การกำจัดพาราเซตามอลด้วยเปอร์ออกซิเดสจากก้านกะหล่ำดอก

ชลิตตาพร สายโสม

ค้นคว้าอิสระนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

REMOVAL OF PARACETAMOL BY PEROXIDASE FROM CAULIFLOWER STEM

CHALITAPORN SAISOM

AN INDEPEDENT STUDY SUBMITTED IN PARTIAL FULLFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF ENGINEERING
MAJOR IN ENVIRONMENTAL ENGINEERING
FACULTY OF ENGINEERING
UBONRATCHATHANI UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2016

COPYRIGHT OF UBONRATCHATHANI UNIVERSITY

ใบรับรองการค้นคว้าอิสระ
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์

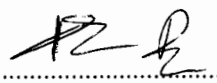
เรื่อง การกำจัดพาราเซตามอลด้วยเปอร์ออกซิเดสจากก้านกะหล่ำดอก

ผู้วิจัย นางสาวชลิตตาพร สายโสม

คณะกรรมการสอบ

รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์พงษ์ มัตราช	ประธานกรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรรณิกา รัตนพงศ์เลขา	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จักรกฤษณ์ อัมพุช	กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษา

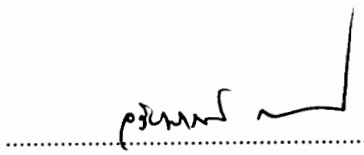


.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรรณิกา รัตนพงศ์เลขา)

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.กุลเชษฐ์ เพียรทอง)
คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์



.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปีการศึกษา 2558

กิตติกรรมประกาศ

การค้นคว้าอิสระนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรรณิกา รัตนพงศ์เลขา อาจารย์ที่ปรึกษาการค้นคว้าอิสระ ที่ให้คอยคำปรึกษาและชี้แนะแนวทางในการทำงานวิจัยจนเสร็จสิ้นและผ่านไปด้วยดี ขอขอบพระคุณประธานหลักสูตรวิศวกรรมมหาบัณฑิตสาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะกรรมการสอบการค้นคว้าอิสระ ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการค้นคว้าอิสระเพื่อทำงานวิจัยให้สำเร็จ

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์ เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ ในการทดลอง ขอบคุณเพื่อนๆ นักศึกษาปริญญาโท คณะวิศวกรรมศาสตร์ สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ที่ให้กำลังใจและคำแนะนำ ทั้งยังช่วยเหลือในการทำวิจัยด้วยดี

สุดท้ายขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การอบรมเลี้ยงดูและให้การสนับสนุน ทั้งยังส่งเสริมด้านการศึกษาเป็นอย่างดีมาโดยตลอด ขอบคุณกำลังใจจากท่านที่มอบให้ จนเป็นแรงผลักดันให้ผู้วิจัยประสบผลสำเร็จในชีวิต

ชลิตตาพร สายโสม

ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

เรื่อง : การกำจัดพาราเซตามอลด้วยเปอร์ออกซิเดสจากก้านกะหล่ำดอก

ผู้วิจัย : ชลิตตาพร สายโสม

ชื่อปริญญา : วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา : วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรรณิกา รัตนพงศ์เลขา

คำสำคัญ : พาราเซตามอล, เปอร์ออกซิเดส, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์, ก้านกะหล่ำดอก

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกำจัดพาราเซตามอลด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่สกัดจากก้านกะหล่ำดอก ในสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพาราเซตามอล ความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ ทำการทดลองในชุดทดลองแบบกะ ความเร็วรอบในการกวนที่ 200 รอบต่อนาที พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดพาราเซตามอลสูงสุดเท่ากับ 66.47% ที่ความเข้มข้นของพาราเซตามอล 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.124 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 1 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายเท่ากับ 7 และอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสกำจัดพาราเซตามอลปนเปื้อนในน้ำและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมและโรงพยาบาลต่อไป

ABSTRACT

TITLE : REMOVAL OF PARACETAMOL BY PEROXIDASE FROM CAULIFLOWER STEM
AUTHOR : CHALITTAPORN SAISOM
DEGREE : MASTER OF ENGINEERING
MAJOR : ENVIRONMENTAL ENGINEERING
ADVISOR : ASST. PROF. KARNIKA RATANAPONGLEKA, Ph.D.
KEYWORDS : PARACETAMOL, PEROXIDASE, HYDROGEN PEROXIDE, CAULIFLOWER STEM

This research aimed to study the removal of paracetamol by peroxidase extracted from cauliflower stems. Variations of concentrations of paracetamol, enzyme, and hydrogen peroxide, pH, and temperatures were tested. The experiments were carried out in a batch system at a stirrer speed 200 rpm. Results showed that the maximum removal efficiency of paracetamol was 66.47% at the conditions of a paracetamol concentration of 1 mg/l, an enzyme concentration of 0.124 U/ml, a hydrogen peroxide concentration of 1 mM, a pH of 7, and a temperature of 25 °C. The study indicated the feasibility of peroxidase for the removal of paracetamol contamination from water and the potential for its application in industries and hospitals.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 แผนการดำเนินงาน	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 พาราเซตามอล	4
2.2 เอนไซม์	7
2.3 เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส	11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง	
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	19
3.2 เอนไซม์	19
3.3 กรอบแนวคิดการวิจัย	20
3.4 วิธีการทดลอง	21
3.5 การวิเคราะห์ผล	22
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	
4.1 ผลของความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่มีต่อการกำจัดพาราเซตามอล	23
4.2 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มีต่อการกำจัดพาราเซตามอล	25
4.3 ผลของความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีต่อการกำจัดพาราเซตามอล	27

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4 ผลของการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่มีต่อการกำจัดพาราเซตามอล 29

4.5 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการกำจัดพาราเซตามอล 30

บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลองการกำจัดพาราเซตามอลด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยชุดการทดลองแบบกะ 33

5.2 ข้อเสนอแนะ 33

เอกสารอ้างอิง 35

ภาคผนวก

ก การวิเคราะห์ปริมาณพาราเซตามอล 43

ข การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ 46

ค เครื่องมือในการวิจัย 49

ง ตารางผลการทดลอง 52

จ ผลงานการนำเสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติ 58

ประวัติผู้วิจัย 68

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
จ.1	การกำจัดพาราเซตามอลเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพาราเซตามอล	53
จ.2	การกำจัดพาราเซตามอลเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์	54
จ.3	การกำจัดพาราเซตามอลเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	55
จ.4	การกำจัดพาราเซตามอลเมื่อเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง	56
จ.5	การกำจัดพาราเซตามอลเมื่อเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ	57

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างพาราเซตามอล	4
2.2	ปฏิกิริยาเคมีการสังเคราะห์พาราเซตามอล	5
2.3	สับสเตรทของเปอร์ออกซิเดส	12
3.1	กรอบแนวคิดการวิจัย	22
4.1	ร้อยละการกำจัดพาราเซตามอลเทียบกับเวลา เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพาราเซตามอล	23
4.2	ร้อยละการกำจัดพาราเซตามอลเทียบกับเวลา เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์	25
4.3	ร้อยละการกำจัดพาราเซตามอลเทียบกับเวลา เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	27
4.4	ร้อยละการกำจัดพาราเซตามอลเทียบกับเวลา เมื่อเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง	29
4.5	ร้อยละการกำจัดพาราเซตามอลเทียบกับเวลา เมื่อเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ	31
ก.1	กราฟมาตรฐานพาราเซตามอล	45
ค.1	เครื่องชั่งสารเคมี	50
ค.2	เครื่องกรองแบบไมโครฟิลเตรชั่น	50
ค.3	เครื่องกวนแบบแม่เหล็ก	51
ค.4	เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	51

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์และคำย่อ	ความหมาย
ml	มิลลิลิตร
mg	มิลลิกรัม
mg/l	มิลลิกรัมต่อลิตร
U/ml	ยูนิตต่อมิลลิลิตร
M	โมลาร์
°C	องศาเซลเซียส
UF	อัลตราฟิลเตรชั่น
NF	นาโนฟิลเตรชั่น
AC	การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

พาราเซตามอล (Paracatamol) มีชื่อสามัญคือ อะเซตามิโนเฟน (Acetaminophen) จัดอยู่ในกลุ่มของยาบรรเทาอาการปวด (analgesics) และช่วยลดไข้ พาราเซตามอลจึงจัดเป็นยาพื้นฐานที่ถูกใช้มากและ หาซื้อได้ง่าย สามารถพบการปนเปื้อนของพาราเซตามอลได้ทั้งในน้ำผิวดินและน้ำใต้ดิน ซึ่งการปนเปื้อนที่พบในแหล่งน้ำที่จะใช้ในการอุปโภคบริโภคนั้นทำให้เกิดความเสี่ยงที่มนุษย์และสัตว์จะได้รับเข้าไป มักพบในน้ำเสียจากโรงพยาบาลที่มีพาราเซตามอลเจือปนอยู่ หากไม่มีการบำบัดก่อนปล่อยทิ้งลงสู่แหล่งน้ำก็จะพบการปนเปื้อนพาราเซตามอลในแหล่งน้ำ ส่งผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ และยังส่งผลทำให้เกิดน้ำเน่าและมีกลิ่นเหม็น ดังนั้นการศึกษาการกำจัดพาราเซตามอลจึงมีความจำเป็น ในปัจจุบันได้มีการศึกษาวิธีการกำจัดพาราเซตามอลหลายวิธีทั้งกระบวนการทางกายภาพและกระบวนการทางเคมี เช่น กระบวนการอิเล็กโตรเฟนตันและโฟโตอิเล็กโตรเฟนตันซึ่งพบว่าเป็นวิธีที่กำจัดได้ดีแต่มีข้อจำกัดในเรื่องวิธีการทำที่ยุ่งยากและยังใช้ต้นทุนสูงในการกำจัด (Mark Daniel G. et al., 2012) กระบวนการกรองอัลตราฟิลเตรชั่น (UF) นาโนฟิลเตรชั่น (NF) การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ (activated carbon adsorption: AC) วิธีการดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการกำจัดแต่มีค่าใช้จ่ายที่สูงทั้งยังมีวิธีการที่ซับซ้อน (A. Vonaetal et al., 2015) การใช้โอโซนเป็นอีกวิธีที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสูงแต่ต้องใช้พลังงานและค่าใช้จ่ายสูงตามไปด้วย รวมทั้งวิธีการใช้โอโซนยังส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในแหล่งน้ำ เนื่องจากการใช้โอโซนนี้จะทำปฏิกิริยากับสารบางชนิดที่จะทำให้เกิดสารก่อมะเร็ง สำหรับการศึกษาครั้งนี้จะใช้กระบวนการทางชีวภาพโดยการใช้เอนไซม์ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีค่าใช้จ่ายไม่สูงเมื่อเทียบกับวิธีการข้างต้น ไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้าง เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และเอนไซม์ยังสามารถทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับสารตั้งต้นได้หลากหลาย เช่น ฟีนอล อะโรมาติกเอมีน และ สารประกอบอนินทรีย์ เป็นต้น

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (ชื่นสุมณ ยิ้มถิน, 2548) และออกซิไดซ์สับสเตรทที่ให้อิเล็กตรอน เช่น ฟีนอล (phenol) อะโรมาติกเอมีน (aromatic amine) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) และสารประกอบอนินทรีย์ (Vernwal SK. et al., 2006) จึงมีการนำเปอร์ออกซิเดสไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย ทั้งในทางการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหาร เกษตรกรรม และการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีสารประกอบฟีนอลซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (นิตยา จันชิว และคณะ, 2551)

เปอร์ออกซิเดสถูกพบได้ทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ (Kongwithtaya S. et al., 2010) ในปัจจุบันเปอร์ออกซิเดสที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ปฏิกิริยาเคมีได้จากรากฮอร์ทเรดิช (horseradich root) ซึ่งต้องนำเข้าจากต่างประเทศทำให้เอนไซม์มีราคาสูง ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาหาแหล่งผลิตเปอร์ออกซิเดสจากแหล่งต่างๆ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป โดยคุณสมบัติเปอร์ออกซิเดสจะแตกต่างกันจากแหล่งผลิต ซึ่งในงานวิจัยนี้เปอร์ออกซิเดสที่ได้จะสกัดจากพืชตระกูลกะหล่ำ โดยนำก้านกะหล่ำดอกมาสกัดเป็นเอนไซม์ชนิดหยาบ เพื่อที่จะนำมาทำการทดลองกำจัดพาราเซตามอล ทั้งยังศึกษาค่าความเป็นกรด – ด่าง ความเข้มข้นของพาราเซตามอล ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการกำจัดพาราเซตามอลด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากก้านกะหล่ำดอก เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพาราเซตามอล ความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 งานวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ โดยทำการทดลองในถังปฏิกรณ์แบบกะ (batch reactor)

1.3.2 เอนไซม์ที่ใช้อยู่ในรูปเอนไซม์หยาบ ซึ่งสกัดจากก้านกะหล่ำดอกที่ซื้อมาจากตลาดวารินฯ อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

1.3.3 น้ำเสียที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เตรียมจากผงพาราเซตามอลบริสุทธิ์ นำมาละลายน้ำให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

1.3.4 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานเอนไซม์ใช้วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น คือ กัวไอเอคอล (guaiacol)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทำให้ทราบถึงการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในการกำจัดพาราเซตามอลเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพาราเซตามอล ความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นชองไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ

1.4.2 สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการวิจัยไปประยุกต์ใช้งานในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนพาราเซตามอลได้อย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ

1.5 แผนการดำเนินงาน

สำหรับการดำเนินงานวิจัยนี้แบ่งเป็น 3 ขั้นตอนหลักๆ ดังนี้

1.5.1 เตรียมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากการสกัดจากก้านกะหล่ำดอก

โดยการนำก้านกะหล่ำดอกไปผ่านเครื่องแยกกาก กรอกด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ส่วนของเหลวใสที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงคือเอนไซม์หยาบ จะถูกนำไปเก็บที่ตู้แช่แข็งสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป ศึกษาการกำจัดพาราเซตามอลด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสหยาบ

1.5.2 ขั้นตอนนี้เป็นการศึกษา

1.5.2.1 การกำจัดพาราเซตามอลด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพาราเซตามอล

1.5.2.2 การกำจัดพาราเซตามอลด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์

1.5.2.3 การกำจัดพาราเซตามอลด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง

1.5.2.4 การกำจัดพาราเซตามอลด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

1.5.2.5 การกำจัดพาราเซตามอลด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

1.5.3 การวิเคราะห์ และสรุปผลการศึกษา

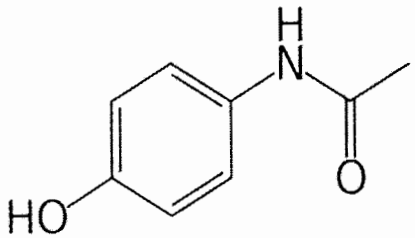
ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนการรวบรวมข้อมูลที่ศึกษาข้างต้น เพื่อนำมาวิเคราะห์และสรุปผลการศึกษา

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พาราเซตามอล (Paracetamol)

2.1.1 คุณสมบัติของพาราเซตามอล

พาราเซตามอล (Paracetamol) ย่อมาจาก para-acetylaminophenol มีชื่อสามัญว่า อะเซตามิโนเฟน (Acetaminophen) เป็นอนุพันธ์ของพาราอะเซทิลอะมิโนฟีนอล (para -acetyl amino- phenol) จัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอล มีสูตรเคมีเป็น $C_8H_9NO_2$ (พงศธร หอมวงษ์ และคณะ, 2555) มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวหรือผลึกรูปแป้ง (ศิริพร จันทรคีรี. 2543) มีจุดเดือดที่ 169 องศาเซลเซียส สภาพละลายในน้ำ 14 mg/mL หรือ 25 mg/mL (20°C) มีน้ำหนักโมเลกุล 151.169 g/mol ความหนาแน่นที่ 1.263 g/cm^3 มีค่า pH ประมาณ 6 ทั้งนี้พาราเซตามอลยังจัดอยู่ในกลุ่มของยาบรรเทาอาการปวด (analgesics) และช่วยลดไข้ ซึ่งเป็นยาพื้นฐานที่ใช้กันมากและยังหาซื้อได้ง่าย

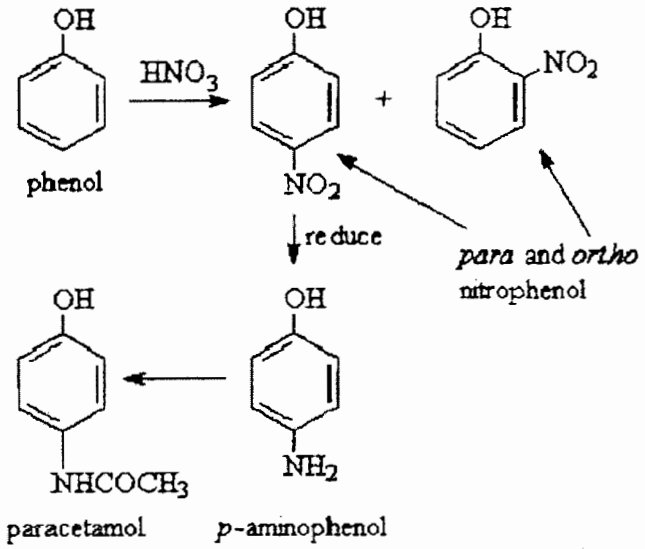


ภาพที่ 2.1 โครงสร้างพาราเซตามอล
ที่มา: ทรงพล ศรีนวล (2557)

โดยกลไกของการออกฤทธิ์ ในฤทธิ์ลดไข้นั้น เกิดจากการยับยั้งศูนย์ควบคุมเกี่ยวกับอุณหภูมิที่บริเวณสมองส่วนไฮโพธาลามัส (Hypothalamus) ส่วนกลไกในการลดอาการปวดนั้นจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการนำของกระแสประสาทที่เกี่ยวกับความเจ็บปวด อย่างไรก็ตาม มีการเสนอกลไกเรื่องของการเกี่ยวข้องกับการเป็น weak inhibitor ในกระบวนการสังเคราะห์ prostaglandin ซึ่งมีผลต่อการสร้างเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้อง ในกระบวนการเจ็บปวดหรือการอักเสบ อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ของพาราเซตามอลยังต้องมีการศึกษาต่อไป (ทรงพล ศรีนวล, 2557)

2.1.2 การสังเคราะห์พาราเซตามอล

การสังเคราะห์พาราเซตามอลมีขั้นตอนดังนี้ เริ่มจากฟีนอล (phenol) ถูกไนเตรต (nitrate) โดยใช้กรดไนตริก (nitric acid) จากนั้นกลั่นลำดับส่วนเพื่อแยกพาราไอโซเมอร์ (para-isomer) จากออร์โธไอโซเมอร์ (ortho-isomer) จากนั้น 4-ไนโตรฟีนอลถูกรีดิวซ์เป็นอะมิโนฟีนอล (aminophenol) โดยใช้โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (sodiumborohydride) ในตัวกลางที่เป็นเบส ท้ายที่สุด 4-อะมิโนฟีนอล (4-aminophenol) ทำปฏิกิริยากับอะซิติกแอนไฮไดรด์ (acetic anhydride) ได้เป็นพาราเซตามอล ดังภาพที่ 2.2 ปฏิกิริยาเคมีการสังเคราะห์พาราเซตามอล (ธนวัน ญาโณทัย, 2551)



ภาพที่ 2.2 ปฏิกิริยาเคมีการสังเคราะห์พาราเซตามอล
ที่มา: ธนวัน ญาโณทัย (2551)

2.1.3 ผลกระทบของพาราเซตามอล

เนื่องจากยาพาราเซตามอลเป็นยาที่ใช้บรรเทาอาการปวดและเป็นยาที่สามารถจำหน่ายได้โดยไม่ต้องมีใบสั่งแพทย์ (Total organic carbon: TOC) เป็นยาที่หาซื้อได้ง่ายและเป็นยาพื้นฐานที่มักใช้มากในโรงพยาบาลจึงเป็นเหตุให้ในน้ำทิ้งจากโรงพยาบาลมียาพาราเซตามอลเจือปนอยู่ และหากไม่มีการบำบัดก่อนทิ้งลงแม่น้ำก็จะเกิดการปนเปื้อนของยาพาราเซตามอลในแหล่งน้ำ หากมีการปนเปื้อนในปริมาณมากๆ อาจส่งผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ ยาพาราเซตามอลเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่สามารถสลายได้ด้วยจุลินทรีย์ การย่อยสลายต้องอาศัยแบคทีเรียในน้ำที่ใช้ออกซิเจน เมื่อออกซิเจนในแหล่งน้ำหมดไปจะทำให้แบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต

และเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วจนทำให้เกิดน้ำเน่าและมีกลิ่นเหม็น จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายยาพาราเซตามอลก็จะเข้าห่วงโซ่อาหารต่อไปและไปสะสมในเนื้อปลาหรือสัตว์น้ำ เมื่อมนุษย์บริโภคปลาที่มียาพาราเซตามอลปนเปื้อน จะทำให้มีโอกาสเกิดโรคหรืออาจเกิดการปนเปื้อนได้ และเมื่อนำน้ำที่ปนเปื้อนไปใช้ในการเกษตรอาจทำให้ผลผลิตเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมแล้วนำมาซึ่งโอกาสที่จะเกิดโรคภัยต่างๆได้เช่นกัน งานวิจัยในอดีตที่มีการตรวจสอบพบได้ว่าในยุโรปและอเมริกา มีการปนเปื้อนยาพาราเซตามอลในระบบบำบัดน้ำเสียทั่วไป 6 - 10 ไมโครกรัมต่อลิตร และในระบบบำบัดน้ำเสียของโรงพยาบาลมีการปนเปื้อน เกิน 150 ไมโครกรัมต่อลิตร

2.1.4 การกำจัดพาราเซตามอล

จากการศึกษาพบว่าได้มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการกำจัดพาราเซตามอลด้วยวิธีต่างๆ เช่นพงศธร หอมวงษ์ และคณะ (2555) ได้ศึกษาการกำจัดสารประเภทยาได้พาราเซตามอลและนอร์ฟลอกซาซิน ในน้ำโดยกระบวนการแวคคูอัมอัลตราไวโอเลต (วียูวี) ซึ่งเป็นกระบวนการออกซิเดชันขั้นสูงแบบหนึ่ง การศึกษาครอบคลุมผลของความเข้มข้นสารพาราเซตามอลและนอร์ฟลอกซาซินเริ่มต้น (1 5 และ 10 มิลลิกรัม/ลิตร) พีเอชเริ่มต้น (พีเอช เท่ากับ 5 7 9) ความเข้นข้นของไบคาร์บอเนต (100, 200, 500, 1000 มิลลิกรัมแคลเซียมคาร์บอเนต/ลิตร) การทดลองภายใต้สภาวะอัลตราไวโอเลต (ยูวี) ได้ดำเนินการเช่นกันเพื่อใช้เปรียบเทียบผลการทดลองกับกระบวนการวียูวี ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากระบวนการวียูวี (ร้อยละ 98.20-100) มีประสิทธิภาพการกำจัดที่ดีกว่ากระบวนการยูวี (ร้อยละ 45.66-70.54) อัตราการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของพาราเซตามอลและนอร์ฟลอกซาซินเป็นไปตามปฏิกริยาอันดับสอง โดยมีค่าคงที่ของปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 0.061-1.837 ลิตรต่อนาที-มิลลิกรัม ในการทดลองที่ความเข้มข้นสารพาราเซตามอลและนอร์ฟลอกซาซินเริ่มต้นทั้งสามค่า เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นสูงขึ้นส่งผลให้มีประสิทธิภาพการย่อยสลายลดลง สำหรับพีเอชเริ่มต้นนั้นส่งผลกระทบเพียงเล็กน้อยต่อประสิทธิภาพการกำจัดสารทั้งสองชนิดโดยที่พีเอชเริ่มต้น 7 มีผลทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดดีที่สุด ส่วนไบคาร์บอเนตส่งผลกระทบต่อการกำจัดสารพาราเซตามอลและนอร์ฟลอกซาซินอย่างชัดเจน เนื่องจากสารเหล่านี้ขัดขวางการทำปฏิกิริยาของอนุมูลไฮดรอกซิลและดูดซึมแสงวียูวี สำหรับผลของกำลังไฟฟ้าของหลอดวียูวีนั้นได้ทดลองที่ค่าความเข้นข้นสารพาราเซตามอลและนอร์ฟลอกซาซินเริ่มต้น 1 และ10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีการเปลี่ยนแปลงค่ากำลังของวียูวีเท่ากับ 30, 60 และ 120 วัตต์ ซึ่งการทดลองทั้งสามให้ประสิทธิภาพการกำจัดที่แตกต่างกันและมีแนวโน้มการลดลงของสารพาราเซตามอลและนอร์ฟลอกซาซินตามกำลังไฟฟ้าของวียูวีที่เพิ่มขึ้น

ธนวัน ญาโณทัย (2551) ศึกษาการตกตะกอนพาราเซตามอล ด้วยเทคนิค Supercritical Anti-Solvent (SAS) โดยมีจุดมุ่งหมาย เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของอนุภาคพาราเซตามอลที่ได้จากเทคนิค SAS และการระเหยแห้ง และศึกษาอิทธิพลของความดัน (1500-3500 ปอนด์ต่อตารานิ้ว) อุณหภูมิ (35-55 องศาเซลเซียส) และความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลาย (10,000 – 20,000 ppm)

ที่มีผลต่อขนาดและการกระจายของขนาดอนุภาค โครงสร้างของผลึกและประสิทธิภาพในการตกตะกอน โดยวิเคราะห์ขนาดและการกระจายของขนาดอนุภาคพาราเซตามอลที่ผ่านการตกตะกอนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scaning Electron Microscope: SEM) และวิเคราะห์โครงสร้างผลึกด้วยเครื่องเอกซเรย์ดิฟแฟรกชัน (X-ray Diffraction: XRD) จากผลการศึกษาพบว่าการตกตะกอนพาราเซตามอลโดยใช้เทคนิค SAS จะมีประสิทธิภาพในการตกตะกอนสูงกว่าวิธีการระเหย นอกจากนั้นอนุภาคพาราเซตามอลที่เตรียมได้จากเทคนิค SAS จะมีความเป็นผลึกสูงและเป็นผลึกแบบโมโนคลินิค (Monoclinic form) อนุภาคตะกอนที่ได้จะมีขนาดเล็กและมีการกระจายของขนาดอนุภาคที่แคบกว่าอนุภาคที่เตรียมได้จากการระเหย นอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่มความดันและความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายที่ใช้ในการตกตะกอน ทำให้อนุภาคที่ได้มีขนาดเล็กลงโดยมีขนาดอยู่ในช่วง 1.11 – 4.52 ไมโครเมตร มีการกระจายของขนาดอนุภาคแคบ และมีประสิทธิภาพในการตกตะกอนสูง (95 เปอร์เซ็นต์) ขึ้น สำหรับผลของการเพิ่มอุณหภูมินั้นพบว่า จะทำให้อนุภาคพาราเซตามอลมีขนาดใหญ่ขึ้น มีการกระจายของขนาดอนุภาคกว้างขึ้น และมีประสิทธิภาพในการตกตะกอนต่ำลง

นอกจากนี้ยังมีการศึกษา การกำจัดพาราเซตามอลก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำ เช่น กระบวนการอิเล็กโตรเฟนตันและโฟโตอิเล็กโตรเฟนตัน (Mark Daniel G. et al., 2012) กระบวนการกรองอัลตราฟิลเตรชั่น (UF) นาโนฟิลเตรชั่น (NF) การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ (activated carbon adsorption: AC) (A. Vonaetal et al., 2015) การใช้โอโซน ซึ่งวิธีการเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการกำจัดสูงแต่ต้องใช้พลังงานและค่าใช้จ่ายสูงตามไปด้วย สำหรับวิธีการใช้โอโซนยังส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในแหล่งน้ำ เนื่องจากวิธีการใช้โอโซนนี้จะทำปฏิกิริยากับสารบางชนิดที่จะทำให้เกิดสารก่อมะเร็ง

2.2 เอนไซม์ (Enzyme)

เอนไซม์ คือ ตัวเร่งที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาที่เกิดในสิ่งมีชีวิต (biological catalyst) ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้นได้เป็น 10^8 - 10^{14} เท่า ของปฏิกิริยาเดิมที่ไม่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง สารที่เข้าทำปฏิกิริยากัน (reactant) ในปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง มีชื่อเรียกว่า สับสเตรท (substrate) โดยส่วนใหญ่แล้วเอนไซม์ชนิดหนึ่งๆเป็นตัวเร่งที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรท เนื่องจากเอนไซม์จะสามารถเร่งปฏิกิริยาที่มีสับสเตรทชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะเท่านั้น

เอนไซม์ส่วนใหญ่เป็นโปรตีน มีลักษณะเป็นก้อน การทำงานของเอนไซม์จะขึ้นกับโครงรูปของโปรตีน เอนไซม์บางชนิดจะทำงานได้ก็ต่อเมื่อมีโคแฟกเตอร์ (สารที่ไม่ใช่โปรตีน) อยู่ด้วย เรียกว่า โฮโลเอนไซม์ (holoenzyme) และเรียกส่วนเอนไซม์ที่เป็นโปรตีนที่ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ว่า อะโพเอนไซม์ (aporenzyme) โคแฟกเตอร์ของเอนไซม์อาจเป็นสารอินทรีย์ เช่น วิตามิน หรืออนุพันธ์ของวิตามิน หรืออาจเป็นไอออนของโลหะ เช่น Zn^{2+} ของเอนไซม์คาร์บอกซีเพปติเดส

(carboxypeptidase) ในกรณีนี้จะเรียกว่า โคเอนไซม์ (coenzyme) ซึ่งเอนไซม์จะจับกับโคเอนไซม์บางชนิดอย่างแน่นมากจนไม่สามารถแยกออกจากเอนไซม์โดยไม่ทำให้เอนไซม์สูญเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไปได้ โคเอนไซม์ประเภทนี้จะถูกเรียกว่า หมู่พรอสเธติก (prosthetic group) เช่น หมู่ไบโอไซติน (biocytin) จะเชื่อมอยู่กับกรดอะมิโนไลซีนของเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์เกิดเป็นไบโอทินิลไลซีน (biotinyllysine) หรือไบโอไซติน (พุทธรักษา พุทธโค และรัญจวน ศรีสุบาล, 2547)

2.2.1 ชนิดของเอนไซม์

การแบ่งประเภทของเอนไซม์นิยมแบ่งตามลักษณะการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งคณะกรรมาธิการเอนไซม์นานาชาติ (International Enzyme Commission: IEC) ได้จัดแบ่งเป็น 6 กลุ่ม คือ

2.2.1.1 ออกซิโดรีดักเตส (Oxidoreductase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชัน

$$H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2H_20 \qquad (2.1)$$

เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยา คือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ : ไฮโดรเจนเปอร์ซิโดรีดักเตส

2.2.1.2 ทรานส์เฟอร์เรส (Transferase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายอะตอมหรือ กลุ่มอะตอมจากสารหนึ่งไปยังอีกสารหนึ่งของตัวรับที่ไม่ใช่น้ำ เรียกว่า donor: acceptor grouptransferred-transferase ตัวอย่างของปฏิกิริยาดังเช่น

$$ATP + D\text{-glucose} \longrightarrow ADP + D\text{-glucose-6-phosphate} \qquad (2.2)$$

2.2.1.3 ไฮโดรเลส (Hydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ใช้น้ำเป็นตัวไปสลายพันธะโคเวเลนต์ในโมเลกุลของสับสเตรท เรียกชื่อ substrate hydrolase น้ำไม่จัดว่าเป็นสับสเตรทของปฏิกิริยา ตัวอย่างของปฏิกิริยา เช่น

$$Triacylglycerrol + H_2O \longrightarrow Diacylglycerrol + Fatty\ acid \qquad (2.3)$$

เอนไซม์ คือ ไตรเอซิลกลีเซอรอลเอซิลไฮโดรเลส หรือ ไตรเอซิลกลีเซอรอลไลเพป

2.2.1.4 ไลเอส (Lyases) เป็นเอนไซม์ช่วยเร่งปฏิกิริยาการดึงเอาส่วนต่างๆ ออกจากโมเลกุล (สับสเตรท) (ที่ไม่ใช่การไฮโดรไลซิส) การเรียกชื่อจะเติมสับสเตรทลงด้านหน้าของไลเอส ตัวอย่างเช่น

$$\text{Malate} \longrightarrow \text{Fumarate} + H_2O \qquad (2.4)$$

เอนไซม์ชื่อมาเลตไฮโดร-ไลเอส ต้องมี – (hyphen) เสมอ และต้องไม่สับสนกับเอนไซม์ไฮโดรเลส ซึ่งจะทำให้เข้าใจผิดได้ง่าย

เอนไซม์ชื่อคาร์บอกซีเลส คือ คาร์บอกซี-ไลเอส แต่ไม่ใช่เอนไซม์คาร์บอกซีเลส ชื่อที่สมบูรณ์คือ เอนไซม์มาเลตไฮโดร-ไลเอส หรือ ฟูมาเลตไฮดราเตส เมื่อก่อนเรียก ฟูมาเรส

2.2.1.5 ไอโซเมอร์เรส (Isomerases) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไอโซเมอร์ของสับสเตรท โดยเรียกชื่อสับสเตรทไว้ข้างหน้าแล้วต่อด้วยไอโซเมอร์เรส และบอกชื่อชนิดของไอโซเมอร์ที่เปลี่ยนแปลงด้วย เช่น มาลีเอต ซิส-ทรานส์-ไอโซเมอเรสหรือฟีนิลไพรูเวทคิโต-อีนอลไอโซเมอเรส เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลง ระหว่างน้ำตาลแอลโดสและคีโตส เรียกว่า คีตอล-ไอโซเมอเรส (ketol-isomerase)

สำหรับปฏิกิริยาไอโซเมอร์ไรเซชันที่มีการย้ายหมู่ภายในโมเลกุลเดียวกัน เช่น 2-ฟอสโฟ-ดี-กลีเซอรอล เป็น 3-ฟอสโฟ-ดี-กลีเซอรอล เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยา เรียกว่า มิวเตส (mutase) ตัวอย่าง คือ ดี-ฟอสโฟกลีเซอรอล 2,3-ฟอสโฟมิวเตส ส่วนเอนไซม์ที่เปลี่ยนไอโซเมอร์ของหมู่ asymmetric เพียงตำแหน่งเดียวหรือหลายตำแหน่งตามลำดับ ดังนั้นมักจะเติมเลขตำแหน่งลงข้างหน้าของคำว่าอีพิเมอเรสด้วย เพื่อที่จะได้ทราบว่าตำแหน่งใดที่ต้องการเปลี่ยนแปลงไอโซเมอร์ ตัวอย่างของ ปฏิกิริยา เช่น

$$\text{L-Alanine} \xrightarrow{\text{alanineracemas}} \text{D-Alanine} \qquad (2.5)$$

2.2.1.6 ไลเกส (Lygases) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์หรือการสร้างพันธะชนิดต่างๆ

$$\text{ATP} + \text{L-Aspartate} + NH_3 \longrightarrow \text{AMP} + \text{Pyrophosphate} + \text{L-Asparagine} \qquad (2.6)$$

เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยานี้ชื่อ แอล-แอสพาร์เตต : แอมโมเนีย ไลเกส (AMP-forming) หรือ แอสพาร์-เตตแอมโมเนียไลเกส

การเรียกชื่อเอนไซม์มีการเรียกหลายแบบ และเนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะ ต่อปฏิกิริยาและสับสเตรท ดังนั้นจึงอาจเรียกชื่อเอนไซม์ตามชนิดของปฏิกิริยาที่เอนไซม์เร่ง เช่น เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยา Dacarboxylation ก็เรียก Decarboxylase หรืออาจเรียกชื่อเอนไซม์ตามสับสเตรทก็ได้เช่น เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการแตกโมเลกุลของมอลโตสก็เรียก Maltase

2.2.2 คุณสมบัติของเอนไซม์

2.2.2.1 เนื่องจากเอนไซม์เป็นสารพวกโปรตีน จึงแสดงคุณสมบัติบางอย่างคล้ายกับโปรตีนทั่วไป เช่น ละลายได้ในน้ำ กลีเซอรอล แอลกอฮอล์ที่เจือจาง และสามารถตกตะกอนได้เช่นเดียวกับการทำให้โปรตีนตกตะกอน

2.2.2.2 เอนไซม์จะถูกทำลายสภาพธรรมชาติได้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง pH หรือการเพิ่มอุณหภูมิสูงๆ ซึ่งผลการทำลายสภาพธรรมชาติของเอนไซม์นี้จะทำให้เอนไซม์หมดประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยา แต่ถ้าการทำลายสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ไม่รุนแรงนัก เอนไซม์ก็อาจกลับสู่สภาพเดิมและทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้อีก

2.2.2.3 เอนไซม์หลายชนิดมีโครงสร้างประกอบด้วยสารที่เป็นโปรตีนกับส่วนที่ไม่ใช่โปรตีนจึงจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้ เรียกส่วนที่ไม่ใช่โปรตีนนี้ว่า โคแฟคเตอร์ (Co-factor) ซึ่งอาจจะเป็นไอออนของโลหะหรือสารอินทรีย์ก็ได้ ถ้าขาดส่วนนี้แล้วเอนไซม์จะไม่สามารถทำงานได้

2.2.2.4 เอนไซม์แต่ละชนิดจะทำงานได้ดีที่สุดที่ pH และที่อุณหภูมิช่วงหนึ่งๆ เท่านั้น pH ที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดเรียก Optimum pH และช่วงอุณหภูมิที่เอนไซม์แต่ละชนิดทำงานได้ดีที่สุดเรียก Optimum temperature

2.2.2.5 เอนไซม์มีคุณสมบัติที่สำคัญที่แตกต่างจากตัวเร่งอื่นๆ คือเอนไซม์มีความจำเพาะต่อปฏิกิริยาที่จะเร่ง (Reaction specificity) และมีความจำเพาะต่อสับสเตรท (Substrate specificity)

2.2.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์

เนื่องจากเอนไซม์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาทางเคมี เพื่อเปลี่ยนสับสเตรทให้เป็นผลิตภัณฑ์ (product) โดยโมเลกุลของเอนไซม์จะรวมตัวกับสับสเตรทเป็นสารประกอบเชิงซ้อนก่อน แล้วจึงเปลี่ยนสับสเตรทให้เป็นผลิตภัณฑ์ (product) โดยที่โมเลกุลของเอนไซม์ไม่ได้เปลี่ยนแปลง หรือสลายตัวไปด้วยจึงทำให้สามารถกลับมาทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้อย่างต่อเนื่องอีก ดังสมการ

$$E + S \longrightarrow ES \longrightarrow P + E \qquad (2.7)$$

อัตราความเร็วของปฏิกิริยาที่ถูกเร่งโดยเอนไซม์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยดังนี้

2.2.3.1 ความเข้มข้นของสับสเตรท

ในปฏิกิริยาที่มีสับสเตรทเพียงชนิดเดียว เมื่อความเข้มข้นของสับสเตรทเพิ่มขึ้นจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นจนถึงจุดที่มีความเร็วสูงสุด หากเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทต่อไปอีก อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะคงที่ตาม Michaelis-Menten kinetics และถ้าความเข้มข้นของสับสเตรทสูงเกินไปก็อาจจะยับยั้งอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นให้ช้าลงได้

2.2.3.2 ความเข้มข้นของเอนไซม์

ในภาวะที่ความเข้มข้นของสับสเตรท พีเอช อุณหภูมิ และบัฟเฟอร์ที่ใช้คงที่ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ให้มากขึ้นจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นแต่ต้องไม่มีสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ปนอยู่ด้วย

2.2.3.3 ผลของพีเอช

เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน การเปลี่ยนแปลงพีเอชของสารละลายโปรตีนจะมีผลต่อประจุที่เกิดขึ้นบนโมเลกุลของโปรตีน จึงมีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ด้วย โดยเฉพาะที่ active site ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สับสเตรทจะต้องเข้ารวมตัวกับเอนไซม์ ดังนั้นเอนไซม์แต่ละชนิดจึงมีค่าพีเอชที่เหมาะสม (optimum pH) สำหรับเร่งปฏิกิริยาให้ได้ความเร็วสูงสุดเสมอ เช่น เอนไซม์เพปซิน เปอร์ออกซิเดส ทริพซิน และแอลคาไลน์ ฟอสฟาเตส จะมีค่าพีเอชที่เหมาะสม เป็น 2, 6, 8 และ 10 ตามลำดับ หากค่าพีเอชของสารละลายสูงหรือต่ำเกินไปกว่าค่าพีเอชที่เหมาะสม จะทำให้ความเร็วของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นช้าลง แต่มีเอนไซม์บางชนิดมีค่าพีเอชที่เหมาะสมในช่วงกว้าง เช่น เอนไซม์คะตะเลส ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ในช่วงพีเอช 3-10

2.2.3.4 ผลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิมีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์ เพราะอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์จะแปรผันตามอุณหภูมิ และอุณหภูมิยังมีอิทธิพลต่อความคงตัวของเอนไซม์ด้วย หากอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ และยังมีผลทำให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์สูญเสียไปด้วย เนื่องจากโครงสร้างที่ตำแหน่ง active site เปลี่ยนไป เอนไซม์ส่วนใหญ่จะมีความคงตัวอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 20-35 องศาเซลเซียส และเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) สำหรับเร่งปฏิกิริยาให้ได้ความเร็วสูงสุด เอนไซม์จะสูญเสีย active มากขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิมากกว่าค่าอุณหภูมิที่เหมาะสม (ฤชุตา มาตวงษ์ และสกุณา จันโท, 2547)

2.3 เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase enzyme)

เปอร์ออกซิเดส (EC 1.11.1.7) มีชื่อตามระบบคือ donor : hydrogen-peroxide oxidoreductase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron accepter) (ชื่นสุมณ ยิ้มถิน, 2548) และออกซิไดซ์สับสเตรทที่ให้อิเล็กตรอน เช่น ฟีนอล (phenol) อะโรมาติกเอมีน (aromatic amine) กรอแอสคอร์บิก (ascorbic acid) และสารประกอบอนินทรีย์ (Vernwal SK. et al., 2006)

