



## รายงานการวิจัย เรื่อง

การพัฒนาแผ่นทดสอบยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม organophosphate และ carbamate โดยใช้  
เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

Development of test-strip for organophosphate and carbamate pesticides based on  
acetylcholinesterase activity

ปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ

บุศราภรณ์ มหาโยธี

Pramote Khuwijtjaru

Busarakorn Mahayothee

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2559

## บทคัดย่อ

**ชื่อโครงการ** การพัฒนาแผ่นทดสอบยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม organophosphate และ carbamate โดยใช้ เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

**ชื่อผู้วิจัย** ปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ และ บุศราภรณ์ มหาโยธี

**หน่วยงานที่สังกัด** ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร วิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัย ศิลปากร

**แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย** งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2557 สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัย ศิลปากร

**ปีที่เสร็จ** พ.ศ. 2559

**ประเภทการวิจัย** การวิจัยประยุกต์

**สาขาวิชา** สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มอุตสาหกรรมเกษตร

การวิจัยนี้มีเป้าหมายในการพัฒนาแผ่นทดสอบยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่ม organophosphate และ carbamate โดยใช้เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส โดยออกแบบแผ่นทดสอบให้สามารถระบุการปนเปื้อนได้ด้วยตาเปล่าและสามารถบอกค่าช่วงการปนเปื้อนได้ โดยสำหรับสารกลุ่ม carbamate ได้ใช้คาร์โบฟูเร็นเป็นตัวแทนในการทดสอบและพบว่าสามารถพัฒนาแผ่นทดสอบโดยใช้วัสดุเป็นกระดาษกรอง แผ่นทดสอบสามารถตรวจวัดการปนเปื้อนได้ในระดับตั้งแต่  $> 2.8$  ppm ไปจนถึง  $< 0.01$  ppm โดยการสังเกตสีด้วยตาเปล่า ในการทดสอบการปนเปื้อนของคาร์โบฟูเร็นในตัวอย่างถั่วฝักยาวเปรียบเทียบกับวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวความดันสูงเมื่อตัวอย่างมีการปนเปื้อน  $1.01$  ppm พบว่าแผ่นทดสอบสามารถอ่านค่าได้ว่ามีการปนเปื้อนในระดับ  $1.4 - 2.8$  ppm ซึ่งนับว่ามีความถูกต้องในระดับที่น่าพอใจ อย่างไรก็ตามในกรณีของยาฆ่าแมลงกลุ่ม organophosphate ซึ่งศึกษาโดยใช้คลอไพริฟอสเป็นตัวแทนในการทดสอบนั้นพบว่ามีปัญหาในการพัฒนาแผ่นทดสอบเนื่องจากค่าการละลายของยาฆ่าแมลงในน้ำมีค่าต่ำทำให้ผลการทดลองไม่แน่นอน ในการศึกษานี้จึงได้พัฒนาเป็นน้ำยาสำหรับทดสอบเบื้องต้นแทน โดยพบว่าสามารถบอกระดับการปนเปื้อนได้อย่างคร่าวๆ

**คำสำคัญ:** ยาฆ่าแมลง ชุดทดสอบ เอนไซม์ การเกิดสี

## Abstract

**Research Title** Development of test-strip for organophosphate and carbamate pesticides based on acetylcholinesterase activity

**Researcher** Pramote Khuwijitjaru and Busarakorn Mahayothee

**Office** Department of Food Technology, Faculty of Engineering and Industrial technology, Silpakorn University

**Research Grant** Fiscal Year 2014 Research and Development Institute, Silpakorn University

**Year of completion** 2016

**Type of research** Applied research

**Subjects** Agriculture and Biology, Sub-group: Agro-industry

This research was aimed to develop test strips for organophosphate and carbamate pesticides determination. Primarily, test strips for naked-eye detection of the pesticide contamination that can provide approximate range of pesticide residue were expected. For carbamate group, carbofuran was studied and the developed test strip was able to detect the pesticide in a concentration range of 0.01 - 2.8 ppm. Validation with yard-long bean sample contaminated with carbofuran at 1.01 ppm measured by HPLC method showed the result of 1.4 – 2.8 ppm contamination detected by the developed test strip. However, for organophosphate pesticide in which chlorpyrifos was selected for testing in this study, because of low solubility of the pesticide, it was not possible to prepare a test strip with reliable performance. Therefore the test reagent for approximate determination of chlorpyrifos was also developed.

**Keywords:** Pesticide, test kit, enzyme, colorimetry

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 จาก  
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย ได้แก่ นางสาวนิสาธน์ แดงวิสุทธิ นางสาวจุฬาลักษณ์ อ่อน  
พุทธา นางสาววรรณพร กิตติวิมลพรรณ และนางสาวขวัญใจ กลิ่นจางกล

## สารบัญ

บทคัดย่อ .....	ก
Abstract .....	ข
กิตติกรรมประกาศ .....	ค
สารบัญตาราง .....	ง
สารบัญภาพ .....	ช
บทนำ .....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ .....	1
1.2 วัตถุประสงค์ .....	1
การตรวจเอกสาร .....	2
2.1 ชนิดของยาฆ่าแมลง .....	2
2.2 หลักการทำงานของชุดทดสอบการตกค้างของยาฆ่าแมลง .....	5
2.3 กลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส .....	6
2.4 แผ่นทดสอบยาฆ่าแมลงโดยใช้ AChE .....	7
2.5 ยาฆ่าแมลงในการทดลอง .....	13
การดำเนินงานวิจัย .....	16
3.1 วัสดุดิบ .....	16
3.2 อุปกรณ์ .....	16
3.3 สารเคมี .....	16
3.4 เครื่องมือ .....	16
3.5 การเตรียมแผ่นทดสอบ .....	16
3.6 การเตรียมชุดทดสอบ .....	17
3.7 การพัฒนาชุดทดสอบสำหรับตรวจสอบคาร์โบฟูแรน .....	17
3.8 การพัฒนาชุดทดสอบสำหรับตรวจสอบคลอร์ไพริฟอส .....	18
3.9 การตรวจสอบปริมาณคาร์โบฟูแรนที่พบในผัก .....	19

<b>ผลการทดลองและวิจารณ์</b> .....	21
4.1 การพัฒนาชุดทดสอบคาร์โบฟูแรน .....	21
4.1.1 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างอินดอกซิลอะซีเตทกับเอนไซม์อะซีติลโคลีน .....	21
เอสเทอเรส .....	21
4.1.2 การกำหนดสเกลความเข้มข้นบนชุดทดสอบ .....	21
4.1.3 ผลการทดสอบชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นด้วยสารละลายคาร์โบฟูแรน .....	25
4.1.4 ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC) .....	26
4.1.5 ผลการทดสอบชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างถั่วฝักยาว .....	28
4.2 การพัฒนาชุดทดสอบสำหรับคลอไพริฟอส .....	29
4.2.1 ศึกษาความเข้มข้นอินดอกซิลอะซีเตทที่เหมาะสม .....	29
4.2.2 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ .....	32
4.2.3 การทวนสอบการใช้งานชุดทดสอบ .....	35
<b>สรุปผลการทดลอง</b> .....	36
<b>เอกสารอ้างอิง</b> .....	37
<b>การเผยแพร่ผลงานวิจัย</b> .....	39
<b>ประวัติผู้วิจัย</b> .....	40
หัวหน้าโครงการวิจัย .....	40
ผู้ร่วมโครงการวิจัย .....	45

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 การออกแบบแผ่นทดสอบยาฆ่าแมลงตกค้างที่ใช้การเปลี่ยนแปลงสีโดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส .....	10
ตารางที่ 1 การออกแบบแผ่นทดสอบยาฆ่าแมลงตกค้างที่ใช้การเปลี่ยนแปลงสีโดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (ต่อ) .....	11
ตารางที่ 1 การออกแบบแผ่นทดสอบยาฆ่าแมลงตกค้างที่ใช้การเปลี่ยนแปลงสีโดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (ต่อ) .....	12
ตารางที่ 2 ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดของคาร์โบฟูแรนในผักตามข้อกำหนดของ มกอช. ....	14
ตารางที่ 3 ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดของคลอร์ไพริฟอสในผักตามข้อกำหนดของ มกอช.....	15
ตารางที่ 4 สืบบนแผ่นทดสอบที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของคาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 0.0224 ppm กับเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	22
ตารางที่ 5 สืบบนแผ่นทดสอบที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของคาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 0.112 ppm กับเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	23
ตารางที่ 6 สืบบนแผ่นทดสอบที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของคาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 0.56 ppm กับเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ .....	23
ตารางที่ 7 สืบบนแผ่นทดสอบที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของคาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 1.4 ppm กับเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	24
ตารางที่ 8 สืบบนแผ่นทดสอบที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของคาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 2.8 ppm กับเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	24
ตารางที่ 9 สีที่เกิดจากปฏิกิริยาของอินดอกซิลอะซิเตทที่ความเข้มข้น 200, 50 และ 10 mM กับเอนไซม์ความเข้มข้น 10.72 U/mL ที่เวลาต่างๆ (ซ้ำที่ 1) .....	30
ตารางที่ 10 สีที่เกิดจากปฏิกิริยาของอินดอกซิลอะซิเตทที่ความเข้มข้น 200, 50 และ 10 mM กับเอนไซม์ความเข้มข้น 10.72 U/mL ที่เวลาต่างๆ (ซ้ำที่ 2) .....	31
ตารางที่ 11 การเปลี่ยนสีที่เวลาต่างๆ หลังทำปฏิกิริยากับยาฆ่าแมลงกับเอนไซม์ 5 นาที .....	32
ตารางที่ 12 การเปลี่ยนสีที่เวลาต่างๆ หลังทำปฏิกิริยากับยาฆ่าแมลงกับเอนไซม์ 10 นาที .....	33
ตารางที่ 13 การเปลี่ยนสีที่เวลาต่างๆ หลังทำปฏิกิริยากับยาฆ่าแมลงกับเอนไซม์ 15 นาที .....	34
ตารางที่ 14 ชุดทดสอบลักษณะระบบสารละลายใช้สำหรับตรวจสอบยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตชนิดคลอไพริฟอส .....	35

## สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 โครงสร้างทั่วไปของยาฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมต .....	2
ภาพที่ 2 ตัวอย่างโครงสร้างยาฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมต .....	3
ภาพที่ 3 โครงสร้างทั่วไปของยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต .....	4
ภาพที่ 4 ตัวอย่างโครงสร้างยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต .....	4
ภาพที่ 5 ปฏิกิริยาไฮโดไลซิสของอินดอกซิลอะซีเตทโดยมีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา .....	6
ภาพที่ 6 การยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition) ด้วยยับยั้งเข้าแย่งจับกับสารตั้งต้นที่บริเวณเร่งของเอนไซม์.....	7
ภาพที่ 7 การติดตามการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) โดยพิจารณากรดอะซีติกที่เกิดขึ้น (A) , โดยใช้ indoxyl acetate (B1), indophenyl acetate (B2) และ โดยใช้วิธีของ Ellman (C) ..	9
ภาพที่ 8 การตัดกระดาษกรองของแผ่น A และแผ่น B .....	16
ภาพที่ 9 (ก) กระดาษแผ่น A และแผ่น B ที่ผ่านการเคลือบด้วยเทียนสีขาว (ข) แผ่นทดสอบที่ใช้ในการตรวจสอบยาฆ่าแมลง .....	17
ภาพที่ 10 รูปแบบแผ่นทดสอบยาฆ่าแมลง .....	17
ภาพที่ 11 ภาพถ่ายและค่าสี (-b*) ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างอินดอกซิลอะซีเตทกับเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่เวลาต่างๆ .....	21
ภาพที่ 12 ผลการทดสอบชุดทดสอบคาร์โบฟูแรนที่ความเข้มข้น 0.28 ppm .....	25
ภาพที่ 13 ผลการทดสอบชุดทดสอบคาร์โบฟูแรนที่ความเข้มข้น 1.5 ppm .....	26
ภาพที่ 14 กราฟมาตรฐานของคาร์โบฟูแรนจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC .....	26
ภาพที่ 15 โครมาโทแกรมจาก (ก) ตัวอย่างถั่วฝักยาวที่ไม่ได้พ่นยาฆ่าแมลงและ (ข) ตัวอย่างที่พ่นด้วยคาร์โบฟูแรนเข้มข้น 46.6 ppm .....	27
ภาพที่ 16 การทดสอบบนชุดทดสอบกับตัวอย่างที่ไม่มียาฆ่าแมลงปนเปื้อนอยู่ .....	28
ภาพที่ 17 การทดสอบบนแผ่นตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นของตัวอย่างที่มีคาร์โบฟูแรนตกค้าง 1.01 ppm .....	28
ภาพที่ 18 การทดสอบการตกค้างของคาร์โบฟูแรนในตัวอย่างที่สกัดจากถั่วฝักยาว (ความเข้มข้น 1.01 ppm) ด้วยชุดทดสอบ GT test kit.....	29

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ในการผลิตผลผลิตทางการเกษตรมีการใช้ยาฆ่าแมลงเพื่อป้องกันการถูกทำลายจากศัตรูพืช ยาฆ่าแมลงเป็นสารพิษที่สามารถเข้าสู่ร่างกายได้หลายวิธี โดยการบริโภคเป็นการนำสารพิษเข้าสู่ร่างกายได้ในปริมาณมากกว่าการรับสารพิษในทางอื่นๆ เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคจึงต้องมีการตรวจสอบการปนเปื้อนหรือการตกค้างของยาฆ่าแมลงในผักผลไม้ซึ่งวิธีที่นิยมใช้ตรวจสอบปริมาณยาฆ่าแมลงได้แก่ วิธี Gas Chromatography (GC) และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณยาฆ่าแมลงได้อย่างถูกต้องแม่นยำและมีความไวสูงสามารถวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนในระดับที่ต่ำมาก แต่วิธีเหล่านี้มีข้อจำกัดคือ มีความยุ่งยากซับซ้อน ต้องทำในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือพร้อมจึงไม่สะดวกในการใช้งานนอกสถานที่ซึ่งต้องใช้บุคลากรที่ผ่านการฝึกอบรมเป็นอย่างดี และมีต้นทุนในด้านเครื่องมือสูง นอกจากนี้การใช้ชุดทดสอบอย่างง่าย (test kit) เพื่อการตรวจสอบการปนเปื้อนของยาฆ่าแมลงเบื้องต้นเป็นวิธีที่ปฏิบัติโดยทั่วไปในการตรวจจับวัตถุพิษของโรงงานอุตสาหกรรมเนื่องจากใช้เวลาสั้นกว่าและให้ผลได้ทันที นอกจากนี้การใช้งานชุดทดสอบโดยทั่วไปจะไม่ซับซ้อนจึงสามารถปฏิบัติได้ในโรงงานอุตสาหกรรมทั่วไป อย่างไรก็ตามชุดทดสอบการปนเปื้อนยาฆ่าแมลงที่มีจำหน่ายในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นแบบที่บอกว่ามีการปนเปื้อนในระดับที่ปลอดภัยหรือไม่เท่านั้น ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะพัฒนาชุดทดสอบยาฆ่าแมลงที่มีขั้นตอนการตรวจสอบไม่ซับซ้อน และสามารถอ่านผลและบอกช่วงการปนเปื้อนได้จากการมองด้วยตาเปล่าโดยใช้หลักการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

### 1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาชุดทดสอบที่สามารถบอกปริมาณยาฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตชนิดคาร์โบฟูเรนและกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตชนิดคลอร์ไพริฟอสที่ตกค้างในผัก

