

การเปรียบเทียบวิธีทดสอบมาตรฐาน การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำในผลิตภัณฑ์จากน้ำยาง : วิธีไหนดีที่สุด

พรอศกดี สงวนธำรงค์

บทนำ

การแพ้โปรตีนจากน้ำยางธรรมชาติ (Latex Allergy) เป็นเรื่องสำคัญต่อวงการการแพทย์และสาธารณสุขมาตั้งแต่ในช่วงปลายทศวรรษที่ 80 ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาวิธีทดสอบมาตรฐานในการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณโปรตีน ทั้งการวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมด โปรตีนที่ละลายน้ำ และโปรตีนที่ก่อให้เกิดการแพ้อย่างต่อเนื่อง

การวิเคราะห์โปรตีนที่ละลายน้ำเป็นการวิเคราะห์โปรตีนที่ได้รับความนิยมมากที่สุดวิธีหนึ่ง แต่เนื่องจากค่าที่วิเคราะห์ได้จากแต่ละวิธีทดสอบมาตรฐานมีความแตกต่างกัน ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างกันได้อย่างสมบูรณ์ และทำให้เกิดข้อโต้แย้งเกี่ยวกับผลการทดสอบที่ได้ว่ามีความถูกต้องแม่นยำเพียงใด และผลของห้องปฏิบัติการใดมีความน่าเชื่อถือมากกว่ากัน นักวิจัยของประเทศมาเลเซียได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบตัวแปรต่างๆ ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำตามวิธีทดสอบมาตรฐาน 5 วิธี เพื่อหาข้อสรุปว่าวิธีทดสอบมาตรฐานวิธีใดเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำ

บทความนี้นำเสนอข้อสรุปจากงานวิจัยนี้และทำเปรียบเทียบรายละเอียดของการวิเคราะห์โปรตีนที่ละลายน้ำในแต่ละวิธีทดสอบมาตรฐาน เพื่อช่วยให้ผู้วิเคราะห์ได้เห็นภาพรวมและรายละเอียดที่แตกต่างกันในแต่ละวิธีทดสอบมาตรฐานอันจะเป็นประโยชน์ต่อการเลือกวิธีวิเคราะห์สร้างความเข้าใจในขั้นตอนการวิเคราะห์ ระวังระดับข้อผิดพลาดที่จะเกิดจากการวิเคราะห์ และทำให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง

ตารางที่ 1 มาตรฐานที่ใช้ทดสอบในการศึกษาวิจัย

ลำดับที่	มาตรฐาน	ชื่อเรื่อง
1	ASTM D5712-95	Standard Test Method for Analysis of Protein in Natural Rubber and Its Products
2	ASTM D5712-99*	Standard Test Method for Analysis of Aqueous Extractable Protein in Natural Rubber and Its Products Using the Modified Lowry Method
3	MS 1392 : 1998	Test Method for the Analysis of Extractable Proteins in Natural Rubber Products
4	EN 455-3 : 2000 (Annex A)	Method for the determination of aqueous extractable proteins in natural rubber gloves using the modified Lowry assay
5	ISO 12243 : 2003	Medical gloves made from natural rubber latex – Determination of water-extractable protein using the modified Lowry method

* ปัจจุบันเป็น ASTM D5712-05 ซึ่งปรับแก้ไขในส่วน Appendix 1 และมีรายละเอียดการทดสอบที่เหมือนปี 1999

วิธีทดสอบ Modified Lowry

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำในแต่ละวิธีทดสอบมาตรฐานมีหลักการที่เหมือนกัน คือ การวัดความเข้มของสีของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับ Folin Reagent โดยสามารถแบ่งขั้นตอนการทดสอบเป็น 3 ขั้นตอนหลักดังนี้

1. การสกัดโปรตีนออกจากชิ้นงานตัวอย่าง
2. การตกตะกอนโปรตีน และทำให้บริสุทธิ์
3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Modified Lowry

