Agricultural Sci. J. 46 : 3/1 (Suppl.) : 327-330 (2015) ว. วิทย. กษ. 46 : 3/1 (พิเศษ) : 327-330 (2558)

การตรวจหาคาร์โบฟูรานที่ตกค้างในผักด้วยแผ่นทดสอบที่ใช้หลักการเปลี่ยนแปลงสี

Detection of Carbofuran Residues in Vegetables by Colorimetric Test-Card

นิสารัตน์ แดงวิสุทธิ์[1] ขวัญใจ กลิ่นจงกล[1] บุศรากรณ์ มหาโยธี[1] และ ปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ[1]

NisaratDangwisut[1], Khwanjai Klinchongkon[1], Busarakorn Mahayothee[1] and Pramote Khuwijitjaru[1]

Abstract

This study has developed a test-card for detection of insecticide residue; carbofuran, based on color changing. The test-card was prepared by adding the acetylcholinesterase enzyme (4.96 U) and the substrate solution, indoxyl acetate (1.5×10^{-7}mol) on separate 13 mm-diameter nylon membranes and drying at 25°C for 30 min. Chinese cabbage, chili and yardlong bean extracts spiked with carbofuran at 0.05, 10, 50, 100, and 1000 ppb were dropped onto the enzyme-coated membrane and left for 15 min. After that, the substrate-coated membrane was overlaid and left for another 25 min before the color measurement (CIE L* a* b*) was performed on the enzyme-coated membrane using a colorimeter. The results showed that blue color intensity (-b*) of the test-card decreased with increasing the carbofuran concentration. The developed test-card could detect carbofuran residues at ≥ 50 ppb. In comparing with the maximum residue limits (MRL) of carbofuran in Chinese cabbage, chili and yardlong bean (30, 500 and 100 ppb, respectively), the test-card was effective to detect carbofuran residues in chili and yardlong bean.

Keywords: carbofuran, acetylcholinesterase, indoxyl acetate

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้พัฒนาแผ่นทดสอบเพื่อตรวจหายาฆ่าแมลงชนิดคาร์โบฟูราน โดยอาศัยการเปลี่ยนสีของแผ่นทดสอบ การเตรียมแผ่นทดสอบทำโดยหยดเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (4.96 หน่วย) และอินดอกซ์ซิลอะซิเตต (1.5×10^{-7} โมล) ลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรนเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร แยกจากกันคนละแผ่น ทิ้งไว้ให้แห้งที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงหยดสารสกัดจากผักกาดขาวปลี พริกขี้หนู และถั่วฝักยาวที่มีการเติมคาร์โบฟูราน ในระดับความเข้มข้น 0.05, 10, 50, 100 และ 1000 ส่วนในพันล้านส่วน (พีพีบี) ลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรนแผ่นที่มีเอนไซม์หยดไว้ ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วจึงนำแผ่นไนลอนเมมเบรนทั้งสองมาประกบกันไว้อีก 25 นาที จากนั้นแยกออกจากกัน นำแผ่นที่มีเอนไซม์ไปวัดค่าสี (CIE L* a* b*) ด้วยเครื่องวัดสี ผลการทดลองพบว่า สารสกัดผักที่มีคาร์โบฟูรานในปริมาณที่มากขึ้น ทำให้ค่าความเข้มสีน้ำเงิน (-b*) ของแผ่นทดสอบลดลง ซึ่งแผ่นทดสอบนี้สามารถใช้ตรวจคาร์โบฟูรานในตัวอย่างผักได้ที่ความเข้มข้น ≥ 50 พีพีบี ในขณะที่ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (MRL) ของคาร์โบฟูรานในผักกาดขาวปลี พริกขี้หนู และถั่วฝักยาว มีค่าเท่ากับ 30, 500 และ 100 พีพีบี ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า แผ่นทดสอบนี้มีประสิทธิภาพในการนำไปใช้ตรวจสอบคาร์โบฟูรานในพริกขี้หนูและถั่วฝักยาว

คำสำคัญ: คาร์โบฟูราน, อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส, อินดอกซ์ซิลอะซิเตต

