19935

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

เรื่อง

การใช้เอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียวทดสอบระดับตกค้างของคลอร์ไพริฟอสในผักกวางตุ้ง

Usage of Acetylcholinesterase from Blow Fly Head for Analysis of Chlorpyrifos Residue in Chinese Kale

T098872

โดย

นาย นพดล ศรีช่วง

ปพ.
ว1697ก
2546

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....98872
วัน,เดือน,ปี.....12 Jun 2003

ปัญญาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2546

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี

ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการจัดศัตรูพืช

ปริญญาตรี

วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

เรื่อง

การใช้เอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียวทดสอบระดับตกค้างของคลอร์ไพริฟอสในผักกวางตุ้ง

Usage of Acetylcholinesterase from Blow Fly Head for Analysis of Chlorpyrifos Residue in Chinese Kale

โดย

นาย นพดล ศรีช่วง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

.....

(รศ. ลักขณา อมรสิน)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(รศ.ดร.วรเดช จันทรสร)

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

วันที่ 19 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

เรื่อง : การใช้เอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียวทดสอบระดับตกค้างของคลอร์ไพริฟอสในผักกวางตุ้ง

โดย : นายนพดล ศรีช่วง

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

สาขาวิชา : เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

อาจารย์ที่ปรึกษา : ..... 19/ตุลาคม/2547

(รศ.ลักขณา อมรสิน)

การใช้เอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียวทดสอบระดับการตกค้างของคลอร์ไพริฟอสในผักกวางตุ้ง ทำการทดลองโดยใช้แมลงวันหัวเขียวตัวเต็มวัยอายุ 2-3 วัน ตรวจวิเคราะห์ตามวิธีการของ Ellman และคณะ (1961) ผักกวางตุ้งที่ใช้ในการทดลองเป็นผักที่ปลูกในแปลงทดลองขนาด 4.5x1.5 เมตร จำนวน 3 แปลง แบ่งเป็นกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ฉีดพ่นคลอร์ไพริฟอส ฉีดพ่นคลอร์ไพริฟอสในอัตราคำแนะนำบนฉลาก (20 มิลลิลิตร/น้ำ 50 ลิตร) และฉีดพ่นคลอร์ไพริฟอสในอัตราสองเท่าของคำแนะนำบนฉลาก (40 มิลลิลิตร/น้ำ 50 ลิตร) ตรวจวิเคราะห์คลอร์ไพริฟอสในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 หลังการฉีดพ่นสารครั้งสุดท้าย ผลการทดลองพบว่าปริมาณคลอร์ไพริฟอสในผักกวางตุ้งจากแปลงควบคุมในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 ทำให้เปอร์เซ็นระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสเหลือ 81.0±10.0, 91.7±4.6, 105.5±10.2, 102.3±4.7 และ 110.9±7.7 แปลงที่ฉีดพ่นสารในอัตราคำแนะนำเหลือ 3.0±1.0, 16.2±8.2, 45.2±10.2, 44.5±9.6 และ 98.1±11.1 แปลงที่ฉีดพ่นสารในอัตราสองเท่าของคำแนะนำเหลือ 1.2±0.6, 8.2±5.1, 42.0±12.3, 38.6±16.8 และ 85.7±8.3 ตามลำดับ เปอร์เซ็นระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสในหัวแมลงวันที่คงเหลือต่ำกว่า 89 ถือว่าให้ผลเป็นบวก และผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณคลอร์ไพริฟอสของผักกวางตุ้งด้วยเครื่อง GC ในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 หลังการฉีดพ่นครั้งสุดท้าย จากแปลงควบคุมพบว่าผักกวางตุ้งมีปริมาณคลอร์ไพริฟอส 0.02±0.03, 0.06±0.00, 0.07±0.06, 0.08±0.04 และ 0.01±0.00 พีพีเอ็ม แปลงที่ฉีดพ่นสารในอัตราแนะนำพบ 3.57±0.52, 2.47±0.06, 1.21±0.02, 0.74±0.07 และ 0.32±0.05 พีพีเอ็ม และแปลงที่ฉีดพ่นสารในอัตราสองเท่าของคำแนะนำพบ 5.48±1.08, 4.19±0.22, 1.74±0.04, 1.39±0.15 และ 0.58±0.03 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้จากการทดสอบทั้งสองแสดงผลที่สอดคล้องกัน คือเปอร์เซ็นระดับการทำงานของเอนไซม์จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอสในผักกวางตุ้งเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

Title : Usage of Acetylcholineesterase from Blow Fly Head for Analysis of Chlopyrifos Residue in Chinese Kale.

By : Mr.Nopadol Srichuang

Degree : Bachelor of Science in Agriculture

Major Field : Plant Pest Management Technology

Advisor : Luckana Amonsin 19/ May /2004

(Assoc.Professor Luckana Amonsin)

Usage of Acetylcholinesterase from Blow fly head for analysis of Chlopyrifos residue in Chinese Kale was conducted by using 2-3 days old of Blow fly head (*Calliphor erythrocephala*). Ellman's method (1961) was used for analysis. Chinese kale were planted in 3 plots of 4.5X1.5 m, as no-application of Chlorpyrifos (control group), sprayed as recommended dose (20 ml/ 50 L of water) and double dose (40 ml/ 50 L of water). The results of enzyme analysis showed that percent enzyme activity remaining in Chinese kale of control group were 81.0±10.0, 91.7±4.6, 105.5±10.2, 102.3±4.7 and 110.9±7.7, sprayed as recommended dose were 3.0±1.0, 16.2±8.2, 45.2±10.2, 44.5±9.6 and 98.1±11.1 and sprayed as double dose were 1.2±0.6, 8.2±5.1, 42.0±12.3, 38.6±16.8 and 85.7±8.3 at 0, 1, 3, 5 and 7 days after the last application, respectively. Percent enzyme activity remaining less than 89% were interpretive as positive. Chlorpyrifos residue in Chinese kale analyze by using GC found that Chlorpyrifos residue in Chinese kale of control group were 0.02±0.003, 0.06±0.00, 0.07±0.06, 0.08±0.04 and 0.01±0.00 ppm, sprayed as recommended dose were 3.57±0.52, 2.47±0.06, 1.21±0.02, 0.74±0.07 and 0.32±0.05 ppm and sprayed as double dose were 5.48±1.08, 4.19±0.22, 1.74±0.04, 1.39±0.15 and 0.58±0.03 ppm at 0, 1, 3, 5 and 7 days after the last application, respectively. In addition there was no contrast of resolution between the enzyme analysis and GC analysis, if percent enzyme activity remaining decreased, Chlorpyrifos residue in Chinese kale were increased.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

การจัดทำปัญหาพิเศษปริญญาตรีฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รศ.ลักขณา อมรสิน ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ได้คอยชี้แนะแนวทางให้ข้าพเจ้าได้ทำปัญหาพิเศษฉบับนี้ คอยแนะนำเป็นที่ปรึกษาเกี่ยวกับการทดลอง จนลุล่วงไปได้ด้วยดี ทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จดังเป้าหมายที่ตั้งไว้

ขอขอบคุณ คุณจรงค์ศักดิ์ พุมนวน นักวิทยาศาสตร์ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการทดลอง ขอขอบคุณเพื่อนๆที่ร่วมช่วยเหลืองานด้วยกันมา ขอขอบคุณคุณพี่ๆ และน้องๆ ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจเสมอมา

หากปรากฏส่วนดีของปัญหาพิเศษฉบับนี้ ขอมอบให้กับ คุณพ่อ คุณแม่และครูอาจารย์ทุกท่านที่คอยอบรมสั่งสอน จนทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

