การหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในนมด้วยเทคนิคทางเอนไซม์

Determination of hydrogen peroxide in milk using enzyme method

นายนวพันธ์ ดันทร์ทอง
นายนาฉัต ชื่นเมือง
นางสาววรากรณ์ แดงหิรัญ

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม-เครื่องสีข้าวและธัญญาหาร
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2556

การหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในนมด้วยเทคนิคทางเอมไซม์

Determination of hydrogen peroxide in milk using enzyme method

นายนวพันธ์ จันทร์ทอง

นายผาณิต สืบเมือง

นางสาววราภรณ์ แสงศรีศิลป์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาเคมีอุตสาหกรรม - เครื่องมือวิเคราะห์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2555

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DETERMINATION OF HYDROGEN PEROXIDE IN MILK USING ENZYME METHOD

NAWAPAN JUNTONG

PANIT SUBMUANG

WARAPORN SAENGSRISIN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN INDUSTRIAL CHEMISTRY – ANALYTICAL INSTRUMENTATION

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ACADEMIC YEAR 2012

หัวข้อโครงงานพิเศษ การหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในนมด้วยเทคนิคทางเอมไซม์

Determination of hydrogen peroxide in milk using enzyme method

ชื่อนักศึกษา นายนวพันธ์ จันทร์ทอง รหัสนักศึกษา 52050974

นายผาณิต สืบเมือง รหัสนักศึกษา 52050986

นางสาววราภรณ์ แสงศรีศิลป์ รหัสนักศึกษา 52051002

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต

สาขาวิชา เคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์ ประจำปีการศึกษา 2555

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น	
ดร.เสาวภาคย์ ธีราทรง	
ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในนมด้วยเทคนิคทางเอมไซม์
	Determination of hydrogen peroxide in milk using enzyme method
ชื่อนักศึกษา	นายนวพันธ์ จันทร์ทอง รหัสนักศึกษา 52050974
	นายผาณิต สืบเมือง รหัสนักศึกษา 52050986
	นางสาววราภรณ์ แสงศรีศิลป์ รหัสนักศึกษา 52051002
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	เคมีอุตสาหกรรม - เครื่องมือวิเคราะห์
ปีการศึกษา	2555
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

บทคัดย่อ

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการ อาหาร ยา ผลิตภัณฑ์ทันตกรรม สิ่งทอ การรักษาสิ่งแวดล้อมและกระบวนการทางชีวเคมีต่างๆในหลายประเทศ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ถูกนำไปใช้เป็นสารเติมแต่งในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และการฟอกสีอาหาร อีกทั้งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังเป็นสารที่ใช้ในการควบคุมสารตกค้างในบรรจุภัณฑ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ทั้งนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้นในร่างกายสูง จะเป็นพิษต่อร่างกายและอาจก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้ ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาจากหลากหลายสถาบันโดยมีการวิจัยคิดค้นและพัฒนาเพื่อหาปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยวิธีต่างๆ เช่น สเปคโทรโฟโตเมตตรี คาเลอรีเมทตรี และไอโอโดเมทตรี ในการตรวจสอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในขั้นพื้นฐาน แต่พบว่าวิธีดังกล่าวยังมีข้อจำกัด เช่น ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน มีผลของสารรบกวนต่างๆ สารเคมีที่ใช้มีราคาสูงและมีความเป็นพิษ

โดยในงานวิจัยชิ้นนี้เราจะวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ด้วยเทคนิคทางเอนไซม์ ซึ่งเอนไซด์ที่ใช้คือ เอนไซด์ฮอสราดิส ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์หนึ่งที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ให้ผลการวิเคราะห์รวดเร็ว และมีความถูกต้องสูงและเพิ่มความว่องไวในการวิเคราะห์ที่ให้สูงมากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำสำคัญ : ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอนไซน์ ลิวโคคริสตัลไวโอเล็ต นม เตตระเมททิลเบนซิดีน

Title	Determination hydrogen peroxide in food by enzyme
Students	Nawapan Janthong
	Panit Submuang
	Waraporn Saengsrisin
Degree	Bachelor of Science
Major	Industrial Chemistry – Analytical Instrumentation
Academic Year	2012
Advisor	Dr.Tipachai Vatanavicharn

Abstract

Hydrogen peroxide (H_2O_2) is widely used in the fields of foods, pharmaceuticals, dental products, textiles, environmental protection, and various biochemical processes In many countries, H_2O_2 has been accepted as a food additive of controlling the growth of microorganisms, bleaching. In a properly designed aseptic packaging system a good microbicidal effect using H_2O_2 can be achieved and the level of residue can also be effectively controlled H_2O_2 is extremely toxic to cells at high concentrations and it can cause cancer. Before many studies of institutions . research and development effort is to determine the amount of hydrogen peroxide such as spectrophotometry calorimetry and iodometry to detect hydrogen peroxide in basic. However, the method is still limited. For example , take the time to analyze it. The effects of disturbance. Chemicals used are toxic and expensive. A simple and highly sensitive with techniques into the enzyme This enzyme is horseradish peroxidase isoenzyme (HRP). A method that can determine the amount of hydrogen peroxide. The results fast. With high accuracy and high sensitivity in the analysis.

Keyword : Hydrogen peroxide, Milk, Horseradish peroxidase, Lueco crystal violet Tetra methyl benzidine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยฉบับนี้นี้สำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์ของบุคคลหลายท่าน ซึ่งไม่อาจจะนำมากล่าวได้ทั้งหมด ซึ่งผู้มีพระคุณท่านแรกที่คณะผู้ศึกษาใคร่ขอขอบกราบพระคุณคือ ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ อาจารย์ผู้สอนที่คอยเป็นที่ปรึกษา ให้ความรู้ คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่างๆ และดูแลแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดในการทำงานทั้งในห้องปฏิบัติการและนอกห้องปฏิบัติการ ด้วยความเอาใจใส่ในทุกๆขั้นตอน และขอขอบพระคุณ ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น ดร.เสาวภาคย์ ธีราทรง และคณาอาจารย์ท่านอื่นๆที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ที่ดีในการศึกษาโครงานพิเศษเพื่อให้โครงการวิจัยค้นคว้านี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์

และความสำเร็จอันเนื่องเกิดจากการศึกษาค้นคว้างานวิจัยในครั้งนี้ ผู้เขียนขอมอบแด่ บิดา มารดา ครู อาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน ซึ่งผู้เขียนมีความซาบซึ้งในความกรุณาอันดียิ่งจากทุกท่านที่ได้กล่าวมาแล้ว และขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

นวพันธ์ จันทร์ทอง
ผาณิต สืบเมือง
วราภรณ์ แสงศรีศิลป์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ระยะเวลาในการดำเนินงาน และ สถานที่ดำเนินงาน	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 แนวคิด ทฤษฎี	4
2.2 โครงสร้างและคุณสมบัติของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	4
2.3 ค่าพีเอชของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	5
2.4 การนำไปใช้งาน	5
2.5 ปฏิกิริยาสลายตัว	5
2.6 ปฏิกิริยารีดอกซ์	5
2.7 กลไกที่เกี่ยวข้องกับการเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	6
2.8 คุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	7
2.9 คุณสมบัติทางเคมีของไฮโรเจนเปอร์ออกไซด์	7
2.10 ระดับความอันตรายของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	9
2.11 การตกค้างของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในนม	11
2.12 Horseradish peroxidase (HRP)	11
2.13 โครงสร้างของ Horseradish peroxidase	12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น การอ้างอิงควรอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.14 Horseradish peroxidase cycle	13
2.15 โครโมเจนิกสับสเตรต (chromogenic substrate)	14
2.16 เอนไซม์	16
2.17 กลไกการทำงานของเอนไซม์	16
2.18 ประเภทของเอมไซน์ตามชนิดของปฏิกิริยา	17
2.19 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์	18
2.20 เทคนิคไอโอโดเมทรี	18
2.21 หลักการการตกตะกอนในนม	18
2.22 โปรตีนในน้ำนม	19
2.23 ปัจจัยที่มีผลต่อ การแขวนลอย และการตกตะกอนของโปรตีน	20
2.24 การเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์แบบต่าง	22
2.25 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	22
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานการวิจัย	25
3.1 อุปกรณ์	25
3.2 สารเคมี	25
3.3 การเตรียมสาร	26
3.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่าง โดยการตกตะกอน	27
3.5 วิธีการทดลอง	28
3.5.1 วิธีไทเทรตแบบไอโอโดเมทรี (standard method)	28
3.5.2 วิธีการหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเทคนิคทางเอนไซม์	29
3.6 การวิเคราะห์ตัวอย่างโดยมีลิวโครคริสตัลไวโอเล็ตเป็นซับสเตรต	30
3.7 การวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเตตระเมททิลเบนซิดีนเป็นซับสเตรต	30
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	31
4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่าง	31
4.2 ผลการตรวจสอบด้วยวิธีมาตรฐาน ไอโอโดเมทรี	32
4.3 ผลการหาจุดสมมูลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับซับสเตรต โดยมีเอมไซน์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3.1 ผลการทดลองหาจุดสมมูลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยมีลิวโคคริสตัลไวโอเลตเป็นสับสเตรต	34
4.3.2 ผลการทดลองหาจุดสมมูลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเตตระเมทิล เบนซิดีน เป็นซับสเตรต	35
4.4 ผลการทดสอบสารมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเอมไซม์	36
4.5 ผลการทดลองหาหาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่าง	39
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	
5.1 สรุปผลการวิจัย	41
เอกสารอ้างอิง	42
ภาคผนวก ก.	44
ภาคผนวก ข.	50
ภาคผนวก ค.	55
ภาคผนวก ง.	56
ภาคผนวก จ.	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และน้ำ 8

ตารางที่ 2.2 ระดับของความรุนแรงตามมาตรฐานของประเทศสหรัฐอเมริกา 9

ตารางที่ 2.3 ตารางรหัสประจำตัวเอนไซน์ (code number) 17

ตารางที่ 2.4 แสดงการเปรียบเทียบ ข้อดี ข้อเสียของแต่ละวิธี 22

ตารางที่ 3.1 อัตราส่วนการผสมสารละลายด้วยวิธีการตกตะกอนที่จุดไอโซอิเลคทริค 27

ตารางที่ 4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่าง โดยการตกตะกอน 31

ตารางที่ 4.2 ผลการไทเทรตหาความเข้มข้นที่แน่นอนของโซเดียมไทโอซัลเฟต 32

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้เป็น Lueco crystal voiolet (LCV) ซับสเตรท 36

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัว โดยใช้ Lueco crystal voiolet (LCV) เป็นสับสเตรต 38

ตารางที่ 4.5 ผลการทดลองโดยใช้ TMB เป็นซับสเตรต 39

ตารางที่ 4.6 ผลการทดลองวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนในตัวอย่างนม โดยใช้ TMB เป็นซับสเตรต 40

ตารางที่ 5.1 แสดงผลการหาจุดสมมูลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้นต่างๆโดยมีลิวโคคริวตัลไวโอเลตเป็นซับสเตรต 42

ตารางที่ 5.2 แสดงผลการหา จุดสมมูลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ ความเข้มข้นต่างๆโดยเตตระเมทิลเบนซิดีน เป็นซับสเตรต 45

ตารางที่ 5.3 การใช้งานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ในอุตสาหกรรม 49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสถานะแก๊ส 4

รูปที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสถานะของแข็ง 4

รูปที่ 2.3 แสดงปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 5

รูปที่ 2.4 แสดงปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 5

รูปที่ 2.5 แสดงปฏิกิริยารีดักชั่นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 6

รูปที่ 2.6 แสดงโครงสร้างของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 7

รูปที่ 2.7 ต้นมะรุม (horseradish) 11

รูปที่ 2.8 โครงสร้าง 3 มิติของ Horseradish peroxidase 12

รูปที่ 2.9 โครงสร้างกลุ่มของฮีม 12

รูปที่ 2.10 วัฏจักรของปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดสที่ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และฟีนอลเป็นออกซิไดซิ่ง และรีดิวซิ่งซับสเตรต 13

รูปที่ 2.11 โครงสร้างของ 1) 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine 2) 3,3'-Diaminobenzidine 3) 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) 13

รูปที่ 2.12 แสดงการออกซิเดชั่นของ 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) to 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine diimine 14

รูปที่ 2.13 แสดงโครงสร้างของ Leuco Crystal Violet 15

รูปที่ 2.14 กลไกการทำงานของเอนไซน์ 16

รูปที่ 2.15 การเปลี่ยนแปลงพลังงานอิสระของปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซน์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา 16

รูปที่ 2.16 แสดงลักษณะของเคซีนในน้ำนมอยู่ในสภาพที่เป็น micelle 20

รูปที่ 2.17 แสดงลักษณะกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH กับ ค่าการละลาย 21

รูปที่ 2.18 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของเกลือกับค่าการละลาย 21

รูปที่ 4.1 กราฟแสดงความสามารถในการละลายของโปรตีนที่ ค่าพีเอชต่างๆ 31

รูปที่ 4.2 กราฟ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (วินาที) กับค่าดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร 34

รูปที่ 4.3 แสดงการเปลี่ยนแปลงสี โดยใช้สับสเตรตเป็น ลิวโคคริสตัลไวโอเลต 35

รูปที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (วินาที) กับค่าดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.5 แสดงการเปลี่ยนสี ของสับสเตรตเตตระเบนซิดีน 36

รูปที่ 4.6 กราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น 37
ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กับค่า Abs. 590 โดยมี LCV เป็นซับสเตรต

รูปที่ 4.7 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น 39
ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กับค่า Abs. 450 โดยมี TMB เป็นซับสเตรต

รูปที่ 5.1 คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า 55

รูปที่ 5.2 การดูดกลืนแสงตามกฎของแลมเบิร์ต (lambert's law) 55

รูปที่ 5.3 องค์ประกอบที่สำคัญของเครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบ single beam 56

รูปที่ 5.4 องค์ประกอบที่สำคัญของเครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบ double beam 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide : H_2O_2) เป็นสารประกอบเปอร์ออกไซด์ (สารที่ประกอบด้วยออกซิเจนสองตัวและเชื่อมกันด้วยพันธะเดี่ยว) รูปแบบที่ง่ายที่สุด มีสภาพเป็นของเหลวใส หนืดกว่าน้ำเล็กน้อย มีรสขม ไม่อยู่ตัว ซึ่งสามารถสลายตัวเป็นออกซิเจนกับน้ำ เมื่อเจือจางจะเป็นสารละลายไม่มีสี เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถสลายตัวเป็นน้ำได้เมื่อถูกแสงและความร้อน โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการอาหาร ยา ผลิตภัณฑ์ทางทันตกรรมและยังรวมไปถึงการใช้เป็นสารในการทำความสะอาดหรือฆ่าเชื้อโรคต่างๆ เช่น น้ำยาล้างแผลเพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในผิวหนัง หรือฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปาก อย่างเราที่คุ้นเคยกันเป็นอย่างดีคือน้ำยาบ้วนปากซึ่งก็มีส่วนผสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อฆ่าเชื้อโรคในช่องปากนั้นเอง และยิ่งไปกว่านั้นสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้นกว่า 90% ยังใช้เป็นเชื้อเพลิงในการขับเคลื่อนจรวดอีกด้วย และนอกจากนี้ยังใช้เป็นสารฟอกขาวในภาคอุตสาหกรรมฟอกย้อม ซึ่งสามารถใช้ได้ดีกับเส้นใยเกือบทุกชนิด พร้อมทั้งเกิดอันตรายต่อเส้นใยน้อยที่สุด ทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า "ตัวฟอกขาวสากล" (Universal bleaching agent) การฟอกขาวด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต้องใช้โซเดียมซิลิเกต (Na_2SiO_3) ควบคุมการสลายตัว นอกจากใช้ฟอกเส้นใยแล้ว ยังใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ฟอกงาช้าง และขนนก และอาจใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารแอนติคลอร์ ซึ่งใช้ทำลายคลอรีนที่ตกค้างบนเส้นใยหลังผ่านการใช้คลอรีนฟอกขาว

จากที่กล่าวมาข้างต้นเราจะเห็นได้ถึงประโยชน์ต่างๆมากมายของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยเฉพาะในการใช้เป็นสารเคมีหลักในการฆ่าเชื้อต่างๆ ซึ่งแน่นอนว่าถ้าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้าไปในร่างกายของมนุษย์ไม่ว่าจะโดยวิธีไหนก็ตามย่อมเกิดอันตรายอย่างแน่นอน และเนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีฤทธิ์กัดกร่อน การหายใจเอาสารชนิดนี้เข้าไป อาจทำให้เกิดอาการเจ็บคอ ไอ หายใจติดขัด เมื่อสัมผัสผิวหนัง อาจเกิดผื่นแดง รู้สึกปวดแสบปวดร้อน เมื่อรับประทานเข้าไปจะเกิดอาการเจ็บคอ ปวดท้อง และอาเจียนได้ และเมื่อสัมผัสถูกดวงตา จะก่อให้เกิดอาการระคายเคือง ตาแดง ปวดตา สายตาอาจพร่ามัวได้ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ถ้าถูกสะสมมากในร่างกายก็จะเป็นอันตรายต่อมนุษย์ร้ายแรงที่สุดคืออาจเป็นสารซึ่งก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้เลยทีเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากคนเรามีการรับประทานอาหารทุกวัน งานวิจัยชิ้นนี้จึงเห็นถึงอันตรายของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ถ้ามีการเจือปนอยู่ในอาหาร หรือสะสมในร่างกายย่อมก่อให้เกิดอันตรายตามมาอย่างแน่นอน ในงานวิจัยชิ้นนี้จึงได้ทำการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ที่มีการเจือปนอยู่ในอาหาร ซึ่งในอาหารที่จะทำการตรวจหาปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก็คือในน้ำนมที่เรามักบริโภคกันอยู่เป็นประจำ ซึ่งในประเทศสหรัฐอเมริกาทำการรับรองว่าในน้ำนมจะต้องไม่พบปริมาณความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกินร้อยละ 0.05 ของน้ำหนักนม

โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองโดยใช้วิธีไอโอโดเมทรี ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ได้งานได้ง่ายและมีความว่องไวสูงในการตรวจวัดความเข้มข้นของปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีอยู่ในน้ำนม และเราจะใช้กระบวนการปฏิกิริยาของเอนไซม์ฮอสราดิส (Horseradish peroxidase : HRP) ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้น โดยวิธีไอโอโดเมทรีจะทำการไทเทรตไอโอดีนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างสารที่สนใจไปออกซิไดส์สารละลายโพแทสเซียมไอโอเดต และปริมาณของไอโอดีนที่เกิดขึ้น โดยจะทำการเตรียมสารตัวอย่างโดยนำตัวอย่างนมสดจากซุปเปอร์มาเกต นำตัวอย่างมาผสมกับสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก และทำการ spike ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ลงไปในตัวอย่าง และเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก พร้อมทั้งทำการปั่นกวนตามเวลาที่กำหนด จากนั้นนำมาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟตด้วยโพแทสเซียมไอโอเดต จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในน้ำนมต่อไป

และเอนไซม์ฮอสราดิส จะใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการออกซิไดซ์ทั้งสารประกอบอินทรีย์และสารประกอบอนินทรีย์เอนไซม์ฮอสราดิสกับเปอร์ออกซิเดสอื่นๆ จะเห็นสีได้ชัดเจนภายใต้ใกล้แสงยูวี โดยคุณสมบัติของเอนไซน์ฮอสราดิสจะมีประโยชน์มากในการจับกับโปรตีนที่โปร่งใส เพื่อที่จะสามารถตรวจวัดได้เมื่อมีความยาวคลื่นเปลี่ยนไป และตรวจหาปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อไป

1.2 วัตถุระสงค์ของการวิจัย

1.เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในอาหารด้วยเทคนิคทางเอนไซม์

2. เพื่อปรับปรุงวิธีการเตรียมสารตัวอย่างก่อนนำมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในอาหารด้วยเทคนิคทางเอนไซม์
2. สามารถปรับปรุงวิธีการเตรียมสารตัวอย่างก่อนนำมาทำการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์

1.4 ระยะเวลาในการดำเนินงาน และ สถานที่ดำเนินงาน

1. เดือนมิถุนายน 2555 ถึง เดือนมีนาคม 2556
2. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง คณะวิทยาศาสตร์

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพของเอนไซน์ในการหาปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจน-เปอร์ออกไซด์ว่ามีประสิทธิภาพมากน้อยเพียงใด
2. ได้ทราบถึงวิธีต่างๆที่ใช้ในการหาปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
3. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาวิธีการหาปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ในอาหารให้มีประสิทธิภาพดี และลดขั้นตอนในการวิเคราะห์เพื่อความรวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

