

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 บทนำต้นเรื่อง

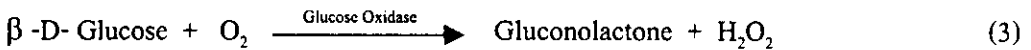
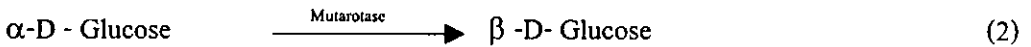
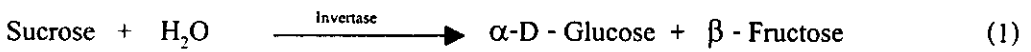
ซูโครสเป็นโมเลกุลน้ำตาลเชิงซ้อน ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคส และฟรักโทส มีชื่อเรียกทั่วไปได้หลายชื่อ ได้แก่ น้ำตาลทราย (cane sugar) หรือน้ำตาลบีท (beet sugar) พบมากในต้นอ้อย น้ำเชื่อม แยม ขนมหวาน ทอฟฟี่ ผลไม้ และผักหลายชนิด (รัชฎา, 2542) มักนิยมใช้เป็นน้ำตาลเพิ่มความหวานตามบ้านเรือนทั่วไป หรือนำไปใช้เป็นวัตถุให้ความหวานในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ดังนั้นในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ให้ได้มาตรฐาน จำเป็นต้องตรวจสอบและระบุปริมาณซูโครสในผลิตภัณฑ์ สำหรับวิธีวิเคราะห์ปริมาณซูโครสที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ได้แก่ การวิเคราะห์ด้วยเครื่องโพลาริมิเตอร์ หรือด้วยวิธีทางเคมี (AOAC, 1990) แต่พบว่าบางครั้งมีสารรบกวน โดยเฉพาะถ้ามีน้ำตาลชนิดอื่นผสมอยู่ด้วยจะทำให้การวิเคราะห์มีความยุ่งยากและมีหลายขั้นตอน

มีการวิจัยหาวิธีอื่นๆ เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณซูโครสให้ถูกต้องและแม่นยำได้แก่ วิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี (spectrophotometry) (Holmes, 1997) วิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC) (Hernandez *et al.*, 1994) และวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography) (Hughes and Thorpe, 1987) แต่พบว่ายังมีข้อจำกัดคือ เครื่องมือมีราคาแพง ขั้นตอนของการวิเคราะห์ยุ่งยาก ต้องมีการเตรียมตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์ และต้องอาศัยประสบการณ์หรือความชำนาญของผู้วิเคราะห์ ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยนำสารชีวภาพ เช่น เอนไซม์ แอนติเจน แอนติบอดี จูลินทรีย์ เนื้อเยื่อของพืชหรือสัตว์ มาทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการวิเคราะห์ และตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากปฏิกิริยาโดยใช้ทรานสดิวเซอร์ซึ่งทำหน้าที่แปลงสัญญาณของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นให้เป็นสัญญาณอิเล็กทรอนิกส์ เทคนิคดังกล่าวนี้คือ ไบโอสเซนเซอร์ (biosensor)

ไบโอสเซนเซอร์ เป็นเครื่องมือหรือเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารที่มีการพัฒนามาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2505 โดย Clark และ Lyons (Tran Minh, 1993) มีข้อดีคือ ใช้งานมีความจำเพาะเจาะจง และราคาไม่แพง สามารถประกอบเป็นระบบได้ง่าย ไม่จำเป็นต้องใช้ผู้ที่มีความ

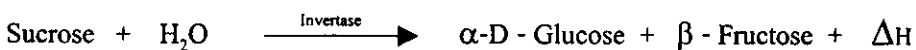
ชำนาญในการวิเคราะห์ และที่สำคัญคือสามารถลดขั้นตอนในการเตรียมสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ จึงได้มีการนำไบโอเซนเซอร์มาประยุกต์ใช้ในงานหลายๆ ด้าน รวมทั้งการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเช่น กลูตาเมตเซนเซอร์ (glutamate sensor) (Jeffries *et al.*, 1997) เอทานอลเซนเซอร์ (ethanol sensor) (Boujtitia and Murr, 1995) และซูโครสเซนเซอร์ (sucrose sensor) (Surareungchai *et al.*, 1999) เป็นต้น

