



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การวิจัยและพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืชตกค้างโดยใช้เทคนิค
โครมาโตกราฟีและอิมมูโนแอสเสย์
**Research and Development of Analytical Methods for Detecting Pesticide
Residues using Chromatographic Techniques and Immunoassay**

โดย ดร.ทิพวรรณ ประภามณฑล และคณะ

สิงหาคม 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
(31 กรกฎาคม 2550 - 30 มิถุนายน 2554)

การวิจัยและพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืชตกค้างโดยใช้เทคนิค
โครมาโตกราฟีและอิมมูโนแอสเสย์

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

คณะผู้วิจัย	สังกัด
ดร. ทิพวรรณ ประภามณฑล	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ดร. ฉายสุรีย์ สุภวิไล	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ดร. จิรประภา วิภาษา	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ผศ. ดร. สมพร จันทร์ระ	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ผศ. ดร. มุกดา ภัทราราวาพันธ์	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ดร. ชูชาติ สันทรทรัพย์	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ในชุดวิจัยแบบมุ่งเป้า “การพัฒนาเกษตรยั่งยืน” ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ ซึ่งมีส่วนช่วยสนับสนุนงานวิจัยระดับปริญญาเอก ในการผลิตคู่มือบัณฑิตในสาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 4 คน คือ นางสาวนิตา พักตร์วิไล นายสุรัตน์ หงษ์สิบสอง นางสาวสรัญญา ถีป้อม และ นางสาวบุหรัน พันธุ์สุวรรณ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งเป็นหน่วยงานหลักที่รับผิดชอบโครงการฯ ที่อำนวยความสะดวกในการบริหารจัดการด้านเงินทุนวิจัยและร่วมสมทบเงินทุนวิจัยร้อยละ 25 ของเงินทุนทั้งหมด อีกทั้งอำนวยความสะดวกในเรื่องของอุปกรณ์ เครื่องมือ ในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ และสนับสนุนงานวิทยานิพนธ์ของนักศึกษาระดับปริญญาเอก สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในความดูแลของ ดร.ทิพวรรณ ประภามณฑล

ขอขอบคุณอาสาสมัครในพื้นที่อำเภอฝาง และอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ที่เสียสละให้ตัวอย่างเลือดน้ำลาย และปัสสาวะสำหรับใช้ตรวจวัดการสัมผัสสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช และขอขอบคุณหนูเมาส์ BALB/c จำนวนหลายชีวิตที่อุทิศร่างกายเพื่อการทดลองและผลิตแอนติบอดีต่อสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

สัญญาเลขที่ DBG5080018
ชื่อโครงการ การวิจัยและพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืชตกค้างโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีและอิมมิวโนแอสเสย์
ชื่อนักวิจัย ทิพวรรณ ประภามณฑล¹ นายสุรียุ สุภวิไล¹ จิรประภา วิภาษา¹สมพร จันทระ² มุกดา ภัทราราวาพันธ์² ชูชาติ สันทรทรัพย์³
¹สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ ²คณะวิทยาศาสตร์ ³คณะเกษตรศาสตร์ 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) ของ carbendazim ในตัวอย่างอยู่ที่ 0.0025 และ 0.005 mg/kg ตามลำดับ ซึ่งค่า LOD และ LOQ ของวิธีการสกัดที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถวิเคราะห์ได้ในระดับที่ต่ำกว่าค่า maximum 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 และ 0.025 mg/kg ตามลำดับ ค่า inter-batch recovery อยู่ในช่วง 98.2 ± 0.002 และ %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 เป็นสารที่มีความหลากหลายเนื่องจากมีหลาย 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 LOD ใน อยู่ในช่วง 0.001 ถึง 0.005 mg/kg และค่า LOQ อยู่ที่ 0.005 ถึง 0.01 mg/kg ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่า 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 antibody ที่ได้ จาก H1- BSA มีค่า ร้อยละ 50 ของการยับยั้งของ cypermethrin ที่ 52 $\mu\text{g/L}$ โดย LOQ เท่ากับ 1.8 $\mu\text{g/L}$ ที่ ร้อยละ 85 ของการยับยั้งด้วย cypermethrin และ ค่า LOD ของ indirect competitive ELISA เท่ากับ 0.39 $\mu\text{g/L}$ ที่ร้อยละ 90 ของการยับยั้งด้วย antibody ต่อ cypermethrin นอกจากนี้แอนติบอดีที่ได้จากการกระตุ้นด้วย H12-BSA มีการตอบสนองที่ดีมีค่าร้อยละ 50 ของการยับยั้งด้วย cypermethrin เท่ากับ 0.32 $\mu\text{g/L}$ และค่าขีดจำกัดของการวัดด้วย indirect competitive ELISA เท่ากับ 0.02 ng/mL ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ได้มีการพัฒนาวิธี indirect competitive ELISA ที่สามารถนำไปใช้ในการพัฒนางานวิจัยในลักษณะที่คล้ายกันได้

การพัฒนาวิธีการตรวจการทำงานของ Cholinesterase 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 จากการนำวิธีดังกล่าว ไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจริงจากอาสาสมัครกลุ่มเกษตรกรและกลุ่มควบคุมพบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ 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 Prapamontol¹, Chaisuree Supavilai¹, Jiraprapa Wipasa¹, Somporn Chantara², Mookda Pattarawarapan², Choochad Santasup³

¹Research Institute for Health Science, ²Faculty of Science, ³Faculty 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 multi-peaks of individual pyrethroid 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 IC₅₀ to

cypermethrin at 52 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the lowest quantification limit of detection of the ELISA was 1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ at 85% B/B0, and the detection limit was 0.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ at 90% B/B0. The antibody from H12-BSA immunized mice show high titers of antibody to cypermethrin with IC_{50} of 0.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 ($r = 0.697$, $p = 0.000$).

สารบัญ

	หน้าที่
กิตติกรรมประกาศ	I
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	II
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	IV
สารบัญ	VI
สารบัญตาราง	X
สารบัญรูปภาพ	XII
บทที่ 1 บทนำ (introduction)	1-1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1-1
1.2 ข้อจำกัดด้านเทคนิคการวิเคราะห์ในปัจจุบัน- Chromatography vs Immunoassay	1-5
1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ	1-7
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร (literature reviews)	2-1
2.1 วิธีเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์สารเคมีกำจัดเชื้อราในกลุ่ม benzimidazole	2-1
2.2 วิธีเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids	2-5
2.2.1 ประวัติสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids	2-5
2.2.2 การสลายตัวของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids	2-7
2.2.3 ความเป็นพิษของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroid	2-7
2.2.4 การวิเคราะห์หาสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids	2-8
2.3 การพัฒนาวิธี ELISA เพื่อตรวจวัดสารเคมีกำจัดแมลง cypermethrin	2-9
2.3.1 วิธีการมาตรฐานสำหรับการตรวจสอบของดีดีทีและอนุพันธ์และ cypermethrin ในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและทางชีวภาพ	2-10
2.3.2 รูปแบบของ ELISA	2-11
2.4 การพัฒนาวิธีตรวจการทำงานของ cholinesterase enzyme ในน้ำลายแทนการตรวจในเลือด	2-14
บทที่ 3 วิธีวิจัย (methodology)	3-1
3.1 วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์สารเคมีกำจัดเชื้อราในกลุ่ม benzimidazole	3-1
3.1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน	3-1
3.1.2 การทำ calibration curve ของสารมาตรฐานคาร์เบนดาซิม (Carbendazim)	3-1
3.1.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์	3-1

สารบัญ (ต่อ)

	หน้าที่
3.1.4 การประยุกต์การสกัดตัวอย่างในการวิเคราะห์สารคาร์เบนดาซิม (carbendazim) ในตัวอย่างส้มสายน้ำผึ้ง	3-3
3.1.4.1 วิธีการเตรียมตัวอย่าง	3-3
3.1.4.2 วิธีการวิเคราะห์	3-3
3.2 วิธีตรวจวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids	3-5
3.2.1 การเตรียมสารมาตรฐาน	3-5
3.2.2 การทำ calibration curves ของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids	3-5
3.2.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงตกค้างกลุ่ม synthetic pyrethroids ในผัก ผลไม้	3-6
3.2.3.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์	3-6
3.2.3.2 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ	3-6
3.2.4 การเลือกสารละลาย (solvent) ในการสกัดตัวอย่าง	3-7
3.2.5 การทดสอบประสิทธิภาพในขั้นตอนการ clean up เพื่อกำจัดตัวรบกวนในตัวอย่าง	3-8
3.2.6 การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดโดยใช้ผักผลไม้ที่มีความหลากหลาย	3-9
3.2.7 การทดสอบความคงทนของวิธีการสกัดตัวอย่างผักผลไม้	3-9
3.3 การพัฒนาวิธี ELISA เพื่อการตรวจวัดสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroid - cypermethrin	3-10
3.3.1 Preparation of haptens for synthetic pyrethroid insecticides	3-10
3.3.2 การเตรียม immunogens และ capture antigen	3-12
3.3.3. การผลิตแอนติบอดีต่อ cypermethrin	3-15
3.3.4 การตรวจหาแอนติบอดีโดยการวิธี indirect ELISA	3-15
3.3.5 การหา ความไวและความจำเพาะต่อสาร โดยวิธี indirect competitive ELISA (ic-ELISA)	3-15
3.4 การพัฒนาวิธีตรวจการทำงานของ cholinesterase enzyme ในน้ำลายแทนการตรวจในเลือด	3-16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้าที่
3.4.1 การพัฒนาวิธีการตรวจวัดการทำงานของ cholinesterase enzyme ในน้ำลาย	3-16
3.4.2 การประยุกต์ใช้วิธีการตรวจวัดการทำงานของ cholinesterase enzyme ในน้ำลายเปรียบเทียบกับ cholinesterase enzyme ใน serum	3-17
3.4.2.1 Study site and Population	3-17
3.4.2.2 Sample and Data Collection	3-17
3.4.2.3 Quality Assurance and Control	3-17
3.4.2.4 Statistic analysis	3-17
บทที่ 4 ผลการวิจัย (results)	4-1
4.1 วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์สารเคมีกำจัดเชื้อรา carbendazim	4-1
4.1.1 Chromatographic separation ของสารมาตรฐาน carbendazim	4-1
4.1.2 พัฒนาวิธีสกัดตัวอย่างโดยใช้ spiked samples	4-2
4.1.3 ผลการวิเคราะห์สารป้องกันกำจัดเชื้อราตกค้างในผลไม้	4-4
4.2 วิธีตรวจวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids	4-4
4.2.1 Chromatographic separation ของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids	4-4
4.2.2 Retention time, target ion และ temperature condition ของสารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids โดยเครื่อง GC-MS	4-8
4.2.3 การพัฒนาวิธีสกัดตัวอย่างโดยใช้ spiked samples	4-10
4.2.3.1 ระดับของการวิเคราะห์	4-10
4.2.3.2 ค่าร้อยละของการกลับคืนของการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids	4-11
4.2.3.3 ค่า intra-batch และ inter-batch ของการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids	4-13
4.2.4 การเลือกใช้สารละลาย (solvent) ในการสกัดตัวอย่าง	4-13
4.2.5 การทดสอบประสิทธิภาพในขั้นตอนการ clean up เพื่อกำจัดตัวรบกวนในตัวอย่าง	4-15
4.2.6 การทดสอบความสามารถของวิธีการสกัดโดยใช้ผักผลไม้ที่มีความหลากหลาย	4-16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้าที่
4.2.7 การทดสอบความคงทนขององวิธีการสกัดตัวอย่างผักผลไม้	4-17
4.3 การพัฒนาวิธี ELISA เพื่อการตรวจวัดสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroid- Cypermethrin	4-18
4.3.1 การยืนยัน โครงสร้างของสาร Haptens	4-18
4.3.2 ปริมาณ โปรตีนที่ได้จาก immunogens และ capture antigens	4-22
4.3.3 การทดสอบหาแอนติบอดีโดยวิธี ELISA	4-22
4.3.4 การตอบสนองของแอนติบอดีจากหนูจากการกระตุ้นด้วย immunogen ชนิด H1 - BSA	4-23
4.3.5 คุณลักษณะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อสารแฮปแทน 1	4-23
4.3.6 การพัฒนาวิธีการตรวจ cypermethrin ด้วยวิธี indirect competitive ELISA (ic-ELISA) จากแอนติบอดีที่ได้จากการใช้ H1-BSA กระตุ้นให้เกิดแอนติบอดี	4-24
4.3.7 การทดสอบความไวและความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ cypermethrin ของแอนติบอดีจากหนูที่กระตุ้นด้วย H1-BSA	4-25
4.3.8 การตอบสนองของแอนติบอดีจากหนูจากการกระตุ้นด้วย immunogen ชนิด H12 - BSA	4-26
4.3.9 คุณลักษณะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อสารแฮปแทน 1 และ แฮปแทน 2	4-27
4.3.10 การพัฒนาวิธีการตรวจ cypermethrin ด้วยวิธี indirect competitive ELISA (ic-ELISA) จากแอนติบอดีที่ได้จากการใช้ H12-BSA กระตุ้นให้เกิดแอนติบอดี	4-28
4.3.11 การตอบสนองของแอนติบอดีจากหนูที่กระตุ้นด้วย immunogen ชนิด H2 - BSA	4-29
4.4 การนำวิธี การตรวจการทำงานของ cholinesterase enzyme ในน้ำลาย แทนการตรวจในเลือดจากวิธีที่ทำการพัฒนาแล้ว	4-30
4.4.1 ระดับการทำงานของเอนไซม์ cholinesterase จากกลุ่มอาสาสมัคร	4-30
4.4.2 Correlation of ChE activities in four enzymes	4-31
4.4.3 Quality Assurance and Control	4-33
4.4.4 ผลการศึกษาเปรียบเทียบกับแบบสัมภาษณ์	4-36

สารบัญ (ต่อ)

	หน้าที่
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผล (conclusion)	5-1
เอกสารอ้างอิง	เอกสารอ้างอิง1-1
ภาคผนวก 1	ภาคผนวก 1 -1
ภาคผนวก 2	ภาคผนวก 2 -1

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ปริมาณการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชชนิดต่างระหว่างปีพ.ศ. 2534-2554	1-1
1.2 ระดับสารเมตาโบไลต์ของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในปีสภาวะจากเด็กนักเรียน อายุ 12-13 ปี จากโรงเรียนแห่งหนึ่งในอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่	1-4
1.3 กลุ่มสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและเทคนิคที่ใช้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารเคมีตกค้าง	1-6
2.1 แสดงค่า MRLs ของ carbendazim ในตัวอย่างพืช (mg/kg)	2-3
2.2 ประวัติสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids	2-6
2.3 การสลายตัวสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids ในพืช ในน้ำผิวดิน และในตะกอนดิน	2-7
2.4 ความเป็นพิษของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids	2-8
3.1 ความเข้มข้นของสารมาตรฐานของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroid 8 ระดับ (หน่วย ng/mL ใน ethyl acetate)	3-5
3.2 สารมาตรฐานในระดับความเข้มข้น 3 ระดับในการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุด	3-7
3.3 การวัดการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างๆ	3-16
4.1 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่าง (LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณได้(LOQ)ของสารคาร์เบนดาซิม (Carbendazim)	4-2
4.2 ค่าร้อยละของการกลับคืนและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์สารคาร์เบนดาซิม (Carbendazim) จากการเติมสารมาตรฐาน 2 ระดับความเข้มข้น	4-3
4.3 ค่าร้อยละของการกลับคืน ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าร้อยละของความแปรปรวนของ inter-batch จากการวิเคราะห์สารคาร์เบนดาซิม(Carbendazim) (เติมความเข้มข้น 0.01 mg/kg)	4-3
4.4 ปริมาณสารคาร์เบนดาซิม(carbendazim)ที่ตรวจพบในกลุ่มตัวอย่างส้มทั่วไป, ส้มออร์แกนิกและส้มปลอดภัย	4-4
4.5 Gas chromatographic conditions of synthetic pyrethroid insecticide analysis	4-5
4.6 Retention time (RT) and ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids	4-6
4.7 Retention time, target ion และ ของสารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS	4-9

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.8 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่าง (LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณได้ของสารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids	4-11
4.9 ค่าร้อยละของการกลับคืนและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids จากการเติมสารมาตรฐาน 3 ระดับความเข้มข้นคือ ระดับต่ำ, ระดับกลาง และระดับสูง	4-12
4.10 ค่าร้อยละของการกลับคืน ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าร้อยละของความแปรปรวนของ intra-batch and inter-batch จากการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids (เติมความเข้มข้น 100 µg/kg)	4-13
4.11 ค่าร้อยละการกลับคืนของสารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids ที่สกัดด้วย solvents 4 ชนิด	4-14
4.12 ค่าร้อยละการกลับคืนของสารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids ที่ clean up ด้วย SAX/PSA และ activated carbon	4-16
4.13 ค่าร้อยละการกลับคืนของการทดสอบความสามารถของวิธีการสกัดโดยใช้ผักผลไม้ที่มีความหลากหลาย	4-17
4.14 ค่าร้อยละการกลับคืนของการทดสอบความคงทนของวิธีการสกัดตัวอย่างผักผลไม้	4-17
4.15 ความเข้มข้นของ โปรตีน และ haptens density ของ immunogens และ coating antigens	4-22
4.16 Mean และ Median (\pm SD) ของค่าการทำงานของเอนไซม์ในผู้บริโภคน จำนวน 100 คน และ เกษตรกร จำนวน 100 คน	4-30
4.17 ลักษณะการสัมผัสสารเคมีของกลุ่มตัวอย่าง	4-37
4.18 การป้องกันตัวจากการสัมผัสสารเคมีฯ ขณะฉีดพ่น ในเกษตรกร	4-38
4.19 ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์	4-39

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
1.1 ระดับดีดีที (p,p'-DDE; p,p'-DDT) ในพลาสติกจากกลุ่มเกษตรกรและกลุ่มผู้บริโภคในจังหวัดเชียงใหม่	1-3
2.1 แสดงโครงสร้างของ carbendazim	2-1
2.2 กลไกการสลายตัวของ carbendazim ในพืช	2-2
2.3 แสดงกลไกการสลายตัวของ carbendazim ในสิ่งแวดล้อม	2-2
2.4 Schematic structure of cholinesterase active site of human PBChE monomer	2-15
3.1 ขั้นตอนการวิเคราะห์ carbendazim ในตัวอย่าง	3-4
3.2 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่างและการ cleanup	3-8
3.3 โครงสร้างของ haptens ที่สังเคราะห์ กับ cypermethrin	3-10
3.4 ขั้นตอนการสังเคราะห์ hapten 1	3-11
3.5 ขั้นตอนการสังเคราะห์ hapten 2	3-12
3.6 แสดง immunogen ชนิด 1 hapten ต่อ 1 โปรตีน	3-13
3.7 แสดง immunogen ชนิด 2 hapten ต่อ 1 โปรตีน	3-14
3.8 ลักษณะโครงสร้างของ 3-Phenoxy benzoic acid	3-14
4.1 (ก) สารมาตรฐานคาร์เบนดาซิม(carbendazim) ที่ไม่ผ่านการสกัดใน pooled sample (ข) สารมาตรฐานคาร์เบนดาซิม(carbendazim) ที่ผ่านการสกัดใน pooled sample	4-1
4.2 Typical chromatograms concentration 1µg/mL; (a) Lambda cyhalothrin, 3 peaks; (b) Permethrin, 2 peaks; (c) Cyfluthrin, 5 peaks; (d) Cypermethrin, 5 peaks; (e) Fenvalerate, 3 peaks; (f) Deltamethrin, 3 peaks; (g) Mixed synthetic pyrethroids 20 peaks and bifenthrin, as an internal standard, 1 peak.	4-7
4.3 Typical standard calibration curve ของ permethrin (2 isomers)	4-8
4.4 chromatogram of synthetic pyrethroid insecticides (1 µg/mL) using GC-MS: 1. lambda-cyhalothrin, 3 peaks; 2.permethrin, 2 peaks; 3. cyfluthrin, 4 peaks; 4. cypermethrin, 3 peaks; 5. fenvalerate, 2 peaks; 6. deltamethrin, 2 peaks.	4-10
4.5 Flow diagram of sample extraction and cleanup steps	4-15
4.6 ¹ H (a), ¹³ C (b) – NMR chromatogram (a, b) และ MS (c) chromatogram ขึ้นยันโครงสร้างของhapten 1	4-19
4.7 ¹ H (a), ¹³ C (b) – NMR chromatogram (a, b) และ MS (c) chromatogram ขึ้นยันโครงสร้างของhapten 2	4-21

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.8 การตอบสนองของแอนติบอดีจากหนูกลุ่ม U ที่กระตุ้นด้วย H1-BSA ทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ซีรัมเจือจางที่ 1 / 1000 และ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ H1 - OVA เป็นตัวเกาะเพลท	4-23
4.9 ความเข้มข้นของแอนติบอดีในซีรัมของเมาส์ U4 ในวันที่ 84, 244 วันและ 322 วัน indirect ELISA ก่อนที่จะรวมซีรัม โดย H1 - OVA ถูกใช้เป็นแอนติเจนเคลือบที่ 2 $\mu\text{g} / \text{mL}$	4-24
4.10 (a) ผลกระทบของเมทานอลต่อประสิทธิภาพการทำงานของแอนติบอดีจากซีรัมหนู U1 เจือจาง 1/10,000 (b) ผลกระทบจาก pH ของบัฟเฟอร์ ต่อประสิทธิภาพการทำงานของแอนติบอดี ทดสอบโดยวิธี non-competitive indirect ELISA โดยใช้ H1-OVA เป็นตัวเกาะเพลท	4-25
4.11 Dose response curve of log concentration of cypermethrin and %B/B0	4-26
4.12 การตอบสนองของแอนติบอดีต่อ immunogen H12-BSA ของหนูกลุ่ม T ทดสอบโดยวิธี non-competitive indirect ELISA โดยใช้ซีรัมเจือจาง 1/1000, (a) ใช้ H1-OVA เกาะเพลท (b) ใช้ 3PBA-OVA เกาะเพลท	4-27
4.13 ความเข้มข้นของแอนติบอดีในซีรัมของเมาส์ T3 กระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีด้วย H12-BSA ในวันที่ 84, 244 วันและ 322 วัน indirect ELISA ก่อนที่จะรวมซีรัม โดย H1 - OVA ถูกใช้เป็นแอนติเจนเคลือบที่ 2 $\mu\text{g} / \text{mL}$	4-28
4.14 ผลกระทบของเมทานอลต่อประสิทธิภาพการทำงานของแอนติบอดีทดสอบโดยวิธี Non-competitive indirect ELISA โดยใช้ H1-OVA เป็นตัวเกาะเพลท และ ซีรัมจากหนู T3 เจือจาง 1/10,000	4-28
4.15 Dose response curve of log concentration of cypermethrin and %B/B0	4-29
4.16 การตอบสนองของแอนติบอดีต่อ immunogen H2-BSA ของหนูกลุ่ม S ทดสอบโดยวิธี non-competitive indirect ELISA โดยใช้ซีรัมเจือจาง 1/1000 และ ใช้ 3PBA-OVA เกาะเพลท	4-30
4.17 Significantly correlation ระหว่างการทำงานของเอนไซม์ plasma BChE และ salivary AChE ($r= 0.205, P = 0.041$) ในกลุ่มผู้บริโภคน (n=100)	4-31
4.18 Significantly correlation ระหว่างการทำงานของเอนไซม์ plasma BChE และ salivary BChE activities ($r= 0.271, P = 0.006$) ในกลุ่มผู้บริโภคน (n=100)	4-32
4.19 Significantly correlation ระหว่างการทำงานของเอนไซม์ salivary AChE และ salivary BChE activities ($r= 0.846, P=0.000$) ในกลุ่มผู้บริโภคน (n=100)	4-32

สารบัญรูปร่างภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.20 Significantly correlation ระหว่างการทำงานของเอนไซม์ salivary AChE และ salivary BChE activities ($r= 0.846, P=0.000$) ในกลุ่มเกษตรกร ($n = 100$)	4-33
4.21 ค่า Mean ของการทำงานของเอนไซม์ salivary AChE ใน controls ทั้งหมด (inter-variation) มีค่าอยู่ระหว่าง 3.15-3.83 mU/mL (Mean activity \pm 2SD)	4-34
4.22 ค่า Mean ของการทำงานของเอนไซม์ salivary BChE ใน controls ทั้งหมด (inter-variation) มีค่าอยู่ระหว่าง 3.28-3.78 mU/mL (Mean activity \pm 2SD)	4-34
4.23 ค่า Mean ของการทำงานของเอนไซม์ red blood cell AChE ใน controls ทั้งหมด (inter-variation) มีค่าอยู่ระหว่าง 5.07-5.65 U/mL (Mean activity \pm 2SD)	4-35
4.24 ค่า Mean ของการทำงานของเอนไซม์ plasma BChE ใน controls ทั้งหมด (inter-variation) มีค่าอยู่ระหว่าง 3.59-4.19 U/mL (Mean activity \pm 2SD)	4-35

บทที่ 1
บทนำ (introduction)

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย: สถานการณ์ของปัญหาการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช

เกษตรกรรมส่วนใหญ่ของประเทศไทยพึ่งพิงสารเคมีทางการเกษตร (agrochemicals) ได้แก่ ปุ๋ยเคมี สารเคมีกำจัดศัตรูพืช (pesticides) รวมทั้งสารเร่งการเจริญเติบโตเป็นปัจจัยหลักการผลิต ดังเห็นได้จากมีการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชเพิ่มมากขึ้นมาโดยตลอด ดังในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ปริมาณการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชชนิดต่างระหว่างปีพ.ศ. 2534-2554

ปี พ. ศ.	ปริมาณสารเคมีกำจัดศัตรูพืชนำเข้า (ตัน)				รวม
	สารเคมีกำจัดแมลง (insecticide)	สารเคมีกำจัดเชื้อรา (fungicide)	สารเคมีกำจัดวัชพืช (herbicide)	อื่นๆ	
2534	5,560	2,087	7,071	311	15,029
2544	8,356	5,384	20,957	2,341	37,038
2545	9,046	5,680	22,670	2,238	39,634
2546	9,790	6,732	31,879	8,549	56,950
2547	8,372	6,429	35,572	2,676	53,049
2548	7,929	47,507	16,401	3,635	16,401
2549	9,383	62,129	20,487	3,764	95,763
2550	10,626	79,239	21,590	4,869	116,323
2551	11,255	68,825	25,332	4,486	109,897
2552	10,367	97,957	24,680	4,590	137,594
2553	23,417	9,671	80,278	4,332	117,698
2554 (ม.ค.-มี.ค.)	6,850.93	2,585.88	25,442.67	1,459.83	36,339

Source: Chunyanuwat, 2004, กรมวิชาการเกษตร, 2011

ปัจจุบันทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมของโลกกำลังเข้าสู่สภาพเสื่อมโทรม เนื่องจากพฤติกรรมการบริโภคที่เปลี่ยนแปลงส่งผลให้ต้องมีการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อรองรับความเปลี่ยนแปลงนั้นด้วย เดิมมนุษย์อาศัยอยู่โดยคำนึงถึงความสอดคล้องกับสภาพพื้นที่และสภาพภูมิอากาศส่งผลต่อการผลิตที่ยั่งยืน แต่เมื่อมีนโยบายพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ โดยเน้นเกษตรแบบอุตสาหกรรมเชิงเดี่ยวเพื่อการส่งออก ซึ่งมีส่วนสนับสนุนให้เกษตรกรใช้สารเคมีทางการเกษตรเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร

ประเทศไทยจัดว่าเป็นผู้ส่งออกผลผลิตทางเกษตรที่สำคัญของโลก โดยในปี 2553 พบว่ามีมูลค่าการส่งออกอยู่ที่ 199.24 พันล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) แต่ในขณะเดียวกันก็มีการนำเข้าสารเคมีทางการเกษตรมากขึ้นด้วย จากข้อมูลสถิติการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืช เพิ่มขึ้นทุกปี ซึ่งจากข้อมูลการนำเข้าในปี พ.ศ. 2544 (ม.ค. – มี.ค.) พบว่าปริมาณนำเข้าอยู่ที่ 36,339 ตัน และในปี พ.ศ. 2553 พบว่ามีการนำเข้าเพิ่มขึ้นเป็น 117,698 ตัน เมื่อทำการแยกประเภทของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่นำเข้าพบว่า สารเคมีกำจัดวัชพืช (herbicide) มีการนำเข้ามากที่สุด คือ 80,278 ตัน หรือ ร้อยละ 68 ของการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชทั้งหมด รองลงมาคือ สารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืชอยู่ที่ 23,417 ตัน ร้อยละ 20 ของการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชทั้งหมด (กรมวิชาการเกษตร, 2554)

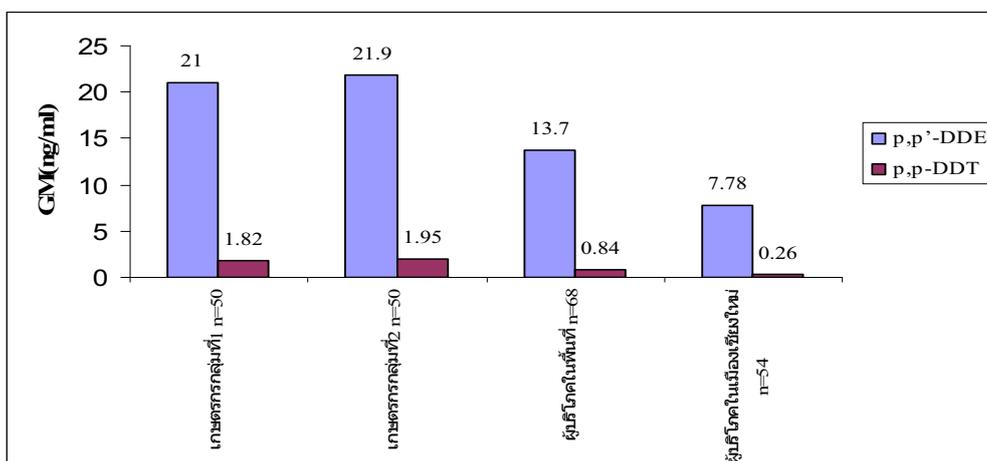
สารเคมีกำจัดแมลงจัดเป็นสารเคมีทางการเกษตรที่ควรมีการศึกษาวิจัยเนื่องจากสารเคมีกำจัดแมลงเป็นสารเคมีที่มีพิษร้ายแรงต่อมนุษย์ และมีการใช้เพิ่มมากขึ้นแต่ผู้ใช้ยังขาดการควบคุมและดูแลตั้งแต่การนำเข้า การผลิต การจำหน่าย และการขนส่ง การใช้ การเก็บรักษาและการทำลาย ส่งผลกระทบต่อสุขภาพอนามัยมนุษย์ และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ทำให้เกิดโรค หรือเกิดอันตรายถึงชีวิต ในปัจจุบันสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ (synthetic pyrethroid insecticide) มีการใช้เพิ่มขึ้นเนื่องจากมีการห้ามใช้และห้ามนำเข้าสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืชกลุ่มออการ์โนคลอรีน (organochlorine insecticide) เพราะเป็นสารที่ตกค้างยาวนานในสิ่งแวดล้อม กลุ่มออการ์โนฟอสเฟต (organophosphate insecticide) และกลุ่มคาร์บาเมต (carbamate insecticide) จำนวนมากที่เป็นสารดูดซึมสะสมในพืชและสัตว์ได้

สำหรับประเทศไทย สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์มีการใช้อย่างกว้างขวาง ทั้งในพื้นที่เกษตรกรรม ในบ้านเรือน และงานด้านสาธารณสุข จากข้อมูลสถิติการนำเข้าของกรมวิชาการเกษตรพบว่าการนำเข้าเพิ่มขึ้นทุกปี โดยในปี 2553 มีการนำเข้า 844.9 ตัน มูลค่าประมาณ 37 ล้านบาท แม้ว่าสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ จะเป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายกับไพรีทริน แต่ประสิทธิภาพด้านความคงทนในสภาพแวดล้อม และความเป็นพิษมีสูงกว่า อีกทั้งสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ยังเป็นสารออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทต่อแมลงและมนุษย์ รวมทั้งมีความเป็นพิษต่อสัตว์ ได้แก่ ผึ้ง และสัตว์น้ำ คือปลา

นอกจากนี้สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์บางตัวยังส่งผลต่อระบบสืบพันธุ์ของเพศชาย และยังก่อให้เกิดโรคมะเร็ง

สำหรับสถานการณ์การตกค้างของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ ข้อมูลจากกรมวิชาการเกษตร (2549) พบว่า สารไซเปอร์เมทรินมีการตกค้างสูงสุดในผักและผลไม้ส่งออก ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ที่ตกค้างในพืชจึงมีความจำเป็นอย่างมาก เพื่อความปลอดภัยจากการบริโภคผักและผลไม้ และเป็นผลดีต่อการส่งออกผักและผลไม้ แต่ในปัจจุบันวิธีที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างมีหลายขั้นตอน อีกทั้งต้องใช้สารสกัดจำนวนมากผู้วิจัยจึงทำการพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างที่ง่ายและรวดเร็ว เพื่อประหยัดเวลา ปริมาณตัวอย่างและสารที่ใช้ในการสกัด เพื่อลดต้นทุนในการวิเคราะห์

จากการศึกษาการสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในเกษตรกรและผู้บริโภคทั้งที่เป็นผู้ใหญ่ เด็กนักเรียน และหญิงมีครรภ์ในระหว่างปี พ.ศ. 2543- 2549 โดย คณะผู้วิจัยจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่าง ปี 2544- 2549 (Stuetz et al., 2001, Kunstadter et al., 2001, Panuwet et al., 2004, Zimmermann et al. 2005, Asawasinsopon et al., 2006a, Asawasinsopon et al., 2006b, Stuetz et al., 2006, Prapamontol et al. 2006, Panuwet et al., 2007a, Panuwet et al., 2007b) พบว่า กลุ่มตัวอย่างประชากรมีการสัมผัสสารเคมี อย่างน้อย 3 กลุ่ม ประกอบด้วยกลุ่มorganochlorines (อาทิ ดีดีที: p,p'-DDE; p,p'-DDT) ดังในรูปที่ 1.1 และ กลุ่มorganophosphates และ กลุ่ม synthetic pyrethroids ดังในตารางที่ 1.2



รูปที่ 1.1 ระดับดีดีที (p,p'-DDE; p,p'-DDT) ในพลาสมาจากกลุ่มเกษตรกรและกลุ่มผู้บริโภคในจังหวัดเชียงใหม่ (Prapamontol et al., 2006)

จากรูปที่ 1.1 จะเห็นได้ว่าเกษตรกรและผู้บริโภคในพื้นที่การเกษตรมีการสัมผัสสารดีดีทีสูง ดีดีทีเป็นสารที่มีฤทธิ์รบกวนระบบฮอร์โมนในมนุษย์ (human endocrine disruptors) โดยระดับของดีดีทีที่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับระดับ testosterone และในเชิงบวกกับระดับ estrogen ในเพศชาย และมีความสัมพันธ์เชิงลบกับระดับ thyroid hormone ในตัวอ่อนในครรภ์ โดยการตรวจในเลือดจากสายรก [Asawasinsopon et al., 2006 a, b)] EAK น่าจะอ้าง 2 papers

ตารางที่ 1.2 ระดับสารเมตาโบไลต์ของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในปัสสาวะจากเด็กนักเรียน อายุ 12-13 ปี จากโรงเรียนแห่งหนึ่งในอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

Pesticides	Metabolites	% Detection (n=207)	Metabolite Levels			
			Mean±SD (ng/ml)	GM (ng/ml)	Min-Max (ng/ml)	Ref value* (ng/ml)
Organophosphate insecticides:						
- Parathion	PNP	98	4.15±3.63	2.87	0.28-19.47	ยังไม่กำหนด
- Chlorpyrifos	TCPY	92	4.33±5.04	2.81	0.20-34.53	ยังไม่กำหนด
Synthetic pyrethroid insecticides:						
- Chlorpyrifos	3-PBA	47	2.06±7.70	0.67	0.03-74.00	1
- Cyfluthrin,	c-DCCA	40	2.13±10.08	0.61	0.16-91.45	2
Permethrin,	t-DCCA	37	1.83±2.81	1.19	0.44-19.90	2
Cypermethrin						

Ref: Panuwet et al., 2007a.

