การตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตตกค้างในผักโดยใช้เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรสสำหรับการประยุกต์เป็นเซนเซอร์ทางการเกษตร

Determination of Carbamates Pesticide Residue in Vegetables by Acetylcholinesterase for Application Sensors

สุพัตรา รสชุ่ม*
Supattra Rotchum
เบญญา เชิดหิรัญกร**
Benya Cherdhirunkorn
ชิราวุฒิ เพชรเย็น**
Chiravoot Pechyen
สุรเชษฐ์ ตุ้มมี***
Surachet Toommee

Received : April 20, 2020
Revised : June 29, 2020
Accepted : July 17, 2020

บทคัดย่อ

สารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมต เมื่อเกิดการตกค้างปนเปื้อนในผักและผลไม้ทำให้เกิดผลผระทบอย่างมาก ทั้งในด้านสุขภาพส่งผลต่อระบบประสาทและกล้ามเนื้อ ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องมีการตรวจวัดสารตกค้างในผักและผลไม้ ซึ่งการตรวจหาปริมาณของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตนั้นโดยอาศัยหลักการการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) เปลี่ยนจากสารละลายใสให้กลายเป็นสารละลายสีเหลือง โดยสำหรับสารกลุ่มคาร์บาเมตได้ใช้คาร์บาริลเป็นตัวแทนในการทดสอบทำให้เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) ถูกยับยั้งและทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนอะซิติลไทโอคลอรีน (ACTI) ให้เป็นไทโอคลอรีนได้น้อยลง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีได้จากสีเหลืองเข้มจางลงตามไปด้วยและสามารถตรวจวัด

*นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชานวัตกรรมและเทคโนโลยีวัสดุ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
Bachelor of Science Program Innovation and Material Technology Program Faculty of Science and Technology Thammasat University
**อาจารย์ประจำสาขาวิชานวัตกรรมและเทคโนโลยีวัสดุ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
Associate Professor, Dr. Department of Materials Technology and Textile, Faculty of Science and Technology, Thammasat University
***อาจารย์ประจำคณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร
Faculty of Industrial Technology, Kamphaeng Phet Rajabhat University, Kamphaeng Phet, Thailand

การเปลี่ยนแปลงสีได้ทันทีด้วยเครื่องวัดสี Spectrophotometer Colorimeter เป็นระบบ CIE L*a*b* พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าสี b* มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของคาร์บาริลเพิ่มขึ้น ซึ่งลดลงตามระยะเวลาและมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันทุกๆ ความเข้มข้น ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของคาร์บาริลในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาคือ 0.2, 0.6 และ 1.0 ppm ให้ผลการทดสอบได้รวดเร็วใช้เวลาเพียงแค่ 3 นาที ซึ่งใช้เวลาน้อยกว่าการทดสอบด้วยวิธีการอื่นๆ เนื่องจากคาร์บาริลสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) ได้อย่างรวดเร็ว ในการศึกษาชุดทดสอบนี้สามารถบอกช่วงการปนเปื้อนของสารเคมีกลุ่มคาร์บาเมตน้อยกว่า 1 ppm จากการวิเคราะห์ค่าสี L*a*b* เพื่อการพัฒนาต่อให้อยู่ในรูปแบบเซนเซอร์เครื่องตรวจวัดทางการเกษตรต่อไป

คำสำคัญ : เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเตอเรส / ชุดทดสอบ / เอลมานรีเอเจนท์ / คาร์บาริล

ABSTRACT

Carbamates group is one of the most widely used insecticides, that often-accumulated residue in fruits and vegetables. The residue of that chemical on fruits and vegetables directly affects the health of consumers such as the nervous system, muscle system, and affect the occurrence of various diseases. The research team has the objective of studying the measurement of Carbaryl substance that is in the Carbamates group, it residue in fruits and vegetables. To determination of the amount of Carbaryl by based on the reaction principle of Acetylcholinesters Enzyme (AChE) to turns from a clear solution to a yellow solution when Carbaryl is detected, it will inhibit color changes that occur. The process of detecting color changes uses Spectrophotometer Colorimeter by CIE L* a* b* system for analysis and measurement of that result. Therefore, the amount of Carbaryl which has the best effect on discoloration were 0.2, 0.6 and 1.0 ppm, respectively. That reaction time is only 3 minutes,which takes less time than testing with other methods due to carbaryl can quickly inhibit the reaction of the Acetylcholinesters Enzyme (AChE). From the above test results, we hope to develop into a portable device for rapid analysis of the amount of Carbaryl less than 1 ppm.

Keywords : Acetylcholinesterase / Test Kit / Ellman's Reagent / Carbaryl

บทนำ

ผลผลิตทางการเกษตรของประเทศไทยนั้นสามารถเปิดตลาดและได้รับอนุญาตให้นำเข้ามายังประเทศออสเตรเลียในขณะนี้มีทั้งสิ้น 9 ชนิด ในปี 2561 ผักและผลไม้สดที่ออสเตรเลียนำเข้าจากไทยมากที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ ทุเรียน มะพร้าว และข้าวโพดฝักอ่อน ซึ่งถือได้ว่าประเทศไทยเป็นประเทศที่ส่งออกผักและผลไม้เขตร้อนที่สำคัญไปยังตลาดสหภาพยุโรปและตลาดอื่นๆ เนื่องจากกลิ่นที่หอมของผักและรสชาติที่หอมหวานของ

ผลไม้ จึงเป็นที่นิยมของชาวต่างชาติ (กรมศุลกากร, 2561) ดังนั้นเกษตรกรจึงมีความจำเป็นในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งการใช้สารกำจัดศัตรูพืชจึงเป็นทางเลือกหลักที่เกษตรกรเลือกนำมาใช้ได้เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถลดจำนวนประชากรของศัตรูพืชได้อย่างรวดเร็ว เห็นผลได้ทันที และใช้ได้ทุกโอกาสที่ต้องการ ทั้งนี้เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคและการป้องกันการกีดกันทางการค้าจึงได้มีกฎหมายว่าด้วยการใช้ผลิตภัณฑ์ป้องกันโรคแมลงและศัตรูพืชและสารตกค้างจากสารกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้ซึ่งประกอบด้วยค่าสาร (Maximum Residue Lavals-MRLs) ระดับการตกค้างที่แตกต่างกันเป็นเกณฑ์การตรวจวัดสารตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้ (กรมวิชาการเกษตร, 2553)

ซึ่งสารกำจัดศัตรูพืชสามารถแบ่งประเภทออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่คือ ออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine), กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphate), กลุ่มคาร์บาเมต (Carbamate) และกลุ่มไพรีทรอยด์ (Pyrethroid) สิ่งที่เราให้ความสำคัญคือ สารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่มีการใช้อยู่จำนวนมาก มีผลกระทบต่อสุขภาพมาก 3 ชนิด คือ ไกลโฟเสท พาราควอต คลอร์โพริฟอส พบว่า มีทั้งนำเข้าในปริมาณมาก ใช้ปริมาณมาก และสร้างผลกระทบสูง (กรมวิชาการเกษตร, 2559) ซึ่งจัดเป็นสารกำจัดศัตรูพืชอยู่ในกลุ่มคาร์บาเมตและออร์กาโนฟอสเฟต

