อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาเครื่องตรวจวัดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติด้วยวิธีวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 29 ส.ค. 2554
เลขทะเบียน 1560784 es
เลขเรียกหนังสือ TS
1842
ป458ร
2553

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปริญญา มาสวัสดิ และคณะ

ตุลาคม 2553

สัญญาเลขที่ R2553B049

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาเครื่องตรวจวัดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ
ด้วยวิธีวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง

คณะผู้วิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปริญญา มาสวัสดิ์ คณะวิทยาศาสตร์
2. ดร.ยุทธพงษ์ อุดแน่น คณะวิทยาศาสตร์

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง "การพัฒนาเครื่องตรวจวัดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติด้วยวิธีวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง" ดำเนินการสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ กระทรวงศึกษาธิการ ประจำปีงบประมาณ 2553 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่อำนวยความสะดวกในเรื่องสถานที่ และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ ตลอดจนคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย

สุดท้ายนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.ช.วยากรณ์ เพ็ชญไพศิษฎ์ นายศุภโชค อุปาลี นางสาวชุติมา สารัมย์ และนางสาวพรชนก พินทอง ที่มีส่วนสำคัญทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง

หากมีข้อผิดพลาดประการใดในรายงานการวิจัยฉบับนี้ คณะผู้วิจัยใคร่ขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้วิจัย

ตุลาคม 2553

ชื่อโครงการ การพัฒนาเครื่องตรวจวัดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติด้วยวิธีวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง

Development of Spectropantonometer for Protein Assay in Natural Rubber

ชื่อผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปริญญา มาสวัสดิ์

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

หมายเลขโทรศัพท์ 055-963439

ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยสาขา เคมี

งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2553

จำนวนเงิน 200,000 บาท **ระยะเวลาทำการวิจัย** 1 ปี

ตั้งแต่ 15 ธันวาคม 2552 ถึง 14 ธันวาคม 2553

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์โปรตีน ทั้งในน้ำยางธรรมชาติ และยางแห้ง โดยวิธีสเปคโตรแพนทาโนเมทรี เปรียบเทียบกับวิธีเจลดาห์ลซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการหาปริมาณโปรตีนในยางแห้ง และวิธีเลารีดัดแปรซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการหาปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากน้ำยาง และผลิตภัณฑ์จากน้ำยาง วิธีสเปคโตรแพนทาโนเมทรีสามารถวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนได้ในรูปของน้ำยางโดยตรง โดยจะนำน้ำยางมาทำปฏิกิริยากับสารละลายไบยูเร็ต และมีการเติมสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ช่วงความเข้มข้นต่างๆ ก่อนนำไปตรวจวัดในระบบอาร์จีบี โดยอาศัยการวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสงด้วยเครื่องสเปคโตรแพนทาโนมิเตอร์

จากผลการทดลองพบว่า เทคนิคสเปคโตรแพนทาโนเมทรี สามารถใช้งานได้ดีในน้ำยางธรรมชาติ โดยพบว่าปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 0.044 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 4.7 %

Abstract

Protein assay in Natural Rubber Latex (NRL) and dry rubber was developed by using spectropantanometry comparing with kjeldahl method (standard method for protein assay in dry rubber) and modified lowry method (standard method for analysis of aqueous extractable protein in NRL and its products). The developed

spectropantanometry could directly use to quantify protein in NRL by standard addition method which added various concentration of standard protein (albumin) to NRL containing biuret solution followed by measuring RGB intensity by the designed spectropantanometer. It was found that protein in NRL detected by spectropantanometry was 0.044 %w/v with the RSD = 4.7 %

สรุปผลการดำเนินงานของโครงการโดยย่อ (Executive Summary)

เครื่องตรวจวัดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติด้วยวิธีวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง (Spectropantonometer) ที่ได้ออกแบบและสร้างขึ้นนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อทำให้การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และเครื่องมือยังสามารถเคลื่อนย้ายได้สะดวก สำหรับวิธีการที่จะได้พัฒนาขึ้นนี้ เป็นการวัดปริมาณ Total Reactive Protein ในตัวอย่างคอลลอยด์ โดยใช้หลอดไดโอดแปล่งแสงสีขาว (LED) เป็นแหล่งกำเนิดแสงขาวที่ตั้งฉากกับตัวอย่าง และวัดแสงที่กระเจิงจากตัวอย่างที่มีการทำปฏิกิริยากับสารเกิดสี เช่น ไบยูเร็ต ลาวรี หรือแบรดฟอร์ด รีเอเจนต์ เพื่อให้ได้สารสีที่สามารถกระเจิงแสงได้ในระบบคอลลอยด์ โดยไม่จำเป็นที่จะต้องนำมาทำให้เป็นสารละลายใส และในระบบคอลลอยด์ เมื่อสารได้ผสมกันอย่างสมบูรณ์อนุภาคของคอลลอยด์นั้นจะเคลื่อนที่แบบบราวเนียน และแพร่กระจายสู่ทุกพื้นที่ของภาชนะจึงสามารถอนุมานได้ว่า ทุกส่วนของภาชนะนั้นมีความเข้มข้นของสารละลายและอนุภาคของคอลลอยด์อย่างละเท่า ๆ กัน ในการสืบค้นสิทธิบัตรทั้งในประเทศและต่างประเทศ พบว่า มีการใช้ระบบนี้เพียงแต่ในการวัดสีของตัวอย่างในระบบ L*a*b เท่านั้น ยังไม่มีการใช้ระบบ RGB สหสัมพันธ์แบบพหุ (Multiple Regression) ในการหาปริมาณของตัวอย่างสารละลายใด ๆ เลย มีเพียงการประยุกต์ใช้ RGB model ในการวิเคราะห์ภาพถ่ายดาวเทียมในแบนด์ต่าง ๆ เท่านั้น (photogrammetry) ดังนั้นเครื่องที่สร้างขึ้นจึงเป็นเครื่องแรกที่ได้มีการประยุกต์ใช้ RGB model ในการหาปริมาณของโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ (อยู่ในระหว่างดำเนินการขอจดอนุสิทธิบัตร)

- ในงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพารา โดยวิธี Spectropantonometry ซึ่งใช้วิธีการทำให้เกิดสีตามวิธีการของไบยูเร็ต เนื่องจากสามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว เตรียมตัวอย่างได้ง่าย ใช้สารเคมีในปริมาณที่น้อย และประหยัดค่าใช้จ่าย แล้วจึงทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง Spectropantonometer ที่ได้ออกแบบและสร้างขึ้นซึ่งมีไดโอดสีขาวเป็นแหล่งกำเนิดแสง เมื่อเรานำน้ำยางพาราที่เจือจางใส่ลงในเครื่องและใช้ web cam ถ่ายภาพก่อนทำการตรวจวัดความเข้มของสีในระบบ RGB แล้วจึงทำการแปลงค่าความเข้มของสีเป็นค่าตัวเลขที่มีค่าแปรผกผันกับความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพารา พบว่าปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 0.044 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 4.7 % (n=7)

เมื่อนำน้ำยางพารามาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีมาตรฐาน คือวิธีเลารีดัดแปร (Modified Lowry method; ASTM D5712-05, 2005) ซึ่งส่งไปให้ส่วนอุตสาหกรรมยาง สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร เป็นผู้ทดสอบ พบว่าน้ำยางพารามีปริมาณ

โปรตีนเท่ากับ 0.046 %โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่เราได้พัฒนาขึ้นโดยใช้เครื่อง Spectropantonometer ที่ได้สร้างขึ้นในห้องปฏิบัติการนี้ ให้ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นนี้จึงให้ผลการทดลองที่เชื่อถือได้ อีกทั้งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็วกว่าวิธีมาตรฐานมาก

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
Executive Summary	ง
สารบัญรูป	ฌ
สารบัญตาราง	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 สมมติฐานของการวิจัย	1
1.3 ยางธรรมชาติ	2
1.3.1 ลักษณะและส่วนประกอบของน้ำยางธรรมชาติ	2
1.3.2 คุณสมบัติและการรักษาสภาพของน้ำยางธรรมชาติ	3
1.3.2.1 สมบัติทางเคมี	3
1.3.2.2 สมบัติทางกายภาพ	4
1.3.3 การรักษาสภาพน้ำยางธรรมชาติ	4
1.3.4 การใช้สารแอมโมเนียเป็นสารรักษาสภาพน้ำยาง	5
1.4 การแพ้น้ำยางธรรมชาติ	5
1.5 การแพ้โปรตีนจากน้ำยางธรรมชาติ	7
1.6 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีเจลดาห์ล (Kjeldahl method)	7
1.7 วิธีเลารีดัดแปร (Modified Lowry method) สำหรับวิเคราะห์โปรตีนที่สามารถสกัดและละลายน้ำได้ในน้ำยางและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากน้ำยาง	10
1.8 Pantone (แพนโทน)	10
1.8.1. ระบบสี RGB	10
1.8.2. ระบบสี CMYK	11
1.9 Pantanometric analysis	11
1.9.1. หลักการของ Pantanometric analysis	11

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
1.9.2. Pantanometer	12
1.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	12
1.11 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	14
1.12 ขอบเขตของการศึกษาวิจัย	14
1.13 ประโยชน์ที่จะได้รับ	14
บทที่ 2 การทดลอง	
2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ทั่วไปที่ใช้ในงานวิจัย	15
2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีเจลดาห์ล (Kjeldahl method)	16
2.3 วิธีเลารีดัดแปร (Modified Lowry) สำหรับวิเคราะห์โปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้ในน้ำยางและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากน้ำยาง	19
2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติโดยใช้เครื่อง Spectropantonometer ที่สร้างขึ้นโดยใช้วิธีการทำให้เกิดสีด้วยวิธีไบยูเร็ต	23
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในยางแห้งโดยวิธีเจลดาห์ล (Kjeldahl method)	29
3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติโดยเลารีดัดแปร (Modified Lowry method)	36
3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นด้วยเครื่องสเปคโตรแพนโทโนมิเตอร์ ที่ออกแบบและสร้างขึ้นโดยใช้วิธีการทำให้เกิดสีแบบไบยูเร็ต (Biuret Method)	54
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	
4.1 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในยางแห้งด้วยวิธีเจลดาห์ล (Kjeldahl method)	60
4.2 ผลการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางธรรมชาติโดยวิธีเลารีดัดแปร (Modified Lowry method)	60

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
4.3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติด้วยเครื่องสเปคโตรแพนทาโนมิเตอร์ที่ออกแบบและสร้างขึ้นโดยใช้วิธีการทำให้เกิดสีแบบไบยูเร็ต	61
บรรณานุกรม	62
Output ที่ได้จากโครงการ	63
ภาคผนวก 1	64
ภาคผนวก 2	71
ภาคผนวก 3	84

สารบัญรูป

รูป		หน้า
1.1	สูตรโครงสร้างทางเคมีของยางธรรมชาติ (cis -1,4 polyisoprene)	4
1.2	สถานะการเป็นสารแขวนลอยของน้ำยางสด	5
1.3	การเกิดการแพ้ชนิด Type I และ Type IV	6
2.1	เครื่อง Spectropantonometer ที่ได้ออกแบบและสร้างขึ้น	23
2.2	ตัวอย่างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน กับความเข้มของสีในระบบ RGB	27
3.1	กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ในช่วงความเข้มข้น100-700 ppm	38
3.2	กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานสำหรับน้ำยางข้น ในช่วงความเข้มข้น 100-500 ppm สำหรับสารละลาย C	40
3.3	กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานสำหรับน้ำยางข้น ในช่วงความเข้มข้น 100-500 ppm สำหรับสารละลาย C'	40
3.4	กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (สารละลาย C-C') สำหรับน้ำยางข้น	41
3.5	กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานสำหรับน้ำยางข้น ในช่วงความเข้มข้น 100-500 ppm สำหรับสารละลาย C	43
3.6	กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานสำหรับน้ำยางข้น ในช่วงความเข้มข้น 100-500 ppm สำหรับสารละลาย C'	43
3.7	กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (สารละลาย C-C') สำหรับน้ำยางข้น	44
3.8	กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานสำหรับน้ำยางข้น ในช่วงความเข้มข้น 100-500 ppm สำหรับสารละลาย C	46
3.9	กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานสำหรับน้ำยางข้น ในช่วงความเข้มข้น 100-500 ppm สำหรับสารละลาย C'	46
3.10	กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (สารละลาย C-C') สำหรับน้ำยางข้น	47
3.11	กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน สำหรับน้ำยางข้น ในช่วงความเข้มข้น 100-500 ppm สำหรับสารละลาย C	49

สารบัญรูป (ต่อ)

รูป		หน้า
3.12	กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน สำหรับน้ำยางข้น ในช่วงความเข้มข้น 100-500 ppm สำหรับสารละลาย C'	49
3.13	กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (สารละลาย C-C') สำหรับน้ำยางข้น	50
3.14	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของของน้ำยางพารา กับความเข้มของสีในระบบ RGB โดยใช้น้ำยางปริมาตร 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 มิลลิลิตร ตามลำดับ	56
3.15	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของของน้ำยางพารา กับความเข้มของสีในระบบ RGB โดยใช้น้ำยางปริมาตร 0.04, 0.05, 0.06, 0.07 และ 0.08 มิลลิลิตร ตามลำดับ	57

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1.1	ส่วนประกอบของน้ำยางธรรมชาติ	3
1.2	ลักษณะการแพ้ที่อาจเกิดขึ้นได้จากการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากน้ำยางธรรมชาติ	6
1.3	แสดงค่า protein factor ที่ได้จากแหล่งโปรตีนแต่ละชนิด	9
2.1	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Albumin และความเข้มแสงในระบบ RGB	25
2.2	ตัวอย่างการใส่ข้อมูลสมการรวมเพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยวิธี Multiple Regression	26
2.3	ตัวอย่างการใส่ข้อมูลสมการรวมเพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยวิธี Multiple Regression	27
3.1	อัตราส่วนของสารที่ใช้ในการทดลอง	29
3.2	ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการไทเทรต ครั้งที่ 1	30
3.3	ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการไทเทรต ครั้งที่ 2	31
3.4	ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการไทเทรต ครั้งที่ 3	31
3.5	ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการไทเทรต ครั้งที่ 4	32
3.6	ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการไทเทรต ครั้งที่ 5	32
3.7	ปริมาณไนโตรเจน (%) ที่มีในน้ำยางพาราข้นชนิดแอมโมเนียสูงโดยวิธีการอบแบบ TSC	33
3.8	ปริมาณไนโตรเจน (%) ที่มีในน้ำยางพาราข้นชนิดแอมโมเนียสูงโดยวิธีการอบแบบ DRC	34
3.9	ปริมาณไนโตรเจน (%) ที่มีในน้ำยางพาราข้นชนิดแอมโมเนียสูงโดยวิธีการอบแบบ Non-slovent	35
3.10	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0 – 900 ppm และค่าการดูดกลืนแสงของน้ำยางข้น	37
3.11	ปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในยางธรรมชาติ ครั้งที่ 1	38

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
3.12 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น ช่วงความเข้มข้น 100 – 500 ppm	39
3.13 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในยางธรรมชาติโดยใช้สารละลาย C	41
3.14 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในยางธรรมชาติ สำหรับสารละลาย C'	41
3.15 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในยางธรรมชาติ สำหรับสารละลาย C-C'	42
3.16 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น ช่วงความเข้มข้น 100 – 500 ppm	42
3.17 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นโดยใช้สารละลาย C	44
3.18 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นโดยใช้สารละลาย C'	44
3.19 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น สำหรับสารละลาย C-C'	45
3.20 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น ช่วงความเข้มข้น 100 – 500 ppm	45
3.21 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นโดยใช้สารละลาย C	47
3.22 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นโดยใช้สารละลาย C'	47
3.23 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น สำหรับสารละลาย C-C'	48
3.24 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น ช่วงความเข้มข้น 100 – 500 ppm	48
3.25 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นโดยใช้สารละลาย C	50
3.26 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นโดยใช้สารละลาย C'	50
3.27 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น สำหรับสารละลาย C-C'	51
3.28 สรุปผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในยางธรรมชาติโดยวิธีเลารีดัดแปร ในหน่วย ppm	51
3.29 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในยางธรรมชาติโดยวิธีเลารีดัดแปร ในหน่วย %w/v	52
3.30 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในยางธรรมชาติโดยวิธีเลารีดัดแปร ในหน่วย ppm	52
3.31 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในยางธรรมชาติโดยวิธีเลารีดัดแปร ในหน่วย %w/v	53
3.32 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางที่สดและใหม่	53

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
3.33 ค่าความเข้มของสีในระบบ RGB โดยใช้ปริมาตรน้ำยางพารา 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 มิลลิลิตร ตามลำดับ	56
3.34 ค่าความเข้มของสีในระบบ RGB โดยใช้ปริมาตรน้ำยางพารา 0.04, 0.05, 0.06, 0.07 และ 0.08 มิลลิลิตร ตามลำดับ	57
3.35 ความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพาราซึ่งได้จากการทำให้เกิดสีแบบไบยูเร็ตก่อนตรวจวัดด้วยเครื่อง Spectropantonometer	59

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

ในปัจจุบันประเทศไทยเป็นประเทศที่ผลิตยางธรรมชาติ เป็นอันดับต้นๆของโลก จากการสำรวจ เมื่อปี 2537 พบว่า ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกยางพาราประมาณ 11.9 ล้านไร่ ผลิตยางได้ 1.72 ล้านตัน สามารถส่งออกขายยังต่างประเทศได้ถึง 1.6 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่า 41,352 ล้านบาท[1] ดังนั้น ยางพาราจึงเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ สามารถนำรายได้เข้าสู่ประเทศได้มากอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งในน้ำยางธรรมชาตินั้น ประกอบด้วยอนุภาคที่เป็นไฮโดรคาร์บอนร้อยละ 30-40 แขวนลอยอยู่ในเซรุ่ม และยังมีส่วนที่ไม่ใช่ยางอีกร้อยละ 2-3 เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต น้ำตาล โลหะ และน้ำ ซึ่งในงานวิจัยนี้จะเน้นถึงความสำคัญของโปรตีนที่มีอยู่ในยางธรรมชาติ เพราะน้ำยางธรรมชาติซึ่งมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ ก่อให้เกิดการตกค้างของโปรตีนในผลิตภัณฑ์บางชนิด ทำให้เกิดอาการแพ้ตามผิวหนัง สำหรับผู้ที่แพ้โปรตีน พบว่าโปรตีนที่ทำให้เกิดอาการแพ้กับผู้ที่สัมผัสยางจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 14-30 kD[2] จึงมีนักวิทยาศาสตร์มากมาย พยายามหาวิธีตรวจสอบโปรตีนในน้ำยาง โดยวิธีแรกที่ใช้คือ วิธีวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีเจลดาห์ล (Kjeldahl method)[3] โดยวิธีนี้จะวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนโดยตรงจากตัวอย่างอินทรีย์และอนินทรีย์ และนำไปใช้บ่งบอกถึงปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในสารที่ทดสอบ วิธีที่ 2 เป็นการหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีเลารีดัดแปร (Modified Lowry method)[4] ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับใช้ในการหาปริมาณโปรตีนในถุงมือยาง จะเห็นได้ว่าทั้ง 2 วิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน จำเป็นต้องจับตัวก้อนยางก่อนนำมาวิเคราะห์ ในขณะที่งานวิจัยชิ้นนี้ ได้พัฒนาเทคนิคใหม่[5] ซึ่งจะเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยตรงในน้ำยาง โดยใช้หลักการวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง ทำให้ลดขั้นตอนที่ยุ่งยาก และประหยัดเวลาในการตรวจวิเคราะห์มากกว่า

1.2 สมมติฐานของงานวิจัย

เครื่องสเปคโตรแพนทาโนมิเตอร์ (Spectropantanometer) ที่ออกแบบและสร้างขึ้นใช้ในการ**ทดสอบหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติได้โดยตรง**

1.3 ยางธรรมชาติ [6]

ยางธรรมชาติมีมากมายหลากหลายสายพันธุ์ แต่ที่นิยมปลูกในประเทศไทยมีชื่อว่า ยางพารา หรือมีชื่อทางวิชาการว่า Hevea Brasiliensis ซึ่งน้ำยางที่ได้จากต้นยาง มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ในน้ำ (emulsion) เป็นของเหลวสีขาว มีสภาพเป็นคอลลอยด์ มีปริมาณของแข็งร้อยละ 30 - 40 มี pH 6.5 – 7 น้ำยางมีความหนาแน่นประมาณ 0.975 – 0.980 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความหนืด 12 – 15 เซนติพอยส์ [6]

น้ำยางสดจะคงสภาพความเป็นน้ำยางอยู่ได้ไม่เกิน 6 ชั่วโมง เนื่องจากมีแบคทีเรียในอากาศและจากแบคทีเรียในเปลือกของต้นยางขณะกรีดยาง จะลงไปในน้ำยาง ซึ่งจะกินสารอาหาร เช่น โปรตีน น้ำตาล ฟอสโฟไลปิด และเกิดการย่อยสลายสารอาหาร ได้เป็นก๊าซชนิดต่างๆ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซมีเทน ซึ่งเกิดการบูดเน่าและเกิดกลิ่นเหม็น การที่มีก๊าซที่ระเหยง่ายเหล่านี้ในน้ำยางเพิ่มมากขึ้น จะส่งผลให้ค่า pH ของน้ำยางลดลง ทำให้น้ำยางเกิดการสูญเสียสภาพ ซึ่งสังเกตได้จากน้ำยางจะค่อยๆ หนืดขึ้นเนื่องจากอนุภาคของยางเริ่มจับตัวเป็นเม็ดเล็กๆ และกลายเป็นก้อนใหญ่ขึ้น ทำให้น้ำยางสูญเสียสภาพ โดยน้ำยางจะแยกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นเนื้อยาง และส่วนที่เป็นเซรั่ม ดังนั้นเพื่อป้องกันการสูญเสียสภาพของน้ำยางไม่ให้อนุภาคของเม็ดยางเกิดการรวมตัวกันเองตามธรรมชาติ จึงมีการเติมสารเคมีลงไปในน้ำยางเพื่อเก็บรักษาน้ำยางให้คงสภาพเป็นของเหลว โดยสารเคมีที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำยางเรียกว่า สารป้องกันการจับตัว (Anticoagulant) ได้แก่ แอมโมเนีย โซเดียมซัลไฟด์ และฟอร์มาลดีไฮด์ เป็นต้น

การนำยางธรรมชาติไปใช้งานมีอยู่ 2 รูปแบบคือ รูปแบบน้ำยาง และรูปแบบยางแห้ง ในรูปแบบน้ำยางนั้นน้ำยางสดจะถูกนำมาแยกน้ำออกเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเนื้อยางด้วยวิธีการต่าง ๆ แต่ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมคือการใช้เครื่องเซนตริฟิวส์ ในขณะที่การเตรียมยางแห้งนั้นจะนิยมใช้วิธีการใส่กรดอะซิติกลงในน้ำยางสด เพื่อทำให้น้ำยางจับตัวเป็นก้อน เกิดการแยกชั้นระหว่างเนื้อยางและน้ำ ส่วนน้ำที่ปนอยู่ในยางจะถูกกำจัดออกไปโดยการรีดด้วยลูกกลิ้งชนิด 2 ลูกกลิ้ง วิธีการที่ทำให้ยางแห้งสนิทมี 2 วิธีคือ การรมควันยาง และการอบแห้งด้วยความร้อน แต่เนื่องจากยางผลิตได้มาจากเกษตรกรจากแหล่งที่แตกต่างกัน ทำให้ต้องมีการแบ่งชั้นของยางตามความบริสุทธิ์ของยางนั้น

1.3.1 ลักษณะและส่วนประกอบของน้ำยางธรรมชาติ [2]

ยางธรรมชาติเป็นคอลลอยด์ที่มีส่วนประกอบอื่นๆ ปะปนอยู่ มีความเป็นกรด-ด่าง (pH) ประมาณ 6.5-7.0 มีความหนาแน่น 0.975-0.980 กรัม/มิลลิลิตร ปริมาณเนื้อยางแห้งของน้ำยางธรรมชาติในสภาพน้ำยางสดมีอยู่ร้อยละ 30 – 40 ปริมาณสารที่ไม่ใช่เนื้อยางอยู่ร้อยละ 2 – 3 โดย