นพดล ศรีช่วง

กุมภาพันธ์ 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II
คำนิยม.....III
สารบัญ.....IV
สารบัญตาราง.....V
สารบัญภาพ.....VI
คำนำ.....1
วัตถุประสงค์.....2
ตรวจเอกสาร.....3
อุปกรณ์และสารเคมี.....9
วิธีการทดลอง.....11
ผลการทดลอง.....17
วิจารณ์ผลการทดลอง.....21
สรุปผลการทดลอง.....22
เอกสารอ้างอิง.....23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ระดับการตกค้างของคลอร์ไพริฟอสในผักกวางตุ้งวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 หลังการฉีดพ่นสารครั้งสุดท้ายโดยใช้เอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียว และเครื่อง GC.....20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1. ระดับปกติของการทำงานของเอนไซม์ของหัวแมลงวันหัวเขียว.....18
2. ความสัมพันธ์ของระดับการทำงานของ เอนไซม์อะเซตทิลเอสเทอเรสกับวันที่เก็บเกี่ยวผักหลังการฉีดพ่นครั้งสุดท้ายในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7.....19
3. ความสัมพันธ์ระดับการตกค้างของคลอร์ไพริฟอส (ppm) กับวันที่เก็บเกี่ยวผักหลังการฉีดพ่นครั้งสุดท้ายในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7.....19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

คลอร์ไพริฟอสเป็นสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตที่ถูกนำเข้ามาใช้ในแปลงปลูกผักเพื่อป้องกันหนอนชนิดต่างๆ ซึ่งใช้ไม่ถูกต้องอาจจะทำให้เกิดการตกค้างในผัก การตกค้างของสารกำจัดแมลงในพืชผักโดยเฉพาะผักที่ใช้เป็นอาหารเป็นปัญหาสำคัญของผู้บริโภคและเกษตรกรผู้ปลูกผัก หากระดับการตกค้างของสารสูงเกินค่า MRL ซึ่งนอกจากทำให้เป็นอัตรายต่อผู้บริโภคแล้วยังมีผลต่อการส่งออกด้วย การตรวจวิเคราะห์สารตกค้างในพืชโดยใช้วิธี GC หรือ HPLC จะใช้เวลานานทำให้ทราบผลช้า จึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ทางชีวเคมีแบบรวดเร็ว(rapid biochemical test)โดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพงแต่ได้ผลดีเมื่อเทียบกับวิธี GC และ HPLC ซึ่งวัตถุประสงค์หลักของการตรวจวิเคราะห์โดยทางชีวเคมี คือมีความรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์ ความสะดวก และการประหยัดค่าใช้จ่าย การตรวจวิเคราะห์ระดับการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน โดยเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากแมลงวันหรือหัวผึ้ง สามารถถูกยับยั้งได้โดยสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถเตรียมขึ้นมาได้เองจากหัวแมลงวันหรือหัวผึ้ง และสามารถนำไปพัฒนาใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตได้

วิธีการวิเคราะห์สารที่สามารถยับยั้งการทำงานของ AChE ด้วยเอนไซม์ AChE เป็นการตรวจสอบเบื้องต้น (screen test) โดยที่การตรวจสอบที่ให้ผลเป็นบวก (positive) อาจนำมาตรวจวิเคราะห์ยืนยันผลด้วยด้วยวิธี GC หรือ HPLC การศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อหาแหล่งเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่สามารถนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์สารออร์กาโนฟอสเฟต เช่น คลอร์ไพริฟอสซึ่งสารกำจัดแมลงที่เกษตรกรใช้กันอย่างแพร่หลาย เพื่อจะใช้เป็นแนวทางในการทดสอบระดับการตกค้างของคลอร์ไพริฟอสในพืชผักเบื้องต้นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียวในการตรวจวิเคราะห์คลอร์ไพริฟอสที่ตกค้างในผักกวางตุ้ง
2. เพื่อเปรียบเทียบวิธีการตรวจวิเคราะห์คลอร์ไพริฟอสโดยใช้เอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

แมลงวันหัวเขียว (Blow Fly: *Calliphor erythrocephala* Meigen; Order Diptera: Family Calliphoridae)

แมลงวันหัวเขียวเป็นแมลงวันที่พบได้ทั่วไป ทั้งตามบ้านเรือนหรือคอกสัตว์ (มยุรา, 2539) แมลงวันในอันดับนี้จะพบได้ทุกพื้นที่ของโลกพบทั้งที่เป็น ตัวห้ำ ตัวเบียน และปรสิต แต่ส่วนใหญ่แล้วจะเป็นพวกที่กินซากพืช ซากสัตว์ หรือสิ่งเน่าเปื่อยเป็นอาหาร ไม่ทำความเสียหายให้กับพืช ยกเว้นแต่พืชอาจเกิดแผลจากการวางไข่ของแมลงวัน หนอนแมลงวันจะอาศัยในที่ชื้นหรือชื้นแฉะ บางชนิดก็เป็นปรสิตภายในตัวสัตว์ บางชนิดเจาะกินใบพืชทำให้เกิดปม (ดุษฎี, 2545) บางชนิดดูดน้ำหวานจากดอกไม้ น้ำคั้นจากพืชหรือดูดเลือดจากสัตว์เป็นอาหาร (Borror *et al.*, 1994) หนอนแมลงวันจะเป็นพวกที่ย่อยอินทรียสารให้มีขนาดเล็กลงหรือไม่ก็เป็นอาหารของสัตว์อื่น หนอนของแมลงในอันดับนี้มีความสำคัญทางการแพทย์ เป็นตัวพาหะนำโรคที่เกิดกับมนุษย์และสัตว์เลี้ยงหลายโรคด้วยกัน เช่น โรคทางเดินอาหาร โรคอหิวาตกโรค เป็นต้น(ดุษฎี, 2545)

แมลงวันหัวเขียวจัดเป็นแมลงวันที่มีขนาดใกล้เคียงกับแมลงวันบ้านหรือมีขนาดใหญ่กว่า ส่วนอกมีสีเป็นสีน้ำเงินหรือสีเขียวมันสะท้อนแสง (พิไล, 2535) ตารวมทั้งสองข้างเป็นสีแดง หนวดมีเส้นขนอริสตาเป็นแบบฟูขนนก (plumose) ส่วนบริเวณของ post scutellum มีลักษณะไม่โป่งนูน บริเวณอกจะพบเส้นขนแข็ง 2 เส้น ส่วนปีกบริเวณ R5 cell ตรงส่วนปลายจะแคบลงที่ปลายปีก ปากเป็นแบบซับดูด (sponging type) ส่วนปลายสุดจะเป็นรูพรุนมีลักษณะคล้ายฟองน้ำ โดยริมฝีปากล่างดัดแปลงเป็นงวง (proboscis) (มยุรา, 2539) แมลงวันหัวเขียวมีขั้นตอนการเจริญเติบโตแบบสมบูรณ์ คือมีระยะไข่ ระยะหนอน ระยะดักแด้ และตัวเต็มวัย เพศเมียจะวางไข่ตามซากสัตว์หรือมูลสัตว์แล้วจะฟักเป็นตัวหนอนภายใน 6-48 ชั่วโมง ซึ่งขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมในขณะนั้น มีการลอกคราบ 3 ครั้ง ใช้เวลา 3-9 วัน หนอนจะมีลำตัวสีเทาหรือสีเหลืองอ่อน ส่วนตอนหน้าของตัวอ่อนจะพบ oral hook 1 คู่ และส่วนปลายท้องของลำตัวจะพบ stigmatic plate ซึ่งมีลักษณะกว้างและแบน ตัวหนอนจะอาศัยอยู่ในซากเน่าของสัตว์หรือมูลสัตว์ บางชนิดจะอาศัยอยู่บนเนื้อเยื่อที่เน่าเปื่อยของสัตว์หรือแผลที่เป็นหนองของมนุษย์ ตัวหนอนมี 3 วัย เมื่อหนอนเจริญเติบโตเต็มที่ถึงวัยที่ 3 ตัวหนอนจะมีความยาวประมาณ 10-14 มิลลิเมตร หนอนจะฝังตัวอยู่ในพื้นดินเพื่อเข้าระยะดักแด้ หนอนเข้าดักแด้ประมาณ 3-7 วัน แล้วออกจากดินกลายเป็นตัวเต็มวัย ช่วงระยะเวลาจากไข่จนเป็นตัวเต็มวัยกินเวลา 16-35 วัน ตัวเต็มวัยมีช่วงอายุประมาณ 1 เดือนหรือมากกว่านี้ และไปทำการผสมพันธุ์เพื่อขยายพันธุ์ต่อไป (อาคม, 2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์โคลินเอสเทอเรส