* Heudorf et al., 2006.

จากตารางที่ 1.2 ซึ่งศึกษาในเด็กนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 1 (อายุ 12-13 ปี) ตรวจพบเมตาโบไลต์ (metabolites) ของกลุ่ม organophosphates และ synthetic pyrethroids ถึงร้อยละ 37- 98 ของกลุ่มนักเรียน 207 คน แม้ว่าเมตาโบไลต์ จะไม่เกินค่า Reference value ที่ยอมให้มีได้ในประชาชนทั่วไปก็ตาม

นอกจากนี้ยังมีรายงานเบื้องต้นโดย ปริญญา ภาณุเวชและคณะ (2007) ซึ่งทำการศึกษากการสัมผัสสารเคมีกำจัดเชื้อราโดยทำการศึกษาในตัวอย่างปัสสาวะของกลุ่มนักเรียนชั้นอายุ 10-15 ปี จำนวน 320 คนที่อาศัยอยู่ในเขตตำบลโป่งแยง อำเภอแม่ริม และตำบลอินทขิล อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ พบ มีสาร ethylenethiourea (ETU) ร้อยละ 13 (Panuwet et al., 2007b) สาร ETU เกิดจากการสลายตัวของสารเคมีกำจัดเชื้อราในกลุ่ม ethylene-bis dithiocarbamates (EBDCs) ซึ่งใช้กันมากที่สุดกลุ่มหนึ่ง ได้แก่ mancozeb, maneb, nabam, zineb สาร ETU มีความสำคัญในด้านผลกระทบต่อสุขภาพโดยจัดเป็นสารที่อาจก่อมะเร็งได้ (WHO, 1988)

จากการศึกษาเหล่านี้ จึงสามารถอนุมานได้ว่าเกษตรกรและผู้บริโภคหรือผู้ที่ไม่ได้ทำการเกษตรมีการสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืชอย่างน้อย 4 กลุ่ม คือ organochlorines, organophosphates, synthetic pyrethroids และ dithiocarbamates ซึ่งมีการนำเข้าเพิ่มมากขึ้นมาโดยตลอด และจากการตรวจพบในกลุ่มผู้บริโภคนั้น อนุมานได้ว่าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชเหล่านี้อยู่ในห่วงโซ่อาหารและเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ในที่สุด ซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ว่าอาหารของเรายังไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค ในการผลิตอาหารปลอดภัยนั้น ในเบื้องต้นต้องมีการตรวจสอบสารเคมีตกค้างคัดกรองในผลผลิต/วัตถุดิบ ซึ่งวิธีที่ใช้อยู่ในปัจจุบันคือชุดตรวจจีที (GT) ซึ่งพัฒนาโดยคุณกรอบทอง รูปหอมและคณะ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชุดตรวจนี้เป็นการตรวจกลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟต และ คาร์บาเมต ในภาคการเกษตรซึ่งมีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชหลายชนิดดังหลักฐานการนำเข้าและการตรวจพบในร่างกายมนุษย์ดังกล่าวแล้ว และมีความพร้อมในระดับหนึ่งในห้องปฏิบัติการของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งส่วนใหญ่จะตรวจวิเคราะห์กลุ่ม organophosphates และ carbamates โครงการวิจัยฯ นี้ จึงได้พัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มที่ใช้กันมาก เช่น กลุ่ม synthetic pyrethroids และกลุ่ม dithiocarbamates

1.2 ข้อจำกัดด้านเทคนิคการวิเคราะห์ในปัจจุบัน- Chromatography vs Immunoassay

ระดับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชตกค้างจะอยู่ในระดับต่ำมากในระดับนาโนกรัมต่อกรัมหรือต่อมิลลิลิตร (หรือระดับ ppb) ของสารตัวอย่าง แต่มีความสำคัญเพราะเป็นสารพิษที่มีอันตรายและเป็นพิษต่อสุขภาพได้ วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารเคมีตกค้างจะอิงเทคนิค chromatography เช่น การวิเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่ม organophosphates จะใช้เทคนิค gas chromatography- flame photometric detection (GC-FPD) หรือ gas chromatography- mass spectrometric detection (GC-MS) สำหรับกลุ่ม synthetic pyrethroids และกลุ่ม dithiocarbamates จะใช้เทคนิค Gas chromatography- electron capture detection (GC-ECD) หรือ GC-MS ซึ่งวิธีต่างๆ ที่ใช้เทคนิคเหล่านี้จะต้องเตรียมตัวอย่างให้สะอาดก่อนฉีดเข้าเครื่องเพื่อตรวจวิเคราะห์ ทั้งนี้เพราะสารตัวอย่างที่เตรียมไม่สะอาดพอจะทำให้ chromatogram มี base line ไม่เรียบ ส่งผลให้แปลผลผิดได้ และที่สำคัญคือทำให้ detector เสียได้ ซึ่งปัญหาหลักที่เกิดขึ้นบ่อยๆ ดังนั้น ในการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์จะใช้เวลาและค่าใช้จ่ายพอๆ กัน จึงทำให้ใช้เวลานานในการออกผลตรวจ อีกทั้งมีราคาแพงถึงตัวอย่างละ 2,000-3,000 บาท ดังนั้น โครงการวิจัยฯ นี้ จึงได้มีการพัฒนาวิธีใหม่ๆ ที่มีราคาไม่แพงและสามารถออกผลตรวจได้รวดเร็ว ทั้งนี้โดยอาศัยเทคนิคการจับตัวของแอนติเจน และแอนติบอดีในรูปแบบ immunoassay เช่น enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งแต่เดิมมีการใช้มากในการตรวจทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ แต่สารเคมีกำจัดศัตรูพืชส่วนใหญ่มีขนาด โมเลกุลค่อนข้างเล็ก (400-600 Da) จึงจำเป็นต้องเตรียมขนาด โมเลกุลให้ใหญ่ขึ้นเป็นสารอิมมิวโนเจน (immunogen)

เพื่อนำไปกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง (หนู กระต่าย) ดังนั้น วิธี immunoassay จึงเป็นวิธีตรวจสอบสารเคมีแต่ละชนิด ซึ่งเหมาะสำหรับการตรวจคัดกรองตัวอย่างจำนวนมาก (massive screening) อีกทั้งสามารถตรวจได้ในภาคสนามได้และมีราคาไม่แพง ในขณะที่วิธี GC และ HPLC สามารถวิเคราะห์สารได้มากชนิดใน 1 ครั้ง (multiple components) ดังนั้น ทั้งวิธีที่ใช้เทคนิค chromatography และ immunoassay จึงเสริมศักยภาพซึ่งกันและกันในการวิเคราะห์สารเคมีในระดับต่ำๆ

ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีตรวจสอบ synthetic pyrethroids แบบ ELISA เพื่อตรวจสอบคัดกรอง สาร cypermethrin residue และเพื่อพัฒนาการตรวจวัด cholinesterase activity โดยทำในตัวอย่างน้ำลาย แทนการตรวจในเลือดด้วยเพื่อประเมินการสัมผัสสารเคมีกลุ่ม organophosphates และ carbamates ซึ่งสารเคมี 2 กลุ่มนี้สามารถยับยั้งการทำงานของ cholinesterase enzymes ซึ่งได้ครอบคลุมร้อยละ 35 ของกลุ่ม/ชนิดสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่ต้องการตรวจติดตามสถานการณ์การใช้และสารตกค้างในประเทศไทย ดังในตารางที่ 1.3

ตารางที่ 1.3 กลุ่มสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและเทคนิคที่ใช้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารเคมีตกค้าง

Pesticides	Techniques	
	Chromatography	Immunoassay
1. Insecticides:		
1.1 Organochlorines	*GC-ECD/GC-MS	* DDT, *Dicofol, *Chlorpyrifos
1.2 Organophosphates	*GC-FPD/GC-MS	**Cholinesterase
1.3 Carbamates	***HPLC-FLD	
1.4 Synthetic pyrethroids	**GC-ECD/ GC-MS	** Cypermethrin
2. Fungicides- dithiocarbamates	**HPLC, GC-ECD/GC-MS	***
3. Herbicides	***HPLC	***

จากตารางที่ 1.3 ปัจจุบันสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ดำเนินการอยู่แล้ว 5 วิธี (*) ได้ดำเนินการจากโครงการวิจัยนี้ อีก 4 วิธี (**) และจะดำเนินการในระยะต่อไป อีก 4 วิธี (***)

ดังนั้น ในรายงานวิจัยครั้งนี้ จึงเป็นการรายงานการวิจัยและพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืช กลุ่ม synthetic pyrethroid insecticides และ dithiocarbamate fungicides และได้พัฒนาใน 2 เทคนิคคือ chromatographic

techniques และ immunoassay เพื่อให้สามารถตรวจสอบสารตกค้างในตัวอย่างต่างๆ ได้ เช่น ผัก ผลไม้ และตัวอย่างอื่นๆ รวมทั้งเพื่อตรวจสอบการรับสัมผัสสารเคมีกลุ่ม organophosphates และ carbamates

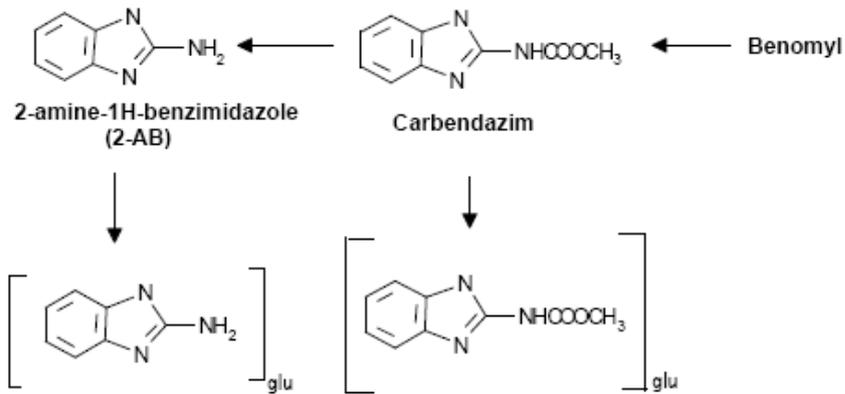
1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อวิจัยและพัฒนาวิธีที่สามารถตรวจได้รวดเร็ว (rapid) และมีความไว (sensitive) ในการวิเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืชตกค้าง โดยเน้นให้มีการเตรียมตัวอย่างที่ง่าย (simple) เพื่อลดต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ทั้งในด้านเวลา ค่าวัสดุและสารเคมี

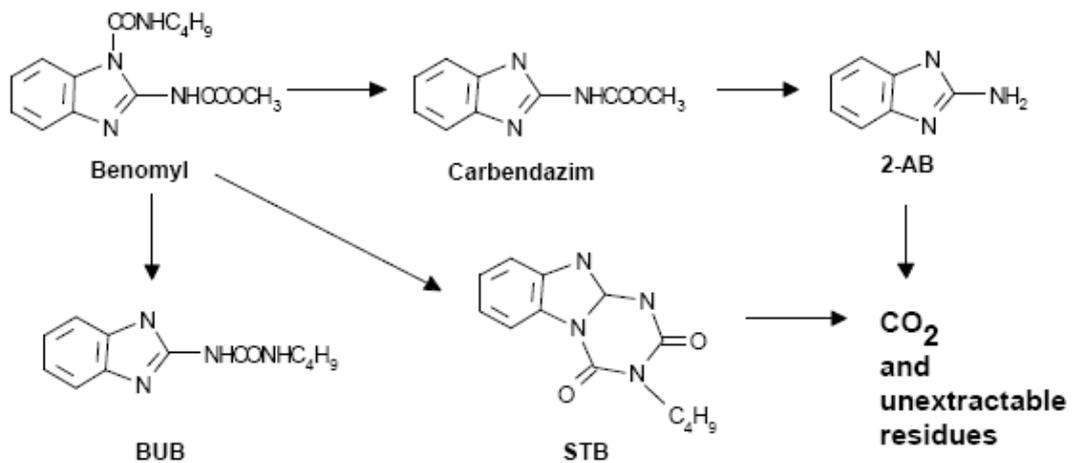
โดยมีวัตถุประสงค์เฉพาะเป็น 3 ประเด็น ดังนี้

- (1) เพื่อพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างที่ง่ายและรวดเร็วสำหรับวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids และสารเคมีกำจัดเชื้อราในกลุ่ม carbendazim ในระดับต่างๆ โดยใช้เทคนิค gas chromatography-electron capture detection (GC-ECD) และยืนยันการผลตรวจโดยใช้เทคนิค gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)
- (2) เพื่อพัฒนาวิธี ELISA สำหรับตรวจสอบสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ ชนิด cypermethrin ในตัวอย่างผักและผลไม้
- (3) เพื่อพัฒนาวิธีวัดการทำงานของ cholinesterase enzyme ในน้ำลายแทนการตรวจในเลือด

และคาร์เบนดาซิมมีกลไกการสลายตัวในพืชและสิ่งแวดล้อม แสดงดังรูปที่ 2.2 และ 2.3



รูปที่ 2.2 กลไกการสลายตัวของ carbendazim ในพืช



รูปที่ 2.3 แสดงกลไกการสลายตัวของ carbendazim ในสิ่งแวดล้อม

2.1.2 การคงทนของ carbendazim ในสิ่งแวดล้อม

ครึ่งชีวิต (half-life) ของ carbendazim ในดินประมาณ 40 วัน (Otto, 1975) และในน้ำและตะกอนดิน มีค่า half-life เท่ากับ 61 วัน (ในสภาวะไม่ sterile) และ 303 วัน (ในสภาวะ sterile) (Arthur, *et al.*, 1989b) ขณะที่มีการตรวจวิเคราะห์ carbendazim พบว่า มี % recoveries ประมาณ 90% หลังจากเก็บตัวอย่างแอปเปิ้ลไว้ 18 เดือน และ peaches 26 เดือน (Hoesterey and Tomic, 1995a,b) และ % recoveries เท่ากับ 74-82% หลังจากเก็บมะเขือเทศและถั่วเขียวไว้ 30 เดือน (Goldberg, 1989a) ทั้งนี้จากการศึกษาของ Deardorff (1991) พบว่า benomyl, carbendazim และ 2-amino-1H-benzimidazole

ยังคงอยู่ในดินได้มากกว่า 9 เดือน (95% recovery) และ carbendazim คงอยู่ในถั่วเหลืองมากกว่า 36 เดือน (Goldberg, 1989b; McNally, 1991b) นอกจากนี้ยังมีค่าสารตกค้างสูงสุดที่ยอมให้

มีได้ (maximum residue limits, MRLs) ของ carbendazim ในตัวอย่างพืชของแต่ละประเทศแสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงค่า MRLs ของ carbendazim ในตัวอย่างพืช (mg/kg)

Plants	Thailand	CODEX	EU	Australia	Korea
Garlic	-	-	0.1	-	1.0
Chili	2.0	2.0	0.1	-	-
Ginger root	-	-	-	10	-
Pepper	-	-	0.1	-	-

การตรวจวิเคราะห์ carbendazim มีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง liquid chromatography ที่ต่อกับดีเทคเตอร์ mass spectrometry (LC-MS) (Blasco *et al.*, 2006) ขณะที่มีการใช้ตัวทำละลายในการสกัดหลายชนิดด้วยกัน เช่น acetonitrile (Romero-Gonzalez *et al.*, 2008), ethyl acetate (Blasco *et al.*, 2006 and Pan *et al.*, 2008), dichloromethane (Hiemstra *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังมีการ homogenize การเขย่า และการสกัดด้วยคลื่นเสียง (sonicating) (Pan *et al.*, 2008) และมีการสกัดด้วยเทคนิค solid-phase extraction (SPE) ที่บรรจุด้วย C₁₈ เพื่อให้สารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์มีความเข้มข้น (Juan-Garcia *et al.*, 2007) ส่วนการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) มีการประยุกต์โดยการปรับเปลี่ยนการใช้ mobile phase เช่น methanol-water (Pan *et al.*, 2008) หรือ acetonitrile-water (Singh *et al.*, 2007) เพื่อให้ลักษณะพีคมีรูปร่างที่ดีและมีความละเอียดมากขึ้น ในปัจจุบันมีการตรวจวิเคราะห์ carbendazim ในตัวอย่างผลไม้ ผัก น้ำ ดิน และไวท์ เป็นจำนวนมาก

การศึกษาของ Zamora และคณะ (2003) เป็นการศึกษา carbendazim, fuberidazole และ thiabendazole ในตัวอย่างน้ำ ด้วยเทคนิค SPE โดยใช้ C₁₈ เป็น cartridge และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง spectrofluorimetry

Michel และ Buszewski (2004) ได้ทำการศึกษาตรวจวิเคราะห์ carbendazim ตกค้างในตัวอย่างผัก โดยใช้เทคนิคการสกัด matrix solid-phase dispersion (MSPD) และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC-UV) ที่ความยาวคลื่น 279 nm ใช้ column แบบ switching ซึ่งจากการศึกษาที่ความเข้มข้น 0.04, 0.08 และ 0.1 g/g พบ %recoveries เท่ากับ 84.3-90.7%

Nozal และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาสารเคมีกำจัดเชื้อราในกลุ่ม azolic จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ cyproconazole, diniconazole, tetraconazole, thiabendazole, flusilazole, triadimenol,

triadimefon, carbendazim และเป็นผลพลอยได้จากการสลายตัวของ 2-aminobenzimidazole ในตัวอย่างเห็ดขาวที่ ซึ่งสกัดด้วยเทคนิค SPE และใช้ polymeric เป็น solid phase และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS ทั้งนี้มีการประยุกต์วิธีการโดยการศึกษาปัจจัยต่างๆ ได้แก่ mobile phase, column temperature, corona current และ fragmentor voltage ซึ่งจากการศึกษาพบ % recoveries อยู่ในช่วง 83-109% ค่า SD ต่ำกว่า 10% และ LOD เท่ากับ 9-31 $\mu\text{g/L}$

Singh และคณะ (2007) ทำการตรวจวิเคราะห์ thiophanate methyl [1.2-alpha-(3-methoxycarbonyl-2-thioureido)benzene] และ carbendazim ในตัวอย่างกะหล่ำปลีและมะเขือเทศ ซึ่งสกัดด้วยเทคนิค Microwave-assisted extraction (MAE) และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC จากการศึกษาคพบ % recoveries ของ carbendazim เท่ากับ 69-75%. และทำการยืนยันผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-MS

Pan และคณะ (2008) ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิคการสกัดแบบ Ultrasonic solvent extraction (USE) ในการตรวจวิเคราะห์ monocrotophos, dimethoate, imidacloprid, carbendazim, carbaryl และ simazine จากตัวอย่างใบผัก ซึ่งการศึกษาคครั้งนี้ทำการศึกษาคชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ระยะเวลาการสกัด และขั้นตอนการสกัด ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) ซึ่งจากการสกัดแบบขั้นตอนเดียว สกัดด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate ปริมาตร 40 mL และ sonication เป็นระยะเวลา 35 นาที พบ % recovery มากกว่า 83% และ LOQ ต่ำกว่า 1.4 $\mu\text{g/kg}$ และจากการศึกษาคครั้งนี้พบว่าวิธี USE เป็นวิธีที่ประหยัดและมีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ monocrotophos, dimethoate, imidacloprid, carbendazim, carbaryl และ simazine ในใบผักเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดจากการ homogenized extraction method

Thurman และ Ferre (2008) ทำการวิเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืช 301 ชนิด ในตัวอย่างพริกไทยสด และมะเขือเทศ โดยใช้เครื่อง Agilent G6410A Triple Quadrupole Mass Spectrometer (QQQ) ซึ่งจากการศึกษาค carbendazim โดยใช้วิธีการสกัดของ QuEChERS method พบ LOD ของพริกไทยสด เท่ากับ 0.5 $\mu\text{g/kg}$ และมะเขือเทศ เท่ากับ 1.0 $\mu\text{g/kg}$

Radisic และคณะ (2009) ทำการตรวจวิเคราะห์ acephate, monocrotophos, carbendazim, acetamiprid, dimethoate, simazine, carbofuran, atrazine, diuron, DNOC (4,6-dinitro-o-cresol), malathion และ tebufenozide ในตัวอย่างน้ำผลไม้ ด้วยเครื่อง LC-MS-MS ทำการสกัดด้วยเทคนิค matrix solid-phase extraction (MSPE) โดยใช้ diatomaceous earth และชะด้วย dichloromethane จากการศึกษาคพบ % recoveries เท่ากับ 71-118% ค่า SD เท่ากับ 5-15% ค่า LOD เท่ากับ 0.01-0.94 ng/mL และ LOQ เท่ากับ 0.03-3.12 ng/mL

ขณะที่ Wu และคณะ (2009) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ carbendazim และ thiabendazole (TBZ) ในตัวอย่างดินและน้ำ ด้วยเทคนิค dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) โดย

ใช้เครื่อง HPLC และดีเทคเตอร์ fluorescence ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด คือ chloroform (CHCl₃), % recoveries ของ carbendazim และ TBZ เท่ากับ 50.8 and 70.9% , LOD ในตัวอย่างน้ำ เท่ากับ 0.5-1.0 ng/mL และในตัวอย่างดินเท่ากับ 1.0-1.6 ng /g และค่า SD เท่ากับ 3.5-6.8% (n=5), % recoveries ของ carbendazim และ TBZ จากการเติม (piking) ในน้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 20 ng/mL เท่ากับ 84.0-94.0% และ 86.0-92.5% ตามลำดับ และในดินที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 ng/g % recoveries เท่ากับ 82.0 และ 93.4%.

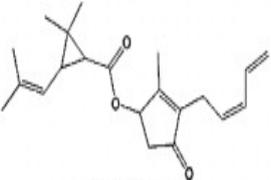
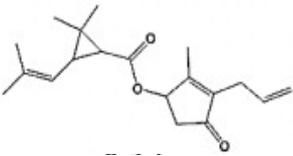
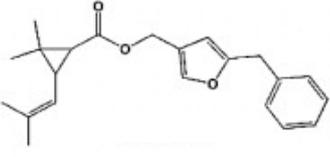
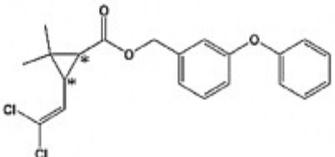
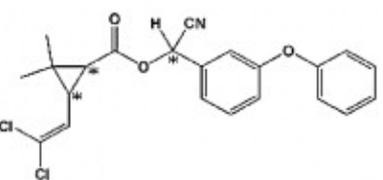
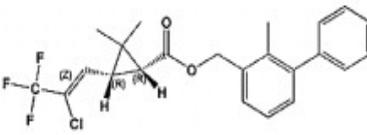
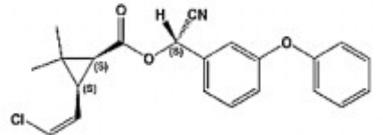
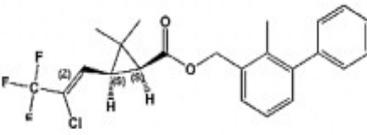
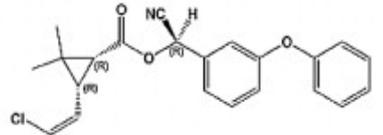
2.2 วิธีเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids

2.2.1 ประวัติสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids

สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids ผลิตขึ้นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2513 และมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นหลักจากทั่วโลกมีการห้าม ยกเลิก และมีการควบคุมการใช้สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม organochlorines และสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมทบางตัว สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids ได้มีการใช้อย่างกว้างขวางทั้งในพื้นที่ชุมชนเพื่อกำจัดแมลงต่างๆในบ้านรวมถึงทางสาธารณสุข และมีการใช้มากในพื้นที่เกษตรกรรมเพราะสารนี้มีความสามารถในการกำจัดแมลงได้อย่างรวดเร็ว (knock down) หลังจากแมลงได้สัมผัสสารนี้จะเข้าไปทำให้เกิดความผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้เกิดอาการกระตุก และตายในที่สุด สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids ที่มีการใช้อย่างแพร่หลายได้แก่ cypermethrin, permethrin, fenvalerate, และ deltamethrin (Heudorf et al., 2006).

สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม แสดงดังตารางที่ 2.2 โดยกลุ่มที่ 1 (Type I) เป็นกลุ่มที่ไม่มีการเติมสารกลุ่มไซยาโน (non-cyano group) และกลุ่มที่ 2 (Type II) มีการเติมสารกลุ่มไซยาโน (cyano group) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดแมลงให้มากยิ่งขึ้น การพัฒนาประสิทธิภาพการทำงานของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids ซึ่งจากเดิมสารไพรีทรินซึ่งสลายตัวได้อย่างรวดเร็วเมื่อโดนแสง ในยุคแรกก็มีการพัฒนาโครงสร้างให้มีความคงทนเพิ่มมากขึ้น ยุคที่สองมีการเติม aromatic alcohols และยุคที่ 3 มีการพัฒนาโดยเพิ่มโครงสร้างของธาตุกลุ่ม halogen และมีการพัฒนาเป็น Type II โดยเติมสารกลุ่มไซยาโน ทำให้มีความเป็นพิษเพิ่มมากขึ้น และในยุคสุดท้ายมีการพัฒนาโครงสร้างที่มีความหลากหลาย โดยมีหลาย isomer จึงทำให้สามารถใช้งานได้อย่างกว้างขวาง

ตารางที่ 2.2 ประวัติสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids

	Type I	Type II
Natural compounds		
	pyrethrin	
1 st synthetic analogs		
	allethrin	
2 nd aromatic alcohols		
	remethrin	
3 rd halogenation and α -cyano addition		
	permethrin	cypermethrin
4 th isomeric enrichment		
	(1 <i>R</i> , 3 <i>R</i>) - bifenthrin	(1 <i>R</i> , <i>cis</i> , α <i>S</i>) - cypermethrin
		
	(1 <i>S</i> , 3 <i>S</i>) - bifenthrin	(1 <i>S</i> , <i>cis</i> , α <i>R</i>) - cypermethrin

2.2.2 การสลายตัวของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มsynthetic pyrethroids

สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มsynthetic pyrethroids เป็นสารที่มีการสลายตัวได้อย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มorganochlorines โดยมีการสลายตัวเมื่อถูกแสง สำหรับบนใบพืชเมื่อถูกแสงการสลายตัวอยู่ในช่วง 4-28 วัน ในน้ำผิวดินอยู่ในช่วง 20-50 วัน และในตะกอนดินอยู่ในช่วง 50-90 วัน ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและโครงสร้างของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มsynthetic pyrethroids แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 การสลายตัวของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มsynthetic pyrethroidsในพืช ในน้ำผิวดิน และในตะกอนดิน

Synthetic pyrethroid insecticides	ในพืช (วัน)	ในน้ำผิวดิน (วัน)	ในตะกอนดิน (วัน)
lamda-cyhalothrin	9	7	28-44
permethrin	10	51-71	5-42
cyfluthrin	14	4	13.5-23.8
cypermethrin	4-12	>50	<14
fenvalerate	14-28	21	15-90
deltamethrin	5.9-17	2	31-36

2.2.3 ความเป็นพิษของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มsynthetic pyrethroid

จากการรายงานของ The German Federal Environment Agency (2548) พบว่าค่าความเป็นพิษของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ค่า LD₅₀ อยู่ในช่วง 20 - >5000 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว (กิโลกรัม) เมื่อทำการจำแนกความเป็นพิษ องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้จัดให้ สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids อยู่ในระดับเป็นพิษน้อย (slightly hazardous) และ ไม่เป็นพิษ (unlike the present acute) ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับ US EPA แสดงดังตารางที่ 2.4 แต่สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids จะมีความเป็นพิษสูงในผึ้งและปลา สำหรับผึ้งหากสัมผัสก็ตายทันที และสำหรับปลาก็มีความสามารถในการรับต่ำมาก ขึ้นอยู่กับชนิดของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids

ตารางที่ 2.4 ความเป็นพิษของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids

Synthetic insecticides	pyrethroid	การจำแนกตามความเป็นพิษ		LD ₅₀ มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว (กิโลกรัม)		
		WHO	US EPA	Bee	Fish	Rat (ppm)
Type I						
	permethrin	-	II	HT	VHT	1200
Type II						
	cypermethrin	U	II	HT	VHT	250
	deltamethrin	U	II	HT	VHT	135
	fenvalerate	-	II	HT	HT	450
	lamda-cyhalothrin	III	II	HT	HT	56
	cyfluthrin	-	II	HT	VHT	250

Note: a.i: active ingredient

Class II: moderately hazardous (U.S. Environmental Protection Agency: US EPA)

Class III: slightly hazardous U: unlike the present acute; (World Health Organization: WHO)

Fish: Very high toxic (VHT) = < 0.1, high toxic (HT) = 0.1-1 ppm

Bee: Highly toxic (HT); kill upon contact as well as residue

2.2.4 การวิเคราะห์หาสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids

สารเคมีกำจัดแมลงนั้นจะต้องมีการเตรียมตัวอย่างเพื่อให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์ ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ และเครื่องมือที่ต้องการวิเคราะห์ การเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์นั้นมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้องและน่าเชื่อถือ ซึ่งการเตรียมตัวอย่างการที่น่าสนใจนั้นต้องง่าย ประหยัด และมีความถูกต้อง โดยทั่วไปขั้นตอนแรกคือการสกัดสารโดยใช้สารทำละลายในการสกัดเรียกว่า liquid-liquid partition จากการศึกษาคพบว่าสารละลายที่นิยมใช้คือ acetonitrile, acetone, hexane, ethyl acetate, methanol, and dichloromethane (Pang et al., 1994, Sannino et al., 2003, Bempelou et al., 2006, Lesueur et al., 2008)

นอกจากนี้อีกขั้นตอนที่สำคัญคือ การทำตัวอย่างที่ได้ให้สะอาด (clean up) ซึ่งจะเป็นเพิ่มความถูกต้องในการวิเคราะห์และช่วยรักษาเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ โดยเฉพาะเครื่องสามารถแยกสารได้ในระดับต่ำ เช่น GC และ HPLC ซึ่งในขั้นตอนการ clean up ส่วนใหญ่จะใช้แบบ solid phase extraction (SPE) (Zawiyah et al., 2007; Anastasiades, 2003; Masahiro et al., 2005)

จากการศึกษาขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างในผัก และผลไม้ของ Anastassiades (2003) ที่ชื่อ “QuEChERS” ซึ่งมาจาก “quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe” (รวดเร็ว, ง่าย, ถูก, มีประสิทธิภาพ, คงทน และปลอดภัย) ซึ่งใช้ปริมาณสารทำลายในการสกัดน้อย แต่จุดอ่อนอยู่ที่ประสิทธิภาพในขั้นตอนการ clean up (Masahiro et al., 2005; Lesueur et al., 2008).