สำหรับการทำงานของซูโครสเซนเซอร์ (Surareungchai *et al.*, 1999; Scheller and Renneberg, 1983; Hamid *et al.*, 1988; Filho *et al.*, 1996) ส่วนใหญ่เป็นการใช้เอนไซม์ร่วมกับอิเล็กโทรดชนิดต่างๆ เรียกว่า เอนไซม์อิเล็กโทรด โดยใช้เอนไซม์ 3 ชนิดร่วมกัน คือเอนไซม์อินเวอร์เทส มิวตาโรเทส และกลูโคสออกซิเดส ดังปฏิกิริยา



จากปฏิกิริยา (1) เอนไซม์อินเวอร์เทสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครสเป็นกลูโคสและฟรักโทส และใช้เอนไซม์มิวตาโรเทสเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของกลูโคสจากรูปแอลฟา ( $\alpha$ -form) ไปเป็นรูปบีตา ( $\beta$ -form) ดังปฏิกิริยา (2) ปฏิกิริยานี้สามารถเกิดเองได้แต่ช้า ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ช่วยในการเกิดปฏิกิริยา จากนั้นเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสเปลี่ยนไปเป็นกลูโคโนแลคโตน และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ดังปฏิกิริยา (3) จากปฏิกิริยาเหล่านี้สามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงได้โดยเลือกใช้อิเล็กโทรดที่เหมาะสมได้แก่ ออกซิเจนอิเล็กโทรด (oxygen electrode) ในการวัดปริมาณออกซิเจน ( $\text{O}_2$ ) ที่ถูกใช้ไป (Cleland and Enfors, 1984) หรือไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์อิเล็กโทรด (hydrogen peroxide electrode) เพื่อวัดปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ที่เพิ่มขึ้น (Scheller and Renneberg, 1983; Hamid *et al.*, 1988) แต่จะเห็นว่าต้องใช้เอนไซม์ร่วมกันถึง 3 ชนิด ดังนั้นหากสามารถลดชนิดของเอนไซม์ลงก็สามารถจะช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายได้

การใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียวสามารถทำได้โดยอาศัยตัวตรวจวัดความร้อนร่วมกับเอนไซม์อินเวอร์เทส เนื่องจากเอนไซม์นี้สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครสได้เป็นกลูโคส และฟรักโทส ดังปฏิกิริยา (Hüttel *et al.*, 1999)



$$\Delta\text{H} = -(15.4 \pm 0.1) \text{ kJ mol}^{-1}$$

ในปฏิกิริยาดังกล่าวจะมีความร้อนเกิดขึ้นด้วย การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของความร้อนนี้สามารถตรวจวัดโดยใช้เทอร์มิสเตอร์ (thermistor) ซึ่งเป็นสารกึ่งตัวนำ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้ค่าความต้านทานไฟฟ้าของเทอร์มิสเตอร์ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยเทอร์มิสเตอร์นี้จะต่อเข้ากับวงจรวัดสโตนบริดจ์และวงจรอิเล็กทรอนิกส์ ทำให้สามารถวัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในรูปของความต่างศักย์ไฟฟ้า ระบบที่ใช้เอนไซม์ร่วมกับการวัดความร้อนโดยเทอร์มิสเตอร์เรียกว่าเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ (enzyme thermistor)

