บทที่ 2

วิธีการวิจัย

2.1 วัสดุและสารเคมี

2.1.1 สารเคมีที่ใช้ในเทคนิคเทอร์มิสเตอร์

- เอนไซม์อินเวอร์เทส (Invertase EC 3.2.1.26 Grade VII : from yeast, 500 units/mg solid, Sigma, USA)
- ซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$, Sucrose, Saccharose for microbiologie, Merck, Germany)
- กลูตารัลดีไฮด์ 25% ($C_5H_8O_2$, Biological Grade : Electron Microscopy Science, USA)
- เอทาโนลามีน (C_4H_7NO, AR Grade : Merck, Germany)
- เม็ดแก้วอัลคิลลามีน (Alkylamine glass beads, from porous glass beads, mean diameter 41 μm, mean pore diameter 200 nm, Eka Noble AB, Sweden)
- โซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดร์ (CH_3BNNa, AR Grade : Fluka, Switzerland)
- โซเดียมเอไซด์ (NaN_3, AR Grade : Merck, Germany)
- โซเดียมไดไฮไดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($NaH_2PO_4.2H_2O$, AR Grade : Merck, Germany)
- ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($Na_2HPO_4.2H_2O$, AR Grade :Merck, Germany)
- กรดอะซิติก 100% (CH_3COOH, AR Grade : Merk, Germany)
- โซเดียมอะซิเตท ($NaCH_3O_2.3H_2O$, AR Grade : Eka, Sweden)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH, AR Grade : Eka, Sweden)
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl, AR Grade : BHD, England)
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl, AR Grade : Merck, Germany)
- ดี(+)กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$, Laboratory grade : Fluka, Switzerland)
- บีต้า-ดี (-) ฟรักโทส ($C_6H_{12}O_6$, Laboratory grade : Sigma, USA)
- น้ำตาลทรายขาว

2.1.2 สารเคมีที่ใช้ในเทคนิคโพลาริเมตริก

- เลดอะซิเตท($(CH_3COO)_2Pb.3H_2O$, AR Grade : Baker Analyzer, USA)
- โพแทสเซียมออกซาเลท ($COOK)_2.H_2O$, AR Grrade : Carlo Erba, Farrmitalia)

2.1.3 ชุดสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ในเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริก (Spectrophotometric) (No. 510-DA, AR Grade : Sigma, USA) ประกอบด้วย

- แบเรียมไฮดรอกไซด์ ($Ba(OH_2)$)
- ซิงค์ซัลเฟต ($Zn(SO_4)$)
- ออโธ-ไดอะนิสิดีน ไดไฮโดรคลอไรด์ (*o*-Dianisidine dihydrochloride, $C_{14}H_{16}N_2O_2$)
- เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสและกลูโคสออกซิเดส (Peroxidase-Glucose Oxidase Enzymes)

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.2.1 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ด้วยระบบเทอร์มิสเตอร์

- เทอร์มิสเตอร์ (Department of Pure and Applied Biochemistry, University of Lund, Sweden)
- เพอร์ริสตอลติกปัมป์ (peristaltic pump, Miniplus 3, Gilson, France)
- ไดอะไลเซอร์ (dialyser)
- เซลลูโลสเอสเทอร์เมมเบรน (Spectra/por 1 cellulose ester membrane, MWCO 6000, Spectrum Laboratories, USA)
- เครื่องบันทึกผล (Chart Recorder, Rose recorder, Model 202 D-1354 รุ่น one pen chart recorder, USA)

2.2.3 อุปกรณ์ทดสอบหาปริมาณซูโครสโดยใช้เทคนิคอื่น

- เครื่องหมุนเหวี่ยง (General Laboratory Centrifuge GlC-2, USA)
- เครื่องโพลาริมิเตอร์ (Polarimeter POLAX-D, ATAGO, Japan)
- เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer SPECTRUM 351, USA)

2.2.4 อุปกรณ์อื่นๆ

- เครื่องชั่ง

-Mettler Model zE260 Delta Range : Mettler, USA

-d61F Mettler P3 00 : Mettler, Switzerland

- เครื่องตรวจวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter, Model 220 Corning, England)

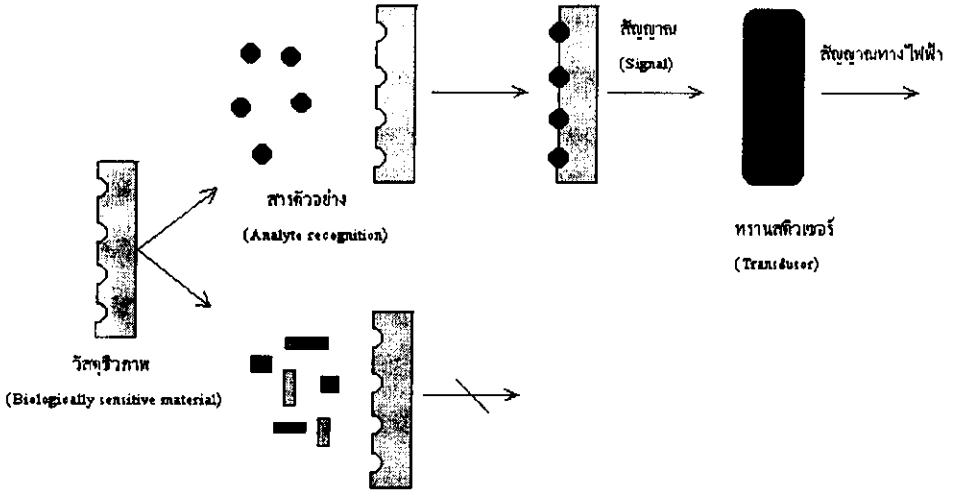
-เครื่องแก้ว (ไพแรกซ์ (pyrex))

-เทอร์โมมิเตอร์

-นาฬิกาจับเวลา

2.3 ซูโครสเซนเซอร์

ไบโอเซนเซอร์ เป็นระบบที่อาศัยการทำงานร่วมกันระหว่างวัสดุชีวภาพกับทรานสดิวเซอร์ (Cooper and Mcneil, 1990) โดยสารชีวภาพจะทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจงกับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ และตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงจากปฏิกิริยาโดยใช้ตัวตรวจวัดที่เหมาะสม ดังภาพประกอบ 2 ชนิดของทรานสดิวเซอร์ที่นิยมใช้ในระบบไบโอเซนเซอร์ ได้แก่ ออปติคอล (optical) แอมเพอโรเมตริก (amperometric) โพเทนชิโอเมตริก (potentiometric) และเทอร์โมเมตริก (thermometric) เป็นต้น



ภาพประกอบ 2 หลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์ : การจับกันระหว่างสารชีวภาพกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ เกิดเป็นสัญญาณที่ตรวจจับได้โดยทรานสดิวเซอร์

ในงานวิจัยนี้จะวิเคราะห์ปริมาณซูโครสโดยใช้สารชีวภาพคือ เอนไซม์อินเวอร์เทส ซึ่งเอนไซม์นี้จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครสได้เป็นกลูโคส ฟรักโทส และมีความร้อนเกิดขึ้น ดังปฏิกิริยา (Hüttl *et al.*, 1999)

$$\text{Sucrose} + H_2O \xrightarrow{\text{Invertase}} \text{Glucose} + \text{Fructose} + \Delta H$$

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

ความร้อนที่เกิดขึ้นนี้สามารถตรวจวัดโดยใช้เทอร์มิสเตอร์

2.4 การตรึงเอนไซม์

การตรึงเอนไซม์ คือ การทำให้เอนไซม์อยู่กับที่หรือจำกัดให้อยู่ในสภาพแวดล้อมขนาดเล็ก โดยที่ยังคงคุณสมบัติของการเร่งปฏิกิริยา และสามารถใช้งานได้หลายครั้งหรืออย่างต่อเนื่อง (Chibata, 1978) ในงานวิจัยนี้ใช้เทคนิคการตรึงเอนไซม์แบบพันธะโควาเลนต์ (covalent binding method) โดยการเชื่อมพันธะโควาเลนต์ระหว่างหมู่ฟังก์ชันของเอนไซม์อินเวอร์เทสกับตัวพยุง คือ เม็ดแก้วอัลคิลลามีน (alkylamine glassbeads) (เม็ดแก้วที่มีการกระตุ้นด้วยการเติมหมู่อะมิโนอัลคิล (aminoalkyl) โดยใช้แกมมาอะมิโนโพรพิลไตรเอททอกซีไซเลน (γ- aminopropyl - triethoxysilane))

เริ่มจากการเติมหมู่อัลดีไฮด์ (aldehyde)โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ให้กับผิวแก้ว อัลคิลลามีนโดยใส่แก้วอัลคิลลามีน 0.4 กรัมในหลอดผสมสาร เติมสารละลาย 25 มิลลิลิตร ของกลูตารัลดีไฮด์ 2.5 เปอร์เซนต์ (โดยปริมาตร) ที่เตรียมในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7 นำหลอดผสมสารนี้ไปตั้งไว้บนเครื่องผสมสารที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 60-90 นาที สีของสารละลายเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีส้มปนน้ำตาล ล้างเม็ดแก้วในหลอดผสมสารด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเทเม็ดแก้วลงในครูซิเบิ้ล ซินเตอร์กลาส (sintered glass) และล้างด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7 500-1000 มิลลิลิตร โดยดูดด้วยซักชันปัมป์ (suction pump) ต้องระวังอย่าให้ตะกอนแห้ง ในขั้นตอนนี้ต้องล้างกลูตารัลดีไฮด์ออกให้หมด ไม่เช่นนั้นกลูตารัลดีไฮด์ที่เหลืออยู่นี้จะเกิดพันธะกับเอนไซม์ขณะตรึง

ในขั้นตอนการตรึงเอนไซม์ ใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส 8 มิลลิกรัม (4,000 unit) ละลายใน 5 มิลลิลิตร ของ 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 เติมสารละลายเอนไซม์ลงในหลอดผสมสารที่มีเม็ดแก้วอัลคิลามีนที่เติมหมู่อัลดีไฮด์แล้ว 1 มิลลิลิตร (sedimented volume) ตั้งไว้ให้ผสมกันบนเครื่องผสมสารที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) นาน 4-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดร์ (sodium cyanoborohydride) 50 มิลลิกรัม และทิ้งสารผสมนี้บนเครื่องผสมสารต่อไปอีกประมาณ 15 ชั่วโมง ล้างเม็ดแก้วด้วย 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 500 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม 0.1 โมลาร์ เอทาโนลามีน (ethanolamine) พีเอช 8 25 มิลลิลิตร และปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาบนเครื่องผสมสารต่อไปอีก 2 ชั่วโมง ขั้นตอนนี้ทำขึ้นเพื่อกำจัดหมู่อัลดีไฮด์ที่เหลือจากการจับกับเอนไซม์ จากนั้นล้างเม็ดแก้วด้วย 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 500 มิลลิลิตร แล้วบรรจุเม็ดแก้วที่มีเอนไซม์สภาวะตรึง (immobilized enzyme) ลงในคอลัมน์เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ เมื่อไม่ได้ใช้จะเก็บเอนไซม์คอลัมน์ไว้ในสารละลาย

0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซึ่งมีโซเดียมเอไซด์ (sodium azide) 0.02 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ผสมอยู่ด้วยเพื่อป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.5 หลักการทำงานของเทอร์มิสเตอร์

เทอร์มิสเตอร์ เป็นสารกึ่งตัวนำที่ความต้านทานจะลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ทำจากส่วนผสมของโลหะออกไซด์ เช่น โคบอลท์ ทองแดง แมงกานีส นิกเกิล เหล็ก และยูเรเนียมรวมกันแล้วเผาจนเป็นเซรามิก รูปร่างของเทอร์มิสเตอร์มีได้หลายแบบ เช่น แผ่นกลมแบน (disk) หลอดกลม (tube) หรือเม็ดเล็กๆ (bead) (Jesperson, 1990) เทอร์มิสเตอร์ที่ใช้กันมากคือแบบเม็ดเล็กๆ

