

การพัฒนาชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ
สำหรับตรวจหาปริมาณคาร์บาริลที่ตกค้างในผัก

Development of a Carbaryl Test Kit Cassette
for Quantitative Detection of Carbaryl Residual in Vegetables

วราภรณ์ รักคุณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

การพัฒนาชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ
สำหรับตรวจหาปริมาณคาร์บาริลที่ตกค้างในผัก

วราภรณ์ รักคุณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นงานวิจัยที่เกิดจากการค้นคว้าและวิจัย ขณะที่ข้าพเจ้าศึกษาอยู่ในคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ดังนั้นงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถือเป็นลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี และข้อความต่างๆในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอรับรองว่าไม่มีการคัดลอกหรือนำงานวิจัยของผู้อื่นมานำเสนอในชื่อของข้าพเจ้า

This thesis consists of research materials conducted at Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi and hence the copyright owner. I hereby certify that the thesis does not contain any forms of plagiarism.

.....วราภรณ์.....
(.....วราภรณ์ รักคุณ.....)



หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับสำหรับตรวจหาปริมาณคาร์บาริล ที่ตกค้างในผัก Development of a Carbaryl Test Kit Cassette for Quantitative Detection of Carbaryl Residual in Vegetables
ชื่อ - นามสกุล	นางสาววราภรณ์ รักคุณ
สาขาวิชา	เคมีประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ศิริวรรณ ตี๋ภู, ประ.ด.
ปีการศึกษา	2565

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์อารีย์ ชูดำ, ประ.ด.)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เนตรนภิส แก้วช่วย, Ph.D.)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ศิริวรรณ ตี๋ภู, ประ.ด.)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์
ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิพัทธ์ จงสวัสดิ์, ประ.ด.)

วันที่ 15 เดือน กันยายน พ.ศ. 2565

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับสำหรับตรวจหาปริมาณคาร์บาริลที่ตกค้างในผัก
ชื่อ - นามสกุล	นางสาววราภรณ์ รักคุณ
สาขาวิชา	เคมีประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ศิริวรรณ ตี๋ภู, ปร.ด.
ปีการศึกษา	2565

บทคัดย่อ

คาร์บาริลเป็นยาฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมต เป็นหนึ่งในยาฆ่าแมลงที่นิยมใช้ควบคุมแมลงในผลิตผลทางการเกษตร ทำให้คาร์บาริลเกิดการตกค้างในอาหาร ส่งผลกระทบต่อปัญหาสุขภาพของผู้บริโภค ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับสำหรับตรวจหาปริมาณคาร์บาริลที่ตกค้างในผัก โดยอาศัยหลักการทางไบโอเซนเซอร์แบบยับยั้ง ใช้อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสเป็นวัสดุชีวภาพ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสีเหลือง คาร์บาริลจะยับยั้งการทำงานของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ความเข้มสีลดลง ตรวจวัดความเข้มสีโดยใช้สมาร์ตโฟน

ขั้นแรกสร้างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับจากกระดาษโครมาโทกราฟี หาสภาวะพารามิเตอร์ที่เหมาะสม จากนั้นศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับสำหรับตรวจวัดคาร์บาริลพบว่าผลการยับยั้งของคาร์บาริลเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของคาร์บาริลจาก 1-50 มิลลิกรัม/ลิตร มีขีดจำกัดในการตรวจพบและขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณเท่ากับ 0.31 และ 1.04 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ มีร้อยละการได้กลับคืน ในช่วง 96 – 103 เปอร์เซ็นต์ มีความเที่ยง ความถูกต้อง และความจำเพาะเจาะจงสูง สุดท้ายนำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับไปตรวจวัดคาร์บาริลที่ตกค้างในตัวอย่างผัก จำนวน 10 ตัวอย่าง ตรวจพบคาร์บาริลตกค้างในกะหล่ำปลี คะน้า ดอกกะหล่ำ ผักกาดขาว ผักกาดหอม และกวางตุ้ง ในช่วงความเข้มข้น 1.03 - 1.16 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ผลการวิเคราะห์ที่ได้จากชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นให้ผลสอดคล้องกับชุดทดสอบในเชิงพาณิชย์

ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับที่พัฒนาขึ้นมีข้อดี ได้แก่ ลดเวลาในการวิเคราะห์ ใช้สารปริมาณน้อย มีราคาถูก และสามารถใช้ตรวจวัดคาร์บาริลได้ในภาคสนาม

คำสำคัญ: คาร์บาริล ชุดทดสอบแบบตลับ สมาร์ตโฟน ผัก

Thesis Title	Development of a Carbaryl Test Kit Cassette for Quantitative Detection of Carbaryl Residual in Vegetables
Name - Surname	Miss Waraporn Rakkhun
Program	Applied Chemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Siriwan Teepoo, Ph.D.
Academic Year	2022

ABSTRACT

Carbaryl, an insecticide in the carbamate family, is one of the most commonly used pesticides to control insects in agricultural products. However, it causes carbaryl residues in food which can cause health problems for consumers. Hence, this research aimed to create a carbaryl test kit cassette for quantitative detection of carbaryl residues in vegetables by using the inhibition biosensor technique. Acetylcholine esterase was used as a biomaterial, making the product a yellow color. Carbaryl then inhibited the activity of acetylcholine esterase, resulting in a color intensity decrease in the product. The color intensity was measured by using a smartphone.

In the first step, a carbaryl test kit cassette was created from chromatography paper. The parameters conditions were optimized. Next, the performances of the carbaryl test kit cassette for detecting carbaryl was investigated. It was found that the inhibitory effect of carbaryl was directly proportional to the concentration of carbaryl ranging from 1-50 mg/L. The limit of detection and the limit of quantitative detection were 0.31 and 1.04 mg/L, respectively. The percentage of recovery was in the range 96 – 103 % with high precision, accuracy and specificity. Finally, the carbaryl test kit cassette was used to measure the carbaryl residues in ten vegetable samples. Carbaryl residues were found in cabbage, kale, cauliflower, napa cabbage, lettuce and Choy sum with the concentration range of 1.03 to 1.16 mg/kg. The analysis results obtained from the developed test kits were consistent with commercial ones.

This developed carbaryl test kit cassette had advantages in terms of reducing analysis time, using small amounts of substances, being inexpensive and portable to measure carbaryl on field.

Keywords: carbaryl, test kit cassette, smartphone, vegetables

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความความกรุณาเป็นอย่างสูงจากอาจารย์ที่ปรึกษา คือ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริวรรณ ติ๊กู ที่เสียสละเวลาและให้คำปรึกษาเป็นอย่างดี รวมทั้งติดตามความก้าวหน้าของการดำเนินงานวิจัย และให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณา ความตั้งใจจริง และความทุ่มเทของอาจารย์เป็นอย่างยิ่ง และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อารีย์ ชูดำ ประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เนตรนภิส แก้วช่วย ที่ได้เสียสละเวลามาเป็นกรรมการสอบในครั้งนี้ และยังกรุณาให้คำแนะนำในการแก้ไขข้อผิดพลาด รวมทั้งแนวคิดที่เป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัยจนวิทยานิพนธ์นี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการการแยกและวิเคราะห์สารปริมาณน้อย อาคารสถาบันวิจัยเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ในการดำเนินงานวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้ประสบผลสำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และให้การสนับสนุนจนผู้วิจัยสามารถนำเอาความรู้และหลักการต่างๆ มาประยุกต์ใช้ในงานวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์นี้ประสบผลสำเร็จไปได้ด้วยดี นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณครอบครัว เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ตลอดจนบุคลากรต่างๆ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจอีกมากมาย ที่ผู้วิจัยไม่สามารถกล่าวนามได้หมดในที่นี้ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในปรารถนาดีของทุกท่านเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจหากวิทยานิพนธ์นี้มีข้อผิดพลาดหรือบกพร่องประการใด ผู้วิจัยกราบขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

วรารณณ์ รักคุณ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	(3)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ.....	(6)
สารบัญตาราง.....	(8)
สารบัญภาพ	(9)
บทที่ 1 บทนำ.....	11
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	11
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	13
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	13
1.4 กรอบแนวคิดของการวิจัย	14
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	16
บทที่ 2 วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	17
2.1 ยาฆ่าแมลงในประเทศไทย	17
2.2 คาร์บาริล.....	18
2.3 วิธีการทั่วไปในการตรวจวัดยาฆ่าแมลง	20
2.4 วิธีตรวจวัดยาฆ่าแมลงโดยใช้ชุดทดสอบ	22
2.5 ไบโอดีเซนเซอร์.....	25
2.6 การตรวจวัดแบบกระดาษ	27
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	29
3.1. สารเคมี	29
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	30
3.3 วิธีการทดลอง	30

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	39
4.1 การสร้างชุดทดสอบคาร์บาร์ลแบบตลับ.....	39
4.2 การอ่านค่าความเข้มข้นชุดทดสอบคาร์บาร์ลแบบตลับ ด้วยแอปพลิเคชัน Color Picker	40
4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบคาร์บาร์ลแบบตลับ.....	41
4.4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบคาร์บาร์ลแบบตลับ.....	47
4.5 ผลการวิเคราะห์หาคาร์บาร์ลในตัวอย่างจริง	54
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	56
5.1 สรุปผลการทดลอง	56
5.2 ข้อเสนอแนะ	57
บรรณานุกรม.....	58
ภาคผนวก ผลงานเผยแพร่ทางวิชาการ.....	63
ประวัติผู้เขียน.....	71



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1	การจัดหมวดหมู่ระดับความเป็นพิษของคาร์บาริล.....	19
ตารางที่ 3.1	แสดงสถานะที่เหมาะสมในการตรวจวัดคาร์บาริล ด้วยชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ.....	35
ตารางที่ 4.1	สรุปผลการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการตรวจวัดคาร์บาริล ด้วยชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ.....	46
ตารางที่ 4.2	ผลการศึกษาการทำซ้ำของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ สำหรับตรวจหาปริมาณคาร์บาริล	47
ตารางที่ 4.3	ผลการศึกษาการทวนซ้ำของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ สำหรับตรวจหาปริมาณคาร์บาริล	48
ตารางที่ 4.4	ผลการศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ	50
ตารางที่ 4.5	ผลการศึกษาความถูกต้องของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ	52
ตารางที่ 4.6	การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับที่พัฒนาขึ้น กับชุดทดสอบในเชิงพาณิชย์	55
ตารางที่ 4.7	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับที่พัฒนาขึ้นกับ ชุดทดสอบ MJPK.....	55

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1.1	ขั้นตอนการวิเคราะห์หาคาร์บาริลด้วยชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ โดยใช้สมาร์ทโฟนเป็นตัวตรวจวัด ประกอบด้วย ก. ขั้นตอนการสร้างชุดทดสอบ คาร์บาริลแบบตลับ ข. ขั้นตอนการตรวจวัด และ ค. ขั้นตอนการประมวลผล	15
ภาพที่ 2.1	ปริมาณและมูลค่าการนำเข้ายาฆ่าแมลงในประเทศไทย ปี 2551-2561	17
ภาพที่ 2.2	โครงสร้างทางเคมีของคาร์บาริล	18
ภาพที่ 2.3	แสดงกลไกการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส	20
ภาพที่ 2.4	ชุดทดสอบยาฆ่าแมลงในผักและผลไม้ MJPK.....	22
ภาพที่ 2.5	ชุดตรวจสอบยาฆ่าแมลงที่ตกค้างในผักและผลไม้ GT	23
ภาพที่ 2.6	ชุดตรวจสอบยาฆ่าแมลงที่ตกค้างในผักและผลไม้ GPO TM KIT	24
ภาพที่ 2.7	องค์ประกอบของเทคนิคไบโอเซนเซอร์	25
ภาพที่ 3.1	การออกแบบและสร้างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ ก. ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับสำหรับตรวจหาปริมาณคาร์บาริลที่ตกค้างในผัก และ ข. กล่องทึบแสงสำหรับถ่ายภาพ	31
ภาพที่ 3.2	การอ่านค่าความเข้มสีบนชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับด้วยแอปพลิเคชัน Color Picker	32
ภาพที่ 4.1	ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับสำหรับตรวจหาปริมาณคาร์บาริลที่ตกค้างในผัก	39
ภาพที่ 4.2	กล่องทึบแสงสำหรับใส่ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับเพื่อถ่ายภาพ	39
ภาพที่ 4.3	ค่าความเข้มสีของ Red Green และ Blue บนชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ ด้วยแอปพลิเคชัน Color Picker	40
ภาพที่ 4.4	ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา	41
ภาพที่ 4.5	ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย 5,5'-ไดไทโอบิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด).....	42
ภาพที่ 4.6	ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายอะซิติลไทโอโคลีน ไอโอไดด์.....	43
ภาพที่ 4.7	ผลการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมของสารละลายเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส	44
ภาพที่ 4.8	ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส	45

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 4.9 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับวิเคราะห์หาคาร์บาริล.....	49
ภาพที่ 4.10 ผลการศึกษาอายุการใช้งานของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ.....	53



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นพื้นที่เกษตรกรรม เหมาะแก่การเพาะปลูก โดยมีผักและผลไม้เป็นพืชเศรษฐกิจของไทยที่ทำรายได้เข้าประเทศเป็นมูลค่าสูง และเนื่องจากความต้องการของผักและผลไม้มีมากขึ้น ทำให้เกษตรกรมีการนำยาฆ่าแมลงมาใช้ในการกำจัดศัตรูพืช เพื่อให้ได้ผลผลิตตามความต้องการของตลาด ซึ่งเป็นวิธีการที่สะดวก รวดเร็ว มากกว่าวิธีการอื่นๆ โดยข้อมูลจากกรมวิชาการเกษตรพบว่าตั้งแต่ปี 2551-2561 มีปริมาณและมูลค่าการนำเข้ายาฆ่าแมลงในประเทศไทยจำนวน 1,663,780 ตัน มูลค่ารวม 246,715 ล้านบาท และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเกือบทุกปี [1] โดยคาร์บาริลเป็นยาฆ่าแมลงที่มีการใช้ในการเกษตรอย่างมาก เช่น ใช้ในการกำจัดเพลี้ยไฟในพริก ใช้ในการกำจัดหนอนใยผัก หนอนคืบกะหล่ำ ดั้วหมัดผักในผักตระกูลกะหล่ำ และใช้ในการกำจัดเพลี้ยไฟ เพลี้ยจักจั่นในข้าว เป็นต้น [2] โดยคาร์บาริลถูกจัดเป็นยาฆ่าแมลงที่มีพิษปานกลาง มีระยะเวลาออกฤทธิ์สั้น และมีการสลายตัวในสภาพแวดล้อมเหมาะสมที่ระยะเวลาประมาณ 1 เดือน [3] หากมีการเก็บเกี่ยวผลผลิตทางการเกษตรก่อนระยะเวลาสลายตัวของคาร์บาริล จะทำให้คาร์บาริลตกค้างสะสมอยู่ในผลผลิตทางการเกษตร ส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค และทำให้เกิดอาการต่างๆ ซึ่งเกิดจากกลไกการออกฤทธิ์ของคาร์บาริลที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส ทำให้เกิดการค้างของอะซีติลโคลีนในการทำงานของระบบประสาทที่มากเกินไปก่อให้เกิดอาการพิษเฉียบพลันและอาการพิษสะสม โดยอาการพิษเฉียบพลันจะเกิดจากการสูดดมหรือสัมผัสโดยการได้รับพิษอย่างอ่อน การได้รับพิษปานกลาง หรือการได้รับพิษเข้มข้น ซึ่งจะแสดงอาการตั้งแต่อาการวิงเวียน คลื่นไส้ ท้องเดิน มีผื่นคันตามผิวหนัง เคืองตา ท้องเดิน น้ำลายฟูมปาก หายใจลำบาก ชีพจรเต้นเร็ว ชัก และหมดสติ ส่วนอาการพิษสะสมเกิดจากการได้รับยาฆ่าแมลงต่อเนื่องทำให้เกิดการสะสมในร่างกาย และเกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของเซลล์ (Mutagen) ส่งผลให้เกิดเนื้องอกหรือมะเร็งขึ้น [4]

ในประเทศไทยมีงานวิจัยพบว่าผักและผลไม้ที่มีการจำหน่ายมีระดับของยาฆ่าแมลงตกค้างที่เกินขีดจำกัด โดยพบว่าในผักชนิดต่างๆ มียาฆ่าแมลงตกค้างในปริมาณสูง ซึ่งเกิดจากการใช้ยาฆ่าแมลงที่ไม่ถูกต้อง ส่งผลทำให้เกิดการตกค้างในผลผลิตทางการเกษตร และเป็นปัญหาด้านความปลอดภัยทางอาหาร เนื่องจากคาร์บาริลมีพิษต่อระบบประสาท ดังนั้นจึงได้มีการกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้างในผลผลิตเกษตร (Maximum Residue Limits ; MRLs) ซึ่งแสดงถึงระดับปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดในอาหารที่ยอมรับให้มีได้ที่พบในอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ แสดงค่าเป็นหน่วยมิลลิกรัมของสารพิษตกค้างต่อกิโลกรัมของผลิตภัณฑ์อาหาร โดยในประเทศไทยได้มีการใช้ค่ามาตรฐานของ Codex MRL มาเป็นเกณฑ์หลักในการกำหนดค่า ซึ่งกำหนดโดยสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กรมวิชาการเกษตร โดยที่ให้มีคาร์บาริลตกค้างได้ไม่เกิน 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม [5]

ในการวิเคราะห์หาคาร์บาริลที่ตกค้างในผลผลิตทางการเกษตรโดยวิธีทั่วไป นิยมใช้เทคนิคทางเคมี ซึ่งสามารถทำการตรวจได้หลายวิธี โดยการนำไปวิเคราะห์หาเชิงปริมาณด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เทคนิคโครมาโตกราฟีโดยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) [6] เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography; GC) [7] เทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [8] เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical technique) [9] โครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Thin-Layer chromatography; TLC) [10] ข้อดีของวิธีเหล่านี้ คือ เป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูง แต่ยังมีข้อเสีย คือ ต้องทำการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเครื่องมือมีขนาดใหญ่ ต้องใช้บุคลากรที่มีความรู้ความชำนาญเฉพาะด้านสูง ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน ไม่เหมาะสมต่อผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งเกิดการเน่าเสียได้เร็ว และไม่สามารถตรวจวัดในภาคสนาม ทำให้กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้พัฒนาชุดทดสอบ ซึ่งพบว่าใช้เวลาน้อยกว่าการทดสอบด้วยวิธีการอื่นๆ ข้างต้น แต่ยังมีข้อเสีย คือ มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ต้องใช้อุปกรณ์และสารเคมีในการวิเคราะห์จำนวนมาก อีกทั้งยังไม่สามารถตรวจวัดยาฆ่าแมลงในภาคสนามได้

จากข้อจำกัดของวิธีต่างๆ ในการวิเคราะห์หาคาร์บาริล งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับร่วมกับสมาร์ตโฟน ด้วยหลักการทางไบโอเซนเซอร์ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสที่มีความเฉพาะเจาะจงกับคาร์บาริล โดยชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้จะใช้กระดาษเป็นวัสดุหลักในการสร้างร่วมกับตัวตรวจวัดทางสี [11] ซึ่งได้มีการนำสมาร์ตโฟนมาใช้สำหรับตรวจวัดสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา และประมวลผลที่เกิดขึ้นด้วยแอปพลิเคชัน โดยคาดว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นจะมีข้อดี คือ ให้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้อง รวดเร็ว มีราคาถูก ใช้สารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณน้อย และสามารถพกพาไปปฏิบัติงานในภาคสนามได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อสร้างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับสำหรับตรวจหาปริมาณคาร์บาริลที่ตกค้างในผัก โดยตรวจวัดด้วยสมาร์ตโฟน

1.2.2 เพื่อตรวจหาปริมาณคาร์บาริลในตัวอย่างผัก โดยใช้ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ออกแบบและสร้างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

1.3.1.1 ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

1.3.1.2 กล้องทีบแสงสำหรับถ่ายภาพ

1.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสร้างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

1.3.3.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

1.3.3.2 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย 5,5'-ไดไทโอปิส

(2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด)

1.3.3.3 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายอะซิติลไทโอโคลีน ไอโอโดด์

1.3.3.4 ค่าพีเอชที่เหมาะสมของสารละลายเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

1.3.3.5 เวลาที่เหมาะสมในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

1.3.3 ศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

1.3.3.1 ศึกษาความเที่ยงของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ (Precision)

1) การทำซ้ำของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ (Repeatability)

2) การทวนซ้ำของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ (Reproducibility)

1.3.3.2 ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

1.3.3.3 ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD)

1.3.3.4 ขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ)

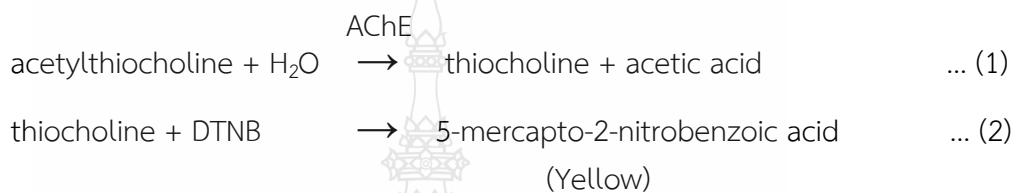
1.3.3.5 ความถูกต้องของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ (Accuracy)

1.3.3.6 อายุการใช้งานของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

1.3.4 วิเคราะห์หาคาร์บาริลด้วยชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับในตัวอย่างผัก

