1994l

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

เรื่อง

# ประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสในหัวแมลงวันหัวเขียว และปลาไหลไฟฟ้าของคลอร์ไพริฟอส

# Efficiency of Chlorpyrifos on Inhibition of Acetylcholinesterase in Blow Fly Head and Electric eel

T098910

โดย

นางสาวสุพรรษา ชาพรมมา

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2546

ปพ.
ส 8229ป
2546

เลขหมู่.........

เลขทะเบียน....98910

วัน.เดือน.ปี.........

**ใบรับรองปัญหาพิเศษ**

**ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช**

**ปริญญา**

**วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)**

เรื่อง

ประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสในหัวแมลงวันหัวเขียว
และปลาไหลไฟฟ้าของคลอร์ไพริฟอส

Efficiency of Chlorpyrifos on Inhibition of Acetylcholinesterase in Blow Fly Head
and Electric eel

โดย

นางสาวสุพรรษา ชาพรมมา

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

..............................................................

(รศ.ลักขณา อมรสิน)
อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรองแล้ว

..............................................................

(รศ.ดร.วรเดช จันทรสร)
หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
วันที่ ...2๙...เดือน...พฤษภาคม.....พ.ศ...2547.

# บทคัดย่อ

| | | |
|---|---|---|
| เรื่อง | : | ประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส ในหัวแมลงวันหัวเขียวและปลาไหลไฟฟ้าของคลอร์ไพริฟอส |
| โดย | : | นางสาวสุพรรษา ชาพรมมา |
| ชื่อปริญญา | : | วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) |
| สาขาวิชา | : | เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | : | .................................. 20 / พ.ค. / 2547 |
| | | (รศ.ลักขณา อมรสิน) |

ประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสในหัวแมลงวันหัวเขียวและปลาไหลไฟฟ้าในการตรวจวิเคราะห์คลอร์ไพริฟอส ตามวิธีของ Ellman และคณะ (1961)โดยทำการทดลองที่คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผลการวิเคราะห์พบว่า คลอร์ไพริฟอสที่ระดับความเข้มข้นต่ำ จะมีอัตราการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อย่างรวดเร็ว และมีความสัมพันธ์แบบวิถีโค้ง ในขณะที่เมื่อความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอสสูงอัตราการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จะช้าลง การศึกษาความไวของวิธีการวิเคราะห์พบว่า เอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวสามารถตรวจวิเคราะห์คลอร์ไพริฟอสได้ในระดับที่ต่ำกว่าเอนไซม์จากปลาไหลไฟฟ้า คือ ตรวจวัดที่ระดับ 0.04 พีพีบี และ 128.60 พีพีบี ตามลำดับ และสามารถตรวจวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นต่ำสุดในตัวอย่างได้ที่ระดับ 0.13 พีพีบี และ 425.20 พีพีบี ตามลำดับ

# Abstract


| | | |
|---|---|---|
| Title | : | Efficiency of chlorpyrifos on inhibition of acetylcholinesterase in Blow Fly Head and Electric eel |
| By | : | Miss Supansa Chapromma |
| Degree | : | Bachelor of Science in Agriculture |
| Major Field | : | Plant Pest Management Technology |
| Advisor | : | Luckana Amonsin 20 / May / 2004 |
| | | (Assoc.Prof.Luckana Amonsin) |

The study of efficiency of chlorpyrifos on inhibition of acetylcholinesterase in Blow fly head and electric eel by Ellman *et al.*(1961) method.The experiments was carried out at Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Chaokuntaharn Ladkrabang.The results showed that chlorpyrifos at low concentration exhibited acetylcholinesterase in fast rate and exhibited as exponential curve, the higher concentration of chlorpyrifos exhibited acetylcholinesterase slower than that of low concentration.The study of enzyme activity found that enzyme from Blow fly head could detect chlorpyrifos at lower concentration than that of enzyme from electric eel.Usage of enzyme from Blow fly head and electric eel have limit of detection (LOD) as 0.04 and 128.60 ppb respectively, and have limit of quality (LOQ) as 0.13 and 425.26 ppb, respectively

# คำนิยม

ปัญหาพิเศษปริญญาตรีครั้งนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องมาจากได้รับความกรุณาจาก รศ.ลักขณา อมรสิน อาจารย์ที่ปรึกษา ที่คอยให้คำปรึกษาและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆในการทำรายงาน รวมทั้ง คุณ จรงค์ศักดิ์ พุมนวน นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช ที่อำนวยความสะดวกและช่วยดูแลการทำงานอย่างต่อเนื่องตลอดมา

ขอขอบคุณบิดา มารดา ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในด้านปัจจัยต่างๆ ตลอดจนเพื่อนๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องช่วยเป็นกำลังใจและให้การช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้

สุพรรษา ชาพรมมา

พฤษภาคม 2547

# สารบัญ

| | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อภาษาไทย | i |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ii |
| คำนิยม | iii |
| สารบัญ | iv |
| สารบัญตาราง | v |
| สารบัญภาพ | vi |
| คำนำ | 1 |
| วัตถุประสงค์ | 2 |
| การตรวจเอกสาร | 3 |
| อุปกรณ์และวิธีการ | 8 |
| ผลการทดลอง | 12 |
| วิจารณ์ผลการทดลอง | 17 |
| สรุปผลการทดลอง | 17 |
| ข้อเสนอแนะ | 18 |
| เอกสารอ้างอิง | 19 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

# สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ระดับต่ำสุดของคลอร์ไพริฟอสที่สามารถตรวจวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวและปลาไหลไฟฟ้า.............................................................. 16

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

# สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า


1. ระดับการทำงานปกติของเอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวในกลุ่มควบคุม.............. 13
2. ระดับการทำงานปกติของเอนไซม์จากปลาไหลไฟฟ้าในกลุ่มควบคุม...................... 13
3. ความสัมพันธ์ของระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียวกับความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอส ........................ 14
4. ความสัมพันธ์ของระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากปลาไหลไฟฟ้ากับความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอส ................................ 14
5. ปริมาณต่ำสุดของคลอร์ไพริฟอสที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) โดยการใช้เอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียว ............................................................ 15
6. ปริมาณต่ำสุดของคลอร์ไพริฟอสที่สามารถตรวจวิเคระห์ได้ (LOD) โดยการใช้เอนไซม์จากปลาไหลไฟฟ้า..................................................................... 15

# คำนำ

ความต้องการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคทั้งภายในและส่งออกต่างประเทศทำให้ต้องมีการป้องกันและกำจัดศัตรูพืชเพื่อไม่ให้ผลผลิตได้รับความเสียหาย เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตอบอุ่นทำให้สามารถเพาะปลูกพืชได้ตลอดทั้งปี จากสภาพดังกล่าวแมลงศัตรูสามารถเจริญและขยายพันธุ์ได้มาก การระบาดของแมลงศัตรูจึงรุนแรงกว่าประเทศในเขตหนาว ส่งผลให้เกษตรกรต้องหาวิธีการป้องกันและกำจัดแมลงมากขึ้น การใช้สารกำจัดศัตรูพืชเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สะดวก สามารถควบคุมและกำจัดแมลงที่ระบาดรุนแรงอย่างได้ผล ทำให้ประเทศไทยมีแนวโน้มการนำเข้าสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชจำนวนมาก ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2512 เป็นต้นมา (ลักขณา , 2544)

