บทที่ 2
หลักการและทฤษฎี

2.1 วัตถุดิบลิกโนเซลลูโลส

2.1.1 ไม้ไผ่

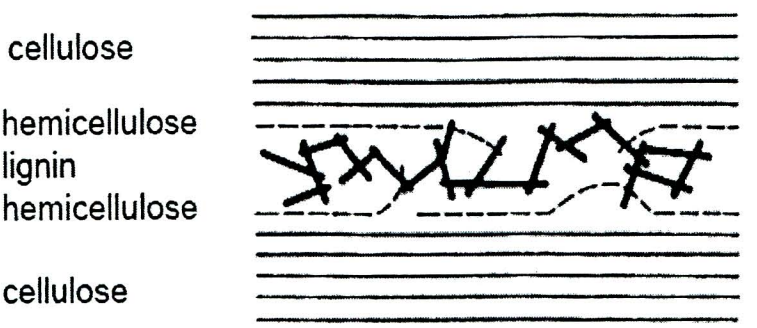
ไม้ไผ่จัดเป็นไม้ไม่ผลัดใบ ขึ้นเป็นกอ ลำต้นเป็นปล่องๆ และเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีลำต้นสูงที่สุด ซึ่งจัดเป็นพืชประเภทลิกโนเซลลูโลส อยู่ในตระกูลเดียวกับพืชวงศ์หญ้า จำพวกข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี และข้าวบาร์เลย์ มีหลายชนิดและหลายสกุล ซึ่งมีจำนวนมากกว่า 1250 ชนิด ภายใน 75 สกุล ไม้ไผ่ในเอเชียมีมากกว่า 1000 ชนิด ครอบคลุมพื้นที่กว่า 180,000 ตารางกิโลเมตร ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีไม้ไผ่อยู่หลายสายพันธุ์ เช่น ไผ่บง ไผ่หวาน ไผ่ป่า ไผ่สีสุก ไผ่จีน ไผ่ดำ ไผ่ตง เป็นต้น โดยเฉพาะไผ่ตงเป็นไผ่หนึ่งในหลายสกุลและหลายชนิดที่พบมากในประเทศไทย หน่อไม้ไผ่ตงมีขนาดใหญ่ หวาน และเป็นที่นิยมมากกว่าหน่อไม้จากไผ่ชนิดอื่น ลำต้นไผ่ตงมีขนาดใหญ่กว่าไผ่ชนิดอื่นๆ มีลักษณะกลวง มีความเหนียว ทนทาน และเบา ประโยชน์ของไม้ไผ่มีดังนี้

- นำมาทำเฟอร์นิเจอร์ เพราะมีความแข็งแรงและยืดหยุ่นที่เหนือกว่าวัสดุสังเคราะห์หลายชนิด
- เป็นพืชที่เจริญเติบโตเร็ว สามารถเติบโตได้อย่างเต็มที่ภายในระยะเวลา 5 ปี และให้ผลผลิตหรือแตกหน่อได้ตลอดเวลา
- มีราคาถูก และสามารถหาได้ทุกภาคในประเทศ
- มีองค์ประกอบทางเคมีในไม้ไผ่ที่สามารถนำมาแปลงสภาพให้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงได้

จากคุณสมบัติทางเคมีของไม้ไผ่จึงนับเป็นแหล่งพลังงานที่มีศักยภาพสำคัญที่ควรได้รับความสนใจและพัฒนาเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการแปลงสภาพของไม้ไผ่เพื่อทำให้เกิดปริมาณน้ำตาลจากเซลลูโลสให้มากที่สุด และนำไปสู่กระบวนการแปรสภาพเพื่อทำให้เกิดเป็นพลังงานเชื้อเพลิงที่มากขึ้น โดยรายละเอียดขององค์ประกอบทางเคมีจะได้กล่าวในหัวข้อต่อไปนี้

2.1.2 องค์ประกอบของวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลส

ไม้ไผ่จัดเป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส มีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งสามารถแปลงสภาพเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่นำไปผลิตเป็นเชื้อเพลิงเอทานอลได้ เนื้อเยื่อของพืชแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันทั้งทางด้านโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมี โดยทั่วไปแล้วเซลลูโลสจะเป็นส่วนที่อยู่โดยรอบส่วนอื่นๆ คือ เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ซึ่งมีการจัดเรียงตัวกันอย่างใกล้ชิด โดยจะมีพันธะโควาเลนต์เชื่อมต่อระหว่างลิกนินและโพลีแซคคาไรด์ ส่วนของเฮมิเซลลูโลสจะมีการเรียงตัวขนานไปกับเส้นใยเซลลูโลส แสดงดังรูป 2.1



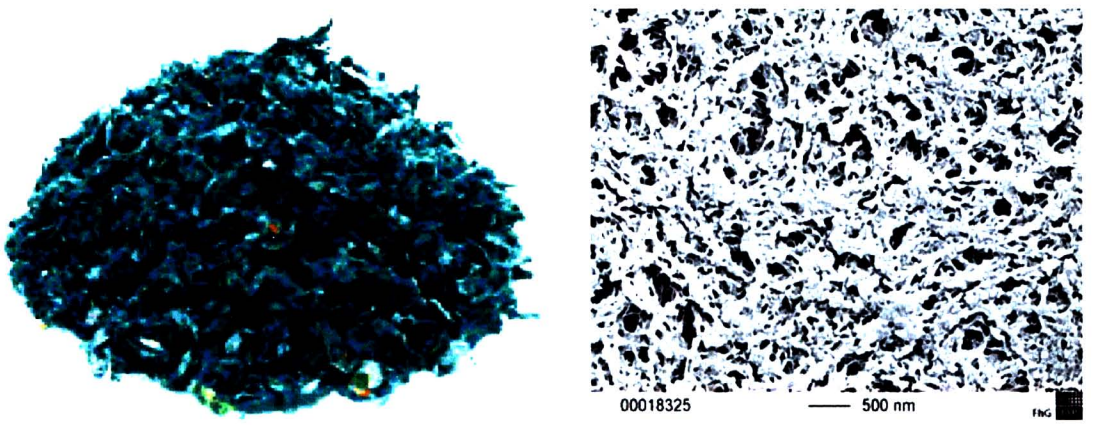
รูป 2.1 ตัวอย่างโครงสร้างวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสในไม้เนื้ออ่อน (วิไลวรรณ ลีนะกุล, 2552)

2.1.2.1 เซลลูโลส (cellulose)

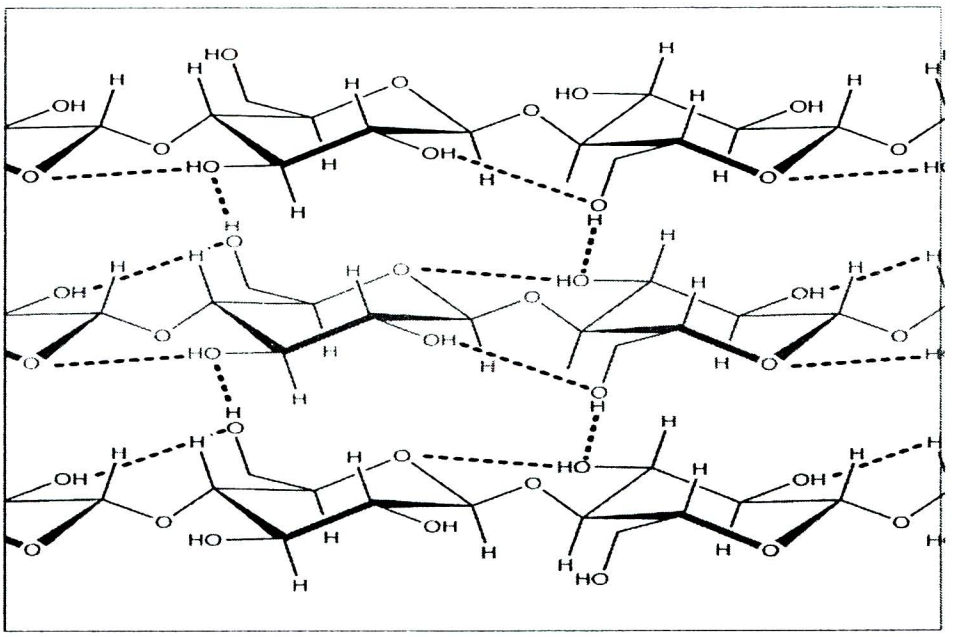
เซลลูโลส(cellulose)เป็นสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ (polysaccarides) เชิงเส้นตรงที่ประกอบด้วยหน่วยซ้ำๆ กัน มีสูตรโมเลกุลทั่วไปคือ $C_6H_{12}O_6$ เป็นโครงสร้างในเนื้อเยื่อพืช เซลลูโลสประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว D-glucopyranose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1-4-glycosidic ซึ่งมีความยาวต่างกันไป จับกับลูกโซ่ข้างเคียงด้วยพันธะไฮโดรเจนทำให้เกิดเป็นลักษณะที่เรียกว่า ไฟบริล (fibrils) แต่ละไฟบริลจะเรียงต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ซึ่งเกิดการทำให้ติดกันขึ้นมา เซลลูโลสจะฝังตัวอยู่ในของเหลวที่มีรูปร่างไม่แน่นอน เรียกว่า แมทริกซ์โพลีแซคคาไรด์ โดยพบรวมกับลิกนิน เพนโตแซนกัม แทนนิน ไขมัน สารที่ทำให้เกิดสี เป็นต้น เซลลูโลสมีหมู่ไฮดรอกซิลถึง 3 หมู่ สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของเซลลูโลสจึงมีมากและโครงสร้างของเซลลูโลสยังจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ จึงทำให้เซลลูโลสมีความเป็นผลึกสูงมาก อุณหภูมิการหลอมตัวจึงสูงมาก มักจะเกิดการสลายตัวก่อนถึงอุณหภูมิหลอมตัว และมีความสามารถในการละลายต่ำ เซลลูโลสธรรมชาติจะมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยต่างกัน การกระจายน้ำหนักโมเลกุลของเซลลูโลสมีความสำคัญต่อสมบัติทางกายภาพ ส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะ

ส่งผลให้คุณสมบัติทางกายภาพไม่ดี ในทางอุตสาหกรรมจะหาน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณได้โดยการวัด จึงจำเป็นที่จะต้องมีการนำวัตถุดิบไปผ่านกระบวนการต่างๆ เพื่อเปลี่ยนสภาพวัตถุดิบให้เหมาะต่อการนำไปย่อยให้เป็นน้ำตาลด้วยการใช้กรดหรือเอนไซม์ (น้ำย่อย) แล้วเข้าสู่กระบวนการหมักต่อไป

โครงสร้างทางกายภาพของผนังเซลล์พืช มีเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบสำคัญ ซึ่งเป็นหน่วยเล็กๆ ที่ประกอบรวมเป็นเนื้อเยื่อพืช ในเซลล์พืชมีโปรโตปลาสซึมและสารหล่อเลี้ยงในเซลล์ โดยมีผนังบางๆ ที่ไม่มีสี เรียกว่า เซลล์เมมแบรนห่อหุ้มอยู่ เซลลูโลสเป็นน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ที่แตกต่างกับแป้ง คือการจัดเรียงตัวที่ต่างกัน เอนไซม์ที่ย่อยให้กลายเป็นน้ำตาลจะไม่เหมือนกัน เอนไซม์ที่ย่อยเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยว คือ เซลลูเลส (cellulese) ลักษณะทางกายภาพของเซลลูโลส โครงสร้างทางเคมี การเรียงตัวของกลูโคส และเซลลูโลสในโครงสร้างพืช แสดงดังรูป 2.2-2.3



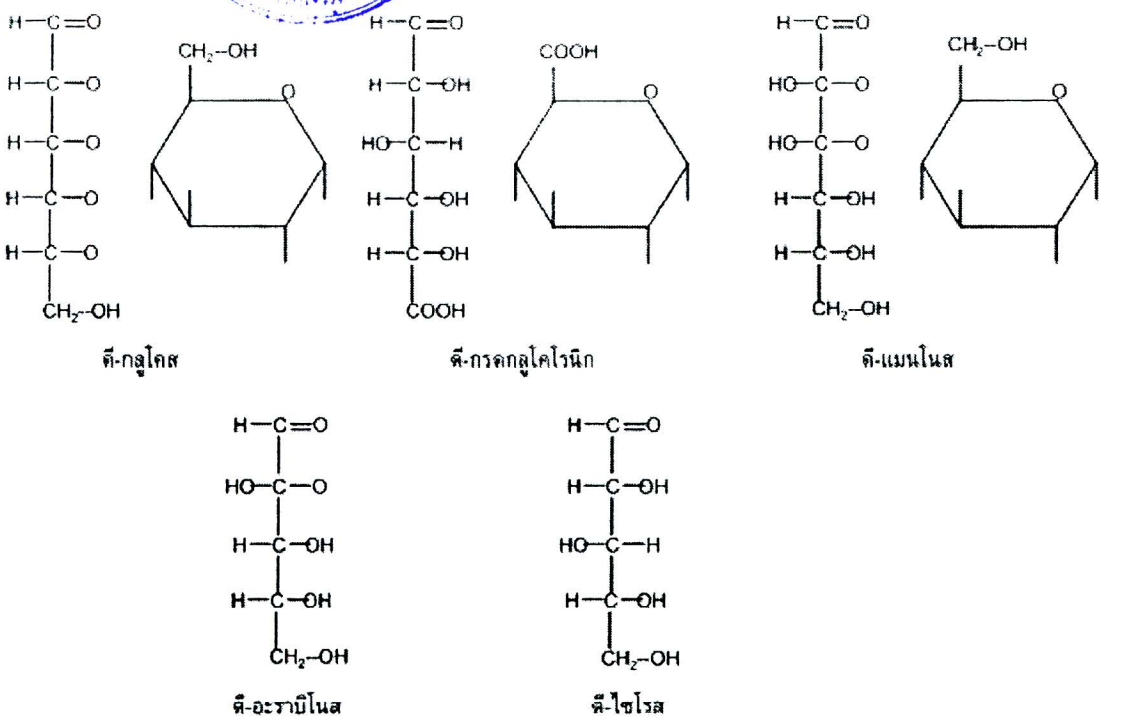
รูป 2.2 ลักษณะเซลลูโลสที่ได้มาจากพืช (นคร ทิพยาวงศ์, 2552)



รูป 2.3 ลักษณะการจัดเรียงตัวของโมเลกุลกลูโคสในเซลลูโลส (นคร ทิพยาวงศ์, 2552)

2.1.2.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ในผนังเซลล์พืช โดยจะทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมประสานกลุ่มเส้นใยเซลลูโลสร่วมกับลิกนินและเพกตินประกอบเป็นผนังเซลล์ทำให้เซลล์มีความแข็งแรง สามารถคงรูปอยู่ได้และมีความคล้ายคลึงกับเซลลูโลส โดยทั่วไปแล้วเฮมิเซลลูโลสประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิด คือ ไซแลน (xylans) ซึ่งมีน้ำตาลไซโลส (xylose) แมนแนน (mannans) ซึ่งมีน้ำตาลแมนโนส (mannose) และกาแลกแตน (galactan) ซึ่งมีน้ำตาลกาแลกโตส (galactose) นอกจากนี้ยังมีกลูโคแมนแนน (glucomannan) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส (glucose) และน้ำตาลแมนโนส (mannose) ไซโลกลูแคน (xyloglucans) ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลส (xylose) และน้ำตาลกลูโคส (glucose) และแคลโลส (callose) จัดเป็นเฮมิเซลลูโลส ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาลกลูโคสที่เกาะกันแบบ β-1, 3-glucosidics bond ซึ่งจะพบบริเวณปลายเซลล์ท่ออาหาร มีโครงสร้างแสดงดังรูป 2.4 เฮมิเซลลูโลสพบในเนื้อเยื่อของพืช โดยรวมอยู่กับสารอื่นๆ เช่น ลิกนิน ลิกโนเซลลูโลส เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ พบมากในแกลบ ซังข้าวโพด เฮกโซแซน สูตรทางเคมีคือ $(C_6H_{12}O_5)_{2n}$

