

การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีโลว์รีดัดแปรสำหรับ วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในถุงมือทางการแพทย์

ปรียานุช บุตรมี วินัส ปัทมาศ วนิดา พลวงศ์ษา และ พรเทพ จันทร์คุณภาส
สำนักวิจัยและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ ประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศหลักที่มีการผลิตและส่งออกถุงมือทางการแพทย์ของโลก เนื่องจากโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติสามารถกระตุ้นให้เกิดอาการแพ้ได้ สมาคมวิชาชีพทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งสหรัฐอเมริกา จึงกำหนดให้มีการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในถุงมือซึ่งมีเกณฑ์ไม่เกิน 200 ไมโครกรัมต่อตารางเดซิเมตร งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและทวนสอบวิธีโลว์รีดัดแปรสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามมาตรฐาน ASTM D5712-15 และ EN 455-3 สำหรับคัมครองผู้บริโภคในประเทศและสนับสนุนการส่งออกถุงมือทางการแพทย์ วิเคราะห์โดยการวัดสีจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับ Cu^{2+} และสาร Folin ในสภาวะต่าง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่สามารถตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร จากการประเมินความสามารถในการยึดจับโปรตีนของวัสดุที่ใช้ตรวจสอบกระบวนการตกตะกอนและศึกษาประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ พบว่าการทดสอบตามมาตรฐาน ASTM ให้ช่วงความเป็นเส้นตรง 5-60 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม มีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 1.8 และ 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ขณะที่การตรวจวัดตามมาตรฐาน EN ให้ช่วงการวิเคราะห์ 5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม มีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 2.0 และ 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ผลการศึกษาความเที่ยงและความแม่นยำของการทดสอบตามมาตรฐาน ASTM และ EN มีค่า HORRAT น้อยกว่า 2.0 และ %recovery ในช่วงร้อยละ 101-104 และ 86-99 สรุปได้ว่าการทดสอบตามมาตรฐานได้รับการทวนสอบอย่างเหมาะสม สามารถนำไปใช้ตรวจหาปริมาณโปรตีนในถุงมือทางการแพทย์ เพื่อการต่อยอดขยายขอบข่ายการให้บริการและส่งเสริมอุตสาหกรรมส่งออกถุงมือทางการแพทย์

คำสำคัญ: โปรตีน, วิธีโลว์รีดัดแปร, ถุงมือทางการแพทย์, ยางธรรมชาติ, การวิเคราะห์โดยการวัดสี

Corresponding author E-mail: preeyanut.b@dmasc.mail.go.th

Received: 18 June 2024

Revised: 17 October 2024

Accepted: 31 October 2024

บทนำ

ถุงมือยางทางการแพทย์ ประกอบด้วย ถุงมือ ศัลยกรรม (surgical glove) และถุงมือตรวจโรค (examination glove) จัดเป็นเครื่องมือแพทย์ที่รุกรานเข้าไปในร่างกาย (invasive medical devices) ตามหลักเกณฑ์ที่ 6 ประเภทที่ 2 และหลักเกณฑ์ที่ 5 ประเภทที่ 1 ตามลำดับ⁽¹⁾ ที่ผลิตทั้งจากน้ำยางธรรมชาติและน้ำยางสังเคราะห์ โดยถุงมือศัลยกรรมต้องผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อก่อนนำมาใช้สวมใส่ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนระหว่างบุคลากรทางการแพทย์กับผู้ป่วย หรือผู้ใช้บริการผ่าตัด ในขณะที่ถุงมือตรวจโรคใช้เพื่อป้องกันการปนเปื้อนระหว่างบุคลากรทางการแพทย์ และผู้ป่วยขณะตรวจวินิจฉัยหรือรักษาในทางการแพทย์ ที่ไม่ใช่การผ่าตัด และป้องกันการสัมผัสวัสดุทางการแพทย์ที่อาจปนเปื้อน ถุงมือศัลยกรรมและถุงมือตรวจโรคที่ผลิตหรือนำเข้าเพื่อขายในประเทศไทย ต้องมีคุณภาพและมาตรฐานเป็นไปตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ว่าด้วยเรื่องมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.) ถุงมือยางปราศจากเชื้อสำหรับการศัลยกรรมชนิดใช้ครั้งเดียว (มอก. 538)⁽²⁾ และถุงมือสำหรับการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ชนิดใช้ครั้งเดียว (มอก. 1056 เล่ม 1)⁽³⁾ ตามลำดับ โดย มอก. ทั้งสองเล่มได้รับการแก้ไขปรับปรุงเหมือนกันทุกประการตามมาตรฐาน ISO 10282⁽⁴⁾ และ ISO 11193-1⁽⁵⁾ ตามลำดับ นอกจากนี้มีมาตรฐานสากลที่กำหนดคุณภาพของถุงมือทางการแพทย์สำหรับส่งออก โดยสมาคมวิชาชีพทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งสหรัฐอเมริกา ประกอบด้วย ASTM D3577⁽⁶⁾ และ ASTM D3578⁽⁷⁾ สำหรับถุงมือศัลยกรรมและถุงมือตรวจโรค ตามลำดับ

จากข้อมูลการค้าระหว่างประเทศคาดว่าถุงมือยางทางการแพทย์ทั่วโลกมีการขยายตัวเพิ่มขึ้น โดยอาจขยายตัวต่อปีร้อยละ 9.1 ภายในปี พ.ศ. 2569⁽⁸⁾ บ่งชี้ว่าถุงมือเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์ที่มีความต้องการเพิ่มขึ้นทุกปี ประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศหลักที่มีการผลิตและส่งออกถุงมือยางธรรมชาติของโลก เนื่องจากมีสภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศร้อนชื้นเหมาะสมในการปลูกต้นยางพารา ทำให้ผู้ประกอบการสามารถแปรรูป

และเข้าถึงแหล่งวัตถุดิบได้ง่ายและมีราคาถูก รวมทั้งผู้ประกอบการมีความชำนาญในการผลิตถุงมือจากน้ำยางธรรมชาติ ส่งผลให้ผู้ผลิตสินค้าต้นน้ำ (เกษตรกรสวนยาง) และกลางน้ำ (โรงงานน้ำยางหรือโรงงานผลิตถุงมือยาง) สามารถผลิตถุงมือยางคุณภาพสูง เป็นที่ยอมรับในระดับสากล และสามารถแข่งขันกับคู่แข่งในตลาดโลกได้ จึงเป็นเหตุให้ถุงมือยางทางการแพทย์ของประเทศไทยสร้างมูลค่าสำหรับตลาดภายในประเทศและตลาดส่งออกได้ในลำดับต้น ๆ ของผลิตภัณฑ์ยางทั้งหมด โดยจัดเป็นอันดับที่ 3 ของมูลค่าการบริโภคภายในประเทศ และมีมูลค่าการส่งออกเป็นลำดับที่ 2 ของโลกรองจากประเทศมาเลเซีย⁽⁹⁾ ซึ่งร้อยละ 90 เป็นถุงมือยางทางการแพทย์ และร้อยละ 10 เป็นถุงมือยางทั่วไป⁽¹⁰⁾