สารกำจัดศัตรูพืชที่ไทยนำเข้าส่วนใหญ่นั้นเป็นสารเคมีประเภท 1a ที่มีพิษร้ายแรงยิ่ง (extremely hazardous) และประเภท 1b คือพิษร้ายแรง (highly hazardous) สภาพการณ์นี้ทำให้เกษตรกรและผู้ที่เกี่ยวข้องได้รับพิษภัยจากสารเคมีดังกล่าวเป็นจำนวนมาก และจากผลการตรวจระดับโคลินเอสเทอเรสจากเลือดของเกษตรกรของกรมอาชีวอนามัยกระทรวงสาธารณสุขพบว่า มีเกษตรกรที่มีผลการตรวจเลือดอยู่ในเกณฑ์ที่ไม่ปลอดภัย และเสี่ยงต่อการเกิดพิษสูงถึง 85,140 คน จากจำนวนเกษตรที่ตรวจเลือด 463,142 คน คิดเป็นร้อยละ 18 ของจำนวนเกษตรกรที่เข้ารับการตรวจเลือด เมื่อปี 2538 ซึ่งเพิ่มขึ้นจากเดิมที่พบในระดับ ร้อยละ 16 ของจำนวนเกษตรกรที่เข้ารับการตรวจเลือดในปี 2537 นอกจากนี้มลพิษที่ได้จากสารเคมีกำจัดศัตรูพืชยังกระจายไปสู่ผู้บริโภคโดยการตกค้างในผลผลิต (วิฑูรย์ , 2542)

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารเคมีด้วยวิธีทางชีวเคมีแบบรวดเร็ว (rapid biochemical test) โดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพง แต่ได้ผลดีเมื่อเทียบกับวิธีการวิเคราะห์มาตรฐานซึ่งได้นำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างอยู่บนพืชผักด้วย วิธีการหนึ่งที่นิยมกันมากในปัจจุบันคือการตรวจวิเคราะห์ระดับการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) โดยพิจารณาระดับเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส (acetylcholinesterase : AchE) ที่ถูกยับยั้งโดยสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมต ซึ่งวิธีการที่ใช้กันมักนิยมใช้เอนไซม์สำเร็จรูปที่ได้จากปลาไหลไฟฟ้า (electric eel) ซึ่งต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศ และมีราคาแพง (จรงค์ศักดิ์ , 2546)

การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทดลองนำเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียวมาใช้แทนเอนไซม์สำเร็จรูป โดยที่เอนไซม์จากแมลงวันหัวเขียวนั้นสามารถเตรียมขึ้นได้เอง เนื่องจากแมลงวันหัวเขียวพบได้อยู่ทั่วไป สามารถนำมาเลี้ยงและเพิ่มจำนวนให้มีปริมาณมากๆ ได้ ซึ่งถือเป็นการนำแมลงที่เป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขมาใช้ให้เกิดประโยชน์

# วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์คลอร์ไพริฟอสโดยใช้เอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่ได้จากหัวแมลงวันหัวเขียว
2. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวกับเอนไซม์สำเร็จรูปที่ได้จากปลาไหลไฟฟ้าในการตรวจวิเคราะห์คลอร์ไพริฟอส

# ตรวจเอกสาร

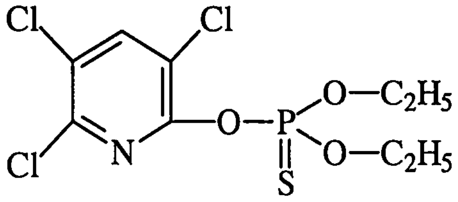
## แมลงวันหัวเขียว (Blow fly : *Calliphora erythrocephala* Meigen)

แมลงวันหัวเขียว (Blow fly) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Calliphora erythrocephala* Meigen อยู่ใน Order Diptera Family Calliphoridae เป็นแมลงวันที่พบได้ทั่วไป ทั้งตามบ้านเรือนหรือคอกสัตว์ แมลงวันในอันดับนี้จะพบได้ทุกพื้นที่ของโลกจะพบทั้งที่เป็นตัวห้ำ ตัวเบียน และปรสิต แต่ส่วนใหญ่จะเป็นพวกที่กินซากพืช ซากสัตว์หรือสิ่งเน่าเปื่อยเป็นอาหาร แมลงวันไม่ทำความเสียหายให้กับพืชแต่พืชอาจเกิดแผลเนื่องจากการวางไข่ของแมลงวัน หนอนแมลงวันจะอาศัยในที่ชื้นหรือชื้นแฉะ บางชนิดเป็นปรสิตภายในตัวสัตว์ (ดุษฎี, 2545) บางชนิดจะดูดน้ำหวานจากดอกไม้ น้ำคั้นจากพืชหรือดูดเลือดจากสัตว์เป็นอาหาร (Borror, 1994) หนอนแมลงวันจะเป็นพวกที่ย่อยสลายอินทรีย์สารให้มีขนาดเล็กลง แมลงวันในอันดับนี้มีความสำคัญทางการแพทย์โดยดุษฎี (2545) รายงานว่า เป็นพาหะของโรคที่เกิดกับมนุษย์หลายโรคด้วยกัน เช่น โรคทางเดินอาหาร โรคพยาธิ เป็นต้น

แมลงวันหัวเขียวจัดเป็นแมลงวันที่มีขนาดใหญ่กว่าแมลงวันบ้าน ส่วนอกมีสีน้ำเงินหรือสีเขียวเป็นมันสะท้อนแสง บริเวณอกจะพบเส้นขนแข็ง 2 เส้น ตารวมทั้งสองข้างเป็นสีแดง ส่วนปากเป็นแบบซับดูด (sponging type) ซึ่งจะพบที่ส่วนของริมฝีปากและฟัน โดยริมฝีปากล่างดัดแปลงเป็นงวง (proboscis) ส่วนปลายสุดจะเป็นรูพรุนมีลักษณะคล้ายฟองน้ำ หนวดมีเส้นขนอริสตา (arista) เป็นแบบพู่ขนนก (plumose) (มยุรา, 2539) Richard and Davies ( 1997 ) รายงานว่าเส้นขนอริสตาที่พบจะน้อยกว่า 7 เส้น มีลักษณะเป็นพู่ขนนกที่บริเวณส่วนยอดของหนวด Chapman (1982) และพิไล (2535) รายงานว่า แมลงวันหัวเขียวมีขั้นตอนการเจริญเติบโตแบบสมบูรณ์ คือมีระยะไข่ ระยะหนอน ระยะดักแด้ และตัวเต็มวัย แมลงวันหัวเขียวเพศเมียจะวางไข่ตามซากสัตว์หรือมูลสัตว์แล้วจะฟักเป็นตัวหนอนภายใน 6-48 ชั่วโมง ระยะหนอนจะใช้เวลา 3-9วัน แล้วฝังตัวอยู่ในพื้นดินเพื่อเข้าดักแด้ ระยะเวลาจากไข่จนเป็นตัวเต็มวัยใช้เวลา 16-35 วัน