1.4 กรอบแนวคิดของการวิจัย

หลักการการสร้างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับสำหรับตรวจหาปริมาณคาร์บาริลที่ตกค้างในผัก โดยตรวจวัดด้วยสมาร์ตโฟนในงานวิจัยนี้ อาศัยการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส โดยเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสจะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของอะซิติลไทโอโคลีน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไทโอโคลีน ดังปฏิกิริยาที่ (1) เมื่อเติมสาร 5,5'-ไดไทโอปีส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) หรือ DTNB สารนี้จะทำปฏิกิริยากับไทโอโคลีนที่ได้มาจากปฏิกิริยาข้างต้น ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 5-เมอร์แคปโต-2-ไนโตรเบนโซอิกแอซิด ซึ่งเป็นสารสีเหลือง ดังปฏิกิริยาที่ (2) [12]



คาร์บาริล มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส ถ้าหากมีคาร์บาริลในตัวอย่าง คาร์บาริลจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสอะซิติลโคลีนได้ จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้น้อยลง ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นน้อยลงด้วย

จากนั้นใช้หลักการการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวมาสร้างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ โดยมีแนวคิดดังภาพที่ 1.1 ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ขั้นตอนแรก คือ ขั้นตอนการสร้างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ (ภาพที่ 1.1 ก) จะประกอบไปด้วย 2 บริเวณ ได้แก่ บริเวณควบคุม (Control pad) และบริเวณตัวอย่าง (Sample pad) ซึ่งสร้างโดยใช้กระดาษโครมาโตกราฟีติดบนแผ่นพลาสติกใส และประกอบเข้ากับตลับพลาสติก จากนั้นเป็นขั้นตอนการตรวจวัด (ภาพที่ 1.1 ข) ทำการหยดสารเคมีที่ใช้ทดสอบในการเกิดปฏิกิริยา และหยดสารละลายตัวอย่างลงบนบริเวณควบคุมและบริเวณตัวอย่างตามลำดับ จากนั้นถ่ายภาพสีที่ได้โดยใช้สมาร์ตโฟนถ่ายภาพในกล้องที่ปรับแสง และขั้นตอนสุดท้ายคือ ขั้นตอนการประมวลผล (ภาพที่ 1.1 ค) โดยนำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ แปลผลข้อมูลโดยใช้แอปพลิเคชัน Color Picker และอ่านค่าสีที่ได้จากฟังก์ชัน RGB (Red, Green, Blue)

ก. ขั้นตอนการสร้างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ



ข. ขั้นตอนการตรวจวัด



ค. ขั้นตอนการประมวลผล



ภาพที่ 1.1 ขั้นตอนการวิเคราะห์สำหรับตรวจหาปริมาณคาร์บาริลในผักด้วยชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ โดยใช้สมาร์ทโฟนเป็นตัวตรวจวัด ประกอบด้วย ก. ขั้นตอนการสร้างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ ข. ขั้นตอนการตรวจวัด และ ค. ขั้นตอนการประมวลผล

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับสำหรับตรวจหาปริมาณคาร์บาริลที่ตกค้างในผัก โดยตรวจวัดด้วยสมาร์ตโฟน

1.5.2 ได้ทราบสถานะที่เหมาะสมของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

1.5.3 สามารถวิเคราะห์หาปริมาณคาร์บาริลที่ตกค้างในผักด้วยชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับที่สร้างขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ

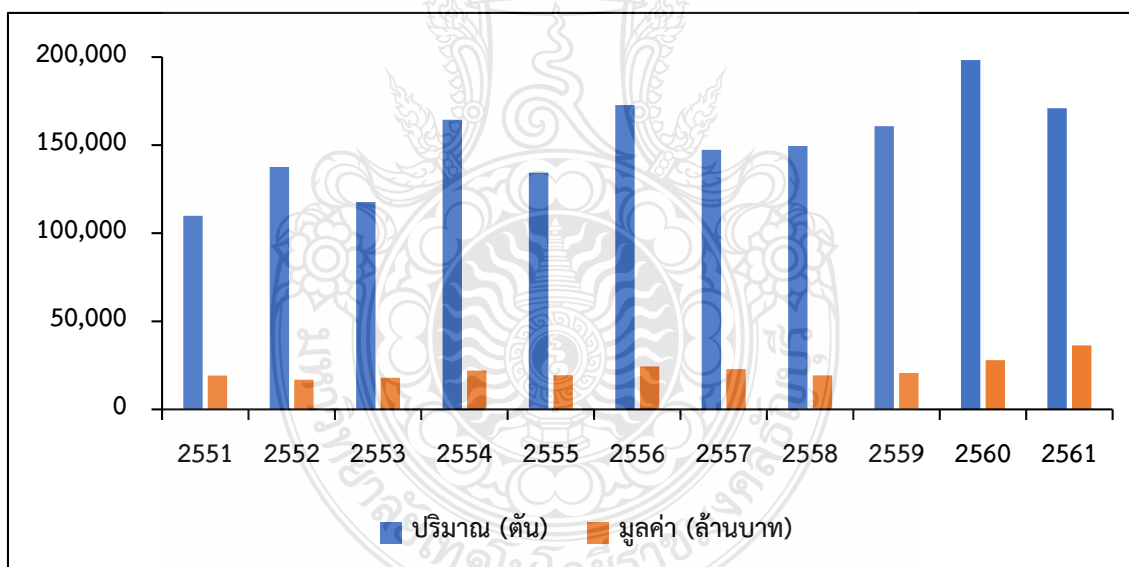


บทที่ 2

วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ยาฆ่าแมลงในประเทศไทย

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม โดยมีการเพาะปลูกพืชเพื่อบริโภคในประเทศ และส่งออก เกษตรกรจึงได้มีการนำยาฆ่าแมลงมาใช้เพื่อป้องกันหรือกำจัดศัตรูพืช และเป็นการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร โดยข้อมูลจากกรมวิชาการเกษตรพบว่าตั้งแต่ปี 2551-2561 ประเทศไทยมีแนวโน้มการนำเข้าสารเคมีทางการเกษตรในปริมาณและมูลค่าการนำเข้ายาฆ่าแมลงจำนวน 1,663,780 ตัน มูลค่ารวม 246,715 ล้านบาท และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเกือบทุกปี [1] ดังภาพที่ 2.1 ซึ่งการใช้ยาฆ่าแมลงทางการเกษตรที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดการตกค้างของยาฆ่าแมลง ส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนหรือสะสมในสิ่งแวดล้อม และอาจเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร โดยเฉพาะสู่ผลิตภัณฑ์เกษตร ก่อให้เกิดความเป็นพิษและอันตรายต่อสุขภาพของผู้คน สัตว์และสิ่งแวดล้อม



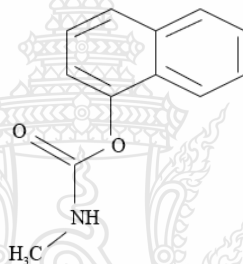
ภาพที่ 2.1 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้ายาฆ่าแมลงในประเทศไทย ปี 2551 – 2561 [1]

โดยยาฆ่าแมลงที่มีการใช้ในการเกษตรในปัจจุบันสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine) กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphate) กลุ่มคาร์บาเมต (Carbamate) และกลุ่มไพรีทรอยด์ (Pyrethroid) โดยที่คาร์บาไรลเป็นยาฆ่าแมลงในกลุ่มคาร์บาเมตที่มีการใช้ในการเกษตรอย่างมาก เนื่องจากเป็นยาฆ่าแมลงที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถกำจัดแมลงและศัตรูพืชได้หลากหลาย

2.2 คาร์บาไรล [13]

2.2.1 ลักษณะและสมบัติของคาร์บาไรล

คาร์บาไรล มีชื่อทางเคมีคือ 1-naphthyl methylcarbamate มีสูตรเคมี $C_{12}H_{11}NO_2$ โดยมีโครงสร้างทางเคมี ดังภาพที่ 2.2 [2] มีลักษณะเป็นผลึกแข็งสีขาว ละลายได้ดีในตัวทำละลายมีขั้ว เช่น อะซีโตน



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของคาร์บาไรล [2]

คาร์บาไรลถูกนำมาใช้กำจัดแมลงกันอย่างแพร่หลายมากกว่า 30 ปี โดยคาร์บาไรลมีชื่อทางการค้า คือ เซพวิน ซึ่งเป็นยาฆ่าแมลงที่มีการใช้มากในด้านเกษตรกรรม เช่น ใช้ในการกำจัดเพลี้ยไฟในพริก ใช้ในการกำจัดหนอนใยผัก หนอนคืบกะหล่ำ ดั้วงหมัดผักในผักตระกูลกะหล่ำ และใช้ในการกำจัดเพลี้ยไฟ เพลี้ยจักจั่นในข้าว เป็นต้น [2] นอกจากนี้ยังใช้กับสัตว์ปีก ปศุสัตว์ และสัตว์เลี้ยงเพื่อกำจัดแมลงรบกวนอีกด้วย

2.2.2 ความเป็นพิษของคาร์บาไรล

คาร์บาไรลถูกจัดเป็นยาฆ่าแมลงที่มีพิษปานกลาง สามารถดูดซึมผ่านทางผิวหนังได้ โดยเฉพาะรอยแผลหรือรอยข่วน มีระยะเวลาออกฤทธิ์สั้น และมีการสลายตัวในสภาพแวดล้อมเหมาะสมที่ระยะเวลาประมาณ 1 เดือน หากมีการเก็บเกี่ยวผลผลิตทางการเกษตรก่อนระยะเวลาสลายตัวของคาร์บาไรล จะทำให้คาร์บาไรลตกค้างสะสมอยู่ในผลผลิตทางการเกษตร ส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค และทำให้เกิดอาการต่างๆ โดยทั่วไปอาการและความรุนแรงของการเกิดพิษจะขึ้นกับปริมาณยาฆ่าแมลงที่ได้รับ วิธีทางที่ได้รับ และระยะเวลาที่ได้รับ ทำให้เกิดอาการพิษเฉียบพลันและอาการพิษสะสม

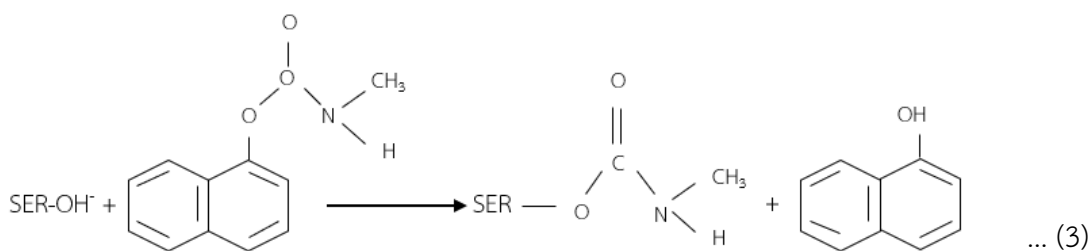
โดยอาการพิษเฉียบพลันจะเกิดจากการสูดดมหรือสัมผัสโดยการได้รับพิษอย่างอ่อน การได้รับพิษปานกลาง หรือการได้รับพิษเข้มข้น ซึ่งจะแสดงอาการตั้งแต่อาการวิงเวียน คลื่นไส้ ท้องเดิน มีผื่นคันตามผิวหนัง เคืองตา ท้องเดิน น้ำลายฟูมปาก หายใจลำบาก ชีพจรเต้นเร็ว ชัก และหมดสติ ส่วนอาการพิษสะสมเกิดจากการได้รับยาฆ่าแมลงต่อเนื่อง ทำให้เกิดการสะสมในร่างกาย และเกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของเซลล์ (Mutagen) ส่งผลให้เกิดเนื้องอกหรือมะเร็งขึ้น [4] เมื่อร่างกายได้รับยาฆ่าแมลง จะก่อให้เกิดพิษ ซึ่งค่าของความเป็นพิษเรียกว่า LD₅₀ (Lethal Dose) โดยเป็นค่าปริมาณของวัตถุพิษที่ทำให้สัตว์ทดลองเสียชีวิตลงครึ่งหนึ่ง (50 %) ของจำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมด โดยแสดงเป็นจำนวนมิลลิกรัมของสารต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวที่ใช้ที่ทำให้สัตว์ทดลองตายร้อยละ 50 ระดับความรุนแรงของคาร์บาริล แสดงดังตารางที่ 2.1 [14]

ตารางที่ 2.1 การจัดหมวดหมู่ระดับความเป็นพิษของคาร์บาริล [14]

ระดับความรุนแรง LD ₅₀ (มิลลิกรัม/กิโลกรัม·น้ำหนักตัว)	ความเป็นพิษ สูง	ความเป็นพิษ ปานกลาง	ความเป็นพิษต่ำ	ความเป็น พิษต่ำมาก
ความรุนแรงที่รับทางปาก	≤ 50	> 50-500	> 500-5000	> 5000
ความรุนแรงที่รับทางผิวหนัง	≤ 200	> 200-2000	> 2000-5000	> 5000
ความรุนแรงที่รับทางการหายใจ	≤ 0.05	≥ 0.05-0.5	> 0.5-2.0	> 2.0

2.2.3 กลไกการออกฤทธิ์ของคาร์บาริล

คาร์บาริลมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญชนิดหนึ่งในระบบประสาทของมนุษย์ สัตว์มีกระดูกสันหลัง แมลง และสิ่งมีชีวิตทั่วไป ซึ่งมีกลไกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส โดยการเกิด phosphorylation หรือ carbamylation ที่หมู่ Hydroxyl และเติม OH (hydroxylation) ให้กับหมู่ leaving group ทำให้เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสไม่สามารถสลายโคลีนได้ ความเข้มข้นของโคลีนใน synaptic cleft เพิ่มสูงขึ้น และเกิดการกระตุ้นระบบประสาท cholinergic ที่มากเกินไป ส่งผลให้มีอาการสั่น ชักกระตุก และเป็นอัมพาต ดังสมการที่ 3



ภาพที่ 2.3 แสดงกลไกการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

2.2.4 ค่าปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดของคาร์บาริล

จากการใช้คาร์บาริลที่มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค ซึ่งเกิดจากการใช้คาร์บาริลที่ไม่ถูกต้อง ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในผลิตผลทางเกษตรและสิ่งแวดล้อม ทำให้ผักและผลไม้ที่มีการจำหน่ายมีระดับของคาร์บาริลตกค้างที่เกินขีดจำกัด ซึ่งพบว่าในผักชนิดต่างๆ มีคาร์บาริลตกค้างในปริมาณสูง ดังนั้นจึงได้มีการกำหนดค่าปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด ซึ่งแสดงถึงระดับปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดที่มีได้ในสินค้าเกษตร มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมสารพิษตกค้างต่อกิโลกรัมสินค้าเกษตร ซึ่งประเทศไทยได้มีการกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้างในผลิตผลเกษตร โดยการใช้ค่ามาตรฐานของ Codex MRL มาเป็นเกณฑ์หลักในการกำหนดค่าที่กำหนดโดยสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กรมวิชาการเกษตร โดยที่ให้มีคาร์บาริลตกค้างได้ไม่เกิน 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม [5]

2.3 วิธีการทั่วไปในการตรวจวัดยาฆ่าแมลง

2.3.1 วิธีตรวจวัดยาฆ่าแมลงโดยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

จากงานวิจัยของ Watanabe และคณะ [6] ได้วิเคราะห์ปริมาณของยาฆ่าแมลงอีโทเฟนพรอกซีในตัวอย่างผัก 6 ชนิด ได้แก่ พริกหยวก แตงกวา มะเขือ กวางตุ้งฮ่องเต้ ปวยเล้ง และมะเขือเทศ โดยใช้เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับตัวตรวจวัดการเรืองแสง (High-performance liquid chromatography - Fluorescence detection; HPLC - FLD) ในการตรวจวัดและทำการสกัดด้วยอะซิโตนไนโตรล์ พบว่ามีค่าขีดจำกัดในการตรวจพบที่ 1.87–3.87 นาโนกรัม /กรัม และเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนในระดับต่ำที่ 5–100 นาโนกรัม/กรัม หรือเท่ากับ 85–111 % โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 12 %

2.3.2 วิธีตรวจวัดยาฆ่าแมลงโดยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography; GC)

จากงานวิจัยของ Zhao และคณะ [7] ได้ทำการวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสจำนวน 31 ชนิดที่ตกค้างในสมุนไพรวางศ์ข่า โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีร่วมกับตัวตรวจวัดแบบฟลูออโรเมตริก โดยพบว่าในงานวิจัยนี้การเตรียมตัวอย่างเสร็จสิ้นในขั้นตอนเดียวและมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ที่สูง โดยมีค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ 1-10 นาโนกรัม / มิลลิลิตร และค่าขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ 4 -30 นาโนกรัม / มิลลิลิตร

2.3.3 วิธีตรวจวัดยาฆ่าแมลงโดยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

จากงานวิจัยของ Navarro และคณะ [8] ได้ทำการวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงในน้ำส้มเขียวหวาน โดยใช้เทคนิค ELISA ในการตรวจหาคลอร์ไพริฟอสและเฟนไทออน พบว่ามีขีดจำกัดในการตรวจพบที่ 0.20 ± 0.04 ไมโครกรัม/ลิตร และ 0.50 ± 0.06 ไมโครกรัม/ลิตร สำหรับคลอร์ไพริฟอสและเฟนไทออนตามลำดับ ซึ่งในการตรวจหาสารตกค้างของยาฆ่าแมลงทั้งสองชนิดทำการทดลองโดยการเจือจางตัวอย่างแบบง่ายและไม่ต้องมีขั้นตอนการทำความสะอาดตัวอย่างเพิ่มเติม ซึ่งได้ผลการทดสอบที่ความแม่นยำ มีประสิทธิภาพ โดยมีเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนที่ 95-106 %

2.3.4 วิธีตรวจวัดยาฆ่าแมลงโดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical technique)

จากงานวิจัยของ Zhao และคณะ [9] ได้ทำการวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าสำหรับมาลาโรนและคาร์บาริล โดยพบว่ามีขีดจำกัดการตรวจวัดที่ต่ำ ซึ่งมีค่า 4.14 พิโคกรัม/มิลลิลิตร และ 1.15 พิโคกรัม/มิลลิลิตร สำหรับมาลาโรนและคาร์บาริลตามลำดับ โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่มีเสถียรภาพ มีความไวสูง สามารถตอบสนองทางเคมีไฟฟ้าได้อย่างรวดเร็วและทำซ้ำได้ดี

2.3.5 วิธีตรวจวัดยาฆ่าแมลงโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผิวนาง (Thin-Layer chromatography; TLC)

จากงานวิจัยของ Shen และคณะ [10] ได้ทำการวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงคาร์เบนดาซิมที่ตกค้างในน้ำส้มและใบคะน้า โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผิวนาง (Thin-Layer chromatography; TLC) ร่วมกับเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามัน (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy; SERS) และพบว่ามีขีดจำกัดการตรวจวัดน้อยกว่า 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยวิธีนี้ไม่ต้องปรับสภาพใดๆ และใช้เวลาการแยก TLC ในเวลาที่สั้น

จากวิธีตรวจวัดยาฆ่าแมลงโดยใช้เครื่องมือในห้องปฏิบัติการการดังกล่าว เป็นวิธีการที่มีความถูกต้อง ความเที่ยง และความแม่นยำสูง แต่ยังมีข้อจำกัด คือ ต้องทำการตรวจวัดในห้องปฏิบัติการ ใช้เวลานาน มีค่าใช้จ่ายสูง และผู้ที่ทำการวิเคราะห์ต้องมีความชำนาญในการวิเคราะห์ อีกทั้งยังไม่สามารถตรวจวัดได้ในภาคสนามได้

2.4 วิธีตรวจวัดยาฆ่าแมลงโดยใช้ชุดทดสอบ

2.4.1 ชุดทดสอบยาฆ่าแมลงในผักและผลไม้ MJPK

ชุดทดสอบยาฆ่าแมลงในผักและผลไม้ MJPK จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นชุดทดสอบเบื้องต้นสำหรับตรวจยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่มยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสในผักและผลไม้ โดยอาศัยหลักการการยับยั้งของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสด้วยเทคนิคการตรวจวัดทางสี และให้ผลการทดสอบในเวลา 30 นาที ซึ่งในการทดสอบจะต้องทำการหั่นผักเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นเติมน้ำยาสกัด ระบายน้ำยาสกัดในน้ำอุ่น และเติมน้ำยาทดสอบ โดยการประเมินผลจะใช้การเปรียบเทียบความเข้มของสีที่เกิดขึ้นของหลอดควบคุมควบคู่กับหลอดตัวอย่าง เพื่อใช้เปรียบเทียบสีในการอ่านผลและจะรายงานผลในเชิงคุณภาพ โดยถ้าหลอดตัวอย่างมีสีเข้มเข้มเหมือนหลอดควบคุม แสดงว่าปลอดภัย ถ้าหากหลอดตัวอย่างมีสีส้มปนชมพู แสดงว่าไม่ปลอดภัย (ถูกยับยั้ง 15%) และถ้าหลอดตัวอย่างมีสีชมพู แสดงว่าไม่ปลอดภัยมาก



ภาพที่ 2.4 ชุดทดสอบยาฆ่าแมลงในผักและผลไม้ MJPK [15]