## การตรวจเอกสาร

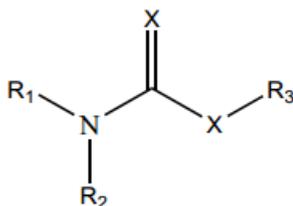
### 2.1 ชนิดของยาฆ่าแมลง

ยาฆ่าแมลงสามารถแบ่งได้ 4 ประเภท

#### 2.1.1 คาร์บาเมต (Carbamate)

คาร์บาเมตเป็นยาฆ่าแมลงกลุ่มที่นิยมใช้ในปัจจุบัน โดยส่วนใหญ่เป็นสารเคมีที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase) แบบย้อนกลับได้ มีความเป็นพิษต่อมนุษย์ค่อนข้างต่ำ สลายตัวได้เร็ว จึงตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้น้อยและสามารถใช้กำจัดแมลงได้เทียบเท่ากับยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (ปรียานูช, 2559)

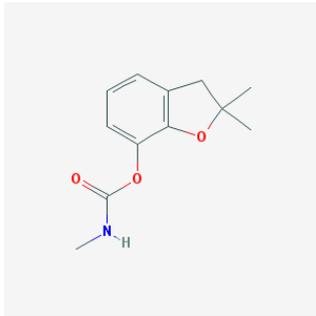
ยาฆ่าแมลงกลุ่มนี้มีโครงสร้างเป็นอนุพันธ์ของกรดคาร์บามิก ( $\text{NH}_2\text{COOH}$ ) ดังภาพที่ 1 ซึ่ง X แทน oxygen หรือ sulphur (thiocarbamate),  $\text{R}_1$  แทนหมู่แอลคิล (alkyl group),  $\text{R}_2$  แทนหมู่แอลคิล (alkyl group) หรือไฮโดรเจน และ  $\text{R}_3$  แทน organic group ทั้ง aromatic หรือ heterocyclic หรือโลหะ (Colovi และคณะ, 2013)



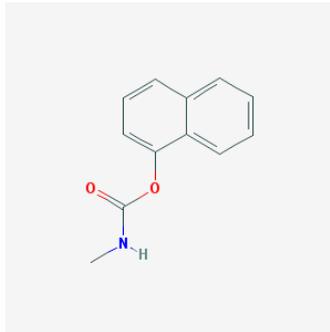
ภาพที่ 1 โครงสร้างทั่วไปของยาฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมต

ที่มา: Mirjana และคณะ (2013)

ตัวอย่างยาฆ่าแมลงกลุ่มนี้ เช่น Carbofuran, Carbaryl, Methomyl, Propoxur, Aldicarb และ Methiocarb เป็นต้น โครงสร้างยาฆ่าแมลงกลุ่มนี้แสดงดังภาพที่ 2



Carbofuran



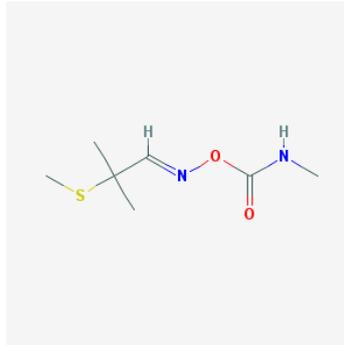
Carbaryl



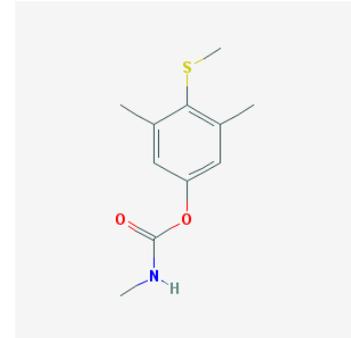
Methomyl



Propoxur



Aldicarb



Methiocarb

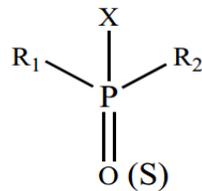
ภาพที่ 2 ตัวอย่างโครงสร้างยาฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมต  
ที่มา: PubChem

### 2.1.2 ออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphate)

ออร์กาโนฟอสเฟตเป็นยาฆ่าแมลงกลุ่มที่นิยมใช้ในปัจจุบัน เป็นสารเคมีที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบสำคัญ มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสแบบถาวร มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงสูงและสลายตัวได้อย่างรวดเร็ว เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมต่ำเมื่อเทียบกับยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน แต่มีความเป็นพิษค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับยาฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมต (ปริญานุช, 2559)

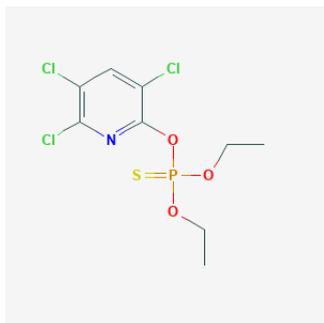
ออร์กาโนฟอสเฟต เป็นสารเอสเตอ์ของกรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) โครงสร้างประกอบด้วยอะตอมกลางเป็นฟอสฟอรัส (P) ซึ่งสามารถสร้างพันธะคู่กับออกซิเจน (P=O) เรียกว่า phosphoric bond หรือสร้างพันธะคู่กับซัลเฟอร์ (P=S) เรียกว่า thiophosphoric bond นอกจากนี้ประกอบด้วย X ด้วย leaving group และ R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> แทนหมู่อัลคอกซี (alkoxy group) หรือ หมู่อัลคิล (Alkyl group) โครงสร้างดังภาพที่ 3 (Eleršek และ Filipič, 2011) โดยยาฆ่าแมลงแต่ละตัวมีหมู่ Leaving group ที่แตกต่างกันซึ่งอัตราการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับหมู่ leaving group ยาฆ่าแมลงที่มีหมู่ leaving group เป็นฟลูออรีน (F) จะมีความเป็นพิษสูงจะมีโอกาสเกิดปฏิกิริยาไฮโดไลซิสและมี

ความสามารถในการเข้ายับยั้งเอนไซม์ได้สูง ส่วนยาฆ่าแมลงที่มีความเป็นพิษต่ำจะมีหมู่ leaving group เป็น หมู่อัลคิล (alkyl groups) หรือ หมู่แอริล (aryl groups) และ R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> เป็นหมู่อัลคอกซี (alkoxy group) (Eleršek และ Filipič, 2011)

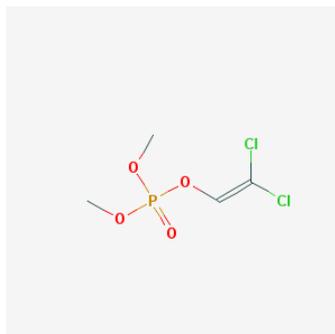


ภาพที่ 3 โครงสร้างทั่วไปของยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต  
ที่มา: Marrazza (2014)

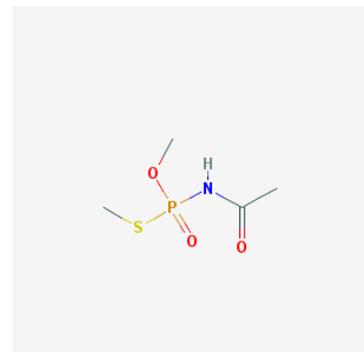
ตัวอย่างยาฆ่าแมลงกลุ่มนี้ เช่น Chlorpyrifos, Dichlorvos, Acephate , Omethoate, Malathion และ Methamidophos เป็นต้นโครงสร้างยาฆ่าแมลงกลุ่มนี้ดังภาพที่ 4



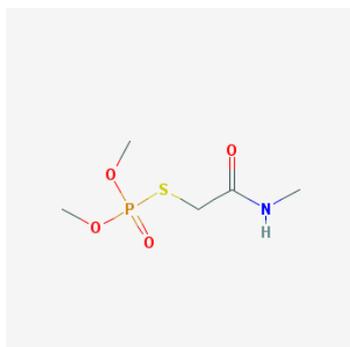
Chlorpyrifos



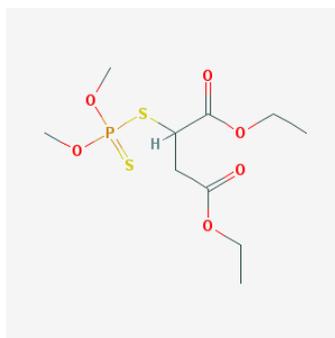
Dichlorvos



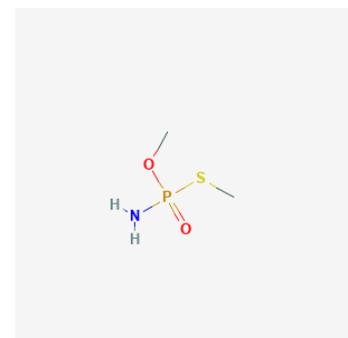
Acephate



Omethoate



Malathion



Methamidophos

ภาพที่ 4 ตัวอย่างโครงสร้างยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต  
ที่มา: PubChem

### 2.1.3 ออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine)

เป็นยาฆ่าแมลงกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ กลไกการออกฤทธิ์ยังไม่ทราบแน่ชัด ในปัจจุบันทั่วโลกได้ยกเลิกการใช้สารกลุ่มนี้แล้วเนื่องจากมีความคงทนในสภาวะแวดล้อมสูงและอันตรายต่อร่างกายหากได้รับสารจะเกิดอาการพิษเฉียบพลัน (ปรียานุช, 2559) ตัวอย่างยาฆ่าแมลงกลุ่มนี้ เช่น DDT, Chlordane, Aldrin, Dieldrin, Endrin, Endosulfan และ Dicofol เป็นต้น

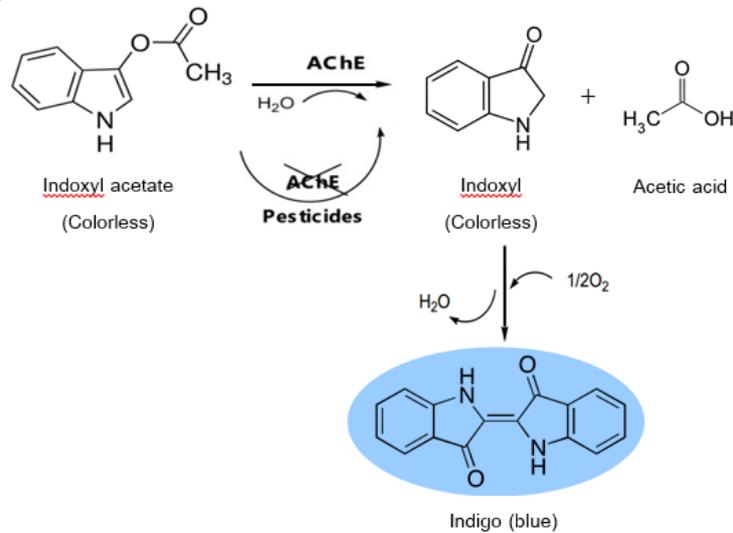
### 2.1.4 ไพรีทรัม (Pyrethrum)

เป็นยาฆ่าแมลงที่สกัดได้จากดอกไม้ตระกูลเบญจมาศ สารที่ได้เรียกว่าไพรีทริน (Pyrethrins) ต่อมาสามารถสังเคราะห์สารที่มีโครงสร้างเลียนแบบไพรีทรินได้และเรียกว่าไพเรทรอยด์ (Pyrethroids) มีคุณสมบัติฆ่าแมลงเช่นเดียวกันแต่ประสิทธิภาพสูงกว่า มีพิษต่อแมลงสูงแต่ความเป็นพิษต่อมนุษย์ต่ำแต่ราคาสูงจึงไม่เป็นที่นิยม ตัวอย่างยาฆ่าแมลงกลุ่มนี้ เช่น Allethrin, Prothrin, Proparathrin และ Cyfluthrin เป็นต้น

## 2.2 หลักการทำงานของชุดทดสอบการตกค้างของยาฆ่าแมลง

ชุดทดสอบการตกค้างของยาฆ่าแมลงที่พบได้บ่อยเป็นชนิดที่อาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (AChE) โดยยาฆ่าแมลง ซึ่งสารตั้งต้นของปฏิกิริยามีหลายชนิด สารตั้งต้นที่ทำให้เกิดสีได้เองหลังการเกิดปฏิกิริยา (Chromogenic reagent) ทำให้ง่ายต่อการวิเคราะห์ไม่ต้องทำปฏิกิริยาหลายขั้นตอนเป็นวิธีที่ได้รับการศึกษามากขึ้นในปัจจุบัน ตัวอย่างสารกลุ่มนี้ได้แก่ Indoxyl acetate (ไม่มีสี) เมื่อเกิดปฏิกิริยาจะให้สีฟ้า-เขียว และ Indophenyl acetate (แดง) เมื่อเกิดปฏิกิริยาจะให้สีฟ้า-ม่วง ในการวิจัยครั้งนี้เลือกใช้ Indoxyl acetate เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาเนื่องจากสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีได้ง่าย (Han และคณะ, 2012)

สารตั้งต้น Indoxyl acetate (ไม่มีสี) เกิดปฏิกิริยาไฮโดไลซิสได้โดยมีเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้ได้สารอินดอกซิล (ไม่มีสี) และกรดอะซิติก จากนั้นสารอินดอกซิลจะถูกออกซิไดซ์อย่างรวดเร็วเมื่อสัมผัสกับอากาศทำให้ได้สารอินดิโก (สีฟ้า) (ภาพที่ 5) ซึ่งสามารถเห็นสีได้บนแผ่นทดสอบหรือในระบบสารละลาย ดังนั้นหากในตัวอย่างที่ทำทดสอบมียาฆ่าแมลงปนเปื้อนอยู่ยาฆ่าแมลงจะออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทำให้ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้ส่งผลให้บนแผ่นทดสอบหรือสารละลายปรากฏความเข้มของสีฟ้าที่แตกต่างกันออกไป โดยความเข้มของสีฟ้าขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของยาฆ่าแมลง หากความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงมากขึ้นความเข้มของสีฟ้าจะลดลงและเมื่อถึงจุดที่ไม่ปรากฏสีแสดงว่าเอนไซม์ถูกยาฆ่าแมลงยับยั้งอย่างสมบูรณ์เนื่องจากความเข้มข้นยาฆ่าแมลงมากกว่าความเข้มข้นเอนไซม์ (Guo และคณะ, 2013)



ภาพที่ 5 ปฏิกริยาไฮโดไลซิสของอินดอกซิลอะซีเตตโดยมีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา  
ที่มา: Apilux และ คณะ (2015)

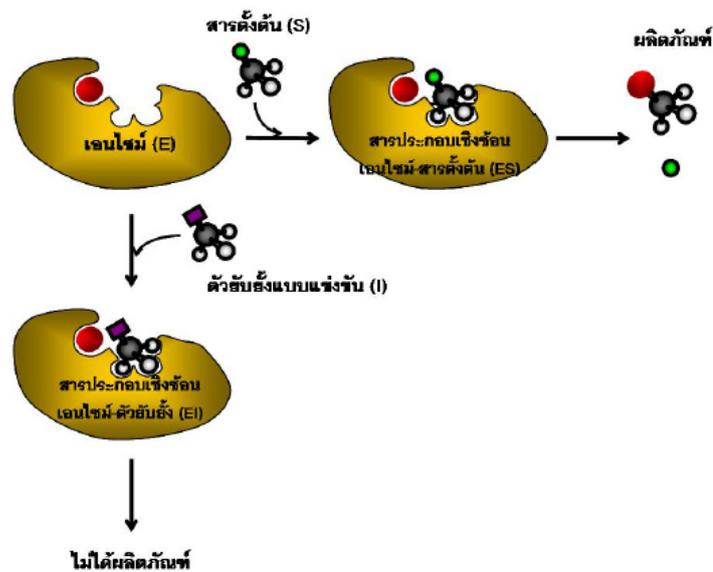
### 2.3 กลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส

เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสเป็นเอนไซม์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดไลซิสของโคลีนเอสเตอ์ ซึ่งเอนไซม์ประกอบด้วยบริเวณเร่ง (Active site) 2 ตำแหน่ง ได้แก่ Anionic subsite และ Esteratic subsite ซึ่งมีกรดอะมิโนชนิดเซรีนอยู่ ยาฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตและออร์กาโนฟอสเฟตสามารถยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสได้ ซึ่งยาฆ่าแมลง 2 กลุ่มนี้มีกลไกการยับยั้งที่คล้ายคลึงกัน แต่แตกต่างกันที่รูปแบบในการยับยั้ง สำหรับยาฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตเป็นการยับยั้งแบบผันกลับได้ (Reversible) และยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตเป็นการยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ (Irreversible) (Colovi และคณะ, 2013)