2.3 การพัฒนาวิธี ELISA เพื่อตรวจวัดสารเคมีกำจัดแมลง cypermethrin

cypermethrin เป็นสารสังเคราะห์กลุ่ม synthetic pyrethroids type II ที่ออกฤทธิ์ฆ่าหลังจากที่แมลงกินหรือสัมผัสสารเข้าไป โดย cypermethrin มีการใช้อย่างแพร่หลายในการปลูกฝ้าย ัญพืช ผักและผลไม้ และสำหรับการเก็บรักษาผลผลิต โครงสร้าง cypermethrin คล้ายกับ pyrethrum ซึ่งเป็นสารกำจัดแมลงธรรมชาติที่มีอยู่ในดอก pyrethrum โดยได้ปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ฤทธิ์แรงขึ้นและมีความเสถียรมากขึ้นกว่าสารจากธรรมชาติ

ผลของ cypermethrin จะขึ้นอยู่กับกลไกการปฏิสัมพันธ์กับช่องโซเดียมในเซลล์ประสาทที่เปิด และปิดเพื่อให้เกิดการส่งสัญญาณประสาท โดยการเปิดและปิดนี้จะช้าลงจากไม่มีผลลิวนาที่เป็น วินาติ นอกจากนี้ cypermethrin ยังรบกวน receptors อื่นๆ ในระบบประสาท ผลก็คือเกิดการ กระตุ้นซ้ำของอวัยวะที่รับความรู้สึก อาการจากพิษรวมถึงความรู้สึกที่ผิดปกติของใบหน้า เวียนหัว ปวดหัว คลื่นไส้ เบื่ออาหาร และความเหนื่อยล้า อาเจียนและการหลั่งในกระเพาะอาหารเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ cypermethrin ยังมีผลทำให้ผิวหนังและตาระคายเคืองโดยปกติอาการจะหายไปหลังจากไม่กี่ วัน แต่ในผู้ป่วยที่มีการสัมผัสอย่างรุนแรง อาจมีอาการกล้ามเนื้อกระตุก และชักกระตุก ในกรณี เช่นนี้อาการอาจยังคงมีอยู่เป็นเวลานานหลายสัปดาห์

cypermethrin มีค่าครึ่งชีวิตในดินอยู่ระหว่าง 4 และ 12 วัน อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Chapman และ Harris (1981) พบว่า cypermethrin ตกค้างยาวนานมากกว่านี้อย่างมีนัยสำคัญ โดย ในดินพื้นที่เกษตรกรรมใน Ontario แคนาดา cypermethrin สามารถตกค้างได้ยาวนานระหว่าง 4 ถึง 12 เดือนโดยมีความคงทนน้อยในดินปนทราย และคงทนมากในดินโคลน ส่วนในชั้นพื้นผิวของดิน การคงทนจะน้อยกว่าโคลน (4 ถึง 6 เดือน)

cypermethrin สามารถขับถ่ายออกทางปัสสาวะ ส่วนใหญ่ในรูปของ PBA glucuronide 4' - OH - PBA และ N-(3-phenoxy-benzoyl) glutamic acid นอกจากนี้ยังพบ cypermethrin ใน อวัยวะและเนื้อเยื่อ และตกค้างในไขมันในร่างกาย และในน้ำนมได้อีกด้วย

2.3.1 วิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจสอบของดีดีทีและอนุพันธ์และ cypermethrin ในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและทางชีวภาพ

วิธีการตรวจวิเคราะห์ cypermethrin ตกค้างที่มีการพัฒนาขึ้นอย่างกว้างขวางมากในตัวอย่างพืช ดิน ผลิตภัณฑ์จากสัตว์และตัวอย่างสิ่งแวดล้อม โดยอาศัยการสกัดสารตกค้างด้วยสารทำละลายอินทรีย์ และทำให้ตัวอย่างที่จะวิเคราะห์สะอาดขึ้นโดยใช้วิธี solvent-solvent partition และ adsorption column chromatography แล้วตรวจวัดปริมาณสารตกค้างด้วย เครื่อง Gas chromatography-electron capture detection (GC-ECD) หรือ GC-MS ซึ่งวิธีดังกล่าวสามารถวิเคราะห์หาสารได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำลงไปถึงระดับ ng/mL (ppb) วิธีทางเลือกที่จะนำมาทดแทนวิธีมาตรฐานที่พัฒนาจากหลักการของวิธี HPLC-UV และ Thin layer chromatography ยังไม่เป็นที่นิยมใช้เนื่องจากวิธีมาตรฐาน GC-ECD มีความไวในการตรวจวิเคราะห์มากกว่าและการเตรียมตัวอย่างไม่แตกต่างกันมาก อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าวิธี GC-ECD จะสามารถวิเคราะห์ปริมาณได้ถูกต้องแม่นยำและเป็นที่ยอมรับแล้ว วิธีดังกล่าวยังมีข้อด้อยคือ มีการใช้สารทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมากในขั้นตอนการสกัดและเตรียมตัวอย่างให้สะอาด ดังนั้นค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างจึงสูงมาก อีกทั้งเครื่องมือในการวิเคราะห์มีราคาแพง พร้อมกับการตรวจสอบที่มีความซับซ้อน ดังนั้นจึงต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญในการดูแลและควบคุมการทำงานของเครื่อง ด้วยเหตุนี้จึงได้มีความพยายามพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ใหม่ที่สามารถดำเนินการอย่างรวดเร็ว มีประสิทธิภาพสูง โดยนักวิทยาศาสตร์ได้พัฒนาเทคนิคที่เรียบง่ายและราคาไม่แพงสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างในปริมาณมากๆ ที่เรียกว่า immunoassay (IA) เช่น วิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ที่พัฒนามาจากเทคนิค immunochemistry

เทคนิคทาง immunochemical methods เป็นวิธีทางเลือกสำหรับการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืช เนื่องจากมีความไวง่าย และคุ้มค่า วิธีการนี้ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพงที่มีความซับซ้อน สิ่งสำคัญที่สุดที่จะต้องนำมาใช้ในวิธีนี้คือ แอนติบอดี (antibody) ที่มีความจำเพาะต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ วิธี Immunoassay ที่ได้รับการพัฒนาสำหรับการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชส่วนใหญ่คือ ELISA ซึ่งมีขั้นตอนในการตรวจวิเคราะห์ที่ง่ายไม่ซับซ้อน โดยอาศัยหลักการการแข่งขันระหว่างสารที่ต้องการวิเคราะห์และสารที่รู้ความเข้มข้น และหาปริมาณสารตกค้างโดยการอ่านความเข้มของสี โดยเครื่อง ELISA reader ส่วน radioimmunoassay เป็นหนึ่งในประเภทของ Immunoassay มีความไวสูง แต่ยังมี ความกังวลเกี่ยวกับความปลอดภัยของการจัดการและการกำจัดวัสดุกัมมันตรังสี ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธี ELISA เป็นส่วนใหญ่ การออกแบบสารแฮปเทน (hapten) เป็นขั้นตอนสำคัญสำหรับการผลิตแอนติบอดีต่อสารเป้าหมาย ซึ่งสารดังกล่าวควรมีโครงสร้างคล้ายกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ให้มากที่สุดเพื่อจะได้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะที่ดีในการวิเคราะห์

2.3.2 รูปแบบของ ELISA

รูปแบบของวิธี ELISA ที่ใช้บ่อยที่สุดสำหรับการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชคือ direct competitive ELISA (dc - ELISA) และ indirect competitive ELISA (ic - ELISA)

dc - ELISA ที่เป็นรูปแบบที่มีจำนวนของแอนติบอดีจะตรึงบน microplate คงที่ซึ่งมักจะทำการโดยการบ่มค้างคืนที่ 4 องศาเซลเซียสหรือที่อุณหภูมิห้อง ตรวจวิเคราะห์สารตกค้างด้วยผลจากการลดระดับในการแย่งจับสารในตัวอย่างกับสารແປທេนที่ติดกับแอนไซม์ การวัดปริมาณสามารถวัดได้จากสีที่เกิดจากแอนไซม์บนແປທេนกับ color reagent โดยสีจะตรงข้ามกับความเข้มข้นคือ ถ้าสีเข้มแสดงว่ามีปริมาณสารในตัวอย่างน้อยและถ้าสีจางแสดงว่ามีปริมาณสารในตัวอย่างมาก สำหรับวิธี indirect ELISA, microplate จะเคลือบด้วยโปรตีนที่ต่อกับสารແປທេน ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม และจะเกิดการจับกันของแอนติบอดีกับสารในตัวอย่างและจับกับสารແປທេน ที่เกาะอยู่บนเพลท จากนั้นแอนติบอดีตัวที่สองที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนแรกแต่มีจับสารແປທេน ที่ติดคลากด้วยแอนไซม์ จะเป็นตัวบอกความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ซึ่งการแปลผลจะใช้หลักการเดียวกับ direct ELISA

ประโยชน์ของ ELISA คือขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์สามารถทำได้ง่าย โดยใช้สารทำละลายที่รวมกับน้ำได้ เช่น acetone, acetonitrile หรือ methanol สามารถที่จะใช้สกัดตัวอย่าง และนำมาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมก็สามารถวิเคราะห์ ได้ ดังมีรายงานการศึกษาในตัวอย่างต่างๆ มาก่อนหน้านี้ เช่น ในตัวอย่างอาหาร (Botchkareva et al, 2003.), น้ำ (Hao et al, 2009) ดินและตัวอย่างปัสสาวะ (Shan et al, 2004, Kim et al., 2007) แต่อย่างไรก็ตาม ก็จะมีผลของสารสกัดตัวอย่างต่อผลการวิเคราะห์ได้เรียกว่า matrix effect ทำให้เกิดผลบวกปลอม หรือ ลบปลอมได้เช่นกัน ดังนั้นหากมีปัจจัยนี้กวนมากๆ ก็จะสามารถเพิ่มกระบวนการการสกัดสารออกจากตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ เช่น การสกัด ด้วย solid phase extraction เป็นต้น

จากปัญหาของวิธีการตรวจหาสารเคมีกลุ่ม synthetic pyrethroids ที่เกิดขึ้น จึงได้มีความพยายามในการพัฒนาวิธีทางด้านอิมมิวโนแอสย์ โดยการฉีดสารกระตุ้นสัตว์ทดลองด้วยสารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunogen) ซึ่งสังเคราะห์มาจากการต่อเชื่อม (conjugate) สารอนุพันธ์ของสารที่สนใจหรือที่เรียกทั่วไปว่า haptens กับสารโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีน จากการรายงานของกลุ่มวิจัยที่ประเทศออสเตรเลีย (Lee et al., 1998) ได้ทำการเตรียม haptens ของ cypermethrin และนำมาต่อเชื่อมกับโปรตีนตรงตำแหน่งหมู่ nitro เพื่อเป็น immunogen เพื่อให้ได้แอนติบอดี แล้วนำไปทดสอบกับตัวอย่างเพื่อหาปริมาณ cypermethrin ตกค้างในตัวอย่างได้โดยวิธี ELISA แต่การพัฒนาวิธีด้านนี้ยังมีไม่มากนัก Bonwick และคณะ (1994) และ Pullen และ Hock (1995) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจาก permetrinic acid ซึ่งนำไปต่อกับโปรตีนเพื่อใช้เป็นอิมมิวโนเจน และสามารถตรวจสารไพรีทรอยด์กลุ่มที่ 1 ได้คือ allethrin, bioresmethrin, s-bioallethrin, cypermethrin,

bioallesthrin, และ pyrethrin ในขณะที่การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีสามารถผลิตได้กับทั้งสาร synthetic pyrethroids กลุ่มที่ 1 และ 2

ยังมีการรายงานแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ cypermethrin น้อยมาก แอนติบอดีส่วนใหญ่ที่มีการรายงานนั้นจะเป็นแอนติบอดีต่อไพรีทรอยด์สังเคราะห์เป็นตัวยุ่ไป หรือไม่อย่างนั้นก็จะรายงานแอนติบอดีที่จำเพาะต่อกลุ่มของ synthetic pyrethroids และบางรายงานก็จะแสดงผลของแอนติบอดีที่ทำให้ cross-reactivity ต่อ cypermethrin (Lee et al, 2004; Hao et al, 2009) เท่านั้น การผลิตแอนติบอดีได้มีการพัฒนามาเรื่อยๆ โดยเริ่มแรก จากคณะของ Pullen และ Hock ในปี 1995 โดยใช้กรด 1R - transpermethrin นำมาต่อกับ bovine serum albumin (BSA) โดยตรงและใช้เป็นแอนติเจนเพื่อมากระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกระต่ายจนได้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ permethrin, cyfluthrin, cypermethrin, S - bioallethrin และ metabolite ที่มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกัน ร้อยละ 50 ของการยับยั้งแอนติบอดี (IC_{50}) ต่อ permethrin เท่ากับ $8 \mu\text{g} / \text{L}$ มีความเป็นเชิงเส้นอยู่ระหว่างความเข้มข้น 0.4 และ $74 \text{ pg} / \text{L}$

Wengatz และคณะ (1998) ได้พัฒนาวิธี ELISA ในการตรวจหาปริมาณของ fenpropathrin โดยใช้ polyclonal antibody จากกระต่าย Shan และคณะ (1999) พัฒนาวิธี ELISA สำหรับการตรวจหา esfenvalerate ที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ในระดับต่ำมากที่สุดที่ $3.0 \mu\text{g} / \text{L}$ และมีความจำเพาะสูงโดยไม่มี cross-reactivity ต่อ synthetic pyrethroids ตัวอื่นเลย การพัฒนาวิธี ELISA ถูกนำไปใช้วัด esfenvalerate ในน้ำโดยสกัดสารด้วย SPE เพื่อเพิ่มความไวของวิธีการโดยรวม

Lee และคณะ (1998) ได้มีความพยายามที่จะผลิตแอนติบอดีต่อสาร synthetic pyrethroids กลุ่มที่ 2 ซึ่งได้แอนติบอดีที่ดีที่สุด และสามารถตรวจหาสาร deltamethrin, cypermethrin และ cyhalothrin ได้ในระดับ 2, 3 และ $5 \mu\text{g} / \text{L}$ ตามลำดับ (Lee et al., 1998)

Shan et al, (2000) ได้พัฒนาเทคนิค competitive ELISA สำหรับการตรวจสอบ permethrin โดยสังเคราะห์สารแฮปแทน 2 ชนิด คือ trans และ cis - isomers จาก 3-(4 - aminophenoxy) benzyl - 3 - (2,2 - dichloroethenyl) cyclopropane -2,2 - dimethyl และนำไปต่อกับ thyroglobulin เพื่อใช้เป็น immunogens แอนติบอดีที่ได้ทดสอบด้วยวิธี ELISA พบว่า แอนติบอดีสามารถจับสาร permethrin ที่ IC_{50} เท่ากับ $2.50 \mu\text{g} / \text{L}$ และไม่มี cross-reactivity กับไพรีทรอยด์สังเคราะห์ตัวอื่นๆ เช่น esfenvalerate, cypermethrin, deltamethrin, cyfluthrin และ ยังรายงานอีกว่า เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ดีและเหมาะสมที่จะใช้ในระบบของ ELISA ที่ระดับ 40% (v / v)

Mak และคณะ (2000) ได้ทำการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสาร synthetic pyrethroids กลุ่มที่ 2 โดยแอนติบอดีสามารถให้ IC_{50} ต่อ cypermethrin, cyfluthrin, cyhalothrin, deltamethrin, esfenvalerate, fenvalerate, และ fluvalinate ที่ 78, 205, 120, 13, 6, 8 และ $123 \mu\text{g} / \text{L}$ ตามลำดับ โดยไม่มี cross-reactivity ต่อสาร synthetic pyrethroids กลุ่มที่ 1

Watanabe และคณะ (2001) ได้พัฒนาวิธี ELISA ที่จำเพาะต่อ synthetic pyrethroids กลุ่มที่ 1 เช่น permethrin, phenothrin, resmethrin และ bioresmethrin โดยการผลิตแอนติบอดีจากกระต่าย โดยใช้สารแฮปเทนที่ได้จากอนุพันธ์ของ permethrin ต่อกับ thyroglobulin BSA หรือ OVA และได้แอนติบอดีที่มีความไวต่อ permethrin ที่ IC_{50} 30 $\mu\text{g/L}$ และ phenothrin ที่ 20 $\mu\text{g/L}$ ตามลำดับ โดย cross-reactivity ต่อ synthetic pyrethroids กลุ่มที่ 2 เช่น esfenvalerate, cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate และ fluvalinate

Lee และคณะ (2002) ได้พัฒนาวิธี competitive ELISA สำหรับการตรวจวัด deltamethrin จากการใช้ สารแฮปเทน 2 ชนิด ที่ถูกสังเคราะห์และจับกับ thyroglobulin เพื่อใช้เป็น immunogens ได้มีการปรับสภาวะต่างๆ ในระบบของ ELISA ให้เหมาะสมในการตรวจวัด deltamethrin โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 17.5 $\mu\text{g/L}$ โดยให้ค่า cross reactivity ต่อสารตัวอื่นๆ เช่น permethrin, phenothrin, bioresmethrin, cyfluthrin, cypermethrin ค่อนข้างต่ำ

วิธี ELISA ในการตรวจวิเคราะห์ cypermethrin ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดย Lee และคณะ (2004) โดยสังเคราะห์สารแฮปเทนแล้วนำไปจับกับ thyroglobulin เพื่อใช้เป็น immunogens เพื่อผลิตแอนติบอดี ผลที่ได้คือ แอนติบอดีสามารถจับกับ cypermethrin โดยให้ ค่า IC_{50} คือ 13.5 $\mu\text{g/L}$ แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อ cypermethrin ค่อนข้างสูงและมี cross reactivity ต่อ deltamethrin, phenothrin, resmethrin, fluvalinate และ Permethrin ค่อนข้างต่ำ นอกจากนี้ ยังพบว่าเมทานอล เป็นสารอินทรีย์ที่ดีที่สุดสำหรับวิธี ELISA ที่จะใช้เป็น co-solvent ที่ความเข้มข้น 40% (v/v) Mark และคณะ (2005) ได้ทำการพัฒนาวิธี ELISA ที่สามารถตรวจหา synthetic pyrethroids กลุ่มที่ 2 ได้แก่ cypermethrin, deltamethrin, cyhalothrin, cyfluthrin, fenvalerate, esfenvalerate และ fluvalinate โดยเตรียมแอนติบอดีจากการฉีดสารกระตุ้นในกระต่าย ผลที่ได้คือ แอนติบอดีสามารถจับกับสารต่างๆ ที่ IC_{50} ของ cypermethrin เท่ากับ 78 $\mu\text{g/L}$ นอกจากนี้ยังไม่พบ cross-reactivity กับ synthetic pyrethroids กลุ่มที่ 1

Gao และคณะ (2006) ได้ผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ cyhalothrin พบว่าแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อ cyhalothrin มาก ต่อมา Zhang et al., (2010) การผลิตระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อทั้ง synthetic pyrethroids กลุ่มที่ 1 และ 2 ได้สำเร็จ

จากการศึกษาของนักวิจัยกลุ่มต่างๆ ได้มีการผลิตแอนติบอดีต่อสารกลุ่ม synthetic pyrethroids หลายชนิด เช่น deltamethrin (Lee et al., 2002) cyhalothrin (Gao et al., 2006) และ cypermethrin (Lee et al., 2004) พบว่ายังไม่มีการนำไปผลิตเป็นชุดตรวจที่ใช้ง่าย ราคาถูกและสามารถนำไปใช้ทดสอบในภาคสนามได้ ดังนั้น การศึกษานี้จึงได้ผลิตแอนติบอดีต่อ cypermethrin ซึ่งเป็นสารที่มีการนำเข้ามาใช้ในประเทศมากที่สุดของสารกลุ่ม synthetic pyrethroids โดยการสังเคราะห์สาร hapten ที่มีลักษณะคล้ายกับ cypermethrin มากที่สุดแล้วนำไปกระตุ้นการทำงานของสัตว์ทดลองเพื่อให้มีการสร้างแอนติบอดี และนำแอนติบอดีที่ได้ไปพัฒนาให้เป็นชุดตรวจ

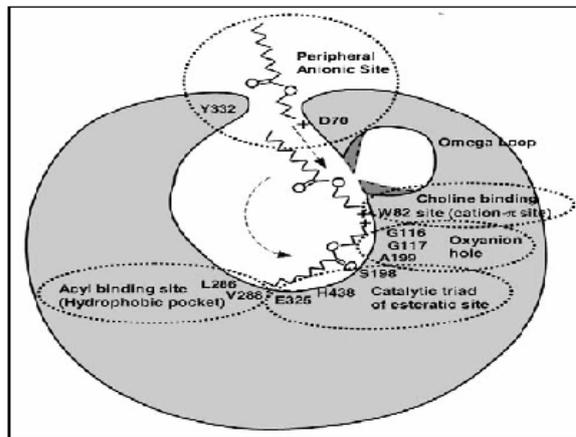
สำเร็จรูป (test kit) ที่สามารถนำไปใช้ได้สำหรับการตรวจหาการตกค้างเบื้องต้น โดยอาศัยหลักการ ELISA ที่มีความไว และความจำเพาะสูง

2.4 การพัฒนาวิธีตรวจการทำงานของ cholinesterase enzyme ในน้ำลายแทนการตรวจในเลือด

เอนไซม์ cholinesterase enzyme (ChE) แบ่งออกเป็นสองชนิดตามชนิดของสารตั้งต้น คือ acetylcholinesterase enzyme (AChE) และ butyrylcholinesterase enzyme (BChE) สารตั้งต้น acetylthiocholine chloride (ATC) สามารถถูก hydrolyze จากเอนไซม์ได้ทั้งสองชนิด แต่สารตั้งต้น butyrylthiocholine chloride (BTC) สามารถถูก hydrolyze จาก BChE ได้เพียงอย่างเดียว (Lassiter *et al.*, 1998) ชนิดของเนื้อเยื่อที่กระจายตัวและแหล่งสร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิดแตกต่างกัน โดย AChE สามารถพบมากในสมอง กล้ามเนื้อ และผนังเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดแดง ในขณะที่ BChE นั้นพบมากใน ตับ ลำไส้เล็ก หัวใจ ไต และปอด (Prody *et al.*, 1987; Dave *et al.*, 2000) รูปแบบโมเลกุลของ human RACHe คือ amphiphilic dimers แต่ของ human PBChE เป็น soluble tetramers (Massoulié *et al.*, 1993) โครงสร้างของ human PBChE ประกอบด้วย three inter-chain disulphide bridges ซึ่งจะสร้างโครงสร้าง globular สามมิติที่เฉพาะเจาะจงของ monomer และยังช่วยให้โครงสร้าง dimeric เสถียร กระบวนการ Proteolysis จะเปลี่ยนโครงสร้างจาก tetramer ไปเป็น monomers dimers และ trimers ได้เมื่อขาด SH groups โดยไม่มีผลกระทบต่อมวลโมเลกุล หรือ catalytic activity ของเอนไซม์ แต่ละ monomer (รูปที่ 2.4) จะประกอบด้วย active site ที่ลึกและแคบ 20Å โดยจะประกอบด้วยกระโถมิโน ประมาณ 5 ตัว ใน active site ประกอบด้วย 5 sub sites ซึ่งช่วยกันในการ hydrolyze สารตั้งต้น ประกอบด้วยส่วนของ peripheral anionic site จะทำหน้าที่จับสารตั้งต้นไว้บริเวณทางเข้าของ active site ส่วน choline binding site จะทำหน้าที่เลื่อนสารตั้งต้นลงมา หลังจากนั้น oxyanion hole site จะหมุนสารตั้งต้นจากแนวตั้งให้เป็นแนวนอน ในส่วนของ acyl portion site จะเป็นส่วนที่แยก BChE ออกจาก AChE เพราะว่า active site ของ BChE จะประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิด Leu286 และ Val288 ซึ่งจะทำได้ hydrolyze สารตั้งต้นที่ประกอบด้วย larger acyl group เช่น BTC ในทางตรงข้าม AChE จะประกอบด้วย phenyl rings ที่มีกรดอะมิโนชนิด Phe295 and Phe29 ที่สามารถ hydrolyze สารตั้งต้นที่ประกอบด้วย shortest acyl group ในส่วนประกอบสุดท้ายของ active site คือ catalytic triad จะประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิด Ser198 His438 และ Glu325 โดย His438 จะปล่อย protons ไปยัง Glu325 จากนั้นจะถ่ายทอด electrons ไปยัง Ser198 ทำให้ hydroxyl oxygen ของ Ser198 เปลี่ยนเป็น nucleophil ซึ่งจะจับกับ ester bond ของสารตั้งต้นทำให้เกิด acyl-enzyme intermediate และ free choline moiety ตามลำดับ สารเคมีกลุ่ม carbamates หรือ organophosphates (OP) จะทำให้ขั้นตอน hydrolysis ดำเนินช้ามาก

ซึ่งทำให้เกิดกระบวนการยับยั้งเอนไซม์แบบ irreversibly (Ekholm and Konschin, 1999; Masson *et al.*, 2001; Masson *et al.*, 2003).

2



รูปที่ 2.4 Schematic structure of cholinesterase active site of human PBChE monomer

จากงานวิจัยของ Sidell and Kaminskis (1975) พบว่า ผู้ชายมีค่า PBChE activity มากกว่าในผู้หญิงที่ไม่รับประทานยาคุมกำเนิด และผู้หญิงกลุ่มนี้จะมีค่า PBChE activity สูงกว่าผู้หญิงที่รับประทานยาคุมกำเนิด อย่างไรก็ตามหลังอายุ 60 ปีไม่มีความแตกต่างระหว่างเพศ สำหรับค่า RChE activity ในกลุ่มผู้หญิงที่รับประทานยาคุมกำเนิดนั้นสูงกว่าในกลุ่มอื่น โดยในผู้ชายมีค่า RChE activity ต่ำที่สุด โดยค่า activity จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามอายุจนกระทั่งอายุ 60 ปี จากนั้นจะไม่พบความแตกต่างเช่นเดียวกัน เอนไซม์ ChE ยังสามารถพบได้ใน body fluids ต่างๆ เช่น เหงื่อ ปัสสาวะ น้ำตา และน้ำลาย (Yamalik *et al.*, 1990) น้ำลายมนุษย์จะประกอบด้วย SChE และ SBChE โดย SBChE นั้นจะมีมากถึง 70-90% (Ueda and Yamaguchi, 1967) แหล่งกำเนิดของเอนไซม์ทั้งสองชนิด คือ ต่อม้ำลาย เบคทีเรีย เนื้อเยื่อในปาก และ สารต่างๆที่ถูกล่อยในปาก (Chauncey *et al.*, 1953) อัตราการไหลของน้ำลายนั้นไม่มีผลต่อค่า activity แต่จะเปลี่ยนแปลงไปตามช่วงเวลาของวัน งานวิจัยนี้พบว่าค่า SBChE activity ในตอน 4 a.m. นั้นมีมากเป็น 3 เท่าของตอน 4 p.m. โดยที่ผู้ชายนั้นจะมีค่า SBChE activity มากเป็น 2 เท่าของผู้หญิง [4.8 ± 2.4 (S.D.) U/l และ 2.2 ± 1.5 (S.D.) U/l ตามลำดับ] ผู้ชายที่ถูกกระตุ้นให้น้ำลายไหลจะมีค่า activity มากกว่าไม่ถูกกระตุ้นเล็กน้อย และค่า activity จะเพิ่มขึ้นในกลุ่มคนที่เป็นโรคเหงือกอักเสบด้วย มีการวิเคราะห์ SChE ในหนู rat ที่ orally intake สารเคมีกลุ่ม malathion ปริมาณ 100 500 และ 1500 ppm จากนั้นพลาสมาและน้ำลายถูกวัด antioxidant power และ ChE activity พบว่าในพลาสมามี antioxidant vitamins เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ในน้ำลายไม่มีผลกระทบ และค่า ChE activity ในหนูหลังจาก exposed เป็นเวลา 28 วัน มีค่า activity ลดลงทั้งในพลาสมาและน้ำลาย แต่ไม่พบ dose-

dependent (Abdollahi *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าค่า ChE activity ในน้ำลาย พลาสมา และสมอง ของหนู rat ถูกยับยั้ง โดย specific inhibitors และค่า SChE activity มีค่าน้อยกว่าค่า ChE activity ในพลาสมาและสมอง 180 และ 1300 เท่าตามลำดับ (Kousba *et al.*, 2003) นอกจากนี้ Borzelleca and Skalsky (1980) รายงานว่า SChE ในหนู rat นั้นเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ correlated กับ PBChE และ RChE activity หลังจาก carbaryl exposure นอกจากนี้ กลุ่มคนที่ เป็นโรคเหงือกอักเสบนั้นจะมีค่า BChE activity เพิ่มมากยิ่งขึ้น เพราะว่าเอนไซม์ตัวนี้สามารถผลิตมาจากแบคทีเรียที่อยู่ในปาก (Chuncey, 1961) โดย BChE ที่ผลิตนี้สามารถสร้าง organic acids ที่ไปทำลายเนื้อเยื่อชนิดแข็งและอ่อนได้ (Makinen, 1966) นอกจากนี้ การรักษาโรคเหงือกอักเสบด้วยวิธีต่างๆสามารถลด SBChE activity (Yamalik *et al.*, 1991) คนไข้ที่เป็นโรค Sjogren's syndrome มีค่า SChE activity เพิ่มมากขึ้น เพราะวาระดับของ lymphocyte ที่เป็นแหล่งสร้างเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น สาร Hydroxychloroquine ที่ใช้ในการรักษาสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เพราะสามารถปรับปรุงอัตราการไหลของน้ำลายได้ (Dawson *et al.*, 2005) ในทางตรงกันข้ามพบว่า คนที่ป่วยเป็นโรค dementia (Breen, 2002) และ Alzheimer's disease (Sayer *et al.*, 2004) จะมีค่า SChE activity ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control เอนไซม์ PBChE พบว่ามี positive correlation กับ RChE levels ($r=0.45$ $p<0.05$) ในกลุ่ม healthy และ OP exposed คนงานที่ทำงานในโรงงาน pesticides นั้นมีค่า ChE activities น้อยกว่ากลุ่ม healthy (พลาสมา, $p<0.05$ และ น้ำลาย, $p<0.01$ ตามลำดับ) โดยที่คนงานนั้นมักจะมีอาการเจ็บป่วยที่สอดคล้องกับอาการ cholinergic effects และ neurotoxicity จาก OP-induced เช่น อ่อนเพลีย ปวดหัว และท้องเสีย (Abdollahi *et al.*, 1996) จากผลการทดลองทั้งหมดนั้นสนับสนุนว่าน้ำลายนั้นสามารถใช้เป็น biomarker ในการประเมินค่าการสัมผัสสารเคมีกลุ่ม OP และ carbamate

บทที่ 3

วิธีวิจัย (methodology)

การวิจัยได้แบ่งออกเป็น 4 ประเด็นตามลักษณะการดำเนินงาน ดังนี้

3.1 วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์สารเคมีกำจัดเชื้อราในกลุ่ม benzimidazole

3.1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานคาร์เบนดาซิม (Carbendazim) 1 mg/mL ปริมาตร 10 mL จากสารมาตรฐานคาร์เบนดาซิม (Carbendazim) assay 99%(w/w) โดยทำการชั่งสารมาตรฐานคาร์เบนดาซิม (Carbendazim) มา 0.101 กรัม ละลายใน Acetonitrile แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 mL

2) เตรียมสารละลายมาตรฐานคาร์เบนดาซิมระดับกลาง (Intermediate Carbendazim) 100 μ g/mL โดยทำการปิเปตต์จากสารละลายมาตรฐานคาร์เบนดาซิม (Carbendazim) 1 mg/mL มา 1 mL แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 mL

3.1.2 การทำ calibration curve ของสารมาตรฐานคาร์เบนดาซิม (Carbendazim)

นำสารละลายมาตรฐานคาร์เบนดาซิม (Carbendazim) ที่เตรียมไว้ในระดับกลางมา dilute ตามความเข้มข้นต่างๆ ประกอบด้วยความเข้มข้นที่ 50, 100, 200, 300, 500 and 800 ng/mL การทำ calibration curve ปริมาณสารมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์ 20 ไมโครลิตร จะฉีดเข้าเครื่อง HPLC-UV detector ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง จากนั้นทำการคำนวณความเข้มข้นโดยใช้พื้นที่ใต้กราฟ

3.1.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

3.1.3.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในตัวอย่างผลไม้ นั้นจะใช้ตัวแทน (pooled sample) ของผลไม้ที่เตรียมมาทำการวิเคราะห์ โดยนำมาปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก ซึ่งขึ้นอยู่กับจำนวนผลไม้ที่เก็บมาเพื่อวิเคราะห์ในแต่ละครั้ง เมื่อชั่งตัวอย่างทั้งหมดจะนำมาปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งเก็บใส่หลอดพลาสติกขนาด 50 mL เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C ในการนำตัวอย่างตัวแทนมาใช้จะแบ่งตัวอย่างตัวแทนที่เก็บไว้มาทำการละลาย ซึ่งใส่หลอดสำหรับสกัด เดิมสารมาตรฐาน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงก่อนทำการสกัดตัวอย่าง

3.1.3.2 การวิเคราะห์เชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ

1) การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

นำสารละลายมาตรฐานคาร์เบนดาซิม(Carbendazim) ที่เตรียมไว้ในระดับความเข้มข้นต่างๆมาตรวจสอบโดยทำการวัดสารมาตรฐาน ดูจากเวลาและขนาดของพื้นที่ใต้กราฟ (peaks) ที่เครื่องแสดงสัญญาณการวัดได้

2) การควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์

ระดับของการวิเคราะห์

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่าง (Limit of detection: LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณได้ (limit of quantification: LOQ)

สำหรับวิธีทดสอบโดยนำตัวอย่างตัวแทนมาเติมตัวสารมาตรฐานในระดับความเข้มข้นต่างกัน 2 ระดับ จากนั้นคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: S.D.) จากนั้นสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้น (X axis) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Y axis) ของแต่ละระดับความเข้มข้น ลากเส้นตัดกราฟตัดที่แกน y จะได้ค่า SD_0 สามารถคำนวณได้จากสมการ

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่าง (LOD) = 3 SD_0

ความเข้มข้นต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณได้(LOQ)=10 SD_0

ค่าร้อยละของการกลับคืน

คือการทดสอบตัวอย่างที่เติมสารที่ต้องการวิเคราะห์ในปริมาณที่แน่นอนแล้วทดสอบปริมาณที่แท้จริงของสาร โดยคำนวณเป็นค่าร้อยละ ทั้งนี้เพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธีทดสอบต่อการสกัดและตรวจวัดสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่มีในตัวอย่าง สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\text{ค่าการกลับคืน (\%)} = ((C_s - C_u) / C_k) \times 100$$

เมื่อ: C_s =ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (mg/kg)
 C_u =ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ไม่เติมสารมาตรฐาน (mg/kg)
 C_k =ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม (mg/kg)

สำหรับวิธีทดสอบโดยนำตัวอย่าง(pooled sample) มาเติมตัวสารมาตรฐานในระดับความเข้มข้นต่างกัน 2 ระดับ ความเข้มข้นที่ 200 และ 500 ng/mL ทำการตรวจวัด 3 ซ้ำ

3.1.4 การประยุกต์การสกัดตัวอย่างในการวิเคราะห์สารคาร์เบนดาซิม (carbendazim) ในตัวอย่างส้มสายน้ำผึ้ง

การวิเคราะห์ carbendazim ในตัวอย่างแสดงดังรูปที่ 3.1 โดยมีขั้นตอนในการวิเคราะห์อย่างละเอียด ดังนี้

3.1.4.1 วิธีการเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างส้ม 10 กรัมใน Teflon plastic centrifuge tube ขนาด 50 mL เติม sodium acetate trihydrate 2 กรัม ทำการสกัดด้วย acetonitrile (มี 1% acetic acid) 10 mL เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 1 นาที แล้วนำไป sonicate ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที หลังจากนั้นนำไป centrifuge อีก 5 นาที ที่ 1500 รอบต่อนาที ดูดสารละลายชั้นบน 2 mL ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 mL ที่มี magnesium sulfate anhydrous 0.25 กรัม และ PSA adsorbent 0.15 กรัม เขย่าด้วยเครื่อง vortex 20 วินาที ดูดสารละลายชั้นบน 0.5 mL ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 mL แล้วนำไประเหยให้แห้ง ด้วย N_2 หลังจากนั้น redissolve 0.5 mL ด้วย 40/60% methanol/water

3.1.4.2 วิธีการวิเคราะห์

วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค High performance liquid chromatography –UV detector โดยใช้ column จาก Supelco, Ascentis C18 (15 cm x 4.6 mm, 5 μ m) ใช้ mobile phase A=water type I pH3 60% และ B= acetonitrile 40% , injected volume 20 μ l , flow rate 0.75 mL/min, วัดที่ 280nm run time 11min และ post run 6 min

ตัวอย่างส้ม 10 กรัมใน plastic centrifuge tube ขนาด 50 mL

เติม sodium acetate trihydrate 2 กรัม
เติม acetonitrile (1% acetic acid) 10 mL

เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 1 นาที

sonicate ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

centrifuge อีก 5 นาที ที่ 1500 รอบต่อนาที

ดูดสารละลายชั้นบน 2 mL ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 mL

เติม magnesium sulfate anhydrous 0.25 กรัม
และ PSA adsorbent 0.15 กรัม

เขย่าด้วยเครื่อง vortex 20 วินาที

ดูดสารละลายชั้นบน 0.5 mL ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 mL

นำไประเหยให้แห้ง ด้วย N₂

redissolve 0.5 mL ด้วย 40/60% methanol/water

วิเคราะห์ โดย HPLC –UV detector (280nm)

รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการวิเคราะห์ carbendazim ในตัวอย่าง

3.2 วิธีตรวจวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids

การพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างที่ง่ายและรวดเร็ว สำหรับวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids ที่ตกค้างในผัก ผลไม้ โดยใช้เทคนิค gas chromatography-electron capture detection (GC-ECD)

3.2.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

- 1) เตรียม volumetric flasks โดยล้างทำความสะอาดด้วย isooctane 3 ครั้ง และล้างด้วย methanol 3 ครั้ง และสุดท้ายล้างด้วย acetone 3 ครั้ง
- 2) เตรียมสารมาตรฐานสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids แต่ละตัวที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ใน ethyl acetate (0.01g/10 mL)
- 3) สารมาตรฐานสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroid แต่ละตัวนำมาผสมในระดับความเข้มข้น 8 ระดับ แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ความเข้มข้นของสารมาตรฐานของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroid 8 ระดับ (หน่วย ng/mL ใน ethyl acetate)

synthetic pyrethroids	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	M ₇	M ₈
lamda-cyhalothrin	10	20	50	100	150	200	250	300
permethrin	5	10	20	50	100	150	200	250
cyfluthrin	20	50	100	150	200	250	300	500
cypermethrin	5	10	20	50	100	150	200	250
fenvalerate	20	50	100	150	200	250	300	500
deltamethrin	20	50	100	150	200	250	300	500
bifenthrin (IS)	20	20	20	20	20	20	20	20