บทความหลายฉบับได้รายงานถึงการนำเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์มาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารต่างๆ เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส (Wang and Taha, 1991; Harborn *et al.*, 1997) คลอเรส-เตอรอลในเลือด (Raghavan *et al.*, 1999) และยูเรียในซีรัม (Bjarnason *et al.*, 1998) เป็นต้น สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณซุโครสนั้นมีการใช้เอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ ในเทคนิคแบทช์อินเจกชันอะนาไลซิส (batch injection analysis, BIA) (Thavarungkul *et al.*, 1999) ในระบบดังกล่าวใช้วิธีฉีดซุโครสลงบนเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ตรึงบนผิวหน้าของเทอร์มิสเตอร์ และวัดความร้อนที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซุโครส พบว่าสามารถวิเคราะห์ซุโครสได้สะดวก รวดเร็ว และมีความจำเพาะเจาะจง แต่มีข้อเสียคือการควบคุมอุณหภูมิของสารตัวอย่างกับสารละลายในระบบให้คงที่นั้นทำได้ยาก และจำเป็นต้องมีการตรึงเอนไซม์ใหม่ทุกครั้งที่ทำการศึกษาทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาการใช้เอนไซม์เทอร์มิสเตอร์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณซุโครสโดยใช้ระบบไหลผ่าน (flow through) ซึ่งมีระบบควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตลอดการทดลองและใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ที่สามารถนำเอนไซม์สภาวะตรงกลับมาใช้งานใหม่ได้อีกหลายครั้ง โดยคาดว่าเทคนิคนี้จะพัฒนาเป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณซุโครสที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีความถูกต้องและแม่นยำ ตลอดจนมีความจำเพาะเจาะจงสูงอีกด้วย ทั้งนี้ในการทดลองจะศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณซุโครส ในตัวอย่างเครื่องดื่มน้ำผลไม้ และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับเทคนิคอื่นที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

## 1.2 การตรวจเอกสาร

วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณซุโครสมีหลายวิธี ได้แก่ วิธีโพลาไรเมตริก (มอก.56-2530) วิธีนี้สารที่ต้องการวิเคราะห์จะต้องมีลักษณะเป็นของเหลวไม่มีสี และไม่ขุ่น ในการวัดใช้เครื่องโพลาไรมิเตอร์วัดการหมุนระนาบแสงของซุโครส แต่วิธีนี้อาจจะมีการรบกวนจากสารอื่น เช่น กลูโคส และฟรักโทส ที่มีสมบัติในการหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์ได้เช่นเดียวกับซุโครส (Meade and Chen, 1977) สำหรับวิธีทางเคมี (AOAC Method, 1990) เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณซุโครสจากปริมาณของกลูโคส และฟรักโทส ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายของซุโครสโดยกรด

ไฮโดรคลอริก กลูโคสและฟรักโทสที่เกิดขึ้นจะอยู่ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ( $\text{CuSO}_4$ ) และสารละลายอัลคาไลน์ทาร์เทรต (alkaline tartrate) ได้ตะกอนคิวปริสออกไซด์ ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) และสามารถคำนวณหาปริมาณของซูโครสได้จากผลต่างระหว่างผลที่ได้ก่อนและหลังการย่อยสลายซูโครส ข้อเสียของวิธีการนี้คือ การวิเคราะห์หามีหลายขั้นตอน นอกจากนี้ยังเป็นเทคนิคที่ไม่จำเพาะเจาะจงสำหรับซูโครส เนื่องจากอาจจะมีการรบกวนจากน้ำตาลตัวอื่น เช่น กลูโคส และฟรักโทสเป็นต้น รวมทั้งกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) และสารประกอบอื่นๆ (Pesce and Kaplan, 1987) ทำให้ได้ผลวิเคราะห์มากกว่าค่าจริง

งานวิจัยเกี่ยวกับวิธีวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสให้มีความถูกต้องและแม่นยำมีอีกหลายวิธี เช่น วิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (Davies, 1988) ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในมันฝรั่ง สถานะการวิเคราะห์คือ ใช้คอลัมน์ยาว 5 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 530 ไมโครเมตร มี OV-1 (dimethyl silicone gum) SE-30 (methyl silicone gum) เป็นสแตชันนารีเฟส (stationary phase) ที่เคลือบในคอลัมน์หนา 2.65 ไมโครเมตร อุณหภูมิหัวฉีด 220 องศาเซลเซียส และใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สพา (carrier gas) ด้วยความเร็ว 15 มิลลิลิตรต่อนาที หรือวิธีที่ใช้ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (Hernandez *et al.*, 1994) ในการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในถั่วเขียว โดยใช้สภาวะการวิเคราะห์คือคอลัมน์ยาว 250 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร มี Spherisorb  $\text{NH}_2$  เป็นสแตชันนารีเฟส ใช้สารละลายอะซิโตไนไตรล์และน้ำ (acetonitrile:water) อัตราส่วน 85 ต่อ 15 โดยปริมาตร เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และใช้รีแฟรคทีฟอินเด็กซ์ (refractive index) เป็นตัวตรวจวัด เทคนิคดังกล่าวสามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณซูโครสได้ถูกต้องและแม่นยำ แต่มีข้อเสียคือ เครื่องมือมีราคาแพง ต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญ และมีประสบการณ์ในการวิเคราะห์สูง

สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครส โดยใช้เทคนิคไบโอเซนเซอร์ นั้นส่วนใหญ่จะเป็นการใช้ เอนไซม์ ร่วมกับทรานส์คิวเซอร์ชนิดต่างๆ ได้แก่ แอมเปอร์โรเมตริกไบโอเซนเซอร์ (amperometric biosensor) และแคลอริเมตริกไบโอเซนเซอร์ (calorimetric biosensors) เป็นต้น

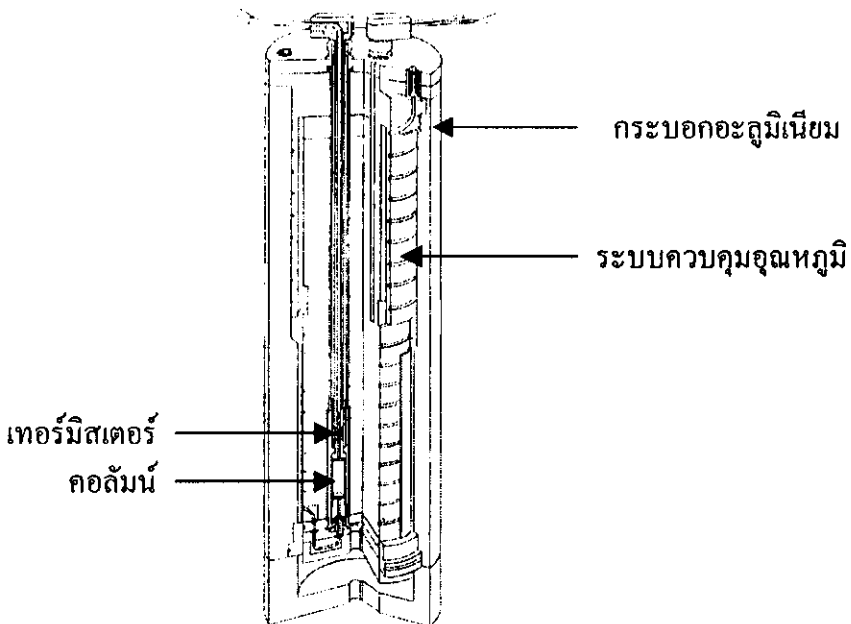
ในแอมเปอร์โรเมตริกไบโอเซนเซอร์ ทรานส์คิวเซอร์ที่ใช้อาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันที่เกิดขึ้นที่ผิวอิเล็กโทรด หรือมีตัวกลาง (mediator) ทำหน้าที่รับส่งอิเล็กตรอนให้กับอิเล็กโทรด กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากการถ่ายโอนอิเล็กตรอนจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Tran Minh, 1993) ตัวอย่างไบโอเซนเซอร์ที่ใช้ทรานส์คิวเซอร์ประเภทนี้คือ การวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสโดยวัดปริมาณออกซิเจนที่ลดลงในการเกิดปฏิกิริยา โดยใช้ออกซิเจนอิเล็กโทรด (oxygen electrode) (Cleland and Enfors, 1984) ที่มีเอนไซม์อินเวอร์เทส มิวตาโรเทส และกลูโคสออกซิเดสตรังร่วมกัน (ปฏิกิริยา 1-3) แต่พบว่าหากในตัวอย่างมีกลูโคสอยู่ด้วย จะทำให้ได้ผลการ

