บทความวิจัย

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำในยางธรรมชาติและผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีโมดิฟายด์ลาวรีชนิดรวดเร็ว

สายรุ้ง อวยพรกชกร* และ ขวัญจิตต์ เหมะวิบูลย์

บทคัดย่อ

โปรตีนในยางพารามักก่อให้เกิดอาการแพ้ในผู้ใช้งานจึงมีความจำเป็นในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโมดิฟายด์ลาวรีเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง ในงานวิจัยนี้โปรตีนที่ละลายได้จากน้ำยางข้นถูกสกัดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนเข้มข้น 2.5 เท่าด้วยเครื่องไมโครเวฟในครัวเรือนที่กำลังไฟฟ้า 560 วัตต์ เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ทำปฏิกิริยากับสารละลายทองแดง(II) สารละลายฟอลิน-ซิโอแคลตูรีเอเจนต์ โดยมีสารละลายโพแทสเซียมแอนติโมนีทาร์เทรตเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดสารเชิงซ้อนสีน้ำเงินและตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 746 นาโนเมตรได้ในช่วงความเข้มข้น 0.05-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 0.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเทคนิคนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้วิเคราะห์ในตัวอย่างน้ำยางข้นและผลิตภัณฑ์ได้

คำสำคัญ: โปรตีน โมดิฟายด์ลาวรี สเปกโทรโฟโตเมตรี

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: sairoongo@nu.ac.th

The Determination of Water Soluble Protein from Natural Rubber Latex and Products by the Rapid Modified Lowry Method

Sairoong Ouypornkochagorn* and Khuanjit Hemavibool

ABSTRACT

Proteins in the natural rubber latex generally lead to allergic reaction in sensitive users. The determination of protein content in condensed rubber latex is crucial. The modified Lowry method was selected to determination of protein content in the samples. The soluble protein from latex was extracted with 2.5X phosphate buffer saline by a household microwave machine at 560 W for 60 minutes. Then these solutions were reacted with copper(II), Follin-Ciocalteu's reagent and potassium antimony tartrate as a catalyst. A blue complex was generated and detected at 746 nm. The dynamic range was 0-100 microgram/milliliter, the limit of detection was 0.05 microgram/milliliter, and the limit of quantification was 0.16 microgram/milliliter. This effective method can be applied for the determination of proteins in condensed rubber and its products.

Keywords: Protein, Modified Lowry, Spectrophotometry

Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University

*Corresponding author, e-mail: sairoongo@nu.ac.th

บทนำ

ผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ ได้แก่ ลูกโป่ง ถุงมือ ถุงยางอนามัยมีการใช้แพร่หลายทั่วโลก ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีข้อด้อยเนื่องจากมีผู้ใช้งานบางกลุ่มเกิดอาการแพ้โปรตีนที่อยู่ในยางพารา [1-3] ดังนั้นจึงมีความพยายามในการสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นและผลิตภัณฑ์จากยางพารา แล้ววิเคราะห์ด้วยวิธีโมดิฟายด์ลาวรีที่ความยาวคลื่น 745 นาโนเมตร โดยสารละลายฟอลินทำปฏิกิริยากับพันธะเปปไทด์จากโปรตีนเกิดสารเชิงซ้อนสีน้ำเงินเข้ม [4, 5] นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเติมสารละลายโพแทสเซียมแอนทิโมนีทาร์เทรต ($K(SbO)C_4H_4O_6$) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเกิดปฏิกิริยาฟอสฟอโมลิบเดทโดยไม่ต้องมีการให้ความร้อน [6-8] และมีงานวิจัยหลายงานวิจัยศึกษาการสกัดหาปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำ เช่น การสกัดโปรตีนชนิด Hev b1 และ Hev b3 จากน้ำยางสดด้วยสารละลายผสมระหว่าง ไทรทันเอ็กซ์-100 (TritonX-100) 0.1% และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตหรือเอสดีเอส (Sodium dodecyl sulfate, SDS) 1% แล้วทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 60,000 xg ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 45 นาที ในขณะที่ Hev b2 สามารถสกัดได้ด้วยสารละลายผสมระหว่าง Tris-HCl pH 7.4 50 มิลลิโมลาร์ และไททันเอ็กซ์-100 (TritonX-100) 0.2% นอกจากนี้ยังพบว่า Hev b1 สามารถสกัดได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS) pH 1N4 [9] ในขณะที่ตั้งบริบูรณ์และคณะพบว่า โปรตีนสามารถสกัดได้ด้วย $CaCl_2$ และ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ที่ 25 ± 5°C เป็นเวลา 120 นาที แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธีโมดิฟายด์ลาวรี [10] ในขณะที่ด่านวานิชกุลเลือกใช้โพลีเอทิลีนไกลคอลในการสกัดโปรตีนจากหางน้ำยางด้วยความเร็วต่ำในเวลา 30 นาที [11] ส่วนวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์โปรตีนที่ละลายน้ำในน้ำยางและผลิตภัณฑ์จากน้ำยางด้วยวิธีโมดิฟายด์ลาวรี (ASTM D5712-10) ทำการสกัดโปรตีนจากผลิตภัณฑ์จากยางพาราด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (พีบีเอส, PBS) ซึ่งพบว่าใช้เวลา 120 นาทีสำหรับการสกัดและใช้เวลาอย่างน้อย 45 นาทีสำหรับการเกิดสารเชิงซ้อนสีน้ำเงินเข้มสำหรับการวัดด้วยเทคนิคโมดิฟายด์ลาวรี [4] ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาในงานที่ผ่านมา พบว่า โปรตีนสามารถสกัดได้ด้วยสารละลาย PBS โดยมีเครื่องไมโครเวฟในครัวเรือนช่วย [12] ซึ่งพบว่า โปรตีนจากน้ำยางข้นสามารถสกัดออกมาภายในเวลา 60 นาที ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องการพัฒนาวิธีวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโมดิฟายด์ลาวรีให้มีความรวดเร็ว โดยการเติมสารละลายโพแทสเซียมแอนทิโมนีทาร์เทรต ($K(SbO)C_4H_4O_6$) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แล้วนำมาประยุกต์ใช้กับสารตัวอย่างน้ำยางข้นและถุงมือยางพารา