2.4.2 ชุดตรวจสอบยาฆ่าแมลงที่ตกค้างในผักและผลไม้ GT

ชุดตรวจสอบยาฆ่าแมลงที่ตกค้างในผักและผลไม้ GT เป็นชุดทดสอบที่ใช้สำหรับตรวจสอบความเป็นพิษของยาฆ่าแมลงที่ตกค้างจากการปนเปื้อนหรือตกค้างในอาหาร โดยสามารถตรวจหาความเป็นพิษของยาฆ่าแมลงในกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต (Organophosphate group) และกลุ่มคาร์บาเมต (Carbamate group) ด้วยหลักการการยับยั้งของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส โดยในการประเมินผล จะใช้การเปรียบเทียบความเข้มของสีที่เกิดขึ้นในหลอดตัวอย่างที่ตรวจกับหลอดควบคุมและหลอดตัดสี (หลอดควบคุมคือไม่พบยาฆ่าแมลงตกค้าง และหลอดตัดสีคือพบยาฆ่าแมลงตกค้างที่ยับยั้งประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์อยู่ที่ระดับ 50 %) ซึ่งผลการตรวจด้วยชุดน้ำยา GT จะอ่านผลได้ 3 แบบ คือ ถ้าสีของหลอดตัวอย่างอ่อนกว่าหรือเท่ากับหลอดควบคุม แสดงว่าไม่พบยาฆ่าแมลงตกค้าง ถ้าสีของหลอดตัวอย่างเข้มกว่าหลอดควบคุมแต่ยังอ่อนกว่าหลอดตัดสี แสดงว่าพบยาฆ่าแมลงตกค้างในระดับที่ปลอดภัย และถ้าสีของหลอดตัวอย่างเข้มเท่ากับหรือเข้มกว่าหลอดตัดสี แสดงว่าพบยาฆ่าแมลงตกค้างในระดับที่ไม่ปลอดภัย



ภาพที่ 2.5 ชุดตรวจสอบยาฆ่าแมลงที่ตกค้างในผักและผลไม้ GT [16]

2.4.3 ชุดตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้าง GPO TM KIT

ชุดตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้าง GPO TM KIT เป็นชุดตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในผักผลไม้ที่พัฒนาโดยองค์การเภสัชกรรม ซึ่งใช้ตรวจสอบยืนยันชนิดของยาฆ่าแมลงทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต (Organophosphate) กลุ่มคาร์บาเมท (Carbamate) กลุ่มไพรีทรอยด์ (Pyrethroid) และกลุ่มออร์แกโนคลอรีน (Organochlorine) ในผัก ผลไม้และธัญพืช โดยในการทดสอบสำหรับยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตและคาร์บาเมท จะใช้หลักการแยกสารด้วยวิธีแผ่น TLC และตรวจสอบด้วยการทำปฏิกิริยากับสารเคมีเพื่อให้เกิดสี ถ้าหากพบยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตและคาร์บาเมท จะเกิดแถบวงกลม (Spot) สีขาวบนแผ่น TLC ส่วนในยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนคลอรีนและไพรีทรอยด์ จะใช้หลักการแยกสารด้วยแผ่น TLC เช่นเดียวกันและจะทำการตรวจสอบด้วยการทำปฏิกิริยากับสารเคมีและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เพื่อให้เกิดสี ถ้าหากพบยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนคลอรีนและไพรีทรอยด์ จะเกิดแถบวงกลม (Spot) เป็นสีเทาน้ำตาลเข้มถึงดำบนแผ่น TLC



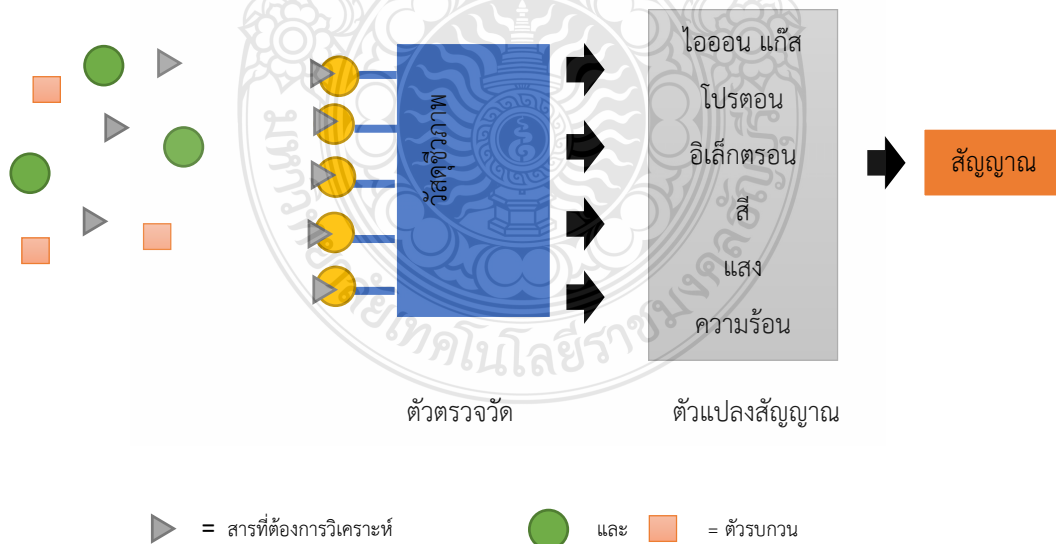
ภาพที่ 2.6 ชุดตรวจสอบยาฆ่าแมลงที่ตกค้างในผักและผลไม้ GPO TM KIT [17]

จากวิธีการดังกล่าวของชุดทดสอบยาฆ่าแมลงในผักและผลไม้ข้างต้น จะพบว่ามีการใช้เวลาน้อยกว่าการทดสอบด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ แต่ยังมีข้อเสีย คือ มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ต้องใช้อุปกรณ์และสารเคมีในการวิเคราะห์จำนวนมาก และมีการรายงานผลการวิเคราะห์ที่ได้ในเชิงคุณภาพหรือกึ่งปริมาณวิเคราะห์ได้เท่านั้น อีกทั้งยังไม่สามารถตรวจวัดยาฆ่าแมลงในภาคสนามได้

ดังนั้นจึงทำให้งานวิจัยนี้สนใจที่จะพัฒนาชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับร่วมกับสมาร์ทโฟน โดยคาดว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นจะมีข้อดี คือ ให้อผลวิเคราะห์ที่ถูกต้อง รวดเร็ว มีราคาถูก ใช้สารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณน้อย และสามารถพกพาไปปฏิบัติงานในภาคสนามได้ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ โคลินเอสเทอเรสที่มีความเฉพาะเจาะจงในคาร์บาริล ด้วยหลักการทางไบโอเซนเซอร์

2.5 ไบโอเซนเซอร์

ไบโอเซนเซอร์ เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดทางชีวภาพเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารต่างๆ อย่างจำเพาะเจาะจง โดยประกอบด้วย 2 ส่วน คือ วัสดุชีวภาพ (Biological element) และ ตัววัดสัญญาณ (Detector) โดยที่วัสดุชีวภาพจะสามารถจับกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ อย่างจำเพาะเจาะจง ตัวอย่างวัสดุชีวภาพ เช่น เอนไซม์ แอนติบอดี กรดนิวคลีอิก หรือดีเอ็นเอ ซึ่งมีลักษณะกลไกแบบแม่กุญแจและลูกกุญแจ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพหรือทางเคมี ซึ่งมีลักษณะเฉพาะ เช่น อิเล็กตรอน สารชนิดใหม่ ความร้อน แสง สี เป็นต้น จากนั้นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนั้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นสัญญาณไฟฟ้า แล้วประมวลตัวตรวจวัดสัญญาณที่เกิดขึ้น [18] แสดงดังภาพที่ 2.7 ซึ่งในปัจจุบันไบโอเซนเซอร์ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ เช่น ด้านการแพทย์ ด้านสิ่งแวดล้อมและด้านอุตสาหกรรม [19-20] เป็นต้น เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไววิเคราะห์สูง มีความจำเพาะเจาะจง มีความรวดเร็วในการตรวจวัด [21] ทำให้เทคนิคไบโอเซนเซอร์เป็นที่นิยมนำมาใช้เพิ่มมากขึ้น



ภาพที่ 2.7 องค์ประกอบของเทคนิคไบโอเซนเซอร์ [18]

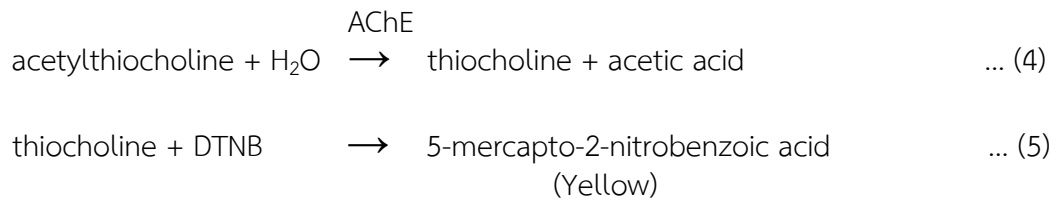
การแบ่งประเภทของไบโอเซนเซอร์ตามวัสดุชีวภาพที่ใช้แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ แอฟฟินิตีไบโอเซนเซอร์ (Affinity biosensor) โดยอาศัยแอนติบอดีเป็นวัสดุชีวภาพในการจับกับแอนติเจนและคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์ (Catalytic biosensor) [22]

คะตะไลติกไบโอเซนเซอร์ เป็นเทคนิคไบโอเซนเซอร์ที่ใช้เอนไซม์เป็นวัสดุชีวภาพ โดยเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาได้ผลิตภัณฑ์ และตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวโดยใช้ตัวตรวจวัดที่เหมาะสม โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากสารตั้งต้นที่ถูกใช้ไปหรือผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

เอนไซม์เป็นสารชีวโมเลกุลที่สร้างขึ้นโดยสิ่งมีชีวิต มีขนาดโมเลกุลใหญ่ที่ซับซ้อน มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก โดยมีกรดอะมิโนต่อกันเป็นสายยาวทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาทางเคมี ทำให้อัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาเร็วขึ้น มีบริเวณที่เรียกว่า active site คอยจับกับสับสเตรท (substrate) ซึ่งสับสเตรทจะต้องมีโครงสร้างที่เหมาะสมพอดีกับเอนไซม์ เหมือนลักษณะของลูกกุญแจ (สับสเตรท) กับแม่กุญแจ (เอนไซม์) ซึ่งเป็นบริเวณจำเพาะเจาะจง เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา สารตั้งต้นจะหลุดออกจากบริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์กลับมาอยู่ในสภาพเดิม [23-25]

เอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสลายสารอะซิติลโคลีน ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการส่งกระแสประสาทไปยังอวัยวะและเนื้อเยื่ออื่นๆ ในร่างกาย โดยทั่วไปในร่างกายมนุษย์จะพบเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส 2 ประเภท คือ บิวทิลโคลีนเอสเทอเรส (Butyrylcholinesterase, BChE) และอะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase, AChE) [26-27] โดยที่เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสถูกสร้างขึ้นมาพร้อมกับการสร้างเม็ดเลือดแดง ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จับอยู่บนบริเวณผิวของบริเวณรอยต่อของปลายประสาท มีความจำเพาะเจาะจงในการทำหน้าที่สลายอะซิติลโคลีนที่หลั่งออกมาจากปลายประสาท [28-29] สามารถพบได้ในเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์ประสาท โดยเอนไซม์ชนิดนี้ถูกยับยั้งด้วยยาฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมต และกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของคาร์บาริล

เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส เป็นเอนไซม์ประเภทคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาคาร์บาริลอาศัยการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส โดยที่เอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสจะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของอะซิติลไทโอโคลีน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไทโอโคลีนดังปฏิกิริยาที่ (4) เมื่อเติมสาร 5,5'-ไดไทโอบิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) หรือ DTNB สารนี้จะทำปฏิกิริยากับไทโอโคลีนที่ได้มาจากปฏิกิริยาข้างต้น ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 5-เมอร์แคปโต-2 ไนโตรเบนโซอิกแอซิด หรือ DTNB ซึ่งเป็นสารสีเหลือง ดังปฏิกิริยาที่ (5) [12]



คาร์บาริล มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส ถ้าหากมีคาร์บาริลในตัวอย่าง คาร์บาริลจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสอะซิติลโคลีนได้ จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้น้อยลง ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นน้อยลงด้วย

2.6 การตรวจวัดแบบกระดาษ

จากข้อจำกัดของวิธีต่าง ๆ ในการวิเคราะห์หาคาร์บาริล ทำให้ในงานวิจัยนี้สนใจที่จะพัฒนาชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับร่วมกับสมาร์ตโฟน โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาและการเปลี่ยนสีของสารที่ตรวจวัดบนกระดาษ และทำการตรวจวัดโดยใช้สมาร์ตโฟน โดยปัจจุบันการตรวจวัดแบบกระดาษนิยมใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต่าง ๆ เนื่องจากการตรวจวัดแบบกระดาษเป็นอุปกรณ์ที่ใช้กระดาษเป็นวัสดุหลักในการสร้าง สามารถกำหนดขอบเขตบริเวณตรวจวัดได้ โดยมีวิธีการผลิตที่ไม่ยุ่งยาก ไม่จำเป็นต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญในการตรวจวิเคราะห์ มีราคาถูก สามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว ใช้สารเคมีและสารตัวอย่างในปริมาณที่น้อย และสามารถพกพาไปใช้ในการตรวจวัดในภาคสนามได้ ซึ่งมีการประยุกต์ใช้งานได้อย่างหลากหลายทั้งทางด้านอาหาร สิ่งแวดล้อมและชีวภาพ

ในปีคศ. 2007 Martinez และคณะ [30] ได้ผลิตอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยสร้างส่วนกั้นจากพอลิเมอร์ที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic barrier) บนกระดาษโครมาโทกราฟีด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น แบบการตัดแปะ (Paper cutting) [31] เทคนิคโฟโตลิโทกราฟี (Photo lithography) [32] การพิมพ์ด้วยน้ำหมึกฉีด (Ink jet printing) [33] การพิมพ์ด้วยไข (Wax printing) [34] การพิมพ์สกรีน (Screening printing) [35] โดยในการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษแต่ละเทคนิค พบว่ามีข้อดีและข้อเสียต่างกัน และในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต่างๆ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ง่ายดังที่กล่าวมาข้างต้น

จากงานวิจัยที่ผ่านมาจะพบว่ามีการพัฒนาตัวตรวจวัดในอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ อย่างเช่น ตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical detector) [36-37] และตัวตรวจวัดทางสี (Colorimetric detector) [38] โดยตัวตรวจวัดทางสี เป็นวิธีที่นำไปใช้ อย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สามารถมองเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำเครื่องสแกน กล้องถ่ายภาพ และสมาร์ทโฟนสำหรับตรวจวัดสีที่เกิดขึ้น จากปฏิกิริยาต่าง ๆ และประมวลผลที่เกิดขึ้นด้วยแอปพลิเคชัน ซึ่งทำให้เกิดความรวดเร็ว ในการวิเคราะห์

งานวิจัยของ Meng และคณะ ในปี ค.ศ. 2015 [12] ได้ทำการพัฒนาไมโครชิพพลาสติก ซึ่งนำมาใช้ในการอ่านปริมาณค่าสีของยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต โดยใช้เครื่องสแกน เป็นตัวตรวจวัด ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส เกิดการทำปฏิกิริยาได้ผลิตภัณฑ์ เป็นสารสีเหลือง จากนั้นประมวลผลผลโดยใช้โปรแกรม Adobe Photoshop CS6 ซึ่งพบว่าวิธีนี้ มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริกที่ค่อนข้างแพงและมีความซับซ้อน แต่ยังไม่สามารถ พกพาในภาคสนามได้

ต่อมา Fernández - Ramos และคณะ [39] ได้ทำการพัฒนาอุปกรณ์แบบกระดาษ ทางชีวภาพสำหรับตรวจหาฆ่าแมลงในแหล่งน้ำ ในงานวิจัยได้สร้างแถบกระดาษโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส และใช้อินดิเคเตอร์เป็นตัวกำหนดค่า pH ซึ่งทำให้เกิดสีต่างกันในกรณี ที่มียาฆ่าแมลงและไม่มียาฆ่าแมลง จากนั้นใช้กล้องถ่ายรูปเป็นตัวตรวจวัดภายในกล่องไม้ที่มีหลอด LED และทำการวิเคราะห์ภาพที่ได้โดยใช้ซอฟต์แวร์ Image J ซึ่งพบว่าสามารถวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง ได้ในปริมาณน้อย มีความเที่ยง และมีความถูกต้องสูง

นอกจากนั้น Montali และคณะ [40] ได้ทำการพัฒนาอุปกรณ์แบบกระดาษที่พับได้ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสเพื่อใช้ในการตรวจหาฆ่าแมลง โดยทำการถ่ายภาพ ในกล่องที่สร้างขึ้นและใช้สมาร์ทโฟนเป็นตัวตรวจวัด ซึ่งพบว่าสามารถวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง ได้อย่างรวดเร็ว และมีข้อดี คือ ใช้งานง่าย พกพาได้สะดวก และมีต้นทุนต่ำ แต่ยังมีข้อจำกัดในการวิเคราะห์ ยังมีหลายขั้นตอน ทำให้ไม่สะดวกในการตรวจวัด

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาชุดทดสอบคาร์บาริลแบบคลัสเตอร์ร่วมกับสมาร์ทโฟน โดยอาศัยหลักการทางไบโอเซนเซอร์ในการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสที่มีความเฉพาะเจาะจง กับคาร์บาริล และทำการตรวจวัดสีที่เกิดขึ้นจากชุดทดสอบด้วยแอปพลิเคชันสำหรับสมาร์ทโฟน เพื่อใช้ สำหรับวิเคราะห์คาร์บาริลได้อย่างง่ายขึ้น ทำให้เกิดความสะดวกรวดเร็ว ใช้สารเคมีในการวิเคราะห์ ปริมาณน้อย และยังสามารถพกพาไปปฏิบัติงานในภาคสนามได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี

- 3.1.1 อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase, C3389, EC 3.1.1.7, Sigma-Aldrich USA)
- 3.1.2 อะซิติลไทโอโคลีน ไอโอไดด์ (Acetylthiocholine iodide, Sigma-Aldrich USA)
- 3.1.3 5,5'- ไดไทโอบิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) (5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid, Sigma-Aldrich USA)
- 3.1.4 คาร์บาริล (1-Naphthyl-N-methylcarbamate, Sigma Aldrich USA)
- 3.1.5 ชุดทดสอบ MJPK (MJPK test kit, Higher Enterprises Co.,Ltd. Bangkok, Thailand)
- 3.1.6 โซเดียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Sodium di-hydrogen orthophosphate, Ajax Finechem, Australia)
- 3.1.7 ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Di-sodium hydrogen orthophosphate, Ajax Finechem, Australia)
- 3.1.8 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 8.0 เตรียมได้จาก
- สารละลาย A : สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต 7.80xx กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เป็น 1,000 มิลลิลิตร
- สารละลาย B : สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต 8.90xx กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เป็น 1,000 มิลลิลิตร
- ผสมสารละลาย A ปริมาตร 47.35 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย B ปริมาตร 2.65 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร และปรับพีเอชให้ได้พีเอช 8.0

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.2.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยมสี่ตำแหน่ง (Analytical balance) รุ่น AZ series (SARTORIUS Instrument, USA)
- 3.2.2 ตู้อบ (drying oven) รุ่น Loading Model 30-750 (Mettler, Island)
- 3.2.3 ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 2.5 20 100 และ 1,000 ไมโครลิตร (BRAND, Germany)
- 3.2.4 ไมโครเซนตริฟิวส์ทิวบ์ (Microcentrifuges tubes) ขนาด 0.6 1.0 และ 2.0 มิลลิลิตร (Molecular Bio Product, USA)
- 3.2.5 เครื่องมือวัดความเป็นกรด – ด่าง (pH meter) รุ่น Model UB – 10 (Denver Instrument, USA)
- 3.2.6 กระดาษโครมาโตกราฟี (Chromatography paper) เบอร์ 4 (Whatman, UK)
- 3.2.7 ตลับพลาสติก (Plastic cassette, Serve Science Co., ltd. Bangkok, Thailand)
- 3.2.8 กล่องทึบแสงสำหรับใช้ใส่ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ
- 3.2.9 สมาร์ทโฟน รุ่น Shine Lite 5080X (Alcatel, France)

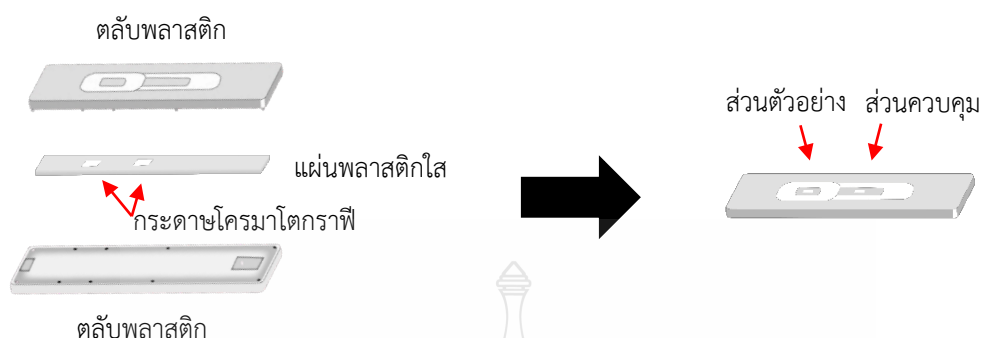
3.3 วิธีการทดลอง

- 3.3.1 การออกแบบและสร้างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ
 - 3.3.1.1 ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

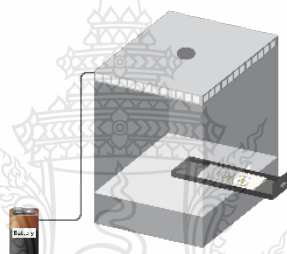
ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับจะประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนควบคุม (control pad) และส่วนตัวอย่าง (sample pad) สร้างโดยใช้กระดาษโครมาโตกราฟี เบอร์ 4 ตัดให้มีขนาด 0.3 × 0.7 เซนติเมตร และนำมาติดบนแผ่นพลาสติกใส ขนาด 0.4 × 6.1 เซนติเมตร โดยใช้เทปกาวสองหน้าเป็นตัวเชื่อม จากนั้นประกอบเข้ากับตลับพลาสติก ดังภาพที่ 3.1 (ก)
 - 3.3.1.2 กล่องทึบแสงสำหรับถ่ายภาพ