สหรัฐอเมริกาเป็นประเทศผู้นำเข้าถุงมือยางรายใหญ่ที่สุดของโลก โดยประเทศไทยมีส่วนแบ่งตลาดส่งออกสูงถึงร้อยละ 30 ของตลาดการส่งออกทั่วโลก^(8,10) จากข้อมูลการใช้ถุงมือทางการแพทย์พบว่ามีชาวอเมริกันแพ้การใช้ถุงมือยางธรรมชาติ เนื่องจากโปรตีนจากน้ำยางธรรมชาติมีสารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ (allergens) ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดอาการแพ้ ตั้งแต่แสบคัน เกิดผื่นแดง หรือเป็นลมพิษ ไปจนถึงอาการแพ้ขั้นรุนแรงจนเป็นอันตรายถึงชีวิต (anaphylaxis)⁽¹¹⁾ โดยการแพ้น้ำยางจัดอยู่ในชนิดที่ 1 (type 1 latex allergy) มีสาเหตุจากการสัมผัสกับโปรตีนในยางธรรมชาติ (hevea natural rubber; HNR) หากกระบวนการผลิตไม่ดีจะทำให้มีโปรตีน HNR คงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์⁽¹²⁾ ส่งผลให้สหรัฐอเมริกาประกาศบังคับใช้กฎหมายห้ามใช้ถุงมือยางธรรมชาติที่มีปริมาณโปรตีนเกินเกณฑ์มาตรฐานที่สมาคมวิชาชีพทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งสหรัฐอเมริกากำหนด⁽¹³⁾ ซึ่งเท่ากับ 200 ไมโครกรัมต่อตารางเดซิเมตร ($\mu\text{g}/\text{dm}^2$)^(6,7) ทำให้ประเทศในทวีปยุโรปมีการกำกับการใช้ถุงมือยางธรรมชาติเช่นกัน ถุงมือยางทางการแพทย์ที่สามารถนำเข้าและจำหน่ายในสหรัฐอเมริกาและกลุ่มประเทศยุโรป ต้องได้รับการทดสอบปริมาณโปรตีนตามมาตรฐาน ASTM D5712-15⁽¹⁴⁾ และ EN 455-3⁽¹⁵⁾ ตามลำดับ ขณะที่ประเทศไทยไม่ได้กำกับให้มีการทดสอบปริมาณโปรตีนในถุงมือยางทางการแพทย์ แต่มอก. 538 และ 1056

ระบุว่าอาจมีการกำหนดให้ทดสอบปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากถุงมือศัลยกรรมและถุงมือตรวจโรคในอนาคต ซึ่งขึ้นกับมาตรฐานระหว่างประเทศที่เกี่ยวข้อง^(2,3) แม้ว่าประเทศไทยยังไม่ได้ควบคุมการใช้ถุงมือทางการแพทย์ แต่ผลการบังคับใช้ในต่างประเทศคาดว่าจะทำให้ความต้องการถุงมือยางธรรมชาติลดลงและทำให้แนวโน้มการใช้ถุงมือที่ผลิตจากยางสังเคราะห์เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากความเคลื่อนไหวของตลาดสหรัฐอเมริกาเป็นปัจจัยกำหนดทิศทางตลาดโลก

แม้ว่าถุงมือยางสังเคราะห์ไม่พบปัญหาการแพ้โปรตีนเหมือนถุงมือยางธรรมชาติ แต่ถุงมือยางสังเคราะห์มีต้นทุนด้านวัตถุดิบสูงกว่าถุงมือยางธรรมชาติ ซึ่งราคาของวัตถุดิบเป็นส่วนสำคัญสำหรับการตัดสินใจทางธุรกิจ และราคาของถุงมือยางสังเคราะห์มีแนวโน้มปรับตัวสูงขึ้น เนื่องจากวัตถุดิบของการผลิตต้องอาศัยกระบวนการผลิตปิโตรเลียมที่มีอยู่อย่างจำกัด⁽¹⁶⁾ ในภาพรวมถุงมือยางธรรมชาติมีความโดดเด่นมากกว่าทั้งด้านความยืดหยุ่น การสัมผัส ความสะดวกสบายในการสวมใส่และความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นเพื่อส่งเสริมความเข้มแข็งของอุตสาหกรรมการผลิตและส่งออกถุงมือยางธรรมชาติ และสนับสนุนความสามารถในการแข่งขันของสินค้าไทย รวมทั้งสร้างความเชื่อมั่นให้แก่ประชาชนและบุคลากรทางการแพทย์ภายในประเทศ ได้ใช้ถุงมือทางการแพทย์ที่ผ่านมาตรฐานและมีความปลอดภัยมีการควบคุมการทดสอบปริมาณโปรตีน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบวิธีโลว์รีดัดแปร (modified lowry method) สำหรับตรวจหาปริมาณโปรตีนในถุงมือทางการแพทย์ตามมาตรฐาน ASTM D5712-15 และ EN 455-3 เป็นการขยายศักยภาพของการเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงของประเทศที่มีมาตรฐาน นำไปสู่ความน่าเชื่อถือในคุณภาพของถุงมือทางการแพทย์ที่ผลิตจากยางธรรมชาติ

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐานและสารเคมี

ovalbumin (Chicken egg white albumin, A5503) (Sigma-Aldrich, USA), Folin-Ciocalteu's phenol reagent (2N, F9252) (Sigma-Aldrich,

USA), bromophenol blue sodium salt ($C_{19}H_9Br_4O_5S \cdot Na$, B5525) (Sigma-Aldrich, USA), disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4 , PA-ACS) (Panreac, Spain), potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4 , RPE-ACS) (Carlo Erba, Italy), sodium chloride ($NaCl$, RPE) (Carlo Erba, Italy), potassium chloride (KCl , RPE-ACS) (Carlo Erba, Italy), deoxycholic acid Na-salt (DOC, 99%) (Acros Organics, Belgium), trichloroacetic acid (TCA, RPE-ACS) (Carlo Erba, Italy), phosphotungstic acid (PTA, RPE) (Carlo Erba, Italy), sodium hydroxide pellets ($NaOH$, RPE-ACS) (Carlo Erba, Italy), cupric sulphate pentahydrate ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$, RPE-ACS) (Carlo Erba, Italy), sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3 , RPE-ACS) (Carlo Erba, Italy), และ sodium tartrate ($C_4H_4Na_2O_6$, RPE) (Carlo Erba, Italy)

เครื่องมือและวัสดุ

เครื่องมือ: เครื่อง UV-Vis spectrophotometer (EVO 350, Thermo Fisher Scientific, USA), เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ML001T, Mettler-Toledo, Switzerland), ตู้บลูมร้อน (TS 8136, Termaks, Norway), เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (MDX-310, Tomy, JAPAN), เครื่องเขย่าสาร (WS-100D, Wiggins, Germany), เครื่องผสมสาร (Genie 2, Scientific Industries Inc., USA) และเครื่องกรองน้ำ Reverse Osmosis & DI Water System (Merck, France)

วัสดุ: ขวดเก็บสารพลาสติก (PP, Nalgene, USA), ขวดรูปชมพู่พลาสติก (PP, Nalgene, USA), คิวเวตพลาสติก (PS, Macro, VMR Apparatus, UK), คิวเวตควอตซ์ (Quartz, Starna Scientific, UK), หลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร (Nunc, Denmark), ตัวกรองหลอดฉีดยา ขนาดรูพรุน 0.22 ไมครอน (CA, Filtratech, France) และตัวกรองหลอดฉีดยา ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน (CA, Johnson, UK)

การเตรียมสารละลายเคมี

เตรียมสารละลาย phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4 ± 0.2) ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ประกอบด้วย Na_2HPO_4 ปริมาณ 14.4 กรัม KH_2PO_4 ปริมาณ 2.7 กรัม NaCl ปริมาณ 80.1 กรัม และ KCl ปริมาณ 2.0 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน (deionized water, DI) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย bromophenol blue ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำ DI

เตรียมสารละลาย DOC และสารผสม TCA:PTA โดยเตรียมสารละลาย DOC ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 มวลต่อปริมาตร และสารละลายผสม TCA:PTA เตรียมโดยผสมสารละลาย TCA ความเข้มข้นร้อยละ 72 กับสารละลาย PTA ความเข้มข้นร้อยละ 72 ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร

เตรียมสารละลาย NaOH โดยเตรียมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 โมลาร์ในน้ำ DI สำหรับละลายตะกอนของโปรตีนตามมาตรฐาน EN 455-3 และ ASTM D5712-15 ตามลำดับ