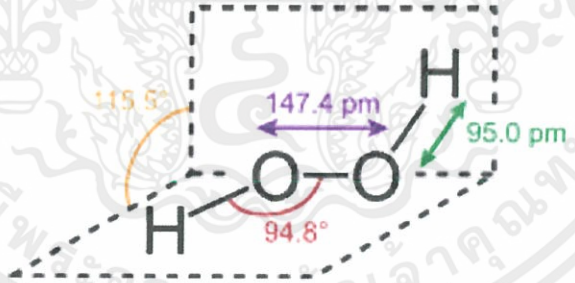
2.1 แนวคิด ทฤษฎี

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide : H_2O_2) เป็นเปอร์ออกไซด์ในรูปอย่างง่าย (ประกอบด้วยออกซิเจนพันธะเดี่ยว) ทั้งยังเป็นที่ตัวออกซิไดซ์ที่แรง ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นของเหลวใสมีความหนืดสูงกว่าน้ำเล็กน้อย ในสารละลายเจือจางจะปรากฏสี เนื่องจากคุณสมบัติออกซิไดซ์ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มักจะใช้เป็นสารฟอกขาวหรือสารทำความสะอาด โดยความสามารถในการออกซิไดซ์ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั้นแรงกว่าออกซิเจนตัวอื่นๆ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกัน

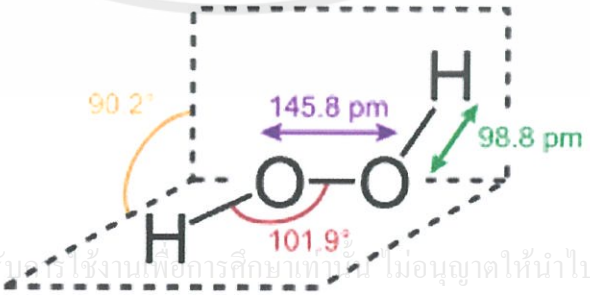
2.2 โครงสร้างและคุณสมบัติของไฮโดรเจนปอร์ออกไซด์

ไฮโดรเจนปอร์ออกไซด์ไม่ใช่โครงสร้างระนาบที่สมมาตรกัน (symmetry) เป็นโครงสร้างที่เกิดการต้านกันระหว่างอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวของออกซิเจนกับพันธะของออกซิเจนและไฮโดรเจน จึงทำให้ได้รูปร่างโมเลกุลที่เบ้

พันธะไฮโดรเจนซึ่งมีความเกี่ยวข้องกันระหว่างโครงสร้างแบบแก็สและแบบผลึก จะเห็นว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในรูปแบบผลึก มุมของระนาบกว้างกว่าแบบแก็ส



รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสถานะแก็ส



รูปที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสถานะของแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ค่าพีเอชของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่บริสุทธิ์จะมีค่าพีเอช 6.2 ดังนั้นจึงถือว่าเป็นกรดอ่อน พีเอชอาจจะต่ำลงถึง 4.5 เมื่อเจือจางที่ประมาณ 60%

2.4 การนำไปใช้งาน

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นิยมใช้เป็นวิธีทั่วไปในการแก้หรือปรับสภาพของน้ำ หาซื้อได้ตามร้านขายยา โดยมีความเข้มข้นที่จำหน่ายอยู่ที่ 3% และ 6 % โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก โดยความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั้น สามารถบอกได้ถึงปริมาณการเกิดของออกซิเจนสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 มิลลิลิตร สามารถเกิดแก๊สออกซิเจนได้ 20 มิลลิลิตร เมื่อสิ้นสุดการย่อย โดยในห้องปฏิบัติการนั้นจะพบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 30% โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักมากที่สุด นอกจากนี้ยังมีเกรดเชิงพาณิชย์ความเข้มข้น 70% ถึง 98% แต่เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่เข้มข้นน้อยกว่า 68% จะสามารถเปลี่ยนสภาพเป็นน้ำและออกซิเจน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 68% จึงไม่เป็นสารอันตราย ควรเก็บอย่างดีเพื่อไม่ให้เกิดการสลายตัว

2.5 ปฏิกิริยาสลายตัว

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เกิดปฏิกิริยาสลายตัว (decomposition) ได้เองตามธรรมชาติโดยจะสลายตัวได้เป็นน้ำและแก๊สออกซิเจน โดยแสงสว่างและความร้อนจะช่วยเร่งให้เกิดการสลายตัวเร็วขึ้น ดังนั้นจึงต้องเก็บไว้ในที่มืด หรือในภาชนะสีน้ำตาลเข้ม และในที่เย็น ดังสมการข้างล่าง

$$2\,H_2O_2 \longrightarrow 2\,H_2O + O_2$$

รูปที่ 2.3 แสดงปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

2.6 ปฏิกิริยารีดอกซ์

เป็นปฏิกิริยาเกี่ยวกับการรับ-ส่งอิเล็กตรอน แบ่งได้เป็น 2 ครึ่งปฏิกิริยาคือ ปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation reaction) เป็นปฏิกิริยาที่เสียอิเล็กตรอน และปฏิกิริยารีดักชั่น (reduction reaction) เป็นปฏิกิริยาที่รับอิเล็กตรอน โดยมีสมการของปฏิกิริยาดังนี้

2.6.1 ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ : ให้อิเล็กตรอน

$$H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2H^+ + 2e^-$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.4 แสดงปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

2.6.2 ปฏิกิริยารีดักชั่นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ : รับอิเล็กตรอน

$$2e^- + 2H^+ + H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O$$

รูปที่ 2.5 แสดงปฏิกิริยารีดักชั่นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

2.7 กลไกที่เกี่ยวข้องกับการเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (metabolism related to toxicity of hydrogen peroxide)

ในกระบวนการหายใจแบบใช้อากาศในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะมีกลไกทางชีวเคมีในการรีดักชันโมเลกุลของออกซิเจนและน้ำ ซึ่งจะมีการใช้อิเล็กตรอนจำนวน 4 อิเล็กตรอน และในกระบวนการเดียวกันนี้จะได้อนุมูลอิสระแอนไอออน (O_2^-) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และได้สารตัวกลางคืออนุมูลอิสระดรอกซี ในกระบวนรีดิวซ์โลหะไอออน (Fe^{2+} : Cu^+) อนุมูลอิสระดรอกซีจะเป็นแหล่งกำเนิดของไฮโดนเจนเปอร์ออกไซด์ โดยปฏิกิริยาเฟนตัน ในปฏิกิริยาเคมีดังกล่าวจะทำให้เกิดออกซิเจนชนิดที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา

โมเลกุลออกซิเจนที่รีดิวซ์จากน้ำโดย 4 ขั้นตอนรีดักชันใช้ 1 อิเล็กตรอน

$O_2 + e\ O_2^{-}\bullet$ (superoxide anion) $\longrightarrow$

$O_2^{-}\bullet + e + 2H^+$ H_2O_2 (hydrogen peroxide) $\longrightarrow$

$H_2O_2 + e + H^+ OH\bullet + H_2O$ (hydroxyl radical) $\longrightarrow$

$OH\bullet + e + H^+ \longrightarrow H_2O$ (water)

Net: $O_2 + 4\ e + 4\ H^+ \longrightarrow 2\ H_2O$

ชนิดของเอนไซม์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการกำจัดการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระของออกซิเจน

$2O_2^{-}\bullet + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$ (SOD : superoxide dismutase)

$H_2O_2 + 2\ GSH \longrightarrow 2\ H_2O + GSSG$ (GSP_x: glutathione peroxidase)

$2H_2O_2 \longrightarrow 2\ H_2O + O_2$ (CAT: catalase)

ในร่างกายสิ่งมีชีวิตจะมีความว่องไว (และก่อให้เกิดความเป็นพิษ) ต่ออนุมูลอิสระดรอกซี สามารถทำให้เกิดยับยั้งการสารเอนไซม์ที่เป็นตัวกระตุ้นโดยโลหะทรานซิชัน เช่น Fe^{2+}และ Cu^+

$H_2O_2 + O_2^{-}\bullet \longrightarrow OH\bullet + OH^- + O_2$(Haber-Weiss reaction)

$H_2O_2 + Cu^+/Fe^{2+} \longrightarrow OH\bullet + OH– + Cu^{2+}/Fe^{3+}$ (Fenton reaction)

ในความเป็นไปได้ทั้งหมดของปฏิกิริยา Haber - Weiss (การเกิดรีดักชันของ H_2O_2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดย $O_2^-\bullet$) ดังนั้น จากสมการของเฟนตันจะเป็นส่วนหนึ่งในปฏิกิริยาของ Haber - Weiss

$$O_2^-\bullet + Fe^{3+}/Cu^{2+} \longrightarrow O_2 + Fe^{2+}/Cu^{+}$$
$$H_2O_2 + Fe^{2+/}Cu^{+} \longrightarrow OH\bullet + OH^- + Fe^{3+}/Cu^{2+}$$

เพราะว่าในสภาพปกติเหล็กจะสร้างพันธะไอออนเหล็กอิสระจะมีอยู่ในพลาสมาในระดับต่ำมาก และในเซลล์ เหล็กจะไม่สามารถทำปฏิกิริยาเฟนตันได้ ตัวรีดิวซ์หรือตัวคีเลตในทางชีวภาพหรือสภาพกรด pH อย่างไรก็ตาม เหล็กอาจจะได้รับมาเพิ่มเติมโดยการขนส่งของโปรตีนที่กักเก็บ Superoxide anion จะถูกขนส่งโดย Superoxide dismutase และทำให้เกิด H_2O_2 ยิ่งไปกว่านั้นยังก่อให้เกิดการขนส่งโลหะไอออน (เกลือของเหล็กอาจสะสมอยู่ในร่างกาย) Superoxide anion และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ถูกรีดิวซ์โดยใช้เหล็กเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา Haber-Weiss จะผลลัพธ์คือจะได้ OH• อนุมูลอิสระไฮดรอกซี จะมีความว่องไวและสามารถออกซิไดซ์สารเคมีอินทรีย์ได้ทุกชนิด รวมทั้ง สารชีวโมเลกุล ดังนั้นหมู่ ไฮดรอกซีที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จึงก่อให้เกิดพิษต่อสิ่งมีชีวิตได้

2.8 คุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ข้อมูลบ่งชี้เฉพาะของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Identify key of Hydrogen Peroxide)

ชื่อมาตรสากล IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)
Name : Dihydrogen Dioxide

ชื่ออื่นๆ Other Name : Dioxidane, Oxidanyl

รูปที่ 2.6 แสดงโครงสร้างของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

2.9 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (physicochemical properties of hydrogen peroxide)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารที่มีความใสเป็นของเหลวที่มีสีค่อนข้างเจือจาง สามารถละลายได้ดีในน้ำ จากตารางที่ 1 เปรียบเทียบคุณสมบัติของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ผสมกับน้ำที่ความเข้มข้นของสารละลายมากกว่า 65% m/m และสามารถละลายในช่วงของตัวทำลายอินทรีย์ เช่น คาร์บอกซิลิก (carboxylic) เอสเทอร์ (esters) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และน้ำ ไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือแสวงหาประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ลบเครื่องหมายการค้าและข้อความแสดงลิขสิทธิ์ออกจากเอกสารนี้ก่อนนำไปใช้

สามารถละลาย/ผสม กับสารพวกAzeotropic(สารละลายที่มีจุดเดือดคงที่ เนื่องจากตัวทำละลายและตัวถูกละลายมีสัดส่วนเหมาะสม แต่ถ้าเปลี่ยนความดันจุดเดือดจะไม่คงที่)และสามารถแยกได้ด้วยการกลั่น ในงานส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตาม จะได้ 100% m/m ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยใช้วิธีการแยกโดยการตกผลึก (crystallization) ที่ความเข้มข้นของสารละลายค่อนข้างสูง ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์บริสุทธิ์ 100% m/m จะนิยมใช้เฉพาะงานวิชาการมากกว่า และไม่ได้ผลิตเพื่อใช้ ในระดับอุตสาหกรรมแต่ก็อาจจะมีบางอุตสาหกรรมที่มีการใช้งาน

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และน้ำ

คุณสมบัติ	ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	น้ำ
จุดหลอมเหลว Melting Point (°C)	-0.43	0.0
จุดเดือด Boiling Point (°C)	150.2	100
ความร้อนของการหลอมเหลว Heat of melting (J/g)	368	334
ความร้อนของการกลายเป็นไอ Heat of Vaporization ($J \cdot g^{-1}K^{-1}$)		
25 °C	1519	2443
b.p.	1387	2258
ค่าจำเพาะของความร้อน Specific heat ($J \cdot g^{-1}K^{-1}$)		
Liquid (25°C)	2.629	4.182
Gas (25°C)	1.352	1.865
ความแน่นสัมพัทธ์ Relative density ($g \cdot cm^{-1}$)		
0 °C	1.4700	0.9998
20°C	1.4500	0.9980
25°C	1.4425	0.9971
ความหนืด Viscosity (mPas)		
0°C	1.819	1.792
20°C	1.249	1.002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิที่จุดวิกฤต Critical temperature °C	457	372.2
ความดันที่จุดวิกฤต Critical pressure (MPa)	20.99	21.44
ดรรชนีการหักเห Refractive index (nD^{20})	1.4084	1.3320

2.10 ระดับความอันตรายของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hazard classes of hydrogen peroxide)

พิจารณาจากกฎกฎระเบียบและข้อบังคับที่ครอบคลุมระบบการขนส่งการเก็บรักษาและการจัดการของวัสดุอันตราย ตามที่หน่วยงานรับรองตามมาตรฐานสากล ได้กำหนดมาตรฐานระดับความอันตรายของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในการพิจารณาจะขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และมีหลักพิจารณาจากความสามารถต่างๆเหล่านี้ควบคู่ด้วย เช่น ปฏิกิริยาออกซิไดซ์ (อันตรายจากไฟไหม้) ความสามารถในการกัดกร่อน (อันตรายต่อสุขภาพ) และความว่องไวในการทำปฏิกิริยา (อันตรายจากการระเบิด)

ตารางที่ 2.2 ระดับของความรุนแรงตามมาตรฐานของประเทศสหรัฐอเมริกา (Federal Hazard Ratings)

จากข้อมูลจากรายการต่อไปนี้จะพิจารณาถึงระดับความแตกต่างของความแรงของ H_2O_2ตามข้อปฏิบัติตามกฎหมายรัฐบาลกลาง (code of federal regulations)ในหัวข้อที่ 29 ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานที่ยอมรับในระดับประเทศ

<8%	ตัวอย่าง Examples	เบกกิ้งโซดา/ยาสีฟันขจัดคราบหินปูน (baking soda - peroxide toothpaste) (0.5%) น้ำยาฆ่าเชื้อสำหรับคอนแทคเลนส์ (contact lens sterilizer) (2%) ยาล้างแผลตามร้านขายยา(over-the-counter drug store hydrogen Peroxide) (3%) น้ำยาซักผ้า (liquid detergent bleach) (5%) สารฟอกสีผม(hair bleach) (7.5%)
	ระดับ	ไม่พบอันตราย Non-hazardous

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	Rating(s)	
8%-28%	ตัวอย่าง Examples	ใช้บำบัดสระว่ายน้ำ (pool shock) (27%)
	ระดับ Rating(s)	Oxidizer - Class 1 อันตรายค่อนข้างเล็กน้อยเนื่องจากสารจะเพิ่มอัตราในการเผาไหม้ แต่จะไม่เกิดการลุกไหม้ขึ้นเองเมื่อสัมผัสกับสารติดไฟ
28.1% -52%	ตัวอย่าง Examples	อุตสาหกรรมส่วนใหญ่ใช้เป็นเกรดที่มีความแรง (most industrial strength grades)
	ระดับ Rating(s)	Oxidizer - Class 2 จะมีความอันตรายระดับปานกลาง มีผลทำให้อัตราการเผาไหม้เพิ่มขึ้น และอาจก่อให้เกิดการลุกไหม้ที่เกิดเองได้เมื่อสัมผัสกับสารติดไฟมีอยู่ใกล้กัน กัดกร่อนCorrosive ก่อให้เกิดรอยไหม้เมื่อมีการสัมผัสกับผิวและเนื้อเยื่อ ไม่เสถียร(reactive)-Class 1 (35 - 52% H_2O_2) โดยปกติสารมีความเสถียรด้วยตัวเอง แต่จะไม่สเถียรที่อุณหภูมิและความดันสูง
52.1% -91%	ตัวอย่าง Examples	กระบวนการทางเคมีที่จัดส่งให้กับผู้ประกอบการที่มีขนาดใหญ่เป็นพิเศษ (70% ของการจัดส่งจะต้องมีการเจือจาง/มีการเก็บไว้กับสถานที่ <52%) Very large users (70% shipped and diluted/stored onsite at < 52%).
	ระดับ Rating(s)	Oxidizer - Class 3 ทำให้อัตราการลุกไหม้ของวัสดุติดไฟเพิ่มขึ้นซึ่งเกิดจากการสัมผัส หรือเกิดจากปฏิกิริยาการสลายตัวของสารเองเมื่อมีการสัมผัสกับความร้อน กัดกร่อนCorrosive ก่อให้เกิดรอยไหม้เมื่อมีการสัมผัสกับผิวและเนื้อเยื่อ ไม่เสถียร (reactive)-Class 3 มีความสามารถในการระเบิดได้ด้วยตัวเอง ซึ่งอาจเกิดจาก ปฏิกิริยาการสลายตัวหรือปฏิกิริยาการระเบิด และที่ระดับนี้สารจะมีว่องไวต่ออุณหภูมิและกลไก ที่อุณหภูมิสูงขึ้น
>91%	ตัวอย่าง Examples	เชื้อเพลิงขับเคลื่อนจรวด Rocket propellant
	ระดับ Rating(s)	Oxidizer - Class 4 สมารถเกิดการระเบิดเมื่อมีการสัมผัสกับความร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11 การตกค้างของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในนม

การตกค้างของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในนมนั้น เกิดจากกระบวนการฆ่าเชื้อ เช่น การพาสเจอไรซ์ (pasteurization) การทำสเตอริไลซ์ (sterlirization) เป็นต้น กล่าวคือกระบวนการฆ่าเชื้อเหล่านี้ เป็นกระบวนการที่ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการฆ่าเชื้อในการอาหารแล้วเกิดการตกค้างไม่สามารถนำออกได้หมด จึงทำให้เกิดการตกค้างของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในนม

ประเทศสหรัฐอเมริกากำหนดให้มีปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ตกค้างต้องต่ำกว่า 0.05% ของน้ำหนักนม

2.12 Horseradish peroxidase (HRP)

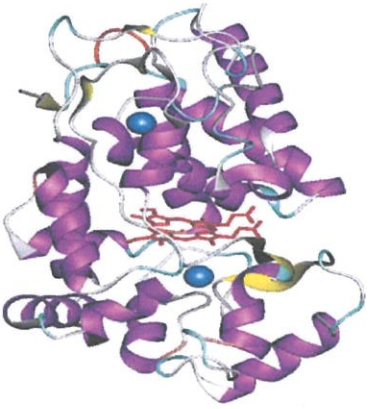
ฮอสเซราดิกเปอร์ออกซิเดส (horseradish peroxidase) นั้นสามารถสกัดได้จากต้นมะรุม ทำหน้าที่ตรวจวัดสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยวัดจากความยาวคลื่นที่เปลี่ยนไปของสารที่นำมาวิเคราะห์

รูปที่ 2.7 ต้นมะรุม (Horseradish)

2.13 โครงสร้างของ Horseradish peroxidase

โครงสร้างส่วนใหญ่ของเอนไซน์จะประกอบด้วย แอลฟา-เฮลิคอล (α-Helical : สีม่วง) และมีบางส่วนเป็น เบต้า-ชีท (β-sheet : สีเหลือง) ดังรูปที่ 2.7 มีสองโดเมน (domains) คือส่วนปลาย (distal) และส่วนต้น(proximal) โดยตรงกลางจะเป็นที่อยู่กลุ่มของฮีม (heme group : สีแดง) โดยโดเมนแต่ละส่วนจะบรรจุ แคลเซียมอะตอม (calcium atom : ทรงกลมสีน้ำเงิน) อยู่ภายในเอนไซน์

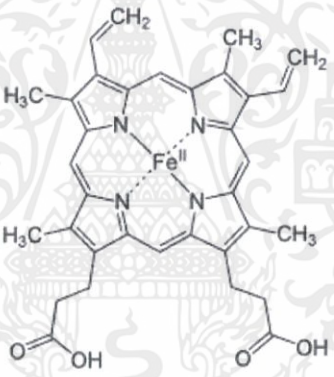
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 โครงสร้าง 3 มิติของ

Horseradish peroxidase

โดยกลุ่มของฮีม (heme group) คือกลุ่มสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเหล็ก (iron) กับพอร์-ไฟริน (porphyrin) ด้วยพันธะโคออดิเนตโควาเลนต์ (coordinate covalent) ซึ่งเป็นพันธะที่เกิดจากการที่อิเล็กตรอนคู่ของอะตอมหนึ่งถูกนำไปให้กับอีกอะตอมหนึ่งร่วมใช้ด้วย โดยพวกโลหะ (metal) จะทำหน้าที่เป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาของเอนไซน์

