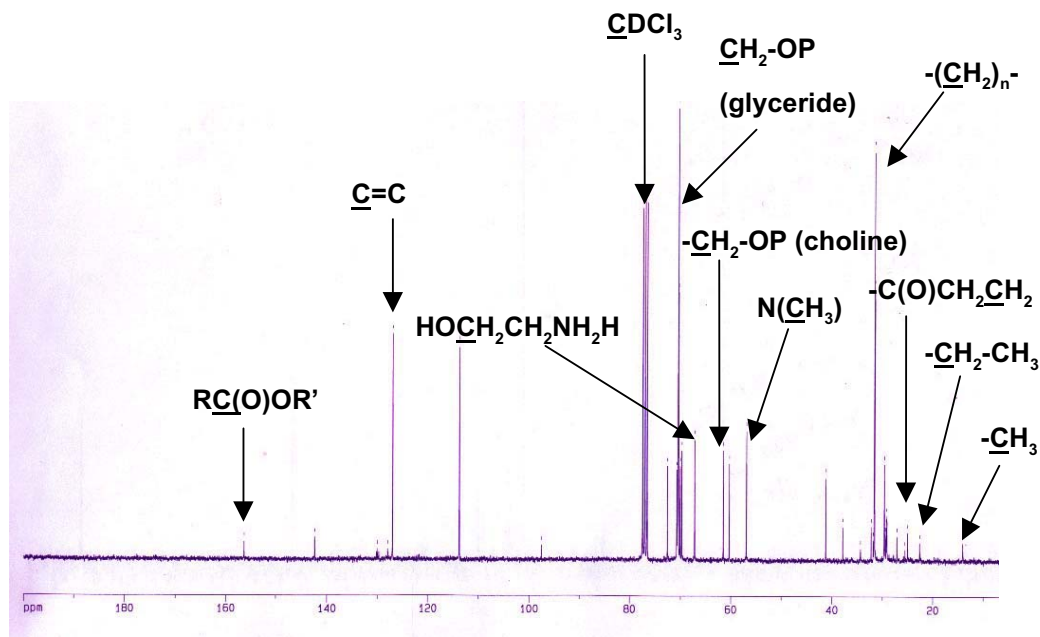
ในการศึกษาลักษณะทางโครงสร้างของฟอสโฟลิปิดที่ผิวอนุภาค โดยทำการย่อยสารเอสเทอร์ของกรดไขมันและฟอสเฟตเอสเทอร์ในปฏิกิริยา Saponification ด้วย NaOH ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่สามารถสกัดฟอสโฟลิปิดออกไปได้ นอกจากนี้ สารประกอบฟอสโฟไลปิดในชั้นซีรัมของน้ำยางชนิดต่างๆ ที่ถูกสกัดออกมาด้วยวิธีต่างๆ คือ การปั่นแยก deproteinization และ saponification ซึ่งสามารถตรวจวัดได้โดยเทคนิค ^{13}C -NMR ดังแสดงในรูปที่ 5.5-5.7



รูปที่ 5.5 สเปกตรัม ^{13}C -NMR ของฟอสโฟลิปิดในซีรัม #1



รูปที่ 5.6 สเปกตรัม ^{13}C -NMR ของฟอสโฟลิปิดในซีรัม #2



รูปที่ 5.7 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของฟอสโฟลิปิดในซีรัม #3

จากรูปที่ 5.5-5.7 แสดงสเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารฟอสโฟลิปิดในส่วนของซีรัมซึ่งได้จากการนำน้ำยามาผ่านกระบวนการ Deproteinization และ Saponification แล้วทำการปั่นแยกส่วนครีมออกไปในส่วนที่ไม่ใช่น้ำ (non-rubber) จะพบ chemical shift ที่ตำแหน่ง 14.22, 30.96, 60.36, 64.12, 70.45 ppm เมื่อเปรียบเทียบกับ chemical shift ของสารประกอบฟอสโฟลิปิดโมเดล สามารถระบุได้ว่าเป็น $-\text{CH}_3$, $-(\text{CH}_2)_n$, $-\text{CH}_2\text{-OP}$, $-\text{CH}_2\text{C(O)O-}$ และ $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH-}$ ตามลำดับ chemical shift เหล่านี้ประกอบไปด้วย $-\text{CH}_2\text{-O-}$ และเมทิลีนสายยาว $-(\text{CH}_2)_n$ ของกรดไขมัน ดังนั้น chemical shift ที่ปรากฏในส่วนของซีรัมชี้ให้เห็นว่าส่วนของซีรัมประกอบด้วยสารฟอสโฟลิปิดที่เชื่อมติดกับส่วนของยาง

ตารางที่ 5.6 แสดงพิกัดตำแหน่งต่างๆ ใน $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบฟอสโฟลิปิดที่ใช้อ้างอิง เพื่อเปรียบเทียบตำแหน่งต่างๆ ในสเปกตรัมของสารตัวอย่างที่เตรียมได้

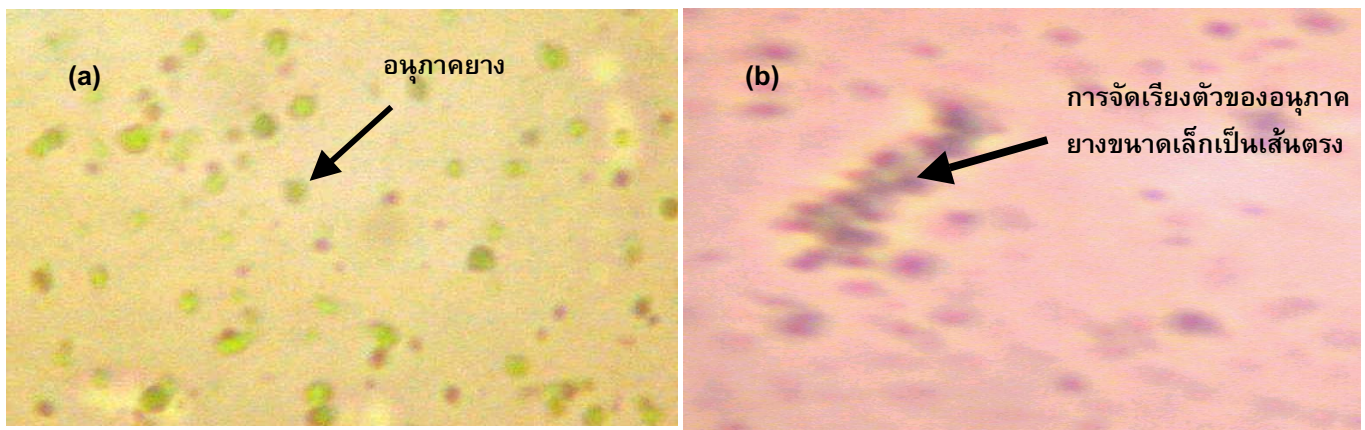
ตารางที่ 5.6 $^{13}\text{C-NMR}$ assignment ของสารประกอบฟอสโฟลิปิด

Assignments	L- α - phosphatidyl choline	L- α - phosphatidic acid	4, 5 Dihydro Sphingomyelin (in CDCl ₃ , 50°C)	Sample (Phospholipid)
$\underline{\text{C}}\text{H}_3$	14.22	14.38	13.9	14.22
$-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_3$	22.94-23.05	23.18	22.6	-
$\text{COCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$	25.45	25.37	26.1	-
$\text{OHCCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$	-	-	26.0	-
$\underline{\text{C}}\text{H}_2(\text{C}=\text{C})_2$	26.19	26.33	-	-
$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{C}=\text{C}$	27.75	27.77	-	-
$-(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_n-$	29.85	30.14	29.6	30.96
$\text{OHCH}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2$	-	-	34.0	-
$\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2$	34.54-34.73	34.45-34.94	36.8	-
$\text{OHC}\underline{\text{C}}\text{H}\text{NH}^{**}$	-	-	54.4	-
$\text{N}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$	54.78	-	54.4	56.97
$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-OP (choline)}$	60.04	-	59.3	60.36
$\underline{\text{C}}\text{H-OC=O}$	63.86	63.85	-	64.12
$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-OC=O}$	64.12	64.50	-	-
$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OP}^{**}$	-	-	65.2	-
$\text{N}\underline{\text{C}}\text{H}_2$	66.62	-	66.4	-
$\text{OH}\underline{\text{C}}\text{HCHNH}^{**}$	-	-	70.7	70.45
$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-OP (glyceride)}$	71.70	71.64	-	71.64
$\text{C}=\text{C}$	130.4-130.5	130.5-130.6	-	127.00
$\text{O}\underline{\text{C}}\text{O}$	173.2-173.5	174.0	-	-
$\text{O}=\underline{\text{C}}\text{NH}$	-	-	173.4	-

5.3 ศึกษาลักษณะของผิวอนุภาคยาง

➤ Optical Microscopy (OM)

การจัดเรียงตัวของอนุภาคยางที่ส่องด้วยกล้อง OM ในรูปที่ 5.8 (a) แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของคอลลอยด์เป็นไปอย่างมีระเบียบซึ่งขึ้นอยู่กับแรงกระทำระหว่างอนุภาค โดยปกติแล้วสามารถใช้การเคลื่อนที่แบบ Brownian มาอธิบายการเคลื่อนที่ของอนุภาคยางโดยสมมติว่าเป็นการกระทำต่อกันของโมเลกุลในของเหลว

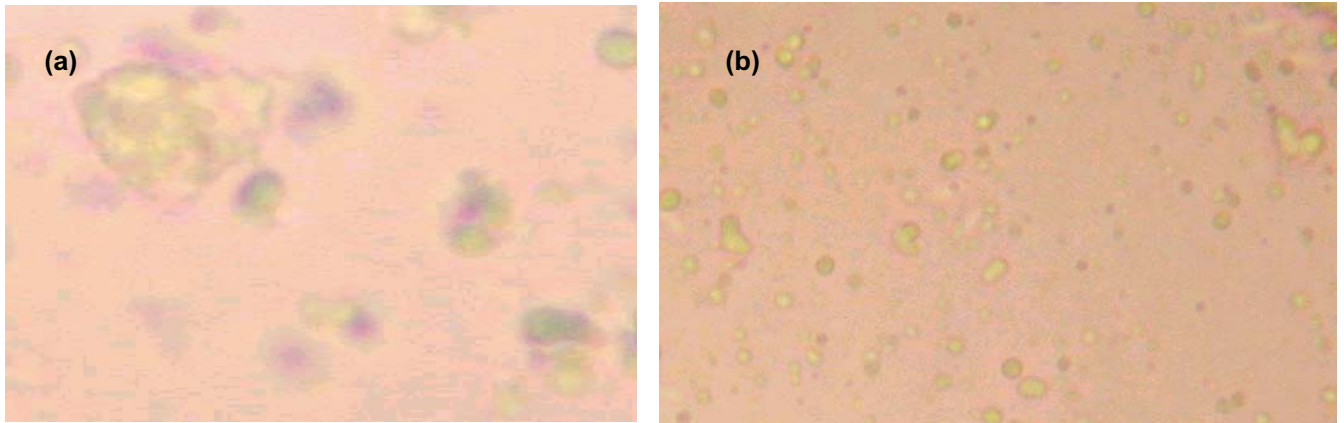


รูปที่ 5.8 อนุภาคของน้ำยางใน Triton[®] X-100 0.2%w/v; (a) Fresh latex (b) น้ำยางหลังการปั่น

อนุภาคของน้ำยางสดส่วนใหญ่จะมีลักษณะกลม เมื่อเก็บน้ำยางไว้เป็นเวลานานขึ้นพบว่ารูปร่างของยางก็จะเปลี่ยนแปลงมากขึ้นและมีขนาดใหญ่ขึ้น อนุภาคที่กลมก็จะเห็นชัดเจนว่ามีทรงกลม ส่วนอนุภาคที่เป็นรูปลูกแพร์และรูปหยดน้ำจะพบการรวมตัวของอนุภาคยางซึ่งเป็นผลของการเกิดแขวนลอยหรือเกิดการเกาะตัวกันเป็นก้อนดังแสดงในรูปที่ 5.8 (b)

นอกจากนี้ พบว่าอนุภาคของยางธรรมชาติที่ได้สกัดโปรตีนและฟอสฟอลิปิดออก จะมีขนาดเพิ่มขึ้น อธิบายได้ว่าอนุภาคยางธรรมชาติจะรวมตัวกันเองดังแสดงในรูปที่ 5.9 (a) และ (b) เนื่องจากมีการหลุดออกไปของโปรตีนขณะปั่นด้วยความเร็วสูง การจัดเรียงตัวของอนุภาคเล็กๆ เป็นเส้นตรงและเส้นโค้งดังรูปที่ 5.9 บางครั้งมีการเปลี่ยนแปลงขนาดและรูปแบบของอนุภาคเรียงตัวเป็นเส้นโดยจะมีอนุภาคขนาดใหญ่อยู่

ตรงปลายและเริ่มเล็กลงจนไปสู่อีกปลายข้างหนึ่ง ดังรูปที่อนุภาคขนาดใหญ่หายไปเนื่องจากได้ไปอยู่ในรูปของการเรียงตัวเป็นเส้น

