

การตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต
อย่างรวดเร็ว โดยใช้เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสจากหัวผึ้งพันธุ์

RAPID METHOD ANALYSIS OF ORGANOPHOSPHATE AND CARBAMATE
INSECTICIDES USING ACETYLCHOLINESTERASE
FROM HONEY BEE HEAD



จรงค์ศักดิ์ พุ่มนวน
JARONGSAK PUMNUAN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชากีฏวิทยาและสิ่งแวดล้อม
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน... 48903 /
จัน, เดือน, ปี 12 ส.ค. 2547

พ.ศ. 2546
ISBN 974-324-796-3

b.....
i.....

**RAPID METHOD ANALYSIS OF ORGANOPHOSPHATE AND
CABAMATE INSECTICIDES USING ACETYLCHOLINESTERASE
FROM HONEY BEE HEAD**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN ENTOMOLOGY AND ENVIRONMENT
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2003

ISBN 974-324-796-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2003

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต
อย่างรวดเร็วโดยใช้เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสจากหัวผึ้งพันธุ์
นักศึกษา นายจรงค์ศักดิ์ พุ่มนวน
รหัสประจำตัว 43066704
ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชา กีฏวิทยาและสิ่งแวดล้อม
พ.ศ. 2546
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ดร.อำมร อินทร์สังข์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม รศ. ลักขณา อมรสิน
ดร. วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ

บทคัดย่อ

การตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตด้วยเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) จากหัวผึ้งพันธุ์โดยอาศัยหลักการของ Ellman ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ผลการตรวจจะระดับการทำงานของเอนไซม์ในหัวผึ้งพันธุ์มีค่าเท่ากับ 6,655 mUnit/g หรือ 88.23 mUnit/หัว ซึ่งหัวผึ้งที่ผ่านการทำให้แห้งโดยวิธี freeze dry มีระดับการทำงานของเอนไซม์ลดลง 20% ระดับการทำงานของเอนไซม์จะไม่แตกต่างกันเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0°C และ -20°C ในระยะเวลา 14 วัน

ในตัวอย่างที่มีสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตทำให้เอนไซม์ถูกยับยั้ง ซึ่งเปรียบเทียบกับสภาวะปราศจากสารกำจัดแมลงปกติ พบว่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (กำหนดที่ 11% ของการยับยั้งเอนไซม์) ของสารออร์กาโนฟอสเฟต 10 ชนิด และคาร์บาเมต 2 ชนิด ได้แก่ methyl parathion, methamidophos, dimethoate, chlorpyrifos, dichlorvos, fenitrothion, trichlofon, diazinon, triazophos, phosalone, carbosulfan และ carbaryl มีค่าเท่ากับ 0.02686, 3.07285, 2.63739, 0.00219, 0.01424, 0.00890, 2.07552, 0.68893, 0.00220, 0.13674, 0.03280 และ 0.03425 ppm ตามลำดับ และศักยภาพของสารกำจัดแมลงในการยับยั้งเอนไซม์ได้ถึง 100% มีค่าเท่ากับ 6.25, 343.00, 1,010.00, 0.56, 7.30, 9.25, 857.00, 359.00, 0.06, 11.60, 12.90 และ 67.00 ppm ตามลำดับ

จากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตบางชนิดโดยใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์กับเอนไซม์จากปลาไหลไฟฟ้า พบว่าสารพิษในความเข้มข้นของต่ำสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากหัวผึ้งได้ดีกว่าปลาไหลไฟฟ้า จากการทดสอบวิธีการวิเคราะห์ด้วยตัวอย่างผักจากแหล่งต่างๆ เช่นตัวอย่างผักคะน้าที่มีการเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารพิษในปริมาณที่แตกต่างกัน หรือตัวอย่างผักคะน้าในแปลงทดสอบหลังจากการฉีดพ่นสารพิษ และตัวอย่างผักจากการสุ่มในแปลงเกษตรกร พบว่าผลการยับยั้งเอนไซม์มีความสอดคล้องกับการตรวจพบสารพิษในตัวอย่างที่สามารถยืนยันด้วยผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC

วิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างโดยใช้เอนไซม์จากหัวมิ่งพันธุ์สามารถหาสารพิษในตัวอย่างได้อย่างรวดเร็ว มีประสิทธิภาพ ประหยัด และให้ค่า sensitivity ของการวิเคราะห์ที่ดีกว่าเอนไซม์ที่ได้จากปลาไหลไฟฟ้า แต่วิธีการนี้เหมาะสำหรับการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างเฉพาะกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของ AChE ได้เท่านั้น sensitivity ของการวิเคราะห์สำหรับสารพิษแต่ละชนิดจะแตกต่างกันและขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของการสกัดด้วย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Rapid Method Analysis of Organophosphate and Carbamate Insecticides Using Acetylcholinesterase from Honey Bee Head
Student	Mr. Jarongsak Pumnuan
Student ID	43066704
Degree	Master of Science
Programme	Entomology and Environment
Year	2003
Thesis Advisor	Dr. Ammorn Insung
Thesis Co – Advisor	Assoc. Prof. Luckana Amonsin Dr. Weerathep Pongprahert

ABSTRACT

A rapid enzymatic method for detection of organophosphate and carbamate insecticides was developed from Ellman reaction. Acetylcholinesterase obtained from honey bee head were analyzed by using Spectrophotometer at the wave length of 412 nm. The normal acetylcholinesterase activity from bee head was 6,655 mUnit/g or 88.23 mUnit/ bee head. Enzyme activity decreased 20% when grinding bee head was freeze-dried. And enzyme activities of the freeze-dried bee heads stored at 0°C and -20°C for 14 days were not significantly different. The enzyme added to organophosphate or carbamate insecticides were examined and compared with control. It was found that the detection limits of the method (at 11% enzyme inhibition) of ten organophosphate and two carbamate insecticides ; methyl parathion, methamidophos, dimethoate, chlorpyrifos, dichlorvos, fenitrothion, trichlofon, diazinon, triazophos, phosalone, carbosulfan and carbaryl, were 0.02686, 3.07285, 2.63739, 0.00219, 0.01424, 0.00890, 2.07552, 0.68893, 0.0020, 0.13674, 0.03280 and 0.03425 ppm, respectively, and the potential of insecticides (100% enzyme inhibition) were 6.25, 343.00, 1,010.00, 0.56, 7.30, 9.25, 857.00, 359.00, 0.06, 11.60, 12.90 and 67.00 ppm, respectively.

The efficiency of acetylcholinesterase of honey bee head and of electric eel for detection of some organophosphate and carbamate insecticides was compared. The result showed that low concentration of insecticides could inhibit enzyme activity of honey bee better than that of electric eel. The applicability of method was also approved

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

by testing with different sources of vegetable samples, as Chinese Kale spiked with various concentrations of certain insecticides, Chinese Kale from study field and various vegetables collected from farmer fields. It was found that generally, enzyme inhibition of those tests appeared accordingly with the result of GC method.

The residual test using enzyme from honey bee head was more rapid, efficiency, economic and detectable sensitivity than that using enzyme from electric eel. However, it was applicable only for organophosphate and carbamate groups which are acetylcholinesterase inhibitor. The detectable sensitivity also depended on the recovery of extract.



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างดีด้วยคำแนะนำและคำปรึกษาจาก ดร.อำมร อินทร์สังข์ ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.ลักขณา อมรสิน และดร.วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณ คุณวินัย ปิตียนต์ คุณพงศ์ศรี โบอตุลย์ คุณศิวาภรณ์ สกุลเที่ยงตรง คุณวิภา ตั้งนิพนธ์ และคุณผกาสินี อินทรอ่อน นักวิชาการ สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่ได้ให้ความรู้เกี่ยวกับการวิเคราะห์หาสารพิษตกค้างทางการเกษตร การหาระดับการทำงานของเอนไซม์ ช่วยยืนยันการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรจากแปลงเกษตรกรโดยใช้เครื่อง GC รวมทั้งที่ให้ความสนับสนุนสารเคมีมาตรฐานในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณชาญณรงค์ ยางสง เจ้าพนักงานการเกษตร 5 ศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร จังหวัดจันทบุรี (ฝั่ง) กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่ได้อนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ ทลอดจนให้คำปรึกษาในการเลี้ยงผึ้งด้วยดีตลอดการวิจัย

ขอขอบพระคุณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้โอกาสในการลาศึกษาต่อและให้ความสนับสนุนในการยกเว้นเงินค่าทำเนียมพิเศษ

ขอขอบพระคุณภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้อนุเคราะห์ในการใช้สถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆ ในการทำวิจัยให้ลุล่วงด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้อำนวยความสะดวกในการใช้ Freeze dryer สำหรับการทำให้เอนไซม์แห้ง

ขอขอบพระคุณ คุณอรพินท์ เกิดด้วยบุญ และครอบครัว ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องค่าใช้จ่ายในการทำวิจัยทั้งหมด

สุดท้ายขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆทุกคนที่ช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จสมบูรณ์ และยังให้กำลังใจต่อผู้วิจัยอย่างใกล้ชิดตลอดมา

คุณประโยชน์อันยิ่งใหญ่มีจากนิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอขอบแต่คุณพ่อคุณแม่ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

จรงค์ศักดิ์ พุมนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง	VII
สารบัญภาพ.....	VIII
สารบัญภาคผนวก.....	X
สารบัญตารางภาคผนวก.....	XI
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย	2
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	10
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	21
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการวิจัย	37
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	44
บรรณานุกรม.....	46
ภาคผนวก	50
ประวัติผู้เขียน	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณได้ (LOQ) ด้วยเอนไซม์จากหัวฝิ่งพันธุ์ของสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตบางชนิด	28
4.2 ช่วงของการใช้งานที่ครอบคลุมระดับความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตบางชนิด ในการตรวจสอบโดยวิธีการใช้เอนไซม์จากหัวฝิ่งพันธุ์.....	29
4.3 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์การตกค้างของ methyl parathion, methamidophos, dichlorvos และ carbaryl โดยวิธีการใช้เอนไซม์จากหัวฝิ่งพันธุ์ และยืนยันวิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC และ TLC ณ วันที่ต่างกัน.....	33
4.4 ผลการวิเคราะห์สารตกค้าง carbaryl ในผักคะน้าที่ฉีดพ่น carbaryl ในอัตราแนะนำ ซึ่งเก็บเกี่ยวใน 0, 3 และ 5 วัน โดยใช้เอนไซม์จากหัวฝิ่งพันธุ์.....	33
4.5 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์การตกค้างของสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต โดยวิธีการใช้เอนไซม์จากหัวฝิ่งพันธุ์ และยืนยันวิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC ในผักและผลไม้จากแปลงเกษตรกรในวันที่มีการเก็บเกี่ยว	35
4.6 ประสิทธิภาพในการสกัด (recovery of extraction) สารกำจัดแมลง methyl parathion โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC และวิธีการใช้เอนไซม์จากหัวฝิ่งพันธุ์	36
5.1 ค่า LOD ที่ได้จากการทดลองกับ AChE ที่ได้จากหัวฝิ่งพันธุ์เปรียบเทียบกับที่ได้จากปลาไหลไฟฟ้า	38

สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.1 เปรอร์เซ็นต์ระดับการทำงานของเอนไซม์แห่งที่เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ 0 °C และ -20 °C ในระยะเวลาต่างๆ กัน.....	21
4.2 เปรอร์เซ็นต์ระดับการทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ (% Enzyme activity remaining) ในกลุ่มควบคุม (5% MeOH เป็นตัวทำลาย หรือ 0.165% ใน reaction mixture)	22
4.3 ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ (% Enzyme activity remaining) กับความเข้มข้นของ methyl parathion, methamidophos, chlopyrifos, dimethoate, dichlorvos และ fenitrothion และศักยภาพของสารกำจัดแมลงในการยับยั้งเอนไซม์ได้ถึง 100% ; A : ผลการทดลอง, B : การ extrapolate	24
4.4 ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ (% Enzyme activity remaining) กับความเข้มข้นของ trichlorfos, diazinon, triazophos, phosalone, carbosulfan และ carbaryl และศักยภาพของสารกำจัดแมลงใน การยับยั้งเอนไซม์ได้ถึง 100% ; A : ผลการทดลอง, B : การ extrapolate	25
4.5 ปริมาณต่ำสุดของ methyl parathion, methamidophos, chlopyrifos, dimethoate, dichlorvos และ fenitrothion ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) โดยใช้เอนไซม์ จากหัวมิ่งพันธุ์	26
4.6 ปริมาณต่ำสุดของ trichlorfos, diazinon, triazophos, phosalone, carbosulfan และ carbaryl ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) โดยใช้เอนไซม์จากหัวมิ่งพันธุ์	27
4.7 ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ (% Enzyme activity remaining) กับความเข้มข้นของ triazophos, phosalone และ carbaryl โดยเอนไซม์ จากหัวมิ่งพันธุ์และจากปลาไหลไฟฟ้า.....	30
4.8 การเปรียบเทียบความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ของ triazophos, phosalone และ carbaryl โดยเอนไซม์จากหัวมิ่งพันธุ์และจากปลาไหลไฟฟ้า.....	31
4.9 ปริมาณต่ำสุดของสารเคมีที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ในตัวอย่งที่สามารถหาปริมาณได้ (LOQ) ของเครื่อง GC โดยใช้สาร มาตรฐาน methyl parathion	32
4.10 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์การตกค้างของ carbaryl โดยวิธี TLC ในผักคะน้า ที่ฉีดพ่น carbaryl ในอัตราแนะนำ ซึ่งเก็บเกี่ยวใน 0, 3 และ 5 วัน ; A : ตามวิธี Raju(1991), B : ตามวิธี Anon (1988).....	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

5.1 ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือกับความเข้มข้นของสารเคมี ... 40



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาคผนวก

หน้า

การคำนวณค่า Enzyme activity 51



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
1. ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ (% Enzyme activity remaining) กับความเข้มข้นของ methyl parathion, methamidophos, chlopyrifos, dichlorvos และ phosalonel โดยใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์.....	52
2. ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ (% Enzyme activity remaining) กับความเข้มข้นของ dimethoate, triazophos, diazinon, trichlorfos, carbaryl, และ fenitrothion โดยใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์.....	53
3. เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ (% Enzyme activity remaining) กับความเข้มข้นของ dimethoate, triazophos, diazinon, trichlorfos, carbaryl และ fenitrothion โดยใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์และจากปลาไหลไฟฟ้า	54
4. เปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ (% Enzyme activity remaining) จากการวิเคราะห์การตกค้างของ methyl parathion, methamidophos, dichlorvos และ carbaryl ในผักคะน้า โดยวิธีการใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์ ณ วันที่ต่างๆกัน.....	55
5. ปริมาณความเข้มข้นของ methyl parathion, methamidophos และ dichlorvos ในผักคะน้าจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC ณ วันที่ต่างๆกัน.....	56

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

จากรายงานการเกิดพิษจากสารกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทย พบว่าในปี 2543 มีผู้ป่วยจากสารกำจัดศัตรูพืช 3,109 ราย มีสาเหตุจากสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตถึง 55.51% สารกำจัดแมลงคาร์บาเมต 9.13% สารกำจัดวัชพืช 7.60% และสารกำจัดศัตรูพืชอื่นๆ 27.76% ขณะที่ในปี 2544 มีผู้ป่วยจากสารกำจัดศัตรูพืช 2,653 ราย มีสาเหตุจากสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟต 52.20% สารกำจัดแมลงคาร์บาเมต 7.30% สารกำจัดวัชพืช 9.90% และสารกำจัดศัตรูพืชอื่นๆ 30.60% (กองระบาดวิทยา. 2543, 2544)

การเกิดพิษจากสารกำจัดศัตรูพืช นอกจากเกิดกับผู้ประกอบอาชีพเกษตรกรรมแล้ว ผู้บริโภคเองยังต้องเสี่ยงภัยจากการใช้สารกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างอยู่บนพืชผักที่บริโภคและเป็นการยากที่จะทราบได้ว่าพืชเหล่านั้นมีสารเคมีตกค้างหรือไม่ ในบางประเทศได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ทางชีวเคมีแบบรวดเร็ว (Rapid biochemical test) โดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพงแต่ได้ผลดีเมื่อเทียบกับวิธีการวิเคราะห์มาตรฐาน มาใช้สู่มตัวอย่างก่อนจำหน่ายให้แก่ผู้บริโภค ซึ่งปัจจุบันวิธีการนี้ได้มีการพัฒนาและใช้กันแพร่หลายมากขึ้น โดยมีวัตถุประสงค์หลักคือความรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์ ความสะดวก และการประหยัดค่าใช้จ่าย

การตรวจวิเคราะห์ระดับการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) เป็นวิธีการหนึ่งที่ยิยมกันมากในปัจจุบัน โดยเฉพาะเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase : AChE) ซึ่งสามารถถูกยับยั้งได้โดยสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต เอนไซม์ชนิดนี้อาจเตรียมขึ้นมาจากแมลงวันหรือผึ้ง (รุ่งฤดี มีสมบุญและคณะ. 2544 ; Food and Fertilizer Technology Center. 1999 ; Shim *et al.* 2002) และสามารถนำมาพัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างได้ เนื่องจากส่วนหัวของผึ้งเป็นแหล่งทรัพยากรของเอนไซม์ AChE เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้สามารถพบได้ในระบบประสาทส่วนกลาง อวัยวะ หรือต่อมต่างๆ ที่ถูกควบคุมการทำงานด้วยระบบประสาทอัตโนมัติ (autonomic nervous system) ในส่วนที่เรียกว่า parasympathetic (วิชา ตั้งนิพนธ์. 2541) ปริมาณเอนไซม์ AChE ในหัวผึ้งมีมากกว่าแมลงวันเมื่อเทียบกับหัวต่อหัว นอกจากนั้นผึ้งยังเลี้ยงง่าย และสามารถเลี้ยงให้มีปริมาณมากๆ ได้ ดังนั้นจึงเหมาะสมที่จะนำหัวผึ้งมาเป็นแหล่งเอนไซม์ AChE

วิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเอนไซม์ AChE เป็นวิธีการตรวจสอบเบื้องต้น (screen) สารพิษตกค้างที่สามารถยับยั้งการทำงานของ AChE ได้ โดยในการตรวจสอบที่ให้ผลเป็น positive นั้นสามารถนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานหรือศึกษาในรายละเอียดเพิ่มเติมได้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gas Chromatography (GC), Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS) หรือ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) สำหรับสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตที่มีการใช้กันแพร่หลายในปัจจุบัน และสารหลายชนิดเป็นสารเคมีที่ได้รับการแนะนำโดยกองกึ่งและสัตววิทยา (2545) คือกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ได้แก่ dichlorvos, trichorfon, chlorpyrifos, methyl parathion, fenitrothion, diazinon, methamidophos, dimethoate, phosalon และ triazophos กลุ่มคาร์บาเมต ได้แก่ carbosulfan และ carbaryl แต่เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์มีข้อจำกัดคือลักษณะความแตกต่างทางโครงสร้างทางเคมีของสารกำจัดแมลง ทำให้ความสามารถในการเข้าจับกับเอนไซม์ได้แตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องนำมาพิจารณาอย่างยิ่งในการที่จะพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์ระดับการตกค้างของสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตอย่างรวดเร็ว โดยใช้เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสจากหัวผึ้งพันธุ์

1.2.2 เพื่อพัฒนาวิธีการที่ได้มาและนำมาปรับใช้เพื่อการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรทั่วไป

1.3 ขอบเขตการวิจัย

จากแนวคิดในการส่งเสริมให้ผู้บริโภคได้บริโภคพืชผักปลอดสารกำจัดศัตรูพืชโดยเฉพาะสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต เนื่องจากเป็นสารเคมีที่มีพิษเฉียบพลันสูงและมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย ซึ่งยากที่ผู้บริโภคจะทราบได้ถึงระดับการตกค้างของสารเคมี วิธีการปัจจุบันต้องนำพืชผักดังกล่าวมาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน ซึ่งต้องใช้เวลา 2-3 วันจึงจะทราบผล ซึ่งในการทดสอบอย่างรวดเร็วโดยวิธี AChE-inhibition ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์เพียง 1-2 ชั่วโมงเท่านั้น ถึงแม้ว่าจะเป็นวิธีการการตรวจสอบในเบื้องต้นก็ตาม แต่ผลการตรวจสอบที่ได้ก็สามารถนำไปใช้อ้างอิงเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคได้และเป็นข้อมูลเบื้องต้นให้เกษตรกรตระหนักถึงการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดแมลงมากขึ้น

ในปัจจุบันวิธีการวิเคราะห์แบบ AChE-inhibition ยังไม่แพร่หลายในประเทศไทย และวิธีการที่ใช้กันอยู่นั้นมักนิยมใช้เอนไซม์สำเร็จรูปที่ได้จากปลาไหลไฟฟ้า (Electric eel) ซึ่งต้องนำเข้าจากต่างประเทศและมีราคาค่อนข้างแพง ดังนั้นในการศึกษาและวิจัยครั้งนี้ จึงมีการนำเอนไซม์ AChE ที่สกัดได้จากหัวผึ้งพันธุ์ ซึ่งสามารถจัดเตรียมเองได้ มาใช้แทนเอนไซม์ AChE ที่สกัดได้จากปลาไหลไฟฟ้า ตรวจหาระดับการทำงานของเอนไซม์ที่เหมาะสม โดยใช้วิธี spectrophotometry

