

การพัฒนา urease strip สำหรับการตรวจปริมาณโลหะหนัก

Development of Urease Strip for Heavy Metal Determination

ชิตชนก คำเลิศ¹⁾, สมปอง ธรรมศิริรักษ์¹⁾, นันทวัน เอื้อวงศ์กุล¹⁾, ธนวิษณุ ลีตพิชยวงศ์²⁾

Mikio Kobayashi²⁾ และ ศักดา ดาดวง^{*1)}

1) ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002

2) บริษัทไทยปาร์คเกอร์ไรซิ่ง จำกัด 570 หมู่ 4 นิคมอุตสาหกรรมบางปู ซอย 12 ถ. สุขุมวิท ต. แพรกษา อ.เมือง จ.สมุทรปราการ

* หัวหน้าโครงการ E-mail : sakdad@kku.ac.th

บทคัดย่อ

ปัญหาการปนเปื้อนของโลหะหนักในน้ำเสียเป็นปัญหาสำคัญ ทำให้ต้องมีการตรวจสอบปริมาณโลหะหนักให้อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด ปัจจุบัน การตรวจสอบใช้เวลานานและมีค่าใช้จ่ายสูง เอนไซม์ยูรีเอสพบมากในถั่วเหลือง เป็นเอนไซม์หนึ่งที่ถูกยับยั้งได้ด้วยโลหะหนัก จึงได้ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์แล้วเตรียมเป็น urease strip พบว่า แถบวัดที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ตรวจได้ง่ายและรวดเร็ว โดยใช้ได้กับโลหะหนักอย่างน้อย 5 ชนิด คือ Hg^{2+} 0.001 ppm, Cu^{2+} 0.1 ppm, Ag^+ 1 ppm, Fe^{2+} 100 ppm และ Zn^{2+} 100 ppm ทั้งที่อยู่เป็นโลหะเดี่ยว หรืออยู่ปะปนกัน ผลการใช้ strip กับน้ำเสียยังสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ของโรงงานของบริษัทไทยปาร์คเกอร์ไรซิ่ง จำกัด ดังนั้น จึงคาดว่า strip ที่พัฒนาขึ้นนี้จะสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบปริมาณโลหะหนักเบื้องต้นได้ต่อไป

คำสำคัญ urease strip เอนไซม์ โลหะหนัก

1. บทนำ

ในปัจจุบันปัญหาการปนเปื้อนของโลหะหนักในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมสู่สิ่งแวดล้อม นับได้ว่าเป็นปัญหาที่สำคัญ จึงต้องมีการกำจัดและตรวจสอบปริมาณโลหะหนักให้อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดก่อนที่จะมีการปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม โรงงานอุตสาหกรรมในประเทศไทยแต่ละแห่งจึงต้องทำการตรวจหาปริมาณอย่างจริงจังตามกฎหมายบังคับ ในการตรวจสอบนั้นจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงและใช้ความเชี่ยวชาญสูง เช่น Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม โรงงานอุตสาหกรรมขนาดเล็กและกลางที่ไม่มีเครื่องมือดังกล่าว ในการตรวจหาปริมาณแต่ละรอบจำเป็นต้องส่งตัวอย่างน้ำไปทดสอบยังสถาบันที่มีเครื่องมือหลายครั้ง ทำให้ใช้เวลานานและมีค่าใช้จ่ายสูง

เอนไซม์หลายชนิดมีความไวสูงต่อโลหะหนัก แม้ว่า จะมีโลหะหนักในความเข้มข้นต่ำ ๆ ก็สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ยูรีเอส (urease) ก็เป็นเอนไซม์หนึ่งที่มีการนำมาใช้เพื่อตรวจหาโลหะหนัก เป็นเอนไซม์ที่พบมากในถั่วโดยเฉพาะถั่วเหลือง ตรวจสอบ activity ได้ง่าย เนื่องจากเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนยูเรีย (NH_2CONH_2) ไปเป็นแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) และไบคาร์บอเนตไอออน (HCO_3^-) NH_4^+ ซึ่งเป็นเบสแก่ทำให้ pH สูงขึ้น จึงตรวจสอบได้จากการเปลี่ยนสีของ indicator หรือใช้ pH meter โลหะหนักหลายชนิดสามารถยับยั้ง activity ของยูรีเอสแบบไม่ผันกลับ โดยเรียงลำดับจากสูงไปต่ำ ได้ดังนี้ $\text{Hg}^{2+} > \text{Ag}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$ (Zhylyak และคณะ, 1995) ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเครื่องมือที่ใช้ใน

