ใบรับรองปัญหาพิเศษ
ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
ปริญญาตรี
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

เรื่อง

ประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสในหัวแมลงวันหัวเขียวและหัวผึ้งพันธุ์ของคลอร์ไพริฟอส

Efficiency of Chlorpyrifos on Inhibition of Acetylcholinesterase in Blow Fly Head and Honeybee Head

โดย

นายประวัติ หมายดี

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

.....

(รศ.ลักขณา อมรสิน)
อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(รศ.ดร. วรเดช จันทรสร)
หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
วันที่ 21 เดือน ตุลาคม พ.ศ.2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

เรื่อง : ประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสในหัวแมลงวันหัวเขียวและหัวผึ้งพันธุ์ของคลอร์ไพริฟอส

โดย : นายประวัติ หมายดี

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

สาขาวิชา : เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

อาจารย์ที่ปรึกษา : ..... 21/ ๓๐ /2547

(รศ.ลักขณา อมรสิน)

ประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสของคลอร์ไพริฟอสทำการทดลองกับหัวแมลงวันหัวเขียวตัวเต็มวัยอายุ 2-3 วันและหัวตัวเต็มวัยผึ้งพันธุ์อายุ 7-14 วัน ตรวจวิเคราะห์ตามวิธีการของ Ellman และคณะ (1961) ผลการตรวจวิเคราะห์พบว่าปริมาณต่ำสุดของคลอร์ไพริฟอสที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยกำหนดจากปริมาณที่ทำให้ระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสในหัวแมลงวันหัวเขียวลดลง 11% และหัวผึ้งพันธุ์ลดลง 12% คือ 0.04 และ 6.44 พีพีบี ตามลำดับ ความเข้มข้นต่ำสุดของคลอร์ไพริฟอสที่สามารถวิเคราะห์ได้จากตัวอย่างโดยกำหนดจากปริมาณที่ทำให้การทำงานของเอนไซม์ในหัวแมลงวันหัวเขียวลดลง 37% และหัวผึ้งพันธุ์ลดลง 39% มีค่าเท่ากับ 0.13 และ 14.33 พีพีบี ตามลำดับ และพบว่าเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียวมีความไวในการตรวจวิเคราะห์คลอร์ไพริฟอสดีกว่าเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวผึ้งพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

Title : Efficiency of chlorpyrifos on inhibition of acetylcholinesterase in Blow fly head and Honeybee head

By : Mr.Prawat Mydee

Degree : Bachelor of Science in Agriculture

Major Field : Plant Pest Management Technology

Advisor : Luckana Amonsin 21 / May / 2004

(Assoc.Prof. Luckana Amonsin)

Efficiency of chlorpyrifos on inhibition of acetylcholinesterase bee head was conducted by using 2-3 days old of blow fly head and 7-14 days old of honeybee head . Analysis by using Ellman *et al.* (1961) method. Limit of detection (LOD) of the analysis from blow fly head and honeybee head which reduced enzyme activity to 11% and 12% were 0.04 and 6.44 ppb, respectively. Limit of quality (LOQ) of the analysis from blow fly head and honeybee head which reduced enzyme activity to 37% and 39% were 0.13 and 14.33 ppb, respectively. The result also showed that blow fly head enzyme was more sensitive than honeybeee head enzyme.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ปัญหาพิเศษปริญญาตรีเป็นบันไดขั้นแรกในการพัฒนากระบวนการคิดแก้ไขปัญหาและการจัดลำดับความคิดของนักศึกษาซึ่งเป็นเรื่องที่จำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนานักศึกษาให้รู้จักคิดเป็นและแก้ไขปัญหาได้ รวมทั้งจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาต่อหรือการทำงานในอนาคต ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รศ.ลักขณา อมรสิน ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้โอกาสในการทำปัญหาพิเศษที่น่าสนใจตลอดจนให้คำปรึกษา ดูแลการทำงานและตรวจแก้ไขรายงานอย่างต่อเนื่องจนสำเร็จด้วยดี

ขอขอบพระคุณพี่ ๆ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโดยเฉพาะพี่จรงค์ศักดิ์ พุมนวน ที่คอยแนะนำให้คำปรึกษาในทุก ๆ ด้าน และเพื่อนๆ ทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกทุกอย่าง ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านเครื่องมืออุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ที่จำเป็นและสถานที่ในการทดลองทำให้การทดลองนี้ประสบความสำเร็จด้วยดี

ประวัติ หมายดี

พฤษภาคม 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.....10
วิธีการ.....12
ผลการทดลอง.....16
วิจารณ์ผลการทดลอง.....22
สรุปผลการทดลอง.....23
เอกสารอ้างอิง.....24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) และปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ในตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ได้ (LOQ) ด้วยเอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวและหัวผึ้งพันธุ์ของคลอร์ไพริฟอส.....21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1. ระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ของหัวแมลงวันหัวเขียวในกลุ่มควบคุม....18
2. ระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ของหัวผึ้งพันธุ์ในกลุ่มควบคุม....18
3. ความสัมพันธ์ของระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของ เอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอส เทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียวกับความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอส....19
4. ความสัมพันธ์ของระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวผึ้งพันธุ์กับความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอส.....19
5. ปริมาณต่ำสุดของคลอร์ไพริฟอสที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยการใช้เอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียว....20
6. ปริมาณต่ำสุดของคลอร์ไพริฟอสที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยการใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์....20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ประเทศไทยมีการใช้สารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืชในปริมาณที่สูง ซึ่งสารเคมีส่วนใหญ่ที่ใช้จะเป็นสารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตเพราะมีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงสูง แต่การใช้สารดังกล่าวจะมีผลเสียตามมาหลายอย่าง เช่น อาจมีการตกค้างในพืชอาหารทำให้เกษตรกรและผู้ที่เกี่ยวข้องได้รับพิษภัยจากสารเคมีดังกล่าวเป็นจำนวนมาก ซึ่งสารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase : AChE) มีผลทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ การตรวจวิเคราะห์หาสารออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตจากพืชอาหารและในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ จึงมีความจำเป็นเพราะผลจากการตรวจวิเคราะห์อาจนำมาแปลผลหาความเสี่ยงอันตรายที่มนุษย์จะได้รับจากการใช้สารดังกล่าว

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์หาสารเคมีโดยทางชีวเคมีแบบรวดเร็ว (Rapid biochemical test) โดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพง แต่ได้ผลดีเมื่อเทียบกับวิธีการวิเคราะห์มาตรฐาน เพื่อนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างอยู่บนพืชผักที่ใช้บริโภค วิธีการหนึ่งที่นิยมกันมากในปัจจุบัน คือการตรวจวิเคราะห์ระดับการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) โดยพิจารณาจากปริมาณเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่ถูกยับยั้งโดยสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต ซึ่งวิธีการที่ใช้ทั่วไปมักนิยมใช้เอนไซม์ที่เป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปซึ่งมีราคาแพงจึงได้มีการพัฒนาการใช้เอนไซม์ที่ได้จากแมลงมาใช้แทนผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปที่มีราคาแพงดังกล่าวซึ่งเอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวและหัวผึ้งพันธุ์เป็นแหล่งเอนไซม์ที่หาได้ง่าย และโดยที่คลอร์ไพริฟอสเป็นสารกำจัดแมลงชนิดหนึ่งในกลุ่มของออร์กาโนฟอสเฟตซึ่งเป็นสารกำจัดแมลงที่นิยมใช้อย่างกว้างขวาง จึงได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสในหัวแมลงหัวเขียวและหัวผึ้งพันธุ์ของคลอร์ไพริฟอส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของคลอร์ไพริฟอสในการยับยั้งเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียวและหัวผึ้งพันธุ์
2. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวกับหัวผึ้งพันธุ์ในการใช้เพื่อตรวจวิเคราะห์คลอร์ไพริฟอส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

แมลงวันหัวเขียว (Blow fly)

