

การสร้างชุดทดสอบความหวานของอ้อยและน้ำตาล

**FABRICATION OF A TEST KIT FOR SWEETNESS DETECTION
OF SUGARCANE AND SUGAR**

ชิตารัตน์ เหล่าชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีนวัตกรรม
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

การสร้างชุดทดสอบความหวานของอ้อยและน้ำตาล

ธิดารัตน์ เหล่าชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีนวัตกรรม

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี


ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ชื่อวิทยานิพนธ์ การสร้างชุดทดสอบความหวานของอ้อยและน้ำตาล
Fabrication of a Test Kit for Sweetness Detection of Sugarcane and Sugar
ชื่อ-นามสกุล นางสาวธิดารัตน์ เหล่าชัย
สาขาวิชา เคมีสิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ ตัญญา ปร.ศ.
ปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


ประธานกรรมการ
(อาจารย์ศิริวรรณ ตัญญา, วท.ศ.)


กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อสังกั โส-สกุลเขมฤทัย, Ph.D.)


กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ ตัญญา ปร.ศ.)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์
ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาค้นคว้าหลักสูตรปริญญาโท


คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิภา พงษ์สวัสดิ์, วท.ศ.)

วันที่ 24 เดือน เมษายน พ.ศ. 2560

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การสร้างชุดทดสอบความหวานของอ้อยและน้ำตาล
ชื่อ - นามสกุล นางสาวธิดารัตน์ เหล่าชัย
สาขาวิชา เคมีนิวตกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ ตี๋ภู, ปร.ด.
ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อ

ความหวานเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของอ้อยและน้ำตาล ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างชุดทดสอบความหวานของอ้อยและน้ำตาล โดยตรวจวัดความเข้มข้นซูโครส อาศัยเทคนิคไบโอเซนเซอร์เพื่อสร้างเป็นโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ ซึ่งประกอบด้วยอินเวอร์เทส มีวตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส เปอร์ออกซิเดส พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ โคลโตซาน และอนุภาคนาโนแม่เหล็ก เมื่อเติมซูโครสและสารไอไดอะนิซิดีน ได้สารละลายสีน้ำตาล จากนั้นนำสารละลายนี้ไปตรวจวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร

เริ่มต้นจากการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็ก สร้างชุดทดสอบจากโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ หาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบ จากนั้นหาประสิทธิภาพของชุดทดสอบ และนำชุดทดสอบไปตรวจวัดความเข้มข้นซูโครสในตัวอย่างจริง

ผลการทดลองพบว่า อนุภาคนาโนแม่เหล็กที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 43 นาโนเมตร มีสมบัติความเป็นแม่เหล็กยิ่งยวด ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมพบว่า ชุดทดสอบนี้มีความเที่ยงตรงและความถูกต้องสูง ช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงในช่วง 10 ถึง 60 มิลลิโมลาร์ จัดจำกัดในการตรวจพบและจัดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพเท่ากับ 3 และ 11 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ สุดท้ายนำชุดทดสอบไปตรวจหาความเข้มข้นของซูโครสในตัวอย่างอ้อยและน้ำตาล โดยเปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธีตรวจวัดของโรงงานน้ำตาลด้วยสถิติ t-test พบว่า วิธีทั้งสองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % สรุปได้ว่า ชุดทดสอบนี้มีข้อดีหลายข้อ เช่น จำเพาะเจาะจงต่อซูโครส ใช้งานง่าย ใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 3 นาที และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ 32 ครั้ง

คำสำคัญ: ชุดทดสอบความหวาน ซูโครส โครโอเจลไบโอเซนเซอร์ อ้อย น้ำตาล

Thesis Title Fabrication of a Test Kit for Sweetness Detection of Sugarcane and Sugar
Name - Surname Miss Thidarut Laochai
Program Innovative Chemistry
Thesis Advisor Assistant Professor Siriwan Teepoo, Ph.D.
Academic Year 2016

ABSTRACT

Sweetness is an indicator of the sugarcane and sugar quality. Therefore, the objective of this research is to fabricate a sweetness test kit of sugarcane and sugar by measuring the concentration of sucrose. It was based on the biosensor technique to fabricate cryogel biosensor which consisted of invertase, mutarotase, glucose oxidase, peroxidase, polyvinyl alcohol, chitosan and magnetic nanoparticles. When sucrose and *o*-dianisidine were added, the brown solution was obtained. Then, the absorbance of this solution was measured with UV-visible spectrophotometer at a wavelength of 430 nm.

Firstly, the magnetic nanoparticles were synthesized. A test kit was fabricated from cryogel biosensor. The conditions of a test kit were optimized. Then the performances of a test kit were evaluated and a test kit was used to measure the concentration of sucrose in the real samples.

The results showed that the synthesized magnetic nanoparticles were 43 nm of size with superparamagnetic properties. Under optimal conditions, the test kit had high precision and accuracy. The concentrations were linear in the range of 10 to 60 mM. Limit of detection and limit of qualitative detection were 3 and 11 mM, respectively. Finally, the test kit was brought to measure the concentration of sucrose in sugar cane and sugar samples by comparing the results with the measure method of sugar industry with *t*-test statistics. Both methods showed no significant difference at the 95% confidence level. It was concluded that this test kit has several advantages such as it is specific to sucrose, easy to measure, requiring only three-minute analysis and can be reused up to 32 times.

Keywords: sweetness test kit, sucrose, cryogel biosensor, sugarcane, sugar

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาเป็นอย่างยิ่งจากอาจารย์ที่ปรึกษา คือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริวรรณ ติ๊กู ที่ให้คำแนะนำ ติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินงานวิจัย และให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่งเสมอมา นับตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณา ความตั้งใจจริง และความทุ่มเทของอาจารย์เป็นอย่างยิ่ง และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.วราภรณ์ ตรีพรหม ประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิงห์โต สกุลเขมฤทัย ที่ได้เสียสละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบครั้งนี้ และยังกรุณาให้คำปรึกษา แนวคิด และตรวจสอบแก้ไขในส่วนที่บกพร่องต่างๆ ของงานวิจัย จนวิทยานิพนธ์นี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) ระดับปริญญาโท ปี 2558 โดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และบริษัทน้ำตาลราชบุรี จำกัด ที่ร่วมให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการการแยกและวิเคราะห์สารปริมาณน้อย อาคารสถาบันวิจัยเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ต่างๆ ในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และให้การสนับสนุน จนผู้วิจัยสามารถนำเอาความรู้ต่างๆ มาประยุกต์ใช้ในงานวิจัย และทำให้วิทยานิพนธ์นี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณครอบครัว เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ตลอดจนบุคคลต่างๆ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจอีกมากมาย ที่ผู้วิจัยไม่สามารถกล่าวนามได้หมดในที่นี้ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในปรารถนาดีของทุกท่านเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจ หากวิทยานิพนธ์นี้มีข้อผิดพลาดหรือบกพร่องประการใด ผู้วิจัยกราบขอขมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ธิดารัตน์ เหล่าชัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	(3)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	(4)
กิตติกรรมประกาศ.....	(5)
สารบัญ.....	(6)
สารบัญรูป.....	(8)
สารบัญตาราง.....	(9)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	(10)
บทที่ 1 บทนำ.....	11
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	11
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	12
1.3 ขอบเขตของการศึกษา.....	13
1.4 กรอบแนวคิดของการวิจัย.....	15
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	17
บทที่ 2 วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	18
2.1 อุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล.....	18
2.2 ชูโครส.....	24
2.3 วิธีทั่วไปที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณชูโครส.....	26
2.4 ไบโอดีเซนเซอร์.....	30
2.4.1 คะตะไลติกไบโอดีเซนเซอร์.....	31
2.4.2 เอนไซม์ตรึงรูป.....	32
2.4.3 ไมโครโอดีเจ.....	34
2.4.4 อนุภาคนาโนแม่เหล็ก.....	37
บทที่ 3 วิธีดำเนินการ.....	39
3.1 สารเคมี.....	39
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	40

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3 การทดลอง.....	41
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	55
4.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็ก และการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพและ ทางเคมี.....	55
4.2 การเตรียมไมโคร โอเจลไบโอเซนเซอร์สำหรับสร้างชุดทดสอบความหวาน.....	57
4.3 ผลวิธีการตรวจวัดความหวาน โดยใช้ชุดทดสอบความหวาน.....	60
4.4 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบความหวาน.....	61
4.5 ผลการประสิทธิภาพของชุดทดสอบความหวาน.....	71
4.6 การตรวจวัดความหวานในตัวอย่างจริงด้วยชุดทดสอบความหวาน.....	85
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	90
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	90
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	92
บรรณานุกรม.....	93
ภาคผนวก ผลงานเผยแพร่ทางวิชาการ.....	100
ประวัติผู้เขียน.....	118

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 การเตรียมโครโอเจลไบโอเซนเซอร์สำหรับสร้างชุดทดสอบความหวาน.....	16
รูปที่ 1.2 ขั้นตอนในการตรวจวัดความหวานในตัวอย่างอ้อยและน้ำตาล.....	17
รูปที่ 2.1 การผลิตน้ำตาลทรายดิบ.....	21
รูปที่ 2.2 การแปรรูปน้ำตาลทรายดิบให้เป็นน้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์.....	23
รูปที่ 2.3 การเกิดกระบวนการอินเวอร์ชันของซูโครส.....	24
รูปที่ 2.4 โครงสร้างของซูโครส.....	25
รูปที่ 2.5 การเกิดซูโครส.....	25
รูปที่ 2.6 หลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์.....	30
รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครสที่ถูกเร่งด้วยอินเวอร์เทส.....	33
รูปที่ 2.8 การเกิดปฏิกิริยาของสารเชื่อมไขว้กัลดูคาร์บอลดีไฮด์.....	34
รูปที่ 2.9 การเกิดโครโอเจล.....	35
รูปที่ 2.10 โครงสร้างไคโตซาน.....	36
รูปที่ 2.11 โครงสร้างพอลิไวนิลแอลกอฮอล์.....	36
รูปที่ 4.1 การตรวจสอบสมบัติทางสนามแม่เหล็กด้วยแม่เหล็กภายนอก.....	55
รูปที่ 4.2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก.....	56
รูปที่ 4.3 การวัดขนาดของอนุภาคนาโนแม่เหล็กด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาคระดับนาโน.....	56
รูปที่ 4.4 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างผลึกของอนุภาคด้วย..... เครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์.....	57
รูปที่ 4.5 ลักษณะ ขนาดของโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมได้.....	58
รูปที่ 4.6 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก (ก) โครโอเจลที่เตรียมได้จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์รวมตัวกับไคโตซาน (ข) และ..... โครโอเจลไบโอเซนเซอร์ (ค).....	59
รูปที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงของสารละลายมาตรฐานซูโครสเมื่อตรวจวัดด้วยชุดทดสอบ ที่สร้าง จากโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ (ก) และความยาวคลื่นสูงสุดในการการดูดกลืนแสง..... ของสารละลายสีน้ำตาล (ข).....	60

สารบัญรูป (ต่อ)

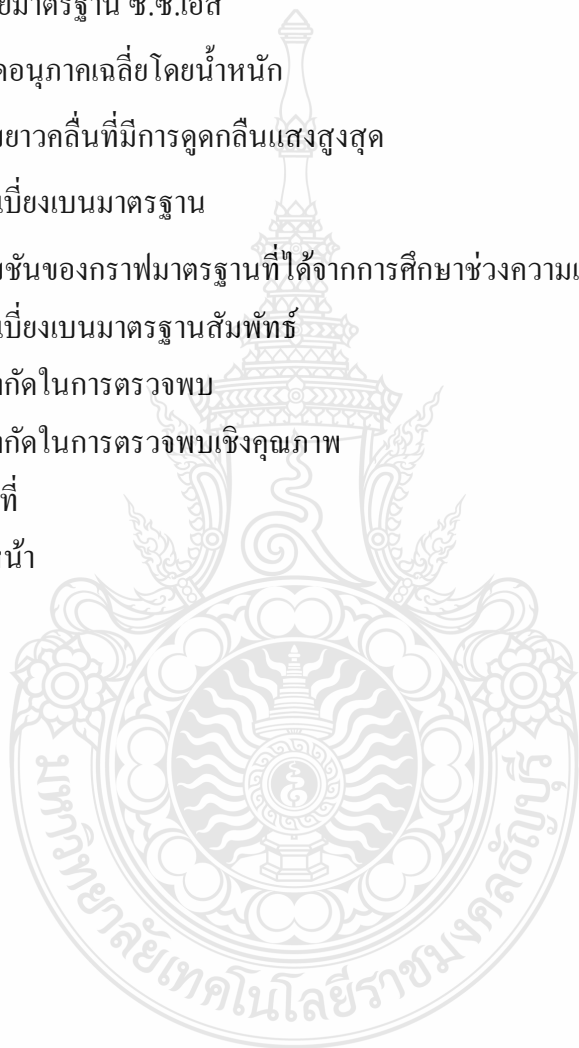
	หน้า
รูปที่ 4.8 การศึกษาอัตราส่วนของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ต่อโคโคซานในการเตรียม..... โครโอเจล.....	62
รูปที่ 4.9 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของอินเวอร์เทส (ก) มิวดาโรเทส (ข)..... กลูโคสออกซิเดส (ค) และเปอร์ออกซิเดส (ง) ที่ตรึงลงบนโครโอเจลไบโอเซนเซอร์..	65
รูปที่ 4.10 การศึกษาความเป็นกรด-เบส ของสารละลายบัฟเฟอร์.....	67
รูปที่ 4.11 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไอโดอะนิซิดีน.....	68
รูปที่ 4.12 ผลการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยา.....	70
รูปที่ 4.13 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	73
รูปที่ 4.14 ความเข้มข้นของสารละลายสีน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของซูโครส.....	75
รูปที่ 4.15 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานซูโครส.....	77
รูปที่ 4.16 การเปลี่ยนแปลงของสารทดสอบเมื่อตรวจวัดด้วยชุดทดสอบความหวาน.....	80
รูปที่ 4.17 ผลการตอบสนองของสารทดสอบต่อชุดทดสอบความหวาน.....	81
รูปที่ 4.18 เปรียบเทียบผลการตอบสนองของสารทดสอบที่ตรวจวัดด้วยชุดทดสอบ..... ความหวานกับโครโอเจลสำหรับตรวจวัดกลูโคส.....	83
รูปที่ 4.19 ความจำเพาะเจาะจงของชุดทดสอบความหวานที่ใช้ในการตรวจวัดซูโครส.....	83
รูปที่ 4.20 ผลการศึกษาอายุการใช้งานของชุดทดสอบ.....	86
รูปที่ 4.21 กราฟมาตรฐานของการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานซูโครสด้วยชุดทดสอบ..... ความหวาน (ก) และกลูโคสด้วยโครโอเจลที่สร้างขึ้นสำหรับตรวจวัดกลูโคส (ข)...	88

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ประเภทสินค้าน้ำตาลส่งออกตลาดโลก.....	19
ตารางที่ 2.2 แสดงสถานะที่ศึกษาในการตรวจวัดความหวานซูโครสด้วยชุดทดสอบ.....	49
ความหวาน.....	
ตารางที่ 4.1 แสดงผลการศึกษาอัตราส่วนของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ต่อโคโคซานในการ.....	46
เตรียมไครโอเจล.....	
ตารางที่ 4.2 แสดงผลการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์.....	63
ตารางที่ 4.3 แสดงผลการศึกษาความเป็นกรด-เบส ของสารละลายบีฟเฟออร์.....	66
ตารางที่ 4.4 แสดงผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไอโดอะนิซิดีน.....	68
ตารางที่ 4.5 แสดงผลการศึกษาเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา.....	69
ตารางที่ 4.6 สรุปสถานะที่เหมาะสมในการตรวจวัดความหวานซูโครสด้วยชุดทดสอบ.....	70
ความหวาน.....	
ตารางที่ 4.7 แสดงผลของการศึกษาการทำซ้ำของชุดทดสอบความหวาน.....	71
ตารางที่ 4.8 แสดงผลของการทวนซ้ำของชุดทดสอบความหวาน.....	72
ตารางที่ 4.9 แสดงผลผลการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน ในการตรวจวัดความหวานของ.....	74
ซูโครสในตัวอย่างอ้อยและน้ำตาล.....	
ตารางที่ 4.10 แสดงผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดความหวานของซูโครส.....	76
ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	
ตารางที่ 4.11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแบลงค์ ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร.....	78
ตารางที่ 4.12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบต่างๆ.....	80
ตารางที่ 4.13 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคส มอลโทส แลคโทส และกรดแอสคอร์บิก....	82
ที่ตรวจวัดด้วยไครโอเจลสำหรับตรวจวัดกลูโคส.....	
ตารางที่ 4.14 แสดงผลการนำกลับไปใช้ใหม่ของชุดทดสอบในการตรวจวัดความหวานซูโครส.....	84
ตารางที่ 4.15 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้โดยชุดทดสอบในแต่ละสัปดาห์.....	85
ตารางที่ 4.16 แสดงผลการหาความเข้มข้นของซูโครสในตัวอย่างจริง.....	89
ตารางที่ 4.17 แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของชุดทดสอบกับวิธีมาตรฐาน.....	89

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

mM	มิลลิโมลาร์
nm	นาโนเมตร
C.C.S	หน่วยมาตรฐาน ซี.ซี.เอส
d_w	ขนาดอนุภาคเฉลี่ยโดยน้ำหนัก
λ_{max}	ความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด
SD	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
m	ความชันของกราฟมาตรฐานที่ได้จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง
% RSD	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์
LOD	ขีดจำกัดในการตรวจพบ
LOQ	ขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ
Vol.	ฉบับที่
pp.	เลขหน้า



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลมีความสำคัญอย่างมากต่อเศรษฐกิจของไทย เนื่องจากสร้างรายได้จากการเป็นสินค้าส่งออกให้กับประเทศนับเป็นมูลค่ามหาศาล โดยน้ำตาลเป็นสินค้าส่งออกของประเทศที่ส่งออกมากเป็นอันดับสองของโลก และอ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่ถูกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตน้ำตาล เพราะอ้อยมีการเพาะปลูกอย่างแพร่หลาย และมีการสะสมของน้ำตาลซูโครสอยู่ปริมาณมาก มูลค่าของอ้อยและน้ำตาลในการซื้อขายจะกำหนดจากค่าความหวานหรือปริมาณซูโครสที่มีอยู่ การซื้อขายจะนิยมซื้อขายโดยใช้หน่วยมาตรฐาน ซี.ซี.เอส (Commercial Cane Sugar ; C.C.S.) ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณภาพของอ้อยที่จะนำไปผลิตเป็นน้ำตาล เช่น อ้อยที่มีความหวาน 10 C.C.S คือ อ้อยที่นำมาผ่านกระบวนการผลิตแล้วได้น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ 10 % (อ้อย 1 ตัน หรือ 1,000 กิโลกรัม ได้น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ 100 กิโลกรัม) โดยค่าความหวานที่ 10 C.C.S. นี้จะได้ราคาในการซื้อขาย ราคาตันละ 300 บาท เป็นต้น ดังนั้นความหวานหรือปริมาณซูโครสนี้จึงเป็นตัวที่ใช้บ่งบอกถึงคุณภาพทั้งในอ้อยและผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่ได้จากอ้อยอีกด้วย [1,2]

ซูโครสเป็นน้ำตาลที่เกิดจากการรวมตัวกันของน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโทส อ้อยมีการสะสมของซูโครสอยู่ในปริมาณมากที่บริเวณลำต้น โดยซูโครสได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ปริมาณซูโครสที่สะสมจะมีมากขึ้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และอายุของอ้อย การนำอ้อยมาแปรรูปเป็นน้ำตาลทำได้โดยการสกัดเอาซูโครสในน้ำอ้อยมาผ่านกระบวนการผลิตน้ำตาลขั้นตอนต่างๆ เช่น การให้ความร้อน การเคี้ยว การฟอกสี การปั่นแยกผลิตภัณฑ์น้ำตาล และการอบ จนได้เป็นน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ออกมา [6,7] แต่ที่ผ่านมาโรงงานอุตสาหกรรมน้ำตาลพบปัญหาเกี่ยวกับการสูญหายของซูโครสไปจากกระบวนการผลิต ทำให้คุณภาพของน้ำตาลที่ผลิตได้ไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ ทั้งนี้เนื่องจากในการผลิตซูโครสสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงหรืออินเวอร์ชัน (Inversion) ของซูโครสกลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ กลูโคส และฟรุกโทส [8] อีกทั้งยังสูญเสียซูโครสไปกับของเสียที่ทิ้งไปจากการผลิต เช่น กากน้ำตาล และกากอ้อย เป็นต้น จึงทำให้โรงงานอุตสาหกรรมน้ำตาลมีการตรวจติดตามปริมาณซูโครสด้วยการตรวจวัดค่าความหวาน ทั้งในอ้อยที่ใช้เป็นวัตถุดิบก่อนที่จะเข้าสู่การผลิต ในระหว่างขั้นตอนการผลิต และการตรวจสอบคุณภาพของน้ำตาลที่ผลิตได้

ปัจจุบันการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสสามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธีทางโพลาไรเมตรี (Polarimetry) [16] วิธีทางโครมาโตกราฟี (Chromatography) [18] และวิธีทางสเปกโตรสโกปี (Spectroscopy) [21] เป็นต้น แต่จากวิธีต่างๆ ที่กล่าวมานี้จะต้องใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์ ซึ่งมีราคาแพง ทำให้มีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์สูง อีกทั้งจะต้องมีการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ที่ซับซ้อน ใช้เวลาวิเคราะห์นาน ผู้ปฏิบัติการจึงต้องมีความชำนาญในการวิเคราะห์ และอาจมีผลจากการรบกวนของสารอื่นทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนไป ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครส เพื่อสร้างเป็นชุดทดสอบสำหรับตรวจวัดความหวานของอ้อยและน้ำตาลโดยติดตามจากปริมาณซูโครส ที่มีราคาถูก สามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้ อาศัยเทคนิคทางไบโอเซนเซอร์ (Biosensor) โดยใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาในการตรวจวัดที่รวดเร็ว ซึ่งจะมีความจำเพาะเจาะจงสูง ไม่ต้องการเตรียมตัวอย่าง ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ และจะพัฒนาให้วิธีวิเคราะห์ที่สามารถที่จะนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้ เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อสร้างชุดทดสอบความหวานในการตรวจวัดปริมาณของซูโครส โดยอาศัยเทคนิคทางไบโอเซนเซอร์

1.2.2 เพื่อตรวจวัดหาความหวานของซูโครสในตัวอย่างจริง โดยใช้ชุดทดสอบที่สร้างขึ้น

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

1.3.1 ศึกษาวิธีการตรวจวัดความหวานของซูโครส โดยใช้เทคนิคทางไบโอเซนเซอร์

1.3.2 สังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็ก ด้วยเทคนิคการตกตะกอนร่วม (Co-precipitation method) และตรวจสอบสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก

1.3.2.1 ศึกษาขนาดของอนุภาคด้วยเทคนิคการวัดขนาดอนุภาคระดับนาโน (Dynamic Light Scattering; DLS)

1.3.2.2 ศึกษารูปร่างและลักษณะพื้นผิวด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope ; TEM)

1.3.2.3 ศึกษาโครงสร้างผลึกของธาตุที่เป็นองค์ประกอบด้วยเทคนิคการวิเคราะห์การเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ (X-ray Diffraction; XRD)

1.3.3 ศึกษาวิธีการสร้างชุดทดสอบ โดยเตรียมโคร โอเจลไบโอเซนเซอร์ซึ่งประกอบด้วยโคร โอเจลที่ได้จากการรวมตัวของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ โคลิซาน และอนุภาคนาโนแม่เหล็ก ศึกษาวิธีการตรึงอินเวอร์เทส มีวตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดสลงบนโคร โอเจล จากนั้นตรวจสอบสมบัติทางกายภาพของโคร โอเจลไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมได้ด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

1.3.4 หาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบความหวาน โดยใช้โคร โอเจลไบโอเซนเซอร์ตรวจวัดความหวานของซูโครส สภาวะที่ศึกษา ดังนี้

1.3.4.1 ศึกษาอัตราส่วนของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ต่อโคลิซานในการเตรียมโคร โอเจล

1.3.4.2 ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์อินเวอร์เทส มีวตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดส

1.3.4.3 ศึกษาความเป็นกรด-เบส ของสารละลายบัฟเฟอร์

1.3.4.4 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโอไดอะนิซิดีน

1.3.4.5 ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยา

1.3.5 หาประสิทธิภาพของชุดทดสอบความหวาน

1.3.5.1 ความเที่ยงตรงของชุดทดสอบความหวาน (Precision)

1.3.5.2 ความถูกต้องของชุดทดสอบความหวาน (Accuracy)

1.3.5.3 ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity range)

1.3.5.4 ขีดจำกัดในการตรวจพบของชุดทดสอบความหวาน (Limit of detection)

1.3.5.5 ขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพของชุดทดสอบความหวาน

(Limit of quantitative)

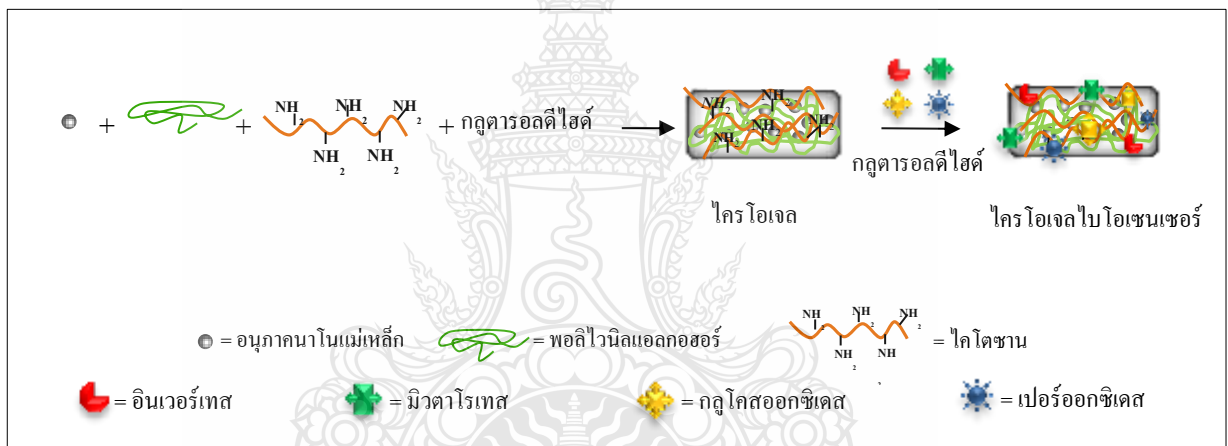
1.3.5.6 ความจำเพาะเจาะจงของชุดทดสอบความหวาน (Selectivity)

1.3.5.7 การนำกลับมาใช้ใหม่ (Reusability)

1.3.5.8 อายุการใช้งานของชุดทดสอบความหวาน (Storage time)

1.3.6 ตรวจวัดความหวานในตัวอย่างจริงด้วยชุดทดสอบความหวานที่สร้างขึ้น โดยตัวอย่างที่ใช้ คือ อ้อย และน้ำตาล เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากชุดทดสอบกับผลที่ได้จากวิธีทางโพลาริมิตรี จากนั้นนำผลวิเคราะห์ที่ได้จากทั้งสองวิธีมาทดสอบด้วยสถิติ t-test

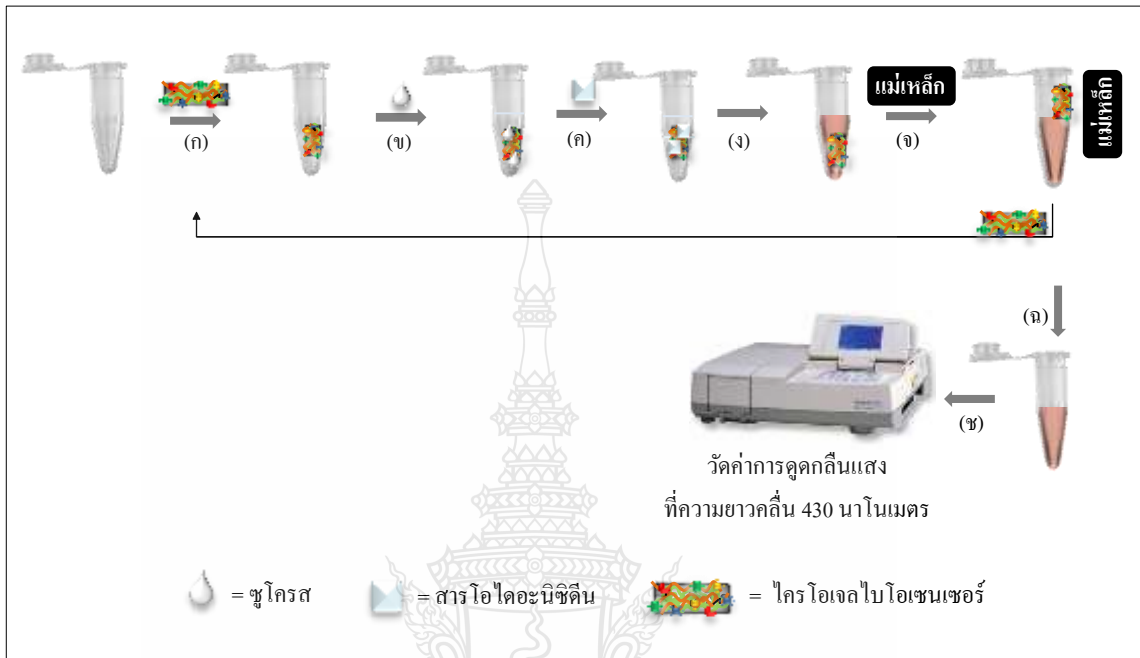
ได้ใหม่อีกครั้ง จึงมีแนวคิดที่จะนำเอนไซม์มาตรึงกับวัสดุรองรับหรือตัวพุง คือ ไครโอเจล (Cryogel) ที่ได้จากการรวมตัวกันของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก (Magnetic nanoparticle) พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Poly (vinyl) alcohol) และไคโตซาน (Chitosan) ด้วยการเชื่อมพันธะโดยใช้กลูตารอลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมไขว้เกิดปฏิกิริยาในสถานะอุณหภูมิต่ำจนเกิดเป็นเจล เรียกว่า ไครโอเจล (Cryogel) จากนั้นนำไครโอเจลมาใช้เป็นวัสดุรองรับสำหรับตรึงเอนไซม์ เนื่องจากไครโอเจลมีสมบัติที่เข้าได้ดีกับสารชีวภาพ และมีหมู่เอมีน (R-NH₂) ของไคโตซานที่สามารถใช้ตรึงเอนไซม์ได้ ด้วยสารเชื่อมไขว้กลูตารอลดีไฮด์ เกิดเป็นพันธะโควาเลนต์ระหว่างปลายด้านหนึ่งที่หมู่เอมีนของไคโตซานบนผิวหน้าโดยรอบไครโอเจล และหมู่อะมิโนของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ตรึงติดอยู่บนไครโอเจลได้ เรียกไครโอเจลที่ตรึงด้วยเอนไซม์ว่า ไครโอเจลไบโอเซนเซอร์ (Cryogel biosensor) ดังรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 การเตรียมไครโอเจลไบโอเซนเซอร์สำหรับสร้างชุดทดสอบความหวาน

จากนั้นนำไครโอเจลไบโอเซนเซอร์ที่ได้ไปตรวจวัดความหวาน โดยติดตามจากปริมาณซูโครสออกไซด์เอนไซม์ที่ตรึงบนไครโอเจลที่ทำปฏิกิริยากับซูโครสในตัวอย่าง ดังรูปที่ 1.2 เมื่อนำตัวอย่าง (น้ำอ้อยหรือน้ำตาล) เดิมลงในไมโครเซนตริฟิวส์ทิวบ์ที่มีไครโอเจลไบโอเซนเซอร์ (ก-ข) จากนั้นเติมสารละลายไอโคอะนิซินซึ่งอยู่ในรูปรีดิซไม่มีสี (ค) จะเกิดปฏิกิริยาดังสมการ 1.1-1.4 ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารไอโคอะนิซินในรูปออกซิไดซ์ซึ่งมีสีน้ำตาล (ง) ต่อไปใช้แม่เหล็กภายนอกดูดแยกไครโอเจลไบโอเซนเซอร์ออกจากสารละลาย (จ-ฉ) และนำสารละลายสีน้ำตาลที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร (ซ) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของซูโครส เพื่อบอกถึงความหวานของ

ตัวอย่าง และเมื่อสิ้นสุดการทดลองแต่ละครั้ง โคร โอลเจล ไซโอเซนเซอร์ ที่ทำการตรวจวัดตัวอย่างแล้ว สามารถนำกลับมาให้ใหม่ได้ทันที



รูปที่ 1.2 ขั้นตอนในการตรวจวัดความหวานในตัวอย่างอ้อยและน้ำตาล ใส่โคร โอลเจล ไซโอเซนเซอร์ ลงในไมโครเซนทริฟิวส์ทิวบ์ (ก) เติมตัวอย่าง (ข) เติมสารละลายโพลิไดอะนิซิน (ค) วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ง) ใช้แม่เหล็กภายนอกแยกโคร โอลเจล ไซโอเซนเซอร์ออกจากสารละลาย (จ-ค) ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้ ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร (ช)

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 ได้ชุดทดสอบที่สามารถตรวจวัดซูโครสได้อย่างมีประสิทธิภาพ
- 1.5.2 ได้ตรวจวัดความหวานในตัวอย่างอ้อยและน้ำตาล โดยใช้ชุดทดสอบที่สร้างขึ้น

บทที่ 2

วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล

อุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลมีความสำคัญต่อประเทศไทยอย่างมากในการสร้างรายได้จากการเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญ อ้อยถูกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบหลักในอุตสาหกรรมน้ำตาล เพราะมีปริมาณของน้ำตาลสะสมอยู่มาก คุณภาพของน้ำตาลจึงขึ้นอยู่กับวัตถุดิบอ้อยที่นำมาใช้ในการผลิต คุณภาพของอ้อยและน้ำตาลพิจารณาได้จากค่าความหวาน (Sweetness) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงปริมาณของซูโครสที่มีอยู่ในอ้อย ค่าความหวานนี้จะมีปริมาณแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ ระยะเวลาในการปลูก การเก็บเกี่ยว รวมทั้งระยะเวลาในการขนส่งอ้อยเพื่อเข้าสู่กระบวนการผลิตน้ำตาล ทำให้การซื้อขายอ้อยและน้ำตาลใช้ค่าความหวานหรือปริมาณซูโครสเป็นตัวกำหนดคุณภาพ [1,2]