น้ำหนักของเนื้อยางทั้งหมด ซึ่งในปริมาณนี้เป็นสารโปรตีนที่ละลายน้ำได้ประมาณครึ่งหนึ่งและประมาณหนึ่งในสี่จะดูดซับที่ผิวอนุภาคยางส่วนที่เหลือจะอยู่ในรูปของสาร Lutoid น้ำยางธรรมชาติประกอบด้วยอนุภาคยางไฮโดรคาร์บอนและสารที่ไม่ใช่ยาง (non - rubber) แขวนลอยอยู่ในตัวกลางที่เป็น aqueous serum phase โดยส่วนประกอบของน้ำยางธรรมชาติ แสดงดังตาราง 1.1

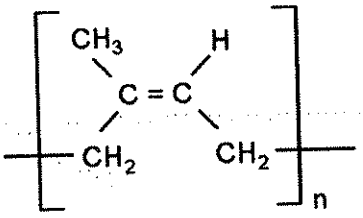
ตาราง 1.1 ส่วนประกอบของน้ำยางธรรมชาติ [2]

ส่วนประกอบ	น้ำยาง (%โดยน้ำหนัก)	ยางแห้ง (%โดยน้ำหนัก)
ยางไฮโดรคาร์บอน	36	93.7
โปรตีน	1.4	2.2
คาร์โบไฮเดรต	1.6	0.4
นิวทรอลไลปิด	1.0	2.4
ไกลโคไลปิด+ฟอสโฟไลปิด	0.6	1.0
อนินทรีย์สาร	0.5	0.2
อื่นๆ	0.4	0.1
น้ำ	58.5	-

1.3.2 คุณสมบัติและการรักษาสภาพของน้ำยางธรรมชาติ [2]

1.3.2.1 สมบัติทางเคมี

ยางธรรมชาติเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เขียนเป็นสูตรเคมี คือ C_5H_8 เรียกชื่อทางเคมีว่า “ไอโซพรีน” (isoprene) โดยโครงสร้าง 1 โมเลกุลของไอโซพรีนที่ต่อกันแบบซิส (linear cis-1,4 polyisoprene) มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 200,000 ถึง 400,000 มีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลกว้างมาก ซึ่งทำให้ยางธรรมชาติมีลักษณะกระบวนการแปรรูปที่ดี โดยสูตรโครงสร้างทางเคมีของยางธรรมชาติ แสดงดังรูป 1.1



รูป 1.1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของยางธรรมชาติ (cis - 1,4 polyisoprene) [2]

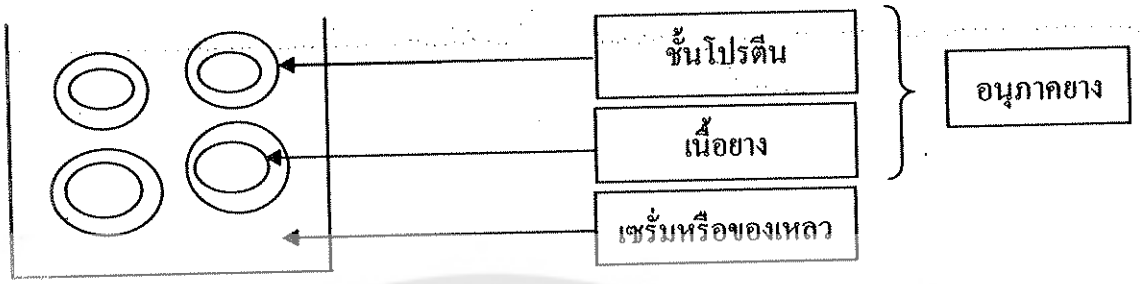
1.3.2.2 สมบัติทางกายภาพ [2]

ที่อุณหภูมิประมาณ -70 องศาเซลเซียส คือ อุณหภูมิของการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (glass transition temperature; Tg) ของยางธรรมชาติ โดยยางจะเปลี่ยนจากยืดหยุ่น กลายเป็นของแข็งและแตกได้คล้ายแก้ว ซึ่งยางธรรมชาติมีความเป็นฉนวนไฟฟ้าที่สูงโดยมีค่าความต้านทานไฟฟ้า (specific resistivity) ประมาณ 1×10^{15} -2×10^{15} ohms-cm

1.3.3 การรักษาสภาพน้ำยางธรรมชาติ [2]

น้ำยางมีส่วนของอนุภาคของยาง (rubber particles) แขวนลอยอยู่ ที่เรียกว่าเซรั่ม (serum) และยังมีส่วนประกอบของสารอื่นๆ ที่ไม่ใช่ยางประกอบอยู่ด้วย เช่น โปรตีน ซึ่งจะถูกดูดซับอยู่รอบๆ ผิวของยาง จะฟอร์มชั้นและห่อหุ้มเปลือกยางไว้ (รูป 1.2) โดยชั้นห่อหุ้มอนุภาคยางมีความสำคัญต่อการคงตัวของน้ำยาง หรือเกิดความเสถียรเกิดขึ้น เพราะชั้นโปรตีนจะป้องกันไม่ให้แต่ละอนุภาคของยางเกิดการรวมตัวกัน และจับตัวเป็นก้อน ซึ่งในชั้นของโปรตีนยังมีอนุภาคลบของคาร์บ็อกซีเลต (carboxylate , $RCCO^-$) ทำให้เกิดการผลักกันเกิดขึ้นระหว่างอนุภาคของยาง ทำให้ป้องกันการรวมตัวกันและจับกันเป็นก้อนของน้ำยางได้ น้ำยางจึงยังคงสภาพเป็นของเหลวอยู่ได้

อนุภาคยางในสภาพที่เป็นน้ำยาง



รูป 1.2 สถานะการเป็นสารแขวนลอยของน้ำยางสด [2]

1.3.4 การใช้สารแอมโมเนียเป็นสารรักษาสภาพน้ำยาง [2]

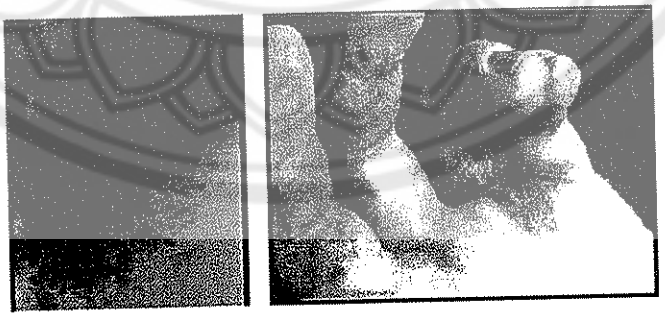
การรักษาสภาพน้ำยางจะใช้ปริมาณแอมโมเนีย 0.2% โดยน้ำหนักของน้ำยาง ซึ่งจะรักษาสภาพของน้ำยางในช่วงเวลาสั้นๆ แต่ถ้าใช้ปริมาณแอมโมเนียประมาณ 0.7% โดยน้ำหนัก จะสามารถรักษาน้ำยางในช่วงเวลาที่นานพอสมควร ในกรณีที่กรีดยางทันทีจะนิยมการเติมแอมโมเนียในปริมาณเล็กน้อยเพียง 0.01%โดยน้ำหนัก เพื่อที่จะป้องกันการเริ่มจับตัวกันของน้ำยาง โดยปกติแอมโมเนียที่ใช้รักษาสภาพน้ำยาง มีอยู่ 2 รูป คือ แอมโมเนียที่อยู่ในรูปของ anhydrous liquid และในรูปแอมโมเนียเข้มข้น แต่จะนิยมใช้แอมโมเนียที่อยู่ในรูป anhydrous liquid ที่บรรจุในถังมากกว่า เพราะมีความปลอดภัยในการเคลื่อนย้ายมากกว่าแอมโมเนียเข้มข้น นอกจากนี้การใช้แอมโมเนียน้ำเข้มข้นโดยตรงจะทำให้น้ำยางจับตัวเป็นหย่อมๆ ได้

1.4 การแพ้น้ำยางธรรมชาติ [7]

น้ำยางธรรมชาติมีส่วนประกอบที่ไม่ใช่ยางอยู่ร้อยละ 2-3 แขวนลอยอยู่ เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต น้ำตาล โลหะ และน้ำ เป็นต้น เมื่อนำน้ำยางธรรมชาติไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์หลายประเภท เช่น ถุงมือยาง ถุงยางอนามัย สายยางยืด จุกนม สายสวนปัสสาวะ เป็นต้น ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการแพ้ต่อผู้ใช้งานได้ เช่น การแพ้โปรตีนหรือสารเคมีที่ตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์ โดยการแพ้โปรตีนที่มีอยู่ในยางธรรมชาติเป็นสาเหตุการแพ้ที่เป็นปัญหามากที่สุด ในผลิตภัณฑ์จากน้ำยางธรรมชาติ โดยลักษณะของอาการแพ้ยาง ที่เกิดจากผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากน้ำยางธรรมชาติ แสดงดังตาราง 1.2

ตาราง 1.2 ลักษณะการแพ้ที่อาจเกิดขึ้นได้จากการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากน้ำยางธรรมชาติ [7]

ลักษณะของการแพ้	อาการ	สาเหตุ	หมายเหตุ
Type IV- การแพ้สารเคมี (Allergic contact dermatitis)ภูมิต้านทานของร่างกายทำงานผ่านทางเม็ดเลือดขาวชนิดทีเซล (T-lymphocytes)ในการต้านการติดเชื้อและทำให้เกิดปฏิกิริยาแบบดีเลย์ไฮเปอร์เซนซิติวิตี้ (Delayed hypersensitivity)	ปรากฏในเวลา 48-98 ชั่วโมง หลังจากที่เกิดการสัมผัสผิวหนังอักเสบเป็นผื่นแดง มีผื่นคัน ซึ่งต่อไปอาจจะเป็นตุ่มพองและขยายวงกว้างกว่าบริเวณที่สัมผัส	สารเคมีตกค้างที่ใช้ในกระบวนการผลิตถุงมือโดยเฉพาะไทยูแรม และคาร์บาเนต	ดูรูป 1.3
Type I-การแพ้โปรตีน (Latex allergy) ปฏิกิริยาที่เกิดการแพ้ขึ้นทันที (Immediate hypersensitivity) เนื่องจาก Immunoglobumin E (IgE) ที่ถูกสร้างขึ้นมาจะมีปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงต่อสารก่อภูมิแพ้	เป็นผื่นแดงทันทีบริเวณที่สัมผัสผิวหนังไหม้หรือเป็นแผลเจ็บปวด ลมพิษผื่นคันภายใน 5-60 นาที หลังจากที่เกิดการสัมผัส โรคเยื่อบุช่องจมูกอักเสบ โรคหอบหืด หายใจลำบาก ปฏิกิริยาภูมิแพ้ชนิดที่รุนแรงที่สุด บางครั้งช็อก อาจรุนแรงมากถึงเสียชีวิต	โปรตีนที่สกัดได้ตกค้างในผลิตภัณฑ์จากน้ำยางธรรมชาติ	



รูป 1.3 การเกิดการแพ้ชนิด Type I และ Type IV [7]

1.5 การแพ้โปรตีนจากน้ำยางธรรมชาติ [7]

ผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติที่พบว่ามีโปรตีนตกค้างอยู่ และก่อให้เกิดอาการแพ้ได้โดยตรงต่อผู้ใช้งาน คือ ถุงมือยาง ลักษณะของการแพ้โปรตีนจากถุงมือยาง จะเกิดผิวหนังอักเสบ เป็นผื่นแดง เกิดลมพิษ อาการหืดหอบ การแพ้โปรตีนจากน้ำยางธรรมชาติเกิดจากการที่สารก่อภูมิแพ้เข้าสู่ร่างกายซึ่งสามารถเกิดได้หลายวิธี ได้แก่

1. ทางผิวหนัง เป็นปฏิกิริยาที่เป็นอันตรายมากที่สุด เกิดขึ้นเมื่อถุงมือสัมผัสพื้นที่เปียกชื้นของร่างกายหรืออวัยวะภายในระหว่างการผ่าตัด

2. ระบบหายใจ เนื่องจากแป้งที่ใช้ป้องกันการติดกันของถุงมือจะดูดซับโปรตีนจากถุงมือที่ผลิตจากยางธรรมชาติเมื่อมีการใช้ถุงมือ อนุภาคเหล่านี้อาจหลุดลอยปะปนอยู่ในอากาศ ทำให้คนที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียงมีโอกาสที่จะได้รับโปรตีนจากยางธรรมชาติไปด้วยแบบไม่ได้ตั้งใจ

3. การสัมผัสกับเยื่อบุภายในและเยื่อบุมิวคัส คือ ผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัด (รวมทั้งผู้ป่วยที่มีความผิดปกติที่กระดูกสันหลัง) จะเกิดการแพ้อย่างรุนแรงเนื่องมาจากการสัมผัสกับถุงมือยางระหว่างทำการผ่าตัด

จากปัญหาเรื่องการแพ้ ทำให้ผู้บริโภคหลีกเลี่ยงการใช้ถุงมือที่ผลิตจากน้ำยางธรรมชาติและหันไปใช้ถุงมือที่ผลิตจากน้ำยางสังเคราะห์แทน แต่จากข้อมูลตามตาราง 1.2 พบว่าถึงแม้ถุงมือสังเคราะห์จะไม่มีโปรตีน แต่ยังไม่ได้รับการยืนยันว่าไม่ก่อให้เกิดการแพ้ใดๆ ทั้งนี้เพราะสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการผลิตถุงมือยางสังเคราะห์ก็สามารถจะทำให้เกิดการแพ้แบบ Type IV ได้ ดังนั้นถ้าผู้ใช้ไม่เป็นผู้ที่ไวต่อการแพ้โปรตีนจากน้ำยางธรรมชาติแล้ว การเลือกใช้ถุงมือที่ผลิตจากน้ำยางธรรมชาติย่อมดีกว่าการเลือกใช้ถุงมือสังเคราะห์ เนื่องจากถุงมือที่ผลิตจากน้ำยางธรรมชาติมีความแข็งแรงกว่าถุงมือสังเคราะห์ เพราะว่ามีความนิ่มและยืดหยุ่นดีมาก สวมใส่ได้สบาย พอดี และมีความสามารถในการหยิบฉวยสิ่งต่างๆได้ดี ไวต่อการสัมผัส

1.6 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีเจลดาห์ล (Kjeldahl method) [3]

วิธีเจลดาห์ล เป็นวิธีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนถูกค้นพบในปี 1883 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวเดนมาร์ก ชื่อ จอห์น เจลดาห์ล โดยครั้งแรกวิธีเจลดาห์ลได้ถูกกำหนดให้เป็นวิธีทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในกระบวนการการผลิตเบียร์ของบริษัทคาร์ลเบิร์ก เนื่องจากตั้งอยู่ใกล้กรุงโคเปนเฮเกน ของประเทศเดนมาร์ก จากนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนให้มีความรวดเร็วและแม่นยำมากกว่าวิธีที่ใช้อยู่ในเวลานั้น ซึ่งผู้ใช้ที่ยังไม่ชำนาญก็จะสามารถใช้งานได้ง่าย และยังประหยัดเวลากว่าเดิมมาก นอกจากนี้ยังประหยัดพลังงานและสารเคมีที่ใช้ ทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ได้

ตั้งแต่ปี 1883 วิธีเจลดาห์ลได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางและสามารถประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย ซึ่งการหาปริมาณไนโตรเจนนั้น จะวิเคราะห์ในรูปของอาหาร เครื่องดื่ม เนื้อสัตว์ อาหารสัตว์ ธัญพืช น้ำเสีย ดิน และตัวอย่างอื่นๆ ซึ่งวิธีเจลดาห์ลได้รับการรับรองจากสถาบันนานาชาติ ได้แก่

- AOAC International (formerly the Association of Official Analytical Chemists)
- Association of American Cereal Chemists
- American Oil Chemists Society
- Environmental Protection Agency
- International Standards Organization
- United States Department of Agriculture

วิธีเจลดาห์ล ใช้วิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนในองค์ประกอบของสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ และถึงแม้ว่าเทคนิคและอุปกรณ์จะมีการปรับเปลี่ยนไปเกือบ 100 ปี แต่หลักการและทฤษฎีที่ได้นำเสนอโดย John Kjeldahl นั้นยังคงอยู่จนถึงทุกวันนี้

ขั้นตอนในการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธีเจลดาห์ล มี 3 ขั้นตอนคือ

1. การย่อย (digestion) วัตถุประสงค์ของการย่อย คือ การเข้าไปทำลายพันธะเคมีของตัวอย่าง เช่น เนื้อ เนยแข็ง เป็นต้น ให้กลายเป็นโมเลกุลย่อย เช่น กรดอะมิโน ถูกสลายพันธะและเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมแรดิคอล (NH_4 radical) วิธีการทำคือ เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงไปในตัวอย่างเพื่อให้เกิดการสลายพันธะของตัวอย่าง จากนั้นทำการเติมเกลือโปแตสเซียมซัลเฟต เพื่อเพิ่มอุณหภูมิของการย่อย และเพื่อให้การย่อยเสร็จสมบูรณ์จะเติมคะตะลิสต์ลงไปเพื่อทำการเร่งการเกิดปฏิกิริยาเคมี ข้อสำคัญในกระบวนการย่อยนี้คือ ต้องควบคุมอัตราส่วนของกรดและเกลือ (acid-salt ratio) และอุณหภูมิให้เหมาะสม การย่อยจึงจะเกิดปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์

2. การกลั่น (distillation) โดยการกลั่นจะเป็นการแยกโปรตีน ออกจากของเหลวในหลอดย่อยโดยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไปเพื่อเป็นการปรับ pH ให้ของเหลวที่อยู่ในหลอดย่อยเป็นกลาง เพื่อเปลี่ยน NH_4^+ (ammonium ion) ให้กลายเป็น แอมโมเนีย (NH_3) จากนั้นกลั่นแยกแอมโมเนียออกมา แล้วจับด้วยสารละลายกรดบอริกเข้มข้น (Conc. Boric acid) ที่ทำให้กลายเป็นสารละลายผสม (mix indicator) โดยแอมโมเนียมที่จับไว้จะไปรวมกับกรดบอริค กลายเป็นแอมโมเนียมบอเรท

3. การไทเทรต (Titration) โดยนำเอาแอมโมเนียมที่ถูกจับไว้ในกรดบอริคมาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก (HCl) หรือ สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)

การคำนวณหา % Nitrogen และ % Protein สามารถคำนวณได้จากสมการ 1.1 [3]

$$\%N = \frac{(A-B) \times C \times 1.4007}{D} \quad \text{.....1.1}$$

โดย

A คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริกที่ใช้ไทเทรตกับตัวอย่าง (mL)

B คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริกที่ใช้ไทเทรตกับแบลงค์ (mL)

C คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริก (N)

D คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

1.4007 คือ น้ำหนักโมเลกุลของไนโตรเจนต่อน้ำหนักของตัวอย่างในหน่วยกรัม

จากนั้นนำ %N ที่ได้มาคำนวณหาปริมาณโปรตีน (% P) ได้จากสมการ 1.2 [3]

$$\%P = \%N \times 6.25 \quad \text{.....1.2}$$

โดย

6.25 คือ ค่า protein factor

ซึ่งค่า protein factor มีอยู่หลายค่าขึ้นอยู่กับการนำไปพัฒนาใช้กับตัวอย่างแต่ละชนิด ค่าจากตาราง 1.3 จะแสดงค่า protein factor ที่ได้จากแหล่งโปรตีนแต่ละชนิด

ตาราง 1.3 ค่า protein factor ที่ได้จากแหล่งโปรตีนแต่ละชนิด [3]

Protein sourses	Protein factor
Milk and dairy	6.38
Other grain	6.25
Rice	5.95
Wheat flour	5.70

* น้ำยางธรรมชาติจัดอยู่ในกลุ่มของ Other grain

1.7 วิธีเลารีดัดแปร (Modified Lowry Method) สำหรับวิเคราะห์โปรตีนที่สามารถสกัด และละลายน้ำได้ในน้ำยางและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากน้ำยาง [4]

วิธีมาตรฐาน (ASTM Standard) ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนประกอบด้วย

D 3577 Specification for Rubber Surgical Gloves

D 3578 Specification for Rubber Examination Gloves

D 4483 Practice for Evaluting Pracision for Test Method Standard in the Rubber and Carbon Black Manufacturing Industries

ข้อมูลดังกล่าวนี้เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่สกัดออกมาได้ทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับยางธรรมชาติและผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ โดยส่วนใหญ่จะทำการสกัดโปรตีนจากถุงมือยางธรรมชาติและถุงมือยางทางการแพทย์ ซึ่งวิธีมาตรฐานนี้จะครอบคลุมในการวิเคราะห์หาโปรตีนที่ถูกสกัดออกมาและสามารถละลายน้ำได้ในน้ำยางธรรมชาติและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากยางธรรมชาติ มีวิธีการ 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. การสกัดโปรตีน (protein extraction) โดยโปรตีนจะถูกสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์
2. การตกตะกอนโปรตีน (protein precipitation) ทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรด
3. การหาปริมาณโปรตีน (protein quantitation) ทำการแยกตะกอนที่ได้ออกมาแล้วละลายตะกอนโปรตีนด้วยอัลคาไลน์ นำไปฟอร์มสีโดยใช้สารละลาย copper/folin จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS Spectrophotometer)

1.8 Pantone (แพนโทน) [5]

แพนโทน (pantone) เป็นจักรพบแม่สี ที่มีความเข้มลดหลั่นกันตามลำดับของสีที่เกิดขึ้น เทคโนโลยีการพิมพ์แบบมีความเหมือนยิ่งยวด (true match) ใช้ระบบแพนโทนในการเทียบสี ระบบแพนโทนกำหนดตัวเลขในแม่แบบเป็นสองชนิดได้แก่

1.8.1. ระบบสี RGB เป็นระบบสีของแสง ซึ่งเกิดจากการหักเหของแสงผ่านแท่งแก้วปริซึม จะเกิดแทบสีที่เรียกว่า สีรุ้ง (Spectrum) ซึ่งแยกสีตามที่สายตามองเห็นได้ 7 สี คือ แดง แสด เหลือง เขียว น้ำเงิน คราม ม่วง ซึ่งเป็นพลังงานอยู่ในรูปของรังสี ที่มีช่วงคลื่นที่สายตาสามารถมองเห็นได้ แสงสีม่วงมีความถี่คลื่นสูงที่สุด คลื่นแสงที่มีความถี่คลื่นสูงกว่าแสงสีม่วงเรียกว่า อุลตราไวโอเลต (Ultraviolet) และคลื่นแสงสีแดง มีความถี่คลื่นต่ำที่สุด คลื่นแสงที่ต่ำกว่าแสงสีแดงเรียกว่า

อินฟราเรด (Infrared) คลื่นแสงที่มีความถี่สูงกว่าสีม่วง และต่ำกว่าสีแดงนั้น สายตาของมนุษย์ไม่สามารถรับได้ และเมื่อศึกษาดูแล้วแสงสีทั้งหมดเกิดจากแสงสี 3 สี คือ สีแดง (Red) สีน้ำเงิน (Blue) และสีเขียว (Green) ทั้งสามสีถือเป็นแม่สีของแสง เมื่อนำมาฉายร่วมกันจะทำให้เกิดสีใหม่อีก 3 สี คือ สีแดงมาเจนต้า สีฟ้าไวแอนและสีเหลือง และถ้าฉายแสงสีทั้งหมดรวมกันจะได้แสงสีขาว จากคุณสมบัติของแสงนี้เรา ได้นำมาใช้ประโยชน์ทั่วไป ในการฉายภาพยนต์ การบันทึกภาพวีดีโอ ภาพโทรทัศน์ การสร้างภาพเพื่อการนำเสนอทางจอคอมพิวเตอร์ และการจัดแสงสีในการแสดง เป็นต้น

1.8.2. ระบบสี CMYK เป็นระบบสีที่เป็นวัตถุ คือสีแดง เหลือง น้ำเงิน แต่ไม่ใช่สีน้ำเงินที่เป็นแม่สีวัตถุธาตุ แม่สีในระบบ CMYK เกิดจากการผสมกันของแม่สีของแสงหรือ ระบบสี RGB คือ

แสงสีน้ำเงิน + แสงสีเขียว = สีฟ้า (Cyan)

แสงสีน้ำเงิน + แสงสีแดง = สีแดง (Magenta)

แสงสีแดง + แสงสีเขียว = สีเหลือง (Yellow)

