



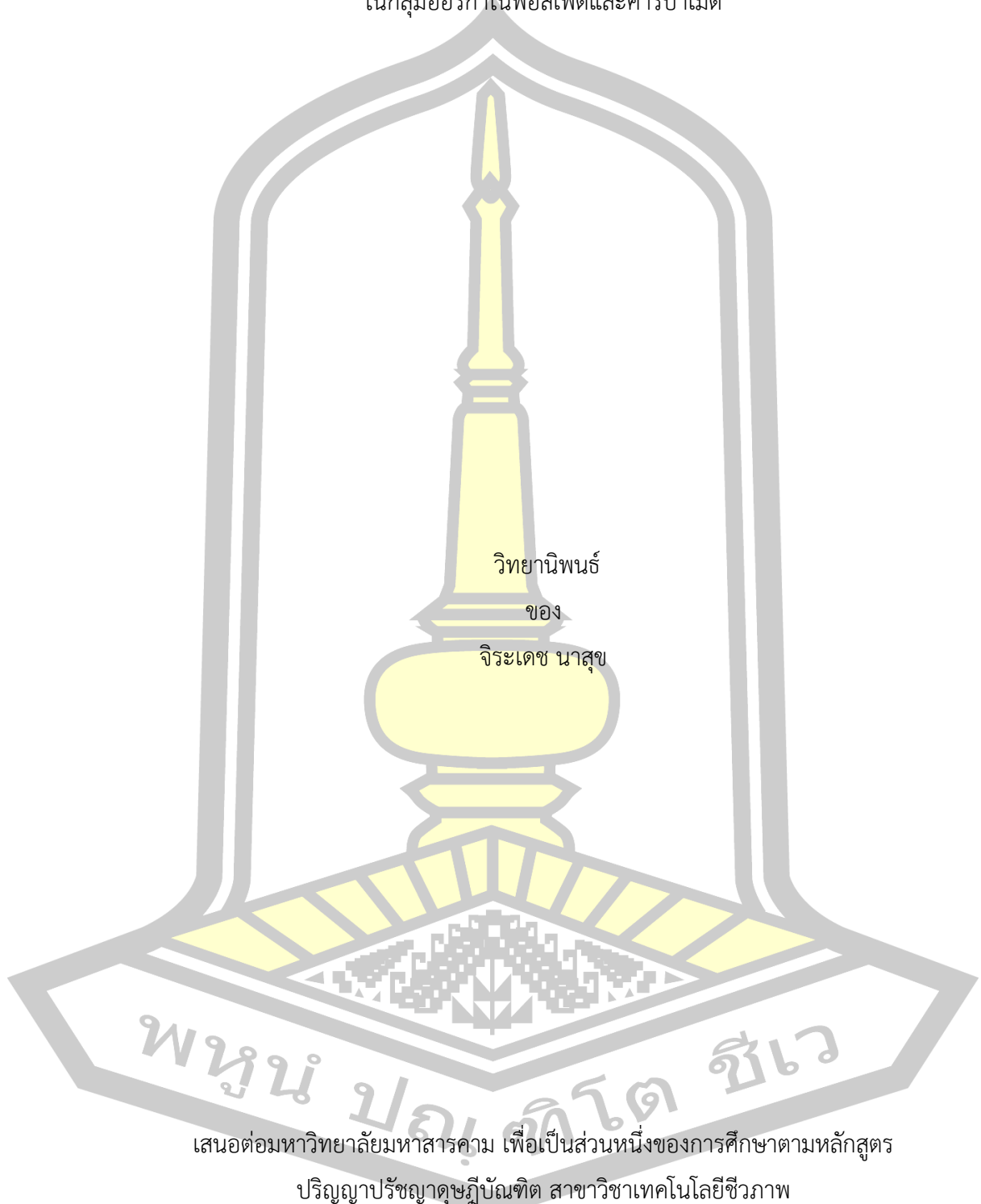
เอสเทอร์เรสจากพืชในการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้าง
ในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต

วิทยานิพนธ์
ของ
จิระเดช นาสุข

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ธันวาคม 2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

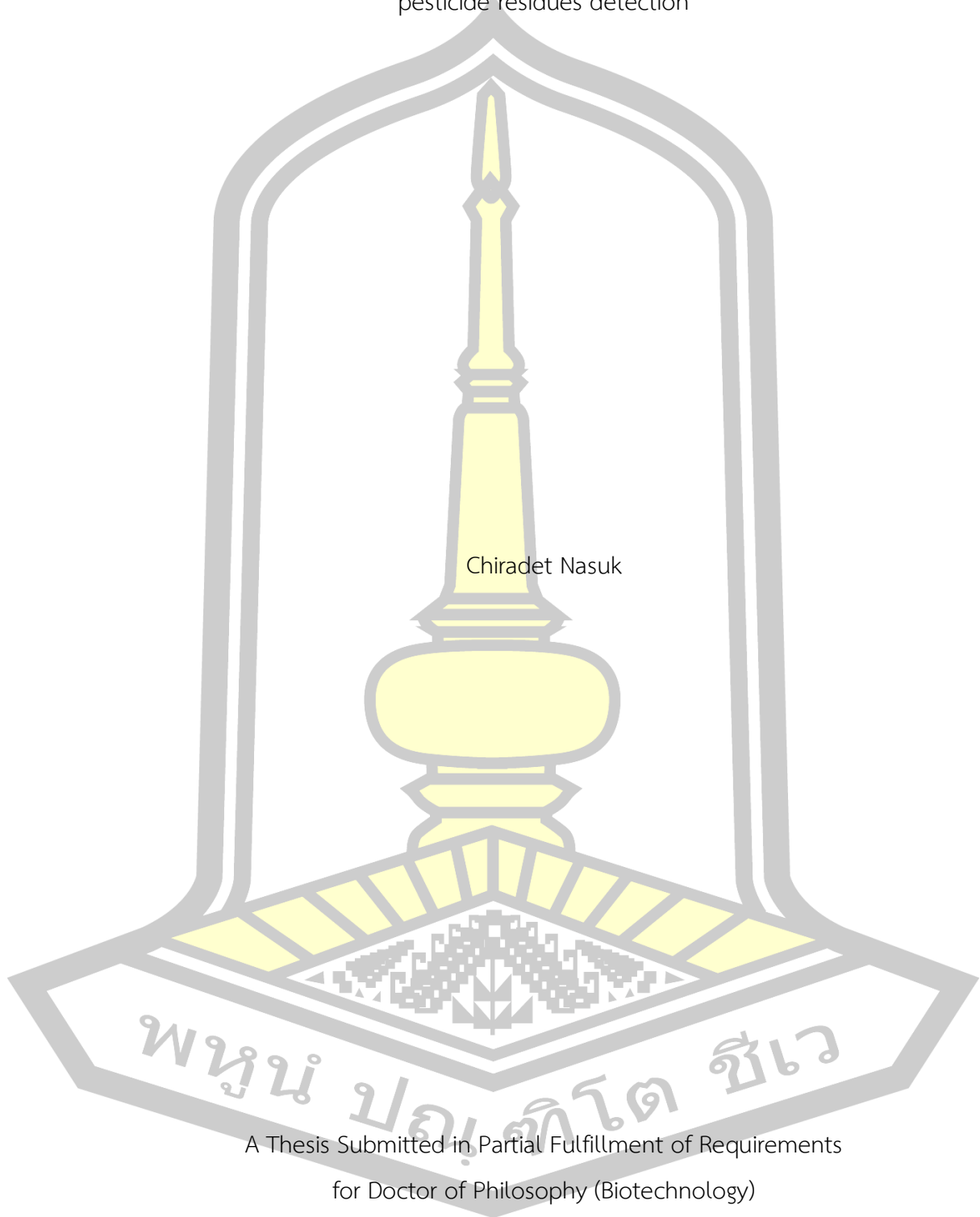
เอสเตอร์เรสจากพืชในการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้าง
ในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต



เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ธันวาคม 2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Plant esterase as indicator for organophosphate and carbamate
pesticide residues detection



Chiradet Nasuk

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Doctor of Philosophy (Biotechnology)

December 2020

Copyright of Mahasarakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนายจิระเดช นาสุข แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร. รัชฎา ตั้งวงศ์ไชย)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผศ. ดร. สุมลวรรณ ชุ่มเชื้อ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผศ. ดร. มลฤดี เซาวรัตน์)

กรรมการ

(ผศ. ดร. ปิยะเนตร จันทร์ธิระติกุล)

กรรมการ

(ผศ. ดร. ดุลย์จิรา สุขบุญญสถิตย์)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

(รศ. ดร. อนุชิตา มุ่งงาม)

คณบดีคณะเทคโนโลยี

(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

พูน บุญเกิด ชีวะ

ชื่อเรื่อง เอสเตอร์เรสจากพืชในการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้าง
ในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต

ผู้วิจัย จิระเดช นาสุข

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุมลวรรณ ชุ่มเชื้อ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มลฤดี เขาวรัตน์

ปริญญา ปรัชญาคุณภิรมย์บัณฑิต **สาขาวิชา** เทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2563

บทคัดย่อ

เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอร์เรส (Carboxylesterase: CES; EC 3.1.1.1) เป็นเอนไซม์เอสเตอร์เรส B (Esterases B; Est-B) ที่มีคุณสมบัติถูกยับยั้งการทำงานจากยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (OPs) และกลุ่มคาร์บาเมต (CAs) งานวิจัยนี้ได้ศึกษาเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอร์เรสจากถั่ว 5 ชนิด คือ ถั่วดำ (*Phaseolus mungo* L.) ถั่วแดง (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi) ถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) ถั่วแดงหลวง (*Phaseolus vulgaris* L.) และถั่วเหลือง (*Glycine max* L.) จากการศึกษาสกัดตัวอย่าง 12 กรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M, pH 7) และทำปฏิกิริยาบางส่วนโดยการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 60 และไดอะไลซิส นำมาศึกษากิจกรรมเอนไซม์และค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ปฏิกิริยาบางส่วนโดยใช้ α -naphthyl acetate ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะ พบค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอร์เรสปฏิกิริยาบางส่วนของถั่วดำมีค่าสูงสุด เมื่อเทียบกับถั่วชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รองลงมาคือ ถั่วเขียว ถั่วแดงหลวง ถั่วแดง และถั่วเหลือง โดยมีค่า 3.96 ± 0.26 1.51 ± 0.10 1.40 ± 0.12 1.29 ± 0.08 และ 0.70 ± 0.04 U/mg ตามลำดับ

การศึกษาผลของยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ที่ความเข้มข้น 0.001 – 3.0 $\mu\text{g/ml}$ ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอร์เรสปฏิกิริยาบางส่วน พบค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (I(%)) ของถั่วดำมีค่าสูงกว่า ถั่วเขียว และถั่วแดง แสดงถึงเอนไซม์จากถั่วดำมีความไวต่อยาฆ่าแมลงสูงกว่าถั่วเขียวและถั่วแดง และพบว่าที่ความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงเท่ากัน ค่า I(%) ของสารกลุ่ม OPs จะมีค่าสูงกว่าสารกลุ่ม CAs นอกจากนี้การศึกษาขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง (LOD; ค่า IC_{10}) ของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอร์เรสปฏิกิริยาบางส่วนจากถั่วดำในตัวอย่างแอปเปิ้ลและผักกาดหอมที่สกัดด้วยวิธี Modified QuEChERS ที่ความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงมาตรฐานกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs คือ 0.002 และ 0.01 mg/kg พบค่า IC_{10} มี

ค่า I(%) 7 9 8 และ 10 ตามลำดับ ความคงตัวของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสบริสุทธิ์บางส่วน จากถั่วดำที่เก็บรักษาอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 วัน พบว่าในระหว่างวันที่ 12-45 ค่า แอคติวิตีจำเพาะเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) และมีค่าลดลงร้อยละ 31.7 ในวันสุดท้ายของการเก็บรักษา

การศึกษาเปรียบเทียบความไวของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสบริสุทธิ์บางส่วนจาก ถั่วดำ กับเอนไซม์ของชุดทดสอบทางการค้า พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสบริสุทธิ์ บางส่วนจากถั่วดำกับวิธีทดสอบของชุดทดสอบทางการค้า ตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และ CAs ในตัวอย่างผักสด จำนวน 50 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบไปด้วย แตงกวา ถั่วฝักยาว ใบโหระพา ผักกาดขาว ผักชี ผักชีฝรั่ง กะหล่ำปลี ผักกาดหอม ใบบวบก และพริกสด พบว่าการทดสอบมีผลการ วิเคราะห์สอดคล้องกัน คือ ตรวจไม่พบหรือพบในระดับปลอดภัย จำนวน 46 ตัวอย่าง (ร้อยละ 92) ตรวจพบในระดับไม่ปลอดภัย จำนวน 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 8) โดยจำแนกเป็น ผักชีฝรั่ง จำนวน 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 6) และผักชี จำนวน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2) โดยข้อดีของเอนไซม์คาร์บอกซิล เอสเทอร์เรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำสามารถทำปฏิกิริยาในสภาวะอุณหภูมิห้องได้

การประเมินประสิทธิภาพวิธีการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และ CAs โดยการ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทียบกับวิธีมาตรฐานที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FPD⁺ และ HPLC-FLD ของตัวอย่างผักสด พบว่าวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ตรวจพบยาฆ่าแมลงจำนวน 11 ตัวอย่าง (ร้อยละ 22) วิธีมาตรฐานตรวจพบ จำนวน 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 34) ผลการประเมิน ประสิทธิภาพพบว่าวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ มีความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 100.0 ความถูกต้อง (accuracy) ร้อยละ 90.0 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ (ร้อยละ 80-100) ยกเว้นค่าความ ไว (sensitivity) ซึ่งมีค่าร้อยละ 70.5 เป็นผลมาจากการทดสอบที่ให้ผลลบลง นอกจากนี้พบ 5 ตัวอย่าง ที่ไม่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน คือ แตงกวา 1 ตัวอย่าง ผักชี 1 ตัวอย่าง โหระพา 2 ตัวอย่าง และ พริกสด 1 ตัวอย่าง

คำสำคัญ : เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรส, ยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต และกลุ่มคาร์ บามาต, ถั่วดำ (*Phaseolus mungo* L.)

TITLE	Plant esterase as indicator for organophosphate and carbamate pesticide residues detection		
AUTHOR	Chiradet Nasuk		
ADVISORS	Assistant Professor Sumonwan Chumchuere , Ph.D. Assistant Professor Monrodee Chaowarat , Ph.D.		
DEGREE	Doctor of Philosophy	MAJOR	Biotechnology
UNIVERSITY	Maharakham University	YEAR	2020

ABSTRACT

Carboxylesterase (CES: EC 3.1.1.1) as Esterases B (Est-B), is an enzyme which inhibited by Organophosphate (OPs) and Carbamate (CAs) groups. In this study, the extractions method and enzyme activity of CES were investigated. Five legume seeds, black gram bean (*Phaseolus mungo* L.), mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek), red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.), red bean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi) and soy bean (*Glycine max* L.) were extracted by phosphate buffer (0.1M, pH 7). After precipitation with 60% of ammonium sulfate and dialysis, the partially purified extracted enzymes were reacted with specificity substrate α -naphthyl for determination of CES activity and specific activity. The partially purified extracted enzymes of black gram showed higher specific activity than mung bean, red kidney bean red, bean and soy bean with significant differences ($p < 0.05$) (3.96 ± 0.26 1.51 ± 0.10 1.40 ± 0.12 1.29 ± 0.08 and 0.70 ± 0.04 U/mg, respectively).

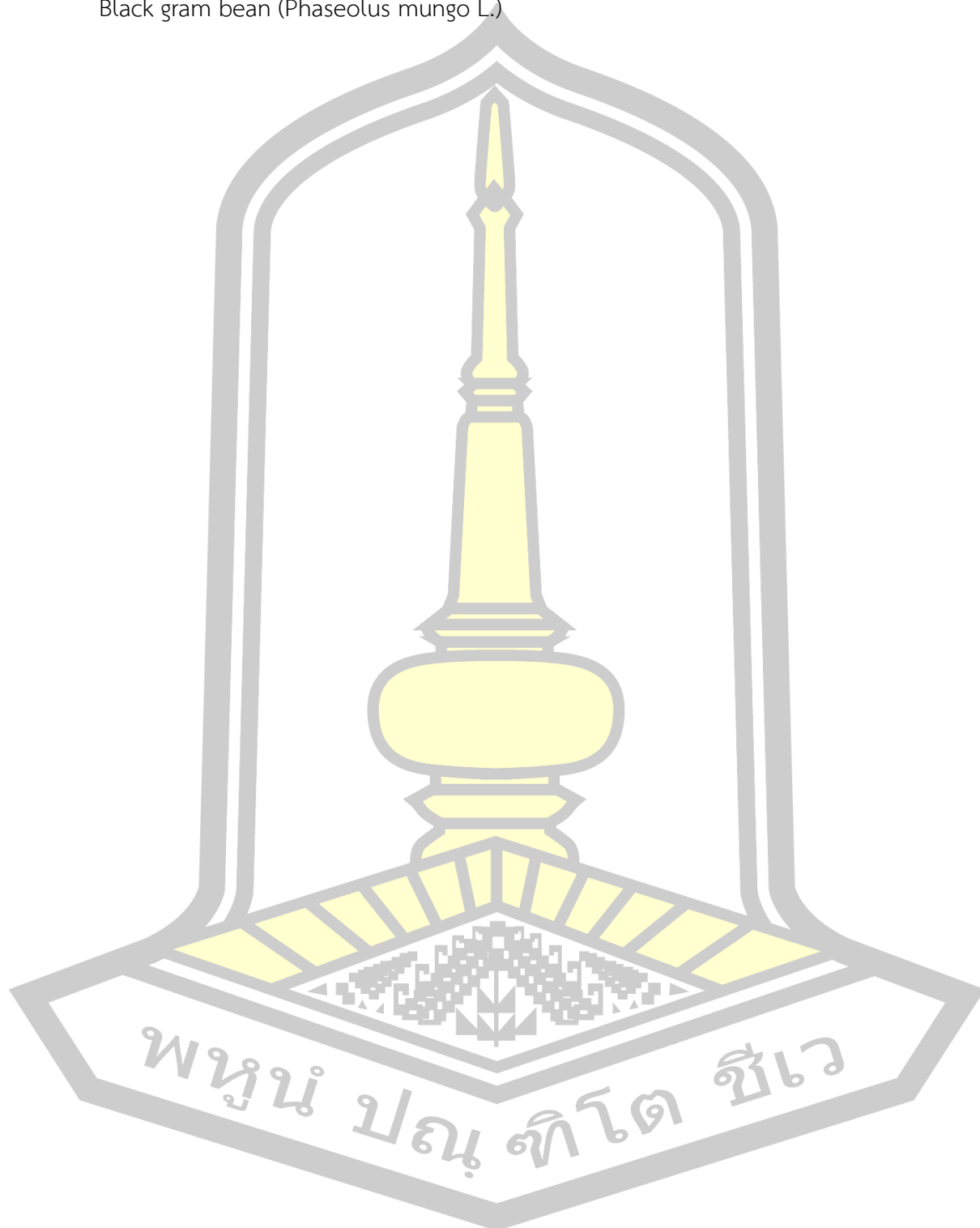
The effect of OPs and CAs pesticides (0.001 – 3.0 $\mu\text{g/ml}$) on the inhibition of partially purified extracted enzymes were investigated. It was found that the partially purified extracted enzymes of black gram bean showed higher the inhibition ratio (I%) than mung bean and red bean with significant differences ($p < 0.05$). It means, partially purified extracted enzymes of black gram bean was more sensitive for OPs and CAs than mung bean and red bean. At the same concentration of OPs and CAs the I(%) of OPs was higher than CAs. The limits of detection (LOD) of

partially purified extracted enzymes of black gram bean by the enzyme inhibition assay were studied. Lettuces and apples were extracted by Modified QuEChERS. After that, the extract samples were determined for OPs and CAs by enzyme inhibition assay using partially purified extracted enzymes of black gram bean. At the concentration of 0.002 and 0.01 mg/kg of OPs and CAs, the results of IC_{10} as LOD of enzyme inhibition assay showed the values of 7, 9, 8 and 10 respectively. During 12-45 day storages at 4°C for 60 days, it was found that the specific activity of enzymes were decreased with no significant differences, more ever the specific activity of enzymes were decreased to 31.7% at the end of storage.

The sensitivity of partially purified extracted enzymes of black gram bean compared with commercial enzyme of test kit on OPs and CAs for 50 samples including, chinese cabbage, lettuce, cabbage, coriander, culantro, chili, sweet basil, yard long bean and cucumber was determined. The sensitivity of black gram bean enzyme was determined accordance with the method of commercials test kit. The 46 samples (92.0%) showed the results as safe level and 4 samples (8.0%) showed unsafe levels consist of culantro 3 samples (6.0%), coriander 1 sample (2.0%). More advantage, partially purified extracted enzymes of black gram bean could react at room temperature.

The efficiency of the enzyme inhibition assay compared with the classical method (GC-FPD⁺ and HPLC-FLD) for determination of pesticide residues in 50 vegetables was investigated. For the enzyme inhibition assay with partially purified extracted enzymes of black gram bean, 11 samples (22.0%) were detected for pesticide residues and 17 samples (34.0%) detected by the classical method (GC-FPD⁺ and HPLC-FLD). The testing performance of the enzyme inhibition assay showed 100.0% specificity and 90.0% accuracy. All of testing performances were acceptable (ranged from 80–100%), except sensitivity was 70.5%. More ever, 5 samples from enzyme inhibition assay had not accordance with the classical method, includes of 2 samples sweet basil, coriander, chili, and cucumber.

Keyword : carboxylesterase, organophosphate and carbamate pesticide residues,
Black gram bean (*Phaseolus mungo* L.)



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความรู้และความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมลวรรณ ชุ่มเชื้อ ประธานกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มลฤดี เขาวรัตน์ กรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชฎา ตั้งวงศ์ไชย ประธานกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะเนตร จันทร์ธีระติกุล กรรมการสอบ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ตุลย์จิรา สุขบุญญสถิตย์ กรรมการสอบ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ตลอดจนช่วยแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ตั้งแต่ต้นจนสำเร็จ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่าน ที่กรุณาอบรมสั่งสอนด้วยความเอาใจใส่ และเมตตาต่อศิษย์อย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณ พนักงานวิทยาศาสตร์ ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ช่วยเหลือให้กำลังใจ และคำแนะนำ

ขอขอบพระคุณ ผู้บังคับบัญชา พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการศึกษา

ขอขอบพระคุณ ครอบครัว ญาติพี่น้อง และเพื่อนๆ ที่ให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน ตลอดจนเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

ท้ายที่สุดนี้ คุณค่าและประโยชน์จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเพื่อบูชาพระคุณบิดา มารดา บุรพจารย์ ญาติพี่น้องและผู้มีพระคุณทุกท่านที่ มีส่วนร่วมในการอบรมสั่งสอนทั้งวิทยาการ คุณธรรม จริยธรรม จนทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จ

จิระเดช นาสุข

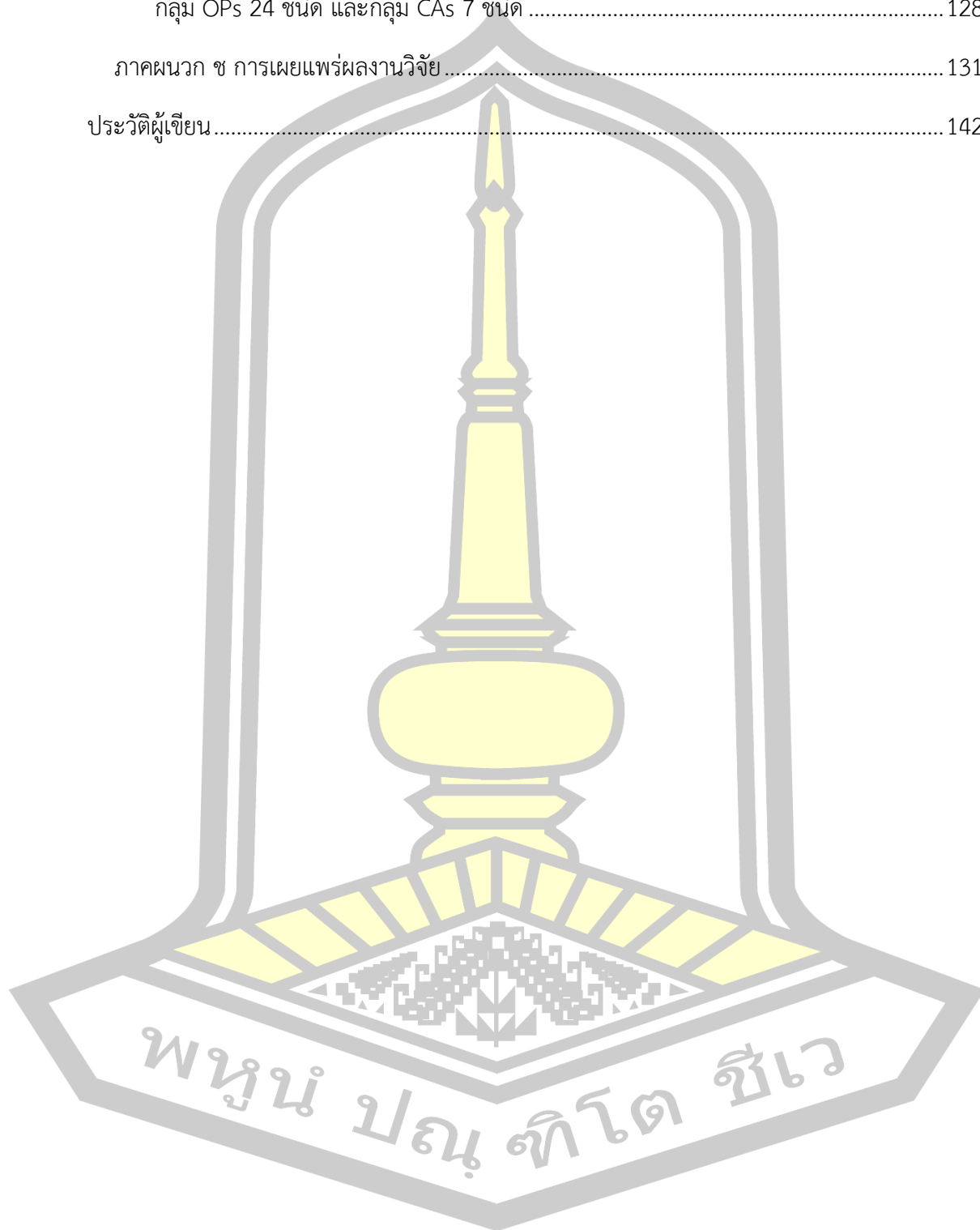
พหุ ม ปณ ทิโต ชีเว

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฌ
สารบัญ.....	ญ
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญภาพประกอบ.....	ต
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 หลักการและเหตุผล.....	1
1.2 ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....	4
1.4 ความสำคัญของการวิจัย.....	4
1.5 ขอบเขตการวิจัย.....	4
1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ.....	5
1.7 กรอบการวิจัย.....	6
บทที่ 2 ปรีทัศน์เอกสารข้อมูล.....	7
2.1 เอนไซม์เอสเทอร์เรส.....	7
2.2 การสกัดและการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์.....	19
2.3 ยาฆ่าแมลง (Pesticides).....	27
2.4 คุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์เอสเทอร์เรส.....	32
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	37
3.1 ตัวอย่าง สารเคมี และเครื่องมือวิเคราะห์.....	37

3.2 แผนการวิจัยและการวิเคราะห์ข้อมูล	39
3.3 วิธีการ	40
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปราย.....	49
4.1 ผลการศึกษาการคัดเลือกตัวอย่างพืชที่มีความไว (Sensitivity) ในการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs	49
4.2 ผลการศึกษาการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากตัวอย่างพืชที่ศึกษา.....	73
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย.....	87
5.1 สรุปผล.....	87
5.2 ข้อเสนอแนะ	90
บรรณานุกรม.....	91
ภาคผนวก.....	107
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One - way Analysis of Variance) ของค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหายาบ และสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน	108
ภาคผนวก ข การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (Paired-Sample T Test) ของค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหายาบและสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน	112
ภาคผนวก ค ค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากตัวอย่างของยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 24OPs และกลุ่ม 7CAs.....	115
ภาคผนวก ง การศึกษาขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ (LOD) จากค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสของยาฆ่าแมลงมาตรฐานผสม กลุ่ม 24OPs และกลุ่ม 7CAs	117
ภาคผนวก จ ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ (Specific activity) ของเอนไซม์จากถั่วดำ ระหว่างการเก็บรักษา 60 วัน	125

ภาคผนวก ฉ ค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสของยาฆ่าแมลงมาตรฐาน กลุ่ม OPs 24 ชนิด และกลุ่ม CAs 7 ชนิด	128
ภาคผนวก ช การเผยแพร่ผลงานวิจัย	131
ประวัติผู้เขียน	142



สารบัญตาราง

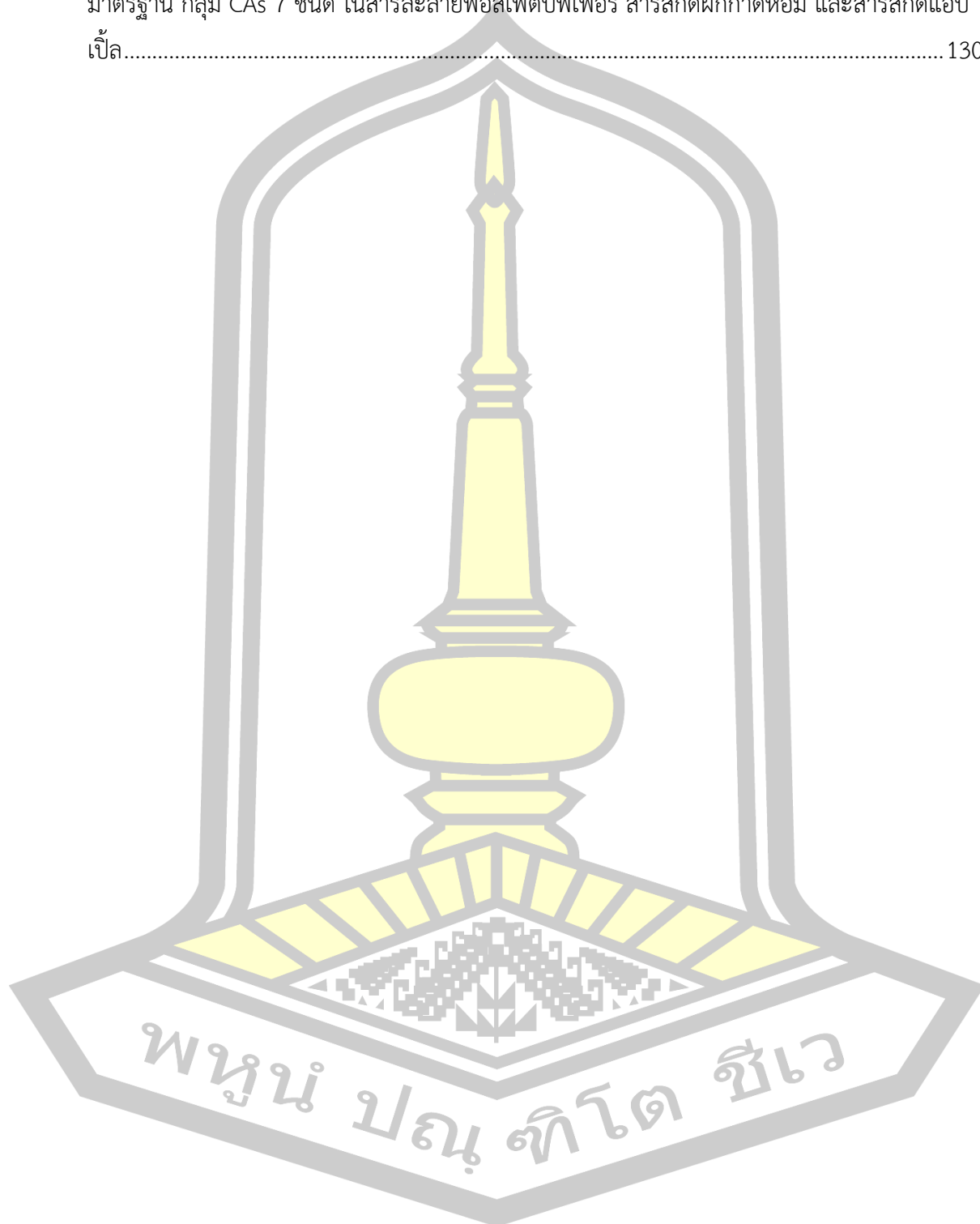
	หน้า
ตาราง 2.1 เอนไซม์เอสเทอร์เรสจากมนุษย์ สัตว์ และจุลินทรีย์.....	13
ตาราง 2.2 เอนไซม์เอสเทอร์เรสจากมนุษย์ สัตว์ และจุลินทรีย์ (ต่อ).....	14
ตาราง 2.3 เอนไซม์เอสเทอร์เรสจากมนุษย์ สัตว์ และจุลินทรีย์ (ต่อ).....	15
ตาราง 2.4 เอนไซม์เอสเทอร์เรสจากมนุษย์ สัตว์ และจุลินทรีย์ (ต่อ).....	16
ตาราง 2.5 วิธีการทำให้เซลล์แตก	21
ตาราง 2.6 สารเคมีที่นำมาใช้ในการการรักษาสภาพของเอนไซม์.....	21
ตาราง 2.7 วิธีการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ตามคุณสมบัติเฉพาะตัวของเอนไซม์.....	24
ตาราง 2.8 ระดับความเป็นพิษของการยาฆ่าแมลง พืชตามเกณฑ์ของ WHO.....	31
ตาราง 4.9 กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสของตัวอย่างพืชที่ศึกษา	51
ตาราง 4.10 กิจกรรมเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสหายาที่ใช้พืชตัวอย่าง น้ำหนักร่างต่างกัน.....	53
ตาราง 4.11 ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสหายาจากเมล็ด ธัญพืชถั่วชนิดต่างๆ	54
ตาราง 4.12 ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสบริสุทธิ์บางส่วน จากถั่ว.....	56
ตาราง 4.13 ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสหายาและสาร สกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสบริสุทธิ์บางส่วน	57
ตาราง 4.14 ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสหายาและสาร สกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสบริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นตัวสกัด 58	58
ตาราง 4.15 ค่าแอกติวิตีจำเพาะของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสบริสุทธิ์บางส่วน	59
ตาราง 4.16 ค่าแอกติวิตีจำเพาะของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสบริสุทธิ์บางส่วนจาก ตัวอย่างถั่วที่ศึกษากับงานวิจัยอื่นๆ	59

ตาราง 4.17 ค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์; IC ₁₀ ค่าดีฟอลต์ลิมิต (Default Limit) และค่า LOD ตามวิธีมาตรฐาน (เครื่อง GC-FPD ⁺ และเครื่อง HPLC-FLD).....	66
ตาราง 4.18 ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำ เมื่อการเก็บรักษา 60 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....	72
ตาราง 4.19 ค่าแอกติวิตีจำเพาะเฉลี่ยของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำ เมื่อเก็บรักษา 60 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....	73
ตาราง 4.20 ผลของการใช้เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำ ทดแทนเอนไซม์ของชุดทดสอบทางการค้าที่ศึกษา.....	75
ตาราง 4.21 ผลของการใช้เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำ ทดแทนเอนไซม์ของชุดทดสอบทางการค้าที่ศึกษา (ต่อ).....	76
ตาราง 4.22 สีหลอดสารมาตรฐานและค่าการยับยั้งเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากถั่วดำ (I: %) เทียบกับชุดทดสอบทางการค้า.....	78
ตาราง 4.23 ผลการศึกษาการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง กลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs โดยเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำ.....	79
ตาราง 4.24 ผลการศึกษาการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง กลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs โดยเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำ (ต่อ).....	80
ตาราง 4.25 ผลการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง ตกค้างกลุ่ม OPs และ CAs ในตัวอย่างผักสดโดยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และวิธีมาตรฐาน.....	81
ตาราง 4.26 ผลการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง ตกค้างกลุ่ม OPs และ CAs ในตัวอย่างผักสดโดยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และวิธีมาตรฐาน (ต่อ).....	82
ตาราง 4.27 ผลการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง ตกค้างกลุ่ม OPs และ CAs ในตัวอย่างผักสดโดยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และวิธีมาตรฐาน (ต่อ).....	83
ตาราง 4.28 ผลการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs โดยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และวิธีมาตรฐาน.....	85
ตาราง ก.29 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ของค่ายูนิตเอนไซม์ของสารสกัดเบื้องต้นของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสที่ปริมาณตัวอย่างต่างกัน.....	109

ตาราง ก.30 ค่าความแปรปรวนของค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ของสารสกัดเบื้องต้นของเอนไซม์	109
ตาราง ก.31 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ของค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหยาบโดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวสกัด	109
ตาราง ก.32 ค่าความแปรปรวนของค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวสกัด	110
ตาราง ก.33 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ของค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวสกัด	110
ตาราง ก.34 ค่าความแปรปรวนของค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ของสารสกัดเบื้องต้นของเอนไซม์	110
ตาราง ก.35 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ของค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหยาบ โดยใช้สารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์เป็นตัวสกัด	111
ตาราง ก.36 ค่าความแปรปรวนของค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน โดยใช้สารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์เป็นตัวสกัด	111
ตาราง ก.37 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ของค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน โดยใช้สารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์เป็นตัวสกัด	111
ตาราง ข.38 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหยาบ (1) และสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน (2) โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวสกัด	113
ตาราง ข.39 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์	113
ตาราง ข.40 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าแอกติวิตีจำเพาะของสารสกัดเอนไซม์	114
ตาราง ค.41 ค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำของยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 24OPs และกลุ่ม 7CAs	114
ตาราง ค.42 ค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วเขียวของยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 24OPs และกลุ่ม 7CAs	115

ตาราง ค.43 ค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจาก ถั่วแดงของยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 24OPs และกลุ่ม 7CAs	116
ตาราง ง.44 ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (I (%)) ของยา ฆ่าแมลงมาตรฐานผสมกลุ่ม 24OPs และ 7CAs.....	118
ตาราง ง.45 ระดับร้อยละยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (I (%)) จากสมการถดถอย.....	118
ตาราง ง.46 ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (I (%)) ของยา ฆ่าแมลงมาตรฐานผสมกลุ่ม 24OPs และ 7CAs ของสารสกัด	119
ตาราง ง.47 ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (I (%)) ของยา ฆ่าแมลงมาตรฐานกลุ่ม 24OPs และ 7CAs ของสารสกัดแอปเปิ้ล ตามค่าดีฟอลต์ลิมิต (default limit).....	120
ตาราง ง.48 ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (I (%)) ของยา ฆ่าแมลงมาตรฐานผสมกลุ่ม 24OPs และ 7CAs ของสารสกัด	121
ตาราง ง.49 ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (I (%)) ของยา ฆ่าแมลงมาตรฐานผสมกลุ่ม 24OPs และ 7CAs ของสารสกัดผักกาดหอมที่จากค่า IC ₁₀ จากสมการ ถดถอย	122
ตาราง ง.50 ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (I (%)) ของยา ฆ่าแมลงมาตรฐานกลุ่ม 24OPs และ 7CAs ของสารสกัดผักกาดหอมตามค่าดีฟอลต์ลิมิต (default limit).....	123
ตาราง ง.51 ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (I (%)) ของยา ฆ่าแมลงมาตรฐานผสมกลุ่ม 24OPs และ 7CAs ของสารสกัดผักกาดหอมตามค่า LOD ของเครื่อง GC-FPD+ และเครื่อง HPLC-FLD.....	124
ตาราง จ.52 ค่าความแปรปรวนของค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของจากถั่วดำระหว่างการเก็บรักษา	126
ตาราง จ.53 การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ของค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์จากถั่ว ดำระหว่างการเก็บรักษา 60 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....	127
ตาราง ฉ.54 ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสของยาฆ่าแมลง มาตรฐาน กลุ่ม OPs 24 ชนิด ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ สารสกัดผักกาดหอม และสารสกัด	129

ตาราง ฉ.55 ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสของยาฆ่าแมลง
มาตรฐาน กลุ่ม CAS 7 ชนิด ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ สารสกัดผักกาดหอม และสารสกัดแอป
เปิ้ล..... 130



สารบัญภาพประกอบ

	หน้า
ภาพประกอบ 2.1 กลไกปฏิกิริยาของเอนไซม์เอสเทอร์เรส	10
ภาพประกอบ 2.2 หลักแนวคิดกระบวนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	20
ภาพประกอบ 3 การปั่นตกตะกอน (Centrifugation) (1) การปั่นตกตะกอนแบบแยกส่วนที่ละชั้น (differential centrifugation), (2) การปั่นตกตะกอนแบบอาศัยสารตัวกลางที่มีความหนาแน่นไล่ระดับ(density gradient centrifugation)	22
ภาพประกอบ 2.4 ไดอะไลซิส (Dialysis)	24
ภาพประกอบ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน	29
ภาพประกอบ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มไพรีทรอยด์ (A) และสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ (B)	30
ภาพประกอบ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (I) และกลุ่มคาร์บาเมต (II) ...	30
ภาพประกอบ 2.8 กลไกการยับยั้งปฏิกิริยาของยาฆ่าแมลง กลุ่มคาร์บาเมต (A) และกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (B).....	34
ภาพประกอบ 4.9 ผลผลิตสารสกัดจากตัวอย่างพืชหลังทำปฏิกิริยากับเอนไซม์หยาบ (crude enzyme).....	50
ภาพประกอบ 4.10 กราฟมาตรฐาน α -naphthol.....	50
ภาพประกอบ 4.11 กลไกปฏิกิริยาของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรส.....	52
ภาพประกอบ 4.12 การแยกชั้นของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสหยาบที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....	53
ภาพประกอบ 4.13 การยับยั้งการทำงานของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำ ถั่วแดง และ ถั่วเขียวโดยยาฆ่าแมลงมาตรฐานผสม กลุ่ม OPs 24 ชนิด	61
ภาพประกอบ 4.14 การยับยั้งการทำงานของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำ ถั่วแดง และ ถั่วเขียวโดยยาฆ่าแมลงมาตรฐานผสม กลุ่ม CAs 7 ชนิด	61
ภาพประกอบ 4.15 กลไกการยับยั้งปฏิกิริยาของสารกลุ่ม CAs (1) และสารกลุ่ม OPs (2).....	62

ภาพประกอบ 4.16 ตัวอย่างสารสกัดผักกาดหอม (สีเขียว) และสารสกัดแอปเปิ้ล (ใส) ก่อน (1) และ
 หลัง (2) การ clean up ด้วย dispersive-SPE และหลังระเหยแห้งและปรับปริมาตรด้วยสารละลาย
 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (3) 64

ภาพประกอบ 4.17 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ I (%) และ
 ความเข้มข้นยาฆ่าแมลง มาตรฐานกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ในตัวอย่างสารสกัดแอปเปิ้ล..... 65

ภาพประกอบ 4.18 ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสของยาฆ่า
 แมลงมาตรฐานแยกชนิด ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PB) สารสกัดแอปเปิ้ล (Apple) และสาร
 สกัดผักกาดหอม (Lettuce) 68

ภาพประกอบ 4.19 ปฏิบัติการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสของ ยาฆ่า
 แมลง มาตรฐาน กลุ่ม OPs 69

ภาพประกอบ 4.20 ปฏิบัติการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสของ ยาฆ่า
 แมลง มาตรฐาน กลุ่ม CAs..... 70

ภาพประกอบ 4.21 ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำ
 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 วัน 71

ภาพประกอบ 4.22 ผลของปฏิบัติการปรับเปลี่ยนสารและสภาวะของชุดทดสอบ B ให้มีเหมาะสม
 กับสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำที่ศึกษา..... 78



บทที่ 1

บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

ในทุกวันนี้ประชากรโลกมีแนวโน้มต้องการอาหารเพิ่มระดับที่สูงขึ้น ดังนั้นเพื่อผลผลิตที่เพิ่มสูงขึ้น เกษตรกรจึงมีการใช้ยาฆ่าแมลงอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้เพื่อควบคุม ป้องกันผลิตผลทางการเกษตรจากศัตรูพืช ยาฆ่าแมลงที่เกษตรกรนิยมนำมาใช้ คือ ยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphates; OPs) และคาร์บาเมต (carbamates; CAs) ถึงแม้ว่าสารเหล่านี้จะมีประโยชน์ในการควบคุม ป้องกันและกำจัดแมลงศัตรูพืช แต่ในขณะเดียวกันก็มีโทษต่อสุขภาพของเกษตรกรผู้ใช้ ผู้บริโภค และพบว่ามีผลต่อสุขภาพของปศุสัตว์ด้วยเช่นกัน (Pimsen et al. 2014) ในขณะที่การปนเปื้อนสะสมของยาฆ่าแมลงในสิ่งแวดล้อม และการตกค้างของยาฆ่าแมลงในผลิตผลทางการเกษตร ในระยะการเพาะปลูกและระยะหลังจากเก็บเกี่ยว ยังมีการรายงานพบอย่างต่อเนื่อง (Nieto García et al. 2015) เพราะฉะนั้นการควบคุมการใช้และการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงที่ตกค้างในผลิตผลทางการเกษตรและสิ่งแวดล้อม เพื่อป้องกันอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง (Li et al. 2009; Yang et al. 2013) จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น หลายหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เช่น องค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Codex alimentarius commission of the food and agriculture organization of the united nations; FAO) องค์การอนามัยโลก (World health organization; WHO) จึงได้กำหนดค่าปริมาณยาฆ่าแมลงตกค้างสูงสุดในพืชและผลิตผลทางการเกษตร (Maximum levels of pesticide residues; MRLs) เพื่อป้องกันอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ที่จะเกิดจากยาฆ่าแมลง (Ben Oujji et al. 2013)

การตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงในปัจจุบันจะใช้หลักการโครมาโตกราฟี โดยจะเชื่อมต่อกับเครื่องตรวจวัดหลากหลายชนิดที่มีความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหาร พืช และผลิตผลทางการเกษตร ตัวอย่างเช่น เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography ;GC) และเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography; HPLC) ที่ต่อกับเครื่องตรวจวัดชนิดต่างๆ เช่น GC-Electron capture detector (GC-ECD) GC-Flame photometric detector (GC-FPD) GC-Tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) HPLC-fluorescence detector (HPLC-FLD) HPLC-mass spectrometry (LC-MS) และ LC-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) เป็นต้น (Jin et al. 2012; Lin, Xue, and Song 2010; Miao et al. 2013; Song et al. 2014; Yang et al. 2013) ถึงแม้ว่าเทคนิคดังกล่าวจะมีความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณที่มี

ขีดจำกัดของการวัดในระดับที่ต่ำ (Low limits of detection; LLOD) แต่เครื่องมือดังกล่าวทั้งหมดก็มีข้อเสีย คือ ราคาแพง ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน เทคนิคแต่ละขั้นตอนของการตรวจวิเคราะห์มีความยุ่งยากและซับซ้อน บุคลากรที่จะใช้เครื่องมือต้องผ่านการฝึกอบรมอย่างชำนาญจึงจะสามารถดำเนินการตรวจวิเคราะห์ได้ การตรวจวิเคราะห์ที่ใช้สารเคมีในปริมาณสูงใน และไม่สามารถนำเครื่องมือออกมาใช้ในภาคสนามได้ (Chauhan, Narang, and Pundir 2011; Wang et al. 2012) ด้วยเหตุผลนี้ การตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้างด้วยวิธีการทางชีวภาพจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เพราะกระบวนการวิเคราะห์รวดเร็ว ง่าย ราคาถูก มีความไว และสะดวกกว่าการตรวจวิเคราะห์แบบวิธีดั้งเดิม (Li et al. 2019; Ben Oujji et al. 2013)

ในปัจจุบัน การตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้าง กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphates; OPs) และกลุ่มคาร์บาเมต (carbamates; CAs) ด้วยวิธีการทางชีวภาพได้รับการพัฒนาขึ้นมา โดยใช้หลักการทำงานของเอนไซม์ 3 รูปแบบ คือ 1) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase; AChE) 2) การใช้เอนไซม์ย่อยสลายสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate hydrolytic enzyme) และ 3) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากพืช (Plant carboxylesterase) ยกตัวอย่าง เช่น เอนไซม์ไบโอเซนเซอร์ (enzymatic biosensors) เครื่องวัดความเข้มแสง (photometer) หรือในรูปแบบอื่นๆ (Amine et al. 2016; Li et al. 2009) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ไบโอเซนเซอร์จากเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสเป็นที่รู้จักและมีการใช้งานอย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้ เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสที่นำประยุกต์มาใช้งานทางชีวภาพนั้น ได้จากการสกัดเนื้อเยื่อหรือเลือดของสิ่งมีชีวิต ซึ่งมีกระบวนการและขั้นตอนการสกัดที่ยุ่งยากซับซ้อนและยังมีข้อจำกัดในการใช้งาน ดังนั้นนักวิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาเอนไซม์เอสเตอเรสจากแหล่งอื่นๆ เพื่อนำมาทดแทนเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (AChE) ที่มีข้อจำกัดดังกล่าวข้างต้น (Li et al. 2019; Yang et al. 2010)

เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากพืช (plant carboxylesterase; EC 3.1.1.1) หรือเรียกว่า ไฟโตเอสเตอเรส (phytoesterase) จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ไฮโดรเลส (EC 3.1.1.X) โดยกลไกการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะย่อยสลายพันธะเอสเตอเรสและยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพ จึงได้รับความสนใจจากนักวิจัยอย่างมาก เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสสามารถพบได้ในพืชหลากหลายชนิด เช่น ข้าวสาลีและผลิตภัณฑ์ ข้าว ถั่วเหลือง งา (Hou et al. 2012; Wang et al. 2012; Xu et al. 2005) เมล็ดสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) (Subramani, Manjunath, et al. 2012) ยางจากต้น African milk bush (*Synadenium grantii* Hook) (Govindappa et al. 1987) เมล็ดตำแย (*Mucuna pruriens*) (Chandrashekharaiah, Ramachandra S, and Siddalinga, M 2011) เห็ดหูหนู (*Sparassis crispa*) (Chandrasekaran, Kim, and Shin 2011) ถั่วแดงหลวง

(*Phaseolus vulgaris* L.) (Ali et al. 2013) เมล็ดข้าเกลือต (*Caesalpinia mimosoides*) (Bhavith K P et al. 2014) เมล็ดฟักทองอเมริกัน (*Cucurbita pepo* cv.) (Fahmy et al. 2008) เมล็ดมะขาม (*Tamrindus indica*) (Kantharaju and Murthy 2014) กิ่ว (*Actinidia eriantha*) (Ileperuma et al. 2007) มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) (Stuhlfelder, Lottspeich, and Mueller 2002) แอปเปิ้ล (*Malus x domestica*) (Souleyre et al. 2011) ตลอดจนสัตว์และจุลินทรีย์บางชนิด (Bornscheuer 2002) ปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากพืชอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร ยา เครื่องสำอาง และยังใช้ในกระบวนการขจัดสารพิษ (detoxification) ในงานเคมีทางการเกษตรอีกด้วย ยิ่งไปกว่านั้นเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากพืชยังแสดงคุณสมบัติ regiospecificity และ stereospecificity ค่อนข้างสูงจึงทำให้เป็นตัวเร่งทางชีวภาพที่มีความจำเพาะต่อผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูงในกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี จากคุณสมบัติดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากพืชสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ได้เช่นเดียวกับเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสที่ได้จากสัตว์ และเนื่องด้วยแหล่งที่มาของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากพืชมีหลากหลายจึงเป็นวัสดุทางเลือกอีกชนิดหนึ่งในการนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้างโดยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Hou et al. 2012; Wang et al. 2012; Yang et al. 2010) อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่การศึกษาเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากพืชในการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้างยังมีปริมาณน้อย

1.2 ความมุ่งหมายของการวิจัย

1.2.1 เพื่อสกัดและศึกษากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากตัวอย่างพืชที่ศึกษา

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphates; OPs) และกลุ่มคาร์บาเมต (Carbamates; CAs) ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากตัวอย่างพืชที่ศึกษา

1.2.3 เพื่อศึกษาความไว (sensitivity) และขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ (Limits of detections; LOD) ยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากตัวอย่างพืชที่ศึกษา

1.2.4 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ระหว่างเอนไซม์ทางการค้าและเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากตัวอย่างพืชที่ศึกษา

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1.3.1 เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากตัวอย่างพืชที่ศึกษาต่างชนิดกันจะมีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์และถูกยับยั้งการทำงานจากยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และ CAs ได้แตกต่างกัน

1.3.2 เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากตัวอย่างพืชที่ศึกษาและเอนไซม์ทางการค้าสามารถใช้เป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ได้ไม่แตกต่างกัน

1.4 ความสำคัญของการวิจัย

ได้เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากตัวอย่างพืชที่ศึกษาสามารถนำมาใช้เป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs

1.5 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1) การคัดเลือกตัวอย่างพืชที่มีความไว (Sensitivity) สูงที่สุด ในการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs

ส่วนที่ 2) การศึกษาการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากตัวอย่างพืชที่ศึกษา

โดยขอบเขตการศึกษามี ดังนี้

1.5.1 ตัวอย่างพืชที่นำมาสกัดและศึกษากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

เมล็ดธัญพืช ได้แก่ ถั่วเหลือง (*Glycine max* L.), ถั่วแดงหลวง (*Phaseolus vulgaris* L.), ถั่วดำ (*Phaseolus mungo*), ถั่วเขียว (*Vigna radidate*), ถั่วลิสง (*Aracluis hyogaea*), งา (*Sesamum indicum*), ถั่วแดง (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi, ลูกเดือย (*Coix lacryma-jobi* L.) และ ข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare* L.)

