สัญญาเลขที่ R2557B088

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาชุดทดสอบโปรตีนที่ละลายน้ำสำหรับยางพารา
และผลิตภัณฑ์จากยางพารา

คณะผู้วิจัย

1. ดร. สายรุ้ง อวยพรกชกร คณะวิทยาศาสตร์
2. ผศ. ดร. ขวัญจิตต์ เหมะวิบูลย์ คณะวิทยาศาสตร์

1693867x ว TS 1492 ส6615 2557

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยการสนับสนุนเงินวิจัยจากมหาวิทยาลัยนเรศวร รวมทั้งขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่เอื้ออำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยนเรศวรที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัย รวมทั้งขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่น้องที่คอยให้การสนับสนุนการทำวิจัยในด้านต่างๆและกำลังใจที่มีต่อผู้วิจัย ทำให้สามารถฟันฝ่าอุปสรรคที่เกิดในระหว่างงานวิจัยได้

ดร. สายรุ้ง อวยพรกชกรและคณะ

บทคัดย่อ

โปรตีนเป็นองค์ประกอบหนึ่งอยู่ในน้ำยางธรรมชาติสามารถก่อให้เกิดอาการแพ้ต่อผู้ใช้ได้ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงศึกษาหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นและผลิตภัณฑ์ยางพารา มักวิเคราะห์หา ปริมาณไนโตรเจนรวมโดยเทคนิคเจลดาร์ล ซึ่งไม่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ในน้ำยางข้น ดังนั้นในที่นี้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเหล่านี้ด้วยวิธีโมดิฟายด์ลาวรี โดยโปรตีนจากน้ำยางที่ละลายได้ทำปฏิกิริยากับสารละลายคอปเปอร์ (II) และฟอลินซิโอแคลตูรีเอเจนต์เกิดเป็นสารประกอบสีน้ำเงิน แล้วทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 745 นาโนเมตร ในงานวิจัยนี้ศึกษาวิธีการสกัดโดยการแช่ในตัวทำละลาย คลื่นความถี่สูง และไมโครเวฟและพบว่า เทคนิคไมโครเวฟเป็นเทคนิคที่เหมาะสมที่สุด โดยศึกษาชนิดของตัวสกัดโปรตีน กำลังไฟฟ้าของเครื่องไมโครเวฟในครัวเรือน และระยะเวลา โปรตีนจากน้ำยางถูกสกัดได้ดีด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนเข้มข้น 2.5 เท่า จำนวน 5 มิลลิลิตร และใช้เทคนิคไมโครเวฟ ที่กำลังไฟฟ้า 560 วัตต์ เป็นเวลา 60 นาทีทำให้หาปริมาณโปรตีนในยางพาราและถุงมือยาง เท่ากับ 2.59 และ 0.42มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

Abstract

Proteins are found in the natural rubber latex, which can lead to allergic reaction in sensitive users. Therefore the determination of protein content in condensed rubber latex and their products is necessary. This is usually done using the tedious Kjeldahl's method for total nitrogen determination, which is not suitable for the analysis of condensed rubber. Thus, modified Lowry method was selected to determination of protein content in these samples. The soluble protein from latex was determined using its reaction with copper (II) and Follin-Ciocalteu's reagent. A blue complex is generated and detected at 745 nm. In this research, the extraction method was optimized by immersing in extractant, using an ultrasonic bath and a household microwave and found that microwave was the optimized technique. All parameters such as extracting solvents, **power of household microwave machine and extraction duration were optimized. The optimized method for protein extraction from natural rubber latex entails immersion of the sample in 5 mL of 2.5X phosphate buffer saline and application of microwave at 560W for 60 minutes. Protein contents in natural latex and natural latex gloves were 2.59 and 0.41 mg/g, respectively**

สารบัญ

บทที่		หน้า
	กิตติกรรมประกาศ	ก
	บทคัดย่อ	ข
	สารบัญ	ค
	สารบัญตาราง	ช
	สารบัญภาพ	ซ
1	บทนำ	
	1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย	1
	1.2 น้ำยาง	2
	1.2.1 วิธีการทำน้ำยางข้น	2
	1.2.1.1 น้ำยางข้นโดยใช้เครื่องปั่น	2
	1.2.1.2 น้ำยางข้นโดยวิธีการระเหยน้ำ	3
	1.2.1.3 น้ำยางข้นโดยวิธีครีมมิ่ง	3
	1.2.1.4 วิธีการแยกด้วยไฟฟ้า	4
	1.2.2 การเก็บ และการขนส่งน้ำยางข้น	4
	1.3 น้ำยางธรรมชาติ	4
	1.3.1 สมบัติของยางธรรมชาติ	5
	1.3.1.1 สมบัติทางเคมี	5
	1.3.1.2 สมบัติทางกายภาพ	5
	1.3.2 ส่วนประกอบของยางธรรมชาติ	5
	1.3.3 การรักษาสภาพและการเสียสภาพของน้ำยางธรรมชาติ	6
	1.4 การแพ้ยางธรรมชาติ	8
	1.4.1 โรคผิวหนังอักเสบจากการระคายเคือง (Irrtant dermatitis)	8
	1.4.2 โรคภูมิแพ้ชนิดที่1 (Type I allergic reactions)	8
	1.4.3 โรคภูมิแพ้ชนิดที่4 (Type IV allergic reaction)	8
	1.4.4 โปรตีนในธรรมชาติที่ทำให้เกิดอาการแพ้	9
	1.5 เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน	11

1.5.1 การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Modified Lowry 11
1.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl 12
1.6 เครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ 14
1.7 เครื่องมือที่ใช้ในการสกัดโปรตีน 17
1.7.1 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) 17
1.7.1.1 หลักการการทำงานของเครื่องหมุนเหวี่ยง 17
1.7.1.2 ชนิดของเครื่องหมุนเหวี่ยง 18
1.7.2 เครื่องอัลตราโซนิกชนิดอ่างน้ำ 19
1.7.3 เครื่องไมโครเวฟ 20
1.7.3.1 ส่วนประกอบภายในเครื่องไมโครเวฟ 21
1.7.3.2 การสร้างคลื่นไมโครเวฟ 21
1.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 22
2 วิธีดำเนินการทดลอง
2.1 เครื่องมือ 25
2.2 อุปกรณ์ 25
2.3 สารเคมี 26
2.3.1 สารเคมีของการทดลองด้วยวิธี Modified Lowry 26
2.3.2 สารเคมีของการทดลองด้วยวิธี Kjeldahl 26
2.4 การเตรียมสารละลายและสารละลายมาตรฐาน 27
2.4.1 การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ด้วยวิธีModified Lowry 27
2.4.1.1 Reagent A (alkaline tartrate) 27
2.4.1.2 Reagent B (copper sulfate) 27
2.4.1.3 Reagent C (alkaline copper tartrate) 27
2.4.1.4 Reagent D (dilute Folin phenol) 27
2.4.2 สารละลาย Albumin bovine serum (BSA) เข้มข้น 30 µg/mL 27
2.4.3 สารละลาย Phosphate Buffer Saline (*PBS*) เข้มข้น 10 เท่า (10X) 27
2.4.4 สารละลาย Phosphate Buffer Saline (*PBS*) เข้มข้นต่างๆ 27
2.4.5 สารละลาย 7.5% Sodium laurylsulphate (SLS) 28
2.4.6 สารละลาย 1mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 28

2.4.7 สารละลาย 10% Acetone 28

2.4.8 สารละลาย 10% Methanol 28

2.4.9 สารละลาย Trichloroacetic Acid (TCA) เข้มข้น 30% (w/v) 28

2.5 การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ด้วยวิธี Kjeldahl 28

2.5.1 สารละลาย 50 % NaOH 28

2.5.2 สารละลาย 0.1 M HCl 28

2.5.3 สารละลาย 0.01 M HCl 28

2.5.4 สารละลาย 0.1 % Methyl red 29

2.6 การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA ด้วยวิธี Modified Lowry 29

2.7 การศึกษาอิทธิพลของสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) ที่มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนด้วยวิธี Modified Lowry 29

2.8 การศึกษาเทคนิคที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้น 30

2.8.1 การศึกษาเทคนิคการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยการแช่ในสารสกัด 30

2.8.2 การศึกษาเทคนิคการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยการใช้เทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) 31

2.8.2.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย Phosphate Buffer Saline (*PBS*) โดยการใช้เทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) 31

2.8.2.2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยการใช้เทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) 31

2.8.3 การศึกษาเทคนิคการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยการใช้เครื่องไมโครเวฟครัวเรือน (Household microwave machine) 32

2.8.3.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายPhosphate Buffer Saline (*PBS*) โดยการใช้เครื่องไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine) 32

2.8.3.2 การศึกษากำลังไฟฟ้าที่เหมะสมในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นด้วยเทคนิคไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine) 32

2.8.3.3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยใช้เทคนิคไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine) 33

2.8.3.4 การศึกษาชนิดสารสกัดที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยใช้เทคนิคไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine) 33

2.9 การหาร้อยละการกลับคืน (% recovery) ของวิธีการวิเคราะห์ 34

2.10 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl 34

3 ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ของการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Modified Lowry 35

3.2 การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA ด้วยวิธี Modified Lowry 36

3.3 อิทธิพลของสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) ที่มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนด้วยวิธี Modified Lowry 37

3.4 การศึกษาเทคนิคที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้น 38

3.4.1 การศึกษาเทคนิคการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยการแช่ในสารสกัด 38

3.4.2 การศึกษาเทคนิคการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยการใช้เทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) 39

3.4.2.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) โดยการใช้เทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) 39

3.4.2.2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดจากโปรตีนด้วยเทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) 40

3.4.3 การศึกษาเทคนิคการสกัดโดยการใช้เทคนิคไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine) 41

3.4.3.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) โดยการใช้เทคนิคไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine) 41

3.4.3.2 การศึกษากำลังไฟฟ้าที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยการใช้เทคนิคไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine) 42

3.4.3.3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยใช้เทคนิคไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine) 43

3.4.3.4 การศึกษาชนิดสารสกัดที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้น 44

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น 44

4 สรุปผลการทดลอง

4.1 สรุปผลการทดลอง 46

4.2 ข้อเสนอแนะ 47

บรรณานุกรม 48

ภาคผนวก 51

การเผยแพร่ผลงาน 52

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1.1	องค์ประกอบของน้ำยางสด	6
2.1	การเตรียมสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) ที่มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนในน้ำยางข้นด้วยวิธี Modified Lowry	30
3.1	ปริมาณโปรตีนที่สกัดจากน้ำยางข้นด้วยเทคนิคการแช่ในสารสกัด PBS	38
3.2	ปริมาณโปรตีนที่สกัดจากน้ำยางข้นด้วยเครื่องไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine)	41
3.3	การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นด้วยเทคนิคไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine)	43
3.4	การศึกษาชนิดสารสกัดที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้น	44
3.5	การวิเคราะห์ปริมาณปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นและถุงมือยางด้วยวิธีต่างๆ	45

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1.1	ผังสายการผลิตน้ำยางข้นโดยใช้เครื่องปั่น	3
1.2	สูตรโครงสร้างทางเคมีของยางธรรมชาติ (cis-1,4 polyisoprene)	5
1.3	สถานการณ์เป็นสารแขวนลอยของน้ำยางสด	7
1.4	ปฏิกิริยา Lowry	11
1.5	ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Modified Lowry	12
1.6	การติดตั้งเครื่องมือเพื่อทำการกลั่นก๊าซแอมโมเนียโดยวิธี Kjeldahl	13
1.7	องค์ประกอบของเครื่อง UV-VIS spectrophotometer	15
1.8	องค์ประกอบที่สำคัญของเครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบลำแสงเดี่ยว (single beam type)	16
1.9	การทำงานของสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ชนิดลำแสงคู่	16
1.10	ลักษณะทั่วไปและส่วนประกอบภายในเครื่องไมโครเวฟ	21
1.11	กลไกการสร้างคลื่นไมโครเวฟ	22
1.12	การเชื่อมต่อ H_2O_2-suction module	23
2.1	ชุดเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Kjedahl	34
3.1	การดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน BSA ด้วยวิธี Modified Lowry ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 400 ถึง 900 nm	35
3.2	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA ด้วยวิธี Modified Lowry	36
3.3	อิทธิพลของสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) ที่มีผลต่อค่าการดูดกลืนของสารละลายมาตรฐาน BSA เข้มข้น 12 และ 24 µg/mL	37
3.4	ปริมาณโปรตีนที่สกัดจากน้ำยางข้นด้วยสารละลาย PBS โดยใช้เทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication)	39
3.5	**การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นด้วยเทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication)**	40
3.6	**การศึกษากำลังไฟฟ้าที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นด้วยเครื่องไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine**	42

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

ยางพาราเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย และเป็นพืชยุทธศาสตร์ในการพัฒนาการเกษตรนอกเหนือจากข้าว มีมูลค่ารวมกว่า 2 แสนล้านบาท[1] เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่ส่งออกยางธรรมชาติเป็นอันดับต้นๆ ของโลก โดยผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติที่มีการส่งออก ได้แก่ ยางแผ่นรมควัน ยางแท่งมาตรฐานและน้ำยางข้น เป็นต้น อุตสาหกรรมจากยางพาราเป็นอุตสาหกรรมที่มีการแข่งขันสูงในตลาดทั้งในประเทศและต่างประเทศ ซึ่งที่สำคัญได้แก่ อุตสาหกรรมน้ำยางข้นเป็นการแปรรูปเป็นน้ำยางข้นเพื่อเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่อเนื่องอื่นๆ เช่น ถุงมือยาง ถุงยางอนามัย สายยางยืด จุกนม สายสวนปัสสาวะ ยางฟองน้ำ ยางรถยนต์ เป็นต้น

ในปัจจุบันต้นไม้ที่ให้น้ำยางมีความสำคัญในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์จากยาง คือต้นยางพารา ซึ่งเป็นพืชใน species *Haveabrasiliensis*, family *Euphorbiaceae* น้ำยางและยางแห้งธรรมชาติที่ใช้กันทั่วโลกเกือบทั้งหมดมาจากต้นพืชนี้พียงแหล่งเดียว แม้ว่าพืชชนิดอื่นๆ ได้แก่ วายยูเล่ (guayule plant) จะสามารถให้น้ำยางได้ แต่ก็ยังมีความสำคัญทางอุตสาหกรรมน้อยมาก[2]ซึ่งน้ำยางสดที่ได้จากการกรีดต้นยางพารา มีลักษณะเป็นของเหลวขุ่นคล้ายน้ำนม มีอนุภาคขนาด 0.05-0.5 ไมครอน ในน้ำยางสดมีปริมาณเนื้อยางแห้งประมาณร้อยละ 25-45ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ อายุ ฤดูกาล และกรรมวิธีกรีดยาง โดยทั่วไปน้ำยางสดประกอบด้วยสารที่เป็นของแข็งทั้งหมดร้อยละ 36 เนื้อยางแห้งร้อยละ 33 โปรตีนและไขมันร้อยละ 1.0-1.2 คาร์โบไฮเดรตและเถ้าร้อยละ 1.0 ความหนาแน่นประมาณ 0.975-0.980 กรัม/มิลลิลิตร และมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5-7.0[3] ซึ่งโปรตีนที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์จากน้ำยางธรรมชาติสามารถก่อให้เกิดการแพ้ต่อผู้ใช้ได้ โดยมีอาการตั้งแต่เป็นผื่นคันแดง ผิวหนังไหม้ หายใจลำบาก หอบหืด และบางรายอาจช็อคเสียชีวิตในที่สุด ทำให้ผู้ผลิตผลิตภัณฑ์เหล่านั้นจากน้ำยางธรรมชาติต้องการวิธีการแก้ไข เนื่องจากเป็นปัญหาสำคัญต่อวงการแพทย์และสาธารณสุขเป็นอย่างมาก ซึ่งโปรตีนที่ละลายน้ำในถุงมือยางหรือผลิตภัณฑ์จากยางพาราอาจละลายออกมาขณะที่ใช้ผลิตภัณฑ์นั้นๆ เมื่อสัมผัสเหงื่อได้ จากการประมาณของ**ประชากร 1-6% เป็นโรคแพ้โปรตีนจากยาง โดยเฉพาะผู้ที่ทำงานสัมผัสกับแป้งในถุงมือยางบ่อยๆ เช่น ในโรงพยาบาลจะมีอัตราความเสี่ยงสูงมากในการเกิดภูมิแพ้ สำหรับกลุ่มเสี่ยงอื่นๆ ได้แก่ กลุ่มของผู้ที่ทำงานในอุตสาหกรรมที่ผลิตผลิตภัณฑ์น้ำยางธรรมชาติ รวมถึงกระบวนการเก็บน้ำยางจากต้นยาง เป็นต้น**[4]

ปัญหาการแพ้โปรตีนในถุงมือยาง เป็นเรื่องที่ได้รับการกล่าวถึงกันมากในปัจจุบัน โดยเฉพาะองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา หรือ FDA (The US Food and Drug Administration) ได้ประกาศปริมาณโปรตีนสูงสุดที่ยอมรับได้ในถุงมือธรรมชาติต้องไม่เกิน 200 μg[4]

ในงานวิจัยได้ทำการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ทั้งหมดจากกกผลิตภัณฑ์ในน้ำยางข้น ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่าโปรตีนชนิดใดที่ทำให้เกิดอาการแพ้ การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทำได้หลายวิธี ในงานวิจัยจึงทำการศึกษาวิธี Modified Lowry และวิธี Kjeldah ดังนั้นจึงทำการศึกษาการเลือกตัวสกัด เทคนิคที่ใช้ในการสกัด และสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสม

1.2 น้ำยาง

น้ำยางมีลักษณะเป็นน้ำสีขาวคล้ายน้ำนม มีเนื้อยางที่เป็นไฮโดรคาร์บอนอยู่ในน้ำยาง เนื้อยางแห้ง 350 ปอนด์ ไนโตรเจนประมาณ 4 ปอนด์ โพแทสเซียม $\frac{1}{2}$ ปอนด์ และฟอสเฟต 1 $\frac{1}{4}$ ปอนด์

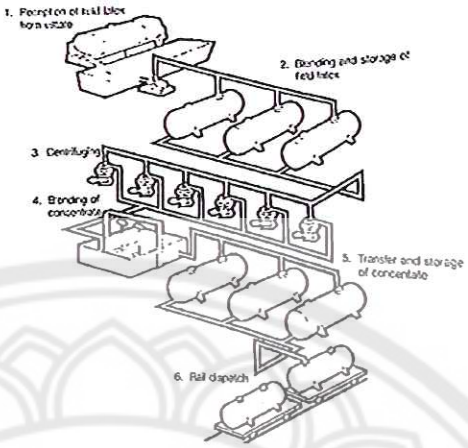
น้ำยางข้น หมายถึง น้ำยางที่ไล่เอาน้ำออกบางส่วน ซึ่งเนื้อยางแห้งตามธรรมชาติมีอยู่ 30-40 % สำหรับน้ำยางข้นมีเนื้อยาง 60% ของน้ำหนักทั้งหมด ประโยชน์ของน้ำยางข้น เช่น ทำกาว ทำลูกโป่ง ทำถุงมือ ผสมสีทาบ้าน เป็นต้น [5]

1.2.1 วิธีการทำน้ำยางข้น

การทำน้ำยางข้น สามารถทำได้หลายวิธี วิธีหลักที่ปฏิบัติมีอยู่ 4 วิธี คือ ใช้เครื่องปั่นการระเหยน้ำ วิธีครีมมิ่ง และ วิธีใช้ขั้วไฟฟ้า [6]

1.2.1.1 น้ำยางข้นโดยใช้เครื่องปั่น

นำน้ำยางสดที่ผ่านการตรวจสอบตามเกณฑ์คุณภาพป้อนเข้าเครื่องปั่น เครื่องปั่นจะแยกน้ำยางสดเป็นส่วนของน้ำยางข้น (มีเนื้อยางแห้งหรือ Dry rubber content ไม่น้อยกว่า 60%) ส่วนของหางน้ำยาง (skim latex) มีเนื้อยางแห้งประมาณ 3-6% และแยกสารอื่นๆที่ไม่ใช่ยางออกจากน้ำยาง ส่วนหางน้ำยางจะถูกแปรรูปเป็นยางสกิมบล็อกโดยการลดปริมาณแอมโมเนียและทำให้ยางจับตัวด้วยกรด น้ำยางข้นจะถูกเติมหรือปรับปริมาณแอมโมเนีย ดังภาพ 1.1



ภาพ 1.1 ผังสายการผลิตน้ำยางข้นโดยใช้เครื่องปั่น[6]

1.2.1.2 น้ำยางข้นโดยวิธีการระเหยน้ำ

ก่อนจะนำเข้าสู่กระบวนการระเหยน้ำมีการควบคุมความดันต่ำและอุณหภูมิสูง น้ำยางที่ได้จะถูกทดสอบให้ได้คุณภาพตามเกณฑ์กำหนดของโรงงานก่อนมีการจำหน่าย ส่วนประกอบโดยประมาณของน้ำยางข้นจากการระเหยน้ำคือ สารของแข็ง 75% ยาง 60% caustic potash 1.5% สารเพิ่มความเสถียร โปรตีนและอื่นๆ 13.5%[6]

1.2.1.3 น้ำยางข้นโดยวิธีครีมมิ่ง

ขั้นตอนการผลิตน้ำยางข้นโดยวิธีครีมมิ่งคือ รวบรวมน้ำยางสดจากสวน เติมแอมโมเนียเติมสารละลายครีมมิ่งเอเจ้นท์ตัวอย่างครีมมิ่งเอเจนท์ ได้แก่ Ammonium, locust bean gum, gum tragacanth, methyl cellulose เป็นต้น กวนน้ำยางประมาณ 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ 40 ชั่วโมง น้ำยางจะเกิดครีม (แยกชั้น) เกือบสมบูรณ์ แยกส่วนล่างคือสกิมออก เติมแอมโมเนียในส่วนของน้ำยางครีมน้ำยางครีมแต่ละชุดจะถูกรวบรวมในแทงก์รวมเป็นเวลาหลายวัน ซึ่งการเกิดครีมจะสมบูรณ์ภายในถังรวม และทำการแยกสกิมออกอีก จากนั้นกวนน้ำยางครีมเบาๆ 1-2 วัน เพื่อความสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกันก่อนนำออกจำหน่าย