สารกลุ่มคาร์บาเมตและออร์กาโนฟอสเฟตนั้นจะออกฤทธิโดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (AChE) ทั้งนี้เอนไซม์ cholinesterase จะมีด้วยกัน 2 ชนิด คือ acetylcholinesterase (AChE) ซึ่งพบที่ผนังเซลล์เมมเบรนของเม็ดเลือดแดง และ pseudocholinesterase ซึ่งพบที่พลาสมา ตับ ตับอ่อนและที่ระบบประสาทส่วนกลาง โดยเอนไซม์ AChE จะทำหน้าที่ในการสลายสารสื่อประสาทอะเซติลโคลีน (acetylcholine; ACh) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการนำส่งกระแสประสาท (nerve impulse) ที่รอยต่อระหว่างเซลล์บริเวณ nerve junction ที่ระบบประสาท parasympathetics และ sympathetic ได้เป็นโคลีน (choline) และอะซิติก แอซิด (acetic acid) โดยที่ acetylcholine นั้นพบได้หลายที่ทั้ง central และ peripheral nerveous system, neuromuscular junctions และ เซลล์เม็ดเลือดแดง (RBCs) ทั้งนี้ในสภาวะปกติ เมื่อกระแสประสาท (nerve impulse) ถูกนำส่งไปแล้ว acetylcholine ซึ่งทำหน้าที่บริเวณปลายเซลล์ประสาทหรือรอยต่อประสาทก็จะถูกทำลายไปโดยเอนไซม์ acetylcholinesterase สำหรับสารเคมีกลุ่มคาร์บาเมตจะมีสูตรโครงสร้างที่ประกอบด้วย carbamic acid ซึ่งจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cholinesterase จากการเกิดกระบวนการ carbamylation ในส่วนของ enzyme ester ทำให้การเกิดปฏิกิริยาการยับยั้งเอนไซม์เป็นแบบผันกลับได้ (reversible) จึงผลให้เกิดการสะสมของ acetylcholine ที่รอยต่อประสาทและเกิดการกระตุ้นระบบประสาททั้ง muscaric และ nicotinic ที่มากกว่าปกติ ทำให้ระบบประสาททำงานผิดปกติมีอาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ปวดศีรษะ ตาพร่ามัวอ่ออนเพลีย ปวดท้อง หากร่างกายได้รับในปริมาณสูงเกินไป อาจมีผลให้เกิดอาการชักและเสียชีวิต (Gupta, RC. & Milatovic, D., 2012)

จากอันตรายของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตเข้าไปยับยั้งเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) ซึ่งในสภาวะปกติจะสามารถเร่งปฏิกิริยาให้ Acetylthiocholine เปลี่ยนเป็น Thiocholine ที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ Ellman's reagent เปลี่ยนจากสารละลายใสให้กลายเป็นสารละลายสีเหลืองได้อย่างรวดเร็ว

แต่เมื่อสารละลายตัวอย่างมีสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตปนเปื้อนอยู่ เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) จะถูกยับยั้งและทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยน Acetylthiocholine ให้เป็น Thiocholine ได้น้อยลง ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยากับ Ellman's reagent ทำให้สีของปฏิกิริยาจางลง (Ellman, et al., 1961) ซึ่ง Chantal J.G.M. Smulders, et al. (2013) ได้ทำการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของคาร์บาเมต 6 ชนิดกับอะซิติลคลอรีนเอสเทอเรสในสมองหนู โดยการนำไอนไซม์อะซิติลตลอรีนเอสเทอเรสที่ได้จากสมองหนูฉีดเข้าไปในไข่กบพร้อมกับสารเคมีกลุ่มคาร์บาเมตที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วดูอัตราการตอบสนองทางไฟฟ้าในเซลล์ไข่กบ จากผลการทดลอง เมื่อความเข้มข้นของสารเคมีคาร์บาเมตเพิ่มมากขึ้น การตอบสนองของเอนไซม์จะเริ่มลดลง และมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันของยาฆ่าแมลงทั้ง 6 ชนิด ทั้งนี้ Du, D., et al. (2007) ได้ศึกษาการใช้เอนไซม์ Acetylcholinesterase เป็นเซนเซอร์ชีวภาพในการตรวจวัดปริมาณสารกำจัดศัตรูพืช โดยใช้ไคโตซานไฮโดรเจลเป็นวัสดุฐานที่มีอนุภาคทองนาโนผสมอยู่ จากการวิเคราะห์ผิวหน้าของเซนเซอร์พบว่า เอนไซม์ Acetylcholinesterase สามารถเกาะอยู่บนผิวหน้าของเซนเซอร์ และสามารถจับกับสารกำจัดศัตรูพืช moncrotophos, carbaryl และ methyl parathione ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าไฟฟ้าเคมี และให้ค่าที่วัดได้ไม่แตกต่างจากการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชด้วยเทคนิค UV-Vis spectrometry ต่อมา Arduini, F., et al. (2013) ได้ศึกษาการใช้เอนไซม์ Acetylcholinesterase ร่วมกับ Acetylthiocholine chloride และ (5,5 0 -dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) ในการตรวจวัดปริมาณสารกำจัดศัตรูพืช โดยใช้เทคนิคสารละลาย 2 ส่วน คือ น้ำและเฮกเซน โดยเอนไซม์ในน้ำจะทำปฏิกิริยากับ Acetylthiocholine chloride ให้กลายเป็น Thiocholine ซึ่งจะจับแยกโลหะหนักในสารกำจัดศัตรูพืชไปแขวนลอยอยู่ในชั้นของสารละลายเฮกเซน สารกำจัดศัตรูพืชที่ถูกแยกโลหะหนักแล้วจะจับกับเอนไซม์ และ Thiocholine ที่ไม่ได้จับกับโลหะหนักจากสารกำจัดศัตรูพืชจะทำปฏิกิริยากับ (5,5 0 -dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) ให้เกิดการเปลี่ยนสีของสารละลาย ซึ่งจะถูกตรวจวัดด้วย UV/VIS spectrophotometer ด้วยวิธีการนี้จะสามารถลดการรบกวนปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีจากโลหะหนักในสารกำจัดศัตรูพืชลงได้ Junsheng Yang, et al. (2018) ได้สังเคราะห์ไบโอเซนเซอร์เป็นฟลูออเรสเซ้นเซนเซอร์ของควอนตัมดอทกับเอลมานรีเจ้น (DTNB) สำหรับตรวจวัดไบโอไทออล กลไกคือในแสงปกติ สีของสารละลายจะเป็นสีใส ในแสงฟลูออเรสเซ้นสีของสารละลายจะเป็นสีเหลือง เมื่อมีการตรวจเจอตัวไบโอไทออล สีของเอลมานรีเจ้น (DTNB) จะเป็นสีเหลืองในแสงปกติ และเป็นสารละลายใสในแสงฟลูออเรสเซ้นซึ่งความยาวคลื่นที่ให้ควอนตัมดอทมันเรืองแสงได้คือ 409 กับ 612 นาโนเมตร Adam Kostelnik, et al. (2017) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิลคลอรีนเอสเทอเรสโดยยาเจรันทามายวิธีการทดลองโดยการนำมีเจราตินผสมกับเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรสแปะอยู่บนหน้าของแผ่น pH มิเตอร์ จากนั้นวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของสีและทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลงของสีด้วยกล้องมือถือ

ในงานวิจัยนี้ การเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของสีจากชุดทดสอบสามารถตรวจวัดค่าสีโดยใช้ Colorimeter Spectrophotometer คือระบบ CIE L*a*b* ซึ่งการวัดสี (Color Measuring) ระบบ CIE L*-a*-b* เป็นระบบการบรรยายสีแบบ 3 มิติ โดยที่แกน L* จะบรรยายถึงความสว่าง (Lightness) จากค่า (+L*)