การตรวจสอบโลหะหนักโดยใช้ยูรีเอส เช่น ammonia electrode (Lee และ Lee, 2002; Starodub และคณะ, 1999; Tsai และคณะ, 2003; Zhylyak และคณะ, 1995) dip-and-read test (Shi และ Jiang, 2002) อย่างไรก็ตาม การพัฒนาเครื่องมือดังกล่าวมีความซับซ้อนทำให้ยุ่งยากในการใช้ และมีราคาแพง ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่จะสร้าง urease strip ซึ่งเป็นแถบวัด จากถั่วเหลืองซึ่งเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่มีราคาถูก การใช้ strip จะช่วยให้ตรวจสอบโลหะหนักได้ด้วยตนเอง ง่าย รวดเร็ว และสะดวกมากกว่า สามารถประมาณปริมาณโลหะหนักได้ในเบื้องต้น แล้วจึงส่งไปตรวจสอบค่าที่แน่นอนยังสถาบันที่มีเครื่องมือเพื่อยืนยันผลอีกครั้งหากจำเป็น

ในการศึกษาครั้งนี้ จะเริ่มจากทำปฏิกิริยายูรีเอสด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) จากนั้นทำการย้ายเอนไซม์ยูรีเอสจาก gel ไปยังแผ่น polyvinylidene fluoride (PVDF) และพัฒนาเป็น urease strip สำหรับตรวจสอบโลหะหนัก โดยทดสอบกับโลหะหนักชนิดเดียวที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ส่วนผสมของโลหะหนักชนิดต่าง ๆ และทดสอบกับน้ำเสียที่ได้รับคามอนูเคราะห์ จากบริษัทไทยปาร์คเกอร์ไรซ์ จำกัด

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

ชุดเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส Mini-Protein II Dual Slab Cell และ Wet transfer blotting apparatus ยี่ห้อ Bio-Rad, เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo, pH paper ยี่ห้อ Whatman, pH meter ยี่ห้อ Beckman, ถั่วเหลือง ซื้อจากตลาดบางลำภู จ.ขอนแก่น, PVDF membrane ยี่ห้อ Millipore, ยูรีเอส ยี่ห้อ Univar, HgCl_2 ยี่ห้อ Sigma, CuSO_4 ยี่ห้อ BDH, AgNO_3 ยี่ห้อ Merck, Acrylamide/Bis และ Sodium dodecyl sulphate (SDS) ยี่ห้อ Bio-Rad, FeSO_4 และ Ammonium persulphate (APS) ยี่ห้อ Carlo Erba, ZnSO_4 , N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) และ phenolphthalein ยี่ห้อ Fluka chemika

2.2 การเตรียมยูรีเอสจากถั่วเหลือง

แช่ถั่วเหลืองในน้ำกลั่น 3-12 ชม. นำมาบดให้ละเอียดในโกร้งบด ละลายน้ำโดยใช้อัตราส่วน ถั่ว 1 กรัมต่อน้ำกลั่น 4 ml ตั้งทิ้งไว้ให้เศษถั่วนอนก้น กรองผ่านผ้าขาวบาง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

2.3 การตรวจสอบ activity ของยูรีเอส

วิธีที่ 1 ปิเปิดน้ำถั่วเหลืองปริมาตร 250 μl เติมน้ำใน 1% ยูรีเอส 3 ml ที่มี ฟีนอลฟทาไลน์ 50 μl

