ชื่อโครงการวิจัย การเตรียมเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสจากสมองหมูและสมองไก่สำหรับใช้ในชุดทดสอบสารปราบศัตรูพืช

ชื่อผู้ทำการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศศิธร แท่นทอง
อาจารย์อัคกะบัทคาน ปาทาน

ชื่อหน่วยงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ปีงบประมาณ **2553**

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้ได้สกัดเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสจากสมองไก่ และสมองหมูเพื่อนำไปใช้กับชุดทดสอบสารปราบศัตรูพืช ผู้วิจัยได้สกัดเอนไซม์โดยบดสมองไก่ หรือสมองหมูกับซิลิกาเจลและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง แยกสารสกัดเอนไซม์ที่ได้แล้วเก็บรักษาสภาพไว้ที่สภาวะที่ต่างกัน แล้วนำไปศึกษาสภาพการคงตัว หาปริมาณโปรตีน ปริมาณเอนไซม์ และหาค่าความสามารถจำเพาะในการทำงานของเอนไซม์ (specific activity) การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ ได้สารสกัดจากสมองไก่ดังต่อไปนี้ สารสกัดเอนไซม์ I เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C สารสกัดเอนไซม์II ใส่กรดซอร์บิค 0.1 โมลาร์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C สารสกัดเอนไซม์III เติมกรดซอร์บิค 1 โมลาร์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C และ สารสกัดเอนไซม์IVเก็บไว้ที่อุณหภูมิ5°C จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดเอนไซม์ I, II, III และ IV มีปริมาณโปรตีนตั้งแต่ 0.12-0.14 มิลลิกรัม มีปริมาณเอนไซม์ 0.04--2.40 ยูนิต ตามลำดับ และมีค่า specific activity 0.31-20.00 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาสารสกัดเอนไซม์ไว้เวลาผ่านไป 434 วัน ปริมาณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.13 mg/g สารสกัดเอนไซม์ II และสารสกัดเอนไซม์ III มีปริมาณเอนไซม์ เหลือ 0.57 และ 1.16 units/gสมองไก่ตามลำดับ ค่า specific activityเท่ากับ 4.75 และ 9.67 units/mg Protein ตามลำดับ ส่วนสารสกัดเอนไซม์ I และสารสกัดเอนไซม์ IV นั้นสลายตัวหมดไป จากการทดลองพบว่าการเติมกรดซอร์บิคลงไปในขั้นตอนการสกัด และรักษาสภาพในขณะสกัดให้มีอุณหภูมิต่ำจะทำให้ได้เอนไซม์ที่มีปริมาณมาก เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -15°C ทำให้เอนไซม์คงสภาพได้นาน

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบการสกัดเอนไซม์จากสมองไก่โดยเติมกรดซอร์บิค กรดเบนโซอิค และไนเตรท แล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตพบว่า เมื่อตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วปริมาณโปรตีนลดลง สารสกัดที่มีการเติมไนเตรทเมื่อตกตะกอนด้วยเกลือ

แอมโมเนียมซัลเฟตแล้วทำให้มีปริมาณเอนไซม์ และ specific activityมากกว่าสารสกัดเอนไซม์ที่เติมกรดเบนโซอิค และกรดซอร์บิค

เมื่อศึกษาการสกัดเอนไซม์จากสมองไก่เปรียบเทียบกับสมองหมูพบว่าเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสจากสมองไก่มีมากกว่าสมองหมู

คำสำคัญ อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส, เอนไซม์

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี PHETCHABUN RAJABHAT UNIVERSITY

Research Title Preparation Cholinesterase from Brain of Pig and Chicken for Using in Pesticide Test Kit

Researcher Assist. Prof. Dr. Sasitron Thantong

Mr. Akgabutkhan Pathan

Faculty Science and Technology

Phetchabun Rajabhat University

Year **2010**

Abstract

This research was acetylcholinesterase (AchE) extraction from the brain of chicken and pig, which was used as pesticides test kit. Brains were grinded in phosphate buffer by using silica gel and centrifuged. The extract was known as crude enzyme. Next, crude enzymes was divided into four samples (Enzyme I to Enzyme IV), each sample was determined enzyme activity, protein contents, and specific activity. Enzyme I was stored at -15˚C, Enzyme II was added 0.1 M sorbic acid, Enzyme III was added 1.0 M and stored at -15˚C, and Enzyme IV was stored at 5˚C. The result showed that they had enzyme activity of 0.04-2.40 units/gram of brain, protein contents of 0.12-0.14 mg/gram of brain, and specific activity of 0.31-20.00 units/mg of protein. Then, these samples were stored for four hundred and thirty-four days. It was found that Enzyme II and Enzyme III had activity of 0.57 and 1.16 units/gram of brain, respectively, while Enzyme I and IV had no activity. In conclusion, the crude enzyme was added sorbic acid and stored at low temperature had high activity and the enzyme was preserved for a long time at-15˚C.

Next, the enzyme from chicken's brain was studied by extraction with adding various salts as sorbic acid, benzoic acid, and nitrate. Then, they were precipitated by ammonium sulfate. The result showed that protein contents of extracts decreased and enzyme was extracted by addition of nitrate had activity and specific activity higher than enzyme was extracted by addition of sorbic acid and benzoic acid.

Finally, comparing activity of AchE from the brain of chicken and pig was studied. The result showed that enzyme from the brain of chicken was higher.

Keyword: acetylcholinesterase (AchE), enzyme

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยการเตรียมเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสจากสมองหมูและสมองไก่ สำหรับใช้ในชุดทดสอบสารปราบศัตรูพืชนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความสะดวกในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ในการทดลอง ข้าพเจ้าขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ หน่วยอารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวหน้าสาขาวิชาเคมี ตลอดจนอาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกต่าง ๆ

ศศิธร แท่นทอง

อัคกะบัทคาน ปาทาน

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

2553

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ ภาษาไทย	**ก**
บทคัดย่อ ภาษอังกฤษ	**ข**
กิตติกรรมประกาศ	**ค**
สารบัญ	**ง**
สารบัญตาราง	**ฉ**
สารบัญภาพ	**ช**
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการทำวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 เอนไซม์	5
2.2 เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส	11
2.3 การแยกสารชีวโมเลกุลออกจากเซลล์	13
2.4 การเสื่อมสภาพของเอนไซม์	17
2.5 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	19
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	25
3.1 สารเคมีและตัวอย่าง	25
3. 2 เครื่องมือและอุปกรณ์	25
3.3 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่	27
3.4 การสกัดเอนไซม์จากสมองหมู	32
3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสมองไก่โดยวิธี Lowry	36
3.6 การวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในสมอง	37

3.7 การหาค่า specific activity 39

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 40

4.1 ตอนที่ 1 ผลการสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ 40

4.2 ตอนที่ 2 ผลการสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมซอร์บิคที่ความเข้มข้นต่างๆ 46

4.3 ตอนที่ 3 ผลการสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมซอร์บิคที่ความเข้มข้นต่างๆ 49

4.4 ตอนที่ 4 ผลการสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมสารกันเสีย
และตกตะกอนด้วยเกลือ แอมโมเนียมซัลเฟต 47

4.5 ผลการสกัดเอนไซม์จากสมองหมู 57

4.6 ผลการเปรียบเทียบการสกัดเอนไซม์จากสมองหมูกับสมองไก่ 59

บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 63

บรรณานุกรม 65

ภาคผนวก ก 57

ภาคผนวก ข 60

ประวัติผู้ทำวิจัย 64

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 หลักการแยกและทำสารชีวโมเลกุลให้บริสุทธิ์ 14

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 25

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง 27

3.3 แสดงชื่อของสารสกัดต่างๆ ในสมองหมูและสมองไก่เมื่อสกัดเสร็จแล้ว 36

3.4 ปริมาตรและสารต่างๆที่ใช้สำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry 37

3.5 ปริมาตรและสารต่างๆที่ใช้สำหรับหาปริมาณเอนไซม์ในสารสกัดเอนไซม์ 38

4.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน BSA ของความเข้มข้นต่างๆ 40

4.2 ผลการหาปริมาณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ 41

4.3 ผลการหาปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ 42

4.4 ผลการคำนวณหาค่า specific activity ของสารสกัดต่างๆในสมองไก่ 44

4.5 ผลการหาปริมาณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมสารกันเสีย
กรดซอร์บิค ที่ความเข้มข้นต่างๆ 46

4.6 ผลการหาปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมสารกันเสีย
กรดซอร์บิค ที่ความเข้มข้นต่างๆ 47

4.7 ผลการหาค่า Specific activity ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมสารกันเสีย
กรดซอร์บิค ที่ความเข้มข้นต่างๆ 48

4.8 ผลการหาปริมาณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมสารกันเสีย
กรดเบนโซอิก ที่ความเข้มข้นต่างๆ 50

4.9 ผลการหาปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติม
กรดเบนโซอิก ที่ความเข้มข้นต่างๆ 51

4.10 ผลการหา Specific activity ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมสารกันเสีย
กรดเบนโซอิก ที่ความเข้มข้นต่างๆ 53

4.11 ผลปริมาณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ ที่เติมสารกันเสีย
อยู่ในสภาวะเย็น และตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 54

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาเพื่อแสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์	8
2.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์	9
2.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์กับภาวะความเป็นกรด – เบส	9

2.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของผลิตผลกับเวลาของการทำงานของปฏิกิริยาเอนไซม์ 10

2.9 การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของอะเซติลโคลีนโดยเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรส 19

2.10 แสดงการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสโดยสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต 21

2.11 สูตรโครงสร้างของกรดซอร์บิค 31

3.1 แสดงภาพตัวอย่างหัวไก่ ที่ผ่ากลางหัว 38

3.2 แสดงภาพสมองไก่ ที่แคะได้และชั่งน้ำหนัก 38

4.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA 46

4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดทั้ง 4 กับเวลาเมื่อเก็บไว้สภาวะต่างๆ รวมเวลาได้ 434 วัน 49

4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Specific activity ของสารสกัดทั้ง 4 กับเวลา เมื่อเก็บไว้สภาวะต่างๆ รวมเวลาได้ 434 วัน 52

ผข.1 ชุดUV-Vis spectrophotometer รุ่น Lambda 12 60

ผข.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง 60

ผข.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง 61

ผข.4 แสดงเครื่องผสมของเหลวแบบหมุนวน 61

ผข.5 แสดงภาพตัวอย่างหัวไก่ 62

ผข.6 แสดงภาพสมองไก่ 62

ผข.7 แสดงภาพสารสกัดหลังจาก centrifure 20 นาที 63

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การวิจัยเรื่องการเตรียมเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสจากสมองหมูและสมองไก่ สำหรับใช้ในชุดทดสอบสารปราบศัตรูพืชผู้วิจัยมีความสนใจเนื่องจาก ปัจจุบันมีการนำสารเคมีหลายชนิดมาใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมและในทางการเกษตร ทำให้ สารเคมีเหล่านั้นมีการแพร่กระจายไปสู่อากาศ ดิน น้ำ และสิ่งแวดล้อม สารปราบศัตรูพืช (สารฆ่าแมลง สารฆ่าหญ้า สารฆ่าเชื้อรา)เป็นสารเคมีที่นิยมใช้มากอีกชนิดหนึ่งและก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม สารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสและคาร์บาเมตมีความเป็นพิษสามารถยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส (Cholinesterase, ChE) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการส่งกระแสประสาทได้

ในการยับยั้งการทำงานของโคลีนเอสเตอเรส สามารถใช้เป็นหลักการที่นำไปใช้การวิเคราะห์หาสารปราบศัตรูพืชในกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส และคาร์บาเมตและอื่นๆ ได้หลายวิธี เช่น วิธีการวิเคราะห์ของ Ellman et al. มีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm (Stewart and and Stolmand, 1961) นอกจากนี้โคลีนเอสเตอเรสที่เหลือจากการถูกยับยั้งด้วยสารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสและคาร์บาเมต สามารถทำให้อินโดฟีนิลดาย (indophenyl dye) เปลี่ยนสีเป็นสีฟ้าได้ แล้ววัดสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 630 nm (Akbarian et al, 1997) จากหลักการนี้ ศศิธร แท่นทอง และคณะ จึงได้พัฒนาชุดทดสอบสำหรับตรวจสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสและคาร์บาเมตที่ตกค้างในผักและผลไม้ การทดสอบว่ามีสารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส และคาร์บาเมต และอื่นๆตกค้างหรือไม่ ทำได้โดยใช้หลักการยับยั้งการทำงานของโคลีนเอสเตอเรส เอนไซม์ที่ไม่ถูกยับยั้งเหลืออยู่จะเปลี่ยน indophenyl dye ให้เป็นสีฟ้า แต่ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นมาได้มีการใช้เอนไซม์สำเร็จที่สั่งซื้อจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาแพงมากถึง 6,000 บาทต่อมิลลิกรัม เอนไซม์ โคลีนเอสเตอเรสสามารถสกัดได้จากสมองหมูและสมองไก่ซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้ในประเทศไทย และในประเทศไทยยังไม่มีผู้ผลิตเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส จำเป็นต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ และใช้เวลาในการสั่งซื้อนาน หลายเดือน ทำให้ไม่สะดวกในการผลิตชุดทดสอบใช้งานและในเชิงธุรกิจ

ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้สนใจที่ศึกษาการเตรียมเอนไซม์โคลีนเอส-เตอเรสจากสมองหมูและสมองไก่สำหรับใช้ในชุดทดสอบเพื่อตรวจสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสและคาร์บาเมตที่ตกค้างในผักและผลไม้ที่ได้พัฒนาไว้แล้ว และยังสามารถนำเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสที่ผลิตได้ไปใช้ในงานที่เกี่ยวข้อง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

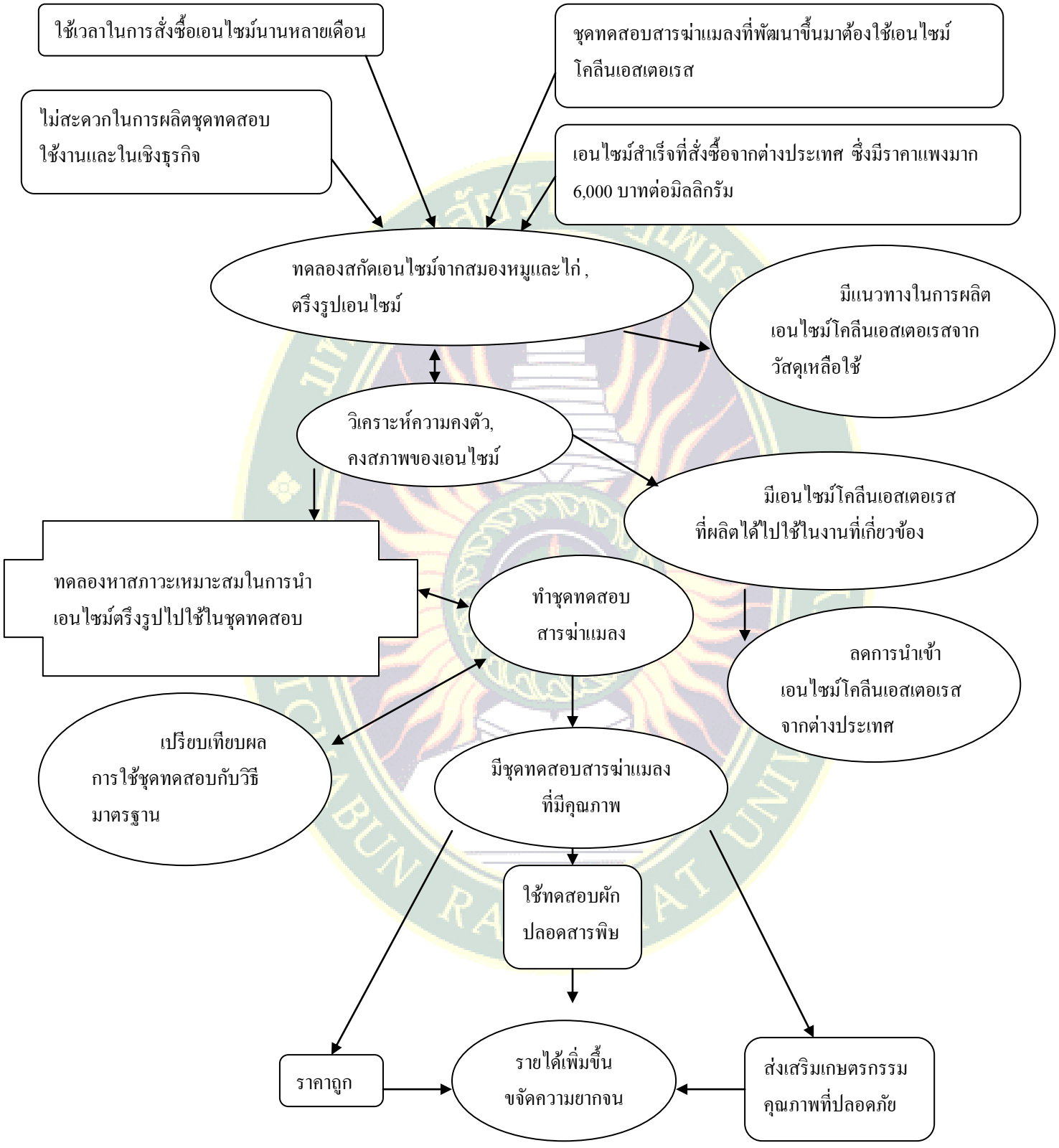
1 ศึกษาการนำเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสจากสมองหมู สมองไก่ มาใช้ในชุดทดสอบ

1.3. ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

1.3.1 สมมุติฐาน

สมองหมูและสมองไก่มีเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส ถ้าสกัดแล้วนำมาตรึงรูปได้ผล น่าจะนำมาใช้ในชุดทดสอบสำหรับตรวจ สารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสและคาร์บาเมตที่ตกค้างในผักและผลไม้ได้

1.3.2 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



1.4 ขอบเขตของการวิจัย

นำเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสจากสมองหมู และสมองไก่ มาตรึงเพื่อใช้ในชุดทดสอบ

1.5ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

มีการเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร หน่วยงานที่เกี่ยวข้องนำไปใช้ประโยชน์ เช่น สถานศึกษา ห้องปฏิบัติการต่างๆ

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอนไซม์

เอนไซม์**(enzyme)** เป็นโปรตีนมีบทบาทที่สำคัญในร่างกายของสิ่งมีชีวิตเพราะเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น เอนไซม์ ในกระบวนการหายใจ การสังเคราะห์โปรตีน ถ้าเอนไซม์ทำหน้าที่ย่อยอาหารจะเรียกว่า น้ำย่อย เช่น อะไมเลส เพปซิน ไลเปส เป็นต้น เอนไซม์เป็นโปรตีนก้อนกลม (globular protein) ประกอบด้วยโซ่พอลิเพปไทด์ขดม้วนแน่นในลักษณะกลม โครงสร้างของโปรตีนพวกนี้ประกอบด้วยเกลียวแอลฟา และโครงรูปเบตาในปริมาณต่างๆกัน โดยมีหมู่ R ที่โพลาร์ของกรดอะมิโนอยู่ด้านนอกของโมเลกุล และหมู่ R ที่ไม่โพลาร์อยู่ด้านในของโมเลกุล เอนไซม์เกือบทุกชนิดส่วนใหญ่ละลายน้ำได้ โดยทั่วไปเอนไซม์ส่วนใหญ่เป็นโปรตีน ยกเว้น ไรโบไซม์ (ribozyme) ซึ่งเป็นกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid, RNA) ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ของ RNA

ในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ร่วมด้วยนั้น โมเลกุลของสารตั้งต้น (substrate) จะถูกเอนไซม์เปลี่ยนสภาพเป็นผลผลิตหรือ ผลิตภัณฑ์ (products) กระบวนการส่วนใหญ่ในเซลล์ในสิ่งมีชีวิตต้องการเอนไซม์ แต่เอนไซม์มีคุณสมบัติที่ต่างจากตัวเร่งปฏิกิริยาทั่วไปคือ เอนไซม์มีความจำเพาะกับสารตั้งต้นเนื่องจาก เอนไซม์ที่มีความจำเพาะ (selective) กับสารตั้งต้น และเร่งปฏิกิริยาของสิ่งมีชีวิต จะพบเอนไซม์ในเนื้อเยื่อและของเหลวในร่างกายทุกชนิด นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์บนเยื่อหุ้มเซลล์ ในระบบหมุนเวียนโลหิต อีกด้วย เอนไซม์มีคุณสมบัติเหมือนตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีทั่วไป เอนไซม์ทำงานด้วย การลดพลังงานกระตุ้น (activation energy)ในปฏิกิริยาเคมี เอนไซม์จะไม่สูญสลายไปกับปฏิกิริยาหรือเปลี่ยนรูปเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ (พรกมล สาฆ้อง,2542)

2.1.1 การจำแนกและการเรียกชื่อเอนไซม์

การจัดแบ่งหมู่และการเรียกชื่อของเอนไซม์ มีวัตถุประสงค์ เพื่อจะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารที่เข้าทำปฏิกิริยา และชนิดของปฏิกิริยาที่เอนไซม์นั้นเข้าไปทำหน้าที่เป็นตัวเร่ง การเรียกชื่อเอนไซม์แต่เดิมนั้นไม่ได้บอกให้ทราบเรื่องราวที่เกี่ยวข้องเลย การแบ่งหมู่เอนไซม์ตามระบบของสหพันธ์ชีวเคมีนานาชาติ (International Union of Biochemistry : IUB) อาศัยหลักการดังนี้คือ

ก. แบ่งชนิดของปฏิกิริยาที่เอนไซม์ทำหน้าที่เร่งออกเป็น 6 พวกใหญ่ ๆ แต่ละพวกมีพวกย่อยอีกประมาณ 4 – 13 พวก

ข. ชื่อเอนไซม์มีสองส่วน ส่วนต้นหมายถึง สารตั้งต้น (อาจมีมากกว่าหนึ่ง) ส่วนปลายซึ่งลงท้ายด้วย –ase หมายถึงชนิดของปฏิกิริยา ดังนั้น คำ –ase จึงมาอยู่ท้ายชื่อปฏิกิริยาแทนที่จะอยู่ท้ายชื่อสารตั้งต้นเหมือนที่เคยเรียกชื่อเดิม

ค. หากต้องการเพิ่มข้อมูลเพื่อความกระจ่างชัดของเอนไซม์ ก็อาจใส่ไว้ในวงเล็บข้างท้าย ตัวอย่างเช่น เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

$$\text{L-malate} + NAD^{+} \longrightarrow \text{pyruvate} + CO_2 + NADH + H^{+}$$

เดิมชื่อเอนไซม์มาเลต (malate enzyme) ถ้าเรียกตามระบบ IUB ก็เป็น L-malate :NAD oxidoreductase (decarboxylating)

ง. เอนไซม์ทุกตัวจะมีเลขรหัสประจำตัว (enzyme comission number, E.C. number) ประกอบด้วยเลข 4 ชุด เช่น malate enzyme ในข้อ ค ข้างบนมีเลขรหัส E.C. 1.1.1.37 เลข 1 ตัวแรกหมายถึงพวกใหญ่ (main class) คือ oxidoreductase เลข 1 ตัวที่สองหมายถึงเลขย่อย (sub - class) คือมีหมู่ –CH-OH เป็นผู้ให้อิเล็กตรอน เลข 1 ตัวที่สามหมายถึง พวกย่อยรองลงไป (sub-sub-class) คือมี NAD^{+} เป็นผู้รับอิเล็กตรอน และเลขชุดที่สี่ คือ 37 หมายถึงลำดับที่ของเอนไซม์ตัวนั้นในพวกย่อยรองอีกทีหนึ่ง (มนตรี จุฬาวัฒนกล และคณะ, 2542)

2.1.2 การวัดปริมาณงานของเอนไซม์

การหาปริมาณเอนไซม์ในสารตัวอย่างชีวภาพทำได้ลำบากเนื่องจากมีเอนไซม์จำนวนน้อยในสารตัวอย่างนั้น และเอนไซม์มีสภาพเป็นโปรตีน และในสารตัวอย่างชีวภาพนั้น ๆ ก็มีโปรตีนอื่นจำนวนมาก การที่จะวัดปริมาณเอนไซม์ด้วยวิธีทางเคมีที่ใช้วัดปริมาณโปรตีนทั่วไปย่อมใช้ไม่ได้ แต่เนื่องจาก เอนไซม์มีคุณสมบัติเฉพาะตัว คือสามารถเร่งปฏิกิริยาเฉพาะ เจาะจง ได้อย่างรวดเร็วแม้มีปริมาณเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงสามารถวัดอัตราเร็วของปฏิกิริยา (rate of reaction) ที่เอนไซม์นั้นทำงานได้ ซึ่งอัตราเร็วนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณเอนไซม์ที่มีอยู่ ถ้ามีเอนไซม์ บริสุทธิ์นำมาวัดอัตราเร็วของปฏิกิริยาเทียบกับเอนไซม์ในสารตัวอย่าง ก็อาจคำนวณน้ำหนัก (ไมโครกรัม) ของเอนไซม์ในสารตัวอย่างนั้น ๆ ได้

2. 1.3 การเกิดปฏิกิริยาเคมีและกลไกการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์

การเกิดปฏิกิริยาเคมี คือ การที่สารตั้นต้นมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลิตภัณฑ์ ปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์มาเกี่ยวข้อง สารตั้งต้นจะต้องมีการสัมผัสชนกันกับเอนไซม์เสียก่อน เกิดเป็นเอนไซม์ซับสเตรตคอมเพล็กซ์ (ES-complex) การสัมผัสชนกันนี้จะต้องมีพลังงานเกิดขึ้น เพียงพอที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาได้

2.1.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์

อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งนั้น สิ่งที่มีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์ มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา เช่น เวลา, อุณหภูมิ, ภาวะความเป็นกรด-เบส (pH), ปริมาณของเอนไซม์, ปริมาณของสารตั้งต้น และการสัมผัสเอนไซม์และสารตั้งต้นเป็นต้น การวัดอัตราการทำงานของเอนไซม์นั้นสามารถกระทำได้ 2 แบบ คือวัดปริมาณของ สารตั้งต้น ที่หายไปและหรือวัดปริมาณของผลิตผลที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาต่อหนึ่งหน่วยเวลา

ก. การสัมผัสเอนไซม์และสารตั้งต้น

ก่อนที่สารตั้งต้นถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตผล จะต้องรวมกับเอนไซม์เป็นสารเชิงซ้อนเสียก่อน ฉะนั้นการที่จะให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดี จะต้องมีการสัมผัสระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้น สำหรับสารตั้งต้นที่ละลายน้ำได้นั้นไม่มีปัญหาเรื่องนี้ ถ้าสารตั้งต้นไม่ละลายน้ำ เช่น สารตั้งต้นจำพวกไขมันเป็นต้น จึงมีกลไกพิเศษช่วยให้เอนไซม์เข้าไปพบกับไขมัน การย่อยอาหารต่างๆ ในลำไส้เล็กซึ่งถึงแม้จะไม่อยู่ในรูปสารละลาย แต่ก็เป็นไปอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เพราะมีการผสมคลุกเคล้าอย่างดีระหว่างเอนไซม์ และอาหารอยู่ตลอดเวลาด้วยการเคลื่อนไหวของลำไส้ การย่อยไขมันซึ่งไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับเอนไซม์ก็ถูกทำให้เป็นอิมัลชัน โดยมีน้ำดีเป็นตัวช่วยทำให้ได้ไขมันเป็นหยดเล็ก ๆ มีพื้นผิวเพิ่มมากขึ้น สามารถสัมผัสกับเอนไซม์ได้ดีขึ้น

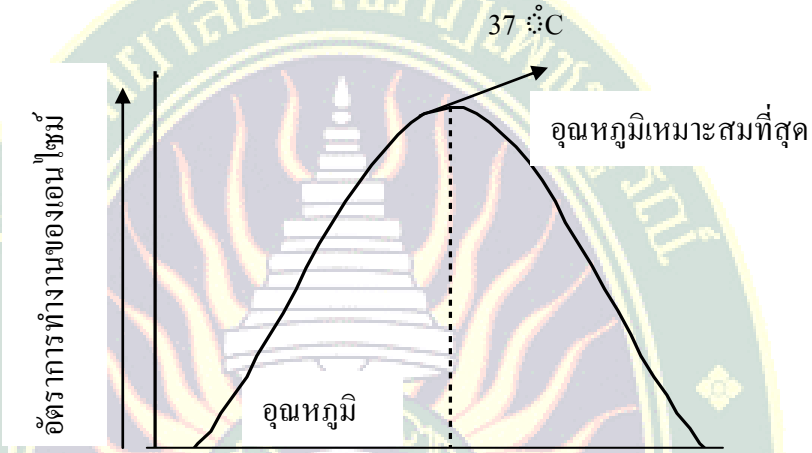
ข. ความเข้มข้นของเอนไซม์และสารตั้งต้น

ในปฏิกิริยาเอนไซม์มีผล ทำให้ให้ปฏิกิริยาถึงสมดุลช้าหรือเร็วเท่านั้นเอง ดังนั้นถ้าให้เวลานานพอการใช้เอนไซม์จำนวนเล็กน้อยหรือจำนวนมากจะให้ผลเท่ากัน คือ สารตั้งต้นทั้งหมดจะถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์เหมือน ๆ กัน ความเข้มของสารตั้งต้นจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นด้วยจนถึงจุดหนึ่งจะหยุดคงที่ กล่าวคือ เมื่อให้ความเข้มข้นของ สารตั้งต้นคงที่แต่เปลี่ยนแปลงปริมาณของเอนไซม์พบว่า การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ (พรกมล สาฆ้อง,2542)

ค. อุณหภูมิ

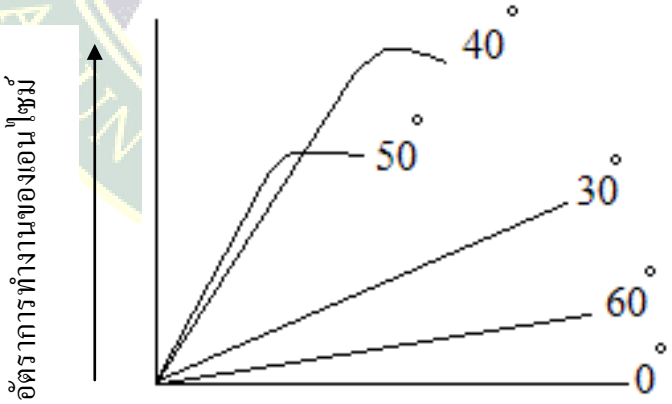
การเพิ่มอุณหภูมิมีผลต่อปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ได้ทั้งทางบวก และทางลบ คือถึงแม้การเพิ่มของอุณหภูมิจะช่วยเร่งอัตราเร็วของปฏิกิริยา แต่ในขณะเดียวกันการเพิ่มอุณหภูมิก็จะทำให้เอนไซม์เปลี่ยนสภาพได้ง่ายขึ้น และถ้าเพิ่มอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ(denaturation) อัตราเร็วของปฏิกิริยาจึงไม่อาจเพิ่มตามอุณหภูมิเสมอไป จะมีอุณหภูมิหนึ่งเท่านั้นซึ่งเรียกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด (optimum temperature) ดังแสดงในภาพที่ 2.1 ซึ่งถ้าอุณหภูมิสูงกว่านี้อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะลดลง เนื่องจากสภาพเอนไซม์เปลี่ยนไปจากเดิม เอนไซม์ ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่มีค่าอุณหภูมิเหมาะที่สุดประมาณ 37 ๐C ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นเอนไซม์จะทำงานได้ช้าลงและถ้าอุณหภูมิ 70 - 80 ๐C เอนไซม์จะไม่ทำงานเร่งปฏิกิริยาได้เลย แต่มีเอนไซม์ในจุลินทรีย์

บางชนิด เช่น แบคทีเรียที่อาศัยตามน้ำพุร้อน หรือปากปล่องภูเขาไฟสามารถทำงานในอุณหภูมิที่สูงใกล้จุดเดือดของน้ำได้ และจากภาพที่ 2.2 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ส่วนใหญ่ทำงานได้ดีที่ 37 ๐ C และลดลงเมื่ออุณหภูมิต่ำลง โดยเฉพาะที่ 0 ๐ C กล่าวได้ว่าไม่มีปฏิกิริยาเกิดขึ้นเลย ในทางปฏิบัติ เมื่อต้องการรักษาเอนไซม์ไม่ให้เร่งปฏิกิริยา มักจะเก็บเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิต่ำเช่น - 4 ๐C (ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์, 2535)



ภาพที่ 2. 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาเพื่อแสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์