น้ำยางข้นชนิดครีมมีข้อได้เปรียบน้ำยางข้นที่เตรียมโดยวิธีอื่นๆ หลายประการ ได้แก่ อุปกรณ์เครื่องมือการผลิตที่ง่าย สะดวกและราคาไม่แพง ไม่ต้องใช้พลังงานสูง มีการสูญเสียส่วนของเนื้อยางไปกับส่วนของสกิมเพียงเล็กน้อย ข้อด้อยคือ ใช้เวลานาน สารครีมมิ่งเอเจ้นท์ที่ตกค้างอาจมีผลกระทบต่อสมบัติความเป็นคอลลอยด์ของน้ำยางและต่อสมบัติของฟิล์มยาง[6]

1.2.1.4 วิธีการแยกด้วยไฟฟ้า

จากการที่ในสถานะของน้ำยาง อนุภาคยางที่แขวนลอยในเซรุ่มต่างถูกห่อหุ้มด้วยคาร์บอกซิเลตไอออน (carboxylate ion, $RCOO^-$) ที่มีประจุลบ ดังนั้น จึงสามารถที่จะอาศัยวิธีการทางไฟฟ้าเข้ามาช่วยในการแยกส่วนของเนื้อยางจากส่วนของเซรุ่มได้ โดยวิธีการจุ่ม ขั้วไฟฟ้าที่เป็นขั้วบวก และลอยตัวสูงขึ้นสู่ผิวหน้าของน้ำยางในที่สุด ทั้งนี้ เนื่องจากความหนาแน่นของอนุภาคยางต่ำกว่าความหนาแน่นของเซรุ่ม วิธีการทำน้ำยางให้ข้นโดยใช้ไฟฟ้านี้เป็นวิธีที่ยุ่งยากและไม่ประหยัด[1]

1.2.2 การเก็บ และการขนส่งน้ำยางข้น

บรรจุน้ำยางข้นในถังขนาดใหญ่ บรรจุน้ำยางข้นได้ประมาณ 30-100 ตัน หรือถังขนาดความจุ 200 ลิตร น้ำยางข้นที่เก็บไว้โดยไม่ถูกกวนจะมีปัญหาเกิดครีมขึ้นบนผิวหน้า เนื่องจากอนุภาคยางลอยขึ้นอยู่ผิวหน้าทำให้น้ำยางส่วนบนข้นมากขึ้น จึงจำเป็นต้องติดตั้งอุปกรณ์สำหรับกวนน้ำยางภายในถัง

การขนส่งน้ำยางข้นไปยังโรงงานผู้ใช้กระทำโดยบรรจุในถังขนาด 200 ลิตร หรือใช้รถติดแทงค์ความจุประมาณ 9,000-14,000 ลิตร หรือความจุมากกว่านี้ ซึ่งเป็นวิธีการที่มีปัญหาน้อย ปัญหาที่อาจเกิด เช่น เกิดการแข็งตัวเนื่องจากเย็นจัด เกิดการตกตะกอน หรือเกิดครีมลอยขึ้นผิวหน้า และมีการปนเปื้อน ภาชนะที่ใช้เก็บน้ำยางข้นควรเคลือบผนังด้านในด้วยสารที่ทนกรดอ่อน เช่น สารเคลือบประเภทไบทูเมน (bitumen) และอีพอกซิเรซิน (epoxy-resin) เป็นต้น

การถ่ายน้ำยางกระทำได้โดยวิธีต่างๆ เช่น โดยใช้แรงโน้มถ่วงของโลก ให้ถังเก็บน้ำยางอยู่ในที่สูงแล้วปล่อยให้น้ำยางไหลไปยังที่ที่ต้องการ โดยวิธีใช้ปั๊มซึ่งต้องเลือกปั๊ม ที่ไม่ทำให้เกิดแรงเฉือนสูง ปั๊มที่ใช้ได้ เช่น Centrifugal pump, single screw และแบบ diaphragm เป็นต้น และอีกวิธีหนึ่งคือ การถ่ายน้ำยางโดยใช้แรงอัดอากาศ[1]

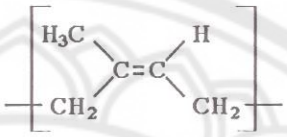
1.3 น้ำยางธรรมชาติ

น้ำยาง (Latex) หมายถึง ของเหลวที่มีลักษณะคล้ายน้ำนม น้ำยางธรรมชาติเป็นน้ำยางชนิดแรกที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรม มีแหล่งที่มาจากต้นยางพารา ซึ่งพบครั้งแรกในบริเวณอเมซอนของอเมริกาใต้และได้ขยายการปลูกต้นไม้ชนิดนี้ไปยังพื้นที่แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยใช้**แอมโมเนียเก็บรักษาความเสถียรของน้ำยาง**[6]

1.3.1 สมบัติของยางธรรมชาติ

1.3.1.1 สมบัติทางเคมี

ยางธรรมชาติเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbon) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและมีหน่วยย่อยเป็นหน่วยไอโซพรีน สูตรทางเคมีเป็น C_5H_8 ไอโซพรีนที่พบในยาง ธรรมชาติจะอยู่ในลักษณะโครงสร้างแบบซิส (cis-configuration)[1] ดังภาพ 1.2



ภาพ 1.2 สูตรโครงสร้างทางเคมีของยางธรรมชาติ (cis-1,4 polyisoprene)[9]

เนื่องจากแต่ละหน่วยไอโซพรีนของยางธรรมชาติมีพันธะคู่ (double bond) และหมู่อัลฟาเมทธีลินที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยายางคงรูปด้วยกรดกำมะถัน อย่างไรก็ตามพันธะคู่ดังกล่าวก็ไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจน หรือ โอโซน ทำให้ยางเกิดการเสื่อมสภาพ[1]

1.3.1.2 สมบัติทางกายภาพ

ยางธรรมชาติมีความถ่วงจำเพาะ 0.934 ที่ 20 องศาเซลเซียส และความถ่วงจำเพาะจะเพิ่มสูงขึ้น ที่อุณหภูมิประมาณ -70 องศาเซลเซียส เนื่องจากการทำให้ยางเย็นจนแข็งหรือยืดยาง[1]

1.3.2 ส่วนประกอบของยางธรรมชาติ

น้ำยางธรรมชาติประกอบด้วย เนื้อยาง 30-36% ส่วนที่ไม่ใช่ยางประมาณ 5-6% ดังตาราง 1.1 แสดงองค์ประกอบของน้ำยางสด

ในยางธรรมชาติมีส่วนประกอบที่ไม่ใช่ยางอยู่หลากหลายชนิด ส่วนที่ไม่ใช่ยางแต่ละชนิดจะส่งผลกระทบต่อสมบัติของยางธรรมชาติที่แตกต่างกัน สามารถจำแนกออกเป็น 4 กลุ่ม[4] ได้แก่

1. โปรตีนและกรดอะมิโน เช่น แอลฟา-โกลบูลิน กรดแอสพาติก พบมากในซีรั่ม สารนี้ทำให้เกิดความเหนียวติดกัน ตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้ยางคงรูป

2. **ไขมัน ประกอบด้วย 3 กลุ่มหลักๆ คือ นิวทรอลลิปิด ไกลโคลิปิด และฟอสโฟลิปิด สารนี้ทำให้เกิดการออกซิเดชั่นจากความร้อน**

3. คาร์โบไฮเดรต สารที่พบมากที่สุดคือ 2 – ออโทเมทิลแอลอิโนซิทอล และประกอบด้วยน้ำตาลชนิดอื่นๆ ด้วยในปริมาณที่น้อย เช่น ซูโครส กลูโคส กาแลกโตสฟรุกโตสแรฟฟิโนสและเพนโตส น้ำตาลเหล่านี้ย่อยสลายได้ง่าย

4. ไอออนของโลหะ ปริมาณของไอออนของโลหะจะแตกต่างกันเนื่องจากกระบวนการผลิตที่แตกต่างกัน

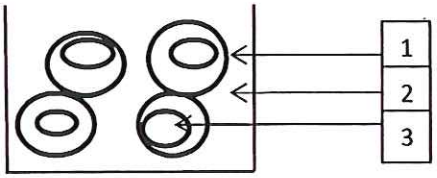
ตาราง 1.1 องค์ประกอบของน้ำยางสด [1]

องค์ประกอบ	น้ำยางสด (% โดยน้ำหนัก)
ยางไฮโดรคาร์บอน	36.0
โปรตีนและกรดอะมิโน	1.4
นิวทรอลลิปิด	1.0
ไกลโคลิปิดและฟอสโฟลิปิด	0.6
คาร์โบไฮเดรต	1.6
สารอนินทรีย์	0.5
อื่นๆ	0.4
น้ำ	58.5

1.3.3 การรักษาสภาพและการเสียสภาพของน้ำยางธรรมชาติ

น้ำยางสด เป็นสารแขวนลอยที่มีส่วนของอนุภาคยางแขวนลอยกระกระจายอยู่ในตัวกลางที่เรียกว่า เซรุ่ม (Serum) น้ำยางมีส่วนของสารอื่นๆที่ไม่ใช่ยาง เช่น โปรตีน ส่วนหนึ่งของสารโปรตีนนี้จะดูดซับอยู่รอบผิวของอนุภาคยางฟอร์มชั้นหรือเปลือกห่อหุ้มอนุภาคยามไว้ ดังภาพ 1.3 ชั้นห่อหุ้มนี้มีความสำคัญต่อสถานะความคงตัวเป็นของเหลวหรือความเสถียรของน้ำยาง เพราะชั้นโปรตีนจะป้องกันไม่ให้อนุภาคยางมารวมตัวและจับกันเป็นก้อน และโปรตีนยังมีอนุมูลลบคาร์บอกซีเลต ก่อให้เกิดการผลักกันระหว่างอนุภาคยาง คือ น้ำยางคงสภาพเป็นของเหลวอยู่ได้ด้วยปัจจัยสำคัญ 2 ประการ คือ ชั้นโปรตีนที่ห่อหุ้มอนุภาคยางและอนุมูลลบของคาร์บอกซีเลต [1]

การเสียสภาพ (destability) การสูญเสียน้ำในชั้นของโปรตีน การทำลายอนุมูลลบของคาร์บ็อกซีเลต สภาพที่น้ำยางถูกกระทบกระเทือนดังกล่าวนี้จะทำให้อนุภาคยางเกิดการรวมตัวกันเป็นก้อนยาง เรียกว่า โคแอกกูลั่ม (Coagulum) แยกตัวออกจากส่วนของเซรุ่มเนื่องจากก้อนยางที่จับตัวนี้มีลักษณะขาวนวลหยุ่นตัวคล้ายก้อนเต้าหู้อ่อนชาวสวนยางจึงเรียกว่า ยางก้อนเต้าหู้[1]



1 ชั้นห่อหุ้ม (สารโปรตีน)

2 ยาง (ไฮโดรคาร์บอน)

3 เซรุ่ม (ส่วนใหญ่เป็นน้ำ)

ภาพ 1.3 สถานการณ์เป็นสารแขวนลอยของน้ำยางสด[1]

การเกิดยางสดเสียสภาพมีสองทฤษฎี คือ ทฤษฎีแรก กล่าวว่า กรดเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของจุลินทรีย์กับสารที่ไม่ใช่ยางซึ่งมีอยู่ในน้ำยาง ส่วนทฤษฎีที่สอง คือการสลายตัวของไอออนของกรดไขมันจากการ hydrolysis ของสารไลปิดต่างๆที่มีอยู่ในน้ำยาง ไอออนเหล่านี้จะถูกดูดซับแทนที่โปรตีนที่ผิวอนุภาคยาง และทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะ ซึ่งมีอยู่ในน้ำยางตั้งแต่เริ่มแรก หรือเกิดจากการหลุดออกมาจากสารประกอบที่เกิดโดยปฏิกิริยาของ enzyme ในน้ำยาง[1]

เนื่องจากในน้ำยางสดมีส่วนประกอบอื่นๆ ที่ไม่ใช่ยาง ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส ซึ่งเป็นอาหารของจุลินทรีย์ เมื่อกรีดเอาน้ำยางออกจากต้นยาง จุลินทรีย์ในอากาศจะลงไปปะปนในน้ำยาง ก่อให้เกิดกรดทำลายชั้นห่อหุ้มอนุภาคยาง ทำให้ยางจับตัวเป็นก้อน เพื่อป้องกันน้ำยางจับตัวเป็นก้อน หรือเพื่อให้น้ำยางอยู่ในสภาพของของเหลวตามที่ต้องการ จึงต้องเติมสารรักษาสภาพน้ำยาง ดังนั้นสารที่ใช้รักษาสภาพน้ำยางควรมีสมบัติต่อไปนี้[1]

1. ประสิทธิภาพในการทำลายหรืออย่างน้อยสามารถระงับการเจริญของจุลินทรีย์ในน้ำยาง

2. ควรมีสภาพเป็นด่างเพื่อส่งเสริมสถานะสารแขวนลอยให้น้ำยาง

3. ทำให้อนุมูลโลหะหนักไม่ว่องไวต่อปฏิกิริยา เพราะอนุมูลเหล่านี้จะส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์

4. สามารถระงับการทำงานของเอนไซม์ที่ช่วยการเจริญของจุลินทรีย์

5. ไม่รบกวนต่อกระบวนการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์ และควรมีราคาเหมาะสม

6. ไม่เป็นพิษต่อสุขภาพของคนและต่อคุณภาพยาง และต้องสามารถขจัดออกจากน้ำยางได้โดยง่ายและสะดวก เมื่อถึงช่วงเวลาที่ไม่ต้องการ

1.4 การแพ้ยางธรรมชาติ

น้ำยางธรรมชาติซึ่งได้จากต้นยางฮีเวีย (Hevea rubber) ถูกนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมหลากหลายชนิด เช่น อุตสาหกรรมยางล้อรถยนต์ อุตสาหกรรมรองเท้า รวมไปถึงอุตสาหกรรมการผลิตถุงมือทางการแพทย์หรือถุงมือผ่าตัด เป็นต้น แต่องค์ประกอบของยาง ธรรมชาตินอกจากส่วนที่เป็นยางแล้ว ยังประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ก่อให้เกิดอาการแพ้ส่วนที่ 1 (Immunoglobulin E (IgE)-mediated type I Hypersensitivity) ดังนั้น อาการแพ้ที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยที่มีการแพ้สารเคมีหรือโปรตีนในผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติสามารถแบ่งออกได้ 3 ประเภท[4] ได้แก่

1.4.1 โรคผิวหนังอักเสบจากการระคายเคือง (Irrtant dermatitis)

โรคนี้เกิดจากปฏิกิริยาการต่อต้านของร่างกายต่อสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกที่พบมากที่สุด แต่ไม่ได้เกิดเนื่องจากการรับรู้และตอบสนองของภูมิคุ้มกันโรคของร่างกาย (allergic response and immune system) และไม่จัดว่าเป็นการติดเชื้อ ลักษณะอาการจะค่อยๆ เกิดขึ้น ทำให้เกิดผื่นแดง เกิดการแตกและเป็นสะเก็ดของผิวหนัง

สาเหตุของการแพ้ คือ การล้างมือบ่อยๆ การใช้ผงซักฟอก (harsh detergent) การขัดถูอย่างแรง (aggressive scrolling) การเสียดสีกับแป้งที่มากับถุงมือ (glove powder abrasion) และสารเคมีที่ใช้ในอุตสาหกรรมถุงมือ เช่น ไทยูแรม (thiuram) แคพโตเบนโซ (captobenzo) ไทอะโซล (thaiazole) คาร์บาเมต (carbarmate) เป็นต้น[4]

1.4.2 โรคภูมิแพ้ชนิดที่1 (Type I allergic reactions)

การตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิดอิมมูโนโกลบินอี (Immunoglobin E, LgE) ซึ่งเป็นแอนติบอดี้ (antibody) หรือภูมิคุ้มกันซึ่งถูกผลิตขึ้นในร่างกาย เนื่องจากการสัมผัสกับสารที่กระตุ้นการแพ้หรือ สารที่ก่อโรคซึ่งเรียกว่า allergen หรือ antigen เช่น โปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ ทำให้เกิดอาการแพ้อย่างฉับพลัน อาจทำให้เกิดอาการช็อก ถึงขั้นเสียชีวิตได้ในบางราย อาการแพ้จะแสดงอาการภายใน 1 นาที ถึง 2 ชั่งโมง ภายหลังการสัมผัสกับผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติ โดยอาการที่แสดงออกให้เห็นอย่างชัดเจนคือ เกิดมลพิษ (urticaria) อย่างรุนแรง และทำให้เกิดเยื่อบุตาอักเสบหรือ หอบหืด[4]

1.4.3 โรคภูมิแพ้ชนิดที่4 (Type IV allergic reaction)

โรคผิวหนังที่เกิดจากการสัมผัส (contact dermatitis) มีสาเหตุมาจาก สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์จากน้ำยางธรรมชาติ เป็นอาการที่แสดงการตอบรับของทีเซลล์ (T-cell) ในร่างกาย โดยปกติอาการแพ้จะเกิดขึ้นภายใน 4-6 ชั่วโมง ภายหลังการแตะต้องสัมผัสผลิตภัณฑ์

จากน้ำยางธรรมชาติ มักจะแสดงอาการแพ้เฉพาะบริเวณของการสัมผัสเท่านั้น อาการที่พบจะรวมไปถึงการเกิดผื่นแดง แผลเป็นหนอง ตุ่มหรือผด[4]

ในปัจจุบันพบว่า บุคคลที่มีความว่องไวต่อการแพ้ยางธรรมชาติสูง (latex hypersensitivity) จะมีโอกาสเสี่ยงสูงมากในการที่จะเกิดภูมิแพ้ชนิดที่ 1 การสัมผัสทางผิวหนังหรือสูดดมพวกโปรตีนที่กระตุ้นให้เกิดการแพ้ที่อาจติดมากับแป้ง (cornstarch powder) จากถุงมือ ทำให้เกิดการหายใจของร่างกายอย่างรุนแรงฉับพลันได้ ซึ่งอาการโรคภูมิแพ้ชนิดที่ 4 พบมากกว่าอาการโรคภูมิแพ้ชนิดที่ 1[4]

1.4.4 โปรตีนในธรรมชาติที่ทำให้เกิดอาการแพ้

จากอาการแพ้ต่างๆ ที่เกิดขึ้นพบว่า สาเหตุหลักส่วนใหญ่เกิดจากการแพ้โปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของยางธรรมชาติ โปรตีนในยางธรรมชาติที่ทำให้เกิดการแพ้มีอยู่หลายชนิด

โดยทั่วไปมีโปรตีนจากน้ำยางธรรมชาติถึง 57 ชนิด ที่ก่อให้เกิดโรคภูมิแพ้ได้ การแพ้โปรตีนในยางธรรมชาติ จะเกิดปฏิกิริยาเฉียบพลันเมื่อร่างกายได้รับสารก่อโรค (antigen) สารนี้จะทำให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกัน (antibody) ได้แก่ สารฮีสตามีน (histamine) ทำให้เกิดการแพ้ ได้แก่ ตาอักเสบ คันตา คันจมูก น้ำมูกไหล หืดหอบ หายใจลำบาก ช็อก และอาจเป็นอันตรายต่อชีวิต[4]

เมื่อมีการศึกษาและสกัดโปรตีนในยางจากแหล่งต่างๆ รวมถึงการศึกษาวิธีการทำยางให้บริสุทธิ์ปราศจากโปรตีน ทำให้พบว่า โปรตีนที่เป็นแอนติเจนจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงกว้างๆ โดยน้ำหนักโมเลกุลของแอนติเจนในช่วง 14-30 กิโลดาลตัน จะถูกผลิตขึ้นมามากที่สุด ซึ่งข้อมูลเกี่ยวกับอาการแพ้และแหล่งที่พบได้ถูกแสดงไว้ในตาราง 1.2 ซึ่งทำให้ทราบแน่ชัดว่าโปรตีนที่ทำให้เกิดอาการแพ้ประกอบด้วยโปรตีน 13 ชนิด คือ โปรตีนชนิด Hev b1 ถึง Hev b13 ในปัจจุบันพบว่ามีผู้ที่เกิดอาการแพ้ยางธรรมชาติประมาณ 17%[4]

จากปัญหาการแพ้โปรตีนในผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติ ซึ่งอาการแพ้นั้นสามารถทำอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ก่อให้เกิดการแพ้ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ

ตาราง 1.2 ข้อมูลแสดงโปรตีนที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ที่พบในส่วนต่างๆ ของน้ำยางธรรมชาติ [4]

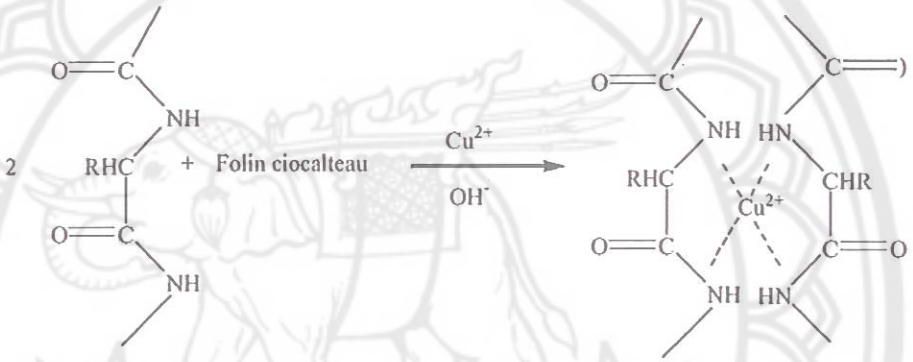
ชื่อโปรตีน	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ค่า pI	ส่วนของน้ำยางที่พบ
Hev b1 (rubber elongation factor)	**14.6**	**4.9**	**อนุภาคยางขนาดใหญ่** (large rubber particles)
Hev b2 (β-1,3-glucanase)	35.1	9.5	อนุภาคลูทอยด์ (lutoids)
Hev b3 (small rubber particle protein)	22.3	4.8	อนุภาคยางขนาดเล็ก (small rubber particles)
Hev b4 (microhelix component)	50-57	4.5	อนุภาคลูทอยด์ (lutoids)
Hev b5 (acidic latex protein)	16	3.5	ไซโตพลาสซึม (cytoplasm)
Hev b6.01 (prohevein, hevein protein)	20	5.6	อนุภาคลูทอยด์ (lutoids)
Hev b6.02 (hevein)	4.7	4.9	อนุภาคลูทอยด์ (lutoids)
Hev b6.03 (prohevein, C-terminal domain)	14	6.4; 7.0; 7.4	อนุภาคลูทอยด์ (lutoids)
Hev b7 (patatin-like proteins)	42.9	4.8	ไซโตพลาสซึม (cytoplasm)
Hev b8 (latex profilins)	13.9	4.9	ไซโตพลาสซึม (cytoplasm)
Hev b9 (latex enolase)	47.7 47.5	5.6 6.4	ไซโตพลาสซึม (cytoplasm)
Hev b10 (manganese superoxide dismutase-MnSOD)	22.9	6.3	ไมโตคอนเดรีย (mitochondria)
Hev b11 (class I chitinase)	**33**	**5.1**	**อนุภาคลูทอยด์ (lutoids)**