แป้งจากธัญพืช ได้แก่ แป้งสาลี (*Triticuma cevitum* L.) และ แป้งข้าวโพด (*Zea mays*)

1.5.2 ยาฆ่าแมลงมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบอยู่ในขอบเขตการตรวจวิเคราะห์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข คือ กลุ่ม OPs 24 สาร และ กลุ่ม CAs 7 สาร คือ

กลุ่ม OPs ประกอบด้วย acephate, azinphos-methyl, chlorpyrifos, dichlorvos, diazinon, dicrotophos, dimethoate, EPN, ethion, methamidophos, methidathion, mevinphos, monocrotophos, omethoate, parathion, parathion-methyl, phosalone, pirimiphos-methyl, profenophos, prothiophos และ triazophos

กลุ่ม CAs ประกอบไปด้วย aldicarb, carbaryl, carbofuran, 3-OH carbofuran, methiocarb, methomyl และ oxamyl

1.5.3 การทำเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน ด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 60% และการทำไดอะไลซิส

1.5.4 วิธีมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้างในตัวอย่างผักสดเป็นวิธีการของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กลุ่ม OPs วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GC-FPD⁺ และกลุ่ม CAs วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-post column derivatization-fluorescence detector

1.5.5 ชุดทดสอบยาฆ่าแมลงตกค้างทางการค้าที่ศึกษา 4 ชุดทดสอบ

1.5.6 สกัดตัวอย่างผักสดสำหรับตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม OPs ด้วยวิธี Modified QuEChRS และกลุ่ม CAs ด้วยวิธี SPE

1.5.7 ประเมินประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม OPs และ CAs ในตัวอย่างผักสดระหว่างวิธีการยั่งย้งการทำงานของเอนไซม์เทียบกับวิธีมาตรฐาน ใช้วิธีอ้างอิงจาก National Association of Testing Authorities (NATA); General Accreditation Guidance-Validation and verification of quantitative and qualitative test methods, January 2018

1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ

1.6.1 ดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลง หมายถึง การใช้เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้าง

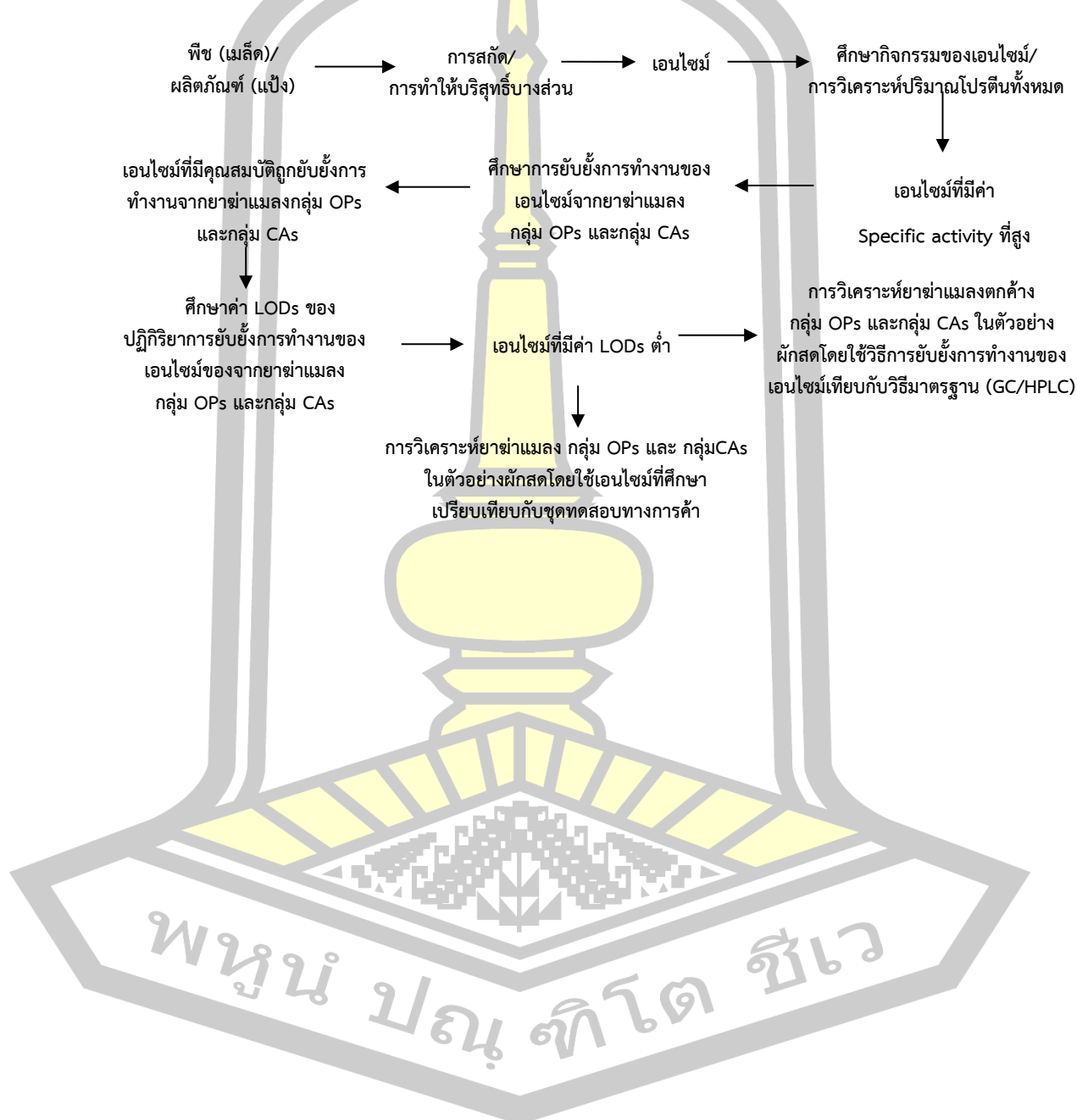
1.6.2 สารสกัดเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน (Partially purified enzymes) หมายถึง สารสกัดเอนไซม์เบื้องต้นที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 60% และการทำไดอะไลซิสก่อนนำไปศึกษา

1.6.3 กิจกรรมเอนไซม์ (Enzyme activity) หมายถึง กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส 1 หน่วยของเอนไซม์ที่เปลี่ยนสารตั้งต้น (α -naphthyl acetate) ไปเป็นผลิตภัณฑ์ (α -naphthol) ปริมาณ 1 ไมโครโมล (μ mol) ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่กำหนด

1.6.4 กิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ (Enzyme specific activity) หมายถึง ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส 1 หน่วยของเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีนรวมของสารสกัดเอนไซม์

1.6.5 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (limits of detection; LOD) หมายถึง ค่าความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสได้

1.7 กรอบการวิจัย



บทที่ 2

ปริทัศน์เอกสารข้อมูล

2.1 เอนไซม์เอสเตอเรส

เอนไซม์เอสเตอเรส (Esterases: EC 3.1.1.x) เป็นเอนไซม์ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส สามารถทำปฏิกิริยาร้างหรือสลายพันธะได้หลากหลายชนิด และความสำคัญอย่างยิ่งในกระบวนการทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิต โดยสามารถพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น มนุษย์ พืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ ปัจจุบันการศึกษาเอนไซม์เอสเตอเรสมืออย่างกว้างขวาง ซึ่งนักวิจัยจึงสามารถค้นพบและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ดังกล่าวได้เป็นจำนวนมาก จึงได้มีการจัดจำแนกประเภทของเอนไซม์ที่ค้นพบ โดยใช้หลักการการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังกล่าวมาใช้ในการจัดจำแนกชนิดของเอนไซม์

2.1.1 การจำแนกประเภทเอนไซม์เอสเตอเรส

2.1.1.1 การจำแนกประเภทเอนไซม์เอสเตอเรสตามหมวดหมู่และระบบเลขรหัส (Enzyme Commission number, EC number)

สมาคมชีวเคมีและอณูชีววิทยานานาชาติ (International Union of Biochemistry and Molecular Biology; IUBMB) ได้จัดประเภทของเอนไซม์เอสเตอเรสตามหมวดหมู่และระบบเลขรหัส (Enzyme Commission number, EC number) ดังนี้

EC 3 เป็นเอนไซม์ไฮโดรเลส ที่ทำหน้าที่เร่งกระบวนการไฮโดรไลซิส หรือการเติมน้ำเข้าไปในการเร่งปฏิกิริยา

EC 3.1 เป็นเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยาไฮโดรเลสกับพันธะเอสเทอร์ (ester bond) เช่น เอนไซม์เอสเตอเรส เอนไซม์ไลเปส เอนไซม์นิวคลีเอส เป็นต้น

EC 3.1.1.X เป็นเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยาไฮโดรเลสกับหมู่คาร์บอกซิลของพันธะเอสเทอร์ (carboxylic ester bond) โดยเอนไซม์เอสเตอเรสสามารถจำแนกได้หลากหลายชนิด ตามประเภทของสารตั้งต้นที่ทำปฏิกิริยา เช่น

Carboxylesterase (EC 3.1.1.1) เป็นเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยาไฮโดรเลสกับหมู่คาร์บอกซิลิกเอสเทอร์ (carboxylic ester) ได้แอลกอฮอล์กับคาร์บอกซิเตทเป็นสารผลิตภัณฑ์

Arylesterase หรือ Paraoxonase (EC 3.1.1.2) เป็นเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยาไฮโดรเลสกับหมู่ฟีนิลอะซิเตท (phenyl acetate) ได้ฟีนอลกับอะซิเลทเป็นสารผลิตภัณฑ์

Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) เป็นเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยาไฮโดรเลสกับหมู่อะซิติลโคลีน (acetylcholine) ได้โคลีนกับอะซิเลทเป็นสารผลิตภัณฑ์

Cholinesterase หรือ Butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8) เป็นเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยาไฮโดรเลสกับหมู่อะซิติลโคลีน (acetylcholine) ได้โคลีนคาร์บอกซิเลทเป็นสารผลิตภัณฑ์

Cholinesterase หรือ Butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8) เป็นเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยาไฮโดรเลสกับหมู่อะซิติลโคลีน (acetylcholine) ได้โคลีนคาร์บอกซิเลทเป็นสารผลิตภัณฑ์

2.1.1.2 การจำแนกประเภทเอนไซม์เอสเทอร์เลสตามปฏิกิริยาของเอนไซม์ จำแนกตามปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะ (specific substrate)

การทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์เอสเทอร์เลสกับสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะสามารถจำแนกเอนไซม์ได้ 2 กลุ่ม คือ

1. เอนไซม์อัลฟาเอสเทอร์เลส (α -Est) เป็นเอนไซม์เอสเทอร์เลสที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น α -naphthyl acetate เช่น Carboxylesterase (EC 3.1.1.1)

2. เอนไซม์เบต้าเอสเทอร์เลส (β -Est) คือ เอนไซม์เอสเทอร์เลสที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น β -naphthyl acetate เช่น Arylesterase (E.C 3.1.1.2)

จำแนกตามปฏิกิริยาการถูกยับยั้งการทำงาน (enzyme inhibition)

การทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์เอสเทอร์เลสกับยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphates; OPs) และกลุ่มคาร์บาเมต (Carbamate; CAs) สามารถจำแนกเอนไซม์ได้ 3 กลุ่ม ดังนี้

1. เอนไซม์เอสเทอร์เลส A หรือ เอนไซม์อริลเอสเทอร์เลส (Esterases A; Est-A; Arylesterase enzyme) เป็นเอนไซม์เอสเทอร์เลสที่ถูกสลายตัวด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โดยยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และ กลุ่ม CAs เช่น Arylesterase (E.C 3.1.1.2)

2. เอนไซม์เอสเทอร์เลส B หรือ เอนไซม์อัลลิเอสเทอร์เลส (Esterases B; Est-B; Aliesterase enzyme) เป็นเอนไซม์เอสเทอร์เลสที่ถูกยับยั้งปฏิกิริยา (inhibition) โดยยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และ กลุ่ม CAs เช่น Carboxylesterase (EC 3.1.1.1) Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7), และ Cholinesterase (EC 3.1.1.8)

3. เอนไซม์เอสเทอร์เลส C คือ เอนไซม์เอสเทอร์เลสที่ไม่ทำปฏิกิริยากับยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และ กลุ่ม CAs เช่น Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.6) (Balen et al. 2004; Barata, Solayan, and Porte 2004; Christian 2006; Gershater and Edwards 2007;

Montella, Schama, and Valle 2012; Ochoa et al. 2013; Satoh and Hosokawa 2006; วารุณี จิตอารี 2007)

นอกจากนี้ Carvalho et al. 2003 Chandrasekaran et al. 2011 Radić and Pevalek-Kozlina 2010 และ Syros et al. 2005 ได้จำแนกเอนไซม์เอสเทอร์เลสโดยใช้เกณฑ์การทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะและสารที่มีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ควบคู่กัน โดยสามารถจำแนกเอนไซม์ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

1. เอนไซม์คาบออกซิลเอสเทอร์เลส (Carboxylesterases; EC 3.1.1.1 หรือ Carboxyl ester hydrolase) คือ เอนไซม์เอสเทอร์เลสที่ถูกยับยั้งปฏิกิริยาโดยยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และ CAs เอนไซม์กลุ่มนี้มีความจำเพาะกับสารอะลิฟาติกเอสเทอร์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไขมันที่มีสายยาวมากกว่าสารกลุ่มอะซิเตท

2. เอนไซม์อาริลเอสเทอร์เลส (Arylesterases; EC 3.1.1.2 หรือ Aryl ester hydrolase) คือ เอนไซม์เอสเทอร์เลสที่สามารถไฮโดรไลซิสยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs ถูกยับยั้งปฏิกิริยาโดยสารกลุ่มซัลไฟไทรล (sulfhydryl inhibitors) และมีความจำเพาะสารตั้งต้นกลุ่มอะโรมาติกแอลกอฮอล์

3. เอนไซม์อะซิติกเอสเทอร์เลส (Acetylerases; EC 3.1.1.6 หรือ acetic ester/acetyl esterase) เป็นเอนไซม์ที่ไม่ถูกยับยั้งปฏิกิริยาโดยสารตัวยับยั้งเอนไซม์ใดๆ และมีความจำเพาะสารตั้งต้นกลุ่มอะซิติก

4. เอนไซม์โคลีนเอสเทอร์เลส เอนไซม์กลุ่มนี้จะมีอัตราการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของโคลีนเอสเทอร์สูงกว่าสารอะลิฟาติกและอะโรมาติกเอสเทอร์ และยังถูกยับยั้งปฏิกิริยาโดยยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และ CAs เอนไซม์โคลีนเอสเทอร์เลส จำแนกเป็น 2 ชนิด คือ

4.1 เอนไซม์อะซิติกโคลีนเอสเทอร์เลส (Acetylcholinesterase; EC 3.1.1.7) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะกับอะซิติกโคลีน

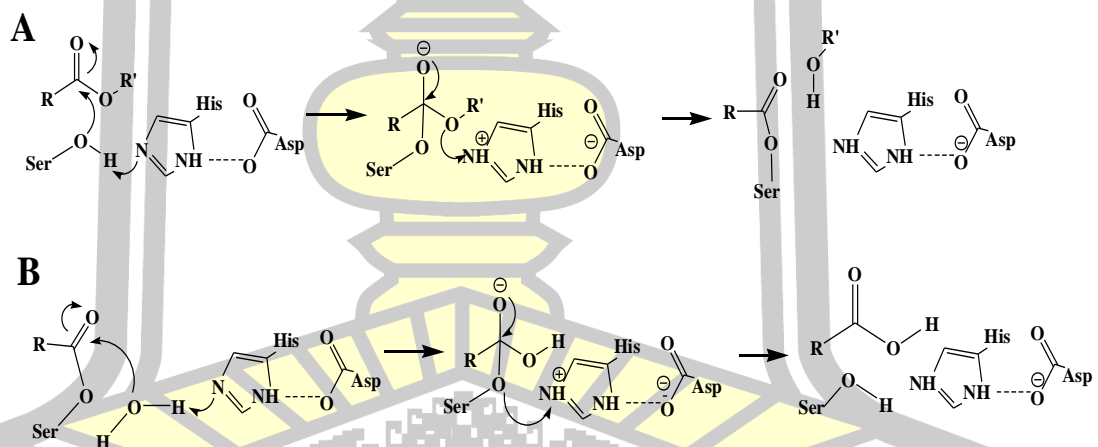
4.2 เอนไซม์โคลีนเอสเทอร์เลส (Cholinesterase; EC 3.1.1.8) บางครั้งอาจเรียกว่า ซูโดโคลีนเอสเทอร์เลส (pseudocholin esterase) เป็นเอนไซม์ที่โคลีนเอสเทอร์เลสไม่จำเพาะกับอะซิติกโคลีน หรือเรียกว่า butyrylcholinesterase

2.1.2 กลไกปฏิกิริยาและฤทธิ์ทางชีวภาพของเอนไซม์เอสเตอร์เลส

กลไกการทำงานของเอนไซม์เอสเตอร์เลสจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยการทำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์เอสเตอร์เลสจะขึ้นอยู่กับกรดอะมิโนที่อยู่บนเอนไซม์ที่เป็นกลุ่มนิวคลีโอไฟล์ (กรดอะมิโนเซอรีน กรดอะมิโนซีทีอื่น กรดแอสพาราเทต), กรดอะมิโนฮิสทีดีน และส่วนที่เป็นกรดในโมเลกุลของเอนไซม์เอสเตอร์เลส (กรดอะมิโนแอสพาราเทต กรดอะมิโนกลูตาเมต) โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาจะแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ (Romano et al. 2015; Souleyre et al. 2011; Viteček et al. 2007)

ขั้นตอนที่ 1) การปฏิกิริยาอะซิลเลชันของสารประกอบเอสเตอร์ โดยกรดอะมิโนเซอรีนซึ่งเป็นนิวคลีโอไฟล์จะเข้าทำปฏิกิริยาที่คาร์บอนอะตอมของหมู่คาร์บอนิลของสารตั้งต้น (carboxyl ester) สลายตัวหมู่ให้แอลกอฮอล์และสารมัธยันตร์ อะซิลเลต เอนไซม์-สับสเตรท (acylated enzyme-substrate intermediate)

ขั้นตอนที่ 2) เริ่มจากหมู่นิวคลีโอไฟล์ของโมเลกุลน้ำเข้าไปทำปฏิกิริยาที่อะตอมของคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลของสารมัธยันตร์ อะซิลเลต เอนไซม์-สับสเตรท แล้วปลดปล่อยกรดออกมาจากปฏิกิริยา (ภาพประกอบ 2.1)



ภาพประกอบ 2.1 กลไกปฏิกิริยาของเอนไซม์เอสเตอร์เลส
ที่มา: Christian 2006

เอนไซม์เอสเตอร์เลสเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำปฏิกิริยาการสร้างหรือสลายพันธะได้หลากหลายชนิดจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในกระบวนการทางชีวภาพต่อสิ่งมีชีวิต จากการศึกษาพบว่า

เอนไซม์เอสเตอเรสส์มีหลากหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการชีวภาพของสิ่งมีชีวิต โดยเอนไซม์เอสเตอเรสส์ที่นักวิจัยนิยมศึกษา คือ

เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสส์ (Carboxylesterases; EC 3.1.1.1) เอนไซม์ชนิดนี้ จะทำงานโดยการสลายสารประกอบกลุ่มคาร์บอกซิลิกเอสเตอเรสส์ในร่างกายให้สลายตัวเป็นแอลกอฮอล์ และกรดคาร์บอกซิลิก เพื่อช่วยในการขจัดหรือสลายสารพิษในร่างกาย เช่น ยาฆ่าแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์ ยาแก้ปวดประสาท (heroin, cocaine, meperidine และ lidocaine) ช่วยกระตุ้นการทำงานของยา prodrugs (temocapril, cilaprazil, quinapril) และยาด้านเนื้องอก (irinotecan และ capecitabin) (Dandan et al. 2018; Hatfield et al. 2010; Lamego et al. 2015) สำหรับการศึกษาเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสส์ในพืชพบว่า มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการทางชีวภาพในพืชโดยที่เกี่ยวข้องกับการทำงานกระบวนการพัฒนาและการเจริญเติบโตของพืช เช่น กระตุ้นการทำงานของโมเลกุลสัญญาณ (signaling molecule) กระบวนการสืบพันธุ์ การสุกของผลไม้ การเจริญเติบโตของเซลล์ การจำกัดหรือการสลายสารพิษ การทำงานของปากใบ การควบคุมกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เอนไซม์นี้ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และ สารทุติยภูมิในพืชอีกด้วย (Bhavith K P et al. 2014; Chandrashekharaiyah et al. 2011; Gershtater and Edwards 2007; Kantharaju and Murthy 2014; Ross et al. 2010; Yang et al. 2013)

เอนไซม์อาร์ลเอสเตอเรสส์ (Arylesterases หรือ Paraoxonase, EC 3.1.1.2) เป็นเอนไซม์เอสเตอเรสส์ที่มีความสามารถในการสลายยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs ที่เข้าสู่ร่างกายและมีความเป็นพิษให้อยู่ในรูปที่ไม่เป็นพิษและกำจัดออกจากร่างกายได้

เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสส์ (Acetylcholinesterase, AChE; EC 3.1.1.7) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการสลายสารอะซิติลโคลีน ซึ่งเป็นสื่อประสาท (neurotransmission) ที่ปลายเส้นประสาท ทำให้ไม่เกิดการสะสมของสารสื่อประสาทอะซิติลโคลีนที่ปลายประสาท (Cunha et al. 2013; วารุณี จิตอารี 2007)

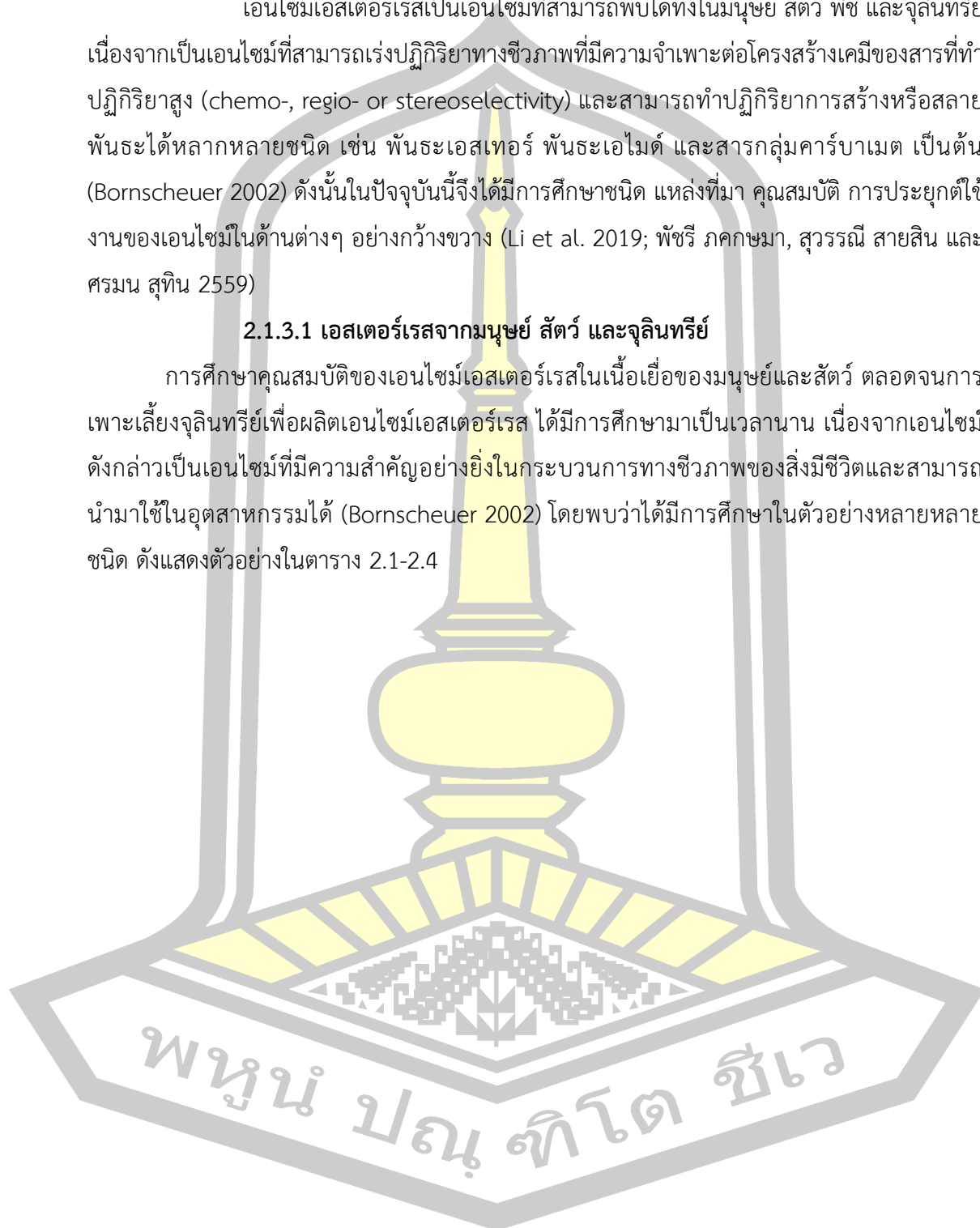
จากการศึกษาพบว่ายาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และ กลุ่ม CAs สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสส์ และเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสส์ได้ ดังนั้นจึงสามารถประยุกต์ใช้หลักการนี้มาใช้ในการตรวจคัดกรองยาฆ่าแมลงกลุ่มดังกล่าวในเลือด พืช ผัก และผลไม้ได้ (พัชรี ภคขมา, สุวรรณีย์ สายสิน และ ครมณ สุทิน 2559)

2.1.3 แหล่งของเอนไซม์เอสเทอร์เรส

เอนไซม์เอสเทอร์เรสเป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ทั้งในมนุษย์ สัตว์ พืช และจุลินทรีย์ เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่มีความจำเพาะต่อโครงสร้างเคมีของสารที่ทำปฏิกิริยาสูง (chemo-, regio- or stereoselectivity) และสามารถทำปฏิกิริยาการสร้างหรือสลายพันธะได้หลากหลายชนิด เช่น พันธะเอสเทอร์ พันธะเอไมด์ และสารกลุ่มคาร์บาเมต เป็นต้น (Bornscheuer 2002) ดังนั้นในปัจจุบันนี้จึงได้มีการศึกษาชนิด แหล่งที่มา คุณสมบัติ การประยุกต์ใช้งานของเอนไซม์ในด้านต่างๆ อย่างกว้างขวาง (Li et al. 2019; พัชรี ภคกษมา, สุวรรณีย์ สายสิน และศรมน สุทิน 2559)

2.1.3.1 เอสเทอร์เรสจากมนุษย์ สัตว์ และจุลินทรีย์

การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เอสเทอร์เรสในเนื้อเยื่อของมนุษย์และสัตว์ ตลอดจนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์เอสเทอร์เรส ได้มีการศึกษามาเป็นเวลานาน เนื่องจากเอนไซม์ดังกล่าวเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในกระบวนการทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตและสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมได้ (Bornscheuer 2002) โดยพบว่าได้มีการศึกษาในตัวอย่างหลากหลายชนิด ดังแสดงตัวอย่างในตาราง 2.1-2.4



ตาราง 2.1 เอนไซม์เอสเตอเรสจากมนุษย์ สัตว์ และจุลินทรีย์

แหล่งของเอนไซม์	ชนิดของเอนไซม์ที่ศึกษา	วัตถุประสงค์ของการศึกษา	อ้างอิง
มนุษย์	เนือเยื่อ	คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (CES1, CES2)	Dandan et al. 2018
	เซลล์ไขมันเนื้องอก	คาร์บอกซิลเอสเตอเรส, อะซิติกโกลิตินเอสเตอเรส	Espinoza et al. 2016
	เซลล์ฮีปาทิน เซลล์ตับ และเซลล์ไต	บิวเทอริลเอสเตอเรส	ทำงานของเอนไซม์จากยาฆ่าแมลง azinphos-methyl และ chlorpyrifos
	เซลล์ตับ	คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (hCES2)	ศึกษาเปรียบเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์จากเซลล์ต่างชนิดกัน
		คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (hICE (CES2), hCE1 (CES1))	ศึกษาเปรียบเทียบกับกิจกรรมการสลายโคเคนและเฮโรอีนของเอนไซม์
สัตว์	ตั๊กแตน (<i>Locusta migratoria</i>)	คาร์บอกซิลเอสเตอเรส	ศึกษาเอนไซม์ที่ผลิตต่อการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ในการกำจัดยาฆ่าแมลง
	แมลงทางหนับ (<i>Foylea auricularia</i>)	คาร์บอกซิลเอสเตอเรส, อะซิติกโกลิตินเอสเตอเรส	ศึกษากิจกรรมการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากยาฆ่าแมลง กลุ่ม OPs และ CAs
	หอยนางรม (<i>Crassostrea gigas</i>)	คาร์บอกซิลเอสเตอเรส, อะซิติกโกลิตินเอสเตอเรส	ศึกษาการใช้เอนไซม์สำหรับการตรวจวัดมลพิษจากการปนเปื้อนของยาฆ่าแมลงบริเวณชายฝั่งทะเล

ตาราง 2.2 เอนไซม์เอสเตอเรสจากมนุษย์ สัตว์ และจุลินทรีย์ (ต่อ)

แหล่งของเอนไซม์	ชนิดของเอนไซม์ที่ศึกษา	วัตถุประสงค์ของการศึกษา	อ้างอิง
หอยทาก (<i>Planorbarius corneus</i>)	คาร์บอกซิลเอสเตอเรส, อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส	ศึกษากิจกรรมการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากยาฆ่าแมลง azinphos-methyl และ chlorpyrifos	Cacciatore, Verrengia Guerrero, and Cohón 2013
หนอนกระทู้ (<i>Spodoptera litura</i>)	คาร์บอกซิลเอสเตอเรส	ศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์และการใช้ประโยชน์เอนไซม์ในการสลายยาฆ่าแมลง	Diao et al. 2013
หนอนไหม (<i>Bombyx mori</i>)	คาร์บอกซิลเอสเตอเรส	ศึกษาเอ็นทีมีผลต่อการควบคุมการทำงานของเอนไซม์	Gao et al. 2007
กิ้ง (<i>Palaeon serratus</i>)	อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส	ศึกษาการใช้เอนไซม์สำหรับการตรวจวัดการปนเปื้อนยาฆ่าแมลง บริเวณปากแม่น้ำ	Frasco et al. 2006
ตั๊กแตนโกลัดดา (<i>Locusta migratoria manilensis</i> (Meyen))	คาร์บอกซิลเอสเตอเรส	ศึกษาคุณลักษณะและการทำงานของเอนไซม์ต่อยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs	He, Ma, and Zhu 2004
เพลี้ยจักจั่น (<i>Nephotettix cincticeps</i> Uhler)	คาร์บอกซิลเอสเตอเรส	ศึกษากิจกรรมการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากยาฆ่าแมลง malathion, permethrin และ cypermethrin	Chiang and Sun 1996
หนอนไหม (<i>Bombyx mori</i>)	คาร์บอกซิลเอสเตอเรส	ศึกษาการการสกัด การคัดเลือกและการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	Siddalinga Murthy and Veerabhadrapa 1996

ตาราง 2.3 เอนไซม์เอสเตอเรสจากมนุษย์ สัตว์ และจุลินทรีย์ (ต่อ)

แหล่งของเอนไซม์	ชนิดของเอนไซม์ที่ศึกษา	วัตถุประสงค์ของการศึกษา	อ้างอิง
จุลินทรีย์	เอนไซม์เอสเตอเรส	ศึกษาการทำปฏิกิริยาเอสเตอเรสของเอนไซม์	Luo et al. 2015
<i>Fusarium</i> sp.	เอนไซม์เอสเตอเรส	ศึกษาประยุกต์เอนไซม์เอสเตอเรสสำหรับการทำ	Grawe et al. 2015
<i>Eupenicillium shearii</i> FREI-39	คาร์บอกซิลเอสเตอเรส	Electrochemical biosensor เพื่อตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง carbofuran	Killens-Cade et al. 2014
<i>Metallospora sedula</i> DSM5348	เอนไซม์เอสเตอเรส	ศึกษาเอนไซม์ของเอนไซม์	Shivashankar, B and Premkumari 2014
<i>Hypsizygus ulmarius</i>	คาร์บอกซิลเอสเตอเรส	ศึกษาโครงสร้างและเอกลักษณ์ทางชีวเคมีของเอนไซม์	Benavente et al. 2013
<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	คาร์บอกซิลเอสเตอเรส	ศึกษาการศึกษาเอกลักษณ์ของเอนไซม์	Wei et al. 2013
<i>Sulfolobus tokodaii</i>	เอนไซม์เอสเตอเรส	ศึกษาการศึกษาเอกลักษณ์ของเอนไซม์	Chandrasekaran, Kim, and Shin 2011
<i>Sparassis crispa</i>	เอนไซม์เอสเตอเรส	ศึกษาการทำปฏิกิริยาเอสเตอเรสของเอนไซม์	Kumar et al. 2012
<i>Rhodocus</i> sp. LKE-028 (MTCC5562)	คาร์บอกซิลเอสเตอเรส	ศึกษาการโคลนนิ่ง การทำปฏิกิริยา เอกลักษณ์ทางชีวเคมีของเอนไซม์	Zhai et al. 2012
<i>Ohrobactrum anthropi</i> YZ-1	เอนไซม์เอสเตอเรส	ศึกษาการทำปฏิกิริยาเอสเตอเรสของเอนไซม์	

ตาราง 2.4 เอนไซม์เอสเตอเรสจากมนุษย์ สัตว์ และจุลินทรีย์ (ต่อ)

แหล่งของเอนไซม์	ชนิดของเอนไซม์ที่ศึกษา	วัตถุประสงค์ของการศึกษา	อ้างอิง	
จุลินทรีย์ (ต่อ)	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	คาร์บอกซิลเอสเตอเรส	ศึกษาการทำปฏิกิริยา เอกลักขณณ์ของเอนไซม์ และการศึกษาแสดงออกของยีน	Park, Choi, and Lee 2006
	P1			
	<i>Clostridium stercorarium</i>	เอสเตอเรส	ศึกษาการทำปฏิกิริยา และเอกลักขณณ์ของเอนไซม์	Donaghy et al. 2000
	<i>Bacillus</i> sp. BP-7	คาร์บอกซิลเอสเตอเรส	ศึกษาการโคลนนิ่งและเอกลักขณณ์ของเอนไซม์	Prim, Pastor, and Diaz 2001
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	เอสเตอเรส	ศึกษาการทำปฏิกิริยาและคุณสมบัติของเอนไซม์	Degrassi et al. 1999
	<i>Arthrobacter viscosus</i> NRRL B-1973	คาร์บอกซิลเอสเตอเรส	ศึกษาการทำปฏิกิริยา และเอกลักขณณ์ของเอนไซม์	Cui et al. 1999
	<i>Arthrobacter ilicis</i>	คาร์บอกซิลเอสเตอเรส	ศึกษาการศึกษาเอกลักขณณ์ของเอนไซม์	Mohapatra, Banerjee, and Bapuji 1998

2.1.3.2 เอนไซม์เอสเทอร์เรสจากพืช

ปัจจุบันได้มีการศึกษาเอนไซม์เอสเทอร์เรสในตัวอย่างพืชอย่างกว้างขวาง เนื่องจากพืชมีหลากหลายชนิด ราคาถูก ตลอดจนสามารถควบคุมการสกัดและการศึกษาปฏิกิริยาได้ง่ายกว่าเอนไซม์ที่สกัดจากเนื้อเยื่อพลาสมาของมนุษย์ สัตว์ หรือการผลิตจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (Hou et al. 2012; Wang et al. 2012; Yang et al. 2010)

การศึกษาพบว่าเมล็ดและผลิตภัณฑ์แปรรูปของเมล็ดจากพืชตระกูลถั่วและธัญพืช ได้มีการนำมาศึกษาเอนไซม์เอสเทอร์เรสหลายชนิด เช่น Ali et al. 2013 ได้ศึกษาเอนไซม์เอสเทอร์เรสจากผงสกัดหยาบของถั่วแดงหลวง (*Phaseolus vulgaris* L.) ที่กำลังงอก พบว่าระหว่างการงอกปริมาณเอนไซม์ลดลงจากร้อยละ 15 เป็นร้อยละ 8 (24 ชั่วโมง ถึง 144 ชั่วโมง) จากการศึกษากิจกรรมเอนไซม์โดยใช้สารตั้งต้นสังเคราะห์ 2 ชนิด คือ 1-naphthyl acetate และ 2-naphthyl acetate พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำสุดที่อายุการงอกของถั่วแดงหลวง 2 วัน และสูงสุดที่อายุการงอก 6 วัน นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาเอนไซม์เอสเทอร์เรสในถั่วเหลือง (*Glycine max* L.) พบน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เอสเทอร์เรสจากถั่วเหลือง มีน้ำหนัก 24 และ 37.2 kDa ตามลำดับ และพบว่า เอนไซม์ดังกล่าวมีความไวในการทำปฏิกิริยากับยาฆ่าแมลง กลุ่ม OPs และสารกลุ่ม CAs (Li et al. 2009)

แป้งสาลี (*Triticum aevitum* L.) ถือเป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาศึกษาเอนไซม์เอสเทอร์เรส โดยศึกษาการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยใช้ยาฆ่าแมลง กลุ่ม OPs ในผักกาดหอม พบเอนไซม์เอสเทอร์เรสที่สกัดได้จากแป้งสาลี สามารถแสดงความไว (sensitivity) ในการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs (Wang et al. 2012) และได้มีการศึกษาในลักษณะที่คล้ายกันโดยนำเอนไซม์ที่สกัดได้มาศึกษากิจกรรมเอนไซม์กับสารที่นำมาใช้ในกระบวนการทำการแช่แข็งตัว (cryopreservation) ชนิดต่างๆ ซึ่งพบว่าสารดังกล่าวมีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญ (Xu et al. 2005) และมีการศึกษาในลักษณะที่คล้ายกัน เพื่อเปรียบเทียบเทคนิคการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ระหว่างเทคนิคไดอะไลซิส หลังการตกตะกอนด้วยเกลือ (ammonium sulphate precipitation) และเทคนิคระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (ATPS) พบว่าเทคนิค ATPS ได้ผลผลิตกลับคืนร้อยละ 83.16 ในขณะที่วิธีเดิมให้ผลผลิตร้อยละ 80 (Yang et al. 2010) และการศึกษาของ Haslam et al. 2001 พบว่าในแป้งสาลีมีเอนไซม์เอสเทอร์เรส จำนวน 11 ไอโซไซม์

ข้าวโพด (*Zea mays*), งา (*Sorghum bicolor*), ข้าว (*Oryza sativa*) ยังถูกนำมาใช้ในการศึกษาเอนไซม์เอสเทอร์เรส โดยการนำเมล็ดแช่น้ำเป็นเวลา 60 นาที ก่อนการสกัด ในส่วนของข้าวจะนำมาเพาะให้งอกเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมล็ดงาจะใส่ไว้ในภาชนะที่มีความชื้น พืชทุกชนิดก่อนจะสกัดเอนไซม์จะทำให้เย็นและแข็งโดยใช้แก๊สไนโตรเจนที่มี

อุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส จากการศึกษาพบเอนไซม์เอสเตอเรสที่สามารถถูกยับยั้งปฏิกิริยาจากยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs ได้ (Gershtater, Sharples, and Edwards 2006)

นอกจากนี้ยังพบว่าได้มีการศึกษาเอนไซม์เอสเตอเรสจากเมล็ดพืชชนิดอื่นๆ เช่น ในปี 2014 ได้มีการศึกษาเอนไซม์เอสเตอเรสจากเมล็ดมะขาม (*Tamarindus indica*) ที่กำลังงอก พบเอนไซม์ที่สกัดจากเมล็ดมะขามที่อายุการงอก 21 วัน มีกิจกรรมเอนไซม์และความจำเพาะของเอนไซม์ที่สูง หลังจากทำให้บริสุทธิ์ พบเอนไซม์เอสเตอเรส จำนวน 9 ไอโซไซม์ (Kantharaju and Murthy 2014) และในปีเดียวกัน Bhavith K P et al. 2014 ได้ทำการศึกษาเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากเมล็ดชำเรือด (*Caesalpinia mimosoides*) พบเอนไซม์เอสเตอเรส มีน้ำหนัก 20 kDa

Subramani et al. 2012 ได้ศึกษาเอนไซม์เอสเตอเรสจากผงสกัดหยาบของเมล็ดสบู่ดำ (*Jatropha curcas*) พบเอนไซม์เอสเตอเรส JCSE-I (*J. curcas* seed esterase-I) ซึ่งก่อนหน้านั้นในปี 1999 ได้มีรายงานการพบเอนไซม์โดยจากเมล็ดสบู่ดำ (*Jatropha curcas*) ที่มีอายุการงอก 4 วัน หลังจากการทำให้บริสุทธิ์แล้วพบว่าได้เอนไซม์เอสเตอเรส 2 ไอโซไซม์ คือ JEA และ JEB (Staubmann et al. 1999)

ปี ค.ศ. 2011 มีรายงานการศึกษาการสกัดเอนไซม์จากผงสกัดหยาบของเมล็ดตำแย (*Mucuna pruriens*) พบเอนไซม์เอสเตอเรส 2 ไอโซไซม์ คือ ME-III และ ME-IV (Chandrashekharaiah et al. 2011) และยังพบว่า เมล็ดฟักทอง (*Cucurbita pepo*) ที่มีอายุการงอก 6 วัน มีการศึกษาพบเอนไซม์เอสเตอเรส จำนวน 6 ไอโซไซม์ (Fahmy et al. 2008)

Gershtater Cummins และ Edwards 2007 ศึกษาเอนไซม์เอสเตอเรสจากเมล็ด *Arabidopsis thaliana* ที่มีอายุ 30 วัน พบโปรตีนกลุ่ม α/β hydrolase ของ *Arabidopsis thaliana* carboxylesterase (AtCXE) จำนวน 5 ชนิด

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาเอนไซม์เอสเตอเรสจากส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ใบ ราก ผล หรือแม้กระทั่งเนื้อเยื่อ เช่น Radic และ Pevalek-Kozlina 2010 ศึกษาใบและรากของ *Centaurea ragusina* L. พบเอนไซม์จำนวน 14 ไอโซไซม์ Syros et al. 2005 ศึกษาเอนไซม์เอสเตอเรสจากยอดอ่อนและเปลือกลำต้นยี่โถ (*Nerium oleander* L.) ที่มีอายุ 6 เดือน ที่ปลูกในสภาวะหนาวเย็นและสภาวะแห้งแล้ง ซึ่งพบเอนไซม์เอสเตอเรสจำนวน 7 ไอโซไซม์ และ Carvalho et al. 2003 ได้สกัดเอนไซม์เอสเตอเรสจากใบของ *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (*Apocynaceae*) และทดสอบทางชีวเคมีกับสาร 2 ชนิด คือ α -naphthyl acetate และ β -naphthyl acetate พบเอนไซม์ β -esterase จำนวน 1 ไอโซไซม์ α -esterases จำนวน 3 ไอโซไซม์ และ α/β esterases จำนวน 10 ไอโซไซม์

Gershter Cummins และ Edwards 2007 ศึกษาเอนไซม์เอสเทอร์เรสจากการเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของเมล็ด *Arabidopsis thaliana* ซึ่งพบว่ามีเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลสจำนวน 4 ชนิด และ Balen et al. 2004 ได้สกัดเอนไซม์เอสเทอร์เรสจากเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกระบองเพชร (*Mammillaria gracillis* Pfeiff) พบเอนไซม์เอสเทอร์เรส จำนวน 13 ไอโซไซม์

ปี ค.ศ. 2002 Stuhlfelder, Lottspeich และ Mueller ได้สกัดเอนไซม์เอสเทอร์เรสจากมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) พบว่าเอนไซม์เอสเทอร์เรสมีโปรตีน 767-fold และยังมีรายงานพบเอนไซม์แพคตินเมทิลเอสเทอร์เรส (PME) จำนวน 22 มิลลิกรัม จากมะเขือเทศสด 4 กิโลกรัม (Vovk and Simonovska 2007) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการศึกษาเอนไซม์เอสเทอร์เรสจากยางของ *Synadenium grantii* Hook, 'f' พบเอนไซม์เอสเทอร์เรสที่มีสายพอลิเปปไทด์ น้ำหนักโมเลกุล 14,000 kDa Govindappa et al. 1987 และในปี ค.ศ. 1985 Upadhyya, Govardhan และ Veerabhadrapa ได้สกัดเอนไซม์เอสเทอร์เรสจากเมล็ดข้าวฟ่าง (*Eleusine coracana* Gaertn) ที่กำลังงอก พบสายพอลิเปปไทด์สายเดี่ยวที่มีน้ำหนักโมเลกุล 70,000 KDa

2.2 การสกัดและการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

เอนไซม์ที่สิ่งมีชีวิตผลิตขึ้นมานั้นจะมี 2 รูปแบบ คือ ผลิตขึ้นภายในเซลล์แล้วหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) และผลิตขึ้นใช้ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) ดังนั้นการที่จะนำเอนไซม์มาใช้ประโยชน์ต้องมีกระบวนการที่เหมาะสมเพื่อให้เอนไซม์นั้นยังคงมีคุณสมบัติตามที่ผู้ใช้งานต้องการ (ธิดารัตน์ เอกสิทธิกุล 2550) การสกัดและการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ มี 3 ขั้นตอนหลัก คือ การเตรียมสารสกัดจากเซลล์ การแยกเอนไซม์ออกจากสารสกัด และการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ กระบวนการดังกล่าวจะใช้หลักแนวคิด คือ

1. เอนไซม์ที่สกัดได้ต้องมีปริมาณและความบริสุทธิ์สูง
2. สูญเสียกิจกรรมทางชีวภาพน้อย
3. ค่าใช้จ่ายที่ใช้ในกระบวนการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ต่ำ

ซึ่งกระบวนการดังกล่าวแสดงในภาพประกอบ 2.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ไม่ใช่เพียงแค่ต้องการกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่ไม่ต้องการออกจากเอนไซม์เท่านั้น แต่ยังคงคำนึงถึงการทำให้เอนไซม์ที่ต้องการมีความคงตัวและมีความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อสภาพการใช้งานอีกด้วย (Hedhammar, Karlström, and Hober n.d.)



