

การพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยการได้รับพิษของ สารกำจัดแมลงกลุ่มคาร์บาเมทและออร์กาโนฟอสเฟต ในตัวอย่างปศุสัตว์โดยใช้พีเอช มิเตอร์

จำรัส เลิศศรี* วัฒนศักดิ์ จำละคร ศิริขวัญ แสงมณี

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน 221 ต.เวียงตาล อ.ห้างฉัตร จ. ลำปาง 52190

*ผู้เขียนและรับผิดชอบ โทรศัพท์: 081-7835485, 082-6619714 E-mail: vrd_np@dld.go.th

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค electrometric method โดยใช้ pH meter ร่วมกับเทคนิค cholinesterase inhibition เพื่อตรวจหาสารกำจัดแมลงกลุ่มคาร์บาเมทและกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตในตัวอย่างปศุสัตว์ ได้แก่ ตัวอย่างอาหารสัตว์ อาหารในกระเพาะและตับของสัตว์ สำหรับใช้ในการวินิจฉัยการได้รับพิษของสารกำจัดแมลงสองกลุ่มนี้ ประเมินความเหมาะสมของวิธีที่พัฒนาขึ้นโดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจได้ของวิธี (limit of detection, LOD) และเปรียบเทียบผลการทดสอบกับเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) และ thin layer chromatography (TLC) เพื่อประเมินประสิทธิภาพความไว ความจำเพาะ ความแม่นยำ ความสามารถในการทำนายผลบวก และความสามารถในการทำนายผลลบ ผลการศึกษา พบว่า LOD ของสารกำจัดแมลงกลุ่มคาร์บาเมท 4 ชนิด ได้แก่ carbofuran, 3-hydroxycarbofuran, methomyl และ carbaryl มีค่าตั้งแต่ 0.20-4.00 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต 4 ชนิด ได้แก่ chlorpyrifos, dichlorvos, methy-parathion และ prothiofos มีค่าตั้งแต่ 0.50-4.00 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ผลการเปรียบเทียบผลการทดสอบกับเทคนิค HPLC พบว่า มีค่าความไว ความจำเพาะ ความแม่นยำ ความสามารถในการทำนายผลบวก และความสามารถในการทำนายผลลบ เท่ากับร้อยละ 88.9, 100.0, 98.1, 100.0 และ 97.8 ตามลำดับ ขณะที่ผลการเปรียบเทียบผลการทดสอบกับเทคนิค TLC พบว่า มีค่าความไว ความจำเพาะ ความแม่นยำ ความสามารถในการทำนายผลบวก และความสามารถในการทำนายผลลบ เท่ากับร้อยละ 100.0, 97.8, 98.1, 87.5 และ 100.0 ตามลำดับ สรุปได้ว่า วิธีนี้มีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้ตรวจคัดกรองเพื่อวินิจฉัยการได้รับพิษของสารกำจัดแมลงกลุ่มคาร์บาเมทและออร์กาโนฟอสเฟตในปศุสัตว์ ทำให้ลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ และสามารถนำไปใช้ในพื้นที่ได้

คำสำคัญ: คาร์บาเมท ออร์กาโนฟอสเฟต ตัวอย่างปศุสัตว์ การยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส พีเอช มิเตอร์