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้ประกอบด้วย เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น BSA224S-CW) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงชนิดลำแสงคู่ (Jusco รุ่น V-650) เครื่องไมโครเวฟครัวเรือน (Sharp รุ่น R-687P) เครื่องผสมสาร (Ika) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hermle รุ่น Z206A) เป็นต้น

วิธีการทดลอง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์โปรตีนที่มีการเติมสารละลายโพแทสเซียมแอนทิโมนี-ทาร์เทรต

ปิเปตสารละลายมาตรฐานโปรตีนโบวีนเซรั่มอัลบูมิน (BSA) 100 µg/mL จำนวน 1.2 mL ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายต่างๆ ดังต่อไปนี้ Na_2CO_3 0.21 mol/L, NaOH 0.11 mol/L, $Na_2C_4H_4O_6$ 8 mmol/L และ $K(SbO)C_4H_4O_6$ 0.8 mmol/L และ $CuSO_4$ 2 mmol/L แล้วจึงปรับปริมาตรแต่ละหลอดทดลองเป็น 2.2 mL ด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาไบยูเร็ตอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเติมสารละลายฟอลิน-ซิโอแคลตู 12% v/v เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีสำหรับการเกิดปฏิกิริยาลาวรีอย่างสมบูรณ์ แล้วนำสารละลายมาตรฐาน BSA มาวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 400-800 nm ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer เพื่อหาความยาวคลื่นที่สารละลายมาตรฐาน BSA ดูดกลืนแสงสูงสุด โดยทำการเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ASTM-D5712-10 [4] (ไม่มีการเติมสารละลาย $K(SbO)C_4H_4O_6$) โดยทำการปิเปตสารละลายมาตรฐานโปรตีนโบวีนเซรั่มอัลบูมิน (BSA) 100 µg/mL ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย Na_2CO_3, NaOH, $Na_2C_4H_4O_6$ และ $CuSO_4$ ความเข้มข้นเดียวกับการเติมสารละลาย $K(SbO)C_4H_4O_6$ แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายฟอลิน-ซิโอแคลตู 12% v/v เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีแล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับวิธีที่มีการเติมสารละลายโพแทสเซียมแอนทิโมนีทาร์เทรตหลังจากนั้นศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายต่างๆ และหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาไบยูเร็ตและปฏิกิริยาลาวรีสำหรับการศึกษาหาปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิคโมดิฟายด์ลาวรีที่มีการเติมสารละลายโพแทสเซียมแอนทิโมนีทาร์เทรต แล้วสร้างกราฟมาตรฐานและขีดจำกัดการตรวจวัด (L.O.D.) และขีดจำกัดหาปริมาณ (L.O.Q.) ด้วยสมการ L.O.D. = $3S_a/b$ และ L.O.Q. = $10S_a/b$ เมื่อ S_a คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณที่วัดได้ และ b คือ ความชันของกราฟมาตรฐาน [13]

