บทคัดย่อ

สัญญาเลขที่ DBG5080018

ชื่อโครงการ การวิจัยและพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืชตกค้างโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีและอิมมิวโนแอสเสย์

ชื่อนักวิจัย ทิพวรรณ ประภามณฑล[1] ฉายสุรีย์ ศุภวิไล[1] จิรประภา วิภายา[1]สมพร จันทระ[2] มุกดา ภัทราวราพันธ์[2] ชูชาติ สันธทรัพย์[3]

[1]สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ [2]คณะวิทยาศาสตร์ [3] คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail address: tprapamontol@rihes.org

ระยะเวลาโครงการ 31 กรกฎาคม 2550 - 30 มิถุนายน 2554

งานวิจัยนี้ประกอบด้วยวิธีวิเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืชตกค้างที่พัฒนาขึ้นใหม่ รวม 4 วิธี ดังนี้

การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์สารเคมีกำจัดเชื้อรา carbendazim โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatograph-UV detection (HPLC-UV) พบว่า limit of detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) ของcarbendazim ในตัวอย่างอยู่ที่ 0.0025 และ 0.005 mg/kg ตามลำดับ ซึ่งค่า LOD และ LOQ ของวิธีการสกัดที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถวิเคราะห์ได้ในระดับที่ต่ำกว่าค่าmaximum residue limits (MRLs) ของ carbendazim ตามมาตรฐาน Codex alimentarius pesticide residues in food (น่าจะมีปีกำกับ) ซึ่งกำหนดไว้ไม่เกิน 0.5 mg/kg ค่าร้อยละของการกลับคืน (recovery) อยู่ในช่วงร้อยละ 62.3-79.8 และ 63.6-69.6 ของระดับความเข้มข้นที่ 0.015 และ0.025 mg/kg ตามลำดับ ค่า inter-batch recovery อยู่ในช่วง 98.2 $\pm$ 0.002และ %CV เท่ากับ 21.5

การพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างที่ง่ายและรวดเร็ว สำหรับวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids ในระดับต่ำๆ ได้ใช้เทคนิค gas chromatography-electron capture detection (GC-ECD) ซึ่ง ECD มีความไวต่อสารที่มีองค์ประกอบของธาตุ halogens ทำให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ดีในความเข้มข้นระดับต่ำๆ งานวิจัยนี้สามารถพัฒนาวิธีสำหรับสกัดสารกลุ่ม synthetic pyrethroids ได้ดีโดยใช้ inactivated carbon ในการสกัด และได้ผลดีมากเมื่อเทียบกับวิธีการที่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ เนื่องจากสารกลุ่ม synthetic pyrethroids เป็นสารที่มีความหลากหลาย เนื่องจากมีหลาย isomer ตั้งแต่ 2 isomers ถึง 5 isomers ดังนั้นจึงคำนวณโดยการคำนวณแบบ sum peak ค่า correlation (R^2) อยู่ระหว่าง 0.978 ถึง 0.996 โดย isomers ส่วนใหญ่จำนวน 17 ใน 20 isomers ที่มีค่า R^2 มากกว่า 0.99 สำหรับค่า LODใน อยู่ในช่วง 0.001 ถึง 0.005 mg/kg และค่า LOQ อยู่ที่ 0.005 ถึง 0.01 mg/kg ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่า LOD และ LOQ ของการสกัดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้

พบว่าสามารถวิเคราะห์ได้ในระดับที่ต่ำกว่าค่า MRLsที่กำหนดไว้ทั้งของประเทศไทยและมาตรฐาน Codex alimentarius pesticide residues in food (พ.ศ. 2549)

สำหรับการผลิต antibody ต่อ cypermethrin เริ่มจากการสังเคราะห์สาร hapten ที่มีส่วนสำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วน cyclopropane (H1) และ ส่วน aromatic ring (H2) เตรียมสาร immunogens 3 ชนิดจากสาร hapten ที่ได้แต่ละตัว ชื่อว่า H1- BSA และ H2- BSA และ H12-BSA hapten density ของ H1- BSA และ H2- BSA เท่ากับ 8 และ 13 ตามลำดับ ความไวและความจำเพาะของ antibodyที่ได้ จาก H1- BSA มีค่า ร้อยละ 50 ของการยับยั้งของ cypermethrin ที่ 52 µg/L โดย LOQ เท่ากับ 1.8 µg/L ที่ ร้อยละ 85 ของการยับยั้งด้วย cypermethrin และ ค่า LOD ของ indirect competitive ELISA เท่ากับ 0.39 µg/L ที่ร้อยละ 90 ของการยับยั้งด้วย antibody ต่อ cypermethrin นอกจากนี้ แอนติบอดีที่ได้จากการกระตุ้นด้วย H12-BSA มีการตอบสนองที่ดีมีค่าร้อยละ 50 ของการยับยั้งด้วย cypermethrin เท่ากับ 0.32 µg/L และค่าขีดจำกัดของการวัดด้วย indirect competitive ELISA เท่ากับ 0.02 ng/mLดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ได้มีการพัฒนาวิธี indirect competitive ELISA ที่สามารถนำไปใช้ในการพัฒนางานวิจัยในลักษณะทีคล้ายกันได้

