บทที่ 3

ผลและการอภิปรายผล

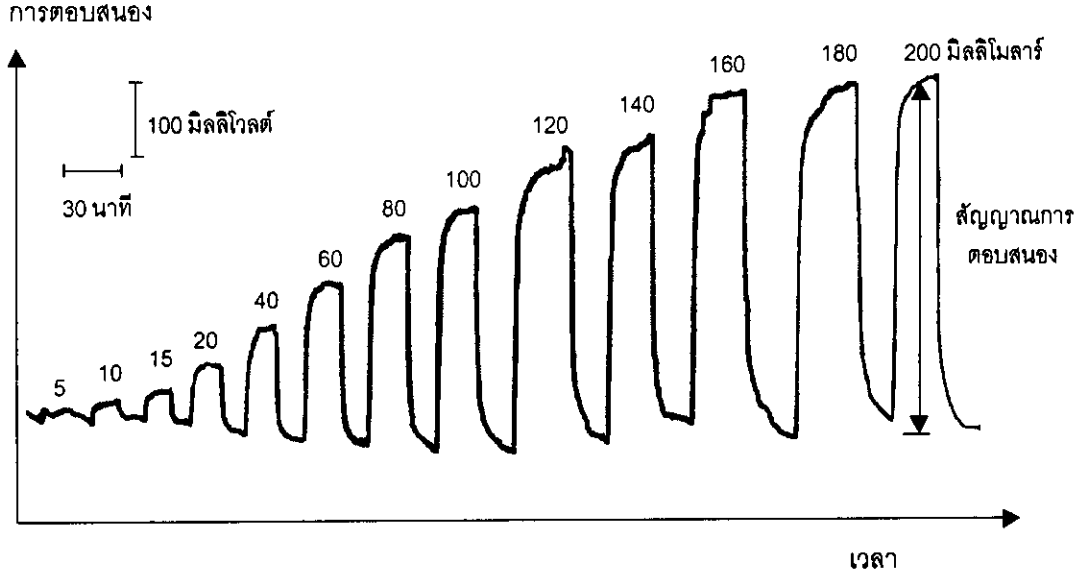
3.1 ลักษณะของสัญญาณการตอบสนอง

3.1.1 การตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์แบบคงที่

ในระบบเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ หากสารละลายซูโครสยังไม่ผ่านเอนไซม์รีแอกเตอร์ จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ วงจรวีตสโตนบริดจ์จะอยู่ในสภาวะสมดุล ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่เท่ากับศูนย์ และสัญญาณที่ได้มีลักษณะเป็นเส้นตรง เรียกว่าระดับอ้างอิงหรือเบสไลน์ เมื่อสารละลายตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านเอนไซม์รีแอกเตอร์สารละลายตัวอย่างจะถูกเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยเอนไซม์อินเวอร์เทสสภาวะตรึงทำให้เกิดความร้อนและมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ สามารถตรวจวัดได้โดยเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัด ในรูปของความต่างศักย์ไฟฟ้าของวงจรวีตสโตนบริดจ์ ขณะที่วงจรบริดจ์ไม่สมดุลโดยที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น

ภาพประกอบ 13 แสดงลักษณะการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อินเวอร์เทสต่อการผ่านสารละลายซูโครสอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราการไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที หลังจากผ่านสารละลายซูโครสเข้าไปในระบบวิเคราะห์ ต้องใช้เวลาประมาณ 6-8 นาที จึงจะเห็นการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณ โดยค่าศักย์ไฟฟ้าจะเพิ่มขึ้นเมื่อเอนไซม์เริ่มตอบสนอง ระยะเวลานี้คือเวลาที่สารละลายใช้ในการเคลื่อนที่ในระบบไหลผ่านจนเกิดปฏิกิริยาที่เอนไซม์รีแอกเตอร์อินเวอร์เทสจนถึงเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัด หลังจากนั้นอีก 3-5 นาที ขึ้นกับความเข้มข้นของซูโครส (ตาราง 2) สัญญาณจะเข้าสู่สภาวะคงที่ ช่วงนี้คือเวลาการตอบสนอง จากนั้นจึงผ่านสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ หลังจากผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ต้องใช้เวลา 6-8 นาที สัญญาณจึงเริ่มกลับคืนสู่เบสไลน์ เวลาช่วงนี้คือเวลาที่สารละลายบัฟเฟอร์เคลื่อนที่ถึงเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัด หลังจากนั้นสัญญาณจะกลับสู่เบสไลน์ภายใน 5-20 นาที (เวลาล้าง) โดยเวลาล้างจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายซูโครสสูงขึ้น เนื่องจากที่ความเข้มข้นสูงๆ มีปริมาณสารละลายซูโครสผ่านเอนไซม์รีแอกเตอร์มาก ต้องใช้เวลามากจึงจะสามารถล้างสารละลายซูโครสได้หมด ดังนั้นการผ่านสารละลายแบบคงที่นี้จะใช้เวลาวิเคราะห์ประมาณ 20-40 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง สำหรับขนาดของสัญญาณการตอบสนองพบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารละลายซูโครสเพิ่มขึ้นสัญญาณการตอบสนองก็จะเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ถ้าความเข้มข้นของสารละลาย

ซูโครสมากจะมีความร้อนเกิดมาก (ค่าศักย์ไฟฟ้าเพิ่มขึ้น) และจากภาพประกอบ 14 จะเห็นว่าช่วงความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่ให้การตอบสนองเชิงเส้น คือ 10-100 มิลลิโมลาร์ โดยมีค่าความไววิเคราะห์ 0.3952 มิลลิโวลต์ต่อมิลลิโมลาร์ และค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง 0.9971

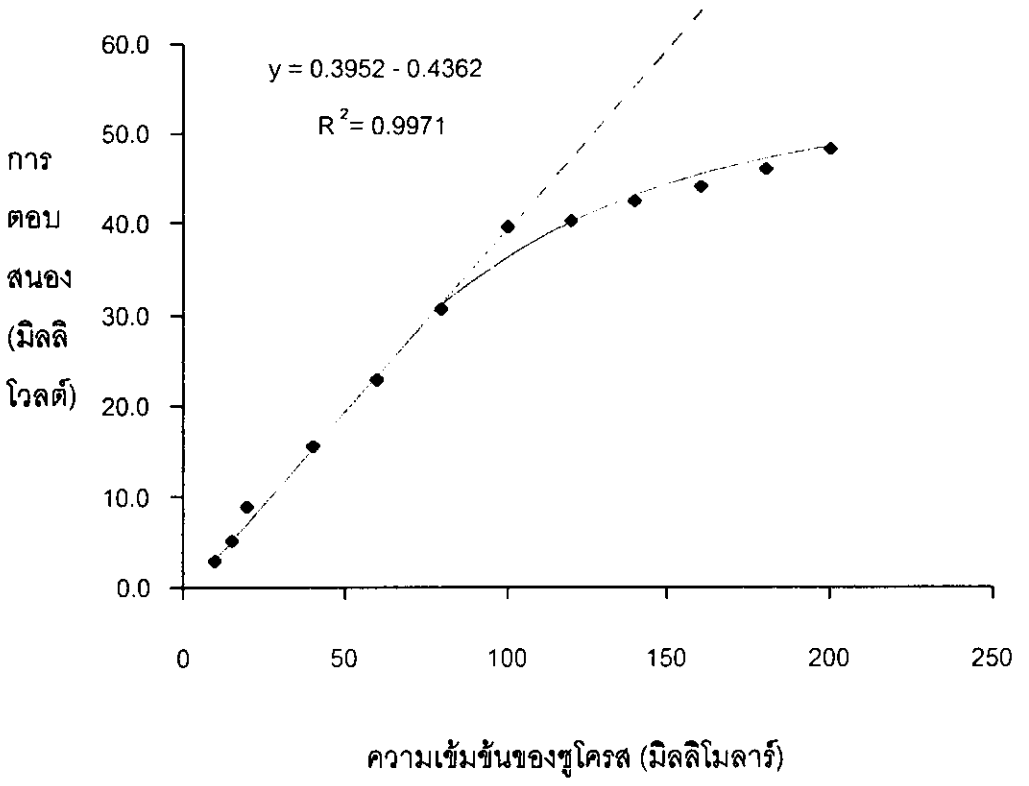


ภาพประกอบ 13 สัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ เมื่อผ่านสารละลายซูโครสแบบต่อเนื่อง ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที

ตารางที่ 2 ช่วงเวลาต่างๆ และการตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ เมื่อผ่านสารละลายซูโครสแบบต่อเนื่อง ด้วยอัตราการไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที

ความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)	เวลาการตอบสนอง (นาที.วินาที)	เวลาล้าง (นาที.วินาที)	เวลาวิเคราะห์ (นาที.วินาที)	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์)
1	-	-	-	ND
3	-	-	-	ND
5	1.50	5.00	22.5	1.6
10	1.50	5.00	22.5	2.8
15	2.00	5.50	23.5	5.2
20	2.40	8.25	27.05	8.8
40	2.50	10.00	28.50	15.6
60	3.10	12.35	31.45	22.8
80	3.50	13.50	33.4	29.2
100	4.25	15.00	35.25	38.6
120	4.45	16.30	37.15	40.4
140	4.50	18.00	38.5	42.4
160	5.30	18.45	40.15	44.0
180	5.45	20.00	41.45	46.0
200	5.50	20.40	42.30	48.2

หมายเหตุ ND = วัดไม่ได้ (non detectable)



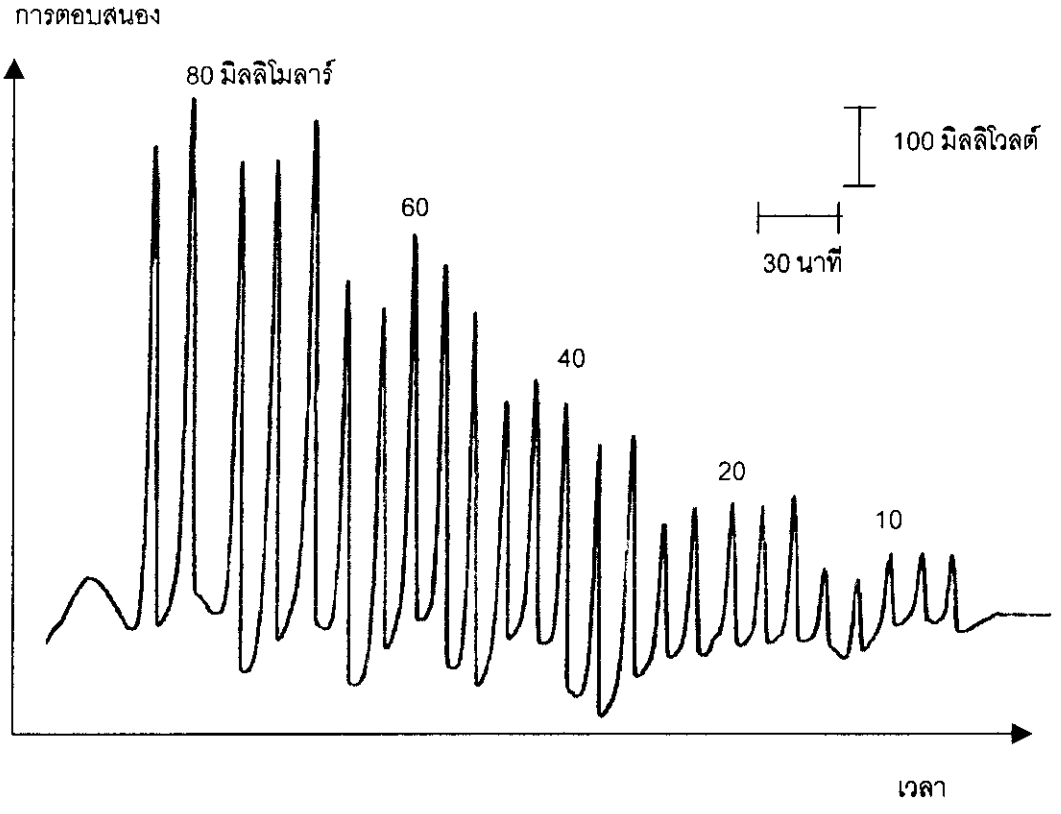
ภาพประกอบ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองกับความเข้มข้นของซูโครส เมื่อผ่านสารละลายซูโครสแบบต่อเนื่อง ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที

3.1.2 การตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์แบบพัลส์

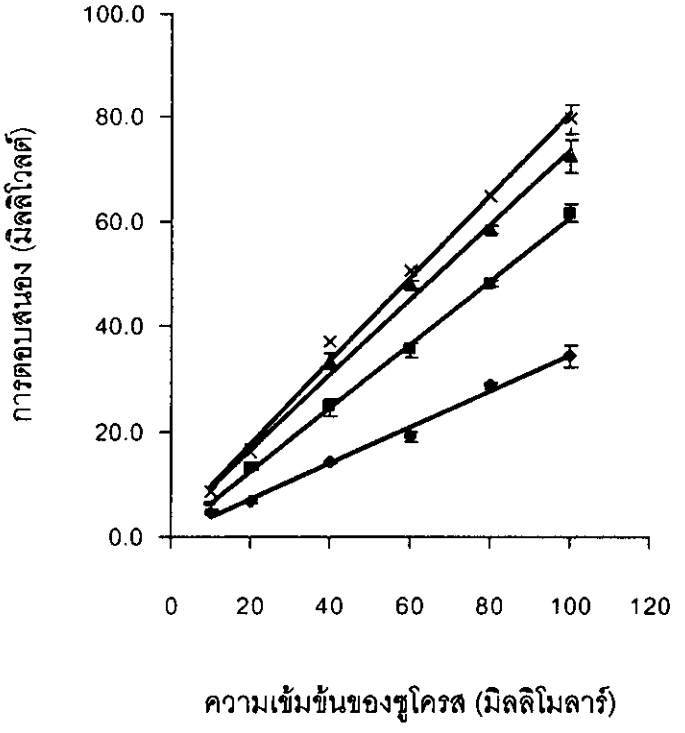
ในการวิเคราะห์สัญญาณการตอบสนองในการทดลอง 3.1.1 นั้นต้องใช้สารละลายซูโครส 4.0-5.0 มิลลิลิตร และใช้เวลา 20-40 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง ดังนั้นเพื่อลดปริมาณของสารละลายและเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ให้น้อยลง จึงเปลี่ยนลักษณะการผ่านสารละลายตัวอย่างเป็นแบบพัลส์ จากการศึกษาเวลาที่เหมาะสมโดยผ่านสารละลายตัวอย่างแบบพัลส์ (2.10.2) โดยผ่านสารละลายซูโครสด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 30 60 90 และ 120 วินาที ทำการทดลองกับสารละลายซูโครสที่มีความเข้มข้น 10 20 40 60 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ พบว่าสัญญาณการตอบสนองจะสูงขึ้น เมื่อเวลาในการผ่านสารละลายซูโครสเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 3 ภาพประกอบ 15 และ 16) เนื่องจากเมื่อใช้เวลาในการผ่านสารตัวอย่างนานขึ้น สารตัวอย่างที่ผ่านเอนไซม์รีแอกเตอร์มีปริมาณมากปฏิกิริยาเกิดได้มากขึ้น โดยที่เวลา 30 วินาทีจะให้สัญญาณการตอบสนองต่ำที่สุด และที่เวลา 120 วินาที จะให้สัญญาณการตอบสนองมากที่สุด ถึงแม้ว่าการผ่านสารตัวอย่างที่เวลา 120 วินาที จะให้ค่าการตอบสนองมากที่สุดแต่ใช้เวลานานมากในการวิเคราะห์ต่อหนึ่งตัวอย่าง เมื่อพิจารณาความไววิเคราะห์ พบว่าในการผ่านสารละลายซูโครส 60 90 และ 120 วินาที ความไววิเคราะห์ไม่มีความแตกต่างกันมากนักแต่ใช้เวลาต่างกันมาก ดังนั้นในการทดลองนี้เลือกเวลาในการผ่านสารละลายซูโครสที่เหมาะสมคือ 60 วินาที ซึ่งใช้เวลาในการวิเคราะห์ 12 นาที ซึ่งน้อยกว่าเมื่อผ่านตัวอย่าง 90 และ 120 วินาที 3 และ 8 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ช่วงเวลาต่างๆ และการตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ ในลักษณะการผ่านสารละลายแบบพัลส์ เป็นเวลา 30 60 90 และ 120 วินาที ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที

ความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์) เมื่อผ่านสารละลายซูโครสที่เวลาต่างๆ			
	30 วินาที	60 วินาที	90 วินาที	120 วินาที
10	4.6 ± 0.2	6.6 ± 1.3	7.9 ± 0.6	8.8 ± 0.8
20	6.8 ± 0.4	13.0 ± 0.2	15.2 ± 0.8	16.0 ± 1.6
40	14.2 ± 0.2	24.6 ± 1.8	33.3 ± 1.4	36.9 ± 0.2
60	19.0 ± 1.0	35.5 ± 1.3	47.9 ± 0.6	50.6 ± 0.2
80	28.8 ± 0.6	48.0 ± 0.6	58.4 ± 0.8	64.8 ± 1.2
100	34.3 ± 2.1	61.6 ± 1.6	72.5 ± 3.2	79.6 ± 2.8
เวลาวิเคราะห์	10	12	15	20
ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อมิลลิโมลาร์)	0.3385	0.6016	0.7168	0.7892
สัมประสิทธิ์ถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง (r^2)	0.9922	0.9988	0.9936	0.9951



ภาพประกอบ 15 สัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์เมื่อผ่านสารละลายซูโครสแบบพัลส์ ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที



ภาพประกอบ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองกับความเข้มข้นของซูโครสเมื่อผ่านสารละลายซูโครสด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 30 60 90 และ 120 วินาที

3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

3.2.1 ระบบไหลผ่านกรณีไม่มีไดอะไลเซอร์

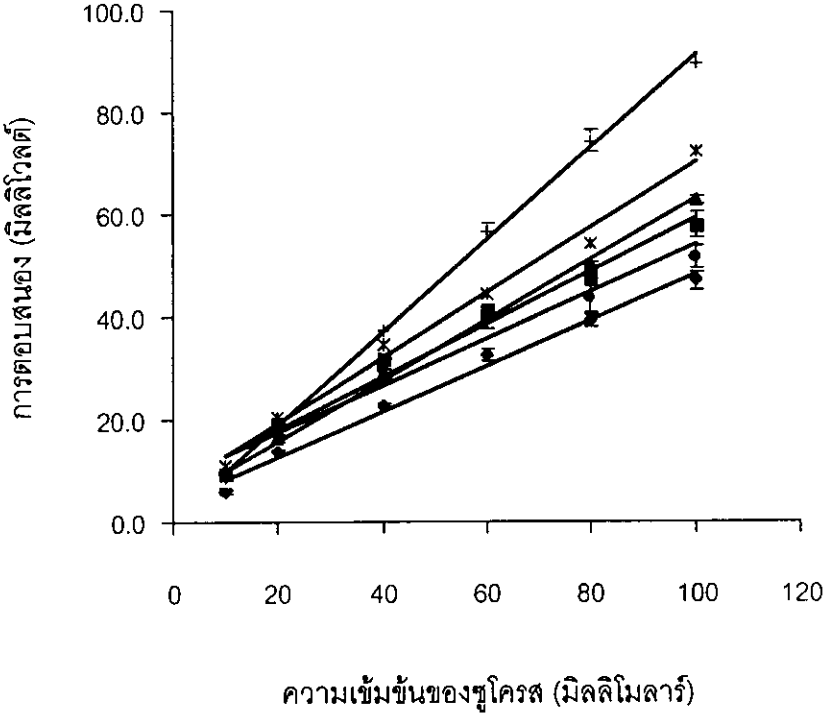
3.2.1.1 เอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดเล็ก ปริมาตร 0.13 ลูกบาศก์เซนติเมตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.40 เซนติเมตร สูง 1.05 เซนติเมตร)

ก. อัตราไหล

จากการศึกษาอัตราไหลของสารละลายตัวอย่าง (2.11.1.1 ก) พบว่าสัญญาณการตอบสนองและค่าความไววิเคราะห์มีค่าสูงสุดที่อัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที (ตาราง 4 ภาพประกอบ 17) ที่อัตราไหลช้า (0.30 มิลลิลิตรต่อนาที) ให้สัญญาณการตอบสนองต่ำกว่า เนื่องจากอัตราไหลที่ช้าเกินไปทำให้สารตัวอย่างเคลื่อนที่เข้าสู่เอนไซม์รีแอกเตอร์ช้าๆ ทีละน้อยทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้ทีละน้อยจะได้พีกของสัญญาณการตอบสนองต่ำแต่กว้าง ส่วนที่อัตราไหลเร็ว (1.00 มิลลิลิตรต่อนาที) ให้สัญญาณการตอบสนองที่ต่ำกว่า เนื่องจากอัตราไหลที่เร็วเกินไปจะทำให้ช่วงเวลาที่สารตัวอย่างอยู่ในเอนไซม์รีแอกเตอร์สั้นมีผลให้ปฏิกิริยาเกิดได้ไม่สมบรูณ์ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้อัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที เนื่องจากให้ค่าสัญญาณการตอบสนองสูงที่สุดและใช้เวลาวิเคราะห์ไม่มากจนเกินไป

ตารางที่ 4 ผลของอัตราไหลต่อการตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ เมื่อผ่านสารละลายซูโครส 500 ไมโครลิตร ในระบบที่ไม่มีไดอะไลเซอร์ เอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดเล็ก

ความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์) ที่อัตราไหลต่างๆ					
	0.30 มิลลิลิตร ต่อนาที	0.40 มิลลิลิตร ต่อนาที	**0.50 มิลลิลิตร ต่อนาที**	0.60 มิลลิลิตร ต่อนาที	0.75 มิลลิลิตร ต่อนาที	1.00 มิลลิลิตร ต่อนาที
10	5.9 ±0.3	7.8 ±0.6	**8.6 ±0.7**	11.0 ±0.6	9.4 ±0.2	9.4 ± 0.4
20	13.8 ±0.2	16.5 ±0.7	**19.2 ±0.7**	20.4 ±0.4	19.2 ±0.8	17.3 ± 0.5
40	22.7 ±0.3	29.0 ±0.7	**37.2 ±0.7**	34.3 ± 1.3	31.9 ±0.3	29.9 ± 2.1
60	32.5 ± 1.1	40.4 ±0.5	**56.6 ± 1.3**	44.2 ± 1.3	40.8 ± 1.1	40.1 ±2.3
80	39.2 ± 1.3	50.2 ±0.5	**74.2 ± 2.1**	54.0 ±0.7	47.9 ± 1.9	43.6 ±2.7
100	47.0 ± 1.8	62.8 ±0.9	**89.4 ±0.9**	72.1± 1.0	57.8 ±2.5	51.5 ±2.2
เวลาวิเคราะห์	20	15	**12**	10	10	8
ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อมิลลิโมลาร์)	0.4457	0.5931	**0.9032**	0.6370	0.5127	0.4551
สัมประสิทธิ์ถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง (r^2)	0.9890	0.9959	**0.9982**	0.9895	0.9790	0.9617



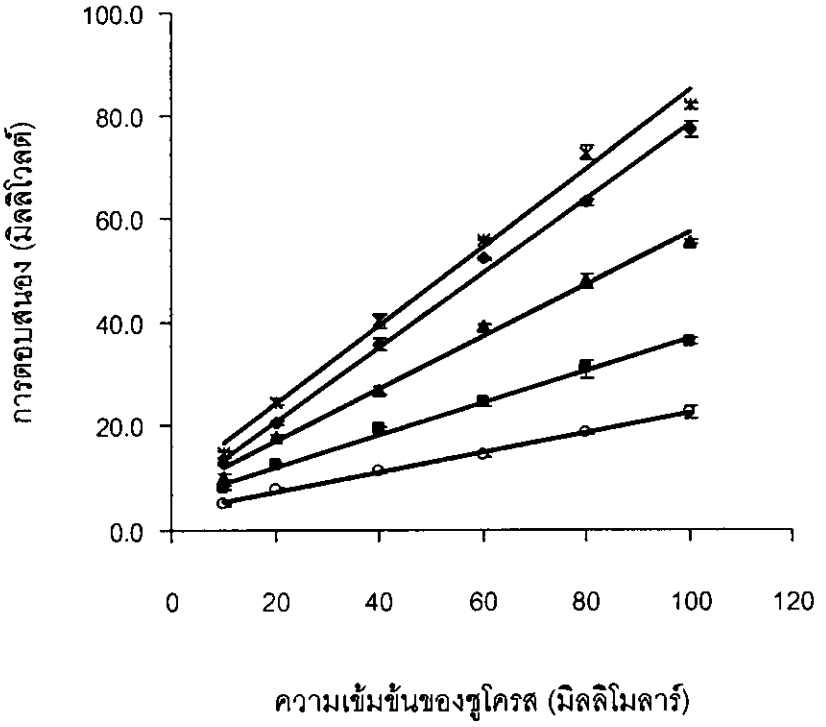
ภาพประกอบ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองกับความเข้มข้นของซูโครส ที่อัตราไหล 0.30 0.40 0.50 0.60 0.75 และ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที โดยผ่านสารละลายซูโครส 500 ไมโครลิตร ในระบบที่ไม่มีไดอะไลเซอร์ เอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดเล็ก

