การตรวจประเมินความสัมพันธ์ระหว่างค่าสี (L*, a* และ b*) กับปริมาณสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืชพาราโอซอลเอทิลที่ตกค้างในผลผลิตการเกษตรโดยใช้เอนไซม์อะซิติลคลอลีนเอสเทอเรส

Assessing the Relationship between Color Values (L*, a* and b*) and Paraoxon-Ethyl Pesticide Residue in Agricultural Products with Acetylcholinesterase

พิมพ์พิมล ตัณฑ์เจริญรัตน์*
Pimpimon Tunjaroenrat
หยาดนภา ผาเจริญ**
Yardnapar Parcharoen
เบญญา เชิดหิรัญกร***
Benya Cherdhirunkorn
ชิราวุฒิ เพชรเย็น***
Chiravoot Pechyen
สุรเชษฐ์ ตุ้มมี****
Surachet Toommee

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

*นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชานวัตกรรมและเทคโนโลยีวัสดุ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
Bachelor of Science Program Innovation and Material Technology Program Faculty of Science and Technology Thammasat University
**อาจารย์ประจำวิทยาลัยแพทย์นานาชาติจุฬาภรณ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
Assistant Professor, Dr. Chulabhorn International College of Medicine, 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

บทคัดย่อ

ออร์กาโนฟอสเฟตเป็นสารเคมีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายทางด้านการเกษตรเนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันหรือกำจัดแมลงและศัตรูพืช ในปี พ.ศ. 2564 ประเทศไทยกำลังก้าวเข้าสู่ “สังคมผู้สูงอายุโดยสมบูรณ์” ส่งผลให้อาหารเพื่อสุขภาพผักผลไม้มีอิทธิพลต่อการใช้ชีวิตประจำวัน ปัญหาที่ตามมาคือสารเคมีตกค้างในกระบวนการเพาะปลูกส่งผลให้ผู้บริโภคได้รับสารพิษตกค้างจากผักผลไม้ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและประสิทธิภาพของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสกับสาร Ellman's reagent เพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารกำจัดแมลงและศัตรูพืชพาราโอซอนเอทิลกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต สีจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีใสขึ้นกับปริมาณสารพาราโอซอนเอทิลตกค้างในตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.2, 0.6 และ 1 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ความเข้มสีที่ได้มีความแตกต่างเพียงเล็กน้อยจึงไม่สามารถแยกด้วยตาเปล่าส่งผลให้ถูกประมวลผลโดยระบบ CIE L* a* b* พบว่า ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างค่าสี b* แสดงค่าในทิศทางลบหมายความว่าค่าสีมีแนวโน้มเข้าหาค่าสีน้ำเงินเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารพาราโอซอนเอทิลที่ตกค้างในสารละลายอ้างอิงตัวอย่างเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงสามารถใช้ค่าสี b* วิเคราะห์สารพาราโอซอนเอทิลความเข้มข้น 0.2, 0.6 และ 1 พีพีเอ็มในตัวอย่างได้และแสดงออกมาในรูปแบบสมการเส้นตรงมีค่าความเชื่อมั่น 0.97, 0.9453 และ 0.972 ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้เป็นการประเมินผลเบื้องต้นเพื่อเพิ่มทางเลือกหนึ่งที่เป็นประโยชน์จากวิเคราะห์ค่าสี L* a* และ b* เพื่อเป็นตัวแทนของการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงและศัตรูตกค้างในผักผลไม้ได้ง่าย รวดเร็ว

คำสำคัญ : กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต / เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส / ระบบ CIE / สหสัมพันธ์

ABSTRACT

Organophosphate are widespread useful in agriculture due to highly effective for the protection / eradication of insects and pests. Thailand is stepping into an aging society in 2021, therefore the healthier food such as fruit and vegetable are influence of living life. However, there are a lot of problems from the use of chemicals in the cultivation process, that are chemical residues in products affected too harmful to consumers. The objective of our research study to find optimize condition and efficiency of Acetylcholinesterase (ACHE) and Ellman’s reagent to check the quantity of Paraoxon Ethyl in the organophosphate group residues in crops. With the mechanism of color change from yellow to transparent color, that is affected due to the quantity of Paraoxon Ethyl at the concentration of 0.2, 0.6 and 1 ppm respectively. The CIE L * a * b * color system is used to process color changes due to the small changes our eyes can't see, that found the correlations between b * values shown negative values. The result shown the values of color tends to approach the value of blue due to the increased concentration of Paraoxon Ethyl in the reference solution. Therefore, b * value can be used to analyze Paraoxon Ethyl at the concentration of 0.2, 0.6 and 1 ppm in

the samples, that is expressed as a linear equation with a value of 0.97, 0.9453, and 0.972 respectively. This study is a preliminary evaluation to add a useful alternative to the color analyzer L * a * and b * to represent the analysis of pesticides in vegetables/fruits high accuracy and fast.

Keywords : Organophosphate / Acetylcholinesterase / CIE L*a*b* System / Correlation

บทนำ

ออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphate) เป็นสารเคมีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายทางด้านการเกษตรในประเทศไทย นำไปใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ต่างๆ สำหรับการนำไปใช้ในระดับครัวเรือนหรือไปถึงระดับอุตสาหกรรมมีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดแมลงและศัตรูพืชต่างๆ เนื่องจากมีประสิทธิภาพที่สูงในการกำจัดแมลงและศัตรูพืช ทำให้พบสารเคมีเหล่านี้สะสมหรือปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและในผลผลิตทางการเกษตร (ปราณี, 2556) ออร์กาโนฟอสเฟตเป็นสารเอสเตอร์ของกรดฟอสฟอริค (Phosphoric Acid) โครงสร้างจะประกอบด้วยอะตอมกลาง คือ ฟอสฟอรัส (P) สร้างพันธะคู่กับออกซิเจน (P=O) เรียกว่า Phosphoric Bond หรือสร้างพันธะคู่กับซัลเฟอร์ (P=S) เรียกว่า Thiophosphoric Bond และสร้างพันธะเดี่ยวกับ X คือ Leaving Group นอกจากนี้สร้างพันธะเดี่ยวกับ R1 และ R2 คือ หมู่อัลคอกซี (Alkoxy Group) หรือ หมู่อัลคิล (Alkyl Group) (Eleršek และ Filipi č, 2011; Beugnet, F., et al., 2012)

ปัจจุบันประเทศไทยจัดอยู่ในภาวะสูงวัยของประชากรเป็นอันดับสองของกลุ่มประเทศอาเซียนรองจากประเทศสิงคโปร์ สะท้อนให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางประชากร (Demographic Change) ของประเทศไทยกำลังก้าวเข้าสู่ “สังคมผู้สูงอายุโดยสมบูรณ์” (Complete aged society) ในปี พ.ศ. 2564 โดยในปี 2558 จะเป็นครั้งแรกที่มีประชากรเด็กน้อยกว่าผู้สูงอายุและมีการคาดการณ์ว่าจำนวนจะเพิ่มขึ้นถึง17 ล้านคนภายในปี 2583 ซึ่งมากกว่า 1 ใน 4 ของประชากรไทยทั้งหมด ข้อมูลทางสถิติแสดงให้เห็นว่าอาหารเพื่อสุขภาพ เช่น ผัก ผลไม้ จึงเป็นที่ต้องการในตลาดมากขึ้น เนื่องจากผู้บริโภคส่วนใหญ่คือ “ผู้สูงอายุ” ร่างกายของผู้สูงอายุมีสภาวะภูมิต้านทานต่ำ หรือภูมิคุ้มกันบกพร่อง เชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ง่ายทำให้ป่วย ดั้งนันจึงต้องให้ความสำคัญกับอาหารที่บริโภคเข้าไปอย่างมาก หากย้อนกลับมาดูต้นทางของการผลิตพบว่าเกษตรกรนั้นยังคงประสบปัญหาหลายด้าน เช่น การเผชิญความเสี่ยงด้วยภัยพิบัติทางธรรมชาติ ทั้งภัยแล้ง อุทกภัย โรคและแมลงศัตรูพืชเป็นปัญหาที่สำคัญที่สุด ด้วยเหตุนี้เกษตรกรจึงแก้ปัญหาด้วยการใช้ยาฆ่าแมลง ซึ่งการใช้ยาฆ่าแมลงในปริมาณมากเกินไปย่อมส่งผลเสียต่อตัวเกษตรกรเองและส่งผลถึงผู้บริโภคด้วย คนไทยจึงมีความเสี่ยงต่อการเจ็บป่วยจากสารเคมีเพิ่มขึ้น