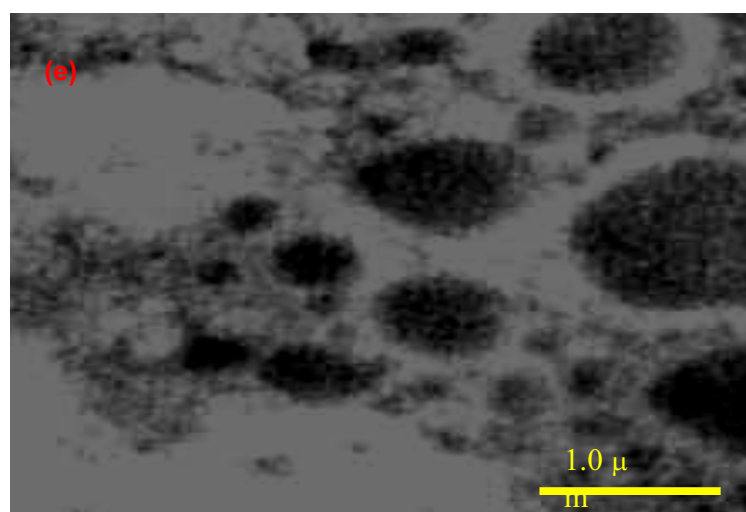
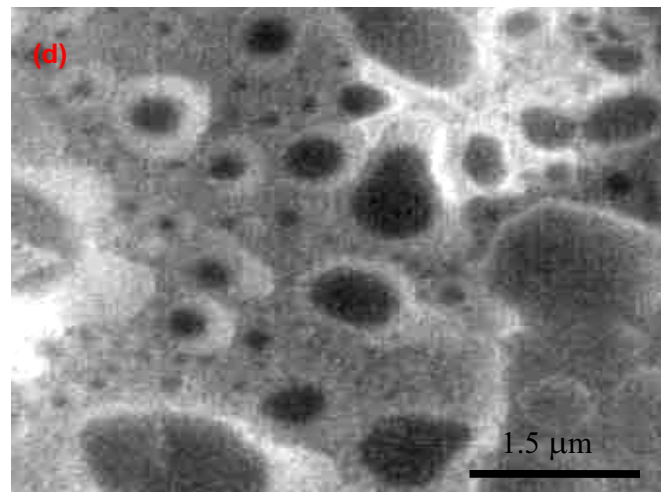
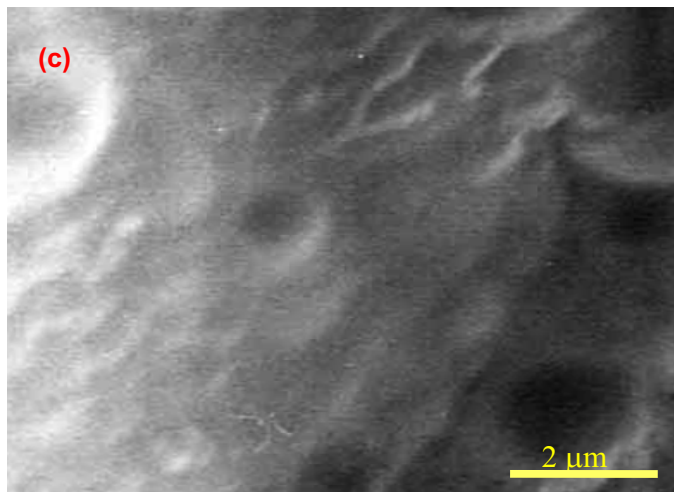
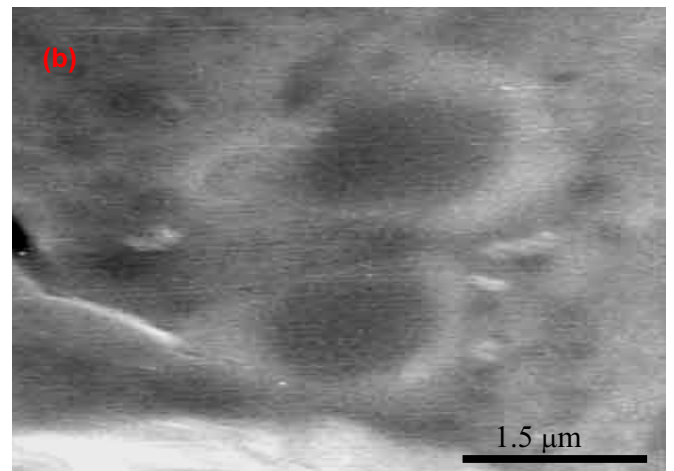
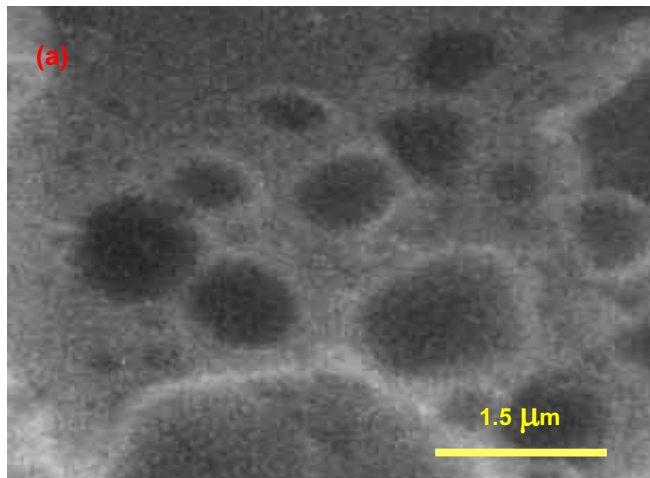


รูปที่ 5.9 อนุภาคของน้ำยางที่ผ่านกระบวนการ; (a) Deproteinization ด้วย Triton[®] X-100 และเอนไซม์ย่อยโปรตีน (b) saponification ใน Triton[®] X-100 0.2%w/v และ NaOH 1%w/v

➤ Scanning electron microscopy (SEM)

ลักษณะพื้นผิวและภาพถ่าย SEM จะแสดงดังรูปที่ 5.10 (a)-(e) จากรูปทำให้สามารถเห็นลักษณะขนาดเล็กบนพื้นผิวแบบฟิล์มได้ ภาพ SEM แสดงถึงลักษณะของพื้นผิวส่วนใหญ่ที่อาจจะมีชั้นของโปรตีนและฟอสโฟลิปิดห่อหุ้ม

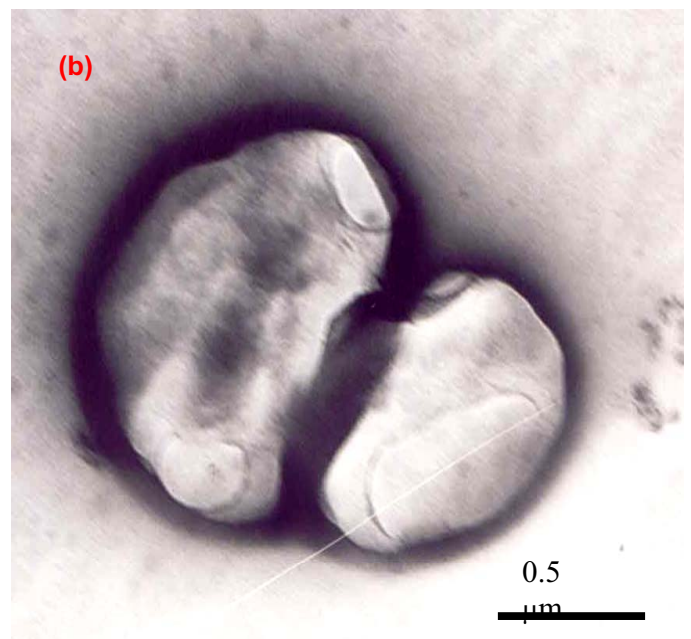
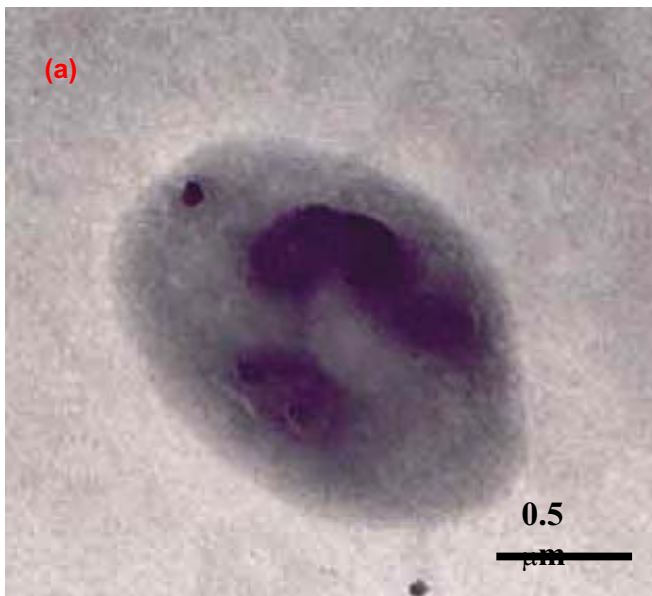
ภาพขยายส่วนของยางรูปที่ 5.10(e) และส่วนของยางรูปที่ 5.10(b) แสดงถึงความชัดเจนของพื้นผิวที่มีแผ่นฟิล์มบางหุ้มอยู่บนอนุภาคยางเมื่อเปรียบเทียบกับยางอนุภาคเล็ก (small rubber) โดยข้อมูลทางด้านโครงสร้างเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าอนุภาคมีการเกาะตัวซ้ำ ภาพ SEM ยังแสดงวัตถุที่มีประจุลบเป็นจำนวนมากที่สะสมอยู่บนผิวอนุภาค

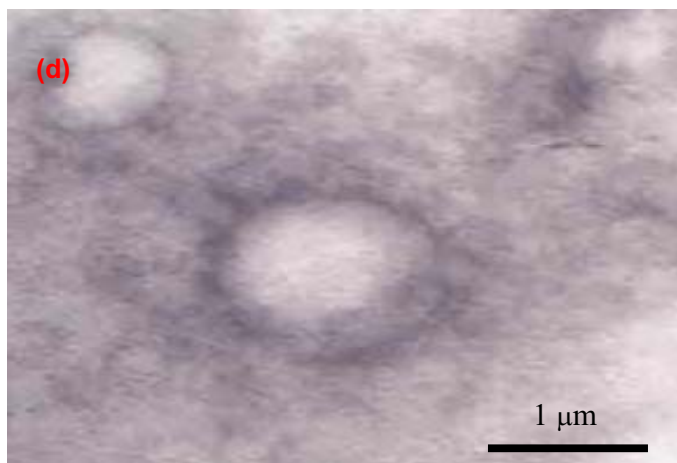
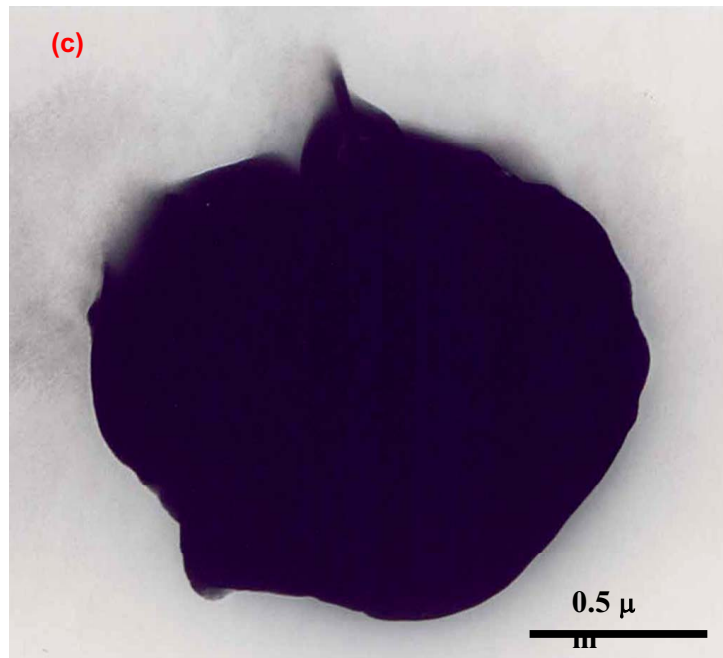


รูปที่ 5.10 ลักษณะพื้นผิวของอนุภาคยางจากภาพ SEM; (a) น้ำยางสด (b) ยางที่ผ่านการปั่นแยก (c) น้ำยางโปรตีนต่ำ (d) น้ำยางซาปอนนิฟิเคชัน และ (e) ยางอนุภาคเล็ก

➤ **Transmission electron microscopy (TEM)**

รูปที่ 5.11 (a) - (e) แสดงลักษณะที่ปรากฏให้เห็นของอนุภาคยางที่ยึดให้อยู่กับที่ด้วย Osmium tetroxide ซึ่งสารนี้อาจทำให้ส่วนของยางที่เป็นไฮโดรคาร์บอนสายยาวถูกออกซิไดซ์ให้เป็นโมเลกุลเล็กเกาะอยู่ที่เยื่อหุ้มอนุภาค เมื่อ Osmium tetroxide ยึดอนุภาคยางจะเห็นเป็นโครงสร้างของเยื่อหุ้มที่อยู่โดยรอบอย่างชัดเจน ซึ่งสังเกตได้จากส่วนสีขาวของอนุภาคยางที่เกาะตัวกันอยู่ แม้ว่าอนุภาคเดี่ยวเหล่านี้จะรวมกันอยู่แต่ยังมีขอบเขตของอนุภาคที่แยกให้เห็นอนุภาคเดี่ยวเป็นที่สังเกตได้ ขอบเขตเหล่านี้แสดงให้เห็นเป็นสีที่ทึบกว่าซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะแสดงถึงสารประกอบฟอสโฟลิปิด-โปรตีนที่สร้างเยื่อหุ้มอนุภาคยาง





รูปที่ 5.11 ลักษณะพื้นผิวของอนุภาคยางจากภาพ TEM; (a) น้ำยางสด (b) น้ำยางที่ผ่านการปั่นแยก (c) น้ำยางโปรตีนต่ำ (d) น้ำยางซาปอนนิฟิเคชันและ (e) ยางอนุภาคเล็ก

อนุภาคน้ำยางมีขนาดอยู่ในช่วง 50-30,000 °A [อ้างอิงจากงานประชุมวิชาการเกี่ยวกับยาง] และมีรูปร่างกลมยกเว้นจะเกิดรูปร่างเป็นรูปลูกแพรดังเช่นน้ำยาง Tjir และในน้ำยางบางสายพันธุ์ที่ได้ทำวิจัยไปแล้ว โดย Southorn ซึ่งแต่ละอนุภาคจะถูกกำหนดบริเวณโดยเยื่อหุ้มฟอสโฟลิปิดและโปรตีน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาลักษณะของน้ำยางสด (Fresh latex), Centrifuged latex, Deproteinized latex, Saponified latex และ Small rubber ที่ถูกเตรียมขึ้น

รูปร่างโดยทั่วไปของอนุภาคน้ำยางสดจะคล้ายกับ Centrifuged latex (จากรูป 5.11 (a) และ (b) ตามลำดับ) จุดสังเกตที่น่าสนใจพบจากภาพที่ส่องด้วยกล้องอิเล็กตรอนคือจะเห็นวงแหวนสีเทาใกล้เคียงกับผิวอนุภาคซึ่งสอดคล้องกับชั้นห่อหุ้มที่เกิดจากโปรตีน-ลิปิด การนำอนุภาคน้ำยางมาทำปฏิกิริยาร่วมกับเอนไซม์เพื่อตัดโปรตีนเป็นสายสั้น (เปรียบเทียบรูปที่ 5.11 (a) กับ (c)) และนำน้ำยางมาทำปฏิกิริยาต่อยด้วย NaOH เพื่อย่อยฟอสโฟลิปิด (เปรียบเทียบรูปที่ 5.11 (a) กับ (d) และรูปที่ 5.11 (c) กับ (d)) ซึ่งจะไม่พบความแตกต่างเด่นชัดของลักษณะพื้นผิว