ภาพประกอบ 2.2 หลักแนวคิดกระบวนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์
ที่มา: Mowery and Seidman 2005

2.2.1 การเตรียมสารสกัดจากเซลล์ (Cell extract preparation)

ขั้นตอนแรกในการทำโปรตีนหรือเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ คือ การทำให้เซลล์ที่เป็นแหล่งของเอนไซม์แตก (Cell breakage) ออกเพื่อให้เอนไซม์เป้าหมายที่ต้องการออกมาผสมกับสารละลายผสม โดยแหล่งของเอนไซม์อาจจะเป็นเซลล์ของจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรืออยู่ในเซลล์หรือเนื้อเยื่อของพืชหรือสัตว์ เป็นต้น ในกรณีที่เอนไซม์เป้าหมายถูกจุลินทรีย์ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์จะไม่มีทำให้เซลล์แตก เนื่องเอนไซม์จะผสมอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว แต่ส่วนใหญ่เอนไซม์จะอยู่ในเซลล์ดังนั้นขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกจึงมีความสำคัญในการสกัดเอนไซม์ ซึ่งวิธีการทำให้เซลล์แตกนั้นมีตั้งแต่วิธีการทำแบบง่าย เช่น การใช้แรงดันออสโมติก (osmolysis) หรือแบบที่ยุ่งยากซับซ้อน เช่น การใช้แรงสั่นสะเทือนในการทำลายเซลล์ (sonication) ซึ่งโดยทั่วไปวิธีการทำให้เซลล์แตกจะแบ่งเป็น 3 วิธี คือ

วิธีการทางกายภาพ (Physical methods) เป็นวิธีการทำให้เซลล์เนื้อเยื่อเซลล์แตกโดยเครื่องมือ เช่น การบดหรือตำโดยใช้เครื่องมือ Blender, Tissue grinder/Homogenizer, Mortar&pestle การทำให้เซลล์แตกใช้ Ultrasonication หรือ High pressure compression (Inert gas) การใช้แรงดัน Osmotic pressure (Hypotonic solution) เป็นต้น

วิธีการทางเคมี (Chemical methods) เป็นวิธีการทำให้เซลล์เนื้อเยื่อเซลล์แตกโดยใช้สารเคมี เช่น การใช้สารละลายอินทรีย์ (Organic solvents) เช่น น้ำ Chloroform Methanol การใช้สารซักฟอก (Detergent) เช่น Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) Deoxycholate, Triton-X การใช้สารที่ทำลายพันธะ (Chaotropic agents) เช่น Potassium thiocyanate Potassium bromide

วิธีการทางเอนไซม์ (Enzymatic methods) เป็นวิธีการทำให้เซลล์เนื้อเยื่อเซลล์แตกโดยใช้เอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่นิยมใช้ เช่น Protease Lipase Cellulase Chitinase

ทั้งนี้ จะเห็นว่าการทำให้เซลล์แตก การจะเลือกใช้วิธีใดนั้นขึ้นอยู่กับประเภทของเซลล์และเอนไซม์เป้าหมาย ดังแสดงตัวอย่างในตาราง 2.5

ตาราง 2.5 วิธีการทำให้เซลล์แตก

ชนิดของเซลล์	วิธีการทำให้เซลล์แตก
แบคทีเรีย	Sonication, Lysozyme
พืช	Blender, Methanol
ยีสต์	Organic solvent
สัตว์	Hand homogenizer, Blade homogenizer

ที่มา: เสาวณีย์ กาญจนชุมพล และ ดวงกมล วิรุฬห์อุดมผล 2553

เมื่อเอนไซม์เป้าหมายที่ต้องการถูกทำให้หลุดออกมาจากเซลล์โดยกระบวนการทำให้เซลล์แตกแล้ว เอนไซม์จะผสมรวมอยู่ในสารสกัดหยาบ ซึ่งสารสกัดหยาบของนอกจากจะมีเอนไซม์เป้าหมายแล้วก็ยังมีชิ้นส่วนของเซลล์ สารต่างๆภายในเซลล์ต่างๆ และนอกจากนี้ยังมีสารละลายที่นำมาใช้ในการรักษาสภาพของเอนไซม์เพื่อป้องกันโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพที่อาจจะสูญเสียไปรวมอยู่ในสารสกัดหยาบของด้วย ตาราง 2.6 จะแสดงตัวอย่างสารเคมีที่นำมาใช้ในการรักษาสภาพของเอนไซม์

ตาราง 2.6 สารเคมีที่นำมาใช้ในการรักษาสภาพของเอนไซม์

สารเคมี	ความเข้มข้น	วัตถุประสงค์
สารละลายบัฟเฟอร์;		
Tris	20 mM, pH 7.4	pH control
Phosphate	0.1 M, pH7.0	pH control
NaCl	100 mM	Ionic strength stability
EDTA	10 mM	Capture metal ion, reduce oxidation
สารซักฟอก;		
Ion detergent; SDS	0.1-0.5%	Protein denature,
Non ion detergent		Preparation of SDS-PAGE
Triton X-100	0.1%	Membranes solubility

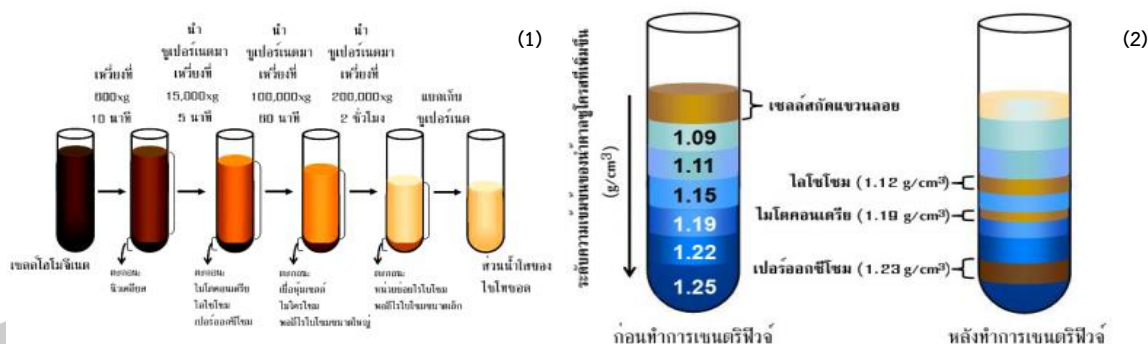
ที่มา: เสาวณีย์ กาญจนชุมพล และ ดวงกมล วิรุฬห์อุดมผล 2553

2.2.2 การแยกเอนไซม์ออกจากสารสกัด (Enzyme separation)

หลังการทำการทำให้เซลล์แตกเอนไซม์ที่ต้องการจะผสมรวมอยู่ในสารสกัดหยาบของที่มีส่วนผสมของเซลล์และองค์ประกอบต่างๆ ของสารสกัด ดังนั้นจึงต้องทำการแยกเอนไซม์ที่ต้องการออกจากสารสกัด โดยเทคนิคที่นิยมคือ การปั่นตกตะกอน (Centrifugation) เป็นการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของขนาด น้ำหนัก ความหนาแน่น ความหนืดของสารละลาย และแรงโน้มถ่วงของโลกที่ทำต่ออนุภาคของสารใหม่ ดังแสดงในภาพประกอบ 2.3 (ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ์ 2544; สัญชัย พยุงกร ม.ป.ป.)

การปั่นตกตะกอนแบบแยกส่วนที่ละชั้น (Differential centrifugation) เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของขนาด น้ำหนัก โดยในแต่ละรอบของการปั่นตกตะกอนสารสกัดจะถูกแยกเป็น 2 ส่วน คือ ตะกอน (pellet) และของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) จากนั้นนำของเหลวส่วนใส ในแต่ละรอบมาทำการปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบสูงขึ้นในแต่ละครั้ง ทำให้เกิดตะกอน และของเหลวส่วนใสครั้ง

การปั่นตกตะกอนแบบอาศัยสารตัวกลางที่มีความหนาแน่นไล่ระดับ (Density gradient centrifugation) เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของอัตราเร็วในการนอนกันหรือแยกออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของความหนาแน่น โดยใช้ตัวกลางที่เหมาะสมและมีความหนาแน่น ต่าง ๆ กัน



ภาพประกอบ 3 การปั่นตกตะกอน (Centrifugation) (1) การปั่นตกตะกอนแบบแยกส่วนที่ละชั้น (differential centrifugation), (2) การปั่นตกตะกอนแบบอาศัยสารตัวกลางที่มีความหนาแน่นไล่ระดับ (density gradient centrifugation)

ที่มา: สัญชัย พยุงกร (ม.ป.ป.)

2.2.3 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (Enzyme purification)

เมื่อแยกเอนไซม์เป้าหมายออกจากสารสกัดหยาบของแล้ว ขั้นตอนต่อมา คือ การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (Enzyme purification) เป็นกระบวนการก่อนจะนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์นั้นมีหลายวิธี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติเฉพาะตัวของเอนไซม์แต่ละชนิด (ตาราง 2.7) และวัตถุประสงค์ของการทำงานเอนไซม์นั้นๆ

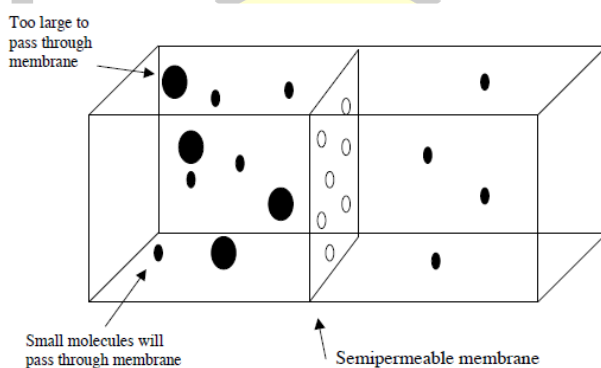
ไดอะไลซิส (Dialysis) เป็นวิธีการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยการแยกเอนไซม์ที่ต้องการออกจากสารอื่นๆโดยใช้เยื่อเลือกผ่าน (semipermeable membrane) ที่ขนาดรูของเยื่อเลือกผ่านยอมให้สารโมเลกุลเล็กแพร่ผ่านได้และป้องกันการผ่านของสารโมเลกุลใหญ่ ซึ่งการทำไดอะไลซิสนิยมใช้ในกระบวนการทางชีวเคมี เช่น การแยกเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกจากเอนไซม์หรือโปรตีน การเปลี่ยนบัฟเฟอร์ให้สารละลายโปรตีน การแยกไอออนเล็กหรือโมเลกุลเล็กซึ่งจับกับสารชีวโมเลกุลเป็นต้น สำหรับ วัสดุที่ใช้ทำเยื่อเลือกผ่านนิยมใช้เซลลูโลสแอซิเตท (cellulose acetate) ซึ่งนิยมเรียกว่า ถุงไดอะไลซิส (Dialysis tube) หรือ เซลโลเฟน (cellophane) (ภาพประกอบ 2.4)

วิธีการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน หลังจากที่ได้ตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว ขั้นตอนต่อมาจะทำการแยกเอนไซม์และเกลือออกจากกัน (desalting) โดยการนำตะกอนเอนไซม์ที่ได้ใส่ลงในถุงไดอะไลซิสปิดปากถุงให้สนิท แล้วนำไปแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ โดยเอนไซม์ซึ่งเป็นสารโมเลกุลใหญ่จะไม่สามารถแพร่ผ่านเยื่อบางของเยื่อเลือกผ่านได้จะยังคงอยู่ในถุงไดอะไลซิส ส่วนสารโมเลกุลเล็กของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตจะสามารถแพร่ผ่านออกมานอกถุงไดอะไลซิส โดยกระจายตัวจากภายในถุงซึ่งมีความเข้มข้นของเกลือสูงออกสู่ภายนอกถุงที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า เมื่อความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตภายในถุงและภายนอกถุงไดอะไลซิสเท่ากันจะทำให้ระบบเป็นภาวะสมดุล ซึ่งการแลกเปลี่ยนหยุด และถ้ามีการเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์อยู่เสมอ จะทำให้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตภายในถุงแพร่ออกมาได้เรื่อยๆ จนเกือบหมด นอกจากนี้การกวนสารละลายบัฟเฟอร์ในภาชนะจะทำให้ถุงไดอะไลซิสเคลื่อนไหวอยู่ตลอดเวลาช่วยให้ถึงภาวะสมดุลได้เร็วขึ้น ข้อควรระวังในการไดอะไลซิส คือ การที่สารละลายบัฟเฟอร์แพร่เข้าสู่ถุงไดอะไลซิส การเกิดออสโมซิส (osmosis) เนื่องจากความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตภายในถุงมีความเข้มข้นสูง ทำให้บัฟเฟอร์แพร่เข้าไปในถุงเพิ่มมากขึ้นไป ซึ่งอาจจะเกิดแรงดันทำให้ถุงไดอะไลซิสฉีกขาดได้ ดังนั้นในการทำไดอะไลซิสไม่ควรเติมสารละลายเอนไซม์จนเต็มถุง ควรเหลือพื้นที่ไว้และควรรีดไล่อากาศออกจากพื้นที่ส่วนดังกล่าวก่อนผูกปิดถุงเพื่อสำหรับการเพิ่มปริมาตรภายในถุง ไดอะไลซิสในกรณีเกิดการออสโมซิส (Mowery and Seidman 2005)

ตาราง 2.7 วิธีการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ตามคุณสมบัติเฉพาะตัวของเอนไซม์

คุณสมบัติเอนไซม์	วิธีการ
ขนาด หรือ มวล	- เจลฟิльтраชัน (Gel filtration) - อุลตราฟิльтраชัน (Ultrafiltration) - ไดอะไลซิส (Dialysis)
ประจุ	- โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-exchange chromatography) - อิเล็กโตรโฟเรซิส (Electrophoresis) - ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง (Isoelectric focusing using)
ความสามารถในการละลาย	- การเปลี่ยนแปลงค่า pH (Isoelectric precipitation) - การเปลี่ยนแปลงค่าความแรงของไอออน (Change in ionic strength) - การลดค่าคงที่ไดอิเล็กตริก (Decrease in dielectric constant)
ความจำเพาะกับสารบางชนิด	- โครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ (Affinity chromatography)

ที่มา: ชรินทร์ เดชะพันธุ์ (ม.ป.ป.) และ สมยศ โอศิริพันธุ์ 2553



ภาพประกอบ 2.4 ไดอะไลซิส (Dialysis)

ที่มา: Mowery and Seidman 2005

2.2.4 การสกัดและการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เอสเทอร์เลส

2.2.4.1 การสกัดเอนไซม์เอสเทอร์เลสด้วยสารละลายบัฟเฟอร์

Li et al. 2019 ได้ศึกษาการสกัดเอนไซม์เอสเทอร์เลสจากมันฝรั่ง (*Solanum Tuberosum*) โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ในสภาวะอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สารสกัดเอนไซม์เบื้องต้นมีจุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point: pI) 4.4 หลังจากศึกษา SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์เอสเทอร์เลสมีน้ำหนักโมเลกุล 16.4, 20.866, 22.73 และ 40.286 kDa

Parasa และ Saraswathi 2015 สกัดเอนไซม์เอสเทอร์เลสจากเมล็ดแคบ้าน (*Sesbania Grandiflora*) โดยใช้ผงละเอียดของเมล็ดที่ล้างไขมันด้วยสารละลาย 10% acetone และสกัดด้วยสารละลาย 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในสภาวะเย็นตลอดเวลา หลังจากทำบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วยเทคนิคการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่สภาวะความเร็ว 10,000 rpm 4 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที จากนั้นนำตะกอนโปรตีนมาทำไดอะไลซิสในสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 50 mM pH 5.4 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และการแยกสารด้วย เทคนิค Ion exchange chromatography โดยใช้ CM-Cellulose พบว่ามีเอนไซม์ที่แยกได้ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ คือ 146.6 และ 1,559 U/mg ตามลำดับ เมื่อศึกษาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบเอนไซม์เอสเทอร์เลสมีน้ำหนักโมเลกุล 28, 25 และ 22 kDa และที่สภาวะการศึกษาเดียวกัน Bhavith K P et al. 2014 ได้สกัดเอนไซม์เอสเทอร์เลสจากเมล็ด *Caesalpinia mimosoides* หลังจากไดอะไลซิส และการแยกสารด้วยคอลัมน์ CM-Cellulose พบว่าเอนไซม์มีค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ คือ 0.32 และ 1.14 U/mg ตามลำดับ และมีน้ำหนักโมเลกุล 20 kDa

Chandre et al. 2014 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์เอสเทอร์เลสจากถั่วลิ้นเต่า (*Pisum sativum* L.) โดยใช้ผงละเอียดของเมล็ดที่สกัดด้วยสารละลาย 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารสกัดไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่สภาวะความเร็ว 10,000 rpm เวลา 10-15 นาที นำตะกอนโปรตีนที่ได้ทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคไดอะไลซิสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 M pH 7 ในอุณหภูมิเย็นตลอดเวลา พบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์ คือ 1.65 $\mu\text{mol}/\text{min}$

Kantharaju และ Murthy 2014 สกัดเอนไซม์เอสเทอร์เลสจากเมล็ดมะขามที่กำลังงอก (*Tamarindus indica*) โดยใช้สารละลาย 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 และนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 10,000 rpm 4 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปศึกษาเอนไซม์ด้วยเทคนิค Native PAGE พบว่าเมล็ดมะขามที่กำลังงอกมีเอนไซม์ จำนวน 9 ไอโซไซม์ Ali et al. 2013 สกัดเอนไซม์เอสเทอร์เลสจากถั่วแดงหลวง

(*Phaseolus vulgaris*) ที่กำลังงอก ซึ่งสกัดโดยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ความเร็ว 10,000 rpm 4 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสมาตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ความเร็ว 10,000 rpm เวลา 30 นาที นำสารสกัดที่ได้มาศึกษาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค native PAGE พบว่า แถบโปรตีนถั่วแดงหลวงที่กำลังงอก จำนวน 6 แถบ

LI et al. 2009 ศึกษาเอนไซม์เอสเทอร์เรสจากถั่วเหลือง โดยใช้ผงละเอียดของถั่วเหลืองมาสกัดโดยใช้ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.3 M pH 7.0 ผสมเขย่าให้เข้ากัน 30 นาที และตั้งทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการปั่นแยกตะกอนด้วยวิธี differential centrifugation ความเร็ว 6,000 8,000 10,000 และ 20,000 rpm 4 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ตามลำดับ หลังจากนั้นรวมส่วนใสมาตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและไดอะไลซิส นำโปรตีนที่ได้มาทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค DEAE-32 chromatography และ SDS-PAGE พบน้ำหนักโมเลกุล 24 และ 37.2 kDa นอกจากนี้ Syros et al. 2005 สกัดเอนไซม์เอสเทอร์เรสจากยี่โถ (*Nerium oleander* L.) โดยใช้ไนโตรเจนเหลวผสมร่วมกับสารบัฟเฟอร์ผสมประกอบด้วย 100 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 7.0 1 mmol L⁻¹ PMSF และ 10% (w/v) polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) ทามวลโมเลกุลของโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE พบน้ำหนักโมเลกุล 38 kDa นอกจากนี้ยังพบว่าที่สภาวะการศึกษาที่คล้ายกัน Balen et al. 2004 ศึกษาการสกัดเอนไซม์จากเนื้อเยื่อของ *Mammillaria gracillis* Pfeiff โดยใช้ตัวอย่างน้ำหนัก 1.0 กรัม สกัดโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ผสม 1.5 ml และ 0.1 M Tris/HCl pH 8.0 และ polyvinylpyrrolidone จากนั้นศึกษาน้ำหนักโมเลกุลโดยเทคนิค SDS-PAGE พบเอนไซม์เอสเทอร์เรส จำนวน 13 ไอโซไซม์

Carvalho et al. 2003 ศึกษาเอนไซม์เอสเทอร์เรสจากใบของ *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (Apocynaceae) โดยใช้ 1.0 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่ผสม 5% PVP-40 0.01 M dithiothreitol (DTT) 10 mM sodium metabisulfite 50 mM ascorbic acid, 1.0 mM EDTA และสารละลาย 0.5% β -mercaptoethanol เมื่อผสมสารสกัดและตัวอย่างให้เข้ากันแล้วจะนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 25,000 rpm 4 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที จากนั้นจะนำสารสกัดไปศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิค PAGE พบเอนไซม์เอสเทอร์เรส จำนวน 14 ไอโซไซม์

2.2.4.2 การสกัดเอนไซม์เอสเทอร์เรสด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์

Shivashankar, B and Premkumari 2014 ได้ศึกษาเอนไซม์เอสเทอร์เรสจากเห็ด *Hypsizygus ulmarius* โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.15 M เป็นตัวสกัด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 10,000 rpm, 4 องศา

เซลเซียส เวลา 20 นาที สารสกัดหยาบที่ได้มีโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์ คือ 3.57 mg/ml และ 2.25 $\mu\text{mole/ml}$ ตามลำดับ และที่สภาวะคล้ายกัน Subramani et al. 2012 ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.1 M สกัดเอนไซม์เอสเทอร์เรสจากเมล็ดสบู่ดำ (*Jatropha curcas*) ที่กำลังงอก พบว่ามีเอนไซม์ที่แยกได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์และค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ คือ 9.07 $\mu\text{mole/min/mg}$ และ 0.092 U/mg ตามลำดับ จากนั้นศึกษาเอนไซม์ด้วยเทคนิค Native PAGE พบแถบโปรตีน จำนวน 13 แถบ

2.2.4.3 การศึกษาการสกัดเอนไซม์เอสเทอร์เรสด้วยน้ำ

Wang et al. 2012 ศึกษาการสกัดเอนไซม์เอสเทอร์เรสโดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวสกัด โดยการสกัดเอนไซม์จากแป้งสาลี หลังจากบั่นผสม 15 นาที ตั้งไว้ค้างคืนที่ 4 องศาเซลเซียส นำสารสกัดที่ได้มาปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 5,000 rpm 4 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที สารสกัดหยาบที่ได้จะถูกนำมาตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคไดอะไลซิสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.38 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เอนไซม์เอสเทอร์เรสที่ได้สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs ได้ Yang et al. 2010 ศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เอสเทอร์เรสที่สกัดจากแป้งสาลีที่ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวสกัด โดยการผสมแป้งสาลีกับน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 4,000 rpm 4 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที จากนั้นทำบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วยเทคนิค aqueous two-phase system (ATPS) โดยใช้ PEG1000/ NaH_2PO_4 พบว่าส่วนสารสกัดเอนไซม์ในชั้นบนของ PEG1000/ NaH_2PO_4 และในชั้นล่างของ PEG1000/ NaH_2PO_4 / $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ มีค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ คือ 0.21 และ 0.72 U/mg ตามลำดับ

2.3 ยาฆ่าแมลง (Pesticides)

ยาฆ่าแมลง (Pesticides) หมายถึง สารจากธรรมชาติหรือสารผสมที่เกิดจากการสังเคราะห์ที่มีวัตถุประสงค์หลักสำหรับป้องกัน ควบคุม ทำลาย พืช สัตว์ จุลินทรีย์ ที่เป็นศัตรูพืช และหากใช้ไม่ถูกวิธีอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ กระทบกระบวนการผลิตอาหาร การแปรรูป การจัดเก็บ การขนส่ง และผลิตผลทางการเกษตรได้ ยาฆ่าแมลง พืชมีมากมายหลากหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะกับชนิดของศัตรูพืชเป้าหมาย ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็นกลุ่มหลักๆ ดังนี้

สารเคมีป้องกันกำจัดแมลง (Insecticides) หรือยาฆ่าแมลง เป็นสารที่มีวัตถุประสงค์ของการใช้งานสำหรับป้องกัน ควบคุม ทำลายแมลงศัตรูพืช

สารเคมีป้องกันกำจัดวัชพืช (Herbicides, weed killers) เป็นสารที่มีวัตถุประสงค์ของการใช้งานสำหรับการทำลายวัชพืชต่างๆ เช่น หญ้า

สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา (Fungicides) เป็นสารที่มีวัตถุประสงค์ของการใช้งานสำหรับป้องกัน ควบคุม ทำลายเชื้อราโรคและศัตรูพืช

สารเคมีป้องกันกำจัดสัตว์ฟันแทะ (Rodenticides) เป็นสารที่มีวัตถุประสงค์ของการใช้งานสำหรับกำจัดหนูหรือสัตว์ฟันแทะที่เป็นศัตรูพืช

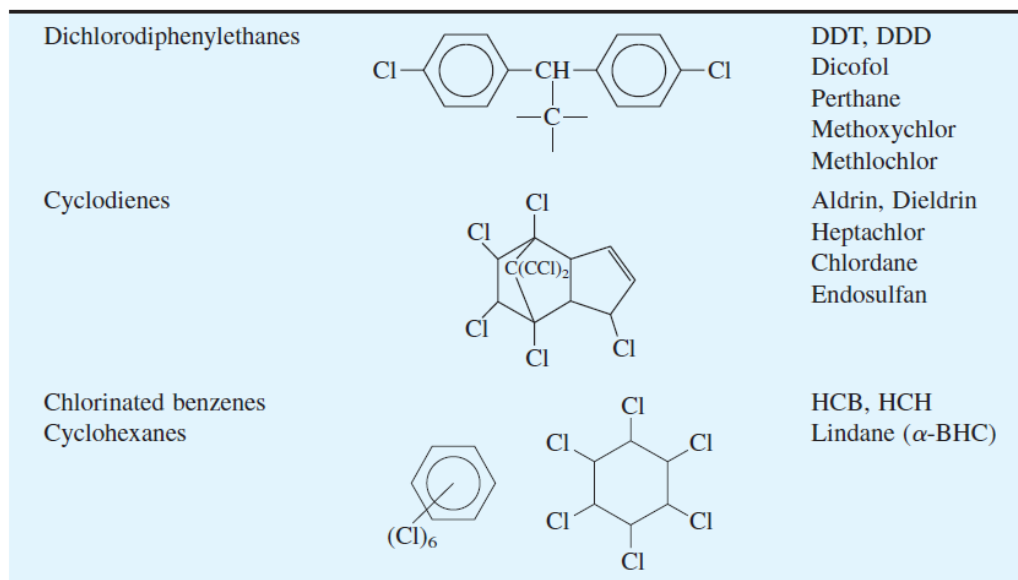
สารรม (Fumigants) เป็นสารเคมีที่สามารถกำจัดหรือฆ่าศัตรูพืชได้หลากหลายชนิด เช่น แมลง วัชพืช เชื้อรา สัตว์ฟันแทะ

นอกจากนี้ยังมีสารเคมีป้องกันกำจัดพืชที่จำเพาะกับศัตรูพืชเป้าหมายโดยเฉพาะ เช่น สารเคมีกำจัดหอย (Molluscicides) สารควบคุมสาหร่าย (Algaecides) สารกำจัดแบคทีเรียหรือไวรัส (Antimicrobial) เป็นต้น (แสงโสม ศิริพานิช 2556; ศิริวรรณ ฉันทเจริญ, อรพันธ์ อันติมานนท์, และ โกวิท บุญมีพงศ์ 2553; ศรีัญญา พัวพลเทพ 2559; Mutengwe, Chidamba, and Korsten 2016; Prieto Garcia et al. 2012; Skretteberg et al. 2015; Donald J. Ecobichon 2001; Kata 2011)

2.3.1 ยาฆ่าแมลง (Insecticides)

ยาฆ่าแมลง (Insecticides) หรือที่ประชาชนทั่วไปนิยมเรียก คือ ยาฆ่าแมลง เป็นสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นหรือสารตามธรรมชาติที่มีวัตถุประสงค์การใช้งานสำหรับป้องกัน ควบคุม ทำลายแมลงศัตรูพืช ปัจจุบันยาฆ่าแมลงที่นิยมใช้ สามารถแบ่งตามโครงสร้างทางเคมีของสารได้ 4 กลุ่มหลัก (Donald J. Ecobichon 2001; Kata 2011; Prieto Garcia et al. 2012; ศรีัญญา พัวพลเทพ 2559; แสงโสม ศิริพานิช 2556) คือ

กลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine; OCs) เป็นสารเคมีที่มีโครงสร้างหลักของสารจะมีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ เช่น dichlorodiphenylethane-, chlorinated cyclodiene, chlorinated benzene- และ chlorinated cyclohexane (ภาพประกอบ 2.5) ยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน เป็นที่มีความคงตัวสลายตัวช้าในธรรมชาติ และสามารถสะสมในชั้นไขมันได้ ในสมัยก่อนใช้ในการควบคุมพาหะโรคไข้เลือดออกและไข้มาลาเรีย ตลอดจนใช้ป้องกัน ควบคุม ทำลายแมลงศัตรูพืช ในเพาะปลูกพืชทางการเกษตร เช่น องุ่น ฝักกาด มะเขือเทศ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ฝ้าย เป็นต้น ปัจจุบันนี้ยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีนนี้หลายประเทศได้ยกเลิกและห้ามใช้ เนื่องจากสะสมตกค้างในสิ่งแวดล้อมยาวนาน และหากมนุษย์ได้รับสารชนิดนี้เข้าสู่ร่างกาย จะเกิดการสะสมในร่างกายซึ่งจะส่งผลต่อระบบประสาทส่วนกลางของมนุษย์อีกด้วย



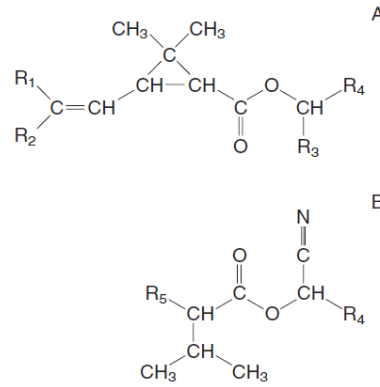
ภาพประกอบ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน

ที่มา : Donald J. Ecobichon 2001

กลุ่มไพรีทรอยด์และสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ (Pyrethroids and synthetic pyrethroids; SPs)

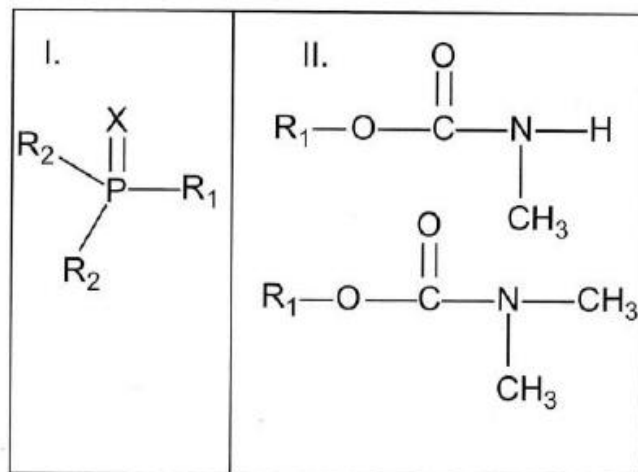
เป็นสารเคมีป้องกันกำจัดที่ได้จากธรรมชาติ เนื่องจากเป็นสารเคมีที่สกัดได้จากการสกัดพืชกลุ่มไพรีทรัม (pyrethrum) หรือ พืชตระกูลเบญจมาศ (chrysanthemum flowers) เช่น *Chrysanthemum cinerariaefolium*, *Chrysanthemum coccineum*) เป็นต้น สารไพรีทรอยด์ธรรมชาติที่สกัดได้เป็นสารอนุพันธ์ของเอสเทอร์ เช่น chrysanthemic pyrethric pyrethrolol cinerolol และ jasmolol เป็นต้น และปัจจุบันได้มีการสังเคราะห์สารกลุ่มไพรีทรอยด์ขึ้น เพื่อใช้จำหน่ายทางการค้าเป็นจำนวนมาก ซึ่งสารสังเคราะห์เหล่านี้จะมีโครงสร้างทางเคมีหลัก และมีความคุณสมบัติ การออกฤทธิ์เหมือนสารไพรีทรอยด์ธรรมชาติ (ภาพประกอบ 2.6) โดยสารกลุ่มไพรีทรอยด์ธรรมชาติและสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ จะผลต่อแมลงศัตรูพืชโดยจะเป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหารของแมลง ทำให้หมดสติชั่วคราวและทำให้เฉื่อยชา เป็นต้น

พุ่ม ปณ ภิโต ชเว



ภาพประกอบ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มไพรีทรอยด์ (A) และสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ (B)
ที่มา : Donald J. Ecobichon 2001

กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphates; OPs) และกลุ่มคาร์บาเมต (Carbamate; CAs) เป็นยาฆ่าแมลงที่มีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกันแต่มีคุณสมบัติและกลไกในการทำการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชเหมือนกัน โดยสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphates; OPs) จะสารประกอบเอสเตอ์ของกรดฟอสฟอริก (phosphoric) หรือ กรดโฟสไฟไรโออิก (phosphorothioic acid) ในขณะที่สารกลุ่มคาร์บาเมตจะเป็นสารประกอบเอสเตอ์กรดคาร์บามิก (carbamic acid) (ภาพประกอบ 2.7)



ภาพประกอบ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (I) และกลุ่มคาร์บาเมต (II)
ที่มา : ศรัญญา พัวพลเทพ 2015

2.3.2 ความเป็นพิษของยาฆ่าแมลง

องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้แบ่งระดับความเป็นพิษของการยาฆ่าแมลง ตามความเสี่ยงของการได้รับสัมผัส ปริมาณการได้รับสาร และชนิดของสารเคมี ซึ่งการจัดระดับความเป็นพิษของยาฆ่าแมลง จะเทียบกับปริมาณสารเคมีต่อน้ำหนักตัวของหนูหรือสัตว์ทดลองในห้องปฏิบัติการที่ได้รับเข้าไปครั้งเดียวแล้วทำให้ตายไป 50% (lethal dose; LD₅₀) โดยจะแบ่งออกเป็น 5 ระดับ จากความเป็นพิษต่ำหาไปหาสูง (Donald J. Ecobichon 2001; Kala 2011; Prieto Garcia et al., 2012; ปัทมา ศรีแสง, สุกาวดี ยะสะกะ, สรัญญา ถีป้อม, พิรญา อึ้งอุตรภักดี และ วันดี วัฒนชัยยิ่งเจริญ 2560; พชรี ภคขมา, สุวรรณิ สายสิน และ ศรมน สุทิน 2559; แสงโถม ศิริพานิช 2556) ดังแสดงในตาราง 2.8

ตาราง 2.8 ระดับความเป็นพิษของการยาฆ่าแมลง พิษตามเกณฑ์ของ WHO

ระดับ	คำอธิบาย	ค่า LD ₅₀ สำหรับหนู (มก./กก. น้ำหนักตัว)	
		ของแข็ง	ของเหลว
Ia	พิษร้ายแรงมาก (Extremely hazardous)	≤5	≤20
Ib	พิษร้ายแรง (Highly hazardous)	5-50	20-200
II	พิษปานกลาง (Moderately hazardous)	50-500	200-2000
III	พิษน้อย (Slightly hazardous)	≥501	≥2001
U	ไม่มีพิษ (Non-hazardous)	≥2000	≥3000

ที่มา: Donald J. Ecobichon 2001; Kala 2011; จำรัส เลิศศรี 2560

2.3.2.1 ความเป็นพิษของยาฆ่าแมลง กลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine; OCs) และกลุ่มไพรีทรอยด์ สารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ (Pyrethroids and synthetic pyrethroids; SPs)

ความเป็นพิษของยาฆ่าแมลง กลุ่มออร์กาโนคลอรีน (OCs) จะเกิดอาการพิษแบบเฉียบพลัน ซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่วนกลางเป็นหลัก ซึ่งความรุนแรงของพิษจากจะมีต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น ชนิดของสาร ช่องทางในการได้รับสาร ความถี่ของการได้รับสาร โดยส่งผลทำให้เกิดการกระวนกระวาย วิตถองการกระตุ้น ชักเกร็ง การหายใจไม่ปกติ ซึม อาเจียน กล้ามเนื้อสั่น น้ำลายไหล อาเจียน และมีอาการจะมีการชักอย่างรุนแรงและตายได้ สำหรับความเป็นพิษของยาฆ่าแมลง กลุ่มไพรีทรอยด์และสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ (SPs) มีความเป็นพิษต่อคนและสัตว์

น้อยมาก เนื่องจากเป็นสารที่สังเคราะห์เลียนแบบ เช่น การระคายเคืองหรือมีอาการคันผิวหนัง แต่ถ้าได้รับสารนี้ในปริมาณสูง จะมีอาการคล้ายคลึงกลุ่ม OCs

2.3.2.2 ความเป็นพิษของยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (OPs) และกลุ่มคาร์บาเมต (CAs)

ยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (OPs) และกลุ่มคาร์บาเมต (CAs) มีการออกฤทธิ์ที่เป็นพิษต่อร่างกาย โดยมีผลต่อการทำงานของระบบประสาท โดยสารทั้งสองกลุ่มนี้จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (acetylcholinesterase; AChE) ที่อยู่บริเวณปลายประสาท ซึ่งเอนไซม์นี้จะทำงานโดยการสลายสารสื่อประสาทอะซิติลโคลีน (acetylcholine; ACh) ซึ่งเป็นสารที่มีผลต่อการกิจกรรมทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิต โดยหากการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (acetylcholinesterase; AChE) ถูกยับยั้งโดยยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต และกลุ่มคาร์บาเมตจะส่งผลให้เกิดการสะสมของสารสื่อประสาทอะซิติลโคลีนที่ปลายประสาท ซึ่งมีผลทำให้เกิดการกระตุ้นระบบประสาททั้ง muscaric และ nicotinic ที่มากกว่าปกติ ซึ่งหากได้รับในปริมาณน้อยจะทำให้อ่อนเพลีย อาเจียน ท้องเดิน น้ำลายออกมากผิดปกติ คลื่นไส้ วิงเวียน กล้ามเนื้อกระตุก แน่นหน้าอก ตาพร่า และหากถ้าได้รับในปริมาณสูงขึ้นไป น้ำลายฟูมปาก อุดจากระและปัสสาวะรด กล้ามเนื้อกระตุกทั่วตัว ชัก หายใจลำบากจะทำให้หมดสติ และหยุดหายใจได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงผลกระทบต่อเจริญเติบโตและระดับสติปัญญาของเด็กด้วย

2.4 คุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์เอสเตอเรส

2.4.1 ผลของค่า pH อุณหภูมิ ไอออนของโลหะ และสารเคมีต่อการทำงานของเอนไซม์เอสเตอเรส

Li et al. 2019 ศึกษาเอนไซม์เอสเตอเรสจากมันฝรั่ง (*Solanum Tuberosum*) พบว่ามีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ คือ pH 7.0 อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส และพบว่าไอออนของ Ca^{2+} และ Ba^{2+} สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่พบว่าเอนไซม์เอสเตอเรสจากถั่วลันเตา (*Pisum sativum* L.) มีสถานะที่เหมาะสมในการศึกษาเอนไซม์ คือ pH 7.0 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Chandre et al. 2014) และเอนไซม์เอสเตอเรสจากเมล็ด *Caesalpinia mimosoides* มีสถานะที่เหมาะสมในการศึกษาเอนไซม์ คือ pH 7.0 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Bhavith K P et al. 2014; Kantharaju และ Murthy 2014) รายงานว่า เอนไซม์เอสเตอเรสจากเมล็ดมะขาม (*Tamarindus indica*) มีสถานะที่เหมาะสมของเอนไซม์อยู่ในช่วง pH 7.0-7.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส – 50 องศาเซลเซียส ในขณะที่ Shivashankar, B และ Premkumari 2014 พบว่าเอนไซม์จากเห็ด *Hypsizygus ulmarius* มี

สภาวะที่เหมาะสม คือ pH 6.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และนอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไอออน Cu^{2+} จาก CuSO_4 ทำให้เอนไซม์จะมีกิจกรรมที่สูงขึ้น ในขณะที่ Fe^{2+} จาก FeSO_4 ทำให้กิจกรรมเอนไซม์มีค่าลดลง

Hou et al. 2012 ได้ศึกษาคูณลักษณะของเอนไซม์เอสเทอร์เรสจากแป้งสาลี พบว่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการศึกษา คือ pH 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพบว่าไอออนของ K^+ และ Na^+ ไม่มีผลต่อเอนไซม์ ในขณะที่ Mg^{2+} Ca^{2+} และ Fe^{2+} ช่วยเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ และในขณะที่ Ba^{2+} Pb^{2+} และสาร PMSF (4.5 mM) และ *N*-bromosuccinimide (11 mM) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ในขณะที่ Wang et al. 2012 รายงานผลการศึกษาว่าเอนไซม์เอสเทอร์เรสจากแป้งสาลีที่ศึกษามีค่า pH 6.38 และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสม

Subramani et al. 2012 รายงานการศึกษาเอนไซม์จากสบู่ดำ (*Jatropha curcas*) ที่พบว่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการศึกษา คือ pH 6.5 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในขณะที่ Staubmann et al. 1999 ซึ่งได้ศึกษาสบู่ดำ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการศึกษา คือ pH 7.0 อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส และพบว่าไอออนของ Ba^{2+} Mn^{2+} และ Ca^{2+} ช่วยเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ และในขณะที่ Cu^{2+} Sn^{2+} และ Fe^{2+} ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และยังพบว่าสารละลาย 20% เอทานอล และ 10-30% อะซิโตน ช่วยเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ ในขณะที่สาร 10% เมทานอล และ 50% อะซิโตน ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

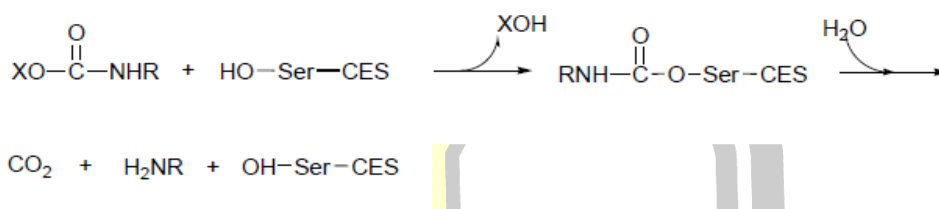
Chandrashekharaiah et al. 2011 รายงานการศึกษาเอนไซม์จากเมล็ดตำแย (*Mucuna Pruriens*) ซึ่งพบว่า pH 7.0-7.5 และอุณหภูมิ 37-45 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาเอนไซม์ นอกจากนี้ Chandrasekaran et al. 2011 ศึกษาเอนไซม์จากเห็ด *Sparassis crispa* พบว่า สภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์อยู่ในช่วง pH 8.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และยังพบว่า ไอออนโลหะ Ca^{2+} รักษากิจกรรมเอนไซม์ไว้คงเดิมในขณะที่ Zn^{2+} Co^{2+} และ K^+ ทำให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลงร้อยละ 40

2.4.2 ผลของยาฆ่าแมลงต่อการทำงานของเอนไซม์เอสเทอร์เรส

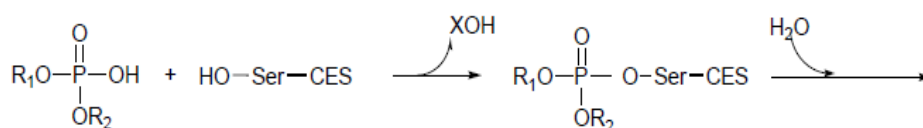
การศึกษากลไกการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะใช้เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสในกลุ่มเอสเทอร์เรส B หรือ เอนไซม์อัลลิเอสเทอร์เรส (Esterases B) เนื่องจากสามารถถูกยับยั้งปฏิกิริยาจากยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (OPs) และ กลุ่มคาร์บาเมต (CAs) ได้ ดังแสดงในภาพประกอบ 2.8 ซึ่งจะคล้ายกับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสารในธรรมชาติทั่วไป โดยจะเกิดมาจากปฏิกิริยาฟอสโฟไรเลชัน (phosphorylation) และปฏิกิริยาคาร์บาไมลเลชัน (carbamylation) ตามลำดับ และในขั้นตอนสุดท้ายของปฏิกิริยาคาร์บาไมลเลชัน น้ำในระบบจะทำปฏิกิริยา แล้วเกิดการสลายตัวของกรดคาร์บาไมกไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ สารประเภทเอมีน และเอนไซม์เอสเทอร์เรสอิสระ ซึ่งแตกต่างจาก

ขั้นตอนสุดท้ายของปฏิกิริยาฟอสโฟไรเลชั่น ซึ่งเอนไซม์ในปฏิกิริยาจะไม่สามารถหลุดออกมาเป็นเอนไซม์อิสระในระบบได้อีก (Colovic et al. 2013)

A



B



ภาพประกอบ 2.8 กลไกการยับยั้งปฏิกิริยาของยาฆ่าแมลง กลุ่มคาร์บาเมต (A)

และกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (B)

ที่มา: Colovic et al. 2013

การศึกษาปฏิกิริยาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอสเตอร์เรสที่สกัดจากตัวอย่างพืชกับยาฆ่าแมลง กลุ่ม OPs และ กลุ่ม CAs มีการศึกษาในตัวอย่างพืชหลายหลาย เช่น ปี ค.ศ. 2014 Kantharaju และ Murthy ได้สกัดเอนไซม์เอสเตอร์เรสจากเมล็ดมะขาม (*Tamarindus indica*) ที่กำลังออก พบเอนไซม์เอสเตอร์เรส จำนวน 9 ไอโซไซม์ และได้ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยใช้วิธีทางแคลอริเมตริก (colorimetric method) โดยใช้ α -naphthyl acetate เป็นสารตั้งต้น ทำปฏิกิริยากับตัวยับยั้งปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ OPs (dichlorvos), CAs (serine sulphate) และ sulphydryl (PCMB) ผลการศึกษาพบว่าเอนไซม์เอสเตอร์เรสจากมะขามถูกยับยั้งปฏิกิริยาจากยาฆ่าแมลง กลุ่ม OPs และ CAs โดยพบว่าเอนไซม์เอสเตอร์เรสไอโซไซม์ที่ 1 ถึง 8 มีความไวต่อสารยาฆ่าแมลง กลุ่ม OPs และ sulphydryl ในขณะที่ไอโซไซม์ที่ 9 มีความไวต่อสารกลุ่ม OPs และ CAs