เอนไซม์โคลินเอสเทอเรสพบในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของสัตว์ รวมทั้งพบในอวัยวะที่ทำให้เกิดไฟฟ้าของปลา เม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เนื้อเยื่อสมองของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและแมลง การค้นพบโครงสร้างทางเคมีของเอนไซม์โคลินเอสเทอเรสนี้มีมานาน ด้วยความก้าวหน้าในการศึกษาด้านชีวโมเลกุลและชีวเคมี ทำให้ทราบว่าโดยทั่วไปเอนไซม์โคลินเอสเทอเรสแบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ ชนิดที่ 1 อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส (acetylcholinesterase, AChE) มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการสื่อสัญญาณประสาทบริเวณปลายประสาทที่เรียกว่า cholinergic synapse และชนิดที่ 2 บิวทัยริลโคลินเอสเทอเรส (butyrylcholinesterase, BChE) ซึ่งรู้จักในชื่ออื่นๆอีกว่า serum cholinesterase, pseudocholinesterase แต่ยังไม่รู้หน้าที่ของเอนไซม์ชนิดนี้

ทั้งเอ็นไซม์ AChE และ BChE พบในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังโดยเฉพาะ AChE สามารถสกัดออกมาได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก ปลา สัตว์เลื้อยคลานและแมลง เอ็นไซม์ทั้ง 2 ชนิด จะทำให้เกิดปฏิกิริยา hydrolyze ทำให้ acetylcholine แตกตัวเป็น acetic acid และ choline รวมทั้งถูกยับยั้งการทำงานได้โดยสารออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต โดยทั่วไปคำว่าโคลินเอสเทอเรส (cholinesterase, ChE) มีความหมายรวมทั้ง AChE และ BChE (วิภา, 2541)

หน้าที่ของเอนไซม์โคลินเอสเทอเรส

เอนไซม์โคลินเอสเทอเรสมีบทบาทในกระบวนการสื่อสัญญาณประสาทชนิด cholinergic transmission ณ บริเวณที่เรียกว่า synapse หรือ cholinergic juction ซึ่งเป็นบริเวณถ่ายทอดสัญญาณจากเซลล์ประสาทหนึ่งไปสู่อีกเซลล์หนึ่ง เริ่มต้นจากสัญญาณประสาทถูกถ่ายทอดส่งมาถึงเซลล์ประสาทชนิด parasympathetic บริเวณ nerve ending ซึ่งมีสาร acetylcholine (ACh) ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีหน้าที่สื่อสัญญาณประสาทสะสมอยู่ในถุง (vesicles) acetylcholine จะถูกหลั่งมาจากบริเวณ presynapse ภายในเวลา 2-3 msec สู่บริเวณ synapse ของเซลล์ประสาท สาร ACh จะเข้าไปจับกับ ACh receptor ที่อยู่ใน postsynaptic membrane ของเซลล์ประสาทตัวถัดไปจะมีผลให้ ion channel เปิด ทำให้การไหลของประจุบวกเข้าสู่เซลล์และเกิด depolarization ที่บริเวณ membrane เซลล์ประสาทตัวที่รับ ACh มาแล้วก็จะกระตุ้นให้กล้ามเนื้อบริเวณนั้นทำงาน โดยทั่วไปเอนไซม์โคลินเอสเทอเรสมีหน้าที่ควบคุมการทำงานของกระบวนการสื่อสัญญาณประสาท ด้วยการลดปริมาณความเข้มข้นของ ACh ที่บริเวณรอยต่อของเซลล์ประสาท โดยการเร่งปฏิกิริยา hydrolysis ทำให้ ACh เกิดเป็น choline และ acetic acid แล้วการถ่ายทอดสัญญาณประสาทจะหยุดและการทำงานของกล้ามเนื้อบริเวณนั้นสิ้นสุดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อใดที่เอนไซม์โคลินเอสเทอเรสถูกจับเกาะโดยสารพิษออร์กาโนฟอสเฟต จะทำให้กระบวนการ hydrolyze ACh ถูกยับยั้ง ทำให้ ACh สะสมมากขึ้น มีผลทำให้มีการกระตุ้นเซลล์ประสาทหรือกล้ามเนื้อบริเวณนั้นให้ทำงานอย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดความเหนื่อยล้า มีอาการชักกระตุกต่อเนื่องอย่างรุนแรงเป็นอัมพาตและตายในที่สุด(ลักขณา, 2544)

กลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลินเอสเทอเรสโดยสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต

สารออร์กาโนฟอสเฟตถูกค้นพบครั้งแรกในประเทศเยอรมันโดย Gerhard Schrader และผู้ร่วมงาน ระหว่างปี ค.ศ. 1930-1940 และใช้เป็นสารกำจัดแมลง เมื่อปลายสงครามโลกครั้งที่ 2 ต่อมามีการใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลินเอสเทอเรสโดยสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ได้มีการอธิบายถึงกลไกการยับยั้งไว้มากมาย ถึงแม้ว่าไม่ชัดเจน แต่มีหลักฐานที่เชื่อถือได้คือ สารออร์กาโนฟอสเฟตสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยทำปฏิกิริยากับ serine ที่บริเวณ catalytic center แล้วทำให้เกิดสารที่เรียกว่า phosphoserine

ความรุนแรงของออร์กาโนฟอสเฟตที่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลินเอสเทอเรสขึ้นอยู่กับการเกิดปฏิกิริยา phosphorylation และเรียกเอนไซม์ที่เปลี่ยนรูปไปแล้วว่า phosphorylated enzyme เมื่อโคลินเอสเทอเรสไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ สาร acetlycholine ก็จะไม่ถูก hydrolyze ทำให้เกิดการสะสมของ acetylcholine ที่รอยต่อของเซลล์ประสาท ในช่วงเวลาที่เอนไซม์โคลินเอสเทอเรสถูกเปลี่ยนสภาพให้ทำงานไม่ได้อย่างโดยสารออร์กาโนฟอสเฟต เป็นสภาวะที่เรียกว่าเกิด aging reaction สภาวะการที่เรียกว่า "non-aged" เป็นสภาวะที่เมื่อเอนไซม์ถูก phosphorylated ไปแล้ว เอนไซม์สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้เร็ว

สภาวะที่โคลินเอสเทอเรสไม่สามารถทำงานได้ตามปกติเมื่อถูก phosphorylated ไปนั้นจะไม่เกิดอย่างถาวร เมื่อ phosphorylated enzyme จะถูก hydrolyze จะทำให้ได้โคลินเอสเทอเรสกลับคืนสู่สภาวะปกติและพร้อมที่จะทำงานได้เหมือนเดิม ทั้งนี้การให้สาร pyridine-2-aldoxime methiodide (2-PAM) จะช่วยเร่งให้เอนไซม์นี้กลับคืนสู่สภาพปกติเร็วขึ้น(วิภา, 2541)

