NU Science Journal 2011; 7(2): 30 - 44

การพัฒนาวิธีการหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางพาราโดยใช้เครื่องวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสงที่ได้ออกแบบขึ้น

ปริญญา มาสวัสดิ์* และ ยุทธพงษ์ อุดแน่น

Development of Protein Assay in Natural Rubber Latex by the Designed Spectropantonometer

Prinya Masawat* and Yuthpong Udnan

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000
ภาควิชาเคมี และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
*Corresponding author. E-mail: prinyam@nu.ac.th

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางพารา โดยใช้วิธีการทำให้เกิดสีด้วยวิธีเลารี เปรียบเทียบกับวิธีไบยูเรต ก่อนนำไปตรวจวัดด้วยเครื่องวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสงที่ได้ออกแบบและสร้างขึ้น ซึ่งสารสีที่เกิดขึ้นจะมีความเข้มที่แปรผกผันกับความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนที่มีในน้ำยาง โดยพบว่าการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางพาราซึ่งมีลักษณะเป็นคอลลอยด์สามารถวิเคราะห์ได้โดยตรง โดยไม่ต้องตกตะกอนก่อน ดังนั้นการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางพาราด้วยวิธีนี้จึงสามารถวิเคราะห์สีแล้วเทียบกลับไปเป็นความเข้มข้นของโปรตีนได้โดยตรง จากการทดลองพบว่าปริมาณของโปรตีนในน้ำยางพารามีค่าเท่ากับ 0.037 และ 0.044 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตรด้วยวิธีการทำให้เกิดสีแบบเลารีและไบยูเรตตามลำดับ ซึ่งวิธีการทำให้เกิดสีทั้งสองวิธีให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

คำสำคัญ : น้ำยางพารา โปรตีน วิธีเลารี วิธีไบยูเรต

Abstract

In this research, protein assay in natural rubber latex (NRL) was developed by using Lowry and Biuret methods for color developing followed by analysis with a laboratory designed and fabricated spectropantonometer. It was found that the developed method could directly be used to quantify colloidal protein in latex without precipitation and preconcentration. Therefore, this protein assay could directly be used to detect the intensity of the color developed proportional to the concentrations of protein in natural rubber latex. From the experiment, the proteins found in natural rubber are 0.037 and 0.044 %w/v by Lowry and Biuret methods, respectively. The results obtained from both color developing methods are not significantly different at 95 % confidence limit.

Keywords: natural rubber latex, protein, Lowry method, Biuret method

บทนำ

ในปัจจุบันประเทศไทยเป็นประเทศที่ผลิตยางพาราเป็นอันดับหนึ่งของโลก จากรายงานการประเมินของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรพบว่า มีผลผลิต 32% ของโลกในปี 2552 ซึ่งหน่วยงาน IRSG (International Rubber Study Group) รายงานว่า ความต้องการใช้ผลผลิตยางมีเพิ่มขึ้น 11.8% ในปี 2553 (สกว., 2553) ดังนั้น ยางพาราจึงเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ สามารถนำรายได้เข้าสู่ประเทศได้มากอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งในน้ำยางพารานั้น ประกอบด้วยอนุภาคที่เป็นไฮโดรคาร์บอน 30-40 % แขวนลอยอยู่ในเซรุ่ม และยังมีส่วนที่ไม่ใช่ยางอีก 2-3 % เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต น้ำตาล โลหะ และน้ำ ซึ่งในงานวิจัยนี้จะเน้นถึงความสำคัญของโปรตีนที่มีอยู่ในน้ำยางพารา เพราะน้ำยางพาราซึ่งมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ ก่อให้เกิดการตกค้างของโปรตีนในผลิตภัณฑ์บางชนิด ทำให้เกิดอาการแพ้ตามผิวหนังสำหรับผู้ที่แพ้โปรตีน พบว่าโปรตีนที่ทำให้เกิดอาการแพ้กับผู้ที่สัมผัสยางจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 14-30 kD (วราภรณ์ ขจรไชยกูล, 2549) จากการค้นคว้างานวิจัยที่เกี่ยวกับการหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางพารา (NRL proteins) โปรตีนแอนติเจน (antigenic proteins) และ โปรตีนที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ (allergenic proteins) พบว่า วิธีวิเคราะห์ทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunologic method) จะใช้เทคนิค ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์โปรตีนแอนติเจน ซึ่งจะใช้แทนปริมาณโปรตีนรวมที่อาจจะก่อให้เกิดอาการแพ้ได้ โดยเป็นเทคนิคที่ให้ความไวในการวิเคราะห์สูง แต่มีข้อเสียคือ ต้องใช้ตัวอย่างเป็นเซรุ่มของมนุษย์ (human serum) ซึ่งไม่สามารถ standardized ได้ (Tomazic-Jezic *et al*., 2002; Beezhold, *et al.*, 2002)