สร้างกล่องทึบแสงสำหรับใช้ใส่ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ เพื่อถ่ายภาพ มีขนาด 8 × 8 × 10 เซนติเมตร และมีช่องวงกลมด้านบนสำหรับถ่ายรูปด้วยสมาร์ทโฟน เพื่อบันทึกรูปภาพของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ ภายในกล่องทึบแสงจะมีหลอดไฟ LED เพื่อควบคุมแสงภายในกล่อง ดังภาพที่ 3.1 (ข)

ก. การออกแบบและสร้างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ



ข. การออกแบบและสร้างกล่องทึบแสงสำหรับถ่ายภาพ



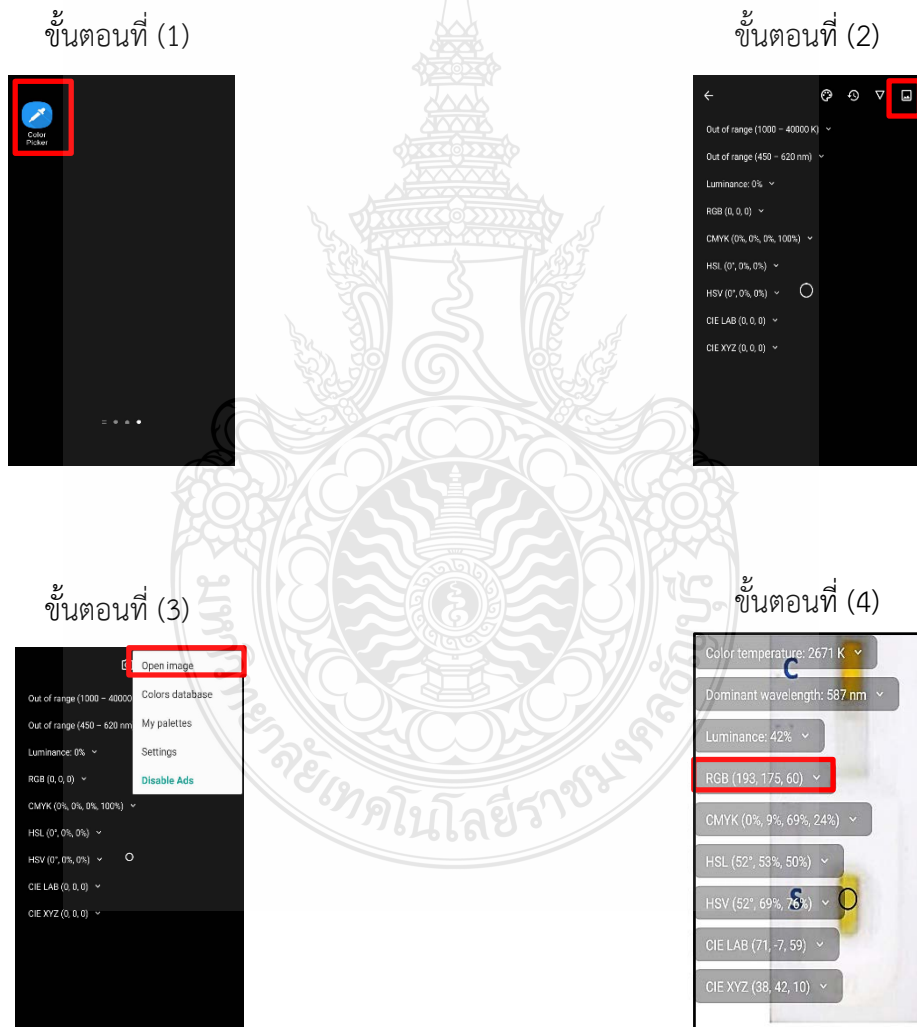
ภาพที่ 3.1 การออกแบบและสร้างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ ก. ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ สำหรับตรวจหาปริมาณคาร์บาริลที่ตกค้างในผัก และ ข. กล่องทึบแสงสำหรับถ่ายภาพ

3.3.2 การอ่านค่าความเข้มข้นชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับด้วยแอปพลิเคชัน Color Picker

ในการวิเคราะห์หาคาร์บาริล โดยใช้ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับที่สร้างขึ้นนั้น จะได้สีของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นแตกต่างกัน โดยในงานวิจัยนี้ได้นำแอปพลิเคชัน Color Picker มาใช้ในการตรวจวัดค่าความเข้มข้น Red Green และ Blue ของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนบริเวณตรวจวัด ดังนั้น จึงจำเป็นต้องเลือกอ่านค่าสีที่เหมาะสม โดยทำการตรวจวัดสารละลายอะซิติกไทโอโคลีน ไอโอไดด์ ความเข้มข้นต่างๆ 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 10 20 30 40 50 และ 60 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นถ่ายภาพด้วยสมาร์ทโฟน โดยขั้นตอนการอ่านค่าความเข้มข้นชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ ด้วยแอปพลิเคชัน Color Picker จะประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

- (1) เปิดแอปพลิเคชัน Color Picker
- (2) เลือกไอคอนที่มุมบนขวาของแอปพลิเคชัน Color Picker
- (3) เลือกภาพถ่ายของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับที่ต้องการอ่านค่า
- (4) วางไอคอนบนบริเวณตรวจวัดของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ และอ่านค่าความเข้มสีของ R G B

จากนั้นนำค่าความเข้มสีที่อ่านได้ไปสร้างเป็นกราฟมาตรฐานเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสี และค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน โดยมีเกณฑ์การพิจารณา คือ จะเลือกค่าสีที่ให้ค่าความชัน (Slope) สูงที่สุด



ภาพที่ 3.2 การอ่านค่าความเข้มสีบนชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับด้วยแอปพลิเคชัน Color Picker

3.3.3 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการสร้างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

3.3.3.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 32 37 และ 40 องศาเซลเซียส ทำการทดลองโดยปิเปตสารละลาย 5,5'-ไดโทโอปิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณควบคุมของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ หลังจากนั้นปิเปตสารละลายเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ความเข้มข้น 0.4 ยูนิต/ไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และสารละลายอะซิติลไทโอโคลีน ไอโอไดด์ ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับเข้าสู่ตู้บที่อุณหภูมิ 32 37 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นวางทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 2 นาที นำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับไปตรวจวัดความเข้มของสีที่ได้โดยใช้สมาร์ทโฟน เหนือในการเลือกสภาวะที่เหมาะสม คือ เลือกอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาที่ให้ความเข้มสีสูงที่สุด

3.3.3.2 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย 5,5'-ไดโทโอปิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด)

ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย 5,5'-ไดโทโอปิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) ที่ความเข้มข้น 1 3 5 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำการทดลองโดยปิเปตสารละลาย 5,5'-ไดโทโอปิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) ความเข้มข้น 1 3 5 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณควบคุมของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ หลังจากนั้นปิเปตสารละลายเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ความเข้มข้น 0.4 ยูนิต/ไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และสารละลายอะซิติลไทโอโคลีน ไอโอไดด์ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับเข้าสู่ตู้บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นวางทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 2 นาที นำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับไปตรวจวัดความเข้มของสีที่ได้โดยใช้สมาร์ทโฟน เหนือในการเลือกสภาวะที่เหมาะสม คือ เลือกความเข้มข้นของสารละลาย 5,5'-ไดโทโอปิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) ที่ให้ค่าความเข้มสีสูงที่สุด

3.3.3.3 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายอะซิติลไทโอโคลีน ไอโอไดด์

ศึกษาผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายอะซิติลไทโอโคลีน ไอโอไดด์ที่ความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำการทดลองโดยปิเปตสารละลาย 5,5'-ไดโทโอปิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณควบคุมของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ หลังจากนั้นปิเปตสารละลายเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ความเข้มข้น 0.4 ยูนิต/ไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และสารละลายอะซิติลไทโอโคลีน ไอโอไดด์ความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นวางทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 2 นาที นำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับไปตรวจวัดความเข้มข้นของสีที่ได้โดยใช้สมาร์ทโฟน เกณฑ์ในการเลือกสภาวะที่เหมาะสม คือ เลือกความเข้มข้นของสารละลายอะซิติกไทโอโคลีน ไอโอไดด์ที่ให้ค่าความเข้มข้นสูงสุด

3.3.3.4 ค่าพีเอชที่เหมาะสมของสารละลายเอนไซม์อะซิติกโคลีนเอสเทอร์

ศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมของสารละลายเอนไซม์อะซิติกโคลีนเอสเทอร์ โดยศึกษาที่พีเอช 7.00 7.50 8.00 และ 8.50 ตามลำดับ ทำการทดลองโดยปิเปตสารละลาย 5,5'-ไดไทโอบิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณควบคุมของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ หลังจากนั้นปิเปตสารละลายเอนไซม์อะซิติกโคลีนเอสเทอร์ที่พีเอช 7.00 7.50 8.00 และ 8.50 ตามลำดับ ความเข้มข้น 0.4 ยูนิต/ไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และสารละลายอะซิติกไทโอโคลีน ไอโอไดด์ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นวางทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 2 นาที นำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับไปตรวจวัดความเข้มข้นของสีที่ได้โดยใช้สมาร์ทโฟน เกณฑ์ในการเลือกสภาวะที่เหมาะสม คือ เลือกค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์อะซิติกโคลีนเอสเทอร์ที่ให้ค่าความเข้มข้นสูงสุด

3.3.3.5 เวลาที่เหมาะสมในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติกโคลีนเอสเทอร์

ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติกโคลีนเอสเทอร์ ที่เวลา 1 3 5 7 และ 9 นาที ทำการทดลองโดยปิเปตสารละลาย 5,5'-ไดไทโอบิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตัวอย่างของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ หลังจากนั้นปิเปตสารละลายเอนไซม์อะซิติกโคลีนเอสเทอร์ ความเข้มข้น 0.4 ยูนิต/ไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร สารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และสารละลายอะซิติกไทโอโคลีน ไอโอไดด์ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 3 5 7 และ 9 นาทีตามลำดับ นำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับไปตรวจวัดความเข้มข้นของสีที่ได้โดยใช้สมาร์ทโฟน แล้วแปลผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเกณฑ์ในการเลือกสภาวะที่เหมาะสม คือ เลือกเวลาในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติกโคลีนเอสเทอร์ที่ให้ค่าความเข้มข้นสูงสุด

ตารางที่ 3.1 แสดงสถานะที่เหมาะสมในการตรวจวัดคาร์บาริลด้วยชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

สถานะที่ศึกษา	การทดลอง
1. อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา (องศาเซลเซียส)	32 37 และ 40
2. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย 5,5'-ไดโทโอปิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	1 3 5 และ 8
3. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย อะซิติกไทโอโคลีน ไอโอไดด์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	20 40 60 80 และ 100
4. ค่าพีเอชที่เหมาะสมของสารละลายเอนไซม์ อะซิติกโคลีนเอสเทอเรส	7.00 7.50 8.00 และ 8.50
5. เวลาที่เหมาะสมในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ อะซิติกโคลีนเอสเทอเรส (นาที)	1 3 5 7 และ 9

3.3.4 ศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

3.3.4.1 ศึกษาความเที่ยงของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

1) การทำซ้ำของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

ศึกษาการทำซ้ำของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ ทำการทดลองโดยปิเปตสารละลาย 5,5'-ไดโทโอปิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบนชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ หลังจากนั้นปิเปตสารละลายเอนไซม์ อะซิติกโคลีนเอสเทอเรส ความเข้มข้น 0.4 ยูนิต์/ไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร สารละลายคาร์บาริล ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และสารละลายอะซิติกไทโอโคลีน ไอโอไดด์ ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับเข้าตู้อบ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง ภายใต้สภาวะเดียวกัน จากนั้นนำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับไปตรวจวัดความเข้มของสีที่ได้โดยใช้สมาร์ตโฟน แล้วแปลผล เป็นค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง นำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ได้ไปคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน สัมพัทธ์ เกณฑ์การยอมรับ คือ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ต้องไม่เกิน 5 % [41]

2) การทวนซ้ำของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

ศึกษาการทวนซ้ำของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ ทำการทดลอง โดยปิเปตสารละลาย 5,5'-ไดไทโอบิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบนชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ หลังจากนั้นปิเปตสารละลายเอ็นไซม์ อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ความเข้มข้น 0.4 ยูนิต/ไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร สารละลายคาร์บาริล ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และสารละลายอะซิติลไทโอโคลีน ไอโอไดด์ ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับเข้าตู้อบ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง ภายใต้สภาวะการทดลองที่ แตกต่างกัน เช่น เปลี่ยนผู้ทดลองหรือเปลี่ยนเวลาในการทดลอง จากนั้นนำชุดทดสอบคาร์บาริล แบบตลับไปตรวจวัดความเข้มของสีที่ได้โดยใช้สมาร์ทโฟน แล้วแปลผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง นำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ได้ไปคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เกณฑ์การยอมรับ คือ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ต้องไม่เกิน 5 % [41]

3.3.4.2 ช่วงความเป็นเส้นตรง

ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับการวิเคราะห์หาคาร์บาริล โดยใช้ สารละลายมาตรฐานคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 1 5 10 20 50 100 200 300 มิลลิกรัม/ลิตร ทำการตรวจวัดภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.3 นำชุดทดสอบคาร์บาริล แบบตลับไปตรวจวัดความเข้มของสีที่ได้โดยใช้สมาร์ทโฟน แล้วแปลผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง จากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับค่าความ เข้มข้นของสารละลายมาตรฐานคาร์บาริล เกณฑ์การยอมรับ คือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์จะต้องมีค่า อยู่ระหว่าง 0.995 ถึง 1.000 [41]

3.3.4.3 ขีดจำกัดในการตรวจพบ

ศึกษาหาขีดจำกัดในการตรวจพบสำหรับวิเคราะห์หาคาร์บาริล โดยทำการทดลอง 10 ซ้ำ ภายใต้สภาวะที่ได้จากข้อ 3.3.3 จากนั้นทำการปิเปตสารละลายแบลนด์ ลงบนชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ นำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับไปตรวจวัดความเข้มของสีที่ได้ โดยใช้สมาร์ทโฟน ทำการทดลอง 10 ซ้ำ นำค่าที่ได้จากการทดลองมาคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อมาคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบ โดยใช้สูตรขีดจำกัดในการตรวจพบ = $3SD/m$ (เมื่อ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, m คือ ความชันของกราฟมาตรฐานจากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง) [42]

3.3.4.4 ซีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ

ศึกษาหาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณสำหรับวิเคราะห์หาคาร์บาริล โดยทำการทดลอง 10 ซ้ำ ภายใต้สภาวะที่ได้จากข้อ 3.3.3 จากนั้นทำการปิเปตสารละลายแบบคลั่งบนชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ นำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับไปตรวจวัดความเข้มของสีที่ได้โดยใช้สมาร์ทโฟน ทำการทดลอง 10 ซ้ำ นำค่าที่ได้จากการทดลองมาคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อมาคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ โดยใช้สูตรขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ = $10SD/m$ (เมื่อ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, m คือ ความชันของกราฟมาตรฐานจากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง) [42]

3.3.4.5 ความถูกต้องของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

ศึกษาความถูกต้องของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ โดยการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery) ทำโดยการเติมสารละลายมาตรฐานคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ลงในตัวอย่างจริง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากนั้นนำค่าที่ได้จากการทดลองไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน โดยใช้กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานคาร์บาริลเกณฑ์การยอมรับ คือ เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนต้องอยู่ในช่วง 80 ถึง 110 เปอร์เซ็นต์ [41]

$$\text{เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน} = [(C_{sp}-C_s)/C_a] \times 100 \quad \dots (6)$$

โดย C_{sp} คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

C_s คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐาน

C_a คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมในตัวอย่าง

3.3.4.6 อายุการใช้งานของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

ในการวิเคราะห์หาคาร์บาริลโดยใช้ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับของงานวิจัยนี้ อาศัยหลักการทางไบโอเซนเซอร์ โดยใช้เอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสและสารเคมีในการเกิดปฏิกิริยากับคาร์บาริล ดังนั้นหากแอกติวิตีของเอนไซม์ลดลงจะส่งผลต่อการตรวจวัดจึงทำการศึกษาอายุการใช้งานเอนไซม์ของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ ขั้นตอนการศึกษาในงานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจวัดการตอบสนองทุกๆ สัปดาห์ ในสภาวะการทดลองเดียวกัน จนกว่าการตอบสนองจะลดลง โดยเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำค่าความเข้มสีที่ได้จากการตรวจวัดในแต่ละสัปดาห์มา หาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ โดยกำหนดให้ค่าการตอบสนองสัปดาห์ที่ 1 ของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับมีประสิทธิภาพเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

3.3.5 การวิเคราะห์หาคาร์บาริลในตัวอย่างจริง

เมื่อได้ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับและสภาวะการทดลองที่เหมาะสมแล้ว นำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับที่ได้ไปตรวจวัดคาร์บาริลในตัวอย่างจริง ตัวอย่างที่ใช้ คือ ผักสด โดยทำการสกัดคาร์บาริลในตัวอย่าง อ้างอิงวิธีการสกัดมาจาก Obana และคณะ [43] โดยใช้ตัวอย่าง ผักสดปริมาณ 1 กรัมผสมกับเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบดละเอียดด้วยเครื่องโฮมจิไนเซอร์ เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำของเหลวไปกรอง เก็บสารละลายส่วนใสไว้ นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาคาร์บาริลด้วยชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับที่พัฒนาขึ้น

การวิเคราะห์หาคาร์บาริลในตัวอย่างจริง ทำการทดลองโดยปิเปตสารละลาย 5,5'-ไดไทโอปิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบนชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ หลังจากนั้นปิเปตสารละลายเอ็นไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ความเข้มข้น 0.4 ยูนิต/ไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร และสารละลายอะซิติลไทโอโคลีน ไอโอไดด์ ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับเข้าสู่อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นวางทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 2 นาที นำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับไปตรวจวัดความเข้มของสีที่ได้ โดยใช้สมาร์ตโฟน นำค่าความเข้มสีที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของคาร์บาริลที่ได้จากกราฟมาตรฐาน เปรียบเทียบผลของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับสำหรับวิเคราะห์หาคาร์บาริลกับผลที่ได้จากชุดทดสอบ MJPK และ UPLC-MS/MS

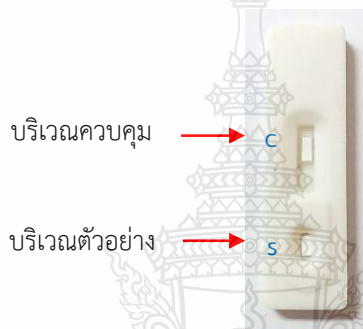
บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการออกแบบและการสร้างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

4.1.1 ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

ผลการออกแบบและการสร้างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับสำหรับตรวจหาปริมาณคาร์บาริลที่ตกค้างในผัก จะประกอบไปด้วย 2 บริเวณ ได้แก่ บริเวณควบคุม (Control pad) และบริเวณตัวอย่าง (Sample pad) ดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับสำหรับตรวจหาปริมาณคาร์บาริลที่ตกค้างในผัก

4.1.2 กล่องทึบแสงสำหรับถ่ายภาพ

ผลการสร้างกล่องทึบแสงสำหรับใช้ใส่ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ เพื่อใช้สำหรับถ่ายภาพ โดยมีช่องสำหรับใส่ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับสูงจากฐานกล่องขึ้นมา 10 เซนติเมตร และช่องวงกลมด้านบนสำหรับถ่ายรูปด้วยสมาร์ทโฟน เพื่อบันทึกคุณภาพของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ ภายในกล่องมีหลอดไฟ LED ดังภาพที่ 4.2

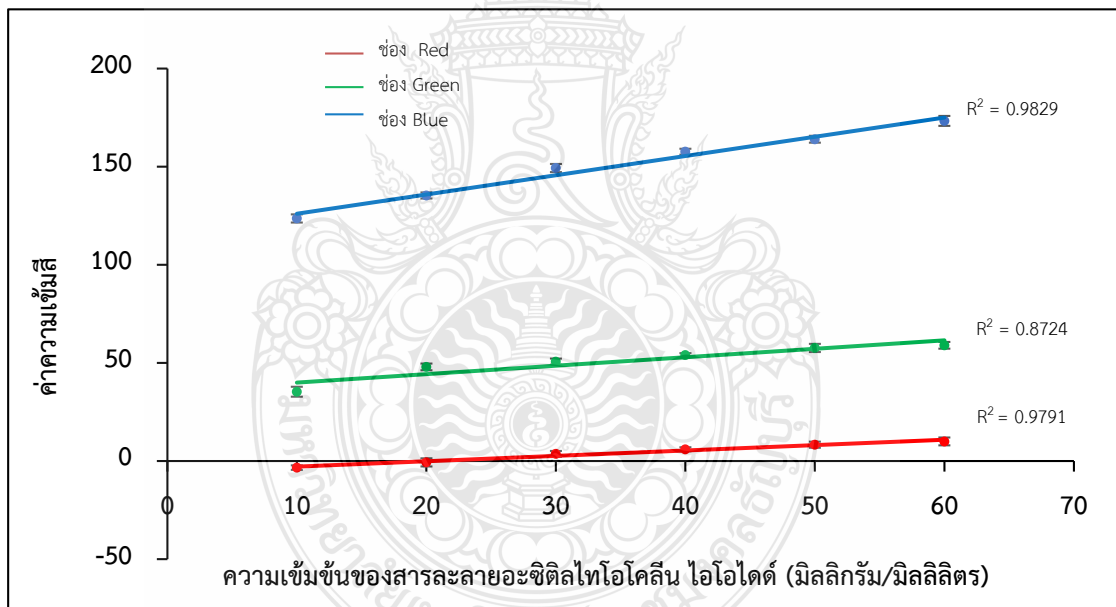


ภาพที่ 4.2 กล่องทึบแสงสำหรับใส่ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับเพื่อถ่ายภาพ