ที่มา : พรกมล สาม้อง ,2542

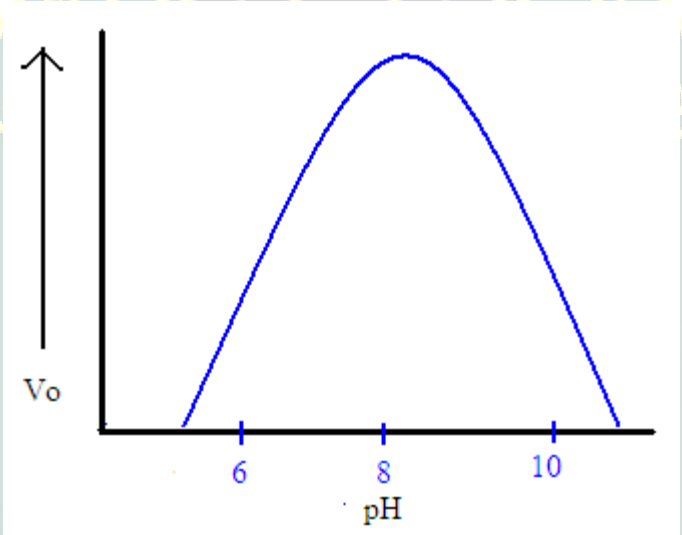


ภาพที่ 2.2 ผลของอุณหภูมิ(๐C) ต่อการทำงานของเอนไซม์

ที่มา : ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์ ,2535

ง. ความเป็นกรด – เบส ต่ออัตราการเร็วของปฏิกิริยา

เอนไซม์เป็นโปรตีนที่มีสภาพไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงของ pH เพียงเล็กน้อยอาจจะทำให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลงหรือเพิ่มขึ้นได้ เอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดที่ pH หนึ่งเท่านั้นเรียกว่า พีเอชที่เหมาะสมที่สุด (optimum pH) ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงค่า pH ระหว่าง 5-9 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ เมื่อเขียนเส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์กับภาวะความเป็นกรด – เบส จะได้รูปกราฟเป็นรูประฆังคว่ำ ดังภาพที่ 2.3

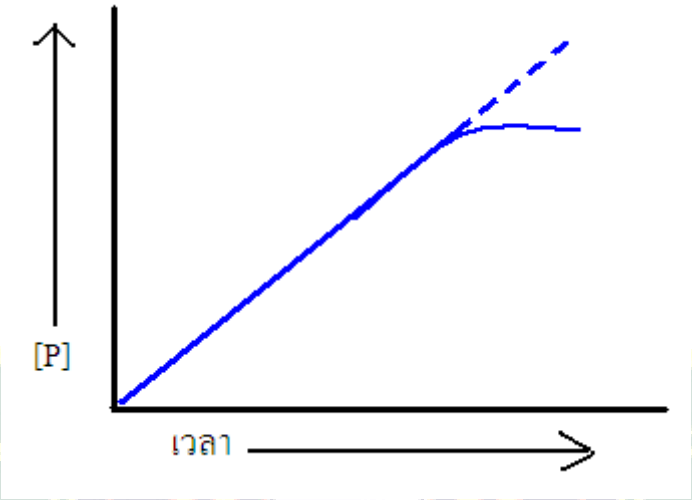


ภาพที่ 2.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์กับภาวะความเป็นกรด – เบส
ที่มา : พจน์ ศรีบุญลือ และคณะ ,2540

จ. เวลา

เวลามีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เมื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมที่สุด แล้วติดตามการทำงานของเอนไซม์เป็นระยะๆ พบว่าเมื่อนำผลที่ได้มาเขียนเป็นเส้นกราฟโดยให้แกนนอนแทนด้วยระยะเวลา แกนตั้งแทนด้วยปริมาณผลิตผลของปฏิกิริยาหรือปริมาณสารตั้งต้นที่หายไป เรียกเส้นกราฟนี้ว่า time – course curve ดังภาพที่ 2.4 ซึ่งจากกราฟพบว่าในระยะช่วงแรกๆเส้นกราฟจะเป็นเส้นตรง ปริมาณของผลิตผลที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อเวลา แต่เมื่อ เวลาผ่านไปนานๆ ผลิตผลที่ได้จะมีปริมาณน้อยลงและไม่แปรผันตรงกับเวลา กราฟจะเป็นเส้นโค้ง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาเหตุ เช่น ปริมาณของสารตั้งต้นที่เหลือมีจำนวนน้อยลงเพราะถูกใช้ไปมากแล้ว หรือปริมาณของผลิตผลเพิ่มมากขึ้นถึงระดับที่ทำให้ปฏิกิริยาเข้าสู่จุดสมดุลหรือเกิดการ

ยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ดังนั้นในทางปฏิบัติจึงต้องทำปฏิกิริยาภายในระยะเวลาสั้นๆ (พจน์ ศรีบุญลือ และคณะ ,2540)



ภาพที่ 2.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของผลิตผลกับเวลาของการทำงานของปฏิกิริยาเอนไซม์
ที่มา : พจน์ ศรีบุญลือ และคณะ ,2540

ฉ. สารยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (enzyme inhibitors)

การทำงานของเอนไซม์สามารถหยุดยั้งได้ด้วยตัวยับยั้งเอนไซม์ ตัวเร่งเอนไซม์คือโมเลกุลที่ช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ ยาและยาพิษส่วนมากเป็นตัวยับยั้ง และส่งเสริมเอนไซม์การแพทย์และเภสัชกรรมด้วยยาต่าง ๆ หลายชนิดที่รักษาโรคเนื่องจากไปยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์บางปฏิกิริยา เช่น พวกยาปฏิชีวนะมีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เป็นต้น

2.1.5 การยังยั้งการทำงานของเอนไซม์

สารยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ มีทั้งสารอนินทรีย์ และสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ที่ยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เช่น โลหะหนักต่างๆ เป็นต้น สารอินทรีย์ที่ยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เช่น สารประกอบฟีโนลิค หรือโปรตีน เป็นต้น สารยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์สามารถเป็นออกได้ 2 พวก โดยดูตำแหน่งที่มันเข้าทำการยับยั้ง คือ 1. สารที่เข้าร่วมกับเอนไซม์ในตำแหน่งเดียวกับสารตั้งต้น หรือบริเวณเร่ง(catalytic site) 2.สารที่เข้าร่วมในตำแหน่งอื่นซึ่งเรียกว่าตำแหน่งแอลโลสเตลิก (allosteric siteหรือ active site)

2.1.6 ความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ (specificity of enzyme)

เอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจง คือเร่งการเปลี่ยนแปลงของสารเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง ได้แก่ ความจำเพาะเจาะจงแบบสมบูรณ์ (absolute specificity) ความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของหมู่ธาตุ (group specificity) ความจำเพาะเจาะจงชนิดของปฏิกิริยาหรือชนิดของพันธะเคมี (reaction of linkge specificity) ความจำเพาะเจาะจงต่อลักษณะการจัดวางตัวของหมู่ธาตุ (stereo chemical specificity)

2.2 เอนไซม์ อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (acethylcolinesterase) เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการทำลายสารอะซิติลโคลีนซึ่งเป็นตัวกลางสำคัญในการรับส่งสัญญาณระหว่างเซลล์หรือสารสื่อประสาทซึ่งจะหลั่งออกมาจากปลายของใยประสาทอัตโนมัติซึ่งเส้นประสาทเหล่านี้จะส่งกระแสประสาทไปยังอวัยวะและเนื้อเยื่อต่างๆในร่างกาย อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสมีพบมากในสัตว์มีกระดูกสันหลัง สามารถสกัดออกมาได้จากสัตว์หลายชนิด สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก ปลา สัตว์เลื้อยคลาน และแมลง รวมทั้งพบในอวัยวะที่ทำให้เกิดไฟฟ้าของปลา เม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เนื้อเยื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและแมลง เอนไซม์นี้ที่อยู่ในระบบประสาทส่วนกลาง อวัยวะ และต่อมต่างๆ ถูกควบคุมการทำงานด้วยระบบประสาทอัตโนมัติส่วนที่เรียกว่า พาราซิมพาเทติก (parasympathetic) เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วยสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตที่มีความเข้มข้นต่ำประมาณ 10^{-5}M เมื่อร่างกายได้รับสารที่ยับยั้งการทำงานของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสแล้ว ก็จะมีการสะสมของสารอะซิติลโคลีนขึ้นในร่างกาย สารอะซิติลโคลีนจะไปกระตุ้นตัวรับของตัวมัน ทำให้มีการส่งกระแสประสาทอยู่ตลอดเวลา

อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสจะทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 40 ๐C และจะเสียสภาพไปที่อุณหภูมิ 60 ๐ C และ pH ที่เหมาะสมคือ 7.5-9 และตัวยับยั้งคือ 1,5-bis(4-allyldimethylammonium phenyl pentan-3-one) และเสียสภาพด้วยแอลกอฮอล์ที่ 78 % (ศศิธร แท่นทองและคณะ,2550)

2. 2.1 อาการที่เกิดขึ้นตามแหล่งที่สะสมของอะซิติลโคลีน

สารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต และ คาร์บาเมตมีความเป็นพิษต่อระบบประสาท มีผลต่อเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส (cholinesterase) มีการจับกับเอนไซม์เอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสจะทำให้เกิดพิษแล้วสลายตัวได้เอง พิษเกิดจากการต้านโคลีนเอสเตอเรส มีผลต่อกล้ามเนื้อเรียบ เช่น หัวใจ และกระเพาะอาหารทำให้เกิดอาการคั่งของอะซิลโคลีนในปริมาณน้อย ๆ จะมีฤทธิ์กระตุ้น แต่เมื่อปริมาณมากกลับออกฤทธิ์ทำลายหรือทำให้เป็นอัมพาต อาการที่แสดง พิษเริ่มด้วยคลื่นไส้ วิงเวียน อ่อนเพลีย กล้ามเนื้อหดตัวเป็นหย่อม ๆ แน่นหน้าอก นอกจากนี้มีอาการอาเจียน ท้องเดิน ตาพร่า น้ำลายออก

มากกว่าปกติ และซึมลง อาการรุนแรงทำให้หมดสติน้ำลายฟูมปาก การตายเกิดจากการหายใจล้มเหลว ทำให้ ป่วย และตายได้ ในแมลง และเป็นพิษกับคนด้วย (ศศิธร แท่นทอง และคณะ, 2550)

อาการที่เกิดขึ้นตามแหล่งที่สะสมของอะซิติลโคลีน แบ่งได้ดังนี้

ก. อาการทางประสาท จะเกิดอาการเบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดิน น้ำตาไหล เหงื่อออก ม่านตาหดตัว กล้ันอุจจาระไม่ได้ มีเสมหะมาก

ข. อาการทางกล้ามเนื้อ จะเกิดอาการกระตุกของกล้ามเนื้อโดยเฉพาะที่ลิ้น บริเวณหน้าและลำคอ หรือกระตุกทั่วร่างกาย เกิดอาการอ่อนเพลียและเป็นอัมพาต

ค. อาการทางสมอง จะเกิดอาการปวดศีรษะ มึนงง อาจชักและหมดสติได้

2. 2.2 การยับยั้งอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสโดยสารกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต

สารออร์แกโนฟอสเฟตถูกนำมาใช้เป็นสารกำจัดแมลงกันอย่างแพร่หลาย สารนี้มีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ได้ 2 วิธี วิธีแรกคือ ยับยั้งโดยตรง เช่น ไดโคลวอส (Dichlovos) วิธีที่สองยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยทางอ้อม เมื่อออร์แกโนฟอสเฟตเข้าสู่ร่างกายจะเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีทำให้เกิดสารใหม่ที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกาย โดยเกิดกระบวนการออกซิเดทีฟดีซัลฟูเรชัน (oxidativedesulfuration) ในสูตรโครงสร้างทั่วไปของออร์แกโนฟอสเฟตจากตำแหน่ง P=S เปลี่ยนเป็น P=O โดย mixed function oxidases (MFO) ที่อยู่ใน endoplasmic reticulum ในตับ ลำไส้ ไต และปอด ทำให้ สารใหม่ที่เกิดขึ้นใหม่มีความเป็นพิษมากกว่าเดิม ตัวอย่างเช่น พาราไทออน มาลาไทออน เป็นต้น

สารอะซิติลโคลีน ที่ไม่ถูกไฮโดรไลซ์ ทำให้เกิดการสะสมของอะซิติลโคลีนบริเวณรอยต่อของเซลล์ประสาทมากขึ้นจึงเกิดการกระตุ้นของเซลล์ประสาทหรือกล้ามเนื้อบริเวณนั้นอย่างต่อเนื่อง มีผลทำให้เกิดการเหนื่อยล้าและอาการชักต่อเนื่องอย่างรุนแรง

2.3 เทคนิคการแยก

สารที่สนใจในการวิเคราะห์ถูกแยกออกจากสารที่รบกวนในการวิเคราะห์โดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมีและทางฟิสิกส์ที่ต่างกัน เทคนิคในการแยกมีหลายวิธีดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 การจำแนกเทคนิคในการแยก

สมบัติพื้นฐานที่ใช้ในการแยก	เทคนิคในการแยก
ขนาด	กรอง, ไดอะไลซีส (dialysis),ไซซ์เอกซ์คลูซันโครมาโทรกราฟี (size – exclusion chromatrography)
มวลและความหนาแน่น (density)	การหมุนเหวี่ยง (centrifugation)
การทำให้เกิดสารประกอบ(complex formation)	การเติมรีเอเจนต์ลงไปเพื่อใช้ป้องกันการรบกวนอันเนื่องจากส่วนประกอบอื่น ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างที่มีผลต่อสัญญาณของสารที่สนใจในการวิเคราะห์ภาษาอังกฤษที่ใช้คำว่า masking
เปลี่ยนสถานะทางฟิสิกส์(change in physical state)	การกลั่น (distillation),การระเหิด (sublimation),การตกผลึกใหม่ (recrystallization)
เปลี่ยนสถานะทางเคมี(change in chemical state)	การตกตะกอน (precipitation),การแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange),การแยกโดยใช้ขั้วไฟฟ้า (electrodeposition), การทำให้เกิดไอ (volatilization)
การแบ่งส่วนระหว่างเฟส (partitioning between phase)	การสกัด (extraction),โครมาโทรกราฟี (chromatrograpy)

ที่มา: (Harvey, 2000 : 205)

2.3.1 การแยกโดยอาศัยขนาด

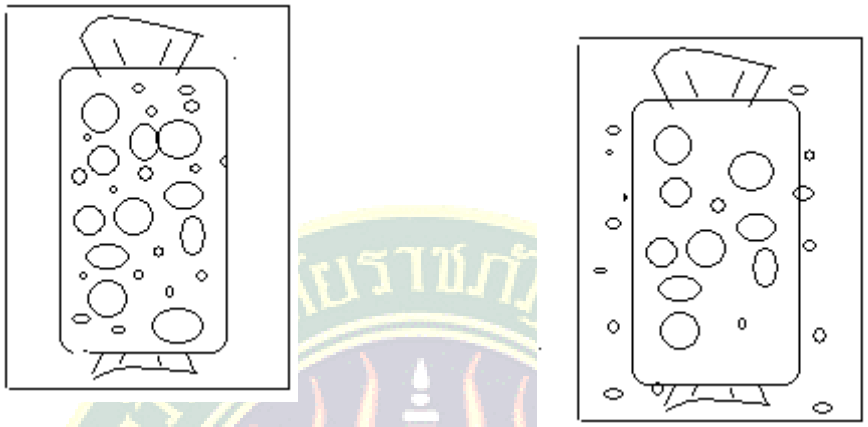
การแยกโดยอาศัยขนาดเป็นการแยกอย่างง่ายโดยอาศัยสมบัติทางฟิสิกส์ โดยอาศัยขนาดที่ต่างกันเพื่อแยกสารที่สนใจวิเคราะห์กับสิ่งที่รบกวนออกจากกัน เทคนิคการแยกโดยอาศัยขนาดแบ่งออกดังนี้

ก. การกรอง

การแยกโดยอาศัยขนาดเป็นการแยกอย่างง่ายโดยอาศัยสมบัติทางฟิสิกส์ โดยอาศัยขนาดที่ต่างกันเพื่อแยกสารที่สนใจวิเคราะห์กับสิ่งที่รบกวนออกจากกัน การกรองเมื่อใช้กระดาษกรองที่มีขนาดต่างกัน อาศัยแรงดึงดูดระหว่างโลก ทำให้สารที่มีขนาดต่างกันแยกออกจากกันได้ หรือทำให้สารที่ไม่ละลายในตัวทำละลายแยกออกจากสารที่ละลายในตัวทำละลายได้ ในการวิเคราะห์น้ำเราสามารถกรองเพื่อวิเคราะห์หาสารแขวนลอย (suspended solid) ที่อยู่ในน้ำได้ ในการวิเคราะห์โดยการชั่งน้ำหนัก (gravimetry) ขั้นตอนการตกตะกอนกรองแล้วชั่งน้ำหนัก การกรองเป็นขั้นตอนหนึ่งที่จะแยกสารที่ละลายของไอออนต่าง ๆ ออกจากตะกอนของสารที่สนใจวิเคราะห์

ข. ไดอะไลซีส

เป็นเทคนิคการแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลหรือไอออน (ion) ที่ต่างกันออกจากกันโดยเยื่อไดอะไลซีสเป็นเยื่อที่ยอมให้สารบางชนิดที่มีโมเลกุลขนาดเล็กผ่านได้ สารขนาดเล็กที่ผ่านเยื่อได้ เช่น Na^{+}, Cl^{-}, $C_6H_{12}O_6$ เทคนิคนี้ใช้สำหรับการแยกสารที่สนใจวิเคราะห์กับสิ่งรบกวนในการวิเคราะห์ออกจากกัน เยื่อไดอะไลซีสทำมาจากเซลลูโลส (cellulose) มีขนาดของรูประมาณ 1-5 นาโนเมตร (nm) สารแต่ละชนิดมีความสามารถในการแพร่ผ่าน (diffusion) เยื่อไดอะไลซีสได้ต่างกัน ใส่สารผสม เช่น แป้งผสมน้ำตาลในถุงไดอะไลซีส แล้วนำไปแช่ในสารละลายที่ไม่เหมือนกับสารละลายที่อยู่ในถุงไดอะไลซีส น้ำตาลที่อยู่ในถุงไดอะไลซีสและสารละลายที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่ารูของถุงไดอะไลซีสจะซึมผ่านเยื่อได้ ส่วนสารที่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถผ่านเยื่อได้จะอยู่ในถุง เช่น แป้ง ไดอะไลซีสใช้ สำหรับแยกโปรตีน ฮอร์โมนและเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ในร่างกายไตทำหน้าที่ในการกรองของเสีย เช่น ยูเรีย กรดยูริก และครีทีนีน (cretinine) ออกจากร่างกายโดยวิธีไดอะไลซีสเช่นกัน



ก ข

ภาพที่ 2.5 แสดงการทำงานของไดอะไลซีส

ก. สารที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์บรรจุในถุงไดอะไลซีสใส่ไว้ในตัวทำละลาย

ข. อนุภาคเล็กจะไหลผ่านเข้าออกถุงไดอะไลซีสได้ส่วนอนุภาคใหญ่ยังคงอยู่ในถุง

ที่มา (ดัดแปลงมาจาก Harvey, 2000 : 206)

ค.ไซซ์เอกซ์คลูชันโครมาโทกราฟี

เป็นวิธีการแยกของผสมที่มีขนาดต่างกันออกจากกันโดยผ่านอนุภาคที่มีรูเล็ก ๆ สารใดมีขนาดเล็กจะออกมาช้า สารที่มีขนาดใหญ่จะออกมาเร็วกว่าเนื่องจากสารขนาดเล็กรอดเข้าไปในรูได้ ไซซ์เอกซ์คลูชันโครมาโทรกราฟีบางครั้งเรียกว่า เจลเพอมีเอชันโครมาโทรกราฟี (gel permeation chromatography) หรือโมเลคูลาเอกซ์คลูชันโครมาโทรกราฟี (molecula exclusion chromatography) หลักการโครมาโทรกราฟีชนิดนี้คือ ความสามารถในการแยกขึ้นกับขนาดของโมเลกุลสารที่ใช้บรรจุในคอลัมน์คือ เดกซ์ทริน (dextrin) หรือพอลิอะครายลามาย (polyacrylamide) ซึ่งเป็นสารที่ภายในอนุภาคมีรูเล็ก ๆ ขนาด 10 ไมครอน(μm) ซึ่งเกิดจาการเชื่อมโยง (cross-linked) กันภายในอนุภาค ขนาดของรูขึ้นอยู่กับองศาของการเชื่อมโยง (degree of cross-linked) ยิ่งมีองศาของการเชื่อมโยงมากจะทำให้ขนาดรูเล็ก ตัวอย่างที่ต้องการแยกจะถูกใส่เข้าไปในกระแสของตัวทำละลายซึ่งใช้ปั๊มป์ดูดผ่านคอลัมน์ด้วยอัตราเร็วสม่ำเสมอ อนุภาคขนาดเล็ก ๆ ในตัวอย่างจะผ่านเข้าไปในรูของสารที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์อนุภาคขนาดเล็กจะแยกออกได้ช้าเพราะจะผ่านเข้าไปในรูของสารที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ส่วนอนุภาคขนาดใหญ่จะหลุดออกมาก่อน โครมาโทรกราฟีชนิดนี้มีการใช้อย่างกว้างขวางในการแยกเพื่อวิเคราะห์พอลิเมอร์ และชีวเคมีซึ่งใช้ในการแยกโปรตีน

2.3.2 การแยกโดยอาศัยมวลและความหนาแน่น

ถ้าสารละลายที่ต้องการแยกประกอบด้วยสารที่สนใจวิเคราะห์กับสิ่งที่รบกวนในการวิเคราะห์ ซึ่งมีมวลและความหนาแน่นต่างกัน การใช้วิธีหมุนเหวี่ยงเป็นวิธีหนึ่งที่น่าจะแยกสารออกจากกันได้ สารละลายของตัวอย่างถูกบรรจุอยู่ในหลอดทดลองที่ใช้สำหรับเครื่องหมุนเหวี่ยงแล้วหมุนด้วยความเร็วรอบที่สูง ๆ อนุภาคที่หนักซึ่งอยู่ในสารละลายจะถูกแรงหมุนเหวี่ยงทำให้เกิดการตกตะกอนอยู่ที่ก้นของหลอดทดลองได้เร็วกว่าอนุภาคที่เบา อนุภาคที่มีความหนาแน่นเท่ากันแต่มวลต่างกันอนุภาคที่หนักกว่าจะตกตะกอนเร็วกว่า อนุภาคที่มีมวลเท่ากันแต่ความหนาแน่นต่างกัน อนุภาคที่มีความหนาแน่นมากกว่าจะตกตะกอนเร็วกว่า การหมุนเหวี่ยงเป็นเทคนิคหนึ่งที่สำคัญที่ใช้ในการแยกสารชีวโมเลกุล

2.3.3 การแยกสารชีวโมเลกุลออกจากเซลล์

การแยกสารชีวโมเลกุลออกจากเซลล์และทำให้บริสุทธิ์ สารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น เอนไซม์ เป็นต้น สามารถแยก โดยเทคนิคดังนี้ (บัณฑิต ลีละศาสตร์, 2540)

ก. การทำให้เซลล์แตก

การแยกสารชีวโมเลกุลที่อยู่ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ จะต้องจัดการทำให้เซลล์แตกเสียก่อนโดยวิธีต่าง ๆ เพื่อปลดปล่อยสารนั้นออกมา โดยวิธีต่างๆ ดังนี้

1. การใช้แรงดันออสโมซิส โดยการเติมน้ำหรือนำเซลล์ลงแช่ในสารละลายไฮโปโทนิค ซึ่งเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นของสารละลายต่ำกว่าความเข้มข้นภายในเซลล์ในภาวะเช่นนี้โมเลกุลของน้ำจะแพร่เข้าสู่เซลล์ทำให้เซลล์บวมและแตกออก วิธีนี้ใช้ได้ดีกับเซลล์สัตว์
2. ใช้ วิธีแช่เย็นเซลล์ให้แข็งแล้วทำให้อุ่นขึ้นทันที
3. ใช้ สารละลายอินทรีย์ เช่นอะซีโตนหรือโทลูอีนก็อาจทำให้เซลล์แตกได้ แต่สารละลายอินทรีย์เหล่านี้ก็อาจทำให้สารชีวโมเลกุล เช่น โปรตีนบางชนิดเสียสภาพได้เหมือนกัน
4. การบดเซลล์ในทรายหรืออะลูมินา

โดยปกติแล้วจะใช้วิธีใดก็ตามจะทำให้เซลล์แตกในสารละลายที่มี pH และความแรงไอออนเหมือนในเซลล์ วิธีการทำให้เซลล์แตกที่ใช้วิธีทางกายภาพส่วนใหญ่จะเกิดความร้อนซึ่งถ้าอุณหภูมิสูงจะทำให้สารชีวโมเลกุลโดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ส่วนมากเสียสภาพธรรมชาติ (denature) จึงจำเป็นต้องทำให้เซลล์แตกและแยกองค์ประกอบต่างๆที่อุณหภูมิต่ำ งานทางด้านชีวเคมีจึงมักทำในห้องเย็น หลังจากเซลล์แตกแล้วขั้นตอนต่อไปคือการนำส่วนที่ได้มากำจัดเศษเซลล์ หรือเซลล์ที่หลงเหลือออกไป นอกจากนี้อาจจะแยกสารที่ไม่ต้องการออกไปด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

1. การกรองหรือการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) คือ การทำให้สารที่มีขนาดต่างกัน ความหนาแน่นและรูปร่างต่างกันแยกออกจากกันโดยอาศัยแรงหนีศูนย์ เครื่องมือที่ใช้เรียกเครื่องเหวี่ยงหรือเครื่องเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) โดยอาศัยหลักการที่ว่าองค์ประกอบที่หนักกว่าจะถูกเหวี่ยงให้ตกลงมาก่อนที่ความเร็วรอบของการเหวี่ยง

2.การ ตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารละลาย เป็นต้น

ข. การแยกสารชีวโมเลกุล

หลักการแยกและทำให้สารชีวโมเลกุลบริสุทธิ์ สามารถแบ่งออกได้หลายวิธีทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติเฉพาะตัวของสารแต่ละชนิด ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 หลักการแยกและทำสารชีวโมเลกุลให้บริสุทธิ์

คุณสมบัติ	วิธีการ
ขนาดหรือมวล	- การปั่นเหวี่ยง(Centrifugation) - Gel filtration - ไดอะไลซิส(Dialysis), Ultrafiltration
ประจุ	- Ion-exchange chromatography - Electrophoresis - Isoelectric focusing
ความสามารถในการละลาย	- เปลี่ยน pH - เปลี่ยนค่า ionic strength - ลดค่า dielectric constant
ความจำเพาะกับสารบางชนิด	- Affinity chromatography - Affinity elution

สารชีวโมเลกุลที่แยกจากเซลล์มักมีปริมาณน้อย เมื่อแยกมาอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์มักจะเจือจางไม่สะดวกในการศึกษาและแยกบริสุทธิ์ วิธีการทำให้สารชีวโมเลกุลเข้มข้นขึ้นมีหลายวิธี เช่น การตกตะกอนด้วยเกลือหรือตัวทำละลายอินทรีย์ ไลโอฟิไลเซชัน (lyophillization หรือ freeze - drying) เป็นวิธีเก่าในการทำให้สารละลายทางชีวภาพเข้มข้นขึ้น และยังคงใช้อยู่โดย เฉพาะอย่างยิ่งเพื่อการเก็บและขนส่งสารชีวภาพ เป็นวิธีที่ขจัดตัวทำละลายจากตัวอย่างที่แช่แข็ง วิธีนี้มีประสิทธิภาพ

สำหรับการทำให้สารที่ไวต่อความร้อนให้แห้งหรือเข้มข้นสารที่ระเหยที่ภาวะอุณหภูมิและความดันต่ำจะถูกขจัดออก ส่วนที่ไม่ระเหย เช่น โปรตีน เกลือ บัฟเฟอร์ เป็นต้น จะเข้มข้นขึ้น

2. 3.4 หลักการแยกและทำให้สารเอนไซม์บริสุทธิ์

มีการพัฒนาเทคนิคต่าง ๆมากมายในการแยกและวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลเทคนิคที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการแยกบริสุทธิ์สารชีวโมเลกุลทุกชนิดคือ โครมาโทกราฟี (chromatography)

ก. โครมาโทกราฟีแบบดูดซับ (absorption chromatography)

โครมาโทกราฟีแบบดูดซับ เป็นโครมาโทกราฟีแบบที่ตัวกลางที่อยู่กับที่เป็นของแข็งที่มีสมบัติดูดซับสารต่าง ๆ และมีสารละลายทำหน้าที่เป็นตัวชะสารเหล่านั้น การแยกสารขึ้นอยู่กับความสามารถของตัวกลางที่อยู่กับที่ในการดูดซับสารแต่ละชนิดไว้ไม่เท่ากัน ระหว่างในการแยก

ข. โครมาโทกราฟีแบบอาศัยการแบ่งละลาย (partition chromatography)

วิธีโครมาโทกราฟีนั้นระหว่างสารตัวกลางและตัวชะตัวกลางมักเป็นของเหลวหรือก๊าซซึ่งติดอยู่กับตัวค้ำจุนสารที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์จะละลายในตัวกลางส่วนหนึ่ง อีกส่วนหนึ่งอยู่ในตัวชะ ดังนั้นจะมีการแบ่งละลายของสารระหว่างตัวกลางและตัวชะ อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของสารที่ละลายในตัวกลางและชะซึ่งเรียกว่าสัมประสิทธิ์ของการแบ่งละลาย (partition coefficient, K_p) จะมีค่าคงที่เสมอ

ค. โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion – exchange chromatography)

โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนมีตัวค้ำจุนจะเป็นโพลีเมอร์ ที่มีประจุทำหน้าที่เป็นตัวกลางที่อยู่กับที่ที่จับกับตัวถูกละลายในตัวกลางที่เคลื่อนที่ ตัวค้ำจุนที่มีตัวแลกเปลี่ยนประจุนี้เรียกว่า ion-exchange resin เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส(carboxymethyl cellulose) เป็นเซลลูโลสที่มีหมู่คาร์บอกซีเมทิล (carboxymethyl,CM) ซึ่งถือประจุลบจะจับกับสารที่มีประจุบวกโมเลกุลในตัวกลางที่เคลื่อนที่เรียกว่า ตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (cationic exchange) ในทางตรงข้ามถ้าตัวแลกเปลี่ยนถือประจุบวก เช่น โพลีสไตรีน

ง. แอฟฟินิตีโครมาโตรกราฟี (affinity chromatography)

แอฟฟินิตีโครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคที่ใช้ในการทำให้สารชีวโมเลกุลให้บริสุทธิ์อย่างมีประสิทธิภาพสูง โดยอาศัยสมบัติจำเพาะของสารที่ต้องการแยก เช่น ถ้าต้องการแยก concanavalin A ซึ่งเป็นโปรตีนจากพืชให้บริสุทธิ์ และเราทราบว่า concanavalin A ต่างจากโปรตีนชนิดอื่นที่สามารถจับกับน้ำตาลกลูโคส เราอาจสร้าง affinity column โดยตรึงน้ำตาลกลูโคสไว้กับตัวกลาง เมื่อผ่านสารผสม concanavalin A จะจับกลูโคสเมื่อล้างโปรตีนอื่นออกเราสามารถชะ concanavalin A ที่ต้องการออกได้โดยใช้สารละลายกลูโคสความเข้มข้นสูง

จ. เจลฟิลเตรชันโครมาโทกราฟี (gel filtration chromatography)

เจลฟิลเตรชันโครมาโทกราฟีหรือ gel exclusion หรือ molecular sieve chromatography เป็นเทคนิคการแยกสารผสมออกจากกันตามขนาดของโมเลกุล ในการแยกสารชีว-โมเลกุลขนาดใหญ่ออกจากสารที่มีขนาดเล็กมาก

เทคนิคทางโครมาโทกราฟีเป็นวิธีการซึ่งใช้แยกโมเลกุลต่าง ๆ ออกจากกันโดยอาศัยสมบัติต่าง ๆ ของโมเลกุล สำหรับเจลฟิลเตรชันนั้น เป็นโครมาโทกราฟีที่สามารถแยกโมเลกุลที่มีขนาดแตกต่างกัน และจัดเป็นเทคนิคหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการแยกสารที่มีมวลโมเลกุล ในช่วง 10 ,000 - 100,000 ดังนั้นจึงทำให้เจลโครมาโทกราฟีมีความสำคัญในการแยกสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ให้บริสุทธิ์ไม่ว่าจะเป็นกรดนิวคลีอิค โพลีแซคคาไรด์ ชีวโมเลกุลอื่น ๆ ด้วย เจลส่วนมากทำมาจากเด็กซ์ทราน อะกาโรสหรือโพลีอะคริละไมด์ และเจลเหล่านี้สามารถแยกออกได้หลายชนิดตามขนาดของรูพรุนเพื่อแยกสารในช่วงการแยกเหมาะสมกับสารที่ต้องการแยกด้วยดังตารางที่ 2.2 เป็นตัวอย่างเจลที่ใช้ในขนาดต่างๆ

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างเจลที่ใช้ในขนาดต่าง ๆ

ชื่อการค้า	ชนิดของเจล	ช่วงการแยกตามขนาด (Kd)
sephadex G-10	dextran	0.05-0.7
sephadex G-25	dextran	1-5
sephadex G-50	dextran	1-30
sephadex G-100	dextran	4-150
sephadex G-200	dextran	5-600
bio-Gel P-2	polyacrylamide	0.1-1.8
bio-Gel P-6	polyacrylamide	1-6
bio-Gel P-10	polyacrylamide	125-20
bio-Gel P-30	polyacrylamide	2.4-40
bio-Gel P-100	polyacrylamide	5-100
bio-Gel P-300	polyacrylamide	60-400
sepharose 6B	agarose	10-4,000
sepharose 4B	agarose	60-20,000
	agarose	70-40,000