บทนำ

สารกลุ่มคาร์บาเมต (carbamate; CM) และออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate; OP) เป็นสารกำจัดแมลงนิยมใช้ในทางการเกษตรเพื่อกำจัดแมลงศัตรูพืช รวมถึงใช้ในปศุสัตว์เพื่อกำจัดปรสิตภายนอก หากนำไปใช้ในทางที่ไม่ถูกต้อง ผิดวัตถุประสงค์ ทำให้เกิดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม เช่น พืชอาหารสัตว์ และน้ำ อาจทำให้สัตว์ได้รับอันตรายและก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจได้ โดยสารกำจัดแมลงทั้ง 2 กลุ่ม มีพิษรุนแรงต่อระบบประสาทของสัตว์ ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส (cholinesterase enzyme; ChE) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาท โดยมีหน้าที่ย่อยสลาย acetylcholine ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่ช่วยในการส่งผ่านสัญญาณข้ามปลายประสาท หากระดับของเอนไซม์ ChE ลดลงจะทำให้ acetylcholine ที่ปลายประสาทมีปริมาณมากเกินไป ก่อให้เกิดการกระตุ้นระบบประสาทในร่างกายมากกว่าปกติ (Sophie et al., 2008) ส่งผลให้เกิดอาการผิดปกติต่างๆ เช่น ท้องเสีย กล้ามเนื้อกระตุก หลดลมตีบ ผิวน้ำขี้ด ชัก หหมดสติ ระบบหายใจล้มเหลวและอาจเสียชีวิตได้ (Windholz et al., 1983) นอกจากนี้ในสัตว์จะพบอาการ ไอ น้ำลายไหล อาเจียน เหงื่อออก ไม่สามารถควบคุมปัสสาวะและอุจจาระได้ เดินขาเกร็ง อ่อนเพลีย ซึม กล้ามเนื้ออัมพาต ชัก และหายใจลำบาก สัตว์อาจตายเนื่องจากหลอดลมตีบตัน อาจไม่พบอาการทุกอย่างในสัตว์ตัวเดียวกัน แต่อาจมีอาการอย่างใดอย่างหนึ่งหรือหลายอย่าง ขึ้นอยู่กับสัตว์แต่ละชนิด (มาลินี, 2523; Clarke et al., 1981; Meerdink, 2003)

กรณีที่สงสัยว่าสัตว์ได้รับพิษจากสารกำจัดแมลง ในสัตว์มีชีวิตจะทำการตรวจหาระดับการทำงานของเอนไซม์ ChE ในเลือดและซีรัมด้วยเทคนิค colorimetric method โดยใช้เครื่อง spectrophotometer (Ellman, 1961) หรือ เทคนิค electrometric method โดยใช้ pH meter (Mohammad et al., 2007) สำหรับสัตว์ที่ตายแล้ว การตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม CM และ OP สามารถทำได้โดยตรวจจากตัวอย่างอาหารในกระเพาะและอวัยวะของสัตว์ด้วยวิธีทางเคมี เช่น high performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC) หรือ thin layer chromatography (TLC) อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวมีข้อจำกัดทั้งค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงในด้านเครื่องมือ วิธีการที่ซับซ้อน และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ ในทางการเกษตรมีการพัฒนาวิธีการทดสอบสารกำจัดแมลงกลุ่ม CM และ OP ด้วยวิธี biosensor (Chiu et al., 1991; Lea and Mladen, 2003) แต่วิธีดังกล่าวไม่ครอบคลุมถึงตัวอย่างทางด้านปศุสัตว์ เช่น ตัวอย่างตับและอาหารในกระเพาะสัตว์ ต่อมา มีการพัฒนาวิธีตรวจหาสารกำจัดแมลงกลุ่ม CM ในตัวอย่างปศุสัตว์โดยวิธี ChE inhibition ร่วมกับ colorimetric method (จำรัสและคณะ, 2556) ซึ่งก็ยังไม่ครอบคลุมสารกำจัดแมลงกลุ่ม OP จึงมีแนวความคิดที่จะพัฒนาวิธีใหม่โดยใช้ pH meter ร่วมกับเทคนิค ChE inhibition จากหลักการที่สารกำจัดแมลงกลุ่ม CM และ OP สามารถทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ChE ทำให้มีค่าเอนไซม์ ChE ลดลง วัดระดับ ChE activity ที่เหลืออยู่โดยทำปฏิกิริยากับ acetylthiocholine ได้ acetic acid มีผลทำให้ pH มีค่าลดลง ดังนั้นการลดลงของ pH ขึ้นอยู่กับระดับของสารกำจัดแมลงในตัวอย่าง