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากตัวอย่างน้ำยางข้นและถุงมือยางพารา

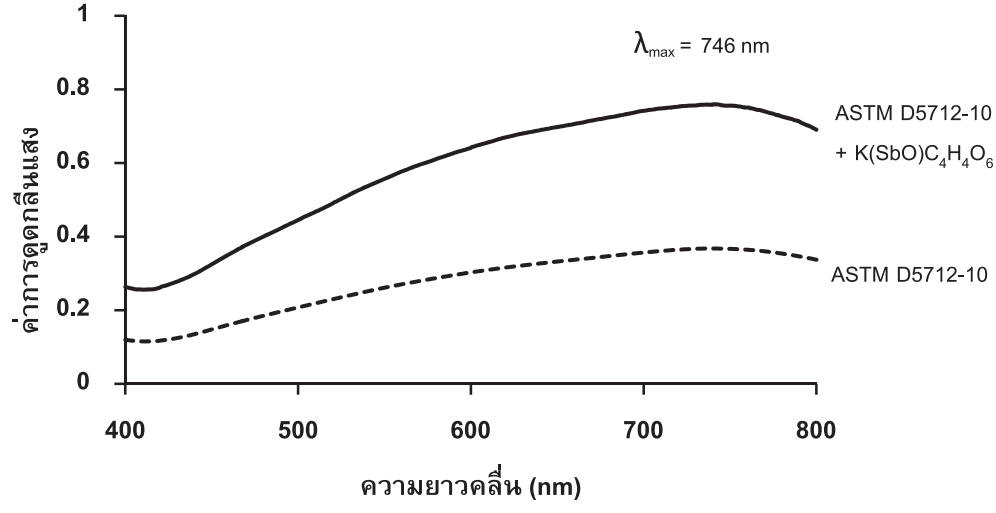
ตัดตัวอย่างถุงมือยางพาราให้มีขนาดประมาณ 4-6 มม. แล้วล้างแป้งออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วชั่งตัวอย่างน้ำยางข้นและถุงมือยางพารามา 0.5 g ด้วยเครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ใส่ลงในหลอดเซนติฟิวส์พลาสติกขนาด 50 mL จากนั้นเติมสารละลาย PBS 2.5 เท่า จำนวน 5 mL แล้วนำไปใส่ในกล่องมีฝาปิดที่มีน้ำบรรจุอยู่ นำเข้าเครื่องไมโครเวฟในครัวเรือนด้วยกำลังไฟฟ้า 560 W เป็นเวลา 20 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ทำการแยกน้ำเซรั่มออกจากเนื้อยาง

สำหรับการวิเคราะห์ด้วยการตกตะกอนทำโดยปิเปตน้ำเซรั่มที่สกัดได้จากตัวอย่างถุงมือยางพาราและน้ำยางข้น จำนวน 2 mL ใส่ลงในหลอดเซนติฟิวส์พลาสติกขนาด 50 mL เติมสารละลายดีออกซีคอเลท (DOC) จำนวน 200 µL และเติมสารละลายผสมกรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) กับสารละลายกรดฟอสฟอทังสติก (PTA) (1:1) ปริมาตร 400 µL เพื่อตกตะกอนโปรตีน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 rpm เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนของโปรตีนด้วย NaOH ปริมาตร 4 mL แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่มีการเติมสารละลายโพแทสเซียมแอนทิโมนีทาร์เทรตด้วยวิธีกราฟมาตรฐานและการเติมสารมาตรฐาน

ผลการทดลอง

การศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์โปรตีนที่มีการเติมสารละลายโพแทสเซียมแอนทิโมนีทาร์เทรต