แสดงถึงสีขาว จนไปถึง (-L*) แสดงถึงสีดำ แกน a* จะบรรยายถึงแกนสีจากเขียว (-a*) ไปจนถึงแดง (+a*) ส่วนแกน b* จะบรรยายถึงแกนสีจากน้ำเงิน (-b*) ไปเหลือง (+b*) ลักษณะการบรรยายสีเรียกว่า Hunter lab scale (Kit L., Ya, et al., 2013) จากนั้นทำการบันทึกผลค่าสี L*-a*-b* นำค่าสีที่ได้มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานและวิเคราะห์ผล

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จัดทำชุดทดสอบขึ้นเพื่อตรวจวัดปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมต (Carbamates) ซึ่งตัวอย่างสารเคมีกลุ่มคาร์บาเมตที่เกษตรกรนิยมใช้คือ คาร์บาริล ใช้กำจัดแมลงชนิด เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไฟ เพลี้ยแป้ง พบมากในแตงกวา พริก องุ่น เป็นต้น โดยการใช้เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) สังเกตการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสีบันทึกค่าสี สี L*-a*-b* นำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานและวิเคราะห์ผลเพื่อพัฒนาต่อให้อยู่ในรูปแบบเซนเซอร์เครื่องตรวจวัดสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตให้เข้าถึงผู้บริโภค เกษตรกร พ่อค้าแม่ค้า และ เพิ่มมูลค่าการส่งออกมากยิ่งขึ้น

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1.1 Acetylthiocholine iodide (ATCI)

1.2 Acetylcholinesterase (AChE)

1.3 Phosphate-buffered saline (PBS buffer)

1.4 Ellman's reagent (DTNB)

1.5 น้ำปราศจากไอออน

1.6 Ethanol 95%

1.7 Carbaryl

2. การเตรียมสารตั้งต้น

2.1 การเตรียมสารละลายเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase) (AChE) โดยฉีดน้ำกลั่น DI จำนวน 10 มิลลิลิตรเข้าไปในขวดเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรสเก็บไว้ในอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส จากนั้นดึงเอนไซม์มาจำนวน 30 ไมโครลิตร ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 15 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยความเร็วรอบประมาณ 2500 รอบต่อนาที

2.2 การเตรียมสารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (Acetylthiocholine) โดยการชั่งอะซิติลไทโอคลอรีนจำนวน 0.289 มิลลิกรัม ผสมกับสารละลายสารละลายเอทานอล 95% จำนวน 10 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยความเร็วรอบประมาณ 2500 รอบต่อนาที

2.3 การเตรียมสารเอลมานรีเอเจ้นท์ (DTNB) โดยการชั่งเอลมานรีเอเจ้นท์ (DTNB) 19.82 มิลลิกรัม ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยความเร็วรอบประมาณ 2500 รอบต่อนาที

3. การเตรียมสารละลายกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมต (Carbamate) โดยการชั่งคาร์บาริล 1 มิลลิกรัม ผสมลงกับสารละลายเอทานอล 95% ปริมาตร 1 ลิตร เพื่อให้ได้เป็นสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น

1 ppm จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 และ 0.1 ppm

4. การทดสอบปฏิกิริยาและการตรวจสอบ

4.1 นำเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรสปริมาตร 30 ไมโครลิตรในฟอตเฟสบัฟเฟอร์ 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยความเร็วรอบประมาณ 1800 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายเอลมาน (DTNB) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยความเร็วรอบประมาณ 1800 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ต่อมาเติมสารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (ATCI) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและเริ่มวัดการเปลี่ยนแปลงสีทันทีทุกๆ 1 นาที จนครบ 10 นาที ด้วยเครื่อง Spectrophotometer colorimeter จากนั้นนำค่าการเปลี่ยนแปลงที่ได้มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน

4.2 นำสารละลายคาร์บาริลความเข้มข้น 0.1 ppm ที่เตรียมไว้ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมเข้ากับเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส 30 ไมโครลิตรในฟอตเฟสบัฟเฟอร์ 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยความเร็วรอบประมาณ 1800 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายเอลมาน (DTNB) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยความเร็วรอบประมาณ 1800 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ต่อมาเติมสารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (ATCI) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและเริ่มวัดการเปลี่ยนแปลงสีทันทีทุกๆ 1 นาที จนครบ 10 นาที ด้วยเครื่อง Spectrophotometer colorimeter ทำซ้ำในขั้นตอนเดียวกันโดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายคาร์บาริล 0.1-1.0 ppm จนครบทุกความเข้มข้น จากนั้นนำค่าการเปลี่ยนแปลงที่ได้มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน

ผลการวิจัย

1. ศึกษาการทำปฏิกิริยาระหว่างสารคาร์บาริลกับสารตั้งต้น เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE), สารละลายเอลมาน (DTNB) และ สารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (ATCI)

จากการทดสอบการเกิดสีเนื่องจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายคาร์บาริลที่เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) สารละลายเอลมาน (DTNB) และ สารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (ATCI) เมื่อทิ้งไว้ในระยะเวลา 10 นาที พบว่าเมื่อไม่มีสารละลายคาร์บาริลเกิดสีเหลืองมองให้ด้วยตาเปล่าแสดงดังภาพ 1 (ก) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายคาร์บาริลเที่ ความเข้มข้น 1 ppm พบว่าจะไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาจากสารละลายสีเหลืองให้กลายเป็นสารละลายใสแสดงดังภาพ 1 (ข)

(ก) (ข)

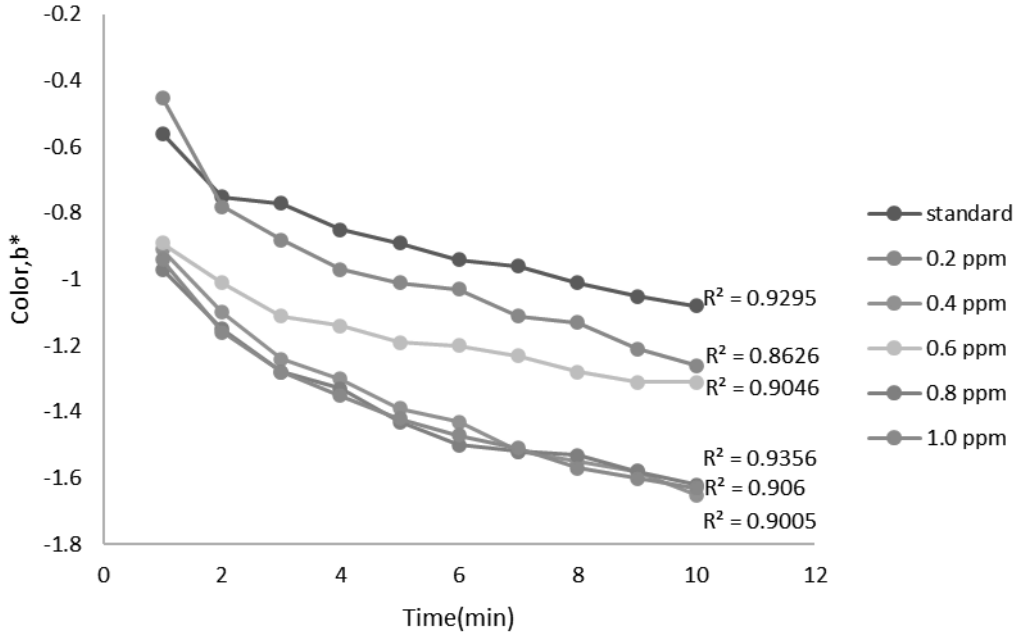
ภาพที่ 1 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงสีของการเกิดปฏิกิริยา เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) สารละลายเอลมาน (DTNB), สารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (ATCI) และ สารละลายคาร์บาริล

2. ศึกษาเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างสารคาร์บาริลกับสารตั้งต้น เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE), สารละลายเอลมาน (DTNB) และ สารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (ATCI)

ในการสร้างกราฟมาตรฐาน ใช้ค่าสีที่ได้จากการวัดด้วยเครื่องวัดสี Spectrophotometer Colorimeter เป็นระบบการวิเคราะห์ CIE L*a*b* ทั้งนี้เนื่องจากสีของการเกิดปฏิกิริยาในบางความเข้มข้นของสารละลายคาร์บาริลไม่สามารถแยกได้ด้วยตาเปล่า แต่สามารถแยกได้ด้วยโปรแกรมมาตรฐาน หลังจากบันทึกข้อมูลค่าสี L* - a* - b* ผลจากการวิเคราะด้วยระบบ CIE L*a*b* ของสารตั้งต้น เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE), สารละลายเอลมาน (DTNB) และ สารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (ATCI) ต่อสารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน สำหรับเป็นเซนเซอร์วิเคราะห์ จากหลักการของระบบการวิเคราะห์ CIE L*a*b* แกน b* จะบรรยายถึงแกนสีจากน้ำเงิน (-b*) ไปเหลือง (+b*) ลักษณะการบรรยายสีเรียกว่า Hunter lab scale (Kit L., Ya, et al., 2013) จึงนำค่าสี (b*) ของการทำปฏิกิริยาสารละลายที่ได้มาสร้างสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงดังในภาพที่ 2

ในการหาเวลาที่เหมาะสมในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE)โดยศึกษาระยะเวลา 1-10 นาทีในการทำการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารละลายคาร์บาริลเที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 ppm กับ เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) เพื่อดูเวลาที่เหมาะสมที่สุดของการเกิดปฏิกิริยา เมื่อวัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสีค่าสี b* ซึ่งแสดงค่าสีเหลืองที่เกิดขึ้นนั้น พบว่า ที่เวลา 1 นาทีของการทำปฏิกิริยา เมื่อความเข้มข้นของสารละลายคาร์บาริลเพิ่มขึ้น การเปลี่ยนแปลงค่าสี (b*) มีค่าลดลง และการเปลี่ยนแปลงของสีลดลงตามเวลาจนกระทั่งที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาประมาณ 3 นาที การเปลี่ยนแปลงของสีจึงค่อยๆ ช้าลงไปจนถึงเวลา 10 นาที โดยมีค่าความเชื่อมั่นมากกว่า 0.9 และเป็นไปในแนวโน้มเดียวกันทุกๆ ความเข้มข้น นั่นหมายความว่า สารละลายคาร์บาริลสามารถยับยั้งเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) ได้จึงทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ทำให้จากสารละลายสีเหลืองเข้มจางลง และระยะเวลา 1 ถึง 3 นาทีเป็นระยะเวลาการยับยั้งปฏิกิริยาที่เหมาะสมเนื่องจาก

เอนไซมอะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา สำหรับการสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงสีของชุดทดสอบในการศึกษานี้

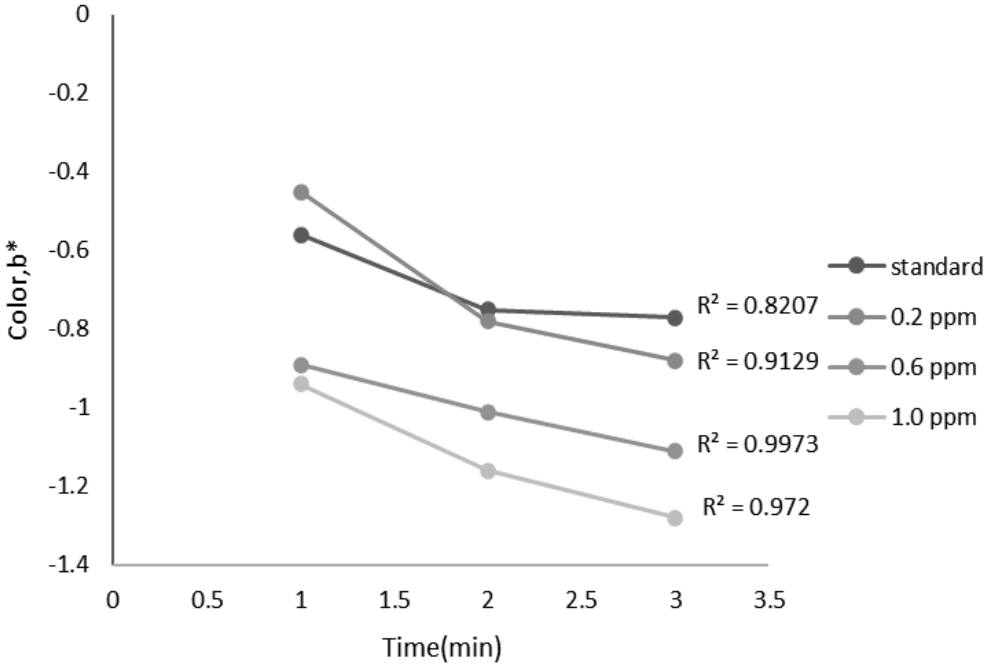


ภาพที่ 2 กราฟแสดงค่าสี (b*) ที่ได้จาการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายคาร์บาริลกับสารตั้งต้น เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE), สารละลายเอลมาน (DTNB) และ สารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (ATCI) ที่เวลา 1 ถึง 10 นาที

3. กำหนดความเข้มข้นของสารคาร์บาริลที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาระหว่างสารคาร์บาริลกับสารตั้งต้น เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE), สารละลายเอลมาน (DTNB) และ สารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (ATCI)