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีตรวจสอบสารกำจัดแมลงกลุ่ม CM และ OP ในตัวอย่างทางปศุสัตว์ คือ อาหารสัตว์ อาหารในกระเพาะและตับด้วยเทคนิค electrometric method โดยใช้ pH meter ร่วมกับเทคนิค ChE inhibition เพื่อใช้ในการชันสูตรและวินิจฉัยการได้รับสารกำจัดแมลงกลุ่ม CM และ OP

อุปกรณ์และวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: เป็น AR grade ได้แก่ sodium barbital (BDH, England), sodium chloride (Ajax, Australia), potassium di-hydrogen phosphate (Ajax, Australia), acetonitrile (LabScan, Thailand) และ acetylthiocholine iodide (Sigma-Aldrich, Switzerland)

สารมาตรฐานของสารกำจัดแมลงกลุ่ม CM 4 ชนิด ได้แก่ carbofuran (98.5%), 3-hydroxycarbofuran (98.5%), methomyl (99.5%) และ carbaryl (99.0%) (Dr. Ehrenstorfer, USA) กลุ่ม OP 4 ชนิด ได้แก่ chlorpyrifos (99.0%), dichlorvos (99.5%), methy-parathion (99.5%) และ prothiofos (99.0%) (Chem Service, USA)

สารละลาย barbital phosphate buffer เตรียมโดยละลาย sodium barbital 1.24 กรัม sodium chloride 35 กรัม และ potassium di-hydrogen phosphate 0.63 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.4 แล้วปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

สารละลาย blood enzyme buffer เตรียมโดยการผสมเลือดโค (whole blood) กับสารละลาย barbital phosphate buffer ที่อัตราส่วน 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 และ 1:50 เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสได้ 1 สัปดาห์

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลาย stock standard ของสารกำจัดแมลง 8 ชนิด คือ carbofuran, 3-hydroxycarbofuran, methomyl, carbaryl, chlorpyrifos, dichlorvos, methy-parathion และ prothiofos ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เตรียมโดยการชั่งสารกำจัดแมลงทั้ง 8 ชนิดๆ ละ 0.0100 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตรแต่ละขวด ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetonitrile เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสได้นาน 3 เดือน

สารละลาย working standard ของสารกำจัดแมลง 8 ชนิด คือ carbofuran, 3-hydroxycarbofuran, methomyl, carbaryl, chlorpyrifos, dichlorvos, methy-parathion และ prothiofos ความ

เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร เตรียมโดยไปเปิด stock standard ของสารกำจัดแมลงแต่ละชนิด ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรแต่ละขวด ขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย acetonitrile เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสได้นาน 1 เดือน

การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่าง blank ได้จากตัวอย่างอาหารสัตว์ อาหารในกระเพาะ และตับของสัตว์ ที่ผ่านการตรวจแล้วว่าไม่มีสารกำจัดแมลงกลุ่ม CM และ OP โดยวิธี HPLC และ TLC สำหรับนำไปเตรียมตัวอย่าง fortified เพื่อนำไปทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจได้ (Limit of detection, LOD)

ตัวอย่างอาหารสัตว์ fortified ความเข้มข้น 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เตรียมโดยชั่งตัวอย่างอาหารสัตว์ที่บดละเอียด 5.0 กรัม ลงในหลอด centrifuge จำนวน 8 ชุดๆ ละ 6 หลอด ชุดที่ 1 เติมสารละลาย stock standard ของสารกำจัดแมลง carbofuran ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 0.010, 0.025, 0.050, 0.100, 0.200 และ 0.250 มิลลิลิตร จะได้ตัวอย่างอาหารสัตว์ fortified ที่มีความเข้มข้น 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ สำหรับชุดที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 เตรียมเช่นเดียวกับชุดที่ 1 แต่เปลี่ยนชนิดของสารละลาย stock standard ของสารกำจัดแมลงจาก carbofuran เป็น 3-hydroxycarbofuran, methomyl, carbaryl, chlorpyrifos, dichlorvos, methy-parathion และ prothiofos ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างอาหารในกระเพาะ fortified และตัวอย่างตับ fortified เตรียมเช่นเดียวกับตัวอย่างอาหารสัตว์ fortified

