บทที่ 4

บทสรุป

งานวิจัยนี้ทดสอบการใช้เอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ในการหาปริมาณซูโครส โดยอาศัยตัวตรวจวัดความร้อนร่วมกับเอนไซม์อินเวอร์เทส ซูโครสจะถูกเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยเอนไซม์อินเวอร์เทสสภาวะตรึงทำให้เกิดความร้อนและมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ สามารถตรวจวัดได้โดยเทอร์มิสเตอร์ ในรูปของความต่างศักย์ไฟฟ้าของวงจรวีสตโตนบริดจ์ โดยที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม 2 ระบบคือ ระบบไหลผ่านที่ไม่มีไดอะไลเซอร์ (ที่มีการใช้ขนาดเอนไซม์รีแอกเตอร์ต่างกัน) และระบบไหลผ่านที่มีไดอะไลเซอร์ (ที่มีการใช้ชนิดของไดอะไลเซอร์ที่มีพื้นที่การแพร่ต่างกัน) โดยสภาวะที่ใช้ในการทดลองคือวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความไวของเครื่องเทอร์มิสเตอร์ 50 $m^{\circ}C/100mV$ และสภาวะที่เหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์คือ อะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์

สภาวะที่เหมาะสมของระบบไหลผ่านที่ไม่ใช้ไดอะไลเซอร์ ที่มีการใช้ขนาดของเอนไซม์รีแอกเตอร์ต่างกันคือ ขนาดเล็ก (ปริมาตร 0.13 ลูกบาศ์กเซนติเมตร) และขนาดใหญ่ (ปริมาตร 0.92 ลูกบาศ์กเซนติเมตร)

	ขนาดเล็ก	ขนาดใหญ่
-อัตราไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)	0.50	1.00
-ปริมาตรสารตัวอย่าง (ไมโครลิตร)	500	500
-ขีดจำกัดต่ำสุด (มิลลิโมลาร์)	10	10
-ค่าความเป็นเชิงเส้น (มิลลิโมลาร์)	10-100	10-100
-ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อมิลลิโมลาร์)	0.7159	0.8650
-เวลาในการวิเคราะห์ (นาที)	12	8

จึงเลือกใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดใหญ่ เนื่องจากให้ค่าความไววิเคราะห์มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า 4 นาที

สภาวะที่เหมาะสมของระบบไหลผ่านที่มีไดอะไลเซอร์ ที่มีการใช้ชนิดของไดอะไลเซอร์ที่มีพื้นที่การแพร่ต่างกันคือ ขนาดกลาง (พื้นที่ในการแพร่ 1.5x298 ตารางมิลลิเมตร) และขนาดใหญ่ (พื้นที่ในการแพร่ 1.5x625 ตารางมิลลิเมตร)

	ขนาดกลาง	ขนาดใหญ่
-อัตราไหลสารตัวอย่าง (มิลลิลิตรต่อนาที)	0.30	0.30
-อัตราไหลสารบัฟเฟอร์ (มิลลิลิตรต่อนาที)	1.00	1.00
-ปริมาตรสารตัวอย่าง (ไมโครลิตร)	500	500
-ขีดจำกัดต่ำสุด (มิลลิโมลาร์)	100	30
-ค่าความเป็นเชิงเส้น (มิลลิโมลาร์)	100-400	30-400
-ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อมิลลิโมลาร์)	0.0158	0.0215
-เวลาในการวิเคราะห์ต่อหนึ่งตัวอย่าง (นาที)	10	10

ในระบบการทดลองจึงใช้ไดอะไลเซอร์ขนาดใหญ่ เนื่องจากให้ค่าความไววิเคราะห์สูงกว่า 36 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถวิเคราะห์ได้ต่ำถึงความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์

ได้ศึกษาผลของกลูโคสและฟรักโทส กรดซิตริก และเกลือโซเดียมคลอไรด์ ในการรบกวนการวิเคราะห์ซูโครสในระบบเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ พบว่าทั้งกลูโคสและฟรักโทสที่มีอยู่ในสารละลายซูโครสไม่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสหากความเข้มข้นของกลูโคส และฟรักโทสอยู่ในช่วง 0-400 มิลลิโมลาร์ ซึ่งความเข้มข้นของกลูโคสและฟรักโทสที่มีอยู่ในตัวอย่างเครื่องดื่มกระป๋องจะมีประมาณ 30-300 มิลลิโมลาร์ (Boujtita *et al.*1999; Paredes *et al.*, 1997) ดังนั้นการใช้ระบบนี้ในการวิเคราะห์ซูโครสในเครื่องดื่มจึงไม่น่าจะมีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์ ส่วนการทดสอบผลของกรดซิตริก พบว่าช่วงความเข้มข้น 0.05-2.0 มิลลิโมลาร์ กรดซิตริกไม่มีผลรบกวนการวิเคราะห์เอนไซม์อินเวอร์เทส ดังนั้นในการวิเคราะห์ซูโครสในตัวอย่างเครื่องดื่มกระป๋องที่มีปริมาณกรดเพียง 0.5-1.0 มิลลิโมลาร์ ไม่น่าจะมีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์