การซื้อขายอ้อยและน้ำตาลจากค่าความหวานราคาที่ใช้ในการซื้อขายจะถูกกำหนดขึ้นมาโดยมีรัฐบาลเป็นตัวกลางหรือผู้ชี้ขาดราคาภายใต้ระบบการซื้อขายเดียวกันทั้งในเกษตรกรและโรงงานอุตสาหกรรม โดยระบบการซื้อขายมี 2 แบบ คือ การซื้อขายตามน้ำหนักและการซื้อขายตามคุณภาพ ปัจจุบันจะนิยมใช้ระบบการซื้อขายตามคุณภาพ เนื่องจากให้ความเป็นธรรมกับทั้งฝ่ายผู้ซื้อและผู้ขาย หน่วยความหวาน ซี.ซี.เอส (Commercial Cane Sugar; C.C.S.) เป็นหน่วยมาตรฐานที่ใช้กำหนดคุณภาพของอ้อยในการซื้อขาย เช่น อ้อยที่มีความหวาน 10 C.C.S. หมายถึง อ้อยที่เมื่อนำมาผลิตน้ำตาลแล้วให้น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ 10 % คือ อ้อย 1 ตัน (1,000 กิโลกรัม) ได้น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ 100 กิโลกรัม เป็นต้น โดยราคาในการซื้อขายอ้อยที่ทางโรงงานน้ำตาลนำมาใช้ผลิตน้ำตาล จะซื้อขายที่ค่า 10 C.C.S. ในราคาตันละ 300 บาท [3]

นอกจากนี้คุณภาพของอ้อยและน้ำตาลยังสามารถพิจารณาได้จากค่าทางคุณภาพอื่นๆ ของอ้อย ซึ่งสามารถนำไปใช้คำนวณหาค่า C.C.S. ต่อไปได้ โดยค่าที่ใช้บอกคุณภาพอ้อยและน้ำตาลมีดังนี้

- 1) ค่าบริกซ์ (Brix) หมายถึง ค่าร้อยละโดยน้ำหนักของของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดในอ้อย
- 2) ค่าโพลาไรเซชัน (Polarization) หมายถึง ค่าการวิเคราะห์ร้อยละน้ำหนักโดยประมาณของซูโครสที่ได้จากการวัดการหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์ด้วยเครื่องโพลาไรมิเตอร์ (Polarimeter)
- 3) ค่าร้อยละของชานอ้อยหรือไฟเบอร์ (Fiber) หมายถึง ค่าปริมาณของชานอ้อยและเส้นใยที่มีอยู่ในอ้อย [4]

2.1.1 การผลิตน้ำตาลจากวัตถุดิบอ้อย

ก่อนที่โรงงานน้ำตาลจะนำอ้อยเข้าสู่กระบวนการผลิต ในขั้นตอนแรกจะมีการตรวจสอบคุณภาพของอ้อย โดยนำอ้อยมาคั้นน้ำแล้วนำไปวิเคราะห์ของแข็งโดยรวม (Total Solid) หรือวิเคราะห์ค่าความหวานในหน่วยบริกซ์ เมื่ออ้อยผ่านเกณฑ์การตรวจสอบแล้วจะถูกลำเลียงเข้าสู่การผลิต น้ำตาลที่ผลิตได้ขั้นต้นจะเป็นน้ำตาลทรายดิบ (Raw sugar) จากนั้นน้ำตาลดิบนี้จะถูกแปรรูปไปเป็นน้ำตาลประเภทต่างๆ โดยผ่านกระบวนการแปรรูป เช่น การฟอกสีให้ได้น้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ เป็นต้น ผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่ผลิตได้ส่วนหนึ่งจะมีการเก็บไว้ในโรงเก็บเพื่อการนำไปจำหน่ายและบริโภคภายในประเทศ และอีกส่วนหนึ่งจะเป็นสินค้าส่งออก ประเภทของน้ำตาลที่ส่งออกตลาดโลก จำแนกได้ 4 ประเภท ดังตาราง 2.1

ตารางที่ 2.1 ประเภทสินค้าน้ำตาลส่งออกตลาดโลก [5]

ประเภท	ชนิด	ปริมาณซูโครส (เปอร์เซ็นต์)
1	น้ำตาลทรายดิบ J spec (ส่งออกญี่ปุ่น)	น้อยกว่า 97.99
2	น้ำตาลทรายดิบ Non J spec	มากกว่า 96.00
3	น้ำตาลทรายดิบ VHP (มาตรฐานสูง)	มากกว่า 99.20
4	น้ำตาลทรายขาว	มากกว่า 99.80

กระบวนการผลิตน้ำตาลมี 2 กระบวนการหลัก คือ การผลิตน้ำตาลทรายดิบ และการแปรรูปน้ำตาลทรายดิบเป็นน้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ ซึ่งแต่ละกระบวนการมีขั้นตอนในการผลิต ดังนี้

2.1.1.1 การผลิตน้ำตาลทรายดิบ

ขั้นตอนการผลิตประกอบด้วย 5 ขั้นตอน แสดงในรูป 2.1 ดังนี้

1) การหีบสกัด (Mill)

อ้อยที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตจะถูกฉีกให้เป็นเส้นเล็กๆ จากนั้นจะเคลื่อนผ่านชุดลูกหีบที่ทำหน้าที่แยกน้ำอ้อยออกจากต้นอ้อย โดยจะทำการหีบน้ำอ้อยออกจากต้นอ้อยผ่านชุดลูกหีบ 4-5 ชุด ในขั้นตอนนี้มีความสำคัญมาก เพราะปริมาณผลผลิตน้ำตาลที่จะได้ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำอ้อยที่หีบสกัดออกมา จึงต้องทำการหีบสกัดน้ำอ้อยออกมาให้ได้มากที่สุด น้ำอ้อยที่ได้นี้จะไหลลงสู่รางรับน้ำอ้อย ส่วนกากอ้อยหรือชากอ้อยจะถูกนำไปใช้ทำเป็นเชื้อเพลิงต่อไป

2) การทำให้ใส (Clarification)

น้ำอ้อยที่ได้จากการหีบสกัดจะถูกส่งไปทำให้ใสขึ้น โดยการให้ความร้อนและตกตะกอนด้วยปูนขาว (Calcium hydroxide; $\text{Ca}(\text{OH})_2$) ซึ่งขั้นตอนนี้จะทำการแยกสิ่งสกปรกที่เป็นเศษกากอ้อยออกก่อน จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิให้กับน้ำอ้อยที่อุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส และผสมกับปูนขาวช่วงความเข้มข้น 46-48 กรัมต่อลิตรในถังพักใส ในการผสมกับปูนขาวจะใช้เวลาไม่เกิน 3 นาที เพราะการใช้เวลามากเกินไปจะทำให้ น้ำอ้อยมีสีที่เข้มขึ้น และจะเกิดปฏิกิริยาเป็นสารอื่นส่งผลให้มีกากน้ำตาลที่ไม่ต้องการมากขึ้นได้ ดังนั้นก่อนที่น้ำอ้อยจะเข้าสู่การทำให้ใส จะต้องทำการแยกเศษกากอ้อยออกก่อน ซึ่งจะไปช่วยลดการเกิดสีที่เข้มขึ้นของน้ำอ้อยและช่วยควบคุมพีเอชให้คงที่ในขณะที่ตกตะกอนน้ำอ้อยอีกด้วย

3) การระเหย (Evaporation)

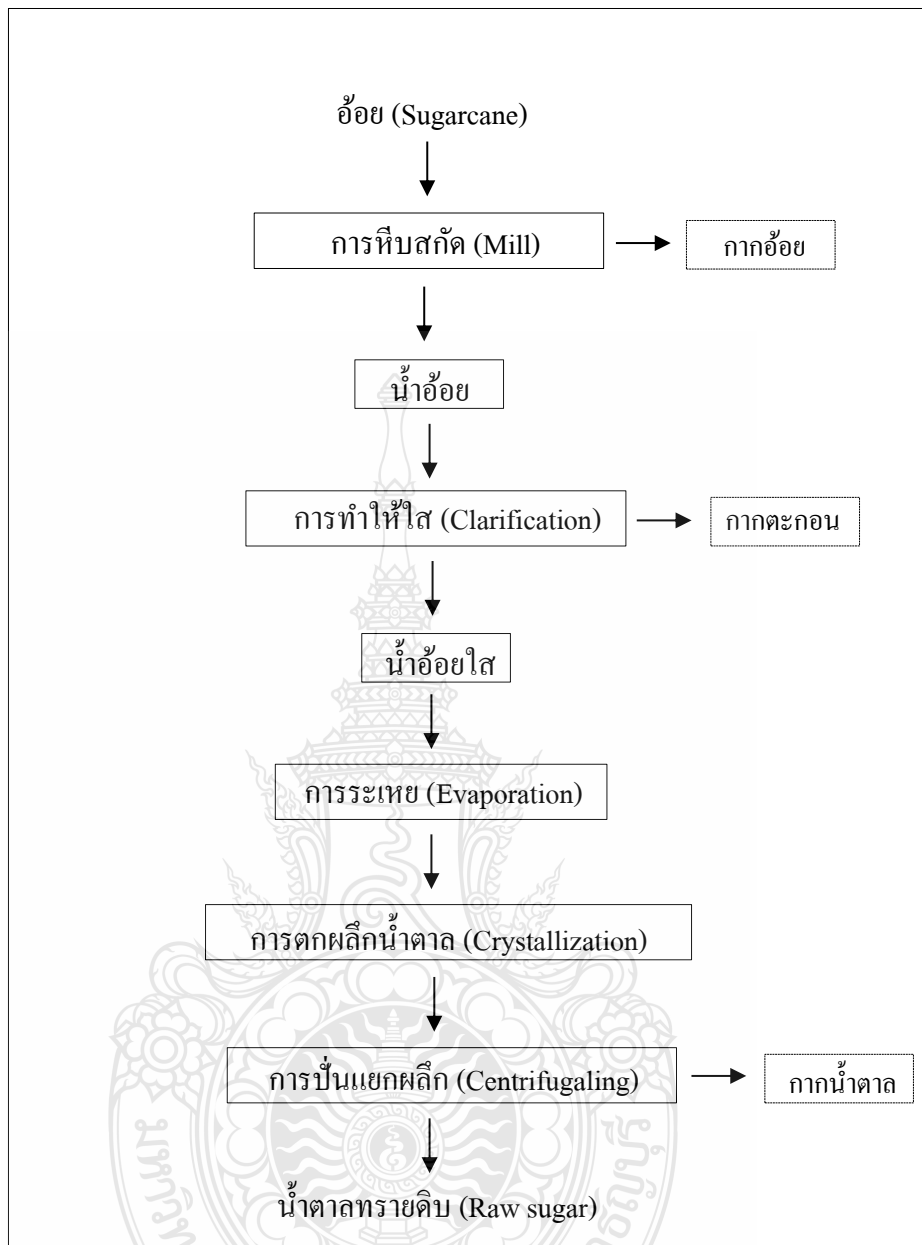
น้ำอ้อยที่ทำให้ใสแล้วจะถูกระเหยน้ำออก ขั้นตอนนี้จะทำการต้มน้ำอ้อยให้เดือดในชุดหม้อต้ม โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 102-105 องศาเซลเซียส ทำให้น้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ได้น้ำอ้อยที่มีลักษณะเป็นน้ำเชื่อม (Syrup) ออกมา โดยน้ำเชื่อมนี้มีความข้นประมาณ 60- 65 บริกซ์ จากนั้นน้ำเชื่อมที่ได้จะถูกส่งเข้าไปเก็บในถังพักเพื่อตกผลึกเป็นเม็คน้ำตาลในขั้นต่อไป

4) การตกผลึกน้ำตาล (Crystallization)

น้ำเชื่อมที่ได้จากการระเหยจะเข้าสู่หม้อเคี้ยวเพื่อทำการตกผลึกน้ำตาล โดยหม้อเคี้ยวที่ใช้จะเป็นหม้อระบบสุญญากาศ (Vacuum pan) ในการตกผลึกน้ำตาลนี้จะทำการเคี้ยวน้ำเชื่อมจนน้ำระเหยออกมาหมด เมื่อถึงจุดอิ่มตัวของน้ำเชื่อมจะเกิดเป็นผลึกน้ำตาลขึ้นมา ซึ่งเรียกผลึกน้ำตาลและกากน้ำตาลที่ได้นี้ว่า เมสสิควิท (Massequite)

5) การปั่นแยกผลึก (Centrifugaling)

ในขั้นตอนนี้เมสสิควิทจะถูกนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกผลึกน้ำตาลออกจากกากน้ำตาลภายในหม้อปั่น (Centrifugals) ผลึกน้ำตาลที่ได้ออกมาจะเป็นน้ำตาลทรายดิบ ซึ่งจะถูกนำไปพักไว้ในโรงเก็บน้ำตาล น้ำตาลดิบที่ได้นี้จะถูกนำไปจำหน่ายหรือนำไปแปรรูปเป็นน้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ที่มีคุณภาพและราคาที่สูงต่อไป [6]



รูปที่ 2.1 การผลิตน้ำตาลทรายดิบ

2.1.1.2 การแปรรูปน้ำตาลทรายดิบเป็นน้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์

กระบวนการในการแปรรูปน้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์จะเป็นการนำน้ำตาลทรายดิบที่ได้ไปผ่านการฟอกสีของน้ำตาลออก เพื่อให้ได้น้ำตาลที่เป็นผลึกใส ไม่มีสี มีขั้นตอนการผลิต 5 ขั้นตอน ดังรูป 2.2

1) การปั่นละลาย (Affinated centrifuging)

น้ำตาลทรายดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตในรูป 2.1 จะถูกนำไปผสมกับน้ำร้อนหรือน้ำเหลืองของการปั่นละลาย (Green molasses) เพื่อทำการล้างสีของน้ำตาลออก โดยจะถูกละลายผลึกน้ำตาลอีกครั้งหนึ่งก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการฟอกสี ในขั้นนี้จะได้เป็นน้ำเชื่อม (Remelted liquor) ออกมา

2) การฟอกสี (Carbonation process)

การฟอกสีเป็นการลดสีของน้ำเชื่อมที่ได้จากการปั่นละลาย โดยจะทำการละลายน้ำเชื่อมอีกครั้งหนึ่งเพื่อละลายน้ำตาลส่วนที่ยังไม่ละลายให้ละลาย จากนั้นจะกรองน้ำเชื่อมละลายผ่านตะแกรงกรอง และนำไปผสมกับปูนขาว การฟอกสีจะเกิดขึ้นที่หม้อฟอก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide; CO₂) ที่ใช้เป็นตัวฟอกสีจะไปทำให้ค่าสีของน้ำเชื่อมลดลง เมื่อขั้นตอนการฟอกสีเสร็จสิ้นน้ำเชื่อมที่ได้เคลื่อนเข้าสู่หม้อกรองแบบที่ใช้แรงดัน (Pressure filter) กรองตะกอนหรือกากน้ำตาลที่ยังเหลือออก จากนั้นจะเข้าสู่การแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-exchange resin) เพื่อลดสีน้ำตาลขั้นตอนสุดท้าย ซึ่งได้เป็นน้ำเชื่อมรีไฟน์ (Fine liquor)

3) การเคี้ยว (Crystallization)

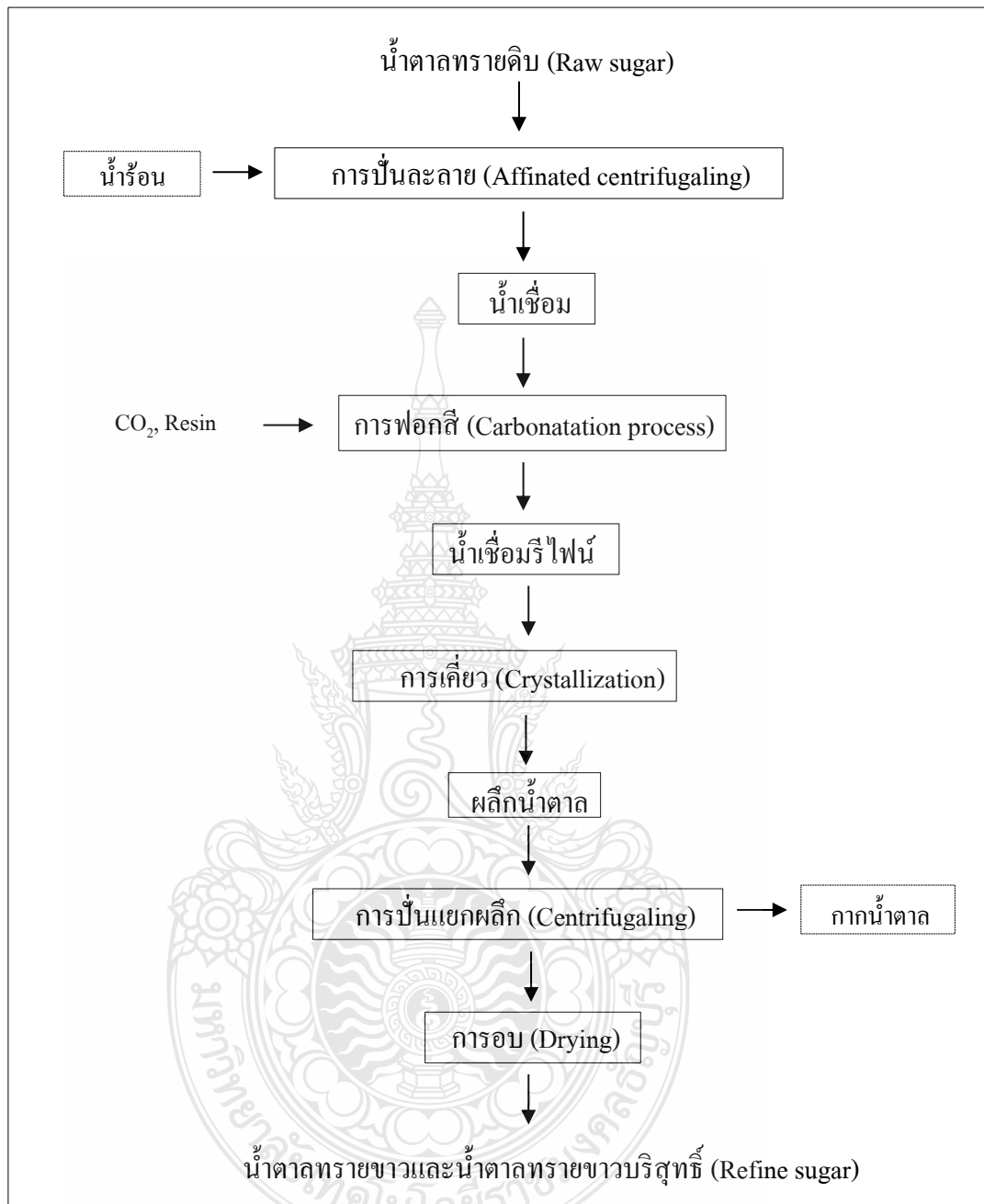
การเคี้ยวจะเป็นการทำให้น้ำเชื่อมรีไฟน์ที่ได้จากการฟอกสีตกผลึกเป็นเม็ดน้ำตาล โดยจะทำการเคี้ยวน้ำตาลรีไฟน์ในหม้อเคี้ยวซึ่งเป็นหม้อเคี้ยวระบบสุญญากาศ (Vacuum pan) เคี้ยวให้น้ำระเหยออกมาจนถึงจุดอิ่มตัวของน้ำเชื่อม ซึ่งจะได้เป็นผลึกน้ำตาลหรือแมสคิวทิตออกมา

4) การปั่นแยกผลึก (Centrifuging)

ผลึกน้ำตาลหรือแมสคิวทิตจากการเคี้ยวจะถูกนำไปปั่นแยกผลึกน้ำตาลในหม้อปั่น (Centrifugals) ได้เป็นผลึกของน้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์

5) การอบ (Drying)

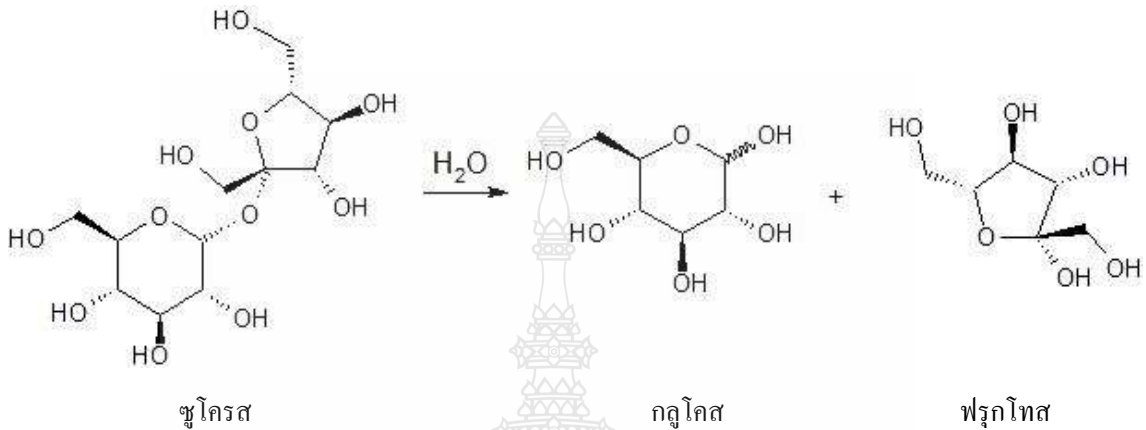
การอบเป็นขั้นตอนสุดท้ายของการแปรรูปน้ำตาลดิบให้เป็นน้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ ผลึกน้ำตาลที่ได้มานั้นจะผ่านเข้าหม้ออบ (Dryer) เพื่อกำจัดความชื้นออก เมื่อขั้นตอนการอบเสร็จสิ้นจะได้เป็นน้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ที่พร้อมจะนำไปทำการบรรจุเพื่อจำหน่ายและส่งออกต่อไป [7]



รูปที่ 2.2 การแปรรูปน้ำตาลทรายดิบให้เป็นน้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์

จะเห็นได้ว่ากระบวนการผลิตน้ำตาลจากวัตถุดิบอ้อย จะต้องผ่านหลายขั้นตอนจนสุดท้ายได้เป็นผลิตภัณฑ์น้ำตาลออกมานั้น ในระหว่างขั้นตอนต่างๆ เหล่านี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีหรือเกิดการอินเวอร์ชันของซูโครสได้ โดยซูโครสจากอ้อยที่ถูกสกัด

ออกมา จะเกิดการการสลายตัวเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เกิดเป็นกลูโคสและฟรุกโทสขึ้น ทำให้สูญเสียปริมาณซูโครส และส่งผลต่อคุณภาพของน้ำตาลที่ผลิต การเปลี่ยนแปลงทางเคมีหรือเกิดการอินเวอร์ชันที่เกิดขึ้น [8] ดังรูปที่ 2.3

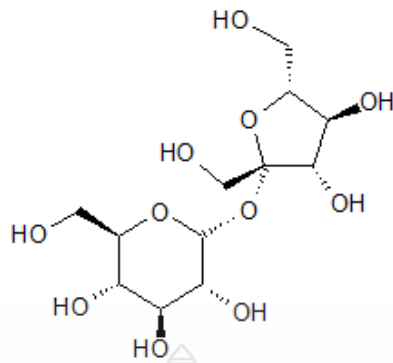


รูปที่ 2.3 การเกิดกระบวนการอินเวอร์ชันของซูโครส

ในการผลิตน้ำตาลปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดการสลายตัวของซูโครส ได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการต้มและเคี้ยวน้ำตาล ฟิเอชในการตกตะกอน ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล และระยะเวลาในการผลิต ทำให้ต้องมีการควบคุมปัจจัยดังกล่าว เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการอินเวอร์ชันของซูโครส เช่น การรักษาระดับฟิเอชในระหว่างการผลิตให้อยู่ระหว่าง 7.80-8.00 [9] ดังนั้นจึงมีการตรวจติดตามปริมาณซูโครสในระหว่างกระบวนการผลิตเพื่อไม่ให้สูญเสียคุณภาพน้ำตาลไป

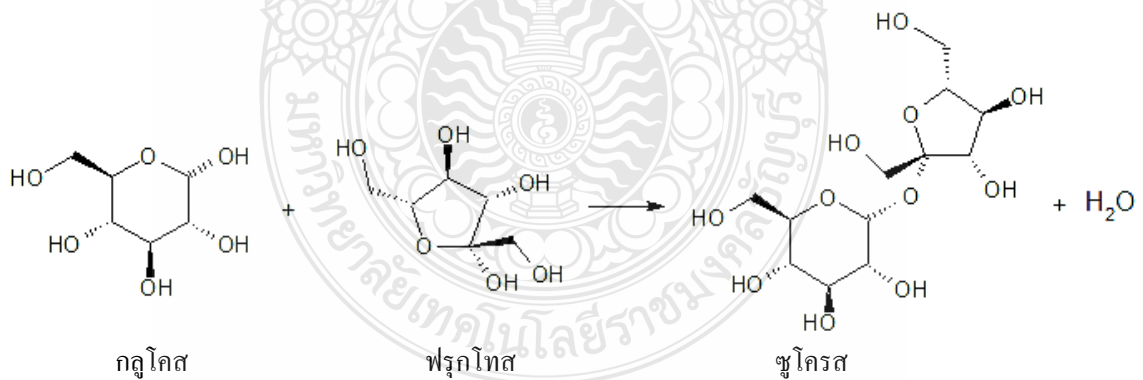
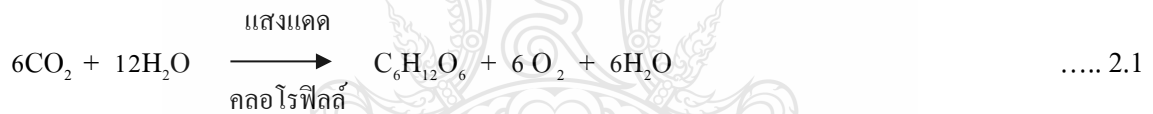
2.1 ซูโครส (Sucrose)

ซูโครส หรือ α -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fructofuranoside เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ประกอบด้วยกลูโคสและฟรุกโทสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidic bond) มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{12}H_{22}O_{11}$ ดังรูปที่ 2.4 ซูโครสเป็นน้ำตาลที่มีสมบัติการละลายน้ำได้ดี เมื่อมีความอิ่มตัวจะตกผลึกได้เป็นผลึกใส ไม่มีสี และสามารถเกิดการย่อยสลาย (Hydrolysis) เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรดหรือเอนไซม์ที่เหมาะสม เกิดเป็นกลูโคสและฟรุกโทสได้ ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับการเกิดอินเวอร์ชันของซูโครส (แสดงในรูป 2.3) นอกจากนี้แล้วซูโครสยังเป็นสารที่ให้ความหวาน ซึ่งเป็นสมบัติด้านรสชาติที่โดดเด่น จึงมีการนำน้ำตาลซูโครสมาใช้ในการบริโภคให้พลังงานแก่ร่างกาย [10]



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของซูโครส

ซูโครสพบได้มากในรูปน้ำตาลที่มีในพืช เช่น อ้อย หัวบีต และมะพร้าว เป็นต้น ซูโครสนี้ได้มาจากกระบวนการสร้างอาหารหรือสังเคราะห์แสงของพืช ดังสมการ 2.1 เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนการสังเคราะห์ด้วยแสงของอ้อยแล้ว จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส (C₆H₁₂O₆) ออกมา กลูโคสที่ได้นี้จะถูกนำไปเก็บสะสมไว้ที่ใบอ้อย จากนั้นจะเกิดการรวมตัวกันทางชีวเคมีกับฟรุกโทส เกิดเป็นซูโครส แล้วเก็บสะสมซูโครสภายในลำต้นต่อไป [11] การเกิดซูโครส ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 การเกิดซูโครส

ที่ผ่านมาพบว่าการผลิตน้ำตาลของโรงงานน้ำตาลประสบปัญหาเกี่ยวกับคุณภาพของน้ำตาลที่ผลิตได้ โดยปริมาณซูโครสไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด สาเหตุมาจากการเกิดอินเวอร์ชันของซูโครสในระหว่างการผลิต ทำให้เกิดการสูญเสียซูโครสที่มากเกินไปในระหว่างกระบวนการผลิตไป ทั้งในกากน้ำตาล กากตะกอน หรือกากอ้อย การตรวจติดตามปริมาณซูโครสในระหว่างกระบวนการผลิต ตลอดจนขั้นตอนตรวจวัดคุณภาพผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่ได้จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อป้องกันถึงคุณภาพของน้ำตาล ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเครื่องมือวิเคราะห์เพื่อตรวจวัดความหวานจากปริมาณซูโครส เช่น เครื่องโพลาริมิเตอร์ [12] เครื่องรีแฟกโตมิเตอร์ [12] เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง [13] และเครื่องสเปกโตรสโคป [14,15] เป็นต้น

2.3 วิธีทั่วไปที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณซูโครส

งานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ต่างๆ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณซูโครส ซึ่งมีหลายวิธี วิธีทั่วไปที่ใช้สำหรับวิเคราะห์หาซูโครส เช่น วิธีทางโพลาริมิตรี (Polarimetry) เป็นวิธีที่นิยมใช้มาก เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย โดยทำการวัดค่าการหมุนหรือการบิดระนาบแสง (Optical rotation; OR) ในการเบี่ยงเบนระนาบแสงโพลาไรซ์ของซูโครส เนื่องจากซูโครสมีโครงสร้างโมเลกุลที่เป็นไครัลอะตอม (Chiral atom) โครงสร้างแสดงในรูป 2.4 จึงสามารถหมุนหรือบิดระนาบแสงได้ วิธีทางโพลาริมิตรีที่นำไปใช้ตรวจหาซูโครส เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณซูโครส โดยการนำไปตรวจวัดการหมุนระนาบแสงสีเหลืองของโซเดียม-ดี (Sodium-D light) ที่ความยาวคลื่น 589 นาโนเมตร ตรวจวัดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ทำการเตรียมตัวอย่างโดยตกตะกอนด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟต จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องตกตะกอนที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที กรองสารละลายที่ได้จากการศึกษาพบว่า ซูโครสมีการหมุนระนาบแสงที่ระนาบ +66.7 องศา วิธีนี้สามารถตรวจวัดซูโครสได้ในช่วงความเข้มข้น 10-70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีขีดจำกัดในการตรวจวัดเท่ากับ 0.076 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และตรวจวัดซูโครสความเข้มข้นต่ำสุดได้ที่ความเข้มข้น 0.231 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดคือ มีความคลาดเคลื่อนในการตรวจวัด เนื่องจากการเกิดการอินเวอร์ชันของซูโครส ซึ่งจะเปลี่ยนไปเป็นกลูโคสและฟรุกโทสที่สามารถหมุนเบี่ยงเบนระนาบแสงโพลาไรซ์ได้เช่นเดียวกัน ทำให้ค่าการตรวจวัดที่ได้มีความคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง [16] นอกจากนี้วิธีทางโพลาริมิตรีนี้ยังถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณซูโครส เพื่อตรวจสอบคุณภาพอ้อยที่ใช้ในการผลิตน้ำตาลก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิต โดยตรวจวัดค่าโพล (Pol) หรือปริมาณร้อยละของซูโครสในตัวอย่างน้ำอ้อยที่หีบสกัดได้ ซึ่งตัวอย่างที่ใช้จะต้องนำมาตกตะกอนให้ใสด้วยตะกั่วแอะซิเตต (Lead acetate) จากนั้นนำน้ำอ้อยส่วนที่ใสไปวัดค่าโพลด้วยเครื่องโพลาริมิเตอร์ วิธีนี้สามารถ

ตรวจสอบคุณภาพอ้อยที่ใช้ในการผลิตได้ แต่ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างมีการใช้ตะกั่วแอซิเตด ซึ่งมีความเป็นพิษและอาจทำให้เกิดอันตรายได้ จึงไม่เหมาะสมในการนำไปใช้สำหรับการวิเคราะห์ [17]

วิธีทางโครมาโตกราฟี (Chromatography) เช่น โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุสมรรถนะสูง (High Performance ion-exchanger chromatography; HPIC) หรือโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography; HPLC) เป็นอีกวิธีที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสได้ โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุสมรรถภาพสูงถูกพัฒนาขึ้นสำหรับวิเคราะห์ซูโครสในตัวอย่างกากน้ำตาลของอ้อยที่ได้จากขั้นตอนสุดท้ายของการผลิตน้ำตาล โดยใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพของกากน้ำตาลในการซื้อขาย ในการศึกษาตัวอย่างกากน้ำตาลที่ใช้จะผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างโดยการกรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุสมรรถนะสูง ใช้ตัวตรวจวัดชนิดพัลส์แอมเพอร์โรเมตริก (Pulsed amperometric detection) ที่มีตัวตรวจจับสัญญาณทางไฟฟ้าเป็นตัวแปลงสัญญาณ สภาวะที่ใช้ศึกษา คือ ใช้คอลัมน์ชนิด CarboPac™ PA1 Analytical ขนาด 4×250 มิลลิเมตร ที่มี guard column (ขนาด 4×50 มิลลิเมตร) และใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นเฟสเคลื่อนที่ จากการศึกษา พบว่า วิธีนี้สามารถวิเคราะห์หาซูโครสในกากน้ำตาลได้ช่วงความเข้มข้น 25-37 % แต่วิธีนี้มีการใช้เครื่องมือราคาแพง ทำให้ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างสูง และใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน เนื่องจากจะต้องหาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ [18]

วิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงมีการพัฒนาขึ้นสำหรับวิเคราะห์หาซูโครสได้เช่นเดียวกัน โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่ได้จากการผลิตในอุตสาหกรรมน้ำตาลต่างๆ เนื่องจากให้ความถูกต้องแม่นยำสูง เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสในกากน้ำตาล ได้ทำการเตรียมตัวอย่างของกากน้ำตาลที่ศึกษาด้วยวิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง (Solid-phase extraction) ใช้ Sep-Pak C18 เป็นคอลัมน์สำหรับสกัด เมื่อได้สารสกัดแล้วจะทำการกรองสารสกัดผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดดัชนีหักเหของแสง (Reflective index detector) จากการศึกษาพบว่า วิธีนี้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสได้ในช่วงความเข้มข้นของซูโครสที่ 1.80-9.02 กรัมต่อลิตร แต่เครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง ในการวิเคราะห์ต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญ มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก และทำได้ในเฉพาะห้องปฏิบัติการเท่านั้น [19]

นอกจากนี้แล้วยังมีการนำวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงนี้ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหาซูโครสในหัวบีทที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลอีกชนิดหนึ่ง โดยทำการศึกษาในตัวอย่าง

หัวบีทจำนวน 142 ตัวอย่าง ทำการเตรียมตัวอย่างโดยใช้หัวบีทสดน้ำหนัก 30 กรัม ทำให้แห้งด้วยวิธีการแช่แข็ง แล้วนำมาบดจนเป็นผงละเอียด จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 80 % โดยปริมาตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า ใช้ความเร็ว 50 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องตกตะกอนที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลาอีก 10 นาที ซึ่งจะได้เป็นสารสกัดตัวอย่างออกมา ต่อบนนำสารสกัดตัวอย่างที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรองในลอนที่มีขนาด 0.22 ไมโครเมตร สุดท้ายนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ภายใต้สภาวะการทดลองโดยใช้คอลัมน์ Waters Sugar-Pak I carbohydrate ขนาด 6.5×300 มิลลิเมตร และใช้สารละลายโซเดียม-แคลเซียมอีดีทีเอ (Na₂Ca-EDTA) เป็นเฟสเคลื่อนที่ จากผลการศึกษาพบว่า ช่วงความเข้มข้นของซูโครสที่วิเคราะห์ได้ คือ 2.92-46.74 มิลลิโมลต่อกรัม สมการเส้นตรง $y = 66132x + 335005$ และมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9992 จากงานวิจัยนี้พบว่า วิธีนี้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสได้ ในช่วงความเข้มข้นของซูโครสที่ต่ำได้ แต่มีข้อจำกัดของวิธี คือ ใช้เครื่องมือราคาแพง มีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์สูง และยังมีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างยุ่งยากทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน [20]