1.5 เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

วิธีการวิเคราะห์โปรตีนที่สนใจศึกษามี 3 วิธี คือ Modified Lowry และ Kjeldahlซึ่งมีหลักการดังนี้

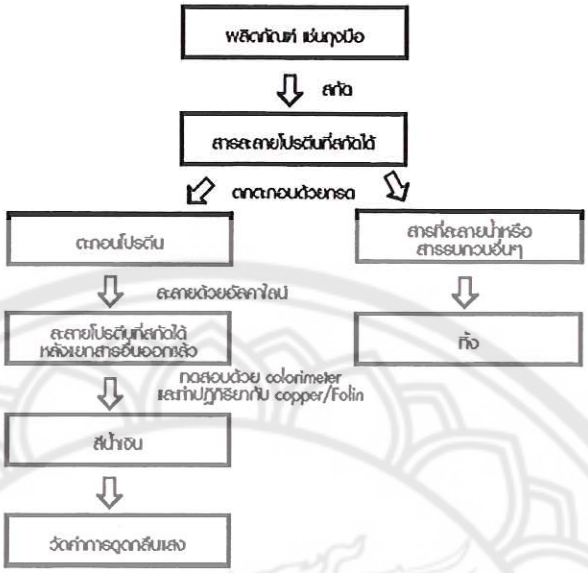
1.5.1 การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Modified Lowry

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีลาวรี(Lowry method) เป็นการพัฒนาวิธีมาจากวิธีไบยูเรต (Biuret) ทำให้ได้ความไว (Sensitivity) มากขึ้นสามารถวัดได้ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่ำๆลงไปถึง 5 μg/mL โดยมีหลักการกว้างๆคือปลายไนโตรเจนที่อยู่ที่พันธะเปปไทด์จะจับตัวกับไอออนของทองแดง (Cu^{2+}) ภายใต้สภาวะที่เป็นด่างทำให้ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำดังภาพ 1.4



ภาพ 1.4 ปฏิกิริยา Lowry

วิธีลาวรีมีความว่องไวต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) สำหรับค่า pH ของสารละลายที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 10-10.5 สารที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธีนี้เช่นอนุพันธ์ของกรดอะมิโนบางชนิดยาไขมันน้ำตาลเกลือเป็นต้นวิธีนี้มีสารรบกวน (Interfering substances) หลายชนิด เช่นไอออนของแอมโมเนีย สารพวกฟีนอลิก กลีเซอรอล น้ำตาลต่างๆ เช่น กลูโคสและซูโครสเป็นต้น ควรกำจัดหรือเจือจางก่อนทำการวิเคราะห์[7] และมีขั้นตอนการวิเคราะห์ แสดงดังภาพ 1.5



ภาพ 1.5 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Modified Lowry[7]

1.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl

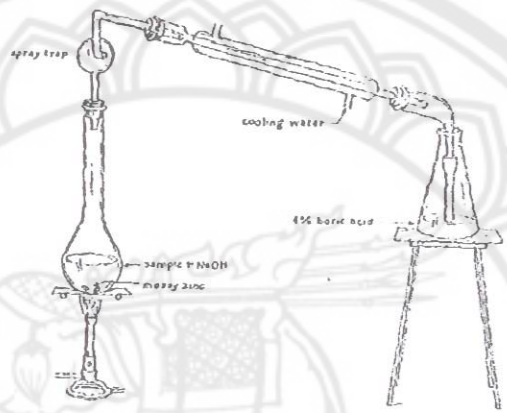
การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Kjeldahl เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในรูปของไนโตรเจนทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่างโดยการย่อยสลายโปรตีนซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน[8] (amino acid) ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบนั้นจะมีการปลดปล่อยไนโตรเจนออกมา และถูกเปลี่ยนสภาพกลายเป็นสารประกอบที่เป็นไอ คือ แอมโมเนีย[9] นอกจากนี้ยังมีเทคนิคของการไทเทรตวิเคราะห์หาปริมาณของแอมโมเนียมาเกี่ยวข้อง การวิเคราะห์ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ได้แก่ การย่อยตัวอย่าง (Digestion), การกลั่นแอมโมเนีย (Distillation), การไทเทรตหาปริมาณแอมโมเนีย (titration) และการคำนวณ

1) การย่อยตัวอย่าง (Digestion) ต้มสารตัวอย่างในกรดซัลฟิวริกเข้มข้นให้เดือดเบาๆ เพื่อทำให้จุดเดือดของกรดซัลฟิวริกสูงขึ้นควรเติมโพแทสเซียมซัลเฟตลงไปด้วย และเร่งให้สารตัวอย่างถูกย่อยได้เร็วขึ้น ควรเติมตัวเร่ง (catalyst) ได้แก่ Cu, Hg และ Se เมื่อทำการย่อยสารตัวอย่าง ไนโตรเจนจะถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมไบซัลเฟต (NH_4HSO_4)[9] ดังสมการ (1.1)

$$C_xH_yN_z \longrightarrow x\,CO_2 + \frac{1}{2}y\,H_2O + z\,NH_4HSO_4 \quad \ldots\ldots\ldots (1.1)$$

2) การกลั่นแอมโมเนีย (Distillation) เมื่อสารตัวอย่างถูกเปลี่ยนสภาพเป็นเกลือของแอมโมเนียมทั้งหมดแล้ว ทำสารละลายให้มีฤทธิ์เป็นเบสด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียมไบซัลเฟตที่ได้จากการย่อยสารตัวอย่าง [9] ดังสมการ (1.2) และแสดงการติดตั้งเครื่องมือ ดังภาพ 1.8

$$NH_4HSO_4 + 2NaOH \longrightarrow 2NH_3 + Na_2SO_4 + 2H_2O \quad \ldots\ldots\ldots (1.2)$$



ภาพ 1.6 การติดตั้งเครื่องมือเพื่อทำการกลั่นก๊าซแอมโมเนียโดยวิธี Kjeldahl[9]

3) การไทเทรตหาปริมาณแอมโมเนีย (titration) เทคนิคการไทเทรตสามารถหาปริมาณแอมโมเนียได้ 2 วิธี คือ การหาปริมาณโดยทางตรงและทางอ้อม

3.1) การหาปริมาณโดยวิธีตรง[9]

ก๊าซแอมโมเนียที่กลั่นได้ จะเข้าไปเก็บในกรดบอริกที่มากเกินพอและแอมโมเนียจะทำปฏิกิริยากับกรดบอริกได้แอมโมเนียมบอเรต ดังสมการ (1.3)

$$NH_3 + H_3BO_3 \longrightarrow NH_4H_2BO_3 \quad \ldots\ldots\ldots (1.3)$$

จากสมการ (1.3) ได้แอมโมเนียมบอเรต สามารถถูกไทเทรตได้ด้วยกรดเกลือ ดังสมการ (1.4) ซึ่งสามารถสังเกตจุดยุติได้ด้วยอินดิเคเตอร์

$$NH_4H_2BO_3 + HCl \longrightarrow NH_4Cl + H_3BO_3 \quad \ldots\ldots\ldots (1.4)$$

3.2) การหาปริมาณโดยอ้อม[9]

ก๊าซแอมโมเนียที่กลั่นได้จะผ่านเข้าไปเก็บในสารละลายของกรดเกลือที่มากเกินพอ ทำให้เกิดปฏิกิริยาขึ้น ดังสมการ (1.5)

$$NH_3 + HCl \longrightarrow NH_4Cl \quad \ldots\ldots\ldots (1.5)$$

ดังนั้นจะมีกรดเกลือที่มากเกินพอเหลืออยู่ให้ไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ดังสมการ (1.6) ซึ่งสามารถสังเกตจุดยุติได้โดยการใช้อินดิเคเตอร์

$$NH_4Cl + NaOH + NH_3 \longrightarrow NaCl + NH_4Cl + 2H_2O \quad \text{..... (1.6)}$$

สำหรับการวิเคราะห์โดยวิธี Modified Lowry และวิธี Bradford ต้องทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง เพื่อนำมาคำนวณหาปริมาณโปรตีน ซึ่งเครื่องมือที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงคือ เครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ มีหลักการดังนี้

สำหรับการวิเคราะห์โดยวิธี Modified Lowry และวิธี Bradford ต้องทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง เพื่อนำมาคำนวณหาปริมาณโปรตีน ซึ่งเครื่องมือที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงคือ เครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์มีหลักการดังนี้

1.6 เครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

UV-VIS Spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงและค่า intensity ในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาวที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างที่วางอยู่ในเครื่องมือ โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อนและสารอนินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้

คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารเมื่อโมเลกุลของตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงที่มีพลังงานเหมาะสมจะทำให้อิเล็กตรอนภายในอะตอมเกิดการดูดกลืนแสงแล้วเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในชั้นที่มีระดับพลังงานสูงกว่าเมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่ความยาวคลื่นค่าต่างๆตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่างๆที่มีอยู่ในตัวอย่างได้[12]

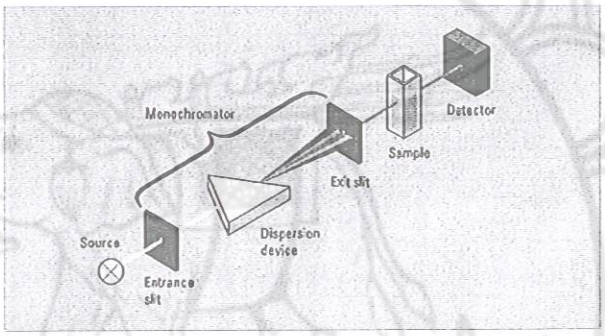
เครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (ภาพ 1.6) ประกอบด้วย[12]

1. Light source แหล่งกำเนิดรังสีเป็นส่วนที่ให้รังสีในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการออกมาอย่างต่อเนื่องและคงที่ รวมทั้งมีความเข้มแสงที่มากพอ หลอดกำเนิดรังสีมีหลายชนิดตามความยาวคลื่นรังสีที่เปล่งออกมา เช่น ช่วง UV จะใช้หลอดไฮโดรเจน (Hydrogen lamp) และหลอดดิวเทอเรียม (Deuterium lamp) ให้ความยาวคลื่นอยู่ในย่าน 160-380 nm และช่วง Visible ใช้หลอด Tungsten/halogen ให้ความยาวคลื่นในช่วง 240-2,500 nm เป็นต้น

2. Monochromator เป็นส่วนที่ใช้ควบคุมแสงโดยจะทำให้แสงที่ออกมาจากต้นกำเนิดแสง ซึ่งเป็นพอลิโครเมติก ให้เป็นแสงโมโนโครเมติก ซึ่งเป็นแถบแสงแคบๆ หรือมีความยาวคลื่นเดียวใช้ฟิลเตอร์ปริซึมหรือ เกรตติ้ง

3. Cell sample เซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายตัวอย่าง บางครั้งอาจเรียกว่า Cuvette ที่ใช้กัน ทั่วไปได้แก่เซลล์ที่ทำด้วยแก้วจะใช้ได้เฉพาะช่วงวิสิเบิล เพราะแก้วจะดูดกลืนรังสีในช่วงยูวีได้ และเซลล์ที่ทำด้วยซิลิกา และควอร์ตซ์ ซึ่งใช้ได้ทั้งช่วงยูวีและวิสิเบิล

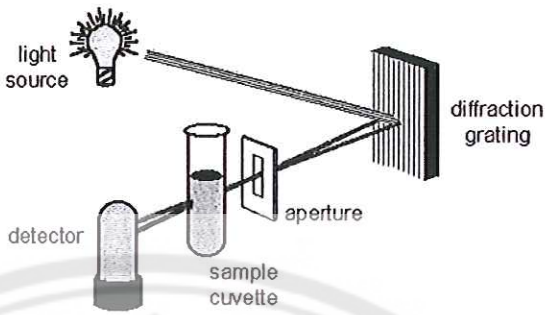
4. Detector ทำหน้าที่ในการวัดความเข้มของรังสีที่ถูกดูดกลืนโดยการแปลงพลังงานคลื่นรังสีเป็นพลังงานไฟฟ้า เครื่องวัดรังสีมีหลายชนิดที่นิยม ได้แก่ Photomultiplier tube และเครื่องวัดแสงชนิดซิลิกอนไดโอด Silicon diode detector



ภาพ 1.7 องค์ประกอบของเครื่อง UV-VIS spectrophotometer

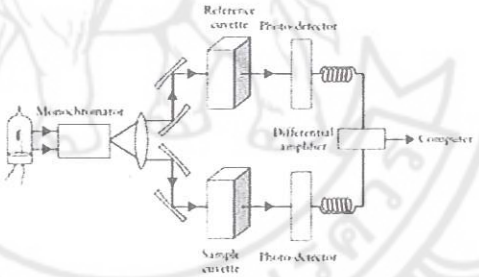
อัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แบ่งตามระบบทางเดินแสงเป็น 2 ชนิด ได้แก่

1. ชนิดลำแสงเดี่ยว (single beam type)ใ ช้ลำแสงอันเดียวกันสำหรับวัดสารอ้างอิง (referenceหรือ blank) และวัดสารตัวอย่าง(sample) การวัดความเข้มแสงกระทำโดยปรับ 0%T แล้วปรับ 0Aหรือ 100%T ด้วยสารอ้างอิงหลังจากนั้นวัดค่าของสารตัวอย่างในหน่วย A หรือ %T ชนิดลำแสงเดี่ยวมีข้อดีตรงที่มีองค์ประกอบน้อยและมีแสงส่องผ่านไปยังสารตัวอย่างเข้มมากกว่าแบบอื่นๆแต่มีข้อเสียตรงที่มีเสถียรภาพในการอ่านค่าต่ำและค่าเปลี่ยนแปลงได้ง่ายนอกจากนี้ยังไม่สามารถกวาด(scan) ดูการดูดกลืนแสงของสารต่างๆได้อย่างต่อเนื่อง[13] ดังภาพ 1.7



ภาพ 1.8 องค์ประกอบที่สำคัญของเครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบลำแสงเดี่ยว (single beam type)[12]

2. ชนิดลำแสงคู่ (double beam type) วัดความเข้มของแสงโดยการสะท้อนแสงที่ผ่านออกมาจากตัวแยกแสงให้ผ่านสารอ้างอิงและสารตัวอย่างสลับกันทำให้ความเข้มของแสงที่ผ่านสารตัวอย่างลดลงครึ่งหนึ่งวงจรขยายจะขยายสัญญาณที่ได้จากการเปรียบเทียบสัญญาณที่ได้รับจากสารตัวอย่างกับสารอ้างอิงอยู่ตลอดเวลาจึงมีเสถียรภาพในการวัดความเข้มของแสงดีมากแต่เนื่องจากใช้ตัวไวแสงอันเดียวจึงต้องมีสวิทช์เลือกวัดสัญญาณและใช้หลอดไฟฟ้ากำเนิดแสงที่มีกำลังส่องสว่างสูงจึงทำให้มีราคาแพงกว่าเครื่องมือชนิดลำแสงเดี่ยว[13] ดังภาพ 1.8



ภาพ 1.9 การทำงานของสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ชนิดลำแสงคู่[13]

การดูดกลืนแสงของเครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟมิเตอร์ ต้องเป็นไปตามกฎของเบียร์-แลมเบิร์ต ซึ่งกล่าวว่าเมื่อผ่านลำแสงที่มีพลังงาน P_0 ไปยังเนื้อสารที่มีความหนา b เซนติเมตร โฟตอนของคลื่นแสงจะเกิดอันตรกิริยากับอะตอมหรือโมเลกุลของสารทำให้พลังงานของคลื่นแสงลดลงจาก P_0 เป็น P(P เป็นพลังงานของคลื่นแสงที่เหลือออกมา)

ค่าการส่งผ่าน (Transmittance) T เป็นอัตราส่วนของพลังงานคลื่นแสงที่ลดลง (P) ต่อพลังงานคลื่นแสง (P_0) ที่ตกกระทบ[14] ดังสมการ 1.7

$$T = \frac{P}{P_0} \qquad \text{..... (1.7)}$$

ค่าการส่งผ่าน นิยมแสดงในรูปร้อยละ (%T) ดังสมการ 1.8

$$\%T = \frac{P}{P_0}(100) \qquad \text{..... (1.8)}$$

ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance, A) สัมพันธ์กับค่าการส่งผ่าน ดังสมการ 1.9

$$A = -\log T = \log\frac{P}{P_0} \qquad \text{..... (1.9)}$$

เรียก $\log\frac{P}{P_0}$ ว่า ความทึบแสง (optical density) สำหรับสารละลาย ค่า absorbance (A) จะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารที่ดูดกลืนคลื่นแสงในสารละลาย Cที่บรรจุในเซลล์ที่มีความหนาเท่ากับ b เซนติเมตร ดังสมการ 1.10

$$A = \log\frac{P}{P_0} = abC \qquad \text{..... (1.10)}$$

a เป็นค่าคงที่ เรียกว่า สภาพดูดกลืน (absorptivity) หน่วย $Lg^{-1}cm^{-1}$

b เป็นความกว้างของเซลล์ หน่วย cm

C เป็นความเข้มข้นของสารละลาย หน่วย g/L

ถ้าความเข้มข้นของสารละลาย (C) มีหน่วยเป็น mol/L ค่าสภาพดูดกลืนจะเรียกเป็นสภาพดูดกลืนโมลาร์ (molar absorptivity, ε) มีหน่วยเป็น $Lmol^{-1}cm^{-1}$ (ดังสมการ 1.10) จะได้

$$A = \log\frac{P}{P_0} = \varepsilon bc \qquad \text{..... (1.11)}$$

1.7 เครื่องมือที่ใช้ในการสกัดโปรตีน

สำหรับเครื่องมือการสกัดโปรตีนในน้ำยางข้นมีด้วยกันหลายเทคนิค แต่สำหรับงานวิจัยนี้มี 3 เทคนิค ได้แก่ เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) เครื่องอัลตราโซนิกชนิดอ่างน้ำ (ultrasonic bath) เครื่องไมโครเวฟ (microwave machine)

1.7.1 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

เครื่องหมุนเหวี่ยงเป็นเครื่องมือพื้นฐานสำหรับเร่งอัตราการตกตะกอนของอนุภาค (particle) ที่ไม่ละลายออกจากของเหลว หรือใช้แยกของเหลวหลาย ๆ ชนิดที่มีความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) ต่างกันออกจากกัน ใช้ทำสารละลายให้เข้มข้นขึ้น ฯลฯ[16]

1.7.1.1 หลักการการทำงานของเครื่องหมุนเหวี่ยง

หลักการของเครื่องหมุนเหวี่ยงมี 2 หลักการ คือ การหมุนเหวี่ยงแบบดิฟเฟอเรนเทียลเกรเดียนต์ (Differential gradient centrifugation) และการหมุนเหวี่ยงแบบเดนซิตีเกรเดียนต์ (Density gradient centrifugation)[16]

1. หลักการทำงานของการหมุนเหวี่ยงแบบดิฟเฟอเรนเทียลเกรเดียนต์ (Differential gradient centrifugation)

เครื่องหมุนเหวี่ยงสร้างแรงหนีศูนย์กลางหรือแรงหมุนเหวี่ยง (centrifugal force, CF) ช่วยเร่งให้อนุภาคตกตะกอนเร็วขึ้น ดังนั้นภายใต้สนามของแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง แรง นอนก้นของอนุภาคจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับแรงหนีศูนย์กลางภายใต้สนามแรงหนีศูนย์กลาง อนุภาคจะตกตะกอนด้วยอัตราเร็วที่ไม่เท่ากัน การปั่นแยกตะกอน จึงต้องใช้เวลาให้นานพอเพียงที่อนุภาคขนาดเล็กจะนอนก้นหมด จนกลายเป็นก้อนตะกอน (pellet) และของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) จึงนิยมใช้วิธีนี้สำหรับการปั่นแยกตะกอนทั้งหมดออกจากของเหลว[16]

2. หลักการทำงานของการหมุนเหวี่ยงแบบเดนซิตีเกรเดียนต์ (Density gradient centrifugation)

การแยกอนุภาคของสารออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของอัตราเร็วในการนอนก้นหรือแยกออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของความหนาแน่น โดยใช้ตัวกลางที่เหมาะสมและมีเครื่องหมุนเหวี่ยงความหนาแน่นต่าง ๆ กัน จึงนิยมใช้สำหรับการแยกสารหลายชนิดออกจากกันโดยมีความบริสุทธิ์สูง[16]

1.7.1.2 ชนิดของเครื่องหมุนเหวี่ยง

เครื่องหมุนเหวี่ยงแบ่งตามแรงหนีศูนย์กลางออกได้เป็น 3 ชนิด[16] ดังนี้

1. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบต่ำ (low speed centrifuge) เป็นเครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็กเป็นส่วนใหญ่ นิยมใช้ในงานทั่ว ๆ ไปในห้องปฏิบัติการมีความเร็วรอบไม่เกิน 6,000 รอบต่อนาที มีแรงหนีศูนย์กลางสูงสุดในช่วง 1,800-7,000 g

2. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบสูง (high speed centrifuge) มีความเร็วรอบไม่เกิน 28,000 รอบต่อนาที มีแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลางสูงสุดถึง 80,000 g จึงนิยมใช้เฉพาะงานที่ต้องการความแรงในการปั่นแยกปานกลาง

3. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบสูงมาก (ultra speed centrifuge) เป็นเครื่องหมุนเหวี่ยงที่มักมีขนาดใหญ่ที่มีความเร็วรอบของการหมุนสูงถึง 150,000 รอบต่อนาที สามารถสร้างแรงหนีศูนย์กลางได้สูงถึง 800,000 g เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดนี้สามารถแบ่งย่อยออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

3.1 แบบวิเคราะห์ (analytical type) สร้างขึ้นเพื่อศึกษาองค์ประกอบของสารต่าง ๆในขณะที่หมุนเหวี่ยง โดยใช้ตัวตรวจหา (detector) ที่หัวหมุน ซึ่งจะปล่อยลำแสงในช่วงความยาวคลื่น 190-800 นาโนเมตร ไปยังหลอดปั่น แล้วจึงส่งสัญญาณให้ระบบคอมพิวเตอร์ทำการวิเคราะห์หาการเคลื่อนที่ของชั้นอนุภาค หาอัตราเร็วในการนอนก้น หรือหาน้ำหนักโมเลกุล