แมลงวันหัวเขียว (Blow fly : *Calliphora erythrocephala* Meigen ; Diptera : Calliphoridae) เป็นแมลงวันที่พบได้ทั่วไป ทั้งตามบ้านเรือนหรือคอกสัตว์ แมลงวันในอันดับนี้จะพบได้ทุกพื้นที่ของโลกจะพบทั้งที่เป็นตัวห้ำ ตัวเบียน และปรสิต แต่ส่วนใหญ่จะเป็นพวกที่กินซากพืช ซากสัตว์ หรือสิ่งเน่าเปื่อยเป็นอาหาร ไม่ทำความเสียหายให้กับพืชยกเว้นแต่พืชอาจเกิดแผลเนื่องจากการวางไข่ของแมลง หนอนแมลงวันจะอาศัยในที่ชื้นหรือชื้นแฉะ บางชนิดก็เป็นปรสิตภายในตัวสัตว์ บางชนิดเจาะกินในพืชหรือทำให้เกิดปม (ดุษฎี, 2545) บางชนิดจะดูดน้ำหวานจากดอกไม้ น้ำคั้นจากพืชหรือดูดเลือดจากสัตว์เป็นอาหาร (Borror, 1994) หนอนแมลงวันจะย่อยสลายอินทรียสารให้มีขนาดเล็กลง

แมลงวันหัวเขียวจัดเป็นแมลงวันที่มีขนาดใหญ่กว่าแมลงวันบ้าน ส่วนอกมีสีน้ำเงินหรือสีเขียวเป็นมันสะท้อนแสง ตารวมทั้งสองข้างเป็นสีแดง หนวดมีเส้นขนอริสตาเป็นแบบฟูขนนก (plumose) Richard and Davies (1997) รายงานว่าเส้นขนอริสตาที่พบจะน้อยกว่า 7 เส้น บริเวณของ post scutellum มีลักษณะไม่โปร่งนูน บริเวณอกจะพบเส้นขนแข็ง 2 เส้น มีปีก ส่วนปีกนั้นบริเวณ R5 cell ตรงส่วนปลายจะแคบลงที่ปลายปีก (ทรงยศ, 2530) ส่วนปากเป็นแบบเดียวกับแมลงวันบ้าน คือแบบซับดูด (sponging type) โดยริมฝีปากล่างดัดแปลงเป็นงวง (proboscis) ส่วนปลายสุดจะเป็นรูพรุนมีลักษณะคล้ายฟองน้ำ (มยุรา, 2539) แมลงวันหัวเขียวมีขั้นตอนการเจริญเติบโตแบบสมบูรณ์ คือมีระยะไข่ ระยะหนอน ระยะดักแด้ และตัวเต็มวัย แมลงวันหัวเขียวเพศเมียจะวางไข่ตามซากสัตว์หรือมูลสัตว์แล้วจะฟักเป็นตัวหนอนภายใน 6-48 ชั่วโมง ระยะหนอนจะใช้เวลา 3-9วัน ก็จะฝังตัวอยู่ในพื้นดินเพื่อเข้าระยะดักแด้ ช่วงระยะเวลาจากไข่จนเป็นตัวเต็มวัยใช้เวลา 16-35 วัน (Chapman, 1982)

หนอนแมลงวันหัวเขียวจะมีลำตัวสีเทาหรือสีเหลืองอ่อน ส่วนตอนหน้าของตัวอ่อนจะพบ oral hook 1 คู่ และส่วนปลายท้องของลำตัวจะพบ stigmatic plate ซึ่งมีลักษณะกว้างและแบน ตัวหนอนจะอาศัยอยู่ในซากเน่าของสัตว์หรือมูลสัตว์ บางชนิดจะอาศัยอยู่บนเนื้อเยื่อที่เน่าเปื่อยของสัตว์หรือแผลที่เป็นหนองของมนุษย์ ตัวหนอนจะมีอยู่ 3 วัย เมื่อหนอนเจริญเติบโตเต็มที่จนถึงวัยที่ 3 ตัวหนอนจะเข้าดักแด้และฝังตัวลงในพื้นดิน จากนั้นก็จะพัฒนาต่อไป จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัยและออกจากดิน และจะไปทำการผสมพันธ์กันเพื่อขยายพันธ์ต่อไป โดยเพศเมียจะมีการกินซากเน่าเปื่อยของสัตว์ต่าง ๆ แผลเน่าเปื่อยของสัตว์เลี้ยงและมูลสัตว์เพื่อนำโปรตีนที่ได้ไปพัฒนารังไข่ให้สมบูรณ์ จากนั้นจะทำการวางไข่เพื่อเจริญวงชีวิตต่อไป (อาคม, 2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผึ้งพันธุ์ (Honeybee)

ผึ้งพันธุ์เป็นแมลงสังคมชนิดหนึ่ง ที่มีการดำรงชีวิตอยู่เป็นกลุ่มหรือ colony มีระบบการแบ่งวรรณะที่มีสมาชิกทำหน้าที่แตกต่างกันออกไป โดยมีผึ้งแม่รัง (Queen) ทำหน้าที่เป็นศูนย์กลางของรัง และปล่อยสารเคมีที่เรียกว่า pheromones ออกไปควบคุมกลไกของสังคมผึ้งภายใน

ผึ้งจัดอยู่ในวงศ์ Apidae สกุล Apis ในปัจจุบันมีด้วยกัน 4 ชนิด คือ

- ผึ้งหลวง (Giant honeybee) *Apis dorsata* และ species ใหม่ที่ใกล้เคียงกับผึ้งหลวงคือ *A. iaboriosa*
- ผึ้งมิ้ม (Dwarf honeybee) *A.florea* และ species ใหม่ที่ใกล้เคียงกับผึ้งมิ้มคือ *A. Andreniformis*
- ผึ้งโพรง (Indian honeybee) *A.cerana* และ species ใหม่ที่ใกล้เคียงกับผึ้งโพรงคือ *A. Koschevnikori*
- ผึ้งพันธุ์ (European honeybee) *A.mellifera*

ผึ้งหลวง ผึ้งมิ้ม ผึ้งโพรง เป็นผึ้งพื้นเมืองในเขตเอเชีย ส่วนผึ้งพันธุ์มีถิ่นกำเนิดในทวีปยุโรปและบางส่วนของทวีปแอฟริกา

ผึ้งพันธุ์ (European honeybee) *A.mellifera* มีความสำคัญต่อสมดุลธรรมชาติ เพราะผึ้งพันธุ์จะทำหน้าที่ในการผสมเกสร ซึ่งจำเป็นต่อการติดผลของผลไม้หลายชนิดและมีประโยชน์ต่อมนุษย์เป็นอย่างมาก โดยเฉพาะผู้ประกอบอาชีพเกษตรกรปลูกไม้ผล ผึ้งจะช่วยผสมเกสรให้ไม้ผลทำให้ได้ผลผลิตมากขึ้น

ปัจจุบันพบว่าสารเคมีกำจัดศัตรูพืช (Pesticides) เป็นปัญหาและอุปสรรคสำคัญที่สุดประการหนึ่งต่อการพัฒนาการเลี้ยงผึ้งทั่วโลก สารเคมีดังกล่าวได้ผลิตขึ้นมาใช้ทั้งในด้านการเกษตรและด้านสาธารณสุข สารเคมีเหล่านี้คือสารกำจัดแมลง สารกำจัดวัชพืช สารกำจัดโรคพืช สารกำจัดหนู และสารกำจัดไส้เดือนฝอย เป็นต้น (สิริวัฒน์, 2529)

จากการสำรวจปัญหาความเป็นพิษของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่มีต่อการเลี้ยงผึ้งในประเทศไทย พบว่ากว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ผึ้งพันธุ์จะได้รับอันตรายจากสารเคมีทางการเกษตรในขณะดอกไม้บาน (blooming period) โดยผึ้งพันธุ์จะบินไปสัมผัสสารพิษที่ตกค้างหลงเหลืออยู่บนดอกไม้ตลอดจนบนดอกวัชพืช เช่น ดอกไมยราพ บริเวณใต้ต้นผลไม้ที่มีการฉีดสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ผึ้งพันธุ์อาจเก็บละอองเกสรที่มีอณุภาคสารพิษไปด้วย หรือดูดกินน้ำหรือน้ำหวานจากพืชที่มีสารพิษเจือปนอยู่ และดูดมูลหวาน (honey dew) จากเพลี้ยแป้งหรือเพลี้ยหอยที่ได้รับพิษจากสารเคมีประเภทดูดซึม (systemic insecticides) (สิริวัฒน์, 2529)

สารเคมีกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตมีความเป็นอันตรายต่อผึ้ง เมื่อผึ้งพันธุ์ได้รับสารเคมีกลุ่มนี้เข้าไปอาจจะโดยการสัมผัส (contact) ซึ่งสารพิษจะถูกดูดซึม (absorbed) ผ่านเข้าทางผนังลำตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยผึ้งอาจสัมผัสสารกำจัดแมลงโดยตรงในขณะที่บินไปหาน้ำหวานในช่วงที่เกษตรกรกำลังพ่นสารเคมี หรือได้รับจากเกสรดอกไม้ที่ได้รับการฉีดพ่นสารเคมี หรืออาจได้รับสารกำจัดแมลงโดยการกินสารเคมี ละอองเกสรหรือน้ำหวานที่มีสารพิษเจือปนอยู่ สารพิษนี้จะไปมีผลต่อระบบประสาท โดยไปยับยั้งหรือลดการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส ทำให้ระบบการทำงานของประสาทผิดปกติ มีผลให้ผึ้งเกิดอาการเหนื่อยล้า มีอาการชักกระตุกอย่างรุนแรง และตายในที่สุด

สิริวัฒน์ (2529) เสนอแนวทางการป้องกันอันตรายจากสารเคมีที่มีต่อผึ้ง ดังนี้

1. ให้ความรู้เกี่ยวกับความเป็นพิษของสารเคมีที่มีต่อผึ้ง สาเหตุและการป้องกันอันตรายอันเกิดจากพิษของสารเคมีทางการเกษตรที่มีต่อผึ้งแก่เกษตรกรและผู้เลี้ยงผึ้ง และส่งเสริมให้เกิดความร่วมมือระหว่างเกษตรผู้ใช้สารเคมีและผู้เลี้ยงผึ้งในการป้องกันอันตรายที่จะเกิดต่อผึ้งเนื่องจากการใช้สารเคมี
2. ส่งเสริมให้ใช้สารที่ไม่มีพิษต่อผึ้งในขณะดอกไม้บานและงดใช้สารเคมีที่มีพิษสูงต่อผึ้ง
3. ควรทำการฉีดพ่นสารเคมีในตอนเย็น ช่วงพลบค่ำหรือเช้าตรู่ ไม่ควรฉีดพ่นสารเคมีขณะที่ผึ้งออกหาอาหาร
4. ใช้สูตรผสม (formulation) ที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดอันตรายต่อผึ้งน้อยที่สุด
5. เลือกสถานที่เลี้ยงผึ้งให้ห่างจากบริเวณที่มีการใช้สารกำจัดศัตรูพืช
6. ขนย้ายรังทันทีเมื่อมีการฉีดพ่นสารกำจัดศัตรูพืชบริเวณใกล้เคียง ถ้าย้ายไม่ทันให้ปิดหน้ารังผึ้งและคลุมรังผึ้งด้วยผ้ากระสอบเปียกชื้นในขณะที่มีการฉีดพ่นสารกำจัดศัตรูพืช 1-2 ชั่วโมง
7. ทำการกำจัดวัชพืชที่กำลังออกดอกใต้ต้นไม้หรือระหว่างต้นผลไม้ก่อนฉีดพ่นสารเคมี
8. ควรมีการตรวจดูรังผึ้งอย่างสม่ำเสมอ ถ้าพบผึ้งตายน้อยกว่า 100 ตัวต่อต้น ถือว่าเป็นการตายตามปกติ ถ้าหากพบว่าผึ้งตายมากกว่านี้ให้รีบปฏิบัติตามข้อ 5-6 ทันที การที่ผึ้งตายด้วยสารเคมีในระดับ 200-400 ตัว แสดงว่าผึ้งตายในระดับต่ำ ถ้าตายประมาณ 500-900 ตัว แสดงว่าตายในระดับปานกลาง และถ้าตายมากกว่า 1,000 ตัวขึ้นไป แสดงว่าตายในระดับสูง

คลอร์ไพริฟอส (Chlorpyrifos)

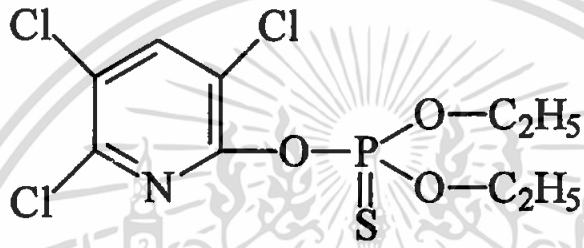
คลอร์ไพริฟอสเป็นสารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารที่มีความเป็นพิษกับสัตว์แบบเฉียบพลันคือได้รับสารพิษในระยะเวลาสั้น (ภายใน 24 ชั่วโมง) โดยได้รับสารพิษเพียงครั้งเดียวหรือหลายครั้ง แล้วแสดงอาการเป็นพิษให้เห็นภายใน 2-3 วันต่อมา และมีหลายรายที่แสดงอาการภายใน 2 สัปดาห์ การเป็นพิษแบบเฉียบพลันนั้นเกิดจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายอย่างรวดเร็วแล้วแสดงอาการพิษออกมาทันที แต่บางกรณีอาจแสดงอาการออกมาช้า ๆ

สารออร์กาโนฟอสเฟตส่วนใหญ่มีความเป็นพิษเฉียบพลันรุนแรง โดยเมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายแล้วจะไปจับกับ acetylcholinesterase และยับยั้งการทำงานของ acetylcholinesterase ทำให้สารสื่อประสาท (neurotransmitter) ชนิดที่เรียกว่า acetylcholine ไม่ถูก hydrolyze และเกิดการสะสมของ acetylcholine มีผลทำให้ระบบประสาทส่วนต่าง ๆ ในร่ายกายทำงานผิดปกติ (วิภา, 2541)

คลอร์ไพริฟอส มีสูตรโครงสร้างทางเคมีและคุณสมบัติ ดังนี้



ชื่อทางเคมี	0,0-diethyl 0-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate
ชื่อทางสามัญ	คลอร์ไพริฟอส
ชนิด	กำจัดแมลงประเภทไม่ดูดซึม ออกฤทธิ์ได้หลายทางทั้งในทางสัมผัส กิน และหายใจ
ความเป็นพิษ	LD_{50} ทางปาก (หนู) 97-276 mg/kg LD_{50} ทางผิวหนัง (กระต่าย) 2,000 mg/kg
สมบัติทางเคมี	ผลึกหยาบสีขาว จุดหลอมเหลว 41.5-43.5°C
การใช้ประโยชน์	ชนิดน้ำมันผสมน้ำ (EC) ใช้ป้องกันและกำจัดเพลี้ยอ่อน หนอนคืบหนอนใยผัก หนอนผีเสื้อกะหล่ำ หนอนกระทู้ต่าง ๆ หนอนเจาะสมอสีชมพู หนอนกุหลาบ เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยกระโดด ไรแดง ไรสนิมส้ม เพลี้ยหอย เพลี้ยแป้ง แมลงวันทองที่ทำลายผักต่าง ๆ ในข้าวโพด ฝ้าย ถั่วลิสง ถั่วเหลือง มันฝรั่ง ข้าว อ้อย ยาสูบ ส้ม สำหรับชนิดเม็ด (G) ใช้ป้องกันและกำจัดแมลงศัตรูข้าวโดยเฉพาะ เช่น เพลี้ยต่าง ๆ
อาการพิษ	จะมีอาการเซื่องซึม ตาพร่า ช่องท้องปวดแข็ง แน่นหน้าอก กล้ามเนื้ออ่อนเปลี้ย ปวดศีรษะ หาใจขัด ม่านตาหรี่ น้ำลายไหล คลื่นไส้อาเจียน ท้องร่วง เหงื่อออกมากตัวสั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแก้พิษ ถ้าถูกผิวหนังให้ล้างด้วยสบู่มาก ๆ ถ้าเข้าตาให้ล้างด้วยน้ำสะอาดนาน ๆ ถ้าเข้าปากหรือกลืนกินลงไปให้นำผู้ป่วยส่งโรงพยาบาล สำหรับแพทย์ยาแก้พิษที่เหมาะสมคือ อะโทรปีนซัลเฟต