การวิเคราะห์ปริมาณซูโครสยังสามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี (Spectroscopy) เช่น การหาปริมาณร้อยละของซูโครสหรือค่าโพล ในน้ำอ้อยด้วยเทคนิคฟูเรียทรานส์-ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy) ที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจสอบคุณภาพอ้อยที่ใช้ในอุตสาหกรรมอ้อย โดยศึกษาตัวอย่างน้ำอ้อยจำนวน 132 ตัวอย่าง ใช้ น้ำอ้อย 112 ตัวอย่าง สำหรับตรวจวัดสเปกตรัมของการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิคฟูเรียทรานส์-ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ย่านความถี่ระหว่าง 400-4,000 ต่อเซนติเมตร (cm⁻¹) แล้วนำสเปกตรัมที่ได้ไปทดสอบทางสถิติ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัดหาสเปกตรัมจะเตรียมด้วยวิธีการกรอง และตัวอย่างน้ำอ้อยที่ใช้สำหรับวัดค่าโพลจะถูกทำให้ใสโดยการตกตะกอนด้วยตะกั่วอะซิเตต จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องตกตะกอน ทำการกรองและนำส่วนที่ใสไปวัดค่าโพลด้วยเครื่องโพลาไรมิเตอร์ จากการศึกษาวิเคราะห์ทางสถิติสเปกตรัมที่ได้จากการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำอ้อยอยู่ในย่านความถี่ช่วง 900-1,200 ต่อเซนติเมตร โดยที่ความถี่ย่าน 980 ต่อเซนติเมตร เป็นความถี่ที่เกิดจากการสั่นของโมเลกุลที่ประกอบด้วย C-O ของซูโครส ผลการทดสอบทางสถิติจากสมการถดถอยเชิงเส้นที่ได้พิจารณาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ในการวิเคราะห์ พบว่าวิธีนี้ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์จากการทดสอบทางสถิติเท่ากับ 0.9984 และจากตัวอย่างน้ำอ้อยจำนวน 20 ตัวอย่าง ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9991 วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้หาปริมาณซูโครสที่ให้ความถูกต้องแม่นยำ และใช้เวลารวดเร็วได้

แม้ว่างานวิจัยนี้จะใช้เวลาในการวิเคราะห์ผล 1-2 นาที แต่วิธีนี้ต้องทำการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการสร้างความสัมพันธ์ในการทดสอบสถิติ อีกทั้งยังมีการเตรียมตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ด้วยวิธีที่ยุ่งยาก ทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน และมีการใช้สารเคมีอันตรายในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่อาจจะทำให้เกิดอันตรายได้ [21]

เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Near infrared spectroscopy) เป็นอีกหนึ่งเทคนิคของวิธีทางสเปกโตรสโกปีที่สามารถตรวจวัดหาปริมาณซุโครสได้เช่นเดียวกัน โดยมีการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพอ้อย ด้วยแสงย่านใกล้อินฟราเรดที่มีความยาวคลื่นช่วง 1,000-2,500 นาโนเมตร ตรวจวัดสเปกตรัมของการดูดกลืนและนำสเปกตรัมที่ได้ไปวิเคราะห์กับค่าโพลของอ้อย จากนั้นทำการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ทางสถิติที่ดีที่สุดเพื่อนำไปใช้ตรวจสอบคุณภาพของอ้อย ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์จะใช้น้ำอ้อยจำนวน 30 ตัวอย่าง ทำการเตรียมตัวอย่าง 2 ลักษณะ คือ การเตรียมตัวอย่างสำหรับวัดค่าสเปกตรัมด้วยเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ โดยนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องตกตะกอนที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 5 องศาเซลเซียส และการเตรียมตัวอย่างสำหรับวัดค่าโพล โดยนำน้ำอ้อยไปตกตะกอนด้วย ตะกั่วแอซิเตต แล้วนำส่วนที่ใสไปวิเคราะห์ร่วมกับการวัดด้วยเครื่องโพลาริมิเตอร์ ผลที่ได้พบว่า การตรวจสอบคุณภาพอ้อยด้วยวิธีนี้ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ และค่าความคลาดเคลื่อนจากการทำนายค่าโพลของซุโครส เท่ากับ ร้อยละ 0.921 และร้อยละ 0.264 ตามลำดับ แต่วิธีก็ยังมีข้อจำกัด คือ เครื่องมือที่ใช้เป็นเครื่องมือชั้นสูงที่มีราคาแพง ทำให้ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์สูง และใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน [17]

จากข้อจำกัดของวิธีที่ได้กล่าวมาทั้งหมด งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาการตรวจวัดซุโครสด้วยเทคนิคทางไบโอเซนเซอร์ให้ได้วิธีที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง ใช้เวลาในการตรวจวัดรวดเร็ว ไม่ต้องการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ และสามารถที่จะนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวัดได้

2.4 ไบโอสเซนเซอร์ (Biosensor)

ในปัจจุบันไบโอสเซนเซอร์เป็นวิธีตรวจวัดที่นิยมใช้ในการตรวจวัดปริมาณจุลินทรีย์ [22] ซึ่งไบโอสเซนเซอร์เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดทางชีวภาพที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณสารที่สนใจ การทำงานของไบโอสเซนเซอร์อาศัยการทำงานร่วมกันระหว่างสารวัสดุชีวภาพ (Biological element) และตัวตรวจวัด (Transducer) สารวัสดุชีวภาพหรือไบโอคะตะลิสต์ (Biocatalyst) เป็นสารที่ได้จากสิ่งมีชีวิต มีความจำเพาะเจาะจง และไวต่อสารที่ต้องการตรวจวัด สารวัสดุชีวภาพที่ใช้ในไบโอสเซนเซอร์ ได้แก่ เอนไซม์ (Enzyme) แอนติบอดี (Antibody) กรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) และดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (Deoxyribonucleic acid; DNA) เป็นต้น และส่วนของตัวตรวจวัดทำหน้าที่รับและแปลงสัญญาณที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างสารวัสดุชีวภาพกับสารที่ต้องการตรวจวัดไปเป็นสัญญาณทางไฟฟ้า โดยสัญญาณทางไฟฟ้าจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารที่ตรวจวัด



รูปที่ 2.6 หลักการทำงานของไบโอสเซนเซอร์

หลักการทำงานของไบโอสเซนเซอร์ ดังรูปที่ 2.6 เมื่อสารที่ต้องการตรวจวัดเข้าจับหรือทำปฏิกิริยากับสารวัสดุชีวภาพอย่างจำเพาะเจาะจง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ เช่น การเกิดอิเล็กทรอนิกส์ การเปลี่ยนแปลงทางสี และการเปลี่ยนแปลงทางความร้อน เป็นต้น จากนั้นตัวตรวจวัดจะทำหน้าที่แปลงสัญญาณที่ได้ให้เป็นสัญญาณไฟฟ้า ประเภทของไบโอสเซนเซอร์แบ่งตามสารวัสดุชีวภาพได้ 2 ประเภท คือ คะตะไลติกไบโอสเซนเซอร์ (Catalytic biosensor) ใช้เอนไซม์ เป็นสารวัสดุชีวภาพ และแอฟฟินิตีไบโอสเซนเซอร์ (Affinity biosensor) ใช้แอนติบอดี เป็นต้น [23,24]

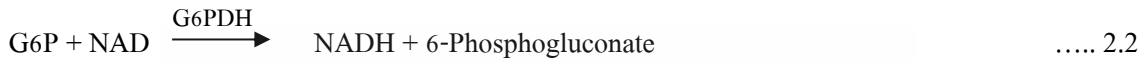
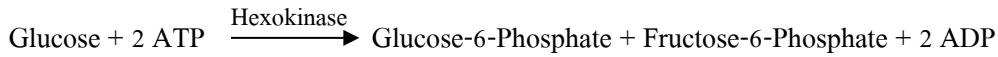
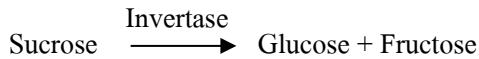
ไบโอเซนเซอร์มีข้อดี ได้แก่ มีความจำเพาะเจาะจงสูง ตรวจวัดได้ง่าย รวดเร็ว ไม่มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ให้ผลที่มีความถูกต้องและแม่นยำ จึงทำให้ไบโอเซนเซอร์ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารหลากหลาย เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในเลือด [25] การวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงในอาหาร [26] การตรวจติดตามเชื้อมะเร็งในเต้านมและรังไข่ [27] และการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในน้ำเสีย [28] เป็นต้น

2.4.1 คตะไลติกไบโอเซนเซอร์ (Catalytic biosensor)

คตะไลติกไบโอเซนเซอร์ เป็นไบโอเซนเซอร์ประเภทหนึ่งที่ใช้เอนไซม์เป็นสารวัสดุชีวภาพ อาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสารที่ต้องการตรวจวัดอย่างจำเพาะเจาะจงเกิดการเปลี่ยนแปลง สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากสารตั้งต้นที่ถูกใช้ไป หรือติดตามจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น [29,30]

เอนไซม์ (Enzyme) เป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่มีโครงสร้างซับซ้อน ประกอบด้วยโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก เกิดจากกรดอะมิโนต่อกันเป็นสายโซ่ยาวหรือพอลิเพปไทด์ (Polypeptide) ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา โดยลดพลังงานกระตุ้นหรือพลังงานก่อกัมมันต์ ทำให้อัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาเร็วขึ้น โดยที่สารตั้งต้น (Substrate) จะเข้าไปจับกับเอนไซม์ที่บริเวณเร่ง (Active site) ซึ่งเป็นบริเวณจำเพาะที่จะเข้าจับกันได้พอดีเหมือนแม่กุญแจกับลูกกุญแจ ตามทฤษฎีการจับกันแบบแม่กุญแจ-ลูกกุญแจ เกิดสารผลิตภัณฑ์ใหม่ เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาเอนไซม์จะหลุดออกไปเป็นอิสระกลับมาอยู่ในสภาพเดิม โดยที่โครงสร้างไม่มีการเปลี่ยนแปลง และเอนไซม์นั้นจะสามารถกลับมาทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาได้ใหม่จนกว่าการทำงานจะลดลง

สำหรับการตรวจวัดชีวโครสด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์จะใช้เอนไซม์อินเวอร์เทสเป็นสารวัสดุชีวภาพ ร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวตรวจวัดที่ใช้ เช่น การตรวจหาชีวโครสโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร โดยอินเวอร์เทสจะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของชีวโครสได้เป็นกลูโคสและฟรุกโทส จากนั้นกลูโคสจะเกิดปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลท (Phosphorylate) กับอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) โดยเฮกโซไคเนส (Hexokinase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเติมหมู่ฟอสเฟต ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส-6-ฟอสเฟต (Glucose-6-Phosphate) ฟรุกโทส-6-ฟอสเฟต (Fructose-6-Phosphate) และอะดีโนซีนไดฟอสเฟต (ADP) ขั้นสุดท้ายกลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (Glucose-6-phosphate dehydrogenase; G6PDH) จะไปเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส-6-ฟอสเฟตกับนิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (NAD) ได้เป็นนิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (NADH) กับ 6-ฟอสโฟกลูโคนต (6-Phosphogluconate) ดังสมการที่ 2.2 ซึ่งจะได้เป็นสารละลายสีเหลือง

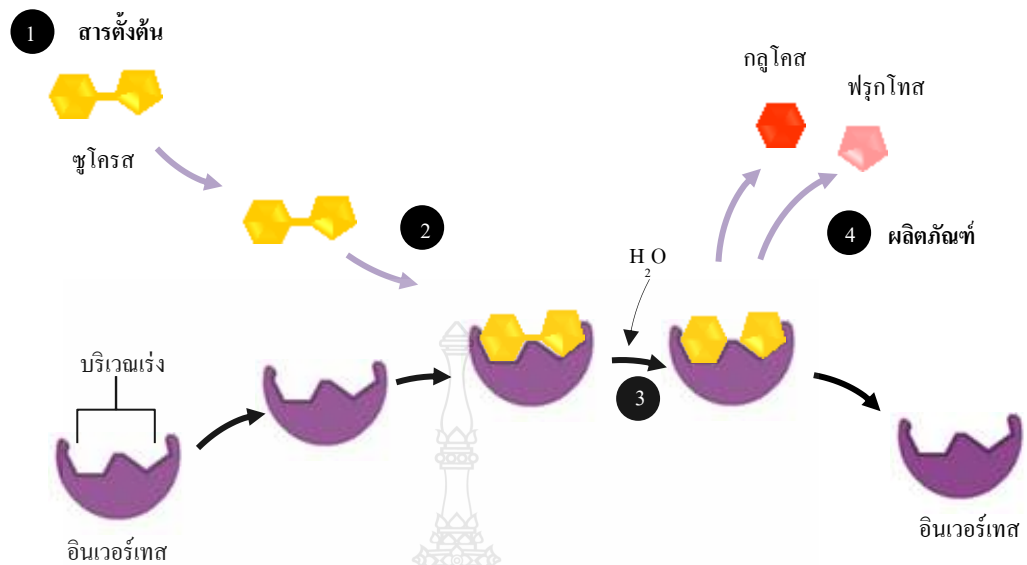


วิธีนี้ให้ความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดซูโครสสูง เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกัน แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ เอนไซม์ที่ใช้ในการตรวจวัดเป็นเอนไซม์อิสระไม่ได้อยู่ในรูปของเอนไซม์ตรึงรูป เมื่อใช้ในการตรวจวัดแล้วจะไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ทำให้สิ้นเปลืองเอนไซม์และค่าใช้จ่ายจากเอนไซม์ที่ค่อนข้างสูง [31]

แม้ว่าอะตะไลติกไบโอเซนเซอร์จะสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้ แต่เอนไซม์นั้นอยู่ในรูปเอนไซม์อิสระ (Free enzyme) ทำให้มีความยากลำบากในการนำเอนไซม์กลับมา หากไม่มีการจำกัดขอบเขตหรือพื้นที่ของเอนไซม์ เพื่อให้เอนไซม์ไม่สามารถเคลื่อนที่ หรือเกิดการสูญหายไป เอนไซม์ตรึงรูป (Immobilized enzyme) หรือการตรึงเอนไซม์บนวัสดุรองรับจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะทำให้นำเอนไซม์ที่ใช้งานแล้ว กลับมาใช้ใหม่ได้อย่างง่ายขึ้น [32]

2.4.2 เอนไซม์ตรึงรูป

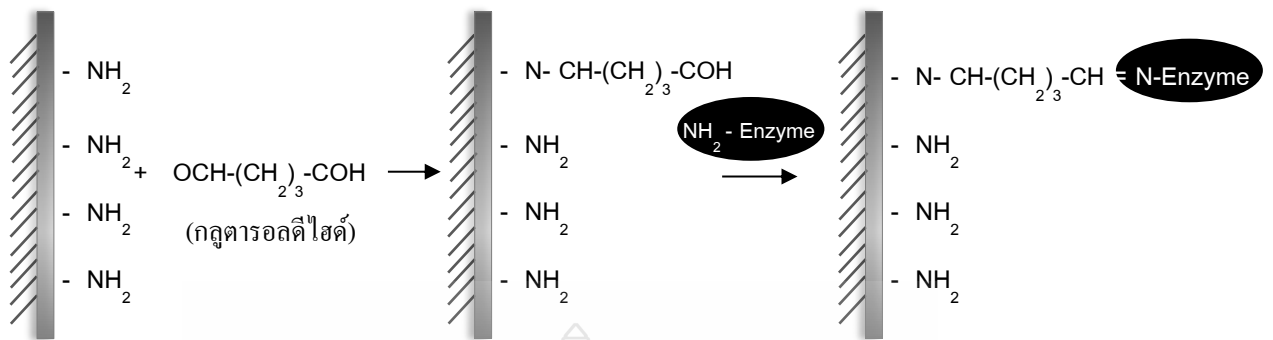
เอนไซม์ตรึงรูปเป็นการเปลี่ยนสถานะของเอนไซม์จากของเหลวให้กลายเป็นของแข็งที่ไม่สามารถละลายน้ำได้หรือละลายน้ำได้น้อยลง โดยการนำเอนไซม์อิสระมาจำกัดให้อยู่ในขอบเขตพื้นที่ที่กำหนด หรือนำมายึดเกาะกับวัสดุรองรับที่เป็นของแข็งด้วยพันธะทางเคมีที่แข็งแรง และเอนไซม์ยังคงมีความสามารถในการทำงานดังเดิม ซึ่งมีข้อดี คือ เมื่อใช้งานแล้วสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้งานได้อีกหลายครั้ง จนกว่าความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะลดต่ำลงสามารถประหยัดค่าใช้จ่ายได้ [33] ตัวอย่างเช่น การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ของซูโครส โดยมีอินเวอร์เทสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดการสลายพันธะไกลโคซิดิกได้เป็นกลูโคสและฟรุกโทส ดังรูปที่ 2.7 จะเห็นได้ว่า เมื่อเอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่บริเวณเร่งอย่างจำเพาะเจาะจงกัน จะเกิดเป็นสารประกอบระหว่างสารตั้งต้นและเอนไซม์ จากนั้นเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ขึ้น ซึ่งเอนไซม์จะหลุดออกมาอย่างอิสระ และสามารถที่จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาต่อไปได้อีก [34]



รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครสที่ถูกเร่งด้วยอินเวอร์เทส

การตรึงเอนไซม์ (Immobilization of enzyme) ในทางไบโอเซนเซอร์ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การห่อหุ้มหรือการทำแคปซูล (Entrapment and encapsulation) การดูดซับ (Adsorption) การเชื่อมโยง (Aggregation) และการเชื่อมพันธะโควาเลนต์ (Covalent linking) เป็นต้น การตรึงเอนไซม์บนวัสดุรองรับมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์เป็นอย่างมาก เนื่องจากจะส่งผลต่อความจำเพาะเจาะจงและความเสถียรของไบโอเซนเซอร์ [35]

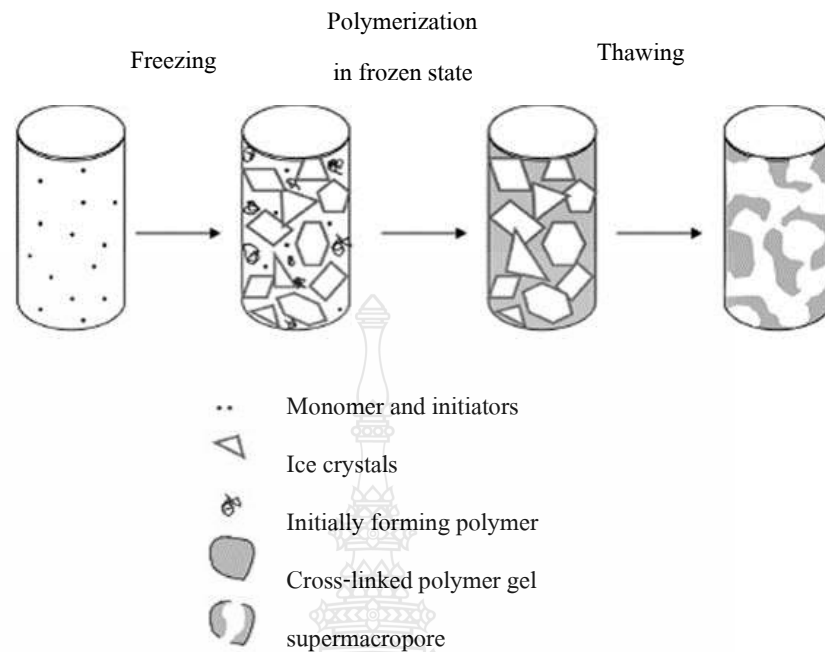
การตรึงเอนไซม์แบบเชื่อมโยงด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent bonding) เป็นการตรึงโดยการเชื่อมพันธะระหว่างหมู่ฟังก์ชัน (Functional group) ของวัสดุรองรับกับหมู่ฟังก์ชันของกรดอะมิโนของเอนไซม์ โดยมีสารเชื่อมโยง (Cross-linking reagent) เช่น กลูตารอลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) [36,37] เป็นตัวเชื่อมพันธะ (Coupling) ระหว่างหมู่อัลดีไฮด์ของกลูตารอลดีไฮด์ 2 หมู่ โดยที่ปลายข้างหนึ่งของกลูตารอลดีไฮด์เกิดพันธะโควาเลนต์กับหมู่เอมีนของวัสดุรองรับ และอีกปลายข้างหนึ่งเกิดพันธะโควาเลนต์กับหมู่อะมิโนของเอนไซม์ ดังรูป 2.8 การตรึงวิธีนี้มีข้อดีคือให้ความแข็งแรงและคงทนในการยึดจับของเอนไซม์กับวัสดุรองรับ ตรึงได้ง่าย และราคาถูก



รูปที่ 2.8 การเกิดปฏิกิริยาของสารเชื่อมไขว้กลูตารอลดีไฮด์

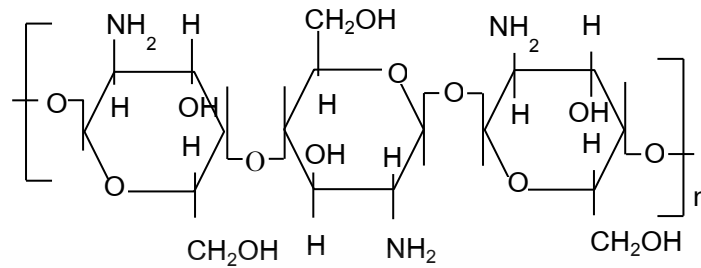
2.4.3 ไครโอเจล (Cryogel)

ไครโอเจลเป็นวัสดุพอลิเมอร์ที่ได้จากกระบวนการไครโอเจลชัน (Cryogelation) ของมอนอเมอร์หรือตัวเริ่มต้นปฏิกิริยาที่เกิดปฏิกิริยาเป็นเจล และแข็งตัวได้ที่สภาวะอุณหภูมิต่ำ จัดเป็นวัสดุพอลิเมอร์ไฮโดรฟิลิกแมโครพอร์ัส (Hydrophilic macroporous) คือ มีสมบัติละลายน้ำได้ดี โครงสร้างมีรูพรุนขนาดใหญ่ สามารถขึ้นรูปได้ และมีสมบัติในการเป็นวัสดุที่ความยืดหยุ่น [38] ไครโอเจลเตรียมได้โดยการทำให้มอนอเมอร์หรือตัวเริ่มต้นปฏิกิริยาเกิดการละลายจนลักษณะเป็นของเหลวใสที่เหนียวขึ้น จากนั้นจะเกิดการรวมตัวกันโดยเชื่อมต่อพันธะให้เป็นพอลิเมอร์ที่มีสายโซ่ยาวหรือเกิดกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชัน โดยมีตัวเชื่อมไขว้เป็นตัวทำให้สารตั้งต้นเกิดเป็นลักษณะของเจล ซึ่งตัวเชื่อมไขว้ที่มีการนำมาใช้ในการเตรียมไครโอเจล เช่น กลูตารอลดีไฮด์ [39] ทำการเชื่อมต่อพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) ของพอลิเมอร์ไครโอเจลเข้าด้วยกัน เมื่อนำไปทำปฏิกิริยาที่สภาวะอุณหภูมิต่ำจะทำให้เกิดการจับตัวเป็นเจลในรูปแบบที่เป็นของแข็ง ได้เป็นไครโอเจลออกมา โดยกระบวนการในการเกิดไครโอเจลหรือไครโอเจลชัน แสดงดังรูปที่ 2.9



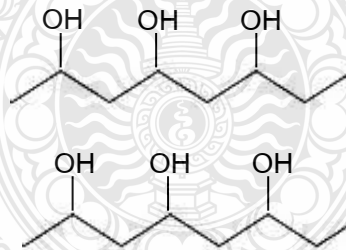
รูปที่ 2.9 การเกิดไครโอเจล [38]

เนื้อด้วยไครโอเจลสามารถเตรียมได้ง่าย และมีความเข้ากันได้ดีกับสารชีวภาพ (Biocompatible) ทำให้มีการนำไครโอเจลไปประยุกต์ใช้ในงานอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะด้านไบโอเซนเซอร์ ไครโอเจลที่ถูกนำมาใช้เป็นวัสดุรองรับสำหรับการตรึงเอนไซม์ ได้แก่ คาร์บอนไครโอเจล (Carbon cryogel) [40] พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ไครโอเจล (Polyvinyl alcohol cryoge) [41] และไคโตซานไครโอเจล (Chitosan cryogel) [42] โดยไคโตซานไครโอเจลเป็นวัสดุพอลิเมอร์ที่นิยมนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์มากที่สุด เนื่องจากไคโตซานมีหมู่เอมีน ($R-NH_2$) ของดีกลูโคซามีน (D-glucosamine) โครงสร้างไคโตซานแสดงดังรูปที่ 2.10 ที่สามารถเกิดพันธะเชื่อมโยงกับหมู่อะมิโนของเอนไซม์ได้ [43]



รูปที่ 2.9 โครงสร้างไคโตซาน

แม้ว่าไคโตซานจะสามารถเตรียมไครโอเจลได้ แต่ในการก่อตัวหรือขึ้นรูปของไคโตซานยังพบว่า มีการก่อตัวเป็นเจลที่ช้า ต้องใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาเป็นไครโอเจลนาน และไคโตซานไครโอเจลที่ได้ไม่แข็งแรงและมีความคงตัวน้อย ทำให้มีการนำไปผสมกับพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ เพื่อใช้เตรียมเป็นไครโอเจลที่มีความแข็งแรง คงทน และใช้เวลาในการเกิดไครโอเจลลดลง [44] เนื่องจากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์เป็นพอลิเมอร์มีสมบัติการซึมผ่านที่ดี สามารถยึดติด และเกิดเป็นเจลได้โดยการเชื่อมพันธะไฮโดรเจนเช่นเดียวกับไคโตซาน แต่มีความแข็งแรงมากกว่า จึงมีการนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกัน โครงสร้างของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ ดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 โครงสร้างพอลิไวนิลแอลกอฮอล์

2.4.4 อนุภาคนาโนแม่เหล็ก (Magnetic nanoparticle)

ปัจจุบันอนุภาคนาโนแม่เหล็กได้รับความสนใจอย่างมากในทางไบโอเซนเซอร์ โดยได้มีการนำอนุภาคนาโนแม่เหล็กไปประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ เช่น อิมมูโนแอสเสย์ (Immunoassay) [45] ไบโอเซฟราซัน (Bioseparation) [46] และการตรึงเอนไซม์ (Immobilization of enzyme) [47] เป็นต้น เนื่องจากสมบัติของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก คือ การเป็นแม่เหล็กยิ่งยวด (Superparamagnetic) ที่มีแรงดึงดูดระหว่างในสนามแม่เหล็กที่มาก ความเข้ากันได้ดีกับสารชีวภาพ และสังเคราะห์ได้ง่าย วิธีในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กทำได้หลายวิธี เช่น การสังเคราะห์ด้วยกระบวนการแตกสลายโดยใช้อุณหภูมิสูง (High-temperature decomposition) กระบวนการไมโครอิมัลชัน (Microemulsion) และวิธีการตกตะกอนร่วม (Co-precipitation) เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีจะได้อนุภาคนาโนแม่เหล็กที่มีขนาดและปริมาณแตกต่างกันไป แต่การสังเคราะห์ด้วยวิธีการตกตะกอนร่วมเป็นวิธีที่ง่ายที่สุด มีราคาถูก ใช้เวลาในการสังเคราะห์น้อย และได้อนุภาคนาโนแม่เหล็กขนาดเล็กและปริมาณมาก ในการเกิดอนุภาคนาโนแม่เหล็กในวิธีนี้ได้จากการตกตะกอนร่วมกันของสารผสมระหว่างสารประกอบเกลือเฟอร์รัส (Fe^{2+}) และสารประกอบเกลือเฟอร์ริก (Fe^{3+}) โดยมีอัตราส่วนเป็น 1:2 ในตัวกลางของเหลวที่เป็นสารละลายเบส ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดังสมการ 2.3 [48]



จากสมบัติในการเข้ากันได้ดีกับสารชีวภาพ และความเป็นแม่เหล็กที่สูง ทำให้มีการนำอนุภาคนาโนแม่เหล็กมาใช้ในการตรึงเอนไซม์ เพื่อที่จะนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้ โดยอาศัยการดึงดูดความเป็นแม่เหล็กกับสนามแม่เหล็กภายนอก ตัวอย่างเช่น มีการศึกษาการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสลงบนอนุภาคนาโนแม่เหล็ก โดยสังเคราะห์ด้วยวิธีตกตะกอนร่วม ที่มีการปรับปรุงพื้นผิวอนุภาคด้วยสาร 3-(aminopropyl) triethoxysilane (APTES) จากนั้นใช้สารละลายกลูโคสออกซิเดสเชื่อมไขว้พันธะระหว่างอนุภาคนาโนแม่เหล็กกับเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ แล้วนำอนุภาคที่เตรียมได้ไปศึกษาการนำกลับมาใช้ใหม่ด้วยการตรวจวัดกลูโคส ผลที่ได้พบว่า อนุภาคนาโนแม่เหล็กที่เตรียมได้สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้ 5-7 ครั้ง (ขึ้นอยู่กับขนาดของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้) โดยที่เอนไซม์ยังสามารถทำงานได้ดังเดิม [49] นอกจากนี้ยังมีการศึกษานำอนุภาคนาโนแม่เหล็กมาตรึงเอนไซม์ 2 ชนิด คือ กลูโคสออกซิเดสร่วมกับเปอร์ออกซิเดส เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำ โดยงานวิจัยนี้พบว่า อนุภาคนาโนแม่เหล็กสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำได้ถึง 10 ครั้ง โดยที่ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไม่ลดลง [50]

จากวรรณกรรมที่ได้ทบทวนมาทั้งหมดนี้ ทำให้มีแนวความคิดในการพัฒนาวิธีการตรวจวัดซูโครส โดยการเตรียมโคร โอลิตที่มีการรวมตัวกันระหว่างพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ โคลโคซาน และอนุภาคนาโนแม่เหล็ก มาทำการตรึงอินเวอร์เทส มิวตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดส เพื่อใช้ในการตรวจวัดซูโครสในตัวอย่างอ้อยและน้ำตาล ที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง รวดเร็ว และสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้ง



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี

- 3.1.1 ซูโครส (Sucrose, Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.2 อินเวอร์เทส (Invertase, EC 3.2.1.26, Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.3 มิวตาโรเทส (Mutarotase, EC 5.1.3.3, BIO Basic Canada Inc., Canada)
- 3.1.4 กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase, EC 1.1.3.4, Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.5 เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase from horseradish, EC 1.11.1.9, Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.6 พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Poly (vinyl) alcohol, Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.7 ไคโตซาน (Chitosan, Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.8 กลูตาโรลดีไฮด์ (Glutaraldehyde, Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.9 แนฟฟิออน (Nafion, Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.10 โอไดอะนิซีน (*o*-Dianisidine, Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.11 เฟอร์รัสคลอไรด์เตตระไฮเดรต (Iron (II) chloride tetrahydrate, Ajax Finechem, Australia)
- 3.1.12 เฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (Iron (III) chloride hexahydrate, Ajax Finechem, Australia)
- 3.1.13 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, Ajax Finechem, Australia)
- 3.1.14 โซเดียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Sodium di-hydrogen orthophosphate, Ajax Finechem, Australia)
- 3.1.15 ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (di-Sodium hydrogen orthophosphate, Ajax Finechem, Australia)
- 3.1.16 โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate, Loba Chemie, India)
- 3.1.17 กรดอะซิติก (Acetic acid, RCI Labscan, Thailand)
- 3.1.18 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.50 เตรียมได้จาก
สารละลาย A : สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ เตรียม
โดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต 5.6784 ± 0.0005 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 200 มิลลิลิตร

สารละลาย B : สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต 3.1202 ± 0.0005 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมสารละลาย A ปริมาตร 137 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย B ปริมาตร 63 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 400 มิลลิลิตร และปรับพีเอชให้ได้พีเอช 6.50

3.1.19 สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.00 เตรียมได้จาก

สารละลาย A : สารละลายโซเดียมอะซิเตต 0.2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมอะซิเตต 0.7216 ± 0.0005 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย B : สารละลายกรดอะซิติก 0.2 โมลาร์ เตรียมโดยเปิดกรดอะซิติก 1.15 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A ปริมาตร 29.6 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย B ปริมาตร 70.4 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 200 มิลลิลิตร และปรับพีเอชให้ได้พีเอช 5.00

3.1.20 ตัวอย่างอ้อย จากบริษัทน้ำตาลราชบุรี จำกัด

3.1.21 ตัวอย่างน้ำตาล (น้ำตาลทรายดิบ น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์) จากบริษัทน้ำตาลราชบุรี จำกัด

3.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์

3.2.1 เครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible spectrophotometer) รุ่น UV-1601 (SHIMADZU, Germany)

3.2.2 เครื่องวัดขนาดอนุภาคระดับนาโน (Particle size analyzer) รุ่น Delsa nano C (Beckman-Coulter, USA)

3.2.3 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope) รุ่น TECNAI 20 (Philips, USA)

3.2.4 เครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ (X-ray diffractometer) รุ่น X'PertPRO (PANalytical, UAE)

3.2.5 เครื่องผสมสาร โดยใช้ความถี่สูง (Vortex mixer) รุ่น VORTEX-GENIE 2 (Scientific Industries, USA)

3.2.6 เครื่องกวนแม่เหล็กแบบใช้ความร้อน (Hotplate stirrer) รุ่น IKA RH basic 1X (Laboratory & Medical Supplies, Malaysia)

3.2.7 เครื่องมือวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Model UB-10 (Denver Instrument, USA)

3.2.8 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance) รุ่น AZ series (SARTORIUS Instrument, USA)

3.2.9 เครื่องสั่นความถี่สูง (Sonicator) รุ่น Transonic Digital S (Elma, Germany)

3.2.10 ตู้อบ (Drying oven) รุ่น Loading Model 30-750 (Mettler, Island)

3.2.11 ไมโครเซนตริฟิวส์ทิวป์ (Microcentrifuges tubes) ขนาด 0.6 1.0 และ 2.0 มิลลิลิตร (Molecular Bio Product, USA)

3.2.12 ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 100 และ 1,000 ไมโครลิตร (Brand, Germany)

3.3 การทดลอง

3.3.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็ก

สังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กด้วยวิธีการตกตะกอนร่วม (Co-precipitation method) ของสารละลาย Fe^{2+} (เฟอร์รัสคลอไรด์เตตระไฮเดรต) กับสารละลาย Fe^{3+} (เฟอร์ริกคลอไรด์-เฮกซะไฮเดรต) ที่อัตราส่วนโดยโมลเท่ากับ 1:2 ตามลำดับ ทำการตกตะกอนสารละลายดังกล่าวด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีขั้นตอนในการสังเคราะห์ดังนี้

(1) ชั่งเฟอร์รัสคลอไรด์เตตระไฮเดรต 0.5960 กรัม (3 มิลลิโมล) และเฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต 1.6220 กรัม (6 มิลลิโมล) ผสมสารทั้งสองเข้าด้วยกันในขวดก้นกลม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเป่าแก๊สไนโตรเจนลงไปในสารละลายเพื่อกำจัดแก๊สออกซิเจน และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พร้อมทั้งคนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กแบบใช้ความร้อนอย่างสม่ำเสมอ