Hou et al. 2012 ได้ศึกษาเอนไซม์เอสเตอร์เรสจากแป้งสาลี (*Triticum aestivum* L.) และศึกษาปฏิกิริยาการยับยั้งของเอนไซม์โดยใช้ยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs (dichlorvos, isocarbophos) และ CAs (carbofuran, carbendazim) ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ α -naphthyl acetate เป็นสารตั้งต้น และใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ตรวจวัดความเข้มของสี ที่ความยาวคลื่น 535 nm จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานโดย dichlorvos carbofuran และ

carbendazim โดยพบว่าค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ที่ร้อยละ 50 (IC₅₀) คือ 0.31– 63.12 ppm

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาเอนไซม์เอสเตอร์เรสจากแป้งสาลี โดยศึกษา ค่า LOD ของยาฆ่าแมลงตกค้าง กลุ่ม OPs (methamidophos, dichlorvos, phoxim, dimethoate และ malathion) ที่ตกค้างในผักกาดหอม พบค่า LOD คือ 0.17, 0.11, 0.11, 0.96 และ 1.70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จากการศึกษา พบว่าวิธีดังกล่าวมีความเหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์สาร dichlorvos, dimethoate และ malathion เพราะค่า LOD ที่ได้ต่ำกว่าค่า ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limits; MRLs) แต่ในขณะที่สาร methamidophos และ phoxim ต้องนำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอน ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต จึงจะมีค่า LOD ที่ต่ำกว่าค่า MRLs (Wang et al. 2012)

เอนไซม์เอสเตอร์เรส JCSE-I ซึ่งสกัดจากเมล็ดสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) สามารถถูกยับยั้งปฏิกิริยาจากสารยาฆ่าแมลง กลุ่ม OPs (dichlorvos, parathion และ phosphamidon) ในขณะที่กลุ่ม CAs (carbaryl และ eserine sulfate) และสาร sulphhydryl inhibitors (*p*-chloromercuribenzoate, PCMB) ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ซึ่ง การศึกษานี้ใช้วิธีทางแคลอริเมตริก (colorimetric method) โดยใช้ 1-แนฟทอล อะซิเตต (1-naphthyl acetate) เป็นสารตั้งต้น (Subramani, Chandrashekharaiyah, et al. 2012) ในขณะที่ เอนไซม์เอสเตอร์เรส ME-III และ ME-IV ที่สกัดจากเมล็ดของตำแย (*Mucuna pruriens*) สามารถถูก ยับยั้งปฏิกิริยาจากยาฆ่าแมลง กลุ่ม OPs (dichlorvos และ phosphamidon) กลุ่ม CAs (carbaryl และ eserine sulfate) และสาร sulphhydryl inhibitors (*p*-chloromercuribenzoate, PCMB) (Chandrashekharaiyah et al. 2011)

Li et al. 2009 ศึกษาเอนไซม์เอสเตอร์เรสที่สกัดจากหัวเหียงทำปฏิกิริยา การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่อยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และ CAs โดยใช้เป็นสารตั้งต้น อัลฟาแนฟ ทอล อะซิเตต (α -naphthyl acetate) และใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ตรวจวัดความเข้มของสี ปฏิกิริยา โดยใช้ความยาวคลื่น 595 nm พบว่าเอนไซม์มีความไวต่อสารกลุ่ม OPs 18 ชนิด และ CAs 6 ชนิด

Gershtater, Sharples and Edwards 2006 ได้ศึกษาเอนไซม์เอสเตอร์เรสที่ สกัดจากเมล็ดข้าวโพด (*Zea mays*) งา (*Sorghum bicolor*) และข้าว (*Oryza sativa*) พบว่า เอนไซม์สามารถถูกยับยั้งการทำงานจากยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs (paraoxon) ได้เช่นกัน ขณะที่เอนไซม์ เอสเตอร์เรสที่สกัดจากใบของ *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (Apocynaceae) ถูกยับยั้งการ ทำงานจากยาฆ่าแมลง กลุ่ม OPs เท่านั้น (Carvalho et al. 2003)

Govindappa et al. 1987 ได้ศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอสเตอเรสที่สกัดจากยางของ *Synadenium grantii* Hook, f โดยใชยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs (paraoxon และ dichlorvos) กลุ่ม CAs (serine sulphate, carbaryl, neostigmine bromide) และ *p*-chloromercuribenzoate (PCMB) ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานจากสารกลุ่ม OPs เท่านั้น

ในปี ค.ศ. 1985 Upadhyya, Govardhan และ Veerabhadrapa รายงานว่าเอนไซม์เอสเตอเรสที่สกัดจากเมล็ดข้าวฟ่าง (*Eleusine coracana* Gaertn) สามารถถูกยับยั้งการทำงานจากยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs (dichlorvos, phosphamidon) และ CAs (serine sulphate) โดยพบว่าเอนไซม์มีความไวต่อสารกลุ่ม OPs มากกว่ากลุ่ม CAs



บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่าง สารเคมี และเครื่องมือวิเคราะห์

3.1.1 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่นำมาศึกษาทั้งหมดซื้อจากร้านค้าในจังหวัดชลบุรี โดยเมล็ดธัญพืชที่นำมาศึกษาประกอบด้วย ถั่วเหลือง (*Glycine max* L.) ถั่วแดงหลวง (*Phaseolus vulgaris* L.) ถั่วดำ (*Phaseolus mungo*) ถั่วเขียว (*Vigna radidate*) ถั่วลิสง (*Aracluis hyogaea*) ถั่วแดง (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi) งา (*Sesamum indicum*) ลูกเดือย (*Coix lacryma-jobi* L.) และ ข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulqare* L.) แป้งจากธัญพืชที่นำมาศึกษา คือ แป้งสาลี (*Triticuma cevitum* L.) และแป้งข้าวโพด (*Zea mays*)

3.1.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดเป็น HPLC grade หรือ analytical grade ซึ่งประกอบด้วย ammonium sulfate, magnesium sulfate anhydrous, sodium acetate anhydrous, sodium dihydrogen phosphate, disodium hydrogen phosphate, sodium carbonate, copper sulfate, sodium hydroxide, sodium tetraborate decahydrate, sodium potassium tatrte, extrelut 20 NT, ethyl acetate และ dispersive-SPE (150 mg MgSO₄, 50 mg PSA, 50 mg GCB) ซื้อจากบริษัทเมอร์ค (Germany) จำกัด

Bovine serum albumin (BSA), fast blue B salt, Dialysis tubing, mercaptoethnol, o-phthaladehyde, Folin&Cocalteu's phenol reagent, sodium lauryl sulfate, α -naphthylol และ α -naphthyl acetate ซื้อจากบริษัท บริษัท ซิกมา-อัลดริช จำกัด (St. Louis, MO, USA)

Methanol, acetic acid, acetonitrile, dichloromethane, n-hexane และ ethyl acetate ซื้อจากบริษัทฮันนี่เวลล์ จำกัด (Burdick & Jackson, USA).

3.1.3 ยาฆ่าแมลงมาตรฐาน

สารมาตรฐานกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphorus; OPs); acephate, azinphos-methyl, chlorpyrifos, dichlorvos, diazinon, dicrotophos, dimethoate, EPN,

ethion, methamidophos, methidathion, mevinphos, monocrotophos, omethoate, parathion, parathion-methyl, phosalone, pirimiphos-methyl, profenophos, prothiophos และ triazophos

สารมาตรฐานกลุ่มคาร์บาเมต (carbamates; CAs); aldicarb, carbaryl, carbofuran, 3-OH carbofuran, methiocarb, methomyl และ oxamyl โดยสารมาตรฐานทั้งหมดซื้อจาก บริษัท Dr.Ehrenstorfer (Augsburg, Germany)

3.1.4 เครื่องมือวิเคราะห์

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและเครื่องตรวจวัดชนิด fluorescence detector (High performance liquid chromatography; HPLC-FLD) ที่ต่อกับเครื่อง post column derivatization (Water-Alliance system e2695, USA) สำหรับตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม CAs

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีและเครื่องตรวจวัดชนิด Flame photometric detector (Gas chromatography; GC-FPD⁺) (Agilent Technology 7890, USA) สำหรับตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม OPs

เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (Perkin Elmer Instruments, USA) ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร สำหรับตรวจวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ กิจกรรมการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ และความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร สำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณของโปรตีนรวม

เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) (ความเร็วสูงสุด 592 G-fore, 6660 Series, Centurion, Scientific Ltd, UK) ความเร็วปั่นเหวี่ยงที่ใช้ คือ 300 G-fore

เครื่องบดปั่นความเร็วสูง (Ultra –Turrax homogenizer; รุ่น T18 digitalยี่ห้อIKA)

เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator; BUCHI R210)

เครื่องระเหยสารละลายแบบ heating box และแก๊สไนโตรเจนสำหรับระเหยสารสกัด

3.1.5 อุปกรณ์และน้ำยาสำหรับชุดทดสอบ

ชุดทดสอบยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม OPs และ CAs ทางการค้า (Commercial pesticide test-kit) จำนวน 4 ชุดทดสอบ

3.2 แผนการวิจัยและการวิเคราะห์ข้อมูล

3.2.1 แผนการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลองที่มีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ CRD (Completely Randomized Design) เพื่อมุ่งศึกษาหัวข้อต่างๆ โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้ คือ

ส่วนที่ 1) การคัดเลือกตัวอย่างพืชที่มีความไว (Sensitivity) สูงที่สุดในการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs

การศึกษาประกอบไปด้วย

1. ศึกษากิจกรรมและค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส
2. ศึกษาปฏิบัติการยับยั้งการทำงานและค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถ

ตรวจพบได้ (Limits of detection; LOD) ของยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม OPs และ CAs

3. ศึกษาสภาวะความคงตัวของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส

ส่วนที่ 2) การเปรียบเทียบการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากตัวอย่างพืชที่ศึกษาและเอนไซม์ทางการค้า

การศึกษาประกอบไปด้วย

1. การศึกษาเปรียบเทียบความไว (sensitivity) ของการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ระหว่างเอนไซม์ทางการค้าและเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากตัวอย่างพืชที่ศึกษา

2. การประเมินประสิทธิภาพการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ในตัวอย่างผักสดด้วยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทียบกับวิธีมาตรฐาน

3.2.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิจัยนี้วิเคราะห์ข้อมูลสถิติเชิงพรรณนาใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ร้อยละ และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และใช้โปรแกรมสถิติสำเร็จรูป IBM SPSS Statistics 23 สำหรับการทดสอบสมมติฐานของตัวอย่างที่ไม่เป็นอิสระต่อกัน โดยใช้ Paired-Sample T-Test และการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way Analysis of Variance) โดยใช้วิธี Duncan multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3.3 วิธีการ

3.3.1 การคัดเลือกตัวอย่างพืชที่มีความไว (Sensitivity) สูงที่สุดในการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs

ในการคัดเลือกตัวอย่างพืชที่มีความไว (Sensitivity) สูงที่สุดในการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs จะพิจารณาจากตัวอย่างพืชที่มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ และความไว (sensitivity) ของเอนไซม์ต่อยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs โดยมีวิธีการทดลองดังนี้

3.3.1.1 การศึกษากิจกรรมคาร์บอกซิลเอสเตอเรสและค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส

การศึกษานี้ข้อนี้ประกอบไปด้วยการศึกษาทดลองวิธีการต่างๆ คือ การศึกษาสภาวะของสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส การศึกษากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส การทำเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสให้บริสุทธิ์บางส่วน การศึกษาค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส และการหาปริมาณโปรตีนรวม ซึ่งมีวิธีการทดลอง ดังนี้

การศึกษาสภาวะของสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส ได้ประยุกต์ตามวิธีการของ Li et al. 2009 และ Wang et al. 2012 มีขั้นตอนดังนี้ นำตัวอย่างเมล็ดธัญพืช (ถั่วเหลือง ถั่วแดงหลวง ถั่วดำ ถั่วเขียว ถั่วลิสง งา ข้าวฟ่าง ลูกเดือย และข้าวบาร์เลย์) มาล้างให้สะอาดและผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น สำหรับแบ่งธัญพืช (แบ่งข้าวโพดและแบ่งลาลี) ไม่ต้องนำมาบดละเอียด ขั้นตอนการสกัดเอนไซม์แบ่งเป็นการศึกษา 2 ชุด คือ

1) ศึกษาปริมาณตัวอย่างที่เหมาะสมในการศึกษาเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสโดยศึกษาปริมาณตัวอย่างที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างซึ่งเริ่มจากปริมาณตัวอย่าง 3 กรัม และเพิ่มปริมาณเป็น 6 9 12 และ 15 กรัม ตามลำดับ

2) การศึกษาชนิดของตัวสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส ที่มีผลต่อปริมาณเอนไซม์ในพืชตัวอย่างที่ศึกษา จากการทบทวนงานวิจัยได้เลือกสารที่นำมาสกัดเอนไซม์ 2 ชนิด คือ น้ำปราศจากไอออนและสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M, pH 7.0)

โดยการสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส เริ่มจากชั่งตัวอย่างในข้อ (1) ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 ml จากนั้นเติมตัวสกัดเอนไซม์ปริมาตร 30 ml เขย่าผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปแช่เย็นทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาแล้วเทตัวอย่างลงใส่หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 50 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge โดยใช้แรงเหวี่ยง 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที หลังจากการปั่นเหวี่ยงเสร็จสิ้น ตัวอย่างจะแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนใส และตะกอนตัวอย่างพืช การศึกษาครั้งนี้จะใช้

ส่วนใสซึ่งก็คือ สารสกัดเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) และเก็บสารสกัดเอนไซม์หยาบในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส

การศึกษากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส ได้ประยุกต์ตามวิธีการของ Li et al. 2009 และ Wang et al. 2012 มีขั้นตอน คือ ทำการเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยปิเปตตัวอย่างเอนไซม์ 1 ml และสารตั้งต้น α -naphthyl acetate (0.3 mM) 5 ml ลงในหลอดทดลองเขย่าผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้ตัวอย่างเอนไซม์และสารตั้งต้นทำปฏิกิริยากันที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที หลังจากนั้นจะหยุดปฏิกิริยาด้วยการปิเปตสาร DBLS 1 ml (1% fast blue B salt และ 5% Sodium laury sulphate อัตราส่วน 2:5) ลงในหลอดตัวอย่างเขย่าผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที ขั้นตอนสุดท้ายจะศึกษาปฏิกิริยาของตัวอย่างด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 nm และนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ค่ายูนิตของเอนไซม์ (Unit;U) จากสูตรคำนวณหน่วยของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (Unit;U) เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสที่เปลี่ยนสารตั้งต้น (α -naphthyl acetate) ไปเป็นผลิตภัณฑ์ (α -naphthol) ปริมาณ 1 μ M ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่กำหนด ซึ่งการคำนวณกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจะใช้กราฟมาตรฐาน α -naphthol ความเข้มข้น 3-27 μ M โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ และสำหรับหลอดเทียบสี (Blank) ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M, pH 7.0) แทนตัวอย่างเอนไซม์

การทำเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสให้บริสุทธิ์บางส่วน ได้ประยุกต์ตามวิธีการของ Ali et al. 2013 ; Bhavith et al. 2014 และ Asperen 1962 ดังนี้ โดยนำสารสกัดเอนไซม์หยาบ ปริมาตร 10 ml มาตกตะกอนโปรตีนด้วยการเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 3.90 กรัม โดยการเติมช้าๆและคนให้เกลือละลายอย่างทั่วถึง ซึ่งจะได้สารละลายโปรตีนที่มีเกลืออิ่มตัวร้อยละ 60 นำตัวอย่างไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างเทลงใส่หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงตกตะกอนขนาด 15 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge โดยใช้แรงเหวี่ยง 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เก็บส่วนของตะกอนข้างล่างหลอด และเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M, pH 7.0) ปริมาตร 2 ml นำไปทำไดอะไลซิส

สำหรับการทำไดอะไลซิส มีขั้นตอนดังนี้ เริ่มจากการตัดถุงไดอะไลซิสให้มีความยาวประมาณ 10 cm จากนั้นนำไปแช่น้ำให้มีความอ่อนตัวประมาณ 5 นาที นำเชือกมัดด้านท้ายของถุงไดอะไลซิส จากนั้นเทตัวอย่างที่ละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M, pH 7.0) ปริมาตร 2 ml ลงในถุงไดอะไลซิส นำเชือกอีกเส้นมามัดที่ด้านบนของถุงไดอะไลซิส มัดถุงติดกับแท่งแก้วคน แล้วนำไปแช่ในบีกเกอร์ที่บรรจุสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M, pH 7.0)

ปริมาตร 300 ml แช่ตัวอย่างทิ้งไว้ข้ามคืน จะได้สารสกัดเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนอยู่ในถุงไดอะไลซิส เก็บเอนไซม์ไว้ในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการทดลองต่อไป

การศึกษาค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส ประยุกต์ตามวิธีการของ Ali et al. 2013; Bhavith et al. 2014 และ Asperen 1962 เป็นการคำนวณจากค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส 1 หน่วยของเอนไซม์ ต่อปริมาณโปรตีนรวมของสารสกัดเอนไซม์ ดังนั้นจึงต้องทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมของสารสกัดเอนไซม์

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวม ประยุกต์ตามวิธีการของ Lowry, Rosebrough และ Randall 1951 ซึ่งมีขั้นตอน คือ ปิเปตตัวอย่างเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม 1 ml และเติมสารละลาย Complex-forming reagent tartrate ปริมาตร 5 ml ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Cioaltea reagent (1N) ปริมาตร 0.5 ml ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 750 nm คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 10 25 50 100 150 200 และ 300 $\mu\text{g/ml}$ ทดสอบ 3 ซ้ำ และใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M, pH 7.0) แทนตัวอย่างเอนไซม์สำหรับหลอดเทียบสี (Blank)

3.3.1.2 การศึกษาปฏิกิริยาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (limits of detection; LOD) ของยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม OPs และ CAs

การศึกษาค่าความไว (sensitivity) ของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน ต่อยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs เป็นการทดสอบปฏิกิริยาการยับยั้งการทำงานของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้ยาฆ่าแมลงมาตรฐานกลุ่ม OPs จำนวน 24 ชนิด และกลุ่ม CAs จำนวน 7 ชนิด ตามวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งการศึกษาศักยภาพการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (limits of detection; LOD) ของยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม OPs และ CAs โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Chandrasekaran et al. 2011; Kantharaju and Murthy 2014) มีขั้นตอนดังนี้

การศึกษาศักยภาพการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ จะเหมือนกับการศึกษากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสในข้อ 3.3.1.2 แต่มีข้อแตกต่างกัน คือ ก่อนการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ตัวอย่างกับสารตั้งต้น จะปิเปตตัวอย่างเอนไซม์ 1 ml และยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs หรือ CAs ที่ระดับความเข้มข้น 0.001 – 3.0 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 1 ml เมื่อผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เพื่อให้ตัวอย่างเอนไซม์และยาฆ่าแมลงได้ทำปฏิกิริยากัน เมื่อครบเวลาแล้วจึง

เติมสารตั้งต้น α -naphthyl acetate (0.3 mM) 5 ml ลงในหลอดตัวอย่างอย่างเขย่าผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที หลังจากนั้นจะดำเนินการทดสอบเหมือนข้อ 3.3.1.2 โดยทดสอบที่ระดับความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงระดับละ 3 ซ้ำ

สำหรับหลอดเทียบสี (Blank tube) ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M, pH 7.0) แทนตัวอย่างเอนไซม์ และหลอดควบคุม (Control tube) จะทำการทดสอบเหมือนตัวอย่าง (Sample tube) แต่ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนตัวอย่างยาฆ่าแมลงจากนั้นจะนำค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance ; Abs) ที่ได้มาคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (% Inhibition; I (%)) จากสูตร

$$I \% = \left(\frac{\text{Abs control} - \text{Abs sample}}{\text{Abs control}} \right) \times 100$$

เมื่อ ค่า I (%) คือ ค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

Abs_{Control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม

Abs_{Sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดตัวอย่าง

ค่า I (%) ที่ได้จะนำมาใช้ในการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า I (%) และความเข้มข้นยาฆ่าแมลงเพื่อหาค่า IC₁₀

IC₁₀ คือ Inhibitory concentration at 10% (IC₁₀) หมายถึง ความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 10%

การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (limits of detection; LOD) ของยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม OPs และ CAs

การศึกษาในข้อนี้จะศึกษาในตัวอย่างผักและผลไม้ โดยตัวอย่างที่นำมาศึกษาจะยึดตามการแบ่งตามประเภทของ Codex alimentarius commission 1993 คือ ใช้ตัวอย่างแอปเปิ้ล (apple) เป็นตัวแทนผักและผลไม้ กลุ่ม High moisture, Low Chlorophyll โดยใช้ส่วนของพืชทั้งหมด ยกเว้นส่วนก้านและเมล็ดแข็ง และใช้ตัวอย่างผักกาดหอม (lettuce) เป็นตัวแทนผักและผลไม้ กลุ่ม High moisture, High Chlorophyll โดยใช้ส่วนของพืชทั้งหมด ยกเว้นส่วนที่ใบเน่า หรือแห้ง

การศึกษาค่า LOD (Limit of detections) จะการเติมยาฆ่าแมลงมาตรฐานกลุ่ม OPs และ CAs ที่ระดับความเข้มข้น 0.001-0.3 µg/ml ลงในตัวอย่างผักและผลไม้ หลังจากสกัดตัวอย่างด้วยวิธี Modified QuEChERS แล้วจะทดสอบด้วยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งค่า I (%) ที่ได้จะนำมาใช้ในการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า I (%) และความ

เข้มข้นยาฆ่าแมลง เพื่อหาค่า IC_{10} ซึ่งค่า IC_{10} นั้น ตามวิธีการของ Enzyme inhibition assay จะแสดงถึงค่า LOD (Amine et al. 2016; Jeanty and Marty 1998; Wang et al. 2012)

การสกัดตัวอย่างผักสดและผลไม้โดยวิธี Modified QuEChERS วิธีการสกัดตัวอย่างนี้ ย่อมาจาก Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged และ Safe ซึ่งเป็นวิธีการสกัดตัวอย่างสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่รวดเร็ว ง่าย ราคาถูก มีประสิทธิภาพ คงทนและปลอดภัย โดยปัจจุบันนี้วิธี QuEChERS ถือว่าเป็นวิธีที่แพร่หลายในการสกัดตัวอย่าง ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้วิธี Modified QuEChERS ตามวิธีการของ ทองสุข ปายะนันท์ และคณะ 2015

การสกัดตัวอย่างด้วยวิธี Modified QuEChERS มีขั้นตอนดังนี้ ซึ่งตัวอย่างผักผลไม้สดที่ปั่นละเอียดแล้ว 10 กรัม ลงในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 50 ml เติม 1% acetic acid ใน acetonitrile 10 ml เขย่าอย่างแรง 1 นาที จากนั้นเติม magnesium sulfate 4 กรัม และ sodium acetate 1 กรัม เขย่าให้ผสมเข้ากัน 1 นาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 3,500 rpm นาน 5 นาที แบ่งสารสกัดส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง 5 ml ใส่ในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 15 ml เติม dispersive-SPE ($MgSO_4$ 150 mg PSA 50 mg และ GCB 50 mg) เขย่า 1 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 3,500 rpm นาน 15 นาที ปิเปตสารสกัดส่วนใสที่ได้ 2 ml ใส่ใน graduated tube ขนาด 15 ml นำไประเหยลดปริมาตรจนเกือบแห้งด้วยเครื่องระเหยสารละลายโดยใช้แก๊สไนโตรเจน

จากนั้นนำตัวอย่างที่ระเหยลดปริมาตรแล้ว มาปรับปริมาตรซึ่งมี 2 วิธี คือ การปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสม n-hexane: ethyl acetate (3 :1) จนครบ 2 ml เพื่อนำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม OPs ด้วยเครื่อง GC-FPD⁺ และการปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M, pH 7.0) เพื่อนำไปศึกษาปฏิกิริยาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสของยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และ CAs โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.3.1.3 การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส

ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ (stability) โดยการศึกษาค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 วัน และนำค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ที่ได้ในแต่ละวันมาเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ เพื่อนำข้อมูลประกอบในการเก็บรักษาสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนให้มีความเหมาะสมในการใช้งาน

3.3.2 การศึกษาการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ของเอนไซม์ทางการค้าและเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากตัวอย่างพืชที่ศึกษา

3.3.2.1 การศึกษาความไว (sensitivity) ของการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ระหว่างเอนไซม์ทางการค้าและเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากตัวอย่างพืชที่ศึกษา

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสที่ศึกษากับเอนไซม์ทางการค้าที่ใช้ในการในการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม OPs และ CAs ที่จำหน่ายในท้องตลาด ในเบื้องต้นพบว่าในท้องตลาดมีชุดทดสอบยาฆ่าแมลงตกค้าง (Commercial pesticide test-kit) สำหรับตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม OPs และ CAs ที่นิยมและใช้อย่างแพร่หลายหลากหลายชนิด

จากการศึกษาคู่มือการใช้งานชุดทดสอบพบว่าแต่ละชุดจะมีรายละเอียดปลีกย่อยแตกต่างกันแต่ทุกชุดใช้หลักการเดียวกัน คือ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส (Cholinesterase inhibition technique) โดยมียาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และ CAs เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้ ยิ่งถ้าตัวอย่างที่นำมาตรวจวิเคราะห์มีปริมาณยาฆ่าแมลงตกค้างสูง การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสจะเพิ่มสูงมากขึ้นตาม เมื่อเติมสารเข้าไปปฏิกิริยากับสารผลิตภัณฑ์ สีของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทดสอบก็จะเข้มมากน้อยตามการทำงานของเอนไซม์ ยิ่งมีสีเข้มมากแสดงว่าในตัวอย่างไม่มีตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แต่หากสีจางแสดงว่าในตัวอย่างมีตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส การศึกษาในครั้งนี้จะนำเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสที่ศึกษามาทำปฏิกิริยาแทนที่เอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสในชุดทดสอบทางการค้า (ธนพงศ์ ภูวาลี และคณะ 2559; พิชรี ภคภษมา และคณะ 2559; อัจจิมา ทองบ่อ และคณะ 2561) และนำวิธีการตรวจสอบที่เหมาะสมมาประยุกต์ใช้กับเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสที่ศึกษา

3.3.2.2 การประเมินประสิทธิภาพการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ในตัวอย่างผักสดด้วยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทียบกับวิธีมาตรฐาน

การตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม OPs และ CAs ในตัวอย่างผักสดด้วยวิธีการมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งเป็นการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม OPs โดยใช้เครื่อง GC-FPD⁺ และตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม CAs ด้วยเครื่อง HPLC-post column derivatization-fluorescence detector ตามวิธีของ ทองสุข ปายะนันท์ และคณะ (2015) โดยนำตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธี Modified QuECHERS ในข้อ 3.3.1.3 ที่ระเหยลดปริมาตรแล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสม n-hexane: ethyl acetate (3 :1) ปริมาตร 2 ml วิเคราะห์ชนิด

และปริมาณยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม OPs จะใช้เครื่อง GC-FPD⁺ (Agilent Technology 7890, USA) ซึ่งมีสภาวะของเครื่อง ดังนี้

Column:	DB-1701, 30 m, 0.25 mm, i.d. 0.25 μ m film thickness
Back inlet:	220°C, Pulse splitless 0.8 min
Oven:	80°C , 1 min, 15°C /min to 180 °C , 3°C /min to 205°C, 7 min, 40 °C /min to final 260 °C 18 min
Front detector:	220°C, FPD ⁺ 60 ml/min, N ₂ for make up

การตรวจวิเคราะห์วิเคราะห์ชนิดและปริมาณยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม CAs จะนำตัวอย่างมาสกัดด้วยวิธี Solid phase extraction (SPE) ก่อนทำการวิเคราะห์

การสกัดตัวอย่างผักสดและผลไม้โดยวิธี Solid phase extraction (SPE)

ประยุกต์ตามวิธี ทองสุข ปายะนันท์ และคณะ 2015 ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ ซึ่งตัวอย่างผักผลไม้สดที่ปั่นละเอียดแล้ว 20 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 250 ml เติมสารละลายผสมระหว่าง methanol : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ [1:1] ปริมาตร 100 ml นำบีกเกอร์ที่มีตัวอย่างไปบดด้วยเครื่องบดปั่นความเร็วสูง (Ultra-Turrax homogenizer) นาน 2 นาที หลังจากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ด้วย suction pump และปั่นล้างตะกอนอีกครั้งด้วย methanol : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ [1:1] ปริมาตร 50 ml นำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากกรกรองใส่ขวดก้นกลม ขนาด 500 ml แล้วนำไประเหยลดปริมาตรด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator) จนสารละลายตัวอย่างในขวดก้นกลมจนเหลือประมาณ 75 ml หลังจากนั้นเทสารละลายตัวอย่างในขวดก้นกลมใส่ใน mixing cylinder ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ขั้นตอนต่อมาจะเป็นขั้นตอนการทำสารละลายตัวอย่างให้บริสุทธิ์โดยวิธี Solid phase extraction (SPE) โดยการบีบอัดสารละลายตัวอย่าง 20 ml ลงในคอลัมน์ที่บรรจุสารเฟสคงที่ (extrelut 20 NT) ซึ่งเป็นตัวดูดซับ ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อให้สารละลายตัวอย่างถูกดูดซับบนตัวดูดซับ หลังจากนั้นจะชะคอลัมน์ด้วยสารผสมระหว่าง dichloromethane กับ n-hexane [1:1] 100 ml ร่องรับสารที่ผ่านคอลัมน์ด้วยขวดก้นกลมขนาด 250 ml นำสารที่ได้ไประเหยลดปริมาตรด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศจนแห้ง แล้วเติม methanol 10 ml ระเหยต่อจนแห้ง เติม methanol 2 ml ดูดสารละลายตัวอย่างออกจากขวดก้นกลมใส่ใน graduated tube นำไประเหยลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยสารละลายด้วยแก๊สไนโตรเจน ระเหยตัวอย่างให้เหลือประมาณ 1.5 ml ปรับปริมาตรสารตัวอย่างในหลอดด้วย methanol จนครบปริมาตร 2 ml แล้วกรองผ่าน syringe filter PTFE 13 ml 0.20 μ m ใส่ในขวดขนาด 2 ml นำไปวิเคราะห์ชนิดและ

ปริมาณยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม CAs ด้วย HPLC-post column derivatization-fluorescence detector (Water-Alliance system e2695, USA) ซึ่งมีสภาวะของดังนี้

Fluorescence detector:	Ex 345 nm, EM 455 nm		
Injection volume:	20 μ l		
Flow rate:	1.0 ml/min		
Analytical column:	Zorbax SB C8 size 25 cm X 4.6 cm		
Column oven:	30°C		
Post-column:	Reagent flow 0.3 ml/min, Reactor temperature 100 °C		
HPLC gradient system:	Time (min)	Water (%)	Acetonitrile (%)
	0	88	12
	30	30	70
	30-45	88	12

การประเมินประสิทธิภาพการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม OPs และ CAs

ในตัวอย่างผักสดและผลไม้สด เพื่อหาความถูกต้อง (accuracy) ความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) โดยวิธีอ้างอิงจาก National Association of Testing Authorities (NATA); General Accreditation Guidance-Validation and verification of quantitative and qualitative test methods, January 2018 และประยุกต์ตามวิธีของ จ้ารัส เลิศศรี 2560 และ อัจจิมา ทองบ่อ และคณะ 2561 ดังนี้

ผลวิเคราะห์วิธีปฏิบัติการ	ผลการวิเคราะห์วิธีมาตรฐาน	
ทำงานของเอนไซม์	ตรวจพบ	ตรวจไม่พบ
ตรวจพบ	ผลบวกจริง (True Positive; TP)	ผลบวกлож (False Positive; FP)
ตรวจไม่พบ	ผลลบлож (False Negative; FN)	ผลลบจริง (True Negative; TN)

เมื่อ TP; True Positive คือ ผลบวกจริง หมายถึง ผลวิเคราะห์ของวิธีปฏิบัติการทำงานของเอนไซม์ตรวจพบเหมือนกับวิธีมาตรฐาน

FP; False Positive คือ ผลบวกหลง หมายถึง ผลวิเคราะห์ของวิธียับยั้งการทำงานของเอนไซม์ตรวจพบแต่วิธีมาตรฐานตรวจไม่พบ

FN; False Negative คือ ผลลบหลง หมายถึง ผลวิเคราะห์ของวิธียับยั้งการทำงานของเอนไซม์ตรวจไม่พบแต่วิธีมาตรฐานตรวจพบ

TN; True Negative คือ ผลลบจริง หมายถึง ผลวิเคราะห์วิธียับยั้งการทำงานของเอนไซม์ตรวจไม่พบเหมือนกับวิธีมาตรฐาน

การประเมินประสิทธิภาพการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม OPs และ CAs โดยนำจำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยวิธียับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทียบกับวิธีมาตรฐานซึ่งเกณฑ์การยอมรับอยู่ในช่วง 80–100% ซึ่งแต่ละพารามิเตอร์มีสูตรการคำนวณ ดังนี้

$$\text{ความไว (\%sensitivity)} = \left(\frac{TP}{TP + FN} \right) \times 100$$

$$\text{ความจำเพาะ (\%specificity)} = \left(\frac{TN}{FP + TN} \right) \times 100$$

$$\text{ความถูกต้อง (\%accuracy)} = \left(\frac{TP + TN}{\text{Total sample}} \right) \times 100$$

พูน ปณ ทิโต ชีเว

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปราย

4.1 ผลการศึกษาการคัดเลือกตัวอย่างพืชที่มีความไว (Sensitivity) ในการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs

4.1.1 ผลการศึกษากิจกรรมและค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากสารสกัดพืชตัวอย่าง

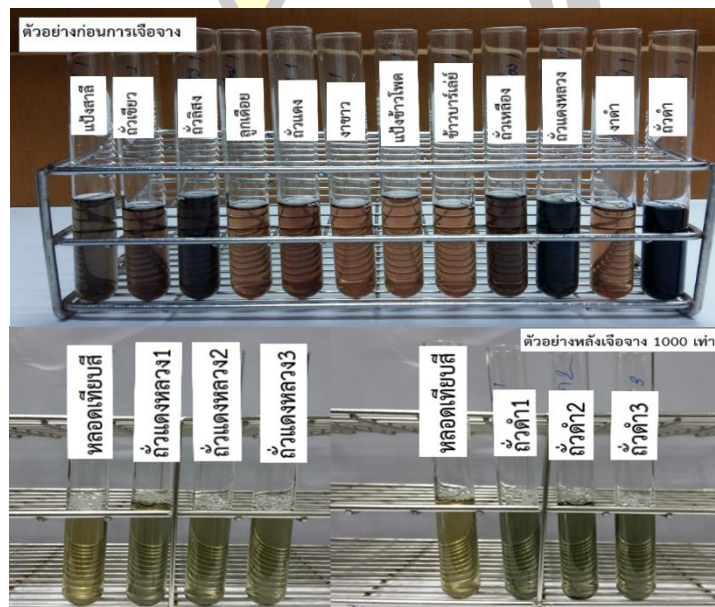
ทำการศึกษาชนิดของสารสกัด ปริมาณน้ำหนักของตัวอย่างพืช การทำเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน ที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ โดยศึกษาเอนไซม์จากตัวอย่างพืชทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น α -naphthyl acetate ที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส และศึกษาค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส เพื่อใช้ในการพิจารณาคัดเลือกพืชที่เหมาะสม

4.1.1.1 ผลการศึกษากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสที่ใช้น้ำเป็นตัวสกัด

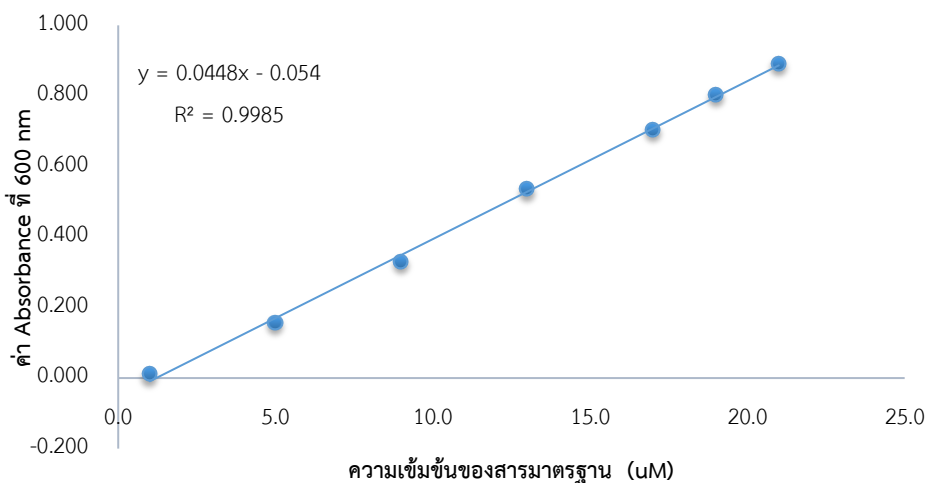
ในเบื้องต้นได้ทดลองศึกษาการสกัดเอนไซม์และทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ในตัวอย่างกลุ่มธัญพืช 2 กลุ่ม คือ เมล็ดธัญพืช (ถั่วเหลือง ถั่วแดงหลวง ถั่วดำ ถั่วเขียว ถั่วลิสง ถั่วแดง งาดำ งาขาว ลูกเดือย และข้าวบาร์เลย์) และในแป้งธัญพืช (แป้งข้าวโพด และแป้งลาลี) โดยประยุกต์ตามวิธีของ Wang et al. 2012 ซึ่งเป็นวิธีการสกัดที่ง่ายเนื่องจากใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวสกัด การสกัดจะใช้ตัวอย่าง 3 กรัม น้ำปราศจากไอออน 30 ml เขย่าผสมให้เข้ากัน นำตัวอย่างไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังการปั่นเหวี่ยงสารละลายส่วนใสของตัวอย่างที่ได้ คือ สารสกัดหยาบของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (crude extract) ที่มีความเข้มข้น 0.1 g/ml ซึ่งจะนำมาใช้ในการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ต่อไป

จากนั้นทำการเจือจางสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหยาบ ก่อนนำมาทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ ซึ่งถือเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญเนื่องจากในสารสกัดหยาบของเอนไซม์เอสเตอเรสที่สกัดได้นั้นประกอบด้วยปริมาณของโปรตีนหรือเอนไซม์อื่นจำนวนมาก ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะไปทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) สารตั้งต้นในปฏิกิริยา เกิดสารผลิตภัณฑ์จำนวนมาก ทำให้สีของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีความเข้มสูง (ภาพประกอบ 4.9) ทำให้การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) มีความยุ่งยากและเกิดความคลาดเคลื่อนของผลมากขึ้น (Wang et al. 2012) ต่อมาทำการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์เอสเตอเรส โดยประยุกต์ตามวิธีของ Ali et al. 2013 Chandrashekharaiiah K S et al. 2014 และ Asperen

K. van. 1962 การทำปฏิกิริยาจะใช้สารตั้งต้น α -naphthyl acetate ซึ่งสารดังกล่าวจะมีความจำเพาะกับเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส และในขั้นตอนสุดท้ายจะนำสารละลายที่ได้จากปฏิกิริยาไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องที่ความยาวคลื่น 600 nm และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ (Unit; U) โดยเทียบจากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน α -naphthol (ภาพประกอบ 4.10) ผลของค่ากิจกรรมเอนไซม์ของตัวอย่างแต่ละชนิดแสดงในตาราง 4.9



ภาพประกอบ 4.9 ผลผลิตสารสกัดจากตัวอย่างพืชหลังทำปฏิกิริยากับเอนไซม์หยาบ (crude enzyme)

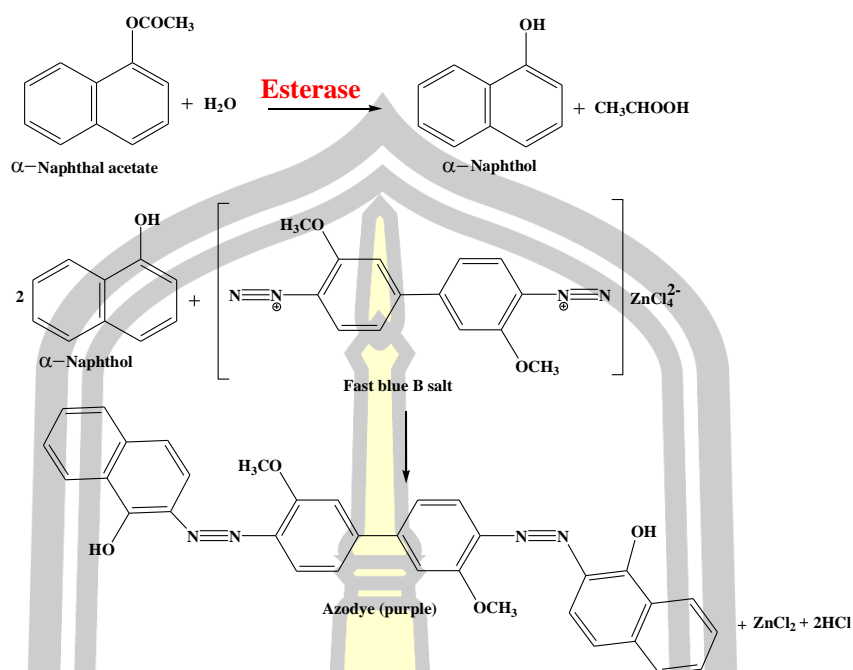


ภาพประกอบ 4.10 กราฟมาตรฐาน α -naphthol

จากตาราง 4.9 ค่ากิจกรรมของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหยาบของตัวอย่างพืชแต่ละชนิด พบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์อยู่ระหว่าง 92.6 – 0.9 U โดยถั่วดำมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดและแป้งข้าวโพดมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำสุด คือ 92.6 และ 0.9 U ตามลำดับ แสดงว่าวิธีการสกัดตัวอย่างพืชมีความเหมาะสมในการใช้สกัดเอนไซม์เอสเตอเรสจากตัวอย่างพืชที่สนใจศึกษา Wang et al. 2012 ได้อธิบายกลไกของปฏิกิริยา (ภาพประกอบ 4.11) ดังนี้คือ สารสกัดเอนไซม์หยาบจะทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะ α -naphthyl acetate แล้วเกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ α -naphthol โดยสารผลิตภัณฑ์นี้จะสามารถทำปฏิกิริยากับสีเอโซ (fast blue B salt) เกิดเป็นสารประกอบสีม่วงได้ และนอกจากนี้ยังพบว่าสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะ α -naphthyl acetate ยังใช้ในการจำแนกชนิดของเอนไซม์เอสเตอเรสได้ โดยหากเอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นชนิดนี้ได้จะถูกจัดให้เป็น เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (Carboxylesterase; CES: EC 3.1.1.1) และมีงานวิจัยที่สอดคล้องซึ่งพบว่ามีการศึกษาสารสกัดเอนไซม์จากพืชที่นำมาทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะ α -naphthyl acetate และเอนไซม์ดังกล่าวถูกจัดเป็นเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสเช่นเดียวกับเอนไซม์ของตัวอย่างที่นำมาศึกษา Bhavith K P et al. 2014 ศึกษาเอนไซม์จากเมล็ด *Caesalpinia mimosoides* และ Shivashankar, B และ Premkumari 2014 ศึกษาเอนไซม์จากเห็ด *Hypsizygus ulmarius* และ Subramani et al. 2012 ศึกษาเอนไซม์จากเมล็ดของ *Jatropha curcas* ซึ่งเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากพืชแต่ละชนิด มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ คือ 90.0 5.74 และ 2.25 U ตามลำดับ

ตาราง 4.9 กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสของตัวอย่างพืชที่ศึกษา

ตัวอย่าง	กิจกรรมเอนไซม์ (U)	ตัวอย่าง	กิจกรรมเอนไซม์ (U)
ถั่วดำ	92.6	งาดำ	8.8
ถั่วแดงหลวง	88.5	งาขาว	8.8
ถั่วลิสง	13.3	แป้งสาลี	1.0
ถั่วเหลือง	11.5	ข้าวบาร์เลย์	0.9
ถั่วเขียว	10.3	ลูกเดือย	0.9
ถั่วแดง	9.7	แป้งข้าวโพด	0.9



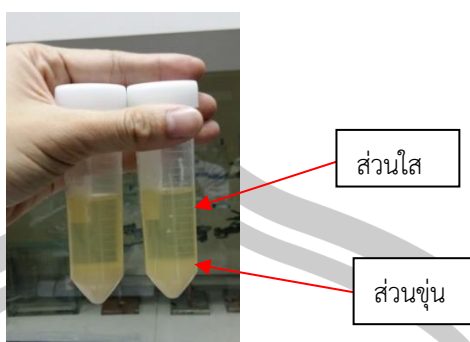
ภาพประกอบ 4.11 กลไกปฏิกิริยาของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส

ที่มา: Wang et al. 2012

4.1.1.2 ผลของการเพิ่มปริมาณตัวอย่างต่อกิจกรรมเอนไซม์

ผลจากการเก็บรักษาสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหยابสำหรับใช้ในการทดสอบจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อนำตัวอย่างออกมาใช้ศึกษาต่อสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหยاب จะแยกชั้นเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนใส และ ส่วนขุ่น (ภาพประกอบ 4.12) จึงได้นำสารสกัดเอนไซม์มาทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ โดยแบ่งตัวอย่างเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนใส ส่วนขุ่น และ ส่วนที่ผสมเป็นเนื้อเดียว ซึ่งจากการทดสอบพบว่า สารสกัดส่วนขุ่นมีค่ากิจกรรมเอนไซม์มากกว่าสารสกัดส่วนใส และส่วนที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน โดยกิจกรรมเอนไซม์ มีค่า 293.7, 171.8 และ 31.4 U ตามลำดับ

จากผลการทดสอบดังกล่าวข้างต้น พบว่าส่วนขุ่นของสารสกัดเอนไซม์มีค่ากิจกรรมเอนไซม์มากกว่าสารสกัดส่วนใส และส่วนที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ดังนั้นหากสามารถทำให้สารสกัดเอนไซม์ที่สกัดได้ตกตะกอนหรือแยกชั้นให้ได้ส่วนขุ่นเพิ่มมากขึ้น จะทำให้ได้สารสกัดเอนไซม์มีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้น จากข้อจำกัดของเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจริง มีความเร็วในการปั่นเหวี่ยงสูงสุด 5,000 rpm จึงทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์มากขึ้น จึงประยุกต์วิธีการสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส โดยการผันแปรการเพิ่มปริมาณของตัวอย่างให้มากขึ้น



ภาพประกอบ 4.12 การแยกชั้นของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสหยาบ
ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การศึกษาในเบื้องต้นได้ใช้ตัวอย่างถั่วดำเป็นต้นแบบโดยศึกษาการเพิ่มปริมาณของพืชตัวอย่างเป็น 6, 9, 12 และ 15 กรัม ซึ่งคิดเป็น 2, 3, 4 และ 5 เท่าของปริมาณตัวอย่างเดิม สารสกัดเอนไซม์ที่ได้จะมีความเข้มข้น 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 g/ml ตามลำดับ จากนั้นจะนำสารสกัดเอนไซม์หยาบที่ได้มาทดสอบกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรส ซึ่งพบว่า สารสกัดเอนไซม์ทั้งหมดมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณตัวอย่างมากขึ้น โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 172.2 ± 2.2 – 916.6 ± 2.8 U ซึ่งพบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาคผนวก ก) อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณตัวอย่างเป็น 12 กรัม มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ 916.6 ± 2.8 U ในขณะที่ปริมาณตัวอย่าง 15 กรัม จะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ 904.9 ± 2.8 U (ตาราง 4.10) อาจเป็นผลเนื่องมาจากหลอดที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างมีขนาดปริมาตร 50 ml ซึ่งเมื่อตัวอย่างถั่วผสมกับน้ำปราศจากไอออนที่ใช้สกัด ทำให้มีปริมาตรและน้ำหนักของตัวอย่างในหลอดปั่นเหวี่ยงเพิ่มขึ้น ประกอบกับความเร็วยรอบในการปั่นเหวี่ยงมีค่าต่ำเพียง 5000 rpm ทำให้การแยกสารสกัดเอนไซม์ได้ไม่ดีพอ จากผลการทดสอบนี้จึงเลือกใช้ปริมาณตัวอย่างเริ่มต้น 12 กรัม เป็นปริมาณที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสในตัวอย่างที่ศึกษาต่อไป