4.2 ผลการอ่านค่าความเข้มข้นชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับด้วยแอปพลิเคชัน Color Picker

ในการวิเคราะห์หาคาร์บาริล โดยใช้ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับที่สร้างขึ้นนั้น จะได้สีของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นแตกต่างกัน โดยในงานวิจัยนี้ได้นำแอปพลิเคชัน Color Picker มาใช้ในการตรวจวัดค่าความเข้มข้น Red Green และ Blue ของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนบริเวณตรวจวัด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเลือกอ่านค่าสีที่เหมาะสม

ผลการทดลองที่ได้จากการตรวจวัดสารละลายอะซิติกไทโอโคลีน ไอโอไดด์ ความเข้มข้นต่างๆ 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 10 20 30 40 50 และ 60 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำการตรวจวัดโดยใช้สมาร์ทโฟนในกล่องทึบแสง และอ่านค่าความเข้มข้น ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4.3 พบว่าสีที่ให้ค่าความเข้มข้นสูงสุดคือ Blue ดังภาพที่ 4.3 ดังนั้นในการอ่านค่าความเข้มข้นชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับด้วยแอปพลิเคชัน Color Picker จะอ่านช่องสี Blue

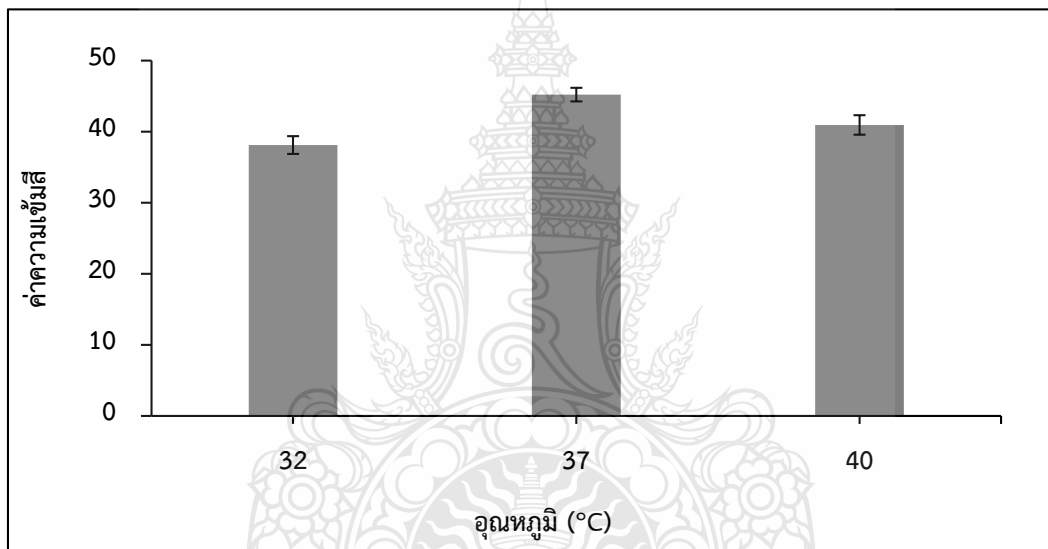


ภาพที่ 4.3 ค่าความเข้มข้นของ Red Green และ Blue บนชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับด้วยแอปพลิเคชัน Color Picker

4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

4.3.1 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

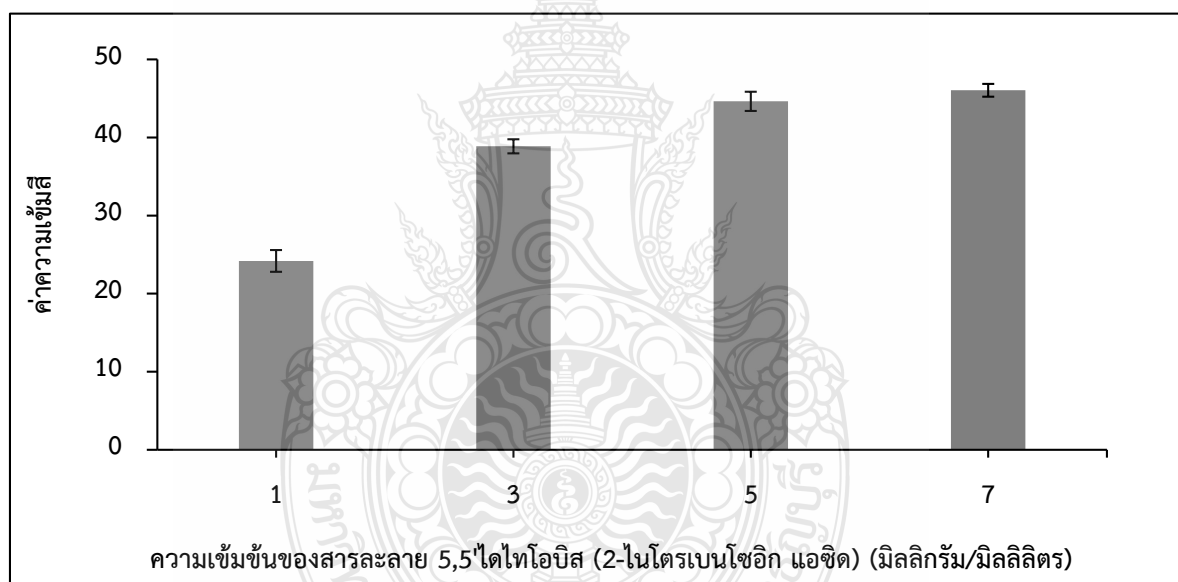
ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 32 37 และ 40 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 4.4 พบว่าค่าความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ และให้ค่าความเข้มข้นสูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีน เอสเทอเรส [44] และเมื่ออุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสจะให้ความเข้มข้นที่ลดลง เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะไปทำลายเอนไซม์ให้เสียสภาพ จึงทำให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพลดลง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 37 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.4 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

4.3.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย 5,5'-ไดไทโอบิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด)

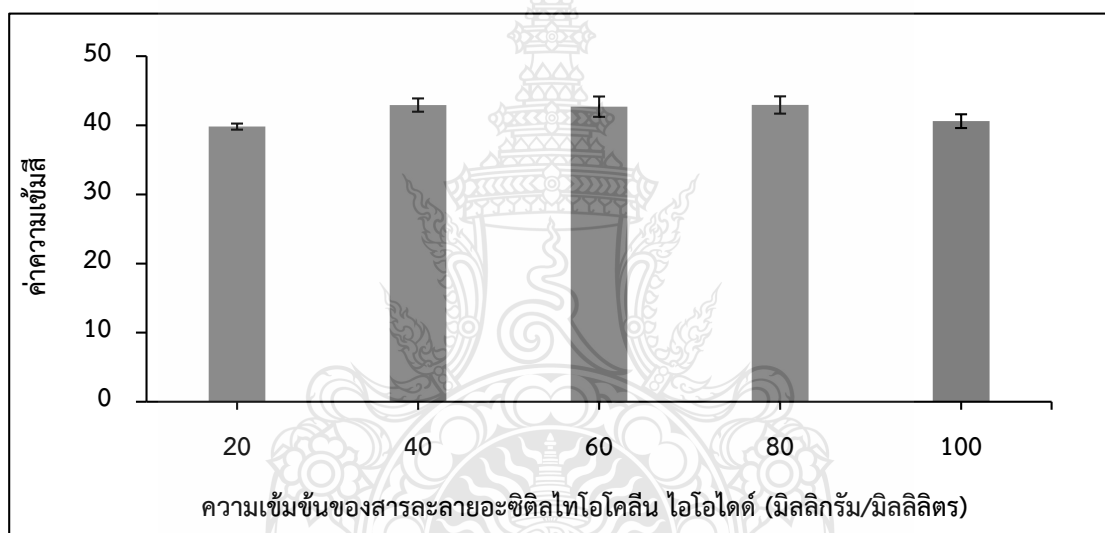
ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย 5,5'-ไดไทโอบิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) ที่ความเข้มข้น 1 3 5 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 4.5 พบว่าช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ค่าความเข้มสีเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลาย 5,5'-ไดไทโอบิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) และเพิ่มสูงสุดที่ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อความเข้มข้นของสารละลาย 5,5'-ไดไทโอบิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) มากกว่า 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะให้ความเข้มสีคงที่ เนื่องจากสารละลาย 5,5'-ไดไทโอบิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) ทำปฏิกิริยากับไทโอโคลินได้สมบูรณ์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของสารละลาย 5,5'-ไดไทโอบิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) ที่เหมาะสม คือ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



ภาพที่ 4.5 ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย 5,5'-ไดไทโอบิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด)

4.3.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายอะซิติกไทโอโคลีน ไอโอไดด์

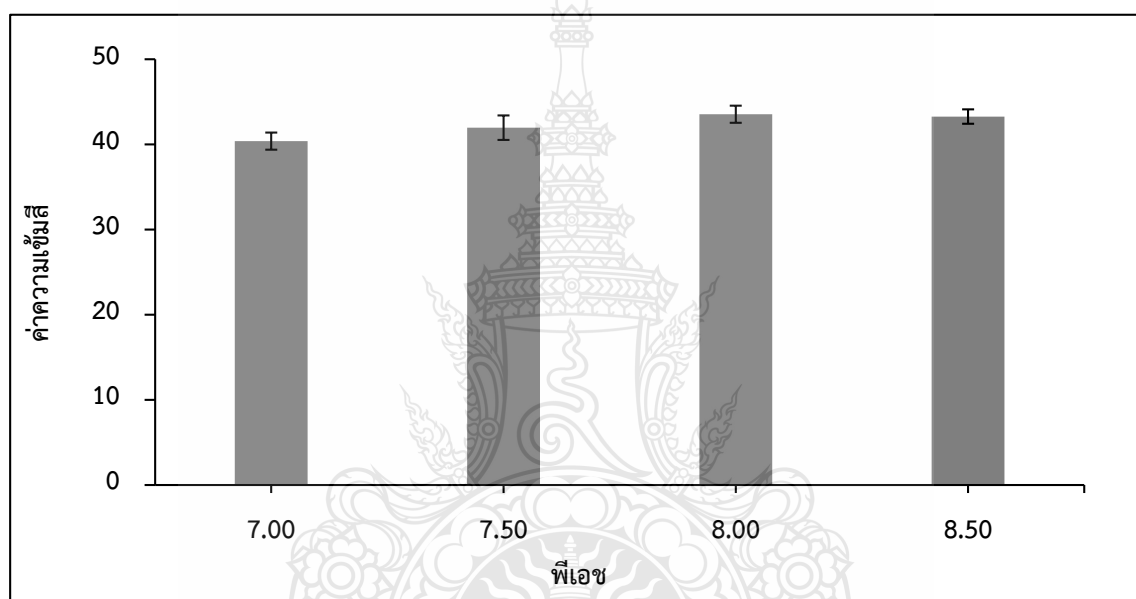
ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายอะซิติกไทโอโคลีน ไอโอไดด์ที่ความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 4.6 พบว่าช่วงความเข้มข้น 20 ถึง 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ค่าความเข้มสีเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลายอะซิติกไทโอโคลีน ไอโอไดด์ และเพิ่มสูงสุดที่ 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อความเข้มข้นของสารละลายอะซิติกไทโอโคลีน ไอโอไดด์มากกว่า 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะให้ความเข้มสีคงที่ เนื่องจากสารละลายอะซิติกไทโอโคลีน ไอโอไดด์ทำปฏิกิริยากับไทโอโคลีนได้สมบูรณ์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของสารละลายอะซิติกไทโอโคลีน ไอโอไดด์ที่เหมาะสม คือ 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



ภาพที่ 4.6 ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายอะซิติกไทโอโคลีน ไอโอไดด์

4.3.4 ผลการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมของสารละลายเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

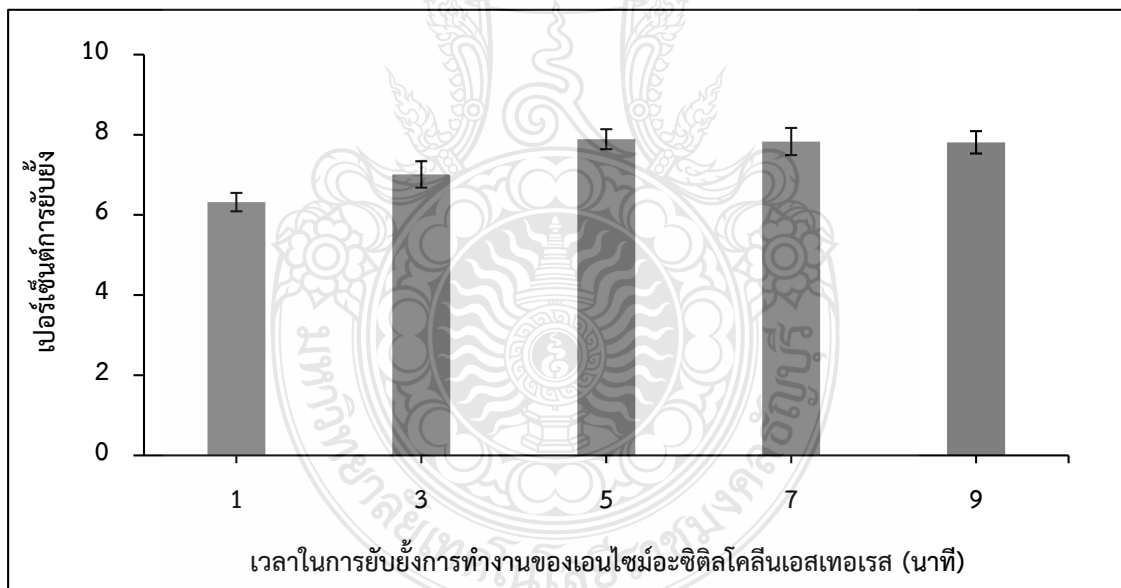
ศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมของสารละลายเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส เนื่องจากพีเอชมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส โดยศึกษาผลค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่พีเอช 7.00 7.50 8.00 และ 8.50 ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 4.7 พบว่าช่วงพีเอช 7.00 ถึง 8.00 จะให้ค่าความเข้มข้นเพิ่มขึ้น แต่เมื่อพีเอชมากกว่า 8.00 จะให้ความเข้มข้นที่ เนื่องจากเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสทำงานได้ดีที่ค่าพีเอช 8.00 [45] ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่เหมาะสมคือ พีเอช 8.00



ภาพที่ 4.7 ผลการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมของสารละลายเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

4.3.5 ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

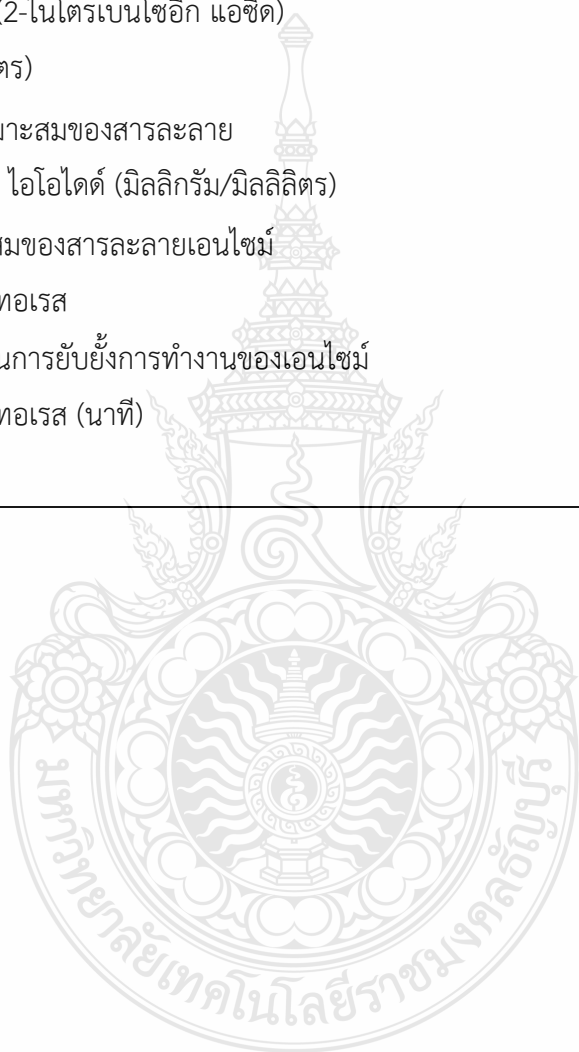
ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ที่เวลา 1 3 5 7 และ 9 นาที สำหรับตรวจวัดคาร์บาริลความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร ผลการศึกษา แสดงดังภาพที่ 4.8 พบว่าช่วงเวลาในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ที่เวลา 1 ถึง 5 นาที มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเพิ่มขึ้น และเพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 5 นาที เนื่องจาก ค่าความเป็นพิษของคาร์บาริลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาของคาร์บาริลกับเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้สมบูรณ์ เมื่อเวลาในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสมากกว่า 5 นาที จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งคงที่ เนื่องจากการทำปฏิกิริยาของคาร์บาริลกับเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้สมบูรณ์แล้ว ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเวลาในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่เหมาะสม คือ 5 นาที



ภาพที่ 4.8 ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

ตารางที่ 4.1 สรุปผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดคาร์บาริลด้วยชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

สภาวะที่ศึกษา	สภาวะที่เหมาะสม
1. อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา (องศาเซลเซียส)	37
2. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย 5,5'-ไดไทโอบิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	5
3. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย อะซิติลไทโอโคลีน ไอโอดัด (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	40
4. ค่าพีเอชที่เหมาะสมของสารละลายเอนไซม์ อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส	8.00
5. เวลาที่เหมาะสมในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (นาที)	5



4.4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

4.4.1 ผลการศึกษาความเที่ยงของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

4.4.1.1 ผลการศึกษาการทำซ้ำของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

ศึกษาการทำซ้ำของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับโดยใช้สารละลายคาร์บาริลที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร ทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง ภายใต้สภาวะเดียวกัน จากนั้นนำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับไปตรวจวัดความเข้มข้นของสีที่ได้โดยใช้สมาร์ทโฟน แล้วแปลผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง นำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ได้ไปคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าในการตรวจหาปริมาณคาร์บาริลมีค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 2.02 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ เนื่องจากเกณฑ์การยอมรับได้ของร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ในช่วงความเข้มข้นระดับไมโครกรัม/ลิตร จะต้องไม่เกิน 5 % แสดงว่าวิธีนี้มีความเที่ยงสูง [41]

ตารางที่ 4.2 ผลการศึกษาการทำซ้ำของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับสำหรับตรวจหาปริมาณคาร์บาริล

ครั้งที่	ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
1	8.15
2	7.94
3	8.24
4	7.91
5	7.87
6	8.14
7	8.26
ค่าเฉลี่ย	8.07
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.16
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์	2.02

4.4.1.2 ผลการศึกษาการทวนซ้ำของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

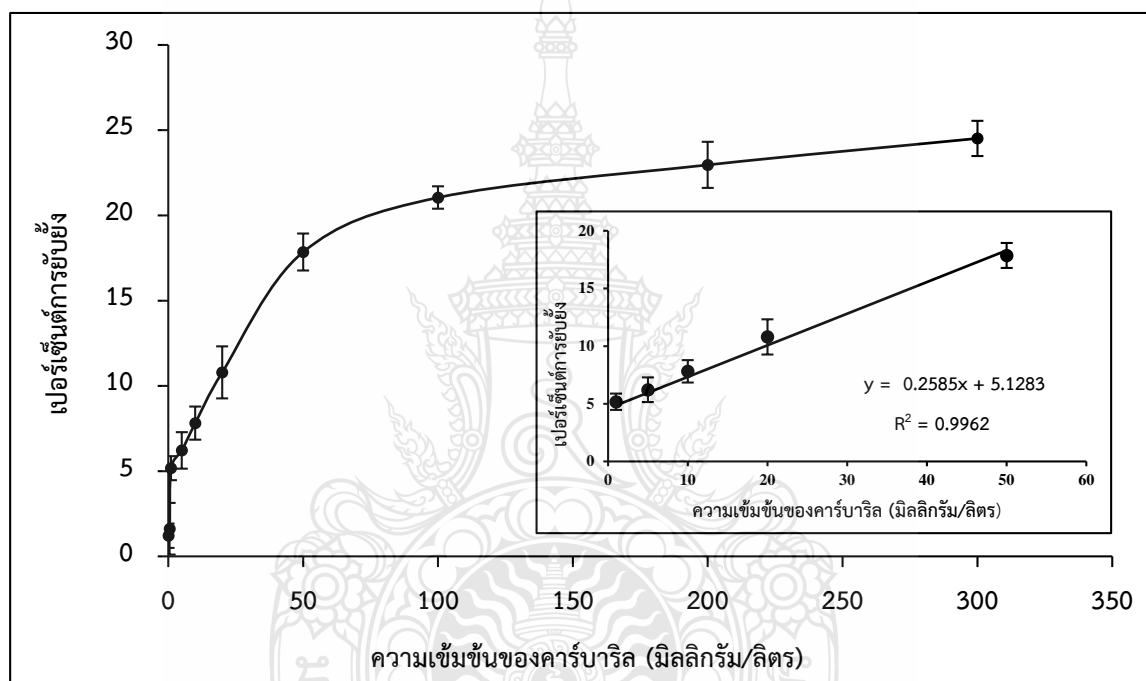
ศึกษาการทวนซ้ำของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับโดยใช้สารละลายคาร์บาริลที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร ทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง ภายใต้สภาวะแตกต่างกัน จากนั้นนำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับไปตรวจวัดความเข้มข้นของสีที่ได้โดยใช้สมาร์ทโฟน แล้วแปลผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง นำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ได้ไปคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าในการตรวจหาปริมาณคาร์บาริลมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 2.28 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ เนื่องจากเกณฑ์การยอมรับได้ของร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ในช่วงความเข้มข้นระดับไมโครกรัม/ลิตร จะต้องไม่เกิน 5 % แสดงว่าวิธีนี้มีความเที่ยงสูง [41]