(2) เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0000 ± 0.0005 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร นำไปใส่ในบิวเรต แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมได้ลงในสารละลายที่ได้จากข้อ (1) ด้วยอัตราการไหลของสารละลายที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ภายใต้สภาวะการควบคุมอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส คนสารละลายผสมอย่างต่อเนื่องจนสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หมด จากนั้นทำการคนต่อไปอีกเป็นระยะเวลา 30 นาที ซึ่งจะเกิดเป็นตะกอนสีน้ำตาลดำ นำตะกอนมาวางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

(3) นำตะกอนของอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่สังเคราะห์ได้ไปทำให้อนุภาคกระจายตัว โดยใช้เครื่องสั่นความถี่สูงเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนมีสถานะเป็นกลาง ตรวจสอบโดยการวัดค่าพีเอชของสารละลาย

(4) ใช้แม่เหล็กภายนอก (External magnet) เพื่อแยกอนุภาคนาโนแม่เหล็กออกจากสารละลาย จากนั้นนำอนุภาคที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปตรวจสอบสมบัติทางกายภาพและทางเคมีต่อไป

3.3.2 การตรวจสอบสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก

3.3.2.1 การศึกษาขนาดของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก

ศึกษาขนาดของอนุภาคนาโนแม่เหล็กด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาคระดับนาโน โดยนำอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่สังเคราะห์ได้ 0.1000 ± 0.0005 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำให้อนุภาคกระจายตัวด้วยเครื่องสั่นความถี่สูงเป็นเวลา 15 นาที และนำสารละลายที่ได้ไปวัดขนาดอนุภาคด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาค มีสถานะการทดลองดังต่อไปนี้

มุมในการวัด : 165 องศา

อุณหภูมิการทดลอง : 25 องศาเซลเซียส

3.3.2.2 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก

ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ รูปร่าง และลักษณะพื้นผิวของอนุภาคนาโนแม่เหล็กด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน โดยนำอนุภาคนาโนแม่เหล็กวางบนแผ่นสำหรับวางตัวอย่างที่เป็นแผ่นทองแดง (Copper grid) จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ภายใต้สภาวะการทดลองดังต่อไปนี้

ความต่างศักย์ : 100 กิโลโวลต์

กำลังขยาย : 250,000 เท่า

3.3.2.3 การตรวจสอบลักษณะทางเคมีของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก

ตรวจสอบลักษณะทางเคมี ได้แก่ โครงสร้างและธาตุที่เป็นองค์ประกอบของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์การเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ โดยนำผงอนุภาคนาโนแม่เหล็กใส่ลงในช่องสำหรับใส่ตัวอย่าง (XRD holder) จากนั้นทำผิวหน้าของตัวอย่างให้เรียบด้วยกระดาษไล่ต์ แล้วทำการวิเคราะห์ดังสภาวะการทดลองต่อไปนี้

แหล่งกำเนิดรังสีเอกซ์ : ทองแดง (ความยาวคลื่น 1.54060 อังสตรอม)

ความต่างศักย์ : 40 กิโลโวลต์

กระแสไฟฟ้า	: 30 มิลลิแอมแปร์
มุมในการวัด	: 20
ช่วงการวัด	: ช่วง 5-80 องศา
ความละเอียดในการวัดมุม	: 0.01 องศา
อุณหภูมิการทดลอง	: 25 องศาเซลเซียส

3.3.3 การเตรียมโครโอเจลไบโอเซนเซอร์สำหรับสร้างชุดทดสอบความหวาน

โครโอเจลไบโอเซนเซอร์ที่ใช้สำหรับการสร้างชุดทดสอบความหวานเตรียมได้จากการผสม พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ ไคโตซาน และอนุภาคนาโนแม่เหล็ก จากนั้นตั้งอินเวอร์เทส มีวตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดสลงบนโครโอเจลที่เตรียมได้ โดยมีกลูตาโรลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมไขว้ ในขั้นนี้จะได้เป็นโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ ซึ่งมีขั้นตอนในการเตรียมโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ ดังนี้

(1) นำสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 3 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเตรียมได้โดยชั่งพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ 3.0000±0.0005 กรัม ละลายใน 2 % โดยปริมาตรของสารละลายกรดอะซิติก ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะได้เป็นสารละลายใส ไม่มีสี มีลักษณะหนืด นำมาวางให้เย็นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปผสมกับสารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 3 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (สารละลายไคโตซานเตรียมได้จากไคโตซาน 3.0000±0.0005 กรัม ละลายใน 2 % โดยปริมาตรของสารละลายกรดอะซิติก ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) ผสมให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก ต่อไปเติมอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่สังเคราะห์ได้จากข้อ 3.3.1 น้ำหนัก 0.1000±0.0005 กรัม ลงในสารละลายผสมพอลิไวนิลแอลกอฮอล์และไคโตซาน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร คนผสมจนได้สารละลายเนื้อเดียวกัน ในขั้นนี้จะได้สารละลายสีดำมีความหนืดสูง หลังจากนั้นเติมสารละลายกลูตาโรลดีไฮด์ ความเข้มข้น 2.5 % โดยปริมาตร จำนวน 100 ไมโครลิตร และคนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กอย่างรวดเร็วจนได้เป็นเจล นำเจลที่ได้เทใส่ลงในแม่พิมพ์วางให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำแม่พิมพ์มาวางไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในขั้นนี้จะได้เป็นโครโอเจล ขั้นตอนต่อไปถอดโครโอเจลที่ได้ออกจากแม่พิมพ์ ตัดให้มีขนาด 0.5×0.5×0.5 เซนติเมตร เพื่อนำไปตรึงเอนไซม์ในขั้นต่อไป

(2) ขั้นตอนการตรึงอินเวอร์เทส มิวตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดส ลงบนไครโอเจล โดยนำไครโอเจลที่ได้จากข้อ (1) แช่ในสารละลายกลูตาโรลดีไฮด์ ความเข้มข้น 2.5 % โดยปริมาตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไครโอเจลใส่ลงในไมโครเซนทริฟิวส์ทิวบ์ขนาด 2 มิลลิลิตร เติมอินเวอร์เทส มิวตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดสความเข้มข้นที่เหมาะสมลงไป โดยใช้ปริมาตรของเอนไซม์แต่ละชนิด 60 ไมโครลิตร วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาการเชื่อมไขว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต่อไปนำไปแช่ในสารละลายแนฟฟิออน ความเข้มข้น 1 % โดยปริมาตร เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ เพื่อกำจัดกลูตาโรลดีไฮด์ และเอนไซม์ที่เหลือจากการเกิดปฏิกิริยา ในขั้นนี้จะได้เป็นไครโอเจลไบโอเซนเซอร์ สำหรับสร้างชุดทดสอบความหวาน

3.3.4 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของไครโอเจลไบโอเซนเซอร์

ลักษณะทางกายภาพของไครโอเจลไบโอเซนเซอร์ ได้แก่ ลักษณะพื้นผิวของไครโอเจล ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน โดยเตรียมตัวอย่างที่ศึกษาด้วยวิธี Ultra-thin section ด้วยการนำไครโอเจลที่ได้ตัดเป็นแผ่นบางมีความหนาประมาณ 60-90 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอัลตราไมโครโทม (Ultramicrotome) จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ได้ไปวางบน Copper grid แล้วนำไปตรวจสอบลักษณะทางกายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน โดยใช้สภาวะดังในข้อ 3.3.2.2 ที่กำลังขยาย 135,000 เท่า

3.3.5 วิธีการตรวจวัดความหวานโดยใช้ชุดทดสอบความหวาน

การตรวจวัดความหวานโดยใช้ไครโอเจลไบโอเซนเซอร์ ขั้นแรกนำไครโอเจลไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.3 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมใส่ลงในไมโครเซนทริฟิวส์ทิวบ์ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายซูโครสหรือตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัดปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลายไอโอดีนนิซิดีนความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ศึกษาได้ในข้อ 3.3.6.4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ ซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงจากสารละลายสีไม่มีสีเป็นสารละลายสีน้ำตาล จากนั้นใช้แม่เหล็กภายนอกแยกไครโอเจลไบโอเซนเซอร์ออกจากสารละลาย เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ในการทดลองครั้งต่อไป และนำส่วนของสารละลายสีน้ำตาลที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร

3.3.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบความหวาน

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณซูโครส โดยการสร้างชุดทดสอบความหวานที่อาศัยเทคนิคทางไบโอเซนเซอร์ เพื่อให้ได้วิธีที่สามารถตรวจวัดซูโครสได้อย่างมีความจำเพาะเจาะจงสูง และสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากชุดทดสอบนี้อาศัยการทำงานของเอนไซม์ 4 ชนิด ในการตรวจวัดความหวานของซูโครส ทำให้การทำงานของชุดทดสอบขึ้นอยู่กับการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังนั้นจึงสนใจที่จะศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ศึกษาอัตราส่วนของโคโคซานในการเตรียมโครโอเจล ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ ศึกษาความเป็นกรด-เบสของสารละลายบัฟเฟอร์ ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไอโคอะนิซิดีน และศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยา เพื่อให้ได้ชุดทดสอบที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวัดความหวาน โดยการศึกษาจะเปลี่ยนแปลงเฉพาะปัจจัยที่ศึกษาส่วนปัจจัยอื่นกำหนดให้คงที่ และเกณฑ์การพิจารณาการเลือกสภาวะที่ดีที่สุดจะพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุด ในการทดลองแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

3.3.6.1 ศึกษาอัตราส่วนของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ต่อโคโคซานในการเตรียมโครโอเจล

ทำการเตรียมโครโอเจลโดยใช้ปริมาณของโคโคซานที่แตกต่างกัน เนื่องจากโคโคซานมีหมู่เอมีน ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพในการตรึงอินเวอร์เทส มีตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดส ดังนั้นจึงศึกษาอัตราส่วนของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ต่อโคโคซานที่อัตราส่วน 1:1 1:2 1:3 และ 1:4 ตามลำดับ โดยใช้พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 3 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และโคโคซาน ความเข้มข้น 3 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ปริมาตรรวมของสารละลาย 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกันจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่สังเคราะห์ได้ 0.1000 ± 0.0005 กรัม ลงไป คนผสมให้ได้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก ต่อไปเติมสารละลาย กลูตาโรลดีไฮด์ ความเข้มข้น 2.5 % โดยปริมาตร จำนวน 100 ไมโครลิตร คนอย่างรวดเร็วจนได้เป็นเจล แล้วนำเจลที่ได้เทใส่ลงในแม่พิมพ์ วางไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นถอดโครโอเจลออกจากแม่พิมพ์ ตัดให้มีขนาด $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ เซนติเมตร โครโอเจลที่ได้จากทั้ง 4 อัตราส่วนนี้จะนำไปตรึงกับเอนไซม์ โดยนำไปแช่ในสารละลาย กลูตาโรลดีไฮด์ความเข้มข้น 2.5 % โดยปริมาตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ขึ้นต่อไปนำไปตรึงอินเวอร์เทส มีตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดส ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตรของเอนไซม์แต่ละชนิด 60 ไมโครลิตร วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาการเชื่อมโยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำไปแช่ในสารละลายแนฟฟิออน ความเข้มข้น 1 % โดยปริมาตร เป็นเวลา 30

นาที่ หลังจากนั้นล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์จะได้เป็นโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ นำโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมได้ในแต่ละอัตราส่วนของโคโตซานไปตรวจวัดความหวานของสารละลายซูโครส โดยทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีน ซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากสารละลายใสไม่มีสีเป็นสารละลายสีน้ำตาล ใช้แม่เหล็กภายนอกแยกโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ออกจากสารละลายและนำส่วนของสารละลายสีน้ำตาลที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร การพิจารณาอัตราส่วนของโคโตซานที่ใช้ในการเตรียมโครโอเจลที่เหมาะสมจะพิจารณาจากการทดลองที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุด

3.3.6.2 ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์

ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์อินเวอร์เทส มิวตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดส โดยนำโครโอเจลที่เตรียมได้ขนาด $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ เซนติเมตร มาแช่ในสารละลายกลูตาโรลดีไฮด์ ความเข้มข้น 2.5 % โดยปริมาตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นตรึงเอนไซม์โดยเติมอินเวอร์เทส มิวตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยจะเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ต้องการศึกษา ส่วนความเข้มข้นของเอนไซม์ชนิดอื่นคงที่

(1) ศึกษาความเข้มข้นของอินเวอร์เทส

ทำการตรึงเอนไซม์ โดยเติมมิวตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้น 0.05 1.00 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เติมเอนไซม์แต่ละชนิดที่ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ลงในไมโครเซนตริฟิวส์ทิวบ์ที่มีโครโอเจลจำนวน 5 หลอด จากนั้นเติมอินเวอร์เทสความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.05 0.10 0.15 0.20 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละไมโครเซนตริฟิวส์ทิวบ์ตามลำดับ วางไว้เพื่อให้เกิดการเชื่อมไขว้กันระหว่างโคโตซานกับเอนไซม์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายเนฟฟิออนความเข้มข้น 1 % โดยปริมาตร เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์จำนวน 5 ครั้ง ต่อไปเติมสารละลายซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลายไอโอดีนปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา จากนั้นใช้แม่เหล็กภายนอกแยกโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ออกจากสารละลายเพื่อนำโครโอเจลไบโอเซนเซอร์กลับมาใช้ใหม่ และนำส่วนของสารละลายสีน้ำตาลที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร

(2) ศึกษาความเข้มข้นของมิวตาโรเทส

ตรึงเอ็นไซม์โดยเติมอินเวอร์เทสความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ศึกษาได้ใน 3.3.6.2 ข้อ (1) กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมเอ็นไซม์แต่ละชนิดปริมาตร 60 ไมโครลิตรลงในไมโครเซนตริฟิวส์ทิวบ์ที่มีโครโอเจล จำนวน 5 หลอด จากนั้นเติมมิวตาโรเทสที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.05 0.06 0.07 0.08 และ 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 60 ไมโครลิตรลงไปในแต่ละไมโครเซนตริฟิวส์ทิวบ์ตามลำดับ วางไว้เพื่อให้เกิดการเชื่อมไขว้กันระหว่างโคโคซานกับเอ็นไซม์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายแนฟฟิออนความเข้มข้น 1 % โดยปริมาตร เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ต่อไปเติมสารละลายซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลายไอโดอะนิซินีน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา จากนั้นใช้แม่เหล็กภายนอกแยกโครโอเจลไป โอะเซนเซอร์ออกจากสารละลาย และนำส่วนของสารละลายสีน้ำตาลที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร

(3) ศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดส

ทำการศึกษาโดยเติมอินเวอร์เทส มิวตาโรเทสความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ศึกษาได้ใน 3.3.6.2 ข้อ (1) และข้อ (2) ตามลำดับ และเติมเปอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมเอ็นไซม์แต่ละชนิดปริมาตร 60 ไมโครลิตรลงในไมโครเซนตริฟิวส์ทิวบ์จำนวน 5 หลอด จากนั้นเติมกลูโคสออกซิเดสที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.20 0.40 0.60 0.80 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 60 ไมโครลิตรลงไปในแต่ละไมโครเซนตริฟิวส์ทิวบ์ ตามลำดับ วางไว้เพื่อให้เกิดการเชื่อมไขว้กันระหว่างโคโคซานกับเอ็นไซม์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายแนฟฟิออนความเข้มข้น 1 % โดยปริมาตร เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ต่อไปเติมสารละลายซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลายไอโดอะนิซินีน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา จากนั้นใช้แม่เหล็กภายนอกแยกโครโอเจลไป โอะเซนเซอร์ออกจากสารละลาย และนำส่วนของสารละลายสีน้ำตาลที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร

(4) ศึกษาความเข้มข้นของเปอร์ออกซิเดส

ศึกษาโดยเติมอินเวอร์เทส มิวตาโรเทส และกลูโคสออกซิเดส ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ศึกษาได้ใน 3.3.6.2 ข้อ (1) ข้อ (2) และข้อ (3) ตามลำดับ ลงในไมโครเซนตริฟิวส์ทิวบ์ จำนวน 5 หลอด จากนั้นเติมเปอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.20 0.40 0.60 0.80 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 60 ไมโครลิตรลงไปในแต่ละไมโครเซนตริฟิวส์ทิวบ์ ตามลำดับ วางไว้ให้เกิดการเชื่อมโยงวุ้นกันระหว่างโคโคซานกับเอนไซม์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายแนฟฟิออนความเข้มข้น 1 % โดยปริมาตร เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ต่อไปเติมสารละลายซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลายไอโดอะนิซิดีนปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา จากนั้นใช้แม่เหล็กภายนอกแยกโครโอเจลไปโอเซนเซอร์ออกจากสารละลาย และนำส่วนของสารละลายสีน้ำตาลที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร

3.3.6.3 ศึกษาความเป็นกรด-เบส ของสารละลายบัฟเฟอร์

ศึกษาความเป็นกรด-เบสของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินเวอร์เทส มิวตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดส ที่ถูกตรึงบนโครโอเจลไปโอเซนเซอร์ โดยศึกษาสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเตรียมเอนไซม์แต่ละชนิด ในสถานะการเป็นกรด กลาง และเบส พีเอชที่ทำการศึกษาคือ 5.00 5.50 6.00 6.50 7.00 7.50 และ 8.00 ซึ่งในสถานะความเป็นกรดศึกษาที่พีเอช 5.00 และ 5.50 จะใช้สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ และทำการศึกษาสถานะที่เป็นกลางและเบส พีเอช 6.00 6.50 7.00 7.50 และ 8.00 ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ ทำการทดลองโดยการละลายอินเวอร์เทส มิวตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดสด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชต่างๆ ที่ศึกษาให้ได้ความเข้มข้นตามความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์นั้นๆ ที่ปริมาตร 60 ไมโครลิตร จากนั้นเติมลงในไมโครเซนตริฟิวส์ทิวบ์ที่มีโครโอเจล วางไว้เพื่อให้เกิดการเชื่อมโยงวุ้นกันระหว่างโคโคซานกับเอนไซม์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายแนฟฟิออนความเข้มข้น 1 % โดยปริมาตร เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ต่อไปเติมสารละลายซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลายไอโดอะนิซิดีนปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา จากนั้นใช้แม่เหล็กภายนอกแยกโครโอเจล

ไบโอเซนเซอร์ออกจากสารละลาย และนำสารละลายสีน้ำตาลที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย เครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร

3.3.6.4 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไอโอดีน

ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายไอโอดีนที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยากับสารละลายซูโครสสำหรับการตรวจวัดความหวาน โดยใช้โครโอเจล ไบโอเซนเซอร์ ในการทดลองทำการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไอโอดีนที่ความเข้มข้น 0.10 0.30 0.50 0.70 0.90 1.10 1.30 และ 1.50 มิลลิโมลาร์ โดยนำโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ใส่ลงในไมโครเซนตริฟิวส์ทิวบ์ จากนั้นเติมสารละลายซูโครส ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในไมโครเซนตริฟิวส์ทิวบ์ แล้วเติมสารละลายไอโอดีนความเข้มข้นต่างๆที่ศึกษา ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา แล้วใช้แม่เหล็กภายนอกแยกโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ออก และนำสารละลายสีน้ำตาลที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร

3.3.6.5 ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยา

ศึกษาเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อินเวอร์เทส มิวตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดส บนโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ ทำปฏิกิริยากับสารละลายซูโครสและสารละลายไอโอดีน โดยใช้โครโอเจลไบโอเซนเซอร์ ในการตรวจวัดความหวาน การทดลองทำการศึกษาเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาที่เวลา 1 3 5 10 15 20 และ 25 นาที โดยนำโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมใส่ลงในไมโครเซนตริฟิวส์ทิวบ์ จากนั้นเติมสารละลายซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในไมโครเซนตริฟิวส์ทิวบ์ แล้วเติมสารละลายไอโอดีนความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.6.4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่ตามเวลาต่างๆ จากนั้นใช้แม่เหล็กภายนอกแยกโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ออกจากสารละลาย และนำสารละลายสีน้ำตาลที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร

ตารางที่ 3.1 แสดงสถานะที่ศึกษาในการตรวจวัดความหวานซูโครสด้วยชุดทดสอบความหวาน

สถานะที่สนใจศึกษา	การทดลอง
1. ศึกษาอัตราส่วนของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ต่อโคโคซานในการเตรียมโครโอเจล	1:1 1:2 1:3 และ 1:4
2. ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
(2.1) อินเวอร์เทส	0.05 0.10 0.15 0.20 และ 0.25
(2.2) มีวตาโรเทส	0.05 0.06 0.07 0.08 และ 0.09
(2.3) กลูโคสออกซิเดส	0.20 0.40 0.60 0.80 และ 1.00
(2.4) เปอร์ออกซิเดส	0.20 0.40 0.60 0.80 และ 1.00
3. ศึกษาความเป็นกรด-เบสของสารละลายบัฟเฟอร์ (พีเอช)	5.00 5.50 6.00 6.50 7.00 7.50 และ 8.00
4. ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไอโอดีนซึน (มิลลิโมลาร์)	0.10 0.30 0.50 0.70 0.90 1.10 1.30 และ 1.50
5. ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยา (นาที)	1 3 5 10 15 20 และ 25

3.3.7 การหาประสิทธิภาพของชุดทดสอบความหวาน

การหาประสิทธิภาพของชุดทดสอบความหวานที่สร้างขึ้นมา เพื่อให้ทราบถึงประสิทธิภาพและข้อจำกัดของชุดทดสอบ โดยมีการหาประสิทธิภาพต่างๆ ของชุดทดสอบ ดังนี้

3.3.7.1 การศึกษาความเที่ยงตรงของชุดทดสอบความหวาน

(1) การทำซ้ำของชุดทดสอบความหวาน

ศึกษาการทำซ้ำของวิธีโดยใช้ชุดทดสอบที่ได้สร้างขึ้นจากโครโอเจลไบโอเซนเซอร์มาตรวจวัดความหวานของซูโครส ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ จำนวน 7 ครั้ง ภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกัน ในการทดลองนำโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมได้ใส่ลงในไมโครเซนตริฟิวส์ทิวบ์ จากนั้นเติมสารละลายซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนซึนความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.6.4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาตามเวลาที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 3.3.6.5 จากนั้นใช้แม่เหล็กภายนอกแยกโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ออกจากสารละลาย นำสารละลายสีน้ำตาลที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณหาความสัมพันธ์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation; % RSD)

(2) การทวนซ้ำของชุดทดสอบความหวาน

ศึกษาการทวนซ้ำของวิธี โดยใช้ชุดทดสอบที่ได้สร้างขึ้นจากไครโอเจลไปโอเซนเซอร์ตรวจวัดความหวานของซูโครส ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ จำนวน 7 ครั้ง ภายใต้สภาวะการทดลองที่แตกต่างกัน คือ ใช้ไครโอเจลไปโอเซนเซอร์ 7 อัน ในการทดลองนำไครโอเจลไปโอเซนเซอร์ที่เตรียมได้ใส่ลงในไมโครเซนตริฟิวส์ทิวบ์ จากนั้นเติมสารละลายซูโครส ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโดอะนิซิดีนความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.6.3 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาตามเวลาที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 3.3.6.4 จากนั้นใช้แม่เหล็กภายนอกแยกไครโอเจลไปโอเซนเซอร์ออกจากสารละลาย นำส่วนของสารละลายสีน้ำตาลที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

3.3.7.2 การศึกษาความถูกต้องของชุดทดสอบความหวาน

ศึกษาความถูกต้องของชุดทดสอบ โดยการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery) ของการตรวจวัดความหวานซูโครสด้วยชุดทดสอบความหวานที่ได้สร้างขึ้นจากไครโอเจลไปโอเซนเซอร์ ตรวจวัดความหวานในตัวอย่างอ้อยและน้ำตาล โดยการเติมสารละลายมาตรฐานซูโครส ที่ความเข้มข้น 10 15 20 25 และ 30 มิลลิโมลาร์ ลงในตัวอย่างจริง จำนวน 5 ตัวอย่าง ตามลำดับ จากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับการตรวจวัดซูโครสภายใต้สภาวะที่เหมาะสม นำสารละลายสีน้ำตาลที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน โดยใช้กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานซูโครสที่ความเข้มข้น 10 ถึง 60 มิลลิโมลาร์

3.3.7.3 การศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของชุดทดสอบความหวาน

ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดความหวานของซูโครสด้วยชุดทดสอบความหวานที่ได้สร้างขึ้นจากไครโอเจลไปโอเซนเซอร์ ตรวจวัดสารละลายมาตรฐานซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโดอะนิซิดีนความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.6.4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาตามเวลาที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 3.3.6.5 จากนั้นใช้แม่เหล็กภายนอกแยกไครโอเจลไปโอเซนเซอร์ออกจากสารละลาย นำสารละลายสีน้ำตาลที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่

ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร และนำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซูโครสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้

3.3.7.4 การศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบของชุดทดสอบความหวาน

ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบของการตรวจวัดความหวานของซูโครสด้วยชุดทดสอบความหวานที่ได้สร้างขึ้นจากโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ ตรวจวัดสารละลายแบลงค์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนนิชิตินความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.6.4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาตามเวลาที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 3.3.6.5 จากนั้นใช้แม่เหล็กภายนอกแยกโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ออกจากสารละลาย นำสารละลายที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ทำการทดลองจำนวน 7 ครั้ง แล้วนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เพื่อคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบ โดยใช้ความสัมพันธ์ขีดจำกัดในการตรวจพบ = $3SD/m$ (เมื่อ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการตรวจวัดสารละลายแบลงค์ และ m คือ ความชัน (Slope) ของกราฟมาตรฐานที่ได้จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง) [51]

3.3.7.5 การศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพของชุดทดสอบ

ความหวาน

ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ โดยใช้ชุดทดสอบความหวานที่ได้สร้างขึ้นจากโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ ตรวจวัดสารละลายแบลงค์ทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนนิชิตินความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.6.4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาตามเวลาที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 3.3.6.5 จากนั้นใช้แม่เหล็กภายนอกแยกโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ออกจากสารละลาย และนำสารละลายที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ทำการทดลองจำนวน 7 ครั้ง นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เพื่อคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ โดยความเข้มข้นที่ได้จะต้องมีความเที่ยงและความถูกต้อง พิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนที่ยอมรับได้ ณ ความเข้มข้นนั้น ใช้ความสัมพันธ์ของขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ = $10SD/m$ [51]

3.3.7.6 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีของชุดทดสอบความหวาน

ศึกษาความจำเพาะของชุดทดสอบความหวานโดยใช้สารทดสอบได้แก่ กลูโคส ฟรุคโทส ไซโลส กาแลคโทส มอลโทส แลคโทส และกรดแอสคอร์บิก ซึ่งเป็นสารที่คาดว่า จะมีผลต่อชุดทดสอบ (ไซโลส กาแลคโทส มอลโทส แลคโทส และกรดแอสคอร์บิก) [52] และเป็น

สารที่พบได้ในตัวอย่าง (กลูโคส และฟรุกโทส) จากนั้นนำผลการวิเคราะห์ที่ได้เปรียบเทียบกับผลที่ได้จากซูโครสที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการตรวจวัดซูโครสด้วยโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ ใช้สารที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนนิซิดินความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.6.4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาตามเวลาที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 3.3.6.5 ใช้แม่เหล็กภายนอกแยกโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ออกจากสารละลาย จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร

3.3.7.7 การศึกษาการนำกลับมาใช้ใหม่ของชุดทดสอบความหวาน

ศึกษาการนำกลับมาใช้ใหม่ของชุดทดสอบความหวานที่ได้สร้างขึ้นจากโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ โดยนำไปตรวจวัดสารละลายซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนนิซิดินความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.6.4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาตามเวลาที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 3.3.6.5 ใช้แม่เหล็กภายนอกแยกโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ออกจากสารละลาย จากนั้นนำสารละลายสีน้ำตาลที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ในการทดลองใช้โครโอเจลไบโอเซนเซอร์เดิมภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกัน นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ พิจารณาจำนวนครั้งที่จะนำโครโอเจลไบโอเซนเซอร์กลับมาใช้ใหม่จากค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

3.3.7.8 การศึกษาอายุการใช้งานของโครโอเจลไบโอเซนเซอร์

ศึกษาอายุการใช้งานของโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ โดยศึกษาระยะเวลาในการนำชุดทดสอบความหวานที่ได้สร้างขึ้นจากโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ไปใช้งานในการตรวจวัดความหวานของสารละลายมาตรฐานซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลาจนการทำงานของโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเก็บรักษาในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการตรวจวัดสารละลายซูโครสในทุกๆ สัปดาห์ ในสภาวะการทดลองเดียวกัน โดยใช้สารละลายซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนนิซิดินความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.6.4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาตามเวลาที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 3.3.6.5 จากนั้นใช้แม่เหล็กภายนอกแยกโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ออกจากสารละลาย นำสารละลายสีน้ำตาลที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร และนำความเข้มข้นของซูโครสที่คำนวณได้มาหาเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพของชุดทดสอบในการตรวจวัดของชุดทดสอบ

โดยกำหนดให้ค่าการตอบสนองสัปดาห์ที่ 1 ของการทดลองชุดทดสอบมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดเป็น 100 %

3.3.8 การตรวจวัดความหวานในตัวอย่างจริง

3.3.8.1 ศึกษาผลของกลูโคสที่มีผลต่อการทำงานของชุดทดสอบ

ศึกษาผลของกลูโคสที่มีผลต่อการทำงานของชุดทดสอบ โดยสร้างโครโอเจลสำหรับตรวจวัดกลูโคส ที่เตรียมลักษณะเช่นเดียวกันกับโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ของชุดทดสอบความหวานในข้อ 3.3.3 แต่ในขั้นตอนการตรึงเอนไซม์จะตรึงเพียงมีตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดสเท่านั้น จากนั้นทำการตรวจวัดความเข้มข้นของสารละลายผสมระหว่างซูโครสกับกลูโคส หาความเข้มข้นของสารแต่ละตัวด้วยวิธีตรวจวัดความหวานตามข้อ 3.3.5 ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาตามเวลาที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 3.3.6.5 และนำสารละลายที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร โดยความเข้มข้นของสารละลายผสมทั้งสองที่ได้จะคำนวณจากสมการเส้นตรงที่ได้จากการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานซูโครสที่ความเข้มข้น 10 ถึง 40 มิลลิโมลาร์ด้วยชุดทดสอบความหวานซูโครส และสมการเส้นตรงจากการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 1 ถึง 30 มิลลิโมลาร์ ด้วยโครโอเจลที่สร้างขึ้นสำหรับตรวจวัดกลูโคส

3.3.8.2 การตรวจวัดความหวานในตัวอย่างจริงด้วยชุดทดสอบความหวาน

เมื่อได้ชุดทดสอบความหวานและสภาวะการทดลองที่เหมาะสมแล้ว นำชุดทดสอบความหวานที่ได้ไปตรวจวัดความหวานในตัวอย่างอ้อยและน้ำตาล จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำอ้อยจากหีบสกัดชุดแรก น้ำอ้อยผสม น้ำตาลทรายดิบ น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ โดยนำตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น จากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับการตรวจวัดซูโครสตามข้อ 3.3.5 โดยใช้ตัวอย่างจริงแทนสารละลายซูโครสทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดอนิซิดีนความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.6.4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาตามเวลาที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 3.3.6.5 ใช้แม่เหล็กภายนอกแยกโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ออกจากสารละลาย จากนั้นนำสารละลายสีน้ำตาลที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของซูโครสที่ตรวจวัดได้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน จากนั้นเปรียบเทียบผลการทดลองของชุดทดสอบกับผลที่ได้จากวิธีทางโพลาไรมิตรีที่ทางโรงงานน้ำตาลใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็ก และการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ และทางเคมี

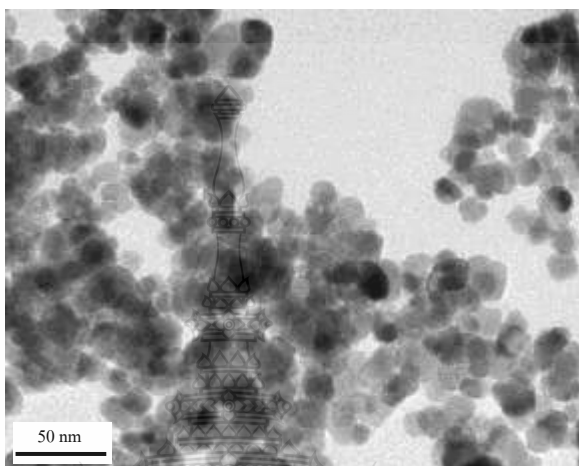
สังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กด้วยวิธีการตกตะกอนร่วม (Co-precipitation method) ของสารละลาย Fe^{2+} (เฟอร์รัสคลอไรด์เตตระไฮเดรต) กับสารละลาย Fe^{3+} (เฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต) ในอัตราส่วนโดยโมลเท่ากับ 1:2 ตามลำดับ ทำการตกตะกอนสารละลายดังกล่าวด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งได้เป็นตะกอนสีน้ำตาลดำ ดังรูปที่ 4.1 เมื่อทำการตรวจสอบสมบัติทางสนามแม่เหล็กโดยใช้แม่เหล็กภายนอก (External magnet) พบว่าอนุภาคนี้อาจสามารถเคลื่อนที่เข้าหาแม่เหล็กภายนอกได้อย่างรวดเร็ว แสดงได้ว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ได้นี้มีสมบัติความเป็นแม่เหล็ก



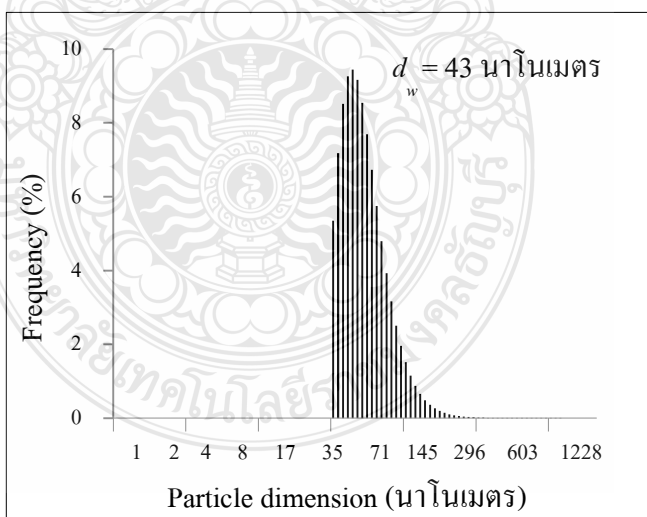
รูปที่ 4.1 การตรวจสอบสมบัติทางสนามแม่เหล็กด้วยแม่เหล็กภายนอก

จากการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้ โดยตรวจสอบลักษณะทางกายภาพด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ใช้ความต่างศักย์ที่ 100 กิโลโวลต์ กำลังขยาย 250,000 เท่า ดังรูปที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นทรงกลม มีขนาดอยู่ในระดับนาโนเมตร จากนั้นตรวจวัดขนาดของอนุภาคด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาคระดับนาโน พบว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (Weight average dimeters; d_w) 43 นาโนเมตร ดังรูปที่ 4.3 และจากการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างผลึกอนุภาคด้วยเทคนิคการวิเคราะห์การเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ ที่ความต่างศักย์ 40 กิโลโวลต์ และมุมในการวัดที่ 2 θ พบว่า อนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีมุมในการเลี้ยวเบนในตำแหน่งที่ 30° 36° 43°