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พร้อมทั้งหาขอบเขตความน่าเชื่อถือ (Method validation) และยืนยันผลโดยวิธี GC สำหรับสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและวิธี TLC สำหรับสารกำจัดแมลงคาร์บาเมต ในการศึกษาครั้งนี้ใช้สารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต 10 ชนิดและคาร์บาเมต 2 ชนิด ได้แก่ dichlorvos, trichorfon, chlorpyrifos, methyl parathion, fenitrothion, diazinon, methamidophos, dimethoate, phosalon, triazophos, carbosulfan และ carbaryl ตามลำดับ โดยทำการเปรียบเทียบความไวในการตรวจวิเคราะห์ระหว่างเอนไซม์ที่ได้จากหัวผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) และเอนไซม์ที่ได้จากปลาไหลไฟฟ้า รวมทั้งการวิเคราะห์พืชผักจากแปลงปลูกที่ฉีดพ่นด้วย methyl parathion, methamidophos และ dichlorvos และจากตัวอย่างพืชผักของแปลงเกษตรกร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความเป็นพิษของสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตคือการไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase : AChE) ในกระบวนการ hydrolyse อะเซทิลโคลีน (acetylcholine) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) โดยที่การยับยั้งปฏิกิริยา hydrolysis นี้จะทำให้ acetylcholine ไม่สามารถแตกตัวเป็นโคลีน (choline) และกรดแอสติติก (acetic acid) ได้ ทำให้มีการสะสมของอะเซทิลโคลีน ณ บริเวณเชื่อมต่อของเซลล์ประสาทจึงทำให้เกิดการส่งสัญญาณและกระตุ้นประสาทมากเกินไป ประสาทกล้ามเนื้อจะทำงานตลอดเวลา ทำให้กล้ามเนื้ออ่อนล้า เป็นอัมพาตและตายในที่สุด (Amder *et al.* 1996) เอนไซม์ AChE เป็นกลุ่มหนึ่งของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส (Cholinesterase : ChE) ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการส่งสัญญาณประสาทบริเวณที่เรียกว่า cholinergic synapse ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งของเอนไซม์ ChE คือเอนไซม์บิวทิลโคลีนเอสเทอเรส (Butyrylcholinesterase : BChE) ซึ่งรู้จักกันในอีกชื่อหนึ่งว่า serum cholinesterase, pseudocholinesterase หรือ nonspecific cholinesterase สามารถพบได้ในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังมีสูตรโครงสร้างคล้ายกับ AChE แต่ยังไม่ทราบหน้าที่และลักษณะทางด้านสรีระวิทยาที่ชัดเจน (Marcel *et al.* 1991) ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ที่มีความยืดหยุ่น (plasticity) และมีความไว (sensitive) สูง (Weingand *et al.* 2001) ถึงแม้ BChE สามารถ hydrolyse สาร acetylcholine ได้ แต่มีอัตราการย่อยสลายต่ำกว่า AChE และไม่ใช่เป้าหมายหลักของการถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต แต่โดยทั่วไปคาดว่าโคลีนเอสเทอเรสมีความหมายรวมทั้ง AChE และ BChE เอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสนี้สามารถสกัดออกมาได้จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของสัตว์หลายชนิด รวมทั้งอวัยวะที่ทำให้เกิดไฟฟ้าของปลาไหลไฟฟ้า เม็ดเลือดแดงและสมองของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และในเนื้อเยื่อของแมลง (วิชาตั้งนิพนธ์. 2541)

จากการรายงานของ Ekholm (2001) เกี่ยวกับรูปร่างโมเลกุลของ AChE และ BChE พบว่าทั้งคู่มีส่วนของ active site ที่เหมือนกัน แต่แตกต่างกันคือความกว้างและแคบของ active center กล่าวคือ ใน AChE มีขนาดแคบกว่า BChE ทำให้ความสามารถในการเข้าจับกับ substrate (Acetylthiocholine iodide) และการกลับสู่สภาพเดิมของเอนไซม์เป็นไปได้ยากกว่า BChE นอกจากนี้สารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตสามารถยับยั้งการทำงานของ AChE และ BChE แตกต่างไปตามชนิดและความเข้มข้นของสารเคมี ซึ่งจากการศึกษาของ Nicode (2001) พบว่าเอนไซม์ AChE ถูกยับยั้ง 5, 25 และ 85% เมื่อถูกยับยั้งด้วย trichlorfon 10, 50 และ 1,000 μM ตามลำดับ ขณะที่ BChE จะถูกยับยั้ง 50, 70 และ 100% ตามลำดับ และหาก

นำเอนไซม์มาทดสอบกับสารเคมีผสมของ trichlorfon : carbosulfan ปริมาณ 10 μM : 10 μM , 50 μM : 20 μM และ 50 μM : 50 μM พบว่า AChE ถูกยับยั้งได้ 30, 90 และ 100% ตามลำดับ ขณะที่ BChE ถูกยับยั้งได้ 100% ทุกกรณี ซึ่งจะเห็นได้ว่า AChE มีความสามารถในการแยกความแตกต่างของความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงได้ดีกว่า BChE

การแสดงผลของการถูกกระตุ้นการยับยั้ง AChE ในแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) และไส้เดือน (*Caenorhabditis elegans*) โดย substrate (Acetylthiocholine iodide) ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ พบว่า AChE จาก *D. melanogaster* มีอัตราการถูกยับยั้งของเอนไซม์มากขึ้นตามความเข้มข้นของ substrate นั้นๆ ขณะที่ BChE ที่สกัดจากเม็ดเลือดแดงของมนุษย์ AChE จาก *C. elegans* และ AChE จากปลาไหลไฟฟ้า จะถูกกระตุ้นให้มีการทำงานมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ substrate ลดน้อยลง กล่าวคืออัตราการยับยั้งของเอนไซม์จะมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ substrate ลดต่ำลง Marcel *et al.* (1998) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Bowman (1981) เกี่ยวกับค่า 50% Inhibition (I_{50}) โดยการเข้าจับของ AChE กับ substrate คือสาร Tubocurarine, Melocquine, Gallamine, Alcuronium, Pancuronium และ Org Nc45 มีค่าที่สูงกว่า BChE ซึ่งหมายถึง AChE จะสามารถจับกับ substrate ได้ยากกว่า BChE นั้นเอง นอกจากนี้อัตราการยับยั้ง AChE ทั้งในคนและหนูเท่ากับ 9.3×10^6 และ 5.1×10^6 $\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ ตามลำดับ ซึ่งจะต่ำกว่า BChE อย่างมีนัยสำคัญ คือ $1,667 \times 10^6$ และ 780×10^6 $\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ ตามลำดับ ถึงแม้ว่า AChE จะมีโครงสร้างที่มีความสามารถในการจับ substrate ได้ยากกว่า BChE ทำให้ระดับการยับยั้ง BChE สูง แต่ในสารกำจัดแมลงที่มีความเข้มข้นต่ำนั้น AChE จะมีความสามารถในการตรวจสอบสารตกค้างที่สามารถตรวจพบได้สูงกว่า BChE กล่าวคือ มีความสามารถในการตรวจสอบสารตกค้างความเข้มข้นต่ำได้ดีกว่า Amitai *et al.* (1998) ซึ่งจากการทดลองของ Marty *et al.* (1995) เกี่ยวกับการหาค่า LOD (limit of detection) ของ carbaryl, malathion, methyl parathion และ trichlorfon พบว่า ค่า LOD ที่ทดสอบกับ AChE จากปลาไหลไฟฟ้า มีค่าเท่ากับ 19, 500, 25 และ 24 ppb ตามลำดับ ในขณะที่ ค่า LOD ที่ทดสอบกับ BChE จากซีรัมของม้าเท่ากับ 250, 300, 250 และ 240 ppb ตามลำดับ

ส่วนหัวของแมลงเป็นส่วนที่ประกอบด้วยสมองซึ่งเป็นศูนย์กลางของระบบประสาท การนำตัวอ่อนของแมลงทั้งตัวเพื่อนำมาสกัดหาเอนไซม์ AChE มักได้ค่าที่ไม่แน่นอนเนื่องจากการทำงานของ phenoloxidase รมกวนการตรวจวิเคราะห์เอนไซม์ AChE ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ใกล้เคียงกับความยาวคลื่น 412 นาโนเมตรที่ตรวจวิเคราะห์ AChE จะทำให้ค่าที่อ่านได้ไม่ตรงกับความเป็นจริง แต่สำหรับส่วนหัวของตัวอ่อนหรือเต็มวัยจะให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน (Frank and Nick. 2001) ระดับการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะมีความ

เฉพาะเจาะจงมากที่สุดในส่วนหัวของตัวเต็มวัยมากกว่าในไข่ ตัวอ่อน และดักแด้ (Casida. 1955) ดังนั้นการนำส่วนหัวของผึ้งมาเป็นแหล่งของเอนไซม์ จึงเป็นสิ่งที่เป็นไปได้สูง

สารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตหรือคาร์บาเมตเป็นสารกำจัดแมลงที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง และเนื่องจากออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ในระบบประสาทของแมลง ทำให้เกิดพิษต่อแมลง รวมทั้งสามารถทำให้เกิดพิษต่อระบบประสาทของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้เช่นกัน ปัจจุบันจึงมีการนำระดับการทำงานของเอนไซม์ AChE ในสิ่งมีชีวิต มาเป็นตัวชี้วัดถึงความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนสารพิษตกค้างดังกล่าวได้ ตัวอย่างเช่นกองอาชีวอนามัย (2539) ได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ โดยใช้กระดาษทดสอบ (Rapid paper) ในการหาปริมาณเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสในตัวอย่างน้ำเหลืองของเกษตรกร เพื่อตรวจดูแนวโน้มการเกิดพิษจากสารเคมี ซึ่งเป็นการเฝ้าระวังและติดตามเพื่อการป้องกันแก้ไขได้ทันที่ การตรวจวิเคราะห์การตกค้างของสารกำจัดแมลงโดยวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน เช่น GC, GC-MS หรือ HPLC มีข้อจำกัดคือจำนวนตัวอย่างสารเคมีมาตรฐานซึ่งอาจส่งผลให้ตัวอย่างนั้นได้ผลเป็น negative ได้และการใช้เวลาในการวิเคราะห์ค่อนข้างนาน แต่การใช้วิธี AChE-inhibition test นี้เป็นการตรวจสอบการยับยั้งเอนไซม์ และหากมีการยับยั้งก็สามารถให้ผลเป็น positive และวิเคราะห์ผลได้ทันที รวดเร็ว มีความไวต่อการตรวจสอบสูง นอกจากนั้นยังใช้ร่วมกับวิธีมาตรฐานเพื่อยืนยันผลการตรวจสอบเมื่อได้ผลเป็น negative ได้อีกด้วย (Schulze *et al.* 2002)

จากคุณสมบัติของเอนไซม์ AChE จึงได้มีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต ตามหลักการ Ellman's reaction (Ellman *et al.* 1961) ดังนี้



ในสภาวะที่ปราศจากสารพิษ เอนไซม์ AChE จะทำปฏิกิริยากับ Acetylthiocholine iodide (ATChI) ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้น (substrate) ของปฏิกิริยา ได้เป็นสารไทโอโคลีน (Thiocholine) ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อกับ 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoate) หรือ DTNB ได้สารสีเหลืองเกิดขึ้น ส่วนในสภาวะที่มีสารพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตจะไปยับยั้งเอนไซม์ ทำให้สีของปฏิกิริยาจางลง ค่าความเข้มของสีเหลืองสามารถตรวจวัดได้จากการวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น (wavelength) 412 นาโนเมตร

การวิเคราะห์หาระดับการทำงานของเอนไซม์ AChE ในหัวผึ้งสามารถนำมาใช้ยืนยันในการวินิจฉัยถึงสาเหตุการตายของผึ้งในธรรมชาติได้ ถึงแม้ว่าจะไม่สามารถบอกชนิดของสารที่สัมผัส แต่การลดลงของระดับการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ก็บ่งชี้ได้ว่าเกิดจากการได้รับสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตหรือคาร์บาเมต (Stefanidou *et al.* 1996) นอกจากนี้ยังมีการใช้ค่าการถูกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE มาประเมินความเป็นพิษของสารกำจัดแมลงร่วมกับการใช้ค่า LD₅₀ ทำให้การประเมินถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้น (Lari *et al.* 1994) ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์โดยนำเอนไซม์ AChE จากเนื้อเยื่อแมลงมาเป็นแหล่งของเอนไซม์ เพื่อการวิเคราะห์การตกค้างของสารพิษบนผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรอย่างรวดเร็วได้ เช่นการยับยั้งเอนไซม์โคลิเนสเทอเรสจากหัวแมลงวันบ้านต่อสารพิษบนผักคะน้า ซึ่งสามารถใช้เอนไซม์ชนิดนี้บ่งชี้ถึงปริมาณสารพิษตกค้างบนผักคะน้าได้ กล่าวคือจากการตรวจวิเคราะห์สารพิษ 7 ชนิด ได้แก่ mevinphos, carbosulfan, carbaryl, methamidophos, monocrotophos, methyl parathion และ dicrotophos พบว่าความเข้มข้นของสารที่เท่ากันจะแสดงผลเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลิเนสเทอเรส (% AChE inhibition) ที่แตกต่างกันมากซึ่งแสดงว่าสารพิษต่างชนิดกันจะมีปฏิริยาต่อคุณสมบัติของเอนไซม์ AChE จากหัวแมลงวันบ้านได้ไม่เท่ากัน โดย mevinphos จะมีปฏิริยาต่อเอนไซม์มากที่สุดและ dicrotophos น้อยที่สุด (สมปอง ทองดีแท้ และคณะ. 2537) และจากการทดลองของ Shim *et al.* (2002) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการใช้ เอนไซม์ AChE จากหัวผึ้งในการตรวจสอบความไวต่อสารกำจัดแมลง ซึ่งสามารถวัดได้จากความเสถียรของเอนไซม์ AChE หลังจากปฏิริยาทางชีวเคมีคงที่แล้ว และสามารถตรวจสอบปริมาณ carbofuran ได้ถึง 15 ppb โดยระดับการทำงานของ AChE ของผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) สัมพันธ์กับปริมาณของ fenitrothion โดยการศึกษาของ Bendahou *et al.* (1999) พบว่า AChE ถูกยับยั้งได้ 60% ที่ระดับ 0.2 mmol/bee สำหรับเวลาที่ใช้เพื่อให้ปฏิริยาเสถียรนั้นอาจแตกต่างกันเนื่องจากปริมาณของสารตั้งต้นกับความเข้มข้นของเอนไซม์ ดังนั้นก่อนทำการทดลองจึงควรทราบเวลาที่ทำให้ปฏิริยาเสถียรของเอนไซม์ AChE หลังจากปฏิริยาทางชีวเคมีคงที่

เมแทบอลิซึมของสารพิษเมื่อเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิต สารพิษเหล่านั้นจะถูกทำให้มีพิษน้อยลงและง่ายต่อการกำจัดออกนอกร่างกาย ในสัตว์จะมีวิธีการเปลี่ยนแปลงสารพิษให้เป็นสารที่มีขั้วมากขึ้นเพื่อให้สารนั้นละลายน้ำได้ง่ายขึ้นและถูกกำจัดออกนอกร่างกายในที่สุด แต่อย่างไรก็ตามวิธีการเมแทบอลิซึ่มดังกล่าวจะไม่ใช่วิธีการเปลี่ยนแปลงสารพิษให้มีพิษน้อยลงเสมอไป เช่นสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตหลายชนิดที่เป็นกลุ่ม pro-insecticide ได้แก่กลุ่ม phosphorothionate หรือ phosphodithioate เช่น malathion, methyl parathion, diazinon, chlopyrifos และ fenitrothion จะต้องผ่านกระบวนการ oxidation ให้อยู่ในรูปของ phosphate (active oxygen analogues) ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีกว่า phosphorothionate หรือ phosphodithioate มาก สารที่อยู่ในรูป phosphate จะถูกเปลี่ยนให้เป็นสารที่มีพิษน้อยลงโดยกระบวนการ hydrolysis และอื่นๆต่อไป (วรเดช จันทรธร. 2535) ดังนั้นในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มนี้จึงต้องเติมสารที่เป็น oxidizing agent เช่น bromine water หรือ microsomal enzyme จากตับ (Barber *et al.* 1999) เพื่อเปลี่ยนสารพิษให้อยู่ในรูป active oxygen analogues ซึ่งอยู่ในสภาพการเกิดพิษตามธรรมชาติก่อนการวิเคราะห์

เนื่องจากการวิเคราะห์อย่างรวดเร็วในหลอดทดลอง ทำให้สารออร์กาโนฟอสเฟตในกลุ่มที่เป็น pro-insecticide ไม่สามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ AChE ได้เต็มที่ จำเป็นต้องถูก activated โดยผ่านกระบวนการ oxidation ให้อยู่ในรูป active oxygen analogues ก่อน รุ่งฤดี มีสมบุญ และคณะ (2545) ได้พัฒนาการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สารประเภทออร์กาโนฟอสเฟต โดยต้องใช้โบรมีนในขั้นตอนของการสกัดเพื่อเปลี่ยนแปลงสารให้อยู่ในรูปที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ดีกว่ารูปเดิม และจากการทดลองพบว่า ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ (โดยกำหนดที่ 15% ของการยับยั้งเอนไซม์) ของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต ซึ่งได้แก่ carbosulfan, oxamyl, methomyl, BPMC, methyl parathion, isoprocarb, malathion, carbaryl, fenitrothion, methamidaphos, omethoate, dicrotophos, monocrotophos, profenophos และ pirimecarb มีค่าอยู่ระหว่าง 0.006-20.0 ppm ซึ่งในการทดลองครั้งนั้นใช้เอนไซม์ลำเจ็จรูป Electric eel และจากการวิเคราะห์ในตัวอย่าง ผักโดยการเติมหรือฉีดพ่นสารพิษออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตบางชนิดในปริมาณที่ต่าง ๆ กัน ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะพบว่าผลการยับยั้งเอนไซม์มีความสอดคล้องกับการตรวจวิเคราะห์สารพิษในตัวอย่างที่สามารถยืนยันด้วยผลการวิเคราะห์ด้วย GC ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Barber *et al.* (1999) ที่ใช้ 0.05% โบรมีน และ microsome ที่สกัดจากตับของหนูในการกระตุ้น parathion และ chlorpyrifos ให้อยู่ในรูปที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ AChE ซึ่งพบว่าสารทั้งสองถูกกระตุ้นได้โดย microsome ที่สกัดจากตับของหนู แต่ผลจากการกระตุ้นมักทำให้ได้สารที่เป็นเมแทบอลไลต์มากกว่าได้สารในรูป active oxygen analogues ขณะที่การกระตุ้นด้วยโบรมีนนั้นจะให้ผลการยับยั้งเอนไซม์ AChE ได้ดีกว่า นอกจากนั้นยังมี Schulze *et al.* (2002) ได้รายงานเกี่ยวกับความจำเป็นในการเพิ่มขั้นตอนการ oxidize ในกระบวนการทดสอบ เพระบางกรณี เช่น parathion ที่เติมสารละลาย bromine สามารถยับยั้ง AChE จากปลาไหลไฟฟ้าได้ถึง 17% ของ parathion 10 µg/l ขณะที่ไม่ผ่านกระบวนการ oxidize สามารถยับยั้งได้แค่ 7% ของ parathion 2,000 µg/l อย่างไรก็ตามการดำเนินการก็ต้องผ่านขั้นตอนการเป่าอากาศไล่โบรมีนออกให้หมดก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์สารพิษ เพราะหากโบรมีนยังเหลืออยู่จะไปทำลายเอนไซม์ได้ ซึ่งทำให้ได้ค่าที่ผิดพลาดเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การนำวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวมาใช้ ควรจะทราบความไว (sensitivity) ของวิธีวิเคราะห์ต่อสารเคมีแต่ละชนิด ซึ่งทราบได้จากค่าปริมาณต่ำสุดของสารพิษที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ AChE ได้ (limit of detection : LOD) ความเข้มข้นต่ำสุดในตัวอย่างที่สามารถตรวจสอบได้ (limit of quality : LOQ) และขอบเขตความน่าเชื่อถือ (Method validation) ซึ่งวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษตกค้างนี้จะเป็นประโยชน์ในการป้องกันอันตรายจากการเกิดพิษแบบเฉียบพลัน (acute toxicity) หรือกึ่งเรื้อรัง (sub-chronic toxicity) อันเนื่องมาจากการได้รับสารพิษในปริมาณที่มากพอ (รุ่งฤดี มีสมบุญ และคณะ. 2545)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์ (สดและแห้ง)

3.1.1 วิธีการเตรียมเอนไซม์

การตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตโดยใช้เอนไซม์ AChE ซึ่งสกัดจากหัวผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) นั้น เอนไซม์สามารถสกัดออกมาในรูปที่นำมาใช้ประโยชน์ได้ทันทีหรือนำมาทำเป็นเอนไซม์แห้งเพื่อเก็บไว้ใช้ในเวลาที่ต้องการวิเคราะห์สารตกค้าง โดยมีวิธีการสกัดดังนี้

- 1) นำหัวผึ้งพันธุ์ที่เลี้ยงไว้ในสภาพที่ปลอดภัยจากสารกำจัดแมลง บริเวณคณะเทคโนโลยีการเกษตร โดยใช้ตัวเต็มวัยของผึ้งงาน มาปั่นในสารละลาย buffer phosphate (pH 8.0, 0.1 M) ซึ่งเตรียมจากส่วนผสมของ Na_2HPO_4 0.05 M และ KH_2PO_4 0.01 M ในอัตราส่วน 4:1 ด้วยความเข้มข้นเนื้อเยื่อ 20 mg ต่อ buffer phosphate 1 ml โดยใช้เครื่อง homogenizer กรองสารละลายที่ได้โดยผ่าน glass wool
- 2) เตรียมเอนไซม์แห้งภายใต้อุณหภูมิต่ำ ด้วยเครื่อง Freeze dryer ที่อุณหภูมิ -40°C
- 3) นำเอนไซม์แห้งที่ได้เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ 0°C และ -20°C
- 4) ทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่เก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็ง ในช่วงเวลา 7, 14 และ 21 วัน โดยการวัดระดับการทำงานของเอนไซม์