5.4 ศึกษาผลของฟอสโฟลิปิดที่มีต่อประจุบนผิวอนุภาคน้ำยาง

จากข้อมูลเบื้องต้น พบว่าประจุบนผิวอนุภาคน้ำยางอาจมีผลมาจากส่วนของโปรตีนและฟอสโฟลิปิดที่ห่อหุ้มอนุภาคน้ำยางไว้ จึงได้ทำการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับผลของฟอสโฟลิปิดที่มีต่อประจุบนผิวอนุภาคน้ำยาง ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5.7

ตารางที่ 5.7 ผลของฟอสโฟลิปิดที่มีต่อค่า zeta potential และ mobility ของน้ำยางที่มีขนาดอนุภาคเล็ก (Small natural rubber latex) และน้ำยางที่ได้จากการสังเคราะห์โพลิไอโซพรีน (Synthetic polyisoprene latex) ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7 ที่ความเข้มข้นของ NaCl 0.001 M

หมายเหตุ ขนาดอนุภาคของน้ำยางสังเคราะห์จากโพลีไอโซพรีนเท่ากับ 903 nm

ขนาดอนุภาคของน้ำยางที่มีอนุภาคเล็กเท่ากับ 144 nm

น้ำยางความเข้มข้น 5% DRC ที่มีการผสมฟอสฟอลิปิด 0.5 กรัม

จากตารางที่ 5.7 แสดงให้เห็นถึงค่า zeta potential และ electrophoretic mobility ของน้ำยางที่มีอนุภาคขนาดเล็กและน้ำยางสังเคราะห์จากโพลีไอโซพรีนที่ได้มีค่าตรงข้ามกับน้ำยางที่มีการเติมฟอสฟอลิปิด กล่าวคือน้ำยางที่มีอนุภาคขนาดเล็กมีค่าติดลบน้อยกว่าน้ำยางที่มีอนุภาคขนาดเล็กที่มีการเติมฟอสฟอลิปิด ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับในกรณีของน้ำยางสังเคราะห์จากโพลีไอโซพรีน จากการที่น้ำยางสดมีอนุภาคที่ถูกจัดเรียงตัวด้วยหลายๆ โมเลกุลของโพลีไอโซพรีน ดังนั้น ผลที่ได้จากข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ฟอสฟอลิปิดทำให้ค่า zeta potential ติดลบมากยิ่งขึ้น

Emulsion	Zeta Potential (mV)	Mobility (micron/sec./v./cm)
1 (0.0023 g phospholipids)	-23.9	-1.994
2 (0.0071 g phospholipids)	-1.9	-0.153
3 (0.0142 g phospholipids)	-1.9	-0.147
4 (0.0261 g phospholipids)	-1.9	-0.153
5 (0.0495 g phospholipids) สารตัวอย่าง	Zeta Potential	Mobility
Polystyrene	(mV)	(micron/sec./v./cm)
Polystyrene	-26.1	-2.542
Phospholipids 5%(w/v)	-30.3	-2.406
# polyisoprene + lipid	-78.6	-6.231
small NR	-19.3	-1.528
# small NR + lipid	- 69.4	-5.496

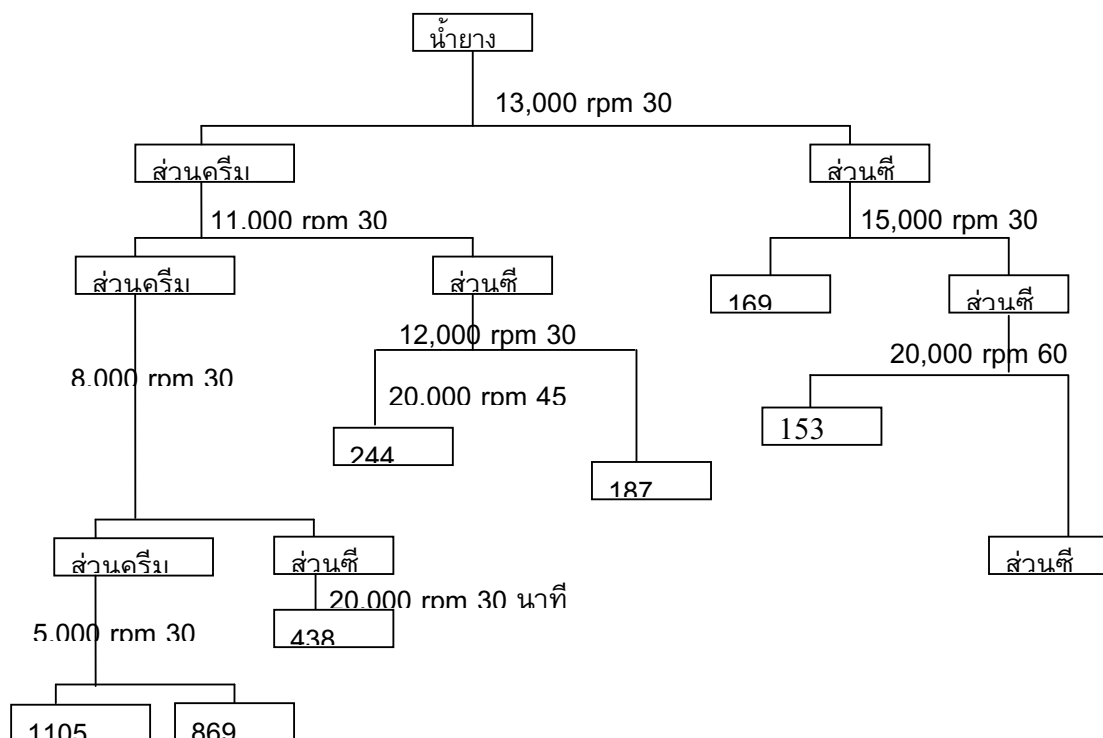
ตารางที่ 5.8 ค่า zeta potential และ mobility ของ emulsion ที่ pH 7, 0.001 M NaCl ของยางอนุภาคเล็กที่มีการเติมฟอสฟอลิปิดในปริมาณที่แตกต่างกัน

จากตารางที่ 5.15 ผลที่ได้ตรงข้ามกับผลที่ได้จากตารางที่ผ่านมา ซึ่งผลที่ได้จากตารางนี้แสดงให้เห็นว่า ปริมาณฟอสโฟลิปิดเพิ่มขึ้นทำให้ค่า zeta potential ต่ำลง ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจาก emulsion ที่ได้จากการเตรียมไม่ได้ถูกปกคลุมด้วยฟอสโฟลิปิดซึ่งหมายความว่าปฏิกิริยานี้ไม่ได้ทำให้เกิด micelle ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยานี้มีลักษณะของอนุภาคที่เหมือนกับที่ได้จากยางธรรมชาติและโพลีไอโซพรีน

ขั้นตอนที่ 6 ศึกษาผลของยางที่มีขนาดอนุภาคต่างๆ กันกับสมบัติทางเคมีเนื่องจากอนุภาคยางธรรมชาติมีการกระจายตัวอยู่ในช่วง 0.05-3 ไมครอน ดังนั้น อนุภาคที่มีขนาดต่างกันอาจมีลักษณะของเมมเบรนที่ห่อหุ้มอยู่ที่ผิวแตกต่างกันออกไป สามารถทำการทดลองได้โดยปั่นแยกน้ำยางสดด้วยความเร็วรอบต่างๆ กันเพื่อให้ได้อนุภาคยางขนาดต่างๆ กัน

วิธีทดลอง

ปั่นน้ำยางสดด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ส่วนครีมยางที่ได้นำมาละลายด้วย 0.1% vv Triton[®] X-100 ปรับให้มีเนื้อยางประมาณ 20% แล้วทำการปั่นด้วยความเร็วรอบที่แตกต่างกัน 6 ครั้ง เพื่อแยกให้ได้ 7 ส่วนที่มีอนุภาคแตกต่างกันดังที่ได้แสดงไว้ในภาพที่ 6.1



ภาพที่ 6.1 การปั่นแยกน้ำยางสดเพื่อให้ได้อนุภาคยางขนาดต่างๆ กัน

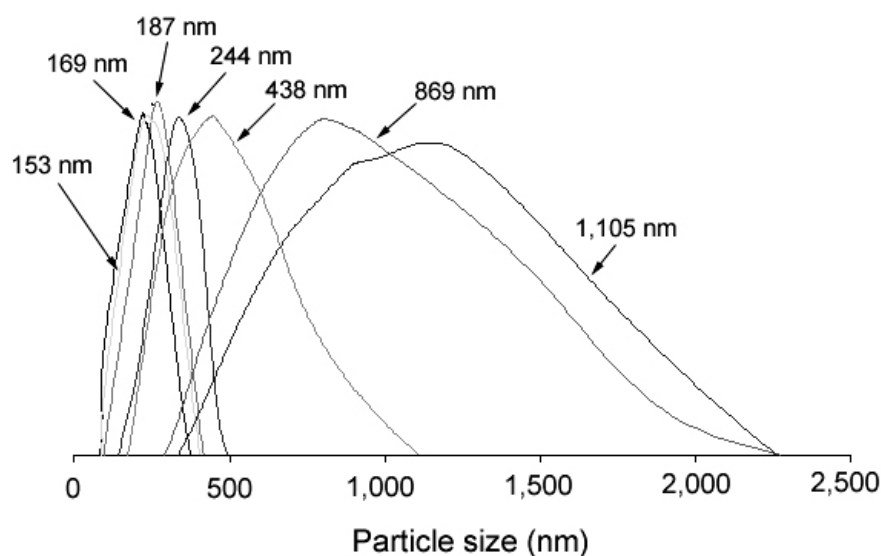
น้ำยางแห้งที่ได้ในแต่ละขั้นตอนการปั่นไปทำการสกัดเอาไขมันอิสระและอนุพันธ์ของเอสเทอร์ออก ด้วยวิธีการสกัดด้วยอะซีโตนเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในเครื่อง Soxhlet ภายใต้สภาวะไนโตรเจน ยางแห้งที่ได้จากขั้นตอนนี้นำมาละลายด้วยโทลูอีน 0.5 % w/v และทำการแยกแต่ละส่วนตามน้ำหนักโมเลกุล ยางที่ได้ในแต่ละน้ำหนักโมเลกุลนำมาทำทรานเอสเทอร์รีฟิเคชันเพื่อสกัดฟอสโฟลิปิดและไขมันออกจากอนุภาคยางโดยการทำปฏิกิริยายางเข้มข้น 1% w/v ในโทลูอีนด้วยโซเดียมเมทอกไซด์ภายใต้สภาวะไนโตรเจนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ยางที่ปราศจากไขมัน (TE-NR) นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนยางด้วยเมทานอลสองครั้ง

วิธีวิเคราะห์

- ขนาดอนุภาคยางด้วยเครื่อง Light Scattering S4700 MALVERN Particle Size Analyzer
- น้ำหนักโมเลกุลของยางด้วยเครื่อง JASCO-Borwin GPC และ Ubbelohde viscometer
- ปริมาณเอสเทอร์ของไขมันด้วยเทคนิค FT-IR (FT/IR 460 JASCO)

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลตอนที่ 6

■ ขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ยและการกระจายตัวของขนาดอนุภาคยางในน้ำยางสดหลังจากการปั่นแยกด้วยความเร็วรอบต่างๆ แสดงไว้ในรูปที่ 6.1