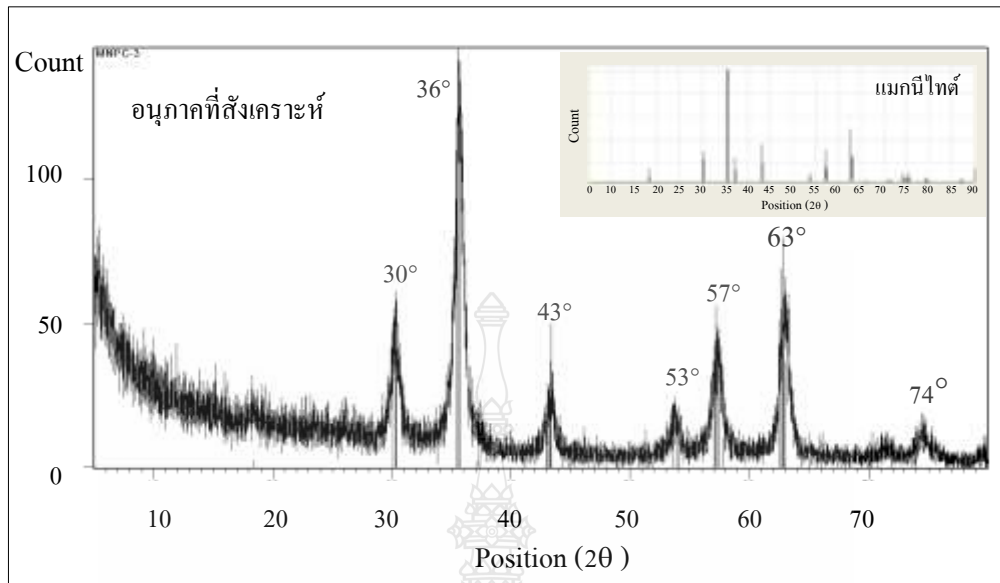
53° 57° 63° และ 74° ซึ่งตรงตามรูปแบบการเลี้ยวเบน (XRD pattern) ของอนุภาคแมกนีไทต์ (Magnetite) ที่เป็นอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่มีสมบัติการเป็นแม่เหล็กยิ่งยวด (Superparamagnetic) [48] รูปที่ 4.4 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ได้เป็นอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่มีสมบัติเป็นแม่เหล็กยิ่งยวด



รูปที่ 4.2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก ที่ความต่างศักย์ 100 กิโลโวลต์ กำลังขยาย 250,000 เท่า



รูปที่ 4.3 การวัดขนาดของอนุภาคนาโนแม่เหล็กด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาคระดับนาโน



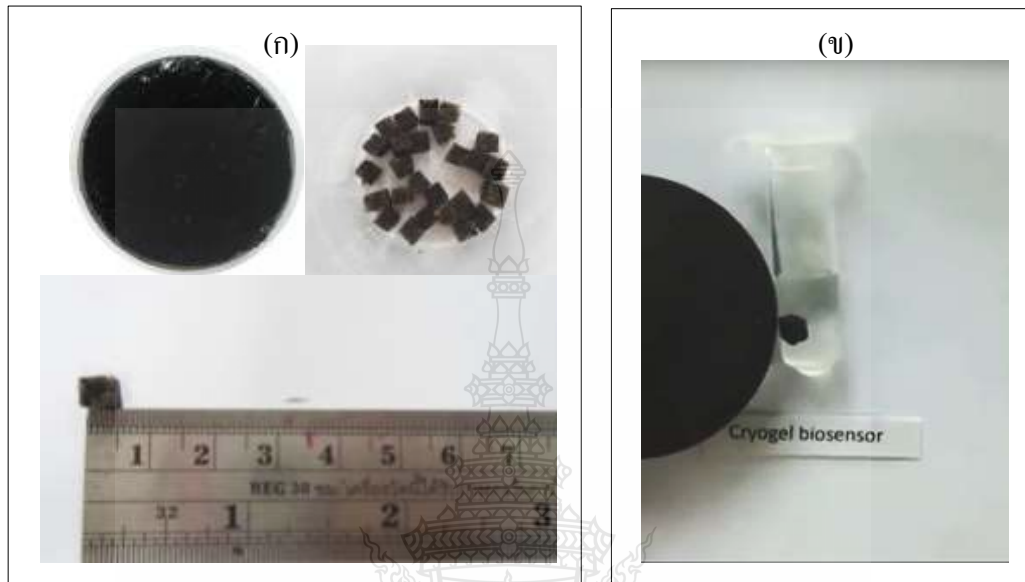
รูปที่ 4.4 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างผลึกของอนุภาคด้วยเครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ ที่ความต่างศักย์ 40 กิโลโวลต์ มุมในการวัด 2θ

4.2 การเตรียมโครโอเจลไบโอเซนเซอร์สำหรับสร้างชุดทดสอบความหวาน

โครโอเจลไบโอเซนเซอร์ที่ใช้สำหรับการสร้างชุดทดสอบความหวานเตรียมได้จากการผสมพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ ไคโตซาน และอนุภาคนาโนแม่เหล็ก ภายใต้สภาวะอุณหภูมิต่ำ จะทำให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน ลักษณะของโครโอเจลที่ได้แสดงในรูปที่ 4.5 หลังจากการนำไปขึ้นรูปได้เป็นโครโอเจลที่มีลักษณะแข็ง มีสีดำ ตัดโครโอเจลให้มีขนาด 0.5×0.5×0.5 เซนติเมตร จากนั้นนำไปตรึงอินเวอร์เทส มีวตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดส จะได้เป็นโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ รูป (ก) ซึ่งโครโอเจลไบโอเซนเซอร์นี้สามารถนำเอนไซม์ที่ตรึงกลับมาใช้ใหม่ได้ โดยอาศัยความเป็นแม่เหล็กจากแม่เหล็กภายนอก รูป (ข)

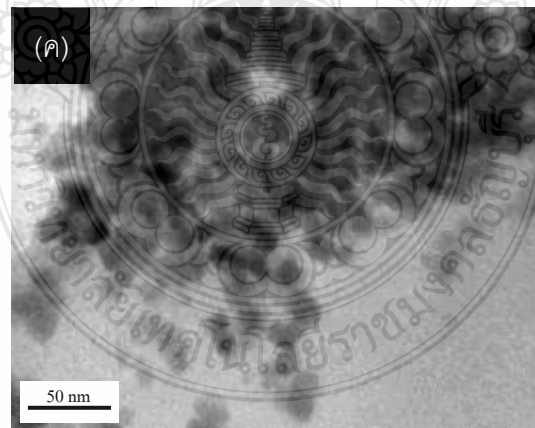
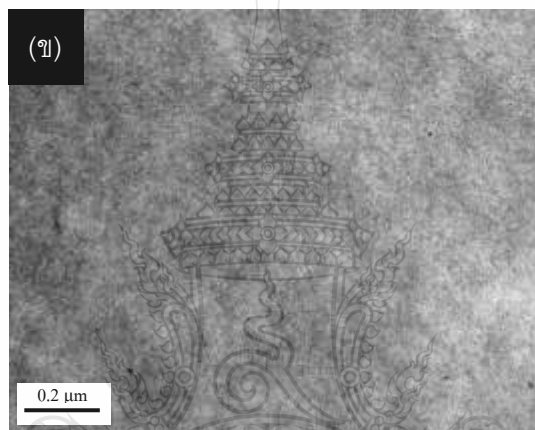
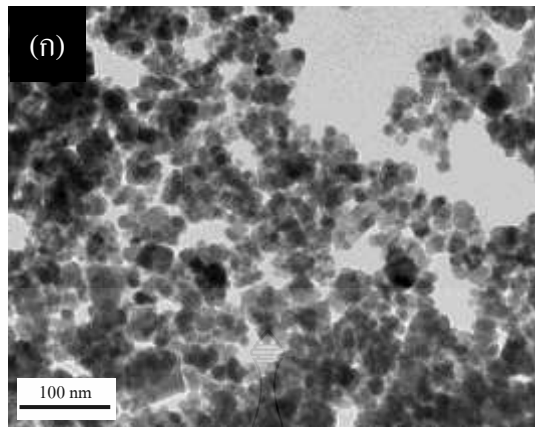
และจากการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ที่ความต่างศักย์ 100 กิโลโวลต์ กำลังขยาย 135,500 เท่า ดังรูปที่ 4.6 โดยได้ทำการเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก (ก) โครโอเจลที่เตรียมได้จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์รวมตัวกับไคโตซาน (ข) และโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ (ค) พบว่าโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมได้มีอนุภาคนาโนแม่เหล็กกระจายตัวอยู่ และแทรกตัวอยู่ใน

พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่รวมตัวกับไคโตซาน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่แทรกตัวอยู่นี้ จะสามารถทำให้โครโอเจลไบโอเซนเซอร์นำแอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้โดยใช้แม่เหล็กภายนอก



รูปที่ 4.5 ลักษณะ ขนาดของโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมได้ (ก) และความสามารถของโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ในการเคลื่อนที่เข้าหาแม่เหล็กภายนอก (ข)

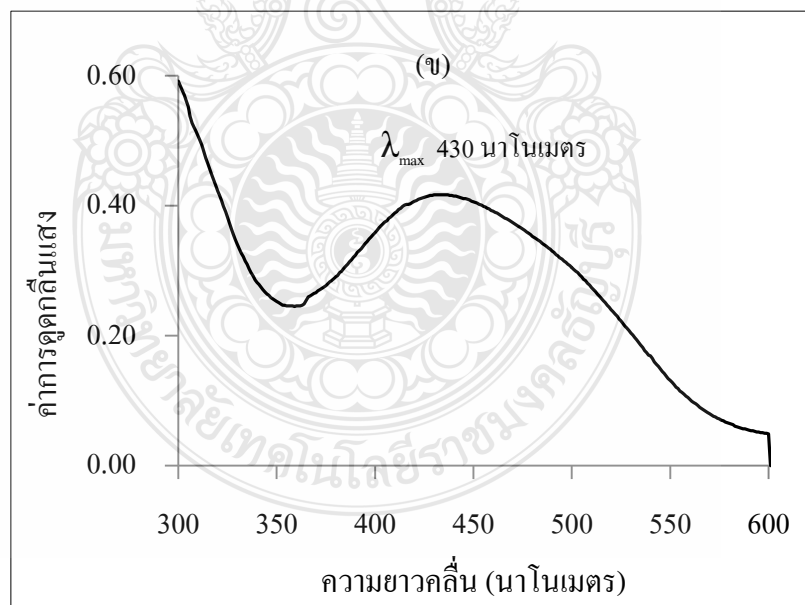
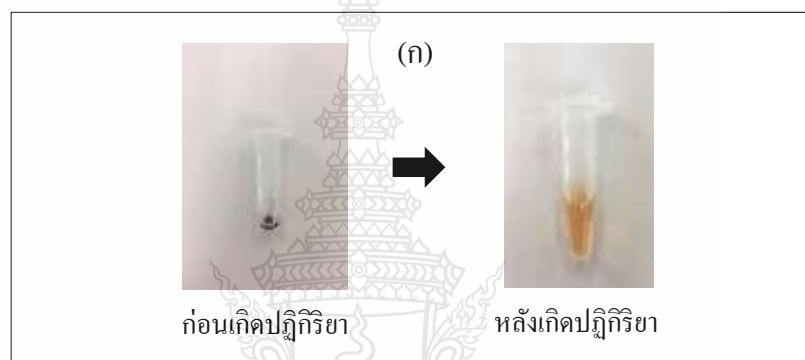




รูปที่ 4.6 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก (ก) ไครโอเจลที่เตรียมได้จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ร่วมกับไคโตซาน (ข) และไครโอเจลไบโอเซนเซอร์ (ค) ที่ความต่างศักย์ 100 กิโลโวลต์ กำลังขยาย 135,500 เท่า

4.3 ผลการตรวจวัดความหวานโดยใช้ชุดทดสอบความหวาน

ตรวจวัดความหวานด้วยชุดทดสอบความหวานที่สร้างขึ้นจากโคร โอลิโกแซคคาไรด์ โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาของซูโครสร่วมกับสารละลายไอโอดีน-ไอโอดีนในระหว่างการทดลองได้ทำการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานซูโครส ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองที่ได้แสดงในรูปที่ 4.7 พบว่า เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารละลายจากใสไม่มีสีไปเป็นสารละลายสีน้ำตาล รูป (ก) จากนั้นนำสารละลายสีน้ำตาลที่ได้ไปตรวจวัดด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เพื่อหาความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{\max}) พบว่ามีความยาวคลื่นสูงสุดที่ 430 นาโนเมตร รูป (ข)



รูปที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงของสารละลายมาตรฐานซูโครสเมื่อตรวจวัดด้วยชุดทดสอบที่สร้างขึ้นจากโคร โอลิโกแซคคาไรด์ (ก) และความยาวคลื่นสูงสุดในการการดูดกลืนแสงของสารละลายสีน้ำตาล (ข)

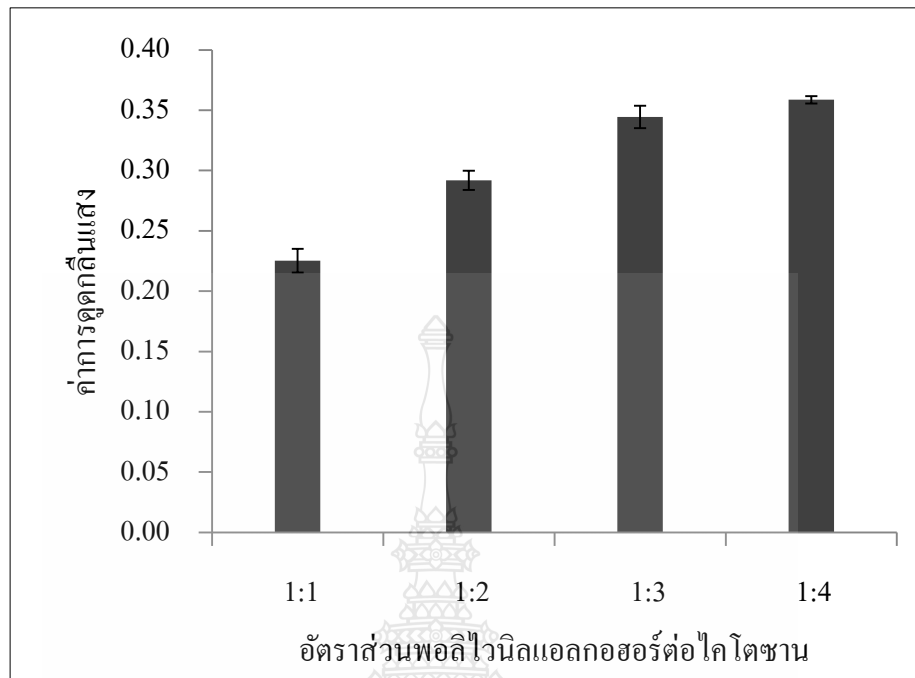
4.4 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบความหวาน

4.4.1 อัตราส่วนของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ต่อไคโตซานในการเตรียมไครโอเจล

ปริมาณของไคโตซานที่แตกต่างกันมีผลต่อประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์ เนื่องจากไคโตซานมีหมู่เอมีนที่สามารถเชื่อมพันธะกับสารเชื่อมไขว้กลูตาโรลดีไฮด์ที่ปลายด้านหนึ่ง ไปเกิดพันธะกับหมู่เอมีนของเอนไซม์ได้ โดยได้ทำการศึกษาอัตราส่วนของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ต่อไคโตซานที่มีผลต่อการตรึงอินเวอร์เทส มิวตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดส ที่อัตราส่วน 1:1 1:2 1:3 และ 1:4 ตามลำดับ จากนั้นนำไครโอเจลไบโอเซนเซอร์ที่ได้ไปตรวจวัดสารละลายซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และนำส่วนของสารละลายที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร โดยการพิจารณาอัตราส่วนของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ต่อไคโตซานที่ใช้ในการเตรียมไครโอเจลที่เหมาะสมจะพิจารณาจากการทดลองที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุด ผลการทดลองที่ได้เป็นดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.8 พบว่า ที่อัตราส่วน 1:4 เป็นอัตราส่วนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด เนื่องจากที่บริเวณผิวหน้าโดยรอบของไครโอเจลไบโอเซนเซอร์มีปริมาณหมู่เอมีนของไคโตซานมากที่สุด จึงทำให้เอนไซม์สามารถไปเกาะติดได้มาก และอัตราส่วนนี้ให้ไครโอเจลที่มีความแข็งแรงและไม่แตกหัก ซึ่งสามารถนำไครโอเจลไบโอเซนเซอร์กลับมาใช้ใหม่ได้ ในการทดลองนี้ไม่สามารถศึกษาอัตราส่วนของไคโตซานที่มากกว่า 4 ส่วนได้ เนื่องจากหากใช้ปริมาณของไคโตซานมากขึ้น ไครโอเจลที่เตรียมได้จะมีความเป็นเจลน้อย ไม่สามารถที่จะขึ้นรูปหรือก่อตัวเป็นเจลได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกอัตราส่วนของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ต่อไคโตซานที่อัตราส่วน 1:4 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเตรียมไครโอเจลเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการศึกษาอัตราส่วนของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ต่อไคโตซานในการเตรียมไครโอเจล

อัตราส่วน พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ต่อไคโตซาน	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
1:1	0.214	0.232	0.230	0.225	0.010
1:2	0.286	0.301	0.289	0.292	0.008
1:3	0.355	0.338	0.340	0.344	0.009
1:4	0.362	0.358	0.356	0.359	0.003



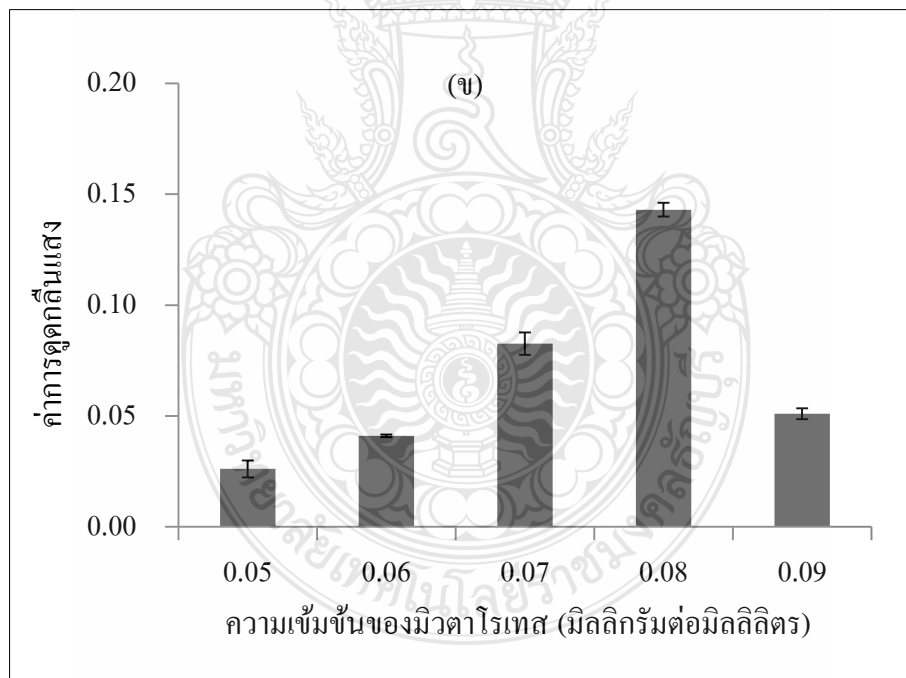
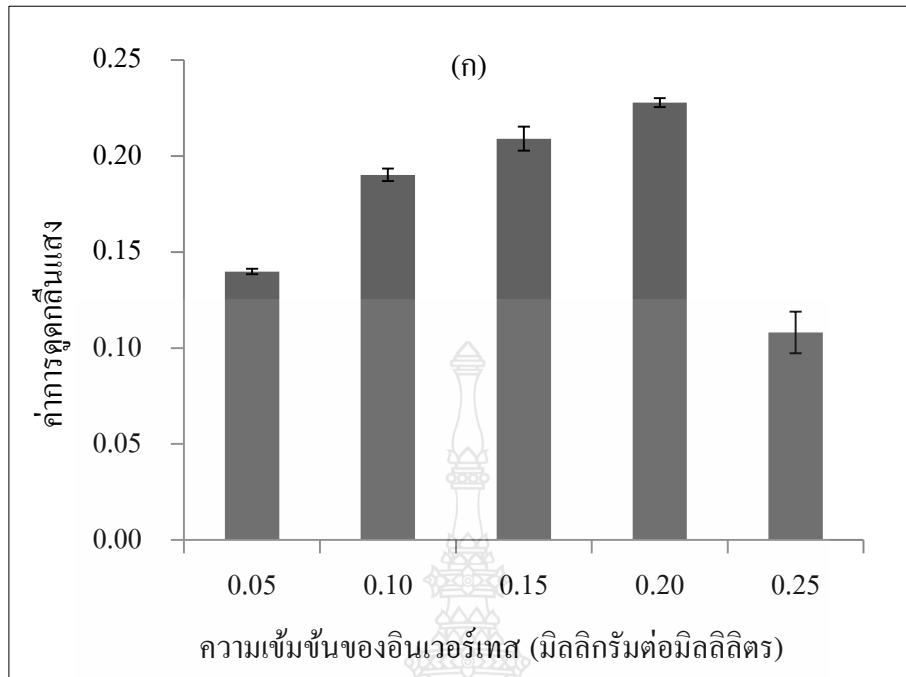
รูปที่ 4.8 การศึกษาอัตราส่วนของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ต่อไคโตซานในการเตรียมโครโอเจล

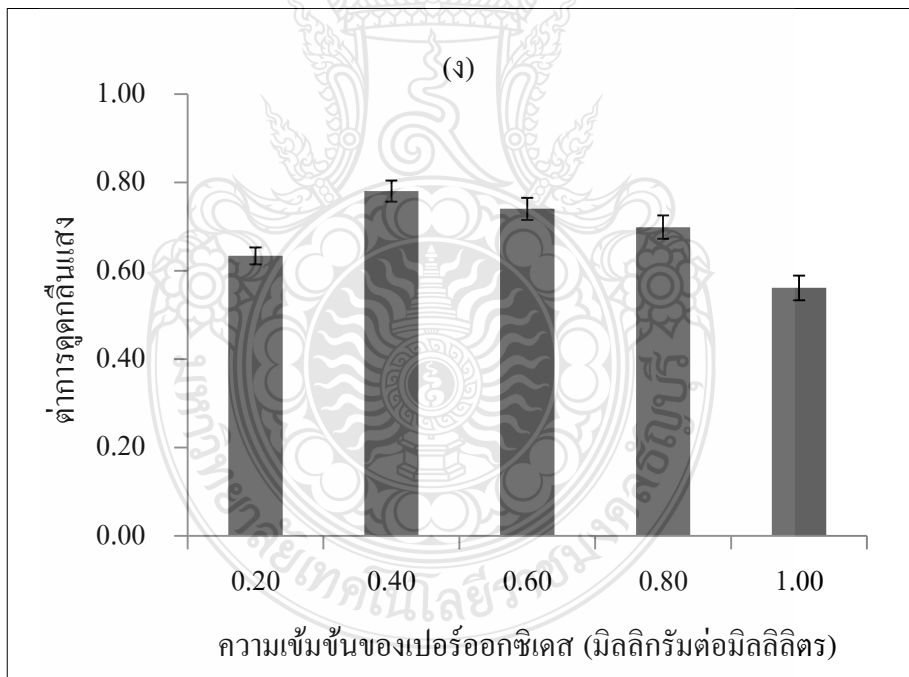
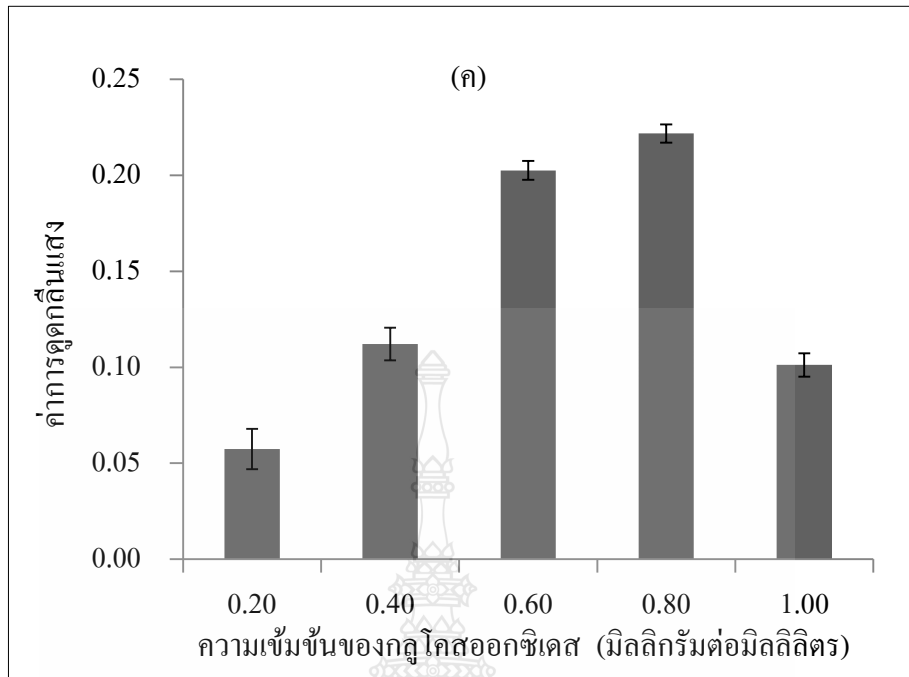
4.4.2 ความเข้มข้นของเอนไซม์

ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ตรึงลงบนโครโอเจลไบโอเซนเซอร์มีผลต่อการตรวจวัดซูโครส เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดมีหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา และเปลี่ยนสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดในแต่ละขั้นตอนไปเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาขั้นต่อไป จึงได้ศึกษาหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด คือ ความเข้มข้นของอินเวอร์เทส มิวตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดสที่ใช้ตรึงบนโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.9 พบว่าความเข้มข้นที่ใช้ในการตรึงลงบนโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ที่เหมาะสมของอินเวอร์เทส มิวตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดส คือ 0.20 0.08 0.80 และ 0.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยพิจารณาเลือกสภาวะที่ดีที่สุดจากค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุดที่ตรวจวัดได้

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์

เอนไซม์	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
อินเวอร์เทส	0.05	0.141	0.139	0.139	0.140	0.001
	0.1	0.194	0.187	0.190	0.190	0.003
	0.15	0.214	0.202	0.211	0.209	0.006
	0.2	0.225	0.228	0.230	0.228	0.002
	0.25	0.111	0.096	0.117	0.108	0.011
มิวตาโรเทส	0.05	0.026	0.019	0.025	0.023	0.004
	0.06	0.041	0.042	0.042	0.042	0.001
	0.07	0.083	0.091	0.082	0.085	0.005
	0.08	0.143	0.139	0.137	0.140	0.003
	0.09	0.051	0.046	0.049	0.049	0.003
กลูโคสออกซิเดส	0.20	0.057	0.037	0.051	0.048	0.010
	0.40	0.112	0.105	0.122	0.113	0.009
	0.60	0.203	0.196	0.193	0.197	0.005
	0.80	0.222	0.231	0.228	0.227	0.005
	1.00	0.101	0.089	0.094	0.095	0.006
เปอร้ออกซิเดส	0.20	0.634	0.596	0.614	0.615	0.019
	0.40	0.780	0.753	0.801	0.778	0.024
	0.60	0.741	0.733	0.694	0.723	0.025
	0.80	0.699	0.662	0.647	0.669	0.027
	1.00	0.562	0.510	0.554	0.542	0.028





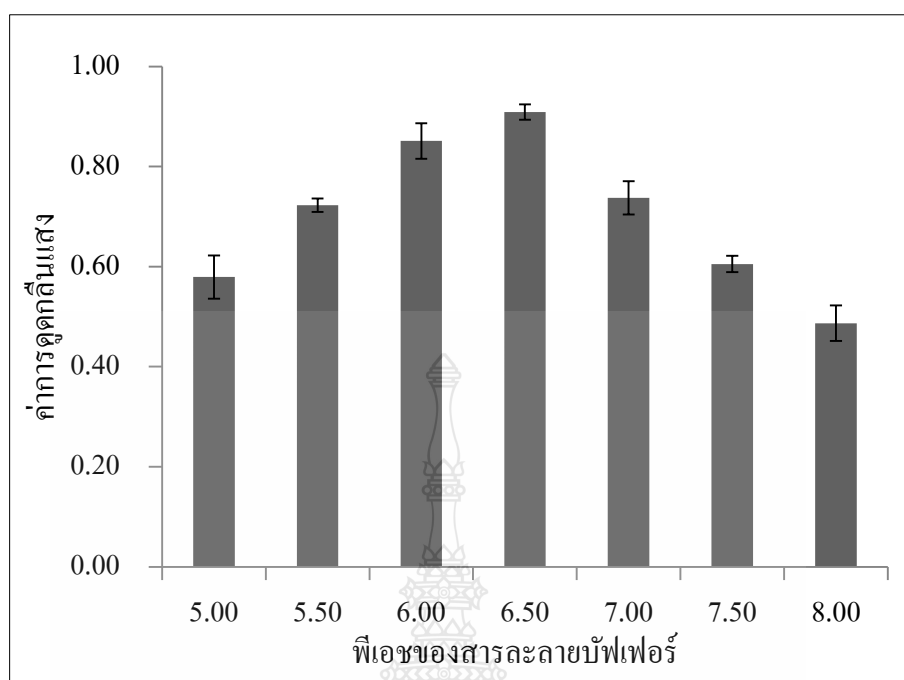
รูปที่ 4.9 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของอินเวอร์เทส (ก) มีวตาโรเทส (ข) กลูโคสออกซิเดส (ค) และเปอร์ออกซิเดส (ง) ที่ตรึงลงบนไครโอเจลไบโอเซนเซอร์

4.4.3 ความเป็นกรด-เบส ของสารละลายบัฟเฟอร์

ความเป็นกรด-เบสของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมมีผลต่อการทำงานของอินเวอร์เทส มิวตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดสที่ถูกตรึงบนโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ ทำการศึกษาสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเตรียมเอนไซม์แต่ละชนิด โดยศึกษาสารละลายบัฟเฟอร์ในสถานะความเป็นกรด กลาง และเบส ที่พีเอชต่างๆ คือ 5.00 5.50 6.00 6.50 7.00 7.50 และ 8.00 ผลการทดลองที่ได้เป็นดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.10 เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นจาก 5.00 ถึง 6.50 จะให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น แต่เมื่อพีเอชมากกว่า 6.50 จะให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง ทั้งนี้เนื่องจากอินเวอร์เทสสามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 5.00 [53] มิวตาโรเทสทำงานได้ดีที่พีเอช 7.10 [54] กลูโคสออกซิเดสทำงานได้ดีที่พีเอช 5.50 [55] และเปอร์ออกซิเดสสามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 6.00 [56] การนำเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดมาทำการตรึงลงบนโครโอเจลร่วมกันในรูปแบบเอนไซม์ตรึงรูปจะทำให้สถานะความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมในการทำงานเปลี่ยนแปลงไป จากการทดลองสรุปได้ว่าที่พีเอช 6.50 ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกที่พีเอชนี้เป็นพีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการศึกษาค่าความเป็นกรด-เบส ของสารละลายบัฟเฟอร์

พีเอช	ค่าการดูดกลืนแสง				ส่วนส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
5.00	0.579	0.493	0.542	0.538	0.043
5.50	0.723	0.701	0.698	0.707	0.013
6.00	0.851	0.782	0.830	0.821	0.035
6.50	0.909	0.879	0.887	0.892	0.015
7.00	0.737	0.671	0.711	0.706	0.033
7.50	0.605	0.574	0.581	0.587	0.016
8.00	0.487	0.439	0.418	0.448	0.035



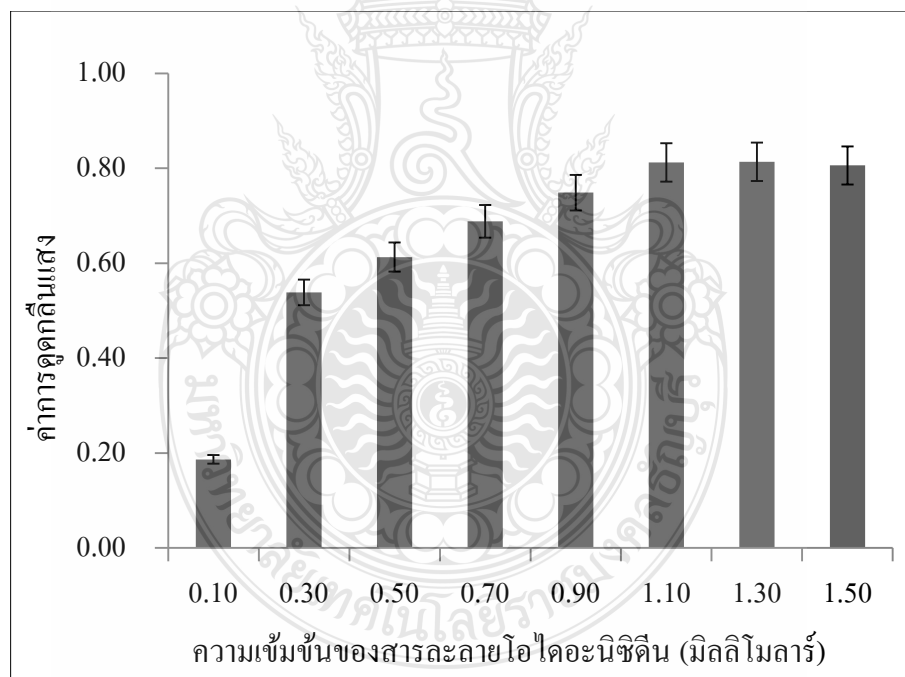
รูปที่ 4.10 การศึกษาความเป็นกรด-เบส ของสารละลายบ्लीฟเฟอร์

4.4.4 ความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์

ความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารละลายซูโครสในการตรวจวัดความหวาน จึงได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.10 0.30 0.50 0.70 0.90 1.10 1.30 และ 1.50 มิลลิโมลาร์ ทำการตรวจวัดสารละลายซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ผลที่ได้ดังแสดงตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.11 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จนถึงความเข้มข้นที่ 1.10 มิลลิโมลาร์ เมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นมากกว่า 1.10 มิลลิโมลาร์ ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ทดสอบด้วยสถิติ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %) เนื่องจากปริมาณของสารตั้งต้น (ซูโครส) มีปริมาณจำกัด จึงทำให้ความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เพิ่มขึ้นมากเกินไปไม่สามารถทำปฏิกิริยากับสารละลายซูโครสได้ ทำให้ค่าการดูดกลืนที่ได้มีค่าคงที่ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เหมาะสมคือ 1.10 มิลลิโมลาร์