3.1.2 การตรวจวิเคราะห์ระดับปฏิกิริยาของเอนไซม์ในหัวผึ้งพันธุ์ (Enzyme activity)

การศึกษาระดับปฏิกิริยาของเอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์ มีความจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากปริมาณความเข้มข้นที่วัดได้บ่งบอกถึงระดับการทำงานของเอนไซม์ต่อหัวผึ้ง 1 หัว ระดับการทำงานของเอนไซม์ มีหน่วยเป็น mUnit/g (tissue) ใช้วิธีตามหลักการของ Ellman's reaction (Ellman *et al.* 1961) มีขั้นตอนดังนี้

- 1) นำหัวผึ้งพันธุ์ปั่นในสารละลาย buffer phosphate (pH 8.0, 0.1 M) ในอัตราส่วนเนื้อเยื่อ 20 mg ต่อ buffer phosphate 1 ml (5 หัว/ตัวอย่าง) โดยใช้เครื่อง homogenizer
- 2) ดูดสารละลายที่ได้ 400 μl เติมลงในหลอดทดลองที่มี buffer phosphate (pH 8.0, 0.1M) 2.6 ml เติมสารละลาย DTNB 0.01 M 100 μl เตรียมได้จากละลาย 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoate) 39.6 mg ใน buffer phosphate (pH 7.0, 0.1 M)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10 ml และสารละลาย ATChI 0.075 M 20 μ l เตรียมได้จากละลาย Acetylthiocholine iodide 21.67 mg ในน้ำกลั่น 10 ml ผสมสารทั้งหมดด้วย vortex mixer

- 3) วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer แบบ visible ที่ความยาวคลื่น 412 nm บันทึกค่าดูดกลืนแสงทุก 30 วินาที ภายในเวลา 3 นาที หาค่าเฉลี่ยความแตกต่างเพื่อคำนวณตามสมการของ Ellman *et al.* (1961) ทำให้ได้ค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ AChE มีหน่วยเป็น mUnit/g (tissue)

$$\text{Enzyme activity} = 2.87 \times 10^4 \times \Delta A$$

เมื่อ ΔA : ค่า absorbance ที่เปลี่ยนแปลงไปต่อนาที

3.1.3 การตรวจวิเคราะห์ระดับปกติของเอนไซม์จากหัวมิ่งซึ่งผ่านการทำให้แห้ง

เป็นระดับการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ต่อหน่วยการทดลอง ซึ่งต้องมีระดับการทำงานที่เหมาะสมและปริมาณที่เท่ากัน เพื่อสามารถนำมาเปรียบเทียบระดับการทำงานของเอนไซม์ที่เหลือหลังจากทำปฏิกิริยากับสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตหรือคาร์บาเมตแล้ว วิธีการหาความเข้มข้นของการทำงานของเอนไซม์ตามหลักการของ Ellman's reaction (Ellman *et al.* 1961) มีดังนี้

- 1) นำเอนไซม์แห้งละลายใน buffer phosphate (pH 8.0, 0.1 M) ในอัตราส่วน 5.5 mg ต่อ buffer phosphate 1 ml
- 2) ดูดสารละลายที่ได้ 400 μ l เติมลงในหลอดทดลองที่มี buffer phosphate (pH 8.0, 0.1M) 2.6 ml เติมสารละลาย DTNB 0.01 M 100 μ l และ ATChI 0.075 M 20 μ l ผสมสารทั้งหมดด้วย vortex mixer
- 3) วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer แบบ visible ที่ความยาวคลื่น 412 nm บันทึกค่าดูดกลืนแสงทุก 30 วินาที ภายในเวลา 3 นาที หาค่าเฉลี่ยความแตกต่างเพื่อคำนวณตามสมการของ Ellman *et al.* (1961) ทำให้ได้ค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ AChE ในสารละลาย buffer phosphate 1 ml มีหน่วยเป็น mUnit/ml

$$\text{Enzyme activity} = 574 \times \Delta A$$

เมื่อ ΔA : ค่า absorbance ที่เปลี่ยนแปลงไปต่อนาที

- 4) ปรับความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 35 mUnit/ml โดยใช้ buffer phosphate (pH 8.0, 0.1 M) ก่อนการนำไปตรวจวิเคราะห์ระดับการตกค้างของสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต

3.1.4 การตรวจวิเคราะห์ระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ (%Enzyme activity remaining) หลังจากทำปฏิกิริยากับสารกำจัดแมลง

ใช้ spectrophotometric method ซึ่งเป็นวิธีการตรวจปริมาณผลผลิตจากการ hydrolyze ของเอนไซม์ซึ่งแสดงถึงปริมาณการทำงานของเอนไซม์และสามารถบอกปริมาณในรูปเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ การตรวจวิเคราะห์ระดับการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ได้ดำเนินการตามวิธีของ Ellman *et al.* (1961) และ Frank and Nick (2001) มีขั้นตอนดังนี้

- 1) ตูดสารละลายสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตที่ละลายใน dichloromethane 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง
- 2) เติม 5% MeOH in water 1 ml
- 3) ใช้อากาศเป่าไล่ dichloromethane ให้หมด (ประมาณ 15 นาที)
- 4) ใส่ 1% bromine in water 50 μ l เขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที
- 5) ใช้อากาศเป่าไล่ bromine ที่เหลืออยู่ให้หมด (ประมาณ 15 นาที) จะได้เป็น sample extract
- 6) ตูดสารละลาย sample extract 250 μ l ลงในหลอดทดลองที่มี buffer phosphate (pH 8.0, 0.1 M) 2.6 ml
- 7) เติมสารสกัดที่ได้จากหัวผึ้ง 400 μ l (0.014 Unit) จากข้อ 3.1.3 เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
- 8) เติม DTNB 0.01 M 100 μ l และ ATChI 0.075 M 20 μ l เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่ 25^o C
- 9) วัดค่าดูดกลืนแสง (Absorbance : ABS) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 412 nm
- 10) คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ระดับการทำงานของเอนไซม์ที่คงเหลือ (%Enzyme activity remaining) โดยเทียบกับกลุ่มควบคุม (Control)

3.2 ขอบเขตความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์ (Method validation)

การตรวจวิเคราะห์สารตกค้างออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตด้วยเอนไซม์เป็นการตรวจสอบเบื้องต้นที่สามารถตรวจสอบได้ง่ายและรวดเร็ว ตัวอย่างที่ให้ผลเป็น positive อาจนำไปทำการตรวจวิเคราะห์ต่อด้วยวิธีมาตรฐานต่างๆ เช่น GC, GC-MS และ HPLC เพื่อยืนยันผลหรือวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารที่แน่นอน ทั้งนี้การตรวจวิเคราะห์โดยการใช้อิทธิฤทธิ์ของเอนไซม์จากหัวผึ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์สามารถตรวจสอบสารพิษในเบื้องต้นได้เท่านั้น ดังนั้นเพื่อให้การตรวจวิเคราะห์มีประสิทธิภาพ จำเป็นต้องทราบความไวหรือ sensitivity ของวิธีการวิเคราะห์โดยการตรวจสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ การหาขอบเขตความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์ สารตกค้างออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตโดยใช้เอนไซม์จากหัวมิ่งพันธุ์ดำเนินการตามวิธีของ John (1989) ดังนี้

3.2.1 ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (limit of detection : LOD) มีขั้นตอนดังนี้

- 1) หาค่า SD จาก % Enzyme activity remaining ของกลุ่มควบคุม (Control ; ไม่มีสารกำจัดแมลง แต่มี 5% MeOH) 150 ตัวอย่าง
- 2) กำหนดค่า % inhibition ซึ่งครอบคลุมค่าเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุม ซึ่งเท่ากับ 3SD เทียบกับกลุ่มที่ไม่มีสารกำจัดแมลง และ 5% MeOH (blank)

3.2.2 ความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ในตัวอย่างที่สามารถพบได้ (limit of quality : LOQ) มีขั้นตอนทำตามข้อ 3.2.1 โดยกำหนดค่า LOQ เท่ากับ 10SD

3.2.3 การหาความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของผลการทดสอบกับความเข้มข้นของสารกำจัดแมลง มีขั้นตอนดังนี้

- 1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน dichlorvos, trichorfon, chlorpyrifos, methyl parathion, fenitrothion, diazinon, methamidophos, dimethoate, phosalon, triazophos, carbosulfan และ carbaryl ใน dichloromethane ชนิดละ 15 ระดับความเข้มข้น
- 2) ตรวจวิเคราะห์ระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ หลังจากทำปฏิกิริยากับสารกำจัดแมลงมาตรฐาน ตามวิธีในข้อ 3.1.4 ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ
- 3) เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารกับค่าเฉลี่ยของระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ

3.2.4 การหาความไว (sensitivity) ของการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงโดยใช้เอนไซม์จากหัวมิ่งพันธุ์มีขั้นตอนดังนี้

- 1) นำค่าความสัมพันธ์ที่ได้จากข้อ 3.2.3 ในช่วงที่สารละลายมาตรฐานยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากหัวมิ่งพันธุ์ครอบคลุมได้ 11% 5 ระดับความเข้มข้น
- 2) เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่า $\ln(\% \text{ Enzyme activity})$
- 3) คำนวณหาค่า regression line
- 4) หาค่าความไวจากค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งได้ 11%

3.2.5 ช่วงของการทดสอบ (Range) เป็นช่วงระดับความเข้มข้นต่างๆของสารตกค้างที่ครอบคลุมระดับความเข้มข้นของสารที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ซึ่งเป็นช่วงของค่า LOQ ถึงค่าความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ 100% มีขั้นตอนดังนี้

- 1) ใช้ค่า LOQ จากข้อ 3.2.2
- 2) นำค่าความสัมพันธ์ที่ได้จากข้อ 3.2.3 ในช่วงที่สารละลายมาตรฐานยับยั้งการทำงานได้ในช่วงสุดท้าย 3 ระดับความเข้มข้น
- 3) เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารกับค่าเฉลี่ยของระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ
- 4) หาค่า regression line และค่า Y-intercept = 0 ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งเอนไซม์ได้ 100%

3.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์กับเอนไซม์สำเร็จรูป

ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพเอนไซม์ AChE แห่งที่ได้จากหัวผึ้งพันธุ์โดยการทำ Freeze dryer กับเอนไซม์ AChE จากปลาไหลไฟฟ้า (AChE : True Cholinesterase ; EC 3.1.1.7) (Sigma) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำเร็จรูปที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ มีขั้นตอนดังนี้

- 1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน phosalone, triazophos และ carbaryl ที่ละลายใน dichloromethane 15 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ
- 2) เติมสารละลายมาตรฐาน 250 μ l ในหลอดทดลองที่มี buffer phosphate (pH 8.0, 0.1 M) 2.6 ml
- 3) เติมเอนไซม์ ที่ได้จากหัวผึ้ง 400 μ l (0.014 Unit) จากข้อ 3.1.3 หรือเอนไซม์สำเร็จรูปจากปลาไหลไฟฟ้า 400 μ l (0.014 Unit) เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 5 นาที
- 4) เติม DTNB 0.01 M 100 μ l และ ATChI 0.075 M 20 μ l ผสมสารทั้งหมดด้วย vortex mixer แล้วทิ้งไว้ 30 นาที ที่ 25°C
- 5) วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 412 nm
- 6) คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ระดับการทำงานของเอนไซม์ที่คงเหลือ
- 7) เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์และเอนไซม์สำเร็จรูป

3.4 การทดสอบผลการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างด้วยเอนไซม์จากหัวมิ่งพันธุ์ และยืนยันการทดสอบการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน

โดยการปลูกผักคะน้าในแปลงทดลองและทำการฉีดพ่นสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตในอัตราที่แนะนำในฉลาก เมื่อถึงกำหนดเก็บเกี่ยวนำมาตรวจวิเคราะห์การตกค้างของสารกำจัดแมลงโดยวิธีการยับยั้งเอนไซม์จากหัวมิ่งพันธุ์เปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC และ Thin Layer Chromatography (TLC) ในการตรวจสอบสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต ตามลำดับ ณ วันที่ 0, 3 และ 5 หลังการฉีดพ่นครั้งสุดท้าย และยืนยันโดยวิธีวิเคราะห์สารตกค้างออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตด้วยเครื่อง GC ในพืชผักจากการแปลงเกษตรกร

3.4.1 ประสิทธิภาพของวิธีการตรวจวิเคราะห์ของเครื่อง GC โดยหาค่าปริมาณต่ำสุดที่เครื่องสามารถตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลง (LOD) ได้มีขั้นตอนดังนี้

- 1) ทำการวิเคราะห์ sample blank ที่เติมด้วยสารมาตรฐาน methyl parathion ที่ความเข้มข้นต่างๆกันที่ความเข้มข้นละ 10 ซีซี
- 2) คำนวณหาค่า SD และเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นกับค่า SD
- 3) หาค่าจุดตัดบนแกน y (Y-intercept) ได้ค่า SD_0
- 4) กำหนดค่า LOD เท่ากับ $3SD_0$

3.4.2 ประสิทธิภาพของวิธีการตรวจวิเคราะห์ของเครื่อง GC เป็นการหาความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ในตัวอย่างที่สามารถพบได้ (LOQ) มีขั้นตอน ตามข้อ 3.4.1 โดยกำหนด LOQ เท่ากับ $10SD_0$

3.4.3 การทดสอบผลการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างจากผักคะน้าที่ควบคุมการฉีดพ่นด้วยสารกำจัดแมลง methamidophos, dichlorvos และ methyl parathion มีขั้นตอนดังนี้

- 1) ทำการปลูกผักคะน้า 5 แปลง โดยแต่ละแปลงมีขนาด 1.5×4.5 เมตรฉีดพ่นด้วย methamidophos 60% w/v EC, dichlorvos 50% w/v EC และ methyl parathion 50% w/v EC ในอัตราตามคำแนะนำ (25 ml / น้ำ 20 L) และ carbaryl 85%WP ในอัตราตามคำแนะนำ (50 g / น้ำ 20 L) และแปลงควบคุมซึ่งไม่ได้ฉีดพ่นสารกำจัดแมลง โดยฉีดพ่นสารครั้งแรกเมื่อผักคะน้ามีอายุ 25 วัน หลังจากนั้นฉีดพ่นทุก 7 วัน และฉีดพ่นครั้งสุดท้ายเมื่อผักมีอายุ 46 วัน
- 2) สุ่มเก็บตัวอย่างผักจำนวน 1 กิโลกรัม จากแปลงทดลองโดยการสุ่มเก็บหลังจากการฉีดพ่นสารครั้งสุดท้ายนาน 1 ชั่วโมง มาทำการสกัดสารตกค้าง (วันที่ 0) และหลังจากนั้นสุ่มผักคะน้าจากแต่ละแปลงมาทำการสกัดและตรวจวิเคราะห์อีกในวันที่ 3 และ 5 หลังจากการฉีดพ่นสารครั้งสุดท้าย แต่ละกลุ่มทำการทดลอง 3 ซีซี

3.4.4 การทดสอบผลการตรวจวิเคราะห์การตกค้างของสารกำจัดแมลงจากพืชผักในแปลงเกษตรกรในวันที่มีการเก็บผลผลิต

1) ตัวอย่างเห็ดนางรมฮังการี ถั่วงอก และฝรั่งไร้เมล็ดจากแปลงเกษตรกรใน จ. นครปฐม คะนํ้าและกุยช่าย จากแปลงเกษตรกรใน จ. ปทุมธานี ชาใบหม่อน ต้นหอม ผักชีไทยและพริกชี้ฟ้าเหลืองใน จ. สุพรรณบุรี ซึ่งตัวอย่างพืชผัก ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงการเกษตรและสหกรณ์

2) สุ่มตัวอย่างพืชผักที่ได้จาก ข้อ 1) มาสกัดและตรวจวิเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ต่อไป

3.4.5 การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักโดยใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์ มีขั้นตอนดังนี้

3.4.5.1 การสกัดสารตกค้างในพืชผัก

การสกัดสารพิษตกค้างในพืชผักเพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์และวิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วย GC นั้นมีความแตกต่างกันสำหรับการตรวจวิเคราะห์ การวิเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ ใช้วิธีสกัดสารพิษตกค้างตามวิธีของ รุ่งฤดี มีสมบุญธรรมและคณะ (2545) มีขั้นตอนดังนี้

- 1) สุ่มซังผักคะน้าที่หั่นแล้วมา 10 g ใส่ในขวดฝาเกลียว ขนาด 30 ml
- 2) ใส่ dichloromethane 10 ml ปิดฝา แล้วเขย่าแรงๆนาน 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
- 3) ดูดส่วนที่ใส 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง
- 4) เติม 5% MeOH in water 1 ml
- 5) ใช้อากาศเป่าไล่ dichloromethane ให้หมด (ประมาณ 15 นาที)
- 6) ใส่ 1% bromine in water 50 μ l เขย่าให้เข้ากันและตั้งไว้ประมาณ 3 นาที
- 7) ใช้อากาศเป่าไล่ bromine ที่เหลืออยู่ให้หมด (ประมาณ 15 นาที) จะได้เป็น sample extract

3.4.5.2 การวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ที่ถูกยับยั้งโดยสารพิษ

การวิเคราะห์การตกค้างของสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต พัฒนาขึ้นตามวิธีของ Ellman *et al.* (1961) และ Frank and Nick (2001) มีขั้นตอนดังนี้

- 1) เติม sample extract 250 μ l ที่ได้จากข้อ 3.4.5.1 ในหลอดทดลองที่มี buffer phosphate (pH 8.0, 0.1 M) 2.6 ml
- 2) เติมสารสกัดที่ได้จากหัวผึ้ง 400 μ l (0.014 Unit) จากข้อ 3.1 เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3) เติม DTNB 0.01 M 100 μ l และ ATChI 0.075 M 20 μ l เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วทิ้งไว้ 30 นาที ที่ 25° C
- 4) นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 412 nm
- 6) เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ระดับการทำงานของเอนไซม์ที่คงเหลือ (%Enzyme activity remaining) กับกลุ่มควบคุม (Control)

3.4.6 การตรวจสอบสารพิษตกค้างออร์กาโนฟอสเฟตโดยใช้เครื่อง GC มีขั้นตอนดังนี้

3.4.6.1 การสกัดสารตกค้าง โดยดัดแปลงจากวิธีของ Greeve (1989) มีขั้นตอนดังนี้

- 1) สุ่มผักคะน้าที่หั่นแล้วมา 50 g
- 2) ปั่นรวมกับ ethyl acetate 100 ml และ sodium sulfate ที่ผ่านการอบ 200° C นาน 12 ชั่วโมง มา 50 g ในโถปั่น (blender) นาน 3 นาที
- 3) กรองผ่าน sodium sulfate เก็บสารละลายที่กรองได้เป็นส่วนที่ A
- 4) เติม ethyl acetate 50 ml และ sodium sulfate 25 g ลงในส่วนที่เหลือจากการกรอง แล้วปั่นนาน 3 นาที เก็บสารละลายที่กรองได้เป็นส่วนที่ B
- 5) ทำซ้ำตามข้อ 4) แล้วเก็บสารละลายที่กรองได้เป็นส่วนที่ C
- 6) นำสารละลายที่กรองได้ทั้ง 3 ส่วน มารวมกันนำไปลดปริมาตรโดยใช้เครื่องลดปริมาตรอุณหภูมิต่ำ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40° C จนเกือบแห้งแล้วปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate ให้ได้ 5 ml เก็บไว้ในขวด vial นำไปตรวจวิเคราะห์ต่อไป

3.4.6.2 การวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GC

ตรวจวิเคราะห์ methamidophos, methyl parathion และ dichlorvos โดยใช้เครื่อง GC ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 14 A ที่มีเครื่องตรวจวัดชนิด Flame Photometric Detector (FPD) ใช้ packing column แก้ว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 mm ความยาว 2.1 m บรรจุด้วย 3% OV-1 on 80/100 support silicon supelcoport ตั้งอุณหภูมิของ column ที่ 180° C injector 250° C Detector 260° C Carrier gas คือ N₂ บริสุทธิ์ 99.99% มีอัตราการไหล 50 ml/นาที H₂ 35 ml/นาที อากาศ 100 ml/นาที สารมาตรฐาน methamidophos, methyl parathion และ dichlorvos เป็น external calibration ฉีดสารสกัดจากตัวอย่างจำนวน 3 μ l แล้วคำนวณหาปริมาณ methamidophos, methyl parathion และ dichlorvos ที่ตรวจวิเคราะห์ได้ โดยคำนวณเป็นปริมาณทั้งหมดจากตัวอย่างผัก 50 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.6 การหาสารพิษตกค้างคาร์บาเมต โดยใช้วิธี TLC