M = standard mixture, IS = internal standard

3.2.2 การทำ calibration curves ของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids

นำสารมาตรฐานสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids ที่ผสมเตรียมไว้ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 °C ในการทำ calibration curve จะทำทั้ง 8 ระดับความเข้มข้นซึ่งครอบคลุมค่า MRLs ของประเทศไทย ประกอบด้วยความเข้มข้นที่ 5, 10, 20, 100, 150, 200, 250 and 300 ng/mL โดยเติมสารไบเฟนทรินเป็น internal standard ความเข้มข้น 20 ng/mL เพื่อควบคุมค่าของการวิเคราะห์แต่ละครั้ง การทำ calibration curve ปริมาณสาร

มาตรฐานเพื่อวิเคราะห์ 1 ไมโครลิตร จะฉีดเข้าเครื่อง GC-ECD ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง จากนั้นทำการคำนวณความเข้มข้นโดยใช้พื้นที่ใต้กราฟ

3.2.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงตกค้างกลุ่ม synthetic pyrethroids ในผัก ผลไม้

3.2.3.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงตกค้างกลุ่ม synthetic pyrethroids ในตัวอย่างผัก ผลไม้ นั้นจะใช้ตัวอย่างตัวแทน (pooled sample) ของผักและผลไม้ที่เตรียมจะทำการวิเคราะห์โดยปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว โดยจะนำผักและผลไม้ที่เก็บในแต่ละช่วงเวลานำมารวมกันในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก ซึ่งขึ้นอยู่กับจำนวนผักผลไม้ที่เก็บมาเพื่อวิเคราะห์ในแต่ละครั้ง เมื่อซังตัวอย่างทั้งหมดจะนำมาปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดพลาสติกขนาด 50 mL เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C ในการนำตัวอย่างตัวแทนมาใช้จะแบ่งตัวอย่างตัวแทนที่เก็บไว้มาทำการละลาย ซึ่งใส่หลอดสำหรับสกัด เติมน้ำมาตรฐาน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงก่อนทำการสกัดตัวอย่าง

3.2.3.2 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ

การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

สารเคมีกำจัดแมลงตกค้างกลุ่ม synthetic pyrethroids แต่ละตัวนำมาตรวจสอบโดยทำการวัดสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน ดูจากเวลาและขนาดของพื้นที่ใต้กราฟ (peaks) ที่เครื่องแสดงสัญญาณการวัดได้

การควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์

1) ระดับของการวิเคราะห์

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่าง (limit of detection: LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณได้ (limit of quantification: LOQ) สำหรับวิธีทดสอบโดยนำตัวอย่างตัวแทนมาเติมตัวสารมาตรฐานในระดับความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ ความเข้มข้นที่ M_1 , M_2 , และ M_3 ทำการตรวจวัด 5 ซ้ำ แสดงดังตารางที่ 3.2 จากนั้นคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: S.D.) จากนั้นสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้น (X axis) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Y axis) ของแต่ละระดับความเข้มข้น ลากเส้นตัดกราฟตัดที่แกน y จะได้ค่า SD_0 สามารถคำนวณได้จากสมการ

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่าง (LOD) = $3 SD_0$

ความเข้มข้นต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณได้(LOQ)=10 SD₀

ตารางที่ 3.2 สารมาตรฐานในระดับความเข้มข้น 3 ระดับในการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุด

sythetic pyrethroids	ระดับความเข้มข้น (ng/mL)		
	ระดับต่ำ	ระดับกลาง	ระดับสูง
lamda-cyhalothrin	10	20	50
permethrin	5	10	20
cyfluthrin	20	50	100
cypermethrin	5	10	20
fenvalerate	20	50	100
deltamethrin	20	50	100

2) ค่าร้อยละของการกลับคืน

คือการทดสอบตัวอย่างที่เติมสารที่ต้องการวิเคราะห์ในปริมาณที่แน่นอน แล้วทดสอบปริมาณที่แท้จริงของสาร โดยคำนวณเป็นค่าร้อยละ ทั้งนี้เพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธีทดสอบต่อการสกัดและตรวจวัดสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่มีในตัวอย่าง สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\text{ค่าการกลับคืน (\%)} = ((C_s - C_u) / C_k) \times 100$$

เมื่อ: C_s = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (mg/kg)

C_u = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ไม่เติมสารมาตรฐาน (mg/kg)

C_k = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม (mg/kg)

3.2.4 การเลือกสารละลาย (solvent) ในการสกัดตัวอย่าง

ในการศึกษาขั้นตอนการเลือกใช้ออกสารละลายในการสกัดตัวอย่างนั้น ใช้วิธีการวิเคราะห์ผักและผลไม้ที่พัฒนาโดยปรับปรุงจากวิธีของ Anastassiades et al., 2003 แสดงดังรูปที่ 3.2 ทดลองสกัดตัวอย่างผักและผลไม้โดยใช้ solvents 4 ชนิดประกอบด้วย ethyl acetate (EA), dichloromethane (DCM), acetonitrile (ACN) และ acetone โดย spiked synthetic pyrethroid standard mixture โดยมีความเข้มข้นชนิดละ 0.05 mg/kg

ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดแล้ว 5 g ใส่ใน Teflon centrifuge tube, 50 mL

เติม Bifenthrin (internal standard) และ Spike standard mixture

เติมสารละลาย dichloromethane, 10 mL

เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที

Sonicate 5 นาที



กรองสารละลายผ่าน Na_2SO_4 , 5 g โดยใช้กรวยกรองแก้ว ใส่ลงใน centrifuge tube, 50 mL และทำการสกัดซ้ำด้วย สารละลาย dichloromethane, 10 mL



SPE loading (carbon cartridge, self-modified)



ทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator

redissolved ด้วย EA, 1 mL



สารสกัด 1 μl วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC – ECD (HP6890)

รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่างและการ cleanup

3.2.5 การทดสอบประสิทธิภาพในขั้นตอนการ clean up เพื่อกำจัดตัวรบกวนในตัวอย่าง

ในการศึกษาครั้งนี้มีขั้นตอนการสกัด แสดงดังภาพที่ 2 โดยในขั้นตอนการ clean up จะเลือกใช้ตัว clean up ที่แตกต่างกัน 3 ชนิดคือ SAX/PSA, activated carbon, and C_{18} วิธีของ Anastassiades et al. (2003) เป็นวิธีที่ได้ชื่อว่าเป็นวิธีที่ quick, easy, cheap, effective and ruggednesses และเรียกย่อๆว่า QuEChERS แต่วิธีนี้ไม่ได้เน้นการกำจัดสิ่งรบกวนของผักผลไม้ได้ ดังนั้น การพัฒนาครั้งนี้ มุ่งพัฒนาการกำจัดสิ่งรบกวนโดยใช้ตัว clean up ที่แตกต่างกัน 3 ชนิดคือ SAX/PSA, C_{18} และ activated carbon 500mg, cartridge 6 mL โดยนักวิจัยดัดแปลงขึ้นใช้เอง

3.3.6 การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดโดยใช้ผักผลไม้ที่มีความหลากหลาย

เพื่อทำการทดสอบความสามารถในการสกัดสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids ที่ตกค้างในผักและผลไม้ที่มีความหลากหลายของสี และองค์ประกอบอื่นๆ ทำให้ผู้วิจัยจึงทำการทดลองนำผักผลไม้ที่มีความแตกต่างของสี ทั้งที่มีสีเข้ม คือ ส้มและผักคะน้า และไม่มีสีหรือสีอ่อน คือ กะหล่ำปลี และลำไย โดยใช้วิธีสกัดแสดงดังรูปที่ 3.2

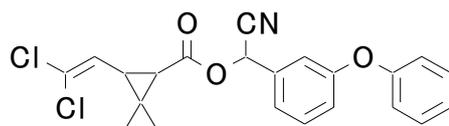
3.2.7 การทดสอบความคงทนขององวิธีการสกัดตัวอย่างผักผลไม้

เพื่อทดสอบความคงทนของวิธีสกัดสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids ที่ตกค้างในผักและผลไม้ จึงกำหนดให้นักวิทยาศาสตร์จำนวน 3 คน ทำการสกัดตัวอย่างตามขั้นตอนการสกัดที่ได้ทำการพัฒนา แสดงดังภาพที่ 2 จำนวนทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นนำตัวอย่างที่สกัดได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-ECD โดยผู้ฉีดตัวอย่างคนเดียวกัน

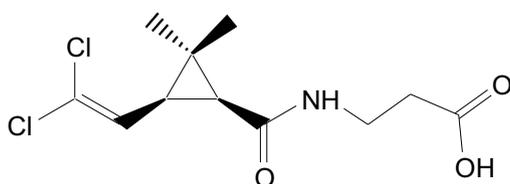
3.3 การพัฒนาวิธี ELISA เพื่อการตรวจวัดสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroid - cypermethrin

3.3.1 Preparation of haptens for synthetic pyrethroid insecticides

สังเคราะห์ haptens ที่มีโครงสร้างคล้าย cypermethrin จำนวน 2 ชนิดจาก 3-(2,2-dichloro-vinyl)-2,2-dimethyl cyclo- propanecarboxylic acid และ 3-phenoxy-benzaldehyde เป็นตัวตั้งต้นโดยสาร haptens จะมีโครงสร้างดังรูปที่ 3.3

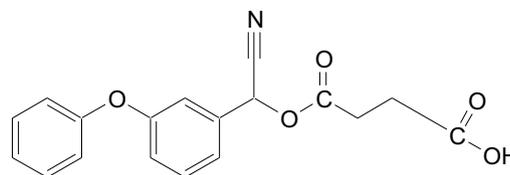


Cypermethrin



{[3-(2,2-Dichloro-vinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropanecarbonyl]-amino}-acetic acid

Hapten 1



Succinic acid mono-[cyano-(3-phenoxy-phenyl)-methyl] ester

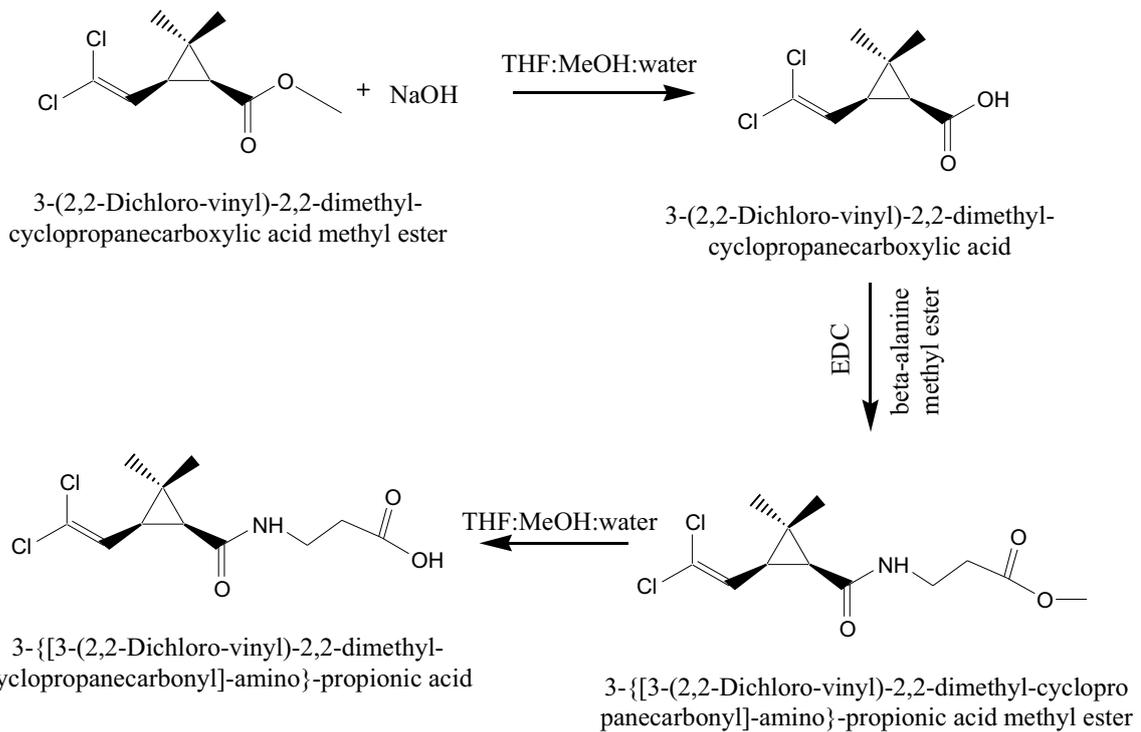
Hapten 2

รูปที่ 3.3 โครงสร้างของ haptens ที่สังเคราะห์ กับ cypermethrin

1) วิธีการสังเคราะห์ hapten1

นำ 3-(2,2-dichloro-vinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropanecarboxylic acid methyl ester 200 mg ผสมให้เข้ากันกับ NaOH 62.0 mg ใน ตัวทำละลาย THF:MeOH:water(3:2:1/v/v/v) คนที่ อุณหภูมิห้อง 4 ชม. คว้าได้สารใหม่เกิดขึ้นหรือไม่โดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) หลังจากนั้นเติมน้ำ 10 mL หลังจากนั้น สกัดด้วย ethyl acetate 2 ครั้ง ทำส่วนน้ำให้มีฤทธิ์เป็นกรด และล้างด้วยน้ำอีก 2 ครั้ง กำจัดน้ำออกด้วย Na_2SO_4 ข้ามกั้น กรองเอาแต่ส่วนใส และทำให้แห้งได้ สาร 3-(2,2-dichloro-vinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropanecarboxylic acid

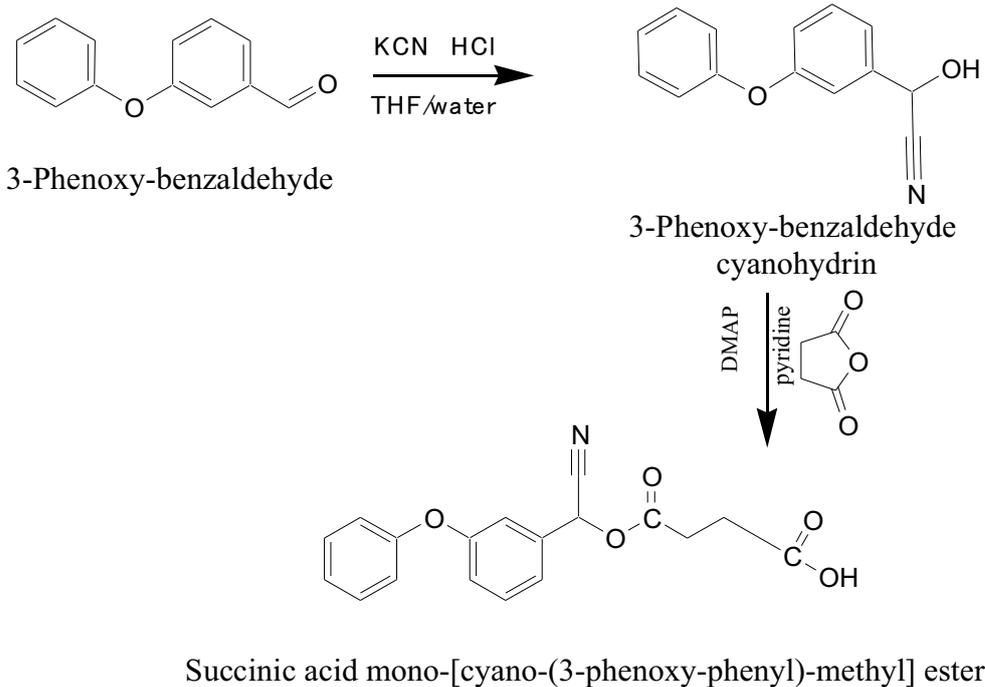
นำ 50 mg ของ beta alanine methyl ester และ EDC 65 mg ผสมกันใน THF 3 mL 10 นาที เติม 59 mg ของ 3-(2,2-dichlorophenyl) 2,2-dimethyl -(1-cyclopropane) carboxylic acid ที่ 0°C หลังจากนั้นคนโดยใช้ magnetic stirrer 10 ชม. ที่อุณหภูมิ 50°C นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator เมื่อแห้งแล้วละลายสารที่ได้ด้วย dichloromethane หลังจากนั้นล้างด้วย 0.5% HCl 2 ครั้ง และ น้ำ 2 ครั้ง กำจัดน้ำทิ้งด้วย MgSO_4 นำไปแยกสารที่ต้องการด้วย วิธี column chromatography โดยใช้ silica gel กระบวนการของปฏิกิริยาแสดงดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 ขั้นตอนการสังเคราะห์ hapten 1

2) วิธีการสังเคราะห์ hapten2

นำ 500 mg ของ 3-phenoxy benzal dehyde และ 246 mg ของ โนสารละลาย THF 1.47 mL และ น้ำ 0.11 mL คนใน ice bath 30 นาที เติม กรด HCl เข้มข้น 0.27 mL คนที่อุณหภูมิห้อง 3 ชม. เติมด้วยสารละลาย Dichloromethane และ น้ำ (15:1 v/v) ทำให้สารละลายมีฤทธิ์เป็นกรดด้วย 3 N HCl ล้างสารละลายด้วยน้ำ 3 ครั้ง เก็บส่วน Dichloromethane แล้วกำจัดน้ำส่วนที่เหลือด้วย $MgSO_4$ แยกสารที่ต้องการด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel ได้สาร 3-phenoxy benzaldehyde cyanohydrin นำสารนี้ไปทำต่อโดยต่อกับ succinic acid anhydride โดยผสมกันใน triethylamine diamine(Et_3N_2)และ chloroform คนไว้ข้ามคืน (16 ชม.) ล้างสารที่ได้ด้วย 1N HCl 3 ครั้ง กำจัดน้ำทิ้งด้วย $MgSO_4$ นำไปแยกสารที่ต้องการด้วย วิธี column chromatography โดยใช้ silica gel ได้สาร hapten 2 กระบวนการของปฏิกิริยาแสดงดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 ขั้นตอนการสังเคราะห์ hapten 2

3) การวิเคราะห์คุณสมบัติของสาร Haptens

ในการสังเคราะห์สาร haptens ในแต่ละขั้นตอนจะต้องตรวจยืนยันผลที่ได้เพื่อให้แน่ใจว่าสารที่ได้เป็นสารที่ต้องการและถูกต้องก่อนนำไปทำต่อในขั้นตอนต่อไปโดยวิธีที่ใช้ในการตรวจยืนยันมี 3 วิธี คือ

1. ^1H - Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (^1H -NMR)
2. ^{13}C - Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (^{13}C -NMR)
3. Gas-chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

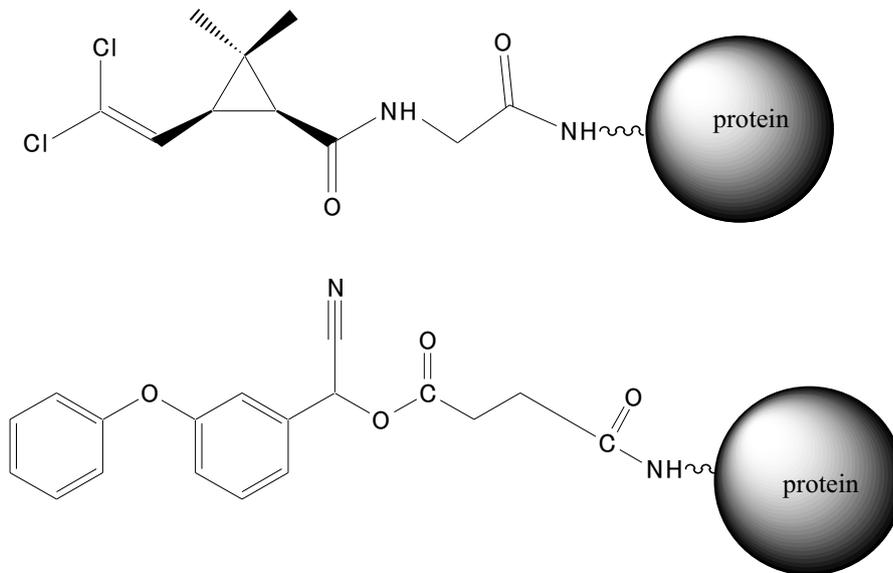
3.3.2 การเตรียม immunogens และ capture antigen

เนื่องจากสาร haptens มีขนาดโมเลกุลเล็กมากระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลองจึงไม่สามารถสร้างแอนติบอดีต่อสาร haptens ได้โดยตรง ดังนั้นเพื่อให้เกิดโอกาสในการสร้างแอนติบอดีให้มากยิ่งขึ้นจึงต้องนำสาร haptens ไปต่อกับโมเลกุลของโปรตีนซึ่งจะมีขนาดใหญ่สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีได้ดียิ่งขึ้น

ในการศึกษานี้จะนำสาร haptens ไปต่อกับโมเลกุลของโปรตีน 3 ชนิด คือ bovine serum albumin (BSA) keyhole limpet hemocyanin (KLH) และ Oval albumin (OVA) มีรายละเอียดดังนี้

1) สาร hapten 1 ชนิด ต่อกับโปรตีน 1 ชนิด

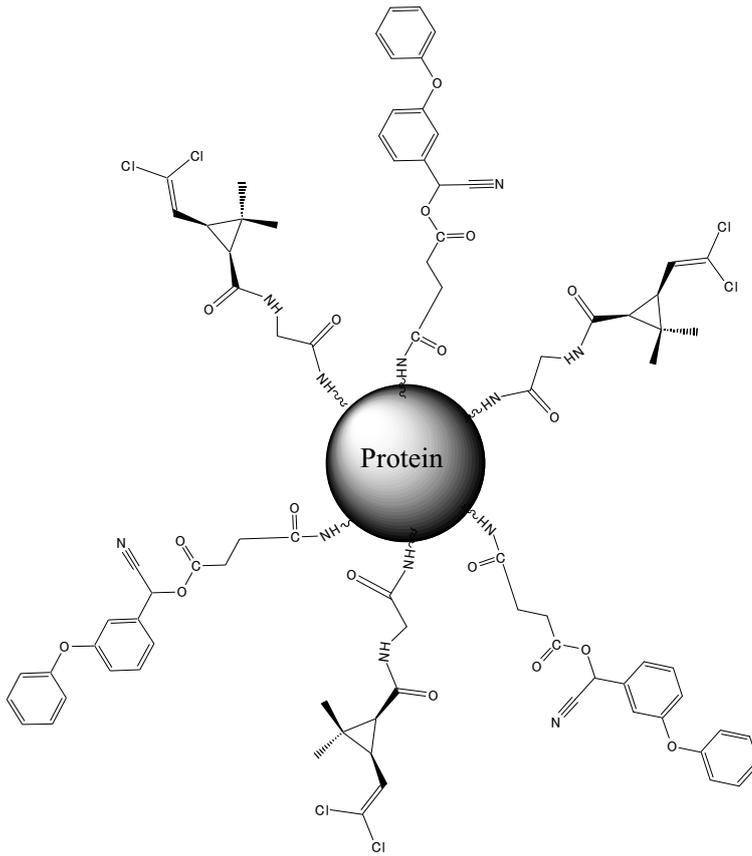
นำ Hapten 1 และ 2 ต่อกับโปรตีนทั้งสามชนิด ซึ่ง haptens ที่ต่อกับ BSA และ KLH เรียกว่า immunogen ใช้สำหรับกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง ส่วน haptens ที่ต่อกับ OVA เรียกว่า capture antigen จะใช้เป็นตัวเกาะเพลาเพื่อใช้ตรวจหาแอนติบอดีที่สัตว์ทดลองสร้างขึ้น โดยวิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (รูปที่ 3.6)



รูปที่ 3.6 แสดง immunogen ชนิด 1 hapten ต่อ 1 โปรตีน

2) โปรตีน 1 ชนิด ต่อด้วย สาร hapten 2 ชนิด (Multi-haptens)

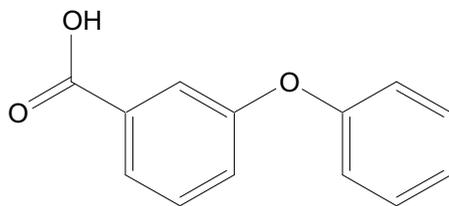
เพื่อเพิ่มโอกาสการสร้างแอนติบอดีของสัตว์ทดลอง ที่มีต่อสาร cypermethrin ให้มากขึ้น จึงนำสาร hapten 1 และ 2 มาต่อกับโปรตีนตัวเดียวกัน แสดงดังรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7 แสดง immunogen ชนิด 2 hapten ต่อ 1 โปรตีน

3) เตรียม capture antigens จากสาร 3-Phenoxy benzoic acid (3-PBA)

เนื่องจากสาร 3-PBA มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับโครงสร้างหลักของสาร hapten 2 จึงเตรียมไว้เป็น capture antigens หากสามารถใช้แทนกันได้ดีในการตรวจหาแอนติบอดีที่ได้ ก็สามารณนำมาใช้ได้ง่ายเนื่องจากเป็นสารที่มีราคาถูกและไม่ต้องเสียเวลาในการสังเคราะห์ โดย 3-PBA มีลักษณะโครงสร้าง ดังรูปที่ 3.8



3-Phenoxy benzoic acid (3-PBA)

รูปที่ 3.8 ลักษณะ โครงสร้างของ 3-Phenoxy benzoic acid

3.3.3. การผลิตแอนติบอดีต่อ cypermethrin

หนู BALB / C (อายุ 8-10 สัปดาห์) ฉีดแอนติเจนเข็มแรกแรกด้วยปริมาณโปรตีนของ immunogen เท่ากับ 30 ug/ml ผสมกับ complete Freund's adjuvant ในชั้นผิวหนัง subcutaneous สำหรับเข็มที่ 2 และ 3 จะผสมกับ incomplete Freund's adjuvant โดยทิ้งระยะห่าง 3 สัปดาห์ การเก็บเลือดจะเก็บจากเส้นเลือดดำที่หางทุกๆ 7 วันและซีรัมถูกจัดเก็บไว้ที่ -20

3.3.4 การตรวจหาแอนติบอดีโดยการวิธี indirect ELISA

- 1) เติมน้ำรีเอเจนต์ μl coating antigen $2\mu\text{g/ml}$ ใน 50 mM carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) ใน Maxisorp Immunoplate (Nunc) ทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4°C
- 2) ล้างเพลทด้วย washing buffer 4 ครั้ง
- 3) เติมน้ำ 1% gelatin $200\mu\text{l}$ ต่อ หลุม ทิ้งไว้ อุณหภูมิ 25°C นาน 1 ชั่วโมง ดูดสารในหลุมทิ้งไป
- 4) เติมน้ำซีรัมเจือจาง 1/1000 หลุมละ $100\mu\text{l}$ ทิ้งไว้ อุณหภูมิ 25°C นาน 1 ชั่วโมง
- 5) ล้างเพลทด้วย washing buffer 4 ครั้ง
- 6) เติมน้ำ HRPconjugated goat anti mouse IgG(H+L) เจือจาง 1/5000 ปริมาณ $100\mu\text{l}$ ต่อหลุม ทิ้งไว้ อุณหภูมิ 25°C นาน 1 ชั่วโมง
- 7) ล้างเพลทด้วย washing buffer 4 ครั้ง
- 8) เติมน้ำ OPD substrate $100\mu\text{l}$ ต่อหลุม ทิ้งไว้ อุณหภูมิ 25°C นาน ครึ่งชั่วโมง
- 9) หยุดปฏิกิริยาด้วย 2N ของ H_2SO_4 ปริมาตร $50\mu\text{l}$ ต่อหลุม
- 10) อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm ด้วยเครื่อง ELISA reader

3.3.5 การหา ความไวและความจำเพาะต่อสารโดยวิธี indirect competitive ELISA (ic-ELISA)

ทำเช่นเดียวกันกับวิธี indirect ELISA โดยจะเปลี่ยนแปลงในขั้นตอนที่ 4 คือ เติมน้ำซีรัมเจือจาง 1/2500 ปริมาตร $50\mu\text{l}$ และ cypermethrin ความเข้มข้นต่างๆ ที่ละลายใน 40% methanol-washingbuffer อีก $50\mu\text{l}$ แล้วทิ้งไว้ อุณหภูมิ 25°C นาน 1 ชั่วโมงครึ่ง แทน ผลที่ได้คำนวณหาความไวจาก inhibition concentration at 50% (IC_{50}) ใช้สมการ Sigmoidal dose-response; curve fit with 4 parameter

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope})})$$

X คือ the logarithm of concentration. Y คือ the response

หาค่าจำเพาะต่อสาร (Cross-reactivity=%CR) ได้จากสมการ

$$\%CR = (\text{IC}_{50} \text{ of target compound} / \text{IC}_{50} \text{ of related compound}) \times 100$$

3.4 การพัฒนาวิธีตรวจการทำงานของ cholinesterase enzyme ในน้ำลายแทนการตรวจในเลือด

3.4.1 การพัฒนาวิธีการตรวจวัดการทำงานของ cholinesterase enzyme ในน้ำลาย

การทำงานของเอนไซม์ โดยทำปฏิกิริยา ใน shaker โดยประยุกต์วิธีของ Ellman et al., 1961 และ Breen, 2002 ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 การวัดการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างๆ

เลือด			น้ำลาย		
สารเคมี	AChE	BChE	สารเคมี	AChE	BChE
0.5 M DTNB, pH 7.7	3 mL	3 mL	0.1M phosphate buffer, pH 8	750 µl	750 µl
Diluted sample (RBC: water = 1:100)	100 µl	-	0.1M dithionitorbenzoic acid (DTNB), pH 7	25 µl	25 µl
Diluted sample (Plasma: water = 1:50)	-	100 µl	saliva	100 µl	100 µl
156 mM acetylthiocholine iodide	10 µl	-	156 mM acetylthiocholine iodide	40 µl	-
156 mM butyrylthiocholine iodide	-	40 µl	156 mM butyrylthiocholine iodide	-	40 µl
15 minutes at 25°C in shaker			30 minutes at 37°C in shaker		
12 mM eserine	50 µl	50 µl	12 mM eserine	25 µl	25 µl
Measured using an ELISA plate reader at a wavelength of 405 nm					

3.4.2 การประยุกต์ใช้วิธีการตรวจวัดการทำงานของ cholinesterase enzyme ในน้ำลาย เปรียบเทียบกับ cholinesterase enzyme ใน serum

3.4.2.1 Study site and Population

น้ำลายและเลือดถูกเก็บจากผู้บริโภคร จำนวน 100 คน และ เกษตรกร จำนวน 100 คน โดยมี เพศชาย และเพศหญิงอย่างละ 50 คน ในอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเป็นพื้นที่การเกษตรในเขตภาคเหนือของประเทศไทย การศึกษานี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติแล้ว จาก The Human Experimentation Committee, Research Institute for Health Sciences (RIHES), Chiang Mai University (N0.32/2006)

3.4.2.2 Sample and Data Collection

อาสาสมัครเซ็นใบยินยอมก่อนเก็บตัวอย่าง วิธีการเก็บตัวอย่าง ดังนี้ (1) น้ำลาย ประมาณ 5 mL ถูกเก็บโดยอมสำลีไว้ประมาณ 5 นาที ซึ่งอาสาสมัครต้องล้างปากด้วยน้ำสะอาดจำนวน 5 ครั้งก่อนเก็บ (2) จากนั้นน้ำลายถูกปั่นที่ 2,500 rpm ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเศษอาหาร และ aliquot ใน microcentrifuge tube (1 mL) และเก็บน้ำลายไว้ที่ -20 °C จนกระทั่งทำการทดลองต่อไป (Breen, 2002) (2) 10 mL เลือด ถูกเก็บโดยเจาะเลือดที่ต้นแขนและเก็บใน heparinized tube จากนั้นปั่นแยกเม็ดเลือดแดงกับพลาสมาโดยปั่นที่ 2,500 rpm ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เม็ดเลือดแดงถูกล้างสองครั้งโดยใช้ PBS สูดท้ายเม็ดเลือดแดงและพลาสมาถูก aliquot ใน microcentrifuge tube (1 mL) และเก็บที่ -20 °C จนกระทั่งทำการทดลองต่อไป (Dyer et al., 2001) (3) อาสาสมัครตอบแบบสอบถามเกี่ยวกับข้อมูลทาง demographic การใช้สารเคมีฯ การรับประทานยา และ การเป็นโรค

3.4.2.3 Quality Assurance and Control

สำหรับ laboratory quality assurance ในแต่ละ batch จะประกอบด้วย 2 sample blanks and 6 controls (pooled saliva and blood) ซึ่งจะวาง หน้า กลาง และท้าย และทุก tubes จะ run in duplicate

3.4.2.4 Statistic analysis

ข้อมูลจากการทดลองถูกวิเคราะห์โดย SPSS version 11.5 โดยวิเคราะห์ตามลำดับดังนี้ (1) การทำงานของเอนไซม์ถูกทดสอบ normal distribution (parametric or nonparametric) (2) the mean (\pm SD) ของการทำงานของเอนไซม์ ถูกวิเคราะห์ในกรณี parametric และ median (\pm SD) ของการทำงานของเอนไซม์ ถูกวิเคราะห์ในกรณี

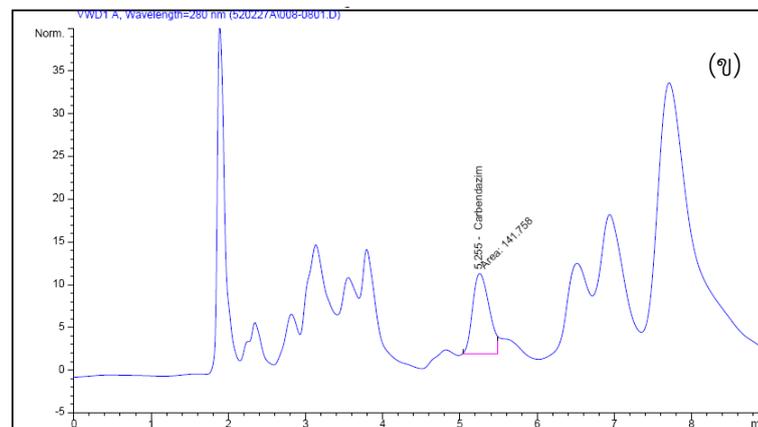
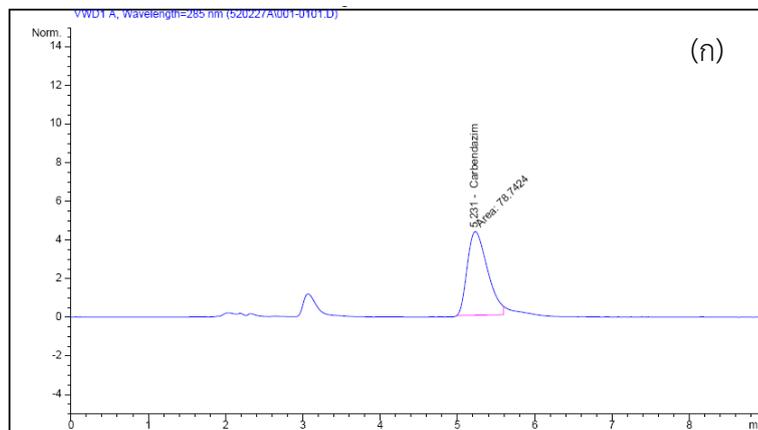
nonparametric (3) correlation ของการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างๆ (salivary AChE, salivary BChE, red blood cell AChE and plasma BChE) ถูกวิเคราะห์โดยใช้ Pearson correlation test (parametric) และ Spearman test (nonparametric). (4) การทำงานของเอนไซม์ในผู้บริโภคนอก และ เกษตรกร ถูกเปรียบเทียบ โดยใช้ paired samples T test (parametric) และ 2 independent samples test (nonparametric) (5) ข้อมูลในแบบสอบถามถูกคำนวณเปอร์เซ็นต์ในแต่ละกรณี และนำไปทดสอบการ correlation กับการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างๆ

บทที่ 4
ผลการวิจัย (results)

4.1 วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์สารเคมีกำจัดเชื้อรา carbendazim

4.1.1 Chromatographic separation ของสารมาตรฐานคาร์เบนดาซิม (carbendazim)

เตรียมสารมาตรฐานคาร์เบนดาซิม (carbendazim) โดย spiked ลงไปในผลไม้ที่เป็นตัวแทน (pooled sample) นำไปผ่านกระบวนการสกัด แสดงโครมาโทแกรมที่ได้ดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 (ก) สารมาตรฐานคาร์เบนดาซิม(carbendazim) ที่ไม่ผ่านการสกัดใน pooled sample
(ข) สารมาตรฐานคาร์เบนดาซิม(carbendazim) ที่ผ่านการสกัดใน pooled sample

จากการสกัดโดย spike สารมาตรฐานคาร์เบนดาซิม (carbendazim) ลงไปในตัวแทนผลไม้ (pooled sample) พบว่าค่า retention time(RT) ของสารคาร์เบนดาซิม (carbendazim) ปรากฏอยู่ที่

เวลา 5.25 นาที และทำการสกัด standard calibration curve 6 ระดับ คือ 50, 100, 200, 300, 500 และ 800 ng/mL ได้ค่าสมการเส้นตรงที่ $y=0.10x - 1.83$ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation, R^2) = 0.967

4.1.2 พัฒนาวิธีสกัดตัวอย่างโดยใช้ spiked samples

วิธีเตรียมตัวอย่าง สำหรับวิเคราะห์คาร์เบนดาซิม(Carbendazim) ได้ทำการพัฒนา จากของ I. Ferrer et al., 2006

ระดับของการวิเคราะห์

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่าง และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณได้ แสดงดังตารางที่ 4.1 ค่า LOD และ LOQ ของสารคาร์เบนดาซิม(Carbendazim) อยู่ที่ 0.0025 และ 0.005 mg/kg ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่า LOD และ LOQ ของการสกัดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้พบว่าสามารถวิเคราะห์ได้ในระดับที่ต่ำกว่าค่ามาตรฐานสูงสุดของการตกค้าง(MRLs) ของสารกำจัดและมาตรฐาน Codex alimentarius pesticide residues in food ซึ่งกำหนดไว้ไม่เกิน 0.5 mg/kg

ตารางที่ 4.1 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่าง (LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณได้(LOQ)ของสารคาร์เบนดาซิม (Carbendazim)

สารเคมีป้องกันเชื้อรา	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
คาร์เบนดาซิม(Carbendazim) n=3	0.0025	0.005

ค่าร้อยละของการกลับคืนของการวิเคราะห์

ค่าร้อยละของการกลับคืนของการวิเคราะห์สารคาร์เบนดาซิม(Carbendazim) จากการเติมสารมาตรฐาน 2 ระดับความเข้มข้นคือ ระดับกลาง และระดับสูงใน pooled sample แสดงดังตารางที่ 4.2 ค่าร้อยละของการกลับคืนอยู่ในช่วง 62.3% ถึง 79.8%, และ 63.6% ถึง 69.6% ของระดับความเข้มข้นที่ กลาง และสูง ตามลำดับ ซึ่งผลค่าร้อยละของการกลับคืน

ของการวิเคราะห์ในสารคาร์เบนดาซิม(Carbendazim)อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ของ Association of Official Agricultural Chemists., AOAC, 2000. (60-115%).