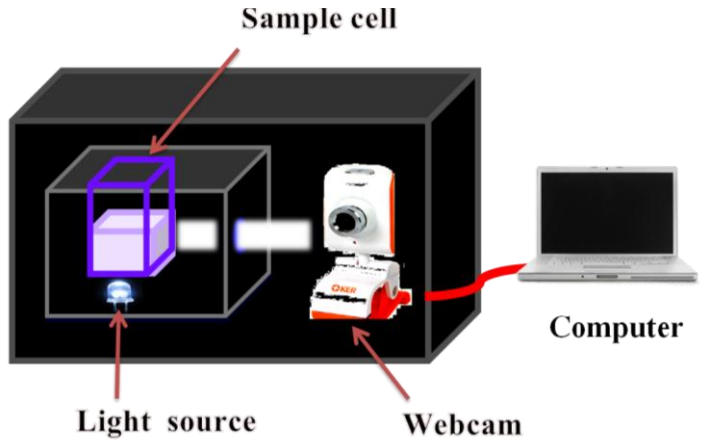
สำหรับการวิเคราะห์ทางเคมีเพื่อหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางพารา มีวิธีมาตรฐาน คือวิธีเลารีดัดแปร (Modified Lowry method) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับใช้ในการหาปริมาณโปรตีนที่สามารถสกัด และละลายน้ำได้ในน้ำยางและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากน้ำยาง (ASTM D5712-05, 2005) โดยโปรตีนที่ละลายน้ำจะถูกสกัดในสารละลายบัฟเฟอร์ จากนั้นทำการตกตะกอนเพื่อเพิ่มความเข้มข้นและเพื่อทำการแยกโปรตีนออกจากสารอื่นๆ ที่ละลายน้ำได้ซึ่งอาจจะรบกวนการวิเคราะห์ แล้วจึงนำโปรตีนที่ตกตะกอนได้มาละลายอีกครั้ง ก่อนทำการวิเคราะห์สีด้วยวิธีเลารีดัดแปรซึ่งเทียบกับสารมาตรฐานโปรตีน พบว่า วิธีมาตรฐานนี้มีขั้นตอนยุ่งยาก เสียเวลาและค่าใช้จ่ายมาก (Yeang *et al.*, 1995; Siler and Cornish, 1995) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำยางพารา ซึ่งจะเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยตรงในน้ำยาง โดยอาศัย charge-coupled devices (CCD) camera (WebCam) เป็นเครื่องตรวจวัด ซึ่งจะทำการถ่ายภาพสีดิจิตอลที่เกิดจากการฟอร์มสีของโปรตีนในน้ำยางพาราด้วยวิธีเลารี (ดรุณี วัชราเรืองวิทย์, 2544; ดารัตน์ ไชยวารี และคณะ, 2552) และวิธีไบยูเรต (สุพรรษา หุ่นทอง และคณะ, 2551) แล้วจึงอ่านค่าสีในระบบ red green and blue (RGB) โดยอาศัยความสัมพันธ์ที่ว่า ค่าความเข้มสีที่เกิดจากการกระเจิงแสง (scattering intensity) ที่เกิดขึ้น และค่าสีในระบบ RGB จะแปรผันกับค่าความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพารา ซึ่งจากเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ WebCam เป็นเครื่องตรวจวัดนั้นยังไม่มีงานวิจัยใดประยุกต์ใช้วิธีการนี้ในการหาความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพาราเลย (Maleki *et al.*, 2004; Gaiao *et al.*, 2006; Chuan-Xiao *et al.*, 2007; Wongwilai *et al.*, 2010)

อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง

1. Spectropantonometer

เครื่องตรวจวัดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติด้วยวิธีวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง (Spectropantonometer) ที่ได้ออกแบบและสร้างขึ้นนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อทำให้การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และเครื่องมือยังสามารถเคลื่อนย้ายได้สะดวก สำหรับวิธีการที่จะได้พัฒนาขึ้นนี้ เป็นการวัดปริมาณ Total Reactive Protein ในตัวอย่างคอลลอยด์ โดยใช้หลอดไดโอดแปล่งแสงสีขาว (LED) เป็นแหล่งกำเนิดแสงขาวที่ตั้งฉากกับตัวอย่าง และวัดแสงที่กระเจิงจากตัวอย่างที่มีการฟอร์มสีกับสารเกิดสี เช่น ไบยูเร็ต เลารี หรือ แบรดฟอร์ด รีเอเจนต์ เพื่อให้ได้สารสีที่สามารถกระเจิงแสงได้ในระบบคอลลอยด์ โดยไม่จำเป็นที่จะต้องนำมาทำให้เป็นสารละลายใส และในระบบคอลลอยด์ เมื่อสารได้ผสมกันอย่างสมบูรณ์ อนุภาคของคอลลอยด์นั้นจะเคลื่อนที่แบบบราวเนียน และแพร่กระจายสู่ทุกพื้นที่ของภาชนะจึงสามารถอนุมานได้ว่า ทุกส่วนของภาชนะนั้นมีความเข้มข้นของสารละลายและอนุภาคของคอลลอยด์อย่างละเท่า ๆ กัน ในการสืบค้นสิทธิบัตร