#### 2.3.1 การยับยั้งแบบผันกลับได้ (Reversible)

สำหรับยาฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตมีกลไกการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสโดยหมู่แทนที่คาร์บาเมตจะเข้าจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ที่ตำแหน่งเดียวกับที่ซับสเตรทเข้าทำปฏิกิริยา เรียกการยับยั้งแบบนี้ว่าการยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition) (ดังภาพที่ 6) เนื่องจากตัวยับยั้งมีโครงสร้างคล้ายกับซับสเตรทจึงสามารถแย่งจับกับเอนไซม์ได้ การยับยั้งแบบนี้สามารถผันกลับได้ เนื่องจากเมื่อตัวยับยั้งจับกับเอนไซม์จะสร้างพันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ทำให้ได้สารประกอบเชิงซ้อนที่มีความเสถียรต่ำ (Carbamylated enzyme) ดังนั้นตัวยับยั้งสามารถหลุดจากเอนไซม์ได้ง่ายกว่ากลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตแต่ยากกว่าซับสเตรทและอัตราการเข้าจับกับเอนไซม์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวยับยั้งหรือ

ยับยั้ง หากตัวใดมีความเข้มข้นมากกว่าก็จะเข้าจับกับเอนไซม์ได้ดีกว่า ซึ่งถ้าต้องการกำจัดตัวยับยั้งออกสามารถทำได้โดยเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรทให้สูงกว่าตัวยับยั้งเพื่อที่จะแย่งจับบริเวณเร่งและทำให้ตัวยับยั้งหลุดไปจากบริเวณเร่งได้ ผลิตรากษณ์ที่ได้จึงเป็นผลิตรากษณ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างซับสเตรทและเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส ซึ่งคือสารสีฟ้าและถ้าเพิ่มความเข้มข้นของตัวยับยั้งให้สูงกว่าซับสเตรทก็จะไม่เกิดผลิตรากษณ์ (ปราณี, 2556)



ภาพที่ 6 การยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition) ตัวยับยั้งเข้าแย่งจับกับสารตั้งต้นที่บริเวณเร่งของเอนไซม์

ที่มา: พัชรา (2543)

### 2.3.2 การยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ (Irreversible)

สำหรับยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตมีกลไกการยับยั้งโดยหมู่ฟอสเฟตจะเข้าจับเอนไซม์และสร้างพันธะโควาเลนต์กับหมู่ไฮดรอกซิลซึ่งเป็นหมู่ข้างของกรดอะมิโนชนิดเซอรีนบนบริเวณเร่งของเอนไซม์ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีความเสถียรสูง (phosphorylated enzyme) ส่งผลให้โครงสร้างพื้นฐานของเอนไซม์เปลี่ยนไปและไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถจับกับซับสเตรทและไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาต่อไปได้ (ปราณี, 2556)

## 2.4 แผ่นทดสอบยาฆ่าแมลงโดยใช้ AChE

แผ่นทดสอบยาฆ่าแมลงที่ใช้ AChE ส่วนใหญ่แล้วเป็นการติดตามการทำงานของ AChE โดยอาศัยการเกิดสี (colorimetric) ของปฏิกิริยาเคมีซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ ดังนี้

### 1). การทดสอบกรดที่เกิดขึ้นด้วย pH indicator

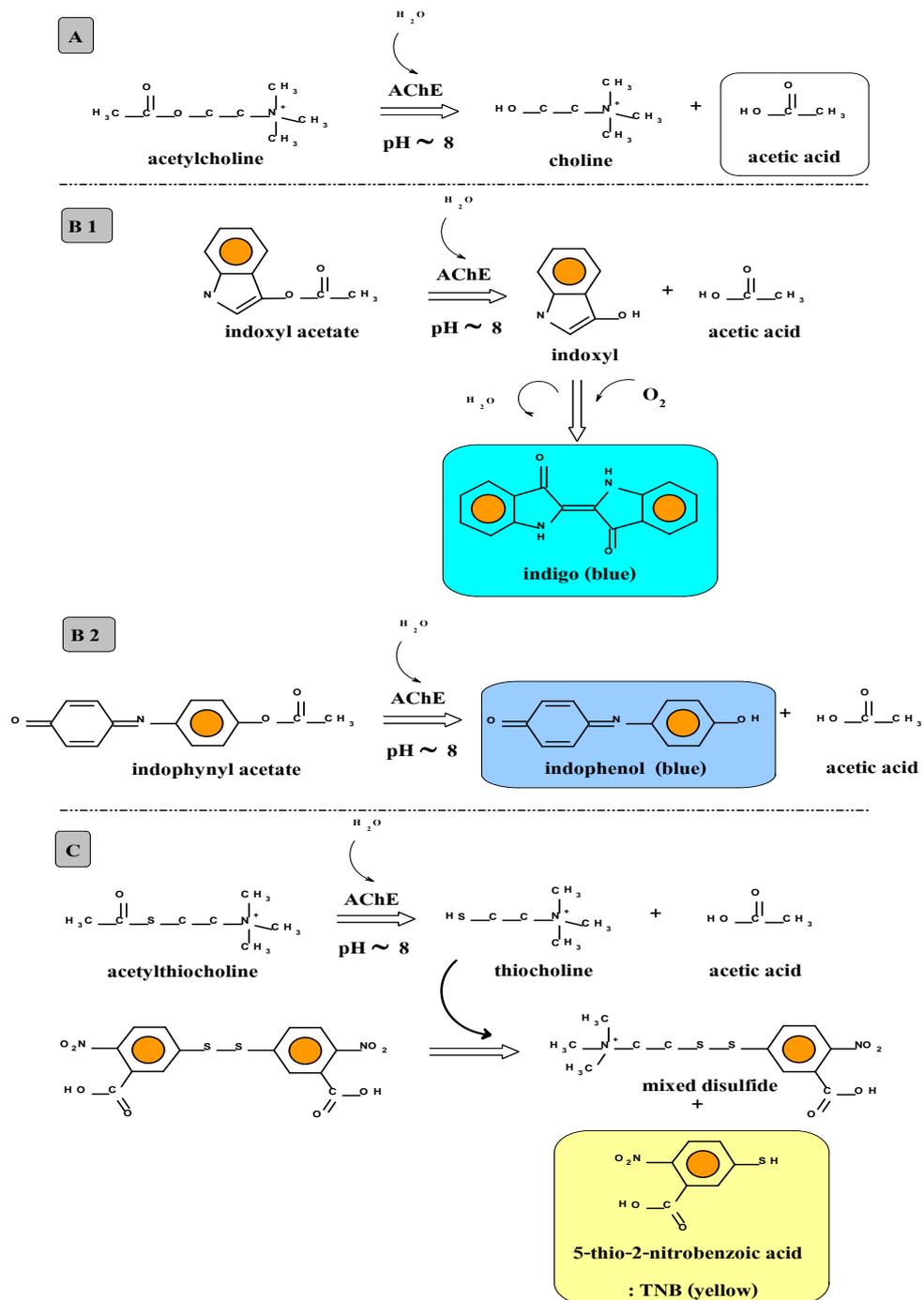
เมื่อสารประกอบเอสเทอร์ของกรดอะเซติกถูกไฮโดรไลซ์โดยมี AChE เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแล้วจะได้ผลิตภัณฑ์คือกรดอะเซติกทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ซึ่งสามารถติดตามได้โดยการดูการเปลี่ยนสีของสารที่เป็นอินดิเคเตอร์ (Miao และคณะ, 2010) ดังแสดงในภาพที่ 7 (A) Thantong และคณะ (2008) ได้ใช้หลักการนี้ในการพัฒนาชุดทดสอบสารฆ่าแมลงกลุ่ม organophosphate และ carbamate โดยชุดทดสอบประกอบด้วย แผ่นดูดซับยาฆ่าแมลงจากสารสกัดผักและผลไม้ จากนั้นนำแผ่นดูดซับมาเติมสารละลายบัฟเฟอร์ และ AChE แล้วปิดทับด้วยกระดาษทดสอบสีเพื่ออ่านผลโดยสังเกตสีของกระดาษทดสอบที่เปลี่ยนไป ชุดทดสอบนี้สามารถตรวจยาฆ่าแมลงตกค้างได้ในระดับต่ำถึง 0.05 ppm

### 2). การทดสอบด้วยสารตั้งต้นที่เกิดสีได้ (chromogenic substrate)

การไฮโดรไลซ์สารตั้งต้นที่เกิดสีได้ อย่างเช่น indoxyl acetate หรือ indophenyl acetate สามารถใช้ในการติดตามการทำงานของ AChE ได้เช่นกัน โดยที่วิธีนี้ไม่ต้องอาศัยอินดิเคเตอร์ใดๆ เนื่องจากสามารถสังเกตสีของสารตั้งต้นที่เปลี่ยนไปได้ทันทีหลังจากที่ปฏิกิริยาสิ้นสุดลง ในกรณีของ indoxyl acetate ซึ่งตามปกติเป็นสารที่ไม่มีสี แต่เมื่อถูกไฮโดรไลซ์แล้วจะให้สารประกอบ indoxyl ที่จะเปลี่ยนเป็นสีฟ้าเมื่อทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศ ดังแสดงในภาพที่ 7 (B1) Pohanka และคณะ (2010) สำหรับ indophenyl acetate นั้น ปกติให้สีแดง แต่สามารถเปลี่ยนเป็นสีฟ้าจนถึงสีม่วงแดงได้หลังจากถูกไฮโดรไลซ์ ดังภาพที่ 7 (B2) อย่างไรก็ตาม การใช้ indophenyl acetate เป็นสารตั้งต้นในการตรวจสอบการทำงานของ AChE อาจทำให้การวิเคราะห์ผลคลาดเคลื่อนได้เนื่องจากเกิดการซ้อนทับกันของสี (color overlapping) ระหว่างสารตั้งต้นกับผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (Han และคณะ, 2012)

### 3). การทดสอบด้วยวิธีของ Ellman

การติดตามการทำงานของ AChE ด้วยวิธีของ Ellman อาศัยหลักการตรวจสอบหมู่ซัลไฟด์ริล (sulfhydryl group) ในสารละลายด้วยสาร 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) หรือ DTNB ซึ่งจากภาพที่ 7 (C) จะเห็นว่า เมื่อ acetylthiocholine (ATCh) ถูกเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วย AChE แล้ว จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด คือ กรดอะเซติก และ thiocholine ซึ่งมีหมู่ซัลไฟด์ริลอิสระอยู่ในโครงสร้าง จึงทำให้ thiocholine สามารถทำปฏิกิริยากับ DTNB และเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่เรียกว่า mixed disulfide กับผลิตภัณฑ์ที่มีสีเหลือง นั่นก็คือ 5-thio-2-nitrobenzoic acid หรือ TNB ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ 412 นาโนเมตร อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับการทำงานของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ chromogenic substrate แล้ว วิธีของ Ellman มีขั้นตอนที่ยุ่งยากกว่าเล็กน้อย แต่วิธีของ Ellman ก็ยังเป็นที่ยอมรับมาก เนื่องจากให้ค่าอัตราการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้น (turnover rate) สูงกว่า indoxyl acetate นอกจากนี้สาร TNB ที่เกิดขึ้นยังมีความเสถียรในช่วงค่า pH เท่ากับ 7.6 ถึง 8.6 ซึ่งเป็นช่วงที่ AChE ทำงานได้เป็นอย่างดี



ภาพที่ 7 การติดตามการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (AChE) โดยพิจารณากรดอะซิติคที่เกิดขึ้น (A) , โดยใช้ indoxyl acetate (B1), indophenyl acetate (B2) และ โดยใช้วิธีของ Ellman (C)

ตารางที่ 1 การออกแบบแผ่นทดสอบยาฆ่าแมลงตกค้างที่ใช้การเปลี่ยนแปลงสีโดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

เอนไซม์	สารตั้งต้น	ชนิดวัสดุ ของแผ่น ทดสอบ	วิธีตรึงเอนไซม์	ตัวอย่างที่ทดสอบ	ค่า LOD ของการทดสอบ / IC <sub>50</sub>	อายุการใช้งาน	อ้างอิง
AChE จาก ปลาไหล ไฟฟ้า	Acetylthiocholine iodide DTNB	Hybond N <sup>+</sup> membrane	หยุด AChE ลงบนแผ่น เมมเบรนแล้วทำแห้งด้วย freeze dried	1. ยาฆ่าแมลงกลุ่มออกแกโน ฟอสเฟตและคาร์บาเมต 2. สารสกัดจากผักและผลไม้ ที่สกัดด้วยเมทานอล	LOD = 1 µg/mL (omethoate) LOD = 0.1 µg/mL (dichlorvos) LOD = 2 µg/mL (methamidophos) LOD = 0.05 µg/mL (chlorpyrifos) LOD = 1.5 µg/mL (carbaryl) LOD = 0.8 µg/mL (pirimicarb.)	2 เดือนที่อุณหภูมิ ห้อง (20-37 °C)	Guo และ คณะ (2013)
AChE จาก เซลล์เม็ด เลือดแดง ของมนุษย์	Acetylcholine chloride	pH indicator strip	หยุด AChE ลงบน pH indicator strip แล้วทำแห้ง โดยปล่อยให้แห้งทั้งคืนใน dry chamber ที่อุณหภูมิ ด้วย GA	ยาฆ่าแมลงกลุ่มออกแกโน ฟอสเฟต	LOD = 5 × 10 <sup>-8</sup> M (paraoxon-ethyl) LOD = 5 × 10 <sup>-9</sup> M (sarin)	อย่างน้อย 1 เดือน	Pohanka และคณะ (2010)

ตารางที่ 1 การออกแบบแผ่นทดสอบยาฆ่าแมลงตกค้างที่ใช้การเปลี่ยนแปลงสีโดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (ต่อ)

เอนไซม์	สารตั้งต้น	ชนิดวัสดุ ของแผ่น ทดสอบ	วิธีเรียงเอนไซม์	ตัวอย่างที่ทดสอบ	ค่า LOD ของการทดสอบ / IC <sub>50</sub>	อายุการใช้ งาน	อ้างอิง
AChE จาก ปลาไหล ไฟฟ้า	Indophenyl acetate (IPA)	กระดาษ กรอง Whatman เบอร์ 1	ตรึง AChE กับ IPA ใต้คนละ ฝั่งของแผ่น กระดาษ แล้วใช้ sodium silicate sol ในการ entrap สารทั้งสองไว้ ใน ลักษณะการพิมพ์ทับเป็น ชั้นๆ ดังนี้ silica/AChE/silica	1. ยาฆ่าแมลงกลุ่มออกแกโน ฟอสเฟตและคาร์บาเมต2. น้ำผลไม้ 3. พ่นยาบนผิวแอปเปิ้ลและ ผักกาดทิ้งไว้ 48 ชม. แล้ว ใช้ สำลี swab ไล่ลงในน้ำ	LOD ~ 1 nM (bendiocarb) LOD ~ 10 nM (carbaryl) LOD ~ 1 nM (paraoxon) LOD ~ 10 nM (malathion)	อย่างน้อย 1 เดือนที่อุณหภูมิ 4 °C	Hossain และ คณะ (2009)
AChE จาก ปลาไหล ไฟฟ้า	Indophenyl acetate (IPA)	Hybond N <sup>+</sup> membrane	หยด AChE ลงบนเมมเบรน แล้วทำแห้งที่อุณหภูมิห้อง	1. ยาฆ่าแมลงกลุ่มออกแกโน ฟอสเฟตและคาร์บาเมต 2. สารสกัดจากผักและข้าวที่ พ่นยาฆ่าแมลงทิ้งไว้ 24 ชม. โดยสกัดด้วยเมทานอล	LOD = 10 <sup>-6</sup> – 10 <sup>2</sup> µg/mL (ออกแกโนฟอสเฟต) LOD = 10 <sup>-6</sup> – 10 <sup>0</sup> µg/mL (คาร์บาเมต)	2 เดือนที่ อุณหภูมิ 4 °C	No และ คณะ (2007)
AChE จาก ปลาไหล ไฟฟ้า	Acetylthiocholine iodide DTNB	กระดาษ กรอง Munktell เบอร์ 1	บ่มกระดาษที่ 120 °C 25 นาที่ ก่อนจะนำไปติดบน แผ่นพลาสติก จากนั้นตรึง AChE ที่ผสมกับ DTNB ลง ไป รอให้แห้ง	Malathion	LOD = 2.5 ppm	2 เดือนที่ อุณหภูมิ 4 °C	Kavruk และคณะ (2013)