ตัวอย่าง unknown ได้แก่ ตัวอย่างอาหารสัตว์ อาหารในกระเพาะและตับของสัตว์ จำนวน 26, 42 และ 38 ตัวอย่าง ตามลำดับ รวม 106 ตัวอย่าง ที่ส่งตรวจวิเคราะห์หาสารพิษในปีงบประมาณ 2556 ใช้สำหรับประเมินประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ (Test performance)

การทดสอบ %ChE inhibition โดยใช้ pH meter

การทดสอบ ChE inhibition: สกัดตัวอย่างตามวิธีของจำรัสและคณะ (2556) ดังนี้ ตัวอย่าง 5.0 กรัม เติม acetonitrile 10 มิลลิลิตร และ sodium chloride 2 กรัม เขย่า 15 นาที นำสารละลายขึ้นบน 1 มิลลิลิตร ไประเหยแห้ง ละลายด้วยสารละลาย barbital phosphate buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย blood enzyme buffer 5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้ววัด pH ครั้งที่ 1 หลังจากนั้นเติมสารละลาย 7.5% acetylthiocholine iodide 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้ววัด pH ครั้งที่ 2 คำนวณหา %ChE inhibition ตามสูตรของ Mohammad et al. (2007)

$$\%ChE \text{ inhibition} = \frac{(\Delta pH) \text{ blank} - (\Delta pH) \text{ sample}}{(\Delta pH) \text{ blank}} \times 100$$

(ΔpH คือ ผลต่างของ pH ที่วัดครั้งที่ 1 และ 2)

ศึกษาอัตราส่วนของเลือดโคกับสารละลาย barbital phosphate buffer

ศึกษาส่วนผสมที่เหมาะสมของเลือดโคกับสารละลาย barbital phosphate buffer ที่อัตราส่วน 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 และ 1:50 สำหรับเตรียมสารละลาย blood enzyme buffer โดยการทดสอบหา %ChE inhibition กับสารละลายมาตรฐานกำจัดแมลงทั้ง 8 ชนิด คือ ความเข้มข้นชนิดละ 1.00 มิลลิกรัม/ลิตร

ศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจได้

นำตัวอย่าง fortified ทดสอบหา %ChE inhibition โดยใช้อัตราส่วนของเลือดโคกับสารละลาย barbital phosphate buffer ที่ได้จากการศึกษาข้างต้น เพื่อประเมินค่า LOD ของสารกำจัดแมลงทั้ง 8 ชนิด โดยการตัดสินใจระดับ %ChE inhibition ที่ 50% ขึ้นไป ซึ่งเป็นระดับที่ทำให้เกิดพิษ (Arnot et al., 2011)

ประเมินประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ (Test performance)

ประเมินประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ โดยเปรียบเทียบผลการตรวจหาสารกำจัดแมลงกลุ่ม CM และ OP ในตัวอย่าง unknown จำนวน 106 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค electrometric method โดยใช้ pH meter กับ HPLC และ TLC นำผลที่ได้จากการตรวจทั้ง 3 วิธี เปรียบเทียบโดยใช้ตาราง Two by Two (ตารางที่ 5, 6) ตามวิธีของ Eleftherios (2002) เพื่อคำนวณหาความไว (relative sensitivity) ความจำเพาะ (relative specificity) ความแม่นยำ (relative accuracy) ความสามารถในการทำนายผลบวก (positive predictive value) และความสามารถในการทำนายผลลบ (negative predictive value) ดังนี้