คำนำ

ปัจจุบันยาฆ่าแมลงถูกนำมาใช้มากขึ้นในทางเกษตรกรรม เป็นสาเหตุให้มียาฆ่าแมลงตกค้างอยู่ในผักผลไม้เป็นจำนวนมาก เนื่องจากยาฆ่าแมลงเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคจึงต้องมีการตรวจวัดยาฆ่าแมลงในพืชผลหลังการเก็บเกี่ยว วิธีตรวจวัดที่นิยมใช้คือ gas chromatography (GC) และ high performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งให้ผลการตรวจวัดเชิงปริมาณที่มีความแม่นยำสูง แต่ก็มีข้อจำกัดคือใช้เครื่องมือราคาแพงและต้องทำในห้องปฏิบัติการ (Guo *et.al*, 2013) อย่างไรก็ตาม มีวิธีสำหรับการตรวจวัดยาฆ่าแมลงที่สะดวกและรวดเร็วกว่าคือ การใช้ชุดน้ำยาทดสอบ (test kit) ซึ่งโดยทั่วไปใช้หลักการการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (Van Dyk and Pletschke, 2011) แต่ชุดน้ำยาทดสอบที่มีอยู่ในประเทศไทยก็ยังมีข้อจำกัดคือมีขั้นตอนในการวิเคราะห์หลายขั้นตอน ดังนั้นเพื่อให้การตรวจสอบการปนเปื้อน

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม 73000

[1]Department of Food Technology, Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University, NakhonPathom73000

ของยาฆ่าแมลงในผักและผลไม้มีความสะดวกมากยิ่งขึ้น งานวิจัยนี้จึงได้มีการพัฒนาแผ่นทดสอบเพื่อใช้ในการตรวจสอบยาฆ่าแมลงชนิดคาร์โบฟูราน

อุปกรณ์และวิธีการ

1 การเตรียมแผ่นทดสอบ

ใช้ไนลอนเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน (Vertical, Thailand) เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร 2 แผ่น แผ่น A หยดเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (Sigma-Aldrich, USA) ความเข้มข้น 1,654 ยูนิต/มิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร (4.96 หน่วย) และทำแห้งโดยการทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องปรับอากาศ (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที แผ่น B หยดอินดอกซ์ซิลอะซิเตต (Sigma-Aldrich, USA) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร (1.5×10^{-7} โมล) และทำแห้งโดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องปรับอากาศ (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปทดสอบโดยหยดยาฆ่าแมลงในขั้นตอนต่อไป

2 การสร้างกราฟการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

เตรียมสารละลายคาร์โบฟูราน (Dr.Ehrenstorfer, Germany) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.02 M, pH 7.5) ที่ความเข้มข้น 10^4, 5×10^3, 2.5×10^3, 10^3, 10^2, 10, 1, 10^{-1} และ 10^{-2} พีพีบี หยดสารละลายปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นทดสอบที่ตรึงเอนไซม์ไว้ (แผ่น A) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลานำแผ่น B ประกบบนแผ่น A แล้วหยดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 M, pH 7.5)12 ไมโครลิตร ประกบให้แน่นทิ้งไว้ 25 นาที เพื่อรอการเกิดปฏิกิริยา จากนั้นแยกแผ่นทดสอบออกจากกัน นำด้านแผ่น A ไปวัดค่าสี ในระบบ L* a* b* โดยเครื่องวัดสี (MiniScanXE, Hunter Associates Laboratory, USA) สร้างความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคาร์โบฟูรานกับค่า -b* โดยใช้สมการ dose response curve ดังนี้

$$-b* = A + \left(\frac{(B-A)}{(1+10^{((\log IC_{50}-X)*H)})}\right)$$

เมื่อพารามิเตอร์ A คือค่า –b* ต่ำที่สุด, B คือ ค่า –b* สูงที่สุดของโมเดล, H คือ Hill slope, X คือ ค่า Log ความเข้มข้นของคาร์โบฟูราน และ IC_{50} คือ ค่าความเข้มข้นของคาร์โบฟูรานที่ทำให้ค่าสีลดลงครึ่งหนึ่ง

3 การตรวจหายาฆ่าแมลงในผักด้วยแผ่นทดสอบ

บดตัวอย่าง ผักกาดขาวปลี พริกขี้หนู และถั่วฝักยาว ที่ได้จากการปลูกด้วยระบบออร์แกนิก ซึ่งปราศจากการปนเปื้อนของยาฆ่าแมลง ชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 5 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ จากนั้นเติมสารละลายคาร์โบฟูราน (ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นตัวทำละลาย) ที่มีความเข้มข้น 0.05, 10, 50, 100 และ 1000 พีพีบี ลงไป แล้วเขย่าเป็นเวลา 2 นาที เพื่อสกัดตัวอย่าง (Han *et al.,* 2012) กรองตัวอย่างแบบสุญญากาศผ่านกระดาษเบอร์ 1 แล้วนำส่วนของของเหลวที่สกัดได้มา 3 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหลอดทดลอง จากนั้นเติมผงถ่านลงไปปริมาณ 150 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 30 วินาที กรองของผสมนั้นอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 โดยการกรองแบบสุญญากาศ เพื่อแยกผงถ่านออกจากตัวอย่าง จากนั้นนำสารสกัดส่วนใสที่กรองได้ ไปทดสอบกับแผ่นทดสอบต่อไป