โดยทั่วไปการตรวจวัดสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูที่ตกค้างอยู่ในผลผลิตทางการเกษตรนั้น จะใช้วิธีการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ชนิดสารและปริมาณที่ตกค้างในห้องปฏิบัติการ โดยใช้วิธีลิควิดโครมาโทกราฟี หรือแก๊สโครมาโทกราฟีร่วมกับการใช้แมสสเปกโตรมิทรี (LC-MS / GC-MS) เป็นหลัก (Smulders, C. J.G.M., et al, 2003) ซึ่งมีขั้นตอนในการตรวจวิเคราะห์ที่ซับซ้อนและใช้ระยะเวลานานกว่าจะทราบผล จึงมีการศึกษาหาวิธีการ

ที่จะสามารถตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชได้อย่างง่าย รวดเร็ว มีต้นทุนต่ำ เซนเซอร์ชีวภาพจึงเป็นตัวเลือกที่ตอบโจทย์ข้อนี้มากที่สุด เนื่องจากมีความไวต่อการตรวจวัดและมีความจำเพาะเจาะจงสูง จึงมีการศึกษาเพื่อหาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืชได้ เช่น การใช้ตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าและวงจรตรวจวัดศักดิ์ไฟฟ้า (Zhanget S.P., et al., 2008) การใช้ปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ (Enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA) ซึ่งจะเรืองแสงให้เห็นเมื่อตรวจพบสารเคมีกำจัดแมลง ข้อได้เปรียบของการใช้เอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้ชนิดของสารเคมีกำจัดแมลงคือ มีความจำเพาะเจาะจงสูง และมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา เอนไซม์ที่ให้ความสนใจคือ Acetylcholinesterase (AChE) ในสภาวะปกติจะสามารถเร่งปฏิกิริยาให้ Acetylthiocholine iodide เปลี่ยนเป็น Thiocholine ที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ Ellman's reagent เปลี่ยนจากสารละลายใสให้กลายเป็นสารละลายสีเหลืองได้อย่างรวดเร็ว แต่เมื่อสารละลายตัวอย่างมีสารกำจัดแมลงปนเปื้อนอยู่ Acetylcholinesterase จะถูกยับยั้งและทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยน Acetylthiocholine iodide ให้เป็น Thiocholine ได้น้อยลง ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยากับ Ellman's reagent เปลี่ยนจากสารละลายใสให้กลายเป็นสารละลายสีเหลืองได้ช้าลงและมีความเข้มของสีลดลงตามปริมาณของสารกำจัดแมลงปนเปื้อนอยู่ที่มากขึ้น (Ellman, et al., 1961; Nabeshima, T., et al., 2003; Walker, et al., 2006) โดยความเข้มของสี ระยะเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนสีและความสัมพันธ์ระหว่างค่าสี L*, a* และ b* ที่แตกต่างกันจะถูกตรวจวัดและประมวลผลโดยระบบ CIE L* a* b* (CIE) (Minolta, 1997) วิธีการที่สามารถระบุความหมายของสีได้ชัดเจนขึ้น โดยที่ค่า a* และ b* เป็นค่าที่ระบุความเป็นสีส่วนความสว่างของสีเป็นค่า L* (Jensen, 2005) เป็นตัวระบุความเข้มข้นของสารเคมีกำจัดแมลงที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างได้ ระบบสี CIE L*a*b* หรือ CIELAB สามารถบอกความแตกต่างของสีได้อย่างสม่ำเสมอและแม่นยำใกล้เคียงกับความแตกต่างของสีที่ตามนุษย์มองเห็น โดย L* ระบุค่าสีของความสว่าง (Lightness) L เข้าใกล้ 0 สีที่มองเห็นจะมืดเป็นสีดำ L เข้าใกล้ 100 สีที่มองเห็นจะมืดเป็นสีขาว a* ระบุค่าสีแดงหรือสีเขียว a ที่มีเครื่องหมายบวกวัตถุมีสีออกสีแดง a ที่มีเครื่องหมายลบวัตถุมีสีออกสีเขียว b* ระบุค่าสีเหลืองหรือสีน้ำเงิน b ที่มีเครื่องหมายบวกวัตถุมีสีออกเหลือง b ที่มีเครื่องหมายลบวัตถุมีสีออกน้ำเงิน (Bora, G. C. และคนอื่นๆ, 2018) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสีและความชื้นที่เปลี่ยนแปลงไประหว่างการอบแห้งแอปเปิ้ล ที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ความชื้นที่หายไปจะถูกตรวจวัดทุกๆ 30 นาทีควบคู่ไปกับการวิเคราะห์ด้วยภาพเป็นค่าสี RGB ซึ่งคำนวณโดยโปรแกรม MATLAB หรือเรียกว่า ระบบสี CLE จากผลการทดสอบสรุปได้ว่าสามารถคาดเดาอุณหภูมิและเวลาที่จะต้องใช้ในการอบแอปเปิ้ลที่ความชื้นต่างๆ ที่ต้องการได้อย่างแม่นยำ รวมถึงสามารถคำนวณความชื้นของชิ้นแอปเปิ้ลใดๆ จากค่าสี RGB ได้เช่นกัน

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาภาวะทีเหมาะสมในการเตรียมเอนไซม์ Acetylcholinesterase และสาร Ellman's reagent เพื่อใช้ในการตรวจวัดสารกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจวัดสารปนเปื้อนสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืชกลุ่มด้วยเอนไซม์ Acetylcholinesterase

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารกำจัดแมลงและศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต

เตรียมสาร Paraoxon-Ethyl เกรดการค้า ความเข้มข้น 1 ส่วนในล้าน (ppm) จำนวน 1 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 96 (Ethyl Alcohol 96%) จำนวน 1,000 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้ในบีกเกอร์ นำเข้าเครื่อง Ultrasonic เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา 5 นาทีเทลงใส่ขวดแก้วจำนวน 10 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดแก้วให้สนิทแล้วนำเข้าเครื่อง Vortex Mixer 1,000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 30 วินาที เก็บไว้ในอุณหภูมิห้องหลีกเลี่ยงแสงแดด จากนั้นนำ Paraoxon-Ethyl ความเข้มข้น 1 ppm เจือจางให้เหลือความเข้มข้น 0.6 และ 0.2 ppm ตามลำดับ

เตรียมสาร Paraoxon-Ethyl ความเข้มข้น 0.6 ppm จำนวน 10 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ 96% จำนวน 4 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสาร Paraoxon-Ethyl ความเข้มข้น 1 ppm จำนวน 6 มิลลิลิตรที่อยู่ในบีกเกอร์ หลังจากนั้นเทลงในขวดแก้วจำนวน 10 มิลลิลิตร นำ Paraoxon-Ethyl ความเข้มข้น 0.6 ppm ปิดฝาขวดแก้วให้สนิทแล้วนำเข้าเครื่อง Vortex Mixer 1,000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 30 วินาที

เตรียมสาร Paraoxon-Ethyl ความเข้มข้น 0.2 ppm จำนวน 10 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 96 จำนวน 8 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสาร Paraoxon-Ethyl ความเข้มข้น 1 ppm จำนวน 2 มิลลิลิตรที่อยู่ในบีกเกอร์ หลังจากนั้นเทลงในขวดแก้วจำนวน 10 มิลลิลิตร นำ Paraoxon-Ethyl ความเข้มข้น 1 ppm ปิดฝาขวดแก้วให้สนิทแล้วนำเข้าเครื่อง Vortex Mixer 1,000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 30 วินาที