กลไกการเกิดปฏิกิริยา คือ เปอร์ออกซิเดสที่อยู่ในระยะพัก (E, ferric state) ให้ 2 อิเล็กตรอนกับ H_2O_2 ปฏิกิริยาให้สารสีเขียว และเปอร์ออกซิเดสจะอยู่ในรูป compound I จากนั้นออกซิไดซ์

สับสเตรท (AH) และเปลี่ยนสภาพอยู่ในรูป compound II และได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำและสารประกอบควินีน (quinine) สีแดง (A) โดยที่เอนไซม์ในรูป compound II จะรับ 1 อิเล็กตรอนทำให้อยู่ในระยะ E และสามารถกลับมาทำปฏิกิริยาใหม่ได้ (Smith; & Veitch. 1998) ดังสมการต่อไปนี้

$$E(Fe^{3+}, R) + H_2O_2 \longrightarrow E(Fe^{4+}=O, R^{O+}) + H_2O \quad (2.8)$$

Native enzyme — compound I

$$\text{Compound I} \longrightarrow E(Fe^{4+}=O, R) + A \quad (2.9)$$

Compound II

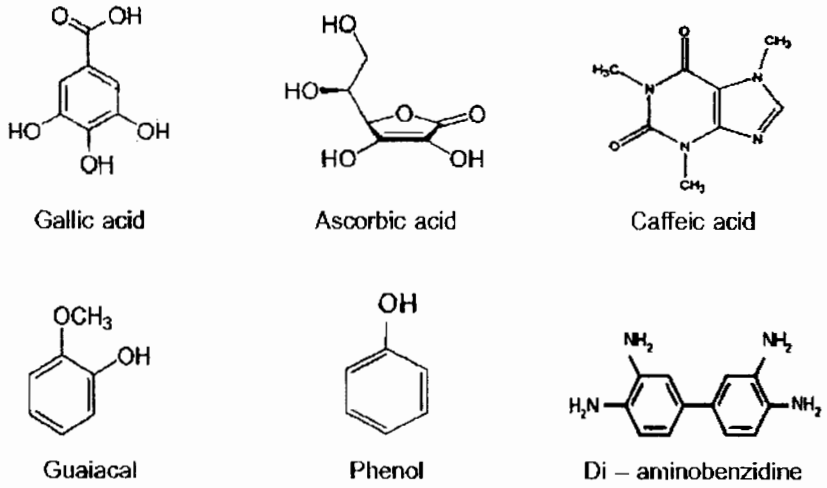
$$\text{Compound II} \longrightarrow E(Fe^{3+}, R) + A + H_2O \quad (2.10)$$

Native enzyme

สรุปได้ดังนี้

$$2\,AH + H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + 2A \ (\text{A ให้สี}) \quad (2.11)$$

เปอร์ออกซิเดสออกซิไดซ์สับสเตรท เช่น phenol , gallic acid, ascorbic acid, caffeic acid, guaiacal, และ diaminobenzidine (DAB) สับสเตรทของเปอร์ออกซิเดสแสดงดังภาพประกอบ 2.4 ในสภาวะที่มี H_2O_2 (Kongwithtaya S. et al., 2010; Quinn B. and Graybiel A., 1996)



ภาพที่ 2.3 สับสเตรทของเปอร์ออกซิเดส

ที่มา: ชัยศาสตร์ คเชนทร์สุวรรณ (2556)

2.3.1 ชนิดของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสแบ่งเป็นชนิดได้ดังนี้

2.3.1.1 Iron – containing peroxidase

1) Ferriprotoporphyrin peroxidases

เอนไซม์บริสุทธิ์จะมีสีน้ำตาล มี ferriprotoporphyrin III เป็น prosthetic group พบทั่วไปในพืชชั้นสูง เช่น horseradish, turnip, fig sap และพบในสัตว์ เช่น tryptophan pyrrolase รวมทั้งพบในจุลินทรีย์ เช่น cytochrome C peroxidase ซึ่ง prosthetic group ถูกแยกออกจากส่วนโปรตีนได้โดย acidic acetone

2) Veroperoxidases

มีลักษณะที่ต่างไปจากกลุ่มที่ 1 คือ Prosthetic group ถูกแยกออกจากส่วนของโปรตีนด้วย acidic acetone ไม่ได้ และเอนไซม์บริสุทธิ์จะมีสีเขียว มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 570 – 690 และ 403 nm เช่น peroxidases ที่พบใน myelocytes , นม

2.3.1.2 Flavoprotein peroxidases

ได้แก่ peroxidases ที่มี prosthetic group เป็น FAD เช่น peroxidases ที่สกัดจาก Streptococci sp. และเนื้อเยื่อสัตว์หลายชนิด

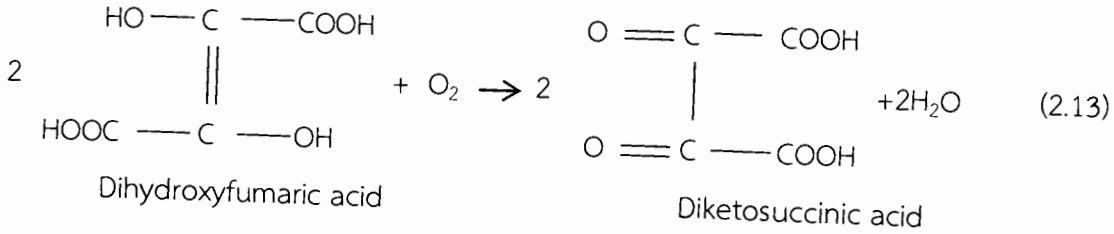
ลักษณะปฏิกิริยาของ Peroxidases สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 4 ลักษณะ ตามชนิดสับสเตรท ดังนี้

1) Peroxidatic

$$H_2O_2 + 2AH_2 \longrightarrow 2H_2O + \text{polymerized product} \qquad (2.12)$$

ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาหลักของ peroxidases ใน in vitro ที่มีสับสเตรทเป็นสารประกอบฟีนอล เช่น p-cresol, guaiacol, resorcinol, aniline

2) Oxidatic



Dihydroxyfumaric acid Diketosuccinic acid (2.13)

สำนักวิทยบริการ มหาวิทยาลัยราชธานี

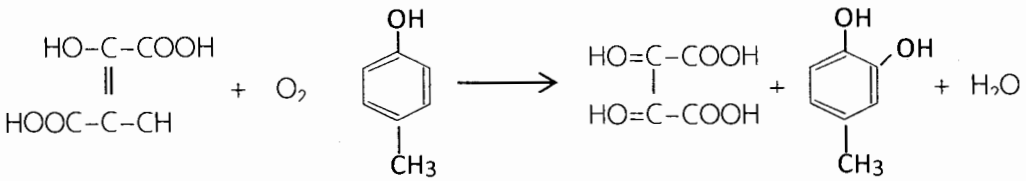
ปฏิกิริยา oxidatic จะเกิดขึ้นเมื่อมีโมเลกุลออกซิเจน (O_2) และสับสเตรท เป็นสารประกอบพวก dihydroxyfumaric acid, ascorbic acid, hydroquinone เป็นต้น

3) Catalatic

$$2H_2O \longrightarrow 2H_2O + O_2 \qquad (2.14)$$

ปฏิกิริยา catalatic เกิดขึ้นได้ในกรณีที่ขาด hydrogen donor (AH_2) และ peroxidases สามารถทำหน้าที่เหมือน catalase โดยเปลี่ยน H_2O_2 ไปเป็น H_2O และ O_2 ตาม ปฏิกิริยาได้บ้าง แต่ช้ากว่าแบบ peroxidatic, oxidatic อย่างน้อย 1,000 เท่า

4) Hydroxylation

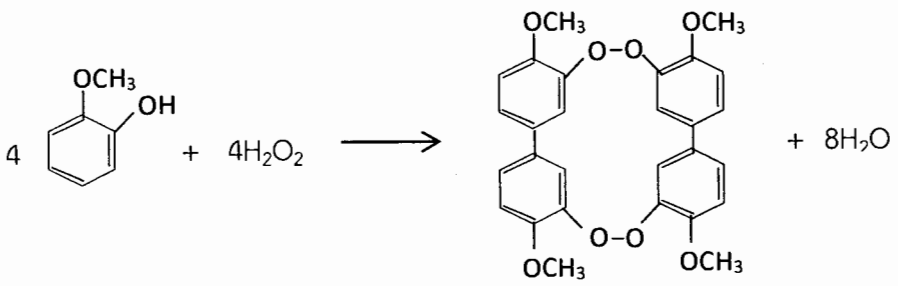


(2.15)

P-Cresol 4-Methylcatechol

ปฏิกิริยา Hydroxylation (ฤชุตา มาตวงษ์ และสกุณา จันโท, 2547) ในกรณี ปฏิกิริยามี hydrogen donor เป็น dihydroxyfumaric acid และ molecular oxygen (O_2) peroxidase จะสามารถเติมหมู่ OH ให้กับสาร aromatic หลายชนิด เช่น p-cresol, tyrosine, phenylalanine, benzoic acid และ salicylic acid

ปฏิกิริยาหลักของ peroxidase เป็นแบบ peroxidatic reaction ดังนั้นในการวัดแอคทิวิตี้ของ peroxidase จะยึดตามปฏิกิริยาหลัก โดยให้ hydrogen donors (AH_2) เป็น guaiacol, pyrogallol, mesidine, cytochrome C, uric acid ตัว hydrogen donor ที่ใช้กันมากที่สุดในการวิเคราะห์คือ guaiacol เนื่องจากไม่ซับซ้อนเตรียมได้ง่าย รวดเร็ว และวัดผลได้โดย spectrophotometer ได้โดยตรงและต่อเนื่อง โดยการเกิดปฏิกิริยาของ guaiacol ที่เร่งโดย peroxidase



(2.16)

Guaiacol Tetraguaiacol

2.3.2 ประเภทของเปอร์ออกซิเดส

เปอร์ออกซิเดสพบได้ทั้งในพืชและในสัตว์ จุลินทรีย์ โดยเปอร์ออกซิเดสจากพืชและจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 300 หน่วย ในขณะที่เปอร์ออกซิเดสที่ได้จากสัตว์ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 576 - 738 หน่วย และจับกับฮีมด้วยพันธะโคเวเลนต์ (covalent bond) เปอร์ออกซิเดสจำแนกตามการเรียงลำดับกรออะมิโนได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้ (O'Brien P., 2000)

2.3.2.1 เปอร์ออกซิเดสของโปรคาริโอต (prokaryotic peroxidase) เช่น แอสคอเบสเปอร์ออกซิเดส(ascorbate peroxidase) ไซโตโซมซีเปอร์ออกซิเดส (cytochrome C peroxidase, CCP) จากยีสต์ มีรายงานว่า แบคทีเรียสร้างเปอร์ออกซิเดสขึ้นมาเพื่อใช้ในการปกป้องเซลล์จากภาวะความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ไซยาโนแบคทีเรียผลิตไฮโดรเปอร์ออกซิเดส (hydroperoxidase) เพื่อกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ให้เป็นน้ำ (Regelsberger G. et al., 2002) เช่นเดียวกับพืชที่ผลิตเปอร์ออกซิเดสและแคทาเลส เพื่อใช้กำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกจากคลอโรพลาสต์และไซโทซอล (Shigeoka S. et al., 2002) สอดคล้องกับรายงานในพืชทนเค็มที่มีกลไกในการป้องกันภาวะความเครียดออกซิเดชั่นจากความเค็มโดยพืชจะสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidative enzymes) ขึ้นมาเพื่อช่วยกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เช่น แคทาเลสเปอร์ออกซิเดส จากการศึกษาแอคทิวิตี้ของเอนไซม์แคทาเลสและเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายหางกระรอก (*Hydrilla verticillata*) สาหร่ายหนาม (*Najas indica*) และสาหร่ายเส้นด้าย (*Najas gramenia*) พบว่า ในภาวะที่มีความเครียดจากเกลือสูงขึ้น โดยแอคทิวิตี้ของแอสคอเบสเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายหางกระรอกเพิ่มขึ้นในขณะที่แอคทิวิตี้ของแอสคอเบสเปอร์ออกซิเดสในสาหร่ายหนามและสาหร่ายเส้นด้ายลดลง (Rout N. and Shaw B., 2001)

2.3.2.2 เปอร์ออกซิเดสของสารที่หลั่งจากเชื้อรา (secretory fungal peroxidase) เช่น ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Lignin peroxidase) และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese

peroxidase) ซึ่งก่อให้เกิดโรครากขาวในพืช ซึ่งผลิตจากเชื้อรา เช่น *Phanerchaete chrysosporium* (Conesa A. et al., 2002) เปอร์ออกซิเดสในกลุ่ม secretory fungal peroxidase จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bridges) 4 ตำแหน่ง ที่เชื่อมด้วย Ca^{2+} 2 ตำแหน่ง (ชื่นสุมณ ยิ้มถิน, 2548)

2.3.2.3 เปอร์ออกซิเดสของสารที่หลั่งจากพืช (secretory plant peroxidase) เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อแต่ละชนิด เช่น การตอบสนองโรคจากบาดแผล สร้างและซ่อมแซมผนังเซลล์และอวัยวะต่างๆ และยังช่วยออกซิไดซ์สารที่เป็นพิษต่อเซลล์ ได้แก่ ฟีนอล อะโรมาติกเอมีน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Sisecioglu M. et al., 2010) กระบวนการสลาย indole-3-acetic acid การสร้างเอทธีลีน เปอร์ออกซิเดสในกลุ่มนี้โมโนเมอร์ไกลโคโปรตีน (monomeric glycoproteins) ประกอบด้วยพันธะไดซัลไฟด์และ Ca^{2+} เช่นเดียวกับประเภทเปอร์ออกซิเดสของสารที่หลั่งจากเชื้อรา แต่แตกต่างกันที่ตำแหน่งของพันธะไดซัลไฟด์ (ชื่นสุมณ ยิ้มถิน, 2548)

2.3.3 แหล่งผลิตเปอร์ออกซิเดส

เปอร์ออกซิเดสสามารถผลิตได้ทั้งในสัตว์ พืช และแบคทีเรีย มีรายงานว่า *Steptomyces viridosporus T7A* สามารถปล่อยลิกนินเปอร์ออกซิเดส (extracellular lignin peroxidase) เพื่อออกซิไดซ์สารประกอบฟีนอล , Vanillic acid (4-hydroxyl-3 methoxybenzoic acid) และ syringic acid (4-hydroxyl-3,5-dimethoxybenzoic acid) โดยใช้ 4-aminoantipyrine (4-AAP) ซึ่งถ้ามีแอคทิวิตี้ของเปอร์ออกซิเดสจะได้สารประกอบควินีนที่ให้สีแดง (Spiker J. et al., 1992) เช่นเดียวกับเปอร์ออกซิเดสของเชื้อราในอาหารวุ้นที่มีสารสกัดจากมอลต์ (malt extract agar) พบว่า *Trichoderma harzianum SIWT 25* สามารถผลิตเปอร์ออกซิเดสซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของ *Scytalidium lacrymans, Coniphora puteana* และตัวเอง โดยวัดแอคทิวิตี้จากพื้นที่ของโคโลนีของเชื้อรา และยังพบว่า *S. lacrymans* สามารถสร้างเส้นใย (mycelia fans) รอบโคโลนีของ *T. viride* อีกด้วย (Score A. et al., 1997)

เสาวณี สุริยาภณานนท์ และคณะ (2537) รายงานว่า เปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการจำแนกพันธุ์มะขาม (Tamarindus indica L., Leguminisae) จากการศึกษาพบว่ามีการสะสมเปอร์ออกซิเดสอยู่ในผนังเซลล์ผิว (epidermis) พบในไซโทซอลของเซลล์พาลิเซด (palisade) เซลล์ฟองน้ำ (spongy) และเซลล์ที่ทำหน้าที่ลำเลียงอาหารและน้ำของเซลล์เนื้อเยื่อลำเลียงอาหารและน้ำ เช่นเดียวกับเปอร์ออกซิเดสในกระหล่ำปลี (Brassica oleracea) (Yazdi et al., 2002)

วสันต์ ตั้งโภคานนท์ และคณะ (2548) รายงานพบ แอคทิวิตี้ของกลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) ในเม็ดเลือดของสุนัข ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลาย H_2O_2 ให้กลายเป็นโมเลกุลของน้ำ ในภาวะความเครียดออกซิเดชั่น เช่นเดียวกับสุวิตา เจริญศรี และวรางคณา จุ้งลก (2551) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของกลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดสในประชาชนที่ได้รับพิษจากสารหนู ซึ่งพบว่า ในกลุ่ม

ตัวอย่างที่ได้รับสารหนูจะมีแอคทิวิตี้ของกลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดสต่ำลง โครงสร้างของเปอร์ออกซิเดสจากยุง (*Aedes aegypti*) มีลักษณะเป็นฮีโมโปรตีนที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 5 ตำแหน่ง และมี Ca^{2+} เช่นเดียวกับโครงสร้างของเปอร์ออกซิเดสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและพบโปรตีนของ AePox ในยุงทุกวัย (Zhoa Z. et al., 2001)

2.3.4 การใช้ประโยชน์ของเปอร์ออกซิเดส

เปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับสับสเตรท เช่น ฟีนอล และสารประกอบอะโรมาติกเอมีน ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จึงมีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างมากมาย ดังนี้

2.3.4.1 การบำบัดน้ำเสีย

น้ำเสียจากอุตสาหกรรมพลาสติก กระดาษ ปิโตรเคมี และอุตสาหกรรมเคมี จะมีสารประกอบฟีนอลและสารประกอบอะโรมาติกเอมีน ซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม (Nicell et al., 1993) จึงต้องกำจัดสารเหล่านี้ก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ เปอร์ออกซิเดสจากรา *Coprinus cinereus* สามารถบำบัดน้ำเสียที่มีความเข้มข้นของฟีนอล 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ร้อยละ 65 pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาในกรณีที่มีเอนไซม์จำกัดเท่ากับ 9 และที่ pH ในช่วง 5-9 ในสภาวะที่มีเอนไซม์เพียงพอต่อการทำปฏิกิริยา (Massuda et al., 2001) เช่นเดียวกับเปอร์ออกซิเดสจากถั่วเหลือง สามารถกำจัด 2,4-dichlorophenol ได้ร้อยละ 90 และทำงานในสภาวะที่เป็นกรดได้ เช่นเดียวกับฮอร์ทเรดิชเปอร์ออกซิเดส (Kenned et al., 2002)

2.3.4.2 การกำจัดสีย้อมสังเคราะห์

เปอร์ออกซิเดสจาก *Pleurotus odtreatus* สามารถกำจัดสี Remazol brilliant blue ได้ และยังสามารถกำจัด bromophenol blue ได้ถึงร้อยละ 98 ในขณะที่ heterocyclic dyes, methylene blue และ toluidine blue O สามารถกำจัดได้เพียงร้อยละ 10 เท่านั้น เช่นเดียวกับฮอร์ทเรดิชเปอร์ออกซิเดส (HRP) ทำงานได้ดีในสภาวะที่ pH ต่ำว่า 6 สามารถกำจัดฟีนอลได้ดีที่สุดรองลงมาคือ ramazol blue และ Cibacron red ตามลำดับ ยังมีรายงานการกำจัดสีย้อมด้วยยีสต์ *Debaryomyces polymorphus* และ *Candida tropisalis* และในรา *Umbelopsis isabellina* และ *Penicillium geastrivorus* ที่สามารถกำจัดสีย้อม reactive black 5 ได้ (Yang et al., 2003)

2.3.4.3 การสังเคราะห์พอลิเมอร์

ฮอร์ทเรดิชเปอร์ออกซิเดสสังเคราะห์สายพอลิเมอร์อะโรมาติก โดยทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟีนอล และอะโรมาติกเอมีน ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เปอร์ออกซิเดสจากปาล์มน้ำมัน (African oil palm) สามารถสังเคราะห์ polyaniline และ sulfonated polystyrene โดยใช้ aniline เป็นต้นแบบในบัฟเฟอร์ที่ pH 3.5 สามารถตรวจสอบ polyaniline sulfonated polystyrene ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Sakharov et al., 2003)

2.3.4.4 การวิเคราะห์ enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA)

ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงในระดับจีนัสและมีความไวในการทดสอบร้อยละ 85-94 และความจำเพาะใช้ในการตรวจสอบเป้าหมายในตัวอย่างโดยใช้แอนติบอดี้ 2 ชนิด โดยชนิดแรกมีความจำเพาะกับสารเป้าหมายซึ่งทำหน้าที่เป็นแอนติเจน ชนิดที่ 2 จะจับเอนไซม์เพื่อบอกตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดี้และแอนติเจน นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งเหมาะสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างครั้งละมากๆ (ฐากรณ์ สอนวัฒนา, 2544) มีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการวินิจฉัยโรคและในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อเฮพาแรนซัลเฟตโปรติโอกลัยแคนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP โดยใช้ glutasaldehyde เพื่อสร้างหมู่ aldehyde และจับกับ primary amine ของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี้จากการตรวจสอบด้วย SDS-PAGE พบแถบขนาด 194 KDa จากการศึกษาพบว่าสามารถติดฉลากแอนติบอดี้โคลน 1EA-1C2 ด้วย HRP ได้ และยังสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนจำเพาะในการตรวจหาแอนติเจนด้วยเทคนิค direct และ sandwich ELISA ได้ (นิตยา จันชิว และคณะ, 2551)