ทั้งในประเทศและต่างประเทศ พบว่า มีการใช้ระบบนี้เพียงแต่ในการวัดสีของตัวอย่างในระบบ L*a*b เท่านั้น ยังไม่มีการใช้ระบบ RGB สหสัมพันธ์แบบพหุ (Multiple Regression) ในการหาปริมาณของตัวอย่างสารละลายใด ๆ เลย มีเพียงการประยุกต์ใช้ RGB model ในการวิเคราะห์ภาพถ่ายดาวเทียมในแบนด์ต่างๆ เท่านั้น (photogrammetry) ดังนั้นเครื่องที่สร้างขึ้นจึงเป็นเครื่องแรกที่ได้มีการประยุกต์ใช้ RGB model ในการหาปริมาณของโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ (อยู่ในระหว่างดำเนินการขอจดอนุสิทธิบัตร)



รูป 1 การจัดอุปกรณ์ของเครื่องวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสงที่ออกแบบและสร้างขึ้น

ตามรูป 1 เป็นภาพแสดงองค์ประกอบของเครื่องวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสงซึ่งประกอบด้วย กล่องควบคุมแสงจากภายนอกซึ่งครอบคลุมในส่วนของหลอดไดโอดแปล่งแสงสีขาว (super bright LED) ทำหน้าที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงที่ส่องแสงขาวตั้งฉากกับสารตัวอย่างซึ่งคือน้ำยางพาราที่ผ่านการทำให้เกิดสีกับสารสีเช่นสารละลายไบยูเร็ตแล้วบรรจุอยู่ในเซลล์ใส่สารตัวอย่าง (sample cell) ซึ่งเป็น polystyrene cuvette ขนาด 4 มิลลิลิตร โดยมีกล้องถ่ายวีดีโอขนาดจิ๋ว (WebCam) ทำหน้าที่ถ่ายภาพด้วยโปรแกรม JPEG PC Camera (China camera Manufacturers, China) และส่งข้อมูลแสงสีไปยังเครื่องคอมพิวเตอร์โน๊ตบุ๊ค จากนั้นใช้โปรแกรม Color detector version 1.0 (Cosmin software) ในการอ่านค่าสีของตัวอย่างที่ระดับโปรตีนต่างๆ หลังจากทำการฟอร์มสีกับสารให้สีแล้วในระบบ RGB จากนั้นเก็บเมตริกซ์สีและความเข้มข้นไว้ในตาราง แล้วนำค่าจากตารางมาสร้างกราฟด้วยวิธี Multiple Regression เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มของสี และปริมาณโปรตีน แล้วคำนวณออกมาเป็นปริมาณโปรตีนในน้ำยางพาราได้ต่อไป ซึ่งวิธีการคำนวณหา

ความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้วิธีการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยวิธี Multiple Regression สามารถแสดงได้ดังตาราง 1 และ 2 ดังนี้

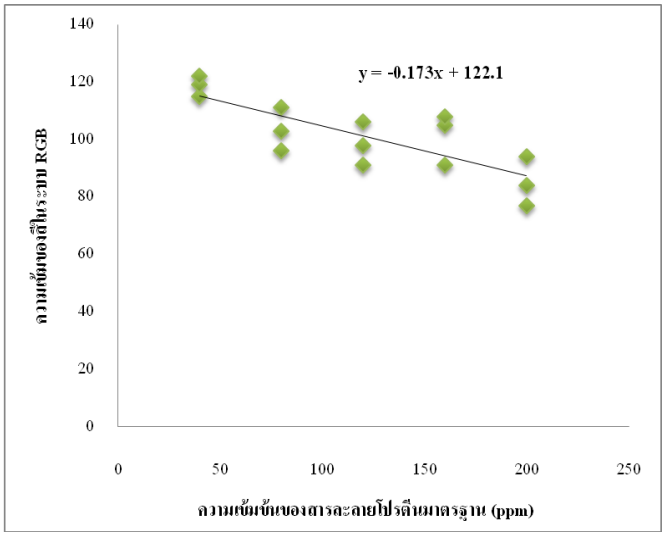
ตาราง 1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโปรตีน (Albumin) และความเข้มของการกระเจิงแสงในระบบ RGB (เตรียมสารโดยวิธีเติมสารมาตรฐาน)

ความเข้มข้นของสารละลาย Albumin (ppm)	ความเข้มของการกระเจิงแสงในระบบ RGB		
	R	G	B
40	115	119	122
80	96	103	111
120	91	98	106
160	91	105	108
200	77	84	94

ตาราง 2 การใส่ข้อมูลในโปรแกรม Excel เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยวิธี Multiple Regression

แกน x	แกน y
40	115
40	119
40	122
80	96
80	103
80	111
120	91
120	98
120	106
160	91
160	105
160	108
200	77
200	84
200	94