ที่มา : บัณฑิต ลีละศาสตร์, 2540

ฉ. อิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis)

อิเล็กโตรโฟรีซิส เป็นคำที่ใช้อธิบายการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีประจุในสนามไฟฟ้า โพลีเมอร์ทางชีวภาพ (biological polymer) ส่วนใหญ่มีประจุจึงสามารถเคลื่อนใน

สนามไฟฟ้าได้ อาศัยสมบัติต่าง ๆ ของแมโครโมเลกุล (macromolecule) ตัวอย่างเช่น มวลโมเลกุลของโปรตีน ความแตกต่างของโมเลกุลในแง่ประจุสุทธิ รูปร่างของโปรตีน รวมทั้งการแยกโมเลกุลที่ต่างกันด้วย อิเล็กโตรโฟรีซิส สามารถแบ่งออก 2 ชนิดดังนี้

(1) อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบโพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) อิเล็คโตรโฟรีซิสแบบโพลีอะคริลาไมด์เจลหรือที่เรียกย่อๆ ว่า PAGE เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในงานวิเคราะห์โปรตีนและสารผสมโปรตีน ไอออนที่มีประจุเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ได้ โปรตีนก็เช่นเดียวกัน เป็นแมโครโมเลกุลที่มีประจุที่ pH ต่างๆ เพราะฉะนั้นจึงเคลื่อนที่ได้ในสนามไฟฟ้าและอัตราการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุ (charge density) ของโปรตีน ความหนาแน่นของประจุหมายถึงอัตราส่วนของประจุต่อมวล (charge/mass) ถ้าอัตราส่วนนี้สูงจะเคลื่อนที่ได้เร็ว เมื่อให้สนามไฟฟ้ากับสารละลายโปรตีนผสม โปรตีนแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกันทำให้แยกออกจากกันได้

(2) อิเล็คโตรโฟรีซิสแบบ SDS-โพลีอะคริลาไมด์เจล (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) ในปัจจุบันการทำ PAGE มักนิยมใช้สารซักฟอกที่มีชื่อว่า โซเดียมโดเดคิลซัลเฟตหรือ SDS ในระบบบัฟเฟอร์ร่วมกับสารที่สลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) การทำ PAGE ที่มี SDS เรียกว่า SDS-PAGE เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกหน่วยย่อยของโปรตีนและหามวลโมเลกุลของมัน SDS 1.4 กรัม/สายโพลีเมอร์เพพไทด์ 1 กรัม SDS-โพลีเพพไทด์คอมเพล็กซ์ (SDS-polypeptide complex) นี้มีรูปร่างเป็นแท่ง เนื่องจากสายโซ่โพลีเพพไทด์เมื่อถูกจับด้วย SDS จะคลายการขดเป็นสายยาว คอมเพลกซ์นี้มีประจุเป็นลบ(เนื่องจาก SDS ไปบดบังประจุของโปรตีน) ทุกคอมเพลกซ์จะเคลื่อนที่ไปในทางทิศทางเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน ที่ทราบมวลโมเลกุล จะทำให้ทราบถึงมวลโมเลกุลของสายโซ่โพลีเพปไทด์

2.4 การเสื่อมสภาพของเอนไซม์

การเสื่อมสภาพของเอนไซม์ เป็นการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน เป็นการเปลี่ยนแปลงสภาพตามธรรมชาติของโปรตีน (native conformation) ที่ปกติทำงานได้ดี ให้กลายเป็นโปรตีนที่ทำงานได้น้อยลงหรือสูญเสียหน้าที่ไป และยังอาจมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติอื่นๆของโปรตีนด้วย สาเหตุที่ทำให้การเสื่อมสภาพของเอนไซม์ ดังต่อไปนี้ (เนตรนภิส ธีระ ,2552)

2.4.1 สารเคมี (chemical agents)

ก. กรดหรือด่างแก่และตัวทำละลายอินทรีย์บางตัวจะทำลาย H-bond และ salt bridges reducing agents เช่น β-mercaptoethanol, dithiothreitol จะทำลายพันธะ disulfide ให้กลายเป็นหมู่ sulfhydryl ส่วน urea จะทำลาย H-bond และ hydrophobic interaction

ข. เกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ จะมีผลทำให้การละลายของโปรตีนดีขึ้นหรือแย่ลงได้ เช่น fibrous protein ปกติจะละลายน้ำได้ยาก ถ้ามีการเติมเกลือลงไปเล็กน้อยจะทำให้โปรตีนละลายน้ำได้ดีขึ้น (salting in) แต่ถ้าเติมเกลือมากเกินไป จะทำให้โปรตีนนั้นตกตะกอนลงมา (salting out)

ค. Detergents จะทำลาย hydrophobic interactions ของโปรตีน ทำให้สาย โพลีเพปไทด์ ยืดออกจากกันเป็นสายยาว

ง. โลหะหนัก (heavy metals) จะทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป เช่น ทำลาย salt bridges หรือโลหะหนักจับตัวกับหมู่ sulfhydryl ของโปรตีน ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนได้ เช่น Ag^{+}, Hg^{+2} และ Pb^{+2} ก็สามารถทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพได้ (ดนัย บุณยเกียรติ, 2552)

2.4.2. สภาพแวดล้อม

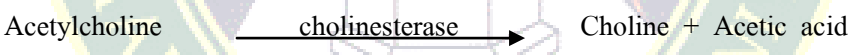
สภาพแวดล้อมที่ไม่ปกติ เช่น การเขย่าแรงๆจนเกิดฟอง (foaming), การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่สูงขึ้น ทำให้อณูของโปรตีนสั่นสะเทือนมากขึ้น ส่งผลให้ H-bond ซึ่งเป็นพันธะอย่างอ่อนถูกทำลายไปได้ นอกจากนี้ยังมี physical agents อย่างอื่นๆ เช่น ความดัน , ความเย็นจัดจนแข็ง, รังสี ultraviolet, x-ray, ultrasound ที่สามารถทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีนให้สูญเสียไปได้

โปรตีนบางอย่างเมื่อถูกทำให้คลายตัว (unfolding) และเสียสภาพธรรมชาติไป อาจทำให้กลับคืนสู่สภาพธรรมชาติได้อีก (renaturation) ถ้าสภาวะเหมาะสม เช่น pH ของตัวทำลายกลับคืนสู่สภาพที่เหมาะสม ถ้าโปรตีนนั้นเป็นเอนไซม์ เอนไซม์นั้นก็สามารถทำงานได้อีก การทำลายสภาพธรรมชาติบางครั้งก็เกิดขึ้นอย่างถาวร การแข็งเป็นลิ่มด้วยความร้อน (coagulation) เป็นการทำลายสภาพธรรมชาติอย่างหนึ่งของโปรตีน ที่ส่วนมากจะกลับคืนสู่สภาพเดิมไม่ได้ เช่น โปรตีนในไข่ขาว นั่นคือความร้อนจะทำให้โปรตีนถูกทำลายสภาพธรรมชาติก่อนแล้วจึงมีการแข็งตัวเป็นลิ่ม การแข็งเป็นลิ่มบางอย่างอาจเกิดจากปฏิกิริยาเคมี โดยเอนไซม์และปัจจัยต่างๆร่วมด้วย เช่น การแข็งเป็นลิ่มของเลือด การเสื่อมสภาพของเอนไซม์ (Denaturation) เมื่อโครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไปจนสารตั้งต้นรวมกับเอนไซม์ที่ บริเวณเร่งไม่ได้ จะทำให้คุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์หมดไป

ดังนั้น ในการสกัดเอนไซม์หรือการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ จึงมักต้องทำในที่ๆมีอุณหภูมิต่ำ เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของเอนไซม์จากความร้อน เมื่อสกัดออกจากเซลล์ความทนทานต่ออุณหภูมิสูงจะลดลง ออกซิเจน และสารที่เป็นสารออกซิไดซ์สามารถทำให้เอนไซม์หลายชนิดเสื่อมสภาพได้ โดยมักจะทำให้เกิดไดซัลไฟด์ บริดจ์ (Disulfide Bridges) ในลูกโซ่โพลีเพปไทด์ที่มี –SH ของกรดอะมิโนซีสเตอีน (Cysteine) สารรีดิวซ์สามารถทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพได้ จะไปทำลายไดซัลไฟด์ บริดจ์เกิดเป็น –SH 2 กลุ่ม

2. 5 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โคลีนเอสเตอเรสเป็นเอนไซม์ที่สลายตัวได้ง่าย เอนไซม์นี้ใช้ในการส่งกระแสประสาท มีอยู่ในสัตว์ทุกชนิด พบมากในสมองและน้ำเลือด ได้มีการสกัดเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส โดยบดสมองกับซิลิกาเจลและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ได้มีการวิจัยสกัดและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสจากสมองวัว สมองหมู และสมองไก่ โดยบดสมองกับซิลิกาเจลกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 จากนั้นทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนและเอธานอล แล้วนำสารสกัดที่ได้ในแต่ละขั้นตอนมาหาปริมาณโปรตีน ปริมาณเอนไซม์ และ specific activity ได้ผลดังนี้ พบว่า สารสกัดสมองที่มีปริมาณโปรตีนมากที่สุดคือ สมองหมู สมองวัว และไก่ตามลำดับ ส่วนปริมาณเอนไซม์ และ specific activity มากที่สุดคือ สมองไก่ สมองวัว และสมองหมู 0.00 6 units , 0.0058 units, 0.00046 units ตามลำดับ specific activity 3.2 x 10^{-7} units/mg protein, 3.0 x10^{-7} units/mg protein 2.0 x 10^{-8} units/mg protein ตามลำดับ (กิติพงษ์ ฟากเซ และ ชลิน ยิ้มพังเทียม, 2549) เนื่องจากสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟเฟต และกลุ่มคาร์บาเมตสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสได้ การวิเคราะห์สารปราบศัตรูพืชโดยใช้เอนไซม์ นี้จึง เป็นวิธีหนึ่งมีการใช้ตรวจหาสารปราบศัตรูพืชแบบไม่เฉพาะเจาะจง โดยใช้ตรวจหาสารในกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอ เฟต และกลุ่มคาร์บาเมตได้เกือบทุกชนิด เอนไซม์ชนิดนี้จะถูกยับยั้งโดยสารกลุ่มออร์กาโนฟอส เฟต และกลุ่มคาร์บาเมตที่ตกค้างอยู่ในอาหารและพืชผักอื่นๆ ทำให้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ เอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส เร่งปฏิกิริยาที่ใช้ อะซิติลโคลีน (acetyl choline, Ach) เป็นสารตั้งต้น แล้วเปลี่ยนเป็น ผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วย โคลีน (choline) และกรดอะซิติก (acetic acid) ดังปฏิกิริยา

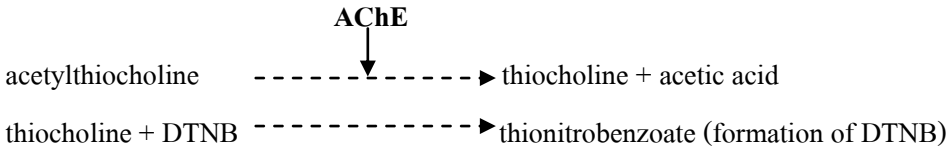


การวัดปริมาณสารปราบศัตรูพืชทำได้โดยวิธีต่างๆ เช่น โคลีนเอสเตอเรสทำปฏิกิริยาแล้วสามารถวัดอัตราการสลายตัวของอะซิติลโคลีนหรือวัดปริมาณโคลีนและกรดอะซิติกที่เกิดขึ้น หรือวัดปริมาณโคลีนเอสเตอเรสที่เหลืออยู่ก็ทำได้ (Stewart and stolmand, 1961 : 689-690)

การหาปริมาณเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสทำได้โดยการนำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ 6 ,000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที หลังจากนั้นนำมาผ่าน คอลัมน์ (column) แล้วนำส่วนที่ได้จากการผ่านคอลัมน์มาหาปริมาณเอนไซม์โดยใช้ 0.05 mL หลังจากนั้นเติม DTNB ลงไป 0.25 mL รอ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 412 nm (Ellman, G.L. ,1961)

ได้มีการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ AChE โดยนำตัวอย่างของสมองมา 20 mg เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 mL นำไปปั่นเหวี่ยงนำสารละลายใสด้านบนมาใส่ในคิวเวต 2.6 mL เติม ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

0.4 mL หลังจากนั้นเติม DTNB 100 μL และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 412 nm แล้วเติม สารตั้งต้น (acetylthiocholine iodide) 2 μL และวัดค่าการดูดกลืนแสงอย่างน้อยเป็นเวลา 6 นาที



การตรึงเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส จะทำให้เก็บได้นานและนำไปใช้งานได้สะดวกขึ้น เอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส จากสมองวัว และสมองหมูถูกตรึงบนอัลจินิกทำให้เสถียรภาพ และแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้น โดยทำการสกัดเอนไซม์ ด้วยการ บดสมองกับซิลิการเจลและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อหาปริมาณโปรตีนและทำบริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยความร้อน และเอทานอล ได้ผลดังนี้ พบว่าสารสกัดมีปริมาณโปรตีน 3.437-6.675 มิลลิกรัมต่อกรัมของสมอง ปริมาณเอนไซม์ตั้งแต่ $4.0 \times 10^{-6} - 5.8 \times 10^{-5}$ ยูนิตต่อกรัมของสมอง และ specific activity ตั้งแต่ $1.16 \times 10^{-6} - 8.68 \times 10^{-6}$ ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน จากนั้นได้นำสารสกัด fraction I ของสมองวัวมาทำการตรึงรูปด้วยกรดอัลจินิก แล้วทำการหาปริมาณโปรตีน ปริมาณเอนไซม์และ specific activity (ชนิษฐา อุดทา และอัคกะบัทคาน ปาทาน, 2550) การตรึงเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสบนสารที่ไม่เปียกน้ำ เช่น a-naphthylamine, benzylamine, Orp-methylbenzylamine groups ทำให้เข้มขึ้น 60-90 เท่า และ 700-1200 เท่า ใช้สำหรับทดสอบแบบสกรีน (Screening) ในกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส เอนไซม์ที่ตรึง รูปแล้วจะทนอุณหภูมิสูงขึ้น 110% หลังจากตรึงแล้วนาน 8 ชั่วโมง ยังทำงานได้ 82-88 % (Cao and et al. , 1995) การตรึงเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสไว้บนเมมเบรน Porex$^{(R)}$ Lateral-Flo^{TM} ทำให้สามารถเก็บเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสไว้ได้หลายเดือนที่อุณหภูมิห้อง ใช้สำหรับทดสอบสารปราบศัตรูพืชในน้ำบริโภคและน้ำประปา เป็นวิธีทดสอบที่ง่าย ราคาไม่แพง ใช้งานได้ดีวิธีหนึ่ง (Weetall and et al. , 2004)

การตรึงอะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (Acetyl cholinesterase, AchE) บน microtitration plate โดยใช้ gelatin หรือ BSA-trehalose film โดยตรึง AchE แบบแห้งพบว่าใช้สำหรับทดสอบสารปราบศัตรูพืชในน้ำ ผัก เลือด (Nguyen and et al, 1997) มีการตรึง AchE บน controlled porous glass beads (CPG) โดยมี acetylcholine เป็นสับสเตรท โดยใช้สารยับยั้งคือ paraoxon (diethyl-p-nitrophenylphosphate) แล้วใช้สาร 1,1 / - trimethylene bis (4-formylpyridinium bromide) dioxime เป็นสารทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้อีกครั้ง (Rodrigues, and et al, 1997) นอกจากนี้AchE ยังถูกตรึงบนผิวของ carbon-modified เพื่อที่จะนำไปใช้ในการตรวจวัดสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (Pontumma and Sritong kam, 2008) การตรึงเอนไซม์ไว้สำหรับใช้ในการตรวจสภาพการถูกยับยั้งของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส ทำให้สามารถบอกได้ว่ามีสารปราบศัตรูพืชตกค้างในอาหาร

และสิ่งแวดล้อมได้ นอกจากนี้ยังใช้ตรวจหาสารเคมีที่อยู่ในร่างกายได้ ในยุโรปกำหนดให้มีสารปราบศัตรูพืชในน้ำดื่มได้ไม่เกิน 1 µg/l การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารปราบศัตรูพืชตกค้างให้เป็นวิธีที่รวดเร็ว ค่าใช้จ่าย ไม่แพง ทำได้โดยใช้การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ หรือไบโอเซนเซอร์ (biosensors) มีการตรึงเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสเพื่อใช้ในการตรวจวัดคุณภาพและปริมาณสารออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตเป็นไบโอเซนเซอร์ส่วนใหญ่มีการใช้ เอนไซม์ โคลีนเอสเตอเรสจาก electric eel, bovine erythrocytes, human erythrocytes, butyrylcholine esterases จาก horse serum หรือ human serum การตรึงเอนไซม์ทำได้โดยใส่เอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสลงใน 500 mg ของแป้งข้าวเจ้าที่ผสมกับ 1.2 ml Tris buffer (pH 7.4) ผสมกันในขณะเย็นแล้วเทใส่ 3.3 ml ของ Tris buffer ผสมกับ 300 µlของ glycerine ที่ต้มให้ร้อนคนจนสารละลายใส แล้วทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 320 K ในอีกบิกเกอร์หนึ่งใส่ 50 mg ChE ละลายใน 600 µl ของ Tris buffer แล้วเทสารลงไปกวนในบิกเกอร์แป้งที่อุณหภูมิ 320 K แล้วล้างด้วย 600 µl ของ Tris buffer ปรับปริมาตรรวมเป็น 6 ml แล้วสารละลายแป้งผสมเอนไซม์ตรึงไว้บน polyurethane foam (10 × 10 × 0.6 cm) ทำให้เย็นในตู้เย็นที่ 278 K 1 ชั่วโมง เพื่อให้แป้งจับตัวเป็นเจล หลังจากนั้นเก็บในตู้ดูดความชื้นทำให้แห้ง 1 คืน แล้วตัดแผ่นที่ตรึงเอนไซม์เป็นชิ้นๆ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm (Pogacnik and Franko, 1999)

ได้ศึกษาการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสจากสารป้องกันกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสและคาร์บาเมตในน้ำคั้นผักและผลไม้โดยใช้หลักการที่สาร DTNB ทำปฏิกิริยากับโคลีนเกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสีเหลืองและดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้จากการสกัดเอนไซม์จากปลาไหลไฟฟ้า ใช้อะซิติลไธโอโคลีน จากการหากิจกรรมเอนไซม์ที่ 15 นาทีภายใต้อุณหภูมิ 37 ºC ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์และ สับสเตรทต่างๆ กันและทำการทดสอบผลของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต กลุ่มคาร์บาเมตต่อการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์พบว่าที่ความเข้มข้นของสับสเตรทและเอนไซม์ 1.2 µmolและ 0.02 unit เกิดกิจกรรมที่ดีที่สุด (รุ่งนภา ก่อประดิษฐ์สกุล และคณะ ,2547)

ได้มีการพัฒนาชุดทดสอบ เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส สำหรับการหาปริมาณสารปราบศัตรูพืชกลุ่ม ออร์กาโนฟอสฟอรัส และ คาร์บาเมต ที่ตกค้างในตัวอย่างทางการเกษตร โดยจะอาศัยวิธีของ Ellman และ ELISA เป็นแนวทางในการพัฒนา สำหรับการตรวจสอบสาร ออร์กาโนฟอสฟอรัส (OP) และคาร์บาเมต (CB) ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นจะเป็นแบบ Screening test มีการใช้AChEที่ถูกสกัดมาจากส่วนหัวของผึ้ง (*Apis mellifera* L.) มีการใช้ Triton X-100 เป็ตัวสกัด และมีการทำบริสุทธิ์โดยผ่าน 3 ขั้นตอน : diethylaminoethyl-cellulose chromatography (DEAE), affinity chromatography and membrane filtering และ Mono-Q column chromatography. และ Epoxy-activated Sepharose 6B affinity chromatography สำหรับการทำบริสุทธิ์ของ AChE การตรวจวัด ออร์กาโนฟอสฟอรัสและคาร์

บาเมต จะใช้หลักการที่ AChE เป็นตัวยับยั้งการแสดงสี (6 แถบ) หรือการไม่ปรากฏของแถบสีจำนวนหนึ่งในการทดสอบ ข้อจำกัดของการตรวจวัด ออร์กาโนฟอสฟอรัสและคาร์บาเมทที่ตกค้างในพืชผลทางการเกษตร และสารละลายมาตรฐานของสารปราบศัตรูพืช อยู่ในช่วง 0.50 ถึง 2.50 ppm และ 0.50 ถึง 4.75 ppm ตามลำดับ (Bo-Mee Kim et. all ,2007)

ได้มีการทดลอง เปรียบเทียบ หาสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส จากตัวอย่างเลือด โดยใช้วิธีการทดสอบ 2 วิธีระหว่าง Electrochemical กับ Ellman 's Photometric วิธี Electrochemical จะเป็นวิธีที่ใช้ อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส เป็นตัวยับยั้ง สามารถใช้ตรวจวัดได้ที่ pH 4 และความเข้มข้น 7 – 10 M ส่วนวิธีของ Ellman 's Photometric นี้สามารถใช้ในการตรวจวัดได้ที่ pH 5.2 และ ความเข้มข้น 10 - 7 M ซึ่งทั้งสองวิธีนี้มีความหมือนกัน แต่วิธี Electrochemical มีเครื่องมือที่ใช้งานได้สะดวก รวดเร็ว มีความถูกต้องแม่นยำ เป็นวิธีที่ง่าย ประหยัดเวลา และเสียค่าใช้จ่ายน้อยในการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังสามารถเป็นตัวตรวจวัดปริมาณของโลหะพื้นฐานได้อีกด้วย (Miroslav Pohanka et. all ,2008)

การทำโคลีนเอสเตอเรสให้บริสุทธิ์โดยการผ่าน column sephadex G-25 และ sephadex G-200 และหามวลโมเลกุลของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรสโดยใช้ electrophoresis (SDS-PAGE) ได้ค่ามวลโมเลกุล ประมาณ 63 ,000 ดาลดตัล (dalton) และหาปริมาณเอนไซม์โดยใช้ ATChI เป็นสารตั้งต้นใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.002 M ที่ pH 7.2 และสารDTNB แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 nm (Lif and Hanz. ,1974)

Richard L.Rotundo (1984) ได้ทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติเยื่อหุ้ม เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสจากสมองไก่ โดยจะตกตะกอนอะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) จากเยื่อหุ้มของสมองไก่แล้วทำให้บริสุทธิ์โดย gel fitration และวิธี Sodium dodecyl sulfate – gel electrophoresis เยื้อหุ้มที่ได้จาก AChE จะไม่ละลายน้ำ และถ้าจะรวมตัวกันจะต้องอาศัยความเข้มข้นและต้องปราศจากสารซักล้าง ซึ่งจะมีความเสถียรภาพในสารละลายเกลือเข้มข้น และสามารถแยกออกโดยการเติมสารซักล้าง antibodies รูปร่าง Polyconal และ monoclonal มีมากในสมองไก่ ดังนั้น AChE จะทำบริสุทธิ์ได้โดยใช้วิธี ion exchange chromatography, affinity chromatography และ preparative gel electrophoresis เป็นต้น

Süleyman Baykal.(1996) ได้ศึกษาสภาพการละลายของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ที่จับกับคอลลาเจนจากเรตินาไก่ โดยจะสกัดในสารละลายที่แตกต่างกัน นั้นคือสารละลายที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง สารที่แตกตัวสูง สารที่ไม่แตกตัวคล้ายสารซักล้าง และ EDTA เพื่อดูค่าการละลายที่เหมาะสมของคอลลาเจนที่จับกับ AChE จะพบว่าสารละลายที่มีความเป็นเกลือสูงและสารละลาย EDTA จะมีค่าการละลายของเอนไซม์ดีที่สุด ในการละลายสารสกัด AChE ใน EDTA ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง (ปราศจากสารซักล้าง) จะพบ Ca^{2+} ซึ่งเป็นธาตุที่ไม่ละลายน้ำ อย่างไรก็ตาม AChE สามารถ

แยกออกจากคอลลาเจน โดยการเติม EDTA ลงไป และยับยั้งโดยใช้ Triton x -100 หรือสารซักล้างเติมลงในบัฟเฟอร์ ซึ่งมี Ca^{2+} ปรากฏอยู่ ซึ่งถือได้ว่า AChE ที่จับกับคอลลาเจนจะประกอบด้วยไขมันที่เป็นกรด ซึ่งพันธะที่ไม่ละลายน้ำจะจับกับโปรตีน ดังนั้น Ca^{2+} น่าจะเป็นตัวเชื่อมโมเลกุลของไขมันให้เป็นเนื้อเยื่อ ถ้าจะเอาไขมันออกจาก AChE จะทำให้โมเลกุลมีสายสั้นลงและยังทำให้ Ca^{2+} สามารถเข้าทำปฏิกิริยาแยกคอลลาเจนได้

การวิเคราะห์หาปริมาณออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ตกค้างในผักและผลไม้ วิธีวิเคราะห์ทำโดยตัวอย่างจะผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี ลิควิด-ลิควิด (Liquid-Liquid Extraction ,LLE) และโซลิดเฟส (Solid – Phase Extraction , SPE) ก่อนแล้วจึงวิเคราะห์ด้วย GC หรือ HPLC (Cunniff , 1997) ซึ่งวิธีดังกล่าวทำในห้องปฏิบัติการ มีความยุ่งยากซับซ้อน เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ มีราคาแพง ผู้ทำการวิเคราะห์ต้องมีความชำนาญสูง ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ต้องเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ค่าใช้จ่ายในการในการวิเคราะห์สูง ต่อมากรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขได้พัฒนาชุดทดสอบขึ้นมาใช้ (กองวิเคราะห์อาหาร , 2544) หน่วยงานต่าง ๆ ทั้งภาครัฐและเอกชนนำชุดทดสอบนี้ไปใช้ในการตรวจสอบสารฆ่าแมลงในภาคสนาม (นุชนารถ จงเลขาและคณะ , 2542) แต่มีปัญหาในการใช้เนื่องจากพืชผักบางชนิดมีสี ทำให้อ่านผลได้ไม่ตรงกับความจริง ประกอบกับสารบางชนิดในชุดทดสอบสลายตัวได้ง่าย ทำให้ต้องเก็บรักษาชุดทดสอบดังกล่าวในตู้เย็น ดั้งนั้นจึงไม่ค่อยสะดวกในการใช้งานในภาคสนาม

ชุดน้ำยาตรวจสอบสารพิษตกค้าง/ยาฆ่าแมลง “จีที” (กัลยวัจณ์ ธูปหอม, 2550) ใช้หลักการทำงานของ cholinesterase inhibition technique เป็นวิธีกึ่งมาตรฐาน ใช้คัดกรองตัวอย่างที่ไม่ปลอดภัยเนื่องจากมีพิษตกค้างจากยาฆ่าแมลง โดยอาศัยหลักการที่ความเป็นพิษตกค้างจากยาฆ่าแมลงทำให้การทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสลดลงตั้งแต่ ร้อยละ 50 ขึ้นไปเป็นเกณฑ์บอกความไม่ปลอดภัย โดยใช้เวลาในการตรวจสอบประมาณ 30-60 นาที สามารถตรวจได้ครั้งละหลายตัวอย่าง ราคาถูก เหมาะสำหรับตรวจผัก และผลไม้ ก่อนวางจำหน่าย

ชุดตรวจสอบอย่างง่าย (Screening test) ใช้รวดเร็ว บอกได้ว่ามี หรือไม่มี ผลิตในอเมริกา ใช้หลักการที่เอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสทำให้อะซิติลไธโอโคลีนเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นไธโอโคลีน แล้วไธโอโคลีนทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ (Ellman’s reagent) เกิดสารประกอบได้สีเหลือง ชุดตรวจสอบนี้เรียกว่า Cholinesterase Screen Microwell Plate Assay ใช้ตรวจสอบออร์กาโนฟอสฟอรัส และคาร์บาเมต ในธัญพืช อาหาร น้ำดื่ม น้ำบาดาล และน้ำบ่อ ขีดจำกัดต่ำสุด (limit of detection) ของชุดตรวจสอบนี้ เท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดตรวจสอบนี้ตรวจได้เร็ว ประหยัดแรงงาน ค่าใช้จ่ายและเวลา (Envirologix Inc., 2550)

ชุดตรวจสอบสารพิษตกค้าง ผลิตในฟิลิปปินส์ ใช้ตรวจสอบสารฆ่าแมลง ส ารกำจัดวัชพืช และสารกำจัดเชื้อรา ในผลไม้ ผัก ดิน น้ำ และเมล็ดธัญพืชได้ สามารถทำได้ในภาคสนาม ในตลาด และในบ้าน ชุดตรวจสอบสารพิษตกค้างทำได้ง่าย ไม่ต้องมีความเชี่ยวชาญ อ่านผลได้ง่าย ผลการตรวจรวดเร็วตรวจสอบสารฆ่าแมลงภายใน 5 นาที ตรวจส ารกำจัดวัชพืช และสารกำจัดเชื้อราภายใน 30 นาที ในขณะที่ตรวจด้วยวิธีมาตรฐานใช้เวลาตรวจ 3 วัน และมีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์สูง ชุดตรวจสอบสารพิษตกค้าง มีการสกัดตัวอย่างแล้วหยดบนกระดาษ(Y, Xiuhua.,1999) หยดรีเอเจนต์ทับลงไป อ่านผลโดยดูสีที่เกิดขึ้นบนกระดาษ (Food&Fertilizer Technology Center, 2549)

Organophosphorus pesticide residue rapid inspection test ผลิตในประเทศจีน ใช้ตรวจสอบออร์กาโนฟอสฟอรัส ใช้ทดสอบคุณภาพ (qualitative detection)ในผัก และผลไม้ ใช้เวลาตรวจสอบภายใน 25 นาที (Nankai, 2550)

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอนไซม์

เอนไซม์**(enzyme)** เป็นโปรตีนมีบทบาทที่สำคัญในร่างกายของสิ่งมีชีวิตเพราะเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น เอนไซม์ ในกระบวนการหายใจ การสังเคราะห์โปรตีน ถ้าเอนไซม์ทำหน้าที่ย่อยอาหารจะเรียกว่า น้ำย่อย เช่น อะไมเลส เพปซิน ไลเปส เป็นต้น เอนไซม์เป็นโปรตีนก้อนกลม (globular protein) ประกอบด้วยโซ่พอลิเพปไทด์ขดม้วนแน่นในลักษณะกลม โครงสร้างของโปรตีนพวกนี้ประกอบด้วยเกลียวแอลฟา และโครงรูปเบตาในปริมาณต่างๆกัน โดยมีหมู่ R ที่โพลาร์ของกรดอะมิโนอยู่ด้านนอกของโมเลกุล และหมู่ R ที่ไม่โพลาร์อยู่ด้านในของโมเลกุล เอนไซม์เกือบทุกชนิดส่วนใหญ่ละลายน้ำได้ โดยทั่วไปเอนไซม์ส่วนใหญ่เป็นโปรตีน ยกเว้น ไรโบไซม์ (ribozyme) ซึ่งเป็นกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid, RNA) ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ของ RNA

ในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ร่วมด้วยนั้น โมเลกุลของสารตั้งต้น (substrate) จะถูกเอนไซม์เปลี่ยนสภาพเป็นผลผลิตหรือ ผลิตภัณฑ์ (products) กระบวนการส่วนใหญ่ในเซลล์ในสิ่งมีชีวิตต้องการเอนไซม์ แต่เอนไซม์มีคุณสมบัติที่ต่างจากตัวเร่งปฏิกิริยาทั่วไปคือ เอนไซม์มีความจำเพาะกับสารตั้งต้น เนื่องจาก เอนไซม์ที่มีความจำเพาะ (selective) กับสารตั้งต้น และเร่งปฏิกิริยาของสิ่งมีชีวิต จะพบเอนไซม์ในเนื้อเยื่อและของเหลวในร่างกายทุกชนิด นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์บนเยื่อหุ้มเซลล์ ในระบบหมุนเวียนโลหิต อีกด้วย เอนไซม์มีคุณสมบัติเหมือนตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีทั่วไป เอนไซม์ทำงานด้วย การลดพลังงานกระตุ้น (activation energy)ในปฏิกิริยาเคมี เอนไซม์จะไม่สูญสลายไปกับปฏิกิริยาหรือเปลี่ยนรูปเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ (พรกมล สาฆ้อง,2542)

2.1.1 การจำแนกและการเรียกชื่อเอนไซม์

การจัดแบ่งหมู่และการเรียกชื่อของเอนไซม์ มีวัตถุประสงค์ เพื่อจะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารที่เข้าทำปฏิกิริยา และชนิดของปฏิกิริยาที่เอนไซม์นั้นเข้าไปทำหน้าที่เป็นตัวเร่ง การเรียกชื่อเอนไซม์แต่เดิมนั้นไม่ได้บอกให้ทราบเรื่องราวที่เกี่ยวข้องเลย การแบ่งหมู่เอนไซม์ตามระบบของสหพันธ์ชีวเคมีนานาชาติ (International Union of Biochemistry : IUB) อาศัยหลักการดังนี้คือ