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไอโอดีน

ความเข้มข้นสารละลาย ไอโอดีน (มิลลิโมลาร์)	ค่าการดูดกลืนแสง				ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
0.10	0.187	0.186	0.178	0.184	0.005
0.30	0.539	0.522	0.519	0.527	0.011
0.50	0.613	0.642	0.612	0.622	0.017
0.70	0.688	0.649	0.660	0.666	0.020
0.90	0.749	0.721	0.723	0.731	0.016
1.10	0.812	0.786	0.790	0.796	0.014
1.30	0.814	0.781	0.798	0.798	0.016
1.50	0.806	0.794	0.796	0.799	0.006



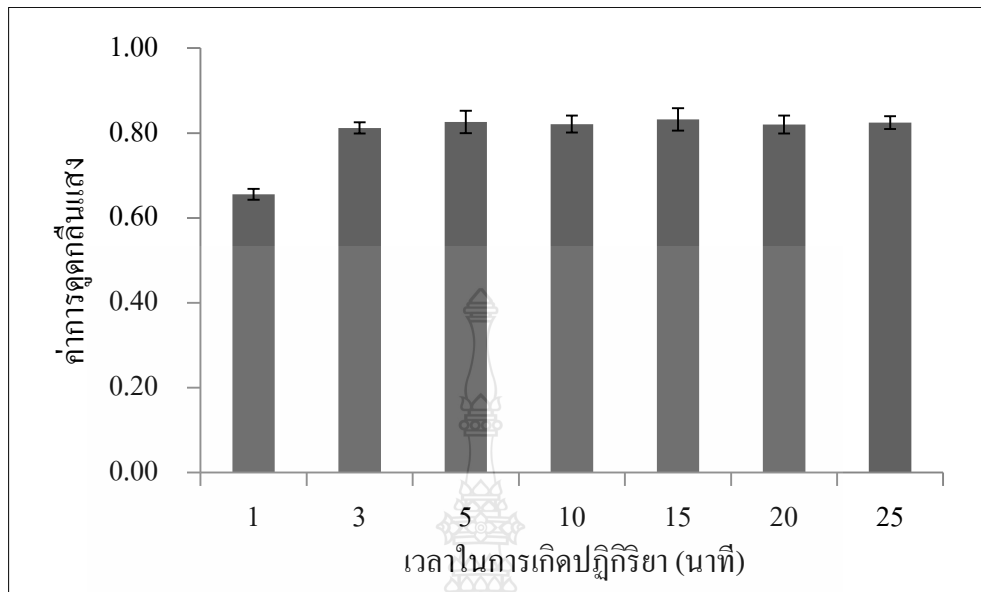
รูปที่ 4.11 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไอโอดีน

4.4.5 เวลาในการเกิดปฏิกิริยา

เนื่องจากการตรวจวัดขึ้นอยู่กับการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารละลายซูโครสกับสารละลายไอโอดีนนิซดิน โดยมีเอนไซม์ที่ถูกรังอยู่บนไครโอเจลไบโอเซนเซอร์ของชุดทดสอบเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมจึงเป็นเวลาที่สามารถทำปฏิกิริยากันได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยศึกษาที่เวลา 1 3 5 10 15 20 และ 25 นาที ตรวจวัดสารละลายซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และนำสารละลายที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.12 พบว่า ที่เวลา 1 ถึง 3 นาที ค่าการดูดกลืนแสงมีการเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นหลังจากนาทีที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ (ทดสอบด้วยสถิติ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %) แสดงว่าเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการตรวจวัดความหวานของซูโครสสมบูรณ์ที่เวลา 3 นาที ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้เวลานี้เป็นเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการศึกษาเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา

เวลาในการเกิดปฏิกิริยา (นาที)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
1	0.656	0.630	0.648	0.645	0.013
3	0.812	0.786	0.794	0.797	0.013
5	0.826	0.775	0.812	0.804	0.026
10	0.821	0.781	0.799	0.800	0.020
15	0.832	0.802	0.779	0.804	0.027
20	0.820	0.810	0.78	0.803	0.021
25	0.825	0.796	0.803	0.808	0.015



รูปที่ 4.12 ผลการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยา

ตารางที่ 4.6 สรุปสถานะที่เหมาะสมในการตรวจวัดความหวานซูโครสด้วยชุดทดสอบความหวาน

สถานะที่ศึกษา	ผลการทดลอง
1. อัตราส่วนของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ต่อไคโตซานในการเตรียมไครโอเจล	1:4
2. ความเข้มข้นของเอนไซม์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
(2.1) อินเวอร์เทส	0.20
(2.2) มิวตาโรเทส	0.08
(2.3) กลูโคสออกซิเดส	0.80
(2.4) เพอร์ออกซิเดส	0.40
3. ความเป็นกรด-เบสของสารละลายบัฟเฟอร์ (พีเอช)	6.50
4. ความเข้มข้นของสารละลายไอโดอะนิซิดีน (มิลลิโมลาร์)	1.10
5. เวลาในการเกิดปฏิกิริยา (นาที)	3

4.5 การหาประสิทธิภาพของชุดทดสอบความหวาน

การหาประสิทธิภาพของชุดทดสอบที่สร้างขึ้น เป็นการหาเพื่อให้ทราบถึงประสิทธิภาพข้อจำกัดของชุดทดสอบ และเป็นการยืนยันการนำมาใช้ได้จริงของชุดทดสอบ ดังนั้นจึงได้ทำการหาประสิทธิภาพของชุดทดสอบ ดังนี้

4.5.1 การศึกษาความเที่ยงตรงของชุดทดสอบความหวาน

4.5.1.1 การทำซ้ำของชุดทดสอบความหวาน

ศึกษาการทำซ้ำโดยใช้ชุดทดสอบที่ได้สร้างขึ้นจากไครโอเจลไบโอเซนเซอร์ เพื่อตรวจวัดความหวานของสารละลายซูโครส ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ จำนวน 7 ครั้ง ภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ พบว่ามีค่าเท่ากับ 3 (ตารางที่ 4.7) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (เกณฑ์ % RSD ต้องไม่เกิน 5 %) แสดงว่าชุดทดสอบนี้มีความเที่ยงตรงสูง

ตารางที่ 4.7 แสดงผลของการศึกษาการทำซ้ำของชุดทดสอบความหวาน

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง
1	0.192
2	0.191
3	0.195
4	0.201
5	0.191
6	0.193
7	0.203
ค่าเฉลี่ย	0.195
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.005
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์	3

4.5.1.2 การทวนซ้ำของชุดทดสอบความหวาน

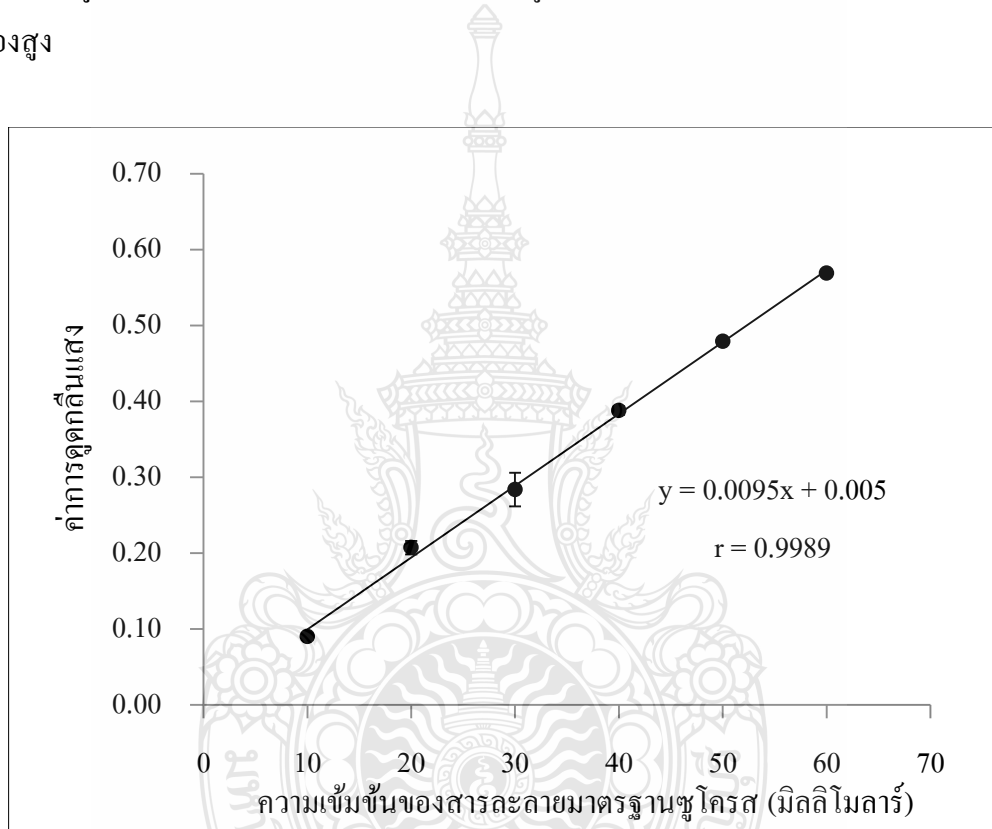
ศึกษาการทวนซ้ำโดยใช้ไครโอเจลไบโอเซนเซอร์ตรวจวัดความหวานของสารละลายซูโครส ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ จำนวน 7 ครั้ง ภายใต้สภาวะการทดลองที่แตกต่างกัน คือ ใช้ไครโอเจลไบโอเซนเซอร์ 7 อัน จากนั้นตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้ด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร พบว่าชุดทดสอบนี้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 4 ดังตารางที่ 4.8 แสดงว่าชุดทดสอบนี้มีความเที่ยงตรงสูง

ตารางที่ 4.8 แสดงผลของการทวนซ้ำของชุดทดสอบความหวาน

ไครโอเจลไบโอเซนเซอร์	ค่าการดูดกลืนแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	0.153	0.185	0.159	0.166
2	0.167	0.160	0.157	0.161
3	0.183	0.172	0.162	0.172
4	0.179	0.187	0.181	0.182
5	0.166	0.156	0.164	0.162
6	0.165	0.168	0.168	0.166
7	0.158	0.167	0.192	0.172
ค่าเฉลี่ยทั้งหมด			0.169	
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน			0.007	
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์			4	

4.5.2 การศึกษาความถูกต้องของชุดทดสอบความหวาน

จากการศึกษาความถูกต้องของวิธี โดยการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery) ของสารละลายมาตรฐานซูโครสความเข้มข้นต่างๆ ที่เติมลงในตัวอย่าง เมื่อนำค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้หาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานซูโครส รูปที่ 4.13 พบว่าได้เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนอยู่ในช่วง 92-104 % ดังตารางที่ 4.9 ซึ่งผลที่ได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (ช่วงที่ยอมรับได้คืออยู่ในช่วง 80 - 120%) [51] แสดงว่าวิธีนี้มีความถูกต้องสูง



รูปที่ 4.13 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน ในการตรวจวัดความหวานของซูโครสใน ตัวอย่างอ้อยและน้ำตาล

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของซูโครส (มิลลิโมลาร์)			เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน
	ก่อนเติม	เติม	หลังเติม	
น้ำตาลทรายดิบ	14.21±0.21	10	23.72±1.07	95
น้ำตาลทรายขาว	14.46±0.24	15	28.77±0.97	95
น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์	14.67±0.16	20	35.16±1.37	102
น้ำอ้อย (ชุดแรก)	16.35±0.34	25	39.37±0.94	92
น้ำอ้อยผสม	12.95±0.46	30	44.04±1.60	104



4.5.3 การศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง

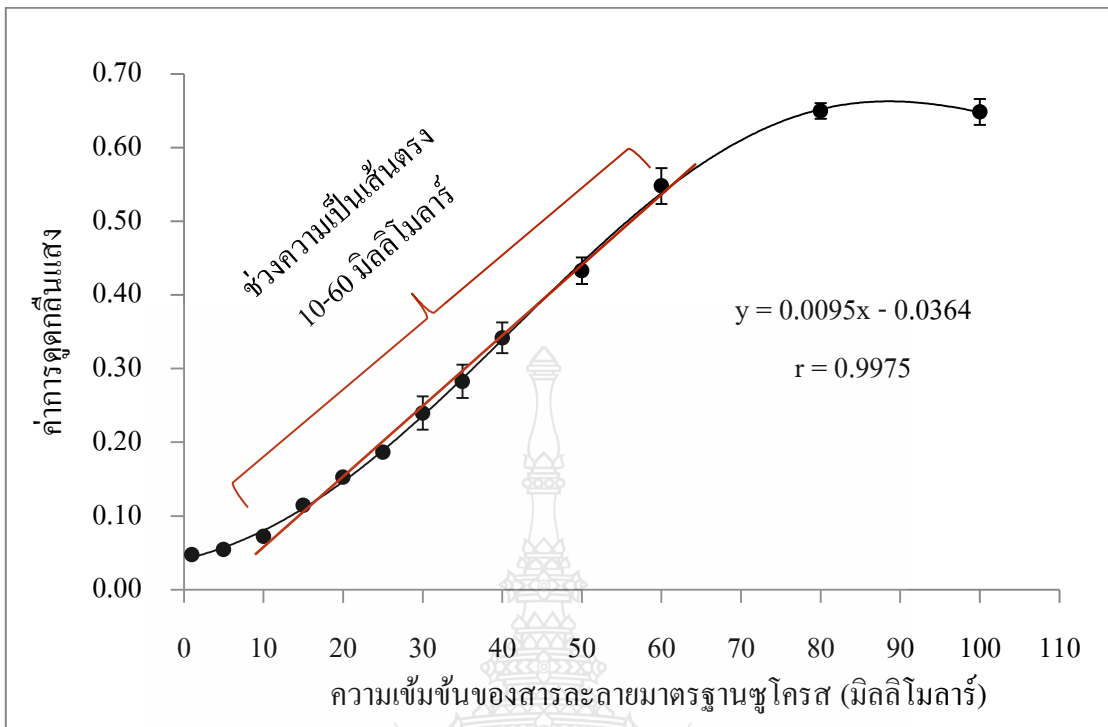
จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง โดยตรวจวัดสารละลายมาตรฐานซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 และ 100 มิลลิโมลาร์ ด้วยชุดทดสอบที่สร้างขึ้น ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร รูปที่ 4.14 แสดงผลการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารละลายซูโครสเพิ่มขึ้น สารละลายสีน้ำตาลจะมีความเข้มสีเพิ่มขึ้น และเมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซูโครสกับค่าการดูดกลืนแสง ผลที่ได้เป็นดังตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.14 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่าการดูดกลืนแสงจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของซูโครส โดยให้ช่วงความเป็นเส้นตรงคือ 10 ถึง 60 มิลลิโมลาร์ และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9975



รูปที่ 4.14 ความเข้มข้นของสารละลายสีน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของซูโครส

ตารางที่ 4.10 แสดงผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดความหวานของซูโครสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นสารละลาย มาตรฐานซูโครส (มิลลิโมลาร์)	ค่าการดูดกลืนแสง				ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
1	0.050	0.047	0.045	0.047	0.003
5	0.056	0.054	0.053	0.054	0.002
10	0.076	0.072	0.069	0.072	0.007
15	0.121	0.114	0.115	0.115	0.001
20	0.154	0.155	0.150	0.153	0.004
25	0.190	0.187	0.182	0.186	0.004
30	0.248	0.257	0.214	0.240	0.023
35	0.297	0.273	0.278	0.283	0.023
40	0.360	0.346	0.319	0.342	0.021
50	0.453	0.428	0.418	0.433	0.018
60	0.520	0.560	0.564	0.548	0.024
80	0.640	0.661	0.648	0.650	0.011
100	0.628	0.658	0.659	0.648	0.018



รูปที่ 4.15 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานชูโครส



4.5.4 การศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบของชุดทดสอบความหวาน

ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบในการตรวจวัดความหวานของซูโครส ด้วยชุดทดสอบความหวาน โดยใช้ชุดทดสอบที่ได้สร้างขึ้นตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแบลงค์จำนวน 7 ครั้ง ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร แล้วนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เพื่อคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบซึ่งได้เท่ากับ 3 มิลลิโมลาร์

ตารางที่ 4.11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแบลงค์ ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง
1	0.032
2	0.036
3	0.033
4	0.044
5	0.046
6	0.057
7	0.051
ค่าเฉลี่ย	0.043
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.010

โดยขีดจำกัดในการตรวจพบคำนวณได้จาก [51]

$$LOD = \frac{3SD}{m}$$

เมื่อ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการตรวจวัดสารละลายแบลงค์
m คือ ความชัน (Slope) ของกราฟมาตรฐานที่ได้จากการศึกษาช่วงความ
เป็นเส้นตรงจากสมการเส้นตรง $y = 0.0095x - 0.0364$ ซึ่ง m
มีค่าเท่ากับ 0.0095

$$\begin{aligned}
 \text{จะได้} \quad \text{LOD} &= \frac{3SD}{m} \\
 &= \frac{3(0.010)}{0.0095} \\
 &= 3 \text{ มิลลิโมลาร์}
 \end{aligned}$$

4.5.5 การศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพของชุดทดสอบความหวาน

ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ โดยใช้ชุดที่สร้างขึ้นตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแบบลงค์ จำนวน 7 ครั้ง ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร แล้วนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เพื่อคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ พบว่าขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ เท่ากับ 11 มิลลิโมลาร์

โดยขีดจำกัดในการตรวจพบคำนวณได้จาก [51]

$$\begin{aligned}
 \text{จะได้} \quad \text{LOD} &= \frac{10SD}{m} \\
 &= \frac{10(0.010)}{0.0095} \\
 &= 11 \text{ มิลลิโมลาร์}
 \end{aligned}$$

และเมื่อศึกษาความเที่ยงที่ความเข้มข้นนี้ พบว่าให้ % RSD เท่ากับ 4 ให้เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนอยู่ในช่วง 83-105 % สรุปว่าชุดทดสอบนี้มีขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพเท่ากับ 11 มิลลิโมลาร์

4.5.6 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของชุดทดสอบความหวาน

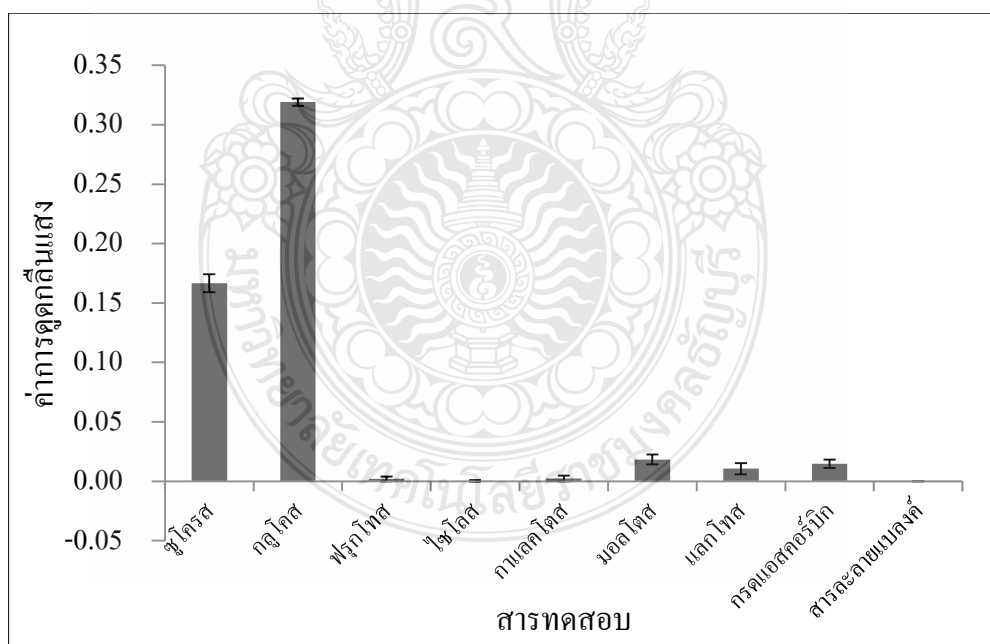
ศึกษาความจำเพาะของชุดทดสอบความหวานด้วยสารทดสอบที่คาดว่าจะมีผลต่อชุดทดสอบ และเป็นสารที่พบได้ในตัวอย่าง ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโทส ไซโลส กาแลคโทส มอลโทส แลคโทส และกรดแอสคอร์บิก เปรียบเทียบผลการตอบสนองต่อชุดทดสอบที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 20 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองที่ได้ดังรูปที่ 4.16 และตารางที่ 4.12 พบว่า ฟรุคโทส ไซโลส และกาแลคโทสไม่มีผลต่อการทำงานของชุดทดสอบ เนื่องจากไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงกับเอนไซม์ของชุดทดสอบได้ แต่กลูโคส มอลโทส แลคโทส และกรดแอสคอร์บิก มีการตอบสนองต่อชุดทดสอบ เนื่องจากสารทดสอบดังกล่าวมีกลูโคสเป็นองค์ประกอบที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ของชุดทดสอบได้เช่นเดียวกับซูโครส



รูปที่ 4.16 การเปลี่ยนแปลงของสารทดสอบเมื่อตรวจวัดด้วยชุดทดสอบความหวาน

ตารางที่ 4.12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบต่างๆ

สารทดสอบ	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	ค่าการดูดกลืนแสง				ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
ซูโครส	20	0.175	0.165	0.160	0.167	0.008
กลูโคส	20	0.316	0.319	0.322	0.319	0.003
ฟรุกโทส	20	0.000	0.002	0.004	0.002	0.002
ไซโลส	20	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001
กาแลคโตส	20	0.000	0.005	0.002	0.002	0.003
มอลโทส	20	0.017	0.023	0.015	0.018	0.004
แลคโทส	20	0.016	0.007	0.009	0.011	0.005
กรดแอสคอร์บิก	20	0.011	0.018	0.015	0.015	0.004
สารละลายเบลงค์	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

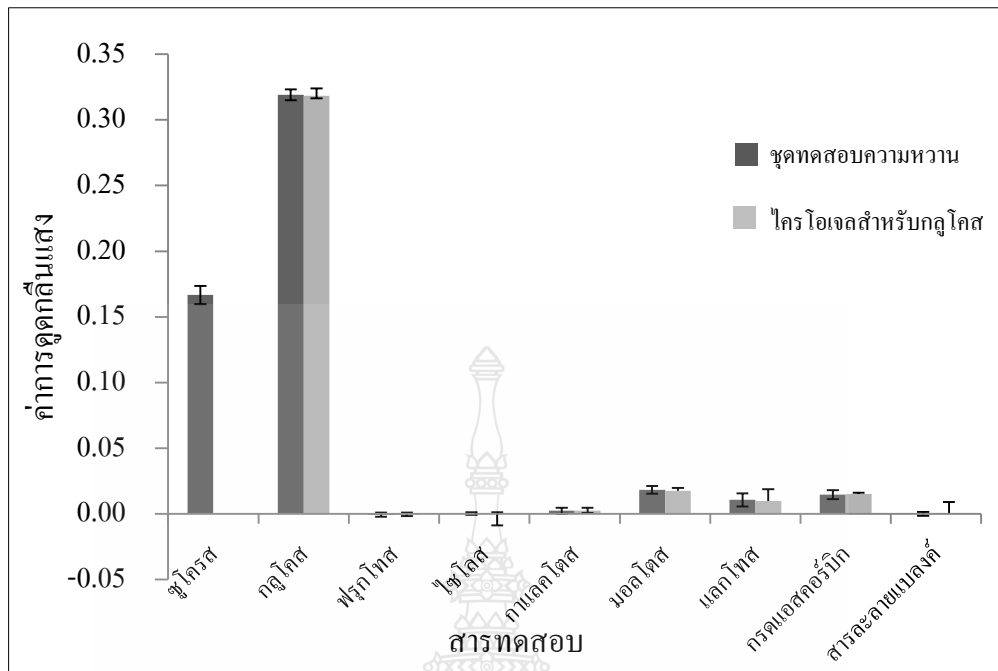


รูปที่ 4.17 ผลการตอบสนองของสารทดสอบต่อชุดทดสอบความหวาน

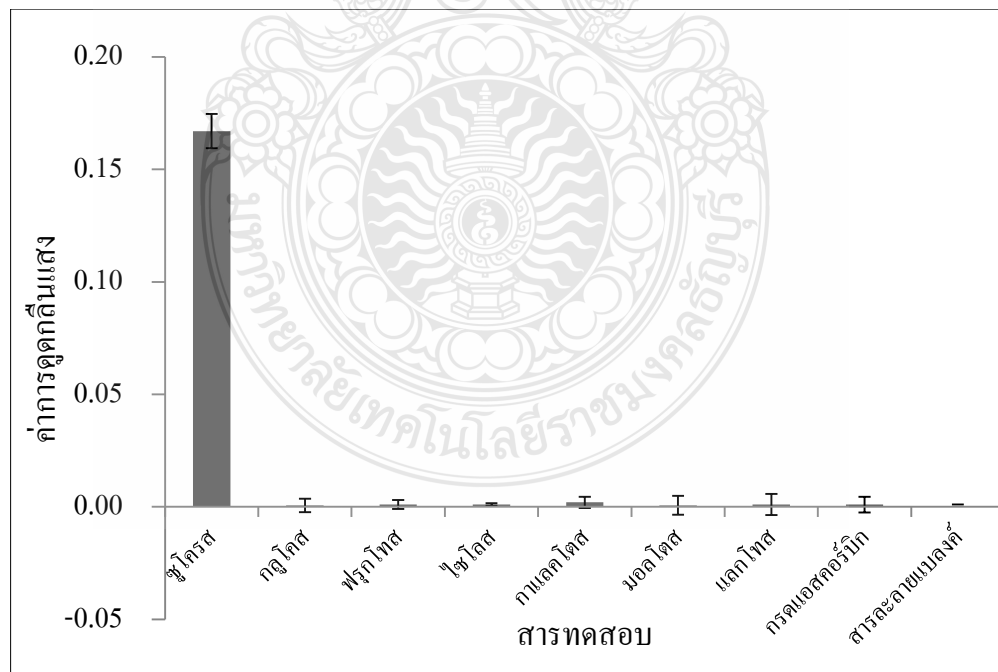
จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า กลูโคส มอลโทส แลคโทส และกรดแอสคอร์บิกมีผลต่อการทำงานของชุดทดสอบได้นั้น เนื่องจากมีกลูโคสเป็นองค์ประกอบอยู่ โดยมอลโทสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ 2 โมเลกุล แลคโทสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่ประกอบด้วยกลูโคสและกาแลคโทส และกรดแอสคอร์บิกมีกลูโคสเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างที่พบได้ในพืช ดังนั้นเพื่อเป็นการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของชุดทดสอบความหวานที่มีผลต่อชูโครส จึงทำการเปรียบเทียบผลการตอบสนองของสารทดสอบที่มีผลต่อการทำงานของชุดทดสอบความหวานดังกล่าวกับวิธีตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจวัดกลูโคส อาศัยหลักการตรวจวัดเช่นเดียวกับชุดทดสอบความหวาน โดยการใช้โครโอเจลที่ตรึงเฉพาะมิวตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดสในการตรวจวัด ผลการทดลองที่ได้ดังตารางที่ 4.13 พบว่ากลูโคส มอลโทส แลคโทส และกรดแอสคอร์บิกที่ตรวจวัดด้วยโครโอเจลสำหรับตรวจวัดกลูโคสให้ค่าการตอบสนองที่ใกล้เคียงกับชุดทดสอบความหวาน (รูปที่ 4.18) และเมื่อนำผลการทดลองจากทั้งสองวิธีมาเปรียบเทียบกันจะเห็นว่าชุดทดสอบความหวานที่สร้างขึ้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อชูโครสสูง ดังรูปที่ 4.19

ตารางที่ 4.13 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคส มอลโทส แลคโทส และกรดแอสคอร์บิกที่ตรวจวัดด้วยโครโอเจลสำหรับตรวจวัดกลูโคส

สารทดสอบ	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
กลูโคส	20	0.317	0.315	0.323	0.318	0.004
มอลโทส	20	0.020	0.017	0.016	0.018	0.002
แลคโทส	20	0.009	0.012	0.008	0.010	0.002
กรดแอสคอร์บิก	20	0.019	0.006	0.020	0.015	0.008
สารละลายแบลงค์	–	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



รูปที่ 4.18 เปรียบเทียบผลการตอบสนองของสารทดสอบที่ตรวจวัดด้วยชุดทดสอบความหวานกับโครีโอเจลสำหรับตรวจวัดกลูโคส



รูปที่ 4.19 ความจำเพาะเจาะจงของชุดทดสอบความหวานที่ใช้ในการตรวจวัดซูโครส

4.5.7 การศึกษาการนำกลับมาใช้ใหม่

ศึกษาการนำกลับมาใช้ใหม่ของชุดทดสอบความหวาน โดยพิจารณาจากจำนวนครั้งที่ จะนำใครโอเจลไปโอเซนเซอร์กลับมาใช้ใหม่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยต้องมีส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐานสัมพัทธ์ของการทดลองอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ในการทดลองทำการตรวจวัดความหวานของ สารละลายมาตรฐานซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองที่ได้ ดังตารางที่ 4.14 เมื่อนำ ข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ และพิจารณาจำนวนครั้งที่ชุดทดสอบจะ สามารถใช้งานได้ พบว่า ชุดทดสอบนี้สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ 32 ครั้ง โดยมีส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 5 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ และชุดทดสอบมีประสิทธิภาพในการทำงาน 84 % (กำหนดให้ครั้งที่ 1 เป็น 100 %)

ตารางที่ 4.14 แสดงผลการนำกลับไปใช้ใหม่ของชุดทดสอบในการตรวจวัดความหวานซูโครส

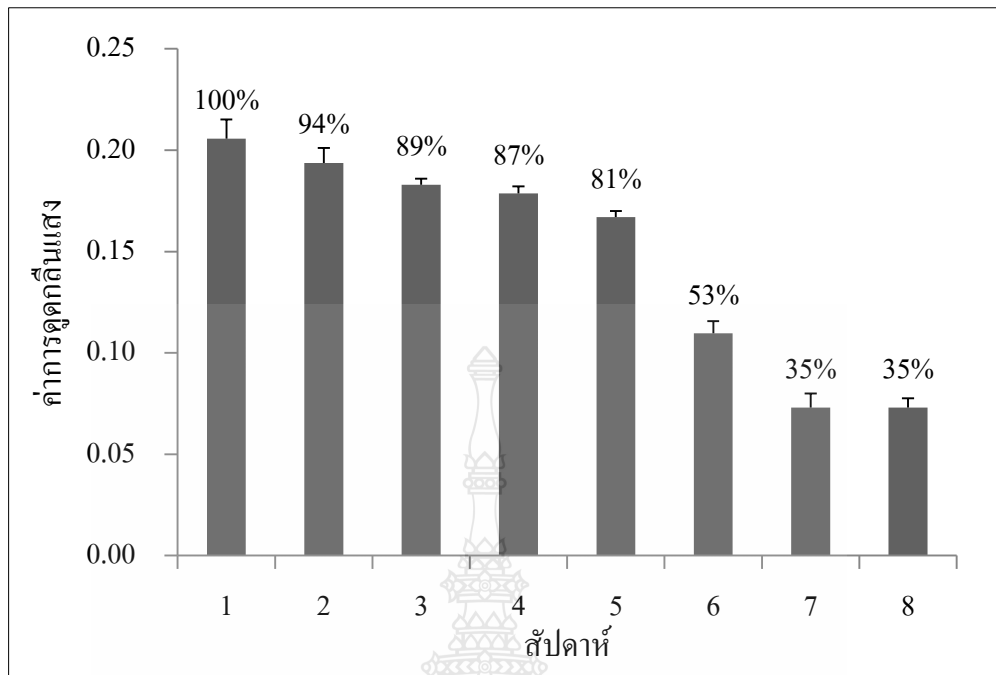
ครั้งที่	ค่าการดูคลิ่นแสง เฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐานสัมพัทธ์	ประสิทธิภาพของชุด ทดสอบ (เปอร์เซ็นต์)
1-5	0.198	0.008	4	98
1-10	0.196	0.008	4	97
1-15	0.198	0.008	4	98
1-20	0.196	0.007	4	94
1-25	0.195	0.008	4	96
1-30	0.192	0.009	4	89
1-32	0.192	0.009	5	84
33-40	0.183	0.022	12	76

4.5.8 การศึกษาอายุการใช้งานของชุดทดสอบความหวาน

ศึกษาอายุการใช้งานของชุดทดสอบความหวาน โดยศึกษาระยะเวลาที่สามารถนำไครโอเจลไปโอเซนเซอร์ไปใช้งานได้โดยมีประสิทธิภาพ โดยทำการการตรวจวัดความหวานของสารละลายมาตรฐานซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ในทุกๆ สัปดาห์ ที่สภาวะการทดลองเดียวกัน เป็นระยะเวลาจนกว่าการทำงานของไครโอเจลไปโอเซนเซอร์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีการเก็บรักษาในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.50 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้มาหาเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพของชุดทดสอบ โดยกำหนดให้ค่าการตอบสนองสัปดาห์ที่ 1 ของการทดลองชุดทดสอบมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดเป็น 100 % ผลการทดลองที่ได้ตั้งตารางที่ 4.15 และรูปที่ 4.20 จะเห็นได้จากการตอบสนองของชุดทดสอบความหวานซูโครสมีค่าการตอบสนองลดลงเมื่อระยะเวลามากขึ้น โดยในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 4 ประสิทธิภาพชุดทดสอบลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญ (ทดสอบด้วยสถิติ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %) แต่หลังจากสัปดาห์ที่ 4 ค่าการตอบสนองของไครโอเจลไปโอเซนเซอร์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นสรุปได้ว่าชุดทดสอบนี้มีอายุการใช้งาน 4 สัปดาห์ โดยมีประสิทธิภาพในการตอบสนอง 87 %

ตารางที่ 4.15 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้โดยชุดทดสอบในแต่ละสัปดาห์

สัปดาห์	ค่าการดูดกลืนแสง				ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ประสิทธิภาพของชุดทดสอบ (เปอร์เซ็นต์)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย		
1	0.213	0.195	0.209	0.206	0.009	100
2	0.191	0.188	0.202	0.194	0.007	94
3	0.186	0.183	0.180	0.183	0.003	89
4	0.175	0.182	0.179	0.179	0.004	87
5	0.167	0.164	0.170	0.167	0.003	81
6	0.104	0.116	0.109	0.110	0.006	53
7	0.077	0.065	0.077	0.073	0.007	35
8	0.074	0.068	0.077	0.073	0.005	35



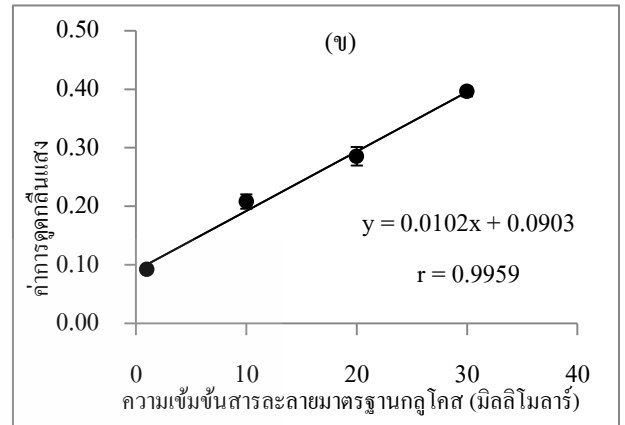
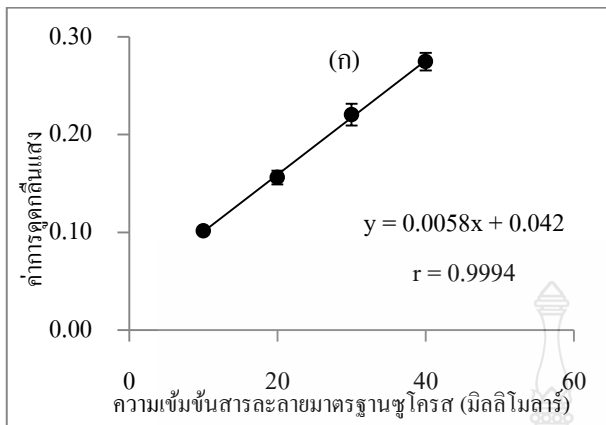
รูปที่ 4.20 ผลการศึกษาอายุการใช้งานของชุดทดสอบ