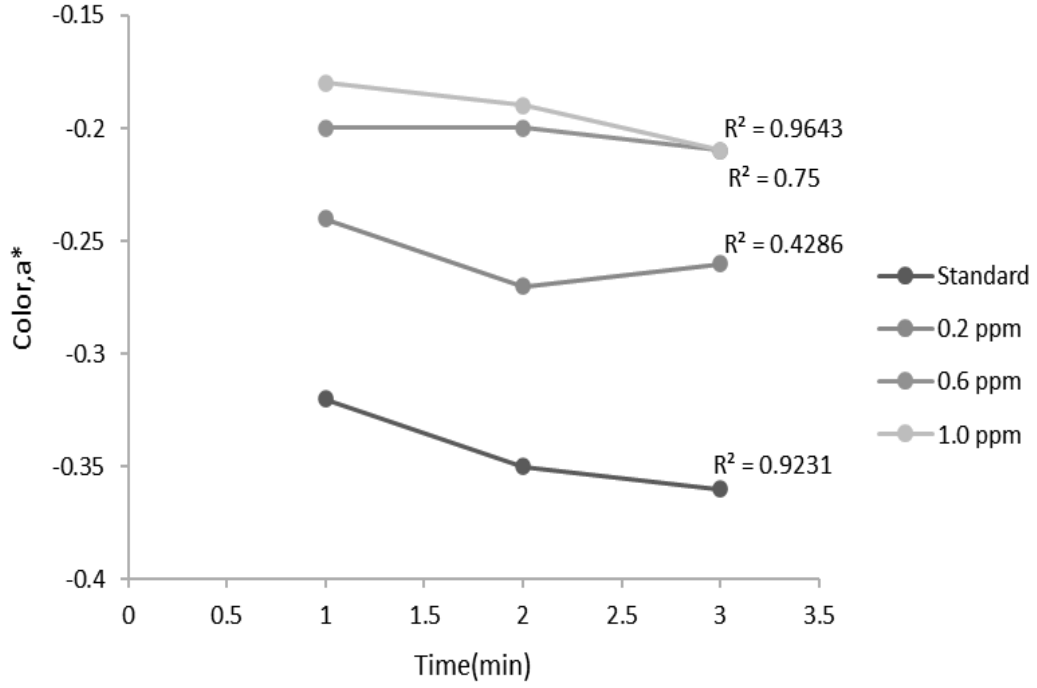
กราฟแสดงค่าสี (b*) ที่แสดงให้เห็นประสิทธิภาพของสารตั้งต้นเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE)), สารละลายเอลมาน (DTNB) และ สารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (ATCI) ต่อสารละลายคาร์บาริลเที่มีความเข้มข้นต่างกันคือ 0, 0.2, 0.6, 1.0 ppm ตั้งแต่เวลา 1-3 นาที ดังในภาพที่ 3 จะเห็นว่า เมื่อไม่มีสารละลายคาร์บาริลประสิทธิภาพการเปลี่ยนแปลงสีของสารตั้งต้นที่ 3 นาทีคือ -0.77 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.8207 เมื่อใส่สารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 0.2 ppm ประสิทธิภาพการเปลี่ยนแปลงสีของสารตั้งต้นที่ 3 นาที คือ -0.88 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.9129 เมื่อใส่สารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 0.6 ppm ประสิทธิภาพการเปลี่ยนแปลงสีของสารตั้งต้นที่ 3 นาที คือ -1.11 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.9973 เมื่อใส่สารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 1.0 ppm ประสิทธิภาพการเปลี่ยนแปลงสีของสารตั้งต้นที่ 3 นาที คือ -1.28 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.972 ซึ่งสารละลายคาร์บาริลเที่ความเข้มข้น 0.2, 0.6 และ 1.0 ppm เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับมี

การยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของสารตั้งต้นได้ชัดเจนที่เวลา 3 นาที และ สารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 0.6 และ 1.0 ppm เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา



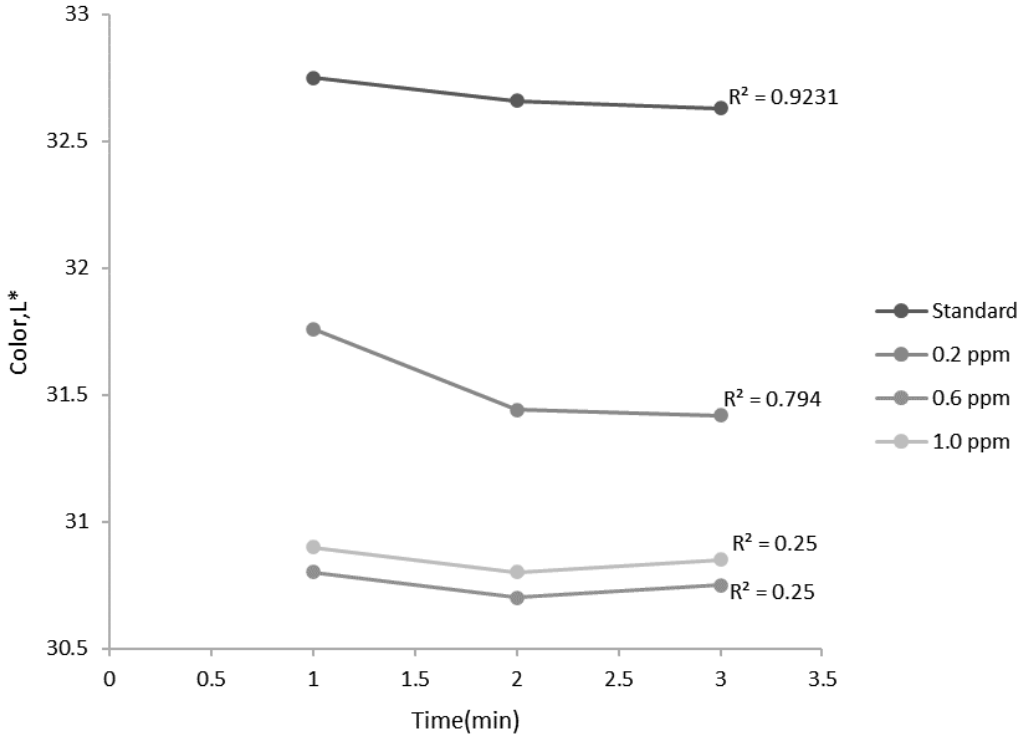
ภาพที่ 3 กราฟแสดงค่าสี (b*) ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายคาร์บาริลกับสารตั้งต้น เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE), สารละลายเอลมาน (DTNB) และ สารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (ATCI) เวลา 1 ถึง 3 นาที

กราฟแสดงค่าสี (a*) ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้นต่างกันคือ 0.2, 0.6, 1.0 ppm กับเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE), สารละลายเอลมาน (DTNB) และสารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (ATCI) ที่เวลา 1 ถึง 3 นาที ดังในภาพที่ 4 จะเห็นว่า เมื่อไม่มีสารละลายคาร์บาริลค่าการเปลี่ยนแปลงสีที่ 3 นาที คือ -0.36 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.9231 เมื่อใส่สารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 0.2 ppm ค่าการเปลี่ยนแปลงสีที่ 3 นาที คือ -0.26 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.4286 เมื่อใส่สารละลายคาร์บาริลที่ความขเมข้น 0.6 ppm ค่าการเปลี่ยนแปลงสีที่ 3 นาที คือ -0.21 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.75 เมื่อใส่สารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 1.0 ppm ค่าการเปลี่ยนแปลงสีที่ 3 นาที คือ -0.21 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.9643 ซึ่งสังเกตได้ว่า ค่า a* จะแสดงค่าจากสีจากเขียว (-a*) ไปจนถึงแดง (+a*) แต่ค่า a* ไม่สามารถบอกผลการทดลองของการเกิดปฏิกิริยานี้ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากสีของการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาไม่เกิดสีเขียวหรือแดง



ภาพที่ 4 กราฟแสดงค่าสี (a*) ที่ได้จาการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายคาร์บาริลกับสารตั้งต้น เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE), สารละลายเอลมาน (DTNB) และ สารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (ATCI) เวลา 1 ถึง 3 นาที