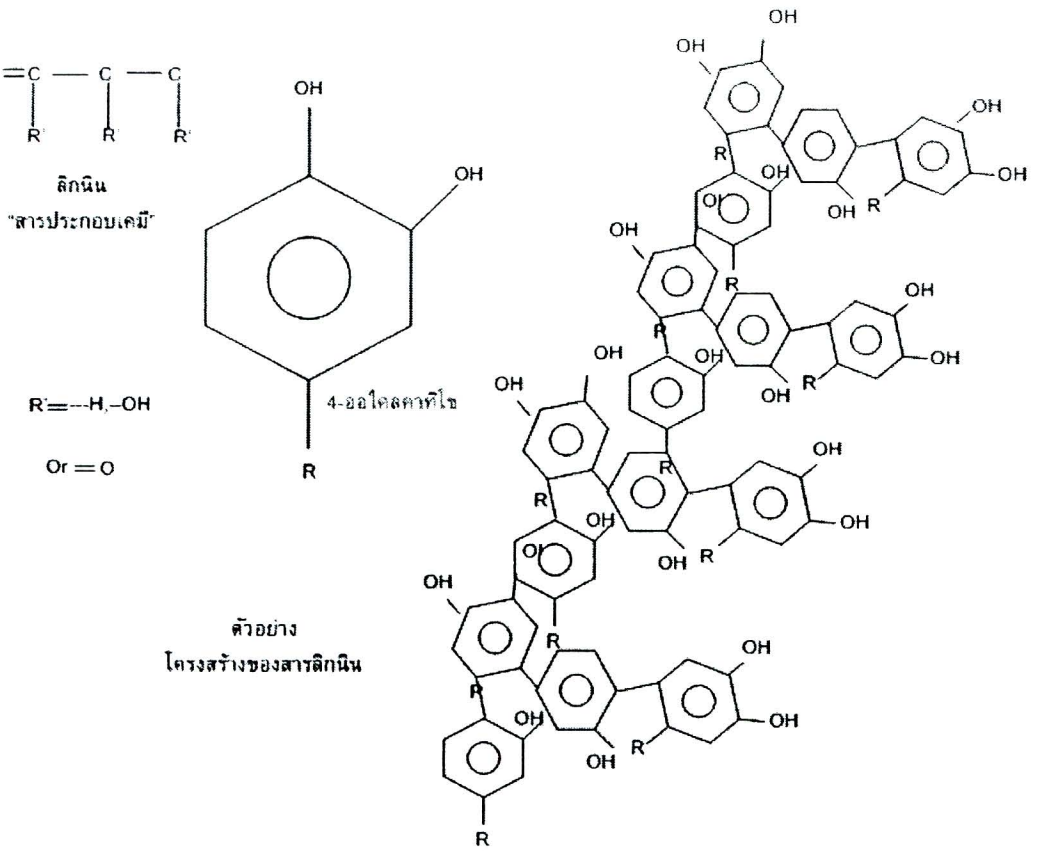


รูป 2.4 ลักษณะสูตรโครงสร้างโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลส (นคร ทิพยาวงศ์, 2552)

2.1.1.3 ลิกนิน (lignin)

ลิกนิน (lignin) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนมีน้ำหนักโมเลกุลสูง มักพบอยู่รวมกับเซลลูโลส ลิกนินเป็นสารที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนรวมกันเป็นหน่วยย่อยหลายชนิดซึ่งเป็นสารอะโรมาติก ลิกนินไม่ละลายน้ำ ไม่มีสมบัติทางการยืดหยุ่น เพราะฉะนั้นจึงทำให้พืชที่มีลิกนินมากมีความแข็งแรงทนทาน เมื่อพืชตายลิกนินจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ลิกเนส (lignase) หรือลิกนินเนส (ligninase) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญในรา ลิกนินมักพบในผนังเซลล์ทุติยภูมิซึ่งตายแล้ว การมีลิกนินทำให้เซลล์แข็งแรงและทำให้ไฟบริลไม่เคลื่อนที่ ช่วยป้องกันอันตรายให้ไฟบริลได้ด้วย และมีความต้านทานต่อสารเคมี และการกระทบกระแทกต่างๆ มีโครงสร้างแสดงดังรูป 2.5

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ - 9 ก.ย. 2554
เลขทะเบียน 242251
เลขเรียกหนังสือ

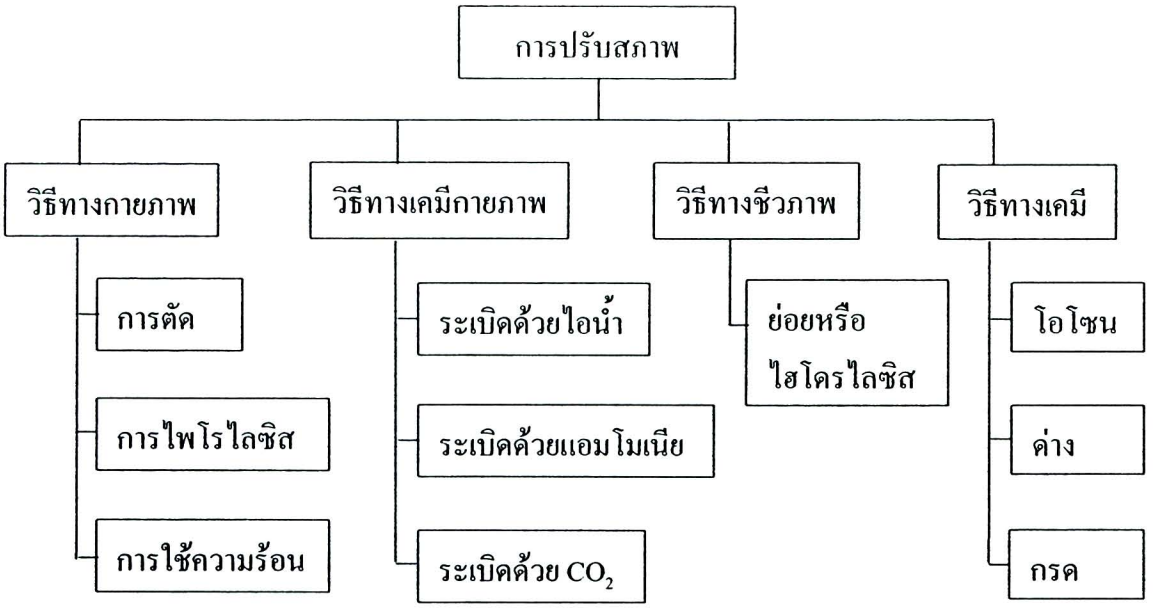


รูป 2.5 โครงสร้างของลิกนิน (นคร ทิพยาวงศ์, 2552)

2.2 กระบวนการเปลี่ยนวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล

2.2.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment)

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบที่ประกอบด้วยเส้นใยธรรมชาติ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และสารอื่นๆ แล้วแต่ละชนิดของวัตถุดิบ การเตรียมวัตถุดิบนั้นต้องทำด้วยกัน 2 กระบวนการ คือ การปรับสภาพ (pretreatment) และการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ซึ่งในกระบวนการปรับสภาพนี้จะทำเพื่อลดเฮมิเซลลูโลสและลิกนินให้เหลือเซลลูโลสให้มากที่สุด นอกจากนี้ยังช่วยทำให้ลดความเป็นผลึกของเซลล์และเพิ่มความพรุนในเนื้อวัตถุดิบอีกด้วย ทำให้ส่งผลดีต่อกระบวนการไฮโดรไลซิสในการย่อยด้วยเอนไซม์ นอกจากนี้การปรับสภาพต้องการปรับปรุงการสร้างตัวของน้ำตาล ช่วยในการเหลีกเลี่ยงการเสื่อมสภาพของคาร์โบไฮเดรตในวัตถุดิบ และลดการสร้างสารยับยั้งที่จะทำให้เกิดการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ได้ ซึ่งกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบแสดงดังรูป 2.6 สามารถแบ่งได้เป็น 4 วิธีหลักๆ ซึ่งแต่ละวิธีมีวิธีย่อยลงไปอีกดังนี้



รูป 2.6 แสดงขั้นตอนการปรับสภาพของวัตถุดิบประเภทไม้เนื้อแข็ง (Hayes, 2009)

2.2.1.1 การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (physical pretreatment)

(i) การใช้แรงทางกล (mechanical communition)

คือวิธีการทำให้วัตถุดิบมีขนาดเล็กลงสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การทุบ การบด การโม่ การเขย่าวัตถุดิบ เป็นต้น ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการลดผลึก (cellulose crystallinity) และเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาให้มากขึ้น ความสามารถในการลดขนาดจะขึ้นอยู่กับขนาดสุดท้ายของวัสดุและคุณสมบัติของวัสดุนั้น ซึ่งปกติขนาดของเศษวัตถุดิบจะทำให้มีขนาดประมาณ 0.2-2 มิลลิเมตร

(ii) การไพโรไลซิส (pyrolysis)

คือวิธีการอบที่ใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง ให้วัตถุดิบกลายสภาพเป็นแก๊สหรือของแข็ง กระบวนการจะทำได้ช้าและการระเหยจะต่ำถ้าใช้อุณหภูมิต่ำ จากการวิจัยพบว่า การใช้อุณหภูมิมากไปหรือน้อยไปจะไม่เป็นผลดี จึงต้องมีการวิจัยที่เหมาะสม ซึ่งสำหรับงานวิจัยนี้ยังมีข้อมูลที่ค่อนข้างน้อย

(iii) การใช้ความร้อน (thermal heat treatment)

คือการปรับสภาพของวัตถุดิบเพื่อทำลายเนื้อเยื่อของเซลลูโลส ซึ่งโดยส่วนใหญ่มักจะใช้อุณหภูมิมากกว่า150-180องศาเซลเซียส แต่ต้องทำให้วัสดุมีขนาดที่เล็กลงก่อนเข้าสู่กระบวนการย่อยวัตถุดิบทางความร้อน ซึ่งมีวิธีการที่น่าสนใจและนิยมนำมาปรับสภาพคือ Liquid

hot water : LHW วิธีนี้มีความแตกต่างตรงที่ใช้ความร้อนในรูปแบบของของเหลว โดยมี pH ในการปรับสภาพวัสดุอยู่ในช่วง 4-7 ใช้อุณหภูมิที่สูงกว่าการระเบิดด้วยไอน้ำ คือมากกว่า 200 องศาเซลเซียส ขึ้นไป และมีการทำปฏิกิริยาได้น้ำตาลมากกว่าการระเบิดด้วยไอน้ำอีกด้วย เนื่องจากของเหลวมีความร้อนสูงมากๆ ทำให้สามารถทำลายโครงสร้างและองค์ประกอบส่วนต่างๆ ของวัตถุดิบได้ดีกว่า

2.2.1.2 การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีกายภาพ (physical-chemical pretreatment)

(i) การระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion)

คือวิธีการที่นำวัตถุดิบผสมกับไอน้ำอิ่มตัวที่ความดันสูง ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (นคร, 2552) การระเบิดด้วยไอน้ำโดยส่วนใหญ่แล้วจะทำที่อุณหภูมิช่วง 160-260 องศาเซลเซียส ความดัน 0.69-4.83 เมกะปาสคาล จากการศึกษาพบว่าการใช้อุณหภูมิที่ต่ำและการใช้เวลาที่นานขึ้นจะทำให้เกิดการละลายเฮมิเซลลูโลสและการเกิดกระบวนการไฮโดรไลซีสได้ค่าที่ดีที่สุด โดยที่วัตถุดิบจะถูกผสมกับไอน้ำอิ่มตัวที่สภาวะความดันสูง หลังจากนั้นจะทำการลดความดันอย่างรวดเร็ว ส่งผลทำให้เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินเกิดการแตกตัวออกจากกันที่อุณหภูมิสูง โดยส่วนของเฮมิเซลลูโลสจะละลายในน้ำที่เกิดจากการควบแน่นของไอน้ำ ซึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อกระบวนการปรับสภาพด้วยวิธีนี้คือ เวลา อุณหภูมิ ขนาดของวัสดุและปริมาณความชื้นที่อยู่ในวัตถุดิบ ซึ่งบางครั้งอาจจะมีการเติมกรด เช่น กรดซัลฟิวริกหรือการเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ก่อนเข้าสู่การระเบิดด้วยไอน้ำ เพื่อให้เข้าไปทำปฏิกิริยาภายในส่วนโครงสร้างของวัตถุดิบตั้งต้นก่อน ข้อดีของกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำคือ มีการสูญเสียพลังงานน้อยกว่า เมื่อเทียบกับการใช้ด้วยวิธีทางกล การแปลงสภาพโดยวิธีทางกลจะใช้พลังงานสูงกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกองค์ประกอบที่ใช้การแยกแบบเชิงกล เชิงความร้อนและเชิงเคมีไว้ด้วยกัน มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยลงเนื่องจากไอน้ำไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม แต่ข้อเสียคือในการทำลายแยกส่วนประกอบออกจากกันของลิกนินมักเกิดไม่สมบูรณ์ และมักเกิดเป็นกลุ่มของสารประกอบที่ไปเป็นตัวยับยั้งการเกิดจุลชีพในการใช้เอนไซม์ในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส (Enzymatic hydrolysis) และกระบวนการหมัก (Fermentation) ด้วย

(ii) การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (ammonia fiber explosion)

วิธีการนี้ใช้แอมโมเนียที่อุณหภูมิสูงให้ความดันสูงระยะหนึ่ง แล้วทำการลดความดันลง ซึ่งมีผลต่อวัตถุดิบ วัตถุดิบที่ผ่านกระบวนการนี้จะมีอัตราการเป็นน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น แต่ไม่มีผลต่อปริมาณของเฮมิเซลลูโลส ได้ผลไม่ดีกับพืชที่มีลิกนินอยู่มาก ในกระบวนการนี้สามารถนำแอมโมเนียกลับมาใช้ได้ใหม่ และไม่ก่อให้เกิดตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

(iii) การระเบิดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 explosion)

วิธีการนี้ใช้คาร์บอนไดออกไซด์จากกรดคาร์บอนิกในการเพิ่มปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสขั้นต่อไป แต่วิธีนี้ได้ผลผลิตต่ำกว่าการใช้ไอน้ำหรือแอมโมเนีย แต่ไม่เกิดตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ในขั้นตอนการไฮโดรไลซิสเหมือนวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ

2.2.1.3 การปรับสภาพวิธีการทางชีวภาพ (biological pretreatment)

วิธีการนี้ใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์เพื่อช่วยในการย่อยวัตถุดิบ เช่น ราขาว รา น้ำตาล ในการลดเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้อยู่ในรูปโซ่ตรงและช่วยลดความเป็นผลึก จุดเด่นของวิธีนี้คือมีการใช้พลังงานต่ำ ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม แต่มีจุดด้อยคือมีอัตราการเกิดไฮโดรไลซิสต่ำมาก ซึ่งเชื้อราจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติไม่เหมือนกัน บางตัวอาจจะมีผลทำลายเซลลูโลสด้วย ดังนั้นควรเลือกตัวที่สามารถทำลายเฮมิเซลลูโลสและลิกนินเท่านั้น