2. การเตรียมเอนไซม์ Acetylcholinesterase (AChE)

เตรียมเอนไซม์ Acetylcholinesterase เกรดการค้า จำนวน 30 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS Buffer) จำนวน 15 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้ว แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Vortex Mixer 1,000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 30 วินาที เก็บไว้ในตู้เย็น

3. การเตรียมสารละลาย 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Ellman's reagent)

เตรียมสาร DTNB เกรดการค้า ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ชั่งสาร DTNB จำนวน 39 มิลลิกรัม ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS Buffer) จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้ว จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเครื่อง Vortex Mixer 1,000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 2 นาที

4. การเตรียมสารละลาย Acetylthiocholine iodide (ATCI)

เตรียมสารละลาย Acetylthiocholine iodide (ATCI) เกรดการค้า ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ชั่งสาร 0.289 มิลลิกรัม ผสมกับสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 96 (Ethyl Alcohol 96%) จำนวน 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้ว จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Vortex Mixer 1,000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 1 นาที

5. ขั้นตอนการทดลอง

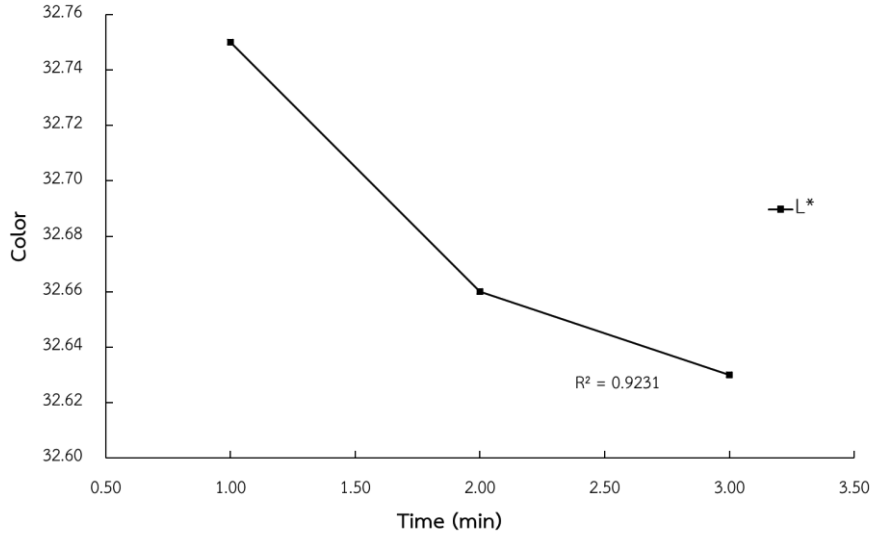
เตรียม 60 ไมโครลิตรของสาร Paraoxon-Ethyl ความเข้มข้น 1 ppm ผสมลงใน Acetylcholinesterase จำนวน 30 ไมโครลิตร ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex Mixer 1,000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเตรียมสาร DTNB จำนวน 300 ไมโครลิตรในสารละลายสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แล้วเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex Mixer 1,000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเตรียม Acetylthiocholine iodide จำนวน 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex Mixer 1,000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 30 วินาที หลังจากนั้นบันทึกข้อมูลค่าสี (L*, a* และ b*) ทันที ซึ่งถูกประมวลผลโดยระบบ CLE L* a* b* จับเวลา 1 นาที ทดสอบทุก ๆ 1 นาที จนครบ 3 นาที ทำซ้ำที่ทุกความเข้มข้นจบครบทุกความเข้มข้น

ผลการวิจัย

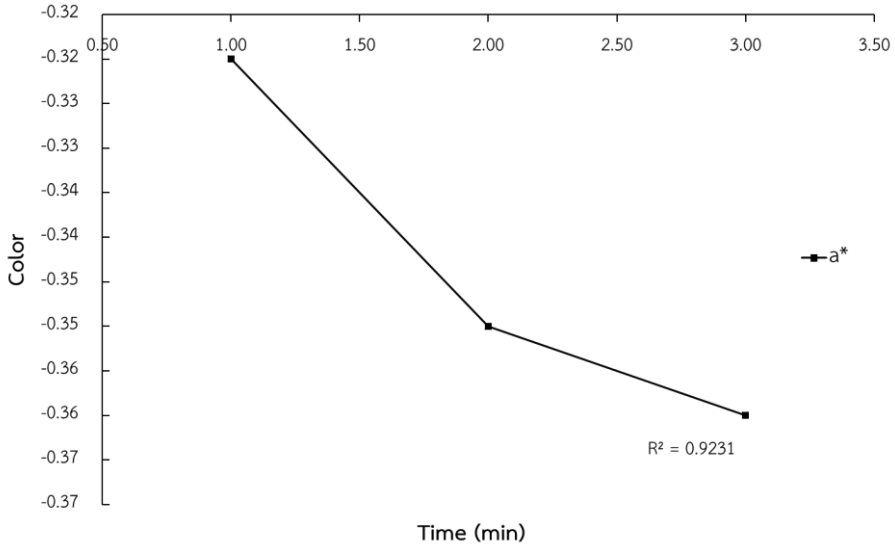
1. ความเข้มข้นของสาร Ellman's reagent กับสาร Acetylthiocholine iodide ที่เหมาะสมในตรวจวัดสารกำจัดแมลงและศัตรูพืชจากการศึกษาความเข้มข้นของ สาร Ellman's reagent กับสาร Acetylthiocholine iodide ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ กับ 0.1 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ พบว่าความเข้มข้นของ Acetylthiocholine ส่งผลต่อความเข้มข้นของสีเหลืองสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เนื่องจาก สาร Ellman's reagent (DTNB) สามารถทำปฏิกิริยากับสารกลุ่ม Sulfhydryl เกิดพันธะ disulfide และ ไอออน 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB2-) กลายเป็นผลิตภัณฑ์สีเหลืองความยาวคลื่นที่วัดได้ 410 นาโนเมตร (Hansen, et al., 2007)

2. ปริมาณของเอนไซม์ Acetylcholinesterase กับสาร Ellman's reagent และสาร Acetylthiocholine iodide ที่เหมาะสมในตรวจวัดสารกำจัดแมลงและศัตรูพืช

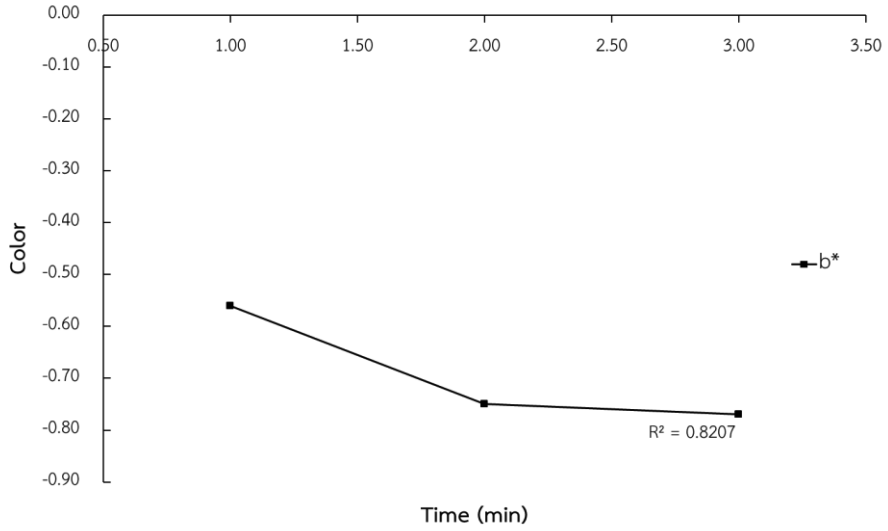
เอนไซม์ Acetylcholinesterase 30 ไมโครลิตร, สาร Ellman's reagent 300 ไมโครลิตรและสาร Acetylthiocholine 300 ไมโครลิตร ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดสารกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสี L* กับเวลาแสดงสมบัติทางกายภาพของเอนไซม์ Acetylcholinesteras, สาร DTNB และสาร Acetylthiocholine iodide