นำสารละลายมาตรฐาน BSA 100 μg/mL ผสมกับสารละลายโมดิฟายด์ลาวรีทั้งที่มีและไม่มีการเติมสารละลายโพแทสเซียมแอนทิโมนีทาร์เทรต ($K(SbO)C_4H_4O_6$) แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายฟอลิน-ซิโอแคลตู 50%v/v ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที (ตามวิธีมาตรฐาน ASTM D5712-10) [4] แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 400-800 nm ได้ผลดังรูปที่ 1 ซึ่งพบว่า การเติมสารละลาย $K(SbO)C_4H_4O_6$ สามารถเร่งการเกิดสีให้เกิดเร็วขึ้นและมีค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนเพิ่มขึ้น เนื่องจากแอนทิโมนีทาร์เทรตเกิดปฏิกิริยากับสารละลายโมลิบดีนัมบลูเกิดโมลิบโดแอนทิโมนิลฟอสเฟต $(PSb_2Mo_{10}O_{40})^{3-}$ [14] ซึ่งทำให้ปฏิกิริยาการเกิดสารเชิงซ้อนเร็วขึ้น แล้วจึงเกิดสารเชิงซ้อนกับโปรตีน [15] โดยมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 746 nm เช่นเดียวกับสารละลายโปรตีนที่ไม่มีแอนทิโมนี-ทาร์เทรต

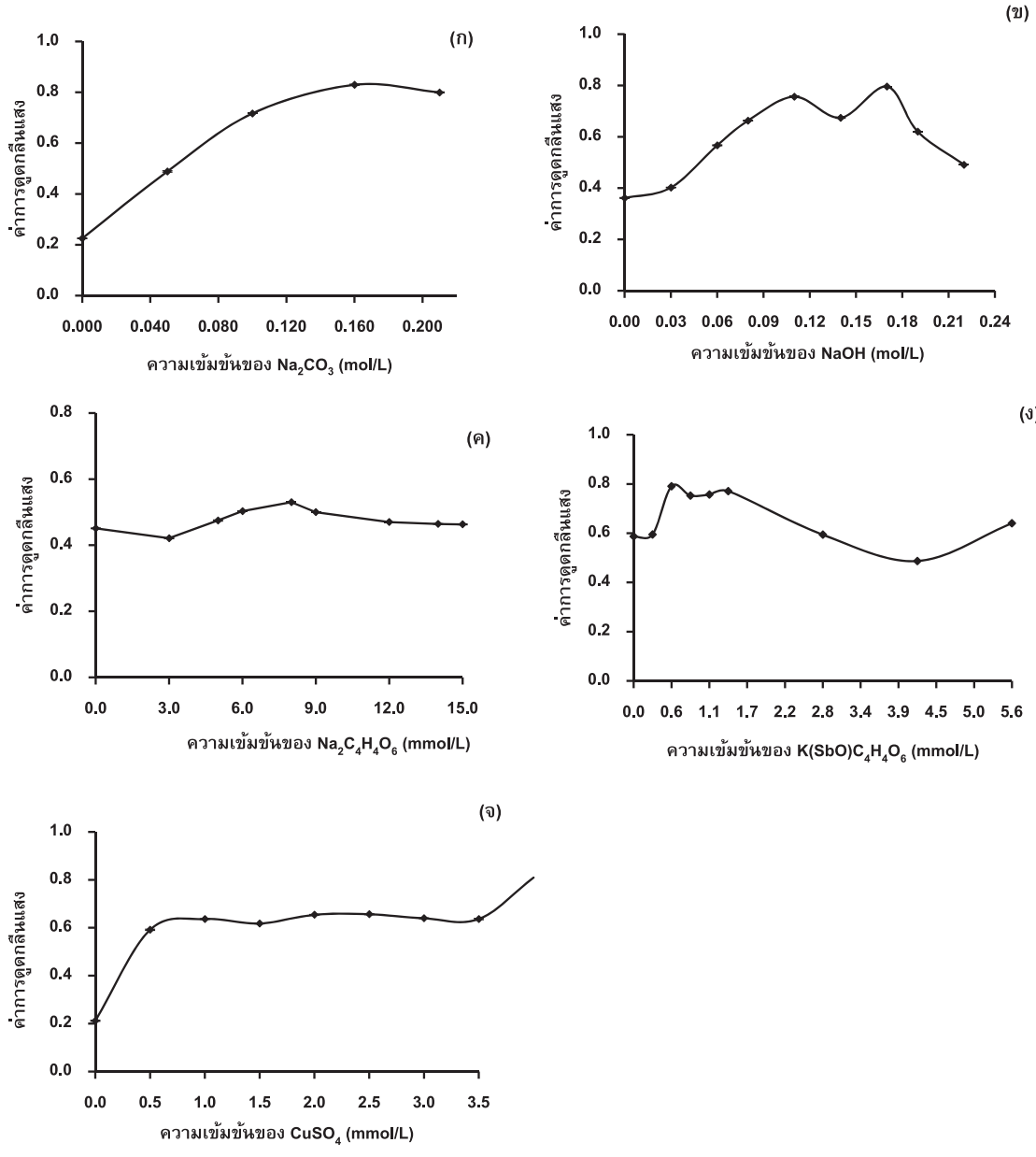


รูปที่ 1 การดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน BSA 100 μg/mL ด้วยวิธีโมดิฟายด์ลาวรี เมื่อไม่มีการเติมสารละลาย $K(SbO)C_4H_4O_6$ (เส้นประ) และเติมสารละลาย $K(SbO)C_4H_4O_6$ (เส้นทึบ)