วิธีทดสอบ Modified Lowry เป็นวิธีที่ง่ายต่อการนำไปใช้งานเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์วิธีอื่น เช่น การวิเคราะห์โดย HPLC แต่มีข้อเสียตรงที่มีความแตกต่างกันของผลที่ได้จากการวิเคราะห์ในแต่ละวิธีทดสอบมาตรฐาน และมีความแปรปรวนของผลการวิเคราะห์ในวิธีทดสอบเดียวกันดังนั้นค่าที่วิเคราะห์ได้จึงไม่สามารถเปรียบเทียบกันได้อย่างมั่นใจ ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดความสับสนทั้งในกลุ่มผู้ผลิตผลิตภัณฑ์และผู้บริโภคผลิตภัณฑ์ ดังนั้น การพิจารณาและเข้าใจ ความสามารถ ข้อดีข้อเสียของวิธีทดสอบมาตรฐานแต่ละวิธีจึงมีความสำคัญ เพื่อที่จะสามารถเลือกใช้วิธีทดสอบให้เหมาะสมรวมถึงการวิเคราะห์ผลการทดสอบได้อย่างถูกต้อง

การศึกษาวิจัยเปรียบเทียบนี้ เป็นการเปรียบเทียบมาตรฐานที่ใช้ทดสอบ 5 มาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 1 และแสดงการเปรียบเทียบรายละเอียดของแต่ละวิธีทดสอบมาตรฐาน ในตารางที่ 2

จากตารางที่ 2 จะพบว่า วิธีทดสอบมาตรฐานส่วนใหญ่จะใช้โปรตีนมาตรฐานเป็นโปรตีนจากไข่ขาว (Ovalbumin) ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน (standard curve) ยกเว้นวิธี MS 1392 : 1998 จะใช้โปรตีนจากซีรัมของวัว (Bovine Serum Albumin: BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน และในการละลายโปรตีน วิธีทดสอบส่วนใหญ่จะใช้บัฟเฟอร์เป็นตัวทำละลาย แต่วิธี MS 1392 : 1998 จะใช้ NaOH ที่ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ในการละลายโปรตีน เนื่องจากวิธีทดสอบนี้จะไม่ตกตะกอนโปรตีนมาตรฐานก่อนการทำกราฟ

มาตรฐาน ส่วนวิธี ASTM D5712-95 ใช้ deionised water เป็นตัวทำละลายโปรตีน โดยในวิธีทดสอบแบบ ASTM ทั้ง 2 วิธีจะระบุอุณหภูมิและเวลาในการละลาย แต่วิธีทดสอบอื่นไม่ได้ระบุไว้สำหรับความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน จะมีการเตรียมที่ความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 0- 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยที่วิธี ASTM D5712-95 จะเตรียมที่ความเข้มข้นสูงกว่าคือ 0-640 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบตัวแปรในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำในวิธีทดสอบมาตรฐานต่าง ๆ