ก. แบ่งชนิดของปฏิกิริยาที่เอนไซม์ทำหน้าที่เร่งออกเป็น 6 พวกใหญ่ ๆ แต่ละพวกมีพวกย่อยอีกประมาณ 4 – 13 พวก

ข. ชื่อเอนไซม์มีสองส่วน ส่วนต้นหมายถึง สารตั้งต้น (อาจมีมากกว่าหนึ่ง) ส่วนปลายซึ่งลงท้ายด้วย –ase หมายถึงชนิดของปฏิกิริยา ดังนั้น คำ –ase จึงมาอยู่ท้ายชื่อปฏิกิริยาแทนที่จะอยู่ท้ายชื่อสารตั้งต้นเหมือนที่เคยเรียกชื่อเดิม

ค. หากต้องการเพิ่มข้อมูลเพื่อความกระจ่างชัดของเอนไซม์ ก็อาจใส่ไว้ในวงเล็บข้างท้าย ตัวอย่างเช่น เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

$$\text{L-malate} + NAD^{+} \longrightarrow \text{pyruvate} + CO_2 + NADH + H^{+}$$

เดิมชื่อเอนไซม์มาเลต (malate enzyme) ถ้าเรียกตามระบบ IUB ก็เป็น L-malate :NAD oxidoreductase (decarboxylating)

ง. เอนไซม์ทุกตัวจะมีเลขรหัสประจำตัว (enzyme comission number, E.C. number) ประกอบด้วยเลข 4 ชุด เช่น malate enzyme ในข้อ ค ข้างบนมีเลขรหัส E.C. 1.1.1.37 เลข 1 ตัวแรกหมายถึงพวกใหญ่ (main class) คือ oxidoreductase เลข 1 ตัวที่สองหมายถึงเลขย่อย (sub - class) คือมีหมู่ –CH-OH เป็นผู้ให้อิเล็กตรอน เลข 1 ตัวที่สามหมายถึง พวกย่อยรองลงไป (sub-sub-class) คือมี NAD^{+} เป็นผู้รับอิเล็กตรอน และเลขชุดที่สี่ คือ 37 หมายถึงลำดับที่ของเอนไซม์ตัวนั้นในพวกย่อยรองอีกทีหนึ่ง (มนตรี จุฬาวัฒนกล และคณะ, 2542)

2.1.2 การวัดปริมาณงานของเอนไซม์

การหาปริมาณเอนไซม์ในสารตัวอย่างชีวภาพทำได้ลำบากเนื่องจากมีเอนไซม์จำนวนน้อยในสารตัวอย่างนั้น และเอนไซม์มีสภาพเป็นโปรตีน และในสารตัวอย่างชีวภาพนั้น ๆ ก็มีโปรตีนอื่นจำนวนมาก การที่จะวัดปริมาณเอนไซม์ด้วยวิธีทางเคมีที่ใช้วัดปริมาณโปรตีนทั่วไปย่อมใช้ไม่ได้ แต่เนื่องจาก เอนไซม์มีคุณสมบัติเฉพาะตัว คือสามารถเร่งปฏิกิริยาเฉพาะ เจาะจง ได้อย่างรวดเร็วแม้มีปริมาณเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงสามารถวัดอัตราเร็วของปฏิกิริยา (rate of reaction) ที่เอนไซม์นั้นทำงานได้ ซึ่งอัตราเร็วนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณเอนไซม์ที่มีอยู่ ถ้ามีเอนไซม์ บริสุทธิ์นำมาวัดอัตราเร็วของปฏิกิริยาเทียบกับเอนไซม์ในสารตัวอย่าง ก็อาจคำนวณน้ำหนัก (ไมโครกรัม) ของเอนไซม์ในสารตัวอย่างนั้น ๆ ได้

2. 1.3 การเกิดปฏิกิริยาเคมีและกลไกการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์

การเกิดปฏิกิริยาเคมี คือ การที่สารตั้นต้นมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลิตภัณฑ์ ปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์มาเกี่ยวข้อง สารตั้งต้นจะต้องมีการสัมผัสชนกันกับเอนไซม์เสียก่อน เกิดเป็นเอนไซม์ซับสเตรตคอมเพล็กซ์ (ES-complex) การสัมผัสชนกันนี้จะต้องมีพลังงานเกิดขึ้น เพียงพอที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาได้

2.1.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์

อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งนั้น สิ่งที่มีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์ มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา เช่น เวลา, อุณหภูมิ, ภาวะความเป็นกรด-เบส (pH), ปริมาณของเอนไซม์, ปริมาณของสารตั้งต้น และการสัมผัสเอนไซม์และสารตั้งต้นเป็นต้น การวัดอัตราการทำงานของเอนไซม์นั้นสามารถกระทำได้ 2 แบบ คือวัดปริมาณของ สารตั้งต้น ที่หายไปและหรือวัดปริมาณของผลิตผลที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาต่อหนึ่งหน่วยเวลา

ก. การสัมผัสเอนไซม์และสารตั้งต้น

ก่อนที่สารตั้งต้นถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตผล จะต้องรวมกับเอนไซม์เป็นสารเชิงซ้อนเสียก่อน ฉะนั้นการที่จะให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดี จะต้องมีการสัมผัสระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้น สำหรับสารตั้งต้นที่ละลายน้ำได้นั้นไม่มีปัญหาเรื่องนี้ ถ้าสารตั้งต้นไม่ละลายน้ำ เช่น สารตั้งต้นจำพวกไขมันเป็นต้น จึงมีกลไกพิเศษช่วยให้เอนไซม์เข้าไปพบกับไขมัน การย่อยอาหารต่างๆ ในลำไส้เล็กซึ่งถึงแม้จะไม่อยู่ในรูปสารละลาย แต่ก็เป็นไปอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เพราะมีการผสมคลุกเคล้าอย่างดีระหว่างเอนไซม์ และอาหารอยู่ตลอดเวลาด้วยการเคลื่อนไหวของลำไส้ การย่อยไขมันซึ่งไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับเอนไซม์ก็ถูกทำให้เป็นอิมัลชัน โดยมีน้ำดีเป็นตัวช่วยทำให้ได้ไขมันเป็นหยดเล็ก ๆ มีพื้นผิวเพิ่มมากขึ้น สามารถสัมผัสกับเอนไซม์ได้ดีขึ้น

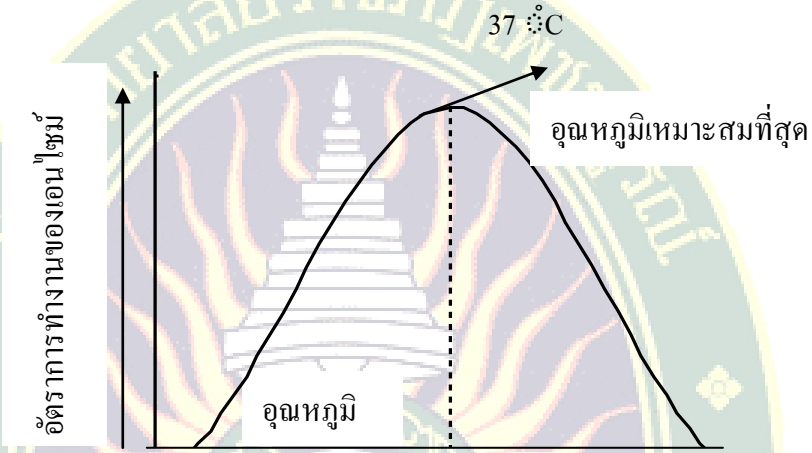
ข. ความเข้มข้นของเอนไซม์และสารตั้งต้น

ในปฏิกิริยาเอนไซม์มีผล ทำให้ให้ปฏิกิริยาถึงสมดุลช้าหรือเร็วเท่านั้นเอง ดังนั้นถ้าให้เวลานานพอการใช้เอนไซม์จำนวนเล็กน้อยหรือจำนวนมากจะให้ผลเท่ากัน คือ สารตั้งต้นทั้งหมดจะถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์เหมือน ๆ กัน ความเข้มของสารตั้งต้นจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นด้วยจนถึงจุดหนึ่งจะหยุดคงที่ กล่าวคือ เมื่อให้ความเข้มข้นของ สารตั้งต้นคงที่แต่เปลี่ยนแปลงปริมาณของเอนไซม์พบว่า การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ (พรกมล สาฆ้อง,2542)

ค. อุณหภูมิ

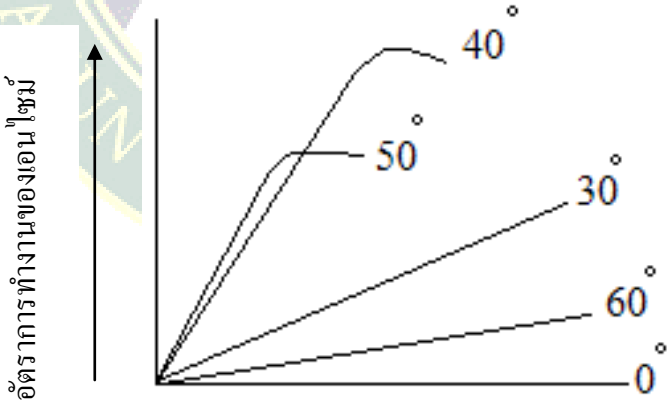
การเพิ่มอุณหภูมิมีผลต่อปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ได้ทั้งทางบวก และทางลบ คือถึงแม้การเพิ่มของอุณหภูมิจะช่วยเร่งอัตราเร็วของปฏิกิริยา แต่ในขณะเดียวกันการเพิ่มอุณหภูมิก็จะทำให้เอนไซม์เปลี่ยนสภาพได้ง่ายขึ้น และถ้าเพิ่มอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ(denaturation) อัตราเร็วของปฏิกิริยาจึงไม่อาจเพิ่มตามอุณหภูมิเสมอไป จะมีอุณหภูมิหนึ่งเท่านั้นซึ่งเรียกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด (optimum temperature) ดังแสดงในภาพที่ 2.1 ซึ่งถ้าอุณหภูมิสูงกว่านี้อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะลดลง เนื่องจากสภาพเอนไซม์เปลี่ยนไปจากเดิม เอนไซม์ ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่มีค่าอุณหภูมิเหมาะที่สุดประมาณ 37 ๐C ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นเอนไซม์จะทำงานได้ช้าลงและถ้าอุณหภูมิ 70 - 80 ๐C เอนไซม์จะไม่ทำงานเร่งปฏิกิริยาได้เลย แต่มีเอนไซม์ในจุลินทรีย์

บางชนิด เช่น แบคทีเรียที่อาศัยตามน้ำพุร้อน หรือปากปล่องภูเขาไฟสามารถทำงานในอุณหภูมิที่สูงใกล้จุดเดือดของน้ำได้ และจากภาพที่ 2.2 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ส่วนใหญ่ทำงานได้ดีที่ 37 ๐ C และลดลงเมื่ออุณหภูมิต่ำลง โดยเฉพาะที่ 0 ๐ C กล่าวได้ว่าไม่มีปฏิกิริยาเกิดขึ้นเลย ในทางปฏิบัติ เมื่อต้องการรักษาเอนไซม์ไม่ให้เร่งปฏิกิริยา มักจะเก็บเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิต่ำเช่น - 4 ๐C (ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์, 2535)



ภาพที่ 2. 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาเพื่อแสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์

ที่มา : พรกมล สาม้อง ,2542

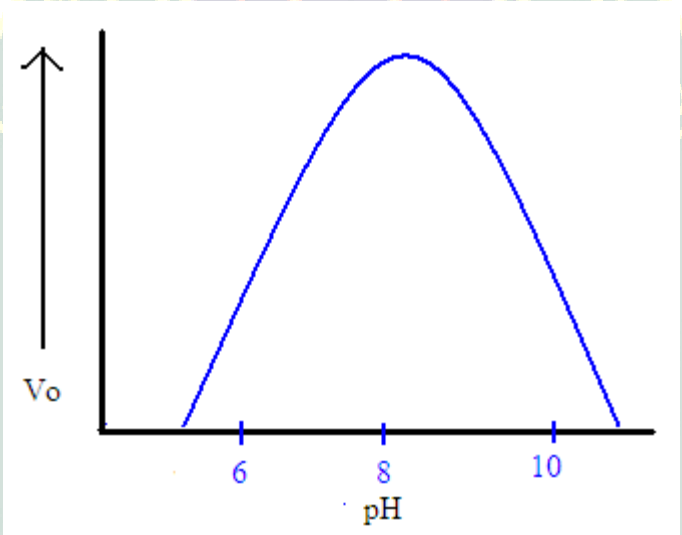


ภาพที่ 2.2 ผลของอุณหภูมิ(๐C) ต่อการทำงานของเอนไซม์

ที่มา : ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์ ,2535

ง. ความเป็นกรด – เบส ต่ออัตราการเร็วของปฏิกิริยา

เอนไซม์เป็นโปรตีนที่มีสภาพไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงของ pH เพียงเล็กน้อยอาจจะทำให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลงหรือเพิ่มขึ้นได้ เอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดที่ pH หนึ่งเท่านั้นเรียกว่า พีเอชที่เหมาะสมที่สุด (optimum pH) ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงค่า pH ระหว่าง 5-9 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ เมื่อเขียนเส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์กับภาวะความเป็นกรด – เบส จะได้รูปกราฟเป็นรูประฆังคว่ำ ดังภาพที่ 2.3

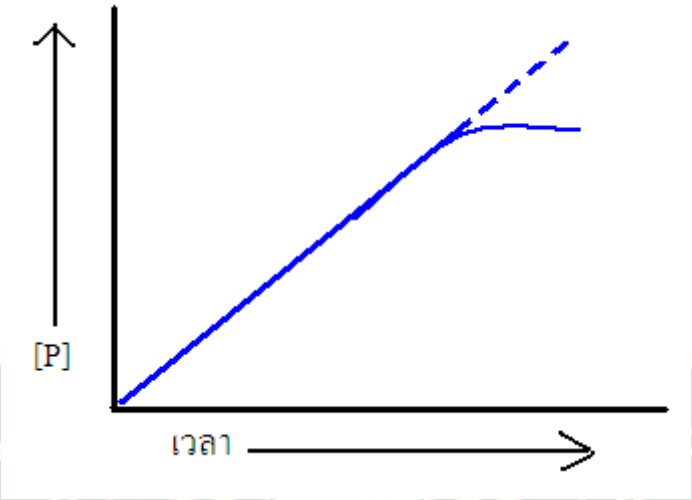


ภาพที่ 2.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์กับภาวะความเป็นกรด – เบส
ที่มา : พจน์ ศรีบุญลือ และคณะ ,2540

จ. เวลา

เวลามีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เมื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมที่สุด แล้วติดตามการทำงานของเอนไซม์เป็นระยะๆ พบว่าเมื่อนำผลที่ได้มาเขียนเป็นเส้นกราฟโดยให้แกนนอนแทนด้วยระยะเวลา แกนตั้งแทนด้วยปริมาณผลิตผลของปฏิกิริยาหรือปริมาณสารตั้งต้นที่หายไป เรียกเส้นกราฟนี้ว่า time – course curve ดังภาพที่ 2.4 ซึ่งจากกราฟพบว่าในระยะช่วงแรกๆเส้นกราฟจะเป็นเส้นตรง ปริมาณของผลิตผลที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อเวลา แต่เมื่อ เวลาผ่านไปนานๆ ผลิตผลที่ได้จะมีปริมาณน้อยลงและไม่แปรผันตรงกับเวลา กราฟจะเป็นเส้นโค้ง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาเหตุ เช่น ปริมาณของสารตั้งต้นที่เหลือมีจำนวนน้อยลงเพราะถูกใช้ไปมากแล้ว หรือปริมาณของผลิตผลเพิ่มมากขึ้นถึงระดับที่ทำให้ปฏิกิริยาเข้าสู่จุดสมดุลหรือเกิดการ

ยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ดังนั้นในทางปฏิบัติจึงต้องทำปฏิกิริยาภายในระยะเวลาสั้นๆ (พจน์ ศรีบุญลือ และคณะ ,2540)



ภาพที่ 2.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของผลิตผลกับเวลาของการทำงานของปฏิกิริยาเอนไซม์
ที่มา : พจน์ ศรีบุญลือ และคณะ ,2540

ฉ. สารยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (enzyme inhibitors)

การทำงานของเอนไซม์สามารถหยุดยั้งได้ด้วยตัวยับยั้งเอนไซม์ ตัวเร่งเอนไซม์คือโมเลกุลที่ช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ ยาและยาพิษส่วนมากเป็นตัวยับยั้ง และส่งเสริมเอนไซม์การแพทย์และเภสัชกรรมด้วยยาต่าง ๆ หลายชนิดที่รักษาโรคเนื่องจากไปยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์บางปฏิกิริยา เช่น พวกยาปฏิชีวนะมีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เป็นต้น

2.1.5 การยังยั้งการทำงานของเอนไซม์

สารยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ มีทั้งสารอนินทรีย์ และสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ที่ยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เช่น โลหะหนักต่างๆ เป็นต้น สารอินทรีย์ที่ยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เช่น สารประกอบฟีโนลิค หรือโปรตีน เป็นต้น สารยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์สามารถเป็นออกได้ 2 พวก โดยดูตำแหน่งที่มันเข้าทำการยับยั้ง คือ 1. สารที่เข้าร่วมกับเอนไซม์ในตำแหน่งเดียวกับสารตั้งต้น หรือบริเวณเร่ง(catalytic site) 2.สารที่เข้าร่วมในตำแหน่งอื่นซึ่งเรียกว่าตำแหน่งแอลโลสเตลิก (allosteric siteหรือ active site)

2.1.6 ความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ (specificity of enzyme)

เอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจง คือเร่งการเปลี่ยนแปลงของสารเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง ได้แก่ ความจำเพาะเจาะจงแบบสมบูรณ์ (absolute specificity) ความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของหมู่ธาตุ (group specificity) ความจำเพาะเจาะจงชนิดของปฏิกิริยาหรือชนิดของพันธะเคมี (reaction of linkge specificity) ความจำเพาะเจาะจงต่อลักษณะการจัดวางตัวของหมู่ธาตุ (stereo chemical specificity)

2.2 เอนไซม์ อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (acethylcolinesterase) เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการทำลายสารอะซิติลโคลีนซึ่งเป็นตัวกลางสำคัญในการรับส่งสัญญาณระหว่างเซลล์หรือสารสื่อประสาทซึ่งจะหลั่งออกมาจากปลายของใยประสาทอัตโนมัติซึ่งเส้นประสาทเหล่านี้จะส่งกระแสประสาทไปยังอวัยวะและเนื้อเยื่อต่างๆในร่างกาย อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสมีพบมากในสัตว์มีกระดูกสันหลัง สามารถสกัดออกมาได้จากสัตว์หลายชนิด สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก ปลา สัตว์เลื้อยคลาน และแมลง รวมทั้งพบในอวัยวะที่ทำให้เกิดไฟฟ้าของปลา เม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เนื้อเยื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและแมลง เอนไซม์นี้ที่อยู่ในระบบประสาทส่วนกลาง อวัยวะ และต่อมต่างๆ ถูกควบคุมการทำงานด้วยระบบประสาทอัตโนมัติส่วนที่เรียกว่า พาราซิมพาเทติก (parasympathetic) เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วยสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตที่มีความเข้มข้นต่ำประมาณ 10^{-5}M เมื่อร่างกายได้รับสารที่ยับยั้งการทำงานของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสแล้ว ก็จะมีการสะสมของสารอะซิติลโคลีนขึ้นในร่างกาย สารอะซิติลโคลีนจะไปกระตุ้นตัวรับของตัวมัน ทำให้มีการส่งกระแสประสาทอยู่ตลอดเวลา

อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสจะทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 40 ๐C และจะเสียสภาพไปที่อุณหภูมิ 60 ๐ C และ pH ที่เหมาะสมคือ 7.5-9 และตัวยับยั้งคือ 1,5-bis(4-allyldimethylammonium phenyl pentan-3-one) และเสียสภาพด้วยแอลกอฮอล์ที่ 78 % (ศศิธร แท่นทองและคณะ,2550)

2. 2.1 อาการที่เกิดขึ้นตามแหล่งที่สะสมของอะซิติลโคลีน

สารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต และ คาร์บาเมตมีความเป็นพิษต่อระบบประสาท มีผลต่อเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส (cholinesterase) มีการจับกับเอนไซม์เอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสจะทำให้เกิดพิษแล้วสลายตัวได้เอง พิษเกิดจากการต้านโคลีนเอสเตอเรส มีผลต่อกล้ามเนื้อเรียบ เช่น หัวใจ และกระเพาะอาหารทำให้เกิดอาการคั่งของอะซิลโคลีนในปริมาณน้อย ๆ จะมีฤทธิ์กระตุ้น แต่เมื่อปริมาณมากกลับออกฤทธิ์ทำลายหรือทำให้เป็นอัมพาต อาการที่แสดง พิษเริ่มด้วยคลื่นไส้ วิงเวียน อ่อนเพลีย กล้ามเนื้อหดตัวเป็นหย่อม ๆ แน่นหน้าอก นอกจากนี้มีอาการอาเจียน ท้องเดิน ตาพร่า น้ำลายออก

มากกว่าปกติ และซึมลง อาการรุนแรงทำให้หมดสติน้ำลายฟูมปาก การตายเกิดจากการหายใจล้มเหลว ทำให้ ป่วย และตายได้ ในแมลง และเป็นพิษกับคนด้วย (ศศิธร แท่นทอง และคณะ, 2550)

อาการที่เกิดขึ้นตามแหล่งที่สะสมของอะซิติลโคลีน แบ่งได้ดังนี้

ก. อาการทางประสาท จะเกิดอาการเบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดิน น้ำตาไหล เหงื่อออก ม่านตาหดตัว กล้ันอุจจาระไม่ได้ มีเสมหะมาก

ข. อาการทางกล้ามเนื้อ จะเกิดอาการกระตุกของกล้ามเนื้อโดยเฉพาะที่ลิ้น บริเวณหน้าและลำคอ หรือกระตุกทั่วร่างกาย เกิดอาการอ่อนเพลียและเป็นอัมพาต

ค. อาการทางสมอง จะเกิดอาการปวดศีรษะ มึนงง อาจชักและหมดสติได้

2. 2.2 การยับยั้งอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสโดยสารกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต

สารออร์แกโนฟอสเฟตถูกนำมาใช้เป็นสารกำจัดแมลงกันอย่างแพร่หลาย สารนี้มีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ได้ 2 วิธี วิธีแรกคือ ยับยั้งโดยตรง เช่น ไดโคลวอส (Dichlovos) วิธีที่สองยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยทางอ้อม เมื่อออร์แกโนฟอสเฟตเข้าสู่ร่างกายจะเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีทำให้เกิดสารใหม่ที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกาย โดยเกิดกระบวนการออกซิเดทีฟดีซัลฟูเรชัน (oxidativedesulfuration) ในสูตรโครงสร้างทั่วไปของออร์แกโนฟอสเฟตจากตำแหน่ง P=S เปลี่ยนเป็น P=O โดย mixed function oxidases (MFO) ที่อยู่ใน endoplasmic reticulum ในตับ ลำไส้ ไต และปอด ทำให้ สารใหม่ที่เกิดขึ้นใหม่มีความเป็นพิษมากกว่าเดิม ตัวอย่างเช่น พาราไทออน มาลาไทออน เป็นต้น

สารอะซิติลโคลีน ที่ไม่ถูกไฮโดรไลซ์ ทำให้เกิดการสะสมของอะซิติลโคลีนบริเวณรอยต่อของเซลล์ประสาทมากขึ้นจึงเกิดการกระตุ้นของเซลล์ประสาทหรือกล้ามเนื้อบริเวณนั้นอย่างต่อเนื่อง มีผลทำให้เกิดการเหนื่อยล้าและอาการชักต่อเนื่องอย่างรุนแรง

2.3 เทคนิคการแยก

สารที่สนใจในการวิเคราะห์ถูกแยกออกจากสารที่รบกวนในการวิเคราะห์โดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมีและทางฟิสิกส์ที่ต่างกัน เทคนิคในการแยกมีหลายวิธีดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 การจำแนกเทคนิคในการแยก

สมบัติพื้นฐานที่ใช้ในการแยก	เทคนิคในการแยก
ขนาด	กรอง, ไดอะไลซีส (dialysis),ไซซ์เอกซ์คลูซันโครมาโทรกราฟี (size – exclusion chromatrography)
มวลและความหนาแน่น (density)	การหมุนเหวี่ยง (centrifugation)
การทำให้เกิดสารประกอบ(complex formation)	การเติมรีเอเจนต์ลงไปเพื่อใช้ป้องกันการรบกวนอันเนื่องจากส่วนประกอบอื่น ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างที่มีผลต่อสัญญาณของสารที่สนใจในการวิเคราะห์ภาษาอังกฤษที่ใช้คำว่า masking
เปลี่ยนสถานะทางฟิสิกส์(change in physical state)	การกลั่น (distillation),การระเหิด (sublimation),การตกผลึกใหม่ (recrystallization)
เปลี่ยนสถานะทางเคมี(change in chemical state)	การตกตะกอน (precipitation),การแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange),การแยกโดยใช้ขั้วไฟฟ้า (electrodeposition), การทำให้เกิดไอ (volatilization)
การแบ่งส่วนระหว่างเฟส (partitioning between phase)	การสกัด (extraction) โครมาโทรกราฟี (chromatrograpy)

ที่มา: (Harvey, 2000 : 205)

1.4 การแยกโดยอาศัยขนาด

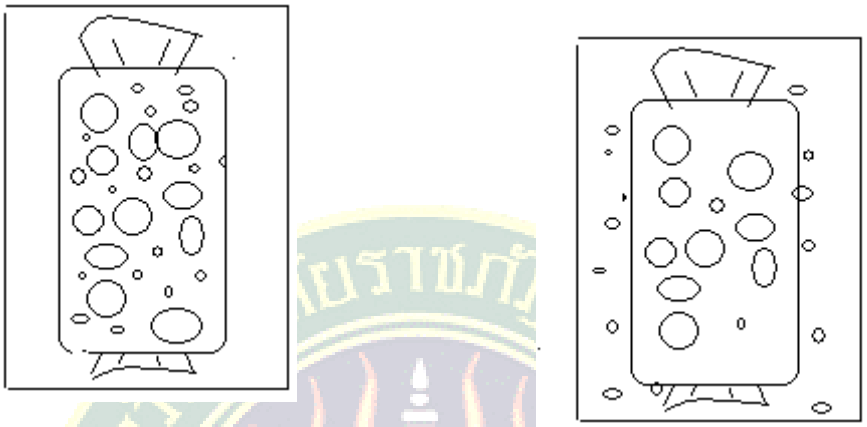
การแยกโดยอาศัยขนาดเป็นการแยกอย่างง่ายโดยอาศัยสมบัติทางฟิสิกส์ โดยอาศัยขนาดที่ต่างกันเพื่อแยกสารที่สนใจวิเคราะห์กับสิ่งที่รบกวนออกจากกัน เทคนิคการแยกโดยอาศัยขนาดแบ่งออกดังนี้

1.4.1 การกรอง

การแยกโดยอาศัยขนาดเป็นการแยกอย่างง่ายโดยอาศัยสมบัติทางฟิสิกส์ โดยอาศัยขนาดที่ต่างกันเพื่อแยกสารที่สนใจวิเคราะห์กับสิ่งที่รบกวนออกจากกัน การกรองเมื่อใช้กระดาษกรองที่มีขนาดต่างกัน อาศัยแรงดึงดูดระหว่างโลก ทำให้สารที่มีขนาดต่างกันแยกออกจากกันได้ หรือทำให้สารที่ไม่ละลายในตัวทำละลายแยกออกจากสารที่ละลายในตัวทำละลายได้ ในการวิเคราะห์น้ำเราสามารถกรองเพื่อวิเคราะห์หาสารแขวนลอย (suspended solid) ที่อยู่ในน้ำได้ ในการวิเคราะห์โดยการชั่งน้ำหนัก (gravimetry) ขั้นตอนการตกตะกอนกรองแล้วชั่งน้ำหนัก การกรองเป็นขั้นตอนหนึ่งที่จะแยกสารที่ละลายของไอออนต่าง ๆ ออกจากตะกอนของสารที่สนใจวิเคราะห์

1.4.2 ไดอะไลซีส

เป็นเทคนิคการแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลหรือไอออน (ion) ที่ต่างกันออกจากกันโดยเยื่อไดอะไลซีสเป็นเยื่อที่ยอมให้สารบางชนิดที่มีโมเลกุลขนาดเล็กผ่านได้ สารขนาดเล็กที่ผ่านเยื่อได้ เช่น Na^+, Cl^-, $C_6H_{12}O_6$ เทคนิคนี้ใช้สำหรับการแยกสารที่สนใจวิเคราะห์กับสิ่งรบกวนในการวิเคราะห์ออกจากกัน เยื่อไดอะไลซีสทำมาจากเซลลูโลส (cellulose) มีขนาดของรูประมาณ 1-5 นาโนเมตร (nm) สารแต่ละชนิดมีความสามารถในการแพร่ผ่าน (diffusion) เยื่อไดอะไลซีสได้ต่างกัน ใส่สารผสม เช่น แป้งผสมน้ำตาลในถุงไดอะไลซีส แล้วนำไปแช่ในสารละลายที่ไม่เหมือนกับสารละลายที่อยู่ในถุงไดอะไลซีส น้ำตาลที่อยู่ในถุงไดอะไลซีสและสารละลายที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่ารูของถุงไดอะไลซีสจะซึมผ่านเยื่อได้ ส่วนสารที่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถผ่านเยื่อได้จะอยู่ในถุง เช่น แป้ง ไดอะไลซีสใช้ สำหรับแยกโปรตีน ฮอร์โมนและเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ในร่างกายไตทำหน้าที่ในการกรองของเสีย เช่น ยูเรีย กรดยูริก และครีทีนีน (cretinine) ออกจากร่างกายโดยวิธีไดอะไลซีสเช่นกัน



ก ข

รูปที่ 1.1 แสดงการทำงานของไดอะไลซีส

ก. สารที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์บรรจุในถุงไดอะไลซีสใส่ไว้ในตัวทำละลาย

ข. อนุภาคเล็กจะไหลผ่านเข้าออกถุงไดอะไลซีสได้ส่วนอนุภาคใหญ่ยังคงอยู่ในถุง

ที่มา (ดัดแปลงมาจาก Harvey, 2000 : 206)

1.4.3 ไซซ์เอกซ์คลูซันโครมาโทกราฟี

เป็นวิธีการแยกของผสมที่มีขนาดต่างกันออกจากกันโดยผ่านอนุภาคที่มีรูเล็ก ๆ สารใดมีขนาดเล็กจะออกมาช้า สารที่มีขนาดใหญ่จะออกมาเร็วกว่าเนื่องจากสารขนาดเล็กรอดเข้าไปในรูได้ ไซซ์เอกซ์คลูซันโครมาโทรกราฟีบางครั้งเรียกว่า เจลเพอมีเอชันโครมาโทรกราฟี (gel permeation chromatography) หรือโมเลคูลาเอกซ์คลูซันโครมาโทรกราฟี (molecula exclusion chromatography) หลักการโครมาโทรกราฟีชนิดนี้คือ ความสามารถในการแยกขึ้นกับขนาดของโมเลกุลสารที่ใช้บรรจุในคอลัมน์คือ เดกซ์ทริน (dextrin) หรือพอลิอะครายลามาย (polyacrylamide) ซึ่งเป็นสารที่ภายในอนุภาคมีรูเล็ก ๆ ขนาด 10 ไมครอน(μm) ซึ่งเกิดจากการเชื่อมโยง (cross-linked) กันภายในอนุภาค ขนาดของรูขึ้นอยู่กับองศาของการเชื่อมโยง (degree of cross-linked) ยิ่งมีองศาของการเชื่อมโยงมากจะทำให้ขนาดรูเล็ก ตัวอย่างที่ต้องการแยกจะถูกใส่เข้าไปในกระแสของตัวทำละลายซึ่งใช้ปั๊มป์ดูดผ่านคอลัมน์ด้วยอัตราเร็วสม่ำเสมอ อนุภาคขนาดเล็ก ๆ ในตัวอย่างจะผ่านเข้าไปในรูของสารที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์อนุภาคขนาดเล็กจะแยกออกได้ช้าเพราะจะผ่านเข้าไปในรูของสารที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ส่วน

อนุภาคขนาดใหญ่จะหลุดออกมาก่อน โครมาโทรกราฟีชนิดนี้มีการใช้อย่างกว้างขวางในการแยกเพื่อวิเคราะห์พอลิเมอร์ และชีวเคมีซึ่งใช้ในการแยกโปรตีน