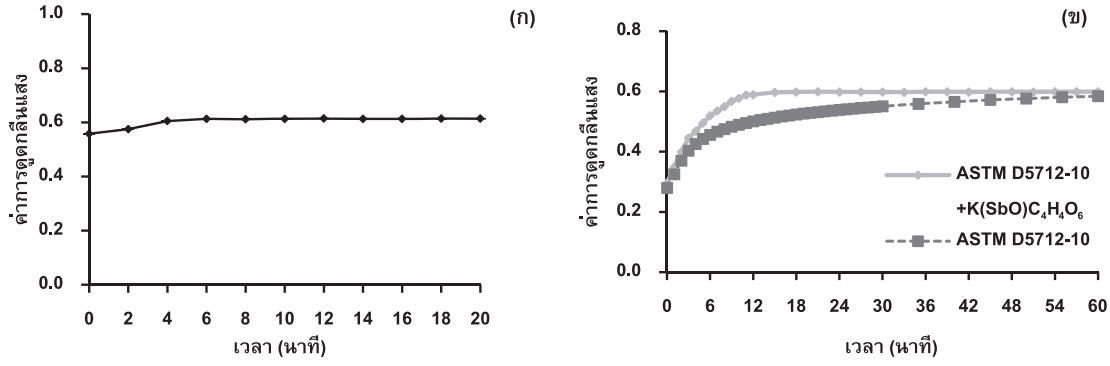
การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโมดิฟายด์ลาวรีที่มีการเติมสารละลายโพแทสเซียมแอนทิโมนีทาร์เทรต

เมื่อนำสารละลายมาตรฐาน BSA 100 μg/mL ผสมกับสารละลายโมดิฟายด์ลาวรีที่มีการเติมสารละลาย $K(SbO)C_4H_4O_6$ โดยทำการศึกษาความเข้มข้นของ Na_2CO_3 NaOH $Na_2C_4H_4O_6$ $K(SbO)C_4H_4O_6$ และ $CuSO_4$ ซึ่งเป็นขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาไบยูเร็ต และเติมสารละลายฟอลิน-ซิโอแคลตู ได้ผลดังรูปที่ 2 รวมทั้งศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในเกิดปฏิกิริยาไบยูเร็ตและลาวรี แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 746 nm ได้ผลดังรูปที่ 3 จากรูปที่ 2(ก) พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Na_2CO_3