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า a* กับเวลาแสดงสมบัติทางกายภาพของเอนไซม์ Acetylcholinesterase, สาร DTNB และสาร Acetylthiocholine iodide



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสี b* กับเวลาแสดงสมบัติทางกายภาพของเอนไซม์ Acetylcholinesterase , สาร DTNB และสาร Acetylthiocholine iodide

หลังจากนั้นบันทึกข้อมูลค่าสี L*, a* และ b* ผลจากการวิเคราะด้วยระบบ CIE L*a*b* ของเอนไซม์ Acetylcholinesterase, สาร Ellman's reagent และสาร Acetylthiocholine iodide สำหรับเป็นเซนเซอร์วิเคราะห์ตัวอย่างสารละลายอ้างอิงโดยปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ Acetylcholinesterase เกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากสารละลายสีใสเป็นสีเหลืองได้อย่างรวดเร็วตั้งแต่เวลาที่ 1 นาที เนื่องจากเอนไซม์ Acetylcholinesterase มีความจำเพาะเจาะจงสูงและมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา จากการวิเคราะห์ค่าสี L* a* และ b* พบว่า ตั้งแต่เวลา 1 นาที ถึง 3 นาที ค่าสี L* ลดลงทุก 1 นาที ส่วนค่าสี a* และค่าสี b* เพิ่มขึ้นทุก 1 นาที ค่าสี L* มากสุด เท่ากับ 32.75, ค่าสี L* น้อยสุด เท่ากับ 32.63, ค้าสี a* มากสุด เท่ากับ -0.32, ค่าสี a* น้อยสุด เท่ากับ -0.36, ค่าสี b* มากสุด เท่ากับ -0.56 และค่าสี b*น้อยสุด เท่ากับ -0.77 อย่างมีนัยสำคัญ (Ellman, et al., 1961) กล่าวว่า ในสภาวะปกติ Acetylcholinesterase จะสามารถเร่งปฏิกิริยา Acetylthiocholine Iodide เปลี่ยนเป็น Thiocholine ที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ Ellman's reagent เปลี่ยนจากสารละลายใสให้กลายเป็นสารละลายสีเหลืองได้อย่างรวดเร็ว ค่าสี L* ที่มีค่าบวกแสดงออกค่าสีสว่าง ค่าสี a* ที่มีค่าลบแสดงออกค่าสีเขียวและค่าสี b* ที่มีค่าลบแสดงค่าสีออกน้ำเงิน ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎี Ellman’s reaction (Arduini, F., et al., 2005) ศึกษาการใช้เอนไซม์ Acetylcholinesterase ร่วมกับ Acetylthiocholine chloride และ 5,5 0 -dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) ในการตรวจวัดปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชโดยเอนไซม์ในน้ำจะทำปฏิกิริยากับ Acetylthiocholine chloride ให้กลายเป็น Thiocholine ซึ่งจะจับแยกโลหะหนักในสารกำจัดศัตรูพืชไปแขวนลอยอยู่ในชั้นของสารละลายเฮกเซน สารกำจัดศัตรูพืชที่ถูกแยกโลหะหนักแล้วจะจับกับเอนไซม์ และ Thiocholine ที่ไม่ได้จับกับโลหะหนักจากสารกำจัดศัตรูพืชจะทำปฏิกิริยา

กับ 5,5 0 -dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) ให้เกิดการเปลี่ยนสีของสารละลาย ซึ่งจะถูกตรวจวัดด้วย UV/VIS spectrophotometer

3. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสี (L*, a* และ b*) ของความเข้มข้นสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลายเอนไซม์ Acetylcholinesterase, สาร Ellman's reagent และ Acetylthiocholine iodide

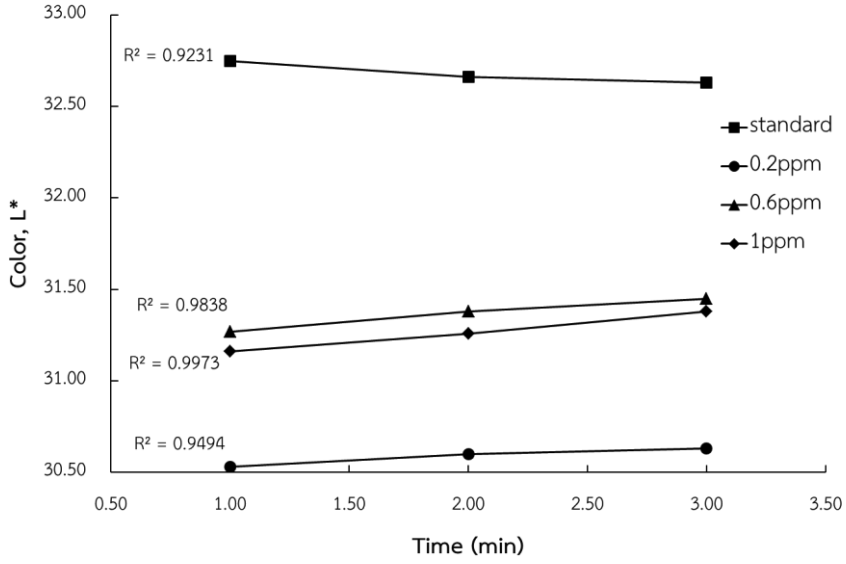
ระบบ CIE LAE coordinate (L* a* b*) ที่นิยมใช้ในการประเมินลักษณะทางกายภาพของสารตัวอย่างที่ศึกษา พิจารณาจากค่าสี L* ที่เข้าใกล้ 0 หมายถึง ตัวอย่างที่มีความมืดสูงจนแสดงสีมืด แต่ถ้าค่าสี L* ที่เข้าใกล้ 100 หมายถึง ตัวอย่างที่ความสว่างสูงมากจนแสดงสีขาวหรือสีใส ค่าสี a* ที่มีค่าบวก หมายถึงตัวอย่างแสดงค่าสีแดง ส่วนค่าสี a* ที่มีค่าลบ หมายถึง ตัวอย่างแสดงค่าสีเขียว และในค่าสี b* ที่มีค่าบวก หมายถึงตัวอย่างแสดงค่าสีเหลือง แต่ถ้าเมื่อไหร่ก็ตามค่าสี b* มีค่าเป็นลบ หมายถึง ตัวอย่างแสดงค่าสีน้ำเงิน (Suwan & Wongwat, 2011)

การอ่านผลวิเคราะห์ของตัวอย่างสารละลายที่ถูกทดสอบ ซึ่งจะเปรียบเทียบกับสารละลายอ้างอิง(สีควบคุม) ถ้าสีสารละลายตัวอย่างที่มีสารพิษตกค้างมีความเข้มของสีลดลง หมายความว่า สารกำจัดแมลงและศัตรูพืชตกค้างอยู่แสดงถึงความไม่ปลอดภัย แต่ถ้าสีของสารละลายตัวอย่างที่มีสารพิษตกค้างความเข้มของสีเท่าเดิมแสดงว่าปลอดภัย การควบคุมคุณภาพในการวิเคราะห์ผลการทดสอบของงานวิจัยนี้ต้องนำ สารละลายอ้างอิงเปรียบเทียบกับสารละลายสารพิษตกค้างของการอ่านผลทดสอบ