1.5 การแยกโดยอาศัยมวลและความหนาแน่น

ถ้าสารละลายที่ต้องการแยกประกอบด้วยสารที่สนใจวิเคราะห์กับสิ่งที่รบกวนในการวิเคราะห์ ซึ่งมีมวลและความหนาแน่นต่างกัน การใช้วิธีหมุนเหวี่ยงเป็นวิธีหนึ่งที่น่าจะแยกสารออกจากกันได้ สารละลายของตัวอย่างถูกบรรจุอยู่ในหลอดทดลองที่ใช้สำหรับเครื่องหมุนเหวี่ยงแล้วหมุนด้วยความเร็วรอบที่สูง ๆ อนุภาคที่หนักซึ่งอยู่ในสารละลายจะถูกแรงหมุนเหวี่ยงทำให้เกิดการตกตะกอนอยู่ที่ก้นของหลอดทดลองได้เร็วกว่าอนุภาคที่เบา อนุภาคที่มีความหนาแน่นเท่ากันแต่มวลต่างกันอนุภาคที่หนักกว่าจะตกตะกอนเร็วกว่า อนุภาคที่มีมวลเท่ากันแต่ความหนาแน่นต่างกันอนุภาคที่มีความหนาแน่นมากกว่าจะตกตะกอนเร็วกว่า

การหมุนเหวี่ยงเป็นเทคนิคหนึ่งที่สำคัญที่ใช้ในการแยกสารชีวโมเลกุล

2.3 การแยกสารชีวโมเลกุลออกจากเซลล์

การแยกสารชีวโมเลกุลออกจากเซลล์และทำให้บริสุทธิ์ สารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น เอนไซม์ เป็นต้น สามารถแยก โดยเทคนิคดังนี้ (บัณฑิต ลีละศาสตร์, 2540)

2.3.1 การทำให้เซลล์แตก

การแยกสารชีวโมเลกุลที่อยู่ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ จะต้องจัดการทำให้เซลล์แตกเสียก่อนโดยวิธีต่าง ๆ เพื่อปลดปล่อยสารนั้นออกมา โดยวิธีต่างๆ ดังนี้

ก. การใช้แรงดันออสโมซิส โดยการเติมน้ำหรือนำเซลล์ลงแช่ในสารละลายไฮโปโทนิค ซึ่งเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นของสารละลายต่ำกว่าความเข้มข้นภายในเซลล์ในภาวะเช่นนี้โมเลกุลของน้ำจะแพร่เข้าสู่เซลล์ทำให้เซลล์บวมและแตกออก วิธีนี้ใช้ได้ดีกับเซลล์สัตว์

ข. ใช้ วิธีแช่เย็นเซลล์ให้แข็งแล้วทำให้อุ่นขึ้นทันที

ค.ใช้ สารละลายอินทรีย์ เช่นอะซีโตนหรือโทลูอีนก็อาจทำให้เซลล์แตกได้ แต่สารละลายอินทรีย์เหล่านี้ก็อาจทำให้สารชีวโมเลกุล เช่น โปรตีนบางชนิดเสียสภาพได้เหมือนกัน

ง. การบดเซลล์ในทรายหรืออะลูมินา

โดยปกติแล้วจะใช้วิธีใดก็ตามจะทำให้เซลล์แตกในสารละลายที่มี pH และความแรงไอออนเหมือนในเซลล์ วิธีการทำให้เซลล์แตกที่ใช้วิธีทางกายภาพส่วนใหญ่จะเกิดความร้อนซึ่งถ้าอุณหภูมิสูงจะทำให้สารชีวโมเลกุลโดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ส่วนมากเสียสภาพธรรมชาติ (denature) จึงจำเป็นต้องทำให้เซลล์แตกและแยกองค์ประกอบต่างๆที่อุณหภูมิต่ำ งานทางด้านชีวเคมีจึงมักทำใน

ห้องเย็น หลังจากเซลล์แตกแล้วขั้นตอนต่อไปคือการนำส่วนที่ได้มากำจัดเศษเซลล์ หรือเซลล์ที่หลงเหลือออกไป นอกจากนี้อาจจะแยกสารที่ไม่ต้องการออกไปด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

ก. การกรองหรือการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) คือ การทำให้สารที่มีขนาดต่างกัน ความหนาแน่นและรูปร่างต่างกันแยกออกจากกันโดยอาศัยแรงหนีศูนย์ เครื่องมือที่ใช้เรียกเครื่องเหวี่ยงหรือเครื่องเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) โดยอาศัยหลักการที่ว่าองค์ประกอบที่หนักกว่าจะถูกเหวี่ยงให้ตกลงมาก่อนที่ความเร็วรอบของการเหวี่ยง

ข.การ ตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารละลาย เป็นต้น

2.3.2 การแยกสารชีวโมเลกุล

หลักการแยกและทำให้สารชีวโมเลกุลบริสุทธิ์ สามารถแบ่งออกได้หลายวิธีทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติเฉพาะตัวของสารแต่ละชนิด ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 หลักการแยกและทำสารชีวโมเลกุลให้บริสุทธิ์

คุณสมบัติ	วิธีการ
ขนาดหรือมวล	- การปั่นเหวี่ยง(Centrifugation) - Gel filtration - ไดอะไลซิส(Dialysis), Ultrafiltration
ประจุ	- Ion-exchange chromatography - Electrophoresis - Isoelectric focusing

ความสามารถในการละลาย	- เปลี่ยน pH - เปลี่ยนค่า ionic strength - ลดค่า dielectric constant
ความจำเพาะกับสารบางชนิด	- Affinity chromatography - Affinity elution

สารชีวโมเลกุลที่แยกจากเซลล์มักมีปริมาณน้อย เมื่อแยกมาอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ มักจะเจือจางไม่สะดวกในการศึกษาและแยกบริสุทธิ์ วิธีการทำให้สารชีวโมเลกุลเข้มข้นขึ้นมีหลายวิธี เช่น การตกตะกอนด้วยเกลือหรือตัวทำละลายอินทรีย์ ไลโอฟิไลเซชัน (lyophillization หรือ freeze - drying) เป็นวิธีเก่าในการทำให้สารละลายทางชีวภาพเข้มข้นขึ้น และยังคงใช้อยู่โดย เฉพาะอย่างยิ่งเพื่อการเก็บและขนส่งสารชีวภาพ เป็นวิธีที่ขจัดตัวทำละลายจากตัวอย่างที่แช่แข็ง วิธีนี้มีประสิทธิภาพสำหรับการทำให้สารที่ไวต่อความร้อนให้แห้งหรือเข้มข้นสารที่ระเหยที่ภาวะอุณหภูมิและความดันต่ำจะถูกขจัดออก ส่วนที่ไม่ระเหย เช่น โปรตีน เกลือ บัฟเฟอร์ เป็นต้น จะเข้มข้นขึ้น

2. 3.3 หลักการแยกและทำให้สารเอนไซม์บริสุทธิ์

มีการพัฒนาเทคนิคต่าง ๆมากมายในการแยกและวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลเทคนิคที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการแยกบริสุทธิ์สารชีวโมเลกุลทุกชนิดคือ โครมาโทกราฟี (chromatography)

ก. โครมาโทกราฟีแบบดูดซับ (absorption chromatography)

โครมาโทกราฟีแบบดูดซับ เป็นโครมาโทกราฟีแบบที่ตัวกลางที่อยู่กับที่เป็นของแข็งที่มีสมบัติดูดซับสารต่าง ๆ และมีสารละลายทำหน้าที่เป็นตัวชะสารเหล่านั้น การแยกสารขึ้นอยู่กับความสามารถของตัวกลางที่อยู่กับที่ในการดูดซับสารแต่ละชนิดไว้ไม่เท่ากัน ระหว่างในการแยก

ข. โครมาโทกราฟีแบบอาศัยการแบ่งละลาย (partition chromatography)

วิธีโครมาโทกราฟีนั้นระหว่างสารตัวกลางและตัวชะตัวกลางมักเป็นของเหลวหรือก๊าซซึ่งติดอยู่กับตัวค้ำจุนสารที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์จะละลายในตัวกลางส่วนหนึ่ง อีกส่วนหนึ่งอยู่ในตัวชะ ดังนั้นจะมีการแบ่งละลายของสารระหว่างตัวกลางและตัวชะ อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของสารที่ละลายในตัวกลางและชะซึ่งเรียกว่าสัมประสิทธิ์ของการแบ่งละลาย (partition coefficient, K_p) จะมีค่าคงที่เสมอ

ค. โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion – exchange chromatography)

โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนมีตัวค้ำจุนจะเป็นโพลีเมอร์ ที่มีประจุทำหน้าที่เป็นตัวกลางที่อยู่กับที่ที่จับกับตัวถูกละลายในตัวกลางที่เคลื่อนที่ ตัวค้ำจุนที่มีตัวแลกเปลี่ยนประจุนี้เรียกว่า ion-exchange resin เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส(carboxymethyl cellulose) เป็นเซลลูโลสที่

มีหมู่คาร์บอกซีเมทิล (carboxymethyl,CM) ซึ่งถือประจุลบจะจับกับสารที่มีประจุบวกโมเลกุลในตัวกลางที่เคลื่อนที่เรียกว่า ตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (cationic exchange) ในทางตรงข้ามถ้าตัวแลกเปลี่ยนถือประจุบวก เช่น โพลีสไตรีน

ง. แอฟฟินิตีโครมาโตรกราฟี (affinity chromatography)

แอฟฟินิตีโครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคที่ใช้ในการทำให้สารชีวโมเลกุลให้บริสุทธิ์อย่างมีประสิทธิภาพสูง โดยอาศัยสมบัติจำเพาะของสารที่ต้องการแยก เช่น ถ้าต้องการแยก concanavalin A ซึ่งเป็นโปรตีนจากพืชให้บริสุทธิ์ และเราทราบว่า concanavalin A ต่างจากโปรตีนชนิดอื่นที่สามารถจับกับน้ำตาลกลูโคส เราอาจสร้าง affinity column โดยตรึงน้ำตาลกลูโคสไว้กับตัวกลาง เมื่อผ่านสารผสม concanavalin A จะจับกลูโคสเมื่อล้างโปรตีนอื่นออกเราสามารถชะ concanavalin A ที่ต้องการออกได้โดยใช้สารละลายกลูโคสความเข้มข้นสูง

จ. เจลฟิลเตรชันโครมาโทกราฟี (gel filtration chromatography)

เจลฟิลเตรชันโครมาโทกราฟีหรือ gel exclusion หรือ molecular sieve chromatography เป็นเทคนิคการแยกสารผสมออกจากกันตามขนาดของโมเลกุล ในการแยกสารชีว-โมเลกุลขนาดใหญ่ออกจากสารที่มีขนาดเล็กมาก

เทคนิคทางโครมาโทกราฟีเป็นวิธีการซึ่งใช้แยกโมเลกุลต่าง ๆ ออกจากกันโดยอาศัยสมบัติต่าง ๆ ของโมเลกุล สำหรับเจลฟิลเตรชันนั้น เป็นโครมาโทกราฟีที่สามารถแยกโมเลกุลที่มีขนาดแตกต่างกัน และจัดเป็นเทคนิคหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการแยกสารที่มีมวลโมเลกุล ในช่วง 10 ,000 - 100,000 ดังนั้นจึงทำให้เจลโครมาโทกราฟีมีความสำคัญในการแยกสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ให้บริสุทธิ์ไม่ว่าจะเป็นกรดนิวคลีอิค โพลีแซคคาไรด์ ชีวโมเลกุลอื่น ๆ ด้วย เจลส่วนมากทำมาจากเด็กซ์ทราน อะกาโรสหรือโพลีอะคริละไมด์ และเจลเหล่านี้สามารถแยกออกได้หลายชนิดตามขนาดของรูพรุนเพื่อแยกสารในช่วงการแยกเหมาะสมกับสารที่ต้องการแยกด้วยดังตารางที่ 2.2 เป็นตัวอย่างเจลที่ใช้ในขนาดต่างๆ

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างเจลที่ใช้ในขนาดต่าง ๆ

ชื่อการค้า	ชนิดของเจล	ช่วงการแยกตามขนาด (Kd)
sephadex G-10	dextran	0.05-0.7
sephadex G-25	dextran	1-5
sephadex G-50	dextran	1-30
sephadex G-100	dextran	4-150
sephadex G-200	dextran	5-600
bio-Gel P-2	polyacrylamide	0.1-1.8
bio-Gel P-6	polyacrylamide	1-6

bio-Gel P-10	polyacrylamide	125-20
bio-Gel P-30	polyacrylamide	2.4-40
bio-Gel P-100	polyacrylamide	5-100
bio-Gel P-300	polyacrylamide	60-400
sepharose 6B	agarose	10-4,000
sepharose 4B	agarose	60-20,000
	agarose	70-40,000

ที่มา : บัณฑิต ลีละศาสตร์, 2540

ฉ. อิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis)

อิเล็กโตรโฟรีซิส เป็นคำที่ใช้อธิบายการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีประจุในสนามไฟฟ้า โพลีเมอร์ทางชีวภาพ (biological polymer) ส่วนใหญ่มีประจุจึงสามารถเคลื่อนในสนามไฟฟ้าได้ อาศัยสมบัติต่าง ๆ ของแมโครโมเลกุล (macromolecule) ตัวอย่างเช่น มวลโมเลกุลของโปรตีน ความแตกต่างของโมเลกุลในแง่ประจุสุทธิ รูปร่างของโปรตีน รวมทั้งการแยกโมเลกุลที่ต่างกันด้วย อิเล็กโตรโฟรีซิส สามารถแบ่งออก 2 ชนิดดังนี้

(1) อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบโพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) อิเล็คโตรโฟรีซิสแบบโพลีอะคริลาไมด์เจลหรือที่เรียกย่อๆ ว่า PAGE เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในงานวิเคราะห์โปรตีนและสารผสมโปรตีน ไอออนที่มีประจุเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ได้ โปรตีนก็เช่นเดียวกัน เป็นแมโครโมเลกุลที่มีประจุที่ pH ต่างๆ เพราะฉะนั้นจึงเคลื่อนที่ได้ในสนามไฟฟ้าและอัตราการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุ (charge density) ของโปรตีน ความหนาแน่นของประจุหมายถึงอัตราส่วนของประจุต่อมวล (charge/mass) ถ้าอัตราส่วนนี้สูงจะเคลื่อนที่ได้เร็ว เมื่อให้สนามไฟฟ้ากับสารละลายโปรตีนผสม โปรตีนแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกันทำให้แยกออกจากกันได้

(2) อิเล็คโตรโฟรีซิสแบบ SDS-โพลีอะคริลาไมด์เจล (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) ในปัจจุบันการทำ PAGE มักนิยมใช้สารซักฟอกที่มีชื่อว่า โซเดียมโดเดคิลซัลเฟตหรือ SDS ในระบบบัฟเฟอร์ร่วมกับสารที่สลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) การทำ PAGE ที่มี SDS เรียกว่า SDS-PAGE เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกหน่วยย่อยของโปรตีนและหามวลโมเลกุลของมัน SDS 1.4 กรัม/สายโพลีเมอร์เพพไทด์ 1 กรัม SDS-โพลีเพพไทด์คอมเพล็กซ์ (SDS-polypeptide complex) นี้มีรูปร่างเป็นแท่ง เนื่องจากสายโซ่โพลีเพพไทด์เมื่อถูกจับด้วย SDS จะคลายการขดเป็นสายยาว คอมเพลกซ์นี้มีประจุเป็นลบ(เนื่องจาก SDS ไปบดบังประจุของโปรตีน) ทุกคอมเพลกซ์จะเคลื่อนที่ไปในทางทิศทางเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน ที่ทราบมวลโมเลกุล จะทำให้ทราบถึงมวลโมเลกุลของสายโซ่โพลีเพปไทด์

2.4 การเสื่อมสภาพของเอนไซม์

การเสื่อมสภาพของเอนไซม์ เป็นการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน เป็นการเปลี่ยนแปลงสภาพตามธรรมชาติของโปรตีน (native conformation) ที่ปกติทำงานได้ดี ให้กลายเป็นโปรตีนที่ทำงานได้น้อยลงหรือสูญเสียหน้าที่ไป และยังอาจมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติอื่นๆของโปรตีนด้วย สาเหตุที่ทำให้การเสื่อมสภาพของเอนไซม์ ดังต่อไปนี้ (เนตรนภิส ธีระ ,2552)

2.4.1 สารเคมี (chemical agents)

ก. กรดหรือด่างแก่และตัวทำละลายอินทรีย์บางตัวจะทำลาย H-bond และ salt bridges reducing agents เช่น β-mercaptoethanol, dithiothreitol จะทำลายพันธะ disulfide ให้กลายเป็นหมู่ sulfhydryl ส่วน urea จะทำลาย H-bond และ hydrophobic interaction

ข. เกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ จะมีผลทำให้การละลายของโปรตีนดีขึ้นหรือแย่ลงได้ เช่น fibrous protein ปกติจะละลายน้ำได้ยาก ถ้ามีการเติมเกลือลงไปเล็กน้อยจะทำให้โปรตีนละลายน้ำได้ดีขึ้น (salting in) แต่ถ้าเติมเกลือมากเกินไป จะทำให้โปรตีนนั้นตกตะกอนลงมา (salting out)

ค. Detergents จะทำลาย hydrophobic interactions ของโปรตีน ทำให้สาย โพลีเพปไทด์ ยืดออกจากกันเป็นสายยาว

ง. โลหะหนัก (heavy metals) จะทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป เช่น ทำลาย salt bridges หรือโลหะหนักจับตัวกับหมู่ sulfhydryl ของโปรตีน ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนได้ เช่น Ag^{+}, Hg^{+2} และ Pb^{+2} ก็สามารถทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพได้ (ดนัย บุณยเกียรติ , 2552)

2.4.2. สภาพแวดล้อม

สภาพแวดล้อมที่ไม่ปกติ เช่น การเขย่าแรงๆจนเกิดฟอง (foaming), การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่สูงขึ้น ทำให้อณูของโปรตีนสั่นสะเทือนมากขึ้น ส่งผลให้ H-bond ซึ่งเป็นพันธะอย่างอ่อนถูกทำลายไปได้ นอกจากนี้ยังมี physical agents อย่างอื่นๆ เช่น ความดัน , ความเย็นจัดจนแข็ง, รังสี ultraviolet, x-ray, ultrasound ที่สามารถทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีนให้สูญเสียไปได้

โปรตีนบางอย่างเมื่อถูกทำให้คลายตัว (unfolding) และเสียสภาพธรรมชาติไป อาจทำให้กลับคืนสู่สภาพธรรมชาติได้อีก (renaturation) ถ้าสภาวะเหมาะสม เช่น pH ของตัวทำลายกลับคืนสู่สภาพที่เหมาะสม ถ้าโปรตีนนั้นเป็นเอนไซม์ เอนไซม์นั้นก็สามารถทำงานได้อีก การทำลายสภาพธรรมชาติบางครั้งก็เกิดขึ้นอย่างถาวร การแข็งเป็นลิ่มด้วยความร้อน (coagulation) เป็นการทำลายสภาพธรรมชาติอย่างหนึ่งของโปรตีน ที่ส่วนมากจะกลับคืนสู่สภาพเดิมไม่ได้ เช่น โปรตีนในไข่ขาว นั่นคือความร้อนจะ

ทำให้โปรตีนถูกทำลายสภาพธรรมชาติก่อนแล้วจึงมีการแข็งตัวเป็นลิ่ม การแข็งเป็นลิ่มบางอย่างอาจเกิดจากปฏิกิริยาเคมี โดยเอนไซม์และปัจจัยต่างๆร่วมด้วย เช่น การแข็งเป็นลิ่มของเลือด การเสื่อมสภาพของเอนไซม์ (Denaturation) เมื่อโครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไปจนสารตั้งต้นรวมกับเอนไซม์ที่ บริเวณเร่งไม่ได้ จะทำให้คุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์หมดไป

ดังนั้น ในการสกัดเอนไซม์หรือการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ จึงมักต้องทำในที่ๆมีอุณหภูมิต่ำ เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของเอนไซม์จากความร้อน เมื่อสกัดออกจากเซลล์ความทนทานต่ออุณหภูมิสูงจะลดลง ออกซิเจน และสารที่เป็นสารออกซิไดซ์สามารถทำให้เอนไซม์หลายชนิดเสื่อมสภาพได้ โดยมักจะทำให้เกิดไดซัลไฟด์ บริดจ์ (Disulfide Bridges) ในลูกโซ่โพลีเพปไทด์ที่มี –SH ของกรดอะมิโนซีสเตอีน (Cysteine) สารรีดิวซ์สามารถทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพได้ จะไปทำลายไดซัลไฟด์ บริดจ์เกิดเป็น –SH 2 กลุ่ม

2. 5 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โคลีนเอสเตอเรสเป็นเอนไซม์ที่สลายตัวได้ง่าย เอนไซม์นี้ใช้ในการส่งกระแสประสาท มีอยู่ในสัตว์ทุกชนิด พบมากในสมองและน้ำเลือด ได้มีการสกัดเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส โดยบดสมองกับซิลิกาเจลและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ได้มีการวิจัยสกัดและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสจากสมองวัว สมองหมู และสมองไก่ โดยบดสมองกับซิลิกาเจลกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 จากนั้นทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนและเอธานอล แล้วนำสารสกัดที่ได้ในแต่ละขั้นตอนมาหาปริมาณโปรตีน ปริมาณเอนไซม์ และ specific activity ได้ผลดังนี้ พบว่า สารสกัดสมองที่มีปริมาณโปรตีนมากที่สุดคือ สมองหมู สมองวัว และไก่ตามลำดับ ส่วนปริมาณเอนไซม์ และ specific activity มากที่สุดคือ สมองไก่ สมองวัว และสมองหมู 0.00 6 units , 0.0058 units, 0.00046 units ตามลำดับ specific activity 3.2 x 10^{-7} units/mg protein, 3.0 x10^{-7} units/mg protein 2.0 x 10^{-8} units/mg protein ตามลำดับ (กิติพงษ์ ฟากเซ และ ชลิน ยิ้มพังเทียม, 2549) เนื่องจากสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟเฟต และกลุ่มคาร์บาเมตสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสได้ การวิเคราะห์สารปราบศัตรูพืชโดยใช้เอนไซม์ นี้จึง เป็นวิธีหนึ่งมีการใช้ตรวจหาสารปราบศัต รูพืชแบบไม่เฉพาะเจาะจง โดยใช้ตรวจหาสารใน กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอ เฟต และกลุ่มคาร์บาเมตได้เกือบทุกชนิด เอนไซม์ชนิดนี้จะถูกยับยั้งโดยสารกลุ่มออร์กาโนฟอส เฟต และกลุ่มคาร์บาเมตที่ตกค้างอยู่ในอาหารและพืชผักอื่นๆ ทำให้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ เอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส เร่งปฏิกิริยาที่ใช้ อะซิติลโคลีน (acetyl choline, Ach) เป็นสารตั้งต้น แล้วเปลี่ยนเป็น ผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วย โคลีน (choline) และกรดอะซิติก (acetic acid) ดังปฏิกิริยา

Acetylcholine —cholinesterase→ Choline + Acetic acid

การวัดปริมาณสารปราบศัตรูพืชทำได้โดยวิธีต่างๆ เช่น โคลีนเอสเตอเรสทำปฏิกิริยาแล้วสามารถวัดอัตราการสลายตัวของอะซิติลโคลีนหรือวัดปริมาณโคลีนและกรดอะซิติกที่เกิดขึ้น หรือวัดปริมาณโคลีนเอสเตอเรสที่เหลืออยู่ก็ทำได้ (Stewart and stolmand, 1961 : 689-690)

การหาปริมาณเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสทำได้โดยการนำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ 6 ,000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที หลังจากนั้นนำมาผ่าน คอลัมน์ (column) แล้วนำส่วนที่ได้จากการผ่านคอลัมน์มาหาปริมาณเอนไซม์โดยใช้ 0.05 mL หลังจากนั้นเติม DTNB ลงไป 0.25 mL รอ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 412 nm (Ellman, G.L. ,1961)

ได้มีการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ AChE โดยนำตัวอย่างของสมองมา 20 mg เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 mL นำไปปั่นเหวี่ยงนำสารละลายใสด้านบนมาใส่ในคิวเวต 2.6 mL เติม ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.4 mL หลังจากนั้นเติม DTNB 100 μL และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 412 nm แล้วเติม สารตั้งต้น (acetylthiocholine iodide) 2 μL และวัดค่าการดูดกลืนแสงอย่างน้อยเป็นเวลา 6 นาที

(Tr. J. medical sciences. ,1972)

การตรึงเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส จะทำให้เก็บได้นานและนำไปใช้งานได้สะดวกขึ้น เอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส จากสมองวัว และสมองหมูถูกตรึงบนอัลจินิกทำให้เสถียรภาพ และแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้น โดยทำการสกัดเอนไซม์ ด้วยการบดสมองกับซิลิการเจลและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อหาปริมาณโปรตีนและทำบริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยความร้อนและเอทานอล ได้ผลดังนี้ พบว่าสารสกัดมีปริมาณโปรตีน 3.437-6.675 มิลลิกรัมต่อกรัมของสมอง ปริมาณเอนไซม์ตั้งแต่ $4.0 \times 10^{-6} - 5.8 \times 10^{-5}$ ยูนิตต่อกรัมของสมอง และ specific activity ตั้งแต่ $1.16 \times 10^{-6} - 8.68 \times 10^{-6}$ ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน จากนั้นได้นำสารสกัด fraction I ของสมองวัวมาทำการตรึงรูปด้วยกรดอัลจินิก แล้วทำการหาปริมาณโปรตีน ปริมาณเอนไซม์และ specific activity (ชนิษฐา อุดทา และอัคกะบัทคาน ปาทาน, 2550) การตรึงเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสบนสารที่ไม่เปียกน้ำ เช่น a-naphthylamine, benzylamine, Orp-methylbenzylamine groups ทำให้เข้มขึ้น 60-90 เท่า และ 700-1200 เท่า ใช้สำหรับทดสอบแบบสกรีน (Screening) ในกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส เอนไซม์ที่ตรึง รูปแล้วจะทนอุณหภูมิสูงขึ้น 110% หลังจากตรึงแล้วนาน 8 ชั่วโมง ยังทำงานได้ 82-88 % (Cao and et al.

, 1995) การตรึงเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสไว้บนเมมเบรน Porex(R) Lateral-Flo™ ทำให้สามารถเก็บเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสไว้ได้หลายเดือนที่อุณหภูมิห้อง ใช้สำหรับทดสอบสารปราบศัตรูพืชในน้ำบริโภคและน้ำประปา เป็นวิธีทดสอบที่ง่าย ราคาไม่แพง ใช้งานได้ดีวิธีหนึ่ง

(Weetall and et al. , 2004)

การตรึงอะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (Acetyl cholinesterase, AchE) บน microtitration plate โดยใช้ gelatin หรือ BSA-trehalose film โดยตรึง AchE แบบแห้งพบว่าใช้สำหรับทดสอบสารปราบศัตรูพืชในน้ำ ผัก เลือด (Nguyen and et al, 1997) มีการตรึง AchE บน controlled porous glass beads (CPG) โดยมี acetylcholine เป็นสับสเตรท โดยใช้สารยับยั้งคือ paraoxon (diethyl-p-nitrophenylphosphate) แล้วใช้สาร 1,1′- trimethylene bis (4-formylpyridinium bromide) dioxime เป็นสารทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้อีกครั้ง (Rodrigues, and et al, 1997) นอกจากนี้AchE ยังถูกตรึงบนผิวของ carbon-modified เพื่อที่จะนำไปใช้ในการตรวจวัดสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (Pontumma and Sritong kam, 2008) การตรึงเอนไซม์ไว้สำหรับใช้ในการตรวจสภาพการถูกยับยั้งของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส ทำให้สามารถบอกได้ว่ามีสารปราบศัตรูพืชตกค้างในอาหารและสิ่งแวดล้อมได้ นอกจากนี้ยังใช้ตรวจหาสารเคมีที่อยู่ในร่างกายได้ ในยุโรปกำหนดให้มีสารปราบศัตรูพืชในน้ำดื่มได้ไม่เกิน 1 μg/l การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารปราบศัตรูพืชตกค้างให้เป็นวิธีที่รวดเร็ว ค่าใช้จ่าย ไม่แพง ทำได้โดยใช้การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ หรือไบโอเซนเซอร์ (biosensors) มีการตรึงเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสเพื่อใช้ในการตรวจวัดคุณภาพและปริมาณสารออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตเป็นไบโอเซนเซอร์ส่วนใหญ่มีการใช้ เอนไซม์ โคลีนเอสเตอเรสจาก electric eel, bovine erythrocytes, human erythrocytes, butyrylcholine esterases จาก horse serum หรือ human serum การตรึงเอนไซม์ทำได้โดยใส่เอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสลงใน 500 mg ของแป้งข้าวเจ้าที่ผสมกับ 1.2 ml Tris buffer (pH 7.4) ผสมกันในขณะเย็นแล้วเทใส่ 3.3 ml ของ Tris buffer ผสมกับ 300 μlของ glycerine ที่ต้มให้ร้อนคนจนสารละลายใส แล้วทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 320 K ในอีกบิกเกอร์หนึ่งใส่ 50 mg ChE ละลายใน 600 μl ของ Tris buffer แล้วเทสารลงไปกวนในบิกเกอร์แป้งที่อุณหภูมิ 320 K แล้วล้างด้วย 600 μl ของ Tris buffer ปรับปริมาตรรวมเป็น 6 ml แล้วสารละลายแป้งผสมเอนไซม์ตรึงไว้บน polyurethane foam (10 × 10 × 0.6 cm) ทำให้เย็นในตู้เย็นที่ 278 K 1 ชั่วโมง เพื่อให้แป้งจับตัวเป็นเจล หลังจากนั้นเก็บในตู้ดูดความชื้นทำให้แห้ง 1 คืน แล้วตัดแผ่นที่ตรึงเอนไซม์เป็นชิ้นๆ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm (Pogacnik and Franko, 1999)

ได้ศึกษาการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสจากสารป้องกันกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสและคาร์บาเมตในน้ำคั้นผักและผลไม้โดยใช้หลักการที่สาร DTNB ทำปฏิกิริยากับโคลีนเกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสีเหลืองและดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร เอนไซม์อะซิติล

โคลีนเอสเทอเรสได้จากการสกัดเอนไซม์จากปลาไหลไฟฟ้า ใช้อะซิติลไธโอโคลีน จากการหากิจกรรมเอนไซม์ที่ 15 นาทีภายใต้อุณหภูมิ 37 ºC ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์และ สับสเตรทต่างๆ กัน และทำการทดสอบผลของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต กลุ่มคาร์บาเมตต่อการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์พบว่าที่ความเข้มข้นของสับสเตรทและเอนไซม์ 1.2 µmolและ 0.02 unit เกิดกิจกรรมที่ดีที่สุด (รุ่งนภา ก่อประดิษฐ์สกุล และคณะ ,2547)

ได้มีการพัฒนาชุดทดสอบ เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส สำหรับการหาปริมาณสารปราบศัตรูพืชกลุ่ม ออร์กาโนฟอสฟอรัส และ คาร์บาเมต ที่ตกค้างในตัวอย่างทางการเกษตร โดยจะอาศัยวิธีของ Ellman และ ELISA เป็นแนวทางในการพัฒนา สำหรับการตรวจสอบสาร ออร์กาโนฟอสฟอรัส (OP) และคาร์บาเมต (CB) ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นจะเป็นแบบ Screening test มีการใช้AChEที่ถูกสกัดมาจากส่วนหัวของผึ้ง (*Apis mellifera* L.) มีการใช้ Triton X-100 เป็ตัวสกัด และมีการทำบริสุทธิ์โดยผ่าน 3 ขั้นตอน : diethylaminoethyl-cellulose chromatography (DEAE), affinity chromatography and membrane filtering และ Mono-Q column chromatography. และ Epoxy-activated Sepharose 6B affinity chromatography สำหรับการทำบริสุทธิ์ของ AChE การตรวจวัด ออร์กาโนฟอสฟอรัสและคาร์บาเมต จะใช้หลักการที่ AChE เป็นตัวยับยั้งการแสดงสี (6 แถบ) หรือการไม่ปรากฏของแถบสีจำนวนหนึ่งในการทดสอบ ข้อจำกัดของการตรวจวัด ออร์กาโนฟอสฟอรัสและคาร์บาเมทที่ตกค้างในพืชผลทางการเกษตร และสารละลายมาตรฐานของสารปราบศัตรูพืช อยู่ในช่วง 0.50 ถึง 2.50 ppm และ 0.50 ถึง 4.75 ppm ตามลำดับ (Bo-Mee Kim et. all ,2007)

ได้มีการทดลอง เปรียบเทียบ หาสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส จากตัวอย่างเลือดโดยใช้วิธีการทดสอบ 2 วิธีระหว่าง Electrochemical กับ Ellman ’s Photometric วิธี Electrochemical จะเป็นวิธีที่ใช้ อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส เป็นตัวยับยั้ง สามารถใช้ตรวจวัดได้ที่ pH 4 และความเข้มข้น 7 – 10 M ส่วนวิธีของ Ellman ’s Photometric นี้สามารถใช้ในการตรวจวัดได้ที่ pH 5.2 และ ความเข้มข้น 10 - 7 M ซึ่งทั้งสองวิธีนี้มีความหมือนกัน แต่วิธี Electrochemical มีเครื่องมือที่ใช้งานได้สะดวกรวดเร็ว มีความถูกต้องแม่นยำ เป็นวิธีที่ง่าย ประหยัดเวลา และเสียค่าใช้จ่ายน้อยในการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังสามารถเป็นตัวตรวจวัดปริมาณของโลหะพื้นฐานได้อีกด้วย (Miroslav Pohanka et. all ,2008)