สีฟ้า (Cyan) สีแดง (Magenta) สีเหลือง (Yellow) นี้นำมาใช้ในระบบการพิมพ์ และมีการเพิ่มเติมสีดำเข้าไปเพื่อให้มีน้ำหนักเข้มข้นอีก เมื่อรวมสีดำ (Black) เข้าไป จึงมีสี่สี โดยทั่วไปจึงเรียกระบบการพิมพ์นี้ว่า ระบบการพิมพ์สี่สี (CMYK) ระบบการพิมพ์สี่สี (CMYK) เป็นการพิมพ์ภาพในระบบที่ทันสมัยที่สุด และได้ภาพใกล้เคียงกับภาพถ่ายมากที่สุด โดยการพิมพ์ทีละสีจากสีเหลือง สีแดง สีน้ำเงิน และสีดำ ลองใช้แว่นขยายส่องดู ผลงานพิมพ์ชนิดนี้ จะพบว่า จะเกิดจากจุดสีเล็กๆ สี่สีอยู่เต็มไปหมด การที่เรามองเห็นภาพมีสีต่างๆ นอกเหนือจากสี่สีนี้ เกิดจากการผสมของเม็ดสีเหล่านี้ในปริมาณต่างๆ คิดเป็น% ของปริมาณเม็ดสี ซึ่งกำหนดเป็น 10-20-30-40-50-60-70-80-90 จนถึง 100%

1.9 Pantanometric analysis

1.9.1. หลักการของ Pantanometric analysis

เป็นการวิเคราะห์สารตัวอย่างคอลลอยด์ที่มีความเข้มข้นเรียงตามลำดับ แล้วนำมาเกิดปฏิกิริยากับสารรีเอเจนต์จนได้สีที่คงที่ จากนั้นนำสารตัวอย่างมาวัดสีแล้วจะได้ค่าเมตริกซ์ตัวเลข เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์แบบ multiple regression analysis แล้ว จะได้ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย และความเข้มข้นของสี ซึ่งเป็นหลักการเดียวกับการวิเคราะห์ภาพถ่าย

ดาวเทียม สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของสีกับความเข้มของสารละลาย เรียกว่า Pantonomic equation

1.9.2. Pantanometer

เครื่อง Pantanometer ประกอบด้วย

1. ระบบตัวเครื่อง จะประกอบไปด้วย ส่วนที่ใส่สารตัวอย่าง และแหล่งกำเนิดแสง
2. ระบบการตรวจวัด จะใช้กล้อง (Webcam) ในการตรวจวัดความเข้มสีของสารตัวอย่าง
3. ระบบการประเมินผล จะมีโปรแกรมที่มีระบบ RGB ที่ใช้ประเมินผลความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

การทำงานของ Pantanometer

ทำการเชื่อมต่อทุกระบบเข้าด้วยกัน เมื่อเตรียมสารตัวอย่างที่เราสนใจได้แล้วนำเข้าเครื่อง ซึ่งจะเป็นระบบปิดเพื่อป้องกันการรบกวนจากแสงภายนอก หลังจากนั้นใช้กล้องตรวจวัดความเข้มของแสงสีในตัวอย่างสารคอลลอยด์ และจะมีโปรแกรมซึ่งใช้ ระบบ RGB (Red, Green, Blue) แสดงค่าออกมาเป็นตัวเลข และนำค่านั้นมาสร้างกราฟเพื่อเทียบกลับเป็นความเข้มข้นของตัวอย่างคอลลอยด์ต่อไป

1.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิเคราะห์ทางเคมี เพื่อหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ มีวิธีมาตรฐาน คือวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางธรรมชาติและผลิตภัณฑ์ [4] เป็นการดัดแปรวิธีเลารีโดยจะวิเคราะห์หาจำนวนโปรตีนที่สกัดออกมาได้ทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับยางธรรมชาติและผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ โปรตีนที่ละลายน้ำจะถูกสกัดในสารละลายบัฟเฟอร์ จากนั้นทำการตกตะกอนเพื่อเพิ่มความเข้มข้น และทำการแยกออกจากสารที่ละลายน้ำได้ ที่อาจจะรบกวนในการวิเคราะห์ จากนั้นนำโปรตีนที่สกัดได้มาละลายอีกครั้ง แล้วทำการวิเคราะห์สี ด้วยวิธีโมดิไฟด์เลารี

จากการค้นคว้างานวิจัยจากต่างประเทศ ที่เกี่ยวกับการลดปริมาณโปรตีน จากถุงมือยางธรรมชาติ มีดังนี้

D.H. Beezhold และ คณะ [8] ได้ทำการศึกษาการลดปริมาณโปรตีน ซึ่งการลดปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ เป็นสิ่งสำคัญในการป้องกันอาการแพ้โปรตีนในยางโดยเทคนิค ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) ที่เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์โปรตีน

แอนติเจน ที่จะใช้แทนปริมาณโปรตีนรวมที่อาจจะก่อให้เกิดอาการแพ้ได้ จึงสอดคล้องกับวิธีที่ช่วยลดความไวต่อโปรตีนและยังช่วยลดการเกิดอาการแพ้โปรตีนจากผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ได้

F.W. Perrella และ A.A. Gaspari [9] ศึกษาเกี่ยวกับการลดปริมาณโปรตีนในยางธรรมชาติ โดยอาศัยความสำคัญของการรักษาเอนไซม์ในถุงมือจากยางธรรมชาติ โดยโปรตีนที่อยู่บนถุงมือยางมีปฏิกิริยาที่ไวต่อการสัมผัส ซึ่งโปรตีนแบบเดียวกันเหล่านี้จะช่วยรักษาความเสถียรของคอลลอยด์ที่อยู่ในยางก่อนที่จะส่งไปถึงมือผู้ประกอบการ ดังนั้นในขณะที่มีการลดปริมาณโปรตีนลง ก็อาจเกิดปัญหาเกิดขึ้น เช่น การไม่คงตัวและเกิดการเปลี่ยนสภาพของยางที่จับตัวกันเป็นก้อน ซึ่งวิธีที่ใช้อยู่จะช่วยลดปริมาณโปรตีนแอนติเจนที่สกัดจากผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ จึงเป็นผลดีในการลดปริมาณโปรตีนในยางระดับทางการค้า ผู้ผลิตถุงมือยางจึงสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณโปรตีนแอนติเจนต่ำได้ โดยจะให้ความสำคัญกับการรักษาเอนไซม์ของยางธรรมชาติ ขณะที่กระบวนการนี้ได้ผลดีมากในการลดปริมาณโปรตีนแอนติเจนในยางธรรมชาติ ถึงแม้ว่าเทคโนโลยีนี้จะมีการเพิ่มต้นทุนในการผลิตยางธรรมชาติ แต่ก็ยังคงมีราคาที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติหรือยางสังเคราะห์ที่ต้องมีการล้างผลิตภัณฑ์ เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนออก

จากการค้นคว้างานวิจัยในเมืองไทย ที่เกี่ยวข้องกับการหาปริมาณโปรตีนจากยางธรรมชาติและผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ มีดังนี้

ดรุณี วัชราเรืองวิทย์ และคณะ [10] ซึ่งได้ทำการศึกษาหาปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำจากถุงมือยางทางการแพทย์และเทคนิคการลดปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำ โดยวิธีเลารี (Lowry) ซึ่งสกัดโปรตีนจากถุงมือยาง โดยทำการตกตะกอนสารละลายโปรตีนด้วยกรด และทิ้งสารที่ละลายน้ำหรือสารรบกวนอื่นๆ ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วยสารละลายอัลคาไลน์ จากนั้นทดสอบด้วย เครื่องคัลเลอริมิเตอร์ (Colorimeter) และทำปฏิกิริยากับสารละลาย copper/folin จะได้สารละลายสีน้ำเงินอย่างสมบูรณ์ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี วิสิเบิลสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS spectrophotometer) พบว่าถุงมือยางชนิดที่มีแป้งช่วยในการหล่อลื่น มีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูงและทดลองด้วยเทคนิคการล้างถุงมือยางด้วยน้ำประปาเพิ่มอีกครั้ง จะช่วยลดปริมาณของโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากถุงมือยางลง โดยปริมาณ 1-4 เท่าของการล้างด้วยน้ำประปาจะช่วยชะล้างสารเคมีและโปรตีนที่อยู่บริเวณผิวของถุงมือยางได้

ดารัตน์ ไชยวารี และ นิษยา วงษ์เกิดชวน [11] ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ โดยใช้วิธีการทำให้เกิดสีด้วยวิธีเลารี เปรียบเทียบกับวิธีไบยูเร็ต ก่อนนำไปตรวจวัดด้วยเครื่องวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสงที่ได้ออกแบบและสร้างขึ้น ซึ่งสารสีที่เกิดขึ้นจะมี

ความเข้มที่แปรผกผันกับความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนที่มีในน้ำยาง โดยพบว่าการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ ซึ่งมีลักษณะเป็นคอลลอยด์สามารถวิเคราะห์ได้โดยตรง โดยไม่ต้องตกตะกอนก่อน ดังนั้นการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางธรรมชาติด้วยวิธีนี้ จึงสามารถวิเคราะห์สีเทียบกลับไปเป็นความเข้มข้นของโปรตีนได้โดยตรง จากการทดลองพบว่าปริมาณของโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติจะอยู่ในช่วง 0.0348-0.0394 และ 0.0406-0.0473 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ด้วยวิธีการเกิดสีแบบเลารีและไบยูเร็ต ตามลำดับ ซึ่งวิธีการทำให้เกิดสีทั้งสองวิธี ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

1.11 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อพัฒนาวิธีการหาปริมาณโปรตีนในยางธรรมชาติ โดยใช้เครื่องวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง (Spectropantanometer) ที่ออกแบบและสร้างขึ้นในห้องปฏิบัติการ ให้เป็นวิธีมาตรฐานในการหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ

1.12 ขอบเขตของการศึกษาวิจัย

ศึกษาสารหาปริมาณโปรตีนจากตัวอย่างน้ำยางธรรมชาติ และยางแห้งโดยวิธีเจลดาห์ล (Kjeldahl method) วิธีเลารีดัดแปร (Modified Lowry method) และวิธีสเปคโตรแพนทาโนเมทรี (Spectropantanometry)

1.13 ประโยชน์ที่จะได้รับ

1. ได้วิธีวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยเทคนิคใหม่
2. เพื่อทำให้ทราบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นต่างจากวิธีมาตรฐานเดิมอย่างไร
3. ทำให้ทราบปริมาณโปรตีนที่มีอยู่จริงในน้ำยางธรรมชาติ

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ทั่วไปที่ใช้ในงานวิจัย

2.1.1 เครื่องมือ

1. เครื่องย่อย Kjeldahl : Gerhardt Kjeldetherm, UK
2. เครื่องกลั่น Kjeldahl : BUCHI 323, Switzerland
3. UV-VIS Spectrophotometer ชนิดลำแสงคู่ : UV-VIS Spectrophotometer Lambda 20, PERKIN ELMER, U.S.A.
4. UV-VIS Spectrophotometer ชนิดลำแสงเดี่ยว : Spectro SC, U.S.A.
5. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง : Model TE 214S, SCIENTIFIC PROMOTION CO. LTD, U.S.A.
6. Ultrasonic bath : CT รุ่น CT-406, U.S.A.
7. Centrifuge : Hettich ZENTRIFUGEN D-7200 Tuttlingen, Germany
8. Cuvette : Bibby sterilin, Disposable range, MACRO, 4 ml, Polystyrene, EU
9. เครื่องทำน้ำปราศจากไอออน : ELGA, England
10. Hot plate : SCHOTT, Germany
11. Web cam - : PC camera, Seaway, China
12. Vortex mixer : vortex-genie, รุ่นG-560E, Scientific Industries, U.S.A.

2.1.2 อุปกรณ์

1. บีกเกอร์ ขนาด 25, 50, 100 และ 500 mL, DURAN, Germany
2. บีกเกอร์พลาสติก ขนาด 50 mL
3. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 mL, PYREX, U.S.A.
4. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10, 50, 100, 500 และ 1000 mL, DURAN, Germany
5. กระจกนาฬิกา
6. หลอด centrifuge
7. ปิเปต ขนาด 1, 5, 10 mL
8. ไมโครปิเปต ขนาด 50-200 µL และ 5,000 µL, GILSON, France

9. กระบอกตวง ขนาด 10, 50 และ 100 mL

10. หลอดหยด

11. แท่งแก้วคนสาร

12. กระดาษกรองชนิด cellulose nitrate, 47 mm diameter, 0.45µm, Whatman

13. ขวดพลาสติกพร้อมฝาปิดชนิดพอลิสไตรีนขนาด 50 mL

14. ชุดกรอง HPLC

15. ช้อนตักสารพลาสติก

16. ช้อนตักสารแสตนเลส

2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีเจลดาห์ล (Kjeldahl method)

2.2.1 สารเคมี

1. Sulfuric acid, H_2SO_4 : MW = 98.08 g/mol, AR grade, LAB-SCAN, Thailand
2. น้ำปราศจากไอออน
3. Mixed Indicator ประกอบด้วย
   - Methyl red, $C_{15}H_{15}N_3O_2$: MW = 269.3 g/mol
   - Ethanol, C_2H_5OH : MW = 46.07 g/mol, Assay 99.8%, AR grade, Merck, Germany
   - Methylene blue, $C_{16}H_{18}N_3SCl$: MW = 319.85 g/mol
4. Sodium Hydroxide, NaOH : MW = 40.00 g/mol, Assay 99%, AR grade, Merck, Germany
5. Boric acid, H_3BO_3 : MW = 61.83 g/mol, Assay 99.8%, AR grade, Merck, Germany
6. น้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูง (60 %DRC) : บริษัท Thai Rubber Latex Corparation Co.,Ltd
7. Catalyst mixture ประกอบด้วย
   - Potassium sulphate, K_2SO_4 : MW = 174.27 g/mol, AR grade, Merck, Germany
   - Copper sulfate, $CuSO_4$: MW = 159.608 g/mol, Assay 99.5%, CARLO ERBA REAGENTI, Italy
   - Selenium powder, Se : MW = 78.96 g/mol, AR grade, Merck, Germany
8. Sodium carbonate, Na_2CO_3 : MW = 106.0 g/mol, AR grade, Merck, Germany

2.2.2 วิธีการเตรียมอินดิเคเตอร์ผสม (Mixed Indicator)

เตรียมโดยชั่งเมทิลเรด 0.15051 กรัม และชั่งเมทิลลีน บลู 0.0500 กรัม จากนั้นนำทั้งสองส่วนผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2.2.3 วิธีการเตรียม คะตะไลต์ผสม (mixed catalyst)

เตรียมโดยชั่งผงซิลิเนียม (Se) 1.17 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) 2.34 กรัม และโพแทสเซียมซัลเฟต 17.55 กรัม จากนั้นนำสารทั้งสามตัวมาบดผสมให้เข้ากันด้วยโกร่งบดสาร (สารนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง)

2.2.4 วิธีการเตรียม 2%w/v Boric acid

ชั่ง Boric acid มา 6.xxxx กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 300 mL

2.2.5 วิธีการเตรียม 67%w/v NaOH

ชั่ง NaOH มา 201.xxxx กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 300 mL

2.2.6 วิธีการเตรียม 0.01 N Na_2CO_3

ชั่ง Na_2CO_3 มา 0.0530 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 100 mL (ใช้สำหรับการทำ Standardisation กับกรด H_2SO_4)

2.2.7 วิธีการเตรียม 0.01 N H_2SO_4

ปิเปต conc. H_2SO_4 มา 0.0276 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 100 mL

2.2.8 การอบยาง

การอบยางมี 3 วิธีดังนี้

1. TSC (Total Solid Content) Method

นำน้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูงมาทำการไล่แอมโมเนียออกโดยใช้ hot plate stirrer จนกว่ากลิ่นของแอมโมเนียจะออกหมด จากนั้นนำน้ำยางที่ทำการไล่แอมโมเนียแล้วมาเทลง platidish แล้วนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2. DRC (Dry Rubber Content) Method

นำน้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูงมาทำการไล่แอมโมเนียออกโดยใช้ hot plate stirrer จนกว่ากลิ่นของแอมโมเนียจะหมดไป จากนั้นนำน้ำยางเทลงใน platidish แล้วค่อยๆ หยดกรดอะซิติกเข้มข้นซึ่งจะทำให้ยางจับตัวเป็นก้อน นำยางก้อนที่ได้ไปล้างน้ำด้วยน้ำประปาจนกว่ากลิ่นของกรดอะซิติกจะหมดไปโดยทำการดึงแผ่ให้เป็นแผ่นบางพร้อมกันไปด้วย จากนั้นจึงนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็น 4 ชั่วโมง

3. Non-Solvent Method

นำน้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูงมาทำการไล่แอมโมเนียออกโดยใช้ hot plate stirrer จนกว่ากลิ่นของแอมโมเนียจะหมดไป จากนั้นค่อยๆ เทน้ำยางลงในสารละลายเมทานอลซึ่งจะทำให้ยางจับตัวเป็นก้อน แล้วนำยางก้อนมาดึงแผ่ให้เป็นแผ่นบางก่อนนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

2.2.9 วิธีการทดลอง

1. การย่อย

นำยางที่อบแล้ว มาตัวอย่างละ 0.300 กรัม ใส่ในหลอดย่อยแต่ละหลอด แล้วทำการชั่งคะตะไลต์ผสม 1.9500 กรัม เติมลงในหลอดย่อยแต่ละหลอด จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นหลอดละ 7.5 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลอด และทำแบลงค์ทุกครั้งโดยแบลงค์ไม่ต้องเติมยางพารา ลงไป หลังจากนั้นนำหลอดย่อยเข้าเครื่องย่อยเจลดาห์ลที่อุณหภูมิ 370 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วจะได้สารละลายใสสีเขียวอมฟ้า

2. การกลั่น

ถ่ายสารในหลอดย่อยหลอดที่ 1 ลงในหลอดกลั่นแล้วเติมน้ำปราศจากไอออนลงไป 30 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 67% 10 มิลลิลิตร ในขั้นตอนนี้ต้องค่อยๆ เติมเพราะจะมีฟองก๊าซเกิดขึ้น ซึ่งจะได้สารละลายสีดำ จากนั้นนำหลอดกลั่นเข้าเครื่องกลั่น

ปิเปต 2% w/v กรดบอริก 30 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่พร้อมทั้งหยดอินดิเคเตอร์ผสม 2 -3 หยด จะได้สารละลายใสสีม่วง จากนั้นนำไปติดตั้งในเครื่องกลั่น แล้วกดปุ่ม start รอเครื่องกลั่นทำงานเป็นเวลา 5 นาที เมื่อเครื่องกลั่นทำงานเสร็จแล้ว นำขวดรูปชมพู่ออกจากเครื่องกลั่น ซึ่งจะได้สาระลายใสสีเขียว นำไปไทเทรตด้วยกรดซัลฟูริกที่ทำการ Standardisation ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนแล้ว

หมายเหตุ หลอดอื่นๆ ก็ปฏิบัติเช่นเดียวกันนี้

3. การไทเทรต

นำสารละลายใสสีเขียวที่ได้จากการกลั่นมาไทเทรตด้วยกรดซัลฟูริก (ที่ได้มีการ standardization หาความเข้มข้นที่แน่นอนกับโซเดียมคาร์บอเนตแล้ว) บันทึกปริมาตรของกรดซัลฟูริกที่ทำให้สารละลายเปลี่ยนจากสารละลายใสสีเขียวเป็นสารละลายใสสีม่วง และคำนวนหาปริมาณไนโตรเจนต่อไป

การทำสารละลายแบลงค์สามารถทำได้โดย เตรียมสารตามวิธีข้างต้น แต่ไม่ใส่ตัวอย่างยางพารา

2.3 วิธีเลารีดัดแปร (Modified Lowry Method) สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้ในน้ำยางธรรมชาติและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากน้ำยาง [8]

2.3.1 สารเคมี

1. ตัวอย่างน้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูง (60 %DRC)
2. สารละลาย Extraction buffer (Phosphate Buffer Saline ; PBS) ประกอบด้วย

3.1 Sodium chloride, NaCl : MW = 58.44 g/mol, Assay 99.5%, AR grade, Merck, Germany

3.2 Potassium chloride, KCl : MW = 74.55 g/mol, CARLO ERBA REAGENTI, Italy

3.3 Disodium hydrogen orthophosphate, Na_2HPO_4 : MW = 141.96 g/mol, CARLO ERBA REAGENTI, Italy

3.4 Potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4 : MW = 136.09, AR grade, Merck, Germany

3.5 Sulfuric acid, H_2SO_4 : MW = 98.08 g/mol, AR grade, LAB-SCAN, Thailand

3.6 Sodium Hydroxide, NaOH : MW = 40.00 g/mol, Assay 99%, AR grade, Merck, Germany

4. Reagent A (Alkaline Tartate solution) ประกอบด้วย

4.1 Sodium carbonate, Na_2CO_3 : MW = 106.0 g/mol, Merck, Germany

4.2 Sodium Hydroxide, NaOH : MW = 40.00 g/mol, Assay 99%, AR grade, Merck, Germany

4.3 Sodium Tartrate, $C_4H_8Na_2O_8$: 230.08 g/mol, Assay 99.5%, AR grade, LOBA Chemie, India

5. Reagent B (Copper Sulphate solution) ได้แก่

Copper Sulphate, $CuSO_4$: MW = 159.608 g/mol, Assay 99.5%, CARLO ERBA REAGENTI, Italy

6. Reagent D (Folin-Ciocalteu reagent; 50 % v/v dilution) ได้แก่

Folin- Ciocalteu : Density 1.27 g/ml, Sigma-Aldrich Chemie Gmblt., Switzerland

7. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (standard protein solution ; 0.1%, 1mg/1ml Albumin : Albumin from hen egg white, Fluka Biochemika, Netherland)

8. สารละลาย Sodium Deoxycholate (DOC) เข้มข้น 0.15 % w/v

9. สารละลายกรด Trichloroacetic Acid (TCA) เข้มข้น 72% w/v ได้แก่

Trichloroacetic (TCA), $C_2HCl_3O_2$: MW = 163.39 g/mol, Assay 95.5%, Sigma-Aldrich, Germany

10. Phosphotungstic Acid (PTA) เข้มข้น 72% v/v ได้แก่

Phosphotungstic acid (PTA), $H_3O_{40}PW_{12}$: MW = 2880.17 g/mol, Fluka, Switzerland

2.3.2 วิธีการเตรียมสาร

1. สารละลาย Extraction buffer (Phosphate Buffer Saline)

เตรียมโดยชั่ง NaCl 8.00 กรัม KCl 0.20 กรัม Na_2HPO_4 1.44 กรัม และ KH_2PO_4 0.24 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 7.4 ด้วยสารละลาย H_2SO_4 หรือสารละลาย NaOH สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 7 วัน

2. Reagent A (Alkaline Tartate solution)

เตรียมโดยละลาย Na_2CO_3 2.22 กรัม NaOH 0.44 กรัม Sodium Tartrate ($C_4H_8Na_2O_8$) 0.18 กรัม ด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3. Reagent B (Copper Sulphate solution)

เตรียมโดยละลาย Copper Sulphate 7.00 กรัม ด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4. Reagent C (Alkaline Copper Tartate solution)

เตรียมโดยผสม reagent A 150 มิลลิลิตร และ reagent B 1 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน

5. Reagent C' (Alkaline Tartate solution)

เตรียมโดยผสม reagent A 150 มิลลิลิตร และ น้ำปราศจากไอออน 1 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน

6. Reagent D (Folin-Ciocalteu reagent; 50 % v/v dilution)

เตรียมโดยผสม Folin-Ciocalteu (2N) 10 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตรเข้าด้วยกัน ต้องทำการเตรียมใหม่ทุกครั้ง

7. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (standard protein solution ; 0.1%, 1mg/mLAlbumin)

เตรียมโดยละลาย albumin 100 มิลลิกรัม ด้วยสารละลาย extraction buffer 100 มิลลิลิตรให้เข้ากัน แล้วนำสารละลายที่เตรียมได้ไปสแกนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer จากนั้นหาความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายมาตรฐานโปรตีน โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาหารด้วย 0.64 (absorbance/0.64) ก็จะได้ความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายมาตรฐานโปรตีน เพื่อใช้ในการเตรียมความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโปรตีนดังนี้

น้ำยางข้น ชนิดแอมโมเนียสูง เตรียม ๑00, 200, 300, 400 และ 500 ppm

ใช้ extraction buffer เป็นสารละลายแบลงค์

8. สารละลาย Sodium Deoxycholate (DOC) เข้มข้น 0.15 % w/v

เตรียมโดยละลาย DOC 0.15 กรัม ด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

9. สารละลายกรด Trichloroacetic Acid (TCA) เข้มข้น 72% w/v

เตรียมโดยละลาย TCA 7.2 กรัม ด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

10. สารละลายกรด Phosphotungstic Acid (PTA) เข้มข้น 72% w/v

เตรียมโดยละลาย PTA 7.2 กรัม ด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