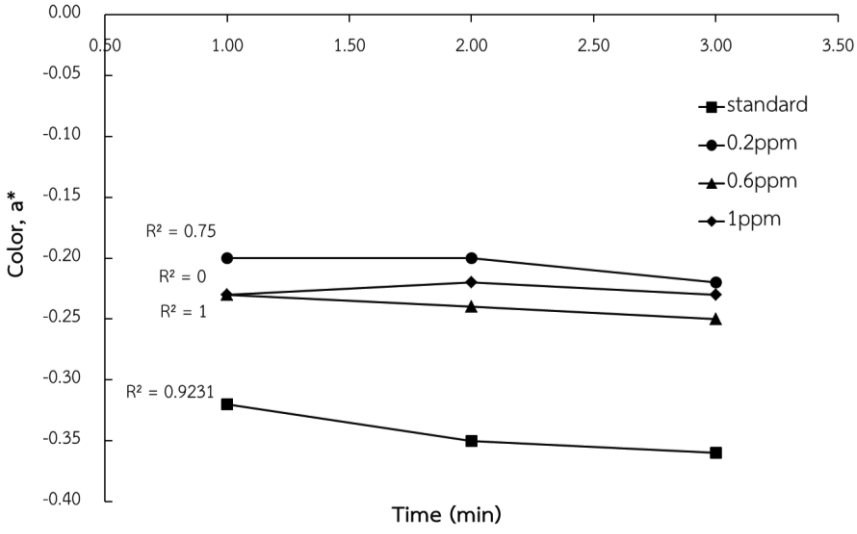
ศึกษาคุณลักษณะความเข้มข้นที่แตกต่างกันของสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ความเข้มข้น 0.2, 0.6 และ 1 ppm ตามลำดับ ที่ตกค้างอยู่ในสารละลายอ้างอิง (AChE, DTNB และ ATCI) แสดงค่าสี L*, a* และ b* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยแสดงความสัมพันธ์ค่าสี L*, a* และ b* ระหว่างความเข้มข้นของสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ความเข้มข้น 0.2, 0.6 และ 1 ppm จับเวลาตั้งแต่ 1 ถึง 3 นาที

จากภาพที่ 4 ค่าสี L* ของสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ความเข้มข้น 0.2 ppm แสดงค่าสี L* น้อยสุด รองลงมา Paraoxon-Ethyl ความเข้มข้น 1 ppm และ Paraoxon-Ethyl ความเข้มข้น 0.6 ppm แสดงค่า L* มากที่สุด จากภาพที่ 5 ค่าสี a* ของสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ความเข้มข้น 0.2 ppm แสดงค่า a* มากที่สุด รองลงมาคือ Paraoxon-Ethyl ความเข้มข้น 1 ppm และ Paraoxon-Ethyl ความเข้มข้น 0.6 ppm มีค่าสี a* น้อยที่สุด ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ความเข้มข้น 0.2, 0.6 และ 1 ppm มีทิศทางการเปลี่ยนค่าสี L* และ ค่าสี a* มีความแปรปรวนของการเปลี่ยนแปลงค่าสีเกิดขึ้น เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของค่า L* และ ค่าสี a* ไม่ใช่สีหลักการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ Acetylcholinesterase เมื่อทำปฏิกิริยากับสาร Ellman's reagent จึงเกิดความแปรปรวนของค่าสี L* และค่าสี a* เมื่อสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ตกค้างในสารละลายอ้างอิงเข้าไปยับยั้งบริเวณ Active site ของเอนไซม์ Acetylcholinesterase ทำ

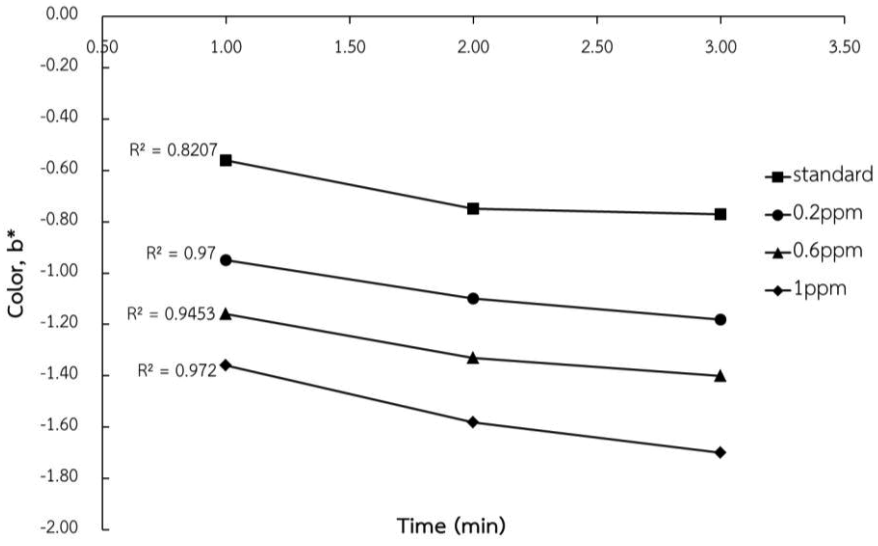
หน้าที่ยับยั้งและเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสีทำให้ความเข้มของสีเหลืองน้อยลงจึงทำให้เกิดความแปรปรวนค่าสี L* และ a* อยู่ระหว่างช่วงคาบเกี่ยวของค่าสีส่งผลให้การเปลี่ยนแปลงค่าสีของสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ที่ความเข้มข้น 0.2 0.6 และ 1 ppm ค่าสี L* และ ค่าสี a* สามารถระบุได้แค่เพียงมีสารเคมี Paraoxon-Ethyl ตกค้างในสารละลายอ้างอิงได้ จากภาพที่ 4 แสดงให้เห็นว่า ค่าสี L* มีสหสัมพันธ์ทางบวกเพิ่มขึ้น หมายความว่า สีมีแนวโน้มไปในทิศทางค่าสีสว่างของทุกความเข้มข้น และจากภาพที่ 5 แสดงให้เห็นว่าค่าสี a* แสดงสหสัมพันธ์ทิศทางลบ หมายความว่า สีมีแนวโน้มไปในทิศทางค่าสีแดงของทุกความเข้มข้น จากภาพที่ 6 ค่าสี b* ของสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ความเข้มข้น 0.2 ppm แสดงค่าสี b* มากที่สุด รองลงมา Paraoxon-Ethyl ความเข้มข้น 0.6 ppm และ Paraoxon-Ethyl ความเข้มข้น 1 ppm มีค่าสี b* น้อยที่สุด การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าสี L*, a* และ b* กับความเข้มข้นของสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.6 และ 1 ppm มีสหสัมพันธ์ทางลบกับค่าสี b* หมายความว่าค่าสีเข้าสู่สีน้ำเงิน พบว่า ค่าสี b* เมื่อความเข้มข้นสารพิษตกค้างเพิ่มขึ้นมีความเข้มสีลดลงตั้งแต่ 1 ถึง 3 นาที ยังมีความแปรปรวนของค่าสีที่น้อยกว่าค่าสี L* และ a* แสดงออกมาในรูปแบบสมการเส้นตรงมีค่าความเชื่อมั่น 0.97, 0.9453 และ 0.972 ตามลำดับ เมื่อใดก็ตามที่มีค่าสี b* สหสัมพันธ์ทิศทางลบเพิ่มขึ้น หมายความว่าความเข้มข้นของสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl เพิ่มขึ้น เนื่องจากค่าสีของสารละลายเข้าสู่ค่าสีน้ำเงินมากขึ้น (แสดงค่าสีเหลืองน้อยลง) ในทางกลับกัน พบว่าถ้าค่าสี b* ไม่มีการเปลี่ยนแปลง หมายความว่าสารละลายตัวอย่างไม่มีสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ตกค้างอยู่เปรียบเทียบที่เวลาเท่ากัน ถ้าสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ตกค้างในเอนไซม์ Acetylcholinesterase จะถูกยับยั้งและเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยน Acetylthiocholine iodide ให้เป็น Thiocholine ได้น้อยลงส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยากับ Ellman's reagent เปลี่ยนจากสารละลายสีใสให้กลายเป็นสารละลายสีเหลืองได้ช้าลงและมีความเข้มของสีเหลืองลดลง (Ellman, et al., 1961)



ภาพที่ 4 ค่า L* และเวลาแสดงสมบัติทางกายภาพเมื่อสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ตกค้างในสารละลายเอนไซม์ Acetylcholinesterase กับสาร DTNB และสาร Acetylthiocholine iodide