3.4.6.1 โดยการดัดแปลงจากวิธีของ Anon (1988) มีขั้นตอนดังนี้

- 1) เตรียม stationary phase โดยเคลือบแผ่นกระจกผิวเรียบขนาด 20×20 cm ซึ่งใช้เป็น absorbent support ด้วย silica gel G 60 แล้วนำไปอบที่ 100°C นาน 1 ชั่วโมง
- 2) นำแผ่นกระจกที่ได้ มาขีด solvent front ระยะทาง 10 cm จากจุดเริ่มต้น
- 3) หยดสารละลายมาตรฐาน carbaryl 10 µl/spot ความเข้มข้น 0, 100, 150, 200, 250 และ 300 ppm และสารสกัดที่ได้จากข้อ 3.4.6.1 ลงบนจุดเริ่มต้นของแผ่นกระจก
- 4) นำแผ่นกระจกที่ได้ไปแช่ใน Chromatographic chamber ซึ่งเตรียม developing solvent (Hexane : Acetone เท่ากับ 4:1) ไว้แล้ว นาน 30 นาที
- 5) เมื่อ developing solvent ขึ้นไปถึง solvent front นำแผ่นกระจกขึ้นจาก Chromatographic chamber ตั้งทิ้งไว้ให้ solvent ระเหยไปจากแผ่นกระจกจนหมด นำแผ่นกระจกไปอังไอบอร์มินซึ่งเตรียมได้จาก 5% bromine ใน carbontetrachloride ใน bromine tank ประมาณ 1-2 นาที เอาออกและตั้งทิ้งไว้ให้ไอบอร์มินระเหยจนหมด นำไปพัฒนาจุดสี
- 6) พัฒนาจุดสีโดยฉีดพ่นด้วยสารละลายแอนไซม์ AChE จากปลาไหลไฟฟ้าให้ทั่วแผ่นกระจก ตั้งทิ้งไว้ให้หมาดแล้วฉีดพ่นทับด้วยสารผสมระหว่าง β -naphthyl acetate 5 mg ใน ethanol 2 ml กับสาร Fast blue B 12.5 mg ในน้ำ 8ml (ผสมแล้วใช้ทันที) จะได้จุดสีขาวบนพื้นม่วง
- 7) คำนวณค่า Rf ของแต่ละจุดโดย

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางของแต่ละสารจากจุดเริ่มต้นถึงจุดที่สารขึ้นถึง}}{\text{ระยะทางของ solvent front}}$$

- 8) แปลผลโดยพิจารณาจากค่า Rf สี ความเข้ม และลักษณะของจุดบนแผ่นกระจกของสารตัวอย่างเปรียบเทียบกับจุดของสารมาตรฐาน

3.4.6.2 โดยการดัดแปลงจากวิธีของ Raju (1991) มีขั้นตอนเหมือนข้อ 3.4.6.1 แต่มีความแตกต่างดังนี้

- 1) การไม่ผ่านกระบวนการอังไอบอร์มิน
- 2) พัฒนาสีโดยใช้ 0.05% aniline ใน 1:4 perchloric acid กับ 0.2% Sodium nitrite ในน้ำ (1:1 v/v) จะได้จุดสีขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ (recovery)

การตรวจสอบสารพิษตกค้างในพืชนอกจากจะขึ้นอยู่กับ sensitivity ของสารพิษแต่ละชนิดแล้วยังขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพในการสกัดสารพิษแต่ละชนิด (recovery extraction) อีกด้วย ตามเทคนิคการหาประสิทธิภาพของการสกัดในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างของ John (1989) โดยการวิเคราะห์ในผักคะน้าที่เติมสารออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตแต่ละชนิดที่มีปริมาณตกค้างเป็น 0.5, 1.0 และ 5.0 เท่าของค่า MRL (maximum residue limit) ของสารแต่ละชนิด ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ โดยใช้ตัวอย่างที่ไม่มีการปนเปื้อนสารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตเป็นตัวเปรียบเทียบ ในการทดลองครั้งนี้ได้ ใช้ methyl parathion ซึ่งระดับ Codex.MRL ในผักกะหล่ำ (Codex ไม่ได้กำหนดค่า MRL ในคะน้า) เท่ากับ 0.2 ppm มีวิธีการดังนี้

3.5.1 การตรวจวิเคราะห์โดยเอนไซม์มีขั้นตอนดังนี้

- 1) สุ่มซึ่งผักคะน้าที่ไม่มีการปนเปื้อนของสารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตที่หั่นแล้ว 10 g ใส่ในขวดฝาเกลียวขนาด 30 ml
- 2) เติมสารกำจัดแมลง methyl parathion ที่ละลายใน dichloromethane ในความเข้มข้น 0, 0.5, 2.0 และ 10.0 ppm 1 ml เขย่าแรงๆ ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที
- 3) ใส่ dichloromethane 9 ml ปิดฝาแล้วเขย่าแรงๆ นาน 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จะได้ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน methyl parathion เท่ากับ 0, 0.10, 0.20 และ 1.0 ppm ตามลำดับ
- 4) ดูดสารที่ใส่ 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง
- 5) เติม 5% MeOH in water 1 ml
- 6) ใช้อากาศเป่า dichloromethane ให้หมด (ประมาณ 15 นาที)
- 7) ใส่ 1% bromine in water 50 μ l เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที
- 8) ใช้อากาศเป่าไล่ bromine ที่เหลือออกให้หมด (ประมาณ 15 นาที) จะได้เป็น sample extract
- 9) นำ sample extract ที่ได้ไปตรวจสอบระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ ตามข้อ 3.1.4
- 10) นำเปอร์เซ็นต์ระดับการทำงานของเอนไซม์ที่คงเหลือ มาเปรียบเทียบกับระดับความไวของเอนไซม์ต่อสารกำจัดแมลงมาตรฐาน methyl parathion

3.6.2 การตรวจวิเคราะห์โดยเครื่อง GC มีขั้นตอนดังนี้

- 1) สุ่มผักคะน้าที่ไม่มีการปนเปื้อนของสารกำจัดแมลง methyl parathion ที่หั่นแล้ว 50 g
- 2) เติมสารกำจัดแมลง methyl parathion ที่ความเข้มข้น 0, 2.5, 10.0 และ 50.0 ppm 1 ml เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
- 3) บั่นรวมกับ ethyl acetate 100 ml และ sodium sulfate ที่ผ่านการอบ 200° C นาน 12 ชั่วโมง มา 50 g ในโถปั่น (blender) นาน 3 นาที
- 4) กรองผ่าน sodium sulfate เก็บสารละลายที่กรองได้เป็นส่วนที่ A
- 5) เติม ethyl acetate 50 ml และ sodium sulfate 25 g ลงในส่วนที่เหลือจากการกรอง แล้วบั่นนาน 3 นาที เก็บสารละลายที่กรองได้เป็นส่วนที่ B
- 6) ทำซ้ำตามข้อ 4) แล้วเก็บสารละลายที่กรองได้เป็นส่วนที่ C
- 7) นำสารละลายที่กรองได้ทั้ง 3 ส่วน มารวมกันนำไปลดปริมาตรโดยใช้เครื่องลดปริมาตรอุณหภูมิต่ำ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40° C จนเกือบแห้งแล้วปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate ให้ได้ 5 ml เก็บไว้ในขวด vial นำไปตรวจวิเคราะห์ต่อไป ตามข้อ 3.4.6.2
- 8) คำนวณ% recovery จากสมการ $\text{Recovery (\%)} = (C_1 - C_2) \times 100 / C_3$ เมื่อ
 C_1 = ความเข้มข้นของ methyl parathion ตัวอย่างผักที่เติมสารมาตรฐาน
 C_2 = ความเข้มข้นของ methyl parathion ตัวอย่างผัก (ควรจะเท่ากับ 0)
 C_3 = ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน methyl parathion

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

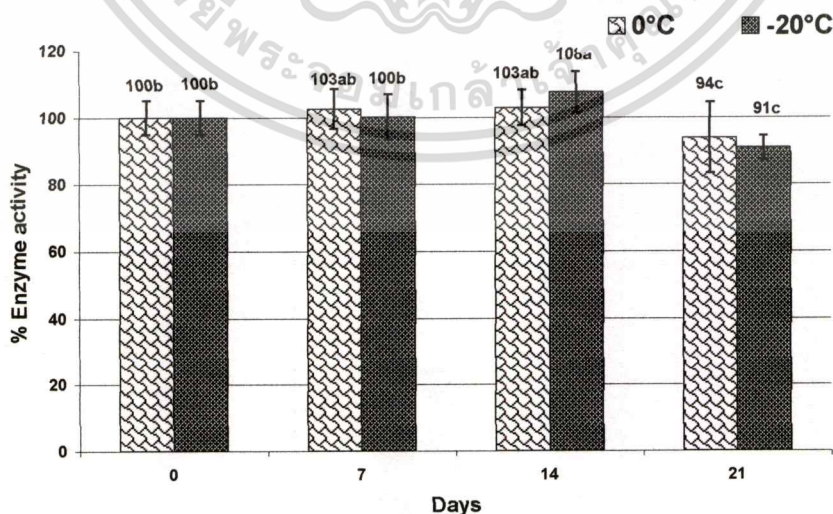
วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SAS (Statistical Analysis System) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's New Multiple Range Test ที่ 99% ($p < 0.01$)

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 การศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์จากหัวฝั่งพันธุ์ (สดและแห้ง)

ประสิทธิภาพของเอนไซม์แห้งที่เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ 0°C ที่ 7, 14 และ 21 วัน คงเหลือการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 102.7 ± 6.0 , 102.9 ± 5.4 และ 93.8 ± 10.6 % ตามลำดับ ขณะที่การเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20°C คงเหลือการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 104.8 ± 6.9 , 107.6 ± 6.2 และ 90.8 ± 3.5 % ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษาระยะเวลาในการเก็บรักษาเบื้องต้น พบว่าเปอร์เซ็นต์คงเหลือของระดับการทำงานของเอนไซม์ที่เก็บไว้ในตู้แช่ 0°C และ -20°C ภายใน 14 วัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99% และถ้าเก็บไว้ถึงวันที่ 21 พบว่าระดับการทำงานของเอนไซม์ลดลง ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99% แต่การลดลงนั้น ไม่เกิน 10% ของระดับการทำงานของเอนไซม์ในวันแรกที่มีทำเอนไซม์แห้ง (ภาพที่ 4.1)

จากการศึกษาระดับการทำงานของเอนไซม์ AChE ในหัวฝั่งพันธุ์ พบว่ามีค่าเท่ากับ $6,655 \pm 595$ (range 5,910–7,422) mUnit/g ($n = 150$) โดยฝั่งพันธุ์จะมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อหัวเท่ากับ 12.055 ± 0.699 (range 10.42–13.90) mg ($n = 150$) หรือระดับการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 80.23 mUnit ต่อหัวฝั่ง 1 หัว ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์การตกค้างของสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตด้วยเอนไซม์จากหัวฝั่งพันธุ์ได้ 5-6 treatments (การวิเคราะห์จะใช้ 14 mUnit / treatment) และระดับการทำงานของหัวฝั่งพันธุ์ในสภาพแห้งจะลดลงเหลือ $5,347 \pm 458$ (range 4,896–7,267) mUnit/g ($n = 150$) ซึ่งแตกต่างจากฝั่งสด ประมาณ 20%

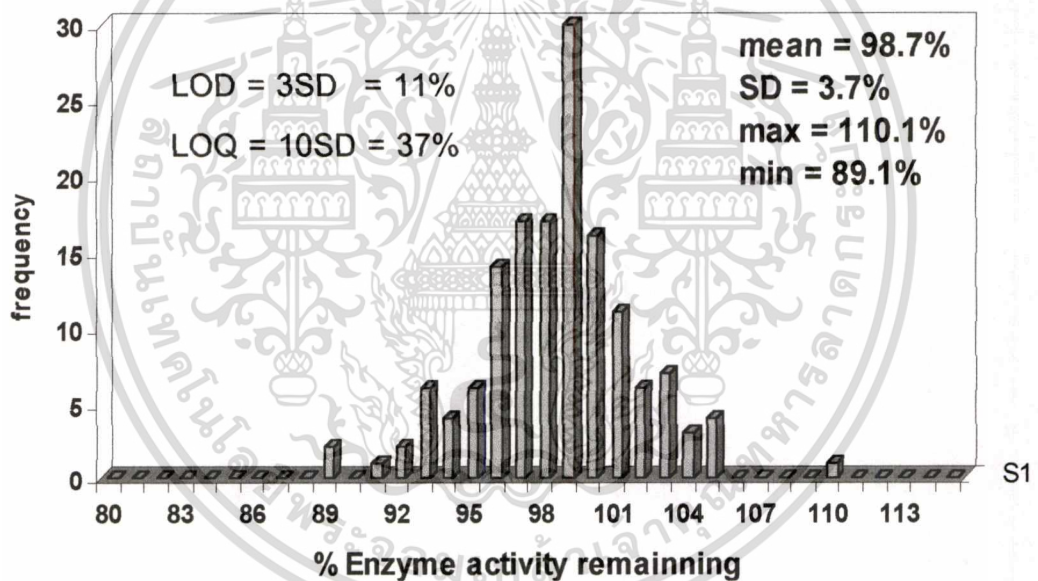


ภาพที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์ระดับการทำงานของเอนไซม์แห้งที่เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ 0°C และ -20°C ในระยะเวลาต่างๆ กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ขอบเขตความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์ (Method validation)

จากเปอร์เซ็นต์ของระดับการทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ (%Enzyme activity remaining) เมื่อผ่านกระบวนการวิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบค่าดูตกดินแสงของกลุ่มเอนไซม์ซึ่งไม่มีสารกำจัดแมลง แต่มี buffer phosphate (Blank) กับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่มีสารกำจัดแมลง แต่มี MeOH ความเข้มข้น 0.165% ใน reaction mixture พบว่ากลุ่มควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ เท่ากับ 98.7 ± 3.7 (range 89.1-110.1)% (n = 150) (ภาพที่ 4.2) ค่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ ได้กำหนดจากปริมาณที่ทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง 11% ซึ่งจะครอบคลุมค่าเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุม เท่ากับ 3SD ส่วนค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณได้ (LOQ) กำหนดจากปริมาณที่ทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง 37% ซึ่งครอบคลุมค่าเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุม เท่ากับ 10SD

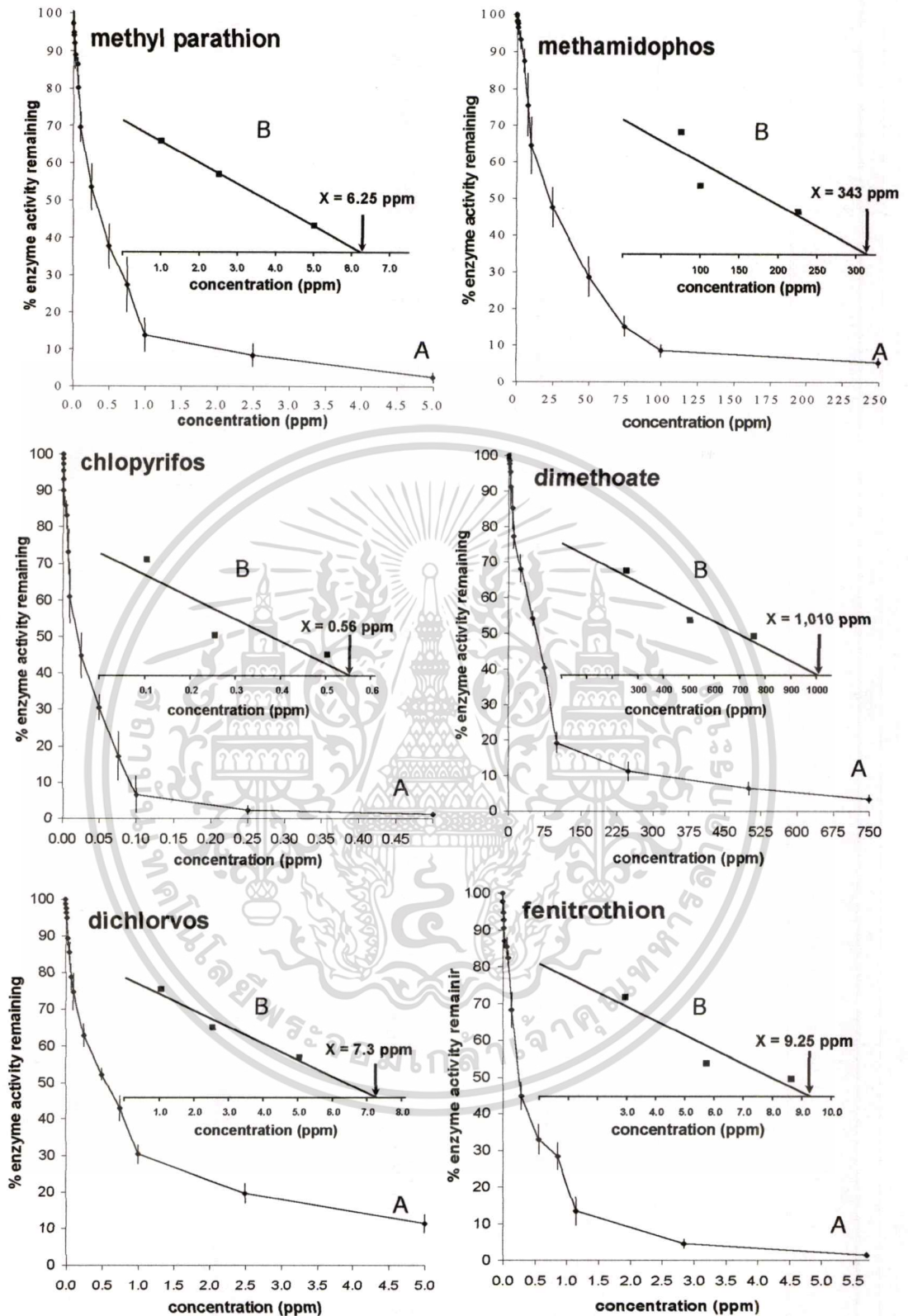


ภาพที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์ระดับการทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ (% Enzyme activity remaining) ในกลุ่มควบคุม (5% MeOH เป็นตัวทำละลาย หรือ 0.165% ใน reaction mixture)

การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับการทำงานของเอนไซม์กับความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตบางชนิดซึ่งเป็นความสามารถของวิธีการวิเคราะห์ พบว่าเอนไซม์ลดการทำงานลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรกหรือในช่วงความเข้มข้นของสารต่ำซึ่งมีความสัมพันธ์แบบวิถีดั้ง (Exponential) และเอนไซม์ลดการทำงานในอัตราที่ช้าลงในช่วงที่มีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณความเข้มข้นของสารสูงขึ้นไปหรือในช่วงที่เหลือเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้น้อยลง ซึ่งมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรง (Linear) เมื่อนำสมการเส้นตรงดังกล่าวมาหาจุดตัดบนแกน x ซึ่งแสดงถึงศักยภาพของสารกำจัดแมลงในการยับยั้งเอนไซม์ได้ 100% จะพบว่า methyl parathion, methamidophos, dimethoate, chlorpyrifos, dichlorvos, fenitrothion, trichlofon, diazinon, triazophos, phosalone carbosulfan และ carbaryl มีเท่ากับ 6.25, 343.00, 1,010.00, 0.56, 7.30, 9.25, 857.00, 359.00, 0.06, 11.60, 12.90 และ 67.00 ppm ตามลำดับ (ภาพที่ 4.3-4.4)

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณต่ำสุดหรือความไวของวิธีการวิเคราะห์สารที่สามารถตรวจได้ (sensitivity) วิเคราะห์ได้จากความสัมพันธ์ของผลการทดสอบกับความเข้มข้นของสารในช่วงความเข้มข้นต่ำซึ่งเป็นแบบวิถีโค้ง โดยประเมินความสัมพันธ์ของเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารกับค่า \ln (% Enzyme activity) โดยที่ % Enzyme activity ที่ครอบคลุมค่าเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมเท่ากับ 89% (11% Inhibition) ซึ่งจากการศึกษาพบว่า ความไวของการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตแต่ละชนิดแตกต่างกัน (ภาพที่ 4.5-4.6) โดยปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจพบสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต คือ methyl parathion, methamidophos, dimethoate, chlorpyrifos, dichlorvos, fenitrothion, trichlofon, diazinon, triazophos และ phosalone มีค่าเท่ากับ 0.02686, 3.07285, 2.63739, 0.00219, 0.01424, 0.00890, 2.07552, 0.68893, 0.00220 และ 0.13674 ppm ตามลำดับ และความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างได้ เท่ากับ 0.13993, 14.12060, 33.52252, 0.00992, 0.23109, 0.05035, 23.3148, 19.78140, 0.00864 และ 0.78737 ppm ตามลำดับ ส่วนปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจพบสารกำจัดแมลงกลุ่มคาร์บาเมต คือ carbosulfan และ carbaryl มีค่าเท่ากับ 0.03280 และ 0.03425 ppm และความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างได้ เท่ากับ 0.07694 และ 0.10587 ppm ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1)



ภาพที่ 4.3 ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ (% Enzyme activity