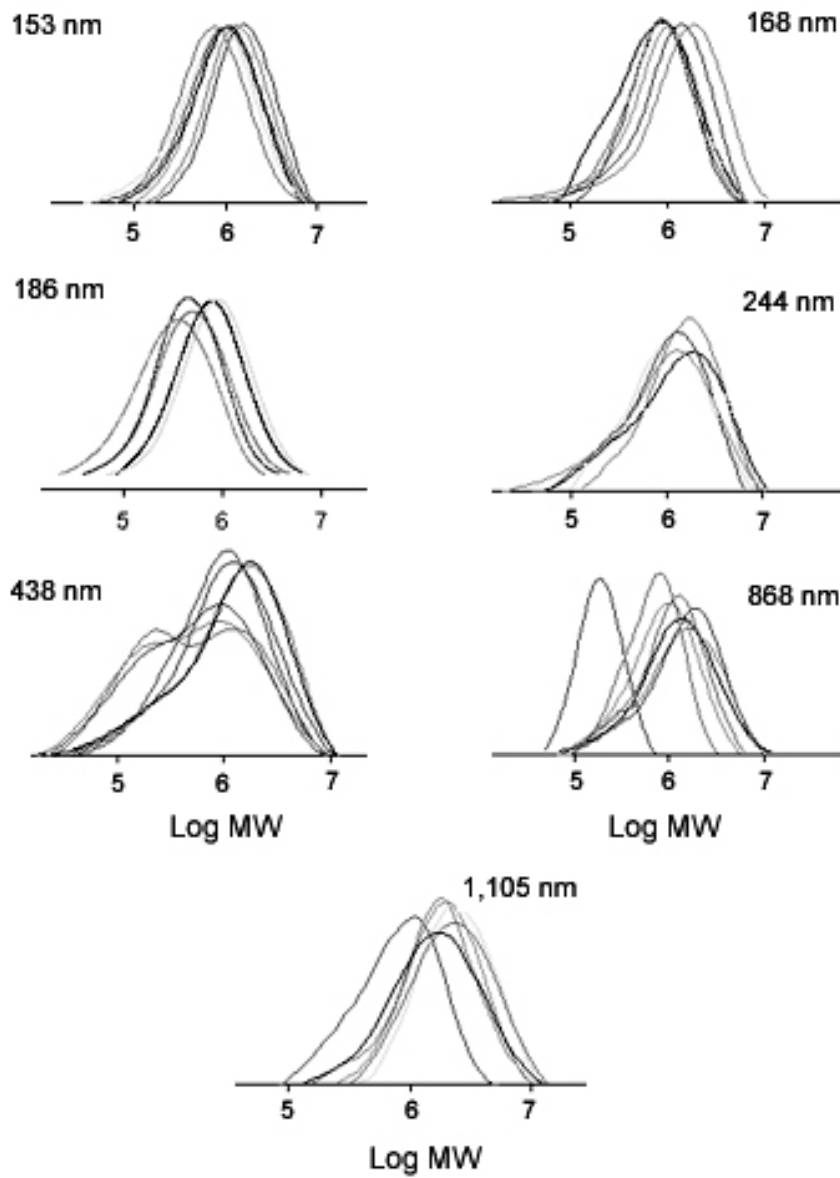


รูปที่ 6.1 การกระจายตัวของอนุภาคยางในน้ำยางที่ได้จากการปั่นแยกที่ความเร็วต่างกัน

น้ำยางสดพบว่าประกอบด้วยอนุภาคยางตั้งแต่ 0.1 ถึง 1.1 μm การกระจายตัวของอนุภาคยางขนาดเล็กจะมีลักษณะแคบในขณะที่การกระจายตัวของอนุภาคยางขนาดใหญ่จะมีการกระจายตัวกว้างมาก ดังนั้น ในที่นี้ยางที่มีขนาดอนุภาคในช่วง 150-200 nm และขนาดใหญ่กว่า 250 nm จะแสดงเป็นยางอนุภาคเล็ก (SRP) และยางอนุภาคใหญ่ (LRP) ตามลำดับ ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดอนุภาคยางและน้ำหนักโมเลกุล ($\bar{M}_n$ และ $\bar{M}_w$) ของแต่ละยางที่ได้จากการแยกด้วยขนาดอนุภาค พบว่าการกระจายตัวของอนุภาคยางสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุลเป็นแบบ bimodal ยางขนาดอนุภาคเล็ก (SRP) ประกอบไปด้วยโมเลกุลยางที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน ($\bar{M}_n$) ต่ำและสูงในช่วง $0.85\text{--}2.17 \times 10^5$ ในขณะที่ยางอนุภาคใหญ่ (LRP) ประกอบไปด้วยน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 1.11×10^5 น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก ($\bar{M}_w$) ของยางอนุภาคเล็กอยู่ในช่วง $6.42\text{--}8.15 \times 10^5$ และยางอนุภาคใหญ่ประมาณ $5.75\text{--}7.88 \times 10^5$ เป็นที่น่าสังเกตว่าน้ำหนักโมเลกุล ($\bar{M}_n$ และ $\bar{M}_w$) เพิ่มขึ้นเมื่อขนาดอนุภาคยางใหญ่ขึ้นในยางที่มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่า 438 nm ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้นในยางอนุภาคใหญ่ (LRP) เนื่องจากอาจจะเกิดกิ่งก้านจากปลายสายโซ่ทั้งสองด้านในโมเลกุลยาง

มีรายงานว่ายางอนุภาคเล็กที่ได้จากน้ำยางของต้นกล้วยประกอบด้วยโมเลกุลยางที่เป็นสายโซ่ตรงซึ่งไม่มีหมู่ฟอสโฟลิปิดที่ปลายสายโซ่ ในขณะที่ยางอนุภาคใหญ่ที่ได้จากต้นที่เจริญวัยเต็มที่จะประกอบด้วยโมเลกุลยางที่มีหมู่ฟอสโฟลิปิดในการเกิดกิ่งก้านที่ปลายสายโซ่ การสังเคราะห์ยางในหลอดทดลองโดยใช้ $^{14}\text{C-IDP}$ บนอนุภาคยางพบว่า $^{14}\text{C-IDP}$ ถูกต่อเติมในอนุภาคยางขนาดเล็กเท่านั้นซึ่งชี้แนะได้ว่ายางอนุภาคเล็ก (SRP) มีหมู่ไฮโดรฟอสเฟตที่มีความว่องไวในการต่อเติมสายโซ่โมเลกุล จากผลที่ได้เหล่านี้ ยางอนุภาคเล็กที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและสูงจะประกอบด้วยโมเลกุลยางที่เป็นสายโซ่ตรงมีปลายที่ว่องไวต่อการทำปฏิกิริยาซึ่งสามารถที่จะเกิดการต่อเติมโมเลกุลเพื่อให้ได้โมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้น

การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการแยกด้วยน้ำหนักโมเลกุลในแต่ละอนุภาคยางที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 6.2 พบว่า ยางที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ที่แยกได้จากยางอนุภาคเล็กที่มีขนาดต่ำกว่า 244 nm แสดงการกระจายตัวเป็นแบบ unimodal ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ แต่อย่างไรก็ตามค่าน้ำหนักโมเลกุลที่สูงที่สุดในยางอนุภาคเล็กไม่ได้อยู่ระหว่างค่าที่สูงที่สุดของการกระจายตัวแบบ bimodal ของยางอนุภาคใหญ่



รูปที่ 6.2 การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของยางจากยางอนุภาคต่างๆ ที่แยกได้โดยน้ำหนักโมเลกุลที่ต่างกัน

การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของยางแต่ละน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากยางอนุภาคขนาด 244 nm เป็นแบบ bimodal ซึ่งส่วนของน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะน้อยกว่าส่วนของน้ำหนักโมเลกุลสูง เป็นที่น่าสังเกตว่าการกระจายตัวแบบ bimodal เห็นได้ชัดจากโมเลกุลยางที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำของยางที่มีอนุภาค 437 nm อย่างไรก็ตามปริมาณเอสเทอร์ของไขมันที่สูงมากสามารถตรวจวัดได้จากยางขนาดประมาณ 437 nm ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน 0.64×10^5 ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่ายางที่มีขนาดอนุภาคประมาณ 437 nm ประกอบไปด้วยโมเลกุลยางทั้งต่ำและสูงจะมีปริมาณเอสเทอร์ของไขมันสูง

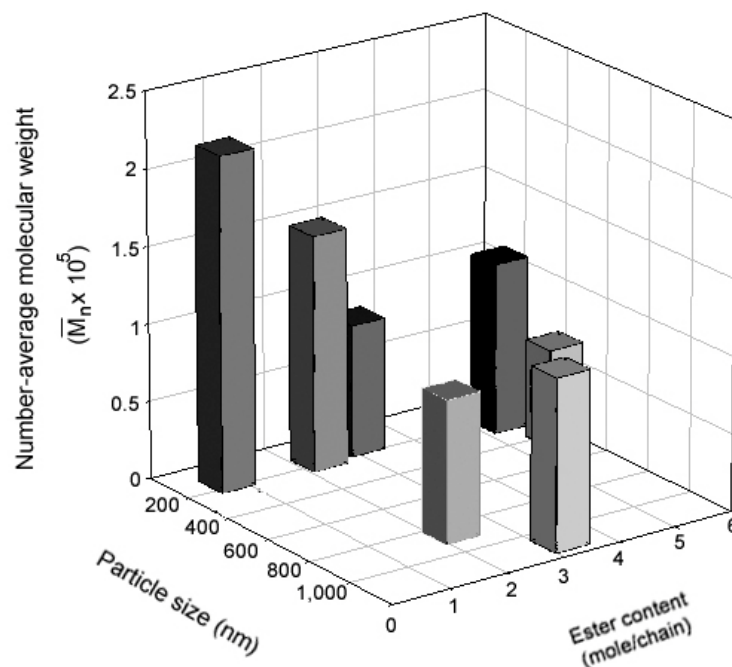
ในช่วงของยางอนุภาคใหญ่ที่มีขนาดใหญ่กว่า 250 nm อัตราส่วนของน้ำหนักโมเลกุลต่ำต่อน้ำหนักโมเลกุลสูงจะลดลงและค่าที่ได้จะค่อนข้างต่ำน้ำหนักโมเลกุลสูงเมื่ออนุภาคยางมีขนาดใหญ่ขึ้น ค่าน้ำหนักโมเลกุลที่สูงที่สุดประมาณ 2.0×10^5 ของยางส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีค่าลดลงและการกระจายตัวจะค่อนข้างต่ำน้ำหนักโมเลกุลที่สูงขึ้นซึ่งได้ค่าของน้ำหนักโมเลกุลที่สูงที่สุดมากกว่า 1.0×10^6 ผลที่ได้นำมาสนับสนุนความคิดที่ว่าส่วนของน้ำหนักโมเลกุลสูงในยางอนุภาคใหญ่เกิดเนื่องมาจากการเกาะกลุ่มกันหรือการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลยางของส่วนโมเลกุลยางที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

มีการตั้งสมมติฐานว่าหมู่ที่ปลายสายโซ่ของโมเลกุลยางจะมีพันธะเชื่อมกับฟอสโฟลิปิดที่มีหมู่เอสเทอร์ของไขมัน ตามสมมติฐานนี้ ปริมาณเอสเทอร์ของไขมันจะเป็นตัวบ่งชี้จำนวนโมเลกุลของไขมันต่อสายโซ่โมเลกุลยาง การวิเคราะห์โครงสร้างของยางด้วยเทคนิค $^{13}\text{C-NMR}$ ชี้ให้เห็นว่ามีหมู่เอสเทอร์จำนวน 2 โมลต่อโมเลกุลยางสายเดี่ยวที่ได้รับจากยางที่มีอนุภาคใหญ่ ในขณะที่จำนวนโมลของหมู่เอสเทอร์ในยางที่มีขนาดอนุภาคเล็กมีค่าใกล้เคียงเท่ากับศูนย์ จากผลการทดลองที่ได้สามารถชี้แนะได้ว่ายางอนุภาคเล็กจะประกอบด้วยโมเลกุลยางที่เป็นสายโซ่ตรงที่ไม่มีหมู่ที่ปลายสายโซ่

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอสเทอร์ของยางน้ำหนักโมเลกุลต่างที่แยกได้ตามน้ำหนักโมเลกุลและอนุภาคของยางเหล่านั้น ปริมาณเอสเทอร์ของยางอนุภาคเล็กจะมีค่าต่ำกว่าที่วัดได้ยางอนุภาคใหญ่มาก ปริมาณเอสเทอร์ที่ต่ำที่สุดที่วัดได้ประมาณ 5.5 mmol/kg rubber พบในยางที่มีอนุภาคขนาด 168 nm อย่างไรก็ตามปริมาณเอสเทอร์ของยางอนุภาคขนาด 244 nm มีค่าประมาณ 13.6 mmol/kg rubber ซึ่งมีค่าเกือบจะเท่ากับปริมาณเอสเทอร์ในยางอนุภาคใหญ่ แสดงให้เห็นว่ายางอนุภาคเล็กที่มีขนาดต่ำกว่า 200 nm จะประกอบด้วยโมเลกุลสายตรงที่ปลายสายโซ่มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาในขณะที่ยางอนุภาคขนาด 244 nm ประกอบด้วยโมเลกุลยางที่ปลายสายโซ่ต่ออยู่กับหมู่ฟอสโฟลิปิด ปริมาณเอสเทอร์ของยางอนุภาคใหญ่มีค่าสูงกว่า 13.6 mmol/kg rubber ปริมาณเอสเทอร์มีค่าสูงที่สุดในยางที่มีอนุภาค

ขนาด 438 nm จากผลการทดลองนำมาสนับสนุนความคิดที่ว่าโมเลกุลยางของยางอนุภาคใหญ่ที่มีการต่อเติมปิดปลายสายโซ่ด้วยหมู่ที่มีเอสเทอร์ของไขมันซึ่งคาดว่าเป็นหมู่ฟอสโฟลิปิดดังที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้

รูปที่ 6.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดอนุภาค ปริมาณเอสเทอร์และน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนของยางที่แยกได้ตามขนาดอนุภาคต่างๆ จะเห็นได้ว่าความสัมพันธ์ดังกล่าวไม่มีแนวโน้ม อย่างไรก็ตาม แนวโน้มที่น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนลดลงขณะที่ปริมาณเอสเทอร์ของไขมันเพิ่มขึ้นจะสังเกตได้ในยางอนุภาคเล็ก



รูปที่ 6.3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอสเทอร์และน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนักของยางที่มีขนาดอนุภาคต่างกัน

เป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณเอสเทอร์ที่ต่ำที่สุดและน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนที่สูงที่สุดสามารถวัดได้จากยางอนุภาคเล็กขนาด 168 nm ในขณะที่ยางขนาดต่างๆ ในยางอนุภาคเล็กจะแสดงปริมาณเอสเทอร์ที่สูงกว่าและน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนจะต่ำกว่า จากการนำค่าที่ได้ทั้งสองนี้จากยางอนุภาคเล็ก

ยกเว้นที่ขนาดอนุภาค 168 nm มาเทียบกับค่าที่ได้จากยางอนุภาคใหญ่ พบว่าปริมาณเอสเทอร์ที่ได้ประมาณ 2-3 โมลต่อหนึ่งสายโซ่โมเลกุลและค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนประมาณ $0.7-0.9 \times 10^5$ ผลการทดลองที่ได้ชี้ให้เห็นว่ายางอนุภาคเล็กประกอบไปด้วยโมเลกุลยางที่มีทั้งน้ำหนักโมเลกุลต่ำและสูง โมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงคาดว่าจะเป็โมเลกุลที่มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเนื่องจากปริมาณเอสเทอร์ของไขมันที่วัดได้มีค่าน้อยในขณะที่โมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าน่าจะเป็นโมเลกุลที่มีการต่อเติมปิดปลายสายโซ่โมเลกุลแล้ว

นอกจากนี้ปริมาณเอสเทอร์ของไขมันที่สูงที่สุดประมาณ 5-6 โมลต่อหนึ่งสายโซ่สามารถวัดได้จากยางอนุภาคใหญ่ ในยางอนุภาคใหญ่ โมเลกุลยางเกือบทั้งหมดจะถูกต่อเติมด้วยบางหมู่ฟังก์ชันที่มีหมู่เอสเทอร์ของไขมันอยู่ด้วย นอกจากนี้จุดกำเนิดกึ่งก้านคาดว่าจะเกิดจากหมู่ที่ปลายสายโซ่นี้โดยการเข้าร่วมหรือการเกาะกลุ่มกันของหมู่นั้นเอง อย่างไรก็ตามค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนของยางอนุภาคใหญ่จะต่ำมากประมาณ $0.6-0.9 \times 10^5$ ผลที่ได้นี้มีความสำคัญในการเกิดกึ่งก้านโดยน่าจะเกิดจากยางที่มีโมเลกุลต่ำซึ่งถูกต่อเติมบางหมู่ที่มีเอสเทอร์ของไขมัน