2.3.3 วิธีการทดลอง

2.3.3.1 วิธีการสกัด

ทำการชั่งน้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูง ตัวอย่างละ 0.5 กรัม แล้วทำการสกัดด้วย Extraction buffer 5 มิลลิลิตร โดยใช้หลอดพอลิสไตรีน ที่อุณหภูมิ 25±5 °C เป็นเวลา 120±5 นาที โดยใช้เครื่อง Vortex (200 rpm) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 15 นาที เมื่อได้สารละลายเป็นสีขาวขุ่น ให้นำไปกรองด้วยกระดาษกรองชนิด low protein binding (cellulose acetate) ขนาด 0.45 μm โดยใส่น้ำยางข้น ชนิดแอมโมเนียสูงที่ผ่านการสกัดและกรองแล้วลงในหลอด polypropylene โดยเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C และทำการวัดภายใน 24 ชั่วโมง

2.3.3.2 การตกตะกอนด้วยกรด

ทำการปิเปตสารละลายแบลงค์ ตัวอย่างน้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูง และสารมาตรฐานโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่สกัดได้อย่างละ 1 มิลลิลิตรลงในหลอด cenntrifuge ชนิดพอลิสไตรีน จากนั้นเติม DOC 0.1 มิลลิลิตรลงในหลอดที่เตรียมไว้ แล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ทำการตกตะกอนโดยเติม 0.2 มิลลิลิตร ของสารละลายผสมของ PTA และ TCA อย่างละครึ่ง ซึ่งต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง แล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 15 นาที (6,000 rpm) แล้วเทส่วนที่ใสทิ้งไป และเก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้ นำมาเติม 0.2 M NaOH หลอดละ 0.75 มิลลิลิตร รวมทั้งหลอดที่เป็นแบลงค์ด้วย แล้วทำการละลายตะกอนโดยใช้ Ultrasonic bath ถ้าตะกอนละลายสมบูรณ์จะได้สารละลายใส ให้เก็บที่อุณหภูมิ 3±1 °C และใช้ภายใน 24 ชั่วโมง

2.3.3.3 การทำให้เกิดสี (color developing)

ทำการเติม Reagent C 2.5 มิลลิลิตร และเติม Reagent D 0.3 มิลลิลิตร ตามลำดับแล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 nm ซึ่งต้องวัดภายใน 1 ชั่วโมง

2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติโดยใช้เครื่อง Spectropantonometer ที่สร้างขึ้นโดยใช้วิธีการทำให้เกิดสีด้วยวิธีไบยูเร็ต

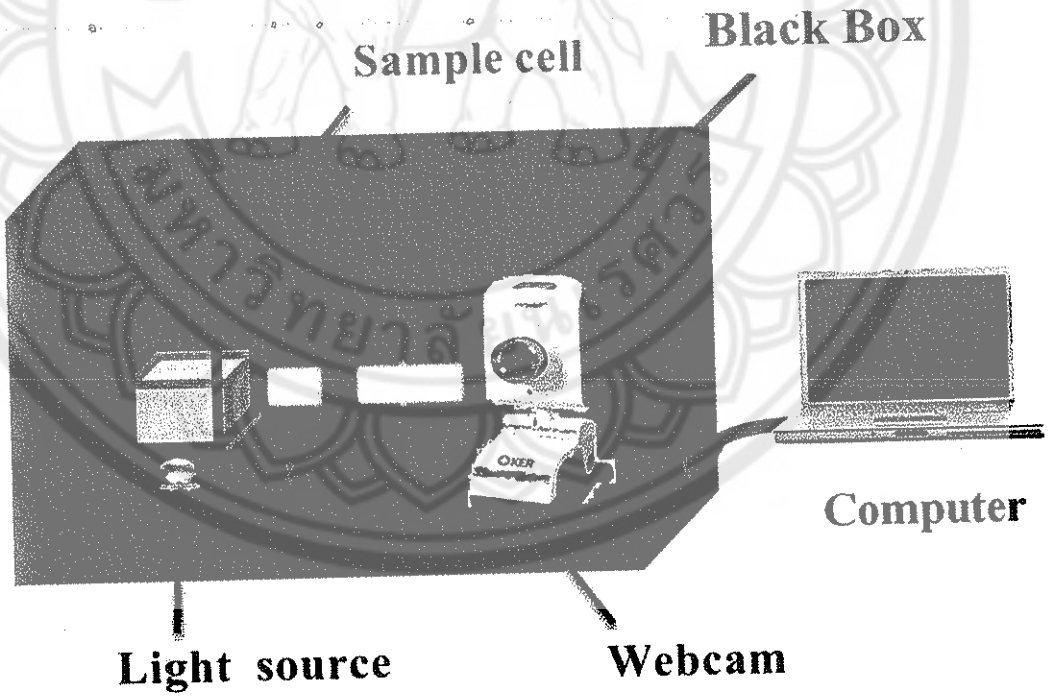
2.4.1 อุปกรณ์

Spectropantonometer

ในงานวิจัยนี้ใช้ชุด spectropantonometer ที่สร้างขึ้นในห้องปฏิบัติการเพื่อวัดความเข้มของสีที่มีอยู่ในตัวอย่างสถานะคอลลอยด์ ซึ่งอุปกรณ์ประกอบด้วย

Sample cell	:	Polystyrene Cuvette ขนาด 4 mL	ใช้ใส่สารตัวอย่าง
Light source	:	หลอด Supper Bright LED สีขาว	ใช้เป็นแหล่งกำเนิดแสง
Web cam	:	PC camera	ใช้ถ่ายภาพสี
Computer	:	Labtop Computer	ใช้อ่านค่าความเข้มแสงในระบบ RGB โดยอาศัยโปรแกรมที่ได้สร้างขึ้น (อยู่ระหว่างดำเนินการขอจดลิขสิทธิ์)
Black Box	:	กล่องอุปกรณ์แพทย์เคลื่อนที่สีดำ	ใช้ป้องกันแสงรบกวนภายนอก

ซึ่งชุด spectropantonometer ที่สร้างขึ้นในห้องปฏิบัติการมีลักษณะอุปกรณ์ดังรูป 2.1



รูป 2.1 เครื่อง Spectropantonometer ที่ได้ออกแบบและสร้างขึ้น

2.4.2 สารเคมี

1. Copper sulfate, $CuSO_4$: MW = 159.608 g/mol, Assay 99.5%, AR grade, Merck, Germany
2. Sodium Hydroxide, NaOH : MW = 40.00 g/mol, Assay 99%, AR grade, Merck, Germany
3. Albumin : Albumin from hen egg white, Fluka Biochemika, Netherland
4. น้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูง

2.4.3 วิธีการทดลอง

2.4.3.1 การเตรียมสารละลายไบยูเร็ต

สารละลายไบยูเร็ตประกอบด้วย สารละลาย 0.5% $CuSO_4$ และ 10% NaOH ซึ่งสามารถเตรียมได้ดังนี้

ละลาย $CuSO_4$ 0.5 กรัม ด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลาย 0.5% $CuSO_4$

ละลาย NaOH 10 กรัม ด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลาย 10% NaOH

2.4.3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโดยวิธี Standard Addition

stock solution : สารละลาย 200 ppm Albumin ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ซึ่งเตรียมได้ดังนี้

ชั่ง Albumin 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 มาทำการเติมน้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูง 0.06 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 20 นาที เพื่อไล่แอมโมเนียออกจากน้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูง แล้วเติมสารละลายไบยูเร็ต คือ 0.5% $CuSO_4$ 1 มิลลิลิตร และ 10% NaOH 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าความเข้มของแสงในระบบ RGB ด้วยเครื่อง Spectropantonometer ที่ออกแบบและสร้างขึ้น

ว
TS
1692
ป458ร
2553

สำนักหอสมุด
29 ส.ค. 2554

2.4.4 วิธีการคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีน

วิธีการคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีน ใช้วิธีการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยวิธี Multiple Regression ซึ่งสามารถแสดงได้ดังตาราง 2.1 และ 2.2 ดังนี้

ตาราง 2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Albumin และ ความเข้มของแสงในระบบ RGB

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Albumin (ppm)	ความเข้มแสงในระบบ RGB		
	R	G	B
40	Y_{1R}	Y_{1G}	Y_{1B}
80	Y_{2R}	Y_{2G}	Y_{2B}
120	Y_{3R}	Y_{3G}	Y_{3B}
160	Y_{4R}	Y_{4G}	Y_{4B}
200	Y_{5R}	Y_{5G}	Y_{5B}

จากข้อมูลดิบที่ได้ จะนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยใส่ข้อมูลดังตาราง 2.2

นำข้อมูลที่ได้จากตาราง 2.2 มาสร้างกราฟ จะได้กราฟและสมการรวมของสมการ RGB จากนั้นนำสมการที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพาราได้โดยการแทนค่า y = 0 เนื่องจากเป็นวิธี Standard Addition เมื่อแทนค่า y = 0 จะได้ค่า x ออกมา ซึ่งคือความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูง ในหน่วย ppm และ สามารถคำนวณเป็น % ได้โดยนำความเข้มข้นในหน่วย ppm ที่ได้ มาหารด้วย 10,000 ก็จะได้ความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูง ในหน่วย % w/v ดังตัวอย่างต่อไปนี้

ตาราง 2.2 การใส่ข้อมูลสมการรวมเพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยวิธี Multiple Regression

แกน x	แกน y
40	Y_{1R}
40	Y_{1G}
40	Y_{1B}
80	Y_{2R}
80	Y_{2G}
80	Y_{2B}
120	Y_{3R}
120	Y_{3G}

แกน x	แกน y
120	Y_{3B}
160	Y_{4R}
160	Y_{4G}
160	Y_{4B}
200	Y_{5R}
200	Y_{5G}
200	Y_{5B}

เช่น ได้ความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูงเท่ากับ 700 ppm คิดเป็น % w/v (g/mL) ได้ดังนี้

ppm คือ mg/L ดังนั้น 700 ppm คือ 700 mg/L

ดังนั้น ถ้าสารละลาย 1,000 mL มีโปรตีน 700 mg หรือ 700×10^{-3} g

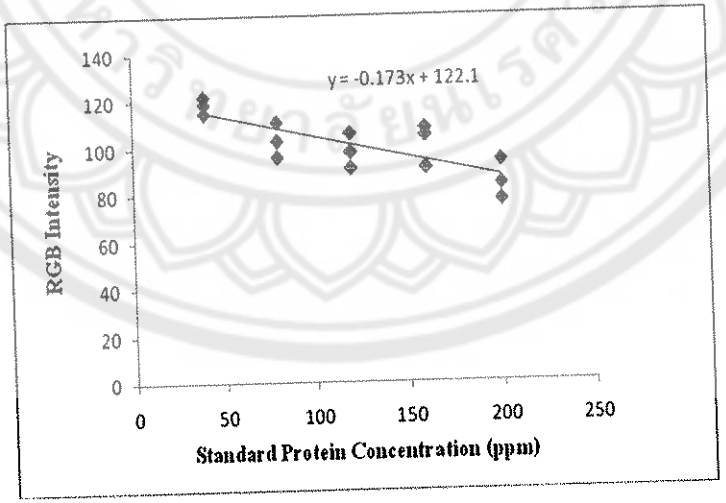
$$\text{ถ้าสารละลาย 100 mL มีโปรตีน} = \frac{700 \times 10^{-3}\ \text{g} \times 100}{1000\ \text{ml}} = \frac{700}{10000} = 0.07\ \text{g}$$

จะได้ว่าความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางข้น ชนิดแอมโมเนียสูง 700 ppm คิดเป็น 0.07 % w/v ตัวอย่างวิธีการคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีน โดยใช้วิธีการสร้างกราฟมาตรฐานแบบ Multiple Regression สามารถแสดงได้ดังตาราง 2.3 และ รูป 2.2 ดังนี้

ตาราง 2.3 ตัวอย่างการใส่ข้อมูลสมการรวมเพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานแบบ Multiple Regression

แกน x	แกน y
40	115
40	119
40	122
80	96
80	103
80	111
120	91
120	98

แกน x	แกน y
120	106
160	91
160	105
160	108
200	77
200	84
200	94



รูป 2.2 ตัวอย่างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐานกับความเข้มของสีในระบบ RGB

จากสมการ $y = -0.173x + 122.1$

แทนค่า $y = 0$; $0 = -0.173x + 122.1$

จะได้ $x = 705.78$

ดังนั้นสามารถหาความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูงได้เท่ากับ 705.78 ppm หรือ 0.07 % w/v

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในยางแห้งโดยวิธีเจลดาห์ล (Kjeldahl method)

จากการทดลองหาปริมาณโปรตีนในยางแห้งโดยวิธีเจลดาห์ลในการทดลอง 2.2 ทำการย่อยตัวอย่างยางแห้ง หนักประมาณ 0.3 กรัม ในหลอดย่อย จำนวน 6 หลอด โดยมีสารละลายแบลงค์จำนวน 2 หลอด ทำการเติมสารละลายกรดซัลฟิวริกแล้วเติมคะตะไลต์ผสมซึ่งมีส่วนผสมคือ คอปเปอร์ซัลเฟต ผงซีลีเนียมและโพแทสเซียมซัลเฟต เพื่อทำการเร่งปฏิกิริยาในการย่อย จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการย่อยไปทำการกลั่น โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 67 % w/v เพื่อแยกเอาไนโตรเจนออกจากของเหลวในหลอดย่อย จากนั้นเติมสารละลายกรดบอริค เข้มข้น 2 % w/v เป็นตัวจับแอมโมเนีย แล้วนำสารละลายที่ได้ไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ โดยใช้สารละลายอินดิเคเตอร์ผสม (mixed indicator) เป็นตัวบอกจุดยุติ ซึ่งในการทดลองได้ใช้อัตราส่วนของสารต่างกันดังแสดงในตาราง 3.1 และได้ผลดังตาราง 3.2-3.6

ตาราง 3.1 อัตราส่วนของสารที่ใช้ในการทดลอง

อัตราส่วนที่	ปริมาตรกรดบอริก (mL)	ปริมาตรน้ำปราศจากไอออน (mL)	ปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ (mL)
1	20	10	10
2	30	30	10
3	30	30	20

ตาราง 3.2 ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการไทเทรต ครั้งที่ 1 (อบยางแบบ TSC และใช้อัตราส่วนที่ 1 ของตาราง 3.1)

หลอดที่	น้ำหนักของยางแห้ง (g)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก ($0.02\ M\ H_2SO_4$) ที่ใช้ในการไทเทรต (mL)
1	0.3012	3.82
2	0.3056	2.56
3	0.3009	2.54
4	0.3019	3.86
5	0.3007	3.78
6	0.3046	3.38
7 (Blank)	-	0.10
8(Blank)	-	0.10

ตาราง 3.3 ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการไทเทรต ครั้งที่ 2 (อบยางแบบ TSC และใช้อัตราส่วนที่ 2 ของตาราง 3.1)

หลอดที่	น้ำหนักของยางแห้ง (g)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐานกร์ดซัลฟิวริก (0.02 M H_2SO_4) ที่ใช้ในการไทเทรต (mL)
1	0.3214	5.04
2	0.3269	4.50
3	0.3221	4.50
4 (Blank)	-	0.52

ตาราง 3.4 ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการไทเทรต ครั้งที่ 3 (อบยางแบบ TSC และใช้อัตราส่วนที่ 3 ของตาราง 3.1)

หลอดที่	น้ำหนักของยางแห้ง (g)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก (0.02 M H_2SO_4) ที่ใช้ในการไทเทรต (mL)
1	0.3214	5.04
2	0.3269	4.50
3	0.3221	4.50
4 (Blank)	-	0.52

ตาราง 3.5 ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการไทเทรต ครั้งที่ 4 (อบยางแบบ DRC และใช้อัตราส่วนที่ 2 ของตาราง 3.1)

หลอดที่	น้ำหนักของยางแห้ง (g)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก (0.02 M H_2SO_4) ที่ใช้ในการไทเทรต (mL)
1	0.3090	0.22
2	0.3122	0.16
3	0.3049	0.16
4 (Blank)	-	0.08

ตาราง 3.6 ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการไทเทรต ครั้งที่ 5 (อบยางแบบ Non-Solvent และใช้อัตราส่วนที่ 2 ของตาราง 3.1)

หลอดที่	น้ำหนักของยางแห้ง (g)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก (0.02 M H_2SO_4) ที่ใช้ในการไทเทรต (mL)
1	0.3108	0.12
2	0.3114	0.16
3	0.3165	0.12
4 (Blank)	-	0.06

เมื่อได้ทำการทดลองตามขั้นตอนของวิธีเจลดาห์ลแล้วได้ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการไทเทรต จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยต้องคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนจากสมการ

$$\%N_2 = [(v_2 - v_1) * M * 0.014 * 100] / w$$

โดย v_1 = ปริมาตรการไทเทรตด้วยกรดซัลฟูริกของสารละลายแบลงค์

v_2 = ปริมาตรการไทเทรตด้วยกรดซัลฟูริกของสารตัวอย่าง

M = ความเข้มข้นที่แท้จริงของกรดซัลฟูริก (โมลาร์)

w = น้ำหนักของสารตัวอย่าง (กรัม)

0.0014 = น้ำหนักมิลลิโมลของไนโตรเจน

จากสมการข้างต้นจะได้ผลการคำนวณของ $\%N_2$ แสดงดังตาราง 3.7-3.9

ตาราง 3.7 ปริมาณไนโตรเจน (%) ที่มีในน้ำยางพาราข้นชนิดแอมโมเนียสูงโดยวิธีการอบแบบ TSC

หลอดที่	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3
1	0.25	0.31	0.31
2	0.16	0.32	0.27
3	0.17	0.29	0.28
4	0.25	-	-
5	0.24	-	-
6	0.20	-	-

หลอดที่	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3
ค่าเฉลี่ย	0.21	0.30	0.29
SD	0.041	0.014	0.021
%RSD	19.2	4.7	7.4

ตาราง 3.8 ปริมาณไนโตรเจน (%) ที่มีในน้ำยางพาราข้นชนิดแอมโมเนียสูงโดยวิธีการอบแบบ DRC

หลอดที่	$\%N_2$
1	0.076
2	0.043
3	0.044
ค่าเฉลี่ย	0.054
SD	0.02
%RSD	34.6

ตาราง 3.9 ปริมาณไนโตรเจน (%) ที่มีในน้ำยางพาราข้นชนิดแอมโมเนียสูงโดยวิธีการอบแบบ Non-solvent

หลอดที่	$\%N_2$
1	0.032
2	0.054
3	0.032
ค่าเฉลี่ย	0.039
SD	0.01
%RSD	32.3

จากการทดลองพบว่า การอบแบบ TSC เป็นการอบที่พบปริมาณโปรตีนมากที่สุด ซึ่งให้ผลการทดลองถูกต้องและใกล้เคียงกับค่ามาตรฐานมากที่สุด โดยเมื่อมีการอบยางแบบ TSC แล้วผ่านกระบวนการย่อยก่อนนำมาเข้าสู่กระบวนการกลั่น ซึ่งในการทดลองได้ทำการทดลอง 3 อัตราส่วน โดยในอัตราส่วนที่ 1 ได้เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 30 มิลลิลิตร ซึ่งเกิดฟองก๊าซเป็นจำนานมาก คาดว่าก๊าซไนโตรเจนที่ลดลงหรือหายไปพร้อมกับฟองก๊าซจำนวนมากที่เกิดขึ้น อัตราส่วนที่ 2 ได้ทำการลดปริมาณของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงเหลือ 20 มิลลิลิตร เนื่องจากในอัตราส่วนแรกเกิดฟองก๊าซขึ้นเป็นจำนวนมากเกินไป ปรากฏว่าในอัตราส่วนที่ 2 นี้ยังคงมีฟองก๊าซเกิดขึ้นแต่มีในปริมาณที่ไม่มากนัก จึงได้ทำการทดลองลดปริมาณของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงเป็น 10 มิลลิลิตร ส่วนในอัตราส่วนที่ 3 ได้ใช้ปริมาณสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 มิลลิลิตร เพื่อทำการศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในแต่ละอัตราส่วนเนื่องจากปริมาณสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จะมีผลโดยตรงกับปริมาณไนโตรเจนที่เกิดขึ้นแต่ปรากฏว่าฟองก๊าซในอัตราส่วนที่ 3 เกิดมากกว่าอัตราส่วนที่ 2 แต่ไม่มากเท่ากับอัตราส่วนที่ 1

ดังนั้นจากรายงานการทดลองทำให้ทราบว่า ในอัตราส่วนที่ 2 เป็นอัตราส่วนปริมาณของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสม เนื่องจากปริมาณฟองก๊าซที่เกิดขึ้นมีไม่มากนัก ดังนั้นปริมาณไนโตรเจนในอัตราส่วนที่ 2 จึงเป็นปริมาณที่เหมาะสมเพื่อที่จะทำการทดลองเพื่อพัฒนาการศึกษาการหาปริมาณไนโตรเจนในยางพาราต่อไป

จากผลการทดลองจะเห็นว่าค่า %RSD ของการอบยางแบบ TSC มีค่าไม่สูงมากนัก เนื่องจากวิธีการอบแบบนี้จะให้ปริมาณโปรตีนมากที่สุด และในการทำการทดลองจะเห็นได้ว่าการอบยางด้วยวิธีนี้จะได้ยางที่บางและใสมากกว่าอีก 2 วิธี ในวิธีการย่อย ยางที่ได้จากการอบด้วยวิธี TSC จะย่อยได้หมดซึ่งจะได้เป็นสารละลายใสด้วย ส่วนของการอบยางแบบ DRC และ non-solvent นั้นจะมีค่า %RSD ค่อนข้างสูงมากเนื่องจากในการอบยางของ 2 วิธีนี้ต้องมีการใช้กรดอะซิติกสำหรับวิธี DRC และใช้เมทานอลสำหรับวิธี non-solvent ผสมกับยางก่อนการเข้าอบ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าจะมีสารดังกล่าวติดอยู่ในยางที่เราได้ก่อนการอบ ทั้ง 2 วิธีนี้ยังต้องมีการดึงแผ่ยางก่อนการเข้าอบจึงทำให้ยางที่อบเสร็จแล้วมีส่วนที่หนาและบางไม่เท่ากันเหมือนกับการอบแบบ TSC ซึ่งในส่วนที่หนาอาจจะไปส่งผลให้ค่า %RSD มีค่ามากตามไปด้วย

3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติโดยวิธีเลารีดัดแปร (Modified Lowry method)

3.2.1 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (Standard Protein) เพื่อทำเป็นกราฟมาตรฐาน

ทำการเตรียมโดยชั่ง Albumin จำนวน 100 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25 °C ซึ่งในวิธีมาตรฐานจะต้องมีการกรองผ่านกระดาษกรองที่มีปริมาณโปรตีนต่ำ แต่ในการทดลองจริงๆ นั้น การใช้กระดาษกรองแบบนี้ค่อนข้างที่จะใช้งบประมาณสูง ทางผู้วิจัยจึงลองใช้กระดาษกรองที่เป็นแบบไนเตรตเมมเบรน (Nitrate membrane) แต่เมื่อได้ทำการกรองจริงๆ ด้วยกระดาษกรองแบบที่มีอยู่นั้น และเมื่อนำไปสแกนหาค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง UV-VIS Spectrophotometer เพื่อหาความเข้มข้นที่แท้จริงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงแล้ว นำไปหาร 0.64 พบว่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ผ่านการกรองนั้นมีค่าลดลงครึ่งหนึ่ง และในขณะที่ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ไม่ผ่านการกรองมีค่าใกล้เคียงกับการเตรียมจากข้างต้น จึงเลือกใช้วิธีที่ไม่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง

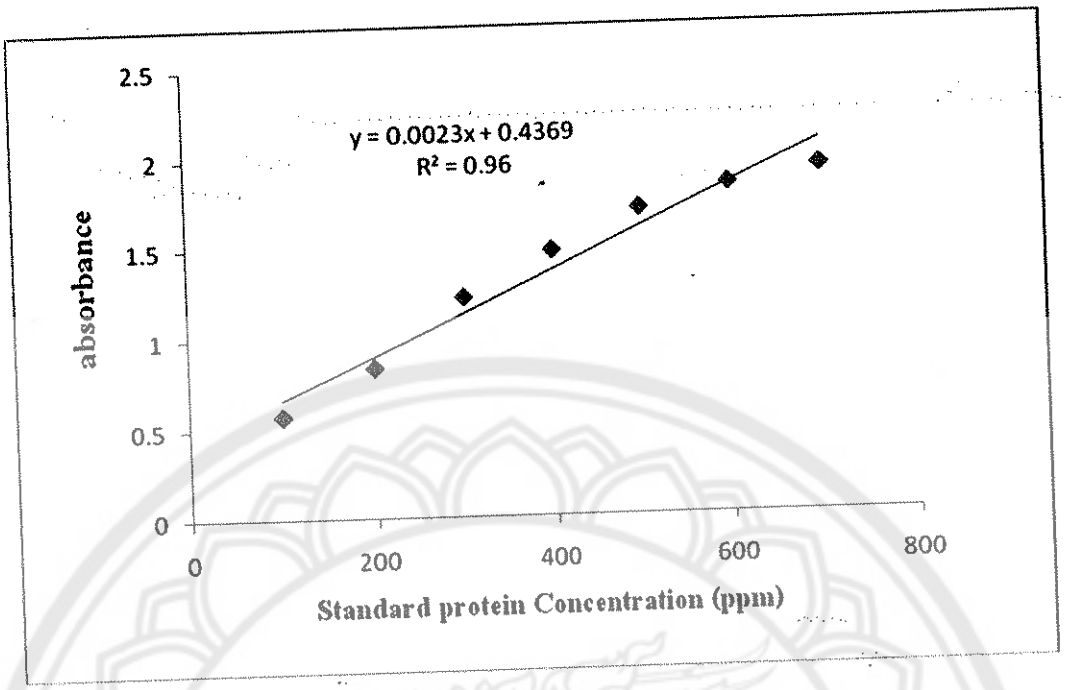
3.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ ครั้งที่ 1