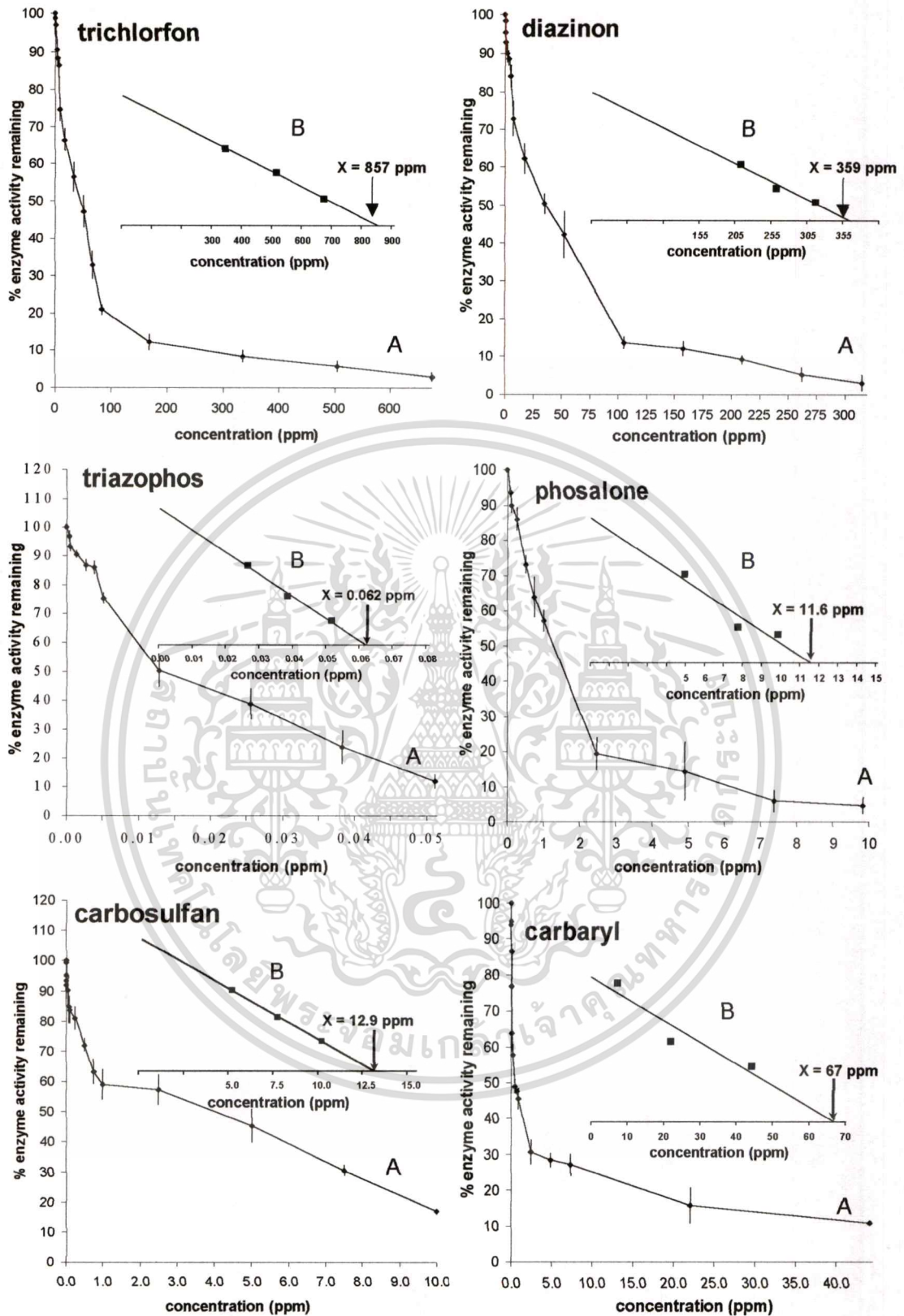
remaining) กับความเข้มข้นของ methyl parathion, methamidophos, chlopyrifos,

dimethoate, dichlorvos และ fenitrothion และศักยภาพของสารกำจัดแมลงในการยับยั้ง

เอนไซม์ได้ 100% ; A : ผลการทดลอง, B: การ extrapolate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

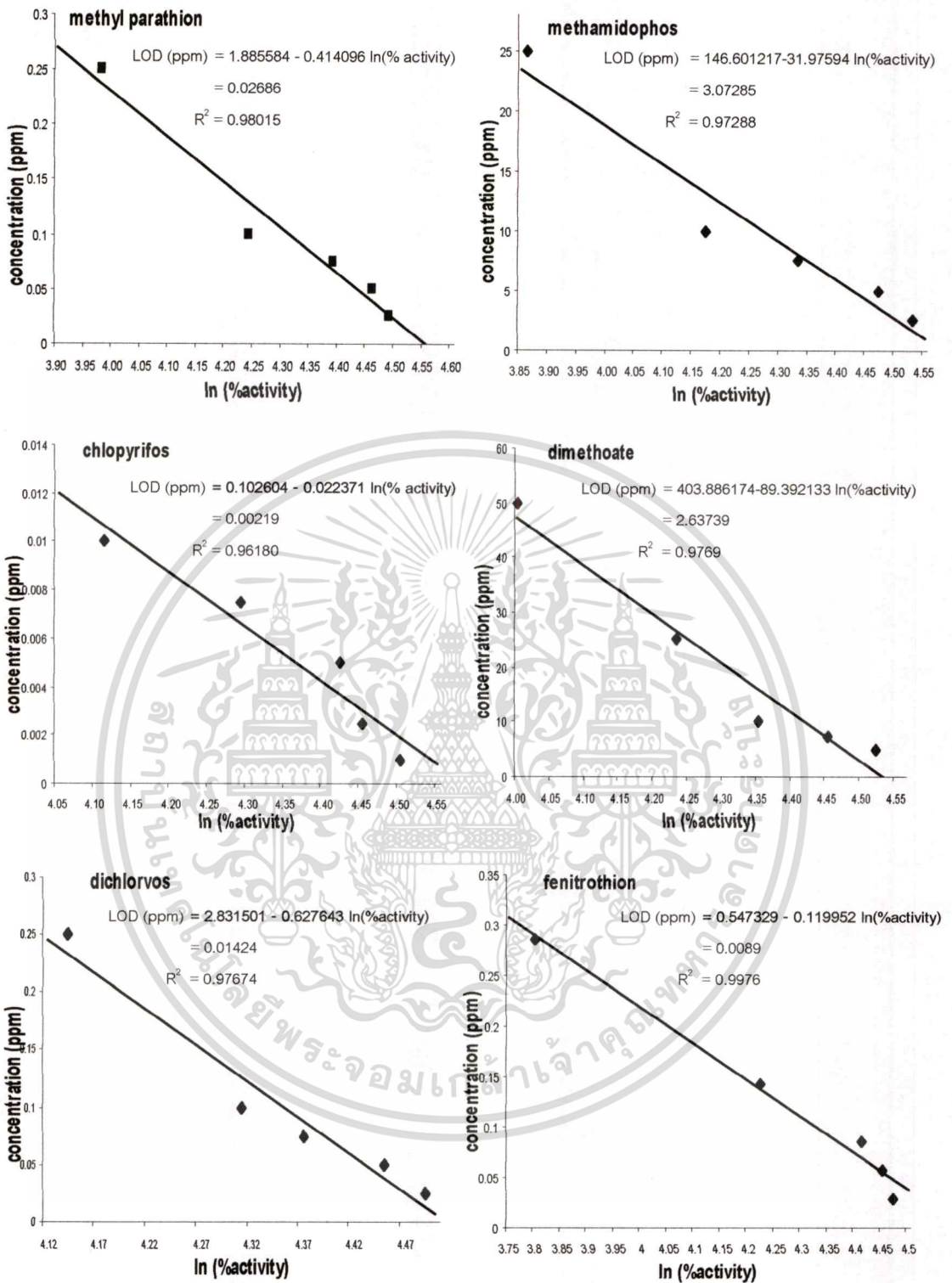
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ (% Enzyme activity remaining) กับความเข้มข้นของ trichlorfos, diazinon, triazophos, phosalone, carbosulfan และ carbaryl และศักยภาพของสารกำจัดแมลงในการยับยั้งเอนไซม์

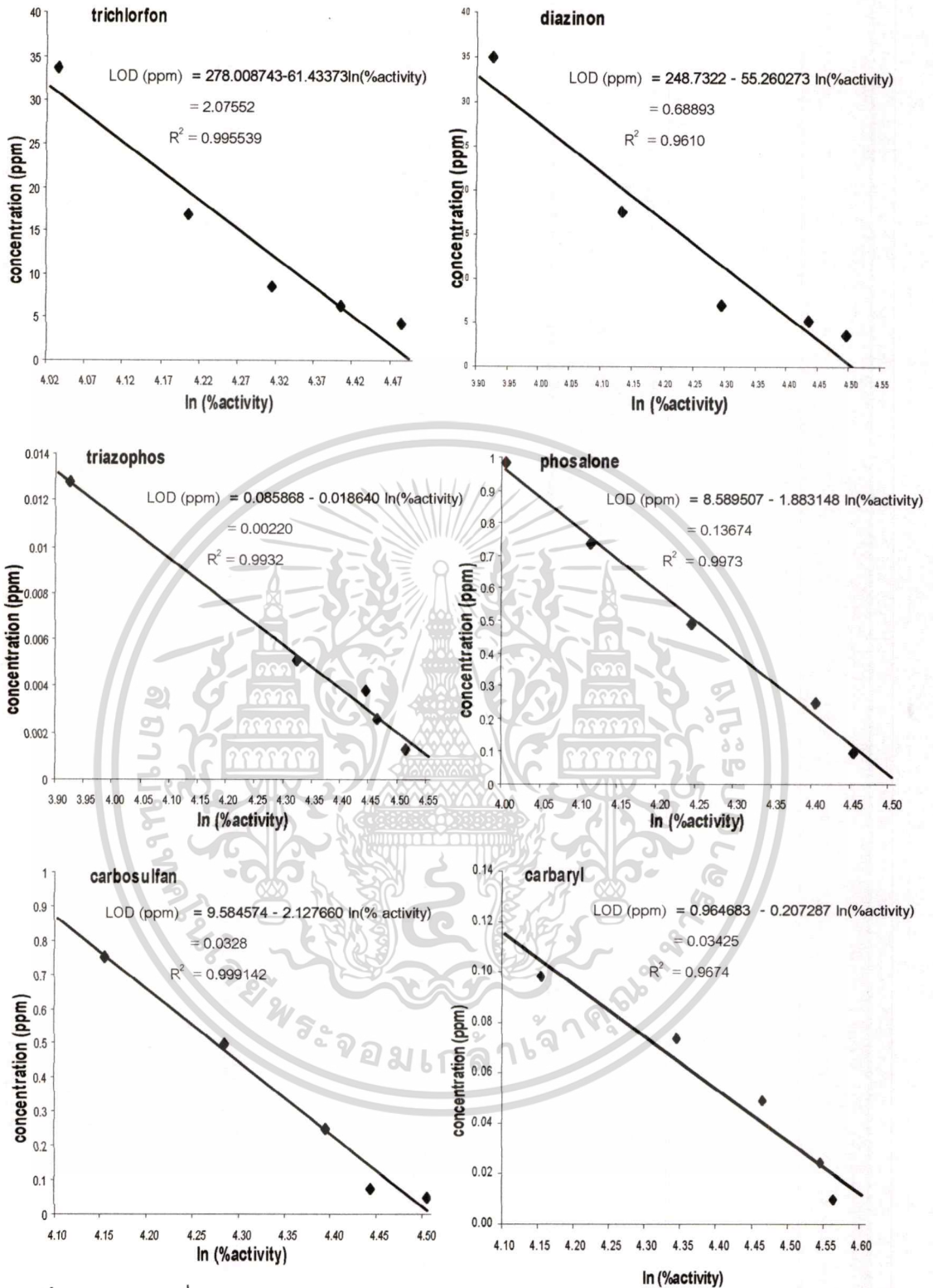
ได้ 100%; A: ผลการทดลอง, B: การ extrapolate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานในหอสมุดดิจิทัล ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 ปริมาณต่ำสุดของ methyl parathion, methamidophos, chlopyrifos, dimethoate, dichlorvos และ fenitrothion ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) โดยใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 ปริมาณต่ำสุดของ trichlorfos, diazinon, triazophos, phosalone, carbosulfan และ carbaryl ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) โดยใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณได้ (LOQ) ด้วยเอนไซม์จากหัวฝิ่งพันธุ์ของสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตบางชนิด

Insecticides	R ²	LOD* (ppm)	LOQ** (ppm)
1. methyl parathion	0.9802	0.02686	0.13993
2. methamidophos	0.9729	3.07285	14.12060
3. dimethoate	0.9769	2.63739	33.52252
4. chlorpyrifos	0.9618	0.00219	0.00992
5. dichlorvos	0.9767	0.01424	0.23109
6. fenitrothion	0.9976	0.00890	0.05035
7. trichlofon	0.9955	2.07552	23.31480
8. diazinon	0.9610	0.68893	19.78140
9. triazophos	0.9932	0.00220	0.00864
10. phosalone	0.9973	0.13674	0.78737
11. carbosulfan	0.9991	0.03280	0.07694
12. carbaryl	0.9674	0.03425	0.10587

* LOD = 11% Inhibition

** LOQ = 37% Inhibition

ช่วงของการทดสอบ(Range) หรือช่วงของการใช้งานที่ครอบคลุมระดับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์คือช่วงปริมาณต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้(LOQ) ถึงค่าความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ 100% พบว่า methyl parathion, methamidophos, dimethoate, chlorpyrifos, dichlorvos, fenitrothion, trichlofon, diazinon, triazophos, phosalone, carbosulfan และ carbaryl มีค่าเท่ากับ 0.13393-6.25, 14.12060-343.00, 33.2252-1,010.00, 0.00992-0.56, 0.23109-7.30, 0.05035-9.25, 23.31480-857.00, 19.78140-359.00, 0.00864-0.06, 0.78737-11.60, 0.07694-12.90 และ 0.10587-67.00 ppm ตามลำดับ และอัตราส่วนของค่าสูงสุดต่อค่าต่ำสุดเท่ากับ 45, 24, 30, 56, 32, 184, 37, 18, 7, 15, 168 และ 633 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ช่วงของการใช้งานที่ครอบคลุมระดับความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงออร์กาโน

ฟอสเฟตและคาร์บาเมตบางชนิด ในการตรวจสอบโดยวิธีการใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์

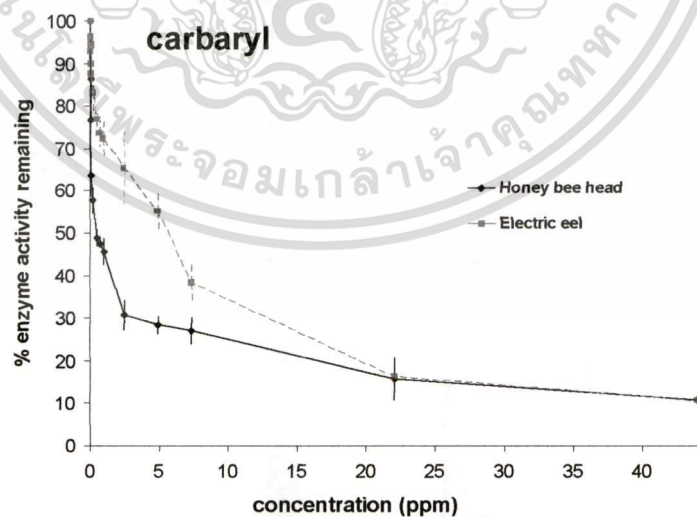
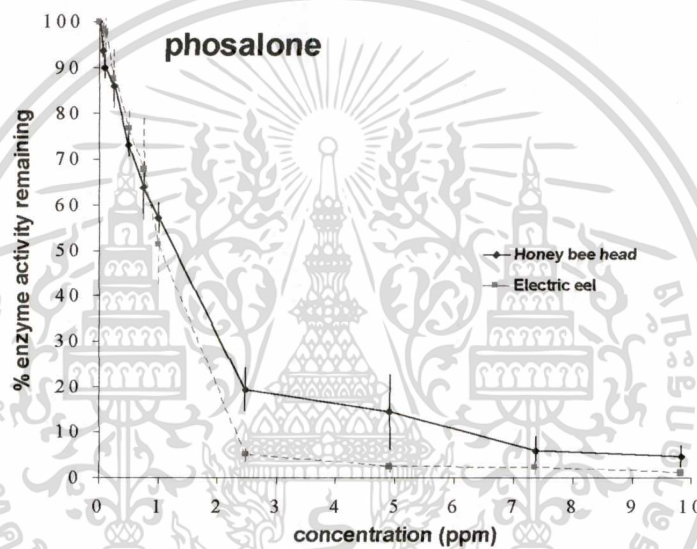
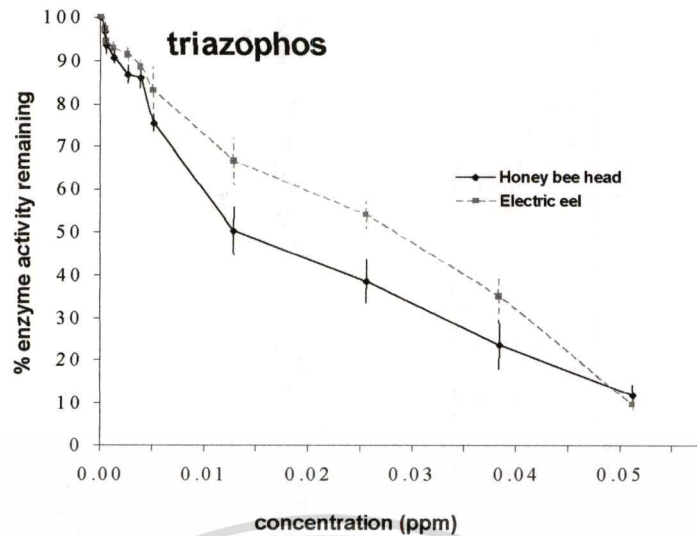
Insecticides	Concentration range (ppm)	Ratio*
1. methyl parathion	0.13393 to 6.25	45
2. methamidophos	14.12060 to 343.00	24
3. dimethoate	33.52252 to 1,010.00	30
4. chlorpyrifos	0.00992 to 0.56	56
5. dichlorvos	0.23109 to 7.30	32
6. fenitrothion	0.05035 to 9.25	184
7. trichlofon	23.31480 to 857.00	37
8. diazinon	19.78140 to 359.00	18
9. triazophos	0.00864 to 0.06	7
10. phosalone	0.78737 to 11.60	15
11. carbosulfan	0.07694 to 12.90	168
12. carbaryl	0.10587 to 67.00	636

* = maximum / minimum

4.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์กับเอนไซม์สำเร็จรูป

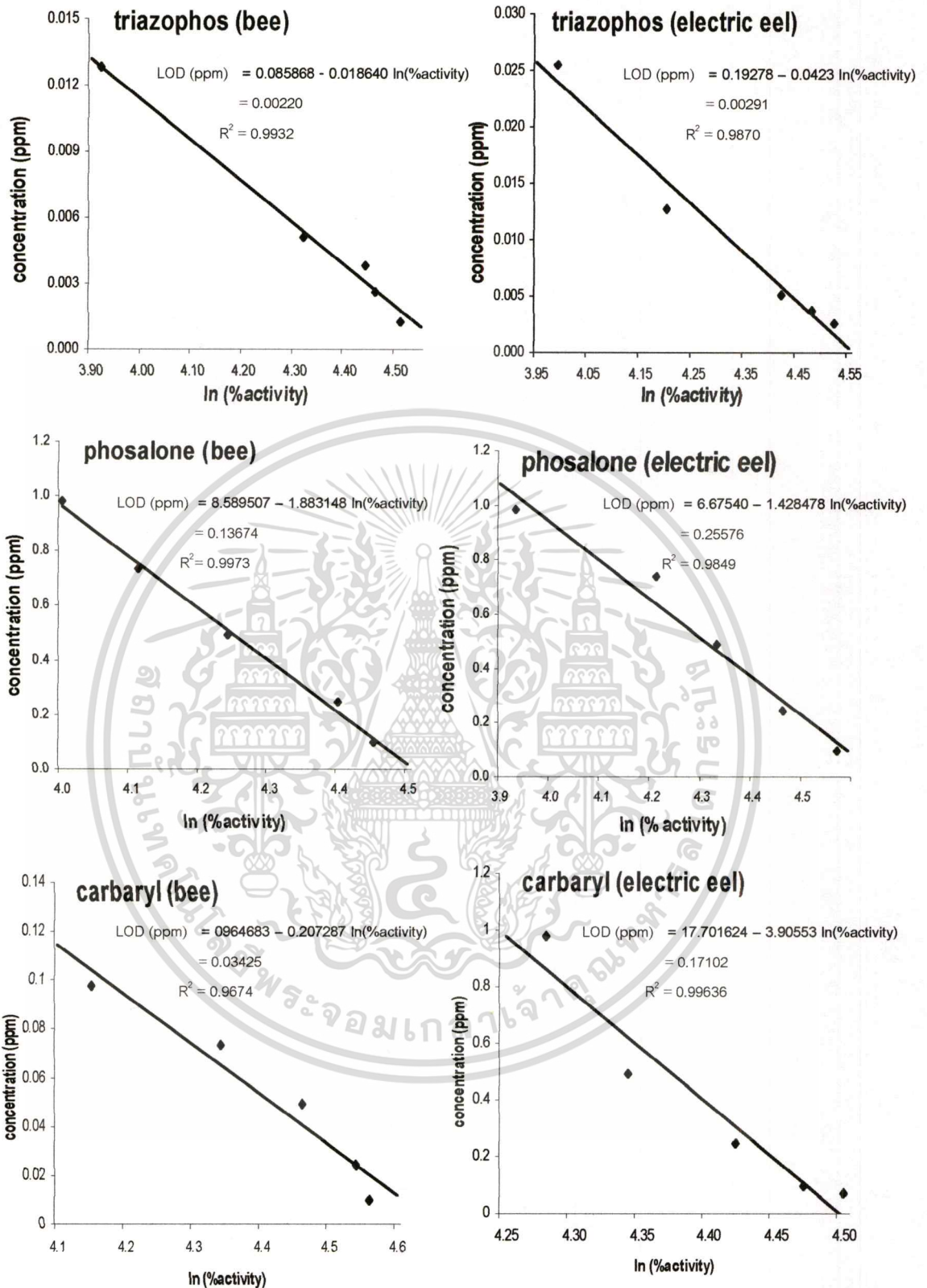
การศึกษาเปรียบเทียบการใช้เอนไซม์ AChE จากหัวผึ้งพันธุ์ตรวจวัดการตกค้างของสารกำจัดแมลง triazophos, phosalone และ carbaryl กับเอนไซม์ AChE จากปลาไหลไฟฟ้าซึ่งเป็นเอนไซม์สำเร็จรูปที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศนั้น พบว่าความสัมพันธ์ของผลการทดสอบกับความเข้มข้นของสารนั้นพบว่าทั้ง triazophos และ carbaryl จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์ได้สูงกว่าจากปลาไหลไฟฟ้าซึ่งแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99% และการยับยั้งของสารเคมีต่อเอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์สูงกว่าเอนไซม์จากปลาไหลไฟฟ้าในทุกช่วงของความเข้มข้น ในส่วน phosalone นั้นก็ยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์ได้ดีกว่าจากปลาไหลไฟฟ้าแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99% และการยับยั้งเอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์จะสูงกว่าเอนไซม์จากปลาไหลไฟฟ้าในช่วงความเข้มข้นของสารเคมีที่ต่ำกว่า 1 ppm เท่านั้น ซึ่งสามารถยับยั้งได้ 60% แต่เมื่อความเข้มข้นของสารที่เพิ่มมากขึ้นประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์จะต่ำกว่าจากปลาไหลไฟฟ้า (ภาพที่ 4.7) ส่วนความสามารถในการตรวจวิเคราะห์โดยเอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์ต่อ triazophos, phosalone และ carbaryl มีค่า LOD เท่ากับ 0.0022, 0.13674 และ 0.03425 ppm ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าค่า LOD ที่ได้จากเอนไซม์ปลาไหลไฟฟ้าซึ่งเท่ากับ 0.00291, 0.25576 และ 0.17102 ppm ตามลำดับ (ภาพที่ 4.8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า, ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ (% Enzyme activity remaining) กับความเข้มข้นของ triazophos, phosalone และ carbaryl โดยเอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์และจากปลาไหลไฟฟ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