เตรียมสารละลาย alkaline copper tartrate จากการละลาย Na_2CO_3 ปริมาณ 4.44 กรัม NaOH ปริมาณ 0.88 กรัม และ $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6$ ปริมาณ 0.36 กรัม ในน้ำ DI ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารละลาย copper sulfate ความเข้มข้น 0.07 กรัมต่อมิลลิลิตร จาก $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ในน้ำ DI แล้วเตรียมสารละลาย alkaline copper tartrate โดยผสมสารละลาย alkaline tartrate กับสารละลาย copper sulfate ในอัตราส่วน 160:1 โดยปริมาตร

เตรียมสารละลาย folin เพื่อทำให้เกิดสี โดยเตรียมสารละลาย folin ความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตรด้วยน้ำ DI จากสาร Folin-Ciocalteu's phenol reagent ความเข้มข้น 2 นอร์แมล (N)

การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายโปรตีน ovalbumin ด้วยสารละลาย PBS (25 มิลลิโมลาร์) จากนั้นบ่มสารละลายในขวดเก็บสารพลาสติกที่

อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (± 5 นาที) กรองสารละลายผ่านตัวกรองหลอดฉีดยา ขนาด 0.22 ไมครอน จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน โดยนำค่าความเข้มข้นการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่วัดได้หารด้วยค่าคงที่ โดยค่าคงที่คือ 0.64 และ 0.715 สำหรับมาตรฐาน ASTM D5712-15 และ EN 455-3 ตามลำดับ

การสกัดโปรตีนจากตัวอย่างถุงมือ

ตัดถุงมือเป็นชิ้นเล็ก ขนาด 1×1 เซนติเมตร ใส่ขวดรูปชมพู่พลาสติก (ทำซ้ำ 3 ครั้ง โดยใช้ถุงมือ 3 ชิ้น) เติมสารละลาย PBS (25 มิลลิโมลาร์) ในอัตราส่วน 8 มิลลิลิตรต่อถุงมือ 1 กรัม นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารที่อัตราเร็ว 100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (± 5 นาที) ที่อุณหภูมิ 25 ± 5 องศาเซลเซียส จากนั้นเทสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความแรง 500 g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นกรองสารละลายด้วยตัวกรองหลอดฉีดยาขนาด 0.45 ไมครอน ใส่ในขวดเก็บสารพลาสติก คำนวณพื้นที่ผิวทั้งหมดของถุงมือจากความกว้างและยาวของถุงมือที่ระบุในมาตรฐาน ASTM D5712-15

ส่วนมาตรฐาน EN 455-3 กำหนดให้ทำเครื่องหมายบริเวณข้อมือบนถุงมือ (หมายเลข 1) ซึ่งห่างจากปลายสุดของนิ้วกลางเป็นระยะ 20 ± 1 เซนติเมตร (ทำซ้ำ 4 ครั้ง โดยใช้ถุงมือ 4 ชิ้น) จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก (m_1) แล้วนำถุงมืออีก 4 ชิ้น เป็นถุงมือหมายเลข 2 โดยใส่ถุงมือหมายเลข 2 ข้างในถุงมือหมายเลข 1 ปรับให้ถุงมือทั้งสองข้างแนบกันพอดี เติมสารละลาย bromophenol blue ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ข้างในถุงมือหมายเลข 2 เพื่อเฝ้าระวังการรั่วซึมของสาร PBS ระหว่างการสกัดโปรตีน และเติมสารละลาย PBS ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ระหว่างถุงมือทั้งสองข้าง หนีบถุงมือเข้าด้วยกัน ณ บริเวณที่ทำเครื่องหมาย นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารที่อัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 ± 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (± 5 นาที) จากนั้นถอดถุงมือออกจากกัน หากพบว่าสารละลายที่สกัดได้มีสีน้ำเงินให้

ทำการสกัดใหม่โดยใช้ถุงมือคู่ใหม่ ทำการเทสารละลายใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 g เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนของสารละลายไว้ในขวดเก็บสารพลาสติก จากนั้นตัดถุงมือตรงตำแหน่งที่ทำเครื่องหมายและทำให้แห้งก่อนชั่งน้ำหนักของถุงมือที่ถูกตัดออก (m_2) คำนวณพื้นที่ผิวของถุงมือเฉพาะส่วนที่โดนสกัดโดยเทียบจากน้ำหนักถุงมือเฉพาะส่วนที่โดนสกัด จากสมการ $m = m_1 - m_2$

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังแสดงในภาพที่ 1

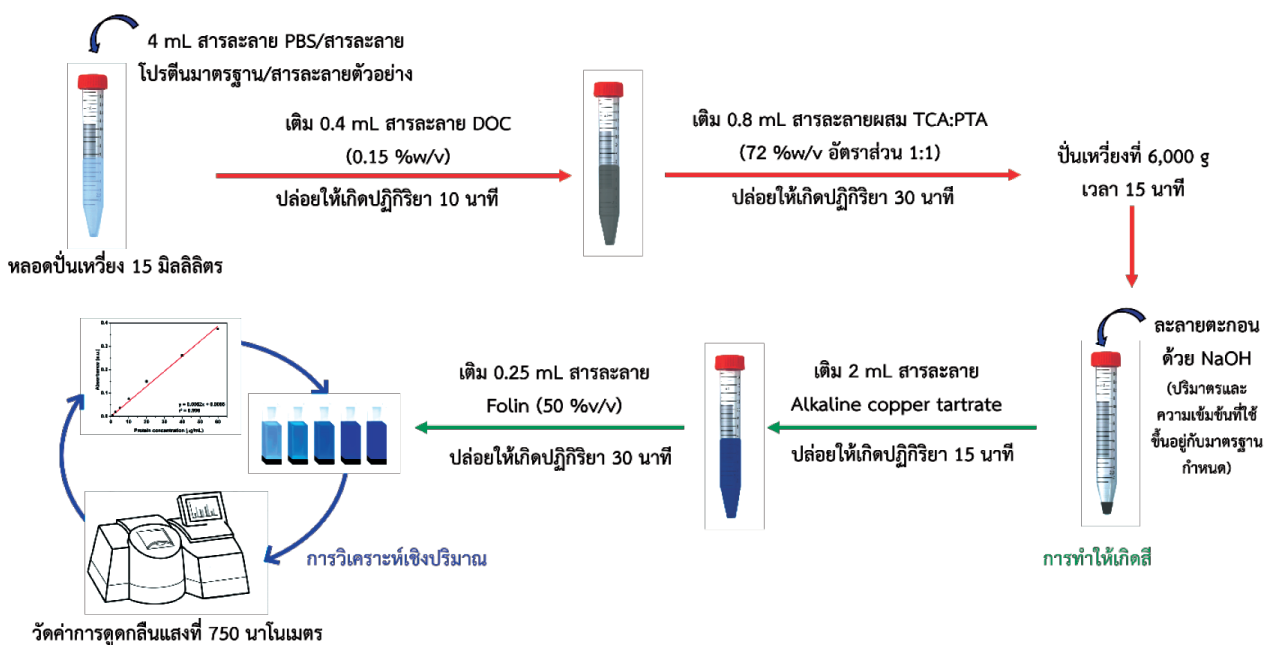
การตกตะกอนโปรตีน ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร โดยมีสารละลาย PBS เป็นตัวควบคุม จากนั้นเติมสารละลาย DOC ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายผสมของ

TCA:PTA ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งและละลายตะกอนด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ตามมาตรฐาน ASTM D5712-15 หรือเติม NaOH เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ตามมาตรฐาน EN 455-3

การทำให้เกิดสี โดยเติมสารละลาย alkaline copper tartrate ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย folin เข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา เป็นเวลา 30 นาที จึงปรากฏสีน้ำเงินอมเขียว

การวิเคราะห์เชิงปริมาณ วัดสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer โดยใช้คิวเวตพลาสติก จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

การตกตะกอนโปรตีน



ภาพที่ 1 กระบวนการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีโลว์รีดัดแปร