คลอร์ไพริฟอส

คลอร์ไพริฟอสเป็นสารกำจัดแมลง (insecticide) ประเภท phosphorothionates กลุ่ม organophosphates ประกอบด้วยส่วนที่เป็น P=S ในโมเลกุล คลอร์ไพริฟอสเป็น phosphoric acid มีชื่อทางเคมีว่า O,O-diethyl-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate มีสูตรเคมี คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ มีน้ำหนักโมเลกุล 221.3 และมีจุดหลอมเหลวระหว่าง 119-121°C เป็นสารที่มีพิษปานกลางโดยมีค่า LD_{50} (acute for rat) 135-163 mg/kg มีค่า ADI (JMPR) 0.01 mg/kg (FAO/WTO, 2002) สารนี้มีความเป็นพิษอยู่ในระดับ II คลอร์ไพริฟอสเป็นสารกำจัดแมลงประเภทสัมผัสตาย กำจัดแมลงได้หลายชนิดได้แก่ Order Orthoptera, Diptera, Homoptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera และ Hemiptera นอกจากนี้ยังใช้กำจัดแมงมุม ปลวก และเหาได้อีกด้วย คลอร์ไพริฟอสไม่เป็นสารดูดซึม (nonsystemic) คือ ไม่สามารถซึมผ่านรากและเคลื่อนย้ายสู่เนื้อเยื่อของพืช เมื่อสลายตัวจะได้อนุพันธ์ที่สำคัญ 2 ชนิด 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) ซึ่งในสภาวะอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิห้องจะเป็นของแข็ง โดยมีจุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 174-175°C และสารอนุพันธ์อีกตัวหนึ่งคือ 3,5,6-trichloro-2-methoxypyridine (TMP) ซึ่งไม่สามารถหาจุดหลอมเหลวได้

ถึงแม้จะมีปัจจัยมากมายในสิ่งแวดล้อมที่เป็นตัวกำหนดการสลายตัวหรือการเคลื่อนย้ายของ คลอร์ไพริฟอส แต่ความคงทนและปริมาณสารพิษตกค้างที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมจะขึ้นอยู่กับสมบัติทางกายภาพและเคมีเป็นส่วนใหญ่ สมบัติดังกล่าวได้แก่

1. ลักษณะทางกายภาพ (physical state)

คลอร์ไพริฟอสเป็นสารที่สามารถระเหยในระดับปานกลางโดยมีความดันไออยู่ระหว่าง 108×10^{-5} – 2.0×10^{-5} mmHg ที่ 25°C อัตราการระเหยของ คลอร์ไพริฟอสจะขึ้นอยู่กับวัตถุที่คลอร์ไพริฟอสจับอยู่ และกระบวนการแยกส่วน (partition) ที่เกิดขึ้น

2. ความสามารถในการละลาย (solubility)

สมบัติในการละลายของคลอร์ไพริฟอส จะขึ้นอยู่กับลักษณะการมีขั้วการมีขั้ว (polarity) ของโมเลกุลซึ่งจะเป็น nonpolar มาก จึงละลายใน organic solvent ได้ดีและละลายน้ำได้น้อย ความสามารถในการละลายของคลอร์ไพริฟอสอยู่ในช่วง 0.94-2.0 μg/ml เมื่ออุณภูมิสูงขึ้นจะละลายได้มากขึ้น และจากการที่คลอร์ไพริฟอสเป็นสาร nonpolar จึงมักจะแพร่กระจาย (diffusion) ไปสู่ organic phase ที่มีอยู่ในธรรมชาติ TMP ซึ่งเป็น metabolite ชนิดหนึ่งของคลอร์ไพริฟอสค่อนจะข้างเป็น nonpolar เหมือนกับ TCP ในรูปที่เป็นกลางซึ่งจะเป็น nonpolar ส่วน TCP ในรูป ionic จะมีความเป็น polar มากกว่า จึงละลายใน organic solvent ได้น้อยกว่าคลอร์ไพริฟอส และ TMP การย้ายของคลอร์ไพริฟอสจะอาศัยน้ำและอากาศเป็นตัวนำพาไป

3. การระเหย (vaporization)

ส่วนใหญ่แล้วอัตราการสลายตัวของคลอร์ไพริฟอสจากผิวใบ เกิดจากการระเหยจากผิวใบภายในเวลา 48 ชั่วโมง และสามารถระเหยไปจากใบไปได้ถึง 79.3% และพบว่าเมื่ออุณภูมิยิ่งสูงก็จะทำให้การระเหยจากใบมีมากยิ่งขึ้น

4. การเปลี่ยนรูป (transformation)

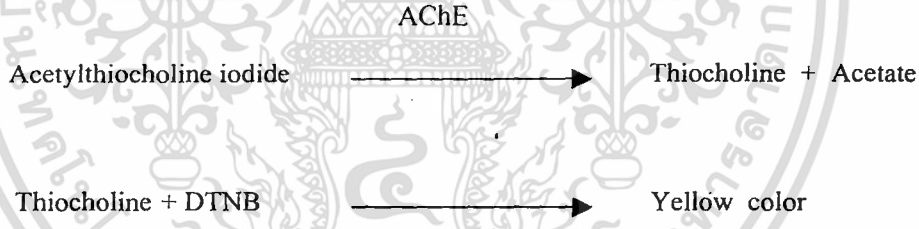
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเปลี่ยนรูปหรือการสลายตัวของคลอร์ไพริฟอสในสิ่งแวดล้อมขึ้นอยู่กับการปนเปื้อนของคลอร์ไพริฟอสกับวัตถุใดในสิ่งแวดล้อม การสลายตัวที่เกิดขึ้นในพืชและสัตว์จะเกิดจากการสลายตัวของส่วนที่เป็น phosphorous ester ทำให้เกิดอนุพันธ์ TCP ทั้งนี้การสลายตัวของคลอร์ไพริฟอสโดยจุลินทรีย์เกิดขึ้นน้อย

การตรวจวิเคราะห์สารออร์กาโนฟอสเฟต

สารออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) เป็นสารกำจัดแมลงที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง สารกลุ่มนี้ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase หรือ AChE) ในระบบประสาทของแมลง แล้วก่อให้เกิดพิษต่อแมลง รวมทั้งสามารถก่อให้เกิดพิษต่อระบบประสาทของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ด้วย จึงเรียกสารกลุ่มนี้ว่าเป็น AChE inhibitor insecticides หรือสารกำจัดแมลงที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส (ไมตรี, 2544)

จากสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ดังกล่าวจึงได้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ สารในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตโดยใช้เอนไซม์ AChE โดยอาศัยหลักการของ Ellman' test ตามปฏิกิริยาดังนี้ (Ellman *et al.*, 1961)



ในสภาวะที่ปราศจากสารออร์กาโนฟอสเฟต เอนไซม์ AChE จะทำปฏิกิริยากับสารอะเซตทิลไธโอโคลิน (acetylthiocholine) ซึ่งเป็นสารตั้งต้น (substrate) ของปฏิกิริยาได้เป็นสารไธโอโคลิน(thiocholine) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ DTNB [5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoate) หรือ Ellman's reagent] ได้สารสีเหลืองตามปฏิกิริยาข้างต้น ส่วนในสภาวะที่มีสารออร์กาโนฟอสเฟตจะทำให้เกิดสีเหลืองลดลง โดยสารดังกล่าวจะไปยับยั้งเอนไซม์ AChE ดังนั้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาหรือการเกิดสีเหลือง จึงแปลผกผันกับปริมาณของสารออร์กาโนฟอสเฟตในตัวอย่าง นั่นคือหากตัวอย่างมีปริมาณสารออร์กาโนฟอสเฟตมากสีของสารสะลายจะเจือจางกว่าในตัวอย่างที่มีปริมาณสารออร์กาโนฟอสเฟตน้อย ค่าความเข้มของสีในสารละลายสามารถตรวจวัดได้โดยการวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่องสเปคโตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น (wavelength) 412 หรือ 415 นาโนเมตร (รุ่งฤดี, 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุอุปกรณ์