$$\text{Relative sensitivity} = \frac{\text{True positive}}{\text{True positive} + \text{False negative}} \times 100$$

$$\text{Relative specificity} = \frac{\text{True negative}}{\text{True negative} + \text{False positive}} \times 100$$

$$\text{Relative accuracy} = \frac{\text{True positive} + \text{True negative}}{\text{Total of samples}} \times 100$$

$$\text{Positive predictive value} = \frac{\text{True positive}}{\text{True positive} + \text{False positive}} \times 100$$

$$\text{Negative predictive value} = \frac{\text{True negative}}{\text{True negative} + \text{False negative}} \times 100$$

ผลการทดลอง

ผลการศึกษาอัตราส่วนของเลือดโคกับสารละลาย barbitol phosphate buffer

อัตราส่วนของเลือดโคกับสารละลาย barbitol phosphate buffer ที่ทำให้ %ChE inhibition ของสารกำจัดแมลง carbofuran, 3-hydroxycarbofuran, methomyl, carbaryl, chlorpyrifos และ prothiofos มีค่ามากที่สุด คือ 1:30 โดยมีค่าเท่ากับ 75.8, 67.8, 42.4, 27.6, 35.4 และ 48.8 ตามลำดับ ในขณะที่อัตราส่วนของเลือดโคกับสารละลาย barbitol phosphate buffer ที่ทำให้ %ChE inhibition ของ dichlorvos และ methyl-parathion มีค่ามากที่สุด คือ 1:20 โดยมีค่า %ChE inhibition เท่ากับ 68.6 และ 65.6 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ผลการศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจได้

ค่า LOD ของสารกำจัดแมลง carbofuran, 3-hydroxycarbofuran, methomyl, carbaryl, chlorpyrifos, dichlorvos, methy-parathion และ prothiofos ในตัวอย่างอาหารสัตว์และตัวอย่างดิน มีค่าเท่ากับ 0.20, 1.00, 2.00, 4.00, 2.00, 0.50, 0.50 และ 2.00 mg/kg ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และ 4) ขณะที่ในตัวอย่างอาหารในกระเพาะสัตว์ มีค่าเท่ากับ 0.50, 1.00, 4.00, 4.00, 4.00, 1.00, 1.00 และ 2.00 mg/kg ตามลำดับ โดยตัดสินจากค่า %ChE inhibition ที่ระดับ 50% ขึ้นไป (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 อัตราส่วนของเลือดโคกับสารละลาย barbitol phosphate buffer และค่า %ChE inhibition ของสารละลายมาตรฐานสารกำจัดแมลง 8 ชนิด

สารมาตรฐาน ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัม/ลิตร	%ChE inhibition ของ อัตราส่วนของเลือดโคกับสารละลาย barbitol phosphate buffer				
	1:10	1:20	1:30	1:40	1:50
carbofuran	68.2 ^b	74.5 ^a	<u>75.8^a</u>	73.8 ^a	69.7 ^b
3-hydroxycarbofuran	56.8 ^b	65.5 ^a	<u>67.8^a</u>	66.7 ^a	64.5 ^a
methomyl	37.4 ^b	41.2 ^a	<u>42.4^a</u>	40.2 ^a	37.2 ^b
carbaryl	18.6 ^b	25.3 ^a	<u>27.6^a</u>	24.1 ^a	20.1 ^b
chlorpyrifos	28.2 ^b	33.4 ^a	<u>35.4^a</u>	33.3 ^a	27.8 ^b
dichlorvos	67.7 ^a	<u>68.6^a</u>	66.6 ^a	64.6 ^a	56.6 ^b
methyl-parathion	64.7 ^a	<u>65.6^a</u>	63.6 ^a	63.1 ^a	58.5 ^b
prothiofos	47.8 ^a	46.6 ^a	<u>48.8^a</u>	45.6 ^a	43.4 ^b