ข. ปริมาตรสารตัวอย่าง

จากการศึกษาผลของปริมาตรสารละลายซูโครส (2.11.1.1ข) โดยผ่านสารละลายซูโครส 200 300 400 500 และ 600 ไมโครลิตร พบว่าสัญญาณการตอบสนองมีค่าสูงขึ้น เมื่อปริมาตรสารละลายมีปริมาตรเพิ่มขึ้น (ตาราง 5 ภาพประกอบ 18) เมื่อปริมาตรสารละลายตัวอย่างน้อยค่าสัญญาณการตอบสนองก็จะน้อย เนื่องจากเมื่อสับสเตรทมีปริมาณน้อยการเกิดปฏิกิริยาก็จะน้อยตามไปด้วย ทำให้ค่าสัญญาณการตอบสนองที่ได้ต่ำ เมื่อเพิ่มปริมาตรของสารละลายตัวอย่างจาก 200 เป็น 300 400 และ 500 ไมโครลิตร การเปลี่ยนแปลงของสัญญาณจะเพิ่มสูงขึ้นมาก แต่ที่ 600 ไมโครลิตร การเปลี่ยนแปลงของสัญญาณที่ได้จะเพิ่มขึ้นจาก 500 ไมโครลิตร มีเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้น่าจะขึ้นอยู่กับความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยา นั่นคือเมื่อปริมาณเอนไซม์คงที่ แม้ว่าจะเพิ่มปริมาตรสารตัวอย่างก็ไม่สามารถเพิ่มการตอบสนองของเอนไซม์ได้ จากการทดลองนี้จึงเลือก 500 ไมโครลิตร เป็นปริมาตรที่เหมาะสม ซึ่งค่าความไววิเคราะห์น้อยกว่า 600 ไมโครลิตร เพียง 6 เปอร์เซ็นต์ แต่ใช้เวลาวิเคราะห์เร็วกว่า 3 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง

ตารางที่ 5 ผลของปริมาณซูโครสต่อการตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ เมื่อผ่านสารละลายซูโครสอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที ในระบบที่ไม่มีไดอะไลเซอร์เอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดเล็ก

ความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์) ที่ปริมาณซูโครสต่างๆ				
	200 ไมโครลิตร	300 ไมโครลิตร	400 ไมโครลิตร	**500 ไมโครลิตร**	600 ไมโครลิตร
10	4.9±0.2	8.0±0.4	10.1±0.6	**12.7±0.2**	14.7±0.6
20	7.7±0.5	13.5±0.2	17.9±0.5	**20.5±0.5**	24.5±0.6
40	11.2±0.4	19.5±0.5	31.2±0.7	**39.6±1.1**	43.5±1.3
60	14.4±0.4	24.3±0.5	39.1±0.6	**52.3±0.2**	60.7±0.2
80	15.3±0.2	30.9±1.7	47.9±1.3	**63.1±0.6**	72.7±1.4
100	16.5±1.2	13.2±0.7	53.2±0.4	**77.1±1.7**	81.7±0.6
เวลาวิเคราะห์	10	10	12	**12**	15
ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อมิลลิโมลาร์)	0.1886	0.3077	0.5036	**0.7159**	0.7593
สัมประสิทธิ์ถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง (r^2)	0.9971	0.9977	0.9926	**0.9966**	0.9928



ภาพประกอบ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองกับความเข้มข้นของซูโครสเมื่อผ่านสารละลายซูโครสปริมาตร 200 300 400 500 และ 600 ไมโครลิตร อัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที ในระบบที่ไม่มีไดอะไลเซอร์ เอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดเล็ก

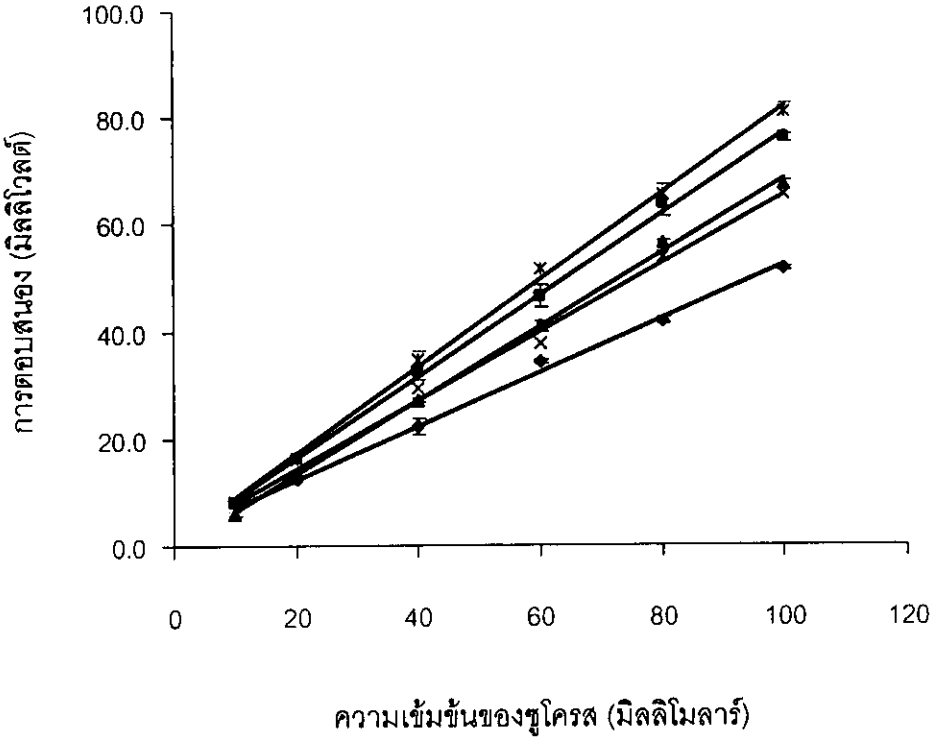
3.2.1.2 เอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดใหญ่ (ปริมาตร 0.92 มิลลิลิตร)
(เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.70 เซนติเมตร สูง 2.40 เซนติเมตร)

ก. อัตราไหล

จากการศึกษาผลของอัตราไหลที่ใช้ในการผ่านสารละลายตัวอย่างเข้าสู่ระบบเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ (2.11.1.2 ก) โดยทำการทดลองที่อัตราไหล 0.30 0.40 0.50 0.75 1.00 และ 1.25 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าสัญญาณการตอบสนองจะสูงสุดที่อัตราไหล 0.75 มิลลิลิตรต่อนาที (ตาราง 6 ภาพประกอบ 19) ในการทดลองนี้เลือกใช้อัตราไหล 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที เนื่องจากมีความไววิเคราะห์น้อยกว่าที่อัตราไหล 0.75 มิลลิลิตรต่อนาที (ซึ่งให้ค่าความไววิเคราะห์สูงสุด) อยู่เพียง 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่าถึง 4 นาที นั่นคือเพียง 8 นาที เทียบกับ 12 นาที

ตารางที่ 6 ผลของอัตราไหลต่อการตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ เมื่อผ่านสารละลายซูโครส 500 ไมโครลิตร ในระบบที่ไม่มีไดอะไลเซอร์ เอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดใหญ่

ความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์) ที่อัตราไหลต่างๆ				
	0.30 มิลลิลิตรต่อนาที	0.50 มิลลิลิตรต่อนาที	0.75 มิลลิลิตรต่อนาที	**1.00 มิลลิลิตรต่อนาที**	1.25 มิลลิลิตรต่อนาที
10	6.3 ±0.5	7.6 ±0.4	8.4 ±0.0	**8.0 ±0.5**	6.1 ±0.6
20	12.5 ±0.2	13.7 ±0.2	16.3 ±0.4	**16.0 ±0.8**	13.5 ±0.2
40	22.2 ±1.4	29.3 ±1.2	34.5 ±1.4	**32.4 ±1.4**	27.1 ±0.2
60	34.1 ±0.5	37.5 ±1.2	51.5 ±2.1	**46.4 ±2.1**	40.8 ±0.8
80	41.9 ±0.5	53.7 ±1.0	65.3 ±2.1	**63.4 ±2.1**	56.3 ±0.5
100	51.5 ±0.5	65.3 ±0.6	80.8 ±0.8	**76.0 ±0.8**	67.2 ±0.8
เวลาวิเคราะห์	20	15	12	**8**	8
ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อมิลลิโมลาร์)	0.4999	0.6406	0.8423	**0.7625**	0.6879
สัมประสิทธิ์ถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง (r^2)	0.9965	0.9951	0.9985	**0.9986**	0.9985



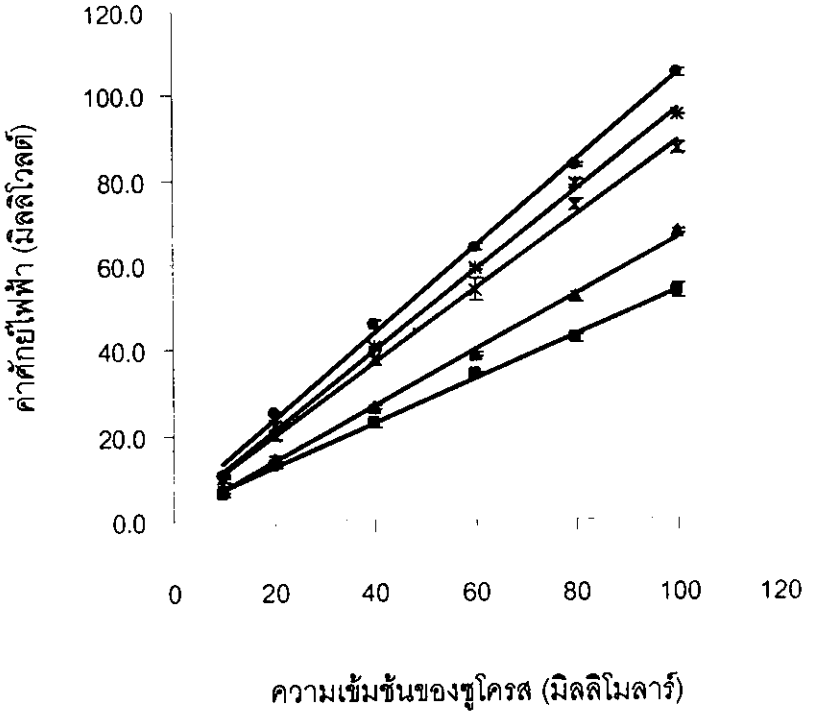
ภาพประกอบ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองกับความเข้มข้นของซูโครส ที่อัตราไหลต่างๆ กัน ในระบบที่ไม่มีไดอะไลเซอร์ เอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดใหญ่

ข. ปริมาตรสารตัวอย่าง

จากการศึกษาผลของปริมาตรของสารละลายซูโครส (2.11.1.2 ข) โดยผ่านสารละลายซูโครส 300 400 500 600 และ 800 ไมโครลิตร พบว่าสัญญาณการตอบสนองมีค่าสูงขึ้นเมื่อสารละลายตัวอย่างมีปริมาตรเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับการทดลอง 3.2.1.1ก (ตาราง 7 ภาพประกอบ 20) ระหว่าง 300 400 และ 500 ไมโครลิตร การตอบสนองจะแตกต่างกันมาก แต่เมื่อเพิ่มปริมาตรสารละลายตัวอย่างเป็น 600 และ 800 ไมโครลิตร การเปลี่ยนแปลงของสัญญาณที่ได้จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย เมื่อพิจารณาจากค่าความไววิเคราะห์ และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อหนึ่งตัวอย่าง ในการทดลองนี้เลือกใช้ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เนื่องจากให้ค่าความไววิเคราะห์ไม่แตกต่างจาก 600 และ 800 ไมโครลิตร มากนักแต่ใช้เวลาน้อยกว่า

ตารางที่ 7 ผลของปริมาณซูโครสต่อการตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์เมื่อผ่านสาระลายซูโครสด้วยอัตราไหล 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที ในระบบที่ไม่มีไดอะไลเซอร์ เอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดใหญ่

ความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์) ที่ปริมาณซูโครสต่างๆ				
	300 ไมโครลิตร	400 ไมโครลิตร	**500 ไมโครลิตร**	600 ไมโครลิตร	800 ไมโครลิตร
10	6.0 ±0.4	7.7 ±0.2	**8.5 ±0.9**	9.6 ±0.8	9.7 ±0.2
20	12.5 ±0.2	14.4 ±0.8	**19.2 ±0.8**	20.0 ±1.2	19.7 ±0.5
40	22.5 ±0.8	26.4 ±0.4	**34.2 ±1.1**	37.9 ±0.2	41.7 ±0.8
60	34.1 ±0.5	38.7 ±0.5	**52.1 ±1.6**	55.5 ±0.4	58.5 ±0.6
80	42.5 ±1.0	52.3 ±1.2	**65.3 ±0.5**	72.4 ±0.7	75.9 ±0.6
100	53.5 ±1.6	67.5 ±0.5	**82.4 ±0.8**	86.6 ±0.0	90.5 ±0.9
เวลาวิเคราะห์	8	8	**8**	10	15
ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อมิลลิโมลาร์)	0.5201	0.6539	**0.8063**	0.8589	0.9304
สัมประสิทธิ์ถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง (r^2)	0.9981	0.9982	**0.9980**	0.9978	0.9953



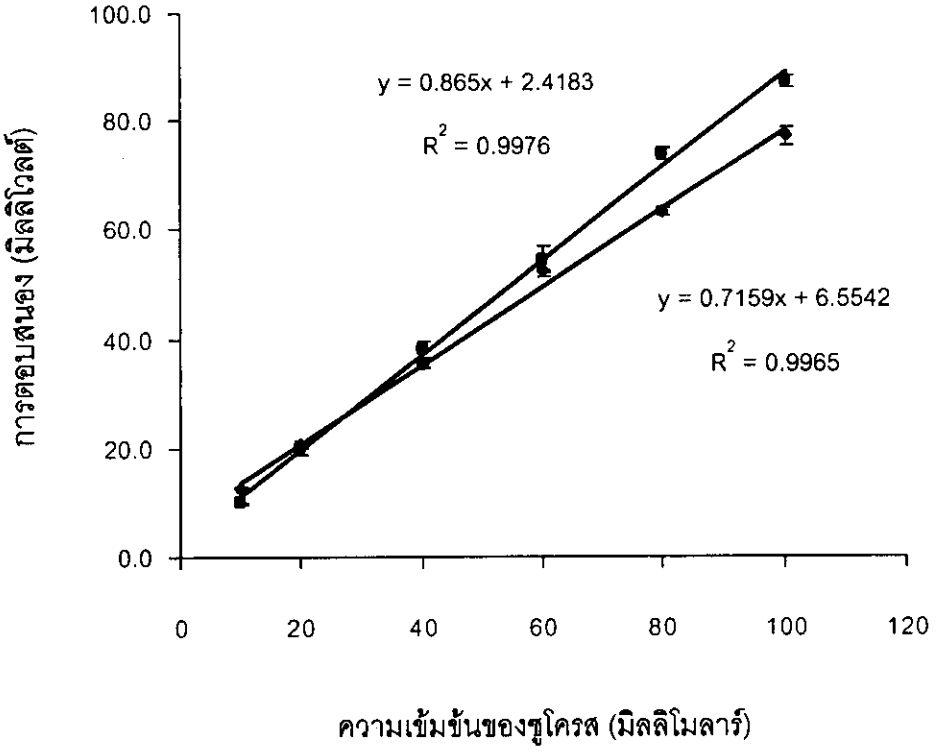
ภาพประกอบ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองกับความเข้มข้นของซูโครส เมื่อผ่านสารละลายซูโครสด้วยปริมาตรต่างๆกัน อัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที ในระบบที่ไม่มีไดอะไลเซอร์ เอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดใหญ่

3.2.1.3 เปรียบเทียบขนาดของเอนไซม์รีแอกเตอร์ ภายในสภาวะที่เหมาะสม

การศึกษาผลของขนาดของเอนไซม์รีแอกเตอร์ (2.11.1.3) พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีปริมาตรต่างกัน เอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีปริมาตรมากกว่า (0.92 ลูกบาศ์กเซนติเมตร) จะให้สัญญาณการตอบสนองสูงกว่าเอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีปริมาตรน้อยกว่า (0.13 ลูกบาศก์เซนติเมตร) เนื่องจากเอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีปริมาตรมากสามารถบรรจุเอนไซม์สภาวะตรึงได้มาก ทำให้ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ในการทดลองนี้เอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีปริมาตรมากจะให้ค่าความไววิเคราะห์มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาในการวิเคราะห์เร็วกว่า 4 นาที (ตาราง 8 ภาพประกอบ 21)

ตารางที่ 8 ผลของขนาดของเอนไซม์รีแอกเตอร์ต่อการตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ ภายในสภาวะที่เหมาะสม

ความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์) เมื่อใช้ขนาดของเอนไซม์รีแอกเตอร์ต่างกัน	
	ปริมาตร 0.13 ลูกบาศก์เซนติเมตร	**ปริมาตร 0.92 ลูกบาศก์เซนติเมตร**
10	12.7±0.2	**9.8 ±0.9**
20	20.5±0.5	**20.0 ±0.8**
40	35.6±1.1	**37.9 ±1.1**
60	52.3±0.2	**54.1 ±1.6**
80	63.1±0.6	**73.8 ±0.5**
100	77.1±1.7	**87.0 ±0.8**
เวลาวิเคราะห์	12	**8**
ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อมิลลิโมลาร์)	0.7159	**0.8650**
สัมประสิทธิ์ถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง (r^2)	0.9965	**0.9976**



ภาพประกอบ 21 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองกับความเข้มข้นของซูโครสเมื่อใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีขนาดต่างกัน ภายในสภาวะที่เหมาะสม

3.2.2 ระบบไหลผ่านที่มีการใช้ได้อะไลเซอร์ขนาดกลาง

(พื้นที่ในการแพร่ 1.5x298.0 ตารางมิลลิเมตร)

3.2.2.1 อัตราไหลที่เหมาะสม

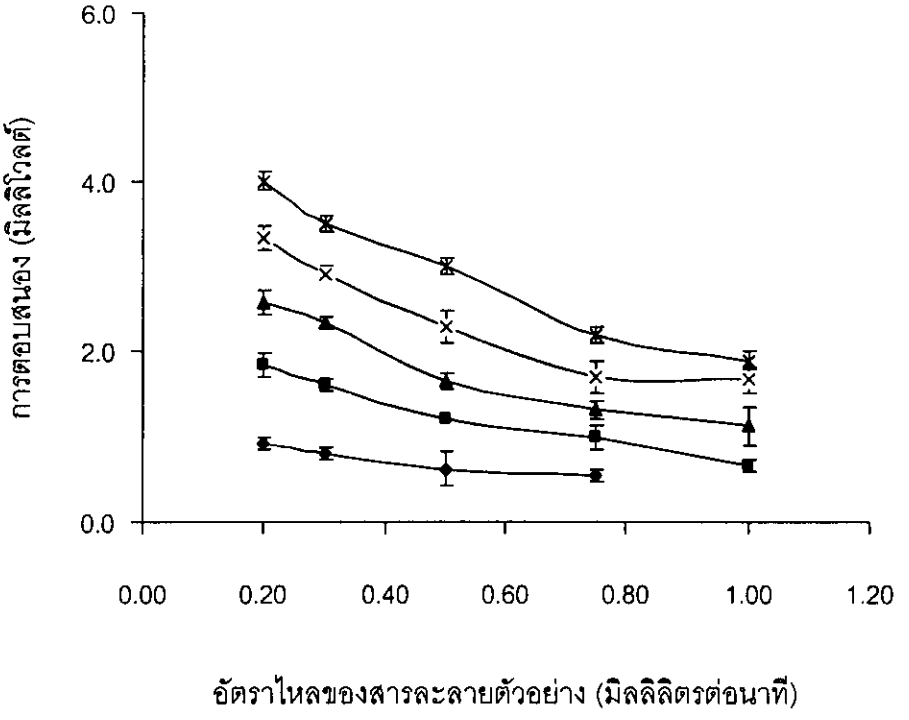
ก. อัตราไหลของสารตัวอย่าง

จากการศึกษาผลของอัตราไหลของสารละลายตัวอย่างในระบบที่มีการใช้ไดอะไลเซอร์ (2.11.2.1 ก) โดยอัตราไหลสารละลายตัวอย่างที่ศึกษาคือ 0.20 0.30 0.40 0.50 และ 0.75 มิลลิลิตรต่อนาที และให้อัตราไหลสารละลายบัฟเฟอร์คงที่ที่ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าสัญญาณการตอบสนองจะมีค่าสูงขึ้น เมื่ออัตราไหลของสารละลายตัวอย่างลดลง (ตาราง 9 ภาพประกอบ 22) ที่อัตราไหล 0.20 มิลลิลิตรต่อนาทีจะให้ค่าการตอบสนองสูงสุด และที่อัตราไหล 0.75 มิลลิลิตรต่อนาที จะให้ค่าการตอบสนองต่ำ เนื่องจากการเคลื่อนที่ของสารละลายตัวอย่างมีผลต่อการแพร่ของโมเลกุลซูโครสจากสารละลายตัวอย่างผ่านไดอะไลซิสเมมเบรน ที่อัตราไหลช้าโมเลกุลของซูโครสจะแพร่ผ่านไดอะไลซิสเมมเบรนได้มากกว่า ค่าการตอบสนองของเอนไซม์ก็จะสูง ในการทดลองนี้พิจารณาเลือกอัตราไหลที่มีความไววิเคราะห์สูง และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างไม่มากนัก อัตราไหลของสารละลายตัวอย่างที่เหมาะสมคือ 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งให้ค่าความไววิเคราะห์ต่ำกว่าที่อัตราไหล 0.20 มิลลิลิตรต่อนาที (ความไววิเคราะห์สูงสุด) เพียง 5 เปอร์เซ็นต์ แต่ใช้เวลาวิเคราะห์น้อยกว่า 2 นาทีต่อตัวอย่าง

ตารางที่ 9 ผลของอัตราไหลของสารละลายตัวอย่างต่อการตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ โดยให้อัตราไหลของสารละลายบัฟเฟอร์คงที่ที่ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที ในระบบที่มีไดอะไลเซอร์ขนาดกลาง

ความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์) ที่อัตราไหลต่างๆ				
	0.20 มิลลิลิตรต่อนาที	**0.30 มิลลิลิตรต่อนาที**	0.40 มิลลิลิตรต่อนาที	0.50 มิลลิลิตรต่อนาที	0.75 มิลลิลิตรต่อนาที
10	ND	ND	ND	ND	ND
50	ND	ND	ND	ND	ND
100	0.9±0.1	**0.8±0.1**	0.6±0.1	0.5±0.1	ND
150	1.4±0.1	**1.2±0.1**	0.9±0.1	0.7±0.1	ND
200	1.8±0.1	**1.6±0.1**	1.2±0.1	1.0±0.1	0.7±0.7
300	2.6±0.1	**2.3±0.1**	1.6±0.1	1.3±0.1	1.1±0.2
400	3.3±0.1	**2.9±0.1**	2.3±0.2	1.7±0.2	1.7±0.1
500	4.0±0.1	**3.5±0.1**	3.0±0.1	2.2±0.1	1.9±0.1
600	4.5±0.1	4.1±0.1	3.3±0.2	2.5±0.1	2.1±0.1
800	5.2±0.1	4.8±0.1	3.7±0.5	3.0±0.2	2.4±0.1
เวลาวิเคราะห์	12	**10**	9	8	8
ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อมิลลิโมลาร์)	0.0076	**0.0067**	0.0056	0.0041	0.0042
สัมประสิทธิ์ถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง (r^2)	0.9971	**0.9953**	0.9944	0.9951	0.9779