1. แมลงวันหัวเขียว (*Calliphora erythrocephala*)
2. เครื่อง spectrophotometer แบบ visible
3. เซลล์แก้วบรรจุสารตัวอย่าง (cuvette)
4. เครื่องปั่นน้ำยากระแสวน (vortex mixer)
5. เครื่องปั่นละเอียด(homogenizer)
6. pH meter
7. เครื่องชั่งชนิดละเอียด (4 ตำแหน่ง)
8. เครื่องแก้ว

   -หลอดทดลอง

   -บีกเกอร์ ขนาด 10, 50, 100, 250 และ 1000 ml

   -Volumetric flask ขนาด 10, 50, 100, 250 และ 1000 ml
9. Automatic pipette ขนาด 50, 100, 200 และ 1000 µl
10. glass wool
11. เครื่องปั่น
12. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (gas chromatography)

สารเคมี

1. สาร 5, 5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)

   -เตรียม DTNB reagent โดยละลายสาร 5, 5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid 39.62 mg ใน buffer phosphate 0.1 mol; pH 7 จำนวน 9 ml หลังจากนั้นเติม sodium bicarbonate 15 mg และ triton-X 100 จำนวน 1 ml
2. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)
3. สารละลาย buffer phosphate (pH 8.0, 0.1 M)

   -เตรียมจากส่วนผสมของ Na_2HPO_4 0.05 M และ KH_2PO_4 0.01M ในอัตราส่วน 4:1
4. สารละลาย Acetylthiocholine iodide 0.075 M (ATChI)

   -เตรียมโดยละลาย Acetylthiocholine iodide 0.2169 g ในน้ำกลั่น 10 ml
5. 5% MeOH in water
6. สารละลาย dichloromethane
7. 1% bromine in water

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. สารละลายมาตรฐาน chlorpyrifos
9. Acetone
10. น้ำกลั่น
11. ethyl acetate
12. sodium sulfate ที่ผ่านการอบที่ 200°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

19935

วิธีการทดลอง

1. การหาปริมาณโปรตีนในหัวแมลงวันหัวเขียว

วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Gerhardt ตามวิธีของศรีสกุล (2543) ซึ่งภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในหัวของแมลงวันหัวเขียวให้

2. การหาประสิทธิภาพของเอนไซม์จากหัวแมลงหัวเขียว

2.1 การตรวจวิเคราะห์ระดับปกติของเอนไซม์ (enzyme activity) ในหัวแมลงวันหัวเขียว

การศึกษาระดับปกติของเอนไซม์ในหัวแมลงวันหัวเขียว จะบอกถึงระดับการทำงานของเอนไซม์ต่อหัวของแมลงวันหัวเขียว 1 หัว มีหน่วยเป็น mUnit/g (protein) ใช้วิธีตามหลักการของ Ellman's reaction (Ellman *et al.*1961) มีขั้นตอนดังนี้

1) นำหัวแมลงวันหัวเขียวปั่นในสารละลาย buffer phosphate(pH 8.0, 0.1 M) ในอัตราส่วนเนื้อเยื่อ 20 mg ต่อ buffer phosphate 1 ml โดยใช้เครื่อง homogenizer
2) ดูดสารละลายที่ได้จากข้อ 1 จำนวน 200 µl เติมในสารละลายที่มี buffer phosphate (pH 8.0, 0.1 M) 1.3 ml เติมสารละลาย DTNB 0.01 M 50 µl และสารละลาย ATChI 0.075 M 10 µl ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer
3) วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer แบบ visible ที่ความยาว คลื่น 412 nm บันทึกค่าดูดกลืนแสงทุกๆ 30วินาที ภายในเวลา 180 วินาที หาค่าเฉลี่ยความแตกต่างเพื่อคำนวณความแตกต่าง ตามสม่การของ Ellman *et al.* (1961) จะได้ค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ AChE มีหน่วยเป็น mUnit/g (protein)

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

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

เมื่อ Δ A: ค่า absorbance ที่เปลี่ยนแปลงไปต่อนาที

P: ปริมาณโปรตีนในหัวแมลงวันหัวเขียว

2.2 การตรวจวิเคราะห์ระดับการทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ (% enzyme remainning) หลังการทำปฏิกิริยากับสารกำจัดแมลง

ใช้ spectrophotometric method โดยตรวจวิเคราะห์ระดับการทำงานของเอนไซม์ ด้วย เครื่อง spectrophotometer ตามวิธีของ Ellman *et al.* (1961) และ Frank and Nick (2001) ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ เจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1) ดูดสารละลายคลอร์ไพริฟอส ที่ละลายใน dichloromethaneในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันจำนวน 2 ml ใส่ในหลอดทดลอง
2) เติม 5% MeOH in water จำนวน 2 ml
3) ใช้อากาศเป่าไล่ dichloromethaneให้หมด
4) ใส่ 1% bromine in water 100 µl เขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที
5) ใช้อากาศเป่าไล่ bromineที่เหลืออยู่ให้หมด จะได้เป็นสารสกัดตัวอย่างผัก
6) ดูดสารสกัดตัวอย่างจำนวน 250 µl ลงในทดลองที่มี buffer phosphate (pH8.0, 0.1 M) 2.6 ml (3 หลอด) (อุณหภูมิ 0°C)
7) เติมสารละลายที่ได้จากหัวแมลงวันหัวเขียว 400 µl (0.014 Unit)จากข้อ 1 ในหัวข้อ 2.1 เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที (อุณหภูมิ 0°C)
8) เติม DTNB 0.01 M 100 µl และ ATChI 0.075 M 20 µl เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที (อุณหภูมิ 25° C)
9) วัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotomete ที่ความยาว คลื่น412 nm
10) คำนวณเปอร์เซ็นต์ระดับการทำงานของเอนไซม์ที่คงเหลือ (% enzyme activity remainning) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control ไม่มีสารกำจัดแมลง แต่มี 5% MeOH)

3. การหาขอบเขตความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์ (method validation)

การตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสในหัวแมลงวันหัวเขียวสามารถตรวจสอบได้ในเบื้องต้นเท่านั้น ซึ่งการตรวจวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพจำเป็นต้องทราบความไว (sensivity) ของวิธีการตรวจวิเคราะห์โดยการตรวจสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของคลอร์ไพริฟอสที่สามารถใช้เอนไซม์ตรวจสอบได้ดำเนินการดังนี้

1) หาค่าเบี่ยงเบนของ %Enzyme activity remaining ของกลุ่มควบคุม(control; ไม่มีสารกำแมลง แต่มี 5%MeOH)จากจำนวน 50 ตัวอย่าง
2) กำหนดค่า % inhibition ในช่วงค่าเบี่ยงเบนเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมเท่ากับ 3SD เทียบกับ blank (กลุ่มที่ไม่มีทั้งสารกำจัดแมลง และ 5%MeOH)
3) กำหนดให้ตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์น้อยกว่า 3SD (11%) ให้ผลเป็นลบ(negative)และตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มากกว่า 3SD (11%) ให้ผลเป็นบวก (positive)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การตรวจวิเคราะห์ระดับการตกค้างของคลอร์ไพริฟอสในผักกวางตุ้งโดยใช้เอนไซม์ จากหัวแมลงวันหัวเขียวและวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟี

ทำการทดลองโดยปลูกผักกวางตุ้งในแปลงทดลองขนาด 1.5×4.5 เมตร จำนวน 3 แปลง แปลงที่ 1 เป็นแปลงควบคุม (ไม่ฉีดพ่นคลอร์ไพริฟอส) แปลงที่ 2 ทำการฉีดพ่นคลอร์ไพริฟอสในอัตราที่แนะนำในฉลาก (20 ml/น้ำ 50 L) แปลงที่ 3 ฉีดพ่นคลอร์ไพริฟอสในอัตราสองเท่าของคำแนะนำในฉลาก (40 ml/น้ำ 50L) เริ่มฉีดพ่นเมื่อผักมีอายุได้ 20 วัน โดยฉีดพ่นสารทุกๆ 7 วัน เมื่อผักมีอายุ 43 วัน สุ่มเก็บผักจำนวน 2 กิโลกรัม จากแปลงทดลองโดยการสุ่มเก็บหลังจากฉีดพ่นสารครั้งสุดท้ายนาน 1 ชั่วโมง มาทำการสกัดสารตกค้าง (วันที่ 0) และหลังจากนั้นสุ่มผักกวางตุ้งจากแต่ละแปลงมาทำการสกัดและตรวจวิเคราะห์อีกในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 หลังจากการฉีดพ่นครั้งสุดท้าย แต่ละกลุ่มทำการทดลอง 6 ซ้ำ ดังนี้