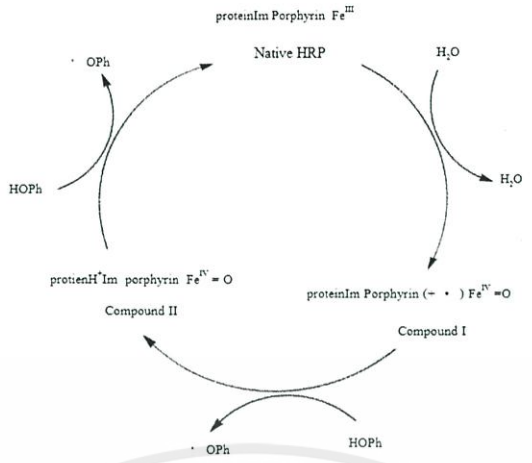


รูปที่ 2.9 โครงสร้างกลุ่มของฮีม

2.14 Horseradish peroxidase cycle

Horseradish peroxidase cycle นั้น เป็นวัฏจักรปฏิกิริยาเบื้องต้นสำหรับเปอร์ออกซิเดส โดยจะมีขั้นตอนดังนี้ เริ่มต้น HRP ถูกออกซิไดซ์นำเอาอิเล็กตรอนออกไป 2 ตัว ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) กลายเป็นสารประกอบ1 (compound I) จากนั้นสารประกอบ1 จะรับอิเล็กตรอนจากสับสเตรตจำพวกฟีนอล (phenols) หรืออะโรมาติกเอมีน (aromatics amine) เปลี่ยนเป็นสารประกอบ2 (compound 2) จากนั้นสารประกอบ2 จะรับอิเล็กตรอนอีกครั้งเปลี่ยนสภาพกลับเป็นเอนไซน์ตัวเดิม ดังรูปที่ 2.9

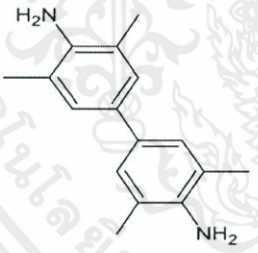
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



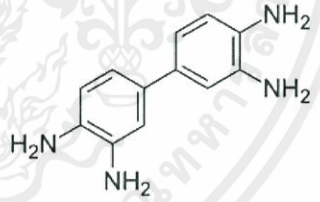
รูปที่ 2.10 วัฏจักรของปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดสที่ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และฟีนอลเป็นออกซิไดซิ่งและรีดิวซิ่งซับสเตรต

2.15 โครโมเจนิกสับสเตรต (chromogenic substrate)

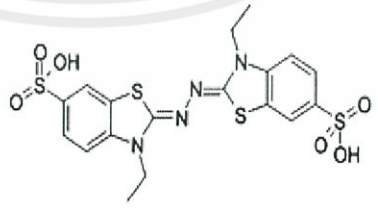
โครโมเจนิกสับสเตรต คือ สารที่ทำปฏิกิริยาจับกับเอนไซน์ โดยจะเพิ่มหรือลดความสามารถในการดูดซับแสงที่มีความยาวคลื่นเฉพาะของตัวสับสเตรตก่อนที่จะเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ (product) สำหรับโครโมเจนิกสับสเตรตที่ใช้สำหรับฮอสเซราดิกเปอร์ออกซิเดสได้แก่ TMB , DAB , ABTS



(1)



(2)

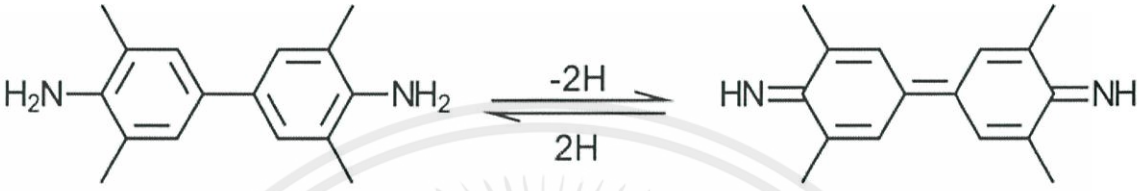


(3)

รูปที่ 2.11 โครงสร้างของ 1) 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine 2) 3,3'-Diaminobenzidine 3) 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดย TMB นั้นเป็นสารที่นิยมใช้เป็นสับสเตรตสำหรับฮอกเซราดิกเปอร์ออกซิเดส ทำงานโดยตรวจจับการเปลี่ยนสีของผลิตภัณฑ์ ที่เปลี่ยนจากสีฟ้า (ค่าการดูดกลืนแสง = 650 nm) เป็นสีเหลือง (ค่าการดูดกลืนแสง = 450 nm) TMB ทำหน้าที่เป็นสารให้อิเล็กตรอน (electron donor) สำหรับปฏิกิริยารีดักชั่นของไฮโดรเจนต์เปอร์ออกไซด์ไปยังน้ำของเอนไซน์เปอร์ออกซิเดส เช่น HRP



3,3',5,5'-tetramethylbenzidine 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine diimine

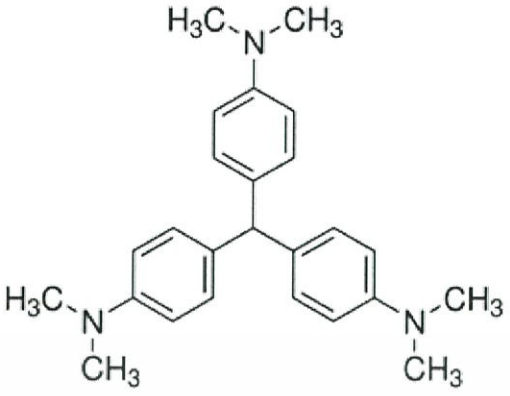
รูปที่ 2.12 แสดงการออกซิเดชั่นของ 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) to 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine diimine

ซับสเตรทอีกตัว ที่นิยมใช้กับสำหรับฮอสเซราดิกเปอร์ออกซิเดสคือ Lueco crystal voiolet โดยLCV นั้นเป็นสารที่นิยมเป็นสีย้อมสำหรับตรวจคราบเลือดหรือใช้ในด้านชีววิทยาเช่น การตรวจหาแบคทีเรีย ใช้เป็นสับสเตรตสำหรับฮอกเซราดิกเปอร์ออกซิเดส ทำงาน โดยตรวจจับการเปลี่ยนสีของผลิตภัณฑ์ โดยจะตรวจวัดที่ความเข้มแสง = 590 nm (สีม่วง) ทำหน้าที่เป็นสารให้อิเล็กตรอน (Electron donor) สำหรับปฏิกิริยารีดักชั่นของไฮโดรเจนต์เปอร์ออกไซด์ไปยังน้ำของเอนไซน์เปอร์ออก-ซิเดส เช่น HRP

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

$$H_2O_2 + 3\ C_6H_5N(CH_3)_2 \longrightarrow CH(C_6H_4N(CH_3)_2)_3 + H_2O$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.13 แสดงโครงสร้างของ Leuco Crystal Violet

2.15.1 ข้อควรระวังในการใช้งาน

LCV ควรจะเก็บให้ห่างจากแสงแดดเพราะเป็นสารที่ไวต่อแสง (เก็บในขวดสีชา) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ถ้าเป็นสารละลายแล้วควรเป็นไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 C

TMB ควรจะเก็บให้ห่างจากแสงแดดเพราะมันไวต่อแสง เช่นเก็บในขวดสีชา และไม่ควรเก็บในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งจะทำให้สารจับเป็นเกล็ดน้ำแข็ง เนื่องจากใช้ DMSO ในการละลาย

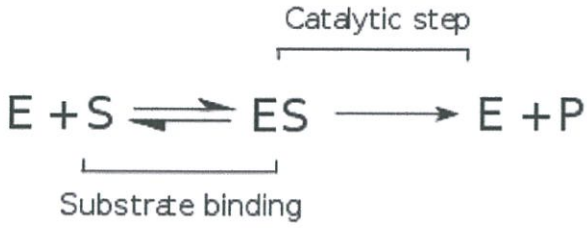
2.16 เอนไซม์

เอนไซม์ (enzyme) คือ ตัวเร่งที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาที่เกิดในสิ่งมีชีวิต (biocatalyst) ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้นถึง 10^{8}-10^{14} ปฏิกิริยาเดิมที่ไม่มีเอนไซน์เป็นตัวเร่ง ในปฏิกิริยาที่มีเอนไซน์เป็นตัวเร่งนั้น สารที่เข้าทำปฏิกิริยากัน (reactant) มีชื่อว่าสับสเตรต (substrate) โดยส่วนใหญ่แล้วเอนไซน์ชนิด หนึ่ง ๆ จะสามารถเร่งปฏิกิริยาที่มีสับสเตรตชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะเท่านั้นนั่นคือ
เอนไซม์เป็นตัวเร่งที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรต

2.17 กลไกการทำงานของเอนไซม์

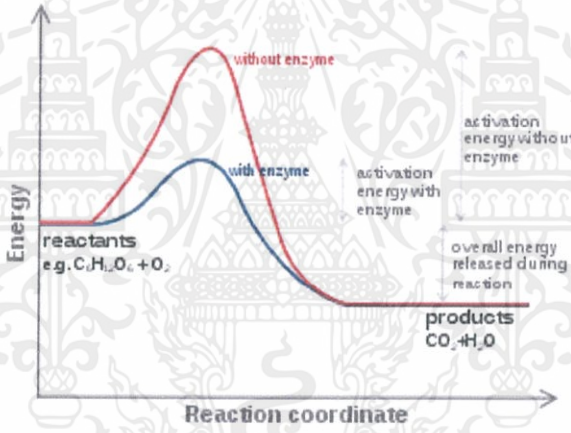
เอนไซม์ (enzyme : E) ทำปฏิกิริยากับสาร (substrate : S) จะได้สารโมเลกุลเชิงซ้อน (Enzyme-substrate complex : ES) ซึ่งจะแตกตัวเป็นสารโมเลกุลเล็ก เรียกว่าผลิตภัณฑ์ (product : P) และเอนไซม์ตามเดิม โดยเอนไซม์จะเป็นอิสระและสามารถทำปฏิกิริยากับ สารอาหาร (Substrate : S) ได้อีกสมการด้านล่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.14 กลไกการทำงานของเอนไซน์

โดยเอนไซม์จะทำให้อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากเอนไซน์จะไปจับกับซับสเตรต ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณพลังงานอิสระของการกระตุ้น (activated energy) ที่ปฏิกิริยานั้นต้องการในการทำปฏิกิริยาให้น้อยลง ดังแสดงในรูปที่ 2.13 แต่ไม่เปลี่ยนแปลงผลต่างของพลังงานอิสระระหว่างสารตั้งต้นกับผลิตภัณฑ์ จึงไม่มีผลต่อจุดสมดุลของปฏิกิริยา



รูปที่ 2.15 การเปลี่ยนแปลงพลังงานอิสระของปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซน์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

2.18 ประเภทของเอมไซม์ตามชนิดของปฏิกิริยา

ได้มีการแบ่งออกเป็น 6 จำพวก ตามชนิดของปฏิกิริยาที่เอนไซน์นั้นเร่ง โดยกำหนดเป็นรหัสประจำตัวเอนไซน์ (code number) ซึ่งจะแบ่งเป็น 6 ชุด ดังตารางแสดงจำพวกของเอนไซน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 ตารางรหัสประจำตัวเอนไซน์ (code number)

ตัวเลขชุดแรก (First digit)	พวกของเอนไซน์ (Enzyme class)	ชนิดของปฏิกิริยาที่ถูกเร่งด้วยเอนไซน์ (Type of reaction catalyzed)
1	ออกซิโดรีดักเทส (Oxidoreductases)	ปฏิกิริยาออกซิเดชั่น/รีดักชั่น (Oxidation/reduction reactions)
2	ทรานสเฟอเรส (Transferases)	ปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายอะตอมหรือหมู่ที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลสองโมเลกุล
3	ไฮโดรเลส (Hydrolases)	ปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส (hydrolytic reactions)
4	ไลเอส (Lyases)	ปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่ต่างๆ ออกจากสับสเตรต (ไม่ได้เกิดวิธีไฮโดรไลซีส)
5	ไอโซเมอเรส (Isomerases)	ปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชั่น (Isomerisation reactions)
6	ไลเกส (Ligases)	ปฏิกิริยาการเชื่อมโมเลกุลสองโมเลกุล ซึ่งจะควบคู่ (couple) กับการแตกออกของพันธะไพโรฟอสเฟต(pyrophosphate) ที่มีอยู่ในนิวคลีโอไซด์ไทรฟอสเฟต (nucleoside triphosphate)

ส่วนตัวเลขชุดที่สองและชุดที่สามของรหัสเอนไซม์ จะบอกถึงชนิดของปฏิกิริยาที่ถูกเร่ง สำหรับชุดตัวเลขที่สี่จะช่วยแยกเอนไซน์ที่เร่งปฏิกิริยาคล้ายกันออกจากกัน เช่น ฮอสเซราดิกเปอร์ออกซิเดส มี EC. Number เท่ากับ 1.11.1.7 แสดงว่าเป็นเอนไซน์จำพวกออกซิโดรีดักเทส (oxidoreductase) เป็นเอนไซน์ที่เร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายอะตอมของไฮโดรเจน อะตอมออกซิเจน หรืออิเล็กตรอนจากสับสเตรตหนึ่งไปอีกสับสเตรตหนึ่ง

2.19 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

1. อุณหภูมิ อัตรา การทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น จนถึงระดับหนึ่ง การทำงานของเอนไซม์จะมีอัตราการทำงานสูงสุด แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่านี้อัตราการทำงานกลับลดลง เพราะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อเอนไซม์ทั่วไปประมาณ 25-40 C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ความเป็นกรด-เบสหรือ pH pH มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เพราะเอนไซม์จะคงสภาพอยู่ได้ในช่วง pH ที่จำกัดเท่านั้น เอนไซม์โดยทั่วไปทำงานได้ดีที่ pHประมาณ 6-7.5 ยกเว้นเพปซินทำงานได้ดีที่ pH ประมาณ 2

3. ปริมาณของเอนไซม์และสับสเตรต ถ้าปริมาณของเอนไซม์และสับสเตรตเพิ่มขึ้นปฏิกิริยาจะเกิดเร็วขึ้น ในทางตรงกันข้ามหากมีปริมาณลดลง ปฏิกิริยาจะเกิดช้าลง แต่ถ้าเพิ่มเฉพาะปริมาณของสับเสตรตขึ้นเรื่อยๆ ส่วนปริมาณของเอนไซม์ไม่เพิ่ม อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นจนถึงระดับหนึ่ง อัตราของปฏิกิริยาจะคงที่

4. ตัวยับยั้งเอนไซม์ โดย ทั่วไปสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มักมีรูปร่างโมเลกุลคล้ายกับสับสเตรต ดังนั้นสารยับยั้งเอนไซม์จึงสามารถแย่งสับสเตรตจับที่บริเวณเร่ง(Active site) ของเอนไซม์ได้ ทำให้สับสเตรตจับกับเอนไซม์ได้น้อยลง ปฏิกิริยาจึงเกิดช้าลง

5. โคแฟกเตอร์ เอนไซม์หลายชนิดจะทำงานได้ดีต้องมีตัวร่วมในการทำงาน โคแฟกเตอร์อาจจะเป็นไอออนของโลหะ เช่น Zn^{2+} Mg^{2+} Cu^{2+} หรืออาจเป็นสารอื่นๆ ซึ่งถ้าเป็นสารอินทรีย์มักจะเรียกว่า ตัวร่วมเอนไซม์หรือโคเอนไซม์ เช่นNAD^{+} FAD^{+}

2.20 เทคนิคไอโอโดเมทรี

การไทเทรตที่เกี่ยวข้องกับการใช้ไอโอดีน จะมีชื่อเฉพาะเรียกว่า ไอโอดิเมททรี (iodimetry) และ ไอโอโดเมททรี (iodometry) ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจัดเป็นปฏิกิริยารีดอกซ์ ทีมีไอโอดีนเป็นตัวออกซิไดซ์ และการไทเทรตที่เกี่ยวข้องกับไอโอดีนมีได้ 2 แบบ คือ

การไทเทรตโดยตรง (direct method) หมายถึง ไอโอดิเมทรี (iodimetry) คือการไทเทรตสารที่ต้องการวิเคราะห์ ด้วยสารละลายมาตรฐานไอโอดีน(จากสารละลายไอโอดีนละลายในโพแทสเซียมไอโอไดด์) และปริมาณของสารสามารถหาได้จากการไทเทรตโดยตรง

การไทเทรตโดยอ้อม (indirect method) เรียกว่า ไอโอโดเมทรี(iodometry) คือการไทเทรตไอโอดีนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างสารที่สนใจไปออกซิไดส์สารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ และปริมาณของไอโอดีนที่เกิดขึ้น นำมาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต

2.21 หลักการการตกตะกอนในนม

โปรตีนสามารถละลายอยู่ในน้ำได้มีเหตุผลหลักสองประการคือ โมเลกุลของโปรตีนมีส่วนที่ชอบน้ำ สามารถเกิดแรงกริยากับน้ำได้เรียกส่วนนี้ว่า hydrophobic patches สามารถเกิดแรงดึงดูดทางไฟฟ้าเอาโมเลกุลของน้ำมาล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีนได้ อีกสาเหตุหนึ่ง คือบนโมเลกุลของโปรตีนมีประจุไฟฟ้าสุทธิ (electrostatic repulsion) สูงกว่าแรงดึงดูดไฟฟ้าสถิต ทำให้โมเลกุลของโปรตีนอยู่ห่างกัน จึงไม่สามารถรวมตัวเข้ามาอยู่ใกล้กันแล้วตกตะกอนลงมาได้ ดังนั้นปัจจัยใดก็ตามที่สามารถเพิ่มปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนด้วยกันเอง (protein - protein interaction)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือการลดปฏิกริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและน้ำ (protein - water interaction) ทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีนลดลง ทำให้โปรตีนตกตะกอนในที่สุด สำหรับการตกตะกอนโปรตีนโดยวิธีที่ไม่ทำให้เกิดการเสียสภาพ ได้แก่

1.1) การตกตะกอนที่ค่าจุดไอโซอิเลคทริค (isoelectric pH) เรียกวิธีการนี้ว่า Isoelectric Precipitation

1.2) การตกตะกอนโปรตีนโดยการเพิ่มความแรงไอออน ด้วยวิธีการตกตะกอนแบบลำดับส่วนด้วยเกลือ (ionic strength หรือ salt fractionation precipitation)

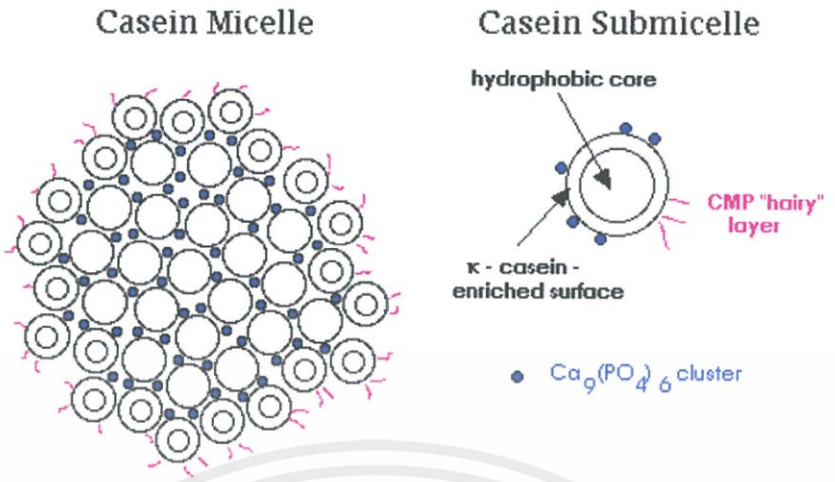
1.3) การตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิต่ำ (organic solvent precipitation) บนโมเลกุลของโปรตีนสามารถแบ่งส่วนที่สำคัญที่เกี่ยวของกับการตกตะกอนได้เป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำ สามารถเกิดแรงดึงดูดกับน้ำได้ดี (hydrophobic patches) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ(hydrophillic patches) การกระจายตัวของทั้งสองส่วน

2.22 โปรตีนในน้ำนม

โปรตีนในน้ำนมวัวแบ่งออกเป็น 2 ชนิดหลักคือ เคซีนและโปรตีนเวย์ โดยเคซีนเป็นฟอสโฟโปรตีน (phosphor protein) มีปริมาณร้อยละ 78 ของโปรตีนทั้งหมด ตกตะกอนที่พีเอช 4.6 หรือตกตะกอนด้วยเอนไซม์เรนนิน (rennin) หรือตกตะกอนในสารละลายอิ่มตัวของโซเดียมคลอไรด์ (Sodium choride)

เคซีนมี 3 ชนิดคือ แอลฟา–เคซีน บีตา–เคซีน และแคปปา–เคซีน โดยแอลฟา-เคซีนมีร้อยละ 50 ของเคซีน บีตา-เคซีนมีร้อยละ 33 ของเคซีน เคซีนทั้งสองชนิดไม่ละลายในน้ำ ส่วนแคปปา-เคซีนมีประมาณร้อยละ 15 ของเคซีนทั้งหมดละลายได้ดีในน้ำ เคซีนทั้ง 3 ชนิดจะเรียงตัวกันเป็นหมู่เรียกว่า ไมเซลล์ โดยภายในไมเซลล์จะมีไมเซลล์ย่อย (sub micells) ที่เชื่อมกันด้วยแคลเซียมฟอสเฟต อยู่ในสภาพแขวนลอยอยู่ในน้ำนม และมีเสถียรภาพต่อความร้อนและความเข้มข้นคือหากน้ำนมถูกระเหยจนเข้มข้นโปรตีนเคซีนก็ยังมีเสถียรภาพอยู่ไม่ตกตะกอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.16 แสดงลักษณะของเคซีนในน้ำนมอยู่ในสภาพที่เป็น Micelle