อาคม (2538) รายงานว่าหนอนจะมีลำตัวสีเทาหรือสีเหลืองอ่อน ส่วนปลายท้องของลำตัวจะพบ stigmatic plate ซึ่งมีลักษณะกว้างและแบน ตัวหนอนจะอาศัยอยู่ในซากเน่าของสัตว์หรือมูลสัตว์ บางชนิดจะอาศัยอยู่บนเนื้อเยื่อที่เน่าเปื่อยของสัตว์หรือแผลที่เป็นหนองของมนุษย์ ตัวหนอนจะมี 3 วัย เมื่อหนอนเจริญเติบโตเต็มที่จนถึงวัยที่ 3 แล้วจะเข้าดักแด้และฝังตัวลงในพื้นดิน จากนั้นก็จะพัฒนาต่อไปจนเป็นตัวเต็มวัยและออกจากดินเพื่อสืบพันธุ์ต่อไป

# คลอร์ไพริฟอส (Chlorpyrifos)



ชื่อเคมีตามระบบ IUPAC *0 , 0*-diethy *0*-(3 , 5 , 6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate คลอร์ไพริฟอส เป็นชื่อสามัญ มีสูตรโมเลกุล คือ $C_9H_{11}C_{13}NO_3PS$ (Mol . wt . 350.6) มีชื่อทางการค้าได้แก่ คลอริดิน® ลอร์สแบน® ไพรีเน็กซ์® คลอร์ไพริฟอส® เอซิแบน®เจนเพสท® คลาสสิก® ซุลแบน®และโบรแดน® คลอร์ไพริฟอสมีลักษณะเป็นผลึกสีขาว มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 41-42°C ละลายได้ใน อะซิโตน เบนซีน คลอโรฟอร์ม เอทธิลแอลกอฮอล์ เมทธิลแอลกอฮอล์ ไอโซออกเทนและสารทำละลายอินทรีย์อื่นๆ คลอร์ไพริฟอส เป็นสารที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมนาน มีพิษต่อสัตว์ที่อาศัยอยู่ในน้ำ จึงมีข้อจำกัดในการใช้ควบคุมแมลงในน้ำ หรือใช้กับพืชน้ำ คลอร์ไพริฟอสเป็นสารที่มีอัตราการสลายตัวเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของค่า pH โดยมี $DT_{50}$ เท่ากับ 1.5 วัน (น้ำ pH 8 ที่ 25 °C) ถึง 100 วัน (phosphate buffer pH 7 ที่ 15 °C) และมีการสลายตัวในดินอย่างช้าๆ โดยมี $DT_{50}$ ในดิน ≈ 60-120 วัน (ดำริห์, 2543 ; Fest and Schmidt, 1983)

**ประสิทธิภาพในการกำจัดศัตรูพืช**

คลอร์ไพริฟอสมีประสิทธิภาพในการกำจัดเพลี้ยอ่อน เพลี้ยหอย เพลี้ยจั๊กจั่น เพลี้ยแป้ง เพลี้ยกระโดด มด หนอนใยผัก หนอนกอลาย หนอนเจาะสมอสีชมพู หนอนผีเสื้อขาวกะหล่ำ หนอนกระทู้ต่างๆ ไรแดง ไรสนิมส้ม แมลงวันทอง แมลงหวี่ขาว ด้วงงวงเจาะสมอ

**วัตถุประสงค์การใช้**

ใช้กับผักต่างๆ เช่น ข้าว ข้าวโพด ฝ้าย ถั่วเหลือง ถั่วลิสง มันฝรั่ง ยาสูบ ส้ม สตรอเบอร์รี่ หน่อไม้ฝรั่ง ไม้ผล มะเขือเทศ ไม้ดอกและไม้ประดับทั่วไป

**การใช้ร่วมกับสารอื่นๆ**

คลอร์ไพริฟอส + บีพีเอ็มซี (5+15%) ใช้ป้องกันกำจัดเพลี้ยอ่อน เพลี้ยหอย เพลี้ยจั๊กจั่น เพลี้ยแป้ง เพลี้ยกระโดด หนอนกอข้าว และ หนอนกระทู้ข้าวโพดที่ทำลายข้าว ยาสูบและพริกไทย

**ข้อควรระวังในการใช้**

1) มีฤทธิ์ตกค้างสั้นการฉีดพ่นลงบนใบพืชควรใช้ก่อนการเก็บเกี่ยว 7-14 วัน
2) คลอร์ไพริฟอสเป็นพิษต่อปลา อันตรายกับผึ้ง ไม่ควรใช้ในระยะที่ต้นไม้ออกดอก
3) ห้ามใช้ร่วมกับ Zineb

**การออกฤทธิ์**

คลอร์ไพริฟอส เป็นสารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ประเภทไม่ดูดซึม ออกฤทธิ์ในการสัมผัสตายและกินตาย โดยไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่ระบบประสาทเช่นเดียวกับสารออร์กาโนฟอสเฟตชนิดอื่นๆ สารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตจะออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส (acetylcholinesterase: AChE) ทำให้มีการสะสมอะเซตทิลโคลิน (acetylcholine) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ที่จุดเชื่อมต่อระหว่างประสาท (synaptic junction) โดยปกติอะเซตทิลโคลินเมื่อจับกับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสแล้วจะแตกตัวเป็นกรดแอซิติกและโคลินซึ่งจะไม่ทำปฏิกิริยาใดๆ คือมีความเฉื่อย แต่อะเซตทิลโคลินที่ไม่แตกตัวและสะสมอยู่ ณ จุดเชื่อมต่อระหว่างประสาทจะทำให้มีการส่งสัญญาณทางประสาทตลอดเวลา มีผลทำให้กล้ามเนื้อกระตุกและเป็นอัมพาตได้ (พาลาภ, 2537; ลักขณา, 2544)

อะเซตทิลโคลินเป็นสารสื่อประสาทที่สร้างจาก อะเซตทิลโคเอนไซม์ เอ (Acetyl Coenzyme A) และโคลิน (choline) โดยมีเอนไซม์โคลินอะเซตทิลเลส (choline acetylase) เป็นตัวกระตุ้น (catalyst) โดยอะเซตทิลโคลินจะถูกเก็บไว้ที่ไซแนปติคเวสิเคิล (synaptic vesicle) ซึ่งจะรวมกลุ่มกันอยู่ใกล้กับพรีไซแนปติคเมมเบรน (presynaptic membrane) เมื่อไซแนปติคเวสิเคิลมีอะเซตทิลโคลินเต็ม ไซแนปติคเวสิเคิลจะเคลื่อนมาที่ไซแนปติคเคลฟท์ (synaptic cleft) แล้วเชื่อมกับพรีไซแนปติกเมมเบรน โดยผนังไซแนปติคเวสิเคิลจะเปิดออกปล่อยให้อะเซตทิลโคลินเข้ามาในบริเวณจุดเชื่อมต่อของไซแนปติค (synaptic junction) แล้วอะเซตทิลโคลินจะเข้าจับกับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส หลังจากนั้นอะเซตทิลโคลินจะถูกทำลายโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ได้โคลินและกรดแอซิติก (acetic acid) โดยกระบวนการดังกล่าวโมเลกุลของอะเซตทิลโคลินจะจับเกาะกับเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่ตำแหน่งเอสเทอราติก (esteratic site) ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซีของเซริน (E-OH) และที่ตำแหน่งแอนไอออนนิค (anionic site) ซึ่งมีประจุลบ การจับเกาะระหว่างโมเลกุลของอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสเริ่มที่การจับเกาะของแอมโมเนียไอออนของอะเซตทิลโคลินกับตำแหน่งแอนไอออนนิคของอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสและการจับเกาะที่ตำแหน่งเอสเทอราติค ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นเป็นขั้นตอน คือขั้นแรกเกิดปฏิกิริยาอะเซตทิเลชัน (acetylation) ซึ่งจะทำให้เกิดสารเชิงซ้อน enzyme-substrate complex ต่อมาโมเลกุลของโคลินจะแยกออกและสุดท้ายจะเกิดปฏิกิริยาดีอะเซตทิเลชัน (deacetylation) (ลักขณา, 2544)