วิเคราะห์สูงกว่าค่าจริง (ปฏิกิริยา 3) ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนามัลติเลเยอร์เอนไซม์อิเล็กโทรด (multilayer enzyme electrode) (Scheller and Renneberg, 1983) ซึ่งประกอบด้วยชั้นของเอนไซม์ เมมเบรนสองชั้นที่ถูกแยกด้วยโคอะไลซิสเมมเบรน และวางอยู่บนผิวอิเล็กโทรด เอนไซม์เมมเบรนชั้นนอกจะมีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส และคะตะเลสตรึงร่วมกัน ส่วนเอนไซม์เมมเบรนชั้นใน (อยู่ติดกับอิเล็กโทรด) จะมีเอนไซม์อินเวอร์เทสและกลูโคสออกซิเดสตรึงร่วมกัน เทคนิคนี้จะสามารถวิเคราะห์ซูโครสได้โดยไม่มีการรบกวนจากกลูโคส เนื่องจากปริมาณกลูโคสที่อยู่ในตัวอย่างจะถูกกำจัดออกบริเวณเอนไซม์เมมเบรนชั้นนอก โดยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะเร่งปฏิกิริยา (3) และคะตะเลสจะเร่งปฏิกิริยาที่เปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นออกซิเจน ส่วนซูโครสจะผ่านเข้าสู่เอนไซม์เมมเบรนชั้นในที่มีเอนไซม์อินเวอร์เทส และกลูโคสออกซิเดส เกิดเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งตรวจวัดโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อิเล็กโทรด เทคนิคนี้มีข้อเสียคือ การใช้เอนไซม์หลายชนิดตรึงร่วมกันบนเมมเบรน ทำให้ปริมาณเอนไซม์ที่อยู่บนเมมเบรนไม่สม่ำเสมอ และการใช้เอนไซม์เมมเบรนหลายอัน ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานลดลง ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคที่สามารถใช้เอนไซม์เมมเบรนอันเดียว และมีปริมาณเอนไซม์ในอัตราส่วนที่เหมาะสม โดยใช้ไตรเอนไซม์อิเล็กโทรด (tri-enzyme Electrode) (Hamid *et al.*, 1988) ร่วมกับเทคนิคโพลีอิมเมกชันอนาไลซิส เอนไซม์อิเล็กโทรดดังกล่าวใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส มีวตาโรเทส และกลูโคสออกซิเดส ตรึงร่วมกันบนตาข่ายไนลอน (nylon net) ในอัตราส่วน 2000:1000:200 วางอยู่บนแพลทินัมอิเล็กโทรด พบว่าสามารถวิเคราะห์ปริมาณซูโครสได้รวดเร็ว (10-20 วินาทีต่อตัวอย่าง) ให้ค่าความเป็นเชิงเส้น  $10^6$ - $10^3$  โมลาร์ และสามารถวิเคราะห์ปริมาณซูโครสในตัวอย่างทางการแพทย์และอาหารได้โดยตรงไม่ต้องเตรียมตัวอย่าง แต่เทคนิคนี้ไม่ได้กล่าวถึงผลการรบกวนจากกลูโคส ดังนั้นหากในตัวอย่างมีกลูโคสอยู่ด้วย ผลการวัดอาจคลาดเคลื่อนได้

จากการวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ข้างต้นเนื่องจากขนาดของศักย์ไฟฟ้าที่ใช้สูง (+0.7V) อาจมีผลทำให้เกิดการรบกวนจากสารรีดอกซ์อื่นๆ เช่นกรดยูริก (uric acid) และกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ในสารละลายได้ (Hale *et al.*, 1991) จึงมีการพัฒนาอิเล็กโทรดให้มีสภาพขั้วที่ว่องไวต่อปฏิกิริยามากขึ้นเพื่อลดขนาดของศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ โดยนำสารตัวกลางที่รับส่งอิเล็กตรอน เช่น การใช้เฟอร์โรซีน (ferrocene) (Dong *et al.*, 1991) และสารเตตระไซยาโนควิโนไดมีเทน (tetracyanoquinodimethane, TCNQ) (Filho *et al.*, 1996) เป็นต้น นำมาผสมรวมกับเอนไซม์ กลูโคสออกซิเดสทำเป็นแกรไฟต์เพสต์อิเล็กโทรด (graphite paste electrode) ตรวจวัดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้า 200 มิลลิโวลต์ พบว่าสามารถวัดปริมาณซูโครสได้ในช่วงความเข้มข้น 0.025-2000 มิลลิโมลาร์ และใช้เวลา 12 นาทีต่อตัวอย่าง เทคนิคนี้สามารถ