ผล

Figure 1 แสดงให้เห็นว่า เมื่อเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ไม่มีคาร์โบฟูราน (0 ppb) ลงบนแผ่นทดสอบ A แล้วนำแผ่นทดสอบ B มาประกบไว้นั้น ทำให้เกิดจุดสีน้ำเงินบนแผ่นทดสอบ A โดยการรายงานความเข้มของจุดสีน้ำเงินนี้ ได้นำเสนอในรูปแบบของค่า –b* ซึ่งแสดงค่าสีน้ำเงิน และความเข้มสีของจุดดังกล่าวนี้ลดลงเมื่อความเข้มข้นของคาร์โบฟูรานเพิ่มขึ้น

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคาร์โบฟูรานที่หยดลงไปบนแผ่นทดสอบ A กับค่า -b* นั้น สามารถอธิบายได้ด้วยสมการ dose response curve ดังแสดงใน Figure 2 โดยจะเห็นได้ว่าค่า –b* นั้นลดลง เมื่อความเข้มข้นของคาร์โบฟูรานเพิ่มขึ้น และลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อความเข้มข้นเข้าใกล้ 100 µg/kg ซึ่งทำให้ค่า –b* ลดลงจนเหลือประมาณ 2 จากการวิเคราะห์การถดถอยของสมการนี้ โดยใช้ฟังก์ชั่น Solver ในซอฟท์แวร์ Microsoft Excel แล้ว ทำให้สามารถหาค่าพารามิเตอร์ของสมการนี้ได้ โดยพบว่า ค่า –b* ต่ำที่สุด มีค่าเท่ากับ 0.48, ค่า –b* สูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 4.56, ค่า Hill slope มีค่าเท่ากับ -0.87, ค่า log IC_{50} มีค่าเท่ากับ 1.68 ซึ่งเมื่อคำนวณแล้ว จะพบว่า ค่า IC_{50} ของแผ่นทดสอบนี้ มีค่าเท่ากับ 48.93 ppb ซึ่งสามารถใช้เป็นค่า limit of detection (LOD) ของแผ่นทดสอบได้

0 ppb 10 ppb 1000 ppb

Figure 1 Changes of color on test card added with carbofuran concentrations of 0, 10 and 1000 ppb

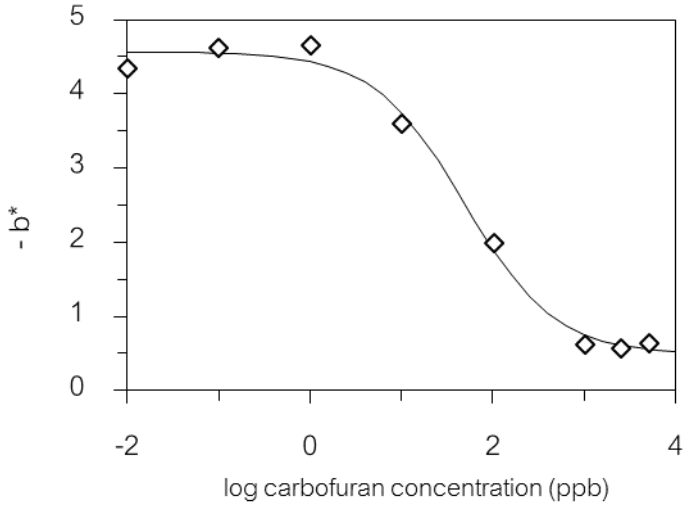

Figure 2 Inhibition of acetylcholinesterase on test-card by various concentrations of carbofuran. Fitted line is –b* = 0.48+ ((4.56-0.48)/(1+$10^{(1.68-x)*(-0.87)}$)).

จากค่าพารามิเตอร์ของสมการ dose response curve นี้ สามารถนำไปทำนายปริมาณคาร์โบฟูรานในตัวอย่างผักกาดขาวปลี พริกขี้หนู และถั่วฝักยาว ได้ ดังแสดงใน Table1

Table 1 Concentration of carbofuran residue in samples analyzed by the developed test card.