		ASTM D5712-95	ASTM D5712-99	MS 1392 : 1998	EN 455-3 : 2000	ISO 12243 : 2003
Standard Curve						
1	Standard Protein	Ovalbumin	Ovalbumin	BSA	Ovalbumin	Ovalbumin
2	Concentration	1000 µg/ml	1000 µg/ml	200 µg/ml	1000 µg/ml	1000 µg/ml
3	Dissolved in	DI water	PBS หรือ TES	0.2 M NaOH	0.1 M TES	PBS หรือ TES
4	Time, Temp	2 h, 37 °C	2 h, 25 °C	-	-	-
5	Absorbance Range	0.03 - 1.5	0.01 - 1.5	0.03 - 1.5	-	-
6	Concentration series	640, 320, 160, 80, 40, 20	200, 100, 60, 35, 10, 2	200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25	100, 50, 20, 10, 5, 2	40, 20, 10, 5, 2.5
7	Protein	Non-Prep or Prep	Precipitated	Non-Precipitated	Precipitated	Precipitated
Lowry Reagent						
A	Na ₂ CO ₃ + NaOH + sodium tartrate	N/A	2.22 + 0.44 + 0.18 % w/v	-	N/A	-
A	Na ₂ CO ₃	N/A	-	0.6 % w/v	N/A	6% w/v
B	CuSO ₄ 5H ₂ O	N/A	7 % w/v	-	N/A	-
B	CuSO ₄ 5H ₂ O + sodium citrate	N/A	-	1.5 + 3 % w/v	N/A	1.5 + 3 % w/v
C	alkaline copper tartrate	Commercial kit	A+B = 150 : 1	-	Commercial kit	-
C	alkaline copper citrate	N/A	-	A+B = 10 : 0.2	N/A	A+B = 10 : 0.2
D	dilute Folin reagent	Commercial kit	dilute 2N, 50:50	dilute 2N, 72:28	Commercial kit	dilute 2N, 72:28
Protein Precipitation Solution						
1	Sodium Deoxycholate (DOC)	0.15 %w/v	0.15 %w/v	-	0.15 %w/v	0.15 %w/v
2	Trichloroacetic acid (TCA)	72 %w/v	72 %w/v	35 %w/v	72 %w/v	72 %w/v
3	Phosphotungstic acid (PTA)	72 %w/v	72 %w/v	1.6 %w/v	72 %w/v	72 %w/v
Sample Preparation						
1	Glove	-	-	7× 7 cm	-	5 × 5 cm
2	Condom, Balloon	-	-	2 g	-	-
3	Thread	-	-	~2 g, 2 cm	-	-
4	Latex	-	-	dry film, RT 2 days	-	-
Protein extraction						
1	extraction method	cut glove	cut glove	cut glove	glove in glove	CG หรือ GIG
2	extractant	DI water	PBS หรือ TES	PBS 0.01 M	TES	PBS หรือ TES
3	extract ratio	1 g : 10 ml	1 g : 5-10 ml	1 g : 5 ml	25-50 ml	1 g : 10-15 ml
4	Temperature	37±2 °C	25±5 °C	23±2 °C	25±5 °C	25±5 °C
5	Time	120±5 min	120±5 min	3 h	120±5 min	120±5 min
6	Centrifuge	500×g, 20 min	500×g, 15 min	3000×g, 30 min	2000×g, 15 min	2000×g, 15 min
Protein Precipitation						
1	Test Solution	1 ml	1 ml	3ml EX+3ml PBS	1 ml	4 ml
2	DOC	0.1 ml, 10 min	0.1 ml, 10 min	-	0.1 ml, 10 min	0.4 ml, 10 min
3	TCA	0.1 ml	mix 50:50, add	1 ml	0.1 ml	0.4 ml
4	PTA	0.1 ml, 20 min	0.2 ml, 30 min	1 ml, 20 min	0.1 ml, 30 min	0.4 ml, 30 min
5	Centrifuge	6000×g, 15 min	6000×g, 15 min	10000×g, 30 min	6000×g, 15 min	6000×g, 30 min
6	Redissolve	0.1 M NaOH	0.2 M NaOH	0.2 M NaOH	0.1 M NaOH	0.2 M NaOH
		0.25 - 1 ml	0.25 - 1 ml	1 - 6 ml	0.2 - 1 ml	0.8 ml
Colourimetric Assay						
1	Blank	0.1 M NaOH	0.2 M NaOH	0.2 M NaOH	0.1 M NaOH	0.2 M NaOH
2	Test Solution	0.2 ml	1.2 ml	0.8 ml	0.2 - 1 ml	0.8 ml
3	Reagent C	0.1 ml	2.5 ml, 15 min	0.3 ml, 10 min	0.125 ml	0.3 ml
4	Reagent D	0.8 ml, 15-30 min	0.3 ml, 30 min	0.1 ml, 30 min	1 ml, 30 min	0.1 ml, 15 min
5	Wavelength	600-750 nm	750 nm	750 nm	600-760 nm	750 nm
Calculation						
Extractable Protein = (g/g)		ND.	$\frac{(C \times V \times F)}{W}$	$\frac{(C \times V \times F)}{W}$	$\frac{(C \times V \times F)}{W}$	$\frac{(C \times V \times F)}{W}$