การตกตะกอนของเคซีนเกิดจากสาเหตุต่างๆ คือ การเติมกรดจนมีพีเอช 4.6 ซึ่งจะทำให้เคซีนไม่มีประจุไฟฟ้าจะเกิดการตกตะกอน หรือการเติมเอนไซม์เรนนิน ซึ่งจะไฮโดรไลซิสแคปปาเคซีน ทำให้หมู่ที่ไม่ชอบน้ำที่อยู่ด้านในของแคปปา-เคซีนเกิดแรงกระทำไฮโดรโฟบิกจนตกตะกอนจึงมีการนำสมบัติดังกล่าวไปใช้ในการแปรรูปน้ำนมให้เป็นโยเกิร์ตและเนยแข็ง

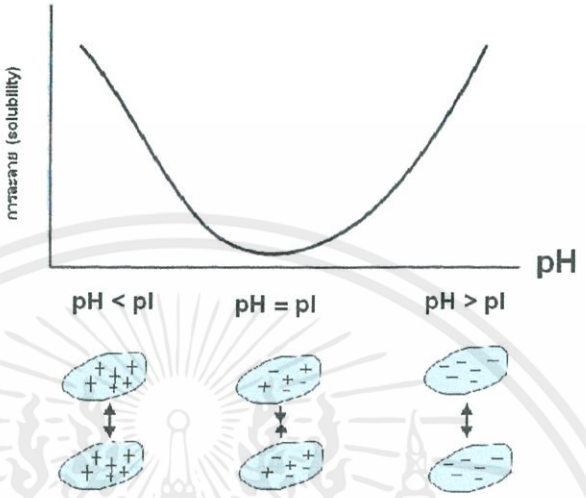
โปรตีนเวย์หลังจากการตกตะกอนของเคซีนออกจากน้ำนมแล้ว ส่วนที่เป็นของเหลวที่เหลือเรียกว่า เวย์ (whey) โปรตีนหลักในเวย์ประกอบไปด้วยบีตา-แลกตัลบูมินและแอลฟา-แลกตัล-บูมิน บีตาแล็ก-ตัลบูมินมีโครงสร้างโมเลกุล มีเสถียรภาพที่พีเอชต่ำกว่า 3.5 และสูงกว่า 7.5 แต่ที่พีเอชในช่วง 3.5 ถึง 7.5 หรือน้ำนมมีพีเอชสูงกว่า 8.6 จะทำให้น้ำนมตกตะกอนจึงทำให้กระบวนการฆ่าเชื้อในน้ำนมเป็นแบบพาสเจอร์ไรเซชัน หรือแบบยูเอชที (ultra high heat treatment, UHT)

2.23 ปัจจัยที่มีผลต่อ การแขวนลอย และการตกตะกอนของโปรตีนได้แก่

การปรับ pH ให้เท่ากับจุดไอโซอิเลกทริก (isoelectric point) คือ pHที่ประจุรวมของกรดอะมิโน (amino acid) หรือโปรตีน (protein) เป็นศูนย์ เนื่องจากโมเลกุลของ กรดอะมิโน และโปรตีน มีทั้ง หมู่อะมิโน (amino group) ที่เป็นเบสอ่อน และหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ที่เป็นกรดอ่อน รวมถึง หมู่ R ที่เป็นได้ ทั้งที่มีขั้ว หรือมี ประจุบวกหรือ ประจุลบ ทำให้กรดอะมิโนเป็นได้ทั้งกรด และเบส ขึ้นอยู่กับ pH กรดอะมิโนที่พบในธรรมชาติ มีประจุรวมเป็นลบ (negative charge) ซึ่งประจุลบที่เหมือนกันจะเกิดแรงจะผลักกัน ทำให้กรดอะมิโนแขวนลอยหรือละลายในน้ำได้ หากมีการปรับ pH ของกรดอะมิโนให้ลดลง เท่ากับจุดไอโซอิเลกทริก ซึ่งประจุรวมของกรดอะมิโนเป็นศูนย์ แรงผลักกันระหว่างประจุที่เหมือนกันจะลดลง ประจุบวกและลบที่มีอยู่เท่าๆกัน ณ. จุดนี้จะดูดกัน มีผลให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติ (protein denaturation) และตกตะกอน

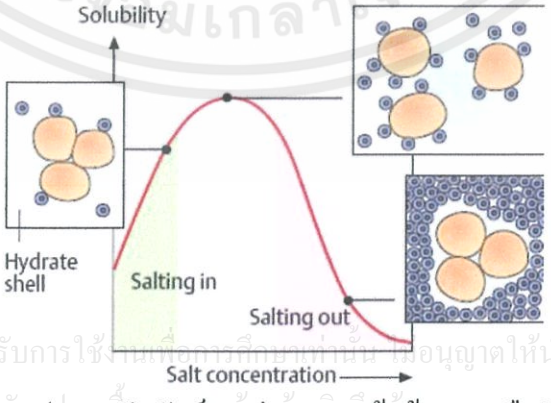
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(precipitation) ถึงแม้กรดอะมิโนบางชนิดจะยังละลายได้ แต่ pH ที่จุดนี้กรดอะมิโนจะมีการละลายได้น้อยที่สุด ถ้าหากปรับ pH ของโปรตีนต่ำกว่าจุดไอโซอิเลกทริก จะทำให้กรดอะมิโนมีประจุรวมเป็นบวก (positive charge)



รูปที่ 2.17 แสดงลักษณะกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH กับ ค่าการละลาย

การเติมเกลือ ในสารละลายโปรตีน ก็ทำให้โปรตีนตกตะกอนได้เช่นเดียวกับการปรับ pH เพราะเกลือแตกตัวเป็นประจุบวกและประจุลบและรวมตัวกับ โปรตีน การเติมเกลือปริมาณน้อยๆ อาจทำให้โปรตีนละลายได้มากขึ้นหรือจับกับน้ำได้ดีขึ้น (salting in) และจะละลายได้ดีขึ้นจนถึงจุดสูงสุด แต่หากสารละลายเกลือเข้มข้นมากขึ้น ก็จะทำให้โปรตีนตกตะกอน (salting out) ตัวอย่างการตกตะกอนของโปรตีนด้วยสารละลายเกลือ คือ การผลิตเต้าหู้ ซึ่งได้จากการเตรียมน้ำนมถั่วเหลือง แล้วตกตะกอนโปรตีนที่แขวนลอยอยู่ในน้ำนมถั่วเหลืองด้วยเกลือ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.18 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของเกลือกับค่าการละลาย

2.24 การเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์แบบต่างๆ

ตารางที่ 2.4 แสดงการเปรียบเทียบ ข้อดี ข้อเสียของแต่ละวิธี

	Biocompatible chitosan membrane	Iodometric Titration	Peroxidase Enzyme	Fluorometric
วิธีการตรวจวัด	chemiluminesence	Colour comparison	Colour comparison	fluorescent
ช่วงที่ตรวจวัดได้ (mg/L)	4	3-100	0.5-2.5	5.0
ตัวรบกวน	ไม่มีการรบกวน	oxidizing agents หรือ reducing agents	ไม่มีการรบกวน	มีรบกวนการขึ้นอยู่กับ substanceที่ใช้
ความง่ายในทดลอง	ง่าย	ง่าย	ง่าย	ง่าย
ความคิดเห็น	ตรวจวัดได้เร็ว ง่ายมีความจำเพาะสูง	ตรวจวัดได้คร่าวๆและมีผลต่อการรบกวน	ตรวจวัดได้คร่าวๆและไม่มีความแม่นยำ	ตรวจวัดในเชิงปริมาณได้ผลที่ดี เร็ว และประหยัด

2.25 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

M.E. Abbas[a], Wei Luo[a], Lihua Zhu[a], Jing Zoub, Heqing Tanga, ,Food Chemistry 120 (2010), 327–331 ได้ทำการศึกษาการวัดการเรืองแสงหาปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในนม โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาเฟนตัน โดยงานวิจัยนี้จะศึกษาเพื่อหาวิธีที่ง่ายและเซนซิทีฟที่ดีเพื่อใช้ในวิธีฟลูออโรเมตริก (fluorometric) สำหรับหาปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในนม ในงานวิจัยนี้ คูมารีน (coumarin) ที่ไม่เรืองแสงจะถูกออกซิไดซ์กลายเป็นไฮดรอกซิลคูมารีน (hydroxycoumarin) ที่เรืองแสงได้ดี ด้วยไฮดรอกซิล แรดิเคิล (hydroxyl radicals) ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาเฟนตัน โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นมีค่าการเรืองแสงที่สูง และสามารถใช้ฟลูออเรสเซนท์โพรบสำหรับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม วิธีการนี้จะใช้TCAเป็นตัวช่วยตกตะกอนของโปรตีนนมตัวอย่างทำให้สารละลายใส่ไม่รบกวนการดูดกลืนแสงของสาร โดยงานวิจัยนี้จะได้ค่าต่ำสุดในการตรวจวัดหาความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (detection limit) ได้สูงและมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความจำเพาะของสารมาก สามารถนำงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้เพื่อหาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในนมด้วยผลลัพธ์ที่น่าพอใจ

Akio Sakuragawa, Tetsuyuki Taniai, Tadao Okutani. Analytica Chimica Acta 374 (1998) 191±200 ได้ทำการศึกษาการวัดการเรืองแสงเพื่อหาปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเอนไซน์ที่ถูกยึดเกาะ จากฮอสเซราดิกเปอร์ออกซิเดสและไซโทซานบีท (chitosan beads) โดยงานวิจัยนี้จะศึกษาเกี่ยวกับ เอนไซน์ยึดเกาะ(immobilized enzyme) ที่ถูกสร้างขึ้นซึ่งประกอบด้วยไซโทซานบีทเป็นตัวถูกยึดเกาะ (carrier) และฮอสเซราดิกเปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่สามารถนำไปใช้เพื่อหาปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสารตัวอย่างจากธรรมชาติได้ โดยเอน-ไซน์จะทำการยึดเกาะผ่านตัวยึดเกาะด้วย bridging method ด้วยกูลทารัลดีไฮไดร์ (glutaradehyde) โดยปฏิกิริยาการยึดเกาะเป็นปฏิกิริยาที่ง่ายและเกี่ยวข้องกับการเตรียมในสภาวะที่เป็นกลางด้วยวิธีการยึดเกาะอื่นๆ เช่น glass-amino beads โดย immobilized enzyme นั้นจะใช้สำหรับการตรวจวัดการเรืองแสงเพื่อหาปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยใช้ 3-(p-hydroxyphenyl)propionic acid เป็นสับสเตรตที่เรืองแสงโดยการทำแบบครั้งเดียว (batch method) โดย immobilized enzyme สามารถนำกลับมาใช้ได้หลายครั้งเพื่อหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอนไซน์นี้สามารถใช้ได้ 7 วันเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศา มีค่าต่ำสุดในการตรวจวัดเท่ากับ 50 ng cm^{-3}

Corey A.Cohn,Aimee Pak, Dniel Strongin, Martin A. Schoonen.Geochemical Transactions 6 (2005) Quantifying hydrogen peroxide in iron-contaning solution using leucocrystal violet การหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสารละลายเหล็ก โดยใช้ ลิวโคคริสตัลไวโอเล็ต ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เจือปนอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติและน้ำเสียจำนวนมาก โดยใน Fe(II) จะสลายตัวอยู่ในรูปแบบ hydroxyl radicals เป็นจำนวนมาก ด้วยเหตุนี้ ไฮโดรเจน-เปอร์ออกไซด์ ใน Fe(II) จึงเป็นเรื่องยากที่จะตรวจสอบเพราะมีช่วงชีวิตที่สั้น เราจะแสดงการหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ปริมาณโดยการใช้เทคนิค ลิวโคคริสตัลไวโอเล็ต (LCV) ในการหาของความเข้มข้นกรดและเหล็กที่แตกต่างกัน ใน biocatalyst peroxidase LCV จะเป็นตัวออกซิไดซ์ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยจะเกิดไอออนสีม่วง (cv^{+}) ที่เสถียร การใช้ลิวโคคริสตัลไวโอเล็ต เป็นวิธีมาตรฐานและเป็นเครื่องมือในการช่วยตรวจสอบระดับความเข้มข้นที่ต่ำของ microM ผลจากการศึกษาค่า pH จะขึ้นกับการออกซิเดชันที่มากที่สุดของ LCV ที่ pH 4.3 โดยจะละลาย Fe(II) ด้วย EDTA ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะเสถียรสำหรับการวิเคราะห์ ผลการทดลองจะบอกถึงปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความหนาแน่นของผิวน้ำ โดยความหนาแน่นของผิวน้ำจะแสดงออกมาโดยขึ้นอยู่กับปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ใน EDTA เท่านั้น โดย chelates จะละลาย Fe(II) โดยให้ cv^{+} มีความเสถียรวิธีนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการทำงานที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งวิเคราะห์
2. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
3. บิวเรต ขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมขาตั้ง
4. หลอดหยด
5. เครื่องให้ความร้อนพร้อมกับปั่นกวน และแท่งแม่เหล็ก
6. ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
   ขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร
7. บีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร
   บีกเกอร์ ขนาด 250 มิลลิลิตร
8. ขวดสีชา

3.2 สารเคมี

1. สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 1 %w/v ($Na_2S_2O_3.5H_2O$)
2. สารละลายโพแทสเซียมไอโอเดต 1/60 (KIO_3)
3. สารละลายโพแทสซียมไอโอไดด์ ร้อยละ 10 (KI)
4. น้ำแป้งเพื่อใช้เป็นอินดิเคเตอร์
5. สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$)
6. สารละลายกรดซัลฟูริก (H_2SO_4)
7. 0.2 M Potassium phosphate buffer at a pH of 7.0
8. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.0017 โมลาร์
9. Horseradish Peroxidase (HRP)
10. Tetramethylbenzidine (TMB)
11. เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase)
12. สารละลาย Leuco crystal violet ($C_{25}N_3H_{30}Cl$)
13. สารละลาย Acetate buffer pH 4.5
14. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)
15. สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก 20 % w/v (TCA)
16. โซเดียมอะซิเตรต 0.1 โมลาร์ (CH_3COONa)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17. อะซิติกเอซิต 0.01 โมลาร์ (CH_3COOH)
18. สารละลาย ซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 5.0

3.3 การเตรียมสาร

1. สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 1 %w/v ($Na_2S_2O_3.5H_2O$)

   ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 0.1 กรัม (Na_2CO_3) ละลายด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา

2. สารละลายโพแทสเซียมไอโอเดต 1/60 (KIO_3)

   ชั่งโพแทสเซียมไอโอเดต 0.073 กรัม (KIO_3) ละลายด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อยปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นคำนวณหาความเข้มข้น

3. สารละลายโพแทสซียมไอโอไดด์ ร้อยละ 10 (KI)

   ชั่งโพแทสเซียมไอโอไดด์ 10 กรัม (KI) ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

4. น้ำแป้ง

   ชั่งแป้ง 1.0 กรัม มาละลายน้ำกลั่นเล็กน้อย คนให้เปียกเทน้ำร้อนเดือด 100 มิลลิลิตร ลงไปแล้ว คนให้แป้งละลาย ต้มสารละลายที่ได้ 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเติมโพแทสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัมลง ไปคนให้เข้ากัน เก็บในขวดที่มีจุกปิด

5. สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต

   ชั่งแอมโมเนียมโมลิบเดต 9 กรัม มาละลายด้วย แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 10 มิลลิลิตร (NH_4OH) จากนั้นเติมแอมโมเนียมไนเตรต 24 กรัม (NH_4NO_3) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

6. สารละลายกรดซัลฟูริก

   เจือจางกรดซัลฟูริกด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:4

7. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.0017 โมลาร์

   เตรียมโดยเติม 1 มิลลิลิตรของ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 30 ลงในน้ำกลั่น จากนั้นเจือจาง 1 มิลลิลิตรของสารละลายที่ 50 มิลลิลิตรด้วย 0.2 โมลาร์ บัฟเฟอร์ฟอสเฟตโพแทสเซียม

8. สารละลาย Leucocrystal violet (LCV)

   เตรียมโดยละลายลิวโคคริสตัลไวโอเลต 31 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการเค็บแล้ว 30 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.25 นอมอล์ ปริมาตร 19.2 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ไว้ที่ความเย็น 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. สารละลายฮอสเซราดิกเปอร์ออกซิเดส (HRP)

เตรียมโดยละลาย HRP 1.490 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศา 18.37 มิลลิลิตรเก็บสารละลายที่ได้ไว้ที่ความเย็น 4 องศาเซลเซียส

10. สารละลายอะซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.5

เตรียมโดยผสมสารละลายโซเดียมอะซิเตรตความเข้มข้น 2 โมลาร์ และกรดอะซิติกความเข้มข้น 2 โมลาร์ ในปริมาตรที่เท่ากัน จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 4.5 ด้วยกรดอะซีติก เก็บสารละลายที่ได้ไว้ที่ความเย็น 4 องศาเซลเซียส เตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตรตความเข้มข้น 2 โมลาร์ โดยชั่งสารมา 27.20 กรัมละลายด้วยน้ำแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร และเตรียมกรดอะซิติกความเข้มข้น 2 โมลาร์ โดยปิเปตสารละลายมา 12 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ 100 มิลลิลิตร

11. สารละลายไฮโดรเจนต์เปอร์ออกไซด์ เตรียม 3,000 มิลลิกัม/ลิตร (0.3%)

สต็อกสารละลาย ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยเจือจางไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 30 ด้วยน้ำกลั่น

12. โซเดียมอะซิเตรต 0.1 โมลาร์

เตรียมโดยชั่ง โซเดียมอะซิเตรต มาจำนวน 1.3680 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

13. อะซิติกเอซิต 0.1 โมลาร์

เตรียมโดยปิเปตอะซิติกแอซิตมา 0.60 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

14. อะซิติกเอซิต 0.01 โมลาร์

เตรียมโดยปิเปตอะซิติกเอซิต 0.1 โมลาร์ที่เตรียมไว้แล้วมา 10 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

15. สารละลายซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 5.0

1. เตรียมกรดซิตริก โดยชั่งกรดซิตริกมา 19.2 กรัมปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

2. เตรียมไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟส 53.65 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

ผสมสารละลาย[1] และสารละลาย[2] ตาม pH ที่ต้องการ (ในที่นี้ใช้ pH 5.0)โดยใช้สารละลาย[1] ปริมาตร 24.3 มิลลิลิตร และสารละลาย[2] ปริมาตร 25.7 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17.สารละลายเตรตระเมทิลเบซิดีน (TMB)

เตรียม 0.05 โมลาร์ ของสารละลาย ซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 5.0 ชั่ง TMB 0.1 กรัม แล้วละลาย TMB ด้วยสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 10 ml เติม TMB 10 ไมโครลิตร ในสารละลาย ซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 5.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30% ปริมาตรเท่ากับ 2 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน

3.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่าง

วิธีตกตะกอนที่จุดไอโซอิเลคทริค

เติมกรดลงไปให้สารละลายนมให้มี pHเท่ากับ 4.6 จะทำให้เคซีนในนมที่ไม่มีประจุไฟฟ้าจะเกิดการตกตะกอนของโปรตีนขึ้น

1. โดยผสมสารละลายตามอัตราส่วนข้างล่างเพื่อหาความเหมาะสม

ตารางที่ 3.1 อัตราส่วนการผสมสารละลายด้วยวิธีการตกตะกอนที่จุดไอโซอิเลคทริค

สารละลาย/หลอดที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0.1 M sodium acetate (ml)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
0.1 M acetic acid (ml)	30	25	20	15	10	7.5	5	3.75	2.5
0.01 M acetic acid (ml)	-	-	-	-	-	-	-	12.5	25
น้ำกลั่น (ml)	-	5	10	15	20	22.5	25	13.75	2.5
ตัวอย่างนม (ml)	5	5	5	5	5	5	5	5	55

ก่อนจะเติมตัวอย่างนมจะต้องวัดค่าพีเอชก่อนและเมื่อเติมนมไปแล้วก็ต้องวัดค่าพีเอชหลังจากนั้นอีกครั้งหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เมื่อผสมสารละลายทั้งหมดแล้วให้ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการตกตะกอนประมาณ 20 นาที

3. หลังจากสารเกิดการตกตะกอนแล้วให้นำสารที่เตรียมไว้ไปกรองแบบลดความดันแล้วนำสารละลายที่ได้จากการกรองมาตรวจวิเคราะห์ต่อไป

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1) วิธีไทเทรตแบบไอโอโดเมททรี (standard method)

1) หาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไอโอเดต

1.2) ไทเทรตโดยให้สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่อยู่ในบิวเรต หลังจากนั้นให้ใส่โพแทสเซียมไอโอเดตลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

1.3) ไทเทรตจนสารละลายกลายเป็นสีเหลืองอ่อน

1.4) เติมน้ำแป้ง 2 มิลลิลิตรไทเทรตต่อโดยเติมโซเดียมไทโอซัลเฟต จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นใสไม่มีสี

1.5) ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้งการไทเทรต 2 ครั้งไม่ควรเกิน 0.05 มิลลิลิตร