2.2.1.4 การปรับสภาพวิธีทางเคมี (chemical pretreatment)

(i) การทำปฏิกิริยากับโอโซน (ozonolysis)

วิธีการนี้สามารถทำได้ที่อุณหภูมิห้องและนับว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการเอาลิกนินออกได้ดี เนื่องจากสามารถทำให้เกิดการแตกตัวของลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในวัตถุดิบได้ เช่น ฟางข้าว เป็นต้น นอกจากนี้ยังไม่มีสารพิษที่จะไปยับยั้งการทำปฏิกิริยาในส่วนต่างๆ ของวัตถุดิบด้วย แต่ผลเสียของวิธีนี้คือมีราคาสูงมาก

(ii) การทำปฏิกิริยาด้วยการใช้ด่าง (alkaline hydrolysis)

การใช้ด่างเจือจางในวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสจะมีผลทำให้เกิดการบวมภายในโครงสร้างของวัตถุดิบ เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสและเพิ่มความพรุนในการทำปฏิกิริยา โดยที่ความพรุนของวัตถุดิบจะสามารถเพิ่มขึ้นได้นั้นต้องกำจัดสายโซ่ที่เชื่อมต่อภายในโครงสร้าง ทำให้ลดความเป็นโครงสร้างผลึกของเซลลูโลสและลดระดับความเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ สามารถแยกสายโครงสร้างระหว่างลิกนินและคาร์โบไฮเดรต และเป็นการแยกองค์ประกอบหรือทำลายโครงสร้างของลิกนิน อย่างไรก็ตามการใช้ด่างเพื่อปรับสภาพมักจะไม่มีผลต่อวัสดุพวกไม้เนื้ออ่อนเท่าไม้เนื้อแข็ง นอกจากนี้มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับไม้ไผ่โดยมีการนำด่างมาปรับสภาพร่วมกับวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ พบว่าได้ปริมาณกลูโคสและไซโลส 456 mg/g และ 460 mg/g ตามลำดับ (Yamashit และคณะ,2010) ดังนั้นจึงควรใช้ด่างร่วมกับวิธีการอื่นเพราะได้ปริมาณน้ำตาลที่มากกว่าด้วยการใช้ด่างปรับสภาพเพียงอย่างเดียว

(iii) การทำปฏิกิริยาด้วยการใช้กรด (acid hydrolysis)

กระบวนการปรับสภาพโดยการใช้กรดนั้นมีจุดประสงค์คือเพื่อให้ได้น้ำตาลในปริมาณที่สูงจากวัตถุดิบจากชีวมวลลิกโนเซลลูโลส เนื่องจากสามารถเข้าไปทำลายพันธะของโครงสร้างวัตถุดิบได้ดีกว่าและนิยมกันอย่างแพร่หลายเพราะราคาไม่สูงมากนัก ซึ่งชนิดของกรดที่นิยมนำมาปรับสภาพวัตถุดิบมีหลายประเภทด้วยกันได้แก่ กรดซัลฟิวริก ไฮโดรคลอริก ไนตริก หรือฟอสฟอริก ในการใช้กรดเจือจางจะมีอยู่ 2 รูปแบบที่ใช้คือ (ก) ปริมาณสารตั้งต้นน้อย (5-10 % [w/w]), ที่อุณหภูมิสูง (T> 433 K) และ (ข) ปริมาณสารตั้งต้นมาก (10-40 % [w/w]), ที่อุณหภูมิต่ำ (T< 433 K) แต่การปรับสภาพวัตถุดิบโดยการใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูงจะมีอันตรายเพราะมีความเป็นพิษสูง ซึ่งมีผลต่อการเกิดการยับยั้งกระบวนการเกิดน้ำตาลและยีสต์ ดังนั้นการใช้กรดเจือจางจึงเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับความนิยมและสนใจที่จะศึกษากันแพร่หลายที่สุด (Ballesteros และคณะ, 2008)

ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้การปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจางและตามด้วยการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพื่อให้เกิดเป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเลือกใช้ปริมาณสารตั้งต้นน้อย คือ 5-10 % w/w ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 160 °C เนื่องจากพบว่าสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของเฮมิเซลลูโลสได้เพียงพอ และถ้ามีการใช้อุณหภูมิที่สูงกว่า 160°C จะมีผลต่อเซลลูโลสมากกว่า ซึ่งพบว่าจะมีการเกิดปริมาณน้ำตาลที่สูงและมีการสลายส่วนประกอบของลิกนิน โดยทั่วไปแล้วการใช้กรดเจือจางผสมกับวัสดุชีวมวลก่อนไปสู่กระบวนการไฮโดรไลซีสพบว่าได้ผลผลิตมากกว่า 90 % และวัสดุชีวมวลที่ไม่ผ่านการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนพบว่าผลผลิตที่ได้มีค่าน้อยกว่า 20% (Hamelinck และคณะ, 2008)

2.2.2 ระดับความรุนแรงของการปรับสภาพ (combined severity factor-pretreatment)

การปรับสภาพด้วยกรดเจือจางที่ระดับความรุนแรงมากขึ้นจะทำให้วัสดุเกิดการแยกตัวออกจากกันมากขึ้นเพราะโครงสร้างของวัสดุถูกทำลาย ส่งผลให้กระบวนการไฮโดรไลซิสทำงานดีขึ้น จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีการ HPLC พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเอนไซม์สามารถเข้าไปย่อยสลายวัสดุได้ดี แต่อย่างไรก็ตามก็มีข้อเสียคือการปรับสภาพที่รุนแรงที่มากเกินไปจะเป็นการทำลายวัสดุอีกทางหนึ่ง ทำให้เกิดการสูญเสียน้ำตาลบางส่วนที่จะออกมาได้เช่นกัน ดังนั้นจึงต้องหาสภาวะที่เหมาะสมกับวัสดุนั้นด้วย เพื่อเป็นการรักษาสภาพวัสดุในการย่อยสลายให้ได้น้ำตาลออกมาให้มากที่สุด

Combined severity factor (CSF) คือตัวแปรที่บ่งบอกระดับวามรุนแรงของการปรับสภาพวัสดุซึ่งมีความแม่นยำที่ช่วยให้การเปรียบเทียบสิ่งที่รวมกันง่ายขึ้น ของปริมาณข้อมูลในช่วงกว้างๆ

โดยแสดงความสัมพันธ์ภายใต้เงื่อนไขคือการทำปฏิกิริยาของเวลา อุณหภูมิ และความเข้มข้นของกรด รวมไว้ในตัวแปรเพียงตัวเดียว (Wyman และ Lloyd, 2005) ซึ่งแสดงดังสมการ (1) ดังนี้

$$R_0 = t \cdot \exp\left(\frac{T_H - T_R}{14.75}\right) \quad (1)$$

โดย

R_0 คือตัวแปรรวมของกระบวนการ

t คือเวลาในการทำปฏิกิริยา (นาที)

T_H คืออุณหภูมิของการทำ hydrolysis (องศาเซลเซียส)

T_R คืออุณหภูมิอ้างอิง (ส่วนใหญ่ใช้ที่ 100 องศาเซลเซียส)

เมื่อรวมผลกระทบของกรดเจือจาง ค่าแฟคเตอร์ความแม่นยำจะใช้ : $\log(CS) = \log(R_0) - pH$

ดังนั้นหาค่า Combined severity factor (CSF) จากสมการ (2) ดังนี้

$$CFS = \log\left\{t \cdot \exp\left(\frac{T_H - T_R}{14.75}\right)\right\} - pH \quad (2)$$

โดย

CSF คือตัวแปรบอกระดับความรุนแรงในการปรับสภาพ

pH คือความเข้มข้นของกรด

2.2.3 การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis)

กระบวนการไฮโดรไลซิสคือการที่ทำให้โมเลกุลเซลลูโลสแตกตัวออกโดยอาศัยการใช้น้ำเป็นตัวช่วยทำปฏิกิริยาแสดงดังสมการที่ 3 โดยหลังจากผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสแล้วจะทำให้เซลลูโลสเกิดการสลายตัวกลายเป็นน้ำตาลกลูโคส (Vessia และคณะ, 2005) ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวอาจจะถูกเร่งด้วยกรดเจือจางหรือกรดเข้มข้น ด่างและเอนไซม์ก็ได้ แล้วแต่การพิจาณาในการเลือกใช้ตามวัตถุดิบที่เป็นสารตั้งต้นด้วย แต่ในส่วนค่าใช้จ่ายแล้วกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์จะมีค่าใช้จ่ายที่ต่ำกว่าการไฮโดรไลซิสด้วยกรดหรือด่าง เพราะว่าจะทำในสภาวะที่เป็นกลางคือ pH = 4.8 และอุณหภูมิ 318-323 K อีกทั้งมักจะไม่เกิดปัญหาการกัดกร่อนตามมาด้วย และเนื่องจากพบว่างานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับไม้ไผ่นิยมใช้เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เป็นตัวทำปฏิกิริยาในวัตถุดิบและใช้เบต้ากลูโคซิเดส (β-glucosidase) เพื่อเติมต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์อีกทางด้วย โดยการใช้เอนไซม์ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสนั้นจะต้องมีความเฉพาะเจาะจงสูงจึงจะมีผลที่ดีและความ

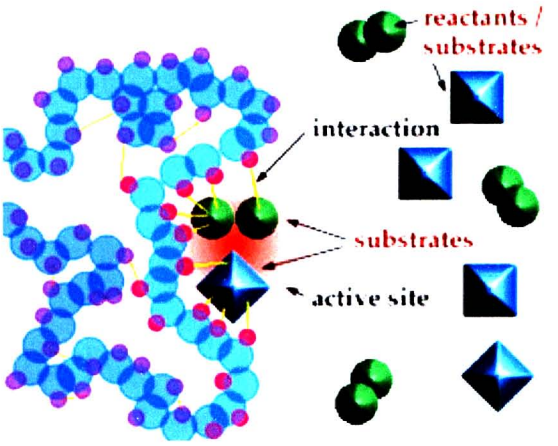
เข้มข้นของปริมาณเอนไซม์ที่มีมาก 15 FPU สามารถทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสได้มากถึง 86% และ 82.6% ตามลำดับ และเวลาในการไฮโดรไลซิสที่ได้ปริมาณน้ำตาลมากที่สุดคือ เวลา 72 ชั่วโมง (Noppadon และคณะ, 2009) จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องไม่นิยมใช้เวลาที่มากกว่านี้เนื่องจากว่าเป็นการใช้เวลาที่นานเกินไปและผลที่ได้เมื่อเทียบกับระยะเวลาแล้วไม่มีความคุ้มทุน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ด้วยปัจจัยดังกล่าว

$$(C_6H_{12}O_5)_n + nH_2O \longrightarrow nC_6H_{12}O_6 \qquad (3)$$

การไฮโดรไลซิสในปัจจุบันมีเทคโนโลยีทางชีววิทยาอยู่ 2 แบบด้วยกัน คือ การใช้เอนไซม์โดยตรงและวิธีการเปลี่ยนจุลินทรีย์ให้เป็นตัวย่อยสลาย ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันคือ หากเทียบทางด้านต้นทุนแล้วการใช้เอนไซม์โดยตรงจะมีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูงกว่าและไม่คุ้มทุนสำหรับการย่อยสลายวัตถุดิบที่มีปริมาณมาก แต่จะมีประสิทธิภาพการย่อยสลายวัตถุดิบได้ดีกว่าการใช้จุลินทรีย์จากพืช และในทางตรงกันข้ามการใช้วิธีการเปลี่ยนด้วยจุลินทรีย์จะเหมาะกับการใช้ในการย่อยสลายในปริมาณที่มากและจำกัดในเรื่องของต้นทุน ทั้งนี้ต้องพิจารณาถึงวัตถุดิบตั้งต้นที่นำมาย่อยสลายด้วยและทั้ง 2 แบบนี้นับว่าเป็นขั้นตอนที่ช้ามาก โดยเฉพาะการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ของวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส เนื่องจากว่ามีการไฮโดรไลซิสเซลลูโลสเป็นตัวขัดขวางโดยโครงสร้างของวัตถุดิบสารตั้งต้นเอง เช่น ลิกนินและส่วนของเฮมิเซลลูโลส พื้นที่ผิว และความเป็นผลึก เป็นต้น ดังนั้นกระบวนการปรับสภาพภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจะช่วยทำให้เพิ่มปริมาณน้ำตาลจากกระบวนการไฮโดรไซิสด้วยเอนไซม์ได้ ซึ่งรายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์จะได้กล่าวถึงในหัวข้อต่อไปนี้

2.2.3.1 เอนไซม์

เอนไซม์ คือตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่เกิดขึ้นภายในเซลล์และเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต (biocatalyst) เอนไซม์จะเร่งเฉพาะชนิดของปฏิกิริยาและชนิดของสารที่เข้าทำปฏิกิริยา โดยจะสามารถลดพลังงานก่อกัมมันต์ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้เร็วขึ้นและทำให้มีอัตราเร็วของปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง ซึ่งเอนไซม์จะเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารที่เรียกว่า สับเสตรต (substrate)



รูป 2.7 ลักษณะโมเลกุลของเอนไซม์

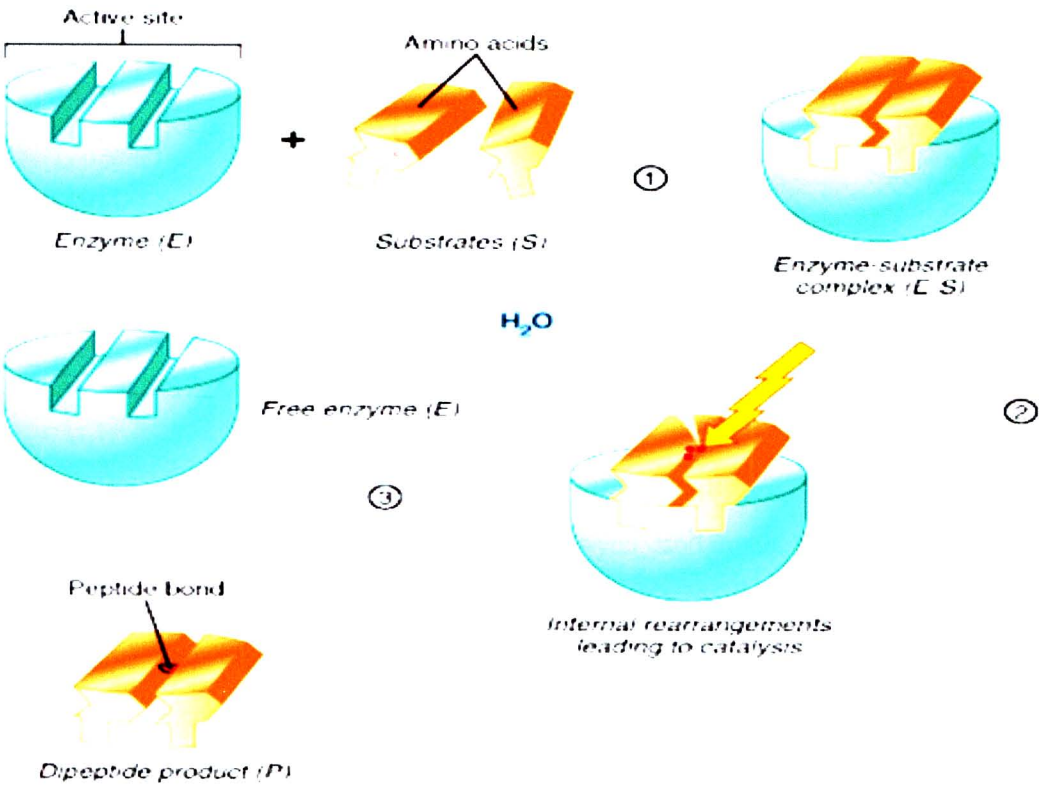
ที่มา : http://www.geocities.com/yon_lap/lprotein.htm