ในสารละลายโมดิฟายด์ลาวรีที่มีการเติมแอนทิโมนีทาร์เทรต คือ 0.160 mol/L จากรูปที่ 2(ข) พบว่า NaOH มีผลต่อสภาพของสารเชิงซ้อนโปรตีนที่เกิดขึ้น โดยเมื่อความเข้มข้นของ NaOH มากขึ้นสารเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจะเกิดตะกอนของ $Sb(OH)_3$ [16] หรือโปรตีนเกิดการเสียสภาพในสภาวะเบส ทำให้โปรตีนตกตะกอนลงมา [16] ดังนั้นความเข้มข้นของ NaOH ที่เหมาะสม คือ 0.11 mol/L และจากรูปที่ 2(ค) พบว่าความเข้มข้นของทาร์เทรตไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสงของโปรตีน BSA ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นตามวิธีมาตรฐาน คือ 8 mmol/L ส่วนรูปที่ 2(ง) พบว่า ถ้าเติม $K(SbO)C_4H_4O_6$ มากเกินไป สารตัวอย่างจะขุ่นจากการตกตะกอนของ Sb ในรูปของ $Sb(OH)_3$ [16] ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของ $K(SbO)C_4H_4O_6$ คือ 0.6 mmol/L ส่วนรูปที่ 2(จ) พบว่า ความเข้มข้นของ $CuSO_4$ ที่เหมาะสม คือ 1.0 mmol/L โดยพบว่า การเติมสารละลาย $CuSO_4$ ลงไปมากเกินไป (ความเข้มข้นมากกว่า 3.5 mmol/L) จะเกิดการตกตะกอนของ $Cu(OH)_2$ และเมื่อพิจารณาระยะเวลาทั้งในขั้นตอนการเกิดสารเชิงซ้อนในปฏิกิริยาไบยูเร็ตและปฏิกิริยาลาวรี พบว่า ในรูปที่ 3(ก) การเติม $K(SbO)C_4H_4O_6$ ทำให้เกิดปฏิกิริยาไบยูเร็ตทันที ปฏิกิริยาเกิดได้อย่างรวดเร็วตั้งแต่เริ่มศึกษา ซึ่งรวดเร็วกว่าวิธีมาตรฐาน ASTM D5712-10 [4] ซึ่งต้องตั้งให้เกิดปฏิกิริยาไบยูเร็ตสมบูรณ์เป็นเวลา 15 นาที ดังนั้นการเติมสารละลายแอนทิโมนีทาร์เทรตในการทดลองนี้ทำให้โปรตีนเกิดปฏิกิริยาไบยูเร็ตได้รวดเร็วขึ้น ในขณะที่รูปที่ 3(ข) พบเช่นกันว่า การเติม $K(SbO)C_4H_4O_6$ ทำให้ปฏิกิริยาลาวรีเกิดได้รวดเร็วขึ้น และการดูดกลืนเริ่มคงที่หลังจากตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ในขณะที่วิธีมาตรฐานการดูดกลืนแสงจะเริ่มคงที่หลังจากตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที ดังนั้นการทำปฏิกิริยาของโปรตีนกับสารละลายโมดิฟายด์ลาวรีที่มีการเติมสารละลายแอนทิโมนีทาร์เทรตจึงใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 15 นาที ในขณะที่วิธีมาตรฐาน ASTM D5712-10 ใช้เวลาทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 45 นาที



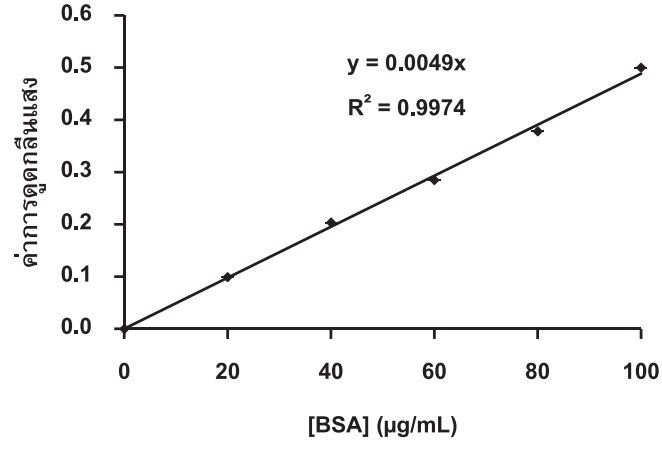
รูปที่ 2 อิทธิพลของความเข้มข้นของ (ก) Na_2CO_3 (ข) NaOH (ค) $Na_2C_4H_4O_6$ (ง) $K(SbO)C_4H_4O_6$ และ (จ) $CuSO_4$ ที่มีต่อการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน BSA 100 µg/mL ด้วยวิธีโมดิฟายด์ลาวรีที่มีการเติมสารละลายโพแทสเซียมแอนทิโมนีทาร์เทรต (n=3)



รูปที่ 3 ระยะเวลาที่มีผลต่อการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน BSA 100 µg/mL ด้วยวิธีโมดิฟายด์ลาวรีที่มีการเติมสารละลายโพแทสเซียมแอนทิโมนีทาร์เทรต โดย (ก) ระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาไบยูเร็ต แล้วกำหนดระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาลาวรีเท่ากับ 30 นาทีและ (ข) ระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาลาวรี (n=3) โดยเส้นทึบคือ การศึกษาตามวิธี ASTM D5712-10+$K(SbO)C_4H_4O_6$ และเส้นประคือการศึกษาตามวิธี ASTM D5712-10 ซึ่งกำหนดระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาไบยูเร็ต เท่ากับ 15 นาที

กราฟมาตรฐานและขีดจำกัดการตรวจวัดสำหรับการวิเคราะห์โปรตีนด้วยปฏิกิริยาสารละลายโมดิฟายด์-ลาวรีที่มีการเติมสารละลายโพแทสเซียมแอนทิโมนีทาร์เทรต