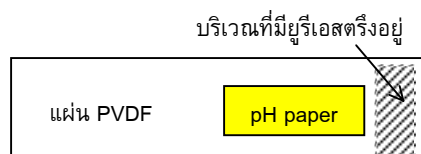
วิธีที่ 2 นำตัวอย่างน้ำถั่วมาเติมน้ำใน 1% ยูรีเอส 30 ml วัดการเปลี่ยนแปลง pH ด้วย pH meter แล้วคำนวณ activity โดยที่ 1 หน่วย (unit) ของเอนไซม์ คือ การเปลี่ยนแปลงของ pH ไป 0.1 หน่วย pH ต่อวินาที

2.4 การแยกปฏิกิริยา urease จากถั่วเหลืองโดยวิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เตรียมน้ำถั่วใน solubilizing buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS, 30% glycerol และ 0.01% bromophenol blue) นำไปโหลดลงบน Mini-protein II Dual Slab Cell (4% stacking gel และ 9% separating gel) จากนั้นให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ที่ 150 Volt ไปจนกระทั่งแถบสีเคลื่อนที่ไปจนตกเจล และทิ้งเวลาไปอีก 15 นาที จึงหยุด

2.5 การเตรียม urease membrane และ urease strip

ย้ายยูรีเอสจากแผ่นเจลที่ได้จาก SDS-PAGE ไปตรึงบนแผ่น PVDF โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 100 mA เป็นเวลา 1 ชม. ด้วย Wet transfer blotting apparatus ล้างแผ่น PVDF ด้วยน้ำกลั่น แล้วตัดเป็นแถบยาว (strip) จากนั้นนำ pH paper มาแปะทับใกล้ ๆ กับบริเวณที่มียูรีเอสตรึงอยู่ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 urease strip

2.6 การทดสอบ urease strip กับสารละลายโลหะหนัก และน้ำเสียทั้งก่อนและหลังบำบัดจากโรงงานของบริษัทไทยปาร์คเกอร์ไรซิ่ง จำกัด

เตรียมสารละลายของโลหะหนักแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน หรือ น้ำเสียทั้งก่อนและหลังบำบัดซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงาน ซึ่งเจือจางตั้งแต่ 10 เท่าถึง 10^5 เท่า มาผสมกับ 1% ยูเรีย แล้วหยดลงบน strip สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของ pH paper บน strip ภายใน 5 นาที

3. ผลการทดลองและอภิปรายผล

3.1 การหา activity ของยูรีเอสในน้ำถั่วเหลืองสด

ตรวจหา activity ในน้ำถั่วเหลืองสดปริมาณต่างๆ โดยใช้ 1% ยูเรีย 30 ml เป็น substrate วัด pH ที่เปลี่ยนแปลงไปด้วย pH meter นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟ (รูปที่ 2) จากนั้นคำนวณค่า activity สูงสุดของเอนไซม์ โดยการลากเส้นตรงให้ผ่านจุดมากที่สุดและมีความชันมากที่สุดแล้วคำนวณดังนี้

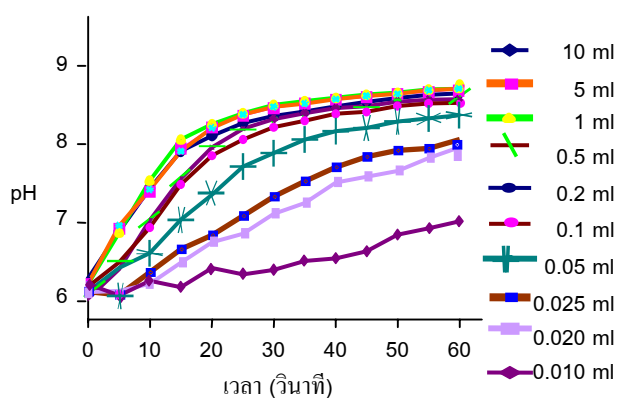
เมื่อใช้น้ำถั่วปริมาณ 10 ml

ใน 15 วินาที เปลี่ยนไป $7.91 - 6.29 = 1.62$ หน่วย pH

Activity คือ 0.1 หน่วย pH ที่เปลี่ยนไปใน 1 วินาที

ดังนั้น $1.62 \text{ หน่วย pH} / 15 \text{ วินาที} = 1.08 \text{ unit}$

ส่วนน้ำถั่วปริมาณอื่น ๆ คำนวณเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 1) พบว่า ปริมาตรน้ำถั่ว 0.5 มิลลิลิตร ให้ activity สูงสุด เมื่อใช้ปริมาตรของน้ำถั่วน้อยที่สุด