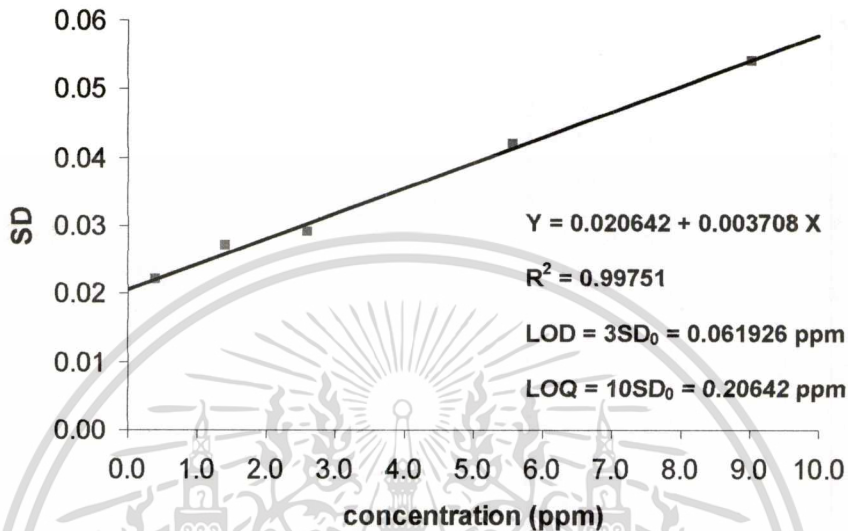


ภาพที่ 4.8 การเปรียบเทียบความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ของ triazophos, phosalone และ carbaryl โดยเอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์และจากปลาไหลไฟฟ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การทดสอบผลการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างด้วยเอนไซม์จากหัวฝั่งพันธุ์ และยืนยันการทดสอบด้วยการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน

จากการศึกษาหาสารตกค้างเพื่อตรวจยืนยันโดยวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC ในครั้งนี้ พบว่ามีค่า LOD เท่ากับ 0.0619 ppm และ ค่า LOQ เท่ากับ 0.2064 ppm (ภาพที่ 4.9)



ภาพที่ 4.9 ปริมาณต่ำสุดของสารเคมีที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณได้ (LOQ) ของเครื่อง GC โดยใช้สารมาตรฐาน methyl parathion

ผลการตรวจวิเคราะห์ผักคะน้าที่ฉีดพ่นด้วย methyl parathion, methamidophos และ dichlorvos ตามอัตราการแนะนำในฉลาก โดยวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC ซึ่งทำการตรวจวิเคราะห์ ณ วันที่ 0, 3 และ 5 วันหลังการฉีดพ่นครั้งสุดท้าย พบว่าสารตกค้าง methyl parathion ในผักคะน้ามีปริมาณ 2.48 ± 0.11 ppm, 0.05 ± 0.01 ppm และตรวจไม่พบ ตามลำดับ ในขณะที่การตรวจวิเคราะห์โดยใช้เอนไซม์จากหัวฝั่งพันธุ์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เหลือเพียง 7.4 ± 3.5 , 77.8 ± 4.0 และ 95.8 ± 5.8 % ตามลำดับ สำหรับคะน้าที่ฉีดพ่นด้วย methamidophos ตรวจพบสารตกค้างในวันที่ 0, 3 และ 5 วันหลังการฉีดพ่น มีปริมาณ 4.19 ± 0.43 , 2.57 ± 0.91 และ 1.41 ± 0.20 ppm ตามลำดับ ในขณะที่การตรวจวิเคราะห์โดยใช้เอนไซม์จากหัวฝั่งพันธุ์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เหลือเพียง 75.3 ± 7.5 , 86.4 ± 11.9 และ 91.5 ± 3.1 % ตามลำดับ ส่วนในผักคะน้าที่ฉีดพ่นด้วย dichlorvos ตรวจพบสารตกค้างในวันที่ 0, 3 และ 5 วันหลังการฉีดพ่น มีปริมาณ 0.532 ± 0.037 ppm, 0.014 ± 0.004 ppm และตรวจไม่พบ ตามลำดับ ในขณะที่การตรวจวิเคราะห์โดยใช้เอนไซม์จากหัวฝั่งพันธุ์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เหลือเพียง 45.5 ± 2.9 , 90.6 ± 1.7 และ 93.5 ± 8.0 % ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์การตกค้างของ methyl parathion, methamidophos, dichlorvos และ carbaryl ในผักคะน้าโดยวิธีการใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์ และยืนยันวิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC ณ วันที่ต่างๆกัน

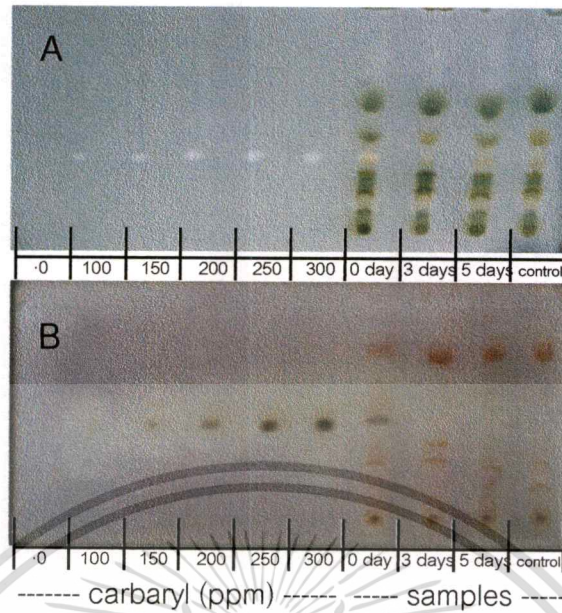
Date	Insecticides	Bee head enzyme	GC
		% Enzyme activity remaining	Concentration (ppm)
0	control	98.1±2.3	ND
	methyl parathion	7.4±3.5	2.48±0.11
	methamidophos	75.3±7.5	4.19±0.43
	dichlorvos	45.5±2.9	0.532±0.037
3	control	97.8±3.0	ND
	methyl parathion	77.8±4.0	0.05±0.01
	methamidophos	86.4±11.9	2.57±0.91
	dichlorvos	90.6±1.7	0.014±0.004
5	control	99.3±3.0	ND
	methyl parathion	95.8±5.8	ND
	methamidophos	91.5±3.1	1.41±0.20
	dichlorvos	93.5±8.0	ND

ND = not detectable at the level lower than 0.06 ppm

สำหรับการตรวจวิเคราะห์ระดับการยับยั้งเอนไซม์ของสาร carbaryl พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ณ วันที่ 0, 3 และ 5 หลังจากการฉีดพ่น เหลือเพียง 1.6 ± 0.4 , 5.8 ± 2.8 และ $20.9 \pm 3.3\%$ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์สารพิษตกค้างคาร์บาเมตเพื่อตรวจยืนยันโดยวิธี TLC พบว่า ณ วันที่ 0 หลังจากการฉีดพ่นครั้งสุดท้ายสามารถตรวจพบสารพิษตกค้างของ carbaryl ในผักคะน้า อยู่ระหว่าง 150-200 ppm และ พบความเข้มข้นน้อยกว่า 100 ppm ในวันที่ 3 และ 5 หลังจากการฉีดพ่น ตามลำดับ (ภาพที่ 4.10)

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์การตกค้างของ carbaryl ในผักคะน้าที่ฉีดพ่น carbaryl ในอัตราแนะนำ ซึ่งเก็บเกี่ยวใน 0, 3 และ 5 วัน โดยวิธีใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์

Date	% Enzyme activity remaining
0	1.6±0.4
3	5.8±2.8
5	20.9±3.3



ภาพที่ 4.10 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์การตกค้างของ carbaryl ในผักคะน้าที่ฉีดพ่น carbaryl ในอัตราแนะนำ ซึ่งเก็บเกี่ยวใน 0, 3 และ 5 วัน โดยวิธี TLC
A : ตามวิธี Raju(1991), B : ตามวิธี Anon (1988)

การวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์โดยสารพิษตกค้างในพืชผักที่ได้แปลงเกษตรกรรม ในวันที่มีการเก็บผลผลิตจำนวน 10 ตัวอย่าง และเปรียบเทียบสารตกค้างที่ตรวจยืนยันโดยวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC จาก พบว่าชาใบหม่อน (ชาเขียว) ผักชีไทย พริกชี้ฟ้าเหลือง เห็ดนางรม ยังการี (2 ตัวอย่าง) ฝรั่งไร้เมล็ด ถั่วอก และ คะน้า จะให้ผลเป็นบวก (positive) โดยการทำงานของเอนไซม์ยังมีเหลือมากกว่า 89% คือ 100.4 ± 3.7 , 100.7 ± 2.4 , 98.9 ± 2.6 , 100.5 ± 2.5 , 97.3 ± 5.5 , 98.9 ± 4.1 , 105.4 ± 6.3 , และ $100.5 \pm 2.9\%$ ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าไม่มีสารพิษตกค้างที่จะมายับยั้งการทำงานของเอนไซม์และสอดคล้องกับการตรวจยืนยันด้วยเครื่อง GC คือไม่สามารถตรวจพบสารตกค้างออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต ส่วนในต้นหอมและกุยช่ายจะให้ผลเป็นลบ (negative) โดยการทำงานของเอนไซม์ยังคงเหลือเพียง 71.0 ± 1.3 และ 11.7 ± 3.8 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจยืนยันด้วยเครื่อง GC คือในต้นหอมจะตรวจพบ methamidophos, omethoate และ trichlotophos ปริมาณ 0.03, 0.11 และ 0.03 ppm ตามลำดับ และในกุยช่ายจะตรวจพบ dichlorvos, mevinphos, diazinon, pirimiphos methyl และ pirimiphos ethyl ปริมาณ 0.20, 0.02, 0.01, 1.48 และ 0.10 ppm ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์การตกค้างของสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมต โดยวิธีการใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์ และยืนยันวิธีการวิเคราะห์ด้วย เครื่อง GC ในผักและผลไม้จากแปลงเกษตรกรในวันที่มีการเก็บเกี่ยว

Vegetable – Fruit (name in Thai)	Bee head enzyme % Enzyme activity remaining	GC Residual concentration* (ppm)
Mulberry tea (ชาใบหม่อน)	100.4±3.7	ND
Spring Onion (ต้นหอม)	71.0±1.3	<ul style="list-style-type: none"> - methamidophos 0.03 ppm - omethoate 0.11 ppm - trichlotophos 0.03 ppm
Coriander (ผักชีไทย)	100.7±2.4	
Yellow Large Pepper (พริกชี้ฟ้าเหลือง)	98.9±2.6	ND
Hungary Mushroom - 1 (เห็ดนางรมฮังการี - 1)	100.5±2.5	ND
Hungary Mushroom - 2 (เห็ดนางรมฮังการี - 2)	97.3±5.5	ND
Guava (ฝรั่งไร้เมล็ด)	98.9±4.1	ND
Bean Sprout (ถั่วงอก)	105.4±6.3	ND
Chinese Kale (คะน้า)	100.5±2.9	ND
Guichai Leaf (กุยช่าย)	11.7±3.8	<ul style="list-style-type: none"> - dichlorvos 0.20 ppm - mevinphos 0.02 ppm - diazinon 0.01 ppm - pirimiphos methyl 1.48 ppm - pirimiphos ethyl 0.10 ppm

ND = not detectable

* = ได้รับความอนุเคราะห์ในการตรวจยืนยันด้วยเครื่อง GC จากสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

4.5 การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ (recovery)

จากการทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์ในผักคะน้าที่เติมสาร methyl parathion ที่ความเข้มข้น 0.098, 0.195 และ 0.976 ppm และเมื่อตรวจวิเคราะห์โดยเครื่อง GC พบว่าสามารถตรวจวิเคราะห์ methyl parathion ในผักคะน้าได้ 0.065, 0.162 และ 1.014 ppm ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพของการสกัด (%Recovery) 66.3, 83.0 และ 103.9% ตามลำดับ และในตัวอย่างเดียวกันเมื่อนำมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจวิเคราะห์โดยเอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์ทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลงเหลือเพียง 77.3 ± 1.9 , 56.6 ± 3.4 และ 13.5 ± 1.0 % ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 ประสิทธิภาพในการสกัด (recovery of extraction) สารกำจัดแมลง methyl parathion โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC และวิธีการใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์

Concentration (ppm)	GC		Bee head enzyme
	Concentration observed (ppm)	%Recovery	% Enzyme activity remaining
0.098	0.065	66.3	77.3 ± 1.9
0.195	0.162	83.0	56.7 ± 3.4
0.976	1.014	103.9	13.5 ± 3.0



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการวิจัย

5.1 การศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์จากหัวฝั่งพันธุ์ (สดและแห้ง)

เอนไซม์ที่นำมาทดสอบในครั้งนี้เป็นเอนไซม์ที่เก็บไว้ในตู้แช่ 0°C และ -20°C ก่อนการทดลอง ซึ่งเก็บไว้ไม่เกิน 2 สัปดาห์ หากมีการเก็บไว้นานกว่า 2 สัปดาห์ ประสิทธิภาพการทำงานอาจมีค่าที่ต่ำลง ดังนั้นก่อนการทดสอบทุกครั้งควรมีการวัดปริมาณการทำงานของเอนไซม์เพื่อปรับปริมาณการทำงานของเอนไซม์ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ การใช้เอนไซม์จากหัวฝั่งพันธุ์มาวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตได้นั้น ต้องเตรียมหัวฝั่งต่อครั้งในปริมาณที่มากพอเนื่องจากต้องผ่านกระบวนการต่างๆเพื่อให้ได้เอนไซม์แห้ง โดยกระบวนการดังกล่าวทำให้เกิดการสูญเสียเอนไซม์ไปบางส่วนได้ ซึ่งจากการทดลองพบว่าระดับเอนไซม์ลดลงถึง 20% ดังนั้นการเตรียมเอนไซม์ในปริมาณที่มากก็สามารถลดปริมาณการสูญเสียให้น้อยลงได้ และจากการศึกษาหาระดับการทำงานปกติของเอนไซม์ในหัวฝั่งเท่ากับ $6,655 \pm 595$ mUnit/g ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองของลักษณะและจรงค์ศักดิ์ (2545) ที่วิเคราะห์ได้ $6,867 \pm 643$ mUnit/g

5.2 ขอบเขตความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์ (Method validation)

เป็นการหาขอบเขตของความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์การตกค้างของสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตโดยใช้เอนไซม์จากหัวฝั่งพันธุ์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์ระดับการทำงานของเอนไซม์ที่คงเหลือของกลุ่มควบคุม เป็นการหาค่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้นั้นเท่ากับ 3SD และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ ในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณได้เท่ากับ 10SD ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้กันโดยทั่วไปทางสถิติ โดย 3 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานนี้ถือว่าเป็นค่าที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ดังนั้นการวิเคราะห์ในแต่ละวิธีจึงมีค่าไม่เท่ากัน เช่น การศึกษาของรุ่งฤดี มีสมบุญ (2545) และ Kumanan and Tran-Minh (1992) จะกำหนดที่ 15 และ 10 % ของการยับยั้งเอนไซม์ตามลำดับ ซึ่งการใช้เครื่อง 96-well microplate spectrophotometer ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณต่ำสุดของสารพิษตกค้างที่สามารถตรวจสอบได้จากหัวฝั่งพันธุ์ พบว่าค่า LOD จะมีค่าต่ำกว่า ค่า LOD ที่ได้จากการทดลองกับปลาไหลไฟฟ้า (ตารางที่ 5.1)

ตารางที่ 5.1 ค่า LOD ที่ได้จากการทดลองกับ AChE ที่ได้จากหัวผึ้งพันธุ์เปรียบเทียบกับที่ได้จากปลาไหลไฟฟ้า

Insecticides	LOD (ppm)				
	Bee head AChE		Electric eel AChE		
	A	A	B	C	D
merhyl parathion	0.0268	-	0.080	0.015	0.015
methamidophos	3.07285	-	4.800	-	-
dichlorvos	0.01424	-	0.050	-	0.022
fennitrothion	0.00890	-	0.540	0.045	-
triazophos	0.00220	0.00291	-	-	-
phosalone	0.13674	0.25576	-	-	-
carbosulfan	0.03280	-	0.006	-	< 0.001
carbaryl	0.03425	0.17102	0.400	0.050	0.019

A = from this study, B = รุ่งฤดี (2545), C = Kumaran and Tran-Minh (1992), D = Marty (1995)

จากความสัมพันธ์ของระดับการทำงานของเอนไซม์ AChE ในหัวผึ้งพันธุ์กับความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต พบว่าสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตในกลุ่ม phosphorothionate หรือ phosphorodithionate ได้แก่ methyl parathion, chlorpyrifos, fenitrothion, triazophos และ phosalone สามารถยับยั้งเอนไซม์ให้เหลือต่ำกว่า 10 % ในความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 2 ppm โดยสารในกลุ่มนี้มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ได้ดีกว่าในรูปเดิมเมื่อไม่ผ่านกระบวนการ oxidation ให้อยู่ในรูปของ phosphate (active oxygen analogues) (วรเดช จันทรสร. 2535) สอดคล้องกับการศึกษาของ Murphy (1986) ที่พบว่า malathion ที่ถูก oxidation โดย bromine สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีกว่า malathion ที่ไม่ถูก oxidation โดย bromine นอกจากนี้ยังมี Schulze *et al.* (2002) ได้รายงานเกี่ยวกับความจำเป็นในการเพิ่มขึ้นขั้นตอนการ oxidize ในกระบวนการทดสอบ เพราะบางกรณี เช่น parathion ที่เติมสารละลาย bromine สามารถยับยั้ง AChE จากปลาไหลไฟฟ้าได้ถึง 17% ของ parathion 10 µg/l ขณะที่ไม่ผ่านกระบวนการ oxidize สามารถยับยั้งได้แค่ 7% ของ parathion 2,000 µg/l อย่างไรก็ตามการดำเนินการก็ต้องผ่านขั้นตอนการเป่าอากาศไล่ออกให้หมดก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์สารพิษ เพราะหากโบรมีนยังเหลืออยู่จะไปทำลายเอนไซม์ได้ ซึ่งทำให้ได้ค่าที่ผิดพลาดเช่นกัน จากผลการศึกษาดังนี้ มีเฉพาะ dimethoate และ diazinon เท่านั้นที่ถูก oxidation และยังมีพิษต่ำอยู่ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากชนิดของหมู่ leaving group ในโครงสร้าง ซึ่งจะทำให้เกิดความหลากหลายของชนิดสารเคมีซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แตกต่างกัน โดยจะขึ้นอยู่กับความคงทนของพันธะระหว่าง phosphate กับหมู่ leaving