นำข้อมูลที่ได้จากตาราง 2 มาสร้างกราฟโดยใช้โปรแกรม Excel จะได้กราฟเส้นตรงดังรูป 2 และสมการเส้นตรงรวมของ RGB จากนั้นนำสมการที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพาราได้โดยการแทนค่า y = 0 เนื่องจากใช้วิธีการเตรียมสารละลายเพื่อทำกราฟมาตรฐานแบบวิธีเติมสารมาตรฐาน เมื่อแทนค่า y = 0 จะได้ค่า x ออกมา ซึ่งคือความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพาราในหน่วย ppm และ สามารถคำนวณเป็น % w/v ได้ต่อไป



รูป 2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐานกับความเข้มของสีในระบบ RGB

2. สารเคมี อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 วิธีการทำให้เกิดสีแบบไบยูเร็ต (สุพรรษา หุ่นทอง และคณะ, 2551)

สารละลายไบยูเร็ตประกอบด้วย สารละลาย 0.5% w/v คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) และ 10% w/v โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ซึ่งสามารถเตรียมได้ดังนี้ ละลาย $CuSO_4$ (99.5%, AR grade, Merck, Germany) 0.5 กรัม ด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลาย 0.5% w/v $CuSO_4$

ละลาย NaOH (99%, AR grade, Merck, Germany) 10 กรัม ด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลาย 10% w/v NaOH

การเตรียมสารละลายเพื่อทำกราฟมาตรฐานโดยวิธีเติมสารมาตรฐาน

stock solution : สารละลาย 200 ppm Albumin ปริมาตร 500 มิลลิลิตรซึ่งเตรียมได้โดยการชั่ง Albumin (Albumin from hen egg white, Fluka Biochemika, Netherland) มา 0.1000 กรัม แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นเตรียม Albumin เข้มข้น 40, 80, 120, 160 และ 200 ppm ตามลำดับ เตรียมโดยปิเปต stock solution มา 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออนตามลำดับ

จากนั้นนำสารละลาย Albumin ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาอย่างละ 10 มิลลิลิตร มาทำการเติมน้ำยางพารา (น้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูง) 0.06 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 20 นาที เพื่อไล่แอมโมเนียออกจากน้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูง จากนั้นทำการเติมสารละลายไบยูเร็ต คือ 0.5% w/v $CuSO_4$ 1 มิลลิลิตร และ 10% w/v NaOH 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสงในระบบ RGB ด้วยเครื่อง Spectropantonometer ที่ออกแบบและสร้างขึ้น

2.2 วิธีการทำให้เกิดสีแบบเลารี (ดรุณี วัชราเรืองวิทย์, 2544; ดารัตน์ ไชยวารี และคณะ, 2552)

สารละลาย 3% w/v โซเดียมซิเตรท ($Na_3(C_6H_5O_7)$) เตรียมโดยการชั่ง $Na_3(C_6H_5O_7)$ (Nutritional Products Ltd., Switzerland) มา 3 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย A คือ สารละลาย 6 % w/v โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ซึ่งเตรียมโดยการชั่ง Na_2CO_3 (AR grade, Merck, Germany) มา 6 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย B คือ สารละลาย 1.5 % w/v $CuSO_4$ (99.5%, AR grade, Merck,Germany) ซึ่งเตรียมโดยการชั่ง $CuSO_4$ มา 1.5 กรัมละลายในสารละลาย 3% w/v $Na_3(C_6H_5O_7)$ เป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย C เตรียมโดยใช้สารละลาย A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการวิเคราะห์

สารละลาย D คือ 72 % w/v Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Switzerland) เตรียมโดยปิเปตสารละลาย Folin-Ciocalteu มา 3.6 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 5 มิลลิลิตร

สารละลาย 5% w/v กรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) เตรียมโดยการชั่ง TCA ($C_2HCl_3O_2$, 95.5%, Sigma-Aldrich, Germany) มา 5 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย 0.2% w/v กรดฟอสโฟทังสติก (PTA) เตรียมโดยการชั่ง PTA ($H_3O_{40}PW_{12}$, Fluka, Switzerland) มา 0.2 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย 0.2 M NaOH เตรียมโดยการชั่ง NaOH (99.9%, AR grade, Merck, Germany) มา 0.8 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนเป็น 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายเพื่อทำกราฟมาตรฐานโดยวิธีเติมสารมาตรฐาน

นำสารละลาย Albumin ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาอย่างละ 10 มิลลิลิตร มาทำการเติมน้ำยางพารา (น้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูง) 0.06 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายที่ได้มา 6 มิลลิลิตร แล้วทำการเติมสารละลาย 5% TCA 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่องอัลตราโซนิคเป็น เวลา 2 นาที แล้วนำมาเติม 0.2% PTA 1 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องอัลตราโซนิคต่ออีก 2 นาที ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงเติมสารละลาย 0.2 M NaOH 2 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย C 0.6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเติมสารละลาย D 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อีก 10 นาที เพื่อให้เกิดสีน้ำเงินอย่างสมบูรณ์ จากนั้นจึงนำไปวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสงในระบบ RGB ด้วยเครื่องวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง ที่ออกแบบและสร้างขึ้น