ตารางที่ 4.3 ผลการศึกษาการทวนซ้ำของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับสำหรับตรวจหาปริมาณคาร์บาริล

ครั้งที่	ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
1	8.31
2	7.87
3	7.99
4	8.09
5	7.78
6	8.17
7	7.93
ค่าเฉลี่ย	8.02
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.19
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์	2.28

4.4.2 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง

ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับวิเคราะห์หาคาร์บาริล โดยใช้สารละลายมาตรฐานคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 1 5 10 20 50 100 200 300 มิลลิกรัม/ลิตร ทำการตรวจวัดภายใต้สภาวะที่เหมาะสม นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานคาร์บาริล ผลการศึกษาพบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์หาคาร์บาริล อยู่ในช่วง 1 ถึง 50 มิลลิกรัม/ลิตร และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9962 แสดงดังภาพที่ 4.9



ภาพที่ 4.9 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับวิเคราะห์หาคาร์บาริล

4.4.3 ผลการศึกษาชี้ดจำกัดในการตรวจพบ

ผลการศึกษาชี้ดจำกัดในการตรวจพบของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับสำหรับวิเคราะห์หาคาร์บาริล โดยใช้ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับตรวจวัดคาร์บาริลในสารละลายแบบลงค์ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม นำค่าที่ได้จากการทดลองมาคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อมาคำนวณหาชี้ดจำกัดในการตรวจพบ ผลการศึกษาดังตารางที่ 4.4 พบว่าชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับสำหรับวิเคราะห์หาคาร์บาริล มีชี้ดจำกัดในการตรวจพบเท่ากับ 0.31 มิลลิกรัม/ลิตร

ตารางที่ 4.4 ผลการศึกษาชี้ดจำกัดในการตรวจพบของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

ครั้งที่	ความเข้มข้นของคาร์บาริลในสารละลายแบบลงค์ (มิลลิกรัม/ลิตร)
1	0.18
2	0.21
3	0.21
4	0.16
5	0.24
6	0.19
7	0.17
8	0.16
9	0.16
10	0.18
ค่าเฉลี่ย	0.186
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.027

โดยขีดจำกัดการตรวจพบคำนวณได้จากสูตร

$$LOD = 3SD/m$$

เมื่อ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการตรวจวัด

m คือ ความชัน (Slope) ของกราฟมาตรฐานที่ได้จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงจากสมการเส้นตรง $y = 0.2585x + 5.1283$ ซึ่ง m มีค่าเท่ากับ 0.2585

จะได้

$$\begin{aligned} LOD &= 3(0.027)/0.2585 \\ &= 0.31 \text{ มิลลิกรัม/ลิตร} \end{aligned}$$

4.4.4 ผลการศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ

ผลการศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับสำหรับวิเคราะห์หาคาร์บาริล โดยทำการทดลอง 10 ซ้ำ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ทำการปิเปตสารละลายแบบลงคัลลงบนบริเวณตรวจวัดของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ นำค่าที่ได้จากการทดลองมาคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อมาคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ ผลการศึกษา พบว่าชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับสำหรับวิเคราะห์หาคาร์บาริล มีขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ เท่ากับ 1.04 มิลลิกรัม/ลิตร โดยขีดจำกัดการตรวจพบเชิงปริมาณคำนวณได้จากสูตร

$$LOQ = 10SD/m$$

เมื่อ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการตรวจวัด

m คือ ความชัน (Slope) ของกราฟมาตรฐานที่ได้จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงจากสมการเส้นตรง $y = 0.2585x + 5.1283$ ซึ่ง m มีค่าเท่ากับ 0.2585

จะได้

$$\begin{aligned} LOQ &= 10(0.027)/0.2585 \\ &= 1.04 \text{ มิลลิกรัม/ลิตร} \end{aligned}$$

4.4.5 ผลการศึกษาหาความถูกต้องของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

ศึกษาความถูกต้องของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ โดยการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery) ทำการศึกษาโดยเติมสารละลายมาตรฐานคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ลงในตัวอย่างจริง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากนั้นนำค่าที่ได้จากการทดลองไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.5 พบว่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนอยู่ในช่วง 96 ถึง 103 ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือช่วง 80 ถึง 110 % [41]

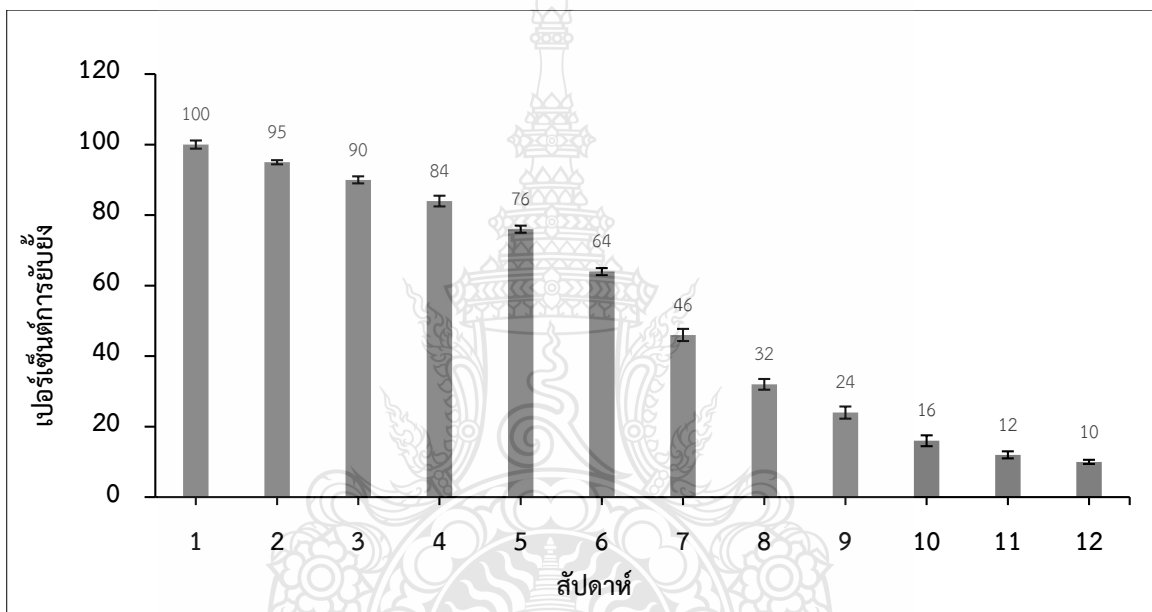
ตารางที่ 4.5 ผลการศึกษาหาความถูกต้องของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของคาร์บาริล (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)			เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน
	ก่อนเติม	เติม	หลังเติม	
บรีคโคลี	ND	1	0.78 ± 0.02	99 ± 0.60
กะหล่ำปลี	1.13 ± 0.03	1	1.82 ± 0.02	97 ± 0.18
ข้าวโพดฝักอ่อน	ND	1	0.85 ± 0.01	100 ± 1.13
คะน้า	1.04 ± 0.01	1	1.80 ± 0.02	103 ± 0.66
ดอกกะหล่ำ	1.03 ± 0.02	1	0.96 ± 0.02	99 ± 1.20
ผักกาดขาว	1.16 ± 0.02	1	1.92 ± 0.01	97 ± 1.43
พริก	ND	1	1.00 ± 0.02	99 ± 0.39
ผักกาดหอม	1.05 ± 0.03	1	1.79 ± 0.02	104 ± 0.92
กวาดั่ง	1.11 ± 0.02	1	1.85 ± 0.01	96 ± 1.56
ถั่วฝักยาว	ND	1	0.84 ± 0.01	100 ± 0.81

ND = ตรวจไม่พบ

4.4.6 ผลการศึกษาอายุการใช้งานของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

ศึกษาอายุการใช้งานเอนไซม์ของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับสำหรับตรวจหาปริมาณคาร์บาริลที่ตกค้างในผัก โดยทำการตรวจวัดการตอบสนองทุกๆ สัปดาห์ ในสภาวะการทดลองเดียวกัน จนกว่าการตอบสนองจะลดลง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.10 พบว่าการเก็บรักษาชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับจะมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์หาคาร์บาริล ลดลงเหลือ 90 เปอร์เซ็นต์ในสัปดาห์ที่ 3 และลดลงเรื่อยๆ ในสัปดาห์ที่ 9 เป็น 24 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากแอกติวิตีของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสลดลง



ภาพที่ 4.10 ผลการศึกษาอายุการใช้งานของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ

4.5 ผลการวิเคราะห์หาคาร์บาริลในตัวอย่างจริง

เมื่อได้ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับและสภาวะการทดลองที่เหมาะสมแล้ว นำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับที่ได้ไปตรวจวัดคาร์บาริลในตัวอย่างจริง ได้แก่ บรีอคโคลี กะหล่ำปลี ข้าวโพดฝักอ่อน คะน้า ดอกกะหล่ำ ผักกาดขาว พริก ผักกาดหอม กวางตุ้ง และถั่วฝักยาว ในการตรวจวิเคราะห์หาคาร์บาริลจะทำการทดลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากนั้นนำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับไปวัดค่าความเข้มข้นที่เกิดขึ้นโดยใช้กล่องทึบแสงและสมาร์ทโฟน นำค่าความเข้มข้นที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของคาร์บาริลที่ได้จากกราฟมาตรฐาน เปรียบเทียบผลของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับสำหรับวิเคราะห์หาคาร์บาริลกับผลที่ได้จากชุดทดสอบ MJPK และ UPLC-MS/MS ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.6 พบว่าชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้ในการตรวจวัดคาร์บาริลในผักได้จริง โดยตรวจพบการปนเปื้อนของคาร์บาริลในกะหล่ำปลี คะน้า ดอกกะหล่ำ ผักกาดขาว ผักกาดหอม และกวางตุ้ง ในช่วงความเข้มข้น 1.03 - 1.16 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยมีปริมาณไม่เกินค่ากำหนดปริมาณสูงสุดที่อนุญาตให้ตกค้างได้ในผลิตภัณฑ์เกษตร เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบ MJPK และ UPLC-MS/MS พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน แต่ชุดทดสอบ MJPK ให้ผลการวิเคราะห์ได้ในเชิงคุณภาพเท่านั้น ดังนั้นสรุปได้ว่าชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับที่พัฒนาขึ้นมีข้อดีกว่า ดังตารางที่ 4.7



ตารางที่ 4.6 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับที่พัฒนาขึ้น
กับชุดทดสอบ MJPK และ UPLC-MS/MS

ตัวอย่าง	ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ ที่พัฒนาขึ้น (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	ชุดทดสอบ MJPK	UPLC-MS/MS (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)
บร็อคโคลี่	ND	ND	ND
กะหล่ำปลี	1.13 ± 0.03	D	1.15 ± 0.02
ข้าวโพดฝักอ่อน	ND	ND	ND
คะน้า	1.04 ± 0.01	D	1.07 ± 0.01
ดอกกะหล่ำ	1.03 ± 0.02	D	1.00 ± 0.03
ผักกาดขาว	1.16 ± 0.02	D	1.20 ± 0.02
พริก	ND	ND	ND
ผักกาดหอม	1.05 ± 0.03	D	1.03 ± 0.02
กวางตุ้ง	1.11 ± 0.02	D	1.08 ± 0.02
ถั่วฝักยาว	ND	ND	ND

ND = ตรวจไม่พบ D = ตรวจพบ

ตารางที่ 4.7 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับที่พัฒนาขึ้นกับ
ชุดทดสอบ MJPK

ปัจจัยที่ศึกษา	ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับที่พัฒนาขึ้น	ชุดทดสอบ MJPK
ผลการวิเคราะห์	เชิงปริมาณ	เชิงคุณภาพ
ปริมาณสาร	4 ไมโครลิตร	10 มิลลิลิตร
ราคา	15 บาท	103 บาท
เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์	5 นาที	10 นาที

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับสำหรับตรวจหาปริมาณคาร์บาริลที่ตกค้างในผัก ด้วยหลักการทางไบโอเซนเซอร์ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสที่มีความเฉพาะเจาะจงกับคาร์บาริล โดยชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับจะประกอบไปด้วย 2 บริเวณ ได้แก่ บริเวณควบคุมและบริเวณตัวอย่าง โดยชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาปริมาณคาร์บาริลที่ตกค้างในผักได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยการแปลผลในเชิงคุณภาพ เมื่อทำการหยดตัวอย่างที่มีคาร์บาริลลงบนชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ จะเกิดการเปลี่ยนสีได้สีของผลิตภัณฑ์เป็นสีเหลือง และการตรวจวัดเชิงปริมาณจะนำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับที่ได้ไปวัดค่าความเข้มข้นโดยใช้สมาร์ตโฟน แปลผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งและคำนวณหาความเข้มข้นของตัวอย่างจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารละลายคาร์บาริลกับค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานคาร์บาริล

เมื่อสร้างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับได้แล้ว จึงทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ พบว่าผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรวจวัดคาร์บาริลด้วยชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ เท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของสารละลาย 5,5'- ไตโทโอปิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) เท่ากับ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ความเข้มข้นของสารละลายอะซิติลไทโอโคลีน ไอโอไดด์ เท่ากับ 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสเท่ากับ 8.00 และเวลาในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส เท่ากับ 5 นาที

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในการชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับแล้ว จึงทำการศึกษาหาประสิทธิภาพของชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับ โดยผลการศึกษาพบว่าชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับมีความเที่ยงสูง (% RSD = 2.02) และมีความถูกต้องสูงโดยคำนวณจากเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน เท่ากับ 96 ถึง 103 มีช่วงความเป็นเส้นตรง 1 ถึง 50 มิลลิกรัม/ลิตร และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9962 มีขีดจำกัดในการตรวจพบเท่ากับ 0.31 มิลลิกรัม/ลิตร และมีขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณเท่ากับ 1.04 มิลลิกรัม/ลิตร สุดท้ายนำชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับไปตรวจวัดคาร์บาริลในตัวอย่างจริง คือ ผักสดจำนวน 10 ตัวอย่าง จากนั้นทำการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการใช้ชุดทดสอบคาร์บาริลแบบตลับกับชุดทดสอบ MJPK พบว่าตรวจพบคาร์บาริลในกะหล่ำปลี

คະน้ำ ดอกกะหล่ำ ผักกาดขาว ผักกาดหอม และกวาดต้ง แต่ปริมาณตกค้างไม่เกินเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด และให้ผลสอดคล้องกับชุดทดสอบ MJPK

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าชุดทดสอบคาร์บาริลแบบลับที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้มีข้อดีคือสามารถตรวจหาปริมาณคาร์บาริลที่ตกค้างในผักทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยมีขีดจำกัดการตรวจพบที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ใช้สารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณน้อย มีราคาถูก และให้ผลการวิเคราะห์รวดเร็ว

5.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสเป็นเอนไซม์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิต จึงเกิดการเสียสภาพของเอนไซม์ได้ง่าย ซึ่งทำให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพน้อยลง ดังนั้นจึงต้องระมัดระวังและควบคุมปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อเอนไซม์ในทุกๆ ขั้นตอน เพื่อประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยา



บรรณานุกรม

- [1] กรมวิชาการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2562, ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตรปี 2558 - 2562 (ออนไลน์), แหล่งที่มา: <http://www.oae.go.th/view/1/ปัจจัยการผลิต/TH-TH>, (17 มกราคม 2564).
- [2] Y. Fan, K. Lai, B. A. Rasco & Y. Huang, "Determination of carbaryl pesticide in Fuji apples using surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with multivariate analysis," *Lwt-Food Science and Technology*, vol. 60, no. 1, pp. 352-357, Jan 2015.
- [3] A. S. Gunasekara, A. L. Rubin, K. S. Goh, F. C. Spurlock and R. S. Tjeerdema, "Environmental fate and toxicology of carbaryl," *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 196, pp. 95-121, 2008.
- [4] I. B. Dhouib, M. M. Lasram, M. Abdeladhim, N. Gharbi, M. B. Ahmed and S. El-Fazaa, "Immunosuppression and oxidative stress induced by subchronic exposure to carbosulfanin rat spleen: Immunomodulatory and antioxidant role of N-acetyl cysteine," *Toxicology Mechanisms and Methods*, vol. 24, pp. 417-427. Sep 2014.
- [5] สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2556, มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (ออนไลน์), แหล่งที่มา: <https://www.acfs.go.th>, (15 พฤศจิกายน 2563).
- [6] E. Watanabe and K. Baba, "Highly sensitive quantification of pyrethroid insecticide etofenprox in vegetables with high-performance liquid chromatography and fluorescence detection," *Journal of Chromatography A*, vol. 1385, pp. 35-41, Mar 2015.
- [7] X. Zhao, W. Kong, J. Wei and M. Yang, "Gas chromatography with flame photometric detection of 31 organophosphorus pesticide residues in *Alpinia oxyphylla* dried fruits," *Food Chemistry*, vol. 162, pp. 270-276, Nov 2014.
- [8] P. Navarro, A. J. Pérez, J. A. Gabaldón, E. Núñez-Delicado, R. Puchades, A. Maquieira and S. Morais, "Detection of chemical residues in tangerine juices by a duplex immunoassay," *Talanta*, vol. 116, pp. 33-38, Nov 2013.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [9] H. Zhao, X. Ji, B. Wang, N. Wang, X. Li, R. Ni and J. Ren. "An ultra-sensitive acetylcholinesterase biosensor based on reduced graphene oxide-Au nanoparticles- β -cyclodextrin/Prussian blue chitosan nanocomposites for organophosphorus pesticides detection," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 65, pp. 23–30, Mar 2015.
- [10] Z. Shen, Q. Fan, Q. Yu, R. Wang, H. Wang and X. Kong. "Facile detection of carbendazim in food using TLC-SERS on diatomite thin layer chromatography," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 247, pp. 119037, Oct 2021.
- [11] A. Fraiwan, H. Lee, and S. Choi, "A paper-based cantilever array sensor: Monitoring volatile organic compounds with naked eye," *Talanta*, vol. 158, pp. 57-62, Sep 2016.
- [12] X. Meng, C. W. Schultz, C. Cui, X. Li, and H.-Z. Yu, "On-site chip-based colorimetric quantitation of organophosphorus pesticides using an office scanner," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 215, pp. 577- 583, Apr 2015.
- [13] S. E. Koshlukova and N. R. Reed. "Carbaryl," *Encyclopedia of Toxicology*, vol. 1, pp. 668-672, 2014.
- [14] WHO, 2009, The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification, www.who.int.
- [15] L. valley. (2021). *MJPK Test kit*. Available: www.labvalley.com.
- [16] B. smartsci. (2021). *GT Test kit*. Available: www.bsmartsci.com.
- [17] H. ents. (2021). *GPO TM KIT*. Available: www.highents.com.
- [18] S. Teepoo, "Nanotechnology and Biosensor," *KKU Science Journal*, vol. 39, pp. 575-586, 2011.
- [19] G. J. Chee, "Development and characterization of microbial biosensors for evaluating low biochemical oxygen demand in rivers," *Talanta*, vol. 117, pp. 366-370, Dec 2013.