4.6 การตรวจวัดความหวานในตัวอย่างจริง

4.6.1 ศึกษาผลของกลูโคสที่มีผลต่อการทำงานของชุดทดสอบ

เนื่องจากกลูโคสสามารถเกิดปฏิกิริยาในการตรวจวัดของชุดทดสอบความหวานได้ เช่นเดียวกับซูโครส เพื่อศึกษาผลของกลูโคสที่มีต่อชุดทดสอบ จึงได้ทำการตรวจวัดความเข้มข้นของสารละลายผสมระหว่างซูโครสกับกลูโคสที่ทราบความเข้มข้น ซึ่งสารละลายผสมดังกล่าวมีซูโครสผสมกับกลูโคสอย่างละ 10 มิลลิโมลาร์ จากนั้นหาความเข้มข้นของสารละลายผสมทั้งสองจากสมการเส้นตรงที่ได้จากการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานซูโครสด้วยชุดทดสอบความหวานซูโครส และกลูโคสด้วยโครโอเจลที่สร้างขึ้นสำหรับตรวจวัดกลูโคส ดังรูปที่ 4.21 ผลการทดลองที่ได้ พบว่า โครโอเจลที่สร้างขึ้นสำหรับตรวจวัดกลูโคสจะตอบสนองต่อกลูโคสเพียงอย่างเดียว เมื่อคำนวณหาความเข้มข้นของของกลูโคสจะสามารถหาได้จากสมการเส้นตรงที่ตรวจวัดจากโครโอเจลที่สร้างขึ้นสำหรับตรวจวัดกลูโคสได้ทันที แต่สำหรับซูโครสเนื่องจากชุดทดสอบความหวานซูโครสตอบสนองต่อสารละลายผสมได้ทั้งซูโครสและกลูโคส ความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้จากสารละลายผสมจึงต้องนำมาหักล้างกันเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของซูโครสที่ถูกต้อง และในการทดลองด้วยวิธีดังกล่าวสามารถตรวจวัดความเข้มข้นของซูโครสและกลูโคสในสารละลายผสม ได้ความเข้มข้นที่ตรงกับความเข้มข้นของสารละลายผสมที่เตรียม ดังนั้นในการทดลองการตรวจวัดความหวานในตัวอย่างจริงขั้นต่อไป จึงทำการทดลองด้วยวิธีการสร้างโครโอเจลที่สร้างขึ้นสำหรับตรวจวัดกลูโคสมาหักล้างตามวิธีข้างต้น เพื่อให้สามารถตรวจวัดความเข้มข้นซูโครสในตัวอย่างจริง และลดปัญหาการรบกวนของกลูโคสที่มีผลต่อชุดทดสอบความหวาน



รูปที่ 4.21 กราฟมาตรฐานของการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานซูโครสด้วยชุดทดสอบความหวาน (ก) และกลูโคสด้วยโครโอเจลที่สร้างขึ้นสำหรับตรวจวัดกลูโคส (ข)

4.6.2 การตรวจวัดความหวานในตัวอย่างจริงด้วยชุดทดสอบความหวาน

เมื่อได้ชุดทดสอบความหวานที่มีสถานะเหมาะสมแล้ว นำชุดทดสอบไปตรวจวัดหาความเข้มข้นของซูโครสในตัวอย่างจริง โดยใช้ตัวอย่างอ้อยและน้ำตาล 5 ตัวอย่าง โดยคำนวณหาความเข้มข้นซูโครสที่ตรวจวัดได้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานซูโครสที่ความเข้มข้น 10 20 30 40 50 และ 60 มิลลิโมลาร์ ซึ่งความเข้มข้นของซูโครสที่ตรวจวัดได้จะไม่มีผลของกลูโคสรบกวนการทำงานของชุดทดสอบ เนื่องจากกลูโคสที่มีในตัวอย่างจะถูกตรวจวัดด้วยโครโอเจลที่สร้างขึ้นสำหรับกลูโคส จากนั้นนำไปหักล้างกับความเข้มข้นของตัวอย่างที่ตรวจวัดได้ทั้งหมด ซึ่งจะได้เพียงความเข้มข้นของซูโครสเท่านั้น ผลการทดลองที่ได้พบว่า ความเข้มข้นซูโครสที่ตรวจวัดได้ด้วยชุดทดสอบความหวานที่สร้างขึ้นมีค่าใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐานที่ใช้ในโรงงานน้ำตาล (วิธีโพลาไรมิตรี) ดังตารางที่ 4.16 และตารางที่ 4.17 เมื่อนำผลการทดลองที่ได้จากทั้งสองวิธีมาทดสอบความแตกต่างของวิธีด้วยสถิติ t-test ผลการทดสอบพบว่าวิธีทั้งสองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % แสดงว่าชุดทดสอบที่สร้างขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดซูโครสในตัวอย่างจริงได้ ซึ่งชุดทดสอบนี้มีข้อดีคือ จำเพาะเจาะจงต่อซูโครส ใช้งานง่าย ตรวจวัดรวดเร็ว และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำ ซึ่งจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ได้

ตารางที่ 4.16 แสดงผลการหาความเข้มข้นของซูโครสในตัวอย่างจริง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของซูโครส (เปอร์เซ็นต์)
น้ำตาลทรายดิบ	97.28±0.21
น้ำตาลทรายขาว	98.99±0.24
น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์	104.43±0.16
น้ำอ้อย (ชุดแรก)	55.97±0.33
น้ำอ้อยผสม	44.33±0.46

ตารางที่ 14.17 แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของชุดทดสอบกับวิธีมาตรฐาน

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของซูโครส (เปอร์เซ็นต์)	
	ชุดทดสอบ	วิธีมาตรฐาน*
น้ำตาลทรายดิบ	97.28	98.64
น้ำตาลทรายขาว	98.99	99.90
น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์	100.43	100.47
น้ำอ้อย (ชุดแรก)	55.97	56.71
น้ำอ้อยผสม	44.33	43.19

* หมายถึง ค่าที่ระบุในตารางได้มาจากค่าของโรงงานน้ำตาลราชบุรีที่ตรวจวัดได้ด้วยวิธีโพลาไรมิตรี

ตารางที่ 4.18 แสดงการเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ทั่วไปกับชุดทดสอบความหวานที่พัฒนาขึ้น

การเปรียบเทียบ	วิธีวิเคราะห์		ชุดทดสอบความหวานที่พัฒนาขึ้น
	ชุดทดสอบ Sucrose Assay kit	วิธีโพลาไรมิตรี	
ราคาชุดทดสอบ/ครั้งบริการ (บาท)	7,512.69	1,000-2,000	460
จำนวนครั้งในการวิเคราะห์ (ครั้ง)	20	1	32
เวลาในการวิเคราะห์ (นาที)	15	45-60	3
ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ /ตัวอย่าง (บาท)	375.63	1,000-2,000	14.38

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีตรวจวัดความหวานจากปริมาณซูโครส โดยสร้างชุดทดสอบเพื่อตรวจวัดความหวานของอ้อยและน้ำตาลที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง และสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้ด้วยเทคนิคทางไบโอเซนเซอร์ ชุดทดสอบนี้เตรียมได้จากการนำพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ โคลโคซาน และอนุภาคนาโนแม่เหล็กมารวมตัวกันเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันภายใต้สภาวะอุณหภูมิ ต่ำ เพื่อให้เกิดเป็นโครโอเจล จากนั้นนำไปทำการตรึงเอนไซม์ โดยใช้สารเชื่อมโยงวักกูลูตารอลดีไฮด์ เกิดพันธะโควาเลนต์จะได้เป็นโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ การทำงานของชุดทดสอบนี้จะอาศัยการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากการเกิดปฏิกิริยาเคมีของซูโครสกับอินเวอร์เทส มิวตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดสที่ตรึงบนโครโอเจลไบโอเซนเซอร์เพื่อเร่งปฏิกิริยา จากนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนซิดินได้เป็นสารละลายสีน้ำตาล นำสารละลายที่ได้ไปตรวจวัดความเข้มสีด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ความเข้มสีของสารละลายสีน้ำตาลที่ได้จะแปรผันตรงตามความหวานหรือปริมาณซูโครสในตัวอย่าง และหลังจากนั้นนำโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ที่ตรวจวัดกลับมาให้ใหม่ได้ในการทดลองต่อไป

ขั้นแรกทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กด้วยวิธีการตกตะกอนร่วม พบว่าอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 43 นาโนเมตร และมีสมบัติความเป็นแม่เหล็กยิ่งยวด จากนั้นนำอนุภาคที่สังเคราะห์ได้ไปเตรียมเป็นโครโอเจล โดยใช้อนุภาคนาโนแม่เหล็กผสมกับพอลิไวนิลแอลกอฮอล์และโคลโคซาน โดยมีอัตราส่วนพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ต่อโคลโคซานที่เหมาะสม คือ 1:4

ขั้นต่อไปศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบ เนื่องจากชุดทดสอบอาศัยการทำงานของเอนไซม์ เพื่อให้ได้ชุดทดสอบมีประสิทธิภาพในการทำงานจึงได้ทำการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยในขั้นแรกศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับตรึงบนโครโอเจลไบโอเซนเซอร์ พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของอินเวอร์เทส มิวตาโรเทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดสที่ได้ คือ 0.20 0.08 0.80 และ 0.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นศึกษาผลความเป็นกรด-เบสของสารละลายบัฟเฟอร์ พบว่า สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ ที่พีเอช 6.50 เป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ต่อไปได้ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไอโอดีนซิดินที่ได้พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายไอโอดีนซิดิน

ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยากับซูโครส คือ 1.10 มิลลิโมลาร์ และสุดท้ายศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาพบว่า เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา คือ 3 นาที

เมื่อทำการทดลองได้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว ได้ศึกษาหาประสิทธิภาพของชุดทดสอบ โดยใช้โคร โอเจล ไปโอเซนเซอร์ตรวจวัดความหวานซูโครส ผลการทดลองพบว่าชุดทดสอบนี้มีความเที่ยงตรง (% RSD < 4%) ความถูกต้องสูง (เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนอยู่ในช่วง 92-104 %) มีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 10 ถึง 60 มิลลิโมลาร์ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9973 มีความไววิเคราะห์เท่ากับ 0.031 หน่วยค่าการดูดกลืนแสงต่อมิลลิโมลาร์ ในการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของชุดทดสอบต่อสารทดสอบที่คาดว่าจะมีผลในการตรวจวัด ได้แก่ ฟรุคโทส ไซโลส กาแลคโทส มอลโทส แลคโทส และกรดแอสคอร์บิก พบว่า สารดังกล่าวไม่มีผลต่อการตรวจวัดของชุดทดสอบนี้ ชุดทดสอบนี้มีขีดจำกัดในการตรวจพบเท่ากับ 3 มิลลิโมลาร์ และขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพเท่ากับ 11 มิลลิโมลาร์ เมื่อทดสอบการนำชุดทดสอบกลับมาใช้ใหม่ พบว่าสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ 32 ครั้ง (%RSD < 5) ประสิทธิภาพในการตอบสนอง 84 % และมีอายุการใช้งาน 4 สัปดาห์ เมื่อเก็บรักษาในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.5 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สุดท้ายทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบที่สร้างขึ้นด้วยการตรวจวัดความหวานในตัวอย่างจริง คือ ตัวอย่างอ้อยและน้ำตาล เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับวิธีมาตรฐานที่โรงงานน้ำตาลใช้วิเคราะห์หาปริมาณซูโครส (วิธีทางโพลาไรเมตรี) โดยใช้ตัวอย่างอ้อยและน้ำตาล จำนวน 5 ตัวอย่าง นำตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น จากนั้นตรวจวัดด้วยชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบผลที่ได้จากทั้งสองวิธี โดยใช้สถิติ t-test ผลการทดลองทางสถิติพบว่า การตรวจวัดความหวานด้วยชุดทดสอบที่สร้างขึ้นให้ผลการทดลองที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าชุดทดสอบที่สร้างขึ้นมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับวิธีที่โรงงานน้ำตาลใช้ โดยมีข้อดีคือ มีความจำเพาะเจาะจงต่อซูโครส ตรวจวัดได้ง่ายและรวดเร็ว ใช้เวลาเพียง 3 นาที (เวลาที่ใช้วิธีของโรงงาน 45 ถึง 60 นาที) และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้มากถึง 32 ครั้ง ทำให้ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 เนื่องจากการทำงานของชุดทดสอบขึ้นอยู่กับการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นจะต้องระมัดระวังและควบคุมปัจจัยที่จะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในการทดลองทุกๆ ขั้นตอน เพื่อป้องกันการเกิดความคลาดเคลื่อนของการทดลอง

5.2.2 การนำงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้กับการตรวจวัดสารอื่น ควรมีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมอีกครั้ง เพื่อให้ได้วิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวัด



บรรณานุกรม

- [1] M. Mathlouthi and P. Reiser, *Sucrose. Properties and Applications*. Chapman and Hall Publisher, 1995.
- [2] M. Wojtczak, J. Biernasiak and A. Papiewska, "Evaluation of microbiological purity of raw and refined white cane sugar," *Food Control*, vol. 25, pp. 136-139, May 2012.
- [3] S. Staunton, D. Donald and G. Pope, "Estimating sugarcane composition using ternary growth relationships," *Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technology*, vol. 33, pp. 1-9, Oct 2011.
- [4] J. Engelke, "Sugarcane: Measuring commercial quality," *Farmnote Department of Agriculture, Kununurra, Australia*, 2002.
- [5] P. Vichyanond, V. Naranong, J. Planggraphan and S. Jitsuchon, "Proposed Reforms in the Structure of Thailand's Sugar and Cane Industry," *Thailand Development Research Institute Quarterly Review*, vol. 28, pp. 1-20, Mar 2013.
- [6] C. Fabeiro, F. Martín de Santa Olalla, R. López and A. Dominguez, "Production and quality of the sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultivated under controlled deficitirrigation conditions in a semi-arid climate," *Agricultural Water Management*, vol. 62, pp. 215-227, Oct 2003.
- [7] The Sugar Association, Inc. 1300 L Street NW, Suite 1001, Washington, DC 20005 202/785-1122.
- [8] W.J. Wienen and R.S. Shallenberger, "Influence of acid and temperature on the rate of inversion of sucrose," *Food Chemistry*, vol. 29, pp. 51-55, Oct 1988.
- [9] K. Panpae, W. Jaturonrusmee, W. Mingvanish, C. Nuntiwattanawong, S. Chunwiset, K. Santudrob and S. Triphanpitak, "Minimization of sucrose losses in sugar industry by pH and temperature optimization," *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*, vol. 12, pp. 513-519, 2008.
- [10] V. Singleton, J. Horn, C. Bucke and M. Adlard, "A new polarimetric method for the analysis of dextran and sucrose," *Journal of the American Society of Sugarcane Technologists*, vol. 22, pp. 112-119, Jun 2002.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [11] R. Mehrotra and H.W. Siesler, "Application of mid infrared/near infrared spectroscopy in sugar industry," *Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 38, pp. 307-354, Jan 2003.
- [12] J.M. McGrath and K.K. Fugate, "Chapter 30: Analysis of sucrose from sugar beet," V.R. Preedy (Ed.), *Dietary sugars: Chemistry, analysis, function and effects*, *Royal Society of Chemistry Publishing, Cambridge*, pp. 526-545, Nov 2012.
- [13] N. Mat Nawi, G. Chen, T. Jensen and S.A. Mehdizadeh, "Prediction and classification of sugar content of sugarcane based on skin scanning using visible and shortwave near infrared," *Biosystems Engineering*, vol. 115, pp. 154-161, Jun 2013.
- [14] Y. Roggo, L. Duponchel and J. Huvenne, "Quality evaluation of sugar beet (*Beta vulgaris*) by near-infrared spectroscopy," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, pp. 1055-1061, Mar 2004.
- [15] M. G. O'shea, S.P. Staunton, D. Donald and J. Simpson, "Developing laboratory near infra-red (NIR) instruments for the analysis of sugar factory products," *Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technology*, vol. 33, pp. 1-8, 2011.
- [16] D. Hemant, S. Manan, P. Vipul, P. Kalpesh and P.Nirav, "A new polarimetric method for the analysis of sucrose in raw material, iron sucrose injection and in process bulk formulations," *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 4(8), pp. 3208-3213, Aug 2013.
- [17] J. Anusornwongchai, S. Kasemsumran, V. Ponpakdee, T. Sansayavichai, W. Thanapase and S. Miyata, "Using near-infrared spectroscopy for quality evaluation of sugarcane," *Journal of Agricultural Science*, vol. 41 (3/1) (Suppl.), pp. 85-88, Sep 2010.
- [18] Dionex application note 92, "The determination of sugars in molasses by high-performance anion exchange with pulsed amperometric detection".
- [19] X. Wanxia Xu, L. Lei and Z. Mingjun, "Determination of Sugars in Molasses by HPLC Following Solid-Phase Extraction," *International Journal of Food Properties*, vol. 18, pp. 547-557, Mar 2014.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [20] L. Pan L, Q. Zhu Q, R. Lu and J.M. McGrath, "Determination of sucrose content in sugar beet by portable visible and near-infrared spectroscopy," *Food Chemistry*, vol. 15, pp. 264-271, Jan 2015.
- [21] T. Jagdish and I. Joseph, "Rapid Estimation of Pol Content in Sugarcane Juice Using FTIR-ATR Spectroscopy," *An International Journal of Sugar Crops and Related Industries*, vol. 5, pp. 143-148, Sep 2003.
- [22] J.F. Kennedy, M. C. B. Pimentel, H.M. Melo Eduardo and J.L. Lima-Filho, "Sucrose biosensor as an alternative tool for sugarcane field samples," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 87, pp. 2266-2271, Jul 2007.
- [23] M. Parikha, "Biosensors and their applications," *Journal of oral biology and craniofacial research*, vol. 6, pp. 153-159, May 2016.
- [24] J. Wang, "Electrochemical glucose biosensors," *Chemical Reviews*, vol. 10, pp. 814-825. Dec 2008.
- [25] S. Chong, N. Yanlian Niu, T. Fengyu, M. Chun, H. Xiaohua, Z. Bo and S. Jian, "Preparation of novel electrochemical glucose biosensors for whole blood based on antibiofouling polyurethane-heparin nanoparticles," *Journal of the International Society of Electrochemistry*, vol. 97, pp. 349-356, May 2013.
- [26] F. Gao and X. Lu, "Detection of pesticides in foods by enzymatic biosensors," *A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, pp.147-160, Dec 2015.
- [27] D. Iulia, C. Cecilia, H. Veronica, M. Giovanna, B.N. Ioana and S. Robert, "Electrochemical immunosensors in breast and ovarian cancer," *Clinica Chimica Acta*, vol. 425, pp. 128-138, Oct 2013.
- [28] J.N. Ntihuga, D. Daniel and A. Krastanov, "Biosensor to Detect Heavy Metals in Waste Water," *Proceedings from the International Conference on Advances in Engineering and Technology*, pp. 159-166, Apr 2006.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [29] E. Akyilmaz, E. Yorganci and E. Asavn, "Do copper ions activate tyrosinase enzyme? A biosensor model for the solution," *Bioelectrochemistry*, vol. 78, pp. 155-16, Jun 2010.
- [30] V. Venugopal, "Biosensors in fish production and quality control," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 17, pp. 147-157, Mar 2002.
- [31] B.N. Estevinho, A. ferraz, L. Santos, F. Rocha and A. Alves, "Uncertainty in the determination of glucose and sucrose in solutions which chitosan by enzyme methods," *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 24, pp. 931-938, Jun 2013.
- [32] R.P. Soundararajan, "Pesticides-Advances in Chemical and Botanical Pesticides," *Agricultural and Biological Sciences*, vol. 30, pp. 489-511, Jul 2012.
- [33] A. Sinan, K. Yasemin, C. Adil and M.Y. Arica, "Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel mafnetic polyvinyl alcohol microspheres," *Food Chemistry*, vol. 74, pp. 281-288, Aug 2001.
- [34] L. Amaya-Delgado, M.E. Hidalgo-Lara, M.C. Montes-Horcasitas, "Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbead," *Food Chemistry*, vol. 99, pp. 299-304, Jul 2006.
- [35] S. Audrey, J. L. J. Blum and B. D. Leca-Bouvier, "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors," *Biotechnology Advances*, vol. 30, pp. 489-511, May 2012.
- [36] M. Isabelle, D. Catherine, J.B. Michel and C.W. Karen, "Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking," *Biotechniques: the International Journal of Life Science Methods*, vol. 37, pp. 790-802, Nov 2004.
- [37] K. Xiaobin, P. Guangchang, G. Lihua, L. Jiapeng, S. Haiqong and W. Fang, "Effect of glutaraldehyde on the conformational properties of *Kluyveromyces lactis* β -Galactosidase and its application to sucrose biosensor preparation," *Sensor and Materials*, vol. 25, pp. 229-240, Jul 2013.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [38] I.L. Vladimir, Y.G. Igor, M.P. Fatima, N.S. Irina, J. Hans and M. Bo, "Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest," *Trends in Biotechnology*, vol.21, pp. 445-451, Oct 2003.
- [39] G. Ertürk, B. Mattiasson, "Cryogels-versatile tools in bioseparation," *Journal Chromatography A*, vol. 29, pp. 24-35, Aug 2014
- [40] V. Flexer, F. Durand, S. Tsujimura and N. Mano, "Efficient direct electron transfer of PQQ-glucose dehydrogenase on carbon cryogel electrodes at neutral pH," *Analytical Chemistry*, vol. 83, pp. 5721-5727, Jun 2011.
- [41] Y.C. Tsai, J.D. Huang and C.C. Chiu, "Amperometric ethanol biosensor based on poly(vinyl alcohol)-multiwalled carbon nanotube-alcohol dehydrogenase biocomposite," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, pp. 3051-3056, Jun 2007.
- [42] M. Hedström, F. Plieva, I. Galaev and B. Mattiasson, "Monolithic macroporous albumin/chitosan cryogel structure: a new matrix for enzyme immobilization," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 390, pp. 907-912, Feb 2008.
- [43] B. Krajewska, "Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 35, pp. 126-139, Aug 2004.
- [44] C. Aree, K. Proespichaya, W., Worawit and N. Niamh, "Poly vinyl alcohol cryogel as a selective test kit for pre and post blast trinitrotoluene," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 222, pp. 654-662, Jan 2016.
- [45] S. Kim and H.B. Lim, "Chemiluminescence immunoassay using magnetic nanoparticles with targeted inhibition for the determination of ochratoxin," *Talanta*, vol. 40, pp. 183-188, Aug 2015.
- [46] J. Chen, Y. Lin and L. Jia, "Preparation of anionic polyelectrolyte modified magnetic nanoparticles for rapid and efficient separation of lysozyme from egg white," *Journal of Chromatography A*, vol. 1388, pp. 43-51, Feb 2015.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [47] Y. Li, Y. Chen, C. Xiao, D. Chen, Y. Xiao and Z. Mei, "Rapid screening and identification of α -amylase inhibitors from garcinia xanthochymus using enzyme-immobilized magnetic nanoparticles coupled with HPLC and MS," *Journal of Chromatography B*, vol. 960 pp. 166-173, Jun 2014.
- [48] T. Hosono, A. Takahashi, R.J. Joseyphus, K. Tohji and B. Jeyadevan, "Synthesis of magnetic nanoparticle for ac magnetic heating," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 321, pp. 3019-3023, Oct 2009.
- [49] J.P. Hee , T. McConnell, B. Soheil , J. K. Matt and A. Patrick, "Synthesis and characterization of enzyme-magnetic nanoparticle complexes: effect of size on activity and recovery," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 83, pp. 198-203, Apr 2011.
- [50] J. Garcia, Y. Zhang, H. Taylor, O. Cespedes, M.E. Webb and D. Zhou, "Multilayer enzyme-coupled magnetic nanoparticles as efficient, reusable biocatalysts and biosensors," *Nanoscale*, vol. 3, pp. 3721-3730, Sep 2011.
- [51] T. Issabel, D.L. Marc and V.B. Erik, "Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance," *Trends in Analytical*, vol. 23, pp. 535-552, Sep 2004.
- [52] R. Antichia, L. Gorton and L. Mannina, "Rapid determination of sucrose in fruit juices a new sensitive carbon nanotube paste osmium-polymer mediated biosensor," *Journal of Food Research*, vol. 3, pp. 101-112, May 2014.
- [53] D.P. Oliveira, L.E M. Oliveira and N.D. Filho, "Optimization of invertase assay conditions in rubber tree plants (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.), " *SciELO Analytics (Beta)*, vol. 30, pp.687-692, May 2006.
- [54] Y. Toyoda, I. Miwa and J. Okuda, "Purification and characterization of multiple forms of mutarotase from hog kidney cortex," *The Journal of Biochemistry*, vol 6, pp. 1889-98, Jun 1982.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [55] Ozyilmaz, Gul and S. Seyhantukel, "Simultaneous and Sequential Co-Immobilization of Glucose Oxidase and Catalase onto Florisil, " *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 17, pp. 960-967, Feb 2007.
- [56] G.P. Mizobutsi, F.L. Finger, R.A. Ribeiro, R. Puschmann, L.L. M. Neves and W.F. Mota, "Effect of pH and temperature on peroxidase and polyphenoloxidase activities of litchi pericarp," *Scientia Agricola*, vol. 67, pp. 213-217, Mar 2010.





ภาคผนวก

ผลงานเผยแพร่ทางวิชาการ

12th Eco-Energy and Materials Science and Engineering Symposium

11-14th June 2015 Peace Laguna resort&Spa, Ao Nang, Krabi, Thailand

- Energy Technology
- Environmental and Social Impact
- Nuclear Technology
- Smart Innovations For Future Life
- Material Technology
- Energy Economic and Management
- Railway Engineering

Co-organized by

Sponsored by

Logos: Thai Royal Emblem, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMUTL), KIT, TAT, PTT, and SPPD.

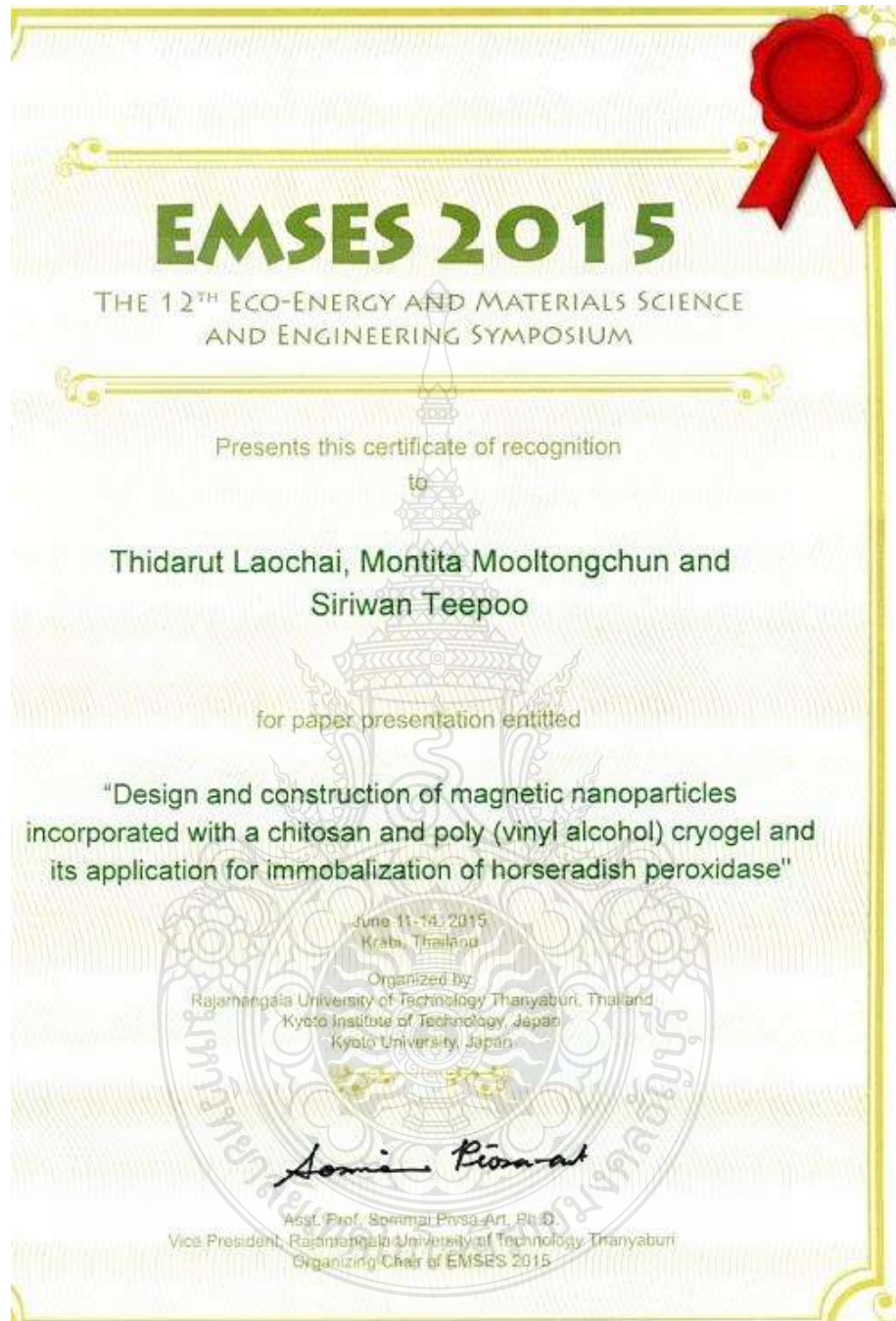
เข้าร่วมงาน “Eco-Energy and Materials Science and Engineering Symposium (EMSES) International Conference, 2015” โดยนำเสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่า (Oral presentation) เมื่อวันที่ 11-14 มิถุนายน 2558 ณ Peace Laguna resort & Spa จังหวัดกระบี่

CONTENT

MT28	Synthesis of poly(methacrylic acid)-b-polystyrene particles by emulsion reversible chain transfer catalyzed polymerization (emulsion RTCP) using hydroquinone as catalyst <i>Siriwan Thaochatturat^a, Masayoshi Okubo^{a, b, *}, Amorn Chaiyasat^{a, *}, Preeyaporn Chaiyasat^{a, *}</i>	163
MT29	Polycyclic quinone fused by a sulfur-containing ring as an organic positive-electrode material for use in rechargeable lithium batteries <i>Masaru Yaoi, Hisanori Ando, Tetsu Kiyobayashi</i>	167
MT31	A study of shelf-life of commercial bioplastics in real weather condition <i>Thitipong Wutisart^a, Manus Seadana, Supakij Suttireungwong^b, Sommai Pivsa-Art^c</i>	172
MT32	Environmental-friendly method for synthesis of silver nanoparticles from dragon fruit peel extract and their antibacterial activity <i>Siriporn Phongtongpasuka^a, Sarinya Poadang, Niti Yongvanich^b</i>	177
MT33	Design and construction of magnetic nanoparticles incorporated with a chitosan and poly (vinyl alcohol) cryogel and its application for immobilization of horseradish peroxidase <i>Thidarut Laochai, Montita Mooltongchun, Siriwan Teepoo</i>	182
MT34	Preparation of carbon fibers from the low-molecular-weight extracts obtained from the degradative solvent extraction of biomass <i>Janewit Wannapeera^{a, b}, Kenshiro Okuda^c, Ryuichi Ashida^c, Nakorn Worasuwannarak^{a, b}, Hideaki Ohgaki^d, Osamu Katoe, Kouichi Miurad,</i>	187
MT36	Moisture Absorption and Fertilizer Release of Poly (Butylene Succinate) Blended with Natural Absorbent for Using in Agriculture Application <i>Arak Pinpueng^a and Nattakarn Hongsrphan^{a, b}</i>	191
MT37	Effect of annealing temperature on sheet resistance and hydrophilicity of TiO ₂ nanoparticle thin films by sparking process <i>Buppachat Toboosung</i>	196
MT39	Stress calculation for the 3D analysis model of the propeller for airplanes <i>Toshiki Mori^a, Satoshi Fukui^b</i>	200
MT41	Influence of TiN film and shape of corner for fatigue cracking behavior of stainless steel <i>Nozomu Nakajima^a, Satoshi Fukui^b</i>	204

Conference Program of 12th Eco-Energy and Materials Science and Engineering

Time		11 th June 2015			
13:00-16:00		Registration (G-Hoor)			
17:00-18:00		EMSES committee meeting			
18:00-20:00		Welcome party (Ballroom)			
Time		12 th June 2015			
9:00-9:30		Opening Ceremony (Ballroom)			
9:30-10:30		Keynote speaker: Prof.Dr.Koichi miura: Developing new technologies for Utilizing Low Rank Coals and Biomass wastes in asian countries: Introduction of a japan-thailand satreps project			
ROOM		Ballroom		Peach hall	
10:45-12:00		Material Technology	Energy Technology	Material Technology	Library
Paper ID		IN05, MT47, MT70, MT74, MT75, MT76	IN13, ET02, ET26, ET27, ET29, ET30	IN01, MT19, MT28, MT31, MT48, MT53	Nuclear Technology IN15, NT02, NT04, NT05, NT06
Chair		Prof. Dr. Hiroyuki Hamada	Asst. Prof. Dr. Torikazu Limpetepakorn	Assoc. Prof. Dr. Yoji Asoa,	Dr. Shigeru Nihi
Co-Chair		Dr. Anin Memon	Asst. Prof. Dr. Amnoaj Reungwanee	Dr. Kiyooki Ishimoto	Dr. Chatchai Veermitisabul
12:00-13:00		Coffee break			
13:00-15:00		Material Technology	Energy Technology	Smart Innovations For Future Life	Nuclear Technology&MT
Paper ID		IN03, MT13, MT15, MT16, MT17, MT18	BT14, ET15, ET16, ET17, ET19, ET20	IN04, SI04, SI06, SI08, SI09	NT07, NT08, NT09, MT08, MT21
Chair		Assoc. Prof. Dr. Tsutomu Ito	Asst. Prof. Dr. Wanchai Subingha	Prof. Dr. Sateaki Fukui	Prof. Hideaki Ohgaki
Co-Chair		Dr. Narongchai O-Chareon	Asst. Prof. Dr. Boonyasag Plangklang	Dr. Pinitapart Jemsombon	Dr. Nathabhat Pankong
15:00-15:15		Coffee break			
15:15-17:00		Material Technology	Energy Technology	Material Technology	Material Technology
Paper ID		IN07, MT22, MT23, MT24, MT26, MT27	ET01, ET03, ET04, ET06, ET07, ET11	IN09, MT29, MT32, MT33, MT34, MT36	IN10, MT37, MT39, MT41, MT42, MT43
Chair		Dr. Hiroyuki Inoya	Dr. Winal Junpong	Prof. Dr. Masayuki Ohnohi	Dr. Tomoko Ota
Co-Chair		Asst. Prof. Dr. Sorapong Pousapree	Dr. Sutaporn Thongwitt	Dr. Natee Sriawatt	Dr. Anin Memon
18:00-22:00		Banquet			
Time		13 th June 2015			
ROOM		Ballroom		Peach hall	
9:40-10:30		Material Technology	Material Technology	Material Technology	Library
Paper ID		IN11, MT45, MT49, MT50, MT51, MT58	IN12, MT54, MT59, MT80, MT61, MT62	MT64, MT65, MT66, MT67, MT68	Material Technology IN14, MT69, MT71, MT72, MT73, MT77
Chair		Asst. Prof. Dr. Ken Mijata	Prof. Dr. Toshikazu Umemura	Asst. Prof. Dr. Sommai Pivsa-Art	Asst. Prof. Dr. Manit Nitthamabul
Co-Chair		Dr. Narongchai O-Chareon	Asst. Prof. Dr. Sorapong Pousapree	Dr. Natee Sriawatt	Dr. Natee Sriawatt
10:30-10:45		Coffee break			
10:45-12:15		Material Technology	Material Technology	Material Technology	Energy Technology
Paper ID		IN02, MT78, MT79, MT80, MT81, MT82	IN06, MT83, MT84, MT85, MT86, MT87	MT88, MT89, MT90	ET21, ET23, ET28, ET24, ET31
Chair		Asst. Prof. Dr. Kazuhiko Yamada	Dr. Hasanori Audo	Dr. Sumonman Niumlang	Dr. Nathabhat Pankong
Co-Chair		Dr. Sutaporn Thumson	Dr. Kiyooki Ishimoto		
12:15-13:30		Lunch			
13:30-14:30		Closing ceremony			



ประกาศนียบัตรการนำเสนอผลงานวิจัยในรูปแบบปากเปล่า ในหัวข้อ “Design and construction of magnetic nanoparticles incorporated with a chitosan and poly (vinyl alcohol) cryogel and its application for immobilization of horseradish peroxidase”



เข้าร่วม “Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2016) ” โดยนำเสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์ (Poster) เมื่อวันที่ 9-11 กุมภาพันธ์ 2559 ณ ไบเทคบางนา กรุงเทพมหานคร



The development of biosensor for the detection of sucrose based on multienzyme

RRI



Thidarut Laochai and Siriwan Teepoo*

Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology,
Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathumthani 12110, Thailand
*e-mail: siriwan@mail.ru.ac.th

Abstract

The biosensor technique was developed for detection of sucrose via multienzyme including invertase, mutarotase, glucose oxidase and horseradish peroxidase. The first step the sucrose was hydrolyzed by invertase to obtain the production of glucose and fructose. Then these products were changed with mutarotase into β -D-glucose and were then oxidized by glucose oxidase. Finally, H_2O_2 and *o*-dianisidine were catalyzed by horseradish peroxidase resulting in brown color solution. The result showed that wavelength of its maximum absorption is at 530 nm. The absorbance value was proportional to the concentration of sucrose. The advantages of this biosensor showed high selectivity and short analysis time (5 minutes). It exhibited a linear response to sucrose over the range 5-25 mM. The biosensor appeared to be suitable for sucrose detection in industrial and agricultural applications.