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสโดยสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตเกิดจากสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตทำปฏิกิริยาฟอสฟอรีเลชัน (phosphorelation) กับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่อยู่ส่วนปลายประสาท ซึ่งขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเริ่มจากการเกิด enzyme-inhibitor complex ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ ต่อมาเกิดฟอสฟอรีเลชัน ซึ่งจะเกิดการยับยั้งเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสทำให้มีการสะสมอะเซตทิลโคลินซึ่งมีผลทำให้มีการ

ถ่ายทอดสัญญาณระหว่างปลายประสาทตลอดเวลา ทำให้แมลงหรือสัตว์แสดงอาการว่องไวผิดปกติ (hyperactivity) สั่นหรือชักเป็นอัมพาตและตายในที่สุด และสุดท้ายจะเกิดปฏิกิริยาดีฟอสฟอรีเลชัน เนื่องจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ซึ่งจะทำให้อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสกลับสู่ภาวะปรกติ (สุภาณี , 2540; ลักขณา, 2544)

**ความเป็นพิษ**

คลอร์ไพริฟอสมีค่า $LD_{50}$ โดยทางปากสำหรับหนูขาวและกระต่ายเท่ากับ 135-163 และ 1000-2000 mg/kg ตามลำดับ และมีค่า $LD_{50}$ โดยทางผิวหนังและทางปากสำหรับผึ้งเท่ากับ 59 และ 250 ng/bee ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีค่า $LC_{50}$ โดยทางสูดดมติดต่อกัน 4-6 ชั่วโมง สำหรับหนูขาว>0.2 mg/l (14 ppb) (ดำริห์, 2543 ; Fest and Schmidt, 1983)

**อาการพิษ**

ผู้ที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสจะมีอาการเซื่องซึม ตาพร่า ช่องท้องปวดเกร็ง แน่นหน้าอก กล้ามเนื้ออ่อนเปลี้ย ปวดศรีษะ หายใจขัด ม่านตาหรี่ น้ำลายไหล คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง เหงื่อออกมาก และตัวสั่น (ปรีชา , 2542)

**คำแนะนำในการแก้พิษ** (ดำริห์, 2543)

1. ช่วยผู้ป่วยให้หายใจสะดวก โดยการให้ออกซิเจนก่อนอื่นใด
2. ให้สารอะโทรปีนซัลเฟต (atropine sulfate) เป็นยาต้านฤทธิ์ โดยให้ 1-2 มิลลิกรัมโดยฉีดเข้าเส้นเลือด ในรายที่มีอาการรุนแรงจะให้สารนี้ในขนาด 4 มิลลิกรัม ก่อนแล้วให้อีก 2 มิลลิกรัม ทุกๆ 10-15 นาที จนเกิดอาการอะโทรปิไนเซชัน (atropinization , ซึ่งจะมีอาการหน้าแดง ปากแห้ง ม่านตาขยาย และชีพจรเต้นเร็ว อาจจะถึง 140 ครั้ง/นาที ) นานอย่างน้อย 24-48 ชั่วโมง หรือจนกว่าผู้ป่วยมีอาการทุเลาดีขึ้น ในเด็กอายุต่ำกว่า 12 ปี จะให้ในอัตรา 0.05 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม
3. หากได้รับโดยการกินให้ล้างท้องด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนต 5% ตามด้วยผงถ่านแอคติเวทเทต (activated carbon) 30-50 กรัม/น้ำ 1 แก้ว แล้วตามด้วยยาระบายโซเดียมซัลเฟต
4. ในขณะให้สารอะโทรปีนซัลเฟตนั้นอาจให้สารกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส (cholinesterase activator) เช่น พราลิด็อกซิม (pralidoxime protopam pyridine-2-aldoximemethochloride 2-PAM) ให้โดยการฉีดเข้าเส้นเลือดช้าๆ (ในอัตราไม่เกิน 0.5 กรัม/นาที) ด้วยการผสมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน พราลิด็อกซิม 1 กรัม ผสมกับสารละลายกลูโคส 5% จำนวน 250 ซีซี ในรายที่รุนแรงจะให้ซ้ำใน 1-2 ชั่วโมง และถ้าจำเป็นก็จะให้อีกในช่วง 10-12 ชั่วโมง แต่ไม่เกิน 24-48 ชั่วโมง (อาจใช้ obidoxime chloride (Toxogenin) ขนาด 0.25 กรัม แทน 2-PAM ขนาด 1 กรัมก็ได้ )

5. ห้ามให้ยาพวกมอร์ฟีน (morphine) ธีโอฟีลลีน (theophylline) เอมิโนฟิลลีน (aminophylline) บาร์บิทูเรท (barbiturate)

6. ไม่ควรให้น้ำเข้าทางเส้นเลือดมากเกินควร เพราะว่าผู้ป่วยเหล่านี้มีอาการหลั่งของเหลวออกมามากและมีแนวโน้มที่จะเกิดปอดบวมได้ง่าย

# อุปกรณ์และสารเคมี

## วัสดุอุปกรณ์

1. เอนไซม์สำเร็จรูปจากปลาไหลไฟฟ้า (AChE : True Cholinesterase ; EC 3.1.1.7)(Sigma)
2. แมลงวันหัวเขียว (Blow fly : *Calliphora erythrocephala* Meigen)
3. เครื่อง spectrophotometer แบบ visible
4. เซลล์แก้วบรรจุสารตัวอย่าง (cuvette)
5. เครื่องปั่นของเหลวกระแสวน (vortex mixer)
6. เครื่องปั่นสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenizer)
7. pH meter
8. เครื่องชั่ง (4 ตำแหน่ง)
9. เครื่องแก้ว
   - -หลอดทดลอง
   - -บีกเกอร์ ขนาด 10, 50, 100 และ 500 ml
   - -Volumetric flask ขนาด 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ml
   - -Erlenmeyer flask ขนาด 500 ml
10. Automatic pipette ขนาด 50, 100, 200 และ 1,000 µl
11. glass wool

## สารเคมี

1. สาร 5, 5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) เตรียมโดยละลายสาร 5, 5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid 39.62 mg.ใน buffer phosphate (0.1 M , pH 7) จำนวน 9 ml. หลังจากนั้นเติม sodium bicarbonate 15 mg. และ triton-X 100 จำนวน 1 ml
2. สารละลาย Acetylthiocholine iodide (ATChI) 0.075 M. เตรียมโดยละลาย Acetylthiocholine iodide 0.2169 g. ในน้ำกลั่น 10 ml.
3. Buffer phosphate (0.1M) : เตรียมได้โดยละลาย $Na_2HPO_4$ 0.05 M (9.465 g ในน้ำ 1,000 ml) และ $KH_2PO_4$ 0.01 M (2.268 g ในน้ำ 250 ml) ในอัตราส่วน 4:1
4. 5% MeOH in water
5. dichloromethane
6. 1% bromine in water
7. สารละลายมาตรฐาน chlorpyrifos