ตารางที่ 1 การออกแบบแผ่นทดสอบยาฆ่าแมลงตกค้างที่ใช้การเปลี่ยนแปลงสีโดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (ต่อ)

เอนไซม์	สารตั้งต้น	ชนิดวัสดุ ของแผ่น ทดสอบ	วิธีเรียงเอนไซม์	ตัวอย่างที่ทดสอบ	ค่า LOD ของการทดสอบ / IC <sub>50</sub>	อายุการใช้ งาน	อ้างอิง
AChE จาก แมลงหวี่ที่ ผ่านการตัด ต่อ พันธุกรรม	Indoxyl acetate	กระดาษ กรอง Whatman เบอร์ 1	จุ่มกระดาษกรองลงใน สารละลาย AChE ที่ผสม กับ gelatin นำขึ้นมาผึ่ง ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง	1. ยาฆ่าแมลงกลุ่ม	IC <sub>50</sub> = 0.06 µg/mL (carbofuran)	4 เดือนที่ อุณหภูมิ 4 °C	Han และ คณะ (2012)
				organophosphate และ	IC <sub>50</sub> = 0.28 µg/mL (methomyl)		
				carbamate	IC <sub>50</sub> = 0.03 µg/mL (dichlorvos)		
				2. ผักที่พ่นยาทิ้งไว้ 24 ชม. แล้วสกัดด้วยสารละลาย	IC <sub>50</sub> = 31.6 µg/mL (methamidophos)		
				ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2	IC <sub>50</sub> = 2.0 µg/mL (monocrotophos) IC <sub>50</sub> = 6.3 µg/mL (omethoate)		
AChE จาก bovine	Acetylcholine bromide	กระดาษ กรอง	หยด AChE ลงบน กระดาษกรองที่ดูดซับสาร จากตัวอย่าง วาง กระดาษทดสอบสีที่บดลง ไป แล้วสังเกตการเปลี่ยน สี	1. ยาฆ่าแมลงกลุ่ม organophosphate และ carbamate 2. สารสกัดผักและผลไม้ ด้วยน้ำกรอง	LOD = 0.05 ppm	-	Thantong และคณะ (2008)

## 2.5 ยาฆ่าแมลงในการทดลอง

ในการวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาชุดทดสอบขึ้น 2 แบบ คือชุดทดสอบที่มีลักษณะเป็นแผ่นทดสอบเหมาะสำหรับยาฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตชนิดคาร์โบฟูแรนและชุดทดสอบที่มีลักษณะเป็นระบบสารละลายเหมาะสำหรับยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตชนิดคลอร์ไพริฟอส โดยชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นอาศัยหลักการเดียวกันคือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส และสามารถบอกปริมาณยาฆ่าแมลงได้จากสีที่ปรากฏบนแผ่นทดสอบหรือสารละลาย โดยปริมาณยาฆ่าแมลงที่ชุดทดสอบสามารถอ่านได้อ้างอิงจากค่าปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit; MRLs) ในผักตามข้อกำหนดของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

### 2.4.1 คาร์โบฟูแรน

สำหรับยาฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตเลือกใช้คาร์โบฟูแรนเนื่องจากเป็นสารก่อมะเร็งและจัดเป็นสารกำจัดศัตรูพืชที่ห้ามใช้และไม่ได้รับอนุญาตให้ขึ้นทะเบียน จากข้อมูลผลการเฝ้าระวังสารเคมีกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักประจำปี 2559 ของเครือข่ายเตือนภัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืช พบว่าส่วนมากตรวจพบในผักจำพวก พริกแห้ง พริกสด ผักตระกูลกะหล่ำ แตงกวาตามลำดับโดยค่า MRL ของผักจะอยู่ในช่วง 0.02 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ถึง 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ดังตารางที่ 1 (มกอช, 2557)

### 2.4.2 คลอไพริฟอส

สำหรับยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตเลือกใช้คลอไพริฟอส เนื่องจากข้อมูลผลการเฝ้าระวังสารเคมีกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักประจำปี 2558 ของเครือข่ายเตือนภัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืช พบว่าเป็นยาฆ่าแมลงที่ตรวจพบการตกค้างในผักผลไม้หลายชนิดมากที่สุด ส่วนมากจะพบในผักจำพวก พริกแดง มะเขือเปราะ คะน้า กะเพรา กวางตุ้ง และแตงกวา เป็นต้น โดยค่า MRL ของผักจะอยู่ในช่วง 0.05 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ถึง 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ดังตารางที่ 2 (มกอช, 2557)

ตารางที่ 2 ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดของคาร์โบฟูแรนในผักตามข้อกำหนดของ มกอช.

ชนิดของยาฆ่าแมลง	สินค้าเกษตร	ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด, MRL (mg/kg)
คาร์โบฟูแรน	พริกแห้ง	2
	เมล็ดกาแฟ	1
	พริก	0.5
	กระถิน	0.2
	ถั่วเขียว	0.2
	กระเจี๊ยบเขียว	0.15
	ถั่วลันเตาฝักสด	0.15
	เมล็ดละหู่	0.1
	เมล็ดถั่วลิสง	0.1
	เมล็ดงา	0.1
	เมล็ดฝ้าย	0.1
	ข้าวฟ่าง	0.1
	ข้าวสาร	0.1
	มะเขือ	0.1
	มันเทศ	0.1
	ถั่วฝักยาว	0.1
	ถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง	0.1
	หน่อไม้ฝรั่ง	0.06
	ข้าวโพดเมล็ดแห้ง	0.05
	เมล็ดโกโก้	0.05
	เมล็ดทานตะวัน	0.05
	มันฝรั่ง	0.05
	ถั่วเหลืองฝักสด	0.02
	ข้าวโพดฝักสด	0.01
	ข้าวโพดฝักอ่อน	0.01
	ผักตระกูลกะหล่ำ	0.03
มันสำปะหลัง	0.02	

ที่มา: สำนักงานมาตรฐานสินค้าการเกษตรและอาหารแห่งชาติ (2557)

ตารางที่ 3 ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดของคลอโรไพริฟอสในผักตามข้อกำหนดของ มกอช.

ชนิดของยาฆ่าแมลง	สินค้าเกษตร	ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด, MRL (mg/kg)
คลอโรไพริฟอส	พริกแห้ง	20
	เครื่องเทศกลุ่มเมล็ด	5
	พริก	3
	พริกหวาน	2
	เครื่องเทศกลุ่มผล	1
	เครื่องเทศกลุ่มราก	1
	ถั่วเหลืองฝักสด	1
	กระเจียบเขียว	0.5
	ข้าวเปลือก	0.5
	หอมแดง	0.2
	หอมใหญ่	0.2
	ข้าวสาร	0.1
	ถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง	0.1
	เมล็ดถั่วลิสง	0.05
	มันเทศ	0.05

ที่มา: สำนักงานมาตรฐานสินค้าการเกษตรและอาหารแห่งชาติ (2557)

## การดำเนินงานวิจัย

### 3.1 วัสดุดิบ

ถั่วฝักยาว

### 3.2 อุปกรณ์

3.2.1 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 5

3.2.2 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

3.2.3 เทียนสีขาว เบอร์ 21 (บริษัท แสงทิพย์, ประเทศไทย)

### 3.3 สารเคมี

3.3.1 Carbofuran (Dr. Ehrenstorfer, Germany)

3.3.2 Chlorpyrifos 10 ng/ $\mu$ l in acetonitrile 10 mL (Dr. Ehrenstorfer, Germany)

3.3.3 Acetylcholinesterase (EC number 3.1.1.7, Sigma, St.Louis, MO, USA)

3.3.4 Indoxyl acetate (Sigma, St.Louis, MO, USA)

3.3.5 Methanol 99.9% (Merck, Germany)

3.3.6 สารไดโซเดียมฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Ajax Finechem, Australia)

3.3.7 สารโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (Ajax Finechem, Austria)

### 3.4 เครื่องมือ

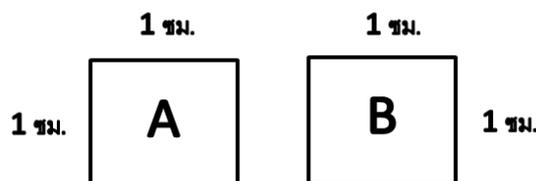
3.4.1 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter รุ่น S20 SevenEasy, Mettler Toledo, Germany)

3.4.2 เครื่องวัดสี (Color Checker รุ่น NR-12, Nippon denshoku, Japan)

3.4.3 เครื่อง High-performance liquid chromatography (Shimadzu, Kyoto, Japan)

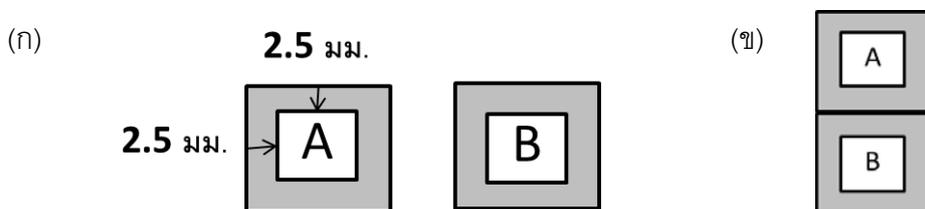
### 3.5 การเตรียมแผ่นทดสอบ

3.5.1 ตัดกระดาษกรองเบอร์ 5 ขนาด 1.0 x 1.0 เซนติเมตร จำนวน 2 แผ่น เรียกว่า แผ่น A และแผ่น B ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 การตัดกระดาษกรองของแผ่น A และแผ่น B

3.5.2 นำแผ่น A และแผ่น B วาดเส้นจากขอบเข้ามาด้านใน  $2.5 \times 2.5$  มิลลิเมตร และตีกรอบ จากนั้นละลายเทียนที่อุณหภูมิ  $75^{\circ}\text{C}$  เคลือบตามกรอบที่วาดไว้ ดังภาพที่ 9 (ก)



ภาพที่ 9 (ก) กระดาษแผ่น A และแผ่น B ที่ผ่านการเคลือบด้วยเทียนสีขาว (ข) แผ่นทดสอบที่ใช้ในการตรวจสอบยาฆ่าแมลง

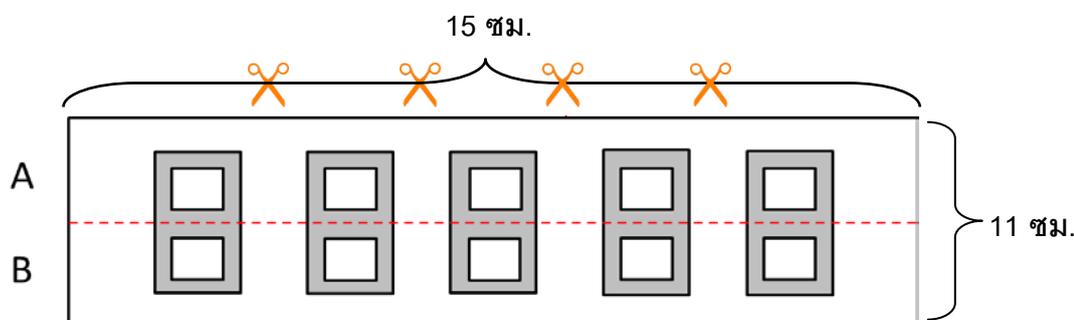
3.5.3 เมื่อเทียนแข็งตัวนำแผ่น A และ B มาติดเทปใสต่อให้เป็นแผ่นเดียวกัน ดังภาพที่ 9(ข)

### 3.6 การเตรียมชุดทดสอบ

3.6.1 ตัดกระดาษแข็งขนาด  $11 \times 15$  เซนติเมตร เพื่อทำเป็นแผ่นรอง

3.6.2 นำแผ่นรองพับครึ่งและติดแผ่นทดสอบ 5 แผ่นกับแผ่นรอง โดยเว้นระยะห่างจากกัน 2 เซนติเมตร

3.6.3 ตัดแผ่นรองบริเวณที่เว้นไว้จนถึงรอยพับครึ่ง เพื่อให้สามารถพับแผ่น A ประกอบกับแผ่น B ได้ทีละแผ่น ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 รูปแบบแผ่นทดสอบยาฆ่าแมลง

### 3.7 การพัฒนาชุดทดสอบสำหรับตรวจสอบคาร์โบฟูแรน

ในการพัฒนาชุดทดสอบสำหรับอ่านค่าปริมาณยาฆ่าแมลงที่พบในผัก เริ่มต้นโดยใช้แผ่นทดสอบในการทดลองทำปฏิกิริยาเพื่อจับคู่ความเข้มข้นยาฆ่าแมลง (ที่กำหนดไว้บนชุดทดสอบ) กับความเข้มข้นไซมที่สามารถทำปฏิกิริยาพอดีกัน จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาจัดทำเป็นชุดทดสอบ

3.7.1 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างอินดอกซิลอะซิเตทกับเอนไซม์อะซิติลโคดีเอสเทอเรส

3.7.1.1 นำแผ่นทดสอบมาโดยแผ่น A หยดเอนไซม์ความเข้มข้น 804 U/mL ใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาณ 3  $\mu$ L และแผ่น B หยดอินดอกซิลอะซิเตทใน methanol ปริมาณ 3  $\mu$ L ทิ้งไว้ให้แห้ง 30 นาที

3.7.1.2 หยดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ลงบนแผ่น A และแผ่น B แผ่นละ 3  $\mu$ L จากนั้นประกบทันที

3.7.1.3 ประกบเพื่อให้สารทำปฏิกิริยากันและในขณะประกบกันจะทำการวัดค่าสี  $b^*$  ของแผ่น A ทุก 1 นาที จนครบ 50 นาที

3.7.1.4 พิจารณาเวลาที่ทำให้ค่าสี  $b^*$  (ค่าสีฟ้า) คงที่ เพื่อกำหนดเป็นเวลาที่ใช้สำหรับการทำปฏิกิริยา

3.7.2 ศึกษาความเข้มข้นเอนไซม์ที่ยาส่าแมลงสามารถยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์

3.7.2.1 แผ่นทดสอบแผ่น A หยดเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาณ 3  $\mu$ L และแผ่น B หยดอินดอกซิลอะซิเตทใน methanol ปริมาณ 3  $\mu$ L ทิ้งไว้ 30 นาที

3.7.2.2 หยดยาส่าแมลงที่ความเข้มข้นต่างๆที่กำหนดไว้ ปริมาณ 3  $\mu$ L ลงบนแผ่น A ทิ้งไว้ 15 นาที

3.7.2.3 หยดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาณ 3  $\mu$ L ลงบนแผ่น A และ B จากนั้นประกบทันที ทิ้งไว้ 35 นาที เพื่อให้สารทำปฏิกิริยากัน

3.7.2.4 ครอบคลุมวัดค่าสี  $b^*$  ของแผ่น A

3.7.2.5 วิเคราะห์ผลโดยเลือกความเข้มข้นเอนไซม์และความเข้มข้นยาส่าแมลงที่ทำปฏิกิริยากัน และได้สีใส

3.7.2.6 กำหนดสเกลความเข้มข้นของเอนไซม์และยาส่าแมลงบนชุดทดสอบเพื่อใช้ในการอ่านค่า

### 3.8 การพัฒนาชุดทดสอบสำหรับตรวจสอบคลอรัไพริฟอส

3.8.1 ศึกษาความเข้มข้นอินดอกซิลอะซิเตทที่เหมาะสม

3.8.1.1 เตรียมเอนไซม์ 10.72 U/mL ใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4