หมายเหตุ ND = วัดไม่ได้ (non detectable)



ภาพประกอบ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองกับอัตราไหลของสารละลายตัวอย่าง โดยให้อัตราไหลสารละลายบัฟเฟอร์คงที่ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที ในระบบที่มีไดอะไลเซอร์ขนาดกลาง

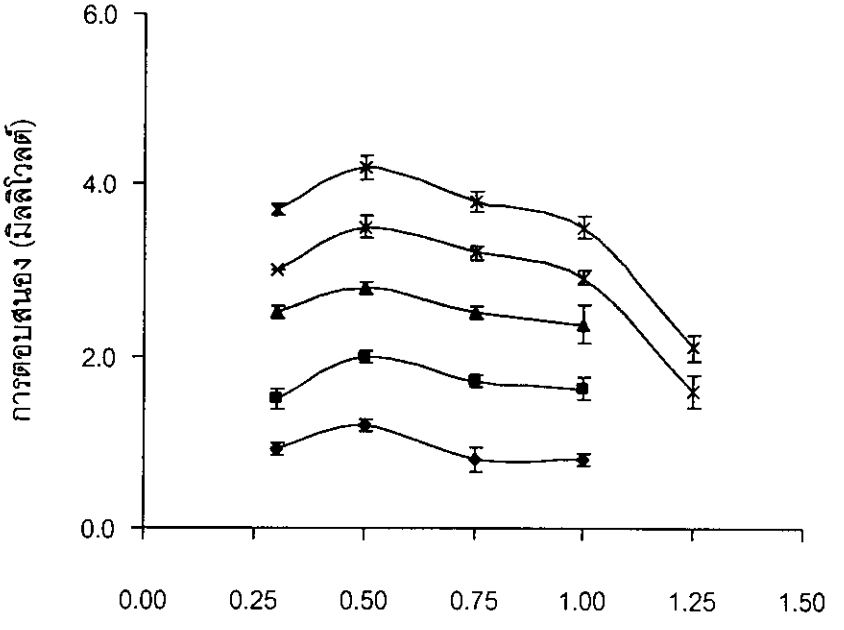
ข. อัตราการไหลของสารละลายบัฟเฟอร์

จากการศึกษาอัตราไหลของสารละลายบัฟเฟอร์ในระบบที่มีไดอะไลเซอร์ขนาดกลาง (2.11.2.1 ข.) อัตราไหลที่ศึกษาคือ 0.30 0.50 0.75 1.00 และ 1.20 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าการตอบสนองสัญญาณจะมีค่าสูงสุด เมื่ออัตราไหลของสารละลายบัฟเฟอร์เท่ากับ 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที (ตาราง 10 ภาพประกอบ 23) เนื่องจากอัตราไหลของสารละลายบัฟเฟอร์มีผลต่อระยะเวลาที่โมเลกุลของซูโครสจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์รีแอกเตอร์อินเวอร์เทส และไหลผ่านไปยังเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัด ดังนั้นที่อัตราไหลช้า (0.30 มิลลิลิตรต่อนาที) จะทำให้เกิดการแพร่กระจายของสารตัวอย่างมากทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้น้อย และที่อัตราไหลเร็วสารตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านเอนไซม์รีแอกเตอร์เร็วเกินไปทำให้ปฏิกิริยาเกิดไม่สมบูรณ์ และการตรวจวัดทำได้ไม่ทัน เมื่อพิจารณาค่าความไววิเคราะห์ พบว่าที่แต่ละอัตราไหลมีความแตกต่างกันไม่มากนัก ในการทดลองนี้เลือกใช้อัตราไหลสารละลายบัฟเฟอร์ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาทีแทนที่จะเป็น 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งให้ค่าการตอบสนองสูงสุด เนื่องจากใช้เวลาวิเคราะห์น้อยกว่าถึง 5 นาทีต่อตัวอย่าง แต่ความไววิเคราะห์น้อยกว่าเพียง 8 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 10 ผลของอัตราไหลสารละลายบัฟเฟอร์ต่อการตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ โดยให้อัตราไหลของสารละลายตัวอย่างคงที่ที่ 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที ในระบบที่มีไดอะไลเซอร์ขนาดกลาง

ความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์) ที่อัตราไหลต่างๆ				
	0.30 มิลลิลิตร ต่อนาที	0.50 มิลลิลิตร ต่อนาที	0.750 มิลลิลิตร ต่อนาที	**1.00 มิลลิลิตร ต่อนาที**	1.25 มิลลิลิตร ต่อนาที
10	ND	ND	ND	**ND**	ND
50	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	**0.5 ± 0.1**	ND
100	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.8 ± 0.1	**0.8 ± 0.1**	ND
200	1.5 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.7 ± 0.1	**1.6 ± 0.1**	ND
300	2.5 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.5 ± 0.1	**2.4 ± 0.2**	ND
400	3.0 ± 0.0	3.5 ± 0.1	3.2 ± 0.1	**2.9 ± 0.1**	1.6 ± 0.2
500	3.7 ± 0.1	4.2 ± 0.1	3.8 ± 0.1	**3.5 ± 0.1**	2.1 ± 0.1
600	4.4 ± 0.3	4.8 ±0 .2	4.5 ± 0.1	**4.5 ± 0.1**	2.8 ± 0.1
เวลาวิเคราะห์	20	15	12	**10**	8
ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อมิลลิโมลาร์)	0.0072	0.0077	0.0071	**0.0071**	-
สัมประสิทธิ์ถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง (r^2)	0.9927	0.9965	0.9944	**0.9950**	-

หมายเหตุ ND = วัดไม่ได้ (non detectable)



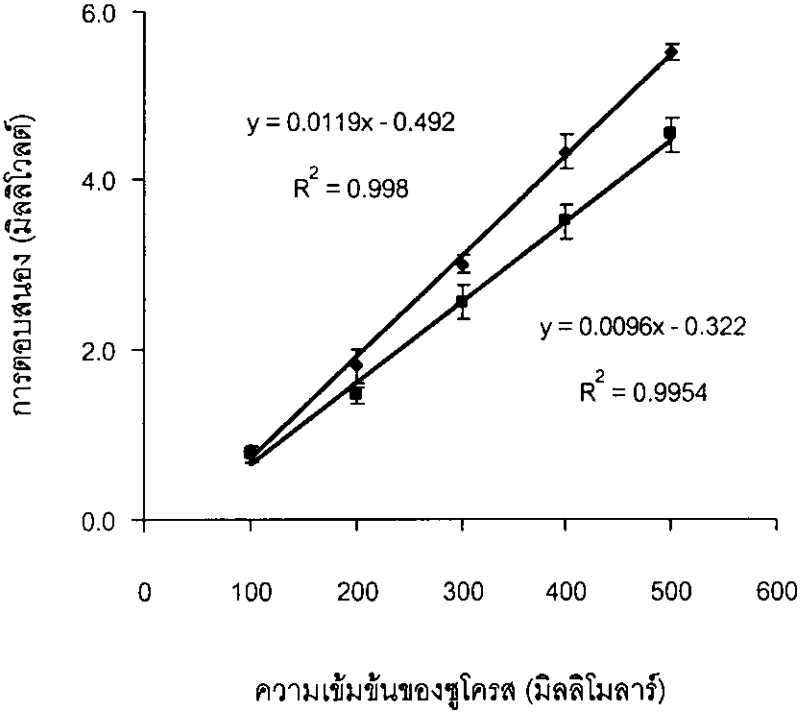
ภาพประกอบ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองกับอัตราไหลของสารละลายบัฟเฟอร์ อัตราไหลของสารละลายตัวอย่างคงที่ที่ 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที ในระบบที่มีไดอะไลเซอร์ขนาดกลาง

ค. ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์

การละลายหรือผสมกันระหว่างสารละลายซูโครสกับสารละลายบัฟเฟอร์จะมีการดูดกลืน หรือคายความร้อนออกมาพร้อมๆ กัน ความร้อนที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครสจะลดลงไปถ้าในสารละลายบัฟเฟอร์มีการเกิดปฏิกิริยาเป็นแบบดูดความร้อน จึงจำเป็นต้องศึกษาชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม จากการศึกษาชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม 2 ชนิด คือ อะซิเตทบัฟเฟอร์ และซิตริกบัฟเฟอร์ (2.11.2.2ก) พบว่าสัญญาณการตอบสนองเมื่อใช้อะซิเตทบัฟเฟอร์จะมีค่าสูงกว่าใช้ซิตริกบัฟเฟอร์ (ตาราง 11 ภาพประกอบ 24) ในการทดลองนี้จึงเลือกใช้อะซิเตทบัฟเฟอร์ ซึ่งให้ค่าความไววิเคราะห์สูงกว่าซิตริกบัฟเฟอร์ 20 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 11 ผลของชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ต่อการตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ในระบบที่มีไดอะไลเซอร์ขนาดกลาง

ความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์) ที่ใช้ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ	
	0.1 M อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.5	0.1 M ซิตริกบัฟเฟอร์ pH 4.5
100	**0.8 ± 0.0**	0.8 ± 0.1
200	**1.6 ± 0.2**	1.1 ± 0.1
300	**2.9 ± 0.1**	2.5 ± 0.2
400	**4.3 ± 0.2**	3.5 ± 0.2
500	**5.5 ± 0.1**	4.5 ± 0.2
เวลาวิเคราะห์	**10**	10
ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อมิลลิโมลาร์)	**0.0119**	0.0096
สัมประสิทธิ์ถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง (r^2)	**0.9980**	0.9954



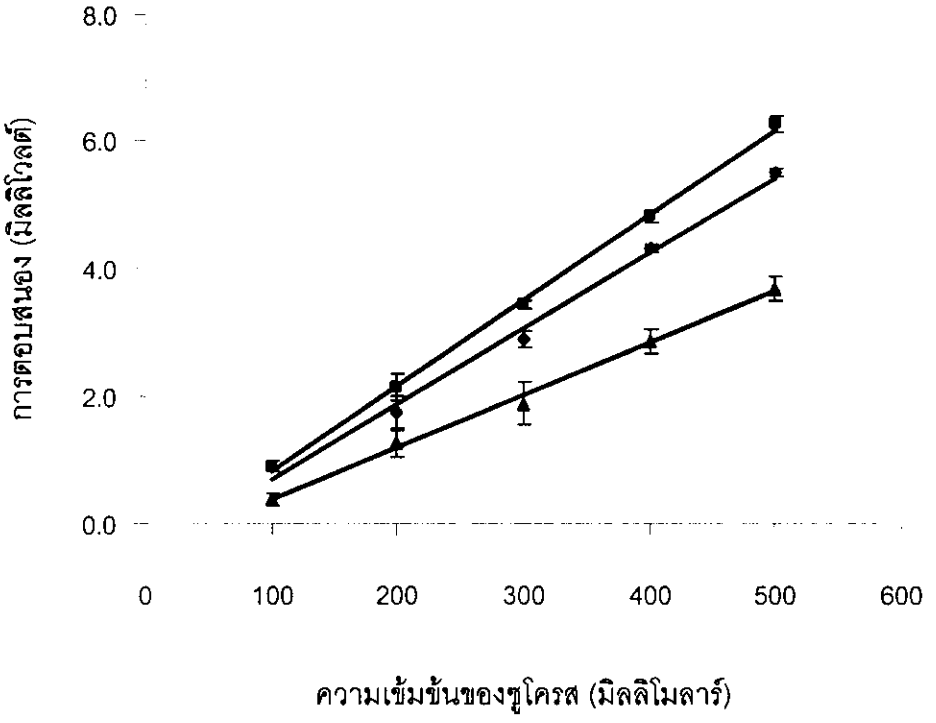
ภาพประกอบ 24 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองกับความเข้มข้นของซูโครสที่ใช้ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์แตกต่างกันคือ อะซิเตทบัฟเฟอร์ และซิตริกบัฟเฟอร์ ในระบบที่มีไดอะไลเซอร์ขนาดกลาง

ง. ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์

ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่ 0.01 0.10 และ 1.00 โมลาร์ (2.11.2.2ข) พบว่าที่ 0.10 โมลาร์ จะให้สัญญาณการตอบสนอง และความไววิเคราะห์สูงสุด (ตารางที่ 12 ภาพประกอบ 25) ที่ความเข้มข้นสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.01 และ 1.00 โมลาร์ ค่าสัญญาณการตอบสนองต่ำกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นสูงจะมีค่าความหนืดมากทำให้การเคลื่อนที่ของซูโครสผ่านไดอะไลซิสเมมเบรนเกิดได้ยาก และที่ความเข้มข้นสารละลายบัฟเฟอร์ต่ำเกินไปจะทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของบัฟเฟอร์ลดลง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.10 โมลาร์

ตารางที่ 12 ผลของความเข้มข้นบัฟเฟอร์ต่อการตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ในระบบที่มีไดอะไลเซอร์ขนาดกลาง

ความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์) ที่ความเข้มข้นของสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ต่างๆ		
	0.01 โมลาร์	**0.10 โมลาร์**	1.00 โมลาร์
100	0.9 ± 0.0	**0.9 ± 0.1**	0.4 ± 0.1
200	1.8 ± 0.3	**2.1 ± 0.2**	1.3 ± 0.2
300	2.9 ± 0.1	**3.4 ± 0.1**	1.9 ± 0.3
400	4.3 ± 0.1	**4.8 ± 0.1**	2.8 ± 1.2
500	5.5 ± 0.1	**6.3 ± 0.1**	3.7 ± 0.2
เวลาวิเคราะห์	10	**10**	15
ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อมิลลิโมลาร์)	0.0118	**0.0134**	0.0082
สัมประสิทธิ์ถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง (r^2)	0.9935	**0.9988**	0.9968



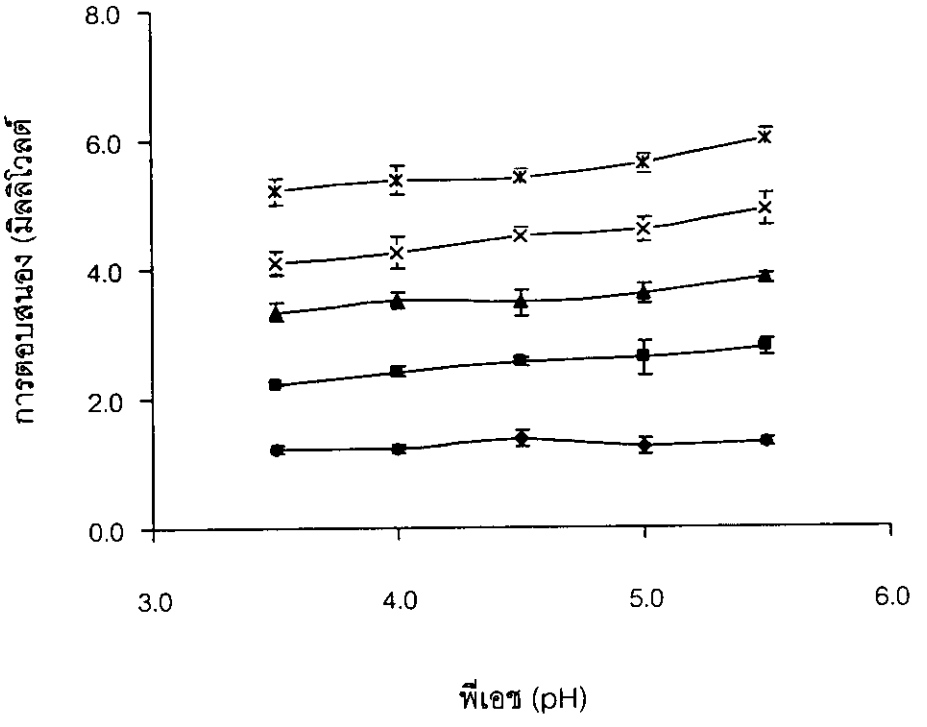
ภาพประกอบ 25 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองกับความเข้มข้นของซูโครส ที่ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นต่างกัน คือ 0.01 0.10 และ 1.00 โมลาร์ ในระบบที่มีไดอะไลเซอร์ขนาดกลาง

จ. พีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์

จากการศึกษาผลของพีเอชของสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ (2.11.2.2ค) พบว่าสัญญาณการตอบสนอง และความไววิเคราะห์ที่พีเอชในช่วง 3.3-5.5 มีค่าใกล้เคียงกัน (ตาราง 13 ภาพประกอบ 26) ซึ่งแสดงว่าในระบบนี้ที่ช่วงพีเอชดังกล่าวนี้ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์รีแอกเตอร์ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้พีเอช 4.5 เนื่องจากเป็นพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทสตามที่ระบุโดยผู้ผลิต

ตารางที่ 13 ผลของพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ ต่อการตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ในระบบที่มีไดอะไลเซอร์ขนาดกลาง

ความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์) ที่พีเอชต่างๆ				
	3.5	4.0	**4.5**	5.0	5.5
100	1.2±0.1	1.2 ±0.1	**1.4 ±0.1**	1.3 ±0.1	1.3 ±0.1
200	2.2 ±0.0	2.4 ±0.1	**2.5 ±0.1**	2.6 ±0.3	2.8 ±0.1
300	3.3 ±0.1	3.5 ±0.1	**3.5 ±0.2**	3.6 ±0.1	3.8 ±0.1
400	4.1 ±0.2	4.3 ±0.3	**4.5 ±0.1**	4.6 ±1.2	4.9 ±0.3
500	5.2 ±0.2	5.4 ±0.2	**5.4 ±0.1**	5.6 ±0.1	6.0 ±1.1
เวลาวิเคราะห์	10	10	**10**	10	10
ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อมิลลิโมลาร์)	0.0097	0.0104	**0.0106**	0.0107	0.0115
สัมประสิทธิ์ถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง (r^2)	0.9970	0.9951	**0.9980**	0.9958	0.9961



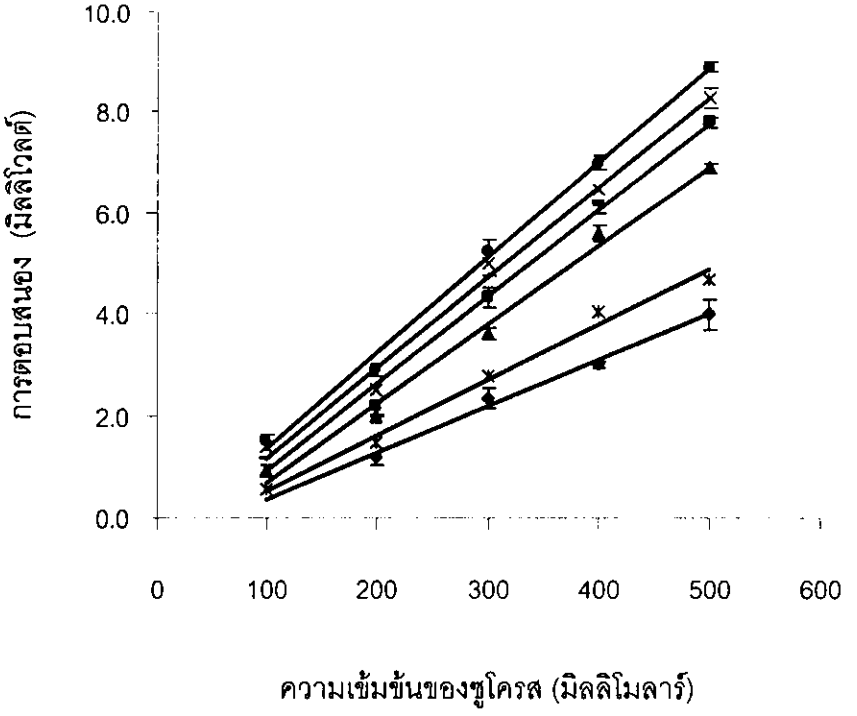
ภาพประกอบ 26 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองกับพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ในระบบที่มีไดอะไลเซอร์ขนาดกลาง

3.2.2.2 ปริมาตรสารตัวอย่าง

ปริมาตรของสารละลายซูโครสจะมีผลต่อขนาดของสัญญาณการตอบสนอง และค่าความไววิเคราะห์ เพราะถ้าใช้สารละลายตัวอย่างที่มีปริมาตรมากเกินไปจะทำให้สิ้นเปลืองสารตัวอย่าง และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องการหาปริมาตรของสารตัวอย่างที่เหมาะสม จากการศึกษาปริมาตรสารละลายซูโครสที่เหมาะสม (2.11.2.3) โดยศึกษาที่ปริมาตร 200 300 400 500 600 และ 800 ไมโครลิตร จากผลการทดลอง (ตาราง 14 ภาพประกอบ 27) พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาตรของสารละลายซูโครส ความไววิเคราะห์จะเพิ่มตามไปด้วย สัญญาณการตอบสนองจะมีค่าสูงขึ้นเมื่อปริมาตรสารละลายซูโครสเพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงที่ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นเมื่อปริมาตรสารตัวอย่างมากขึ้น ความไววิเคราะห์ที่ได้จะไม่เพิ่มขึ้นมากนัก ดังนั้นการเลือกปริมาตรสารตัวอย่างที่เหมาะสม จึงควรเลือกปริมาตรที่ให้ความไวในการวิเคราะห์สูง ไม่สิ้นเปลืองสารตัวอย่างและเวลามากเกินไป ในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ปริมาตรของสารตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร

ตารางที่ 14 ผลของปริมาณของซูโครสต่อการตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ ในระบบที่มีไดอะไลเซอร์ขนาดกลาง

ความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์) ที่ปริมาณซูโครสต่างๆ					
	200 มิลลิลิตร	300 มิลลิลิตร	400 มิลลิลิตร	**500 มิลลิลิตร**	600 มิลลิลิตร	800 มิลลิลิตร
5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
30	ND	ND	ND	ND	ND	ND
50	ND	ND	0.4±0.1	0.8±0.0	1.0±0.1	1.0±0.1
100	ND	0.5±0.1	0.9±0.1	**1.3±0.0**	1.4±0.1	1.5±0.1
200	1.2±0.2	1.5±0.1	2.0±0.0	**2.2±0.1**	2.5±0.0	2.9±0.1
300	2.3±0.2	2.8±0.1	3.6±0.1	**4.3±0.2**	5.0±0.3	5.3±0.2
400	3.0±0.1	4.0±0.1	5.6±0.1	**6.3±0.3**	6.5±0.1	7.0±0.1
500	4.0±0.1	4.7±0.1	6.9±0.1	**7.8±0.1**	8.3±0.1	8.9±0.1
600	4.2±0.2	5.3±0.1	7.3±0.1	8.2±0.1	9.2±0.2	10.2±0.1
เวลาวิเคราะห์	8	9	10	**10**	12	15
ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อมิลลิโมลาร์)	0.0090	0.0109	0.01660	**0.0172**	0.0178	0.0189
สัมประสิทธิ์ถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง (r^2)	0.9915	0.9894	0.9917	**0.9979**	0.9900	0.9958



ภาพประกอบ 27 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองกับความเข้มข้นของซูโครส เมื่อผ่านสารละลายซูโครส 200 300 400 500 600 และ 800 ไมโครลิตร ด้วยอัตราไหล 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที และอัตราไหลของสารละลายบัฟเฟอร์ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที ในระบบที่มีไดอะไลเซอร์ขนาดกลาง

3.2.3 ระบบไหลผ่านที่มีการใช้ ไดอะไลเซอร์ขนาดใหญ่

(พื้นที่ในการแพร่ 1.5 x 625.0 ตารางมิลลิเมตร)