ลักษณะการเกิดกึ่งก้านของยางอนุภาคเล็กและใหญ่สามารถยืนยันได้จากการวัดค่าความหนืดที่ความเข้มข้นเจือจางของสารละลายยางที่มีขนาดอนุภาคต่างๆ ค่า Huggins, K' เป็นค่าที่ใช้วัดความเป็นสายโซ่ที่มีกึ่งก้าน ค่า K' สูงบ่งชี้ถึงระดับความเป็นสายโซ่ที่มีกึ่งก้าน มีรายงานว่ายาง DPNR และ TE-DPNR มีค่า K' ประมาณ 0.57-0.59 ซึ่งสอดคล้องกับโมเลกุลที่มีกึ่งก้านและค่า K' 0.42-0.45 จะสอดคล้องกับโมเลกุลที่เป็นสายโซ่ตรง ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 6.1 ยางอนุภาคเล็กจะแสดงค่า K' ที่ต่ำกว่าที่ได้จากยางอนุภาคใหญ่ยกเว้นยางที่มีอนุภาคขนาด 244 nm ซึ่งจะให้ค่า K' ใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากยางอนุภาคใหญ่ เป็นที่น่าสังเกตว่ายางอนุภาคใหญ่จะแสดงค่า K' ที่สอดคล้องกับโมเลกุลที่มีกึ่งก้านซึ่งอยู่ค่าที่ได้อยู่ในช่วง 0.6-0.7 สามารถตั้งสมมติฐานว่ายางอนุภาคเล็กในน้ำยางจากต้นยางที่เจริญวัยแล้วจะประกอบด้วยโมเลกุลที่เป็นสายโซ่ตรงที่ไม่มีฟอสฟอลิปิดที่ปลายสายโซ่ ในขณะที่ยางอนุภาคใหญ่ที่ได้จากต้นยางที่เจริญวัยแล้วและยางอนุภาคเล็กที่ได้จากต้นกล้ายางจะเป็นโมเลกุลของโพลีไอโซพรีนที่ถูกปิดปลายสายโซ่ด้วยฟอสฟอลิปิดที่ทำให้เกิดจุดกำเนิดกึ่งก้าน นอกจากนั้นยังมีรายงานว่ายางอนุภาคเล็กจะมี rubber transferase activity สูงกว่าในยางอนุภาคใหญ่ จากผลที่ได้เหล่านี้สามารถสนับสนุนความคิดที่ว่ายางอนุภาคเล็กในน้ำยางที่ได้จากต้นที่เจริญวัยแล้วจะประกอบไปด้วยโมเลกุลที่เป็นสายโซ่ตรงซึ่งปลายสายโซ่มีความว่องไวต่อการเกิด

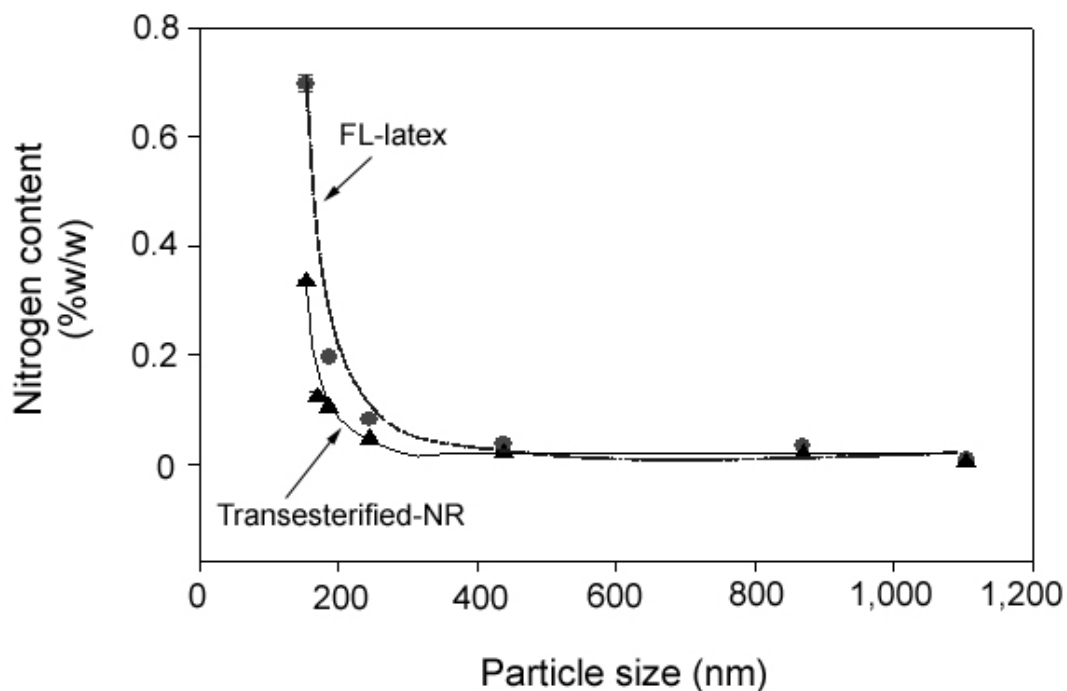
ปฏิกิริยาในการต่อเติมสายโซ่ต่อไปได้ ในทางตรงกันข้าม ยางอนุภาคใหญ่ถูกคาดว่าจะประกอบด้วยโมเลกุล
ยางที่ถูกปิดปลายด้วยหมู่ฟังก์ชันที่มีหมู่เอสเทอร์ของไขมัน เช่น พวกลิพิด เป็นต้น

ตารางที่ 6.1 $\bar{M}_n$ ปริมาณเอสเทอร์ ค่า Huggins' k' และปริมาณไนโตรเจนก่อนและหลังทำทรานเอสเทอร์รี
ฟิเคชัน (TE) ของยางอนุภาคขนาดต่างๆ กัน

ขนาดอนุภาค (nm)	$\bar{M}_n$ ($\times 10^5$)	ปริมาณเอสเทอร์ (mole/chain)	Huggins constant (k')	ปริมาณไนโตรเจน (%w/w)	
				ก่อนทำ TE	หลังทำ TE
153	0.86	3.13	0.48	0.686	0.335
169	2.17	0.78	0.43	0.195	0.105
187	1.53	2.34	0.59	-	0.124
244	1.11	5.39	0.69	0.082	0.046
438	0.64	5.67	0.47	0.036	0.021
869	0.92	2.23	0.62	0.035	0.019
1105	1.12	3.29	0.74	0.007	0.004

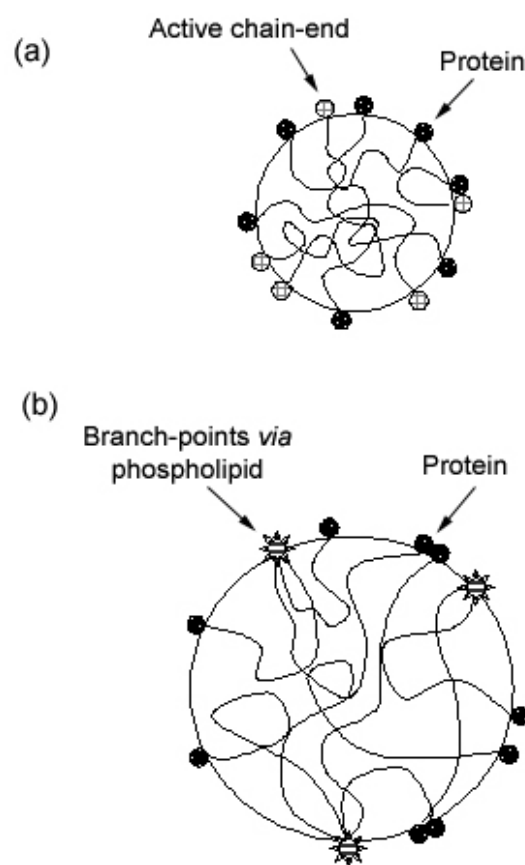
ปริมาณไนโตรเจนของยางที่ได้จากขนาดอนุภาคที่ต่างกันดังที่แสดงไว้ในรูปที่ 6.4 ยางอนุภาคเล็ก
จะแสดงค่าปริมาณไนโตรเจนสูงที่สุดประมาณ 0.7% w/w ปริมาณไนโตรเจนจะลดลงอย่างรวดเร็วจาก 0.7
เป็น 0.08% w/w เมื่อขนาดอนุภาคยางเพิ่มขึ้นในช่วงของยางอนุภาคเล็ก ในขณะที่ค่าจะค่อยๆ ลดลงในช่วง

ของยางอนุภาคใหญ่ ปริมาณไนโตรเจนแสดงถึงสารประกอบที่มีไนโตรเจนอะตอมที่ติดอยู่บนอนุภาคยางหรือโมเลกุลยาง โดยพิจารณาจากความเป็นจริงที่ว่าอนุภาคยางถูกชะล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวแล้วทำการปั่นแยกด้วยความเร็วสูง ซึ่งชี้ให้เห็นว่ายางอนุภาคเล็กจะมีสารประกอบที่มีไนโตรเจนอะตอมสูงกว่าในยางอนุภาคใหญ่ สารประกอบไนโตรเจนในยางธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นสารจำพวกโปรตีน จากผลการทดลองที่กล่าวข้างต้นชี้ให้เห็นว่าโปรตีนจะรวมอยู่กับยางอนุภาคเล็กในปริมาณที่มากกว่าในยางอนุภาคใหญ่ เป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงจนถึง 30-50% สามารถได้จากยางหลังการทำทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันในแต่ละขนาดอนุภาคยางดังแสดงไว้ในตารางที่ 6.1 ปฏิบัติการทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันจะย่อยสลายเอสเทอร์ของโมเลกุลไขมันและฟอสเฟต ในขณะที่ยังคงปริมาณโปรตีนที่ติดอยู่กับอนุภาคยางไว้ภายใต้สภาวะที่กล่าวข้างต้น การลดลงของปริมาณไนโตรเจนชี้ให้เห็นว่าการมีอยู่ของสารประกอบไนโตรเจนที่ปลายแอลฟา คือ พวกฟอสโฟลิปิดที่มีไนโตรเจน ซึ่งสมมติฐานนี้สามารถยืนยันได้จากการวิเคราะห์โครงสร้างของหมู่ฟังก์ชันที่ปลายแอลฟาด้วยเทคนิค ^{13}C - และ ^1H -NMR ที่มีความถี่สูง



รูปที่ 6.4 ปริมาณไนโตรเจน (%w/w rubber) ของยางที่มีขนาดอนุภาคต่างๆที่ได้จากการปั่นแยก

จากผลการทดลองที่ได้ สามารถที่จะสมมติว่ายางอนุภาคเล็กที่ประกอบไปด้วยโมเลกุลที่เป็นสายโซ่ตรงโดยส่วนมากจะมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและสูงซึ่งคาดว่าจะประกอบด้วยสายโซ่ที่ปลายมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาในการต่อเติมโมเลกุล ในทางตรงกันข้าม ยางอนุภาคใหญ่ส่วนมากจะประกอบไปด้วยโมเลกุลที่มีกิ่งก้าน จุดกำเนิดกิ่งก้านในยางอนุภาคใหญ่ถูกคาดว่าจะได้รับมาจากการเกาะกลุ่มกันของยางที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำโดยเกิดผ่านกลุ่มของฟอสโฟลิปิดบนผิวอนุภาคยาง โครงสร้างของโมเลกุลยางในยางอนุภาคเล็กและยางอนุภาคใหญ่ถูกสมมติขึ้นดังแสดงไว้ในรูปที่ 6.5



รูปที่ 6.5 สมมติฐานโครงสร้างของยาง (a) อนุภาคเล็ก และ (b) อนุภาคใหญ่ที่ได้จากน้ำยางสด

ขั้นตอนที่ 7 การศึกษาโครงสร้างของหมู่ปลายโอเมก้าของยางธรรมชาติโดยวิเคราะห์โครงสร้างทางโมเลกุลของยางโมเลกุลต่ำและโพลีพรีนอลที่ได้จากยางธรรมชาติรวมทั้งการวิเคราะห์หาจำนวนไนโตรเจนอะตอมต่อหนึ่งสายโซ่ของยางที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ

7.1 การวิเคราะห์โครงสร้างของปลายโอเมก้าของโพลีพรีนอล

ตัวอย่าง

- ส่วนล่างสุดที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางด้วยความเร็ว (Fresh bottom fraction)
- น้ำยางของต้น shootings (RRIM 600)
- โพลีพรีนอลมาตรฐาน เช่น farnesol, dolichol, polyprenol-18 and polyprenol-11

วิธีทดลอง

การแยกส่วนของไขมัน

ส่วนของไขมันและสารประกอบอื่นๆ สามารถแยกได้จากส่วนของยางใน fresh bottom fraction และจากยาง shootings ด้วยวิธีการตกตะกอนในยางที่ละลายในโทลูอีนด้วยเมทานอลหรืออะซีโตน ทำซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำส่วนของโทลูอีน-เมทานอลหรืออะซีโตนมาระเหยให้มีความเข้มข้นที่อุณหภูมิ 40°C แล้วทำให้แห้งด้วยการอบในสุญญากาศ ส่วนของไขมันที่แยกได้นำไปทำปฏิกิริยาด้วยเบสเข้มข้น 15% w/v KOH ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อกำจัดส่วนไขมันส่วนเกินออกจะได้ unsaponifiable lipid ซึ่งมีโพลีพรีนอลรวมอยู่ด้วย

การแยกโพลีพรีนอลออกจากส่วนของ unsaponifiable lipid ด้วยเทคนิค GPC และ silica gel column

จากการแยกน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันด้วยเทคนิค GPC โดยใช้สองคอลัมน์ที่มีขนาดรูพรุนต่ำกว่า 30,000 พบว่า สามารถแยก unsaponifiable lipids ของ fresh BF และ *Hevea* shootings ได้สองและสามตัวอย่างที่แตกต่างกันในน้ำหนักโมเลกุลตามลำดับ

นอกจากนี้การแยกผ่านคอลัมน์ (Silica gel 60G) โดยเพิ่มความเข้มข้นของไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซนจาก 0-30% v/v จากนั้นทำการเก็บสารที่ถูกชะออกมาแล้วนำวิเคราะห์ด้วย reverse-phase thin layer chromatography (RP-TLC) เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของโพลีฟีนอลในแต่ละแฟรกชันที่เก็บได้

7.2 การวิเคราะห์โครงสร้างของปลายโอเมก้าของยางที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