3. ผลการทดลอง และการวิจารณ์

3.1 การทดสอบหาความสัมพันธ์ของโปรตีนในตัวอย่างสารคอลลอยด์กับความเข้มของสีในระบบ RGB

เนื่องจากตัวอย่างน้ำยางพารามีลักษณะเป็นสารคอลลอยด์ ซึ่งไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้โดยตรง เพราะอนุภาคของคอลลอยด์ขัดขวางการส่องผ่านของแหล่งกำเนิดแสง แม้ว่าจะมีโครโมฟอร์ (chromophore) บางชนิดที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างแล้วเกิดสารสีที่มีความเข้มที่แปรผันกับความเข้มข้นของสารเคมีที่ทำปฏิกิริยานั้น ๆ ก็ตาม สารสีที่มีความเข้มของสีแปรผันกับความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ สามารถวิเคราะห์เทียบความเข้มของสีกลับไปเป็นความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในตัวอย่างนั้นได้ ได้แก่ ระบบ RGB (Red, Green, Blue) และระบบ CMYK (Cyan, Magenta, Yellow, Black) บางระบบ ใช้ค่า L, a, b หรือ L, a*, b

ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองหาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างสารคอลลอยด์กับความเข้มของสีในระบบ RGB โดยใช้ตัวอย่างสารคอลลอยด์คือ สบู่ซึ่งเตรียม โดยการชั่งเนื้อสบู่ (สีขาว) 0.5 กรัม ละลายเนื้อสบู่ในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 500 มิลลิลิตรบน Hot plate จากนั้นเติมน้ำมันพืช (มรกต,น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 100%) 0.1 มิลลิลิตร คนจนละลาย เป็นสารละลายคอลลอยด์ ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

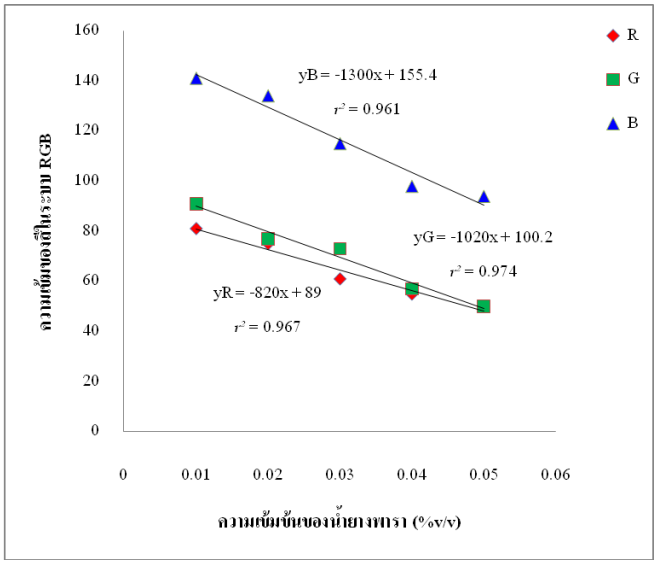
จากนั้นทำการชั่งสารมาตรฐานโปรตีน (Albumin) 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยสารละลายคอลลอยด์ที่เตรียมขึ้น ทำการเติมสารละลายไบยูเร็ตคือ 0.5% $CuSO_4$ และ 10% NaOH อย่างละ 2 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มของสีที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ แล้วนำไปวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสงในระบบ RGB ด้วยเครื่องวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสงที่ออกแบบและสร้างขึ้น แล้วทำการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสีในระบบ RGB กับค่าความเข้มข้นของโปรตีน จากการทดลองพบว่าได้กราฟที่มีความชันเป็นลบเหมือนรูป 2 (ได้ทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง) จึงทำให้สามารถสรุปได้ว่า โปรตีนในสารละลายคอลลอยด์สามารถทำให้เกิดสีกับสารละลายไบยูเร็ต แล้วให้สารสีม่วงที่มี ความเข้มของสีแปรผกผันกับความเข้มข้นของปริมาณของโปรตีนที่มีอยู่ในสารละลายคอลลอยด์ ทำให้การวิเคราะห์โปรตีนสามารถทำได้โดยตรงจากตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นคอลลอยด์ โดยไม่ต้องตกตะกอนโปรตีนออกมาก่อน ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความสามารถในการวิเคราะห์สี แล้วเทียบกลับไปเป็นความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนได้โดยตรง โดยการแทนค่าในสมการเส้นตรงดังที่ได้อธิบายข้างต้น