4.1 การตรวจวิเคราะห์โดยใช้เอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวตามวิธีของรุ่งฤดี และคณะ (2545)

- การสกัดคลอร์ไพริฟอสจากตัวอย่างผัก

1) สุ่มผักกวางตุ้งที่สับละเอียดแล้วมา 10 g ใส่ในขวดฝาเกลียวขนาด 30 ml
2) ใส่ dichloromethane 10 ml ปิดฝา เขย่าแรงๆ 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
3) ดูดส่วนที่ใส 2 ml ใส่หลอดทดลอง
4) เติม 5% MeOH in water 2 ml
5) ใช้อากาศเป่าไล่ dichloromethane ให้หมด
6) ใส่ 1%bromine in water 100 µl เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที
7) ใช้อากาศเป่าไล่ bromine ที่เหลือให้หมดจะได้เป็นสารสกัดจากตัวอย่าง

- การวัดระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียว

ใช้วิธีของ Ellman *et al.* (1961) และ Frank and Nick (2001) ดังนี้

1) ใส่สารสกัดจากตัวอย่างผักจำนวน 250 µl ในหลอดทดลองที่มี buffer phosphate (pH 8.0, 0.1M) จำนวน 2.6 ml
2) เติมสารสกัดจากหัวแมลงวัน 400 µl ในหลอดทดลองจากข้อ 1 เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
3) เติม DTNB 0.1 M จำนวน 100 µl และ ATChI 0.075 M จำนวน 20 µl เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer ทิ้งไว้ 30 นาที จะได้สารละลายสีเหลือง
4) นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 412 nm
5) แปลผลโดยเปรียบเทียบระดับการทำงานของเอนไซม์ที่คงเหลือกับกลุ่มควบคุม (control)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การตรวจวิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟี

4.2.1 สกัดสารคลอร์ไพริฟอสจากผักกวางตุ้ง โดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Greeve (1989)

1) สุ่มผักกวางตุ้งที่สับละเอียดแล้วมา 50 g
2) ปั่นรวมกับ ethyl acetate 100 ml และ sodium sulfate ที่ผ่านการอบที่ 200°C นาน 12 ชั่วโมง มา 100 g ในโถปั่น (blender) นาน 3 นาที
3) กรองผ่าน glass wool และ sodium sulfate ใส่ใน erlenmayer flask
4) เติม ethyl acetate 50 ml และ sodium sulfate 50 g ลงไปในส่วนที่เหลือจากการกรอง แล้วปั่นนาน 3 นาที นำไปกรองใส่รวมกับส่วนที่กรองครั้งแรก
5) ทำซ้ำตาม ข้อ 4)
6) นำสารละลายที่กรองได้ไปลดปริมาตรโดยใช้เครื่องลดปริมาตรอุณหภูมิต่ำ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40°C จนเกือบแห้งแล้วปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate ให้ได้ 5 ml เก็บไว้ในขวด vial นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC

4.2.2 การตรวจวิเคราะห์คลอร์ไพริฟอสด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี

ใช้เครื่อง GC ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 14 A ที่มี detectorชนิด Flame Photometic Detector (FPD) ใช้ packing column แก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 mm ความยาว 2.1 m บรรจุด้วย 3% OV-1 on 80/100 support silicon supelcoport ตั้งอุณหภูมิของ column ที่ 200°C injector 250°C Detector 260°C Carrier gas คือ N_2 บริสุทธิ์ 99.99% มีอัตราการไหล 50 ml/นาที H_2 35 ml/นาที อากาศ 100 ml/นาที ฉีดสารสกัดจากตัวอย่างจำนวน 3 µl นำค่าที่ได้จากเครื่องไปคำนวนหาปริมาณคลอร์ไพริฟอสที่ตกค้างในผักกวางตุ้งโดยคำนวนเป็นปริมาณทั้งหมดจากตัวอย่างผัก 50 g

4.3 การหาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ (recovery)

การตรวจสอบสารพิษตกค้างในพืชนอกจากจะขึ้นอยู่กับ sensitivity ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ยังขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพในวิธีการสกัดสารแต่ละชนิดอีกด้วย การหาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ใช้วิธีการของ John(1989) โดยเติมคลอร์ไพริฟอสในขั้นตอนการสกัดสารจากผักในอัตรา 1.0 และ 5.0 เท่าของ MRL (maximum residue limit) ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ตัวอย่างผักที่ใช้เป็นผักในแปลงควบคุม คือไม่ฉีดพ่นสารคลอร์ไพริฟอส มีวิธีการดังนี้

4.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์โดยเอนไซม์

1) สุ่มผักที่สับละเอียดแล้วให้ได้ 10 g ใส่ในขวดฝาเกลียวขนาด 30 ml
2) เติมสารละลายมาตรฐานคลอร์ไพริฟอสที่ละลายใน dichloromethane อัตราความเข้มข้น 1.0 และ 5.0 เท่าของ MRL ค่า MRL ของคลอร์ไพริฟอส = 1 ppm (FAO/WTO, 2002) เขย่าแรงๆ ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) ใส่ dichloromethane 9 ml ปิดฝาเขย่าแรงๆ นาน 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ดูดสารละลายจำนวน 2 ml ใส่หลอดทดลอง
4) เติม 5%MeOH in water 2 ml
5) ใช้อากาศเป่า dichloromethane ให้หมด
6) ใส่ 1%bromine in water 100 µl เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 3 นาที
7) ใช้อากาศเป่าไล่ bromine ที่เหลืออยู่ให้หมดจะได้เป็นสารสกัดจากตัวอย่างผัก (sample extract)
8) นำสารสกัดจากตัวอย่างผักที่ได้ไปตรวจระดับการทำงานของเอนไซม์ที่เหลือตามข้อ 4.1
9) เปรียบเทียบระดับการทำงานของเอนไซม์ที่คงเหลือกับระดับความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอสที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องแกสโครมาโตกราฟฟี

4.3.2 การตรวจวิเคราะห์โดยเครื่อง GC มีขั้นตอนดังนี้

1) สุ่มผักที่สับละเอียดแล้วให้ได้ 50 g
2) เติมสารละลายมาตรฐานคลอร์ไพริฟอสในอัตราความเข้มข้น 1.0 และ 5.0 เท่าของ MRL (ค่า MRL ของคลอร์ไพริฟอสเท่ากับ 1 ppm) เขย่าแรงๆ ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
3) ปั่นรวมกับ ethyl acetate 100 ml และ sodium sulfate (ผ่านการอบที่ 200°C นาน 12 ชั่วโมง) จำนวน 100 g ในโถปั่น (blender) นาน 3 นาที
4) กรองผ่าน glass wool และ sodium sulfate ใส่ใน erlenmayer flask
5) เติม ethyl acetate 50 ml และ sodium sulfate 50 g ลงไปในส่วนที่เหลือจากการกรอง แล้วปั่นนาน 3 นาที นำไปกรองใส่รวมกับส่วนที่กรองครั้งแรก
6) ทำซ้ำตาม ข้อ 5)
7) นำสารละลายที่กรองได้ทั้ง 2 ครั้ง ไปลดปริมาตรโดยใช้เครื่องลดปริมาตรอุณหภูมิต่ำ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40°C จนเกือบแห้งแล้วปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate ให้ได้ 5 ml เก็บไว้ในขวด vial นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC
8) คำนวณ %recovery จากสมการ $Recovery(\%) = (C_1 - C_2) \times 100 / C_3$