2.3.4.5 การเกษตร

ความสัมพันธ์ของข้าวต่อโรคไหม้จากเชื้อรา *Pyricularia grisea* พบว่า ข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 1, ดอกพะยอม, หางยี 71 และสุพรรณบุรี 90 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสปอร์เชื้อรา *Pyricularia grisea* มีแอคทิวิตี้ของเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ซึ่งเกิดจากกลไกการป้องกันตนเองของพืช (ลือชัย อารยะรังสฤษฎ์ และสุภาพร จันทร์บัวทอง, 2553) และรายงานของธนวัชน์ ธนศรีสถิต (2546) พบว่าเกลือโซเดียมคลอไรด์มีผลต่อปริมาณแอสคอเบสเปอร์ออกซิเดส (APX) ในไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica* ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคอลไรด์ 0.5 M และ 2.0 M มีแอคทิวิตี้จำเพาะของ APX เท่ากับ 0.52 และ 0.48 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และที่ความเข้มข้นของเหลือโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 50-300 mM พบว่า APX ทำงานได้ดีซึ่งสามารถสรุปได้ว่า APX จาก *A. halophytica* สามารถทำงานได้ในสภาวะที่มีความเค็ม

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

3.1.1.1 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของบริษัท Inolab (lavel 1)

3.1.1.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centifuge) ของบริษัท Universal รุ่น 32R

3.1.1.3 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer)

3.1.1.4 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของบริษัท Rainbow

3.1.1.5 เครื่องแก้ว เช่น บีกเกอร์ หลอดทดลอง ปิเปต ขวดรูปชมพู่ ขวดปรับปริมาตร

3.1.1.6 เครื่องชั่ง 2, 4 ตำแหน่ง

3.1.1.7 เครื่องปั่นกวน (Stirrer)

3.1.1.8 เครื่องแยกกาก

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 พาราเซตามอล (paracetamol)

3.1.2.2 โซเดียมอะซิเตท ($CH_3COONa.3H_2O$)

3.1.2.3 ไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต (Na_2HPO_4)

3.1.2.4 โมโนเบสิกโซเดียมฟอสเฟต (NaH_2PO_4)

3.1.2.5 โปแตสเซียมเฟอริไซยาไนด์ (III), ($K_3Fe(CN)_6$)

3.1.2.6 เฟอร์ริคคลอไรด์ : Iron (III) chloride ($FeCl_3$)

3.1.2.7 ไฮโดรคลอริก (HCl)

3.1.2.8 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

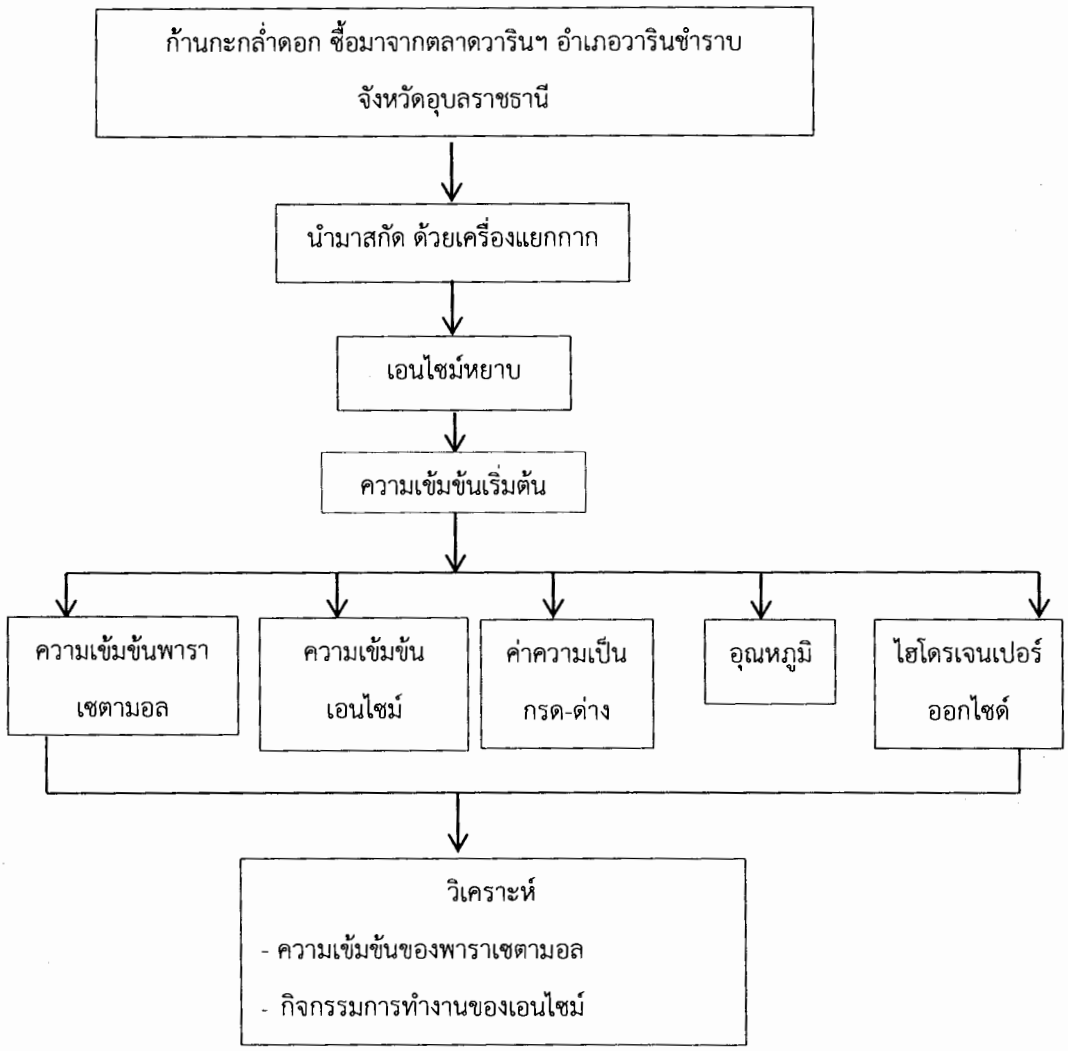
3.1.2.9 กัวไอเอคอล (Guaiacal)

3.2 เอนไซม์

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากก้านกะหล่ำดอก ซึ่งนำมาสกัดเป็นเอนไซม์หยาบ โดยการนำก้านกะหล่ำดอกไปผ่านเครื่องแยกกาก กรองด้วยผ้าขาวบาง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จะได้ส่วนใสที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยง คือ เอนไซม์หยาบ จะถูกนำไปเก็บที่ตู้แช่แข็งสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

3.3 กรอบแนวคิดการวิจัย

การดำเนินการวิจัยนี้เริ่มจากสกัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากก้านกะหล่ำดอก เอนไซม์ที่ได้อยู่ในรูปเอนไซม์หยาบ ถูกนำมาใช้ในการกำจัดพาราเซตามอล เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพาราเซตามอล ความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ โดยกรอบแนวคิดการวิจัยนี้แสดงดังภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 กรอบแนวคิดการวิจัย

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การกำจัดพาราเซตามอลเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์

ทำการเตรียมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ที่ได้จาก 3.2 โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 0.012, 0.025, 0.062 และ 0.124 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยเตรียมสารละลายพาราเซตามอลปนเปื้อนที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร และเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 ลงไป กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บน้ำตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุกๆ 30 นาที จนครบ 240 นาที ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของพาราเซตามอลและค่ากิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส บันทึกผลการทดลอง

3.4.2 การกำจัดพาราเซตามอลเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพาราเซตามอล

ทดสอบความสามารถในการกำจัดพาราเซตามอล ที่ความเป็นกรด – ด่าง 7 ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 0.124 ยูนิตต่อมิลลิตร โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นสารละลายพาราเซตามอลเป็น 1, 3, 5, 7 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสลงไป 0.124 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 ลงไป กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บน้ำตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุกๆ 30 นาที จนครบ 240 นาที ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของพาราเซตามอลและค่ากิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส บันทึกผลการทดลอง

3.4.3 การกำจัดพาราเซตามอลเมื่อเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง

ทดสอบความสามารถในการกำจัดพาราเซตามอล โดยทำการเปลี่ยนค่าความเป็นกรด – ด่าง ของสารละลายที่ปนเปื้อนพาราเซตามอล 4 – 8 (พีเอช 4 – 5 : อะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 6 – 7 : ฟอตเฟตบัฟเฟอร์ และพีเอช 8 : ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์) ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 0.124 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ใช้ความเข้มข้นสารละลายพาราเซตามอล 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสลงไป 0.124 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บน้ำตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุกๆ 30 นาที จนครบ 240 นาที ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของพาราเซตามอลและค่ากิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส บันทึกผลการทดลอง

3.4.4 การกำจัดพาราเซตามอลเมื่อเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

ทดสอบความสามารถในการกำจัดพาราเซตามอล ที่ความเป็นกรด – ด่าง 7 เตรียมความเข้มข้นสารละลายพาราเซตามอล 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยทำการเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษาเป็น 25, 35, 45, 55 และ 65 องศาเซลเซียส ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 0.124 ยูนิตต่อมิลลิตร และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บน้ำตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุกๆ 30 นาที จนครบ

240 นาที ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของพาราเซตามอลและค่ากิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส บันทึกผลการทดลอง

3.4.5 การกำจัดพาราเซตามอลเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นไฮโตรเจนเปอร์ออกไซด์

ทดสอบความสามารถในการกำจัดพาราเซตามอล ที่ความเป็นกรด – ด่าง 7 เตรียมความเข้มข้นสารละลายพาราเซตามอล 1 มิลลิกรัมต่อลิตรปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยทำการเปลี่ยนความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ใช้ในการศึกษาเป็น 0.25, 0.5, 1, 1.5 และ 2 มิลลิโมลาร์ ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 0.124 ยูนิตต่อมิลลิลิตร กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บน้ำตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุกๆ 30 นาที จนครบ 240 นาที ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของพาราเซตามอลและค่ากิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส บันทึกผลการทดลอง

3.5 การวิเคราะห์ผลและการคำนวณ

3.5.1 การวิเคราะห์การวัดปริมาณพาราเซตามอล

การวิเคราะห์ปริมาณพาราเซตามอลด้วยเทคนิคการเทียบสี (Colorimetric Method) ที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร (Nagendra et al., 2011) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ (รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก)

3.5.2 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

เตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ปริมาตร 2.3 มิลลิลิตร กัวไอเอคอล 18 มิลลิโมล และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารสกัดหยาบเอนไซม์ที่เจือจางลง 20 เท่า ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีสารวิเคราะห์ดังกล่าว ผสมให้เข้ากัน แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วนำสารละลายผสมที่ได้นี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร

3.5.3 การคำนวณร้อยละการกำจัดพาราเซตามอล

การกำจัดพาราเซตามอล สามารถคำนวณได้จากผลต่างของความเข้มข้นของพาราเซตามอลเริ่มต้นกับความเข้มข้นของพาราเซตามอล ณ เวลาใดๆ เทียบกับความเข้มข้นของฟีนอลเริ่มต้นและแสดงผลในรูปของร้อยละ ดังแสดงในสมการที่ (3.1)

$$\frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100 \qquad (3.1)$$

โดย C_0 = ความเข้มข้นพาราเซตามมอลเริ่มต้น (mg/l)

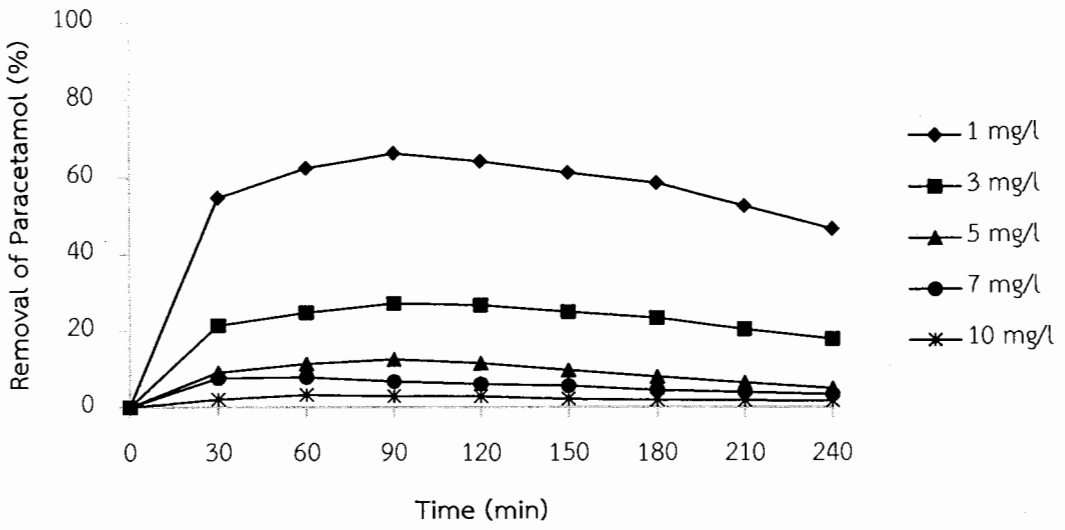
C_t = ความเข้มข้นพาราเซตามอล ณ เวลาใดๆ (mg/l)

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การศึกษาการกำจัดพาราเซตามอลด้วยเปอร์ออกซิเดสสกัดจากก้านกะหล่ำดอก (cauliflower stem) ในครั้งนี้ทำการทดลองในระบบถังปฏิกรณ์แบบกะ (batch reactor) กวนที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยทำการศึกษาเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพาราเซตามอล ความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และอุณหภูมิ ซึ่งเตรียมพาราเซตามอลจากผงพาราเซตามอลบริสุทธิ์นำมาละลายน้ำให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ เป็นการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ ผลการศึกษาเป็นดังนี้

4.1 ผลของความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่มีต่อการกำจัดพาราเซตามอล

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของความเข้มข้นของพาราเซตามอล ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่ใช้ในการศึกษา คือ 1, 3, 5, 7 และ 10 mg/l ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M พีเอชเท่ากับ 7 โดยสภาวะศึกษาควบคุมความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.124 U/ml ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1 mM ที่อุณหภูมิ 25°C ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 4.1



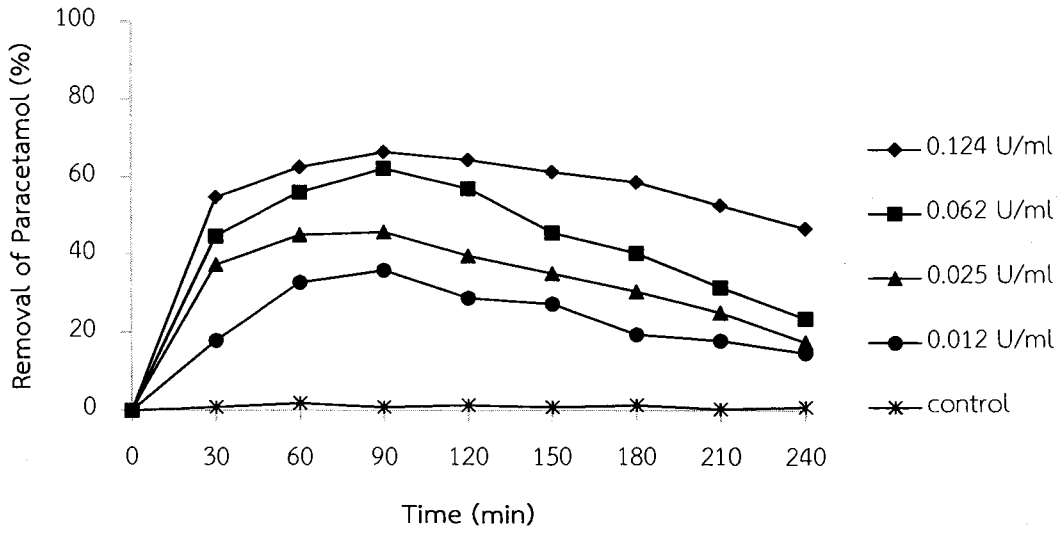
ภาพที่ 4.1 ร้อยละการกำจัดพาราเซตามอลเทียบกับเวลา เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพาราเซตามอล

จากผลการศึกษาพบว่าการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพาราเซตามอลส่งผลต่อร้อยละการกำจัดพาราเซตามอลในระบบถังปฏิกรณ์แบบกะ โดยการเพิ่มความเข้มข้นของพาราเซตามอลในระบบทำให้ค่าการกำจัดมีแนวโน้มลดลง ดังแสดงในภาพที่ 4.1 ซึ่งจะเห็นว่าการใช้พาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าการกำจัดที่ดีที่สุด โดยในช่วง 90 นาทีแรก ค่าการกำจัดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องให้ค่าร้อยละการกำจัดสูงสุดที่ 66.47 สำหรับความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่ 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีทิศทางการเปลี่ยนแปลงค่าการกำจัดที่คล้ายกับการใช้พาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร คือค่าการกำจัดจะเพิ่มขึ้นสูงสุดที่นาทีที่ 90 ให้ร้อยละการกำจัดเท่ากับ 27.26 และ 12.59 ตามลำดับ หลังจากนั้นค่าการกำจัดจะมีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น อาจเกิดจากการที่พาราเซตามอลทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ทำให้เกิดเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และสารผลิตภัณฑ์อื่นเกิดขึ้น ซึ่งสารผลิตภัณฑ์อื่นที่เกิดขึ้นนั้นไปส่งผลต่อวิธีการวิเคราะห์พาราเซตามอล ทำให้ความเข้มข้นของพาราเซตามอล ณ เวลานั้นเกิดความคลาดเคลื่อน จึงทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดลดลง แต่ถ้าไม่มีผลกระทบของสารผลิตภัณฑ์อื่นนั้น ผู้วิจัยคาดว่า ประสิทธิภาพการกำจัดจะเพิ่มขึ้นแล้วมีค่าคงที่ และเมื่อใช้พาราเซตามอลความเข้มข้นที่ 7 และ 10 พบว่า ร้อยละการกำจัดสูงสุดเกิดขึ้นที่นาทีที่ 60 โดยให้ร้อยละการกำจัดที่ 7.91 และ 3.21 ตามลำดับ หลังจากที่เวลาดังกล่าวค่าการกำจัดมีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น เนื่องจากความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่สูงขึ้น ส่งผลต่อการกำจัดพาราเซตามอลโดยตรง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพาราเซตามอล ส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดลดลง ผลดังกล่าวอาจเกิดจากการที่เอนไซม์เข้าเร่งปฏิกิริยาไม่เพียงพอต่อความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่สูงขึ้นหรืออาจเกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น ขัดขวาง กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จึงทำให้ไม่สามารถจับกับสารตั้งต้น(พาราเซตามอล)ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ S. Singh et al. (2005) ศึกษาเกี่ยวกับการกำจัดฟีนอด้วยการใช้รากขนของผักกาดปลี *(Brassica juncea)* โดยศึกษาความเข้มข้นของฟีนอลที่ 50, 100, 200, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าใบรากขนผักกาดปลี สามารถกำจัดฟีนอลที่ 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตรได้หมดที่ร้อยละ 100 ในระยะเวลา 3 วัน แต่เมื่อความเข้มข้นของฟีนอลเพิ่มขึ้นที่ 200 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตรทำให้การกำจัดมีประสิทธิภาพลดลง คือกำจัดได้ร้อยละ 97 และ 47 ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร กำจัดได้เพียงร้อยละ 27 ดังนั้นผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ารากขนของผักกาดปลีสามารถกำจัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังพบงานวิจัยของ A. Deva et al. (2014) ที่ศึกษาการใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากกะหล่ำดอก (*Brassica oleracea)* ในการบำบัดฟีนอลในน้ำเสีย พบว่า ความเข้มข้นของฟีนอลเริ่มต้นหรือความเข้มข้นต่ำ มีประสิทธิภาพการกำจัดได้ดี แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟีนอล ทำให้มีประสิทธิภาพการกำจัดลดลง และอีกหนึ่งงานวิจัยของ A. Bódalo et al. (2006) ศึกษาการกำจัด 4-คลอโรฟีนอลด้วยเปอร์ออกซิเดสจากถั่วเหลืองและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง พบว่า ความเข้มข้นของ 4-คลอโรฟีนอลที่แตกต่างกันโดย

ศึกษาความเข้มข้นที่ 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 มิลลิโมลาร์ ประสิทธิภาพการกำจัดลดลงเมื่อความเข้มข้น 4-คลอโรฟีนอลเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นที่ต่ำจะมีประสิทธิภาพการกำจัดได้ร้อยละ 90 ซึ่งสามารถกำจัดได้ดีกว่า

4.2 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มีต่อการกำจัดพาราเซตามอล

เป็นการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดพาราเซตามอล สำหรับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ คือ 0.012, 0.025, 0.062 และ 0.124 U/ml ในสภาวะศึกษาควบคุมใช้ความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่ 1 mg/l ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M พีเอช 7 ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 mM ที่อุณหภูมิ 25°C ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 4.2