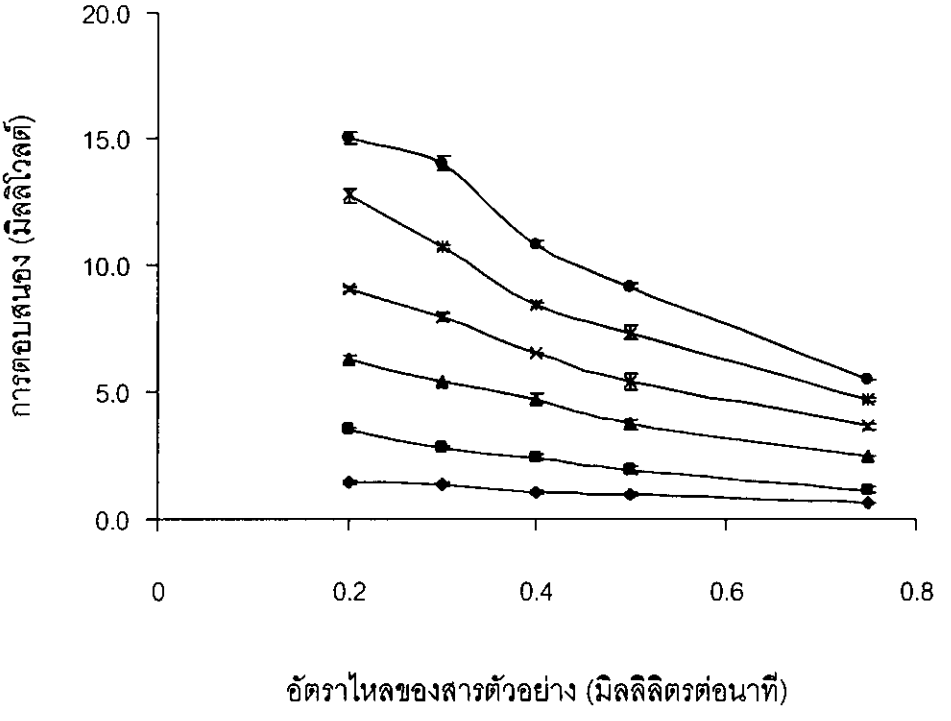
3.2.3.1 อัตราไหลที่เหมาะสม

ก. อัตราไหลของสารตัวอย่าง

จากผลการศึกษาอัตราไหลของสารละลายตัวอย่างในระบบที่มีการใช้ไดอะไลเซอร์ขนาดใหญ่ (2.11.3.1 ก.) โดยศึกษาที่ 0.20 0.30 0.40 0.50 และ 0.75 มิลลิลิตรต่อนาที โดยให้อัตราไหลสารละลายบัฟเฟอร์คงที่ที่ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าสัญญาณการตอบสนองจะมีค่าสูงที่อัตราไหลสารตัวอย่างช้า (ตาราง 15 ภาพประกอบ 28) เช่นเดียวการทดลอง (3.2.5.1 ก) ดังนั้นในการทดลองนี้เลือกใช้อัตราไหลสารตัวอย่างที่เหมาะสมคือ 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที เนื่องจากค่าความไววิเคราะห์ไม่แตกต่างกับที่อัตราไหล 0.20 มิลลิลิตรต่อนาทีมากนัก แต่ใช้เวลาวิเคราะห์เพียง 10 นาทีต่อตัวอย่าง

ตารางที่ 15 ผลของอัตราไหลของสารละลายตัวอย่างต่อการตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ โดยให้อัตราไหลของสารละลายบัฟเฟอร์คงที่ที่ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที ในระบบที่มีไดอะไลเซอร์ขนาดใหญ่

ความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์) ที่อัตราไหลต่างๆ				
	0.20 มิลลิลิตร ต่อนาที	**0.30 มิลลิลิตร ต่อนาที**	0.40 มิลลิลิตร ต่อนาที	0.50 มิลลิลิตร ต่อนาที	0.75 มิลลิลิตร ต่อนาที
50	1.4±0.1	**1.3±0.1**	1.0±0.1	1.0±0.1	0.6±0.0
100	3.5±0.1	**2.8±0.1**	2.4±0.1	1.9±0.1	1.1±0.1
200	6.3±0.1	**5.4±0.0**	4.7±0.2	3.7±0.2	2.5±0.0
300	9.0±0.1	**7.9±0.1**	6.5±0.0	5.4±0.3	3.6±0.1
400	12.8±0.3	**10.7±0.1**	8.4±0.1	7.3±0.3	4.7±0.1
500	15.0±0.2	**14.0±0.3**	10.8±0.1	9.2±0.3	5.5±0.0
เวลาวิเคราะห์	12	**10**	10	8	8
ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อมิลลิโมลาร์)	0.0295	**0.0278**	0.0205	0.0181	0.0109
สัมประสิทธิ์ถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง (r^2)	0.9958	**0.9971**	0.9974	0.9997	0.9918



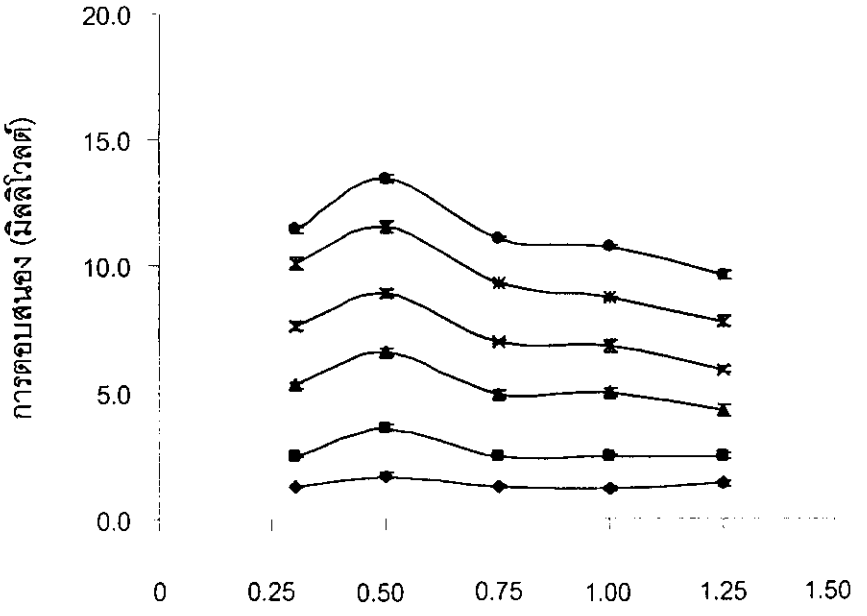
ภาพประกอบ 28 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองกับอัตราไหลของสารละลายตัวอย่าง โดยให้อัตราไหลสารละลายบัฟเฟอร์คงที่ที่ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที ในระบบที่มีไดอะไลเซอร์ขนาดใหญ่

ข. อัตราไหลของสารละลายบัฟเฟอร์

จากการศึกษาอัตราไหลของสารละลายบัฟเฟอร์ในระบบที่มีไดอะไลเซอร์ขนาดใหญ่ (2.11.3.1 ข) โดยให้อัตราไหลสารละลายตัวอย่างคงที่ที่ 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราไหลของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ศึกษาคือ 0.30 0.50 0.75 1.00 และ 1.20 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าหากอัตราไหลช้าหรือเร็วเกินไปสัญญาณการตอบสนองจะต่ำ เช่นเดียวกับการทดลอง 3.2.2.1ข อัตราไหลที่ให้ค่าการตอบสนองสูงสุด คือ 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที (ตาราง 16 ภาพประกอบ 29) แต่เมื่อพิจารณาความไววิเคราะห์ของแต่ละอัตราไหล พบว่าไม่มีความแตกต่างมากนัก ดังนั้นในการทดลองนี้เลือกใช้อัตราไหลสารละลายบัฟเฟอร์ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที เนื่องจากเวลาเมื่อเทียบกับอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ให้สัญญาณการตอบสนองสูงสุด ใช้เวลาน้อยกว่า นั่นคือใช้เวลาวิเคราะห์เพียง 10 นาทีต่อตัวอย่าง

ตารางที่ 16 ผลของอัตราไหลของสารละลายบัฟเฟอร์ต่อการตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ โดยให้อัตราไหลสารละลายตัวอย่างคงที่ที่ 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที ในระบบที่มีไดอะไลเซอร์ขนาดใหญ่

ความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์) ที่อัตราไหลต่างๆ				
	0.30 มิลลิลิตร ต่อนาที	0.50 มิลลิลิตร ต่อนาที	0.75 มิลลิลิตร ต่อนาที	**1.00 มิลลิลิตร ต่อนาที**	1.25 มิลลิลิตร ต่อนาที
50	1.3±0.0	1.7±0.1	1.3±0.1	**1.2±0.1**	1.4±0.1
100	2.5±0.0	3.6±0.1	2.5±0.0	**2.5±0.1**	2.5±0.1
200	5.3±0.1	6.6±0.1	4.9±0.1	**5.0±0.2**	4.3±0.3
300	7.6±0.1	8.9±0.1	7.0±0.1	**6.8±0.3**	5.9±0.1
400	10.1±0.3	11.5±0.1	9.3±0.0	**8.7±0.1**	7.8±0.2
500	11.4±0.1	13.4±0.3	11.0±0.1	**10.7±0.1**	9.6±0.1
เวลาวิเคราะห์	25	20	15	**10**	10
ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อมิลลิโมลาร์)	0.0226	0.0275	0.0252	**0.0226**	0.0179
สัมประสิทธ์ถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง (r^2)	0.9992	0.9941	0.9991	**0.9985**	0.9939



ภาพประกอบ 29 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองกับอัตราไหลของสารละลายบัฟเฟอร์ โดยให้อัตราไหลสารละลายตัวอย่างคงที่ที่ 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที ในระบบที่มีไดอะไลเซอร์ขนาดใหญ่

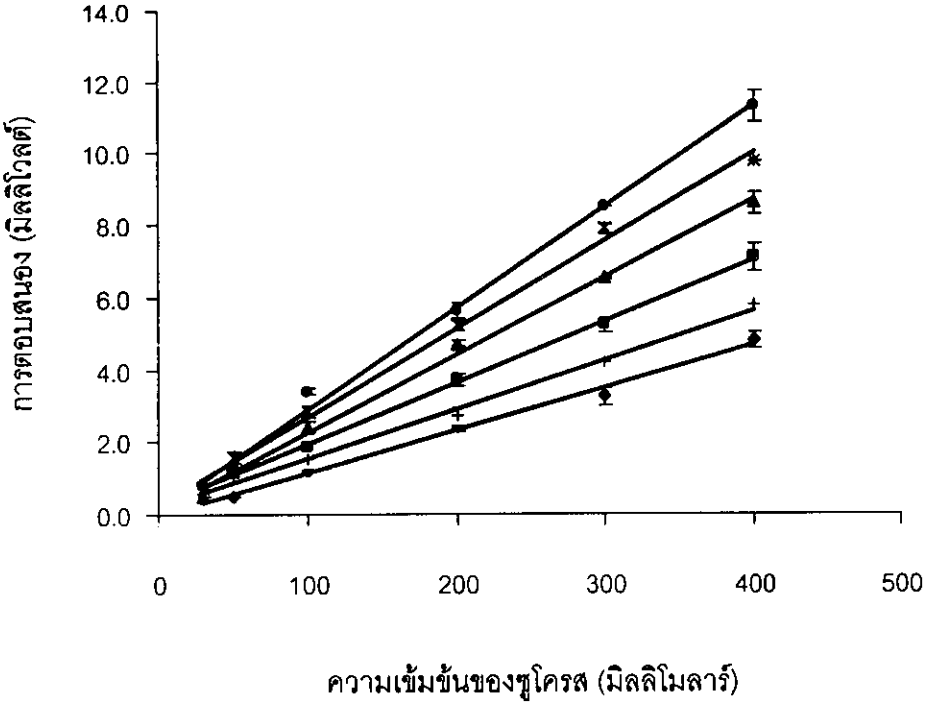
3.2.3.2 ปริมาตรสารตัวอย่าง

จากการศึกษาปริมาตรสารละลายซูโครสที่เหมาะสม ในระบบที่มีการใช้ไดอะไลเซอร์ขนาดใหญ่ (2.11.3.2) โดยศึกษาที่ 200 300 400 500 600 และ 800 ไมโครลิตร พบว่าค่าสัญญาณการตอบสนองมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาตรสารตัวอย่างเพิ่มขึ้น (ตาราง 17 ภาพประกอบ 30) เมื่อพิจารณาความไววิเคราะห์ที่ปริมาตร 500 600 และ 800 ค่าความไววิเคราะห์ที่เพิ่มขึ้นไม่มีความแตกต่างกันมากนัก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ปริมาตรสารตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร เนื่องจากให้ค่าความไววิเคราะห์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และใช้เวลาในการวิเคราะห์เร็วกว่า 5-10 นาทีต่อตัวอย่าง เมื่อเทียบกับที่ปริมาตร 600 และ 800 ไมโครลิตรซึ่งให้ค่าสัญญาณสูงกว่า และนอกจากนี้ยังเป็นการประหยัดสารตัวอย่าง และสารละลายบัฟเฟอร์ด้วย

ตารางที่ 17 ผลของปริมาณซูโครสต่อการตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ โดยใช้อัตราไหลของสารละลายตัวอย่าง และบัฟเฟอร์ 0.03 และ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ ในระบบที่มีไดอะไลเซอร์ขนาดใหญ่

ความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์) ที่ปริมาณซูโครสต่างๆ					
	200 มิลลิลิตร	300 มิลลิลิตร	400 มิลลิลิตร	**500 มิลลิลิตร**	600 มิลลิลิตร	800 มิลลิลิตร
5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
30	ND	ND	ND	**0.5±0.0**	0.7±0.0	0.8±0.0
50	0.5±0.0	1.0±0.1	1.0±0.1	**1.2±0.1**	1.6±0.1	1.3±0.0
100	1.2±0.0	1.5±0.2	1.5±0.1	**2.4±0.1**	2.8±0.1	3.4±0.1
200	2.4±0.1	2.7±0.3	2.7±0.1	**4.7±0.1**	5.2±0.1	5.6±0.2
300	3.3±0.3	4.2±0.1	4.2±0.2	**6.5±0.0**	7.9±0.1	8.5±0.0
400	4.8±0.2	5.8±0.1	5.8±0.1	**8.6±.0.3**	9.8±0.0	11.3±0.4
500	5.9±0.1	7.1±0.1	7.1±0.1	10.3±0.3	12.0±0.1	13.3±0.5
เวลาวิเคราะห์	8	9	10	**10**	15	20
ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อมิลลิโมลาร์)	0.0118	0.0136	0.0196	**0.0215**	0.0244	0.0280
สัมประสิทธิ์ถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง (r^2)	0.9920	0.9937	0.9980	**0.9962**	0.9957	0.9963

หมายเหตุ ND = วัดไม่ได้ (non detectable)



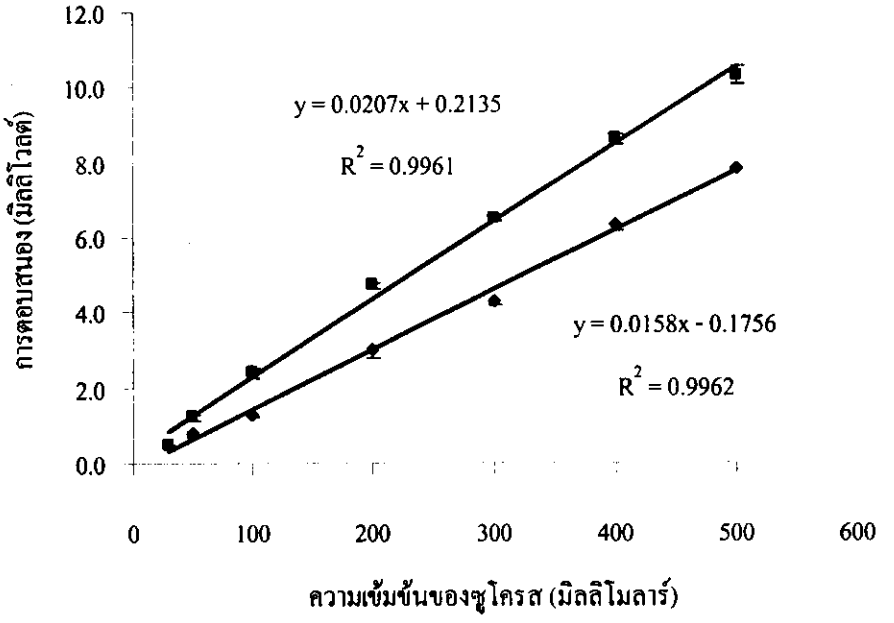
ภาพประกอบ 30 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองกับความเข้มข้นของซูโครส เมื่อผ่านสารละลายซูโครส 200 300 400 500 600 และ 800 ไมโครลิตร ด้วยอัตราไหล 0.30 มิลลิตรต่อนาที และอัตราไหลสารละลายบัฟเฟอร์ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที ในระบบที่มีไดอะไลเซอร์ขนาดใหญ่

3.2.3.3 เปรียบเทียบชนิดของไดอะไลเซอร์ที่มีพื้นที่การแพร่ต่างกัน

ขนาดของไดอะไลเซอร์ที่ต่างกันจะมีผลต่อขนาดของสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์แตกต่างกัน เนื่องจากไดอะไลเซอร์ที่มีขนาดใหญ่จะมีพื้นที่การแพร่มาก ทำให้ปริมาณซูโครสที่อยู่ในสารละลายตัวอย่างแพร่ผ่านไดอะไลซิสเมมเบรนได้มากกว่า จากการทดลองเปรียบเทียบไดอะไลเซอร์ขนาดเล็กกับขนาดใหญ่ (2.11.4) พบว่าไดอะไลเซอร์ที่มีขนาดใหญ่จะให้ค่าสัญญาณการตอบสนองและความไววิเคราะห์สูงกว่า 36 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 18 ภาพประกอบ 31) นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์ปริมาณซูโครสได้ต่ำถึงที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ขณะที่การใช้ไดอะไลเซอร์ขนาดเล็กสามารถวิเคราะห์ได้เพียง 50 มิลลิโมลาร์

ตารางที่ 18 ผลของชนิดของไดอะไลเซอร์ต่อการตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ ภายในสภาวะที่เหมาะสม

ความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์) ในระบบที่ใช้ไดอะไลเซอร์ที่มีพื้นที่การแพร่ต่างๆ กัน	
	พื้นที่การแพร่ 1.5 x 298 ตารางมิลลิเมตร	พื้นที่การแพร่ 1.5 x 625 ตารางมิลลิเมตร
10	ND	ND
20	ND	ND
30	ND	0.5 ± 0.0
50	0.8 ± 0.0	1.2 ± 0.1
100	1.3 ± 0.0	2.4 ± 0.1
200	2.2 ± 0.1	4.7 ± 0.1
300	4.3 ± 0.2	6.5 ± 0.0
400	6.3 ± 0.3	8.6 ±. 0.3
500	7.8 ± 0.1	10.3 ± 0.3
เวลาวิเคราะห์	10	10
ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อมิลลิโมลาร์)	0.0156	0.0215
สัมประสิทธ์ถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง (r^2)	0.9932	0.9962



◆ ไดอะไลเซอร์ที่มีพื้นที่ในการแพร่ 1.5 x 298 ตารางมิลลิเมตร

■ ไดอะไลเซอร์ที่มีพื้นที่ในการแพร่ 1.5 x 625 ตารางมิลลิเมตร

ภาพประกอบ 31 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองกับความเข้มข้นของซูโครส ที่ใช้ชนิดของไดอะไลเซอร์ที่มีพื้นที่การแพร่ต่างกัน

3.3 ผลจากสารรบกวน

3.3.1 ผลของกลูโคสและฟรักโทส

จากการศึกษาผลของซูโครสและฟรักโทสที่มีต่อซูโครส (2.12.1) พอสรุปได้ดังนี้

-เมื่อซูโครสมีกลูโคสหรือฟรักโทสเป็นองค์ประกอบ ความเข้มข้นของกลูโคสหรือฟรักโทสที่ 800 มิลลิโมลาร์จะให้ค่าการตอบสนองที่มีความแตกต่างจากเมื่อไม่มีกลูโคสหรือฟรักโทสอย่างชัดเจน (ตาราง 19 และ 20 ภาพประกอบ 32 และ 33) ในขณะที่สารละลายกลูโคสหรือฟรักโทสในช่วงความเข้มข้น 50-500 มิลลิโมลาร์ การรบกวนมีเพียงเล็กน้อย

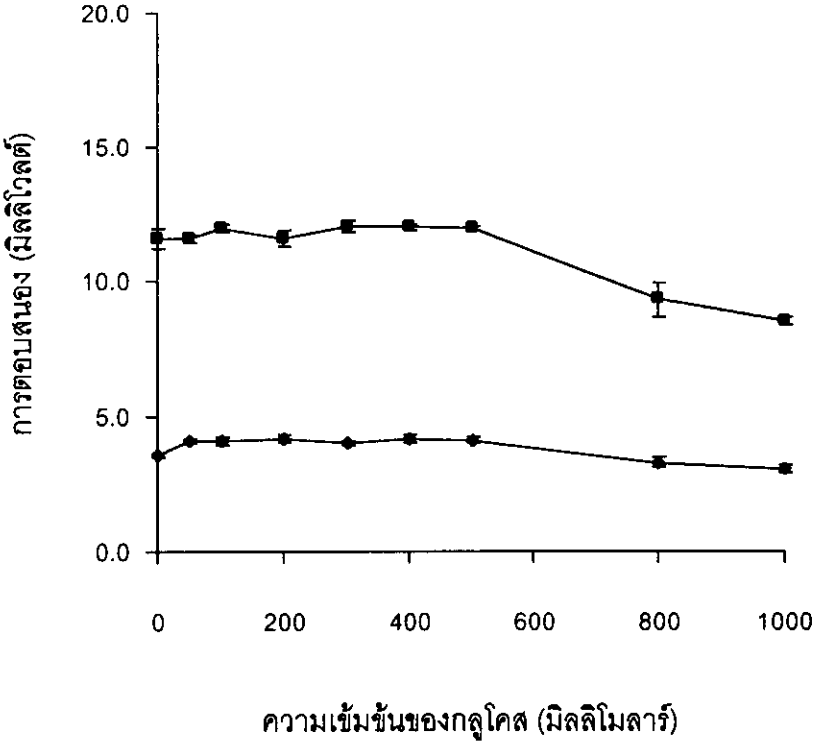
-ตัวอย่างที่ประกอบด้วยซูโครส กลูโคส และฟรักโทสให้ผลใกล้เคียงกับข้างต้น กล่าวคือที่ความเข้มข้นของกลูโคสและฟรักโทสที่ 800 มิลลิโมลาร์ จะให้ค่าการตอบสนองที่มีความแตกต่าง (ตาราง 21 ภาพประกอบ 34) ส่วนสารละลายกลูโคสและฟรักโทสในช่วงความเข้มข้น 50-500 มิลลิโมลาร์ มีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์สารละลายซูโครสน้อยมาก

ตามปกติเอนไซม์อินเวอร์เทสมีความจำเพาะเจาะจงกับซูโครส ดังนั้นสัญญาณการตอบสนองที่ได้น่าจะมาจากความร้อนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครสเพียงอย่างเดียวถึงแม้ว่าสารละลายซูโครสจะมีกลูโคสหรือฟรักโทสอยู่ก็ไม่ควรมีสัญญาณการตอบสนองแตกต่างออกไป แต่ในการทดลองพบว่า เมื่อสารละลายนั้นมีซูโครสอยู่รวมกับของกลูโคสหรือฟรักโทสที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 500 มิลลิโมลาร์ จะมีผลทำให้สัญญาณการตอบสนองมีขนาดต่ำกว่าเมื่อสารละลายมีซูโครสเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้อาจเนื่องจากในสารละลายซูโครสที่มีปริมาณกลูโคส และ/หรือฟรักโทสความเข้มข้นสูงจะมีความหนืดมาก ทำให้การแพร่ของซูโครสผ่านไดอะไลซิสเมมเบรนเกิดได้ยาก สัญญาณการตอบสนองที่ได้จึงมีค่าน้อยลง

อย่างไรก็ตามวิธีนี้จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ซูโครสในตัวอย่างเครื่องดื่มซึ่งบางชนิดเป็นน้ำผลไม้จะมีกลูโคสและฟรักโทสอยู่ 30-300 มิลลิโมลาร์ (Boujtita *et al.* 1999; Paredes *et al.* 1997.) ในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวน้ำตาลทั้งสองนี้ไม่น่าจะมีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์

ตารางที่ 19 การตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ต่อสารละลายซูโครสที่มีปริมาณกลูโคสต่างๆ กัน