3.2 แบบเตรียมสาร (preparative type) สร้างขึ้นเพื่อใช้แยกองค์ประกอบของสาร โดยใช้ของเหลวชนิดเดียวกันแต่มีความหนาแน่นต่างกันใส่ลงในหลอดปั่น ตัวอย่างเช่น albumin, CsCl, Ficol, NaI, sucrose, metrizamide, colloidal silica เป็นต้น เมื่อหมุนเหวี่ยงถึงจุดสมดุลในเวลาที่เหมาะสม อนุภาคเหล่านั้นจะแยกออกเป็นชั้นที่ชัดเจนหรือกระจายตัวอยู่ในสารละลายที่มีความหนาแน่นเท่า ๆ กับอนุภาคนั้น จึงทำให้สามารถแยกองค์ประกอบได้จากชั้นต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น

โดยงานวิจัยนี้ได้นำเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) มาใช้ในการสกัดโปรตีนในน้ำยางข้น โดยนำน้ำยางข้นและตัวสกัดใส่ลงในหลอดเซนติฟิวส์ แล้วนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง(centrifuge) ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที โดยกำหนดระยะเวลาในการหมุนเหวี่ยง จากนั้นนำสารละลายออกมาจะได้เนื้อยางมีลักษณะเป็นก้อนและสารละลายใส เนื่องจากน้ำยาง (latex) มีลักษณะคล้ายน้ำนม ซึ่งมีส่วนประกอบหลายชนิด อาศัยหลักการเร่งการตกตะกอนของอนุภาคที่ไม่ละลายออกจากของเหลวที่มีความถ่วงจำเพาะต่างกัน

1.7.2 เครื่องอัลตราโซนิกชนิดอ่างน้ำ

คลื่นเสียงอัลตราโซนิกเป็นคลื่นเสียงความถี่สูงมากกว่า 20 กิโลเฮิรตซ์ จนถึง 106 กิโลเฮิรตซ์ ซึ่งเป็นช่วงความถี่ที่หูของคนปกติไม่สามารถได้ยิน เพราะหูของคนปกติได้ยินเสียงในช่วงความถี่ 16–16,000 เฮิรตซ์

เครื่องอัลตราโซนิกมีองค์ประกอบหลักที่สำคัญ[17] ดังนี้

1. อ่างล้าง มักพบในรูปของอ่าง 2 ชั้น ชั้นในทำจากเหล็กกล้าไร้สนิมชนิดที่ทนต่อการกัดกร่อนได้ดี นิยมทำให้ผิวเรียบ ตามมุมมีลักษณะโค้งมน

2. ตัวกำเนิดคลื่นเสียงอัลตราโซนิก (ultrasonic transducer)ประกอบด้วย แผ่นโลหะประกบกับแผ่นผลึก(crystal) กำเนิดความถี่ นิยมใช้แผ่นโลหะที่เป็นส่วนผสมของ ตะกั่ว เซอโคเนียม และไททาเนี่ยม(lead zirconate titanate compound) เนื่องจากแข็งแรง มีราคาถูก และให้พลังงานเสียงได้สูงมากถึง 100 วัตต์/ตารางเซนติเมตร

3. ออสซิลเลเตอร์ (oscillator) เป็นวงจรขยายสัญญาณป้อนกลับแบบบวก (positive feed back) โดยที่สัญญาณออก (output signal) ถูกป้อนกลับเสริมเฟสกับสัญญาณเข้า (input signal) ซึ่งในที่นี้เป็นสัญญาณความถี่ที่เกิดจากผลึกเมื่อได้รับกระแสไฟฟ้า ออสซิลเลเตอร์จะ**ขยายความถี่ให้แรงขึ้น ด้วยการควบคุมแรงดัน (โวลต์) ที่จ่ายให้กับทรานซิสเตอร์ ในกรณีที่ต้องการเปลี่ยนค่าความถี่สามารถทำได้โดยการปรับค่าความจุของตัวเก็บประจุที่ต่อกับผลึกกำเนิดความถี่**

4. ตัวกลาง (medium) เครื่องล้างอัลตราโซนิกส่วนใหญ่ใช้น้ำเป็นตัวกลางในการพาคลื่นเสียงไปยังสิ่งสกปรก เมื่อคลื่นเสียงผ่านจากก้นอ่างเข้าสู่ตัวกลาง การอัด (compression) และการขยาย (expansion) ของคลื่นเสียง

5. ตัวตั้งเวลา (timer) ใช้สำหรับตั้งเวลาการทำงานของเครื่องล้างอัลตราโซนิก

6. ปุ่มควบคุมความร้อน (temperature control knob) ใช้ควบคุมการทำงานของตัวกำเนิดความร้อน (heater) ซึ่งติดอยู่นอกอ่างล้างชั้นใน

7. ปุ่มกำจัดแก๊สในตัวกลาง (degassing knob) ใช้สำหรับปล่อยคลื่นความถี่ใดความถี่หนึ่งเข้าไปในตัวกลางเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากตัวกลางก่อนใส่สิ่งของลงไปล้าง

งานวิจัยนี้ได้นำเครื่องอัลตราโซนิกชนิดอ่างน้ำมาใช้ในการสกัดโปรตีนในน้ำยางข้น โดยนำน้ำยางข้นและตัวสกัดใส่ลงในหลอดเซนติฟิวส์ ตั้งอุณหภูมิเริ่มต้นและเวลา นำเข้าเครื่องอัลตราโซนิกชนิดอ่างน้ำโดยจะใช้น้ำเป็นตัวกลางในการพาคลื่นเสียงอัลตราโซนิกส่งไปยังสารละลาย ทำให้สามารถสกัดโปรตีนออกจากน้ำยางข้นได้และเนื่องจากความร้อนและคลื่นอัลตราโซนิก ทำให้ได้เนื้อยางมีลักษณะเป็นก้อนและสารละลายใส

1.7.3 เครื่องไมโครเวฟ

เครื่องไมโครเวฟ ให้ความร้อนกับอาหารโดยการ แผ่คลื่นย่านความถี่ไมโครเวฟ โดยปกติจะใช้ ช่วงความถี่ 2.45 จิกะเฮิรตซ์ (GHz) (หรือความยาวคลื่น 12.24 เซนติเมตร) ผ่านเข้าไปในอาหาร โมเลกุลของน้ำ ไขมัน และ น้ำตาล ที่อยู่ในอาหารจะดูดซับพลังงานของคลื่นที่ผ่านเข้าไปและเกิดเป็นความร้อนขึ้น ในกระบวนการที่เรียกว่า การเกิดความร้อนในสารไดอีเล็กตริก (dielectric heating) เนื่องจากโมเลกุลส่วนใหญ่นั้นเป็นโมเลกุลที่มีขั้วไฟฟ้า คือ มีประจุบวก และ ประจุลบที่ขั้วตรงกันข้าม เมื่อคลื่นไมโครเวฟ ซึ่งเป็นสนามไฟฟ้าผ่านเข้าไป โมเลกุลเหล่านี้ก็จะถูกเหนี่ยวนำและหมุนขั้วเพื่อปรับเรียงตัวตามสนามไฟฟ้าของคลื่น และคลื่นนี้เป็นสนามไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงสลับไปมาจึงส่งผลให้โมเลกุลเหล่านี้หมุนกลับไปมา ทำให้เกิดความร้อนขึ้น การให้ความร้อนด้วยคลื่นไมโครเวฟนี้จะมีประสิทธิภาพการเกิดความร้อนสูงสุด ในการให้ความร้อนแก่น้ำ และ ประสิทธิภาพต่ำ เมื่อให้ความร้อนแก่ ไขมัน น้ำตาล และ น้ำแข็ง การให้ความร้อนด้วยคลื่นไมโครเวฟนี้ มักจะมีการให้คำอธิบายที่ผิดว่าเกิดจาก การสั่นพ้องของโมเลกุลน้ำ (การสั่นพ้องของโมเลกุลน้ำ ซึ่งเกิดได้ที่ความถี่ที่สูงมาก ในช่วง หลายสิบจิกะเฮิรตซ์ เท่านั้น

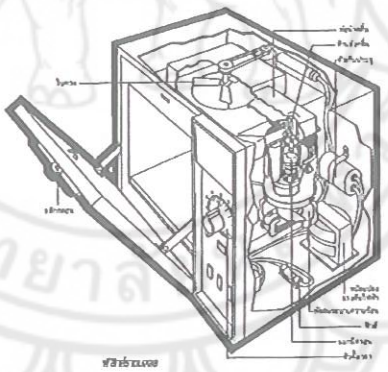
ช่องสำหรับอบอาหารนั้นจะถูกล้อมไว้ด้วย ลูกกรงฟาราเดย์ เพื่อกักไม่ให้คลื่นหลุดลอดออกมาสู่ภายนอก ประตูตู้นั้นส่วนใหญ่จะเป็นกระจก ซึ่งจะมีชั้นที่เป็นลูกกรงทำด้วยสารตัวนำไฟฟ้าสำหรับกันคลื่น เนื่องจากข่ายลูกกรงนี้มีขนาดความกว้างของช่องเล็กกว่า ความยาวคลื่น คือ

12 เซนติเมตร คลื่นไมโครเวฟจึงไม่สามารถลอดผ่านออกมาได้ ในขณะที่ แสงสว่างผ่านลอดออกมาได้เนื่องจาก แสงมีความยาวคลื่นที่สั้นกว่ามาก[18]

1.7.3.1 ส่วนประกอบภายในเครื่องไมโครเวฟ

เครื่องไมโครเวฟ จะมีตัวตั้งเวลาติดตั้งไว้ด้วยเพื่อควบคุมการทำงานของเตาอบ ซึ่งจะเริ่มทำงานได้ก็ต่อเมื่อประตูเตาปิดสนิทและถูกลงสลักกลอนไว้อย่างปลอดภัยแล้วเท่านั้น กระแสไฟฟ้าแรงดันต่ำที่ป้อนเข้าสู่ตัวเตาจะถูกแปลงให้มีแรงดันสูงขึ้นจากเดิมประมาณ 30 เท่า ด้วยหม้อแปลงแรงดันไฟฟ้า แล้วจึงผ่านไปยังตัวเก็บประจุซึ่งจะทำงานร่วมกับอุปกรณ์ประกอบอื่น ๆ เพื่อทำการเปลี่ยนไฟฟ้ากระแสสลับให้เป็นไฟฟ้ากระแสตรงและป้อนเข้าสู่ "แมกนีตรอน" ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นตัวสร้างคลื่นไมโครเวฟขึ้นมา คลื่นจะออกจากแมกนีตรอนผ่านเข้าไปในท่อนำคลื่น (มีลักษณะเป็นท่อสี่เหลี่ยมผืนผ้า) เพื่อป้อนเข้าสู่ห้องอบต่อไป [19] ที่ปากทางเข้าสู่ห้องอบจะมีอุปกรณ์กลไกคล้าย ๆ พัดลมเรียกว่า "ใบกวน" ทำหน้าที่กวนให้คลื่นสะท้อนไปมาลงสู่ห้องอบ และอาหารภายในเตาก็จะดูดกลืนคลื่นเข้าไปทำให้ตัวมันเองสุกได้

พัดลมระบายความร้อนและสวิตช์ควบคุมอุณหภูมิจะป้องกันแมกนีตรอนมิให้มีอุณหภูมิสูงเกินขนาด และฟิวส์จะป้องกันสภาวะการรับภาระเกินกำลัง ดังภาพ 1.9

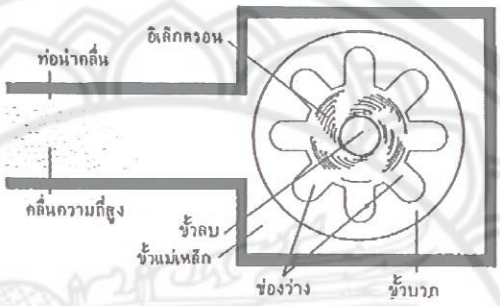


ภาพ 1.10 ลักษณะทั่วไปและส่วนประกอบภายในเครื่องไมโครเวฟ[19]

1.7.3.2 การสร้างคลื่นไมโครเวฟ

เมื่อมีกระแสไฟฟ้าไหลเข้าสู่ขั้วลบของแมกนีตรอน ก็จะปล่อยอนุภาคไฟฟ้าหรืออิเล็กตรอนออกมา อิเล็กตรอนจะวิ่งเข้าหาทรงกระบอกกลวงซึ่งภายในเซาะเป็นร่องยาวไว้ ทรงกระบอกนี้ล้อมอยู่รอบขั้วลบ และทำหน้าที่เป็นขั้วบวก ขณะเดียวกันสนามแม่เหล็กจาก

ขั้วแม่เหล็ก ประกอบกับลักษณะช่องว่างเป็นร่องยาวจะส่งผลให้เกิดแรงผลักดันอิเล็กตรอนให้วิ่งเป็นวงกลมรอบขั้วลบ เกิดสภาพเหมือนกับมีกระแสไฟฟ้าไหลกลับไปกลับมาอย่างรวดเร็ว ซึ่งผลที่ได้ก็คือจะเกิดคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (เส้นที่มีลักษณะเป็นคลื่น) ที่มีอัตราการเปลี่ยนแปลงกลับไปกลับมาเท่ากันจากนั้นก้านส่งคลื่นก็จะส่งคลื่นเข้าสู่ท่อนำคลื่นต่อไป (ทิศทางตามลูกศร)[19]ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้นำเครื่องไมโครเวฟครัวเรือน (household) มาใช้ในการสกัดโปรตีนออกจากน้ำยางข้นดังภาพ 1.10



ภาพ 1.11 กลไกการสร้างคลื่นไมโครเวฟ[19]

1.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ใน ค.ศ. 2007 ชญาภา นิ่มสุวรรณ [10] ได้เสนอวิธีการตรวจสอบการแพ้โปรตีนในยางธรรมชาติและวิธีการแก้ไข โดยการตรวจสอบสารที่ทำให้เกิดภูมิแพ้ทำได้ 2 วิธีได้แก่

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ทั้งหมด เป็นการหาปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ทั้งหมดจากผลิตภัณฑ์ โดยไม่สามารถบอกได้ว่าโปรตีนชนิดใดเป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดอาการแพ้ ซึ่งมีวิธีวิเคราะห์ คือ การวิเคราะห์โดยเทียบสี (Colorimetric analysis) การวิเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟี (Chromatographic analysis) และการทดสอบทางภูมิคุ้มกัน (Immunoassay)

1.1 การวิเคราะห์โดยเทียบสี (Colorimetric analysis) ได้แก่วิธี Modified Lowry และ Bradford assay

1.2 การวิเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟี (Chromatographic analysis) เป็นการหากรดอะมิโนของแต่ละชนิดด้วยเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatograpghy) ปริมาณโปรตีนเท่ากับปริมาณกรดอะมิโนรวมกันทั้งหมด แบ่งเป็น 2 วิธี คือ การวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยใช้ HPLC (High Performance Liquid Chromatograpghy) และ SE-HPLC (Size –exclusion High Performance Liquid Chromatograpghy)

1.3 การทดสอบทางภูมิคุ้มกัน (Immunoassay) ได้แก่ LEAP (Latex ELISA for

AntigenticProtein : ASTM D 6499-03) ซึ่ง ELISA เป็นวิธีการหาปริมาณโปรตีนแอนติเจนโดยอาศัยหลักการ การเกิดอันตรกิริยาเฉพาะเจาะจงระหว่างโปรตีนกับโปรตีน

2. การประเมินความสามารถในการก่อให้เกิดการแพ้โดยตรงหรือปริมาณสารที่ก่อให้เกิดการแพ้

2.1 การทดสอบทางคลินิก (ทางผิวหนัง) ใช้วิธีการขูด การจิ้ม การฉีดยาใต้ผิวหนัง และการแปะสารที่ผิวหนัง

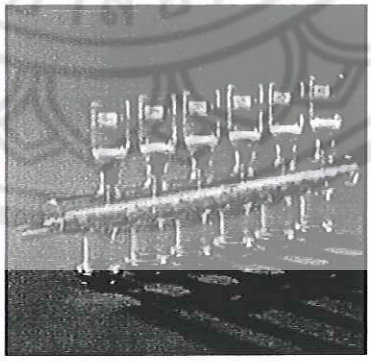
2.2 การทดสอบทางเซรุ่มวิทยา (ทางเลือด)

แนวทางการแก้ปัญหาการแพ้โปรตีนจากการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากน้ำยางธรรมชาติ ซึ่งในที่นี้ได้เสนอไว้ 6 วิธี ได้แก่ การลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางโดยใช้เอมไซม์โปรติโอไลติก (Proteolytic Enzymes) ฟูมซิลิกา (Fumed Silica) การล้าง (Leaching) คลอริเนชัน (Chlorination) การเคลือบผิวด้วยพอลิเมอร์ (Polymer Coating) และการลดปริมาณแป้งในถุงมือ

ในปี ค.ศ. 2011 M. Buffler และ J. Traunig[21] ได้ศึกษาปริมาณโปรตีนในนมด้วยวิธี Kjeldahlซึ่งในนมจะประกอบด้วย โปรตีนบริสุทธิ์ 94% (ประมาณ 3.1g/100g) และ non-Protein-nitrogen 6% (ประมาณ 0.2g/100g) ในการวิเคราะห์โดยใช้วิธี Kjeldahl แบ่งเป็น 3 วิธี คือ Standard method, การย่อยด้วย H_2O_2และ Micro-Kjeldahl

1. Standard method จะทำการใส่นมซึ่งเป็นสารตัวอย่าง และเติม Sulfuric acid ทำการย่อยจะได้เป็นสารละลาย ammonium sulphate หลังจากนั้นนำมากลั่นโดยเติม NaOH เกิดเป็นไอของ ammonium ซึ่งใช้ boric acid เป็นตัวจับไปของ ammonium และนำไปไทเทรตกับ HCl หรือ H_2SO_4

2. การย่อยด้วย H_2O_2 เหมาะสำหรับสารละลายที่มีฟอง โดยทำการเติมสารตัวอย่างและ Sulfuric acidและเชื่อมต่อด้วย H_2O_2-suction module ระหว่างการย่อยเติม hydrogen peroxide ลงใน carpillary funnel แสดงดัง ภาพ 1.11



ภาพ 1.12 การเชื่อมต่อ H_2O_2-suction module

3. Micro-Kjeldahl เป็นวิธีที่คล้ายกับ Standard method แต่ใช้ปริมาณของสารตัวอย่างที่ทำ

การวิเคราะห์เพียงเล็กน้อย และใช้เวลาในการย่อยลดลงเมื่อเทียบกับ Standard method

ต่อมาในปี ค.ศ. 2013 C. Pavel และคณะ[22]ได้ศึกษาหาปริมาณโปรตีนในนมผึ้งด้วยวิธี Kjeldahl, Bradford และ Modified Lowry ซึ่งนำทั้ง 3 วิธี มาเปรียบเทียบกันว่าวิธีใดให้ผลที่ดีและแม่นยำที่สุด โดย วิธี Kjeldahl ใช้หลักการของ AOAC และทำการกลั่น ส่วน วิธี Modified Lowry จะทำการเจือจางสารตัวอย่างก่อน แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuged) เป็นเวลา 25 นาที นำสารละลายมาเติม Folin-Ciocalteu reagent เพื่อให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสี และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm สำหรับวิธี Bradford นำสารตัวอย่างผสมกับ Sodium phosphate buffer (pH 6.1) นำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuged) เป็นเวลา 20 นาที เติม reagent และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm เมื่อทำการทดลองเสร็จสิ้น พบว่า วิธี Bradford ได้ปริมาณโปรตีนที่น่าเชื่อถือน้อยกว่า วิธี Kjeldahl และ Modified Lowry เนื่องจากมีความไวและความแม่นยำสูง รวมถึงความเร็วในการวิเคราะห์

1693867x ว TS 1892 ส๓๑ 2557

บทที่ 2

วิธีดำเนินการทดลอง

2.1 เครื่องมือ

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงชนิดลำแสงคู่ ยี่ห้อ Jusco รุ่น V-650 spectrophotometer, Japan
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารตกตะกอน ยี่ห้อ HERMLE รุ่น Z206A, Germany
3. เครื่องอัลตราโซนิกชนิดอ่างน้ำ ยี่ห้อ ELMAรุ่น S30H, Germany
4. ไมโครเวฟครัวเรือน ยี่ห้อ SHARP รุ่น R-687P, Japan
5. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BSA224S-CW, Thailand
6. เครื่องเขย่าสาร (Vortex) ยี่ห้อ IKA, USA
7. เครื่องหล่อเย็น Cooling Bath ยี่ห้อ Cole-Parmer, USA
8. เครื่องดูดจ่ายสารละลายปิเปต (Micro Pipette) ยี่ห้อ Nichiryo, Japan

2.2 อุปกรณ์

1. ขวดย่อยโปรตีน Kjeldahl flask ขนาด 800 mL
2. บีกเกอร์ ขนาด 25, 50, 100, 250, 500 และ 1000 mL
3. ขวดปรับปริมาตร ขนาด 5, 10, 50, 100, 250 และ 500 mL
4. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 mL
5. กระบอกตวง ขนาด 5, 10 และ 100 mL
6. หลอดหยดสาร
7. แท่งแก้วคนสาร
8. ขวดใส่สารเคมีพลาสติกขนาด 100 mL
9. กรวยกรองแก้ว
10. ช้อนตักสารเคมี
11. หลอดเซนตริฟิวส์พลาสติก ขนาด 15 และ 50 mL
12. ที่วางหลอดทดลอง
13. เซลล์บรรจุสารตัวอย่าง (Cuvettes)
14. Parafilm

15. ปิเปตขนาด 1 และ 10 mL

2.3 สารเคมี

2.3.1 สารเคมีของการทดลองด้วยวิธี Modified Lowry[22]

1. Sodium carbonate (Na_2CO_3), Carlo Erba, Italy
2. Sodium hydroxide (NaOH), Labscan, Thailand
3. Sodium tartrate ($Na_2C_4H_4O_6$), Carlo Erba, Italy
4. Cupric sulphate (Pentahydrate), Loba Chemie, India
5. Folin-ciocalteu' s reagent, Carlo Erba, Italy
6. Albumine bovine serum (BSA), Acros Organics, Japan
7. Sodium deoxycholate(DOC), Acros Organics, Japan
8. Trichloroacetic Acid (TCA), Loba Chemie, India
9. Phosphotungstic Acid (PTA), Carlo Erba, Italy
10. Sodium chloride (NaCl), Labscan, Thailand
11. Potassium chloride (KCl), Univar, USA
12. Sodium phosphate dibasic dihydrate ($HNa_2O_4P{\cdot}2H_2O$), Riedel-detlaen, Germany
13. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), Univar, USA
14. Sodium laurylsulphate (SLS: $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$), Carlo Erba, Italy
15. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA : $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$), Fluka, Switzerland
16. Acetone (CH_3COCH_3), Labscan, Thailand
17. Methanol (CH_3OH), BDH, USA