การคำนวณปริมาณโปรตีนในถุงมือ

คำนวณปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ (extractable-protein content; E) ในหน่วยไมโครกรัมต่อตารางเดซิเมตร ($\mu\text{g}/\text{dm}^2$) ดังสมการที่ 1

$$E = \frac{c \times V \times F}{A} \quad \text{สมการที่ 1}$$

- เมื่อ c คือ ความเข้มข้นเฉลี่ยของสารละลายโปรตีน ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
 V คือ ปริมาตรของสารละลาย PBS (mL)
 F คือ ปัจจัยความเข้มข้น ดังสมการที่ 4 หรือ 5
 A คือ พื้นที่ผิวทั้งหมดของถุงมือ (ASTM D5712-15) หรือพื้นที่ผิวของถุงมือเฉพาะส่วนที่โดนสกัด (EN 455-3)(dm^2)

การทดสอบความใช้ได้ของวิธี

ประเมินความสามารถในการยึดจับโปรตีน (protein binding capacity)

ศึกษาความสามารถในการยึดจับโปรตีนของวัสดุพลาสติกที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ ขวดเก็บสารพลาสติก หลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร และตัวกรองหลอดฉีดขนาด 0.22 และ 0.45 ไมครอน ทำการทดสอบโดยใช้วัสดุอย่างละ 2 ชุด ชุดละ 5 ชิ้น เตรียมสารละลายโปรตีนอ้างอิง ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายอ้างอิง ปริมาตร 10

มิลลิลิตร ใส่วัสดุทดสอบ (เฉพาะขวดเก็บสารพลาสติก และหลอดปั่นเหวี่ยง) เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายอ้างอิงลงในวัสดุชิ้นถัดไปให้ครบ 5 ชิ้น สำหรับตัวกรองหลอดฉีดยาทดสอบโดยกรองสารละลายอ้างอิง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผ่านตัวกรองที่เสียบต่อกัน 5 ชิ้น จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสารละลายที่ผ่านวัสดุทดสอบ (3 ซ้ำ) เปรียบเทียบกับสารละลายอ้างอิง (3 ซ้ำ) คำนวณความสามารถในการยึดจับกับโปรตีน ดังสมการที่ 2

$$\text{ปริมาณโปรตีนที่ดูดซับ} = \frac{10(R - T)}{5} \quad (\mu\text{g}/\text{material}) \quad \text{สมการที่ 2}$$

- เมื่อ R คือ ความเข้มข้นโปรตีนในสารละลายอ้างอิง ($\mu\text{g}/\text{mL}$, n = 3)
 T คือ ความเข้มข้นโปรตีนในสารละลายที่ผ่านวัสดุทดสอบ ($\mu\text{g}/\text{mL}$, n = 6)

การทดสอบกระบวนการตกตะกอนโปรตีน

เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 5, 10, 20, 40 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสร้างกราฟมาตรฐานโดยไม่ผ่านกระบวนการตกตะกอน (unprecipitated protein solution) และเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 20

และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ สำหรับทดสอบการตกตะกอน (precipitated protein solution) จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยกราฟมาตรฐาน จำนวน 2 ซ้ำ คำนวณค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นโปรตีน (C, n = 4) และคำนวณ %recovery ดังสมการที่ 3

$$\% \text{recovery} = \frac{C}{F} \times \frac{100}{\text{actual concentration}} \quad \text{สมการที่ 3}$$

เมื่อ C คือ ความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีน ($\mu\text{g/mL}$, $n = 4$)

F คือ ปัจจัยความเข้มข้น มาตรฐาน ASTM D5712-15 ดังสมการที่ 4 และมาตรฐาน EN 455-3 ดังสมการที่ 5

actual concentration คือ ความเข้มข้นที่แท้จริงของโปรตีน คือ 2.5, 5, 10, 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

$$F = \frac{\text{ปริมาตร NaOH ที่ใช้ในการละลายตะกอนของตัวอย่าง}}{\text{ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ในการละลายตะกอนของโปรตีนมาตรฐาน}} \quad \text{สมการที่ 4}$$

$$F = \frac{\text{ปริมาตร NaOH ที่ใช้ในการละลายตะกอน}}{0.8} \quad \text{สมการที่ 5}$$

การศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง ชีตจำกัดในการตรวจวัด (**limit of detection; LOD**) และขีดจำกัดในการวิเคราะห์ปริมาณ (**limit of quantitation; LOQ**)

เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0, 100.0, 125.0 และ 150.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายโปรตีน ovalbumin ด้วยสารละลาย PBS เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวัดความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากนั้นศึกษา LOD และ LOQ โดยวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่ำสุด ($1 \mu\text{g/mL}$) จำนวน 10 ครั้ง คำนวณค่า S'_0 ⁽¹⁷⁾ แล้วคำนวณ $\text{LOD} = 3 \times S'_0$ และ $\text{LOQ} = 10 \times S'_0$ ยืนยันค่า LOD โดยวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ความเข้มข้นเท่ากับ LOD (20 ซ้ำ) เปรียบเทียบกับสารละลาย blank (10 ซ้ำ) คำนวณค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) ของ blank กำหนดเกณฑ์ยอมรับ คือ โปรตีนที่ความเข้มข้นเท่ากับ LOD ต้องให้ค่าสัญญาณการวิเคราะห์สูงกว่าค่า $\bar{X} + \text{SD}$ ของ blank โดยยอมรับให้มีผลลบลง

(false negative result) น้อยกว่าร้อยละ 5⁽¹⁷⁾ และยืนยันค่า LOQ โดยวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ความเข้มข้นเท่ากับ LOQ (20 ซ้ำ) คำนวณ %recovery และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ คือ โปรตีนที่ความเข้มข้นเท่ากับ LOQ ต้องให้ค่า %recovery ในช่วงร้อยละ 80–110 และ %RSD น้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 10 ($0.66 \times \text{predicted RSD}_r$)⁽¹⁸⁾

ความเที่ยง (precision) และความแม่นยำ (trueness)

เตรียม fortified sample โดยเติมสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ 3 ระดับความเข้มข้น (ต่ำ กลาง และสูง รวมทั้งให้ครอบคลุมช่วงใช้งาน) ในตัวอย่างถุงมือที่มีระดับโปรตีนต่ำ จากนั้นสกัดโปรตีนจากตัวอย่างถุงมือ และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน จำนวน 10 ซ้ำ และ 7 ซ้ำ สำหรับศึกษาความเที่ยงภายใต้สภาวะการทำซ้ำ (repeatability) และสภาวะการทวนซ้ำ (within-laboratory reproducibility) ตามลำดับ ประเมินผล ความเที่ยงและความแม่นยำจากการศึกษาจาก HORRAT และ %recovery⁽¹⁸⁾ คำนวณดังสมการที่ 6 และ 7 ตามลำดับ

$$\text{HORRAT} = \frac{\text{RSD}_r}{\text{predicted RSD}_r} \quad \text{สมการที่ 6}$$

$$\text{เมื่อ predicted RSD}_r = 2C^{-0.15}$$

$$\% \text{recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้} - \text{ความเข้มข้นในตัวอย่าง}}{\text{ความเข้มข้นที่เติม}} \quad \text{สมการที่ 7}$$

การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน
ถุงมือ เปรียบเทียบระหว่างผู้วิเคราะห์

สกัดโปรตีนจากตัวอย่างถุงมือตามมาตรฐาน
ASTM D5712-15 และ EN 455-3 จำนวน 10 ซ้ำ
จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่สกัด เปรียบเทียบ
ผลการทดสอบระหว่างนักวิเคราะห์ด้วยสถิติ paired
t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และ degree of
freedom (df) เท่ากับ 9

เปรียบเทียบระหว่างมาตรฐาน

สกัดโปรตีนจากตัวอย่างถุงมือตามมาตรฐาน
ASTM D5712-15 และ EN 455-3 จำนวน 4 ซ้ำ จากนั้น
วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ซ้ำละ 2 ครั้ง (duplicate)
(n = 8) เปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างสองมาตรฐาน