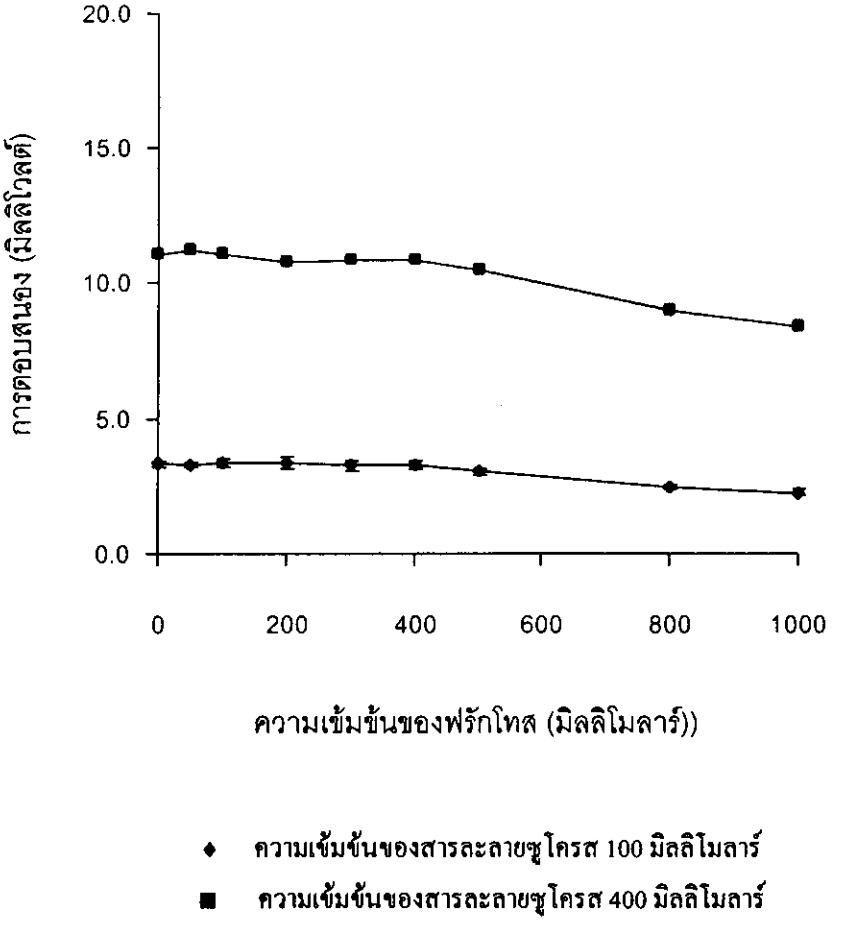
ความเข้มข้นของซูโครสที่มีปริมาณกลูโคสต่างๆกัน (มิลลิโมลาร์)	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์)	
	ความเข้มข้นของซูโครส (มิลลิโมลาร์)	
	100	400
	ค่าเฉลี่ย ± SD	ค่าเฉลี่ย ± SD
ซูโครส	3.6 ± 0.1	11.6 ± 0.4
ซูโครส + กลูโคส 50 มิลลิโมลาร์	4.1 ± 0.1	12.0 ± 0.1
ซูโครส + กลูโคส 100 มิลลิโมลาร์	4.1 ± 0.1	11.9 ± 0.1
ซูโครส + กลูโคส 200 มิลลิโมลาร์	4.2 ± 0.1	12.0 ± 0.3
ซูโครส + กลูโคส 300 มิลลิโมลาร์	4.0 ± 0.1	12.0 ± 0.2
ซูโครส + กลูโคส 400 มิลลิโมลาร์	4.1 ± 0.1	12.0 ± 0.2
ซูโครส + กลูโคส 500 มิลลิโมลาร์	4.2 ± 0.1	11.6 ± 0.1
ซูโครส + กลูโคส 800 มิลลิโมลาร์	3.8 ± 0.2	9.3 ± 0.6
ซูโครส + กลูโคส 1000 มิลลิโมลาร์	3.2 ± 0.1	8.5 ± 0.1



ภาพประกอบ 32 การตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ต่อสารละลายซูโครสที่มีปริมาณกลูโคสต่างๆ กัน

ตารางที่ 20 การตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ต่อสารละลายซูโครสที่มีปริมาณฟรักโทสต่างๆ กัน

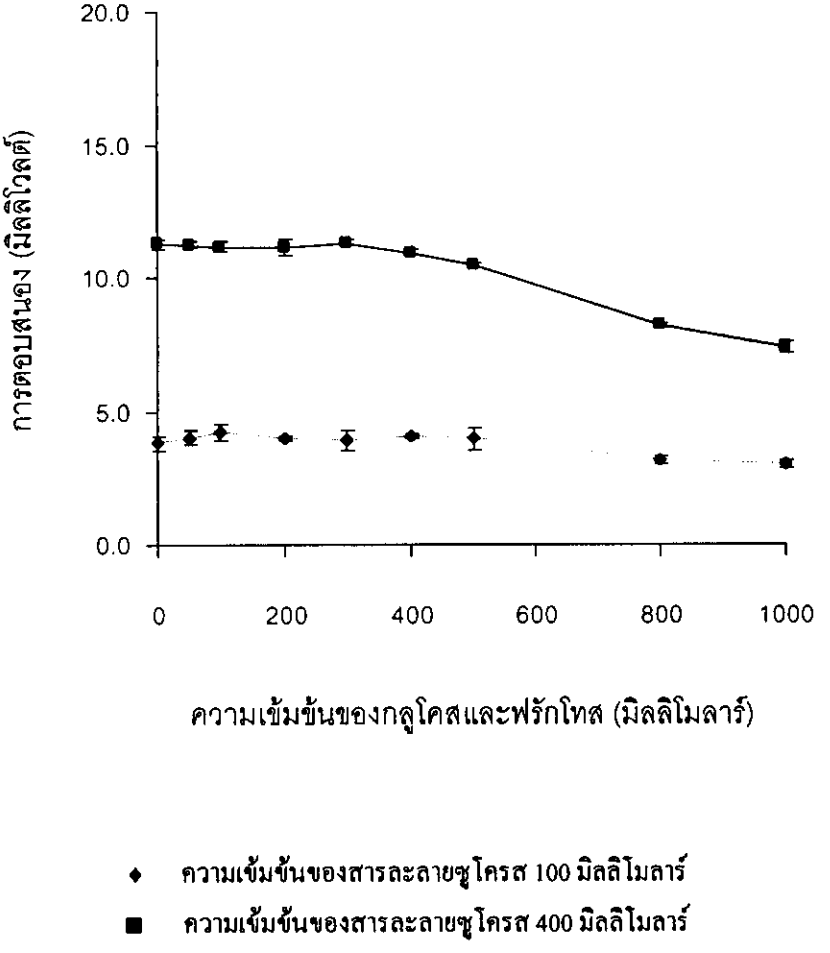
ความเข้มข้นของซูโครสที่มีปริมาณฟรักโทสต่างๆกัน (มิลลิโมลาร์)	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์)	
	ความเข้มข้นของซูโครส (มิลลิโมลาร์)	
	100	400
	ค่าเฉลี่ย ± SD	ค่าเฉลี่ย ± SD
ซูโครส	3.3 ± 0.1	11.1 ± 0.0
ซูโครส + ฟรักโทส 50 มิลลิโมลาร์	3.3 ± 0.1	11.2 ± 0.1
ซูโครส + ฟรักโทส 100 มิลลิโมลาร์	3.3 ± 0.2	11.1 ± 0.1
ซูโครส + ฟรักโทส 200 มิลลิโมลาร์	3.2 ± 0.2	10.8 ± 0.2
ซูโครส + ฟรักโทส 300 มิลลิโมลาร์	3.3 ± 0.2	10.9 ± 0.1
ซูโครส + ฟรักโทส 400 มิลลิโมลาร์	3.3 ± 0.1	10.9 ± 0.2
ซูโครส + ฟรักโทส 500 มิลลิโมลาร์	3.0±0.1	10.4 ± 0.1
ซูโครส + ฟรักโทส 800 มิลลิโมลาร์	2.4± 0.1	9.0 ± 0.2
ซูโครส + ฟรักโทส 1000 มิลลิโมลาร์	2.2 ± 0.1	8.4 ± 0.1



ภาพประกอบ 33 การตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ต่อสารละลายซูโครสที่มีปริมาณฟรักโทสต่างๆ กัน

ตารางที่ 21 การตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ต่อสารละลายซูโครสที่มีปริมาณกลูโคสและฟรักโทสต่างๆ กัน

ความเข้มข้นซูโครส ที่มีปริมาณกลูโคสและฟรักโทสต่างๆกัน (มิลลิโมลาร์)	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์)	
	ความเข้มข้นของซูโครส (มิลลิโมลาร์)	
	100	400
	ค่าเฉลี่ย ± SD	ค่าเฉลี่ย ± SD
ซูโครส	3.8 ± 0.3	11.3 ± 0.2
ซูโครส + กลูโคสและฟรักโทสอย่างละ 50 มิลลิโมลาร์	4.0 ± 0.3	11.2 ± 0.1
ซูโครส + กลูโคสและฟรักโทสอย่างละ 100 มิลลิโมลาร์	4.2 ± 0.3	11.2 ± 0.2
ซูโครส + กลูโคสและฟรักโทสอย่างละ 200 มิลลิโมลาร์	4.0 ± 0.1	11.1 ± 0.3
ซูโครส + กลูโคส และฟรักโทสอย่างละ 300 มิลลิโมลาร์	3.9 ± 0.4	11.3 ± 0.1
ซูโครส + กลูโคสและฟรักโทสอย่างละ 400 มิลลิโมลาร์	4.1 ± 0.1	10.9 ± 0.1
ซูโครส + กลูโคสและฟรักโทสอย่างละ 500 มิลลิโมลาร์	4.0 ± 0.4	10.5 ± 0.1
ซูโครส + กลูโคสและฟรักโทสอย่างละ 800 มิลลิโมลาร์	3.1 ± 0.2	8.2 ± 0.1
ซูโครส + กลูโคสและฟรักโทสอย่างละ 1000 มิลลิโมลาร์	3.0 ± 0.2	7.4 ± 0.2



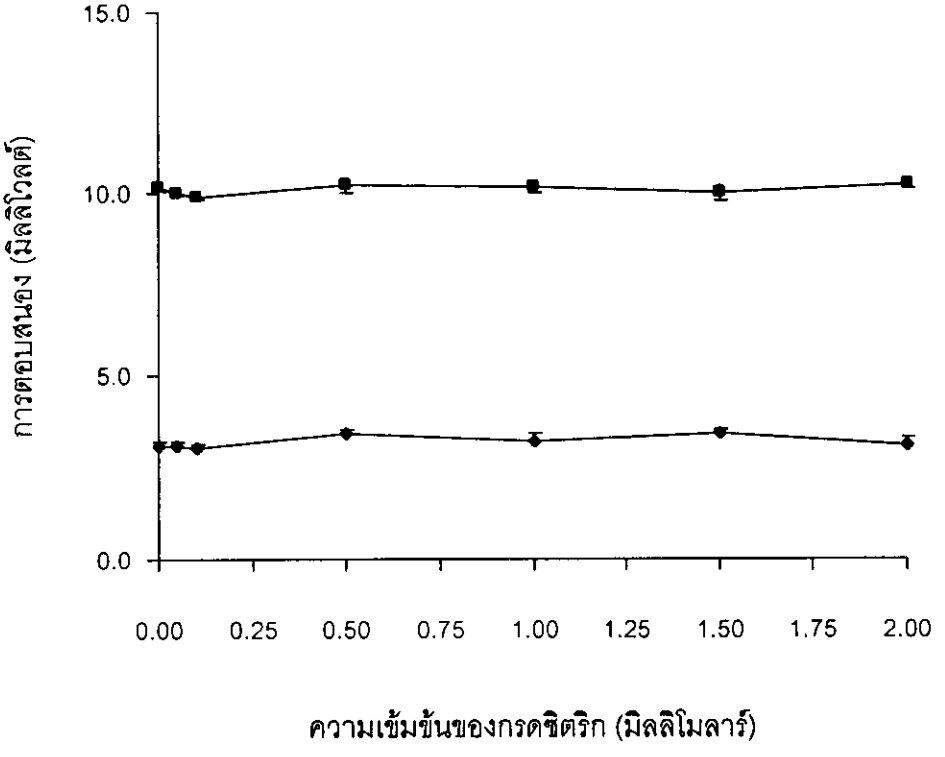
ภาพประกอบ 34 การตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ต่อสารละลายซูโครสที่มีปริมาณกลูโคสและฟรักโทสต่างๆ กัน

3.3.2 ผลของกรดซิตริก

จากการศึกษาผลของกรดซิตริก (2.12.2) พบว่าเมื่อซูโครสมีกรดซิตริก ในช่วง 0.05-2.00 มิลลิโมลาร์ จะให้ค่าสัญญาณการตอบสนองที่ไม่แตกต่างกัน เปรียบเทียบกับเมื่อไม่มีกรดซิตริก (ตาราง 22 ภาพประกอบ 35) ดังนั้นในการวิเคราะห์ซูโครสในตัวอย่างเครื่องดื่มกระป๋อง ซึ่งจะมีปริมาณกรดซิตริกอยู่เพียง 0.50-1.00 มิลลิโมลาร์ (Grudpan *et al.*, 1998) จะไม่มีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์

ตารางที่ 22 การตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ต่อสารละลายซูโครสที่มีปริมาณกรดซิตริกต่างๆ กัน

ความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์) ที่มีปริมาณกรดซิตริกต่างๆ กัน	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์)	
	ความเข้มข้นของซูโครส (มิลลิโมลาร์)	
	100	400
	ค่าเฉลี่ย ± SD	ค่าเฉลี่ย ± SD
ซูโครส	3.1 ± 0.1	10.2 ± 0.1
ซูโครส + กรดซิตริก 0.05 มิลลิโมลาร์	3.1 ± 0.1	10.0 ± 0.1
ซูโครส + กรดซิตริก 0.10 มิลลิโมลาร์	3.4 ± 0.2	9.9 ± 0.1
ซูโครส + กรดซิตริก 0.50 มิลลิโมลาร์	3.4 ± 0.1	10.0 ± 0.2
ซูโครส + กรดซิตริก 1.00 มิลลิโมลาร์	3.2 ± 0.2	10.2 ± 0.1
ซูโครส + กรดซิตริก 1.50 มิลลิโมลาร์	3.1 ± 0.1	10.0 ± 0.1
ซูโครส + กรดซิตริก 2.00 มิลลิโมลาร์	3.1 ± 0.2	10.2 ± 0.1



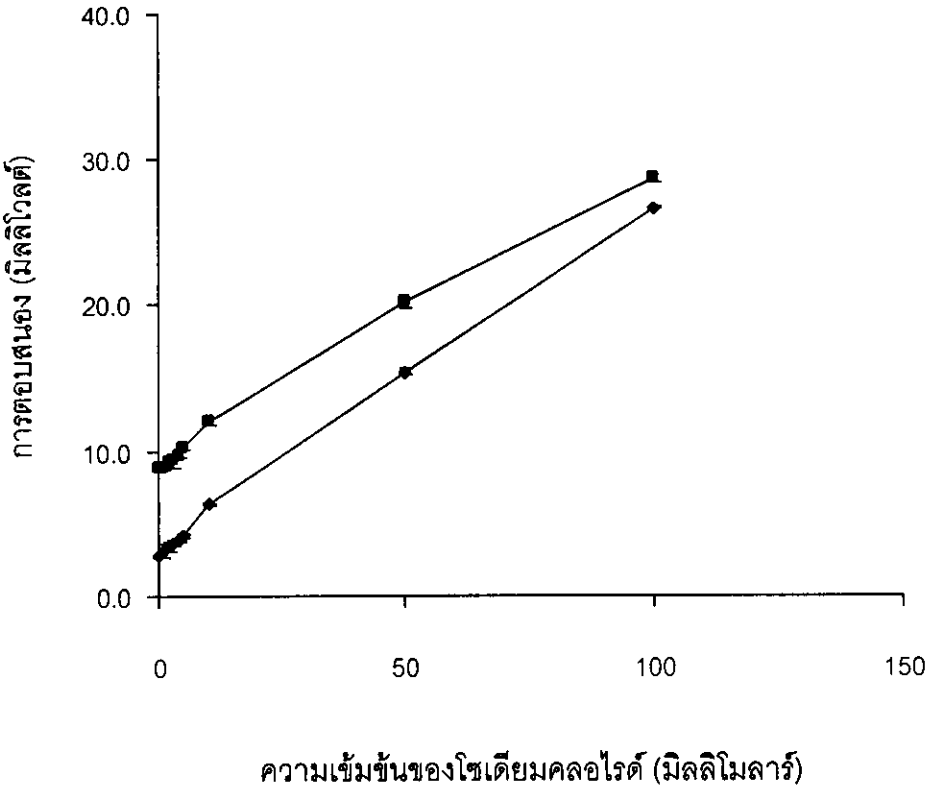
ภาพประกอบ 35 การตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ต่อสารละลายซูโครสที่มีปริมาณกรดซิตริกต่างๆ กัน

3.3.3 ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์

จากการศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (2.12.3) พบว่าเมื่อซูโครสมีเกลือโซเดียมคลอไรด์จะให้ค่าสัญญาณการตอบสนองที่สูงขึ้น (ตาราง 23 ภาพประกอบ 36) ดังนั้นในการที่จะนำวิธีนี้ไปใช้ในการวิเคราะห์ซูโครสในตัวอย่างเครื่องดื่มน้ำผลไม้กระป๋องซึ่งมีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์อยู่ในช่วง 1-60 มิลลิโมลาร์นั้นจะมีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์ น่าจะเนื่องจากปริมาณไอออนที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ความร้อนที่วัดได้เปลี่ยนไป (McLean and Penketh, 1968)

ตารางที่ 23 การตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ต่อละลายซูโครสที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ กัน

ความเข้มข้นของซูโครส (มิลลิโมลาร์) ที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่างๆกัน	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์)	
	ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส (มิลลิโมลาร์)	
	100	400
	ค่าเฉลี่ย ± SD	ค่าเฉลี่ย ± SD
ซูโครส	2.7 ± 0.1	8.8 ± 0.1
ซูโครส + โซเดียมคลอไรด์ 1.0 มิลลิโมลาร์	3.1 ± 0.1	8.8 ± 0.5
ซูโครส + โซเดียมคลอไรด์ 2.0 มิลลิโมลาร์	3.4 ± 0.2	9.3 ± 0.3
ซูโครส + โซเดียมคลอไรด์ 3.0 มิลลิโมลาร์	3.6 ± 0.5	9.4 ± 0.2
ซูโครส + โซเดียมคลอไรด์ 4.0 มิลลิโมลาร์	4.0 ± 0.1	9.6 ± 0.1
ซูโครส + โซเดียมคลอไรด์ 5.0 มิลลิโมลาร์	4.2 ± 0.1	10.2 ± 0.1
ซูโครส + โซเดียมคลอไรด์ 10.0 มิลลิโมลาร์	6.3 ± 0.3	12.0 ± 0.1
ซูโครส + โซเดียมคลอไรด์ 50.0 มิลลิโมลาร์	15.3 ± 0.4	20.1 ± 0.2
ซูโครส + โซเดียมคลอไรด์ 100.0 มิลลิโมลาร์	26.5 ± 0.2	28.5 ± 0.1



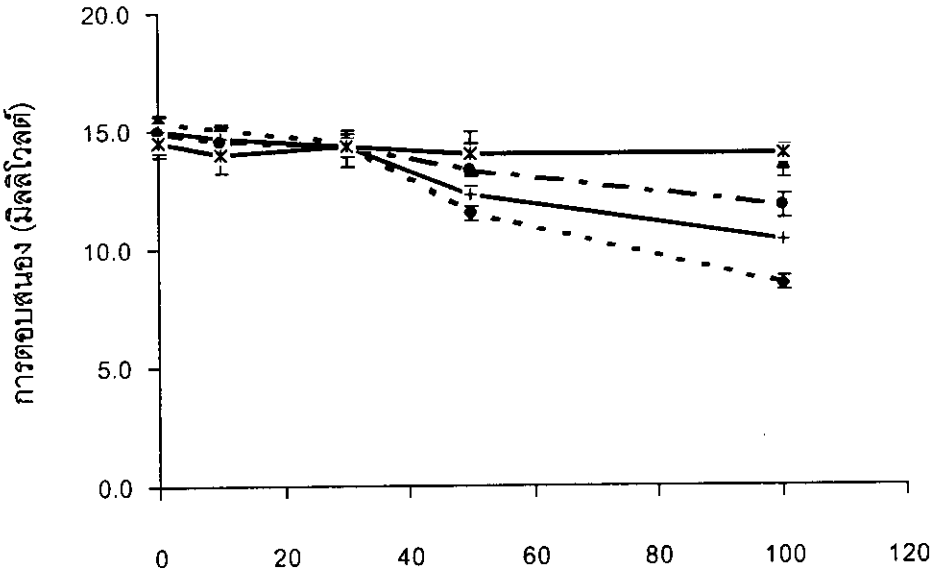
ภาพประกอบ 36 การตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ต่อสารละลายซูโครสที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ กัน

3.4 สภาวะที่เหมาะสมในระบบที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์

จากการศึกษาปริมาณเกลือที่เหมาะสมสำหรับเติมในสารละลายบัฟเฟอร์ที่จะใช้เจือจางสารตัวอย่าง (2.13) (ตารางที่ 24 ภาพประกอบ 37) จะเห็นว่าเมื่อปริมาณเกลือในบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้น การตอบสนองจากตัวอย่างที่มีปริมาณเกลือต่างๆ จะมีความแตกต่างกันน้อยลง ในการทดลองนี้เลือกใช้ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1000 มิลลิโมลาร์ เติมลงในสารละลายบัฟเฟอร์ฝังตัวอย่าง เมื่อใช้สารละลายนี้ในการเจือจางตัวอย่าง ปริมาณเกลือที่มากเกินพอนี้จะทำให้สารตัวอย่างที่ถูกเจือจางแล้วมีปริมาณเกลือใกล้เคียงกับ 1000 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นค่าการตอบสนองที่วัดได้จากระบบจึงเป็นการตอบสนองที่เกิดจากซูโครสไม่ใช่จากความแตกต่างของเกลือในบัฟเฟอร์และในตัวอย่าง ที่ไม่ใช้ 2000 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มากเกินไปจะทำให้สารละลายมีความหนืดมาก ทำให้การแพร่ของสารละลายซูโครสผ่านไดอะไลซิสเมมเบรนได้น้อย สัญญาณการตอบสนองที่ได้มีค่าน้อยลง

ตารางที่ 24 การตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ต่อสารละลายตัวอย่างที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่างกัน

สารตัวอย่างซูโครส : บัฟเฟอร์ที่มีเกลือ (1:4) ที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่างกัน	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์) ที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ในสารละลายบัฟเฟอร์ต่างกัน				
	100 มิลลิโมลาร์	250 มิลลิโมลาร์	500 มิลลิโมลาร์	1 000 มิลลิโมลาร์	2 000 มิลลิโมลาร์
ตัวอย่าง	15.5±0.3	15.5±0.8	14.9±0.8	14.4±0.3	13.5±0.3
ตัวอย่าง + โซเดียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์	15.0±0.3	15.0±0.6	14.3±0.6	13.7±0.3	14.0±0.3
ตัวอย่าง + โซเดียมคลอไรด์ 30 มิลลิโมลาร์	13.5±0.3	14.5±0.3	14.3±0.3	14.3±0.3	14.3±0.5
ตัวอย่าง + โซเดียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์	10.3±0.3	12.3±0.3	13.3±0.3	14.0±0.3	14.0±0.3
ตัวอย่าง + โซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์	8.5±0.3	10.5±0.5	12.2±0.5	13.5±0.3	13.5±0.3