รูปที่ 2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH กับเวลาของสารละลายน้ำถั่วปริมาณต่าง ๆ ในยูเรีย

ตารางที่ 1 Activity สูงสุดของยูรีเอสเมื่อใช้ปริมาตรน้ำถั่วต่าง ๆ กัน

ปริมาตรน้ำถั่ว (มล.)	activity (unit)	ปริมาตรน้ำถั่ว (มล.)	activity (unit)
10	1.08	0.1	0.84
5	1.13	0.05	0.64
1	1.23	0.025	0.40
0.5	1.12	0.020	0.33
0.2	0.97	0.010	0.13

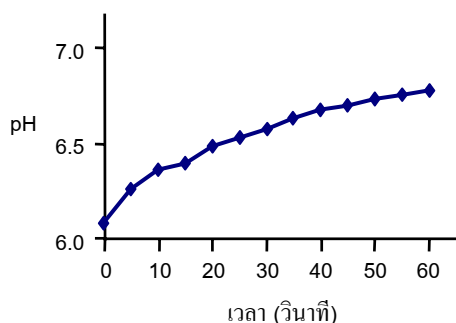
3.2 การตรวจสอบ activity ของเอนไซม์ยูรีเอสบนแผ่น PVDF และการเตรียม urease strip

ภายหลังการแยกเอนไซม์ยูรีเอสให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และย้ายยูรีเอสจากเจลไปยังแผ่น PVDF แล้ว นำแผ่น PVDF ไปตรวจหา activity ของยูรีเอส โดยนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นหลายครั้งแล้วหยด 1% ยูเรีย ปริมาตร 2 ml ที่ผสมกับฟีนอล์ฟทาลีน 50 μ l ลงให้ทั่วแผ่น PVDF ทั้งแผ่น พบแถบสีชมพู (รูปที่ 3) จากสีของฟีนอล์ฟทาลีนในสภาพต่าง แสดงว่าเอนไซม์ urease ยังคงมี activity อยู่ และเร่งการเปลี่ยนยูเรียไปเป็นแอมโมเนียมไอออนซึ่งเป็นเบสแก่

จากนั้น เพื่อตรวจหา activity ของเอนไซม์ยูรีเอสบนแผ่น PVDF จึงได้นำแผ่น PVDF ทั้งแผ่นลงแช่ใน 1% ยูเรีย ปริมาตร 30 ml พร้อมกับวัด pH ที่เปลี่ยนแปลงไปด้วย pH meter นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟ (รูปที่ 4) คำนวณหา activity ของยูรีเอส พบ activity บนแผ่น PVDF ประมาณ 0.12 unit ลดลงจากที่มีในน้ำถั่วเหลืองสด คือ 1.12 unit ถึงเกือบ 10 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากสาเหตุต่างๆ เช่น ความร้อนที่เกิดขึ้นขณะทำบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE และขณะ transfer ยูรีเอสจาก gel ไปยังแผ่น PVDF การเสียสภาพของเอนไซม์จาก SDS เป็นต้น วิธีการแก้ไข ทำได้โดยการใช้โวลต์ต่ำลงขณะแยกบริสุทธิ์ หรือ แยกบริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิต่ำ เป็นต้น และยังต้องหาปริมาณของ SDS ที่เหมาะสมเพื่อให้เอนไซม์เสียสภาพน้อยที่สุดแต่ยังคงมี activity อยู่ และสามารถเคลื่อนย้ายจากเจลลงสู่แผ่น PVDF ได้



รูปที่ 3 การตรวจ activity ของยูรีเอสบนแผ่น PVDF



รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับค่า pH เมื่อตรวจสอบยูรีเอสที่ยูบนแผ่น PVDF แขนยูเรีย