ประเภทสูตรผสม 20%EC, 40%EC, 2.5G และ 5G

เอนไซม์โคลินเอสเทอเรส

การค้นพบโครงสร้างทางเคมีของเอนไซม์โคลินเอสเทอเรสนี้มีมานานและด้วยความก้าวหน้าในการศึกษาด้านชีวโมเลกุลและชีวเคมี ทำให้ทราบว่าโดยทั่วไปเอนไซม์โคลินเอสเทอเรสแบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ ๆ คือ ชนิดที่ 1 acetylcholinesterase (AChE) มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการสื่อสัญญาณประสาทบริเวณปลายประสาทที่เรียกว่า cholinergic synapse และชนิดที่ 2 butyrylcholinesterase (BChE) ซึ่งรู้จักในชื่ออื่น ๆอีกว่า serum cholinesterase pseudo-cholinesterase หรือ nonspecific cholinesterase ทั้งเอ็นไซม์ AChE และ BChE พบในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังโดยเฉพาะ AChE สามารถสกัดออกมาได้จากสัตว์หลายชนิดทั้งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก ปลา สัตว์เลื้อยคลานและแมลง เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดจะทำให้เกิดปฏิกิริยา hydrolyze กับสาร acetylcholine ทำให้แตกตัวเป็น acetic acid และ chloline และถูกยับยั้งการทำงานได้โดยสารออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต โดยทั่วไปคำว่า โคลินเอสเทอเรส (cholinesterase, ChE) มีความหมายรวมทั้ง AChE และ BChE

เอนไซม์โคลินเอสเทอเรสพบในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของสัตว์ รวมทั้งพบในอวัยวะที่ทำให้เกิดไฟฟ้าของปลาไหล เม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เนื้อเยื่อสมองของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและแมลง (วิภา, 2541)

เอนไซม์โคลินเอสเทอเรสมีบทบาทในกระบวนการสื่อสัญญาณประสาทชนิด cholinergic transmission ณ บริเวณที่เรียกว่า synapse หรือ cholinergic juction ซึ่งเป็นบริเวณถ่ายทอดสัญญาณจากเซลล์ประสาทหนึ่งไปสู่อีกเซลล์หนึ่ง เริ่มต้นจากสัญญาณประสาทถูกถ่ายทอดส่งมาถึงเซลล์ประสาทชนิด parasympathetic บริเวณ nerve ending ซึ่งมีสาร acetylcholinesterase (AChE) ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีหน้าที่สื่อสัญญาณประสาทสะสมอยู่ในถุง (vesicles) acetylcholine (ACh) จะถูกหลั่งมาจากบริเวณ presynapse ภายในเวลา 2-3 msec สู่บริเวณ synapse ของเซลล์ประสาท สาร AChE จะเข้าไปจับ AChE receptor ที่อยู่ใน postsynaptic membrane ของเซลล์ประสาทตัวถัดไปจะมีผลให้ Na^+ ion channel เปิด ทำให้การไหลของประจุบวกเข้าสู่เซลล์และเกิด depolarization ที่บริเวณ membrane เซลล์ประสาทตัวที่รับ Acetylcholin (ACh) มาแล้วก็จะกระตุ้นให้กล้ามเนื้อบริเวณนั้นทำงาน โดยทั่วไปเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสมีหน้าที่ควบคุมการทำงานของกระบวนการสื่อสัญญาณประสาทด้วยการลดความเข้มข้นของ ACh ที่บริเวณรอยต่อของเซลล์ประสาท โดยการเร่งปฏิกิริยา hydrolysis ทำให้ ACh เกิดเป็น choline

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ acetic acid แล้วการถ่ายทอดสัญญาณประสาทจะหยุดและการทำงานของกล้ามเนื้อบริเวณนั้นสิ้นสุดลง

เมื่อเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสถูกจับเกาะโดยสารออร์กาโนฟอสเฟตจะทำให้กระบวนการ hydrolyze ACh ถูกยับยั้ง ทำให้ ACh สะสมมากขึ้น มีผลทำให้มีการกระตุ้นเซลล์ประสาทหรือกล้ามเนื้อบริเวณนั้นทำงานอย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดความเหนื่อยล้า มีอาการชักกระตุกต่อเนื่องอย่างรุนแรงเป็นอัมพาตและตายในที่สุด

กลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสโดยสารออร์กาโนฟอสเฟต

สารออร์กาโนฟอสเฟตถูกค้นพบครั้งแรกในประเทศเยอรมัน โดย Gerhard Schrader และผู้ร่วมงาน ระหว่างปี ค.ศ. 1930-1940 และใช้เป็นสารกำจัดแมลง เมื่อปลายสงครามโลกครั้งที่ 2 และต่อมามีการใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสโดยสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต มีการอธิบายถึงกลไกการยับยั้งไว้มากมาย แม้ว่าไม่ชัดเจน แต่มีหลักฐานที่เชื่อถือได้คือสารออร์กาโนฟอสเฟต สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยทำปฏิกิริยากับ serine ที่บริเวณ catalytic center แล้วทำให้เกิดสารที่เรียกว่า phosphoserine

ความรุนแรงของออร์กาโนฟอสเฟตที่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลินเอสเทอเรสขึ้นอยู่กับการเกิดปฏิกิริยา phosphorylation และเรียกเอนไซม์ที่เปลี่ยนรูปไปแล้วว่า phosphorylated enzyme เมื่อโคลินเอสเทอเรสไม่ทำงานแล้ว สาร ACh ก็จะไม่ถูก hydrolyze จึงเกิดการสะสมของ ACh

สภาวะที่ไม่ทำงานของโคลินเอสเทอเรสเมื่อถูก phosphorylated ไปนั้นไม่ถาวรจะเกิดเพียงชั่วขณะเท่านั้น ต่อมา phosphorylated enzyme จะถูก hydrolyze ทำให้ได้ AChE กลับคืนสู่สภาพพร้อมที่จะทำงานได้เหมือนเดิม การให้สาร pyridine-2-aldoxime methiodide (2-PAM) จะช่วยเร่งให้เอนไซม์นี้กลับคืนสู่สภาพปกติเร็วขึ้นโดยดึงเอากลุ่ม phosphate ออกไป

ในบางสถานการณ์ AChE อาจถูกเปลี่ยนสภาพให้ทำงานไม่ได้เป็นเวลานานโดยสารออร์กาโนฟอสเฟตสภาวะเช่นนี้เรียกว่าเกิด aging reaction ส่วนการเกิด "non-aged" เป็นภาวะที่เอนไซม์ถูก phosphorylated ไปแล้ว สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ตามที่ได้กล่าวข้างต้น โดยเกิดปฏิกิริยา hydrolysis แล้วกลับคืนเอง หรือช่วยเร่งด้วย 2-PAM

สารออร์กาโนฟอสเฟตชนิดที่มี alkylgroup เป็น 0,0-dimethylgroup เช่น fenitrothion, azinphos methyl และ malathion เป็นต้น และชนิดที่เป็น 0,0-diethylgroup เช่นdiazinon และ chlopyrifos เป็นต้น ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดนี้จะได้ oxon เป็น metabolite ที่ทำปฏิกิริยากับโคลินเอสเทอเรสแล้วได้ 0,0-dimethyl, 0,0-diethyl, 0-methyl และ 0,ethyl phosphoserine moiety ในเอนไซม์ด้วย (วิภา, 2541)

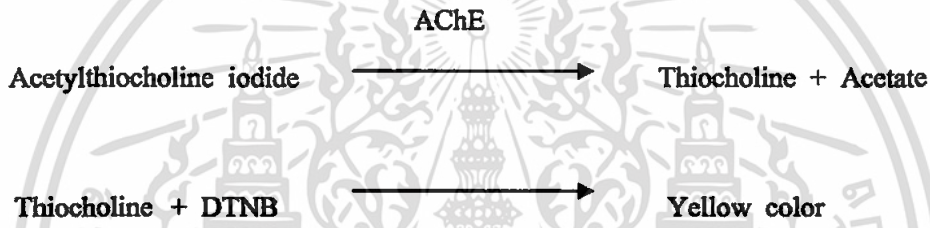
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจวิเคราะห์สารออร์กาโนฟอสเฟต

สารออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) เป็นสารกำจัดแมลงที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง สารกลุ่มนี้ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase หรือ AChE) ในระบบประสาทของแมลง จึงก่อให้เกิดพิษต่อแมลง รวมทั้งสามารถก่อให้เกิดพิษต่อระบบประสาทของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ จึงเรียกสารในกลุ่มนี้ว่าเป็น AChE insecticides หรือสารกำจัดแมลงที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส

จากสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ดังกล่าวจึงได้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ สารในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตโดยใช้เอนไซม์ AChE โดยอาศัยหลักการของ Ellman ตามปฏิกิริยาดังนี้

ปฏิกิริยาของ Ellman (Ellman's reaction)



ในสภาวะที่ปราศจากสารออร์กาโนฟอสเฟต เอนไซม์ AChE จะทำปฏิกิริยากับสารอะเซตทิลไธโอโคลิน (Acetylthiocholine) ซึ่งเป็นสารตั้งต้น (substrate) ของปฏิกิริยาได้เป็นสารไธโอโคลีน (Thiocholine) ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อกับ Ellman's reagent [5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoate) หรือ DTNB] ได้สารสีเหลืองตามปฏิกิริยาข้างต้น ส่วนในสภาวะที่มีสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต โดยสารพิษดังกล่าวจะไปยับยั้งเอนไซม์ AChE ซึ่งจะทำให้การเกิดสีเหลืองลดลง ดังนั้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาหรือการเกิดสีเหลืองจึงแปลผกผันกับปริมาณของสารพิษในตัวอย่างนั้น หมายความว่าหากตัวอย่างมีปริมาณสารพิษมากสีของปฏิกิริยาจะเจือจางกว่าในตัวอย่างที่มีปริมาณสารพิษที่น้อยกว่า ค่าความเข้มของสีเหลืองสามารถตรวจวัดได้จากการวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น (wavalength) 412 หรือ 415 นาโนเมตร (รุ่งฤดี, 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุอุปกรณ์

1. ผึ้งพันธุ์ (Honeybee) อายุ 7-14 วัน
2. แมลงวันหัวเขียว (Blow fly) อายุ 2-3 วัน
3. เครื่อง spectrophotometer แบบ visible
4. เซลล์แก้วบรรจุสารตัวอย่าง (cuvette)
5. เครื่องปั่นของเหลวกระแสวน (vortex)
6. เครื่องปั่นสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenizer)
7. pH meter
8. เครื่องชั่ง (4 ตำแหน่ง)
9. เครื่องแก้ว
   -หลอดทดลอง
   -บีกเกอร์ ขนาด 10, 50, 100 และ 200 ml
   -Volumetric flask ขนาด 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ml
   -Erlenmayer flask 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) 0.01 M เตรียมได้จากการละลายสาร 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. สารละลาย Acetylthiocholine iodide (ATChI) 0.075 M เตรียมโดยละลาย Acetylthiocholine iodide 0.2169 g ในน้ำกลั่น 10 ml
3. Buffer phosphate (0.1 M) 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 1:4
4. 5% MeOH in water
5. dichloromethane
6. 1% bromine in water

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

19934

7. สารละลายมาตรฐาน chlorpyrifos
8. Acetone
9. น้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

วิธีการทดลอง

วิธีการ

1. การวิเคราะห์โปรตีนในหัวแมลงวันหัวเขียวและผึ้งพันธุ์

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

2. การตรวจวิเคราะห์ระดับปกติของเอนไซม์ (Enzyme activity) ในหัวผึ้งพันธุ์และหัวแมลงหัวเขียว

การศึกษาระดับปกติของเอนไซม์ในหัวผึ้งพันธุ์หรือหัวแมลงหัวเขียว มีความจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากปริมาณความเข้มข้นที่วัดได้ บ่งบอกถึงระดับการทำงานปกติของเอนไซม์ต่อหัวผึ้งพันธุ์หรือหัวแมลงวันหัวเขียว 1 หัว ระดับการทำงานของเอนไซม์มีหน่วยเป็น mUnit/g(protein) ใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ตามหลักการของ Ellman *et al.* (1961) มีขั้นตอนดังนี้

1) นำหัวผึ้งพันธุ์หรือหัวแมลงวันหัวเขียว ที่เลี้ยงในสภาพที่ปลอดภัยจากสารกำจัดแมลงบริเวณคณะเทคโนโลยีการเกษตร โดยใช้ผึ้งพันธุ์ตัวเต็มวัยอายุ 7-14 วัน และแมลงวันหัวเขียวอายุ 2-3 วัน ปั่นในสารละลาย buffer phosphate (pH 8.0, 0.1 M) ในอัตราส่วนเนื้อเยื่อ 20 mg ต่อ buffer phosphate 1 ml โดยใช้เครื่อง homogenizer กรองสารละลายที่ได้ผ่าน glass wool
2) ดูดสารละลายที่ได้จากข้อ 1) 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 ผสมสารให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer
3) วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer แบบ visible ที่ความยาวคลื่น 412 nm บันทึกค่าดูดกลืนแสงทุก ๆ 30 วินาที ภายในเวลา 3 นาที หาค่าเฉลี่ยความแตกต่างเพื่อคำนวณความแตกต่าง ตามสมการของ Ellman *et al.* (1961) ดังนี้

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

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

เมื่อ ΔA : ค่า absorbance ที่เปลี่ยนแปลงไปต่อนาที

P : ปริมาณโปรตีนในหัวแมลงวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การตรวจวิเคราะห์ระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือหลังการทำปฏิกิริยากับสารกำจัดแมลง (Enzyme activity remainning)

ตรวจวิเคราะห์โดยใช้ spectrophotometric method ซึ่งจะตรวจวัดระดับการทำงานของ AChE ที่เหลือจากการถูกยับยั้งโดย chlorpyrifos โดยดำเนินการตามวิธีของ Frank and Nick (2001) และ Ellman *et al.* (1961) มีขั้นตอนดังนี้

1) ดูดสารละลายกำจัดแมลง chlorpiryfos ที่ละลายใน dichloromethane 2 ml ใส่ในหลอดทดลอง
2) เติม 5% MeOH in water 2 ml
3) ใช้อากาศเป่าไล่ dichloromethane ให้หมด
4) ใส่ 1% bromine in water 100 µl เขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที
5) ใช้อากาศเป่าไล่ bromine ที่เหลืออยู่ให้หมด จะได้เป็น sample extract
6) ดูดสารละลาย sample extract 250 µl ลงในหลอดทดลองที่มี buffer phosphate (pH 8.0, 0.1 M) 2.6 ml
7) เติมสารละลายที่ได้จากหัวผึ้งหรือหัวแมลงวันหัวเขียว 400 µl (0.014 Unit) จากข้อ 2 เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
8) เติม DTNB 0.01 M 100 µl และ ATChI 0.075 M 20 µl เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixzer แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25°C 30 นาที
9) วัดค่าดูดกลืนแสง (Absorbance : ABS) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 412 nm
10) คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ระดับการทำงานของเอนไซม์ที่คงเหลือ (% Enzyme activity remainning) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Control)

4. การหาขอบเขตความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์ (Method validation)

การตรวจวิเคราะห์สารออร์กาโนฟอสเฟต ด้วยเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสเป็นวิธีการที่สามารถตรวจสอบได้ง่ายและรวดเร็ว ซึ่งตัวอย่างที่ให้ผลเป็น positive อาจนำไปตรวจวิเคราะห์เพื่อยืนยันผลและวิเคราะห์ชนิดของสารรวมทั้งหาปริมาณของสารที่แน่นอนได้ด้วยวิธีมาตรฐานต่าง ๆ เช่น GC, GC-MS และ HPLC ทั้งนี้การตรวจวิเคราะห์สารออร์กาโนฟอสเฟตโดยการใช้เอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสเป็นการตรวจสอบสารพิษเบื้องต้นซึ่งจำเป็นต้องทราบความไวหรือ sensivity ของวิธีการตรวจวิเคราะห์เพื่อให้ผลการตรวจวิเคราะห์มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือรวมทั้งบอกความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ การหาขอบเขตความน่าเชื่อถือของการตรวจวิเคราะห์ chlorpyrifos โดยใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์และหัวแมลงวันหัวเขียวใช้วิธีการของ John (1989) ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1 หาความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือกับความเข้มข้นของสารกำจัดแมลง มีขั้นตอนดังนี้