1.6) จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอน

2) หาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสารละลายตัวอย่าง

2.1) เติมน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟูริก 10 มิลลิลิตร แล้วค่อยเติมสารละลายตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร

2.2) เติมสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต ลงไปในสารละลายที่เตรียมไว้ 2 หยด

2.3) นำสารละลายที่เตรียมไว้ไปไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ไทเทรตจนสารละลายกลายเป็นสีเหลืองอ่อน

2.4) เติมน้ำแป้งลงไป 2 มิลลิลิตร สารละลายจะกลายเป็นสีน้ำเงิน และนำไปไทเทรตต่อ จากสารละลายเปลี่ยนเป็นใสไม่มีสี

2.5) นำสารละลายBlankที่เตรียมไว้แล้ว มาไทเทรตกับโซเดียมไทโอซัลเฟต เหมือนกับสารละลายตัวอย่าง แต่เปลี่ยนจากตัวอย่างเป็นสารละลายแบลงค์โดยทำซ้ำข้อ 2.1-2.4

2.6) สารละลายที่Spike ไว้แล้วมาไทเทรตโซเดียมไทโอซัลเฟตเหมือนกับสารละลายตัวอย่าง แต่เปลี่ยนจากตัวอย่างเป็นสารละลายที่ Spike โดยทำซ้ำข้อ 2.1-2.4

2.7) จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2) วิธีการหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเทคนิคทางเอนไซม์

1.) Standardization of H_2O_2 Stock Solution

ก่อนนำ 3,000 มิลลิกัม/ลิตร สต๊อกสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไปใช้งาน ปิเปต 10 มิลลิลิตรของ 0.1 โนมอล โพเทสเซียมเปอร์แมงกาเนส ลงในบีกเกอร์ จากนั้นเติม 5 มิลลิลิตร ของ 20% ซัลฟูริก แล้วนำไปไทเทตรด้วย 0.1 โนมอล โพเทสเซียมเปอร์แมงกาเนส จนกว่าสีชมพูจะหายไป

mg/L H2O2 = (mLs of 0.1 N KMnO4) x 170.1

Wt. % H2O2 = (mLs of 0.1 N KMnO4) x 0.017

2.) การทำกราฟมาตรฐาน (Calibration Curve)

2.1) เติม 0.11 mL ของ 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 0.89 มิลลิลิตร ใน vial ขนาด 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 1 มิลลิลิตร ของสารละลาย leuco crystal violet 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลายเปอร์ซิเดรส และเติม 6 มิลลิลิตร ของสารละลายอะซิเตรตบัฟเฟอร์ สารละลายนี้จะมีความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.01 มิลลิกรัม/ลิตร

2.2) ผสมสารละลายให้เข้ากันจากนั้นรอให้สารละลายเปลี่ยนสี

2.3) เติมสารละลายลงในเซลล์ ขนาด 1 เซนติเมตร ที่ค่าการดูดกลืนแสง 590 นาโนเมตร พร้อมทั้งทำสารละลายแบลงค์ จากนั้นทำการวัดค่าดูดกลืนแสงของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน 4 ความเข้มข้น โดยที่

ขวดที่ [1] นำ 0.010 มิลลิลิตร ของ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 30 และปรับปริมาตาด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

ขวดที่ [2] นำ 0.042 มิลลิลิตร ของ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ร้อยละ 30 และปรับปริมาตาด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

ขวดที่ [3] นำ 0.083 มิลลิลิตร ของ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ร้อยละ 30 และปรับปริมาตาด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

ขวดที่ [4] นำ 0.125 มิลลิลิตร ของ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ร้อยละ 30 และปรับปริมาตาด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

ขวดที่ [5] นำ 0.170 มิลลิลิตร ของ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ร้อยละ 30และปรับปริมาตาด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

จะได้ความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.01 , 0.025 , 0.050 , 0.075 และ 0.109 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ

2.5) เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น จะได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง เราจะเรียกกราฟนี้ว่า กราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (calibration curve)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การวิเคราะห์ตัวอย่างโดยมี Leuco crystal violet เป็นซับสเตรต

3.6.1) สำหรับตัวอย่างที่จะทำการวิเคราะห์โดยนำตัวอย่างมา 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย leuco crystal violet 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 มิลลิลิตร และสารละลายอะซิเตรตบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันจากนั้นรอ 5 นาที เพื่อให้สารละลายเปลี่ยนสี

3.6.2) เติมสารละลายลงตัวอย่างลงในเซลล์ ขนาด 1 เซนติเมตร ที่ค่าการดูดกลื่นแสง 590 นาโนเมตร พร้อมทั้งทำสารละลายแบงค์ โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบงค์

3.6.3) นำค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากสมาการถดถอยเชิงเส้นที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

3.7 การวิเคราะห์ตัวอย่างโดย TMB เป็นซับสเตรต

1. สำหรับตัวอย่างที่มีประมาณ 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำการวิเคราะห์โดยเติม 10 มิลลิลิตรลงใน vial ขนาด 20 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย TMB จากนั้นรอประมาณ 5 นาที เพื่อให้สารละลายเปลี่ยนสี

2. เติมสารละลายลงในเซลล์ที่ขนาด 1 เซนติเมตร ที่ค่าการดูดกลื่นแสง 2 ช่วงคือ 450 นาโนเมตร และ 650 nm พร้อมทั้งทำสารละลายBlank

3. นำค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากสมการถดถอยเชิงเส้นที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

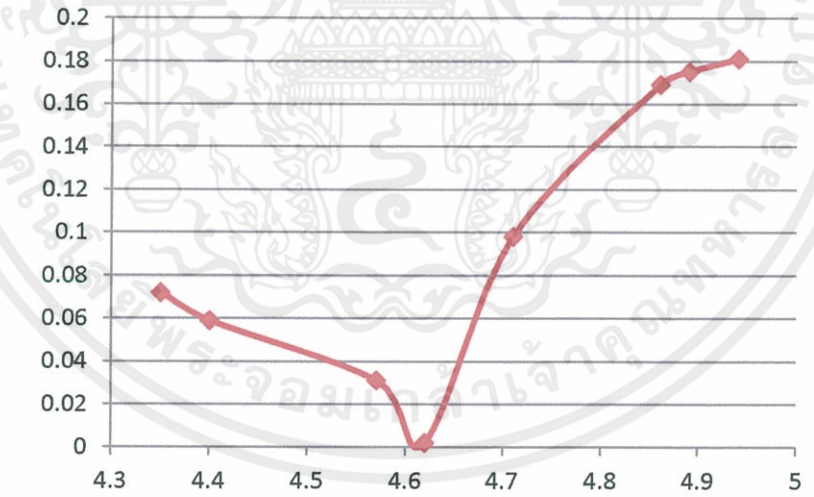
บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่าง

วิธีตกตะกอนที่จุดไอโซอิเลคทริค

ตารางที่ 4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่าง โดยการตกตะกอน

หลอดที่	1	2	3	4	5	6	7	8
pH ก่อนเติมนม	3.86	3.97	4.16	4.27	4.44	4.54	4.61	4.88
pH หลังเติมนม	4.35	4.43	4.57	4.62	4.71	4.86	4.89	5.08
OD 600	0.072	0.059	0.031	0.002	0.098	0.169	0.175	0.181



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงความสามารถในการละลายของโปรตีนที่ ค่าพีเอชต่างๆ

วิเคราะห์ผล

จากกราฟจะเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีนโดยการปรับเปลี่ยนค่าพีเอชสามารถแสดงลักษณะความสัมพันธ์ได้ดังกราฟที่ เห็นได้ว่า ที่ค่าพีเอชของสารละลายโปรตีนที่มีค่าพีเอชต่ำกว่าค่าจุดไอโซอิเลคทริคของโปรตีน ที่ต้องการแยก ประจุสุทธิบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โมเลกุลของเอนไซม์แต่ละโมเลกุลแสดงประจุบวก ทำให้เกิดแรงผลักระหว่างประจุบวกเหมือนกัน โมเลกุลของเอนไซม์จึงสามารถละลายอยู่ในน้ำได้ เมื่อทำการปรับค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจนเขาใกล้ค่าจุดไอโซอิเลคทริคของโปรตีน ประจุสุทธิที่แสดงมีค่าเป็นบวกน้อยลงเรื่อยๆ ทำให้แรงผลักระหว่างโมเลกุลมีค่าน้อยลง จึงเกิดการเคลื่อนที่เขาใกล้กันมากขึ้น ค่าการละลายจึงลดลงจนกระทั่งถึงจุดที่ค่าพีเอชเท่ากับจุดไอโซอิเลคทริคประจุสุทธิรวมมีค่าเปนศูนย์ ซึ่งในที่นี้ต้องการตกตะกอนโปรตีนเคซีน ในนมซึ่งมีค่าจุดไอโซอิเล็กทริคเท่ากับ 4.6 เมื่อมีการปรับค่าพีเอชจนมีค่าเท่ากับจุดไอโซอิเลคทริค โมเลกุลของโปรตีนจะเคลื่อนที่เข้าใกลกันมากพอที่จะเกิดการรวมตัวกัน และตกตะกอนลงมา ซึ่งเป็นจุดที่มีค่าการละลายต่ำที่สุด และเมื่อมีการปรับค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนเกินกว่าคาจุดไอโซ-อิเลคทริค ประจุสุทธิบนโมเลกุลจะมีค่าเป็นประจุลบ เกิดแรงผลักระหว่างประจุลบ ทำใหแต่ละโมเลกุลอยู่ห่างกันมากขึ้น ค่าการละลายจึงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จึงไม่เกิดการตกตะกอน ดังนั้นจึงเลือกใช้ค่าพีเอชที่ 4.62 เนื่องจากมีค่าเท่ากับจุดไอโซอิเลคทริคเพราะมีการตกตะกอนมากที่สุดจึงเหมาะที่จะใช้ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

4.2 ผลการตรวจสอบด้วยวิธีมาตรฐานไอโอโดเมทรี

4.2.1. หาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3.5H_2O$)

โดยใช้โพแทสเซียมไอโอไดเดต (KIO_3) 0.073 กรัม ละลายในน้ำแล้วเติม KI มากเกินพอ จากนั้นนำไปไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต โดยที่โพแทสเซียมไอโอไดเดต มีความเข้มข้น

$$\text{ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไอโอไดเดต} = \frac{0.073}{214} \times \frac{1,000}{100}$$

$$= 3.4112 \times 10^{-3}\ M$$

ตารางที่ 4.2 ผลการไทเทรตหาความเข้มข้นที่แน่นอนของโซเดียมไทโอซัลเฟต

ปริมาตรสารละลาย	ปริมาตรโซเดียมไทโอซัลเฟต ที่ใช้ V (ml)			ปริมาตรเฉลี่ยที่ใช้
KIO_3 (ml)	1	2	3	
25	4.70	4.75	4.75	4.733

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้อง มีดังนี้

$$IO_3^-(aq) + 6H_3^+O(aq) + 5I^-(aq) \longrightarrow 3I_2(aq) + 9H_2O$$

$$6S_2O_3^{2-}(aq) + 3I_2(aq) \longrightarrow 3S_4O_6^{2-}(aq) + 6I^-(aq)$$

จำนวนโมลของ I_2 = 3 เทาของจำนวนโมลของ KIO_3

จำนวนโมลของ I_2 = 1/2เท่าของจำนวนโมลของ $Na_2S_2O_3$

จำนวนโมลของ $Na_2S_2O_3$ = 6 เทาของจำนวนโมล KIO_3

$$\frac{M_{Na2S2O3}V_{Na2S2O}}{1000} = \frac{6 \times N_{KIO3}V_1}{1000}$$

$$= \frac{6 \times 25.0\ ml \times 3.4112 \times 10^{-3}}{4.733\ ml}$$

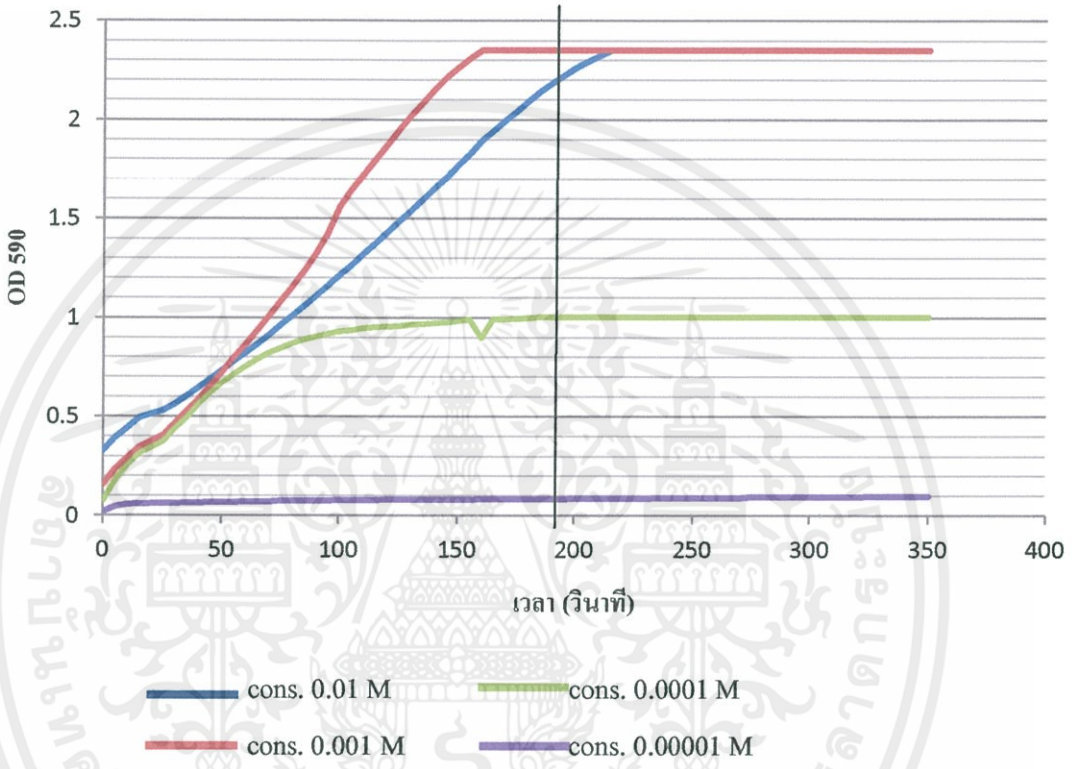
$$M_{Na2S2O3} = 0.1081\ N$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการหาจุดสมมูลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับซับสเตรตโดยมีเอมไซน์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

4.3.1 ผลการทดลองหาจุดสมมูลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยมีลิวโคคริวตัลไวโอเลตเป็นซับสเตรต

นำข้อมูลที่ได้จากการจับเวลา มาเขียนกราฟความสัมพันธ์เพื่อหาจุดสมมูล ได้ดังนี้

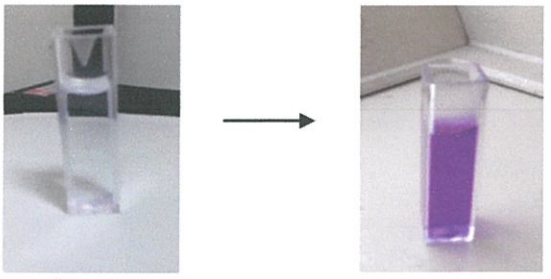


รูปที่ 4.2 กราฟ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (วินาที) กับค่าดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร

วิเคราะห์ผล

จากการทดลองจะเห็นว่าจะหลังจากที่ทำการผสมสาร บัฟเฟอร์ ซับสเตรตซึ่งเป็นลิวโครคริสตัลไวโอเล็ตลงในสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยจะเติมเอนไซม์เป็นลำดับสุดท้าย โดยจะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วง 590 นาโนเมตร และเริ่มจับเวลาตั้งแต่ศูนย์ ไปจนถึงจุด End point ซึ่งจะทำทั้งหมด 4 ความเข้มข้น จากนั้นนำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ ระหว่าง เวลาที่สารเปลี่ยนแปลงกับค่า ดูดกลืนแสง 590 นาโนเมตร เมื่อดูจากกราฟจะเห็นว่าเวลาที่ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มคงที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงซึ่งจะเริ่มตั้งที่เวลา 190 วินาที หรือ 3 นาที 10 วินาที สารละลายจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงแล้วเนื่องจากถึงจุด End point แล้วนั้นเอง

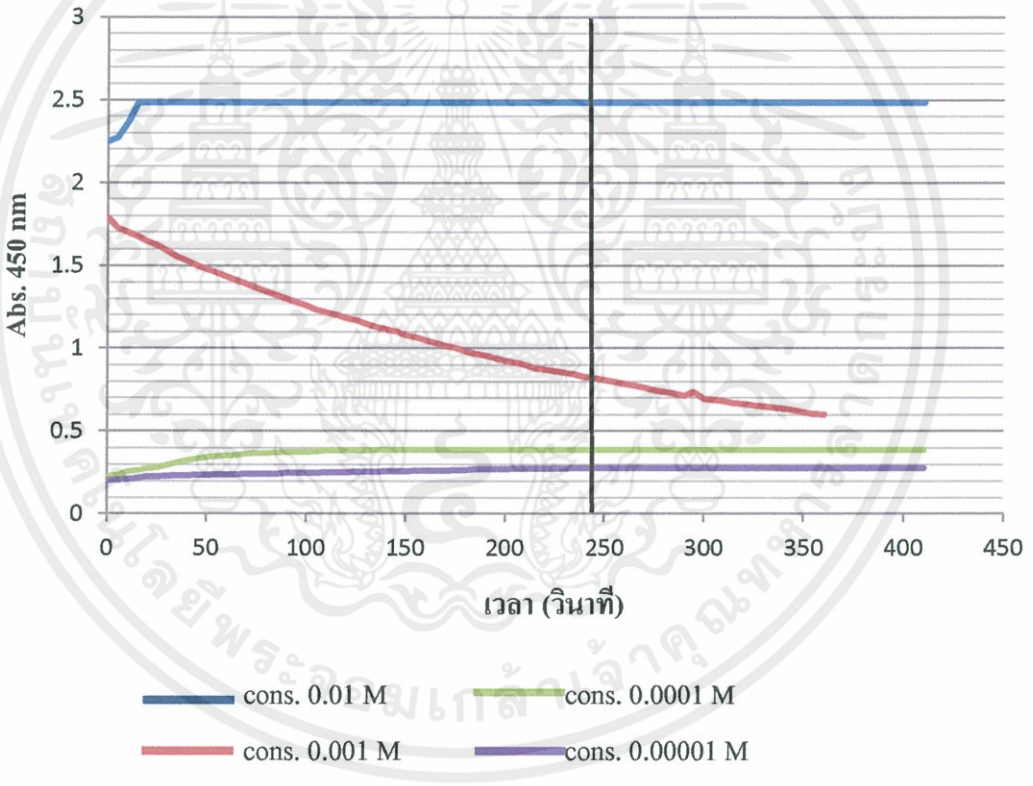
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงการเปลี่ยนแปลงสี โดยใช้สับสเตรตเป็น ลิวโคคริสตัลไวโอเลต

4.3.2 ผลการทดลองหาจุดสมมูลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆโดยเตตระเมทิลเบนซิดีน เป็นซับสเตรต

นำข้อมูลที่ได้จากการจับเวลา มาเขียนกราฟความสัมพันธ์เพื่อหาจุดสมมูล ได้ดังนี้



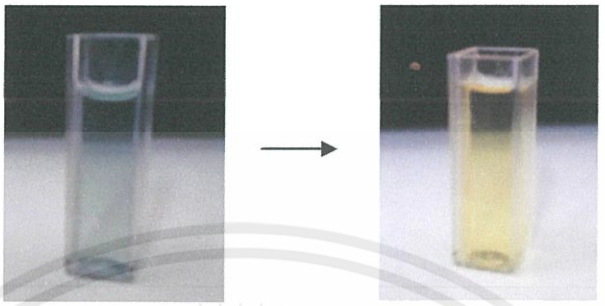
รูปที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (วินาที) กับค่าดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร

วิเคราะห์ผล

จากการนำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟจะเห็นว่าข้อมูลที่ได้ในการตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงของความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พอหยด TMB ลงไปสีจะเปลี่ยนสีเหลืองอมน้ำตาลไวมาก นั้นก็เป็นเพราะมีความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มาเกินไปจึงไม่สามารถนำมาเขียนกราฟได้และในส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสาร... ไม่ว่ากรณีใด...