ลักษณะของเอนไซม์โดยส่วนใหญ่แล้วจะมีลักษณะรูปร่างม้วนเป็นก้อน อาจมีมวลโมเลกุล 10,000 ถึงมากกว่า 1 ล้าน ซึ่งเป็นสารประกอบโปรตีนหรือพอลิเพปไทด์ บางชนิดประกอบด้วยพอลิเพปไทด์เพียงสายเดียว บางชนิดประกอบด้วยพอลิเพปไทด์หลายสายและมักมีไอออนของโลหะหรือโมเลกุลที่ไม่ใช่โปรตีนอยู่ด้วย จะสามารถทำงานได้ดีนั้นก็ขึ้นอยู่กับลักษณะโครงรูปของโปรตีน (conformation) ที่มีการขดตัวแบบจำเพาะและเรียงลำดับของกรดอะมิโนนั้นด้วย เอนไซม์บางชนิดไม่สามารถทำงานได้หากขาดส่วนประกอบอื่นๆที่จำเป็นนอกเหนือจากโปรตีน เอนไซม์ที่ทำงานเมื่อมีไอออนของโลหะเรียกว่า แฟกเตอร์ เช่น Fe2+, Mg^{3+}และ Mn^{2+} หรืออาจเป็นสารประกอบอินทรีย์เรียกว่าโคเอนไซม์ (coenzyme) ส่วนของเอนไซม์ที่ประกอบไปด้วยโคเอนไซม์หรือไอออนของโลหะจะเรียกว่าโฮโลเอนไซม์ (holoenzyme) และส่วนที่เป็นโปรตีนจะเรียกว่าอะโพเอนไซม์ (apoenzyme) โดยส่วนใหญ่ของโคเอนไซม์เป็นสารอินทรีย์หรืออนุพันธ์ของวิตามิน

2.2.3.2 กลไกการทำงานเอนไซม์

เอนไซม์เป็นโปรตีนลักษณะกลม ทำให้มีบริเวณเร่ง (active site) ซึ่งมีลักษณะเป็นร่องบนผิวของโมเลกุล โดยเอนไซม์สามารถจับกับสารตั้งต้นที่เรียกว่า สับสเตรต ได้พอดีกับบริเวณเร่งมีความจำเพาะเจาะจงจนกลายเป็นสารเชิงซ้อนที่เรียกว่า เอนไซม์กับสเตรตคอมเพล็กซ์ (enzyme-substrate complex) ดังรูป 2.8 เป็นผลให้โมเลกุลของสับเสรตมีความว่องไวมากขึ้น ต้องการพลังงานเริ่มต้นน้อยลง เกิดปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด ทำให้มีการแปรสภาพของสับสเตรตเปลี่ยนเป็นผลผลิต เช่น มีการสลายพันธะ หรือมีการสร้างพันธะของสับสเตรตขึ้นมาใหม่

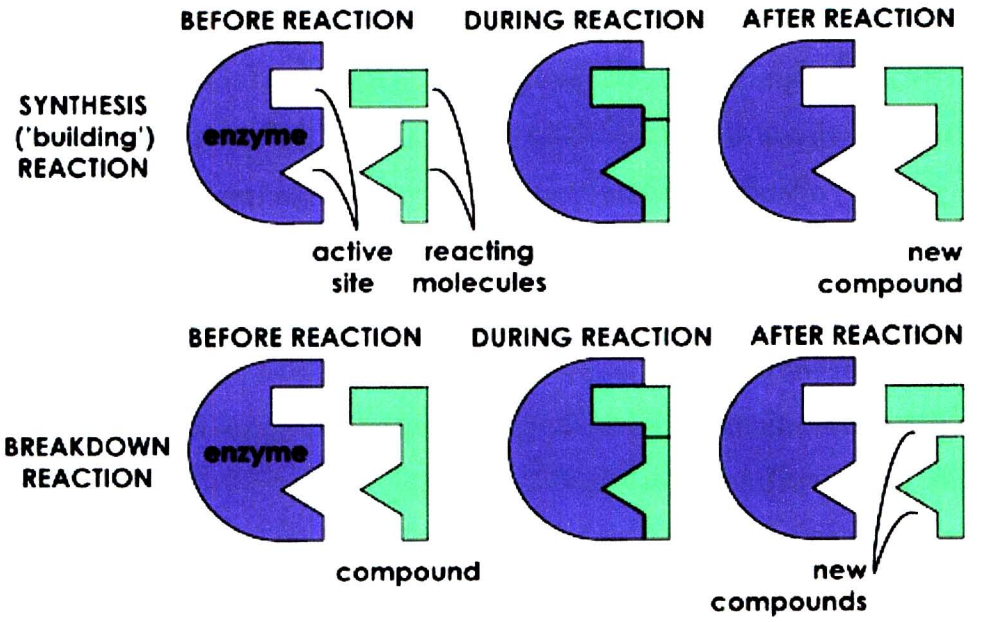
แล้วเกิดสารผลิตภัณฑ์ขึ้น ตามทฤษฎีแม่กุญแจและลูกกุญแจ (lock-and-key model) ของอีมิล ฟิชเชอร์ (Emil Fischer) หลังจากนั้นเอนไซม์ก็จะหลุดออกจากโมเลกุลและเข้าไปจับกับสับเสรตตัวอื่นกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาเช่นนี้อีก



รูป 2.8 กลไกการทำงานเอนไซม์

ที่มา : http://www.geocities.com/yon_lap/lprotein.htm

ทฤษฎีแม่กุญแจและลูกกุญแจ (lock-and-key model) ของอีมิล ฟิชเชอร์ (Emil Fischer) ได้อธิบายกลไกการทำงานของเอนไซม์คือ เอนไซม์เปรียบเสมือนลูกกุญแจและสับสเตรตเปรียบเสมือนแม่กุญแจ ซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อไขด้วยลูกกุญแจ และลูกกุญแจจะต้องมีโครงสร้างที่เข้ากันได้กับแม่กุญแจจึงจะใช้ไขกันได้ลูกกุญแจแต่ละดอก แสดงดังรูป 2.9 ต่อมาเดเนียล โคชแลนด์ (Daniel Koshland) ได้เสนอทฤษฎีเหนี่ยวนำให้พอดี (induced fit model) โดยเสนอว่าบริเวณเร่งของเอนไซม์ไม่จำเป็นต้องอยู่ในลักษณะขนาดและรูปร่างทางเลขาคณิตที่ลงตัวแต่สามารถยืดหยุ่นได้ด้วยการเรียงตัวของหมู่อัลคิล (R-group) ของกรดอะมิโนใหม่ และเมื่อถูกชักนำด้วยโมเลกุลของสับสเตรต บริเวณหมู่เอนไซม์จับกับหมู่ต่างๆ บนสับสเตรตได้พอดี



รูป 2.9 ทฤษฎีแม่กุญแจและลูกกุญแจ

ที่มา : http://www.geocities.com/yon_lap/lprotein.htm

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

(i) ความเข้มข้นของเอนไซม์

เมื่อมีสับสเตรตจำนวนมากพอ ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของเอนไซม์ คือเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์มีเพิ่มขึ้น จะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มมากขึ้นด้วย (Zhang และคณะ, 2009)

(ii) อุณหภูมิ

อัตราการทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น จนถึงระดับหนึ่งการทำงานของเอนไซม์จะมีอัตราการทำงานสูงสุด แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่านี้อัตราการทำงานกลับลดลง เพราะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อเอนไซม์ทั่วไปประมาณ 25-50 °C

(iii) ความเป็นกรด-เบสหรือ pH

pH มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เพราะเอนไซม์จะคงสภาพอยู่ได้ในช่วง pH ที่จำกัดเท่านั้น เอนไซม์โดยทั่วไปทำงานได้ดีสภาวะเป็นกลางคือ 4.8

2.2.3.3 การเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์

กระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์มีปัจจัยเกี่ยวข้องกับวัตถุดิบตั้งต้น การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส สภาวะเงื่อนไขที่ใช้ (อุณหภูมิ ความเป็นกรด-เบส และปัจจัยอื่นๆ) การเพิ่มผลผลิตหรืออัตราการเกิดกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ มีรายละเอียดคือ

(i) สารตั้งต้น

ความเข้มข้นของสารตั้งต้นมีผลต่อผลผลิตที่ได้และอัตราเริ่มต้นของปฏิกิริยาเอนไซม์ไฮโดรไลซิสของเซลลูโลส การเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้นมีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ โดยที่ระดับความเข้มข้นต่ำ จะมีผลผลิตที่ต่ำและอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก และที่ระดับความเข้มข้นสูงมากๆ จะสามารถยับยั้งตัวมันเองได้ โดยปริมาณของสารที่เป็นตัวยับยั้งจะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่างสารตั้งต้นต่อเอนไซม์ ทำให้เกิดอัตราการเกิดปฏิกิริยาต่ำ

(ii) เอนไซม์เซลลูเลส

การเพิ่มปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสมีผลทำให้อัตราการเกิดกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ทำงานได้ดีมากขึ้น แต่การใช้เอนไซม์มากก็ส่งผลต่อความไม่คุ้มทุน ส่วนประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสคือ cellulolytic enxyme ที่ย่อยเซลลูโลสให้ได้ปริมาณน้ำตาลโมเลกุลให้เล็กลงได้ โดยส่วนใหญ่แล้วมักจะมีการใช้ปริมาณเอนไซม์ที่ 7-33 FPU ต่อกรัมสารตั้งต้น และเวลาที่ใช้ 48-72 ชั่วโมง เช่น ปริมาณสาร 15 FPU เวลา 72 ชั่วโมง ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงเซลลูโลสของเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้จะสามารถทำงานได้ดีนั้นจะขึ้นอยู่กับเป็นสิ่งแวดล้อม เช่น ความชื้น ปริมาณออกซิเจน ไนโตรเจน อุณหภูมิ pH องค์ประกอบของคาร์บอนชนิดอื่น ความเป็นผลึกของเซลลูโลส พื้นที่ผิว และที่สำคัญคือปริมาณของลิกนิน เพราะการมีลิกนินจะมีผลทำให้เกิดการกั้นการทำงานของเซลลูโลส ดังนั้นการกำจัดลิกนินจะมีผลทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดียิ่งขึ้น

กระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์มีการทำงานอยู่ 3 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกจะเกิดการดูดซับเอนไซม์เซลลูเลสบนพื้นผิวของเซลลูโลส ขั้นตอนที่สองจะเกิดการย่อยสลายทางชีววิทยาเพื่อให้เกิดการหมักของน้ำตาล และขั้นตอนที่สามจะมีการดูดซับของเซลลูเลสจนกว่าจะไม่สามารถทำงานได้อีก การทำงานของเซลลูเลสจะลดลงระหว่างที่เกิดกระบวนการไฮโดรไลซิส การใช้เซลลูเลสผสมกับเอนไซม์อื่นมีผลทำให้เกิดการย่อยเซลลูโลสได้ดีขึ้น เช่น การเติม β-glucosidase ที่นิยมนำมาใช้คู่กันกับเอนไซม์เซลลูเลส แต่ข้อเสียคือถ้ามีมากเกินไปจะทำให้เกิดสารที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานขึ้นได้ ส่งผลให้อัตราการเกิดผลผลิตที่ได้น้อยตามมาด้วย

(iii) ผลข้างเคียงจากผลิตภัณฑ์สุดท้าย

ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาอาจจะมีผลในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์หรือปฏิกิริยาได้ เช่น จากเซลลูบิโอสหรือเซลลูโลสที่เพิ่มมากขึ้น มีหลายวิธีที่ช่วยไม่ให้เกิดการยับยั้งขึ้น

เช่น การใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น การเติมเอนไซม์บางชนิดเข้าไปเพื่อเพิ่มกิจกรรมการแปลงสภาพเซลลูบิโอส การเอาน้ำตาลเชิงเดี่ยวที่ได้ออกทันทีโดยใช้เยื่อกรอง การเปลี่ยนแปลงเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลและเอทานอลอย่างรวดเร็วในเวลาอันสั้น เช่น กระบวนการ simultaneous saccharification and fermentation

2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลด้วยวิธี HPLC

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) คือวิธีการแยกของผสมเพื่อหาชนิดและปริมาณขององค์ประกอบแต่ละตัวของวัตถุดิบ เป็นวิธีการตรวจสอบองค์ประกอบของสารที่มีความถูกต้องและแม่นยำ ด้วยการใช้ของเหลวเป็นเฟสในการเคลื่อนที่ในระหว่าง 2 เฟส คือ Stationary phase กับ mobile phase ในส่วน Station phases นั้นเป็นสารที่อยู่นิ่งในคอลัมน์ ส่วน mobile phase คือ สารที่เคลื่อนผ่านคอลัมน์และเกิดแรงดึงดูดระหว่างสารประกอบกับ Stationary phase และยังมีอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในกรณีที่มีปริมาณที่น้อยคือเทคนิค Gas Chromatography (GC) ซึ่งจะเป็นการใช้แก๊สเป็นเฟสในการเคลื่อนที่

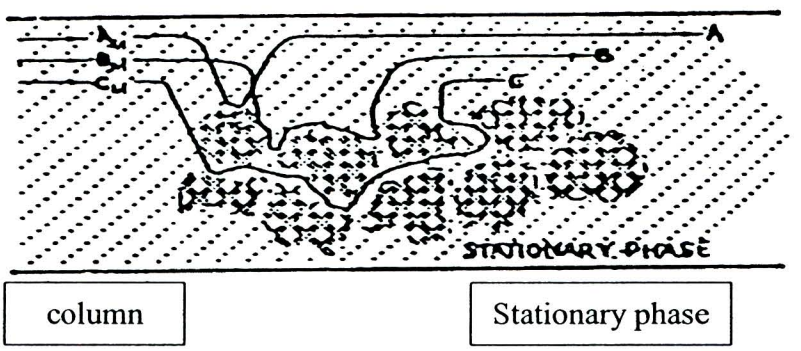
วัตถุประสงค์งานวิจัยเลือกใช้วิธีนี้เพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบของน้ำตาลของหน่อไม้และไม้ไผ่ ซึ่งได้แก่ กลูโคส กาแลกโตส ไซโลส แมนโนส และอะราบิโนส รวมไปถึงน้ำตาลองค์ประกอบอื่นๆ ด้วย โดยจะแบ่งการวิเคราะห์เป็น 2 ประเภท คือการวิเคราะห์จากกระบวนการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจางที่สภาวะต่างๆ ซึ่งสามารถวิเคราะห์จากสารละลายโมโนแซกคาไรด์ที่ได้จากการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสด้วยกรดได้โดยตรง และการวิเคราะห์จากกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับเบต้ากลูโคซิเดสตามลำดับ ซึ่งมีรายละเอียดของเครื่องมือ HPLC และการวิเคราะห์ดังนี้

2.3.1 ทฤษฎีการวิเคราะห์ด้วย HPLC

Liquid Chromatography จะใช้ของเหลวเป็นเฟสในวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยสารแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ด้วยทิศทางที่ต่างกันภายใน stationary phase ซึ่งเป็นอนุภาคเล็กๆ (โดยทั่วไปประมาณ 5-50 mm)บรรจุในคอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-5 มิลลิเมตร โดยขึ้นอยู่กับ equilibrium distribution ของสารนั้นๆ ระหว่าง stationary phase กับ mobile phase เพิ่มอัตราการไหลให้ได้ 1-2 มิลลิลิตร/นาที ปั๊มจะเป็นตัวให้ความดันกับวัฏภาคเคลื่อนที่หรือตัวทำละลาย ผ่านคอลัมน์ระหว่างปั๊มกับระบบฉีดสาร ซึ่งต่อกับคอลัมน์เพื่อรับสารที่ฉีดเข้าไปโดยปั๊มฉีดหรือวาล์ว ระบบสัญญาณต่อที่ปลายคอลัมน์ วัดการแยกของสารโดยโครมาโตแกรม บันทึกโดยระบบบันทึกสัญญาณ