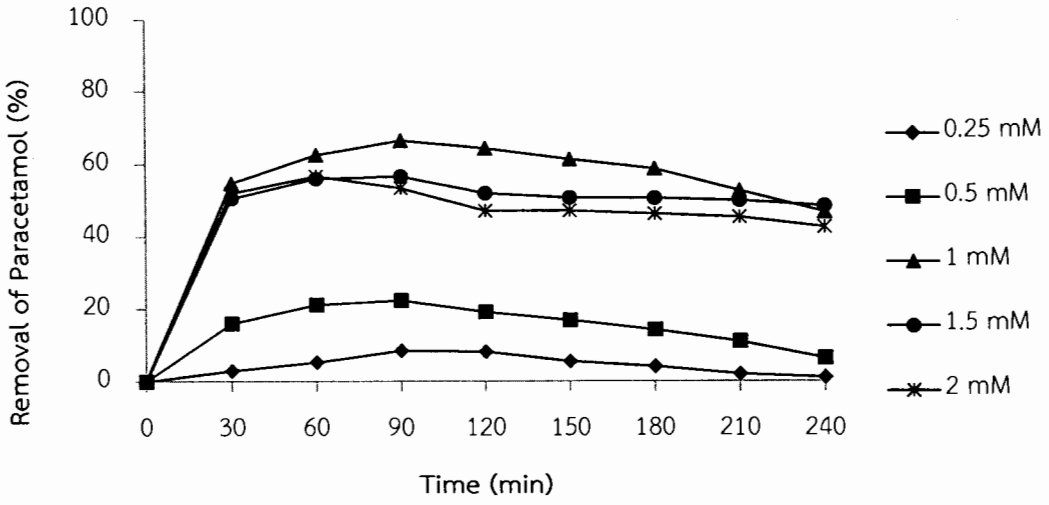
ภาพที่ 4.2 ร้อยละการกำจัดพาราเซตามอลเทียบกับเวลา เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์

จากผลการศึกษาอธิบายได้ว่าการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ส่งผลต่อร้อยละการกำจัดพาราเซตามอล โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ในระบบทำให้ค่าการกำจัดมีแนวโน้มที่ดีขึ้น ดังแสดงในภาพ 4.2 จะเห็นได้ว่าการใช้เอนไซม์ที่ความเข้มข้น 0.124 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สามารถกำจัดพาราเซตามอลได้ร้อยละ 66.47 ที่ช่วงเวลา 90 นาทีแรก จากนั้นประสิทธิภาพการกำจัดจะเริ่มลดลง และต่ำสุดที่ความเข้มข้น 0.012 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในช่วง 90 นาทีแรก ที่สามารถกำจัดได้ร้อยละ 35.94 ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ถึงปริมาณที่เหมาะสมต่อการกำจัดประสิทธิภาพของการกำจัดจะเริ่มคงที่หรืออาจลดลงเพียงเล็กน้อย เนื่องจากความเข้มข้นของเอนไซม์

มีมากเกินพอที่จะทำปฏิกิริยากับพาราเซตามอล และเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นประสิทธิภาพการกำจัดมีแนวโน้มลดลง เนื่องจากเอนไซม์เสื่อมสภาพ หรือสามารถอธิบายได้ในลักษณะเดียวกับการอธิบายผลการทดลองในหัวข้อ 4.1 ซึ่งศึกษาได้จากงานวิจัย Kalaiarasan and Palvannan (2015) ที่ศึกษาการกำจัดฟีนอลจากสภาพที่เป็นกรดโดยฮอทสราดิชเปอร์ออกซิเดส พบว่า ประสิทธิภาพในการกำจัดฟีนอลเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของฮอทสราดิชเปอร์ออกซิเดส และยังสามารถศึกษาผลงานวิจัยของ A. Deva et al. (2014) ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือ ศึกษาการใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากกะหล่ำดอก *(Brassica oleracea)* ในการบำบัดฟีนอลในน้ำเสีย พบว่า ความเข้มของของเอนไซม์ที่ใช้ในการทดสอบคือ 0.6 , 1.25 , 3.75 และ 5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของฟีนอลที่ 1 , 5 และ 10 มิลลิโมล ทราบว่าผลของความเข้มข้นเอนไซม์ที่ 5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการกำจัดฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้นคือ 1 มิลลิโมล ได้ร้อยละ 93 และเมื่อความเข้นข้นของฟีนอลเพิ่มขึ้นที่ 5 และ 10 มิลลิโมล ทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดลดลงสามารถกำจัดได้ร้อยละ 81.1 และ 73.6 ตามลำดับ อีกทั้งยังมีงานวิจัยของ J.L. Gomez.et.al. (2006) ศึกษาเกี่ยวกับการตรึงเปอร์ออกซิเดสบนแผ่นแก้ว ซึ่งความเข้มข้นของเอนไซม์ (0.014, 0.022, 0.029 และ 0.039 mg/ml) ถูกนำมาใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงของเปอร์ออกซิเดสจากถั่วเหลืองและฮอทสราดิชเปอร์ออกซิเดส (Soybean peroxidase; SBP and horseradish peroxidases; HRP) ในการกำจัดฟีนอล โดยใช้ความเข้มข้นของฟีนอลคงที่ ผลที่ได้พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 0.039 mg/ml ทั้ง SBP และ HRP สามารถกำจัดได้ดีที่สุดที่ 74% และ 78% ตามลำดับ และผลงานของ Z. Karim and Q. Husain (2010) ศึกษาการกำจัดแอนทราซีน จากน้ำเสียโดยเปอร์ออกซิเดสตรึงจากมะระ ในการประมวลผลพร้อมกับเครื่องปฏิกรณ์เกลียว-เบดแบบต่อเนื่อง พบว่า การกำจัดแอนทราซีนกำจัดได้ดีที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตรโดยมีการใช้ความเข้นข้นของแอนทราซีนที่แตกต่างกันทำให้มีการกำจัดได้ดีที่ร้อยละ 83 และศึกษาผลงานของ M. Gomez et al. (2009) มีศึกษาการเปรียบเทียบทางเลือกสำหรับบำบัด 4-คลอโรฟีนอลจากน้ำเสีย พบว่า การบำบัด 4-คลอโรฟีนอลที่ความเข้มข้นคงที่ แต่ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากถั่วเหลืองที่ 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ประสิทธิภาพการกำจัดสามารถกำจัดได้น้อย และที่ความเข้มข้นที่ 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ประสิทธิภาพการกำจัดสามารถกำจัดได้ดีกว่า

4.3 ผลของความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีต่อการกำจัดพาราเซตามอล

ศึกษาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ใช้ คือ 0.25, 0.5, 1, 1.5 และ 2 mM ในสภาวะศึกษาควบคุมความเข้มข้นของพาราเซตามอล 1 mg/l ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M พีเอช 7 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.124 U/ml ที่อุณหภูมิ 25°C ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 4.3



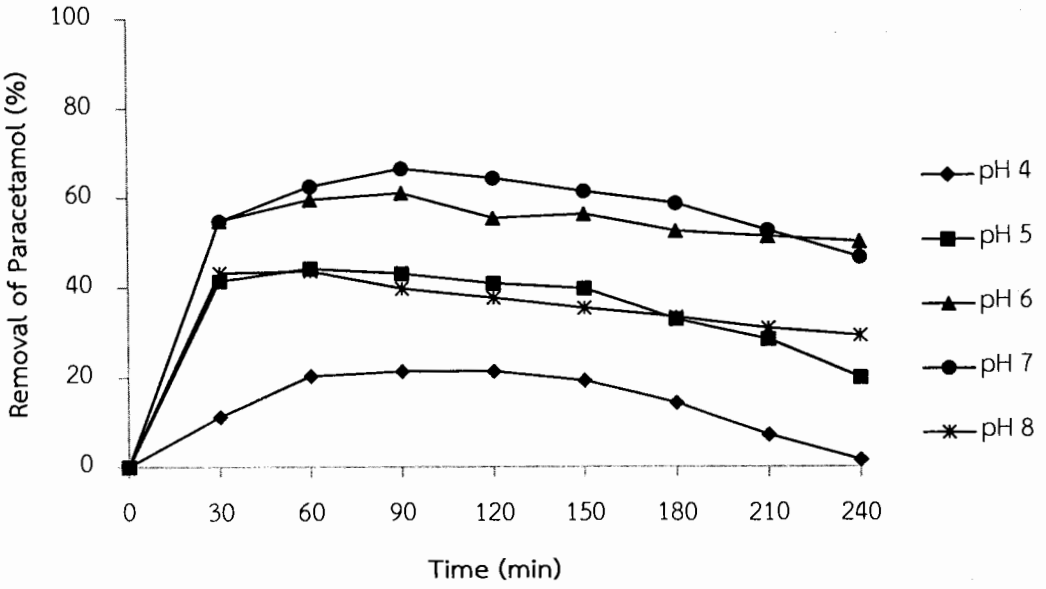
ภาพที่ 4.3 ร้อยละการกำจัดพาราเซตามอลเทียบกับเวลา เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

จากผลการศึกษาพบว่าการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีผลต่อการกำจัดพาราเซตามอลในระบบ โดยที่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้มีประสิทธิภาพการกำจัดพาราเซตามอลได้สูงสุดที่ร้อยละ 66.47 ที่ช่วงเวลา 90 นาทีแรก อาจกล่าวได้ว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำปฏิกิริยากันเองทำให้เกิด $OH^{\bullet}$ ขึ้น ซึ่ง $OH^{\bullet}$ ที่เกิดขึ้นจะไปทำปฏิกิริยากับพาราเซตามอลโดยมีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้ความเข้มข้นของพาราเซตามอลลดลง ซึ่งเอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวรับอิเล็คตรอนและออกซิไดส์ซับสเตรทที่ให้อิเล็คตรอน แต่ถ้าความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากเกินไปจะทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำปฏิกิริยากับ $OH^{\bullet}$ เกิดเป็นน้ำและสารผลิตภัณฑ์อื่น ($HO_2^{\bullet}$) ซึ่งทำให้ความเข้มข้นของ $OH^{\bullet}$ ลดลง แล้วไปทำปฏิกิริยากับพาราเซตามอลได้น้อยลง จึงทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดพาราเซตามอลลดลงด้วย เมื่อใช้ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่ำกว่า 1 มิลลิโมลาร์ คือ 0.25 และ 0.5 มิลลิโมลาร์ พบว่าแนวโน้มในการกำจัดพาราเซตามอลมีประสิทธิภาพน้อยกว่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งในช่วง 90 นาทีแรก สามารถกำจัดได้เพียงร้อยละ 8.41, 22.32

ตามลำดับ เนื่องจากความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีในระบบไม่เพียงพอต่อการทำปฏิกิริยากับพาราเซตามอล ทำให้ไม่สามารถแตกตัวได้เป็นอนุมูลอิสระได้มากพอที่จะจับกับพาราเซตามอล และเมื่อใช้ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สูงกว่า 1 มิลลิโมลาร์ คือ 1.5 และ 2 มิลลิโมลาร์ ก็พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดพาราเซตามอลน้อยกว่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 มิลลิโมลาร์เช่นเดียวกัน ซึ่งในช่วง 60 นาทีแรก สามารถกำจัดได้ร้อยละ 56.63 และ 56.73 ตามลำดับ เป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระได้มากจึงทำให้อนุมูลอิสระไปจับกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แทนที่จะจับกับสารพาราเซตามอล จึงทำให้การกำจัดที่เกิดขึ้นในระบบลดลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งตรงกับงานวิจัยของ A. Deva et al. (2014) ที่ศึกษาการใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากกะหล่ำดอก *(Brassica oleracea)* ในการบำบัดฟีนอลในน้ำเสีย พบว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 1 มิลลิโมลาร์ มีความเหมาะสม ที่ทำให้ร้อยละสูงสุดในการกำจัดฟีนอล เป็น 66.5 และการกำจัดฟีนอลลดลงเมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้น และคล้ายกับผลงานของ A. Bódalo et.al. (2006) ศึกษาการกำจัด 4-คลอโรฟีนอลด้วยเปอร์ออกซิเดสจากถั่วเหลืองและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง พบว่ามีการศึกษาการใช้ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ 6 ค่า คือ 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 มิลลิโมลาร์ ซึ่งความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดที่ดีกว่า กล่าวว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ต่ำกว่า 1 หรือสูงว่า 1 มิลลิโมลาร์ จะไปยับยั้งทำให้เอนไซม์เสื่อม และอีกงานวิจัยของ F. Jamal et al. (2012) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมและการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในเปอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จากบวบป้อม พบว่า ในการศึกษาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะศึกษาที่ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6 และ 1.8 มิลลิโมลาร์ พบเปอร์เซ็นต์การลดสีดีขึ้นเมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้น ซึ่งเปอร์เซ็นการลดสีที่ดีที่สุดที่ความเข้นข้น 0.8 และ 1 มิลลิโมลาร์ สำหรับการสลายและปฏิกิริยาของสีย้อมยังคงสามารถมีผลถึง 1.2 มิลลิโมลร์ ที่ยังสามารถลดสีย้อมได้ดี เมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มสูงขึ้นเปอร์เซ็นต์การลดสีก็ลดลง แต่ขัดแย้งกับผลงานของธรรมศักดิ์ ศรีสุกใส (2547) ศึกษาเกี่ยวกับการกำจัดสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มโดยการใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพารา พบว่า การเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสนั้น ไม่ได้ช่วยในการกำจัดสารประกอบฟีนอลมากนัก โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3% ให้ประสิทธิภาพการกำจัดสูงกว่าการไม่เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียง 5% แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กลับทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มากเกินไปทำให้ประสิทธิภาพการบำบัดลดลง

4.4 ผลของการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่มีต่อการกำจัดพาราเซตามอล

ศึกษาการกำจัดพาราเซตามอลที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4, 5, 6, 7 และ 8 ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ในสภาวะศึกษาควบคุม ความเข้มข้นของพาราเซตามอล 1 mg/l ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ , อะซิเตตบัฟเฟอร์ และ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.1 M ความเข้มข้นเอนไซม์ 0.124 U/ml ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 mM ที่อุณหภูมิ 25°C ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 4.4



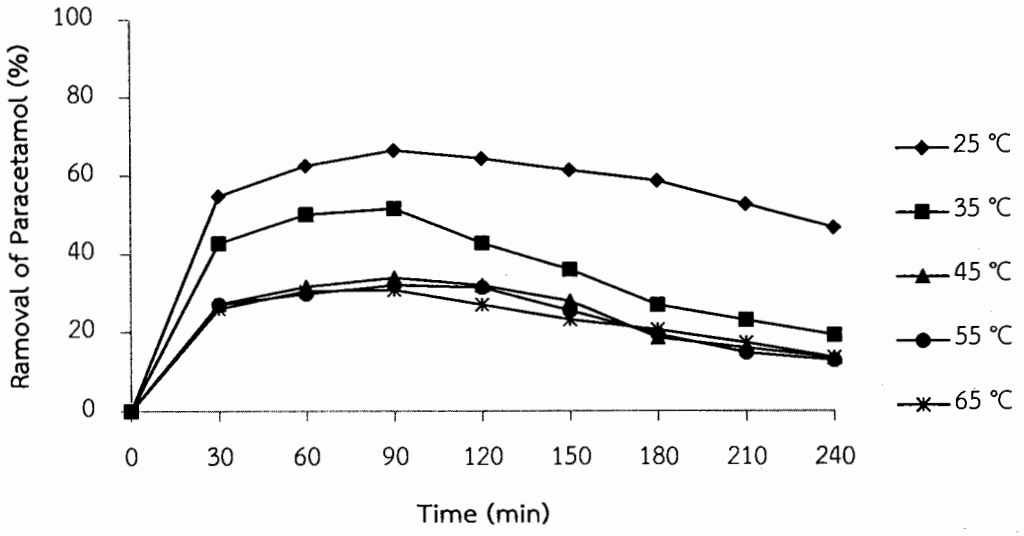
ภาพที่ 4.4 ร้อยละการกำจัดพาราเซตามอลเทียบกับเวลา เมื่อเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง

จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายพาราเซตามอล ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7 มีประสิทธิภาพการกำจัดที่ดีที่สุดร้อยละ 66.47 ซึ่งจะกำจัดได้ดีในช่วง 90 นาทีแรก หลังจากนั้นประสิทธิภาพการกำจัดมีการลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4 และ 5 มีแนวโน้มการกำจัดคล้ายกัน ซึ่งจะสามารถกำจัดได้ดีที่สุดร้อยละ 21.32 และ 43.19 ตามลำดับ ที่เวลา 90 นาทีแรก หลังจากนั้นมีแนวโน้มการกำจัดลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเช่นกัน และที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6 และ 8 มีทิศทางการกำจัดที่ดีที่สุดที่เวลา 90 นาทีแรก กำจัดได้ร้อยละ 61.06 และ 43.71 ตามลำดับ หลังจากนั้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นประสิทธิภาพการกำจัดจะลดลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง มีผลต่อพาราเซตามอลและประสิทธิภาพในการกำจัดพาราเซตามอล เมื่อใช้ค่าพีเอชที่มีความเป็นกรดคือ พีเอชที่ 4-5 ประสิทธิภาพการกำจัดจะต่ำ อาจเป็นเพราะค่าความเป็นกรดเข้าไปทำลายสภาพของเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน

เมื่อเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ส่งผลต่อประจุในโมเลกุลของโปรตีน หรือทำให้โครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนถูกทำลาย ส่งผลโดยตรงต่อบริเวณเร่ง (Active site) และอาจทำให้การจับกันระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้นที่บริเวณเร่ง ไม่สามารถจับกันได้หรือจับกันได้ยาก เนื่องจากรูปร่างของเอนไซม์เปลี่ยนรูปหรือเอนไซม์เกิดการเสียสภาพ นอกจากนี้ยังส่งผลต่อประจุของสารตั้งต้นที่เข้าทำปฏิกิริยาด้วย แต่เมื่อใช้ค่าพีเอชที่มีความเป็นกลางคือพีเอช 6-8 จะสามารถกำจัดได้ดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ A. Deva.et.al. (2014) ศึกษาการใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากกะหล่ำดอก *(Brassica oleracea)* ในการบำบัดฟีนอลในน้ำเสีย ได้ทำการทดลองโดยใช้ค่าพีเอชตั้งแต่ 3.6 - 7.0 และพบว่าในช่วงของค่าพีเอช 6.5 - 7.0 แสดงให้เห็นการทำงานของเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพที่ดี สำหรับเอนไซม์ที่มีค่าพีเอชต่ำหรืออยู่ในช่วงที่เป็นกรด ทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพ จึงกล่าวได้ว่าค่าพีเอชที่เป็นกลางเหมาะสมกับเปอร์ออกซิเดสจากกะหล่ำดอก คือ พีเอช 7.0 ซึ่งยังมีความคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Alemzadeh and Nejati (2009) ศึกษาการกำจัดฟีนอลด้วยฮอทสราดิชเปอร์ออกซิเดสตรึง พบว่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์คือพีเอช 7 แต่สำหรับเอนไซม์ตรึงคือค่าพีเอชประมาณ 8 ความแตกต่างของพีเอชนี้อาจเป็นผลมาจากภายในของเอนไซม์ อีกหนึ่งงานวิจัยของ Z. Gong et al. (2015) ศึกษาเกี่ยวกับการทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดสจากเมล็ดเกาลัด พบว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับโพลีฟีนอลออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จากเมล็ดเกาลัดมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 และค่าความเป็นกรดสูงหรือต่ำจะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งอีกทั้งยังพบงานวิจัยที่ศึกษาของ Bayramoglu and Arıca (2008) ศึกษาเอนไซม์สำหรับกำจัดฟีนอลและพี-คลอโรฟีนอลในเครื่องปฏิกรณ์ พบว่า ค่า พีเอชอยู่ที่ประมาณ 7.0 มีประสิทธิภาพการกำจัดสูงสุดประมาณ 86 เปอร์เซ็นต์ และ 59 เปอร์เซ็นต์ สำหรับฟีนอล และพี-คลอโรฟีนอลตามลำดับ ทั้งนี้ผลงานของ Dahili et al. (2015) ที่ศึกษาการกำจัด 2,4 –ไดคลอโรฟีนอลด้วยเอนไซม์ฮอทสราดิชเปอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์และฮอทสราดิชเปอร์ออกซิเดสที่ตรึงโดยอนุภาคเอทิลเซลลูโลสแห้ง พบว่า ผลของพีเอชมีความเสถียรภาพต่อการทำงานในช่วงพีเอช 4.0 -10.0 พีเอชที่เหมาะสมพบที่พีเอช 6 เมื่อเปรียบเทียบเอนไซม์บริสุทธิ์กับเอนไซม์ตรึงบนเอทิลเซลลูโลสกับปราศจากเอนไซม์

4.5 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการกำจัดพาราเซตามอล

ศึกษาการกำจัดพาราเซตามอลที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 25, 35, 45, 55 และ 65 °C ในสภาวะศึกษาควบคุม โดยใช้พาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 1 mg/l ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M พีเอช 7 เอนไซม์ที่ความเข้มข้น 0.124 U/ml ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 mM ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 ร้อยละการกำจัดพาราเซตามอลเทียบกับเวลา เมื่อเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

จากผลการศึกษาอธิบายได้ว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่สูงขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดลดลง ซึ่งจะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพการกำจัดที่ดีที่สุดที่ร้อยละ 66.47 ในช่วง 90 นาทีแรก หลังจากนั้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นที่ 35, 45, 55 และ 65 องศาเซลเซียส ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดลดลงและมีลักษณะการกำจัดคล้ายกับที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เนื่องจากเอนไซม์ได้ถูกทำลายสภาพจากการถูกความร้อนทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไปจนสารเริ่มต้นเข้าไปรวมกับบริเวณเร่ง (Active site) ไม่ได้ ทำให้การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์หมดไป ซึ่งพบกับงานวิจัยของ A. Deva.et.al. (2014) ศึกษาการใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากกะหล่ำดอก *(Brassica oleracea)* ในการบำบัดฟีนอลในน้ำเสีย ที่กล่าวว่าเปอร์ออกซิเดสกำหนดที่อุณหภูมิต่างๆ เมื่อเอนไซม์ถูกเพิ่มเข้ามาในระบบที่สมดุลอุณหภูมิได้ โดยกำหนดอุณหภูมิในช่วง 20-60 องศาเซลเซียส พบว่า กิจกรรมเปอร์ออกซิเดสที่รับได้สูงสุดในช่วงอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส และการทำงานของเอนไซม์ลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้น ตรงกับงานวิจัยของ Vetal and Rathod (2015) ศึกษาเทคนิคการทำเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกส้มให้บริสุทธิ์ พบว่า ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อเปอร์ออกซิเดส คืออุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส สำหรับอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้ปัจจัยในการทำงานของเอนไซม์ลดลง อาจเกิดจากเอนไซม์เสื่อมเนื่องจากความร้อน แล้วยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bayramoglu and Arıca. (2008) ศึกษาเอนไซม์สำหรับกำจัดฟีนอลและพี-คลอโรฟีนอลในเครื่องปฏิกรณ์ สำหรับอุณหภูมิระหว่าง 25-35 องศาเซลเซียส พบว่า มีการเกิดปฏิกิริยาได้ดีหรือมีประสิทธิภาพการกำจัดที่ดี แต่สำหรับอุณหภูมิที่ 45-55 องศาเซลเซียส มีอัตราการย่อยสลายฟีนอลได้ช้าหรือกำจัดได้ไม่ดี เนื่องจากสูญเสียสภาพที่ความร้อนสูง และอีกงานวิจัยที่คล้ายกันของ F. Jamal et al.

ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมและการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในเปอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จากบวบป้อม โดยศึกษาอุณหภูมิที่ 10-90 องศาเซลเซียส พบว่า เปอร์เซ็นต์การลดสีได้ดีที่สุดที่ 50 องศาเซลเซียส แต่พบว่าในขณะที่อุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียสแสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงได้มากสุด

บทที่ 5
สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

การกำจัดพาราเซตามอลโดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากก้านกะหล่ำดอก โดยทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นพาราเซตามอล ความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ ซึ่งสามารถสรุปผลได้ดังนี้

5.1 สรุปผลการวิจัยกำจัดพาราเซตามอลด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยชุดการทดลองแบบกะ

5.1.1 สรุปผลการวิจัยความเข้มข้นของพาราเซตามอลในการกำจัดพาราเซตามอล

ผลการศึกษาความเข้มข้นของพาราเซตามอลเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพการกำจัดพาราเซตามอล โดยนำความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่ 1, 3, 5, 7 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ควบคุมความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 0.124 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพาราเซตามอล ส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดลดลง และที่ความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดพาราเซตามอลได้สูงสุดร้อยละ 66.47 ที่เวลา 90 นาทีและที่เวลา 240 นาที ประสิทธิภาพการกำจัดเหลือในระบบร้อยละ 46.71

5.1.2 สรุปผลการวิจัยความเข้มข้นของเอนไซม์ในการกำจัดพาราเซตามอล

ผลการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อประสิทธิภาพการกำจัดพาราเซตามอล โดยใช้เอนไซม์ที่ความเข้มข้น 0.012, 0.024, 0.062, 0.124 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดพาราเซตามอล โดยทำการควบคุมความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ส่งผลให้ร้อยละการกำจัดพาราเซตามอลสูงขึ้น โดยความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดพาราเซตามอลได้สูงสุดที่ 0.124 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีร้อยละการกำจัดเท่ากับ 66.47 ในช่วง 90 นาทีแรก และที่เวลา 240 นาที ประสิทธิภาพการกำจัดเหลือเท่ากับ 46.71

5.1.3 สรุปผลการวิจัยความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการกำจัดพาราเซตามอล

ผลการศึกษาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ส่งผลต่อการกำจัดพาราเซตามอล โดยใช้ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 0.25, 0.5, 1, 1.5 และ 2 มิลลิโมลาร์ ใช้ความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 0.124 ยูนิตต่อมิลลิลิตร พีเอช

7 และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าการเพิ่มไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากเกินไป ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะไปทำปฏิกิริยากับ $OH^{\cdot}$ ทำให้ $OH^{\cdot}$ ในระบบลดลง ส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดลดลง ซึ่งความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 1 มิลลิโมลาร์ มีผลการกำจัดที่ดีที่สุดสามารถกำจัดได้ร้อยละ 66.47 ที่ 90 นาทีแรกและที่เวลา 240 นาที ค่าการกำจัดเหลือเท่ากับ 46.71

5.1.4 สรุปผลการวิจัยการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในการกำจัดพาราเซตามอล

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ของสารละลายพาราเซตามอลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยทำการศึกษาที่ค่าพีเอช 4-8 ควบคุมความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.124 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 1 มิลลิโมลาร์และอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ส่งผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดพาราเซตามอล ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4 และ 5 ประสิทธิภาพการกำจัดน้อย กำจัดได้เพียงร้อยละ 21.32 และ 44.32 ตามลำดับ เมื่อใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6 และ 8 สามารถกำจัดได้ร้อยละ 61.06 และ 43.71 ตามลำดับ โดยค่าพีเอช 7 มีประสิทธิภาพการกำจัดสูงสุดร้อยละ 66.47 ในช่วง 90 นาที และที่เวลา 240 นาที ประสิทธิภาพการกำจัดเหลือเท่ากับ 46.71

5.1.5 สรุปผลการวิจัยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในการกำจัดพาราเซตามอล

ผลการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อการกำจัดพาราเซตามอล โดยมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ 25, 35, 45, 55 และ 65 องศาเซลเซียส ควบคุมความเข้นข้นของพาราเซตามอลที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.124 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 1 มิลลิโมลาร์ และพีเอช 7 พบว่า การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลต่อการกำจัดพาราเซตามอลทำให้การกำจัดมีค่าลดลง และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถกำจัดได้สูงสุดที่ร้อยละ 66.47 ในช่วง 90 นาที และที่เวลา 240 นาที เหลือการกำจัดไว้เท่ากับ 46.71

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 เนื่องจากการใช้เอนไซม์กำจัดพาราเซตามอล อาจมีสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นในระบบ จึงควรมีการศึกษาอัตราส่วนสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นกับสารพาราเซตามอลที่เหลืออยู่ในระบบ

5.2.2 อนไซม์ที่นำมาใช้ในครั้งนี้เป็นเอนไซม์หยาบ ซึ่งมีประสิทธิภาพการกำจัดได้ดี หาซื้อได้ง่าย แต่มีบางช่วงหรือบางฤดูจะไม่มีการปลูกกะหล่ำดอกขาย ทำให้ยากแก่การจัดหานำมาใช้ในการวิจัย จึงควรมีการใช้พืชชนิดอื่นแทน เช่น ถั่วเหลือง ผักกาดปลี บล็อกโคลี่ เป็นต้น

5.2.3 จากการศึกษาการกำจัดพาราเซตามอล ในการทดลองมีการละลายผงพาราเซตามอลให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ และนำมาศึกษาประสิทธิภาพการกำจัด ซึ่งควรมีการศึกษาและเปรียบเทียบการกำจัดพาราเซตามอลในการน้ำเสียสังเคราะห์ เพื่อดูประสิทธิภาพในการกำจัดพาราเซตามอล

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

ชัยศาสตร์ คเชนสุวรรณ. **การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย Oscillatoria sp.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, 2556.

ชื่นสุมณ ยิ้มถิน. **การกำจัดสารประกอบฟีนอลโดยเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2548.

ฐากรณ์ สอนวัฒนา. **ลักษณะสมบัติของเปอร์ออกซิเดสในหัวมันสำปะหลัง Manihot esculenta Crantz หลังการเก็บเกี่ยว.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2544.

ทรงพล ศรีนวล. "Paracetamal Toxicity", **วารสารนิติเวชศาสตร์.** 6(1): 82-86, 2557.

ธนวัช ธนศรีสถิต. **รายงานวิจัยบทบาทของเอนไซม์ catalase และ ascorbate peroxidase ต่อการทนเค็มของ Aphathece halophytica.** กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2546.

ธนวัน ญาโณทัย. **การตกตะกอนพาราเซตามอลโดยใช้ Supercritical Anti-Solvent (SAS).** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, 2551.

ธรรมศักดิ์ ศรีสุขใส. **การกำจัดสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงงานน้ำมันปาล์มโดยการใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพารา.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2547.

นิตยา จันชิว และคณะ. "การผลิตโมโลโคนอล แอนติบอดีจำเพาะต่อเฮพาแรนซัลเฟตโปรติโอกลัยแคนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ออร์สราดิช เปอร์ออกซิเดสสำหรับงานตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา", **วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่.** 41(3): 167-174, 2551.

พงศธร หอมวงษ์ และคณะ. **การกาจัดยาพาราเซตามอลและนอร์ฟลอกซาซินในน้าโดยกระบวนการแวคคูอัมอัลตราไวโอเลต.** ปริญญานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต: มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2555.

พุทธรักษา พุทธโค และรัญจวน ศรีสุบาล. **การศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนสด้วยสารสกัดหยาบจากรากย่านาง.** ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต: มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา, 2547.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

ฤชุตา มาตวงษ์ และสกุณา จันโท. **การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดฟีนอลโดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากมันสำปะหลังและมันเทศ**. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต: มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์, 2547.

ลือชัย อารายะรังสฤษฎ์ และสุภาพร จันทร์บัวทอง. **รายงานวิจัยเรื่องกิจกรรมของเอนไซม์ Peroxidase กับปฏิกิริยาต่อโรคไหม้ของข้าวบางพันธุ์**. ปทุมธานี: ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี, 2553.

วนิดา ชูอักษร. **เทคโนโลยีการกำจัดสีในน้ำเสียอุตสาหกรรม**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, 2012.

วสันต์ ตั้งโภคานนท์ และคณะ. "ความสัมพันธ์ของกลูตาไธโอน, กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสกับค่าทางโลหิตวิทยา และค่าเคมีคลินิกในสุนัขโตเต็มวัย และสุนัขสูงอายุ", **เชียงใหม่สัตวแพทยสาร**. 3(1):21-29, 2548.

ศิริพร จันทรคีรี. **การวิเคราะห์ปริมาณอะเซตามิโนเฟนในพลาสมาโดยเปรียบเทียบระหว่างเทคนิคไมเซลลาร์ ลิควิด โครมาโทรกราฟฟี และเทคนิครีเวอร์สเฟสลิควิด โครมาโทรกราฟฟี**. สงขลา: มหาวิทยาลัยทักษิณ, 2543.

สุวิตา เจริญศรี และวรางคณา จุ้งลก. "การลดลงของระดับ glutathione peroxidase activites ในประชากรอำเภอร่อนพิบูลย์", ใน **การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 33**. นครศรีธรรมราช: มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์, 2551.

เสาวณี สุริยาภณานนท์ และคณะ. "การศึกษากายวิภาควิทยาวิญชเคมีของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสเอสเทอเรส และเอซิดฟอสฟาเตสของใบมะขาม", ใน **รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 32 สาขาพืช**. น. 541-553. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2537.

A. Bódalo et al. "Removal of 4-chlorophenol by soybean peroxidase and hydrogen peroxide in a discontinuous tank reactor", **Desalination**. 195(1): 51–59, 2006.

A. Deva et al. "Extraction of peroxidase from waste Brassica oleracea used for the treatment of aqueous phenol in synthetic waste water", **Journal of Environmental Chemical Engineering**. 2(2): 1148–1154, 2014.

A. Vonaetal et al. "Comparison of different removal techniques for selected Pharmaceuticals", **JournalofWaterProcessEngineering**. 5(1): 48–57, 2015.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Alemzadeh and Nejati. "Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase", **Journal of Hazardous Materials**. 166(2) 1082–1086, 2009.

Bayramoglu and Arıca. "Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: Horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads", **Journal of Hazardous Materials**. 156(1): 148–155, 2008.

Conesa A. et al. "Fungel peroxidase: molecular aspects and applications", **Journal of Biotechnology**. 93(2): 143-158, 2002.

Dahili et al. "2,4-Dichlorophenol removal by purified horseradish peroxidaseenzyme and crude extract from horseradish immobilized to nanospray dried ethyl cellulose particles", **Process Biochemistry**. 50(11): 1835–1842, 2015.

F. Jamal et al. "Optimization of internal conditions for biocatalytic dye color removal and a comparision of redox mediator's efficiency on partially purified trichosanthes dioica peroxidase", **journal of Molecular Cataltsis B: Enzymatic**. 74(1): 116-124, 2012.

J.L. Gomez et al. "Immobilization of peroxidases on glass beads: An improved alternative for phenol removal", **Enzyme and Microbial Technology**. 39(5): 1016–1022, 2006.

Kalaiarasan and Palvannan. "Efficiency of Carbohydrate Additives on the Stability of Horseradish Peroxidase (HRP): HRP-Catalyzed Removal of Phenol and Malachite Green Decolorization from Wastewater", **CLEAN – Soil, Air, Water**. 43(6): 846–856, 2015.

Kenned et al. "Optimization of soybean peroxidase treatment of 2,4-dichlorephenol", **Water Research**. 28(1): 149-158, 2002.

Kongwithtaya S. et al. "Characterization of ammonium precipitatant peroxidase from lvy gourd", in **Proceedings of Pure and Applied Chemistry international Conference 2010**. Ubon Ratchathani: Ubon Ratchathani University, 2010.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Lakshmi and Sibanda. "Soret and Dufour effects on free convection along a vertical wavy surface in a fluid saturated Darcy porous medium", **International Journal of Heat and Mass Transfer**. 53(15): 3030–3034, 2010.

M. Gomez et al. "Comparison of alternative treatments for 4-chlorophenol removal from aqueous solutions: Use of free and immobilized soybean peroxidase and KrCl excilamp", **Journal of Hazardous Materials**. 169(3): 46–51, 2009.

Mark Daniel G. et al. "Acetaminophen degradation by electro-Fenton and photo electro-Fenton using a double cathode electrochemical cell", **Journal of Hazardous Materials**. 217(1): 200-207, 2012.

Massuda et al. "Effect of reaction conditions on phenol removal by polymerization and precipitation using Coprius cinereus peroxidase", **Enzyme and Mirobiol Technol**. 28(4): 295-300, 2001.

Nagendra et al. "Modeling of soot deposition in wavy-fin exhaust gas recirculator coolers", **International Journal of Heat and Mass Transfer**. 54(7): 1671–1681, 2011.

Nicell et al. "Reactor development for peroxidase catalyzed polymerization and precipitation of phenol from waste water", **Water Reseaech**. 27(1): 1629-1639, 1993.

O'Brien P. "Peroxidase", **Chemico – Biological interaction**. 129(1-2): 113-139, 2000.

Quinn B. and Graybiel A. "A differentiated silver intensification procedure of the peroxidase – diaminobenzidine reaction", **The journal of Histochemistry and Cytochemistry**. 44(1): 71-74, 1996.

Regelsberger G. et al. "Occurrence and biochemistry of hydroperoxidase in oxygenic phototropic prokaryote (Cyanobacteria)", **Plant physiol. Biochem**. 40(1): 479-490, 2002.

Rout N. and Shaw B. "Salt tolerance in aquatic macrophytes: possible involvement of the antioxidative enzyme", **Plant Science**. 160(3): 415-423, 2001.

S. Singh et al. "Phenol removal using Brassica juncea hairy roots: Role of inherent peroxidase and H_2O_2", **Journal of Biotechnology**. 123(1): 43–49, 2006.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Sakharov et al. "Synthesis of polylectrolyte complexes of polyaniline and sulfonated polystyrene by plam tree peroxidase", **Enzyme Microbiology and Technology**. 33(5): 661-667, 2003.

Score A. et al. "Extracellular phenoloxidase and peroxidase enzyme production during interspecific fungal interaction", **Internation Biodeterioration & Biodegradation**. 39(2-3): 225-233, 1997.

Shigeoka et al. "Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes", **Journal of Experimental Botany**. 53(372): 1305-1319, 2002.

Shijin Wu et al. "Paracetamol in the environment and its degradation by microorganisms", **Appl Microbiol Biotechnol**. 96(1):875–884, 2012.

Sisecioglu M. et al. "Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish", **Journal of Medicinal Plant Research**. 4(12): 1187-1196, 2010.

Smith, A.T. and Veitch, N.C. "Substrate binding and catalysis in heme peroxidases", **Curr. Opin. Chem. Biol**. 2(2): 269–278, 1998.

Spiker J. et al. "Oxidation of phenolic and non-phenolic substrates by the lignin peroxidase of Streptomyces viridosporus T7A", **Apply Microbiol Biotechnol**. 37(4): 518-523, 1992.

Vernwal SK. et al. "Purification of a peroxidase from Solanum melongena fruit juice", **Indian J. Biochem.Biol**. 43(1): 239-243, 2006.

Vetal and Rathod. "Purification and characterization of polyphenol oxidase from waste potato peel by aqueous two-phase extraction", **Prep Biochem Biotechnol**. 45(7): 632-49, 2015.

Yang et al. "Decolourization of synthetic dyes and production of manganese dependent peroxidase by new fungal isolates", **Biotechnology Lettere**. 25(9): 709-713, 2003.

Yazdi et al. "Purification and som partial characterization of peroxidase isoenzyme from Brassica oleracea capitate L", **Journal of science, Islamic Republic iran**. 13(2): 107-112, 2002.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Z. Gong et al. "Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from chestnut kernel", **LWT-Food Science and Technology**. 60(2): 1095-1099, 2015.

Z. Karim and Q. Husain. "Removal of anthracene from model wastewater by immobilized peroxidase from Momordica charantia in batch process as well as in a continuous spiral-bed reactor", **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 66(3): 302–310, 2010.