Where:

C = protein conc. of extract (g/ml)
V = volume of extraction buffer (ml)
F = dilution factor
W = weight of sample (g)

Remark:

BSA = Bovine Serum Albumin
PBS = Phosphate Buffered Saline
TES = N-tris-[Hydroxymethyl]-methyl-2-aminoethanesulfonic acid
EX = Extract Solution

ในการเตรียมสารละลาย Lowry เพื่อใช้ทำให้เกิดสีที่มีความแตกต่างกันทั้งชนิดของสารเคมี อัตราส่วนการเตรียม และความเข้มข้น โดยในวิธี ASTM D5712-95 และ EN 455-3 : 2000 จะกำหนดให้ใช้สารเคมีที่เป็นชุดทดสอบทางการค้า (kit) แต่วิธี ASTM D5712-99, MS 1392 : 1998, ISO 12243 : 2003 จะต้องเตรียมสารเคมีเอง ซึ่งในวิธี MS จะเตรียมเหมือนกับในวิธี ISO โดยจะได้สารละลาย C เป็น Alkaline Copper Citrate และสารละลาย D จะเจือจางจาก Folin Reagent ในอัตราส่วน 72 ส่วนต่อน้ำ 28 ส่วน ในขณะที่วิธี ASTM D 5712-99 จะเตรียมสารละลาย C เป็น Alkaline Copper Tartrate และเจือจาง Folin Reagent ในอัตราส่วน 50 : 50 ซึ่งมีความเข้มข้นน้อยกว่าวิธี MS และวิธี ISO

ในการเตรียมสารเคมีสำหรับตกตะกอนโปรตีน ส่วนใหญ่จะเหมือนกัน คือ ใช้ DOC, TCA และ PTA เป็นตัวตกตะกอนโปรตีน ยกเว้นวิธี MS 1392 : 1998 จะไม่ใช้ DOC และพบว่าความเข้มข้นของ TCA และ PTA ก็มีความเข้มข้นที่น้อยกว่าด้วย คือ TCA ร้อยละ 35 และ PTA ร้อยละ 1.6 ส่วนการเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบ วิธี MS จะระบุวิธีการเตรียมตัวอย่างตามชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการทดสอบ เช่น ถู่มือ ถูยางอนามัย ลูกโป่ง ยางยืด และน้ำยาง ในขณะที่วิธีทดสอบอื่น ๆ จะไม่ระบุวิธีการเตรียมตัวอย่างไว้



การสกัดโปรตีน วิธีทดสอบส่วนใหญ่จะใช้วิธีสกัดแบบ Cut Glove* ยกเว้นวิธี EN 455-3 : 2000 จะใช้วิธี Glove in Glove** ในขณะที่วิธี ISO 12243 : 2003 จะสามารถใช้ได้ทั้งสองวิธี โดยในการสกัดนั้นวิธีทดสอบส่วนใหญ่จะใช้บัฟเฟอร์เป็นสารสกัด ซึ่งอาจเป็นบัฟเฟอร์ชนิด PBS หรือ TES แต่ใน ASTM D5712-95 ให้ใช้ deionized water ในการสกัดโดยอัตราส่วนในการสกัดมีความแตกต่างกันตั้งแต่ 5 ถึง 15 มิลลิลิตรต่ออย่าง 1 กรัม และการสกัดแบบ Glove in Glove จะใช้บัฟเฟอร์ประมาณ 25 ถึง 50 มิลลิลิตร ต่อถูมือ 1 คู่ สำหรับอุณหภูมิในการสกัด ส่วนใหญ่มีค่าใกล้เคียงกัน คือ 23-25°C แต่ในวิธี ASTM D5712-95 กำหนดไว้ที่ 37°C และเวลาในการสกัด วิธีส่วนใหญ่กำหนดไว้ที่ 2 ชั่วโมง ยกเว้นวิธี MS 1392 : 1998 กำหนดให้สกัดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