หมายเหตุ ^a และ ^b หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

ตารางที่ 2 ค่า LOD และค่า %ChE inhibition ของสารกำจัดแมลง 8 ชนิด ในตัวอย่างอาหารสัตว์ fortified (ตัดสินจาก %ChE inhibition ที่ระดับ 50% ขึ้นไป)

ชนิดของสาร	ค่าเฉลี่ย %ChE inhibition						LOD
	ในตัวอย่างอาหารสัตว์ fortified (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)						(มิลลิกรัม/กิโลกรัม)
	0.20	0.50	1.00	2.00	4.00	5.00	
carbofuran	<u>55.8</u>	63.1	78.2	73.6	83.9	85.9	0.20
3-hydroxycarbofuran	17.8	35.8	<u>66.2</u>	81.2	81.4	91.2	1.00
methomyl	11.2	14.8	37.6	<u>58.5</u>	62.8	70.3	2.00
carbaryl	5.5	18.8	31.8	32.9	<u>55.6</u>	62.1	4.00
chlorpyrifos	17.3	23.7	34.7	<u>52.7</u>	65.2	77.3	2.00
dichlorvos	20.6	<u>56.5</u>	60.2	78.8	88.6	89.7	0.50
methyl-parathion	34.7	<u>61.4</u>	63.8	78.4	86.3	90.6	0.50
prothiofos	11.7	19.6	47.6	<u>57.3</u>	57.2	64.2	2.00

ตารางที่ 3 ค่า LOD และค่า %ChE inhibition ของสารกำจัดแมลง 8 ชนิด ในตัวอย่างอาหารในกระเพาะ สัตว์ fortified (ตัดสินจาก %ChE inhibition ที่ระดับ 50% ขึ้นไป)

ชนิดของสาร	ค่าเฉลี่ย %ChE inhibition						LOD
	ในตัวอย่างอาหารในกระเพาะสัตว์ fortified (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)						(มิลลิกรัม/กิโลกรัม)
	0.20	0.50	1.00	2.00	4.00	5.00	
carbofuran	45.4	<u>54.3</u>	74.2	74.3	78.6	91.4	0.50
3-hydroxycarbofuran	18.5	35.8	<u>54.7</u>	87.2	87.8	92.9	1.00
methomyl	13.8	17.8	44.1	45.2	<u>53.4</u>	67.8	4.00
carbaryl	7.8	15.8	25.2	34.8	<u>45.3</u>	56.2	4.00
chlorpyrifos	14.7	25.8	36.8	43.6	<u>57.8</u>	77.3	4.00
dichlorvos	22.6	43.2	<u>64.8</u>	86.7	90.1	96.6	1.00
methyl-parathion	32.8	45.9	<u>62.9</u>	78.6	88.6	95.4	1.00
prothiofos	9.7	18.7	43.8	<u>51.8</u>	55.9	68.4	2.00

ตารางที่ 4 ค่า LOD และค่า %ChE inhibition ของสารกำจัดแมลง 8 ชนิด ในตัวอย่างตับ fortified (ตัดสินจาก %ChE inhibition ที่ระดับ 50% ขึ้นไป)

ชนิดของสาร	ค่าเฉลี่ย %ChE inhibition ในตัวอย่างตับ fortified (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)						LOD (มิลลิกรัม/ กิโลกรัม)
	0.20	0.50	1.00	2.00	4.00	5.00	
Carbofuran	<u>52.4</u>	67.5	75.8	75.7	79.1	93.1	0.20
3-hydroxycarbofuran	22.5	42.1	<u>67.8</u>	86.8	87.2	93.8	1.00
Methomyl	12.1	18.6	42.7	<u>54.1</u>	62.7	67.1	2.00
Carbaryl	8.70	13.5	27.6	33.5	<u>51.3</u>	68.5	4.00
Chlorpyrifos	12.1	23.4	35.4	<u>51.4</u>	66.4	76.8	2.00
Dichlorvos	24.3	<u>51.6</u>	66.6	87.4	93.1	95.6	0.50
methyl-parathion	33.5	<u>57.4</u>	63.6	77.4	87.6	93.5	0.50
Prothiofos	11.1	20.1	48.8	<u>55.6</u>	55.8	67.9	2.00