ภายหลังการตรวจสอบพบ activity ของยูรีเอสบนแผ่น PVDF แล้วจึงนำไปเตรียมเป็น urease strip ดังได้กล่าวไว้ใน ” อุปกรณ์และวิธีการทดลอง ”

3.3 การทดสอบ urease strip กับโลหะหนัก

urease strip ที่ได้ถูกนำไปทดสอบกับโลหะหนักที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ถ้า urease ยังมี activity ยูเรียจะถูกเปลี่ยนไปเป็น NH_4^+ ซึ่งจะทำให้ pH สูงขึ้นและเปลี่ยน pH paper บน strip จากสีเหลืองเป็นสีเขียว ภายใน 5 นาที แต่ถ้ายูรีเอสถูกยับยั้งด้วยโลหะหนัก สีของ pH paper จะมีสีเหลืองดังเดิม (รูปที่ 5) จากนั้นทำการทดสอบ strip กับสารละลายโลหะหนักชนิดต่างๆ คือ HgCl_2 , FeSO_4 , CuSO_4 , AgNO_3 และ ZnSO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยนำสารละลายโลหะหนักมาผสมกับ 1% ยูเรีย ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร แล้วหยดลงบนแผ่น strip และสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีของ pH paper (ตารางที่ 2) พบว่า ความเข้มข้นของ HgCl_2 มากกว่า 0.001 ppm, FeSO_4 มากกว่า 100 ppm, CuSO_4 มากกว่า 0.1 ppm, AgNO_3 มากกว่า 1 ppm และ ZnSO_4 มากกว่า 100 ppm ขึ้นไป สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ยูรีเอสได้



รูปที่ 5 ตัวอย่างของการตรวจสอบโลหะหนักโดยใช้ urease strip โดยที่ strip 1 คือ ตัวอย่างที่ไม่มีโลหะหนัก ให้สีเขียว ส่วน strip 2 เป็นตัวอย่างที่มีปริมาณโลหะหนักมากพอ ให้สีเหลือง

ตารางที่ 2 การทดสอบ strip กับสารละลายของโลหะหนักชนิดต่างๆ สังเกตผลภายใน 5 นาที

HgCl_2 (ppm)	ผลการ ทดสอบ	FeSO_4 (ppm)	ผลการ ทดสอบ
-	+	-	+
100	-	100	-
10	-	10	+
1	-	1	+
0.1	-	0.1	+
0.01	-	0.01	+
0.005	-	0.005	+
0.001	-	0.001	+
0.0001	+	0.0001	+
0.00001	+	0.00001	+

CuSO_4 (ppm)	ผลการ ทดสอบ	AgNO_3 (ppm)	ผลการ ทดสอบ	ZnSO_4 (ppm)	ผลการ ทดสอบ
-	+	-	+	-	+
100	-	100	-	100	-
10	-	10	-	10	+
1	-	1	-	1	+
0.1	-	0.1	+	0.1	+
0.01	+	0.01	+	0.01	+
0.005	+	0.005	+	0.005	+
0.001	+	0.001	+	0.001	+
0.0001	+	0.0001	+	0.0001	+
0.00001	+	0.00001	+	0.00001	+

- strip ให้สีเหลือง

+ strip ให้สีเขียว

ดังนั้น strip ที่พัฒนาขึ้นมาได้นี้จะใช้ตรวจหาโลหะหนัก 5 ชนิด เรียงลำดับจากความไวสูงไปต่ำดังนี้ Hg^{2+} 0.001 ppm, Cu^{2+} 0.1 ppm, Ag^+ 1 ppm, Fe^{2+} 100 ppm และ Zn^{2+} 100 ppm และยังได้ทดสอบกับส่วนผสมของโลหะหนักเหล่านี้ต่าง ๆ กัน (ตารางที่ 3) พบ