ตารางที่ 4.2 ค่าร้อยละของการกลับคืนและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์สารคาร์เบนดาซิม (Carbendazim) จากการเติมสารมาตรฐาน 2 ระดับความเข้มข้น

สารเคมีป้องกันเชื้อรา	ระดับกลาง		ระดับสูง	
	ความเข้มข้น (mg/kg)	Recoveries (%)±SD	ความเข้มข้น (mg/kg)	Recoveries (%)±SD
คาร์เบนดาซิม (Carbendazim) n=3	0.015	71±12.3	0.025	66.3±4.6

ค่า inter-batch ของการวิเคราะห์สารคาร์เบนดาซิม(Carbendazim)

จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีสกัดเพื่อวิเคราะห์สารคาร์เบนดาซิม (Carbendazim) โดยศึกษาจากค่า inter-batch โดยใช้ตัวอย่างทั้งหมด 5 ซ้ำ พบว่า ค่าร้อยละของการกลับคืนของ inter-batch อยู่ในช่วง 98.2 ค่าร้อยละของความแปรปรวนอยู่ในช่วง 21.5 ผลแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ค่าร้อยละของการกลับคืน ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าร้อยละของความแปรปรวนของ inter-batch จากการวิเคราะห์สารคาร์เบนดาซิม(Carbendazim) (เติมความเข้มข้น 0.01 mg/kg)

สารเคมีป้องกันเชื้อรา	Inter- batch (n=10)	
	%recovery ±SD	% CV
คาร์เบนดาซิม(Carbendazim) n=5	98.2±0.002	21.5

4.1.3 ผลการวิเคราะห์สารป้องกันกำจัดเชื้อราตกค้างในผลไม้

จากวิเคราะห์สารคาร์เบนดาซิม(carbendazim)ที่ตกค้างในตัวอย่างส้ม 100 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็น กลุ่มส้มทั่วไป 36 ตัวอย่าง ส้มออร์แกนิก 26 ตัวอย่าง และส้มปลอดภัย 38 ตัวอย่าง พบว่าตรวจพบเจือปนปริมาณสารคาร์เบนดาซิม(carbendazim) ที่ตกค้างในกลุ่มส้มทั่วไปคิดร้อยละ 41.7%,กลุ่มส้มออร์แกนิกคิดร้อยละ 26.9 % และ กลุ่มส้มปลอดภัยคิดร้อยละ 13.2% โดย ปริมาณที่ตรวจพบได้อยู่ในช่วง 0.007-0.077 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, 0.006-0.036มิลลิกรัม/กิโลกรัม และ 0.014-0.06 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ของกลุ่มตัวอย่างส้มทั่วไป,ส้มออร์แกนิก และส้มปลอดภัย ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ปริมาณสารคาร์เบนดาซิม(carbendazim)ที่ตรวจพบในกลุ่มตัวอย่างส้มทั่วไป,ส้มออร์แกนิกและส้มปลอดภัย

กลุ่มตัวอย่างส้ม	%ที่ตรวจพบ	ปริมาณสารที่ตรวจพบ(mg/kg)
ส้มทั่วไป(n=36)	41.7	0.007-0.077
ส้มออร์แกนิก(n=26)	26.9	0.006-0.036
ส้มปลอดภัย(n=38)	13.2	0.014-0.06

จากผลการตรวจพบปริมาณสารคาร์เบนดาซิม(carbendazim) ในกลุ่มตัวอย่างส้มพบว่า กลุ่มตัวอย่างส้มทั่วไปตรวจพบเจือปนปริมาณมากที่สุดคิดเป็น 41.7% รองลงมาคือออร์แกนิกคิดเป็น 26.9% และพบกลุ่มส้มปลอดภัยตรวจพบปริมาณสารคาร์เบนดาซิม(carbendazim)น้อยที่สุดคิดเป็น 13.2% การตรวจพบเจือปนปริมาณสารคาร์เบนดาซิม(carbendazim)ทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่าง ส้ม พบว่าไม่เกินค่ามาตรฐานสูงสุดของสารตกค้าง(MRLs) กลุ่มสารป้องกันกำจัดเชื้อราที่ได้ กำหนดไว้สำหรับประเทศไทยและมาตรฐาน Codex alimentarius pesticide residues in food (0.5mg/kg)

4.2 วิธีวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids

4.2.1Chromatographic separation ของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids

เตรียมสารมาตรฐานsynthetic pyrethroids 6 ชนิด (lambda cyhalothrin, permethrin, cyfluthrin, cypermethrin, fenvalerate และ deltamethrin) ใน ethyl acetate (EA) พร้อมกับศึกษา สภาพที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง gas chromatograph- electron capture detector (GC-

ECD, HP6890) (ตารางที่ 4.5) ค่า retention time (RT) ของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids (ตารางที่ 4.6) และตัวอย่าง chromatograms (รูปที่ 4.2)

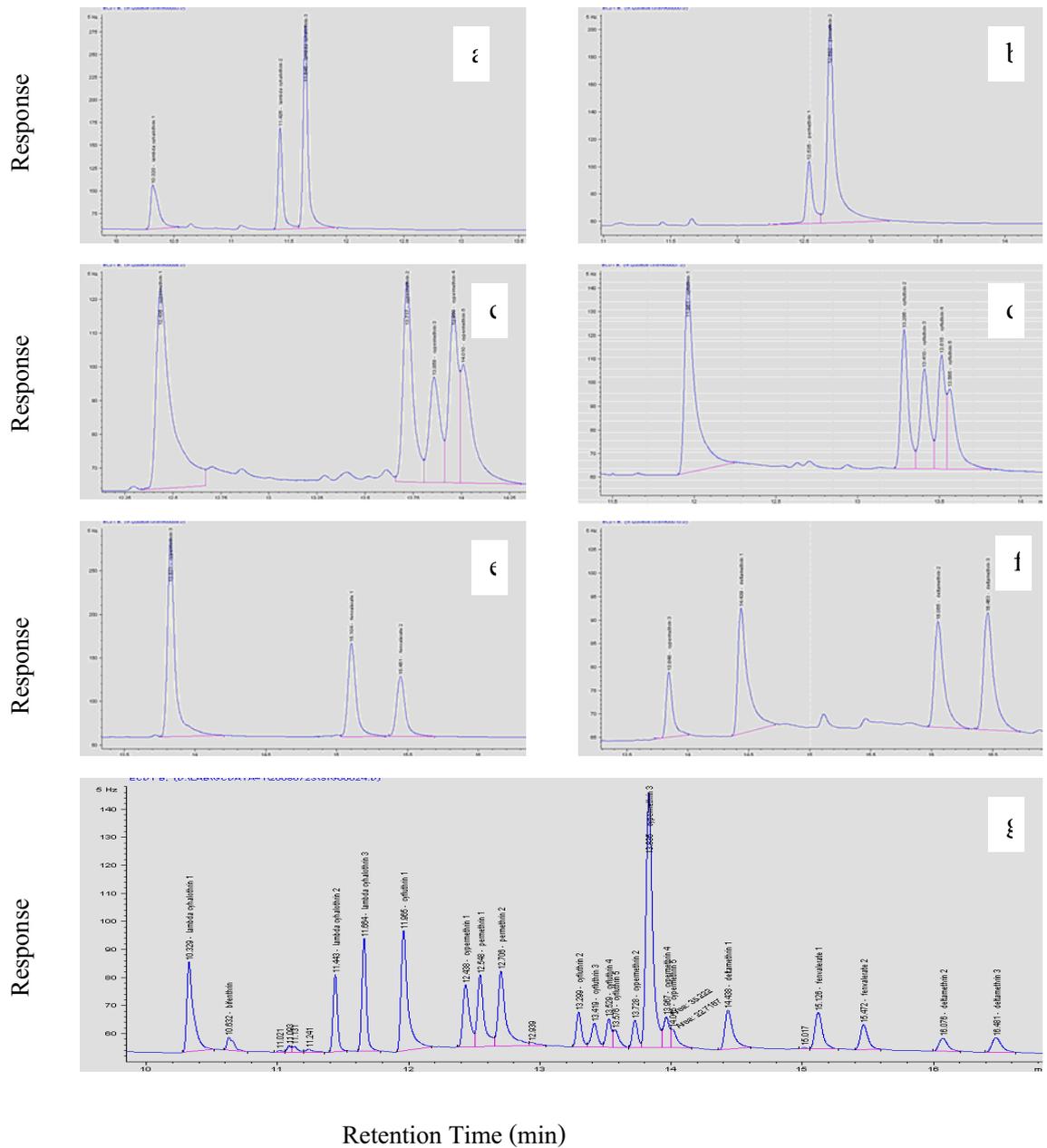
ตารางที่ 4.5 Gas chromatographic conditions of synthetic pyrethroid insecticide analysis

อุณหภูมิ detector (ECD): 300 °C
คอลัมน์ : 30m x 0.25mm x 0.32mm film thickness (HP5, 5%phenylmethylpolysiloxane)
อุณหภูมิ Oven programming: initial 100°C for 1 min, increase at 25°C/min to 250°C, hold for 1 min, increased at 5 °C/min to 280°C, hold for 5 min (total run time 22 min)
อุณหภูมิ injection port.: 250 °C
Mobile gas: ultra pure helium (99.999%)
ECD make up gas: ultra pure nitrogen (99.999%)
ปริมาณ Injection: 1 µL (splitless)
Flow rate of helium mobile phase: 1.5 mL/min

ตารางที่ 4.6 Retention time (RT) and ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids

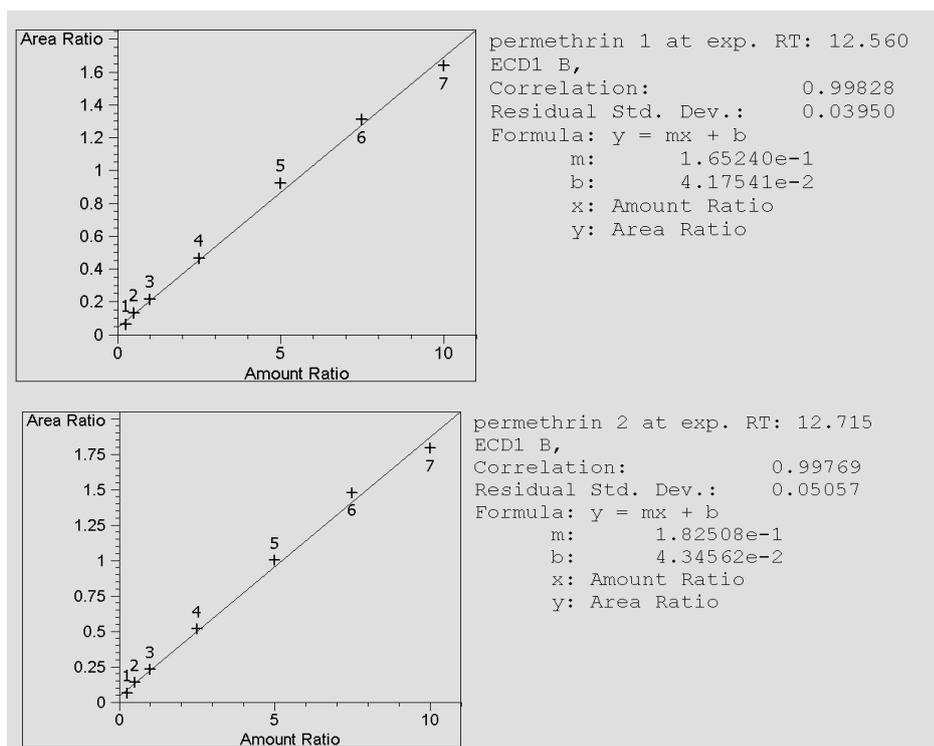
สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม	RT	Equation	Correlation
synthetic pyrethroids	(min)	(y=mx+b)	(R ²)
1. lamda-cyhalothrin1	10.204	Y = 0.24x + 0.08	0.9949
2. lamda-cyhalothrin2	11.292	Y = 0.05x + 0.02	0.9951
3. lamda-cyhalothrin3	11.508	Y = 0.14x + 0.07	0.9916
4. permethrin1	12.389	Y = 0.21x + 0.04	0.9949
5. permethrin2	12.541	Y = 0.25x + 0.05	0.9949
6. cyfluthrin 1	11.816	Y = 0.25x + 0.09	0.9951
7. cyfluthrin 2	13.122	Y = 0.06x + 0.03	0.9911
8. cyfluthrin 3	13.237	Y = 0.07x + 0.02	0.9901
9. cyfluthrin 4	13.347	Y = 0.05x + 0.03	0.9927
10. cyfluthrin 5	13.394	Y = 0.04x + 0.01	0.994
11. cypermethrin1	12.277	Y = 0.21x + 0.04	0.9945
12. cypermethrin2	13.544	Y = 0.08x + 0.009	0.9969
13. cypermethrin3	13.66	Y = 0.83x + 0.91	0.9782
14. cypermethrin4	13.777	Y = 0.09x + 0.04	0.9948
15. cypermethrin5	13.826	Y = 0.06x + 0.03	0.9919
16. fenvalerate1	14.897	Y = 0.13x + 0.06	0.9909
17. fenvalerate2	15.23	Y = 0.09x + 0.04	0.9908
18. deltamethrin1	14.238	Y = 0.12x - 0.009	0.9968
19. deltamethrin2	15.813	Y = 0.06x + 0.01	0.9921
20. deltamethrin3	16.207	Y = 0.12x + 0.03	0.9932

จาก ตารางที่ 4.6 สมการคำนวณของแต่ละ isomer มีค่าในระดับดีพอใช้โดยมีค่า R² ระหว่าง 0.978 (cypermethrin3) ถึง 0.996 (cypermethrin2) โดย isomers ส่วนใหญ่จำนวน 17 ใน 20 isomers ที่มีค่า R² มากกว่า 0.99 ซึ่งจะได้พัฒนาให้ดียิ่งขึ้นต่อไปอีก และมี standard calibration curve 7 ระดับ คือ 5, 10, 20, 30, 50, 100 และ 200 ng/mL ตามลำดับ



รูปที่ 4.2 Typical chromatograms concentration 1 μ g/mL; (a) lambda cyhalothrin, 3 peaks; (b) permethrin, 2 peaks; (c) cyfluthrin, 5 peaks; (d) cypermethrin, 5 peaks; (e) fenvalerate, 3 peaks; (f) deltamethrin, 3 peaks; (g) Mixed synthetic pyrethroids 20 peaks and bifenthrin, as an internal standard, 1 peak.

จากรูปที่ 4.3 จะเห็นว่าสารเคมีกลุ่มนี้แต่ละชนิดมีหลาย isomers และในแต่ละ isomer ทับซ้อนกัน ดังนั้นในการวิเคราะห์สารกลุ่ม synthetic pyrethroids 6 ชนิด มี 21 isomers แต่ ณ สภาพการวิเคราะห์ขณะนี้ มี 20 peaks



รูปที่ 4.3 Typical standard calibration curve ของ permethrin (2 isomers)

จาก รูปที่ 4.3 permethrin มี 2 isomers และมี standard calibration curve มีค่า correlation (R^2) ในระดับดีเท่ากับ 0.9982 และ 0.99769 ตามลำดับ

4.2.2 Retention time, target ion และ temperature condition ของสารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids โดยเครื่อง GC-MS

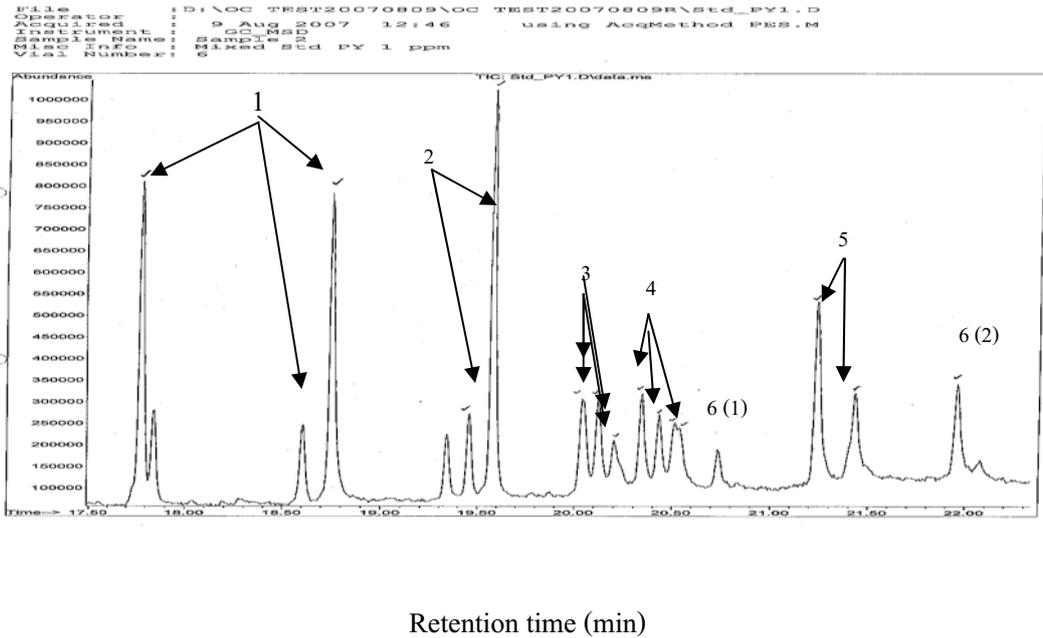
GC-MS ที่ใช้คือ Agilent 7890A. Column: HP-5 MS capillary column, 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μ m film thickness with cross-linked 5% phenyl methyl polysiloxane; sample injection

volume: 1 μ L with splitless injection mode; injection port temperature: 250 $^{\circ}$ C; column oven temperature: programming from 60 $^{\circ}$ C, hold for 1 min, increased oven temp to 180 $^{\circ}$ C with 25 $^{\circ}$ C /min ramp rate; and finally increased oven temp to 300 $^{\circ}$ C with 5 $^{\circ}$ C /min ramp rate and hold for 15 min; Helium flow rate: 1.5 mL/min ได้ chromatogram (รูปที่ 4.4) แสดงดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 Retention time, target ion และ ของสารกำจัดแมลงกลุ่มsynthetic pyrethroidsวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS

Synthetic pyrethroid insecticides	Retention time (min)	m/z
1. lamda-cyhalothrin1	18.749	181, 208, 141
2. permethrin1	19.444	183, 127
3. permethrin2	19.569	
4. cyfluthrin 1	20.194	163, 209,127
5. cyfluthrin 2	20.025	
6. cyfluthrin 3	20.032	
7. cyfluthrin 4	20.194	
8. cypermethrin1	20.326	181, 209,127
9. cypermethrin2, 3, 4	20.419	
10. fenvalerate1	21.233	167, 125, 209
11. fenvalerate2	21.427	
12. deltamethrin	21.952	181, 253, 209

พบว่า จากสภาวะการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ในขณะนี้ chromatogram มี 12 peaks



รูปที่ 4.4 chromatogram of synthetic pyrethroid insecticides (1 µg/mL) using GC-MS: 1. lambda-cyhalothrin, 3 peaks; 2. permethrin, 2 peaks; 3. cyfluthrin, 4 peaks; 4. cypermethrin, 3 peaks; 5. fenvalerate, 2 peaks; 6. deltamethrin, 2 peaks.

4.2.3 การพัฒนาวิธีสกัดตัวอย่างโดยใช้ spiked samples

วิธีเตรียมตัวอย่างที่ง่ายและรวดเร็ว สำหรับวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids ได้ทำการพัฒนาจากของ Anastassiades et al., 2003

4.2.3.1 ระดับของการวิเคราะห์

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่าง และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณได้ แสดงดังตารางที่ 4.8 ค่า LOD ของเปอร์เมทรินและ cypermethrin อยู่ที่ 0.001 mg/kg, lamda-cyhalothrin อยู่ที่ 0.003 mg/kg และ cyfluthrin, เฟนวาเลอเรท, เดลตร้าเมทริน อยู่ที่ 0.005 mg/kg ส่วนค่า LOQ พบว่า ของ permethrin และ cypermethrin อยู่ที่ 0.005 mg/kg, lamda-cyhalothrin อยู่ที่ 0.025 mg/kg และ cyfluthrin, fenvalerate, deltamethrin อยู่ที่ 0.01 mg/kg ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่า LOD และ LOQ ของการสกัดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้พบว่าสามารถ

วิเคราะห์ได้ในระดับที่ต่ำกว่าค่ามาตรฐานสูงสุดของการตกค้าง(MRLs) ของสารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroidsที่ได้กำหนดไว้สำหรับประเทศไทยและมาตรฐาน Codex alimentarius pesticide residues in food

ตารางที่ 4.8 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่าง (LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณได้ของสารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids

Synthetic pyrethroid insecticides	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
lamda-cyhalothrin	0.003	0.005
permethrin	0.001	0.025
cyfluthrin	0.005	0.01
cypermethrin	0.001	0.025
fenvalerate	0.005	0.01
deltamethrin	0.005	0.01

4.2.3.2 ค่าร้อยละของการกลับคืนของการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids

ค่าร้อยละของการกลับคืนของการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids จากการเติมสารมาตรฐาน 3 ระดับความเข้มข้นคือ ระดับต่ำ, ระดับกลาง และระดับสูงใน pooled sample แสดงดังตารางที่ 4.9 ค่าร้อยละของการกลับคืนอยู่ในช่วง 96.8% ถึง 109.3%, จาก 86.5% ถึง 96.9 % และ จาก 83.8% ถึง 98.4% 3 ของระดับความเข้มข้นที่ต่ำ, กลาง และสูง ตามลำดับ ซึ่งผลค่าร้อยละของการกลับคืนของการวิเคราะห์ในสารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids แต่ละตัวอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ของ CODEX (70-110%).

ตารางที่ 4.9 ค่าร้อยละของการกลับคืนและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่มsynthetic pyrethroidsจากการเติมสารมาตรฐาน
 3 ระดับความเข้มข้นคือ ระดับต่ำ, ระดับกลาง และระดับสูง

Synthetic pyrethroid insecticides	ระดับต่ำ		ระดับกลาง		ระดับสูง	
	Recoveries (%)±SD	ความเข้มข้น (ng/mL)	Recoveries (%)±SD	ความเข้มข้น (ng/mL)	Recoveries (%)±SD	ความเข้มข้น (ng/mL)
lamda-cyhalothrin	98.4 ± 12.4	10	92.2 ± 5.7	20	89.0 ± 15	50
permethrin	106.9 ± 2.7	5	93.1 ± 4.7	10	84.8 ± 16.5	20
cyfluthrin	109.3 ± 9.7	20	96.9 ± 5.5	50	98.4 ± 3.3	100
cypermethrin	96.8 ± 6.9	5	86.5 ± 10.0	10	89.5 ± 9.4	20
fenvalerate	102.7 ± 3.9	20	94.1 ± 6.4	50	89.6 ± 1.8	100
deltamethrin	105.2 ± 2.1	20	96.5 ± 9.4	50	83.8 ± 3.0	100

4.2.3.3 ค่า intra-batch และ inter-batch ของการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids

จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีสกัดเพื่อวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids โดยศึกษาจากค่า intra-batch และ inter-batch โดยใช้ตัวอย่างทั้งหมด 10 ซ้ำ พบว่า ค่าร้อยละของการกลับคืนของ intra-batch อยู่ในช่วง 87.9 ถึง 102.1 ค่าร้อยละของความแปรปรวนอยู่ในช่วง 1.8 ถึง 7.4 ค่าร้อยละของการกลับคืนของ inter-batch อยู่ในช่วง 81.5 ถึง 113.9 ค่าร้อยละของความแปรปรวนอยู่ในช่วง 5.8 ถึง 15.7 for ซึ่ง intra-batch และ inter-batch อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ที่ 21%. (Pihlström, 2010) ผลแสดงดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ค่าร้อยละของการกลับคืน ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าร้อยละของความแปรปรวนของ intra-batch and inter-batch จากการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids (เติมความเข้มข้น 100 µg/kg)

Synthetic pyrethroid insecticides	Intra- batch (n=10)		Inter- batch (n=10)	
	%recovery ±SD	%CV	%recovery ±SD	% CV
lamda-cyhalothrin	97.9 ± 3.7	3.8	102.6 ± 9.9	9.6
bifenthrin(IS)	102.1 ± 1.9	1.9	107.2 ± 6.2	5.8
permethrin	92.7 ± 5.1	5.5	81.0 ± 12.8	15.7
cyfluthrin	98.9 ± 1.8	1.8	91.8 ± 10.3	11.3
cypermethrin	87.9 ± 1.7	2.1	94.5 ± 14.4	15.3
fenvalerate	98.7 ± 4.3	4.3	113.9 ± 11.6	10.3
deltamethrin	92.8 ± 6.9	7.4	89.7 ± 8.0	8.9

4.2.4 การเลือกใช้สารละลาย (solvent) ในการสกัดตัวอย่าง

การพัฒนาโดยปรับปรุงจากวิธีของ Anastassiades et al., 2003. และ Fillion et al. 2000. การศึกษาขั้นตอนการเลือกสารละลายในการสกัดตัวอย่างนั้นใช้วิธีการวิเคราะห์ผักและผลไม้ สำหรับการทดลองสกัดตัวอย่างผักและผลไม้โดยใช้ solvents 4 ชนิดประกอบด้วย ethyl acetate (EA), dichloromethane (DCM), acetonitrile (ACN) และ acetone ซึ่งเติมสารมาตรฐานผสมของสารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids โดยมีความเข้มข้นชนิดละ 0.05 mg/kg แสดงผลดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ค่าร้อยละการกลับคืนของสารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids ที่สกัดด้วย solvents 4 ชนิด

Synthetic insecticides	pyrethroid	% Recovery			
		EA	DCM	ACN	acetone
lamda-cyhalothrin		54	68	2	3
permethrin		27	69	1	1
cyfluthrin		37	79	4	3
cypermethrin		63	90	6	3
fenvalerate		34	90	8	4
deltamethrin		82	28	13	6
Range of recoveries		27-82	28-90	1-13	1-6

จาก ตารางที่ 4.11 ใช้ solvents 4 ชนิดในการสกัดผักและผลไม้ พบว่า DCM มีประสิทธิภาพในการสกัดดีที่สุดโดยมีค่า recovery ของสารทั้ง 6 ชนิดอยู่ระหว่างร้อยละ 28-90 ดังนั้นจึงเลือก DCM มีรายละเอียดการสกัดในรูปที่ 4.5

ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดแล้ว 5 g ใส่ใน teflon centrifuge tube, 50 mL

เติม Bifenthrin (IS*) และ spike standard mixture

เติมสารละลาย dichloromethane, 10 mL

เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที

Sonicate 5 นาที

กรองสารละลายผ่าน Na_2SO_4 , 5 g โดยใช้กรวยกรองแก้วใส่ลงใน centrifuge tube, 50 mL

และทำการสกัดซ้ำด้วย สารละลาย dichloromethane, 10 mL

SPE loading (carbon cartridge, self-modified)

ทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator

redissolved ด้วย EA, 1 mL

สารสกัด 1 μL วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC – ECD (HP6890)

รูปที่ 4.5 Flow diagram of sample extraction and cleanup steps

Note: *IS = internal standard

4.2.5 การทดสอบประสิทธิภาพในขั้นตอนการ clean up เพื่อกำจัดตัวรบกวนในตัวอย่าง

ในการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ solid-phase extraction cartridges สำหรับการ clean up ตัวอย่างทั้งหมด 3 ชนิด ประกอบด้วย SAX/PSA, activated carbon, and octadecyl (C_{18}) ซึ่งในการทดสอบพบว่า C_{18} เมื่อนำมาใช้ในการ clean up ตัวอย่างไม่สามารถที่จะกำจัดสีได้นักวิจัยจึงเลือกใช้เพียง 2 ชนิดที่เหลือคือ SAX/PSA และ activated carbon ผลการศึกษพบว่า activated carbon สามารถกำจัดสีรงควัตถุและสิ่งปนเปื้อนอื่นได้ดีกว่า SAX/PSA ดูได้จากค่าร้อยละของการกลับคืนของ activated carbon อยู่ในช่วง 63.3% ถึง 101.0 โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานอยู่ในช่วง 1.14 ถึง 20.41 แสดงผลดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ค่าร้อยละการกลับคืนของสารกำจัดแมลงกลุ่มsynthetic pyrethroidsที่ clean up ด้วย SAX/PSA และ activated carbon

Synthetic pyrethroid insecticides	activated carbon (n=3)	SAX/PSA (n=3)
lamda-cyhalothrin	91.7±8.44	7.4±5.07
bifenthrin(IS)	101.0±1.14	28.3±6.56
permethrin	82.5±8.29	65.8±52.46
cyfluthrin	78.2±15.49	34.0±13.90
cypermethrin	67.5±15.85	26.5±12.27
fenvalerate	92.6±14.02	57.0±35.87
deltamethrin	63.3±20.41	52.4±6.02

4.2.6 การทดสอบความสามารถของวิธีการสกัดโดยใช้ผักผลไม้ที่มีความหลากหลาย

ในการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบความสามารถของวิธีการสกัดสารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroidsที่ตกค้างในผักผลไม้ โดยใช้ผักผลไม้ที่มีความหลากหลาย 4 ชนิดประกอบด้วย กะหล่ำปลี กระเทียม ส้ม และลำไย ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมาสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความหลากหลาย ได้จากค่าร้อยละการกลับคืนของสารกำจัดแมลงกลุ่มsynthetic pyrethroidsอยู่ในช่วง 69 ถึง 131 เมื่อศึกษาในสารแต่ละตัวจะพบว่าสูงกว่าร้อยละ 80 ยกเว้น สารเพอร์เมทรินในกะหล่ำปลี และกระเทียมที่มีค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ที่ 76 และ69 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 ค่าร้อยละการกลับคืนของการทดสอบความสามารถของวิธีการสกัดโดยใช้ผักผลไม้ที่มีความหลากหลาย

Synthetic pyrethroid insecticides	กะหล่ำปลี	คะน้า	ลำไย	ส้ม
lamda-cyhalothrin	108 ± 15.9	82 ± 33.1	99 ± 3.50	94 ± 9.32
bifenthrin(IS)	100 ± 5.31	87 ± 4.2	99 ± 4.98	103 ± 6.01
permethrin	76 ± 19.1	69 ± 25.2	93 ± 6.79	91 ± 10.20
cyfluthrin	131 ± 24.9	107 ± 20.5	118 ± 15.3	97 ± 8.68
cypermethrin	83 ± 21.6	96 ± 16.5	104 ± 13.9	99 ± 3.32
fenvalerate	106 ± 21.1	91 ± 23.2	103 ± 10.20	100 ± 3.95
deltamethrin	95 ± 14.3	100 ± 12.6	92 ± 5.10	100 ± 1.66