เนื่องจากความต้านทานของเทอร์มิสเตอร์มีสมบัติที่เปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิ ดังนั้นจึงนำเทอร์มิสเตอร์มาใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้โดยการต่อเทอร์มิสเตอร์กับวงจรวีตสโตนบริดจ์ (Wheat-stone bridge) (ภาพประกอบ 3) โดยมีหลักการดังนี้ เมื่อปรับความต้านทาน R_2 หรือ R_3 จนค่าศักย์ไฟฟ้า $V_1=V_2$ จะได้ว่า $E_{un} = 0$ เรียกว่าวงจรบริดจ์อยู่ในสมดุล (balance bridge) ซึ่งจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อ R_1/R_2 เท่ากับ R_T/R_3 และที่สภาวะนี้ถ้าทราบค่าความต้านทาน R_1, R_2 และ R_3 ก็จะสามารถหาความต้านทาน R_T ได้ ในทางปฏิบัติเป็นการยากที่จะทำให้วงจรในระบบการทดลองอยู่ในสภาพบริดจ์สมดุลตลอดเวลาที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ดังนั้นจึงมักจะวัดความแตกต่างของศักย์ไฟฟ้าระหว่าง V_1 และ V_2 ในขณะที่วงจรบริดจ์ไม่สมดุลแทน นั่นคือวัด E_{un} และ E_{un} ที่วัดได้จะแปรผันเป็นสัดส่วนกับผลต่างของความต้านทานระหว่างเทอร์มิสเตอร์ทั้งสอง (R_T และ R_1) (Jesperson, 1990) ดังสมการ

$$V_1 = \frac{E_b R_1}{R_1 + R_2} \quad (1)$$

$$V_2 = \frac{E_b R_T}{R_3 + R_T} \quad (2)$$

แต่

$$E_{un} = V_1 - V_2 \quad (3)$$

$$E_{un} = E_b \left[\frac{R_1}{R_1 + R_2} - \frac{R_T}{R_3 + R_T} \right] \quad (4)$$

โดยที่ E_b = ศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่วงจร

E_{un} = ศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้เมื่อวงจรบริดจ์ไม่สมดุล

R_T = ค่าความต้านทานของเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัด

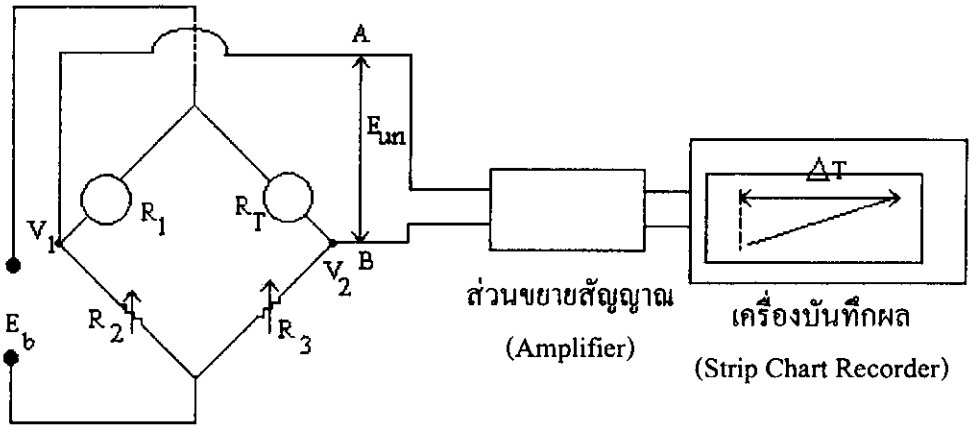
R_1 = ค่าความต้านทานของเทอร์มิสเตอร์อ้างอิง

V_1 = ค่าศักย์ไฟฟ้าที่จุด A

V_2 = ค่าศักย์ไฟฟ้าที่จุด B

R_2 และ R_3 = ค่าความต้านทานที่ปรับค่าได้เพื่อให้บริดจ์สมดุล

ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลงจะทำให้ความต้านทาน R_T เปลี่ยนไปซึ่งจะวัดได้ในรูปของการเปลี่ยนแปลงค่าศักย์ไฟฟ้า E_{un} ในงานวิจัยนี้เทอร์มิสเตอร์ที่ใช้เป็นเทอร์มิสเตอร์แบบเม็ด (beads thermistor) ชนิด 41A28 ของ VECO (Vitory Engineering Corporation, Springfield, N.J.) มีความต้านทาน 10 กิโลโอห์ม (kΩ) ที่ 25 องศาเซลเซียส และมีสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแปลงความต้านทาน -4.4 % ต่อหนึ่งองศาเซลเซียส ชุดขยายสัญญาณที่ใช้สามารถปรับความไว (sensitivity) ในการวัดได้ คือ 1 10 20 50 200 และ 500 ซึ่งที่ความไวสูงสุด 1 หมายถึง เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 1 มิลลิองศาเซลเซียส (m°C) จะให้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 มิลลิโวลต์ ที่ความไว 10 20 50 200 และ 500 หมายถึง ค่าความต่างศักย์ 100 มิลลิโวลต์ จะให้ค่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเทียบเท่ากับ 10 20 50 200 และ 500 มิลลิองศาเซลเซียส ตามลำดับ



ภาพประกอบ 3 ระบบการวัดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิโดยใช้เทอร์มิสเตอร์ประกอบในวงจรวีตสโตนบริดจ์

E_b = ศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่วงจร

E_{un} = ศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้เมื่อวงจรบริดจ์ไม่สมดุล

R_T = ค่าความต้านทานของเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัด

R_1 = ค่าความต้านทานของเทอร์มิสเตอร์อ้างอิง

V_1 = ค่าศักย์ไฟฟ้าที่จุด A

V_2 = ค่าศักย์ไฟฟ้าที่จุด B

R_2 และ R_3 = ค่าความต้านทานที่ปรับค่าได้เพื่อให้บริดจ์สมดุล

2.6 ระบบเทอร์มิสเตอร์

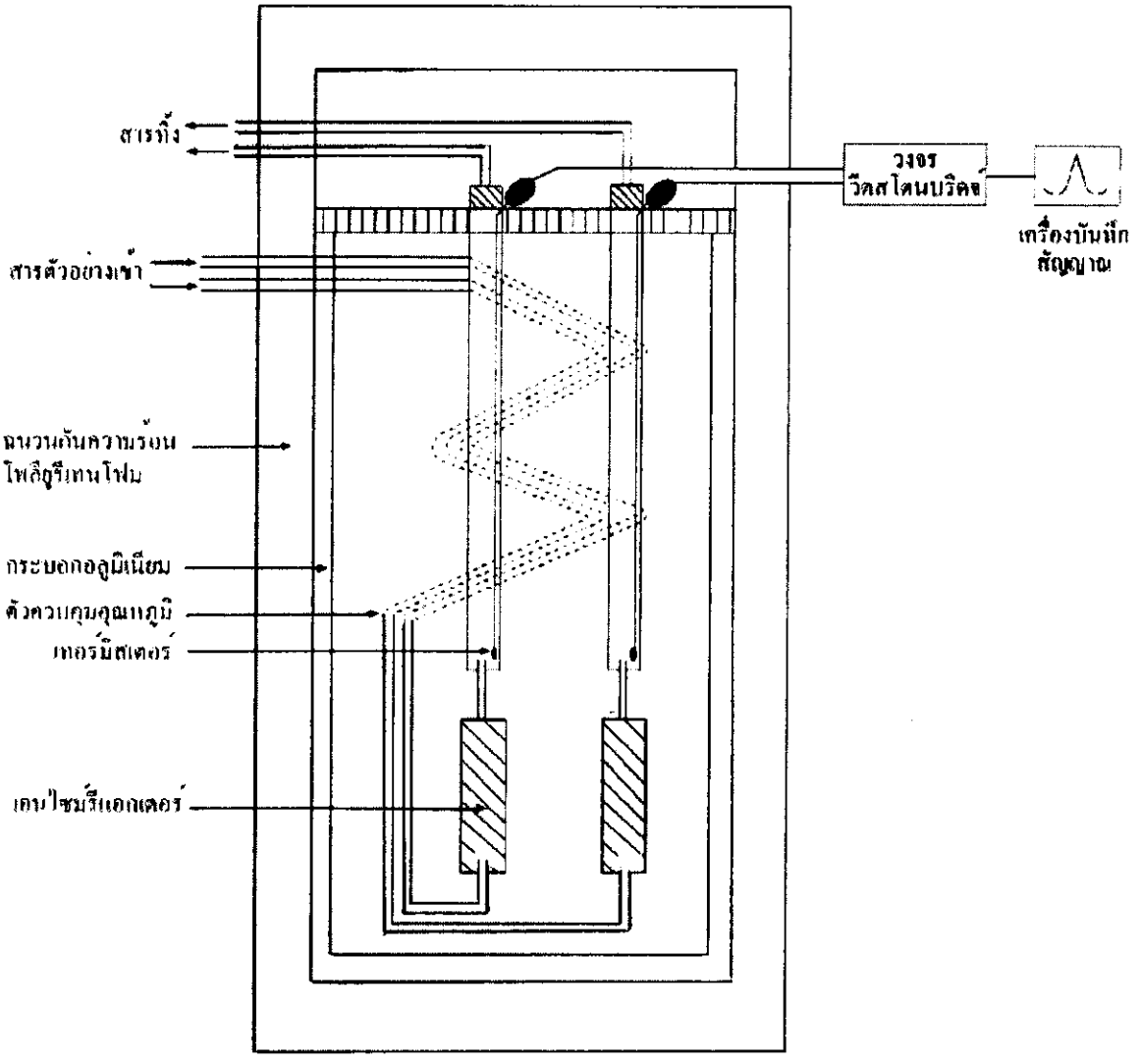
ระบบเทอร์มิสเตอร์ เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดความร้อน (calorimeter) ชนิดหนึ่งใช้ในการวัดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (ภาพประกอบ 4) ประกอบด้วยทรงกระบอกอะลูมิเนียม (ขนาด 80 มิลลิเมตร สูง 250 มิลลิเมตร) ซึ่งมีระบบควบคุมอุณหภูมิภายใน (heat exchanger) ให้อยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส หรือ 37 องศาเซลเซียส หุ้มด้วยฉนวนที่ทำด้วยโพลียูรีเทนโฟม (polyuretane foam) ภายในทรงกระบอกอะลูมิเนียม มีท่อเทฟลอน 2 อัน (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 8 มิลลิเมตร ยาว 200 มิลลิเมตร) สามารถถอดเข้าออกได้สวมต่ออยู่กับเอนไซม์รีแอกเตอร์ ภายในท่อเทฟลอนมีช่องสำหรับสารละลายที่ไหลออกจากเอนไซม์รีแอกเตอร์ และมีเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัด (sensing thermistor) และเทอร์มิสเตอร์อ้างอิง (reference thermistor) ทำจากเทอร์มิสเตอร์ที่เหมือนกันสองตัวยึดติดอยู่ในปลายท่อเทฟลอนทั้ง 2 อัน โดยเทอร์มิสเตอร์ทั้ง 2 ตัวจะต่อกับสายไฟที่สอดผ่านท่อเทฟลอนเพื่อไปต่อกับวงจรวีตสโตนบริดจ์ และเครื่องขยายสัญญาณ ซึ่งสามารถปรับค่าความไววิเคราะห์ได้ที่ค่าความไววิเคราะห์สูงสุด (REC SPAN =1) เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 1 มิลลิองศาเซลเซียส จะให้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 มิลลิโวลต์

2.7 เอนไซม์รีแอกเตอร์

เอนไซม์รีแแอกเตอร์ คือคอลัมน์ที่มีเอนไซม์สภาวะตรึงบรรจุอยู่ สำหรับระบบเทอร์มิสเตอร์นี้มีคอลัมน์ 2 ขนาดที่มีปริมาตรที่บรรจุเอนไซม์สภาวะตรึงต่างกันคือ 0.92 และ 0.13 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ภาพประกอบ 5) การเปลี่ยนเอนไซม์รีแอกเตอร์ทำได้ง่ายโดยสวมเข้าไปในปลายท่อเทฟลอน (ซึ่งภายในมีเม็ดเทอร์มิสเตอร์ติดอยู่กับท่อสำหรับให้สารละลายไหลออก) โดยจะยึดติดพอดีกับเครื่องมือ

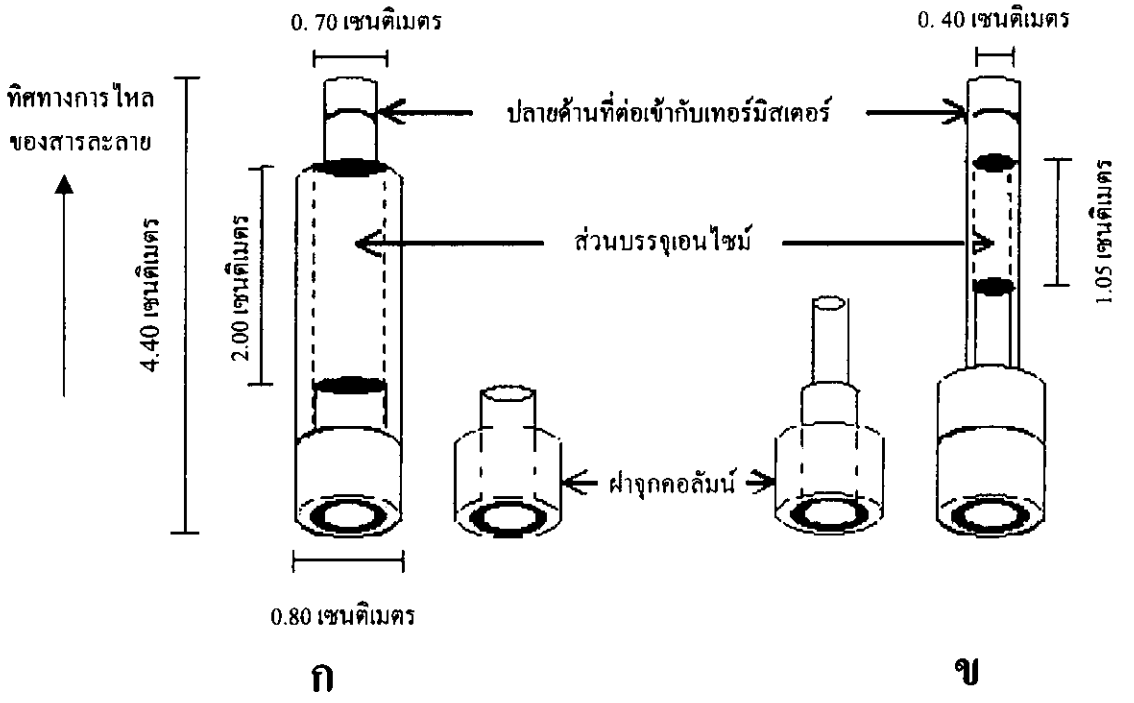
2.8 ระบบไหลผ่านสำหรับเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์