การตกตะกอนโปรตีน เป็นขั้นตอนที่สำคัญในการวิเคราะห์ ซึ่งพบความแตกต่างในวิธีทดสอบแต่ละวิธี คือ ปริมาณสารละลายที่นำมาใช้ตกตะกอน ซึ่งวิธี ISO 12243 : 2003 จะใช้ปริมาณสารมากที่สุด (อัตราส่วนของสารเคมีที่ใช้ตกตะกอนก็เพิ่มขึ้นด้วย) ในขณะที่วิธี MS 1392 : 1998 จะใช้บัฟเฟอร์ผสมกับสารละลายที่สกัดได้มาใช้ตกตะกอน ส่วนวิธีการเติมสารเคมีสำหรับตกตะกอน มีความแตกต่างกันเล็กน้อย คือในวิธี ASTM D5712-99 จะต้องผสม TCA กับ PTA เข้าด้วยกันก่อนเติมลงในสารละลายที่สกัดได้ ในขณะที่วิธีอื่น จะเติม DOC, TCA และ PTA ตามลำดับ เมื่อตกตะกอนโปรตีนแล้ว จะเป็นขั้นตอนการปั่นแยกโปรตีนออก โดยส่วนใหญ่จะกำหนดที่ความเร็ว 6000×g เป็นเวลา 15-30 นาที แต่วิธี MS 1392 : 1998 จะกำหนดให้ใช้ความเร็วที่ 10000×g เป็นเวลา 30 นาทีซึ่งเป็นความเร็วและเวลาในการปั่นแยกที่มากที่สุด

ความแตกต่างที่ชัดเจนในแต่ละวิธีทดสอบอีกขั้นตอน คือ การละลายโปรตีนที่ปั่นแยกได้ด้วย NaOH พบว่าวิธี ASTM D5712-99, MS 1392 : 1998, ISO 12243 : 2003 จะใช้ ความเข้มข้นของ NaOH ที่ 0.2 โมลาร์ แต่วิธี ASTM D5712-95 และ EN 455-3 : 2000 จะใช้ความเข้มข้นที่ 0.1 โมลาร์ นอกจากนี้ ปริมาณที่ใช้ในการละลายก็มีความแตกต่างกัน ซึ่งขั้นตอนนี้จะมีผลทำให้ค่า dilution factor มีความแตกต่างกันด้วย

ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน พบข้อแตกต่างในเรื่องปริมาณสารละลายโปรตีนที่ใช้ในการทำให้เกิดสี นอกจากนี้ ชนิด และความเข้มข้นของ Lowry Reagent ก็มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงพบว่า แต่ละวิธีมีการเติมสารเคมีในปริมาณ และเวลาที่ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาแตกต่างกันไป โดยเมื่อเกิดสารเชิงซ้อนสีน้ำเงินสมบูรณ์แล้ว จะนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600-760 นาโนเมตร ซึ่งทุกวิธีจะแนะนำให้ใช้ความยาวคลื่นที่ 750 นาโนเมตร ในขั้นตอนนี้ มีข้อสังเกตสำหรับวิธี ASTM D5712-99 คือ ปริมาณสารละลายที่ได้จากการละลายโปรตีน (0.25 – 1 มิลลิลิตร) มีไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ในการทำให้เกิดสี (1.2 มิลลิลิตร) ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นความผิดพลาดในการกำหนดมาตรฐาน ซึ่งจากประสบการณ์ของผู้เขียน จะใช้ NaOH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในการละลายโปรตีน และนำปริมาตรนี้มาใช้ในการทำให้เกิดสี ก็จะทำให้ไม่เกิดความสับสน ทั้งขณะทำการทดสอบและการคำนวณ

การคำนวณ จากตารางที่ 2 จะพบว่ามีหลักในการคำนวณที่คล้ายคลึงกัน คือ นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปหาเป็นปริมาณโปรตีนที่ละลายได้จากกราฟมาตรฐาน แล้วนำมาคูณด้วยปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดและหารด้วยน้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ แต่จะมีข้อแตกต่างกันตรงที่