3.8.1.2 เตรียมอินดอกซิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 200, 50 และ 10 mM ใน methanol

3.8.1.3 หยดเอนไซม์ความเข้มข้น 10.72 U/mL ปริมาณ 200  $\mu$ L ลงในขวด vial ขนาด 2 mL จำนวน 3 ขวด

3.8.1.4 หยดอินดอกซิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 200  $\mu$ L ลงในขวดที่มีการหยดเอนไซม์

- 3.8.1.5 จับเวลาดูการเปลี่ยนแปลงสีทุก 5 นาที จนครบ 30 นาทีและเปรียบเทียบสีของ  
อินดอกซิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นต่างๆ
- 3.8.1.6 ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง
- 3.8.2 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์
- 3.8.2.1 เตรียมเอนไซม์ 10.72 U/mL ใน 0.1M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4
- 3.8.2.2 เตรียมอินดอกซิลอะซิเตทความเข้มข้น 50 mM
- 3.8.2.3 เตรียมคลอโรฟิรฟอสที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 5, 4, 3, 2, 1, 0.1, 0.05 และ 0.01 ppm
- 3.8.2.4 หยดเอนไซม์ความเข้มข้น 10.72 U/mL ปริมาณ 200  $\mu$ L ลงในขวด vial ขนาด 2mL  
จำนวน 8 ขวด เรียกขวดที่ 1– 8
- 3.8.2.5 หยดยาฆ่าแมลงที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 200  $\mu$ L ลงในขวดที่ 1 – 8
- 3.8.2.6 จับเวลา 5 นาทีเพื่อศึกษาเวลาที่ยาฆ่าแมลงเข้าจับกับเอนไซม์อย่างสมบูรณ์
- 3.8.2.7 เมื่อครบเวลาหยดอินดอกซิลอะซิเตทความเข้มข้น 50 mM ปริมาณ 200 $\mu$ L  
ลงในขวดที่ 1– 8
- 3.8.2.7 ทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้สารทำปฏิกิริยาเกิดสีอย่างสมบูรณ์
- 3.8.2.8 ทดลองซ้ำ โดยเปลี่ยนเฉพาะเวลาในขั้นตอนที่ 3.8.2.5 เป็น 10 นาทีและ 15 นาที
- 3.8.3 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเกิดสีที่เหมาะสม
- 3.8.3.1 เตรียมเอนไซม์ 10.72 U/mL ใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4
- 3.8.3.2 เตรียมอินดอกซิลอะซิเตทความเข้มข้น 50 mM ใน methanol
- 3.8.3.3 เตรียมยาฆ่าแมลงที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 5, 4, 3, 2, 1, 0.1, 0.05 และ 0.01 ppm
- 3.8.3.4 หยดเอนไซม์ความเข้มข้น 10.72 U/mL ปริมาณ 200  $\mu$ L ลงในขวด vial ขนาด 2 mL  
จำนวน 8 ขวด เรียกว่าขวดที่ 1– 8
- 3.8.3.5 หยดยาฆ่าแมลงที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 200  $\mu$ L ลงในขวดที่ 1 – 8
- 3.8.3.6 ทิ้งไว้ 5 นาทีเพื่อให้ยาฆ่าแมลงเข้าจับกับเอนไซม์อย่างสมบูรณ์
- 3.8.3.7 เมื่อครบเวลาหยด อินดอกซิลอะซิเตทความเข้มข้น 50 mM ปริมาณ 200  $\mu$ L  
ลงในขวดที่ 1– 8
- 3.8.3.8 จับเวลาดูการเปลี่ยนแปลงสีทุก 5 นาที จนครบ 30 นาที
- 3.8.3.9 ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

### 3.9 การตรวจสอบปริมาณคาร์โบฟูแรนที่พบในผัก

- 3.9.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

ล้างแก้วฝักยวให้สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้ง เตรียมคาร์โบฟูแรนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไว้ เป็น stock solution ฟันคาร์โบฟูแรนปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงบนแก้วฝักยว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (ทำ 3 ซ้ำ และสำหรับ blank )

### 3.9.2 ขั้นตอนการสกัดยาฆ่าแมลงจากตัวอย่าง

หั่นแก้วฝักยวให้ละเอียดแล้วชั่งตัวอย่าง 2 กรัม เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร ผสมให้ เข้ากัน 2 นาที ด้วยเครื่องผสม vortex นำไปสกัดในอ่างอัลตราซาวด์เป็นเวลา 5 นาที กรองของเหลวที่สกัด ได้ผ่าน nylon membrane 0.22 ไมโครเมตร ได้สารละลายส่วนใสนำไปวิเคราะห์ HPLC และสำหรับแผ่น ทดสอบ test kit

การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนด้วยวิธี HPLC (Kongphonprom และ Burakham, 2016) โดยใช้คอลัมน์ Inertsil ODS-3 (4.6 × 150 mm, GL Science, Kyoto, Japan) และใช้ mobile phase เป็น 0.1% acetic acid: methanol (50:50 v/v) ด้วยอัตราการไหล 1.0 mL/min ตรวจวัดคาร์โบฟู แรนด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 280 nm

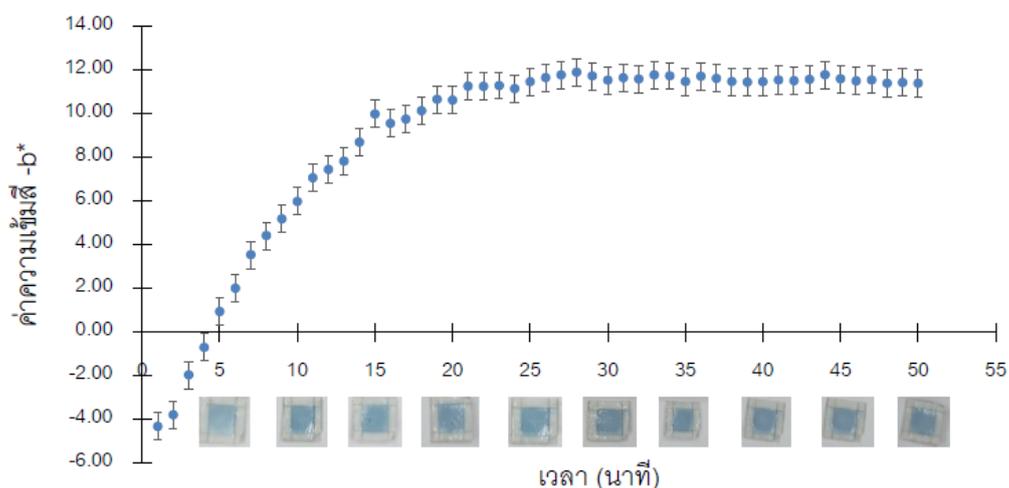
## ผลการทดลองและวิจารณ์

### 4.1 การพัฒนาชุดทดสอบคาร์โบฟูแรน

#### 4.1.1 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างอินดอกซิลอะซิเตทกับเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

##### เอสเทอเรส

จากการทดสอบการเกิดสีเนื่องจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารอินดอกซิลอะซิเตทกับเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสเมื่อทิ้งไว้เป็นระยะเวลาต่างๆ รวม 50 นาที (ภาพที่ 11) พบว่าเกิดสีฟ้าเห็นได้ด้วยตาเปล่า และเมื่อวัดค่าสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องวัดสีพบว่าค่า  $-b^*$  ซึ่งแสดงค่าสีฟ้าที่เกิดขึ้นนั้นเพิ่มขึ้นตามเวลาจนกระทั่งคงที่ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาประมาณ 25 นาที และสีฟ้ามีความคงตัวตลอดระยะเวลาการสังเกต 50 นาที แสดงให้เห็นว่าระยะเวลา 25 นาทีเป็นระยะเวลาการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมสำหรับการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของชุดทดสอบในการศึกษา



ภาพที่ 11 ภาพถ่ายและค่าสี ( $-b^*$ ) ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างอินดอกซิลอะซิเตทกับเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่เวลาต่างๆ

#### 4.1.2 การกำหนดสเกลความเข้มข้นบนชุดทดสอบ

ทำการทดสอบความเข้มข้นของคาร์โบฟูแรนบนชุดทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.01, 0.0224, 0.112, 0.56, 1.4 และ 2.8 ppm และความเข้มข้นของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่ใช้ทดสอบคือ 100, 134, 268, 402, 603 และ 804 U/mL

เมื่อใช้เอนไซม์และยาฆ่าแมลงแต่ละความเข้มข้นมาทดสอบบนแผ่นทดสอบเพื่อหาค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยากับคาร์โบฟูแรนจนหมดพอดี เช่น ในตารางที่ 4 แสดงผลการใช้คาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 0.0224 ppm พบว่าการใช้เอนไซม์ในช่วง 268 – 804 U/mL ทำให้แผ่นทดสอบแสดงสีฟ้าที่

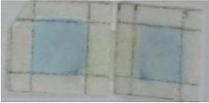
สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า และเมื่อวัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสีพบว่าได้ค่า  $b^*$  มีค่าเป็นลบซึ่งแสดงให้เห็นว่าสีนั้นเป็นสีฟ้าเช่นเดียวกันโดยความเข้มลดลงตามความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ลดลง แต่การใช้เอนไซม์ที่ความเข้มข้น 134 U/mL ไม่เกิดสีฟ้าบนแผ่นทดสอบ และสอดคล้องกับค่า  $b^*$  ซึ่งมีค่าเป็นบวกแสดงให้เห็นว่าไม่แสดงค่าสีที่เป็นสีฟ้า แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นเอนไซม์นี้ทำให้คาร์โบฟูแรนสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้หมดจึงทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสอินดอกซิลอะซิเตทและทำให้ไม่เกิดสารที่ให้สี

ตารางที่ 4 สีบนแผ่นทดสอบที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของคาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 0.0224 ppm กับเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

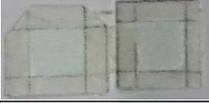
ความเข้มข้นของเอนไซม์ (U/mL)	ค่า $b^*$	ภาพประกอบ
804	-4.76	
603	-6.53	
402	-1.94	
268	-1.10	
134	0.29	

สำหรับผลการทดลองในตารางที่ 5 ซึ่งแสดงผลการใช้คาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 0.112 ppm พบว่าการใช้เอนไซม์ที่ความเข้มข้น 128 และ 134 U/mL ไม่เกิดสีฟ้าบนแผ่นทดสอบ จึงเห็นได้ว่าความเข้มข้นของคาร์โบฟูแรนที่สูงขึ้นสามารถยับยั้งเอนไซม์ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปเช่นกัน

ตารางที่ 5 สืบค้นแผ่นทดสอบที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของคาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 0.112 ppm กับเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของเอนไซม์ (U/mL)	ค่า b*	ภาพประกอบ
804	-3.08	
603	-4.75	
402	-2.18	
268	-0.11	
134	0.48	

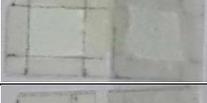
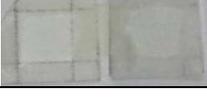
ตารางที่ 6 สืบค้นแผ่นทดสอบที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของคาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 0.56 ppm กับเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของเอนไซม์ (U/mL)	ค่า b*	ภาพประกอบ
804	-1.95	
603	-0.86	
402	-0.04	
268	-0.66	
134	0.50	

ตารางที่ 7 สืบค้นแผ่นทดสอบที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของคาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 1.4 ppm กับเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของเอนไซม์ (U/mL)	ค่า b*	ภาพประกอบ
804	0.39	
603	-0.17	
402	-0.10	
268	-0.03	
134	0.89	

ตารางที่ 8 สืบค้นแผ่นทดสอบที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของคาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 2.8 ppm กับเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

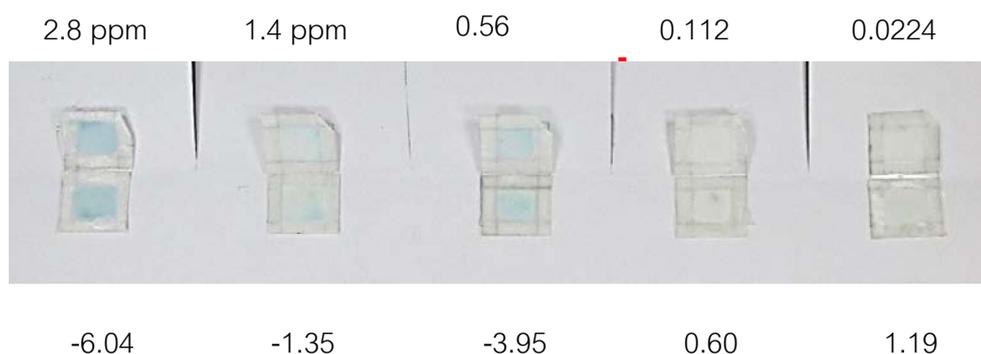
ความเข้มข้นของเอนไซม์ (U/mL)	ค่า b*	ภาพประกอบ
804	0.02	
603	0.57	
402	0.45	
268	0.05	
134	0.14	

จากผลการทดลองในตารางที่ 4-8 พบว่าค่าของเอนไซม์กับคาร์โบฟูแรนที่ทำปฏิกิริยากันพอดีคือ (0.01 ppm, 100 U/mL) (ไม่ได้แสดงผล) , (0.0224 ppm, 134 U/mL), (0.112 ppm, 268 U/mL), (0.56

ppm, 402 U/mL), (1.4 ppm, 603 U/mL) และ (2.8 ppm, 804 U/mL) ดังนั้นทำให้สามารถเตรียมชุดทดสอบสำหรับคาร์โบฟูแรนได้โดยการใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่างๆ เหล่านี้ โดยชุดแผ่นทดสอบดังกล่าวสามารถบอกค่าความเข้มข้นของคาร์โบฟูแรนได้ตั้งแต่น้อยกว่า 0.01 ppm ไปจนกระทั่งสูงกว่า 2.8 ppm ซึ่งเป็นช่วงที่ครอบคลุมค่า MRL ของคาร์โบฟูแรนในผลิตผลชนิดต่างๆ ตามมาตรฐานของ มกอช. ดังแสดงในตารางที่ 2

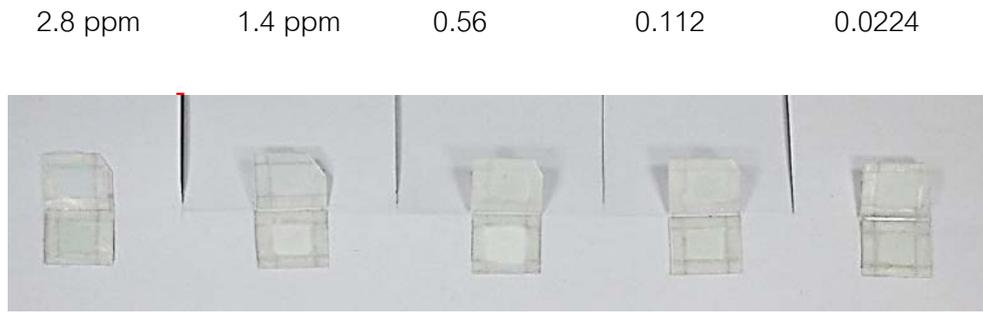
#### 4.1.3 ผลการทดสอบชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นด้วยสารละลายคาร์โบฟูแรน

เมื่อทดสอบการใช้ชุดทดสอบสำหรับคาร์โบฟูแรนที่พัฒนาขึ้นได้โดยใช้คาร์โบฟูแรนเข้มข้น 0.28 ppm ผลการทดลองที่ได้จากแผ่นทดสอบคือปรากฏเห็นเป็นสีฟ้าใน 3 แผ่นแรกคือแผ่นที่ซึ่งแสดงความเข้มข้นของคาร์โบฟูแรนเป็น 0.56 - 2.8 ppm และไม่มีสีฟ้าปรากฏใน 2 แผ่นท้ายคือแผ่นที่แสดงความเข้มข้นของคาร์โบฟูแรน 0.0224 ppm- 0.112 ppm ดังนั้นจึงสามารถอ่านค่าได้ว่าคาร์โบฟูแรนที่ใช้ทดสอบนี้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงมากกว่าหรือเท่ากับ 0.112 ppm แต่ไม่เกิน 0.56 ppm ซึ่งเป็นช่วงที่ถูกต้อง