4.2.7 การทดสอบความคงทนของวิธีการสกัดตัวอย่างผักผลไม้

เพื่อทดสอบความคงทนของวิธีสกัดสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids ที่ตกค้างในผักและผลไม้ จึงกำหนดให้นักวิทยาศาสตร์จำนวน 3 คน ทำการสกัดตัวอย่างตามขั้นตอนการสกัดที่ได้ทำการพัฒนาแสดงดังรูปที่ 4.5 จำนวนทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นนำตัวอย่างที่สกัดได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-ECD โดยผู้ฉีดตัวอย่างคนเดียวกัน พบว่า ค่าร้อยละการกลับคืนเฉลี่ยของทั้ง 3 คน อยู่ในช่วง 90.8 ถึง 118.9 และค่าร้อยละของความแปรปรวนอยู่ในช่วง 0.68 ถึง 17.13 แสดงดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ค่าร้อยละการกลับคืนของการทดสอบความคงทนของวิธีการสกัดตัวอย่างผักผลไม้

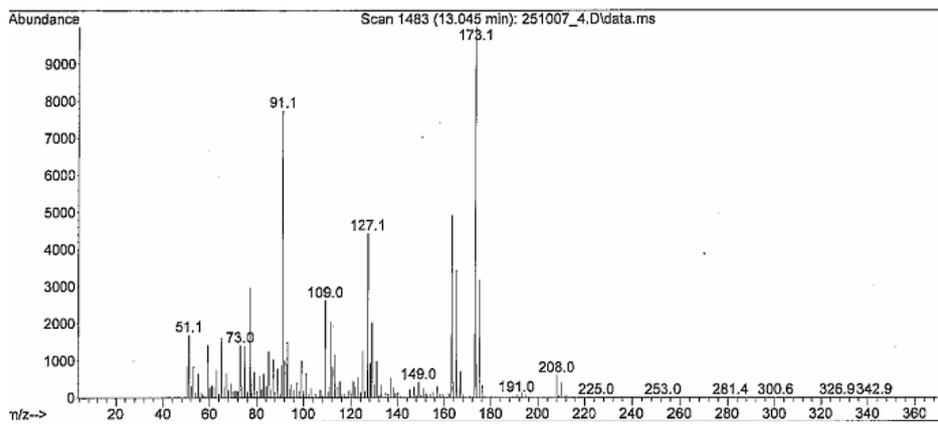
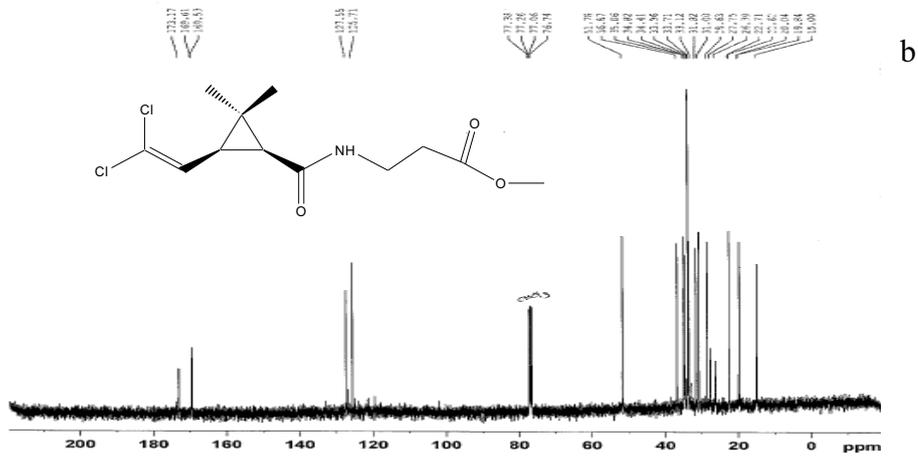
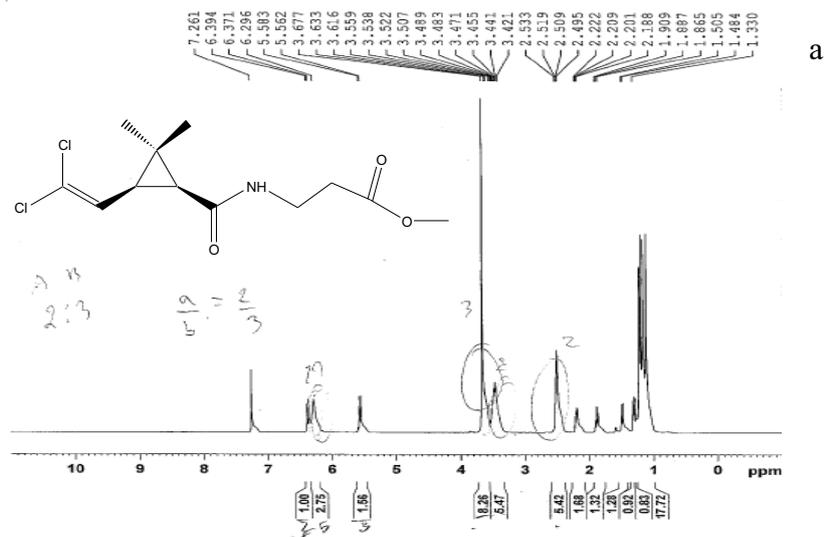
Synthetic pyrethroid insecticides	Scientist 1	Scientist 2	Scientist 3	ค่าเฉลี่ย	
	%recovery	%recovery	%recovery	%recovery	% CV
	±SD	±SD	±SD	±SD	
lamda-cyhalothrin	126.9±12.24	134.1±28.60	97.3±10.84	118.9±20.37	2.7
bifenthrin(IS)	92.4±6.29	96.4±4.40	95.8±7.04	95.4±2.57	17.13
permethrin	94.3±31.09	104.1±17.76	82.3±11.64	93.6±10.92	11.67
cyfluthrin	110.1±36.63	119.1±21.11	113.3±14.61	114.2±4.56	4
cypermethrin	85.5±64.71	104.1±48.29	95.5±8.96	95.0±9.28	9.76
fenvalerate	100.9±13.00	99.6±17.79	100.0±6.48	100.2±0.68	0.68
deltamethrin	85.8±26.79	89.8±9.86	96.8±3.95	90.8±5.56	6.13

4.3 การพัฒนาวิธี ELISA เพื่อการตรวจวัดสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroid-Cypermethrin

จากการตรวจยืนยันผลได้ผลดังต่อไปนี้

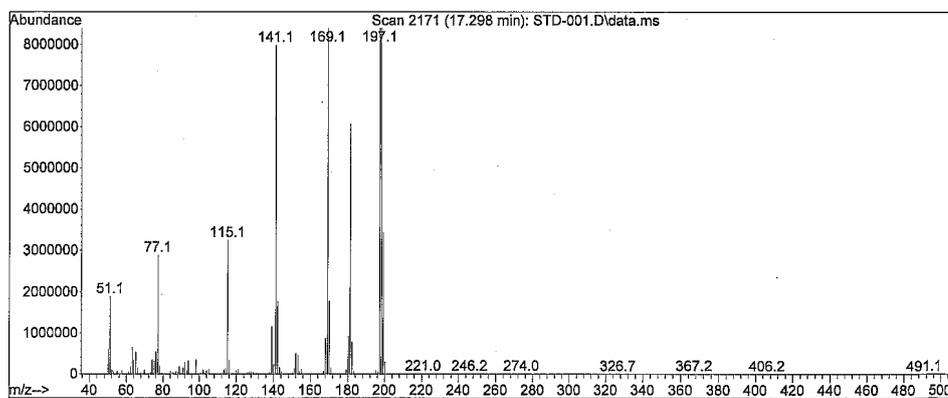
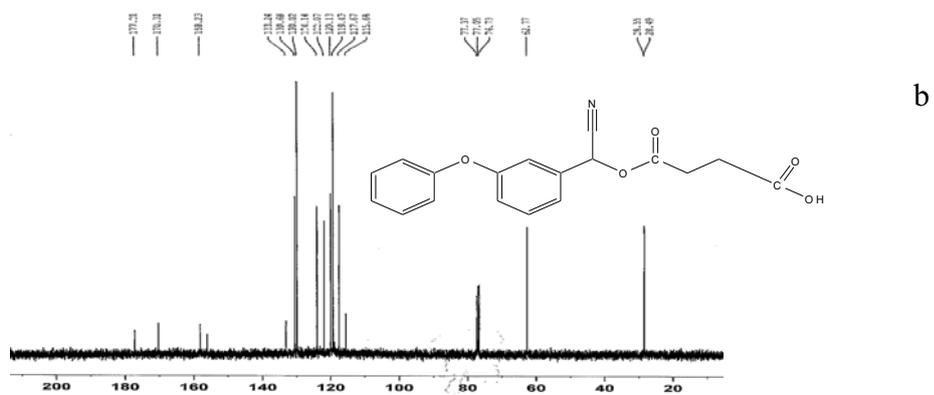
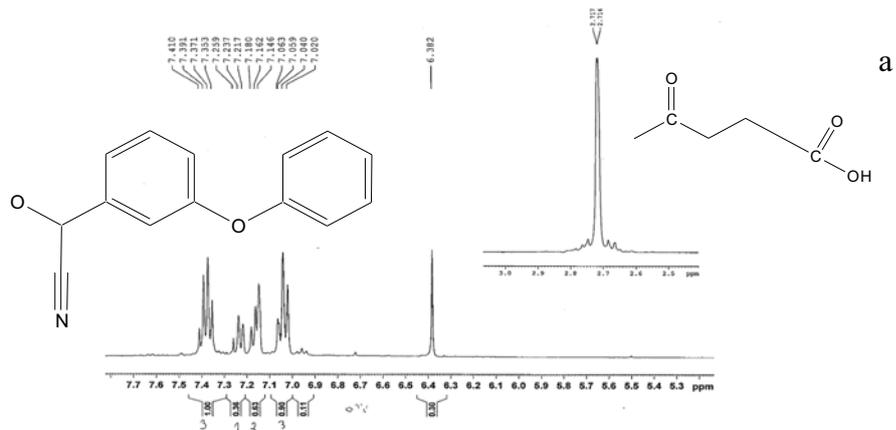
4.3.1 การยืนยันโครงสร้างของสาร Haptens โดยวิธี ^1H - Nuclear magnetic resonance spectrometer (^1H -NMR) ^{13}C - Nuclear magnetic resonance (^{13}C -NMR) โดยวิธี Gas-chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

สารแฮปเทน 1 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวเหลือง ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.34 (ethyl acetate:hexane:acetic acid, 1:10:0.01) และนำไปยืนยันจำนวน hydrogen atom ในโครงสร้างของสารแฮปเทนด้วย ^1H -NMR แล้ว พบว่า มี peak 2 ชุดในโครมาโตแกรมเดียวกัน เนื่องจากสารที่นำมาสังเคราะห์เป็นสารที่มี 2 isomer ดังนั้นจึงให้ผล ^1H -NMR 2 ชุด ^1H -NMR ^{13}C -NMR และมวลโมเลกุล แสดงผลได้ดังนี้ ^1H -NMR 400 MHz, CDCl_3 and showed peaks at δ (ppm) 6.353 (t, $J = 30$, 1H), 5.572 (d, $J=8.4$, 1H), 3.677 (s,, 2H), 2.519 (t, $J = 4$, 2H), 1.176 (s, 6H). ^{13}C - NMR (400 MHz, CDCl_3) and shown peak at δ (ppm) 173.17, 169.61, 169.53, 127.55, 125.71, 51.78, 36.87, 35.06, 34.82, 34.41, 33.96, 33.71, 33.12, 31.82, 31.00, 28.63, 27.75, 26.39, 22.71, 20.62, 20.04, 19.84, 15.00 MS ใช้เพื่อตรวจยืนยันผล homogeneous peak, $t_r=13.045$ min. MSD 5973 (EI) Hewlett Packard calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{NO}_3$ (M+H+) 280 คือ 281 โครมาโตแกรม แสดงในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ^1H (a), ^{13}C (b) – NMR chromatogram (a, b) และ MS (c) chromatogram ยืนยันโครงสร้างของhaptin 1

สารแฮปเทน 2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.28 (ethyl acetate:hexane:acetic acid, 1:10:0.01) และนำไปยืนยันจำนวน hydrogen atom ในโครงสร้างของสารแฮปเทนด้วย แล้ว พบว่า $^1\text{H-NMR}$ $^{13}\text{C-NMR}$ และมวลโมเลกุล ได้ผลดังนี้ $^1\text{H-NMR}$ showed peaks at (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.371 (t, $J = 7.2$, 1H), 7.237 (d, $J = 8$, 2H), 7.162 (t, $J = 6.4$, 3H), 7.040 (d, $J = 8$, 2H), 2.713 (d, $J = 1.2$, 4H). $^{13}\text{C-NMR}$ was (400 MHz, CDCl_3) 177.31, 170.32, 159.23, 133.24, 130.68, 130.02, 124.14, 122.07, 120.13, 119.43, 117.67, 115.68, 77.37, 77.05, 74.73, 42.17, 28.55, 28.49 MS ใช้เพื่อตรวจยืนยันผล homogeneous peak, $t_r = 17.298$ min. MSD 5973 (EI) Hewlett Packard calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_5$ (M+H⁺) 325.10 คือ 326.7 โครมาแกรมแสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 ^1H (a), ^{13}C (b) – NMR chromatogram (a, b) และ MS (c) chromatogram ยืนยันโครงสร้างของhaptin 2

4.3.2 ปริมาณโปรตีนที่ได้จาก immunogens และ capture antigens

นำ immunogens และ capture antigens ที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bio-Rad โดยเทียบค่าจาก standard curve จากโปรตีนมาตรฐาน ได้ผลดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 ความเข้มข้นของโปรตีน และ haptens density ของ immunogens และ coating antigens

Immunogens and coating antigens	Protein concentration (mg/mL)	Hapten density
H1-BSA	3.98	8
H2-BSA	2.92	13
H12-BSA	1.76	-
H1-OVA	0.80	10
H2-OVA	1.48	9
3-PBA-OVA	0.86	9

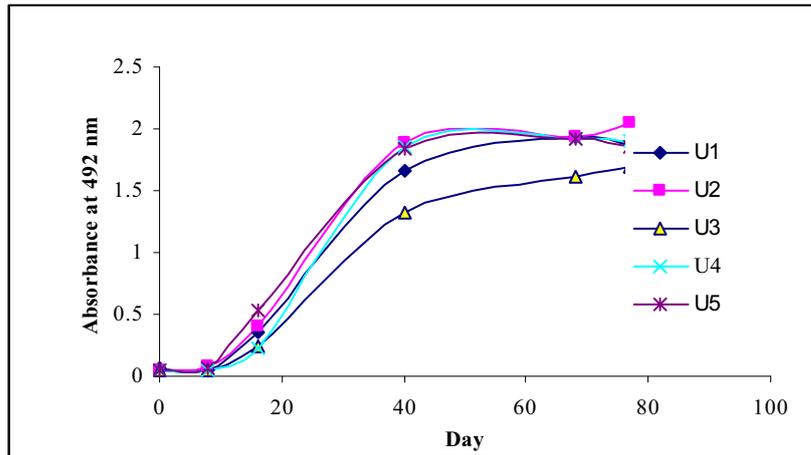
จากการคำนวณหาความหนาแน่นของสารแฮปเทนบน โมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิด โดยประมาณพบว่า immunogens H1 - BSA และ H2 - BSA มี 8 และ 13 แฮปเทนบน 1 โมเลกุล โปรตีน และ coating antigen, H1 - OVA, H2 - OVA และ 3PBA - OVA มี 10, 9, และ 9 ตามลำดับ ความเข้มข้นของโปรตีนของ immunogens และ coating antigens หาได้จากเทียบปริมาณโปรตีนจาก standard curve พบว่า ปริมาณ ความเข้มข้นของ immunogens H1 - BSA, H2 - BSA และ H12 - BSA, coating antigens, H1 - OVA, H2 - OVA และ 3PBA - OVA แสดงในตารางที่ 4.15

4.3.3 การทดสอบหาแอนติบอดีโดยวิธี ELISA

การตอบสนองของแอนติบอดีในหนูต่อ immunogens 3 ชนิด ทดสอบโดยวิธี indirect ELISA ความเข้มข้นของแอนติเจนที่ถูกเคลือบ 2 µg/mL และเจือจางซีรัม 1 / 1,000 พบว่าระดับของแอนติบอดีเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ หลังจากกระตุ้นครั้งแรก แสดงว่าแอนติบอดีที่ได้ ยืนยันว่าเป็นแอนติบอดีต่อแฮปเทนที่ฉีดเข้าไป

4.3.4 การตอบสนองของแอนติบอดีจากหนูจากการกระตุ้นด้วย immunogen ชนิด H1 - BSA

การตอบสนองของแอนติบอดีจากหนูที่ได้รับวัคซีนกระตุ้นด้วย immunogen ชนิด H1 - BSA จากวิธี ELISA พบว่าระดับของแอนติบอดีเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ หลังจากกระตุ้นเข็มแรก แอนติบอดีจากหนู แอนติบอดีต่อ BSA ไม่มี cross-reactivity ต่อ OVA ที่ใช้เป็น coating antigens หลังจากทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ OVA เกาะเพลท แล้วใช้แอนติบอดีต่อ BSA พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรเท่ากับ 0.045 ± 0.03 (รูปที่ 4.8)

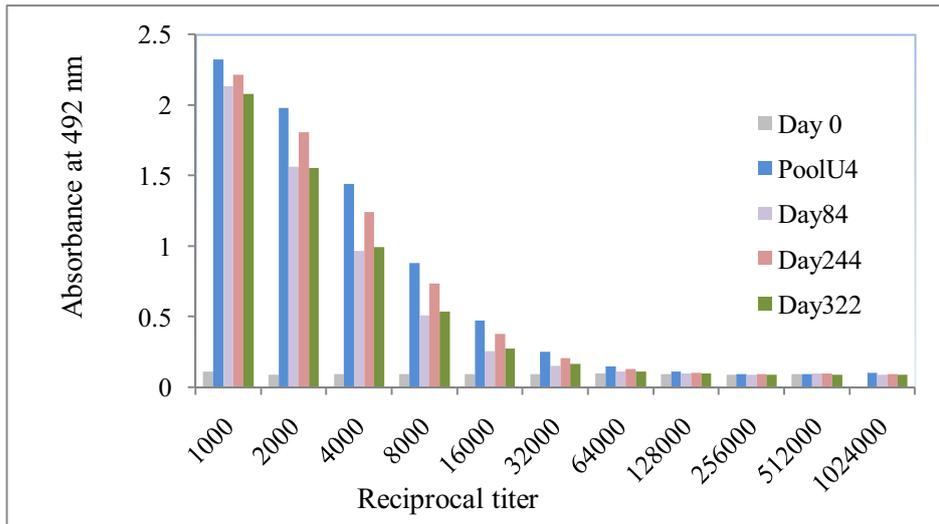


รูปที่ 4.8 การตอบสนองของแอนติบอดีจากหนูกลุ่ม U ที่กระตุ้นด้วย H1-BSA ทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ซีรัมเจือจางที่ 1 / 1000 และ 2 µg/mL H1 - OVA เป็นตัวเกาะเพลท

4.3.5 คุณลักษณะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อสารแฮปแทน 1

แอนติบอดีจากหนู U4 ให้ความไวในการจับกับ cypermethrin โดยการทดสอบด้วยวิธี ELISA ดังนั้น จึงใช้ซีรัมจากหนู U4 มาใช้ในการศึกษาต่อไป

ความเข้มข้นของแอนติบอดีในซีรัมที่เก็บในเวลาที่แตกต่างกันหลังจากการฉีดเข็มที่ 3 ทดสอบโดยวิธีการไตเตรท ก่อนรวมซีรัมจากหนู U4 เพื่อนำใช้ในการพัฒนาวิธี ELISA ต่อไป ผลพบว่า ความเข้มข้นของแอนติบอดีหลังฉีดเข็มที่ 3 แล้ว ให้ค่า reciprocal titer > 128,000 ทุกช่วงเวลาที่ยกซีรัม รูปที่ 4.9 ดังนั้น จึงนำซีรัมของหนู U4 ที่เก็บหลังจากฉีดเข็มที่ 3 แล้ว มารวมกัน แล้วแบ่ง aliquoted ประมาณหลอดละ 200 µL และเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนา Immunoassay ต่อไป



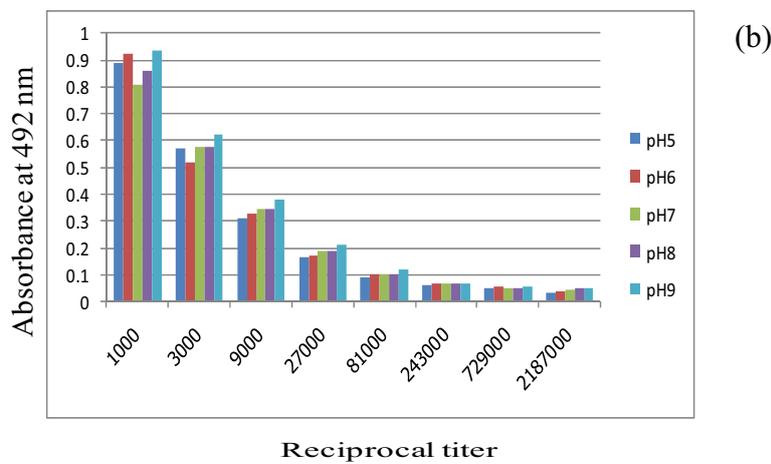
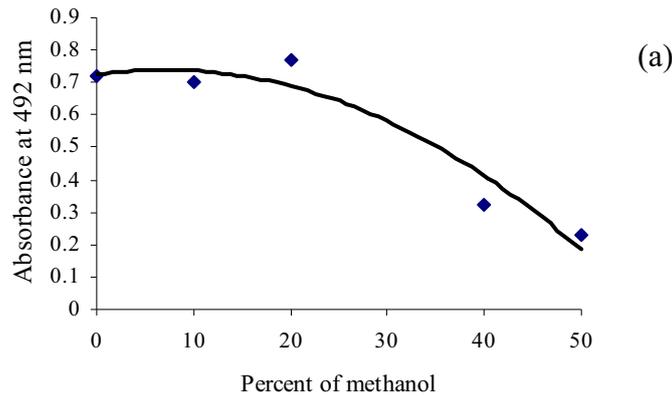
รูปที่ 4.9 ความเข้มข้นของแอนติบอดีในซีรัมของเมาส์ U4 ในวันที่ 84, 244 วัน และ 322 วัน indirect ELISA ก่อนที่จะรวมซีรัม โดย H1 - OVA ถูกใช้เป็นแอนติเจนเคลือบที่ 2 $\mu\text{g} / \text{mL}$

4.3.6 การพัฒนาวิธีการตรวจ cypermethrin ด้วยวิธี indirect competitive ELISA (ic-ELISA) จากแอนติบอดีที่ได้จากการใช้ H1-BSA กระตุ้นให้เกิดแอนติบอดี

ในการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทดสอบหา cypermethrin จำเป็นต้องหาตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อให้ cypermethrin และ แอนติบอดี สามารถทำงานได้ เนื่องจาก cypermethrin เป็นสารเคมีที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ แต่ตัวทำละลายอินทรีย์มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของแอนติบอดีลดลง จากการศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่าเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดที่สามารถใช้ในระบบของ ELISA ได้ (Lee et al, 2003; สวน et al, 2004.) ดังนั้น การศึกษานี้จึงเลือกใช้เมทานอล ในการละลาย cypermethrin ในระบบของ ELISA

การศึกษากลกระทบบจากความเข้มข้นของเมทานอลต่อแอนติบอดี โดยใช้วิธี non - competitive indirect ELISA พบว่า ที่ร้อยละ 50 ของเมทานอล ทำให้ลดประสิทธิภาพในการทำงานของแอนติบอดีลดลงมากกว่าร้อยละ 50 จากที่ไม่มีเมทานอล ดังนั้น จึงใช้ความเข้มข้นของเมทานอลร้อยละ 20 ในระบบ ELISA เนื่องจากส่งผลกระทบต่อเล็กน้อยเมื่อเทียบกับที่ไม่มีเมทานอลในระบบ ดังรูปที่ 4.10(a)

การศึกษากลกระทบบของค่า pH ของบัฟเฟอร์ซึ่งอาจจะใช้สำหรับระบบ ELISA และมีผลกับความไวและความจำเพาะของแอนติบอดี (Shan et al., 1999; Shan et al., 2000; Park et al., 2004) จากการศึกษพบว่า ช่วงของค่า pH ระหว่าง 5.0-8.0 ของ PBS (pH 5, 6, 7, 8 และ 9) ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการทำงานของแอนติบอดี ดังรูปที่ 4.10(b)



รูปที่ 4.10 (a) ผลกระทบของเมทานอลต่อประสิทธิภาพการทำงานของแอนติบอดีจากซีรัมหนู U1 เจือจาง 1/10,000 (b) ผลกระทบจาก pH ของบัฟเฟอร์ ต่อประสิทธิภาพการทำงานของแอนติบอดี ทดสอบโดยวิธี non-competitive indirect ELISA โดยใช้ H1-OVA เป็นตัวเกาะเฟลท

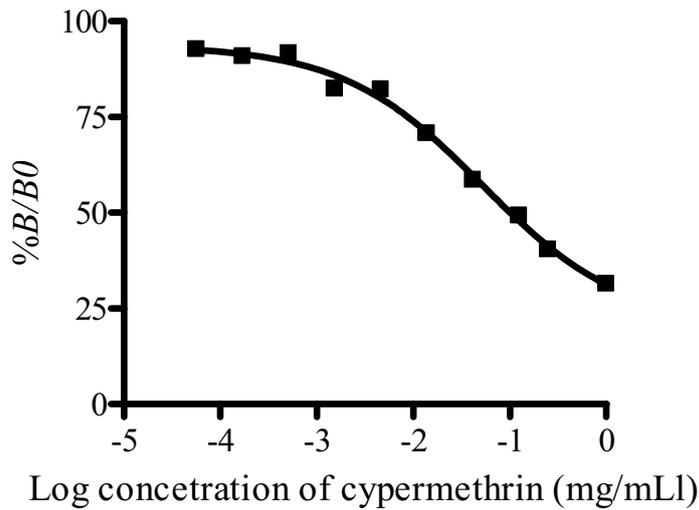
4.3.7 การทดสอบความไวและความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ cypermethrin ของแอนติบอดีจากหนูที่กระตุ้นด้วย H1-BSA

ความไวและความจำเพาะของแอนติบอดี ทดสอบได้จาก ic-ELISA มี โดยใช้สารมาตรฐาน cypermethrin และสารอื่นที่มีโครงสร้างคล้ายกัน คือ Permethrin, cyfluthrin, deltamethrin พบว่า ความเข้มข้นของการยับยั้งที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของ cypermethrin คือ 52 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อย่างมีคุณภาพคือ 1.8 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ที่ร้อยละ 85 ของการยับยั้ง และ ต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 0.39 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ที่ร้อยละ 90 ของการยับยั้ง รูปที่ 4.11

จากผลที่ได้แอนติบอดีไม่มี cross-reactivity ต่อ permethrin, cycluthrin และ deltamethrin ที่มีความเข้มข้นมากกว่า 0.2 mg / mL ในทางตรงกันข้าม จากการศึกษาก่อนหน้านี้ใช้สารแฮปเทนที่มีโครงสร้างหลักคล้ายกับสารแฮปเทนที่ใช้ในการศึกษาปัจจุบัน แต่ไม่มีการต่อแขน พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารแฮปเทนแต่ไม่พบ cross-reactivity cypermethrin (Pullen และ Hock,

1995) ดังนั้นจากผลที่ได้สามารถบอกได้ว่าการต่อแขนของสารแฮปแทนก่อนที่จะนำไปต่อกับโปรตีน มีผลต่อกระบวนการการสร้างแอนติบอดี

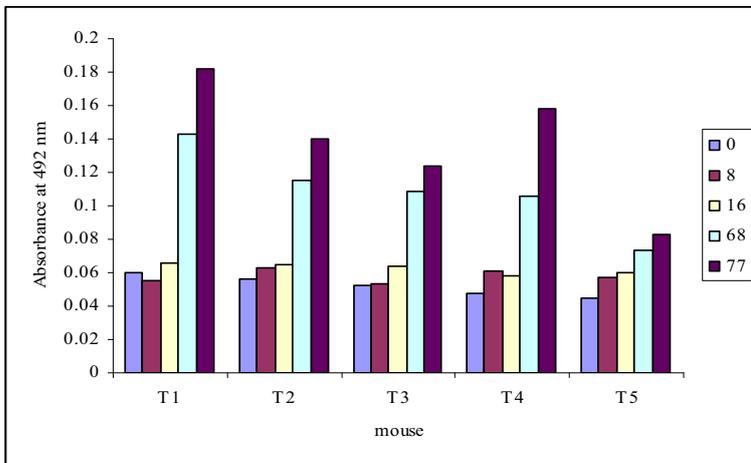
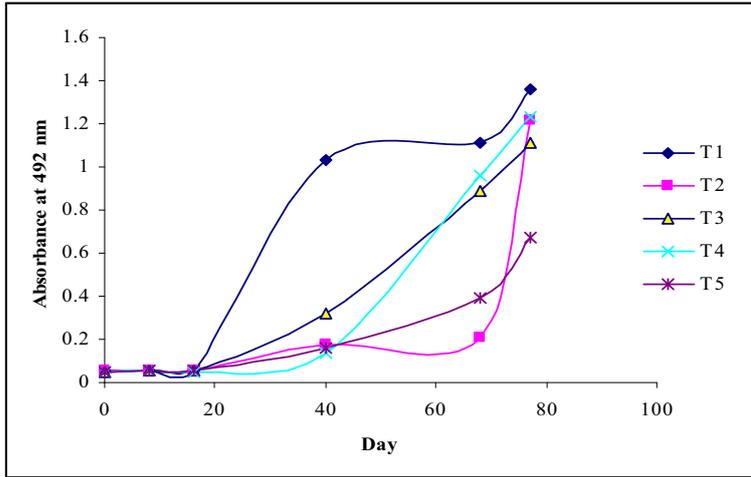
โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ cypermethrin จากหนูที่ได้จากการศึกษานี้สามารถที่จะนำไปใช้กับการพัฒนา Immunoassay สำหรับการตรวจสอบสารตกค้าง cypermethrin ในสินค้าเกษตรและตัวอย่างสิ่งแวดล้อมได้



รูปที่ 4.11 Dose response curve of log concentration of cypermethrin and %B/B0

4.3.8 การตอบสนองของแอนติบอดีจากหนูจากการกระตุ้นด้วย immunogen ชนิด H12 - BSA

การตอบสนองของแอนติบอดีจากหนูที่ได้รับวัคซีนกระตุ้นด้วย immunogen ชนิด H1 - BSA จากวิธี ELISA พบว่าระดับของแอนติบอดีเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ หลังจากกระตุ้นเข็มแรก แอนติบอดีจากหนู แอนติบอดีต่อ BSA ไม่มี cross-reactivity ต่อ OVA ที่ใช้เป็น coating antigens หลังจากทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ OVA เกาะเพลท แล้วใช้แอนติบอดีต่อ BSA พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรเท่ากับ 0.066 ± 0.005 (รูปที่ 4.12)



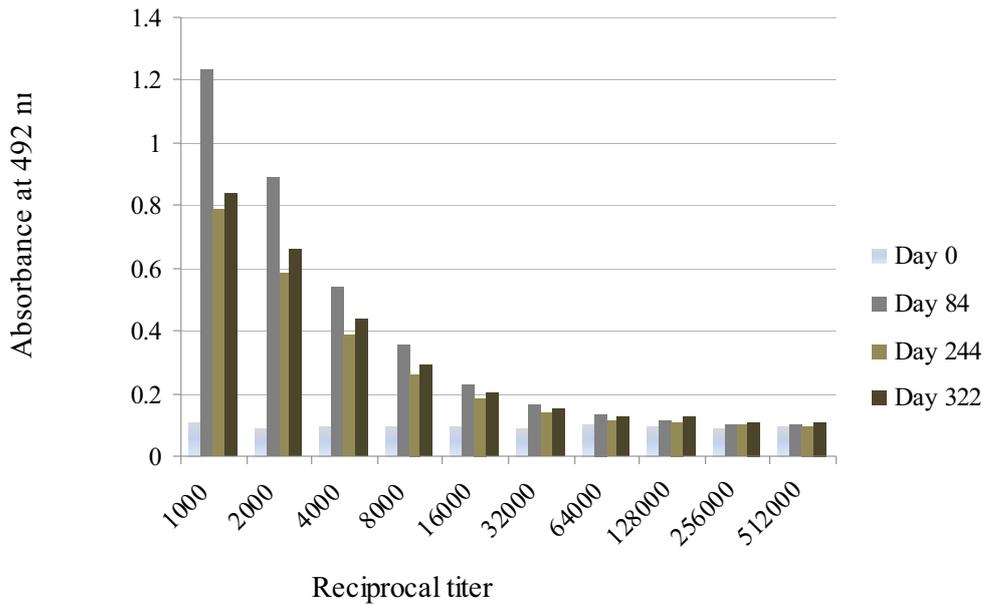
(b)

รูปที่ 4.12 การตอบสนองของแอนติบอดีต่อ immunogen H12-BSA ของหนูกลุ่ม T ทดสอบโดยวิธี non-competitive indirect ELISA โดยใช้ซีรัมเจือจาง 1/1000, (a) ใช้ H1-OVA เกาะเพลท (b) ใช้ 3PBA-OVA เกาะเพลท

4.3.9 คุณลักษณะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อสารแอสเพน 1 และ แอสเพน 2

แอนติบอดีจากหนู T3 ให้ความไวในการจับกับ cypermethrin โดยการทดสอบด้วยวิธี ELISA ดังนั้น จึงใช้ซีรัมจากหนู T3 มาใช้ในการศึกษาต่อไป

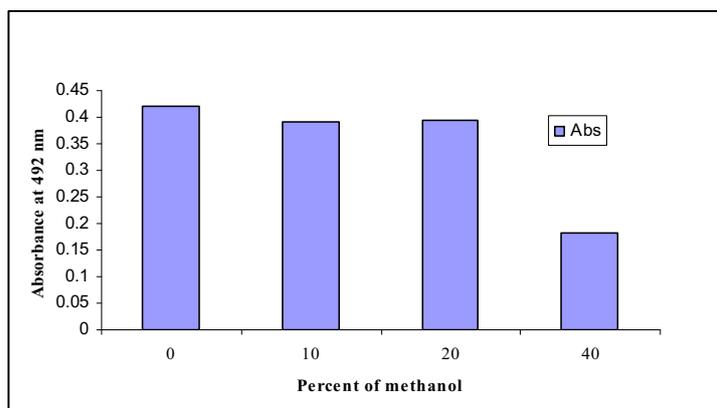
ความเข้มข้นของแอนติบอดีในซีรัมที่เก็บในเวลาที่แตกต่างกันหลังจากการฉีดเข็มที่ 3 (day 84, day 244, and day 322) ทดสอบโดยวิธีการไตเตรท ก่อนรวมซีรัมจากหนู T3 เพื่อนำใช้ในการพัฒนาวิธี ELISA ต่อไป ผลพบว่า ความเข้มข้นของแอนติบอดีหลังฉีดเข็มที่ 3 แล้ว ให้ค่า reciprocal titer > 256,000 ทุกช่วงเวลาที่เก็บซีรัม รูปที่ 4.13 ดังนั้น จึงนำซีรัมของหนู T3 ที่เก็บหลังจากฉีดเข็มที่ 3 แล้ว มารวมกัน แล้วแบ่ง aliquoted ประมาณหลอดละ 200 μ L และเก็บไว้ที่ -20° C เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนา Immunoassay ต่อไป