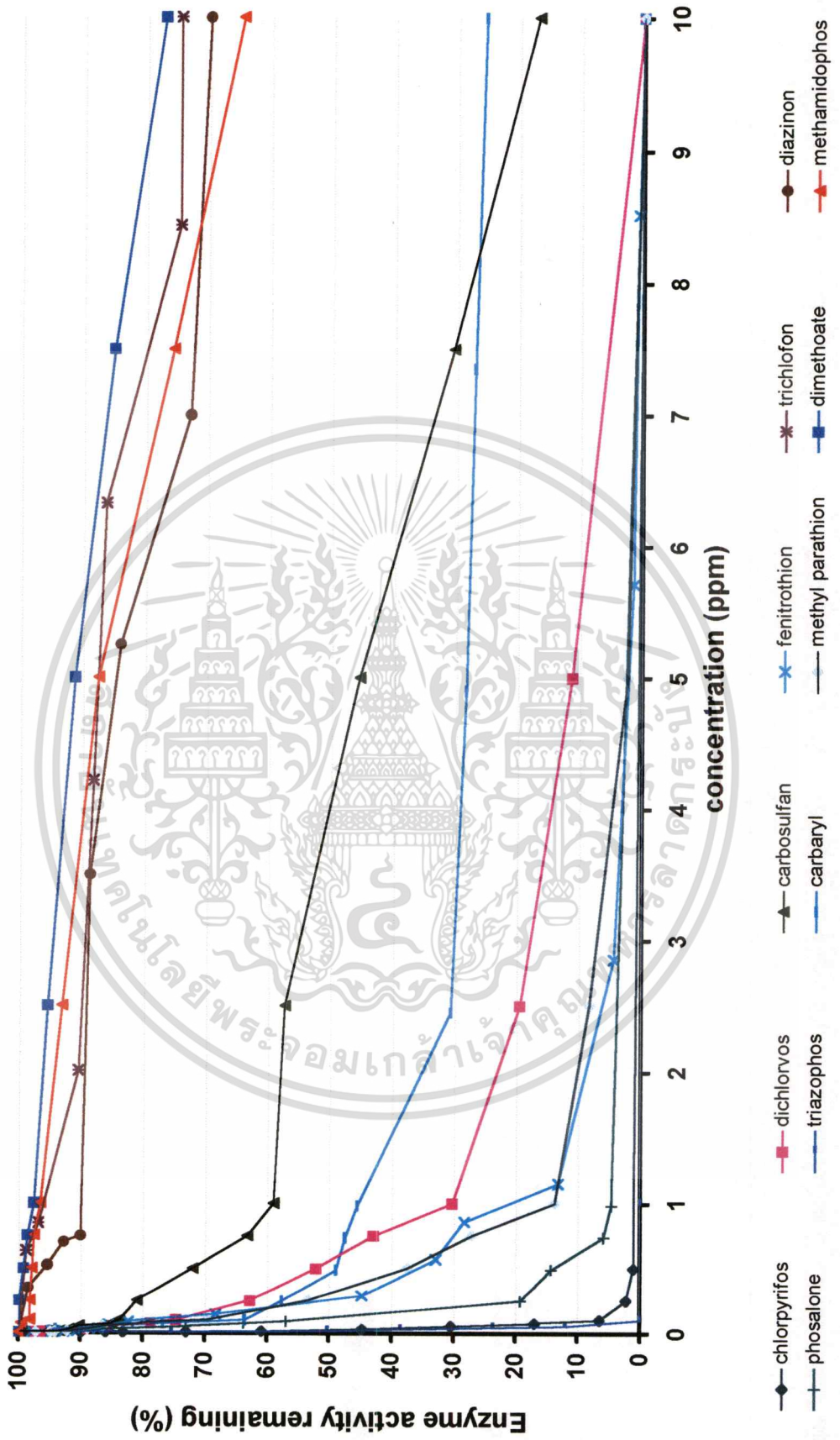
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

group และการดึงดูดอิเล็กตรอนของสารใน leaving group (Fukuto. 1990) ซึ่งจากการทดลองพบว่าหมู่ leaving group ที่มีโครงสร้างแบบ heterocyclic ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มากกว่าแบบ phenyl และ aliphatic ตามลำดับ

นอกจากนี้ชนิดของ alkyl group ในโครงสร้างของสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟต ทำให้ความคงทนของการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสารกำจัดแมลงมากหรือน้อยต่างกัน ซึ่ง diethyl สามารถจับกับเอนไซม์ได้นานกว่า dimethyl ถึง 6 เท่า (วรเดช จันทรธร. 2535) จึงทำให้ความเป็นพิษสูงกว่า แต่ต่างจากการทดลองครั้งนี้ diazinon และ dichlorvos กลับตรงกันข้าม อาจเป็นเพราะประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ยังขึ้นกับค่าความเป็นพิษ (LD_{50}) ซึ่งการยับยั้งระดับการทำงานของเอนไซม์นี้จะสัมพันธ์กับค่า LD_{50} (Pogacnik and Franko. 2002) โดยค่า LD_{50} ทางปากของหนูขาวของ diazinon และ dichlorvos เท่ากับ 1,250 และ 50 ppm ตามลำดับ (Fram Chemical Handbook, 1995) มีความเป็นพิษต่ำกว่าถึง 25 เท่า ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าหมู่ alkyl group ของ diazinon และ dichlorvos อาจมีอิทธิพลทำให้เกิดพิษต่อเอนไซม์น้อยกว่าโครงสร้างในส่วนอื่นๆของสารเคมี และจากการทดลองความเป็นพิษของสารกำจัดแมลงคาร์บาเมตพบว่า carbosulfan มีความเป็นพิษสูงกว่า cabaryl ซึ่งสอดคล้องกับค่า LD_{50} ทางปากของหนูขาว เท่ากับ 8 และ 246-283 ppm (Fram Chemical Handbook, 1995) ตามลำดับ (ภาพที่ 5.1)

ช่วงระดับความเข้มข้นที่สามารถตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างโดยวิธีการใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์ เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณได้ถึงปริมาณความเข้มข้นที่สามารถทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ทั้งหมด จากการทดลองพบว่า triazophos และ fenitrothion เป็นสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตที่มีช่วงของการใช้งานแคบและกว้างที่สุด ตามลำดับ ในสารเคมีที่มีช่วงการทดสอบแคบนี้ อาจเป็นเพราะสารเคมีมีโครงสร้างที่สามารถจับกับเอนไซม์ได้ดีหรือนานกว่าสารเคมีที่มีช่วงของการทดสอบที่กว้าง กล่าวคือ triazophos มีหมู่ alkyl เป็น diethyl ซึ่งสามารถทำให้ยึดจับกับเอนไซม์ได้นานกว่า fenitrothion ที่มีหมู่ alkyl ที่เป็นแบบ dimethyl ซึ่งสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟต ที่มีหมู่ alkyl เป็น diethyl สามารถยึดจับกับเอนไซม์ AChE ได้นานกว่า dimethyl ถึง 6 เท่าตัว (วรเดช จันทรธร. 2535) และ fenitrothion เป็นสารเคมีที่ซึ่งอาจกล่าวได้ว่ามีพิษสูง สลายตัวได้ยากในสภาพธรรมชาติ แต่ถูก hydrolyze ได้ดีในสิ่งมีชีวิต ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะ อมรสิน (2544) ที่ได้รายงานไว้ว่าเป็นสารประเภทล้มผัสตาย มีค่า LD_{50} ทางปากของหนูขาว เท่ากับ 250 ppm เป็นสารที่มีการตกค้างนาน มีความเฉพาเจาะจงสูงจึงนำมาใช้แทน ethyl parathion และ DDT เพื่อควบคุมแมลงศัตรูป่าไม้อย่างกว้างขวาง มีความเป็นพิษต่ำต่อสัตว์ป่า ผึ้ง และแมลงที่เป็นประโยชน์ ปลอดภัยมากในการนำมาใช้เพื่อการสาธารณสุข เช่นใช้ในการควบคุมยุงและแมลงวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5.1 ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่คงเหลือกับความเข้มข้นของสารเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนอัตราการยับยั้งเอนไซม์ของสารกำจัดแมลงทุกชนิดที่ทดสอบลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงความเข้มข้นของสารเคมีต่ำๆ และมีอัตราการลดที่ช้าลงเมื่อสารเคมีมีความเข้มข้นมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ พัชรา วีระกะลัส (2541) รายงานว่า ในเอนไซม์ที่มีปริมาณน้อยๆ สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่มีปริมาณมาก

5.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์จากหัวผึ้งกับเอนไซม์สำเร็จรูป

ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์เอนไซม์ที่เหลือหลังจากทำปฏิกิริยากับสารกำจัดแมลง triazophos, phosalone และ carbaryl ในความเข้มข้นของสารตั้งต้น (substrate น้อย) ทำให้เอนไซม์ AChE จากหัวผึ้งพันธุ์จับกับ substrate ได้ดี จึงมีเปอร์เซ็นต์เอนไซม์ที่เหลือน้อยกว่าเอนไซม์ AChE จากปลาไหลไฟฟ้าซึ่งขัดแย้งกับการทดลองของ Marcel *et al.* (1998) เกี่ยวกับการแสดงออกของการถูกกระตุ้นการยับยั้งเอนไซม์ AChE ในหัวแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) โดย substrate (Acetylthiocholine iodide) ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ พบว่ามีอัตราการถูกยับยั้งของเอนไซม์มากขึ้นตามความเข้มข้นของ substrate นั้นๆ ขณะที่ AChE จากปลาไหลไฟฟ้า จะถูกกระตุ้นให้มีการทำงานมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ substrate ลดน้อยลง อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพของเอนไซม์ AChE จากหัวผึ้งพันธุ์ ในการตรวจวิเคราะห์สาร triazophos, phosalone และ carbaryl จะได้ค่า LOD ที่ต่ำกว่าเอนไซม์จากปลาไหลไฟฟ้า อาจเป็นเพราะเอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์อยู่ในรูป crude extract ซึ่งจะประกอบด้วย เนื้อเยื่อ ธาตุ และสารประกอบต่างๆ ตามธรรมชาติของสิ่งมีชีวิต ซึ่งสารเหล่านี้อาจให้เอนไซม์สามารถจับกับ substrate ได้ดีขึ้น ขณะที่เอนไซม์จากปลาไหลไฟฟ้า จะมี impurity น้อยกว่า อาจไม่เพียงพอต่อการกระตุ้นให้เอนไซม์สามารถจับกับ substrate ให้ดีขึ้นได้

5.4 การทดสอบผลการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างด้วยเอนไซม์ และยืนยันการทดสอบด้วยการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน

การศึกษากการตกค้างของสารกำจัดแมลงในผักคะน้า ณ วันต่างๆ หลังจากฉีดพ่นโดยใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์ พบว่าสอดคล้องกับการวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐานด้วยเครื่อง GC จึงเป็นการสนับสนุนความเที่ยงตรงและประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ได้ กล่าวคือ การ screening test โดยใช้เอนไซม์จะทำให้ผลเป็น positive และ negative เมื่อความเข้มข้นของสารมีค่ามากหรือน้อยกว่าค่า LOQ ของสารแต่ละชนิด และอยู่ในช่วงของการทดสอบ

จากการทดลองตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตด้วยเครื่อง GC ในตัวอย่างผลิตผลทางการเกษตร ที่ได้มาจากแปลงเกษตรกรพบว่าสอดคล้องกับการวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ กล่าวคือการ screening test ด้วยเอนไซม์ที่ให้ผลเป็น negative

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออยู่เห็นเป็นประโยชน์ในการนำ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คือชาใบหม่อน ผักชีไทย พริกชี้ฟ้าเหลือง เห็ดนางรมฮังการี ฝรั่งไร้เมล็ด ถั่วงอก และคะน้า ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ด้วย GC แล้วไม่พบสารตกค้าง แต่กุ่มข่ายและต้นหอมให้ผลเป็น positive คือทำให้การทำงานของเอนไซม์จากหัวมุ้งพันธุ้เหลือเพียง 11.7% เท่านั้น ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ด้วย GC แล้วพบสารกำจัดแมลง dichlovos, mevinphos, diazinon, pirimiphos methyl และ pirimiphos ethyl ที่ตกค้างในกุ่มข่ายในความเข้มข้น 0.20, 0.02, 0.01, 1.48 และ 0.10 ppm ตามลำดับ จากความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์เอนไซม์ที่เหลือกับความเข้มข้นของ dichlovos ความเข้มข้น 0.20 ppm ทำให้เอนไซม์เหลือการทำงานประมาณ 60% ความเข้มข้น diazinon ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 ppm จะไม่สามารถตรวจพบได้โดยใช้เอนไซม์นี้ ดังนั้นสารตกค้างที่ทำให้เอนไซม์จากหัวมุ้งพันธุ้ลดลงเหลือ 11.7% ได้นั้นอาจมาจาก pirimiphos methyl และ pirimiphos ethyl ส่วนสารกำจัดแมลง methamidophos, omethoate และ trichlotophos ที่ตกค้างในต้นหอมความเข้มข้น 0.03, 0.11 และ 0.03 ppm ตามลำดับ ทำให้การทำงานของเอนไซม์จากหัวมุ้งพันธุ้เหลือ 71% จากความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์เอนไซม์ที่เหลือกับความเข้มข้นของ methamidophos ความเข้มข้น 0.03 ppm จะไม่สามารถตรวจพบได้โดยใช้เอนไซม์นี้ ดังนั้นสารตกค้างที่ทำให้เอนไซม์จากหัวมุ้งพันธุ้ลดลงเหลือ 71% ได้นั้นอาจมาจาก omethoate และ trichlotophos นอกจากนั้นการตรวจพบสารเคมีที่มีค่าความเข้มข้นบางชนิดต่ำกว่าค่า LOQ แต่เมื่อมีสารเคมีหลายชนิดรวมกันก็อาจทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลงมากกว่า 11% จึงอาจให้ผลเป็น positive ได้ ตัวอย่างการใช้เอนไซม์มาตรวจวิเคราะห์สารตกค้างในส้มของ Palchetti *et al.* (1996) พบว่าเอนไซม์ AChE จะลดลงได้ $58 \pm 4\%$ ซึ่งสามารถตรวจพบ phosalone, chlorpyrifos และ pirimicarb เท่ากับ 0.6, 0.05 และ 0.005 ppm ตามลำดับ และกรณีที่เอนไซม์ลดลงไม่ถึง 10% แสดงว่าไม่มีผลต่อระดับเอนไซม์จึงเป็นการปลอดภัยต่อผู้บริโภค

จากการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต ในผลผลิตทางการเกษตรประจำปี 2545 (กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง. 2546) พบว่ามากกว่า 50% ของตัวอย่างมีปริมาณสารพิษตกค้างมากกว่าค่า LOQ ของวิธีการวิเคราะห์โดยการใช้เอนไซม์จากหัวมุ้งพันธุ้ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าเราสามารถใช่วิธีการตรวจสอบด้วยเอนไซม์จากหัวมุ้งพันธุ้ เพื่อหาปริมาณที่เป็น positive ก่อนที่จะนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน ส่วนในตัวอย่างที่ให้ผลเป็น negative อาจไม่จำเป็นต้องนำไปตรวจวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐาน เนื่องจากหากมีสารเคมีในตัวอย่างพืชผักก็ไม่สามารถทำให้เอนไซม์แตกต่างไปจากระดับปกติได้ จึงอาจจะกล่าวได้ว่าปลอดภัยต่อผู้บริโภค ซึ่งการ screening test นี้จึงเป็นการประหยัดทั้งเวลาและค่าใช้จ่าย

5.5 การทดสอบประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ (recovery)

ความสามารถในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในพืช นอกจากขึ้นอยู่กับความ sensitivity ของสารแต่ละชนิดแล้ว อาจขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพในการสกัดสารพิษแต่ละชนิด (recovery of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

extraction) อีกด้วย ซึ่งจากการศึกษาประสิทธิภาพในการสกัดสารกำจัดแมลง methyl parathion ในความเข้มข้น 0.0981, 0.195 และ 0.970 ppm โดยวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC มีค่าเท่ากับ 66.3, 83.0 และ 103.9 % ซึ่งเกณฑ์กำหนดโดยทั่วไปของ recovery (AOAC Peer – Verified Methods. 1993) ที่ความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง 0.01, 0.1, และ 1.0 ppm ควรมีค่า % recovery เท่ากับ 60-115, 80-110 และ 80-110% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม % recovery ที่ได้เพิ่มขึ้นอยู่กับความสามารถของเครื่อง GC นั้นๆ ด้วย ซึ่งจากการทดลองค่าความเข้มข้นของการวิเคราะห์ในตัวอย่างที่สามารถวัดได้ (LOQ) ของเครื่องเท่ากับ 0.206 ppm ดังนั้น % recovery ที่ได้จึงต่ำกว่าปกติ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการวิเคราะห์ระดับการตกค้างของสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตโดยใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์ มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว ประหยัด และมีความไวค่อนข้างดี ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าในความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงระดับต่ำๆ เอนไซม์ AChE จากหัวผึ้งพันธุ์จะจับกับสารกำจัดแมลงได้ดีกว่าเอนไซม์ AChE จากปลาไหลไฟฟ้าซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากต่างประเทศ แต่ในความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงระดับสูงๆ ประสิทธิภาพในการจับกับสารกำจัดแมลงของเอนไซม์ทั้งสองไม่ต่างกัน ทั้งนี้เพื่อความสะดวก รวดเร็ว และสามารถนำเอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์มาใช้ได้ทันทีจึงควรเตรียมเป็นเอนไซม์แห้งโดยทำ freeze dry และเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ 0°C ถึง -20°C โดยก่อนการนำมาใช้ควรทดสอบวัดระดับการทำงานของเอนไซม์เพื่อปรับระดับความเข้มข้นให้ได้ระดับการทำงานของเอนไซม์ที่ไม่ต่ำกว่าที่ต้องการทุกครั้ง โดยเฉพาะเมื่อเก็บรักษาไว้เกิน 2 สัปดาห์

ข้อควรระวังในการเลี้ยงผึ้งพันธุ์ในธรรมชาติ คือพื้นที่ที่เลี้ยงต้องปลอดภัยจากสารเคมี ทั้งนี้ในกระบวนการสกัดอาจทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลงบ้าง จึงควรเตรียมเอนไซม์ในปริมาณที่มากพอเพื่อให้มีปริมาณการทำงานของเอนไซม์เพียงพอกับการทดสอบ

ผลบวก (positive) ของการวิเคราะห์จะพิจารณาจากการที่เอนไซม์ AChE จากหัวผึ้งพันธุ์ถูกยับยั้ง 11% จากระดับการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มควบคุม โดยที่ช่วงความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงแต่ละชนิดที่สามารถตรวจพบได้จะแตกต่างกันตามชนิดของสารกำจัดแมลง

การยืนยันผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกันทั้งจากการทดสอบฝักในแปลงที่ควบคุมการฉีดพ่นสารกำจัดแมลงและฝักตัวอย่างจากแปลงเกษตรกร ซึ่งเป็นการสนับสนุนประสิทธิภาพและความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ที่จะนำมาใช้เป็นการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตในเบื้องต้น (screening test) ซึ่งไม่สามารถแยกได้ว่าเป็นสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตหรือคาร์บาเมตชนิดใด ทั้งนี้ความถูกต้องแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างในฝักจะขึ้นอยู่กับความไวในการจับกับ AChE ของสารกำจัดแมลงและประสิทธิภาพในการสกัดสารจากตัวอย่างฝัก

การนำวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเอนไซม์ไปใช้ในกระบวนการ screening test ซึ่งสามารถ screen กลุ่มสารพิษได้ขั้นตอนหนึ่ง เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวก ไปทำการวิเคราะห์ต่อด้วยวิธีมาตรฐาน เช่น GC, HPLC จะช่วยประหยัดเวลาในการตรวจวิเคราะห์ทำ

ให้ทราบผลของการตรวจวิเคราะห์เร็วขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการนำวิธีดังกล่าวไปใช้ควรมีข้อมูล sensitivity ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษแต่ละชนิดและต้องทราบว่าสารพิษแต่ละชนิดจะต้องมีระดับความเข้มข้นอย่างน้อยเท่าไรจึงจะสามารถตรวจพบได้และอยู่ในขอบเขตที่ผู้ใช้งานยอมรับได้หรือไม่ ซึ่งค่า sensitivity ของสารพิษแต่ละชนิดสามารถหาได้โดยการหาค่า LOD

ข้อควรระวังในการใช้เอนไซม์ AChE ตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมต คือสารเคมีที่ใช้โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ ซึ่งมีอายุการใช้งานจำกัดและเสื่อมสภาพได้ ต้องไม่หมดอายุการใช้งานหรือไม่เตรียมทิ้งไว้นานเกินไป เนื่องจากการเตรียมไว้เป็นเวลานานหรือเก็บรักษาไม่ถูกต้อง จะทำให้ประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ลดลงและอาจคลาดเคลื่อนได้ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าต้องศึกษาวิธีการสกัดเพื่อให้ได้มาซึ่งประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ที่ดีขึ้นได้



บรรณานุกรม

- กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง. 2546 .”ผลการปฏิบัติงานวิจัยประจำปี 2545.” หน้า 24-32. ใน เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ กองวัดภูมิพิษการเกษตร ประจำปี 2546.
กรุงเทพฯ : กองวัดภูมิพิษการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กองกัญและสัตววิทยา. 2545. คำแนะนำการป้องกันกำจัดแมลงและสัตว์ศัตรูพืช ปี 2545.
กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์สมาคมกัญและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กองระบาดวิทยา. 2543. “โรคพิษจากสารกำจัดแมลงและวัชพืช.” หน้า 261-269. ใน สรุป รายงานการเฝ้าระวังโรค 2541. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์ สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงสาธารณสุข.
- กองระบาดวิทยา. 2544. “โรคพิษจากสารกำจัดแมลงและวัชพืช.” หน้า 254-263. ใน สรุป รายงานการเฝ้าระวังโรค 2542. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์ สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงสาธารณสุข.
- กองอาชีวอนามัย. 2539. “การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลการตรวจวิเคราะห์โคลินเอสเทอร์ในเม็ดเลือดแดง (Red Blood Cell) กับการตรวจวิเคราะห์โคลินเอสเทอร์ในน้ำเหลือง (Serum) ด้วยชุด Test Mate OP Kit.” หน้า 271-302. ใน รายงานการวิจัยปัญหาทางอาชีวอนามัยในประเทศไทย 2539 เล่มที่ 1. กรุงเทพฯ : กองอาชีวอนามัย กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข.
- พัชรา วีระกัลล. 2541. เอนไซม์. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รุ่งฤดี มีสมบุญ. 2544. “การวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเอนไซม์ (Enzymatic Method).” หน้า 12.1 - 12.8. ใน ความรู้พื้นฐานการวิเคราะห์คุณภาพและสารพิษตกค้างของวัดภูมิพิษการเกษตร การอบรมเจ้าหน้าที่สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1-8 ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : กองวัดภูมิพิษการเกษตร กรมวิชาการ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- รุ่งฤดี มีสมบุญ และคณะ. 2545. “การพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารพิษตกค้างอย่างรวดเร็ว.” หน้า 156-165. ใน การวิเคราะห์วิจัยและควบคุมวัตถุอันตรายเป็นหัวใจของเกษตรกรดีที่เหมาะสม การประชุมวิชาการ กองวัดภูมิพิษการเกษตร ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : กองวัดภูมิพิษการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ลักขณา อมรสิน. 2544. เคมีของสารกำจัดแมลง. กรุงเทพฯ : ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ลักษณะ อมรสิน และจรงค์ศักดิ์ พุมนวน. 2545. "ผลของเมทนามิโดฟอสต่อระดับการทำงานของอะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส และการเป็นพิษต่อผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*)."
วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 20(1) : 70-78.
- วรเดช จันทรธร. 2535. เคมีของสารป้องกันและกำจัดแมลง. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- วิภา ตั้งนิพนธ์. 2541. "ความเป็นพิษของสารกำจัดศัตรูพืชออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต."
ข่าววัตถุมิพิษ. 25(3) : 113-123.
- สมปอง ทองดีแท้ และคณะ. 2537. "วิจัยการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสจากหัวแมลงวันบ้านของวัตถุมิพิษบนผักคะน้า." หน้า 207-214. ใน รายงานประจำปี 2537. กรุงเทพฯ : กองวัตถุมิพิษการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- Anon 1988. **Analytical Method for Residues of Pesticides.** Netherlands : SDU publishers.
- Amders, M.O. *et al.* 1996. **The Basic Science of Poisons.** New York : Mc Graw-Hill.
- Amitai, G. *et al.* 1998. "Inhibition of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase by Chlorpyrifos-oxon." **Biochem Pharmacol.** 56(3) : 293-299.
- AOAC peer - Verified Method. 1993. **Manual on Policies and Procedures.** Texas.
- Barber, D. *et al.* 1999. "Comparison of two *in vitro* Activation System for Protoxicant Organophosphorus Esterase Inhibitors." **Toxicol. Sci.** 47 : 16-22.
- Bendahou, N. *et al.* 1999. "Toxicity of Cypermethrin and Fenitrothion on the Hemolymph Carbohydrates, Head Acetylcholinesterase, and Thoracic Muscle Na^+, K^+ -ATPase of Emerging Honeybees (*Apis mellifera mellifera* L.)."
Ecotoxicol. Environ. Saf. 44 : 139-146.
- Bowman, W.C. 1981. "New Neuromuscular Blocking Drugs and Their Antagonists."
Ind. J. Pharmac. 13(1) : 1-22.
- Casida, J.E. 1955. "Comparative Enzymology of Certain Insect Acetylcholinesterase in Relation to Poisonings by Organophosphorus Insecticides." **Biochem. J.** 60 : 487-496.
- FAO/WHO. 2002. **Codex Alimentarius Commission / Draft and Proposed Draft Maximum Residue Limit in Food and Feeds.** Rome, Italy.