8. Acetone
9. น้ำกลั่น

## วิธีการ

**1. การวิเคราะห์โปรตีนในหัวแมลงวันหัวเขียว**

ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาสัตวศาสตร์ซึ่งใช้เครื่อง Gerhardt (Kjldathem; Vapodest 2) และทำตามวิธีของ ศรีสกุล (2543)

**2. การตรวจวิเคราะห์ระดับการทำงานปกติของเอนไซม์ (Enzyme activity) ในหัวแมลงวันหัวเขียว**

การศึกษาระดับการทำงานปกติของเอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวมีความจำเป็น เนื่องจาก ปริมาณความเข้มข้นที่วัดได้จะบอกถึงระดับการทำงานของเอนไซม์ต่อหัวแมลงวันหัวเขียว 1 หัว มีหน่วยเป็น mUnit/g(โปรตีน) ซึ่งจะนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่ถูกยับยั้งหรือเปอร์เซ็นต์เอนไซม์ที่เหลือ การตรวจวิเคราะห์ใช้วิธีตามหลักการของ Ellman's reaction (Ellman *et al.*, 1961) มีขั้นตอนดังนี้

2.1 นำหัวแมลงวันหัวเขียวที่เลี้ยงไว้ในสภาพที่ปลอดภัยจากสารกำจัดแมลง (ในเรือนเพาะชำบริเวณคณะเทคโนโลยีการเกษตร) โดยใช้ตัวเต็มวัยของแมลงวันหัวเขียวอายุ 2-3 วัน มาปั่นในสารละลาย buffer phosphate (pH 8.0 , 0.1 M) ในอัตราส่วนเนื้อเยื่อ 20 mg ต่อ buffer phosphate 1 ml (5หัว/1 ตัวอย่าง) โดยใช้เครื่อง homogenizer กรองสารละลายที่ได้ผ่าน glass wool

2.2 ดูดสารละลายที่ได้จำนวน 200 µl เติมลงในหลอดทดลองที่มี buffer phosphate (pH 8.0 , 0.1 M) 1.3 ml เติมสารละลาย DTNB 0.01 M จำนวน 50 µl และสารละลาย ATChI 0.075 M จำนวน 10 µl ผสมสารให้เข้ากันด้วย vortex mixer

2.3 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 412 nm บันทึกค่าดูดกลืนแสงทุก 30 วินาที ภายในเวลา 3 นาที หาค่าเฉลี่ยความแตกต่างแล้วนำไปคำนวณตามสมการของ Ellman *et al*.(1961)

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

$$= 574 \times \frac{1}{P} \ \text{mUnit/g(protein)}$$

เมื่อ

$\Delta A$ : ค่า absorbance ที่เปลี่ยนแปลงไปต่อนาที

P : โปรตีนในเนื้อเยื่อ (g)

**3. การตรวจวิเคราะห์ระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือหลังจากทำปฏิกิริยากับสารกำจัดแมลง (%Enzyme activity remaining)**

ตรวจวิเคราะห์โดยใช้ spectrophotometric method ซึ่งจะตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่เหลือจากการถูกยับยั้งโดย คลอร์ไพริฟอส และสามารถบอกปริมาณเป็นเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ การตรวจวิเคราะห์ระดับการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ได้ดำเนินการตามวิธีของ Ellman *et al.* (1961) และ Frank and Nick (2001) มีขั้นตอนดังนี้

3.1 ดูดสารละลายสารกำจัดแมลง chlorpyrifos ที่ละลายใน dichloromethane 2 ml ใส่ในหลอดทดลอง

3.2 เติม 5 % MeOH in water 2 ml

3.3 ใช้อากาศเป่าไล่ dichloromethane ให้หมด

3.4 ใส่ 1 % bromine in water 100 µl เขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที

3.5 ใช้อากาศเป่าไล่ bromineที่เหลืออยู่ให้หมด จะได้เป็น sample extract

3.6 ดูดสารละลาย sample extract 250 µl ลงในหลอดทดลองที่มี buffer phosphate (pH 8.0 , 0.1 M) 2.6 ml

3.7 เติมสารสกัดที่ได้จากหัวแมลงวันหัวเขียว/ปลาไหลไฟฟ้า 400 µl (0.014 Unit) จากข้อ 2 เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

3.8 เติม DTNB 0.01 M 100 µl และ ATChI 0.075 M 20 µl เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่ 25 °C

3.9 วัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance : ABS) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 412 nm

3.10 คำนวณระดับการทำงานของเอนไซม์ที่เหลือของเอนไซม์จากแมลงวันหัวเขียว (% enzyme activity remaining) เทียบกับกลุ่มควบคุม

**4. การหาขอบเขตของความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์ (Method of validation)**

โดยการตรวจสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้และการตรวจหาความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ในตัวอย่าง การหาขอบเขตความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์สารตกค้างออร์กาโนฟอสเฟตโดยใช้เอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวและเอนไซม์สำเร็จรูปจากปลาไหลไฟฟ้าดำเนินการตามวิธีของ John (1989) ดังนี้

4.1 หาความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือกับความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงมีขั้นตอนดังนี้

4.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน คลอร์ไพริฟอส ใน dichloromethane จำนวน 12 ระดับความเข้มข้น

4.1.2 ตรวจวิเคราะห์ระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือหลังจากทำปฏิกิริยา กับสารกำจัดแมลง ตามวิธีข้อ 3 ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

4.1.3 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอส กับค่าเฉลี่ยของระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ

4.2 หาปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ ได้ (limit of detection : LOD) มีขั้นตอนดังนี้

4.2.1 หาค่า SD จาก % enyme activity remaining ของกลุ่มควบคุม (control ; ไม่มีสารกำจัดแมลง แต่มี 5 % MeOH) เทียบกับ blank (กลุ่มที่ไม่มีสารกำจัดแมลง และ 5 % MeOH) 50 ตัวอย่าง

4.2.2 กำหนดค่า % inhibition ซึ่งครอบคลุมค่าเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมซึ่งเท่ากับ 3SD

4.2.3 นำค่าความสัมพันธ์ที่ได้จากข้อ 4.1 ในช่วงที่ความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงมาตรฐานยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากแมลงวันหัวเขียวและปลาไหลไฟฟ้าที่ครอบคลุม %inhibition มาอย่างละ 4 ระดับความเข้มข้น

4.2.4 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงมาตรฐานกับค่า (%enzyme activity remaining)

4.2.5 คำหาสมการเส้นตรงและค่า $R^2$

4.2.6 คำนวนค่า LOD จากสมการเส้นตรงที่ได้จากข้อ 4.2.5 ดังนี้ LOD = b-a*ln (%enzyme activity remaining) เมื่อ %enzyme activity remaining เป็นระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานปรกติในกลุ่มควบคุม