Objective

- ❖ To develop a biosensor for detection of sucrose.

Methodology

The reactions for the detection sucrose were shown the following:



- The reaction was stopped with sulfuric acid. Then the solution was the absorbance at a wavelength of 530 nm.

Results and Discussion

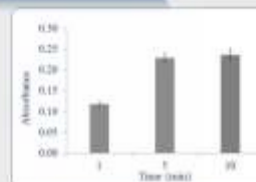


Fig. 2 Effect of reaction time

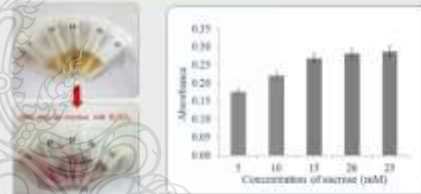


Fig. 3 Effect of concentration for detection sucrose ranging from 5-25 mM

Results and Discussion

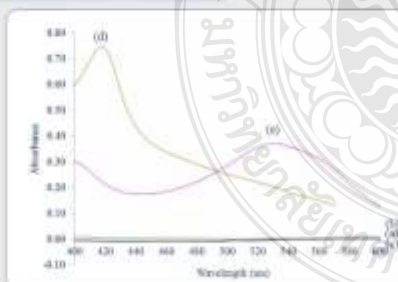


Fig. 1 Absorption spectra obtained after the reaction of (a) sucrose and invertase, (b) α -D-glucose and mutarotase (c) β -D-glucose and glucose oxidase (d) H_2O_2 , *o*-dianisidine and peroxidase and (e) resulted solution under acid condition.

Conclusion

The development of biosensor for the detection of sucrose based on multienzyme, invertase, mutarotase, glucose oxidase and horseradish peroxidase showed high selectivity and short analysis time (5 minutes). The absorbance value was proportional to the concentration of sucrose. It exhibited a linear response to sucrose over the range 5-25 mM. The biosensor appeared to be suitable for sucrose detection in industrial and agricultural applications.

Acknowledgment

1. Research and Researches for Industry (MAG) supported by The Thailand Research Fund (TRF)
2. Science and Technology faculty, Rajamangala University of Technology Thanyaburi
3. Nano-sensor Research Group (NSR)

References

1. Sreerangula, S., Waring, S., Srikanth, P., Teerichan, M., Kothala, K. *Analytica Chimica Acta* 1999, 400, 7-15.
2. Gowda, M.D., Thakar, M.S., Kanah, N.G. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2001, 17, 585-589.
3. Akame, A.; Arada, J.M.; Martin, M.I.; Pablos, F.; Garcia, A.G. *Talanta* 2005, 61, 700-706.

โปสเตอร์นำเสนอผลงานวิจัยในงาน PACCON 2016 หัวข้อ “The development of biosensor for the detection of sucrose based on multienzyme” Section: Food and Agricultural Chemistry”



CERTIFICATE OF ATTENDANCE

to certify that

THIDARUT LAOCHAI

participated in

PURE AND APPLIED CHEMISTRY INTERNATIONAL CONFERENCE

PACCON 2016

'THAILAND: ONE HUNDRED YEARS OF
ADVANCEMENT IN CHEMISTRY'

February 9 - 11, 2016

Bangkok, Thailand

Associate Professor Dr. Vudhichai Parasuk
Chairman, Department of Chemistry
Faculty of Science, Chulalongkorn University

Associate Professor Dr. Surin Laosooksathit
President, the Chemical Society of Thailand





การทดสอบความรู้ภาษาอังกฤษ RT-TEP มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

การสร้างชุดทดสอบความหวานของอ้อยและน้ำตาล

(Fabrication of a Test Kit for Sweetness Detection of Sugarcane and Sugar)

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี






ชื่อผู้ทำวิจัย : นายสาริณีกร งามคำดี
สาขาที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริภรณ์ ไม้ชู
เลขที่วิทยุฯ : MDO 58 0113

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อสร้างชุดทดสอบความหวานของอ้อยและน้ำตาลด้วยเทคนิคโพลีเมอร์เคลือบฟิล์มบางจากปริมาณสูง โดยชุดทดสอบมีขั้นตอนได้จากการนำฟิล์มโพลีเมอร์เคลือบฟิล์มบางมาเคลือบฟิล์มบางที่ได้ไว้บนโพลีเมอร์ จากนั้นนำไปใช้กับเครื่องวัดค่าความหวาน เครื่องวัดค่าความหวานแบบพกพาที่ผลิตโดยบริษัทโรดริโก เทคโนโลยี จำกัด และเครื่องวัดค่าความหวานแบบพกพาที่ผลิตโดยบริษัทโรดริโก เทคโนโลยี จำกัด เพื่อใช้ในการตรวจสอบความหวานของอ้อยและน้ำตาล โดยชุดทดสอบสามารถตรวจสอบความหวานของอ้อยและน้ำตาลได้ โดยมีความแม่นยำสูงถึง 98% และชุดทดสอบมีอายุการใช้งานได้ 5 ปี

วิธีดำเนินการวิจัย

- การเตรียมสารตั้งต้นในแม่พิมพ์
- การเคลือบโพลีเมอร์เคลือบฟิล์มบางด้วยวิธีการตกตะกอนร่วม (Co-precipitation method) ของสารละลาย Fe³⁺ (เพื่อใช้เคลือบฟิล์มบางโพลีเมอร์) และการละลาย Fe³⁺ (เพื่อใช้เคลือบฟิล์มบางโพลีเมอร์) ที่ใช้สารละลายโพลีเมอร์กับ 1.2 ส่วนด้วย โดยทำการทดสอบด้วยการเคลือบฟิล์มบางโพลีเมอร์ที่มีความเข้มข้น 2.5 M จากนั้นนำฟิล์มบางที่เคลือบฟิล์มบางโพลีเมอร์มาเคลือบฟิล์มบางด้วยวิธี DLS TSM และ XRD
- การเตรียมโพลีเมอร์เคลือบฟิล์มบางด้วยวิธีการตกตะกอนร่วม



รูปที่ 1 ภาพแสดงขั้นตอนการเตรียมโพลีเมอร์เคลือบฟิล์มบางด้วยวิธีการตกตะกอนร่วม

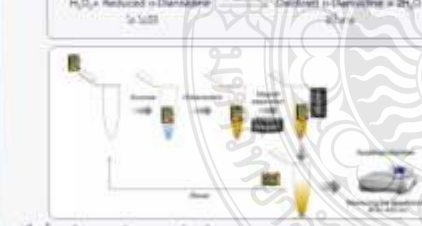
- การตรวจสอบความหวานด้วยชุดทดสอบความหวาน

ปฏิกิริยาทางเคมี:

$$\text{Sucrose} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Invertase}} \alpha\text{-D-Glucose} + \text{Fructose}$$

$$\alpha\text{-D-Glucose} \xrightarrow{\text{Mutarotase}} \beta\text{-D-Glucose}$$

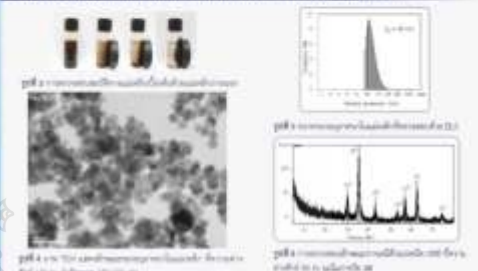
$$\beta\text{-D-Glucose} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{Glucose oxidase}} \text{Gluconic acid} + 2\text{H}_2\text{O}_2$$

$$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Reduced o-Dianthrazine} \xrightarrow{\text{Catalase}} \text{Oxidized o-Dianthrazine} + 2\text{H}_2\text{O}$$


รูปที่ 2 ขั้นตอนการตรวจสอบความหวานด้วยชุดทดสอบความหวาน


ผลกึ่งกลาง

- การตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ และทางเคมีของฟิล์มบางโพลีเมอร์
- การตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ ของโพลีเมอร์เคลือบฟิล์มบาง
- ประสิทธิภาพของชุดทดสอบความหวาน



รูปที่ 3 ภาพแสดงสมบัติทางกายภาพของฟิล์มบางโพลีเมอร์เคลือบฟิล์มบาง

รูปที่ 4 ภาพแสดงสมบัติทางเคมีของฟิล์มบางโพลีเมอร์เคลือบฟิล์มบาง



รูปที่ 5 ภาพแสดงสมบัติทางกายภาพของโพลีเมอร์เคลือบฟิล์มบาง

รูปที่ 6 ภาพแสดงสมบัติทางเคมีของโพลีเมอร์เคลือบฟิล์มบาง

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้สามารถสร้างชุดทดสอบความหวานสำหรับตรวจสอบปริมาณน้ำตาลด้วยวิธีการโพลีเมอร์เคลือบฟิล์มบางจากปริมาณสูงได้ โดยชุดทดสอบมีขั้นตอนได้จากการนำฟิล์มโพลีเมอร์เคลือบฟิล์มบางมาเคลือบฟิล์มบางที่ได้ไว้บนโพลีเมอร์ จากนั้นนำไปใช้กับเครื่องวัดค่าความหวาน เครื่องวัดค่าความหวานแบบพกพาที่ผลิตโดยบริษัทโรดริโก เทคโนโลยี จำกัด และเครื่องวัดค่าความหวานแบบพกพาที่ผลิตโดยบริษัทโรดริโก เทคโนโลยี จำกัด เพื่อใช้ในการตรวจสอบความหวานของอ้อยและน้ำตาล โดยชุดทดสอบสามารถตรวจสอบความหวานของอ้อยและน้ำตาลได้ โดยมีความแม่นยำสูงถึง 98% และชุดทดสอบมีอายุการใช้งานได้ 5 ปี

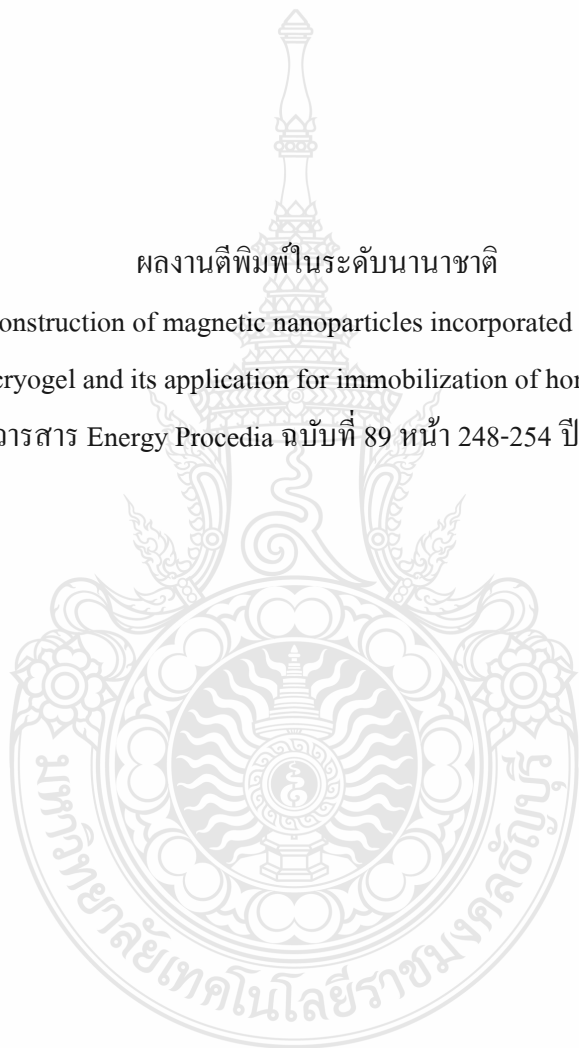
ความเข้มข้นน้ำตาล (g/L)	ค่าความหวาน (°Brix)	ค่าความหวาน (°Brix)	ค่าความหวาน (°Brix)	ค่าความหวาน (°Brix)	ค่าความหวาน (°Brix)	ค่าความหวาน (°Brix)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
20	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
30	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00
40	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00
50	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00

เข้าร่วมกิจกรรม “RRI U Forum 2017” โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พอว.): ระดับปริญญาโท ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โดยนำเสนอความก้าวหน้างานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์ เมื่อวันที่ 6 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2560 ณ ห้องจามจรี โรงแรมพทุมวันปริ้นเซส จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ผลงานตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ

เรื่อง “Design and construction of magnetic nanoparticles incorporated with a chitosan and poly
(vinyl) alcohol cryogel and its application for immobilization of horseradish peroxidase”

วารสาร Energy Procedia ฉบับที่ 89 หน้า 248-254 ปี 2016





CoE on Sustainable Energy System (Thai-Japan), Faculty of Engineering, Rajamangala University of Technology Thanyaburi (RMUTT), Thailand

Design and construction of magnetic nanoparticles incorporated with a chitosan and poly (vinyl) alcohol cryogel and its application for immobilization of horseradish peroxidase

Thidarut Laochai, Montita Mooltongchun, Siriwan Teepoo*

Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathumthani 12110, Thailand

Abstract

Magnetic nanoparticles were synthesized by simple co-precipitation method in aqueous medium. The structural characteristics of the powders were studied by XRD and the sizes of nanoparticles were measured with dynamic light scattering. The prepared magnetic nanoparticles were about 43 nm in diameter and were then subsequently incorporated into a chitosan and poly (vinyl alcohol) cryogel and applied to immobilize the horseradish peroxidase through covalent binding method (MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar). The MNP-CS-PVA- HRP cryogel microbar was applied for the detection of hydrogen peroxide. The horseradish peroxidase can catalytically oxidize the substrate of hydrogen peroxide and *o*-dianisidine, generating blown colour that are proportional to the concentrations of hydrogen peroxide. The results showed that the absorption values at 430 nm increased with the hydrogen peroxide concentrations ranging from 10-1,000 mM. The immobilized horseradish peroxidase on magnetic nanoparticles retained enzyme activity up to the 10th reusable. The proposed approach confirmed that the magnetic nanoparticles not only possessed enzyme activity but also showed potential application in varieties of simple, robust, and cost-effective analytical methods in the future.

© 2016 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Peer-review under responsibility of the organizing committee of the 12th EMSSES 2015

Keywords: Magnetic nanoparticles; Horseradish peroxidase; Hydrogen peroxide; Poly (vinyl) alcohol cryogel

1. Introduction

Over the past few decades, nanoparticles have much interested due to their own advantages such as high surface area, excellent in chemical, physical and biological properties [1-2]. A variety of nanoparticles with different materials such as gold [3], silver [4], titanium oxide [5] and magnetic nanoparticles [6] have been applied in many

*Corresponding author at: Tel: +66-02-5493529; Fax: +66-02-5493526
E-mail address: siriwan@mail.rmUTT.ac.th; sawansa_and@hotmail.com

scientific fields. Among the various nanomaterials, magnetic nanoparticles have been rising as a significant useful material for variety applications. Firstly, magnetic nanoparticles have a very large surface-to-volume and good biocompatibility [2]. Moreover, the magnetic nanoparticles are especially used for concentration, separation, purification and identification of interested analyt [7-8]. The magnetic nanoparticles were synthesized in several forms mostly includes Fe_3O_4 (magnetite), $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (hematite), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemite), FeO (wustite), $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ and $\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$, among which magnetite and maghemite are popular candidates since its biocompatibility have already applications in biotechnologies [9]. Magnetic nanoparticles were widely applied for immobilization of enzyme [10], immunoassay [11], bioseparation [12] and biosensor [13]. Magnetic nanoparticles have a wide promise to immobilize enzyme on its surface not only to perform better than conventional bulk supports used in enzyme immobilization but also faster separation by external magnetic field which resulting in immobilized enzyme could be reused. Various attempts have been made to immobilize enzyme on magnetic nanoparticles with different methods including using layer-by-layer [14], electrostatic force [15] and covalent binding [16]. Recently, Kuo and co-workers have been used the Fe_3O_4 -chitosan nanoparticles for the immobilization of lipase via covalent method. The results found that, after twenty repeated uses the immobilized lipase retains over 83% of its original activity [17].

In this work, we synthesized magnetic nanoparticles (MNP) and were incorporated into a chitosan (CS) and poly (vinyl) alcohol (PVA) cryogel (MNP-CS-PVA cryogel microbar). This magnetic-CS-PVA cryogel was applied for immobilization of horseradish peroxidase (MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar) for hydrogen peroxide detection. To our knowledge, this MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar is used for the first time as a support material for enzyme immobilization. As shown in Fig. 1, horseradish peroxidase was covalently immobilized on MNP-CS-PVA cryogel microbar by using glutaraldehyde as a crosslink agent. In the presence of hydrogen peroxide, *o*-dianisidine was oxidized by horseradish peroxidase resulting in the color change to blown color [18]. The absorbance value of the colorful products is proportional to the concentration of the hydrogen peroxide.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

All chemicals used in this study were of analytical grade. Iron (II) chloride and iron (III) chloride were purchased from POCH SA, Poland. Chitosan with low molecular weight and 75% deacetylation degree, acetic acid, sodium hydroxide (NaOH), 30% hydrogen peroxide solution, poly (vinyl) alcohol (PVA, 87-90% hydrolyzed), *o*-dianisidine and horseradish peroxidase (HRP; EC 1.11.1.7) were obtained from Sigma-Aldrich. Glutaraldehyde was purchased from Fluka. All solution was prepared with high purity water.

2.2. Instrumentation

The size measurements of magnetic nanoparticles were done with dynamic light scattering (DLS, DeLsa nano C Particle Analyzer, USA). XRD study was carried out by using X-ray diffractometer (X'Pert PRO, PANalytical) for structural characterization of magnetic nanoparticles. The absorbance measurements were carried out by using a UV-1601 UV-visible spectrophotometer (SHIMADZU, Japan) with a 10 mm path length quartz cuvette sub-micro (16.40/Q/10 Starna, USA).

2.3. Synthesis of magnetic nanoparticles

The magnetic nanoparticles were prepared by co-precipitating of Fe^{3+} ($\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) and Fe^{2+} ($\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ions in base solution with nitrogen gas as the protective gas. Briefly, the 0.3 mmol ferric and 0.6 mmol ferrous salts (molar ratio 1:2) were dissolved in deionized water and were then mixed under nitrogen gas at 90 °C. Then 2.5 M NaOH was added into above mixture solution with vigorous stirring for 30 min. The black precipitates were formed and were separated by magnetic decantation. Finally, the precipitates were washed with deionized water to remove excess base and were dried at 80 °C for 3 h. There resulting magnetic nanoparticles were characterized with dynamic light scattering and X-ray diffractometer.

2.4. Preparation of MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar

Firstly, The PVA was dissolved in ultrapure water (90 °C) a final concentration of 0.3% w/v and was stirred for 1 h and left to cool at room temperature. Next step, resulting PVA solution was mixed with 2% w/v chitosan. After that, 0.1 g of synthesized magnetic nanoparticles and 2.5% glutaraldehyde were added to above solution with vigorous stirring for 30 min and were than incubated in ice bath for 5 min. This composite was poured into the template and kept at 0 °C for 12 h. Then, the frozen gel was removed from the template and left it at room temperature for 10 min. After that, the 2.5% glutaraldehyde was added and was incubated as for 30 min to coupling with enzyme. Finally, 2 mg/ml HRP enzyme was added to resulting cryogel with incubated at 4 °C for overnight to obtain MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar.

2.5. Detection of hydrogen peroxide by MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar

The procedures of the assay are as follows (Fig. 1): First, a piece of the MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar (0.5 cm ×0.5 cm) was placed in a vial. Then aliquots of 50 µl of hydrogen peroxide and *o*-dianisidine were added into a vial containing MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar and were incubated for a few min. Subsequently, brown solution was obtained and was monitored the absorbance at a wavelength of 430 nm with a UV-visible spectrophotometer.

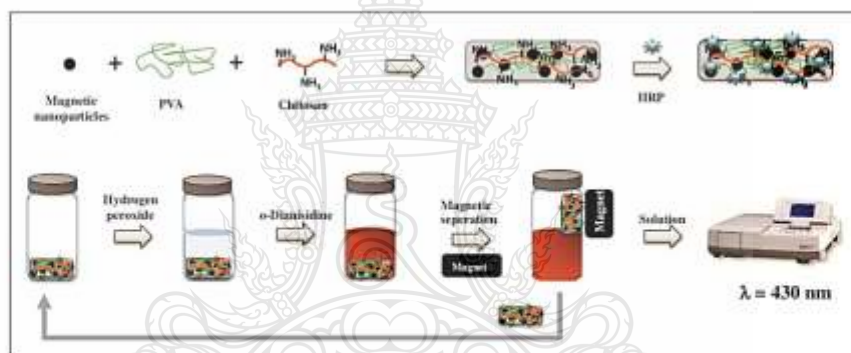


Fig. 1 Schematic illustration of the MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar procedure for the detection of hydrogen peroxidase.

3. Results and discussions

3.1. Characterizations of magnetic nanoparticles

Fig. 2 shows the synthesized magnetic nanoparticles by co-precipitation method. The results found that the magnetic nanoparticles showed magnetism property with can be isolated from solution by external magnet.



Fig. 2 The photograph of magnetic nanoparticles.

The results of the characterizations of magnetic nanoparticles were shown in Fig. 3. The size of magnetic nanoparticles was measured by dynamic light scattering technique. The magnetic nanoparticles are shown in Fig. 3A. From this figure, magnetite nanoparticles are well dispersed. The nanoparticles are narrow size distribution with a mean average size of 43 nm. The XRD results were used to confirm the structural of the magnetic nanoparticles as in fig.3B. It shows the XRD pattern of magnetic nanoparticles. The characteristic peaks presented at $2\theta = 30.36^\circ$; 43° , 53° , 57° , 63° , and 74° for synthesized magnetic nanoparticles (Fig. 3B (a)), which were correspond to the XRD pattern of standard magnetite from the database (ICSD collection code: 084611) (Fig. 3B (b)).

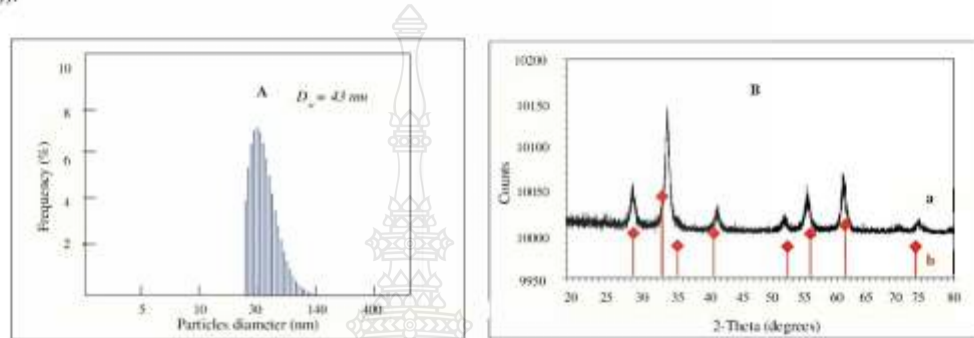


Fig. 3 Characterizations of magnetic nanoparticles; dynamic light scattering result (A) and XRD pattern results (B) of synthesized magnetic nanoparticles (a) and standard XRD pattern of magnetite (b)

3.2. Characterizations of MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar

Fig. 4A shows the constructed MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar with a diameter of 0.5 cm. and 0.5 cm. long. The incorporation of the magnetic nanoparticles in cryogel helped to separate the MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar from solution by external magnet to reuse for next experiment (Fig. 4B). Then the activity of this MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar was studied by adding hydrogen peroxide and *o*-dianisidine. As shown in Fig 4C, after the reaction the blown color was obtained leading to absorbance of this solution reached to 0.4 at the maximum wavelength of 430 nm indicating successful incorporation of HRP molecules in MNP-CS-PVA cryogel microbar.

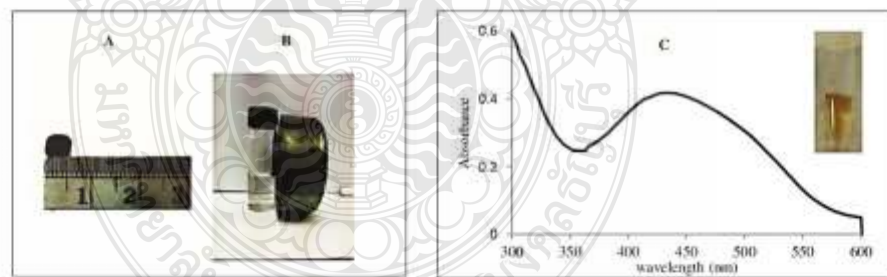


Fig. 4 The photograph of MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar with the size of 0.5 cm×0.5 cm (A), MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar held in place by an external magnet (B) and UV-vis spectrum obtained from adding 1 M of hydrogen peroxide and *o*-dianisidine (C).

3.3. Optimization of composition of MNP-CS-PVA-HRP cryogel

The ratio of PVA to chitosan can affect the amount of HRP in cryogel microbar which was optimized. As shown in table I, the absorbance value increased with the increasing ratios of 1: 1, 1: 2, 1: 3 and 1: 4 because higher amount of HRP on cryogel microbar via amine group of chitosan. Therefore, the ratio of 1:4 was selected as the optimal ratio of PVA to chitosan for further experiments.

Table 1. The study of the ratio of PVA to chitosan in cryogel.

Ratio PVA : Chitosan	Absorbance
1:1	0.379
1:2	0.398
1:3	0.457
1:4	0.553

3.4. Study the effect of pH on hydrogen peroxide detection

The optimum pH values of 0.1 M phosphate buffer were studied ranging from 5.00 to 8.00. According to Fig. 5, the maximal absorbance value was achieved at pH of 7.00. However, the activity decreased sharply when the pH value was above 7.00, which might be caused by the denaturation of HRP at such pH value. Accordingly, pH 7.00 was selected for use in subsequent experiments for detection of hydrogen peroxide.

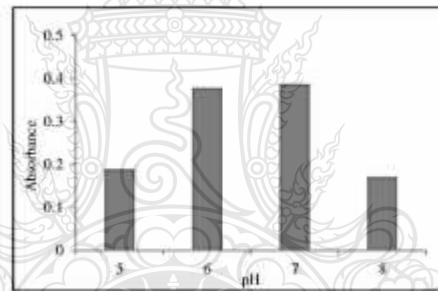


Fig. 5 The effect of pH.

3.5. Application of MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar for the detection of hydrogen peroxide

The MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar was evaluated for the hydrogen peroxide detection at difference concentrations. As shown in Fig. 6, the absorption values at 430 nm increased with the increase of the hydrogen peroxide concentrations in the range of 10–1,000 mM. This result indicated that the MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar might have the potential application for analysis of hydrogen peroxide.

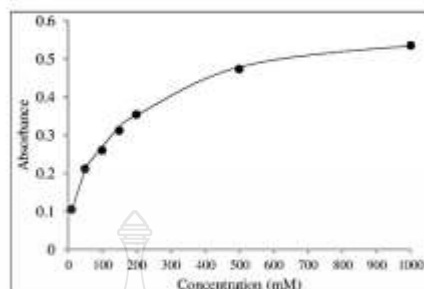


Fig. 6 Calibration curve for determination of hydrogen peroxide by using MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar.

3.6. Reusability MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar

The possibility of the reuse MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar for successive activity measurements was investigated. Each experiment, the MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar was separated from the solution by using external magnet and was washed with distilled water. The results found that, the MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar can be reused up to 10 times without any significant loss of enzyme activity. Thus, the magnetic nanoparticles were successfully applied for the construction of MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar.

4. Conclusions

In this work, we described the fabrication MNP-CS-PVA-HRP cryogel microbar by incorporating magnetic nanoparticles and HRP into PVA and chitosan cryogel for the detection of hydrogen peroxide. It exhibited high sensitivity to hydrogen peroxide. Additionally, it can be reused up to 10 times resulting in cost effective chemical analysis.

Acknowledgements

This work was supported by Research and Researchers for Industries (RRI). The authors also thank Polymer colloid Lab for support on dynamic light scattering instrument and Department of Chemistry and Department of materials and metallurgical engineering, Rajamangala University of Technology Thanyaburi for support on X-ray diffractometer.

References

- [1] Farre M, Sanchis J, Barcelo D. Analysis and assessment of the occurrence, the fate and the behavior of nanomaterials in the environment. *Trend Anal Chem* 2011;30:515-27.
- [2] Teresa A. P. Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles. *Trend Anal Chem* 2014;62:28-36.
- [3] He J, L, Tian Y, F, Cao Z, Zou W, Sun X. An electrochemical immunosensor based on gold nanoparticle tags for picomolar detection of c-Mycoprotein. *Sens. Actuator, B* 2013;181:835-41.
- [4] Devi R, Batra B, Lata S, Yadav S, A, Pundir C, S. Method for determination of xanthine in meat by amperometric biosensor based on silver nanoparticles/cysteine modified Au electrode. *Process Biochem* 2013;48:242-49.
- [5] Zhang S, Ma H, Yan L, Cao W, Yan T, Wei Q, Du B. Copper-doped titanium dioxide nanoparticles as dual-functional labels for fabrication of electrochemical immunosensors. *Biosens Bioelectron* 2014;59:335-41.
- [6] Nourani S, Ghourchian H, Boutsorabi S, M. Magnetic nanoparticle-based immunosensor for electrochemical detection of hepatitis B surface antigen. *Anal Biochem* 2013;441:1-7.
- [7] Sahoo B, Sahu S, K, Pramanik P. A novel method for the immobilization of urease on phosphonate grafted iron oxide nanoparticle. *J Mol Catal B: Enzym* 2011;69:95-102.
- [8] Mirabi A, Dalirandeh Z, Rad A, S. Preparation of modified magnetic nanoparticles as absorbent for the preconcentration and determination of cadmium ions in food and environmental water samples prior to flame atomic absorption spectrometry. *J Magn Magn Mater* 2015;381:138-44.

- [9] Wu W, He Q, Jiang C. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Res Lett* 2008;3:397-415.
- [10] Li Y, Chen Y, Xiao C, Chen D, Xiao Y, Mei Z. Rapid screening and identification of α -amylase inhibitors from *Garcinia xanthochymus* using enzyme-immobilized magnetic nanoparticles coupled with HPLC and MS. *J Chromatogr B* 2014;960:166-73.
- [11] Kim S, Lim HB. Chemiluminescence immunoassay using magnetic nanoparticles with targeted inhibition for the determination of ochratoxin. *Talanta* 2015;140:183-8.
- [12] Chen J, Lin Y, Jia L. Preparation of anionic polyelectrolyte modified magnetic nanoparticles for rapid and efficient separation of lysozyme from egg. *J Chromatogr A* 2015;1388:43-51.
- [13] Devi R, Pandir C. S. Construction and application of an amperometric uric acid biosensor based on covalent immobilization of uricase on iron oxide nanoparticles/chitosan-g-polyaniline composite film electrodeposited on Pt electrode. *Sens Actuators, B* 2014;193:608-15.
- [14] Zhao Y, Yuan PI, Yuan R, Chai YQ, Hong CL. Bionzyme-functionalized three-layer composite magnetic nanoparticles for electrochemical immunosensors. *Sens. Actuator, B* 2009;30:2284-90.
- [15] Bahrami A, Hejazi P. Electrostatic immobilization of pectinase on negatively charged AGT-Fe₃O₄ nanoparticles. *J Mol Catal B: Enzym* 2013;93:1-7.
- [16] Soozanipour A, Taheri K. A, Isfahani A. L. Covalent attachment of xylanase on functionalized magnetic nanoparticles and determination of its activity and stability. *Chem Eng* 2015; 270:235-43.
- [17] Kuo C. H, Liu Y. C, Chang C. M, Chen J, Chang C, Shieh C. J. Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles. *Carbohydr Polym* 2012;87:2538-45.
- [18] Graf E and Penniston J. T. Method for determination of hydrogen peroxide with its application illustrated by glucose assay. *Penniston Clin Chem* 1980;26:658-60.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวธิดารัตน์ เหล่าชัย
วัน เดือน ปีเกิด 13 พฤศจิกายน 2534
ที่อยู่ 111/62 หมู่ 9 ตำบลบางเลน อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม 73130
การศึกษา สำเร็จการศึกษาวិทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
เบอร์โทรศัพท์ 081-6590669
อีเมล s_laochai@hotmail.com