3.2 การทดสอบหาช่วงความเข้มข้นของน้ำยางพาราที่เหมาะสม

ได้ทำการเตรียมน้ำยางพารา 2 ช่วงความเข้มข้น คือ 0.01-0.05 %v/v (ใช้น้ำยางพาราปริมาตร 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 มิลลิลิตรตามลำดับ เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 10 มิลลิลิตร) และ 0.04-0.08 %v/v (ใช้น้ำยางพาราปริมาตร 0.04, 0.05, 0.06, 0.07 และ 0.08 มิลลิลิตรตามลำดับ เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 10 มิลลิลิตร) แล้วนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงเป็นเวลา 40 นาที จากนั้นเติมสารละลายไบยูเร็ต คือ 0.5% $CuSO_4$ 1 มิลลิลิตร และ 10% NaOH 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสงในระบบ RGB ด้วยเครื่อง วัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง ได้ผลการทดลองดังตาราง 3-4 และรูป 3-4

ตาราง 3 ค่าความเข้มของสีในระบบ RGB โดยใช้ปริมาตรน้ำยางพารา 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 มิลลิลิตร ตามลำดับ

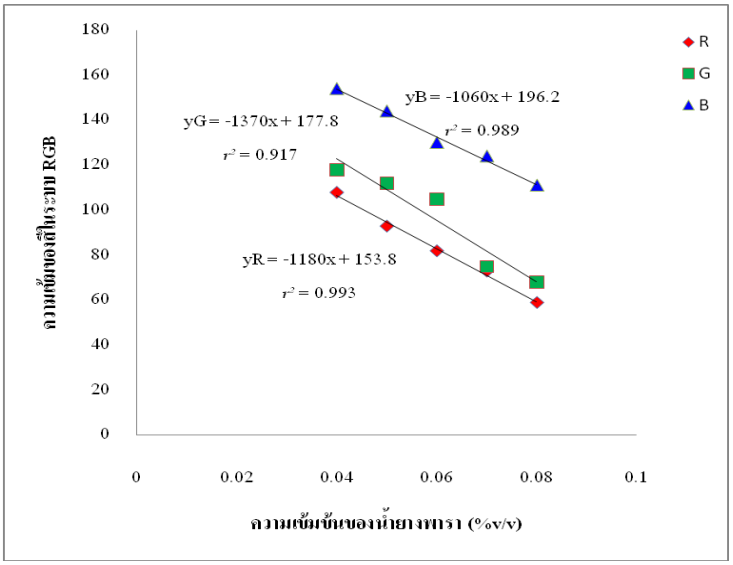
ความเข้มข้นของน้ำยาง	ความเข้มของสีในระบบ RGB		
(%v/v)	R	G	B
0.01	81	91	141
0.02	75	77	134
0.03	61	73	115
0.04	55	57	98
0.05	50	50	94



รูป 3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำยางพารากับความเข้มของสีในระบบ RGB โดยใช้น้ำยางปริมาตร 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 มิลลิลิตร ตามลำดับ

ตาราง 4 ค่าความเข้มของสีในระบบ RGB โดยใช้ปริมาตรน้ำยางพารา 0.04, 0.05, 0.06, 0.07 และ 0.08 มิลลิลิตร ตามลำดับ

ความเข้มข้นของน้ำยาง	ความเข้มของสีในระบบ RGB		
(%v/v)	R	G	B
0.04	108	118	154
0.05	93	112	144
0.06	82	105	130
0.07	73	75	124
0.08	59	68	111



รูป 4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำยางพารากับความเข้มของสีในระบบ RGB โดยใช้น้ำยางปริมาตร 0.04, 0.05, 0.06, 0.07 และ 0.08 มิลลิลิตร ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่า กราฟในรูป 3-4 มีความชันเป็นลบ แสดงให้เห็นว่าค่าความเข้มสีในระบบ RGB แปรผกผันกับความเข้มข้นของน้ำยางพารา (สีที่ตามองเห็นดูเข้มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำยางพาราเพิ่มขึ้นแต่ค่าความเข้มสีในระบบ RGB กลับลดลงตามความเข้มข้นของน้ำยางพารา) ได้ความสัมพันธ์เป็นสมการเส้นตรงดิ่งลงซึ่งมีค่าความเป็นเส้นตรง (r^2) มากกว่า 0.9 ทั้งสองช่วง ความเข้มข้น แต่เราจะเลือกช่วงความเข้มข้นของน้ำยางพาราเท่ากับ 0.04-0.08 %v/v สำหรับ การวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไปเนื่องจากให้ค่าความเป็นเส้นตรงดีกว่าช่วงความเข้มข้น 0.01-0.05 %v/v และได้ทำการทดลองซ้ำแบบเดิมอีก 5 ซ้ำ ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน โดยในการทดลองเพื่อ หาความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพาราด้วยวิธีการทำให้เกิดสีแบบไบยูเร็ตและเลารี ได้เลือกความเข้มข้นของน้ำยางซึ่งเป็นค่ากลางของความเข้มข้นที่เหมาะสม (0.04-0.08 %v/v) คือ เท่ากับ 0.06 %v/v เนื่องจากเมื่อทดลองทำให้เกิดสีด้วยทั้งสองวิธีจะสังเกตสีได้ชัดเจนและใช้น้ำยางไม่มากหรือน้อยเกินไป (ดารัตน์ ไชยวารี และคณะ, 2552)