ความเข้มข้น 0.001 M ค่าดูดกลืนแสงค่อยๆลดลงจนถึง 0.036 ใช้เวลา 13 นาที จึงนำค่าดูดกลืนแสงของความเข้มข้น 0.0001 และ 0.00001 มาเขียนกราฟเพื่อหาจุดสมมูล ซึ่งเวลาที่ได้คือ 240 วินาที จะเห็นการเปลี่ยนแปลงจากสีฟ้า แล้วเปลี่ยนเป็นสีเหลืองที่เวลานี้



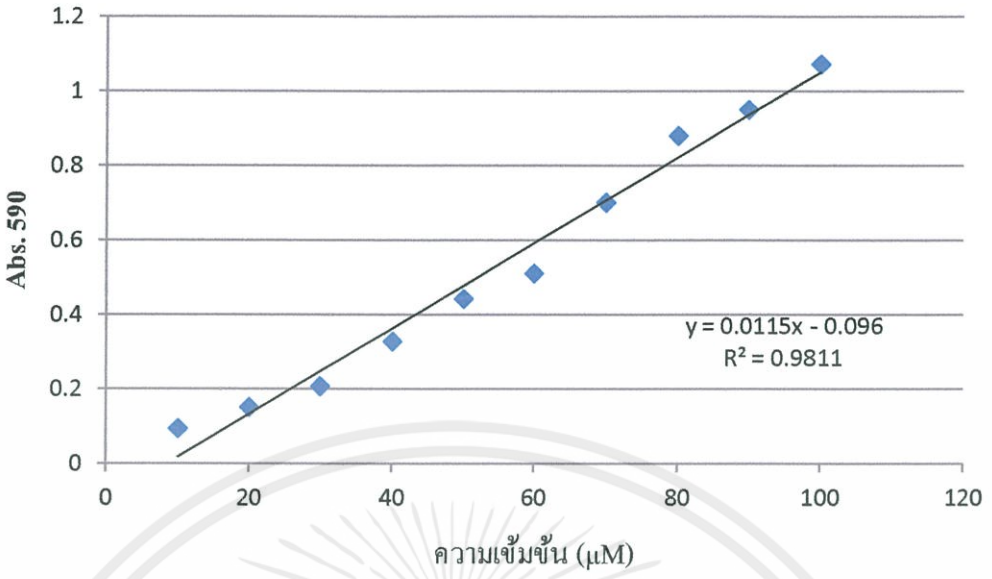
รูปที่ 4.5 แสดงการเปลี่ยนสี ของสับสเตรตเตตระเบนซิดีน

4.4 ผลการทดสอบสารมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเอมไซม์

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้เป็น Lueco crystal voiolet (LCV) ซับสเตรท

ขวดที่	ความเข้มข้นของ H_2O_2(μM)	ค่า OD 590
1	10	0.096
2	20	0.153
3	30	0.209
4	40	0.329
5	50	0.443
6	60	0.511
7	70	0.702
8	80	0.88
9	90	0.951
10	100	1.073

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 กราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มขันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กับค่า OD 590 โดยมี LCV เป็นซับสเตรต

วิเคราะห์ผล

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างจากการตกตะกอน โดยใช้หลักการของ pI ทำให้ได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ pH เท่ากับ 4.62 ซึ่งเลือกใช้ในการทดลองนี้

หลังจากได้ตัวอย่างที่เหมาะสมแล้วนำมาทำการวิเคราะห์ต่อ โดยวิธีทางเอมไซม์โดยใช้ลิวโคคริสตัลไวโอเล็ต เป็นซับสิเตรตสำหรับฮอกเซราดิกเปอร์ออกซิเดส โดยนำไปวัดความเข้มแสงที่ 590 นาโนเมตร โดยจะดูการเปลี่ยนแปลงของสีที่เปลี่ยนไปโดยสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วง และบัพเฟอร์ที่ใช้คือซิเตรตบัพเฟอร์ที่ pH 4.5

เมื่อทำการทดลองผลที่ได้คือเมื่อ เติมลิวโคคริสตัลไวโอเลตลงในสารมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะยังไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง แต่เมื่อเติมฮอซเซราดิสเปอร์ออกไซด์ลงไปสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วง ซึ่งเป็นสับสเตรตสำหรับฮอกเซราดิกเปอร์ออกซิเดส ทำงานโดยตรวจจับการเปลี่ยนสี ทำหน้าที่เป็นสารให้อิเล็กตรอน (electron donor) สำหรับปฏิกิริยารีดักชั่นของไฮโดรเจนต์เปอร์ออกไซด์ไปยังน้ำของเอนไซน์เปอร์ออกซิเดส ของฮอสเซราดิสเปอร์ออกไซด์ โดยรอ 190 วินาทีแล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างนมโดยใช้ลิวโคคริสตรัลไวโอเลตเป็นสับสเตรต

ลิวโคคริสตรัลไวโอเลต	Abs. 590 nm
ตัวอย่างนมที่ได้จากการตกตะกอน	0.076
ตัวอย่างนมที่เติม 50 μM H_2O_2	0.397
ตัวอย่างนมที่เติม 75 μM H_2O_2	0.750

คำนวณหาความเข้มข้น โดยแทนลงในสมการ $y = 0.0115 x - 0.096$

$R^2 = 0.9811$

โดยแทนค่าที่ได้จากการวัดค่าดูดกลืนแสง ลงใน y เพื่อคำนวณหาความเข้มข้น x ในตัวอย่างนมที่ได้จากการตกตะกอน เท่ากับ 0.076

จะได้ $0.076=0.0115x – 0.096$

$X = (0.076+0.096)/0.0115$

$X = 14.9565$ μM

ตัวอย่างที่เติม 50 μM H_2O_2 เท่ากับ 0.397

$0.397=0.0115x – 0.096$

$X = (0.397+0.096)/0.0115$

$X = 42.8696$ μM

ตัวอย่างที่เติม 75 μ M H_2O_2 เท่ากับ 0.750

$0.750 =0.0115x – 0.096$

$X = (0.750+0.096)/0.0115$

$X = 73.5652$ μM

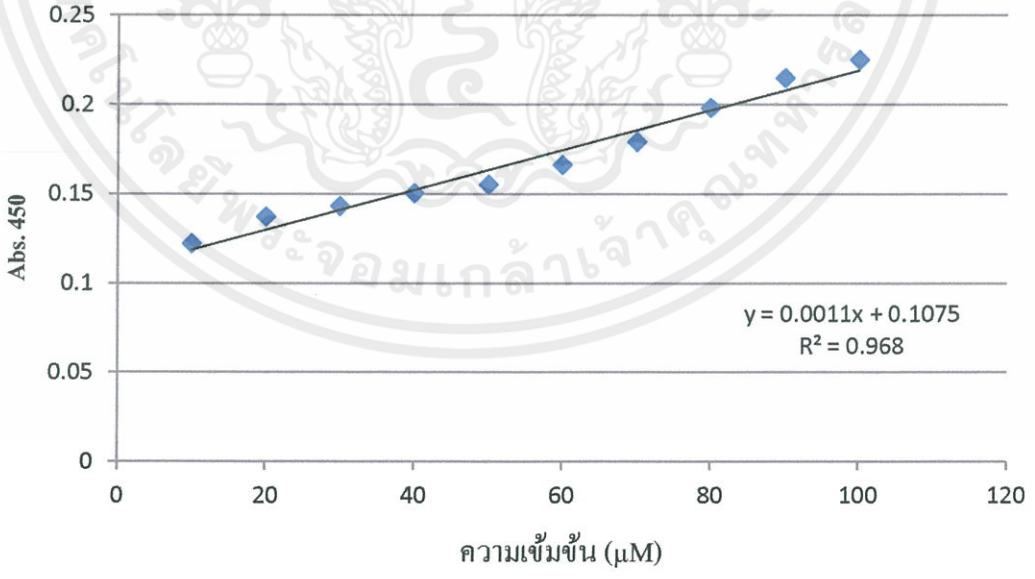
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการทดสอบสารมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเอมไซม์โดยใช้ซับสเตรตเป็น Tetramethylbenzidine (TMB)

ตารางที่ 4.5 ผลการทดลองโดยใช้ TMB เป็นซับสเตรต

หลอดที่	ความเข้มข้นของ H_2O_2 (μM)	ค่า OD 450 (450 nm)
1	10	0.122
2	20	0.137
3	30	0.143
4	40	0.1502
5	50	0.155
6	60	0.166
7	70	0.179
8	80	0.198
9	90	0.215
10	100	0.225

ข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน



รูปที่ 4.7 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กับค่า Abs. 450 โดยมี TMB เป็นซับสเตรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์ผล

โดย TMB นั้นเป็นสารที่ใช้เป็นสับสเตรตสำหรับฮอกเซราดิกเปอร์ออกซิเดส ทำงานโดยตรวจจับการเปลี่ยนสีของผลิตภัณฑ์ ที่เปลี่ยนจากสีฟ้า (ค่าการดูดกลืนแสง = 650 นาโนเมตร) เป็นสีเหลือง (ค่าการดูดกลืนแสง = 450 นาโนเมตร) TMB ทำหน้าที่เป็นสารให้อิเล็กตรอน (electron donor) โดยที่จะทำการตรวจวัดค่า OD ที่ 450 นาโนเมตร แต่จากกราฟจะเห็นว่าค่าที่วัดได้นั้นเมื่อนำมาเขียนกราฟแล้ว จากความชันของกราฟจะไม่มีความน่าเชื่อถือ เพราะ เมื่อดูจากค่าดูดกลื่นแสงเนื่องมาจากการแกว่งของเครื่องได้โดยค่าที่ได้เปลี่ยนแปลงไปน้อยมาก

4.5.1 ผลการทดลองหาหาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่าง โดยมีสับสเตรตเป็นเตตระเมทิล เบนซีดีน

ตารางที่ 4.6 ผลการทดลองวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนในตัวอย่างนม

เตตระเมทิลเบนซิดีน	Abs. 450 nm
ตัวอย่างนมที่ได้จากการตกตะกอน	0.123
ตัวอย่างนมที่เติม 50 μM H_2O_2	0.153
ตัวอย่างนมที่เติม 75 μM H_2O_2	0.184

คำนวณหาความเข้มข้น โดยแทนลงในสมการ $y = 0.0011x + 0.1075$

$R^2 = 0.968$

โดยแทนค่าที่ได้ ลงใน y เพื่อคำนวณหาความเข้มข้น x

ตัวอย่างได้ค่า y เท่ากับ 0.123

จะได้ $0.123 = 0.0011x + 0.1075$

$X = (0.123-0.1075)/0.0011$

$X = 14.0909$ μM

ตัวอย่างที่เติม 50 μM H_2O_2 เท่ากับ 0.153

$0.153 = 1118.4x + 0.1075$

$X = (0.153 - 0.1075)/0.0011$

$X = 41.3637$ μ M

ตัวอย่างที่เติม 0.000075 M H_2O_2 เท่ากับ 0.184

$0.184 = 1118.4x + 0.1075$

$X = (0.184 - 0.1075)/1118.4$

$X = 69.5455$ μM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองทำวิจัยเพื่อหาปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในนมโดยใช้วิธีทางเอนไซน์ พบว่าสามารถหาจุดสมมูลของปฏิกิริยาระหว่างโครโมเจนิคซับสเตรตและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เอนไซน์เป็นตัวเร่ง ถ้าใช้ลิวโคคริสตัลไวโอเล็ตเป็นซับสเตรท (LCV) จุดสมมูลของปฏิกิริยาจะอยู่ที่ 190 วินาทีและสารจะเปลี่ยนสีจากสีใสเป็นสีม่วง ส่วนเตตระเมทิลเบนซิดีน (TMB) เป็นซับเสตรทจะมีจุดสมมูลอยู่ที่ 290 วินาที และสารจะเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีเหลือง จากนั้นทำกราฟมาตรฐานของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้ค่า $R^2 = 0.981$ และสมการเส้นตรงคือ $y = 11467x - 0.096$ โดยการเตรียมสารตัวอย่างก่อนจะนำมาวิเคราะห์เพื่อหาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะต้องนำสารตัวอย่างไปตกตะกอนโปรตีนก่อนการวิเคราะห์ โดยโปรตีนจะตกตะกอนดีที่สุดที่ pH = 4.62 ค่าOD.600 ของสารเท่ากับ 0.02 และค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ตรวจพบในสารตัวอย่างโดยใช้ลิวโคคริสตัลไวโอเล็ตเป็นซับสเตรท จะได้ค่าความเข้มข้น = 1.49996×10^{-5} M จากนั้นเติม 0.00005 M และ 0.000075 M H_2O_2 ลงในตัวอย่างและนำไปตรวจวัดจะได้ความเข้มข้น = 2.0563×10^{-4} M , 2.1235×10^{-4} M และค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ตรวจพบในสารตัวอย่างโดยใช้เตตระเมทิลเบนซิดีน เป็นซับสเตรท จะได้ค่าความเข้มข้น = 1.6541×10^{-5} M จากนั้นเติม 0.00005 M และ 0.000075 M H_2O_2 ลงในตัวอย่างและนำไปตรวจวัดจะได้ความเข้มข้น = 1.0662×10^{-3} M , 1.1575×10^{-3} M

จากผลการทดลองที่ได้มานั้นสามารถนำไปประยุกต์พัฒนาเป็นชุดเครื่องมือ สำหรับตรวจสอบหาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในงานภาคสนามได้ โดยใช้จุดสมมูลของสารและเฉดสีต่างๆ ของซับสเตรทที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

[1] พัชรา วีระกะลัส. **เอนไซน์**. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2554, หน้า 28-45.

[2] Anees A. Ansari, Pratima R. Solanki, B.D. Malhotra. **Hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase immobilized nanostructured cerium oxide film.** J. Biotechnology. 142 (2009), 179–184.

[3] Corey A. Cohn, Aimee Pak, Daniel Strongin, Martin A. Schoonen. **Quantifying hydrogen peroxide in iron-containing solutions using leuco crystal violet**. J. Geochem. 6 (2005), 3.

[4] M.E. Abbas a, Wei Luo, Lihua Zhu, Jing Zou, Heqing Tang. **Fluorometric determination of hydrogen peroxide in milk by using a Fenton reaction system**. J. Food Chemistry. 120 (2010), 327–331.

[5] Nigel C. Veitch. **Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme.** J. Phytochemistry. 65 (2004), 249–259.

[6] Tiina Kri_s_ciunaite, Irina Stulova, Natalja Kabanova, Tiiu-Maie Laht, Raivo Vilu. **The effect of hydrogen peroxide on the growth of thermophilic lactic starter and acid gelation of UHT milk.** J. International Dairy. 21 (2011), 239e246.

[7] Wei Luoa, M.E. Abbasa, Lihua Zhua, Kejian Dengb, Heqing Tang. **Rapid quantitative determination of hydrogen peroxide by oxidation decolorization of methyl orange using a Fenton reaction system**. J. analytica chimica acta. 629 (200), 1–5.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[8] [Online]. Available : การตกตะกอนโปรตีน
http://www.agro.cmu.ac.th/e_books/protein/Book-lesson1.pdf

[9] [Online]. Available : ขั้นตอนการผลิตนม
http://www.dpo.go.th/main.php?filename=process

[10] [Online]. Available : ชนิดของนมและส่วนประกอบ
http://www.thaigoodview.com/library/studentshow/st2545/4-5/no12/milk.html

[11] [Online]. Available : โปรตีน
http://www.agro.cmu.ac.th/e_books/protein/Book-lesson1.pdf

[12] [Online]. Available : ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
http://www.jongjarern.com/insurances/index.php?topic=1378.0

[13] [Online]. Available : 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
http://en.wikipedia.org/wiki/3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

[14] [Online]. Available : Horseradish peroxidase
http://en.wikipedia.org/wiki/Horseradish_peroxidase

[15] [Online]. Available : hydrogen peroxide
http://global.britannica.com/EBchecked/topic/278760/hydrogen-peroxide

[16] [Online]. Available : Lueco crystal violet
http://en.wikipedia.org/wiki/Crystal_violet

[17] [Online]. Available : Permanganate Titration
http://www.h2o2.com/technical-library/default.aspx?pid=67&name=
AnalyticalMethods-for-H2O2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

ผลการทดลอง

ตารางที่ 5.1 แสดงผลการหาจุดสมมูลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆโดยมีลิวโคคริวตัลไวโอเลตเป็นซับสเตรต

Conc. / Time (s)	0.01 M	0.001 M	0.0001 M	0.00001 M
0	0.33	0.157	0.076	0.019
5	0.397	0.235	0.179	0.048
10	0.442	0.291	0.253	0.057
15	0.492	0.347	0.315	0.06
25	0.532	0.406	0.376	0.062
30	0.566	0.467	0.439	0.064
35	0.606	0.53	0.501	0.066
40	0.649	0.589	0.567	0.066
45	0.691	0.656	0.623	0.068
50	0.735	0.725	0.672	0.069
55	0.779	0.796	0.714	0.07
60	0.823	0.863	0.755	0.071
65	0.869	0.936	0.791	0.072
70	0.916	1.013	0.825	0.073
75	0.965	1.088	0.849	0.074
80	1.013	1.16	0.87	0.074
85	1.06	1.238	0.888	0.076
90	1.111	1.323	0.905	0.076
95	1.161	1.424	0.918	0.076
100	1.214	1.56	0.929	0.077
105	1.268	1.649	0.938	0.077
110	1.323	1.723	0.946	0.078

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

115	1.376	1.802	0.953	0.079
120	1.434	1.878	0.957	0.08
125	1.489	1.955	0.96	0.08
130	1.545	2.026	0.965	0.081
135	1.6	2.092	0.969	0.081
140	1.658	2.156	0.974	0.082
145	1.711	2.216	0.979	0.082
150	1.772	2.268	0.984	0.083
155	1.829	2.312	0.989	0.083
160	1.895	2.35	0.9	0.084
165	1.947	2.35	0.992	0.085
170	1.995	2.35	0.994	0.085
175	2.043	2.35	0.996	0.085
180	2.096	2.35	0.999	0.085
185	2.141	2.35	1.004	0.085
190	2.182	2.35	1.004	0.086
195	2.222	2.35	1.004	0.086
200	2.259	2.35	1.004	0.087
205	2.293	2.35	1.004	0.087
210	2.324	2.35	1.004	0.088
215	2.35	2.35	1.004	0.088
220	2.35	2.35	1.004	0.088
225	2.35	2.35	1.004	0.089
230	2.35	2.35	1.004	0.089
235	2.35	2.35	1.004	0.09
240	2.35	2.35	1.004	0.09
245	2.35	2.35	1.004	0.091
250	2.35	2.35	1.004	0.091
255	2.35	2.35	1.004	0.091
260	2.35	2.35	1.004	0.092
265	2.35	2.35	1.004	0.092

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

270	2.35	2.35	1.004	0.092
275	2.35	2.35	1.004	0.093
280	2.35	2.35	1.004	0.093
285	2.35	2.35	1.004	0.093
290	2.35	2.35	1.004	0.093
295	2.35	2.35	1.004	0.094
300	2.35	2.35	1.004	0.094
305	2.35	2.35	1.004	0.094
310	2.35	2.35	1.004	0.095
315	2.35	2.35	1.004	0.095
320	2.35	2.35	1.004	0.095
325	2.35	2.35	1.004	0.096
330	2.35	2.35	1.004	0.096
335	2.35	2.35	1.004	0.096
340	2.35	2.35	1.004	0.096
345	2.35	2.35	1.004	0.096
350	2.35	2.35	1.004	0.096

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5.2 แสดงผลการหา จุดสมมูลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆโดย เตตระเมทิลเบนซิดีน เป็นซับสเตรต

Conc. / Time (s)	10000 µM	1000 µM	100 µM	10 µM
0	2.25	1.787	0.231	0.204
5	2.272	1.729	0.234	0.209
10	2.365	1.702	0.258	0.212
15	2.488	1.675	0.263	0.218
20	2.488	1.648	0.274	0.225
25	2.488	1.623	0.283	0.228
30	2.488	1.59	0.296	0.232
35	2.488	1.556	0.312	0.233
40	2.488	1.528	0.323	0.236
45	2.488	1.503	0.335	0.237
50	2.488	1.479	0.342	0.239
55	2.488	1.458	0.349	0.24
60	2.488	1.436	0.355	0.242
65	2.488	1.411	0.36	0.242
70	2.488	1.389	0.366	0.244
75	2.488	1.367	0.369	0.244
80	2.488	1.345	0.371	0.246
85	2.488	1.323	0.374	0.247
90	2.488	1.302	0.376	0.248
95	2.488	1.28	0.378	0.249
100	2.488	1.261	0.379	0.25
105	2.488	1.235	0.381	0.251
110	2.488	1.218	0.383	0.254
115	2.488	1.2	0.384	0.254
120	2.488	1.182	0.385	0.254
125	2.488	1.17	0.386	0.256
130	2.488	1.148	0.386	0.257

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

135	2.488	1.131	0.387	0.258
140	2.488	1.115	0.387	0.259
145	2.488	1.103	0.387	0.26
150	2.488	1.08	0.387	0.261
155	2.488	1.064	0.387	0.263
160	2.488	1.048	0.387	0.264
165	2.488	1.032	0.387	0.265
170	2.488	1.018	0.387	0.266
175	2.488	1.002	0.387	0.267
180	2.488	0.981	0.387	0.269
185	2.488	0.969	0.387	0.27
190	2.488	0.958	0.387	0.27
195	2.488	0.941	0.387	0.271
200	2.488	0.928	0.387	0.271
205	2.488	0.915	0.387	0.274
210	2.488	0.902	0.387	0.274
215	2.488	0.88	0.387	0.275
220	2.488	0.875	0.387	0.276
225	2.488	0.863	0.387	0.277
230	2.488	0.853	0.387	0.277
235	2.488	0.843	0.387	0.278
240	2.488	0.83	0.387	0.278
245	2.488	0.82	0.387	0.279
250	2.488	0.809	0.387	0.279
255	2.488	0.799	0.387	0.28
260	2.488	0.787	0.387	0.281
265	2.488	0.774	0.387	0.281
270	2.488	0.765	0.387	0.281
275	2.488	0.745	0.387	0.281
280	2.488	0.74	0.387	0.281
285	2.488	0.726	0.387	0.281