ตาราง 4.10 กิจกรรมเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสหยาบที่ใช้พืชตัวอย่าง น้ำหนักต่างกัน

น้ำหนักตัวอย่าง (g)	กิจกรรมเอนไซม์ (U)
6	176.2 ± 2.2
9	359.4 ± 1.8
12	916.6 ± 2.8
15	904.9 ± 2.8

4.1.1.3 ผลการศึกษาค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส

การศึกษาในหัวข้อนี้จะเลือกตัวอย่างเมล็ดธัญพืชตระกูลถั่ว เนื่องจากผลการศึกษาในข้อ 4.1.1.1 พบว่า ตัวอย่างถั่ว (ถั่วแดง ถั่วเขียว ถั่วดำ ถั่วเหลือง และถั่วแดงหลวง) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าตัวอย่างชนิดอื่นๆ ที่นำมาศึกษา นอกจากนี้ตัวอย่างเมล็ดธัญพืชเหล่านี้ยังหาง่าย ราคาถูก ดังนั้นจึงเลือกศึกษาตัวอย่าง เมล็ดถั่วแดง ถั่วเขียว ถั่วดำ ถั่วเหลือง และถั่วแดงหลวง โดยยกเว้นการศึกษาตัวอย่างถั่วลิสง เนื่องจากสารสกัดเอนไซม์ที่ได้จะมีส่วนของไขมันแขวนลอยอยู่ปริมาณมาก ทำให้รบกวนกระบวนการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ ซึ่งจำเป็นต้องมีการเพิ่มขั้นตอนของการกำจัดไขมันในกระบวนการอีก อย่างไรก็ตามเนื่องจากถั่วแต่ละชนิดมีปริมาณของโปรตีนมากน้อยแตกต่างกัน (บุญวิสุทธิ์ และคณะ 2544; งานส่งเสริมสุขภาพและอาชีวอนามัย โรงพยาบาลสงขลานครินทร์, ม.ป.ป.) ซึ่งจะมีผลต่อปริมาณของเอนไซม์ที่สกัดได้ในตัวอย่าง ดังนั้นการเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์ของตัวอย่างแต่ละชนิด จะใช้ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ (Specific activity: U/mg) ซึ่งเป็นค่าที่บอกความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ ในการวัดปริมาณของเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อปฏิกิริยานั้นๆ โดยไม่รวมถึงโปรตีนชนิดอื่นๆ ที่รวมอยู่ในสารสกัดเอนไซม์โดยค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์จะบอกถึงความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ หากตัวอย่างชนิดไหนมีค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์สูง แสดงว่ามีความบริสุทธิ์สูงหรือมีโปรตีนหรือเอนไซม์ชนิดอื่นๆปนเปื้อนในสารสกัดเอนไซม์ตัวอย่างในปริมาณน้อย (ศศิธร แทนทอง และ อัครกะบัทคาน ปาทาน 2553) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงใช้ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์เป็นตัวตัดสินว่าเมล็ดธัญพืชถั่วชนิดไหนจะมีความไวในปฏิกิริยามากกว่ากัน (ตาราง 4.11)

ตาราง 4.11 ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหายาจากเมล็ดธัญพืชถั่วชนิดต่างๆ

ชนิดตัวอย่าง	กิจกรรมเอนไซม์ (U)	ปริมาณโปรตีนรวม (mg/ml)	ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ (U/mg)
ถั่วดำ	821.0	999.2	0.82±0.07 ^a
ถั่วแดง	253.5	466.7	0.56±0.10 ^b
ถั่วเขียว	337.6	778.5	0.44±0.08 ^c
ถั่วเหลือง	291.5	1,178.6	0.25±0.04 ^d
ถั่วแดงหลวง	263.3	1,230.6	0.22±0.03 ^d

หมายเหตุ: 95% confidence interval ($P < 0.05$), Duncan's multiple range test

จากข้อมูลข้างต้นแสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหายาบจากถั่วแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยพบว่าถั่วดำมีค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์มากกว่าถั่วชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาคผนวก ก) คือ 0.82 ± 0.07 U/mg รองลงมาคือ ถั่วแดง ถั่วเขียว ถั่วแดงหลวง และถั่วเหลือง ซึ่งมี 0.56 ± 0.10 , 0.44 ± 0.08 , 0.25 ± 0.04 และ 0.22 ± 0.03 U/mg ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดหายาบของเอนไซม์จากถั่วทุกชนิดมีค่าต่ำมาก ซึ่งจากงานทบทวนเอกสารงานวิจัยพบว่าวิธีการเพิ่มค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ให้สูงขึ้น ทำได้โดยการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ซึ่งมีด้วยกันหลายวิธี ตัวอย่างเช่น การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต การใช้วิธีการทางโครมาโทกราฟีต่างๆ เช่น โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (DEAE–Sephrose anion exchange chromatography) โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเรชัน (gel filtration chromatography) โครมาโทกราฟีแบบวิเคราะห์แยกน้ำหนัโมเลกุล (Size Exclusion Chromatography) เป็นต้น (Bhavith K P et al. 2014; Chandrashekharaiyah et al. 2011; Subramani, Chandrashekharaiyah, et al. 2012)

4.1.1.4 ผลการศึกษาผลของการทำเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนต่อค่าแอกติวิตี

จำเพาะเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส

การทำให้สารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากถั่วให้บริสุทธิ์มากขึ้น สามารถทำให้สารสกัดเอนไซม์มีค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นการศึกษาในหัวข้อนี้จะศึกษาการทำบริสุทธิ์บางส่วน (Partial purification) ของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสโดยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละ 60 ซึ่ง Li et al. 2009 ได้รายงานว่าการตกตะกอนด้วยเกลืออัมมัวแอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละ 60 เป็นปริมาณเกลือที่เหมาะสมจะทำให้ได้ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์สูง โดยหลังจากการตกตะกอนสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหายาบด้วยเกลือแล้ว จะนำตัวอย่างที่ได้มาปั่นเหวี่ยง แล้วนำส่วนตะกอนของโปรตีนมาทำไดอะไลซิสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M, pH 7.0) ที่ไว้ค้างคืน จากนั้นจะนำเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน โดยจะเรียกว่า สารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน ซึ่งอยู่ในถุงไดอะไลซิสมาศึกษากิจกรรมเอนไซม์และค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ ผลการศึกษาแสดงในตาราง 4.12 พบว่า ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนของถั่วดำมีค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์สูงสุด เมื่อเทียบกับถั่วชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาคผนวก ก) รองลงมาคือ ถั่วแดง ถั่วเขียว ถั่วแดงหลวง และถั่วเหลือง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.06 ± 0.22 , 1.07 ± 0.25 , 0.96 ± 0.21 , 0.64 ± 0.13 และ 0.39 ± 0.06 U/mg ตามลำดับ

ตาราง 4.12 ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่ว

ชนิดตัวอย่าง	กิจกรรมเอนไซม์ (U)	ปริมาณโปรตีนรวม (mg/ml)	ค่าแอกติวิตีจำเพาะ (U/mg)
ถั่วดำ	1,625.5	531.8	3.06 ± 0.22 ^a
ถั่วแดง	353.9	351.8	1.07 ± 0.25 ^b
ถั่วเขียว	341.0	364.5	0.96 ± 0.21 ^b
ถั่วแดงหลวง	457.7	744.3	0.64 ± 0.13 ^c
ถั่วเหลือง	302.0	808.0	0.39 ± 0.06 ^d

หมายเหตุ: 95% confidence interval ($P < 0.05$), Duncan's multiple range

เมื่อเปรียบเทียบค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ระหว่างสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหยาบ และสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน (ตาราง 4.13) พบว่าค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน มีค่าสูงกว่าสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหยาบในทุกตัวอย่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาคผนวก ข ตาราง ข.38) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chandrashekharaiyah K S et al. 2014 ที่ศึกษาเอนไซม์จากเมล็ด *Caesalpinia mimosoides* งานวิจัยของ Chandrashekharaiyah, Ramachandra S, และ Siddalinga, M 2011 ศึกษาเอนไซม์จากเห็ด *Sparassis crispa* และงานวิจัยของ Subramani et al. 2012 ที่ได้ศึกษาเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสที่สกัดจากเมล็ดของ *Jatropha curcas* โดยพบว่า เมื่อนำสารสกัดเอนไซม์หยาบมาทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต จะพบปริมาณโปรตีนรวมของเอนไซม์มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับสารสกัดเอนไซม์เริ่มต้น แต่ค่ากิจกรรมเอนไซม์และค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์จะเพิ่มสูงขึ้น

พูน ปณ ทิโต ชีเว

ตาราง 4.13 ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหยาบและสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน

ตัวอย่าง	ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ (U/mg)	
	1	2
ถั่วดำ	0.82±0.07 ^a	3.06 ±0.22 ^a
ถั่วแดง	0.56±0.10 ^b	1.07±0.25 ^b
ถั่วเขียว	0.44±0.08 ^c	0.96±0.21 ^b
ถั่วแดงหลวง	0.22±0.03 ^d	0.64±0.13 ^c
ถั่วเหลือง	0.25±0.04 ^d	0.39±0.06 ^d

หมายเหตุ 1 คือ สารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหยาบ และ 2 คือ สารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน, 95% confidence interval ($P < 0.05$), Duncan's multiple range test

4.1.1.5 ผลการศึกษากิจกรรมและค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์คาร์บอกซิล

เอสเตอเรสที่ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นตัวสกัด

จากการศึกษาการสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสโดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวสกัด ซึ่งวิธีการสกัดดังกล่าวสามารถสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสได้และเมื่อนำเอนไซม์ที่สกัดได้มาทำบริสุทธิ์บางส่วน ด้วยด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตพบว่าค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์สูงกว่าสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหยาบ และเมื่อเก็บรักษาสารสกัดเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนที่สกัดด้วยน้ำปราศจากไอออนไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อนำตัวอย่างเอนไซม์ออกมาทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ ซึ่งก่อนทดสอบจะทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา พบว่าสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางแล้วจะมีอนุภาคของสารสกัด แขนงลอยเป็นเม็ดเล็กๆ อยู่ในสารละลายซึ่งไม่เหมาะสมกับการใช้งาน ซึ่งจากการศึกษาวิธีการสกัดจากงานวิจัยอื่นๆ พบว่าการสกัดที่ทำงานไม่ยุ่งยากสามารถทำการสกัดได้มีประสิทธิภาพเป็นการสกัดโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ตามวิธีของ Ali et al. 2013 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นสารสำหรับสกัดเอนไซม์ แต่วิธีการในขั้นตอนอื่นๆ ยังคงยึดตามวิธีการของ Wang et al. 2012 ดังเดิม

ผลการศึกษาการทดสอบค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหยาบและสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นตัวสกัด พบว่าค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์

บริสุทธิ์บางส่วนสูงกว่าที่ได้จากสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหยาบ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำมีค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์สูงกว่าถั่วชนิดอื่นๆ รองลงมาคือ ถั่วเขียว ถั่วแดงหลวง ถั่วแดง และถั่วเหลือง โดยมีค่าเท่ากับ 3.96 ± 0.26 , 1.51 ± 0.10 , 1.40 ± 0.12 , 1.29 ± 0.08 และ 0.70 ± 0.04 U/mg ตามลำดับ (ตาราง 4.14) และยังพบว่าในทุกตัวอย่างค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจะมีค่ามากกว่าสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหยาบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาคผนวก ก ตาราง ก.35-ก.38 และ ภาคผนวก ข ตาราง ข.39)

ตาราง 4.14 ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหยาบและสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นตัวสกัด

ตัวอย่าง	กิจกรรมเอนไซม์ (U)		ปริมาณโปรตีนรวม (mg/ml)		ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ (U/mg)	
	1	2	1	2	1	2
	ถั่วดำ	861.9	493.6	1,306.2	1,960.1	1.53 ± 0.22 ^a
ถั่วเขียว	1,719.1	685.3	912.2	947.8	0.79 ± 0.09 ^b	1.51 ± 0.10 ^b
ถั่วแดง	851.7	512.9	666.9	776.6	0.73 ± 0.05 ^b	1.29 ± 0.08 ^c
ถั่วแดงหลวง	834.0	639.9	607.4	826.4	0.53 ± 0.07 ^c	1.40 ± 0.12 ^{bc}
ถั่วเหลือง	905.9	510.3	216.0	354.9	0.23 ± 0.05 ^d	0.70 ± 0.04 ^d

หมายเหตุ 1 คือ สารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหยาบ และ 2 คือ สารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน, 95% confidence interval ($P < 0.05$), Duncan's multiple range test

เมื่อเปรียบเทียบค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนที่ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นสารสกัด และใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นสารสกัด (ตาราง 4.15) พบว่าเอนไซม์ที่สกัดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์สูงกว่าเอนไซม์ที่ใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวสกัดในทุกตัวอย่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาคผนวก ข ตาราง ข.40) ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปในหัวข้อ การศึกษาความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน จะใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นสารสกัดพืชตัวอย่างในการศึกษา เนื่องจากมีแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์สูงกว่าสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหยาบ ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์มีความไวต่อการทำปฏิกิริยา โดยตัวอย่างถั่วที่จะใช้ในการศึกษา คือ ถั่วดำ ถั่วเขียว และถั่วแดง เนื่องจากถั่วทั้งสามชนิดมีค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์สูง แล้วยังไม่มียางงานการศึกษา นอกจากนี้ยังพบว่าค่าแอกติวิตี

ตีจำเพาะเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนของตัวอย่างถั่วดำมีค่าสูงกว่างานวิจัยอื่นๆอีก
ด้วย (ตาราง 4.15)

ตาราง 4.15 ค่าแอกติวิตีจำเพาะของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน

ตัวอย่าง	ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ (U/mg)	
	1	2
ถั่วดำ	3.06 ± 0.22 ^a	3.96 ± 0.26 ^a
ถั่วเขียว	1.07 ± 0.25 ^b	1.51 ± 0.10 ^b
ถั่วแดง	0.96 ± 0.21 ^b	1.29 ± 0.08 ^c
ถั่วแดงหลวง	0.64 ± 0.13 ^c	1.40 ± 0.12 ^{bc}
ถั่วเหลือง	0.39 ± 0.06 ^d	0.70 ± 0.04 ^d

หมายเหตุ 1 คือ สกัดโดยใช้น้ำปราศจากไอออน และ 2 สกัดโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์, 95%
confidence interval (P<0.05), Duncan,s multiple range test

ตาราง 4.16 ค่าแอกติวิตีจำเพาะของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจาก
ตัวอย่างถั่วที่ศึกษากับงานวิจัยอื่นๆ

ชนิดตัวอย่าง	ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ (U/mg)		งานวิจัยอื่นๆ
	กรณีศึกษา		
ถั่วดำ (<i>Phaseolus mungo</i>)	3.97	-	-
ถั่วแดงหลวง (<i>Phaseolus vulgaris</i> L)	1.38	5.9 × 10 ⁻² *	Ali et al. 2013
ถั่วเขียว (<i>Vigna radiata</i> (L.) Wilczek)	1.51	-	-
ถั่วเหลือง (<i>Glycine max</i> L.)	7 × 10 ⁻¹	1.7 × 10 ⁻¹ **	LI et al. 2009
ถั่วแดง (<i>Vigna umbellata</i> (Thunb.) Ohwi&Ohashi)	1.29	-	-
ตำแย (<i>Mucuna pruriens</i>)	-	5.7 × 10 ⁻²	Chandrashekaraiah, Ramachandra S and Siddalinga, M 2011
ชำเลือด (<i>Caesalpinia mimosoides</i>)	-	3.2 × 10 ⁻¹	Chandrashekaraiah K S et al. 2014
สบู่ดำ (<i>Jatropha curcas</i>)	-	1.2 × 10 ⁻¹	Subramani et al. 2012
มะขาม (<i>Tamarindus indica</i>)	-	1.5 × 10 ⁻²	Kantharaju Murthy 2014

* ทดสอบในระหว่าง การทำ Germination ** ทำ Differential centrifugation ก่อนทำการ salt
precipitation

4.1.2 ผลการศึกษาปฏิบัติการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถ

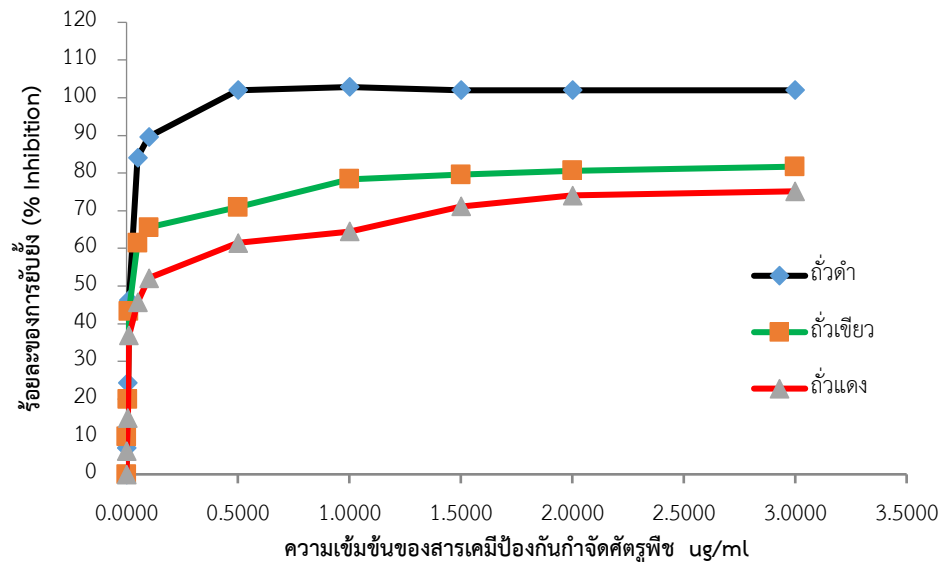
ตรวจพบได้ (limits of detection; LOD) ของยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม OPs และ CAs

เนื่องจากยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส ดังนั้นการศึกษาคูณสมบัติของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส จึงมีความสำคัญ อาทิเช่น ความไวต่อยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs เป็นต้น โดยการศึกษาที่ใช้สารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำ ถั่วแดง และถั่วเขียว มาศึกษาการยับยั้งปฏิบัติการซึ่งได้ประยุกต์ตามวิธีของ Chandrashekharaiiah, Ramachandra S และ Siddalinga, M 2011 และ Kantharaju and Murthy 2014 โดยการนำสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำ ถั่วแดง และถั่วเขียว ทำปฏิกริยากับยาฆ่าแมลงมาตรฐานกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นนำไปทดสอบกิจกรรมเอนไซม์กับ α -naphthyl acetate ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (% Inhibition; I (%)) โดยเทียบกับหลอดควบคุมซึ่งเป็นตัวอย่างเอนไซม์ที่ไม่ถูกยับยั้งโดยยาฆ่าแมลงมาตรฐาน

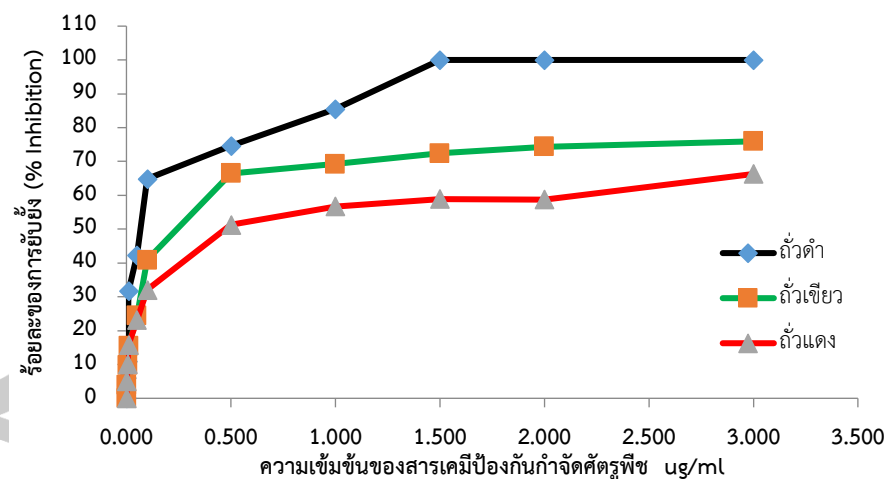
4.1.2.1 ผลการศึกษาความไว (sensitivity) ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสต่อยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs

ปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้างในผลิตภัณฑ์ เช่น ยาฆ่าแมลง สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา สารเคมีกำจัดวัชพืช จะดำเนินการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างหลายชนิดในการตรวจวิเคราะห์เพียงครั้งเดียว หรือเรียกว่า multi-pesticide residue method (พินิตา ไชยยันต์บุรณ์ และคณะ 2538) การศึกษานี้จะทำการศึกษาความไว (sensitivity) ของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน ต่อยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ซึ่งเป็นการทดสอบปฏิบัติการยับยั้งการทำงานของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้ยาฆ่าแมลงมาตรฐานกลุ่ม OPs จำนวน 24 ชนิด และกลุ่ม CAs จำนวน CAs 7 ชนิด ตามวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

วิธีการทดสอบทำโดยใช้เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่ว 3 ชนิด ได้แก่ ถั่วดำ ถั่วเขียว และถั่วแดง ที่ระดับความเข้มข้น 0.001 – 3.0 $\mu\text{g/ml}$ ทำปฏิกริยากับยาฆ่าแมลงมาตรฐานกลุ่ม OPs จำนวน 24 ชนิด และกลุ่ม CAs จำนวน CAs 7 ชนิด ผลของปฏิกริการยับยั้งเอนไซม์ในกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และระดับความเข้มข้นของยาฆ่าแมลง (ภาพประกอบ 4.13 - 4.14)



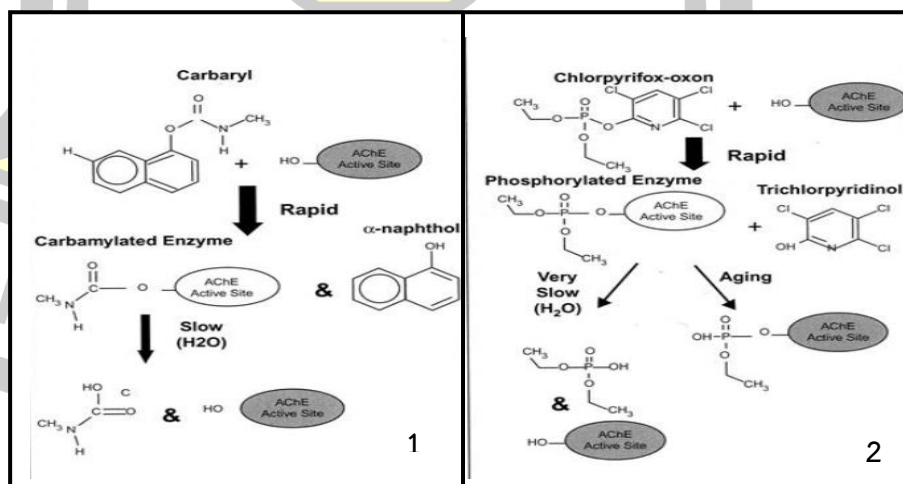
ภาพประกอบ 4.13 การยับยั้งการทำงานของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธ์บางส่วนจากถั่วดำ ถั่วแดง และ ถั่วเขียวโดยยาฆ่าแมลงมาตรฐานผสม กลุ่ม OPs 24 ชนิด



ภาพประกอบ 4.14 การยับยั้งการทำงานของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธ์บางส่วนจากถั่วดำ ถั่วแดง และ ถั่วเขียวโดยยาฆ่าแมลงมาตรฐานผสม กลุ่ม CAs 7 ชนิด

จากกราฟความสัมพันธ์แสดงให้เห็นค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธ์บางส่วนที่สกัดจากถั่วดำจะสูงกว่า ถั่วเขียว และถั่วแดง (ภาคผนวก ค ตาราง ค.41-ค.43) นอกจากนี้ยังพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของยาฆ่าแมลง มาตรฐานกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ที่เท่ากัน ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสของยาฆ่าแมลง

มาตรฐานกลุ่ม OPs จะมีค่าสูงกว่าสารกลุ่ม CAs สามารถอธิบายสาเหตุด้วยกลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอสเตอเรส (เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสและเอนไซม์คาร์บอกซอลเอสเตอเรส) ของยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs (ภาพประกอบ 4.15) โดยยาฆ่าแมลงกลุ่ม CAs จะเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบผันกลับได้ (reversible inhibitor) ซึ่งจากกลไกปฏิกิริยาพบว่าเมื่อยาฆ่าแมลงกลุ่ม CAs ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เอสเตอเรสและเมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดลง เอนไซม์เอสเตอเรสและยาฆ่าแมลงกลุ่ม CAs จะแยกออกจากกัน เอนไซม์เอสเตอเรสยังสามารถทำปฏิกิริยาต่อไปได้ ในขณะที่ยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบผันกลับไม่ได้ (irreversible inhibitor) พบว่าเมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เอสเตอเรสและเมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดลง เอนไซม์เอสเตอเรสและยาฆ่าแมลงจะไม่แยกออกจากกัน ทำให้เอนไซม์เอสเตอเรสไม่สามารถทำปฏิกิริยาต่อไปได้ ดังนั้นจากกลไกปฏิกิริยาดังกล่าวจึงทำให้ค่า I (%) แตกต่างกัน (มาลี ธีรานุสนธิ์ และอนุสรณ์ อยู่เย็น 2556; ศรัญญา พัวพลเทพ 2559) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Govindappa et al. 1987 ที่ศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากยางของ *Synadenium grantii* Hook, f ของสารกลุ่ม OPs (paraoxon, dichlorvos) และ CAs (serine sulphate, carbaryl และ neostigmine bromide) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน สารกลุ่ม OPs มีค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์สูงกว่าสารกลุ่ม CAs เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Hou et al. 2012 ที่ศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากแป้งสาลี และ Upadhy, Govardhan, and Veerabhadrapa 1985 ที่ศึกษาเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากข้าวฟ่าง (*Eleusine coracana* Gaertn.) ซึ่งต่างก็พบว่าระดับความเข้มข้นที่เท่ากันปฏิกิริยาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสของยาฆ่าแมลง กลุ่ม OPs จะมีค่าสูงกว่าสารกลุ่ม CAs



ภาพประกอบ 4.15 กลไกการยับยั้งปฏิกิริยาของสารกลุ่ม CAs (1) และสารกลุ่ม OPs (2)

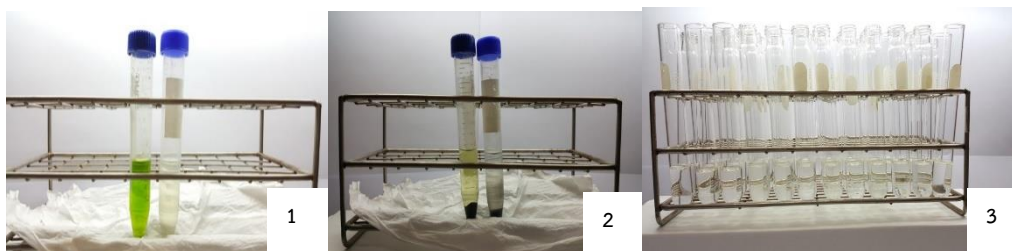
ที่มา ศรัญญา พัวพลเทพ 2559

4.2.2.2 ผลการศึกษาขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ (limits of detections; LOD) ยาฆ่าแมลง กลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs

จากการศึกษาในข้อ 4.1.2.1 พบว่าเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ บางส่วนที่สกัดจากถั่วดำ มีความไวในการทำปฏิกิริยากับยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs สูงกว่าถั่วเขียวและถั่วแดง ดังนั้นในการศึกษาขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ (limits of detections; LOD) จึงเลือกเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิบางส่วนที่สกัดจากถั่วดำมาศึกษา ทำได้โดยศึกษาปฏิกิริยาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากยาฆ่าแมลงมาตรฐานที่เจือจางในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PB; สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M, pH7) ในตัวอย่างผักกาดหอม (Lettuce) และแอปเปิ้ล (Apple)

การศึกษาในหัวข้อนี้ เบื้องต้นได้ศึกษาวิธีการสกัดตัวอย่างพืช 2 ชนิด ได้แก่ ผักกาดหอม (Lettuce) และแอปเปิ้ล ด้วยวิธี Modified QuEChERS ซึ่งวิธีการสกัดตัวอย่างนี้ใช้สำหรับการสกัดตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง กลุ่ม OPs ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography; GC-FPD⁺) แต่ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้สกัดตัวอย่างสำหรับการศึกษการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ดังนั้นจึงต้องศึกษาความเหมาะสมของวิธีการสกัดตัวอย่าง ทั้งนี้วิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวิธี Modified QuEChERS จะใช้ acetonitrile เป็นสารสกัด และ clean up ด้วยการเติม dispersive-SPE เพื่อขจัดสารปนเปื้อนอื่นๆ เช่น คลอโรฟิลล์ ไชมัน เป็นต้น ผักกาดหอม เป็นตัวแทนพืชกลุ่ม High moisture , High Chlorophyll ส่วนแอปเปิ้ลเป็นตัวแทนของพืชกลุ่ม High moisture , Low Chlorophyll สารสกัดตัวอย่างที่ได้จะมีสีของคลอโรฟิลล์ ซึ่งอาจจะรบกวนการทดสอบโดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ดังนั้นการเติม dispersive-SPE จะช่วยให้สารสกัดตัวอย่างมีความใส และในขั้นตอนสุดท้ายจะนำสารสกัดตัวอย่างไประเหยเพื่อเพิ่มความเข้มข้นและทำการปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M, pH 7.0) ซึ่งพบว่าสารสกัดตัวอย่างที่ได้ มีคุณลักษณะเหมาะสมสำหรับการทดสอบด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (ภาพประกอบ 4.16)

พจนัน ปณุกิตโต ชีเว

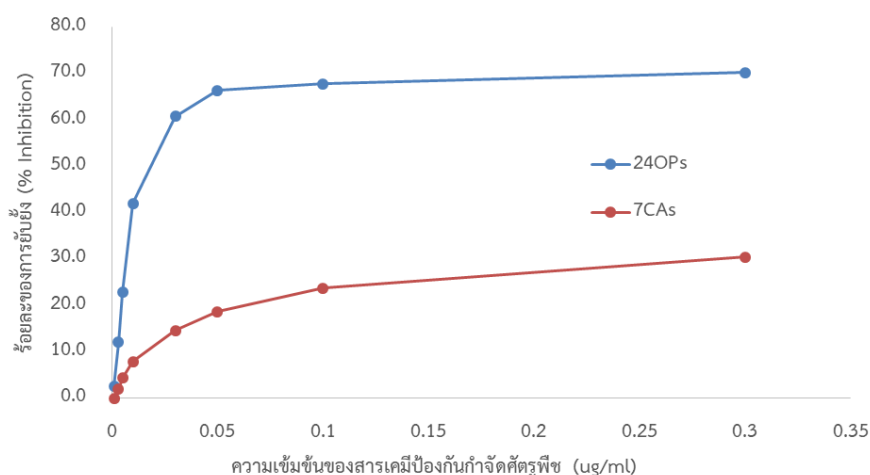


ภาพประกอบ 4.16 ตัวอย่างสารสกัดผักกาดหอม (สีเขียว) และสารสกัดแอปเปิ้ล (ใส) ก่อน (1) และหลัง (2) การ clean up ด้วย dispersive-SPE และหลังระเหยแห้งและปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (3)

ในเบื้องต้นได้เตรียมยาฆ่าแมลงมาตรฐานผสม กลุ่ม OPs และ กลุ่ม CAs ที่ระดับความเข้มข้นของสาร 0.001-0.3 $\mu\text{g/ml}$ ลงในตัวอย่างแอปเปิ้ล จากนั้นนำตัวอย่างแอปเปิ้ลมาสกัดด้วยวิธี Modified QuEChERS นำสารสกัดที่ได้มาศึกษาค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (% Inhibition; I (%)) ซึ่งค่า I (%) ที่ได้จะนำมาใช้ในการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า I (%) และความเข้มข้นยาฆ่าแมลงมาตรฐาน เพื่อหาค่า IC_{10} ซึ่งค่า IC_{10} หมายถึงค่า LOD ตามวิธีการของ Enzyme inhibition assay (Amine et al. 2016; Jeanty and Marty 1998; Wang et al. 2012)

ผลการศึกษการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธี บางส่วนที่ได้จากถั่วดำ พบว่าที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ค่า I (%) ของยาฆ่าแมลงมาตรฐานกลุ่ม OPs จะมีค่าสูงกว่าสารกลุ่ม CAs ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในข้อ 4.2.1 นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงมาตรฐานเพิ่มขึ้น ค่า I (%) จะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นและเริ่มจะคงที่ โดยพบว่าสารกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs มีค่า I (%) เริ่มคงที่ ที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ แสดงในกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า I (%) และความเข้มข้นยาฆ่าแมลง (ภาพประกอบ 4.17)

พหุ ประถมศึกษา



ภาพประกอบ 4.17 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ I (%) และความเข้มข้นยาฆ่าแมลง มาตรฐานกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ในตัวอย่างสารสกัดแอปเปิ้ล

จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า I (%) และความเข้มข้นยาฆ่าแมลงมาตรฐานกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ในตัวอย่างสารสกัดแอปเปิ้ล สามารถใช้สมการถดถอยทำนายค่า IC_{10} ได้ ซึ่งพบว่า ค่า IC_{10} ของยาฆ่าแมลงมาตรฐานกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs มีค่า 0.002 และ 0.01 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (ภาคผนวก จ ตาราง จ.52 และ ตาราง จ.53)

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 387 พ.ศ.2560 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง กำหนดค่าการตรวจพบดีฟอลต์ลิมิต (default limit) สำหรับพิษและสัตว์ ได้ไม่เกิน 0.01 mg/kg และค่า LOD ตามวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ใช้ทดสอบยาฆ่าแมลง กลุ่ม OPs ด้วยเครื่อง GC-FPD⁺ และ กลุ่ม CAs ด้วยเครื่อง HPLC-FLD มีค่าเท่ากับ 0.02 mg/kg และ 0.003 mg/kg ตามลำดับ และเมื่อทำการทดสอบค่า I (%) ตามความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงกลุ่มดังกล่าว โดยใช้เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทรีบางส่วนที่สกัดจากถั่วดำ ผลการศึกษาพบ IC_{10} ค่าดีฟอลต์ลิมิต (default limit) และค่า LOD ตามวิธีมาตรฐาน (เครื่อง GC-FPD⁺ และเครื่อง HPLC-FLD) ของตัวอย่างสารสกัดแอปเปิ้ลและผักกาดหอม ด้วยวิธียับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แสดงดังตาราง 4.17 (ภาคผนวก ง ตาราง ง.46 – ง.48)

พูน ปลูก ทัโต ชเว

ตาราง 4.17 ค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์; IC_{10} ค่าดีฟอลต์ลิมิต (Default Limit) และค่า LOD ตามวิธีมาตรฐาน (เครื่อง GC-FPD⁺ และเครื่อง HPLC-FLD)

สภาวะที่ศึกษา (ความเข้มข้น; mg/kg)	ค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์; I(%)			
	สารสกัดแอปเปิ้ล		สารสกัดผักกาดหอม	
	กลุ่ม 24OPs	กลุ่ม 7CAs	กลุ่ม 24OPs	กลุ่ม 7CAs
ค่า IC_{10}	7	9	8	10
ค่าดีฟอลต์ลิมิต	45	9	48	10
ค่า LOD	54	1	56	2

จากตาราง 4.17 แสดงค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์; I(%) ของยาฆ่าแมลงมาตรฐานกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ที่เติมลงไปในตัวอย่างแอปเปิ้ลและตัวอย่างผักกาดหอม พบว่า ค่า IC_{10} มีค่า 7, 9, 8 และ 10 ตามลำดับ ค่า I(%) ของค่าดีฟอลต์ลิมิต มีค่า 45, 9, 48, และ 10 ตามลำดับ ในขณะที่ค่า LOD ตามวิธีมาตรฐาน (เครื่อง GC-FPD⁺ และเครื่อง HPLC-FLD) มีค่า 54, 1, 56, และ 2 ตามลำดับ (ภาคผนวก ง ตาราง ง.46-ง.48)

นอกจากนี้ยังพบว่า ค่า I (%) ที่ระดับความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงมาตรฐานที่มีความเข้มข้นในปริมาณน้อย เช่น 0.002 และ 0.003 mg/kg ผลการทดสอบค่า I (%) พบว่ามีค่าน้อยมาก สาเหตุเนื่องจากการทำปฏิกิริยาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของยาฆ่าแมลงมาตรฐานที่มีความเข้มข้นในปริมาณน้อยจะทำให้ทำให้สีของปฏิกิริยาของหลอดตัวอย่างที่ทดสอบกับหลอดควบคุมที่ไม่มีปฏิกิริยาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของยาฆ่าแมลงมาตรฐาน มีความแตกต่างกันน้อยมาก เมื่อนำมาทดสอบค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณค่า I (%) ของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส จึงทำให้ค่า I (%) ที่ได้มีค่าน้อย

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นสามารถพิจารณา ค่า LOD จาก ค่า I (%) ที่ทำการศึกษาในสารสกัดแอปเปิ้ลและสารสกัดผักกาดหอมทั้ง 3 สภาวะ ซึ่งพบว่า ค่า I (%) ที่ได้จากสมการถดถอยของสารสกัดแอปเปิ้ลและสารสกัดผักกาดหอมมีค่าใกล้เคียงกัน (มีค่าอยู่ระหว่าง IC_7 - IC_{10}) ดังนั้นจึงใช้ ค่า IC_{10} ตามวิธีการ Enzyme inhibition assay เป็น ค่า LOD ของวิธีการที่ศึกษาในครั้งนี้ และเนื่องจากการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงในตัวอย่างจะดำเนินการตรวจวิเคราะห์สารหลายชนิดในการตรวจวิเคราะห์เพียงครั้งเดียว (multi-pesticide residue method) ดังนั้นค่า LOD

ของสารสกัดตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์จึงควรมีค่าใกล้เคียงกันมากที่สุด ซึ่งจากการทดสอบ ค่า IC₁₀ จากสมการถดถอย จึงเป็นค่า LOD ที่เหมาะสมที่สุด

สำหรับการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้างในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ โดยทั่วไป ใช้การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสของยาฆ่าแมลงมาตรฐาน เป็นการตรวจวิเคราะห์โดยการตรวจสอบหาฆ่าแมลงตกค้างหลายชนิดในการตรวจวิเคราะห์เพียงครั้งเดียวซึ่งยาฆ่าแมลงมาตรฐานที่ใช้ทดสอบเป็นสารผสมหลายชนิด ดังนั้นจึงต้องทราบว่ายาฆ่าแมลงมาตรฐานที่นำมาใช้ทดสอบแต่ละชนิด สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสที่สกัดได้จากถั่วดำหรือไม่ จึงได้ทำการศึกษาผลของชนิดยาฆ่าแมลงมาตรฐานต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส โดยศึกษาเปรียบเทียบค่า I (%) ของยาฆ่าแมลงมาตรฐานในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PB) (สารควบคุม) ในตัวอย่างสารสกัดผักกาดหอม (Lettuce) และสารสกัดแอปเปิ้ล (Apple) (ภาพประกอบ 4.18)

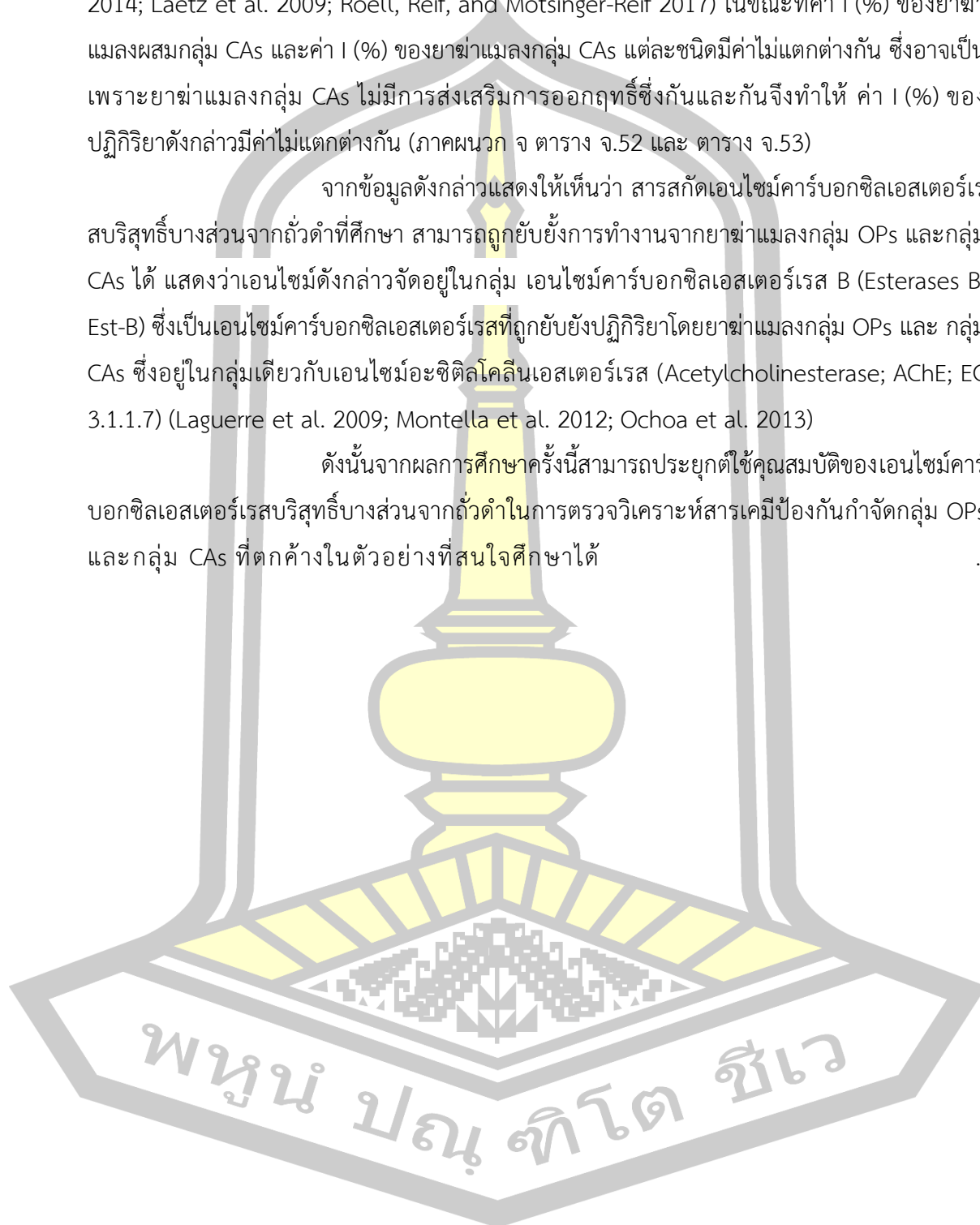
ผลการทดสอบพบว่า ค่า I (%) ของยาฆ่าแมลงมาตรฐานกลุ่ม OPs มีค่าสูงกว่ากลุ่ม CAs โดยพบว่าสารกลุ่ม OPs มีค่า I (%) เฉลี่ยร้อยละ 28 และพบว่าปฏิกิริยาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสของสารสกัดผักกาดหอมมีค่าสูงสุด รองลงมา คือ ปฏิกิริยาในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และปฏิกิริยาในสารสกัดแอปเปิ้ล มีค่าเฉลี่ยร้อยละ 27 นอกจากนี้ยังพบว่า ยาฆ่าแมลงมาตรฐานที่ให้ค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสเฉลี่ยสูงสุดทั้ง 3 ชุดการศึกษา (สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ สารสกัดผักกาดหอม และสารสกัดแอปเปิ้ล) คือสาร dichlorvos มีค่า I (%) เฉลี่ย ร้อยละ 44 โดยเมื่อพิจารณาสีของหลอดตัวอย่าง พบว่า หลอดที่ 1 ซึ่งเป็นหลอดตัวอย่างที่มีการเติมสาร dichlorvos จะมีสีของหลอดจางกว่าหลอดตัวอย่างอื่นๆ เนื่องจากสาร dichlorvos จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสทำให้เกิดสารผลิตภัณฑ์ปริมาณน้อยส่งผลให้สีของหลอดตัวอย่างจางกว่าหลอดตัวอย่างอื่นๆ (ภาพประกอบ 4.19) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kantharaju และ Murthy 2014 ที่ศึกษาสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากเมล็ดมะขาม (*Tamarindus indica*) พบมีความไวต่อสาร dichlorvos สูงโดยมีค่า I (%) ร้อยละ 100 และ Hou et al. 2012 รายงานการศึกษาเอนไซม์จากแป้งสาลี (*Triticum aestivum* L.) พบว่าสาร dichlorvos มีความไวสูงต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มีค่า I (%) ร้อยละ 90 ในขณะที่ปฏิกิริยาของสารมาตรฐานกลุ่ม CAs มีค่า I (%) เฉลี่ย ร้อยละ 13 โดยสารที่ให้เฉลี่ยสูงสุด คือ carbofuran carbaryl และ methiocarb ร้อยละ 14 และสารในกลุ่ม CAs แต่ละชนิดมี ค่า I (%) เฉลี่ย ใกล้เคียงกันแสดงให้เห็นจากสีของหลอดตัวอย่างที่มีสีใกล้เคียงกัน (ภาพประกอบ 4.20)

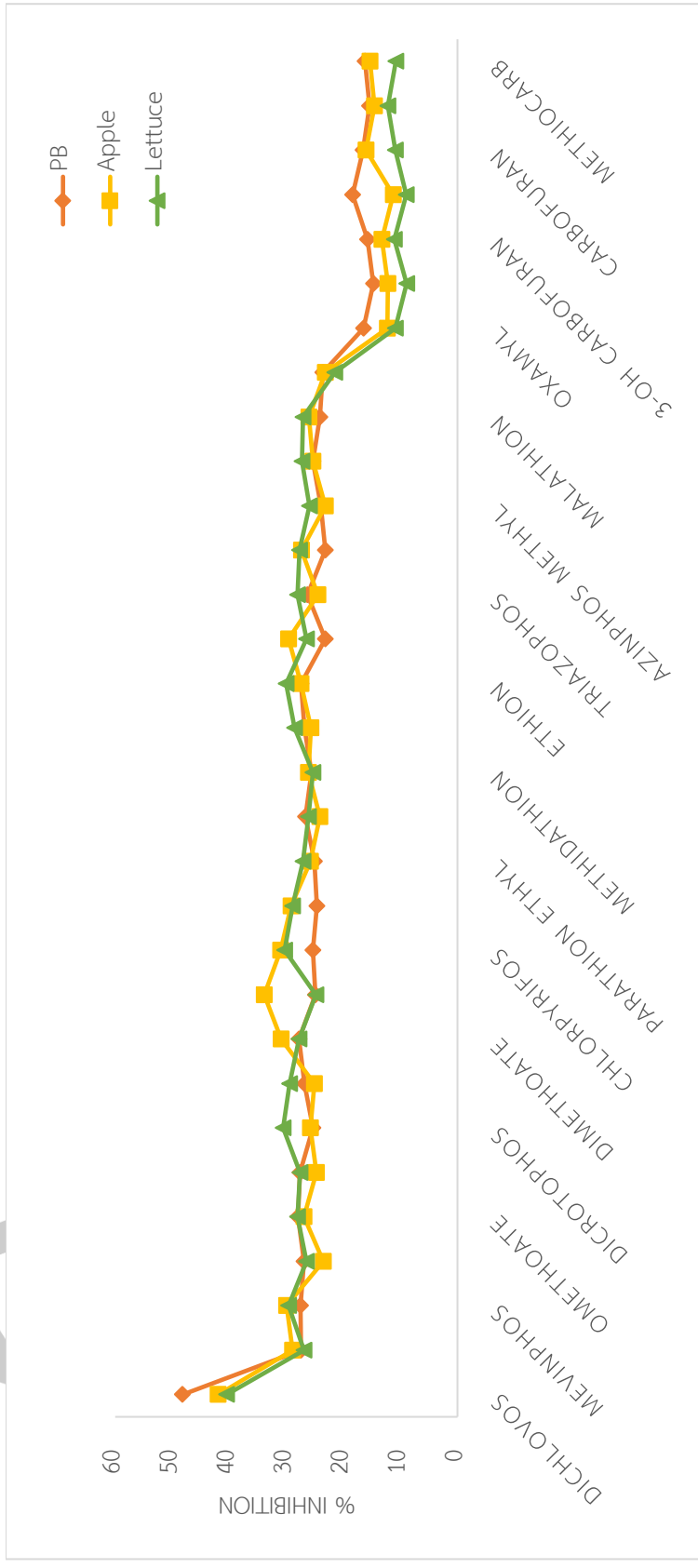
การจากศึกษาข้างต้นพบว่า ค่า I (%) ของยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม OPs มีค่า I (%) มากกว่าของยาฆ่าแมลงแยกชนิด เป็นผลมาจากยาฆ่าแมลงแต่ละชนิดจะมีการส่งเสริมการออก

ฤทธิ์ซึ่งกันและกัน ทำให้ ค่า I (%) สูงขึ้นกว่าเดิม หรือเรียกว่า Synergistic effects (Cedergreen 2014; Laetz et al. 2009; Roell, Reif, and Motsinger-Reif 2017) ในขณะที่ค่า I (%) ของยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม CAs และค่า I (%) ของยาฆ่าแมลงกลุ่ม CAs แต่ละชนิดมีค่าไม่แตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นเพราะยาฆ่าแมลงกลุ่ม CAs ไม่มีการส่งเสริมการออกฤทธิ์ซึ่งกันและกันจึงทำให้ ค่า I (%) ของปฏิกริยาดังกล่าวมีค่าไม่แตกต่างกัน (ภาคผนวก จ ตาราง จ.52 และ ตาราง จ.53)

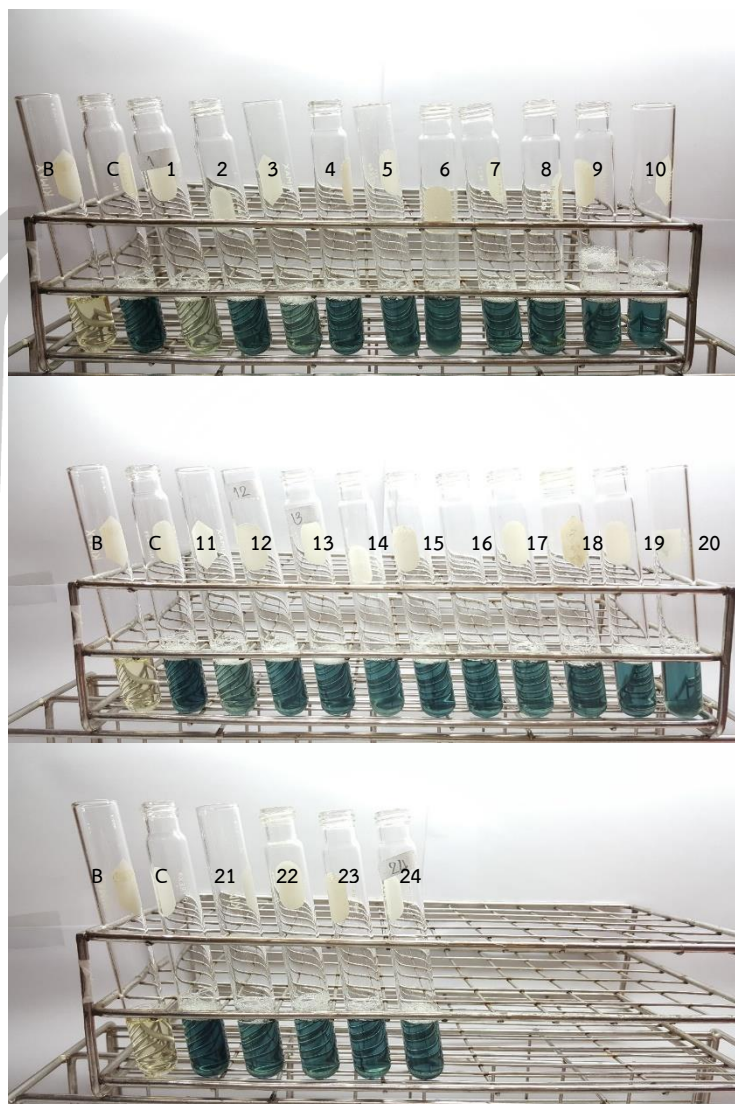
จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสเรสปริสฤทธิ์บางส่วนจากถั่วดำที่ศึกษา สามารถถูกยับยั้งการทำงานจากยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ได้ แสดงว่าเอนไซม์ดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่ม เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส B (Esterases B; Est-B) ซึ่งเป็นเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสที่ถูกยับยั้งปฏิกริยาโดยยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และ กลุ่ม CAs ซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกับเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase; AChE; EC 3.1.1.7) (Laguerre et al. 2009; Montella et al. 2012; Ochoa et al. 2013)

ดังนั้นจากผลการศึกษานี้สามารถประยุกต์ใช้คุณสมบัติของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสปริสฤทธิ์บางส่วนจากถั่วดำในการตรวจวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ที่ตกค้างในตัวอย่างที่สนใจศึกษาได้ ..