ป้องกันสัญญาณรบกวนจากกริดแอสคอร์บิก และกริดอินทรีอื่นๆ ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ค่าศักย์ไฟฟ้าสูงๆ ได้ อย่างไรก็ตามเทคนิคแอมเพอร์โรเมตริกดังกล่าวข้างต้นส่วนใหญ่จะต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกันได้แก่ กลูโคสออกซิเดส อินเวอร์เทส และมิวตาโรเทส หากสามารถลดการใช้เอนไซม์ให้ใช้เพียงชนิดเดียวได้ก็จะเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย การใช้เอนไซม์ชนิดเดียวทำได้โดยใช้เทคนิคแคลอริเมตริกไบโอเซนเซอร์

แคลอริเมตริกไบโอเซนเซอร์ ใช้เทอร์มิสเตอร์ (thermistor) เป็นทรานสดิวเซอร์ โดยอาศัยหลักการวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิหรือจากความร้อนที่เกิดขึ้น ระบบที่ใช้เอนไซม์ร่วมกับเทอร์มิสเตอร์นี้เรียกว่า เอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ ระบบดังกล่าวมีการพัฒนามาตั้งแต่ปี ค.ศ.1974 โดย Mosbach และคณะ (Danielsson and Mosbach, 1987) หลักการของระบบเป็นการทำงานร่วมกันระหว่างสารชีวภาพที่เป็นเอนไซม์กับทรานสดิวเซอร์คือเทอร์มิสเตอร์ ซึ่งมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมาก ลักษณะของระบบเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ประกอบด้วยคอลัมน์ที่เป็นเทฟลอน (teflon) ที่บรรจุเอนไซม์สภาวะจริง โดยมีเทอร์มิสเตอร์ติดอยู่ตรงปลายคอลัมน์ ซึ่งอยู่ในกระบอกอะลูมิเนียม (aluminium cylinder) ที่มีการควบคุมอุณหภูมิภายในได้ในระดับ  $\pm 0.01$  องศาเซลเซียส ดังภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 ภาพตัดขวางของระบบเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ (Danielsson and Mosbach, 1988)

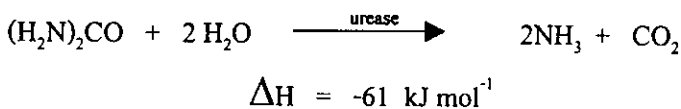
โดยทั่วไปปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์มักจะเป็นปฏิกิริยาคายความร้อน (exothermic) ซึ่งให้พลังงานความร้อนในช่วง 20-100 กิโลจูลต่อโมล (Danielsson and Mosbach, 1987 และ 1988)

ดังแสดงในตารางที่ 1 พลังงานความร้อนที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนกับปริมาณสารตัวอย่าง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการใช้ค่าความร้อนเป็นสัญญาณชี้ นำ ไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารต่างๆ

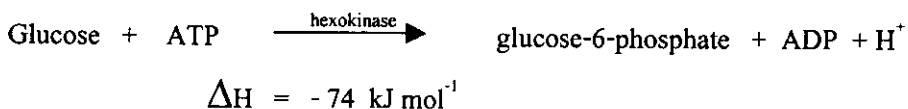
ตารางที่ 1 แสดงพลังงานความร้อนของปฏิกิริยาโดยเอนไซม์บางชนิด (Wolf *et al.*, 2002)