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

290	2.488	0.714	0.387	0.281
295	2.488	0.74	0.387	0.281
300	2.488	0.697	0.387	0.281
305	2.488	0.688	0.387	0.281
310	2.488	0.681	0.387	0.281
315	2.488	0.672	0.387	0.281
320	2.488	0.665	0.387	0.281
325	2.488	0.657	0.387	0.281
330	2.488	0.65	0.387	0.281
335	2.488	0.643	0.387	0.281
340	2.488	0.636	0.387	0.281
345	2.488	0.629	0.387	0.281
350	2.488	0.616	0.387	0.281
355	2.488	0.607	0.387	0.281
360	2.488	0.602	0.387	0.281
365	2.488	0.597	0.387	0.281
370	2.488	0.586	0.387	0.281
375	2.488	0.579	0.387	0.281
380	2.488	0.598	0.387	0.281
385	2.488	0.482	0.387	0.281
390	2.488	0.475	0.387	0.281
395	2.488	0.455	0.387	0.281
400	2.488	0.42	0.387	0.281
405	2.488	0.419	0.387	0.281
410	2.488	0.399	0.387	0.281

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

ประเภทของนมและขั้นตอนการผลิตนม

นมเป็นอาหารธรรมชาติที่มีความสมบูรณ์และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง อุดมด้วยแร่ธาตุอาหาร ครบทุกหมู่ คือ โปรตีน วิตามิน เกลือแร่ คาร์โบไฮเดรต และไขมัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาลนมหรือแล็กโทส (lactose) และโปรตีนที่เรียกว่า เคซีน (casein) จะพบในธรรมชาติคือในนมหรือน้ำนมเท่านั้น นมจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาร่างกายและสมองของเด็กและเยาวชน

นมมีส่วนประกอบดังนี้

1. น้ำ เป็นสื่อกลางให้สารอาหารหลายชนิดละลาย ทำให้สะดวกในการบริโภค โดยเฉพาะเด็กอ่อนหรือทารกที่ยังไม่มีฟันเคี้ยวอาหาร

2. ไขมัน ตามปกติเรียกไขมันจากน้ำนมว่า มันเนย เป็นส่วนประกอบที่สำคัญทางโภชนาการและเศรษฐกิจ ให้พลังงาน ตลอดจนสารอาหารและวิตามินเอ ดี อี และเค นอกจากนี้ยังเป็นปัจจัยที่สำคัญใช้ในการกำหนดราคาซื้อขายน้ำนมดิบ เพราะสามารถนำไปใช้อุตสาหกรรมนมได้ นมให้ไขมันเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับขนมปัง นมผงถั่วเหลือง หรือเนื้อ การดื่มนมจึงไม่ทำให้อ้วน

3. โปรตีน ในน้ำนมเกือบทั้งหมดประกอบด้วยสารอาหารโปรตีน ที่เรียกว่า เคซีน โกลบุลิน (globulin) อัลบูมิน (albumin) ในปริมาณค่อนข้างสูง และมีกรดอะมิโน (amio acid) อยู่19 ชนิด ซึ่งมีประโยชน์ต่อการสร้างเนื้อเยื่อ เลือด และกระดูก นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ อีกด้วย

4. สารประกอบที่มีไนโตรเจน ตามปกตินมจะมีแร่ธาตุไนโตรเจนอยู่ประมาณร้อยละ0.5

5. แล็กโทส เมื่อถูกย่อยแล้วจะกลายเป็นกลูโคส (glucose)และกาแล็กโทส (galactose)น้ำตาลกาแล็กโทสนี้เป็นส่วนประกอบของซีรีโบรไซด์ (cerebroside) ซึ่งพบมากในเยื่อหุ้มสมองและเยื่อหุ้มประสาท ดังนั้นทารกและเด็กจึงมีความต้องการแล็กโทสเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตของสมอง

6. วิตามิน ในนมมีวิตามินเอ บี 1 (thaiamine) บี 2 บีรวม บี 6 บี 12 ซี ดี และดี 3ซึ่งช่วยป้องกันโรคลักปิดลักเปิด อัมพาต โรคผิวหนัง โรคลำไส้ โรคฟันผุ เป็นต้น

7. แร่ธาตุในน้ำนม มีลักษณะเป็นเถ้า ประกอบด้วยโพแทสเซียม แคลเซียม โซเดียม แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส คลอไรด์ ซิเทรต เหล็ก ทองแดง และไอโอดีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเภทของนม

หากแบ่งนมออกเป็นประเภท ตามกระบวนการผลิต อาจแบ่งได้เป็น 6 ประเภท ดังนี้

1. นมสด คือ นมธรรมชาติที่รีดมาจากแม่โค นำมาผลิตเป็นนมสดได้ 3 ชนิด คือ

1.) นมสดธรรมดา

2.) นมสดพร่องมันเนย

3.) นมสดขาดมันเนย

2. นมผง คือ นมสดที่ทำให้น้ำระเหยไปจนเป็นผง มี 3 ชนิดเช่นกัน คือ นมผงธรรมดา หรือนมผงพร้อมมันเนย (dry whole milk) นมผงพร่องมันเนย และนมผงขาดมันเนย (skimmed milk)

3. นมข้น คือ นมสดที่ระเหยเอาน้ำบางส่วนออก จึงมีความเข้มข้นมากขึ้น และอาจมีการเติมน้ำตาล หรือไม่ก็ได้ มี 4 ชนิด คือ นมข้นไม่หวาน นมข้นหวาน นมข้นขาดมันเนยไม่หวาน และนมข้นขาดมันเนยชนิดหวาน การทำให้นมข้นมีรสหวาน โดยการเติมน้ำตาล มักใช้ความเข้มข้นประมาณร้อยละ 45-50 เป็นความเข้มข้นที่ ช่วยเก็บรักษาคุณภาพผลิตภัณฑ์นมข้นหวาน ไว้ได้นาน เพราะน้ำตาลช่วยเพิ่มความดันออสโมติก ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโต จะเห็นได้ว่า นมข้นหวานเป็นนมที่มีปริมาณน้ำตาลสูงมาก และยิ่งถ้าเป็นนมข้นขาดมันเนยชนิดหวาน จะมีคุณค่าทางอาหารต่ำ มีน้ำตาลสูง จึงมีคุณค่าต่อเด็กน้อย และมีผลทำให้เกิดฟันผุได้ค่อนข้างมาก

4. นมคืนรูป คือ ผลิตภัณฑ์นมที่ได้จากการนำเอาส่วนประกอบ ของนมสด ซึ่งได้แยกออกแล้ว มาผสมกันขึ้นใหม่ มีลักษณะเช่นเดียวกับ นมสด หรือนมข้น มี 5 ชนิด คือ นมคืนรูปธรรมดา นมข้นคืนรูปไม่หวาน นมข้นคืนรูปหวาน นมข้นขาดมันเนยคืนรูปไม่หวาน นมแปลงไขมัน

5. นมปรุงแต่ง (falvoured milk) คือ นมหรือนมผงที่ปรุงแต่งด้วยสี กลิ่น หรือรส ไม่ว่าจะมีการเติมวัตถุที่มีคุณค่า ทางอาหารอื่นใด หรือไม่ สิ่งที่นำมาปรุงแต่ง ต้องไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ นมปรุงแต่ง มี 2 ชนิด คือ ชนิดเหลว และชนิดแห้ง นมปรุงแต่งที่นิยมมีหลายชนิด เช่น นมปรุงแต่งรสหวาน, นมปรุงแต่งชอกโกแลต นมปรุงแต่งกาแฟ

6. นมเปรี้ยว (cultured milk) คือ นม หรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากนม ที่หมักด้วยจุลินทรีย์ ที่ไม่ทำให้เกิดพิษ อาจเติมวัตถุอื่น ที่จำเป็นต่อหรรมวิธีการผลิต หรือปรุงแต่ง สี กลิ่น รส ด้วยก็ได้ นมเปรี้ยวเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการเปลี่ยนน้ำตาลในนมให้เป็นกรด และมักปรุงแต่งรส โดยเติมน้ำตาลซูโครสประมาณร้อยละ 15 นมเปรี้ยวบางชนิดมีนมขาดมันเนย เพียงร้อยละ 50ส่วนประกอบที่เหลือเป็นน้ำตาล จึงมีคุณค่าทางอาหารน้อย ไม่เหมาะให้เด็กดื่ม เช่น ยาคูลท์ เป็นเครื่องดื่มที่ประกอบด้วยจุลิ-นทรีย์ที่เป็นมิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตนม

ขั้นตอนหนึ่งในการผลิตนมคือการทำ UHT คือทำให้มีอุณหภูมิสูงถึง 120-135 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วินาทีเพื่อการฆ่าเชื้อ แต่ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเพื่อฆ่าเชื้อโดยการลดปริมาณของแบคทีเรียในนมสดที่จะได้รับก่อนเข้าไปในโรงงานจึงทำให้ได้เป็นนมที่ เรียกว่านมสดคุณภาพสูง เพราะเป็นไปตามกระแสของผู้บริโภคที่ต้องการนมสดจากธรรมชาติที่มีการทำ Low Temperature Sterilization Treatment Milk (HTST ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา15 วินาที หรืออาจทำที่อุณหภูมิต่ำกว่านั้น คือ 63 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที) จากนั้นคือการนำไปบรรจุ

นมคือ ของเหลวสีขาวสะอาดสดเป็นปกติ ซึ่งได้จากการรีดจากเต้านมของสัตว์ให้นมต่าง ๆ ที่มีสุขภาพดี เช่น โค กระบือ แพะ แกะ ฯลฯ ในช่วงเวลาอย่างน้อย 3 วัน ภายหลังคลอดลูก หรือจนกว่าจะปราศจากนมเหลือง นมประกอบไปด้วย มันเนย (ไขมัน) โปรตีน น้ำตาลแลคโตส เกลือแร่ และน้ำ

หมายเหตุ

ก. ไขมันของนมนิยมเรียกว่า "มันเนย" (butter fat) เพราะใช้ทำเนยเหลว (butter)

ข. ธาตุน้ำนมไม่รวมมันเนย(solid-not-fat) คือองค์ประกอบของนมซึ่งประกอบด้วย โปรตีน+แลค-โตส+เกลือแร่

ค. ธาตุน้ำนมทั้งหมด (total solid) คือองค์ประกอบของนมทั้งหมด ซึ่งประกอบด้วย มันเนย+โปรตีน+แลคโตส+เกลือแร่

จ. นมที่มีขายในท้องตลาดส่วนมากคือนมโคนมดิบ (raw milk)คือ นมโคที่รีดมาจากเต้านมโคแล้วยังไม่ได้ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อ ดังนั้นจึงห้ามดื่มนมดิบ

คุณสมบัติของนมโค มีดังต่อไนี้คือ

1. สีของนม นมโคมีสีขาวอมเหลือง สีขาวเป็นสีของโปรตีนเคซีน (Casein) ส่วนสีเหลืองเป็นสีของคาโรตีน (carotene)

2. นมมีความเป็นกรด ค่า pH ของนมคือ 6.6 ความเป็นกรดของนมเนื่องมาจากโปรตีนและเกลือแร่ของนมเอง

3. ความถ่วงจำเพาะของนมมีค่าเฉลี่ย 1.072 (ความถ่วงจำเพาะของน้ำมีค่า 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นมพร้อมดื่ม

คือนมโคที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคด้วยความร้อน หรือนมสดผ่านความร้อน มี 3 ชนิดคือ

1) นมพาสเจอร์ไรซ์ (Pasteurized milk) นมโคที่ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อนไม่ต่ำกว่า ๖๓ องศาเซลเซียส และคงอยู่ที่อุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 30 นาที หรือทำให้ร้อนไม่ต่ำกว่า 72 องศาเซลเซียส และคงอยู่ที่อุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 16 วินาที แล้วทำให้เย็นลงทันทีที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า นี้จะผ่านกรรมวิธีทำนมสดให้เป็นเนื้อเดียวกันหรือไม่ก็ได้

2) นมสเตอริไลซ์ (Sterilized milk) คือนมโคที่ผ่ากรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อนไม่ต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาที่เหมาะสม ทั้งนี้ต้องผ่านกรรมวิธีทำนมสดให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3) นม ยู เอส ที (U.H.T. = Ultra high temperature milk or Ultra heat treated milk)นม ยู เอส ที คือ นมโคที่ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อนไม่ต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส ไม่น้อยกว่า 1 วินาที แล้วบรรจุในภาชนะและสภาวะที่ปราศจากเชื้อ ทั้งนี้ต้องผ่านกรรมวิธีทำนมสดให้เป็นเนื้อเดียวกัน

2.กล่องนม

1. กล่องยูเอชที มีกระดาษ อะลูมิเนียมฟอยล์และพลาสติก ประเภทโพลีเอทีลีนเป็นส่วนประกอบ ซึ่งช่วยให้ผลิตภัณฑ์ที่บรรจุ สามารถเก็บไว้ได้นาน โดยไม่ ต้องแช่เย็น
2. กล่องพาสเจอไรซ์มีส่วนประกอบเป็นกระดาษ และพลาสติก เท่านั้น จึงต้องแช่เย็น เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่บรรจุอยู่เก็บไว้ได้นาน

ชั้นของกล่องนม

1. โพลีเอทิลีน (polyethylene) - ป้องกันความชื้นจากภายนอก
2. กระดาษ – เพื่อความคงทนแข็งแรงของกล่อง
3. โพลีเอทิลีน (polyethylene) - ช่วยผนึกกล่องให้แน่นสนิท
4. อลูมิเนียมฟอยล์– ป้องกันภาวะภายนอก
5. โพลีเอทิลีน (polyethylene) - ช่วยผนึกกล่องให้แน่นสนิท
6. โพลีเอทิลีน (polyethylene) - ช่วยป้องกันและยึดติดการรั่วซึมของของเหลว

องค์ประกอบของบรรจุภัณฑ์กล่องนมที่ปลอดเชื้อ

• กระดาษ (70 เปอร์เซ็นต์) มีความเหนียวแข็งแรงและมีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

• พลาสติก Polyethylene (24 เปอร์เซ็นต์) อยู่ในชั้นในสุดที่ท าให้แพกเกจของเหลวแน่นและเคลือบปกป้องในภายนอกช่วยให้แพคเกจแห้ง

• อลูมิเนียม (ร้อยละ 6) ป้องกันแสงและออกซิเจน สามารถเก็บได้นานโดยไม่ต้องแช่เย็น ป้องกันการเน่าเสียโดยไม่ใช้สารเคมีกันบูด

ม้วนกระดาษที่ใช้ผลิตกล่องนมจะทำการติด Strip ซึ่งทำหน้าที่เปรียบเสมือนกาวในการเชื่อมกระดาษให้ติดกันระหว่างการขึ้นรูปกล่องนมโดยการใช้ความร้อนในการ seal ทำให้พลาสติก PE (Polyethylene) ซึ่งมีอยู่ในกระดาษและ Strip เกิดการแนบติดกันกระดาษที่ผ่านการติด Strip จะผ่านการฆ่าเชื้อด้วย Hydrogen Peroxide Bath ภายในจะประกอบด้วยชั้นของ Water Bath และชั้นของ Hydrogen peroxide Bath โดยมีการกำหนดอุณหภูมิและความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เพื่อทำลายเชื้อแบคที่เรียที่ปนเปื้อนมาซึ่งอาจส่งผลต่อผลิตภัณฑ์ จากนั้นกระดาษจะผ่านกระบวนการทำแห้งโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงเพื่อกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้ไม่ส่งผลอันตรายต่อผลิตภัณฑ์แสดงการ seal กล่องตามยาวหลังจากกระดาษและStrip ผ่านการฆ่าเชื้อจะเข้าสู่ขั้นตอนการบรรจุโดยการขึ้นรูปกล่องโดยกระดาษจะผ่านห่วงวงแหวนและ strip จะทำหน้าที่เชื่อมกระดาษทั้ง 2 ด้าน เพื่อทำการขึ้นรูปกล่อง (Forming Unit)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

ค่าความขุ่นมัวของสาร

ค่าความขุ่นมัว

ค่าความขุ่นมัวเรียกอีกอย่างว่าค่าโอดี (Optical density) ใช้เมื่อสารที่ต้องการวัดมีลักษณะเป็นอนุภาคแขวนลอยในของเหลว เช่น เซลล์แบคทีเรียส่วนค่า A (absorpbant) ใช้เมื่อต้องการวัดสารละลายตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกันอย่างสมบูรณ์ เช่น สารละลายสีย้อมในน้ำ ส่วนใหญ่ในกรณีที่วิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธี colorimetric ก็จะใช้คำนี้ทั้ง OD.600 และ A.600 ตั้งค่าเครื่องสเปกโตรเหมือนกันทั้ง 2 วิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.

UV-VIS Spectrophotometer

เป็นเครื่องมือที่วัดการดูดกลืนแสงของแสงช่วงความยาวคลื่น 190-800 nm UV-VIS Spectrophotometer ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในห้องปฏิบัติการเพื่อหาปริมาณสารอนินทรีย์ในตัวอย่าง เช่น ไนไตรท์ แอมโมเนีย ฯลฯ โดยวัดการดูดกลืนแสงของสารประกอบที่มีสีเทียบกับสารละลายมาตรฐานธรรมชาติของแสง

แสงเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic wave) แสงมีความเร็วในสุญญากาศเท่ากับผลคูณของความยาวคลื่น และความถี่ แต่ความเร็วในการเดินทางจะเปลี่ยนไปเมื่อเดินทางผ่านตัวกลางอื่นๆ โดยมีความเร็วในการเดินทางเท่ากับ 2.9979×10^{-16} ซม./วินาที/n (n = ดรรชนีหักเหของตัวกลาง, refractive index) แสงต่างชนิดกันจะมีความยาวคลื่นต่างกันและเคลื่อนที่ด้วยความเร็วแตกต่างกันความเข้มของแสงนิยมวัดในหน่วยกำลังเทียน (candle power) หรือลูเมน (lumen) ปริมาณแสงแปรผันโดยตรงกับความเข้ม (intensity) ของแสง ดังนั้นการวัดความเข้มของแสงจึงเป็นการวัดปริมาณแสงทางอ้อม

ความยาวคลื่นแสงนิยมแทนด้วยอักษรกรีกคือ λ (แลมบ์ดา, lambda) แสงแต่ละช่วงความยาวคลื่นถูกกำหนดให้มีชื่อเรียกต่างกันตามข้อกำหนดของ The Joint Committee on Nomenclature in Applied Spectroscopy ดังนี้ (ชูชาติ และเปรมใจ, 2525)

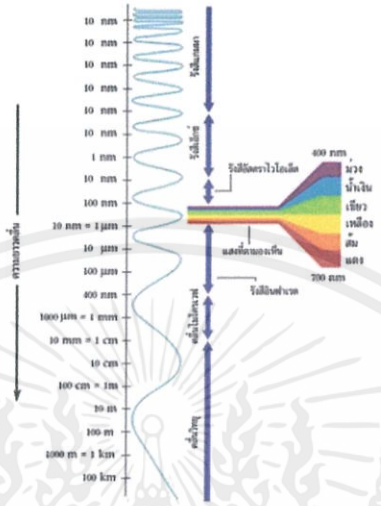
แสงที่มองเห็น (visible light) เป็นแสงสีขาวที่เกิดจากการรวมกันของแสงสีต่างๆ มีสีหลักอยู่ 7 สี คือ สีม่วง สีคราม สีน้ำเงิน สีเขียว สีเหลือง สีแสด และสีแดง มีความยาวคลื่นตั้งแต่ 400-700 ?m เมื่อแสงสีขาวตกกระทบวัตถุแล้วทำให้มองเห็นวัตถุเป็นสีใดแสดงว่าวัตถุดูดกลืนแสงสีอื่นหมดแต่สะท้อนแสงสีที่ตามองเห็นออกมา แต่ถ้าวัตถุนั้น ๆ ดูดกลืนแสงทุกสีไว้ได้หมดจะมองเห็นวัตถุเป็นสีดำ

แสงอุลตราไวโอเลต (ultraviolet light) มีความยาวคลื่นตั้งแต่ 210-380 ?m เป็นแสงที่มีคุณสมบัติในการทำให้อิเล็กตรอนของอะตอมเกิดการส่งผ่าน (electronic transmission) เมื่อร่างกายถูกแสงนี้เป็นเวลานานอาจเกิดอันตราย ตัวอย่างเช่น ผิวหนังไหม้เกรียม เยื่อบุลูกตาถูกทำลาย และอาจทำให้เกิดเป็นมะเร็งของผิวหนังได้ เนื่องจากแสงอุลตราไวโอเลตทำให้ไธมินเบส (thymine base) ในนิวเคลียสของเซลล์รวมตัวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสงอินฟราเรด (infrared light) เป็นแสงที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า สามารถทำให้โมเลกุลของวัตถุต่างๆ เกิดการสั่นสะเทือนอย่างรุนแรงจนเกิดความร้อนขึ้นมาก เนื่องจากวัตถุส่วนใหญ่

ดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นในช่วง 3,000-100,000 ?m ได้ดี ดังนั้นจึงนิยมใช้รังสีอินฟราเรดในการทำให้วัตถุต่างๆ แห้ง เพราะมีประสิทธิภาพในการทำให้แห้งสูงกว่าการใช้ความร้อนแบบธรรม-ดา

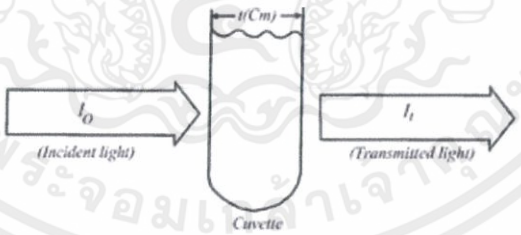


รูปที่ 5.1 คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า

กฎแห่งการดูดกลืนแสง

1. กฎของแลมเบิร์ต (ค.ศ.1760) กล่าวว่า แสงที่ถูกดูดกลืนเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความหนาของตัวกลางที่แสงผ่าน

$$I_t = I_o \times 10^{-kt} \quad (1)$$



รูปที่ 5.2 การดูดกลืนแสงตามกฎของแลมเบิร์ต (lambert's law)

2. กฎของเบียร์ (Beer's law) กฎของเบียร์ (ค.ศ.1852) กล่าวว่า แสงที่ถูกดูดกลืนเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารในของเหลว ซึ่งเมื่อคำนวณเช่นเดียวกับกฎของแลมเบิร์ต จะได้สมการ

$$I_t = I_o \times 10^{-kc} \quad (2)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อรวมกฎทั้งสองเข้าด้วยกัน(Beer-Lambert's law) โดยการบวกสมการที่ (1) และสมการที่ (2) จะได้สมการใหม่ดังนี้

$$I_t = I_o \times 10^{-\varepsilon ct} \quad (3)$$

แต่แสงส่องผ่าน (transmittance, T) มีค่าเท่ากับ I_t/I_o และแสงที่ถูกดูดกลืน (absorbance, A หรือ optical density, OD) มีค่าเท่ากับ $\log (I_o/I_t)$ ดังนั้น

$$A = \varepsilon ct \quad (4)$$

หรือ

$$A = -\log T \quad (5)$$

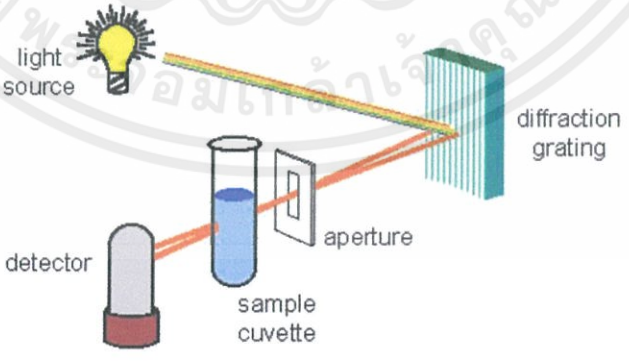
ε = molar absorptivity มีหน่วยเป็น $mole^{-1}cm^{-1}$

c = ความเข้มข้นของสารในหน่วย mole/L

t = ความหนาของสารละลายในหน่วย ซม.