ภาพที่ 12 ผลการทดสอบชุดทดสอบคาร์โบฟูแรนที่ความเข้มข้น 0.28 ppm

เช่นเดียวกันเมื่อทดสอบโดยใช้สารละลายคาร์โบฟูแรนเข้มข้น 1.5 ppm ผลการทดลองที่ได้จากแผ่นทดสอบที่พัฒนาขึ้นคือปรากฏเห็นเป็นสีฟ้าที่แผ่นแรกคือที่แสดงความเข้มข้น 2.8 ppm และไม่มีสีฟ้าปรากฏที่ 4 แผ่นท้ายคือที่ยาฆ่าแมลงความเข้มข้น 0.0224 - 1.4 ppm ดังนั้นจึงสามารถอ่านค่าได้ว่ายาฆ่าแมลงที่ใช้ทดสอบนี้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงมากกว่าหรือเท่ากับ 1.4 ppm แต่ไม่เกิน 2.8 ppm ซึ่งเป็นช่วงที่ถูกต้องเช่นเดียวกัน



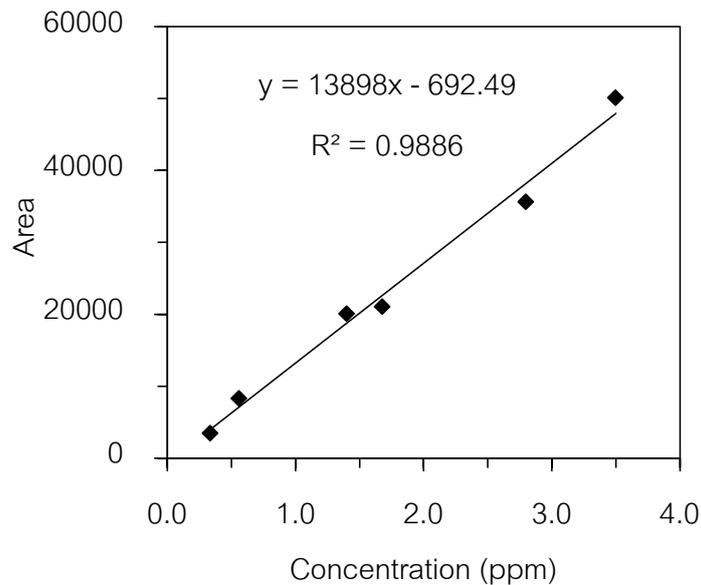
ค่า b

-0.39      0.42      1.03      0.66      0.51

ภาพที่ 13 ผลการทดสอบชุดทดสอบคาร์โบฟูแรนที่ความเข้มข้น 1.5 ppm

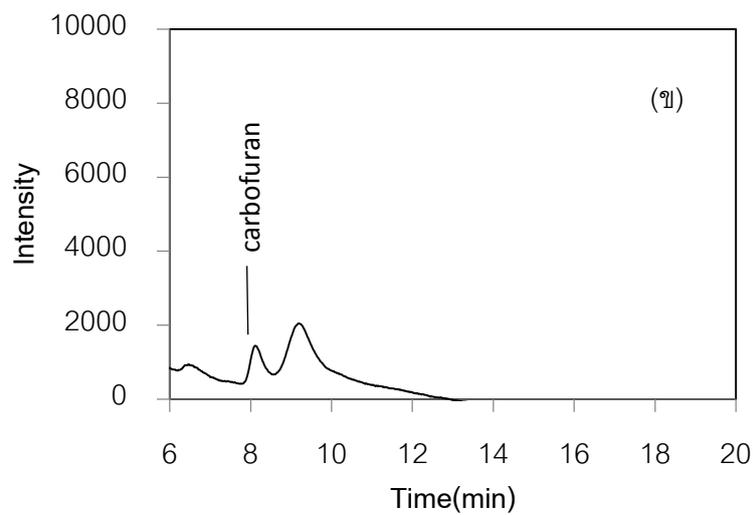
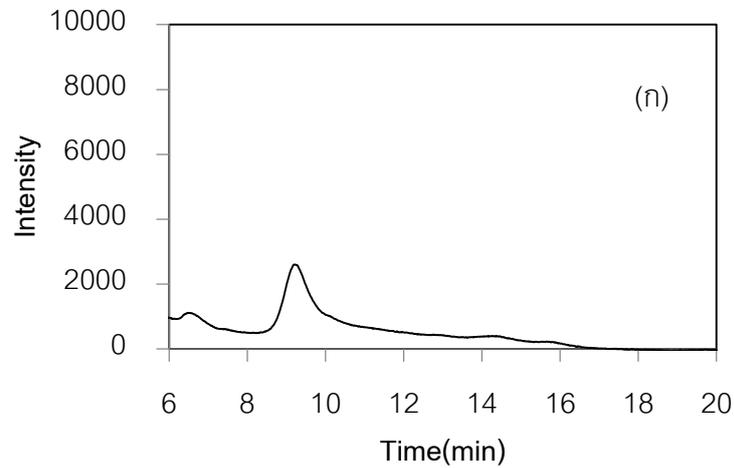
#### 4.1.4 ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนสามารถใช้วิธี HPLC โดยจากการเตรียมสารมาตรฐานคาร์โบฟูแรนในการวิเคราะห์ได้ผลดังภาพที่ 14 ซึ่งจะเห็นได้ว่ากราฟมาตรฐานมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงตลอดช่วงการวิเคราะห์โดยสามารถคำนวณค่า limit of detection (LOD) ได้จากกราฟมาตรฐาน (Miller และ Miller, 2010) ได้เป็น 0.45 ppm



ภาพที่ 14 กราฟมาตรฐานของคาร์โบฟูแรนจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC

จากการใช้สารละลายคาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 46.6 ppm ฟ่นบนตัวอย่างถั่วฝักยาวและนำมาสกัดเพื่อหาปริมาณคาร์โบฟูแรนตกค้างได้ผลการทดลองดังภาพที่ 15 โดยพบพีคของคาร์โบฟูแรนที่เวลาประมาณ 8 นาทีในโครมาโทแกรมและคำนวณปริมาณคาร์โบฟูแรนตกค้างในตัวอย่งตกค้างได้เป็น 1.01 ppm



ภาพที่ 15 โครมาโทแกรมจาก (ก) ตัวอย่างถั่วฝักยาวที่ไม่ได้พ่นยาฆ่าแมลงและ (ข) ตัวอย่างที่พ่นด้วยคาร์โบฟูแรนเข้มข้น 46.6 ppm

#### 4.1.5 ผลการทดสอบชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างถั่วฝักยาว

จากผลการทดลองนำสารสกัดที่ได้จากตัวอย่างถั่วฝักยาวที่ปราศจากคาร์โบฟูแรนบนชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นปรากฏเห็นเป็นสีฟ้าบนทุกแผ่นทดสอบ (ภาพที่ 16) จึงอ่านค่าได้ว่าไม่มียาฆ่าแมลงปนเปื้อนในตัวอย่างนี้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแผ่นทดสอบที่พัฒนาขึ้นให้ค่าที่ถูกต้อง

2.8 1.4 0.56 0.11 0.02 0.01



ภาพที่ 16 การทดสอบบนชุดทดสอบกับตัวอย่างที่ไม่มียาฆ่าแมลงปนเปื้อนอยู่

สำหรับตัวอย่างที่ปนคาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 46.6 ppm ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่ามีคาร์โบฟูแรนตกค้างอยู่ในปริมาณ 1.01 ppm นั้นเห็นสีฟ้าบนแผ่นทดสอบที่ความเข้มข้น 2.8 แต่ไม่เห็นสีฟ้าบนแผ่นทดสอบแผ่นอื่น (ภาพที่ 17) สรุปผลการอ่านได้ว่าการปนเปื้อนของคาร์โบฟูแรนในช่วง 1.4 – 2.8 ppm ซึ่งสูงกว่าค่าที่วิเคราะห์ได้จากวิธี HPLC อยู่เพียงเล็กน้อย เมื่อทำการทดสอบกับชุดทดสอบ GT-Test kit ซึ่งเป็นชุดทดสอบทางการค้าที่ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายในประเทศ โดยมีหลักการการอ่านผลโดยการเปรียบเทียบความเข้มของสีที่เกิดขึ้นในหลอดตัวอย่างกับหลอดควบคุมและหลอดตัดสินและพบว่าในตัวอย่างที่ไม่มีสารปนเปื้อนได้ผลถูกต้องคือ ไม่พบสารพิษตกค้าง ในขณะที่ตัวอย่างที่สกัดได้จากถั่วฝักยาวที่ปนด้วยคาร์โบฟูแรนพบว่าการปนเปื้อนในระดับไม่ปลอดภัย (ภาพที่ 18) อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าแผ่นตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้สามารถบอกช่วงของการปนเปื้อนได้ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ใช้งานมากยิ่งขึ้น

2.8 1.4 0.56 0.11 0.02 0.01



ภาพที่ 17 การทดสอบบนแผ่นตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นของตัวอย่างที่มีคาร์โบฟูแรนตกค้าง 1.01 ppm



Blank ตัวอย่าง ตัวอย่าง หลอดควบคุม หลอดตัดสี

ภาพที่ 18 การทดสอบการตกค้างของคาร์โบฟูเร็นในตัวอย่งที่สกัดจากถั่วฝักยาว (ความเข้มข้น 1.01 ppm) ด้วยชุดทดสอบ GT test kit

#### 4.2 การพัฒนาชุดทดสอบสำหรับคลอไพริฟอส

งานวิจัยนี้ได้ออกแบบแผ่นทดสอบสำหรับคลอไพริฟอสในลักษณะเดียวกับคาร์โบฟูเร็นดังที่รายงานไปแล้วข้างต้นแต่พบว่าผลการทดลองไม่มีความคงที่ โดยสาเหตุอาจเกิดเนื่องจากความสามารถในการละลายของคลอไพริฟอสในน้ำมีค่าต่ำมาก โดยค่าที่มีการรายงานไว้คือประมาณ 2 ppm (<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/carbaryl-dicrotophos/chlorpyrifos-ext.html>) ซึ่งอาจมีค่าต่ำลงอีกในบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ดังนั้นจึงไม่สามารถพัฒนาแผ่นทดสอบที่ใช้ทดสอบได้จริง แต่ได้พัฒนาชุดทดสอบที่เป็นสารละลายแทน

##### 4.2.1 ศึกษาความเข้มข้นอินดอกซิลอะซีเตทที่เหมาะสม

ตารางที่ 9 และ 10 แสดงผลการทดลองซ้ำสำหรับการศึกษาความเข้มข้นอินดอกซิลอะซีเตทที่เหมาะสม ซึ่งสามารถทำได้โดยนำอินดอกซิลอะซีเตทที่มีความเข้มข้นต่างๆ มาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ความเข้มข้น 10.72 U/mL พบว่าที่เวลาในการทำปฏิกิริยา 30 นาที ปรากฏสีที่ชัดเจนที่สุด โดยที่ความเข้มข้น 200 mM ปรากฏสีฟ้าขุ่นทั้งหมด ที่ความเข้มข้น 50 mM ปรากฏสีเขียวใสมีการแยกชั้นขุ่นที่ชัดเจน และที่ความเข้มข้น 10 mM ปรากฏเป็นสีฟ้าอ่อนใสเกือบขาว ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงเลือกใช้อินดอกซิลอะซีเตทความเข้มข้น 50 mM เนื่องจากสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีได้ง่ายและชัดเจนมากที่สุด

ตารางที่ 9 สีที่เกิดจากปฏิกิริยาของอินดอกซิลอะซิเตทที่ความเข้มข้น 200, 50 และ 10 mM กับเอนไซม์ ความเข้มข้น 10.72 U/mL ที่เวลาต่างๆ (ซ้ำที่ 1)

เวลาในการทำปฏิกิริยา (นาที)	ความเข้มข้นอินดอกซิลอะซิเตท		
	200 mM	50 mM	10 mM
5			
10			
15			
20			
25			
30			

ตารางที่ 10 สีที่เกิดจากปฏิกิริยาของอินดอกซิลอะซีเตตที่ความเข้มข้น 200, 50 และ 10 mM กับเอนไซม์ ความเข้มข้น 10.72 U/mL ที่เวลาต่างๆ (ซ้ำที่ 2)

เวลาในการทำปฏิกิริยา (นาที)	ความเข้มข้นอินดอกซิลอะซีเตต		
	200 mM	50 mM	10 mM
5			
10			
15			
20			
25			
30			

#### 4.2.2. ศึกษาเวลาที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

ในการหาเวลาที่เหมาะสมในการยับยั้งเอนไซม์โดยคลอโรไฟริฟอส โดยศึกษาระยะเวลา 5, 10 และ 15 นาที ใช้ความเข้มข้นอินดอกซิลอะซิเตท 50 mM ได้ผลดังตารางที่ 11 – 13

ตารางที่ 11 การเปลี่ยนสีที่เวลาต่างๆ หลังทำปฏิกิริยากับยาฆ่าแมลงกับเอนไซม์ 5 นาที

เวลาในการทำปฏิกิริยากับอินดอกซิลอะซิเตท (นาที)	ความเข้มข้นยาฆ่าแมลง (ppm)							
	5	4	3	2	1	0.1	0.05	0.01
5								
10								
15								
20								
25								
30								

ตารางที่ 12 การเปลี่ยนสีที่เวลาต่างๆ หลังทำปฏิกิริยากับยาฆ่าแมลงกับเอนไซม์ 10 นาที

เวลาในการทำปฏิกิริยา กับอินดอกซิลอะซิเตท (นาที)	ความเข้มข้นยาฆ่าแมลง (ppm)							
	5	4	3	2	1	0.1	0.05	0.01
5								
10								
15								
20								
25								
30								

ตารางที่ 13 การเปลี่ยนสีที่เวลาต่างๆ หลังทำปฏิกิริยากับยาฆ่าแมลงกับเอนไซม์ 15 นาที

เวลาในการทำปฏิกิริยา กับอินดอกซิลอะซิเตท (นาที)	ความเข้มข้นยาฆ่าแมลง (ppm)							
	5	4	3	2	1	0.1	0.05	0.01
5								
10								
15								
20								
25								
30								

จากตารางที่ 11-13 จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้เอนไซม์ความเข้ม 10.72 U/mL และหยดยาฆ่าแมลงที่ความเข้มข้นต่างๆจากนั้นทิ้งไว้ให้ยาฆ่าแมลงเข้ายับยั้งเอนไซม์โดยใช้เวลาในการยับยั้งที่แตกต่างกัน พบว่าที่เวลาในการทำปฏิกิริยากับอินดอกซิลอะซิเตท 30 นาที ปรากฏสีที่ชัดเจนที่สุด ในการใช้เวลาในการยับยั้งเอนไซม์ 5-15 นาที พบว่าสีที่ปรากฏไม่แตกต่างกัน จึงแสดงให้เห็นว่าการใช้เวลาเพียง 5 นาทีเพียงพอในการทำให้ยาฆ่าแมลงสามารถเข้ายับยั้งเอนไซม์อย่างสมบูรณ์

จากตารางที่ 11 เมื่อใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 10.72 U/mL หยดยาฆ่าแมลงที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ทิ้งไว้ 5 นาทีเพื่อยับยั้งเอนไซม์ จากนั้นจึงผสมอินดอกซิลอะซิเตทความเข้มข้น 50 mM และสังเกตการเปลี่ยนสีทุก 5 นาที จนครบ 30 นาที พบว่าที่เวลา 5 -20 นาที เมื่อใช้คลอไพริฟอส 5 ppm สารละลายปรากฏเป็นสีใส และเมื่อลดความเข้มข้นเป็น 4 ppm และ 3 ppm สารละลายปรากฏสีฟ้าใส และที่เวลา 25 นาที ความเข้มข้นยาฆ่าแมลง 5 ppm จึงเริ่มปรากฏเป็นสีฟ้าใส ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงเลือกใช้เวลาในการเกิดสีคือ 30 นาที เนื่องจากเห็นสีชัดเจนที่สุด สำหรับคลอไพริฟอสที่ความเข้มข้น 0.01 - 2 ppm สารละลายปรากฏสีเขียวและแยกชั้นขุ่น