สาร A มีการเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ก่อนสาร B และ C ตามลำดับ พิจารณาสาร A และสาร C จากรูป 2.10 พบว่าสาร C ที่ equilibrium ส่วนใหญ่จะอยู่ใน stationary phase มีเพียงส่วนน้อย

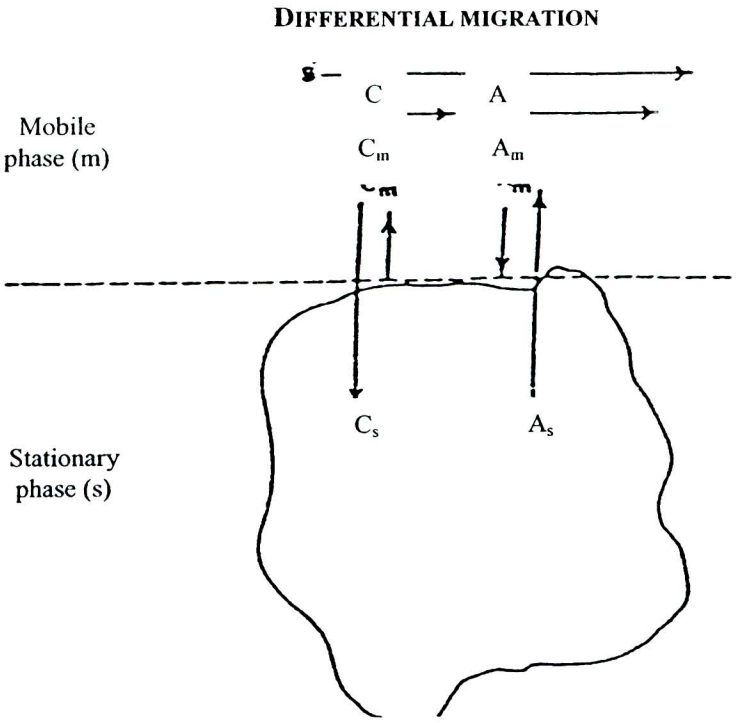
ของโมเลกุลที่อยู่ใน mobile phase ซึ่งตรงกันข้ามกับสาร A ส่วนใหญ่จะอยู่ใน mobile phase มากกว่าและเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าสาร C เพราะบริเวณดังกล่าวไม่มีตัวขัดขวางในการเคลื่อนที่ แต่โมเลกุลของ solvent หรือ mobile phase (S) จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้เร็วที่สุด



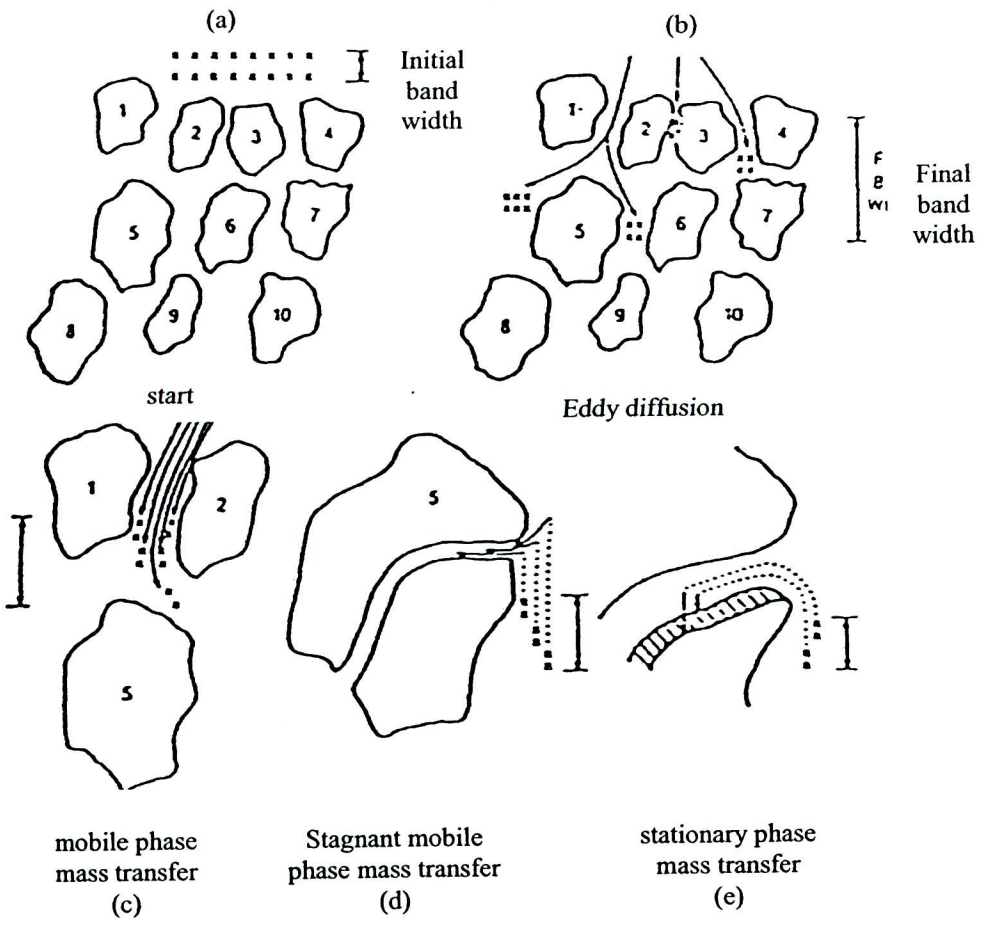
รูป 2.10 การเคลื่อนที่ในทิศทางต่างๆ กันของสาร A, B และ C (วิไลวรรณ ลีนะกุล, 2552)

ลักษณะที่สองของการแยกคือ การแพร่กระจายของโมเลกุลไปตามความยาวของคอลัมน์ซึ่งเป็นลักษณะทางกายภาพ จากรูป 2.11(a) แสดงถึงภาพตัดขวางที่ตอนบนของคอลัมน์อันประกอบด้วยอนุภาคตั้งแต่หมายเลข 1-10 และโมเลกุลของตัวอย่างคือรูป X อยู่ที่ส่วนบนของคอลัมน์ ในระยะแรกนี้โมเลกุลจะรวมตัวกันอยู่ในช่วงแคบๆ ซึ่งเมื่อวัดความกว้างในแนวตั้งจะเรียกเป็น initial band width

รูป 2.11(b)แสดงถึงหนึ่งในขบวนการแพร่กระจายของโมเลกลุที่เรียกว่า "eddy diffusion" หรือ "multi flow paths" ซึ่งเป็นการเคลื่อนที่ของ solvent ไปตามทางระหว่างอนุภาคต่างๆ ภายในคอลัมน์ ของเหลวที่ไหลผ่านช่องกว้างๆ จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าที่ผ่านช่องแคบๆ ดังนั้นช่องว่างระหว่างอนุภาค 1 และ 2 หรือ 5 และ 6 ซึ่งค่อนข้างกว้าง จะมีค่า solvent velocity สูง และทำให้โมเลกุลเคลื่อนที่ลงมายังคอลัมน์ได้ระยะทางมากกว่าช่องว่างระหว่างอนุภาค 2 และ 3 หรือ 3 และ 4 ผลของ eddy diffusion ทำให้โมเลกุลของตัวอย่างแพร่กระจาย initial band width ซึ่งแคบมาเป็นช่วงที่กว้างมากขึ้น ซึ่งเรียกว่า "final band width" การกระจายเช่นนี้จะดำเนินไปเรื่อยๆ ขณะที่มี solvent ไหลผ่านคอลัมน์ และจะดำเนินไปด้วยดีถ้าอนุภาคของ packing มีขนาดเล็กและเท่าๆ กัน (รูป 2.12) ทำให้ได้ผลเป็น peak ที่แคบ (sharp) ไม่กว้าง (broad) เหมือนกับตอนที่ใช้อนุภาคขนาดใหญ่ นอกจากนั้นต้องระมัดระวังในการ pack คอลัมน์ด้วย เพราะถ้าเกิดช่องว่างขึ้น (รูป 2.13) จะทำให้ได้ผลเป็น peak ที่มีทาง (tailing peak)

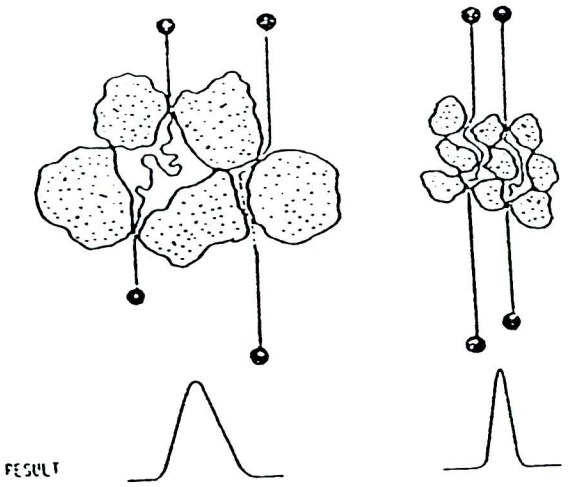


แสดงการเกิด retention ใน LC



รูป 2.11 การแพร่กระจายของโมเลกุลใน LC

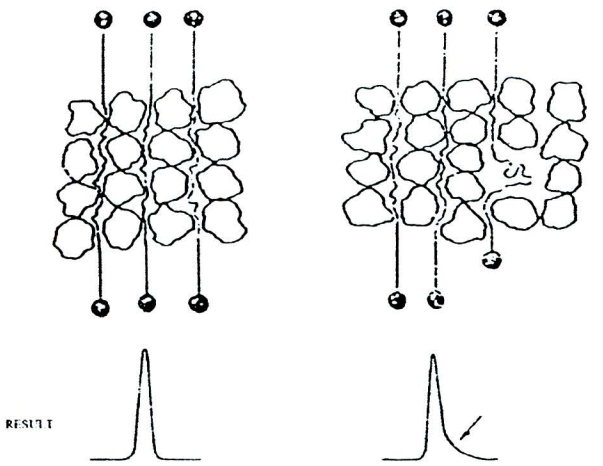
ที่มา : คู่มือหลักสูตรเข้มข้นการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC



รูป 2.12 แสดงถึงผลของขนาดอนุภาคที่มีต่อ eddy diffusion
ที่มา : คู่มือหลักสูตรเข้มข้นการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC

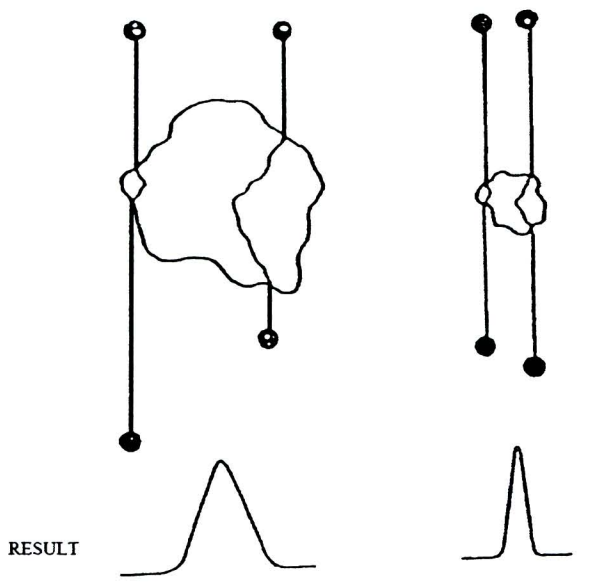
ขบวนการที่ 2 ของการแพร่กระจายของโมเลกุลในรูป 2.11 (c) คือ mobile phase mass transfer ซึ่งหมายถึง ความแตกต่างของอัตราการไหลไปยังส่วนต่างๆ รอบๆ บริเวณอนุภาค ในรูป (c) ระหว่างอนุภาค 1 และ 2 จะพบว่าของเหลวที่อยู่ติดกับอนุภาคจะเคลื่อนที่ได้ช้ามากหรือไม่เคลื่อนที่เลย ขณะที่ของเหลวบริเวณตรงกลางจะไหลได้เร็วที่สุด อันเป็นผลให้โมเลกุลของตัวอย่างที่อยู่ใกล้อนุภาคเคลื่อนที่ได้ระยะทางสั้นๆ แต่โมเลกุลที่อยู่ตรงกลางเคลื่อนที่ไปได้ระยะทางมากกว่า

รูป 2.11 (d) แสดงถึง stagnant mobile phase mass transfer ที่เกิดขึ้นในรูพรุนของอนุภาคที่อยู่ในคอลัมน์ ซึ่งจะมี mobile phase เข้าไปอยู่และไม่เคลื่อนที่ หรือ stagnant ใน (d) แสดงถึงรูพรุนของอนุภาค 5 ที่มีโมเลกุลของตัวอย่างเคลื่อนที่เข้าออกโดยการแพร่ โมเลกุลเหล่านี้ถ้าแพร่ไปในระยะทางสั้นๆ ในรูและแพร่ออกมาจะกลับสู่ mobile phase ได้เร็ว หลังจากนั้นจะเคลื่อนที่ลงมาตามคอลัมน์ แต่ถ้าโมเลกุลใดเคลื่อนที่เข้าไปอยู่ในรูนานจะกลับเข้าสู่ mobile phase ช้า ทำให้เคลื่อนที่ไปในคอลัมน์ได้ระยะทางที่สั้นกว่า



รูป 2.13 ผลของช่องว่างใน packing ที่มีต่อ eddy diffusion
ที่มา : คู่มือหลักสูตรเข้มข้นการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC

รูป 2.11 (e) แสดงถึงผลของ stationary phase mass transfer หลังจากโมเลกุลของตัวแพร่เข้าไปในรู พวกมันจะเคลื่อนที่ผ่าน stationary phase หรือบางครั้งจะติดอยู่กับ stationary phaseเลย ถ้าโมเลกุลเหล่านี้เคลื่อนที่ผ่านเข้าไปใน stationary phase ลึกมากๆก็จะใช้เวลานาน และเคลื่อนที่ไปในคอลัมน์ได้ระยะทางสั้นเช่นเดียวกับใน(d)ส่วนโมเลกุลใดที่ผ่านเข้าและออกจาก stationary phase โดยใช้เวลาเพียงเล็กน้อยก็จะกลับเข้าสู่ mobile phase เร็ว และเคลื่อนที่ไปในคอลัมน์ได้มากกว่า

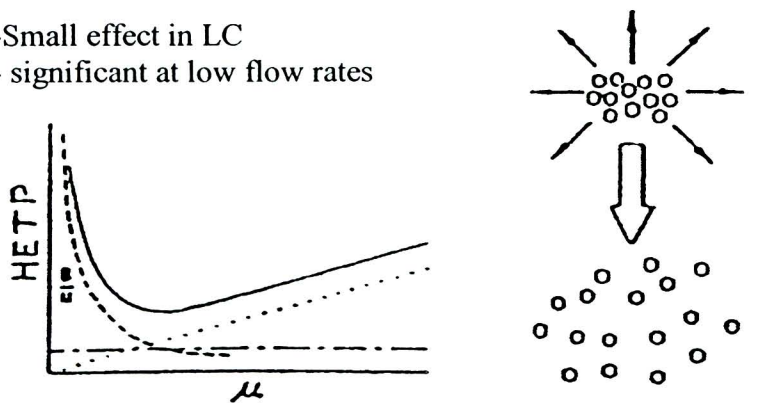


รูป 2.14 ผลของขนาดของอนุภาคต่อ mass transfer
ที่มา : คู่มือหลักสูตรเข้มข้นการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC

ในรูป 2.14 จะเห็นได้ว่าถ้าลดขนาดของอนุภาคลงแล้ว ผลของ mass transfer จะลดลงด้วย ทำให้ได้พีคที่แคบ และสิ่งสุดท้ายที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของโมเลกุล longitudinal diffusion หรือ random molecular diffusion ซึ่งหมายถึงการแพร่ของโมเลกุลของตัวอย่างไปในทุกทิศทุกทาง ตลอดเวลาไม่ว่า mobile phase จะหยุดนิ่งหรือเคลื่อนที่ก็ตาม longitudinal diffusion นี้มีผลเล็กน้อย ใน LC ทั่วไป แต่จะมีผลมากถ้าอัตราการไหลของ mobile phase ต่ำและอนุภาคในคอลัมน์มีขนาดเล็ก

- Random molecular diffusion- longtitutinal diffusion

-Small effect in LC
- significant at low flow rates



รูป 2.15 แสดงการแพร่กระจายของโมเลกุลแบบ longitudinal diffusion
ที่มา : คู่มือหลักสูตรเข้มข้นการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC

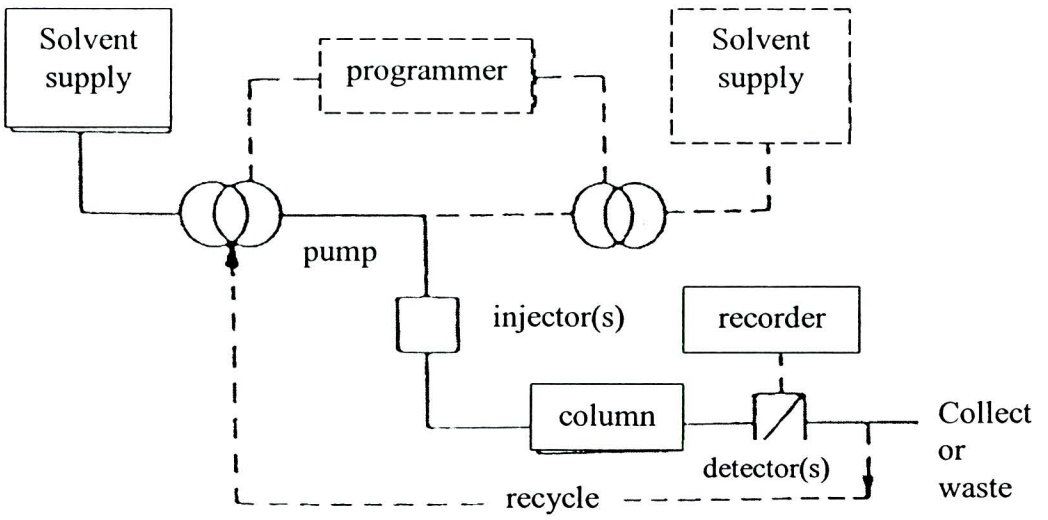
2.3.2 ส่วนประกอบของ HPLC

HPLC สารละลายที่เป็น mobile phase ซึ่งกรองแล้วจาก solvent supply ถูกดูดโดยปั๊มเข้าสู่คอลัมน์ ขณะเดียวกันก็พาเอาสารผสมที่ฉีดเข้าบริเวณ injector เข้าสู่คอลัมน์เพื่อแยกด้วยสารประกอบแต่ละชนิดที่แยกออกมาจากคอลัมน์สามารถตรวจวัดได้โดยใช้ตัวตรวจวัดและบันทึกผลออกมาเป็นพีที่ recorder ดังนั้นส่วนประกอบที่สำคัญอย่างน้อยที่สุดที่เครื่อง HPLC ควรจะมีได้แก่

2.3.2.1 Mobile phase เป็นสารละลายที่ใช้นำสารที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ เพื่อทำการแยก การเลือกชนิดของ mobile phase ขึ้นกับสิ่งต่อไปนี้

2.3.2.1.1 System compatibility หมายถึง ความสามารถในการละลายซึ่งกันและกันระหว่าง mobile phase นั่นคือระบบของ mobile phase อันใหม่ต้องเข้ากันได้กับ mobile phase อันเก่า ถ้าเข้ากันไม่ได้ก็ต้องล้างระบบเก่าด้วย mobile phase ที่เป็นตัวกลาง (intermediate solvent)

ก่อน ซึ่งเป็น mobile phase ที่ละลายได้ทั้งใน mobile phase เก่าและใหม่ สาเหตุที่ต้องกระทำเช่นนี้ก็เพื่อป้องกันการเกิด colloid ของ detector ซึ่งจะทำให้เกิด drift หรือ noise



รูป 2.16 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC
ที่มา : คู่มือหลักสูตรเข้มข้นการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC

Mobile phase preparation

การเตรียม mobile phase preparation ก่อนนำไปใช้ควรกรองไล่ฟองอากาศออก (degas) สาเหตุที่ต้องกรองก็เพื่อป้องกันอนุภาคขนาดใหญ่ไม่ให้ไปอุดตันอยู่ในคอลัมน์ ซึ่งจะทำให้ความดันกลับสูงตัวคอลัมน์จะเสียหรือเสื่อมประสิทธิภาพลง และปั๊มเสื่อมทำงานได้ flow rate ไม่คงที่ นอกจากนั้นยังทำให้ที่ฉีดตัวอย่างสึกและรั่วได้ การกรองสามารถทำได้โดยการผ่านสารละลายไปบนแผ่นกรองที่ขนาดรูพรุน 0.45-0.5 ไมโครเมตร และใช้ปั๊มที่มีความดันประมาณ 25 Hg เป็นเครื่องมือช่วยในการดูดสารละลาย ชนิดของแผ่นกรองที่ใช้มี 2 แบบ แบบที่เป็น Teflon ซึ่งกรองสารได้ทุกชนิดรวมทั้งน้ำแต่ต้องใส่เมทานอลลงบนแผ่นกรองก่อน อีกแบบหนึ่งคือทำด้วย cellulose acetate ซึ่งกรองได้เฉพาะสารละลายที่เป็นน้ำหรือที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบเท่านั้น ในการกรองควรทิ้งสารละลายส่วนแรกไป เพราะอาจมีสารจำพวก surfactant, glycerin หรืออื่นๆ ปนอยู่ และควรใช้แผ่นกรอง 1 แผ่น ต่อ solvent 1 ชนิด

ส่วนสาเหตุที่ต้อง degas ก็เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศใน cell ของ detector ซึ่งต้องระวังอย่างมากกับสารละลายจำพวกที่ละลายกับน้ำได้ วิธี degas ทำได้หลายวิธี เช่น โดยการวางขวดที่ใส่สารละลายลงใน ultrasonic bath หรือก๊าซอีเลียมพ่นลงไปแทนที่อากาศในสารละลายการใช้ความร้อน หรือกรองสารละลายที่ใช้ปั๊มสุญญากาศ ก็จัดเป็นวิธี degas อีกวิธีหนึ่ง การ degas นี้ทำนาน

ประมาณ 5-20 นาที จากรูป 2.16 แสดงขวดที่ใช้เก็บ mobile phase ของ Hewlett Packard ซึ่งทำด้วยแก้วหรือ stainless steel ถ้าต้องการทำแทนอย่างง่ายๆอาจใช้ Erlenmeyer flask กับ magnetic stirrer เท่านั้น ในระบบนี้ประกอบด้วย filter ที่ใช้กรองสารซึ่งมีรูขนาดรูพรุน 2 ไมโครเมตร และที่ส่วนประกอบที่ช่วยในการ degas คือ heater,stirrer ท่อสำหรับพ่นก๊าซเฉื่อยและทำให้เป็นสุญญากาศ ก๊าซเฉื่อยที่ใช้ส่วนใหญ่คือก๊าซฮีเลียม เพราะก๊าซฮีเลียมละลายในของเหลวเกือบทุกชนิดได้น้อยมาก นอกจากนั้นส่วนที่ว่างตอนบนของสารละลายในขวดที่เป็นก๊าซฮีเลียมก็มีข้อดีด้วยคือป้องกันการละลายกลับของก๊าซออกซิเจนใน mobile phase และลดการติดไฟของสารไวไฟที่ระเหยง่าย

2.3.2.2 Solvent delivery system (pump) เป็นส่วนที่ใช้ในการดูดสารละลายจาก mobile phase reservoir เข้าสู่คอลัมน์และผ่านไปยัง detector โดยชนิดของปั๊มแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดใหญ่ๆคือ

2.3.2.2.1 Constant flowrate pump แบ่งออกได้เป็น

- Reciprocating pump เป็นปั๊มที่นิยมใช้กัน มีขนาดของ chamber ตั้งแต่ 35-400 μl พร้อมกับ reciprocating piston หรือ flexible diaphragm ที่มีแรงดันมากกว่าแรงดันกลับของคอลัมน์ ทำให้สารละลายไหลผ่านเข้าสู่คอลัมน์ได้ดังรูป อาจเป็นปั๊มแบบหัวเดียว สองหัวหรือสามหัว นอกจากนั้นแบ่งย่อยได้อีกตามวิธีการที่ใช้ในการลด pulse ของpumping noise, การ compensate solvent compensate compressibility และการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหล

- Positive-Displacement pump แบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ

ก. Screw-driven syringe ปั๊มแบบนี้มีลักษณะคล้ายกับเข็มฉีดยาขนาดใหญ่ซึ่งลูกสูบทำงานได้โดยอาศัย screw-feed drive ผ่าน gear box ที่ถูกควบคุมโดย digital stepping motor อีกทอดหนึ่ง อัตราการดูดสารละลายจะขึ้นกับ voltage ที่ป้อนเข้า motor

ข. Hydraulic amplifier ปั๊มแบบนี้ gear pump จะจ่ายน้ำมันไปยัง hydraulic intensifier ทั้งสอง และความดันของสารละลายจะเพิ่มจาก oil pressure 9 เท่า intensifier หนึ่งจะคอยจ่ายสารละลายให้กับ column ขณะที่อีกตัวหนึ่งจะคอยเติมสารละลายไว้ให้เต็ม intensifier ทั้งสองชุดนี้ ใช้ในการทำ gradient elution และอัตราการไหลของสารละลายในปั๊มนี้ จะเป็นไปอย่างคงที่

2.3.2.2.2 Constant pressure pump เป็นปั๊มที่มีความดันคงที่ ดังนั้นค่าแรงดันกลับของคอลัมน์ ความหนืดของ mobile phase และอุณหภูมิของคอลัมน์ จึงต้องคงที่ด้วยถ้าอัตราการไหลของ mobile phase ยังคงเท่าเดิม แบบที่ง่ายที่สุดของปั๊มชนิดนี้คือการเพิ่มแรงดันของก๊าซให้แก่ mobile phase ใน reservoir ปั๊มชนิดนี้แม้ว่าจะมีราคาถูก แต่มีข้อจำกัดในการดูดสารละลายและไม่สะดวกในการเติมสารละลาย นอกจากนั้นความดันจากถังก๊าซที่จะจ่ายให้แก่สารละลายใน

ปั๊มต้องไม่เกิน 2000 psi ทำให้มักมีปัญหาเนื่องจากก๊าซที่ละลายอยู่ในสารละลายจะรวมตัวเป็นฟองอากาศใน detector cell ด้วย

ใน HPLC การวิเคราะห์สารอาจใช้ mobile phase เพียงชนิดเดียวสำหรับแยก เรียกวิธีการนี้ว่า "Isocratic elution" แต่บางครั้งตัวอย่างเป็น complex mixture ซึ่งมีค่า k หลายค่า การแยกจะทำได้สะดวกถ้าใช้ส่วนผสมของ solvent หลายชนิด และเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ mobile phase ขณะที่ทำการแยกสาร วิธีการหลังนี้เรียกว่า "Gradient elution"

2.3.2.3 Injector เป็นส่วนที่ใช้นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เข้าสู่คอลัมน์ sample injector ที่ดีควรมีลักษณะคือ ใช้ฉีดตัวอย่างชนิดใดก็ได้ สะดวกต่อการใช้ ปริมาณของตัวอย่างที่ฉีดแต่ละครั้งเท่ากัน และฉีดตัวอย่างขณะที่มีแรงดันกลับสูงๆได้ ประมาณ 4000-5000 psi

2.3.2.3.1 Syringe injector เป็นวิธีแรกที่นิยมใช้ จึงลอกเลียนแบบมาจาก GC เป็นการฉีด ตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ที่มีแรงดันน้อยกว่า 1000 psi หรือฉีดเข้าสู่ mobile phase โดยใช้เข็มแทงทะลุผ่าน septum ที่ทำด้วย silicone, neoprene หรือ fluoroelastomer แต่วิธีนี้ข้อเสียคือ เศษของ septum ที่เกิดจากการถูกแทงบ่อยๆจะไปอุดตันที่คอลัมน์ ทำให้แรงดันกลับสูงขึ้น หรือเกิดมีรอยรั่วเนื่องจากรูที่ septum นั้น นอกจากนั้น septum บางชนิดไม่ทนต่อสารเคมีจึงถูกสารละลายกัดได้ และ septum บางชนิดก็แข็งเกินไปทำให้ฉีดได้น้อยครั้ง จึงมีวิธีแก้ปัญหานี้ เรียกว่า "septum sandwich" คือใช้ septum 2 ชนิดมาประกบกัน โดยอันหนึ่งเป็น septum ที่แข็งแต่ทนสารละลายได้ดี และเป็นอันที่ติดกับ mobile phase ส่วน septum ที่อ่อนและไม่ทนต่อสารละลายจะอยู่ด้านนอกไว้สำหรับฉีด

จากการใช้เข็มฉีดสารตัวอย่าง มักจะพบปัญหาการอุดตันอยู่เสมอ จากเศษของ septum หรือตัวอย่างที่แห้งค้างในเข็ม เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาจาก septum ควรใช้เข็มแบบ bard-free needle with 20° angle ส่วนปัญหาอันหลังหลีกเลี่ยงได้ โดยล้างเข็มด้วยสารละลายสะอาดที่เหมาะสมแล้วทำให้แห้งด้วยอากาศหลังจากการใช้ทุกครั้งและก่อนเก็บ

2.3.2.3.2 Sampling valves เป็นส่วนที่ฉีดตัวอย่างเข้าคอลัมน์ ที่มีข้อดีและนิยมใช้กันมาก เพราะทนดันได้ในช่วง 2000-6000 psi จากตัวอย่างในรูปเป็น loop ที่มีลิ้นเปิดปิดหกทางของ valco และใช้เข็มฉีดตัวอย่างเข้าไปเก็บไว้ที่ external loop ในขณะที่ฉีดความดันในระบบจะไม่ผ่านเข้ามา แต่เมื่อฉีดสารเข้าไปหมดแล้วปิดลิ้นด้านหนึ่งและเปิดอีกด้านหนึ่ง ก็จะทำให้สารที่ฉีดเข้าไปไหลเข้าสู่ระบบได้ sample loop ที่ยาวแต่แคบจะเหมาะกับตัวอย่างที่มีปริมาณมากๆเพราะ peak ที่ได้จะไม่กว้าง loop ที่ใช้มี 2 ชนิด คือ ชนิด fixed loop และ variable loop และถ้ามีตัวอย่างจำนวนมากที่ต้องทำเป็นประจำก็อาจใช้ automatic injectors แทนได้