วิธีเตรียมตัวอย่าง

การสกัดยางจากใบยางพารา ต้นยางที่ออกใหม่ ต้นยางอ่อนและต้นเจริญวัย

ต้นยางอ่อน (young tree): เก็บตัวอย่างน้ำยางจากต้นยางอายุ 1 ปีของสายพันธุ์ RRIM600 และจากต้นยางอายุ 3 ปี ของสายพันธุ์ RRIT251 ซึ่งทำการเพาะที่สถาบันวิจัยยางจะเชิงเทรา ประเทศไทยโดยการกรีดบริเวณลำต้นและก้านด้วยคัตเตอร์ แล้วรองรับน้ำยางที่ไหลออกมาด้วยอะซีโตน จากนั้นทำการสกัดยางด้วยโทลูอีนอย่างน้อยสามครั้ง ส่วนที่สกัดได้จากโทลูอีนทำให้เข้มข้นด้วยการระเหยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วจึงตกตะกอนยางด้วยเมทานอล ยางที่ได้นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนใหม่ด้วยการละลายยางในโทลูอีนแล้วจึงตกตะกอนด้วยเมทานอลอย่างน้อยสามครั้ง จากนั้นจึงนำยางที่บริสุทธิ์แล้วไปทำให้แห้งด้วยการอบในสุญญากาศ ยางโมเลกุลต่ำของแต่ละต้นยางอ่อนได้รับจากการแยกตามน้ำหนักโมเลกุล

ใบยางจากต้นแก่และต้นอ่อน : เก็บใบยางแล้วล้างทำความสะอาดจากนั้นบดใบยางด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ ทำการสกัดสี ไขมันและสิ่งปนเปื้อนด้วยเอทานอลและอะซีโตน จากนั้นจึงทำการสกัดยางออกจากใบด้วยโทลูอีนหรือไซโคลเฮกเซน สารละลายยางที่สกัดได้ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการระเหยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสแล้วจึงตกตะกอนยางด้วยเอทานอล ยางที่ได้นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนใหม่ด้วยการละลายยางในโทลูอีนแล้วจึงตกตะกอนด้วยเอทานอลอย่างน้อยสามครั้ง จากนั้นจึงนำยางที่บริสุทธิ์แล้วไปทำให้แห้งด้วยการอบในสุญญากาศ

ต้นยางอายุมากกว่า 17 ปี (mature tree): เก็บตัวอย่างน้ำยางสดจากต้นยางพาราของสายพันธุ์ RRIM600 ด้วยการกรีดหน้ายาง แล้วให้น้ำยางไหลลงในภาชนะที่หล่อด้วยน้ำแข็งเพื่อรักษาน้ำยางและส่วนต่างๆ ในน้ำยางให้คงสภาพเดิม น้ำยางสดที่ได้นำมากรองด้วยผ้าก๊อตแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็วสูง

10,000 rpm 30 min then 19,000 rpm 60 min ซึ่งสามารถแยกส่วนของซีรัมและ bottom fraction ออกจากส่วนของอนุภาคยางได้ ยางที่ได้นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ต้นยางที่งอกใหม่ (shootings) : เก็บตัวอย่างยางโดยการกรีดที่ก้านและลำต้น จากนั้นทำการเก็บใส่ลงบีกเกอร์ที่มีเอทานอลอยู่เพื่อจับยางเนื่องจากยางที่ออกมาง่ายต่อการจับตัวเป็นอนุภาคเล็กๆ จากนั้นทำการปั่นเพื่อแยกเอาเอทานอลออก แล้วจึงละลายยางด้วยโทลูอีนและเติมสารป้องกันการเกิดออกซิไดซ์ (pyrogallol; 1,2,3-trihydroxybenzene) ทำการสกัดยางด้วยโทลูอีนประมาณสามครั้งโดยการปั่นแยกส่วนที่ละลายในโทลูอีน จากนั้นทำการระเหยเอาโทลูอีนออกที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วจึงตกตะกอนยางด้วยเมทานอล ยางที่ได้นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนใหม่ด้วยการละลายยางในโทลูอีนแล้วจึงตกตะกอนด้วยเมทานอลอย่างน้อยสามครั้ง จากนั้นจึงนำยางที่บริสุทธิ์แล้วไปทำให้แห้งด้วยการอบในสุญญากาศ

การเตรียมยางที่มีความบริสุทธิ์สูง

นำส่วนครีมนยางที่ละลายในน้ำที่มีสารลดแรงตึงผิวมาชะล้างด้วยการปั่นด้วยความเร็วรอบประมาณห้าครั้งตามด้วยการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์และการทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน นำยางจากการปั่นล้าง ยางที่ปราศจากโปรตีน (DPNR) และยางผ่านการทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน (TEDP) มาแยกน้ำหนักโมเลกุลต่ำโดยการแยกตามน้ำหนักโมเลกุลหรือการตกตะกอนย้อนกลับของสารละลายยางในโทลูอีนด้วยเมทานอล

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

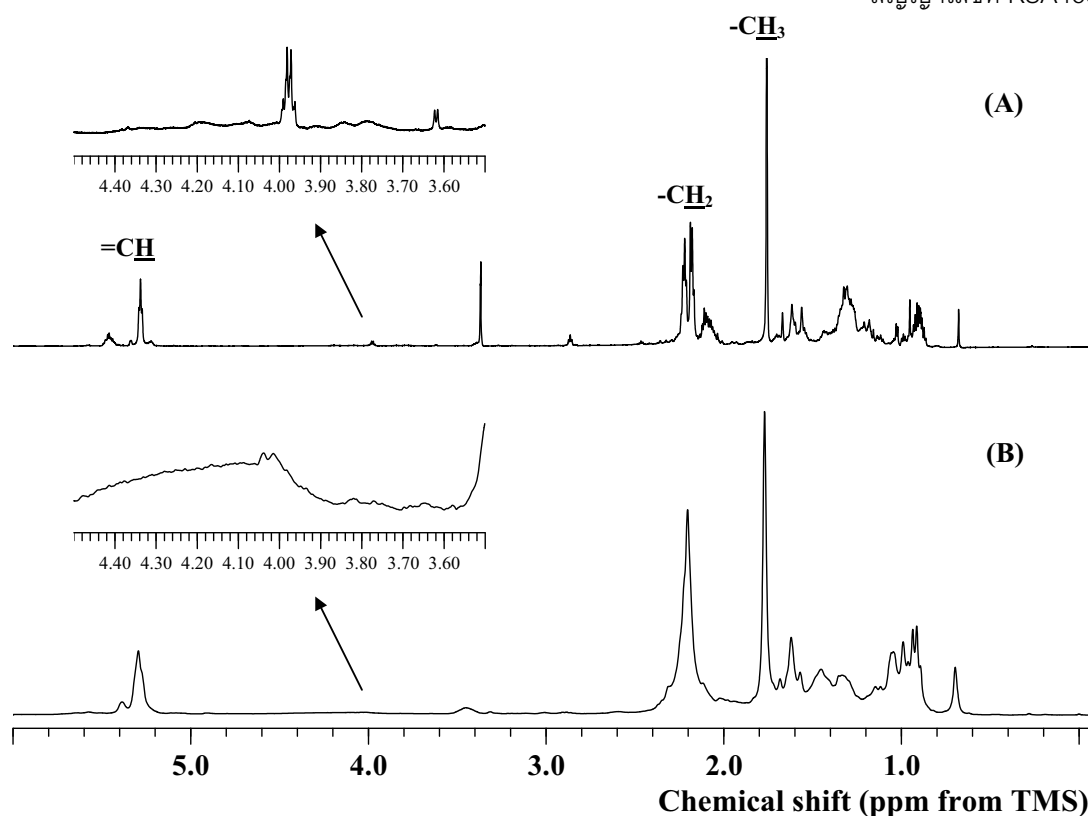
- วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่แยกได้ด้วยเทคนิค reverse-phase TLC และ normal-phase TLC
- วัดน้ำหนักโมเลกุลโดยเทคนิค GPC
- วัดโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR
- วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยเครื่อง Nitrogen analyzer

ผลการทดลองและวิเคราะห์การทดลองตอนที่ 7

7.1 การวิเคราะห์โครงสร้างของปลายโอเมก้าของโพลีพรีนอล

โพลีพรีนอลที่แยกได้จากการตกตะกอนยังสามารถตรวจสอบได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR จาก FTIR สเปกตรัมของส่วนไขมันที่แยกได้และส่วนที่เป็นยางที่ได้จาก fresh BF พบว่า ส่วนไขมันที่แยกได้แสดงตำแหน่งที่จำเพาะต่อหน่วยไอโซพรีนเทียบกับสเปกตรัมของส่วนที่เป็นยางที่ 1664 และ 835 cm^{-1} ซึ่งสอดคล้องกับ C=C stretching และ C-H bending ตามลำดับ นอกเหนือจากนั้น ส่วนไขมันยังแสดงตำแหน่งจำเพาะของโครงสร้างของสารประกอบ polyisoprenoid ที่ 1450 cm^{-1} (C-H deformation ของ $-\text{CH}_2$ และ $-\text{CH}_3$) และที่ 1360 cm^{-1} (C-H deformation ของ $-\text{CH}_3$) อย่างไรก็ตามส่วนไขมันที่แยกได้นี้มีปริมาณของไขมันมากกว่าปริมาณของสารประกอบ isoprenoid ซึ่งสังเกตได้จากค่าความเข้มของสัญญาณตำแหน่งที่ 1738 cm^{-1} ของ C=O ในสารประเภทไขมัน เพื่อที่จะทำการลดปริมาณไขมันที่มีอยู่ในสารตัวอย่างที่แยกได้ จึงได้ทำปฏิกิริยาดับเบส

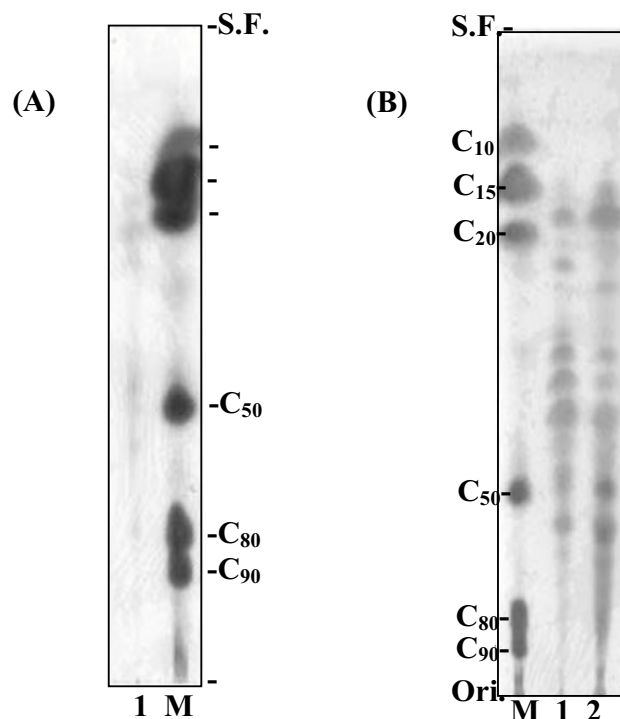
จากรูปที่ 7.1 แสดง $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ unsaponifiable lipid ของ *Hevea* shootings และ fresh BF พบว่าสารที่สกัดได้ทั้งสองชนิดแสดงสัญญาณจำเพาะต่อตำแหน่งของเมทิล เมทิลลีน และเมโทน์โปรตอนของ *cis*-isoprene unit ที่ 1.757, 2.219 และ 5.282 ppm ตามลำดับ ด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่ปลายสายโซ่ที่ 3.99-4.01 ppm ซึ่งบ่งชี้ว่า unsaponifiable lipids จะมีโพลีพรีนอลรวมอยู่ด้วยแต่ไม่มีสารประกอบ dolichol พิจารณาได้จากสัญญาณที่ 3.6 ppm มีรายงานว่า dolichol ถูกพบอยู่ในส่วนต่างๆ ของต้นยางพารา เช่น เมล็ด รากอ่อน ใบอ่อนและใบแก่ รวมทั้งต้นยางที่งอกใหม่ อย่างไรก็ตาม ปริมาณ dolichol ที่มีอยู่จะต่ำกว่าโพลีพรีนอลที่สะสมมากขึ้นเมื่อใบยางมีอายุมากขึ้น



รูปที่ 7.1 ^1H -NMR สเปกตรัมของ unsaponifiable lipids จาก (A) ต้นยางทีงอกใหม่ และ (B) ส่วนล่างสุดของการปั่น (fresh BF)

การกระจายของโมเลกุลโพลีฟีนอลที่มีความยาวโมเลกุลต่างกัน ใน unsaponifiable lipid ถูกตรวจวัดโดย reverse-phase TLC (RP-TLC) โดยใช้ อัตราส่วนของอะซีโตนในน้ำ 19:1 v/v เป็นตัวนำพา **รูปที่ 7.2** แสดงการกระจายของโมเลกุลโพลีฟีนอลที่มีความยาวโมเลกุลต่างกัน ใน unsaponifiable lipids ที่สกัดได้จากต้นยางทีงอกใหม่และ fresh BF พบว่า มีโพลีฟีนอลที่มีความยาวแตกต่างกัน คือ ในช่วง C_{10} - C_{30} , C_{45} - C_{60} และ $>\text{C}_{80}$ ใน unsaponifiable lipid จากต้นยางทีงอกใหม่ ส่วนโพลีฟีนอลที่สกัดได้จาก lipid และ unsaponifiable lipid ของ fresh BF พบการกระจายของโมเลกุลที่มีความยาว C_{15} - C_{70} ถึงแม้ว่าจะไม่สามารถบ่งชี้ว่าจุดที่เกิดจากการย้อมด้วยไอโอไดนเป็นโพลีฟีนอลเนื่องจากความสามารถในการตรวจวัดของไอโอไดนต่อสารประกอบอื่นๆ ที่มี double bond อย่างไรก็ตามมันถูกเชื่อว่าโพลีฟีนอลที่มีความยาว C_{50} - C_{80} พบอยู่ในยางของต้นยางทีงอกใหม่และ fresh BF คล้ายกับที่รายงานไว้ในเปเปอร์