#### 4.2.3 การทดสอบการใช้งานชุดทดสอบ

จากตารางที่ 14 เป็นการทดสอบความถูกต้องของชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้น โดยใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 10.72 U/mL หยดคลอไพริฟอสที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้ยาฆ่าแมลงเข้ายับยั้งเอนไซม์ และตามด้วยอินดอกซิลอะซิเตทความเข้มข้น 50 mM ที่ทิ้งไว้ 30 นาทีจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งได้ผลที่ลักษณะเดียวกัน และสามารถสรุปได้ว่าหากสารละลายปรากฏเป็นสีใสแสดงว่ามีปริมาณคลอไพริฟอสมากกว่า 3 ppm และหากปรากฏเป็นสีเขียวแสดงว่ามีปริมาณยาฆ่าแมลงน้อยกว่า 3 ppm

ตารางที่ 14 ชุดทดสอบลักษณะระบบสารละลายใช้สำหรับตรวจสอบยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตชนิดคลอไพริฟอส

จำนวนครั้งที่ทดลอง	ความเข้มข้นยาฆ่าแมลง (ppm)							
	5	4	3	2	1	0.1	0.05	0.01
1								
2								
3								

## สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้ได้พัฒนาแผ่นทดสอบยาฆ่าแมลงตกค้างชนิด carbamate ได้แก่คาร์โบฟูราน และน้ำยาทดสอบยาฆ่าแมลงตกค้างชนิด organophosphate ได้แก่คลอไพริฟอส โดยใช้หลักการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส โดยแผ่นทดสอบที่พัฒนาได้สามารถบอกช่วงการปนเปื้อนของคาร์โบฟูรานในช่วง 0.01 – 0.28 ppm จากการทดสอบการปนเปื้อนของคาร์โบฟูรานในตัวอย่างถั่วฝักยาวที่ระดับ 1.01 ppm สามารถอ่านผลจากแผ่นทดสอบได้สูงกว่าค่าที่วัดได้ด้วยวิธี HPLC เล็กน้อย สำหรับยาฆ่าแมลงชนิดคลอไพริฟอสนั้นไม่สามารถเตรียมแผ่นทดสอบลักษณะเดียวกันได้ จึงได้พัฒนาเป็นน้ำยาชุดทดสอบซึ่งสามารถบอกระดับการปนเปื้อนได้ว่ามากกว่าหรือน้อยกว่า 3 ppm

## เอกสารอ้างอิง

- ปริญานุษ สายสุพรรณ. 2558. กรมวิชาการเกษตร. (ออนไลน์) แหล่งที่มา:  
[http://www.doa.go.th/pibai/pibai/n14/v\\_7-aug/rai.html](http://www.doa.go.th/pibai/pibai/n14/v_7-aug/rai.html) (เข้าถึงวันที่ 29 ธันวาคม 2558)  
เครือข่ายเตือนภัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืช. ผลการเฝ้าระวังสารเคมีกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้  
ประจำปี 2559 . (ระบบออนไลน์) แหล่งที่มา:  
[www.thaipan.org/sites/default/files/file/pesticide\\_doc24\\_press\\_4\\_5\\_2559.pdf](http://www.thaipan.org/sites/default/files/file/pesticide_doc24_press_4_5_2559.pdf).  
(เข้าถึงวันที่ 20 มิถุนายน 2559)
- Colovi, B.M., Krsti, Z.D., Lazarevi -Pasti, D.T, Bondzic, M.A. and Vasic, M.V. 2013.  
Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. Current  
Neuropharmacology. 11: 315-335.
- Eleršek, T. and Filipič, M. 2011. Organophosphorus pesticides mechanisms of their  
toxicity. In Pesticides - The Impacts of Pesticides Exposure. 243-260. IntechOpen. DOI:  
10.5772/14020.
- Guan, H., Zhang, F., Yu, J. and Chi, D. 2012. The novel acetylcholinesterase biosensors  
based on liposome bioreactors–chitosannanocomposite film for detection of  
organophosphates pesticides. Food Research International. 49: 15–21.
- Guimarães Selva, M.T. and Longo Cesar da Paixão, R.T. 2016. Boron-doped diamond as a  
sensor for the classification of carbamate pesticides using a chemometric  
approach. New Journal of Chemistry. 40: 2514-2520.
- Guo, X., Zhang, X., Cai, Q., Shen, T. and Zhu, S. 2013. Developing a novel sensitive visual  
screening card for rapid detection of pesticide residues in food. Food Control. 30: 15-23.
- Han, Z., Chi, C., Bai, B., Liu, G., Rao, O., Peng, S. 2012. Chromogenic platform based on  
recombinant *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase for visible unidirectional  
assay of organophosphate and carbamate insecticideresidues. Analytica Chimica Acta.  
720:126-33.
- Hossain, S.M.Z., Luckham, R.E., McFadden, M.J., Brennan, J.D. 2009.Reagentless bidirectional  
lateral flow bioactive paper sensors for detection of pesticides in beverage and food  
samples. Analytical Chemistry. 81(21):9055-64.
- Fukuto, T. R. 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides.  
Environmental Health Perspectives. 87: 245-254.

- Kavruk, M., Özalp, V.C., Öktem, H.A. 2013. Portable bioactive paper-based sensor for quantification of pesticides. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2013:1-8.
- Kongphonprom, K., Burakham, R. 2016. Determination of carbamate insecticides in water, fruit, and vegetables by ultrasound- ssisted dispersive liquid–liquid microextraction and high performance liquid chromatography. *Analytical Letters*. 49(6):753-767.
- Marrazza, G. 2014. Piezoelectric Biosensors for organophosphate and carbamate pesticides: A review. *Biosensors*. 4(3): 301-317
- Miao, Y., He, N., Zhu, J.J. 2010. History and new developments of assays for cholinesterase activity and inhibition. *Chemical Reviews*. 110(9):5216-34.
- Miller, J.N. and Miller, J.C. 2010. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 6<sup>th</sup> ed. Pearson Education Limited, UK. 278 p.
- No, H.Y., Kim, Y.A., Lee, Y.T., Lee, H.S. 2007. Cholinesterase-based dipstick assay for the detection of organophosphate and carbamate pesticides. *Analytica Chimica Acta*. 594:37-43
- Pohanka, M., Karasova, J.Z., Kuca, K., Holas, O., Korabecny, J., Cabal, J. 2010. Colorimetric dipstick for assay of organophosphate pesticides and nerve agents represented by paraoxon, sarin and VX. *Talanta*. 81:621-4.
- Szpyrka, E., Kurdziel, A., Matyaszek, A., Podbielska, M., Rupa, J. and Slowik-Borowiec, M. 2015. Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from the region of south-eastern Poland. *Food Control*. 48: 137-142.
- Thantong, S., Jonglaekha, N., Patan, A. 2008. Development of a Simple Test Kit for Testing Pesting Residues in Vegetables and Fruits. Research Report: Phetchabun Rajabhat University. (in Thai)

## การเผยแพร่ผลงานวิจัย

Khwanjai Klinchongkon, Busarakorn Mahayothee and Pramote Khuwijitjaru. (2014) Image analysis for determining color intensity of acetylcholinesterase-based pesticide test strip. The 2<sup>nd</sup> International Conference on Agriculture and Agro-Industry 2014 (ICAAI 2014), November 20-21, 2014, Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand.

นิตสารัตน์ แดงวิสุทธิ ขวัญใจ กลิ่นจงกล บุศราภรณ์ มหาโยธี และ ปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ. (2558) การตรวจหาสารโบฟูรานที่ตกค้างในผักด้วยแผ่นทดสอบที่ใช้หลักการเปลี่ยนแปลงสี, วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ปีที่ 46 ฉบับที่ 3/1 (พิเศษ) กันยายน-ธันวาคม 2558 หน้า 327-330

\*นิตสารัตน์ แดงวิสุทธิ ขวัญใจ กลิ่นจงกล บุศราภรณ์ มหาโยธี และ ปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ. (2558) การตรวจหาสารโบฟูรานที่ตกค้างในผักด้วยแผ่นทดสอบที่ใช้หลักการเปลี่ยนแปลงสี, งานประชุมวิชาการวิทยาการหลังการ เก็บเกี่ยวแห่งชาติ ครั้งที่ 13, วันที่ 18 และ 19 มิถุนายน 2558 ณ เดอะกรีนเนอรั วีสอร์ท เขาใหญ่ จ. นครราชสีมา

\*ได้รับรางวัล การนำเสนอผลงานภาคนิทัศน์ "ชมเชย"

## ประวัติผู้วิจัย

### หัวหน้าโครงการวิจัย

ปราโมทย์ คูวิจิตรจากรู

ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์

สถานที่ทำงานปัจจุบัน ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม  
โทรศัพท์ 034-219361 โทรสาร 034-272194 e-mail: kpramote@su.ac.th

### ประวัติการศึกษา

- ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยศิลปากร  
ปีที่จบ 2539

- ปริญญาโท Master of Agricultural Science, Kyoto University ประเทศญี่ปุ่น  
ปีที่จบ 2544

- ปริญญาเอก Doctor of Agricultural Science, Kyoto University ประเทศญี่ปุ่น  
ปีที่จบ 2547

### ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการ

1. Klinchongkon, K.; Chanthong, N.; Ruchain, K.; Khuwijitjaru, P.; Adachi, S., Effect of ethanol addition on subcritical water extraction of pectic polysaccharides from passion fruit peel. Journal of Food Processing and Preservation, doi: 10.1111/jfpp.13138.
2. Khuwijitjaru, P.; Koomyart, I.; Kobayashi, T.; Adachi, S., Hydrolysis of konjac flour under subcritical water conditions. Chiang Mai Journal of Science (in press).
3. Khuwijitjaru, P.; Kobayashi, T.; Adachi, S., Degradation kinetics of trisaccharides comprising glucose residues in subcritical water. Journal of Carbohydrate Chemistry 2016, 35, 286-299.
4. Wiboonsirikul, J.; Watanabe, Y.; Omori, A.; Khuwijitjaru, P.; Adachi, S., Antioxidative properties of stearyl ascorbate in a food matrix system. Journal of Oleo Science 2016, 65, 487-492
5. Watanabe, Y.; Khuwijitjaru, P.; Hamai, Y.; Wiboonsirikul, J.; Adachi, S., Antioxidative property of acyl ascorbate in cookies containing iron. Japan Journal of Food Engineering 2016, 17, 77 - 81.

6. Tamiya, S.; Koomyart, I.; Kobayashi, T.; Shiga, H.; Yoshii, H.; Khuwijitjaru, P.; Adachi, S., Preparation of liquid and solid seasonings with shrimp-like flavor from Isada krill under subcritical water conditions by steam injection. *Food Science and Technology Research* 2016, 22, 317-323.
7. Soisangwan, N.; Gao, D.-M.; Kobayashi, T.; Khuwijitjaru, P.; Adachi, S., Kinetic analysis for the isomerization of cellobiose to cellobiulose in subcritical aqueous ethanol. *Carbohydrate Research* 2016, 433, 67-72.
8. Soisangwan, N.; Gao, D.-M.; Kobayashi, T.; Khuwijitjaru, P.; Adachi, S., Production of lactulose from lactose in subcritical aqueous ethanol. *Journal of Food Process Engineering* 2016, DOI: 10.1111/jfpe.12413.
9. Rungpichayapichet, P.; Mahayothee, B.; Nagle, M.; Khuwijitjaru, P.; Müller, J., Robust NIRS models for non-destructive prediction of fruit ripeness and quality in mango. *Postharvest Biology and Technology* 2016, 111, 31-40.
10. Mahayothee, B.; Koomyart, I.; Khuwijitjaru, P.; Siriwongwilaichat, P.; Nagle, M.; Müller, J., Phenolic compounds, antioxidant activity, and medium chain fatty acids profiles of coconut water and meat at different maturity stages. *International Journal of Food Properties* 2016, 19, 2041-2051.
11. Koomyart, I.; Nagamizu, H.; Khuwijitjaru, P.; Kobayashi, T.; Shiga, H.; Yoshii, H.; Adachi, S., Using severity factor as a parameter to optimize krill treatment under subcritical water conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2016, 80, 11, 2192-2197.
12. Koomyart, I.; Nagamizu, H.; Khuwijitjaru, P.; Kobayashi, T.; Shiga, H.; Yoshii, H.; Adachi, S., Direct treatment of Isada krill under subcritical water conditions to produce seasoning with shrimp-like flavor. *Food Technology and Biotechnology* 2016, 54, 2, 335–341.
13. Khuwijitjaru, P., Utilization of plant-based agricultural waste by subcritical water treatment *Japan Journal of Food Engineering* 2016, 17, 33-39.
14. Wiboonsirikul, J.; Nakata, Y.; Kobayashi, T.; Khuwijitjaru, P.; Adachi, S., Degradation of disaccharides containing two glucose units in subcritical water. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering* 2015, 10, 681-686.
15. Rungpichayapichet, P.; Mahayothee, B.; Khuwijitjaru, P.; Nagle, M.; Müller, J., Non-destructive determination of  $\beta$ - carotene content in mango by NIR spectroscopy compared

- with colorimetric measurements. *Journal of Food Composition and Analysis* 2015, 38, 32-41.
16. Koomyart, I.; Nagamizu, H.; Khuwijitjaru, P.; Kobayashi, T.; Shiga, H.; Yoshii, H.; Adachi, S., Compositions, flavour and antiradical properties of products from subcritical water treatment of raw Isada krill. *International Journal of Food Science and Technology* 2015, 50, 1632-1639.
  17. Klinchongkon, K.; Khuwijitjaru, P.; Wiboonsirikul, J.; Adachi, S., Extraction of oligosaccharides from passion fruit peel by subcritical water treatment. *Journal of Food Process Engineering*, doi:10.1111/jfpe.12269.
  18. Koomyart, I.; Nagamizu, H.; Khuwijitjaru, P.; Kobayashi, T.; Shiga, H.; Yoshii, H.; Adachi, S., Subcritical water treatment for producing seasoning from semidried Isada krill. *Journal of Food Process Engineering* 2014, 37, 567-574.
  19. Khuwijitjaru, P.; Suaylam, B.; Adachi, S., Degradation of caffeic acid in subcritical water and on-line HPLC-DPPH assay of degradation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2014, 62, 1945-1949.
  20. Khuwijitjaru, P.; Pokpong, A.; Klinchongkon, K.; Adachi, S., Production of oligosaccharides from coconut meal by subcritical water treatment. *International Journal of Food Science and Technology* 2014, 49, 1946-1952.
  21. Khuwijitjaru, P.; Plernjit, J.; Suaylam, B.; Samuhaseneetoo, S.; Pongsawatmanit, R.; Adachi, S., Stability of some phenolic compounds in subcritical water and radical scavenging activity of their degradation products. *Can. J. Chem. Eng.* 2014, 92, 810-815.
  22. Wiboonsirikul, J.; Mori, M.; Khuwijitjaru, P.; Adachi, S., Properties of extract from okara by its subcritical water treatment. *International Journal of Food Properties* 2013, 16, 974-982.
  23. Wanpen, C.; Ngampanya, B.; Pruksasri, S.; Jaturapiree, P.; Khuwijitjaru, P., The effect of ultrasonic pretreatment on inulin extraction from Jerusalem artichoke tuber. *KMUTT Research and Development Journal* 2013, 36, 261-270.
  24. Murayama, Y.; Wiboonsirikul, J.; Khuwijitjaru, P.; Kobayashi, T.; Adachi, S., Antioxidant characteristics of extracts from cereal residues by their subcritical water treatment. *Journal of Oleo Science* 2012, 61, 465-468.