เมื่อ

C_1=ความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอสในตัวอย่างผักที่วัดได้จากเครื่อง

C_2=ความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอสในตัวอย่างผักที่ไม่ฉีดพ่นด้วยคลอร์ไพริฟอส (ควรจะเท่ากับ 0)

C_3=ความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอสที่เติมลงไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์โปรตีนในหัวแมลงวันหัวเขียว

ผลการวิเคราะห์โปรตีนพบว่าในหัวแมลงวันหัวเขียวมีโปรตีนเท่ากับ 25.83 ของเนื้อเยื่อทั้งหมด

2. ระดับการทำงานปกติของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสในแมลงวันหัวเขียว

ผลการวิเคราะห์พบว่าระดับการทำงานปกติของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสในหัวแมลงวันหัวเขียวมีค่าเท่ากับ 1,097.8±118.8 มิลลิยูนิต/กรัมโปรตีน (mUnit/g(protein)) หรือ 153.17±0.64 มิลลิยูนิต/หัว (mUnit/head) เปอร์เซ็นต์ระดับการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่มีสารกำจัดแมลงแต่มี 5% เท่ากับ 102.0 ± 3.74 (range 90.6-110.6) (n = 50) (ภาพที่ 1) ทั้งนี้เมื่อระดับความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอสที่ทำให้เอนไซม์ลดลงมากกว่าหรือเท่ากับ 3SD (≥11%) จะแสดงผลเป็นบวก(positive)

3. ระดับการตกค้างของคลอร์ไพริฟอสในผักกวางตุ้ง

3.1 ผลการตรวจวิเคราะห์โดยใช้เอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียว

ผลการตรวจวิเคราะห์ระดับการยับยั้งการทำงานเอนไซม์ของคลอร์ไพริฟอสที่ตกค้างในผักกวางตุ้งในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 หลังจากฉีดพ่นคลอร์ไพริฟอสครั้งสุดท้าย พบว่าสารสกัดจากผักกวางตุ้งในแปลงควบคุมทำให้เปอร์เซ็นต์ระดับการทำงานของเอนไซม์คงเหลือ 81.0±10.0, 91.7±4.6, 105.5±10.2, 102.3±4.7 และ 110.9±7.7 ตามลำดับ แปลงที่ฉีดพ่นคลอร์ไพริฟอสในอัตราคำแนะนำคงเหลือ 3.0±1.0, 16.2±8.2, 45.2±10.2, 44.5±9.6 และ 98.1±11.1 และแปลงที่ฉีดพ่นคลอร์ไพริฟอสในอัตราสองเท่าของคำแนะนำคงเหลือ 1.2±0.6, 8.2±5.1, 42.0±12.3, 38.6±16.8 และ 85.7±8.3 (ตารางที่ 1 และภาพที่ 2)

3.2 ผลการตรวจวิเคราะห์ระดับการตกค้างของคลอร์ไพริฟอสในผักกวางตุ้งด้วยเครื่อง GC

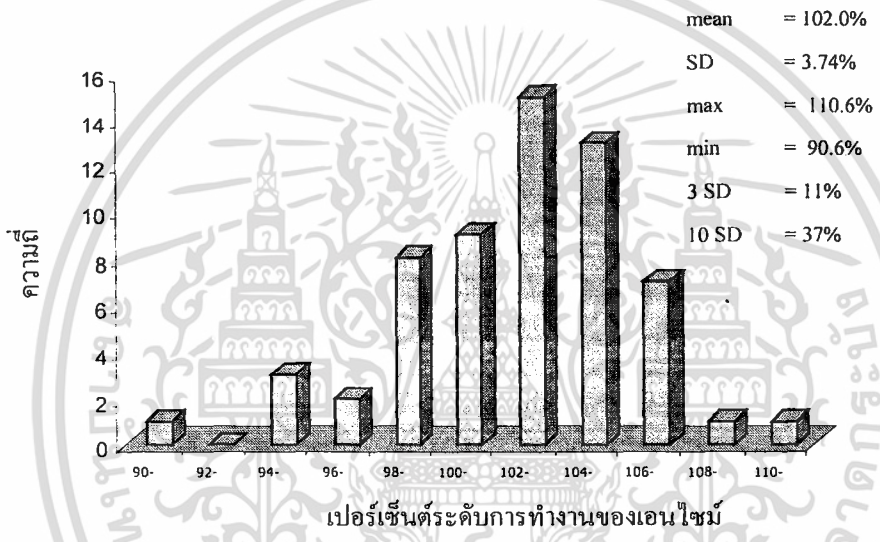
ผลการตรวจวิเคราะห์คลอร์ไพริฟอสที่ตกค้างในผักกวางตุ้งในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 หลังจากฉีดพ่นสารครั้งสุดท้าย โดยใช้เครื่อง GC พบระดับการตกค้างของคลอร์ไพริฟอสขจากแปลงควบคุมเท่ากับ 0.017±0.029, 0.062±0.001, 0.075±0.063, 0.085±0.036 และ 0.008±0.00 พีพีเอ็ม ผักกวางตุ้งจากแปลงที่ฉีดพ่นคลอร์ไพริฟอสในอัตราคำแนะนำเท่ากับ 3.567±0.516, 2.496±0.056, 1.214±0.022, 0.736±0.067 และ 0.323±0.046 พีพีเอ็ม และผักกวางตุ้งจากแปลงที่ฉีดพ่นคลอร์ไพริฟอสในอัตราสองเท่าของคำแนะนำเท่ากับ5.476±1.076, 4.193±0.220, 1.741±0.039, 1.393±0.151 และ 0.581±0.032 พีพีเอ็ม ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

93872

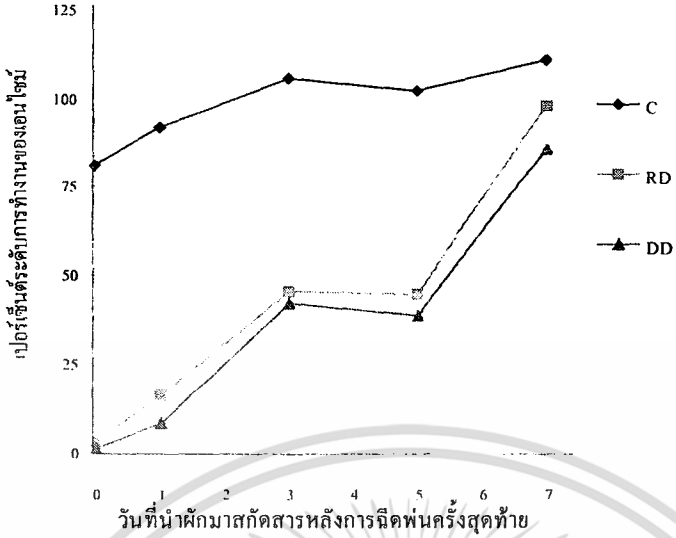
4. การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ (recovery)

ผลการทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์โดยการเติมคลอร์ไพริฟอสในอัตราความเข้มข้น 1.0 และ 5.0 เท่าของ MRL พบว่าการเติมคลอร์ไพริฟอสในอัตรา 1.0 และ 5.0 เท่าของค่า MRL ทำให้เปอร์เซ็นต์ระดับการทำงานของเอนไซม์ลดลง 100% และค่าของการวิเคราะห์โดยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟี %recovery มีค่าเท่ากับ 110.4 และ 92.5% ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ในช่วง 80-110% ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ จึงถือว่าผลการตรวจวิเคราะห์นี้เชื่อถือได้