- Ekholm, M. **Molecular of Substrates and Inhibition of Acetylcholin- and Butyrylcholinesterase.** [Online]. Available : <http://ethesis.helsinki.fi>. 2001.
- Ellman, G.L. *et al.* 1961. "A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity." **Biochem. Pharm.** 7 : 88-95.
- Farm Chemicals Handbook. 1995. **Pesticide dictionary.** Vol. 81. Meister Publishing Comp.
- Food and Fertilizer Technology Center (FFTC). **Rapid Bioassay.** [Online]. Available : <http://www.agnet.org/library/article/ac1999g.html>. 1999.
- Frank, J.B., and Nick, C.T. 2001. "An Insensitive Acetylcholinesterase Confers Resistance to Methomyl in the Beet Armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera : Noctuidae)." **J. Econ. Entomol.** 94(2) : 524-528.
- Fukuto, T.R. 1990. "Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides." **Environmental Health Perspectives.** 87 : 245-254.
- Greeve, P.A. 1989. **Analytical Method for Residues of Pesticides in Foodstuffs.** 5th ed. Netherlands : Part I. Rijswijk.
- John, K.T. 1989. **Quality Assurance of Chemical Measurements.** 6th ed. Michigan : Lewis publishers.
- Kim, Y.G. *et al.* 1997. "Variation in Insecticide Susceptibilities of the Beet Armyworm, *Spodoptera exigua* Hubner : Esterase and Acetylcholinesterase Activities." **J. Appl. Entomol.** 36 : 172-178.
- Kumaran, S. and Tran-Minh, C.T. 1992. "Determination of Organophosphorus and Carbamate Insecticides by Flow Injection." **Analytical Biochemistry.** 200 : 187-194.
- Lari, L. *et al.* 1994. "Evaluation of Toxic Effects of Organophosphorus Insecticides Azinphos-methyl in Experimental and Naturally Exposed Birds." **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 26 : 234-239.
- Marcel, V. *et al.* 1998. "Two Invertebrate Acetylcholinesterase Show Activity Followed by Inhibition with Substrate Concentration." **Biochem. J.** 329 : 329-334.
- Marty, J.L. *et al.* 1995. "Biosensor Potential in Pesticide Detection." **Trends in Anal. Chem.** 14(7) : 329-333.

- Murphy, S.D. 1986. "Toxicity Effects of Pesticides". 519-581. in Klaassen, C. D. *et al* **The Basic Science of Poisons**. 3rd. Macmillan Publishing Company. New York.
- Nicode, J.R. 2001. "New Trends in Biosensors for Organophosphorus Pesticides." **Sensors**. 1 : 60-72.
- Palchetti, I. *et al*. 1996. "Determination of Anticholinesterase Pesticides in Sample Using a Disposable Biosensor". **Analytica Chemical Acta**. 377 : 315-321.
- Pogacnik, L. and Franko, M. 2002. "Validation of Different Commercially Available Cholinesterases for Pesticides Toxicity Test." **Ann. Chim.** 92(1/2) : 93-101.
- Ruju, J. 1991. "A Thin-Layer Chromatographic Method for the Detection of Carbaryl with Diazotized p-nitroaniline and Diazotized p-aminoacetophenone." **J. Anal. Chem.** [Online]. Available : <http://www.macherey-nagel.com/web/MN-WER-Applikationen.nsf>. 2003.
- Schulze, H. *et al*. 2002. "Rapid Detection of Neurotoxic Insecticides in Food Using Disposable Acetylcholinesterase-biosensors and Sample Solvent Extraction." **Anal. Bioanal. Chem.** 372 : 268-272.
- Shim, J.H. *et al*. **Rapid Bioassay of Pesticide Residue (RBPR) by Using Honey Bee AChE on Fruits and Vegetables**. [Online]. Available : <http://agininfo.snu.ac.kr/Apiculture/meeting/16th/16th08.htm>. 2002.
- Stefanidou, M. *et al*. 1996. "Bee Head Acetylcholinesterase as an Indicator of Exposure to Organophosphate and Carbamate Insecticides." **Vet. Hum. Toxicol.** 38(6) : 420-422.
- Weingand, A.Z. *et al*. 2001. "Pressure- and Heat-Induced Inactivation of Butyrylcholinesterase : Evidence for Multiple Intermediates and the Remnant Inactivation Process." **Biochem. J.** 356 : 487-493.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการคำนวณค่า Enzyme activity

Enzyme activity ในหน่วย $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{L} = \text{mUnit}/\text{ml} = \text{Unit}/\text{L}$

$$= \Delta A \times \frac{1}{1.0 \text{ min} \times 1.36 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot 10 \text{ mm}} \times \frac{3120 \mu\text{l}}{400 \mu\text{l}}$$

$$= \Delta A \times \frac{\text{mmol} \cdot \text{mm} \times 3120}{1.0 \text{ min} \times 1.36 \text{ L} \cdot 10 \text{ mm} \times 400}$$

$$= \Delta A \times \frac{3120 \times 10^3 \mu\text{mol}}{5440}$$

$$= \Delta A \times 574 \text{ mUnit}/\text{ml}$$

$$= \Delta A \times 574 \times \frac{1}{C_0} \text{ mUnit}/\text{ml}$$

$$= \Delta A \times 574 \times \frac{1}{20 \text{ mg}/\text{ml}} \text{ mUnit}/\text{ml}$$

$$= \Delta A \times 2.87 \times 10^4 \text{ mUnit}/\text{g (tissue)}$$

เมื่อ ΔA : ค่า absorbance ที่เปลี่ยนแปลงไปต่อนาที

C_0 : ความเข้มข้นเริ่มต้นของเนื้อเยื่อ

ตารางภาคผนวกที่ 1 ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ (% Enzyme activity remaining) กับความเข้มข้นของ methyl parathion, methamidophos, chlorpyrifos, dichlorvos และ phosalone โดยใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์

Methyl parathion			chlorpyrifos			methamidophos		
conc.	mean	SD	conc.	mean	SD	conc.	mean	SD
0.0000	100.0	0.0	0.00000	100.0	0.0	0.000	100.0	0.0
0.0010	97.2	5.4	0.00010	98.7	2.3	0.075	99.5	2.1
0.0025	97.3	4.7	0.00025	97.3	2.6	0.100	98.2	1.5
0.0050	94.9	5.3	0.00050	95.5	3.5	0.250	98.2	1.8
0.0075	94.2	5.9	0.00075	93.1	3.2	0.500	97.9	2.0
0.0100	92.2	4.9	0.00100	90.0	4.3	0.750	97.6	2.0
0.0250	88.9	3.7	0.00250	86.0	2.2	1.000	96.6	2.1
0.0500	86.4	1.7	0.00500	83.2	3.8	2.500	93.2	2.3
0.0750	80.3	3.0	0.00750	73.1	6.1	5.000	87.5	3.1
0.1000	69.7	4.0	0.01000	61.0	7.3	7.500	75.6	8.4
0.2500	53.4	6.3	0.02500	44.8	6.1	10.000	64.5	7.8
0.5000	37.6	5.9	0.05000	30.5	3.5	25.000	47.5	5.3
0.7500	27.2	7.3	0.07500	17.1	6.6	50.000	28.6	5.4
1.0000	13.8	4.5	0.10000	6.6	4.0	75.000	15.2	2.8
2.5000	8.4	3.0	0.25000	2.3	1.1	100.000	8.5	1.8
5.0000	2.4	1.4	0.50000	1.2	0.4	250.000	5.3	1.2

dichlorvos			carbosulfan			phosalone		
conc.	mean	SD	conc.	mean	SD	conc.	mean	SD
0.0000	100.0	0.0	0.0000	100.0	0.0	0.000	100.0	0.0
0.0010	99.9	1.3	0.0050	99.3	1.3	0.074	93.7	1.3
0.0025	98.8	1.0	0.0075	95.2	5.3	0.098	89.9	2.0
0.0050	97.6	1.3	0.0100	93.3	5.7	0.246	86.0	3.2
0.0075	96.4	1.6	0.0250	91.8	4.5	0.491	73.1	2.5
0.0100	94.8	1.6	0.0500	90.2	4.6	0.737	63.8	5.6
0.0250	89.4	1.9	0.0750	84.9	5.6	0.982	57.1	3.2
0.0500	85.7	2.4	0.1000	83.7	4.4	2.455	19.4	4.7
0.0750	78.8	3.6	0.2500	80.9	3.8	4.910	14.4	8.2
0.1000	74.7	4.9	0.5000	72.0	2.1	7.365	5.9	3.1
0.2500	62.8	3.1	0.7500	63.2	4.0	9.821	4.7	2.3
0.5000	52.2	1.5	1.0000	59.0	5.0	24.731	.	.
0.7500	42.9	3.4	2.5000	57.3	4.9	49.100	.	.
1.0000	30.3	2.5	5.0000	45.4	5.5	73.650	.	.
2.5000	19.6	2.8	7.5000	30.4	1.6	98.210	.	.
5.0000	11.3	2.4	10.0000	16.9	0.9	247.31	.	.

conc. = concentration of insecticides (ppm)

mean = mean of % enzyme remaining activity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2 ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ (% Enzyme activity remaining) กับความเข้มข้นของ dimethoate, triazophos, diazinon, trichlorfos, carbaryl, และ fenitrothion โดยใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์

dimethoate			triazophos			diazinon		
conc.	Mean	SD	conc.	mean	SD	conc.	mean	SD
0.00	100.0	0.0	0.0000	100.0	0.0	0.000	100.0	0.0
0.25	99.9	3.2	0.0004	96.7	1.9	0.350	98.5	1.8
0.50	99.2	3.0	0.0005	93.4	1.8	0.525	95.4	2.1
0.75	98.6	2.6	0.0013	90.7	1.3	0.700	92.8	2.6
1.00	97.6	3.3	0.0026	86.7	2.0	1.751	90.1	2.6
2.50	95.5	5.2	0.0038	85.9	2.3	3.501	88.7	2.0
5.00	91.3	5.8	0.0051	75.4	1.9	5.252	84.0	2.8
7.50	85.1	5.9	0.0128	50.3	5.5	7.002	72.9	4.6
10.00	77.1	3.2	0.0255	38.6	5.2	17.510	62.2	4.0
25.00	68.3	3.8	0.0383	23.7	5.8	35.010	50.3	3.6
50.00	54.2	2.1	0.0511	12.0	2.3	52.520	42.1	6.2
75.00	40.3	1.1	0.1277	.	.	105.040	13.6	1.7
100.00	19.3	2.8	0.2554	.	.	157.560	12.0	1.9
250.00	11.2	2.7	0.3830	.	.	210.080	9.1	1.1
500.00	6.4	1.7	0.5110	.	.	262.600	5.2	1.8
750.00	3.4	1.1	1.2770	.	.	315.120	3.0	2.0

trichlorfon			carbaryl			fenitrothion		
conc.	mean	SD	conc.	mean	SD	conc.	mean	SD
0.000	100.0	0.0	0.0000	100.0	0.0	0.00000	100.0	0.0
0.633	98.8	4.2	0.0074	102.2	4.7	0.00286	97.8	2.5
0.844	96.9	3.4	0.0098	94.9	5.0	0.00571	94.7	2.9
2.109	90.5	2.7	0.0245	94.0	3.5	0.00857	92.7	2.6
4.217	88.3	2.0	0.0490	86.4	2.2	0.01142	90.6	2.5
6.326	86.3	2.0	0.0735	76.8	3.7	0.02856	87.1	2.1
8.435	74.6	3.0	0.0980	63.7	5.1	0.05711	85.5	2.4
16.870	66.4	3.0	0.2449	57.7	3.0	0.08567	82.4	2.0
33.740	56.4	3.9	0.4898	48.9	1.9	0.14230	68.3	4.9
50.609	47.2	4.2	0.7347	47.5	0.7	0.28557	44.8	3.7
67.478	32.9	3.6	0.9795	45.5	3.0	0.57110	32.9	4.1
84.348	20.9	1.3	2.4490	30.7	3.4	0.85670	28.3	3.6
168.700	12.2	2.1	4.8980	28.3	2.0	1.14226	13.3	3.9
337.400	8.3	1.5	7.3470	27.1	3.0	2.85570	4.5	1.2
506.100	5.7	1.4	22.041	15.7	5.0	5.71130	1.5	0.6
674.800	2.9	0.6	44.082	10.9	0.3	8.56700	0.8	0.3

conc. = concentration of insecticides (ppm)

mean = mean of % enzyme remaining activity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3 เปรียบเทียบความเข้มข้นของโปรตีนที่ทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ (% Enzyme activity remaining) กับความเข้มข้นของ dimethoate, triazophos, diazinon, trichlorfos, carbaryl และ fenitrothion โดยเอนไซม์ที่เหลือจากหัวผึ้งและจากปลาไหลไฟฟ้า

conc.	triazophos				phosalone				carbaryl			
	Honey bee		Electric eel		Honey bee		Electric eel		Honey bee		Electric eel	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
0.0000	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0
0.0004	96.7	1.9	97.3	2.0	93.7	1.3	98.3	3.0	102.2	4.7	96.2	4.5
0.0005	93.4	1.8	94.5	1.7	89.9	2.0	97.9	6.6	94.9	5.0	94.7	4.2
0.0013	90.7	1.3	92.8	1.6	86.0	3.2	87.5	6.9	94.0	3.5	92.9	6.0
0.0026	86.7	2.0	91.4	2.6	73.1	2.5	76.6	4.1	86.4	2.2	94.5	1.3
0.0038	85.9	2.3	88.6	2.4	63.8	5.6	67.8	11.1	76.8	3.7	89.9	3.3
0.0051	75.4	1.9	82.9	5.6	57.1	3.2	51.2	9.4	63.7	5.1	87.6	3.2
0.0128	50.3	5.5	66.5	5.6	19.4	4.7	5.0	1.5	57.7	3.0	83.1	4.3
0.0255	38.6	5.2	54.0	3.3	14.4	8.2	2.8	1.2	48.9	1.9	76.7	2.7
0.0383	23.7	5.8	35.1	4.9	5.9	3.1	2.2	1.7	47.5	0.7	73.5	3.0
0.0511	12.0	2.3	9.6	1.2	4.7	2.3	1.1	0.5	45.5	3.0	72.3	4.0
0.1277	24.731	.	.	.	30.7	3.4	65.3	8.7
0.2554	49.100	.	.	.	28.3	2.0	54.9	7.3
0.3830	73.660	.	.	.	27.1	3.0	38.3	9.5
0.5110	98.210	.	.	.	15.7	5.0	16.2	9.7
1.2770	247.31	.	.	.	10.9	0.3	10.5	0.9

conc. = concentration of insecticides (ppm)
 mean = mean of % enzyme remaining activity

ตารางภาคผนวกที่ 4 เปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ (% Enzyme activity remaining) จากกาาวิเคราะห์การตกค้างของ methyl parathion, methamidophos, dichlorvos และ carbaryl ในผักคะน้า โดยวิธีการใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์ ณ วันที่ต่างกัน

วันที่ 0	R1					R2					R3					mean	SD
	sr1	sr2	sr3	sr4	sr5	sr1	sr2	sr3	sr4	sr5	sr1	sr2	sr3	sr4	sr5		
control	96.10	99.54	98.22	99.69	102.42	97.27	96.42	94.02	99.15	100.28	96.07	97.07	96.57	97.61	101.41	98.12	2.26
methyl parathion	4.47	7.10	14.01	11.17	7.98	5.64	8.75	12.08	10.42	5.07	1.37	6.16	9.34	3.86	4.10	7.43	3.52
methamidophos	80.70	79.95	82.47	63.00	79.46	82.15	81.78	81.02	65.68	82.49	74.12	70.46	72.56	60.94	72.47	75.28	7.48
dichlorvos	47.51	50.27	47.69	46.47	48.55	43.68	44.48	46.13	47.95	44.44	38.82	43.66	46.08	42.55	43.87	45.48	2.85
carbaryl	1.53	2.25	1.84	1.94	2.51	1.21	1.36	1.15	1.47	1.68	1.29	1.52	1.38	1.38	1.19	1.58	0.40

วันที่ 3	R1					R2					R3					mean	SD
	sr1	sr2	sr3	sr4	sr5	sr1	sr2	sr3	sr4	sr5	sr1	sr2	sr3	sr4	sr5		
control	93.23	93.95	97.07	96.11	98.60	95.37	93.14	99.73	97.52	100.02	98.24	101.66	99.34	99.34	102.95	97.76	2.96
methyl parathion	78.34	73.42	74.00	76.07	76.33	77.56	74.09	76.32	78.59	85.62	86.81	74.62	75.96	77.76	81.92	77.83	4.04
methamidophos	79.97	77.86	77.03	75.11	72.80	97.79	91.32	88.94	60.27	89.48	100.32	96.32	99.16	97.53	92.51	86.43	11.90
dichlorvos	92.92	90.89	89.75	91.31	90.38	89.65	93.73	91.27	92.24	92.28	88.83	89.70	89.93	88.08	88.59	90.64	1.65
carbaryl	9.36	3.36	4.92	4.70	10.22	8.67	2.58	3.90	3.57	8.21	8.96	2.52	3.79	3.42	8.15	5.76	2.79

วันที่ 5	R1					R2					R3					mean	SD
	sr1	sr2	sr3	sr4	sr5	sr1	sr2	sr3	sr4	sr5	sr1	sr2	sr3	sr4	sr5		
control	98.66	102.10	96.77	96.86	100.60	96.37	99.28	94.75	98.99	96.27	103.94	100.76	97.34	103.10	104.36	99.34	3.03
methyl parathion	90.53	98.60	99.23	99.09	99.52	82.83	95.31	92.33	99.54	97.24	84.78	97.89	102.98	96.19	100.84	95.79	5.80
methamidophos	94.82	92.39	93.22	92.08	96.79	94.70	91.21	91.77	90.80	94.55	89.89	89.61	88.76	84.74	87.25	91.51	3.17
dichlorvos	96.64	101.76	98.59	101.52	94.08	84.02	85.14	82.24	86.34	81.36	95.00	97.89	93.08	107.87	96.23	93.45	7.97
carbaryl	24.86	16.46	21.23	22.78	13.66	24.05	17.94	22.37	20.37	22.55	24.36	17.43	22.65	20.08	22.99	20.92	3.25

mean = mean of % enzyme remaining activity

ประวัติผู้เขียน

นายจรงค์ศักดิ์ พุมนวน เกิดเมื่อวันที่ 17 มีนาคม 2518 ที่จังหวัดพัทลุง สำเร็จ การศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์) จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ ทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2540

ปีพ.ศ. 2541 ทำงานในตำแหน่งครูรับจ้าง โรงเรียนขจรโรจนวิทยา เขตราชบุรีบูรณะ กรุงเทพมหานคร

ปีพ.ศ. 2542 – ปัจจุบัน รับราชการในตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ ระดับ 4 สังกัดภาควิชา เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้า คุณทหารลาดกระบัง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้