รูปที่ 4.13 ความเข้มข้นของแอนติบอดีในซีรัมของเมาส์ T3 กระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีด้วย H12-BSA ในวันที่ 84, 244 วันและ 322 วัน indirect ELISA ก่อนที่จะรวมซีรัม โดย H1 - OVA ถูกใช้เป็นแอนติเจนเคลือบที่ 2 $\mu\text{g} / \text{mL}$

4.3.10 การพัฒนาวิธีการตรวจ cypermethrin ด้วยวิธี indirect competitive ELISA (ic-ELISA) จากแอนติบอดีที่ได้จากการใช้ H1-BSA กระตุ้นให้เกิดแอนติบอดี

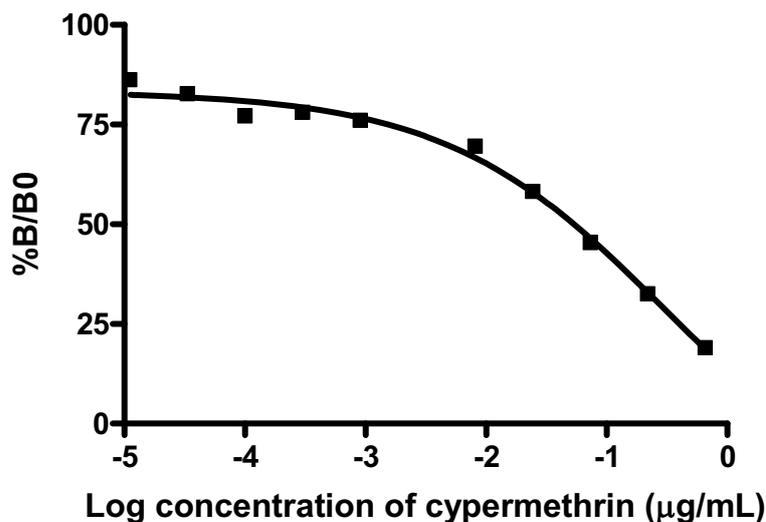
- 1) ผลกระทบจากเมทานอลต่อประสิทธิภาพการทำงานของแอนติบอดีต่อ cypermethrin แอนติบอดีจากการกระตุ้นด้วย H12-BSA พบว่าเมทานอลที่ร้อยละ 20 เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในระบบของ ELISA ดังรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14 ผลกระทบของเมทานอลต่อประสิทธิภาพการทำงานของแอนติบอดีทดสอบโดยวิธี Non-competitive indirect ELISA โดยใช้ H1-OVA เป็นตัวเกาะเฟลท และ ซีรัมจากหนู T3 เจือจาง 1/10,000

2) การทดสอบความไวและความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ cypermethrin ของแอนติบอดีจากหนูที่กระตุ้นด้วย H12-BSA

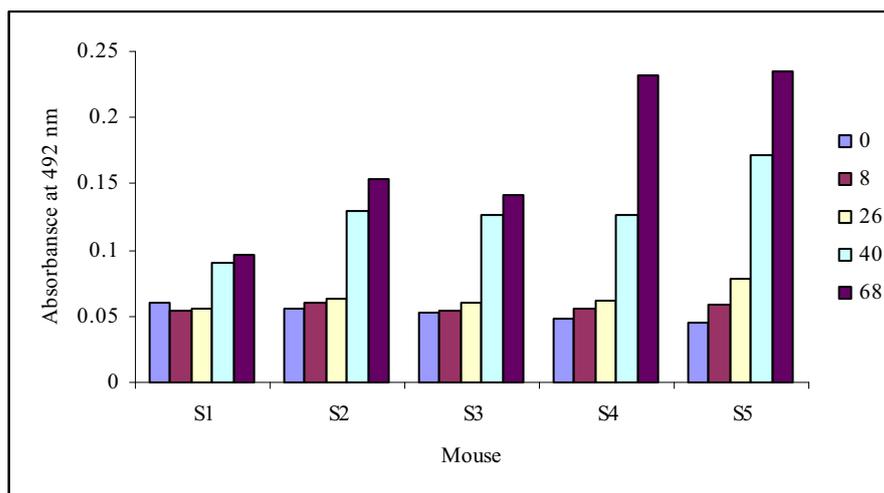
ความไวและความจำเพาะของแอนติบอดี ทดสอบได้จาก ic-ELISA มี โดยใช้สารมาตรฐาน cypermethrin และสารอื่นที่มีโครงสร้างคล้ายกัน คือ Permethrin, cyfluthrin, deltamethrin พบว่าความเข้มข้นของการยับยั้งที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของ cypermethrin คือ $0.32 \mu\text{g} / \text{mL}$ และ ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 0.02 ng/mL ที่ร้อยละ 80 ของการยับยั้ง โดยไม่มี cross-reactivity ต่อ permethrin, cycluthrin และ deltamethrin ที่มีความเข้มข้นมากกว่า $0.2 \text{ mg} / \text{mL}$ รูปที่ 4.15



รูปที่ 4.15 Dose response curve of log concentration of cypermethrin and %B/B0

4.3.11 การตอบสนองของแอนติบอดีจากหนูที่กระตุ้นด้วย immunogen ชนิด H2 - BSA

การตอบสนองของแอนติบอดีจากหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วย immunogen ชนิด H2- BSA ทดสอบโดยวิธี ELISA พบว่าระดับของแอนติบอดีเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ หลังจากกระตุ้นเข็มแรก (รูปที่ 4.16) แต่ระดับของแอนติบอดีมีน้อยมากหลังจากที่ได้รับการกระตุ้นด้วย immunogen 2-BSA จึงไม่สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาต่อได้



รูปที่ 4.16 การตอบสนองของแอนติบอดีต่อ immunogen H2-BSA ของหนูกลุ่ม S ทดสอบโดยวิธี non-competitive indirect ELISA โดยใช้ซีรัมเจือจาง 1/1000 และ ใช้ 3PBA-OVA เกาะเพลท

4.4 การนำวิธี การตรวจการทำงานของ cholinesterase enzyme ในน้ำลายแทนการตรวจในเลือด จากวิธีที่ทำการพัฒนาแล้ว

4.4.1 Mean and Median (\pm SD) of ChE activities

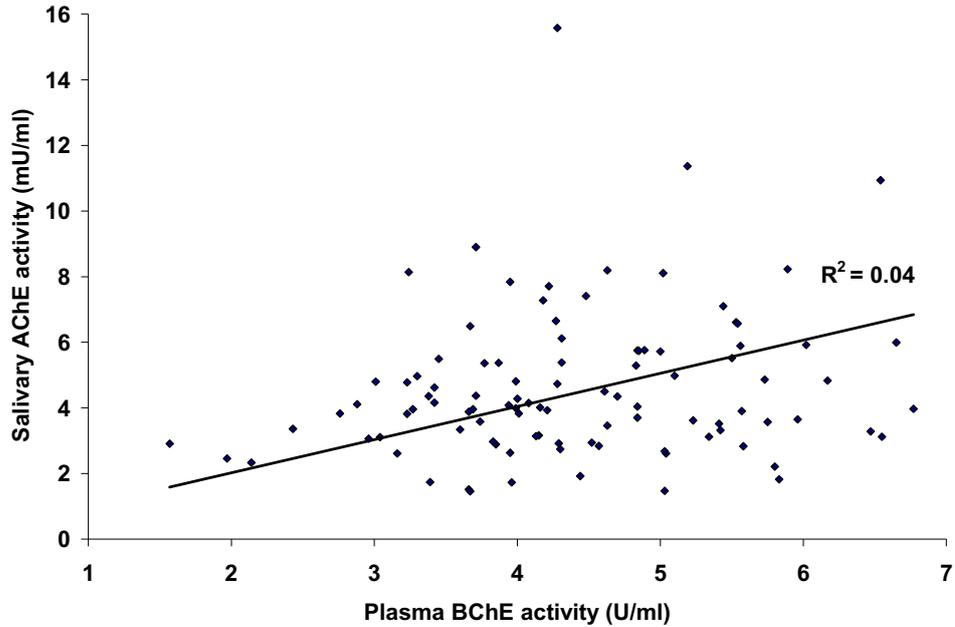
จากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BChE ในเลือดและน้ำลายจากอาสาสมัครจำนวน 100 ราย ได้ผลดังตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 Mean และ Median (\pm SD) ของค่าการทำงานของเอนไซม์ในผู้บริโภคน้ำดื่ม จำนวน 100 คน และ เกษตรกร จำนวน 100 คน

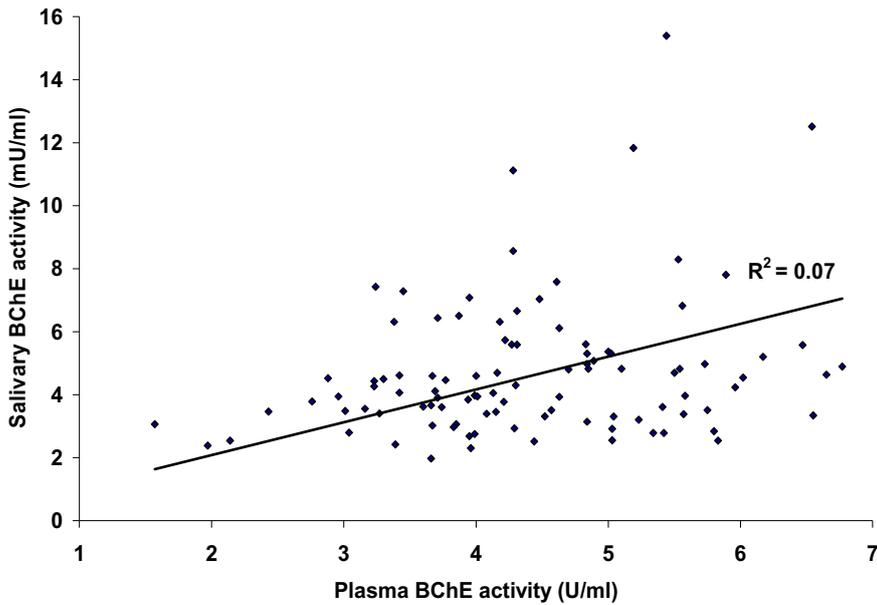
เอนไซม์	แหล่ง	Mean (\pm SD) (U/mL)		Median (U/mL)	
		ผู้บริโภคน้ำดื่ม	เกษตรกร	ผู้บริโภคน้ำดื่ม	เกษตรกร
AChE	เลือด	4.18 \pm 1.70	-	-	3.94 \pm 1.88
	น้ำลาย	4.16 \pm 0.195	-	-	3.93 \pm 2.25
BChE	เลือด	4.26 \pm 0.115	4.20 \pm 1.12	-	-
	น้ำลาย	4.35 \pm 0.169	-	-	4.25 \pm 2.21

4.4.2 Correlation of ChE activities in four enzymes

ในกลุ่มผู้บริโภคมพบ Significant correlation ระหว่างการทำงานของเอนไซม์ plasma BChE และ salivary AChE ($r = 0.205$, $P = 0.041$ in รูปที่ 4.17) และระหว่าง plasma BChE และ salivary BChE ($r = 0.271$, $P = 0.006$ in รูปที่ 4.18)

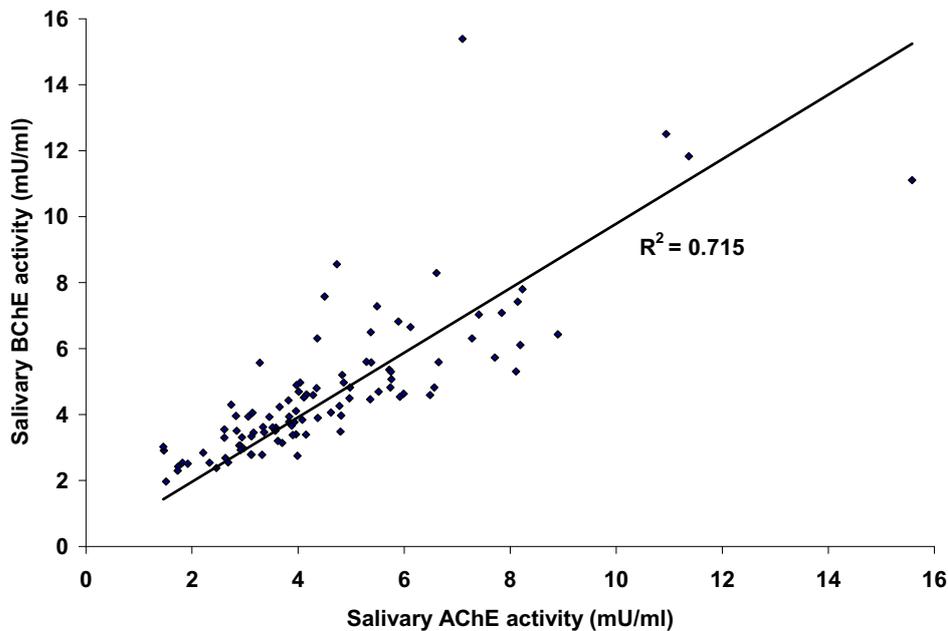


รูปที่ 4.17 Significantly correlation ระหว่างการทำงานของเอนไซม์ plasma BChE และ salivary AChE ($r = 0.205$, $P = 0.041$) ในกลุ่มผู้บริโภคม ($n=100$)



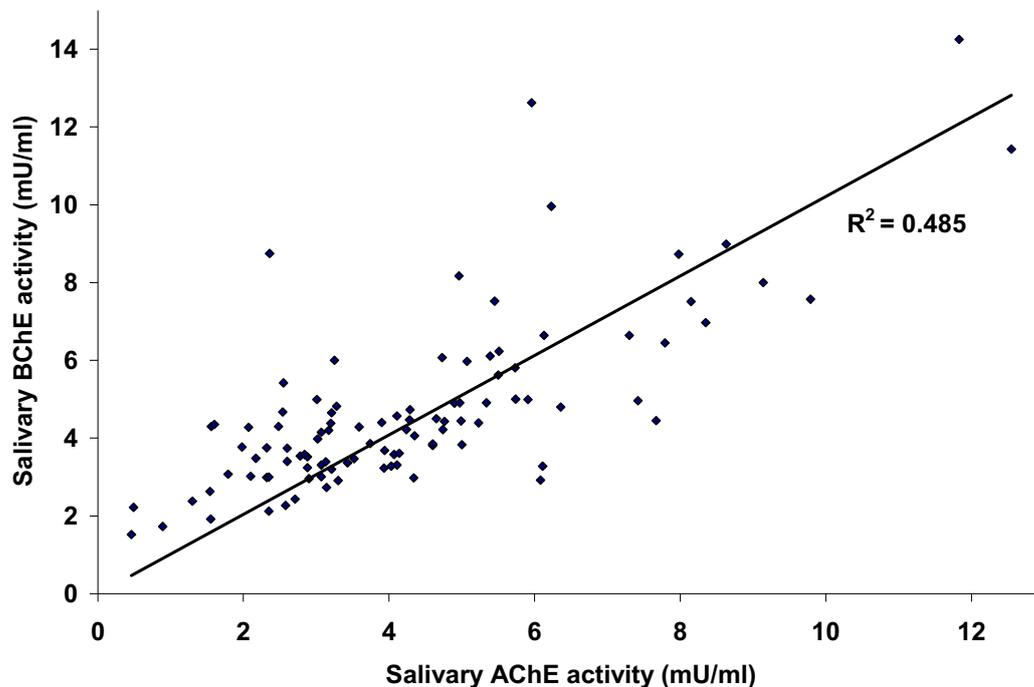
รูปที่ 4.18 Significantly correlation ระหว่างการทำงานของเอนไซม์ plasma BChE และ salivary BChE activities ($r = 0.271$, $P = 0.006$) ในกลุ่มผู้บริโภคน (n=100)

นอกจากนี้ยังพบ Correlation ระหว่างการทำงานของเอนไซม์ salivary AChE and salivary BChE ($r = 0.846$, $P = 0.000$ in รูปที่ 4.19)



รูปที่ 4.19 Significantly correlation ระหว่างการทำงานของเอนไซม์ salivary AChE และ salivary BChE activities ($r = 0.846$, $P = 0.000$) ในกลุ่มผู้บริโภคน (n=100)

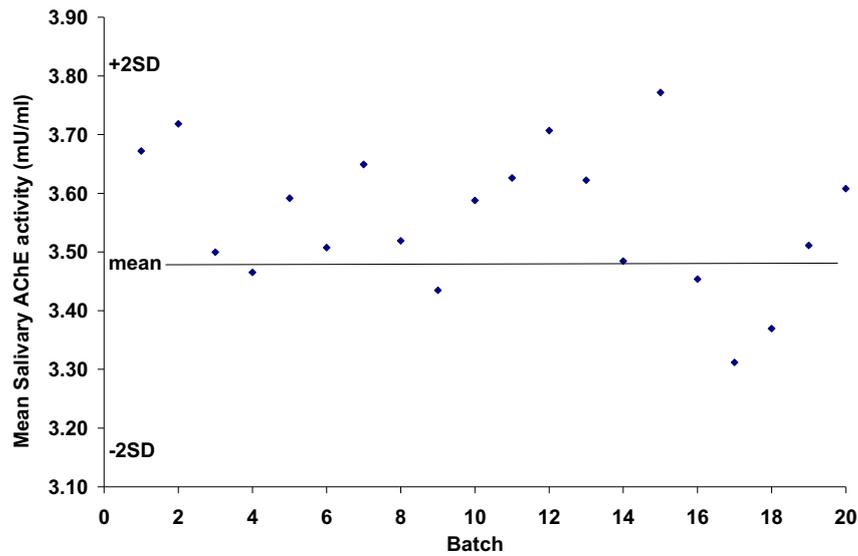
อย่างไรก็ตามในกลุ่มเกษตรกรพบ Significant correlation แค่ในการทำงานของเอนไซม์ salivary AChE และ salivary BChE ($r= 0.697, P=0.000$ in รูปที่4.20)



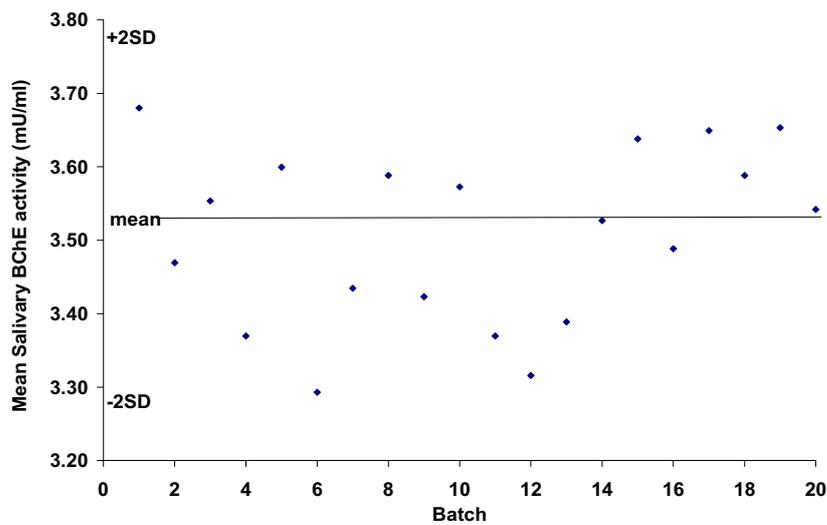
รูปที่4.20 Significantly correlation ระหว่างการทำงานของเอนไซม์ salivary AChE และ salivary BChE activities ($r= 0.846, P=0.000$) ในกลุ่มเกษตรกร ($n = 100$)

4.4.3 Quality Assurance and Control

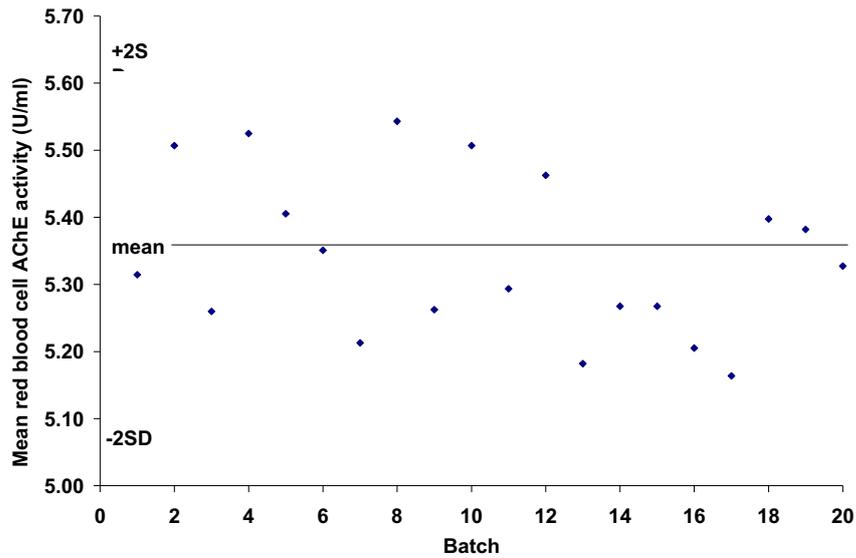
ในงานวิจัยนี้มีการควบคุม Quality assurance โดยแต่ละ batch ของการวัดใน samples จะมี 2 sample blanks and 6 controls (pooled saliva and blood) ซึ่งจะวาง หน้า กลาง และท้าย และทุก tubes จะ run in duplicate เมื่อนำค่าการทำงานของเอนไซม์ของ controls (6 tubes) ในแต่ละ batch (Intra-variation) มาคำนวณ Mean of coefficient of variation (%CV) พบว่ามีค่าน้อยกว่า 5% โดยมีค่าดังนี้ salivary AChE (3.08) salivary BChE (2.91) red blood cell AChE (2.54) และ plasma BChE (1.79) นอกจากนี้ %CV ของการทำงานของเอนไซม์ใน controls ทั้งหมด (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) โดยค่าการทำงานของเอนไซม์ทั้งหมดนี้อยู่ใน OCV interval (Mean activity \pm 2SD) โดยแสดงใน รูปที่ รูปที่4.21 4.22 4.23 และ 4.24



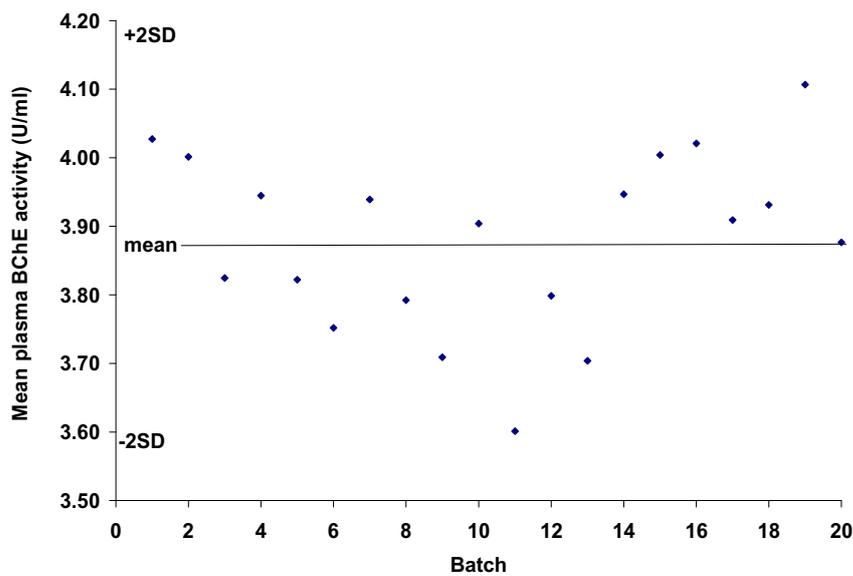
รูปที่ 4.21 ค่า Mean ของการทำงานของเอนไซม์ salivary AChE ใน controls ทั้งหมด (inter-variation) มีค่าอยู่ระหว่าง 3.15-3.83 mU/mL (Mean activity \pm 2SD)



รูปที่ 4.22 ค่า Mean ของการทำงานของเอนไซม์ salivary BChE ใน controls ทั้งหมด (inter-variation) มีค่าอยู่ระหว่าง 3.28-3.78 mU/mL (Mean activity \pm 2SD)



รูปที่ 4.23 ค่า Mean ของการทำงานของเอนไซม์ red blood cell AChE ใน controls ทั้งหมด (inter-variation) มีค่าอยู่ระหว่าง 5.07-5.65 U/mL (Mean activity \pm 2SD)



รูปที่ 4.24 ค่า Mean ของการทำงานของเอนไซม์ plasma BChE ใน controls ทั้งหมด (inter-variation) มีค่าอยู่ระหว่าง 3.59-4.19 U/mL (Mean activity \pm 2SD)

4.4.4 ผลการศึกษาเปรียบเทียบกับแบบสัมภาษณ์

ลักษณะต่างๆของกลุ่มตัวอย่างถูกแสดงใน ตารางที่ 4.17

ตารางที่ 4.17 ลักษณะการสัมผัสสารเคมีของกลุ่มตัวอย่าง

ลักษณะการสัมผัส	ผู้บริโภคร	เกษตรกร
	(N=100)	(N=100)
	เปอร์เซ็นต์ (%)	
ข้อมูลพื้นฐาน		
อายุ		
<20	1	2
21-30	24	6
31-40	25	40
41-50	32	34
51-60	15	18
> 61	3	0
การใช้สารเคมีในบ้าน		
ไม่ใช้	38	56
ใช้	62	44
การบริโภค		
ผักและผลไม้ปลอดสารพิษ	21	16
ผักและผลไม้ทั่วไป	79	84
การล้างมือก่อนรับประทานอาหาร		
ไม่ล้างมือ	2	0
ล้างบางครั้ง	10	5
ล้างทุกครั้งด้วยน้ำเปล่า	63	64
ล้างทุกครั้งด้วยสบู่	14	14
ล้างทุกครั้งด้วยน้ำยาล้างจาน	8	17
ล้างทุกครั้งด้วยผงซักฟอก	3	0

ตารางที่ 4.17 ลักษณะการสัมผัสสารเคมีของกลุ่มตัวอย่าง (ต่อ)

	ผู้บริโภคร (N=100)	เกษตรกร (N=100)
	เปอร์เซ็นต์ (%)	
การล้างผักก่อนรับประทาน		
ไม่ล้าง	1	0
ล้าง 1 ครั้งด้วยน้ำเปล่า	27	37
ล้าง 2 ครั้งด้วยน้ำเปล่า	2	5
ล้าง 3 ครั้งด้วยน้ำเปล่า	4	3
ล้างมากกว่า 3 ครั้งด้วยน้ำเปล่า	0	1
แช่และล้างด้วยน้ำเปล่า	50	38
แช่ด้วยน้ำเกลือและล้างด้วยน้ำเปล่า	14	15
ล้างผ่านด้วยน้ำก๊อก	1	0
ล้างด้วยน้ำยา Baby mind	1	0
ล้างด้วย Sodium bicarbonate	0	1
การล้างผลไม้ก่อนรับประทาน		
ไม่ล้าง	3	10
ล้างบางครั้ง	0	4
ล้าง 1 ครั้งด้วยน้ำเปล่า	53	55
ล้าง 2 ครั้งด้วยน้ำเปล่า	1	1
ล้าง 3 ครั้งด้วยน้ำเปล่า	1	1
ล้างมากกว่า 3 ครั้งด้วยน้ำเปล่า	0	1
แช่และล้างด้วยน้ำเปล่า	32	19
แช่ด้วยน้ำเกลือและล้างด้วยน้ำเปล่า	8	6
ล้างผ่านด้วยน้ำก๊อก	1	0
ล้างด้วยน้ำยา Baby mind	1	0
ล้างด้วย Sodium bicarbonate	0	3

การทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างๆในผู้บริโภค และ เกษตรกร ถูกเปรียบเทียบ โดยใช้ Paired samples T test (parametric) และ 2 independent samples test (nonparametric) พบว่า ไม่มี

ความแตกต่างกันในทุกชนิดของเอนไซม์ เพราะว่าทั้งสองกลุ่มนี้มีพฤติกรรมที่ส่งผลต่อการสัมผัสสารเคมีฯคล้ายคลึงกัน ตัวอย่างเช่น ทั้งคู่เน้นมีการใช้สารเคมีที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในบ้านประมาณ 50% กินอาหารที่ไม่ปลอดสารเคมีฯมากกว่า 80% มักจะล้างมือด้วยน้ำเปล่ามากกว่า 50% และส่วนมากล้างผักและผลไม้โดยการแช่และล้างน้ำเปล่า โดยพฤติกรรมที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ ชักนำไปเกิดการสะสมของสารเคมีฯในร่างกายมากยิ่งขึ้น ในส่วนของเกษตรกรก็มีการป้องกันตัวจากการสัมผัสสารเคมีฯขณะฉีดพ่นในสวนด้วยวิธีต่างๆ ดัง ตารางที่ 4.18 ดังนั้นการสัมผัสสารเคมีฯจึงมาจากทางเดียวกันกับผู้บริโภคดังที่กล่าวไปแล้ว จึงทำให้การทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.18 การป้องกันตัวจากการสัมผัสสารเคมีฯ ขณะฉีดพ่น ในเกษตรกร

พฤติกรรม	เปอร์เซ็นต์(%) (n=100)
ไม่ได้ฉีดพ่น	30
สวมถุงมือ	53
สวมเสื้อแขนยาว	70
สวมหน้ากากกันสารเคมีฯ	57
สวมรองเท้าบู๊ท	66
สวมเสื้อคลุมพลาสติก	3
สวมหมวก	1
สวมหน้ากากผ้า	4
สวมแว่นตา	1
สวมหมวกกันน็อก	1

ตารางที่ 4.19 ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการทำงานของเอ็นไซม์

ปัจจัย	ผู้บริโภคน(N=100)	เกษตรกร(N=100)
	เปอร์เซ็นต์ (%)	
อายุ (ปี)		
<20	1	2
21-30	24	6
31-40	25	40
41-50	32	34
51-60	15	18
> 61	3	0
การเป็นโรค		
โรคความดันโลหิตสูง	14	12
โรคไขมันในเลือดสูง	9	2
โรคเบาหวาน	6	2
โรคปวดหัวเรื้อรัง	94	85
โรคปวดท้องเรื้อรัง	98	14
โรคไต	1	1
โรคตับ	3	1
โรคเหงือกอักเสบ	13	24
โรคภูมิแพ้	21	12
โรคความจำเสื่อม	4	12
โรคโลหิตจาง	0	3
โรคไชนัส	1	1
โรคเก๊าท์	0	2
โรคไทรอย์	0	1
โรคริดสีดวงทวาร	0	1
โรคชา	1	1
โรคหอบ หืด	1	0
โรคไมเกรน	2	0

ใน ตารางที่ 4.19 ข้อมูลแสดงปัจจัยอื่นที่มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งพบว่าเมื่ออายุเพิ่มขึ้นการทำงานของเอนไซม์ red blood cell AChE จะเพิ่มมากขึ้น ($r= 0.216, P=0.031$) เฉพาะในกลุ่มผู้บริโภคน้ำตาล ซึ่งจำนวนคนในช่วงอายุต่างๆแสดงใน ตารางที่ 3 ซึ่งผลของความสัมพันธ์นี้อาจทำให้ไม่พบ correlation ระหว่างเอนไซม์ AChE ในเลือดและในน้ำลาย โดยพบ correlation แต่ในระหว่าง เอนไซม์ BChE ในเลือดและในน้ำลายในกลุ่มผู้บริโภคน้ำตาล ส่วนในกลุ่มของเกษตรกรนั้นไม่พบ correlation ในทุกชนิดของเอนไซม์ อาจเป็นเพราะว่า เกษตรกรนั้นตรวจพบว่าเป็นโรคที่มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์มากกว่าในกลุ่มผู้บริโภคน้ำตาล เช่น เกษตรกรเป็นโรคเหงือกอักเสบมากกว่าผู้บริโภคน้ำตาลเกือบสองเท่า โดยคนที่ เป็นโรคนี้จะทำให้มีการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ salivary BChE (Yamalik et al., 1990) นอกจากนี้ยังมีข้อมูลทางสถิติที่สนับสนุนว่าในกลุ่มของเกษตรกรนั้นมีผลกระทบจากปัจจัยอื่นต่อการทำงานของเอนไซม์มาก เช่น การกระจายตัวของการทำงานของเอนไซม์ (salivary BChE salivary AChE และ red blood cell AChE)ไม่เป็นแบบปกติ ในขณะที่พบการกระจายตัวแบบเป็นปกติในกลุ่มผู้บริโภคน้ำตาล จึงทำให้พบ correlation ระหว่างการทำงานของเอนไซม์ plasma BChE กับ salivary AChE ($r= 0.205, P = 0.041$ และ plasma BChE กับ salivary BChE ($r= 0.271, P = 0.006$) และยังพบ correlation ระหว่างเอนไซม์ทั้งสองชนิดในน้ำลาย ($r= 0.846, P=0.000$) อย่างไรก็ตาม salivary BChE นั้นเหมาะสมที่จะใช้เป็น biomarker มากกว่า salivary AChE เพราะว่า stronger correlation และจากเหตุผลอื่น คือ BChE เป็นองค์ประกอบมากถึง 70-90% ในน้ำลาย (Yamalik et al., 1990; Ueda & Yamaguchi, 1976) และ ATC substrate นั้นสามารถถูก hydrolyze ทั้งจาก AChE และ BChE (Lassiter et al., 1998) จึงไม่มีความ specific เหตุผลสุดท้ายแสดงใน ตารางที่ 4 ค่าการทำงานของเอนไซม์ salivary BChE และ plasma BChE ในงานวิจัยนี้คล้ายกับงานวิจัยที่ผ่านมา และมีค่าในน้ำลายน้อยกว่าในเลือด 1000 เท่า (Ryhanen et al, 1983; Sidell and Kaminskis, 1975) นอกจากนี้ยังพบว่าค่า correlation ระหว่าง BChE ในเลือดและในน้ำลายในงานวิจัยนี้ ($r= 0.271, P = 0.006, n=100$) มีค่ามากกว่างานวิจัยของ Ng (2009) ที่ผ่านมา ($r = 0.42, P = 0.071, n=19$) เพราะว่ามีจำนวนอาสาสมัครมากยิ่งขึ้น

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย (conclusion)

5.1 การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์สารเคมีกำจัดเชื้อรา carbendazim

จากการพัฒนาวิธีเพื่อเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์สารเคมีกำจัดเชื้อรา carbendazim ในตัวอย่างพบว่าสามารถนำไปใช้ได้ดีในการตรวจในตัวอย่างผลไม้ โดยมีค่า LOD และ LOQ ของสาร carbendazim อยู่ที่ 0.0025 และ 0.005 mg/kg ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่า LOD และ LOQ ของการสกัดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้พบว่าสามารถวิเคราะห์ได้ในระดับที่ต่ำกว่าค่ามาตรฐานสูงสุดของการตกค้าง(MRLs) ของสารกำจัดและมาตรฐาน Codex alimentarius pesticide residues in food ซึ่งกำหนดไว้ไม่เกิน 0.5 mg/kg ค่าร้อยละของการกลับคืนอยู่ในช่วง 62.3% ถึง 79.8%, และ 63.6% ถึง 69.6% ของระดับความเข้มข้นที่ 0.015 และ 0.025 mg/kg ตามลำดับ ค่า inter-batch อยู่ในช่วง 98.2 ค่าร้อยละของความแปรปรวนอยู่ในช่วง 21.5 เมื่อนำวิธีการดังกล่าวไปใช้วิเคราะห์ carbendazim ตกค้างในสัมพบว่า สามารถใช้ได้ดี สามารถตรวจพบได้ในระดับ 0.007-0.014 mg/kg