กราฟแสดงค่า L* ที่ได้จาการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้นต่างกัน คือ 0.2, 0.6, 1.0 ppm กับ เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่เวลา 1 ถึง 3 นาที ดังภาพที่ 5 จะเห็นว่า ประสิทธิภาพการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อไม่มีสารละลายคาร์บาริลที่เวลา 3 นาที คือ 32.63 ประสิทธิภาพการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อใส่สารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 0.2 ppm ที่เวลา 3 นาที คือ 31.42 ประสิทธิภาพการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อใส่สารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 0.6 ppm ที่เวลา 3 นาที คือ 30.75 ประสิทธิภาพการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อใส่สารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 1.0 ppm ที่เวลา 3 นาที คือ 30.85 การเกิดปฏิกิริยายาของสารตั้งต้นเมื่อไม่มีสารละลายคาร์บาริล ค่า L* แสดงความสว่างมีค่ามาก นั่นหมายความว่าสีของการเกิดปฏิกิริยาเป็นสีเหลืองเข้ม เมื่อมีสารละลายคาร์บาริลไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาให้สารละลายสีเหลืองเข้มจางลง ค่า L* แสดงความสว่างมีค่าน้อย ซึ่งจะเห็นว่าสารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 0.6 และ 1.0 ppm พบว่าค่าความสว่างของสีที่ปรากฏแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย



ภาพที่ 5 กราฟแสดงค่า L* ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายคาร์บาริลกับสารตั้งต้น เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE), สารละลายเอลมาน (DTNB) และ สารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (ATCI) เวลา 1 ถึง 3 นาที

จากผลการทดลองทั้ง 4 กราฟที่ผ่านมา เมื่อนำค่าสีที่วัดด้วยเครื่องวัดสีมาเปรียบเทียบค่า L*- a*-b* ของแต่ละความเข้มข้นที่เวลาการทำปฏิกิริยา 1-3 นาที จะเห็นค่าสี (b*) ที่แตกต่างกันของสารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้นคือ 0.0, 0.2, 0.6, 1.0 ppm โดยมีความผันแปรของค่าสี (b*) ตอบสนองที่สามารถอธิบายได้มีอยู่ในตัวแบบเชิงเส้น คือ 0.8207, 0.9129, 0.9973, 0.972 ตามลำดับ ซึ่งความแปรผันของค่าสี (b*) เป็นไปตามทฤษฎีการเกิดปฏิกิริยายาการเปลี่ยนแปลงของสี Ellman's reaction (Ellman, et al., 1961) การทำงานของเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) ด้วยวิธีของ Ellman อาศัยหลักการตรวจสอบหมู่ซัลไฟดริล (sulfhydryl group) ในสารละลายด้วยสารเอลมาน 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) หรือ DTNB จะเห็นว่า เมื่อ อะซิติลไทโอคลอรีน (ATCI) ถูกเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) แล้วจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด คือ กรดอะซีติก และ thiocholine ซึ่งมีหมู่ซัลไฟดริลอิสระอยู่ในโครงสร้าง จึงทำให้ thiocholine สามารถทำปฏิกิริยากับ DTNB และเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่เรียกว่า mixed disulfide กับผลิตภัณฑ์ที่มีสีเหลือง นั่นก็คือ 5-thio-2-nitrobenzoic acid หรือ TNB นอกจากนี้สาร TNB ที่เกิดขึ้น ยังมีความเสถียรในช่วงค่า pH เท่ากับ 7.6 ถึง 8.6 ซึ่งเป็นช่วงที่เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (AChE)

ทำงานได้เป็นอย่างดี และข้อมูลข้างต้นได้แสดงยังให้เห็นว่าความผันแปรของค่าสี (L*) และ (a*) มีความแปรผันของค่าสีค่อนข้างมาก ค่าสี (L*) สามารถอธิบายความแปรผันได้มีอยู่ในตัวแบบเชิงเส้น คือ 0.9231 0.794 0.25 และ 0.25 ตามลำดับ ค่อนข้างมาก ค่าสี (a*) สามารถอธิบายความแปรผันได้มีอยู่ในตัวแบบเชิงเส้น คือ 0.9231 0.4286 0.75 และ 0.9643 ตามลำดับ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของค่าสี (L*) และ ค่าสี (a*) ค่าของสีที่แสดงออกมานั้นไม่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงสีของการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (AChE) เมื่อทำปฏิกิริยากับสารเอลมาน (DTNB) จึงเกิดความแปรปรวนของค่าสี L* และค่าสี a* ค่อนข้างมาก

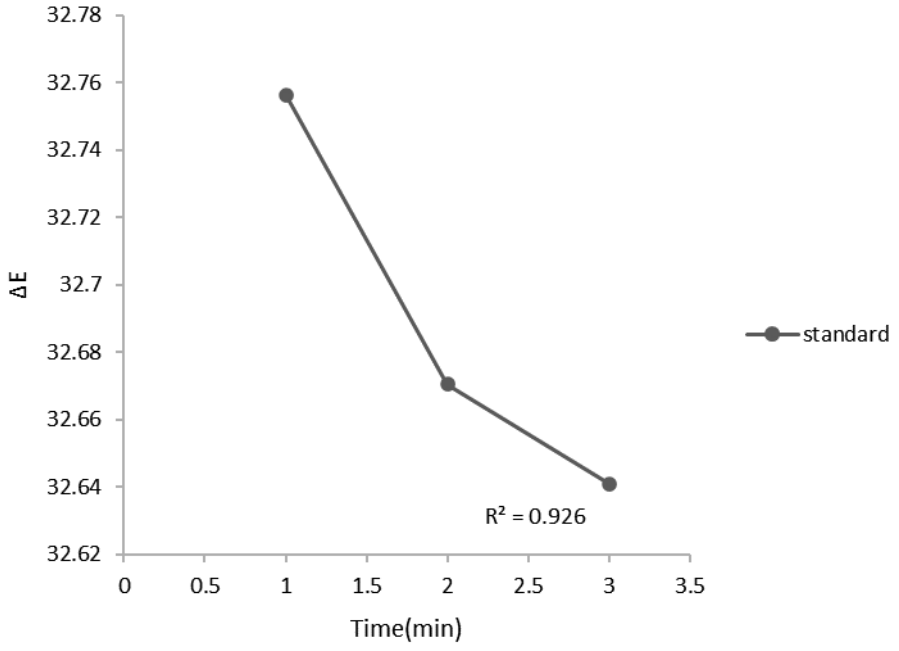
สำหรับสารละลายคาร์บาริลมีกลไกการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสโดยหมู่แทนที่คาร์บาริลจะเข้าจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ที่ตำแหน่งเดียวกับที่ซับสเตรทเข้าทำปฏิกิริยา เรียกการยับยั้งแบบนี้ว่าการยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition) เนื่องจากตัวยับยั้งมีโครงสร้างคล้ายกับสับสเตรทจึงสามารถแย่งจับกับเอนไซม์ได้ การยับยั้งแบบนี้สามารถผันกลับได้เนื่องจากเมื่อตัวยับยั้งจับกับเอนไซม์จะสร้างพันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ทำให้ได้สารประกอบเชิงซ้อนที่มีความเสถียรต่ำ (Carbamylated enzyme) ดังนั้นตัวยับยั้งสามารถหลุดจากเอนไซม์ได้ง่าย และจะเห็นว่า อัตราการเข้ายับยั้งเอนไซม์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวยับยั้งหรือสับสเตรท หากตัวใดมีความเข้มข้นมากกว่าก็จะเข้าจับกับเอนไซม์ได้ดีกว่า ซึ่งถ้าต้องการกำจัดตัวยับยั้งออกสามารถทำได้โดยเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรทให้สูงกว่าตัวยับยั้งเพื่อที่จะแย่งจับบริเวณเร่งและทำให้ตัวยับยั้งหลุดไปจากบริเวณเร่งได้ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างซับสเตรทและเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส ซึ่งคือสารสีเหลืองและถ้าเพิ่มความเข้มข้นของคาร์บาริลให้สูงกว่าซับสเตรทก็จะไม่เกิดสี