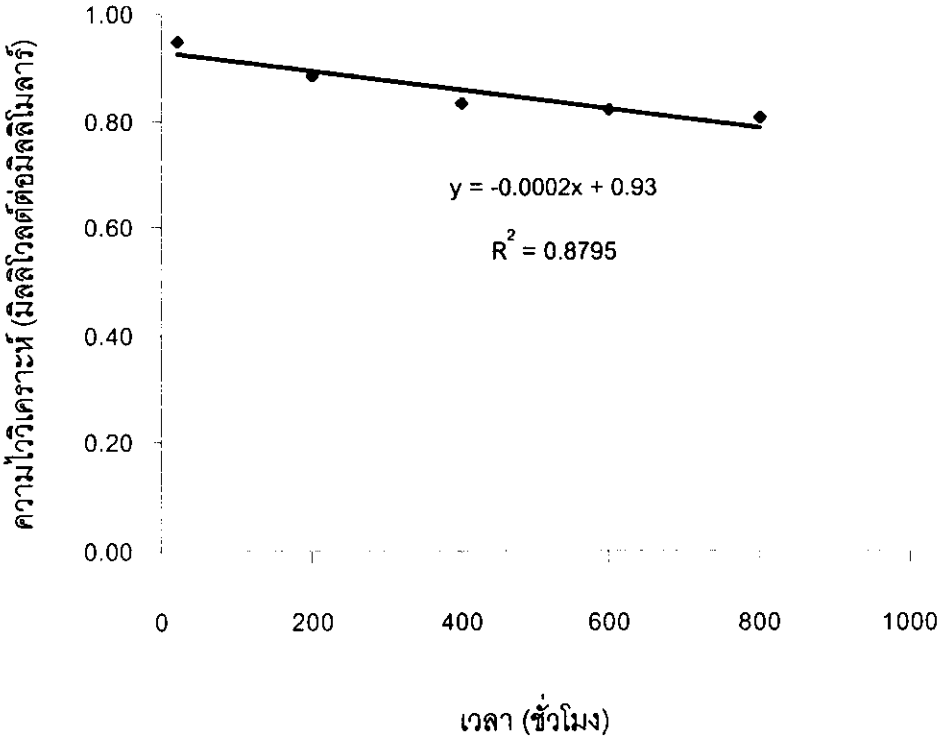
ภาพประกอบ 37 การตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ต่อสารละลายตัวอย่างที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ กัน

3.5 อายุการทำงานของเอนไซม์รีแอกเตอร์

เอนไซม์เป็นวัสดุชีวภาพที่เกิดการเสื่อมสภาพได้โดยตัวเอง หรือจากการใช้งานเป็นเวลานานซึ่งจะทำให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาลดลง จากการศึกษาอายุการทำงานของเอนไซม์รีแอกเตอร์ (2.14) หลังจากใช้งานไป 20 200 400 600 และ 800 ชั่วโมง พบว่าค่าสัญญาณการตอบสนองจะมีค่าลดลง เมื่อระยะเวลาการใช้งานมากขึ้น (ตาราง 25 ภาพประกอบ 38) อย่างไรก็ตาม ความไววิเคราะห์หลังจากใช้งานไป 800 ชั่วโมง ก็ยังเพียงพอที่จะใช้ในการวิเคราะห์

ตารางที่ 25 ผลของอายุของเอนไซม์รีแอกเตอร์ต่อการตอบสนองของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ ในสภาวะที่เหมาะสมของระบบที่ไม่มีไดอะไลเซอร์ เอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดใหญ่

ความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)	ค่าสัญญาณการตอบสนองของเทอร์มิสเตอร์ (มิลลิโวลต์) เมื่อใช้อายุการใช้งานของเอนไซม์รีแอกเตอร์				
	20 ชั่วโมง	200 ชั่วโมง	400 ชั่วโมง	600 ชั่วโมง	800 ชั่วโมง
10	9.6±0.0	9.8±0.1	10.2±0.1	9.6±0.1	8.1±0.5
20	19.3±0.2	20.0±0.3	19.0±0.1	19.2±0.3	16.3±0.5
40	37.5±0.2	37.9±0.7	36.0±0.1	36.2±0.5	35.2±0.7
60	57.1±0.1	53.9±0.6	52.2±0.1	51.6±0.6	47.3±0.6
80	76.1±0.2	72.5±0.2	68.7±0.1	67.5±0.3	65.2±0.1
เวลาวิเคราะห์	10	10	10	10	10
ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อมิลลิโมลาร์)	0.9496	0.8826	0.8332	0.8210	0.8055
สัมประสิทธิ์ถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง (r^2)	0.9959	0.9989	0.9998	0.9991	0.9990



ภาพประกอบ 38 ความสัมพันธ์ระหว่างความไววิเคราะห์กับอายุการใช้ของเอนไซม์รีแอกเตอร์ ในสภาวะที่เหมาะสมของระบบที่ไม่มีไดอะไลเซอร์ เอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดใหญ่

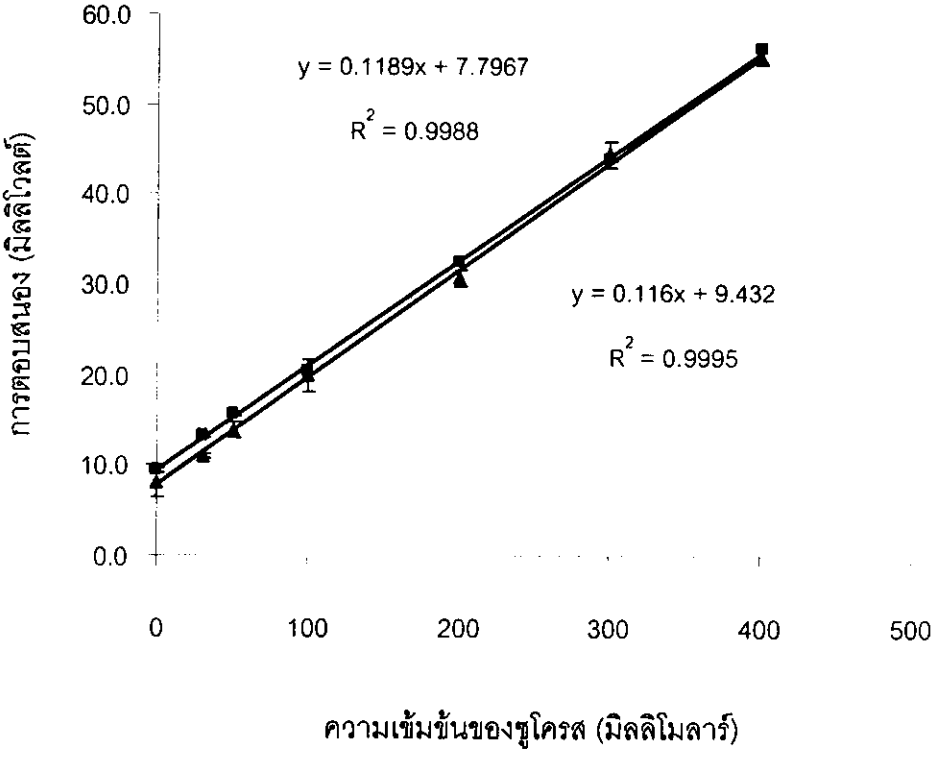
3.6 การวิเคราะห์หาปริมาณซูโครส

3.6.1 เทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์

จากสภาวะที่เหมาะสมการทดลองของระบบที่มีไดอะไลเซอร์ขนาดใหญ่ สารละลายบัฟเฟอร์ฝั่งตัวอย่างมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.00 โมลาร์ อัตราไหลสารตัวอย่าง 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราไหลสารละลายบัฟเฟอร์ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที และปริมาตรสารตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร นำมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายมาตรฐานซูโครสความเข้มข้น 30-400 มิลลิโมลาร์ ได้ผลการทดลองดังตาราง 26 ภาพประกอบ 39 และวิเคราะห์ปริมาณซูโครสในตัวอย่างเครื่องดื่มกระป๋องสองชุด โดยนำเครื่องดื่มกระป๋องที่ผ่านการกรองแล้วหนึ่งส่วนเจือจางกับสารละลายบัฟเฟอร์สี่ส่วน หาปริมาณซูโครสจากกราฟมาตรฐานของแต่ละชุดได้ผลการทดลอง ดังตาราง 27 และ 28

ตารางที่ 26 การตอบสนองของเทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ต่อสารละลายซูโครสมาตรฐาน ชุดที่ 1 และ ชุดที่ 2

ความเข้มข้นของซูโครส (มิลลิโมลาร์)	การตอบสนอง (มิลลิโวลต์)	
	ชุดที่ 1 ค่าเฉลี่ย ± SD	ชุดที่ 2 ค่าเฉลี่ย ± SD
0	8.0 ± 0.3	9.3 ± 0.2
30	11.0 ± 1.5	13.2 ± 0.1
50	13.9 ± 0.1	15.8 ± 0 .2
100	19.9 ± 0.9	20.4 ± 0.2
200	30.7 ± 1.8	32.5 ± 0.2
300	44.5 ± 0.9	43.9 ± 0.4
400	55.0 ± 1.5	56.2 ± 0.2
ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อมิลลิโมลาร์)	0.1189	0.1160
สัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง (r^2)	0.9988	0.9995



ภาพประกอบ 39 การตอบสนองของเทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ต่อสารละลายซูโครสมาตรฐาน ชุดที่ 1 และ ชุดที่ 2 เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 27 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสที่มีอยู่ในเครื่องดื่มกระป๋องชุดที่ 1 ด้วยเทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์

เครื่องดื่ม	วันที่ผลิต วัน-เดือน-ปี	ความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)	
		เทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ ค่าเฉลี่ย ± SD (n = 3)	ข้างกระป๋อง
มะพร้าว UFC	04-05-00	295 ± 0	117
เก็กฮวย UFC	04-05-00	269 ± 16	292
บัวบก Malee	30-11-00	307 ± 16	409
ลำไย UFC	04-05-00	286 ± 34	321
เฉาก๊วย UFC	07-08-00	295 ± 18	409
มะตูม UFC	04-05-00	370 ± 22	292
ชามะนาว UFC	04-05-00	122 ± 16	234
แอปเปิ้ล Malee	12-12-00	63 ± 18	278
ลิ้นจี่ UFC	22-07-00	59 ± 32	497
ส้ม UFC	22-07-00	55 ± 22	205
องุ่น Malee	13-12-00	ND	205
ผรั่ง UFC	28-07-00	ND	205
บ๊วย ดอยคำ	28-07-00	ND	292

หมายเหตุ วันที่วิเคราะห์ 7 มิถุนายน 2544 (07-06-01)

ND = non detectable

ตารางที่ 28 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสที่มีอยู่ในเครื่องดื่มกระป๋องชุดที่ 2 ด้วยเทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์

เครื่องดื่ม	วันที่ผลิต วัน-เดือน-ปี	ความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)	
		เทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ ค่าเฉลี่ย ± SD (n = 3)	ข้างกระป๋อง
มะพร้าว Malee	12-05-01	223 ± 33	175
มะพร้าว Freeze	27-04-01	236 ± 6	146
เก็กฮวย Malee	09-11-00	283 ± 29	351
เก็กฮวย Freeze	23-03-01	292 ± 6	234
ลำไย Malee	04-11-00	408 ± 12	380
ลำไย A-Tip	10-01-01	374 ± 22	351
เฉาก๊วย Malee	14-06-00	309 ± 17	409
เฉาก๊วย Freeze	18-10-00	326 ± 39	263
เฉาก๊วย A-Tip	15-12-00	378 ± 27	253
ฟักเขียว Freeze	09-03-01	210 ± 19	132
กระเจี๊ยบ A-Tip	15-12-00	85 ± 35	292
ชาลิปตัน	27-05-01	59 ± 6	304
ชามะนาว ยูนิฟ	16-08-00	59 ± 17	307
บ๊วย สิงห์เฟรช	24-10-00	ND	584

หมายเหตุ วันที่วิเคราะห์ 14 สิงหาคม 2544 (04-08-01)

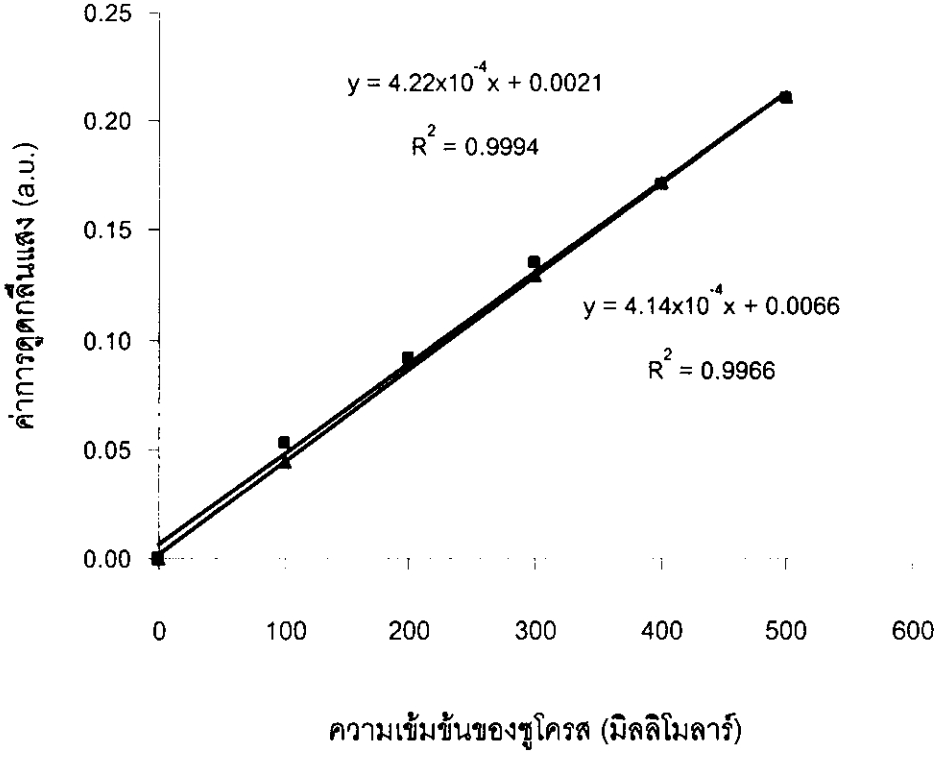
ND = non detectable

3.6.2 เทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี

วิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในตัวอย่างเครื่องดื่มกระป๋องจำนวน 2 ชุด ด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตริก (2.15.2) และทำกราฟมาตรฐานของแต่ละชุด ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดสารละลายมาตรฐานซูโครสที่ใช้ทำกราฟมาตรฐาน แสดงดังตาราง 29 ภาพประกอบ 40 และวิเคราะห์ความเข้มข้นของซูโครสในตัวอย่างเครื่องดื่ม ชุดที่ 1 และ 2 ได้จากกราฟมาตรฐาน แสดงดังตาราง 30 และ 31 ตามลำดับ

ตารางที่ 29 ค่าการดูดกลืนแสงของเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตริกต่อสารละลายซูโครสมาตรฐาน ชุดที่ 1 และ ชุดที่ 2

ความเข้มข้นของซูโครส	ค่าการดูดกลืนแสง (a.u.)	
(มิลลิโมลาร์)	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2
0	0.00	0.00
100	0.04	0.05
200	0.09	0.09
300	0.13	0.14
400	0.17	0.17
500	0.21	0.21
ความไววิเคราะห์	4.22×10^{-4}	4.14×10^{-4}
สัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง (r^2)	0.9994	0.9966



ภาพประกอบ 40 ค่าการดูดกลืนแสงของเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตริกต่อสารละลายซูโครสมาตรฐาน ชุดที่ 1 และ ชุดที่ 2 เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 30 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสที่มีอยู่ในเครื่องดื่มกระป๋อง ชุดที่ 1 ด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตริก

เครื่องดื่ม	วันที่ผลิต วัน-เดือน-ปี	ค่าการดูดกลืนแสง (a.u.) ก่อนและหลังย่อยซูโครส			ปริมาณซูโครส * (มิลลิโมลาร์)	
		ก่อน	หลัง	หลัง-ก่อน	สเปกโตรโฟโตเมตรี	ข้างกระป๋อง
มะพร้าว UFC	04-05-00	0.05	0.16	0.11	256	117
เก๊กฮวย UFC	04-05-00	0.01	0.16	0.15	350	292
บัวบก Malee	30-11-00	0.02	0.15	0.13	303	409
ลำไย UFC	04-05-00	0.05	0.19	0.14	327	321
เฉาก๊วย UFC	07-08-00	0.03	0.14	0.11	256	409
มะตูม UFC	04-05-00	0.00	0.14	0.14	327	292
ชามะนาว UFC	04-05-00	0.15	0.16	0.01	19	234
แอปเปิ้ล Malee	12-12-00	0.10	0.11	0.01	19	278
ลิ้นจี่ UFC	22-07-00	0.20	0.21	0.01	19	497
ส้ม UFC	22-07-00	0.11	0.13	0.02	42	205
องุ่น Malee	13-12-00	0.10	0.10	0.00	ND	205
ผรั่ง UFC	28-07-00	0.12	0.12	0.00	ND	205
บ๊วย คอยคำ	28-07-00	0.10	0.11	0.01	19	292

หมายเหตุ วันที่วิเคราะห์ 7 มิถุนายน 2544 (07-06-01)

ND = non detectable

* = ปริมาณซูโครสเทียบจากผลต่างของปริมาณกลูโคสก่อนและหลังย่อยซูโครสที่ได้จากค่าการดูดกลืนแสง

ตารางที่ 31 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสที่มีอยู่ในเครื่องดื่มกระป๋อง ชุดที่ 2 ด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตริก

เครื่องดื่ม	วันที่ผลิต วัน-เดือน-ปี	ค่าการดูดกลืนแสง (a.u.) ก่อนและหลังย่อยซูโครส			ปริมาณซูโครส * (มิลลิโมลาร์)	
		ก่อน	หลัง	หลัง-ก่อน	สเปกโตรโฟโตเมตรี	ข้างกระป๋อง
มะพร้าว Malee	12-05-01	0.03	0.15	0.12	274	175
มะพร้าว Freeze	27-04-01	0.03	0.16	0.13	298	146
เก๊กฮวย Malee	09-11-00	0.02	0.15	0.13	298	351
เก๊กฮวย Freeze	23-03-01	0.03	0.17	0.14	322	234
ลำไย Malee	04-11-00	0.02	0.20	0.18	419	380
ลำไย A-Tip	10-01-01	0.04	0.21	0.17	395	351
เฉาก๊วย Malee	14-06-00	0.03	0.18	0.15	346	409
เฉาก๊วย Freeze	18-10-00	0.02	0.17	0.15	346	263
เฉาก๊วย A-Tip	15-12-00	0.05	0.19	0.14	322	253
ฟักเขียว Freeze	09-03-01	0.03	0.15	0.12	274	132
กระเจี๊ยบA-Tip	15-12-00	0.15	0.15	0.00	ND	292
ชาลิปตัน	27-05-01	0.13	0.16	0.03	57	304
ชามะนาว ยูนิฟ	16-08-00	0.20	0.20	0.00	ND	307
บ๊วย สิงห์เฟรช	24-10-00	0.22	0.22	0.00	ND	584

หมายเหตุ วันที่วิเคราะห์ 14 สิงหาคม 2544 (14-08-01)

ND = non detectable

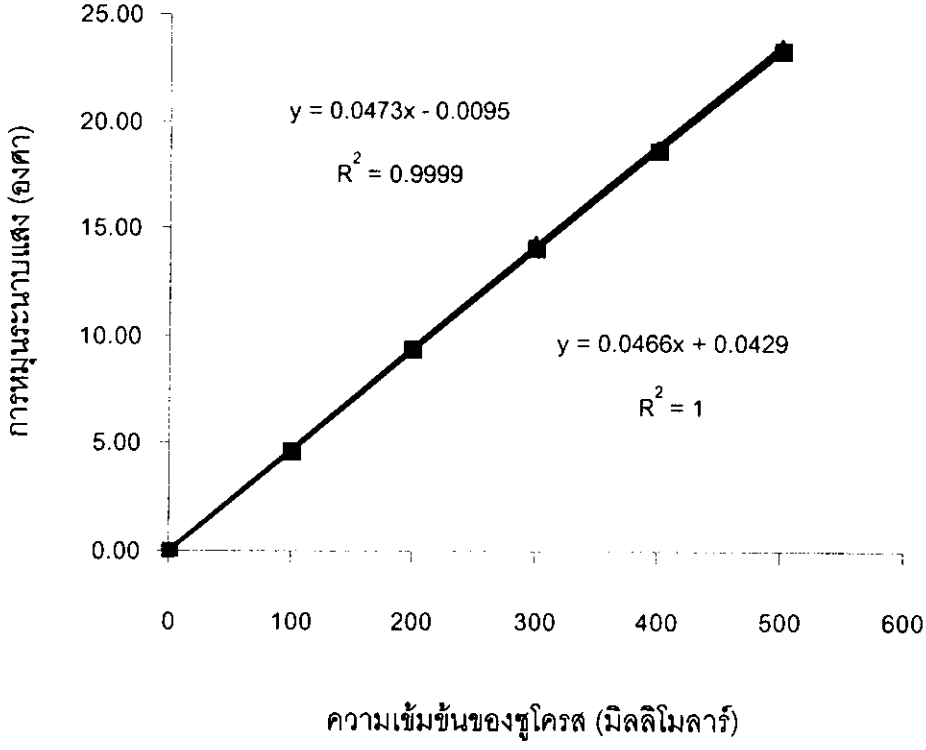
* = ปริมาณซูโครสเทียบจากผลต่างของปริมาณกลูโคสก่อนและหลังย่อยซูโครสที่ได้จากค่าการดูดกลืนแสง

3.6.3 เทคนิคโพลาริเมตรี

วิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในตัวอย่างเครื่องดื่ม ด้วยเทคนิคโพลาริเมตริก (2.15.3) ทำการทดลอง 2 ชุด และทำกราฟมาตรฐานของแต่ละชุด เช่นเดียวกันกับเทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ และสเปกโตรโฟโตเมตริก ค่าการหมุนระนาบแสงที่ได้จากการวัดสารละลายมาตรฐานซูโครสที่ใช้ทำกราฟมาตรฐาน แสดงดังตาราง 32 ภาพประกอบ 41 และวิเคราะห์ความเข้มข้นของซูโครสในตัวอย่างเครื่องดื่มกระป๋องชุดที่ 1 และ 2 ได้จากกราฟมาตรฐาน แสดงดังตาราง 33 และ 34 ตามลำดับ

ตารางที่ 32 การหมุนระนาบแสงของเทคนิคโพลาริเมตริกต่อสารละลายซูโครสมาตรฐาน ชุดที่ 1 และ ชุดที่ 2

ความเข้มข้นของซูโครส	การหมุนระนาบแสง (องศา)	
(มิลลิโมลาร์)	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2
0	0.00	0.00
100	4.68	4.70
200	9.40	9.42
300	14.34	14.04
400	18.84	18.68
500	23.62	23.30
ความไววิเคราะห์	0.0473	0.0466
สัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง (r^2)	0.9999	1



ภาพประกอบ 41 การหมุนระนาบแสงของเทคนิคโพลาริเมตริกต่อสารละลายซูโครสมาตรฐาน ชุดที่ 1 และ ชุดที่ 2 เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 33 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสที่มีอยู่ในเครื่องดื่มกระป๋อง ชุดที่ 1 ด้วยเทคนิคโพลาริเมตริก

เครื่องดื่ม	วันที่ผลิต วัน-เดือน-ปี	การหมุนระนาบแสง (องศา)	ปริมาณซูโครส (มิลลิโมลาร์)	
			เทคนิคโพลาริเมตรี	ช้างกระป๋อง
มะพร้าว UFC	04-05-00	5.70	241	117
เก๊กฮวย UFC	04-05-00	7.52	318	292
บัวบก Malee	30-11-00	7.80	330	409
ลำไย UFC	04-05-00	8.12	344	321
เฉาก๊วย UFC	07-08-00	8.60	364	409
มะตูม UFC	04-05-00	8.70	368	292
ชามะนาว UFC	04-05-00	ND	ND	234
แอปเปิ้ล Malee	12-12-00	ND	ND	278
ลิ้นจี่ UFC	22-07-00	ND	ND	497
ส้ม UFC	22-07-00	ND	ND	205
องุ่น Malee	13-12-00	ND	ND	205
ผรั่ง UFC	28-07-00	ND	ND	205
บ๊วย ดอยคำ	28-07-00	ND	ND	292

หมายเหตุ วันที่วิเคราะห์ 7 มิถุนายน 2544 (07-06-01)

ND = non detectable

ตารางที่ 34 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสที่มีอยู่ในเครื่องดื่มกระป๋อง ชุดที่ 2 ด้วยเทคนิคโพลาริเมตริก

เครื่องดื่ม น้ำผลไม้	วันที่ผลิต วัน-เดือน-ปี	การหมุนระนาบแสง (องศา)	ปริมาณซูโครส (มิลลิโมลาร์)	
			เทคนิคโพลาริเมตรี	ข้างกระป๋อง
มะพร้าว Malee	12-05-01	5.96	254	175
มะพร้าว Freeze	27-04-01	5.86	250	142
เก็กฮวย Malee	09-11-00	7.89	337	351
เก็กฮวย Freeze	23-03-01	7.72	330	234
ลำไย Malee	04-11-00	10.00	427	380
ลำไย A-Tip	10-01-01	8.70	372	351
เฉาก๊วย Malee	14-06-00	8.12	347	409
เฉาก๊วย Freeze	18-10-00	7.90	337	263
เฉาก๊วย A-Tip	15-12-00	9.66	413	253
ฟักเขียว Freeze	09-03-01	6.16	263	132
กระเจี๊ยบ A-Tip	15-12-00	ND	ND	292
ชาลิปตัน	27-05-01	ND	ND	304
ชามะนาว ยูนิฟ	16-08-00	ND	ND	307
บ๊วย สิงห์เฟรช	24-10-00	ND	ND	584