สารตั้งต้น	เอนไซม์	ความร้อนที่คายออกมา (Heat output) กิโลจูลต่อโมล (kJ mol <sup>-1</sup> )
ซูโครส	อินเวอร์เทส	15
กลูโคส	เฮกโซไคเนส	74
	กลูโคสออกซิเดส/คะตะเลส	225
กลอเรสเคอรอล	กลอเรสเคอรอลออกซิเดส	53
เอสเทอร์	ลิโมนาดีน	4-16
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	คะตะเลส	100
เพนนิซิลิน G	เพนนิซิลินเนส	77
เปปไทด์	ทริปซิน	10-30
แป้ง	อะไมเลส	8
ยูเรีย	ยูรีเอส	61
กรดยูริก	ยูรีเอส	49

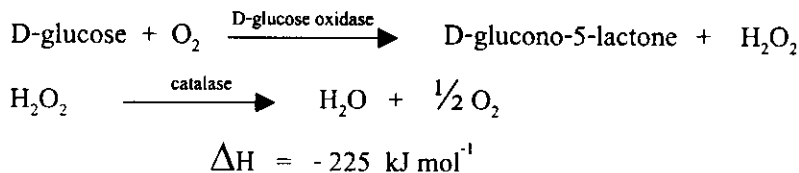
มีรายงานการนำเอนไซม์เทอร์มิสโตร์มาใช้ในการวิเคราะห์วิจัยต่างๆ เช่น การวิเคราะห์ปริมาณยูเรียในซีรัม ตามปฏิกิริยา



พบว่าในช่วงความเป็นเชิงเส้นกว้างตั้งแต่ 0.01-200 มิลลิโมลาร์ (Bjarnason *et al.*, 1998) ทำให้สามารถเจือจางสารตัวอย่างซีรัมได้ในอัตราส่วน 1:10 เท่า โดยที่เอนไซม์รีแอกเตอร์สามารถใช้วิเคราะห์ ตัวอย่างได้มากกว่าร้อยละตัวอย่าง โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ 3 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง ส่วนการหาปริมาณกลูโคส มีการใช้ทั้ง เอนไซม์เฮกโซไคเนส ตามปฏิกิริยา (Wolf *et al.*, 1999)



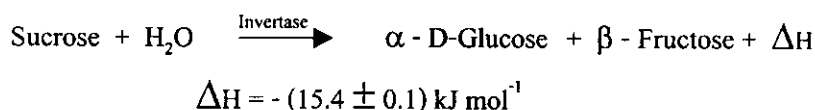
หรือใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสตรังร่วมกันกับคะตะเลส ตามปฏิกิริยา (Wolf *et al.*, 1999)



การใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ไฮกโซโคเนส (Danielsson and Mosbach, 1987) สามารถใช้วิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้น 0.5-25.0 มิลลิโมลต่อลิตร โดยสามารถวิเคราะห์ได้ 40 ตัวอย่างต่อชั่วโมง ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้องและแม่นยำ ในกรณีที่ใช้กลูโคสออกซิเดสและคะตะเลสตรังร่วมกัน (Calsson *et al.*, 1996; Harborn *et al.*, 1997) ให้ความไววิเคราะห์ของระบบสูงมากกว่าการใช้กลูโคสออกซิเดสเพียงอย่างเดียวถึง 2 เท่า ให้ช่วงความเป็นเชิงเส้นได้ถึง 0.002-0.8 มิลลิโมลาร์ และสามารถเจือจางสารตัวอย่างได้ 50-100 เท่า และใช้ปริมาตรตัวอย่างเพียง 5-20 ไมโครลิตร ฉีดเข้าไปในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ไหลเข้าสู่เอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ได้โดยตรงโดยไม่ต้องเตรียมสารตัวอย่าง และผลที่ได้มีความแม่นยำสูง

นอกจากนี้ยังมีการใช้เอนไซม์เทอร์มิสเตอร์มาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก (heavy metal) โดยอาศัยการยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ยูรีเอสที่ถูกตรึงอยู่บนเม็ดแก้ว (porous glass bead) โดยใช้ระบบไหลผ่านพบว่าสามารถวิเคราะห์หาปริมาณของปรอท (II) และทองแดง (II) ได้ในช่วง 2-10 ไมโครโมลาร์ และ 0.1-0.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ หลังจากการยับยั้งจะผ่านสารละลายโซเดียมไอโอไดด์ (sodium iodide, NaI) และกรดเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก (ethalenediamine- tetraacetic acid, EDTA) เพื่อให้เอนไซม์สามารถทำงานได้เหมือนเดิม (Thavarungkul, *et al.*, 1994) การนำเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์มาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก พบว่ามีข้อดีคือ เอนไซม์สามารถนำกลับมาใช้ได้ใหม่หลังจากผ่านการยับยั้ง