4. ศึกษาความแตกต่างของการวัดสีจากค่าสี L* - a* - b* ในการเปลี่ยนแปลงการเกิดปฏิกิริยาของสารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 0.0 0.2 0.6 และ 1.0 ppm กับสารตั้งต้น เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE), สารละลายเอลมาน (DTNB) และ สารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (ATCI)

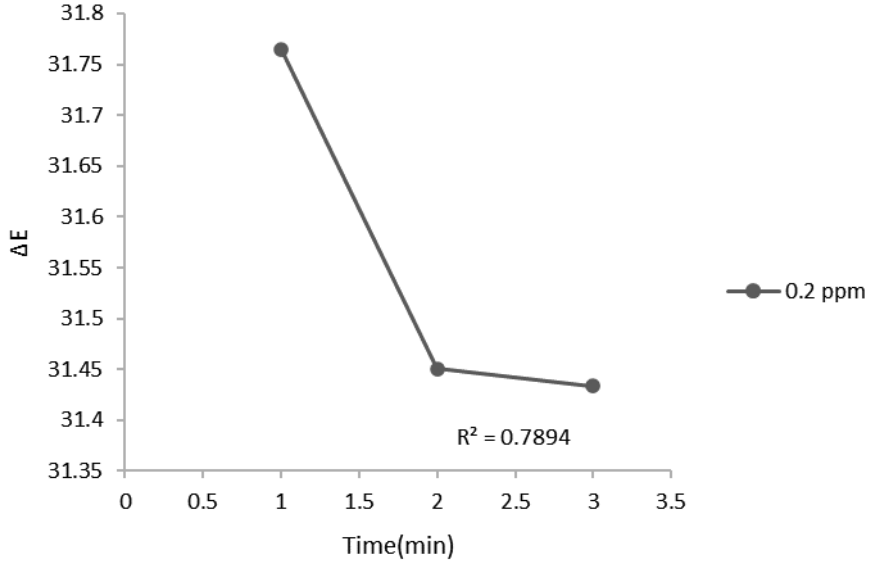
เมื่อนำผลจากการบันทึกผล L*-a*-b* มาวิเคราะห์ความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงสีสามารถบ่งบอกความแม่นยำเครื่องมือวัดที่ใช้มีการทำงานและความน่าเชื่อถือได้ ยังแสดงให้เห็นคุณลักษณะทางด้านความเสถียร (Stability) ซึ่งค่าสีจะแสดงออกมาในรูปแบบของความแตกต่างของค่า ΔE* มีสูตรคำนวณหาดังสมการต่อไปนี้ (Walker, C.H., et al., 2006)

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2+(\Delta a^*)^2+[(\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

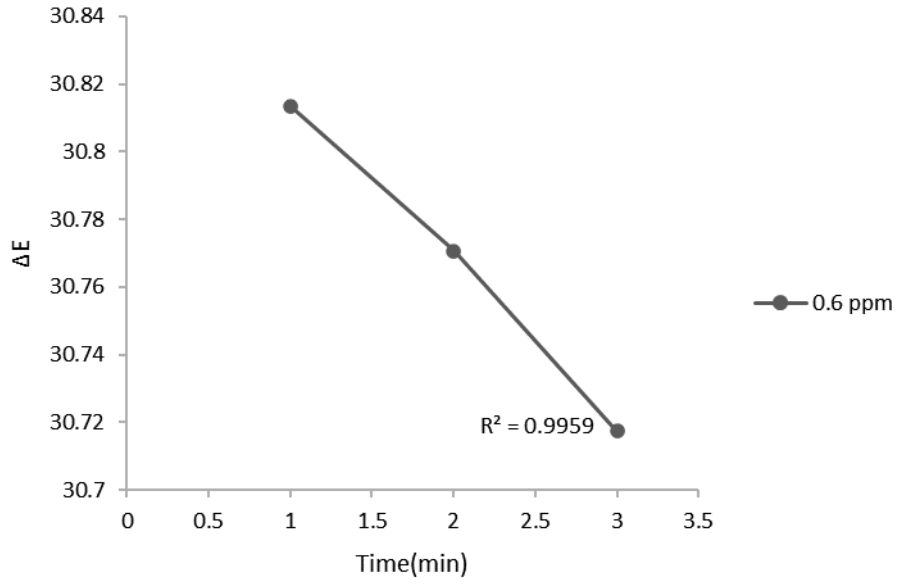
แสดงผลการวัดความแตกต่างของค่าสี L* a* และ b* สารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 0.0, 0.2, 0.6 และ 1.0 ppm กับสารตั้งต้น เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE), สารละลายเอลมาน (DTNB) และ สารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (ATCI) ในรูปแบบของค่า ΔE*



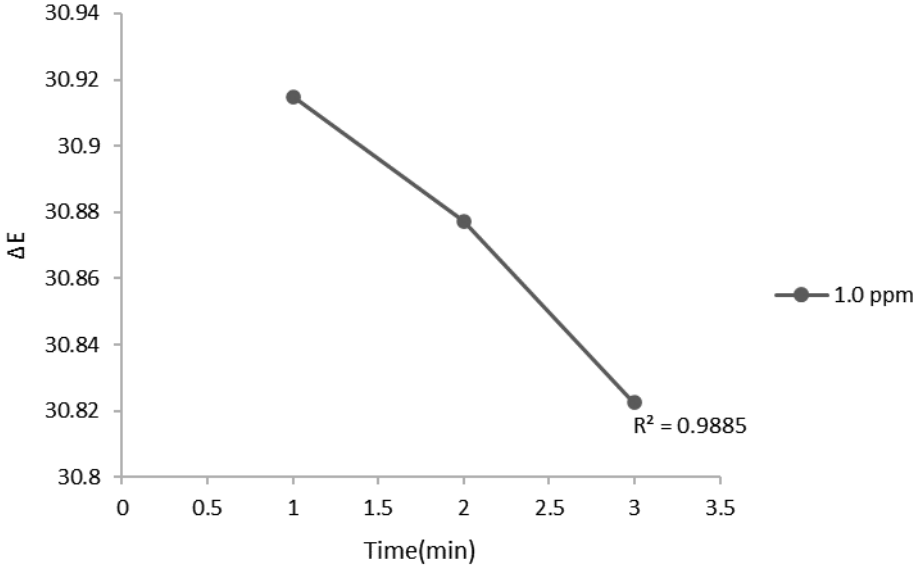
ภาพที่ 6 กราฟแสดงค่าความแตกต่างของค่าสี ΔE* ของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (AChE) อะซิติลไทโอคลอรีน (ATCI) และ เอลมานรีเอเจนท์ (DTNB) เมื่อไม่มีสารคาร์บาริล



ภาพที่ 7 กราฟแสดงค่าความแตกต่างของค่าสี ΔE* ของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (AChE) อะซิติลไทโอคลอรีน (ATCI) และ เอลมานรีเอเจนท์ (DTNB) เมื่อมีสารคาร์บาริล 0.2 ppm



ภาพที่ 8 กราฟแสดงค่าความแตกต่างของค่าสี ΔE* ของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (AChE) อะซิติลไทโอคลอรีน (ATCI) และ เอลมานรีเอเจนท์ (DTNB) เมื่อมีสารคาร์บาริล 0.6 ppm