ระบบไหลผ่าน (flow through) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์อย่างต่อเนื่อง จะใช้การผ่านสารละลายตัวอย่างเป็นช่วงสั้นๆ เข้าไปในระบบกระแสตัวพา (carrier stream) ที่ไหลอย่างต่อเนื่องในท่อที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดเล็ก โดยปราศจากช่องอากาศคั่น ด้วยอัตราการไหลคงที่ การเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่เกิดขึ้นในขณะที่สารละลายตัวอย่างไหลจนถึงระบบตรวจวัด (detection system) จะถูกบันทึกได้โดยใช้เครื่องบันทึกสัญญาณ (recorder) หรือคอมพิวเตอร์ สัญญาณของการเปลี่ยนแปลง



ภาพประกอบ 4 ระบบเทอร์มิสเตอร์ (ปรับปรุงจาก Eggins, 1996)

Central Library
Prince of Songkla University



ภาพประกอบ 5 เอนไซม์รีแอกเตอร์ ที่มีปริมาตรแตกต่างกัน 2 ชนิด

ก) 0.92 ลูกบาศก์เซนติเมตร

ข) 0.13 ลูกบาศก์เซนติเมตร

จะมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ในการทดลองนี้จะศึกษาระบบไหลผ่านของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ 2 ระบบคือ ระบบไหลผ่านที่ไม่มีไดอะไลเซอร์ (ภาพประกอบ 6) และระบบไหลผ่านที่ใช้ไดอะไลเซอร์ (ภาพประกอบ 7) ส่วนประกอบของระบบไหลผ่านแสดงในภาพประกอบ 6 และ 7 ประกอบด้วย

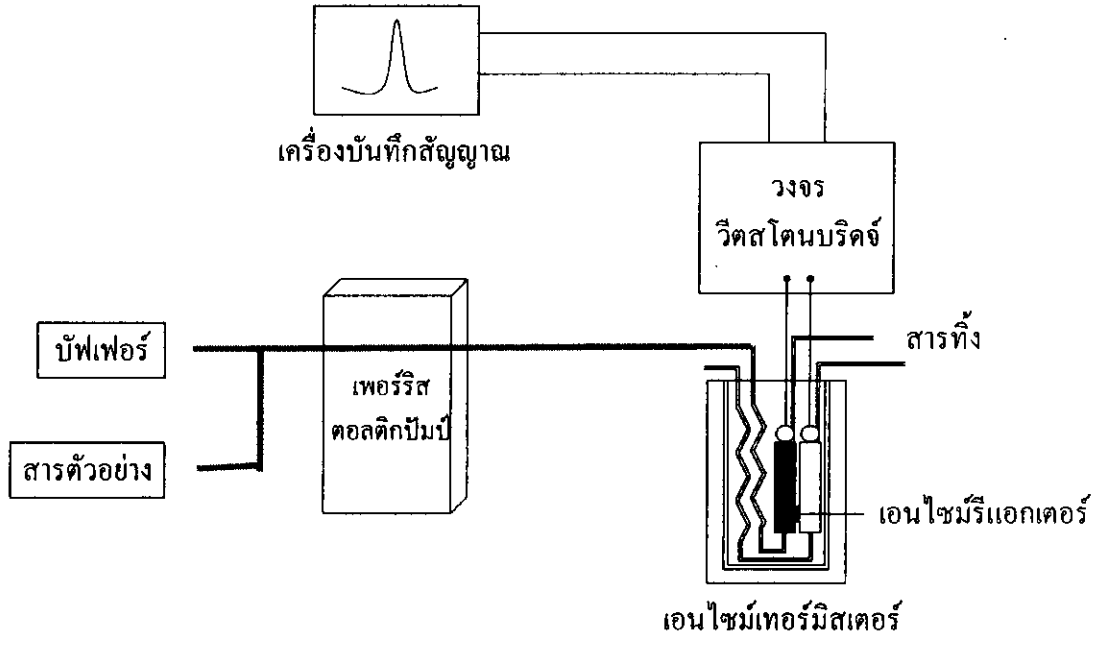
ก. หน่วยขับเคลื่อน (propelling unit) โดยมีเพอร์ริสตอลติกปั๊มปั๊มควบคุมการไหลของสารละลายบัฟเฟอร์ เข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราไหลคงที่

ข. หน่วยนำสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบ (sample introduction) นำสารละลายตัวอย่างปริมาตรคงที่เข้าสู่สารละลายบัฟเฟอร์เป็นช่วงสั้นๆ โดยสลับท่อระหว่างภาชนะที่ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ และสารละลายตัวอย่าง

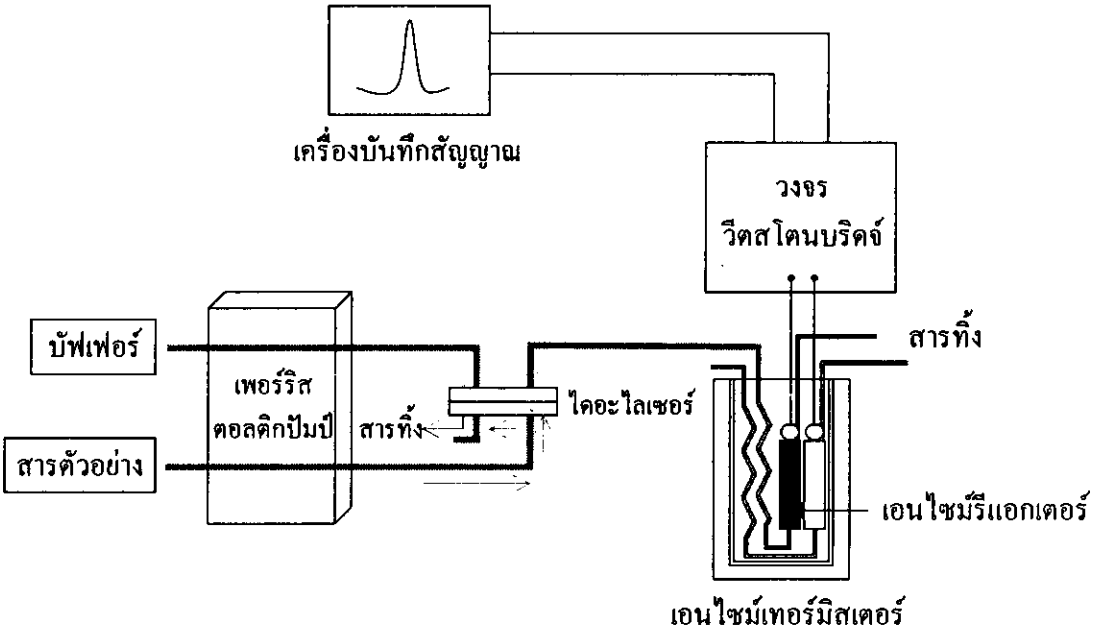
ค. หน่วยแยกสาร (separation unit) เป็นการแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากสารละลายตัวอย่าง โดยใช้ไดอะไลเซอร์ (ภาพประกอบ 7 และ 8) ซึ่งจะยอมให้โมเลกุลหรือไอออนขนาดเล็กเท่านั้นที่จะแพร่ผ่านไดอะไลซิสเมมเบรน (dialysis membrane) (cellulose ester MWCO 6000) เข้าไปในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ไหลผ่านอีกด้านหนึ่งของเมมเบรน และในการทดลองนี้จะใช้ไดอะไลเซอร์ 2 อันที่มีพื้นที่การแพร่ต่างกันคือ 1.5 x 298 ตารางมิลลิเมตร และ 1.5 x 625 ตารางมิลลิเมตร

ง. หน่วยเกิดปฏิกิริยา (reaction unit) คือส่วนที่เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายซูโครส โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อินเวอร์เทสในสภาวะตรึงที่บรรจุในเอนไซม์รีแอกเตอร์ การทดลองนี้ใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ 2 ขนาด (เส้นผ่าศูนย์กลาง x ความยาวของส่วนที่บรรจุเอนไซม์) คือ 0.70 x 2.40 เซนติเมตร และ 0.40 x 1.05 เซนติเมตร

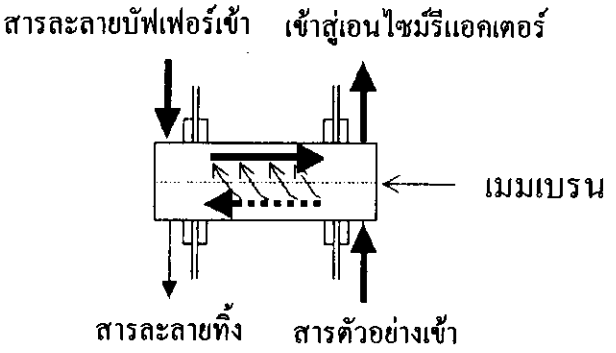
จ. หน่วยตรวจวัดสัญญาณ (detection unit) ประกอบด้วยเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ที่ต่อกับวงจรวีตสโตนบริดจ์ เมื่อสารละลายซูโครสผ่านเอนไซม์รีแอกเตอร์เอนไซม์อินเวอร์เทสจะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครส ทำให้ความร้อนในสารละลายเพิ่มขึ้น และทำให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้น การเปลี่ยนแปลงนี้จะตรวจวัดในรูปของการเพิ่มของความต่างศักย์ไฟฟ้า และแสดงผลบนเครื่องบันทึกผล (chart recorder) หรือคอมพิวเตอร์

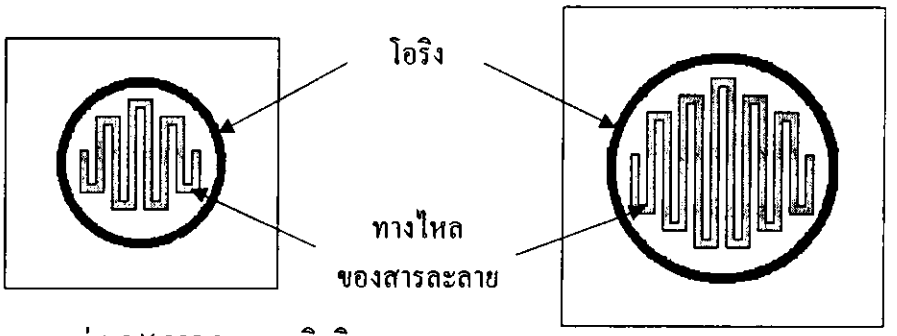


ภาพประกอบ 6 ระบบไหลผ่านของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์



ภาพประกอบ 7 ระบบไหลผ่านของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ กรณีใช้ไดอะไลเซอร์