ภาพที่ 5 ค่า a* และเวลาแสดงสมบัติทางกายภาพเมื่อสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Eth ตกค้างในสารละลายเอนไซม์ Acetylcholinesterase กับสาร DTNB และสาร Acetylthiocholine iodide



ภาพที่ 6 ค่า b* และเวลาแสดงสมบัติทางกายภาพเมื่อสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ตกค้างในสารละลายเอนไซม์ Acetylcholinesterase กับสาร DTNB และสาร Acetylthiocholine iodide

ข้อมูลดังกล่าวแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสีกับปริมาณ Acetylthiocholine ทั้งหมดที่ศึกษาในสารละลายที่ปนเปื้อนสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับรายงานของ (Kubilay, et al., 2013) ศึกษาการเตรียม Ellman's reagent บน Gold Nanoparticles (Au-NPs) สำหรับเป็นเซนเซอร์ตรวจวัดตัวอย่างสารกลุ่ม Bio thiols ที่ช่วงความเข้มข้นต่ำๆ แสดงการเปลี่ยนแปลงเมื่อเติมสาร Ellman's reagent (DTNB) บน Gold Nanoparticles เมื่อเพิ่ม Cysteine สารละลายสีใสจะค่อยๆ เปลี่ยนกลายเป็นสีเหลืองอ่อน ด้วยเหตุผลที่ว่า Cysteine ประกอบไปด้วย หมู่ Sulfhydryl ทำปฏิกิริยากับ Ellman's reagent จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสีเหลืองอ่อน กล่าวได้ว่าถ้ามีปริมาณหมู่ Sulfhydryl สูงเมื่อจับตัว Ellman's reagent แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของสีเหลืองอย่างชัดเจนและที่ช่วงความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรเป็นช่วงความยาวคลื่นของสีม่วงแต่เมื่อมองด้วยตาเปล่าจะเห็นเป็นสีเหลือง จึงมีการดูดกลืนแสงในช่วงนี้มากที่สุดของแต่ละความเข้มข้นของ Cysteine และจากการศึกษาของ (P. Miroslav, et al., 2011)ประสิทธิภาพในการตรวจวัดกลุ่ม Organophosphate ด้วยเอนไซม์ Acetylcholinesteraseกับสาร Indoxyl Acetate ย้อมติดสีเอนไซม์ Acetylcholinesterase จากปลาไหลไฟฟ้าและศึกษากลไกของปฏิกิริยาโดยเปรียบเทียบกลไกไม่ถูกหน่วงปฏิกิริยาและกลไกที่ถูกหน่วงปฏิกิริยาโดยใช้ Paraoxon-Ethyl เพื่อคำนวณ Michaelis constant, ความเร็วการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด (Maximum reaction velocity) แสดงการเปรียบเทียบสำหรับ Paraoxon-Ethyl ซึ่งอยู่ในกลุ่มยาฆ่าแมลงออร์กาโนฟอสเฟต โดยใช้ Acetylthiocholine ทดสอบการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ Acetylcholinesterase เมื่อความเข้มเพิ่มขึ้นของ Paraoxon-Ethyl ร้อยละการหน่วงปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นเนื่องจากเอนไซม์ Acetylthiocholine จับตัวกับParaoxon-Ethyl ยับยั้งการทำงานเอนไซม์ Acetylcholinesterase ซึ่ง

จากการยังยั้งโดย Paraoxon- Ethyl สูงถึงร้อยละ 95 หมายความว่ายังคงมีการทำงานของเอนไซม์ Acetylcholinesterase เหลือการทำงานอยู่เพียงร้อยละ 5

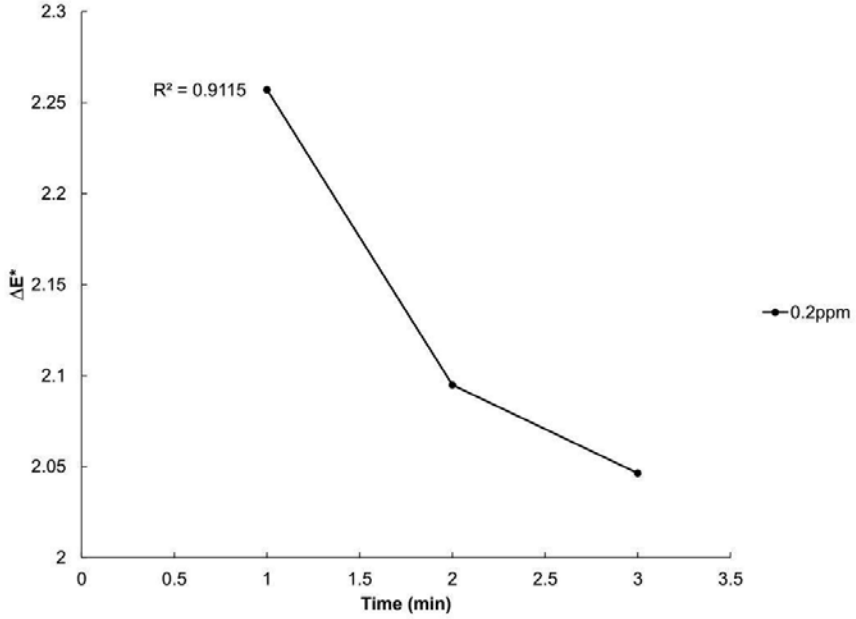
จากการศึกษาความเข้มข้นของสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.6 และ 1 ppm ตามลำดับ มีความสัมพันธ์กับค่าสี L* a* และ b* การวิเคราะห์ค่าสีด้วยปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสีด้วยเอนไซม์ Acetylcholinesterase ทำหน้าที่ย่อย Acetylthiocholine iodide กลายเป็น thiocholine เข้าทำปฏิกิริยากับ Ellman’s method เกิดโครงสร้างวงอะโรเมติกทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าสี เมื่อพบการตกค้างของสารเคมีจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon- Ethyl เข้าทำปฏิกิริยายับยั้งแบบไม่ผันกลับ จึงส่งผลให้เอนไซม์ Acetylcholinesterase ทำงานไม่ได้ ส่งผลให้มีการคั่งของ Acetylcholine เนื่องจากถ้าสารเคมีจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl เข้าสู่บริเวณ Active site ของเอนไซม์ Acetylcholinesterase จะจับตัวกันแบบถาวร ซึ่งเกิดการเสียรูปหรือเสียสภาพไม่สามารถกลับมาทำหน้าที่บริเวณ Active site ได้อีก หากแต่ยังมีเอนไซม์หลงเหลืออยู่ในสาระลายที่ยังไม่ได้จับตัวกับสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl จะวกกลับไปเริ่มต้นทำหน้าที่ย่อย Acetylthiocholine iodide ส่งผลให้ทำให้มีโอกาสที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงค่าสีได้ไม่มาก เหตุผลดังกล่าวทำให้การเปลี่ยนแปลงค่าสีไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนมาก เนื่องจากมีเอนไซม์บางส่วนเสียสภาพไปแล้ว อาจมีบางส่วนเท่านั้นที่ทำหน้าที่ย่อย Acetylthiocholine iodide กลายเป็น thiocholine ความสัมพันธ์ดังกล่าวจะเป็นช่องทางต่อการคัดเลือกที่เป็นประโยชน์และปลอดภัยในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl โดยผลจากการศึกษา พบว่าค่าสี L* กับ ค่าสี a* สามารถระบุได้ว่ามีสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ตกค้างในสารละลายอ้างอิงตัวอย่างได้ แต่ค่าสี b* สามารถใช้ระบุความแตกต่างของความเข้มข้นสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ที่ความเข้มข้น 0.2 0.6 และ 1 ppm ได้ เมื่อสารละลายปนเปื้อน Paraoxon-Ethyl ค่าสี b* แสดงการเปลี่ยนแปลงแนวโน้มในทิศทางลบที่มีค่าลบเพิ่มขึ้นกับเวลาเปลี่ยนแปลงไป จับเวลาตั้งแต่ 1 ถึง 3 นาที แต่ถ้าค่าสี b* ไม่มีพบการเปลี่ยนแปลงแสดงให้เห็นว่าไม่พบการตกค้างของสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl การทดลองครั้งนี้เป็นเพียงการประเมินหรือชุดทดสอบเบื้องต้นเพื่อเพิ่มทางเลือกอีกหนึ่งทางที่เป็นประโยชน์สามารถตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ได้มีขั้นตอนในการวิเคราะห์ไม่ซับซ้อน เห็นผลรวดเร็ว โดยปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ Acetylcholinesterase ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยากับ Ellman's reagent เปลี่ยนจากสารละลายใสให้กลายเป็นสารละลายสีเหลืองลดลงตามปริมาณสารกำจัดแมลงและศัตรูพืชตกค้างอยู่ โดยความเข้มของสีที่ลดลง ระยะเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนสีและค่าสี L* a* และ b* ที่แตกต่างกันจะถูกตรวจวัดและบันทึกด้วยระบบ CIE (L* a* b*) เป็นตัวระบุความเข้มข้นสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ที่ตกค้างอยู่ในตัวอย่างได้ แต่การตรวจสอบด้วยวิธีวิเคราะห์ทางเคมียังคงมีความจำเป็นที่ต้องทำการประเมินเพื่อความแม่นยำและถูกต้องในการระบุความความเข้มข้นของสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช

4. การวัดค่าความแตกต่างของสีสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ตกค้างอยู่ในสารละลาย เอนไซม์ Acetylcholinesterase, สาร Ellman's reagent และ สาร Acetylthiocholine iodide

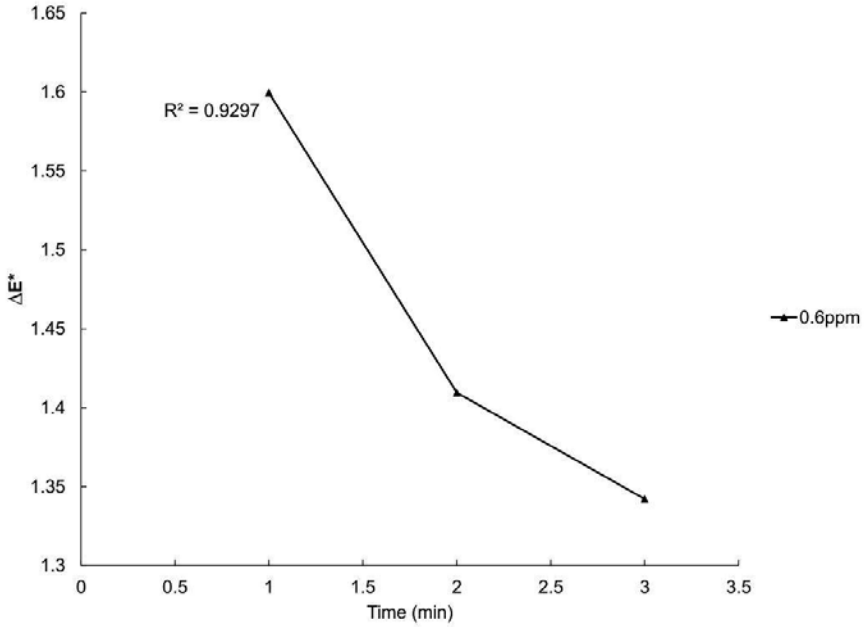
การวัดค่าสีในรูปแบบสารละลายโดยระบบ CIE L*a*b* สามารถเปรียบเทียบความต่างของค่าสี L* a* และ b* ได้ โดยเทียบสารละลายอ้างอิง นำค่า L* a* และ b* ของสารละลายตัวอย่าง (อ้างอิง) มาคำนวณตั้งต้นเทียบกับค่าสี L* a* และ b* ของสารละลายที่เปลี่ยนแปลงไป ค่าสีจะแสดงออกมาในรูปแบบของความแตกต่างของค่า ΔE* มีสูตรคำนวณหาดังสมการต่อไปนี้ (Cayless, et al., 1983; Walker, et al., 2006)

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2+(\Delta a^*)^2+[(\Delta b^*)^2]^{0.5}$$

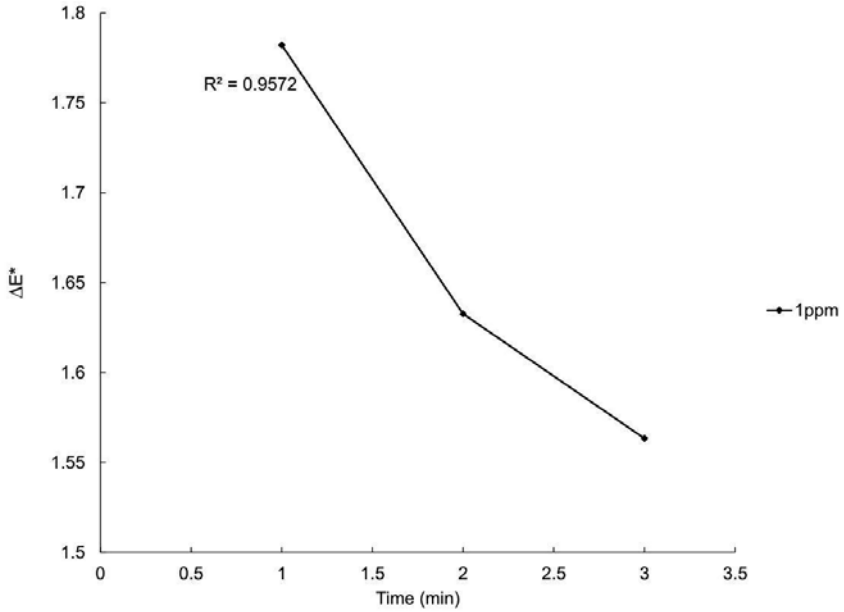
แสดงผลการวัดความแตกต่างของค่าสี L* a* และ b* สารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ที่ตกค้างอยู่ในสารละลายเอนไซม์ Acetylcholinesterase, สาร Ellman's reagent และ สาร Acetylthiocholine iodide ในรูปแบบของค่า ΔE*



ภาพที่ 7 วัดความแตกต่างของค่าสีในรูปแบบของค่า ΔE* ของสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ที่ความเข้มข้น 0.2 ppm ตกค้างอยู่ในสารละลายอ้างอิง



ภาพที่ 8 ความแตกต่างของค่าสีในรูปแบบของค่า ΔE* ของสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ที่ความเข้มข้น 0.6 ppm ตกค้างอยู่ในสารละลายอ้างอิง



ภาพที่ 9 ความแตกต่างของค่าสีในรูปแบบของค่า ΔE* ของสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ที่ความเข้มข้น 1 ppm ตกค้างอยู่ในสารละลายอ้างอิง

แสดงผลการวัดความแตกต่างของค่าสี L* a* และ b* ในรูปแบบของ ΔE* จากภาพที่ 7 จะเห็นได้ว่า สารละลายตัวอย่างที่มีสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ตกค้างในสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.2 ppm พบความแตกต่างของค่าสีสูงสุดอยู่ที่ 1 นาที และ ค่าสีต่ำสุดอยู่ 3 นาที รูปแบบของ ΔE* จากภาพที่ 8 จะเห็นได้ว่า Paraoxon-Ethyl ตกค้างในสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.6 ppm พบความแตกต่างของค่าสีสูงสุดอยู่ที่ 1 นาที และ ค่าสีต่ำสุดอยู่ 3 นาที และ จากภาพที่ 9 จะเห็นได้ว่า Paraoxon-Ethyl ตกค้างในสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1 ppm พบความแตกต่างของค่าสีสูงสุดอยู่ที่ 1 นาที และ ค่าสีต่ำสุดอยู่ 3 นาที ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ตกค้างในสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.2, 0.6 และ 1ppm ตามลำดับ ที่เวลา 1 นาที จะมีการเปลี่ยนแปลงค่าสี ΔE* ที่ปรากฏมีค่าสูงสุด รองลงมาที่เวลา 2 นาที และ ที่เวลา 3 นาที จะมีการเปลี่ยนแปลงค่าสี ΔE* ที่ปรากฏค่าต่ำสุด Paraoxon-Ethyl ตกค้างในสารละลายตัวอย่างนั้นที่ทุกความเข้มข้นมีการเปลี่ยนแปลงค่าสี ΔE* ในทิศทางเดียวกัน ส่งผลให้สารละลายอ้างอิงนั้นที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ที่ตกค้างในสารละลายตัวอย่างอ้างอิงจะเกิดการเปลี่ยนแปลงค่าสีเกิดขึ้นจากการประมวลผลด้วยเครื่อง Colorimeter ด้วยระบบ CIE L*a*b*