เมื่อทราบความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน คือ 936 ppm จึงได้มีการกำหนดช่วงความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐานในช่วง 0-900 ppm และได้ทำการเตรียมตัวอย่างน้ำยางธรรมชาติ ตามการทดลอง 2.3.2 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เพื่อทำเป็นกราฟมาตรฐาน ซึ่งได้ผลดังตาราง 3.10 และกราฟแสดง ดังรูป 3.1

ตาราง 3.10 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0 – 900 ppm และค่าการดูดกลืนแสงของน้ำยางข้น

ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (ppm)	Absorbance
0	0
100	0.575
200	0.838
300	1.224
400	1.476
500	1.702
600	1.832
700	1.924
800	1.999
900	1.999
น้ำยางข้น 1	0.372
น้ำยางข้น 2	1.170
น้ำยางข้น 3	1.006

ซึ่งจากตารางจะพบว่าที่ความเข้มข้น 800 และ 900 ppm ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมือนกัน จึงไม่นำความเข้มข้นดังกล่าวมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน ซึ่งจะแสดงในรูป 3.1



รูป 3.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 100-700 ppm

จากตาราง 3.10 จะสังเกตเห็นว่า ที่ตัวอย่างน้ำยางข้น 1 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่าสองตัวหลัง เป็นเพราะว่าได้มีการนำไปกรองด้วยกระดาษกรองแบบธรรมดา เพื่อต้องการให้ได้สารละลายที่ใส แต่เกิดปัญหาด้านการกรองทำให้โปรตีนที่อยู่ในน้ำยางบางส่วนหายไป เมื่อนำไปวัดจึงได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่าตัวอื่น ซึ่งน้ำยางข้น 2 และน้ำยางข้น 3 ไม่ได้ผ่านการกรอง

นำค่าที่วัดได้ของตัวอย่างยางทั้ง 2 ชนิด ไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในยางธรรมชาติ โดยใช้สมการจากรูป 3.1 ซึ่งผลการคำนวณแสดงดังตาราง 3.11

ตาราง 3.11 ปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในน้ำยางธรรมชาติ ครั้งที่ 1

น้ำยางธรรมชาติ	ปริมาณโปรตีน (ppm)
1	ND
2	367
3	285

หมายเหตุ ND หมายถึง Not Detected

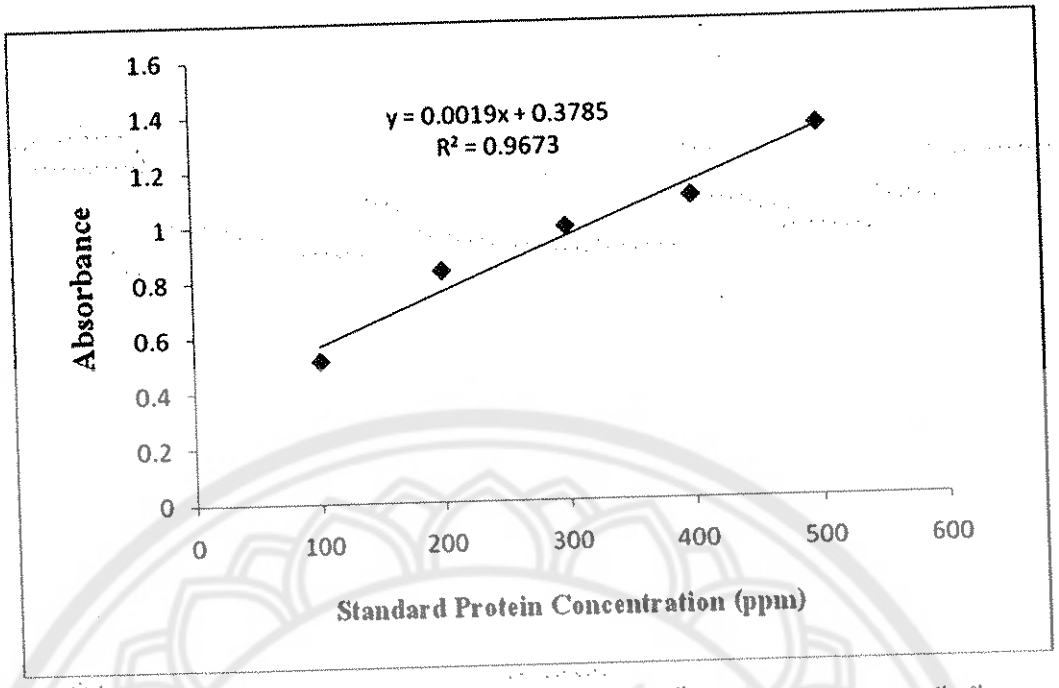
ในครั้งต่อไปจะทำการกำหนดความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน เพื่อทำเป็นกราฟมาตรฐาน โดยจะเตรียมความเข้มข้นในช่วง 100, 200, 300, 400 และ 500 ppm

3.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในยางธรรมชาติ ครั้งที่ 2

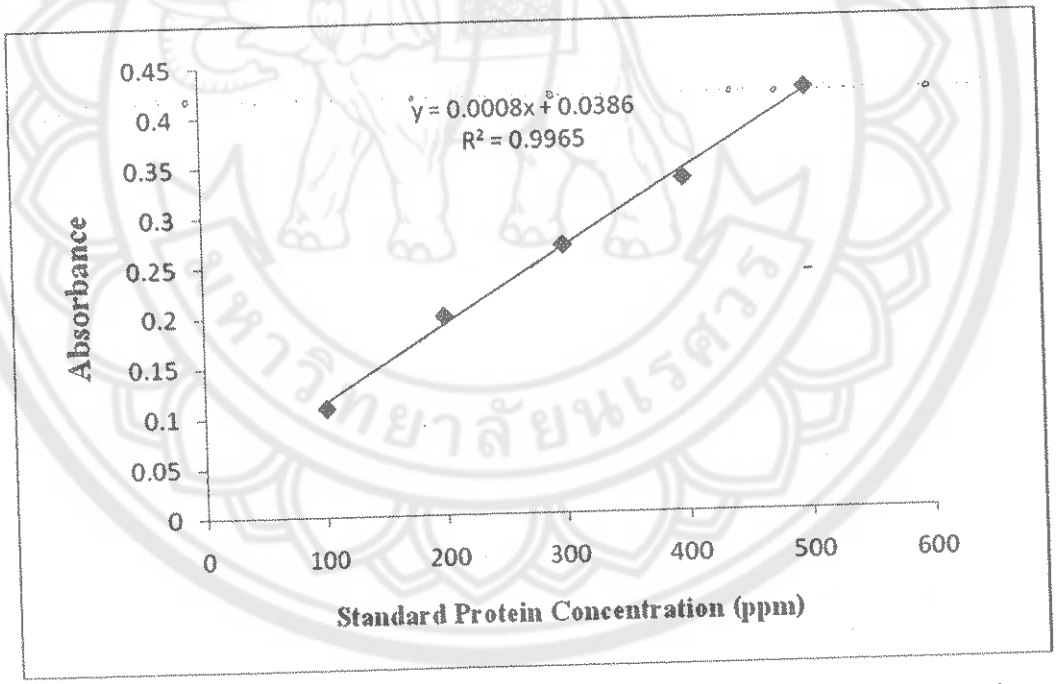
ในการทดลอง ครั้งที่ 2 มีการกำหนดช่วงความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐานตามที่กำหนดไว้ข้างต้น โดยมีการใช้สารละลาย C' (Reagent C') เพื่อเป็นตัวกำจัดตัวรบกวน ตามที่วิธีมาตรฐานกำหนด โดยนำค่าที่วัดได้มาหักลบกัน ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากยางธรรมชาติ แสดงดังตาราง 3.12 – 3.15 และ รูป 3.2 - 3.4 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนสำหรับยางแห้งและน้ำยางข้น

ตาราง 3.12 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น ที่ช่วงความเข้มข้น 100 – 500 ppm

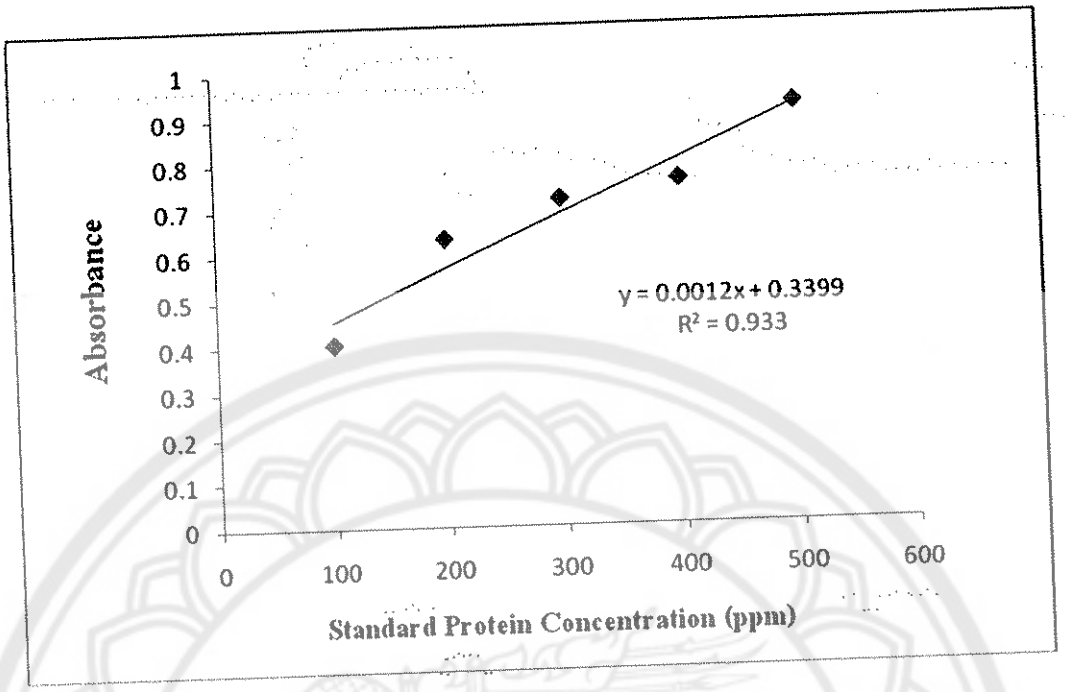
ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (ppm)	Absorbance		
	สารละลาย C	สารละลายC'	สารละลาย C-C'
100	0.513	0.109	0.404
200	0.832	0.119	0.713
300	0.985	0.268	0.717
400	1.089	0.333	0.756
500	1.340	0.421	0.919
น้ำยางข้น 1	0.588	0.172	0.416
น้ำยางข้น 2	0.985	0.348	0.637
น้ำยางข้น 3	0.992	0.342	0.650



รูป 3.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานสำหรับน้ำยางข้นในช่วงความเข้มข้น 100 – 500 ppm สำหรับสารละลาย C



รูป 3.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานสำหรับน้ำยางข้นในช่วงความเข้มข้น 100 – 500 ppm สำหรับสารละลาย C'



รูป 3.4 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (สารละลาย C – C') สำหรับน้ำยางข้น

ตาราง 3.13 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติโดยใช้สารละลาย C

น้ำยางธรรมชาติ	ปริมาณโปรตีน (ppm)
1	110
2	319
3	323

ตาราง 3.14 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ สำหรับสารละลาย C'

น้ำยางธรรมชาติ	ปริมาณโปรตีน (ppm)
1	167
2	387
3	379

ตาราง 3.15 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ สำหรับสารละลาย C-C'

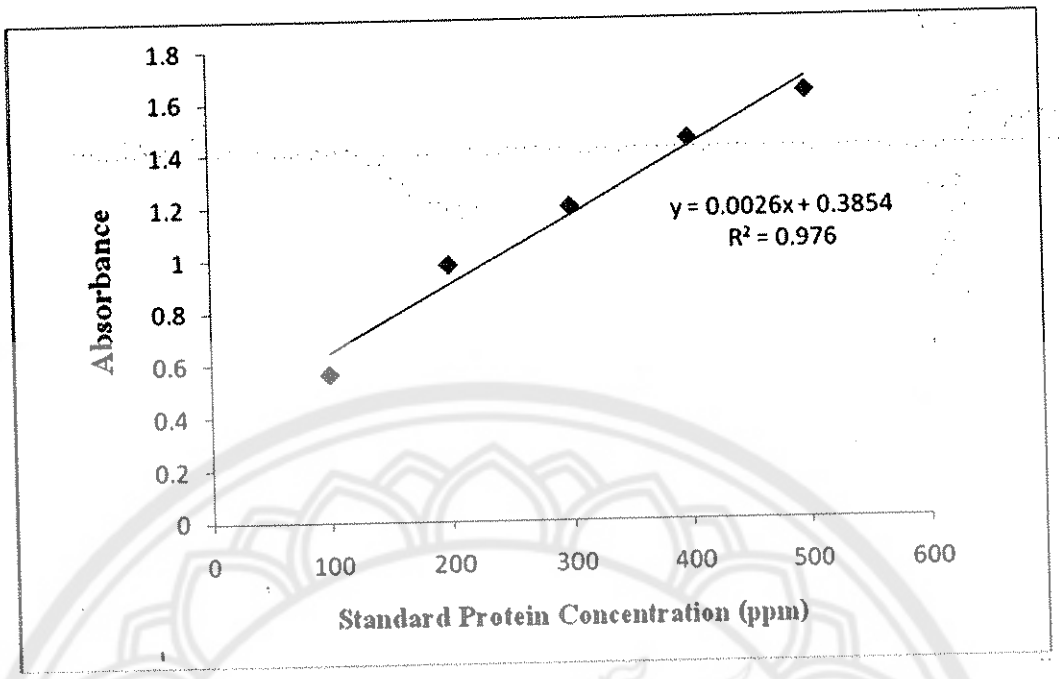
น้ำยางธรรมชาติ	ปริมาณโปรตีน (ppm)
1	63.4
2	248
3	258

3.2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในยางธรรมชาติ ครั้งที่ 3

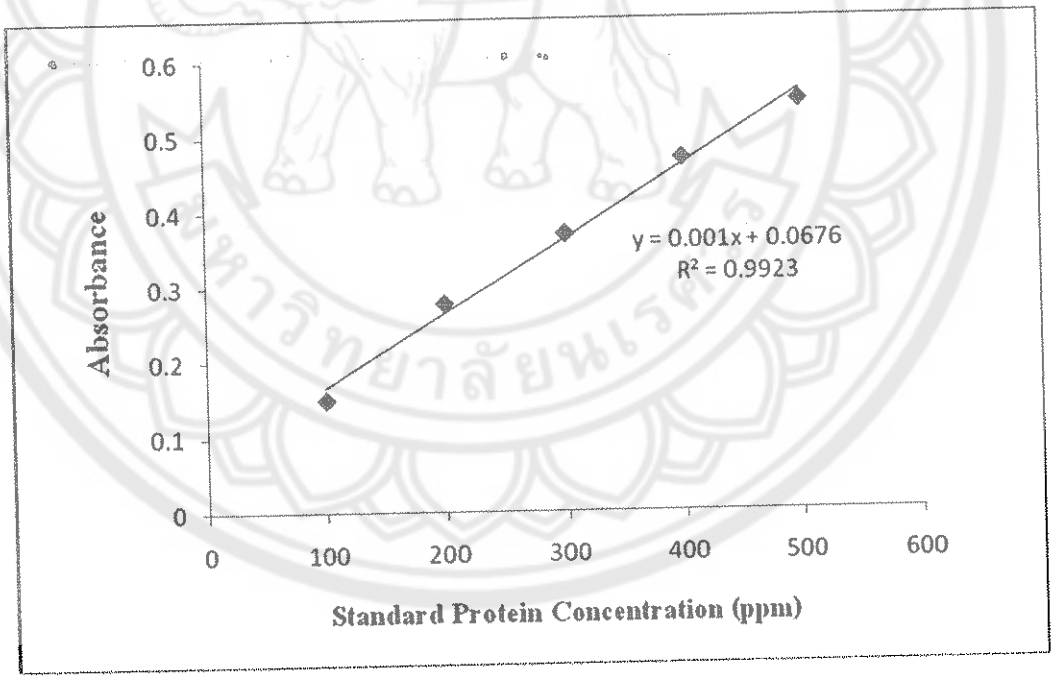
ได้ทำการทดลองซ้ำ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้อง ซึ่งทำการทดลองเหมือนกับครั้งที่ 1 และ 2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในยางธรรมชาติ แสดงดังตาราง 3.16 – 3.19 และกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานในยางธรรมชาติ แสดงดังรูป 3.5 – 3.7

ตาราง 3.16 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น ในช่วงความเข้มข้น 100 – 500 ppm

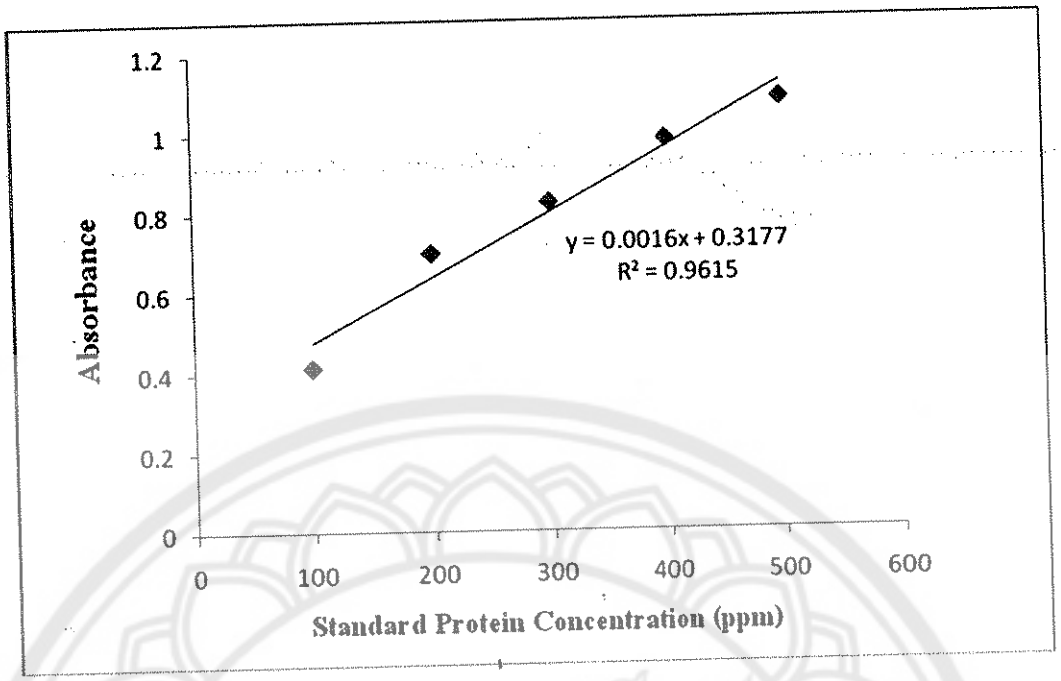
ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (ppm)	absorbance		
	สารละลาย C	สารละลาย C'	สารละลาย C-C'
100	0.566	0.150	0.416
200	0.978	0.278	0.70
300	1.195	0.370	0.825
400	1.450	0.470	0.980
500	1.626	0.546	1.080
น้ำยางข้น 1	0.899	0.316	0.583
น้ำยางข้น 2	1.147	0.517	0.630
น้ำยางข้น 3	1.225	0.561	0.664



รูป 3.5 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานสำหรับน้ำยางข้น ในช่วงความเข้มข้น 100 – 500 ppm สำหรับสารละลาย C



รูป 3.6 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานสำหรับน้ำยางข้น ในช่วงความเข้มข้น 100 – 500 ppm สำหรับสารละลาย C'



รูป 3.7 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (สารละลาย C – C') สำหรับน้ำยางข้น

ตาราง 3.17 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นโดยใช้สารละลาย C

น้ำยางธรรมชาติ	ปริมาณโปรตีน (ppm)
1	198
2	293
3	323

ตาราง 3.18 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น สำหรับสารละลาย C'

น้ำยางธรรมชาติ	ปริมาณโปรตีน (ppm)
1	249
2	450
3	494

ตาราง 3.19 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น สำหรับสารละลาย C-C'

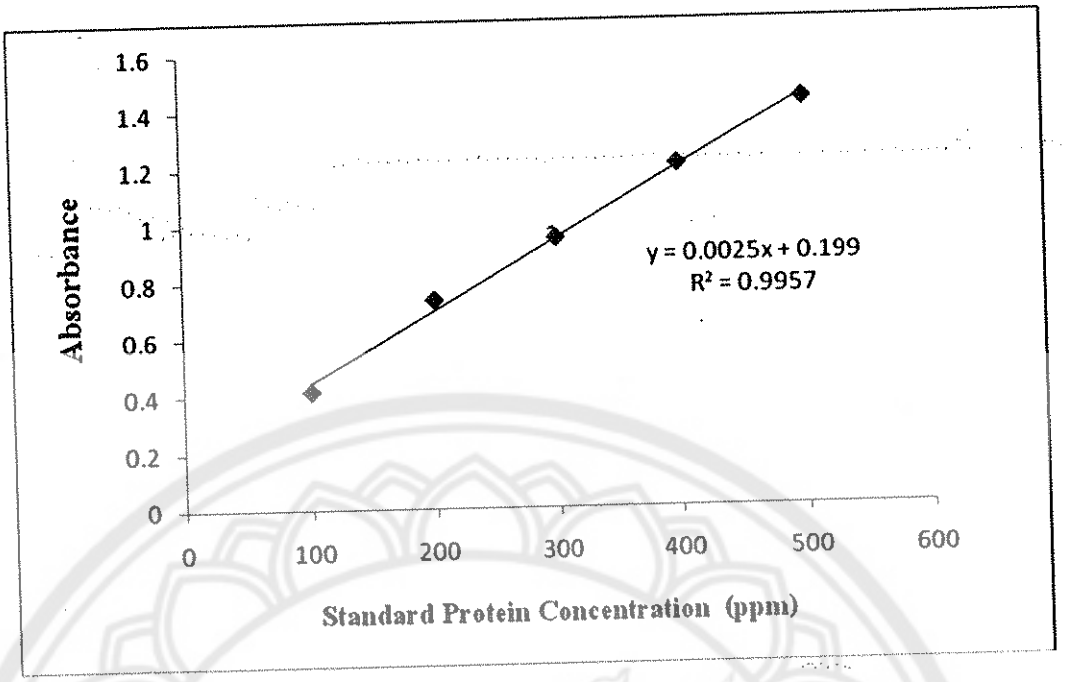
น้ำยางธรรมชาติ	ปริมาณโปรตีน (ppm)
1	166
2	195
3	216