Zhao Z. et al. "Aedes aegypti peroxidase gene characterization and developmental expression", **Insert Biochemistry and Molacular Biology**. 31(4-5): 481-490, 2001.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การวิเคราะห์การวัดปริมาณพาราเซตามอล

การวิเคราะห์การวัดปริมาณพาราเซตามอล

1. การเตรียมสารสำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นพาราเซตามอล

1.1 เตรียมสารละลายไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 5 M

เตรียมสารละลายไฮโดรคลอริก 410.5 มิลลิลิตร (ไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 37%) และปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ในขวดปรับปริมาตร

1.2 เตรียมสารละลายโปแตสเซียมเฟอริกไซยาไนด์ (Potassium ferricyanide) 0.002 M

ชั่งโปแตสเซียมเฟอริกไซยาไนด์ 0.66 กรัม เจือจางด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ในขวดปรับปริมาตร

1.3 เตรียมสารละลายเฟอร์ริคคลอไรด์ (Ferric chloride : $FeCl_3$) ความเข้มข้น 0.1 M

ชั่งเฟอร์ริคคลอไรด์ มา 4.05 กรัม เจือจางด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร

2. การวิเคราะห์ความเข้มข้นพาราเซตามอล

2.1 เตรียมน้ำตัวอย่าง 10 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง

2.2 เติม 0.002 M สารละลายโปแตสเซียมเฟอริกไซยาไนด์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเติม 0.1 M สารละลายเฟอร์ริคคลอไรด์ ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

2.3 เติม 5 M สารละลายไฮโดรคลอริก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 20 นาทีแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร แล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นพาราเซตามอล

3. การเตรียมกราฟมาตรฐานพาราเซตามอล

3.1 เตรียมสารละลาย Stock solution พาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งผงพาราเซตามอลบริสุทธิ์ 1 กรัม เจือจางด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร

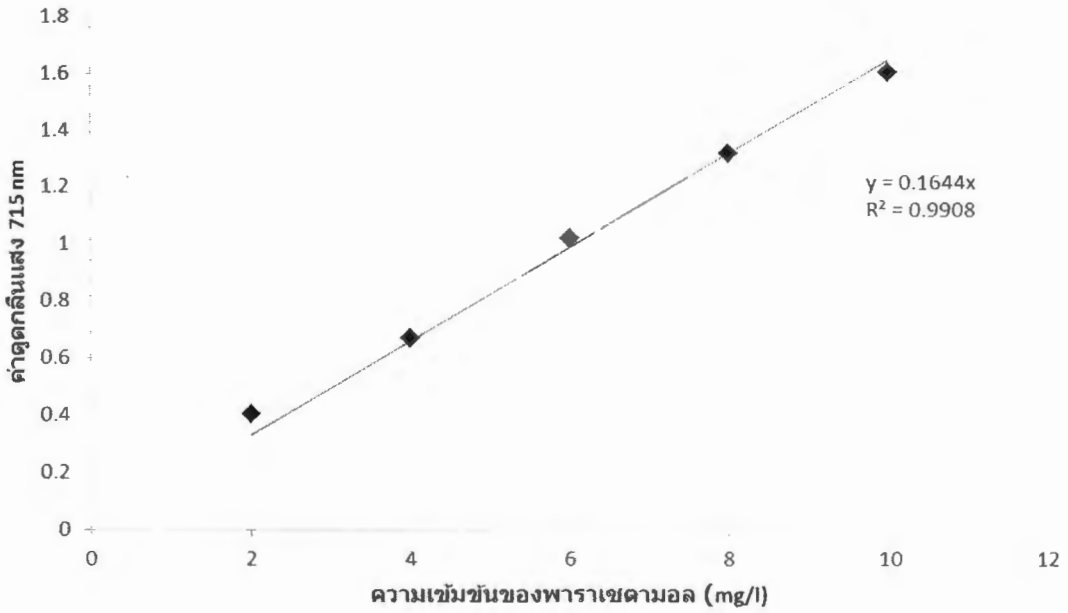
3.2 เตรียมสารละลายพาราเซตามอลความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปต Stock พาราเซตามอล มา 2.5 ml เจือจางด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร

3.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล

เตรียมสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลที่ความเข้มข้นพาราเซตามอล 1 – 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จากสารละลายพาราเซตามอลความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. กราฟมาตรฐานพาราเซตามอล



ภาพที่ ก.1 กราฟมาตรฐานพาราเซตามอล

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารละลายในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

การเตรียมสารละลายในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

1. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

1.1 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M พีเอช 7

สารละลาย ก : 0.2 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.2H_2O$) เจือจางด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

สารละลาย ข : 0.2 M monobasic sodium phosphate ($Na_2H_2PO_4.2H_2O$) เจือจางด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ผสมสารละลาย ก (30.50 มิลลิลิตร) และ ข (19.50 มิลลิลิตร) ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

1.2 การเตรียมสารละลายกัวไอเอคอล ความเข้มข้น 18 mM และสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7

เตรียมโดยปิเปตกัวไอเอคอล 18 มิลลิโมล และปิเปตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย 0.1 M ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในขวดปรับปริมาตร

2. วิเคราะห์ความเข้มข้นของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

เตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ปริมาตร 2.3 มิลลิลิตร กัวไอเอคอล 18 มิลลิโมล และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารสกัดหยาบเอนไซม์ที่เจือจางลง 20 เท่า ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีสารวิเคราะห์ดังกล่าว ผสมให้เข้ากัน แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วนำสารละลายผสมที่ได้นี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตรเมตร

3. การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์

$$\text{Enzyme activity (unit/ml)} = \frac{(A_{470})(0.001\times10^{6})(D)}{(\varepsilon)(V)(t)}$$

โดยที่

A_{470} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่คลื่นความยาว 470 นาโนเมตร

D คือ ค่าระดับความเจือจาง

ε คือ ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เท่ากับ 3.6×10^4

V คือ ค่าปริมาตรของเอนไซม์ที่ให้ทำปฏิกิริยา (มิลลิลิตร)

t คือ ค่าเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา (นาที)

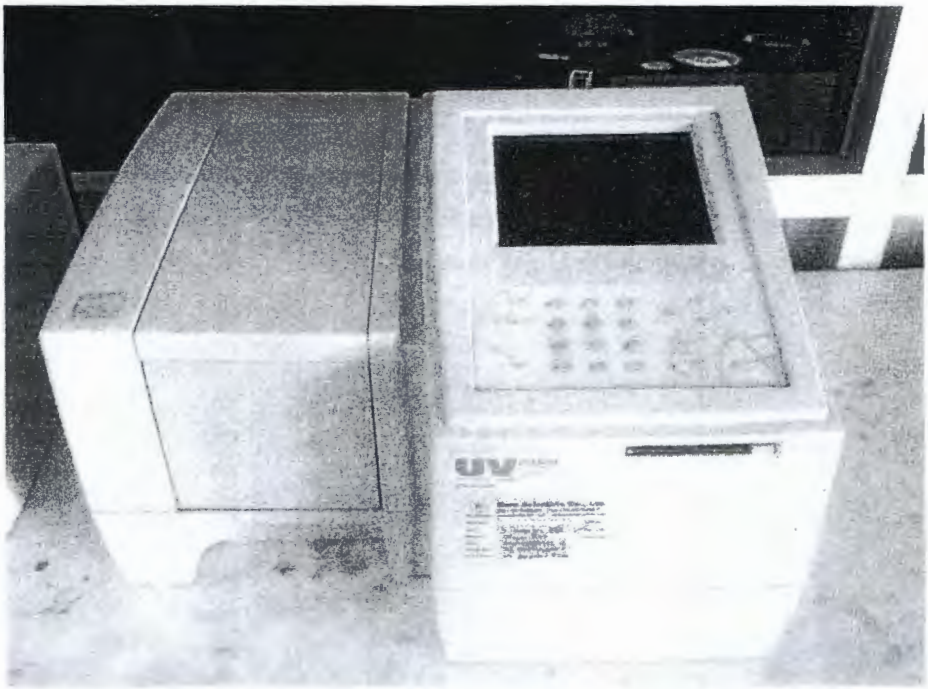
Enzyme activity หน่วยเป็น Unit/ml

ภาคผนวก ค
เครื่องมือในการวิจัย

ภาพที่ ค.1 เครื่องชั่งสารเคมี

ภาพที่ ค.2 เครื่องกรองแบบไมโครฟิลเตรชั่น

ภาพที่ ค.3 เครื่องกวนแบบแม่เหล็ก



ภาพที่ ค.4 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

ภาคผนวก ง

ตารางผลการทดลอง

ตารางที่ จ.1 การกำจัดพาราเซตามอลเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพาราเซตามอล

เวลา (นาที)	การกำจัด (%)														
	พาราเซตามอล 1 mg/l			พาราเซตามอล 3 mg/l			พาราเซตามอล 5 mg/l			พาราเซตามอล 7 mg/l			พาราเซตามอล 10 mg/l		
	test 1	test 2	average	test 1	test 2	average	test 1	test 2	average	test 1	test 2	average	test 1	test 2	average
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	58.05	51.25	54.79	18.94	23.96	21.47	9.67	8.51	9.1	7.44	7.86	7.65	0.97	3.17	2.09
60	63.79	61.25	62.57	23.83	25.83	24.84	11.78	10.96	11.38	6.52	9.27	7.91	1.94	4.44	3.21
90	68.39	64.37	66.47	26.38	28.13	27.26	13.46	11.68	12.59	6.42	7.15	6.79	1.94	3.81	2.89
120	65.52	63.13	64.37	26.17	27.29	26.74	13.04	10.1	11.59	5.6	6.55	6.08	1.54	4.05	2.81
150	63.22	59.38	61.38	24.04	25.83	24.95	11.5	7.93	9.74	5.19	5.94	5.58	0.97	3.25	2.13
180	59.77	57.5	58.68	23.4	23.33	23.37	9.25	6.63	7.97	4.28	4.53	4.41	0.89	2.77	1.85
210	55.17	50	52.69	20	20.83	20.42	8.27	4.61	6.47	3.66	4.13	3.9	0.81	2.62	1.73
240	49.43	43.75	46.71	17.45	18.33	17.89	5.89	3.89	4.91	2.85	3.83	3.35	0.56	2.46	1.53

ตารางที่ จ.2 การกำจัดพาราเซตามอลเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์

เวลา (นาที)	การกำจัด (%)														
	เอนไซม์ 0.124 U/ml			เอนไซม์ 0.062 U/ml			เอนไซม์ 0.025 U/ml			เอนไซม์ 0.012 U/ml			control		
	test 1	test 2	average	test 1	test 2	average	test 1	test 2	average	test 1	test 2	average	test 1	test 2	average
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	58.04	51.25	54.79	46.29	43.33	44.73	32.81	41.79	37.4	17.46	18.46	17.96	0.95	0.94	0.94
60	63.79	61.25	62.57	59.25	53.33	56.14	40.62	49.25	45.03	26.98	38.46	32.8	0.95	2.83	1.89
90	68.39	64.37	66.46	46.29	76.66	62.28	42.18	49.25	45.8	22.22	49.23	35.93	0.95	0.94	0.94
120	65.51	63.12	64.37	57.4	56.66	57.011	39.06	40.29	39.69	23.8	33.84	28.9	0.95	1.88	1.42
150	63.21	59.37	61.37	46.29	45	45.613	35.93	34.32	35.11	33.33	21.53	27.34	-0.95	2.83	0.94
180	59.77	57.5	58.68	40.74	40	40.35	32.81	28.35	30.53	20.63	18.46	19.53	2.85	0	1.42
210	55.17	50	52.691	29.62	33.33	31.57	25	25.37	25.19	19.04	16.92	17.96	1.9	-0.94	0.47
240	49.42	43.75	46.7	22.22	25	23.68	17.18	17.91	17.55	14.28	15.38	14.84	0.95	0.94	0.94

ตารางที่ จ.3 การกำจัดพาราเซตามอลเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เวลา (นาที)	การกำจัด (%)														
	H_2O_2 0.25 mM			H_2O_2 0.5 mM			H_2O_2 1 mM			H_2O_2 1.5 mM			H_2O_2 2 mM		
	test 1	test 2	average	test 1	test 2	average	test 1	test 2	average	test 1	test 2	average	test 1	test 2	average
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	7.01	0	2.89	20.78	10.77	15.94	58.04	51.25	54.79	49.77	51.18	50.52	53.33	50.67	52.01
60	2.92	7.47	5.21	24.15	17.96	21.15	63.79	61.25	62.57	53.39	58.26	56	60	53.39	56.72
90	8.18	8.62	8.4	26.96	17.36	22.31	68.39	64.37	66.46	52.48	60.23	56.63	52	54.75	53.366
120	9.35	6.89	8.11	21.34	16.76	19.13	65.51	63.12	64.37	50.22	53.54	52	47.55	46.6	47.08
150	4.67	6.32	5.5	20.22	13.17	16.815	63.21	59.37	61.37	48.41	52.75	50.73	48	46.15	47.08
180	3.5	4.59	4.05	17.41	10.77	14.2	59.77	57.5	58.68	47.51	53.14	50.527	46.66	45.7	46.18
210	0.58	3.44	2.02	12.35	9.58	11.01	55.17	50	52.69	46.6	52.75	49.89	45.33	45.24	45.29
240	0	2.29	1.15	10.67	1.79	6.37	49.42	43.75	46.7	43.89	52.36	48.42	43.55	41.62	42.6

ตารางที่ จ.4 การกำจัดพาราเซตามอลเมื่อเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง

เวลา (นาที)	การกำจัด (%)														
	pH 4			pH 5			pH 6			pH 7			pH 8		
	test 1	test 2	average	test 1	test 2	average	test 1	test 2	average	test 1	test 2	average	test 1	test 2	average
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	11.88	10.41	11.16	41.86	41.11	41.47	54.43	55.29	54.86	58.04	51.25	54.79	43.38	43.21	43.29
60	23.76	16.66	20.3	52.32	36.66	44.31	60.94	58.23	59.58	63.79	61.25	62.57	43.38	44.03	43.71
90	21.78	20.83	21.31	41.86	44.44	43.18	59.76	62.35	61.06	68.39	64.37	66.46	39.25	40.32	39.79
120	26.73	15.62	21.31	39.53	42.22	40.9	55.02	55.88	55.45	65.51	63.12	64.37	37.19	38.27	37.73
150	17.82	20.83	19.28	36.04	43.33	39.77	55.02	57.64	56.34	63.21	59.37	61.37	35.53	35.39	35.46
180	19.8	8.33	14.21	32.55	33.33	32.95	57.39	47.64	52.5	59.77	57.5	58.68	33.05	33.74	33.4
210	9.9	4.166	7.1	29.06	27.77	28.4	55.62	47.05	51.32	55.17	50	52.69	30.99	30.86	30.92
240	4.95	0	1.52	24.41	15.55	19.88	52.66	47.64	50.14	49.42	43.75	46.7	29.75	28.8	29.27

ตารางที่ จ.5 การกำจัดพาราเซตามอลเมื่อเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

เวลา (นาที)	การกำจัด (%)														
	Temp. 25 °C			Temp. 35 °C			Temp. 45 °C			Temp. 55 °C			Temp. 65 °C		
	test 1	test 2	average	test 1	test 2	average	test 1	test 2	average	test 1	test 2	average	test 1	test 2	average
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	58.04	51.25	54.79	42.11	43.52	42.81	24.61	29.7	27.2	27.04	27.27	27.15	29.26	22.51	26.01
60	63.79	61.25	62.57	50.87	49.41	50.14	31.79	31.68	31.73	33.33	25.87	29.8	32.68	28.27	30.55
90	68.39	64.37	66.46	52.04	51.17	51.61	30.25	37.62	34	39.62	23.77	32.11	36.09	25.13	30.8
120	65.51	63.12	64.37	46.19	39.41	42.81	19.48	44.05	31.98	35.84	26.57	31.45	38.04	15.18	27.02
150	63.21	59.37	61.37	34.5	37.64	36.07	26.66	29.2	27.95	29.55	20.97	25.49	23.9	22.51	23.23
180	59.77	57.5	58.68	28.07	25.88	26.97	11.28	25.74	18.63	24.52	13.98	19.53	24.39	16.75	20.7
210	55.17	50	52.69	22.22	24.11	23.16	13.84	18.31	16.12	19.49	9.79	14.9	18.53	16.23	17.42
240	49.42	43.75	46.71	19.29	19.41	19.35	12.82	14.35	13.6	17.61	7.69	12.91	15.6	11.51	13.63

ภาคผนวก จ
ผลงานการนำเสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติ

การกำจัดพาราเซตามอลด้วยเปอร์ออกซิเดสจากก้านกะหล่ำดอก

Removal of Paracetamol by Peroxidase from Cauliflower Stem

ชลิตตาพร สายโสม[1] กรรณิกา รัตนพงศ์เลขา[2*]

Chalittaporn Saisom[1] Karnika Ratanapongleka[2*]

[1]บัณฑิตศึกษา สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

[2*]ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี 34190

โทรศัพท์ : 087-5446101, โทรสาร: 045-353342, E-mail: poopreaw_1001@hotmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกำจัดพาราเซตามอลด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่สกัดจากก้านกะหล่ำดอก ในสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นของพาราเซตามอล ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ ทำการทดลองในชุดทดลองแบบกะ ความเร็วรอบในการกวนที่ 200 รอบต่อนาที พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดพาราเซตามอลสูงสุดเท่ากับ 66.47% ที่ความเข้มข้นของพาราเซตามอล 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณเอนไซม์ 0.124 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 1 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายเท่ากับ 7 แ ะอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพื่อกำจัดพาราเซตามอลปนเปื้อนในน้ำและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมและโรงพยาบาลต่อไป

คำสำคัญ : พาราเซตามอล; เปอร์ออกซิเดส; ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

Abstract

This research aims to study the degradation of paracetamol by peroxidase extracted from cauliflower stems. The concentration of enzyme, the concentration of paracetamol, the concentration of hydrogen peroxide, pH and temperature were tested. The experiments were carried out in batch system at stirrer speed 200 rpm. The results showed that the maximum removal efficiency of paracetamol was 66.47% at paracetamol concentration 1 mg/l, enzyme concentration 0.124 U/ml, hydrogen peroxide 1 mM, pH of the solution at 7 and 25 ^{0}C. The study indicated the feasibility of peroxidase for degradation of paracetamol contaminated in water and can be applied in the industries and hospitals.

Keywords: Paracetamol; Peroxidase; Hydrogen peroxide

บทนำ

พาราเซตามอล (paracetamol) มีชื่อสามัญคือ อะเซตามิโนเฟน (acetaminophen) เป็นสารประกอบฟีนอล จัดอยู่ในกลุ่มของยาบรรเทาอาการปวด (analgesics) และช่วยลดไข้ หาซื้อได้ง่าย จัดเป็นยาพื้นฐานที่มักใช้มากในโรงพยาบาลจึงเป็นเหตุให้ในน้ำทิ้งจากโรงพยาบาลมียาพาราเซตามอลเจือปนอยู่ และหากไม่มีการบำบัดก่อนทิ้งลงแม่น้ำก็จะเกิดการปนเปื้อนของยาพาราเซตามอลในแหล่งน้ำ และหากมีการปนเปื้อนในปริมาณมากอาจส่งผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ ยาพาราเซตามอลเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่สามารถสลายได้ด้วยจุลินทรีย์ การกำจัดต้องอาศัยแบคทีเรียในน้ำที่ใช้ออกซิเจนซึ่งละลายในน้ำ เมื่อออกซิเจนในแหล่งน้ำหมดไปจะทำให้แบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วจนทำให้เกิดน้ำเน่าและมีกลิ่นเหม็น จุลินทรีย์ที่กำจัดยาพาราเซตามอลก็จะเข้าห่วงโซ่อาหารต่อไปและไปสะสมในเนื้อปลาหรือสัตว์น้ำ เมื่อมนุษย์บริโภคปลาที่มียาพาราเซตามอลปนเปื้อน จะทำให้มีโอกาสเกิดโรคหรืออาจเกิดการปนเปื้อนได้ และเมื่อนำน้ำที่ปนเปื้อนไปใช้ในการเกษตรอาจทำให้ผลผลิตเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมแล้วนำมาซึ่งโอกาสที่จะเกิดโรคภัยต่างๆได้เช่นกัน กระบวนการทางชีวภาพโดยการใช้เอนไซม์ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีค่าใช้จ่ายไม่สูง ไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้าง เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน และออกซิไดซ์สับสเตรทที่ให้อิเล็กตรอน เช่น ฟีนอล (phenol) อะโรมาติกเอมีน (aromatic amine) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) และสารประกอบอนินทรีย์ [1] จึงมีการนำเปอร์ออกซิเดสไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย ทั้งในทางการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหาร เกษตรกรรม และการบำบัดน้ำเสียจากโรงงาน อุตสาหกรรมที่มีสารประกอบฟีนอลซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง

เปอร์ออกซิเดสถูกพบได้ทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ [2] ในปัจจุบันเปอร์ออกซิเดสที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ปฏิกิริยาเคมีได้จากรากของพืชในกลุ่มฮอร์ทเรดิช (horseradish root) ซึ่งต้องนำเข้าจากต่างประเทศทำให้เอนไซม์มีราคาสูง ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาหาแหล่งผลิตเปอร์ออกซิเดสจากแหล่งอื่นเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป โดยทั่วไปคุณสมบัติเปอร์ออกซิเดสจะแตกต่างกันจากแหล่งผลิต ซึ่งในงานวิจัยนี้เปอร์ออกซิเดสที่ได้สกัดจากก้านกะหล่ำดอกทำเป็นเอนไซม์ชนิดหยาบ เพื่อที่จะนำมากำจัดพาราเซตามอล ทั้งยังศึกษาความเข้มข้นของพาราเซตามอล ความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นของไฮโดรเจอเปอร์ออกไซด์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ ที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการกำจัดพาราเซตามอล ได้แก่ สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากบริษัท Honeywell ประเทศเยอรมันนี โพแทสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ เฟอริกคลอไรด์ จากบริษัท Ajax ประเทศออสเตรเลีย ไฮโดรคลอริก จากบริษัท Merck ประเทศเยอรมันนี Guaiacol จากบริษัท Sinoway ประเทศจีน

การเตรียมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

นำก้านกะหล่ำดอกมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด หลังจากนั้นจะตัดให้เป็นชิ้นเล็กเพื่อง่ายต่อการแยกกากด้วยเครื่องสกัดน้ำผลไม้แบบแยกกาก เมื่อทำการแยกกากเสร็จจึงนำส่วนที่เป็นของเหลวไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ต่อด้วยการนำไปผ่านเครื่องกรองด้วยเยื่อกรองระดับไมโครฟิลเตรชั่น จะได้เป็นเอนไซม์หยาบ สำหรับใช้ในงานวิจัยต่อไป

การกำจัดพาราเซตามอลในชุดทดลองแบบกะ

การศึกษาการกำจัดพาราเซตามอลด้วยเปอร์ออกซิเดสในชุดทดลองแบบกะ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ใช้สกัดจากก้านกะหล่ำดอก น้ำตัวอย่างที่ใช้เป็นน้ำเสียสังเคราะห์ซึ่งเตรียมจากพาราเซตามอลนำมาละลายในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 1-10 mg/l และทำการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ 0.012-0.124 U/ml การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.25- 2.0 mM ค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายที่ 4-8 และอุณหภูมิในช่วง 25-65 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างสารละลายมาวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์และความเข้มข้นของพาราเซตามอล โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 30 นาที เป็นเวลา 240 นาที

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณพาราเซตามอลและการทำงานของเอนไซม์