4.3 หา ความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ในตัวอย่างที่สามารถพบได้ (limit of quality ; LOQ) มีขั้นตอนการทำเหมือนข้อ 4.2 โดยกำหนดค่า LOQ เท่ากับ 10SD

**5. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวกับเอนไซม์สำเร็จรูปจากปลาไหลไฟฟ้า**

เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์คลอร์ไพริฟอสของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่ได้จากหัวแมลงวันหัวเขียวกับเอนไซม์ที่ได้จากปลาไหลไฟฟ้า โดยใช้ข้อมูลจากข้อ 4.2 และ4.3

98910

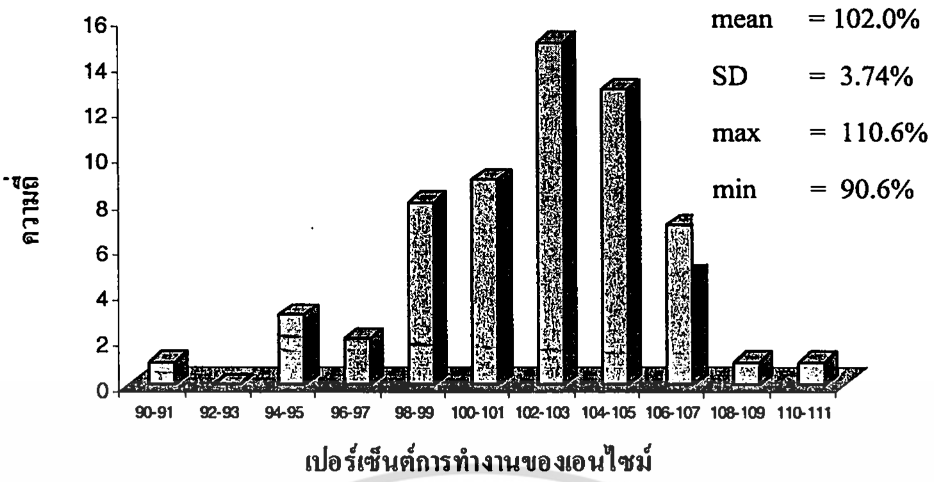
ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

# ผลการทดลอง

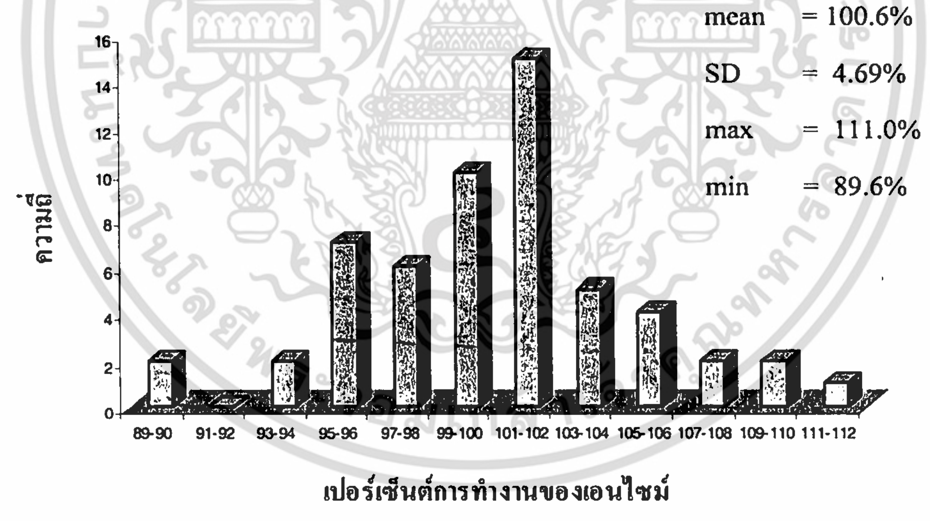
ผลการวิเคราะห์โปรตีนในหัวแมลงวันหัวเขียวตามวิธีของ ศรีสกุล (2543) โดยใช้เครื่อง Gerhardt พบว่า ปริมาณโปรตีนในหัวแมลงวันหัวเขียวมีค่าเท่ากับ 25% ของน้ำหนักเนื้อเยื่อทั้งหมด ผลการตรวจวิเคราะห์ระดับการทำงานปกติของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียวมีค่าเท่ากับ 1,097.8±118.8 มิลลิยูนิต/กรัมโปรตีน (mUnit/g) หรือ 153.17 ± 0.64 มิลลิยูนิต/หัว (mUnit/head) และมีระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวในกลุ่มควบคุม (ไม่มีสารกำจัดแมลงแต่มี 5% MeOH) เท่ากับ 102.0 ± 3.74 (range 90.6-110.6) (n = 50) และระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสของปลาไหลไฟฟ้าในกลุ่มควบคุม (ไม่มีสารกำจัดแมลงแต่มี 5% MeOH) เท่ากับ 100.6 ± 4.7 (range 89.6-111.0) (n = 50)

การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสของหัวแมลงหัวเขียวกับความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอส (ภาพที่ 3) และระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสของปลาไหลไฟฟ้ากับความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอส (ภาพที่ 4) พบว่า เอนไซม์ลดการทำงานอย่างรวดเร็วในช่วงที่ระดับความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอสต่ำซึ่งมีความสัมพันธ์แบบวิถีโค้ง (exponential) โดยที่เอนไซม์จะลดการทำงานในอัตราที่ช้าลงในช่วงที่คลอร์ไพริฟอสมีความเข้มข้นสูงขึ้น

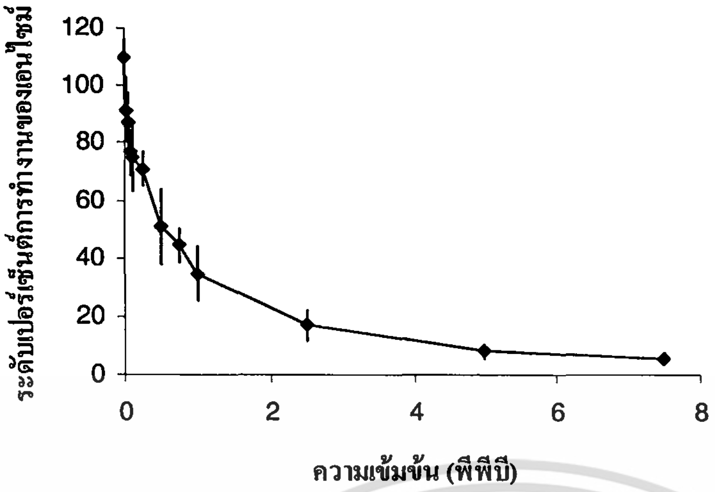
การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจได้ หรือความไวของวิธีการวิเคราะห์ (sensitivity) โดยประเมินความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารกับค่า ln(%enzyme activity remaning) แบบเส้นตรง โดยใช้ %enzyme activity remaning ที่ครอบคลุมค่าเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ยของการควบคุมในแมลงวันหัวเขียวเท่ากับ 89% (11% inhibition) (ภาพที่ 1) และในปลาไหลไฟฟ้าเท่ากับ 86% (14% inhibition) (ภาพที่ 2) ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจพบคลอร์ไพริฟอสโดยใช้เอนไซม์ในหัวแมลงวันหัวเขียวมีค่าเท่ากับ 0.04 พีพีบี (ดังสมการในภาพที่ 5) และในปลาไหลไฟฟ้ามีค่าเท่ากับ 128.60 พีพีบี (ดังสมการในภาพที่ 6) ความเข้มข้นต่ำสุดของคลอร์ไพริฟอสที่สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างได้ (LOQ) โดยใช้เอนไซม์ในหัวแมลงวันหัวเขียวมีค่าเท่ากับ 0.13 พีพีบี และในปลาไหลไฟฟ้ามีค่าเท่ากับ 425.26 พีพีบี (ตารางที่ 1)