3.2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในยางธรรมชาติ ครั้งที่ 4

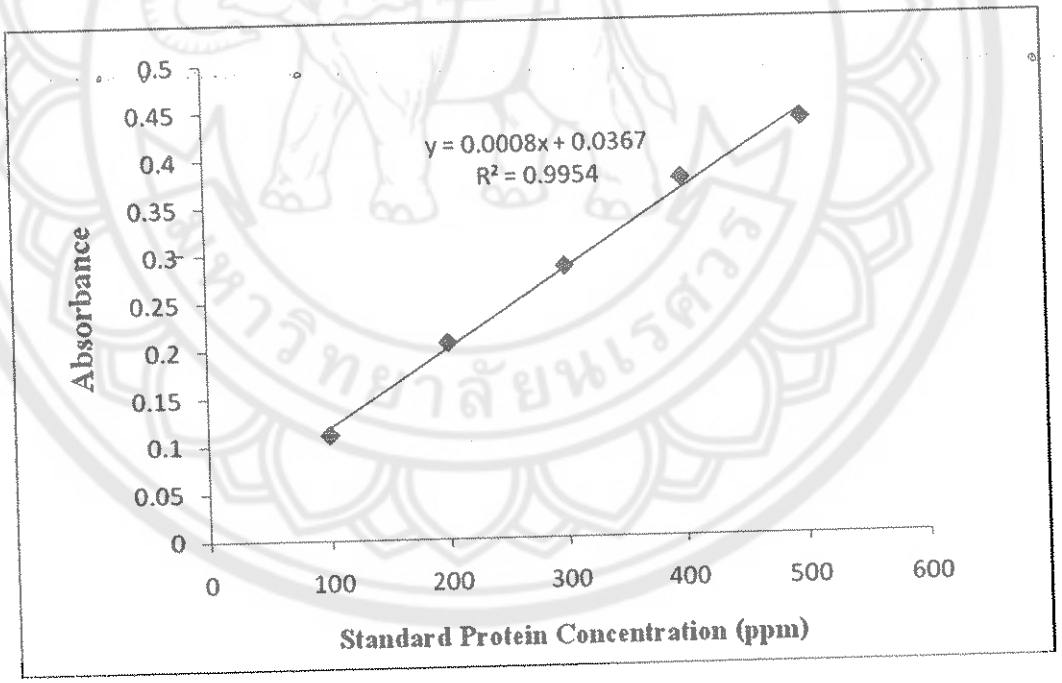
ทำการวิเคราะห์ซ้ำ เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ถูกต้องยิ่งขึ้น โดยมีขั้นตอนเหมือนกับการทดลองที่ผ่านมา ซึ่งการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน แสดงดังตาราง 3.20 – 3.23 และ รูป 3.8 -3.10

ตาราง 3.20 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น ช่วงความเข้มข้น 100 – 500 ppm

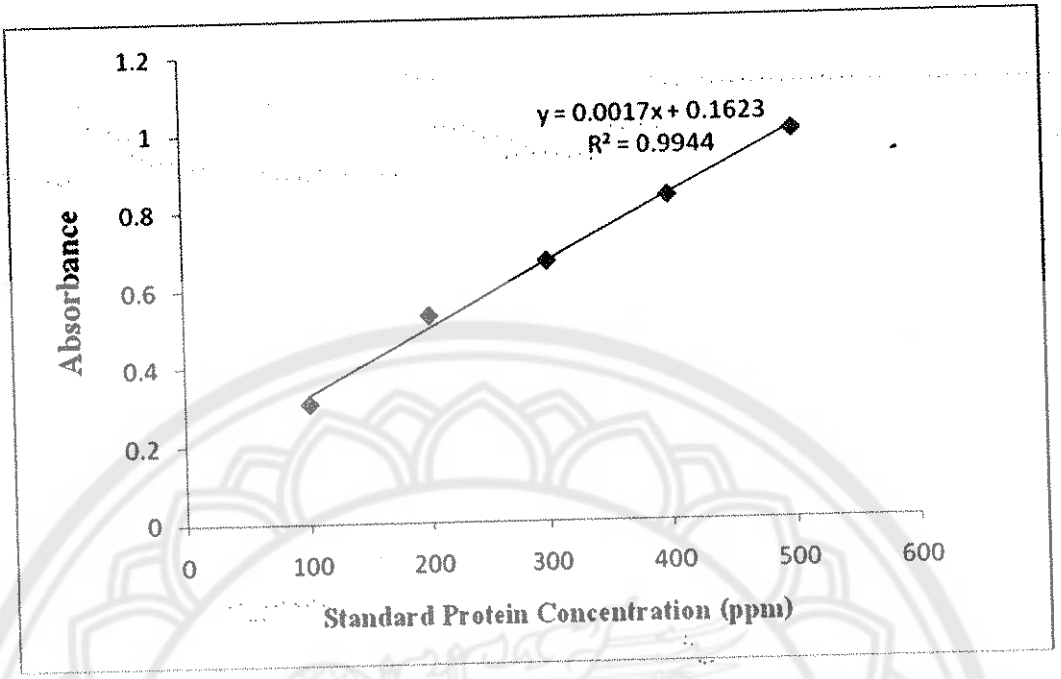
ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (ppm)	absorbance		
	สารละลาย C	สารละลาย C'	สารละลาย C-C'
100	0.418	0.111	0.307
200	0.736	0.206	0.530
300	0.950	0.284	0.666
400	1.206	0.375	0.831
500	1.432	0.436	0.996
น้ำยางข้น 1	0.662	0.359	0.303
น้ำยางข้น 2	0.939	0.368	0.571
น้ำยางข้น 3	0.959	0.383	0.576



รูป 3.8 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานสำหรับน้ำยางข้น ในช่วงความเข้มข้น 100 – 500 ppm สำหรับสารละลาย C



รูป 3.9 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานสำหรับน้ำยางข้น ในช่วงความเข้มข้น 100 – 500 ppm สำหรับสารละลาย C'



รูป 3.10 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (สารละลาย C – C') สำหรับน้ำยางข้น

ตาราง 3.21 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติโดยใช้สารละลาย C

น้ำยางธรรมชาติ	ปริมาณโปรตีน (ppm)
1	185
2	296
3	304

ตาราง 3.22 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติโดยใช้สารละลาย C'

น้ำยางธรรมชาติ	ปริมาณโปรตีน (ppm)
1	403
2	414
3	433

ตาราง 3.23 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ สำหรับสารละลาย C-C'

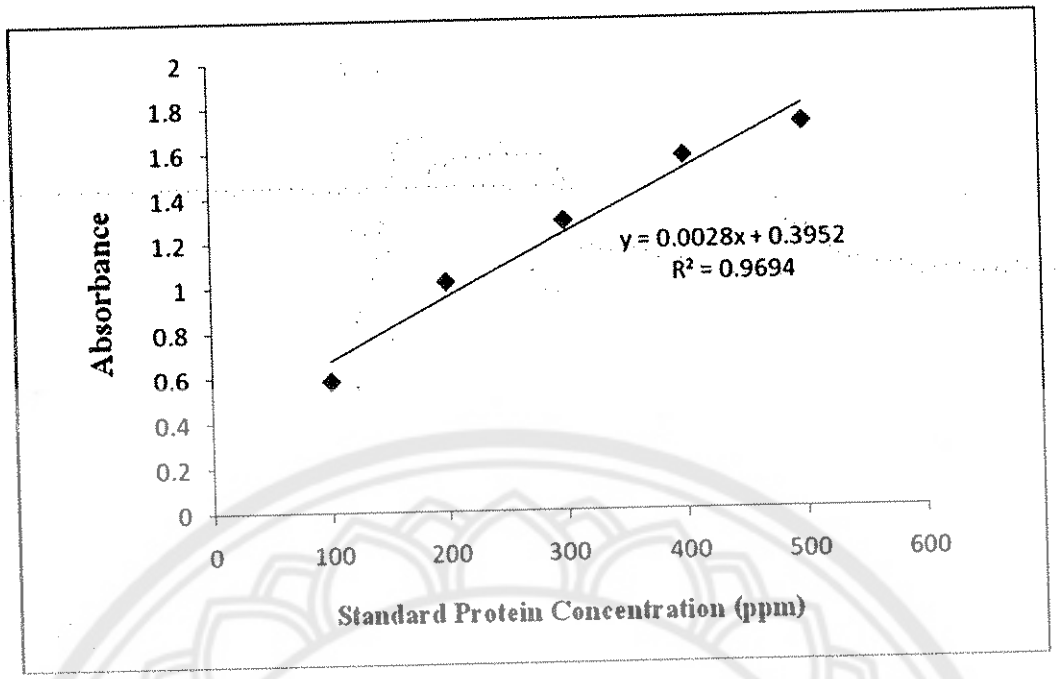
น้ำยางธรรมชาติ	ปริมาณโปรตีน (ppm)
1	82.8
2	240
3	243

3.2.6 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในยางธรรมชาติ ครั้งที่ 5

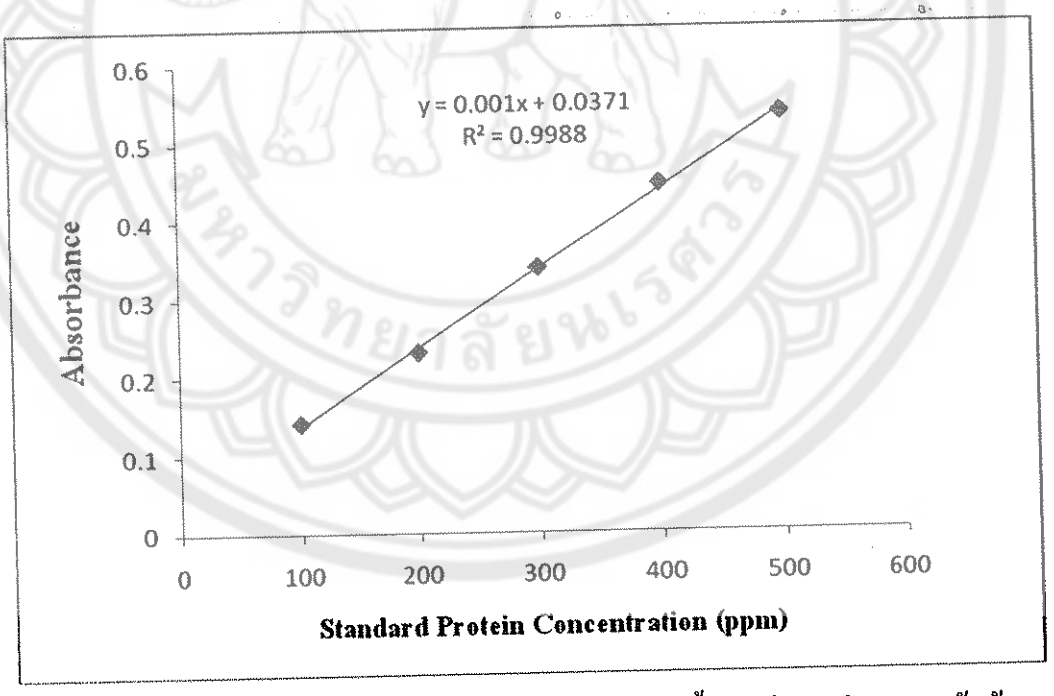
ทำการวิเคราะห์ซ้ำ เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ถูกต้องยิ่งขึ้น โดยมีขั้นตอนเหมือนกับการทดลองที่ผ่านมา ซึ่งการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน แสดงดังตาราง 3.24-3.27 และรูป 3.11-3.13

ตาราง 3.24 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น ช่วงความเข้มข้น 100 – 500 ppm

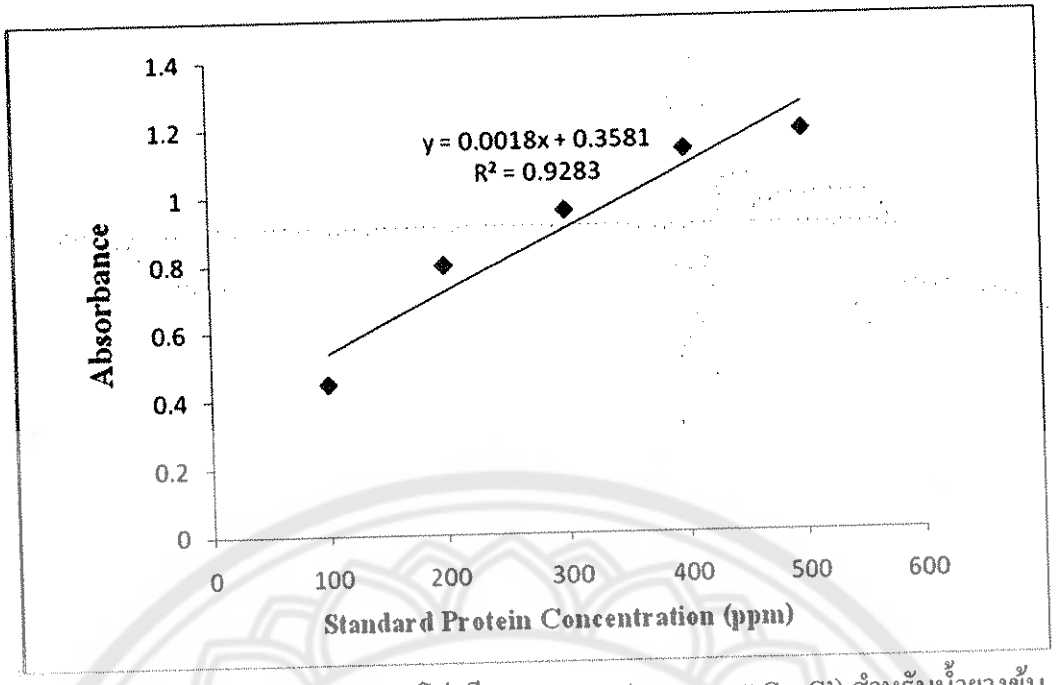
ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (ppm)	Absorbance		
	สารละลาย C	สารละลาย C'	สารละลาย C-C'
100	0.587	0.141	0.446
200	1.023	0.231	0.792
300	1.289	0.339	0.950
400	1.573	0.446	1.127
500	1.716	0.536	1.180
น้ำยางข้น 1	1.070	0.446	0.624
น้ำยางข้น 2	1.126	0.490	0.636
น้ำยางข้น 3	1.075	0.514	0.561
น้ำยางข้น 4	1.125	0.533	0.592



รูป 3.11 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานสำหรับน้ำยางข้น ในช่วงความเข้มข้น 100 – 500 ppm สำหรับสารละลาย C



รูป 3.12 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานสำหรับน้ำยางข้น ในช่วงความเข้มข้น 100 – 500 ppm สำหรับสารละลาย C'



รูป 3.13 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (สารละลาย C – C') สำหรับน้ำยางข้น

ตาราง 3.25 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น โดยใช้สารละลาย C

น้ำยางธรรมชาติ	ปริมาณโปรตีน (ppm)
1	241
2	261
3	243
4	261

ตาราง 3.26 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น โดยใช้สารละลาย C'

น้ำยางธรรมชาติ	ปริมาณโปรตีน (ppm)
1	409
2	453
3	477
4	496

ตาราง 3.27 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น สำหรับสารละลาย C-C'

น้ำยางธรรมชาติ	ปริมาณโปรตีน (ppm)
1	148
2	154
3	113
4	130

จากการวิเคราะห์ซ้ำจำนวน 5 ครั้ง ในการหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติโดยวิธีเลารีดัดแปร แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในหน่วย ppm และ % w/v ดังตาราง 3.28 - 3.29

ตาราง 3.28 สรุปผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติโดยวิธีเลารีดัดแปรในหน่วย ppm

ครั้งที่	ปริมาณโปรตีน (ppm)		
	C	C'	C-C'
1	326	-	-
2	251	311	190
3	217	398	192
4	262	417	189
5	252	459	136
เฉลี่ย	262	396	177
S.D.	39.8	62.3	27.2
%RSD	15.2	15.7	15.4

ตาราง 3.29 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติโดยวิธีเลารีดัดแปรในหน่วย % w/v

ครั้งที่	ปริมาณโปรตีน (% w/v)		
	C	C'	C-C'
1	0.033	-	-
2	0.025	0.031	0.019
3	0.022	0.040	0.019
4	0.026	0.042	0.019
5	0.025	0.046	0.014
เฉลี่ย	0.026	0.040	0.018
S.D.	0.004	0.005	0.003
%RSD	15.60	13.82	14.08

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น จากตาราง 3.28 และ3.29 ได้ทำการวิเคราะห์ซ้ำจำนวน 5 ครั้ง และนำมาหาค่า % RSD ปรากฏว่าปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นที่วิเคราะห์ได้มี %RSD ที่ยังไม่เหมาะสม ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นอีก 3 ครั้ง และได้ผลดังตาราง 3.30 – 3.31

ตาราง 3.30 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติโดยวิธีเลารีดัดแปรในหน่วย ppm

ครั้งที่	ปริมาณโปรตีน (ppm)		
	C	C'	C-C'
1	251	311	190
2	217	398	192
3	262	417	189
เฉลี่ย	243	375	190
S.D.	23.5	56.5	1.53
%RSD	9.64	15.1	0.80

ตาราง 3.31 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติโดยวิธีเลารีดัดแปรในหน่วย % w/v

ครั้งที่	ปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น (%w/v)		
	C	C'	C-C'
1	0.025	0.031	0.019
2	0.022	0.040	0.019
3	0.026	0.042	0.019
เฉลี่ย	0.024	0.038	0.019
S.D.	0.0021	0.0059	0
%RSD	8.6	15.6	0

เมื่อส่งน้ำยางพาราข้น (สดใหม่)ไปให้ส่วนอุตสาหกรรมยาง สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร เป็นผู้ทดสอบการหาปริมาณโปรตีนซึ่งใช้วิธีเลารีดัดแปรเช่นกัน พบว่าน้ำยางพารามีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.046 % w/v เมื่อเปรียบเทียบผลกับตาราง 3.29 และ 3.31 จะเห็นได้ว่ามีค่าใกล้เคียงในกรณีที่ใช้สารละลาย C' แต่เนื่องจากเราได้ใช้น้ำยางพาราที่เก็บไว้นานเกือบ 1 ปีมาทำการวิเคราะห์ซึ่งยางอาจเกิดการเสื่อมคุณภาพ สังเกตเห็นน้ำยางข้นมีลักษณะจับตัวเป็นก้อนและมีสีเหลืองเมื่อเทียบกับน้ำยางที่ยังสดและใหม่ ผู้วิจัยจึงได้ลองนำน้ำยางที่สดใหม่ ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวสีขาว ไม่จับตัวกันเป็นก้อน มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีเลารีดัดแปรซ้ำอีกจำนวน 2 ซ้ำ ได้ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ดังตาราง 3.32

ตาราง 3.32 ผลการวิเคราะห์หาโปรตีนในน้ำยางที่สดและใหม่

ครั้งที่	ปริมาณโปรตีน (ppm)			ปริมาณโปรตีน (% w/v)		
	C	C'	C-C'	C	C'	C-C'
1	445	824	343	0.045	0.082	0.034
2	435	808	282	0.044	0.081	0.028
เฉลี่ย	440	816	313	0.045	0.082	0.031
S.D.	7.07	11.3	43.1	0.0007	0.0007	0.004
%RSD	1.61	1.39	13.8	1.600	0.870	13.68

จากผลการวิเคราะห์ตามตาราง 3.32 นั้น จะสังเกตเห็นว่าปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้ในครั้งล่าสุด เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้ในครั้งแรกๆ มีปริมาณที่สูงขึ้นมากกว่าเดิม อาจเป็นเพราะว่าน้ำยางที่เก็บไว้นานเกินไปนั้น เกิดการสูญเสียสภาพของแอมโมเนีย เพราะการรักษาสภาพของน้ำยาง จะทำการเติมแอมโมเนียลงไป ถ้าเก็บน้ำยางไว้นานเกิน แล้วนำมาวิเคราะห์จึงทำให้ได้ปริมาณโปรตีนที่ค่อนข้างต่ำ ส่วนน้ำยางที่ค่อนข้างสดและใหม่ เมื่อนำมาวิเคราะห์จึงได้ปริมาณโปรตีนที่ค่อนข้างสูงขึ้น และผลที่ได้น่าจะถูกต้องมากกว่าด้วย โดยค่าจากใช้สารละลาย C จะใกล้เคียงกับค่าที่ส่งไปให้ส่วนอุตสาหกรรมยางเป็นผู้ทดสอบ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า เมื่อจะทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางพาราโดยวิธีเลารีดัดแปร ต้องใช้น้ำยางที่สดและใหม่เท่านั้นซึ่งจะทำให้ประหยัดเวลาในการวิเคราะห์โดยแค่ใช้สารละลาย C ก็สามารถให้ผลที่ถูกต้องและแม่นยำแล้ว

3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นด้วยเครื่องสเปคโตรแพนทาโนมิเตอร์ ที่ออกแบบและสร้างขึ้น โดยใช้วิธีการทำให้เกิดสีแบบไบยูเร็ต (Biuret Method)

3.3.1 การทดสอบหาความสัมพันธ์ของโปรตีนในตัวอย่างสารคอลลอยด์กับความเข้มของสีในระบบ RGB

เนื่องจากตัวอย่างน้ำยางพารามีลักษณะเป็นสารคอลลอยด์ ซึ่งไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้โดยตรง เพราะอนุภาคของคอลลอยด์ขัดขวางการส่องผ่านของแหล่งกำเนิดแสง แม้ว่าจะมีโครโมฟอร์ (chromophore) บางชนิดที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างแล้วเกิดสารสีที่มีความเข้มที่แปรผันกับความเข้มข้นของสารเคมีที่ทำปฏิกิริยานั้น ๆ ก็ตาม สารสีที่มีความเข้มของสีแปรผันกับความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ตามจักรภพแม่สีของแพนโทน 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 สบู่ซึ่งเตรียมโดยการชั่งเนื้อสบู่ (สีขาว) 0.5 กรัม ละลายเนื้อสบู่ในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 500 มิลลิลิตร บน Hot plate จากนั้นเติมน้ำมันพืช (มรกต,น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 100%) 0.1 มิลลิลิตร คนจนละลายเป็นสารละลายคอลลอยด์ 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 ด้วยเครื่อง Spectropantonometer ที่ออกแบบและสร้างขึ้น (ได้ทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง)

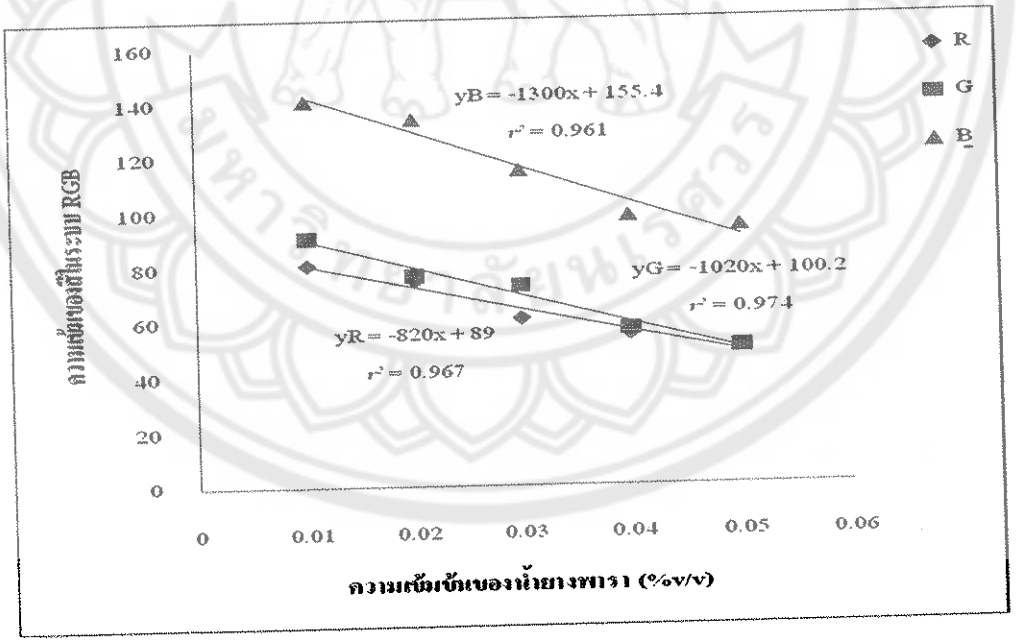
จากการทดลองพบว่า โปรตีนในสารละลายคอลลอยด์สามารถทำปฏิกิริยากับสารละลายไบยูเร็ต แล้วให้สารสีม่วงที่มีความเข้มของสีแปรผกผันกับความเข้มข้นของปริมาณของโปรตีนที่มีอยู่ในสารละลายคอลลอยด์ ทำให้การวิเคราะห์โปรตีนสามารถทำได้โดยตรงจากตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นคอลลอยด์ โดยไม่ต้องตกตะกอนโปรตีนออกมาก่อน ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความสามารถในการวิเคราะห์สี แล้วเทียบกลับไปเป็นความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนได้โดยตรง

3.3.2 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 Spectropantonometer ได้ผลการทดลองดังตาราง 3.33-3.34 และรูป 3.14-3.15

ตาราง 3.33 ค่าความเข้มของสีในระบบ RGB โดยใช้ปริมาตรน้ำยางพารา 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 มิลลิลิตร ตามลำดับ