ในระบบนี้พบว่าเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นเพียง 5 มิลลิโมลาร์ ก็สามารถให้ผลการตอบสนอง โดยจะให้การตอบสนองที่เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์มากขึ้น การเปลี่ยนความเข้มข้นของไอออนในสารละลายเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอออนของเกลือจะทำให้อุณหภูมิของสารละลายเปลี่ยนแปลง (McLean and Penketh, 1968) การใช้ระบบนี้ในการวิเคราะห์เครื่องดื่มที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 1-50 มิลลิโมลาร์ จึงมีผลรบกวนการวิเคราะห์ ดังนั้นเพื่อปรับให้ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ของเครื่องดื่มกระป๋องแต่ละชนิดใกล้เคียงกันมากที่สุดเพื่อลดผลจากเกลือให้น้อยที่สุด จึงเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงไปในสารละลายบัฟเฟอร์ด้านตัวอย่าง 1000 มิลลิโมลาร์ และใช้สารละลายดังกล่าวเจือจางตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

เนื่องจากบัฟเฟอร์มีเกลือในปริมาณมากการเจือจางดังกล่าวจึงทำให้มีปริมาณเกลือในสารตัวอย่างแตกต่างจากบัฟเฟอร์น้อยมาก

สำหรับลักษณะของตัวอย่างพบว่าระบบเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์สามารถวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในเครื่องดื่มกระป๋องได้โดยผ่านขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างอย่างง่ายๆ คือ การกรองเท่านั้น และสามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีสีต่างๆ ได้โดยไม่มีการรบกวนจากสีของสารตัวอย่าง ซึ่งเห็นได้จากการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในน้ำกระป๋อง เช่น เฉาก๊วย เก๊กฮวย และใบบัวบก ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับวิธีโพลาริเมตริก และสเปกโตรโฟโตเมตริก ในการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสของระบบเอนไซม์ เทอร์มิสตอร์จะใช้เอนไซม์อินเวอร์เทสเพียงชนิดเดียว จึงเป็นข้อได้เปรียบอีกข้อหนึ่งเมื่อเทียบกับวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริกที่ใช้เอนไซม์สามชนิดคือ เอนไซม์อินเวอร์เทส กลูโคสออกซิเดส และ เพอร์ออกซิเดส

จากการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ซูโครสที่ได้จากเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ สเปกโตรโฟโตเมตริก และโพลาริเมตริก พบว่าทั้งสามวิธีให้ผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันพอสมควร ในกรณีของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ความแตกต่างของผลการวิเคราะห์จากสองวิธีอาจจะเนื่องมาจากสารรบกวนของตัวอย่างแต่ละตัวอย่างมีความแตกต่างกันมากบ้างน้อยบ้างจึงเกิดความคาดเคลื่อน หากปริมาณสารรบกวนมีค่าที่แน่นอนวิธีเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์จะวิเคราะห์ได้ดี ดังเช่นในการวิเคราะห์หาปริมาณยูเรียในซีรัม (Limbut, 2001) และการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในพลาสมา (Untang, 2003) โดยใช้เอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ เนื่องจากในซีรัมและพลาสมามีเกลือเป็นองค์ประกอบประมาณ 0.9 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ดังนั้นเมื่อปรับบัฟเฟอร์ที่ใช้กับสารตัวอย่างให้มีปริมาณเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์แล้ว พบว่าค่าที่วิเคราะห์ได้จะเป็นผลเนื่องจากยูเรียหรือกลูโคสเท่านั้น โดยงานวิจัยทั้งสองดังกล่าวได้เปรียบเทียบผลที่ได้จากเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์กับวิธีมาตรฐานอื่นพบว่าให้ผลตรงกัน

ในกรณีของการวัดปริมาณซูโครสในเครื่องดื่มกระป๋องวิธีที่น่าจะนำมาใช้ดีกว่าน่าจะเป็นแบทช์อินเจกชันอนาไลซิส (Batch injection Analysis, BIA) ในวิธีนี้สารตัวอย่างจะถูกฉีดลงบนหัววัดเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์อย่างรวดเร็ว ดังนั้นตัวอย่างจะกระจายตัวจากหัววัดเร็วมากทำให้สามารถตรวจวัดเฉพาะซูโครสได้ดีโดยมีผลจากสารรบกวนอื่นๆ น้อยมาก เช่น การวิเคราะห์ปริมาณซูโครสในน้ำอ้อยซึ่งมีส่วนประกอบหลายชนิด ได้แก่ สารแขวนลอย กลูโคส ฟรักโทส ไอออนของทองแดง และเงิน แต่สามารถใช้วิธีแบทช์อินเจกชันอนาไลซิสในการวิเคราะห์และให้ผลที่ดี (ประภาพรรณ, 2538)

เทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์นี้หากมีการพัฒนาต่อไปโดยต้องลดผลจากสารรบกวนต่างๆ ก็น่าจะสามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในทางอุตสาหกรรมได้ เนื่องจากเทคนิค

นี้ไม่ต้องเตรียมตัวอย่างก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ ใช้สารตัวอย่างน้อย และไม่มีผลรบกวนจากอุณหภูมิภายนอก เนื่องจากระบบนี้เป็นระบบที่มีการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตลอดการทดลอง นอกจากนี้ยังสามารถนำเอนไซม์อินเวอร์เทสสภาวะตรึงกลับมาใช้ได้อีกหลายครั้ง ซึ่งมีการใช้งานนานมากกว่า 800 ชั่วโมง