Preparing valve tubing ท่อต่างๆที่ซื้อมาปลายจะเรียบและมีค่า inner diameter (i.d.) คงที่ตลอด แต่ถ้านำท่อที่มีอยู่มาตัดเอง ควรใช้เครื่องมือสำหรับตัดโดยเฉพาะ เพื่อให้ได้ท่อที่มีปลายเรียบสำหรับต่อกับด้านในของ port ในตัว valve นอกจากนั้นก่อนใช้ท่อใหม่ควรล้างด้วย mobile phase ที่กำลังใช้อยู่ก่อนต่อเข้าระบบ

2.3.2.4 Column เป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่สุดของ HPLC โดยทั่วไปสารที่ใช้บรรจุในคอลัมน์จะเป็น silica gel ซึ่งมีหน้าที่ดูดซับ (adsorb) หรือ partition หรือทั้ง 2 อย่างพร้อมกัน สารที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ อาจใช้วิธีการเคลือบบน supporter แต่ปัจจุบันได้ใช้วิธีการที่เรียกว่า bonded phase แทน โดยใช้สารอินทรีย์บางชนิด เช่น octadecylsilane (ODS) ไปทำปฏิกิริยากับ supporter

ขนาดของอนุภาคของ Stationary phase ที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ ควรมีขนาดเล็ก ซึ่งจะทำให้การแยกได้ peak ที่แยกจากกันชัดเจน

2.3.2.5 Detectors นับว่าเป็นส่วนสำคัญมากเช่นกัน เพราะนอกจากใช้ตรวจวัดสารตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณแล้ว ยังเป็นส่วนที่ใช้บอกความผิดปรกติของระบบได้ด้วย เช่น บอกถึง flowrate ที่เปลี่ยนแปลงไป การเกิดฟองอากาศในปั๊ม รอยรั่วต่างๆ อุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงและการขึ้นๆลงๆ (fluctuate) ของแรงดันกลับ ดังตารางจะแสดงชนิดของ detector ที่ใช้กันทั่วไป และที่ใช้เฉพาะงานวิจัยบางอย่าง แบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ (1) bulk property หรือ universal detector และ (2) แบบ solute property selective หรือ specific detector แบบที่หนึ่ง bulk property detector ใช้ได้กว้างกว่า เพราะใช้ได้กับสารทุกชนิดที่เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเมื่อเทียบกับ mobile phase แต่แบบที่ (2) solute property detector จะวัดคุณสมบัติเฉพาะเจาะจงมากกว่าจึงดีในแง่ที่ทำให้มีความไวสูง และไม่ขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงของ mobile phase มากนัก บางครั้งจะแบ่ง detector ออกตามวิธีที่ใช้เป็น destructive และ nondestructive detector

2.3.2.6 Recorder โดยทั่วไปที่นิยมใช้เพื่อเก็บผลวิเคราะห์ คือ strip chart recorder เพราะสามารถใช้เก็บและเรียกข้อมูลกลับคืนมาได้ รวมทั้งนำไปใช้กับเครื่องมืออื่นๆได้ วิธีการใช้เครื่อง recorder นี้ แต่ละชนิดก็จะแตกต่างกันไป แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นโดยทั่วไปมักจะเหมือนกันคือเกิดจากความผิดพลาดของผู้ใช้เป็นส่วนใหญ่

ดังนั้นจึงได้ศึกษาการออกแบบการทดลองที่สามารถนำมาวิเคราะห์ตัวแปรเพื่อใช้ในการศึกษาด้วยวิธีการออกแบบพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology and Designs) ซึ่งมีรายละเอียดในหัวข้อ 2.4 ดังนี้

2.4 การออกแบบพื้นผิวตอบสนอง

การออกแบบพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology : RSM) คือการรวบรวมเทคนิควิธีการทางคณิตศาสตร์และสถิติที่มีประโยชน์ต่อการสร้างแบบจำลองและการวิเคราะห์ปัญหา ซึ่งแสดงผลตอบสนองต่อผลจากตัวแปรต่างๆ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาความเหมาะสมหรือจุดที่ดีที่สุดจากความสัมพันธ์ของตัวแปรเหล่านั้นได้ (Montgomery, 2001) โดยเฉพาะในสถานการณ์ที่ตัวแปรต้น (Input variable) หลายๆ ตัวมีผลต่อคุณสมบัติบางประการหรือปริมาณของผลผลิตที่ได้ ซึ่งจะเรียกคุณสมบัติหรือลักษณะบางประการของผลผลิตนี้ว่า ผลตอบสนอง (Respond) และตัวแปรต้นดังกล่าวจะเรียกว่า ตัวแปรอิสระ (Independent variable) หรือปัจจัย (Factor) ตัวอย่างเช่น การหาปริมาณน้ำตาลจากปัจจัยที่ศึกษาคือความเข้มข้นกรด (x_1) และเวลาในการปรับสภาพ (x_2) เพื่อให้ปริมาณน้ำตาลมากที่สุด ดังนั้นผลผลิตที่ได้ เป็นฟังก์ชันของความเข้มข้นกรดและเวลาในการปรับสภาพแสดงความสัมพันธ์ดังสมการที่ 4

$$Y = f(x_1, x_2) + \varepsilon \qquad (4)$$

โดยกำหนดให้ปัจจัยนั้นแทนค่าด้วย x และ ε คือ ค่าความผิดพลาดของผลตอบ Y ที่เป็นผลมาจากการทดลอง ถ้ากำหนดว่า $Y = f(x_1,x_2) = \eta$ ดังนั้น สามารถแสดงความสัมพันธ์ของพื้นผิวได้ดังสมการที่ 5 คือ

$$\eta = f(x_1,x_2) \qquad (5)$$

ซึ่งจะเรียกว่า "พื้นผิวผลตอบสนอง (Response Surface)" โดยส่วนใหญ่จะแสดงพื้นผิวผลตอบสนองในรูปของกราฟิก โดยที่ η จะถูกพล็อตกับระดับของ x_1 และ x_2 เพื่อที่จะช่วยให้มองรูปร่างได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งอาจจะพล็อตเส้นโครงร่าง (contour plot) ของพื้นผิวผลตอบสนองแสดงดังรูปที่ 2.18 โดยที่ปัญหาในส่วนใหญ่จะไม่ทราบความสัมพันธ์ระหว่างผลตอบและตัวแปรอิสระ โดยในขั้นแรกจะต้องหาตัวประมาณที่เหมาะสมที่ใช้เป็นตัวแทนสำหรับแสดงความสัมพันธ์ที่แท้จริงระหว่าง Y และเซตของตัวแปรอิสระอาจจะเป็นแบบจำลองของผลตอบมีความสัมพันธ์แบบเชิงเส้นกับตัวแปรอิสระ ตัวแบบที่ใช้จำลองพื้นผิวผลตอบสนอง ได้แก่ ความสัมพันธ์อันดับหนึ่ง (First-Order Model) แสดงดังสมการที่ 6 หรือถ้าตัวแบบความสัมพันธ์อันดับหนึ่งไม่เพียงพอที่จะประมาณพื้นผิวผลตอบสนองได้ สามารถนำการใช้ตัวแปรอันดับสูงขึ้นไป ที่มีลักษณะความสัมพันธ์แบบเส้นโค้ง เช่น ตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสอง (Second-Order Model) แสดงดังสมการที่ 7 เป็นต้น (Montgomery, 2001)

ตัวแบบความสัมพันธ์อันดับหนึ่ง

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + ... + \beta_k x_k + \varepsilon \qquad (6)$$

แผนการทดลองที่ใช้ในการหาตัวแบบความสัมพันธ์อันดับหนึ่ง ที่นิยมใช้ได้แก่

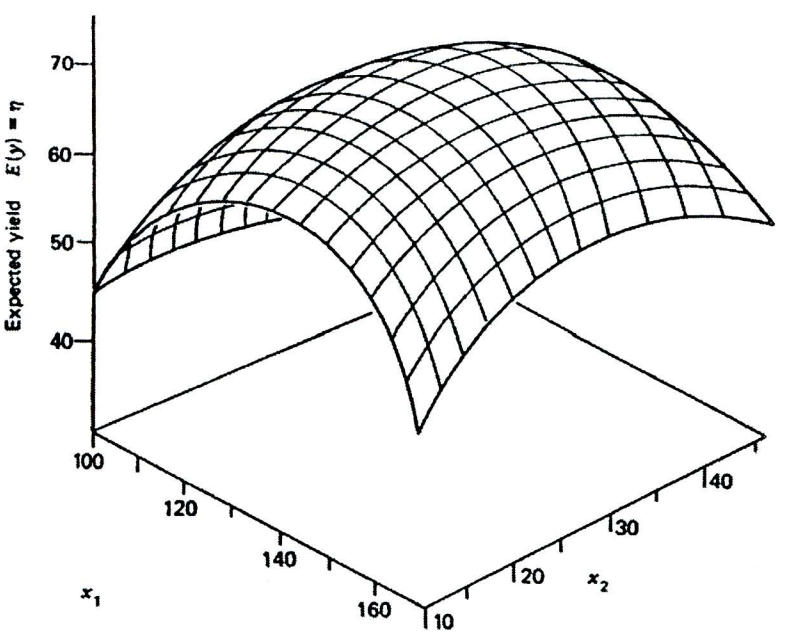
1. แผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลที่มีระดับของปัจจัย 2 ระดับ (2^k Factorial design)
2. แผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลเชิงส่วน (2^{k-p} Fraction Factorial design)
3. แผนการทดลองแบบซิมเพล็ก (Simplex design)
4. แผนการทดลองแบบเพลกเก็ต-เบอร์แมน (Plackett-Burman design)

ตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสอง

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i x_j + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} x_i^2 + \sum\sum_{i=1} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \qquad (7)$$

แผนการทดลองที่ใช้ในการหาตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสอง ที่นิยมใช้ได้แก่

1. แผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลที่มีระดับของปัจจัย 3 ระดับ (3^k Factorial design)
2. แผนการทดลองแบบบ็อกซ์-วิลสัน (Box-Wilson design)
3. แผนการทดลองแบบบ็อกซ์-เบ็นเกน (Box-Behnken design)

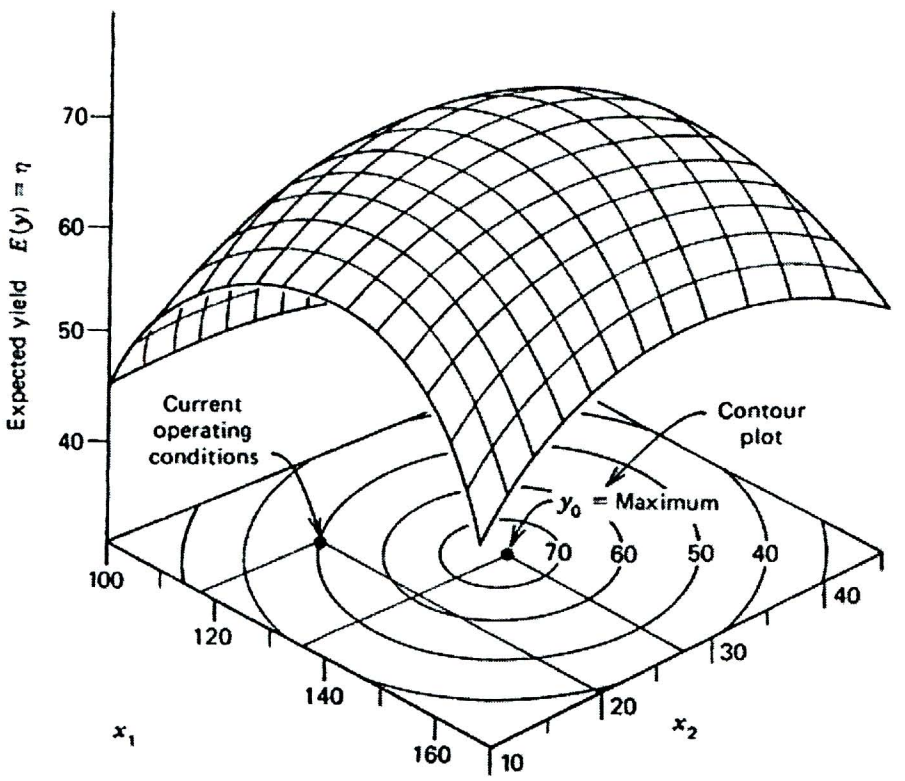


รูป 2.17 ตัวอย่างพื้นผิวผลตอบสนองแบบสามมิติ (Montgomery, 2001)

2.4.1 ตัวแปร

Input Variable ตัวแปรต้น เป็นปัจจัยเชิงปริมาณ เช่น ชนิดของวัตถุดิบ ระยะเวลา ความเข้มข้นของกรด เป็นต้น

Response Variable ค่าผลตอบสนอง เป็นค่าคุณภาพของผลผลิตที่ต้องการ เช่น ปริมาณผลผลิตที่ได้ (yield) ความหนืด ความแข็ง ระดับความเข้มข้น เป็นต้น



รูปที่ 2.18 ภาพ contour plot ของผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว (Montgomery, 2001)

2.4.2 เทคนิค RSM

เทคนิค RSM จะสามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้นกับค่าการตอบสนอง แสดงให้เห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของผลตอบสนองเมื่อระดับของปัจจัยเชิงปริมาณเปลี่ยนแปลง และการหาระดับของปัจจัยเชิงปริมาณที่เหมาะสมที่จะทำให้ได้ผลตอบสนองที่ดีที่สุด หรือสามารถเลือกจุดที่เหมาะสมที่ได้จากผลตอบสนองหลายๆ ค่าได้ ซึ่งมีกระบวนการเป็นลำดับขั้นตอน โดยมีขั้นตอนหลัก 4 ขั้นตอน ดังนี้

2.4.2.1 การทดลองเพื่อหาตัวแบบที่เหมาะสมบนขอบเขตของระดับปัจจัยเริ่มต้น

จุดประสงค์ของขั้นตอนนี้ คือ การประมาณรูปแบบความสัมพันธ์ที่เหมาะสมบนขอบเขตของระดับของปัจจัยเริ่มต้น โดยขอบเขตของปัจจัยเริ่มต้นมีขนาดเล็ก ซึ่งตัวแบบความสัมพันธ์อันดับหนึ่งก็เพียงพอในการประมาณรูปแบบความสัมพันธ์ที่แท้จริงที่เหมาะสมกับขอบเขตของระดับปัจจัยเริ่มต้นได้

2.4.2.2. การหาขอบเขตระดับปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด

จุดประสงค์ของขั้นตอนนี้คือ การหาขอบเขตระดับปัจจัยที่ทำให้เกิดผลตอบสนองเหมาะสมที่สุด ซึ่งจากขั้นตอนการหาตัวแบบที่เหมาะสมบนขอบเขตระดับปัจจัยเริ่มต้นด้วยตัวแบบความสัมพันธ์อันดับหนึ่งอาจจะยังไม่สามารถทำให้เกิดผลตอบสนองที่เหมาะสมที่สุดได้ โดยใช้วิธี Steepest ascent เมื่อต้องการหาผลตอบสนองที่มากที่สุด