ก) พื้นที่การแพร่ 1.5 X 298.0 ตารางมิลลิเมตร

ข) พื้นที่การแพร่ 1.5 X 625.0 ตารางมิลลิเมตร

ภาพประกอบ 8 ไดอะไลเซอร์ที่มีพื้นที่การแพร่ต่างกัน 2 ขนาด

ก) 1.5 x 298 ตารางมิลลิเมตร

ข) 1.5 x 625 ตารางมิลลิเมตร

2.9 การวิเคราะห์ผล

การเปลี่ยนแปลงของความร้อนที่เกิดขึ้นจากการตอบสนองของเอนไซม์ที่บันทึกได้ โดยใช้เครื่องบันทึกสัญญาณ หรือคอมพิวเตอร์ สัญญาณของสารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่างสามารถศึกษาได้จากความสูงของพีก (peak height) ความกว้างของพีก (peak width) หรือพื้นที่ใต้พีก (peak area) (ภาพประกอบ 9a) โดยที่ขนาดของสัญญาณจะเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง วิธีวัดความสูงของพีกใช้เมื่อพีกมีลักษณะแคบมาก ซึ่งไม่สามารถหาความกว้างของฐานพีกได้ วิธีวัดพื้นที่ของพีกเมื่อพีกที่ได้มีลักษณะกว้างเพราะพีกที่กว้างๆ นั้นความสูงจะไม่สัมพันธ์กับปริมาณ ในงานวิจัยนี้ใช้วิธีการวัดความสูงของพีก ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายที่สุดและทำได้รวดเร็ว (แม้น, 2535) โดยความสูงของพีกที่ได้จากสัญญาณการตอบสนองมีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารตัวอย่าง การวัดความสูงของพีกสามารถวัดได้โดยหาเส้นฐาน (base line) ของพีก แล้วลากเส้นตรงจากส่วนยอดของพีกตามแนวดิ่งจนถึงเส้นฐาน ระยะทางของเส้นตรงจากฐานถึงส่วนยอดของพีก คือ ความสูงของพีก (ภาพประกอบ 9b) ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณทุกครั้งจะต้องนำผลการทดลองของชุดการทดลองที่ได้มาประเมินค่า และอธิบายผลที่ได้โดยอาศัยพารามิเตอร์ต่างๆ ดังต่อไปนี้มาร่วมพิจารณา

-ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) เป็นค่าที่ใช้แสดงความเที่ยงของการทดลองที่ทำซ้ำหลายๆ ครั้ง ซึ่งถ้ามีค่าต่ำแสดงว่าการทดลองนั้นมีความเที่ยงสูง (Miller and Miller, 1993)

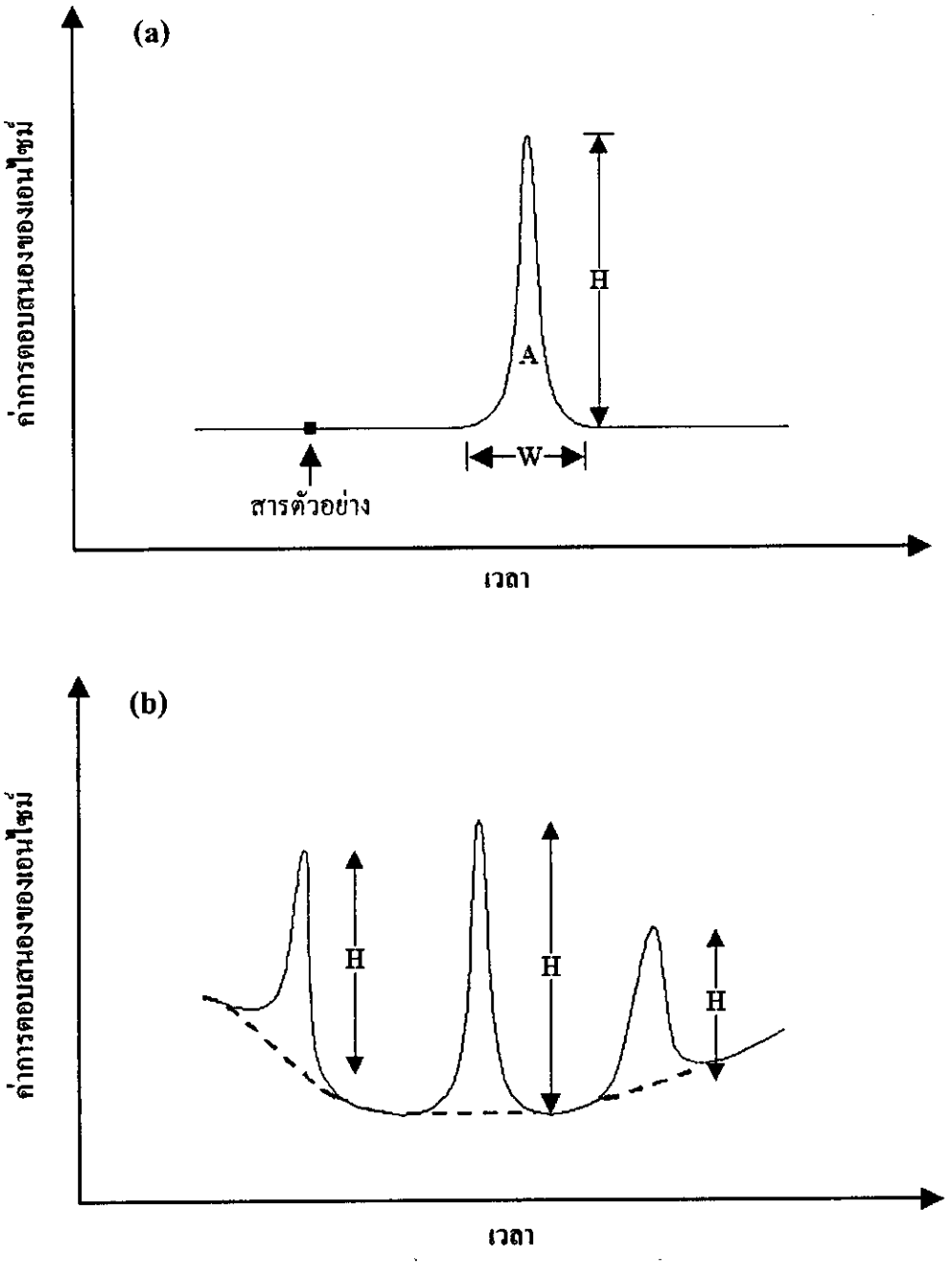
-ช่วงการตอบสนองเชิงเส้น (linear range) คือช่วงความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับสัญญาณการตอบสนอง (Miller and Miller, 1993)

-สัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง (correlation coefficient) คือค่าที่ใช้วัดความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรว่ามีความสัมพันธ์กันในลักษณะเชิงเส้นมากน้อยเพียงใด โดยจะมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 (Miller and Miller, 1993)

-ความไววิเคราะห์ (sensitivity) คือความชันของกราฟมาตรฐานในช่วงที่เป็นเส้นตรงที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการตอบสนองและความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ (Miller and Miller, 1993)

-ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (limit of detection) คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ควรตรวจวัดได้ โดยในการวิเคราะห์ผลจะหมายถึงปริมาณสารที่สามารถให้สัญญาณการตอบสนองของพีกสูงเป็น 2 เท่าของสัญญาณรบกวน (Miller and Miller, 1993)

นอกจากพารามิเตอร์ดังกล่าวข้างต้น ในการพิจารณาสัญญาณการตอบสนองที่ได้ยังต้องพิจารณาถึงความสูงของสัญญาณ ความกว้างของสัญญาณ และเวลาที่ใช้วิเคราะห์ด้วย



ภาพประกอบ 9 แสดงการวัดความสูงพีก

(a) การวัดความสูงพีกจากเส้นที่ฐาน

(b) การวัดความสูงพีกจากเบสไลน์

H คือ ความสูงของพีก

A คือ พื้นที่ของพีก

W คือ ความกว้างของพีก

2.10 ลักษณะสัญญาณการตอบสนอง

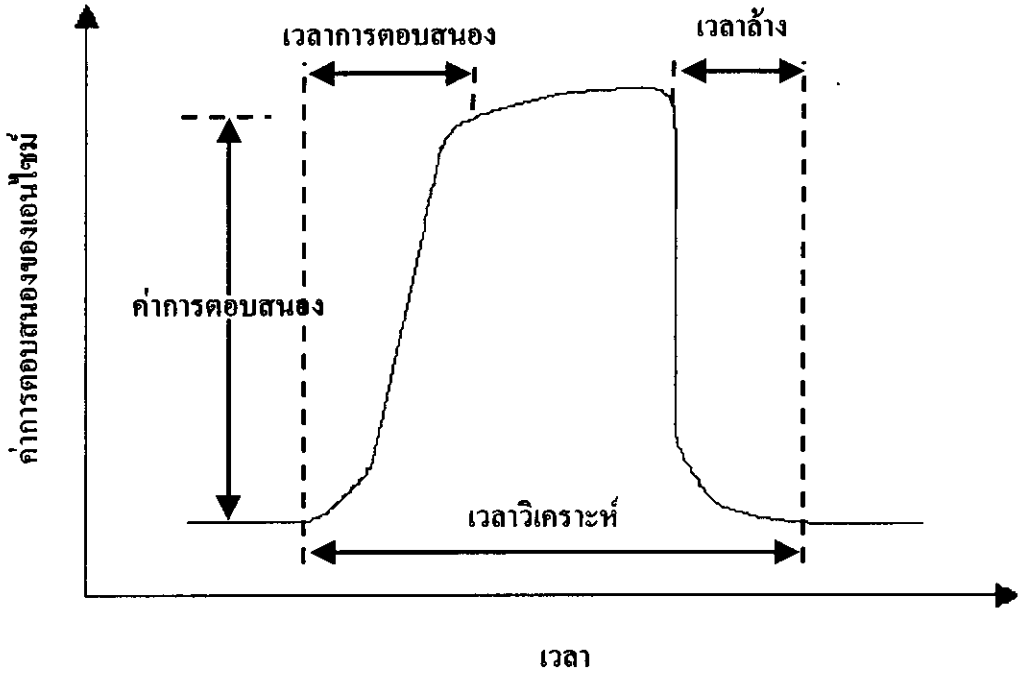
ในการศึกษาเกี่ยวกับการตอบสนองของเอนไซม์สภาวะตรึงในระบบไหลผ่าน เพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับช่วงเวลาต่างๆที่จะใช้ในการปรับปรุงระบบต่อไป เริ่มจากการผ่านสารละลาย ตัวอย่างเข้าไปในระบบอย่างต่อเนื่อง และตรวจวัดสัญญาณการตอบสนองที่เกิดขึ้นจนกระทั่งสัญญาณการตอบสนองคงที่ แล้วจึงผ่านสารละลายบัฟเฟอร์จนสัญญาณการตอบสนองกลับสู่ เบสไลน์ (ภาพประกอบ 10) จากสัญญาณดังกล่าวจะได้ค่าเวลาการตอบสนอง (response time) ซึ่งเป็นช่วงเวลาระหว่างการเริ่มเกิดสัญญาณจนสัญญาณมีค่าคงที่ เวลาที่ใช้ในการล้างระบบเพื่อให้สัญญาณกลับสู่เบสไลน์ (washout time) และเวลาวิเคราะห์ (analysis time) ซึ่งหมายถึงเวลาตั้งแต่เริ่มมีการตอบสนองจนกระทั่งสัญญาณกลับสู่เบสไลน์และการตอบสนองที่มากที่สุด ถึงแม้ว่าการผ่านสารละลายดังกล่าวจะให้ค่าการตอบสนองที่มากที่สุดแต่ใช้เวลาในการวิเคราะห์นานมากในการวิเคราะห์ต่อหนึ่งตัวอย่าง ดังนั้นเพื่อลดปริมาณสารละลายและเวลาที่ใช้วิเคราะห์ให้น้อยลง จึงปรับปรุงลักษณะการผ่านสารละลายให้เป็นแบบพัลส์ โดยผ่านสารละลายตัวอย่างเป็นช่วงสั้นๆ เข้าไปในระบบไหลผ่านที่มีการผ่านสารละลายบัฟเฟอร์อย่างต่อเนื่อง โดยเลือกระยะเวลาของการผ่านสารแต่ละตัวอย่างให้อยู่ในช่วงเวลาการตอบสนองของการผ่านสารละลายแบบคงที่ ลักษณะสัญญาณการตอบสนองแบบพัลส์แสดงในภาพประกอบ 11 ช่วงเวลาต่างๆของระบบนี้ประกอบด้วย เวลาการตอบสนองคือช่วงเวลาตั้งแต่เริ่มเกิดสัญญาณจนสัญญาณมีค่ามากที่สุด (peak) เวลาที่ใช้ในการล้างคือช่วงเวลาที่ใช้ในการทำให้สัญญาณลดลงกลับสู่เบสไลน์ เวลาการวิเคราะห์คือเวลาที่ใช้ตั้งแต่เอนไซม์เริ่มตอบสนองจนสัญญาณกลับสู่เบสไลน์ โดยค่าการตอบสนองคือค่าความแตกต่างระหว่างเบสไลน์และการตอบสนองที่สูงที่สุด

2.10.1 การตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อินเวอร์เทส

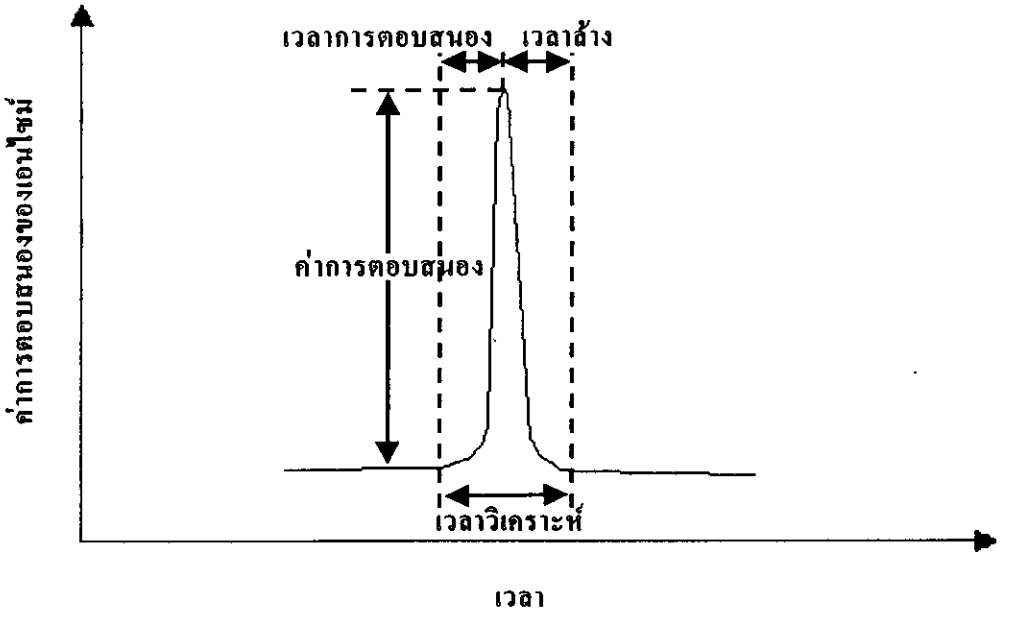
สภาวะที่ใช้ในการทดลอง

-อัตราไหล	0.50	มิลลิลิตรต่อนาที
-อะซิเตทบัฟเฟอร์	0.10	โมลาร์ พีเอช 4.5
-อุณหภูมิขณะทดลอง	30	องศาเซลเซียส
-ค่าความไวของเครื่องเทอร์มิสเตอร์	200	m°C/100mV

ในการศึกษาลักษณะการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อินเวอร์เทสต่อสารละลายซูโครส เริ่มจากการผ่านสารละลาย 0.10 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 ปรับความต้านทาน R_2 หรือ R_3 จนกระทั่งวงจรบริดจ์สมดุล นั่นคือ E_{in} เป็นศูนย์ เพื่อให้ได้เบสไลน์ จากนั้นผ่านสารละลายซูโครสจนกระทั่งสัญญาณการตอบสนองคงที่ แล้วจึงผ่านสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์เพื่อ



ภาพประกอบ 10 สัญญาณการตอบสนองแบบคงที่



ภาพประกอบ 11 สัญญาณการตอบสนองแบบพัลส์

ให้สัญญาณกลับสู่เบสไลน์ พิจารณาช่วงเวลาการตอบสนอง เวลาล้าง เวลาวิเคราะห์ และสัญญาณการตอบสนอง โดยใช้สารละลายซูโครสที่มีความเข้มข้น 1 3 5 10 20 40 60 80 100 120 140 160 180 และ 200 มิลลิโมลาร์

2.10.2 การตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อินเวอร์เทสเมื่อผ่านสารละลายแบบพัลส์

การวัดสัญญาณการตอบสนองแบบคงที่ของเอนไซม์รีแอกเตอร์อินเวอร์เทสในการทดลอง 2.10.1 ต้องใช้สารละลายซูโครส 4-5 มิลลิลิตร และใช้เวลา 20-40 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง เพื่อลดปริมาณของสารละลาย และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ให้น้อยลงจึงเปลี่ยนลักษณะการผ่านสารละลายตัวอย่างเป็นแบบพัลส์ นั่นคือผ่านสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์เป็นช่วงๆ สลับกับการผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ เริ่มจากการผ่านอะซิเตทบัฟเฟอร์เพื่อให้ได้เบสไลน์แล้วจึงผ่านสารละลายซูโครสเป็นเวลา 30 วินาที (0.25 มิลลิลิตร) จากนั้นผ่านอะซิเตตบัฟเฟอร์ซ้ำ เพื่อให้สัญญาณกลับมาที่เบสไลน์เหมือนเดิม โดยทำการทดลองกับสารสารละลายซูโครสที่มีความเข้มข้น 10 20 40 60 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ ผ่านสารละลายซูโครสทีละความเข้มจนครบชุด ทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนเวลาที่ใช้ในการผ่านสารละลายซูโครสเป็น 60 90 และ 120 วินาที ตามลำดับ เปรียบเทียบความไววิเคราะห์ และเวลาวิเคราะห์ของแต่ละพัลส์ ที่เลือกศึกษาโดยใช้เวลา 30-120 วินาทีเนื่องจากเป็นช่วงเวลาของการผ่านสารตัวอย่างที่อยู่ในช่วงเวลาเฉลี่ยของการตอบสนองต่อซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ ของการทดลอง 2.10.1 ในการทดลองนี้ได้ปรับชุดขยายสัญญาณให้มีความไววิเคราะห์ 50 (การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 50 มิลลิองศาเซลเซียส จะให้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 มิลลิโวลต์) เพื่อให้เครื่องมือมีความไววิเคราะห์มากขึ้น

2.11 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

ในระบบไหลผ่านของเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ปัจจัยที่จะมีผลต่อการวัดคือ อัตราไหล ชนิด พีเอช และความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ และปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง ซึ่งในการทดลองนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบไหลผ่าน 3 ระบบคือ ระบบไหลผ่านกรณีไม่มีไดอะไลเซอร์ ระบบไหลผ่านที่มีการใช้ไดอะไลเซอร์ขนาดกลาง (พื้นที่การแพร่ 1.5x298 ตารางมิลลิเมตร) และระบบที่มีการใช้ไดอะไลเซอร์ขนาดใหญ่ (พื้นที่การแพร่ 1.5x625 ตารางมิลลิเมตร)

2.11.1 ระบบไหลผ่านกรณีไม่มีไดอะไลเซอร์

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาระบบไหลผ่านกรณีที่ไม่มีไดอะไลเซอร์ ที่มีเอนไซม์รีแอกเตอร์ 2 ขนาด เอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดเล็กมีปริมาตร 0.13 ลูกบาศ์กเซนติเมตร และเอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดใหญ่มีปริมาตร 0.92 ลูกบาศ์กเซนติเมตร สภาวะการทดลองที่ใช้ คือ

-อะซิเตทบัฟเฟอร์	0.10	โมลาร์ พีเอช 4.5
-อุณหภูมิขณะทดลอง	30	องศาเซลเซียส
-ค่าความไวของเครื่องเทอร์มิสเตอร์	50	m°C/100mV

2.11.1.1 เอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดเล็ก ปริมาตร 0.13 ลูกบาศก์เซนติเมตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.40 เซนติเมตร ยาว 1.05 เซนติเมตร)

ก. อัตราไหล

อัตราไหลที่เหมาะสมจะทำให้สารละลายสามารถทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ภายในเอนไซม์รีแอกเตอร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ค่าการตอบสนองของเอนไซม์มีค่าสูง จึงได้ศึกษาอัตราไหลที่เหมาะสมโดยผ่านสารละลายซูโครสที่มีความเข้มข้น 10 20 40 60 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ โดยที่แต่ละความเข้มข้นของสารละลายซูโครสจะผ่านสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์เพื่อให้ได้สัญญาณเบสไลน์ ผ่านสารละลายซูโครสทีละความเข้มข้นปริมาตร 500 ไมโครลิตร จนครบชุดที่อัตราการไหล 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วจึงเปลี่ยนอัตราไหลเป็น 0.40 0.50 0.60 0.75 และ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ เปรียบเทียบค่าความไววิเคราะห์ และเวลาวิเคราะห์ของแต่ละอัตราไหล

ข. ปริมาตรสารตัวอย่าง

การเพิ่มปริมาตรสารตัวอย่างจะทำให้เอนไซม์รีแอกเตอร์มีสัญญาณการตอบสนองสูงขึ้น ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาด้วย นั่นคือในขณะที่ปริมาณเอนไซม์คงที่ หากปริมาตรสารตัวอย่างมากเกินความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาก็ไม่สามารถเพิ่มการตอบสนองของเอนไซม์ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้ได้ศึกษาปริมาตรสารละลายซูโครสที่เหมาะสม โดยผ่านสารละลายซูโครสที่มีความเข้มข้น 10 20 40 60 80 100 150 200 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยที่แต่ละความเข้มข้นของสารละลายซูโครสจะผ่านสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์เพื่อให้ได้สัญญาณเบสไลน์ ผ่านสารละลายซูโครส ทีละความเข้มข้นจนครบชุดด้วยอัตราการไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วจึงเปลี่ยนปริมาตรเป็น 300 400 500 และ 600 ไมโครลิตร ตามลำดับ เปรียบเทียบค่าความไววิเคราะห์ และเวลาวิเคราะห์ของแต่ละปริมาตร

2.11.1.2 เอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดใหญ่ ปริมาตร 0.92 มิลลิลิตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.70 เซนติเมตรยาว 2.40 เซนติเมตร)

ก. อัตราไหล

ศึกษาอัตราไหลที่เหมาะสมกรณีใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีขนาดใหญ่ทำการทดลองเช่นเดียวกับ 2.11.1.1 โดยใช้สารละลายซูโครสที่มีความเข้มข้น 10 20 40 60 80 และ

100 มิลลิโมลาร์ ผ่านสารละลายซูโครสปริมาตร 500 ไมโครลิตร จนครบชุดด้วยอัตราไหล 0.30 0.40 0.50 0.75 1.00 และ 1.25 มิลลิลิตรต่อนาทีตามลำดับ พิจารณาค่าความไววิเคราะห์ และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์

ข. ปริมาตรสารตัวอย่าง

ศึกษาปริมาตรซูโครสที่เหมาะสมกรณีใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีขนาดใหญ่ ทำการทดลองเช่นเดียวกับ 2.11.1.1 โดยใช้สารละลายซูโครสที่มีความเข้มข้น 1 2 5 10 20 40 60 80 100 120 140 และ 160 มิลลิโมลาร์ ผ่านสารละลายซูโครสจนครบชุดด้วยอัตราไหล 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที (อัตราไหลที่เหมาะสมการทดลอง 2.11.1.2 ก) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วจึงเปลี่ยนปริมาตรเป็น 300 400 500 600 และ 800 ไมโครลิตร ตามลำดับ พิจารณาค่าความไววิเคราะห์ ปริมาตรสารตัวอย่าง ช่วงความเป็นเชิงเส้น ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.11.1.3 เปรียบเทียบขนาดของเอนไซม์รีแอกเตอร์ ภายในสภาวะที่เหมาะสม

ขนาดของเอนไซม์รีแอกเตอร์จะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาของสับสเตรทกับเอนไซม์ สำหรับเอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีขนาดใหญ่และมีปริมาตรมาก จะมีปริมาณเอนไซม์และพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างสารตัวอย่างกับเอนไซม์มากกว่าเอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดเล็กและปริมาตรน้อยกว่า ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้มากขึ้น สัญญาณการตอบสนองก็จะมีค่าเพิ่มขึ้นด้วย ในการทดลองนี้เปรียบเทียบสัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อินเวอร์เทสที่สภาวะที่เหมาะสมระหว่างเอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดเล็กปริมาตร 0.13 ลูกบาศก์เซนติเมตรกับเอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดใหญ่ปริมาตร 0.92 ลูกบาศก์เซนติเมตร เปรียบเทียบค่าความไววิเคราะห์ ค่าความเป็นเชิงเส้น ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด และ เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.11.2 ระบบไหลผ่านที่มีการใช้การใช้ไดอะไลเซอร์ ขนาดกลาง

(พื้นที่ในการแพร่ 1.5 x 298 ตารางมิลลิเมตร)

ในการทดลองนี้ศึกษาการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อินเวอร์เทสต่อสารละลายซูโครส โดยนำไดอะไลเซอร์มาใช้ในระบบไหลผ่านเพื่อลดขั้นตอนในการเตรียมสารตัวอย่าง และช่วยป้องกันสารโมเลกุลใหญ่ไม่ให้เข้าไปถึงเอนไซม์รีแอกเตอร์ เนื่องจากจะทำให้เกิดการอุดตันของระบบ ในไดอะไลเซอร์จะมีการไหลของสารละลาย 2 ด้านได้แก่ ด้านสารตัวอย่าง (sample line) ทำหน้าที่นำสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบ และด้านสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer line) ทำหน้าที่นำสารที่ต้องการวิเคราะห์จากสารตัวอย่างที่แพร่ผ่านไดอะไลซิสเมมเบรน (dialysis membrane) เข้าสู่เอนไซม์รีแอกเตอร์ (ภาพประกอบ 7 และ 8) นั่นคือโมเลกุลของซูโครสจากสารตัวอย่างจะแพร่ผ่าน

ไดอะไลซิสเมมเบรนเข้าไปในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ไหลผ่านอีกด้านหนึ่งของเมมเบรนเข้าสู่เอนไซม์รีแอกเตอร์ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาปัจจัยต่างๆ ของระบบไหลผ่านที่มีไดอะไลเซอร์ด้วย

เนื่องจากเอนไซม์มีราคาแพงถ้าหากลดปริมาณการใช้ลงได้ก็จะเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย ในการศึกษาเริ่มต้นสำหรับการทดลองนี้จึงได้ศึกษาระบบไหลผ่านที่มีไดอะไลเซอร์โดยใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดเล็ก ปริมาตร 0.13 ลูกบาศก์มิลลิลิตร (เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.40 เซนติเมตร สูง 1.05 เซนติเมตร) ทำการทดลองโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากการทดลอง 2.11.1.2 แต่เนื่องจากการใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดเล็กไม่สามารถตรวจวัดสัญญาณที่เกิดขึ้นได้ ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณซูโครสที่แพร่ผ่านไดอะไลซิสเมมเบรนมีปริมาณน้อย ทำให้การตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์ลดลง แม้ว่าจะเพิ่มปริมาตรของสารตัวอย่างก็ไม่สามารถเพิ่มการตอบสนองของเอนไซม์ได้ ดังนั้นหากเพิ่มปริมาณเอนไซม์สภาวะตรึงอาจทำให้สัญญาณการตอบสนองสูงขึ้นได้ ดังนั้นจึงใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดใหญ่ ปริมาตร 0.92 มิลลิลิตร ในการทดลอง โดยทดสอบปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องดังนี้

2.11.2.1 อัตราไหลที่เหมาะสม

อัตราไหลของสารละลายทั้งสองด้านจะมีผลต่อการแพร่ของโมเลกุลสารตัวอย่างผ่านเมมเบรน ดังนั้นจึงได้ศึกษาอัตราการไหลของสารละลาย

ก. อัตราไหลของสารตัวอย่าง

ศึกษาอัตราไหลของสารละลายตัวอย่าง โดยให้อัตราไหลของสารละลายบัฟเฟอร์คงที่ที่ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรสารตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นอัตราไหลและปริมาตรที่เหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์กรณีที่ไม่มีไดอะไลซอร์จากการทดลอง 2.11.2 โดยผ่านสารละลายซูโครสที่มีความเข้มข้น 10 50 100 200 300 400 500 600 และ 800 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเปลี่ยนอัตราไหลของสารละลายตัวอย่างเป็น 0.20 0.30 0.40 0.50 และ 0.75 มิลลิลิตรต่อนาที พิจารณาความไววิเคราะห์ ค่าความเป็นเชิงเส้น ขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวัดได้ และเวลาที่ใช้ในการทดลอง

ข. อัตราไหลของสารละลายบัฟเฟอร์

ศึกษาอัตราไหลของสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ โดยให้อัตราไหลของสารละลายตัวอย่างคงที่ที่ 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งเป็นอัตราไหลที่เหมาะสมของสารละลายตัวอย่างจากข้อ ก. ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลอง 2.11.2.1ก โดยเปลี่ยนอัตราไหลของสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์เป็น 0.30 0.50 0.75 1.00 และ 1.25 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ อัตราไหลของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม คือ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที

ดังนั้นสภาวะการทดลองที่เหมาะสม ซึ่งจะใช้ในการทดลองต่อไปคือ

-อัตราไหลสารตัวอย่าง	0.30	มิลลิลิตรต่อนาที
-อัตราไหลบัฟเฟอร์	1.00	มิลลิลิตรต่อนาที
-อะซิเตทบัฟเฟอร์	0.10	โมลาร์ พีเอช 4.5
-ปริมาตรสารตัวอย่าง	500	ไมโครลิตร
-อุณหภูมิขณะทดลอง	30	องศาเซลเซียส
-ค่าความไวของเครื่องเทอร์มิสเตอร์	50	m°C/100mV

2.11.2.2 หาสภาวะที่เหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์

ก. ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์

โดยทั่วไปในการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของบัฟเฟอร์ที่จะใช้จะต้องศึกษาก่อนว่าไอออนของสารละลายบัฟเฟอร์นั้นมีผลหรือทำปฏิกิริยากับเอนไซม์หรือไม่ โดยเฉพาะพวกเคาน์เตอร์ไอออน (counter ion) ซึ่งเป็นไอออนที่มีประจุตรงข้ามกับเอนไซม์ซึ่งอาจจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ทำให้มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งมักจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นจึงควรทำการทดสอบโดยใช้บัฟเฟอร์สองชนิดหรือมากกว่าตรงช่วงพีเอชที่มีค่าเท่ากันแล้วเปรียบเทียบผลที่ได้ นอกจากนี้ในระบบการตรวจวัดความร้อน ความร้อนของสารละลายเนื่องจากปฏิกิริยาเคมีเกิดจากการละลายหรือการผสมกันของของเหลว การเกิดดีโปรโตเนชั่น (deprotonation คือการที่ไอออนหนึ่งถูกล้อมรอบด้วยโมเลกุลของน้ำ) หรือการเกิดโซลเวชั่น (solvation คือการที่ไอออนหนึ่งถูกล้อมรอบด้วยโมเลกุลของตัวทำละลาย) ของสารละลายบัฟเฟอร์จะมีการดูดกลืนหรือคายความร้อนออกมาพร้อมๆ กัน ดังนั้นความร้อนที่เกิดจากการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครสจะสูญสลายไปถ้าในสารละลายบัฟเฟอร์มีการเกิดปฏิกิริยาเป็นแบบดูดความร้อน (Bataillard *et al.*, 1993; Bjarnason *et al.*, 1998) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ในการทดลองนี้ต้องการตรวจวัดตัวอย่างทางด้านอุตสาหกรรมอาหารจึงได้เปรียบเทียบบัฟเฟอร์ 2 ชนิด คือ อะซิเตทบัฟเฟอร์ และซิตริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ พีเอช 4.5 ซึ่งทั้งสองชนิดนี้เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมอาหาร และมีช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อเอนไซม์อินเวอร์เทส ทำการทดลองโดยผ่านสารละลายซูโครสปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่มีความเข้ม 50 100 200 300 400 และ 500 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเตรียมในบัฟเฟอร์แต่ละชนิด อัตราไหลของสารละลายบัฟเฟอร์คือ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที และอัตราไหลของสารตัวอย่างคือ 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งเป็นอัตราไหลที่เหมาะสมจากการทดลอง 2.11.2 พิจารณาค่าความไววิเคราะห์

ข. ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์

ระบบเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ที่นำไดอะไลเซอร์มาใช้ในระบบไหลผ่านนี้ ความเข้มข้นของสารละลาย (ความหนืด) มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลผ่านไดอะไลซิสเมมเบรน ในสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้นต่ำ (ความหนืดน้อย) จะมีอัตราการซึมผ่านไดอะไลซิสเมมเบรนได้ดีกว่าสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นสูง (ความหนืดมาก) (www.spectrapore.com) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาสัญญาณการตอบสนองที่ความเข้มข้นสารละลายบัฟเฟอร์แตกต่างกัน ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลอง 2.11.2.2 ก โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 0.10 และ 1.00 โมลาร์ พีเอช 4.5 (เป็นชนิดบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลอง 2.11.2.2ก) ผ่านสารละลายซูโครสปริมาตร 500 ไมโครลิตรที่ความเข้มข้น 50 100 200 300 400 และ 500 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเตรียมในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์แต่ละความเข้มข้น

ค. พีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์

เอนไซม์เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีหมู่ที่สามารถเกิดประจุได้ (ionizable groups) ซึ่งการเกิดเป็นประจุของหมู่อะมิโน และหมู่คาร์บอกซิลิกเหล่านี้จะขึ้นอยู่กับค่าคงที่ของการแตกตัว (ionization constants) ของแต่ละหมู่ และขึ้นกับพีเอชของสิ่งแวดล้อมด้วย ที่พีเอชต่ำหรือสูงเกินไป มักจะทำให้ประจุของเอนไซม์กับสับสเตรทเปลี่ยนไปจนไม่เหมาะสมที่จะทำปฏิกิริยากัน (อาภัสรา, 2543) นอกจากนี้พีเอชที่สูงมากหรือต่ำมากอาจจะทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติไป ในการทดลองนี้ใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส ผลิตโดยบริษัท Sigma ซึ่งจะทำงานได้ประสิทธิภาพดีที่พีเอช 4.5 แต่เมื่อเอนไซม์อยู่ในสภาวะตรึง (การตรึงเอนไซม์การทดลอง 2.5) พีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อาจจะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปขึ้นกับธรรมชาติของวัสดุที่ใช้เป็นตัวตรึงเอนไซม์ (Cabral and Kennedy, 1991; Guilbault, 1984) ดังนั้นจึงควรศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ (ความเข้มข้นอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม จากการทดลอง 2.11.2.2 ข) พีเอช 3.5 4.0 4.5 5.0 5.0 และ 5.5 โดยผ่านสารละลายซูโครสปริมาตร 500 ไมโครลิตรที่ความเข้มข้น 50 100 200 300 400 และ 500 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเตรียมในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ แต่ละพีเอช พิจารณาค่าความไววิเคราะห์

2.11.2.3 ศึกษาปริมาตรที่เหมาะสม

เมื่อสารละลายตัวอย่างผ่านเข้าสู่เอนไซม์รีแอกเตอร์อินเวอร์เทสมีปริมาตรเพิ่มขึ้นสัญญาณการตอบสนองที่ได้ก็ควรจะเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของสัญญาณการตอบสนองนี้ขึ้นกับความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาด้วย ดังนั้นจึงได้ศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมที่จะทำให้ได้สัญญาณการตอบสนองที่สมดุลกับอัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

ทดลองโดยผ่านสารละลายซูโครสปริมาตร 200 300 400 500 600 และ 800 ไมโครลิตร ความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่ใช้คือ 5 10 20 30 50 100 200 300 400 500 และ 600 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยใช้สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ พีเอช 4.5 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์ พิจารณาค่าความไววิเคราะห์ ปริมาตรสารตัวอย่าง ช่วงความเป็นเชิงเส้น ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์

สภาวะที่เหมาะสมในการทดลองนี้คือ การใช้ระบบไหลผ่านที่มีการใช้ไดอะไลเซอร์ขนาดพื้นที่ในการแพร่ 1.5x298 ตารางมิลลิเมตร และใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดใหญ่ ซึ่งสภาวะการทดลองคือ ใช้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ พีเอช 4.5 อัตราไหลสารละลายตัวอย่าง และสารละลายบัฟเฟอร์ คือ 0.30 และ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ ปริมาตรสารตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร เมื่อพิจารณาค่าความไววิเคราะห์ ช่วงความเป็นเชิงเส้น และขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด พบว่าค่าความไววิเคราะห์มีค่าต่ำมากไม่สามารถวิเคราะห์แยกปริมาณซูโครส ในตัวอย่างเครื่องดื่มผลไม้ซึ่งมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0 – 500 มิลลิโมลาร์ ได้

จากการทดลองข้างต้นพบว่าเมื่อนำเอาไดอะไลเซอร์มาใช้ในระบบ ปริมาณซูโครสที่แพร่ผ่านไดอะไลเซอร์เข้าสู่เอนไซม์รีแอกเตอร์มีปริมาณน้อย ดังนั้นถ้าหากใช้ไดอะไลเซอร์ที่มีพื้นที่การแพร่มากขึ้นน่าจะทำให้ซูโครสแพร่ผ่านเมมเบรนได้มากขึ้น ซึ่งจะทำให้การตอบสนองของเอนไซม์เพิ่มขึ้น

2.11.3 สภาวะที่เหมาะสมของระบบเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ ร่วมกับการใช้ไดอะไลเซอร์ขนาดใหญ่ (พื้นที่การแพร่ 1.5 x 625 ตารางมิลลิเมตร)

ไดอะไลเซอร์ที่พื้นที่การแพร่มากขึ้นมีผลต่อการแพร่ของโมเลกุลของสารตัวอย่างผ่านเมมเบรน ดังนั้นจึงต้องศึกษาปัจจัยต่างๆ ของระบบไหลผ่าน

2.11.3.1 ศึกษาอัตราไหลที่เหมาะสม

ก. อัตราไหลของสารตัวอย่าง

ศึกษาอัตราไหลของสารละลายตัวอย่าง โดยให้อัตราไหลของสารละลายบัฟเฟอร์คงที่ที่ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที (จากการทดลอง 2.11.2) และเปลี่ยนอัตราไหลของสารละลายตัวอย่างเป็น 0.20 0.30 0.40 0.50 และ 0.75 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าอัตราไหลของสารละลายตัวอย่างที่เหมาะสมที่สุด คือ 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที

ข. อัตราไหลของสารละลายบัฟเฟอร์

ศึกษาอัตราไหลของสารละลายบัฟเฟอร์ โดยให้อัตราไหลของสารละลายตัวอย่างคงที่ที่ 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที (จากการทดลอง 2.11.2) และเปลี่ยนอัตราไหลของสารละลาย

บัฟเฟอร์เป็น 0.30 0.50 0.75 1.00 และ 1.25 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าอัตราไหลของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมคือ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที ดังนั้นในการทดลองหลังจากนี้จึงเลือกใช้อัตราไหลของสารละลายบัฟเฟอร์ และสารละลายตัวอย่างที่ 1.00 และ 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

2.11.3.2 ปริมาตรของสารตัวอย่าง

ศึกษาปริมาตรของสารละลายซูโครสที่เหมาะสม โดยผ่านสารละลายซูโครสปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 5 10 20 30 50 100 200 300 400 500 และ 600 มิลลิโมลาร์ ทำการทดลองซ้ำสารละลายชุดเดียวกันโดยใช้ปริมาตรสารละลายซูโครส 300 400 500 600 และ 800 ไมโครลิตร พิจารณาความไววิเคราะห์ ขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ พบว่าที่ปริมาตรเหมาะสมของสารละลายซูโครสที่เลือกใช้คือ 500 ไมโครลิตร

2.11.4 เปรียบเทียบผลจากไดอะไลเซอร์ขนาดเล็กและขนาดใหญ่

ไดอะไลเซอร์ที่มีพื้นที่การแพร่ต่างกันทำให้ปริมาณการแพร่ผ่านของซูโครสไม่เท่ากัน เปรียบเทียบระบบที่ใช้ไดอะไลเซอร์ที่แตกต่างกัน โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละระบบ นั่นคือ อัตราไหลของสารละลายตัวอย่าง และบัฟเฟอร์ของไดอะไลเซอร์ทั้งสองขนาดคือ 0.30 และ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ พิจารณาค่าความไววิเคราะห์เปรียบเทียบกัน

2.12 ผลจากสารรบกวน

ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ใดๆ นอกจากจะศึกษาคุณสมบัติในการวิเคราะห์ต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นแล้วยังต้องคำนึงถึงผลจากสารตัวอื่นๆ ซึ่งอาจจะมีผลในทางเสริมหรือในทางหักล้างสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์ของสารที่สนใจ ในงานวิจัยนี้ต้องการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสในเครื่องดื่มน้ำผลไม้ ซึ่งนอกจากจะมีน้ำตาลซูโครสแล้ว ยังมีน้ำตาลชนิดอื่น และ สารตัวอื่นๆ ด้วย

2.12.1 ผลของกลูโคสและฟรักโทส

ในเครื่องดื่มนอกจากจะมีน้ำตาลซูโครสแล้วยังมีน้ำตาลกลูโคสปนอยู่ 0.6-6.0 เปอร์เซ็นต์ หรือ 0.03-0.3 โมลาร์ (Boujtita *et al.*, 1999) และฟรักโทส 0.7-5.0 เปอร์เซ็นต์ หรือ 0.04-0.3 โมลาร์ (Paredes *et al.*, 1997) จึงศึกษาเพื่อดูว่าน้ำตาลดังกล่าวมีผลรบกวนการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อินเวอร์เทสอย่างไร โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด คือตัวอย่างที่ประกอบด้วย

-ซูโครสและกลูโคส

-ซูโครสและฟรักโทส

-ซูโครส กลูโคส และฟรักโทส

โดยความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่ศึกษาคือ 100 และ 400 มิลลิโมลาร์ ซึ่งแต่ละความเข้มข้นนี้จะมีปริมาณกลูโคสหรือฟรักโทส หรือทั้งกลูโคสและฟรักโทสอย่างละ 50 100 200 300 400 500 800 และ 1000 มิลลิโมลาร์ ผสมอยู่ด้วย

2.12.2 ผลของกรดซิตริก

ผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว เช่น ส้ม มะม่วง องุ่น เป็นต้น จะมีส่วนผสมของกรดบางชนิดเช่น กรดซิตริก (citric acid) กรดมาลิก (malic acid) เป็นต้น ประกอบอยู่ด้วย เมื่อนำมาผลิตเป็นน้ำผลไม้พร้อมดื่มจะมีกรดประมาณ 0.8-1.2 เปอร์เซ็นต์ แสดงในปริมาณของกรดซิตริก (Grudpan *et al.*, 1998) หรือ 0.5-1.0 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาผลของความเป็นกรดด้วย โดยศึกษาที่ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส 100 และ 400 มิลลิโมลาร์ ซึ่งแต่ละความเข้มข้นนี้จะมีปริมาณกรดซิตริก อย่างละ 0.05 0.10 0.50 1.00 1.50 และ 2.00 มิลลิโมลาร์ ผสมอยู่ด้วย

2.12.3 ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์

ในกระบวนการผลิตเครื่องดื่มน้ำผลไม้ ส่วนผสมนอกจากจะมีการเติมน้ำตาลทรายแล้ว ยังมีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในการทำน้ำผลไม้พร้อมดื่ม เช่น น้ำฝรั่ง น้ำแตงโม น้ำมะม่วง เป็นต้น โดยมีปริมาณเกลือประมาณ 0.33 เปอร์เซ็นต์ (57 มิลลิโมลาร์) (สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน, 2541) ส่วนปริมาณเกลือที่พบในเครื่องดื่มผลไม้บรรจุกระป๋องคือ 0.05-0.12 เปอร์เซ็นต์ (8-20 มิลลิโมลาร์) (Grudpan *et al*, 1998) นอกจากนี้ได้วิเคราะห์หาปริมาณเกลือในตัวอย่างเครื่องดื่มน้ำผลไม้ ได้แก่ น้ำเก็กฮวย น้ำมะพร้าว น้ำบ๊วย และน้ำส้ม โดยใช้วิธีของโวลฮาร์ด (Volhard's Method) (ศุภชัย, 2539) ซึ่งเป็นวิธีหาแบบทางอ้อม โดยเติมสารละลายมาตรฐานซิลเวอร์ไนเตรตที่ทราบจำนวนที่แน่นอนลงไปในสารละลายตัวอย่างให้มีจำนวนมากเกินพอ ปริมาณของซิลเวอร์ไนเตรตที่มากเกินพอซึ่งเหลือจากการทำปฏิกิริยาหาได้โดยการทำแบคไทเทรชัน (back titration) กับสารละลายมาตรฐานไธโอไซยาเนต ใช้สารละลายเฟอร์ริคอาลัม (ferric alum) เป็นอินดิเคเตอร์ พบว่ามีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ในน้ำเก็กฮวย น้ำมะพร้าว น้ำบ๊วย และน้ำส้ม ผสมอยู่ 0.5 24.0 56.5 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองจึงได้ศึกษาผลของปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อการตอบสนองของเอนไซม์เซนเซอร์ โดยศึกษาที่ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส 100 และ 400 มิลลิโมลาร์ ซึ่งแต่ละความเข้มข้นนี้จะมีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ อย่างละ 1 2 3 4 5 10 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ผสมอยู่ด้วย

2.13 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบที่มีเกลือ

จากการศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่าปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ (0.05-0.12 เปอร์เซ็นต์)ในตัวอย่างเครื่องดื่มผลไม้ มีผลต่อสัญญาณการตอบสนองเอนไซม์รีแอกเตอร์อินเวอร์เทส (2.12.3) ดังนั้นเพื่อปรับให้ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ของระบบมีสภาวะใกล้เคียงกับสารตัวอย่างมากที่สุด ซึ่งทำได้โดยเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงไปในสารละลายบัฟเฟอร์ด้านสารตัวอย่าง (สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้เจือจางสารตัวอย่าง) ในปริมาณที่เหมาะสม เพื่อไม่ให้มีผลต่างของเกลือโซเดียมคลอไรด์ของระบบกับสารตัวอย่าง ดังนั้นจึงต้องศึกษาปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสม ทำได้โดยพิจารณาดังนี้

1. โดยการเจือจางสารละลายตัวอย่างให้มากที่สุด เพื่อลดสารรบกวนต่างๆให้น้อยลง แต่ทั้งนี้การเจือจางสารละลายตัวอย่างจะต้องพิจารณาถึงขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด และช่วงความเป็นเชิงเส้นของสารละลายซูโครสที่ใช้ทำกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ด้วย ในตัวอย่างเครื่องดื่มน้ำผลไม้จะมีปริมาณซูโครสในช่วง 150-500 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นในการทดลองนี้จะสามารถเจือจางสารละลายตัวอย่างได้มากที่สุดคือ 5 เท่า

2. การเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงไปในสารละลายบัฟเฟอร์ด้านสารตัวอย่าง (สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้เจือจางสารตัวอย่าง) ให้มีปริมาณเท่ากันหรือว่ามากกว่าจนไม่มีผลต่างของเกลือโซเดียมคลอไรด์ของระบบกับสารตัวอย่าง หลังจากทำการเจือจางสารละลายแล้ว

ดังนั้นในการทดลองนี้จะศึกษาปริมาณเกลือที่เหมาะสมสำหรับเติมในสารละลายบัฟเฟอร์ด้านสารตัวอย่าง เมื่อมีการเจือจางตัวอย่าง 5 เท่า โดยทำการทดสอบเหมือนตัวอย่างจริง เริ่มด้วยการเลือกใช้สารละลายซูโครสความเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นซูโครสที่อยู่ในช่วงกลางของกราฟมาตรฐาน ที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0 5 10 30 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ผสมอยู่ด้วย ซึ่งเตรียมในอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.10โมลาร์ พีเอช 4.5 จากนั้นเจือจางสารละลายแต่ละชุดด้วยอัตราส่วน 1:4 ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.10 โมลาร์ พีเอช 4.5 ที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไร์ผสมอยู่ด้วย 100 500 1000 และ 2000 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ศึกษาค่าการตอบสนองโดยผ่านสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จนครบทุกชุด พล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการตอบสนองกับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ เปรียบเทียบปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เติมในอะซิเตทบัฟเฟอร์

2.14 อายุการทำงานของเอนไซม์รีแอกเตอร์

เนื่องจากเอนไซม์เป็นโมเลกุลของโปรตีนซึ่งจะถูกทำลายสภาพธรรมชาติได้ โดยสารเคมี และสภาวะต่างๆ เช่น อุณหภูมิ พีเอช เป็นต้น (สุนันทา, 2535) นั่นคือเมื่อใช้เอนไซม์เป็นเวลานานทำให้ประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาจะลดลง สัญญาณการตอบสนองลดลง จึงได้ศึกษาผลของอายุเอนไซม์รีแอกเตอร์อินเวอร์เทส หลังจากใช้งานไป 20 200 400 600 และ 800 ชั่วโมง ในสภาวะเหมาะสมของระบบที่ไม่มีไดอะไลเซอร์ คอลัมน์ใหญ่

2.15 การวิเคราะห์หาปริมาณซูโครส

การทดลองนี้จะวิเคราะห์ปริมาณซูโครสในตัวอย่างเครื่องดื่มน้ำผลไม้ เช่น น้ำฝรั่ง น้ำลำใย น้ำเก็กฮวย เป็นต้น ซึ่งซื้อจากร้านค้าทั่วไป โดยเปรียบเทียบเทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์ เทคนิคสเปคโตรโฟโตเมตรี และเทคนิคโพลาริเมตรี

2.15.1 การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์

สารละลายมาตรฐาน (standard solution) เตรียมสารละลายซูโครสที่ความเข้มข้น 30 50 100 200 300 และ 400 มิลลิโมลาร์ ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.10 โมลาร์ พีเอช 4.5 ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.00 โมลาร์ผสมอยู่ด้วย เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน (calibration curve) โดยผ่านสารละลายซูโครสปริมาตร 500 ไมโครลิตร เข้าสู่ระบบที่ประกอบด้วยไดอะไลเซอร์ขนาดใหญ่ (พื้นที่การแพร่ 1.5 x 625.0 ตารางมิลลิเมตร) และใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ขนาดใหญ่ (ปริมาตร 0.92 มิลลิลิตร) โดยใช้อัตราไหลด้านสารละลายบัฟเฟอร์ และด้านสารตัวอย่าง คือ 1.00 และ 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ นำค่าสัญญาณการตอบสนองมาเขียนกราฟเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของซูโครสมาตรฐาน ใช้เป็นกราฟมาตรฐาน

สารละลายตัวอย่าง (sample solution) ตัวอย่างเครื่องดื่มน้ำผลไม้ ก่อนนำมาวิเคราะห์กรองเพื่อแยกเอาชิ้นผลไม้ออก โดยใช้กระดาษกรอง (whatman เบอร์ 1) สารตัวอย่างที่ได้เตรียมเช่นเดียวกับสารละลายซูโครสมาตรฐาน โดยเจือจางสารตัวอย่างต่อสารละลายบัฟเฟอร์อัตราส่วน 1:4

สารละลายแบลงค์ (reagent blank) เตรียมเช่นเดียวกับสารละลายตัวอย่างแต่ไม่มีสารตัวอย่าง โดยใช้อะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.10 โมลาร์ พีเอช 4.5 (ไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์) แทนสารตัวอย่าง

ทำการทดลองเช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐาน นำค่าสัญญาณการตอบสนองที่ได้มาคำนวณเป็นความเข้มข้นของซูโครส จากกราฟมาตรฐาน ปริมาณซูโครสของสารตัวอย่างที่ได้จะเท่ากับปริมาณซูโครสที่วัดได้ลบกับสารละลายแบลงค์

2.15.2 การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคโพลาริเมตรี

เตรียมสารละลายซูโครสมาตรฐานในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 100 200 300 400 และ 500 มิลลิโมลาร์ นำมาใส่หลอดที่ใช้สำหรับวัดองศาการหมุนระนาบแสง ซึ่งมีขนาดความยาว 100 มิลลิเมตร แล้ววางบนแท่นตัวอย่างจากนั้นปรับจนมองเห็นแถบมืดกับแถบสว่างเป็นแถบเดียว อ่านค่าการหมุนระนาบแสงของสารละลายมาตรฐานซูโครส นำมาสร้างกราฟมาตรฐาน

สารตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโพลาริเมตริกได้นั้นต้องมีลักษณะใสไม่มีสี ในน้ำผลไม้จะมีสารแขวนลอยประเภท โปรตีน แป้ง และไขมันอยู่ ดังนั้นจึงต้องนำตัวอย่างน้ำผลไม้มาตกตะกอนสารแขวนลอยเหล่านี้ด้วยเลดอะซิเตท ในอัตราส่วน 1.0 กรัมต่อตัวอย่างน้ำผลไม้ 100 มิลลิลิตร คนสารละลายเพื่อให้สารนี้กระจายตัวทั่วตัวอย่าง แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เพื่อให้ตะกอนที่เกิดขึ้นจับรวมตัวกันจนแยกตัวให้เห็นน้ำผลไม้ใส นำไปกรองแยกตะกอนออกด้วยกระดาษกรอง (whatman เบอร์ 1) ในกรวย ขณะกรองให้ปิดปากกรวยเพื่อป้องกันการระเหยของตัวอย่าง หากเติมเลดอะซิเตทมากเกินไปจะทำให้สารละลายที่กรองได้นั้นมีลักษณะขุ่น ซึ่งสามารถแก้ไขได้ด้วยการเติมโพแทสเซียมออกซาเลตลงไปในอัตราส่วน 0.25 กรัมต่อตัวอย่างน้ำผลไม้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำตัวอย่างที่กรองได้ไปวิเคราะห์ คำนวณหาความเข้มข้นปริมาณซูโครสในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

2.15.3 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี

เนื่องจากเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี จะมีช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ซูโครสอยู่ในช่วง 0.0014 (25 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) – 0.0167 (300 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) โมลาร์ (Sigma, n.d.) ดังนั้นจึงต้องนำตัวอย่างน้ำผลไม้ มาเจือจาง 100 เท่าด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.50 แล้วจึงนำแต่ละตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสซึ่งประกอบด้วยสารละลายต่างๆ ดังนี้

แบลงค์ (blank) คือสารละลายบัฟเฟอร์ที่ไม่มีสารตัวอย่าง (ซูโครส) ซึ่งถือเป็นหลอดอ้างอิง

สารละลายมาตรฐาน (standard solution) คือสารละลายซูโครสมาตรฐานซึ่งทราบความเข้มข้นที่แน่นอน

สารตัวอย่าง (sample) คือตัวอย่างเครื่องดื่มน้ำผลไม้ที่ต้องการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครส เนื่องจากการวิเคราะห์วิธีนี้จะหาปริมาณซูโครสในรูปของน้ำตาลกลูโคส แต่เนื่องจากในน้ำ

ผลไม้จะมีทั้งกลูโคสและซูโครสผสมกันอยู่ ดังนั้นจึงต้องแบ่งสารตัวอย่างน้ำผลไม้เป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งทำการวิเคราะห์หากลูโคสก่อนการย่อยสลายซูโครส อีกส่วนหนึ่งวิเคราะห์หากลูโคสหลังจากการย่อยสลายซูโครส โดยมีเอนไซม์อินเวอร์เทสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครส สรุปเป็นขั้นตอนดังนี้

แบลงค์ (lank)	สารละลายมาตรฐาน	สารตัวอย่าง	
		การย่อยซูโครสไปเป็นกลูโคสกับฟรักโทส (inversion)	
		ก่อน	หลัง
1.8 มิลลิลิตร น้ำ	1.8 มิลลิลิตร น้ำ	1.8 มิลลิลิตร น้ำ	1.8 มิลลิลิตร น้ำ
0.2 มิลลิลิตร อะซิเตทบัฟเฟอร์	0.2 มิลลิลิตร ซูโครส	0.2 มิลลิลิตร ตัวอย่าง	0.2 มิลลิลิตร ตัวอย่าง
0.1 มิลลิลิตร น้ำ	1.8 มิลลิลิตร อินเวอร์เทส	0.1 มิลลิลิตร น้ำ	0.1 มิลลิลิตรอินเวอร์เทส

ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครส แล้วนำทุกหลอดมาเติมแบเรียมไฮดรอกไซด์และซิงค์ซัลเฟตอย่างละ 1.0 มิลลิลิตร เพื่อทำให้เกิดการตกตะกอนของสารแขวนลอยที่มีอยู่ในน้ำผลไม้ เช่น โปรตีน แป้ง และ ไขมัน

นำไปเซนตริฟิวส์ (centrifuge) ด้วยความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้สารแขวนลอยตกตะกอนแล้วจึงนำ 0.5 มิลลิลิตรของส่วนใสแต่ละหลอดเติมลงในสารละลายผสมระหว่างเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส กลูโคสออกซิเดส และออโธ-อะนิสิดีน หลอดละ 5.0 มิลลิลิตร

ตั้งทิ้งไว้ เป็นเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสไปเป็นกรดกลูโคนิก (gluconic acid) กับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ โดยมีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับออโธ-ไดอะนิสิดีน (ไม่มีสี) โดยการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) ได้เป็นสารประกอบของออโธ-ไดอะนิสิดีนที่มีสารสีน้ำตาลเกิดขึ้น

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะเป็นสัดส่วนตรงกับปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ซึ่งจากผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างก่อนและหลังการย่อยสลายซูโครส สามารถนำมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของซูโครสที่มีอยู่ในสารตัวอย่างได้จากกราฟมาตรฐานที่ได้จากสารละลายซูโครสมาตรฐาน

2.16 การเปรียบเทียบผลวิเคราะห์

เปรียบเทียบผลวิเคราะห์ปริมาณซูโครสในตัวอย่างเครื่องดื่ม ด้วยวิธีเอนไซม์เทอร์มิสเตอร์กับวิธีมาตรฐานสองวิธี (สเปกโตรโฟโตเมตรี และวิธีโพลาริเมตรี) และปริมาณซูโครสที่บรรจุข้างกระป๋อง โดยใช้สถิติในการทดสอบวิธีแต่ละคู่ว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ หรือวิธีการใดให้ผลที่มากกว่ากัน ในการทดสอบนี้ใช้เทคนิคการวิเคราะห์ความสัมพันธ์คือ วิธีการวิเคราะห์ความถดถอยเชิงเส้น (Regression line) (Miller and Miller, 1993) และวิธีการทดสอบของ Bland-Altman (Glantz, 1997)

2.16.1 วิธีการวิเคราะห์ความถดถอยเชิงเส้น

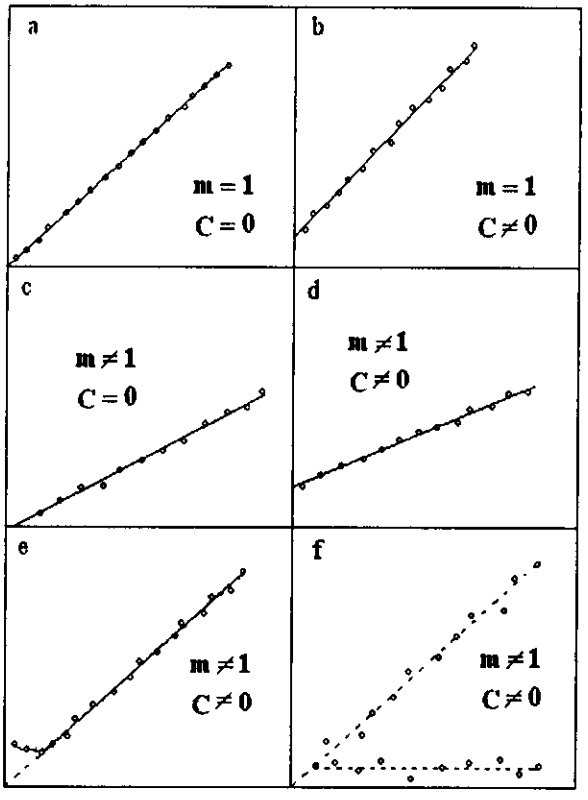
การวิเคราะห์ความถดถอยเชิงเส้น เป็นการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สองวิธีที่ความสัมพันธ์อยู่ในรูปเชิงเส้น โดยการพล็อตกราฟระหว่างปริมาณที่วิเคราะห์ได้โดยวิธีที่ต้องการตรวจสอบความถูกต้องกับปริมาณที่วิเคราะห์ได้จากวิธีมาตรฐานในตัวอย่างเดียวกัน แต่ละจุดบนกราฟแสดงถึงตัวอย่างแต่ละตัวที่วิเคราะห์โดย 2 วิธี ซึ่งจะได้กราฟเส้นตรงที่ประกอบด้วยความชัน (slope, m) จุดตัดแกน (intercept, C) และสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง (correlation coefficient, r^2)

ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ทดสอบของทั้งสองวิธีมีค่าเหมือนกันทุกประการไม่มีความผิดพลาดของการวัดจะได้ค่าจุดตัดแกนเป็นศูนย์ ความชันและสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสองมีค่าเท่ากับหนึ่ง ดังแสดงในภาพประกอบ 12a ซึ่งในทางปฏิบัติเป็นไปได้ยากที่จะให้ผลสมบูรณ์โดยไม่เกิดความผิดพลาดของการวัด แม้ว่าความผิดพลาดระบบ (system error) ไม่เกิดขึ้นแต่ยังคงมีความผิดพลาดสุ่ม (random error) ซึ่งเป็นความผิดพลาดที่กำจัดหรือหลีกเลี่ยงได้ยากส่งผลให้ลักษณะของจุดตัดแกนมีค่าเบี่ยงเบนไปจากศูนย์ และความชันมีค่าเบี่ยงเบนไปจากหนึ่ง ดังแสดงในภาพประกอบ 12b เพื่อให้ผลวิเคราะห์เป็นที่ยอมรับและไม่มีความผิดพลาดระบบเกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ของค่าความถดถอยเชิงเส้น จะต้องมีการวัดค่าความคลาดเคลื่อนของความชัน (S_m) และจุดตัดแกน (S_c) เมื่อนำไปบวกหรือลบกับค่าความชัน ($m \pm S_m$) และค่าจุดตัดแกน ($m \pm S_c$) แล้วมีค่าครอบคลุมในช่วงหนึ่ง และศูนย์ ตามลำดับ แสดงว่าทั้งสองวิธีให้ผลทดสอบที่ไม่ต่างกัน

2.16.2 การทดสอบของ Bland-Altman

วิธีของ Bland-Altman เป็นวิธีที่แสดงให้เห็นว่าผลการทดลองจากทั้งสองวิธีจากตัวอย่างเดียวกันนั้นมีความสอดคล้องกันอย่างไร หลักการพิจารณาคือหาผลต่างของผลการทดลองจากสองวิธี ซึ่งค่านี้จะบอกถึงความไม่สอดคล้องกันของวิธีทั้งสอง หลังจากนั้นหาค่าเฉลี่ย และค่า

เบี่ยงเบนมาตรฐานของผลต่างเหล่านี้ ค่าเฉลี่ยของผลต่างนี้คือค่าที่วัดความเอนเอียง (bias) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน คือค่าที่แสดงว่าความแตกต่างระหว่างสองวิธีวิเคราะห์มีการกระจายตัวมากน้อยอย่างไร สุดท้ายหาค่าประมาณที่ดีที่สุดจากสองวิธี นั่นคือค่าเฉลี่ยของผลการทดลองของแต่ละคู่ หลังจากนั้นเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างกับค่าเฉลี่ยซึ่งจะแสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างอย่างเป็นระบบระหว่างเทคนิคการวัดทั้งสองหรือไม่



ภาพประกอบ 12 แสดงการเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์สองวิธี โดยใช้สมการถดถอยเชิงเส้น (Miller and Miller, 1993)

a แสดงผลของสองวิธีวิเคราะห์ไม่มีความแตกต่าง

b-f แสดงผลที่เปลี่ยนแปลงไปตามค่าความผิดพลาดระบบ