บรรณานุกรม (ต่อ)

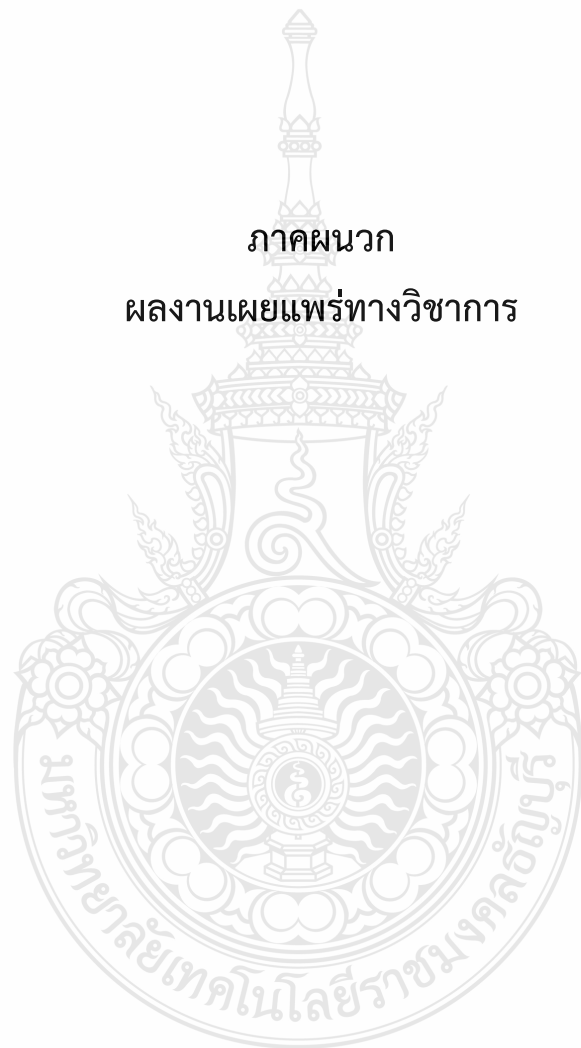
- [20] N. Cennamo, L. Zeni, P. Tortora, M. E. Regonesi, A. Giusti, M. Staiano, S. D' Auria and A. Varriale et al, "A high sensitivity biosensor to detect the presence of perfluorinated compounds in environment," *Talanta*, vol. 178, pp. 955-961, Feb 2018.
- [21] โสภกา กลิ่นจันทร์, "ไบโอเซนเซอร์กับการประยุกต์ใช้," *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ*, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, 2001.
- [22] P. Mehrotra, "Biosensors, and their applications - A review," *Journal of oral biology and craniofacial research*, vol. 6, no. 2, pp. 153-159, Jan 2016.
- [23] R. L. Caygill, G.E. Blair and P.A. Millner, "A review on viral biosensors to detect human pathogens," *Analytica Chimica Acta*, vol. 681, pp. 8-15, Nov 2010.
- [24] P. Singh, "SPR Biosensors: Historical Perspectives, and Current Challenges," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 229, pp. 110-130, Jun 2016.
- [25] K. Rathee , V. Dhull , R. Dhull, and S. Singh, "Biosensors based on electrochemical lactate detection : A comprehensive review," *Biochemistry and Biophysics Reports*, vol. 5, pp. 35-54, Mar 2016.
- [26] Y. Miao, N. He and J. J. Zhu, " History and new developments of assays for cholinesterase activity and inhibition," *Chemical Reviews*, pp. 5216-5234, Jul 2010.
- [27] M. Stefanidou, S. Athanasis and H. Spiliopoulou, " Butyrylcholinesterase: biomarker for exposure to organophosphorus insecticides," *Internal Medicine Journal*, pp. 57-60, Mar 2009.
- [28] L.G. Costa, "Current issues in organophosphate toxicology," *Clinica Chimica Acta*, vol. 366, pp.1-13, Apr 2006.
- [29] M. Eddleston, N. Buckley, P. Eyer and A. Dawson, "Management of acute organophosphorus pesticide poisoning," *Lancet*, vol. 371, pp. 597-607, Feb 2008.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [30] A. W. Martinez, S. T. Phillips, M. J. Butte, and G. M. Whitesides, "Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 46, pp. 1318-1320, Feb 2007.
- [31] L. Xie, X. Zi, H. Zeng, J. Sun, L. Xu, and S. Chen, " Low-cost fabrication of a paperbased microfluidic using a folded pattern paper," *Analytica Chimica Acta*, vol. 1053, pp. 131-138, Apr 2019.
- [32] S. A. Klasner, A. K. Price, K. W. Hoeman, R. S. Wilson, K. J. Bell, and C. T. Culbertson, " Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 397, no. 5, pp. 1821-1829, Jul 2010.
- [33] K. Crowley, A. Morrin, A. Hernandez, E. O'Malley, P. G. Whitten, G. G. Wallace, M. R. Smyth, A. J. Killard " Fabrication of an ammonia gas sensor using inkjet-printed polyaniline nanoparticles," *Talanta*, vol. 77, no. 2, pp. 710-717, Dec 2008.
- [34] C. K. Chiang, A. Kurniawan, C. Y. Kao, and M. J. Wang, "Single step and mask-free 3D wax printing of microfluidic paper-based analytical devices for glucose and nitrite assays," *Talanta*, vol. 194, pp. 837-845, Mar 2019.
- [35] J. Sitanurak et al., " T-shirt ink for one-step screen-printing of hydrophobic barriers for 2D-and 3D-microfluidic paper-based analytical devices," *Talanta*, vol. 205, Jul 2019.
- [36] S. H. Lee et al., "Determination of acetaminophen using functional paper-based electrochemical devices," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 232, pp. 514- 522, Sep 2016.
- [37] X. M. Bi et al., " Gold-coated nanostructured carbon tape for rapid electrochemical detection of cadmium in rice with in situ electrodeposition of bismuth in paperbased analytical devices," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 260, pp. 475- 479, May 2018.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [38] A. Fraiwan, H. Lee, and S. Choi, "A paper-based cantilever array sensor: Monitoring volatile organic compounds with naked eye," *Talanta*, vol. 158, pp. 57-62, Sep 2016.
- [39] M. D. Fernández-Ramos , A. L. Ogunneye , N. A. A. Babarinde , M. M. Erenasa and L.F. Capitán-Vallvey." Bioactive microfluidic paper device for pesticide determination in waters, " *Talanta*, vol. 218, May 2020.
- [40] L. Montali, M. M. Calabretta, A. Lopreside, M. D'Elia , M. Guardigli and Elisa Michelini. " Multienzyme chemiluminescent foldable biosensor for on-site detection of acetylcholinesterase inhibitors," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 162, Aug 2020.
- [41] I. Taverniers, M. De Loose, and E. Van Bockstaele, "Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance," *TRAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 23, pp. 535-552, Sep 2004.
- [42] H. Heli and O. Amirizadeh, "Non-enzymatic glucose biosensor based on hyperbranched pinelike gold nanostructure," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 63, pp. 150-154, Jun 2016.
- [43] H. Obana, M. Okihashi, K. Akutsu, Y. Kitagawa and S. Hori, "Determination of Neonicotinoid Pesticide Residues in Vegetables and Fruits with Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography Mass Spectrometry, " *Journal Agriculture Food Chem*, vol. 51, pp. 2501-2509, 2003.
- [44] C. J. VIDAL, E. MUÑOZ, J. C. GÓMEZ-FERNÁNDEZ and J. A. LOZANO, "Effects of pH and temperature on acetylcholinesterase from sarcoplasmic reticulum," *Biochemical Society Transactions*, vol. 10, pp. 374-375. 1982.
- [45] M. E. I. Badawy and A. F. El-Aswad, "Bioactive paper sensor based on the acetylcholinesterase for the rapid detection of organophosphate and carbamate pesticides, " *International Journal of Analytical Chemistry*, vol. 2014, pp. 1-8, Nov. 2014.



ภาคผนวก

ผลงานเผยแพร่ทางวิชาการ

ผลงานตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ เรื่อง “ Colorimetric test strip cassette readout with a smartphone for on-site and rapid screening test of carbamate pesticides in vegetables” วารสาร Microchemical Journal ฉบับที่ 181 หน้า 107837 ปี 2022





Colorimetric test strip cassette readout with a smartphone for on-site and rapid screening test of carbamate pesticides in vegetables

Waraporn Rakkhun^a, Jongjit Jantra^b, Chehasan Cheubong^a, Siriwan Teepoo^{a,*}

^a Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Thanyaburi, Pathum Thani 12110, Thailand

^b King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Prince of Chumphon Campus, Chumphon 86160, Thailand

ARTICLE INFO

Keywords:
Carbaryl
Test strip cassette
Smartphone
Vegetables
Carbamate pesticides

ABSTRACT

A test strip cassette integrated with a smartphone detector was developed for the colorimetric detection of carbamate pesticides in vegetables. The influence of various experimental conditions was examined for the detection of the optimum analytical performance of the test strip cassette. The test strip cassette detection of carbamate pesticides was carried out by using 140 mM of acetylthiocholine, 13 mM of 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), temperature at 37 °C and pH of 8.0. The developed test strip cassette platform is rapid within 5 min. Based on the inhibition effect of carbaryl on acetylcholinesterase activity, the inhibition effect of carbaryl was proportional to its concentration ranging from 1 to 50 mg/L with the detection limit of 0.30 mg/L. The limit of quantitative value was determined to be 1.0 mg/L. The spiking carbaryl, the recoveries were within 96–103% and the relative standard deviations were less than 1.56%. The analysis of carbamate pesticides residual in vegetable samples gave the results in good agreement with the most widely used commercial test kit and UPLC-MS/MS method. The developed test strip cassette required only 5 min for an assay. With the simple procedures and tiny size, it showed a great promising for the developed test strip to work on-site for carbamate pesticides detection in vegetables.

1. Introduction

Nowadays, insecticides are routinely used in agriculture to protect vegetables and fruits from diseases, pests and weeds, leading to high yield and quantity in their production [1,2]. Carbamate pesticide is one of the most commonly used pesticides in agricultural applications, including cereals, beans, vegetables and other crops [3,4]. Because of the wide use of carbamate pesticides, their excessive residues in foods and caused serious health risks to the consumers [5,6]. Carbaryl is a carbamate class of pesticides. Carbaryl shows high activity to inhibit the activity of cholinesterase and may lead to malformation, mutation and cancer [7,8]. The maximum residue limits (MRL) of carbaryl in some food resources were issued in different countries. For example, the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and the World Health Organization (WHO) allows carbaryl MRL at 6–10 mg/kg for apple and 5 mg/kg for tomato [9], while Thailand has set the MRL at 10 mg/kg in vegetables [10]. Thus, sensitive, accurate and rapid detection of carbaryl is necessary for food safety to prevent a high risk to human health. The application of the analytical method for the detection of targets in real matrices is important [11–13]. A number of analytical

methods have been utilized to detect carbamate pesticides, including chromatography [14,15], spectrophotometry [16,17], electrochemistry [18,19], chemiluminescence [20,21] and fluorimetry [22–24]. The methods mentioned above provided the advantages of high accuracy and sensitivity. However, the operation of the above instruments needs to perform by a skilled operator. Thus, developing a simple, fast and on-site assay for carbamate pesticides detection is significant.

The test strip, a simple and equipment-free assay, has been reported that the technique is rapid, cost-effective and enabling less reagent consumption [25,26]. The test strip is a strip of material such as paper containing chemicals that react to a certain substance based on a chemical sensor or biosensor principle detection [27,28]. In this work, we developed a test strip for the detection of carbaryl using a biosensor technique (denoted as test strip cassette), which is being considered suitable approach for rapid and on-field carbamate pesticides monitoring. The principle is based on the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) by organophosphorus and carbamate pesticides [29–31]. Most of the biosensors for organophosphorus and carbamate pesticide detection rely on fluorescence [32,33], electrochemiluminescence [34,35] and electrochemical detections [36,37], which on-site detection

* Corresponding author.

E-mail address: siriwan@mail.rmutt.ac.th (S. Teepoo).

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107837>

Received 13 June 2022; Received in revised form 26 July 2022; Accepted 27 July 2022

Available online 1 August 2022

0026-265X/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

was limited. A colorimetric detector is ideal for the consumers to perform an on-site detection since there is no need of skilled personnel and the results can be visually observed. In 2015, Meng et al. developed a plastic microchip-based colorimetric quantitation of organophosphorus pesticides using an office scanner [38]. Cha et al., 2020 established a colorimetric detection of pesticides using intrinsic AChE, which naturally occurred in extracellular vesicles [39]. The resulting absorbance was measured at 650 nm using a microplate reader. In 2017, Guo et al. reported a colorimetric biosensor for the assay of paraoxon in environmental water samples using iodine-starch color reaction resulting in blue color production and was then detected with a spectrophotometer at the wavelength of 572 nm [40]. The detection process of the above-mentioned methods was complicated and difficult for on-site pesticide detection. Recently, smartphones have been increasingly aided portable analytical chemistry tools for on-site detection.

Herein, we developed a test strip cassette using AChE-based biosensor for colorimetric detection readout with a smartphone and its application for carbamate pesticides detection in vegetable samples for the first time. Carbaryl was chosen as the model study of carbamate pesticides to evaluate the inhibition biosensor because of its many applications in agriculture. The activity of AChE was inhibited by carbaryl pesticides resulting in less color production. The proposed test paper strip cassette platform is given in Fig. 1. Based on this platform, the strip was developed, optimized and applied as a simple, rapid and efficient assay for detecting carbamate pesticides residue in vegetables.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Acetylcholinesterase (C3389, EC 3.1.1.7), acetylthiocholine (ATCh), 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and carbaryl were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium dihydrogen orthophosphate and disodium hydrogen orthophosphate were obtained from Ajax Finechem (Seven Hills, New South Wales, Australia). Chromatography paper No. 4 was obtained from GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, UK). Cassette was purchased from Serve Science Co., Ltd. (Bangkok, Thailand). Commercial test kit was purchased from Higher Enterprises Co., Ltd. (Bangkok, Thailand). All chemicals used in this study were of analytical grade. An Alcatel Shine Lite 5080X smartphone with CMOS image sensor and the size of detection of $8.5 \times 8.5 \times 4$ mm (Alcatel, France). The color intensity was evaluated using the Color Picker application. This program is package program. The AChE solution was stored in a refrigerator at 4°C before use.

The ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was obtained from Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) with an MS/MS detector (Quattro Premier XE, Waters, Milford, MA, USA). The chromatographic separation was performed on an Acquity UPLC HSS T3 ($1.8 \mu\text{m}$, 2.1×100 mm) and the column oven temperature was set at 40°C . The injection volume was $10 \mu\text{L}$. The mobile phases consisted of A: 0.01 M ammonium acetate in 0.01 M acetic acid and B: methanol (LCMS grade). The elution conditions were optimized using a mobile phase flow of 0.25 mL/min . The detection time was detected at 14.5 min. The instrument was operated using an electrospray (ESI) source in positive mode. The determination of

carbaryl and two transitions were chosen including ($202.2 > 145.1$) and ($202.2 > 117.2$).

2.2. Fabrication of a paper strip cassette for the detection of carbaryl

The test strip consists of two pads: a sample pad and a control pad made from chromatography paper by cutting it into $0.3 \text{ cm} \times 0.7 \text{ cm}$. The chromatography paper was placed onto a plastic film ($0.4 \text{ cm} \times 6.1 \text{ cm}$) using double-sided adhesive tape as a connector and was then assembled in the strip cassettes ($1.9 \text{ cm} \times 7 \text{ cm} \times 4 \text{ mm}$).

2.3. Colorimetric test strip for detection of carbaryl

Fig. 1 showed the assay strategy of carbaryl analysis using a test strip cassette. Firstly, $1 \mu\text{L}$ of 13 mM of DTNB in ethanol was dropped onto the both sample pad and control pad. Freshly prepared of $2 \mu\text{L}$ AChE ($0.4 \text{ units}/\mu\text{L}$ in 20 mM pH 8.0 phosphate buffer) was added. Next, $1 \mu\text{L}$ of carbaryl standard solution or extracted sample was introduced on the sample pad, whereas, $1 \mu\text{L}$ of distilled water was dropped onto the control pad, followed by adding the $1 \mu\text{L}$ of 140 mM ATCh in distilled water onto both pads. Subsequently, it was incubated at 37°C for 5 min. When the reaction was complete, the color change presented on the sample pad was captured by a smartphone camera. The image was then converted to an intensity value by the Color Picker application.

2.4. Smartphone-based colorimetric test strip

The color change on the test strip cassette was recorded by a smartphone camera in a light control box ($8 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$) with white LED lamps (14.4 W , Warm light 4000 K). The smartphone was placed in a holder at a fixed distance (8 cm) from the test strip cassette. The intensity (I) was determined from CIE 1931 color space via the Color Picker application, which was used for the quantification of carbaryl. The inhibition ratio (Inhibition %) of carbaryl to the AChE, was calculated from the intensity value of the Luminance \bar{Y} as follows, where I_{con} and I_{car} represent the intensity value the absence and the presence of the carbaryl, respectively. I_0 indicates the intensity of the background signal.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(I_0 - I_{\text{con}}) - (I_0 - I_{\text{car}})}{(I_0 - I_{\text{con}})} \times 100$$

2.5. Preparation of vegetables extract for carbamate detection

Ten vegetable samples (broccoli, cabbage, baby corn, kale, cauliflower, napa cabbage, chili, lettuce, Choy sum and asparagus bean) were purchased from a local market in Pathum Thani, Thailand. All vegetable samples were cleaned with distilled water and cut into small pieces. One gram of each sample was mixed with 1 mL of methanol and homogenized using an ultrasonic homogenizer for 2 min [41]. The extracted sample was filtered by a syringe filter and the supernatant was kept for further analysis of carbaryl using the test strip cassette.

2.6. Recovery study

One gram of real sample was added into 1 mL of methanol firstly.



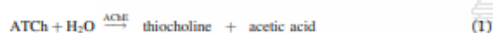
Fig. 1. Schematic diagram of the proposed colorimetric test strip cassette readout with a smartphone for quantitative detection of carbaryl.

Then, standard solution of carbaryl was spiked into the above solution to obtain the final concentration of 1 mg/L. The spiked sample was homogenized and was filtered. The supernatant was obtained. Then 1 μ L of the spiked sample was applied to the proposed procedures.

3. Results and discussion

3.1. Detection of carbamate pesticides based on test strip cassette

A colorimetric test strip cassette has been developed based on the activity inhibition of AChE by carbamate pesticides. AChE is known to catalyze the hydrolysis of ATCh, yielding thiocholine and acetic acid (Eq. 1). Thiocholine further reacted with DTNB and the yellow color of 5-mercapto-2-nitrobenzoic acid (MNBA) was produced (Eq. 2).



In the presence of carbaryl, AChE activity was inhibited causing less thiocholine generated and consequently to decrease the intensity of the yellow color. Fig. 2A shows the result of the control experiment when DTNB, AChE and ATCh were sequentially added to the sample and control pads without carbaryl. The dark yellow color was observed in both control and sample pads as expected. When different concentrations of carbaryl were loaded to the sample pad, the pale yellow color was observed by naked eyes (Fig. 2B-D). The color intensity was measured using a smartphone. The results demonstrated that increasing the concentration of carbaryl caused the reduction of color intensity.

3.2. Image and data analysis

The results were obtained using a smartphone camera. The photos were taken in controlled light conditions at fixed focal distance located in a light control box. The picture was analyzed by the Color Picker application and the CIE 1931 color space were measured to obtain color intensity signal. Different concentrations of ATCh were loaded to the test strip cassette and were left to react with AChE and DTNB. The yellow color was observed and the CIE 1931 color space values were analyzed. The relationship between Luminance \bar{Y} and ATCh concentration is presented in Fig. S1. The combination assay/reader/image analysis is fine with linearity of $r = 0.992$. Therefore, the Luminance \bar{Y} was employed for further calculation of the percentage of inhibition for quantitative detection of carbaryl.

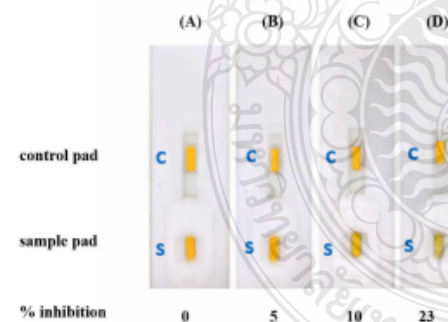


Fig. 2. Digital images of the test strips cassette (A) in the absence of carbaryl and in the presence (B) 10 mg/L, (C) 100 mg/L and (D) 500 mg/L of carbaryl under conditions using 13 mM of DTNB, 0.4 units/ μ L AChE, 140 mM ATCh and incubation time at 37 $^{\circ}$ C for 5 min.

3.3. Optimizations for the test strip fabrication

To achieve complete hydrolysis reaction of ATCh to thiocholine by AChE, various analytical parameters, e.g., ATCh concentration, DTNB concentration, temperature and pH were evaluated by the proposed test strip cassette.

Firstly, the effect of ATCh loaded on a test strip cassette was verified from 70 to 350 mM. The intensity response is depicted in Fig. 3A. The intensity increased with the increase of ATCh concentration. The maximum intensity was reached at 140 mM of ATCh, indicating the completed hydrolysis reaction. Therefore, 140 mM was chosen as the optimum for the following study.

Concentrations of DTNB were then studied between 2.5 and 180 mM. The results showed that the color intensity increased with the increased DTNB concentrations from 2.5 to 13 mM (Fig. 3B). The intensity response remained unchanged, when DTNB concentration was >13 mM. This was due to the limited concentration of ATCh as substrate reagent (140 mM) on the test strip. Thus, 13 mM was chosen to use in the subsequent experiment.

Next parameter to be considered was the effect of temperature on the activity of AChE. The temperature in the range of 32–40 $^{\circ}$ C were investigated. In Fig. S2(A), the experiment performed at 37 $^{\circ}$ C provided the highest color intensity compared to 32 and 40 $^{\circ}$ C. At high temperatures, the enzyme may be denatured and stop working. So, temperature of 37 $^{\circ}$ C was used for ongoing studies.

The effect of pH on the activity of AChE, the maximum response was obtained at pH 8.0 (Fig. S2(B)).

3.4. Effect of inhibition time for detection of carbamate

The inhibition time referred to the exposure time of carbaryl to AChE. It can be said that when the inhibition time increase, the rate of enzyme activity decreases. Therefore, the inhibition time was considered as another key factor for the analysis of carbaryl by varying between 1 and 9 min. Carbaryl of 10 mg/L was used for the entire study. By increasing the inhibition time from 1 to 5 min, the percentage of inhibition increased 2.2% (Fig. 3C). The inhibition has not increased after 5 min indicating an equilibration state. Thereby, 5 min was chosen as the inhibition time for the detection of carbaryl.

3.5. Analytical performance of the test strip

For quantitative analysis of carbaryl, a calibration curve was constructed. Various concentrations of carbaryl were analyzed and percentages of inhibition were calculated, as shown in Fig. 4. The obtained results showed that the degree of inhibition was proportional to the concentrations of carbaryl and had a linear correlation with carbaryl concentration from 1 to 50 mg/L. The linear regression equation was $y = 0.26x + 5.1$ (correlation coefficient = 0.998).

The limit of detection (LOD) toward carbaryl was determined to be 0.30 mg/L. The calculation was based on 3 SD/m, where SD referred to the standard deviation of blank ($n = 10$) and m indicated the slope of the calibration curve. The proposed test strip cassette provided the limit of quantification (LOQ) of 1.0 mg/L, which was calculated from 10 SD/m. The obtained LOQ was much lower than the maximum limit of carbaryl allowed in vegetables (10 mg/L) [10].