2.3.2 สารเคมีของการทดลองด้วยวิธี Kjeldahl

1. Sulfuric acid (Conc.H_2SO_4), Labscan, Thailand
2. Sodium hydroxide (NaOH), Labscan, Thailand
3. Hydrochloric acid (HCl), Labscan, Thailand
4. Titanium Dioxide (TiO_2), Carlo Erba, Italy
5. Potassium sulfate (K_2SO_4), Carlo Erba, Italy
6. Boric Acid (H_3BO_3), Carlo Erba, Italy
7. Methyl red

2.4 การเตรียมสารละลายและสารละลายมาตรฐาน

2.4.1 การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ด้วยวิธีModified Lowry

2.4.1.1 Reagent A (alkaline tartrate)

ชั่ง Na_2CO_3, NaOH และ $Na_2C_4H_4O_6$ จำนวน 2.22, 0.44 และ 0.18 g ตามลำดับ ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 mL ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL หลังจากนั้นเก็บสารละลายใส่ในขวดพลาสติกขนาด 100 mL ที่อุณหภูมิ 4 °C

2.4.1.2 Reagent B (copper sulfate)

ชั่ง $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ จำนวน 7.00 g ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งละลายในบีกเกอร์ขนาด 50 mL ด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL หลังจากนั้นเก็บสารละลายใส่ในขวดพลาสติกขนาด 100 mL ที่อุณหภูมิ 4 °C

2.4.1.3 Reagent C (alkaline copper tartrate)

นำ reagent A จำนวน 75 mL กับ reagent B จำนวน 0.5 mL โดยสารละลาย reagent C เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ต้องการใช้งาน

2.4.1.4 Reagent D (dilute Folin phenol)

ปิเปตสารละลาย Folin-ciocalteu's reagent จำนวน 10 mL เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 mL โดยทำการเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ต้องการใช้งาน

2.4.2 สารละลาย Albumin bovine serum (BSA) เข้มข้น 30 µg/mL

ชั่ง Albumin bovine serum (BSA) จำนวน 0.01 g ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 mL ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL หลังจากนั้นเก็บสารละลายใส่ในขวดพลาสติกขนาด 100 mL ที่อุณหภูมิ 4 °C

2.4.3 สารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) เข้มข้น 10 เท่า (10X)

ชั่ง NaCl, KCl, $HNa_2O_4P \cdot 2H_2O$, KH_2PO_4 จำนวน 8.00, 2.00, 1.44 และ2.40 g ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งตามลำดับละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด100 mL หลังจากนั้นเก็บสารละลายใส่ในขวดพลาสติกขนาด 100 mL ที่อุณหภูมิ 4 °C

2.4.4 สารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) เข้มข้นต่างๆ

เตรียมสารละลาย PBS ความเข้มข้น1 เท่า (1X), 1.5 เท่า (1.5X), 2 เท่า (2X), 2.5 เท่า (2.5X), 5 เท่า (5X) และ7.5 เท่า (7.5X)โดยใช้กระบอกตวงตวงมาจำนวน 10 mL, 15 mL, 20 mL, 25 mL, 50 mL และ 75 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL หลังจากนั้นเก็บสารละลายใส่ในขวดพลาสติกขนาด 100 mL ที่อุณหภูมิ 4 °C

2.4.5 สารละลาย 7.5% Sodium laurylsulphate (SLS)

ชั่ง Sodium laurylsulphate (SLS) จำนวน 7.50 g ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL หลังจากนั้นเก็บสารละลายใส่ในขวดพลาสติกขนาด 100 mL ที่อุณหภูมิ 4 °C

2.4.6 สารละลาย 1mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

ชั่ง Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) จำนวน 0.004 g ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL หลังจากนั้นเก็บสารละลายใส่ในขวดพลาสติกขนาด 100 mL ที่อุณหภูมิ 4 °C

2.4.7 สารละลาย 10% Acetone

ปิเปต Acetone 5 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ในขวดปรับปริมาตร 50 mL หลังจากนั้นเก็บสารละลายใส่ในขวดพลาสติกขนาด 100 mL ที่อุณหภูมิ 4 °C

2.4.8 สารละลาย 10% Methanol

ปิเปต Methanol 5 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ในขวดปรับปริมาตร 50 mL หลังจากนั้นเก็บสารละลายใส่ในขวดพลาสติกขนาด 100 mL ที่อุณหภูมิ 4 °C

2.4.9 สารละลาย Trichloroacetic Acid (TCA) เข้มข้น 30% (w/v)

ชั่ง Trichloroacetic Acid (TCA) น้ำหนัก 30.00 g ด้วยเครื่องชั่ง 2 ตำแหน่งละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL หลังจากนั้นเก็บสารละลายใส่ในขวดพลาสติกขนาด 100 mL ที่อุณหภูมิ 4 °C

2.5 การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ด้วยวิธี Kjeldahl

2.5.1 สารละลาย 50 % NaOH

ชั่ง NaOH น้ำหนัก 50.00 g ด้วยเครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL

2.5.2 สารละลาย 0.1 M HCl

นำ HCl มาจำนวน 4.10 mL เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 500 mL ทำการหาความเข้มข้นที่แน่นอน โดยไทเทรตกับสารปฐมภูมิ Na_2CO_3 (MW=105.99)

2.5.3 สารละลาย 0.01 M HCl

นำสารละลาย 0.1 M HCl มา 50 mL มา 50 mL เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 500 mL ทำการหาความเข้มข้นที่แน่นอน โดยไทเทรตกับสารปฐมภูมิ Na_2CO_3 (MW=105.99)

2.5.4 สารละลาย 0.1 % Methyl red

ชั่ง Methyl red น้ำหนัก 0.10 g ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL

2.6 การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA ด้วยวิธี Modified Lowry

เตรียมสารละลายมาตรฐานBSA เข้มข้น 0, 6,12,18, 24, 30µg/mL ตามลำดับเพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน Albumin bovine serum (BSA) โดยปิเปตสารละลาย BSA เข้มข้น30 µg/mL (ดังข้อ 2.4.2) จำนวน 1, 2, 3, 4 และ 5 mL ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้น ปิเปตสารละลาย BSA ความเข้มข้นต่างๆ ดังกล่าวมา 1.2 mL ใส่ในหลอดเซนติฟิวส์พลาสติก ขนาด 15 mL

นำสารละลายที่เตรียมไว้ข้างต้นมาวิเคราะห์โดยวิธี Modified Lowry โดยเติม reagent C จำนวน 2.5 mL เขย่าให้เข้ากันใช้เครื่องเขย่าสาร (Vortex) ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วเติม reagent D จำนวน 0.3 mL เขย่าให้เข้ากัน ใช้เครื่องเขย่าสาร (Vortex) ทิ้งไว้ 30 นาที และทำการเตรียมสารละลายแบลงก์ และเติมสารละลาย reagent C และ D ด้วยวิธีการข้างต้นนำสารละลาย BSA ความเข้มข้น 30 µg/mL มาหาความยาวคลื่นสูงสุดในช่วง 400-900 nm นำสารละลายมาตรฐาน BSA ทั้งหมด และแบลงก์มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer วัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด เพื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสง

จากนั้นนำมาหาค่า Limit of detection (LOD) เพื่อตรวจสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้ โดยทำการวัดสารละลายแบลงก์ทั้งหมด 10 ครั้ง จากนั้นทำการคำนวณค่า Limit of detection (LOD) จากสูตร

$$\text{Limit of detection (LOD)} = \frac{3SD_{blank}}{Slope}$$

2.7 การศึกษาอิทธิพลของสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) ที่มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนด้วยวิธี Modified Lowry

ในการศึกษาอิทธิพลของสารละลาย PBS ซึ่งได้เลือกทำการศึกษา BSA ที่ความเข้มข้น 12 และ 24 µg/mL โดยเติมสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) เข้มข้น 0.5 เท่า, 1 เท่า, 1.5 เท่า, 2 เท่า, 2.5 เท่า, 5 เท่า, 7.5 เท่า, 10 เท่า ลงในหลอดเซนติฟิวส์พลาสติก ขนาด 15 mL จำนวน 9 หลอด แล้วเติมสารละลายต่างๆ ดังตาราง 2.1 โดยทำการเตรียมสารละลายแบลงก์ในทุกความเข้มข้นของ PBS นำสารละลายมาวิเคราะห์โดยวิธี Modified Lowry เหมือนในข้อ 2.6

ตาราง 2.1 การเตรียมสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) ที่มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนในน้ำยางข้นด้วยวิธี Modified Lowry

ความเข้มข้น BSA (µg/mL)	ปริมาตรของ BSA เข้มข้น 100 µg/mL (mL)	ปริมาตรของ PBS ความเข้มข้นต่างๆ (mL)	Reagent C (mL)	Reagent D (mL)
12	0.5	0.7	2.5	0.3
24	1.0	0.2	2.5	0.3

จากนั้นนำสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลาย PBS เพื่อศึกษาอิทธิพลของสารละลาย PBS ที่มีต่อการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานโปรตีน

2.8 การศึกษาเทคนิคที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้น

การสกัดโปรตีนสามารถทำได้หลายเทคนิค แต่งานวิจัยนี้สนใจเพียง 3 เทคนิค ได้แก่ การแช่ตัวอย่างในสารสกัด, การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) และเครื่องไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine)

2.8.1 การศึกษาเทคนิคการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยการแช่ในสารสกัด

ชั่งตัวอย่างน้ำยางข้นมา 0.5 g ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งใส่ลงในหลอดเซนติฟิวส์พลาสติก ขนาด 50 mL ปิเปตสารละลาย PBS เข้มข้น 0.5 เท่า, 1 เท่า, 1.5 เท่า, 2 เท่า, 2.5 เท่า, 5 เท่า, 7.5 เท่า, 10 เท่า จำนวน 5 mL ลงในแต่ละหลอด (แต่ละความเข้มข้นทำอย่างละ 3 หลอด) ทำการเขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบ เป็นเวลา 20 นาที

หลังจากนั้นปิเปตสารละลายที่ได้จำนวน 1.2 mL ลงในหลอดเซนติฟิวส์พลาสติก ขนาด 15 mL เพื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Modified Lowry โดยเติม reagent C จำนวน 2.5 mL เขย่าให้เข้ากัน ใช้เครื่องเขย่าสาร(Vortex) ทิ้งไว้ 15 นาที เติม reagent D จำนวน 0.3 mL เขย่าให้เข้ากัน ใช้เครื่องเขย่าสาร (Vortex) ทิ้งไว้ 30 นาที

นำสารสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยการแช่ตัวอย่างในการสกัดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ในช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 400-900 nm บันทึกค่าการดูดกลืนแสงและนำไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นนำ

สารละลายมาตรฐาน BSA และแบลงก์มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ในช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 400-900 nm บันทึกค่าการดูดกลืนแสงเพื่อนำไปศึกษาสารละลาย PBS ที่มีอิทธิพลต่อการดูดกลืนแสง

หมายเหตุ ถ้าสารละลายที่ได้ไม่สามารถแยกได้ระหว่างเนื้อยางกับสารละลายได้ทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งหนึ่ง

2.8.2 การศึกษาเทคนิคการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยการใช้เทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication)

2.8.2.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) โดยการใช้เทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication)

ชั่งตัวอย่างน้ำยางข้นมา 0.5 g ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งใส่ลงในหลอดเซนติฟิวส์พลาสติก ขนาด 50 mL ปิเปตสารละลาย PBS เข้มข้นเป็น 0.5 เท่า, 1 เท่า, 1.5 เท่า, 2 เท่า, 2.5 เท่า, 5 เท่า, 7.5 เท่า, 10 เท่า จำนวน 5 mL ลงในแต่ละหลอด (แต่ละความเข้มข้นทำอย่างละ 3 หลอด)

จากนั้นนำไปทำการสกัดตัวอย่างด้วยเครื่องอัลตราโซนิค โดยอุณหภูมิเริ่มต้น 60 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตามที่กำหนดจึงนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น 10-15 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายที่ได้จำนวน 1.2 mL ลงในหลอดเซนติฟิวส์พลาสติก ขนาด 15 mLเพื่อไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Modified Lowry โดยเติม reagent C จำนวน 2.5 mL เขย่าให้เข้ากัน ใช้เครื่องเขย่าสาร (Vortex) ทิ้งไว้ 15 นาที เติม reagent D จำนวน 0.3 mL เขย่าให้เข้ากัน ใช้เครื่องเขย่าสาร (Vortex) ทิ้งไว้ 30 นาที

นำสารสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นด้วยเทคนิคการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer บันทึกค่าการดูดกลืนแสงและนำไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น

2.8.2.2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยการใช้เทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication)

ชั่งน้ำยางข้น 0.5 gและเติมสารละลาย PBS ความเข้มข้นที่สกัดโปรตีนได้ดีที่สุดที่ได้จากการศึกษาใน 2.8.2.1จำนวน 5 mL ลงในแต่ละหลอด (แต่ละความเข้มข้นทำอย่างละ 3 หลอด) โดยทำการทดลองด้วยเครื่องคลื่นความถี่สูงเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 60 °C ในการแช่ตัวอย่าง เป็นเวลา 30 นาที, 60 นาที, 90 นาที, 120 นาทีและ180 นาที ตามลำดับปิเปตสารละลายที่ได้จำนวน 1.2 mL ลงในหลอดเซนติฟิวส์พลาสติก ขนาด 15 mLเพื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Modified Lowry โดยเติม reagent C จำนวน 2.5 mL เขย่าให้เข้ากันใช้เครื่องเขย่าสาร (Vortex) ทิ้งไว้ 15 นาที เติม reagent D จำนวน 0.3 mL เขย่าให้เข้ากัน ใช้เครื่องเขย่าสาร (Vortex) ทิ้งไว้ 30 นาที

จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer บันทึกค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น และทำการเปรียบเทียบระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปตีน

2.8.3 การศึกษาเทคนิคการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยการใช้เครื่องไมโครเวฟครัวเรือน (Household microwave machine)

2.8.3.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายPhosphate Buffer Saline (PBS) โดยการใช้เครื่องไมโครเวฟในครัวเรือน(Household microwave machine)

ชั่งตัวอย่างน้ำยางข้นมา 0.5 g ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งใส่ลงในหลอดเซนติฟิวส์พลาสติกขนาด 50 mL ปิเปตสารละลาย PBS มีความเข้มข้นเป็น 0.5 เท่า, 1 เท่า, 1.5 เท่า, 2 เท่า, 2.5 เท่า, 5 เท่า, 7.5 เท่า, 10 เท่า จำนวน 5 mL ลงในแต่ละหลอด (แต่ละความเข้มข้นทำอย่างละ 3 หลอด) ตั้งไว้ในกล่องสำหรับใส่ในเครื่องไมโครเวฟครัวเรือน (Household microwave machine) แล้วเทน้ำใส่ภายในกล่องจนสูงกว่าระดับสารละลายในหลอด (คล้าย water bath จำลอง) นำเข้าเครื่องไมโครเวฟ กำลังไฟฟ้า 560 W เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาตามที่กำหนดจึงนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

นำสารละลายที่ได้มาจำนวน 1.2 mL มาวิเคราะห์ด้วยวิธี Modified Lowry โดยเติม reagent C จำนวน 2.5 mL เขย่าให้เข้ากัน ใช้เครื่องเขย่าสาร (Vortex) ทิ้งไว้ 15 นาที เติม reagent D จำนวน 0.3 mL เขย่าให้เข้ากันใช้เครื่องเขย่าสาร (Vortex) ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer บันทึกค่าการดูดกลืนแสง และนำไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น

2.8.3.2 การศึกษากำลังไฟฟ้าที่เหมะสมในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นด้วยเทคนิคไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine)

ชั่งตัวอย่างน้ำยางข้นมา 0.5 g ใส่ลงในหลอดเซนติฟิวส์พลาสติกขนาด 50 mL ปิเปตสารละลาย PBS ความเข้มข้นการสกัดโปรตีนได้ดีที่สุด(ดังข้อ 2.8.3.1)โดยใช้ความเข้มข้น PBS ความเข้มข้นที่ดีที่สุดได้จากการทำการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนจากกราฟแท่ง ทำให้ทราบความเข้มข้นของ PBS ที่เหมาะสมมาจำนวน 5 mL ใส่ลงไปในแต่ละหลอด จากนั้นนำเข้าเครื่องไมโครเวฟครัวเรือน (Household microwave machine) และทำการสกัดโดยใช้กำลังไฟฟ้า240, 400, 560 และ 800 W เป็นเวลา 20 นาที ตามลำดับเมื่อครบเวลาตามที่กำหนดจึงนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

นำสารละลายที่เตรียมได้มา 1.2 mLไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Modified Lowry เติม reagent C จำนวน 2.5 mL เขย่าให้เข้ากัน ใช้เครื่องเขย่าสาร (Vortex) ทิ้งไว้ 15 นาที เติม reagent D จำนวน 0.3 mL เขย่าให้เข้ากันใช้เครื่องเขย่าสาร (Vortex) ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่

ความยาวคลื่นสูงสุดด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer บันทึกค่าการดูดกลืนแสงและนำไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น

2.8.3.3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยใช้เทคนิคไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine)

นำน้ำยางข้น 0.5 g มาทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสม โดยศึกษาในช่วงเวลา 20, 30, 60 และ 90 นาที ที่กำลังไฟฟ้าที่ศึกษาได้ดังข้อ 2.8.3.2 นำสารละลายที่เตรียมได้มา 1.2 mL ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Modified Lowry เติม reagent C จำนวน 2.5 mL เขย่าให้เข้ากัน ใช้เครื่องเขย่าสาร (Vortex) ทิ้งไว้ 15 นาที เติม reagent D จำนวน 0.3 mL เขย่าให้เข้ากันใช้เครื่องเขย่าสาร (Vortex) ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer บันทึกค่าการดูดกลืนแสงจากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นและทำการเปรียบเทียบระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน

ทำการทดลองอีกครั้งกับสารตัวอย่างถุงมือยาง หนัก 1 g ด้วยสภาวะที่ดีที่สุด

2.8.3.4 การศึกษาชนิดสารสกัดที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยใช้เทคนิคไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine)

ชั่งตัวอย่างน้ำยางข้นมา 0.5 g ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งใส่ลงในหลอดเซนติฟิวส์พลาสติกขนาด 50 mL (แต่ละสารสกัดทำอย่างละ 3 หลอด) โดยทำการศึกษาสารสกัด 6 ชนิด คือ น้ำกลั่น, 10X PBS, 7.5% SLS, 1mM EDTA, 10% Acetone และ10% Methanol ทำการเตรียมสารละลายดังที่แสดงข้างต้น โดยปิเปตสารสกัดมาจำนวน 5 mL ใส่ลงในหลอดเซนติฟิวส์พลาสติกขนาด 50 mL ตั้งไว้ในกล่องสำหรับใส่ในเครื่องไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine) แล้วเทน้ำใส่ภายในกล่องจนสูงกว่าระดับสารละลายในหลอด (คล้าย water bath จำลอง) นำเข้าเครื่องไมโครเวฟ กำลังความร้อน 560 W เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาตามที่กำหนดจึงนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

นำสารละลายที่ได้มาจำนวน 1.2 mL มาวิเคราะห์ด้วยวิธี Modified Lowry โดยเติม reagent C จำนวน 2.5 mL เขย่าให้เข้ากัน ใช้เครื่องเขย่าสาร (Vortex) ทิ้งไว้ 15 นาที เติม reagent D จำนวน 0.3 mL เขย่าให้เข้ากันใช้เครื่องเขย่าสาร (Vortex) ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer บันทึกค่าการดูดกลืนแสง **และนำไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น**

2.9 การหาร้อยละการกลับคืน (% recovery) ของวิธีการวิเคราะห์

การหาค่าร้อยละการกลับคืนเป็นการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการ ซึ่งทำได้โดยการเติม (spiked) โปรตีนมาตรฐาน BSA 40 µg/mL ลงไปในขั้นตอนการสกัดน้ำยางข้น แล้วทำการตกตะกอนสารสกัด จำนวน 3 ครั้ง นำตะกอนที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Modified Lowry จากนั้นจึง คำนวณหาค่าร้อยละการกลับคืน จากสูตร

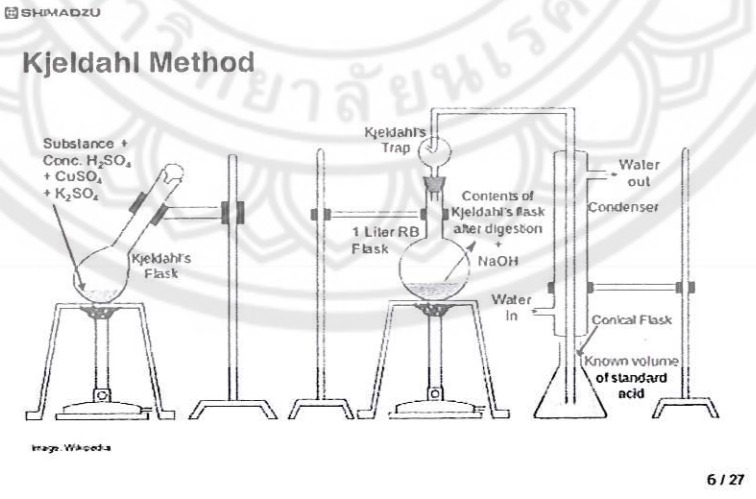
$$\% \text{ Recovery} = \frac{(\text{ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมด} - \text{ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่าง}) \times 100}{\text{ปริมาณสารที่เติมลงไป}}$$

2.10 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl

ชั่ง น้ำยางข้น 0.5 g, Mercuric oxide น้ำหนัก 0.70 g , K_2SO_4 8.00 g, TiO_2 0.80 และ Conc. H_2SO_4 40 mL ลงในขวด Kjeldahl ทำการย่อยจะได้สารละลายสีใส ทิ้งไว้ให้เย็น

ทำการกลั่นโดยนำสารละลายที่ย่อยได้มาเติมน้ำกลั่น 50 mL เพื่อเจือจางกรด จากนั้นเติม 50% NaOH 70 mL เพื่อให้สารละลายในขวด Kjeldahl มีสภาพเป็นใสแก่ ดังภาพ 2.1