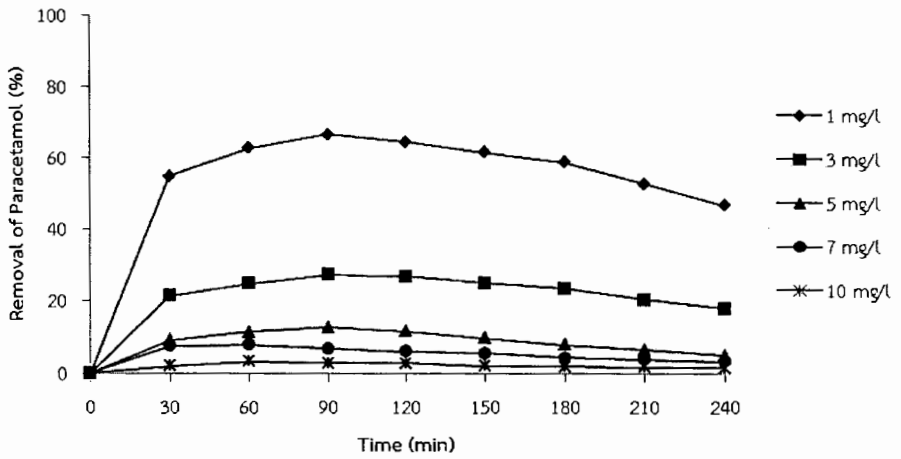
การวิเคราะห์ความเข้มข้นของพาราเซตามอล วิเคราะห์ด้วยวิธีการเทียบสี (colorimetric method) จากนั้นนำไปวัดที่ความยาวคลื่น 715 nm ตามวิธีของ Nagendra (2011) [3] ส่วนการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จะใช้กัวไอเอคอล (Guaiacol) เป็นสับสเตรท นำไปวัดความยาวคลื่นที่ 436 nm ตามวิธีของ Lakshmi (2010) [4]

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลของความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่มีต่อการกำจัดพาราเซตามอล

การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพาราเซตามอลส่งผลต่อร้อยละการกำจัดพาราเซตามอลในชุดทดลองแบบกะ โดยการเพิ่มความเข้มข้นของพาราเซตามอลในระบบทำให้ค่าการกำจัดมีแนวโน้มลดลง ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งจะเห็นว่าการใช้พาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 1 mg/l ให้ค่าการกำจัดที่ดีที่สุด โดยในช่วง 90 นาทีแรก ค่าการกำจัดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องให้ค่าร้อยละการกำจัดสูงสุดที่ 66.47

สำหรับความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่ 3 และ 5 mg/l มีทิศทางการเปลี่ยนแปลงค่าการกำจัดที่คล้ายกับการใช้พาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 1 mg/l คือค่าการกำจัดจะเพิ่มขึ้นสูงสุดที่นาทีที่ 90 ให้ร้อยละการกำจัดเท่ากับ 27.26 และ 12.59 ตามลำดับ หลังจากนั้นค่าการกำจัดจะมีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น และเมื่อใช้พาราเซตามอลความเข้มข้นที่ 7 และ 10 mg/l พบว่า ร้อยละการกำจัดสูงสุดเกิดขึ้นที่นาทีที่ 60 โดยให้ร้อยละการกำจัดที่ 7.91 และ 3.21 ตามลำดับ หลังจากที่เวลาดังกล่าวค่าการกำจัดที่มีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากการที่เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาไม่เพียงพอต่อความเข้มข้นของพาราเซตามอลหรืออาจเกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น ขัดขวาง กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จึงทำให้ไม่สามารถจับกับสารตั้งต้น(พาราเซตามอล)ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Singh (2005)[5] ศึกษาเกี่ยวกับการกำจัดฟีนอลด้วยการใช้รากขนของผักกาดปลี (*Brassica juncea*) โดยศึกษาความเข้มข้นของฟีนอลที่ 50, 100, 200, 500 และ 1,000 mg/l พบว่าใบรากขนผักกาดปลีสามารถกำจัดฟีนอลที่ 50 และ 100 mg/l ได้หมดที่ร้อยละ 100 ในระยะเวลา 3 วัน แต่เมื่อความเข้มข้นของฟีนอลเพิ่มขึ้นที่ 200 และ 500 mg/l ทำให้การกำจัดมีประสิทธิภาพลดลง คือกำจัดได้ร้อยละ 97 และ 47 ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 1000 mg/l กำจัดได้เพียงร้อยละ 27 ดังนั้นผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ารากขนของผักกาดปลีสามารถกำจัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

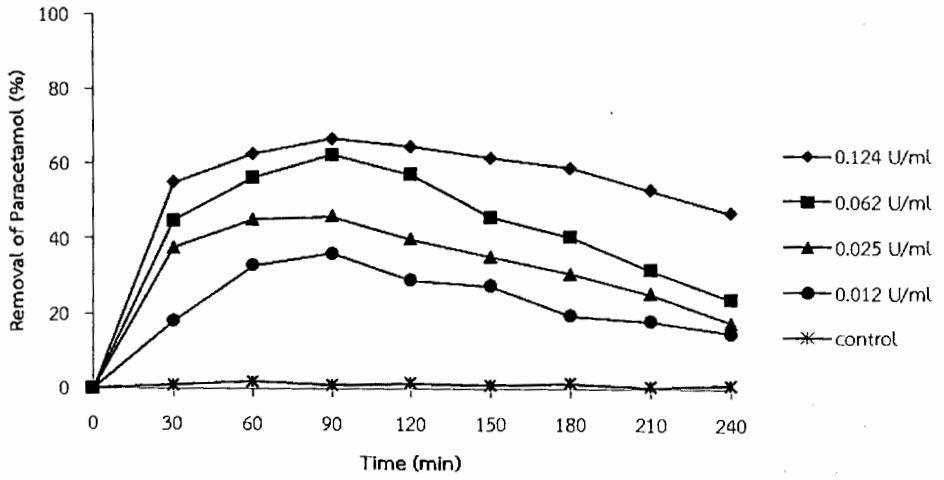


รูปที่ 1 ร้อยละการกำจัดพาราเซตามอลเทียบกับเวลา เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพาราเซตามอล

ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มีต่อการกำจัดพาราเซตามอล

อธิบายได้ว่าการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ส่งผลต่อร้อยละการกำจัดพาราเซตามอลโดยเจือจางความเข้มข้นของเอนไซม์ในระบบทำให้ค่าการกำจัดมีแนวโน้มลดลง ดังแสดงในรูปที่ 2 จะเห็นได้ว่าการใช้เอนไซม์ที่ความเข้มข้น 0.124 U/ml มีประสิทธิภาพการกำจัดที่ดีที่สุดร้อยละ 66.47

และที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 0.62, 0.25 และ 0.012 U/ml มีลักษณะการกำจัดที่คล้ายกัน คือ ในช่วง 90 นาทีแรก จะมีประสิทธิภาพการกำจัดที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยให้ค่าการกำจัดร้อยละ 62.28, 45.80 และ 35.94 ตามลำดับ หลังจากนั้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นทำให้ค่าการกำจัดลดลง อาจกล่าวได้ว่า เกิดจากเอนไซม์เสื่อมสภาพหรือเอนไซม์มีปริมาณไม่เพียงพอต่อความเข้มข้นของสารตั้งต้น(พาราเซตามอล) หากมีการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ให้มีปริมาณที่เหมาะสมต่อการกำจัด ประสิทธิภาพการกำจัดจะเริ่มคงที่ เนื่องจากความเข้มข้นของเอนไซม์มีมากเกินพอที่จะทำปฏิกิริยากับพาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 1 mg/l ยังสามารถศึกษาผลงานวิจัยของ Deva (2014) [6]ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือ ศึกษาการใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากกะหล่ำดอก (*Brassica oleracea*) ในการบำบัดฟีนอลในน้ำเสีย พบว่า ความเข้มของของเอนไซม์ที่ใช้ในการทดสอบคือ 0.6, 1.25, 3.75 และ 5 U/ml และความเข้มข้นของฟีนอลที่ 1, 5 และ 10 mM โดยผลของความเข้มข้นเอนไซม์ที่ 5 U/ml มีประสิทธิภาพในการกำจัดฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้นคือ 1 mM ได้ร้อยละ 93 และเมื่อความเข้นข้นของฟีนอลเพิ่มขึ้นที่ 5 และ 10 mM ทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดลดลงสามารถกำจัดได้ร้อยละ 81.1 และ 73.6 ตามลำดับ

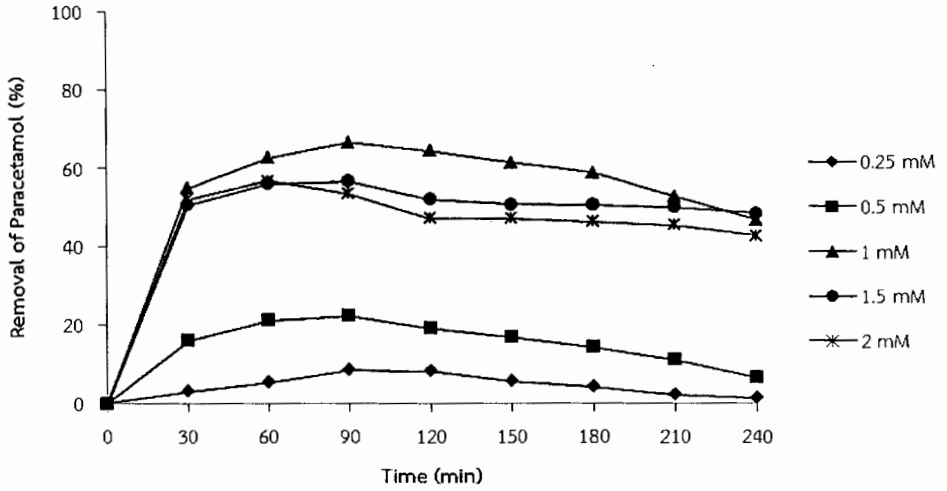


รูปที่ 2 ร้อยละการกำจัดพาราเซตามอลเทียบกับเวลา เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์

ผลของความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีต่อการกำจัดพาราเซตามอล

การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีผลต่อการกำจัดพาราเซตามอลในระบบ (รูปที่ 3) โดยที่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 mM ส่งผลให้มีประสิทธิภาพการกำจัดพาราเซตามอลได้สูงสุดที่ร้อยละ 66.47 ที่ช่วงเวลา 90 นาทีแรก เนื่องจากความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีความเหมาะสมต่อการกำจัดพาราเซตามอล แต่เมื่อความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่น้อยกว่าหรือสูงกว่า 1 mM จะมีแนวโน้มทำให้การกำจัดมีประสิทธิภาพที่ต่ำกว่า ซึ่งความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 0.25, 0.5 และ 1.5 mM มีทิศทางการกำจัดคล้าย 1 mM คือมีแนวโน้ม

การกำจัดลดลงในช่วง 90 นาทีแรกที่ร้อยละการกำจัด 8.41 , 22.32 และ 56.63 ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 2 mM มีประสิทธิภาพการกำจัดได้ดีที่ร้อยละการกำจัดที่ 56.73 ในช่วง 60 นาทีแรก อาจกล่าวได้ว่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีความเข้มข้นไม่เพียงพอต่อการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่จะกำจัดพาราเซตามอล เพราะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถสลายตัวเป็นน้ำกับออกซิเจนเมื่อถูกแสงและความร้อน หรืออาจเกิดจากการไปทำการยับยั้งการทำปฏิกิริยาในการกำจัดพาราเซตามอล ทำให้มีแนวโน้มการกำจัดได้น้อยกว่า ศึกษาจากงานของ Bódalo (2006) [7] ศึกษาการกำจัด 4-คลอโรฟีนอลด้วยเปอร์ออกซิเดสจากถั่วเหลืองและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง พบว่ามีการศึกษาการใช้ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 6 ค่า คือ 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 mM ซึ่งความเข้มข้น 1 mM มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดที่ดีกว่า กล่าวว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ต่ำกว่าหรือสูงว่า 1 mM จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

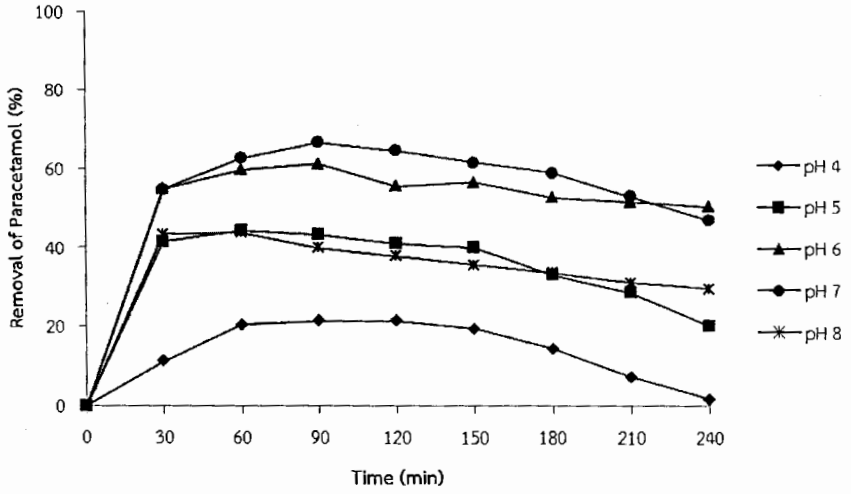


รูปที่ 3 ร้อยละการกำจัดพาราเซตามอลเทียบกับเวลา เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ผลของการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่มีต่อการกำจัดพาราเซตามอล

เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายพาราเซตามอล ผลการศึกษา (รูปที่ 4) พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7 มีประสิทธิภาพการกำจัดที่ดีที่สุดร้อยละ 66.47 ซึ่งจะกำจัดได้ดีในช่วง 90 นาทีแรก หลังจากนั้นประสิทธิภาพการกำจัดมีการลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6 และ 4 มีแนวโน้มการกำจัดคล้ายกัน ซึ่งจะสามารถกำจัดได้ดีที่สุดร้อยละ 61.06 และ 21.32 ตามลำดับ ที่เวลา 90 นาทีแรก หลังจากนั้นมีแนวโน้มการกำจัดลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น

เช่นกัน และที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 8 และ 5 มีทิศทางการกำจัดที่ดีที่สุดที่เวลา 60 นาทีแรก กำจัดได้ร้อยละ 43.71 และ 44.32 ตามลำดับ หลังจากนั้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นประสิทธิภาพการกำจัดจะลดลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง มีผลต่อพาราเซตามอลและประสิทธิภาพในการกำจัดพาราเซตามอล เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน เมื่อเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ส่งผลต่อประจุในโมเลกุลของโปรตีน หรือทำให้โครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนถูกทำลาย ส่งผลโดยตรงต่อบริเวณเร่ง (Active site) และอาจทำให้การจับกันระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้นที่บริเวณเร่ง ไม่สามารถจับกันได้ หรือจับกันได้ยาก เนื่องจากรูปร่างของเอนไซม์เปลี่ยนรูปหรือเอนไซม์เกิดการเสียสภาพ นอกจากนี้ยังส่งผลต่อประจุของสารตั้งต้นที่เข้าทำปฏิกิริยาด้วย พบงานวิจัยที่ศึกษาของ Bayramoglu and Arica. (2008) [8] ศึกษาเอนไซม์สำหรับกำจัดฟีนอลและพี-คลอโรฟีนอลในเครื่องปฏิกรณ์ พบว่าค่าพีเอชอยู่ที่ประมาณ 7.0 มีประสิทธิภาพการกำจัดสูงสุดประมาณ 86 เปอร์เซ็นต์ และ 59 เปอร์เซ็นต์ สำหรับฟีนอลและพี-คลอโรฟีนอลตามลำดับ

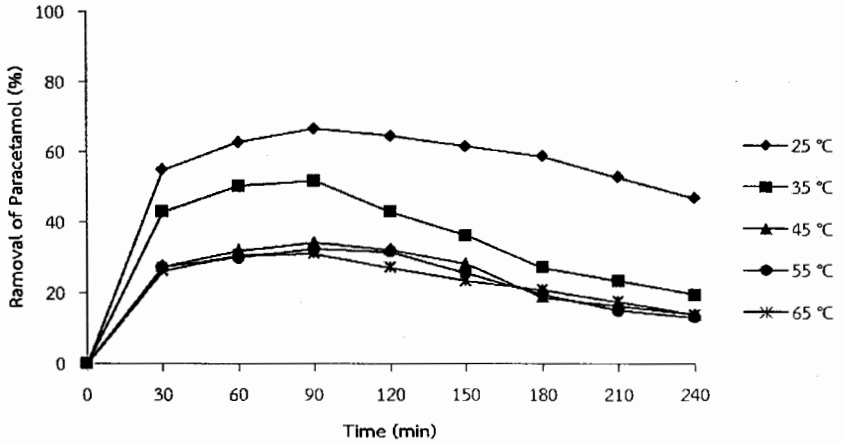


รูปที่ 4 ร้อยละการกำจัดพาราเซตามอลเทียบกับเวลา เมื่อเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง

ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการกำจัดพาราเซตามอล

จากรูปที่ 5 อธิบายได้ว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่สูงขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดลดลง ซึ่งจะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพการกำจัดที่ดีที่สุดที่ร้อยละ 66.47 ในช่วง 90 นาทีแรก หลังจากนั้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นที่ 35, 45, 55 และ 65 องศาเซลเซียส ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดลดลงและมีลักษณะการกำจัดคล้ายกับที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เนื่องจากเอนไซม์ได้ถูกทำลายจากความร้อนทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพไป เป็นเหตุให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไปจนสารเริ่มต้นเข้าไปรวมกับบริเวณเร่ง (Active site) ไม่ได้ ทำให้การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์หมดไป สอดคล้องกับงานวิจัยของ Bayramoglu and Arica.(2007) [8] ศึกษาเอนไซม์

สำหรับกำจัดฟีนอลและพี-คลอโรฟีนอลในถังปฏิกรณ์ สำหรับอุณหภูมิระหว่าง 25-35 องศาเซลเซียส พบว่า มีการเกิดปฏิกิริยาได้ดีหรือมีประสิทธิภาพการกำจัดที่ดีแต่สำหรับอุณหภูมิที่ 45-55 องศาเซลเซียส มีอัตราการกำจัดฟีนอลได้ช้าหรือกำจัดได้ไม่ดี เนื่องจากสูญเสียสภาพที่ความร้อนสูง



รูปที่ 5 ร้อยละการกำจัดพาราเซตามอลเทียบกับเวลา เมื่อเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

สรุป

การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดพาราเซตามอลด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส พบว่า เปอร์ออกซิเดสมีประสิทธิภาพในการกำจัดพาราเซตามอล โดยสามารถกำจัดได้สูงสุดที่ความเข้มข้นพาราเซตามอล 1 mg/l ปริมาณของเอนไซม์ 0.124 U/ml ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 mM ค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายเท่ากับ 7 และอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส โดยให้ค่าการกำจัดสูงสุดที่ร้อยละ 66.47

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหลักสูตรบัณฑิตศึกษา สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์สารเคมี เครื่องมือ สถานที่วิจัย ตลอดจนสนับสนุนการนำเสนอผลงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

[1] Vernwal ,S. et al.,Purification of a peroxidase from solanum melongena fruit juice. Indain J. Biochem. Biophy. 43: 239-243.

[2] Shijin Wu, Lili Zhang, Jianmeng Chen. Paracetamol in the environment and its degradation by microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol. 96(2012): p875–884.

[3] Nagendra et al., Modeling of soot deposition in wavy-fin exhaust gas recirculator coolers. International Journal of Heat and Mass Transfer,: 54(2011) p.1671–1681.

[4] Lakshmi and Sibanda. Soret and Dufour effects on free convection along a vertical wavy surface in a fluid saturated Darcy porous medium. International Journal of Heat and Mass Transfer,: 53 (2010) p. 3030–3034.

[5] Singh et.al., Phenol removal using Brassica juncea hairy roots:Role of inherent peroxidase and H_2O_2. Journal of Biotechnology.: 123 (2006) 43–49.

[6] Deva et al., Extraction of peroxidase from waste Brassica oleracea used for the treatment of aqueous phenol in synthetic waste water. Journal of Environmental Chemical Engineering.; (2014) 1148–1154.

[7] Bódalo et al., Removal of 4-chlorophenol by soybean peroxidase and hydrogen peroxide in a discontinuous tank reactor. Desalination.: 195 (2006) 51–59.

[8] Bayramoglu and Arıca., Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: Horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads. Journal of Hazardous Materials.: 156 (2008) 148–155.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวชลิตตาพร สายโสม
วัน เดือน ปีเกิด	10 มกราคม 2533
ประวัติการศึกษา	พ.ศ.2552 - 2555 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)
ผลงานทางวิชาการ	ชลิตตาพร สายโสม และ กรรณิกา รัตนพงศ์เลขา “การกำจัดพาราเซตามอลด้วยเปอร์ออกซิเดสจากก้านกะหล่ำดอก” ใน การประชุมวิชาการแห่งชาติครั้งที่ 15. สมาคมวิศวกรสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย 2559 ในวันที่ 11 – 13 พฤษภาคม 2559 ณ โรงแรมเดอะ ทวิน ทาวเวอร์ รองเมือง กรุงเทพฯ.