วิธี Steepest ascent เป็นวิธีการที่ทำให้เกิดการเคลื่อนที่เป็นอันดับบนเส้นทางที่มีความชันมากขึ้นหรือในทิศทางที่มีการเพิ่มขึ้นของผลตอบสนองมากที่สุด เพื่อที่จะหาขอบเขตของระดับปัจจัยที่ทำให้เกิดผลตอบสนองมากที่สุด โดยใช้สมการที่ประมาณได้จากขั้นตอนที่แล้ว ซึ่งแสดงเส้นโครงร่างของพื้นที่ผิวตอบสนองที่ได้จากตัวแบบความสัมพันธ์อันดับหนึ่งและรูปสี่เหลี่ยมเล็กๆ คือของเขตของระดับปัจจัยเริ่มต้น โดยทิศทางในการเคลื่อนที่คือทิศทางที่ผลตอบสนองเพิ่มขึ้นเร็วที่สุด คือทิศทางที่ตั้งฉากกับพื้นผิวที่สร้างมา โดยที่ step ในการเคลื่อนที่ Δx_i หาได้จาก

$$\Delta x_i = \frac{\hat{\beta}_i}{l} \tag{8}$$

$$l = \left[\sum_{i=1}^{k} \hat{\beta}_i^{\,2} \right]^{1/2} \tag{9}$$

โดยที่ $\hat{\beta}_i$ คือค่าประมาณสัมประสิทธิ์ของรูปแบบความสัมพันธ์ที่เหมาะสมบนขอบเขตของระดับปัจจัยเริ่มต้นด้วยความสัมพันธ์กำลังหนึ่ง

การทดลองจะเริ่มจากการทดลองที่จุดศูนย์กลางการทดลองจากขั้นตอนที่แล้ว และจะเคลื่อนที่ไปตามเส้นทางดังกล่าว คือจะเพิ่มระดับของปัจจัยที่ i ครั้งละ Δx_i โดยจะทำการทดลองไปจนกระทั่งค่าผลตอบสนองมีการเปลี่ยนแปลงในทิศทางตรงกันข้ามจึงจะหยุดการทดลอง

2.4.2.3 การทดลองเพื่อหาตัวแบบที่เหมาะสมบนขอบเขตของระดับปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด

จุดประสงค์ของขั้นตอนนี้คือ ประมาณรูปแบบความสัมพันธ์ที่เหมาะสมบนขอบเขตของปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด จากขั้นตอนดังกล่าวเมื่อได้จุดศูนย์กลางของขอบเขตของระดับของ

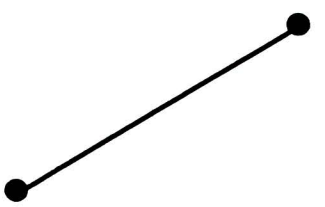
ปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดแล้ว โดยทั่วไปแล้วการประมาณรูปแบบความสัมพันธ์ต้องประมาณด้วยตัวแบบความสัมพันธ์อันดับต่ำก่อน ถ้าผลที่ได้ไม่มีความเหมาะสมจึงจะประมาณด้วยตัวแบบอันดับสูงขึ้น เช่น ตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสอง เป็นต้น

2.3.2.4 การหาระดับปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด

จุดประสงค์ของขั้นตอนนี้คือ การหาระดับของปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด โดยใช้ตัวแบบที่ได้จากการประมาณพื้นผิวตอบสนองด้วยตัวแบบความสัมพันธ์ที่เหมาะสม จากมนขั้นตอนที่แล้ว และ เมื่อได้ระดับของแต่ละปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด ก็สามรถนำไปแทนค่าในตัวแบบสมการเพื่อหาผลตอบสนองที่เหมาะสมที่สุดได้

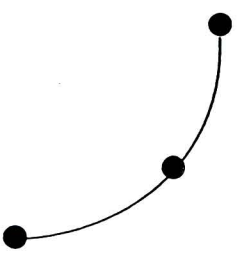
2.4.3 แนวคิดในการวางแผนการทดลอง

ผลตอบสนอง (Response) ซึ่งสามารถเขียนให้อยู่ในรูปฟังก์ชันของตัวแปรอิสระ หรือปัจจัยดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น จะมีลักษณะดังรูป 2.19 และรูป 2.20



รูป 2.19 ผลตอบสนองที่มีลักษณะเป็นฟังชันก์เชิงส้นตรง (ณรงค์ชัย สถาวรวิจิตร, 2549)

ลักษณะของผลตอบสนองดังรูป 2.19 สามารถประมาณพื้นผิวตอบสนองได้ด้วยตัวแบบความสัมพันธ์อันดับหนึ่ง ซึ่งต้องการระดับปัจจัยเพียง 2 ระดับเท่านั้น แผนการทดลองที่ง่ายที่สุดในการหาตัวแบบความสัมพันธ์อันดับหนึ่ง คือแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลที่มีระดับปัจจัย 2 ระดับ (2^k Factorial design) หรือในกรณีที่ระดับปัจจัยที่มากกว่านั้นก็จะมีการใช้ที่มากกว่า คือ แผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลเชิงส่วน (2^{k-p} Fractional Factorial design) หรือแผนการทดลองแบบเพลกเก็ต-เบอร์แมน (Plackett-Burman design) เป็นต้น



รูป 2.20 ผลตอบสนองที่มีลักษณะเป็นฟังก์ชันเชิงเส้นโค้ง (ณรงค์ชัย สถาวรวิจิตร, 2549)

ส่วนผลตอบสนองที่มีลักษณะเป็นเส้นโค้งดังรูป 2.20 สามารถประมาณได้ด้วยตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสอง ซึ่งต้องระดับปัจจัยของปัจจัยอย่างน้อย 3 ระดับจึงจะเพียงพอในการแสดงลักษณะของผลตอบสนองที่เป็นเส้นโค้ง แผนการทดลองที่สามารถใช้ในการหาตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสอง คือ แผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลที่มีระดับของปัจจัย 3 ระดับ (3^k Factorial design) จากแผนการทดลองที่ใช้หาตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสอง คือ แผนการทดลองแบบบ๊อกซ์-วิลสัน ซึ่งต่อมานิยมเรียกว่าแผนการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design) หรือเรียกย่อๆ ว่า CCD โดยพัฒนามาจากแผนการทดลองแบบแฟคเทอเรียลที่มีระดับของปัจจัย 2 ระดับ (2^k Factorial design) หรือแผนการทดลองแบบแฟคเทอเรียลเชิงส่วน (Fractional Factorial design)

การนำหลักการการออกแบบพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology : RSM) มาใช้ในการศึกษา โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design : CCD) เพราะเป็นการออกแบบการทดลองที่ใช้ในสำหรับฟิตแบบจำลองกำลังสอง (Second-Order Model) และนำไปสู่การแปรผลพื้นผิวตอบสนองที่ต้องการศึกษา เพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยสำคัญ 2 ปัจจัยคือระยะเวลาและความเข้มข้นของกรด ที่ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสให้มากที่สุด ซึ่งข้อดีของวิธีการ CCD คือเป็นวิธีการที่ยืดหยุ่น สามารถช่วยลดจำนวนการทดลองลงได้ จึงทำให้มีค่าใช้จ่ายและพลังงานที่ใช้ลดน้อยลงไปด้วย

2.4.3 การออกแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design : CCD)

Central Composite Design (CCD) คือการออกแบบที่ทุกระดับของแต่ละปัจจัยห่างจาก Center ของ design เท่ากันและทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง แต่ละปัจจัยจะมีระดับการทดลอง 5 ระดับ ($-\alpha, -1, 0, 1, \alpha$) หลักการพื้นฐานของการออกแบบส่วนประสมกลางนั้นเป็นการขยายการออกแบบจากแผนการทดลองแบบแฟคเทอเรียลที่มีระดับปัจจัย 2 ระดับ (2^k Factorial Design) โดยทั่วไปแล้ว CCD จะเพิ่มการทดลองตามแนวแกน ซึ่งเป็นจุดแนวแกน (Axial Point) จำนวนการทดลอง 2k การทดลองและเพิ่มการทดลองจำนวน m ซ้ำ ที่จุดศูนย์กลาง (Center Point) ของการทดลอง เพื่อใช้ในการทดสอบความเหมาะสมของตัวแบบ (lack of fit test) จะได้จำนวนการทดลองทั้งหมด N ครั้ง แสดงดังสมการที่ 8 และค่า α นี้จะเป็นตัวบอกให้ทราบถึงระยะปลายสุดของระดับของปัจจัยที่สนใจศึกษาทั้งทางด้านต่ำ (Low) และด้านสูง (High) ทั้งนี้เพื่อให้สามารถพยากรณ์ได้ตลอดบริเวณตามระยะทางจากจุดกึ่งกลางของการออกแบบ ซึ่งคุณสมบัตินี้เรียกว่า Rotatable Design นั่นคือค่าความแปรปรวนของผลตอบที่ถูกพยากรณ์จะมีค่าคงตัวบนรูปทรงกลม ซึ่งเป็นคุณสมบัติอย่างหนึ่งที่ใช้ในแบบจำลองกำลังสองเพื่อหาพื้นผิวผลตอบสนอง

$$N = 2^k+2k+m \quad (8)$$

เพื่อให้การทดลองเป็นไปตามคุณสมบัติ Rotatable Design กล่าวคือ ค่าความแปรปรวนของการประมาณมีค่าเท่ากันที่ทุกๆ จุดของการทดลอง ที่มีระยะห่างจากจุดศูนย์กลางของการทดลองเท่าๆ กัน จะต้องมีการกำหนดค่า α และ m ที่เหมาะสม โดยค่า α , m และจำนวนครั้งของการทดลองที่มีจำนวนปัจจัยต่างๆ แสดงดังตาราง 2.1

ตาราง 2.1 ค่า α , m และจำนวนครั้งของการทดลองที่มีจำนวนปัจจัยต่างๆ

จำนวนปัจจัย (k)	2^k	การทดลองตามแนวแกน (2k)	จำนวนการทดลองซ้ำ (m)	α	จำนวนการทดลองทั้งหมด (N)
2	4	4	5	1.414	13
3	8	6	6	1.682	20
4	16	8	7	2.0	31
5	32	10	10	2.378	52
6	64	12	15	2.828	91
7	128	14	21	3.364	163

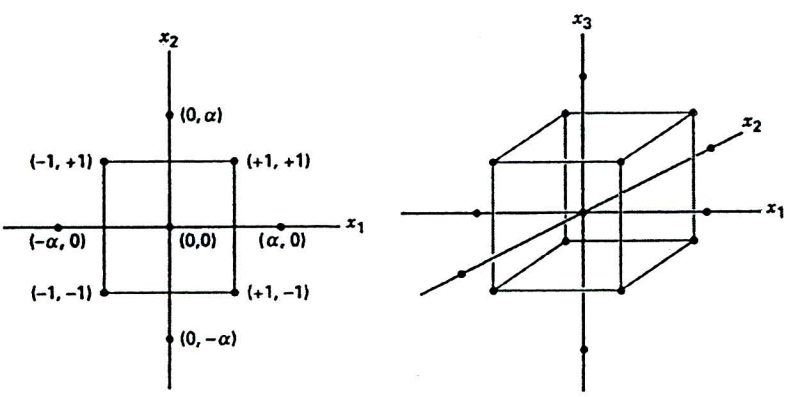
ตาราง 2.2 ช่วงของค่าระดับปัจจัย 2 และ 3 ระดับ

ระดับ 2 ปัจจัย	รหัสของปัจจัย					สัญลักษณ์
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$	
A	$A_{-\alpha}$	A_{-1}	A_0	A_1	$A_{+\alpha}$	X_A
B	$B_{-\alpha}$	B_{-1}	B_0	B_1	$B_{+\alpha}$	X_B
ระดับ 3 ปัจจัย	**รหัสของปัจจัย**					**สัญลักษณ์**
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$	
A	$A_{-\alpha}$	A_{-1}	A_0	A_1	$A_{+\alpha}$	X_A
B	$B_{-\alpha}$	B_{-1}	B_0	B_1	$B_{+\alpha}$	X_B
C	$C_{-\alpha}$	C_{-1}	C_0	C_1	$C_{+\alpha}$	X_C

จากตาราง 2.2 แสดงรูปแบบของแผนการทดลองแบบ CCD ช่วงของค่าระดับปัจจัย 2 และ 3 ระดับ และตัวอย่างของปัจจัย 2 ระดับแสดงดังตาราง 2.3 ซึ่งจะเห็นว่ามีจำนวนการทดลองเท่ากับ 13 การทดลอง ประกอบด้วยการทดลอง 2^2 แฟคเทอเรียล 4 การทดลอง การทดลองตามแนวแกน 4 การทดลอง และการทดลองซ้ำที่จุดศูนย์กลางอีก 5 การทดลอง

ตาราง 2.3 ระดับ 2 ปัจจัยของตัวแปรที่ศึกษา

การทดลองที่	ค่าของปัจจัยการทดลอง		รหัสของปัจจัย		ผลผลิต
	A	B	X_A	X_B	Y
1	A_{-1}	B_{-1}	-1	-1	Y_1
2	A_{-1}	B_1	-1	+1	Y_2
3	A_1	B_{-1}	+1	-1	Y_3
4	A_1	B_1	+1	+1	Y_4
5	$A_{-\alpha}$	B_0	-1.414	0	Y_5
6	A_0	$B_{-\alpha}$	0	-1.414	Y_6
7	A_α	B_0	+1.414	0	Y_7
8	A_0	B_α	0	+1.414	Y_8
9	A_0	B_0	0	0	Y_9
10	A_0	B_0	0	0	Y_{10}
11	A_0	B_0	0	0	Y_{11}
12	A_0	B_0	0	0	Y_{12}
13	A_0	B_0	0	0	Y_{13}



รูป 2.21 การออกแบบส่วนประสมกลาง สำหรับ n=2 และ n=3 (ปารเมศ ชุติมา, 2545)

จากตาราง 2.2 นำหลักการออกแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design : CCD) มาใช้ ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า A_0 B_0 และ C_0 เป็นจุดกึ่งกลางของปัจจัย A B และ C ตามลำดับ ส่วนใหญ่แล้วจะมีการทดสอบซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 3-5 ครั้ง เพื่อวัดความ error ของการทดสอบ และค่าของระดับของปัจจัยที่นำมาใช้ปกติจะไม่ใช่ค่าต่ำสุดหรือสูงสุดของการออกแบบ เมื่อมี Axial Points เพราะปกติ Axial Points จะอยู่นอก Cube ของการออกแบบ (ยกเว้นกำหนดค่า α มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1) ซึ่งถ้าไม่ระมัดระวังแล้ว อาจจะทำให้ไม่สามารถทำการ Runs การทดลองได้ เพราะว่า Axial Runs อยู่นอกเหนือจากจุดที่ใช้ทดลอง ซึ่งค่า $-\alpha$ และ $+\alpha$ สามารถปรับค่าเพื่อดูแนวโน้มของแต่ละปัจจัยได้ จากแผนการทดลองแบบ CCD ในงานวิจัยนี้สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรอิสระที่ศึกษา (dependent variable) คือความเข้มข้นกรดและเวลาในตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสองแสดงดังสมการที่ 9 คือ

$$Y = \beta_0 + \beta_A x_A + \beta_B x_B + \beta_{AA} x_A^{\,2} + \beta_{BB} x_B^{\,2} + \beta_{AB} x_A x_B + \varepsilon \qquad (9)$$

โดย

y คือ ปริมาณผลผลิต (Yield)

β คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Regression Coefficients)

x_A คือ ค่าของปัจจัยที่ A

x_B คือ ค่าของปัจจัยที่ B

ε คือ ค่าความผิดพลาดของจากการทดลอง

เมื่อได้สมการที่ดีที่สุดของแล้ว จะนำไป plot graph โดยใช้ Program SAS, statistica หรือ Sigma plot เพื่อดูจุดที่ให้ปริมาณผลผลิตได้มากที่สุด และทำให้ทราบว่าปัจจัยใดที่มีผลต่อการเกิดผลผลิต (Y) นั้น ซึ่งรายละเอียดขั้นตอนการออกแบบ CCD จะได้กล่าวในบทที่ 3 ต่อไป