ผลการประเมินประสิทธิภาพของการทดสอบ

ผลการตรวจหาสารกำจัดแมลงกลุ่ม CM และ OP ในตัวอย่าง unknown จำนวน 106 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค electrometric method โดยใช้ pH meter เปรียบเทียบกับเทคนิค HPLC พบว่า ได้ผลบวกจริง 18 ตัวอย่าง ผลลบจริง 88 ตัวอย่าง ผลลบเทียม 2 ตัวอย่าง และไม่พบผลบวกเทียม (ตารางที่ 5) เมื่อนำมาคำนวณแล้วพบว่า มีค่าความไว 88.9% ความจำเพาะ 100.0% ความแม่นยำ 98.1% ความสามารถในการทำนายผลบวกที่ตรวจพบ 100.0% และความสามารถในการทำนายผลลบที่ตรวจไม่พบ 97.8% และผลเปรียบเทียบกับเทคนิค TLC พบว่า ได้ผลบวกจริง 14 ตัวอย่าง ผลลบจริง 92 ตัวอย่าง ผลบวกเทียม 2 ตัวอย่าง และไม่พบผลลบเทียม (ตารางที่ 6) เมื่อนำมาคำนวณแล้วพบว่า มีค่าความไว 100.0% ความจำเพาะ 97.8% ความแม่นยำ 98.1% ความสามารถในการทำนายผลบวกที่ตรวจพบ 87.5% และความสามารถในการทำนายผลลบที่ตรวจไม่พบ 100.0 %

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบผลการตรวจหาสารกำจัดแมลงในตัวอย่าง unknown ด้วยเทคนิค electrometric method กับ HPLC

วิธี		HPLC		ผลรวม
		ผลบวก	ผลลบ	
pH meter	ผลบวก	16	0	16
(developed method)	ผลลบ	2 (ผลลบเทียม)	88	90
	ผลรวม	18	88	106

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบผลการตรวจหาสารกำจัดแมลงในตัวอย่าง unknown ด้วยเทคนิค electrometric method กับ TLC

วิธี		TLC		ผลรวม
		ผลบวก	ผลลบ	
electrometric	ผลบวก	14	2 (ผลบวกเทียม)	16
method (developed	ผลลบ	0	90	90
method)	ผลรวม	14	92	106

ผลการเปรียบเทียบชนิดของสารกำจัดแมลงที่ตรวจพบในตัวอย่าง อาหารสัตว์ อาหารในกระเพาะ สัตว์ และตับสัตว์ ด้วยเทคนิค HPLC และ TLC กับค่า %ChE inhibition (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบชนิดของสารกำจัดแมลงที่ตรวจพบในตัวอย่าง unknown ด้วยเทคนิค HPLC และ TLC กับค่า %ChE inhibition

ชนิดตัวอย่าง	ผลจาก HPLC	ผลจาก TLC	%ChE inhibition
อาหารสัตว์ 1	methomyl	methomyl	84
อาหารสัตว์ 2	methomyl	methomyl	83
อาหารสัตว์ 3	methomyl และ carbofuran	methomyl และ carbofuran	84
อาหารสัตว์ 4	methomyl	methomyl	98
อาหารสัตว์ 5	methomyl	methomyl	91
อาหารในกระเพาะ 6	methomyl	methomyl	78
อาหารในกระเพาะ 7	methomyl	methomyl	74
อาหารในกระเพาะ 8	methomyl และ carbofuran	methomyl และ carbofuran	68
อาหารในกระเพาะ 9	aldicarb	ไม่พบ	77
อาหารในกระเพาะ 10	aldicarb	ไม่พบ	88
อาหารในกระเพาะ 11	methomyl	methomyl	56
อาหารในกระเพาะ 12	methomyl	methomyl	67
ตับ 13	methomyl	methomyl	64
ตับ 14	methomyl และ 3-hydroxycarbofuran	methomyl และ 3-hydroxycarbofuran	62
ตับ 15	methomyl	methomyl	53
ตับ 16	methomyl	methomyl	78
ตับ 17	aldicarb sulfone และ aldicarb sulfoxide	ไม่พบ	22
ตับ 18	aldicarb sulfone และ aldicarb sulfoxide	ไม่พบ	25