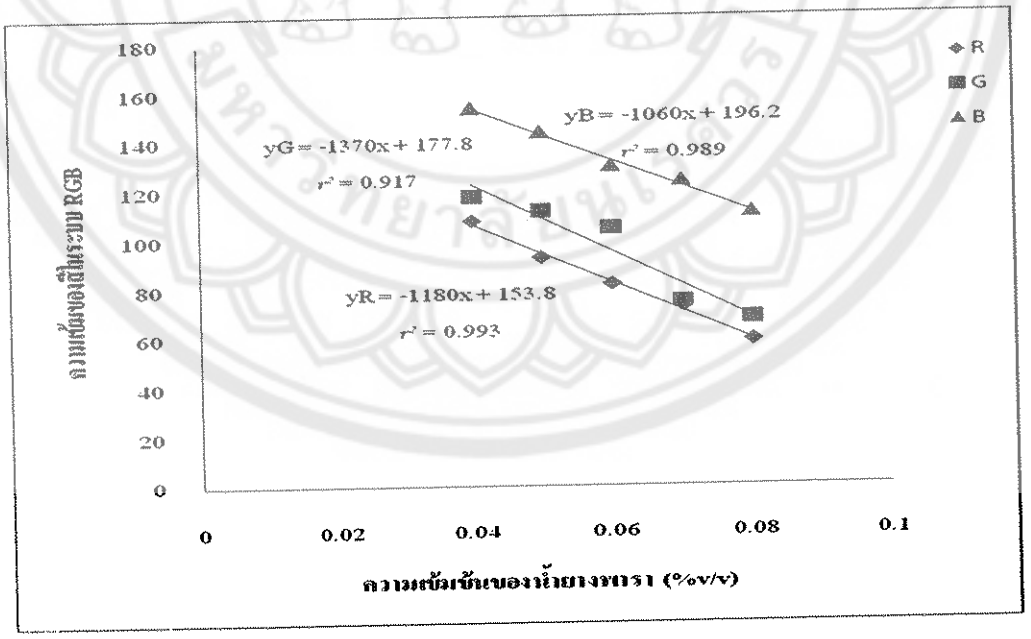
ความเข้มข้นของน้ำยาง (%v/v)	ความเข้มของสีในระบบ RGB		
	R	G	B
0.01	81	91	141
0.02	75	77	134
0.03	61	73	115
0.04	55	57	98
0.05	50	50	94



รูป 3.14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำยางพารากับความเข้มของสีในระบบ RGB โดยใช้น้ำยางปริมาตร 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 มิลลิลิตร ตามลำดับ

ตาราง 3.34 ค่าความเข้มของสีในระบบ RGB โดยใช้ปริมาตรน้ำยางพารา 0.04, 0.05, 0.06, 0.07 และ 0.08 มิลลิลิตร ตามลำดับ

ความเข้มข้นของน้ำยาง (%v/v)	ความเข้มของสีในระบบ RGB		
	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 3.15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำยางพารากับความเข้มของสีในระบบ RGB โดยใช้น้ำยางปริมาตร 0.04, 0.05, 0.06, 0.07 และ 0.08 มิลลิลิตร ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่า ค่าความเข้มสีในระบบ RGB แปรผกผันกับความเข้มข้นของน้ำยางพารา ได้ความสัมพันธ์เป็นสมการเส้นตรงดิ่งลงซึ่งมีค่าความเป็นเส้นตรง (r^2) มากกว่า 0.9 ทั้งสองช่วงความเข้มข้น แต่เราจะเลือกช่วงความเข้มข้นของน้ำยางพาราเท่ากับ 0.04-0.08 %v/v สำหรับการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไปเนื่องจากให้ค่าความเป็นเส้นตรงดีกว่าช่วงความเข้มข้น 0.01-0.05 %v/v และได้ทำการทดลองซ้ำแบบเดิมอีก 5 ซ้ำ ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน โดยในการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพาราด้วยวิธีการทำให้เกิดสีแบบไบยูเร็ตและเลารี ได้เลือกความเข้มข้นของน้ำยางซึ่งเป็นค่ากลางของความเข้มข้นที่เหมาะสม (0.04-0.08 %v/v) คือเท่ากับ 0.06 %v/v เนื่องจากเมื่อทดลองทำให้เกิดสีด้วยทั้งสองวิธีจะสังเกตสีได้ชัดเจนและใช้น้ำยางไม่มากหรือน้อยเกินไป

3.3.3 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพารา

เมื่อทราบความสัมพันธ์ของโปรตีนในตัวอย่างสารคอลลอยด์กับความเข้มของสีในระบบ RGB และได้เลือกความเข้มข้นของน้ำยางพาราแล้วก็ได้ทำการทดลองดังหัวข้อ 2.4.3.2 ซึ่งวิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีนในตัวอย่างน้ำยางพาราข้นชนิดแอมโมเนียสูงด้วยวิธีการทำให้เกิดสีแบ็บไบยูเร็ตโดยวิธีการเติมสารมาตรฐาน (standard addition method) และใช้วิธีการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยวิธี Multiple Regression ดังที่ได้อธิบายในหัวข้อ 2.4.4 ได้ผลดังตาราง 3.35

ตารางที่ 3.35 ความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพาราซึ่งได้จากการทำให้เกิดสีด้วยวิธีไบยูเร็ตก่อนตรวจวัดด้วยเครื่อง Spectropantonometer

ครั้งที่	ปริมาณของโปรตีนในน้ำยางพารา (%w/v)
1	0.045
2	0.045
3	0.041
4	0.042
5	0.043
6	0.045
7	0.047
ค่าเฉลี่ย	0.044
S.D.	0.0021
%RSD	4.7

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในยางแห้งด้วยวิธีเจลดาห์ล (Kjeldahl method)

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีเจลดาห์ลโดยคำนวณจากปริมาณไนโตรเจน จะใช้ตัวอย่างยางธรรมชาติที่เป็นยางแห้งเท่านั้น โดยนำยางแห้งมาทำการย่อย กลั่น และไทเทรตหาปริมาตรของสารละลายกรดมาตรฐาน เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่มีอยู่ในยางแห้ง

ผลการทดลองพบว่า ปริมาณไนโตรเจนที่มีในน้ำยางพาราข้นชนิดแอมโมเนียสูงโดยวิธีการอบแบบ TSC มีประมาณเท่ากับ 0.30 % โดยน้ำหนัก (ตาราง 3.7) อย่างไรก็ตามวิธีนี้เหมาะสำหรับการวิเคราะห์โปรตีนในยางแห้งเท่านั้น

4.2 ผลการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางธรรมชาติโดยวิธีเลารีดัดแปร (Modified Lowry method)

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในน้ำยางธรรมชาติทำได้โดยการสกัด และตกตะกอนโปรตีนก่อนนำไปทำให้เกิดสี แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เพื่อทำการวิเคราะห์เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

ผลการวิเคราะห์พบว่า ปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.038 % w/v (ตาราง 3.31: พิจารณาจากการใช้สารละลาย C') เมื่อทำการวิเคราะห์โปรตีน โดยใช้น้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูงที่สดและใหม่ จะสังเกตได้ว่ามีปริมาณโปรตีนที่มากกว่าการวิเคราะห์ในครั้งแรกๆ เป็นเพราะว่าน้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูงที่เก็บไว้นานเกินไปจะสูญเสียสภาพการเป็นน้ำยาง จึงทำให้ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนได้ต่ำกว่าการวิเคราะห์ด้วยน้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูง ที่สดและใหม่ ซึ่งผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูง ที่สดและใหม่ พบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.045 % w/v (ตาราง 3.32: พิจารณาจากการใช้สารละลาย C) โดยมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ส่งไปให้ส่วนอุตสาหกรรมยาง สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร เป็นผู้ทดสอบ

อย่างไรก็ตาม วิธีนี้เป็นการวิเคราะห์โปรตีนที่สามารถสกัด และละลายน้ำได้เท่านั้นไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูงได้โดยตรงโดยจะต้องทำการสกัดและ ตกตะกอนโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติออกมาก่อน ซึ่งใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน วิเคราะห์ได้ยาก ต้องอาศัยความชำนาญในการวิเคราะห์ และยังสิ้นเปลืองพลังงานและสารเคมีที่ใช้ ค่าใช้จ่าย

ในการวิเคราะห์สูง เนื่องจากสารเคมีที่ใช้มีราคาสูง และต้องใช้สารเคมีหลายชนิดในการวิเคราะห์ด้วย

4.3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ ด้วยเครื่องสเปคโตรแพนทาโนมิเตอร์ที่ออกแบบและสร้างขึ้น โดยใช้วิธีการทำให้เกิดสีแบบไบยูเร็ต

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ โดยวิธี Spectropantonometry ซึ่งใช้วิธีการทำให้เกิดสีตามวิธีการของไบยูเร็ต แล้วจึงทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง Spectropantonometer ที่ได้ออกแบบและสร้างขึ้นซึ่งมีไดโอดสีขาวเป็นแหล่งกำเนิดแสง เมื่อเรานำน้ำยางธรรมชาติที่เจือจางใส่ลงในเครื่องและใช้ web cam ถ่ายภาพก่อนทำการตรวจวัดความเข้มของสีในระบบ RGB แล้วจึงทำการแปลงค่าความเข้มของสีเป็นค่าตัวเลขที่มีค่าแปรผกผันกับความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ พบว่ามีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.044 % w/v (ตาราง 3.35) เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ ซึ่งส่งไปให้ส่วนอุตสาหกรรมยาง สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร เป็นผู้ทดสอบ พบว่าวิธีที่เราได้พัฒนาขึ้นโดยใช้เครื่อง Spectropantonometer ที่ได้สร้างขึ้นในห้องปฏิบัติการนี้ ให้ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นนี้จึงให้ผลการทดลองที่เชื่อถือได้ อีกทั้งเป็นวิธีที่ง่ายสะดวก รวดเร็วกว่าวิธีมาตรฐานมาก

บรรณานุกรม

1. http://web.ku.ac.th/agri/rubber/main-rubber.htm สืบค้นเมื่อวันที่ 16 ตุลาคม 2552

2. วราภรณ์ ขจรไชยกูล (2549) "ยางธรรมชาติ : การผลิตและการใช้งาน" ห้างหุ้นส่วนจำกัด ซีโน ดีไซน์ กรุงเทพมหานคร

3. Labconco, ***A Guide To Kjeldahl Nitrogen Determination Methods and Apparatus***, Expotech Rockley Road Houston, Texas U.S.A.

4. Standard Test Method for Analysis of Aqueous Extractable Protein in Natural Rubber and its Products Using the Modified Lowry Method, ASTM D5712, ***Annual Book of ASTM Standards***, vol. 14, 1995.

5. สุพรรษา หุ่นทอง และคณะ (2551) "การวัดความเข้มของแสงสีโดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีในตัวอย่างคอลลอยด์" ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

6.http://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%A2%E0%B8%B2%E0%B8%87%E0%B8%98%E0%B8%A3%E0%B8%A3%E0%B8%A1%E0%B8%8A%E0%B8%B2%E0%B8%95%E0%B8%B4 สืบค้นเมื่อ วันที่ 22 มิถุนายน 2553

7. http://www.rubbercenter.org สืบค้นเมื่อวันที่ 22 มิถุนายน 2553

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

9. F.W. Perrella and A. A. Gaspari, Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment, ***Methods 27*** (2002) 77-86.

10. ดรุณี วัชราเรืองวิทย์ (2544) "การศึกษาหาปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำจากถุงมือยางทางการแพทย์และเทคนิคการลดปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำ" กลุ่มงานเทคโนโลยีผลิตภัณฑ์ 1 กองฟิสิกส์และวิศวกรรม กรมวิทยาศาสตร์บริการ

11. ดารัตน์ ไชยวารี และคณะ (2551) "การพัฒนาการวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้เครื่องวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง" ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

Output ที่ได้จากโครงการ

1. ส่งไปจดอนุสิทธบัตรคือ เครื่องตรวจวัดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติด้วยวิธีวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง

2. ส่งไปตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยนเรศวร (Naresuan University Science Journal) ในชื่อเรื่อง "**การพัฒนาวิธีการหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางพาราโดยเครื่องสเปคโทรแพนโทโนมิเตอร์ที่ได้ออกแบบขึ้น (Development of Protein Assay in Natural Rubber Latex by the Designed Spectropantonometer)** "

3. ได้นำเสนอในรูปแบบโปสเตอร์ในการประชุมวิชาการนานาชาติ Pure and Applied Chemistry International Conference 2010 เมื่อ 21-23 มกราคม 2553ในหัวข้อเรื่อง "Development of protein assay in natural rubber by the designed spectropantonometer"

ภาคผนวก 1

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

เครื่องตรวจวัดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติด้วยวิธีวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

สาขาเคมีในส่วนที่เกี่ยวข้องกับเครื่องตรวจวัดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติด้วยวิธีวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

หนึ่งในสามของมูลค่าส่งออกผลิตภัณฑ์ที่มาจากน้ำยางธรรมชาติคือถุงมือยาง น้ำยางธรรมชาติประกอบด้วยส่วนของเนื้อยาง และส่วนที่ไม่ใช่ยาง โดยโปรตีนจะอยู่ทั้งในส่วนของเนื้อยางโดยห่อหุ้มอยู่ที่ผิวรอบนอกของอนุภาคยาง และอยู่ในส่วนที่ไม่ใช่ยาง โดยจะกระจายอยู่ในชั้นน้ำและปะปนอยู่ในส่วนของสารลูทอยด์ โปรตีนในยางธรรมชาติแม้จะมีปริมาณไม่มากนัก แต่ก็มีผลต่อผู้ที่แพ้โปรตีนเมื่อผิวหนังของผู้แพ้มีการสัมผัสถูกถุงมือยาง นอกจากนั้นโปรตีนยังมีผลต่อความเสถียรของคุณภาพและความคงทนของถุงมือยาง ดังนั้นโรงงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องตรวจวัดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติก่อนนำไปขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์และโปรตีนคงเหลือในชิ้นผลิตภัณฑ์ก่อนจำหน่าย ซึ่งการวิเคราะห์หาโปรตีนในปัจจุบันมีทั้งการรายงานค่าโปรตีนโดยตรง และการรายงานในรูปของปริมาณไนโตรเจน โดยการใช้มาตรฐาน ASTM D-5712-95 และ ASTM D-3533-90 เป็นต้น อย่างไรก็ตามมาตรฐานดังกล่าวต้องใช้เวลา ค่าใช้จ่าย และสารเคมีจำนวนมาก ทั้งยังต้องขึ้นกับความชำนาญของผู้วิเคราะห์ ด้วยเหตุผลนี้จึงได้ทำการสร้างเครื่องตรวจวัดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติด้วยวิธีวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง โดยอาศัยหลักการวิเคราะห์แบบ Pantonometric analysis (การวัดความเข้มของการกระเจิงแสง) ทำให้สามารถวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางธรรมชาติซึ่งมีลักษณะเป็นคอลลอยด์ได้โดยตรง โดยไม่ต้องตกตะกอนก่อน เพียงแค่นำน้ำยางไปทำให้เกิดสีกับสารละลายไบยูเร็ตแล้วทำการวิเคราะห์สีจากนั้นเทียบกลับไปเป็นความเข้มข้นของโปรตีนได้โดยตรง

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์โดยย่อ

เครื่องตรวจวัดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติด้วยวิธีวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง ตามการประดิษฐ์นี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อทำให้การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และเครื่องมือยังสามารถเคลื่อนย้ายได้สะดวก สำหรับวิธีการที่จะได้พัฒนาขึ้นนี้ เป็นการวัดปริมาณ Total Reactive Protein ในตัวอย่างคอลลอยด์ โดยใช้หลอดไดโอดแปล่งแสงสีขาว (LED) เป็นแหล่งกำเนิดแสงขาวที่ตั้งฉากกับตัวอย่าง และวัดแสงที่กระเจิงจากตัวอย่างที่มีการทำปฏิกิริยากับสารเกิดสี เช่น ไบยูเร็ต ลาวรี หรือ แบรดฟอร์ด รีเอเจนต์ เพื่อให้ได้สารสีที่สามารถกระเจิงแสงได้ในระบบคอลลอยด์ โดยไม่จำเป็นที่จะต้องนำมาทำให้เป็นสารละลายใสและในระบบคอลลอยด์ เมื่อสารได้ผสมกันอย่างสมบูรณ์ อนุภาคของคอลลอยด์นั้นจะเคลื่อนที่แบบบราวเนียน และแพร่กระจายสู่ทุกพื้นที่ของภาชนะจึงสามารถอนุมานได้ว่า ทุกส่วนของภาชนะนั้นมีความเข้มข้นของสารละลายและอนุภาคของคอลลอยด์อย่างละเท่า ๆ กัน ในการสืบค้นสิทธิบัตรทั้งในประเทศและต่างประเทศ พบว่า มีการใช้ระบบนี้เพียงแต่ในการวัดสีของตัวอย่างในระบบ L*a*b เท่านั้น ยังไม่มีการใช้ระบบ RGB สหสัมพันธ์แบบพหุในการหาปริมาณของตัวอย่างสารละลายใด ๆ เลย มีเพียงการประยุกต์ใช้ RGB model ในการวิเคราะห์ภาพถ่ายดาวเทียมในแบนด์ต่าง ๆ เท่านั้น (photogrammetry) ดังนั้นเครื่องที่สร้างขึ้นจึงเป็นเครื่องแรกที่ได้มีการประยุกต์ใช้ RGB model ในการหาปริมาณของโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 แสดงองค์ประกอบของเครื่องตรวจวัดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติด้วยวิธีวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

ตามรูปที่ 1 เป็นภาพแสดงองค์ประกอบของเครื่องตรวจวัดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติด้วยวิธีวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง ซึ่งประกอบด้วย กล่องควบคุมแสงจากภายนอกซึ่งครอบคลุมในส่วนของหลอดไดโอดแปล่งแสงสีขาว 1 ซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงที่ส่องแสงขาวตั้งฉากกับสารตัวอย่างซึ่งคือน้ำยางธรรมชาติที่ผ่านการทำให้เกิดสีกับสารสีเช่น สารละลายไบยูเร็ตแล้วบรรจุอยู่ในเซลล์ใส่สารตัวอย่าง 2 ซึ่งมีกล้องถ่ายวีดีโอขนาดจิ๋ว (web cam) 3 ทำหน้าที่ถ่ายภาพด้วยโปรแกรม JPEG PC Camera และส่งข้อมูลแสงสีไปยังเครื่องคอมพิวเตอร์

โน๊ตบุ๊ค 4 จากนั้นใช้โปรแกรม Color detector version 1.0 ในการอ่านค่าสีของตัวอย่างที่ระดับโปรตีนต่าง ๆ หลังจากทำปฏิกิริยากับสารให้สีแล้วในระบบ RGB จากนั้นเก็บเมตริกซ์สีและความเข้มข้นไว้ในตาราง แล้วนำค่าจากตารางมาสร้างกราฟสหสัมพันธ์ถดถอยแบบพหุ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มของสี และปริมาณโปรตีน แล้วคำนวณออกมาเป็นปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติได้ต่อไป

วิธีการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

ดังได้บรรยายไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

บทสรุปการประดิษฐ์

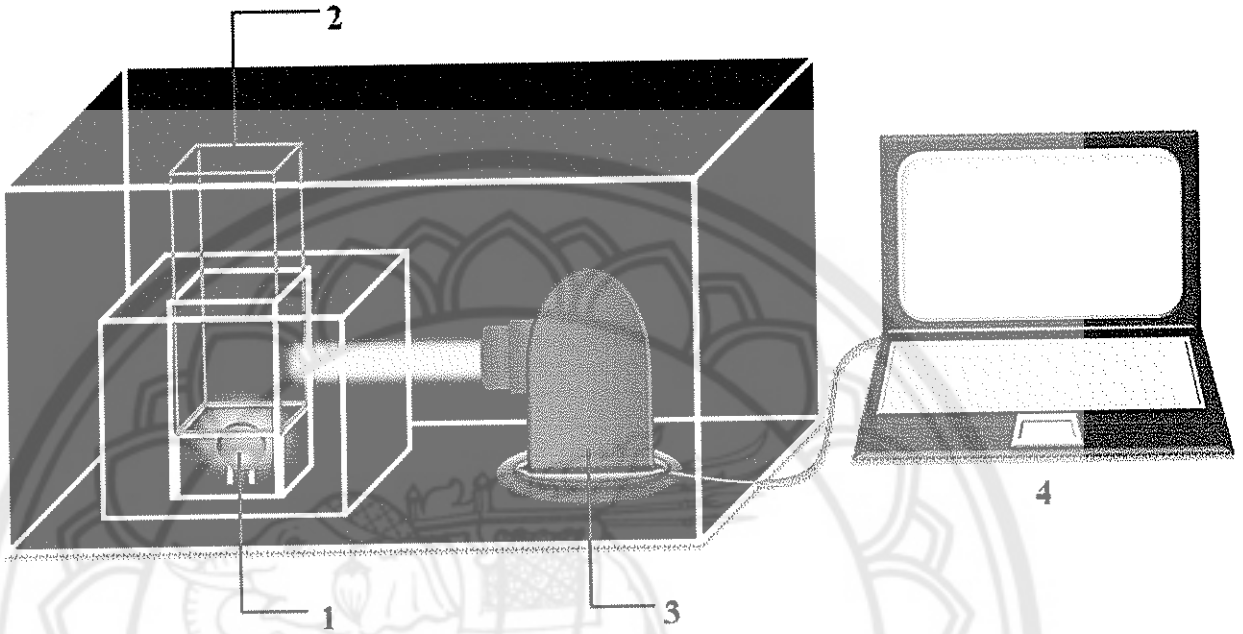
เครื่องตรวจวัดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติด้วยวิธีวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง ประกอบด้วยส่วนสำคัญคือ กล่องควบคุมแสงซึ่งครอบคลุมในส่วนของแหล่งกำเนิดแสง เซลล์ใส่สารตัวอย่าง และ กล้องถ่ายรูปขนาดเล็ก ไม่ให้ถูกแสงจากภายนอก ใช้หลอดไดโอดเปล่งแสงสีขาว (LED) เป็นแหล่งกำเนิดแสงที่ตั้งฉากกับเซลล์ใส่ตัวอย่าง จากนั้นใช้กล้องถ่ายวีดีโอขนาดจิ๋ว (web cam) ในการถ่ายภาพแสงสีที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของโปรตีนในตัวอย่างน้ำยางธรรมชาติกับสารละลายไบยูเร็ตแล้วอ่านค่าสีของตัวอย่างที่ระดับโปรตีนต่างๆ ด้วยโปรแกรม color detector version 1.0 ซึ่งจะเก็บเมตริกซ์สีในระบบ RGB จากนั้นนำค่าสีไปพล็อตกราฟสหสัมพันธ์ถดถอยแบบพหุกับความเข้มข้นของโปรตีนก็จะสามารถคำนวณปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติได้

หน้า 1 ของจำนวน 1 หน้า

ข้อถือสิทธิ

1. เครื่องตรวจวัดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติด้วยวิธีวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง มีลักษณะที่ประกอบด้วย หลอดไดโอดเปล่งแสงสีขาว (LED) (1) ทำหน้าที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงที่ส่องแสงตั้งฉากกับสารละลายตัวอย่างที่บรรจุอยู่ในเซลล์ใส่สารตัวอย่าง (2) โดยตัวอย่างน้ำยางธรรมชาติได้มีการนำมาทำให้เกิดสีกับสารละลายไบยูเร็ตก่อน จากนั้นใช้กล้องถ่ายวีดีโอขนาดจิ๋ว (3) ถ่ายภาพแสงสีที่เกิดขึ้นที่ระดับโปรตีนต่างๆ แล้วเก็บเมตริกซ์สีในระบบ RGB ด้วยโปรแกรม color detector version 1.0 ก่อนนำค่าสีไปพล็อตกราฟสหสัมพันธ์ถดถอยแบบพหุกับความเข้มข้นของโปรตีนก็จะสามารถคำนวณปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติได้ต่อไป

150



รูปที่ 1

155

ภาคผนวก 2

บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ คณะวิทยาศาสตร์ งานนโยบายและแผน โทร. ๓๑๓๐

ที่ ศธ ๐๕๒๗.๐๑.๐๔(๓)/๑๔๔ **วันที่** ๔ สิงหาคม ๒๕๕๓

เรื่อง ตอบรับการตีพิมพ์บทความวิจัย

เรียน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปริญญา มาสวัสดิ์

ตามที่ ท่านได้ส่งบทความวิจัย เรื่อง **การพัฒนาวิธีการหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางพาราโดยเครื่องสเปคโทรแพนโทโนมิเตอร์ที่ได้ออกแบบขึ้น** เพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์ ความทราบแล้วนั้น ในการนี้คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรจึงใคร่ขอแจ้งให้ทราบว่า ขณะนี้บทความของท่านกำลังอยู่ในกระบวนการพิจารณาจากผู้ทรงคุณวุฒิ