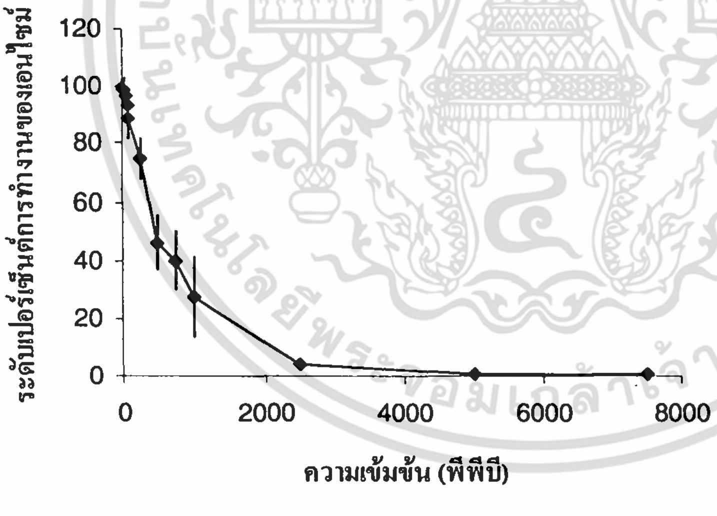

**ภาพที่ 1** ระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานปกติของเอนไซม์จากแมลงวันหัวเขียวในกลุ่มควบคุม



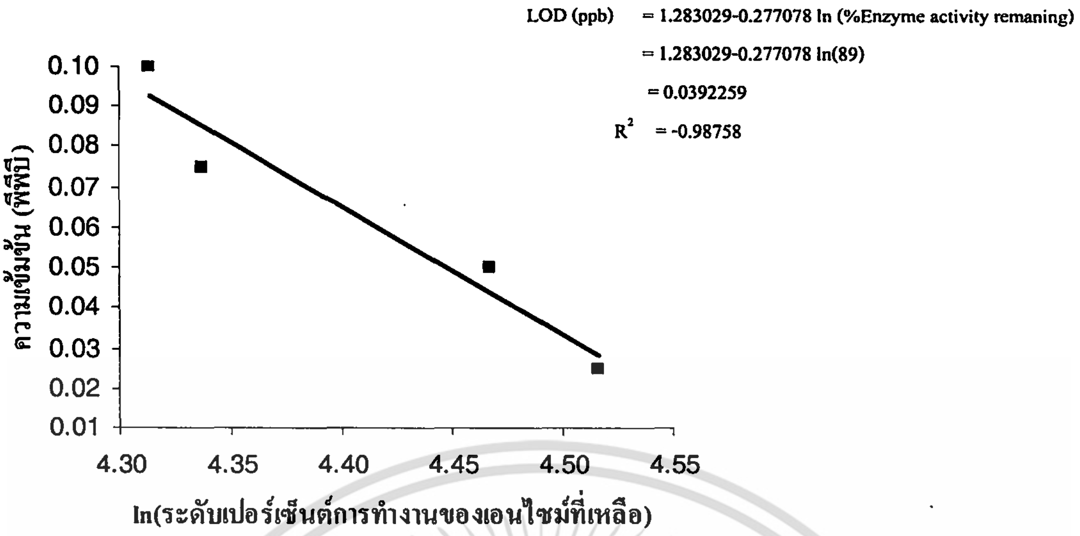

**ภาพที่ 2** ระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานปกติของเอนไซม์จากปลาไหลไฟฟ้าในกลุ่มควบคุม



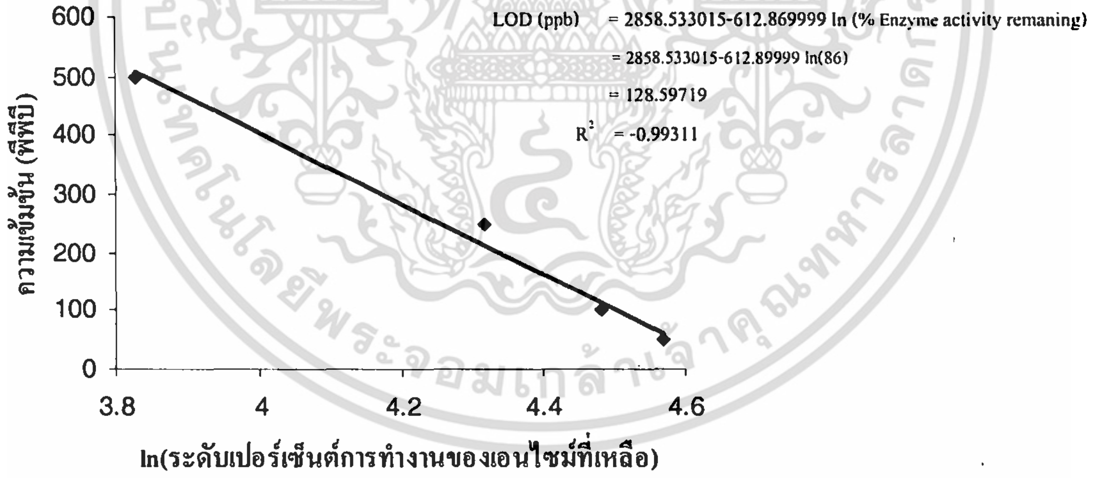

**ภาพที่ 3** ความสัมพันธ์ของระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส จากหัวแมลงวันหัวเขียว กับความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอส




**ภาพที่ 4** ความสัมพันธ์ของระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส จากปลาไหลไฟฟ้ากับความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอส




**ภาพที่ 5** ปริมาณต่ำสุดของ คลอร์ไพริฟอส ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) โดยการใช้เอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียว




**ภาพที่ 6** ปริมาณต่ำสุดของคลอร์ไพริฟอสที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) โดยการใช้เอนไซม์จากปลาไหลไฟฟ้า

**ตารางที่ 1** ระดับต่ำสุดของคลอร์ไพริฟอสที่สามารถตรวจวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวและปลาไหลไฟฟ้า

| แหล่งเอนไซม์ | $R^2$ | LOD$^{-1/}$ | LOQ$^{-2/}$ |
|---|---|---|---|
| ปลาไหลไฟฟ้า | -0.99311 | 128.60 | 425.26 |
| แมลงวันหัวเขียว | -0.98758 | 0.04 | 0.13 |

$^{-1/}$ = 11% inhibition (แมลงวันหัวเขียว) และ 14% inhibition (ปลาไหลไฟฟ้า)

$^{-2/}$ =37% inhibition (แมลงวันหัวเขียว) และ 47% inhibition (ปลาไหลไฟฟ้า)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