ภาพที่ 9 กราฟแสดงค่าความแตกต่างของค่าสี ΔE* ของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (AChE) อะซิติลไทโอคลอรีน (ATCI) และ เอลมานรีเอเจนท์ (DTNB) เมื่อมีสารคาร์บาริล 1.0 ppm

กราฟแสดงค่าความแตกต่างของสี ΔE* ในภาพที่ 6 จะเห็นได้ว่าเมื่อไม่มีสารคาร์บาริลเข้าไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา พบความแตกต่างของค่าสีที่ 1 นาทีคือ 32.76 และ ค่าสีที่ 3 นาทีคือ 32.64 ด้วยค่าความ

เชื่อมั่น 0.926 ต่อมาแสดงค่าความแตกต่างของสี ΔE* ในภาพที่ 7 จะเห็นได้ว่า เมื่อสารคาร์บาริลเข้าไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา 0.2 ppm พบความแตกต่างของค่าสีที่ 1 นาทีคือ 31.76 และ ค่าสีที่ 3 นาทีคือ 31.43 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.7894 ในภาพที่ 8 จะเห็นได้ว่า เมื่อสารคาร์บาริลเข้าไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา 0.6 ppm พบความแตกต่างของค่าสีที่ 1 นาทีคือ 30.81 และ ค่าสีที่ 3 นาทีคือ 30.72 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.9995 ในภาพที่ 9 จะเห็นได้ว่า เมื่อสารคาร์บาริลเข้าไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา 1.0 ppm พบความแตกต่างของค่าสีที่ 1 นาทีคือ 30.91 และ ค่าสีที่ 3 นาทีคือ 30.82 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.9885 จากการวิเคราะห์ผลทั้ง 4 กราฟข้างต้น ชี้ให้เห็นว่า เมื่อไม่มีสารคาร์บาริลและมีสารคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 0.2, 0.6 และ 1.o ppm ที่เวลา 1 นาที ค่าการเปลี่ยนแปลงสีมีค่ามากที่สุด และที่เวลา 3 นาทีมีค่าการเปลี่ยนแปลงสีมีค่าน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงสีในแต่ละความเข้มข้นของสารคาร์บาริล พบว่ามีความแตกต่างของค่าสีเกิดขึ้นอย่างชัดเจนและเป็นไปในแนวโน้มเดียวกันของทุก ๆ ความเข้มข้น ทำให้มั่นใจได้ว่าเครื่องมือวัดที่ใช้มีการทำงานได้อย่างแม่นยำและน่าเชื่อถือได้ ยังแสดงให้เห็นคุณลักษณะทางด้านความเสถียร (Stability) ของเครื่องวัดสี Spectrophotometer Colorimeter ด้วยระบบ CIE L*a*b* สำหรับการตรวจวัดค่าการเปลี่ยนแปลงสีในการศึกษาครั้งนี้

อภิปรายผล

จากผลการวิจัยสรุปได้ว่าเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) มีความเหมาะสมที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมต เนื่องจากเอนไซมอะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) ถูกยับยั้งได้อย่างรวดเร็วในชวงที่สารละลายคาร์บาริลมีความเขมข้นต่ำ มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารอะซิติลไทโอคลอรีน (ACTI) และสารเอลมานรีเอเจนท์ (DTNB) ซึ่งได้มีการเตรียมสารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 0.0 ถึง 1.0 ppm พบว่า เมื่อใส่สารละลายคาร์บาริลเข้าไปเพื่อไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลตลอรีนเอเทอเรส (AChE) แล้วสังเกตการเกิดปฏิกิริยาที่เวลา 1 ถึง 10 นาที เวลาที่เหมาะสมที่สุดของการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงสีคือ 1 ถึง 3 นาที เนื่องจากเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรสมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา หลังจาก 3 นาที การเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ค่อนข้างช้า การเปลี่ยนแปลงสีเกิดความแตกต่างเพียงเล็กน้อย ต่อมาได้สังเกตความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดสารละลายคาร์บาริลของการเกิดปฏิกิริยาคือ 0.2, 0.6 และ 1.0 ppm มีการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้ค่อนข้างชัดเจน ดังนั้นงานวิจัยนี้สามารถตรวจวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตโดยใช้หลักการทำงานของเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) โดยชุดแบบทดสอบสามารถบอกช่วงการปนเปื้อนของสารละลายคาร์บาริลในช่วงน้อยกว่า1.0 ppm ได้ สำหรับการทำเป็นกราฟค่ามาตรฐานเพื่อพัฒนาต่อให้อยู่ในรูปแบบเครื่องตรวจวัดทางการเกษตรต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสาขาวิชาเทคโนโลยีวัสดุและสิ่งทอ ที่อำนวยความสะดวกทางด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำวิจัย และขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำเกี่ยวกับในการทำงานวิจัยด้วยดีตลอดมา ในระหว่างการดำเนินงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

วิชาการเกษตร, กรม. (2553). **สารพิษตกค้าง : ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด**. [Online]. Available : https://www.acfs.go.th [2562, มีนาคม 23].

_____. (2559). **เปิดตัวเลขไทยนำเข้ายาฆ่าหญ้า-แมลง กว่า 9 หมื่นตัน/ปี.** [Online]. Available : https://www.isranews.org/thaireform-other-news/51511-biothai.html. [2562, เมษายน 29].

ศุลกากร, กรม. (2561). **สถิติมูลค่าการส่งออกผักและผลไม้สดจากไทยมายังออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ ปี 2561.** [Online]. Available : http://www.customs.go.th/statistic_report [2562, มีนาคม 8].

Adam Kostelnik, et al. (2017). Acetylcholinesterase Inhibitors Assay Using Colorimetric pH Sensitive Strips and Image Analysis by a Smartphone. **International Journal of Analytical Chemistry, 217,** 555–561.

Arduini, F., et al. (2013). Acetylcholinesterase biosensor based on self-assembled monolayer-modified gold-screen printed electrodes for organophosphorus insecticide detection. **Sensors and Actuators B, 179**, 201-208.

Chantal, J.G.M. Smulders., et al. (2013). Selective effects of carbamate pesticides on rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors and rat brain acetylcholinesterase. **Toxicology and Applied Pharmacology, 193**, 139-146.

Du, D., et al. (2007). One-step electrochemically deposited interface of chitosan–gold nanoparticles for acetylcholinesterase biosensor design. **Journal of Electroanalytical Chemistry, 605,** 53-60.

Ellman, G.L., et al. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharm, 7**, 88-95.

Gupta RC & Milatovic D. (2012). Organophosphates and carbamates. In: Gupta RC, editor. **Veterinary Toxicolgy Basic and Principle**, 581.

Junsheng Yang., et al. (2018). A high performance N-doped carbon quantum dots/5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) fluorescent sensor for biothiols detection. **Sensors and Actuators B Chemical, 255**, 3179-3186.

Kit L. Yam, Spyridon E. Papadakis. (2013). A simple digital imaging method for measuringand analyzing color of food surfaces.

Mishra, A., et al, P. (2014). The Quality Identification of Fruits in Image Processing Using Matlab. **International Journal of Research in Engineering and Technology, 3**(10), 92-95.

Walker, C.H., et al. (2006). **Principle of Ecotoxicology**. Taylor & Francis : USA.