Added carbofuran (ppb)	Chinese cabbage		Chili		Yardlong bean	
	–b*	Estimated Concentration (ppb)	–b*	Estimated Concentration (ppb)	–b*	Estimated Concentration (ppb)
0	5.73	ND	5.51	ND	5.53	ND[1]
0.05	5.41	ND	4.75	ND	4.99	ND
10	4.66	ND	4.67	ND	3.96	6.75±2.01
50	3.34	22.43±19.67	2.68	24.59±8.42	3.06	29.31±18.51
100	2.41	58.12±20.12	2.05	85.51±13.81	2.32	69.49±33.94
1000	1.15	400.85±279.05	0.68	593.30±114.98	1.29	266.49±107.98

[1] ND = Not detected

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองข้างต้นจะเห็นว่า เมื่อไม่มีการเติมยาฆ่าแมลงคาร์โบฟูรานลงในตัวอย่าง ทำให้เกิดจุดสีน้ำเงินเข้มบนแผ่นทดสอบ ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสที่มีอยู่ สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของอินดอกซ์ซิลอะซิเตตให้เป็นอินดอกซ์ซิล และเมื่อสารนี้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับอากาศแล้วจึงเปลี่ยนเป็นสารสีน้ำเงิน (Han *et al.*, 2012) อย่างไรก็

ตาม เมื่อตัวอย่างที่ใช้ทดสอบนั้นมีคาร์โบรานปนอยู่ คาร์โบฟูรานสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส ทำให้การเปลี่ยนอินดอกซ์ซิลอะซิเตตให้เป็นอินดอกซ์ซิลได้น้อยลง และทำให้จุดสีน้ำเงินบนแผ่นทดสอบมีความเข้มต่ำลงไปด้วย

ในการทดลองตรวจวัดยาฆ่าแมลงในตัวอย่างทั้งสามชนิดที่เติมคาร์โบฟูรานความเข้มข้นต่างๆ กัน ด้วยแผ่นทดสอบที่พัฒนาขึ้นมานี้ พบว่า สามารถระบุได้ว่าตัวอย่างมีคาร์โบฟูรานตกค้างเมื่อค่าสี –b* เท่ากับ 3.34, 2.68, 3.96 หรือต่ำกว่านั้น สำหรับตัวอย่าง ผักกาดขาวปลี พริกขี้หนู และถั่วฝักยาว ตามลำดับ ในกรณีที่ความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงต่ำเกินไป จะไม่สามารถระบุปริมาณยาฆ่าแมลงในตัวอย่างได้ถูกต้อง จึงต้องระบุเป็น ไม่สามารถตรวจพบได้ (ND) อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าแผ่นทดสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจพบยาฆ่าแมลงในตัวอย่างได้ แต่ค่าความเข้มข้นที่ได้จากการทำนายด้วยสมการนั้น ยังคงมีความคลาดเคลื่อนค่อนข้างสูง ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สรุปผลการทดลอง

แม้ว่าแผ่นทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้ ไม่สามารถทำนายค่าความเข้มข้นของคาร์โบฟูแรนในตัวอย่างได้อย่างแม่นยำ แต่สามารถนำแผ่นทดสอบนี้ไปใช้ตรวจยาฆ่าแมลงในเชิงคุณภาพได้ ว่าในตัวอย่างนั้นๆ มีการปนเปื้อนของยาฆ่าแมลงเกินมาตรฐานหรือไม่ โดยหากพิจารณาปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (MRL) ตามมาตรฐานของประเทศไทยสำหรับคาร์โบฟูรานที่พบใน ผักกาดขาวปลี พริกขี้หนู และถั่วฝักยาว ซึ่งมีค่าเท่ากับ 30, 500 และ 100 พีพีบี ตามลำดับ (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2556) จะเห็นว่าแผ่นทดสอบนี้ สามารถระบุการปนเปื้อนของคาร์โบฟูรานในพริกขี้หนูและถั่วฝักยาวได้ ทั้งจากการอ่านค่า –b* หรือการพิจารณาด้วยตาเปล่า เนื่องจากการหายไปของสีน้ำเงินเกิดขึ้นอย่างชัดเจน หากมีการปนเปื้อนเกินกว่าค่า MRL

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการ “การพัฒนาแผ่นทดสอบยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม organophosphate และ carbamate โดยใช้เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส” (SURDI 57/01/47)ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2557 ผ่านสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2556. มาตฐานสินค้าเกษตร มกษ. 9002-2556: สารพิษตกค้าง : ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด.

Guo, X., X. Zhang, O. Cai, T. Shen and S. Zhu. 2013. Developing a novel sensitive visual screening card for rapid detection of pesticide residues in food. Food Control 30: 15-23.

Han, Z., C. Chi, B. Bai, G. Liu, Q. Rao, S. Peng, H. Liu, Z. Zhao, D. Zhang and A. Wu. 2012. Chromogenic platform based on recombinant *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase for visible unidirectional assay of organophosphate and carbamate residues. Analytical Chimica Acta 720: 126-113.

Van Dyk, J. S. and B. Pletschke. 2011. Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. Chemosphere 82:291-307.