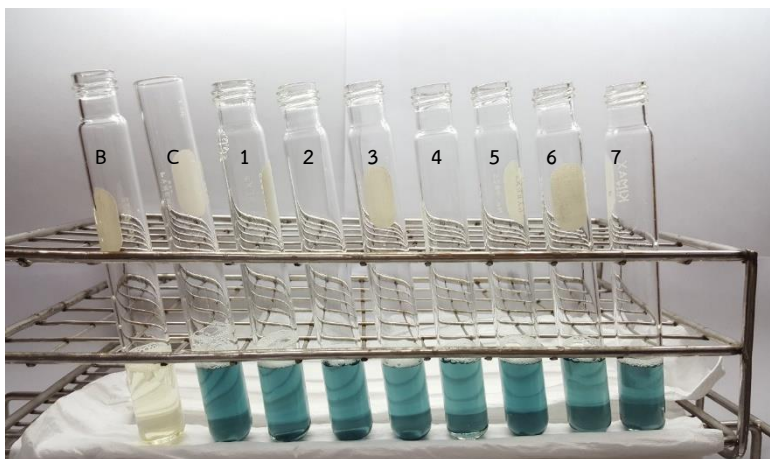


ภาพประกอบ 4.18 คาร์บอนิลของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสของยาฆ่าแมลงมาตรฐานแยกชนิด ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PB) สารสกัดแอปเปิ้ล (Apple) และสารสกัดผักกาดหอม (Lettuce)



ภาพประกอบ 4.19 ปฏิกริยาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสของ
ยาฆ่าแมลง มาตรฐาน กลุ่ม OPs

หมายเหตุ: B (blank), C (control), Dichlovos (1), Methamidophos (2), Mevinphos (3), Acephate (4), Omethoate (5), Diazinon (6), Dicrotophos (7), Monocrotophos (8), Dimethoate (9), Primiphos methyl (10), Chlorpyrifos (11), Parathion methyl (12), Parathion ethyl (13), Prothiophos (14), Methidathion (15), Profenophos (16), Ethion (17), EPN (18), Triazophos (19), Phosalone (20), Azinphos methyl (21), Fenitrothion (22), Malathion (24) และ Propagite (24)



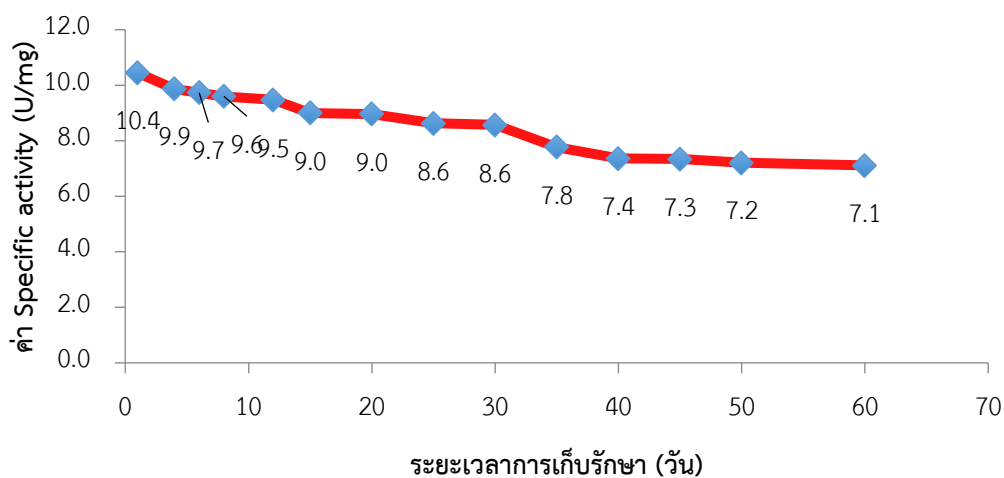
ภาพประกอบ 4.20 ปฏิบัติการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสของ
ยาฆ่าแมลง มาตรฐาน กลุ่ม CAs

หมายเหตุ : B (blank), C (control), Oxamyl (1), Methomyl (2), 3-OH carbofuran (3), Aldicarb (4), Carbofuran (5), Carbaryl (6) และ Methiocarb (7)

4.1.3 การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส

จากการศึกษาความคงตัว (stability) ของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนของถั่วดำ ในหัวข้อ โดยศึกษาค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ เมื่อเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 วัน (ตาราง 4.18) พบว่าในวันที่ 0 มีค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์เริ่มต้น 10.4 U/mg และเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษามากขึ้นค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์จะเริ่มมีค่าลดน้อยลง และวันที่ 60 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการเก็บรักษา พบว่าค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์จะมีค่าลดลงเหลือ 7.1 U/mg โดยคิดเป็นร้อยละ 31.7 (ภาพประกอบ 4.21)

พหุ ประถมศึกษา



ภาพประกอบ 4.21 ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธ์บางส่วนจากถั่วดำ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 วัน

นอกจากนี้ยังพบว่า จากการเก็บรักษาเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธ์บางส่วนจากถั่วดำ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่าค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ในช่วงของวันที่เก็บรักษา วันที่ 12-45 ค่าเฉลี่ยของค่าค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ภายในกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) (ภาคผนวก ฉ ตาราง ฉ.54-ฉ.55) (ตาราง 4.18)

จากข้อมูลดังกล่าว สามารถนำมาใช้ประกอบในการเก็บรักษาสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธ์บางส่วนที่ศึกษา ให้มีความเหมาะสมในการใช้งาน ตลอดจนการวางแผนในการสกัดเอนไซม์จากถั่วด้วยวิธีการหรือขั้นตอนใหม่ และเพื่อลดความผิดพลาดในการศึกษา อันเป็นผลมาจากค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ที่ลดลง นอกจากนี้พบว่าที่ระยะเวลาการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตั้งแต่วันที่ 30 ของการเก็บรักษาตัวอย่างสารสกัดเอนไซม์เริ่มมีกลิ่นเหม็น ซึ่งถึงแม้ว่าค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์จะลดลงเพียงร้อยละ 17.3 (8.6 U/mg) แต่ลักษณะทางกายภาพของเอนไซม์ไม่เหมาะสมต่อการใช้งาน ดังนั้นจึงควรศึกษาทดลองสกัดสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธ์บางส่วนใหม่เพื่อใช้สำหรับการทดสอบ

ตาราง 4.18 ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสในส่วนของรากแก้วดำ เมื่อการเก็บรักษา 60 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วัน / ตัวอย่างที่	ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสในส่วนของรากแก้วดำ (U/mg)														
	4	6	8	12	15	20	25	30	35	40	45	50	60		
1	11.2	10.8	10.3	10.0	10.1	9.9	8.7	8.4	8.1	7.4	6.6	7.7	7.0	7.1	
2	11.1	10.6	9.7	9.8	9.0	8.0	8.8	8.6	8.1	8.3	7.1	7.3	8.4	7.2	
3	10.7	10.5	9.3	10.1	8.9	7.8	9.4	9.1	9.2	8.0	7.6	7.6	7.6	7.2	
4	11.0	9.7	9.9	10.2	10.7	10.7	9.3	9.0	8.9	7.8	7.2	7.2	7.1	7.1	
5	10.1	10.1	9.3	8.6	8.6	8.6	8.6	8.4	8.6	7.9	7.6	7.7	7.1	7.3	
6	9.8	9.5	9.6	9.8	9.6	9.6	9.1	8.6	8.4	7.6	7.6	7.0	6.7	6.8	
7	9.9	9.0	10.1	9.7	9.5	8.9	8.9	8.5	9.0	7.7	7.6	7.2	7.4	7.1	
8	9.8	8.8	9.6	8.7	9.6	8.5	8.9	8.6	8.3	7.4	7.5	7.1	6.4	7.1	
ผลรวม	10.4	9.9	9.7	9.6	9.5	9.0	9.0	8.6	8.6	7.8	7.4	7.3	7.2	7.1	

ตาราง 4.19 ค่าแอกติวิตีจำเพาะเฉลี่ยของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำ เมื่อเก็บรักษา 60 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วัน	ค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ (Specific activity; U/mg)	ร้อยละของการลดลงของค่า แอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์
0	10.4 ^a	-
4	9.9 ^b	4.8
6	9.7 ^b	6.7
8	9.6 ^b	7.7
12	9.5 ^{bc}	8.7
15	9.0 ^{cd}	13.5
20	9.0 ^{cd}	13.5
25	8.6 ^d	17.3
30	8.6 ^d	17.3
35	7.8 ^e	25.0
40	7.4 ^{ef}	28.8
45	7.3 ^{ef}	29.8
50	7.2 ^f	30.8
60	7.1 ^f	31.7

หมายเหตุ: 95% confidence interval ($P < 0.0$), Duncan's multiple range test

4.2 ผลการศึกษาการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากตัวอย่างพืชที่ศึกษา

4.2.1 การศึกษาความไว (sensitivity) ของการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากตัวอย่างพืชที่ศึกษาเปรียบเทียบกับเอนไซม์จากชุดทดสอบทางการค้า

4.2.1.1 ผลการศึกษาวิธีการของชุดทดสอบทางการค้าที่เหมาะสมกับเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสที่ศึกษา

การศึกษาชุดทดสอบ (Test kit) สำหรับการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ที่จำหน่ายในท้องตลาดและนิยมใช้อย่างแพร่หลายจำนวน 4 ชุดทดสอบ โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้ คือ

1. นำเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำมาใช้แทนเอนไซม์ของชุดทดสอบทางการค้า
2. เลือกวิธีการของชุดทดสอบทางการค้าที่เหมาะสมมาประยุกต์ใช้กับเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำที่ศึกษา
3. เปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ระหว่างชุดทดสอบทางการค้าและเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำ


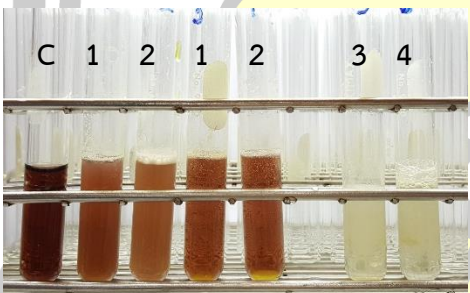
จากการศึกษาคู่มือการใช้งานชุดทดสอบที่จำหน่ายในท้องตลาดที่นำมาศึกษา พบว่า เอนไซม์ที่ใช้ภายในชุดทดสอบทางการค้าทุกชุดทดสอบ จะใช้เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (AChE) ซึ่งผลการศึกษานำเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำมาใช้ทดสอบทดแทนเอนไซม์ AChE ของชุดทดสอบทางการค้า พบว่าเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำ ไม่สามารถนำมาใช้ทดแทนเอนไซม์ AChE ของชุดทดสอบทางการค้าที่จำหน่ายในท้องตลาดได้ทุกชุด เนื่องจากในการทำปฏิกิริยาจะมีการใช้สารตั้งต้นที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์ AChE เท่านั้น ซึ่งสารตั้งต้นชนิดดังกล่าวนี้ไม่มีความจำเพาะกับเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำ ทำให้เมื่อนำเอนไซม์ดังกล่าวมาทำปฏิกิริยาในสภาวะเดียวกับสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ AChE ปฏิกิริยาจึงไม่สามารถเกิดขึ้นได้ ดังแสดงในตาราง 4.20-4.21



ตาราง 4.20 ผลของการใช้เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำ ทดแทนเอนไซม์ของชุดทดสอบทางการค้าที่ศึกษา

ชุดทดสอบ	ผลการศึกษา
<p>A</p>  <p>* หมายเลข 1, 2 คือ เอนไซม์ของชุดทดสอบ, หมายเลข 3, 4 คือ เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากถั่วดำ</p>	<p><u>การอ่านผลจากชุดทดสอบ</u> เปรียบเทียบกับสีของตัวอย่างกับหลอดควบคุม และแปลผลระดับความปลอดภัย ถ้าสีที่เกิดขึ้นเป็นสีส้มเข้ม อยู่ในระดับปลอดภัย สีส้มปนชมพู อยู่ในระดับไม่ปลอดภัย (ถูกยับยั้ง ร้อยละ 15) สีชมพู อยู่ในระดับไม่ปลอดภัยมาก</p> <p><u>การแปลผลจากการศึกษา</u> หลอดหมายเลข 3, 4 พบว่าได้ผลสีชมพู ซึ่งไม่สอดคล้องกับหลอดหมายเลข 1, 2 ที่เกิดจากเอนไซม์จากชุดทดสอบ</p>
<p>B</p>  <p>* หมายเลข 1, 2 คือ เอนไซม์ของชุดทดสอบ, หมายเลข 3, 4 คือ เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากถั่วดำ</p>	<p><u>การอ่านผลจากชุดทดสอบ</u> โดยการสังเกตสีของน้ำยาในหลอดตัวอย่างเทียบกับสีของหลอดเทียบสีมาตรฐานทั้ง 3 หลอด คือ</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) ไม่พบหรือพบปลอดภัย หลอดสีม่วงเข้ม 2) พบไม่ปลอดภัย หลอดสีม่วงอ่อน 3) พบเป็นพิษ หลอดสีเทา <p><u>การแปลผลจากการศึกษา</u> หลอดหมายเลข 3, 4 พบว่าได้หลอดทดสอบเป็นสีม่วงอ่อน ซึ่งสอดคล้องกับหลอดหมายเลข 1, 2 ที่เกิดจากเอนไซม์จากชุดทดสอบ</p>

ตาราง 4.21 ผลของการใช้เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำ ทดแทนเอนไซม์ของชุดทดสอบทางการค้าที่ศึกษา (ต่อ)

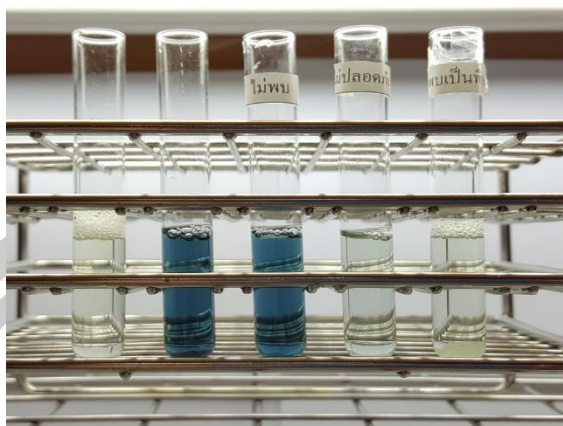
ชุดทดสอบ	ผลการศึกษา
<p>C</p>  <p>* หมายเลข 1, 2 คือ เอนไซม์ของชุดทดสอบ, หมายเลข 3, 4 คือ เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากถั่วดำ</p>	<p><u>การอ่านผลจากชุดทดสอบ</u> ผลบวก ถ้าพบแถบสีวงกลม (spot) สีขาวบนสีม่วงขึ้นที่บนแผ่น TLC แสดงว่าพบยาฆ่าแมลงในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs และ ผลลบ ถ้าไม่พบแถบสีวงกลม (spot) สีขาวบนพื้นสีม่วงบนแผ่น TLC แสดงว่า ไม่พบยาฆ่าแมลงในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs</p> <p><u>การแปลผลจากการศึกษา</u> หลอดหมายเลข 3, 4 พบว่าได้ผลสีชมพู ซึ่งไม่สอดคล้องกับหลอดหมายเลข 1, 2 ที่เกิดจากเอนไซม์จากชุดทดสอบ</p>
<p>D</p>  <p>* หมายเลข 1, 2 คือ เอนไซม์ของชุดทดสอบ, หมายเลข 3, 4 คือ เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากถั่วดำ</p>	<p><u>การอ่านผลจากชุดทดสอบ</u> เปรียบเทียบสีของหลอดตัวอย่างเทียบกับสีของหลอดเทียบสีมาตรฐานทั้ง 3 หลอด คือ</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) ไม่พบหรือพบปอดภัย หลอดสีน้ำตาลเข้ม 2) พบไม่ปอดภัย หลอดสีน้ำตาลอ่อน 3) พบเป็นพิษ หลอดสีเหลือง <p><u>การแปลผลจากการศึกษา</u> หลอดหมายเลข 3, 4 พบว่าได้ผลสีขาวยาว ซึ่งไม่สอดคล้องกับหลอดหมายเลข 1, 2 ที่เกิดจากเอนไซม์จากชุดทดสอบ</p>

จากผลการศึกษาดังกล่าว พบว่าวิธีการของชุดทดสอบ B มีความเป็นไปได้ที่จะนำมาประยุกต์ใช้กับเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากถั่วดำ เพราะเป็นวิธีการทำปฏิกิริยาที่ไม่ยุ่งยากและ

การแปลผลการทดสอบสามารถทำได้ง่าย เนื่องจากชุดทดสอบ B จะมีหลอดทดสอบที่มีสารมาตรฐาน 3 หลอด ไว้สำหรับการเทียบสีกับหลอดสารตัวอย่างที่ศึกษา และนอกจากนี้เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากถั่วดำ ยังสามารถทำปฏิกิริยาในสภาวะอุณหภูมิห้องได้ ซึ่งแตกต่างจากวิธีการของชุดทดสอบ B ที่ต้องใช้อุณหภูมิในการทดสอบที่ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เนื่องจากเอนไซม์ที่อยู่ในชุดทดสอบเป็นเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสที่ได้มาจากซีรัมของสัตว์ ดังนั้นอุณหภูมิจึงมีความสำคัญต่อการศึกษาปฏิกิริยา การปรับเปลี่ยนสารและสภาวะของชุดทดสอบ B ให้มีเหมาะสมกับสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำที่ศึกษา แสดงผลการศึกษาดังภาพประกอบ 4.22 จากการทดสอบพบว่า เมื่อประยุกต์วิธีการชุดทดสอบ B มาใช้กับสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำที่ศึกษา มีความเหมาะสมสำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป โดยมีขั้นตอนการทดสอบ ดังนี้

1. นำกล่องน้ำอุ่นเทคโนโลยีเติมน้ำให้เกือบ เสียบปลั๊กแล้วตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิของน้ำมีความร้อนตามที่กำหนดไว้ คือ 50 องศาเซลเซียส (สำหรับระเหยน้ำยาสกัดตัวอย่าง)
2. หั่นตัวอย่างผัก ผลไม้ ให้ละเอียดและตัดตัวอย่างใส่ขวดพลาสติก ปริมาณ 5 กรัมหรือความสูง 2 ซีดของขวดพลาสติก ใช้หลอดหยดดูดน้ำยาสกัด 5 ml หรือเติมน้ำยาสกัดให้ท่วมตัวอย่างปิดฝาขวดพลาสติก เขย่าให้ตัวอย่างและน้ำยาสกัดผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
3. นำแผ่นกระดาษโครมาโตกราฟ 1 ชิ้น (สำหรับ 1 ตัวอย่าง) วางในถ้วยโลหะที่ตั้งบนกล่องน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วดูดน้ำยาสกัดตัวอย่างจากข้อ 2 ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในถ้วยโลหะ เมื่อน้ำยาสกัดตัวอย่างในถ้วยโลหะระเหยแห้งหมดแล้วจึงใช้เข็มหมุดจิ้มแผ่นกระดาษโครมาโตกราฟใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำ จำนวน 0.5 ml เขย่าผสมให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้ 15 นาที
4. เติมสารตั้งต้น α -naphthyl acetate (0.3 mM) จำนวน 1 ml เขย่าแล้วทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเติมสาร DBLS (% fast blue B salt และ 5% Sodium laury sulphate อัตราส่วน 2:5) จำนวน 2 หยด เขย่า สังเกตสีที่เปลี่ยนแปลงอ่านผลเทียบกับกระดาษแถบสีมาตรฐาน

พูน ปณ ทิโต ชิว




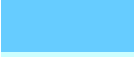

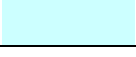


ภาพประกอบ 4.22 ผลของปฏิกิริยาการปรับเปลี่ยนสารและสภาวะของชุดทดสอบ B ให้มีเหมาะสมกับสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสบริสุทธ์บางส่วนจากถั่วดำที่ศึกษา

4.2.1.2 ผลการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสบริสุทธ์บางส่วนจากถั่วดำที่ศึกษา

ผลการศึกษาประเมินประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสบริสุทธ์บางส่วนจากถั่วดำที่ศึกษา โดยใช้ขั้นตอนการตรวจสอบที่ได้ในข้อ 4.2.1.1 มาทดสอบค่า I (%) พบว่า หลอดสารมาตรฐานที่ 1, 2 และ 3 มีค่า I (%) น้อยกว่า ร้อยละ 40 ร้อยละ 40-80 และ มากกว่า ร้อยละ 80 ตามลำดับ ซึ่งสีของหลอดทดสอบทั้ง 3 ชนิด แสดงในตาราง 4.22 จากนั้นจะทำการทดสอบในตัวอย่างผักสด จำนวน 50 ตัวอย่าง ประกอบไปด้วย ผักกาดขาว ผักกาดหอม แตงกวา ผักชี ผักชีฝรั่ง ถั่วฝักยาว กะหล่ำปลี ใบโหระพา ใบบัวบก และพริกสด ผลการตรวจวิเคราะห์แสดงดังตาราง 4.23 -4.24

ตาราง 4.22 สีหลอดสารมาตรฐานและค่าการยับยั้งเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เรสจากถั่วดำ (I: %) เทียบกับชุดทดสอบทางการค้า

หลอดสารมาตรฐาน	การแปลผล	ชุดทดสอบทางการค้า		สภาวะที่ศึกษา	
		สีหลอดทดสอบ	ค่า I (%)	สีหลอดทดสอบ	ค่า I (%)
หลอด 1	ไม่พบหรือพบในระดับปลอดภัย		<50%		<40%
หลอด 2	พบในระดับไม่ปลอดภัย		50%-70%		40%-80%
หลอด 3	พบในระดับเป็นพิษ		>70%		>80%

ปลอดภัย จำนวน 46 ตัวอย่าง (ร้อยละ 92) ตรวจพบในระดับไม่ปลอดภัย จำนวน 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 10) โดยจำแนกเป็น ผักชี จำนวน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2) และผักชีฝรั่ง จำนวน 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 6)

4.2.2 การประเมินประสิทธิภาพการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ในตัวอย่างผักสดด้วยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

4.2.2.1 ผลการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และ CAs ในตัวอย่างผักสดด้วยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

ผลการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ในตัวอย่างผักสด จากวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme inhibition assay) โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) เปรียบเทียบกับผลการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และ CAs ในตัวอย่างผักสดด้วยวิธีการมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยใช้เครื่อง GC-FPD⁺ สำหรับตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และเครื่อง HPLC-FLD สำหรับกลุ่ม CAs โดยใช้ตัวอย่างผักสดจำนวน 50 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบไปด้วย แตงกวา ถั่วฝักยาว ใบโหระพา ผักกาดขาว ผักชี ผักชีฝรั่ง กะหล่ำปลี ผักกาดหอม ใบบัวบก และพริกสด ผลการตรวจวิเคราะห์แสดงดังตาราง 4.25

ตาราง 4.25 ผลการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง ตกค้างกลุ่ม OPs และ CAs ในตัวอย่างผักสดโดยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และวิธีมาตรฐาน

ตัวอย่างที่	ตัวอย่างผัก	ผลการวิเคราะห์			
		วิธีมาตรฐาน (ชนิดและปริมาณ; mg/kg)		วิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์	
		GC-FPD ⁺	HPLC-FLD	ค่า I (%)	LOD = IC ₁₀
1	ผักกาดขาว	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	0	ตรวจไม่พบ
2	ผักกาดขาว	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	3	ตรวจไม่พบ
3	ผักกาดขาว	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	3	ตรวจไม่พบ
4	ผักกาดขาว	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	2	ตรวจไม่พบ
5	ผักกาดขาว	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	5	ตรวจไม่พบ

ตาราง 4.26 ผลการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง ตกค้างกลุ่ม OPs และ CAs ในตัวอย่างผักสดโดยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และวิธีมาตรฐาน (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ตัวอย่างผัก	ผลการวิเคราะห์			
		วิธีมาตรฐาน (ชนิดและปริมาณ; mg/kg)		วิธีการยับยั้งการ ทำงานของเอนไซม์	
		GC-FPD ⁺	HPLC-FLD	ค่า I (%)	LOD = IC ₁₀
6	ผักกาดหอม	chlorpyrifos <0.05	carbofuran 0.02	16	ตรวจพบ
7	ผักกาดหอม	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	2	ตรวจไม่พบ
8	ผักกาดหอม	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	3	ตรวจไม่พบ
9	ผักกาดหอม	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	0	ตรวจไม่พบ
10	ผักกาดหอม	chlorpyrifos <0.05	carbofuran 0.01	12	ตรวจพบ
11	แตงกวา	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	0	ตรวจไม่พบ
12	แตงกวา	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	6	ตรวจไม่พบ
13	แตงกวา	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	0	ตรวจไม่พบ
14	แตงกวา	ตรวจไม่พบ	carbofuran <0.01	7	ตรวจไม่พบ
15	แตงกวา	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	0	ตรวจไม่พบ
16	ผักชี	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	2	ตรวจไม่พบ
17	ผักชี	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	0	ตรวจไม่พบ
18	ผักชี	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	2	ตรวจไม่พบ
19	ผักชี	chlorpyrifos 1.73	ตรวจไม่พบ	65	ตรวจพบ
20	ผักชี	chlorpyrifos <0.05	ตรวจไม่พบ	8	ตรวจไม่พบ
21	ผักชีฝรั่ง	chlorpyrifos 0.81	ตรวจไม่พบ	54	ตรวจพบ
22	ผักชีฝรั่ง	chlorpyrifos 0.05	ตรวจไม่พบ	22	ตรวจพบ
23	ผักชีฝรั่ง	chlorpyrifos 1.53	ตรวจไม่พบ	64	ตรวจพบ
24	ผักชีฝรั่ง	chlorpyrifos 0.23	ตรวจไม่พบ	45	ตรวจพบ
25	ผักชีฝรั่ง	chlorpyrifos 1.76	ตรวจไม่พบ	74	ตรวจพบ
26	ถั่วฝักยาว	ตรวจไม่พบ	methomyl 0.14	11	ตรวจพบ
27	ถั่วฝักยาว	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	5	ตรวจไม่พบ
28	ถั่วฝักยาว	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	0	ตรวจไม่พบ
29	ถั่วฝักยาว	ตรวจไม่พบ	methomyl 0.21	13	ตรวจพบ
30	ถั่วฝักยาว	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	0	ตรวจไม่พบ

ตาราง 4.27 ผลการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง ตกค้างกลุ่ม OPs และ CAS ในตัวอย่างผักสดโดยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และวิธีมาตรฐาน (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ตัวอย่างผัก	ผลการวิเคราะห์			
		วิธีมาตรฐาน (ชนิดและปริมาณ; mg/kg)		วิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์	
		GC-FPD ⁺	HPLC-FLD	ค่า I(%)	LOD = IC ₁₀
31	กะหล่ำปลี	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	4	ตรวจไม่พบ
31	กะหล่ำปลี	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	0	ตรวจไม่พบ
33	กะหล่ำปลี	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	5	ตรวจไม่พบ
34	กะหล่ำปลี	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	0	ตรวจไม่พบ
35	กะหล่ำปลี	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	2	ตรวจไม่พบ
36	โหระพา	chlorpyrifos <0.05	carbaryl 0.04	8	ตรวจไม่พบ
37	โหระพา	chlorpyrifos <0.05	carbofuran 0.08	9	ตรวจไม่พบ
38	โหระพา	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	4	ตรวจไม่พบ
39	โหระพา	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	0	ตรวจไม่พบ
40	โหระพา	chlorpyrifos 0.05	carbofuran 1.8 aldicarb 0.02	22	ตรวจพบ
41	ใบบัวบก	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	2	ตรวจไม่พบ
42	ใบบัวบก	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	1	ตรวจไม่พบ
43	ใบบัวบก	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	5	ตรวจไม่พบ
44	ใบบัวบก	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	3	ตรวจไม่พบ
45	ใบบัวบก	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	5	ตรวจไม่พบ
46	พริกสด	ตรวจไม่พบ	carbofuran 0.05	8	ตรวจไม่พบ
47	พริกสด	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	3	ตรวจไม่พบ
48	พริกสด	chlorpyrifos 0.13	ตรวจไม่พบ	22	ตรวจพบ
49	พริกสด	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	6	ตรวจไม่พบ
50	พริกสด	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	5	ตรวจไม่พบ

จากตาราง 4.25-4.27 ผลการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง ตกค้างกลุ่ม OPs และ CAS ในตัวอย่างผักสดจำนวน 50 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบไปด้วย แตงกวา ถั่วฝักยาว ใบโหระพา ผักกาดขาว

ผักชี ผักชีฝรั่ง กะหล่ำปลี ผักกาดหอม ใบบัวบก และพริกสด โดยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และวิธีมาตรฐานตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FPD⁺ และ HPLC-FLD ผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งพิจารณาจากค่า IC₁₀ ซึ่งเป็นค่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ (LOD) ของวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme inhibition assay) ตรวจพบยาฆ่าแมลง ตกค้าง จำนวน 11 ตัวอย่าง (ร้อยละ 22) ในขณะที่วิธีมาตรฐานตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FPD⁺ และ HPLC-FLD ตรวจพบสารตกค้างจำนวน 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 34) จำแนกเป็น ตรวจพบสารกลุ่ม OPs จำนวน 13 ตัวอย่าง (ร้อยละ 26) และ สารกลุ่มCAs จำนวน 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 18) ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบว่ามีตัวอย่าง จำนวน 5 ตัวอย่าง ที่ให้ผลการวิเคราะห์ไม่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน GC-FPD⁺ และ HPLC-FLD คือ แต่งกว่า 1 ตัวอย่าง (carbofuran <0.01) ผักชี 1 ตัวอย่าง (chlorpyrifos <0.05) โหระพา 2 ตัวอย่าง (chlorpyrifos <0.05, carbaryl 0.04 และ chlorpyrifos <0.05, carbofuran 0.08) และ พริกสด 1 ตัวอย่าง (carbofuran <0.01) โดยทั้ง 5 ตัวอย่างมีค่า I (%) คือ 7, 8, 8, 9 และ 8 ตามลำดับ ค่า LOD ของวิธีที่ศึกษาอยู่ในช่วง IC₇ – IC₁₀ แต่เนื่องจากค่า LOD ของวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กำหนดไว้ที่ IC₁₀ ดังนั้น ตัวอย่างที่มีค่า I (%) น้อยกว่า IC₁₀ จึงแปลผลการทดสอบเป็นการตรวจไม่พบ ในขณะที่วิธีมาตรฐานตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FPD⁺ และ HPLC-FLD พบว่าสามารถตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงได้ในปริมาณที่มีความเข้มข้นน้อยได้ เมื่อเทียบกับวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งค่า LOD ของวิธีมาตรฐานที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FPD⁺ และ HPLC-FLD คือ 0.02 และ 0.003 mg/kg ซึ่งเมื่อนำความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงดังกล่าวมาทดสอบค่า I (%) พบว่ามีค่า I (%) ของสารสกัดแอปเปิ้ล คือ 54, 1 และค่า I (%) ของสารสกัดผักกาดหอม คือ 56, 2 ตามลำดับ (แสดงในตาราง 4.28)

4.2.2.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ในตัวอย่างผักสดโดยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

การประเมินประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs โดยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme inhibition assay) เทียบกับวิธีมาตรฐานที่ตรวจวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GC-FPD⁺ และ HPLC-FLD ตามวิธีของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งได้ประยุกต์ตามวิธีของ จำรัส เลิศศรี 2560 และ อัจจิมา ทองบ่อ และคณะ 2561 เนื่องการประเมินประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์เป็นการทดสอบความถูกต้องของวิธีเพื่อศึกษาความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และความถูกต้อง (accuracy) ของวิธีการที่พัฒนาหรือสนใจศึกษา ซึ่งเกณฑ์การยอมรับอยู่ในช่วง 80 –100% ซึ่งผลการทดสอบแสดงในตาราง 4.28

ตาราง 4.28 ผลการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs โดยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และวิธีมาตรฐาน

ผลการวิเคราะห์จากวิธีการยับยั้ง การทำงานของเอนไซม์	ผลการวิเคราะห์จากวิธีมาตรฐาน	
	ตรวจพบ	ตรวจไม่พบ
ตรวจพบ	12 (TP)	0 (FP)
ตรวจไม่พบ	5 (FN)	33 (TN)

จากตาราง 4.28 แสดงผลผลการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs โดยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และวิธีมาตรฐาน เพื่อนำมาการประเมินประสิทธิภาพการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม OPs และ CAs ของวิเคราะห์ด้วยวิธียับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทียบกับวิธีมาตรฐาน โดยแทนค่าผลการวิเคราะห์ในสูตรการคำนวณ ได้ผลการคำนวณ ดังนี้

$$\text{ความไว (\%sensitivity)} = \left(\frac{TP}{TP + FN} \right) \times 100$$

$$\begin{aligned} \text{แทนค่าในสมการ} &= \left(\frac{12}{12 + 5} \right) \times 100 \\ &= 70.5 \% \end{aligned}$$

$$\text{ความจำเพาะ (\%specificity)} = \left(\frac{TN}{FP + TN} \right) \times 100$$

$$\begin{aligned} \text{แทนค่าในสมการ} &= \left(\frac{33}{0 + 33} \right) \times 100 \\ &= 100.0 \% \end{aligned}$$

$$\text{ความถูกต้อง (\%accuracy)} = \left(\frac{TP + TN}{\text{Total sample}} \right) \times 100$$

$$\begin{aligned} \text{แทนค่าในสมการ} &= \left(\frac{12 + 33}{50} \right) \times 100 \\ &= 90.0 \% \end{aligned}$$

ผลการศึกษาเปรียบเทียบการประเมินประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม OPs และ CAs ของวิเคราะห์ด้วยวิธียับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทียบกับวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผักสด จำนวน 50 ตัวอย่าง ได้ผลดังนี้ ความไว (sensitivity) ร้อยละ 70.5 ความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 100.0% ความถูกต้อง (accuracy) ร้อยละ 90.0% โดยทุกค่า

ผ่านเกณฑ์มาตรฐานเกณฑ์การยอมรับซึ่งอยู่ในช่วง 80–100% ยกเว้น ค่าความไว (sensitivity) นอกจากนี้ยังพบว่า การทดสอบให้ผลลบลง (False Negative; FN) จำนวน 5 ตัวอย่าง ประกอบไปด้วย แดงกว่า 1 ตัวอย่าง ผักชี 1 ตัวอย่าง โหระพา 2 ตัวอย่าง และ พริกสด 1 ตัวอย่าง ซึ่งโดย ผลการทดสอบด้วยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไม่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน เนื่องจากในตัวอย่าง ผักสดอาจมีสารพฤกษเคมี (Phytochemical) ต่างๆ ที่สามารถรบกวนการวิเคราะห์ตัวอย่าง (matrix effect) โดยสารเหล่านี้ อาจจะมียับยั้งการทำงานของเอนไซม์เช่นเดียวกับยาฆ่าแมลง หรืออาจทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นในชุดทดลอง ดังนั้น ค่า I (%) ที่คำนวณได้ อาจจะไม่ได้อาจเกิดจากการยับยั้งการทำงานของยาฆ่าแมลงโดยตรง แต่อาจเกิดจากสารพฤกษเคมีของพืชร่วมด้วย (มาลี ธีรานุสนธิ์ และอนุสรณ์ อยู่เย็น 2556; วนสนันท์ วัฒนสุกุล 2559; วรวิทย์ จันทรสวรรณ ม.ป.ป.) จึงทำให้ค่า I (%) มีค่าน้อยกว่าค่า LOD ของวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (IC_{10}) และทำให้ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ศึกษาเทียบกับวิธีมาตรฐานมีผลการทดสอบไม่สอดคล้องกันจึงส่งผลให้ค่าความไว (sensitivity) มีค่าเพียงร้อยละ 70.5



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

5.1 สรุปผล

5.1.1 การคัดเลือกตัวอย่างพืชที่มีความไว (Sensitivity) สูงที่สุดในการเป็นดัชนี ตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs

5.1.1.1 การศึกษากิจกรรมและค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส

การศึกษาวิธีสกัดและกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากพืช พบว่า สารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหายาจากพืชที่ใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวสกัด สามารถทำปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสได้ โดยตัวอย่างพืชแต่ละชนิดมีกิจกรรมเอนไซม์เรียงลำดับจากมากไปน้อย ดังนี้ ถั่วดำ (92.6 U) ถั่วแดงหลวง (88.5 U) ถั่วลิสง (13.3 U) ถั่วเหลือง (11.5 U) ถั่วเขียว (10.3 U) ถั่วแดง (9.7 U) งาดำและงาขาว (8.8 U) แป้งสาลี (1.0 U) ข้าวบาร์เลย์ ลูกเดือย และแป้งข้าวโพด (0.9 U) ตามลำดับ เนื่องจากปฏิกิริยาเกิดจากสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหายาจากตัวอย่างพืชที่ศึกษากับสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะ (α -naphthyl acetate) จึงจัดเอนไซม์ดังกล่าวเป็นเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (Carboxylesterase: EC 3.1.1.1)

การเพิ่มปริมาณตัวอย่างจาก 3 กรัม เป็น 6 9 12 และ 15 กรัม พบว่า กิจกรรมเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นเมื่อปริมาณตัวอย่างมากขึ้น โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดระหว่าง 172.2 ± 2.2 – 926.1 ± 2.8 U ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และพบว่าปริมาณของตัวอย่าง 12 กรัม มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 916.6 ± 2.8 U

การศึกษาค่าแอกติวิตีจำเพาะของสารสกัดหายาของเอนไซม์จากถั่วแดง ถั่วเขียว ถั่วดำ ถั่วเหลือง และถั่วแดงหลวง พบว่าถั่วดำมีค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์สูงกว่าถั่วชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รองลงมาคือ ถั่วแดง ถั่วเขียว ถั่วแดงหลวง และถั่วเหลือง ซึ่งมีค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ 0.82 ± 0.07 0.56 ± 0.10 0.44 ± 0.08 0.25 ± 0.04 และ 0.22 ± 0.03 U/mg ตามลำดับ เมื่อศึกษาการทำริสซูธึ่บางส่วนของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหายาด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 60 พบว่า สารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนของถั่วดำมีค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์สูงสุด เมื่อเทียบกับถั่วชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รองลงมาคือ ถั่วแดง ถั่วเขียว ถั่วแดงหลวง และถั่วเหลือง ซึ่งมีค่า 3.06 ± 0.22 1.07 ± 0.25 0.96 ± 0.21 0.64 ± 0.13 และ 0.39 ± 0.06 U/mg ตามลำดับ

การศึกษาค่าแอกติวิตีจำเพาะของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิที่บางส่วนที่ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวสกัด พบว่าเอนไซม์ที่สกัดโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์สูงกว่าเอนไซม์ที่ใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และพบว่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิที่บางส่วนมีค่าสูงกว่าสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหยาบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในทุกตัวอย่าง โดยถั่วดำมีค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์สูงกว่าถั่วชนิดอื่นๆ รองลงมาคือ ถั่วเขียว ถั่วแดงหลวง ถั่วแดง และถั่วเหลือง โดยมีค่า 3.96 ± 0.26 , 1.51 ± 0.10 , 1.40 ± 0.12 , 1.29 ± 0.08 และ 0.70 ± 0.04 U/mg ตามลำดับ

5.1.1.2 ผลการศึกษาปฏิบัติการยับยั้งการทำงานและค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (limits of detection; LOD) ของยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม OPs และ CAs

การศึกษาผลของยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ต่อการยับยั้งการทำงานของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิที่บางส่วนของ ถั่วดำ ถั่วเขียว และถั่วแดง ที่ระดับความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงมาตรฐาน $0.001-3.0 \mu\text{g/ml}$ พบว่า ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (I(%)) ของสารสกัดจากถั่วดำมีค่าสูงกว่า ถั่วเขียว และถั่วแดง แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิที่สกัดจากถั่วดำ มีความไวในการทำปฏิกิริยากับยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs สูงกว่าถั่วเขียวและถั่วแดง นอกจากนี้ยังพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นยาฆ่าแมลงมาตรฐานในระดับที่เท่ากัน ค่า I(%) ของยาฆ่าแมลงมาตรฐานกลุ่ม OPs จะมีค่าสูงกว่าสารกลุ่ม CAs สาเหตุมาจากยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs เป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบผันกลับไม่ได้ (irreversible inhibitor) ขณะที่สารกลุ่ม CAs เป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบผันกลับได้ (reversible inhibitor)

การศึกษาค่า LOD ของการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิที่บางส่วนจากถั่วดำโดยวิธียับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในตัวอย่างแอปเปิ้ลและผักกาดหอมที่สกัดด้วยวิธี Modified QuEChERS พบว่า ค่า I(%) ของสารกลุ่ม OPs และ กลุ่ม CAs ในสารสกัดตัวอย่างแอปเปิ้ลและผักกาดหอม มีค่า IC_{10} จากสมการถดถอย (0.002 และ $0.01 \mu\text{g/ml}$) 7, 9, 8 และ 10 ตามลำดับ และเมื่อศึกษาค่า I(%) ของค่าดีฟอลต์ลิ้มิต ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 387 (0.01 mg/kg) พบว่ามีค่า I(%) 45, 9, 48, และ 10 ตามลำดับ ในขณะที่ค่า LOD ตามวิธีมาตรฐานเครื่อง GC-FPD⁺ (0.02 mg/kg) และเครื่อง HPLC-FLD (0.003 mg/kg) มีค่า I(%) 54, 1, 56, และ 2 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า ค่า I(%) ของสารพิษ dichlorvos ซึ่งเป็นสารกลุ่ม OPs มีค่า I(%) เฉลี่ยสูงที่สุดอยู่ที่ร้อยละ 44 ในขณะที่กลุ่ม CAs สารพิษ carbofuran, carbaryl และ methiocarb มีค่า I(%) เฉลี่ยสูงที่สุดร้อยละ 14

จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำ มีคุณสมบัติถูกยับยั้งการทำงานจากยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ได้ แสดงว่า เอนไซม์ดังกล่าว จัดอยู่ในกลุ่ม เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส B (Esterases B; Est-B)

5.1.1.3 การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส

การศึกษาความคงตัว (stability) ของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 60 วัน อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าในวันที่ 0 ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์เริ่มต้น 10.4 U/mg และวันที่ 60 ค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์จะมีค่าลดลงเหลือ 7.1 U/mg โดยคิดเป็นร้อยละ 31.7 จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์เฉลี่ยในแต่ละวันมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการใช้งานอยู่ในช่วงวันที่ 0-30 (10.4-8.6 U/mg)

5.1.2 ผลการศึกษาการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ของเอนไซม์ทางการค้าและเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากตัวอย่างพืชที่ศึกษา

5.1.2.1 ผลการศึกษาเปรียบเทียบความไว (sensitivity) ของการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ระหว่างเอนไซม์ทางการค้าและเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากตัวอย่างพืชที่ศึกษา

การนำเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วดำมาใช้แทนเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (AChE) ในชุดทดสอบการค้า พบว่าวิธีการของชุดทดสอบบางชุดสามารถมาประยุกต์ใช้กับเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากถั่วดำได้ เนื่องจากเป็นวิธีการทำปฏิกิริยาที่ไม่ยุ่งยากและสามารถแปลผลการทดสอบทำได้ง่ายโดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสจากถั่วดำสามารถทำปฏิกิริยาในสภาวะอุณหภูมิห้องได้ เมื่อนำวิธีการดังกล่าวใช้ในการศึกษาการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง กลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ในตัวอย่างผักสด จำนวน 50 ตัวอย่าง ประกอบด้วย แตงกวา ถั่วฝักยาว ใบโหระพา ผักกาดขาว ผักชี ผักชีฝรั่ง กะหล่ำปลี ผักกาดหอม ใบบัวบก และพริกสด พบว่าจากการศึกษามีผลการวิเคราะห์สอดคล้องกัน คือ ตรวจไม่พบหรือพบในระดับปลอดภัย จำนวน 46 ตัวอย่าง (ร้อยละ 92) ตรวจพบในระดับไม่ปลอดภัย จำนวน 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 8)

การตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง ตกค้างกลุ่ม OPs และ CAs ในตัวอย่างผักสดจำนวน 50 ตัวอย่าง โดยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และวิธีมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FPD⁺ และ HPLC-FLD พบว่า ผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งพิจารณาจากค่า IC₁₀ ตรวจพบยาฆ่าแมลง ตกค้าง จำนวน 11 ตัวอย่าง (ร้อยละ 22)

ในขณะที่วิธีมาตรฐาน ตรวจพบสารตกค้างจำนวน 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 34) จำแนกเป็น ตรวจพบสารกลุ่มOPs จำนวน 13 ตัวอย่าง (ร้อยละ 26) และ สารกลุ่มCAs จำนวน 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 18) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ามีตัวอย่าง จำนวน 5 ตัวอย่าง ที่ให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน เนื่องจากค่า I (%) มีค่าน้อยกว่า IC_{10} (24OPs; 0.002 และ 7CAs; 0.01 mg/kg) จึงแปลผลการทดสอบเป็นการตรวจไม่พบ ในขณะที่วิธีมาตรฐาน ค่า LOD ของเครื่อง GC-FPD⁺ และ HPLC-FLD คือ 0.02 และ 0.003 mg/kg ในผักกาดหอม ตามลำดับ

5.1.2.2 การประเมินประสิทธิภาพการเป็นดัชนีตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs ในตัวอย่างผักสดด้วยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

การประเมินประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และ CAs ด้วยวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FPD⁺ และ HPLC-FLD ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผักสด จำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่าประสิทธิภาพของวิธีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทียบกับวิธีมาตรฐาน คือ ความไว (sensitivity) ร้อยละ 70.5 ความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 100.0 และความถูกต้อง (accuracy) ร้อยละ 90.0 โดยทุกค่าผ่านเกณฑ์มาตรฐานเกณฑ์การยอมรับซึ่งอยู่ในช่วงร้อยละ 80–100 ยกเว้นค่าความไว (sensitivity) ซึ่งเป็นผลมาจากการทดสอบที่ให้ผลลบลง จำนวน 5 ตัวอย่าง ในแตงกวา 1 ตัวอย่าง ผักชี 1 ตัวอย่าง โหระพา 2 ตัวอย่าง และ พริกสด 1 ตัวอย่าง

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการทำเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีค่าแอกติวิตีจำเพาะสูงขึ้น สำหรับการประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงกลุ่ม OPs และกลุ่ม CAs หรือเพื่อนำเอนไซม์มาประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

พหุ ประถมศึกษา

บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

- งานส่งเสริมสุขภาพและอาชีวอนามัย โรงพยาบาลสงขลานครินทร์. (ม.ป.ป.) *ถั่ว 5 สี 5 ชนิด*. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://medinfo2.psu.ac.th/healthpromotion/index.php>. [สืบค้นเมื่อ 20 มกราคม 2563].
- จำรัส เลิศศรี (2560) *การประยุกต์ใช้เอนไซม์โคลินเอสเตอเรสจากจิ้งหรีดเพื่อทดสอบหาสารกำจัดแมลงกลุ่มคาร์บาเมตและกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตในตัวอย่างผัก*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ์. (2544). *บทที่ 5 : เครื่องหมุนเหวี่ยง เครื่องมือวิทยาศาสตร์ (SCIENTIFIC INSTRUMENTS)* พิมพ์ที่ หจก. โรงพิมพ์คลังน่านาวิทยา. กรุงเทพมหานคร
- ชรินทร์ เตชะพันธ์. (ม.ป.ป.) เอกสารประกอบการสอน *การทำโปรตีนและเอนไซม์ให้บริสุทธิ์* ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- ทองสุข ปายะนันท์ จิตผกา สันทัดรบ วิชาดา จงมีวาสนา รัตยากร, ศรีโคตร และ วีรุฒิ วิทยนันท์ (2558) การศึกษายาฆ่าแมลงตกค้างในผลส้ม *วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*. 57(4):391-400.
- ชนพงศ์ ภูบาลี, อรุณข วงศ์วัฒนาเสถียร, สมศักดิ์ อาภาศรีทองสกุล, และ มาลี สุปันตี. ๖2559). ความชุกของการมีสารเคมีกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักจากตลาด และห้างสรรพสินค้าในอำเภอเมืองจังหวัดมหาสารคาม. *วารสารเภสัชกรรมไทย* 8(2):399-409.
- ธิดารัตน์ เอกสิทธิกุล. (2550). “*บทที่ 7 การสกัดแยกโปรตีนจากพืชบางชนิด*.” คู่มือปฏิบัติการชีวเคมีและเทคโนโลยี (TN 312). กรุงเทพมหานคร: สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง.
- บุญวิสุทธิ์, สุรีย์พันธ์, สมศรี ภูสีม่วง, จันทิพย์ ศรีชัยญา, สายฝน ศิลปพรหม, และ ปิยนันท์ เผ่าม่วง. (2544). *ตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการของไทย Nutritive Values of Thai Foods*. จังหวัดนนทบุรี: โรงพิมพ์องค์การทหารผ่านศึก. [ออนไลน์]. ได้จาก: http://nutrition.anamai.moph.go.th/ewt_news.php?nid=492 [สืบค้นเมื่อ 15 มกราคม 2563].