ตารางที่ 1 ปริมาณโปรตีนที่ดูดซับบนวัสดุทดสอบ

วัสดุทดสอบ	ความเข้มข้นโปรตีน ($\mu\text{g/mL}$)		ปริมาณโปรตีนที่ดูดซับ ($\mu\text{g/material}$)
	สารละลายอ้างอิง (n = 3)	สารละลายที่ผ่านวัสดุ ทดสอบ (n = 6)	
ขวดเก็บสารพลาสติก	10.423 $\pm$ 1.1	8.635 $\pm$ 0.9	3.576
หลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 15 มิลลิลิตร	10.101 $\pm$ 0.4	6.792 $\pm$ 0.7	6.618
หลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 50 มิลลิลิตร	10.358 $\pm$ 0.3	6.342 $\pm$ 0.6	8.032
ตัวกรองหลอดฉีดยา ขนาด 0.22 ไมครอน	9.259 $\pm$ 0.5	6.637 $\pm$ 0.6	5.244
ตัวกรองหลอดฉีดยา ขนาด 0.45 ไมครอน	10.254 $\pm$ 0.5	8.054 $\pm$ 0.8	4.400

ดำเนินการยืนยันว่าห้องปฏิบัติการทำการทดสอบ
ในสภาวะที่ทำให้โปรตีนสูญหาย (sample lost) น้อยที่สุด
จึงทดสอบกระบวนการตกตะกอน ดังแสดงในภาพ
ที่ 2(ก) กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้น
ของโปรตีนก่อนตกตะกอน (C/F) กับความเข้มข้น
ของโปรตีนที่เตรียม และกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง
%recovery กับความเข้มข้นของโปรตีนที่เตรียม ดังแสดง
ในภาพที่ 2(ข) พบว่าการวิเคราะห์ตามมาตรฐาน ASTM
D5712-15 และ EN 455-3 ให้ค่า %recovery มากกว่า
ร้อยละ 80 ทุกช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา

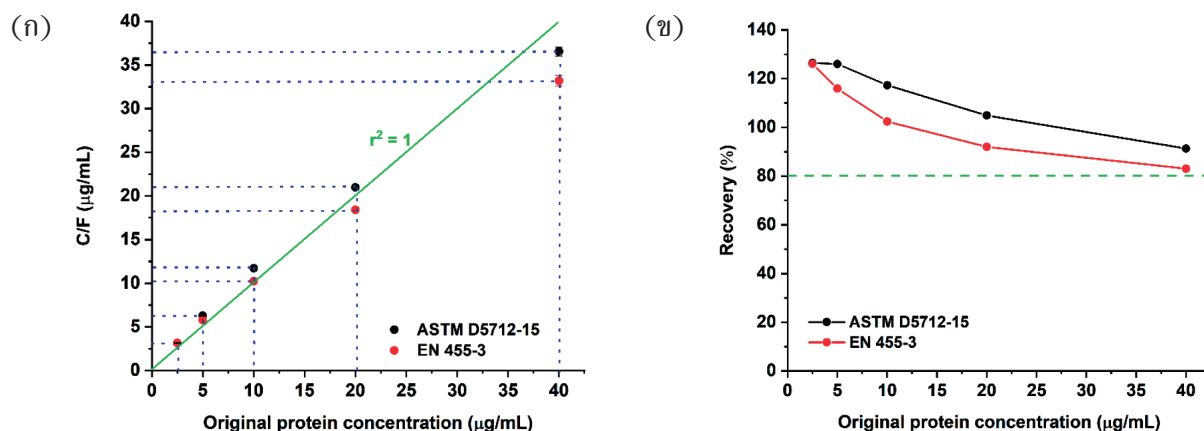
จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟ
ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance)
กับความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ดังแสดง

ด้วยสถิติ paired t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
และ df เท่ากับ 7

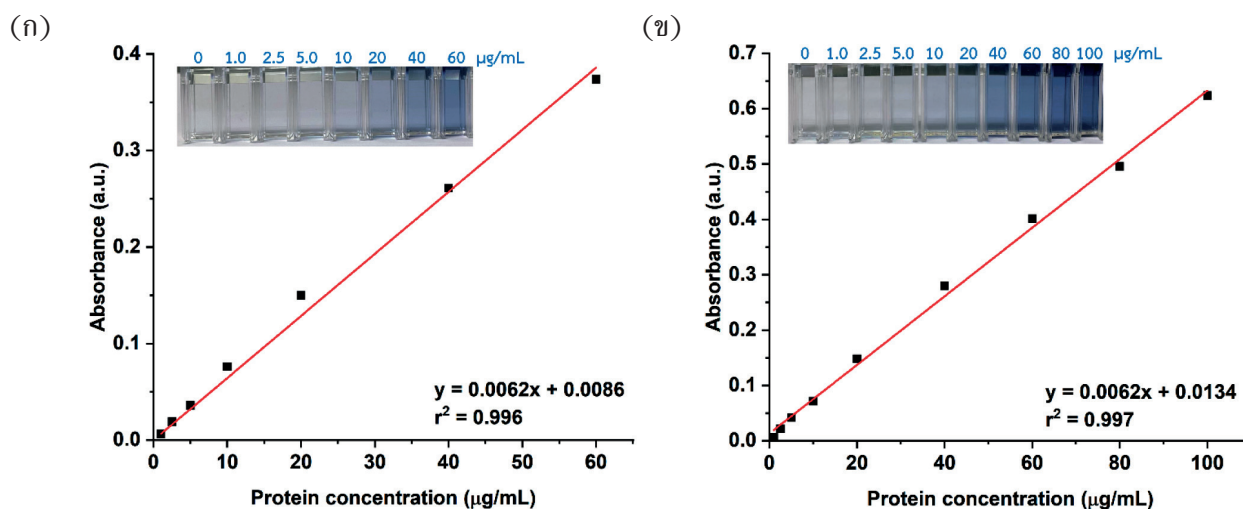
ผล

ผลการศึกษาความสามารถในการยึดจับกับโปรตีน
(protein binding capacity) ของวัสดุที่นำมาใช้ในการ
ทดสอบ ได้แก่ ขวดเก็บสารพลาสติก หลอดปั่นเหวี่ยง
ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร และตัวกรองหลอดฉีดยา
ขนาด 0.22 และ 0.45 ไมครอน พบว่าวัสดุทดสอบทุกชนิด
ที่ใช้ในการศึกษาเหมาะสมสำหรับใช้วิเคราะห์หาปริมาณ
โปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 1 เนื่องจากค่าปริมาณโปรตีน
ที่ดูดซับน้อยกว่า 10 $\mu\text{g/material}$ ตามมาตรฐาน
EN 455-3⁽¹⁵⁾

ในภาพที่ 3 พบว่าการทดสอบตามมาตรฐาน ASTM
D5712-15 และ EN 455-3 ให้ช่วงความเป็นเส้นตรง
สำหรับการวิเคราะห์เท่ากับ 1-60 ($r^2 = 0.996$) และ
1-100 ($r^2 = 0.997$) ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ
เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient
of determination; r^2) มีเกณฑ์ยอมรับมากกว่าหรือ
เท่ากับ 0.995 ผลการคำนวณและยืนยัน LOD และ LOQ
พบว่าการทดสอบโปรตีนตามมาตรฐาน ASTM D5712-15
มีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 1.8 และ 5.0 ไมโครกรัม
ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่มาตรฐาน EN 455-3 มีค่า LOD
และ LOQ เท่ากับ 2.0 และ 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ตามลำดับ



ภาพที่ 2 (ก) ความสัมพันธ์ระหว่างค่า C/F และ (ข) %recovery กับความเข้มข้นที่แท้จริงของโปรตีน เมื่อมาตรฐาน ASTM D5712-15 และ EN 455-3 มีค่า F เท่ากับ 4 และ 5 ตามลำดับ



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของโปรตีน ทดสอบตามมาตรฐาน (ก) ASTM D5712-15 และ (ข) EN 455-3