5.2 การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids

การพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างที่ง่ายและรวดเร็ว สำหรับวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids ในระดับต่างๆ โดยใช้เทคนิค gas chromatography-electron capture detection (GC-ECD) เนื่องจาก ECD มีความไวต่อสารที่มีองค์ประกอบของธาตุ Halogen ทำให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ดีในความเข้มข้นระดับต่างๆ (Zawiyah et al., 2007) สำหรับสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids เป็นสารที่มีความหลากหลายเนื่องจากมีหลาย isomer ตั้งแต่ 2 isomers ถึง 5 isomers ค่า correlation (R²) อยู่ระหว่าง 0.978 ถึง 0.996 โดย isomers ส่วนใหญ่จำนวน 17 ใน 20 isomers ที่มีค่า R² มากกว่า 0.99 ทำให้การวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของสารแต่ละตัวต้องใช้ในการคำนวณแบบ sum peak

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่าง (LOD) อยู่ในช่วง 0.001 ถึง 0.005 mg/kg และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณได้ (LOQ) อยู่ที่ 0.005 ถึง 0.01 mg/kg ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่า LOD และ LOQ ของการสกัดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้พบว่าสามารถวิเคราะห์ได้ในระดับที่ต่ำกว่าค่ามาตรฐานสูงสุดของการตกค้าง (MRLs) ที่กำหนดไว้สำหรับประเทศไทยและมาตรฐาน Codex alimentarius

ค่าร้อยละของการกลับคืนของการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids จากการเติมสารมาตรฐาน 3 ระดับความเข้มข้น คือ ต่ำ, กลาง และสูง อยู่ในช่วง 83.8 ถึง 109.33 ซึ่งอยู่ในช่วงการยอมรับของ CODEX alimentarius (70-110%)

ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีสกัดจาก Intra-batch และ inter-batch โดยใช้ตัวอย่างทั้งหมด 10 ซ้ำ พบว่า ค่าร้อยละของการกลับคืนของ intra-batch อยู่ในช่วง 87.9 ถึง 102.1 และ ค่าร้อยละของการกลับคืนของ inter-batch อยู่ในช่วง 81.5 ถึง 113.9 ซึ่ง intra-batch และ inter-batch อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ที่ 21%. (Pihlström, 2010) ในการทดสอบ solvents จากการสกัดตัวอย่างผักและผลไม้ 4 ชนิด พบว่า dichloromethane ให้ค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ระหว่างร้อยละ 28-90 ดังนั้นจึงเลือก DCM และในการทดสอบ clean up สารสกัดที่มีสีรงควัตถุด้วย carbon cartridge (self-modified) พบว่าค่าร้อยละของการกลับคืนอยู่ในช่วงร้อยละ 86 ถึง 96 ซึ่งอยู่ในระดับดี

จากการทดสอบความสามารถของวิธีการสกัดสารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids ที่ตกค้างในผักผลไม้ โดยใช้ผักผลไม้ที่มีความหลากหลาย พบว่าค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 69 ถึง 131 เมื่อศึกษาในสารแต่ละตัวจะพบว่าสูงกว่าร้อยละ 80 ยกเว้น สารเปอร์เมทรินในกะหล่ำปลีและคะน้า และเมื่อทดสอบความคงทนของวิธีสกัดสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids ที่ตกค้างในผักและผลไม้ โดยกำหนดให้นักวิทยาศาสตร์จำนวน 3 คน ทำการสกัดตัวอย่างตามขั้นตอนการสกัดที่ได้ทำการพัฒนา พบว่าค่าร้อยละการกลับคืนเฉลี่ยของทั้ง 3 คน อยู่ในช่วง 90.8 ถึง 118.9 และค่าร้อยละของความแปรปรวนอยู่ในช่วง 0.68 ถึง 17.13

สรุปได้ว่าจากผลการพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids สังกะหรณ์ในผักและผลไม้ ทำให้รวดเร็วขึ้น ใช้ปริมาณสารในการสกัดน้อยกว่า และสามารถกำจัดสีรงควัตถุจากผักและผลไม้ได้ เนื่องจากสีรงควัตถุจากผักและผลไม้เหล่านี้ไม่ปลอดภัยกับเครื่อง GC-ECD ในการทำงานระยะยาว

5.3 การพัฒนาวิธี ELISA เพื่อการตรวจวัดสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroid-Cypermethrin

จากวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี ELISA เพื่อการตรวจวัดสาร cypermethrin ซึ่งอยู่ในกลุ่ม synthetic pyrethroid นั้น สิ่งที่สำคัญที่สุดก็คือ สาร hapten ซึ่งจำเป็นจะต้องมีส่วนที่คล้ายคลึงกับ cypermethrin มากจึงจะสามารถผลิตแอนติบอดีต่อ cypermethrin ได้ โดยอาศัยหลักการเพื่อให้แอนติบอดีจับกับส่วนที่เหมือนกับ hapten บนโครงสร้างของ cypermethrin, จากงานวิจัยนี้สามารถผลิต haptens ได้ 2 haptens โดยมีโครงสร้างคล้ายกับ cypermethin คือ 1. ส่วนของ cyclopropane ring ซึ่งใช้ในการสังเคราะห์เป็น hapten 1 (H1) และ ส่วนที่เป็น aromatic moiety ซึ่งใช้ในการสังเคราะห์เป็น hapten 2 (H2) หลังจากนั้นนำทั้ง 2 haptens ไปต่อกับโปรตีน BSA เพื่อนำไปใช้ในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของหนู (BALB/c) เพื่อให้เกิดการสร้างแอนติบอดีต่อ hapten เรียกว่า immunogens โดยจะได้ 2 immunogens คือ H1 – BSA และ H2 – BSA และ H12 – BSA ซึ่งเกิดจากการนำ H1 และ H2 มาต่อกับโปรตีนตัวเดียวกัน และเช่นกัน H1 และ H2 ยังต้องนำไปต่อกับ OVA เพื่อใช้เป็น ตัวเกาะเพลทในการทำ ELISA ความหนาแน่น H1- BSA และ H2- BSA คือ 8

และ 13 ตามลำดับ ความไวและความจำเพาะของ antibody ที่ได้ จาก H1- BSA มีค่า ร้อยละ 50 ของ การยับยั้งของ cypermethrin ที่ 52 µg/mL โดย LOQ เท่ากับ 1.8 µg/mL ที่ ร้อยละ 85 ของการยับยั้ง ด้วย cypermethrin และ ค่า LOD ของ indirect competitive ELISA เท่ากับ 0.39 µg/mL ที่ ร้อยละ 90 ของการยับยั้งด้วย antibody ต่อ cypermethrin นอกจากนี้แอนติบอดีที่ได้จากการกระตุ้นด้วย H12- BSA มีการตอบสนองที่ดีที่จะมีค่าร้อยละ 50 ของการยับยั้งด้วย cypermethrin เท่ากับ 0.32 µg/mL และค่าขีดจำกัดของการวัดด้วย indirect competitive ELISA เท่ากับ 0.02 ng/mL

5.4 การพัฒนาวิธี การตรวจการทำงานของ cholinesterase enzyme ในน้ำลายแทนการตรวจในเลือด จากการพัฒนาวิธีเพื่อตรวจการทำงานของเอนไซม์ cholinesterase ในน้ำลาย พบว่า วิธีการตรวจนี้มีค่าแม่นยำดีมาก เมื่อเทียบกับวิธีของเลือด โดยค่า Intra-variation มีค่าน้อยกว่า 5% คือ salivary AChE = 3.08 และ salivary BChE = 2.91 นอกจากนี้ %CV ของการทำงานของเอนไซม์ ใน controls ทั้งหมด inter-variation ก็พบว่ามีค่าน้อยกว่า 5% เช่นกัน โดยมีค่าดังนี้ salivary AChE = 3.38 และ salivary BChE = 3.38 red

เมื่อนำมาทดสอบหาความสัมพันธ์จากผลที่ได้จากตัวอย่างจริงเทียบระหว่างตัวอย่างน้ำลาย และเลือดพบว่า plasma BChE และ salivary AChE มีความสัมพันธ์กันที่ $r = 0.205, p = 0.041$ และ ระหว่าง plasma BChE และ salivary BChE ที่ $r = 0.271, p = 0.006$ เมื่อทดสอบโดยสถิติ Pearson correlation test จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสามารถนำตัวอย่างน้ำลายมาทดสอบหา การทำงาน ทดแทนการใช้ตัวอย่างเลือดได้ดี อีกทั้งยังเป็นตัวอย่างที่เก็บได้ง่ายและไม่ต้องใช้อุปกรณ์มาก

เอกสารอ้างอิง

- _____. 2554. “สารป้องกันและกำจัดโรคพืช ตอนที่ 4”. [Online]. Available <http://www.bloggang.com/mainblog.php?id=yakkeaw&month=06-01-2011&group=8&gblog=4> (20 August 2011).
- Abdollahi, M., Balali-Mood, M., Akhgari, M., Jannat, B., Kebriaeezadeh, A., Nikfar, S. 1996. A survey of cholinesterase activity in healthy and organophosphate exposed populations. *Irn. J. Med. Sci.* 21 (1&2): 68.
- Abdollahi, M., Jalali, N., Jafari, A. 1995. Chronic toxicity in organophosphorus exposed workers. *Med. J. Islam. Repub. Iran.* 9: 221-225.
- Abdollahi, M., Mostafalou, S., Pournourmohammadi, S., Shadnia, S. 2004. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 137: 29-34.
- Blasco, C., Font, G., Pico, Y. 2006. Evaluation of 10 pesticide residues in oranges and tangerines from Valencia (Spain). *Food Control*, 17(11): 841-846.
- Borzelleca, J.F. and Skalsky, H.L. 1980. The excretion of pesticides in saliva and its value in assessing exposure. *J. Environ. Sci. Health.* 15: 843-866.
- Botchkareva, A. E., Eremin, S. A., Montoya, A., Manclus, J. J., Mickova, B., Rauch, P., Fini, F., Girotti, S. 2003. Development of chemiluminescent ELISAs to DDT and its metabolites in food and environmental samples. *J Immunol Methods*, 283, (1-2), 45-57.
- Breen, K. 2002. The characterisation of salivary acetylcholinesterase (AChE) as a potential biochemical marker of Alzheimer’s disease progression (Research Grant Final Report). Alzheimer’s Society Quality Research in Dementia.
- Chapman, R. A. Harris, C. R., Persistence of four pyrethroid insecticides in a mineral and an organic soil. *J Environ Sci Health B* 1981, 16, (5 Pt B), 605-15.
- Chauncey, H. H., Lionetti, F., Winer, R. A., Lisanti, V. F. 1953. Enzymes of human saliva. I. The determination, distribution, and origin of whole saliva enzymes. *J. Dent. Res.* 33: 321–334.
- Chuncey, H.H. 1961. Salivary enzymes. *J. Am. Dent. Assoc.* 63: 361-368.
- Dave, K.R., Syal, A.R., Katyare, S.S. 2000. Tissue cholinesterases. A comparative study of their kinetic properties. *Z Naturforsch.* 55: 100-108.

- Dawson, L.J., Caulfield, V.L., Stanbury, J.B., Field, A.E., Christmas, S.E., Smith, P.M. 2005. Hydroxychloroquine therapy in patients with primary Sjogren's syndrome may improve salivary gland hypofunction by inhibition of glandular cholinesterase. *Rheumatology*. 44: 449-455.
- Dyer, S.M., Cattani, M., Pisaniello, D.L., Williams, F.M., Edwards, J.W. 2001. Peripheral cholinesterase inhibition by occupational chlorpyrifos exposure in Australian termiticide applicators. *Toxicol*. 169: 177-185.
- Ekholm, M., and Konschin, H. 1999. Comparative model building of human butyrylcholinesterase. *J Mol Struct*. 467: 161-172.
- Elliott, M., Casida, J.E., Quistad, G.B. 1995. *Pyrethrum Flowers: Production, Chemistry, Toxicology, and Uses*. Oxford University Press, New York, pp. 3-31.
- Ellman, G., Courtney, D., Andres, V., Featherstone, R. 1961. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol*. 7: 88-95.
- Fernandez-Alvarez, M., Llompарт, M., Lamas, J.P., Lores, M., Garcia-Jares, C., Cela, R., Dagnac, T. 2009. Development of a matrix solid-phase dispersion method for the simultaneous determination of pyrethroid and organochlorinated pesticides in cattle feed. *J Chromatograph A* 1216(14), 2832-2842.
- Gao, H., Ling, Y., Xu, T., Zhu, W., Jing, H., Sheng, W., Li, Q. X., Li, J. 2006. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the pyrethroid insecticide cyhalothrin. *J Agric Food Chem* 54(15), 5284-91.
- Goldberg, S. 1989. Freezer Storage Stability of MBC on Soybean. Du Pont, McKenzie Lab., USA. Report no. A52977. Unpublished.
- Hao, X. L., Kuang, H., Li, Y. L., Yuan, Y., Peng, C. F., Chen, W., Wang, L. B., Xu, C. L. 2009. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the alpha-cyano pyrethroids multiresidue in Tai lake water. *J Agric Food Chem*, 57(8), 3033-9.
- Hiemstra, M. and de Kok, A. 2007. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1154 (1-2): 3-25.
- Hoesterey, R. W. and Tomic, D. M. 1995a. Determination of the Storage Stability of Benomyl in Apples and Apple Products. Du Pont Agricultural Products, E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, Delaware, USA Du Pont Report No. AMR 2016-91. Unpublished.

- Hoesterey, R. W. and Tomic, D. M. 1995b. Determination of the Storage Stability of Benomyl in Peaches and Peach Products. Du Pont Agricultural Products, E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, Delaware, USA Du Pont Report No. AMR 2015-91. Unpublished.
- Hofmann, J.N., Keifer, M.C., De Roos, A.J., Fenske, R. A., Furlong, C.E., Belle, G.V., Checkoway, H. 2011. Occupational determinants of serum cholinesterase inhibition among organophosphate-exposed agricultural pesticide handlers in Washington State. *Occup. Environ. Med.* 67:375-386.
- Jalali, N., Pajoumand, A., Abdollahi, M., Shadnia, S. 2000. Epidemiological survey of poisoning mortality in Tehran during 1997–1998. *Toxicol. Lett.* 116: 84-84.
- Juan-Garcia, A., Font, G., Pico, Y. 2007. On-line preconcentration strategies for analyzing pesticides in fruits and vegetables by micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A*, 1153 (1-2): 104-113.
- Kim, H.J., Ahn, K.C., Ma, S.J., Gee, S.J., Hammock, B.D., 2007. Development of sensitive immunoassays for the detection of the glucuronide conjugate of 3-phenoxybenzyl alcohol, a putative human urinary biomarker for pyrethroid exposure. *J Agric Food Chem* 55, 3750-3757.
- Kousba, A.A., Poet, T.S., Timchalk, C. 2003. Characterization of the in vitro kinetic interaction of chlorpyrifos-oxon with rat salivary cholinesterase: A potential biomonitoring matrix. *Toxicology*. 188: 219 -232.
- LaDu, B.N., Bartels, C.F., Nogueira, C.P., Hajra, A., Lightstone, H., Van der Spek, A.F.L., Lockridge, O. 1990. Phenotypic and molecular biological analysis of human butyrylcholinesterase variants. *Clin. Biochem.* 23: 423-431.
- Lassiter, T.L., Barone, S. Jr., Padilla, S. 1998. Autogenetic differences in the regional and cellular acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity in rat brain. *Dev. Brain Res.* 105: 109-123.
- Lee, J. K., Park, S. H., Lee, E. Y., Kim, Y. J., Kyung, K. S. 2004. Development of an ELISA for the Detection of the Residues of the Fungicide Iprovalicarb. *J Agric Food Chem* 52(22), 6680-6686.
- Lee, N., McAdam, D. P., Skerritt, J. H. 1998. Development of Immunoassays for Type II Synthetic Pyrethroids. 1. Hapten Design and Application to Heterologous and Homologous Assays. *J Agric Food Chem*, 46(2), 520-534.

- Lu, C., Anderson, L. C., Morgan, M. S., Fenske, R. A. 1997. Correspondence of salivary and plasma concentrations of atrazine in rats under variable salivary flow rate and plasma concentration. *J. Toxicol. Environ. Health* 52: 317–329.
- Mak, S. K., Shan, G., Lee, H.-J., Watanabe, T., Stoutamire, D. W., Gee, S. J., Hammock, B. D. Development of a class selective immunoassay for the type II pyrethroid insecticides. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 534, (1), 109-120.
- Makinen, K.K. 1966. Studies on oral enzymes 1. Fractionation and characterization of aminopeptidases of human saliva. *Acta. Odontol. Scand.* 24: 579-604.
- Maroni, M., Jarvisalo, J., la Ferla, F. 1986. The WHO-UNDP epidemiological study on the health effects of exposure to organophosphorus pesticides. *Toxicol. Lett.* 33:115.
- Masson, P., Nachon, F., Bartels, C.F., Froment, M.T., Ribes, F., Matthews, C., Lockridge, O. 2003. High activity of human butyrylcholinesterase at low pH in the presence of excess butyrylcholine. *Eur J Biochem.* 270: 315-325.
- Masson, P., Xie, W., Froment, M.T., Lockridge, O. 2001. Effects of mutations of active site residues and amino acids interacting with Ω loop on substrate activation of butyrylcholinesterase. *Biochim Biophys Acta.* 1544: 166-176.
- Massoulie, J., Sussman, J., Bon, S., Silman I. 1993. Structure function of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Brain.* 98: 139-146.
- Mattes, C., Bradley, R., Slaughter, E., Browne, S. 1996. Cocaine and butyrylcholinesterase (BChE): determination of enzymatic parameters. *Life Sci.* 58(13): 257–261.
- McNally, M. E. 1991a. Freezer Storage Stability of MBC on Wheat Grain and Straw. E. I. du Pont de Nemours and Company, Du Pont Agricultural Products, Wilmington, Delaware, USA Du Pont Report No. AMR 904-87. Unpublished.
- McNally, M.E. 1991b. Freezer Storage Stability of MBC on Soybean. Supplement. Du Pont, McKenzie Lab., USA. Report no. A52978. Unpublished. Melkebeke, T. and Geuijen, I. 1996. Carbendazim + diethofencarb; wettable powder; 250 g/kg + 252 g/kg. Code: AE F017411 10 WP50 A601. Magnitude of residues of carbendazim and diethofencarb on glasshouse grown round tomatoes after two applications of SCHAA 10722 in the Netherlands; 1995. Notox B.V., the Netherlands. Report no. A57012. Unpublished.

- Michel, M., and Buszewski, B. 2004. Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the determination analysis of carbendazim residue in plant material. *J Chromatogr B*, 800 : 309–314.
- Michelangelo A. 2003. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. *J Chromatograph A*, 1015 163–184.
- Mileson, B.E., Chambers, J.E., Chen, W.L., Dettbarn, W., Ehrich, M., Eldefrawi, A.T., Gaylor, D.W., Hamernik, K., Hodgson, E., Karczmar, A.G., Padilla, S., Pope, C.N., Richardson, R.J., Saunders, D.R., Sheets, L.P., Sultatos, L.G., Wallace, K.B. 1998. Common mechanism of toxicity: a case study of organophosphorus pesticides. *Toxicol. Sci.* 41: 8-20.
- Ng, V., Koh, D., Wee, A., Chia, S.E. 2009. Salivary acetylcholinesterase as a biomarker for organophosphate exposure. *Occup Med.* 59: 120-122.
- Nozal, M.J., Bernal, J.L., Jimenez, J.J., Martin, M.T., Bernal, J. 2005. Determination of azolic fungicides in wine by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization–mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1076 (1-2): 90-96.
- Ntow, W.J., Tagoe, L.M., Drechsel, P., Kelderman, P., Nyarko, E., Gijzen, H.J. 2009. Occupational Exposure to Pesticides: Blood Cholinesterase Activity in a Farming Community in Ghana. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56:623–630.
- Pan, J., Xia, X.X., Liang, J. 2008. Analysis of pesticide multi-residues in leafy vegetables by ultrasonic solvent extraction and liquid chromatography- tandem mass spectrometry. *Ultrason Sonochem*, 15 (1): 25-32.
- Pang, G.F., Cao, Y.Z., Fan, C.L., Zhang, J.J., Li, X.M. 1997. Modification of AOAC multiresidue method for determining synthetic pyrethroid residues in fruits, vegetables, and grains. Part III: Studies of analyte stability and method ruggedness. *J AOAC Int.*, 80, (1) 63-73 available from: PM:9011060
- Pichini, S., Altieri, I., Zuccaro, P., Pacifici, R. 1996. Drug monitoring in nonconventional biological fluids and matrices. *Clin Pharmacokinet.* 30 (3): 211-228.
- Pihlström, T. 2010. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document No. SANCO/10684/2009. Supersedes Document No.SANCO/3131/2007.Implemented by 01/01/2010
- Prody, C.A., Zevin-Sonkin, D., Gnatt, A., Goldberg, O., Soreq, H. 1987. Isolation and characterization of full- length cDNA clones coding for cholinesterase from fetal human

- tissues. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 84: 3555-3559.
- Pullen, S., Hock, B. Development of Enzyme Immunoassays for the Detection of Pyrethroid Insecticides. *Anal. Lett.* 1995, 28, (5), 765-779.
- Radisic, M., Grujic, S., Vasiljevic, T., Lausevic, M. 2009. Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem*, 113 : 712–719.
- Romero-Gonzalez, R., Garrido Frenich, A., Martinez Vidal, J.L. 2008. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, 76 (1): 211-225.
- Ryhanen, R., Narhi, M., Puhakainen, E., Hanninen, O., Kontturi-Narhi, V. 1983. Pseudocholinesterase activity and its origin in human oral fluid. *J. Dent. Res.* 62:20–23.
- Sannino, A., Bandini, M., Bolzoni, L. 2003. Determination of pyrethroid pesticide residues in processed fruits and vegetables by gas chromatography with electron capture and mass spectrometric detection. *J AOAC Int.*, 86, (1) 101-108 available from: PM:12607747
- Sannino, A., Bolzoni, L., Bandini, M. 2004. Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables. *J Chromatograph A*, 1036(2), 161-169.
- Sayer, R., Law, E., Connelly, P. J., Breen, K. C. 2004. Association of a salivary acetylcholinesterase with Alzheimer’s disease and response to cholinesterase inhibitors. *Clin. Biochem.* 37: 98–104.
- Shan, G., Huang, H., Stoutamire, D. W., Gee, S. J., Leng, G., Hammock, B. D. 2004. A Sensitive Class Specific Immunoassay for the Detection of Pyrethroid Metabolites in Human Urine. *Chem Res Toxicol* 17(2), 218-225.
- Sidell, F.R. and Kaminskis, A. 1975. Influence of age, sex, and oral contraceptives on human blood cholinesterase activity. *Clin. Chem.* 21(10): 1393-1395.
- Singh, S.B., Foster, G.D., Khan, S.U. 2007. Determination of thiophanate methyl and carbendazim residues in vegetable samples using microwave-assisted extraction. *J Chromatogr A*, 1148(2): 152-157.
- Stajnbaher, D. and Zupancic-Kralj, L. 2003. Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatograph A*, 1015(1-2), 185-198.

- Stefanidou, M., Athanaselis, S., Velonakis, M., Pappas, F., Koutselinis, A. 2003. Occupational exposure to cholinesterase inhibiting pesticides: a Greek case. *Int. J. Environ. Health. Res.*13:23–29.
- Thurman, E. M. and Ferre, I. 2008. Multiresidue Analysis of 301 Pesticides in Food Samples by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry. [Online]. Available <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5989-8614EN.pdf> (20 August 2011).
- Ueda, K. and Yamaguchi, K. 1976. Cholinesterase activity of human saliva and types of the enzymes. Comparison of whole saliva with parotid saliva. *Bull. Tokyo Dent. Coll.* 17: 231–241.
- Wengatz, I., Stoutamire, D. W., Gee, S. J., Hammock, B. D. **1998**. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of the Pyrethroid Insecticide Fenprothrin. *J Agric Food Chem* 46(6), 2211-2221.
- Wengatz, I., Stoutamire, D. W., Gee, S. J., Hammock, B. D. 1998. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of the Pyrethroid Insecticide Fenprothrin. *J Agric Food Chem* 46(6), 2211-2221.
- Wu, Q., Li, Y., Wang, C., Liu, Z., Zang, X., Zhou, X., Wang, Z. 2009. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of carbendazim and thiabendazole in environmental samples. *Anal Chim Acta*, 638(2) : 139-45.
- Yamalik, N., Ozer, N., Caglayan, F., Caglayan, G. 1990. Determination of pseudocholinesterase activity in the gingival crevicular fluid, saliva, and serum from patients with juvenile periodontitis and rapidly progressive periodontitis. *J. Dent. Res.* 69: 87–89.
- Yamalik, N., Ozer, N., Caglayan, F., Caglayan, G., Akdoganli, T. 1991. The Effect of periodontal therapy on salivary pseudocholinesterase activity. *J. Dent. Res.* 70(6): 988-990.
- Zamora, D.P., Martinez Vidal, J.L., Martinez Galera, M., Frenich, A.G., Lopez Gonzalez, J.L., Arahal, M.R. 2003. Correction of predicted concentration in the use of solvent-based calibration lines for determining carbendazim, fuberidazole and thiabendazole in water after a SPE step. *Talanta*, 60 (2-3): 335-344.
- กรมวิชาการเกษตร. 2554. ข้อมูลสถิติการนำเข้าสารเคมีทางการเกษตร. Available on: <http://www.doa.go.th/ard/pdf>.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 2010. “สรุปการนำเข้าวัตถุดิบรายปี 2553” [Online]. Available <http://m.doa.go.th/ard/stat2.php?cat=2> (20 August 2011).

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2554. ข้อมูลการนำเข้าและส่งออกผลผลิตทางเกษตร. Available on: http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export.php

ภาคผนวก 1
ผลงานวิจัยเผยแพร่

1. ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว

Production of monoclonal antibody to acaricide dicofol and its derivatives.

[Hongsibsong S, Prapamontol T, Suphavilai C, Wipasa J, Pattarawarapan M, Kasinrerkerk W.](#)

Hybridoma (Larchmt). 2010 Dec; 29(6):495-500. Epub 2010 Nov 30.

Impact factor = 0.28

2. ผลงานวิจัยที่รอการตอบรับให้ตีพิมพ์

- 1) Preparation of Hapten and Immunogen for Producing Polyclonal Antibody Specific to Cypermethrin.

International Journal of Agriculture and Biology

- 2) Development and Application of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of p,p'-DDE in human milk and comparison of the results against GC-ECD detection.

Journal of Agricultural and Food Chemistry.

- 3) Residues of Synthetic Pyrethroid Pesticides in Vegetables, Fruits, Sediment, and Water from Highland Agricultural Area, Fang district, Chiang Mai, Thailand.2011.

International journal of Sustainable development and planning.

3. ผลงานวิจัยที่เตรียมส่งตีพิมพ์

- 1) Correlation of cholinesterase activity between saliva and blood among consumers and farmers in Chiang Mai agriculture area. Journal: Occupational Medicine.

- 2) A novel ELISA method for assessing pyrethroid insecticides exposure by detecting 3-PBA-adduct in plasma and its application in farmer and consumer groups. Journal: Chemical Research in Toxicology.

- 3) Determination of 3-PBA in Plasma and in Urine by an Immunoassay. Journal: Analytical and Bioanalytical Chemistry

4. การเสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าในการประชุมระดับนานาชาติ

- 1) N. Pakvilai, T. Prapamontol, P. Thavornyutikarn, A. Mungkalabrug, S. Chantara, C. Santhasub. 2009. Survey of Fresh Fruits and Vegetables for Synthetic Pyrethroid Insecticide Residues in Chiang Mai City, Northern Thailand. 2009 Wuhan International Conference on the Environment, Wuhan, Hubei, China, 15-18 Oct, 2009.
- 2) N. Pakvilai, T. Prapamontol, P. Thavornyutikarn, A. Mungkalabrug, S. Chantara, C. Santhasub. 2011. Residues of Synthetic Pyrethroid Pesticides in Vegetables, Fruits, Sediment, and Water from Highland Agricultural Area, Fang district, Chiang Mai, Thailand. 2011. "Food and Environment 2011: 1st International Conference on Food and Environment - The Quest for a Sustainable Future" New Forest, Southampton, UK, 21- 23 June, 2011.

ภาคผนวก 2

รหัสประจำตัว.....

แบบสอบถาม

ภายใต้ “โครงการวิจัยเรื่อง การประเมินการสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืชโดยการวัดการทำงานของเอนไซม์โคลินเอสเตอเรสในเลือดและน้ำลาย และการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเมตาโบไลต์ในเลือดและปัสสาวะ”

คำชี้แจง แบบสอบถามนี้เกี่ยวข้องกับปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โคลินเอสเตอเรสและปริมาณเมตาโบไลต์ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป โดยข้อมูลที่ได้รับนี้จะถูกเก็บเป็นความลับ และไม่นำมาเผยแพร่ต่อสาธารณะด้วยเหตุผลใดๆ ยกเว้นการรายงานผลวิจัยที่ไม่ระบุชื่อของผู้เข้าร่วมวิจัย

1. ข้อมูลส่วนตัวของอาสาสมัคร

ชื่อ(นาย/นาง/นางสาว).....นามสกุล.....

อายุ.....ปี

ส่วนสูง.....เซนติเมตร

น้ำหนัก.....กิโลกรัม

จบการศึกษาระดับชั้น.....

อาชีพ.....

อยู่บ้านเลขที่..... หมู่..... บ้าน..... ตำบล..... อำเภอ.....

จังหวัด.....รหัสไปรษณีย์.....

เบอร์โทรศัพท์.....

ปกติท่านทำความสะอาดพื้นวันละกี่ครั้ง (โปรดทำเครื่องหมาย ✓ ในช่องว่าง)

1.9.1 1 ครั้งหลังตื่นนอน

1.9.2 2 ครั้งหลังตื่นนอนและก่อนนอน

1.9.3 มากกว่า 2 ครั้ง

1.10 ข้อนี้ตอบเฉพาะกรณีอาสาสมัครที่เป็นเพศหญิง

ในขณะที่ท่านได้คุมกำเนิดโดยการรับประทานยาคุมกำเนิดหรือไม่ (โปรดทำเครื่องหมาย ✓ ในช่องว่าง)

1.10.1 ไม่รับประทาน 1.10.2 รับประทาน

2. ข้อมูลเกี่ยวกับปัญหาสุขภาพของอาสาสมัคร

2.1 ในระยะ 3 เดือนที่ผ่านมา ท่านเป็นโรคดังต่อไปนี้หรือไม่ (โปรดทำเครื่องหมาย ✓ ในช่องว่าง)

	ไม่เป็น	เป็น
2.1.1 โรคปริทันต์ (โรคเหงือกอักเสบ)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2.1.2 โรคภูมิแพ้	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2.1.3 โรคตับ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2.1.4 โรคอัลไซเมอร์ (ความจำเสื่อม)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

2.2 ท่านมีโรคประจำตัวหรือไม่

2.2.1 ไม่มีโรคประจำตัว 2.2.2 มีโรคประจำตัว คือ.....

2.3 ในสัปดาห์นี้ท่านกินยาหรือไม่ (โปรดทำเครื่องหมาย ✓ ในช่องว่าง)

2.3.1 ไม่ได้กินยา 2.3.2 กินยา คือ.....

3. ข้อมูลเกี่ยวกับการสัมผัสสารเคมีของอาสาสมัคร

3.1 ใน 1 เดือนที่ผ่านมาท่านใช้สารเคมีในบ้านดังต่อไปนี้หรือไม่ (โปรดทำเครื่องหมาย ✓ ในช่องว่าง)

	ไม่ใช่	ใช่
3.1.1 ยาฆ่าแมลง (เช่น ปลูก แมลง ยุง มด แมลงสาบ)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3.1.2 ยาฆ่าหญ้า	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3.1.3 น้ำยาล้างห้องน้ำ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3.1.4 ลูกเหม็น	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3.1.5 ยาเบื่อหนู	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

3.2 ท่านใช้มุ้งเคลือบยากันยุงหรือไม่

3.2.1 ไม่ใช่ 3.2.2 ใช่ โปรดระบุระยะเวลาที่ใช้.....

3.3 ใน 1 ปีสาธารณสุขมาพ่นยากันยุงบริเวณบ้านของท่านจำนวนกี่ครั้ง.....

3.4 ท่านได้ทำงานในภาคเกษตรกรรม (ทำนา ทำสวน ทำไร่) หรือไม่

4.1 ไม่ได้ทำ (ข้ามไปตอบข้อ 4.2 ทำ

5. ท่านมีพื้นที่เกษตรจำนวน.....ชนิดพืช.....

5. จำนวนปีที่ท่านทำงานในภาคเกษตรกรรม.....

6. ท่านผสมสารเคมีฯก่อนใช้พ่นในพื้นที่เกษตรหรือไม่

5.1 ไม่ผสม (เลือกที่ใช้บ่อย)

1) ชื่อสารเคมี.....ชนิดเดือนละ.....ครั้ง

2) ชื่อสารเคมี.....ชนิดเดือนละ.....ครั้ง

3) ชื่อสารเคมี.....ชนิดเดือนละ.....ครั้ง

4) ชื่อสารเคมี.....ชนิดเดือนละ.....ครั้ง

5) ชื่อสารเคมี.....ชนิดเดือนละ.....ครั้ง

5.2 ผสม (เลือกที่ใช้บ่อย)

1) ชื่อสารเคมี.....

.....ชนิดเดือนละ.....ครั้ง

2) ชื่อสารเคมี.....

.....ชนิดเดือนละ.....ครั้ง

3) ชื่อสารเคมี.....

.....ชนิดเดือนละ.....ครั้ง

7. ชนิดของเครื่องมือที่ท่านใช้ในการพ่นสารเคมี

7.1 สะพายหลัง 7.2 มอเตอร์ 7.3 ทั้งสองอย่าง

8. ท่านสวมใส่อะไรเพื่อป้องกันสารเคมีฯขณะทำงานในภาคการเกษตร

8.1 ถุงมือ 8.2 เสื้อแขนยาวและกางเกงขายาว 8.3 หน้ากาก

8.4 รองเท้าบูต 8.5 เสื้อคลุมพลาสติก 8.6 อื่นๆ.....

4. ข้อมูลเกี่ยวกับการบริโภคของอาสาสมัคร

1. ผักและผลไม้ที่ท่านซื้อมารับประทานประจำปลอดสารเคมีฯหรือไม่

1.1 ปลอดสารเคมี 1.2 ไม่ปลอดสารเคมี

2. ก่อนที่ท่านจะรับประทานผักและผลไม้ที่ซื้อส่วนมากท่านจะล้างก่อนหรือไม่

2.1 ไม่ 2.2 ล้างโดยวิธี.....

4. ท่านมีข้อเสนอแนะอย่างไรในการส่งเสริมให้การบริโภคผักและผลไม้ปลอดสารเคมีฯกันมากขึ้น.....