ว่า แม้ว่าจะอยู่ปะปนกัน หากไม่มีชนิดใดมีความเข้มข้นสูงพอที่จะยับยั้ง activity ของเอนไซม์ได้ ยูรีเอสก็ยังคงทำงานได้ แสดงว่าการยับยั้งยูรีเอสของโลหะหนักเหล่านี้เป็นการยับยั้ง ณ active site จุดเดียวกัน ดังนั้น คาดว่า น่าจะสามารถนำ strip ไปตรวจตัวอย่างที่มีโลหะหนักเหล่านี้อยู่ปะปนกันได้

ตารางที่ 3 การทดสอบ strip กับสารละลายผสมของ โลหะหนักชนิดต่างๆ สังเกตผลภายใน 5 นาที

โลหะหนัก	ผลการทดสอบ
ไม่มีโลหะหนัก	+
1000 ppm Hg ²⁺	-
0.0001 ppm Hg ²⁺	+
0.01 ppm Cu ²⁺	+
0.1 ppm Ag ⁺	+
10 ppm Fe ²⁺	+
10 ppm Zn ²⁺	+
0.0001 ppm Hg ²⁺ + 0.1 ppm Ag ⁺	+
0.1 ppm Ag ⁺ + 10 ppm Zn ²⁺	+
10 ppm Zn ²⁺ + 10 ppm Fe ²⁺	+
10 ppm Fe ²⁺ + 0.01 ppm Cu ²⁺	+
0.01 ppm Cu ²⁺ + 0.1 ppm Ag ⁺	+
0.0001 ppm Hg ²⁺ + 10 ppm Zn ²⁺ + 10 ppm Fe ²⁺	+
0.0001 ppm Hg ²⁺ + 0.01 ppm Cu ²⁺ + 0.1 ppm Ag ⁺ + 10 ppm Fe ²⁺ + 10 ppm Zn ²⁺	+
- strip ให้สีเหลือง + strip ให้สีเขียว	

3.4 การใช้ strip ทดสอบกับน้ำเสียทั้งก่อนและหลังบำบัดจากโรงงานของบริษัทไทยปาร์คเกอร์ไรซิ่ง จำกัด

โดยนำน้ำเสียมาเจือจางตั้งแต่ 10 ถึง 10⁵ เท่า แล้วนำมาผสมกับ 1% ยูเรีย ปริมาตร 300 µl หยดลงบนแผ่น strip ปริมาตร 60 µl ต่อ strip สังเกตผลภายใน 5 นาที (ตารางที่ 4) ซึ่งได้ผลดังนี้

lot 06/10/2003 น้ำเสียก่อนบำบัด ให้ strip สีเขียวทั้งหมด ไม่ว่าจะมีค่าการเจือจางเท่าใด ส่วนน้ำเสียหลังบำบัด เฉพาะที่ค่าการเจือจาง 10 เท่า เท่านั้น ที่ให้สีเหลือง แสดงว่าน้ำเสียหลังบำบัดอาจมีปริมาณโลหะหนักมากกว่าน้ำเสียก่อนบำบัด และเมื่อนำผลไปตรวจสอบกับ

ข้อมูลของการวิเคราะห์ของบริษัท (ตารางที่ 5) พบว่า น้ำเสียหลังบำบัดมีไอออนบางชนิดเพิ่มขึ้น

lot 05/11/2003 น้ำเสียก่อนบำบัด ให้ strip สีเหลืองเมื่อเจือจาง 10 เท่า แต่เมื่อทดสอบกับน้ำเสียหลังบำบัด พบว่า strip ทั้งหมดให้สีเขียว แสดงว่าน้ำเสียหลังบำบัดมีปริมาณโลหะหนักลดลง ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของการวิเคราะห์ของทางบริษัท

lot 22/12/2003 และ lot 06/01/2004 น้ำเสียก่อนบำบัด เฉพาะที่เจือจาง 10 เท่า ที่ให้สีเหลือง แต่ strip อื่นให้สีเขียว ส่วนน้ำเสียหลังบำบัดทุกอันให้สีเขียวหมด ดังนั้น น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วมีโลหะหนักลดลง ซึ่งก็สอดคล้องกับข้อมูลการวิเคราะห์ของทางบริษัท