ความเที่ยงและความแม่นยำศึกษาโดยเตรียม fortified sample จากการเติมสารละลายโปรตีน มาตรฐานที่ 3 ระดับความเข้มข้น 10, 30 และ 55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ให้ครอบคลุมช่วงการใช้งาน ของกราฟมาตรฐาน) ใส่ในตัวอย่างถุงมือตามมาตรฐาน ASTM D5712-15 ขณะที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 95 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้สำหรับทดสอบตามมาตรฐาน EN 455-3 ผลการประเมินความเที่ยงภายใต้สภาวะการ ทำซ้ำ (repeatability) จากการวิเคราะห์จำนวน 10 ครั้ง พบค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.5–1.0 และ 0.5–1.1

สำหรับมาตรฐาน ASTM D5712-15 และ EN 455-3 ตามลำดับ ผลการทดสอบความเที่ยงภายใต้สภาวะทวนซ้ำ (within-laboratory reproducibility) จำนวน 7 ครั้ง พบค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.4–0.8 และ 0.6–1.1 สำหรับมาตรฐาน ASTM D5712-15 และ EN 455-5 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 ทั้งนี้พบว่าความแม่นยำของการทดสอบตามมาตรฐาน ASTM D5712-15 และ EN 455-3 มีค่า %recovery อยู่ในช่วงร้อยละ 101–104 และ 86–99 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ความเที่ยงและความแม่นยำของการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามมาตรฐาน ASTM D5712-15 และ EN 455-3 ภายใต้สภาวะการทำซ้ำและการทวนซ้ำ

มาตรฐาน	ความเข้มข้นของ fortified sample ($\mu\text{g/mL}$)	สภาวะการทวนซ้ำ (n = 10)			สภาวะการทำซ้ำ (n = 7)		
		ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) [*]	% Recovery	HORRAT	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) [*]	% Recovery	HORRAT
ASTM D5712-15	10	10.245 $\pm$ 1.2	102.5	1.0	10.305 $\pm$ 0.5	103.1	0.4
	30	31.057 $\pm$ 1.4	103.5	0.5	30.733 $\pm$ 1.5	102.4	0.5
	55	56.552 $\pm$ 2.9	102.8	0.6	55.633 $\pm$ 4.1	101.2	0.8
EN 455-3	10	9.438 $\pm$ 0.9	94.4	0.8	9.422 $\pm$ 0.6	94.2	0.6
	50	49.346 $\pm$ 4.6	98.7	1.1	47.963 $\pm$ 4.9	95.9	1.1
	95	81.652 $\pm$ 3.0	86.0	0.5	83.240 $\pm$ 7.3	87.6	1.1

หมายเหตุ: ^{*}คือ ความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ยที่วัดได้ของ fortified sample ซึ่งผ่านการหาค่าความเข้มข้นในตัวอย่างถุงมือ

ศึกษาเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างถุงมืออย่างทางการแพทย์ระหว่างนักวิเคราะห์ (intra-laboratory comparison) จากผลการทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ พบว่าผลการทดสอบปริมาณโปรตีนระหว่างนักวิเคราะห์ทั้งสองตามมาตรฐานสากล ASTM

D5712-15 และ EN 455-3 มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากการประเมินด้วยสถิติ paired t-test ที่ df เท่ากับ 9 เนื่องจากค่า $t_{\text{cal}} < t_{\text{crit}}$ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในถุงมืออย่างทางการแพทย์ระหว่างนักวิเคราะห์ ทดสอบตามมาตรฐาน ASTM D5712-15 และ EN 455-3 ด้วยสถิติ paired t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (df = 9)

มาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยของโปรตีน ($\mu\text{g/dm}^2$) (n = 10)		t_{cal}	t_{crit}
	นักวิเคราะห์คนที่ 1	นักวิเคราะห์คนที่ 2		
ASTM D5712-15	198.4 $\pm$ 29.6	188.5 $\pm$ 13.2	1.028	2.262
EN 455-3	44.3 $\pm$ 5.5	42.4 $\pm$ 5.5	0.653	

ศึกษาเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างถุงมืออย่างทางการแพทย์ระหว่างมาตรฐาน ASTM D5712-15 และ EN 455-3 โดยสุ่มทดสอบถุงมือ จำนวน 3 ตัวอย่าง พบว่าผลการทดสอบระหว่าง

มาตรฐานสากลทั้งสองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากการประเมินผลด้วยสถิติ paired t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และ df เท่ากับ 7 เนื่องจากค่า $t_{\text{cal}} < t_{\text{crit}}$ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในถุงมือยางทางการแพทย์ ทดสอบตามมาตรฐาน ASTM D5712-15 และ EN 455-3 ด้วยสถิติ paired t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (df = 7)

ถุงมือทางการแพทย์	ค่าเฉลี่ยของโปรตีน ($\mu\text{g}/\text{dm}^2$) (n = 8)		t_{cal}	t_{crit}
	ASTM D5712-15	EN 455-3		
ตัวอย่างถุงมือที่ 1	49.7 $\pm$ 4.1	53.6 $\pm$ 4.6	1.819	
ตัวอย่างถุงมือที่ 2	166.5 $\pm$ 5.6	198.6 $\pm$ 16.2	1.864	2.365
ตัวอย่างถุงมือที่ 3	356.4 $\pm$ 3.7	385.7 $\pm$ 28.8	2.219	

วิจารณ์

วิธีโลว์รีดัดแปรเป็นหนึ่งในวิธีมาตรฐานที่นิยมใช้ในการตรวจหาปริมาณของโปรตีนตามมาตรฐาน ASTM D5712-15 และ EN 455-3 ในประเทศสหรัฐอเมริกาและกลุ่มประเทศยุโรป ซึ่งใช้หลักการของวิธีโลว์รีดัดแปรและเทคนิคการวัดสีเป็นแนวทางสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากยางธรรมชาติ วัสดุที่ใช้ในกระบวนการตรวจวัดต้องเป็นวัสดุที่ทำจากพลาสติกโพลีโพรพิลีน (polypropylene; PP) หรือพลาสติกโพลีสไตรีน (polystyrene; PS) เพื่อป้องกันการดูดซับของโปรตีน เนื่องจากโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนและโครงสร้างของกรดอะมิโนประกอบด้วยหมู่เอมีน ($-\text{NH}_2$) และกรดคาร์บอกซิลิก ($-\text{COOH}$) จึงทำให้มีคุณสมบัติเป็น amphiphilic มีทั้งส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และชอบน้ำ (hydrophilic) ทำให้โปรตีนมีแนวโน้มที่จะดูดซับบนพื้นผิวของวัสดุผ่านแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction)⁽¹⁹⁾ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพื้นผิวที่เป็นแก้วมีผลอย่างมากต่อการดูดซับของโปรตีน ดังนั้นเพื่อป้องกันการดูดซับของโปรตีนบนพื้นผิวของวัสดุทดสอบ จึงใช้วัสดุที่ทำจากพลาสติกชนิด PP หรือ PS ซึ่งมีคุณสมบัติในการดูดซับโปรตีนต่ำ และเพื่อยืนยันว่ารุ่น/ยี่ห้อของวัสดุพลาสติกที่นำมาใช้เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน จึงตรวจสอบความสามารถในการยึดจับโปรตีนของวัสดุดังกล่าว โดยวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ผ่านวัสดุทดสอบเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนอ้างอิง ผลการทดสอบยืนยันว่ารุ่นหรือยี่ห้อของวัสดุพลาสติกที่ใช้ในการศึกษานี้มีความสามารถในการดูดซับโปรตีนต่ำ