* Cut Glove เป็นการทดสอบโดยตัดถูมือเป็นชิ้นเล็กๆ หรือตามขนาดที่กำหนด แล้วนำมาสกัดโดยแช่ในภาชนะที่มีสารที่ใช้สกัดอยู่ภายใน

** Glove in Glove เป็นการทดสอบโดยนำถูมือ (ชั้นใน) ซ่อนลงในถูมืออีกชั้นหนึ่ง (ชั้นนอก) แล้วใส่สารที่ใช้สกัดลงในระหว่างถูมือชั้นนอกกับถูมือชั้นใน ซึ่งตลอดช่วงการสกัด สารที่ใช้สกัดจะสัมผัสเฉพาะส่วนของถูมือเท่านั้น

Meaning of Dilution factor (F)

ASTM D5712-99	F =	$\frac{\text{Vol.NaOH used to redissolve the test extract (ml.)}}{\text{Vol.NaOH used to redissolve the standard ovalbumin protein (ml.)}}$
MS 1392:1998	F=	$\frac{\text{Vol of redissolved protein solution (ml.)}}{\text{Vol of extract used to precipitation (ml.)}}$
BS EN 445-3:2000	F=	$\frac{\text{Vol.NaOH used to redissolve the protein (ml.)}}{0.2}$
ISO 12243 : 2003	F=	$\frac{\text{Vol.NaOH used to redissolve the protein (ml.)}}{\text{Vol of extract before precipitation (ml.)}}$

dilution factor ซึ่งในแต่ละวิธีกำหนดให้มีความหมายที่แตกต่างกัน ดังแสดงในสมการ

จากนิยามที่แตกต่างกัน จึงทำให้ค่าที่คำนวณได้มีความแตกต่างกัน ซึ่งผู้วิเคราะห์จะต้องทำความเข้าใจเกี่ยวกับรายละเอียดและขั้นตอนการวิเคราะห์ เพื่อให้สามารถคำนวณได้ถูกต้อง เพราะวิธีการคำนวณในบางวิธีอาจทำให้เกิดความผิดพลาดและความสับสนได้ ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างวิธีได้

จะเห็นได้ว่าในแต่ละวิธีทดสอบมาตรฐานจะมีความแตกต่างกันในรายละเอียด ทั้งวิธีการ สารเคมี ตลอดจนการคำนวณ ซึ่งทำให้ผลที่วิเคราะห์ได้มีความแตกต่างกัน และมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อความแปรปรวนของค่าปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำที่วิเคราะห์ได้ เช่น ความว่องไวต่อชนิดของโปรตีนที่แตกต่างกัน อัตราส่วนระหว่างปริมาตรของสารเคมีกับตัวอย่างที่วิเคราะห์ ความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่วิเคราะห์และสารรบกวน ความเป็นสัดส่วนตรงต่อช่วงของการทดสอบ

ในการศึกษานี้ จึงมีการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความแปรปรวนของค่าที่ทดสอบ โดยแต่ละวิธีทดสอบมาตรฐานจะมีการศึกษาใน 5 ปัจจัย คือ

1. ความว่องไวต่อโปรตีน (Sensitivity)
2. อัตราส่วนระหว่างปริมาตรของสารเคมีกับปริมาตรของตัวอย่าง (Versatility)
3. ผลกระทบของสารรบกวน (Interfering Substances)
4. ความเป็นสัดส่วนตรงต่อช่วงของการทดสอบ (Linearity)
5. ร้อยละการกลับคืน (% Recovery)

ผลการศึกษา

จากการศึกษาวิธีทดสอบมาตรฐาน 5 วิธี คือ ASTM D5712-95, ASTM D5712-99, MS 1392 : 1998, EN 445-3 : 2000 และ ISO 12243 : 2003 พบว่า