การทำโคลีนเอสเตอเรสให้บริสุทธิ์โดยการผ่าน column sephadex G-25 และ sephadex G-200 และหามวลโมเลกุลของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรสโดยใช้ electrophoresis (SDS-PAGE) ได้ค่ามวลโมเลกุล ประมาณ 63 ,000 ดาลตัล (dalton) และหาปริมาณเอนไซม์โดยใช้ ATChI เป็นสารตั้งต้นใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.002 M ที่ pH 7.2 และสารDTNB แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 nm (Lif and Hanz. ,1974)

Richard L.Rotundo (1984) ได้ทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติเยื่อหุ้ม เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสจากสมองไก่ โดยจะตกตะกอนอะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) จากเยื่อหุ้มของสมองไก่แล้วทำให้บริสุทธิ์โดย gel fitration และวิธี Sodium dodecyl sulfate – gel electrophoresis เยื้อหุ้มที่ได้จาก AChE จะไม่ละลายน้ำ และถ้าจะรวมตัวกันจะต้องอาศัยความเข้มข้นและต้องปราศจากสารซักล้าง ซึ่งจะมีความเสถียรภาพในสารละลายเกลือเข้มข้น และสามารถแยกออกโดยการเติมสารซักล้าง antibodies รูปร่าง Polyconal และ monoclonal มีมากในสมองไก่ ดังนั้น AChE จะทำบริสุทธิ์ได้โดยใช้วิธี ion exchange chromatography, affinity chromatography และ preparative gel electrophoresis เป็นต้น

Süleyman Baykal.(1996) ได้ศึกษาสภาพการละลายของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ที่จับกับคอลลาเจนจากเรตินาไก่ โดยจะสกัดในสารละลายที่แตกต่างกัน นั้นคือสารละลายที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง สารที่แตกตัวสูง สารที่ไม่แตกตัวคล้ายสารซักล้าง และ EDTA เพื่อดูค่าการละลายที่เหมาะสมของคอลลาเจนที่จับกับ AChE จะพบว่าสารละลายที่มีความเป็นเกลือสูงและสารละลาย EDTA จะมีค่าการละลายของเอนไซม์ดีที่สุด ในการละลายสารสกัด AChE ใน EDTA ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง (ปราศจากสารซักล้าง) จะพบ Ca^{2+} ซึ่งเป็นธาตุที่ไม่ละลายน้ำ อย่างไรก็ตาม AChE สามารถแยกออกจากคอลลาเจน โดยการเติม EDTA ลงไป และยับยั้งโดยใช้ Triton x -100 หรือสารซักล้างเติมลงในบัฟเฟอร์ ซึ่งมี Ca^{2+} ปรากฏอยู่ ซึ่งถือได้ว่า AChE ที่จับกับคอลลาเจนจะประกอบด้วยไขมันที่เป็นกรด ซึ่งพันธะที่ไม่ละลายน้ำจะจับกับโปรตีน ดังนั้น Ca^{2+} น่าจะเป็นตัวเชื่อมโมเลกุลของไขมันให้เป็นเนื้อเยื่อ ถ้าจะเอาไขมันออกจาก AChE จะทำให้โมเลกุลมีสายสั้นลงและยังทำให้ Ca^{2+} สามารถเข้าทำปฏิกิริยาแยกคอลลาเจนได้

การวิเคราะห์หาปริมาณออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ตกค้างในผักและผลไม้ วิธีวิเคราะห์ทำโดยตัวอย่างจะผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี ลิควิด-ลิควิด (Liquid-Liquid Extraction ,LLE) และโซลิดเฟส (Solid – Phase Extraction , SPE) ก่อนแล้วจึงวิเคราะห์ด้วย GC หรือ HPLC (Cunniff , 1997) ซึ่งวิธีดังกล่าวทำในห้องปฏิบัติการ มีความยุ่งยากซับซ้อน เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ มีราคาแพง ผู้ทำการวิเคราะห์ต้องมีความชำนาญสูง ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ต้องเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ค่าใช้จ่ายในการในการวิเคราะห์สูง ต่อมากรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขได้พัฒนาชุดทดสอบขึ้นมาใช้ (กองวิเคราะห์อาหาร , 2544) หน่วยงานต่าง ๆ ทั้งภาครัฐและเอกชนนำชุดทดสอบนี้ไปใช้ในการตรวจสอบสารฆ่าแมลงในภาคสนาม (นุชนารถ จงเลขาและคณะ , 2542) แต่มีปัญหาในการใช้เนื่องจากพืชผักบางชนิดมีสี ทำให้อ่านผลได้ไม่ตรงกับความจริง ประกอบกับสารบางชนิดในชุดทดสอบสลายตัวได้ง่าย ทำให้ต้องเก็บรักษาชุดทดสอบดังกล่าวในตู้เย็น ดั้งนั้นจึงไม่ค่อยสะดวกในการใช้งานในภาคสนาม

ชุดน้ำยาตรวจสอบสารพิษตกค้าง/ยาฆ่าแมลง “จีที” (กัลยวัจณ์ ธูปหอม, 2550) ใช้หลักการทำงานของ cholinesterase inhibition technique เป็นวิธีกึ่งมาตรฐาน ใช้คัดกรองตัวอย่างที่ไม่ปลอดภัยเนื่องจากมีพิษตกค้างจากยาฆ่าแมลง โดยอาศัยหลักการที่ความเป็นพิษตกค้างจากยาฆ่าแมลงทำให้การทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสลดลงตั้งแต่ ร้อยละ 50 ขึ้นไปเป็นเกณฑ์บอกความไม่ปลอดภัย โดยใช้เวลาในการตรวจสอบประมาณ 30-60 นาที สามารถตรวจได้ครั้งละหลายตัวอย่าง ราคาถูก เหมาะสำหรับตรวจผัก และผลไม้ ก่อนวางจำหน่าย

ชุดตรวจสอบอย่างง่าย (Screening test) ใช้รวดเร็ว บอกได้ว่ามี หรือไม่มี ผลิตในอเมริกา ใช้หลักการที่เอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสทำให้อะซิติลไธโอโคลีนเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นไธโอโคลีน แล้วไธโอโคลีนทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ (Ellman’s reagent) เกิดสารประกอบได้สีเหลือง ชุดตรวจสอบนี้เรียกว่า Cholinesterase Screen Microwell Plate Assay ใช้ตรวจสอบออร์กาโนฟอสฟอรัส และคาร์บาเมต ในธัญพืช อาหาร น้ำดื่ม น้ำบาดาล และน้ำบ่อ ขีดจำกัดต่ำสุด (limit of detection) ของชุดตรวจสอบนี้ เท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดตรวจสอบนี้ตรวจได้เร็ว ประหยัดแรงงาน ค่าใช้จ่าย และเวลา (Envirologix Inc., 2550)

ชุดตรวจสอบสารพิษตกค้าง ผลิตในฟิลิปปินส์ ใช้ตรวจสอบสารฆ่าแมลง ส ารกำจัดวัชพืช และสารกำจัดเชื้อรา ในผลไม้ ผัก ดิน น้ำ และเมล็ดธัญพืชได้ สามารถทำได้ในภาคสนาม ในตลาด และในบ้าน ชุดตรวจสอบสารพิษตกค้างทำได้ง่าย ไม่ต้องมีความเชี่ยวชาญ อ่านผลได้ง่าย ผลการตรวจรวดเร็วตรวจสอบสารฆ่าแมลงภายใน 5 นาที ตรวจส ารกำจัดวัชพืช และสารกำจัดเชื้อราภายใน 30 นาที ในขณะที่ตรวจด้วยวิธีมาตรฐานใช้เวลาตรวจ 3 วัน และมีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์สูง ชุดตรวจสอบสารพิษตกค้าง มีการสกัดตัวอย่างแล้วหยดบนกระดาษ(Y, Xiuhua.,1999) หยดรีเอเจนต์ทับลงไป อ่านผลโดยดูสีที่เกิดขึ้นบนกระดาษ (Food&Fertilizer Technology Center, 2549)

Organophosphorus pesticide residue rapid inspection test ผลิตในประเทศจีน ใช้ตรวจสอบออร์กาโนฟอสฟอรัส ใช้ทดสอบคุณภาพ (qualitative detection)ในผัก และผลไม้ ใช้เวลาตรวจสอบภายใน 25 นาที (Nankai, 2550)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและตัวอย่าง

3.1.1 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. acetlythiocholine iodide	FLUKA
2. bovine serum albumin (BSA)	FLUKA
3. copper sulphate pentahydrate ($CuSO_4.5H_2O$)	ศึกษาภัณฑ์พาณิชย์
4. disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	AJAX FINECHEM
5. disodium carbonate (Na_2CO_3)	AJAX FINECHEM
6. 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoice acid) [DTNB]	FLUKA
7. folin-ciocalteu's phenol reagent	CARLO ERBA
8. hydrochloric acid (HCl)	CARLO ERBA
9. potassium sodium tartrate	APS FINECHEM
10. silica gel	MERCK
11. sodium dihydrogen phosphate dihydrate ($NaH_2PO_4.2H_2O$)	CARLO ERBA
12. sodium hydrogen phosphate anhydrate ($NaHPO_4$)	AJAX FINECHEM
13. sodium hydroxide (NaOH)	CARLO ERBA
14. sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)	ศึกษาภัณฑ์พาณิชย์
15. sorbic acid 16. Benzoic acid 17. sodium nitrate	สหภัณฑ์อุปกรณ์ศึกษา

3.1.2 ตัวอย่าง

3.1.2.1ตัวอย่างสมองไก่

หัวไก่จากบริษัท สหฟาร์ม จำกัด ที่ได้นำมาจำหน่าย ณ ตลาดเทศบาล 1 ในเขตพื้นที่ อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ โดยนำหัวไก่ที่ได้นี้ประมาณ 10 หัว มาผ่ากลางหัว แล้วแคะสมองไก่ออกมาชั่งน้ำหนัก บันทึกน้ำหนักที่ได้

3.1.2.1ตัวอย่างสมองหมู

หัวหมูที่นำมาทำการทดลองได้นำมาจากฟาร์มชาวบ้าน ที่นำมาจำหน่าย ณ ตลาดเทศบาล 1 ในเขตพื้นที่ อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ โดยนำหัวหมูที่ได้นี้มาผ่ากลางหัว แล้วแคะสมองหมูออกมาชั่งน้ำหนัก

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์	**บริษัทผู้ผลิต**
1. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)	HETTICH ZENTRIFUGEN
2. แผ่นให้ความร้อน (hotplate)	JENWAY
3. เครื่องวัดกรด – ด่าง (pH meter)	HANNA
4. UV-Vis spectrophotometer รุ่น Lambda 12	PERKIN ELMER
5. เครื่องผสมสารละลาย (vortex)	SCIENTIFIC INDUSTRIES
6. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง	SCIENTIFIC PROMOTION

3.3 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่

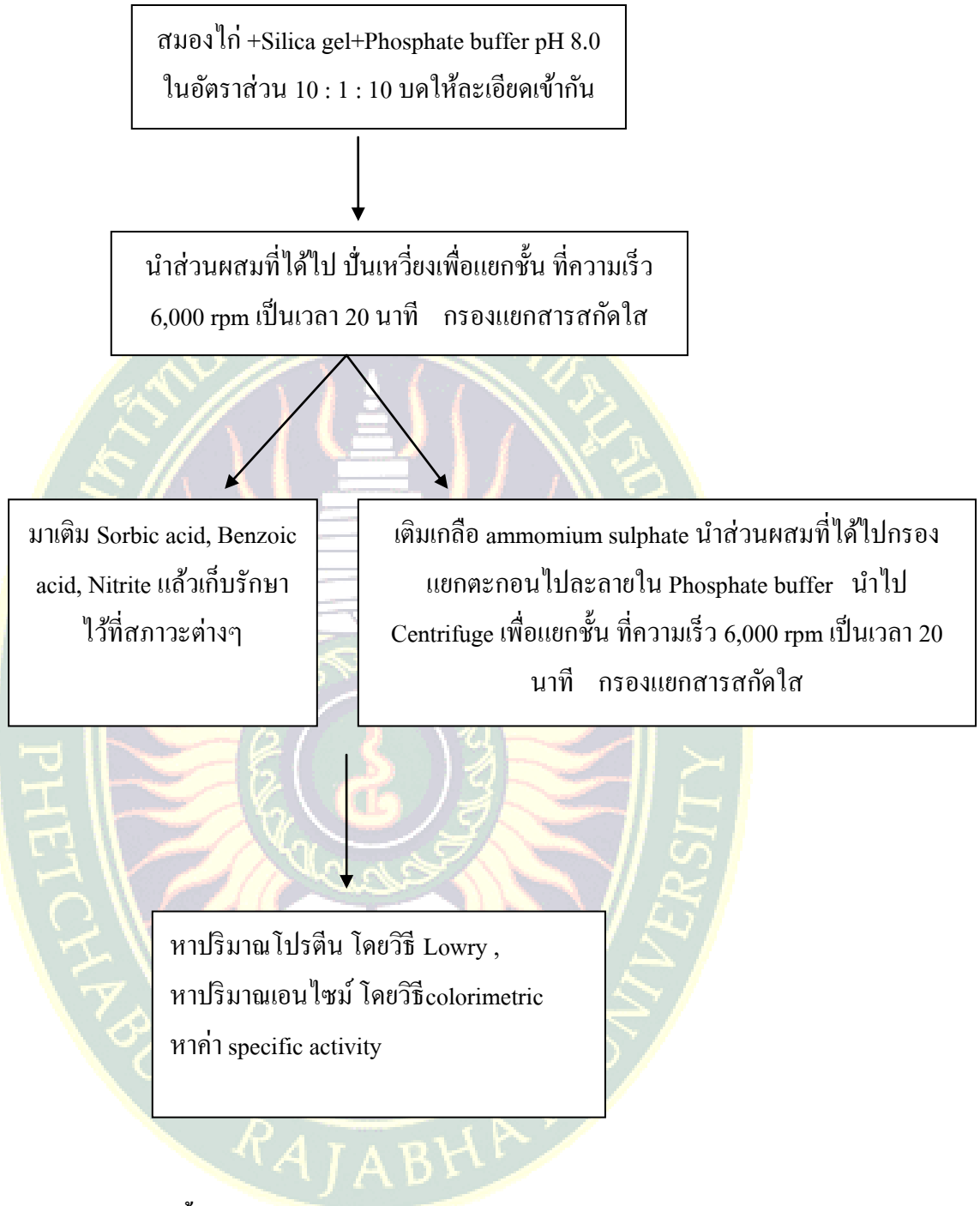
การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ นี้แบ่งออกเป็น 4 ตอน ดังต่อไปนี้

ตอนที่ 1 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่

ตอนที่ 2 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่โดยเติม สารกันเสีย Sorbic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตอนที่ 3 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่โดยเติม สารกันเสีย Benzoic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตอนที่ 4 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ และตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต



ขั้นตอนการดำเนินการวิจัยสกัดสมองไก่

3.3.1 ตอนที่ 1 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C และ 5°C

3.3.1.1 วิธีการเตรียมสารฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer : PBS) ความเข้มข้น 100 mmol/L มี pH เท่ากับ 8.0 ชั่ง Na_2HPO_4 มา 6.135 g และ NaH_2PO_4 .$2H_2O$ มา 1.06 g ละลายในน้ำกลั่นปรับ pH ด้วย NaOH (100 mmol/L) หรือ HCl (100 mmol/L) ให้มี pH เท่ากับ 8.0 แล้วปรับให้ครบปริมาตร 500 ml

3.3.1.2 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่

1. ชั่งสมองไก่ ผสมกับ siliga gel บดให้ละเอียด แล้วเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ในอัตราส่วน 10 : 1 : 10 ตามลำดับ

2. นำสมองไก่มา Centrifuge เพื่อแยกชั้น ที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที

3. กรองสารสกัดใสส่วนบนซึ่งเป็นสารสกัดเอนไซม์ด้วยกระดาษกรอง จากนั้นนำส่วนที่เหลือมาทำการบดอีกครั้งโดยใส่ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 จำนวน 10 ml

4. นำไป Centrifuge เพื่อแยกชั้นอีกครั้ง ที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที

5. กรองสารสกัดใสส่วนบนซึ่งเป็นสารสกัดเอนไซม์ด้วยกระดาษกรอง นำสารสกัดใสทั้งสองส่วนผสมกัน เรียกว่า สารสกัด I บันทึกปริมาตรของสารสกัดเอนไซม์ นำไปหาปริมาณโปรตีน ปริมาณเอนไซม์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส

3.3.1.3 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่โดยเติม สารกันเสีย (Sorbic acid 100 mmol/L) ทำตามข้อ 3.3.1.2 แต่เติม Sorbic acid 0.1625 gในขั้นตอนการบดสมอง แล้วเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด II

3.3.1.4 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่โดยเติม สารกันเสีย (Sorbic acid 1,000 mmol/L) ทำตามข้อ 3.3.1.2 แต่เติม Sorbic acid 1.7604 g ในขั้นตอนการบดสมอง แล้วเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด III

3.3.1.5 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ ทำตามข้อ 3.3.1.2 แต่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด IV

3.3.2 ตอนที่ 2 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติม กรดซอร์บิค ที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.3.2.1 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ ทำตามข้อ 3.3.1.2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด S1 และแบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เรียกว่า สารสกัด Sd1

3.3.2.2 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่โดยเติม สารกันเสีย (Sorbic acid 20 mmol/L) ทำตามข้อ 3.3.1.2 แต่เติม Sorbic acid 0.0224 gในขั้นตอนการบดสมอง แล้วเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด S2 และแบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เรียกว่า สารสกัด Sd2

3.3.2.3 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่โดยเติม สารกันเสีย (Sorbic acid 40 mmol/L) ทำตามข้อ 3.3.1.2 แต่เติม Sorbic acid 0.0449 g ในขั้นตอนการบดสมอง แล้วเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด S3 และแบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เรียกว่า สารสกัด Sd3

3.3.2.4 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่โดยเติม สารกันเสีย (Sorbic acid 60 mmol/L) ทำตามข้อ 3.3.1.2 แต่เติม Sorbic acid 0.0673 g ในขั้นตอนการบดสมอง แล้วเก็บสารสกัดไว้ก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด S4 และแบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด Sd4

3.3.2.5 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่โดยเติม สารกันเสีย (Sorbic acid 80 mmol/L) ทำตามข้อ 3.3.1.2 แต่เติม Sorbic acid 0.0897 g ในขั้นตอนการบดสมอง แล้วเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด S5 และแบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เรียกว่า สารสกัด Sd5

3.3.2.6 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่โดยเติม สารกันเสีย (Sorbic acid 100 mmol/L) ทำตามข้อ 3.3.1.2 แต่เติม Sorbic acid 0.1121 g ในขั้นตอนการบดสมอง แล้วเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด S6 และแบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เรียกว่า สารสกัด Sd6

3.3.3 ตอนที่ 3 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติม สารกันเสีย Benzoic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.3.3.1 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ ทำตามข้อ 3.3.1.2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด B1 และแบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เรียกว่า สารสกัด Bd1

3.3.3.2 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่โดยเติม สารกันเสีย (Benzoic acid 50 mmol/L) ทำตามข้อ 3.3.1.2 แต่เติม Benzoic acid 0.1538 g ในขั้นตอนการบดสมอง แล้วเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด B2 และแบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด Bd2

3.3.3.3 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่โดยเติม สารกันเสีย (Benzoic acid 100 mmol/L) ทำตามข้อ 3.3.1.2 แต่เติม Benzoic acid 0.3078 g ในขั้นตอนการบดสมอง แล้วเก็บสารสกัดไว้ ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด B3 และแบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด Bd3

3.3.3.4 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่โดยเติม สารกันเสีย (Benzoic acid 500 mmol/L) ทำตามข้อ 3.3.1.2 แต่เติม Benzoic acid 1.5388 g ในขั้นตอนการบดสมอง แล้วเก็บสารสกัดไว้ที่

อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด B4 และแบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด Bd4

3.3.3.5 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่โดยเติม สารกันเสีย (Benzoic acid 1000 mmol/L) ทำตามข้อ 3.3.1.2 แต่เติม Benzoic acid 3.0776 g ในขั้นตอนการบดสมอง แล้วเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด B5 และแบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด Bd5

3.3.4 ตอนที่ 4 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ แล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

3.3.4.1 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ ทำตามข้อ 3.3.1.2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด b1 และแบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เรียกว่า สารสกัด b2

3.3.4.2 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่โดยเติม สารกันเสีย (Sorbic acid 100 mmol/L) ทำตามข้อ 3.3.1.2 แต่เติม Sorbic acid 0.112 gในขั้นตอนการบดสมอง สารสกัดที่ได้เรียกว่าสารสกัด S11 จากนั้น นำสารสกัดออกมา 5 ml ทำการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 70% 5 ml นำไปหมุนเหวี่ยง 5 นาที นำตะกอนที่ได้เติม phosphate buffer pH 8.0 ปริมาตร 1 ml แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง 5 นาที แยกส่วนใสออกมา สารสกัดที่ได้เรียกว่า สารสกัด S12 แล้วเก็บไว้ที่ -15 องศาเซลเซียส

3.3.4.3 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่โดยเติม สารกันเสีย (Sorbic acid 1000 mmol/L) ทำตามข้อ 3.3.1.2 แต่เติม Sorbic acid 1.121 g ในขั้นตอนการบดสมอง แล้วเก็บสารสกัดไว้สารสกัดที่ได้เรียกว่าสารสกัด S21 แล้วปิเปตสารสกัดออกมา 5 ml ทำการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 70% 5 ml นำไปหมุนเหวี่ยง 5 นาที นำตะกอนที่ได้เติม phosphate buffer pH 8.0 1 ml นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง 5 นาที บันทึกปริมาตร สารสกัดที่ได้เรียกว่า สารสกัด S22 แล้วเก็บไว้ที่ -15 องศาเซลเซียส

3.3.4.4 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่โดยเติม สารกันเสีย (Benzoic acid 100 mmol/L) ทำตามข้อ 3.3.1.2 แต่เติม Benzoic acid 0.212 g ในขั้นตอนการบดสมอง แล้วเก็บสารสกัดไว้สารสกัดที่ได้เรียกว่าสารสกัด B11 จากนั้นปิเปตสารสกัดออกมา 5 ml ทำการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 70% 5 ml นำไปหมุนเหวี่ยง 5 นาที นำตะกอนที่ได้เติม phosphate buffer pH 8.0 1 ml นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง 5 นาที บันทึกปริมาตร สารสกัดที่ได้เรียกว่า สารสกัด B12 นำไปเก็บไว้ที่ -15 องศาเซลเซียส

3.3.4. 5 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่โดยเติม สารกันเสีย (Benzoic acid 1000 mmol/L)

ทำตามข้อ 3.3.1.2 แต่เติม Benzoic acid 2.122 g ในขั้นตอนการบดสมอง แล้วเก็บสารสกัดไว้ สารสกัดที่ได้เรียกว่าสารสกัด B21 นำสารสกัดออกมา 5 ml ทำการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 70% 5 ml นำไปหมุนเหวี่ยง 5 นาที นำตะกอนที่ได้เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 1 ml นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง 5 นาที บันทึกปริมาตร สารสกัดที่ได้เรียกว่า สารสกัด B22 แล้วเก็บไว้ที่ -15 องศาเซลเซียส

3.3.4.6 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่โดยเติม สารกันเสีย (Nitrate 100 mmol/L) ทำตามข้อ 3.3.1.2 แต่เติม Nitrate 0.069 g ในขั้นตอนการบดสมอง แล้วเก็บสารสกัดไว้สารสกัดที่ได้เรียกว่าสารสกัด N11 ปิเปตสารสกัดออกมา 5 ml ทำการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 70% 5 ml นำไปหมุนเหวี่ยง 5 นาที นำตะกอนที่ได้เติม phosphate buffer pH 8.0 1 ml นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง 5 นาที บันทึกปริมาตร สารสกัดที่ได้เรียกว่า สารสกัด N12 แล้วเก็บไว้ที่ -15 องศาเซลเซียส

3.3.4.7 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่โดยเติม สารกันเสีย (Nitrate 1000 mmol/L) ทำตามข้อ 3.3.1.2 แต่เติม Nitrate 2.122 g ในขั้นตอนการบดสมอง แล้วเก็บสารสกัดไว้สารสกัดที่ได้เรียกว่าสารสกัด N21 แล้วปิเปตสารสกัดออกมา 5 ml ทำการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 70% 5 ml นำไปหมุนเหวี่ยง 5 นาที นำตะกอนที่ได้เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 1 ml นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง 5 นาที บันทึกปริมาตร สารสกัดที่ได้เรียกว่า สารสกัด N22 แล้วเก็บไว้ที่ -15 องศาเซลเซียส

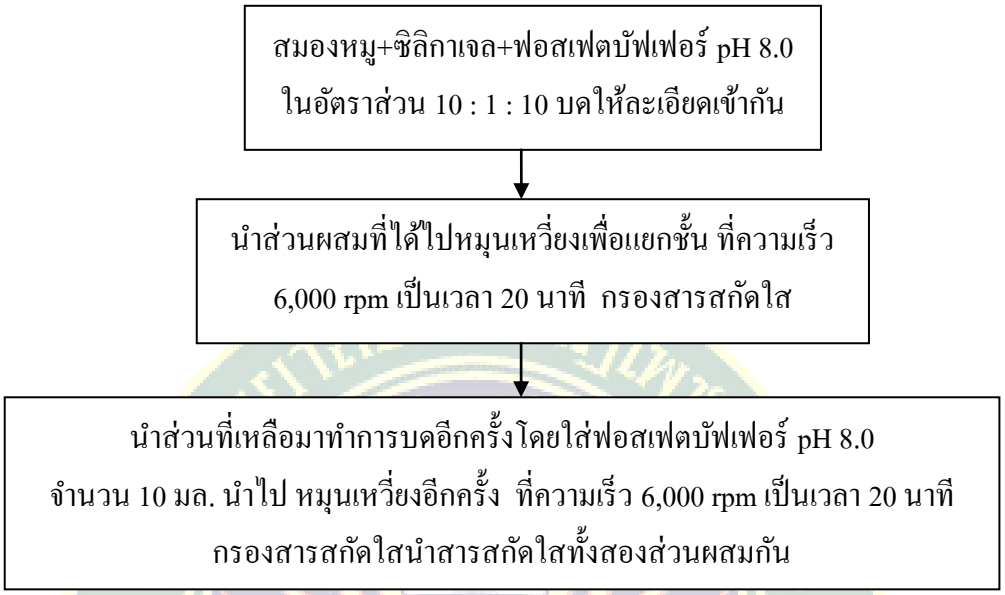
3.4 การสกัดเอนไซม์จากสมองหมู

แนวทางในการดำเนินการวิจัยประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 2 ขั้นตอน คือ

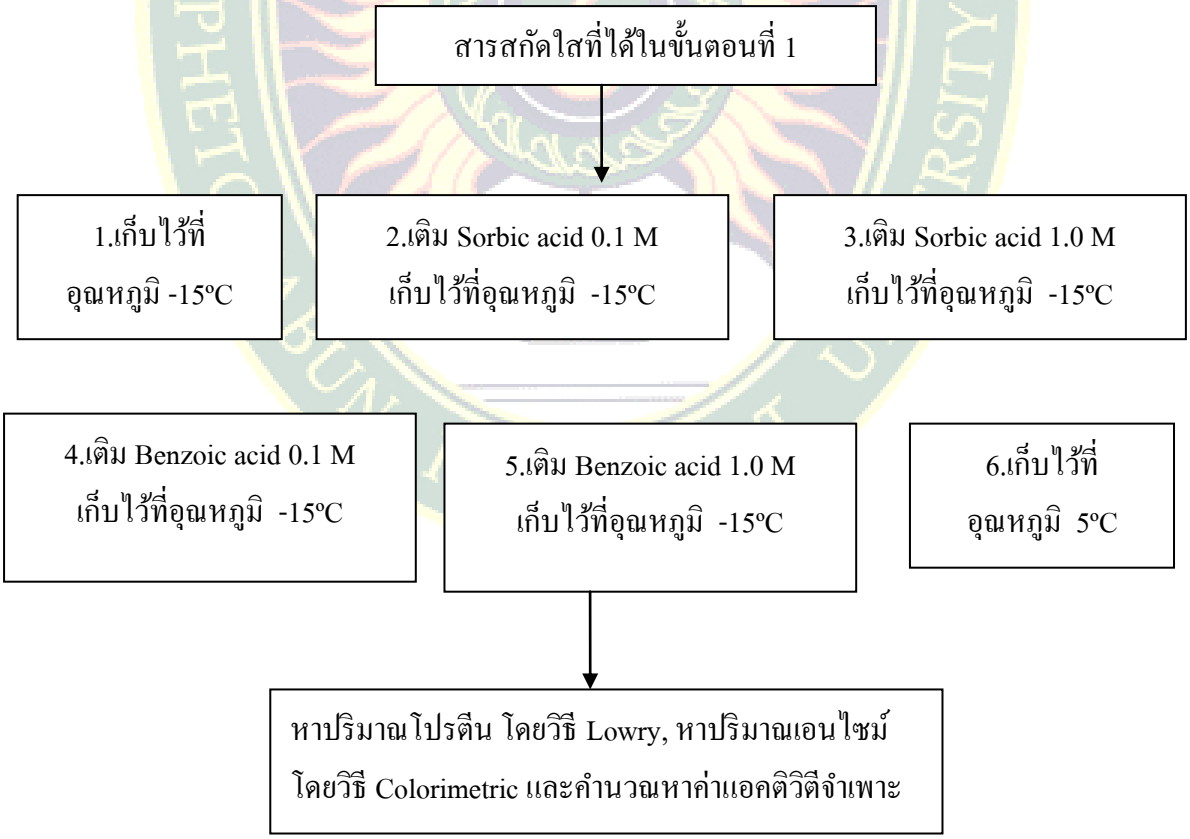
ขั้นตอนที่ 1 การสกัดอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสจากสมองหมู

ขั้นตอนที่ 2 เก็บรักษาเอนไซม์ ให้อยู่ได้นานและไม่เสื่อมคุณภาพโดยมีขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การสกัดอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสจากสมองหมู



ขั้นตอนที่ 2 เก็บรักษาเอนไซม์ ให้อยู่ได้นานและไม่เสื่อมคุณภาพโดยมีขั้นตอน ดังนี้



3.4.1 การสกัดเอนไซม์จากสมองหมู

3.4.1.1 การสกัดเอนไซม์จากสมองหมู

1. ชั่งสมองหมู ผสมกับซิลิกาเจล บดให้ละเอียด แล้วเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ในอัตราส่วน 10 : 1 : 10 ตามลำดับ

2. นำสมองหมูไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกชั้น ที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที

3. กรองสารสกัดใสส่วนบนซึ่งเป็นสารสกัดเอนไซม์ด้วยกระดาษกรอง จากนั้นนำส่วนที่เหลือมาทำการบดอีกครั้งโดยใส่ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 จำนวน 10 ml

4. นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นอีกครั้ง ที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที

5. กรองสารสกัดใสส่วนบนซึ่งเป็นสารสกัดเอนไซม์ด้วยกระดาษกรอง นำสารสกัดใสทั้งสองส่วนผสมกัน บันทึกปริมาตรของสารสกัดเอนไซม์ นำไปหาปริมาณโปรตีน ปริมาณเอนไซม์ และค่าแอคติวิตีจำเพาะ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส เรียกว่า สารสกัด A

3.4.1.2 การสกัดเอนไซม์จากสมองหมูโดยเติม สารกันเสีย (กรดซอร์บิค 100 mmol/L) ทำตามข้อ 3.4.1.1 แต่เติม Sorbic acid 0.1457 g เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด B

3.4.1.3 การสกัดเอนไซม์จากสมองหมูโดยเติม สารกันเสีย (กรดซอร์บิค 1,000 mmol/L) ทำตามข้อ 3.4.1.1 แต่เติม Sorbic acid 1.3455 g เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด C

3.4.1.4 การสกัดเอนไซม์จากสมองหมูโดยเติม สารกันเสีย (กรดเบนโซอิก 100 mmol/L) ทำตามข้อ 3.4.1.1 แต่เติม Benzoic acid 0.1648 g เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด D

3.4.1.5 การสกัดเอนไซม์จากสมองหมูโดยเติม สารกันเสีย (กรดเบนโซอิก 1,000 mmol/L)ทำตามข้อ 3.4.1.1 แต่เติม Benzoic acid 1.5875 g เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด E

3.4.1.6 การสกัดเอนไซม์จากสมองหมู ทำตามข้อ 3.4.1.1 แต่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เรียกว่าสารสกัด F

3.4.2 การเปรียบเทียบการสกัดเอนไซม์จากสมองหมูกับสมองไก่

ทำการทดลองสกัดเอนไซม์ในสมองหมูและสมองไก่ในสภาวะต่างๆ ดังตาราง 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดงชื่อของสารสกัดต่างๆ ในสมองหมูและสมองไก่เมื่อสกัดเสร็จแล้ว