## วิจารณ์ผลการทดลอง

ระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่ลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากทำปฏิกิริยากับคลอร์ไพริฟอสที่มีความเข้มข้นของสารต่ำ อาจเป็นเพราะระดับการทำงานของเอนไซม์ที่มีอยู่สามารถจับกับคลอร์ไพริฟอสที่มีความเข้มข้นต่ำพอดี เมื่อคลอร์ไพริฟอสมีความเข้มข้นสูงขึ้น ระดับการทำงานของเอนไซม์น้อยกว่าจึงไม่เพียงพอที่จะจับกับคลอร์ไพริฟอส อัตราการทำงานของเอนไซม์จึงลดลงอย่างช้าๆ สำหรับค่า LODและ LOQ ของแมลงวันหัวเขียวต่ำกว่า อาจเป็นผลจากความสดและใหม่ของเอนไซม์เพราะเอนไซม์จากแมลงวันหัวเขียวสกัดแล้วใช้ทันทีในขณะที่เอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากปลาไหลไฟฟ้าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตเพื่อการค้าจึงไม่สดและใหม่เท่าเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากแมลงวันหัวเขียว

## สรุปผลการทดลอง

การตรวจวิเคราะห์คลอร์ไพริฟอสโดยใช้เอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียวและปลาไหลไฟฟ้าพบว่า เอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียวมีประสิทธิภาพดี รวดเร็ว ประหยัดและมีความไวค่อนข้างดี ซึ่งเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียว สามารถตรวจวิเคราะห์คลอร์ไพริฟอสได้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าเอนไซม์จากปลาไหลไฟฟ้าซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า คือสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณต่ำสุด (LOD) ของคลอร์ไพริฟอสได้ในระดับ 0.04 พีพีบี ในขณะที่เอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากปลาไหลไฟฟ้าสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณต่ำสุดของคลอร์ไพริฟอสได้ที่ระดับ 128.60 พีพีบี นอกจากนี้ยังสามารถตรวจวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของคลอร์ไพริฟอสในตัวอย่างได้ ( LOQ) โดยใช้เอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสของแมลงวันหัวเขียวและเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากปลาไหลไฟฟ้า โดยตรวจพบที่ระดับ 0.13 พีพีบีและ 425.26 พีพีบี ตามลำดับ แต่การทดลองนี้ไม่ได้ศึกษากับเอนไซม์ที่เก็บรักษาไว้นานๆ จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวที่เก็บไว้เป็นเวลานาน จะมีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์คลอร์ไพริฟอสได้ดีหรือไม่

# ข้อเสนอแนะ

การใช้เอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียวตรวจวิเคราะห์หาสารกำจัดแมลงเป็นเพียงการตรวจสอบเบื้องต้น ซึ่งจะทราบเพียงว่าเป็นสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสหรือไม่เท่านั้นไม่สามารถบอกชนิดของสารและปริมาณที่แน่นอนได้ซึ่งผลการตรวจวิเคราะห์ที่ให้ผลบวก (positive) จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำไปตรวจวิเคราะห์ในขั้นต่อไป เพื่อให้ทราบชนิดและความเข้มข้นของสาร เช่น การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC), Hight Perfommance Liquid Chromatography (HPLC) และ Thin Leyer Chromatography (TLC)

การเตรียมเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากแมลงวันหัวเขียวควรใช้ตัวเต็มวัยของแมลงวันหัวเขียวอายุ 2-3 วันเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ $0^{\circ}C$ ถึง $-20\ ^{\circ}C$ เมื่อจะนำมาทดสอบจึงนำมาตัดหัว บดแล้วละลายในบัพเฟอร์ และควรเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ในที่เย็นตลอดเวลาโดยก่อนนำเอนไซม์มาทำการตรวจวิเคราะห์ ต้องตรวจวิเคราะห์หาระดับการทำงานของเอนไซม์ก่อนเพื่อจะได้ทราบว่าเอนไซม์เสื่อมสภาพหรือไม่และยังมีระดับการทำงานของเอนไซม์มากพอที่จะสามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ได้รวมทั้งสามารถปรับระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ให้เหมาะสมกับการตรวจวิเคราะห์

# เอกสารอ้างอิง


จรงค์ศักดิ์ พุมนวน. 2546. การตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและ คาร์บาเมตอย่างรวดเร็ว โดยใช้เอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวผึ้งพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชากีฏวิทยาและสิ่งแวดล้อม ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตรสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ดำริห์ รุ่งสุข. 2543. สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและสัตว์. ภาควิชาอารักขาพืช คณะผลิตกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่.

ดุษฎี อินทร. 2545. ผลของการสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการตายของหนอนแมลงวันหัวเขียว. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พิไล พูลสวัสดิ์. 2535. แมลงและสัตว์ขาปล้องที่สำคัญทางการแพทย์. ที.พี.พริ้นท์. กรุงเทพฯ.

มยุรา สุนย์วีระ. 2539. กีฏวิทยาเบื้องต้น. คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

ปรีชา พุทธปรีชาพงศ์. 2542. สารกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทย. ฝ่ายสารวัตรเกษตร กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร.

พาลาภ สิงหเสนี . 2540. พิษของยาฆ่าแมลงต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พัชรา วีระกะลัส. 2541. เอนไซม์. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ลักขณา อมรสิน. 2544 . เคมีของสารกำจัดแมลง. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิฑูรย์ เลี่ยนจำรูญ. 2542. การส่งเสริมการเกษตรกับการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช. หน้า 91-114. *ใน.* รายงานสรุปการสัมมนาแนวทางการสร้างมติในการปฏิรูปนโยบายสารกำจัดศัตรูพืชเพื่อการดำเนินการในอนาคต 2542. กรุงเทพฯ : ฝ่ายเศรษฐกิจรายสาขาสถาบันวิจัยเพื่อพัฒนาประเทศไทย.

ศรีสกุล วรจันทรา . 2543. บทปฏิบัติการโภชนาการศาสตร์. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุภาณี พิมพ์สมาน. 2540. สารฆ่าแมลง. ขอนแก่น : โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา.

อาคม สังข์วรานนท์. 2538. กีฏวิทยาทางสัตวแพทย์. ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Borror, D.J. , D.M. Delong and C.A. Triplehorn. 1994. An Introdrction to the Study of Insect. Holt Rinehart and Winson, New York. 852 pp.

Chapman, R.F. 1982. The Insect Sturcture and Function, 3 rd Edition. Hodder and Stroghton, London. 919 pp.

Ellman ,G.L. *et al.* 1961. "A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity". Biochem.Pharm. 7: 88-95.

Frank , I.B.,and Nick, C.J. 2001. "An Insensitive Acetylcholinesterase Confers Resistance to Methomyl in the Beet Armyworm *Spodoptera exigue* (Lepidoptera : Noctuidae)". J.Econ. Entomol. 94(2) : 524-528.

Fest , C. and K.J. Schmidt. 1983. Organophosphorus Insecticides. *In* Buchel , K.H. (Editor). Chemistry of pesticide. Translated by Holmwood , G.M.John Wiley & Sons , New York. pp. 48-125.

John , K.T. 1989. Quality Assurance of Chemical Measurements. 6th ed. Michigan : Lewis Publishers