- วิธีทดสอบมาตรฐาน ISO 12243 : 2003 และ MS 1392 : 1998

มีความว่องไวต่อโปรตีนมากที่สุด โดยการคำนวณจากดัชนีการดูดกลืนแสง ซึ่งอัตราส่วนและความเข้มข้นของสารเคมีที่แตกต่างกันในการทดลอง จะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน ผลการวิจัยพบว่า วิธี ISO และ MS จะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุด นั่นคือ มีความว่องไวมากที่สุด

- วิธี ISO และ MS จะมีความคล่องตัวในการนำไปใช้มากที่สุด เนื่องจากอัตราส่วนของปริมาตรสารเคมีต่อปริมาตรสารตัวอย่างที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์ต่ำที่สุด

- ผลกระทบของสารรบกวน พบได้น้อยที่สุดในวิธี ISO 12243 : 2003

- ทั้ง 5 วิธี แสดงค่าความสัมพันธ์ที่เป็นสัดส่วนตรงที่ดีในช่วงความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนต่ำจนถึงปานกลาง โดยที่ ASTM D5712-99 และ MS 1392 : 1998 กราฟจะเป็นแบบ Polynomial ในช่วงความเข้มข้นสูง ๆ

- ค่าร้อยละการกลับคืนที่สูงที่สุด พบได้ในวิธี ASTM D5712-95 ตามมาด้วย ISO 12243 : 2003, EN 445-3 : 2000, MS 1392 : 1998 และ ASTM D5712-99 ตามลำดับ

นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์ทั้ง 5 วิธี พบว่า วิธี MS 1392 : 1998 จะให้ค่าปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำที่กว้างที่สุด คือ ตั้งแต่ 9-369 ไมโครกรัมต่อกรัม และยังพบว่า MS 1392 : 1998 จะมีค่าโปรตีนที่ละลายได้สูงที่สุดในตัวอย่างที่มีโปรตีนมาก (ตั้งแต่ 200 ไมโครกรัมต่อกรัมขึ้นไป) ในขณะที่วิธี ASTM D5712-99 จะมีค่าโปรตีนที่ละลายน้ำสูงที่สุดในตัวอย่างที่มีโปรตีนน้อย (น้อยกว่า 200 ไมโครกรัมต่อกรัม) ในทางกลับกัน วิธี EN 445-3 : 2000 จะมีค่าโปรตีนที่ละลายน้ำเป็นช่วงแคบที่สุด คือ 5-75 ไมโครกรัมต่อกรัม และให้ค่าโปรตีนที่ละลายน้ำต่ำที่สุดในตัวอย่างถุงมือที่ทำการวิเคราะห์

ตัวแปรอื่นนอกเหนือจาก 5 ปัจจัยที่ทำการศึกษาและส่งผลกระทบต่อผลวิเคราะห์ที่ได้ คือ วิธีการสกัดโปรตีน ซึ่งจะพบว่าวิธีสกัดแบบ Glove in Glove จะให้ค่าโปรตีนที่ละลายน้ำต่ำ

กว่าแบบ Cut Glove ดังจะเห็นได้ว่าวิธี EN 455-3 : 2000 ซึ่งใช้การ สกัดแบบ Glove in Glove จะให้ผลของโปรตีนที่ต่ำกว่าอีก 4 วิธี ที่เหลือ ทั้งนี้โดยการเปรียบเทียบจากตัวอย่างถุงมือ 38 ตัวอย่าง

ค่าโปรตีนที่ละลายน้ำที่วิเคราะห์จากถุงมือบริเวณฝ่ามือ จะให้ค่าที่แตกต่างจากค่าที่วิเคราะห์จากทั้งถุงมือ โดยค่าจาก ฝ่ามือจะต่ำกว่าค่าจากทั้งถุงมือ และยังพบว่าวิธีที่ใช้เวลาในการ สกัดนานกว่า จะให้ค่าโปรตีนที่ละลายน้ำสูงกว่า จากเหตุผลนี้ จึงพบว่า ค่าโปรตีนที่ละลายน้ำของวิธี MS 1392 : 1998 จะมีค่า สูงกว่าวิธี ISO 12243 : 2003 แม้ว่าจะใช้สารเคมีในการสกัดที่ เหมือนกัน