อาจกล่าวได้ว่า strip ที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้ได้ง่าย ไม่ต้องการเครื่องมือราคาแพง ให้ผลรวดเร็ว น่าจะสามารถใช้งานในการทดสอบหาปริมาณของโลหะหนักในเบื้องต้นได้ เนื่องจากการทดสอบหลายครั้งให้ผลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์น้ำเสียทั้งก่อนและหลังบำบัดของบริษัทไทยปาร์คเกอร์ไรซิ่ง จำกัด อย่างไรก็ตาม สำหรับการทดลองในขั้นนี้ยังไม่สามารถหาปริมาณของโลหะหนักได้อย่างแม่นยำ สาเหตุอาจเนื่องมาจากเอนไซม์ที่ตรึงบนแผ่น PVDF ยังควบคุมให้มีปริมาณเท่ากันได้ยาก และการเปลี่ยนแปลงสีของ pH paper ยังไม่ชัดเจนพอ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่ส่งผลกระทบต่อ การเปลี่ยนแปลงสีของ pH paper อีกด้วย เช่น pH เดิมของน้ำเสียอาจส่งผลต่อการตรวจสอบ จำเป็นต้องปรับ pH ให้เป็นกลางก่อนทดสอบ นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำเสียอาจจะส่งผลได้ด้วย จึงอาจจำเป็นต้องต้มน้ำเสียก่อนนำมาตรวจสอบ

ในท้ายนี้ การวิจัยในครั้งนี้เป็นเสมือนงานขั้นต้นที่จะนำไปสู่การพัฒนาให้สามารถนำ urease strip ไปใช้ในการตรวจสอบโลหะหนักได้ และน่าจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการใช้เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ อีกหลายชนิด เพื่อตรวจสอบโลหะหนักในน้ำเสียหรือผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ต่อไป

4. สรุปผลการทดลอง

1. Urease strip ที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นแถบวัดซึ่งสามารถใช้ตรวจสอบโลหะหนักได้ง่ายและรวดเร็ว น่าจะ

สามารถนำไปตรวจหา Hg^{2+} ปริมาณ 0.001 ppm, Cu^{2+} 0.1 ppm, Ag^+ 1 ppm, Fe^{2+} 100 ppm และ Zn^{2+} 100 ppm ได้ และสามารถตรวจสอบโลหะเหล่านี้ได้แม้จะอยู่ปะปนกัน

2. การนำ urease strip ไปทดสอบกับน้ำเสียก่อนและหลังบำบัด ให้ผลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ของทางโรงงานของบริษัทไทยปาร์คเกอร์ไรซิ่ง จำกัด จึงคาดว่าน่าจะสามารถนำ strip ไปใช้กับน้ำเสียได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายอุตสาหกรรม โครงการโรงงานอุตสาหกรรมสำหรับนักศึกษาปริญญาตรี (IPUS) ประจำปี 2546 และขอขอบคุณ ผศ.ดร.ชาโรณี อัครวิเชียร ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในความกรุณาช่วยจัดหาเครื่อง Wet transfer blotting apparatus

ตารางที่ 4 การทดสอบ strip กับน้ำเสียก่อนและหลังบำบัด จากโรงงานของบริษัทไทยปาร์คเกอร์ไรซิ่ง จำกัด สังเกตผลภายใน 5 นาที