ปัทมา ศรีแสง, สุดาวดี ยะสะกะ, สรัญญา ถีป้อม, ณัฐพงศ์ โปรายสุรินทร์ และ พันธุ์ทิพย์ หินหุ้มเพชร
 พิทยา อึ้งอุตรภักดี, วันดี วัฒนชัยยิ่งเจริญ. (2560). สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในฝรั่งและแอปเปิ้ล
 ตัดแต่งที่จำหน่าย บริเวณรอบมหาวิทยาลัยแห่งหนึ่งในเขตภาคเหนือตอนล่าง. *เวชกรรมไทย*
 1(10):82-87.

พนิดา ไชยยันต์บุรณ์, กัญญารัตน์ เต็มปิยพล, ฉันทพิริยะพูนม เกษสิริ, มณฑาทิพย์ อรุณวารากรณ์
 และสมชาย ฉันทพิริยะพูน. (2538). การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุ
 อันตรายทางการเกษตรให้ ถูกต้อง แม่นยำตามมาตรฐานสากล Expansion the Efficiency
 of Pesticide Multi-Residue Analysis to the International Standard.
 กรุงเทพมหานคร.

พัชรี ภคกษมา, สุวรรณีย์ สายสิน, และ ศรมน สุทิน. (2559). การตรวจสอบสารเคมีฆ่าแมลงตกค้าง
 ของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตในผักในพื้นที่จังหวัดสมุทรปราการ. *สมาคม
 สถาบันอุดมศึกษาเอกชนแห่งประเทศไทย ในพระราชูปถัมภ์ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ
 สยามบรมราชกุมารี*.5(1):22-30.

มาลี ธีรานุสนธิ์ และ อนุสรณ์ อยู่เย็น. (2556). คู่มือวิธีตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นพิษวิทยาทางสัตวแพทย์
 Basic Analytical Method of Veterinary Toxicology. [ออนไลน์]. ได้ จาก :
http://niah.dld.go.th/th/index.php?option=com_content&view=article&id=1049:vettotoxicomannal&catid=24:book&Itemid=300. [สืบค้นเมื่อ 5 มกราคม 2563].

วันสนันท์ วัฒนสุกุล. (2559). *การพัฒนาแถบเทียบสี จากชุดจี้ทีเพื่อตรวจปริมาณ สารป้องกันกำจัด
 ศัตรูพืชในผัก*. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรวิทย์ จันทรสวรรณ. (ม.ป.ป.). หลักการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือโดยการสร้างกราฟมาตรฐาน.” (แกน
 x). [ออนไลน์]. ได้ จาก <https://web.rmutp.ac.th/woravith/upload/AnalChem/calibration.pdf>. [สืบค้นเมื่อ 18 ธันวาคม 2562].

วารุณี จิตอารี. (2007). บทบาทของเอนไซม์พาราออกซอนเนสในการกำจัดพิษจากสารเคมีกำจัด
 ศัตรูพืช กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต. *วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่*. 40(1):31-40.

ศรัญญา พัวพลเทพ. (2559). สารกำจัดศัตรูพืช (Pesticide). [ออนไลน์]. ได้จาก :
<http://www.pharmaco.vet.ku.ac.th/>. [สืบค้นเมื่อ 15 ธันวาคม 2562].

ศศิธร แทนทอง และ อัครกะบัคคาน ปาทาน. (2553). *การเตรียมเอนไซม์โคลิเนเอสเตอเรสจากสมองหมูและสมองไก่สำหรับใช้ในชุดทดสอบสารปราบศัตรูพืช*. รายงานการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์.

ศิริวรรณ ฉั่นเจริญ, อรพันธ์ อันติมานนท์ และ โกวิทย์ บุญมีพงศ์. (2553). *คู่มือเกษตรกรปลอดโรคสำหรับเกษตรกรและอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน*. แก้ไขโดย สำนักโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

เสาวณีย์ กาญจนชุมพล และ ดวงกมล วิรุฬห์อุดมผล 2553. การแยก protein ให้บริสุทธิ์ (Protein Purification). *Metrology info*. 12(59):14-21

สมยศ โอศิริพันธ์. (2553). *การทำบริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของเอนไซม์ เบต้า-กาแลคโตซิเดส B 1.2 สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล*.

สัณชัย พยุภกร. (ม.ป.ป.). *เทคนิคทางชีวเคมีขั้นพื้นฐาน ในเซลล์ชีววิทยา*. [ออนไลน์]. ได้จาก: (<http://biochem.md.chula.ac.th/Data/PDF files/Basic Biochemical Techniques in Cell Biology-2012.pdf>). [สืบค้นเมื่อ 15 ธันวาคม 2562].

แสงโฉม ศิริพานิช. (2556). สถานการณ์และผลกระทบต่อสุขภาพจากการสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ปี พ.ศ. 2556 (Situation and Health Effects Related to Pesticides, 2013). *รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์*. 44(44):689-692.

อัจฉิมา ทองบ่อ, มณีวรรณ ผุยเดชา, และ ลักษณะ ลือประเสริฐ. (2561). การพัฒนาชุดทดสอบสารเคมีป้องกันกำจัดแมลง 4 และสารเคมีกำจัดวัชพืช 2,4-ดี ในผัก ผลไม้และธัญพืช. *วารสารอาหารและยา*. ฉบับเดือนพฤษภาคมถึงสิงหาคม:49-57.

Ali, Syed Azmal, Grishma Bendre, Shraddha Ojha, V. Krishnamurthy, N. Ramachandra Swamy, and Kempohalli S. Chandrashekharaiah. (2013). "Esterases from the Seeds of an Edible Legume, *Phaseolus Vulgaris* L.; Variability and Stability during Germination. *American Journal of Plant Sciences*. 4:905-909.

Amine, A., F. Arduini, D. Moscone, and G. Palleschi. (2016). Recent Advances in Biosensors Based on Enzyme Inhibition. *Biosensors and Bioelectronics*. 76:180-94.

- Asperen K. van. (1962). A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *Journal of Insect Physiology*. 8(4):401-416.
- Balen, Biljana, Marijana Krsnik-Rasol, Ivana Zadro, and Vera Simeon-rudolf. (2004). "Esterase Activity and Isoenzymes in Relation to Morphogenesis in *Mammillaria Gracillis* Pfeiff. Tissue Culture. *Acta Botanica Croatica*. 63(2):83–91.
- Barata, Carlos, Arun Solayan, and Cinta Porte. (2004). Role of B-Esterases in Assessing Toxicity of Organophosphorus (Chlorpyrifos, Malathion) and Carbamate (Carbofuran) Pesticides to *Daphnia Magna*. *Aquatic Toxicology*. 66(2):125–39.
- Ben Oujji, Najwa, Idriss Bakas, Georges Istamboulié, Ihya Ait-Ichou, Elhabib Ait-Addi, Régis Rouillon, and Thierry Noguier. (2013). Sol-Gel Immobilization of Acetylcholinesterase for the Determination of Organophosphate Pesticides in Olive Oil with Biosensors. *Food Control*. 30(2):657–61.
- Benavente, Rocío., Esteban-Torres, María., Acebrón, Iván., De Las Rivas, Blanca., Muñoz, Rosario., Álvarez, Yanaisis and Mancheño, José M. (2013). Structure, biochemical characterization and analysis of the pleomorphism of carboxylesterase Cest-2923 from *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *FEBS Journal*. 280(24):6658-6671.
- Bhavith K P, Chandrashekaraiah K. S, M. Narayana Swamy, and N Ramachandra Swamy. (2014). Purification and Characterization of Esterase from the Seeds of *Caesalpinia Mimosoides*. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*. 2(6).
- Bornscheuer, Uwe T. (2002). Microbial Carboxyl Esterases: Classification, Properties and Application in Biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*. 26(1):73–81.
- Cacciatore, Luis Claudio., Verrengia Guerrero, Noemí and Cochón, Adriana Cristina. (2013). Cholinesterase and carboxylesterase inhibition in *Planorbarius corneus* exposed to binary mixtures of azinphos-methyl and chlorpyrifos. *Aquatic Toxicology*. 128-129:124-134

- Carvalho, Vanda Marilza de, Rosimar Maria Marques, Ana Sílvia Lapenta, and Maria de Fátima P. S. Machado. (2003). Functional Classification of Esterases from Leaves of *Aspidosperma Polyneuron* M. Arg. (Apocynaceae). *Genetics and Molecular Biology*. 26(2):195–98.
- Cedergreen, Nina. (2014). Quantifying Synergy: A Systematic Review of Mixture Toxicity Studies within Environmental Toxicology. *PLoS ONE*. 9(5):1-12.
- Chandrasekaran, Gayathri, Geun Joong Kim, and Hyun Jae Shin. (2011). Purification and Characterisation of an Alkaliphilic Esterase from a Culinary Medicinal Mushroom, *Sparassis Crispa*. *Food Chemistry*. 124(4):1376–81.
- Chandrashekharaiyah, K. S., N. Ramachandra S, and K. R. Siddalinga, M. (2011). Carboxylesterases from the Seeds of an Underutilized Legume, *Mucuna Pruriens*; Isolation, Purification and Characterization. *Phytochemistry*. 72(18):2267–74.
- Chandre, Mahesh A., Bhagyashri N. Raut, Nilesh S. Chavan, Ashok V Kharde, and Shilpa H. Tarte. (2014). Studies on the Isolation and Characterization of Esterase Enzyme from Green Peas. *International Journal of Current Biotechnology*. 2(6):5–9.
- Chauhan, Nidhi, Jagriti Narang, and C. S. Pundir. (2011). Immobilization of Rat Brain Acetylcholinesterase on Porous Gold-Nanoparticle-CaCO₃ Hybrid Material Modified Au Electrode for Detection of Organophosphorous Insecticides. *International Journal of Biological Macromolecules*. 49(5):923–29.
- Chiang, Shih Wen and Sun, Chih Ning. (1996). Purification and characterization of carboxylesterases of a rice green leafhopper *Nephotettix cincticeps* Uhler. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 5(3):181-189.
- Christian, Markus. (2006). *Plant Carboxylesterases Involved in Pesticide*. PhD thesis. School of Biological and Biomedical Sciences Durham University.

- Colovic, Mirjana B., Danijela Z. Krstic, Tamara D. Lazarevic-Pasti, Aleksandra M. Bondzic, and Vesna M. Vasic. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors : Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*. 11:315–35.
- Cui, W., Winter, W. T., Tanenbaum, S. W. and Nakas, J. P. (1999). Purification and characterization of an intracellular carboxylesterase from *Arthrobacter viscosus* NRRL B-1973. *Enzyme and Microbial Technology*. 24(3-4):200-208.
- Cunha, Edite, Paula C. A. G. Pinto, José P. S. Carvalho, and M. Lúcia M. F. S. Saraiva. (2013). Automated Carboxylesterase Assay for the Evaluation of Ionic Liquids Human Toxicity. *Journal of Hazardous Materials*. 244–245:563–69.
- Dandan, Wang, Liwei Zou, Qiang Jin, Jie Hou, Guangbo Ge, and Ling Yang. (2018). Human Carboxylesterases: A Comprehensive Review. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 8(5):699–712.
- Degrassi, Giuliano, Uotila, Lasse., Klima, Raffaella and Venturi, Vittorio. (1999). Purification and properties of an esterase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and identification of the encoding gene. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(8):3470-3472.
- Diao, Jianxiong., Zhao, Guangyu., Li, Yuanqing., Huang, Jinli and Sun, Ying (2013). Carboxylesterase from *Spodoptera Litura*: Immobilization and use for the Degradation of Pesticides. *Procedia Environmental Sciences*. 18:610-619.
- Donaghy, John A., Bronnenmeier, K., Soto-Kelly, P. F. and McKay, A. M. (2000). Purification and characterization of an extracellular feruloyl esterase from the thermophilic anaerobe *Clostridium stercorarium*. *Journal of Applied Microbiology*. 88(3):458-466.
- Donald J. Ecobichon. (2001). “CHAPTER 22 TOXIC EFFECTS OF PESTICIDES. *Casarett & Doull's Toxicology - The Basic Science of Poison*. edited by C. D. Klaassen. McGraw-Hill.

- Espinoza, Marlon., Rivero Osimani, Valeria., Sánchez, Victoria., Rosenbaum, Enrique and Guiñazú, Natalia. (2016). B-esterase determination and organophosphate insecticide inhibitory effects in JEG-3 trophoblasts *Toxicology in Vitro*. 32(190-197).
- Fahmy, Afaf S., Amal Z. Abo-Zeid, Tarek M. Mohamed, Hala M. Ghanem, Ibrahim H. Borai, and Saleh A. Mohamed. (2008). Characterization of Esterases from *Cucurbita Pepo* Cv. Eskandrani. *Bioresource Technology*. 99(2):437-43.
- Frasco, Manuela F., Fournier, Didier., Carvalho, Félix and Guilhermino, Lúcia. (2006). Cholinesterase from the common prawn (*Palaemon serratus*) eyes: Catalytic properties and sensitivity to organophosphate and carbamate compounds. *Aquatic Toxicology*. 77(4):412-421.
- Gao, Gui tian., Chen, Ke ping., Yao, Qin., Chen, Hui qing., Wang, Lin ling., Xu, Jia ping., ZHAO, Yuan and WANG, Yong jie. (2007). *Agricultural Sciences in China*. 6(8):1018-1026.
- Gershater, Markus C. and Robert Edwards. (2007). Regulating Biological Activity in Plants with Carboxylesterases. *Plant Science*. 173(6):579-88.
- Gershater, Markus, Kate Sharples, and Robert Edwards. (2006). Carboxylesterase Activities toward Pesticide Esters in Crops and Weeds. *Phytochemistry*. 67(23):2561-67.
- Govindappa, T., L. Govardhan, P. S. Jyothy, and P. S. Veerabhadrapa. (1987). Purification and Characterisation of a Carboxylesterase from the Latex of *Synadenium Grantii* Hook, F. *Journal of Biosciences*. 12(1):71-86.
- Grawe, Gregory Ferreira., de Oliveira, Tássia Regina., de Andrade Narciso, Esther., Moccélini, Sally Katiuce., Terezo, Ailton José., Soares, Marcos Antonio and Castilho, Marilza. (2015). Electrochemical biosensor for carbofuran pesticide based on esterases from *Eupenicillium shearii* FREI-39 endophytic fungus. *Biosensors and Bioelectronics*. 63:407-413.

- Hatfield, M. J., L. Tsurkan, J. L. Hyatt, X. Yu, C. C. Edwards, L. D. Hicks, R. M. Wadkins, and P. M. Potter. (2010). Biochemical and Molecular Analysis of Carboxylesterase-Mediated Hydrolysis of Cocaine and Heroin. *British Journal of Pharmacology*. 160(8):1916–28.
- He, Yan Ping., Ma, En Bo and Zhu, Kun Yan. (2004). Characterizations of general esterases in relation to malathion susceptibility in two field populations of the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 78(2):103-113.
- Hedhammar, My, Amelie Eriksson Karlström, and Sophia Hober. (n.d.). Chromatographic Methods for Protein Purification, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden. [Online]. Available from: <https://www.coursehero.com/file/10145190/ChromMethods>. [Cited 3 July 2018].
- Hou, Chang jun, Kun He, Li min Yang, Dan qun Huo, Mei Yang, Shun Huang, Liang Zhang, and Cai hong Shen. (2012). Catalytic Characteristics of Plant-Esterase from Wheat Flour. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28(2):541–48.
- Ileperuma, Nadeesha R., Sean D. G. Marshall, Christopher J. Squire, Heather M. Baker, John G. Oakeshott, Robyn J. Russell, Kim M. Plummer, Richard D. Newcomb, and Edward N. Baker. (2007). High-Resolution Crystal Structure of Plant Carboxylesterase AeCXE1, from *Actinidia Eriantha*, and Its Complex with a High-Affinity Inhibitor Paraoxon. *Biochemistry*. 46(7):1851–59.
- Jeanty, G. and J. L. Marty. (1998). Detection of Paraoxon by Continuous Flow System Based Enzyme Sensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 13(2):213–18.
- Jin, Baohui, Liqi Xie, Yanfeng Guo, and Guofang Pang. (2012). Multi-Residue Detection of Pesticides in Juice and Fruit Wine: A Review of Extraction and Detection Methods. *Food Research International*. 46(1):399–409.

- Kała, M. (2011). Chapter 16 Pesticides. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. Edited by A. C. Moffat, M. D. Osselton, and B. Widdop. Italy: Pharmaceutical Press.
- Kantharaju, S. and K. R. Siddalinga Murthy. (2014). Characterization of Esterases of *Tamarindus Indica* Seeds. *Journal of Bioscience and Medicine*. (June):54–62.
- Killens-Cade, Rushyannah., Turner, Rachel., MacInnes, Christine and Grunden, Amy. (2014). Characterization of a Thermostable, Recombinant Carboxylesterase from the Hyperthermophilic Archaeon *Metallosphaera sedula* DSM5348. *Advances in Enzyme Research*. 2(1):1-13.
- Kumar, Lokendra., Singh, Balvinder., Adhikari, Dilip Kumar., Mukherjee, Joydeep and Ghosh, Debashish. (2012). A thermoalkaliphilic halotolerant esterase from *Rhodococcus* sp. LKE-028 (MTCC 5562): Enzyme purification and characterization. *Process Biochemistry*. 47(6):983-991.
- Laetz, Cathy A., David H. Baldwin, Tracy K. Collier, Vincent Hebert, John D. Stark, and Nathaniel L. Scholz. (2009). The Synergistic Toxicity of Pesticide Mixtures: Implications for Risk Assessment and the Conservation of Endangered Pacific Salmon. *Environmental Health Perspectives*. 117(3):348–53.
- Laguerre, Christel, Juan C. Sanchez-Hernandez, Heinz R. Köhler, Rita Triebkorn, Yvan Capowiez, Magali Rault, and Christophe Mazzia. (2009). B-Type Esterases in the Snail *Xeropicta Derbentina*: An Enzymological Analysis to Evaluate Their Use as Biomarkers of Pesticide Exposure. *Environmental Pollution*. 157(1):199–207.
- Lamego, Joana, Pedro Ferreira, Márcia Alves, Ana Matias, and Ana Luisa Simplicio. (2015). Comparison of in Vitro Methods for Carboxylesterase Activity Determination in Immortalized Cells Representative of the Intestine, Liver and Kidney. *Molecular and Cellular Probes*. 29(4):215–22.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1):265-275.

- Li, Jian ke, Yan li Zhou, Yan xia Wen, Jian hua Wang, and Qiu hui Hu. (2009). Studies on the Purification and Characterization of Soybean Esterase, and Its Sensitivity to Organophosphate and Carbamate Pesticides. *Agricultural Sciences in China*. 8(4):455–63.
- Li, Jing, Xiaowan Li, Shanshan Li, Guanghui Shen, Qingying Luo, Hejun Wu, Anjun Chen, and Zhiqing Zhang. (2019). “ Properties and Extraction of Crude Pectin Esterase from Potato (*Solanum Tuberosum*). *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 611(1).
- Lin, Qin Bao, Yuan Yuan Xue, and Huan Song. (2010). Determination of the Residues of 18 Carbamate Pesticides in Chestnut and Pine Nut by GPC Cleanup and UPLC-MS-MS. *Journal of Chromatographic Science*. 48(1):7–11.
- Luo, Zhu Hua., Ding, Jie Fei., Xu, Wei., Zheng, Tian Ling and Zhong, Tian Hua. (2015). Purification and characterization of an intracellular esterase from a marine Fusarium fungal species showing phthalate diesterase activity. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 97:7-12
- Malagnoux, Laure., Capowiez, Yvan ans Rault, Magali. (2014). Tissue distribution, characterization and in vitro inhibition of B-esterases in the earwig *Forficula auricularia*. *Chemosphere*. 122:456-464
- Miao, Qing, Weijun Kong, Shihai Yang, and Meihua Yang. (2013). Rapid Analysis of Multi-Pesticide Residues in Lotus Seeds by a Modified QuEChERS-Based Extraction and GC-ECD. *Chemosphere* 91(7):955–62.
- Mohapatra, B. R., Banerjee, U. C. and Bapuji, M. (1998). Characterization of a fungal amylase from *Mucor* sp. associated with the marine sponge *Spirastrella* sp. *Journal of Biotechnology*. 60(1-2):393-398.
- Montella, Isabela Reis, Renata Schama, and Denise Valle. (2012). The Classification of Esterases: An Important Gene Family Involved in Insecticide Resistance - A Review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 107(4):437–49.

- Mowery, By Jeanette and Lisa Seidman. (2005). Purification of SS-Galactosidase from *E. Coli*. *Biotechnology*. 1–174.
- Mutengwe, Mbulaheni T., Lizyben Chidamba, and Lise Korsten. (2016). Monitoring Pesticide Residues in Fruits and Vegetables at Two of the Biggest Fresh Produce Markets in Africa. *Journal of Food Protection*. 79(11):1938–45.
- National Association of Testing Authorities Australia (NATA). (2018). Validation and verification of quantitative and qualitative test methods. *General Accreditation Guidance*. January:1-31
- Nieto García, Antonio José, Roberto Romero González, and Antonia Garrido Frenich. (2015). Multi-Pesticide Residue Analysis in Nutraceuticals from Grape Seed Extracts by Gas Chromatography Coupled to Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *Food Control*. 47:369–80.
- Ochoa, Victoria, Carmen Riva, Melissa Faria, and Carlos Barata. (2013). Responses of B-Esterase Enzymes in Oysters (*Crassostrea Gigas*) Transplanted to Pesticide Contaminated Bays Form the Ebro Delta (NE, Spain). *Marine Pollution Bulletin*. 66(1–2):135–42.
- Parasa, Reema and Saraswathi, Raman. (2015). Carboxylesterases of *Sesbania Grandiflora* Seeds. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*. 4(11):11057-11062.
- Park, Young Jun., Choi, Soo Young and Lee, Hee Bong. (2006). A carboxylesterase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1; purification, characterization, and expression. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 1760(5):820-828.
- Pimsen, Rungnapa, Akachai Khumsri, Sumrit Wacharasindhu, Gamolwan Tumcharern, and Mongkol Sukwattanasinitt. (2014). Colorimetric Detection of Dichlorvos Using Polydiacetylene Vesicles with Acetylcholinesterase and Cationic Surfactants. *Biosensors and Bioelectronics*. 62:8–12.

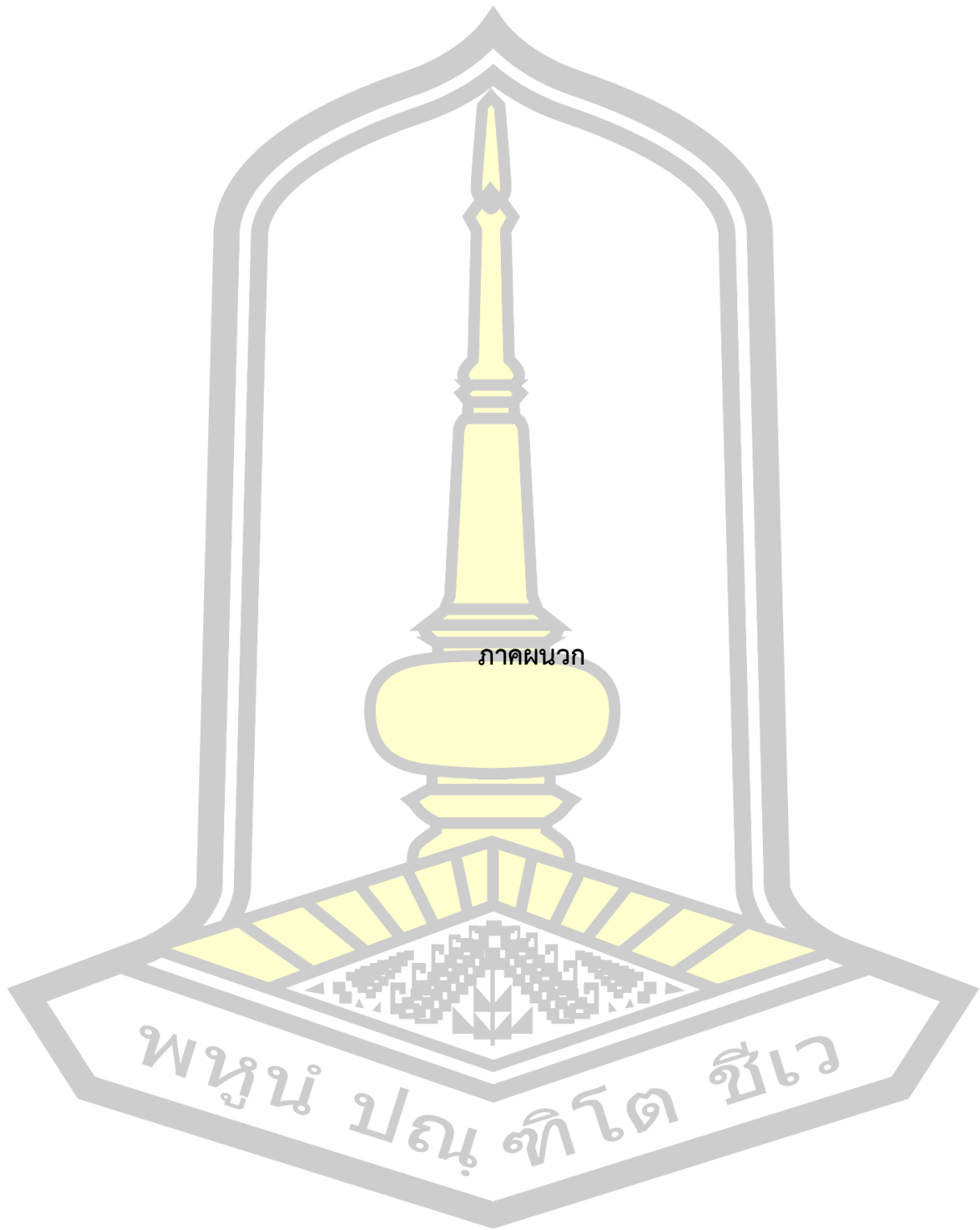
- Prieto Garcia, Francisco, Sandra Y. Cortés Ascencio, John C. Gaytan Oyarzun, Alejandra Ceruelo Hernandez, and Patricia Vazquez Alavarado. (2012). Pesticides: Classification, Uses and Toxicity. Measures of Exposure and Genotoxic Risks. *Journal of Research in Environmental Science and Toxicology*. 1(11):2315–5698.
- Prim, Núria., Pastor, F. I. Javier and Diaz, Pilar. (2001). Cloning and characterization of a bacterial cell-bound type B carboxylesterase from *Bacillus* sp. BP-7. *Current Microbiology*. 42(4):237-240.
- Radić, Sandra and Pevalek-Kozlina, Branka. (2010). Differential esterase activity in leaves and roots of *Centaurea ragusina* L. as a consequence of salinity. *Periodicum Biologorum*. 112(3):253–258.
- Roell, Kyle R., David M. Reif, and Alison A. Motsinger-Reif. (2017). An Introduction to Terminology and Methodology of Chemical Synergy-Perspectives from across Disciplines. *Frontiers in Pharmacology*. 8(APR):1–11.
- Romano, Diego, Francesco Bonomi, Marcos Carlos de Mattos, Thiago de Sousa Fonseca, Maria da Conceição Ferreira de Oliveira, and Francesco Molinari. (2015). Esterases as Stereoselective Biocatalysts. *Biotechnology Advances*. 33(5):547–65.
- Ross, Matthew K., Timothy M. Streit, Katye L. Herring, and Shuqi Xie. (2010). Carboxylesterases: Dual Roles in Lipid and Pesticide Metabolism. *Journal of Pesticide Science*. 35(3):257–64.
- Satoh, Tetsuo and Masakiyo Hosokawa. (2006). Structure, Function and Regulation of Carboxylesterases. *Chemico-Biological Interactions*. 162(3):195–211.
- Shivashankar, B and Premkumari, M. (2014). Characterization of Esterolytic Activity from Edible Mushroom *Hypsizygus Ulmarius*. *Journal of Bio Innovation*. 8330(3):124–134.

- Siddalinga Murthy, K. R. and Veerabhadrapa, Patnagere S. (1996). Purification, characterization and properties of carboxylesterase from the midgut of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 26(3):287-296.
- Skretteberg, L. G., B. Lyrån, B. Holen, A. Jansson, P. Fohgelberg, K. Siivinen, J. H. Andersen, and B. H. Jensen. (2015). Pesticide Residues in Food of Plant Origin from Southeast Asia - A Nordic Project. *Food Control*. 51:225–35.
- Song, Weitao, Yiqun Zhang, Guijie Li, Haiyan Chen, Hui Wang, Qi Zhao, Dong He, Chun Zhao, and Lan Ding. (2014). A Fast, Simple and Green Method for the Extraction of Carbamate Pesticides from Rice by Microwave Assisted Steam Extraction Coupled with Solid Phase Extraction. *Food Chemistry*. 143:192–98.
- Souleyre, Edwige J. F., Sean D. G. Marshall, John G. Oakeshott, Robyn J. Russell, Kim M. Plummer, and Richard D. Newcomb. (2011). Biochemical Characterisation of MdCXE1 , a Carboxylesterase from Apple That Is Expressed during Fruit Ripening. *Phytochemistry*. 72(7):564–71.
- Staubmani, R., I. Ncube, G. M. Gübitz, W. Steiner, and J. S. Read. (1999). “Esterase and Lipase Activity in *Jatropha Curcas* L. Seeds. *Journal of Biotechnology*. 75:117–26.
- Stuhlfelder, Christiane, Friedrich Lottspeich, and Martin J. Mueller. (2002). Purification and Partial Amino Acid Sequences of an Esterase from Tomato. *Phytochemistry*. 60(3):233–40.
- Subramani, T., K. S. Chandrashekharaiah, N. Ramachandra Swamy, and K. R. Siddalinga Murthy. (2012). Purification and Characterization of Carboxylesterase from the Seeds of *Jatropha Curcas*. *Protein Journal*. 31(2):120–28.
- Subramani, T., K. C. Manjunath, K. R. Siddalinga Murthy, and N. Ramachandra Swamy. (2012). Esterase Activity From the Germinated *Jatropha Curcas* Seeds in Different Extraction Buffers. *International Journal of Science and Nature*. 3(1):173–75.

- Syros, Thomas, Traianos Yupsanis, Demitrios Petkou, and Athanasios S. Economou. (2005). Protein, Leucine Aminopeptidase, Esterase, Acid Phosphatase and Photosynthetic Responses of Oleander (*Nerium Oleander* L.) during Cold Acclimation and Freezing Treatments. *Journal of Plant Physiology*. 162(8):886–94.
- Upadhy, G. Aravinda., Govardhan, L. and Veerabhadrapa, P. S. (1985). Purification and properties of a carboxylesterase from germinated finger millet (*Eleusine coracana* Gaertn.). *Journal of Biosciences*. 1985. 7(3-4):289-301.
- Víteček, J., J. Petrlová, J. Petřek, V. Adam, L. Havel, K. J. Kramer, and R. Kizek. (2007). Application of Fluorimetric Analysis of Plant Esterases to Study of Programmed Cell Death and Effects of Cadmium(II) Ions. *Biologia Plantarum*. 51(3):551–55.
- Vovk, Irena and Breda Simonovska. (2007). Separation of Pectin Methylesterases and Polygalacturonases on Monolithic Columns. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 849(1–2):337–43.
- Wang, Jun-liang, Qing Xia, An-ping Zhang, Xiao-yan Hu, and Chun-mian Lin. (2012). Determination of Organophosphorus Pesticide Residues in Vegetables by an Enzyme Inhibition Method Using α -Naphthyl Acetate Esterase Extracted from Wheat Flour. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 13(4):267–73.
- Wei, Tao., Feng, Shengxue., Shen, Yulong., He, Peixin., Ma, Geli., Yu, Xuan., Zhang, Fei and Mao, Duobin. (2013). Characterization of a novel thermophilic pyrethroid-hydrolyzing carboxylesterase from *Sulfolobus tokodaii* into a new family. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 97:225-232.
- Xu, Fei, Tse Chao Hua, Da Wen Sun, Jian Jun Xiao, and Xiao Lei Zhao. (2005). Enzyme Activity of Wheat Esterase as Affected by Various Cryopreservation Conditions. *Journal of Food Engineering*. 69(1):17–22.

- Yang, Limin., Huo, Danqun., Hou, Changjun., He, Kun., Lv, Fengjuan., Fa, Huanbao and Luo, Xiaogang. (2010). Purification of plant-esterase in PEG1000/ NaH_2PO_4 aqueous two-phase system by a two-step extraction. *Process Biochemistry*. 45(10):1664-1671.
- Yang, Limin, Danqun Huo, Kun He, Suyi Zhang, and Changjun Hou. (2013). Role of Tryptophan in the Active Site of Plant Esterase: Chemical Modification and Fluorometric Studies. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 170(4):909–24.
- Zhang, Jianqin., Ge, Pingting., Li, Daqi., Guo, Yaping., Zhu, Kun Yan., Ma, Enbo and Zhang, Jianzhen. (2015). Two homologous carboxylesterase genes from *Locusta migratoria* with different tissue expression patterns and roles in insecticide detoxification. *Journal of Insect Physiology*. 77(1-8)
- Zhai, Yi., Li, Kan., Song, Jinlon., Shi, Yanhua and Yan, Yanchun. (2012). Molecular cloning, purification and biochemical characterization of a novel pyrethroid-hydrolyzing carboxylesterase gene from *Ochrobactrum anthropi* YZ-1. *Journal of Hazardous Materials*. 221-222:206-212.







ตาราง ก.29 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ของค่ายูนิตเอนไซม์ของสารสกัดเบื้องต้นของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสที่ปริมาณตัวอย่างต่างกัน

ปริมาณ		3	6	9	12	15
ตัวอย่าง (กรัม)	Mean	80.643	176.230	359.357	916.567	904.873
3	80.643	-	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
6	176.230		-	0.003*	0.000*	0.000*
9	359.357			-	0.000*	0.000*
12	916.567				-	0.001*
15	904.873					-

Note: * 95% confidence interval ($P < 0.05$)

ตาราง ก.30 ค่าความแปรปรวนของค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ของสารสกัดเบื้องต้นของเอนไซม์เอสเตอเรส โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวสกัด

แหล่งความแปรปรวน	SS	df	MS	F	p
ระหว่างกลุ่ม	2.473	4	0.618	135.245	0.000*
ภายในกลุ่ม	0.206	45	0.005		
รวมทั้งหมด	2.678	49			

Note: * 95% confidence interval ($P < 0.05$), SS: sum of square, df: degree of freedom, MS: mean square

ตาราง ก.31 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ของค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหายาโดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวสกัด

ตัวอย่าง		ถั่วดำ	ถั่วแดง	ถั่วเขียว	ถั่วแดงหลวง	ถั่วเหลือง
	Mean	0.827	0.558	0.442	0.250	0.218
ถั่วดำ	0.827	-	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
ถั่วแดง	0.558		-	0.003*	0.000*	0.000*
ถั่วเขียว	0.442			-	0.000*	0.000*
ถั่วแดงหลวง	0.250				-	0.827
ถั่วเหลือง	0.218					-

Note: * 95% confidence interval ($P < 0.05$)

ตาราง ก.32 ค่าความแปรปรวนของค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวสกัด

แหล่งความแปรปรวน	SS	df	MS	F	p
ระหว่างกลุ่ม	45.360	4	11.340	346.889	0.000*
ภายในกลุ่ม	1.572	45	0.033		
รวมทั้งหมด	46.692	49			

Note: * 95% confidence interval ($P < 0.05$), SS: sum of square, df: degree of freedom, MS: mean square

ตาราง ก.33 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ของค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวสกัด

ตัวอย่าง	Mean	ถั่วดำ	ถั่วแดง	ถั่วเขียว	ถั่วแดงหลวง	ถั่วเหลือง
		3.063	1.063	0.960	0.633	0.380
ถั่วดำ	3.063	-	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
ถั่วแดง	1.063		-	0.725	0.000*	0.000*
ถั่วเขียว	0.960			-	0.001*	0.003*
ถั่วแดงหลวง	0.633				-	0.024*
ถั่วเหลือง	0.380					-

Note: * 95% confidence interval ($P < 0.05$)

ตาราง ก.34 ค่าความแปรปรวนของค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ของสารสกัดเบื้องต้นของเอนไซม์เอสเตอเรส โดยใช้สารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์เป็นตัวสกัด

แหล่งความแปรปรวน	SS	df	MS	F	p
ระหว่างกลุ่ม	9.118	4	2.729	179.575	0.000*
ภายในกลุ่ม	0.571	45	0.013		
รวมทั้งหมด	9.989	49			

Note: * 95% confidence interval ($P < 0.05$), SS: sum of squares, df: degree of freedom, MS: mean square

ตาราง ก.35 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ของค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหยาบ โดยใช้สารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์เป็นตัวสกัด

ตัวอย่าง		ถั่วดำ	ถั่วเขียว	ถั่วแดง	ถั่วแดงหลวง	ถั่วเหลือง
	Mean	1.527	0.728	0.791	0.534	0.240
ถั่วดำ	1.527	-	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
ถั่วเขียว	0.728		-	0.722	0.003*	0.000*
ถั่วแดง	0.791			-	0.055	0.000*
ถั่วแดงหลวง	0.534				-	0.000*
ถั่วเหลือง	0.240					-

Note: * 95% confidence interval ($P < 0.05$)

ตาราง ก.36 ค่าความแปรปรวนของค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน โดยใช้สารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์เป็นตัวสกัด

แหล่งความแปรปรวน	SS	df	MS	F	p
ระหว่างกลุ่ม	64.408	4	16.102	801.869	0.000*
ภายในกลุ่ม	0.904	45	0.020		
รวมทั้งหมด	65.312	49			

Note: * 95% confidence interval ($P < 0.05$), SS: sum of square, df: degree of freedom, MS: mean square

ตาราง ก.37 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ของค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน โดยใช้สารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์เป็นตัวสกัด

ตัวอย่าง		ถั่วดำ	ถั่วแดง	ถั่วเขียว	ถั่วแดงหลวง	ถั่วเหลือง
	Mean	9.470	1.294	1.152	1.393	0.695
ถั่วดำ	9.470	-	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
ถั่วแดง	1.294		-	0.008*	0.525	0.000*
ถั่วเขียว	1.152			-	0.288	0.000*
ถั่วแดงหลวง	1.393				-	0.000*
ถั่วเหลือง	0.695					-

Note: * 95% confidence interval ($P < 0.05$)



ตาราง ข.38 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหยาบ (1) และสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน (2) โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวสกัด

เปรียบเทียบ ระหว่าง (1) และ (2)	ความแตกต่างระหว่างคู่ (Paired Differences)				
	Mean	SD	t	df	p-value
ถั่วดำ	2.236	0.267	26.469	9	0.000
ถั่วเขียว	0.518	0.184	8.787	9	0.000
ถั่วแดง	0.512	0.255	6.357	9	0.000
ถั่วแดงหลวง	0.422	0.115	11.617	9	0.000
ถั่วเหลือง	0.140	0.068	6.465	9	0.000

Note: 95% confidence interval ($P < 0.05$), SD: standard deviation, df: degree of freedom

ตาราง ข.39 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสหยาบ (1) และสารสกัดเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วน (2) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์เป็นตัวสกัด

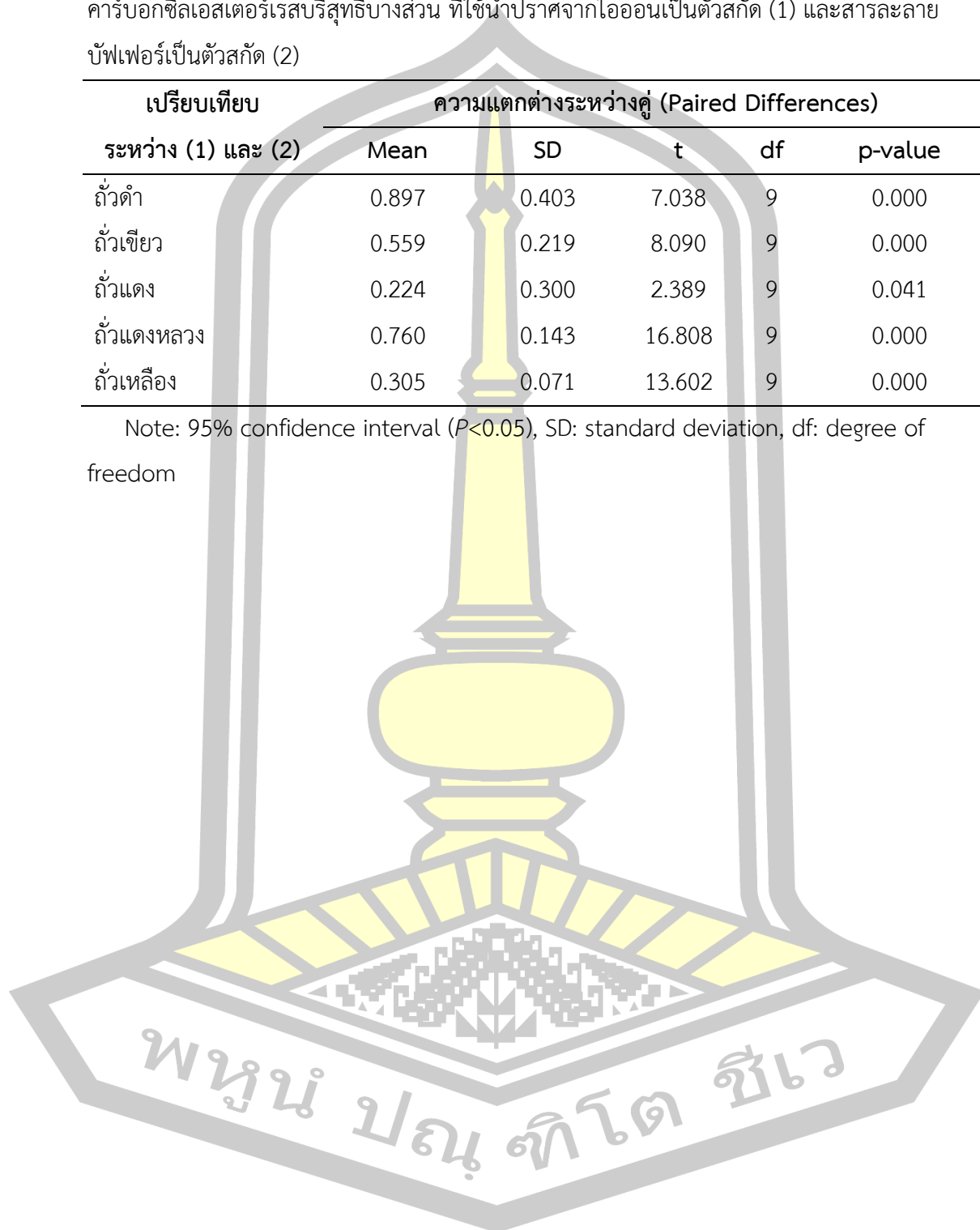
เปรียบเทียบ ระหว่าง (1) และ (2)	ความแตกต่างระหว่างคู่ (Paired Differences)				
	Mean	SD	t	df	p-value
ถั่วดำ	2.430	0.291	26.426	9	0.000
ถั่วเขียว	0.728	0.147	15.706	9	0.000
ถั่วแดง	0.566	0.099	18.180	9	0.000
ถั่วแดงหลวง	0.870	0.149	18.410	9	0.000
ถั่วเหลือง	0.465	0.057	25.794	9	0.000