การสกัดเอนไซม์จากสมอง ในสภาวะ และการเก็บรักษา	ชื่อสารสกัดเอนไซม์ จากสมองหมู	ชื่อสารสกัดเอนไซม์ จากสมองไก่
1. สารสกัดเอนไซม์จากสมองหมู และสมองไก่ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –15°C	สารสกัด A	สารสกัด ก
2.สารสกัดเอนไซม์จากสมองหมู และสมองไก่ โดยเติมกรดซอร์บิค 100 mmol/l ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –15°C	สารสกัด B	สารสกัด ข
3.สารสกัดเอนไซม์จากสมองหมู สมองไก่ โดยเติมกรดซอร์บิค 1,000 mmol/lที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –15°C	สารสกัด C	สารสกัด ค
4.สารสกัดเอนไซม์จากสมองหมู สมองไก่ โดยเติมกรดเบนโซอิก 100 mmol/lที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –15°C	สารสกัดD	สารสกัด ง
5.สารสกัดเอนไซม์จากสมองหมู สมองไก่ โดยเติมกรดซอร์บิค 1,000 mmol/lที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –15°C	สารสกัด E	สารสกัด จ
6.สารสกัดเอนไซม์จากสมองหมู สมองไก่ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C	สารสกัด F	สารสกัด ฉ

สกัดเอนไซม์ในสมองหมูและสมองไก่เก็บรักษาสภาพไว้ที่สภาวะที่ต่างกัน แล้วนำไปศึกษาสภาพการคงตัว หาปริมาณโปรตีน ปริมาณเอนไซม์ และหาค่าความสามารถจำเพาะในการทำงานของเอนไซม์(specific activity)**ต่อไป**

3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารสกัดเอนไซม์จากสมองโดยวิธี Lowry

3.5.1 วิธีการเตรียมสาร

สารละลาย A

ชั่งสาร Na_2CO_3 2 g นำไปละลายใน 0.1 M NaOH แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วยสารละลาย NaOH

สารละลาย B

ชั่งสาร $CuSO_4 .5H_2O$ 2 g ละลายน้ำกลั่น 40 ml และชั่งสาร potassium sodium tartrate 1 g ละลายน้ำกลั่น 40 ml นำสารทั้งสองผสมกันแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

สารละลาย C

นำสารละลาย A 50 ml ผสมกับสารละลาย B 1 ml โดยผสมเมื่อต้องการใช้

สารละลาย D

นำสารละลาย follin-ciocalteau's phenol reagent มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1

สารละลายมาตรฐาน BSA

ชั่งสาร BSA 0.1250 g ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 500 ml

3.5.2 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

3.5.2.1 การทำกราฟมาตรฐาน

ในการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry โดยใช้การทำปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนในสารละลายมาตรฐาน BSA กับ folin-ciocalteas's phenol ซึ่งจะได้สารละลายสีฟ้า แล้ววัดการดูดกลืนแสงของตัวอย่างด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เมื่อเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA โดยปริมาตรสารละลายที่ใช้แสดงดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.4 ปริมาตรและสารต่างๆที่ใช้สำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

สารที่ใช้	หลอดที่					
	แบลงค์	1	2	3	.....	10
สารละลายมาตรฐาน BSA (ml)	-	0.1	0.2	0.3	.....	1.0
น้ำกลั่น (ml)	1.0	0.9	0.8	0.7	.....	-
สารละลาย C (ml)	5	5	5	5	.....	5
เขย่าด้วยเครื่อง VORTEX ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที						
สารละลาย D (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	.....	0.5
เขย่า ด้วยเครื่อง VORTEX ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที						
บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร						

3.5.2.2 การหาปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง

1. ปิเปตสารสกัดเอนไซม์ มาอย่างละ 0.1 ml ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก 4 หลอด ตามลำดับเพื่อทำการเจือจางสารสกัดเอนไซม์

2. ปิเปต Phosphate buffer pH 8.0 มา 0.9 ml ลงในหลอดทั้ง 4 เขย่าให้เข้ากัน สารผสมที่ได้เรียกว่า สต๊อกตัวอย่าง

3. ทำการทดลองเหมือนกับข้อ 3.5.2.1 เพียงแต่ใช้สารสกัดเอนไซม์ปิเปตจากสต๊อกตัวอย่างมา 0.1 ml แทน สารละลาย BSA และใช้น้ำกลั่น 0.9 ml ทุกหลอด (โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็น แบลงค์)

3.6 การวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในสารสกัดจากสมอง

3.6.1 วิธีการเตรียมสาร

3.6.1.1 สารตั้งต้น acetlythiocholine iodide (75 mmol/L)

ชั่ง acetylthiocholine iodide มา 108.35 mg ละลายด้วยน้ำกลั่น 5 ml จะได้สารตั้งต้น 75 mmol/L (เก็บใส่ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C และเก็บไว้ใช้ไม่เกิน 7วัน)

3.6.1.2 สารละลาย DTNB : (DTNB 10 mmol/L : $NaHCO_3$ 17.85 mmol/L)

ชั่ง DTNB มา 39.6 mg ละลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 จำนวน 10 ml และเติม Sodium hydrogen carbonate 15 mg คนให้ละลาย

3.6.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

3.6.2.1 การทำกราฟมาตรฐาน

วิธีการหาปริมาณเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอร์เรส มีด้วยกันหลายวิธี แต่ในวิจัยนี้ได้เลือกวิธี colorimetric เพราะว่าการหาปริมาณรวดเร็ว ง่าย และประหยัด โดยวิธีนี้จะอาศัยการทำงานของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสโดยให้ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น (acetylthiocholine iodide) และใช้ DTNB เป็นตัวทำปฏิกิริยากับผลิตภัณฑ์ที่ได้ จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เป็นสีเหลืองและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer โดยใช้สารสกัดเอนไซม์ที่นำมาทดลองได้จากสารสกัด มาอย่างละ 0.1 ml ซึ่งแสดงวิธีปฏิบัติไว้ในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 ปริมาตรและสารต่างๆที่ใช้สำหรับหาปริมาณเอนไซม์ในสารสกัดเอนไซม์

สาร	ปริมาตรที่ใช้	หน่วย
สารสกัดเอนไซม์	0.1	ml
0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0	2.9	ml
Set auto zero ค่าดูดกลืนแสงที่ 412 nm		
DTNB	100	µl
Acetythiocholine iodide	2	µl
บันทึกค่าดูดกลืนแสงที่ 412 nm ทุก 1 นาที จนครบ 6 นาที		

สามารถคำนวณหาปริมาณเอนไซม์ในสารสกัดเอนไซม์ โดย ใช้ค่าการดูดกลืนแสงนาทีที่ 1 และนาทีที่ 6 ของสารสกัดเอนไซม์ ซึ่งคำนวณได้จากสูตรดังนี้ (Süleyman Baykal,1996)

$$\text{ปริมาณเอนไซม์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงนาทีที่ 6} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงนาทีที่ 1}}{\text{นาทีที่ 6} - \text{นาทีที่ 1}}$$

3.7 การหาค่า specific activity

ค่า specific activity คือ ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เป็นการวัดเฉพาะปริมาณของเอนไซม์ที่มีอยู่โดยไม่มีโปรตีนอื่นปนเปื้อน ซึ่งไม่ใช่หน่วยในเชิงเปรียบเทียบ จึงต้องวัดความสามารถจำเพาะในการทำงานของเอนไซม์ (specific activity) เพิ่มเติม โดยความสามารถจำเพาะในการทำงานของเอนไซม์ หมายถึง จำนวนหน่วยของเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ความสามารถจำเพาะของสารสกัดเอนไซม์ที่เราสนใจมีค่าต่ำ ในเวลา เริ่มต้น และ จะเพิ่มขึ้นระหว่างการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ เมื่อเอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูง จะมีค่ามาก ขึ้นตามไปด้วย ดังนั้น ความสามารถจำเพาะในการทำงานของเอนไซม์ ก็คือ การวัดความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ นั่นเอง สามารถคำนวณหาค่า specific activity ได้จากสูตร

$$\text{specific activity} = \frac{\text{ปริมาณเอนไซม์ (units/gสมอง)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (mg/gสมอง)}}$$

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4. 1 ตอนที่ 1 การสกัดเอนไซม์จากสมองไก่

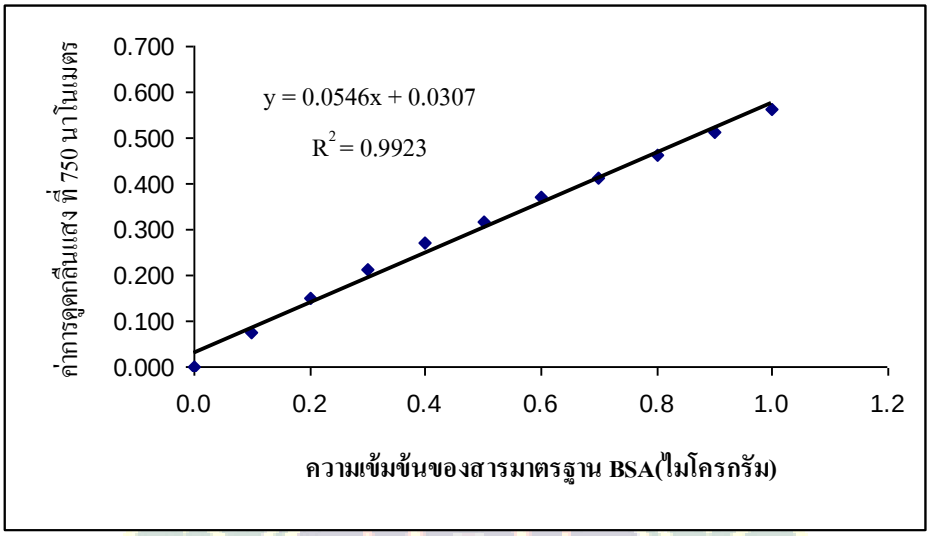
การทดลองครั้งนี้ทำการสกัดเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสจากสมองไก่ เมื่อสกัดเอนไซม์แล้วทำการทดลองเก็บไว้ 4 สภาวะ 1) เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -15°C 2) สารสกัดเอนไซม์เติมกรดซอร์บิค 100 mmol/l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C 3) สารสกัดเอนไซม์ที่เติมกรดซอร์บิค100น mmol/l 1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C 4) สารสกัดเอนไซม์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C จากนั้นนำสารสกัดแต่ละตัวมาหาปริมาณโปรตีน ปริมาณเอนไซม์และ specific activity

4.1.1 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

การหาปริมาณโปรตีนในสารสกัดเอนไซม์ จะใช้สารละลาย BSA เป็นสารมาตรฐานทำปฏิกิริยากับ folin-ciocalteu's phenol reagent ซึ่งสีที่ได้คือสารละลายสีฟ้า และมีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm ซึ่งจะแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆดังตารางที่ 4.1 และเมื่อเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA ความเข้มข้นต่างๆ ดังภาพที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน BSA ของความเข้มข้นต่างๆ

หลอดที่	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm
แบลงค์	0.0	0.000
1	0.1	0.074
2	0.2	0.148
3	0.3	0.213
4	0.4	0.269
5	0.5	0.318
6	0.6	0.369
7	0.7	0.412
8	0.8	0.462
9	0.9	0.512
10	1.0	0.562



ภาพที่ 4.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA

4.1.2 ผลการหาปริมาณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่

ผลการหาปริมาณโปรตีนจากสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C และ5°C และสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดซอร์บิค 100 mmol/l และ 1,000 mmol/l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C ได้ผลดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการหาปริมาณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่

สารสกัดเอนไซม์ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของโปรตีน (µg/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/gสมองไก่)
1.สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C (สารสกัด I)	0.79	0.13
2. สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดซอร์บิค 100 mmol/l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C (สารสกัด II)	0.67	0.12
3. สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดซอร์บิค 1,000 mmol/l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C (สารสกัด III)	0.71	0.12
4.สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C (สารสกัด IV)	0.81	0.14

4.1.3 ผลการหาปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เก็บรักษาไว้เวลาต่างๆ

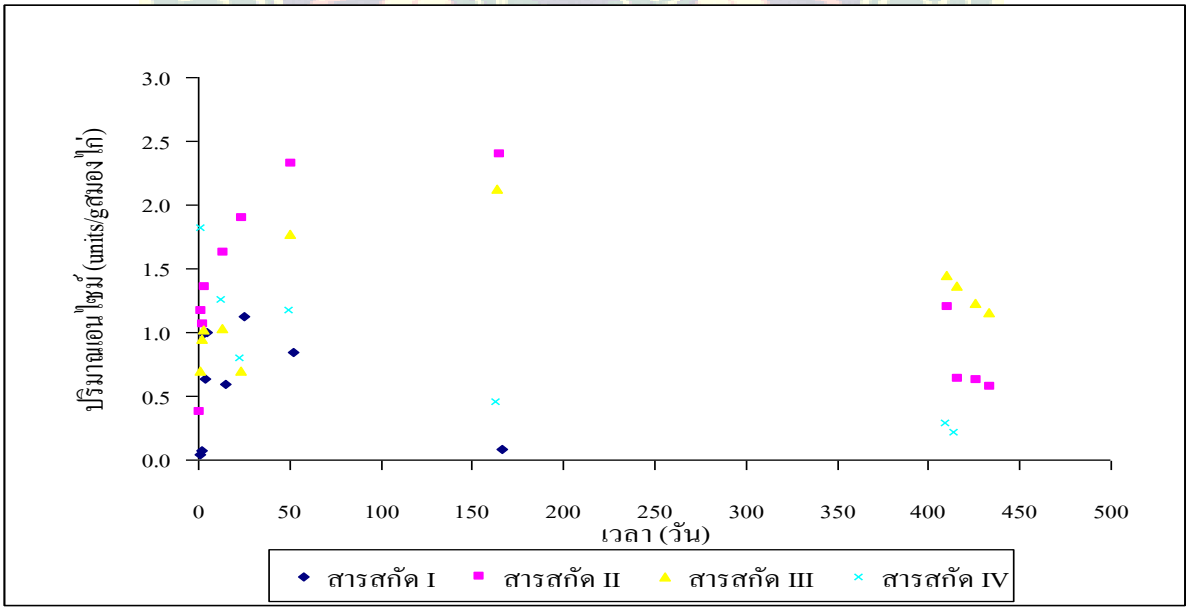
ผลการหาปริมาณเอนไซม์จากสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C และ5°C และสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมสารกันเสีย (กรดซอร์บิค 100 mmol/l และ 1,000 mmol/l) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C และทำการทดลอง เป็นเวลา 434 วัน ดังตารางที่ 4.3และได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณเอนไซม์กับเวลาในการทำการทดลอง ดังภาพที่ 4.2

ตารางที่ 4.3 ผลการหาปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่

เวลา (วัน)	ปริมาณเอนไซม์ (Units / g สมองไก่)			
	สารสกัด I เอนไซม์เก็บไว้ที่-15°C	สารสกัด II เอ็นไซม์เติมกรดซอร์บิค 0.1M เก็บไว้ที่-15°C	สารสกัด III เอ็นไซม์เติมกรดซอร์บิค 1.0M เก็บไว้ที่-15°C	สารสกัด IV เอนไซม์เก็บไว้ที่ 5°C
1	0.04	0.37	0.70	1.82
2	0.07	1.17	0.95	1.37
3	0.99	1.06	1.02	-
4	0.64	1.35	-	-
5	1.00	-	-	-
12	-	-	-	1.26
13	-	-	1.03	-
14	-	1.62	-	-
15	0.59	-	-	-
22	-	-	-	0.80
23	-	-	0.70	-
24	-	1.90	-	-
25	1.13	-	-	-
49	-	-	-	1.18
50	-	-	1.77	-
51	-	2.32	-	-
52	0.84	-	-	-
163	-	-	-	0.46

164	-	-	2.12	-
165	-	2.40	-	-
166	0.08	-	-	-
409	-	-	-	0.29
410	-	-	1.45	-
411	-	1.20	-	-
414	-	-	-	0.22
415	-	-	1.36	-
416	-	0.64	-	-
426	-	-	1.23	-
427	-	0.62	-	-
433	-	-	1.16	-
434	-	0.57	-	-

จากตารางที่ 4.3 นำมาเขียนกราฟระหว่างผลการหาปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่และเวลาที่เก็บรักษาผลดังภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2ปริมาณเอนไซม์ในสารสกัดเมื่อเก็บไว้เวลาต่างๆ

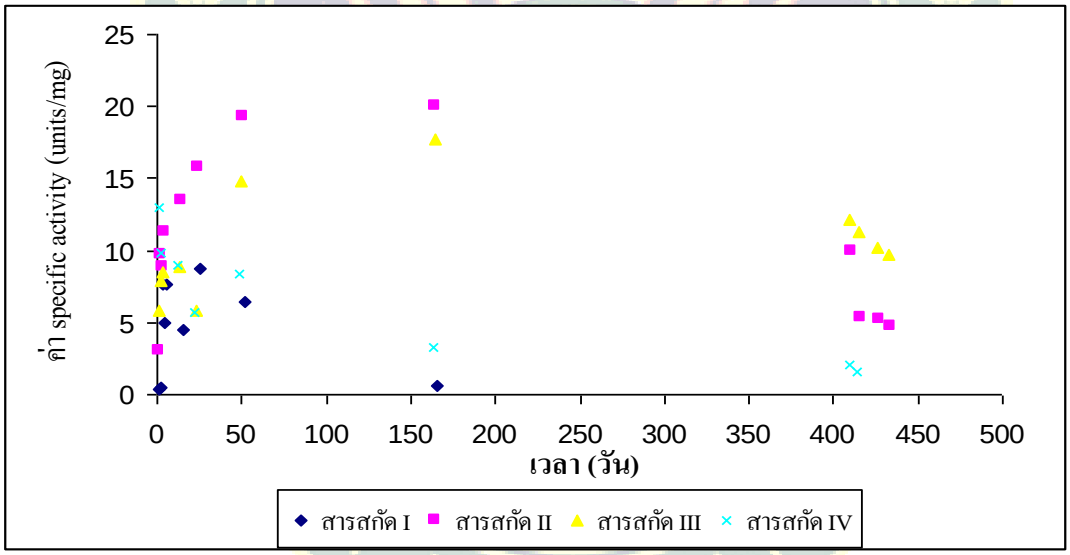
4.1.4 ผลการหาค่า specific activity ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่

ผลการหาค่า specific activity ของเอนไซม์ได้ผลดังตารางที่ 4.4 จากนั้นเขียนกราฟ ได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า specific activity กับเวลาในการเก็บรักษาสารสกัดเอนไซม์ ดังภาพที่ 4.3

ตารางที่ 4.4 ผลการคำนวณหาค่า specific activity ของสารสกัดต่างๆในสมองไก่

เวลา (วัน)	ค่า specific activity ของสารสกัดต่างๆในสมองไก่ (Units / mg Protein)			
	สารสกัด I	สารสกัด II	สารสกัด III	สารสกัด IV
1	0.31	3.08	5.83	13.00
2	0.54	9.75	7.92	9.79
3	7.62	8.83	8.50	-
4	4.92	11.25	-	-
5	7.69	-	-	-
12	-	-	-	9.00
13	-	-	8.85	-
14	-	13.50	-	-
15	4.54	-	-	-
22	-	-	-	5.71
23	-	-	5.83	-
24	-	15.83	-	-
25	8.69	-	-	-
49	-	-	-	8.43
50	-	-	14.75	-
51	-	19.33	-	-
52	6.46	-	-	-
163	-	-	-	3.29
164	-	-	17.67	-
165	-	20.00	-	-
166	0.62	-	-	-
409	-	-	-	2.07
410	-	-	12.08	-

เวลา (วัน)	Specific activity (units/mgสมองไก่)			
	สารสกัด I	สารสกัด II	สารสกัด III	สารสกัด IV
411	-	10.00	-	-
414	-	-	-	1.57
415	-	-	11.33	-
416	-	5.33	-	-
426	-	-	10.25	-
427	-	5.17	-	-
433	-	-	9.67	-
434	-	4.75	-	-



ภาพที่ 4.3 ค่า specific activity ของเอนไซม์ในสารสกัดเมื่อเก็บไว้เวลาต่างๆ

จากการทดลองพบว่าการเติมกรดซอร์บิคทำให้เอ็นไซม์ยังคงสภาพและใช้งานได้นาน การเติมกรดซอร์บิคที่ความเข้มข้น 100 mmol/l ทำให้เอ็นไซม์ทำงานได้ดีในช่วงหลังสกัดจนถึง 150 วัน หลังจาก 150- 434 วัน เอ็นไซม์ทำงานได้ลดลง

4.2 ตอนที่ 2 ผลการสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติม กรดซอร์บิคที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.2.1 ผลการหาปริมาณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่

ผลการหาปริมาณโปรตีนซึ่งได้จากสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดซอร์บิคที่ความเข้มข้นต่างๆ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C และ5°C ได้ผลดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลการหาปริมาณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมสารกันเสีย กรดซอร์บิคที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัดจากสมองไก่ที่เติมกรดซอร์บิค (mmol/l)	ปริมาณโปรตีน (mg/gสมองไก่)					
	เวลา (วัน)					
	1	10	15	42	49	55
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C (S1)	0.0345	0.025	0.026	0.038	0.024	0.012
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดซอร์บิค 20 mmol/l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C (S2)	0.0449	0.029	0.023	0.032	0.039	0.014
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดซอร์บิค 40 mmol/l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C (S3)	0.0352	0.027	0.030	0.029	0.041	0.029
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดซอร์บิค 60 mmol/l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C (S4)	0.0387	0.037	0.039	0.032	0.043	0.019
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดซอร์บิค 80 mmol/l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C (S5)	0.0362	0.017	0.020	0.040	0.024	0.029
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดซอร์บิค 100 mmol/l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C (S6)	0.0319	0.024	0.025	0.035	0.020	0.021
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C (Sd1)	0.0461	0	0	0	0	0
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดซอร์บิค 20 mmol/l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C (Sd2)	0.0352	0	0	0	0	0
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดซอร์บิค 40 mmol/l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C (Sd3)	0.0352	0	0	0	0	0
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดซอร์บิค 60	0.0372	0	0	0	0	0

mmol/l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C (Sd4)						
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดซอร์บิค 80 mmol/l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C (Sd5)	0.0337	0	0	0	0	0
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดซอร์บิค 20 mmol/l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C (Sd6)	0.0345	0	0	0	0	0

จากตารางพบว่าสารสกัดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C เมื่อเวลาผ่านไป 10 วันสลายตัวหมด

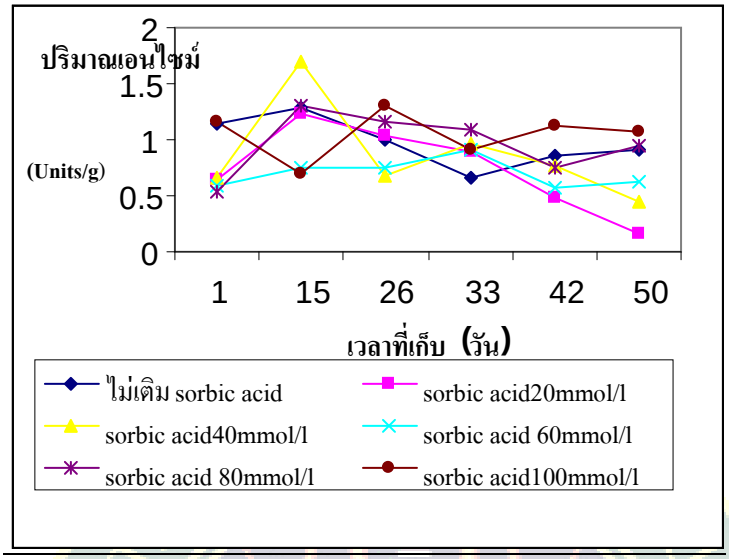
4.2.2 ผลการหาปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดซอร์บิค

ผลการหาปริมาณเอนไซม์ซึ่งได้จากสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดซอร์บิคที่ความเข้มข้นต่างๆ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C และ5°C ได้ผลดังตารางที่ 4.6 เมื่อนำผลไปเขียนกราฟดังภาพที่ 4.4

ตารางที่ 4.6 ผลการหาปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมสารกันเสีย กรดซอร์บิคที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัดจากสมองไก่	ปริมาณเอนไซม์ (Units / g สมองไก่)					
	เวลา (วัน)					
	1	15	26	33	42	50
S1	1.139	1.28	1.00	0.654	0.866	0.913
S2	0.643	1.23	1.04	0.884	0.475	0.158
S3	0.660	1.70	0.67	0.969	0.762	0.447
S4	0.584	0.75	0.75	0.903	0.058	0.623
S5	0.527	1.30	1.16	1.090	0.749	0.945
S6	1.152	0.69	1.30	0.917	1.123	1.074
Sd1	0.959	0	0	0	0	0
Sd2	1.133	0	0	0	0	0
Sd3	0.683	0	0	0	0	0
Sd4	0.597	0	0	0	0	0
Sd5	0.457	0	0	0	0	0
Sd6	0.492	0	0	0	0	0

จากตารางพบว่าสารสกัดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C เมื่อเวลาผ่านไป 10 วันสลายตัวหมด



ภาพที่ 4.4 แสดงปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมสารกันเสีย กรดซอร์บิค ที่ความเข้มข้นต่างๆ

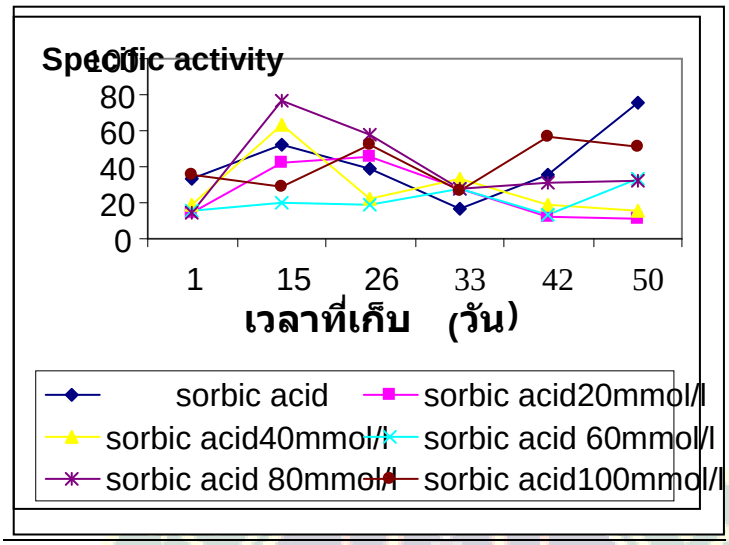
จากกราฟพบว่าสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมสารกันเสีย กรดซอร์บิค ที่ความเข้มข้นต่างๆ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C เมื่อเวลาผ่านไป 50 วัน ยงพบเอนไซม์อยู่ การเติมกรดซอร์บิค ที่ความเข้มข้น 1,000 mmol/l ทำให้ปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดยังคงอยู่ปริมาณที่สูง

4.2.3 ผลการหาค่า specific activity ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดซอร์บิค

ผลการหาปริมาณ specific activity ซึ่งได้จากสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดซอร์บิคที่ความเข้มข้นต่างๆ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C และ5°C ได้ผลดังตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.5

ตารางที่ 4.7 ผลการหาค่า Specific activity ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมสารกันเสีย กรดซอร์บิค ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัดจากสมองไก่	Specific activity (units/mgสมองไก่)					
	เวลาที่เก็บ (วัน)					
	1	15	26	33	42	50
S1	33.01	51.20	38.46	17.21	36.08	76.08
S2	14.32	42.41	45.22	27.62	12.18	11.29
S3	18.75	62.96	22.33	33.41	18.59	15.41
S4	15.09	20.27	19.23	28.22	1.35	32.79
S5	14.56	76.47	58.00	27.25	31.21	32.58
S6	36.11	28.75	52.00	26.2	56.15	51.14
Sd1	20.80	0	0	0	0	0
Sd2	32.19	0	0	0	0	0
Sd3	19.40	0	0	0	0	0
Sd4	16.05	0	0	0	0	0
Sd5	13.56	0	0	0	0	0
Sd6	14.26	0	0	0	0	0



ภาพที่ 4.5 แสดงค่า Specific activity ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมสารกันเสีย กรดซอร์บิค ที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.3 ตอนที่ 3 ปริมาณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดเบนโซอิค

4.3.1 ผลการหาปริมาณโปรตีน

ผลการหาปริมาณโปรตีนซึ่งได้จากสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดเบนโซอิคที่ความเข้มข้นต่างๆ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C และ5°C ได้ผลดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ผลการหาปริมาณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมสารกันเสีย กรดเบนโซอิก ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัด	ปริมาณโปรตีน (mg/gสมองไก่)			
	เวลา (วัน)			
	1	28	35	41
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C (B1)	0.0318	0.0223	0.0149	0.0183
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดเบนโซอิค 50mmol/lเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C (B2)	0.0196	0.0189	0.0122	0.0101
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดเบนโซอิค 100mmol/lเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C (B3)	0.0196	0.0210	0.0203	0.0115
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดเบนโซอิค 500mmol/lเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C (B4)	0.0156	0.0135	0.0149	0.0108
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดเบนโซอิค 1,000mmol/l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C (B5)	0.0014	0.0014	0.0007	0.0007
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C (Bd1)	0.0290	0	0	0
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดเบนโซอิค 50mmol/lเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C (Bd2)	0.0215	0	0	0
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดเบนโซอิค 100mmol/lเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C (Bd3)	0.0303	0	0	0
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดเบนโซอิค 500mmol/lเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C (Bd4)	0.0227	0	0	0
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดเบนโซอิค 1,000mmol/l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C Bd5	0.0183	0	0	0

จากการทดลองพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 7 วันสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C จะเสื่อมสภาพสลายตัวจนหมด

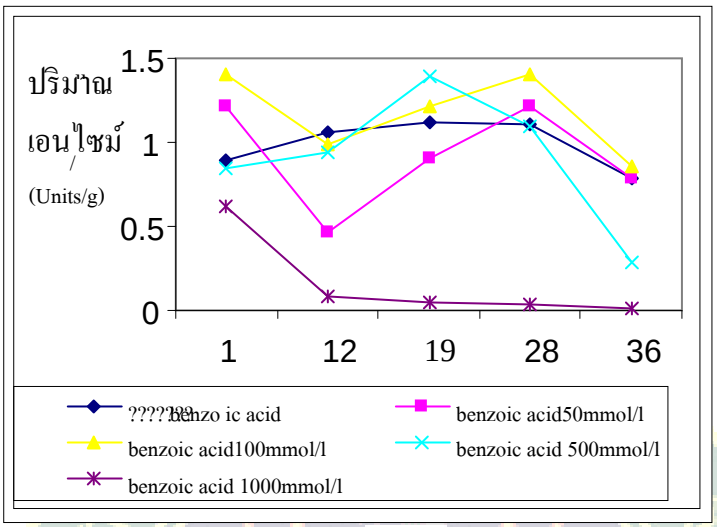
4.3.2 ปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดเบนโซอิก ที่ความเข้มข้นต่าง

ผลการหาปริมาณเอนไซม์ซึ่งได้จากสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดเบนโซอิคที่ความเข้มข้นต่างๆ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C และ5°C ได้ผลดังตารางที่ 4.9 และภาพที่ 4.6

ตารางที่ 4.9 ผลการหาปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติม กรดเบนโซอิก ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัด	ปริมาณเอนไซม์ (Units / g สมองไก่)				
	เวลา (วัน)				
	1	12	19	28	36
B1	0.89	1.06	1.12	1.11	0.78
B2	1.22	0.47	0.90	1.21	0.78
B3	1.40	0.99	1.22	1.40	0.86
B4	0.84	0.94	1.39	1.10	0.28
B5	0.62	0.08	0.05	0.03	0.01
Bd1	0.67	0	0	0	0
Bd2	0.64	0	0	0	0
Bd3	0.57	0	0	0	0
Bd4	0.58	0	0	0	0
Bd5	0.15	0	0	0	0

จากการทดลองพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 7 วันสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C จะเสื่อมสภาพสลายตัวจนหมด



ภาพที่ 4.6 แสดงปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมสารกันเสีย กรดเบนโซอิก ที่ความเข้มข้นต่างๆ

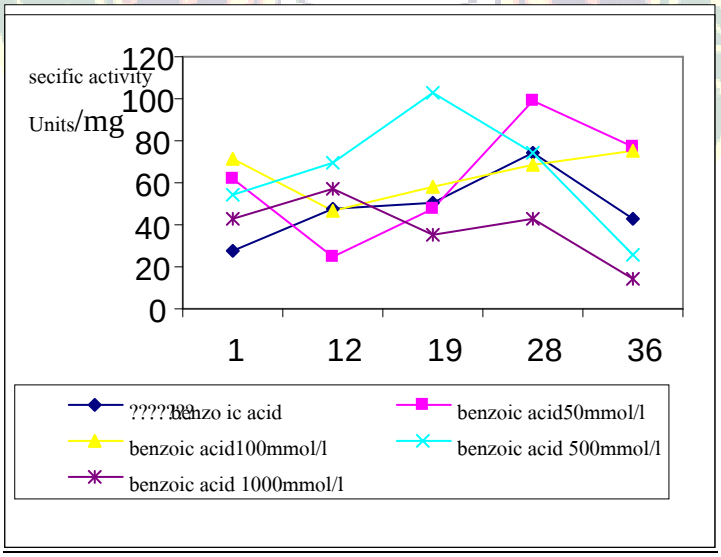
จากกราฟพบว่าการเติมสารกันเสีย กรดเบนโซอิก ที่ความเข้มข้น1000 mmol/l ปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ลดลง