กระบวนการทดสอบด้วยวิธีโลว์รีดัดแปร เริ่มจากการสกัดโปรตีนที่ละลายได้ในน้ำจากผลิตภัณฑ์ถุงมือทางการแพทย์ จากนั้นตกตะกอนโปรตีนด้วยกรด (acid precipitation) เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนและแยกโปรตีนออกจากสารอื่นๆ ที่ละลายน้ำได้ ซึ่งอาจจะรบกวนการวิเคราะห์ ได้แก่ สารลดแรงตึงผิว (surfactants) สารเร่งปฏิกิริยา (accelerators) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) เป็นต้น⁽²⁰⁾ เนื่องจาก isoelectric point (pI) ของโปรตีนมีค่าอยู่ระหว่าง 4-7 เมื่อเติมกรดลงไปในการละลายจะทำให้ค่า pH ลดลง เมื่อค่า pH เท่ากับ pI จะทำให้ประจุรวมเท่ากับศูนย์ แรงผลักระหว่างประจุลดลงส่งผลให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (conformational changes) และตกตะกอน⁽²¹⁾ หากสภาวะในการตกตะกอนไม่เหมาะสมอาจทำให้โปรตีนสูญเสียระหว่างการทดสอบ ส่งผลต่อเนื่องให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อน จึงตรวจสอบกระบวนการตกตะกอน พบว่า %recovery ลดลงเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้น โดยลดลงเกือบถึงร้อยละ 80 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบผ่านเกณฑ์กำหนดที่ระบุว่า %recovery ไม่ควรน้อยกว่าร้อยละ 80 ที่ความเข้มข้นของโปรตีนต่ำกว่าหรือเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร⁽²²⁾ บ่งชี้ว่ามีโปรตีนสูญเสียในระดับที่ยอมรับได้ ยืนยันว่าสภาวะที่ใช้ในกระบวนการตกตะกอนเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์โปรตีน

จากผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์โปรตีน พบว่าสารละลายโปรตีนมีสีน้ำเงินอมเขียวและความเข้มข้นของสารละลายเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของโปรตีน เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยา

รีดอกซ์ (redox reaction) โดยหมู่อะมิโนของโปรตีนส่วนใหญ่ คือ tyrosine, tryptophan และ cysteine⁽²³⁾ จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ในสภาวะต่างทำให้ไนโตรเจนของพันธะเปปไทด์จับกับไอออนของทองแดง (Cu^{2+}) ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ของสาร Folin-Ciocalteu's phenol เกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ heteropolymolybdenum blue ซึ่งมีสีน้ำเงินอมเขียว ทำให้สามารถตรวจวัดด้วยเทคนิคการวัดสี โดยใช้เครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร⁽²⁴⁻²⁶⁾

การศึกษานี้ได้ทดสอบตามมาตรฐาน EN 455-3 ซึ่งช่วงความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 1-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กว้างกว่ามาตรฐาน ASTM D5712-15 ที่มีช่วงความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 1-60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คาดว่าเป็นผลมาจากความเข้มข้นของ NaOH เนื่องจากสาร NaOH มีหน้าที่หลักในการทำให้สารละลายมีสภาพเป็นด่าง ส่งผลให้อะตอมของไฮโดรเจน (H atom) หลุดออก และไนโตรเจนของพันธะเปปไทด์จับกับ Cu^{2+} เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถเร่งปฏิกิริยารีดักชันของสาร Folin-Ciocalteu's phenol ต่อไป หากใช้ NaOH ความเข้มข้นสูงจะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเร็วขึ้น ส่งผลให้สีของสารละลายเข้มกว่าในระดับความเข้มข้นเดียวกัน นอกจากนี้อาจมี NaOH ส่วนเกินทำปฏิกิริยากับ Cu^{2+} กลายเป็น copper hydroxide รบกวนการเกิดเป็นสารเชิงซ้อนระหว่าง Cu^{2+} กับโปรตีน⁽²⁷⁾ ทำให้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการทดสอบตามมาตรฐาน EN 455-3 กว้างกว่า เนื่องจากใช้ความเข้มข้นของ NaOH น้อยกว่ามาตรฐาน ASTM D5712-15 ถึง 2 เท่า จากการคำนวณและยืนยันผล LOD พบว่า LOD ของการทดสอบตามมาตรฐาน ASTM D5712-15 และ EN 455-3 เท่ากับ 1.8 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่ผลการคำนวณและยืนยัน LOQ พบว่า LOQ ของทั้งสองมาตรฐานมีค่าเท่ากันที่ 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นช่วงความเข้มข้น 5-60 และ 5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงนำมาใช้สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีนในถุงมือทางการแพทย์ตามมาตรฐาน ASTM D5712-15

และ EN 455-3 ตามลำดับ เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องสูง

จากผลการทวนสอบความเที่ยงและความแม่นยำของวิธีโลว์รีดัดแปรตามมาตรฐาน ASTM D5712-15 และ EN 455-3 ภายใต้สภาวะการทำซ้ำและสภาวะการทวนซ้ำ พบว่าค่า HORRAT น้อยกว่า 2.0 บ่งชี้ว่าวิธีการทดสอบมีความถูกต้องสูง^(17,18) สามารถประยุกต์ใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับทดสอบหาปริมาณโปรตีนในถุงมือทางการแพทย์ จากการศึกษาเปรียบเทียบผลการทดสอบปริมาณโปรตีนระหว่างนักวิเคราะห์ตามมาตรฐาน ASTM D5712-15 และ EN 455-3 พบว่าความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างถุงมือทางการแพทย์ที่ทดสอบระหว่างนักวิเคราะห์ทั้งสอง จำนวน 10 ซ้ำ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของปริมาณโปรตีนในตัวอย่างถุงมือทางการแพทย์จากการวิเคราะห์ตามมาตรฐานสากลทั้งสอง พบว่าค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของโปรตีนในถุงมือทั้ง 3 ตัวอย่าง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน

สรุป

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในถุงมือทางการแพทย์ด้วยวิธีโลว์รีดัดแปรตามมาตรฐานสากล ASTM D5712-15 และ EN 455-3 ได้รับการทวนสอบตามขั้นตอนอย่างเหมาะสม วัสดุที่ใช้ในกระบวนการทดสอบมีความสามารถในการดูดซับโปรตีนต่ำ เหมาะสมกับการนำมาใช้วิเคราะห์โปรตีน อีกทั้งสภาวะที่ใช้ในกระบวนการตกตะกอนไม่ทำให้โปรตีนสูญเสีย ทำให้เพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนและกำจัดสารที่อาจรบกวนการวิเคราะห์ได้ ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าช่วงความเป็นเส้นตรงที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 5-60 และ 5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับมาตรฐาน ASTM D5712-15 และ EN 455-3 ตามลำดับ ผลการทวนสอบความเที่ยงและความแม่นยำทั้งภายใต้สภาวะการทำซ้ำและการทวนซ้ำ มีค่า HORRAT และ %recovery เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับสากล ยืนยันว่าการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในถุงมือทางการแพทย์ด้วยวิธีโลว์รีดัดแปรตามวิธีมาตรฐานทั้งสองมีความถูกต้อง เมื่อทำการทดสอบหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง

ถุงมือยางทางการแพทย์ เปรียบเทียบระหว่างนักวิเคราะห์ ภายใต้ห้องปฏิบัติการเดียวกัน พบว่าผลการทดสอบที่ได้ มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และผลการวิเคราะห์ โปรตีนในตัวอย่างถุงมือทางการแพทย์เปรียบเทียบกับ มาตรฐาน ASTM D5712-15 และ EN 455-3 มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงสามารถเลือกใช้ มาตรฐานทั้งสองสำหรับวิเคราะห์ระดับโปรตีนในถุงมือ เพื่อคุ้มครองผู้บริโภคภายในประเทศ และรับรองปริมาณ โปรตีนเพื่อสนับสนุนอุตสาหกรรมส่งออกถุงมือยาง ทางทางการแพทย์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้การ สนับสนุนงบประมาณภายใต้โครงการพัฒนางานทาง ห้องปฏิบัติการเคมีสำหรับทดสอบปริมาณแป้งและ โปรตีนในถุงมือยางทางการแพทย์ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2567 และขอขอบคุณบุคลากรกลุ่มเครื่องมือแพทย์ สำนักงานรังสีและเครื่องมือแพทย์ ที่ให้คำปรึกษาและ ช่วยเหลือในการวางแผนงานจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. กองควบคุมเครื่องมือแพทย์ สำนักงานคณะกรรมการ อาหารและยา. หลักเกณฑ์การจัดประเภทเครื่องมือ แพทย์ตามความเสี่ยง. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนัก พิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนดี้ไซน์; 2561.
2. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 538-2560 ถุงมือยางปราศจากเชื้อสำหรับการศัลยกรรมชนิดใช้ ครั้งเดียว. กรุงเทพฯ: สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์ อุตสาหกรรม; 2560.
3. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1056 เล่ม 1-2556 ถุงมือสำหรับการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ ชนิดใช้ครั้งเดียว เล่ม 1: เกณฑ์กำหนดสำหรับถุงมือ ที่ทำจากน้ำยางหรือสารละลายยาง. กรุงเทพฯ: สำนักงาน มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม.; 2556.
4. ISO 10282:2023 Single-use sterile rubber surgical gloves – Specification. 4th ed. Geneva: International Organization for Standardiza- tion; 2023.
5. ISO 11193-1:2020 Single-use medical examination gloves–Specification for gloves made from rubber latex or rubber solution. 3rd ed. Geneva: International Organization for Standardization; 2020.
6. ASTM D3577-19 Standard specification for rubber surgical gloves. West Conshohocken, PA: American Society for Testing and Material; 2019.
7. ASTM D3578-19 Standard specification for rubber examination gloves. West Conshohocken, PA: American Society for Testing and Materials; 2019.
8. สำนักงานส่งเสริมการค้าในต่างประเทศ. รายงานตลาด สินค้าถุงมือยางในสหรัฐอเมริกา. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 24 พ.ค. 2567]; [16 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www.ditp.go.th/contents_at-tach/613885/613885.pdf.
9. นาดยา โชติกุล. การวิเคราะห์ความสามารถในการ ส่งออกยางพาราของผู้ประกอบการจังหวัดสงขลา. ว สดคมศาสตร์และวัฒนธรรม 2566; 7(4): 128-44.
10. สถาบันพลาสติก. บทวิเคราะห์เรื่อง โอกาสของถุงมือ ทางทางการแพทย์จากน้ำยางธรรมชาติในสถานการณ์ โรค ระบาดโควิด19. โครงการพัฒนาระบบฐานข้อมูลเชิงลึก อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ยางและไม้ยางพารา. [ออนไลน์]. [สืบค้น 24 พ.ค. 2567]; [15 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://rubber.oie.go.th/box/Article/64178/บทวิเคราะห์%20โอกาสของถุงมือทางการแพทย์จากน้ำยางธรรมชาติในสถานการณ์โรคระบาด โควิด19.pdf>.
11. Wu M, McIntosh J, Liu J. Current prevalence rate of latex allergy: Why it remains a problem? J Occup Health 2016; 58(2): 138-44.
12. Sussman GL, Beezhold DH, Kurup VP. Allergens and natural rubber proteins J Allergy Clin Immunol 2002; 110(2 Suppl): S33-9.
13. Drake K. Illinois bans latex gloves for food service workers. Health news. [online]. 2023; [cited 2024 May 24]; [1 screen]. Available from: URL: <https://healthnews.com/news/illinois-bans-latex-gloves-for-food-service-workers>.

14. ASTM D5712-15 Standard test method for analysis of aqueous extractable protein in latex, natural rubber, and elastomeric products using the modified Lowry method. West Conshohocken, PA: American Society for Testing and Materials; 2015.
15. BS EN 455-3:2015 Medical gloves for single use Part 3: Requirements and testing for biological evaluation. London: The British Standards Institution; 2015.
16. จัตรพงศ์ งามโชควัฒนา, เนสินี ไชยเอื้อย. สถานการณ์ของภาวะแพ้โปรตีนลาเท็กซ์ในอุ้งมือยางทางการแพทย์ของบุคลากรสุขภาพและแนวทางป้องกันในปัจจุบัน. ศรีนครินทร์เวชสาร 2566; 38(2): 187-96.
17. Magnusson B, Örnemark U, editors. The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. Middlesex, UK: Eurachem; 2014.
18. FAO/WHO. Codex alimentarius commission procedural manual. 27th ed. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2019.
19. Zheng K, Kapp M, Boccaccini AR. Protein interactions with bioactive glass surfaces: a review. Appl Mater Today 2019; 15: 350-71.
20. ปริญญา มาสวัสดิ์, ยุทธพงษ์ อุดแน่น. การพัฒนาวิธีการหาปริมาณโปรตีนในน้ำยางพารา โดยใช้เครื่องวัดค่าความเข้มของการกระเจิงแสงที่ได้ออกแบบขึ้น. วมหวิทยาลัยนเรศวร:วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2554; 7(2): 30-44.
21. Novák P, Havlíček V, editors. Protein extraction and precipitation. In: Ciborowski P, Silberring J, editors. Proteomic profiling and analytical chemistry. 2nd ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; 2016. p. 51-62.
22. ISO 12243:2003 Medical gloves made from natural rubber latex-Determination of water-extractable protein using the modified Lowry method. Geneva: International Organization for Standardization; 2003.
23. Everette JD, Bryant QM, Green AM, Abbey YA, Wangila GW, Walker RB. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. J Agric Food Chem 2010; 58(14): 8139-44.
24. Chapter 9-Quantification and analysis of proteins. In: Shen CH. Diagnostic molecular biology. 2nd ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; 2023. p. 231-257.
25. Ford L, Theodoridou K, Sheldrake GN, Walsh PJ. A critical review of analytical methods used for the chemical characterization and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds. Phytochem Anal 2019; 30(6): 587-99.
26. Rodger A, Sanders K. UV-visible absorption spectroscopy, biomacromolecular applications. In: Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry. 3rd ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; 2017. p. 495-502.
27. Siltanen P, Kekki M. Determination of protein by the biuret reaction using cupric hydroxide suspension reagent. Scand J Clin Lab Invest 1960; 12(2): 228-34.

Method Verification of the Modified Lowry Assay for Determination of Protein in Medical Gloves

Preeyanut Butmee, Veenus Pathamat, Wanida Ponwongsa, and Pornthep Chancunapas
Bureau of Radiation and Medical Devices, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Thailand is a leader in manufacturing and export of medical gloves made from natural rubber. Unfortunately, the protein content of natural rubber latex products can cause allergies in some latex-sensitive individuals. Thus, American Society for Testing and Materials prescribes a method for detecting residual protein in finished gloves, which recommended a maximum limit of 200 $\mu\text{g}/\text{dm}^2$. The objective of this work is to study and verify the modified Lowry methods for protein analysis in accordance with the ASTM D5712-15 and EN 455-3 standards, which aimed not only to protect customer safety but also to encourage the rubber glove export industry. The measurements relied on a colorimetric analysis as a consequence of the reactivity of proteins with Cu^{2+} and Folin reagent in an alkaline condition, producing blue-colored products that can be measured using 750 nm spectrophotometer. Protein binding capacity of the materials used throughout the work, the precipitation processes, and analytical performance characteristics of the methods were sequentially investigated. The verified ASTM results demonstrated linearity from 5–60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with a LOD and a LOQ of 1.8 and 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Meanwhile, the linear range of 5–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with the LOD of 2.0 and the LOQ of 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were received according to the EN standard. Furthermore, the precision and trueness of these two methods were assessed. The HORRAT values were less than 2.0 and the recovery percentages were found as 101–104% and 86–99% for ASTM and EN standards, respectively. In conclusion, the standard testing is appropriately verified and can be applied to detect the protein content in medical gloves, leading to further expanding the scope of services to promote the medical rubber gloves in the country.

Keywords: Protein, Modified lowry method, Medical gloves, Natural rubber latex, Colorimetric analysis