3.3 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพารา

เมื่อทราบความสัมพันธ์ของโปรตีนในตัวอย่างสารคอลลอยด์กับความเข้มของสี ในระบบ RGB และได้เลือกความเข้มข้นของน้ำยางพาราแล้วก็ได้ทำการทดลองดังหัวข้อ 2.1 และ 2.2 ซึ่งวิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีนในตัวอย่างน้ำยางพาราข้นชนิดแอมโมเนียสูงด้วยวิธีการทำให้เกิด สี

แบบไบยูเร็ตและเลารีโดยวิธีการเติมสารมาตรฐาน (standard addition method) และใช้วิธีการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยวิธี Multiple Regression ดังที่ได้อธิบายข้างต้นซึ่งกราฟที่ได้จะมีลักษณะดังรูป 2 คือเป็นเส้นตรงเส้นเดียวที่เกิดจากการรวมกันของเส้นตรง 3 เส้นของความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของโปรตีนและค่าความเข้มสีอาร์ จี และ บี โดยได้ทำการทดลองทั้งหมด 7 ครั้งทั้งการทำให้เกิดสีด้วยวิธีไบยูเร็ตและวิธีเลารี ได้แสดงสมการของทั้ง 7 ครั้งดังตาราง 5 และแสดงผลความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพาราที่ได้จากการแทนค่า y = 0 ในสมการในตาราง 5 ได้ผลดังตาราง 6

ตาราง 5 สมการรวมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐานกับความเข้มของสีในระบบ RGB ด้วยวิธีไบยูเร็ตและวิธีเลารี

ครั้งที่	สมการเส้นตรงที่ใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนจากวิธี Multiple Regression	
	วิธีไบยูเร็ต	วิธีเลารี
1	y = -2600x + 115.6 r^2 = 0.996	y = -2675x + 93.3 r^2 = 0.998
2	y = -2575x + 116.5 r^2 = 0.984	y = -3000x + 107.4 r^2 = 0.984
3	y = -1040x + 136.8 r^2 = 0.994	y = -1050x + 134.8 r^2 = 0.999
4	y = -1100x + 148.8 r^2 = 0.999	y = -1110x + 129.8 r^2 = 0.994
5	y = -1050x + 145.4 r^2 = 0.992	y = -1210x + 147.0 r^2 = 0.995
6	y = -1080x + 135.2 r^2 = 0.997	y = -1500x + 173.4 r^2 = 0.989
7	y = -950x + 119.4 r^2 = 0.997	y = -1040x + 154.2 r^2 = 0.998

ตาราง 6 ความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพาราซึ่งได้จากการทำให้เกิดสีด้วยวิธีไบยูเร็ต และวิธีเลารี ก่อนตรวจวัดด้วยเครื่องวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง

ครั้งที่	ปริมาณของโปรตีนในน้ำยางพารา (%โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)	
	วิธีไบยูเร็ต	วิธีเลารี
1	0.045	0.035
2	0.045	0.036
3	0.041	0.039
4	0.042	0.035
5	0.043	0.037
6	0.045	0.038
7	0.047	0.038
ค่าเฉลี่ย	0.044	0.037
S.D.	0.0021	0.0016
%RSD	4.7	4.3

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพารา ซึ่งใช้วิธีทำให้เกิดสีตามวิธีการของเลารีและไบยูเร็ต แล้วจึงทำการตรวจวัดด้วยเครื่องวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสงที่ได้ออกแบบและสร้างขึ้นโดยมีไดโอดสีขาวเป็นแหล่งกำเนิดแสง เมื่อเรานำน้ำยางพาราที่เจือจางใส่ลงในเครื่องและใช้ WebCam ถ่ายภาพสีดิจิตอลก่อนทำการตรวจวัดค่าความเข้มของสีในระบบ RGB แล้วจึงทำการแปลงค่าความเข้มของสีเป็นค่าตัวเลข พบว่าเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า สีของสารละลายที่เกิดขึ้นจะเข้มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีนที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อทำการตรวจวัดค่าสีในระบบ RGB แล้วทำการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าสีในระบบ RGB กับค่าความเข้มข้นของโปรตีนพบว่าได้กราฟที่มีความชันเป็นลบแสดงว่า ค่าสีในระบบ RGB แปรผกผันกับความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพารา จากนั้นนำผลการทดลองจากวิธีการทำให้เกิดสีทั้งสองวิธีมาเปรียบเทียบกันโดยใช้ paired t-test (Miller *et al*., 1993) พบว่าสามารถใช้การทำให้เกิดสีทั้งสองวิธีในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางพาราได้ โดยวิธีการทำให้เกิดสีทั้งสองวิธีให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่วิธีการทำให้เกิดสีแบบไบยูเร็ตมีข้อดีที่เหนือกว่าวิธีการทำให้