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

(รองศาสตราจารย์ปรียานันท์ แสนโภชน์)
รองคณบดีฝ่ายวางแผนพัฒนาและกิจการพิเศษ ปฏิบัติราชการแทน
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

การพัฒนาวิธีการหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางพาราโดยเครื่องสเปคโทรแพนโทโนมิเตอร์ที่ได้ออกแบบขึ้น

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
Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand
Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University

*Corresponding author. E-mail: prinyam@nu.ac.th

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางพารา โดยใช้วิธีการทำให้เกิดสีด้วยวิธีเลารี เปรียบเทียบกับวิธีไบยูเรต ก่อนนำไปตรวจวัดด้วยเครื่องวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสงที่ได้ออกแบบและสร้างขึ้น ซึ่งสารสีที่เกิดขึ้นจะมีความเข้มที่แปรผกผันกับความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนที่มีในน้ำยาง โดยพบว่าการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางพาราซึ่งมีลักษณะเป็นคอลลอยด์สามารถวิเคราะห์ได้โดยตรง โดยไม่ต้องตกตะกอนก่อน ดังนั้นการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางพาราด้วยวิธีนี้จึงสามารถวิเคราะห์สีแล้วเทียบกลับไปเป็นความเข้มข้นของโปรตีนได้โดยตรง จากการทดลองพบว่า ปริมาณของโปรตีนในน้ำยางพารามีค่าเท่ากับ 0.037 และ 0.044 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรด้วยวิธีการทำให้เกิดสีแบบเลารีและไบยูเรตตามลำดับ 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 method for color developing analysis by 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 method, 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 ประกอบด้วยอนุภาคที่เป็นไฮโดรคาร์บอนร้อยละ 30-40 แขวนลอยอยู่ในเซรุ่ม และยังมีส่วนที่ไม่ใช่ยางอีกร้อยละ 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 ต้องใช้ตัวอย่างเป็นเซรุ่มของมนุษย์และยังไม่ทราบความแม่นยำของสารเคมีที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน (Tomazic-Jezic, V.J. *et al.*, 2002; Beezhold, D.H. *et al.*, 2002)

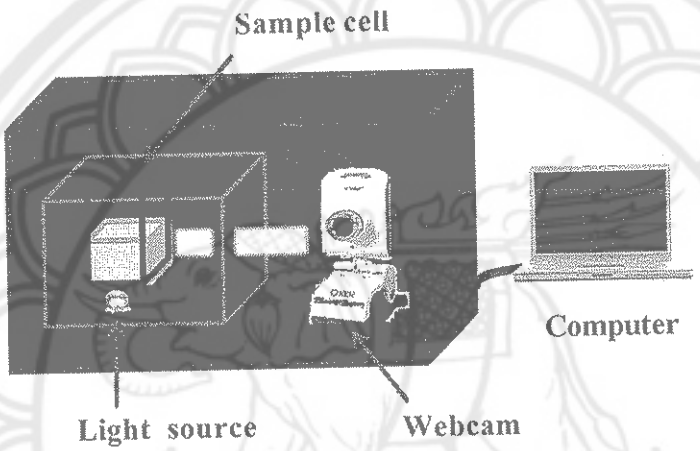
สำหรับการวิเคราะห์ทางเคมีเพื่อหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางพารา มีวิธีมาตรฐาน คือวิธีเลารีดัดแปร (Modified Lowry method) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับใช้ในการหาปริมาณโปรตีนที่สามารถสกัด และละลายน้ำได้ในน้ำยางและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากน้ำยาง (ASTM D5712-05, 2005) โดยโปรตีนที่ละลายน้ำจะถูกสกัดในสารละลายบัฟเฟอร์ จากนั้นทำการตกตะกอนเพื่อเพิ่มความเข้มข้น และเพื่อทำการแยกโปรตีนออกจากสารอื่นๆ ที่ละลายน้ำได้ซึ่งอาจจะรบกวนการวิเคราะห์ แล้วจึงนำโปรตีนที่สกัดได้มาละลายอีกครั้ง ก่อนทำการวิเคราะห์สีด้วยวิธีเลารีดัดแปรซึ่งเทียบกับสารมาตรฐานโปรตีน พบว่า วิธีมาตรฐานนี้มีขั้นตอนยุ่งยาก เสียเวลาและค่าใช้จ่ายมาก (Yeang, H.Y. *et al.*, 1995; Siler, D.J. *et al.*, 1995) ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำยางพารา ซึ่งจะเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยตรงในน้ำยาง โดยใช้หลักการวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง ทำให้ลดขั้นตอนที่ยุ่งยาก และประหยัดเวลาในการตรวจวิเคราะห์มาก

อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง

1. Spectropantonometer

เครื่องตรวจวัดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติด้วยวิธีวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสง (Spectropantonometer) ที่ได้ออกแบบและสร้างขึ้นนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อทำให้การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และเครื่องมือยังสามารถเคลื่อนย้ายได้สะดวก สำหรับวิธีการที่จะได้พัฒนาขึ้นนี้ เป็นการวัดปริมาณ Total Reactive Protein ในตัวอย่างคอลลอยด์ โดยใช้หลอดไดโอดแปล่งแสงสีขาว (LED) เป็นแหล่งกำเนิดแสงขาว

ที่ตั้งฉากกับตัวอย่าง และวัดแสงที่กระเจิงจากตัวอย่างที่มีการทำปฏิกิริยากับสารเกิดสี เช่น ไบยูเร็ต ลาวรี หรือ แบรดฟอร์ด รีเอเจนต์ เพื่อให้ได้สารสีที่สามารถกระเจิงแสงได้ในระบบคอลลอยด์ โดยไม่จำเป็นที่จะต้องนำมาทำให้เป็นสารละลายใส และในระบบคอลลอยด์ เมื่อสารได้ผสมกันอย่างสมบูรณ์ อนุภาคของคอลลอยด์นั้นจะเคลื่อนที่แบบบราวเนียน และแพร่กระจายสู่ทุกพื้นที่ของภาชนะจึงสามารถอนุมานได้ว่า ทุกส่วนของภาชนะนั้นมีความเข้มข้นของสารละลายและอนุภาคของคอลลอยด์อย่างละเท่า ๆ กัน ในการสืบค้นสิทธิบัตรทั้งในประเทศและต่างประเทศ พบว่า มีการใช้ระบบนี้เพียงแต่ในการวัดสีของตัวอย่างในระบบ L*a*b เท่านั้น ยังไม่มีการใช้ระบบ RGB สหสัมพันธ์แบบพหุ (Multiple Regression) ในการหาปริมาณของตัวอย่างสารละลายใด ๆ เลย มีเพียงการประยุกต์ใช้ RGB model ในการวิเคราะห์ภาพถ่ายดาวเทียมในแบนด์ต่าง ๆ เท่านั้น (photogrammetry) ดังนั้นเครื่องที่สร้างขึ้นจึงเป็นเครื่องแรกที่ได้มีการประยุกต์ใช้ RGB model ในการหาปริมาณของโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ (อยู่ในระหว่างดำเนินการขอจดอนุสิทธิบัตร)



รูป 1 การจัดอุปกรณ์ของเครื่อง spectropantonometer ที่ออกแบบและสร้างขึ้น

ตามรูป 1 เป็นภาพแสดงองค์ประกอบของเครื่อง spectropantonometer ซึ่งประกอบด้วย กล่องควบคุมแสงจากภายนอกซึ่งครอบคลุมในส่วนของหลอดไดโอดแปล่งแสงสีขาว (supper bright LED) ทำหน้าที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงที่ส่องแสงขาวตั้งฉากกับสารตัวอย่างซึ่งคือน้ำยางพาราที่ผ่านการทำให้เกิดสีกับสารสีเช่นสารละลายไบยูเร็ตแล้วบรรจุอยู่ในเซลล์ใส่สารตัวอย่าง (sample cell) ซึ่งเป็น polystyrene cuvette ขนาด 4 มิลลิลิตร โดยมีกล้องถ่ายวีดีโอขนาดจิ๋ว (web cam) ทำหน้าที่ถ่ายภาพด้วยโปรแกรม JPEG PC Camera และส่งข้อมูลแสงสีไปยังเครื่องคอมพิวเตอร์โน๊ตบุ๊ค จากนั้นใช้โปรแกรม Color detector version 1.0 ในการอ่านค่าสีของตัวอย่างที่ระดับโปรตีนต่าง ๆ หลังจากทำปฏิกิริยากับสารให้สีแล้วในระบบ RGB จากนั้นเก็บเมตริกซ์สีและความเข้มข้นไว้ในตาราง แล้วนำค่าจากตารางมาสร้างกราฟด้วยวิธี Multiple Regression เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มของสี และปริมาณโปรตีน แล้วคำนวณออกมาเป็นปริมาณโปรตีนในน้ำยางพาราได้ต่อไป ซึ่งวิธีการคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้วิธีการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยวิธี Multiple Regression สามารถแสดงได้ดังตาราง 1 และ 2 ดังนี้

ตาราง 1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโปรตีน (Albumin) และ ความเข้มของการกระเจิงแสงในระบบ RGB (เตรียมสารโดยวิธี standard addition)

ความเข้มข้นของสารละลาย Albumin (ppm)	ความเข้มของการกระเจิงแสงในระบบ RGB		
	R	G	B
40	Y_{1R}	Y_{1G}	Y_{1B}
80	Y_{2R}	Y_{2G}	Y_{2B}
120	Y_{3R}	Y_{3G}	Y_{3B}
160	Y_{4R}	Y_{4G}	Y_{4B}
200	Y_{5R}	Y_{5G}	Y_{5B}

จากข้อมูลดิบที่ได้ จะนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยใส่ข้อมูลดังตาราง 2

ตาราง 2 การใส่ข้อมูลสมการรวมเพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยวิธี Multiple Regression

แกน x	แกน y
40	Y_{1R}
40	Y_{1G}
40	Y_{1B}
80	Y_{2R}
80	Y_{2G}
80	Y_{2B}
120	Y_{3R}
120	Y_{3G}

แกน x	แกน y
120	Y_{3B}
160	Y_{4R}
160	Y_{4G}
160	Y_{4B}
200	Y_{5R}
200	Y_{5G}
200	Y_{5B}

นำข้อมูลที่ได้จากตาราง 2 มาสร้างกราฟโดยใช้โปรแกรม Excel จะได้กราฟเส้นตรงและสมการเส้นตรงรวมของ RGB จากนั้นนำสมการที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพาราได้โดยการแทนค่า $y = 0$ เนื่องจากใช้วิธีการเตรียมสารละลายเพื่อทำกราฟมาตรฐานแบบ Standard Addition เมื่อแทนค่า $y = 0$ จะได้ค่า x ออกมา ซึ่งคือความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพาราในหน่วย ppm และ สามารถคำนวณเป็น % w/v ได้ต่อไป

2. สารเคมี อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 วิธีการทำให้เกิดสีแบบไบยูเร็ต (สุพรรษา หุ่นทองและคณะ, 2551)

สารละลายไบยูเร็ตประกอบด้วย สารละลาย 0.5% w/v $CuSO_4$และ 10% w/v 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

การเตรียมสารละลายเพื่อทำกราฟมาตรฐานโดยวิธี **Standard Addition**

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 ไชยวารีและคณะ, 2552)

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

สารละลาย A คือ สารละลาย 6 % w/v 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 TCA เตรียมโดยการชั่ง TCA ($C_2HCl_3O_2$, 95.5%, Sigma-Aldrich, Germany) มา 5 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย 0.2% w/v 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

การเตรียมสารละลายเพื่อทำกราฟมาตรฐานโดยวิธี Standard Addition

นำสารละลาย Albumin ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาอย่างละ 10 มิลลิลิตร มาทำการเติมน้ำยางพารา (น้ำยางข้นชนิดแอมโมเนียสูง) 0.06 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายที่ได้มา 6 มิลลิลิตรแล้วทำการเติมสารละลาย 5% TCA 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่องอัลตราโซนิคเป็นเวลา 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 ด้วยเครื่อง Spectropantonometer ที่ออกแบบและสร้างขึ้น

3. ผลการทดลองและการวิจารณ์

3.1 การทดสอบหาความสัมพันธ์ของโปรตีนในตัวอย่างสารคอลลอยด์กับความเข้มของสีในระบบ RGB

เนื่องจากตัวอย่างน้ำยางพารามีลักษณะเป็นสารคอลลอยด์ ซึ่งไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้โดยตรง เพราะอนุภาคของคอลลอยด์ขัดขวางการส่องผ่านของแหล่งกำเนิดแสง แม้ว่าจะมีโครโมฟอร์ (chromophore) บางชนิดที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างแล้วเกิดสารสีที่มีความเข้มที่แปรผันกับความเข้มข้นของสารเคมีที่ทำปฏิกิริยานั้น ๆ ก็ตาม สารสีที่มีความเข้มของสีแปรผันกับความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ตามจักรภพแม่สีของแพนโทน 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 สบู่ซึ่งเตรียมโดยการชั่งเนื้อสบู่ (สีขาว) 0.5 กรัม ละลายเนื้อสบู่ในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 500 มิลลิลิตร บน Hot plate จากนั้นเติมน้ำมันพืช (มรกต,น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 100%) 0.1 มิลลิลิตร คนจนละลายเป็นสารละลายคอลลอยด์ ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

จากนั้นทำการชั่งสารมาตรฐานโปรตีน (Albumin) 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยสารละลายคอลลอยด์ที่เตรียมขึ้น ทำการเติมสารละลายไบยูเร็ต คือ 0.5% $CuSO_4$ และ 10% NaOH อย่างละ 2 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มของสีที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ แล้วนำไปวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสงในระบบ RGB ด้วยเครื่อง Spectropantonometer ที่ออกแบบและสร้างขึ้น (ได้ทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง)

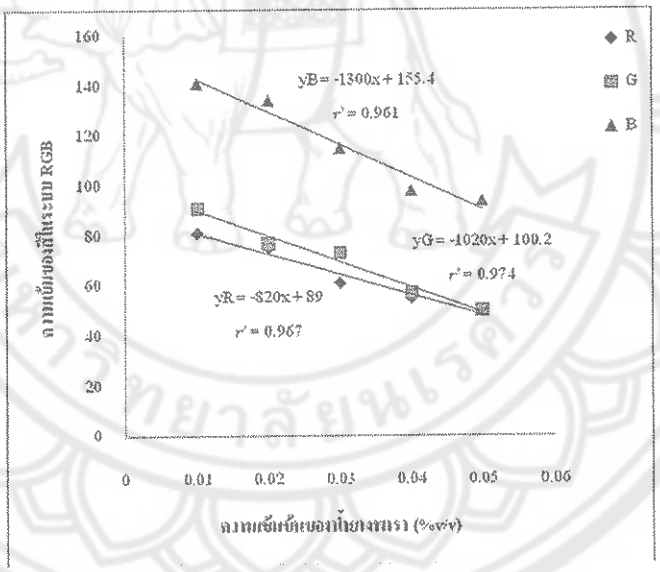
จากการทดลองพบว่า โปรตีนในสารละลายคอลลอยด์สามารถทำปฏิกิริยากับสารละลายไบยูเร็ต แล้วให้สารสีม่วงที่มีความเข้มของสีแปรผกผันกับความเข้มข้นของปริมาณของโปรตีนที่มีอยู่ในสารละลายคอลลอยด์ ทำให้การวิเคราะห์โปรตีนสามารถทำได้โดยตรงจากตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นคอลลอยด์ โดยไม่ต้องตกตะกอนโปรตีนออกมาก่อน ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความสามารถในการวิเคราะห์สี แล้วเทียบกลับไปเป็นความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนได้โดยตรง

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 Spectropantonometer ได้ผลการทดลองดังตาราง 3-4 และรูป 2-3

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

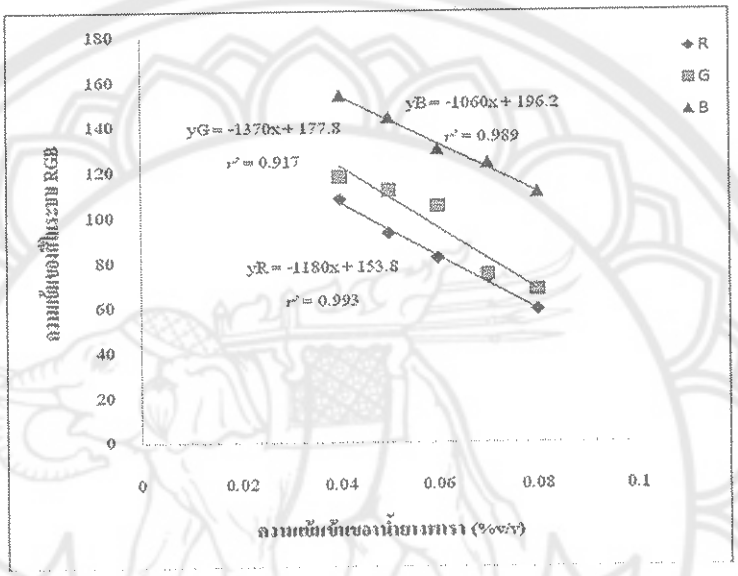
ความเข้มข้นของน้ำยาง (%v/v)	ความเข้มของสีในระบบ RGB		
	R	G	B
0.01	81	91	141
0.02	75	77	134
0.03	61	73	115
0.04	55	57	98
0.05	50	50	94



รูป 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำยางพารากับความเข้มของสีในระบบ 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 (%v/v)	ความเข้มของสีในระบบ RGB		
	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 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำยางพารากับความเข้มของสีในระบบ RGB โดยใช้น้ำยางปริมาตร 0.04, 0.05, 0.06, 0.07 และ 0.08 มิลลิลิตร ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่า ค่าความเข้มสีในระบบ RGB แปรผกผันกับความเข้มข้นของน้ำยางพารา ได้ความสัมพันธ์เป็นสมการเส้นตรงดิ่งลงซึ่งมีค่าความเป็นเส้นตรง (r^2) มากกว่า 0.9 ทั้งสองช่วงความเข้มข้น แต่เราจะเลือกช่วงความเข้มข้นของน้ำยางพาราเท่ากับ 0.04-0.08 %v/v สำหรับการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไปเนื่องจากให้ค่าความเป็นเส้นตรงดีกว่าช่วงความเข้มข้น 0.01-0.05 %v/v และได้ทำการทดลองซ้ำแบบเดิมอีก 5 ซ้ำ ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน โดยในการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพาราด้วยวิธีการทำให้เกิดสีแบบไบยูเร็ตและเลารี ได้เลือกความเข้มข้นของน้ำยางซึ่งเป็นค่ากลางของความเข้มข้นที่เหมาะสม (0.04-0.08 %v/v) คือเท่ากับ 0.06 %v/v เนื่องจากเมื่อทดลองทำให้เกิดสีด้วยทั้งสองวิธีจะสังเกตสีได้ชัดเจนและใช้น้ำยางไม่มากหรือน้อยเกินไป (ดารัตน์ ไชยวารีและคณะ, 2552)

3.3 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพารา

เมื่อทราบความสัมพันธ์ของโปรตีนในตัวอย่างสารคอลลอยด์กับความเข้มของสีในระบบ RGB และได้เลือกความเข้มข้นของน้ำยางพาราแล้วก็ได้ทำการทดลองดังหัวข้อ 2.1 และ 2.2 ซึ่งวิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีนในตัวอย่างน้ำยางพาราข้นชนิดแอมโมเนียสูงด้วยวิธีการทำให้เกิดสีแบบไบยูเร็ตและเลารีโดยวิธีการเติม

สารมาตรฐาน (standard addition method) และใช้วิธีการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยวิธี Multiple Regression ดังที่ได้อธิบายข้างต้น ได้ผลดังตาราง 5

ตาราง 5 ความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพาราซึ่งได้จากการทำให้เกิดสีด้วยวิธีไบยูเร็ต และวิธีเลารีก่อนตรวจวัดด้วยเครื่อง Spectropantonometer

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 โดยวิธี Spectropantonometry ซึ่งใช้วิธีการทำให้เกิดสีตามวิธีการของเลารีและไบยูเร็ต แล้วจึงทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง Spectropantonometer ที่ได้ออกแบบและสร้างขึ้นซึ่งมีไดโอดสีขาวเป็นแหล่งกำเนิดแสง เมื่อเรานำน้ำยางพาราที่เจือจางใส่ลงในเครื่องและใช้ web cam ถ่ายภาพก่อนทำการตรวจวัดความเข้มของสีในระบบ RGB แล้วจึงทำการแปลงค่าความเข้มของสีเป็นค่าตัวเลขที่มีค่าแปรผกผันกับความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพารา จากนั้นนำผลการทดลองจากวิธีการทำให้เกิดสีทั้งสองวิธีมาเปรียบเทียบกัน พบว่าสามารถใช้การทำให้เกิดสีทั้งสองวิธีในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางพาราได้ โดยวิธีการทำให้เกิดสีทั้งสองวิธีให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่วิธีการทำให้เกิดสีแบบไบยูเร็ตมีข้อดีที่เหนือกว่าวิธีการทำให้เกิดสีแบบเลารี คือ สามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว เตรียมตัวอย่างได้ง่าย ใช้สารเคมีในปริมาณที่น้อยกว่า และประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่า ดังนั้นวิธีการทำให้เกิดสีแบบไบยูเร็ต จึงน่าจะเหมาะสมสำหรับนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำยางพาราได้เป็นอย่างดีต่อไป

เมื่อนำน้ำยางพารามาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีมาตรฐาน คือวิธีเลารีดัดแปร (Modified Lowry method; ASTM D5712-05, 2005) ซึ่งส่งไปให้ส่วนอุตสาหกรรมยาง สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร เป็นผู้ทดสอบ พบว่าน้ำยางพารามีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.046 %โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่เราได้พัฒนาขึ้นโดยใช้เครื่อง Spectropantonometer ที่ได้สร้างขึ้นในห้องปฏิบัติการนี้ ให้ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่

ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นนี้จึงให้ผลการทดลองที่เชื่อถือได้ อีกทั้งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว กว่าวิธีมาตรฐานมาก

กิตติกรรมประกาศ

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

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรที่ให้ความอนุเคราะห์ทางด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ รวมทั้งเงินทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้บางส่วน

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยนเรศวรที่ให้เงินทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 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 ซีโน ดีไซน์. กรุงเทพมหานคร.

สุพรรษา หุ่นทอง ศิริวิมล อินทร์เอี่ยม และ ปริญญา มาสวัสดิ์. (2551). การวัดความเข้มของแสงสีโดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีในตัวอย่างคอลลอยด์. 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.

http://coursewares.mju.ac.th/ea341/lesson2/ch02_6.pdf สืบค้นเมื่อวันที่ 4 มิถุนายน 2553

Perrella, F.W. and Gaspari, A.A. (2002). Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment, *Methods, 27*, 77-86.

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.

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.

ภาคผนวก 3

PACCON
PURE AND APPLIED CHEMISTRY INTERNATIONAL CONFERENCE 2010

CERTIFICATE OF ACHIEVEMENT IN RECOGNITION OF

Asst. Prof. Prinya Masawat

FOR THE PARTICIPATION IN

THE PURE AND APPLIED CHEMISTRY INTERNATIONAL CONFERENCE 2010
JANUARY 21-23, 2010

SUPAWAN TANTAYANON
PRESIDENT, THE CHEMICAL SOCIETY OF THAILAND

JANPEN INTARAPRASERT
CHAIRPERSON OF LOCAL ORGANIZING COMMITTEE

PURE AND APPLIED CHEMISTRY INTERNATIONAL CONFERENCE 2010

CHALLENGES IN CHEMISTRY FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT

JANUARY 21-23, 2010

UBON RATCHATHANI, THAILAND

ISBN: 978-974-523-221-1

Development of protein assay in natural rubber by the designed spectropantonometer

Prinya Masawat,[1*] Saisunee Liawruangrath[2] and Suphachoke Upalee[2]

[1]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000*

[2] *Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiangmai University, Chiangmai, Thailand 50200*

**E-mail: prinyam@nu.ac.th, Tel: +66-5-596-3439*

In this research, protein assay in natural rubber was developed by using Lowry and Biuret method for color developing analysis by 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 in the ranges of 0.0348-0.0394 and 0.0406-0.0473 %w/w by Lowry and Biuret method, respectively. The results obtained from both color developing methods are not significantly different at 95 % confidence limit.

REFERENCES

1. http://www.scisoc.or.th/stt/33/sec_c/paper/stt33_C1_C0032.pdf (retrieved on 8th October, 2009)
2. http://www.rubbercenter.org/files/latex%20allergy.pdf (retrieved on 4th March, 2009)