เมื่อนำสารละลายมาตรฐานโปรตีน BSA ในช่วงความเข้มข้น 0-100 µg/mL มาทำปฏิกิริยากับสารละลายโมดิฟายด์ลาวรีที่มีการเติมแอนทิโมนีทาร์เทรตได้ผลดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน BSA ด้วยวิธีโมดิฟายด์ลาวรีที่มีการเติมสารละลายโพแทสเซียมแอนทิโมนีทาร์เทรต (n=3)

จากรูปที่ 4 พบว่า กราฟมาตรฐานโปรตีนมาตรฐานมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วง 0-100 μg/mL โดยมีความสัมพันธ์เท่ากับ $y = 0.0049x$ ($R^2 = 0.9974$) และมีค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.05 μg/mL และ 0.16 μg/mL ตามลำดับ

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างน้ำยางข้นและถุงมือยางพารา

เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำยางข้นและถุงมือยางด้วยวิธีดังกล่าว ได้ผลการทดลองดังตาราง 1

ตาราง 1 ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างน้ำยางข้นและถุงมือยางพาราที่ได้จากการคำนวณโดยวิธีการสร้างกราฟมาตรฐาน และการเติมสารมาตรฐาน BSA (n=3)

ตัวอย่าง	วิธีเตรียมตัวอย่าง	ปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง (mg/g)		ร้อยละการคืนกลับ
		กราฟมาตรฐาน	การเติมสารมาตรฐาน	
น้ำยางข้น	ตกตะกอน	6.1 ± 0.4	6.5 ± 0.5	101.3
	ไม่ตกตะกอน	9.8 ± 0.6	10.9 ± 0.8	98.6
ถุงมือยางพารา	ตกตะกอน	0.6 ± 0.02	0.5 ± 0.01	100.7
	ไม่ตกตะกอน	0.9 ± 0.01	0.5 ± 0.02	99.2

ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างน้ำยางข้นและถุงมือยางพาราด้วยสร้างกราฟมาตรฐานและกราฟมาตรฐานชนิดการเติมสารมาตรฐาน พบว่าการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างน้ำยางข้นและถุงมือยางพาราด้วยการตกตะกอนและไม่ตกตะกอนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนแบบตกตะกอนในตัวอย่างทั้งสองชนิดมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าแบบไม่ตกตะกอน ซึ่งเกิดจากการรบกวนของสารในน้ำยาง [17] เช่น สารที่ใช้ในการรักษาสภาพน้ำยาง ได้แก่ แอมโมเนีย และสารจำพวก secondary preservative ที่ใช้ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำยาง ซึ่งมี 2 ประเภท คือประเภทที่เป็นสารเคมี เช่น ฟีนอล อัลโฟเนต เป็นต้น และสารแอนติไบโอติก เช่น ซิงค์ออกไซด์ (ZnO) เตตระเมทิลไทยูแรมไดซัลไฟด์ (TMTD) เป็นต้น ดังนั้นในการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีสารรบกวนในปริมาณมากจึงควรทำการตกตะกอนโปรตีนก่อนนำไปวิเคราะห์ เมื่อศึกษาหาค่าร้อยละการคืนกลับในตัวอย่างทั้งสองชนิด พบว่า ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 98.6-101.3 แสดงว่า สิ่งเจือปนในน้ำยางข้นไม่มีผลต่อปริมาณโปรตีนที่เติมเข้าไป