เกิดสีแบบเลารี คือ สามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว เตรียมตัวอย่างได้ง่าย ใช้สารเคมีในปริมาณ ที่น้อยกว่า และประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่า ดังนั้นวิธีการทำให้เกิดสีแบบไบยูเร็ต จึงน่าจะเหมาะสมสำหรับนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพาราได้เป็นอย่างดีต่อไป

เมื่อนำน้ำยางพารามาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีมาตรฐาน คือวิธีเลารีดัดแปร (Modified Lowry method; ASTM D5712-05, 2005) ซึ่งส่งไปให้ส่วนอุตสาหกรรมยาง สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร เป็นผู้ทดสอบ พบว่าน้ำยางพารามีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.046 %โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่เราได้พัฒนาขึ้นโดยใช้เครื่องวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง ที่ได้สร้างขึ้นในห้องปฏิบัติการนี้โดยใช้ paired t-test (Miller *et al*., 1993) พบว่าให้ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นนี้จึงให้ผลการทดลองที่เชื่อถือได้ อีกทั้งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็วกว่าวิธีมาตรฐานมาก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.ช.วยากรณ์ เพ็ชญไพศิษฏ์ นายศุภโชค อุปาลี นางสาวชุติมา สารัมย์ และนางสาวพรชนก พินทอง ที่ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรที่ให้ความอนุเคราะห์ทางด้านเครื่องมือและอุปกรณ์รวมทั้งเงินทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้บางส่วน

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยนเรศวรที่ให้เงินทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2553

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

ดรุณี วัชราเรืองวิทย์. (2544). การศึกษาหาปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำจากถุงมือยางทางการแพทย์และเทคนิคการลดปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำ. กลุ่มงานเทคโนโลยีผลิตภัณฑ์ 1 กองฟิสิกส์และวิศวกรรม กรมวิทยาศาสตร์บริการ. กรุงเทพมหานคร.

ดารัตน์ ไชยวารี นิษยา วงษ์เกิดชวน และ ปริญญา มาสวัสดิ์. (2552). การพัฒนาการวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้เครื่องวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.

วราภรณ์ ขจรไชยกูล. (2549). ยางธรรมชาติ : การผลิตและการใช้งาน. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ซีโนดีไซน์. กรุงเทพมหานคร.

สุพรรษา หุ่นทอง ศิริวิมล อินทร์เอี่ยม และ ปริญญา มาสวัสดิ์. (2551). การวัดความเข้มของแสงโดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีในตัวอย่างคอลลอยด์. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.

สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ. (2553). เอกสารการประชุมวิชาการยางพาราแห่งชาติ ครั้งที่ 2 Value Creation สู่การพึ่งพาตนเอง. กรุงเทพมหานคร.

ASTM D5712-05. (2005). Standard Test Method for Analysis of Aqueous Extractable Protein in Natural Rubber and its Products Using the Modified Lowry Method. ASTM International. United States.

Beezhold, D.H., Kostyal D.A. and Tomazic-Jezic, V.J. (2002). Measurement of latex proteins and assessment of latex protein exposure. *Method*, *27*, 46-51.

Chuan-Xiao, Y., Xiang-Ying, S., Bin, L. and Hui-Ting, L. (2007). Determination of Total Phosphorus in Water Sample by Digital Imaging Colrimetry. *Chinese J. Anal. Chem*., *35*, 850-853.

Gaiao, E.N., Martins, V.L., Lyra, W.S., Almeida, L.F., Silva, E.C. and Araujo, M.C.U. (2006).Digital image-based titrations. *Anal. Chim. Acta*., *570*, 283-290. Retrieved June 4, 2010, from http://coursewares.mju.ac.th/ea341/lesson2/ch02_6.pdf

Maleki, N., Safavi, A. and Sedaghatpour, F. (2004). Single-step calibration, prediction and real samples data acquisition for artificial neural network using a CCD camera. *Talanta*, *64*, 830-835.

Miller, J.C. and Miller, J.N. (1993). Statistics for Analytical Chemistry, 3rd edition. Ellis Horwood Limited, England.

Siler, D.J. and Cornish, K. (1995). Measurement of protein in natural rubber latex. *Anal. Biochem.*, *229*, 278-281.

Tomazic-Jezic, V.J. and Lucas, A.D. (2002). Protein and allergen assays for natural rubber latex products. *J. Allergy Clin. Immunol.*, *110*(2), 40-46.

Wongwilai, W., Lapanantnoppakhun, S., Grudpan, S. and Grudpan, K. (2010). Webcam camera as a detector for a simple lab-on-chip time based approach. *Talanta*, *81*, 1137-1141.

Yeang, H.Y., Yusof, F. and Abdullah, L. (1995). Precipitation of Hevea brasiliensis latex proteins with trichloroacetic acid and phosphotungstic acid in preparation for the Lowry protein assay. *Anal. Biochem.*, *226*, 35-43.