จากนั้นให้ความร้อนกลางๆพอเดือด ทำการกลั่นจนกระทั่งสารละลายที่รองรับในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุสารละลาย 4% บอริกที่หยดอินดิเคเตอร์ 0.1% methyl red 3-4 หยด มีปริมาตรเพิ่มขึ้น จาก 20 mL เป็น 100-150 mL (ถ้ามีแอมโมเนียออกมาสารละลายจะเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลือง) จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปไทเทรตด้วยด้วย 0.01 M HCl ที่ทำการหาความเข้มข้นที่แน่นอนแล้ว แล้วนำมาไทเทรตจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำไปคำนวณหาไนโตรเจน และโปรตีนรวมต่อไป



ภาพ 2.1 ชุดเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Kjedahl [26]

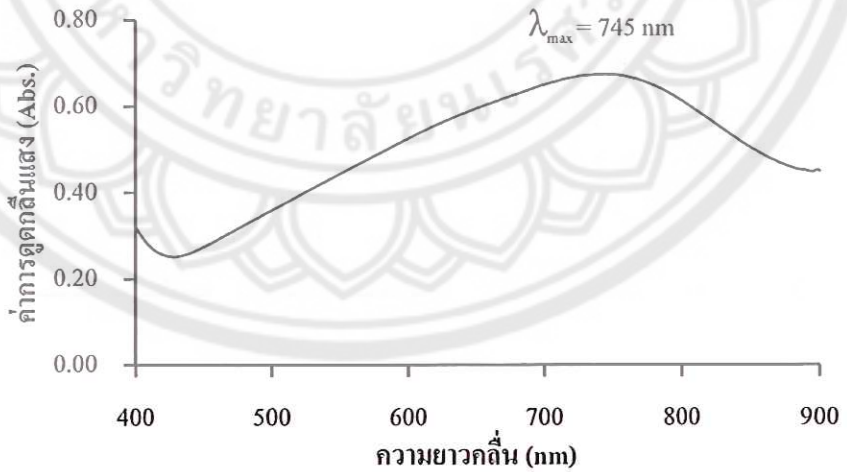
บทที่ 3

ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น ซึ่งในงานวิจัยทำการศึกษาด้วยวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธี คือ Modified Lowry และ Kjeldahl เนื่องจาก วิธี Bradford ผู้วิจัยได้ทำการศึกษางานวิจัยของ C.Pavel และคณะ [21] ซึ่งทำการเปรียบเทียบศึกษาการหาปริมาณโปรตีนในนมผึ้งด้วยวิธี Kjeldahl, Bradford และ Modified Lowry และพบว่า วิธี Bradford มีน่าเชื่อถือน้อยและไม่แน่นอนเท่าที่ควร ดังนั้นจึงเลือกวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธี Modified Lowry และ Kjeldahl เท่านั้น มีผลการทดลองดังต่อไปนี้

3.1 การศึกษาความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ของการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Modified Lowry

ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer เพื่อให้ได้สัญญาณการวิเคราะห์ที่ดีที่สุด จึงทำการศึกษาความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยใช้ความเข้มข้น 30 µg/mL ทำปฏิกิริยากับ copper (II) และ Folin-ciocalteu' s reagent ศึกษาในช่วงความยาวคลื่น 400-900 nm ได้ผลดังภาพ 3.1

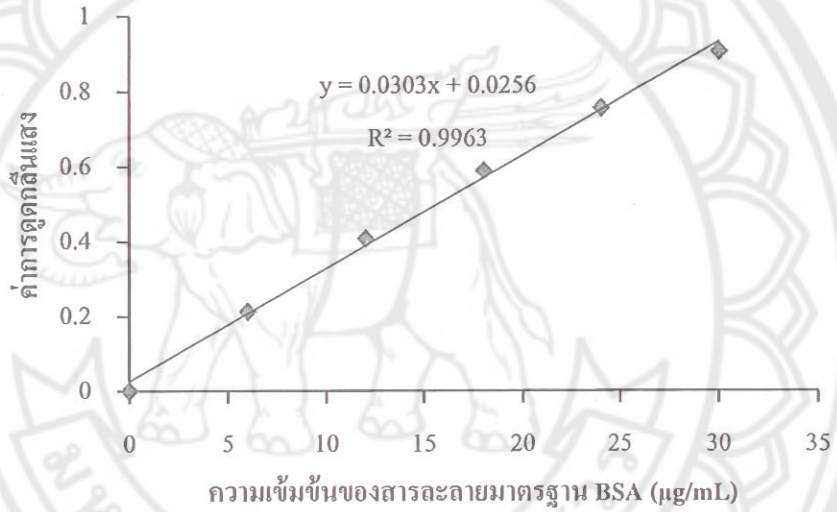


ภาพ 3.1 การดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน BSA ด้วยวิธี Modified Lowry ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 400 ถึง 900 nm

จากภาพ 3.1 พบว่า สารละลายมาตรฐานโปรตีนดูดกลืนแสงด้วยวิธี Modified Lowry สูงสุดที่ความยาวคลื่น 745 nm

3.2 การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA ด้วยวิธี Modified Lowry

การสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้เทียบหาความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้น 0, 6, 12, 18, 24 และ 30 µg/mL ทำปฏิกิริยากับ copper (II) และ Folin-ciocalteu' s reagent แล้ววัดที่ความยาวคลื่น 745 nm ได้ผลการทดลองดังภาพ 3.2



ภาพ 3.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA ด้วยวิธี Modified Lowry

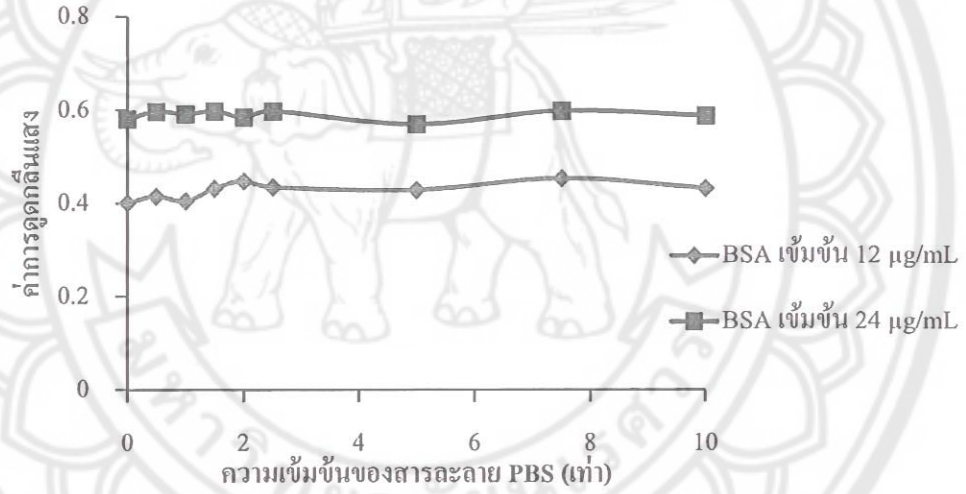
จากภาพ 3.2 พบว่า กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA ในช่วง 0-30 µg/mL ได้ความสัมพันธ์ y = 0.0303x + 0.0256 มีค่าความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.9963 และมีค่า LOD เท่ากับ 0.026 µg/mL (แสดงการคำนวณ ภาคผนวก ก)

เมื่อสร้างกราฟได้แล้วจึงทำการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางข้น โดยนำตัวอย่างน้ำยางข้นมาสกัด และทำปฏิกิริยากับ copper (II) และ Folin-ciocalteu' s reagent วัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้น เนื่องจากงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Modified Lowry ซึ่งวิธีการสกัดจะอ้างอิงมาจาก ASTM D5712-10 Modified Lowry[22] พบว่า ใน

การสกัดโปรตีนมักใช้ สารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) เป็นตัวทำละลาย ดังนั้นในการทดลองขั้นตอนต่อไปจึงศึกษาอิทธิพลของสารละลาย PBS ที่มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสง

3.3 อิทธิพลของสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) ที่มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสง ของสารละลายโปรตีนด้วยวิธี Modified Lowry

เมื่อศึกษาอิทธิพลของสารละลาย PBS ที่มีอิทธิพลต่อการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีน โดยนำสารละลายมาตรฐาน BSA เข้มข้น 12 และ 24 µg/mL เติมสารละลาย PBS เข้มข้นที่ใช้ในการสกัด 0.5 - 10 เท่า ลงไปในสารละลาย BSA แล้วจากนั้น เติม copper (II) และ Folin-clocalteu' s reagent เพื่อเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Modified Lowry ที่ความยาวคลื่น 745 nm ได้ผลดังภาพ 3.3



ภาพ 3.3 อิทธิพลของสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) ที่มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน BSA เข้มข้น 12 และ 24 µg/mL

เมื่อเติมสารละลาย PBS ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปในสารละลายมาตรฐาน BSA ดังภาพ 3.3 พบว่า BSA เข้มข้น 12 และ 24 µg/mL ที่เติม PBS ลงไป มีค่าการดูดกลืนแสงไม่ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น **สารละลาย PBS ไม่มีอิทธิพลต่อการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานโปรตีนด้วยวิธี Modified Lowry**

3.4 การศึกษาเทคนิคที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้น

ศึกษาเทคนิคการสกัด เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น งในงานวิจัยนี้ ได้ศึกษา 3 เทคนิค คือ การแช่ในตัวสกัด การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) และเครื่องไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine)

3.4.1 การศึกษาเทคนิคการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยการแช่ในสารสกัด

โดยนำน้ำยางข้น 0.5 g มาเติมสารละลาย PBS เข้มข้น 1 - 10 เท่า ลงในแต่หลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง โดยทำซ้ำความเข้มข้นละ 3 หลอด แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ความเร็ว 6,000 รอบ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเก็บสารละลายที่ได้จากการสกัด นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Modified Lowry โดยเติม copper (II) และ Folin-ciocalteu' s reagent แสดงผลที่ได้ดังตาราง 3.1

ตาราง 3.1 ปริมาณโปรตีนที่สกัดจากน้ำยางข้นด้วยเทคนิคการแช่ในสารสกัด PBS

ความเข้มข้นของสารละลาย PBS (X)	ปริมาตรโปรตีน (mg/g)
1	ไม่สามารถสกัดได้
1.5*	3.60 ± 0.12
2	2.90 ± 0.003
2.5	2.38 ± 0.033
5	2.28 ± 0.016
7.5	1.95 ± 0.04
10	1.78 ± 0.02

* นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงในเวลา 40 นาที (2 เท่า จากปกติ)

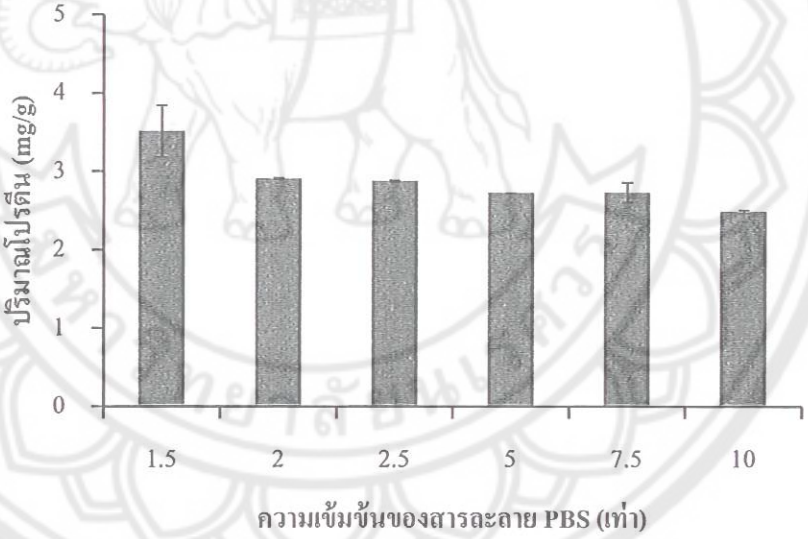
จากตาราง 3.1 พบว่า สารละลาย PBS เข้มข้น 1 เท่า ไม่สามารถสกัดได้ เนื่องจากไม่สามารถแยกโปรตีนออกจากน้ำยางข้นได้ ส่วนสารละลาย PBS เข้มข้น 1.5 เท่า สกัดโปรตีนออกมาได้มากที่สุด แต่ใช้เวลาในการเข้าปั่นเหวี่ยง 40 นาที เนื่องจากถ้าเข้าปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 20 นาที ไม่สามารถสกัดโปรตีนออกจากน้ำยางข้นได้ สำหรับสารละลาย PBS เข้มข้น 2 เท่า ปริมาณโปรตีนในการสกัดมีความคลาดเคลื่อนสูง และสารละลาย PBS เข้มข้น 2.5 และ 5 เท่า มีปริมาณโปรตีนที่ใกล้เคียงกัน แต่ถ้าใช้สารละลาย PBS เข้มข้น 5 เท่า เป็นตัวสกัด ทำให้เปลืองสารสกัดอย่างมาก

ดังนั้นในการสกัดโปรตีนออกจากน้ำยางข้นด้วยเทคนิคการแช่ในตัวสกัด จึงเลือกใช้ PBS เข้มข้น 2.5 เท่า ในการสกัดโปรตีน พบว่า ปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นเท่ากับ 2.38 ± 0.03 mg/g

3.4.2 การศึกษาเทคนิคการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยการใช้เทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication)

3.4.2.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) โดยการใช้เทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication)

การศึกษาการสกัดโปรตีนด้วยเทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) โดยนำน้ำยางข้น 0.5 g และเติมสารละลาย PBS เข้มข้น 1 - 10 เท่า ลงในหลอดทดลอง แล้วนำไปสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิคชนิดอ่างน้ำ ที่อุณหภูมิเริ่มต้น 60 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อทำการสกัดเรียบร้อยแล้ว นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Modified Lowry โดยเติม copper (II) และ Folin-clocalteu' s reagent แสดงผลที่ได้ดังภาพ 3.4



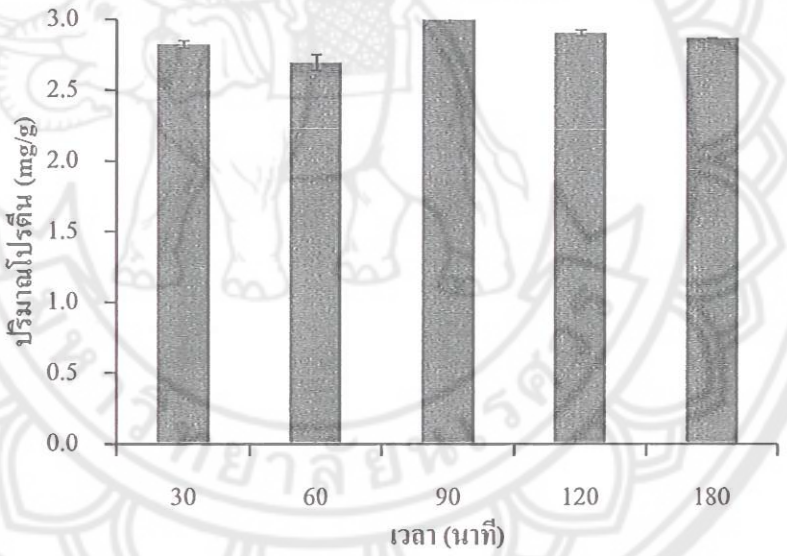
ภาพ 3.4 ปริมาณโปรตีนที่สกัดจากน้ำยางข้นด้วยสารละลาย PBS โดยใช้เทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication)

เมื่อทำการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย PBS ความเข้มข้นต่างๆ (ภาพ 3.4) พบว่า สารละลาย PBS เข้มข้น 1 เท่า ไม่สามารถแยกโปรตีนออกจากน้ำยางข้นได้ อย่างไรก็ตามจากภาพ 3.4 จะเห็นได้ว่า เมื่อสารละลาย PBS เข้มข้น 1.5 เท่า สกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นออกมาได้มาก

ที่สุด แต่มีค่าความคลาดเคลื่อนมาก และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย PBS เป็น 2 ถึง 7.5 เท่า พบว่าปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ไม่แตกต่างกันมากนัก และเพื่อไม่ให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์จึงเลือกใช้ PBS เข้มข้น 2.5 เท่า ดังนั้น ในการสกัดโปรตีนออกจากน้ำยางข้นด้วยเทคนิคการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) จึงเลือกใช้ PBS 2.5 เท่า ในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้น และพบว่า ปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นเท่ากับ 2.88 ± 0.007 mg/g

3.4.2.2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดจากโปรตีนด้วยเทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication)

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย PBS ที่ใช้ในการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง ดังข้อ 3.4.2.1 นั้น เมื่อทำการสกัดน้ำยางข้นด้วยสารละลาย PBS เข้มข้น 2.5 เท่า ที่อุณหภูมิเริ่มต้น 60 °C แล้ว แล้วศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดโดยเริ่มต้นจาก 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที แสดงผลดังภาพ 3.5



ภาพ 3.5 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นด้วยเทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication)

จากภาพ 3.5 พบว่า การสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย PBS เข้มข้น 2.5 เท่า เป็นเวลา 30, 60, 90, 120, 180 นาที ให้ผลการสกัดไม่ได้แตกต่างกันมากนัก แต่ที่เวลา 90 นาที สามารถสกัดโปรตีนออกมาได้มากกว่าเพียงเล็กน้อย

ดังนั้นในการสกัดโปรตีนออกจากน้ำยางข้นด้วยเทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) สกัดโดยนำน้ำยางข้น 0.5 g สกัดด้วยสารละลาย PBS เข้มข้น 2.5 เท่า ที่อุณหภูมิเริ่มต้น 60°C เป็นเวลา 90 นาที พบว่า ปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นเท่ากับ 3.00 ± 0.03 mg/g

3.4.3 การศึกษาเทคนิคการสกัดโดยการใช้เทคนิคไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine)

3.4.3.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) โดยการใช้เทคนิคไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine)

การศึกษาการสกัดโปรตีนโดยใช้เทคนิคไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine) ซึ่งในการทดลองเริ่มด้วยการนำน้ำยางข้น 0.5 g มาเติมสารละลาย PBS เข้มข้น 0.5 - 10 เท่า ลงในหลอดทดลอง แล้วนำไปสกัดด้วยเครื่องเครื่องไมโครเวฟในครัวเรือน ที่กำลังไฟฟ้า 560 W เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Modified Lowry โดยการเติม copper (II) และ Folin-clocalteu' s reagent แสดงผลที่ได้ดังตาราง 3.2

ตาราง 3.2 ปริมาณโปรตีนที่สกัดจากน้ำยางข้นด้วยเครื่องไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine)

ความเข้มข้นของสารละลาย PBS (เท่า)	ปริมาตรโปรตีน (mg/g)
0.5*	2.93 ± 0.06
1	2.51 ± 0.12
2	1.99 ± 0.22
2.5	1.83 ± 0.03
5	1.74 ± 0.04
7.5	1.64 ± 0.16
10	1.63 ± 0.15

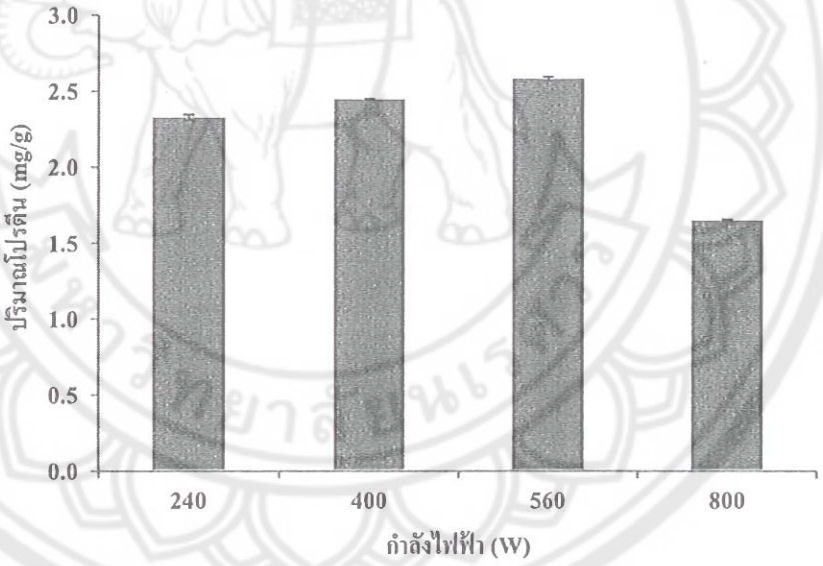
* สารละลาย PBS เข้มข้น 0.5 เท่า ใช้เวลาในการสกัดโปรตีน เป็นเวลา 40 นาที

จากตาราง 3.2 พบว่า สารละลาย PBS เข้มข้น 0.5 เท่า สกัดโปรตีนออกมาได้มากที่สุด แต่ใช้เวลาในการสกัด 40 นาที เนื่องจาก ถ้าเข้าเครื่องไมโครเวฟในครัวเรือนเป็นเวลา 20 นาที ไม่

สามารถสกัดโปรตีนออกจากน้ำยางข้นได้ เพราะ สารละลายที่ใช้ในการสกัดมีความเข้มข้นน้อยเกินไป จึงไม่สามารถสกัดโปรตีนออกจากน้ำยางข้นได้ภายในเวลา 20 นาที สำหรับ PBS เข้มข้น 1 เท่า และ 2 เท่า มีค่าความคลาดเคลื่อนมาก และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย PBS พบว่าปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ไม่แตกต่างกันมากนัก และเพื่อไม่ให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ จึงเลือกใช้ PBS เข้มข้น 2.5 เท่า ดังนั้นในการสกัดโปรตีนออกจากน้ำยางข้นด้วยเทคนิคไมโครเวฟ จึงเลือกใช้ PBS เข้มข้น 2.5 เท่า และปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นเท่ากับ 1.83 ± 0.03 mg/g

3.4.3.2 การศึกษากำลังไฟฟ้าที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยการใช้เทคนิคไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine)

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย PBS ที่ใช้ในการสกัดด้วยเครื่องไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine) ดังข้อ 3.4.3.1 นั้น พบว่า เมื่อทำการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นด้วยสารละลาย PBS เข้มข้น 2.5 เท่า เป็นเวลา 20 นาที แล้วศึกษากำลังไฟฟ้าที่ใช้ในการสกัดเป็น 240, 400, 560 และ 800 W ตามลำดับ แสดงผลดังภาพ 3.6