หมายเหตุ วันที่วิเคราะห์ 14 สิงหาคม 2544 (14-08-01)

ND = non detectable

3.7 การเปรียบเทียบเทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ กับเทคนิคอื่นๆ

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสในตัวอย่างเครื่องดื่มจำนวน 27 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ สเปกโตรโฟโตเมตรี โพลาริเมตรี และค่าที่ระบุข้างกระป๋อง ดังแสดงในตาราง 35 พบว่าในเครื่องดื่มที่มีกรดซิตริก เช่น ชามะนาว แอปเปิ้ล ส้ม บ๊วย กระเจี๊ยบ ลิ้นจี่ ฝรั่ง และองุ่น ปริมาณซูโครสที่วิเคราะห์ได้ต่ำกว่าจนถึงไม่พบเมื่อเทียบกับค่าที่ระบุไว้ข้างภาชนะบรรจุค่อนข้างมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่กรดซิตริกไปเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของซูโครสให้เป็นกลูโคส และฟรักโทส (Junk and Pancoast, 1973) ทำให้ปริมาณซูโครสลดลง นอกจากนี้ระยะเวลาการเก็บตัวอย่างยังเป็นปัจจัยที่สำคัญ เนื่องจากซูโครสเมื่ออยู่ในรูปของสารละลายจะไม่เสถียรทำให้เกิดการสลายไปเป็นกลูโคสและฟรักโทสได้เมื่อเวลาผ่านไป (Junk and Pancoast, 1973) จะเห็นได้จากผลการทดลองที่แสดงในตาราง 35 ในตัวอย่างชามะนาว แอปเปิ้ล ลิ้นจี่ ส้ม องุ่น ฝรั่ง และบ๊วย ซึ่งทำการวิเคราะห์ 6-11 เดือนหลังจากวันผลิต พบว่าปริมาณกลูโคสก่อนและหลังการวัดมีปริมาณเท่ากัน ซึ่งยืนยันได้ว่าปริมาณซูโครสในตัวอย่างเกิดการสลายตัวจริง

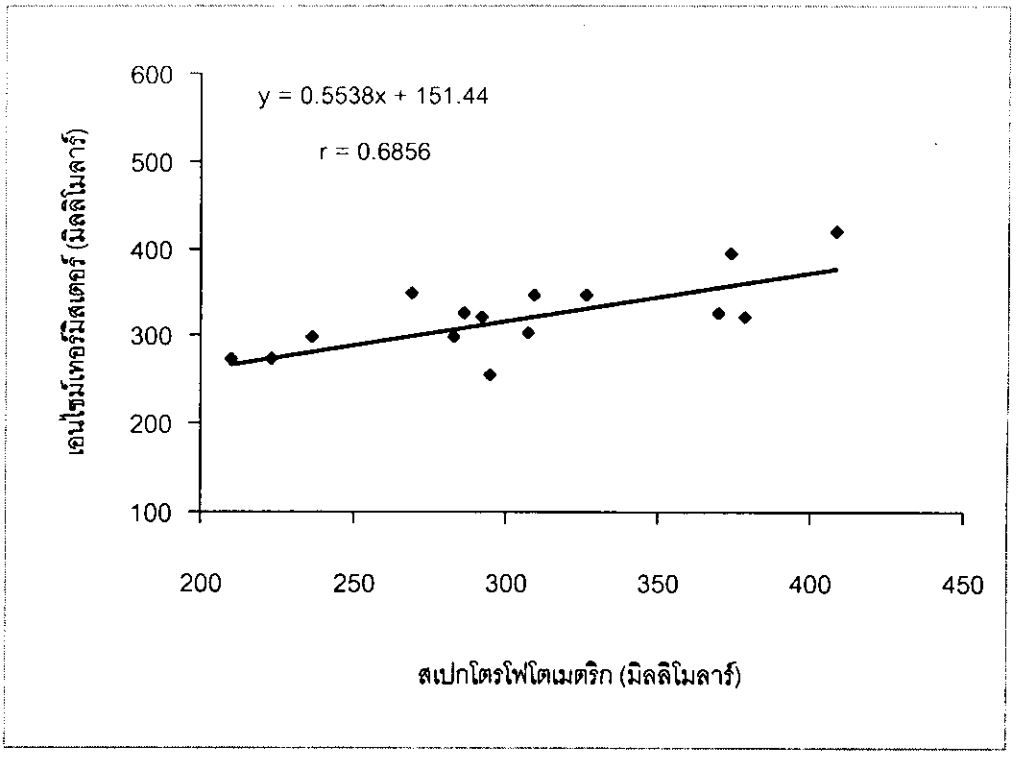
สำหรับเครื่องดื่มที่ไม่มีกรดซิตริกเป็นส่วนประกอบ ได้แก่ มะพร้าว เก็กฮวย บัวบก เฉาก๊วย ลำไย มะตูม และน้ำฟักเขียว นำมาทดสอบเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสในเครื่องดื่มกระป๋องของวิธีต่างๆ แต่ละคู่ ดังนี้

1. เทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์กับสเปกโตรโฟโตเมตริก
2. เทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์กับโพลาริเมตริก
3. เทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรีกับโพลาริเมตริก
4. เทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์กับข้างกระป๋อง
5. เทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรีกับข้างกระป๋อง
6. เทคนิคโพลาริเมตริกกับข้างกระป๋อง

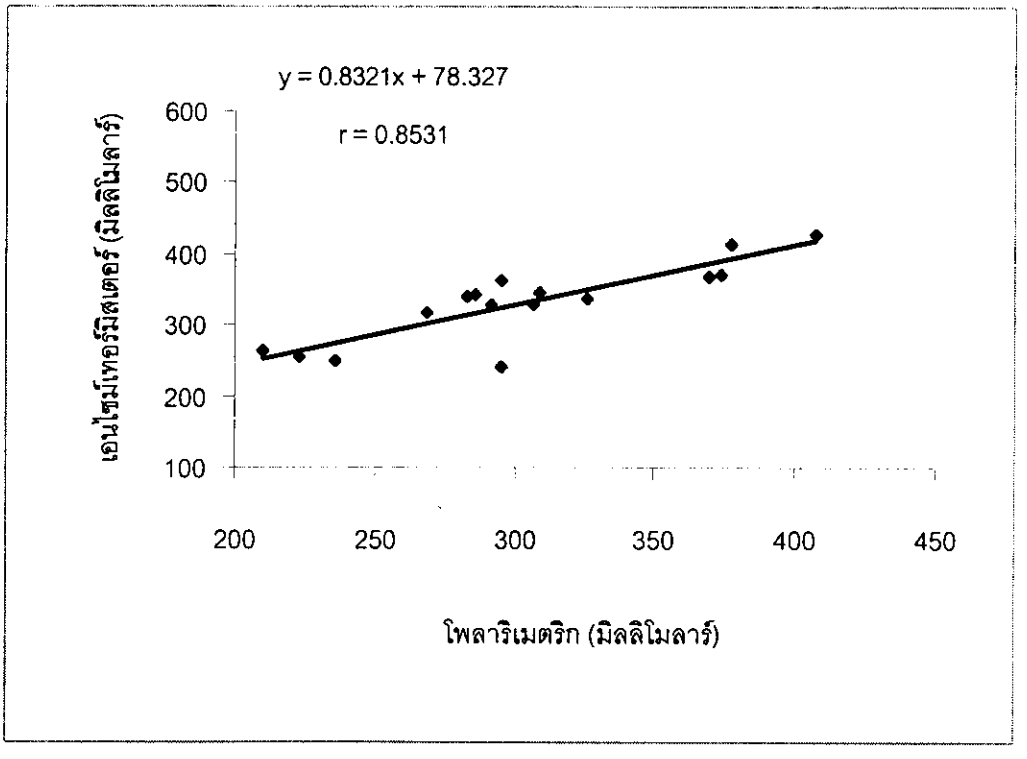
จากการทดสอบด้วยวิธีการวิเคราะห์ความถดถอยเชิงเส้น โดยพิจารณาความสัมพันธ์ในรูปสมการเชิงเส้นคือ ความชัน และ จุดตัดแกน ดังแสดงในภาพประกอบ 42-47 และตาราง 36 จะเห็นว่าผลการทดลองจากแต่ละวิธีมีความสัมพันธ์ในระดับหนึ่งแต่จุดจากผลการทดลองที่แสดงในภาพจะกระจายจากแนวเส้นตรงค่อนข้างมาก ซึ่งแสดงให้เห็นในค่าของสัมประสิทธิ์สัมพันธ์ (r) ของทุกคู่ที่พิจารณาว่ามีค่าน้อยกว่า 1 ค่อนข้างมาก นั่นคือเทคนิคแต่ละคู่ที่ทดสอบนั้นไม่สามารถสรุปได้ว่าให้ผลที่เท่ากันซึ่งอาจจะเกิดจากความคลาดเคลื่อนของการวัดวิธีใดวิธีหนึ่งหรือจากทั้งสองวิธีที่เปรียบเทียบกัน ดังนั้นจึงได้ใช้วิธีของ Bland-Altman (Glantz , 1997) เพื่อพิจารณาว่าสองวิธีใดๆ มีความสอดคล้องกันมากน้อยอย่างไร

ตารางที่ 35 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์เทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ สเปกโตรโฟโตเมตริก โพลาริเมตรี และปริมาณซูโครสที่ระบุข้างกระป๋อง

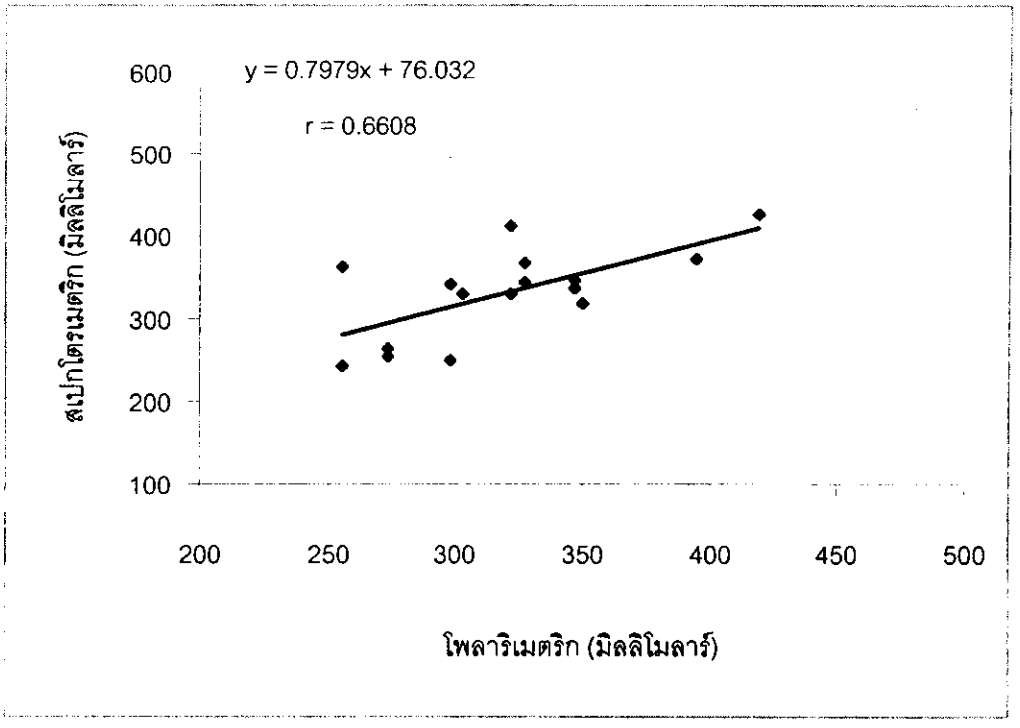
ลำดับที่	ชื่อตัวอย่าง	วันที่ผลิต	ปริมาณซูโครส (มิลลิโมลาร์)			
			ข้างกระป๋อง	เอนไซม์เทอร์มิสเตอร์	สเปกโตรโฟโตเมตรี	โพลาริเมตรี
1	มะพร้าว Malee	12-05-01	175	223	274	254
2	มะพร้าว Freeze	27-04-01	146	236	298	250
3	มะพร้าว UFC	16-11-00	117	295	256	241
4	เก็กฮวย Malee	09-11-00	351	283	298	337
5	เก็กฮวย Freeze	23-03-01	234	292	322	330
6	เก็กฮวย UFC	16-11-00	292	269	350	318
7	ลำไย Malee	04-11-00	380	408	419	427
8	ลำไย A-Tip	10-01-01	351	374	395	372
9	ลำไย UFC	16-11.00	321	286	327	344
10	เฉาก๊วย Malee	14-06-00	409	309	346	347
11	เฉาก๊วย Freeze	18-10-00	263	326	346	337
12	เฉาก๊วย A-Tip	15-12-00	526	378	322	413
13	เฉาก๊วย UFC	07-08-00	409	295	256	364
14	บัวบก Malee	30-11-00	409	307	303	330
15	มะตูม Malee	04-05-00	292	370	327	368
16	ฟักเขียว Freeze	09-03-01	132	210	274	263
17	ชาลิปตัน	27-05-01	304	59	57	ND
18	ชามะนาว UFC	16-11-00	234	122	19	ND
19	ชามะนาว ยูนิฟ	16-08-00	307	59	ND	ND
20	บ๊วย สิงห์เฟรช	24-10-00	584	ND	ND	ND
21	บ๊วย ดอยคำ	28-07-00	292	ND	19	ND
22	กระเจี๊ยบ A-Tip	15-12-00	292	85	ND	ND
23	ลิ้นจี่ UFC	22-07-00	497	59	19	ND
24	ผรั่ง UFC	28-07-00	205	ND	ND	ND
25	องุ่น Malee	13-12-00	205	ND	ND	ND
26	แอปเปิ้ล Malee	12-12-00	278	63	19	ND
27	ส้ม UFC	22-07-00	205	55	42	ND



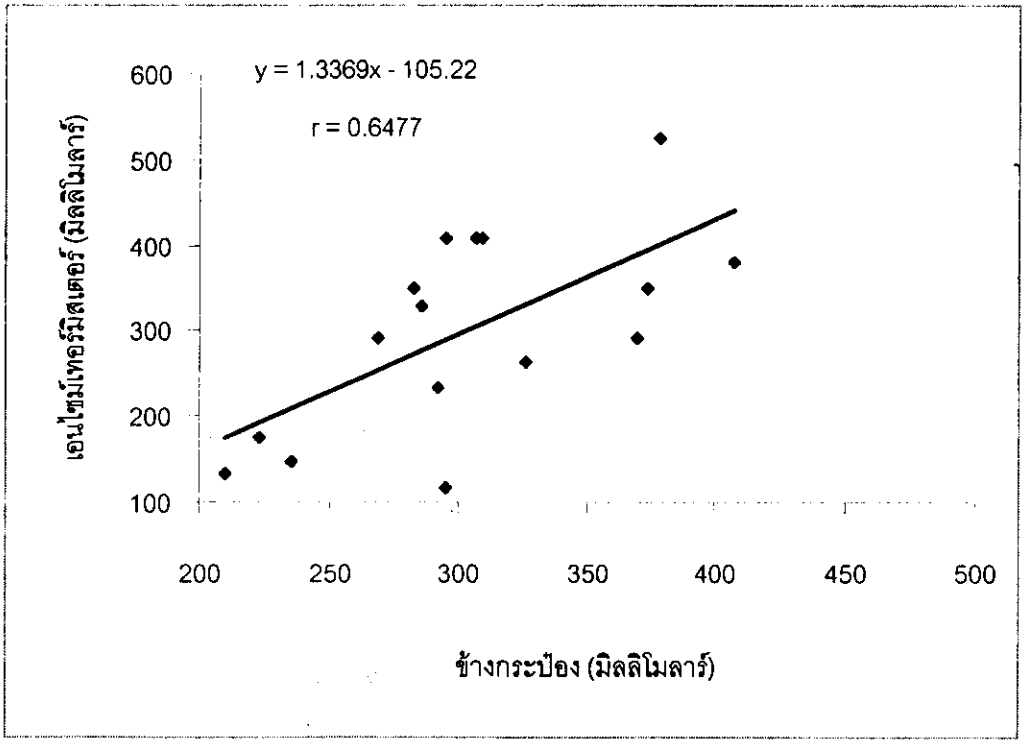
ภาพประกอบ 42 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสระหว่างเทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์กับเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี



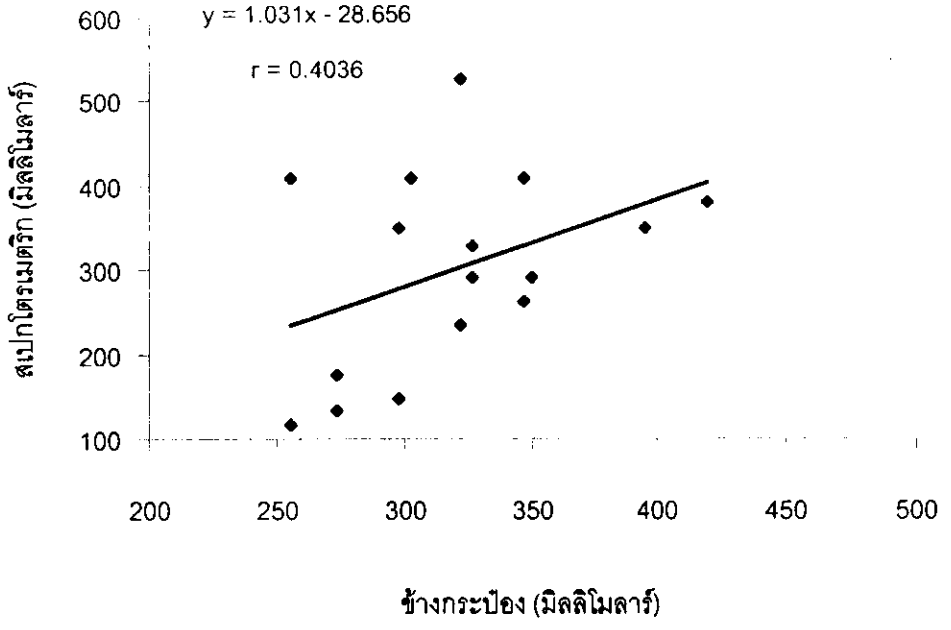
ภาพประกอบ 43 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสระหว่างเทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์กับเทคนิคโพลาริเมตริก



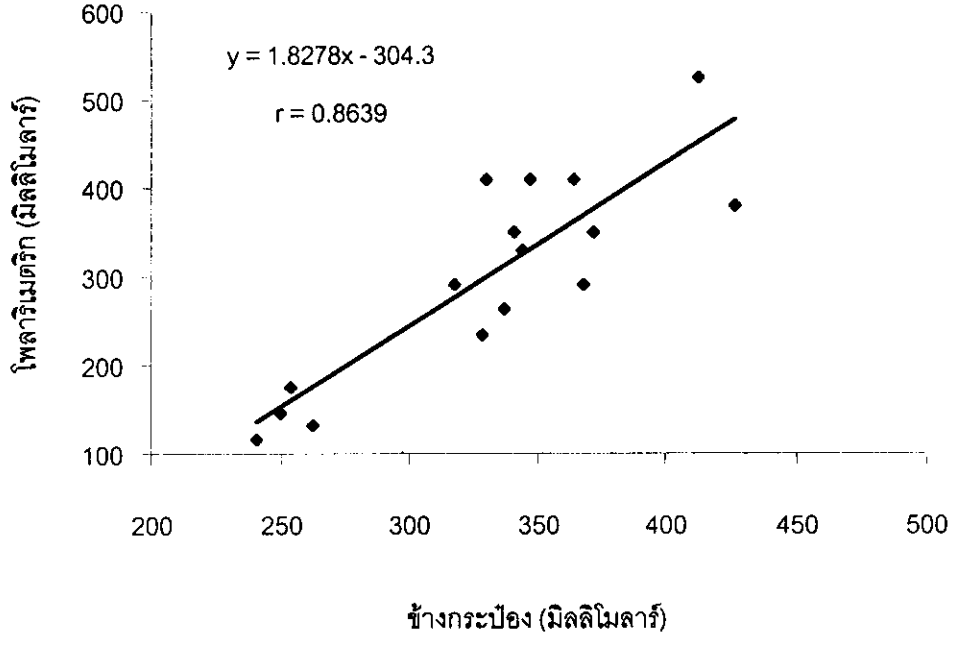
ภาพประกอบ 44 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสระหว่างเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรีกับเทคนิคโพลาริเมตริก



ภาพประกอบ 45 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสระหว่างเทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์กับข้างกระป๋อง



ภาพประกอบ 46 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสระหว่างเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตริกกับข้างกระป๋อง



ภาพประกอบ 47 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสระหว่างเทคนิคโพลาริเมตริกกับข้างกระป๋อง

ตารางที่ 36 สรุปการเปรียบเทียบความแตกต่างของเทคนิควิเคราะห์แต่ละคู่ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความถดถอยเชิงเส้น

วิธีวิเคราะห์	สมการความถดถอยเชิงเส้น (regression line)	ค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้น (r)	ความคลาดเคลื่อน (confident limits)	
			ความชัน	จุดตัดแกน
1.เอนไซม์เทอร์มิสเตอร์กับสเปกโตรโฟโตเมตริก	Y=0.5538x+151.44	0.6856	0.5538± 0.16	151.44±49.12
2.เอนไซม์เทอร์มิสเตอร์กับโพลาริเมตริก	Y=0.8321x+78.327	0.8531	0.8 ± 0.14	78.3 ±52.51
3.สเปกโตรโฟโตเมตริกกับโพลาริเมตริก	Y=0.7979x+76.032	0.6608	0.7 ± 0.20	76.0 ±64.64
4.เอนไซม์เทอร์มิสเตอร์กับข้างกระป๋อง	Y=1.3369x-105.22	0.6477	1.3 ± 0.43	-105.2 ±131.33
5.สเปกโตรโฟโตเมตริกกับข้างกระป๋อง	Y=1.031x-28.656	0.4036	1.0 ± 0.52	-28.6 ±166.74
6.โพลาริเมตริกกับข้างกระป๋อง	Y=1.8278x-304.3	0.8639	1.8 ± 0.26	-304.3 ±88.69

วิธีของ Bland-Altman นี้เป็นวิธีง่ายๆ ที่แสดงให้เห็นว่าผลการทดลองจากสองวิธีจากตัวอย่างเดียวกันนั้นมีความสอดคล้องกันอย่างไร หลักการพิจารณาคือ หาค่าผลต่างของผลการทดลองจากสองวิธี ซึ่งค่านี้จะบอกถึงความไม่สอดคล้องกันของวิธีทั้งสอง หลังจากนั้นหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลต่างเหล่านี้ ค่าเฉลี่ยของผลต่างนี้คือค่าที่วัดความเอนเอียง (bias) ระหว่างสองวิธี และสุดท้ายหาค่าประมาณที่ดีที่สุดจากสองวิธีนั้นคือค่าเฉลี่ยของผลการทดลองแต่ละคู่ หลังจากนั้นเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างกับค่าเฉลี่ย ซึ่งจะแสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างอย่างเป็นระบบระหว่างเทคนิควัดทั้งสองหรือไม่ ตาราง 37-42 แสดงผลการวัดความแตกต่าง และค่าเฉลี่ยของเทคนิคที่เปรียบเทียบกันหกคู่ และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความแตกต่าง และค่าเฉลี่ยแสดงในภาพประกอบ 48-53