อภิปรายผล

งานวิจัยเรื่องการตรวจประเมินความสัมพันธ์ระหว่างค่าสี L*, a* และ b* กับปริมาณสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ที่ตกค้างในผลผลิตการเกษตรโดยใช้ Acetylcholinesterase สามารถสรุปการวิจัยได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมในการสารละลายอ้างอิง เอนไซม์ Acetylcholinesterase 30 ไมโครลิตร, สาร Ellman's reagent 300 ไมโครลิตรและสาร Acetylthiocholine iodide 300 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการตรวจวัดสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ได้

ประสิทธิภาพเอนไซม์ Acetylcholinesterase เพื่อใช้ในการตรวจวัดสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าสี L*, a* และ b* กับความเข้มข้นสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ตกค้างอยู่ในสารละลายอ้างอิงที่ความเข้มข้น 0.2, 0.6 และ 1 ppm ตามลำดับ ซึ่งถูกประมวลผลจากเครื่อง Colorimeter ด้วยระบบ CIE L*a* และ b* พบว่า ค่าสี b* สามารถระบุสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.6 และ 1 ppm ตามลำดับ ที่ตกค้างในสารละลายอ้างอิงได้ แสดงออกมาในรูปแบบของสมการเส้นตรงมีค่าความเชื่อมั่น 0.97, 0.9453 และ 0.972 ตามลำดับ ส่วนค่าสี L* กับ ค่าสี a* ระบุได้แค่เพียงมีปริมาณการตกค้างของสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ในสารละลายอ้างอิงตัวอย่าง ข้อมูลดังกล่าวแสดงถึงการทำงานของเอนไซม์ Acetylcholinesterase คือ เอนไซม์ Acetylcholinesterase นั้นทำหน้าที่ย่อยและสลายสารสื่อประสาท Acetylcholine เกิดปฏิกิริยาการยับยั้งแบบไม่ผันกลับ (irreversible) และทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยน Acetylthiocholine iodide ให้เป็น Thiocholine ได้น้อยลง ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยากับสาร Ellman's reagent จะถูกคอนจูเกตกับหมู่ฟังก์ชันโปรตีนเอนไซม์ จึงมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีทำให้เสารละลายอ้างอิงนั้นเป็นอินดิเคเตอร์ในการ

ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงค่าสีด้วยระบบ CIE L*a* และ * ส่งผลให้สามารถตรวจวิเคราะห์ความสัมพันธ์ค่าสีระหว่างการเกิดปฏิกิริยาของสารละลายอ้างอิงกับสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช Paraoxon-Ethyl ได้

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเอนไซม์ Acetylcholinesterase กับ สาร Ellman's reagent เพื่อประสิทธิภาพในการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูแมลงและศัตรูพืชที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 1 ppm ตกค้างในสารละลายอ้างอิงตัวอย่างซึ่งถูกประมวลผลด้วยระบบ CIE L*a*b* ค่าสี L* a* และ b* ระบุปริมาณของเอนไซม์ Acetylcholinesterase ที่เหลืออยู่เป็นตัวบ่งชี้ความเข้มสี ถ้ามีสารพิษตกค้างสูง สีที่ได้จากการทดสอบมีความสีเข้มลดน้อยลง โดยการใช้ค่าสี L* a* หรือ b* ช่วยบอกปริมาณสารพิษที่ตกค้างได้ เช่น ตกค้าง 0.2 – 1 ppm แสดงให้เห็นว่าสามารถบ่งชี้แบบกึ่งปริมาณได้ ดังนั้นสามารถนำมาใช้งานเป็นชุดทดสอบที่ได้มากกว่าข้อกำหนดการผ่านหรือไม่ผ่านเกษณ์ เนื่องจากเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้กำหนดปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดของสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืชเอาไว้ในข้อกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 9002-2559 ในการตรวจวัดสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืชที่ตกค้างอยู่ในผลผลิตทางการเกษตรและจุดมุ่งหมายสูงสุดของวิจัยนี้พัฒนาและคิดค้นประดิษฐ์เครื่องตรวจวัดสารกำจัดศัตรูแมลงและศัตรูพืชที่มีขนาดเล็ก แม่นยำ เคลื่อนที่ได้ โดยใช้เทคโนโลยีประมวลผลภาพ (Image processing) ในการวิเคราะห์และคำนวณสารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืชที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 1 ppm ตกค้างในผักผลไม้สด จากการเปลี่ยนแปลงสีของสาร Ellman's reagent ด้วยปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ Acetylcholinesterase iodide

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่อำนวยความสะดวกทางด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำวิจัย และขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำเกี่ยวกับในการทำงานวิจัยด้วยดีตลอดมา ในระหว่างการดำเนินงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. (2556). **เอนไซม์เทคโนโลยี**. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Arduini F., et al. (2005). Extraction and Detection of Pesticides by Cholinesterase Inhibition in a Two-Phase System : a Strategy. **Analytical Letters, 38**(11), 1703-1719.

Cayless, M.A. & Marsden, (1983). **A.M Lamp and Lighting**. (3 rd ed.). Arnold, London.

Beugnet F. & Franc M., (2012). Insecticide and acaricide molecules and/or combinations to prevent pet infestation by ectoparasites. **Trend in Parasitology, 28**, 267-279.

Bora, G.C., et al. (2018). Image processing analysis to track color changes on apple and correlate to moisture content in drying stages. **Food Quality and Safety, 2**, 105-110.

Eleršek, T. & Filipi č, M. (2011). Organophosphorus pesticides mechanisms of their toxicity. In **Pesticides-The Impacts of Pesticides Exposure. 243-260**. IntechOpen. DOI : 10.5772/14020.

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

Güc, K., et al. (2013). Selective optical sensing of biothiols with Ellman's reagent: 5,5 -Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)-modified gold nanoparticles. **Analytica Chimica Acta, 794**, 90-98.

Jensen, R.J. (2005). **Introductory Digital Image Processing**. Prentice Hall Series in Geographic Information Sciences. Third Edition.

Minolta. (1997). **Minolta Operator' s Manual for Photocopier EP5325**. Technical Manual Minolta Camera Co., Ltd., Business Equipment Division. Osaka, Japan : Minolta.

Nabeshima, T., et al. (2003). An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, Culex tritaeniorhynchus. **Biochemical and Biophysical Research Communications, 313**, 794-801.

Pohanka, M., et al. (2011). Assessment of Acetylcholinesterase Activity Using Indoxylacetate and Comparison with the Standard Ellman's Method. **Molecular Sciences, 12**, 2631-2640.

R.E. Hansen, H. Østergaard, P. Nørgaard, J.R.Winther. (2007). **Anal Biochem, 363**, 77-82.

R.W.G. Hunt. (1993). **Measuring Colour**. (2 nd ed.). The City University, London.

Smulders, C.J.G.M., et al. (2003). Selective effects of carbamate pesticides on rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors and rat brain acetylcholinesterase. **Toxicology and Applied Pharmacology, 193**, 139-146.

Suwan, T. & Wongwat, S. (2011). **Development of Jackfruit Seed Cracker,Research report from Faculty of Agro-Industry**. Bangkok : King Mongkut's University of Technology North Bangkok. (in Thai)

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

Zhang, S.P., et al. (2008). Study of enzyme biosensor based on carbon nanotubes modified electrode for detection of pesticides residue. **Chinese Chemical Letters, 19**, 592-594.