4.3.3 ค่า specific activity ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดเบนโซอิก ที่ความเข้มข้นต่าง

ผลการหาปริมาณ specific activity ซึ่งได้จากสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดเบนโซอิคที่ความเข้มข้นต่างๆ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C และ5°C ได้ผลดังตารางที่ 4.10 และภาพที่ 4.7

ตารางที่ 4.10 ผลการหา Specific activity ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมสารกันเสีย กรดเบนโซอิก ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัด	Specific activity (units/mgสมองไก่)				
	เก็บ1วัน	เก็บ12วัน	เก็บ19วัน	เก็บ28วัน	เก็บ36วัน
B1	27.99	47.53	50.22	74.50	42.62
B2	62.24	24.87	47.62	99.18	77.23
B3	71.43	47.14	58.10	68.97	74.78
B4	53.84	69.63	102.96	73.83	25.93
B5	42.86	57.14	35.71	42.86	14.29
Bd1	23.10	0	0	0	0
Bd2	29.77	0	0	0	0
Bd3	19.00	0	0	0	0
Bd4	25.55	0	0	0	0
Bd5	8.20	0	0	0	0



ภาพที่ 4.7 แสดงค่า specific activityของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมสารกันเสีย กรดเบนโซอิก ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากกราฟพบว่าการเติมสารกันเสีย กรดเบนโซอิก ที่ความเข้มข้น1000 mmol/l ค่า specific activity ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ลดลง ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกการเติมสารกันเสีย กรดเบนโซอิก ที่ความเข้มข้น100 mmol/l

4.4 ตอนที่ 4 ผลการสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ ที่เติมสารกันเสีย อยู่ในสภาวะเย็น และตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

4.4.1 ปริมาณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ ที่เติมสารกันเสีย อยู่ในสภาวะเย็นและตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

ผลการหาปริมาณโปรตีนซึ่งได้จากสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ โดยเติมสารกันเสีย คือ กรดซอร์บิค กรดเบนโซอิค และ ไนเตรท ที่ความเข้มข้น 100 mmol/l และ1,000 mmol/lแล้วแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C ส่วนที่2 นำไปตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 70% แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C ได้ผลดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ผลปริมาณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ ที่เติมสารกันเสีย อยู่ในสภาวะเย็นและตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

สารสกัด	ปริมาณโปรตีน (mg/gสมองไก่)	
	ไม่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ (b1)	0.034	0.005
เติมกรดซอร์บิค 100 mmol/l (S11)	0.046	0.008
เติมกรดซอร์บิค 1,000 mmol/l (S21)	0.026	0.011
เติมกรดเบนโซอิค 100 mmol/l (B11)	0.017	0.006
เติมกรดเบนโซอิค 1,000 mmol/l 0.1 M (B21)	0.034	0.014
เติมไนเตรท100 mmol/l (N11)	0.037	0.005
เติมไนเตรท1,000 mmol/l 1.0 M (N21)	0.041	0.008

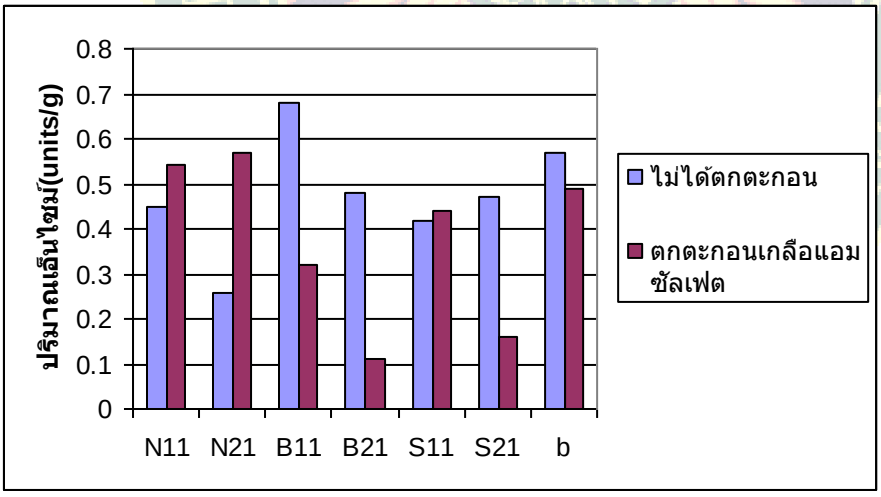
พบว่าเมื่อตกตะกอนสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วปริมาณโปรตีนลดลง

4.4.2 ปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ ที่เติมสารกันเสีย อยู่ในสภาวะเย็นและตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

ผลการหาปริมาณเอนไซม์ซึ่งได้จากสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ โดยเติมสารกันเสีย คือ กรดซอร์บิค กรดเบนโซอิค และ ไนเตรท แล้วนำไปตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ผลดังตารางที่ 4.12 และกราฟที่ 4.8

ตารางที่ 4.12 ผลการหาปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมสารกันเสีย กรดเบนโซอิก และตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

สารสกัด	ปริมาณเอนไซม์ (Units / g สมองไก่)	
	ไม่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต
สารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่(b1)	0.57	0.49
เติมกรดซอร์บิค 100 mmol/l 0.1 M (S11)	0.42	0.44
เติมกรดซอร์บิค 1,000 mmol/l (S21)	0.47	0.16
เติมกรดเบนโซอิค 100 mmol/l (B11)	0.68	0.32
เติมกรดเบนโซอิค 1,000 mmol/l (B21)	0.48	0.11
เติมไนเตรท100 mmol/l (N11)	0.45	0.54
เติมไนเตรท1,000 mmol/l 1.0 M (N21)	0.26	0.57



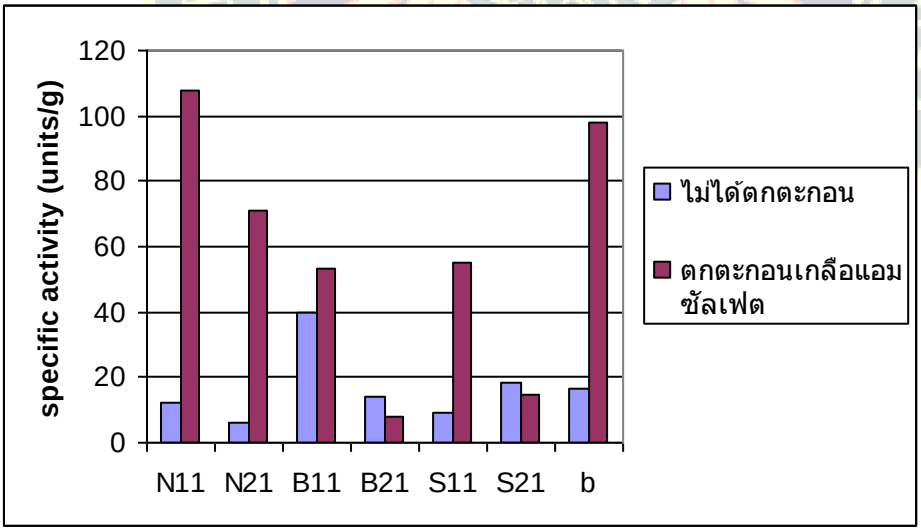
ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมสารกันเสีย กรดเบนโซอิก และตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

4.4.3 ค่า specific activity ของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ ที่เติมสารกันเสีย อยู่ในสภาวะเย็น และตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

ผลการหาปริมาณ specific activity ซึ่งได้จากสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ โดยเติมสารกันเสีย คือ กรดซอร์บิค กรดเบนโซอิค และ ไนเตรท ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ผลดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 ผลการหาปริมาณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมสารกันเสีย กรดเบนโซอิก ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัด	ค่าspecific activity ของเอนไซม์สมองไก่ (units/mgสมองไก่)	
	ไม่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต
b1	16.76	98.00
S11	9.13	55.00
S21	18.07	14.54
B11	40.00	53.33
B21	14.11	7.85
N11	12.16	108.00
N21	6.34	71.25



ภาพที่ 4.9 กราฟแสดงการเปรียบเทียบspecific activity สมองไก่ที่เติมสารต่างๆ แล้วตกตะกอนด้วยมเนียมซัลเฟต

จากกราฟพบว่าสมองไก่ที่เติมสารไนเตรท และตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตมีค่า specific activityสูง

4.5 ผลการสกัดเอนไซม์จากสมองหมู

จากการทดลองใช้สมองหมูผสมกับซิลิกาเจล และฟอสเฟตบัฟเฟอร์บดละเอียด เติม กรดซอร์บิค 100 mmol/l ,กรดซอร์บิค 1,000 mmol/l,กรดเบนโซอิก 100 mmol/l และกรดเบนโซอิก 1,000 mmol/l ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –15˚C และ 5˚C ได้สารสกัดเอนไซม์สำหรับหาปริมาณโปรตีน ปริมาณเอนไซม์ และ specific activity

4.5.1 ผลการหาปริมาณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์จากสมองหมู

ผลการหาปริมาณโปรตีนซึ่งได้จากสารสกัดเอนไซม์จากสมองหมู ที่เติม กรดซอร์บิค 100 mmol/l ,กรดซอร์บิค 1,000 mmol/l,กรดเบนโซอิก 100 mmol/l และกรดเบนโซอิก 1,000 mmol/l แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –15˚C และ 5˚C เมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 3, 8, 9 และ 10 วันได้ผลดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ผลการหาปริมาณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์จากสมองหมู

สารสกัดเอนไซม์	ปริมาณโปรตีน (mg/gสมองหมู)			
	เก็บ3 วัน	เก็บ8 วัน	เก็บ9 วัน	เก็บ10 วัน
1.สารสกัดเอนไซม์จากสมองหมูที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –15˚C (สารสกัด A)	0.0544	0.0792	0.0552	0.0386
2.สารสกัดเอนไซม์โดยเติมกรดซอร์บิค 100 mmol/l ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –15˚C (สารสกัด B)	0.053	0.0446	0.0423	0.0316
3.สารสกัดเอนไซม์โดยเติมกรดซอร์บิค 1,000 mmol/lที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –15 ˚C (สารสกัด C)	0.042	0.0549	0.0322	0.334
4.สารสกัดเอนไซม์โดยเติมกรดเบนโซอิก 100 mmol/lที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –15 ˚C (สารสกัด D)	0.0424	0.0787	0.0615	0.0354
5.สารสกัดเอนไซม์โดยเติมกรดซอร์บิค 1,000 mmol/lที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –15 ˚C (สารสกัด E)	0.0541	0.0507	0.0377	0.0330
6.สารสกัดเอนไซม์จากสมองหมูที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5˚C (สารสกัด F)	0.0546	0.0837	0.0872	0.072

4.5.2 ผลการหาปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดต่างๆ ในสมองหมู

ผลการหาปริมาณเอนไซม์ซึ่งได้จากสารสกัดเอนไซม์จากสมองหมู ที่เติมสารกันเสีย (กรดซอร์บิค 100 mmol/l ,กรดซอร์บิค 1,000 mmol/l,กรดเบนโซอิก 100 mmol/l และกรดเบนโซอิก 1,000 mmol/l) ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –15˚C และ 5˚C ได้ผลดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 ผลการหาปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดจากสมองหมู

สารสกัดเอนไซม์	ปริมาณเอนไซม์ (units/gสมองหมู)			
	เก็บ 3 วัน	เก็บ 8 วัน	เก็บ 9 วัน	เก็บ 10 วัน
1. สารสกัด A	0.1278	0.0339	0.0286	0.0234
2. สารสกัด B	0.0304	0.0152	0.0334	0.00608
3. สารสกัด C	0.0185	0.0238	0.0291	0.0212
4. สารสกัด D	0.0683	0.0574	0.0191	0.0355
5. สารสกัด E	0.0224	0.0252	0.0168	0.005607
6. สารสกัด F	0.00185	0.0449	0.0396	0.002642

4.5.3 ผลการหาspecific activityของสารสกัดต่างๆ ในสมองหมู

ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ ของสารสกัดต่างๆ ในสมองหมูผลดังตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 specific activity ของสารสกัดต่างๆ ในสมองหมู

จำนวนวันที่เก็บ / รักษาสารสกัดเอนไซม์	**specific activity(units/mgโปรตีน)**			
	3 วัน	**8 วัน**	**9 วัน**	**10 วัน**
1. สารสกัด A	2.349	0.4280	0.5181	0.6062
2. สารสกัด B	0.5661	0.3408	0.7895	0.1924
3. สารสกัด C	0.4363	0.4335	0.9037	0.6347
4. สารสกัด D	1.6108	0.7293	0.3105	1.0028
5. สารสกัด E	0.4140	0.4970	0.4456	0.1699
6. สารสกัด F	0.0034	0.5364	0.4541	0.3664

จากตาราง 4.16 พบว่าค่าspecific activity ของสารสกัดต่างๆ ในสมองหมูมีค่าต่ำมาก

4.6 ผลการเปรียบเทียบการสกัดเอนไซม์จากสมองหมูกับสมองไก่

ทำการทดลองสกัดเอนไซม์ในสมองหมูและสมองไก่ในสภาวะต่างๆ ดังตาราง 4.17

ตารางที่ 4.17 แสดงชื่อของสารสกัดต่างๆ ในสมองหมูและสมองไก่เมื่อสกัดเสร็จแล้ว

การสกัดเอนไซม์จากสมอง ในสภาวะ และการเก็บรักษา	ชื่อสารสกัดเอนไซม์จากสมองหมู	ชื่อสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่
1. สารสกัดเอนไซม์จากสมองหมู และสมองไก่ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –15°C	สารสกัด A	สารสกัด ก
2.สารสกัดเอนไซม์จากสมองหมู และสมองไก่ โดยเติมกรดซอร์บิค 100 mmol/l ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –15°C	สารสกัด B	สารสกัด ข
3.สารสกัดเอนไซม์จากสมองหมู สมองไก่ โดยเติมกรดซอร์บิค 1,000 mmol/lที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –15°C	สารสกัด C	สารสกัด ค
4.สารสกัดเอนไซม์จากสมองหมู สมองไก่ โดยเติมกรดเบนโซอิก 100 mmol/lที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –15°C	สารสกัดD	สารสกัด ง
5.สารสกัดเอนไซม์จากสมองหมู สมองไก่ โดยเติมกรดซอร์บิค 1,000 mmol/lที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –15°C	สารสกัด E	สารสกัด จ
6.สารสกัดเอนไซม์จากสมองหมู สมองไก่ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C	สารสกัด F	สารสกัด ฉ

จากตารางที่ 4.16 นำสารสกัดเอนไซม์ไปทดลองหาค่าปริมาณโปรตีนผลดังตารางที่ 4.18 ปริมาณเอนไซม์ผลดังตารางที่ 4.19 specific activityของสารสกัดต่างๆ ในสมองหมูเปรียบเทียบกับสมองไก่เมื่อสกัดเสร็จแล้วเก็บรักษาไว้ 1-4 วันผลดังตารางที่ 4.20

ตารางที่ 4.18 แสดงปริมาณโปรตีนของสารสกัดต่างๆ ในสมองหมูเปรียบเทียบกับสมองไก่เมื่อสกัดเสร็จแล้วเก็บรักษาไว้ 1-4 วัน

สารสกัดเอนไซม์ / จำนวนวันที่เก็บรักษา	ปริมาณโปรตีน(mg/gสมอง)			
	1 วัน	2 วัน	3 วัน	4 วัน
1. สารสกัด A	0.030	0.028	0.034	0.034
สารสกัด ก	0.039	0.042	0.038	0.0405
2. สารสกัด B	0.030	0.023	0.033	0.028
สารสกัด ข	0.042	0.029	0.012	0.047
3. สารสกัด C	0.034	0.022	0.030	0.034
สารสกัด ค	0.052	0.025	0.030	0.040
4. สารสกัด D	0.035	0.026	0.035	0.039
สารสกัด ง	0.041	0.036	0.036	0.045
5. สารสกัด E	0.051	0.027	0.0313	0.044
สารสกัด จ	0.053	0.040	0.029	0.048
6. สารสกัด F	0.056	0.061	0.0707	0.054
สารสกัด ฉ	0.090	0.078	0.086	0.058

ตารางที่ 4.19 แสดงปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดต่างๆ ในสมองหมูเปรียบเทียบกับสมองไก่เมื่อสกัดเสร็จแล้วเก็บรักษาไว้ 1-4 วัน

สารสกัดเอนไซม์ / จำนวนวันที่เก็บรักษา	ปริมาณเอนไซม์(unit/gสมอง)			
	1 วัน	2 วัน	3 วัน	4 วัน
1. สารสกัด A	0.370	0.351	0.848	0.628
สารสกัด ก	0.652	0.596	0.963	1.296
2. สารสกัด B	0.257	0.312	0.793	0.619
สารสกัด ข	0.710	0.505	0.684	2.030
3. สารสกัด C	0.324	0.283	0.482	0.698
สารสกัด ค	0.722	0.336	0.454	2.292
4. สารสกัด D	0.399	0.372	0.883	1.053
สารสกัด ง	0.510	0.549	0.437	1.963
5. สารสกัด E	0.398	0.351	0.694	0.577
สารสกัด จ	0.680	0.398	0.955	3.310
6. สารสกัด F	0.384	0.511	0.804	0.698
สารสกัด ฉ	0.680	2.502	2.492	3.278

ตารางที่ 4.20 ตารางแสดงspecific activityของสารสกัดต่างๆ ในสมองหมูเปรียบเทียบกับสมองไก่เมื่อสกัดเสร็จแล้วเก็บรักษาไว้ 1-4 วัน

สารสกัดเอนไซม์ / จำนวนวันที่เก็บรักษา	specific activityของสารสกัดต่างๆ(units/mg)			
	1 วัน	2 วัน	3 วัน	4 วัน
1. สารสกัด A	12.523	12.754	25.118	18.465
สารสกัด ก	16.643	14.106	25.202	32.042
2. สารสกัด B	8.534	13.408	24.016	21.835
สารสกัด ข	16.554	17.143	16.504	43.209
3. สารสกัด C	9.474	12.826	16.016	20.279
สารสกัด ค	13.839	13.726	15.242	56.677
4. สารสกัด D	10.662	14.154	25.058	26.800
สารสกัด ง	12.297	15.433	12.046	43.139
5. สารสกัด E	7.747	12.857	22.158	13.097
สารสกัด จ	12.891	9.969	32.934	69.319
6. สารสกัด F	6.823	8.419	11.375	13.857
สารสกัด ฉ	7.535	32.186	29.067	57.000

จากตารางที่ 4.20 พบว่าค่าspecific activityของสารสกัดในสมองหมูเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากสมองไก่ ในสมองหมูมีค่าน้อยกว่าสมองไก่ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกสมองไก่ในการสกัดเอ็นไซม์มาใช้กับชุดทดสอบ

บทที่ 5
สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองครั้งนี้ทำการสกัดเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสจากสมองไก่และสมองหมู แบ่งออกเป็น 4 ตอนดังต่อไปนี้

ตอนที่ 1 โดยเมื่อสกัดเอนไซม์แล้วทำการทดลองเก็บไว้ 4 สภาวะ 1) เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -15°C 2) สารสกัดเอนไซม์เติมกรดซอร์บิค 0.1โมลาร์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C 3) สารสกัดเอนไซม์ที่เติมกรดซอร์บิค 1 โมลาร์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C 4) สารสกัดเอนไซม์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C จากนั้นนำสารสกัดแต่ละตัวมาหาปริมาณโปรตีน ปริมาณเอนไซม์และ specific activity ได้ผลดังนี้ ปริมาณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.13 mg/g เมื่อเวลาผ่านไป 166 วันปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C g เหลือเพียง 0.08 units/gสมองไก่ และ specific activityเท่ากับ 0.62 units/mg Proteinหลังจากนั้นสลายตัวหมดไป เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดเอนไซม์เติมกรดซอร์บิค 0.1โมลาร์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C เมื่อเวลาผ่านไป 434 วัน ปริมาณเอนไซม์ยังคงเหลืออยู่ 0.57 units/gสมองไก่ และ specific activityเท่ากับ 4.75 units/mg Protein สารสกัดเอนไซม์เติมกรดซอร์บิค 1.0โมลาร์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C เมื่อเวลาผ่านไป 433 วันปริมาณเอนไซม์ยังคงเหลืออยู่ 1.16 units/gสมองไก่ และ specific activityเท่ากับ 9.67 units/mg Protein ในขณะที่สารสกัดเอนไซม์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C เริ่มต้นมีปริมาณเอนไซม์ยังคงเหลืออยู่ 1.82 units/gสมองไก่ เมื่อเวลาผ่านไป 415 วันตรวจไม่พบเอนไซม์ จากการทดลองพบว่าการเติมกรดซอร์บิคทำให้เอ็นไซม์ยังคงสภาพและใช้งานได้นาน การเติมกรดซอร์บิคที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ทำให้เอ็นไซม์ทำงานได้ดีในช่วงหลังสกัดจนถึง 150 วัน หลังจาก 150- 434 วัน เอ็นไซม์ทำงานได้ลดลง

แสดงว่าการเติมกรดซอร์บิค 0.1โมลาร์ ในสารสกัดเอนไซม์จะช่วยรักษาให้เอนไซม์ไม่สลายตัว เมื่อเวลาผ่านไปจะทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้น สารสกัดเอนไซม์เมื่อเวลาผ่านไปปริมาณเอนไซม์และspecific activityจะเพิ่มขึ้นแล้วลดลงจนหมดไป ขึ้นอยู่กับ เวลาที่เก็บรักษา อุณหภูมิที่เก็บรักษา และความเข้มข้นของสารกันเสียที่เติม

ตอนที่ 2 เมื่อสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดซอร์บิคที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วทำการทดลองเก็บไว้ 4 สภาวะ 1) เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -15°C 2) สารสกัดเอนไซม์เติมกรดซอร์บิค 0.02 , 0.04, 0.06, 0.08, 0.1โมลาร์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C 3) สารสกัดเอนไซม์เติมกรดซอร์บิค 0.02 , 0.04, 0.06, 0.08, 0.1โมลาร์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C จากนั้นนำสารสกัดแต่ละตัวมาหาปริมาณโปรตีน ปริมาณเอนไซม์และ specific activity ได้ผลดังนี้ ปริมาณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่มี

ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.03 8 mg/g ปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดอยู่ในช่วง 0.457-1.133 units/gสมองไก่ และ specific activityเท่ากับ 14.32-36.11 units/mg Protein เมื่อเวลาผ่านไป 15วัน สารสกัดเอนไซม์เติมกรดซอร์บิค 0.02 , 0.04, 0.06 , 0.08 , 0.1โมลาร์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C สลายตัวไม่พบเอนไซม์ ส่วนสารสกัดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C เติมกรดซอร์บิคปริมาณ 0.02 , 0.04, 0.06, 0.08, 0.1โมลาร์ พบว่าปริมาณโปรตีน ปริมาณเอนไซม์ และspecific activity มีความแตกต่างกัน

ตอนที่ 3 เมื่อสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดเบนโซอิคที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วทำการทดลองเก็บไว้ 3 สภาวะ 1) เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -15°C 2) สารสกัดเอนไซม์เติมกรดเบนโซอิค 0.05 , 0.1, 0.5, 1.0 โมลาร์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15°C 3) สารสกัดเอนไซม์เติมกรดเบนโซอิค 0.05 , 0.1, 0.5, 1.0 โมลาร์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C จากนั้นนำสารสกัดแต่ละตัวมาหาปริมาณโปรตีน ปริมาณเอนไซม์ และspecific activity แล้วเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 36 วัน ได้ผลดังนี้ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 7 วันสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C จะเสื่อมสภาพสลายตัวจนหมด

พบว่าปริมาณโปรตีน ปริมาณเอนไซม์ และspecific activity ของสารสกัดเอนไซม์ที่เติมกรดเบนโซอิค 0.05 , 0.1, 0.5 และ 1.0 โมลาร์ มีความแตกต่างกัน การเติมกรดเบนโซอิคที่ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ทำให้ปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดสมองไก่ลดลง ความเข้มข้นที่เหมาะสมกรดเบนโซอิคที่ควรเติมในการสกัดสมองไก่คือความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ตอนที่ 4 เมื่อสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดซอร์บิค เบนโซอิค และไนเตรดที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1.0 โมลาร์ แล้ว แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ 1) เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -15°C 2) สารสกัดเอนไซม์นำไปตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -15°C จากนั้นนำสารสกัดแต่ละตัวมาหาปริมาณโปรตีนพบว่าเมื่อตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วโปรตีนลดลง ค่า specific activity เพิ่มขึ้น พบว่าสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ และสารสกัดเอนไซม์จากสมองไก่ที่เติมกรดซอร์บิค เบนโซอิค และไนเตรดที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เมื่อตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วค่า specific activity เพิ่มขึ้น การเติมไนเตรดที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์แล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตค่า specific activityมีค่ามากที่สุด คือ 108.00 units/gสมองไก่

ตอนที่ 5 เมื่อสกัดเอนไซม์จากสมองหมูผสมซิลิกาเจล และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่เติมกรดซอร์บิคที่ความเข้มข้นต่างๆ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -15°C และ 5°C พบค่า specific activityมีค่าระหว่าง 6.82-26.80 units/gสมองหมู เมื่อสกัดเอนไซม์จากสมองหมู เปรียบเทียบ สกัดเอนไซม์จากสมองไก่พบค่า specific activity 7.53-69.3 units/gสมองไก่ ค่าspecific activityของสมองไก่มากกว่าสมองหมู

เมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสจากหัวผึ้ง (honeybee heads)โดยให้ผึ้งตายที่อุณหภูมิ -70 °C นำมาเฉพาะส่วนหัวเพื่อสกัด AChE ด้วย homogenizeในฟอสเฟตบัฟเฟอร์pH

7.4 ที่เย็น พบว่าค่า specific activityเมื่อตกตะกอนสมองผึ้ง 0.112 µmol/min/mg (Kim Bo-Mee and et.al ,2007)

ในการสกัดเอนไซม์ โคลีนเอสเตอเรส หรือการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ ต้องทำใน สภาพอุณหภูมิต่ำ เนื่องจาก เอนไซม์ จะสลายตัวได้ด้วย ความร้อน ถ้าเอนไซม์อยู่ในเซลล์อาจจะทนต่ออุณหภูมิสูง ได้ระดับหนึ่ง แต่เมื่อสกัดออกจากเซลล์ แล้ว ความทนทานต่ออุณหภูมิสูงจะลดลง ออกซิเจน สารที่เป็นสารออกซิไดซ์ และจุลินทรีย์ที่มีอยู่ทั่วไปในอากาศจะ ทำให้เอนไซม์ เสื่อมสภาพได้ เมื่อโครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไปจนสารเริ่มต้นรวมกับเอนไซม์ที่ Active Site ไม่ได้ จะทำให้คุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์หมดไป เมื่อเอนไซม์เกิดการเสื่อมสภาพไปแล้ว ไม่สามารถจะกลับคืนมาสู่สภาพที่ทำงานได้อีก

ดังนั้นในการทดลองนี้ผู้วิจัยจึงได้นำวัตถุกันเสียที่ใช้ในการถนอมอาหารมาใช้เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ทั่วไปในอากาศ สภาพแวดล้อม ในสมองไก่และหมูที่จะใช้ในการสกัดเอนไซม์ ผู้วิจัยเลือกใช้ กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิค และไซเดียมไนเตรด เพราะ กรดซอร์บิคความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.1-0.25% สารสกัดเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสจากสมองไก่คงสภาพได้ดีที่สุดในกรดซอร์บิคเข้มข้น 1 โมลาร์ ทำงานได้ดีที่ 37 ๐C แต่เมื่อต้องการรักษาเอนไซม์ไม่ให้เร่งปฏิกิริยาหรือชะงักการเจริญเติบโตและหยุดกระบวนการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ต่างๆ มักจะเก็บเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ -18 ๐C หรือต่ำกว่านั้น จากผลการทดลองเมื่อนำสารสกัดไว้ในอุณหภูมิที่แตกต่างกันพบว่า สารสกัดเอนไซม์มีค่าการทำงานต่างกัน

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทดลองสกัดเอนไซม์ AChE โดยใช้วิธีประยุกต์อย่างง่าย โดยอาศัยการทำให้วัตถุดิบที่จะนำมาใช้สกัดอยู่ในสภาพที่เย็น

บรรณานุกรม

กฤษณา รุ่งเรืองศักดิ์ และ ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์.(2521) **ปฏิบัติการและหลักเบื้องต้นในวิชาชีวเคมี.** กรุงเทพ:พิมพ์โครงการตำรา-ศิริราช.คณะแพทย์ศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

กิติพงษ์ ฟากเซ และชลิน ยิ้มพังเทียม.(2549) **การศึกษา การสกัด คุณลักษณะและการทำบริสุทธิ์ เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส.** คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

กุลยา จันทร์อรุณ.(2533) **เคมีอาหาร**.กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์การศาสนากรมศาสนา

โครงสร้างอะซิติลโคลีนเอสเทอเรส. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/8c/Acetylcholinesterase -1EA5.png [9 กรกฎาคม 2552]

จารุณี มีจุ้ย (2539). **ศึกษาวิธีการนับจำนวนและแยกเชื้อจุลินทรีย์จากซีอิ๊วและเต้าเจียว**. http://www.lartc.rmutl.ac.th/d_research.php?ID=0000000067 [3 กรกฎาคม 2552]

ฉวีวรรณ เปสี.(2542). **ชีวเคมี.** พิมพ์ครั้งที่ 1. โครงการวิชาการราชภัฏเฉลิมพระเกียรติสำนักส่งเสริมวิชาการ.สำนักส่งเสริมวิชาการสถาบันราชภัฏอุดรธานี

ชนิษฐา อุดทา.(2550) **การศึกษาการสกัดและการตรึงรูปเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส.** คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์.(2535) **คุณสมบัติและการทำงานของเอนไซม์.** กรุงเทพมหานคร. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ดนัย บุณยเกียรติ. (2552). **บทที่ 3 เอนไซม์**. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่http://web.agri.cmu.ac.th/hort/course/359311/PPHY03_enzymel.ppt#256,1, บทที่ 3 เอนไซม์,[2 กรกฎาคม2552]

เนตรนภิส. (2552). **สารชีวโมเลกุล.** www.si.mahidol.ac.th ,[2 กรกฎาคม 2552]

บัณฑิต ลีละศาสตร์.(2540) **คู่มือปฏิบัติการชีวเคมีเบื้องต้นระดับปริญญาตรี.** เชียงใหม่

ปราณี อ่านเปรื่อง.(2543) **เอนไซม์ทางอาหาร**.พิมพ์ครั้งที่3.คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พจน์ ศรีบุญลือ และคณะ.(2540) **ตำราชีวเคมี.** พิมพ์ครั้งที่ 2. ขอนแก่น. ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทย์ศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พรกมล สาม้อง.(2542) **เอกสารประกอบการสอนรายวิชา ชีวเคมี 1.** โปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.สถาบันราชภัฏสกลนคร

ภาพการส่งกระแสประสาท. *Cholinergic transmission. In: Pharmacology, 4th edition. Rang HP, Dale MM and Ritter JM. Edinburgh, UK: Harcourt Publishers Ltd, 2001:110–138.*

http://www.cnsforum.com/content/pictures/imagebank/hirespng/Drug_neostig.png [8 กรกฎาคม 2552]

ระดมพล ช่วยชูชาติ. (2552) **วัตถุกันเสีย**. http://www.radompon.com/dlibrary/news.php?newsid=69 [15 กรกฎาคม]

วิจิตร บุณยะโหตระ. (2533) **ภัยจากอาหาร.** พี รุ่งโรจน์การพิมพ์ จำกัด : กรุงเทพฯ. http://www.techno.msu.ac.th/fn/ecenter/fad/antibio.htm :[4 กรกฎาคม 2552]

สมเพียร จิรชัย.(2542) **หลักการแปรรูปและการถนอมอาหาร**.คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏกาญจนบุรี

Bertram Peretz.(1996) **chronic stimulation increases acetylcholinesterase activity in old aplysia.** 80(1-2): 203-10. [14 มิถุนายน 2552]

Ellman G.L.(1961) **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity biochemical pharmacology** 7:88-95, 1961.[11 มิถุนายน 2552]

Kim Bo-Mee and et.al (2007**). Development of an Acetylcholinesterase-Based Detection Kit for the Determination of Organophosphorus and Carbamate Pesticide Residues in Agricultural Samples.** Korean Chem Vol. 28, No. 6**.** http://newjournal.kcsnet.or.kr/ main/j_search/j_ download.htm?code=B070608 [4 มิถุนายน 2552]

Süleyman Baykal.(1996) **effects of nerve growth factor on acetylcholinesterase activity of injured spinal cord**. http://journals.tubitak.gov.tr/medical/issues/sag-99-29-2/sag-29-2-5-96032.pdf [17 มิถุนายน 2552]