1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน chlorpyrifos ใน dichloromethane 12 ระดับความเข้มข้น (หัวแมลงวันหัวเขียวใช้ความเข้มข้นที่ 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0, 250.0, 500.0, 750.0 และ 1,000.0 ppb ส่วนหัวผึ้งพันธุ์ใช้ความเข้มข้นที่ 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.5, 5.0 และ 7.5 ppb)

2) ตรวจวิเคราะห์ระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ หลังการทำปฏิกิริยากับสารกำจัดแมลงมาตรฐานตามวิธีในข้อ 3 ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

3) เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ chlorpyrifos กับค่าเฉลี่ยของระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ

4.2 หาปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (limit of detection : LOD) มีขั้นตอนดังนี้

1) หาค่า SD จาก % Enzyme activity remaining ของกลุ่มควบคุม (Control ; ไม่มีสารกำจัดแมลง แต่มี 5% MeOH) เทียบกับ blank (กลุ่มที่ไม่มีสารกำจัดแมลงและ 5% MeOH) จำนวน 50 ตัวอย่าง

2) กำหนดค่า % inhibition ซึ่งควบคุมค่าเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมเท่ากับ 3SD

3) นำค่าความสัมพันธ์ที่ได้จากข้อ 4.1 ในช่วงที่สารกำจัดแมลงมาตรฐานยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวและหัวผึ้งพันธุ์ที่ครอบคลุม %inhibition มา 4 ระดับความเข้มข้น เพื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงมาตรฐาน กับค่า ln(%Enzyme activity remaining)

4) คำนวณหาสมการเส้นตรงและค่า R^2

5) คำนวณค่า LOD จากสมการเส้นตรงที่ได้จากข้อ 4) ดังนี้

LOD = b – a*ln(%Enzyme activity remaining) เมื่อ %Enzyme activity remaining เป็นระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ปกติในกลุ่มควบคุม (ไม่มีสารกำจัดแมลงแต่มี 5% MeOH)

4.3 หาความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ในตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ได้ (limit of quality :LOQ) มีขั้นตอนทำตามข้อ 4.1 แต่ตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวอย่างที่ผ่านวิธีการสกัดตามวิธีการของ Frank and Nick (2001) โดยกำหนดค่า LOQ เท่ากับ 10SD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวกับเอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์

เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์คลอร์ไพริฟอสของเอนไซม์ AChE ที่ได้จากหัวแมลงวันหัวเขียวกับเอนไซม์ AChE จากหัวผึ้งพันธุ์ โดยใช้ข้อมูลข้อ 4.2 และ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์โปรตีนและระดับการทำงานของเอนไซม์ในหัวแมลงวันหัวเขียวและหัวผึ้งพันธุ์

ผลการวิเคราะห์โปรตีนในหัวแมลงวันหัวเขียวและหัวผึ้งพันธุ์พบว่ามีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 25.83% และ 19.78% ของเนื้อเยื่อ หรือ 153.17 ± 0.64 และ 54.51 ± 8.60 มิลลิยูนิค/หัว (mUnit/head) ตามลำดับ ตามลำดับ ระดับการทำงานปกติของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสในหัวแมลงวันหัวเขียวและหัวผึ้งพันธุ์มีค่าเท่ากับ 1,097.8 ± 118.8 และ 297.1 ± 46.9 มิลลิยูนิค/กรัม (โปรตีน) (mUit/g (protein)) ตามลำดับ

2. ขอบเขตความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์

ผลการวิเคราะห์พบว่าในหัวแมลงวันหัวเขียวมีระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มที่ไม่มีสารกำจัดแมลงแต่มี 5% MeOH มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 102.0 ± 3.74 (range 90.6-110.6)% (n = 50) (ภาพที่ 1) ค่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) กำหนดจากปริมาณสารกำจัดแมลงที่ทำให้ระดับการทำงานของเอนไซม์ลดลง 11% และในหัวผึ้งพันธุ์มีระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มที่ไม่มีสารกำจัดแมลงแต่มี 5% MeOH มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 100.6 ± 3.96 (range 91.9-113.0)% (n = 50) (ภาพที่ 2) ค่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) กำหนดจากปริมาณที่ทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง 12% ซึ่งจะครอบคลุมค่าเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมเท่ากับ 3SD พบว่าปริมาณต่ำสุดของคลอร์ไพริฟอสที่ตรวจวิเคราะห์ได้โดยเอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวและหัวผึ้งพันธุ์เท่ากับ 0.04 และ 6.44 พีพีบี (ppb) ตามลำดับ ความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณได้ (LOQ) ซึ่งกำหนดจากปริมาณสารกำจัดแมลงที่ทำให้การทำงานของเอนไซม์ในหัวแมลงวันหัวเขียวลดลง 37% และหัวผึ้งพันธุ์ลดลง 39% ซึ่งจะควบคุมค่าเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมเท่ากับ 10SD พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของคลอร์ไพริฟอสที่ตรวจวิเคราะห์ได้โดยเอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวและหัวผึ้งพันธุ์เท่ากับ 0.13 และ 14.33 พีพีบี (ppb) ตามลำดับ

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณต่ำสุดหรือความไวของวิธีการวิเคราะห์สารที่สามารถตรวจได้ (sensitivity) วิเคราะห์ได้จากความสัมพันธ์ของผลการยับยั้งกับความเข้มข้นของสารในช่วงความเข้มข้นต่ำซึ่งเป็นแบบวิถีโค้ง โดยประเมินความสัมพันธ์ของเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารกับค่า ln(%Enzyme activity remaining) โดยที่ %Enzyme activity remaining ที่ครอบคลุมค่าเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมในแมลงวันหัวเขียวเท่ากับ 89% (11% Inhibition) และผึ้งพันธุ์เท่ากับ 88% (12% Inhibition) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าปริมาณต่ำสุด (LOD) ที่สามารถตรวจ

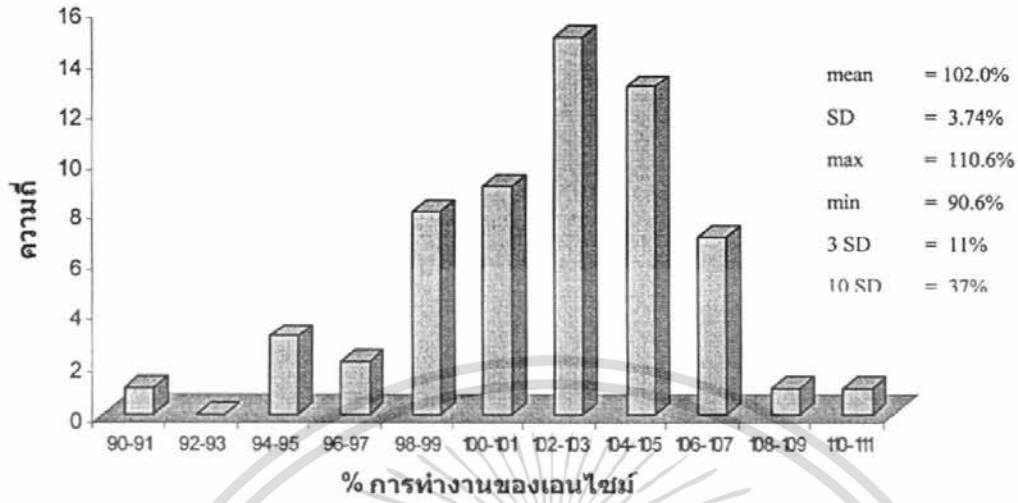
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบสารคลอร์ไพริฟอสแมลงวันหัวเขียวมีค่าเท่ากับ 0.04 พีพีบี (สมการในภาพที่ 5 และตารางที่ 1) และผึ้งพันธุ์มีค่าเท่ากับ 6.44 พีพีบี (สมการในภาพที่ 6 และตารางที่ 1) ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างได้ (LOQ) ในหัวแมลงวันหัวเขียวมีค่าเท่ากับ 0.13 พีพีบี และหัวผึ้งพันธุ์มีค่าเท่ากับ 14.33 พีพีบี (ตารางที่ 1)