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโมดิฟายด์ลาวรีที่มีการเติมสารละลายโพแทสเซียมแอนทิโมนีทาร์เทรต ซึ่งประกอบด้วย สารละลาย Na_2CO_3 0.16 mol/L, NaOH 0.11 mol/L, $Na_2C_4H_4O_6$ 8 mmol/L, $K(SbO)C_4H_4O_6$ 0.6 mmol/L, $CuSO_4$ 1 mmol/L และ Folin-ciocalteu's reagent 12% v/v ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 746 nm มีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วง 0-100 µg/mL โดยมีความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารมาตรฐานโปรตีน เท่ากับ $y = 0.0049 \times$ ($R^2 = 0.9974$) โดยมีขีดจำกัดการตรวจวัด L.O.D. และ L.O.Q. เท่ากับ 0.05 µg/mL และ 0.16 µg/mL ตามลำดับ และเมื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างน้ำยางข้นและถุงมือยางพารา พบว่ามีปริมาณโปรตีนในตัวอย่างน้ำยางข้นประมาณ 6.1-10.9 mg/g และในตัวอย่างถุงมือยางพาราประมาณ 0.5-0.9 mg/g โดยมีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยนเรศวร และภาควิชาเคมีที่สนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Geiger, J. W., Davis, N. M., Blakemore, W. S. and Long, G. L. 1987. A Method for Determining Total Nitrogen in Kjeldahl Digestion Solution Using a Centrifugal Analyser. *Journal of Automatic Chemistry.* 9(2): 72-76.
2. Periago, M. J., Ros, G., Martinez, C. and Rincón, F. 1996. Variations of Non-protein Nitrogen in Six Spanish Legumes according to the Extraction Method used. *Food Research International.* 29(5-6): 489-494.
3. Lynch, J. M. and Barbano, B. M., 1999. Kjeldahl Nitrogen Analysis as a Reference Method for Protein Determination in Dairy Products. *Journal of AOAC International.* 82(6): 1389-1401.
4. ASTM International, 2010. ASTM D5712-10, Standard Test Method for Analysis of Aqueous Extractble Protein in Natural Rubber and its Products Using the Modified Lowry Method. West Conshohocken, PA,
5. Tori, E. A., Cazzoli, A. F. and Tapiz, L. M. 1998. Phosphorus in Oil. Production of Molybdenum Blue Derivative at Ambient Temperature Using Noncarcinogenic Reagents. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 75(1): 41-44.
6. Dhar, R. K., Zheng, Y., Rubenstone, J., and van Geen, A. 2004. A Rapid Colorimetric for Measuring Arsenic Concentrations in Groundwater. *Analytica Chimica Acta.* 526(2): 203-209.

7. Moonrungsee, N., Pencharee, S., and Jakmunee, J. 2015. Colorimetric Analyzer Based on Mobile Phone Camera for Determination of Available Phosphorus in Soil. *Talanta.* 136: 204-209.
8. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry.* 193(1): 265-275.
9. Sontimuang, C., Suedee, R., Canyak, B., Phadoongsombat, N., and Dickert, F. L. 2011. Development of a Rubber Elongation Factor, Surface-imprinted Polymer-quartz Crystal Microbalance Sensor, for Quantitative Determination of Hev b1 Rubber Latex Allergens Present in Natural Rubber Latex Products. *Analytica Chimica Acta.* 687(2): 184-192.
10. Tangboriboon, N., Phudkrachang, P., Mulsow, L., Kunchornsup, W., and Sirivat, A. 2012. Removal of Water Extractable Proteins from Concentrated Natural Rubber Latex by Eggshells. *Journal of Elastomers Plastics.* 45(3): 253-269.
11. Danwanichakul, D., Rattanaphan, O., Srisatjang, J., and Danwanichakul, P. 2014. Extraction of Protein from Skim Natural Rubber Latex Using PEG as a Surfactant via Low Speed Centrifugation and Continuous Flow. *Journal of Applied Polymer Science.* 131(4): 1-9.
12. Ouypornkochagorn, S., Hemavibool, K. 2015. The Extraction of the Water Soluble Protein from Rubber Latex by Household Microwave Machine. In: Proceeding of Pure and Applied Chemistry International Conference 2015. 21-23 January 2015; Bangkok, Thailand. p. 113-116.
13. Şengül, Ü. 2016. Comparing Determination Methods of Detection and Quantification Limits for Aflatoxin Analysis in Hazelnut. *Journal of Food and Drug Analysis.* 24(1): 56-62.
14. Takahashi, M., and Tanaka, M. 2012. Analysis of Complex-formation Reaction in Molybdenum Blue Method by ESI-MS. *Bunseki Kaguku.* 60(12): 1049-1054.
15. Sun, H., Yan S. C, Cheng, W. S. 2000. Interaction of Antimony with Tripeptide Glutathione Implication for Its Mode of Action. *European Journal of Biochemistry.* 267(17): 5450-7.
16. Patent US 4078917A. 1978. Extraction of Antimony Trioxide from Antimony Sulfide Ore.
17. George, U. U., Andy, J. A., and Joseph, A. 2014. Biochemical and Phytochemical Characteristics of Rubber Latex (*Heavea brasiliensis*) Obtained from a Tropical Environment in Nigeria. *International Journal of Scientific & Technology Research.* 3(8): 377-380.

ได้รับบทความวันที่ 29 กรกฎาคม 2559
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 20 กุมภาพันธ์ 2560