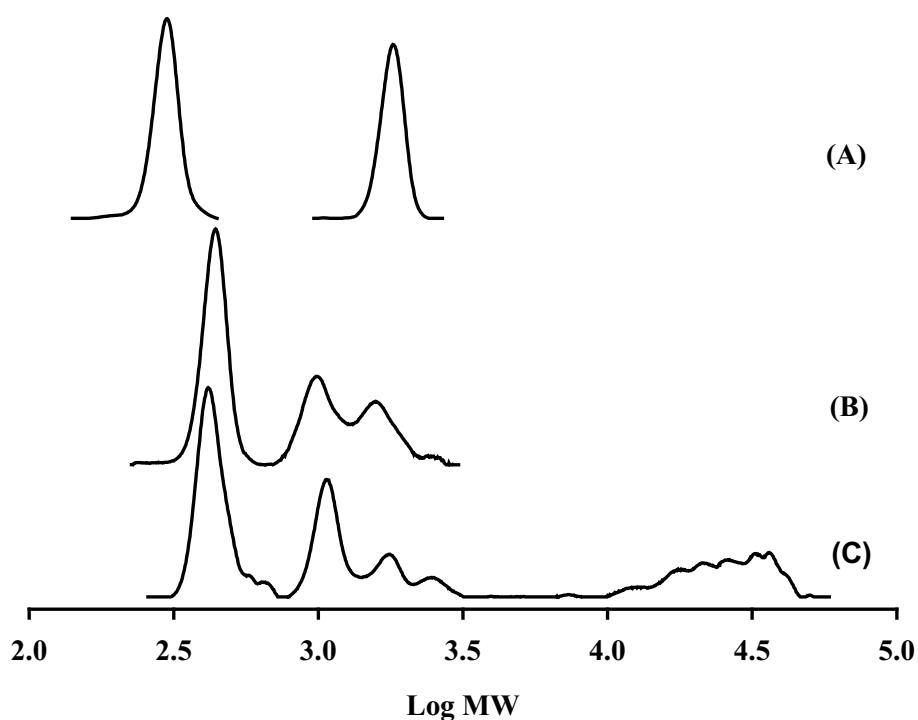
จากผลของ $^1\text{H-NMR}$ และ TLC พบว่า โพลีฟีนอลถูกแยกมาจากส่วนที่เป็นยางของต้นยางที่งอกใหม่หรือ fresh BF โดยการตกตะกอนในโทลูอีนด้วยเมทานอลหรืออะซีโตนตามด้วยการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยเบสเพื่อขจัดส่วนที่เป็นไขมันออกไป ปริมาณโพลีฟีนอลที่ได้สกัดได้จากต้นยางที่งอกใหม่ประมาณ 14.2% w/w ของยาง ในขณะที่ปริมาณที่สกัดได้จาก fresh BF ต่ำมากประมาณ 4.6% w/w ของยาง ซึ่งปริมาณโพลีฟีนอลที่ได้จาก fresh BF มีความไม่แน่นอนขึ้นกับลักษณะของ BF ที่แยกได้จากน้ำยางสด ปริมาณโพลีฟีนอลที่สูงสามารถได้รับการเติมตัวเริ่มต้นลงไปใน fresh BF อย่างไรก็ตาม ต้นยางที่งอกใหม่ให้ปริมาณโพลีฟีนอลสูงกว่าที่ได้จาก fresh BF ซึ่งอาจเนื่องมาจากแหล่งที่แตกต่างกัน เช่น การสกัดโพลีฟีนอลจากยางและ BF ที่ส่วนมากประกอบด้วยส่วนที่ไม่ใช่ยาง



รูปที่ 7.2 RP-TLC โครมาโตแกรมของ (A) ต้นยางที่งอกใหม่: แถวที่ 1 unsaponifiable lipid และ (B) fresh BF: แถวที่ 1 ส่วนที่เป็นไขมันทั้งหมด แถวที่ 2 unsaponifiable lipid และแถว M โพลีฟีนอลมาตรฐาน

➤ การแยกโพลีพรีนอลจาก unsaponifiable lipid ด้วยเทคนิค GPC

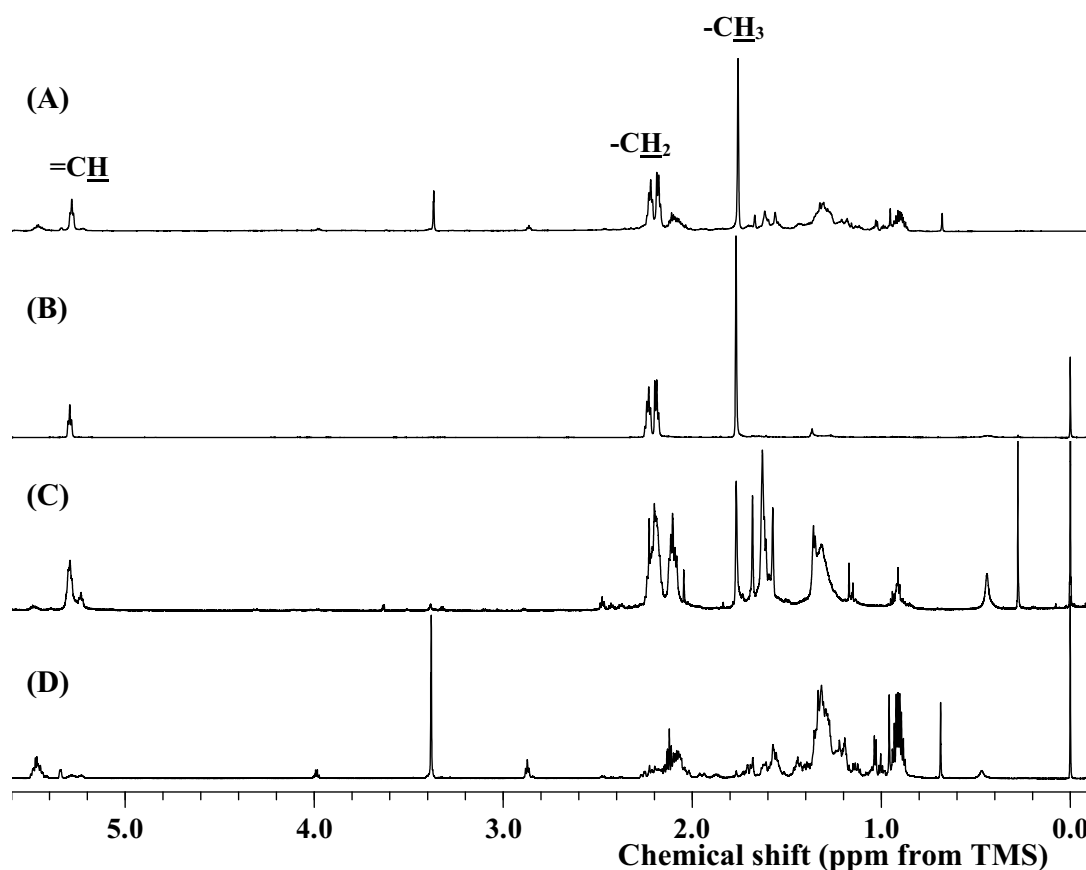
โพลีพรีนอลถูกแยกได้จาก unsaponifiable lipids ของทั้งต้นยางที่งอกใหม่และ fresh BF โดยเทคนิค GPC ที่ต่อด้วยสองคอลัมน์ที่มี exclusion limit ต่ำจนถึง 30,000 รูปที่ 7.3 แสดงการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของ unsaponifiable lipids ของต้นยางที่งอกใหม่และ fresh BF เมื่อเทียบกับโพลีพรีนอล-18 และฟาร์เนซอล มันสามารถที่จะเห็นได้ว่ามีอย่างน้อยสองช่วงของน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างที่ได้จากโพลีพรีนอลที่แยกได้จาก unsaponifiable lipids จากทั้งต้นยางที่งอกใหม่และ fresh BF เมื่อพิจารณาเทียบกับโพลีพรีนอล-18 น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนของ unsaponifiable lipids จากต้นยางที่งอกใหม่และ fresh BF โดยประมาณเท่ากับ 1269 และ 1209 ตามลำดับซึ่งสอดคล้องกับโพลีพรีนอลที่มีสายยาวมากกว่านั้น น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนที่ 431 และ 432 ของ unsaponifiable lipids จากต้นยางที่งอกใหม่และ fresh BF ตามลำดับ คาดว่าน่าจะเป็นโพลีพรีนอลที่มีสายสั้น ($\approx C_{20}$) อย่างไรก็ตาม ยางที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมาก ($\overline{M}_n = 2.32 \times 10^4$) ถูกพบใน unsaponifiable lipid จากต้นยางที่งอกใหม่ ซึ่งรวมอยู่กับโพลีพรีนอลโดยการตกตะกอนแต่สามารถแยกออกได้ภายหลังด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี



รูปที่ 7.3 การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของ (A) โพลีฟีนอลมาตรฐาน (โพลีฟีนอล-18 และ ทรานส์-ทรานส์-ฟาร์เนซิล) และ (B)-(C) unsaponifiable lipids จาก fresh BF และต้นยางที่งอกใหม่ตามลำดับ โดยเทคนิค GPC

ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น สองและสามน้ำหนักโมเลกุลที่แยกได้จาก unsaponifiable lipids ของ fresh BF และต้นยางที่งอกใหม่ตามลำดับ น้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ที่แยกได้จะถูกนำมาทำให้เข้มข้นและตรวจวัดความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ รูปที่ 7.4 แสดง $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสามน้ำหนักโมเลกุลที่แยกได้จาก สเปกตรัมของสามน้ำหนักโมเลกุลที่แยกได้จาก unsaponifiable lipids ของต้นยางที่งอกใหม่ด้วยเทคนิคการแยกด้วย GPC เปรียบเทียบกับสเปกตรัมที่ได้จากตัวอย่างก่อนทำการแยก จะเห็นอย่างชัดเจนว่าสัญญาณที่เฉพาะเจาะจงของหน่วยไอโซพรีนที่ 1.764, 2.219 และ 5.282 ppm ใน fraction ที่หนึ่งและสอง ส่วน fraction สุดท้าย ($\bar{M}_n = 431$) จะมีปริมาณของโพลีฟีนอลน้อย ในขณะที่ส่วนที่ไม่ใช่มียามากสังเกตได้จากสัญญาณที่ 0.8-1.4 ppm ซึ่งเป็นพวกไขมัน ในทางเดียวกัน fraction ที่หนึ่งของ unsaponifiable lipid ของ fresh BF ประกอบด้วยโพลีฟีนอล ในขณะที่ fraction สองมีปริมาณสิ่งเจือปน

มาก ดังนั้นโพลีฟีนอลที่แยกได้จากต้นยางที่งอกใหม่ (fraction 2) และ fresh BF (fraction 1) จะนำไปทำการวิเคราะห์โครงสร้างทางด้านปลายโอเมก้า รวมทั้งส่วนของยางน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่ได้จากต้นยางที่งอกใหม่



รูปที่ 7.4 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ (A) unsaponifiable lipids ของต้นยางที่งอกใหม่และ (B)-(D) สามแฟรกชัน คือ Fr. 1 ($\bar{M}_n = 2.32 \times 10^4$), Fr. 2 ($\bar{M}_n = 1.27 \times 10^3$) และ Fr. 3 ($\bar{M}_n = 431$) ตามลำดับ ที่ได้จากการแยกด้วยเทคนิค GPC ของสารตัวอย่าง (A)

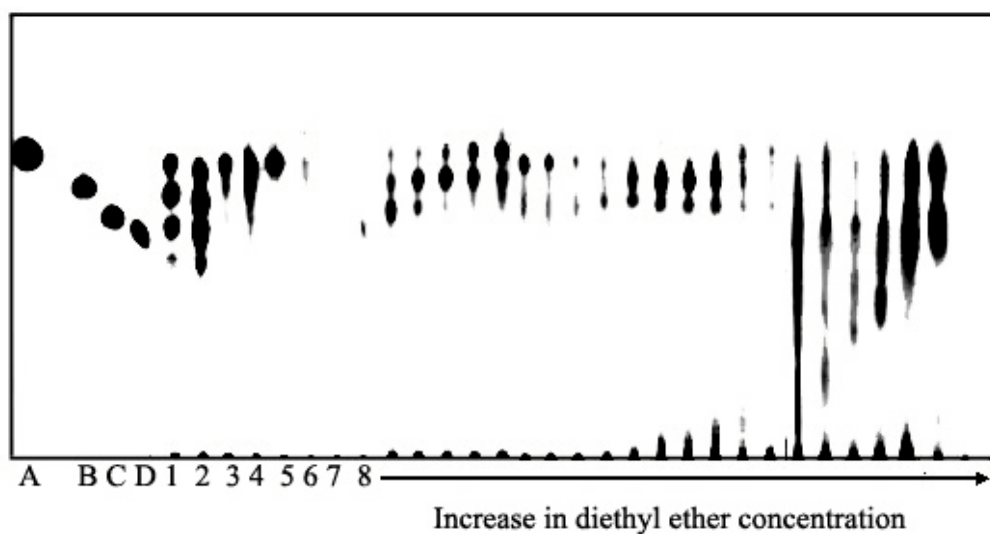
➤ การแยกโพลีฟีนอลจาก unsaponifiable lipid ด้วยคอลัมน์ Silica gel 60G

โพลีฟีนอลมีสมบัติการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่คล้ายคลึงกันกับในไขมัน มีรายงานว่าโพลีฟีนอลสามารถแยกได้จาก unsaponifiable lipids โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี คือ Silica gel column

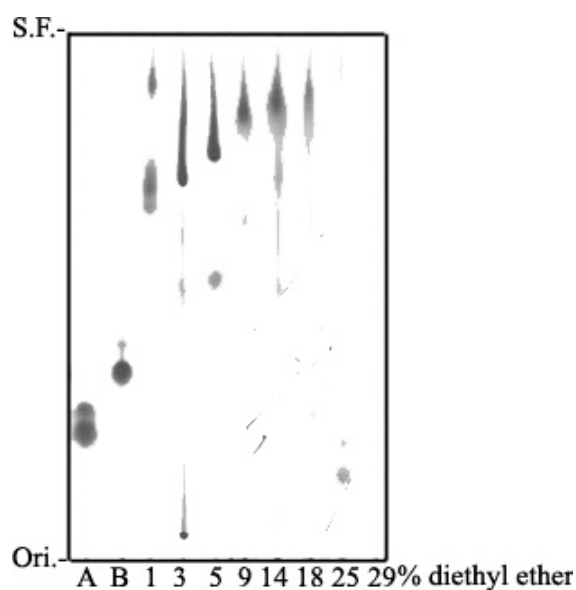
ดังนั้นจึงละลายส่วน unsaponifiable lipid ของ fresh BF ในเฮกเซนและโพลีดีมethylsiloxane Silica gel 60G เนื่องจากการละลายในควมมีขั้วต่างกัน สารประกอบแต่ละชนิดจะถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของไดเอทิล อีเทอร์จากความเข้มข้น 0-30% ในเฮกเซนและทำการตรวจวัดการมีอยู่ของโพลีฟีนอลด้วยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC จาก TLC โครมาโตแกรมของแต่ละแฟรกชันที่ถูกชะออกมาโดยใช้ตัวนำพาที่แตกต่างกันจะแสดงไว้ในรูปที่ 7.5