การพัฒนาวิธีการตรวจการทำงานของCholinesterase enzyme (ChE) ในน้ำลาย พบว่า วิธีที่พัฒนาได้นี้สามารถตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ได้ดีเทียบเท่ากับวิธีใช้กับตัวอย่างเลือด โดยมีค่าความแม่นยำของวิธี ที่ coefficient of variation (%CV) น้อยกว่า 5% โดย salivary AChE = 3.08 salivary BChE= 2.91 red blood cell AChE= 2.54 และ plasma BChE = 1.79 ส่วนค่า inter-variation ก็พบว่ามีค่าน้อยกว่า 5% เช่นกัน โดยมีค่าดังนี้ salivary AChE= 3.38 salivary BChE= 3.38 red blood cell AChE =2.24 และ plasma BChE= 3.32 จากการนำวิธีดังกล่าวไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจริงจากอาสาสมัครกลุ่มเกษตรกรและกลุ่มควบคุมพบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคั ระหว่างกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ plasma BChE และ salivary AChE (r= 0.205, p = 0.041) และระหว่าง plasma BChE และ salivary BChE (r= 0.271, p = 0.006) ในกลุ่มเกษตรกรพบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญแค่ในการทำงานของเอนไซม์ salivary AChE และ salivary BChE (r= 0.697, p=0.000)

Abstract

Project Code: DBG5080018

Project Title: Research and Development of Analytical Methods for Detecting Pesticide Residues using Chromatographic Techniques and Immunoassay

Investigators: Tippawan Prapamontol[1], Chaisuree Supavilai[1], Jiraprapa Wipasa[1], Somporn Chantara[2], Mookda Pattarawarapan[2], Choochad Santasup[3]

[1]Research Institute for Health Science, [2]Faculty of Science, [3]Faculty of Agriculture: Chiang Mai University.

E-mail address: tprapamontol@rihes.org

Project Duration: July 31, 2007 – June 30, 2011

This research composed of 4 newly developed pesticide analytical methods as following.

The developed carbendazim fungicide analytical method employed High performance liquid chromatography-UV detection (HPLC-UV) and principally focused on sample preparation. The developed method provided the limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) for detecting carbendazim in vegetable samples at 0.0025 and 0.005 mg/kg, respectively, which enable to detect carbendazim far below the Maximum Residue Limit (MRL) set at 0.5 mg/kg by the Codex alimentarius pesticide residues in food. Recoveries at concentrations of 0.015 and 0.025 mg/kg were 62.3-79.8 and 63.6-69.6 %, respectively and coefficient variation of inter-batch analysis was 21.5 %

The developed sensitive synthetic pyrethroid insecticides method employed a gas chromatography-electron capture detection (GC-ECD) with simple and rapid sample preparation. The developed sample preparation method employed inactivated carbon and provided better result than reported methods. Summation of areas of multipeaks of individual pyerethroid insecticides were applied and the correlation of standard calibration curves were from 0.978 ถึง 0.996. The LOD and LOQ were ranging from 0.001 to 0.005 mg/kg and 0.005 to 0.01 mg/kg, respectively.

In the production of antibody to cypermethrin, two haptens containing major parts, cyclopropane moiety (H1) and aromatic moiety (H2), similar structure to cypermethrin were synthesized. Three immunogens were prepared, two immunogens with each hapten were named H1-BSA, H2-BSA and one immunogen with two haptens was H12-BSA. The hapten densities of H1-BSA, H2-BSA were 8 and 13, respectively. The antibody from H1-BSA immunized mice showed high titers to the hapten. The antibody from H1 immunized mice gave IC_{50} to

cypermethrin at 52 μg/mL, the lowest quantification limit of detection of the ELISA was 1.8 μg/mL at 85% B/B0, and the detection limit was 0.39 μg/mL at 90% B/B0. The antibody from H12-BSA immunized mice show high titers of antibody to cypermethrin with IC_{50} of 0.32 ug/mL and LOD was 0.02 ng/mL. In summary, the indirect competitive ELISA method has been developed that can be used to develop research in a manner similar.

Development of the ChE enzymes in the saliva found the developers have been able to measure the level of the enzyme, as well as with blood. The accuracy of method was shown as coefficient of variation (% CV) were less than 5% of salivary AChE = 3.08, salivary BChE = 2.91, red blood cell AChE = 2.54, and plasma BChE = 1.79. The inter-variation found that less than 5% as well, the value of the salivary AChE = 3.38, salivary BChE = 3.38, red blood cell AChE = 2.24, and plasma BChE = 3.32. Of the above methods to apply to real-life examples of voluntary groups and the control group showed Significant correlation between the activity of plasma BChE and salivary AChE ($r = 0.205$, $p = 0.041$) and between plasma BChE and salivary BChE ($r. = 0.271$, $p = 0.006$). Significant correlation was found only among the farmers in the functioning of the enzyme salivary AChE and salivary BChE ($r = 0.697$, $p = 0.000$).