ภาพ 3.6 การศึกษากำลังไฟฟ้าที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นด้วยเครื่องไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine)

จากภาพ 3.6 พบว่า กำลังไฟฟ้า 240 W และ 800 W ให้ผลการสกัดใกล้เคียงกัน เนื่องจาก กำลังไฟฟ้า 240 W มีอุณหภูมิน้อยจึงทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นออกมาได้เพียงเล็กน้อย แต่กำลังไฟฟ้า 800 W มีอุณหภูมิสูงเกินไป อาจทำให้สารละลายที่สกัด

ได้ระเหยออกไปก่อนที่จะเกิดการสกัด ดังนั้นกำลังไฟฟ้าดังกล่าวมีความสามารถในการสกัดโปรตีนออกจากน้ำยางข้นน้อยกว่า กำลังไฟฟ้า 400 และ 560 W จะเห็นได้ว่ากำลังไฟฟ้าทั้งสองนี้ให้ผลใกล้เคียงเช่นกัน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ที่กำลังไฟฟ้า 560 W เนื่องจากมีอุณหภูมิสูงกว่าทำให้มีประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนออกจากน้ำยางข้นมากกว่า 400 W

ดังนั้นในการสกัดโปรตีนออกจากน้ำยางข้นด้วยเทคนิคไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine) จึงทำการสกัดน้ำยางข้น 0.5 g ด้วยสารละลาย PBS เข้มข้น 2.5 เท่า ด้วยกำลังไฟฟ้า 560 W เป็นเวลา 20 นาที และมีปริมาณโปรตีน เท่ากับ 2.59 ± 0.01 mg/g

3.4.3.3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยใช้เทคนิคไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine)

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย PBS และกำลังความร้อนที่ใช้ในการสกัด ดังข้อ 3.4.3.1 และ3.4.3.2 พบว่า เมื่อทำการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยเครื่องไมโครเวฟในครัวเรือนด้วยสารละลาย PBS เข้มข้น 2.5 เท่า ด้วยกำลังไฟฟ้า 560 W และศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในช่วงเวลา 20, 30, 60 และ 90 นาที แสดงผลดังตาราง 3.3

ตาราง 3.3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นด้วยเทคนิคไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine)

ขั้นตอน	ปริมาณโปรตีนที่สกัดในเวลาต่างๆ (mg/g)			
	20 นาที	30 นาที	60 นาที	90 นาที
การสกัด	2.59 ± 0.01	2.64 ± 0.02	3.31 ± 0.02	สารละลายแห้ง

จากตาราง 3.3 พบว่า ระยะเวลา 20, 30 และ 60 นาที สามารถสกัดโปรตีนออกจากน้ำยางข้นได้ โดย 60 นาทีสามารถสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นได้มากที่สุด ในขณะที่การสกัดเป็นเวลา 90 นาที ไม่สามารถนำสารละลายมาวิเคราะห์ได้ เนื่องจาก กำลังความร้อนสูงและระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดนานเกิดไป อาจทำให้สารละลายระเหยออกไปหมด จนแห้ง ดังนั้นระยะเวลาในการสกัดที่เหมาะสม คือ 60 นาที

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนออกจากน้ำยางข้นด้วยเทคนิคไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine) **คือ สกัดด้วยสารละลาย PBS เข้มข้น 2.5 เท่า ด้วยกำลังไฟฟ้า 560 W เป็นเวลา 60 นาที และพบว่าน้ำยางข้นมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 3.31 ± 0.02 mg/g**

3.4.3.4 การศึกษาชนิดสารสกัดที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้น

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย PBS และกำลังความร้อนที่ใช้ในการสกัด ดังข้อ 3.4.3.1 - 3.4.3.3 พบว่า เมื่อทำการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้นโดยเครื่องไมโครเวฟในครัวเรือนด้วยสารละลาย PBS เข้มข้น 2.5 เท่า ด้วยกำลังไฟฟ้า 560 W เป็นเวลา 60 นาที ดังนั้นในที่นี่จึงศึกษาสารสกัดชนิดอื่นๆว่ามีประสิทธิภาพในการสกัดอย่างไร จึงศึกษาสารสกัด 6 ชนิด คือ PBS 2.5 เท่า, 1mM EDTA, 10% Methanol, 10% Acetone, 7.5% SLS และน้ำกลั่น ได้ผลการทดลองดังตาราง 3.4

ตาราง 3.4 การศึกษาชนิดสารสกัดที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากน้ำยางข้น

สารสกัด	ความเข้มข้นของสารสกัด	ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการสกัด (mg/g)
PBS	2.5 เท่า	3.31 ± 0.02
EDTA	1mM	สารละลายไม่แยกออกจากกัน
Methanol	10%	
Acetone	10%	
SLS	7.5%	

จากตาราง 3.4 พบว่า PBS เข้มข้น 2.5 เท่า สามารถสกัดโปรตีนออกจากน้ำยางข้นได้เพียงชนิดเดียว ซึ่งมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 3.31 ± 0.02 mg/g ส่วนสารสกัดชนิดอื่น ได้แก่ 1 mM EDTA, 10% Methanol, 10% Acetone, 7.5% SLS และ น้ำกลั่น ไม่สามารถแยกโปรตีนออกจากน้ำยางข้นได้

ดังนั้นในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากน้ำยางข้นด้วยวิธี Modified Lowry ควรสกัดน้ำยางข้น 0.5 g ด้วยสารละลาย PBS เข้มข้น 2.5 เท่า ด้วยเทคนิคไมโครเวฟ (Household microwave machine) ที่กำลังไฟฟ้า 560 W เป็นเวลา 60 นาที

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น

เมื่อนำน้ำยางข้นที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Kjeldahl การสกัดด้วยเทคนิคไมโครเวฟ และ**การวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐานตาม D5702-10 แล้ววิเคราะห์ด้วย Modified Lowry ได้ผลดังตาราง 3.5**

ตาราง 3.5 การวิเคราะห์ปริมาณปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นและถุงมือยางด้วยวิธีต่างๆ

วิธี	ปริมาณโปรตีน (mg/g)	ค่าร้อยละการคืนกลับ
<u>น้ำยางข้น</u>		
Kjedahl		
- ปริมาณรวม	5.30 ± 0.28	-
- โปรตีน	3.19 ± 0.25	
- ไม่ใช่โปรตีน	1.11 ± 0.03	
D5702-10	2.38 ± 0.0	-
Microwave extraction	2.59 ± 0.01	113.7
<u>ถุงมือยาง</u>		
D5702-10	0.54 ± 0.04	
Microwave extraction	0.42± 0.01	-

จากตาราง 3.5 พบว่า การวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางข้นด้วยวิธี Kjeldahl มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 5.30 ± 0.28 mg/g ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางข้นด้วยวิธี Modified Lowry จะเห็นได้ว่า พบปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นที่แตกต่างกันมาก เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Kjedahl เป็นการย่อยเพื่อหาปริมาณไนโตรเจนรวมที่อยู่ในสารละลาย ซึ่งในน้ำยางข้นมีการเติมสารละลายแอมโมเนียเพื่อรักษาสภาพน้ำยาง นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่มีการใช้เวลาในการย่อยนานทำให้ค่าที่วิเคราะห์ได้มีความคลาดเคลื่อนมาก ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน เนื่องจากจะได้ค่ามากกว่าความเป็นจริง เมื่อนำเทคนิคดังกล่าวมาวิเคราะห์ถุงมือยาง พบว่า ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้ต่ำกว่าวิธีมาตรฐานเพียงเล็กน้อย

สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไมโครเวฟที่พัฒนาขึ้นมาเป็นวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนได้ใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐานตาม ASTM ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความน่าเชื่อถือ

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

4.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้น โดยศึกษาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Modified Lowry ใช้เป็นวิธีในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด ชนิดสารสกัดและเทคนิคที่เหมาะสมในการสกัด โดยสามารถสรุปผลการวิจัยได้ดังนี้

ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นด้วยวิธี Modified Lowry ทำได้โดยการสกัดโปรตีนออกจากน้ำยางข้น ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ทีสีน้ำเงินโดยการเติม copper (II) และ Folin-ciocalteu' s reagent แล้วนำไปวัดที่ความยาวคลื่น 745 นาโนเมตร เพื่อทำการวิเคราะห์เทียบกับกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย BSA เข้มข้น 0 - 30 µg/mL ได้สมการเส้นตรงคือ $y = 0.009X+0.025$ ค่า $R^2= 0.996$ และหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (Limit of Detective: LOD) เท่ากับ 0.026 µg/mL ซึ่งในการสกัดโปรตีนออกจากน้ำยางข้นจะใช้เทคนิคในการสกัด 3 เทคนิค ได้แก่ การแช่ในตัวสกัดการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication)และเครื่องไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine) และทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

ในการศึกษาเทคนิคการสกัดโดยการใช้เทคนิคการแช่ในตัวสกัด พบว่า สกัดน้ำยางข้น 0.5 g ด้วยสารละลาย PBS เข้มข้น 2.5 เท่า จำนวน 5 mL แล้วปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 20 นาที ซึ่งวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน เท่ากับ 2.38 ± 0.03 mg/g ในขณะที่การสกัดโดยการใช้เทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) พบว่า การสกัดน้ำยางข้น 0.5 g ด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) เข้มข้น 2.5 เท่า ที่อุณหภูมิเริ่มต้น 60 °C เป็นเวลา 90 นาที สามารถใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 3.00 ± 0.03 mg/g

ในการศึกษาเทคนิคการสกัดโดยการใช้เทคนิคไมโครเวฟในครัวเรือน (Household microwave machine) พบว่า การสกัดน้ำยางข้น 0.5 g ด้วยสารละลาย PBS เข้มข้น 2.5 เท่าด้วยกำลังไฟฟ้า 560 W เป็นเวลา 60 นาที สามารถสกัดโปรตีนออกจากน้ำยางข้นและวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน เท่ากับ 3.31 ± 0.02 mg/g

4.2 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นเพียงการเสนอแนวทางการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางข้น ด้วยวิธีการวิเคราะห์ Modified Lowry ซึ่งการวิเคราะห์โปรตีนที่เป็นวิธีมาตรฐานทั่วไปมี 3 วิธี คือ Modified Lowry, Bradford และKjeldahl methods ซึ่งไม่ทราบปริมาณที่แน่นอน ดังนั้นจึงควรทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน

บรรณานุกรม

[1] วราภรณ์ ขจรไชยกุล. (2549). ยางธรรมชาติ: การผลิตและการใช้งาน. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วน จำกัด ซีโน ดีไซน์.หน้า 12-9

[2] วราภรณ์ ขจรไชยกุล.(2555).เทคโนโลยีน้ำยาง.กรุงเทพฯ:สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.).หน้า 5-30

[3] แนวปฏิบัติที่ดีด้านการป้องกันและลดมลพิษอุตสาหกรรมน้ำยางข้น จาก www.pcd.go.th/count/waterdl.cfm?FileName=rubbertree.pdf สืบค้นเมื่อวันที่ 7 กรกฎาคม 2557

[4] จิตต์ลัดดา ศักดาภิพาณิชย์.(2553).เทคโนโลยียางธรรมชาติ.กรุงเทพฯ:เทคโนบิซ คอมมิวนิเคชั่นจำกัด.หน้า 13-16

[5] รัตน์ เพชรจันทร์.(2527).ยางพารา.(1).กรุงเทพ: หน่วยศึกษานิเทศก์กรมการฝึกหัดครู. หน้า 44-224

[6] วราภรณ์ ขจรไชยกุล.(2555).เทคโนโลยีน้ำยาง.กรุงเทพฯ:สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.).หน้า 5-30

[7] ปฏิกิริยา Lowry จาก kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2010/6160/9/Chapter2.pdf สืบค้นเมื่อวันที่ 7 กรกฎาคม 2557

[8] การวิเคราะหหาปริมาณโปรตีนในอาหารโดยวิธี Kjeldahl method จาก http://nutrition.anamai.moph.go.th/temp/files/Training_center/swu54/3.pdf วันที่ 8 กรกฎาคม 2557

[9] บทที่ 8 การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนโดยวิธีเจลดาห์ล จาก http://e-book.ram.edu/e-book/c/CH234/ch234-8.pdf สืบค้นเมื่อวันที่ 8 กรกฎาคม 2557

[10] การแห้โปรตีนในน้ำยางข้น: วิธีการตรวจสอบและเทคโนโลยีการแก้ไข จาก www.rubbercenter.org/files/Journal_RDCTRI_2.pdf สืบค้นเมื่อวันที่ 7 กรกฎาคม 2557

[11] RUBBER: NATURAL & SYNTHETIC จาก http://rubbertrainer.blog.com/2014/02/14/rubber-natural-synthetic/ สืบค้นเมื่อวันที่ 8 กรกฎาคม 2557

[12] หลักการ uv-vis spectrophotometer จาก http://glasswarechemical.com/ สืบค้นเมื่อวันที่ 8 กรกฎาคม 2557

[13] บทที่ 11 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง จาก home.kku.ac.th/chuare/12/spectrophotometer.pdf

สืบค้นเมื่อวันที่ 8 กรกฎาคม 2557

[14] เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophometer) จาก http://www.aquatoyou.com/index.php/2013-05-16-04-06-08/874-uv-vis-spectrophotometer สืบค้นเมื่อวันที่ 8 กรกฎาคม 2557

[15] Spectroscopy จาก webstat.sci.ubu.ac.th/wwwSci/news/showdoc.php?DOCID=26650 สืบค้นเมื่อวันที่ 8 กรกฎาคม 2557

[16] นิพนธ์ ตั้งคณานุรักษ์ และ คณิตา ตั้งคณานุรักษ์.(2547).สเปกโทรสโกปีด้านการวิเคราะห์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.หน้า 67-68

[16] บทที่ 5 เครื่องหมุนเหวี่ยง (CENTRIFUGE) จาก home.kku.ac.th/chuare/12/centrifuge.pdf สืบค้นเมื่อวันที่ 8 กรกฎาคม 2557

[17] บทที่ 2 การใช้เครื่องมือ จาก e-book.ram.edu/e-book/t/TN312(L)51/TN312-2.pdf สืบค้นเมื่อวันที่ 8 กรกฎาคม 2557

[18] บทที่ 9 เครื่องล้างอัลตราโซนิก(ULTRASONIC CLEANER) จาก home.kku.ac.th/chuare/12/ultrasoniccleaner.pdf สืบค้นเมื่อวันที่ 8 กรกฎาคม 2557

[19] เตาอบไมโครเวฟ จาก http://th.wikipedia.org/wiki/เตาไมโครเวฟ สืบค้นเมื่อวันที่ 8 กรกฎาคม 2557

[20] เตาอบไมโครเวฟ จาก http://www.rmutphysics.com/charud/specialnews/5/microwave/index.htm สืบค้นเมื่อวันที่ 8 กรกฎาคม 2557

[21] Michaela Buffler and Jurgen Traunig. (2011). A compilation of various methods for protein determination in milk, based on the classic determination by Kjeldahl. BUCHI Labortechnik AG.

[22] Crenguta-Ioana Pavel, L.AI. Marghitas, Victorita Bonta, Cristina M. Mihai and Lavinia I. Tomos. (2013). Determination of total protein content in royal jelly: A comparision of The Kjeldahl, The Modified Lowry and The Bradford methods. Romania

[23] ASTM D5712-10. Standard Test Method for Analysis of Aqueous Extractable Protein in Natural Rubber and Its Products Using the Modified Lowry Method.

[24] J. Mendham, R.C.Denney, J.D.Barnes, & M.Thomas.(1939).Vogel: Text book of quantitative chemiscal analysis. 6 th ed. Singapore: Addison Wesley Longman Singapore (Pte) Ltd.

[25] Crude protein in meat block digestion method. AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (1990). 937.

[26] https://en.wikipedia.org/wiki/Kjeldahl_method สืบค้นเมื่อวันที่ 8 กรกฎาคม 2557

ภาคผนวก

1. ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในการสารสกัดโดยวิธี Modified Lowry

การเตรียมตัวอย่าง ชั่งน้ำยางข้น 0.5011 g นำไปผสมกับสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) ปริมาตร 5.00 mL นำไปสกัดด้วยวิธีต่างๆ จึงดูดสารละลายมา 1.2 mL เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย วิธี Modified Lowry โดยเติม reagent และทำการเจือจางสารละลาย ดังนั้นปริมาณของสารละลายทั้งหมดเท่ากับ 14 mL จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

สมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน $y = 0.0303x + 0.0256$

แทนค่า y เท่ากับ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

X เท่ากับ ค่าปริมาณโปรตีนที่ต้องการหา

นำตัวอย่างสารละลายโปรตีนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.4970 ที่ความยาวคลื่น 745 nm

วิธีคำนวณ แทนค่าการดูดกลืนแสงเป็นค่า y ในสมการเส้นตรง

$0.4970 = 0.0303x + 0.0256$

$X = 15.56$ µg/mL

ในสารละลายตัวอย่าง	1 mL	มีปริมาณโปรตีนอยู่	15.56 µg
ถ้าในสารละลายตัวอย่าง	14 mL	มีปริมาณโปรตีนอยู่	217.84 µg
ในสารละลายตัวอย่าง	1.2 mL	มีปริมาณโปรตีนอยู่	217.84 µg
ถ้าในสารละลายตัวอย่าง	5 mL	มีปริมาณโปรตีนอยู่	907.67 µg
ในน้ำยางข้น	0.5011 g	มีปริมาณโปรตีนอยู่	907.67 µg
ถ้าในน้ำยางข้น	1 g	มีปริมาณโปรตีนอยู่	1,811.36 µg/g

ดังนั้น จะมีปริมาณโปรตีน 1,811.36 µg/g หรือ 1.81 mg/g

2.การคำนวณหาขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (Limit of Detective: LOD)

จากสูตร $LOD = \frac{3SD_{blk}}{slope}$

LOD = ขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detective)

SD_{blk} = ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัดสัญญาณของ Blank

ซึ่งค่า SD_{blk} ได้จากการวัด blank ทั้งหมด 10 ครั้ง จึงได้ค่า SD_{blk} เท่ากับ 0.00026

วิธีคำนวณ $LOD = \frac{3(0.00026)}{0.0303} = 0.026$ µg/mL

การเผยแพร่ผลงาน

1. การประชุมวิชาการระดับนานาชาติ Pure and Applied Chemistry International Conference 2015 (PACCON2015), 21 - 23 January 2015, Bangkok, Thailand

PACCON 2015

Pure and Applied Chemistry
International Conference 2015

PACCON 2015

Pure and Applied Chemistry International Conference 2015

ISBN : 978-974-456-758-1

PACCON 201

Pure and Applied Chemist
International Conference 20

"Innovative Chemistry for Sustainability of the AEC and Beyond"

21st - 23rd January 2015
Amari Watergate Hotel
Bangkok, Thailand

Organized by The Chemical Society of Thail
under the Patronage of Her Royal Highness Princess Chulabhorn Mah

Coorganized by Department of Chemistry, Faculty of Scie
King Mongkut's University of Technology Thon

Department of Chemistry, Faculty of Science
King Mongkut's University of Technology Thonburi

ANC PO 019 The Extraction of the Water Soluble Protein from Rubber Latex by Household Microwave Machine

Khuanjit Hemavibool[1], Sairoong Ouypornkochagorn[1]*
[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok, 65000, Thailand
*E-mail: sairoongo@nu.ac.th

- The protein from natural latex were extracted by microwave technique.
- The extracting solvents, power of household microwave machine and duration of extraction were optimized.
- The optimized method for protein extraction from natural rubber latex is immersion of the sample in 5 mL of 2.5X phosphate buffer saline and application of microwaves at 560W for 60 minutes.

Keywords Proteins, Modified Lowry; Latex; Microwave

ANC PO 020 New Dicationic Ionic Liquid Based on Imidazolium as Gas Chromatography Stationary Phase for Selective Separation of Polyaromatic Compounds

Kourosh Tabar-Heydar*, Marzieh AfshinRahmanian, Amir-Mohammad Azadeh, Ali Sharifi, Mojtaba Mirzaei
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Clean Technologies, Chemistry and Chemical Engineering Research Center of Iran, Tehran14968, Iran
*E-mail:ktabarh@ccerci.ac.ir

- A novel digationic ionic liquid based imidazolium, ([C9(2MNPTim)2][(NTf2)2]),was synthesized.
- Activity coefficient at infinite dilution has been determined in this IL for 26 polar and non-polar compounds.
- The data obtained for the selectivity suggest that [C9(2MNPTim)2][(NTf2)2] has a good potential for separation of the polyaromatics and aliphatics.

Keywords Gas chromatography; Ionic liquid; Stationary phases; Abraham salvation parameters

ANC PO 021 Fast Liquid Chromatography for the Quantitative Analysis of Zinc Pyrithione in Antidandruff Shampoo

Jutkamas Chunsang, Warawut Tiyaboonchai*
Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Patumthani, 12120 Thailand
*E-mail: twarawut@litu.ac.th

- The method was based on the transchelation of zinc pyrithione (ZPT) to copper pyrithione obtaining more stable complexation.
- The separation can be achieved less than five minutes. The calibration curve was ranged from 0.02 – 3.33 % w/w (r^2 > 0.9994). The limits of detection and quantitation were 0.001 and 0.005 % w/w, respectively
- The proposed method was successfully applied to determine ZPT in antidandruff shampoo. For eight antidandruff shampoos, ZPT amounts ranged from 0.48 to 0.83 % w/w.

Keywords Zinc pyrithione; Antidandruff; Monolithic column; Transchelation, Fast liquid chromatography

Department of Chemistry, Faculty of Science
King Mongkut's University of Technology Thonburi

ANC PO 022 Simultaneous Determination of UV-Sensitive and Less UV-Sensitive Macrolides in Urine by Liquid Chromatography-Aerosol Detector

Shaodong Jia[1], Jing Li[1] and Sung Won Kwon[1]*
[1]Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, 151742, Korea
*E-mail: swkwon@snu.ac.kr

- We reported the simultaneous determination of macrolides in real urine by liquid chromatography-aerosol detector.
- The proposed detection method with charged aerosol detector showed much better sensitivity comparing with evaporative light scattering detector.
- This is the first report of the determination of macrolides with/without chromophores in urine.