Note: 95% confidence interval ($P < 0.05$), SD: standard deviation, df: degree of freedom

ตาราง ข.40 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าแอกติวิตีจำเพาะของสารสกัดเอ็นไซม์
คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิบางส่วน ที่ใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวสกัด (1) และสารละลาย
บัฟเฟอร์เป็นตัวสกัด (2)

เปรียบเทียบ ระหว่าง (1) และ (2)	ความแตกต่างระหว่างคู่ (Paired Differences)				
	Mean	SD	t	df	p-value
ถั่วดำ	0.897	0.403	7.038	9	0.000
ถั่วเขียว	0.559	0.219	8.090	9	0.000
ถั่วแดง	0.224	0.300	2.389	9	0.041
ถั่วแดงหลวง	0.760	0.143	16.808	9	0.000
ถั่วเหลือง	0.305	0.071	13.602	9	0.000

Note: 95% confidence interval ($P < 0.05$), SD: standard deviation, df: degree of freedom





ตาราง ค.41 ค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเดสเทอเรโรสทรูทีนบางส่วนจากถ้ำของยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 24OPs และกลุ่ม 7CAs

ความเข้มข้นของยาฆ่าแมลง ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์								
	ยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 24OPs			ยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 7CAs			ยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 7CAs		
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	เฉลี่ย
0.001	8.3	8.2	8.4	8.3	4.4	3.4	3.2	3.7	3.7
0.005	21.8	27.4	23.6	24.3	12.3	11.1	9.3	10.9	10.9
0.010	47.6	43.6	47.5	46.2	30.6	31.5	32.9	31.7	31.7
0.050	84.9	84.6	82.8	84.1	42.9	41.3	42.7	42.3	42.3
0.100	91.5	89.6	87.6	89.6	63.4	65.1	66.0	64.8	64.8
0.500	102.7	102.1	101.2	102.0	73.7	75.2	75.0	74.6	74.6
1.000	102.3	103.6	102.6	102.8	89.7	84.5	82.2	85.5	85.5

ตาราง ค.42 ค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสบริสุทธิ์บางส่วนจากถั่วเขียวของยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 24OPs และกลุ่ม 7CAs

ความเข้มข้นของยาฆ่าแมลง ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์											
	ยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 24OPs			ยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 7CAs			ยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 7CAs					
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0.001	5.3	4.1	4.4	4.6	5.8	3.0	3.1	4.0				
0.005	18.5	24.0	17.3	20.0	10.3	10.9	8.1	9.7				
0.01	42.6	45.1	42.3	43.3	16.9	17.7	11.5	15.4				
0.050	60.3	61.8	62.3	61.4	24.8	24.9	23.5	24.4				
0.100	63.0	66.7	67.1	65.6	41.4	40.0	41.0	40.8				
0.500	69.6	72.4	70.7	70.9	68.0	67.7	63.8	66.5				
1.000	80.2	79.0	75.8	78.3	70.4	70.6	66.7	69.2				
1.500	79.9	81.2	77.5	79.5	73.4	73.5	70.1	72.4				
2.000	79.3	81.6	81.1	80.7	75.4	75.5	72.2	74.3				
3.000	79.1	82.3	83.8	81.7	75.0	78.0	74.8	75.9				

ตาราง ค.43 ค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสรีสตีรัลบางส่วนจากถั่วแดงของยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 24OPs และกลุ่ม 7CAs

ความเข้มข้นของยาฆ่าแมลง ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์							
	ยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 24OPs			ยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 7CAs				
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0.001	8.4	6.5	3.6	6.2	7.1	4.6	5.0	5.6
0.005	16.4	15.7	13.0	15.0	10.4	8.3	11.6	10.1
0.01	37.1	33.6	39.9	36.9	14.7	13.9	18.8	15.8
0.050	47.8	43.2	45.9	45.6	23.6	21.9	23.9	23.1
0.100	51.6	50.3	54.3	52.1	32.1	31.8	32.1	32.0
0.500	63.9	60.1	60.3	61.4	50.7	49.6	53.5	51.2
1.000	65.9	62.0	65.6	64.5	54.0	58.9	57.2	56.7
1.500	74.0	70.9	68.5	71.1	56.9	59.9	60.1	58.9
2.000	74.5	75.1	72.6	74.0	56.7	57.9	61.6	58.7
3.000	73.7	76.8	75.0	75.1	67.3	62.7	68.9	66.3



ตาราง ง.44 ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (I (%)) ของยาฆ่าแมลงมาตราผสมกลุ่ม 24OPs และ 7CAs ของสารสกัดแอปเปิ้ล

ความเข้มข้นของยาฆ่าแมลง (mg/kg)	ค่าร้อยละยับยั้งการทำงานของงานของเอนไซม์ I (%)								
	ยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 24OPs			ยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 7CAs			เฉลี่ย		
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
0.001	3.1	3.7	3.5	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.003	17.0	13.9	17.1	16.0	1.8	1.9	2.3	2.0	2.0
0.005	26.1	35.9	29.2	30.4	4.0	5.0	4.0	4.0	4.0
0.010	49.8	53.6	64.4	55.9	8.0	6.5	9.0	8.0	8.0
0.030	79.4	77.2	86.7	81.1	13.1	14.5	16.0	13.1	13.1
0.050	88.9	86.8	89.5	88.4	18.4	18.5	19.0	18.4	18.4
0.100	90.4	90.0	90.8	90.4	21.5	24.6	25.0	21.5	21.5
0.300	93.9	93.5	93.5	93.6	31.8	29.5	29.8	31.8	31.8

ตาราง ง.45 ระดับร้อยละยับยั้งการทำงานของงานของเอนไซม์ (I (%)) จากสมการถดถอย

ยาฆ่าแมลงมาตรฐาน	สัมประสิทธิ์การกำหนด		ระดับร้อยละยับยั้งการทำงานของงานของเอนไซม์ (I (%))
	สมการถดถอย (Linear Regression)	(The Coefficient of determination; r^2)	
กลุ่ม 24OPs	$Y = 4309.5x - 0.503$	0.995	IC ₁₀ 0.002 IC ₅₀ 0.01
กลุ่ม 7CAs	$Y = 1084.1x - 1.189$	0.993	IC ₁₀ 0.01 IC ₅₀ 0.05

ตาราง ง.46 ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส (I (%)) ของยาฆ่าแมลงมาตรฐานผสมกลุ่ม 24OPs และ 7CAs ของสารสกัดแอปเปิ้ลที่คำนวณจาก ค่า IC₁₀ จากสมการถดถอย

ตัวอย่างที่	ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส (I (%))			ยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 24OPs (0.02 mg/kg)			ยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 7CAs (0.01 mg/kg)		
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
1	7.2	6.9	5.5	6.5	6.9	8.2	13.8	9.6	
2	9.1	7.9	8.8	8.6	6.6	7.9	12.3	9.0	
3	5.3	8.3	8.4	7.3	5.2	10.4	11.0	8.9	
4	6.1	8.5	6.2	6.9	6.7	6.4	7.2	6.8	
5	6.1	6.7	6.9	6.6	6.4	9.2	17.4	11.0	
6	7.5	7.1	3.1	5.9	9.4	6.1	6.8	7.4	
7	8.9	6.6	8.8	8.1	9.9	9.3	19.0	12.7	
8	4.7	7.8	7.3	6.6	12.1	10.4	8.9	10.5	
9	5.4	8.3	2.4	5.4	7.1	7.4	9.3	8.0	
10	8.4	7.3	3.9	6.5	8.6	12.4	9.0	10.0	
I (%) เฉลี่ย				7				9	

ตาราง ง.47 ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (I (%)) ของยาฆ่าแมลงมาตรฐาน 24OPs และ 7CAs ของสารสกัดแอปเปิ้ล ตามค่าดีฟอลต์ลิมิต (default limit)

ตัวอย่างที่	ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (I (%))			ยาฆ่าแมลงกลุ่ม 24OPs (0.01 mg/kg)			ยาฆ่าแมลงกลุ่ม 7CAs (0.01 mg/kg)		
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
1	46.7	41.0	44.0	43.9	6.9	8.2	13.8	9.6	
2	46.4	41.8	36.2	41.4	6.6	7.9	12.3	9.0	
3	43.9	40.8	46.3	43.7	5.2	10.4	11.0	8.9	
4	52.6	39.1	49.7	47.1	6.7	6.4	7.2	6.8	
5	55.4	46.0	47.3	49.6	6.4	9.2	17.4	11.0	
6	42.0	43.7	45.4	43.7	9.4	6.1	6.8	7.4	
7	47.4	41.4	40.8	43.2	9.9	9.3	19.0	12.7	
8	46.0	43.3	45.7	45.0	12.1	10.4	8.9	10.5	
9	44.5	46.0	49.6	46.7	7.1	7.4	9.3	8.0	
10	43.6	45.0	41.9	43.5	8.6	12.4	9.0	10.0	
I (%) เฉลี่ย				45				9	

* ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (I (%)) ของกลุ่ม 7CAs มีค่าเท่ากับค่าจากผลการทดลอง

ตาราง ง.48 ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (I (%)) ของยาฆ่าแมลงมาตรฐานผสมกลุ่ม 24OPs และ 7CAs ของสารสกัดแอปเปิ้ลตามค่า LOD ของเครื่อง GC-FPD⁺ และเครื่อง HPLC-FLD

ตัวอย่างที่	ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (I (%))			ยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 7CAs (0.003 mg/kg)				
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
1	55.3	57.6	53.8	55.6	0.0	1.2	0.0	0.4
2	54.9	57.1	48.5	53.5	0.0	1.3	0.0	0.4
3	51.3	53.7	47.9	51.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4	42.2	45.0	45.9	44.3	0.0	4.2	0.0	1.4
5	39.5	42.5	43.7	41.9	0.7	0.4	1.9	1.0
6	70.3	71.7	41.6	61.2	1.0	1.8	0.0	0.9
7	67.3	68.9	53.4	63.2	0.0	0.0	2.8	0.9
8	65.3	67.0	54.5	62.2	0.4	1.2	0.0	0.5
9	52.2	54.6	48.1	51.6	0.5	1.5	1.4	1.1
10	50.9	53.3	55.3	53.2	0.3	0.1	0.0	0.1
I (%) เฉลี่ย				54				1

ตาราง ง.49 ค่าร้อยละของการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (I (%)) ของยาฆ่าแมลงมาตรฐานผสมกลุ่ม 24OPs และ 7CAs ของสารสกัดผักกาดหอมที่จากค่า IC₁₀ จากสมการถดถอย

ตัวอย่างที่	ค่าร้อยละของการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (I (%))			ยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 24OPs (0.002 mg/kg)			ยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 7CAs (0.01 mg/kg)		
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
1	8.2	8.3	10.8	9.1	10.9	8.2	12.8	10.9	
2	10.1	9.4	9.6	9.7	6.6	10.9	12.3	6.6	
3	6.2	9.7	8.0	8.0	5.2	10.4	11.0	5.2	
4	7.1	4.8	10.9	7.6	7.7	6.4	13.2	7.7	
5	7.1	8.2	9.6	8.3	6.4	9.2	11.4	6.4	
6	8.5	8.5	12.6	9.9	9.4	9.1	16.8	9.4	
7	9.9	10.7	9.5	10.0	9.9	9.3	19.0	9.9	
8	5.7	4.1	8.8	6.2	12.1	10.4	10.9	12.1	
9	6.4	9.7	8.8	8.3	7.1	8.4	9.3	7.1	
10	9.4	8.7	10.8	9.6	9.6	12.4	9.0	9.6	
I (%) เฉลี่ย				8				10	

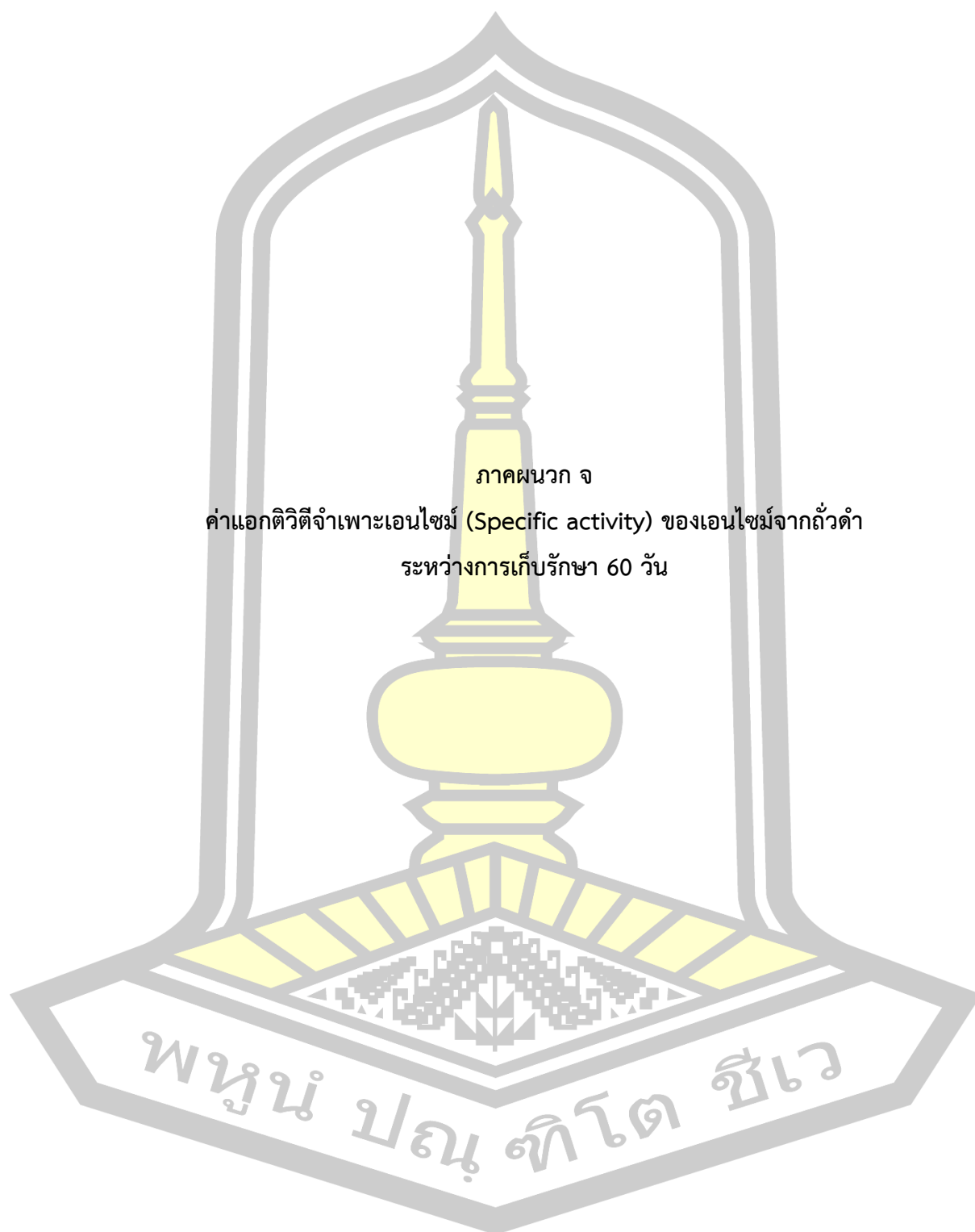
ตาราง ง.50 ค่าร้อยละของการปฏิบัติงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (I (%)) ของยาฆ่าแมลงมาตรฐานกลุ่ม 24OPs และ 7CAs ของสารสกัดผักกาดหอมตามค่าดีฟอลต์ลิมิต (default limit)

ตัวอย่างที่	ค่าร้อยละของการปฏิบัติงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (I (%))			ยาฆ่าแมลงกลุ่ม 24OPs (0.01 mg/kg)			ยาฆ่าแมลงกลุ่ม 7CAs (0.01 mg/kg)		
	1	2	เฉลี่ย	3	1	2	3	เฉลี่ย	
1	48.9	47.28	47.0	44.9	10.9	8.2	12.8	10.9	
2	48.6	48.01	44.6	37.3	6.6	10.9	12.3	6.6	
3	46.2	47.12	46.9	47.3	5.2	10.4	11.0	5.2	
4	54.6	45.66	50.3	50.5	7.7	6.4	13.2	7.7	
5	57.2	51.82	52.4	48.2	6.4	9.2	11.4	6.4	
6	44.3	49.72	46.8	46.3	9.4	9.1	16.8	9.4	
7	49.6	47.69	46.4	41.8	9.9	9.3	19.0	9.9	
8	48.2	49.39	48.1	46.7	12.1	10.4	10.9	12.1	
9	46.8	51.82	49.7	50.4	7.1	8.4	9.3	7.1	
10	45.9	50.89	46.6	42.9	9.6	12.4	9.0	9.6	
I (%) เฉลี่ย			48					10	

* ค่าร้อยละของการปฏิบัติงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (I (%)) ของกลุ่ม 7CAs มีค่าเท่ากับค่าจากผลการทดลอง

ตาราง ง.51 ค่าร้อยละของการปฏิบัติงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (I (%)) ของยาฆ่าแมลงมาตรฐานผสมกลุ่ม 24OPs และ 7CAs ของสารสกัดผักกาดหอมตามค่า LOD ของเครื่อง GC-FPD+ และเครื่อง HPLC-FLD

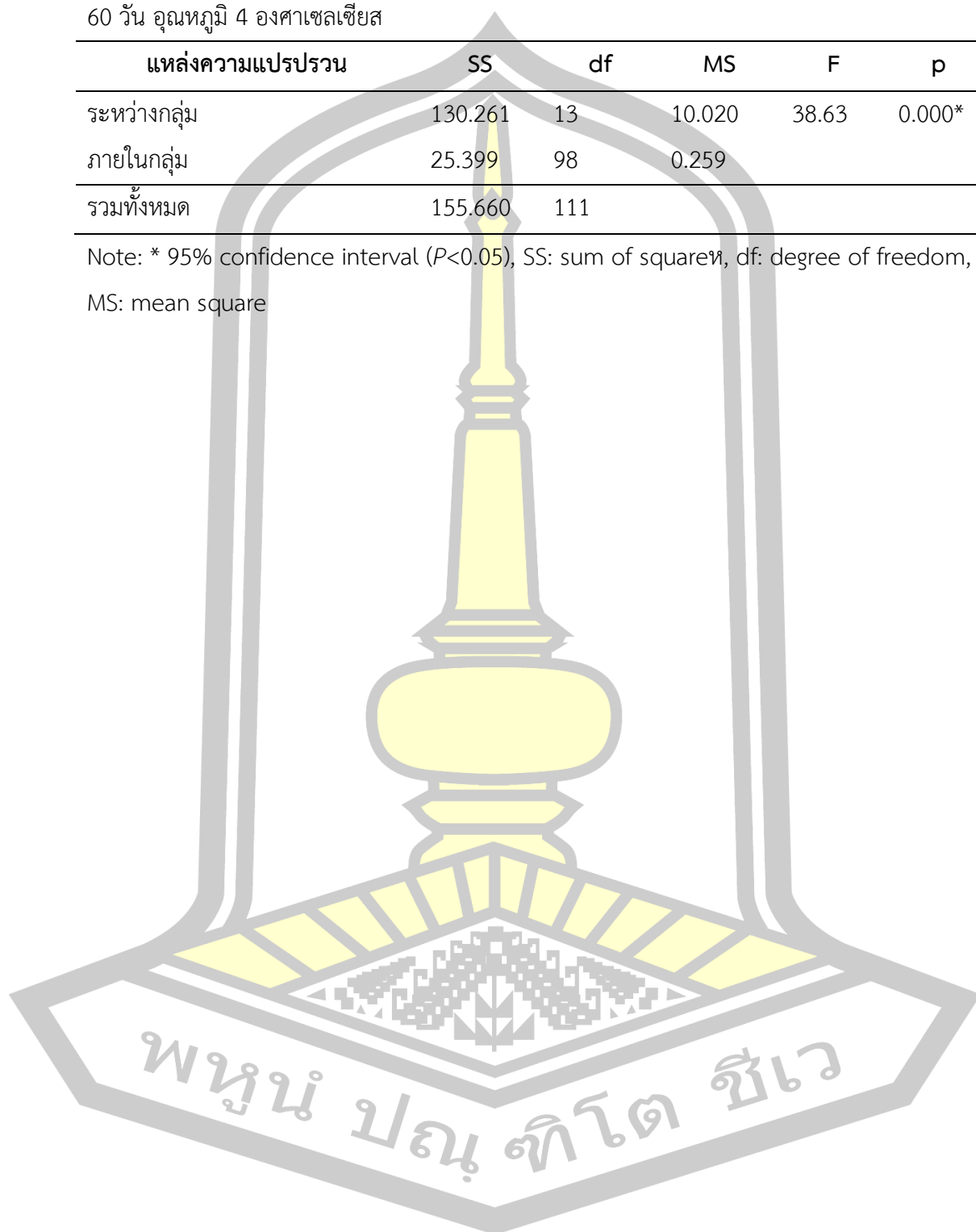
ตัวอย่างที่	ค่าร้อยละของการปฏิบัติงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (I (%))			ยาฆ่าแมลงผสมกลุ่ม 7CAs (0.003 mg/kg)				
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
1	59.3	56.8	57.9	58.0	0.0	2.3	1.4	1.2
2	58.9	56.3	53.1	56.1	0.0	0.1	0.2	0.1
3	55.7	52.8	52.5	53.7	0.0	0.5	0.0	0.2
4	47.3	44.0	50.6	47.3	0.0	0.2	0.0	0.1
5	44.9	41.5	48.7	45.0	6.1	0.0	4.2	3.4
6	72.9	71.2	46.8	63.6	6.5	1.2	3.5	3.7
7	70.2	68.4	57.5	65.4	4.9	0.1	8.5	4.5
8	68.4	66.4	58.5	64.4	5.8	0.9	2.7	3.1
9	56.4	53.7	52.6	54.3	6.0	0.2	0.0	2.0
10	55.3	52.4	59.3	55.7	5.8	1.2	1.2	2.7
I (%) เฉลี่ย				56				2



ตาราง จ.52 ค่าความแปรปรวนของค่าแอกติวิตีจำเพาะเอนไซม์ของจากถั่วตำระหว่างการรักษา 60 วัน อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

แหล่งความแปรปรวน	SS	df	MS	F	p
ระหว่างกลุ่ม	130.261	13	10.020	38.63	0.000*
ภายในกลุ่ม	25.399	98	0.259		
รวมทั้งหมด	155.660	111			

Note: * 95% confidence interval ($P < 0.05$), SS: sum of square, df: degree of freedom, MS: mean square



ตาราง จ.53 การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ของค่าแอกทวิตวิตีจำเพาะเอมไซม์จากถั่วดำระหว่างการรักษา 60 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วันที่	1	4	6	8	12	15	20	25	30	35	40	45	50	60
Mean	10.450	9.875	9.725	9.600	9.462	9.000	8.962	8.650	8.575	7.762	7.350	7.350	7.212	7.112
1	10.450	0.588	0.219	0.066	0.013	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
4	9.875	-	1.000	0.998	0.935	0.050	0.033	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
6	9.725	-	-	1.000	0.999	0.219	0.158	0.004	0.001	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
8	9.600	-	-	-	1.000	0.518	0.416	0.021	0.008	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
12	9.462	-	-	-	-	0.8863	0.785	0.098	0.044	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
15	9.000	-	-	-	-	-	1.000	0.983	0.921	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
20	8.962	-	-	-	-	-	-	0.994	0.960	0.001	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
25	8.650	-	-	-	-	-	-	-	1.000	0.044	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
30	8.575	-	-	-	-	-	-	-	-	0.098	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
35	7.762	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.936	0.936	0.658	0.384
40	7.350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.000	1.000	1.000
45	7.350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.000	1.000
50	7.212	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.000
60	7.112	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note: * 95% confidence interval (P<0.05)

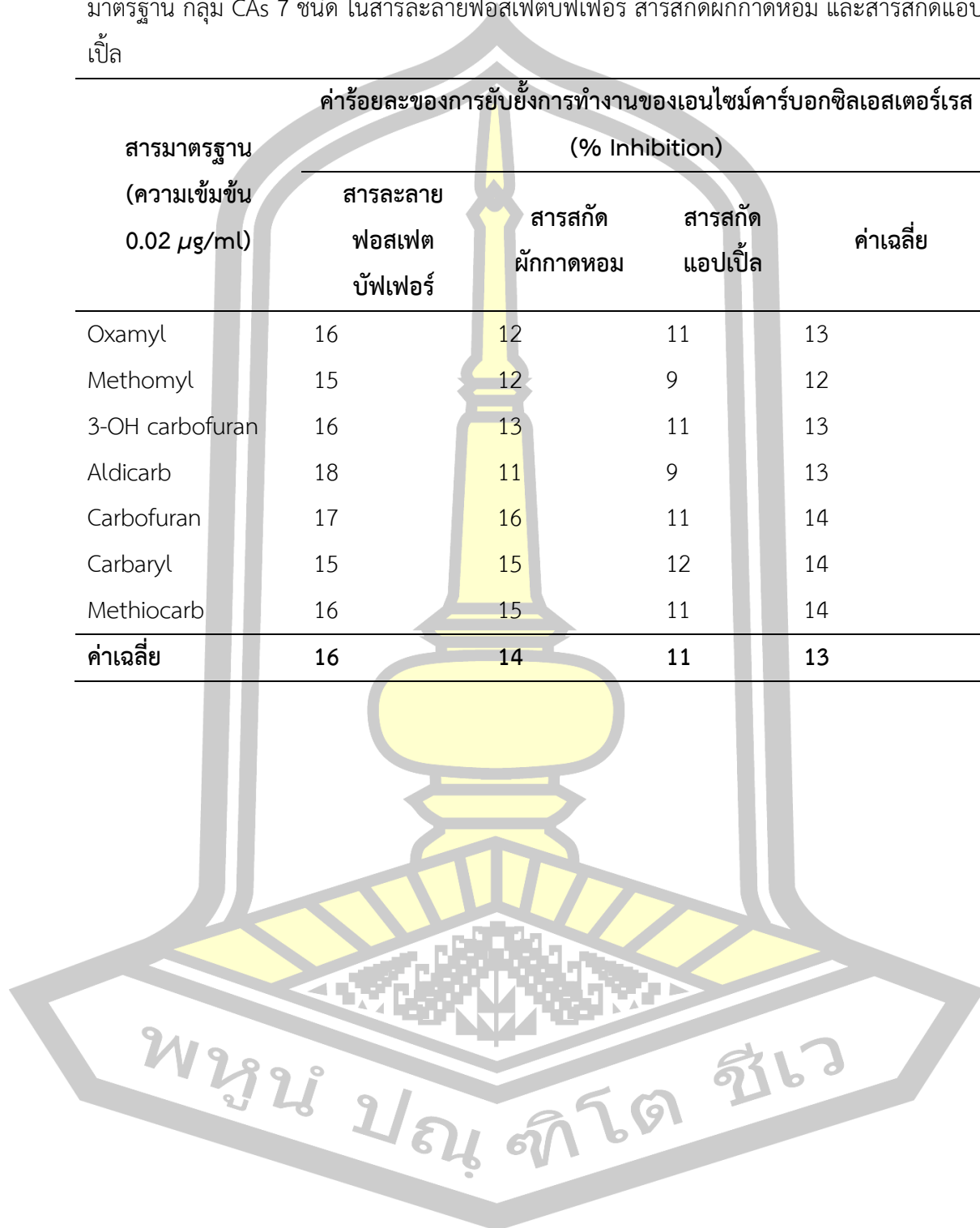


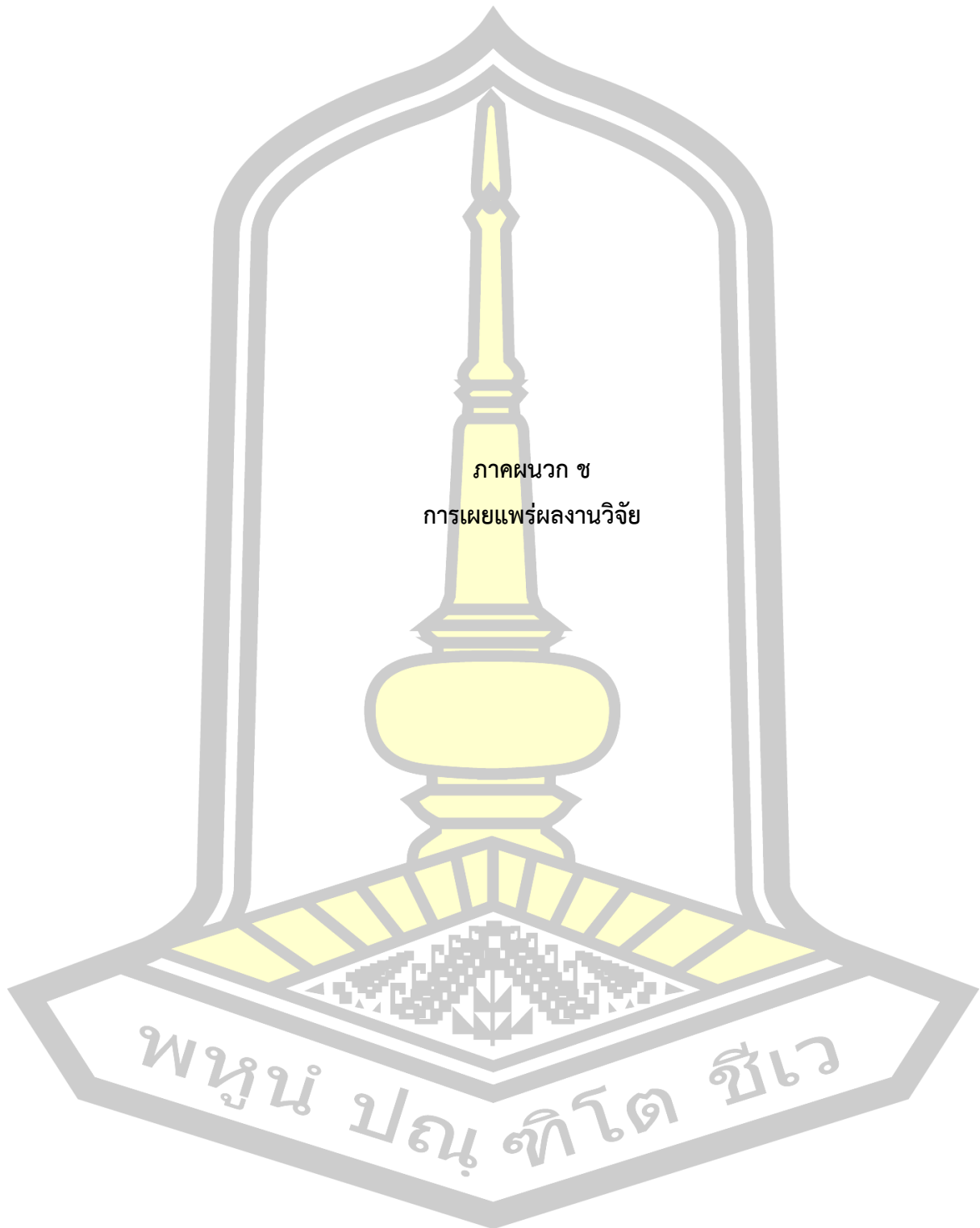
ตาราง จ.54 ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสของยาฆ่าแมลงมาตรฐาน กลุ่ม OPs 24 ชนิด ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ สารสกัดผักกาดหอม และสารสกัดแอปเปิ้ล

สารมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0.02 µg/ml)	ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (% Inhibition)			ค่าเฉลี่ย
	สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์	สารสกัด ผักกาดหอม	สารสกัด แอปเปิ้ล	
	Dichlorvos	48	42	
Methamidophos	27	29	27	28
Mevinphos	28	30	30	29
Acephate	27	24	26	26
Omethoate	28	27	28	28
Diazinon	28	25	28	27
Dicrotophos	25	26	31	27
Monocrotophos	27	25	29	27
Dimethoate	28	31	28	29
Primiphos methyl	25	34	25	28
Chlorpyrifos	25	31	30	29
Parathion methyl	25	29	29	28
Parathion ethyl	25	26	27	26
Prothiophos	27	24	26	26
Methidathion	26	26	25	26
Profenophos	27	26	29	27
Ethion	27	27	30	28
EPN	23	30	26	26
Triazophos	26	24	28	26
Phosalone	23	27	28	26
Azinphos methyl	24	23	26	24
Fenitrothion	25	25	27	26
Malathion	24	26	27	26
Propagite	24	23	22	23
ค่าเฉลี่ย	27	27	28	27

ตาราง จ.55 ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรสของยาฆ่าแมลงมาตรฐาน กลุ่ม CAS 7 ชนิด ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ สารสกัดผักกาดหอม และสารสกัดแอปเปิ้ล

สารมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0.02 $\mu\text{g/ml}$)	ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (% Inhibition)			ค่าเฉลี่ย
	สารละลาย ฟอสเฟต บัฟเฟอร์	สารสกัด ผักกาดหอม	สารสกัด แอปเปิ้ล	
Oxamyl	16	12	11	13
Methomyl	15	12	9	12
3-OH carbofuran	16	13	11	13
Aldicarb	18	11	9	13
Carbofuran	17	16	11	14
Carbaryl	15	15	12	14
Methiocarb	16	15	11	14
ค่าเฉลี่ย	16	14	11	13





ภาคผนวก ช
การเผยแพร่ผลงานวิจัย

พหุบัณฑิต โท ชีวะ



The 29th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference
November 23-25, 2017 Swissôtel Le Concorde, Bangkok, Thailand

Carboxylesterase activity of the legume seed extracts

Chiradet Nasuk¹, Monrodee Chaowarat¹ and
Sumonwan Chumchuere^{1*}

¹Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Mahasarakham University,
Mahasarakham, Thailand 44150

*Corresponding author. E-mail: mon_msu@yahoo.com

ABSTRACT

Carboxylesterases were extracted from seeds of black gram (*Phaseolus mungo* L.), mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek), red bean (*Vigna umbellata* (Thumb.) Ohwi & Ohashi), red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soy bean (*Glycine max* L.) with phosphate buffer (0.1M, pH 7). These enzymes were partially purified by ammonium sulfate precipitation. α -naphthyl acetate was used as the specificity substrate for measurement of enzyme activity. The partially purified extracted enzymes showed higher specific activity than crude extracts. The highest specific activity enzyme (1.4×10^{-2} U/mg) was found in black gram extract while the lowest specific activity was found in red bean extract (6.0×10^{-4} U/mg). This result indicated that the partially purified extract from black gram should be further study for organophosphorus and carbamate residues detection in vegetables.

Keywords: carboxylesterase, legume seeds, α -naphthyl acetate, specific activity

INTRODUCTION

Carboxylesterase (EC 3.1.1.1) is classified into the hydrolase group which catalyze various types of ester compounds to carboxylic acid and alcohols (Bhavith et al., 2014). These enzymes are widespread in nature, found in animals, plants and microorganisms (Hou et al., 2012). The biological functions of these enzymes including, cell expansion, abscission, fruit ripening, insecticidal resistance against infection, hydrolysis of ester xenobiotic molecules (Shivashankar and Premkumari, 2014). These enzymes showed inhibition activities of organophosphorus (OPs) and carbamate (CAs) pesticide like animal-origin acetylcholinesterase (AChE).

The 29th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference
November 23-25, 2017 Swissôtel Le Concorde, Bangkok, Thailand

Legume seeds are rich of excellent sources of protein, dietary fiber, micronutrients and phytochemicals compounds. Protein content of legume seeds is generally between 20-40 g/100 g dry wt. (Ali et al., 2013, Comai et al., 2007 and Messina, 1999). Recently, carboxylesterases extracted from various types of legume seeds have chosen for enzyme activity and pesticide inhibition investigation because they are cheaper, easier and more convenience extraction than AChE. These enzymes also showed very high sensitivity to OPs and CAs with the lowest detective limits (LODs). (Wang, J., et al 2012, Jian-ke, L., et al., 2009 and Fei, X., et al., 2005). Base on the results, the aim of this study is to investigate the activity of carboxylesterase extracted from legume seeds.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Seeds of black gram (*Phaseolus mungo* L.), mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek), red bean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi), red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soy bean (*Glycine max* L.) were purchased from local market in Chonburi province, Thailand.

All chemicals and reagents were HPLC or analytical grade. Ammonium sulfate anhydrous, sodium dihydrogen phosphate, disodium hydrogen phosphate, sodium carbonate, copper sulfate, sodium hydroxide, sodium potassium ttrate were purchased from Merck (Germany). Bovine serum albumin (BSA), α -naphthyl acetate, α -naphthol, fast blue B salt and folin & ciocalteu's phenol reagent were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. Acetone was purchased from Honeywell. Distilled water was used in this experiment.

Methods

Extraction of carboxylesterase

Water extraction of carboxylesterase was carried out according to the modified method of Wang et al., (2012). Seeds of black gram, mung bean, red bean, red kidney bean and soy bean were washed with tap water, after air-dried for 30 minutes the samples were smashed using blender. About 12 g of smashed samples were weighed into 125 ml of Erlenmeyer flask, and 30 ml of phosphate buffer (0.1M, pH 7) was added into each flask. These samples were statically placed overnight at 4°C. The mixtures then were centrifuged for 10 min at 300G. After centrifugation, the supernatants were collected.

The 29th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference
November 23-25, 2017 Swissôtel Le Concorde, Bangkok, Thailand

Partial purification of carboxylesterase

The crude extracts were further partial purified carried out according to the modified method of Wang et al., (2012) and Jian-ke et al., (2009). About 3.90 g of ammonium sulfate powder was weighed and slowly mixed with crude extract enzyme (10 ml) to achieve 60% saturation. The mixture was placed at 4°C for 2 h and was centrifuged at 300G for 10 min. The sediment containing enzyme was collected and dissolved with phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0), following by dialysis in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) overnight at room temperature. The dialyzed of carboxylesterase solution was stored at 4°C prior to use.

Assay of carboxylesterase activity

Carboxylesterase activity assay was based on the spectrophotometer method according to the modified method of Van Asperen (1962) and Ali et al., (2013). The partial purified enzyme solution (1.0 ml) and 0.3 mM α -naphthyl acetate (5.0 ml) as a substrate were added into test tube and gentle mixed (stock solution of 30 mM α -naphthyl acetate was prepared in acetone and working solution was diluted in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.0). The mixture was incubated for 15 minutes at room temperature. After incubation, 1.0 ml of DBLS reagent (5 parts of 5% sodium lauryl sulphate and 2 parts of 1% fast blue B salt) were added for stop reaction. The reaction was left for 15 minutes. After that, the absorbance was monitored at 600 nm by spectrophotometer (Perkin Elmer Instruments, USA). Phosphate buffer was used for the control. The calculation of esterase activity was performed using α -naphthol as a standard curve, ranging at concentrations of 3.0-27.0 μ M. All enzyme assays were performed in triplicate.

One unit of esterase activity was defined as the amount of enzyme required to produce 1 μ mol of substrate (α -naphthyl acetate) to α -naphthol min^{-1} at 15°C.

Protein assay

Carboxylesterase extract was determined for protein content according to the method of Lowry et al. (1951) with bovine serum albumin (BSA) as a standard. The measurement was detected with the spectrophotometer at 700 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

Total protein content

This report showed total protein content and total activity of carboxylesterase extracted from various types of edible legume seeds including, mung bean, red bean, red kidney bean, black gram and soy bean. These seeds were extracted by phosphate buffer (0.1M, pH 7) at room temperature. The maximum total protein (433103.13 mg) was found in red kidney bean extract and total activity (1306.15 U) was found in black gram extract as shown in table 1.

Table 1. Total protein content and total activity of carboxylesterase of legume seed extracts.

Legume seeds	Total protein (mg)	Total activity (U)
Mung bean	357635.42	333.46
Red bean	300746.88	59.41
Red kidney bean	433103.13	456.08
Black gram	361928.13	1306.15
Soy bean	380371.88	129.61

Activity of carboxylesterase

The crude extracts then were partially purified by 60% saturation of ammonium sulfate and activity of carboxylesterase was investigated. Table 2 shows the efficiency of the partially purified enzymes. For the results, the specific activity of partially purified enzymes from edible legume seeds was higher than those crude extracted enzymes that similar to previous reports of Kantharaju and Siddalinga (2014) and Subramani et al., (2012). The highest specific activity was found in black gram extract (1.4×10^{-2} U/mg), whereas the lowest value was found in red bean extract (6.0×10^{-4} U/mg). However, carboxylesterases activity was also affected by temperature and pH on hydrolysis of α -naphthyl acetate (Mahesh et al., 2014).

Table 2. Carboxylesterase activity of partially purified extracts of legume seeds.

Legume seeds	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)
Mung bean	388.31	1.8×10^{-3}
Red bean	134.47	6.0×10^{-4}
Red kidney bean	947.78	5.4×10^{-3}
Black gram	2953.72	1.4×10^{-2}
Soy bean	106.48	6.1×10^{-4}

The results of variance analysis and pair comparisons are displayed in Tables 3 and 4. The paired samples test comparison between the partially purified extracts and crude extracts showed significant differences ($P < 0.05$). The variance analysis of specific activity of crude extract of black gram, red kidney bean and soy bean were significant differences ($P < 0.05$). On the other hand, the specific activity of crude extract of red bean and soy bean were no significant differences with 95% confidence interval. Similarly, the specific activity of partially purified extract of black gram, red kidney bean and soy bean were significant differences ($P < 0.05$), while red bean and soy bean were no significant differences.

Table 3. Pair of legumes seeds sample test of partially purified extracts and crude extracts.

Pair of partially purified extracts and crude extracts	Paired sample test				
	Mean	SD	t	df	p-value
Mung bean	8.6×10^{-4}	1.8×10^{-4}	15.31	9	.000
Red bean	4.2×10^{-3}	5.9×10^{-5}	21.57	9	.000
Red kidney bean	4.5×10^{-3}	5.1×10^{-4}	27.50	9	.000
Black gram	1.1×10^{-2}	8.6×10^{-4}	38.94	9	.000
Soy bean	1.2×10^{-4}	3.4×10^{-5}	14.12	9	.000

Note: 95% confidence interval ($P < 0.05$), SD: standard deviation, df: degree of freedom

The 29th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference
November 23-25, 2017 Swissôtel Le Concorde, Bangkok, Thailand

Table 4. Variance analysis of specific activity of crude extracts and partially purified extracts of legumes seeds.

Samples	N	Mean	SD	F	P-value
Crude extracts				324.836	.000
Mung bean	10	9.3x10 ^{-4b}	9.7x10 ⁻⁵		
Red bean	10	2.0x10 ^{-4a}	1.3x10 ⁻⁵		
Red kidney bean	10	1.0x10 ^{-3b}	8.9x10 ⁻⁴		
Black gram	10	3.6x10 ^{-3c}	5.2x10 ⁻³		
Soy bean	10	3.4x10 ^{-4a}	3.1x10 ⁻⁴		
Partially purified extracts				2186.065	.000
Mung bean	10	1.8x10 ^{-3b}	1.8x10 ⁻⁴		
Red bean	10	6.0x10 ^{-4a}	4.8x10 ⁻⁵		
Red kidney bean	10	5.4x10 ^{-3c}	4.9x10 ⁻⁴		
Black gram	10	1.4x10 ^{-2d}	6.9x10 ⁻⁴		
Soy bean	10	6.1x10 ^{-4a}	2.6x10 ⁻⁵		

Note: the values represented by the same lower-case letters are not significantly different at $P < 0.05$ according to Duncan's multiple range tests.

CONCLUSION

This research investigated the carboxylesterase activity of five edible legume seeds comparison between crude extracts and partially purified extracts. The partially purified extract from black gram showed the highest specific activity enzyme. From this result, we have planned to conduct more studies on sensitivity of carboxylesterase extracted from black gram for detection the organophosphorus and carbamate residues in vegetables.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge to Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Mahasarakham, Thailand and Regional Medical Science Center 6 Chonburi, Thailand for offering facilities to carry out the research work.

REFERENCES

- Ali, S., A., Bendre, G., Ojha, S., Krishnamurthy, V., N. Ramachandra Swamy, V. N. and Chandrashekharaiyah, K., S. (2013). Esterases from the Seeds of an edible legume, *Phaseolus vulgaris* L.; variability and stability during germination. *American Journal of Plant Sciences*, 4, 905-909.
- Bhavith, K. P., Narayana, S. M., Ramachandra, S. N. and Chandrashekharaiyah, K. S. (2014). Purification and Characterization of esterase from the seeds of *Caesalpinia mimosoides*. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 2(6), 634-641.
- Comai, S., Bertazzo, A., Bailoni, L., Zancato, M., Costa, Carlo, V. L. and Allegri, G. (2007) Protein and non-protein Zfree and protein-bond) tryptophan in legume seeds. *Food chemistry*, 103, 657-661.
- Fei, X., Tse-Chao H., Da-Wen S., Jian-Jun X., Xiao-Lei Z. (2005) Enzyme activity of wheat esterase as affected by various cryopreservation conditions. *Journal of Food Engineering*, 69, 17-22.
- Hou, C., He K., Yang, L., Huo, D., Yang, M., Huang, S., Zhang, L. and Shen, C. (2012) Catalytic characteristics of plant-esterase from wheat flour. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 541-548.
- Jian-ke, L., Yan-li, Zhou., Yan-xia, Wen., Jian-hua, Wang., and Qiy-hui, Hu. (2009). Studies on the purification and characterization of soybean esterase, and its sensitivity to organophosphate and carbamate pesticides. *Agricultural Sciences in China*, 8(4), 455-463.
- Kantharaju, S. and Siddalinga M. K. R. (2014) Characterization of Esterases of *Tamarindus indica* Seeds. *Journal of Biosciences and Medicines*, 2, 54-62.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Mahesh. A. Chandre, Bhagyashri. N. Raut, Nilesh. S. Chavan, Ashok. V. Kharde, and Shilpa. H. Tarte. (2014). Studies on the Isolation and Characterization of Esterase enzyme from Green Peas, *International Journal of Current Biotechnology*, 2(6), 5-9.
- Messina, M. J. (1999) Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 439-450.

The 29th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference
November 23-25, 2017 Swissôtel Le Concorde, Bangkok, Thailand

- Shivashankar, M. and Premkumari, B. (2014). Characterization of esteolytic activity from edible mushroom *Hypsizygus ulmrius*. *Journal of Bio Innovation*, 3(3), 124-134.
- Subramani, T., Chandrashekharaiah, K. S., Ramachandra Swamy, N. and Siddalinga Murthy, K. R. (2012). Purification and Characterization of Carboxylesterase from the Seeds of *Jatropha curcas*. *Protein Journal*, 31, 120-128.
- Van Asperen, K. (1962) A Study of House Fly Esterase by Means of a Sensitive Colorimetric Method. *Journal of Insect Physiology*, 8, 401-416.
- Wang, J., Xia, Q., Zhang, A., Hu, X. and Lin, C. (2012). Determination of organophosphorus pesticide residues in vegetables by an enzyme inhibition method using α -naphthyl acetateesterase extracted from wheat flour. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 4, 267-273.





TO CERTIFY THAT

**Chiradet Nasuk, Monrodee Chaowarat
and Sumonwan Chumchuere**

gave poster presentation entitled

Carboxylesterase activity of the legume seeds extracted

at The 29th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology
and International Conference
November 23 – 25, 2017
Bangkok, Thailand

R. Chongcharoen

.....
**Asst. Prof. Dr. Ratsaman Chongcharoen
Chairperson of Organizing Committee**

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายจิระเดช นาสุก
วันเกิด	10 สิงหาคม 2525
สถานที่เกิด	จังหวัดนครราชสีมา
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	34 หมู่ 10 บ้านหนองจิก ตำบลโบลัส อำเภอฟินาย จังหวัดนครราชสีมา 30110
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2548 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม พ.ศ. 2553 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม พ.ศ. 2563 ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ปร.ด.) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม
ผลงานวิจัย	Chiradet Nasuk, Monrodee Chaowarat and Sumonwan Chumchuere. (2017). Carboxylesterase activity of the legume seed extracts. The 29th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. FA 211-218.

พูน ปณ ทิโต ชีเว