น้ำเสีย lot 06/10/2003				น้ำเสีย lot 05/11/2003			
ก่อนบำบัด		หลังบำบัด		ก่อนบำบัด		หลังบำบัด	
ค่าการเจือจาง (เท่า)	ผลการทดสอบ	ค่าการเจือจาง (เท่า)	ผลการทดสอบ	ค่าการเจือจาง (เท่า)	ผลการทดสอบ	ค่าการเจือจาง (เท่า)	ผลการทดสอบ
C	+	C	+	C	+	C	+
10	+	10	-	10	-	10	+
10^2	+	10^2	+	10^2	+	10^2	+
10^3	+	10^3	+	10^3	+	10^3	+
10^4	+	10^4	+	10^4	+	10^4	+
10^5	+	10^5	+	10^5	+	10^5	+
น้ำเสีย lot 22/12/2003				น้ำเสีย lot 06/01/2004			
ก่อนบำบัด		หลังบำบัด		ก่อนบำบัด		หลังบำบัด	
ค่าการเจือจาง (เท่า)	ผลการทดสอบ	ค่าการเจือจาง (เท่า)	ผลการทดสอบ	ค่าการเจือจาง (เท่า)	ผลการทดสอบ	ค่าการเจือจาง (เท่า)	ผลการทดสอบ
C	+	C	+	C	+	C	+
10	-	10	+	10	-	10	+
10^2	+	10^2	+	10^2	+	10^2	+
10^3	+	10^3	+	10^3	+	10^3	+
10^4	+	10^4	+	10^4	+	10^4	+
10^5	+	10^5	+	10^5	+	10^5	+

C คือ control - strip ให้สีเหลือง + strip ให้สีเขียว

ตารางที่ 5 ค่า pH และปริมาณของโลหะหนักชนิดต่างๆ ที่มีอยู่ในน้ำเสียก่อนและหลังบำบัดวิเคราะห์โดยโรงงานของบริษัทไทยปาร์คเกอร์ไรซิ่ง จำกัด

DATE	06/10/2003		05/11/2003		22/12/2003		06/01/2004	
ITEM	ก่อนบำบัด	หลังบำบัด	ก่อนบำบัด	หลังบำบัด	ก่อนบำบัด	หลังบำบัด	ก่อนบำบัด	หลังบำบัด
pH	7.03	7.22	4.85	7.45	3.18	7.55	3.59	7.58
F ⁻ (ppm)	9.88	26.74	9.00	7.56	133.20	21.25	20.84	20.15
Cl ⁻ (g/l)	0.83	0.95	0.87	0.68	1.68	1.12	0.467	0.76
Zn (ppm)	0.09	0.06	76.00	5.90	33.40	5.70	43.15	6.65
Mn (ppm)	0.41	0.15	6.72	0.05	8.65	0	25.25	0
Ni (ppm)	0.55	0.14	9.47	0.17	45.65	0.12	11.93	0.27
Na (ppm)	3.29	1.53	1.56	0.77	1.43	1.90	1.57	1.77
Cu (ppm)	0	0	0	0	0.01	0	0	0
Mg (ppm)	0.13	3.55	3.10	2.31	4.76	2.75	3.80	1.36
Fe (ppm)	0.02	0.32	0	0	2.77	0	0.09	0
Cr (ppm)	0	0	0	0	0.02	0	1.56	0
Pb (ppm)	0	0	0	0	0	0	0	0
TOC (ppm)	155.41	82.01	97.25	17.30	180.90	34.58	289.60	126.31

เอกสารอ้างอิง

- Lee, S.M. and Lee, W.Y. Determination of Heavy Metal Ions Using Conductometric Biosensor Based on Sol-Gel-Immobilized Urease. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2002**, 23(8), 1169-1172.
- Shi, G. Q. and Jiang, G. A dip-and-read test strip for the determination of mercury(II) ion in aqueous samples based on urease activity inhibition. *Anal. Sci.* **2002**, 18(11), 1215-1219.
- Starodub, N. F.; Kanjuk, N. I.; Kukla, A. L. and Shirshov, Y. M. Multi-enzymatic electrochemical sensor: field measurements and their optimisation. *Analytica Chimica Acta* **1999**, 385 (1-3), 461-466.
- Tsai, H. C.; Doong, R. A.; Chiang, H. C. and Chen, K. T. Sol-gel derived urease-based optical biosensor for the rapid determination of heavy metals. *Analytica Chimica Acta* **2003**, 481(1), 75-84.
- Zhylyak, G. A.; Dzyadevich, S. V.; Korpan, Y. I.; Soldatkin, A. P. and El'skaya, A. V. Application of urease conductometric biosensor for heavy-metal ion determination. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1995**, 24(1-3), 145-148.