The precision (intra- and inter-day) of the proposed test strip cassette was assessed by detecting 10 mg/L of carbaryl for seven times in the same day (intra-day). The inter-day precision test was conducted using the same carbaryl concentration and the measurement was performed seven consecutive days. The intra-day and inter-day average relative standard deviations (RSD) were 2.0 and 2.3%, respectively. The obtained RSD implied good precision of the test strip cassette for quantitative detection of carbaryl. The performance of the strips manufactured from different batches of chromatography paper was also investigated by studying three different batches. The results were found that the %

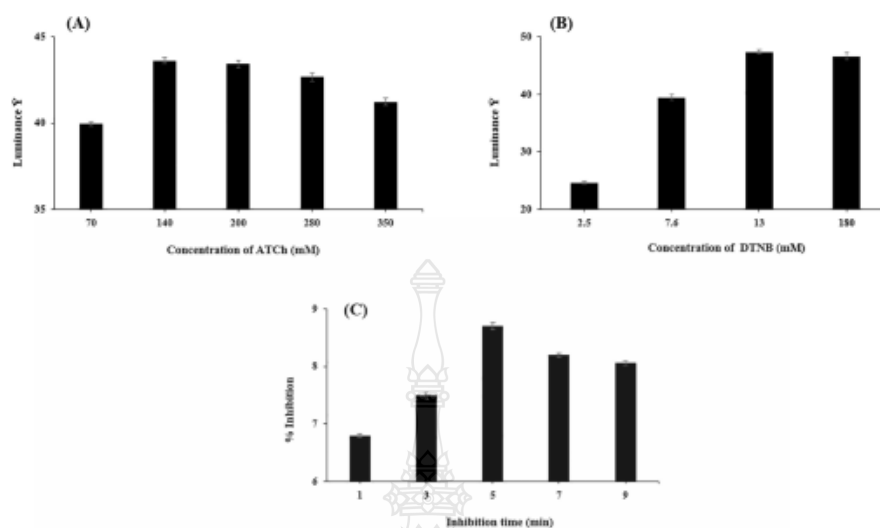


Fig. 3. The effect of (A) ATCh concentration (B) DTNB concentration and (C) inhibition time. Error bars represent the standard deviations of three repetitive experiments.

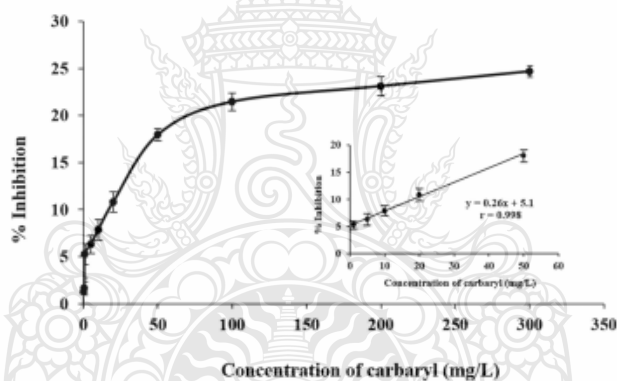


Fig. 4. Calibration curve created under the optimum conditions for carbaryl concentrations between 1 and 50 mg/L plotted against % inhibition. The inset shows the linear part of curve.

RSD was 0.92 for the detection of 10 mg/L carbaryl. It indicated that the fabrications of the test strip cassette had high precision.

Additionally, storage stability of the test strip was studied. Using the concentration of 10 mg/L of carbaryl, the signal was recorded weekly. The test strip was kept at 4 °C when not in use. The results obtained from the test showed that the sensitivity retained 95% after 3 weeks of storage (Fig. S3). However, the sensitivity decreased gradually after 6 weeks. This was most likely due to the loss of biological activity of AChE.

Moreover, the selectivity of the developed test strip was tested with three groups of compounds. The first group was heavy metals (Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+}), the molecules which are known to disturb AChE activity. The second group was some other insecticides (heptachlor, deltamethrin, cypermethrin, glyphosate and malathion) that may present in real samples. The third one was the group of compounds that could be found

in vegetables such as oxalic acid, glucose and vitamin A. As shown in Fig. S4, in the presence of Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , oxalic acid, glucose, vitamin A, heptachlor, deltamethrin and cypermethrin, there were no significant changes in the responses. Only glyphosate (% inhibition = 2.1) and malathion (% inhibition = 2.5) showed the inhibition toward AChE activity because they are organophosphorus pesticides. However, carbaryl gave a higher inhibition degree than glyphosate and malathion. Therefore, the proposed test strip can be used as a screening tool for carbamate pesticides in real samples. The proposed test strip cassette offered excellent analytical performances over the previous work [39,42] since it was a truly portable detection device, simple assay and required short analysis time.

3.6. Matrix effect test

The matrix effects were estimated via matrix-matched calibration method. The matrix-matched calibration was done by using a blank sample, which was vegetable sample such as baby corn containing no carbamate pesticide, were spiked with 1, 5, 10, 20 and 50 mg/L carbaryl. As shown in Fig. S5, the slopes of the standard calibration curve and matrix-matched calibration curve are not different, indicating no matrix effect. Therefore, the quantitative detections of carbamate pesticide in real samples were carried out using the standard calibration curve.

3.7. Detection of carbamate pesticides in vegetable samples using the test strip cassette

To verify the practical applicability of the carbamate pesticides test strip cassette, real sample analysis was investigated in broccoli, cabbage, baby corn, kale, cauliflower, Chinese cabbage, chili, lettuce, Choy sum and asparagus bean. The samples were extracted and were then analyzed using the developed test strip with a smartphone. To evaluate the accuracy of the test strip cassette, the recoveries of spiked carbaryl concentration of 1 mg/L in ten vegetable samples were detected. The results showed the relative recoveries in the range of 96 to 103%, with the RSD below 1.56% in all samples (Table 1). The results showed the relative recoveries in the range of 96 to 103%, with the RSD in the range of 0.18–1.56% for intra-day precision and 0.99–3.49% inter-day precision. These results indicate that the developed test strip can be applied for carbamate pesticides detection in real samples with high accuracy. The acceptable relative recoveries and RSD also demonstrated the high efficiency of the test strip that can be used without the effect of interferences presented in real sample.

The performance of the developed test strip cassette was verified by a commercial test kit, which gives a yes/no response. The presence of residual carbamate pesticides in the sample above 1 mg/L was reported as detected, whereas the concentration of carbamate pesticides residue lower 1 mg/L was shown as not detected. The results are shown in Table 2. Residual carbamate pesticides were detected in cabbage, kale, cauliflower, napa cabbage, lettuce and Choy sum.

The analytical results obtained from the proposed test strip cassette agreed well with those obtained from the commercial test kit. Moreover, the developed test strip cassette could provide detailed information about the levels present. This was a major advantage over the commercial test kit. Additionally, the developed test strip cassette offered a significantly reduced assay time and less chemical consumption (Table S1).

The detection of carbamate pesticides in real samples was further confirmed by UPLC-MS/MS technique. Carbaryl was used as a model study. Standard carbaryl concentration of 1 mg/L was analyzed by UPLC-MS/MS. From the chromatogram, a retention time of carbaryl was shown at 8.21 min while mass fragments were at $m/z = 202 > 145$ and $202 > 127$. The vegetable samples were analyzed by UPLC-MS/MS using the same conditions. The chromatograms were recorded at the same retention time and mass fragments were characterized. The analytical results were shown in Fig. S6 and Table 2. Carbaryl was detected in six vegetable samples, i.e., cabbage, kale, cauliflower, napa cabbage, lettuce and Choy sum. The pesticides concentration values by the developed test strip cassette were more than by UPLC/MS-MS analysis because the developed method detected the total carbamate pesticides, whereas UPLC/MS-MS analysis detected only carbaryl. Thus, the proposed test strip cassette was a great potential to work on-field for screening pesticides.

4. Conclusion

In this study, we developed a colorimetric test strip cassette for a screening test of carbamate pesticides using a smartphone as a detector.

Table 1

Recovery results of carbaryl in real samples (n = 3) obtained from the developed test strip cassette.

Sample	Concentration of carbaryl (mg/kg)			Recovery (%)
	Original sample	Spiked	Found	
broccoli	ND	1	0.78 ± 0.02	99 ± 0.60
cabbage	1.13 ± 0.03	1	1.82 ± 0.02	97 ± 0.18
baby corn	ND	1	0.85 ± 0.01	100 ± 1.13
kale	1.04 ± 0.01	1	1.80 ± 0.02	103 ± 0.66
cauliflower	1.03 ± 0.02	1	0.96 ± 0.02	99 ± 1.20
napa cabbage	1.16 ± 0.02	1	1.92 ± 0.01	97 ± 1.43
chili	ND	1	1.00 ± 0.02	99 ± 0.39
lettuce	1.05 ± 0.03	1	1.79 ± 0.02	104 ± 0.92
Choy sum	1.11 ± 0.02	1	1.85 ± 0.01	96 ± 1.56
asparagus bean	ND	1	0.84 ± 0.01	100 ± 0.81

ND = Non-Detected.

Table 2

Analysis of carbaryl in vegetable samples using the proposed test strip cassette, commercial test kit and UPLC-MS/MS.

Sample	Test strip cassette (mg/kg)	Commercial test kit	UPLC-MS/MS (mg/kg)
broccoli	ND	ND	ND
cabbage	1.13 ± 0.03	D	1.15 ± 0.02
baby corn	ND	ND	ND
kale	1.04 ± 0.01	D	1.07 ± 0.01
cauliflower	1.03 ± 0.02	D	1.00 ± 0.03
napa cabbage	1.16 ± 0.02	D	1.20 ± 0.02
chili	ND	ND	ND
lettuce	1.05 ± 0.03	D	1.03 ± 0.02
Choy sum	1.11 ± 0.02	D	1.08 ± 0.02
asparagus bean	ND	ND	ND

ND = Non-Detected; D = Detected.

Under the optimum conditions, the developed test strip offered a simple, rapid and sensitive assay. The developed assay also provided a good advantage of less consumption of reagents per assay (4 µL) which reduced waste generation. A proof-of-concept experiment was performed to apply for the detection of carbamate pesticides in vegetables. The test strip provided the results in good agreement with the commercial pesticide test kit as well as the chromatographic method (UPLC-MS/MS) enabling the potential to use the developed test strip in the commercial market. A significant advantage of the developed test strip is that it could provide the information of carbaryl concentration presented in the samples. As such, the proposed test strip cassette showed a great promise to be an alternative test strip for screening of carbamate pesticides on field and to be a truly portable device.

CRedit authorship contribution statement

Waraporn Rakkhun: Methodology, Validation, Writing – review & editing. Jongjit Jantra: Writing – review & editing. Chehasan Cheubong: Writing – review & editing. Siriwan Teepoo: Supervision, Funding acquisition, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

The authors do not have permission to share data.

Acknowledgements

This research was supported by The Science, Research and Innovation Promotion Funding (TSRI) (Grant no. FRB650070/0168). This research block grant was managed under Rajamangala University of Technology Thanyaburi (FRB65E0624).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107837>.

References

- X. Yan, H. Li, X. Su, Review of optical sensors for pesticides, *TrAC Trends Anal. Chem.* 103 (2018) 1–20.
- M. Valcke, M.H. Bourgaud, L. Rochette, L. Normandin, O. Samet, D. Belleville, C. Blanchet, D. Phaneuf, Human health risk assessment on the consumption of fruits and vegetables containing residual pesticides: A cancer and non-cancer risk benefit perspective, *Environ. Int.* 108 (2017) 63–74.
- Y. Fan, K. Lai, B.A. Rasco, Y. Huang, Determination of carbaryl pesticide in high apples using surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with multivariate analysis, *Lwt – Food Sci. Technol.* 60 (1) (2015) 352–357.
- M. Lee, Y. Paill, Y. Na, D.S. Lee, S.H. Lim, G. Yi, Highly stable, rapid colorimetric detection of carbaryl pesticides by azo coupling reaction with chemical pre-treatment, *Sens. Actuators, B Chem.* 261 (2018) 489–496.
- X. Fadle, F. Placencia, A.M. Dominguez, F. Cereceda-Balic, *Tridascantia* as a biosensor for pesticide genotoxicity evaluation of iprodione, carbaryl, dimethoate and 4,4'-DDE, *Sci. Total Environ.* 575 (2017) 146–151.
- S. Wang, C. Yu, J. Wang, Enzyme immunoassay for the determination of carbaryl residues in agricultural products, *Food Addit. Contam.* 22 (8) (2005) 735–742.
- I.B. Dhouib, M.M. Leson, M. Abdeladhim, N. Gharbi, M.B. Ahmed, S. El-Fassi, Immunosuppression and oxidative stress induced by subchronic exposure to carbendathion in spleen: immunomodulatory and antioxidant role of N-acetylcysteine, *Toxicol. Mech. Methods* 24 (2014) 417–427.
- I. Bin Dhouib, A. Annabi, M. Jallouli, S. Marzouki, N. Gharbi, S. El-Fassi, M. Montassar Leson, Carbamate pesticides induced immunotoxicity and oxidative genotoxicity in human: a review, *J. Appl. Biomed.* 14 (2) (2016) 85–90.
- S. Zanato, A. Traverso, M. Tremolada, F. Sinigaglia, A. Porro, G. Pizzilli, N. Di, F. Florio, A. Capella, M. Marzollo, C. Tumino, G. Catterlati, C.M. Bisio, Psychopathological Aspects in Childhood Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT): The Perception of Parents and Adolescents, *Front. Psychol.* 8 (2017) 1–13.
- Thai agricultural standard, Pesticide residue: maximum residue limits, National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok, 125 (2013) 1–44.
- R. Sedghi, B. Heidari, M. Behbahani, Synthesis, characterization and application of poly (acrylamide-co-methylbisacrylamide) nanocomposite as a colorimetric chemosensor for visual detection of trace levels of Hg and Pb ions, *J. Hazard. Mater.* 285 (2015) 109–116.
- M. Behbahani, S. Salimi, H.S. Abandouari, F. Omid, M. Sakiyan, K. Arzali, Application of a tailor-made polymer as a selective and sensitive colorimetric sensor for reliable detection of trace levels of cyanide ions in complex matrices, *RSC Adv.* 5 (74) (2015) 59912–59920.
- M.K. Boidi, M. Behbahani, Z.B. Feyzabadi, Material Design of a Chromium Imprinted Polymer and Its Application as a Highly Selective Electrochemical Sensor for Determining Chromium Ions at Trace Levels, *Chem. Sci.* 6 (2021) 11939–11947.
- J.A. Marillo Puigarin, L.F. Garcia Borrero, A. Carrasquero Duran, Determination of carbamates in soils by liquid chromatography coupled with on-line post-column UV irradiation and chemiluminescence detection, *Arab. J. Chem.* 13 (1) (2020) 2778–2784.
- M.S. Talebianpoor, S. Khodadoust, A. Moosavi, R. Mahmoudi, J. Rikhsati, J. Mohammadi, Preconcentration of organophosphate pesticides in water samples by using modified silica bar with ZnS nanoparticles loaded on aminated silica and their HPLC determination: Response surface methodology, *Mikrochim. J.* 120 (2017) 64–70.
- S. Suphasek, E. Punhong, W. Sritankham, K. Guadagnoli, A new method for spectrophotometric determination of carbaryl based on guinea tree bark peroxidase enzymatic reaction, *Mikrochim. J.* 144 (2019) 56–63.
- A.S. Tsagkari, L. Uhl, J. Pulkrabova, J. Hajkova, Screening of Carbamate and Organophosphate Pesticides in Food Matrices Using an Affordable and Simple Spectrophotometric Acetylcholinesterase Assay, *Appl. Sci.* 10 (2020) 4–14.
- F. Arduini, S. Cinti, V. Caranelli, L. Amendola, G. Palleschi, D. Mosconi, Origami multiple paper-based electrochemical biosensors for pesticide detection, *Biosens. Bioelectron.* 126 (2019) 346–354.
- F.E. Salih, B. Achou, M. Ouammou, J. Benmaha, A. Ouazzane, S.A. Younsi, M. E. Rhazi, Electrochemical sensor based on low silica X anodic modified carbon paste for carbaryl determination, *J. Adv. Res.* 8 (2017) 669–676.
- L. Montali, M.M. Calabretta, A. Lopeside, M. D'Elia, M. Guardigli, E. Michellini, Multienzyme chemiluminescent foldable biosensor for on-site detection of acetylcholinesterase inhibitors, *Biosens. Bioelectron.* 162 (2020), 112232.
- S. Li, X. Wu, C. Liu, G. Yin, J. Luo, Z. Xu, Application of DNA aptamers as sensing layers for detection of carbofuran by electrogenerated chemiluminescence energy transfer, *Anal. Chim. Acta* 941 (2016) 94–100.
- D. Su, H. Li, X. Yan, Y. Linand, G. Lu, Biosensors based on fluorescence carbon nanomaterials for detection of pesticides, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 134 (2021), 116126.
- N. Cheng, Y. Song, Q. Fu, D. Du, Y. Luo, Y. Wang, W. Xu, Y. Lin, Aptasensor based on fluorophore-quencher nano-pair and smartphone spectrum reader for on-site quantification of multi-pesticides, *Biosens. Bioelectron.* 117 (2018) 75–83.
- F. Shahdost-fard, N. Fakhri-Kashani, M.R. Hormozi-nezhad, A ratiometric fluorescence nanosensor using CdTe QDs for fast detection of carbaryl insecticide in apple, *Talanta* 221 (2021), 121467.
- W. Dungehal, O. Chailapakul, C.S. Henry, Electrochemical detection for paper-based microfluidics, *Anal. Chem.* 81 (14) (2009) 5821–5826.
- A.W. Martinez, S.T. Phillips, G.M. Whitesides, E. Carrillo, Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3–10.
- D.M. Cate, J.A. Adkins, J. Mettakoonpitak, C.S. Henry, Recent Developments in Paper-Based Microfluidic Devices, *Anal. Chem.* 87 (1) (2015) 19–41.
- P. Estrella, N. Bhalia, P. Jolly, N. Fornisano, P. Estrella, Introduction to biosensors, *Essays, Biochem.* 60 (1) (2016) 1–8.
- J. Frutik, M. Tankiewicz, M. Bialik, Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 30 (6) (2011) 814–826.
- C.S. Pundir, N. Chauhan, Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review, *Anal. Biochem.* 429 (1) (2012) 19–31.
- L. Huang, D.W. Sun, H. Pu, Q. Wei, L. Luo, J. Wang, A colorimetric paper sensor based on the domain mutation of acetylcholinesterase and degradable γ-MnOOH nanorzyme for sensitive detection of organophosphorus pesticides, *Sens. Actuators, B* 290 (2019) 573–580.
- J. Chang, H. Li, T. Hou, F. Li, Paper-based fluorescent sensor for rapid naked-eye detection of acetylcholinesterase activity and organophosphorus pesticides with high sensitivity and selectivity, *Biosens. Bioelectron.* 86 (2016) 971–977.
- B. Liang, L. Han, Displaying of acetylcholinesterase mutants on surface of yeast for ultra-trace fluorescence detection of organophosphate pesticides with gold nanoflowers, *Biosens. Bioelectron.* 148 (2020), 111825.
- S.S. Miao, M.S. Wu, L.Y. Ma, X.J. He, H. Yang, Electrochemiluminescence biosensor for determination of organophosphorus pesticides based on bimetallic Pt-Au/multi-walled carbon nanotubes modified electrode, *Talanta* 158 (2016) 142–151.
- Y. He, J. Du, J. Luo, S. Chen, R. Yuan, Core-shell-free electrochemiluminescence biosensor for the determination of organophosphorus pesticide, *Biosens. Bioelectron.* 150 (2020), 111898.
- H. Zhao, X.-J. B. Wang, N. Wang, X. Li, R. Ni, J. Ren, An ultra-sensitive acetylcholinesterase biosensor based on reduced graphene oxide-Au nanoparticles-β-cyEcdotein/Trisulfate blue-chitosan nanocomposites for organophosphorus pesticides detection, *Biosens. Bioelectron.* 65 (2015) 23–30.
- Y. Song, J. Chen, M. Sun, C. Gong, Y. Shen, Y. Song, L. Wang, A simple electrochemical biosensor based on AuNPs/MPS/Au electrode sensing layer for monitoring carbamate pesticides in real samples, *J. Hazard. Mater.* 304 (2016) 103–109.
- X. Meng, C. W. Schultz, C. Cui, X. Li, H.-Z. Yu, On-site chip-based colorimetric quantitation of organophosphorus pesticides using an office scanner, *Sens. Actuators, B.* 215 (2015) 577–583.
- S.S. Chiu, P.S. Dai, S. Kim, J.M. Kim, S.H. Hwang, S.S. Oh, K.S. Park, Simple colorimetric detection of organophosphorus pesticides using naturally occurring extracellular vesicles, *Mikrochim. J.* 158 (2020), 105130.
- L. Guo, Z. Li, H. Chen, Y. Wu, L. Chen, Z. Songand, T. Lin, Colorimetric biosensor for the assay of pirarazin in environmental water samples based on the iodine-starch color reaction, *Anal. Chim. Acta* 967 (2017) 59–63.
- H. Ohana, M. Okshabi, E. Akhavan, Y. Eltagawa, S. Huri, Determination of Neoprene-based Pesticide Residues in Vegetables and Fruits with Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 51 (9) (2003) 2501–2505.
- Y. Cai, Z. Qiu, X. Lin, W. Zeng, X. Cai, W. Liu, Y. Liu, Self-assembled nanomaterials based on aggregation-induced emission of AuNCs: Fluorescence and colorimetric dual-mode biosensors of organophosphorus pesticides, *Sens. Actuators, B Chem.* 321 (2020), 128481.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาววารารณ์ รุกคุณ
วัน เดือน ปีเกิด 12 มีนาคม 2533
ที่อยู่ 3 หมู่ 4 ตำบลโพธิ์แท่น อำเภองครักษ์ จังหวัดนครนายก 26120
การศึกษา ปริญญาตรี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เบอร์โทรศัพท์ 085-3922708
อีเมล waraporn.rukkun@gmail.com