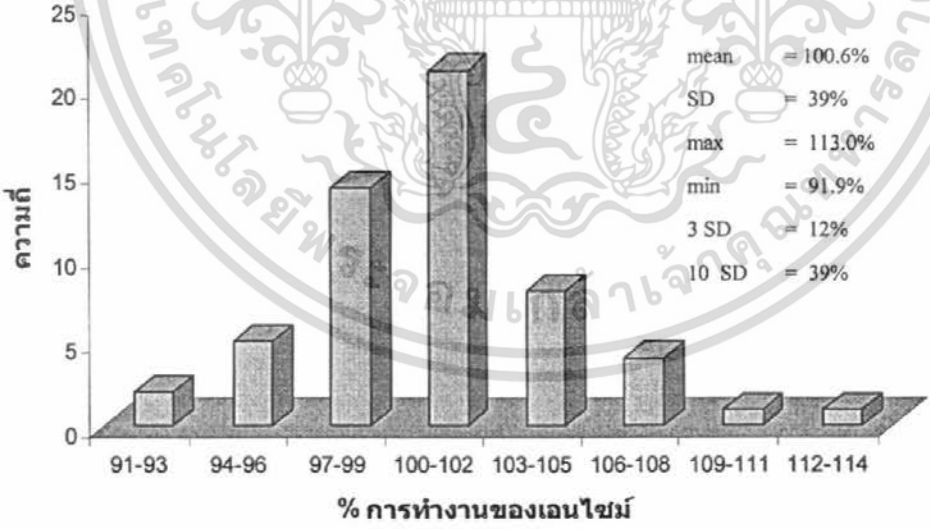
การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับการทำงานของเอนไซม์ในหัวผึ้งพันธุ์และหัวแมลงหัวเขียวกับความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอส พบว่าเอนไซม์ในหัวผึ้งพันธุ์และหัวแมลงหัวเขียวลดการทำงานอย่างรวดเร็วในช่วงแรกหรือในช่วงที่ความเข้มข้นของสารต่ำซึ่งมีความสัมพันธ์แบบวิถีโค้ง โดยที่เอนไซม์จะลดการทำงานในอัตราที่ช้าลงในช่วงที่มีปริมาณความเข้มข้นของสารสูงขึ้น

การศึกษาเปรียบเทียบการใช้เอนไซม์ AChE จากหัวผึ้งพันธุ์และหัวแมลงวันหัวเขียวเพื่อตรวจวิเคราะห์การตกค้างของคลอร์ไพริฟอส พบว่าคลอร์ไพริฟอสจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวได้ดีกว่าจากหัวผึ้งพันธุ์ในทุกความเข้มข้น ซึ่งค่า LOD ของหัวแมลงวันหัวเขียวมีค่าเท่ากับ 0.04 พีพีบี ซึ่งต่ำกว่าค่า LOD ที่ได้จากเอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.44 พีพีบี แสดงว่าเอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวสามารถตรวจวิเคราะห์คลอร์ไพริฟอสในระดับต่ำกว่าเอนไซม์จากผึ้งพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

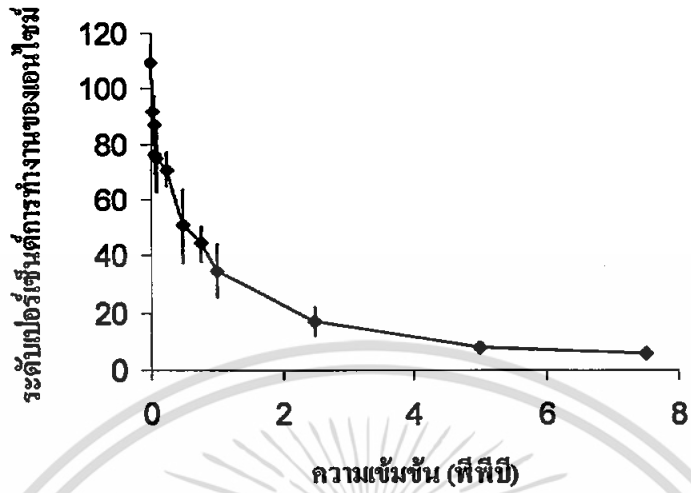


ภาพที่ 1 ระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ในหัวแมลงวันหัวเขียวในกลุ่มควบคุม

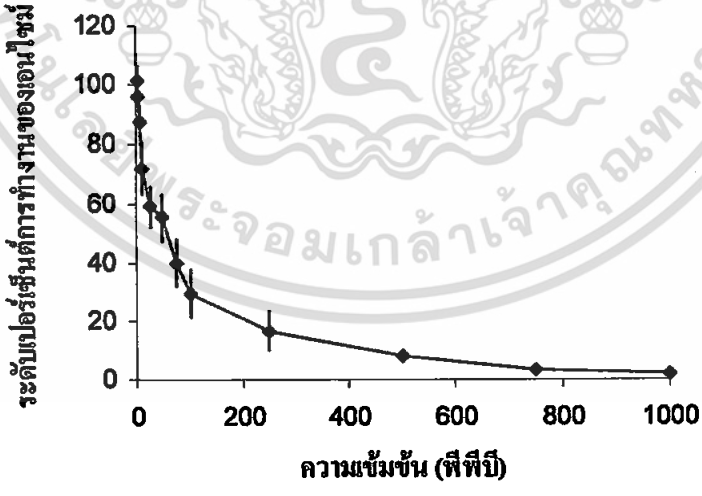


ภาพที่ 2 ระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ในหัวผึ้งพันธุ์ในกลุ่มควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

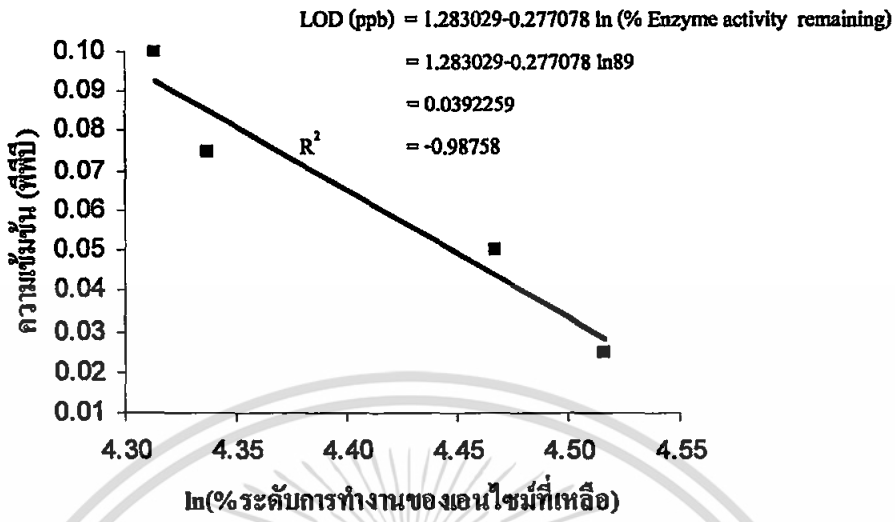


ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ของระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของ เอนไซม์อะเซตทิล โคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียวกับความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอส

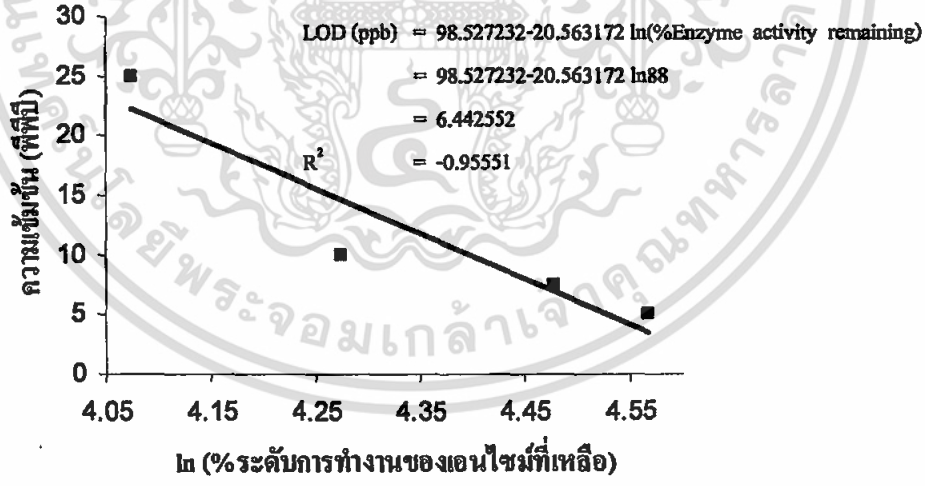


ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ของระดับเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์อะเซตทิล โคลินเอสเทอเรสจากหัวผึ้งพันธุ์กับความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5 ปริมาณต่ำสุดของคลอร์ไพริฟอสที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยการใช้เอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียว



ภาพที่ 6 ปริมาณต่ำสุดของคลอร์ไพริฟอสที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยการใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่1 ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ในตัวอย่าง ที่สามารถหาปริมาณได้ (LOQ) ด้วยเอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวและหัวผึ้งพันธุ์ของสารกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอส

แหล่งเอนไซม์	R^2	LOD[1/]	LOQ[2/]
หัวแมลงวันหัวเขียว	-0.98758	0.04	0.13
หัวผึ้ง	-0.95551	6.44	14.33

1/ = 11% inhibition (แมลงวันหัวเขียว) และ 12% inhibition (ผึ้งพันธุ์)

2/ = 37% inhibition (แมลงวันหัวเขียว) และ 39% inhibition (ผึ้งพันธุ์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์ผลการทดลอง

การหาขอบเขตความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์การตกค้างของคลอร์ไพริฟอส โดยใช้เอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสในหัวแมลงหัวเขียวและหัวผึ้งพันธุ์เป็นการหาค่าปริมาณต่ำสุดที่จะสามารถตรวจสอบได้ (LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณได้ (LOQ) โดยกำหนดให้ครอบคลุมค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากกลุ่มควบคลุม 3SD และ 10SD นั้นเป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไปทางสถิติ โดย 3 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานนี้ถือว่าเป็นค่าที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ซึ่งการวิเคราะห์ในแต่ละวิธีจะมีค่าไม่เท่ากัน โดยการทดลองในครั้งนี้ใช้เอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวกำหนดที่ 11 % และหัวผึ้งพันธุ์กำหนดที่ 12 % ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของรุ่งฤดี (2545) ซึ่งศึกษาจากเอนไซม์ที่เป็นผลิตภัณฑ์การค้ากำหนดที่ 15% และจรงค์ศักดิ์ (2538) ซึ่งศึกษาในหัวผึ้งพันธุ์กำหนดที่ 11% ทั้งนี้เปอร์เซ็นต์การลดลงของการทำงานของเอนไซม์ที่กำหนดต้องครอบคลุม 3เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ส่วนการตรวจวิเคราะห์ LOQ ที่กำหนดให้ครอบคลุม 10SD จะได้เปอร์เซ็นต์การลดลงของเอนไซม์จากหัวแมลงวันเท่ากับ 37% และหัวผึ้งพันธุ์เท่ากับ 39% ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของรุ่งฤดี (2545) ซึ่งศึกษาจากเอนไซม์ที่เป็นผลิตภัณฑ์การค้าได้เปอร์เซ็นต์การลดลงของเอนไซม์เท่ากับ 50% และจรงค์ศักดิ์ (2538) ซึ่งศึกษาในหัวผึ้งพันธุ์ได้เปอร์เซ็นต์การลดลงของเอนไซม์เท่ากับ 37%

ประสิทธิภาพของเอนไซม์ AChE จากหัวแมลงวันหัวเขียวในการตรวจวิเคราะห์คลอร์ไพริฟอสมีค่า LOD ต่ำกว่าเอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์ อาจเป็นเพราะเอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวสดกว่าเอนไซม์จากหัวผึ้ง (เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์ได้จากหัวผึ้งพันธุ์ที่แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C นานประมาณ 6 เดือน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าสามารถตรวจวิเคราะห์คลอร์ไพริฟอส โดยใช้เอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวและหัวผึ้งพันธุ์ได้ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ดี รวดเร็ว ประหยัด และมีความไวค่อนข้างดี ซึ่งจากการทดลอง พบว่าเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันจะจับกับสารกำจัดแมลงได้ดีกว่าเอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์

การประเมินผลบวก (positive) ของการตรวจวิเคราะห์จะพิจารณาจากการที่เอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวแมลงวันหัวเขียวถูกยับยั้งได้อย่างน้อย 11% และเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจากหัวผึ้งพันธุ์ถูกยับยั้งอย่างน้อย 12% จากระดับการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มควบคุม โดยความเข้มข้นต่ำสุดของคลอร์ไพริฟอสที่สามารถตรวจวิเคราะห์โดยการใช้เอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์จะสูงกว่าเอนไซม์ที่จากหัวแมลงวันหัวเขียวคือเท่ากับ 6.44 และ 0.04 พีพีบี ตามลำดับ และความเข้มข้นต่ำสุดของคลอร์ไพริฟอสที่สามารถวิเคราะห์ได้จากตัวอย่างโดยใช้เอนไซม์จากหัวแมลงวันหัวเขียวและเอนไซม์จากหัวผึ้งพันธุ์มีค่าเท่ากับ 0.13 และ 14.33 พีพีบี ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

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

ทรงยศ พิศิษฐ์กุล. 2530. ลักษณะสำคัญของแมลงในวงศ์ต่าง ๆ. ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น. 140 หน้า.

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

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

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

รุ่งฤดี มีสมบูรณ์. 2541. ในความรู้พื้นฐานการวิเคราะห์คุณภาพและสารพิษตกค้างของวัตถุมีพิษการเกษตร. *ใน*.เอกสารวิชาการประกอบคำบรรยายในการพัฒนาอบรมเจ้าหน้าที่สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1-8 ครั้งที่ 1. กองวัตถุมีพิษการเกษตร กรมวิชาการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. หน้า (12-1)-(12-8).

รุ่งฤดี มีสมบูรณ์. 2544. การวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเอนไซม์(Enzymatic method). หน้า 121-128 *ใน*.ความรู้พื้นฐานการวิเคราะห์คุณภาพและสารพิษตกค้างของวัตถุมีพิษทางเกษตร. การอบรมเจ้าหน้าที่สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1-8 ครั้งที่ 1. กองวัตถุมีพิษทางการเกษตร กรมวิชาการ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพ ฯ.

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

วิภา ตั้งนิพนธ์. 2541. ความเป็นพิษของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต. ข่าวสารวัตถุมีพิษ. 25(3)1 : 113-123.

วินัย ปีติยนต์. 2535. วิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์วัตถุมีพิษ. ข่าวสารวัตถุมีพิษ. 19(2) : 80.

สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. 2529. ความเป็นพิษของสารกำจัดศัตรูพืชต่อผึ้ง. ชีววิทยาของผึ้ง. ฝ่ายวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 912 หน้า.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศรีสกุล วรจันทรา. 2543. บทปฏิบัติการโภชนาการศาสตร์. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เสริม สีมา. 2533. วัตถุมีพิษทางการเกษตร. ข่าวสารวัตถุมีพิษ. 17(2) : 86-87.

อาคม สังข์วรานนท์. 2538. กีฏวิทยาทางสัตวแพทย์. ภาควิชาพยาธิวิทยา, คณะสัตวแพทย์ศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 650 หน้า.

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.

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

Richard, O.W. and R.G. Davies. 1997. IMM' General Texbook of Entomology Volume 2, Chapman and Hall Ltd, London. 1354 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้