จากภาพจะเห็นว่าความเข้มข้นที่ได้จากเทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ สเปกโตรโฟโตเมตริก และโพลาริเมตริก (ภาพประกอบ 48-50) มีค่าต่างจากที่ระบุไว้ข้างกระป๋องมาก ซึ่งน่าจะเป็นไปได้ว่าปริมาณน้ำตาลที่ระบุไว้ข้างกระป๋อง แตกต่างจากปริมาณที่มีอยู่จริง ตัวอย่างเช่นในน้ำมะพร้าว (ลำดับที่ 1-3 ตาราง 35) และ ฟักเขียว (ลำดับที่ 16) ปริมาณน้ำตาลข้างกระป๋องจะน้อยกว่าที่วิเคราะห์ได้จากทั้ง 3 วิธีเกือบเท่าตัว ในขณะที่น้ำเฉาก๊วย (ลำดับที่ 10 12 และ 13) ปริมาณข้างกระป๋องจะมากกว่าที่วิเคราะห์ได้ค่อนข้างมาก

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธีวิเคราะห์ 3 วิธีจะเห็นได้ว่าเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์มีความเอนเอียงไปทางลบของทั้งวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริกและโพลาริเมตริกโดยค่าเฉลี่ยของความแตกต่างระหว่างเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์กับสเปกโตรโฟโตเมตริก คือ –16 มิลลิโมลาร์ ดังตาราง 40 ภาพประกอบ 51 และเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์กับโพลาริเมตริกอยู่ที่ –27 มิลลิโมลาร์ ดังตาราง 41 ภาพประกอบ 52 การวัดโดยเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ที่มีค่าน้อยกว่าระบบทั้งสอง อาจจะเนื่องจากผลของเกลือซึ่งผ่านเข้าไปในคอลัมน์ของเอนไซม์ เนื่องจากเคยมีรายงานว่าเกลือมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิด (Bloomfeild and Stephens, 1996) ดังนั้นหากต้องการที่จะพัฒนาระบบนี้ต่อไปจะต้องศึกษาผลของเกลือต่อการทำงานของเอนไซม์ ส่วนการเปรียบเทียบระหว่างวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริกกับโพลาริเมตริก ค่าเฉลี่ยของความแตกต่างคือ –11 มิลลิโมลาร์ ดังตาราง 42 ภาพประกอบ 53 นั่นคือเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตริกมีแนวโน้มที่จะให้ค่าที่ต่ำกว่าเทคนิคโพลาริเมตริก เมื่อพิจารณาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานกับค่าที่วิเคราะห์ได้ เทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์กับโพลาริเมตริกจะใกล้เคียงกันที่สุด โดยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจะอยู่ในช่วง 7-13 เปอร์เซ็นต์ของค่าที่วิเคราะห์ได้ ส่วนเทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์กับสเปกโตรโฟโตเมตริก อยู่ในช่วง 10-17 เปอร์เซ็นต์ และเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตริกกับโพลาริเมตริก อยู่ในช่วง 10-17 เปอร์เซ็นต์ ความแตกต่างดังกล่าวคาดว่าเกิดจากความคลาดเคลื่อนของการวัดซึ่งอาจจะเกิดได้ในทั้ง 3 วิธี ในการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่อง

ดื่มกระป๋องโดยเทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ก่อนการวิเคราะห์มีการกรองตัวอย่างเพื่อกำจัดอนุภาคขนาดใหญ่โดยกระดาษกรอง ดังนั้นอนุภาคแขวนลอยที่เล็กกว่านั้น (ขนาดเล็กกว่า 11 ไมโครเมตร) เช่น สี โปรตีน ไขมัน แป้ง เป็นต้น จะถูกผ่านเข้าไปในระบบเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ ซึ่งอาจจะไปรบกวนการเคลื่อนที่ของซูโครสผ่านเมมเบรนในไดอะไลเซอร์ เนื่องจากปริมาณของอนุภาคเหล่านี้ในเครื่องดื่มแต่ละชนิดน่าจะไม่เท่ากันจึงส่งผลให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อนต่างกันไป ส่วนในกรณีของเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตริกต้องวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสก่อนและหลังการย่อยซูโครสโดยเอนไซม์ ดังนั้นจึงมีขั้นตอนเพิ่มขึ้นทำให้โอกาสของความคลาดเคลื่อนเพิ่มขึ้น ส่วนในกรณีของเทคนิคโพลาริเมตริกก็มีการเตรียมตัวอย่างก่อนวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตริกและอาจมีการรบกวนเนื่องจากสารอื่น เช่น กลูโคส ที่มีในระบบทำให้ค่าที่ได้อาจจะคลาดเคลื่อนไป

ตารางที่ 37 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์กับข้างกระป๋อง โดยวิธีการทดสอบของ Bland-Altman

ลำดับที่	เครื่องดื่ม	ความเข้มความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)		ผลต่างของสอง วิธีวิเคราะห์ (มิลลิโมลาร์)	ค่าเฉลี่ยของสองวิธีวิเคราะห์ (มิลลิโมลาร์)
		เอนไซม์เทอร์มิสเตอร์	ข้างกระป๋อง		
1	มะพร้าว Malee	223	175	48	199
2	มะพร้าว Freeze	236	146	90	191
3	มะพร้าว UFC	295	117	178	206
4	เก๊กฮวย Malee	283	351	-68	317
5	เก๊กฮวย Freeze	292	234	58	263
6	เก๊กฮวย UFC	269	292	-23	281
7	ลำไย Malee	408	380	28	394
8	ลำไย A-Tip	374	351	23	363
9	ลำไย UFC	286	321	-35	304
10	เฉาก๊วย Malee	309	409	-100	359
11	เฉาก๊วย Freeze	326	263	63	295
12	เฉาก๊วย A-Tip	378	526	-148	452
13	เฉาก๊วย UFC	295	409	-114	352
14	บัวบก Malee	307	409	-102	358
15	มะตูม Malee	370	292	78	331
16	ฟักเขียว Freeze	210	132	78	171
ค่าเฉลี่ยของผลต่างของสองวิธีวิเคราะห์				**3**	
SD				**91**	

ตารางที่ 38 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตริกกับข้างกระป๋อง โดยวิธีการทดสอบของ Bland-Altman

ลำดับที่	เครื่องดื่ม	ความเข้มความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)		ผลต่างของสองวิธีวิเคราะห์ (มิลลิโมลาร์)	ค่าเฉลี่ยของสองวิธีวิเคราะห์ (มิลลิโมลาร์)
		สเปกโตรโฟโตเมตริก	ข้างกระป๋อง		
1	มะพร้าว Malee	274	175	99	225
2	มะพร้าว Freeze	298	146	152	222
3	มะพร้าว UFC	256	117	139	187
4	เก๊กฮวย Malee	298	351	-53	325
5	เก๊กฮวย Freeze	322	234	88	278
6	เก๊กฮวย UFC	350	292	58	321
7	ลำไย Malee	419	380	39	400
8	ลำไย A-Tip	395	351	44	373
9	ลำไย UFC	327	321	6	324
10	เฉาก๊วย Malee	346	409	-62	378
11	เฉาก๊วย Freeze	346	263	84	305
12	เฉาก๊วย A-Tip	322	526	-204	424
13	เฉาก๊วย UFC	256	409	-153	333
14	บัวบก Malee	303	409	-106	356
15	มะตูม Malee	327	292	35	310
16	ฟักเขียว Freeze	274	132	142	203
ค่าเฉลี่ยของผลต่างของสองวิธีวิเคราะห์				19	
SD				107	

ตารางที่ 39 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเทคนิคโพลาริเมตริกกับข้างกระป๋อง โดยวิธีการทดสอบของ Bland-Altman

ลำดับที่	เครื่องดื่ม	ความเข้มความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)		ผลต่างของสองวิธีวิเคราะห์ (มิลลิโมลาร์)	ค่าเฉลี่ยของสองวิธีวิเคราะห์ (มิลลิโมลาร์)
		โพลาริเมตริก	ข้างกระป๋อง		
1	มะพร้าว Malee	254	175	79	215
2	มะพร้าว Freeze	250	146	104	198
3	มะพร้าว UFC	241	117	124	179
4	เก๊กฮวย Malee	337	351	-14	344
5	เก๊กฮวย Freeze	330	234	96	282
6	เก๊กฮวย UFC	318	292	26	305
7	ลำไย Malee	427	380	47	404
8	ลำไย A-Tip	372	351	21	362
9	ลำไย UFC	344	321	23	333
10	เฉาก๊วย Malee	347	409	-62	378
11	เฉาก๊วย Freeze	337	263	74	300
12	เฉาก๊วย A-Tip	413	526	-113	470
13	เฉาก๊วย UFC	364	409	-45	387
14	บัวบก Malee	330	409	-79	370
15	มะตูม Malee	368	292	76	330
16	ฟักเขียว Freeze	263	132	131	198
ค่าเฉลี่ยของผลต่างของสองวิธีวิเคราะห์				**30**	
SD				**75**	

ตารางที่ 40 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์กับเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตริก โดยวิธีการทดสอบของ Bland-Altman

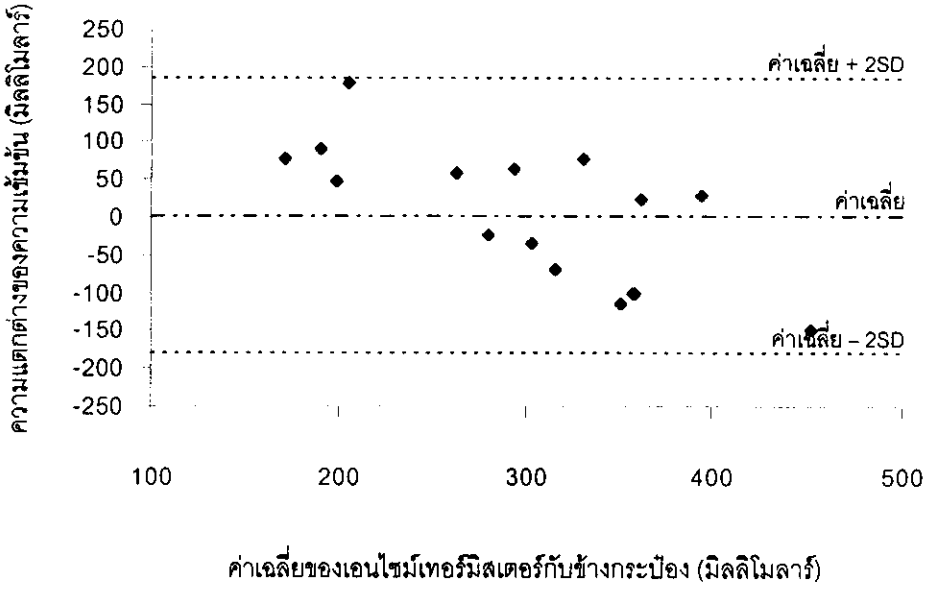
ลำดับที่	เครื่องดื่ม	ความเข้มความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)		ผลต่างของสองวิธีวิเคราะห์ (มิลลิโมลาร์)	ค่าเฉลี่ยของสองวิธีวิเคราะห์ (มิลลิโมลาร์)
		เอนไซม์เทอร์มิสเตอร์	สเปกโตรโฟโตเมตริก		
1	มะพร้าว Malee	223	274	-51	249
2	มะพร้าว Freeze	236	298	-62	267
3	มะพร้าว UFC	295	256	39	276
4	เก๊กฮวย Malee	283	298	-15	291
5	เก๊กฮวย Freeze	292	322	-30	307
6	เก๊กฮวย UFC	269	350	-81	310
7	ลำไย Malee	408	419	-11	414
8	ลำไย A-Tip	374	395	-21	385
9	ลำไย UFC	286	327	-41	307
10	เฉาก๊วย Malee	309	346	-37	328
11	เฉาก๊วย Freeze	326	346	-20	336
12	เฉาก๊วย A-Tip	378	322	56	350
13	เฉาก๊วย UFC	295	256	39	276
14	บัวบก Malee	307	303	4	305
15	มะตูม Malee	370	327	43	349
16	ฟักเขียว Freeze	210	274	-64	242
ค่าเฉลี่ยของผลต่างของสองวิธีวิเคราะห์				**-16**	
SD				**42**	

ตารางที่ 41 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์กับเทคนิคโพลาริเมตริกโดยวิธีการทดสอบของ Bland-Altman

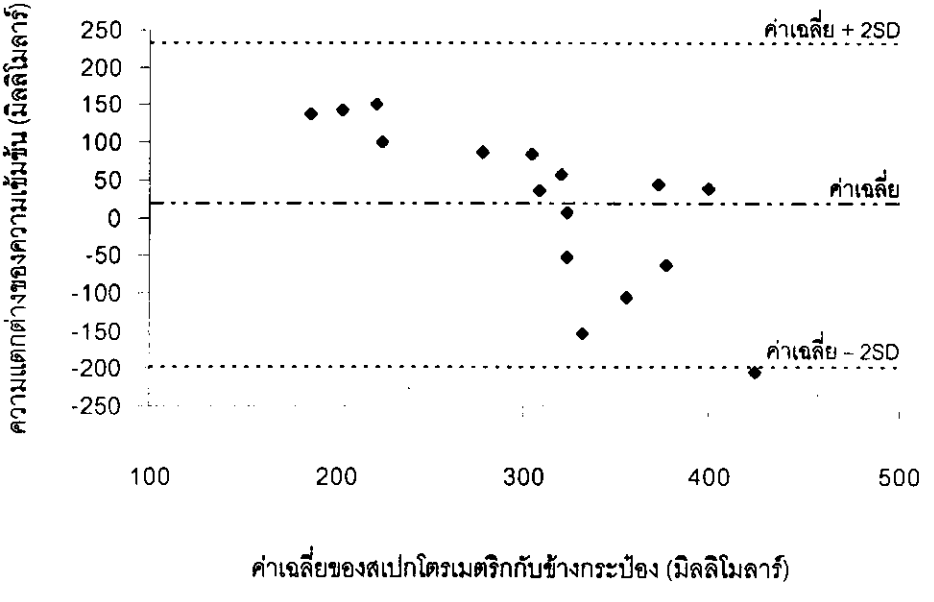
ลำดับที่	เครื่องดื่ม	ความเข้มความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)		ผลต่างของสองวิธีวิเคราะห์ (มิลลิโมลาร์)	ค่าเฉลี่ยของสองวิธีวิเคราะห์ (มิลลิโมลาร์)
		เอนไซม์เทอร์มิสเตอร์	โพลาริเมตริก		
1	มะพร้าว Malee	223	254	-31	239
2	มะพร้าว Freeze	236	250	-14	243
3	มะพร้าว UFC	295	241	54	268
4	เก๊กฮวย Malee	283	337	-54	310
5	เก๊กฮวย Freeze	292	330	-38	311
6	เก๊กฮวย UFC	269	318	-49	294
7	ลำไย Malee	408	427	-19	418
8	ลำไย A-Tip	374	372	2	373
9	ลำไย UFC	286	344	-58	315
10	เฉาก๊วย Malee	309	347	-38	328
11	เฉาก๊วย Freeze	326	337	-11	332
12	เฉาก๊วย A-Tip	378	413	-35	396
13	เฉาก๊วย UFC	295	364	-69	330
14	บัวบก Malee	307	330	-23	319
15	มะตูม Malee	370	368	2	369
16	ฟักเขียว Freeze	210	263	-53	237
ค่าเฉลี่ยของผลต่างของสองวิธีวิเคราะห์				**-27**	
SD				**30**	

ตารางที่ 42 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตริกกับเทคนิคโพลาริเมตริก โดยวิธีการทดสอบของ Bland-Altman

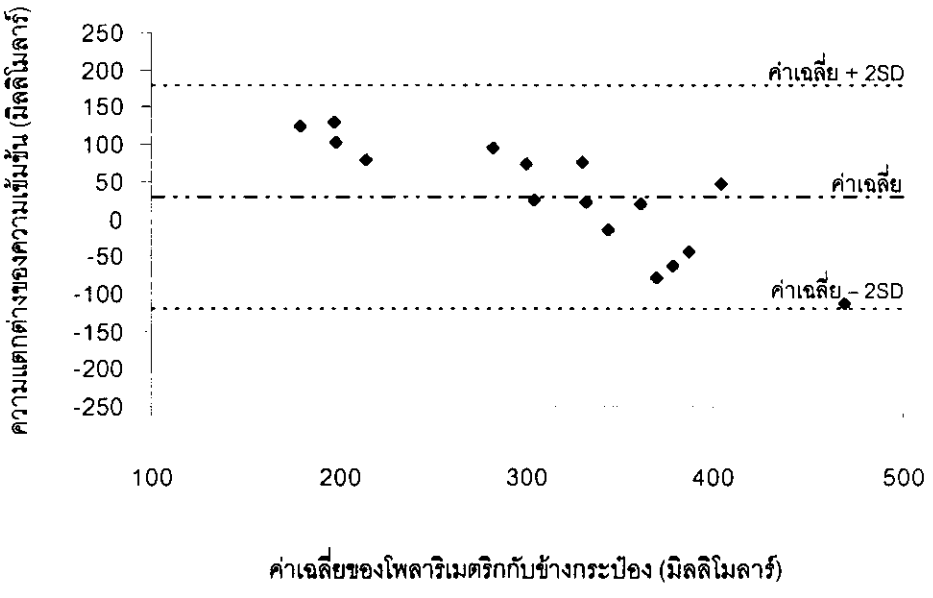
ลำดับที่	เครื่องดื่ม	ความเข้มความเข้มข้นซูโครส (มิลลิโมลาร์)		ผลต่างของสอง วิธีวิเคราะห์ (มิลลิโมลาร์)	ค่าเฉลี่ยของสองวิธีวิเคราะห์ (มิลลิโมลาร์)
		สเปกโตรโฟโตเมตริก	โพลาริเมตริก		
1	มะพร้าว Malee	274	254	20	264
2	มะพร้าว Freeze	298	250	48	274
3	มะพร้าว UFC	256	241	15	249
4	เก๊กฮวย Malee	298	337	-39	318
5	เก๊กฮวย Freeze	322	330	-8	326
6	เก๊กฮวย UFC	350	318	32	334
7	ลำไย Malee	419	427	-8	423
8	ลำไย A-Tip	395	372	23	384
9	ลำไย UFC	327	344	-17	336
10	เฉาก๊วย Malee	346	347	-1	347
11	เฉาก๊วย Freeze	346	337	9	342
12	เฉาก๊วย A-Tip	322	413	-91	368
13	เฉาก๊วย UFC	256	364	-108	310
14	บัวบก Malee	303	330	-27	317
15	มะตูม Malee	327	368	-41	348
16	ฟักเขียว Freeze	274	263	11	269
ค่าเฉลี่ยของผลต่างของสองวิธีวิเคราะห์				**-11**	
SD				**42**	



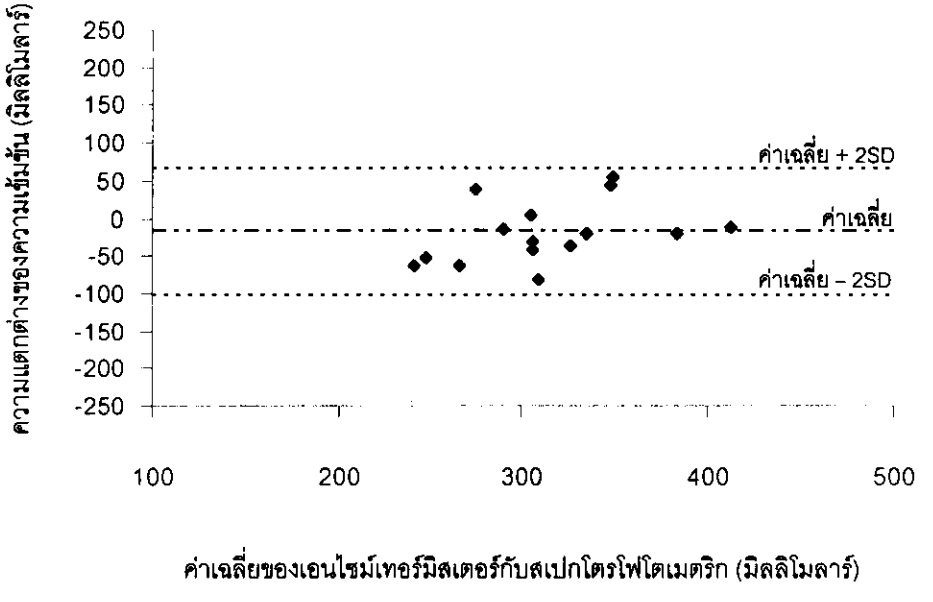
ภาพประกอบ 48 ความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างและค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของซูโครส ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์และข้างกระป๋อง



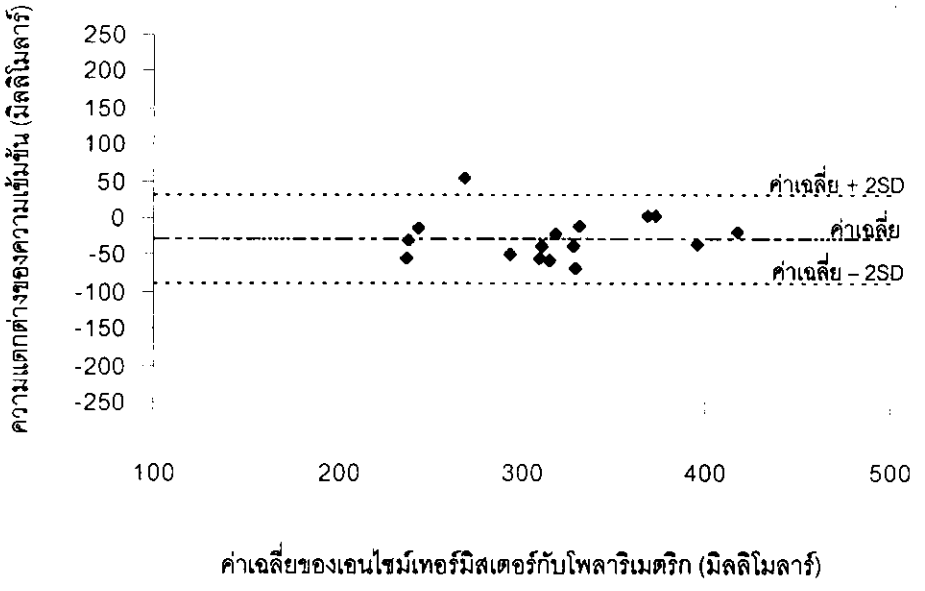
ภาพประกอบ 49 ความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างและค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของซูโครส ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตริกและข้างกระป๋อง



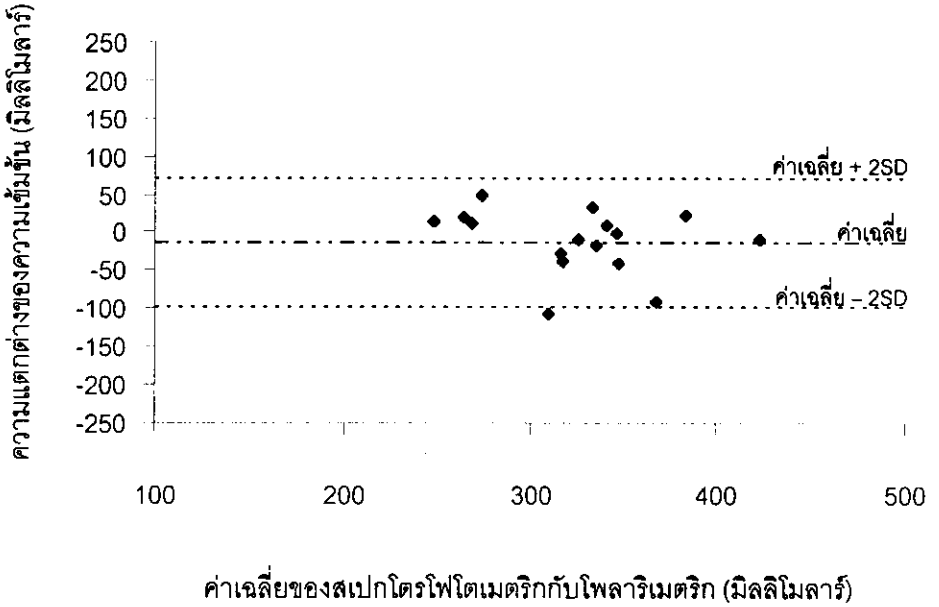
ภาพประกอบ 50 ความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างและค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของซูโครส ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโพลาริเมตริและข้างกระป๋อง



ภาพประกอบ 51 ความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างและค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของซูโครสที่ วิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ และเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตริก



ภาพประกอบ 52 ความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างและค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของซูโครส ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์และเทคนิคโพลาริเมตริก



ภาพประกอบ 53 ความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างและค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของซูโครสที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตริกและเทคนิคโพลาริเมตริก