แบทซ์อินเจกชันอนาไลซิสสำหรับการหาปริมาณซูโครส

Batch Injection Analysis (BIA) for Quantitative Analysis of Sucrose

ประภาพรรณ ศุภพิชญ์นาม

Prapapun Suppapitnarm

เลขหมู่ QK898 S98 ป46 2538 ฉ.2

เลขทะเบียน ....

8 / ก.ย. / 38

Order Key 4903

BIB Key 82124

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Analytical Chemistry

Prince of Songkla University

2538

ชื่อวิทยานิพนธ์	แบทซ์อินเจกชันอนาไลซิสสำหรับการหาปริมาณซูโครส
ผู้เขียน	นางสาวประภาพรรณ ศุภพิชญ์นาม
สาขาวิชา	เคมีวิเคราะห์

คณะกรรมการที่ปรึกษา

....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เพริศพิชญ์ คณาธารณา)

....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปณต ถาวรังกูร)

คณะกรรมการสอบ

....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เพริศพิชญ์ คณาธารณา)

....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปณต ถาวรังกูร)

....กรรมการ
(อาจารย์รุ่งโรจน์ รัตนโอภาส)

....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยาพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์

....
(ดร. ไพรัตน์ สงวนไทร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ แบทซ์อินเจกชันอนาไลซิสสำหรับการหาปริมาณซูโครส

ผู้เขียน นางสาวประภาพรรณ ศุภพิชญ์นาม

สาขาวิชา เคมีวิเคราะห์

ปีการศึกษา 2538

บทคัดย่อ

แบทซ์อินเจกชันอนาไลซิส (BIA) เป็นเทคนิคที่ใช้การฉีดสารตัวอย่างซึ่งมีปริมาตรเป็นไมโครลิตรลงบนตัวตรวจวัดซึ่งอยู่ในสารละลายที่มีปริมาตรมากและถูกคนอยู่ตลอดเวลา ในรายงานนี้จะกล่าวถึงการใช้เทคนิค BIA ในการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสโดยวัดความร้อนที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครสโดยเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ตรึงอยู่บนเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัด จากผลการทดลองพบว่าสภาวะการทดลองที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสมีดังนี้ สารละลายปริมาตรมากในบีกเกอร์คือ อะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ pH 4.80 ใช้ปลอกเทอร์มิสเตอร์ยาว 15 มิลลิเมตร ที่มีระยะห่างของรูปลอกเทอร์มิสเตอร์จากเทอร์มิสเตอร์ 2 มิลลิเมตร เวลาที่ทำให้เกิดสมดุลอุณหภูมิระหว่างสารตัวอย่างกับสารละลายในบีกเกอร์ 30 วินาที โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส อัตราเร็วในการฉีดสารละลายตัวอย่างซึ่งควบคุมการฉีดด้วยเครื่อง EDOS 5221 อยู่ที่ตำแหน่ง 4 อัตราเร็วในการคนสารละลาย 300 รอบต่อนาที ระยะห่างของปลายปิเปตจากเทอร์มิสเตอร์ 2 มิลลิเมตร และปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้ 25 ไมโครลิตร ในการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสด้วยเทคนิค BIA นี้ สามารถทำการวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างได้ 20 - 30 ตัวอย่างต่อชั่วโมงโดยที่สารละลายไม่ต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง และให้ช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรงสำหรับซูโครส 0.00 - 0.50 โมลาร์ กลูโคส ฟรักโทส รวมทั้งไอออนของโลหะหนัก ทองแดง (II) และเงิน (I) ไม่มีผลรบกวนในการวิเคราะห์ซูโครส

ระบบ BIA นี้ใช้ทดสอบหาปริมาณซูโครสในน้ำอ้อยสดและน้ำผลไม้กระป๋อง ผลการวิเคราะห์ที่ได้จากเทคนิคนี้เมื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากเทคนิคโพลาริเมตริกและเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริกพบว่า ความแตกต่างระหว่างผลการทดสอบที่ได้ไม่มีนัยสำคัญที่ระดับ 5%

Thesis Title	Batch Injection Analysis (BIA) for Quantitative Analysis of Sucrose
Author	Miss Prapapun Suppapitnarm
Major Program	Analytical Chemistry
Academic Year	1995

Abstract

Batch Injection Analysis (BIA) is a technique involving the injection of microliter samples toward a nearby detector , immersed in a large-volume , stirred blank solution. This work focused on the use of BIA method in the analysis of sucrose based on the hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on a sensing thermistor where the resulting heat from the reaction is measured. Optimum conditions for the BIA response were as followed ; acetate buffer 0.01 M pH 4.80 was used as blank solution , the lenght of PVC thermistor covered tube was 15 mm , the distance of the first set of holes in the PVC tube was 2 mm from the thermistor , equilibrate time for reaching thermal equilibrium between the sample and blank solution was 30 second , stirring rate and temperature of the blank solution were 300 rpm and 20 $^{\circ}$C respectively. The injection rate of sample using EDOS 5221 was at position 4 , tip-detector distance was 2 mm and sample volume was 25 µL. The proposed system permits the analysis of about 20 - 30 samples per hour and sample preparation is not required. The linear range of sucrose is 0.00 - 0.50 M. No significant interferences was observed from glucose , fructose and heavy metal ions , e.g. , Cu (II) and Ag (I).

BIA technique was tested in the analysis of sugarcane juice and canned juice. Results obtained by this procedure were compared with those obtained by the conventional polarimetric and spectrophotometric methods and the differences were not significant at 5% level.

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ประสบความสำเร็จได้ด้วยความกรุณาของรองศาสตราจารย์ ดร.เพริศพิชญ์ คณาธารณา อาจารย์ที่ปรึกษา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปณต ถาวรังกูร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำแนวทางแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นเกี่ยวกับวิทยานิพนธ์นี้ตลอดมาตั้งแต่ต้นจนจบการศึกษา ผู้ทำวิทยานิพนธ์จึงขอกราบขอบพระคุณท่านทั้งสองไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณอาจารย์พรรณี อัศวตรีรัตนกุล อาจารย์ภุชงค์ วรรัตนานุรักษ์ อาจารย์รุ่งโรจน์ รัตนโอภาส และอาจารย์ประสิทธิ์ เรืองไรรัตนโรจน์ ที่ได้ให้คำแนะนำปรึกษาบางประการ ขอบคุณอาจารย์อนุชิต ชินาจริยวงศ์ และเจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการ การกำจัดศัตรูพืชที่ได้ให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับโปรแกรม irristat ตลอดจนบุคลากรทั้งภาควิชาเคมีและภาควิชาฟิสิกส์ทุกท่านที่ได้ให้ความสะดวกและช่วยเหลือในเรื่องสารเคมีและอุปกรณ์ต่างๆที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์

ขอบคุณคณะกรรมการควบคุมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ทุกท่านที่กรุณาเสนอแนะแก้ไขเพิ่มเติมทำให้วิทยานิพนธ์มีความถูกต้องสมบูรณ์มากขึ้น

สุดท้ายผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอขอบพระคุณต่อคุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้ความสนับสนุนในด้านทุนทรัพย์ และขอบคุณพี่ น้อง รวมทั้งเพื่อนนักศึกษาปริญญาโทที่เป็นกำลังใจในการศึกษาตลอดมาจนสำเร็จ

ประภาพรรณ ศุภพิชญ์นาม

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบาญ	(6)
รายการตาราง	(8)
รายการภาพประกอบ	(10)
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 บทนำต้นเรื่อง	1
1.2 การตรวจเอกสาร	3
1.3 วัตถุประสงค์	11
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	11
1.5 ขอบเขตของการศึกษา	11
2 วิธีการวิจัย	12
2.1 วัสดุ	12
2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	13
2.3 ระบบการทดลองและการวิเคราะห์ผล	14
2.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยพื้นฐานของระบบ BIA	25
2.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ซูโครส	30
2.6 การใช้ปิเปตที่ควบคุมการฉีดสารละลายตัวอย่างด้วยเครื่อง EDOS 5221	33
2.7 การเปรียบเทียบเทคนิค BIA กับเทคนิคอื่น	35
2.8 การวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในน้ำกระป๋องด้วยเทคนิค BIA	38
3 ผลและการอภิปรายผล	39
3.1 ลักษณะทั่วไปของสัญญาณ	39
3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยพื้นฐานของระบบ BIA	41
3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ซูโครส	53

สารบาญ (ต่อ)

หน้า

3.4 การใช้ปิเปตที่ควบคุมการฉีดสารละลายตัวอย่างด้วยเครื่อง EDOS 5221 71

3.5 การเปรียบเทียบเทคนิค BIA กับเทคนิคอื่น 82

3.6 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในน้ำกระป๋องด้วยเทคนิค BIA 97

4 บทสรุป 103

บรรณานุกรม 106

ภาคผนวก 112

ประวัติผู้เขียน 115

รายการตาราง

ตาราง	หน้า
1. การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและเวลาต่อสัญญาณเมื่อใช้ปฏิกิริยากรด-เบส ที่ความยาวของปลอกเทอร์มิสเตอร์ต่างกัน	42
2. การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและเวลาต่อสัญญาณที่มีระยะห่างของรูระดับแรก ของปลอกเทอร์มิสเตอร์ต่างกัน	46
3. การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเมื่อสารละลายตัวอย่างถูกแช่ในสารละลายใน บีกเกอร์ที่เวลาต่างๆ กัน	49
4. การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและเวลาต่อสัญญาณที่อัตราเร็วในการคน สารละลายต่างกัน	51
5. การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่อุณหภูมิต่างกันคือ อุณหภูมิ 20 $^{\circ}$C และอุณหภูมิ 25 $^{\circ}$C	57
6. การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่สารละลายมี pH ต่างๆ กัน	60
7. การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่มีปริมาณ กลูโคสต่างๆ กัน	62
8. การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่ปริมาณ ฟรักโทสต่างๆ กัน	63
9. การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่มีปริมาณ กลูโคสและฟรักโทสต่างๆ กัน	64
10. การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่มีปริมาณ ทองแดง (II) ต่างๆ กัน	66
11. การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่ปริมาณ เงิน (I) ต่างๆ กัน	67
12. การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่ความเข้มข้นของสารละลายซูโครสต่างๆ กัน	69
13. การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเมื่อใช้อัตราเร็วในการฉีดสารละลายต่างๆ กัน	74
14. การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับระยะห่างระหว่างปลายปิเปตกับเทอร์มิสเตอร์	76
15. การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง	78
16. การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของน้ำอ้อยที่มีการตกตะกอนกับไม่มี การตกตะกอนสารแขวนลอย	80

รายการตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
17. การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิจากสารละลายซูโครสมาตรฐานที่ได้จากเทคนิค BIA เพื่อใช้เป็นคาลิเบรทชันเคิร์ฟ	83
18. การหมุนระนาบแสงจากสารละลายซูโครสมาตรฐานที่ได้จากเทคนิคโพลาริเมตริก เพื่อใช้เป็นคาลิเบรทชันเคิร์ฟ	84
19. การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิต่อสารละลายซูโครสมาตรฐานที่ได้จากเทคนิค BIA	85
20. ค่าการหมุนระนาบแสงต่อสารละลายซูโครสมาตรฐานที่ได้จากเทคนิคโพลาริเมตริก	85
21. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสระหว่างเทคนิค BIA กับเทคนิคโพลาริเมตริกโดยใช้สารละลายซูโครสมาตรฐาน	86
22. ผลการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสที่มีอยู่ในน้ำอ้อยด้วยเทคนิค BIA เปรียบเทียบกับเทคนิคโพลาริเมตริก	89
23. ค่าการดูดกลืนแสงจากสารละลายซูโครสมาตรฐานที่ได้จากเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริกเพื่อใช้เป็นคาลิเบรทชันเคิร์ฟ	93
24. ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสในน้ำอ้อยด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริก	94
25. ผลการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสในน้ำอ้อยด้วยเทคนิค BIA เปรียบเทียบกับเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริก	95
26. ผลการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสในน้ำกระป๋องด้วยเทคนิค BIA	98
27. ผลการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสในน้ำผลไม้กระป๋องด้วยเทคนิค BIA (ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ไม่ตรงกับข้างกระป๋อง)	100
28. ผลการวิเคราะห์น้ำส้ม (Freeze) ที่มีวันผลิตห่างจากวันวิเคราะห์ต่างกันด้วยเทคนิค BIA	102
29. ส่วนประกอบของอ้อยและน้ำอ้อย	113
30. โลหะหนักในน้ำตาลดิบ (Heavy Metals in Raw Sugar)	114

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1. ภาคตัดขวางของชั้นเอนไซม์อิเล็กโทรด	8
2. ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในระบบ BIA	16
3. ลักษณะของเทอร์มิสเตอร์ (Thermistor) ที่ใช้ในงานวิจัย	17
4. ลักษณะของปลอกเทอร์มิสเตอร์ที่ใช้ป้องกันการสูญเสียความร้อน	18
5. ระบบการวัดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิโดยใช้เทอร์มิสเตอร์ประกอบในวงจรวีตสโตนบริดจ์	20
6. ตัวอย่างสัญญาณจากเทคนิค BIA ที่วัดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของปฏิกิริยากรด-เบส โดยที่ความเข้มข้นกรดไนตริก 0.50 โมลาร์ และโซโดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 โมลาร์	23
7. ลักษณะของปลอกเทอร์มิสเตอร์	27
8. ลักษณะของปลอกเทอร์มิสเตอร์ที่รูระดับแรกของปลอกเทอร์มิสเตอร์อยู่สูงจากเทอร์มิสเตอร์ต่างๆ กัน	29
9. แถบมืดกับแถบสว่างในเทคนิคโพลาริเมตริก	36
10. ตัวอย่างสัญญาณการตอบสนองจากระบบ BIA ที่ได้จากการวัดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ	40
11. ตัวอย่างสัญญาณจากระบบ BIA ที่วัดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิจากปฏิกิริยาของกรดไนตริก 0.50 โมลาร์ กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 โมลาร์	42
12. ผลของความยาวของปลอกเทอร์มิสเตอร์ต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ	43
13. ผลของความยาวของปลอกเทอร์มิสเตอร์ต่อเวลาต่อสัญญาณ	43
14. ตัวอย่างสัญญาณที่ได้จากการศึกษาระยะห่างจากเทอร์มิสเตอร์ของรูระดับแรกของปลอกเทอร์มิสเตอร์เมื่อใช้กรดไนตริก 0.50 โมลาร์ กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 โมลาร์	45
15. ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับระยะห่างจากเทอร์มิสเตอร์ของรูระดับแรกของปลอกเทอร์มิสเตอร์	47
16. ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาต่อสัญญาณกับระยะห่างจากเทอร์มิสเตอร์ของรูระดับแรกของปลอกเทอร์มิสเตอร์	47

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
17. ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับเวลาที่แช่สารละลายตัวอย่าง	49
18. ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับอัตราเร็วในการคนสารละลาย	52
19. ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาต่อสัญญาณกับอัตราเร็วในการคนสารละลาย	52
20. เปรียบเทียบลักษณะสัญญาณจากระบบ BIA ที่ได้จากปฏิกิริยากรด-เบสกับปฏิกิริ ยาไฮโดรไลซิสของซูโครส	54
21. สัญญาณการตอบสนองที่ความเข้มข้นของซูโครส 0.10 โมลาร์	55
22. ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสและ 25 องศาเซลเซียส	58
23. ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับ pH	60
24. ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของซูโครสที่มีปริมาณกลูโคสต่างๆ กัน	62
25. ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของซูโครสที่มีปริมาณฟรักโทสต่างๆ กัน	63
26. ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่มีปริมาณกลูโคสและฟรักโทสต่างๆ กัน	64
27. ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่มีปริมาณทองแดง (II) ต่างๆ กัน	66
28. ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่มีปริมาณเงิน (I) ต่างๆ กัน	67
29. ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน	70
30. เปรียบเทียบสัญญาณการตอบสนองที่ได้จากการใช้ไมโครปิเปตแบบดิจิตอลที่ควบคุมการฉีดสารละลายด้วยมือกับการใช้ไมโครปิเปต EDOS 5221 ที่อัตราเร็ว 4 โดยใช้สารละลายซูโครส 0.30 โมลาร์	72

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ หน้า

31. ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับอัตราเร็วที่ใช้ในการฉีดสารละลาย 74
32. ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับระยะห่างระหว่างปลายปิเปตกับเทอร์มิสเตอร์ 76
33. ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง 78
34. ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของน้ำอ้อยที่มีการตกตะกอนและไม่มีการตกตะกอนสารแขวนลอย 81
35. การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิจากสารละลายซูโครสมาตรฐานที่ได้จากเทคนิค BIA เพื่อใช้ทำเป็นคาลิเบรทชันเคิร์ฟ 83
36. การหมุนระนาบแสงจากสารละลายซูโครสมาตรฐานที่ได้จากเทคนิคโพลาริเมตริกเพื่อใช้เป็นคาลิเบรทชันเคิร์ฟ 84
37. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสระหว่างเทคนิค BIA กับเทคนิคโพลาริเมตริกจากสารละลายซูโครสมาตรฐาน 87
38. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในน้ำอ้อยระหว่างเทคนิค BIA กับเทคนิคโพลาริเมตริก 91
39. ค่าการดูดกลืนแสงจากสารละลายซูโครสมาตรฐานที่ได้จากเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริก 93
40. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสในน้ำอ้อยระหว่างเทคนิค BIA กับเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริก 96
41. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสระหว่างเทคนิค BIA กับค่าที่ระบุไว้ข้างกระป๋อง 99
42. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสระหว่างเทคนิค BIA กับค่าที่ระบุไว้ข้างกระป๋อง 101
43. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในน้ำส้มกระป๋องระหว่างเทคนิค BIA กับค่าที่ระบุไว้ข้างกระป๋องที่มีจำนวนวันผลิตห่างจากวันวิเคราะห์ต่างกัน 102

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

ซูโครสเป็นน้ำตาลที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร โดยใช้เป็นเครื่องเสริมรสชาติผลิตภัณฑ์ทางอาหารหรือเป็นวัตถุดิบในการผลิตสินค้าอุตสาหกรรมอาหาร เช่น นมข้นหวาน ผลไม้กระป๋อง เครื่องดื่ม ไอศกรีม (วิฑูรย์ พัฒนรัชต์ , 2520) แยม เจลลี่ และลูกกวาด (Pancocast and Junk , 1980) ดังนั้นเพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีคุณค่าทางโภชนาการและมีรสชาติที่ดี จึงต้องมีวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของซูโครสเพื่อใช้ในการควบคุมกระบวนการผลิต (Paine and Paine , 1992) และในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารบางประเภทซูโครสเป็นสารอาหารที่สำคัญในกระบวนการหมัก ซึ่งการควบคุมกระบวนการหมักนี้จำเป็นต้องมีการวิเคราะห์หาปริมาณของน้ำตาลในถังหมัก เนื่องจากหากความเข้มข้นของน้ำตาลสูงเกินไปอาจจะยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักได้ (Karube , 1987) นอกจากนี้ในการประเมินคุณภาพของวัตถุดิบ เช่น อ้อยที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล จะใช้ปริมาณซูโครสที่วิเคราะห์ได้ในน้ำอ้อยเป็นตัวบ่งชี้ (Zagatto , Mattos and Jacintho , 1988) ซึ่งจากความสำคัญของการตรวจหาซูโครสดังกล่าวข้างต้น ทำให้มีการพัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสขึ้น เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว และถูกต้องแม่นยำ

การวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสที่นิยมใช้โดยทั่วไปคือ เทคนิคโพลาริเมตริก (Polarimetric Method) (Meade and Chen , 1977) ซึ่งจะวัดความสามารถในการหมุนระนาบแสงของซูโครสด้วยเครื่องโพลาริมิเตอร์ (Polarimeter) แต่เทคนิคนี้อาจจะมีการรบกวนจากสารอื่นที่มีคุณสมบัติในการหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์ (Optical Active) ได้ เช่น กลูโคส และฟรักโทส สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสโดยเทคนิคคาปิลลารีแก๊สโครมาโทกราฟี (Capillary Gas Chromatography) (Davies , 1988) และเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography) (Grosz and Braunsteiner , 1989) จะให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำ แต่มีข้อเสียคือใช้เวลาในการวิเคราะห์นานกล่าวคือ 10 นาที และ 80 นาที ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีขั้นตอนการเตรียมสารที่ยุ่งยาก เทคนิคที่ให้ผลการวิเคราะห์รวดเร็วกว่าสองเทคนิคที่กล่าวมาแล้วคือ เทคนิคโฟล์วอินเจกชัน

อนาไลซิส (Flow Injection Analysis (FIA)) (Mattos , Zagatto and Jacintho , 1988) วิธีนี้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสได้ถูกต้องแม่นยำ และไม่ต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างที่ยุ่งยาก แต่เทคนิคนี้จะกำจัดสารละลายที่ใช้ทำการวิเคราะห์ออกจากระบบได้ยาก เนื่องจากทางที่สารละลายต้องผ่านมีขนาดเล็กมาก และระบบ FIA นี้ยังต้องใช้สารละลายหลายชนิดเพื่อทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการวิเคราะห์ จึงต้องมีเส้นทางเดินของสารเป็นจำนวนมากซึ่งทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายมากในส่วนนี้ (Wang , 1992)

นอกจากวิธีทางเคมีดังกล่าวแล้วได้มีการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสโดยการใช้เอนไซม์ (Enzyme) ร่วมกับออกซิเจนอิเล็กโทรด (O_2-electrode) (Cleland and Enfors , 1984 ; Karube , 1987) ข้อดีของเทคนิคนี้คืออุปกรณ์ราคาไม่แพงเมื่อเทียบกับเทคนิคอื่นๆ และการใช้เอนไซม์ทำให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Clark , 1987) ในการวิเคราะห์ส่วนมากจะทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครสเป็นกลูโคสและฟรักโทส และตรวจวัดการลดลงของปริมาณออกซิเจนในสารละลายเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส ซึ่งปริมาณของออกซิเจนที่ลดลงนี้จะสัมพันธ์กับปริมาณของกลูโคสหรือซูโครสนั่นเอง ข้อเสียของเทคนิคนี้คือปริมาณของออกซิเจนในสารละลายที่ใช้อาจจะไม่คงที่ตลอดเวลา (Park , Ro and Kim , 1991) ซึ่งอาจจะทำให้ผลการวิเคราะห์ผิดพลาดได้ จากที่กล่าวมาแล้วจะเห็นว่าในการวิเคราะห์ซูโครสยังต้องการเทคนิคที่สะดวก รวดเร็ว และแม่นยำกว่าเทคนิคเหล่านี้

เทคนิคที่อาจจะพัฒนามาเป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ซูโครสคือแบทช์อินเจกชันอนาไลซิส [Batch Injection Analysis (BIA)] (Wang and Taha , 1991a) ซึ่งประกอบด้วยตัวตรวจวัด (Detector) อยู่ในภาชนะบรรจุสารละลาย ในการวิเคราะห์จะฉีดสารตัวอย่างที่มีปริมาตรอยู่ในช่วงไมโครลิตรลงบนตัวตรวจวัด สารตัวอย่างจะทำปฏิกิริยากับสารละลายที่อยู่รอบๆ หรือสารที่ตรึงไว้บนตัวตรวจวัดเกิดเป็นสัญญาณที่วัดได้โดยตัวตรวจวัดนั้นๆ สารละลายที่อยู่รอบๆ ตัวตรวจวัด จะถูกคนอยู่ตลอดเวลาเพื่อล้างทั้งสารตัวอย่างและผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาบนผิวหน้าของตัวตรวจวัดออกไป ทำให้ผิวหน้าของตัวตรวจวัดพร้อมที่จะทำการวิเคราะห์ในครั้งต่อไปได้ เทคนิคนี้มีข้อดีคือใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกล่าวคือสามารถทำการวิเคราะห์ได้ผลรวดเร็วเช่นตัวอย่างบางชนิดจะใช้เวลาเพียง 5 วินาที นอกจากนี้ยังใช้สารละลายตัวอย่างน้อย ระบบไม่ยุ่งยากซับซ้อน สะดวกและใช้ง่าย

มีรายงานการนำเทคนิค BIA มาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณคลอไรด์และฟลูออไรด์ โดยใช้ตัวตรวจวัดชนิดโพเทนชิโอเมตริก (Potentiometric Detector) (Wang and Taha , 1991b) โดยค่าศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไอออนที่มีอยู่ในสารละลาย ในรายงานระบุไว้ว่าสามารถทำการวิเคราะห์ได้ผลรวดเร็วประมาณ 720 ตัวอย่างต่อชั่วโมง ใช้สารตัวอย่างเพียง 50

ไมโครลิตร นอกจากนั้นยังมีรายงานที่เกี่ยวกับการพัฒนาเทคนิค BIA ที่ใช้ร่วมกับตัวตรวจวัด ชนิดอื่นเช่น การใช้เทคนิค BIA ร่วมกับตัวตรวจวัดความร้อน (Thermal Detector) (Wang and Taha , 1991c) ตัวตรวจวัดชนิดแอมเพอโรเมตริก (Amperometric Detector) (Wang and Taha , 1991a) และตัวตรวจวัดชนิดไฟเบอร์ออปติคฟลูออโรเมตริก (Fiber-Optic Fluorometric Detector) (Wang , Rayson and Taha , 1992)

ในงานวิจัยนี้จะศึกษาเทคนิคแบทซ์อินเจกชันอนาไลซิสในการหาปริมาณซูโครส โดยใช้ตัวตรวจวัดความร้อนร่วมกับเอนไซม์อินเวอร์เทส (Invertase) เนื่องจากเอนไซม์นี้จะทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครสได้เป็นกลูโคสและฟรักโทส ดังสมการ

$$\text{ซูโครส} + \text{น้ำ} \xrightarrow{\text{อินเวอร์เทส}} \text{กลูโคส} + \text{ฟรักโทส} + \text{ความร้อน} \qquad \text{-------} (1)$$

หรือ

$$\text{Sucrose} + H_2O \xrightarrow{\text{invertase}} \alpha\text{-D-Glucose} + \beta\text{-Fructose} + \Delta H$$

(Campanella and Tomassetti , 1990)

$$\Delta H = -14.93 \ \text{KJmol}^{-1}$$ (Goldberg , Tewari and Ahluwalia , 1989)

จะเห็นว่าปฏิกิริยาดังกล่าวมีความร้อนเกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของความร้อนนี้จะตรวจวัดโดยใช้เทอร์มิสเตอร์ (Thermistor) [สารกึ่งตัวนำที่ความต้านทานไฟฟ้าลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (ระวิ สงวนทรัพย์ , 2529)] เทอร์มิสเตอร์นี้จะต่อกับวงจรวีตสโตนบริดจ์ (Wheatstone Bridge) และวงจรอิเล็กทรอนิกส์ ทำให้สามารถวัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในรูปของความต่างศักย์ไฟฟ้า คาดว่าเทคนิคนี้จะสามารถพัฒนาเป็นวิธีในการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสที่สะดวก รวดเร็ว และจำเพาะเจาะจงต่อซูโครสที่ต้องการจะวิเคราะห์

น้ำอ้อยสดและน้ำผลไม้กระป๋องจะเป็นตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลซูโครส โดยการทดสอบระบบของวิธี BIA ที่พัฒนาขึ้นมา

1.2 การตรวจเอกสาร

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสที่นิยมใช้อยู่ในปัจจุบันสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ การวิเคราะห์โดยไม่ใช้เอนไซม์และใช้เอนไซม์

การวิเคราะห์ซูโครสโดยไม่ใช้เอนไซม์นั้นมีหลายวิธีที่นิยมใช้กันมากคือเทคนิคโพลาริเมตริก (Pomeranz and Meloan , 1978) เทคนิคนี้จะใช้เครื่องโพลาริมิเตอร์วัดการหมุนระนาบแสงของ

ซูโครส ข้อเสียของเทคนิคนี้คือ อาจจะมีการรบกวนจากสารอื่น เช่น กลูโคส และฟรักโทส ที่มีสมบัติในการหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์ได้ (Cadet , et al. , 1991 ; Meade and Chen , 1977) นอกจากนี้สารที่จะทำการวิเคราะห์ต้องมีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี และไม่ขุ่น ดังนั้นหากตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์มีลักษณะขุ่นและ/หรือมีสีจะต้องมีกระบวนการเตรียมสารละลายตัวอย่างให้ใสและไม่มีสีก่อนการวิเคราะห์

การวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสอีกวิธีหนึ่งเป็นวิธีทางเคมี (Chemical Methods) (AOAC Methods , 1980) โดยจะวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสจากปริมาณของกลูโคสและฟรักโทสซึ่งเกิดจากการย่อยสลายของซูโครสโดยกรดไฮโดรคลอริก กลูโคสและฟรักโทสที่เกิดขึ้นจะอยู่ในรูปของน้ำตาลรีดิวซิง (reducing sugar) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสารละลายคิวปริกซัลเฟต ($CuSO_4$) และสารละลายอัลคาไลน์ทาร์เทรต (Alkaline Tartrate) ได้ตะกอนของคิวปรัสออกไซด์ (Cu_2O) ถ้าวิเคราะห์โดยการวิเคราะห์กราวิเมตริก (Gravimetric Methods) จะใช้วิธีชั่งน้ำหนักตะกอน แต่ถ้าเป็นการวิเคราะห์โดยปริมาตร (Volumetric Methods) จะนำตะกอนคิวปรัสออกไซด์ที่ได้ละลายกับกรดไนตริก 5 มิลลิลิตร เติมน้ำให้มีปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$) ผลที่ได้นำมาคำนวณหาปริมาณซูโครส โดยทั่วไปแล้วมักจะทำการวิเคราะห์ตัวอย่างก่อนและหลังการใช้กรดไฮโดรคลอริกย่อยสลายซูโครส เนื่องจากในตัวอย่างอาจจะมีน้ำตาลกลูโคสและฟรักโทสผสมอยู่ด้วย ในกรณีนี้ปริมาณของซูโครสจะคำนวณจากผลต่างระหว่างผลที่ได้ก่อนและหลังการย่อยสลายซูโครส ข้อเสียของเทคนิคนี้คือการวิเคราะห์มีหลายขั้นตอน นอกจากนี้ยังเป็นเทคนิคที่ไม่จำเพาะเจาะจงสำหรับซูโครส เนื่องจากอาจจะมีการรบกวนจากน้ำตาลตัวอื่น เช่น อะราบิโนส แมนโนส กาแลคโตส มอลโตส แลคโตส เป็นต้น รวมทั้งกรด - แอสคอร์บิค และสารประกอบอื่นๆ (Pesce and Kaplan , 1987) ทำให้ผลการวิเคราะห์ได้ค่ามากกว่าค่าจริง

เทคนิคที่ให้ผลถูกต้องแม่นยำกว่าเทคนิคข้างต้น คือ เทคนิคคาปิลลารีแก๊สโครมาโทกราฟฟี (Davies , 1988) ซึ่งมีรายงานการศึกษาปริมาณซูโครสในมันฝรั่ง โดยสภาวะการวิเคราะห์คือ ใช้คอลัมน์ยาว 5 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 530 ไมโครเมตร มี Hewlett Packard (HP) -1 (เทียบเท่ากับ OV-1 (Dimethyl silicone gum) , SE-30 (Methyl silicone gum)) เป็นสเตชันนารีเฟสที่เคลือบในคอลัมน์หนา 2.65 ไมโครเมตร อุณหภูมิหัวฉีด (Injector) 220 องศาเซลเซียส (^{o}C) อุณหภูมิคอลัมน์ 140 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของตัวตรวจวัด 300 องศาเซลเซียส และใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สพา (Carrier Gas) ด้วยความเร็ว 15 มิลลิลิตรต่อนาที โดยรายงานว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ 10 นาที และมีช่วงในการตรวจวัด 10 นาโนกรัม - 3 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร ($3x10^{-7}$ - $9x10^{-5}$ โมลาร์) แม้ว่าเทคนิคคาปิลลารีแก๊สโครมาโทกราฟฟีจะสามารถใช้วิเคราะห์หา

ปริมาณซูโครสได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ แต่ก็มีข้อเสียคือ เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์มีราคาแพง และต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญและมีประสบการณ์ในการวิเคราะห์สูง

นอกจากนี้ได้มีการพัฒนาโดยการนำเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟี (Grosz and Braunsteiner , 1989) มาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครส โดยสารตัวอย่างและสารมาตรฐานจะต้องนำมาเจือจางกับสารละลายผสมระหว่างน้ำกับเมทานอลในอัตราส่วน 1 : 1 และใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) เป็นตัวทำละลายผสมของเอทธิลอะซิเตท (Ethylacetate) - เอทานอล(Ethanol) (96%) - กรดอะซิติก (Acetic Acid) (60%) - สารละลายกรดบอริกอิ่มตัวที่เย็น (Cold Saturated Boric Acid Solution) ในอัตราส่วน 50 + 20 + 10 + 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร (v/v) พบว่า เวลาที่ใช้ในการแยกสารเมื่อเฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่เป็นระยะทาง 10 เซนติเมตร คือ 50-55 นาที หลังจากนั้นจะทำให้เพลท (Plate) แห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปหาปริมาณโดยการวัดการสะท้อนของแสง(Reflectance) หรือฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescence) โดยมีขีดจำกัดตรวจวัดต่ำสุด (Detection Limit) 25 นาโนกรัมต่อ 0.5 ไมโครลิตร $(7 \times 10^{-5}$ โมลาร์) ข้อเสียของเทคนิคนี้คือ ใช้เวลาในการวิเคราะห์ต่อสารตัวอย่างนาน และมีขั้นตอนในการวิเคราะห์ที่ยุ่งยาก

การหาปริมาณซูโครสสามารถทำได้รวดเร็วขึ้นโดยใช้เทคนิคโฟล์วอินเจกชันอนาไลซิส (Mattos , Zagatto and Jacintho , 1988) วิธีนี้จะวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสจากกลูโคสที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายของซูโครสโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจะไปรีดิวซ์เฮกซะไซยาโนเฟอเรต (III) [Hexacyanoferrate (III) ; $K_3Fe(CN)_6$] ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ได้เป็นเฮกซะไซยาโนเฟอเรต (II) [Hexacyanoferrate (II) ; $K_4Fe(CN)_6$] ดังสมการ

$$\text{กลูโคส} + K_3Fe(CN)_6 \text{ ------------------------> } K_4Fe(CN)_6$$

และเฮกซะไซยาโนเฟอเรต (II) ทำปฏิกิริยากับเฟอริกซัลเฟต [$Fe_2(SO_4)_3$] เกิดผลิตภัณฑ์คือเฟอริกเฟอโรไซยาไนด์ [Ferric ferrocyanide ; $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$] ที่มีสีน้ำเงินเข้ม (prussian blue) ดังสมการ

$$3K_4Fe(CN)_6 + 2Fe_2(SO_4)_3 \text{ ------------------------> } Fe_4[Fe(CN)_6]_3 + 6K_2SO_4$$

และตรวจวัดสีน้ำเงินเข้มของเฟอริกเฟอโรไซยาไนด์ด้วยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 512 นาโนเมตร ปริมาณซูโครสสามารถหาได้จากผลต่างของน้ำตาลกลูโคสก่อนและหลังการย่อยสลายซูโครส ในการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้รายงานว่า สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างได้ 40 ตัวอย่างต่อ 1 ชั่วโมง และไม่ต้องผ่านการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก ให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (R.S.D.) น้อยกว่า 1% แต่มีข้อเสียคือระบบ FIA นี้จะมีการใช้สารละลายหลายชนิดเพื่อทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการวิเคราะห์ ทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายมาก เนื่องจาก

ต้องมีทางเดินของสารละลายหลายทาง และยังต้องมีอุปกรณ์ที่ใช้แยกและรวมสารตามจุดต่างๆ นอกจากนี้การกำจัดสารละลายที่ใช้ออกจากท่อ (tube) สามารถทำได้ยาก เนื่องจากท่อที่ใช้มีขนาดเล็กมาก (Wang , 1992)

กลุ่มที่สองจะเป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณซูโครสโดยการใช้เอนไซม์ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นการใช้เอนไซม์ร่วมกับอิเล็กโทรดต่างๆ เรียกว่า เอนไซม์อิเล็กโทรด (Enzyme electrode) เอนไซม์อิเล็กโทรดสำหรับซูโครสที่มีอยู่ในปัจจุบันจะใช้เอนไซม์อินเวอร์เทสเร่งปฏิกิริยาไฮโดร - ไลซิสของซูโครสเป็นกลูโคสและฟรักโทส ดังสมการ 1

$$\text{Sucrose} + H_2O \xrightarrow{\text{Invertase}} \alpha\text{-D-Glucose} + \text{Fructose} \quad \text{-------(1)}$$

และใช้เอนไซม์มิวตาโรเตส (Mutarotase) เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปแอลฟาไปเป็นรูปบีต้าของกลูโคส ดังสมการ 2

$$\alpha\text{-D-Glucose} \xrightarrow{\text{Mutarotase}} \beta\text{-D-Glucose} \quad \text{-------(2)}$$

ปฏิกิริยาที่ 2 นี้สามารถเกิดขึ้นได้เอง เรียกปรากฏการณ์ในการเปลี่ยนกลับไปมาในรูปแอลฟาไปเป็นรูปบีต้าของกลูโคสว่า มิวตาโรเตชั่น (Mutarotation) แต่เกิดขึ้นได้ช้า จึงมักใช้เอนไซม์ช่วยในการเร่งปฏิกิริยา หลังจากนั้นเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (Glucose Oxidase) จะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส ดังสมการ 3

$$\beta\text{-D-Glucose} + O_2 \xrightarrow{\text{Glucose Oxidase}} \text{Gluconolactone} + H_2O_2 \quad \text{-------(3)}$$

ในปฏิกิริยาของกลูโคสที่เปลี่ยนไปเป็นกลูโคโนแลคโทน (Gluconolactone) (สมการ 3) มีการใช้ออกซิเจนในการเกิดปฏิกิริยา ปริมาณออกซิเจนที่ลดลงนี้ตรวจวัดได้โดยใช้ออกซิเจนอิเล็กโทรด (Cleland and Enfors , 1984) ซึ่งปริมาณออกซิเจนที่ลดลงในสารละลายจะสัมพันธ์กับปริมาณกลูโคสหรือซูโครสเป็นเชิงเส้นในช่วง 5 กรัมต่อลิตร - 150 กรัมต่อลิตร หรือ 0.01 - 0.44 โมลาร์

ในวิธีข้างต้นหากตัวอย่างมีกลูโคสอยู่ด้วย ผลการวิเคราะห์ที่ได้จะทำให้ได้ค่าของซูโครสสูงกว่าที่เป็นจริง ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาโดยใช้มัลติเลเยอร์เอนไซม์อิเล็กโทรด (ภาพประกอบ 1) (Multilayer Enzyme Electrode) (Scheller and Renneberg , 1983) ซึ่งจะประกอบด้วยแผ่นเมมเบรนสามชั้น ระหว่างเมมเบรนชั้นนอกกับชั้นกลางจะมีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส [Glucose Oxidase (GOD)] และเอนไซม์คะตะเลส [Catalase (CAT)] เมมเบรนชั้นนอกนี้ (ก) จะให้กลูโคสและซูโครสผ่านเข้าไป กลูโคสและผลผลิตที่เกิดขึ้นจะถูกกำจัดระหว่างเมมเบรนชั้นนอกกับชั้นกลางด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและเอนไซม์คะตะเลสโดยที่เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเร่ง

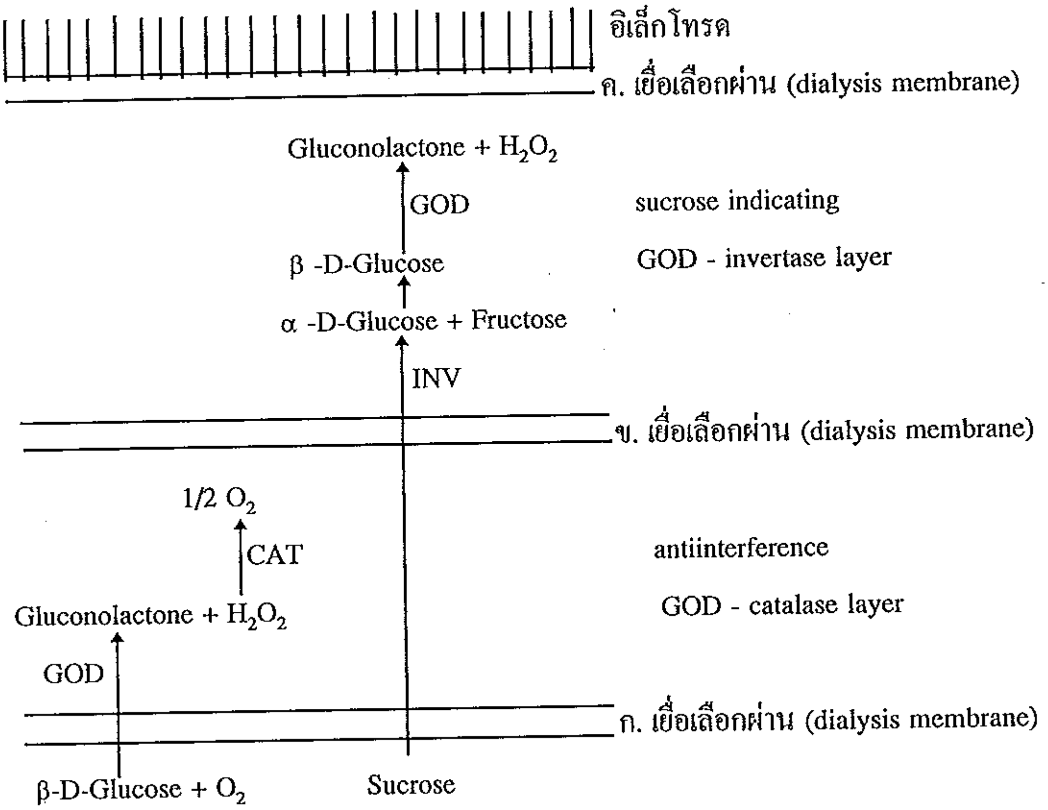
ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ดังสมการ 3 ซึ่งไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์คะตะเลสได้เป็นแก๊สออกซิเจน ดังสมการ

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 1/2\ O_2$$

ส่วนซูโครสจะผ่านเมมเบรนชั้นกลาง (ข) เข้าไปยังชั้นซึ่งมีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและเอนไซม์อินเวอร์เทสปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น จะเป็นไปตามสมการ 1 , 2 และ 3 ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่เกิดขึ้นจะผ่านเมมเบรนชั้นใน (ค) เข้าไป และถูกตรวจวัดด้วยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์อิเล็กโทรด (H_2O_2-electrode) ดังแสดงในภาพประกอบ 1 วิธีดังกล่าวให้ช่วงความเป็นเส้นตรงจนถึง 13 มิลลิโมลาร์ (mM) แม้ว่าวิธีนี้จะสามารถวิเคราะห์ซูโครสได้โดยไม่มีการรบกวนจากกลูโคส แต่มีข้อเสียคือ ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์ซูโครสแคบ

ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาวิจัยวิธีการหาปริมาณซูโครสโดยใช้ไตรเอนไซม์อิเล็กโทรด (Tri-Enzyme Electrode) ร่วมกับเทคนิคโฟล์วอินเจกชันอนาไลซิส (Hamid , Moody and Thomas , 1988) โดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส มิวตาโรเตส (Mutarotase) และกลูโคสออกซิเดสตรึงร่วมกันบนตาข่ายไนล่อน (Nylon) ด้วยอัตราส่วน 2000 : 1000 : 200 I.U. (International Unit ของเอนไซม์มีค่าเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งให้สับสเตรทหนึ่งไมโครโมลเปลี่ยนเป็นผลิตผลในเวลาหนึ่งนาทีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) ปริมาณของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาจะถูกตรวจวัดด้วยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์อิเล็กโทรด โดยที่ค่าศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้นั้นจะเป็นสัดส่วนของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในสารละลาย และสัญญาณการตอบสนองจะอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงเมื่อความเข้มข้นซูโครสอยู่ในช่วง 10^{-6} - 10^{-3} โมลาร์

วิธีการหาปริมาณซูโครสโดยใช้เอนไซม์อิเล็กโทรดที่กล่าวมาข้างต้น ส่วนใหญ่อิเล็กโทรดจะประกอบด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส มิวตาโรเตส และอินเวอร์เทสตรึงร่วมกันในเมมเบรน ซึ่งปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ไปหรือปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของเอนไซม์อินเวอร์เทสและกลูโคสออกซิเดส จะถูกตรวจวัดโดยใช้ออกซิเจนอิเล็กโทรดหรือไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์อิเล็กโทรด ข้อเสียของการใช้ออกซิเจนอิเล็กโทรดคือปริมาณออกซิเจนในสารละลายขณะไม่เกิดปฏิกิริยามักจะไม่คงที่อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นๆลงๆ (Fluctuated) (Park , Ro and Kim , 1991) ทำให้ผลการวิเคราะห์ผิดพลาดได้ สำหรับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์อิเล็กโทรดช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ซูโครสจะมีช่วงแคบ ดังนั้นเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวจึงได้มีการพัฒนาการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครส โดยใช้พีเอชอิเล็กโทรด (pH Electrode) ร่วมกับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส และเอนไซม์อินเวอร์เทส (Park , Ro and Kim ,



ภาพประกอบ 1 ภาพตัดขวางของชั้นเอนไซม์อิเล็กโทรด (Scheller and Renneberg , 1983) ประกอบด้วยแผ่นเมมเบรนสามชั้น คือ เมมเบรนชั้นนอก (ก) ทำหน้าที่ในการเลือกซูโครสและกลูโคสในสารตัวอย่างเข้าไปในระบบ ระหว่างเมมเบรนชั้นนอกกับชั้นกลางจะมีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและเอนไซม์คะตะเลส เมมเบรนชั้นกลาง (ข) ทำหน้าที่เลือกซูโครสให้เข้าไปในระบบ และระหว่างเมมเบรนชั้นกลางกับชั้นในจะมีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและเอนไซม์อินเวอร์เทส ส่วนเมมเบรนชั้นใน (ค) เลือกให้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ผ่าน

1991) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคโนแลคโทนและใช้เอนไซม์กลูโคโนแลคโทเนส (Gluconolactonase) ในการเปลี่ยนกลูโคโนแลคโทนไปเป็นกลูโคเนส (Gluconate) กับไฮโดรเจนไอออน(H^+)ดังสมการ

$$\text{Gluconolactone} \xrightarrow{\text{Gluconolactonase}} \text{Gluconate} + H^+$$

โดยที่ปริมาณไฮโดรเจนไอออนที่เกิดจากปฏิกิริยาจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของซูโครส โดยให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์ซูโครสจนถึง 70 กรัมต่อลิตร (0.20 โมลาร์)

เทคนิคต่างๆดังกล่าวข้างต้นมีข้อด้อยคือให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์ซูโครสแคบ ซึ่งถ้าสารตัวอย่างที่ใช้มีความเข้มข้นสูงจะต้องทำการเจือจาง (Dilution) สารตัวอย่างก่อน ซึ่งทำให้ต้องเสียเวลาในขั้นตอนนี้และอาจทำให้การวิเคราะห์ผิดพลาดได้ ดังนั้นในการวิเคราะห์ซูโครสจึงยังต้องการเทคนิคที่สะดวก รวดเร็ว กว่าเทคนิคที่กล่าวมาแล้ว

เทคนิคที่น่าสนใจคือแบทซ์อินเจกชันอนาไลซิส ซึ่งเป็นเทคนิคใหม่เริ่มพัฒนาเมื่อปี ค.ศ. 1991 (Wang and Taha , 1991a) และได้มีการศึกษามาโดยต่อเนื่อง (Wang , 1992 ; Wang and Taha , 1991b ; Wang and Taha , 1991c ;Wang , Rayson and Taha , 1992 ; Wang , et al. , 1992) โดยใช้เทคนิค BIA ร่วมกับตัวตรวจวัดหลายชนิดด้วยกัน และในการวิเคราะห์มีทั้งที่ไม่ใช้เอนไซม์และใช้เอนไซม์ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

ในการวิเคราะห์หาปริมาณเฟอโรไซยาไนด์(Ferrocyanide)และไฮโดรควิโนน(Hydroquinone) ใช้ตัวตรวจวัดชนิดแอมเพอโรเมตริก (Wang and Taha , 1991a) สารละลายที่อยู่ในเซลล์ (ภาชนะบรรจุสารละลายที่มีตัวตรวจวัดแช่อยู่) ที่ใช้ในการวิเคราะห์เฟอโรไซยาไนด์และไฮโดรควิโนน คือ โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.1 โมลาร์ และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) 0.1 โมลาร์ ตามลำดับ ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้คือ 20 ไมโครลิตร และปลายปิเปตที่ฉีดสารตัวอย่างห่างจากตัวตรวจวัด 2 มิลลิเมตร เมื่อฉีดเฟอโรไซยาไนด์และไฮโดรควิโนนลงบนอิเล็กโทรดทำงาน (Working electrode) เฟอโรไซยาไนด์และไฮโดรควิโนนถูกออกซิไดส์ด้วยศักย์ไฟฟ้าที่ป้อนให้กับอิเล็กโทรดทำงาน +0.9 และ +1.1 โวลต์ ตามลำดับ กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจะมีความสัมพันธ์เป็นเชิงเส้นกับความเข้มข้นของเฟอโรไซยาไนด์และไฮโดรควิโนน จากผลการทดลองพบว่า สามารถทำการวิเคราะห์ตัวอย่างได้ 720 ตัวอย่างต่อชั่วโมง และให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์สำหรับเฟอโรไซยาไนด์และไฮโดรควิโนนเท่ากับ 1.6% และ 1.1% ตามลำดับ

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณคลอไรด์ (Chloride) และฟลูออไรด์ (Fluoride) โดยใช้เทคนิค BIA ใช้อิเล็กโทรดที่จำเพาะกับไอออน (Ion - selective electrode) (Wang and Taha , 1991b) โดยใช้สารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.05 โมลาร์ ที่มีโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) 0.25 โมลาร์ pH 6.0 เป็นสารละลายในเซลล์สำหรับการวิเคราะห์คลอไรด์และในการ

วิเคราะห์ฟลูออไรด์ ใช้โซเดียมอะซิเตท 0.2 โมลาร์ กรดอะซิติก 0.17 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 0.35 โมลาร์ และ 1,2 - diaminocyclohexane - N,N,N,N - tetraacetic acid (DCTA) 1 กรัมต่อลิตร (gL^{-1}) ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้คือ 50 ไมโครลิตร ระยะห่างของปลายปิเปตจากตัวตรวจวัด 2 มิลลิเมตร และอัตราเร็วในการคนสารละลายของคลอไรด์และฟลูออไรด์เท่ากับ 300 และ 500 รอบต่อนาที ตามลำดับ ค่าศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้โดยอิเล็กโทรดจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไอออนคลอไรด์และฟลูออไรด์ โดยให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์ของคลอไรด์และฟลูออไรด์เป็น 0.5 - 10 มิลลิโมลาร์ และ 10 - 5000 ไมโครโมลาร์ (μM) ตามลำดับ และขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดของคลอไรด์เท่ากับ 0.1 มิลลิโมลาร์ (0.18 ไมโครกรัมต่อ 50 ไมโครลิตร) และของฟลูออไรด์เท่ากับ 2 ไมโครโมลาร์ (2 นาโนกรัมต่อ 50 ไมโครลิตร)

นอกจากนี้ยังได้มีการใช้เทคนิค BIA ร่วมกับไฟเบอร์ออปติกฟลูออโรเมตริก (Wang , Rayson and Taha , 1992) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโรดามีนบี (Rhodamine B) และไรโบฟลาวิน (Riboflavin) โดยอาศัยหลักการที่โมเลกุลของโรดามีนบีและไรโบฟลาวินจะดูดกลืนโฟตอนจากแหล่งกำเนิดแสงแล้วเปลี่ยนจากสถานะพื้น (ground state) ไปสู่สถานะกระตุ้น (excited state) ซึ่งไม่เสถียร เมื่อกลับสู่สถานะพื้นจะปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์ออกมา ซึ่งจะวัดได้โดยใช้ไฟเบอร์ออปติกฟลูออโรเมตริก ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์จะเป็นสัดส่วนตรงกับปริมาณโรดามีนบีและไรโบฟลาวิน ในการทดลองใช้น้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 7.4 เป็นสารละลายที่อยู่ในเซลล์ในการวิเคราะห์โรดามีนบีและไรโบฟลาวิน ตามลำดับ มีแหล่งกำเนิดแสงคือ ซีนอนอาร์กแลมป์ (xenon arc lamp) 500 วัตต์ ปริมาตรที่ใช้ในการฉีดสารละลาย 25 ไมโครลิตร ระยะห่างของปลายปิเปตจากตัวตรวจวัดเป็น 1 มิลลิเมตร อัตราเร็วในการคนสารละลาย 250 รอบต่อนาที และตรวจวัดความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของโรดามีนบีและไรโบฟลาวิน ที่ความยาวคลื่น 568.7 นาโนเมตร (nm) และ 575.5 นาโนเมตร ตามลำดับ สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างได้ 120 - 500 ตัวอย่างต่อชั่วโมง และให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 2 - 3% นอกจากนี้ให้ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดของโรดามีนบี (Rhodamine B) 1 ไมโครโมลาร์

เทคนิค BIA นี้ยังได้มีการใช้ร่วมกับเอนไซม์ในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส โดยใช้เอนไซม์คะตะเลสและกลูโคสออกซิเดสตรึงบนผิวของเทอร์มิสเตอร์ (Wang and Taha , 1991c) ซึ่งจะตรวจวัดความร้อน (ΔH) ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา

$$\beta\text{-D-Glucose} + O_2 \xrightarrow[\text{Catalase}]{\text{Glucose Oxidase}} \text{D-Gluconic acid} + 1/2\ O_2 + \Delta H$$

(Tran-Minh and Vallin , 1978)

โดยสารละลายที่อยู่ในเซลล์คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0 ใช้ปริมาตรสารละลายตัวอย่าง 25 ไมโครลิตร ระยะห่างของปลายปิเปตจากตัวตรวจวัด 2 มิลลิเมตร และอัตราเร็วในการคนสารละลาย 300 รอบต่อนาที จากผลการวิเคราะห์พบว่า การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสที่เพิ่มขึ้น โดยมีค่าความชัน 257 มิลลิโวลต์ต่อโมลาร์ (mV/M) และให้ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดที่ 2 มิลลิโมลาร์ ให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 1 - 2%

จากการวิเคราะห์โดยการใช้เทคนิค BIA ร่วมกับ ตัวตรวจวัดต่างๆ ที่กล่าวมา สามารถสรุปได้ว่า เทคนิคนี้สามารถทำการวิเคราะห์ได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีความถูกต้องและแม่นยำ ใช้สารตัวอย่างในการทำการวิเคราะห์น้อย รวมทั้งสามารถกำจัดปัญหาที่เกิดขึ้นจากการใช้ปั๊มและท่อได้ นอกจากนี้ไม่มีผลที่เกิดจากการใช้สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างกันมาก (Carryover) รบกวนต่อการวิเคราะห์

1.3 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาหลักการและปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการวิเคราะห์ซูโครสโดยเทคนิคแบทช์อินเจกชันอนาไลซิส
2. ทดสอบเทคนิคนี้โดยการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในน้ำอ้อย และน้ำผลไม้กระป๋อง
3. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากเทคนิคแบทช์อินเจกชันอนาไลซิสกับวิธีการวิเคราะห์มาตรฐานที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ปริมาณซูโครสที่สะดวก และรวดเร็ว
2. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิจัย และปรับปรุงเทคนิคนี้ที่อาจจะสามารถใช้ในทางการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสในอุตสาหกรรม

1.5 ขอบเขตของการศึกษา

1. ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อเทคนิคแบทช์อินเจกชันอนาไลซิส
2. วิเคราะห์หาปริมาณซูโครสที่มีอยู่ในสารละลายตัวอย่างและเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับเทคนิคที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

2.1 วัสดุ

2.1.1 สารเคมีที่ใช้ในเทคนิคแบทช์อินเจกชันอนาไลซิส

- เอนไซม์อินเวอร์เทส (Invertase EC 3.2.1.26 , 852 units/mg solid , Grade VII : Sigma , U.S.A.)
- อัลบูมิน (Laboratory Grade : Fluka , Switzerland)
- กลูตารัลดีไฮด์ 25% ($C_5H_8O_2$, AR Grade : Riedel - de Haen , Germany)
- น้ำตาลทรายขาว (มีซูโครส 99.5% (วิชัย ตันไพจิตร , 2522 ; Pearson , 1970 ; Zapsalis , 1985) , $C_{12}H_{22}O_{11}$)
- ดี (+) -กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$, Laboratory Grade : Fluka , Switzerland)
- บีต้า-ดี (-) ฟรักโทส ($C_6H_{12}O_6$, Laboratory Grade : Sigma , U.S.A.)
- กรดอะซิติก 100% (CH_3COOH , AR Grade : Merck , Germany)
- โซเดียมอะซิเตท ($NaCH_3O_2.3H_2O$, AR Grade : Mallinckrodt , U.S.A.)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH , AR Grade : Eka , Sweden)
- กรดไนตริก 65% (HNO_3 , AR Grade : Merck , Germany)
- ทองแดงซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$, AR Grade : Carlo Erba , Farmitalia)
- เงินไนเตรท ($AgNO_3$, AR Grade : Carlo Erba , Farmitalia)
- สารประกอบซิลิโคนฮีตซิงค์ (Silicone Heat Sink Compound : Unick , Taiwan)

2.1.2 สารเคมีที่ใช้ในเทคนิคโพลาริเมตริก

- ตะกั่วอะซิเตท ($(CH_3COO)_2Pb.3H_2O$, AR Grade : Baker Analyzed , U.S.A.)
- โพแทสเซียมออกซาเลต ($(COOK)_2.H_2O$, AR Grade : Carlo Erba , Farmitalia)

2.1.3 ชุดสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ซูโครสในเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริก

(Spectrophotometric) (No. 510-DA , AR Grade : Sigma , U.S.A.) ประกอบด้วย

- แบเรียมไฮดรอกไซด์ (Ba(OH_2))
- สังกะสีซัลเฟต (Zn(SO_4))
- ออโธ-ไดอะนิสิดีน ไดไฮโดรคลอไรด์ (o-Dianisidine dihydrochloride , $C_{14}H_{16}N_2O_2.2HCl$)
- เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสและกลูโคสออกซิเดส (Peroxidase-Glucose Oxidase Enzymes)

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.2.1 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ด้วยระบบแบทซ์อินเจกชันอนาไลซิส

- ชุดอุปกรณ์เทอร์มิสเตอร์ ประกอบด้วย เทอร์มิสเตอร์ตรวจวัด (Sensing thermistor) และ เทอร์มิสเตอร์อ้างอิง (Reference thermistor) โดยเทอร์มิสเตอร์ทั้งสองนี้จะต่อเข้ากับชุดวงจรวีตสโตนบริดจ์และอุปกรณ์ขยายสัญญาณ (Department of Pure and Applied Biochemistry , University of Lund , Sweden)
- เครื่องคนสารละลาย (Magnetic stirrer , Framo-Geratetechnik M 21/1 , Germany)
- แท่งคนสารละลาย (Stirring bar)
- ปลอกเทอร์มิสเตอร์ ทำจากพีวีซี (PVC) สำหรับสวมเทอร์มิสเตอร์เพื่อป้องกันการสูญเสียความร้อน
- เครื่องบันทึกผล (Chart recorder , Single channel , Linear Instrument Company , U.S.A.)

2.2.2 อุปกรณ์ฉีดสารตัวอย่าง

- ไมโครปิเปตแบบดิจิตอล (Digitalmicropipette , Model 5000 volume 10 - 50 µl NICHIRYO , Japan)
- ไมโครปิเปตที่มีระบบฉีดอัตโนมัติ (Eppendorf micro pipette EDOS 5221 , Germany)

2.2.3 อุปกรณ์ทดสอบหาปริมาณซูโครสโดยใช้เทคนิคอื่น

- เครื่องหมุนเหวี่ยง (General Laboratory Centrifuge GLC-2 , U.S.A.)
- เครื่องโพลาริมิเตอร์ (Polarimeter POLAX-D , ATAGO , Japan)
- เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer SPECTRUM 351 , U.S.A.)

2.2.4 อุปกรณ์อื่นๆ

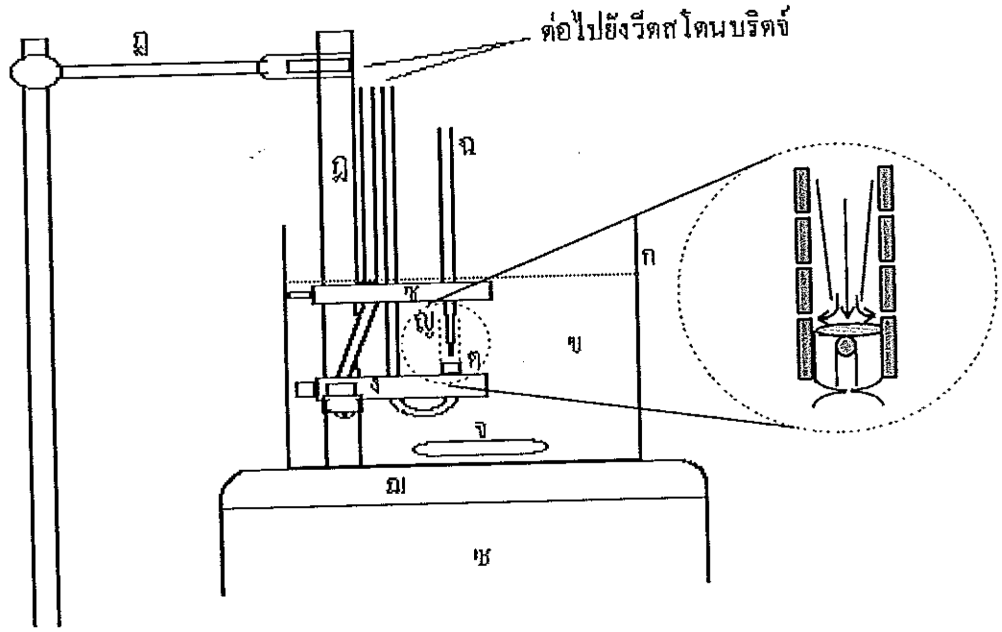
- เครื่องตรวจวัดความเป็นกรด - เบส (pH meter , Model 220 Corning , England)
- เครื่องแก้ว (ไพเรกซ์ (Pyrex))

2.3 ระบบการทดลองและการวิเคราะห์ผล

2.3.1 ระบบแบทช์อินเจกชันอนาไลซิส (BIA)

ระบบแบทช์อินเจกชันอนาไลซิสเรียกย่อว่า BIA ที่ใช้ในการหาปริมาณซูโครส (ภาพประกอบ 2) ประกอบด้วยบีกเกอร์ขนาดปริมาตร 2 ลิตร (ก) บรรจุสารละลาย (ข) ในสารละลายจะมีเทอร์มิสเตอร์สองตัว (ค และ ง) โดยเทอร์มิสเตอร์ตัวหนึ่งจะตรวจวัดความร้อนที่เกิดขึ้น (ค) และอีกตัวหนึ่งจะใช้เป็นเทอร์มิสเตอร์อ้างอิง (ง) สารละลายในบีกเกอร์มีปริมาตรประมาณ 1 ลิตร สารละลายที่มีปริมาตรมากนี้จะทำหน้าที่ในการควบคุมอุณหภูมิของระบบให้มีค่าคงที่ สารละลายนี้จะถูกคนอยู่ตลอดเวลาด้วยแท่งคนสารละลาย (magnetic stirring bar) (จ) เพื่อช่วยในการล้างสารละลายที่ฉีดลงไปบนเทอร์มิสเตอร์รวมทั้งผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังช่วยในการกระจายความร้อนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาบริเวณหัววัดไปยังสารละลายหลังจากที่มีการตรวจวัดแล้ว ทำให้ระบบวิเคราะห์เข้าสู่สภาพเดิมอย่างรวดเร็ว ปลายปิเปต (ฉ) ที่ใช้ในการฉีดสารตัวอย่างจะถูกสอดอยู่ในช่องที่เจาะไว้เฉพาะในแผ่นพลาสติก (ช) ขนาดกว้าง 1.80 เซนติเมตร ยาว 4.80 เซนติเมตร และหนา 0.80 เซนติเมตร แผ่นพลาสติกนี้สามารถเลื่อนขึ้นลงได้เพื่อกำหนดตำแหน่งของปลายปิเปต เนื่องจากปริมาตรที่ใช้ในการฉีดสารตัวอย่างในระบบการวิเคราะห์นี้จะอยู่ในระดับไมโครลิตร ในขณะที่สารละลายในบีกเกอร์มีปริมาตรเป็นลิตร ดังนั้นสารตัวอย่างที่ฉีดลงไปบนเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัดจะถูกเจือจางอย่างรวดเร็วโดยสารละลายในบีกเกอร์ บีกเกอร์ที่บรรจุสารละลายนี้จะวางบนเครื่องคนสารละลาย (magnetic stirrer) (ซ) โดยที่มีโฟมโพลีสไตรีน (polystyrene form) (ฌ) หนา 5.0 เซนติเมตร วางระหว่างบีกเกอร์กับเครื่องคนสารละลายเพื่อทำหน้าที่เป็นฉนวนป้องกันไม่ให้ความร้อนที่เกิดจากเครื่องคนสารละลายผ่านเข้าไปในระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์

เทอร์มิสเตอร์ตรวจวัดและเทอร์มิสเตอร์อ้างอิงทำจากเทอร์มิสเตอร์ที่เหมือนกันสองตัว ดังภาพประกอบ 3 หัวของเทอร์มิสเตอร์จะยึดอยู่ในท่อพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 4.5 มิลลิเมตรโดยกาวอีพ๊อกซี ขาทั้งสองข้างจะต่อกับสายไฟและสอดผ่านท่อพลาสติก ซึ่งมีความยาว 25.0 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 3.0 มิลลิเมตร เพื่อไปต่อกับวงจรวีตสโตนบริดจ์และเครื่องขยายสัญญาณ บนเทอร์มิสเตอร์ทั้งสองจะมีแผ่นเมมเบรน (Membrane) (พลาสติกบางๆ) หุ้มอยู่ เพื่อกันไม่ให้น้ำซึมเข้าไป ระหว่างแผ่นเมมเบรนกับหัวเทอร์มิสเตอร์เชื่อมต่อกันด้วยซิลิโคน ฮีตซิงค์ ซึ่งจะนำความร้อนจากภายนอกเมมเบรนมายังเทอร์มิสเตอร์ บนแผ่นเมมเบรนของเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัดจะตรึงเอนไซม์อินเวอร์เทสไว้ (ดูรายละเอียดการตรึงเอนไซม์ หน้า 31) เมื่อฉีดสารละลายซูโครสไปบนเทอร์มิสเตอร์นี้ เอนไซม์อินเวอร์เทสจะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครส ทำให้เกิดความร้อนซึ่งสามารถตรวจวัดได้ และเพื่อป้องกันไม่ให้ความร้อนที่เกิดขึ้นเกิดการสูญเสียรวดเร็วเกินไป เทอร์มิสตอร์ตรวจวัด จะมีปลอกเทอร์มิสเตอร์ (ภาพประกอบ 2 ญ) ซึ่งทำจากพีวีซีสวมอยู่ โดยปลอกนี้จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4.5 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 5.0 มิลลิเมตร และจะเจาะรูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.0 มิลลิเมตร 3 ระดับ ระดับละ 2 รูตรงข้ามกัน และให้มีระยะห่างระหว่างแต่ละระดับนั้นเท่าๆ กัน ดังภาพประกอบ 4 รูของปลอกเทอร์มิสเตอร์นี้จะเป็นทางที่ความร้อนและผลผลิตที่เกิดจากปฏิกิริยาแพร่ไปยังส่วนอื่นของสารละลาย ระบบการทดลองนี้ไม่จำเป็นต้องใช้กับเอนไซม์เสมอไป อาจจะใช้กับปฏิกิริยาอื่นๆได้หากปฏิกิริยานั้นๆเป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความร้อน เช่น ปฏิกิริยากรด-เบส ปฏิกิริยารีด๊อกซ์ (redox reaction) (Wang and Taha , 1991c)



ภาพประกอบ 2 ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในระบบ BIA

ก : บีกเกอร์ปริมาตรขนาด 2 ลิตร

ข : สารละลายปริมาตรประมาณ 1 ลิตร

ค : เทอร์มิสเตอร์ตรวจวัด

ง : เทอร์มิสเตอร์อ้างอิง

จ : แท่งคนสารละลาย

ฉ : ไมโครปิเปตที่ใช้ในการฉีดสาร

ช : แผ่นพลาสติก

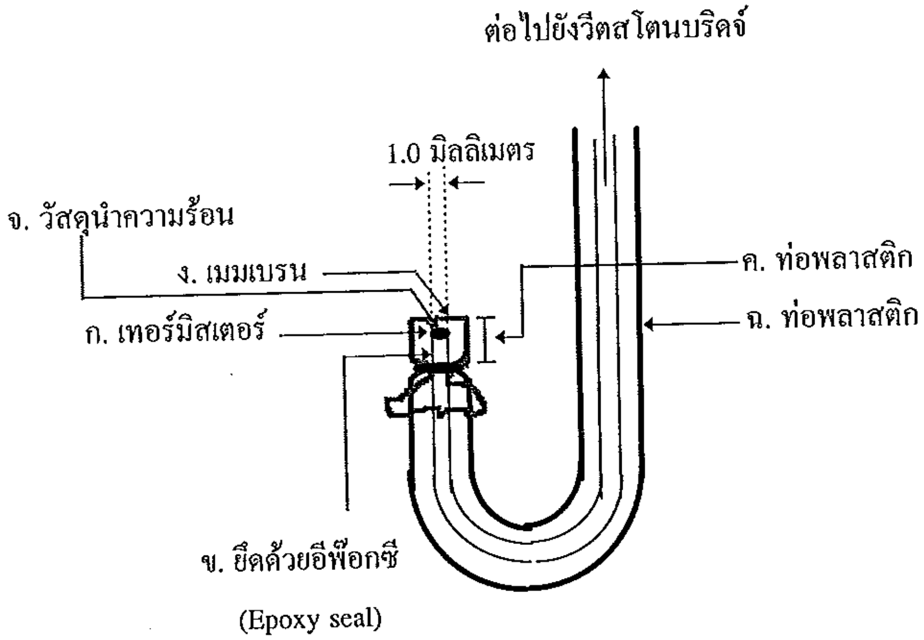
ซ : เครื่องคนสารละลาย

ฌ : โฟมโพลีสไตรีน

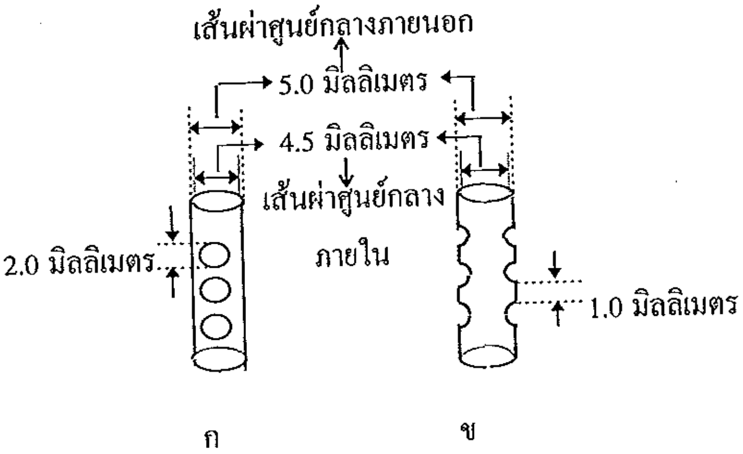
ญ : ปลอกเทอร์มิสเตอร์

ฎ : แกนโลหะ

ฏ : ตัวจับแกนโลหะ



ภาพประกอบ 3 ลักษณะของเทอร์มิสเตอร์ (Thermistor) ที่ใช้ในงานวิจัย เทอร์มิสเตอร์ (ก) ยึดด้วยอีพ๊อกซี (ข) อยู่ในท่อพลาสติก (ค) มีแผ่นเมมเบรน (ง) ปิดทับเทอร์มิสเตอร์และยึดด้วย O-ring เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำผ่านเข้าไปในส่วนของเทอร์มิสเตอร์ ระหว่างแผ่นเมมเบรนและเทอร์มิสเตอร์จะมีซิลิโคนฮีตซิงค์ (จ) อยู่ ซึ่งช่วยในการนำความร้อนภายนอกเมมเบรนมายังเทอร์มิสเตอร์ ขาทั้งสองข้างของเทอร์มิสเตอร์สอดผ่านท่อพลาสติก (ฉ) เพื่อต่อกับสายไฟที่จะไปยังวงจรวีตสโตนบริดจ์



ภาพประกอบ 4 ลักษณะของปลอกเทอร์มิสเตอร์ที่ใช้ป้องกันการสูญเสียความร้อน จะเจาะรูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.0 มิลลิเมตร 3 ระดับ ระดับละ 2 รูตรงข้ามกัน และให้มีระยะห่างระหว่างแต่ละระดับนั้นเท่าๆ กัน 1.0 มิลลิเมตร

ก : ด้านหน้าของรูของปลอกเทอร์มิสเตอร์

ข : ด้านข้างของรูของปลอกเทอร์มิสเตอร์

2.3.2 หลักการวัดโดยใช้เทอร์มิสเตอร์

เทอร์มิสเตอร์ทำจากส่วนผสมของโลหะออกไซด์ เช่น โคบอลท์ ทองแดง แมงกานีส นิกเกิล เหล็ก และยูเรเนียมรวมกันแล้วเผาจนเป็นเซรามิก รูปร่างของเทอร์มิสเตอร์มีได้หลายแบบ เช่น แผ่นกลมแบน (Disk) หลอดกลม (Tube) หรือเม็ดเล็กๆ (Bead) (Jesperson , 1990) เทอร์มิสเตอร์ที่ใช้กันมากคือแบบเม็ดเล็กๆ เทอร์มิสเตอร์เป็นสารกึ่งตัวนำที่ความต้านทานจะลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น

เนื่องจากความต้านทานของเทอร์มิสเตอร์มีสมบัติที่เปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิ ดังนั้นจึงนำเทอร์มิสเตอร์มาใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (ความร้อน) ของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ โดยการต่อเทอร์มิสเตอร์กับวงจรวีตสโตนบริดจ์ (Wheat-stone bridge) ดังแสดงในภาพประกอบ 5

หลักการวัดความต้านทานโดยวงจรวีตสโตนบริดจ์ พิจารณาจากภาพประกอบที่ 5 ได้ดังนี้

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

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

แต่

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

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

โดยที่

E_b = ศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่วงจร

E_{un} = ศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้เมื่อวงจรบริดจ์ไม่สมดุล

R_T = ค่าความต้านทานของเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัด

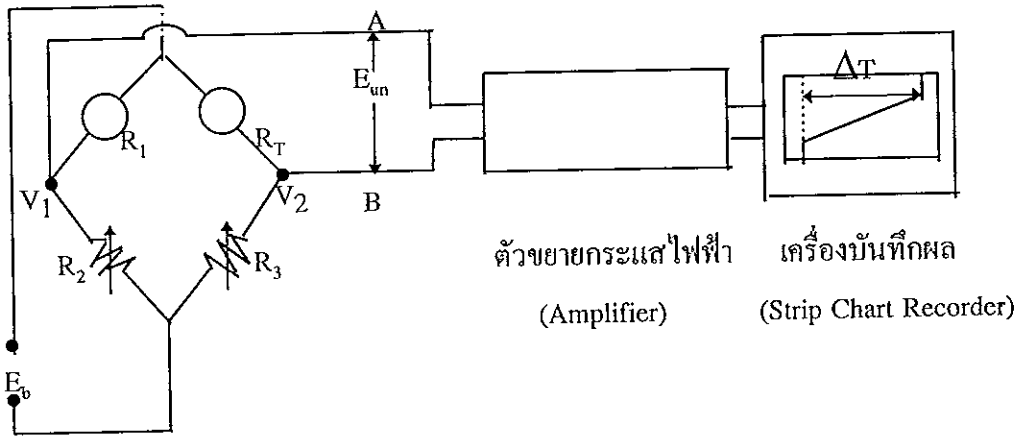
R_1 = ค่าความต้านทานของเทอร์มิสเตอร์อ้างอิง

V_1 = ศักย์ไฟฟ้าที่จุด A

V_2 = ศักย์ไฟฟ้าที่จุด B

R_2 และ R_3 = ค่าความต้านทานที่ปรับค่าได้เพื่อให้บริดจ์สมดุล

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY



ภาพประกอบ 5 ระบบการวัดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิโดยใช้เทอร์มิสเตอร์ประกอบในวงจรวีตสโตนบริดจ์ (Jesperson , 1990) โดยที่

E_b คือ ศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่วงจร (Applied potential to the bridge)

E_{un} คือ ศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้เมื่อวงจรบริดจ์ไม่สมดุล (Unbalance potential)

R_T คือ ค่าความต้านทานของเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัด

R_1 คือ ค่าความต้านทานของเทอร์มิสเตอร์อ้างอิง

R_2 และ R_3 คือ ค่าความต้านทานที่ปรับค่าได้เพื่อให้เกิดวงจรบริดจ์สมดุล

V_1 คือ ศักย์ไฟฟ้าที่จุด A

V_2 คือ ศักย์ไฟฟ้าที่จุด B

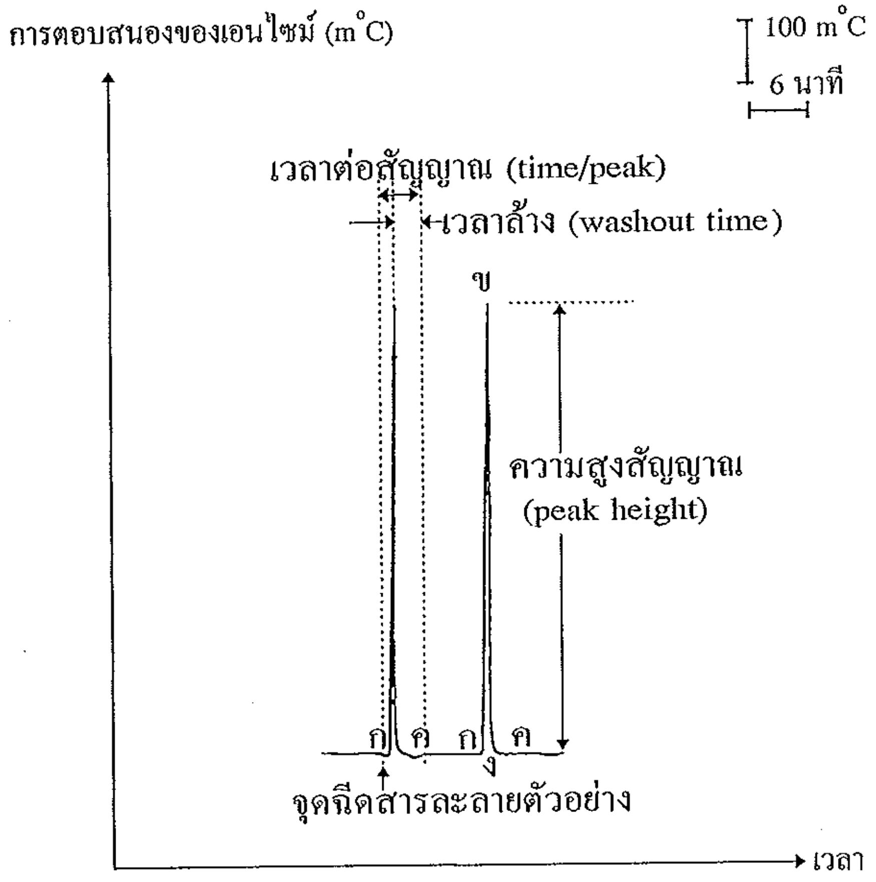
เมื่อปรับ R_2 หรือ R_3 จน $V_1 = V_2$ จะได้ว่า $E_{un} = 0$ เรียกว่า วงจรวีตสโตนบริดจ์อยู่ในสมดุล (balanced bridge) ซึ่งจะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อ R_1/R_2 เท่ากับ R_T/R_3 และที่สภาวะนี้ถ้าทราบค่าความต้านทาน R_1 , R_2 และ R_3 ก็จะสามารถหาความต้านทาน R_T ได้

ในทางปฏิบัติเป็นการยากที่จะทำให้วงจรในระบบการทดลองอยู่ในสภาพบริดจ์สมดุลตลอดเวลาที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ดังนั้นจึงมักจะวัดความแตกต่างของศักย์ไฟฟ้าระหว่าง V_1 และ V_2 ในขณะที่วงจรบริดจ์ไม่สมดุลแทน นั่นคือวัด E_{un} และ E_{un} ที่วัดได้ จะแปรผันเป็นสัดส่วนกับผลต่างของอุณหภูมิระหว่างเทอร์มิสเตอร์ทั้งสอง (R_T และ R_1) (Jesperson , 1990) ดังสมการ 4

ในงานวิจัยนี้เทอร์มิสเตอร์ที่ใช้เป็นเทอร์มิสเตอร์แบบเม็ด (bead thermistor) ชนิด 51A72 ของ VECO (Victory Engineering Corporation , Springfield , NJ , USA.) มีความต้านทาน 100 กิโลโอห์ม (KΩ) ที่ 25 องศาเซลเซียส และสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแปลงความต้านทานเป็น -4.6% ต่อหนึ่งองศาเซลเซียส ชุดขยายสัญญาณที่ใช้สามารถปรับความไว (sensitivity) ในการวัดได้ ซึ่งที่ความไวสูงสุด 10 หมายถึง เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 10 มิลลิองศาเซลเซียส (m°C) จะให้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 มิลลิโวลต์ ที่ความไว 100 และ 1000 หมายถึง ค่าความต่างศักย์ 100 มิลลิโวลต์ จะให้ค่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเทียบเท่ากับ 100 และ 1000 มิลลิองศาเซลเซียสตามลำดับ โดยการทดลองในปฏิกิริยากรด-เบสจะใช้ความไว 1000 และ 100 ส่วนปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครสจะใช้ความไว 10 และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจะถูกบันทึกบนเครื่องบันทึกผล

เมื่อเริ่มการทดลองจะนำเทอร์มิสเตอร์ทั้งสองจุ่มลงไปในสารละลายในบีกเกอร์และปรับความต้านทาน R_2 หรือ R_3 จนกระทั่งวงจรบริดจ์อยู่ในสมดุล นั่นคือ E_{un} เป็นศูนย์ หากยังไม่มีการฉีดสารละลายตัวอย่างลงบนเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัดก็จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเกิดขึ้น สัญญาณที่ได้มีลักษณะเป็นเส้นเรียบซึ่งจะเป็นระดับอ้างอิงของสัญญาณหรือเบสไลน์ (baseline) ในการวิเคราะห์จะใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างและนำปิเปตนี้มาแช่ในสารละลายในบีกเกอร์ระยะเวลาหนึ่งเพื่อปรับอุณหภูมิระหว่างสารละลายตัวอย่างในปิเปตให้เท่ากับสารละลายในบีกเกอร์ หลังจากนั้นจึงฉีดสารละลายตัวอย่างลงไปบนเทอร์มิสเตอร์ สารละลายตัวอย่างนี้จะทำปฏิกิริยากับสารละลายในบีกเกอร์หรือสารที่ตรึงไว้บนเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัดทำให้เกิดความร้อน ซึ่งทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิที่สามารถตรวจวัดได้ในรูปของการเพิ่มขึ้นของความต่างศักย์ไฟฟ้าเนื่องจากวงจรบริดจ์ไม่สมดุล (E_{un}) ในขณะที่เกิดการเปลี่ยนแปลงนี้สารละลายในบีกเกอร์ยังมีการคนอยู่ตลอดเวลา ดังนั้นสารละลายตัวอย่างและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยารวมทั้งความร้อนที่เกิดขึ้นก็จะแพร่ออกไปจากบริเวณเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัด ทำให้สัญญาณการตอบสนองมีค่าลดลงจนกลับเข้าสู่สภาพเดิม (ภาพประกอบ 6) พร้อมที่จะทำการวิเคราะห์ครั้งต่อไป ช่วงเวลาของการเกิดปฏิกิริยาที่

จะกล่าวถึงต่อๆ ไปแบ่งเป็นดังนี้ เวลาตั้งแต่เริ่มฉีดสารตัวอย่างจนถึงจุดที่เริ่มให้สัญญาณการตอบสนองเรียกว่า เวลาตอบสนอง (response time) (เวลาช่วงนี้สั้นมากจึงไม่ได้แสดงไว้ในภาพประกอบ 6) เวลาที่ใช้ตั้งแต่เริ่มตอบสนองจนสัญญาณกลับเข้าสู่สภาพเดิม (ก-ค) คือ เวลาต่อสัญญาณ (time/peak) และเวลาที่ใช้ในการล้างสารต่างๆ ออกจากหัววัดจนสัญญาณกลับคืนสู่สภาพเดิม (ข-ค) เรียกว่า เวลาล้าง (washout time) ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างจะทำการฉีดตัวอย่างละห้าครั้ง และวัดความสูงของสัญญาณ (peak height) (ข-ง) ที่เกิดจากการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในปฏิกิริยาทั้งห้าครั้งและนำมาหาค่าเฉลี่ย โดยที่ความสูงของสัญญาณจะเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง



ภาพประกอบ 6 ตัวอย่างสัญญาณจากเทคนิค BIAที่วัดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของปฏิกิริยากรด-เบส โดยที่ความเข้มข้นกรดไนตริก 0.50 โมลาร์ และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 โมลาร์

ก : จุดฉีดสารตัวอย่าง

ก-ค : เวลาที่ใช้ตั้งแต่เริ่มตอบสนองจนสัญญาณกลับเข้าสู่สภาพเดิม (time/peak)

ข-ค : เวลาที่ใช้ในการล้าง (washout time)

ข-ง : ความสูงของสัญญาณการตอบสนอง (peak height)

2.3.3 การวิเคราะห์ผล

ในการวิเคราะห์ผลจากการทดลองเพื่อหาปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค BIA กล่าวคือ

- ความยาวของปลอกเทอร์มิสเตอร์
- ระยะห่างของรูของปลอกเทอร์มิสเตอร์จากเทอร์มิสเตอร์
- ผลของกลูโคสและฟรักโทส
- ผลของไอออนของโลหะหนักทองแดงหรือเงิน
- ความแตกต่างของน้ำอ้อยที่มีการตกตะกอนและไม่มีการตกตะกอนสารแขวนลอย
- การเปรียบเทียบเทคนิค BIA กับเทคนิคโพลาริเมตริก และเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริก

จะทำโดยนำผลที่ได้จากลักษณะที่ต่างกันของปัจจัยข้างต้น เช่น ผลที่ได้เมื่อใช้ความยาวของปลอกเทอร์มิสเตอร์ที่ต่างกันมาวิเคราะห์โดยวิธี ANOVA (Analysis of Variance) โดยใช้โปรแกรม irristat ในคอมพิวเตอร์ (Biometrics Unit , International Rice Research Institute , Manila , Philippines) เริ่มจากการนำค่าเฉลี่ยที่ได้จากการฉีดสารละลายตัวอย่าง 5 ครั้ง (n = 5) ของลักษณะที่ต่างกันนี้มาวิเคราะห์วาเรียนซ์ในแผนการทดลองแบบซีอาร์ดี [completely randomized design (CRD)] ซึ่งเป็นแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด ใช้สำหรับการทดลองที่มีปัญหาเพียงกลุ่มเดียว และให้ปัญหาอื่นคงที่ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ , 2535) ตัวอย่างเช่น การเปรียบเทียบความยาวของปลอกเทอร์มิสเตอร์ก็จะศึกษาในเรื่องความแตกต่างของความยาวของปลอกเทอร์มิสเตอร์เพียงอย่างเดียว (จัดเป็นทรีตเมนต์ที่ทำการศึกษา) ส่วนปัจจัยอื่น เช่น ระยะห่างของรูระดับแรกจากเทอร์มิสเตอร์ ระยะห่างของปลายปิเปตกับเทอร์มิสเตอร์ เวลาที่ทำให้เกิดสมดุลอุณหภูมิ ฯลฯ ในการทดลองนี้ให้ใช้เหมือนกันสำหรับทุกความยาวของปลอกเทอร์มิสเตอร์ จากนั้นคำนวณหาค่า F และนำไปเปรียบเทียบกับค่า F จากตารางที่ระดับความแตกต่าง 0.05 นั่นคือ มีระดับความแตกต่าง 5% หรือมีช่วงความเชื่อมั่น 95% ค่า F ที่คำนวณได้มากกว่า $F_{0.05}$ (จากตาราง) (ไพศาล เหล่าสุวรรณ , 2535) แสดงว่า ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันในทางสถิติหรือความแตกต่างมีนัยสำคัญ แต่ถ้าค่า F ที่คำนวณได้น้อยกว่า $F_{0.05}$ (จากตาราง) แสดงว่า ความแตกต่างไม่มีนัยสำคัญ

2.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยพื้นฐานของระบบ BIA

ในระบบ BIA ที่ใช้เทอร์มิสเตอร์เป็นตัวตรวจวัดปัจจัยที่น่าจะมีผลต่อการวัดคือส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงและการแพร่กระจายของความร้อนได้แก่

- ขนาดความยาวของปลอกเทอร์มิสเตอร์ที่ใช้เพื่อป้องกันไม่ให้ความร้อนที่เกิดขึ้นมีการสูญเสียเร็วเกินไป อันเนื่องมาจากการแพร่กระจายไปยังสารละลายส่วนอื่นๆ
- ระยะห่างของรูของปลอกเทอร์มิสเตอร์จากผิวของเทอร์มิสเตอร์ เนื่องจากรูนี้จะช่วยในการแพร่กระจายของสารตัวอย่างและผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกจากผิวหน้าของเทอร์มิสเตอร์
- อัตราการคนสารละลาย ซึ่งจะมีผลต่อการล้างผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกจากผิวของเทอร์มิสเทอร์ และยังช่วยในการแพร่กระจายความร้อนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไปยังสารละลายในบีกเกอร์หลังจากที่มีการตรวจวัดแล้ว
- เวลาที่สารละลายตัวอย่างต้องใช้ในการปรับอุณหภูมิให้เท่ากับของเหลวในระบบ

การทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยต่างๆเหล่านี้ศึกษาโดยใช้ปฏิกิริยากรด-เบส ระหว่างกรดไนตริกกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ เนื่องจากปฏิกิริยาจะเกิดได้รวดเร็ว และให้ความร้อนสูง (Wang and Taha , 1991c) ผลที่ได้เห็นได้ชัดเจน การฉีดสารละลายใช้ไมโครปิเปตแบบดิจิตอลชนิดที่ควบคุมการฉีดสารละลายตัวอย่างด้วยมือ

ระบบทดลองประกอบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1.00 โมลาร์ ปริมาตร 1 ลิตร เป็นสารละลายในบีกเกอร์ และใช้กรดไนตริก (HNO_3) 0.50 โมลาร์ เป็นสารละลายตัวอย่าง ความเข้มข้นของกรด-เบสที่เลือกใช้นี้เป็นความเข้มข้นที่จะให้การตอบสนองอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรง (Wang and Taha , 1991c)

สภาวะที่ใช้ในการทดลอง 2.4.1 - 2.4.4 คือ

- ปริมาตรสารละลายตัวอย่าง	25	ไมโครลิตร
- อัตราเร็วในการคน (ยกเว้นการทดลอง 2.4.4)	300	รอบต่อนาที
- ปลายปิเปตห่างจากตัวตรวจวัด	2.0	มิลลิเมตร
- ระยะห่างของรูของปลอกเทอร์มิสเตอร์จากผิวเทอร์มิสเตอร์เป็นระยะ (ยกเว้นการทดลอง 2.4.1)	2.0	มิลลิเมตร

- ความไวในการวิเคราะห์ของเทอร์มิสเตอร์
  ค่าศักย์ไฟฟ้า 100 มิลลิโวลต์ จะให้ค่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ = 1000 มิลลิองศาเซลเซียส
  (ยกเว้นการทดลอง 2.4.3 ค่าศักย์ไฟฟ้า 100 มิลลิโวลต์ จะให้ค่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ = 100 มิลลิองศาเซลเซียส)

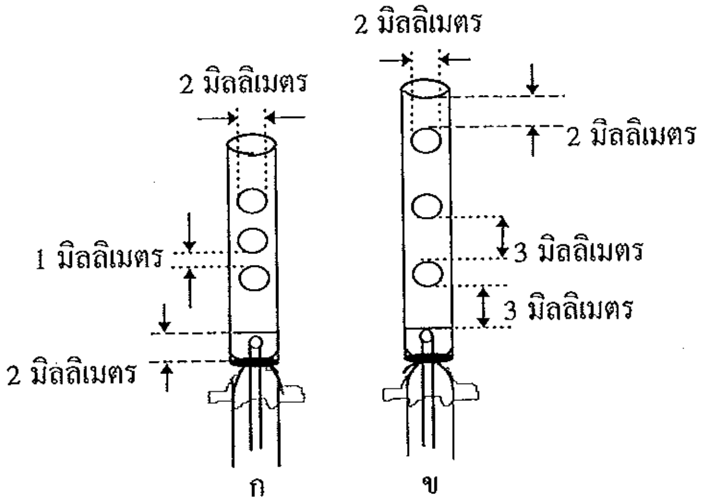
ในการทดลองจะใช้ปิเปตดูดสารตัวอย่าง 25 ไมโครลิตร แล้วนำปลายปิเปตไปสอดลงในช่องของแผ่นพลาสติกที่ปรับตำแหน่งของปลายปิเปตให้ห่างจากเทอร์มิสเตอร์ตามที่กำหนด ให้แช่อยู่นาน 30 วินาที (ยกเว้นการทดลอง 2.4.3) เพื่อปรับอุณหภูมิระหว่างสารตัวอย่างให้เท่ากับกับสารละลายที่อยู่ในบีกเกอร์ จะเรียกเวลาในช่วงนี้ว่า เวลาที่ทำให้เกิดสมดุลอุณหภูมิ (equilibrate time) หลังจากนั้นฉีดสารตัวอย่างลงบนเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัดและวัดสัญญาณที่เกิดขึ้น

2.4.1 ผลของความยาวของปลอกเทอร์มิสเตอร์

เนื่องจากระบบการทดลองนี้ใช้การวัดปริมาณความร้อนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาบนผิวของเทอร์มิสเตอร์ในรูปของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ดังนั้นจึงใช้ปลอกเทอร์มิสเตอร์สวมคลุมเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัด (Wang and Taha , 1991c) เพื่อป้องกันไม่ให้ความร้อนที่เกิดขึ้นแพร่กระจายไปยังสารละลายส่วนอื่นๆ เร็วเกินไป และสัญญาณการตอบสนองที่วัดได้จะมากหรือน้อยน่าจะขึ้นอยู่กับความยาวของปลอกเทอร์มิสเตอร์ด้วย ดังนั้นจึงทำการศึกษาเพื่อดูว่าความยาวของปลอกเทอร์มิสเตอร์ มีผลต่อสัญญาณการตอบสนองอย่างไร

ปลอกเทอร์มิสเตอร์ที่ใช้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4.5 มิลลิเมตร และเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 5.0 มิลลิเมตร เจาะรูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.0 มิลลิเมตร 3 ระดับ ระดับละ 2 รูตรงข้ามกัน และให้มีระยะห่างระหว่างแต่ละระดับนั้นเท่าๆ กัน ดังภาพประกอบ 7 แต่จะมีความยาวต่างกัน โดยปลอกเทอร์มิสเตอร์แบบสั้น มีระยะห่างระหว่างแต่ละระดับ 1.0 มิลลิเมตร ส่วนแบบยาวมีระยะห่างระหว่างแต่ละระดับ 3.0 มิลลิเมตร และให้ขอบล่างของรูระดับแรกอยู่สูงจากผิวของเทอร์มิสเตอร์เป็นระยะ 3.0 มิลลิเมตร ดังนั้นความยาวทั้งหมดของปลอกเทอร์มิสเตอร์แบบสั้นและแบบยาวเป็น 15.0 และ 19.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ทำการทดลองโดยฉีดสารละลายกรดไนตริก 0.50 โมลาร์ ลงบนผิวของเทอร์มิสเตอร์ที่อยู่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 โมลาร์ โดยทำการศึกษากับปลอกเทอร์มิสเตอร์แบบสั้นก่อนแล้วจึงศึกษากับปลอกเทอร์มิสเตอร์แบบยาว



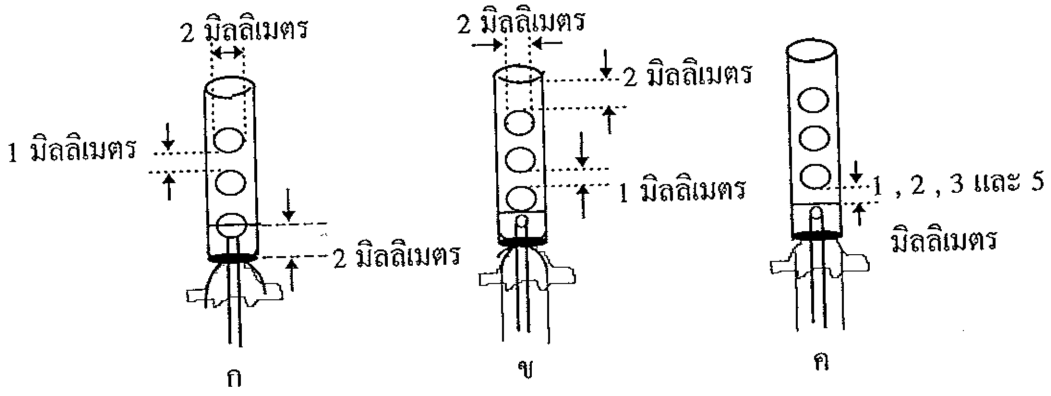
ภาพประกอบ 7 ลักษณะของปลอกเทอร์มิสเตอร์
ก : แบบสั้น 15 มิลลิเมตร
ข : แบบยาว 19 มิลลิเมตร

2.4.2 ผลของระยะห่างของรูของปลอกเทอร์มิสเตอร์จากเทอร์มิสเตอร์

ในระบบการทดลองนี้ปลอกเทอร์มิสเตอร์จะมีรูเจาะไว้เพื่อช่วยในการแพร่กระจายของสารตัวอย่างและผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกจากผิวหน้าของเทอร์มิสเตอร์เพื่อให้ระบบเข้าสู่สภาพเดิมพร้อมที่จะใช้วิเคราะห์ในครั้งต่อไป ดังนั้นระยะห่างของรูของปลอกเทอร์มิสเตอร์ จากเทอร์มิสเตอร์น่าจะมีผลต่อสัญญาณที่ได้

จากการทดลองเบื้องต้น (2.4.1) พบว่า ปลอกเทอร์มิสเตอร์แบบสั้นจะให้สัญญาณการตอบสนองค่อนข้างสูง ถึงแม้ว่าจะให้สัญญาณการตอบสนองต่ำกว่าปลอกเทอร์มิสเตอร์แบบยาวประมาณ 2 ใน 3 แต่สัญญาณจะใช้เวลาเข้าสู่เบสไลน์น้อยกว่า ทำให้สามารถทำการวิเคราะห์ได้รวดเร็ว ดังนั้นจึงใช้ปลอกเทอร์มิสเตอร์แบบสั้นในการทดลองโดยพิจารณารูระดับแรกของปลอกเทอร์มิสเตอร์ให้อยู่สูงจากเทอร์มิสเตอร์เป็นระยะที่ต่างๆ กัน 6 ระยะ (ภาพประกอบ 8) คือ เส้นผ่าศูนย์กลางของรูระดับแรกอยู่ในระดับเดียวกันกับผิวของเทอร์มิสเตอร์ และขอบล่างของรูระดับแรกสูงจากผิวของเทอร์มิสเตอร์ เป็นระยะ 0.0 , 1.0 , 2.0 , 3.0 และ 5.0 มิลลิเมตร ความยาวของปลอกเทอร์มิสเตอร์ต่างๆ ข้างต้นจะเป็น 11.0 , 12.0 , 13.0 , 14.0 , 15.0 และ 17.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ทดลองโดยฉีดสารละลายกรดไนตริก 0.50 โมลาร์ 25 ไมโครลิตร ลงบนเทอร์มิสเตอร์ที่อยู่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 โมลาร์ โดยทำการศึกษาที่ระยะเส้นผ่าศูนย์กลางของรูระดับแรกอยู่ในระดับเดียวกันกับผิวของเทอร์มิสเตอร์ก่อน แล้วจึงศึกษาที่ขอบล่างของรูระดับแรกสูงจากผิวของเทอร์มิสเตอร์เป็นระยะ 0.0 , 1.0 , 2.0 , 3.0 และ 5.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ



ภาพประกอบ 8 ลักษณะของปลอกเทอร์มิสเตอร์ที่รูระดับแรกของปลอกเทอร์มิสเตอร์อยู่สูงจากเทอร์มิสเตอร์ต่างๆ กัน

ก : เส้นผ่าศูนย์กลางของรูระดับแรกอยู่ในระดับเดียวกันกับเทอร์มิสเตอร์

ข และ ค : ขอบล่างของรูระดับแรกสูงจากผิวของเทอร์มิสเตอร์เป็นระยะ 0.0 , 1.0 , 2.0 , 3.0 และ 5.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ

2.4.3 ผลของเวลาที่ทำให้เกิดสมดุลอุณหภูมิระหว่างสารละลายตัวอย่างในปิเปตกับสารละลายในบีกเกอร์

ระบบการทดลองนี้ใช้เทอร์มิสเตอร์เป็นตัวตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิซึ่งเกิดจากปฏิกิริยา ดังนั้นสารละลายตัวอย่างที่ใช้ควรจะมีการปรับอุณหภูมิให้เท่ากับสารละลายในบีกเกอร์ก่อนที่จะฉีดลงบนเทอร์มิสเตอร์มิเช่นนั้นผลการวัดที่ได้จะผิดพลาดไป การปรับอุณหภูมินี้ทำโดยใช้ปิเปตดูดสารละลายในปริมาตรที่ต้องการแล้วสอดปลายปิเปตลงในช่องของแผ่นพลาสติกโดยให้ปลายปิเปตแช่ในสารละลายในบีกเกอร์เป็นระยะเวลาหนึ่ง เพื่อให้สารละลายตัวอย่างในปิเปตมีการปรับอุณหภูมิจนเท่ากับอุณหภูมิของสารละลายในบีกเกอร์แล้วจึงฉีดสารตัวอย่าง เวลานี้คือเวลาเกิดสมดุลอุณหภูมิ ศึกษาโดยให้สารละลายตัวอย่างและสารละลายในบีกเกอร์เป็นสารละลายชนิดเดียวกัน นั่นคือโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 โมลาร์ และแช่ปลายปิเปตในบีกเกอร์เป็นเวลาต่างๆ กัน คือ 0 , 10 , 20 , 30 , 40 และ 60 วินาที ก่อนที่จะฉีดสารละลายลงบนเทอร์มิสเตอร์ เนื่องจากสารละลายทั้งสองเป็นสารละลายชนิดเดียวกันจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาเคมี ถ้าหากมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิแสดงว่า อุณหภูมิของสารละลายตัวอย่างกับสารละลายในบีกเกอร์ต่างกัน เวลาที่น้อยที่สุดที่ใช้ในการแช่ปิเปตที่ทำให้ไม่มีสัญญาณเกิดขึ้นคือ เวลาที่ทำให้เกิดสมดุลอุณหภูมิ

2.4.4 ผลของการคนสารละลาย

การคนสารละลายในระบบ BIA ก็เพื่อล้างสารตัวอย่างที่เหลืออยู่และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกจากผิวของเทอร์มิสเตอร์และช่วยกระจายความร้อนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไปยังสารละลายในบีกเกอร์หลังจากที่มีการตรวจวัดแล้ว เป็นการทำให้ระบบพร้อมสำหรับการวิเคราะห์ครั้งต่อไป ดังนั้นอัตราเร็วในการคนสารละลายควรจะมีผลต่อสัญญาณที่เกิดขึ้น จึงทำการทดสอบโดยฉีดสารละลายกรดไนตริก 0.50 โมลาร์ 25 ไมโครลิตร ลงบนเทอร์มิสเตอร์ที่จุ่มอยู่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 โมลาร์ ที่อัตราเร็วในการคนสารละลาย 100 , 300 และ 400 รอบต่อนาที

2.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ซูโครส

ที่ผ่านมาเป็นการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยต่างๆในเทคนิค BIA แต่จุดประสงค์ในงานวิจัยนี้ต้องการนำเทคนิค BIA มาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสโดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทสตรึงบนเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัด เนื่องจากเอนไซม์อินเวอร์เทสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครส ในกรณีนี้จะใช้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ (acetate buffer) 0.01 โมลาร์ pH 4.77 (Hestrin , Feingold and Schramm , 1955) ปริมาตรประมาณ 1 ลิตร เป็นสารละลายที่อยู่

ในบีกเกอร์ และใช้สารละลายซูโครสซึ่งเตรียมในอะซิเตทบัฟเฟอร์เป็นสารละลายตัวอย่าง ในการทดลองขั้นต้นนี้จะฉีดสารละลายซูโครสโดยใช้ไมโครปิเปตแบบดิจิตอลที่ควบคุมการการฉีดสารละลายซูโครสด้วยมือ

ในการทดลองจะใช้สภาวะการทดลอง ดังนี้

- ปริมาตรสารละลายตัวอย่าง 25 ไมโครลิตร
- อัตราเร็วในการคน 300 รอบต่อนาที
- ปลายปิเปตห่างจากเทอร์มิสเตอร์ 2.0 มิลลิเมตร
- ระยะห่างของรูของปลอกเทอร์มิสเตอร์จากเทอร์มิสเตอร์ 2.0 มิลลิเมตร
- ความไวในการตรวจวัด (sensitivity) ของเทอร์มิสเตอร์

ค่าศักย์ไฟฟ้า 100 มิลลิโวลต์ จะให้ค่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ = 10 มิลลิองศาเซลเซียส

- ในการทำการทดลองจะใช้สารตัวอย่าง 25 ไมโครลิตร ให้ปลายปิเปตอยู่ห่างจากเทอร์มิสเตอร์ 2.0 มิลลิเมตร ให้แช่อยู่นาน 30 วินาที เพื่อให้เกิดสมดุลอุณหภูมิระหว่างสารตัวอย่างกับสารละลายในบีกเกอร์ก่อนที่จะฉีดสารละลาย

2.5.1 การตรึงเอนไซม์

การตรึงเอนไซม์ คือ การทำให้เอนไซม์อยู่กับที่ หรือจำกัดให้อยู่ในสภาพแวดล้อมขนาดเล็กโดยที่ยังคงว่องไวในการทำปฏิกิริยา และสามารถใช้งานได้อย่างต่อเนื่อง (ภาวิณี คณาสวัสดิ์ , 2531) ในงานวิจัยนี้ใช้วิธีการตรึงเอนไซม์แบบเชื่อมไขว้ (crosslinking) โดยการทำให้เกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างหมู่ฟังก์ชันของเอนไซม์อินเวอร์เทสกับตัวค้ำจุน (carrier) คือ อัลบูมิน (albumin) ในการตรึงเอนไซม์จะใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส 1 มิลลิกรัม ละลายใน 20 ไมโครลิตร (µl) ของ 17.5% อัลบูมิน โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) แล้วผสมกับ 5 ไมโครลิตรของ 5% กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) โดยปริมาตรต่อปริมาตร (v/v) คนเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นปิเปตส่วนผสมนี้ 5 ไมโครลิตร หยดลงบนเมมเบรนที่ปิดอยู่บนเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัด ส่วนเมมเบรนที่ปิดอยู่บนเทอร์มิสเตอร์อ้างอิงจะมีชั้นของอัลบูมินซึ่งไม่มีเอนไซม์ตรึงอยู่ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20 - 23 องศาเซลเซียสเพื่อให้เกิดการเชื่อมไขว้ (crosslink) เป็นเวลาประมาณ 7 - 10 นาที นำปลอกเทอร์มิสเตอร์มาสวมเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัด แล้วจึงนำเทอร์มิสเตอร์ทั้งสองนี้ไปจุ่มในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์

2.5.2 ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (detection limit)

การวิเคราะห์สารตัวอย่างในแต่ละเทคนิคจำเป็นที่จะต้องทราบขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดของแต่ละเทคนิคนั้นด้วย เพื่อเป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างว่า สารตัวอย่างนั้นก่อนที่จะนำมาทำการวิเคราะห์ต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างอย่างไร ทำการศึกษาโดยใช้

สารละลายซูโครสมาตรฐาน 0.05 และ 0.10 โมลาร์ โดยพิจารณาจากความเข้มข้นที่ให้ค่าสัญญาณการตอบสนองต่อสัญญาณรบกวนเท่ากับ 2 (Christian , 1980 ; Strobel , 1973) และถือว่าเป็นความเข้มข้นที่ให้ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด

2.5.3 ผลของอุณหภูมิ

ในปฏิกิริยาเคมีทั่วๆ ไป เมื่อเพิ่มอุณหภูมิมักจะทำให้มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงขึ้นเนื่องจากโมเลกุลของตัวทำปฏิกิริยามีพลังงานมากขึ้นและเพิ่มจำนวนโมเลกุลที่มีพลังงานเพียงพอที่จะเข้าสู่สภาพเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ แต่สำหรับปฏิกิริยาเอนไซม์การเพิ่มอุณหภูมิจะให้ผลที่ซับซ้อนกว่า (ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์ , 2530) กล่าวคืออัตราของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึงระดับหนึ่ง แต่หากอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ และอัตราของปฏิกิริยาก็จะลดลง (Rawn , 1983) เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ของระบบที่ใช้ในงานวิจัยนี้ จึงทำการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิสองค่าที่ระบบเครื่องปรับอากาศของห้องสามารถปรับได้ โดยใช้สารละลายซูโครสที่ความเข้มข้น 0.30 , 0.50 , 1.00 , 2.00 , 3.00 และ 4.00 โมลาร์

2.5.4 ผลของ pH

เอนไซม์เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีหมู่ที่สามารถเกิดเป็นประจุได้ (ionizable groups) ซึ่งการเกิดเป็นประจุของหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิลิกเหล่านี้จะขึ้นอยู่กับค่าคงที่ของการแตกตัว (ionization constants) ของแต่ละหมู่ และขึ้นกับ pH ของสิ่งแวดล้อมด้วย (Dixon , et al. , 1979) ที่ pH ต่ำหรือสูงเกินไป มักจะทำให้ประจุของเอนไซม์กับสับสเตรทเปลี่ยนไปจนไม่เหมาะสมที่จะทำปฏิกิริยากัน นอกจากนี้ pH ที่สูงมากหรือต่ำมากอาจจะทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติไป ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาเพื่อหา pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษา pH ในช่วง 4.50 - 5.50 เพราะเป็น ช่วง pH ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ซูโครส (Hestrin , Feingold and Schramm , 1955) โดยใช้สารละลายซูโครสที่ความเข้มข้น 0.50 โมลาร์ เป็นสารละลายตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่ pH 4.50 , 4.77 , 5.00 และ 5.50

2.5.5 ผลของกลูโคสและฟรักโทส

จุดประสงค์หนึ่งของระบบการทดลองนี้ก็เพื่อที่จะวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในตัวอย่างธรรมชาติ เช่นในน้ำอ้อย ซึ่งในน้ำอ้อยนี้ นอกจากจะมีน้ำตาลซูโครสแล้ว ยังมีน้ำตาลชนิดอื่น เช่น กลูโคส และฟรักโทส ปนอยู่อย่างละ 2 - 4% (Meade and Chen , 1977) หรือ 0.02 - 0.05 โมลาร์ จึงทำการศึกษาเพื่อดูว่าน้ำตาลเหล่านี้จะมีผลต่อการวิเคราะห์ซูโครสอย่างไร โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด คือ ตัวอย่างที่ประกอบด้วย

- ซูโครสและกลูโคส
- ซูโครสและฟรักโทส
- ซูโครส กลูโคสและฟรักโทส

สารละลายที่บรรจุในบีกเกอร์คืออะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ pH 4.80 โดยซูโครสมีความเข้มข้น 0.10 , 0.40 และ 1.00 โมลาร์ ซึ่งแต่ละความเข้มข้นนี้จะมีปริมาณกลูโคสหรือฟรักโทส หรือทั้งกลูโคสและฟรักโทสอย่างละ 0.02 , 0.05 , 0.10 , 0.40 และ 1.00 โมลาร์ ผสมอยู่ด้วย

2.5.6 ผลของไอออนของโลหะหนักที่มีต่อซูโครส

ในน้ำตาลดิบ (Raw sugar) พบว่า จะมีปริมาณทองแดง (II) (Cu^{2+}) อยู่ 1.22 ppm และเงิน (I) (Ag^{+}) อยู่ 0.0002 ppm (Meade and Chen , 1977) เนื่องจากไอออนโลหะหนักเหล่านี้สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทส (Hestrin , Feingold and Schramm , 1955 ; Ohlenbusch and Vogele , 1974) จึงศึกษาเพื่อดูว่าไอออนของทองแดง (II) และเงิน (I) จะมีผลยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์ในการวิเคราะห์ซูโครสหรือไม่ โดยใช้สารละลายซูโครส 0.10 , 0.40 และ 0.70 โมลาร์ ซึ่งแต่ละความเข้มข้นจะมีปริมาณทองแดง (II) หรือเงิน (I) 0.0 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 3.0 ppm และ 0.0 , 5.0 , 10.0 , 20.0 ppm ตามลำดับ และใช้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ pH 4.80 เป็นสารละลายที่อยู่ในบีกเกอร์

2.5.7 ช่วงความเข้มข้นที่ให้การตอบสนองเชิงเส้น

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่างของแต่ละเทคนิคสารตัวอย่างควรจะมีความเข้มข้นอยู่ในช่วงที่ให้ผลการตอบสนองเชิงเส้น ทั้งนี้เป็นเพราะช่วงความเข้มข้นที่ให้การตอบสนองเป็นเส้นตรงจะคำนวณได้ง่าย และให้ค่าการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแน่นอน ในการศึกษาเพื่อหาช่วงการตอบสนองเชิงเส้นนี้ใช้สารละลายซูโครส 0.10 , 0.30 , 0.50 , 0.70 และ 1.00 โมลาร์ และใช้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ pH 4.80 เป็นสารละลายที่อยู่ในบีกเกอร์

2.6 การใช้ปิเปตที่ควบคุมการฉีดสารละลายตัวอย่างด้วยเครื่อง EDOS 5221

จากการใช้ไมโครปิเปตแบบดิจิตอลที่ควบคุมการฉีดสารละลายด้วยมือ พบว่าเป็นการยากในการที่จะควบคุมน้ำหนักมือที่กดลงบนปิเปตเพื่อฉีดสารละลายตัวอย่างด้วยอัตราเร็วคงที่ ทำให้สัญญาณการตอบสนองที่ได้มีขนาดไม่เท่ากัน และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลการทดลองค่อนข้างสูงประมาณ 11-18% ดังนั้นในแต่ละการทดลองจึงใช้เวลาในการวิเคราะห์ค่อนข้างมาก เนื่องจากต้องมีการฝึกฉีดสารตัวอย่างในระยะต้นเพื่อควบคุมน้ำหนักมือให้สม่ำเสมอ จนได้สัญญาณการ

ตอบสนองที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ดังนั้นในช่วงหลังจึงนำชุดอุปกรณ์ปิเปตที่มีระบบควบคุมอัตราการฉีดสารละลายตัวอย่างมาใช้ในการวิเคราะห์ เพื่อลดปัญหาดังกล่าว

2.6.1 ผลของอัตราเร็วที่ใช้ในการฉีดสารละลาย

ไมโครปิเปต EDOS 5221 (Eppendorf , Germany) มีระบบควบคุมอัตราเร็วที่ใช้ในการฉีดให้เป็นไปอย่างสม่ำเสมอและสามารถตั้งอัตราเร็วในสเกลตั้งแต่ 1 - 8 โดยตัวเลขที่เพิ่มขึ้นหมายถึงอัตราเร็วในการฉีดสารละลายที่เพิ่มขึ้น อัตราเร็วที่ใช้ในการฉีดสารละลายจะมีผลต่อการแพร่กระจายของสารในขณะที่ทำการวิเคราะห์ อัตราเร็วที่เหมาะสมคืออัตราเร็วที่จะให้ค่าการตอบสนองสูงและมีค่าเบี่ยงเบนน้อย ซึ่งจะทำให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ การทดลองนี้ใช้สารละลายซูโครสที่มีความเข้มข้น 0.10 , 0.30 และ 0.50 โมลาร์ ฉีดลงบนเทอร์มิสเตอร์ด้วยอัตราเร็ว 1 , 3 , 4 , 5 และ 7 ซึ่งอัตราเร็ว 1 จะหมายถึงอัตราเร็วการฉีดสารละลายที่ช้าที่สุด

2.6.2 ผลของระยะห่างระหว่างปลายปิเปตกับเทอร์มิสเตอร์

ในการทดลองฉีดสารละลายลงไปบนเทอร์มิสเตอร์หากตำแหน่งของปิเปตห่างจากเทอร์มิสเตอร์เป็นระยะทางที่ไม่เหมาะสมอาจจะทำให้สารตัวอย่างหรือความร้อนที่เกิดจากปฏิกิริยาแพร่กระจายออกไปก่อนที่เทอร์มิสเตอร์จะตรวจวัดได้ ทำให้การตอบสนองที่ได้มีค่าน้อย ซึ่งจะไปทำให้ผลการวิเคราะห์มีค่าความผิดพลาดเกิดขึ้นได้มาก ในการศึกษาเพื่อหาระยะห่างที่เหมาะสมระหว่างปลายปิเปตกับเทอร์มิสเตอร์นี้จะฉีดสารละลายซูโครส 0.30 โมลาร์ เนื่องจากเป็นความเข้มข้นของซูโครสที่มีอยู่ในน้ำอ้อยซึ่งจะใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาขั้นต่อไป โดยกำหนดให้ระยะห่างระหว่างปลายปิเปตกับเทอร์มิสเตอร์ เป็น 1.0 , 2.0 , 3.0 , 4.0 และ 5.0 มิลลิเมตร และใช้อัตราเร็วของการฉีดที่ 4 ซึ่งพบว่าเป็นอัตราเร็วที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลอง 2.6.1

2.6.3 ผลของปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง

เมื่อสารละลายตัวอย่างที่ฉีดลงบนเทอร์มิสเตอร์มีปริมาตรเพิ่มขึ้นสัญญาณการตอบสนองที่ได้ก็ควรจะเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามสัญญาณการตอบสนองนี้จะขึ้นกับความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาด้วย ดังนั้นจึงน่าจะมีปริมาตรที่เหมาะสมค่าหนึ่งซึ่งจะทำให้ได้สัญญาณการตอบสนองที่สมดุลกับอัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ในการทดลองนี้ใช้สารละลายซูโครส 0.30 โมลาร์ โดยทดสอบที่ปริมาตรของสารละลาย 10 , 15 , 20 , 25 , 30 และ 50 ไมโครลิตร ใช้ระยะห่างระหว่างปลายปิเปตกับตัวตรวจวัด 2 มิลลิเมตร และใช้อัตราเร็วในการฉีดที่ 4

2.6.4 ความแตกต่างของน้ำอ้อยที่มีการตกตะกอนและไม่มีการตกตะกอนสารแขวนลอย

ในน้ำอ้อยจะมีสารแขวนลอยประเภทโปรตีน แป้ง และไขมัน (Meade and Chen , 1977) ซึ่งอาจจะทำให้ผลการวิเคราะห์แตกต่างไปจากเมื่อไม่มีสารแขวนลอย ดังนั้นจึงทำการศึกษา

เพื่อดูว่าหากมีการตกตะกอนสารเหล่านี้ออกไปโดยการเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) จะให้ผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างจากน้ำอ้อยที่ไม่มีการตกตะกอนอย่างไร โดยจะพิจารณาน้ำอ้อยที่ได้จากส่วนต่างๆ ของอ้อยด้วย นั่นคือจะใช้อ้อยซึ่งยาวประมาณ 230 เซนติเมตร แล้วตัดปลายทั้งสองทิ้งปลายละ 15 เซนติเมตร จากนั้นตัดเป็นท่อนๆ ละ 40 เซนติเมตร 5 ท่อน แล้วนำแต่ละท่อนไปเข้าเครื่องหีบเพื่อเก็บน้ำอ้อย น้ำอ้อยแต่ละตัวอย่างจะถูกแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งจะไม่ทำการเซนตริฟิวจ์ (raw juice) อีกส่วนหนึ่งนำไปทำการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้น้ำอ้อยจากส่วนใส และนำตัวอย่างที่เตรียมไว้ทั้ง 2 ส่วนนี้ไปทำการวิเคราะห์

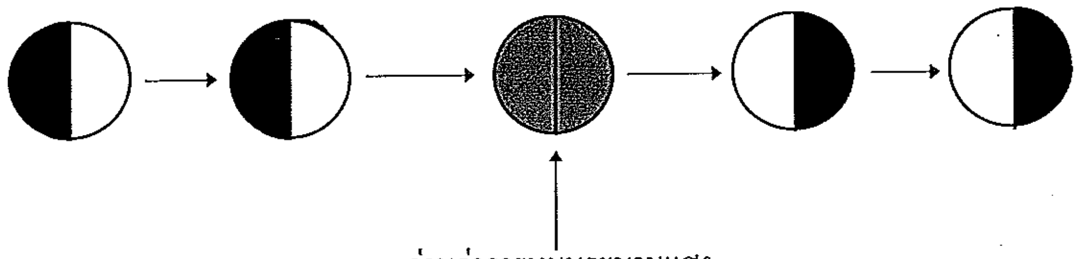
2.7 การเปรียบเทียบเทคนิค BIA กับเทคนิคอื่น

2.7.1 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสระหว่างเทคนิค BIA กับเทคนิคโพลาริเมตริก

2.7.1.1 การวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในสารละลายมาตรฐาน

ทำการศึกษาเพื่อดูว่าในการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสจากสารละลายมาตรฐาน ค่าที่ได้จากเทคนิค BIA กับค่าที่ได้จากเทคนิคโพลาริเมตริกมีความแตกต่างกันอย่างไร โดยเตรียมสารละลายซูโครสมาตรฐานในอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ pH 4.80 ที่ความเข้มข้น 0.10 , 0.20 , 0.30 , 0.40 และ 0.50 โมลาร์ เพื่อใช้ในการหาคาลิเบรทชันเคิร์ฟ (Calibration curve) จากนั้นเตรียมสารละลายซูโครสมาตรฐาน 0.10 , 0.15 , 0.20 , 0.25 , 0.30 , 0.35 , 0.40 และ 0.50 โมลาร์ เป็นสารละลายตัวอย่าง และนำไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค BIA และเทคนิคโพลาริเมตริก ค่าที่ได้ของทั้งสองเทคนิคดังกล่าวจะนำมาคำนวณเป็นความเข้มข้นของซูโครสจากคาลิเบรทชันเคิร์ฟในแต่ละเทคนิค

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโพลาริเมตริกนี้ ทำโดยนำสารละลายซูโครสมาตรฐานที่เตรียมไว้มาใส่หลอดที่ใช้สำหรับวัดองศาการหมุนระนาบแสง ซึ่งมีขนาดความยาว 200 มิลลิเมตร แล้ววางบนแท่นตัวอย่างจากนั้นปรับจนมองเห็นแถบมืดกับแถบสว่างเป็นแถบเดียวกัน ดังภาพประกอบ 9 แล้วจึงอ่านค่าการหมุนระนาบแสงของสารละลายมาตรฐานซูโครส



ภาพประกอบ 9 แถบมืดกับแถบสว่างในเทคนิคโพลาริเมตริก

2.7.1.2 การวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในน้ำอ้อย

การเตรียมตัวอย่างของเทคนิค BIA

จากผลการทดลองข้อ 2.6.4 พบว่า โปรตีน แป้ง และไขมัน ที่มีอยู่ในน้ำอ้อยจะไม่มีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสโดยเทคนิค BIA ดังนั้นจึงใช้น้ำอ้อยดิบในการวิเคราะห์ แต่จะทำการเจือจางน้ำอ้อยในแต่ละตัวอย่างด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ pH 4.80 เพื่อให้มีความเข้มข้นของน้ำอ้อยต่างๆ กัน ดังนี้ 40% , 60% , 80% , 100% โดยปริมาตรต่อปริมาตร (V/V) และใช้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์เดียวกันนี้เป็นสารละลายที่อยู่ในบีกเกอร์

การเตรียมตัวอย่างของเทคนิคโพลาริเมตริก

สารตัวอย่างที่จะนำมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโพลาริเมตริกได้นั้นต้องมีลักษณะใส ไม่มีสี น้ำอ้อยดิบนั้นจะมีลักษณะขุ่น เนื่องจากมีสารพวกโปรตีน แป้ง และไขมันอยู่ ดังนั้นจึงต้องนำตัวอย่างน้ำอ้อยมาทำการตกตะกอนสารแขวนลอยเหล่านี้ด้วยตะกั่วอะซิเตท (lead acetate) ในอัตราส่วน 1.0 กรัมต่อตัวอย่างน้ำอ้อย 100 มิลลิลิตร คนสารละลายเพื่อให้สารนี้กระจายตัวทั่วตัวอย่าง แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เพื่อให้ตะกอนที่เกิดขึ้นจับรวมตัวกันจนแยกตัวให้เห็นน้ำอ้อยใส นำไปกรองแยกตะกอนออกด้วยกระดาษกรอง (whatman เบอร์ 1) ในกรวย ขณะกรองให้ปิดปากกรวยเพื่อป้องกันการระเหยของตัวอย่าง หากเติมตะกั่วอะซิเตทมากเกินไป จะทำให้สารละลายที่กรองได้นั้นมีลักษณะขุ่น ซึ่งสามารถแก้ไขได้ด้วยการเติมโพแทสเซียมออกซาเลตลงไปในอัตราส่วน 0.25 กรัมต่อตัวอย่างน้ำอ้อย 100 มิลลิลิตร (Meade and Chen , 1977) จากนั้นจึงนำตัวอย่างที่กรองได้ไปทำการวิเคราะห์

2.7.2 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสในน้ำอ้อยระหว่างเทคนิค BIA กับเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริก

การเตรียมตัวอย่างของเทคนิค BIA

เตรียมเช่นเดียวกับ 2.7.1.2 โดยให้มีความเข้มข้นของน้ำอ้อย 40% , 50% , 60% , 70% , 80% , 90% , 100% โดยปริมาตรต่อปริมาตร (V/V) แล้วจึงนำไปทำการวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่างของเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริก

เนื่องจากเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริก จะมีช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์กลูโคสอยู่ในช่วง 0.0014 (25 mg/dl) - 0.0167 (300 mg/dl) โมลาร์ (Sigma , n.d.) ดังนั้นจึงต้องนำน้ำอ้อยแต่ละตัวอย่าง ซึ่งเตรียมสำหรับเทคนิค BIA มาเจือจาง 100 เท่าด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ pH 4.80 แล้วจึงนำแต่ละตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสซึ่งประกอบด้วยสารละลายต่างๆ ดังนี้

แบลงค์ (Blank) คือ บัฟเฟอร์ที่ไม่มีสารตัวอย่าง (ซูโครส) ซึ่งถือเป็นหลอดอ้างอิง

สารละลายมาตรฐาน (Standard) คือ สารละลายซูโครสมาตรฐานซึ่งทราบความเข้มข้นที่แน่นอน

สารตัวอย่าง (Sample) คือ น้ำอ้อยที่ต้องการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครส เนื่องจากการวิเคราะห์วิธีนี้จะหาปริมาณซูโครสในรูปของน้ำตาลกลูโคสประกอบน้ำอ้อยจะมีทั้งกลูโคสและซูโครสผสมกันอยู่ ดังนั้นจึงต้องแบ่งสารตัวอย่างที่เป็นน้ำอ้อยเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งทำการวิเคราะห์หากลูโคสก่อนการย่อยสลายซูโครส อีกส่วนหนึ่งวิเคราะห์หากลูโคสหลังจากการย่อยสลายซูโครส โดยมีเอนไซม์อินเวอร์เทสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครส สรุปเป็นขั้นตอนดังนี้

แบลงค์ (Blank)	สารละลายมาตรฐาน	สารตัวอย่าง: การย่อยซูโครสไปเป็นกลูโคสกับฟรักโทส (Inversion) ก่อน	สารตัวอย่าง: การย่อยซูโครสไปเป็นกลูโคสกับฟรักโทส (Inversion) หลัง
1.8 mL น้ำ	1.8 mL น้ำ	1.8 mL น้ำ	1.8 mL น้ำ
0.2 mL อะซิเตทบัฟเฟอร์	0.2 mL ซูโครส	0.2 mL สารตัวอย่าง	0.2 mL สารตัวอย่าง
0.1 mL น้ำ	0.1 mL อินเวอร์เทส	0.1 mL น้ำ	0.1 mL อินเวอร์เทส

* **ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครส** แล้วนำทุกหลอดมาเติมแบเรียมไฮดรอกไซด์และสังกะสีซัลเฟตอย่างละ 1.0 มิลลิลิตร เพื่อทำให้เกิดการตกตะกอนของสารแขวนลอยที่มีอยู่ในน้ำอ้อย เช่น โปรตีน แป้ง และไขมัน

** **นำไปเซนตริฟิวจ์** (centrifuge) ด้วยความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้สารแขวนลอยตกตะกอนแล้วจึงนำ 0.5 มิลลิลิตรของส่วนใสของแต่ละหลอดเติมลงในสารละลายผสมระหว่างเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส กลูโคสออกซิเดส และออโธ-ไดอะนิสิดีนหลอดละ 5.0 มิลลิลิตร

*** **ตั้งทิ้งไว้ เป็นเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง** เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสไปเป็นกรดกลูโคนิก (Gluconic acid) กับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ โดยมีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับออโธ-ไดอะนิสิดีน (ไม่มีสี) โดยการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (Peroxidase) ได้เป็นสารประกอบของออโธ-ไดอะนิสิดีนที่มีสีน้ำตาลเกิดขึ้น

**** **วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร (nm)** โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะเป็นสัดส่วนตรงกับปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ซึ่งจากผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างก่อนและหลังการย่อยสลายซูโครสสามารถนำมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของซูโครสที่มีอยู่ในสารตัวอย่างได้จากคาลิเบรทชันเคิร์ฟที่ได้จากสารละลายซูโครสมาตรฐาน

2.8 การวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในน้ำกระป๋องด้วยเทคนิค BIA

ใช้เทคนิค BIA วิเคราะห์หาปริมาณซูโครสของน้ำกระป๋องชนิดต่างๆ และใช้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ pH 4.80 เป็นสารละลายที่อยู่ในบีกเกอร์ และเปรียบผลการวิเคราะห์ที่ได้กับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ผู้ผลิตระบุไว้

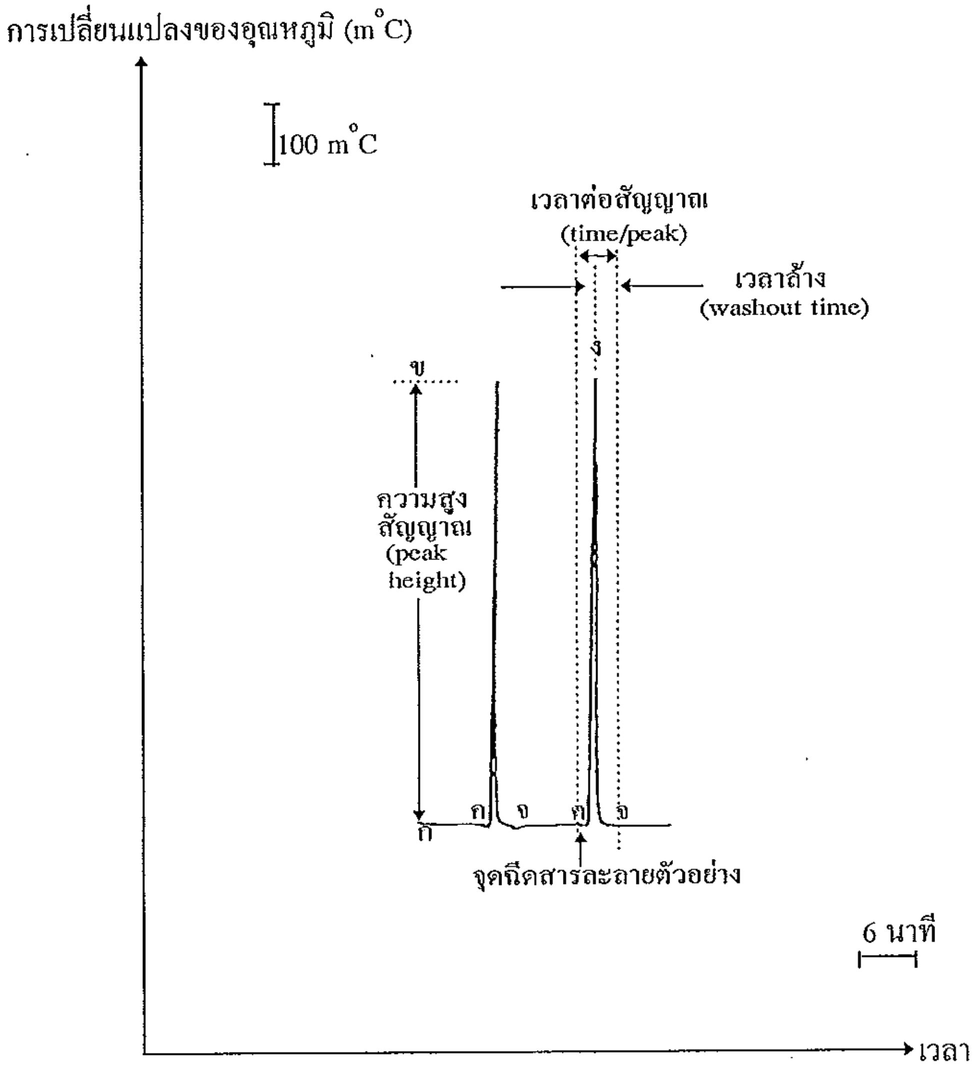
บทที่ 3

ผลและการอภิปรายผล

3.1 ลักษณะทั่วไปของสัญญาณ

ในระบบ BIA นี้หากไม่ฉีดสารละลายตัวอย่างลงบนเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัดจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ วงจรวีตสโตนบริดจ์จะอยู่ในสภาวะสมดุลค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่เท่ากับศูนย์ และสัญญาณที่ได้มีลักษณะเป็นเส้นตรงเรียกว่าเบสไลน์ (ภาพประกอบ 10 ก) เมื่อฉีดสารละลายตัวอย่างลงบนเทอร์มิสเตอร์สารละลายตัวอย่างจะทำปฏิกิริยากับสารละลายในบีกเกอร์หรือสารที่ตรึงไว้บนเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัดทำให้เกิดความร้อนนั่นคือเกิดการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ในรูปของความต่างศักย์ไฟฟ้าของวงจรวีตสโตนบริดจ์ในขณะที่วงจรบริดจ์ไม่สมดุล โดยที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น จากนั้นสารละลายตัวอย่างและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาจะถูกล้างออกไปจากผิวของเทอร์มิสเตอร์โดยสารละลายที่อยู่ในบีกเกอร์ซึ่งมีการคนอยู่ตลอดเวลาทำให้สัญญาณที่เกิดขึ้นมีค่าลดลงจนกลับสู่เบสไลน์พร้อมที่จะทำการวิเคราะห์ครั้งต่อไป ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างข้อมูลที่ใช้คือความสูงของสัญญาณการตอบสนองที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของปฏิกิริยา (ก-ข) โดยที่ความสูงของสัญญาณจะเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง ช่วงเวลาต่างๆ ที่วัดได้จากระบบ BIA เมื่อทดลองกับปฏิกิริยากรด-เบสและปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ พอสรุปได้ดังนี้

ช่วง	ปฏิกิริยากรด-เบส (วินาที)	ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (วินาที)
เวลาจากเมื่อเริ่มฉีดสารตัวอย่างจนถึงจุดที่เริ่มให้สัญญาณการตอบสนอง	1 - 2	3 - 4
เวลาในการล้างสารต่างๆ ออกจากเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัดเพื่อให้สัญญาณคืนสู่เบสไลน์ (ง-ข)	40 - 80	110 - 140
เวลาต่อหนึ่งสัญญาณ (ค-ข)	45 - 90	115 - 170
จำนวนครั้งที่สามารถวิเคราะห์ได้ต่อหนึ่งชั่วโมง	40 - 80 ครั้ง	20 - 30 ครั้ง



ภาพประกอบ 10 ตัวอย่างสัญญาณการตอบสนองจากระบบ BIA ที่ได้จากการวัดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ

ก-ข : ความสูงของสัญญาณการตอบสนอง

ค : จุดฉีดสารละลายตัวอย่าง

ง-จ : เวลาในการล้างสารต่างๆ ออกจากเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัดเพื่อให้สัญญาณคืนสู่เบสไลน์

ค-จ : เวลาต่อสัญญาณ

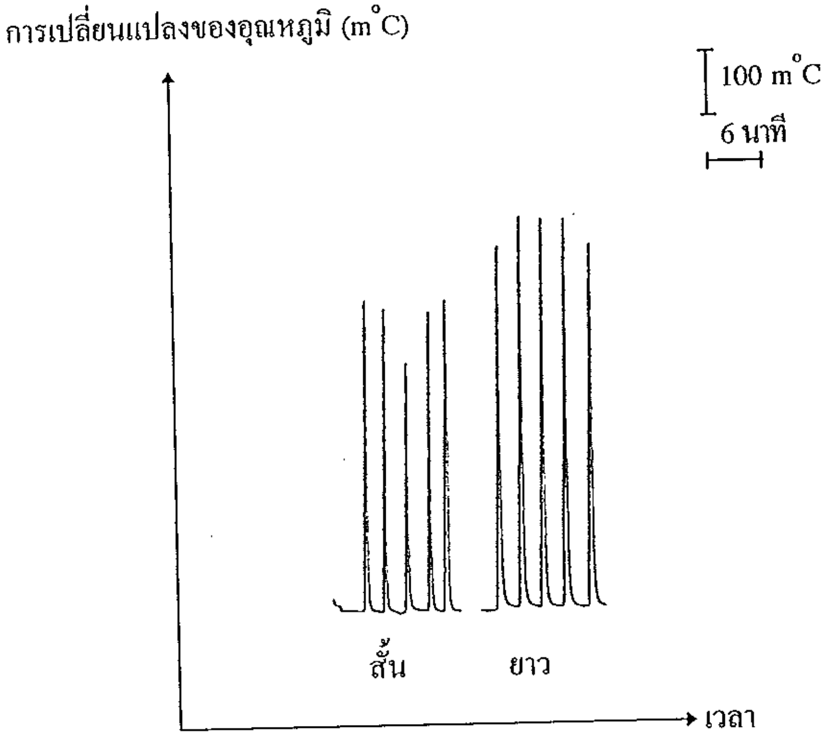
3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยพื้นฐานของระบบ BIA

3.2.1 ผลของความยาวของปลอกเทอร์มิสเตอร์

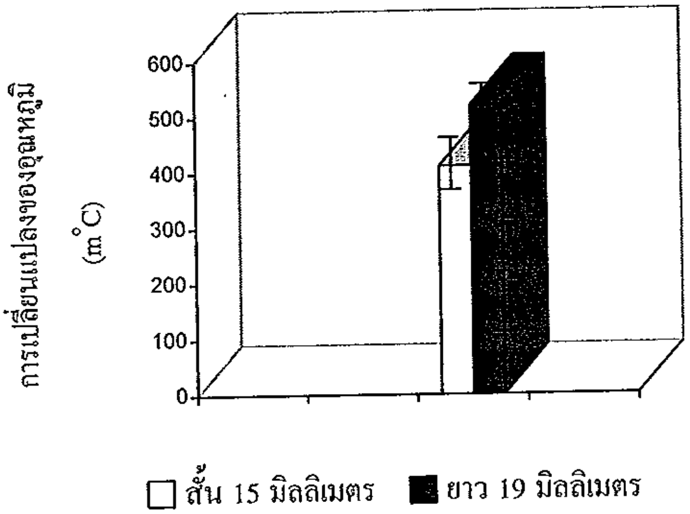
จากการศึกษาผลของความยาวของปลอกเทอร์มิสเตอร์ที่มีต่อสัญญาณการเพิ่มของอุณหภูมิ (2.4.1) โดยทำการทดลองจำนวน 3 ชุด พบว่าในปลอกเทอร์มิสเตอร์แบบสั้นนั้นสัญญาณที่บันทึกได้จะน้อยกว่าปลอกเทอร์มิสเตอร์แบบยาว (ตาราง 1 ภาพประกอบ 11 และภาพประกอบ 12) แต่จะใช้เวลาต่อสัญญาณน้อยกว่า (ตาราง 1 ภาพประกอบ 13) โดยที่ปลอกเทอร์มิสเตอร์แบบสั้นให้การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเฉลี่ย 3 ชุด เท่ากับ 86 $\pm$ 8 % และเวลาต่อสัญญาณเป็น 79 $\pm$ 1 % ของปลอกเทอร์มิสเตอร์แบบยาว ตามลำดับ ทั้งนี้น่าจะเนื่องจากเมื่อปลอกเทอร์มิสเตอร์มีขนาดยาวขึ้น อัตราในการแพร่กระจายของสารละลายตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ และความร้อนที่เกิดขึ้นเกิดได้ช้า ถึงแม้ว่าปลอกเทอร์มิสเตอร์แบบสั้นจะให้การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้อยกว่าปลอกเทอร์มิสเตอร์แบบยาวแต่ก็ไม่มากนัก ประกอบกับใช้เวลาต่อสัญญาณน้อยกว่าแบบยาวทำให้สามารถวิเคราะห์ผลได้รวดเร็ว ดังนั้นจึงเลือกใช้ปลอกเทอร์มิสเตอร์แบบสั้นในการศึกษาสภาวะอื่นๆ ต่อไป

ตาราง 1 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและเวลาต่อสัญญาณเมื่อใช้ปฏิกิริยากรด-เบสที่ความยาวของปลอกเทอร์มิสเตอร์ต่างกัน

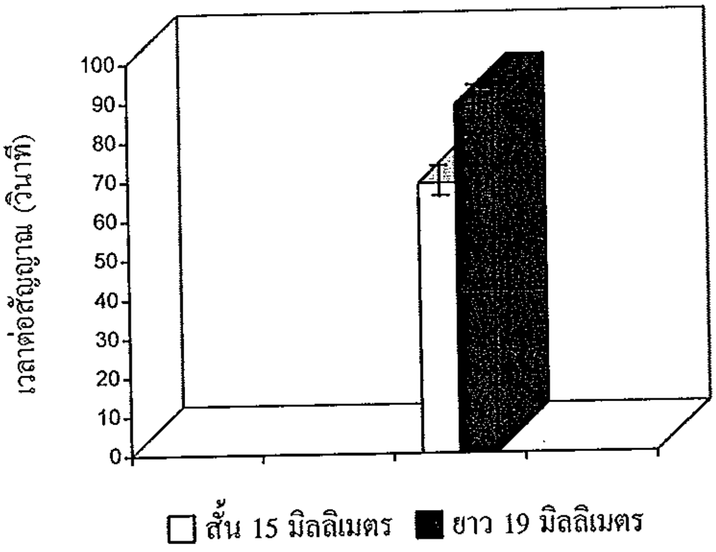
ความยาวของปลอกเทอร์มิสเตอร์	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (m°C)			เวลาต่อสัญญาณ (วินาที)		
	ชุดที่			ชุดที่		
	1	2	3	1	2	3
สั้น 15 มิลลิเมตร	410±50	470±50	440±100	69±3	72±2	66±3
ยาว 19 มิลลิเมตร	520±40	550±10	470±80	89±4	90±3	82±7



ภาพประกอบ 11 ตัวอย่างสัญญาณจากระบบ BIA ที่วัดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิจากปฏิกิริยาของกรดไนตริก 0.50 โมลาร์ กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 โมลาร์ เพื่อศึกษาผลของความยาวของปลอกเทอร์มิสเตอร์ โดยใช้ปริมาตรของกรดไนตริก 25 ไมโครลิตร อัตราเร็วในการคนสารละลาย 300 รอบต่อนาที และปลายปิเปตห่างจากผิวของเทอร์มิสเตอร์ 2.0 มิลลิเมตร



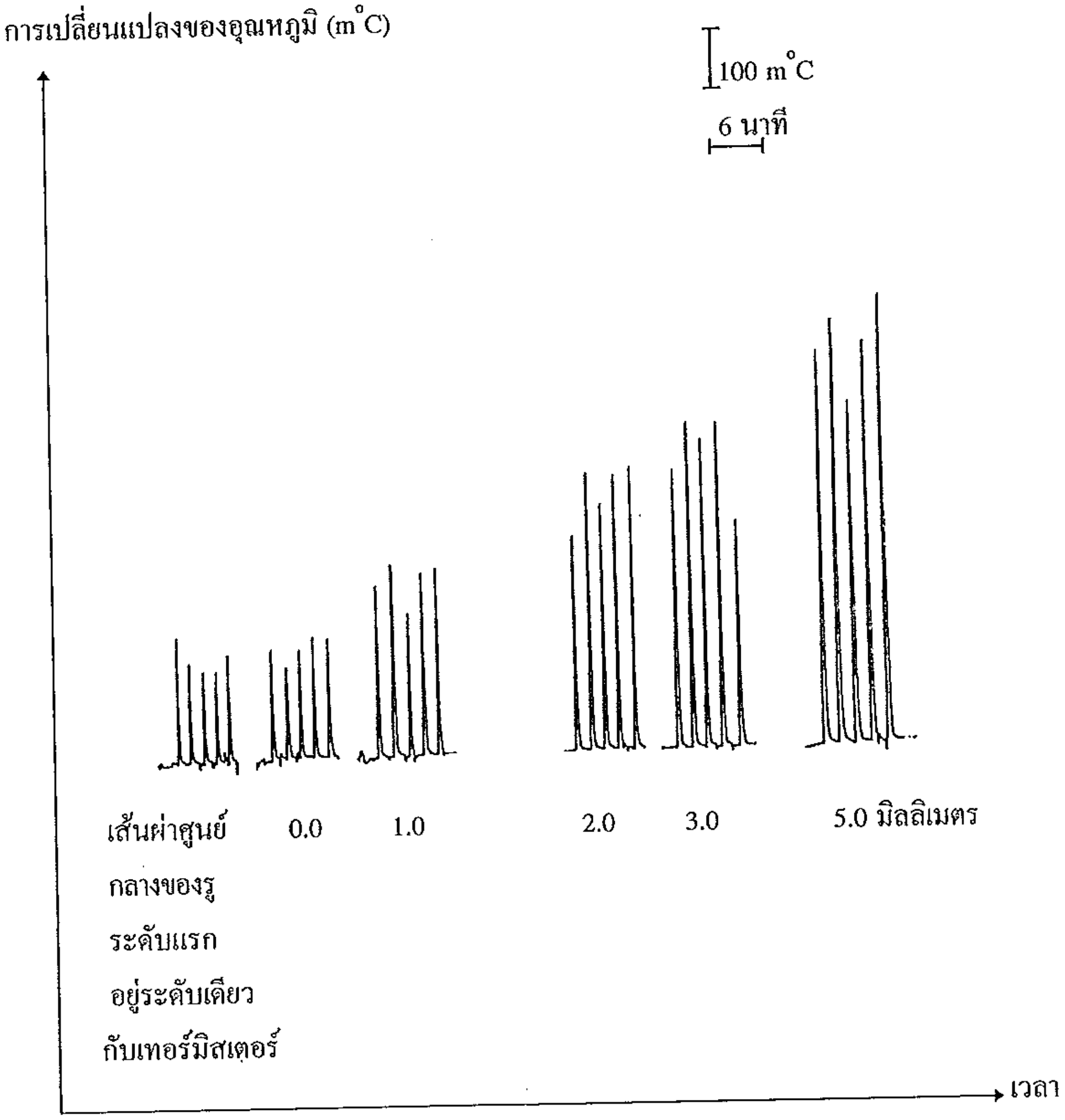
ภาพประกอบ 12 ผลของความยาวของปลอกเทอร์มิสเตอร์ต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (ชุดที่ 1 จากตาราง 1 ชุดอื่นให้ผลลักษณะเดียวกัน)



ภาพประกอบ 13 ผลของความยาวของปลอกเทอร์มิสเตอร์ต่อเวลาต่อสัญญาณ (ชุดที่ 1 จากตาราง 1 ชุดอื่นให้ผลลักษณะเดียวกัน)

3.2.2 ผลของระยะห่างจากผิวเทอร์มิสเตอร์ของรูของปลอกเทอร์มิสเตอร์

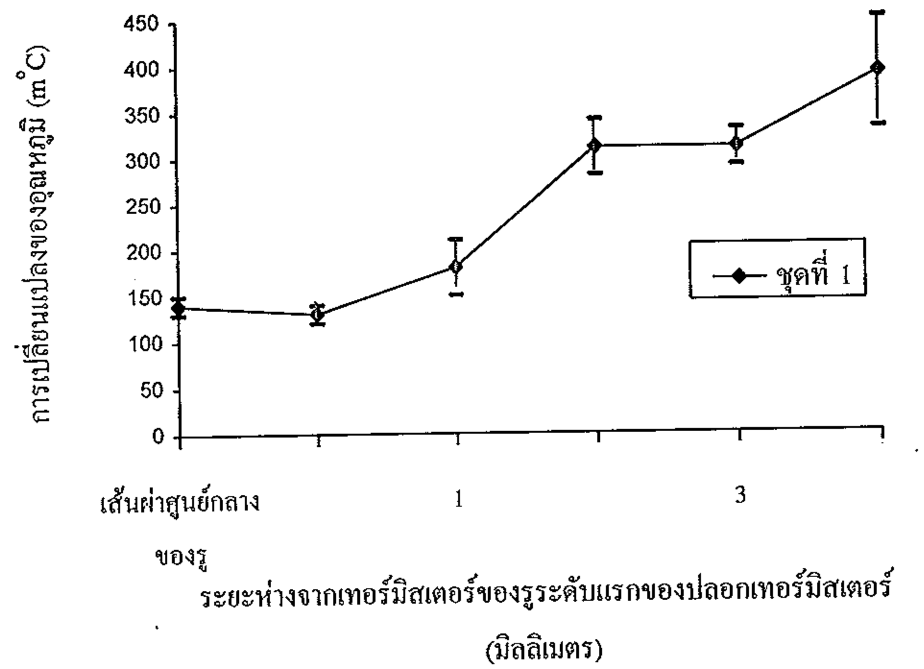
ในการศึกษาผลของระยะห่างจากผิวเทอร์มิสเตอร์ของรูระดับแรกของปลอกเทอร์มิสเตอร์ (2.4.2) ทำการทดลองจำนวน 3 ชุด พบว่า เมื่อรูระดับแรกของปลอกเทอร์มิสเตอร์ห่างจากเทอร์มิสเตอร์เพิ่มขึ้น ขนาดของสัญญาณเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิจะสูงขึ้น (ตาราง 2 ภาพประกอบ 14 และ 15) แต่จะใช้เวลาต่อสัญญาณเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน (ตาราง 2 ภาพประกอบ 16) เนื่องจากเมื่อรูปลอกเทอร์มิสเตอร์อยู่ห่างจากเทอร์มิสเตอร์มากขึ้นอัตราเร็วในการแพร่กระจายของสารละลายตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ และความร้อนที่เกิดขึ้นที่ผิวเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัดเกิดได้ช้า และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของสัญญาณและเวลาต่อสัญญาณที่ระยะห่างของรูระดับแรกของปลอกเทอร์มิสเตอร์จากเทอร์มิสเตอร์ ทั้ง 6 ระยะ โดยใช้ ANOVA พบว่า ความแตกต่างมีนัยสำคัญระหว่างผลการทดลอง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ที่ระยะเส้นผ่าศูนย์กลางของรูระดับแรกอยู่ในระดับเดียวกับเทอร์มิสเตอร์ ระยะขอบล่างของรูระดับแรกอยู่สูงจากเทอร์มิสเตอร์ 0.0 และ 1.0 มิลลิเมตร มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิต่ำ กลุ่มที่ 2 ที่ระยะขอบล่างของรูระดับแรกอยู่สูงจากเทอร์มิสเตอร์ 2.0 กับ 3.0 มิลลิเมตร ให้การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิสูงขึ้น และกลุ่มที่ 3 ที่ระยะขอบล่างของรูระดับแรกอยู่สูงจากเทอร์มิสเตอร์ 5.0 มิลลิเมตร มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิสูงที่สุด ในการเลือกระยะที่เหมาะสมจะพิจารณาควบคู่กันไปทั้งการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและเวลาต่อสัญญาณที่ใช้ ดังนั้นจึงเลือกระยะห่างจากเทอร์มิสเตอร์ของรูปลอกเทอร์มิสเตอร์คือ 2.0 มิลลิเมตร ในการศึกษาสภาวะอื่นต่อๆ ไป เนื่องจากที่ระยะนี้มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิสูงกว่าอีกสามระยะแรกอย่างมีนัยสำคัญและใช้เวลาน้อยกว่าอีกสองระยะถัดไป



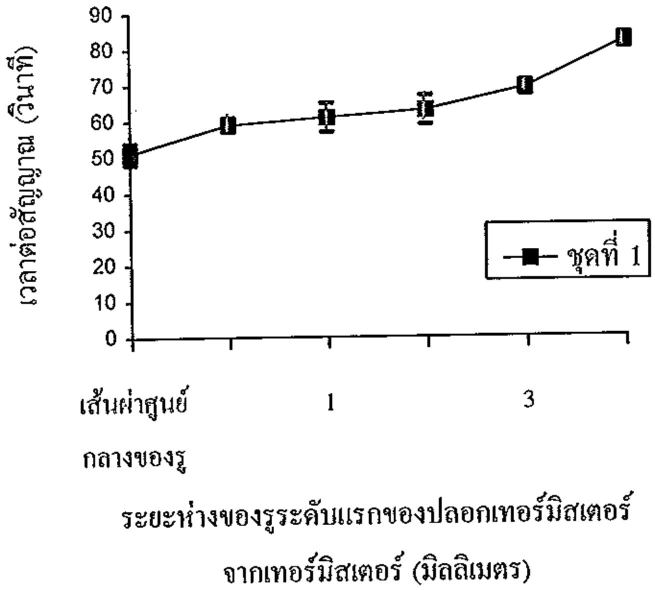
ภาพประกอบ 14 ตัวอย่างสัญญาณที่ได้จากการศึกษาระยะห่างจากเทอร์มิสเตอร์ของรูระดับแรกของปลอกเทอร์มิสเตอร์เมื่อใช้กรดไนตริก 0.50 โมลาร์ กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 โมลาร์ โดยใช้ปริมาตรของกรดไนตริก 25 ไมโครลิตร อัตราเร็วในการคนสารละลาย 300 รอบต่อนาที และปลายปิเปตห่างจากผิวของเทอร์มิสเตอร์ 2.0 มิลลิเมตร

ตาราง 2 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและเวลาต่อสัญญาณที่มีระยะห่างของรูระดับแรกของปลอกเทอร์มิสเตอร์ต่างกัน

ระยะห่างจากผิวเทอร์มิสเตอร์ของรูระดับแรกของปลอกเทอร์มิสเตอร์ (มิลลิเมตร)	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (m°C)			เวลาต่อสัญญาณ (วินาที)		
	ชุดที่			ชุดที่		
	1	2	3	1	2	3
เส้นผ่าศูนย์กลางของรูแรกอยู่ระดับเดียวกับเทอร์มิสเตอร์	140±10	140±20	140±10	51±3	52±1	46±2
0.0	130±10	140±10	150±10	59±2	56±3	54±3
1.0	180±30	240±40	210±40	61±4	62±2	59±3
2.0	310±30	360±70	360±30	63±4	62±2	70±3
3.0	310±20	400±70	380±40	69±2	66±3	77±5
5.0	390±60	540±60	480±60	82±2	75±3	89±4



ภาพประกอบ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับระยะห่างจากเทอร์มิสเตอร์ของรูระดับแรกของปลอกเทอร์มิสเตอร์ (ชุดที่ 1 จากตาราง 2 ชุดอื่นให้ผลลักษณะเดียวกัน)



ภาพประกอบ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาต่อสัญญาณกับระยะห่างจากเทอร์มิสเตอร์ของรูระดับแรกของปลอกเทอร์มิสเตอร์ (ชุดที่ 1 จากตาราง 2 ชุดอื่นให้ผลลักษณะเดียวกัน)

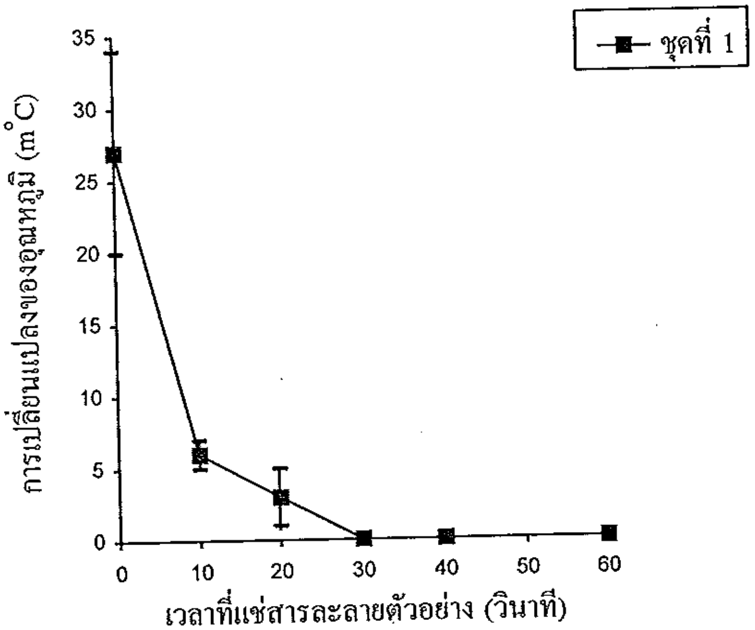
3.2.3 เวลาที่ทำให้เกิดสมดุลอุณหภูมิระหว่างสารละลายตัวอย่างในปิเปตกับสารละลายในบีกเกอร์

เวลาในการเกิดสมดุลอุณหภูมิระหว่างสารละลายตัวอย่างกับสารละลายที่อยู่ในบีกเกอร์ (2.4.3) คือเวลาที่ใช้ในการแช่ปลายปิเปตที่มีสารละลายตัวอย่างในสารละลายที่อยู่ในบีกเกอร์ เพื่อทำให้อุณหภูมิของสารละลายตัวอย่างและสารละลายในบีกเกอร์เท่ากัน สารละลายตัวอย่างที่ใช้ คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นสารละลายชนิดเดียวกันกับสารละลายที่อยู่ในบีกเกอร์ ซึ่งเมื่อฉีดลงไปบนเทอร์มิสเตอร์จะไม่มีปฏิกิริยาเคมีเกิดขึ้น ดังนั้นหากฉีดสารละลายตัวอย่างที่มีอุณหภูมิเท่ากับสารละลายในบีกเกอร์ลงบนเทอร์มิสเตอร์ จึงไม่ควรมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ แต่ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงก็แสดงว่าอุณหภูมิในสารละลายตัวอย่างและสารละลายในบีกเกอร์มีความแตกต่างกัน

จากการทดลอง 2 ชุด พบว่า เมื่อแช่ปลายปิเปตไว้ 0 - 20 วินาที จะมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ส่วนที่เวลา $\geq$ 30 วินาที จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (ตาราง 3 ภาพประกอบ 17) ดังนั้นเวลา 30 วินาที คือเวลาที่ทำให้เกิดสมดุลอุณหภูมิระหว่างสารละลายตัวอย่างกับสารละลายที่อยู่ในบีกเกอร์ และได้ใช้เวลา 30 วินาที นี้ในการศึกษาสภาวะอื่นๆ ต่อไป

ตาราง 3 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเมื่อสารละลายตัวอย่างถูกแช่ในสารละลายในบีกเกอร์ที่เวลาต่างๆ กัน

เวลาที่แช่สารละลายตัวอย่างแล้วทำให้เกิดสมดุล (วินาที)	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ($m^{o}C$) ชุดที่	
	1	2
0	27±7	40±10
10	6±1	4±2
20	3±2	3±1
30	0±1	0±1
40	0±1	0±1
60	0±1	0±1



ภาพประกอบ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับเวลาที่แช่สารละลายตัวอย่าง (ชุดที่ 1 จากตาราง 3 ชุดที่ 2 ให้ผลในลักษณะเดียวกัน)

3.2.4 ผลของอัตราเร็วในการคนสารละลาย

จากการศึกษาผลของอัตราเร็วในการคนสารละลาย 100 , 300 และ 400 รอบต่อนาที (2.4.4) โดยทำการทดลอง 3 ชุด พบว่า ขนาดของสัญญาณการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจะสูงที่สุดที่อัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที (ตาราง 4 ภาพประกอบ 18) การที่อัตราเร็ว 400 รอบต่อนาที ให้การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่ต่ำกว่าอาจเนื่องมาจากการที่สารตัวอย่างผลิตภัณฑ์และความร้อนเกิดการแพร่กระจายเร็วเกินไป ส่วนที่อัตราเร็ว 100 รอบต่อนาทีให้การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิต่ำกว่าเช่นกัน น่าจะเป็นเพราะการแพร่กระจายของสารตัวอย่างบริเวณผิวของเทอร์มิสเตอร์มีน้อยเกินไปทำให้เกิดปฏิกิริยาได้น้อย ส่วนเวลาต่อสัญญาณมีค่าน้อยลง เมื่ออัตราเร็วในการคนสารละลายเพิ่มขึ้น (ตาราง 4 ภาพประกอบ 19) เนื่องจากอัตราเร็วในการคนสารละลายเพิ่มขึ้น ทำให้การแพร่กระจายของสารละลายตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ และความร้อนเกิดได้เร็วขึ้น

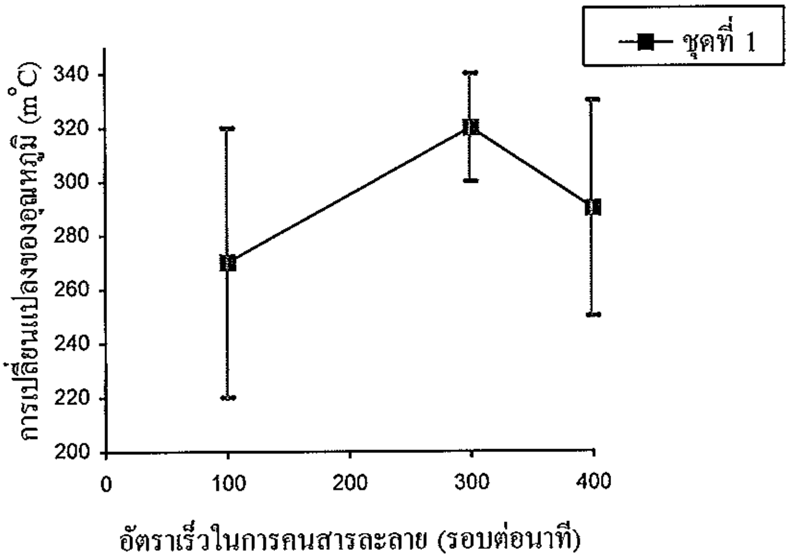
เมื่อพิจารณาแล้วอัตราเร็วในการคนสารละลายที่เหมาะสมที่สุด คือ 300 รอบต่อนาที เนื่องจากให้การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมากที่สุด

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยพื้นฐานของระบบ BIA พอสรุปได้ดังนี้

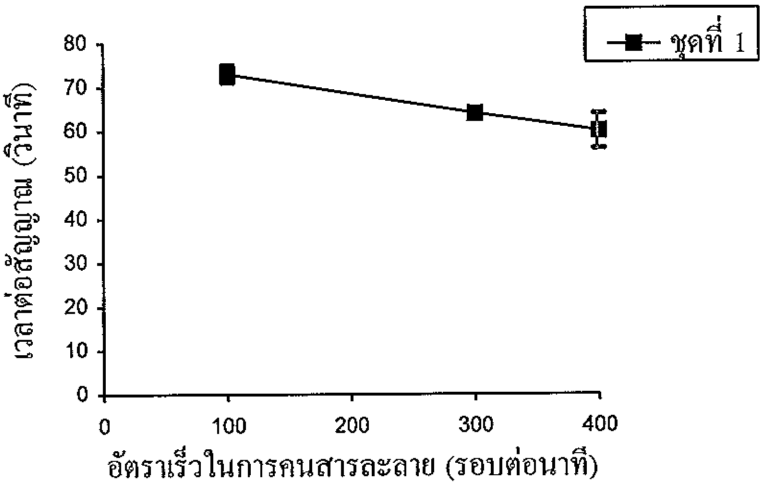
- ความยาวของปลอกเทอร์มิสเตอร์	15 มิลลิเมตร
- ระยะห่างของรูระดับแรกของปลอกเทอร์มิสเตอร์จากเทอร์มิสเตอร์	2 มิลลิเมตร
- เวลาที่ใช้แช่สารละลายตัวอย่าง	30 วินาที
- อัตราเร็วในการคนสารละลาย	300 รอบต่อนาที

ตาราง 4 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและเวลาต่อสัญญาณที่อัตราเร็วในการคนสารละลายต่างกัน

อัตราเร็วในการคน สารละลาย (รอบ/นาที)	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (m°C)			เวลาต่อสัญญาณ (วินาที)		
	ชุดที่			ชุดที่		
	1	2	3	1	2	3
100	270±50	250±30	260±50	73±2	72±5	74±1
300	320±20	290±70	340±50	64±1	60±2	63±1
400	290±40	290±20	320±50	60±4	55±1	57±2



ภาพประกอบ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภู มิกับอัตราเร็วในการคนสารละลาย (ชุดที่ 1 จากตาราง 4 ชุดอื่นให้ผลในลักษณะเดียวกัน)

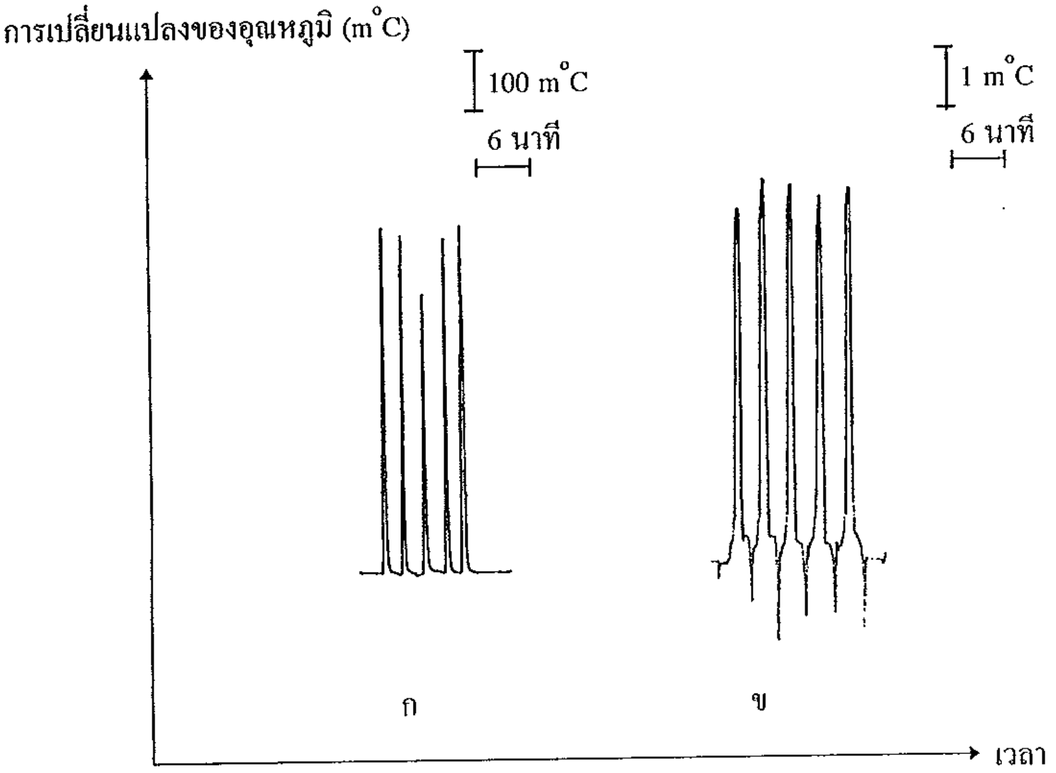


ภาพประกอบ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาต่อสัญญาณกับอัตราเร็วในการคนสารละลาย (ชุดที่ 1 จากตาราง 4 ชุดอื่นให้ผลในลักษณะเดียวกัน)

3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ซูโครส

3.3.1 ลักษณะของสัญญาณ

การวิเคราะห์ซูโครสโดยการวัดความร้อนซึ่งเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครสโดยเอนไซม์อินเวอร์เทสพบว่า ความร้อนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยานี้จะน้อยกว่าปฏิกิริยากรด-เบสอยู่ประมาณ 100 เท่า ดังนั้นในการวัดการตอบสนองจึงต้องมีการขยายสัญญาณเพิ่มขึ้นจากเดิม ทำให้สัญญาณที่เป็นเบสไลน์มีการขยายขนาดตามไปด้วย จึงเห็นเป็นลักษณะขึ้นๆ ลงๆ ไม่เรียบดังเช่นปฏิกิริยากรด-เบส (ภาพประกอบ 20) นอกจากนี้จะเห็นว่าสัญญาณของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครสจะลดลงก่อนที่จะมีการเพิ่มขึ้น (ข) เนื่องจากสารละลายซูโครสที่ใช้ปกติจะเก็บไว้ในตู้เย็นทำให้มีอุณหภูมิต่ำกว่าสารละลายในบีกเกอร์เมื่อนำปิเปตที่มีสารละลายอุณหภูมิต่ำนี้มาจุ่มในบีกเกอร์เทอร์มิสเตอร์สามารถตรวจวัดอุณหภูมิที่ต่ำลงนี้ได้ สัญญาณที่ปรากฏออกมาจึงเป็นสัญญาณที่ลดต่ำลงและค่อยๆกลับสู่เบสไลน์เมื่อมีการปรับสมดุลอุณหภูมิระหว่างสารละลายตัวอย่างในปิเปตและสารละลายในบีกเกอร์ นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าเวลาในการเกิดสัญญาณและเวลาต่อสัญญาณของปฏิกิริยาซูโครสจะมากกว่าด้วย



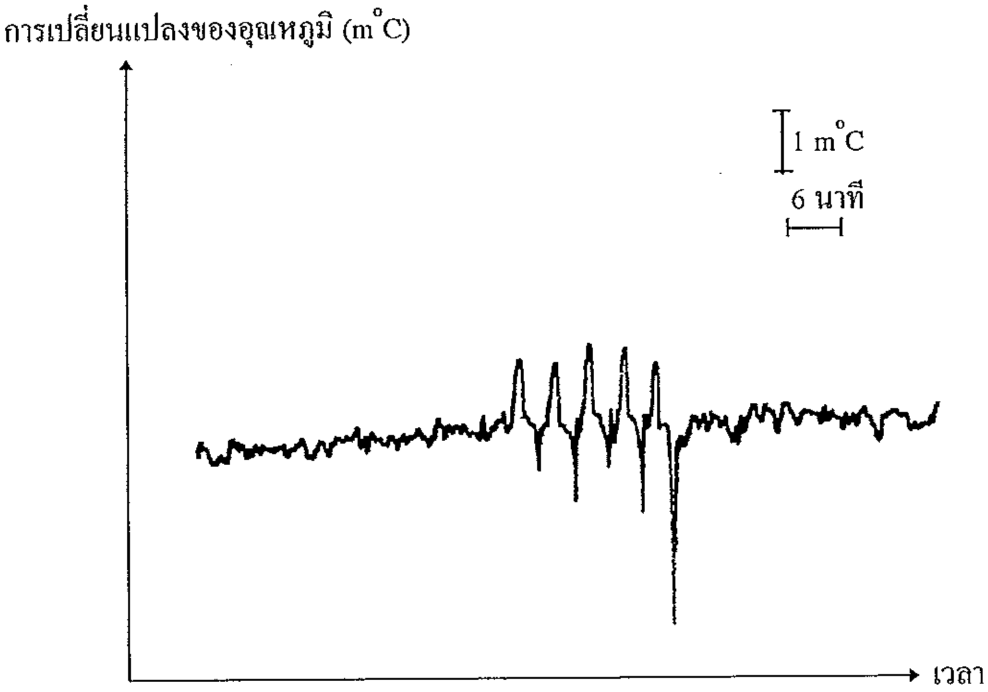
ภาพประกอบ 20 เปรียบเทียบลักษณะสัญญาณจากระบบ BIA ที่ได้จากปฏิกิริยากรด-เบสกับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครส

ก : ปฏิกิริยากรด-เบส โดยใช้กรดไนตริก 0.50 โมลาร์กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 โมลาร์

ข : ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครสที่ความเข้มข้น 0.30 โมลาร์

3.3.2 ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด

การศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ซูโครสด้วยเทคนิค BIA (2.5.2) พบว่า ความเข้มข้นของซูโครสที่ให้สัดส่วนระหว่างสัญญาณการตอบสนองต่อสัญญาณรบกวนเท่ากับ 2 (Christian , 1980 ; Strobel , 1973) คือ ที่ความเข้มข้นของซูโครส 0.10 โมลาร์ (ภาพประกอบ 21) นั่นคือขีดจำกัดต่ำสุดของระบบการทดลองคือที่ซูโครส 0.10 โมลาร์



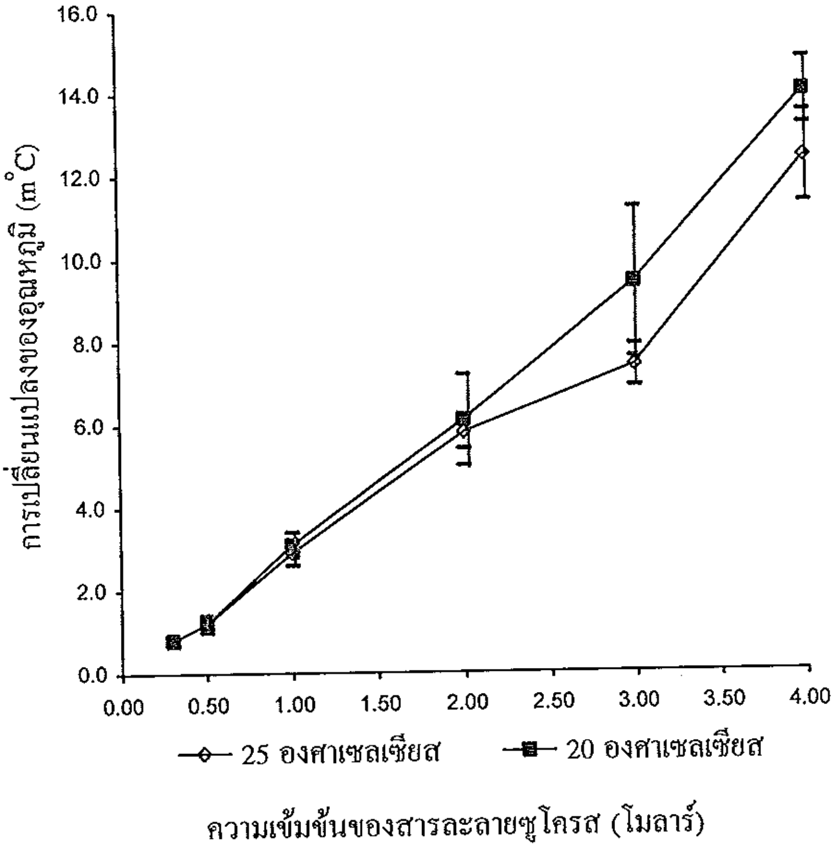
ภาพประกอบ 21 สัญญาณการตอบสนองที่ความเข้มข้นของซูโครส 0.10 โมลาร์

3.3.3 ผลของอุณหภูมิ

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ (2.5.3) โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ชุด พบว่า ถ้าทำการทดลองที่อุณหภูมิ 20 °C จะให้การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่สูงกว่าการทำการทดลองที่อุณหภูมิ 25 °C (ตาราง 5 ภาพประกอบ 22) ทั้งนี้น่าจะเนื่องจากว่าในการทดลองใช้เทอร์มิสเตอร์เป็นตัวตรวจวัดความแตกต่างของความร้อน เมื่อทำการทดลองที่อุณหภูมิ 20 °C เบสไลน์จะต่ำกว่าที่ 25 °C ทำให้ที่ 20 °C สามารถวัดความแตกต่างระหว่างความร้อนในสารละลายกับความร้อนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาได้ชัดเจนกว่าที่อุณหภูมิ 25 °C ดังนั้นจึงใช้อุณหภูมิ 20 °C ในการทดลองเมื่อมีการใช้เอนไซม์

ตาราง 5 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่อุณหภูมิต่างกันคือ อุณหภูมิ 20 °C และอุณหภูมิ 25 °C

ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส (โมลาร์)	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (m°C)			
	25 °C		20 °C	
	ชุดที่		ชุดที่	
	1	2	1	2
0.30	0.8±0.1	0.5±0.1	0.8±0.1	0.7±0.1
0.50	1.2±0.1	1.0±0.2	1.2±0.2	1.1±0.1
1.00	2.9±0.3	2.9±0.3	3.1±0.3	3.8±0.2
2.00	5.8±0.4	5.8±0.5	6.1±1.1	7.2±0.2
3.00	7.4±0.5	7.6±0.9	9.4±1.8	8.4±0.9
4.00	12.4±1.1	10.7±0.7	14.0±0.8	14.3±0.8



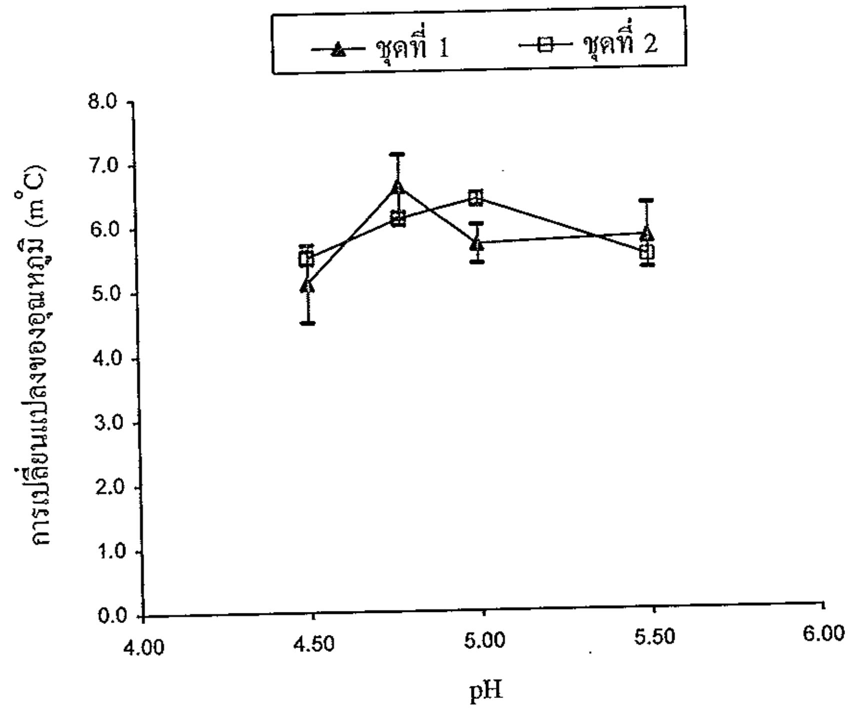
ภาพประกอบ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสและ 25 องศาเซลเซียส (แสดงผลชุดที่ 1 จากตาราง 5 ชุดอื่นให้ผลในลักษณะเดียวกัน)

3.3.4 ผลของ pH

ในทางทฤษฎีอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่ถูกเร่งโดยเอนไซม์นอกจากจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิแล้วยังขึ้นอยู่กับ pH ด้วย เนื่องมาจาก pH มีผลต่ออัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท (enzyme-substrate complex (ES)) ไปเป็นผลิตภัณฑ์ จากการศึกษาผลของ pH ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ 2 ชุด (2.5.4) พบว่า pH ที่ให้การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิสูงสุดของชุดที่ 1 คือ 4.77 และชุดที่ 2 คือ 5.00 (ตาราง 6 ภาพประกอบ 23) นั่นคือ pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์น่าจะอยู่ในช่วง pH 4.77 - 5.00 ซึ่งตรงกับผลการศึกษาของ Ohlenbusch and Vogele (1974) และ Bacon (1955) ซึ่งพบว่า pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์อินเวอร์เทสอยู่ในช่วง 4.7 - 4.9 และ 4.0 - 6.0 ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกใช้ pH 4.80 ซึ่งอยู่ในช่วง pH ที่ให้ค่าการตอบสนองสูงสุดในการศึกษาลำดับต่อไป

ตาราง 6 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่สารละลายมี pH ต่างๆ กัน

pH	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (m°C) ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส 0.50 โมลาร์ ชุดที่ 1	ชุดที่ 2
4.50	5.1±0.6	5.5±0.1
4.77	6.6±0.5	6.1±0.1
5.00	5.7±0.3	6.4±0.1
5.50	5.8±0.5	5.5±0.2



ภาพประกอบ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับ pH

3.3.5 ผลของกลูโคสและฟรักโทส

จากการศึกษาผลของกลูโคสและฟรักโทสที่มีต่อซูโครส (2.5.5) พอสรุปได้ดังนี้

- เมื่อซูโครสมีกลูโคสหรือฟรักโทสเป็นองค์ประกอบ ความเข้มข้นของกลูโคสหรือฟรักโทสที่ 1.00 โมลาร์เท่านั้นที่จะให้ค่าการตอบสนองที่มีความแตกต่างอย่างเป็นนัยสำคัญ เปรียบเทียบกับเมื่อไม่มีกลูโคสหรือฟรักโทส (ตาราง 7 และ 8 ภาพประกอบ 24 และ 25) แสดงว่า สารละลายกลูโคสหรือฟรักโทสในช่วงความเข้มข้น 0.02 - 0.40 โมลาร์ ไม่มีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์สารละลายซูโครส ยกเว้นที่ซูโครสความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ ความแตกต่างเริ่มมีนัยสำคัญที่ฟรักโทส 0.40 โมลาร์

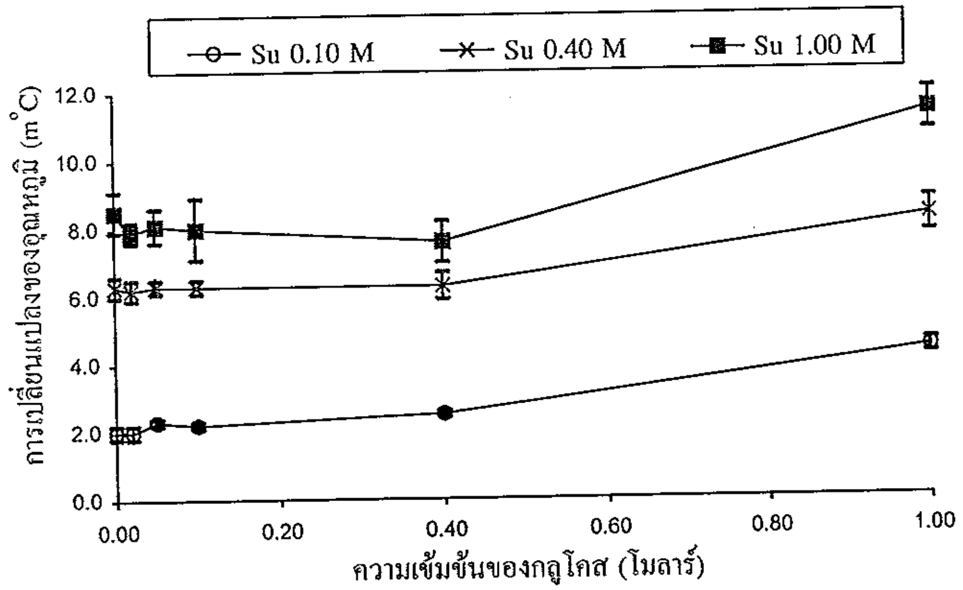
- ตัวอย่างที่ประกอบด้วยซูโครสกับกลูโคสและฟรักโทสให้ผลใกล้เคียงกับข้างต้น กล่าวคือที่ความเข้มข้นของกลูโคสและฟรักโทสที่ 1.00 โมลาร์เท่านั้นที่จะให้ค่าการตอบสนองที่มีความแตกต่างอย่างเป็นนัยสำคัญ (ตาราง 9 ภาพประกอบ 26) ยกเว้นที่ความเข้มข้นของซูโครส 0.10 โมลาร์ ความแตกต่างเริ่มมีนัยสำคัญที่กลูโคสและฟรักโทส 0.40 โมลาร์

ตามปกติเอนไซม์อินเวอร์เทสมีความจำเพาะเจาะจงกับซูโครส ดังนั้นสัญญาณการตอบสนองที่ได้น่าจะมาจากความร้อนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครสเพียงอย่างเดียว ถึงแม้ว่าสารละลายซูโครสจะมีกลูโคสหรือฟรักโทสอยู่ก็ไม่ควรมีสัญญาณการตอบสนองเพิ่มขึ้น แต่ในการทดลองพบว่า เมื่อสารละลายนั้นมีซูโครสอยู่รวมกับของกลูโคสหรือฟรักโทสที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 0.40 โมลาร์ จะมีผลทำให้สัญญาณการตอบสนองมีขนาดสูงกว่าเมื่อสารละลายมีซูโครสเพียงอย่างเดียว ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองเพื่อยืนยันผลดังกล่าวโดยฉีดสารละลายกลูโคสหรือฟรักโทสในช่วงความเข้มข้น 0.02 - 0.50 โมลาร์ไปบนเอนไซม์อินเวอร์เทสพบว่า กลูโคส 0.50 โมลาร์หรือฟรักโทส ≥0.40 โมลาร์จะให้สัญญาณการตอบสนองแสดงว่ากลูโคสและฟรักโทสความเข้มข้นสูงนี้เมื่อผสมกับบัฟเฟอร์ก็สามารถทำให้เกิดความร้อนได้ (mixing heat)

อย่างไรก็ตามวิธีนี้จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ซูโครสในตัวอย่างน้ำอ้อยซึ่งจะมีกลูโคสและฟรักโทสอยู่เพียง 0.02 - 0.05 โมลาร์ ซึ่งในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวน้ำตาลทั้งสองนี้ไม่น่าจะมีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์

ตาราง 7 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่มีปริมาณกลูโคสต่างๆ กัน

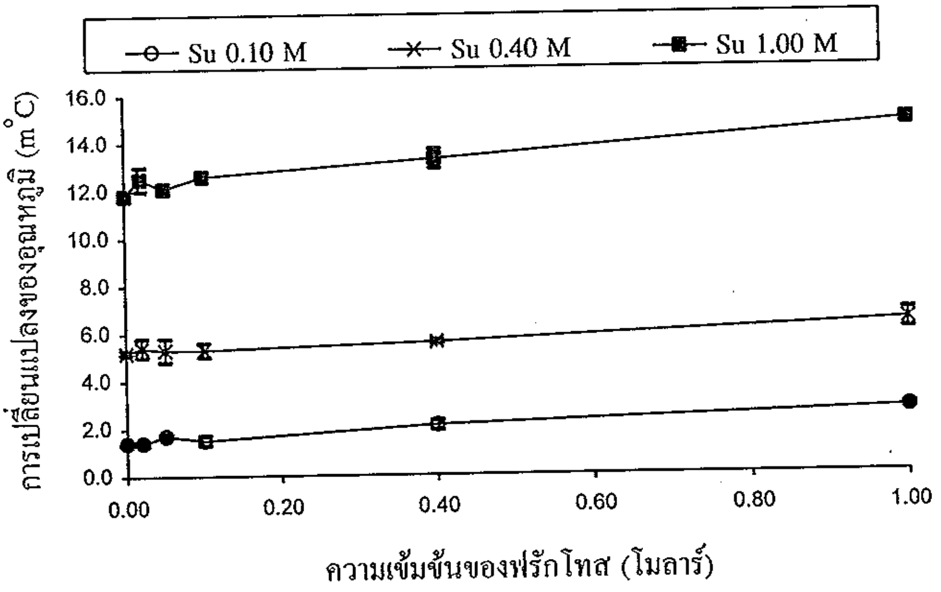
ความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่มีปริมาณกลูโคสต่างๆ กัน (โมลาร์)	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (m°C)		
	ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส (โมลาร์)		
	0.10	0.40	1.00
ซูโครส	2.0±0.2	6.3±0.3	8.5±0.6
ซูโครส+กลูโคส 0.02 M	2.0±0.2	6.2±0.3	7.9±0.3
ซูโครส+กลูโคส 0.05 M	2.3±0.1	6.3±0.2	8.1±0.5
ซูโครส+กลูโคส 0.10 M	2.2±0.1	6.3±0.2	8.0±0.9
ซูโครส+กลูโคส 0.40 M	2.5±0.1	6.3±0.4	7.6±0.6
ซูโครส+กลูโคส 1.00 M	4.4±0.2	8.3±0.5	11.4±0.6



ภาพประกอบ 24 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของซูโครสที่มีปริมาณกลูโคสต่างๆ กัน

ตาราง 8 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่มีปริมาณฟรักโทสต่างๆ กัน

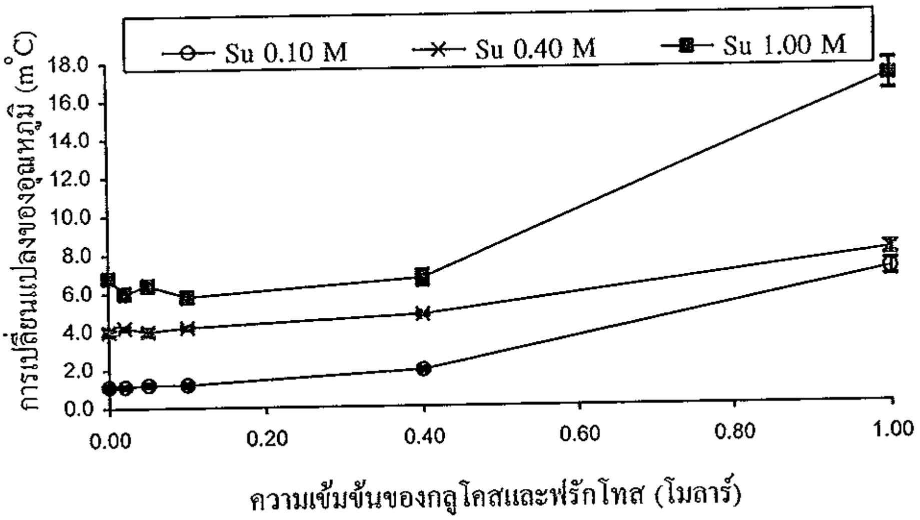
ความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่มีปริมาณฟรักโทสต่างๆ กัน (โมลาร์)	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ($m^{\circ}C$)		
	ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส (โมลาร์)		
	0.10	0.40	1.00
ซูโครส	1.4±0.1	5.2±0.1	11.8±0.2
ซูโครส+ฟรักโทส 0.02 M	1.4±0.1	5.4±0.4	12.5±0.5
ซูโครส+ฟรักโทส 0.05 M	1.7±0.1	5.3±0.5	12.1±0.2
ซูโครส+ฟรักโทส 0.10 M	1.5±0.2	5.3±0.3	12.6±0.2
ซูโครส+ฟรักโทส 0.40 M	2.1±0.2	5.6±0.1	13.3±0.4
ซูโครส+ฟรักโทส 1.00 M	2.7±0.1	6.4±0.4	14.8±0.2



ภาพประกอบ 25 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของซูโครสที่มีปริมาณฟรักโทสต่างๆ กัน

ตาราง 9 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่มีปริมาณกลูโคสและฟรักโทสต่างๆ กัน

ความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่มีปริมาณกลูโคสและฟรักโทสต่างๆ กัน (โมลาร์)	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ($m^{\circ}C$) ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส (โมลาร์)		
	0.10 M	0.40 M	1.00 M
ซูโครส	1.1±0.1	4.0±0.2	6.8±0.2
ซูโครส+กลูโคสและฟรักโทสอย่างละ 0.02 M	1.1±0.1	4.2±0.1	6.0±0.3
ซูโครส+กลูโคสและฟรักโทสอย่างละ 0.05 M	1.2±0.1	4.0±0.2	6.4±0.3
ซูโครส+กลูโคสและฟรักโทสอย่างละ 0.10 M	1.2±0.1	4.2±0.1	5.8±0.3
ซูโครส+กลูโคสและฟรักโทสอย่างละ 0.40 M	1.9±0.1	4.8±0.1	6.7±0.4
ซูโครส+กลูโคสและฟรักโทสอย่างละ 1.00 M	7.0±0.4	8.0±0.3	17.1±0.8



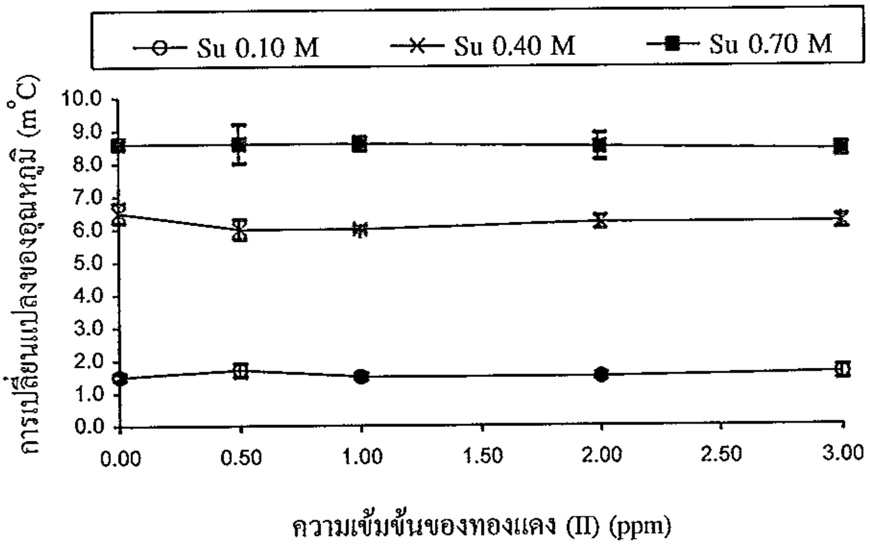
ภาพประกอบ 26 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่มีปริมาณกลูโคสและฟรักโทสต่างๆ กัน

3.3.6 ผลของโลหะหนักที่มีต่อสารละลายซูโครส

จากการศึกษาผลของไอออนทองแดง (II) และเงิน (I) ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทสในการวิเคราะห์ซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ (2.5.6) พบว่า สัญญาณการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในการวิเคราะห์ซูโครสที่มีสารละลายทองแดง (II) ในช่วง 0.5 - 3.0 ppm (ตาราง 10 ภาพประกอบ 27) หรือมีสารละลายเงิน (I) ในช่วง 5.0 - 20.0 ppm (ตาราง 11 ภาพประกอบ 28) เมื่อเทียบกับขณะที่ไม่มีโลหะหนักผสมอยู่พบว่าความแตกต่างของสัญญาณการตอบสนองนั้นไม่มีนัยสำคัญ แสดงว่าในระบบนี้สารละลายทองแดง (II) หรือเงิน (I) ความเข้มข้นดังข้างต้นจะไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

ตาราง 10 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่มีปริมาณทองแดง (II) ต่างๆ กัน

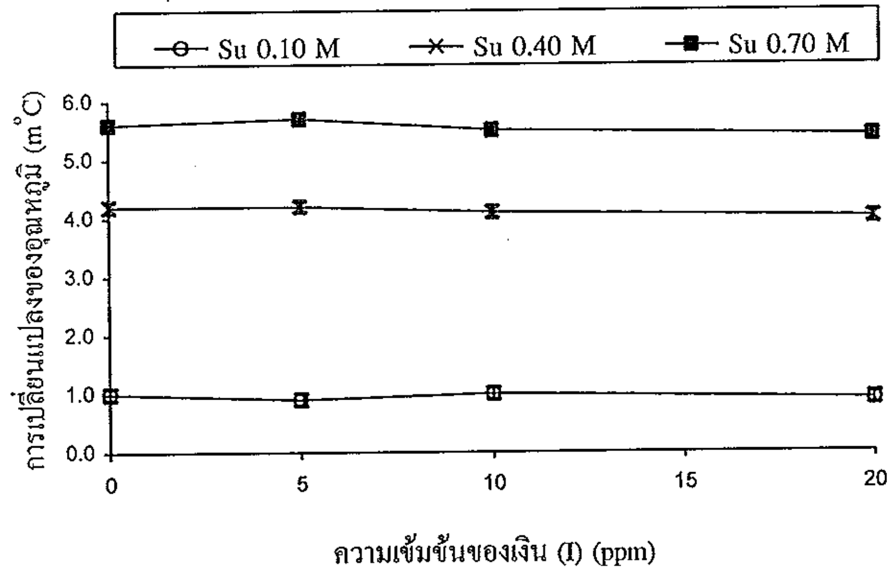
ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส ที่มีปริมาณทองแดง (II) ต่างๆ กัน (ppm)	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (m°C) ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส (โมลาร์) 0.10 M	0.40 M	0.70 M
ซูโครส	1.5±0.1	6.5±0.3	8.6±0.1
ซูโครส+ทองแดง (II) 0.5 ppm	1.7±0.2	6.0±0.3	8.6±0.6
ซูโครส+ทองแดง (II) 1.0 ppm	1.5±0.1	6.0±0.1	9.6±0.2
ซูโครส+ทองแดง (II) 2.0 ppm	1.5±0.1	6.2±0.2	8.5±0.4
ซูโครส+ทองแดง (II) 3.0 ppm	1.6±0.2	6.2±0.2	8.4±0.2



ภาพประกอบ 27 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่มีปริมาณทองแดง (II) ต่างๆ กัน

ตาราง 11 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่มีปริมาณเงิน (I) ต่างๆ กัน

ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส ที่มีปริมาณของเงิน (I) ต่างๆ กัน (ppm)	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ($m^{\circ}C$) ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส (โมลาร์)		
	0.10 M	0.40 M	0.70 M
ซูโครส	1.0±0.1	4.2±0.1	5.6±0.1
ซูโครส+เงิน (I) 5.0 ppm	0.9±0.1	4.2±0.1	5.7±0.1
ซูโครส+เงิน (I) 10.0 ppm	1.0±0.1	4.1±0.1	5.5±0.1
ซูโครส+เงิน (I) 20.0 ppm	0.9±0.1	4.0±0.1	5.4±0.1



ภาพประกอบ 28 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่มีปริมาณเงิน (I) ต่างๆ กัน

3.3.7 ช่วงความเข้มข้นที่ให้การตอบสนองเชิงเส้น

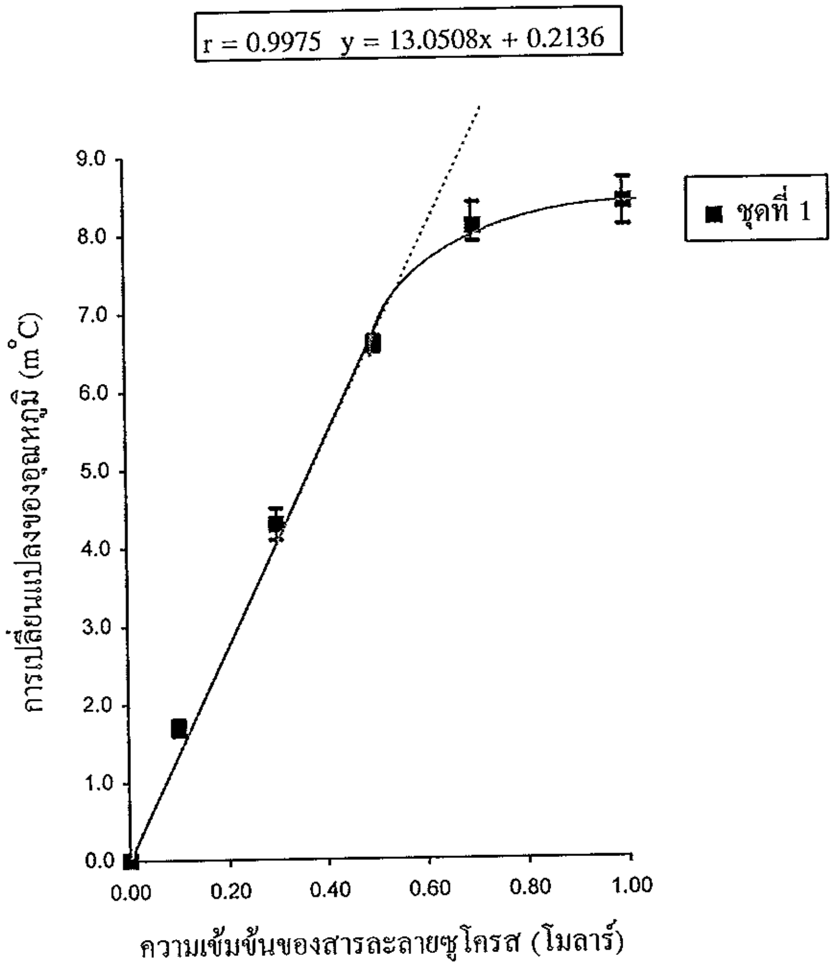
ในการศึกษาหาช่วงความเข้มข้นที่ให้การตอบสนองเชิงเส้น (2.5.7) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ชุด พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารละลายซูโครสน้อยกว่า 0.50 โมลาร์ การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นเป็นเชิงเส้น (ตาราง 12 ภาพประกอบ 29) และการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิจะเริ่มคงที่นั่นคือไม่เปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้นที่ 0.70 โมลาร์ ทั้งนี้น่าจะเนื่องจากอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่ถูกเร่งโดยเอนไซม์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสับสเตรท ในช่วงที่ความเข้มข้นของสับสเตรทยังน้อยอยู่ การเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทจะทำให้อัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากบริเวณเร่งของโมเลกุลเอนไซม์ยังไม่อิ่มตัวด้วยสับสเตรท และจะเพิ่มขึ้นในอัตราที่ช้าลงในช่วงที่ความเข้มข้นของสับสเตรทสูงขึ้น และในที่สุดอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาจะไม่สามารถเพิ่มขึ้นอีกถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทมากขึ้นเพียงใดก็ตาม เพราะบริเวณเร่งของโมเลกุลเอนไซม์ทุกโมเลกุลอิ่มตัวไปด้วยสับสเตรท จึงไม่มีบริเวณเร่งที่ว่างที่จะให้สับสเตรทเข้าไปจับ (สุนันทา ภิญญาวัธน์ , 2532)

ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ซูโครส สรุปได้ดังนี้

- อุณหภูมิที่ใช้ทำการทดลอง	20 องศาเซลเซียส
- pH ที่เหมาะสม	4.80
- ช่วงความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่ให้การตอบสนองเชิงเส้น	0.00 - 0.50 โมลาร์
- กลูโคสและฟรักโทสที่มีอยู่ในสารละลายซูโครสจะไม่มีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์ซูโครส ในช่วงความเข้มข้น	0.02 - 0.10 โมลาร์
- ทองแดง (II) หรือเงิน (I) ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทส ในช่วงความเข้มข้นของทองแดง (II)	0.5 - 3.0 ppm
หรือความเข้มข้นของเงิน (I)	5.0 - 20.0 ppm

ตาราง 12 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่ความเข้มข้นของสารละลายซูโครสต่างๆ กัน

ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส (โมลาร์)	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (m°C)		
	ชุดที่		
	1	2	3
0.00	0.0±0.4	0.0±0.3	0.0±0.3
0.10	1.7±0.1	1.3±0.1	1.1±0.1
0.30	4.3±0.2	3.7±0.1	4.1±0.2
0.50	6.6±0.1	6.2±0.2	6.4±0.3
0.70	8.1±0.3	7.9±0.2	8.3±0.2
1.00	8.4±0.3	7.7±0.3	8.5±0.4

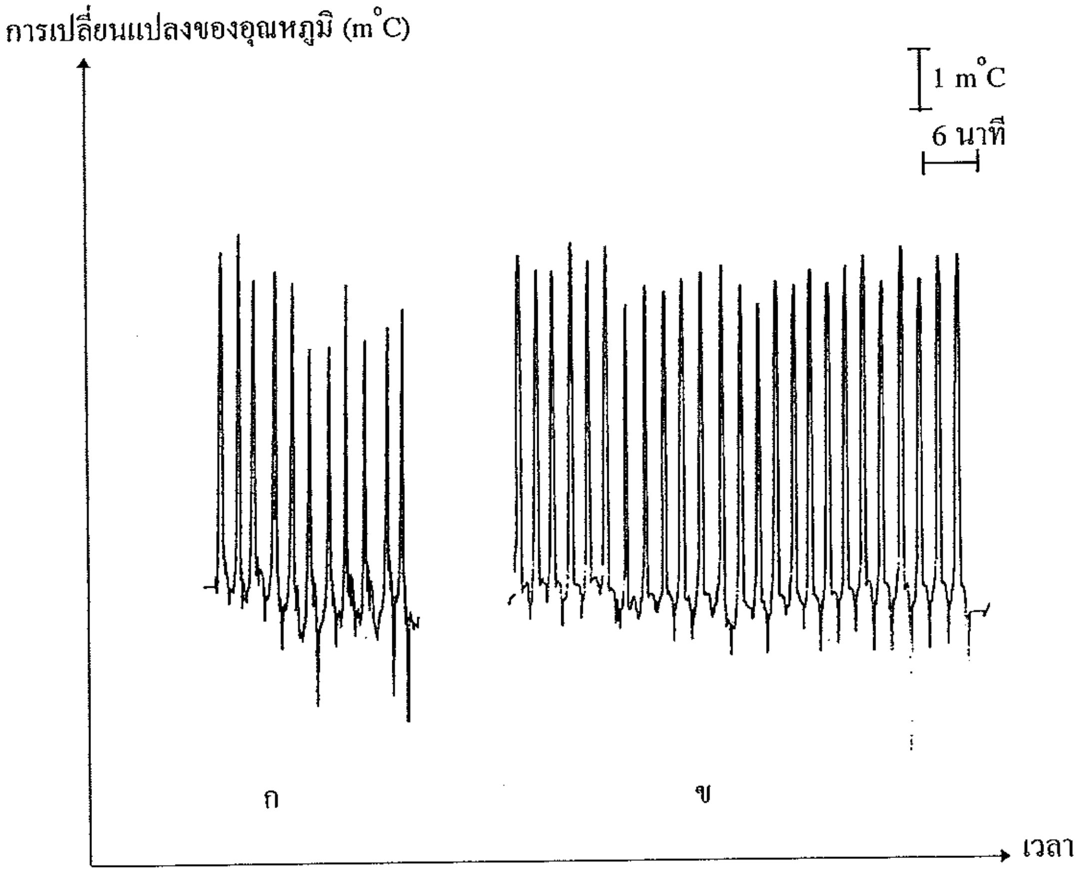


ภาพประกอบ 29 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (ชุดที่ 1 จากตาราง 12 ชุดอื่นให้ผลลักษณะเดียวกัน)

3.4 การใช้ปิเปตที่ควบคุมการฉีดสารละลายตัวอย่างด้วยเครื่อง EDOS 5221

3.4.1 การตอบสนองเมื่อใช้ EDOS 5221 เปรียบเทียบกับการใช้ไมโครปิเปตแบบดิจิตอล

ในการใช้ปิเปตที่ควบคุมการฉีดสารละลายโดยใช้มือเป็นการยากที่จะควบคุมน้ำหนักมือที่กดลงบนปิเปตให้คงที่ตลอดเวลาทำให้อัตราเร็วของการฉีดสารละลายแต่ละครั้งแตกต่างกันเป็นผลให้สัญญาณการตอบสนองที่ได้ไม่เท่ากัน ทำให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ค่อนข้างสูงประมาณ 13% (n = 11) (ภาพประกอบ 30 ก) แต่เมื่อนำชุดอุปกรณ์ปิเปตที่มีระบบควบคุมอัตราการฉีดสารละลายตัวอย่างมาใช้ในการวิเคราะห์พบว่า สัญญาณการตอบสนองที่ได้มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ประมาณ 4% (n = 25) (ภาพประกอบ 30 ข) ซึ่งน้อยกว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ได้จากการใช้ไมโครปิเปตแบบดิจิตอลที่ควบคุมการฉีดสารละลายตัวอย่างด้วยมือประมาณ 3 เท่า ดังนั้นจึงเลือกใช้ชุดอุปกรณ์ปิเปตที่มีระบบควบคุมอัตราการฉีดสารละลายตัวอย่างมาใช้ในการศึกษาสภาวะอื่นต่อไป



ภาพประกอบ 30 เปรียบเทียบสัญญาณการตอบสนองที่ได้จากการใช้ไมโครปิเปตแบบดิจิตอลที่ควบคุมการฉีดสารละลายด้วยมือกับการใช้ไมโครปิเปต EDOS 5221 ที่อัตราเร็ว 4 โดยใช้สารละลายซูโครส 0.30 โมลาร์

ก : ไมโครปิเปตแบบดิจิตอล r.s.d. 13%

ข : ไมโครปิเปต EDOS 5221 r.s.d. 4%

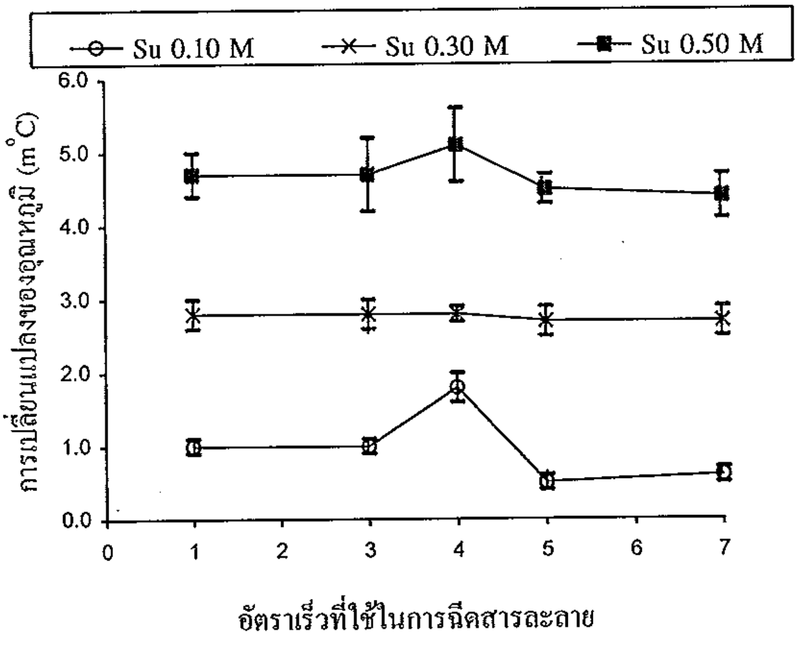
3.4.2 ผลของอัตราเร็วที่ใช้ในการฉีดสารละลาย

จากการศึกษาผลของอัตราเร็วที่ใช้ในการฉีดสารละลายตัวอย่างโดยเครื่อง EDOS 5221 (2.6.1) พบว่า สัญญาณการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิจะสูงที่สุดที่อัตราเร็ว 4 (ตาราง 13 ภาพประกอบ 31) อัตราเร็วในการฉีดสารละลายตัวอย่างที่ช้ากว่าคือ 1 และ 3 จะให้การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิต่ำ อาจเกิดเนื่องจากอัตราเร็วของการเดินทางของสารละลายตัวอย่างทำให้สารตัวอย่างที่ใช้ซึ่งมีปริมาณน้อยถูกเจือจางด้วยสารละลายในบีกเกอร์ก่อนที่จะไปถึงบริเวณที่เกิดปฏิกิริยา และถ้าใช้อัตราเร็วในการฉีดสารละลายตัวอย่างเร็วเกินไป คือ อัตราเร็ว 5 และ 7 ก็จะให้การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิต่ำเช่นเดียวกัน ทั้งนี้น่าจะเป็นเพราะว่าเมื่อฉีดสารละลายตัวอย่างเร็วเกินไปจะทำให้สารละลายตัวอย่างถูกดันให้แพร่กระจายออกไปจากบริเวณหัววัดได้รวดเร็วก่อนที่จะเกิดปฏิกิริยา และเมื่อดูค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เฉลี่ยระหว่างความเข้มข้นของซูโครส 0.10 , 0.30 และ 0.50 โมลาร์ ของอัตราเร็ว 1 , 3 , 4 , 5 และ 7 จะมีค่าใกล้เคียงกันคือ 8% , 9% , 8% , 10% และ 9% ตามลำดับ

ในการวิเคราะห์จึงเลือกใช้อัตราเร็วในการฉีดสารละลายซูโครสที่อัตราเร็ว (speed) 4 เนื่องจากให้การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิสูงสุด

ตาราง 13 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเมื่อใช้อัตราเร็วในการฉีดสารละลายต่างๆ กัน

อัตราเร็วในการฉีดสารละลาย	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (m°C) ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส (โมลาร์)		
	0.10 M	0.30 M	0.50 M
1	1.0±0.1	2.8±0.2	4.7±0.3
3	1.0±0.1	2.8±0.2	4.7±0.5
4	1.8±0.2	2.8±0.1	5.1±0.5
5	0.5±0.1	2.7±0.2	4.5±0.2
7	0.6±0.1	2.7±0.2	4.4±0.3



ภาพประกอบ 31 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับอัตราเร็วที่ใช้ในการฉีดสารละลาย

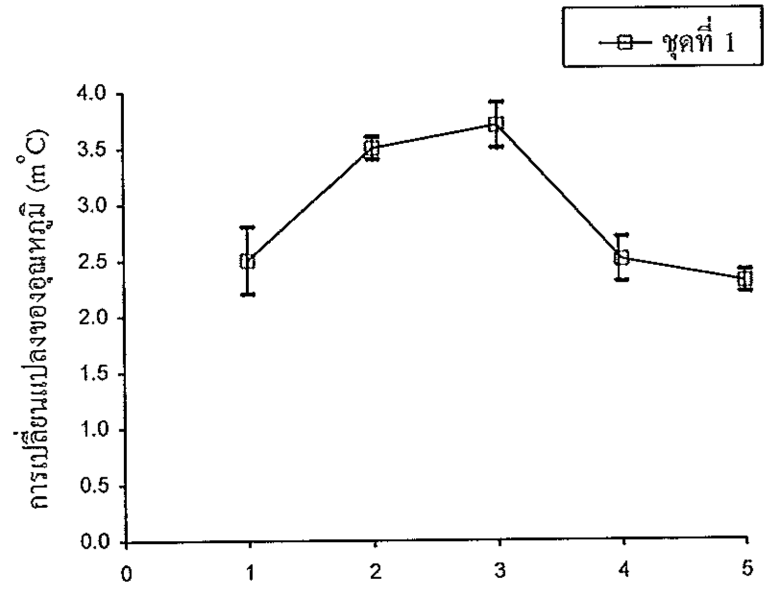
3.4.3 ผลของระยะห่างระหว่างปลายปิเปตกับเทอร์มิสเตอร์

ขณะที่ทำการทดลองเพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นจะใช้ระยะห่างระหว่างปลายปิเปตกับเทอร์มิสเตอร์ 2.0 มิลลิเมตร เนื่องจากเป็นระยะที่เหมาะสมที่สุดจากการศึกษาของ Wang and Taha (1991c) และเมื่อได้ศึกษาผลของระยะห่างระหว่างปลายปิเปตกับเทอร์มิสเตอร์ในระบบ BIA นี้ (2.6.2) พบว่า ที่ระยะห่างระหว่างปลายปิเปตกับเทอร์มิสเตอร์เป็น 2.0 และ 3.0 มิลลิเมตร จะให้การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิสูงกว่าที่ระยะอื่นๆ (ตาราง 14 ภาพประกอบ 32) ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อระยะระหว่างปลายปิเปตกับเทอร์มิสเตอร์มากเกินไป (4.0 และ 5.0 มิลลิเมตร) โอกาสที่สารตัวอย่างจะแพร่ไปยังสารละลายที่อยู่ในบีกเกอร์เกิดได้มากขึ้น สารละลายตัวอย่างที่จะไปทำปฏิกิริยาที่ผิวเทอร์มิสเตอร์จึงลดน้อยลง จึงทำให้สัญญาณที่วัดได้มีขนาดลดลง ส่วนที่ระยะห่างระหว่างปลายปิเปตกับเทอร์มิสเตอร์น้อยเกินไป (1.0 มิลลิเมตร) สัญญาณที่ได้ก็จะต่ำเช่นกัน ทั้งนี้น่าจะเป็นเพราะเมื่อฉีดสารละลายตัวอย่างลงบนเทอร์มิสเตอร์ สารตัวอย่างนี้จะถูกดันให้ออกไปจากผิวหน้าของเทอร์มิสเตอร์ (ดูภาพประกอบ 2) เร็วกว่าเมื่อมีปิเปตอยู่ห่างออกไปทำให้สารตัวอย่างมีเวลาสัมผัสกับผิวหน้าเทอร์มิสเตอร์น้อย และเมื่อดูค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เฉลี่ย 3 ชุดที่ระยะห่างระหว่างปลายปิเปตกับเทอร์มิสเตอร์ 1.0 , 2.0 , 3.0 , 4.0 และ 5.0 มิลลิเมตร จะมีค่าเท่ากับ 8% , 3% , 4% , 11% และ 7% ตามลำดับ

ระยะที่เหมาะสมควรจะเป็นระยะที่ให้ค่าการตอบสนองสูงประกอบกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ต่ำ ดังนั้นระหว่างระยะ 2.0 มิลลิเมตร และ 3.0 มิลลิเมตร จึงเลือกที่จะใช้ระยะห่างระหว่างปลายปิเปตจากเทอร์มิสเตอร์ 2.0 มิลลิเมตร เนื่องจากให้ค่าการตอบสนองเฉลี่ย 3 ชุดใกล้เคียงกับที่ระยะ 3.0 มิลลิเมตร นั่นคือต่ำกว่าเพียง 10% แต่จะให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า

ตาราง 14 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับระยะห่างระหว่างปลายปิเปตกับเทอร์มิสเตอร์

ระยะห่างระหว่างปลายปิเปตกับเทอร์มิสเตอร์ (มิลลิเมตร)	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (m°C)		
	ชุดที่		
	1	2	3
1	2.5±0.3	3.5±0.2	2.8±0.2
2	3.5±0.1	3.9±0.1	3.3±0.1
3	3.7±0.2	5.0±0.2	3.4±0.1
4	2.5±0.2	2.7±0.4	2.0±0.2
5	2.3±0.1	2.6±0.2	2.2±0.2



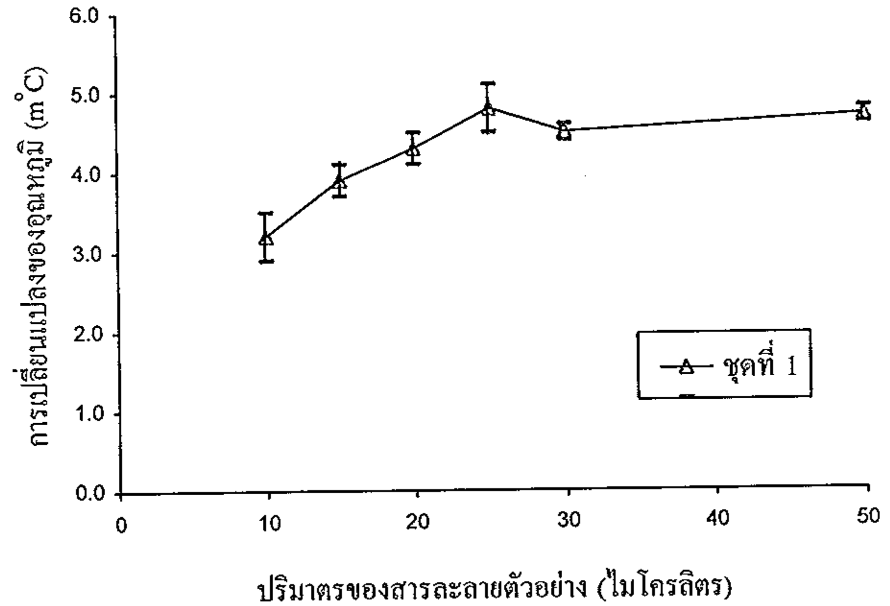
ภาพประกอบ 32 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับระยะห่างระหว่างปลายปิเปตกับเทอร์มิสเตอร์ (ชุดที่ 1 จากตาราง 14 ชุดอื่นๆ ให้ผลในลักษณะเดียวกัน)

3.4.4 ผลของปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง

จากการศึกษาผลของปริมาตรที่ใช้ในการฉีดสารละลายตัวอย่าง (2.6.3) พบว่า ที่ปริมาตรสารละลายตัวอย่างน้อย การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิก็จะน้อย ซึ่งน่าจะเนื่องจากเมื่อสับสเตรทมีปริมาณน้อยการเกิดปฏิกิริยาก็จะน้อยตามไปด้วย ทำให้ค่าการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่ได้ต่ำ เมื่อเพิ่มปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิจะเพิ่มสูงขึ้น จนกระทั่งถึงที่ปริมาตร 25 ไมโครลิตร (ตาราง15 ภาพประกอบ 33) หลังจากนั้นแม้ว่าจะเพิ่มปริมาตรของสารละลายตัวอย่างมากขึ้นเพียงใดก็ตาม การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่ได้จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหรือมีค่าเกือบคงที่ ทั้งนี้น่าจะเป็นเพราะพื้นที่ผิวหน้าของเทอร์มิสเตอร์ที่มีเอนไซม์ตรึงอยู่มีบริเวณจำกัดถึงแม้ปริมาตรสารละลายตัวอย่างจะมากแต่ส่วนที่จะสัมผัสกับเอนไซม์มีได้มากที่สุดเท่ากับพื้นที่ผิวของเอนไซม์ที่ตรึงไว้เท่านั้น จากผลการทดลองนี้จึงสามารถสรุปได้ว่าปริมาตรที่เหมาะสมที่สุดคือที่ 25 ไมโครลิตร

ตาราง 15 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง

ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (ไมโครลิตร)	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (m°C) ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3
10	3.2±0.3	3.4±0.3	3.3±0.1
15	3.9±0.2	3.9±0.4	3.8±0.2
20	4.3±0.2	4.1±0.3	4.0±0.1
25	4.8±0.3	4.5±0.2	4.4±0.2
30	4.5±0.1	4.6±0.2	4.5±0.2
50	4.7±0.1	5.1±0.1	4.7±0.2



ภาพประกอบ 33 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกับปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (ชุดที่ 1 ตาราง 15 ชุดอื่นให้ผลในลักษณะเดียวกัน)

3.4.5 ความแตกต่างของน้ำอ้อยที่มีการตกตะกอนและไม่มีการตกตะกอนสารแขวนลอย

เมื่อเปรียบเทียบสัญญาณการตอบสนองต่อน้ำอ้อยที่ได้จากการผ่านขั้นตอนการตกตะกอนกับน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านขั้นตอนการตกตะกอนสารแขวนลอยพบว่า ความแตกต่างนั้นไม่มีนัยสำคัญ (ตาราง 16 และภาพประกอบ 34)

ดังนั้นในการศึกษาหาปริมาณซูโครสในน้ำอ้อยต่อไปจะทำการศึกษาในน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านขั้นตอนการตกตะกอนสารแขวนลอย

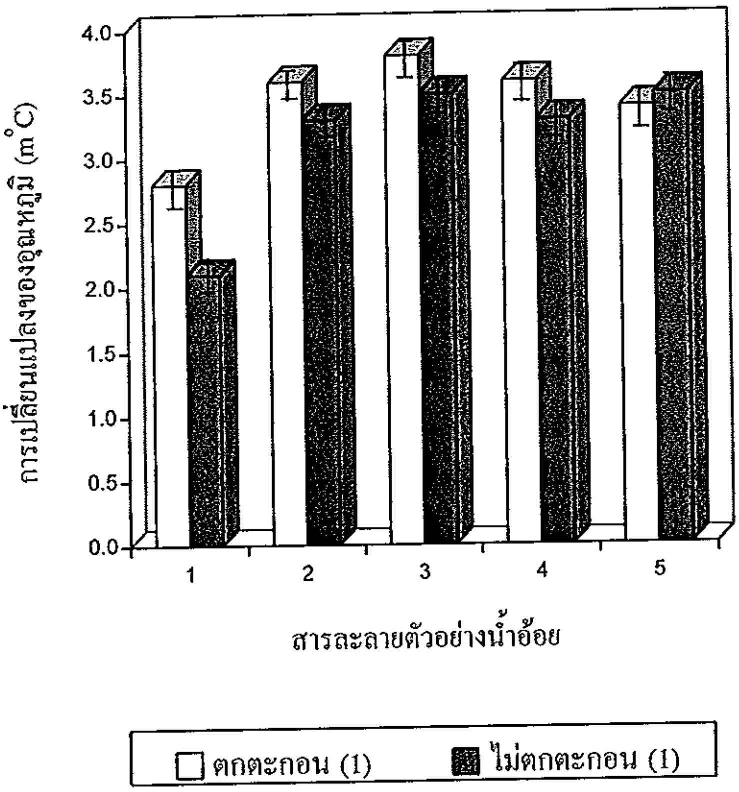
ปัจจัยที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ซูโครสเมื่อใช้ปิเปตที่ควบคุมการฉีดสารละลายตัวอย่างด้วยเครื่อง EDOS 5221 สรุปดังนี้

- อัตราเร็วในการฉีดสารละลายซูโครส	4
- ระยะห่างของปลายปิเปตจากเทอร์มิสเตอร์	2.0 มิลลิเมตร
- ปริมาตรที่เหมาะสมในการฉีดสารละลายตัวอย่าง	25 ไมโครลิตร

- สารแขวนลอยต่างๆ ที่มีในน้ำอ้อย ไม่มีผลรบกวนอย่างเป็นนัยสำคัญต่อการวิเคราะห์ซูโครส ดังนั้นสามารถใช้น้ำอ้อยสดในการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครส

ตาราง 16 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของน้ำอ้อยที่มีการตกตะกอนและไม่มีการตกตะกอนสารแขวนลอย

น้ำอ้อยท่อนที่	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (m°C)					
	ตกตะกอน			ไม่ตกตะกอน		
	ชุดที่			ชุดที่		
	1	2	3	1	2	3
1	2.8±0.1	2.7±0.1	2.4±0.1	2.1±0.1	2.6±0.1	2.5±0.1
2	3.6±0.1	3.3±0.1	3.4±0.1	3.3±0.1	3.3±0.1	2.8±0.1
3	3.8±0.1	3.4±0.1	4.1±0.1	3.5±0.1	3.6±0.1	3.5±0.1
4	3.6±0.1	3.6±0.1	3.7±0.1	3.3±0.1	3.5±0.1	3.4±0.1
5	3.4±0.1	3.4±0.1	3.1±0.1	3.5±0.1	3.6±0.1	3.2±0.1



ภาพประกอบ 34 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของน้ำอ้อยที่มีการตกตะกอนและไม่มีการตกตะกอนสารแขวนลอย (ชุดที่ 1 จากตาราง 16 ชุดอื่นให้ผลในลักษณะเดียวกัน)

3.5 การเปรียบเทียบเทคนิค BIA กับเทคนิคอื่น

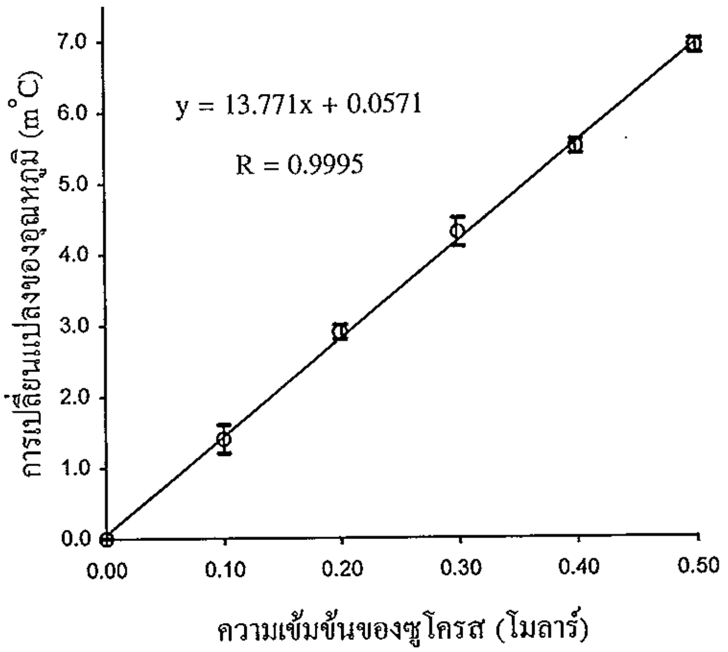
3.5.1 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสระหว่างเทคนิค BIA กับเทคนิคโพลาริเมตริก

3.5.1.1 สารละลายมาตรฐาน

ในการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสจากสารละลายมาตรฐานระหว่างเทคนิค BIA กับเทคนิคโพลาริเมตริก (2.7.1.1) เริ่มต้นจากการทำคาลิเบรทชันเคิร์ฟของทั้งสองเทคนิค (ตาราง 17 ภาพประกอบ 35 และ ตาราง 18 ภาพประกอบ 36) เพื่อใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง หลังจากนั้นนำสารละลายซูโครสมาตรฐานไปวิเคราะห์โดยเทคนิค BIA และเทคนิคโพลาริเมตริก ได้ค่าการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและค่าการหมุนระนาบแสงดังตาราง 19 และตาราง 20 ตามลำดับ แล้วจึงนำค่านี้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างจากคาลิเบรทชันเคิร์ฟของแต่ละเทคนิค เมื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของซูโครสที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค BIA กับเทคนิคโพลาริเมตริกพบว่า ความแตกต่างไม่มีนัยสำคัญ (ตาราง 21 ภาพประกอบ 37)

ตาราง 17 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิจากสารละลายซูโครสมาตรฐานที่ได้จากเทคนิค BIA เพื่อใช้เป็นคาลิเบรทชันเคิร์ฟ

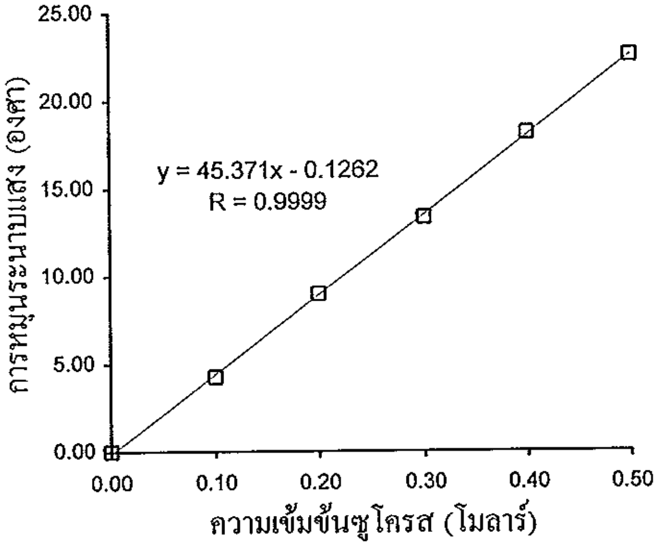
ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส (โมลาร์)	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (m°C)
0.00	0.0±0.3
0.10	1.4±0.2
0.20	2.9±0.1
0.30	4.3±0.2
0.40	5.5±0.1
0.50	6.9±0.1



ภาพประกอบ 35 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิจากสารละลายซูโครสมาตรฐานที่ได้จากเทคนิค BIA เพื่อใช้เป็นคาลิเบรทชันเคิร์ฟ

ตาราง 18 การหมุนระนาบแสงจากสารละลายซูโครสมาตรฐานที่ได้จากเทคนิคโพลาริเมตริก เพื่อใช้เป็นคาลิเบรทชันเคิร์ฟ

ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส (โมลาร์)	การหมุนระนาบแสง (องศา)
0.00	0.00
0.10	4.25
0.20	9.00
0.30	13.35
0.40	18.15
0.50	22.55



ภาพประกอบ 36 การหมุนระนาบแสงจากสารละลายซูโครสมาตรฐานที่ได้จากเทคนิคโพลาริเมตริกเพื่อใช้เป็นคาลิเบรทชันเคิร์ฟ

ตาราง 19 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิต่อสารละลายซูโครสมาตรฐานที่ได้จากเทคนิค BIA

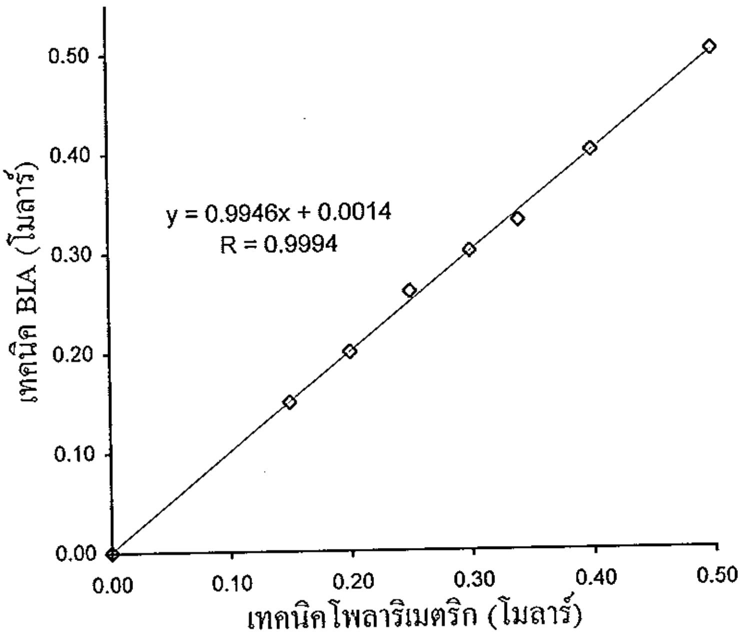
ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส (โมลาร์)	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ($m^{o}C$)
0.10	1.3±0.1
0.15	2.2±0.2
0.20	2.8±0.1
0.25	3.7±0.1
0.30	4.2±0.1
0.35	4.6±0.1
0.40	5.5±0.3
0.50	7.0±0.1

ตาราง 20 ค่าการหมุนระนาบแสงต่อสารละลายซูโครสมาตรฐานที่ได้จากเทคนิคโพลาริเมตริก

ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส (โมลาร์)	การหมุนระนาบแสง (องศา)
0.10	4.30
0.15	6.50
0.20	8.90
0.25	11.40
0.30	13.40
0.35	15.45
0.40	18.00
0.50	22.50

ตาราง 21 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสระหว่างเทคนิค BIA กับเทคนิคโพลาริเมตริกโดยใช้สารละลายซูโครสมาตรฐาน

ความเข้มข้นของสารละลายซูโครสมาตรฐาน (โมลาร์)	BIA (โมลาร์)	โพลาริเมตริก (โมลาร์)
0.10	วัดไม่ได้	0.10
0.15	0.15±0.01	0.15
0.20	0.20±0.01	0.20
0.25	0.26±0.01	0.25
0.30	0.30±0.01	0.30
0.35	0.33±0.01	0.34
0.40	0.40±0.02	0.40
0.50	0.50±0.01	0.50



ภาพประกอบ 37 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสระหว่างเทคนิค BIA กับ
เทคนิคโพลาริเมตริก จากสารละลายซูโครสมาตรฐาน

3.5.1.2 น้ำอ้อย

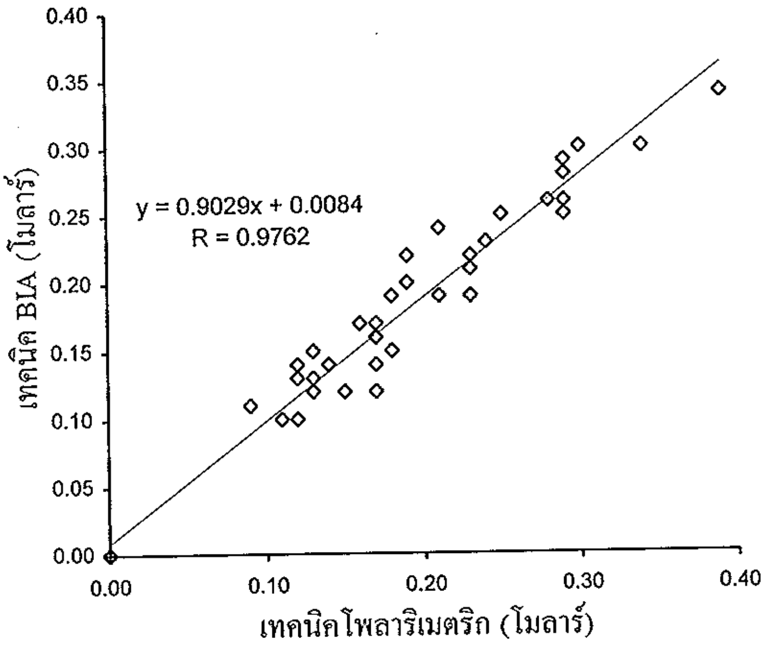
ในการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในน้ำอ้อยที่ใช้เป็นสารละลายตัวอย่างระหว่างเทคนิค BIA กับเทคนิคโพลาริเมตริก (2.7.1.2) ทำการทดลอง 4 ชุด โดยจะทำคาลิเบรทชันเคิร์ฟของเทคนิค BIA กับเทคนิคโพลาริเมตริกเช่นเดียวกับในข้อ 3.5.1.1 ทุกชุด ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของปริมาณซูโครสในน้ำอ้อยระหว่างเทคนิค BIA กับเทคนิคโพลาริเมตริก ดังตาราง 22 และภาพประกอบ 38 เมื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของซูโครสที่ได้จากเทคนิค BIA กับเทคนิคโพลาริเมตริกพบว่า ความแตกต่างระหว่างเทคนิคทั้งสองนี้ไม่มีนัยสำคัญ

ตาราง 22 ผลการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสที่มีอยู่ในน้ำอ้อยด้วยเทคนิค BIA เปรียบเทียบกับเทคนิคโพลาริเมตริก

ชุดที่	น้ำอ้อย		BIA (โมลาร์)	โพลาริเมตริก (โมลาร์)
1	ตัวอย่าง 1	40%	วัดไม่ได้	0.03
		60%	วัดไม่ได้	0.05
		80%	วัดไม่ได้	0.07
		100%	0.11±0.01	0.09
	ตัวอย่าง 2	40%	วัดไม่ได้	0.08
		60%	0.14±0.01	0.12
		80%	0.17±0.01	0.16
		100%	0.22±0.01	0.19
	ตัวอย่าง 3	40%	0.10±0.01	0.09
		60%	0.15±0.01	0.13
		80%	0.19±0.01	0.18
		100%	0.22±0.01	0.23
2	ตัวอย่าง 1	40%	วัดไม่ได้	0.09
		60%	0.13±0.01	0.12
		80%	0.17±0.01	0.17
		100%	0.24±0.01	0.21
	ตัวอย่าง 2	40%	0.10±0.01	0.11
		60%	0.15±0.01	0.18
		80%	0.23±0.01	0.24
		100%	0.29±0.01	0.29
	ตัวอย่าง 3	40%	วัดไม่ได้	0.11
		60%	0.12±0.01	0.17
		80%	0.19±0.01	0.23
		100%	0.25±0.01	0.29

ตาราง 22 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสที่มีอยู่ในน้ำอ้อยด้วยเทคนิค BIA เปรียบเทียบกับเทคนิคโพลาริเมตริก

ชุดที่	น้ำอ้อย		BIA (โมลาร์)	โพลาริเมตริก (โมลาร์)
3	ตัวอย่าง 1	40%	วัดไม่ได้	0.09
		60%	0.12±0.03	0.13
		80%	0.16±0.03	0.17
		100%	0.19±0.03	0.21
	ตัวอย่าง 2	40%	0.10±0.03	0.12
		60%	0.14±0.03	0.17
		80%	0.21±0.03	0.23
		100%	0.28±0.03	0.29
	ตัวอย่าง 3	40%	0.10±0.03	0.11
		60%	0.16±0.03	0.17
		80%	0.21±0.03	0.23
		100%	0.26±0.03	0.29
4	ตัวอย่าง 1	40%	วัดไม่ได้	0.10
		60%	0.14±0.01	0.14
		80%	0.20±0.01	0.19
		100%	0.25±0.01	0.25
	ตัวอย่าง 2	40%	0.13±0.01	0.13
		60%	0.19±0.01	0.21
		80%	0.26±0.01	0.28
		100%	0.30±0.01	0.34
	ตัวอย่าง 3	40%	0.12±0.01	0.15
		60%	0.21±0.01	0.23
		80%	0.30±0.01	0.30
		100%	0.34±0.01	0.39



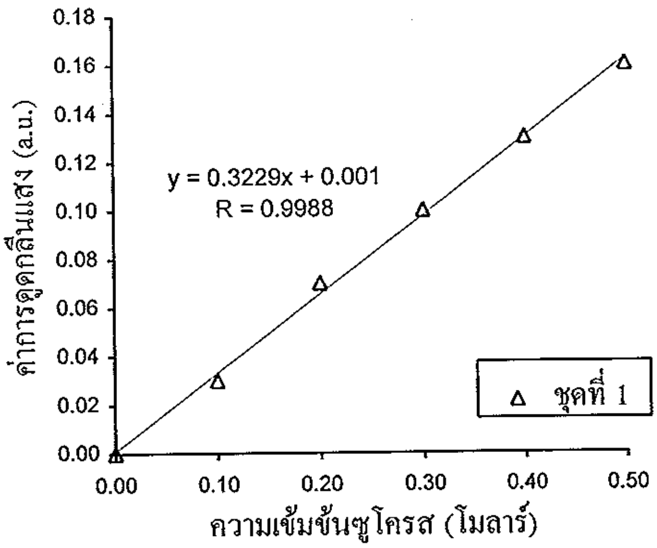
ภาพประกอบ 38 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในน้ำอ้อยระหว่างเทคนิค BIA กับเทคนิคโพลาริเมตริก

3.5.2 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสในน้ำอ้อยระหว่างเทคนิค BIA กับเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริก

การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในน้ำอ้อยระหว่างเทคนิค BIA กับเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริก (2.7.2) ทำการทดลอง 3 ชุด และทำคาลิเบรทชันของแต่ละเทคนิคทุกชุด ตาราง 23 ภาพประกอบ 39 แสดงคาลิเบรทชันเคิร์ฟของเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริก ส่วนขั้นตอนอื่นๆ ทำเช่นเดียวกับ 3.5.1.2 เพียงแต่ใช้เทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริกแทนเทคนิคโพลาริเมตริก ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการหาปริมาณซูโครสในน้ำอ้อยของเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริกแสดงดังตาราง 24 และค่าความเข้มข้นของซูโครสในน้ำอ้อยที่คำนวณได้จากคาลิเบรทชันเคิร์ฟของทั้งสองเทคนิคแสดงในตาราง 25 ภาพประกอบ 40 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า เมื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของซูโครสที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค BIA กับเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริก ความแตกต่างระหว่างสองเทคนิคนี้จะไม่มีนัยสำคัญ

ตาราง 23 ค่าการดูดกลืนแสงจากสารละลายซูโครสมาตรฐานที่ได้จากเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริกเพื่อใช้เป็นคาลิเบรทชันเคิร์ฟ

ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส (โมลาร์)	ค่าการดูดกลืนแสง (a.u.) ชุดที่ 1	2	3
0.00	0.00	0.00	0.00
0.10	0.03	0.05	0.03
0.20	0.07	0.08	0.07
0.30	0.10	0.12	0.10
0.40	0.13	0.15	0.13
0.50	0.16	0.19	0.17



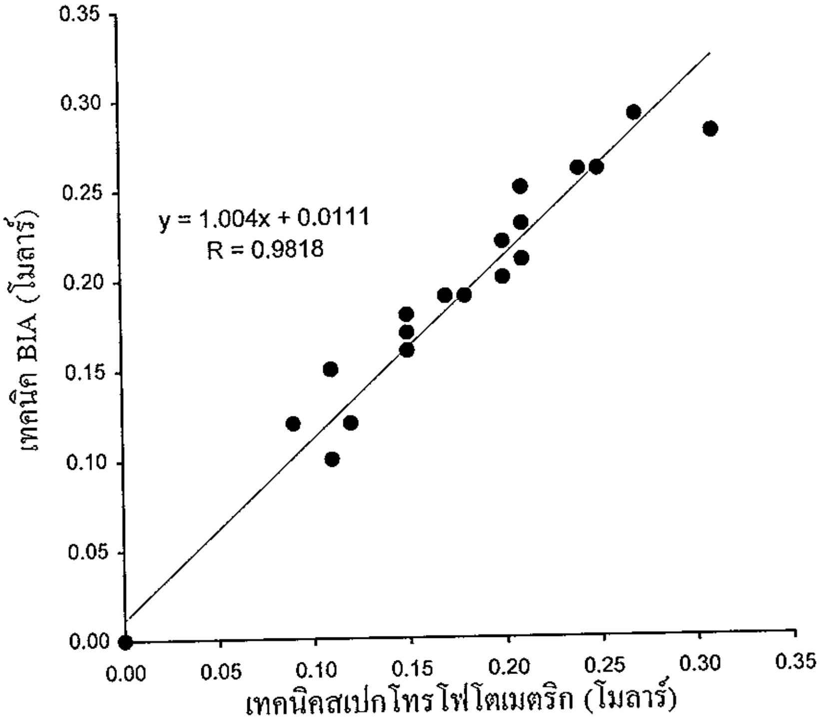
ภาพประกอบ 39 ค่าการดูดกลืนแสงจากสารละลายซูโครสมาตรฐานที่ได้จากเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริก (ชุดที่ 1 ตาราง 23)

ตาราง 24 ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสในน้ำอ้อยด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริก

ชุดที่	น้ำอ้อย	ค่าการดูดกลืนแสง (a.u.)	
		การย่อยสลายซูโครส (Inversion)	
		ก่อน	หลัง
1	40%	0.02	0.05
	50%	0.02	0.07
	60%	0.02	0.09
	70%	0.03	0.10
	80%	0.04	0.11
	90%	0.04	0.12
	100%	0.04	0.14
2	40%	0.02	0.06
	50%	0.02	0.07
	60%	0.03	0.08
	70%	0.03	0.10
	80%	0.03	0.11
	90%	0.04	0.12
	100%	0.04	0.14
3	40%	0.01	0.05
	50%	0.01	0.06
	60%	0.02	0.07
	70%	0.02	0.08
	80%	0.02	0.09
	90%	0.03	0.11
	100%	0.04	0.13

ตาราง 25 ผลการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสในน้ำอ้อยด้วยเทคนิค BIA เปรียบเทียบกับเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริก

ชุดที่	น้ำอ้อย	BIA (โมลาร์)	สเปกโทรโฟโตเมตริก (โมลาร์)
1	40%	0.12±0.01	0.09
	50%	0.16±0.01	0.15
	60%	0.21±0.01	0.21
	70%	0.23±0.01	0.21
	80%	0.25±0.01	0.21
	90%	0.26±0.01	0.24
	100%	0.28±0.01	0.31
2	40%	วัดไม่ได้	0.09
	50%	0.10±0.02	0.11
	60%	0.15±0.02	0.11
	70%	0.19±0.02	0.17
	80%	0.20±0.02	0.20
	90%	0.22±0.02	0.20
	100%	0.26±0.03	0.25
3	40%	0.12±0.05	0.12
	50%	0.18±0.07	0.15
	60%	0.17±0.06	0.15
	70%	0.19±0.06	0.18
	80%	0.21±0.07	0.21
	90%	0.26±0.07	0.24
	100%	0.29±0.06	0.27



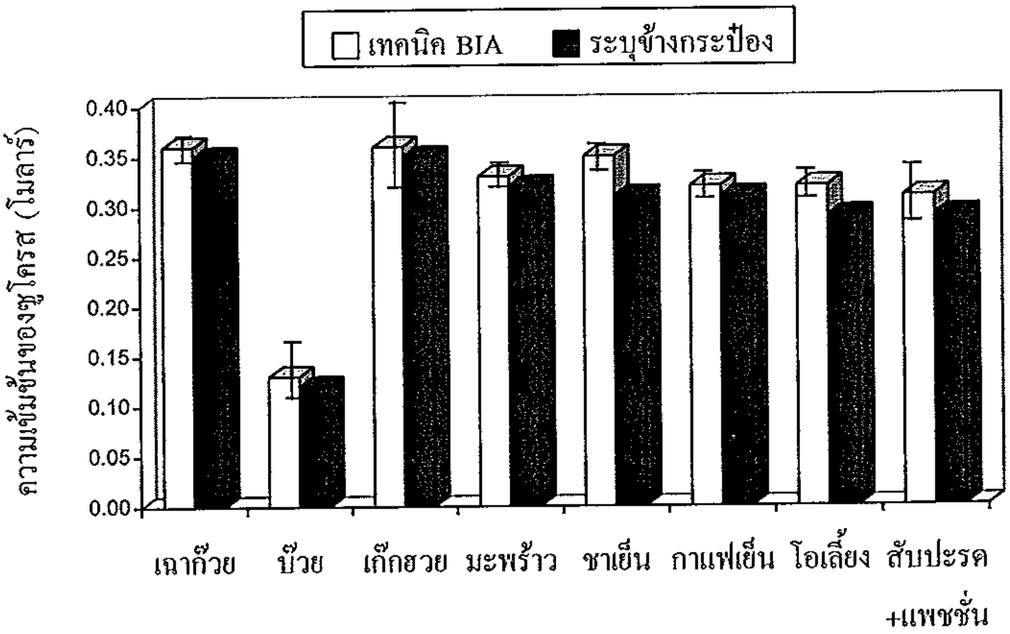
ภาพประกอบ 40 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสในน้ำอ้อยระหว่างเทคนิค BIA กับเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริก

3.6 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในน้ำกระป๋องด้วยเทคนิค BIA

เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในน้ำกระป๋องด้วยเทคนิค BIA (2.8) พบว่า เมื่อตัวอย่างที่ใช้ไม่มีกรดซิตริกเป็นส่วนประกอบ อันได้แก่ เฉาก๊วย บ๊วย เก๊กฮวย มะพร้าว ชาเย็น กาแฟเย็น โอเลี้ยง และสับปะรดผสมแพชชั่น จะได้ผลการวิเคราะห์สูงกว่าค่าที่ระบุไว้ข้างกระป๋องเฉลี่ยประมาณ 6.3 ± 3.9% (ตาราง 26 และภาพประกอบ 41) ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากว่าขณะที่ทำการทดลองช่วงเวลาที่ทำคาลิเบรทชันเคิร์ฟกับช่วงเวลาวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างนั้นอุณหภูมิห้องมีความแตกต่างกันเล็กน้อยซึ่งจะมีผลต่อสัญญาณที่ได้ แต่เมื่อวิเคราะห์โดยวิธีทางสถิติพบว่า ความแตกต่างนี้ไม่มีนัยสำคัญ สำหรับในน้ำผลไม้กระป๋องที่มีกรดซิตริก เช่น ส้ม แอปเปิ้ล สับปะรด และมะนาว ปริมาณซูโครสที่วิเคราะห์ได้ต่ำกว่าค่าที่ระบุไว้ข้างกระป๋องค่อนข้างมาก (ตาราง 27 ภาพประกอบ 42) ทั้งนี้คาดว่าน่าจะเนื่องมาจากการที่กรดซิตริกไปเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของซูโครสให้เป็นกลูโคสและฟรักโทส (Junk and Pancoast , 1973) ทำให้ปริมาณซูโครสลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า น้ำส้มที่ระบุวันผลิตห่างจากวันที่นำมาวิเคราะห์มากขึ้น ซูโครสที่วิเคราะห์ได้จะน้อยลง (ตาราง 28 ภาพประกอบ 43) แสดงว่า นอกจากกรดซิตริกที่ไปเร่งการสลายตัวของซูโครสแล้วเวลายังเป็นปัจจัยที่สำคัญเนื่องจากซูโครสเมื่ออยู่ในรูปของสารละลายจะไม่เสถียร ทำให้เกิดการสลาย (Decomposition) ไป เมื่อเวลาผ่านไป (Junk and Pancoast , 1973)

ตาราง 26 ผลการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสในน้ำกระป๋องด้วยเทคนิค BIA

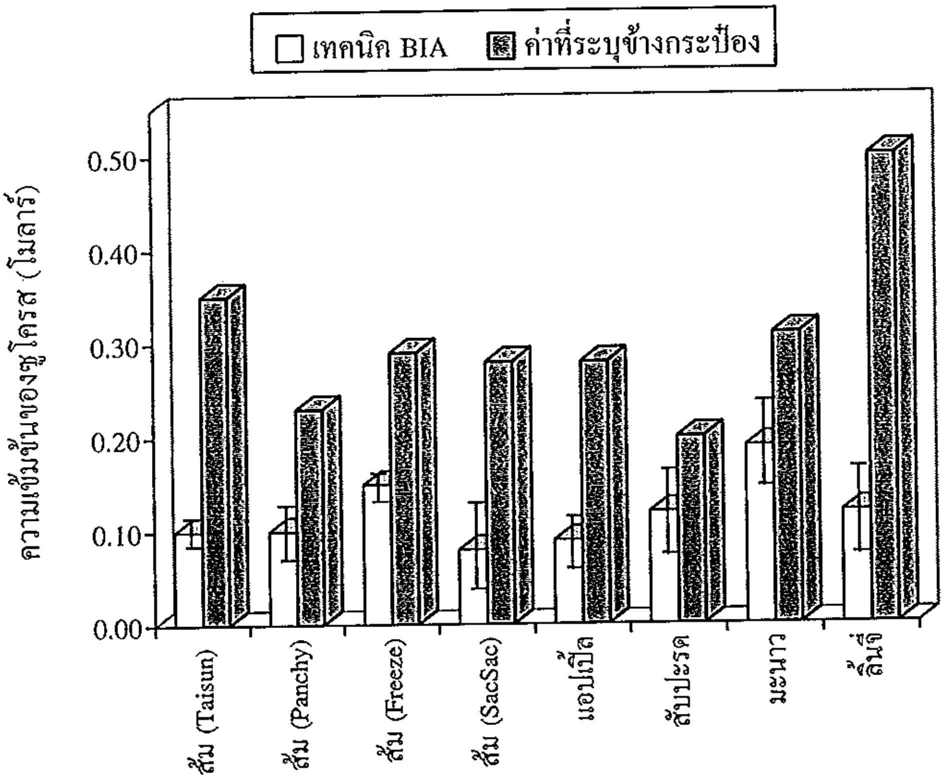
น้ำผลไม้ กระป๋อง	ความเข้มข้นของซูโครส (โมลาร์)		ความแตกต่างระหว่างค่าที่ได้จากเทคนิค BIA กับข้างกระป๋อง (%)
	เทคนิค BIA	ข้างกระป๋อง	
เฉาก๊วย (Pigion)	0.36±0.01	0.35	2.9
บ๊วย (UFC)	0.13±0.03	0.12	8.3
เก๊กฮวย (Malee)	0.36±0.04	0.35	2.9
มะพร้าว (Freeze)	0.33±0.01	0.32	3.1
ชาเย็น (Freeze)	0.35±0.01	0.31	12.9
กาแฟเย็น (Birdy)	0.32±0.01	0.31	3.2
โอเลี้ยง (Freeze)	0.32±0.01	0.29	10.3
สับปะรด+แพชชั่น (Freeze)	0.31±0.03	0.29	6.9
		เฉลี่ย	6.3 ± 3.9%



ภาพประกอบ 41 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสระหว่างเทคนิค BIA กับค่าที่ระบุไว้ข้างกระป๋อง

ตาราง 27 ผลการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสในน้ำผลไม้กระป๋องด้วยเทคนิค BIA (ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ไม่ตรงกับข้างกระป๋อง)

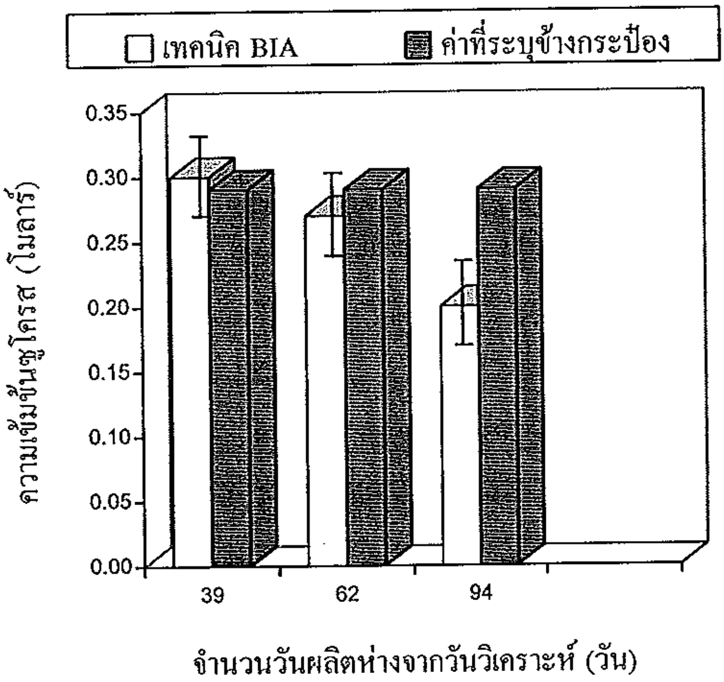
น้ำผลไม้กระป๋อง	ความเข้มข้นของซูโครส (โมลาร์)		ความแตกต่างระหว่างค่าที่ได้จากเทคนิค BIA กับข้างกระป๋อง (%)
	เทคนิค BIA	ข้างกระป๋อง	
ส้ม (Taisun)	0.10±0.01	0.35	-71.4
ส้ม (Panchy)	0.10±0.03	0.23	-56.5
ส้ม (Freeze)	0.15±0.01	0.29	-48.3
ส้ม (Sac Sac)	0.08±0.05	0.28	-71.4
แอปเปิ้ล (Malee)	0.09±0.03	0.28	-67.9
สับปะรด (Sac Sac)	0.12±0.05	0.20	-40.0
มะนาว (Golden Pan)	0.19±0.05	0.31	-38.7
ลิ้นจี่ (UFC)	0.12±0.05	0.50	-76.0
		เฉลี่ย	-58.8 ± 15.0%



ภาพประกอบ 42 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสระหว่างเทคนิค BIA กับค่าที่ระบุไว้ข้างกระป๋อง

ตาราง 28 ผลการวิเคราะห์น้ำส้ม (Freeze) ที่มีวันผลิตห่างจากวันวิเคราะห์ต่างกันด้วยเทคนิค BIA

ความเข้มข้นข้างกระป๋อง (โมลาร์)	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ที่มีวันผลิตห่างจากวันวิเคราะห์ (โมลาร์)		
	39 วัน	62 วัน	94 วัน
0.29	0.30±0.04	0.27±0.04	0.20±0.04



ภาพประกอบ 43 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในน้ำส้มกระป๋องระหว่างเทคนิค BIA กับค่าที่ระบุไว้ข้างกระป๋องที่มีจำนวนวันผลิตห่างจากวันวิเคราะห์ต่างกัน

บทที่ 4

บทสรุป

จากผลการทดลองจะเห็นว่าเทคนิค BIA ที่ใช้ตัวตรวจวัดความร้อนร่วมกับเอนไซม์อินเวอร์เทสสามารถวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสได้ โดยเอนไซม์นี้จะทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครสได้เป็นกลูโคสกับฟรักโทสพร้อมทั้งให้ความร้อนและสามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของความร้อนนี้โดยใช้เทอร์มิสเตอร์

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยพื้นฐานของระบบ BIA พบว่า ความยาวของปลอกเทอร์มิสเตอร์ที่ใช้สวมคลุมเทอร์มิสเตอร์ตรวจวัด เพื่อป้องกันไม่ให้ความร้อนที่เกิดขึ้นแพร่กระจายไปยังสารละลายส่วนอื่นๆ เร็วเกินไปนั้นควรจะมีความยาว 15 มิลลิเมตร โดยมีระยะห่างจากเทอร์มิสเตอร์ของรูปลอกเทอร์มิสเตอร์ 2 มิลลิเมตร ก่อนที่จะฉีดสารละลายตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์ควรจะแช่สารละลายตัวอย่างเพื่อให้สารละลายตัวอย่างในปิเปตมีการปรับอุณหภูมิจนเท่ากับอุณหภูมิของสารละลายในบีกเกอร์อย่างน้อย 30 วินาที และอัตราเร็วในการคนสารละลายที่เหมาะสมเพื่อล้างสารละลายตัวอย่างและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกจากเทอร์มิสเตอร์และช่วยกระจายความร้อนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไปยังสารละลายในบีกเกอร์หลังจากที่มีการตรวจวัดแล้วคือ 300 รอบต่อนาที

เมื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ซูโครสพบว่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทสเท่ากับ 4.80 โดยทำที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราเร็วในการฉีดสารละลายโดยเครื่อง EDOS 5221 ที่ 4 และระยะห่างของปลายปิเปตจากเทอร์มิสเตอร์ 2 มิลลิเมตร ปริมาตรสารละลายตัวอย่าง 25 ไมโครลิตร และช่วงความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่ให้การตอบสนองเชิงเส้น 0.00 - 0.50 โมลาร์

สำหรับขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ซูโครสด้วยเทคนิค BIA นี้ พบว่าเป็น 0.10 โมลาร์ ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่นเช่น เทคนิคคาปิลลารีแก๊สโครมาโทกราฟีให้ช่วงในการตรวจวัด 3×10^{-7} - 9×10^{-5} โมลาร์ (Davies , 1988) และเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีให้ขีดจำกัดตรวจวัดต่ำสุด 7×10^{-5} โมลาร์ (Grosz and Braunsteiner , 1989) แต่ถ้าตัวอย่างที่ต้องการวัดมีความเข้มข้นของซูโครสสูงเช่นน้ำอ้อยซึ่งจะมีปริมาณซูโครสประมาณ 0.30 โมลาร์ วิธีนี้จึงน่าจะมีความเหมาะสมกว่าวิธีอื่นเนื่องจากไม่ต้องทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์

นอกจากนี้ยังพบว่าระบบวิเคราะห์นี้การรบกวนจากสิ่งอื่นๆ มีน้อยมากจากการศึกษาสิ่งที่น่าจะมีผลต่อการรบกวนในการวิเคราะห์ซูโครส เช่น กลูโคสและฟรักโทส รวมทั้งไอออนของทองแดง (II) หรือเงิน (I) พบว่า ทั้งกลูโคสและฟรักโทสที่มีอยู่ในสารละลายซูโครสจะไม่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสหากความเข้มข้นของกลูโคสและฟรักโทสอยู่ในช่วง 0.02 - 0.10 โมลาร์ ซึ่งก็เป็นความเข้มข้นของกลูโคสและฟรักโทสที่มีอยู่ในน้ำอ้อยนั่นคือ 0.02 - 0.05 โมลาร์ ดังนั้นการใช้ระบบนี้ในการวิเคราะห์ซูโครสในน้ำอ้อยจึงไม่น่าจะมีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์ และในระบบ BIA นี้ ไอออนของทองแดง (II) ในช่วงความเข้มข้น 0.5 - 3.0 ppm หรือความเข้มข้นของเงิน (I) ในช่วง 5.0 - 20.0 ppm จะไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทส

สำหรับลักษณะของตัวอย่างพบว่า สารแขวนลอยต่างๆ ที่มีอยู่ในน้ำอ้อยจะไม่มีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์ซูโครสอย่างเป็นนัยสำคัญ ดังนั้นระบบ BIA นี้จึงสามารถวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในน้ำอ้อยได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างแม้ว่าสารตัวอย่างจะมีลักษณะขุ่น นอกจากนี้เทคนิค BIA สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีสีต่างๆ ได้โดยที่ไม่มีการรบกวนจากสีของสารตัวอย่าง ซึ่งเห็นได้จากการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในน้ำกระป๋อง เช่น เฉาก๊วย บ๊วยเก๊กฮวย ชาเย็น กาแฟเย็น และโอเลี้ยง เป็นต้น ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับวิธีโพลาริเมตริกและสเปกโทรโฟโตเมตริก นอกจากนี้ในการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสของระบบ BIA จะใช้เอนไซม์อินเวอร์เทสเพียงชนิดเดียว โดยใช้เป็นปริมาณไม่มากเพียง 1 มิลลิกรัม ในการตรึงเอนไซม์อินเวอร์เทส 1 ครั้งสามารถทำการวิเคราะห์ได้ประมาณ 130 ครั้ง แต่ละตัวอย่างใช้การฉีดวิเคราะห์ 5 ครั้ง นั่นคือใช้เอนไซม์อินเวอร์เทสประมาณ 0.04 มิลลิกรัมต่อหนึ่งตัวอย่าง จึงเป็นข้อได้เปรียบอีกข้อหนึ่งเมื่อเทียบกับวิธีสเปกโทรโฟโตเมตริกที่ใช้เอนไซม์สามชนิดคือ เอนไซม์อินเวอร์เทส กลูโคสออกซิเดส และเพอร์ออกซิเดส โดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทสถึง 0.5 มิลลิกรัมต่อหนึ่งตัวอย่าง และวิธีนี้ยังต้องผ่านขั้นตอนการเจือจางสารตัวอย่างด้วย

ในระบบ BIA นี้สามารถฉีดสารตัวอย่างได้ 20 - 30 ครั้งต่อชั่วโมงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและในการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างในการทดลองนี้จะฉีดสารตัวอย่าง 5 ครั้งต่อหนึ่งความเข้มข้น ทำให้เสียเวลาค่อนข้างมากกล่าวคือประมาณ 10 - 15 นาทีต่อหนึ่งความเข้มข้น แต่เนื่องจากความแตกต่างของผลการตอบสนองใน 5 ครั้งนี้จะมีประมาณ 4% ดังนั้นในการใช้งานจริงอาจจะฉีดสารตัวอย่างเพียงครั้งเดียวซึ่งจะลดเวลาลงเหลือแค่ 2 - 3 นาทีต่อตัวอย่าง อย่างไรก็ตามเวลา 10 - 15 นาทีก็ยังสั้นกว่าเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธีสเปกโทรโฟโตเมตริกที่ใช้เวลาถึง 70 นาทีต่อตัวอย่าง

จากการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสโดยการใช้เทคนิค BIA ร่วมกับตัวตรวจวัดความร้อน สามารถสรุปได้ว่าเทคนิคนี้สามารถทำการวิเคราะห์ได้ง่าย สะดวก เพราะไม่ต้องผ่านขั้นตอน

การเตรียมสารตัวอย่างก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ได้รวดเร็ว มีความถูกต้อง และใช้สารตัวอย่างในการทำการวิเคราะห์น้อย

ดังนั้นเทคนิค BIA ที่ใช้เทอร์มิสเตอร์เป็นตัวตรวจวัดน่าจะสามารถใช้ในการวิเคราะห์สารอื่นๆ โดยใช้ปฏิกิริยาเอนไซม์ได้อีก เพราะปฏิกิริยาเอนไซม์ทุกชนิดจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความร้อนตัวอย่างเช่น การหาปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์โดยใช้เอนไซม์คะตะเลส (Tran-Minh and Vallin , 1978) การหาปริมาณยูเรีย (urea) โดยใช้เอนไซม์ยูรีเอส (urease) (Fulton , Cooney and Weaver , 1980) การหาปริมาณกลูโคสโดยใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (Weaver , et al. , 1976) เป็นต้น

บรรณานุกรม

ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์. 2530. "เอนไซม์และปฏิกิริยาในชีวเคมี" , ใน ชีวเคมี. , หน้า 150-152. มนตรี จุฬาวัฒนทล , บรรณาธิการ. กรุงเทพฯ : ห้างหุ้นส่วนจำกัด ค.ส.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2535. สถิติสำหรับการวิจัยทางเกษตร. ม.ป.ท. : ม.ป.พ.

ภาวิณี คณาสวัสดิ์. 2531. การตรึงเอนไซม์และเซลล์. ม.ป.ท. : ม.ป.พ.

ระวิ สงวนทรัพย์. 2529. พจนานุกรมศัพท์วิทยาศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

วิชัย ตันไพจิตร. 2522. "โภชนาการเพื่อสุขภาพ" , ใกล้หมอ. 3 (เมษายน 2522) , 75-78.

วิฑูรย์ พัฒนรัชต์. 2520. "อุตสาหกรรมน้ำตาล" , อุตสาหกรรมสาร กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม. 20 (ธ.ค. 2520) , 11-22.

สุนันทา ภิญญาวัธน์. 2532. ชีวเคมี 2. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง : มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

AOAC Methods. 1980. Official Methods of Analysis. 13th ed. Association of Official Analytical Chemists : Washington DC.

Bacon , J.S.D. 1955. "Methods for Measuring Transglycosylase Activity of Invertases" , In Methods in Enzymology I. p. 259. Colowick , S.P. and Kaplan , N.O. , eds. New York : Academic press.

Cadet , F. , et al. 1991. "Quantitative Determination of Sugar Cane Sucrose by Multidimensional Statistical Analysis of their Mid-Infrared Attenuated Total Reflectance Spectra" , Applied Spectroscopy. 45 (1991) , 166-173.

Campanella , L. and Tomassetti , M. 1990. "The Membrane Sensors in the Environmental , Biological and Clinical Analysis" , In Bioinstrumentation : Research , Developments and Applications. , p. 1396. Wise , D.L. , ed. USA : Butterworth.

Christian , G.D. 1980. Analytical chemistry. 3d. ed. New York : John Wiley & Sons.

Clark , L.C. 1987. "The enzyme electrode" , In Biosensors : fundamentals and Applications. , pp. 3-12. Turner , A.P.F. ; Karube , I. and Wilson , G.S. , eds. Oxford : Oxford University Press.

Cleland , N. and Enfors , S.-O. 1984. "Externally Buffered Enzyme Electrode for Determination of Glucose" , Anal. Chem. 56 (1984) , 1880-1884.

Davies , H.V. 1988. "Rapid Determination of Glucose , Fructose and Sucrose in Potato Tubers by Capillary Gas Chromatography" , Potato Research. 31 (1988) , 569-572.

Dixon , M. , et al. 1979. Enzyme. 3d ed. New York : Academic Press.

Fulton , S.P. ; Cooney , C.L. and Weaver , J.C. 1980. "Thermal Enzyme Probe with Differential Temperature Measurements in a Laminar Flow - Through Cell" , Anal. Chem. 52 (1980) , 505-508.

Goldberg , R.N. ; Tewari , Y.B. and Ahluwalia , J.C. 1989. "Thermodynamics of the Hydrolysis of Sucrose" , J. Bio. Chem. 264 (1989) , 9901-9904.

Grosz , J. and Braunsteiner , W. 1989. "Quantitative Determination of Glucose , Fructose and Sucrose and Separation of Fructo-oligosaccharides by Means of TLC" , J. Planar Chromatography. 2 (1989) , 420- 423.

Hamid , J.A. ; Moody , G.J. and Thomas , J.D.R. 1988. "Chemically Immobilised Tri-enzyme Electrode for the Determination of Sucrose Using Flow Injection Analysis" , Analyst. 113 (1988) , 81-85.

Hestrin , S. ; Feingold , D. and Schramm , M. 1955. "Hexoside Hydrolases" , In Methods in Enzymology I. , p. 251. Colowick , S.P. and Kaplan , N.O. , eds. New York : Academic Press.

Jespersen , N.D. 1990. "Thermistor Probes" , In Sensors in Bioprocess control. , pp. 193-220. Twork , J.V. and Yacynych , A.M. , eds. New York and Basel : Marcel Dekker , INC.

Junk , W.R. and Pancoast , H.M. 1973. Handbook of Sugar for Processors , Chemists and Technologists. Westport , Connecticut : The AVI Publishing Company , INC.

Karube , I. 1987. "Micro-organism based sensors" , In Biosensors : fundamentals and Applications. , p. 13. Turner , A.P.F. ; Karube , I. and Wilson , G.S. , eds. Oxford : Oxford University Press.

Mattos , I.L. ; Zagatto , E.A.G. and Jacintho , A.O. 1988. "Spectrophotometric Flow - Injection Determination of Sucrose and Total Reducing Sugar in Suger - Cane Juice and Molasses" , Anal. Chim. Acta. 214 (1988) , 247-257.

Meade , G.P. and Chen , J.C.P. 1977. Cane Sugar Handbook. 10th ed. , New York : John Wiley & Sons.

Ohlenbusch , H.D. and Vogele , P. 1974. "Invertase" , In Methods of Enzymatic Analysis. Vol. 2. pp. 923-928. Bergmeyer , H.U. , ed. New York : Academic Press.

Paine , F.A. and Paine , H.Y. 1992. A Handbook of Food Packaging. 2d ed. , New York : Blackie Academic & Professional.

Pancoast , H.M. and Junk , W.R. 1980. Handbook of Sugars. 2d ed. , Westport , Connecticut. : The AVI Publishing Company , INC.

Park , J.K. ; Ro , H.S. and Kim , H.S. 1991. "A New Biosensor for Specific Determination of Sucrose Using an Oxidoreductase of Zymomonasmobilis and Invertase", Biotechnol. Bioeng. 38 (1991) , 217-223.

Pearson , D. 1970. The Chemical Analysis of Foods. 6th ed. New York : Chemical Publishing Company , INC.

Pesce , A.J. and Kaplan , L.A. 1987. Methods in Clinical Chemistry. Washington , D.C. : The C.V. Mosby Company.

Pomeranz , Y. and Meloan , C.E. 1978. Food Analysis : Theory and Practice. Westport , Connecticut : The AVI Publishing Company , INC.

Rawn , J.D. 1983. Biochemistry. New York : Harper & Row , Publishers , Inc.

Scheller , F. and Renneberg , R. 1983. "Glucose-Eliminating Enzyme Electrode for Sucrose Determination in Glucose - Containing Samples" , Anal. Chim. Acta. , 152 (1983) , 265-269.

Sigma. n.d. "Glucose Quantitative , Enzymatic [Glucose Oxidase] Determination in Whole Blood , Serum or Plasma at 425-475 nm [Procedure No. 510]" s.l. : s.n. (Unpublished)

Strobel , H.A. 1973. Chemical Instrumentation : A Systematic Approach. 2d. ed. London : Addison-Wesley Publishing Company.

Tran-Minh , C. and Vallin , D. 1978. "Enzyme - Bound Thermistor as an Enthalpimetric Sensor" , Anal. Chem. 50 (1978) , 1874-1878.

Tzonwara S.M. - Karayanni & Crouch S.R. 1990. "Enzymatic Determinations of Glucose , Sucrose and Maltose in Food Samples by Flow Injection Analysis" , Food Chem. 35 (1990) , 109-116.

Wang , J. and Taha , Z. 1991a. "Batch Injection Analysis" , Anal. Chem. 63 (1991) , 1053-1056.

-------. 1991b. "Batch Injection with Potentiometric Detection" , Anal. Chim. Acta. 252 (1991) , 215-221.

-------. 1991c. "Batch Injection Analysis with Thermistor Sensing Devices" , Anal. Lett. 24 (1991) , 1389-1400.

Wang , J. 1992. "Injection Analysis-From Flow-Injection Analysis to Batch - Injection Analysis" , Microchemical J. 45 (1992) , 219-224.

Wang , J. ; Rayson , G.D. and Taha , Z. 1992. "Batch Injection Analysis Using Fiber - Optic Fluorometric Detection" , Applied Spectroscopy. 46 (1992) , 107-110.

Wang , J. , et al. 1992. "Computerized pipettes with programmable dispension for Batch Injection Analysis" , Anal. Chim. Acta. 267 (1992) , 171-177.

Weaver , J.C. , et al. 1976. "Experiments and Calculations Concerning a Thermal Enzyme Probe" , Biochim. Biophys. Acta. 452 (1976) , 285-291.

Zagatto , E.A.G. ; Mattos , I.L. and Jacintho , A.O. 1988. "Determination of Sucrose in Sugar - cane Juice and Molasses by Flow - Injection Spectrophotometry" , Anal. Chim. Acta. 204 (1988) , 259-270.

Zapsalis , C. R. Anderle Beck. 1985. Food Chemistry and Nutritional Biochemistry. New York : John Wiley & Sons.

ภาคผนวก

ตาราง 29 ส่วนประกอบของอ้อยและน้ำอ้อย

(Meade and Chen , 1977)

อ้อยที่ใช้หีบ	เปอร์เซ็นต์ (%)
น้ำ	73-76
ของแข็ง	24-27
ของแข็งที่ละลายน้ำได้	10-16
เยื่อใย (แห้ง)	11-16

ส่วนประกอบของน้ำอ้อย	ของแข็งที่ละลายน้ำ (%)
น้ำตาล	75-92
ซูโครส	70-88
กลูโคส	2-4
ฟรุกโตส	2-4
เกลือ	3.0-4.5
เกลือของกรดอนินทรีย์	1.5-4.5
เกลือของกรดอินทรีย์	1.0-3.0
กรดอินทรีย์	1.5-5.5
กรดคาร์บอกซิลิค	1.1-3.0
กรดอะมิโน	0.5-2.5
สารอินทรีย์อื่นที่ไม่ใช้น้ำตาล	
โปรตีน	0.5-0.6
แป้ง	0.001-0.050
ยาง (Gums)	0.30-0.60
ไข,ไขมัน,ฟอสฟาโท	0.05-0.15
อื่นๆ	3.0-5.0

ตาราง 30 โลหะหนักในน้ำตาลดิบ (Heavy Metals in Raw Sugar)

(Meade and Chen , 1977)

โลหะ	ปริมาณ (ppm)
เหล็ก	10.71
แมงกานีส	3.58
ทองแดง	1.22
สังกะสี	0.50
ตะกั่ว	0.20
นิกเกิล	0.12
โครเมียม	0.07
โคบอลท์	0.04
แคดเมียม	0.005
ซิลเวอร์	0.0002

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวประภาพรรณ ศุภพิชญ์นาม	
วัน เดือน ปีเกิด	4 สิงหาคม 2513	
วุฒิการศึกษา		

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
การศึกษาบัณฑิต (กศ.บ.) เกียรตินิยมอันดับ 2	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สงขลา	2534