สรุป

จากการให้คะแนนตามตัวแปรที่ทำการศึกษา ซึ่งคะแนน มากหมายถึงมี Performance ต่ำ จะพบว่า จากผลการศึกษา วิธี ISO 12243 : 2003 และ MS 1392 : 1998 จะได้คะแนนต่ำ ที่สุด คือ 8 และ 9 คะแนนตามลำดับ นั่นคือ มี Performance ดี ที่สุด ดังนั้น จึงพอจะสรุปได้ว่า จากตัวแปรที่ทำการศึกษา วิธี ISO และ MS เป็นวิธีที่ดีกว่า วิธี ASTM D5712-99 ซึ่งตาม คะแนนจะจัดอยู่ในลำดับที่ 3 สำหรับวิธี ASTM D5712-95 และ EN 455-3 : 2000 จะจัดอยู่ในลำดับที่ 4 และ 5 ตามลำดับ

สำหรับข้อสรุปจากความคิดเห็นและประสบการณ์ของผู้เขียนไม่ต้องการจะชี้เฉพาะลงไปว่าวิธีการใดดีที่สุด เนื่องจาก แต่ละวิธีก็มีข้อดีข้อเสียที่แตกต่างกัน เช่น วิธี ASTM D5712-99 มีความสับสนเรื่องปริมาตรที่ใช้ในการทำให้เกิดสี เพราะเป็น ปริมาตรที่มากกว่าปริมาตรที่ได้จากการละลายโปรตีนด้วย NaOH ซึ่งถ้าปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร ทั้งหมด ก็จะเข้าใจ ง่ายขึ้น ทั้งขณะทำการทดสอบและการคำนวณ

ส่วนวิธี MS 1382 : 1998 มีข้อจำกัดคือไม่ได้ตกตะกอน โปรตีนมาตรฐานในการทำการกราฟมาตรฐาน และในการตกตะกอน ตัวอย่างจะใช้สารละลายผสมระหว่างสารละลายที่สกัดได้กับ บัฟเฟอร์มาทำการตกตะกอนโปรตีน นอกจากนี้ยังมีความแตกต่าง กันระหว่างปริมาตรที่ใช้ในการละลายโปรตีนกับปริมาตรที่ใช้ใน การทำให้เกิดสี ซึ่งจะมีผลต่อการคำนวณค่าปริมาณโปรตีน

ดังนั้นการจะเลือกใช้วิธีใดผู้วิเคราะห์จะต้องทำความเข้าใจในรายละเอียดของวิธีวิเคราะห์ให้ลึกซึ้ง รวมถึง ฝึกความสามารถในการทดสอบ การใช้เครื่องมือ เนื่องจากการวิเคราะห์มี หลายขั้นตอน และสามารถเกิดข้อผิดพลาดจากการทดลองได้ ง่ายในทุกขั้นตอน จึงต้องมีความระมัดระวังและปฏิบัติตามขั้นตอนอย่างเคร่งครัด เพื่อความถูกต้องแม่นยำของผลการวิเคราะห์

เอกสารอ้างอิง

1. Norhayati M., "Modified Lowry Methods for Determination of Extractable Protein Content - Which one is the Best", *Malaysian Rubber Technology Development*, 4, 18, (2004)

พร้อมคำดี สงวนอำนาจ

การศึกษา : ประณนาโก สาขาวิทยาศาสตร์โพลิเมอร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ประสบการณ์การทำงาน : - ฝ่ายวิจัยและพัฒนา
บริษัทไทยรับเบอร์ลาเท็กซ์คอร์ปอเรชัน (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)
- ฝ่ายประกันคุณภาพ บริษัท ดี-รับเบอร์โปรดักส์ จำกัด
สถานที่ทำงานปัจจุบัน : ฝ่ายวิจัยและพัฒนา เทคโนโลยีโพลิเมอร์
ศูนย์เทคโนโลยีและวัสดุแห่งชาติ