ในการใช้เทอร์มิสเตอร์วิเคราะห์หาปริมาณซูโครส Thavarungkul และคณะ (1999) ใช้เอนไซม์อินเวอร์เทสตรังบนผิวเทอร์มิสเตอร์ร่วมกับเทคนิคแบทอินเจกชันอนาไลซิส ซึ่งจะตรวจวัดความร้อน ( $\Delta H$ ) ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา





โดยสารละลายที่อยู่รอบๆ เทอร์มิสเตอร์ คือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ พีเอช 4.8 ใช้ปริมาตรสารละลายตัวอย่าง 25 ไมโครลิตรฉีดลงบนเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และอัตราเร็วในการคนสารละลาย 300 รอบต่อนาที จากผลการวิเคราะห์พบว่า การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของซูโครสที่เพิ่มขึ้น สามารถทำการวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างได้ 20-30 ตัวอย่างต่อชั่วโมง โดยที่สารละลายไม่ต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง และให้ช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรงสำหรับซูโครส 0.00-0.50 โมลาร์ เทคนิคนี้สามารถทำการวิเคราะห์ได้สะดวก รวดเร็ว มีความถูกต้อง และแม่นยำ ใช้เอนไซม์ตัวเดียว ใช้สารตัวอย่างในการวิเคราะห์น้อยโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง แต่จะต้องควบคุมอุณหภูมิของสารตัวอย่างกับสารละลายในระบบให้คงที่ และจะต้องมีการตรึงเอนไซม์ใหม่ทุกครั้งที่ทำทดลอง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจการใช้เอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ในการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสโดยใช้ระบบไหลผ่าน (flow through system) ที่มีระบบการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตลอดการทดลอง และใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ที่สามารถนำมาใช้ได้หลายครั้ง

### 1.3 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการตรึงเอนไซม์ อินเวอร์เทส บนเม็ดแก้วอัลคิลลามีน (alkylamine glass beads)
2. ศึกษาปัจจัยและสภาวะการทดลองที่มีผลต่อการตอบสนองของเอนไซม์ เช่น pH
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของซูโครสเซนเซอร์ด้วยระบบไหลผ่าน เช่น อัตราการไหล และปริมาตรสารตัวอย่างที่ใช้
4. ศึกษาการหาปริมาณซูโครสในตัวอย่างเครื่องคั้นน้ำผลไม้ ด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์ โดยใช้ระบบไหลผ่าน

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในตัวอย่าง
2. ได้วิธีวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสที่มีประสิทธิภาพ สะดวก รวดเร็ว มีความจำเพาะเจาะจง สามารถนำไปใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการต่อไปได้
3. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษา วิจัย และปรับปรุงเทคนิคเพื่อให้สามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในทางอุตสาหกรรม
4. เป็นแนวทางสำหรับนำเทคนิคนี้ไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารชนิดอื่นๆ ได้ต่อไป

### 1.5 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาการตรึงเอนไซม์อินเวอร์เทส บนเม็ดแก้วอัลคิลลามีน (alkylamine glass beads)
2. ศึกษาสัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์ที่ถูกตรึง
3. ศึกษาปัจจัยต่างๆ ของระบบแบบไหลผ่าน ที่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในสารตัวอย่างโดยเทคนิคไบโอเซนเซอร์ เช่น อัตราการไหลของตัวอย่าง และสารละลายบัฟเฟอร์ เป็นต้น
4. ศึกษาช่วงอายุการใช้งานของเอนไซม์ สภาวะจริง และช่วงความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ได้
5. วิเคราะห์หาปริมาณซูโครสที่มีอยู่ในสารละลายตัวอย่างและเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับเทคนิคที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน
6. สรุปผลการทดลอง