Keywords Aerosol detector; Liquid chromatography; Macrolide analysis; Urine

ANC PO 023 Quantitative Detection of β-Galactosidase Activity during Cell Senescence using a Two-Photon Fluorescent Probe

Hyo Won Lee,[1] Cheol Ho Heo,[1] and Hwan Myung Kim[1]*
[1]Department of Chemistry & Department of Energy Systems Research, Ajou University, Suwon 443-749, Korea
*E-mail: kimhm@ajou.ac.kr

- We developed a ratiometric two-photon fluorescent probe (SG1) for β-galactosidase (β-gal) and its application to quantitative detection of β-gal activity during cellular senescence in situ.
- This new probe is capable of detecting β-gal activity in live cells and deep inside of tissues using ratiometric TPM imaging.
- This probe may find useful applications in biomedical research, including studies of cell aging.

Keywords Two-photon probe; β-galactosidase; Quantitative detection

ANC PO 024 Spectrophotometric Investigation of Iron(II) and Iron(III) as N,N-bis(5-methoxy-2-hydroxybenzyl)methylamine (MeMD) Complex

Natphimol Boonkaewin[1], Pompun Pornsinlapatip[1]*, Watcharapol Sienglum[1], Nattamon Koonsaeng[1], Apirat Laobuthee[2]
[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, 10900, Thailand.
[2]Department of Materials Engineering, Faculty of Engineering, Kasetsart University, Bangkok, 10900, Thailand.
*E-mail: fscippps@ku.ac.th

- A derivative of benzoxazine dimers MeMD was investigated as a new complexing agent for the simultaneous spectrophotometric determination of two ion species of iron, Fe(II) and Fe(III).
- The calibration graph of Fe(II)-MeMD and Fe(III)-MeMD complex was found to be linear over a dynamic range of 0.6 to 12.0 ppm-Fe(II) and 2.0 to 3.4 ppm-Fe(III), respectively.

Keywords Fe (II); Fe (III); Benzoxazine dimers; Spectrophotometry

The Extraction of the Water Soluble Protein from Rubber Latex by Household Microwave Machine

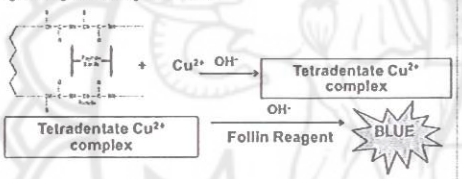
Salroona Ouypornkochagorn*, Khuanjit Hemavibool
Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok, 65000, Thailand.
E-mail: salroonao@nu.ac.th

Abstract

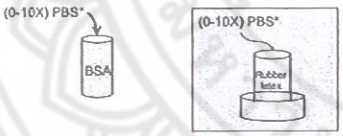
Proteins are found in the natural rubber latex, which can lead to allergic reaction in sensitive users. Therefore the determination of protein content in condensed rubber latex is necessary. This is usually done using the tedious Kjeldahl's method for total nitrogen determination, which is not suitable for the analysis of condensed rubber. Thus, modified Lowry method was selected to determination of protein content in these samples. The soluble protein from latex was determined using its reaction with copper(II) and Follin-Ciocalteu's reagent. A blue complex is generated and detected at 745 nm. In this research, the extraction method was optimized using microwave. All parameters such as extracting solvents, power of household microwave machine and extraction duration were optimized. The optimized method for protein extraction from natural rubber latex is immersion of the sample in 5 mL of 2.5X phosphate buffer saline and application of microwave at 560W for 60 minutes.

Introduction

Natural rubber is the economic product in Thailand. Many natural latex products e.g. balloon, glove, condom etc. are spread over the world. The drawbacks of these products are skin allergic symptom. It comes from protein content in rubber latex which caused of many allergic symptoms to many users. In this work, the new method was developed the extraction method by a household microwave machine which did not need the sophisticated instrument, many parameters were adjusted to get the appropriate extraction procedure and then determined protein content with Modified Lowry method. The peptide bonds of aqueous soluble protein reacted with copper under alkaline conditions and then reacted with the Folin reagent to get a strong blue color.



Experiment



Salt	Concentration (mmol/L)	Concentration (g/L)
NaCl	137	8.0
KCl	2.7	0.2
Na_2HPO_4	10	1.44
KH_2PO_4	1.8	0.24

Results

I. Effects of concentration of PBS to BSA and protein extraction from condensed rubber latex by household microwave

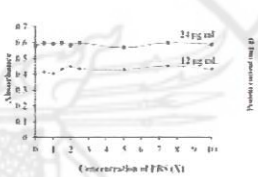


Figure 1 The effects of PBS concentration on (a) 12 g/mL and 24 g/mL BSA by Modified Lowry method.

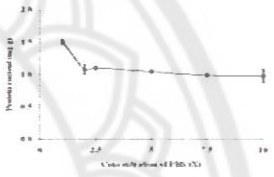


Figure 2 Effect of PBS concentration to protein contents from condense rubber latex by a household microwave extraction (n=3).

II. Effect of the power of microwave machine to protein extraction from condensed rubber latex

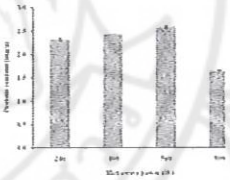


Figure 3 Effect of microwave power to protein contents from condense rubber latex by a household microwave extraction (n=3)

III. The comparation of the protein extraction from condensed rubber latex

Method	Protein content (mg/g)
Microwave technique	2.59 ± 0.01
D5712-10	2.38 ± 0.03

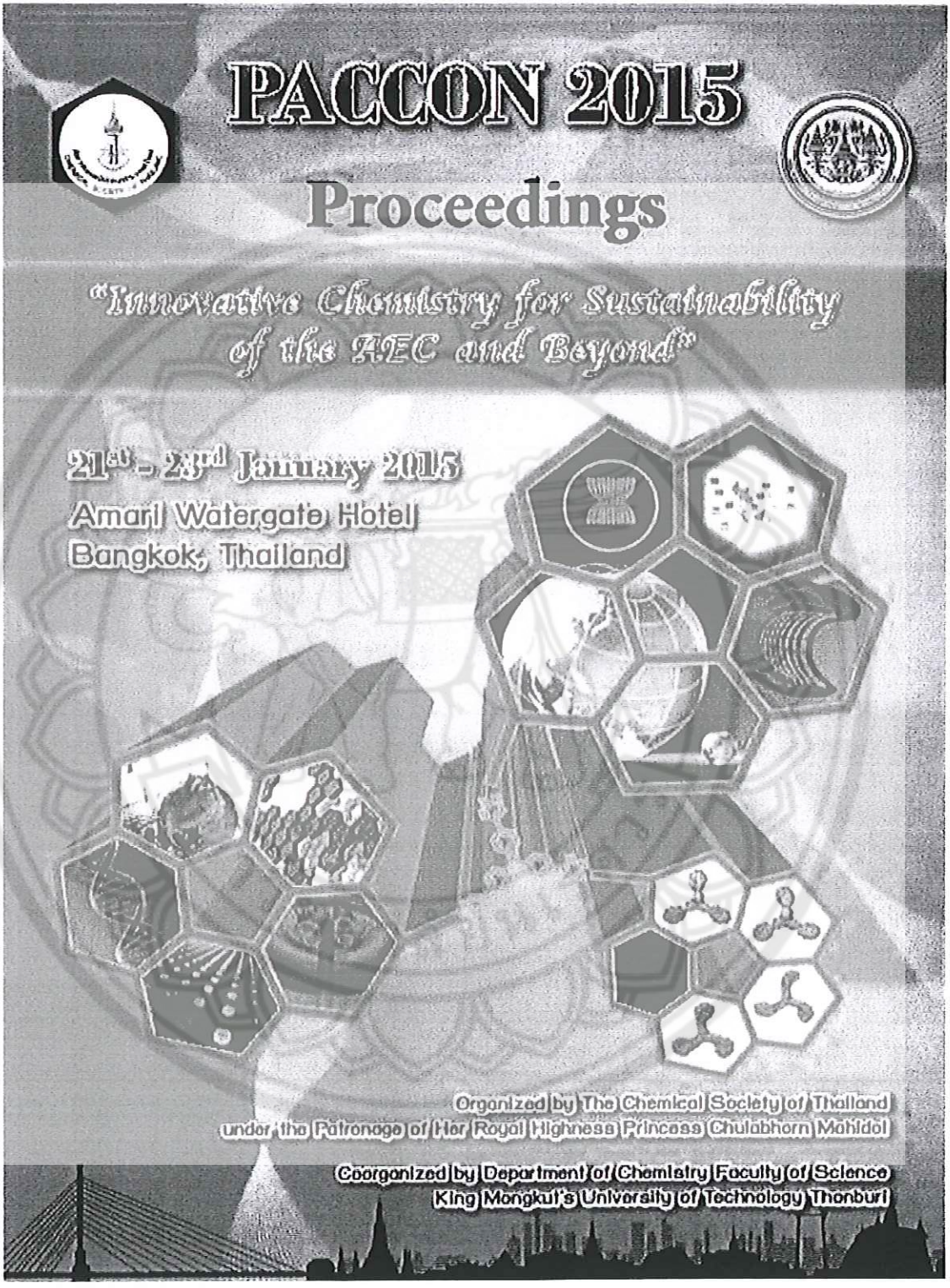
Conclusion

- The protein from natural latex were extracted by household microwave technique.
- The optimized method for protein extraction from natural rubber latex its immersion of the sample in 5 mL of 2.5X phosphate buffer saline and application of microwaves at 560W for 60 minutes
- This new extraction method by household microwave is the effective method.

References

[1] Geiger, J.W., Davis, N.M., Blakemore, W.S. and Long, G.L. 1987, *J Autom. Chem* ., 9, 72-76.
[2] Perlnd HarwM.J., Ros, G., Martinez, C. and Rincón, F., 1996, *Food Res. Int.*, 29, 489-494.
[3] Lynch, J.M. and Barbano, B.M., 1999, *J. AOAC Int.* 82, 1389-1401.
[4] ASTM D5712-10, 2010. Standard Test Method for Analysis of aqueous Extractible Proteinvin Natural Rubber and its Products Using the Modified Lowry method. Vol. 9.02
[5] Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, 1951. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Acknowledgements This research supports by the National Research Council of Thailand.


PACCON 2015
Proceedings
"Innovative Chemistry for Sustainability of the AEC and Beyond"
21st - 23rd January 2015
Amari Watergate Hotel
Bangkok, Thailand
Organized by The Chemical Society of Thailand
under the Patronage of Her Royal Highness Princess Chulabhorn Mahidol
Coorganized by Department of Chemistry Faculty of Science
King Mongkut's University of Technology Thonburi

THE EXTRACTION OF WATER SOLUBLE PROTEIN FROM RUBBER LATEX BY HOUSEHOLD MICROWAVE MACHINE

Sairoong Ouypornkochagorn *, Khuanjit Hemavibool

Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok, 65000, Thailand

**E-mail: sairoongo@nu.ac.th,* Tel. +66 5596 3436, Fax. +66 5596 3401

Abstract: Proteins in the natural rubber latex generally lead to allergic reaction in sensitive users. Therefore, the determination of protein content in condensed rubber latex is crucial. Usually, it was performed using the tedious Kjeldahl's method for total nitrogen determination, which is not suitable for the analysis of condensed rubber. Thus, modified Lowry method was selected to determination of protein content in the samples. The soluble protein from latex was determined using its reaction with copper(II) and Follin-Ciocalteu's reagent. A blue complex was generated and detected at 745 nm. In this research, the microwave extraction method was selected and optimized as well as important parameters such as extracting solvents, power of household microwave machine and extraction time were also investigated. It was found that immersion of the sample in 5 mL of 2.5X phosphate buffer saline with microwave at 560 W for 60 minutes was effective process for determination of proteins in condensed rubber.

1. Introduction

Natural rubber is the economic product in Thailand. Many natural latex products e.g. balloon, glove, condom etc. are widely consumed over the world. The drawbacks of these products are skin allergic symptom. It originates from protein content in rubber latex which caused of many allergic symptoms to many users. The determination of protein content in natural rubber latex usually used Kjedahl technique [1,2,3]. There is a standard test method for protein determination of aqueous extractable protein in natural rubber latex products which require a long time preparation for the extraction method [4]. Additionally, this technique cannot separate rubber latex and serum. Therefore, it is not suitable to dissolve protein in serum for protein determination. In this work, the new extraction method was developed by employment a household microwave machine which did not need the sophisticated instrument; many parameters were adjusted to give the appropriate extraction procedure and then determined protein content with Modified Lowry method. The peptide bonds of aqueous soluble protein reacted with copper under alkaline conditions and then reacted with the Folin reagent to generate a strong blue color [4, 5].

2. Materials and Methods

Ultraviolet and visible spectrophotometry was carried out on Jusco V-650 spectrophotometer. All reagents were of analytical reagent grade. Bovine serum albumin (BSA), sodium deoxycholate)DOC(were taken from Acros Organics, Japan, Folin ciocalteu's phenol reagent, sodium carbonate)Na_2CO_3(, sodium tartrate, phosphotungstic acid)PTA(, sodium laurylsulphate were obtained from Carlo Erba, Italy. NaCl, $NaHPO_4$, NaOH, acetone were purchased from RCI Labscan, Thailand. $CuSO_4.5H_2O$, Trichloroacetic Acid)TCA(were from Loba, KCl and KH_2PO_4 were from Univar, $Na_2HPO_4{\cdot}2H_2O$ was purchased from Riedel-de Haën. EDTA was obtained from Fluka, Switzerland.

2.1 Bovine serum albumin

A 100 µg/mL BSA solution was prepared with distilled water and used as standard in all assays.

2.2 Phosphate buffer saline (10X)

8.00, 2.00, 1.44 and 2.40 g of NaCl, KCl, $Na_2HPO_4{\cdot}2H_2O$ and KH_2PO_4, respectively were dissolved in 100 mL of distilled water.

2.3 Modified Lowry reagent

Reagent A- 2.22, 0.44 and 0.18 g of Na_2CO_3, NaOH and $Na_2C_4H_4O_6$, respectively were dissolved in 100 mL of distilled water

Reagent B- 7.00 g of $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ was prepared in 100 mL distilled water

Reagent C- 75 mL of reagent A and 0.5 mL of reagent B were mixed together

Reagent D- 10 ml of Folin-ciocalteu's reagent was diluted with 10 mL of distilled water.

2.4 Standard curve and detection limit

0, 6, 12, 18, 24, 30 µg/mL of BSA were prepared from stock solution (100 µg/mL) and 1.2 mL of each solution was pipetted to 15 mL polypropylene centrifuge tubes. Reagents C 2.5 mL was added and leaves to stand for 15 minutes. After that, 0.3 mL of reagent D was added, left for 30 minutes and finally measured at 745 nm. The relationship between absorbance and concentration were plotted as calibration curve of protein content and limit of detection was also calculated from three times of standard deviation of blank solution divided by slope of calibration curve.

2.5 Effects of concentration of PBS

500 and 1000 µL of 100 µg/mL BSA were pipetted into 15 mL polypropylene centrifuge tube, 700 µL and 200 µL of 0.5X, 1X, 1.5X, 2X, 2.5X, 5X, 7.5X and 10X PBS were added into the BSA solution, respectively. Then, 2.5 mL of reagent C was added and

left for 15 minutes, followed by adding 0.3 mL of reagent D and left for 30 minutes. Finally, the absorbance of each solution was measured at 745 nm.

2.6 Protein extraction from condensed rubber latex by ASTM D5702-10 method

A 0.5 g of condensed rubber latex was prepared into 50 mL polypropylene centrifuge tube, added 5 mL of 2.5X PBS and stand at room temperature for 60 minutes. Then 1.2 mL of extraction solution were pipette to 15 mL-centrifuge tube and then added reagent C, reagent D and measured as same as those of standard solutions.

2.7 Protein extraction from condensed rubber latex by household microwave machine

The effects of the concentration of PBS as extractant were studied. A 0.5 g of condensed rubber latex was prepared into 50 mL of centrifuge tube, added 5 mL of 0.5X, 1X, 1.5X, 2X, 2.5X, 5X, 7.5X and 10X PBS, respectively. All solutions were placed in the microwave machine as a condition of the water bath and then heated with the power of 560W for 20 minutes. After all solutions cooled, 1.2 mL of each extraction solution was pipetted to 15 ml-centrifuge tube and then reagent C and reagent D was added and the absorbance was measured as same as those of standard solutions.

The power of the microwave machine (at 240, 400, 560 and 800 W for 20 minutes) and the extraction times (*i.e.* 30, 60 and 90 minutes) were also studied for the determination of protein contents in condensed rubber latex.

Protein content from condensed rubber latex by the household microwave machine was compared to ASTM method D5712-10 [3].

3. Results and Discussion

3.1 Standard curve and detection limit of BSA by Modified Lowry method

The relationship of absorbance and BSA concentration was shown in Figure 1.

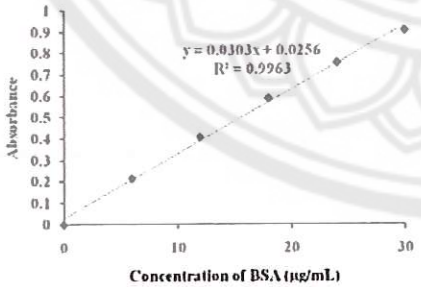


Figure 1 Calibration curve of BSA by Modified Lowry method.

The limit of detection was 0.026 µg/mL (the calculation was not shown). (n=3, S/N=3)

3.2 Effects of concentration of PBS to standard solution of BSA by Modified Lowry method

Since PBS used to extract protein from condenses rubber latex, it might affect the determination of proteins by Lowry method. The absorption of protein standards in various PBS concentrations were studied and shown in Figure 2.

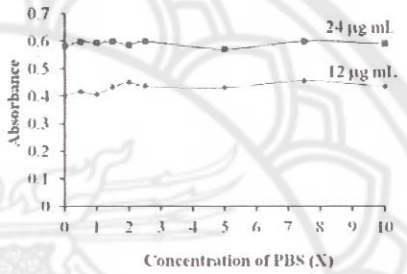


Figure 2 The effects of PBS concentration on (a) 12 g/mL and 24 g/mL BSA by Modified Lowry method.

The result in Figure 2 showed that the concentration of PBS did not affect on the absorption signal of BSA at all. Therefore, PBS was the suitable reagent for protein extraction.

3.3 Effect of the concentration of PBS to protein extraction from condensed rubber latex by household microwave machine

In this part, rubber latex were immersed in various concentration of PBS and heated by microwave machine and then analyzed by Modified Lowry method as shown in Figure 3.

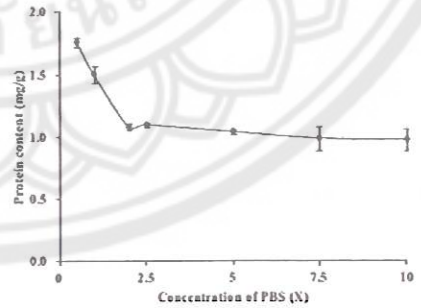


Figure 3 Effect of PBS concentration to protein contents from condense rubber latex by a household microwave extraction (n=3).

Figure 3 showed that a lot of protein content was removed from rubber latex by 1X PBS but standard deviation value were significantly high. Therefore, 2.5X PBS was selected to be an extractant and found that 1.10 ± 0.02 mg/g of protein from latex were extracted.

3.4 Effect of the power of microwave machine to protein extraction from condensed rubber latex by household microwave machine

Rubber latex were immersed in 2.5X PBS and heated by various power of microwave machine for 20 minutes and then analyzed by Modified Lowry method as shown in Figure 4.

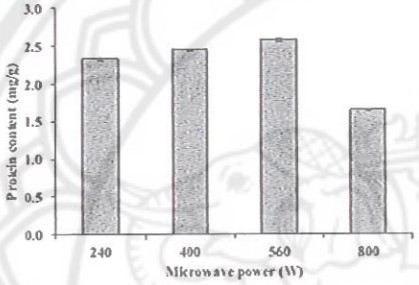


Figure 4 Effect of microwave power to protein contents from condense rubber latex by a household microwave extraction (n=3)

From Figure 4, the power of microwave machine clearly affected the extraction efficiency. It showed that 240W and 400W were too low to extract protein from rubber latex while the power of 800W was too high. Most of extractant was evaporated during extraction process. Therefore, the suitable power of microwave for protein extraction was 560W which extracted 3.24 ± 0.03 mg/g of protein from rubber latex.

3.5 Effect of the extraction time to protein extraction from condensed rubber latex by household microwave machine

Rubber latex were immersed in 2.5X PBS and heated at 560W with microwave machine for 20, 30, 60 and 90 minutes and then analyzed by Modified Lowry method as shown in Figure 5 and found that the appropriate extraction time for natural rubber latex was 60 minutes.

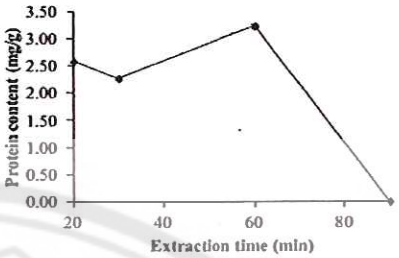


Figure 5 Effect of extraction times to protein contents from condense rubber latex by a household microwave extraction (n=3)

Therefore, the appropriate condition for protein extraction by household microwave machine is heated 0.5 g of condensed rubber latex in 2.5X phosphate buffer saline at 560W for 60 minutes in the situation of water bath. Finally, protein content from this technique was compared to D5702-10 method as shown in Table 1.

Table 1 Protein content in condensed rubber latex (n=3)

Method	Protein content (mg/g)
Microwave technique	2.59 ± 0.01
D5712-10	2.38 ± 0.03

From Table 1, it was found that the new extraction method by household microwave extraction had efficiency similar to standard ASTM method. This method was better than ASTM method since it required less time for extraction.

4. Conclusions

Condensed rubber latex can be analyzed by Modified Lowry method which was very sensitive. The protein from natural latex were extracted by microwave technique. The extracting solvents, power of household microwave machine and duration of extraction were optimized. The optimized method for protein extraction from natural rubber latex entailed immersion of the sample in 5 mL of 2.5X phosphate buffer saline and application of microwaves at 560W for 60 minutes. Finally, it was found that this new extraction procedure by household microwave was the effective method and the extractant does not affect to the analysis.

Acknowledgements

This research supports by the National Research Council of Thailand.

References

[1] Geiger, J.W., Davis, N.M., Blakemore, W.S. and Long, G.L., 1987, *J Autom. Chem*., 9, 72-76.

[2] Perind Harw, M.J., Ros, G., Martinex, C. and Rincón, F., 1996, *Food Res. Int.*, 29, 489-494.
[3] Lynch, J.M. and Barbano, B.M., 1999, *J. AOAC Int.* 82, 1389-1401.
[4] ASTM D5712-10, 2010. Standard Test Method for Analysis of aqueous Extractble Proteinvin Natural Rubber and its Products Using the Modified Lowry method. Vol. 9.02
[5] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., 1951, *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.