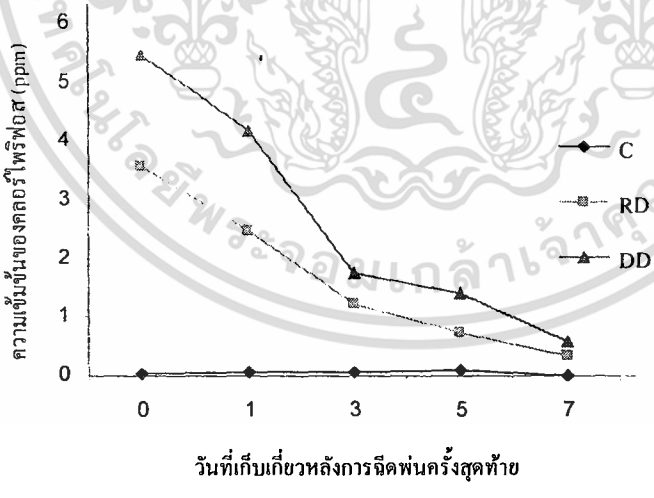


ภาพที่ 1 เปอร์เซ็นระดับการทำงานของเอนไซม์ในหัวแมลงวันหัวเขียวที่ไม่มีสารกำจัด แมลง แต่มี 5%MeOH (n=50)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสกับวันที่นำผักมาสกัดสารในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 หลังการฉีดพ่นครั้งสุดท้าย



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระดับการตกค้างของคลอร์ไพริฟอส(ppm) กับวันที่เก็บเกี่ยวผักหลังการฉีดพ่นครั้งสุดท้าย ณ วันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ระดับการตกค้างของคลอร์ไพริฟอสในผักกวางตุ้งในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 โดย วิธีการใช้เอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียว และการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC

วันที่ตรวจวิเคราะห์	การฉีดพ่นสาร	วิธีการวิเคราะห์	
		เอนไซม์จากหัวแมลงวัน	GC
0	C	81.0 ± 10.0 P	0.02 ± 0.03
	RD	3.0 ± 1.0 P	3.57 ± 0.52
	DD	1.2 ± 0.6 P	5.48 ± 1.08
1	C	91.7 ± 4.6 N	0.06 ± 0.00
	RD	16.2 ± 8.2 P	2.47 ± 0.06
	DD	8.2 ± 5.1 P	4.19 ± 0.22
3	C	105.7 ± 10.2 N	0.07 ± 0.06
	RD	45.2 ± 10.2 P	1.21 ± 0.02
	DD	42.0 ± 12.3 P	1.74 ± 0.04
5	C	102.3 ± 4.7 N	0.08 ± 0.04
	RD	44.5 ± 9.6 P	0.74 ± 0.07
	DD	38.6 ± 16.8 P	1.39 ± 0.15
7	C	110.9 ± 7.7 N	0.01±0.00
	RD	98.1 ± 11.1 N	0.32 ± 0.05
	DD	85.7 ± 8.3 P	0.58 ± 0.03

C: แปลงควบคุม RD: ฉีดพ่นสารตามอัตราแนะนำ DD: ฉีดพ่นสารในอัตราสองเท่าของคำแนะนำ

N: ผลเป็นลบ (negative) ระดับการทำงานของเอนไซม์มากกว่า 89%

P: ผลเป็นบวก (positive) ระดับการทำงานของเอนไซม์น้อยกว่าหรือเท่ากับ 89%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการวิเคราะห์ระดับการตกค้างของคลอร์ไพริฟอสในผักกวางตุ้งโดยใช้เอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียวและเครื่อง GC ในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 หลังการฉีดพ่นครั้งสุดท้าย พบว่าการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีแสดงผลที่สอดคล้องกัน คือเปอร์เซ็นต์ระดับการทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอสในผักกวางตุ้งลดลงซึ่งผลการวิเคราะห์ให้ผลที่ตรงกับจรงค์ศักดิ์(2546) แต่ผักกวางตุ้งที่นำมาวิเคราะห์โดยใช้เอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียวในวันที่ 5 ของแปลงที่ฉีดพ่นคลอร์ไพริฟอสในอัตราคำแนะนำบนฉลากไม่สอดคล้องกับผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ในวันที่ 3 แล้วผลการวิเคราะห์ในวันที่ 5 น่าจะผิดพลาดเพราะตามหลักการเปอร์เซ็นต์ระดับการทำงานของเอนไซม์ในวันที่ 5 ควรสูงกว่าวันที่ 3 แต่ผลการวิเคราะห์กลับต่ำกว่า และผลการตรวจวิเคราะห์ในวันที่ 7 เปอร์เซ็นต์ระดับการทำงานของเอนไซม์สูงกว่าวันที่ 3 มาก แสดงว่าผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ระดับการทำงานของเอนไซม์ในวันที่ 5 ผิดพลาด ซึ่งอาจเป็นการผิดพลาดของผู้ทำการทดลอง ในทำนองเดียวกันผักกวางตุ้งจากแปลงควบคุมที่นำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC ในวันที่ 1, 3 และ 5 พบว่าระดับความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอสสูงกว่าวันที่ 0 ซึ่งอาจมีผลมาจากการสุ่มเก็บตัวอย่างผักจากแปลงควบคุม คืออาจสุ่มได้ต้นที่มีความปนเปื้อนของสารสูง หรืออาจเนื่องจากความผิดพลาดจากการสกัดสารและการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องแกสโครมาโตกราฟฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

ผลจากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการวิเคราะห์ระดับการตกค้างของสารกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอส โดยใช้เอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียว มีประสิทธิภาพดี รวดเร็ว ประหยัด มีความไวค่อนข้างดี และระดับต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) ด้วยเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียวมีค่า 0.04 พีพีบี ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ) มีค่า 0.13 พีพีบี ผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ และมี เปอร์เซ็นต์ recovery อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ เป็นการยืนยันว่าผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียวเชื่อถือได้ และสามารถนำมาใช้เป็นการตรวจวิเคราะห์คลอร์ไพริฟอสในเบื้องต้นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จรงค์ศักดิ์ พุมนวน. 2546. การตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตอย่างรวดเร็ว โดยใช้เอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวผึ้งพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขากีฏวิทยาและสิ่งแวดล้อม, ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

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

ไมตรี ศรีโพนทอง. 2544. ระดับการทำงานของอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสในผึ้งพันธุ์. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พิไล พูลสวัสดิ์. 2535. แมลงและสัตว์ขาปล้องที่สำคัญทางการแพทย์. บริษัท ที.พี.พริ้นท์. กรุงเทพฯ. 144หน้า.

มยุรา สุนย์วีระ. 2539. กีฏวิทยาเบื้องต้น. คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 117 หน้า.

มยุรา สุนย์วีระ. 2539. กีฏวิทยาเบื้องต้นภาคปฏิบัติ. คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 318 หน้า.

รุ่งฤดี มีสมบูรณ์. 2544. ในความรู้พื้นฐานการวิเคราะห์คุณภาพและสารพิษตกค้างของวัตถุมีพิษการเกษตร. เอกสารวิชาการประกอบคำบรรยายในการพัฒนาอบรมเจ้าหน้าที่สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1-8 ครั้งที่ 1. กองวัตถุมีพิษการเกษตร กรมวิชาการ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. หน้า (12-1)-(12-8).

รุ่งฤดี มีสมบูรณ์. 2545. "การวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเอนไซม์ (enzymatic method)". หน้า 121-128 ในความรู้พื้นฐานการวิเคราะห์คุณภาพและสารพิษตกค้างของวัตถุมีพิษทางเกษตร. การอบรมเจ้าหน้าที่สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1-8 ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: กองวัตถุมีพิษทางการเกษตร กรมวิชาการ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

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

วิภา ตั้งนิพนธ์. 2541. ความเป็นพิษของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมต. ข่าวสารวัตถุมีพิษ. 25(3) 1 113-123.

ศรีสกุล วรจันทรา. 2543. บทปฏิบัติการโภชนาการศาสตร์. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้