ชนิดของเครื่องวัดการดูดกลืนแสง

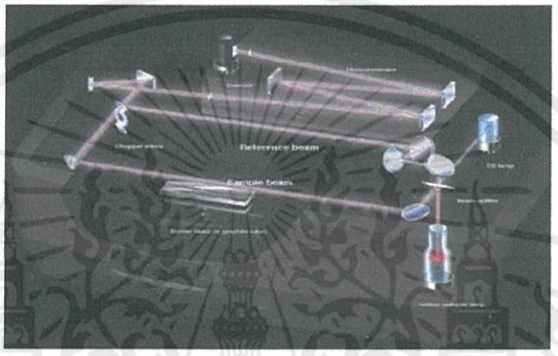
1. ชนิดลำแสงเดี่ยว (single beam type) ใช้ลำแสงลำเดียวกันสำหรับวัดสารอ้างอิง (reference หรือ blank) และสารตัวอย่าง (sample) การวัดความเข้มแสงกระทำโดยปรับ 0 %T แล้วปรับ 0A หรือ 100 %T ด้วยสารอ้างอิง หลังจากนั้นวัดค่าของสารตัวอย่างในหน่วย A หรือ %T ชนิดลำแสงเดี่ยวมีข้อดีตรงที่มีองค์ประกอบน้อย และมีแสงผ่านไปยังสารตัวอย่างมากกว่าแบบอื่นๆ แต่มีข้อเสียตรงที่มีเสถียรภาพในการอ่านค่าต่ำและค่าเปลี่ยนแปลงได้ง่าย นอกจากนี้ยังไม่สามารถกวาด (scan) ดูการดูดกลืนของแสงต่างๆ อย่างต่อเนื่องได้



รูปที่ 5.3 องค์ประกอบที่สำคัญของเครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบ single beam

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ชนิดลำแสงคู่ (double beam type) วัดความเข้มของแสงโดยการสะท้อนแสงที่ผ่านออกมาจากตัวแยกแสงให้ผ่านสารอ้างอิงและสารตัวอย่างสลับกัน ทำให้ความเข้มแสงที่ผ่านตัวอย่างลดลงครึ่งหนึ่ง วงจรจะขยายสัญญาณที่ได้จากการเปรียบเทียบสัญลักษณ์ที่ได้รับจากสารตัวอย่างกับสารอ้างอิงอยู่ตลอดเวลา ดังนั้นจึงมีเสถียรภาพในการวัดความเข้มของแสงดีมากแต่เครื่องวัดชนิดนี้มีองค์ประกอบซับซ้อน เนื่องจากใช้ตัวไวแสงอันเดียวจึงต้องมีวงจรเลือกวัดสัญญาณ และใช้หลอดไฟฟ้ากำเนิดแสงมีกำลังส่องสว่างสูง จึงทำให้มีราคาแพงกว่าเครื่องมือชนิดลำแสงเดี่ยว



รูปที่ 5.4 องค์ประกอบที่สำคัญของเครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบ double beam

วิธีใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

เครื่องวัดการดูดกลืนแสงแต่ละแบบอาจมีเทคนิคการใช้และวิธีการใช้แตกต่างกันบ้างซึ่งผู้ใช้ควรศึกษาคู่มือการใช้งานโดยละเอียดก่อนสำหรับวิธีใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสงโดยทั่วไปมีดังนี้(ชูชาติ, 2539)

1. ถอดถุงคลุมเครื่องออก
2. เปิดสวิทซ์ไฟฟ้าเพื่ออุ่นเครื่องนาน 10-30 นาที
3. ปิดแสงจากภายในหรือภายนอกไม่ให้ตกกระทบตัวไวแสง โดยการปิดฝาครอบช่องใส่คิวเวทท์และปิดช่องแสงออก
4. ปรับ 0%T ด้วยปุ่มปรับศูนย์ ค่าความเข้มของแสงควรจะคงที่ ถ้าไม่คงที่อาจเกิดจากการอุ่นเครื่องไม่พอ หรือเครื่องมือมีความผิดปกติ
5. เลือกความยาวคลื่นแสงที่ต้องการวัดโดยหมุนปุ่มเลือกความยาวคลื่น
6. เลือกตัวกรองตัดแสงรบกวนที่เหมาะสม
7. ใส่รีเอเจนต์อ้างอิง (reagent blank) ลงในช่องใส่คิวเวทท์ ปิดฝาช่องใส่คิวเวทท์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. ปรับ 100%T หรือ OD ด้วยปุ่มควบคุมการปรับในขั้นตอนนี้ต้องกระทำทุกครั้งที่มีการเปลี่ยนความยาวคลื่นแสงที่ใช้วัด

9. ใส่สารตัวอย่างลงในช่องใส่คิวเวทท์ ปิดฝาช่องใส่คิวเวทท์

10. อ่านค่า %T หรือ A

11. ปิดสวิทซ์ไฟฟ้า ปล่อยให้เครื่องเย็นก่อนคลุมเครื่องด้วยถุงคลุมเครื่องมือ

ข้อควรปฏิบัติในการใช้งาน

เพื่อให้การใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสงมีความผิดพลาดน้อยที่สุดควรปฏิบัติดังนี้ (ชูชาติ, 2539)

1. เลือกใช้วิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม

2. เลือกสารตัวอย่างที่เหมาะสม (ไม่ขุ่นหรือมีสีอื่นๆ เจือปนมาก)

3. ปฏิบัติตามคำแนะนำในคู่มือการใช้งาน (operating manual) อย่างเคร่งครัด

4. ตั้งเครื่องมือในที่มีฝุ่นน้อย ความชื้นต่ำอุณหภูมิไม่สูง และควรตั้งห่างจากผนังเพื่อให้ความร้อนระบายออก

5. ใช้เครื่องควบคุมโวลต์ (voltage stabilizer) ถ้าโวลต์ของกระแสไฟฟ้าที่จ่ายให้กับเครื่องมือ มีค่าเปลี่ยนแปลงเกิน 10% (198-242 โวลต์)

6. อุ่นเครื่องให้พอเพียงก่อนใช้งาน

7. ตรวจดูสภาพของหลอดไฟกำเนิดแสงเป็นระยะ ๆ พร้อมกับดูตำแหน่งที่ถูกต้องด้วย

8. ปิดหลอดไฟกำเนิดแสงเมื่อไม่ได้ใช้งาน

9. ปิดช่องแสงออกเมื่อไม่ได้วัดความเข้มของแสง เพื่อยืดอายุการใช้งานของหลอดไฟกำเนิดแสง

10. ใช้ความกว้างของช่องแสงออกแคบ เพื่อสร้างแสงสีเดียวที่มีช่วงความยาวคลื่นแคบ

11. ควรอ่านค่าความเข้มข้นของแสงในช่วง 15-80 %T เนื่องจากการตอบสนองของตัวไวแสงส่วนใหญ่เป็นเส้นตรง

12. ใช้คิวเวทท์ที่สะอาดและมีค่าความแตกต่างของ %T ต่ำ

13. ในกรณีที่มีคิวเวทท์น้อยจำเป็นต้องใช้ร่วมกัน ควรวัดสารละลายที่มีความเข้มข้นน้อยก่อนสารละลายที่มีความเข้มข้นมากตามลำดับ

14. ตรวจสอบความไวของตัวไวแสงเป็นระยะๆ

15. ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลง 100%T หรือ O Abs เป็นระยะ ๆ ในขณะที่ใช้งานเครื่องอยู่

16. มีการบำรุงรักษาเครื่องมือเป็นระยะๆ และสม่ำเสมอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ.

ประโยชน์ของไฮโดรเจนต์ในกระบวณการต่างๆ

ตารางที่ 5.3 การใช้งานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ในอุตสาหกรรม

สิ่งทอ • การฟอกสี ผ้าฝ้ายผ้าเร่ยอน ผ้าลินิน ผ้าไหม • กระบวนการเตรียมเคมีสิ่งทอ(การลอกแป้ง) • การผลิตผ้ายีนส์ • การกำจัดคลอรีน • การตรึงสีย้อม	**Textile** • Bleaching cotton, rayon, linen, silk • Desizing (CMC, starch, PVA) • Denim processing • Antichlorination • Dye fixation
เยื่อกระดาษและกระดาษ • การฟอกเยื้อกระดาษโดยทางกลและเคมี • การดึงหมึกพิมพ์และฟอกสีในการรีไซเคิลกระดาษ	**pulp & Paper** • Bleaching Mechanical and Chemical pμlp. • De-inking and bleaching of recycled paper
ฟอกหนัง • การฟอกผิวและการขจัดขน • การสกัดโปรตีนจากหนังสัตว์	**Leather-tanning** • Bleaching skin and hair removal. • Proteins extracted from skin as animal feed.
อาหาร • การบรรจุภัณฑ์ที่ปลอดเชื้อของ นม น้ำผลไม้ ฯลฯ • การฟอก/ใช้เป็นสารเคมีขจัดสี • ใช้ปรับแต่งเพื่อลดความหนืดของแป้ง • ใช้เป็นสารกันบูดในอาหารประเภทนม • ใช้ฟอกสีน้ำตาล • ใช้เป็นสารทำความสะอาดสำหรับอุปกรณ์และท่อน้ำ	**Food** • Aseptic packaging of milk, fruit juices, etc. • Bleaching / decolorizing agent • Modification of starches to lower the viscosity • Food preservative (milk, whey) • Sugar syrup decolorization • Cleaning solutions for equipments& pipes.
การบำบัดน้ำเสียและการควบคุมมลพิษ	Effluent Treatment and Emission

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>สารมลพิษอนินทรีย์</u> • รีดักชันสารประกอบกำมะถัน(H_2S, SO_X, Thiosulfates) • ไซยาไนด์ • สารประกอบคลอรีนที่ว่องไว(Cl_2,Cl^-,OCl^-) • ไนโตรเจนออกไซด์NO_x • การกำจัดโลหะ(Fe, As, Cr, etc) <u>สารมลพิษอินทรีย์</u> • ฟีโนลิก • อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน • สารประกอบอินทรีย์ซัลเฟอร์(mercaptans, sulfides) • สารคลอโรไฮโดรคาร์บอน(vinyl chloride, trichloroethylene, tetra chloroethylene, etc) • สารกำจัดศัตรูพืช • แอลดีไฮด์ <u>ทั่วไป</u> • การฟื้นฟูทางชีวภาพของน้ำผิวดินกับน้ำใต้ดิน • การลดค่า COD และ BOD • การควบคุมการสร้างตะกอน • เพิ่มค่า DO • กำจัดเมือก • ทำความสะอาดดินที่ปนเปื้อนสารเคมี	**Control** <u>Inorganic Pollutants</u> • Reduced sulfur compounds (H_2S, SO_X, Thiosulfates) • Cyanides (simple and complex) • Active chlorine compounds (Cl_2,Cl^-,OCl^-) • NO_x • Metals removal (Fe, As, Cr, etc) <u>Organic Pollutants</u> • Phenolics • Aromatic hydrocarbons • Organo sulfur compounds(mercaptans, sulfides) • Chlorinated hydrocarbons (vinyl chloride, trichloroethylene, tetra chloroethylene, etc) • Pesticides • Aldehydes <u>General</u> • Bioreclamation of Aquifiers& ground water • COD & BOD reduction, • Bulking control/sludge densification • Supplements DO • Slime removal • Clean up of contaminated soils.
เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	**Aquaculture**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟาร์มกุ้ง • ใช้เป็นสารเคมีทำความสะอาดน้ำ(ขจัด H_2S, สารอินทรีย์) • เติมออกซิเจนให้กับน้ำ • ควบคุมการเจริญของสาหร่าย • รีดักชันไนไทรย์	Shrimp farming • Water cleaning agent (H_2S, organics removal) • Oxygen supplier. • Algae control • Nitrite reduction
การขุดเจาะ กระบวนการสกัดทองและเงิน • เพิ่มประสิทธิภาพในการชะล้างไซยาไนด์บนกองแร่ • ชำระล้างสารพิษไซยาไนด์ ยูเรเนียม • ทำแร่มีความบริสุทธิ์ขึ้น(V, Mo, Na removal) • การชะล้างในพื้นที่ • ออกซิแดนท์กรดหรือชะล้างด่าง • รีไซเคิลยูเรเนียมจากเจาะแบบเปียกด้วยกรดฟอสฟอริก	**Mining** Gold & Silver processing • Heap and agitated cyanides leaching enhancement • Cyanide detoxification Uranium • Yellowcake purification (V, Mo, Na removal) • In-situ leaching • Oxidant in acid or alkaline leaching • Recovery of uranium from wet process phosphoric acid
การผลิตสารเคมี การผลิต • อีพอกไซด์ • ตัวกลางในการสังเคราะห์สเตียรอยด์ การผลิตสารอินทรีย์เพอร์ออกซีเจน • กรดเปอร์แอซิด,MEK เปอร์ออกไซ การผลิตสารเคมีอินทรีย์เฉพาะ • เลตโตน • แอลกอฮอล์ • สารโพลีซัลไฟด์ การผลิตเม็ดพลาสติก • สารละลายอิมัลชันในกระบวนการสังเคราะห์	**Chemical Manufacturing** Manufacture • Epoxides of Oils • Intermediates (Steroids) Manufacture Organic Peroxygens • Peracids, MEK Peroxides Manufacture Speciality organics • Lactones • Alcohols • Polysulfide curing agents Manufacture Initiator for polymers • Emulsion Solution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พอลิเมอร์ ออกไซด์ของกำมะถันและไนโตรเจน • ซัลพอกไซด์,ซัลโฟน • เอมีนออกไซด์ การผลิตสารอนินทรีย์เพอร์ออกซิเจน CaO_2, ZnO,เปอร์โบรเรต,เปอร์คาร์บอเนต การผลิตกรดอาร์ซินิก	polymerization Oxides of sulfur and nitrogen • Sulfoxides,Sulfones • Amine oxides Manufacture Inorganic peroxygens • CaO_2, ZnO_2, Perborates, percarbonates Manufacture Arsenic acid
กระบวนการทางเคมี • H_2SO_4 • การขจัดสี • การฟอกสินแร่ • การปรับเปลี่ยนคุณสมบัติของแป้ง • การกำจัดน้ำมัน • การปรับส่วนผสมในน้ำหล่อเย็น	**Chemical processing** • H_2SO_4 • Decolorization • Mineral bleaching • Starch modification • Oil bleaching • Formulations for Cooling water treatment
ผงซักฟอกและสารฟอกขาว • เปอร์บอเรต • เปอร์คาร์โบเนต • สารฟอกชนิดเหลว H_2O_2 • สารเปอร์ออกไซด์ชนิดข้นหรือเจล • กรดเปอร์แอซิด	**Detergent and Peroxide based bleaches** • Perborates • Percarbonates • Liquid H_2O_2 Bleach • Thickened/gelled peroxides • Peracids
เครื่องสำอาง • ฟอกย้อมสีผม • ครีมจัดแต่งผม • การเซตสีย้อมโดยการออกซิเดชัน • ครีมบำรุงผิวหน้า	**Cosmetics** • Hair bleach • Perm waves • Hair dye setting through oxidation • Facial creams

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เภสัชกรรม • สูตรน้ำยาฆ่าเชื้อเฉพาะที่ • น้ำยาบ้วนปาก,น้ำยาทำความสะอาดฟันปลอม • น้ำยาล้างเลนส์ • การบำบัดด้วยออกซิเจน	**Pharmaceutical** • Topical antiseptic formulations • Mouth wash, denture cleaner • Contact lens cleaner • Oxygen Therapy
โรงผลิตไฟฟ้า • การควบคุม SO_X • การควบคุมคราบเมือกในน้ำหล่อเย็น	**Power Plant** • SO_X control • Slime control in cooling water
แท่นขุดเจาะน้ำมัน • ทำให้เกิดเจล/พอลิเมอร์และแตกพันธะพอลิเมอร์ • กำจัดเมือกในการฉีดหลุม • ทำลายอิมัลชัน • เพิ่มประสิทธิภาพและกระตุ้นการซึมผ่าน • ก๊าซธรรมชาติ • การกำจัด H_2S ในน้ำเค็ม	**Oil Field** • Gel/polymer formation and breaking • Slime removal in injection wells • Emulsion breaking • Stimulation and permeability enhancement • Natural gas sweetening • H_2S removal in brines
ฟอกสีไม้ • เฟอร์นิเจอร์สีครีม	**Wood Bleaching** • Cream color furniture
ชุบโลหะและโลหะผสม • ทำความสะอาด, เพิ่มความแวววาวหรือเพิ่มความทึบให้กับโลหะหรืออัลลอยด์ • การกู้คืนโลหะมีค่าและการทำให้โลหะมีบริสุทธิ์ เช่น โคบอลต์ แพลเลเดียมทังสเตน	**Electroplating & Metallurgy** • Cleaning,engraving,brightening or Passivation of metals and alloys • Recovery and purification of precious metals eg. cobalt, palladium, tungsten
สัตว์ปีก • ใช้ฆ่าเชื้อโรคในโรงเพาะฟัก • ฆ่าเชื้อในกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ไข่ • ลดน้ำตาลในไข่และควบคุมป้องกันการเกิดจุด	**Poultry** • In Hatchery to destroy microorganisms • To pasteurize egg whites

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สีน้ำตาล	• desugar egg whites and prevents browning Control
การฆ่าเชื้อโรค • บรรจุภัณฑ์อาหารทะเลผัก ผลไม้ • กระบวนการผลิตน้ำ • ถังน้ำดื่ม / อุปกรณ์ / ท่อน้ำ / หลอดน้ำดื่ม - บ่อน้ำ • หอหล่อเย็น/ เครื่องปรับอากาศ (ที่โรงพยาบาล โรงแรม) • อุตสาหกรรมเครื่องดื่มและเบียร์ • ฟาร์มสัตว์ปีก • สระว่ายน้ำ / สปา / น้ำพุ • ชั้นและกระเบื้องที่โรงพยาบาล / โรงแรม / โรงเรียนยานพาหนะการขนส่ง	**Disinfection** • Sea-food, fruits, vegetable packaging • Process water • Drinking water tanks/ equipments/ pipelines/ Water tube - wells • Cooling Towers/ Air conditioning (at hospitals, hotels) • Beverage industry and breweries • Poultry farm • Pools/ Spa/ Fountains • Floors and tiles at hospitals/ hotels/ schools Transport vehicles

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้