RP-TLC ที่ใช้ตัวนำพาผสมระหว่างอะซีโตนและเฮกเซนที่แสดงไว้ในรูปที่ 7.5 (A) จะให้ข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของโพลีฟีนอลที่มีความยาวต่าง ๆ สารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากซึ่งมีโมเลกุลที่ไม่มีขั้วจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ด้วยเฮกเซน โพลีฟีนอลโมเลกุลยาวที่มีความยาวต่าง ๆ กันจะถูกชะออกมาก่อนด้วยความเข้มข้นของไดเอทิล อีเทอร์ประมาณ 1-2% และ 3-5% ซึ่งสามารถสังเกตได้จากจุดยาวใกล้กับตำแหน่งของ solvent front ในรูปที่ 7.5 (B) อย่างไรก็ตาม แฟรกชันที่ถูกชะออกมาด้วยความเข้มข้นของไดเอทิล อีเทอร์ 1% ดูเหมือนว่าจะมีสารประกอบที่ไม่มีขั้วจากการพบจุดที่มีค่า Rf 0.32 ดังแสดงในรูปที่ 7.5 (C) ซึ่งบ่งชี้ว่าโพลีฟีนอลที่ได้จากชะด้วยความเข้มข้น 1-2% ไดเอทิล อีเทอร์ยังมีสารเจือปนจากเอสเทอร์อยู่มากไปกว่านั้น หลายโมเลกุลที่มีความยาวของโพลีฟีนอลในระดับกลางถูกชะออกมาด้วยความเข้มข้นประมาณ 9-23% ไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซน สารประกอบที่มีหมู่แอลกอฮอล์อิสระคาดว่าจะมีอยู่ในแฟรกชันของไดเอทิล อีเทอร์ที่มีความเข้มข้น 9-29% เมื่อเทียบกับโพลีไฮดรอกซีฟีนอยด์ที่มีหมู่แอลกอฮอล์ คือ ทรานส์-ทรานส์-ฟาร์เนซิล และโซลาเนซอลดังรูปที่ 7.5 (C) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแฟรกชันที่ได้จากความเข้มข้นของไดเอทิล อีเทอร์ 24-29% จะไม่มีโพลีฟีนอยด์ที่มีหมู่แอลกอฮอล์ จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC พบว่าโพลีฟีนอลมีอยู่ในแฟรกชันชะด้วยความเข้มข้นของไดเอทิลอีเทอร์ 1-23% ลักษณะของจุดที่คล้ายคลึงกันในแต่ละแฟรกชันถูกนำมารวมกัน คือ ที่ 1-2%, 3-5% และ 9-15% ไดเอทิลอีเทอร์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์โครงสร้าง ในขณะที่แฟรกชันที่ 6-8% ไดเอทิลอีเทอร์ไม่นำมาวิเคราะห์เนื่องจากมีปริมาณต่ำไม่เพียงพอต่อการวัด

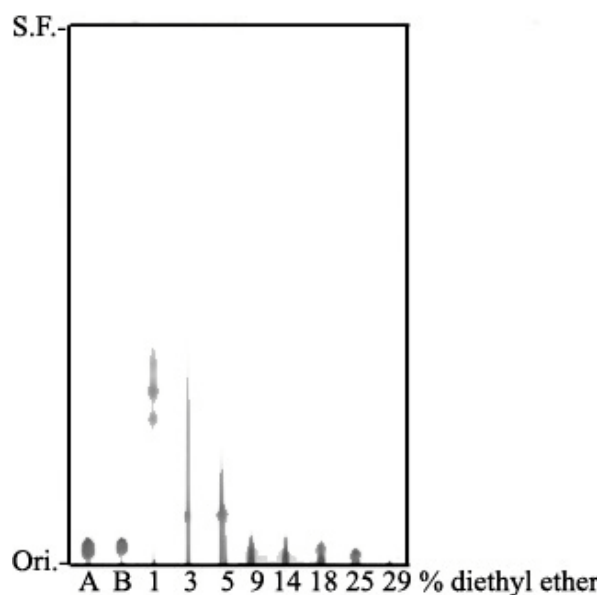
(A)



(B)



(C)

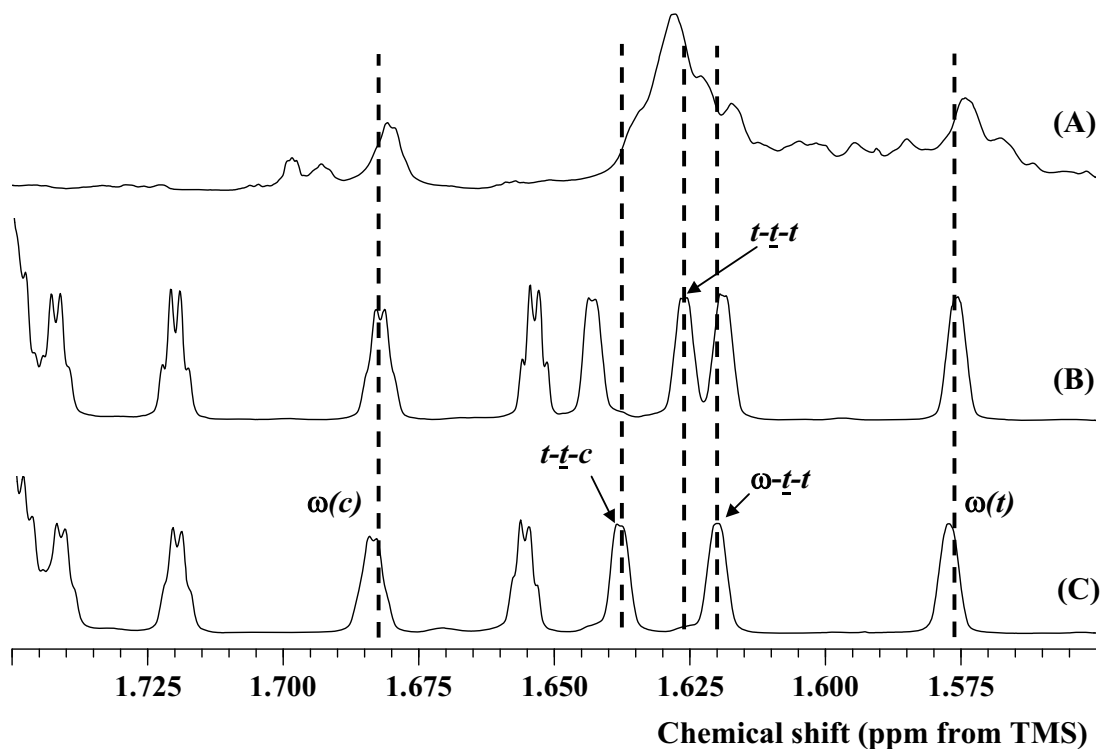


รูปที่ 7.5 TLC โครมาโตแกรมของแฟรกชันที่ชะออกมาจากคอลัมน์ Silical gel 60G โดยใช้ RP-TLC ด้วย
ตัวนำพา (A) เฮกเซนและอะซีโตนในอัตราส่วน 9:1, v/v และใช้ TLC ด้วย (B)-(C) โทลูอินและ
เอทิลแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน 9:1, v/v และ โทลูอินกับเฮกเซนในอัตราส่วน 1:1, v/v ตามลำดับ
แถบ A: ทรานส์-ทรานส์-ฟาร์เนซิล (C15), B: โซลานะซอล (C45), C: โพลีฟีนอล-17 (C85) และ D: โป
ลีฟีนอล-19 (C95)

➤ วิเคราะห์โครงสร้างของปลายโอเมก้าในโพลีพรีนอลจากยางธรรมชาติ

โพลีพรีนอลที่ได้จาก fresh BF

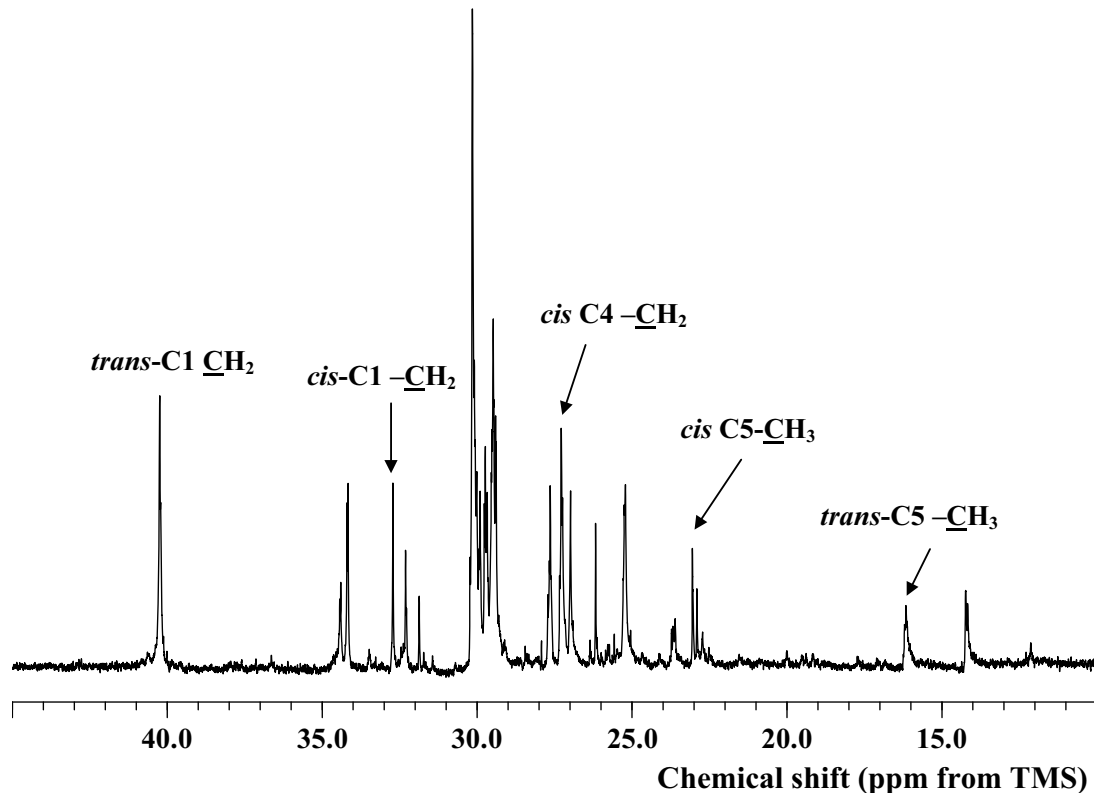
ดังที่ได้กล่าวข้างต้น แพรกชั้นแรกที่ได้ unsaponifiable lipid ของ fresh BF ด้วยเทคนิคการแยกโดย GPC จะมีโพลีพรีนอลเป็นองค์ประกอบ ซึ่งจะพบสัญญาณของเมทิลโปรตอนในหมู่ไดเมทิลแอลลิลในรูปทรานส์และซิสที่ตำแหน่ง 1.574 และ 1.681 ppm ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสัญญาณของโพลีพรีนอล-11 และโพลีพรีนอล-18 ดังแสดงในรูปที่ 7.6 มากกว่านั้น สัญญาณกว้างที่ 1.628 ppm ถูกคาดว่าเป็นสัญญาณของเมทิลโปรตอนในหมู่ทรานส์ไอโซพรีน



รูปที่ 7.6 เมทิลโปรตอนของ (A) โพลีพรีนอล (Fr. 1) ของ unsaponifiable lipid จาก fresh BF ที่แยกได้ด้วยเทคนิค GPC, (B) โพลีพรีนอล-11 และ (C) โพลีพรีนอล-18

ในทางตรงกันข้าม สัญญาณเนื่องจากหมู่ไดเมทิลแอลลิลไม่สามารถตรวจวัดได้ที่ตำแหน่ง 17.6 ppm ของ ^{13}C -NMR สเปกตรัมดังแสดงไว้ในรูปที่ 7.7 มากกว่านั้น สัญญาณเนื่องจากหมู่ C1-CH_2

ในทรานส์ไอโซพรีนมีความเข้มข้นของสัญญาณสูงมากเมื่อเทียบกับสัญญาณของซิสไอโซพรีนและ C5-CH₃ ในทรานส์ไอโซพรีน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการรบกวนสัญญาณจากสารเจือปน



รูปที่ 7.7 ¹³C-NMR สเปกตรัมของโพลีพรีนอลจาก fresh BF ที่แยกได้ด้วยเทคนิค GPC

เพื่อที่จะจัดสิ่งปนเปื้อนในสารตัวอย่าง โพลีพรีนอลที่ได้จาก unsaponifiable lipids ของ fresh BF ถูกแยกโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี สามแฟรกชันคือ 1-2%, 3-5% และ 9-15% ไดเอทิลอีเทอร์ ที่ได้จากการแยกโพลีพรีนอลจาก unsaponifiable lipid ของ fresh BF ด้วย Silica gel 60G column ดังที่ได้อธิบายไว้แล้วนำมาทำการวิเคราะห์โครงสร้าง ในที่นี้โพลีพรีนอลที่ชะด้วยความเข้มข้นของไดเอทิลอีเทอร์ 1-2%, 3-5% และ 9-15% จะแทนด้วย Fr. 1, 2 และ 3 ตามลำดับ รูปที่ 7.7 แสดง ¹H-NMR สเปกตรัมของสามแฟรกชันจาก fresh BF ที่ได้หลังจากผ่านคอลัมน์ Silica gel 60G มันเห็นได้ชัดว่าแฟรกชันเหล่านี้มีสารที่มีไอโซพรีนซึ่งแสดงสัญญาณของเมทิล เมทิลีน และเมไทน์โปรตอน สังเกตได้ว่าสัญญาณจากสารปนเปื้อนที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบมีความเข้มที่ลดลงและไม่เห็นสัญญาณที่ตำแหน่ง 0.8-1.4 ppm