25. Khuwijitjaru, P.; Watsanit, K.; Adachi, S., Carbohydrate content and composition of product from subcritical water treatment of coconut meal. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2012, 18, 225-229.
26. Khuwijitjaru, P.; Sayputikasikorn, N.; Samuhasaneetoo, S.; Penroj, P.; Siriwongwilaichat, P.; Adachi, S., Subcritical water extraction of flavoring and phenolic compounds from cinnamon bark (*Cinnamomum zeylanicum*). *Journal of Oleo Science* 2012, 61, 349-355.
27. Leelayuwapan, H.; Hiangratch, K.; Liangpaiboon, T.; Khuwijitjaru, P.; Boonyarattanakalin, S. In Identification of Products Obtained from Subcritical Water Hydrolysis of Coconut Meal, PACCON2011, Thailand, 2011; Thailand, 2011; pp 124-127.
28. Khuwijitjaru, P.; Yuenyong, T.; Pongsawatmanit, R.; Adachi, S., Effects of ferric chloride on thermal degradation of  $\gamma$ -oryzanol and oxidation of rice bran oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2011, 113, 652-657.
29. Khuwijitjaru, P.; Anantanasuwong, P.; Adachi, S., Emulsifying and foaming properties of defatted soy meal extracts obtained by subcritical water treatment. *International Journal of Food Properties* 2011, 14, 9-16.
30. Khuwijitjaru, P.; Suthasirisup, T., Properties of breader prepared from rice flour. *KKU Research Journal* 2010, 15, 965-972.
31. Khuwijitjaru, P.; Yuenyong, T.; Pongsawatmanit, R.; Adachi, S., Degradation kinetics of gamma-oryzanol in antioxidant-stripped rice bran oil during thermal oxidation. *Journal of Oleo Science* 2009, 58, 491-497.
32. Khuwijitjaru, P.; Wanpen, C.; Mala, T.; Ariyakriangkrai, M.; Adachi, S., Effect of subcritical water pretreatment on enzymatic digestibility of rice straw, corn stover and sugar cane bagasse. *KKU Research Journal* 2009, 14, 1084-1090 (in Thai).
33. Khuwijitjaru, P.; Chaloodong, K.; Adachi, S., Phenolic content and radical scavenging capacity of kaffir lime fruit peel extract obtained by pressurized hot water extraction. *Food Science and Technology Research* 2008, 14, 1-4.
34. Wiboonsirikul, J.; Khuwijitjaru, P.; Kimura, Y.; Morita, H.; Tsuno, T.; Adachi, S., Production optimization of the extract with high phenolic content and radical scavenging activity from defatted rice bran by subcritical water treatment. *Japan Journal of Food Engineering* 2007, 8, 311-315.

35. Khuwijitjaru, P.; Nualchan, P.; Adachi, S., Foaming and emulsifying properties of rice bran extracts obtained by subcritical water treatment. *Silpakorn University Science and Technology Journal* 2007, 1, 7-12.
36. Fujii, T.; Khuwijitjaru, P.; Kimura, Y.; Adachi, S., Decomposition kinetics of monoacyl glycerol and fatty acid in subcritical water under temperature-programmed heating conditions. *Food Chemistry* 2006, 94, 341-347.
37. Khuwijitjaru, P.; Taengtieng, N.; Changprasis, S., Degradation of gamma-oryzanol in rice bran oil during heating: An analysis using derivative UV-spectrophotometry. *Silpakorn University International Journal* 2004, 4, 154-165.
38. Khuwijitjaru, P.; Kimura, Y.; Matsuno, R.; Adachi, S., Solubility of oleic and linoleic acids in subcritical water. *Food Science and Technology Research* 2004, 10, 261-263.
39. Khuwijitjaru, P.; Kimura, Y.; Matsuno, R.; Adachi, S., Preparation of finely dispersed O/W emulsion from fatty acid solubilized in subcritical water. *Journal of Colloid and Interface Science* 2004, 278, 192-197.
40. Khuwijitjaru, P.; Fujii, T.; Adachi, S.; Kimura, Y.; Matsuno, R., Kinetics on the hydrolysis of fatty acid esters in subcritical water. *Chemical Engineering Journal* 2004, 99, 1-4.
41. Khuwijitjaru, P. Solubility of fatty acids and hydrolysis of their esters in subcritical water. Dissertation, Kyoto University, Kyoto, 2004.
42. Khuwijitjaru, P.; Adachi, S.; Matsuno, R., Solubility of saturated fatty acids in water at elevated temperatures. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2002, 66, 1723-1726.

## ผู้ร่วมโครงการวิจัย

บุศราภรณ์ มหาโยธี (Busarakorn Mahayothee)

ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์

สถานที่ทำงานปัจจุบัน ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม  
โทรศัพท์ 034-219361 โทรสาร 034-272194 e-mail: kpramote@su.ac.th

ประวัติการศึกษา

- ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขา เทคโนโลยีอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีที่จบ พ.ศ. 2532
- ปริญญาโท M.Sc. สาขา เทคโนโลยีอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีที่จบ พ.ศ. 2537
- ปริญญาเอก Ph.D. สาขา Food Technology The University of Hohenheim, Germany ปีที่จบ พ.ศ. 2548

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการ

1. Busarakorn Mahayothee, Intira Koomyart, Pramote Khuwijitjaru, Prasong Siriwongwilaichat, Marcus Nagle, Joachim Müller. (2016). Phenolic compounds, antioxidant activity, and medium chain fatty acids profiles of coconut water and meat at different maturity stages. *International Journal of Food Properties* 19(9): 2041-2051.
2. Marcus Nagle, Kiatkamjon Intani, Giuseppe Romano, Busarakorn Mahayothee, Vicha Sardud, Joachim Müller. (2016). Determination of surface color of 'all yellow' mango cultivars using computer vision. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering* 9(1) 42-50.
3. Patchimaporn Udomkun, Marcus Nagle, Dimitrios Argyropoulos, Busarakorn Mahayothee, Joachim Müller. (2016). Multi-sensor approach to improve optical monitoring of papaya shrinkage during drying. *Journal of Food Engineering* 189:82-89.
4. Patchimaporn Udomkun, Marcus Nagle, Dimitrios Argyropoulos, Busarakorn Mahayothee, Sajid Latif, Joachim Müller. (2016). Compositional and functional dynamics of dried papaya as affected by storage time and packaging material. *Food Chemistry* 196:712-719.
5. Parika Rungpichayapichet, Busarakorn Mahayothee, Marcus Nagle, Pramote Khuwijitjaru, Joachim Müller. (2016). Robust NIRS models for non-destructive prediction of fruit ripeness and quality in mango. *Postharvest Biology and Technology* 111: 31-40.

6. Busarakorn Mahayothee, Intira Koomyart, Pramote Khuwijitjaru, Prasong Siriwongwilaichat, Marcus Nagle, Joachim Müller. Phenolic compounds, antioxidant activity, and medium chain fatty acids profiles of coconut water and meat at different maturity stages. *International Journal of Food Properties* 19(9): 2041-2051.
7. Marcus Nagle, Kiatkamjon Intani, Giuseppe Romano, Busarakorn Mahayothee, Vicha Sardud, Joachim Müller. (2016). Determination of surface color of 'all yellow' mango cultivars using computer vision. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering* 9(1) 42-50.
8. Patchimaporn Udomkun, Dimitrios Argyropoulos, Marcus Nagle, Busarakorn Mahayothee, Joachim Müller. (2015). Single layer drying kinetics of papaya amidst vertical and horizontal airflow. *LWT- Food Science and Technology* 64: 67-73.
9. Schulze, K., Nagle, M., Spreer, W., Mahayothee, B., Müller, J. (2015). Development and assessment of different modeling approaches for size-mass estimation of mango fruits (*Mangifera indica* L., cv. Nam Dokmai). *Computers and Electronics in Agriculture* 114, 269-276.
10. Patchimaporn Udomkun, Marcus Nagle, Busarakorn Mahayothee, Donatus Nohr, Alexander Koza, Joachim Müller. (2015) Influence of air drying properties on non-enzymatic browning, major bio-active compounds and antioxidant capacity of osmotically pretreated papaya. *LWT - Food Science and Technology* 60(2): 914–922.
11. Parika Rungpichayapichet, Busarakorn Mahayothee, Pramote Khuwijitjaru, Marcus Nagle, Joachim Müller. (2015). Non-destructive determination of  $\beta$ - carotene content in mango by NIR spectroscopy compared with colorimetric measurements. *Journal of Food Composition and Analysis* 38:32-41.
12. Patchimaporn Udomkun, Dimitrios Argyropoulos, Marcus Nagle, Busarakorn Mahayothee, Joachim Müller. (2015). Sorption behaviour of papayas as affected by compositional and structural alterations from osmotic pretreatment and drying. *Journal of Food Engineering* 157: 14-23.
13. Patchimaporn Udomkun, Marcus Nagle, Busarakorn Mahayothee, Joachim Müller. 2014. Laser-based imaging system for non-invasive monitoring of quality changes of papaya during drying. *Food Control* 42, 225-233.

14. Patchimaporn Udomkun, Busarakorn Mahayothee, Marcus Nagle, Joachim Müller. 2014. Effects of calcium chloride and calcium lactate applications with osmotic pretreatment on physicochemical aspects and consumer acceptances of dried papaya. *International Journal of Food Science & Technology*.
15. Marcelo Precoppe, Serm Janjai, Busarakorn Mahayothee, Joachim Müller. 2013. Improved energy efficiency of farmers cooperative litchi drying operation in Northern Thailand. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(11) 2376–2383.
16. Marcus Nagle; Habasimbi K; Mahayothee B; Haewsungcharern M; Janjai S; Müller J. (2011). Fruit processing residues as an alternative fuel for drying in Northern Thailand. *Fuel*, 90 (2), 813-823.
17. Precoppe M F; Nagle M; Janjai S; Mahayothee B; Müller J (2011). Analysis of dryer performance for the improvement of small-scale litchi processing. *International Journal of Food Science & Technology*, 46 (3), 561–569.
18. Marcus Nagle, Busarakorn Mahayothee, Parika Rungpichayapichet, Serm Janjai and Joachim Müller. 2010. Effect of irrigation on near-infrared (NIR) based prediction of mango maturity. *Scientia Horticulturae*, 125 (4)771-774.
19. Janjai, S., Lamlert, N., Tohsing, K., Mahayothee, B., Bala, B. K., Mueller, J. 2010. Measurement and modeling of moisture sorption isotherm of litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.). *International Journal of Food Properties*, 13(2) 251-260.
20. Marcus Nagle, Juan Carlos Gonzalez Azcarraga, Busarakorn Mahayothee, Methinee Haewsungcharern, Serm Janjai, Joachim Muller. 2010. Improved quality and energy performance of a fixed-bed longan dryer by thermodynamic modifications, *Journal of Food Engineering*, 99(3) 392-399.
21. S. Janjai, B. Mahayothee, N. Lamlert, B.K. Bala, M. Precoppe, M. Nagle, J. Muller, 2010. Diffusivity, shrinkage and simulated drying of litchi fruit (*Litchi Chinensis* Sonn.), *Journal of Food Engineering*, 96(2) , 214-221.
22. Janjai S; Precoppe M F; Lamlert N; Mahayothee B; Bala B K; Nagle M; Müller J (2010). Thin-layer drying of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *Food and Bioproducts Processing*, online available.
23. Busarakorn Mahayothee, Patchimaporn Udomkun, Marcus Nagle, Methinee Haewsungcharoen, Serm Janjai, Joachim Mueller. 2009. Effects of pretreatments on colour

- alterations of litchi during drying and storage. *European Food Research and Technology*, 229 (2) 329-337.
24. S. Janjai, P. Intawee, K. Tohsing, B. Mahayothee, B.K. Bala, M.A. Ashraf, J. Muller. (2009) Neural network modeling of sorption isotherms of longan (*Dimocarpus longan* Lour.), *Computers and Electronics in Agriculture*, 66, (2), May 2009, 209-214.
  25. Franz Roman, Marcus Nagle, Hermann Leis, Serm Janjai, Busarakorn Mahayothee, Methinee Haewsungcharoen, Joachim Muller. Potential of roof-integrated solar collectors for preheating air at drying facilities in Northern Thailand. 2009. *Renewable Energy* 34(7): 1661-1667.
  26. S. Janjai, N. Lamlert, P. Intawee, B. Mahayothee, B.K. Bala, M. Nagle, J. Muller. (2009) Experimental and simulated performance of a PV-ventilated solar greenhouse dryer for drying of peeled longan and banana. *Solar Energy*, 83 (9), 1550-1565.
  27. Janjai, S., Lamlert, N. Intawee, P., Mahayothee, B., Boonrod, Y., Haewsungcharern, M., Bala, B. K., Nagle, M., Mueller, J. 2009. Solar Drying of Peeled Longan Using a Side Loading Type Solar Tunnel Dryer: Experimental and Simulated Performance. *Drying Technology* 27(4) 595-605.
  28. M. Nagle, J. C. González-Azcárraga, S. Phupaichitkun, B. Mahayothee, M. Haewsungcharern, S. Janjai, He. Leis & J. Müller (2008). Effects of operating practices on performance of a fixed-bed convection dryer and quality of dried longan. 43(11): 1979 - 1987.
  29. Janjai, S., Lamlert, N., Intawee, P., Mahayothee, B., Haewsungcharern, M., Bala, B. K., Nagle, M., Leis, H. & Müller, J. 2008. Finite Element Simulation of Drying of Longan Fruit. *Drying Technology*, 26 (6), 666-674.
  30. S. Janjai, N. Lamlert, P. Intawee, B. Mahayothee, M. Haewsungcharern, B.K. Bala, J. Müller. 2008. Finite element simulation of drying of mango. *Biosystems Engineering*, 99(4): 523-531.
  31. Sarawut Phupaichitkun, Busarakorn Mahayothee, Thomas Waldenmaier, Joachim Müller. Generalized single-layer model for drying kinetics of unpeeled-longan. *Int J Agric & Biol Eng*. 2008; 1(2): 64-71.

32. Busarakorn Mahayothee, Sybille Neidhart, Reinhold Carle and Werner Mühlbauer. 2007. Effects of variety, ripening condition and ripening stage on the quality of sulphite-free dried mango slices. *European Food Research and Technology*, 225(5-6): 723-732.
33. S. Janjai, B.K. Bala, N. Lamlert, B. Mahayothee, M. Haewsungcharern, W. Muehlbauer, J. Muller. 2007. Moisture Diffusivity Determination of Different Parts of Longan Fruit. *International Journal of Food Properties*, 10(3): 471-478.
34. Busarakorn Mahayothee, S. Neidhart, W. Mühlbauer, R. Carle. 2007. Effects of Calcium Carbide and 2-Chloroethylphosphonic Acid on Fruit Quality of Thai Mangoes under Various Postharvest Ripening Regimes. *European Journal of Horticultural Science*, 72(4):171-178.
35. Janjai S, Bala BK, Tohsing K, Mahayothee B, Haewsungcharern M, Müller J. 2007. Moisture sorption isotherms and heat of sorption of mango (*Magnifera Indica* L. cv. Nam Dok Mai). *International Agricultural Engineering Journal*;16(3-4):159-168.
36. Janjai, S., Bala, B.K., Tohsing, K., Mahayothee, B., Haewsungcharern, M., Muehlbauer, W., Mueller, J. 2006. Equilibrium moisture content and heat of sorption of longan (*Dimocarpus longan* Lour.). *Drying technology* 24 (12),1691-1696.
37. Mahayothee, B., Neidhart, S., Leitenberger, M., Mühlbauer, W., Carle, R. Non-destructive determination of maturity of Thai mangoes by near-infrared spectroscopy. *Acta Horticulturae (ISHS) 2004*; 645: 581-588.
38. Mahayothee, B., Neidhart, S., Mühlbauer, W., Carle, R. Influence of postharvest ripening processes on appropriate maturity for drying mangoes 'Nam Dokmai' and 'Kaew'. *Acta Horticulturae (ISHS) 2004*; 645: 241-248.