วิจารณ์และสรุปผล

การศึกษานี้ได้ศึกษาการใช้เอนไซม์ ChE ในเลือดโคแทนการใช้เอนไซม์ทางการค้าที่มีราคาแพงมาพัฒนาเป็นวิธีทดสอบสำหรับตรวจหาสารกำจัดแมลงในตัวอย่างปศุสัตว์ โดยนำมาเตรียมเป็นสารละลาย blood enzyme buffer เพื่อใช้เป็นสารทดสอบสำหรับในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา ChE inhibition พบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเลือดโคกับสารละลาย barbital phosphate buffer คือ 1:30 เนื่องจากเป็นอัตราส่วนที่ทำให้ %ChE inhibition ของสารกำจัดแมลงกลุ่ม CM และ OP ส่วนใหญ่มีค่ามากที่สุด (6/8) อย่างไรก็ตาม สามารถใช้อัตราส่วน 1:20 และ 1:40 ได้เช่นเดียวกัน เนื่องจาก %ChE inhibition มีค่าไม่แตกต่างจากอัตราส่วน 1:30 อย่างมีนัยสำคัญ และการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการทดลองหาตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง อย่างไรก็ตาม ผู้ทำการทดลองได้เลือกใช้ acetonitrile เป็นตัวทำละลายในการสกัดสารกำจัดแมลงกลุ่ม CM และ OP ออกจากตัวอย่างอาหารในกระเพาะและตับของสัตว์ตามวิธีของจาร์สและคณะ (2556) เพราะสามารถตกตะกอนโปรตีนและเอนไซม์ที่เป็นสารรบกวนในตัวอย่างได้ แต่ acetonitrile สามารถทำให้เอนไซม์ ChE ในสารละลาย blood enzyme buffer ตกตะกอนได้ ดังนั้น จึงต้องระเหย acetonitrile ออกให้หมดก่อนนำไปทดสอบ

ค่า LOD ของสารกำจัดแมลงกลุ่ม CM 4 ชนิด และ OP 4 ชนิด ในตัวอย่างอาหารสัตว์ อาหารในกระเพาะและตับของสัตว์ ที่ตัดสินจากค่า %ChE inhibition ที่ระดับ 50% ขึ้นไป พบว่า LOD ของสารกำจัดแมลงกลุ่ม CM ทั้ง 4 ชนิด มีค่าตั้งแต่ 0.20-4.00 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และกลุ่ม OP ทั้ง 4 ชนิด มีค่าตั้งแต่ 0.50-4.00 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เมื่อพิจารณาสารกำจัดแมลงแต่ละชนิด พบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจได้ มีค่าน้อยกว่า 5.00 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่มีความเหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยความเป็นพิษของสารกลุ่ม CM และ OP เนื่องจากส่วนใหญ่สารกำจัดแมลงมีค่า LD₅₀ มากกว่า 5.00 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (มาลินี, 2523) ไกล่เคียงกับการศึกษาของจาร์สและคณะ (2556) ที่ใช้เอนไซม์ ChE ในซีรัมโคตรวจหาสารกำจัดแมลงกลุ่ม CM ในตัวอย่างปศุสัตว์ ได้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจได้อยู่ในช่วง 0.25-5.00 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และ Kim et al. (2007) ศึกษาเอนไซม์ ChE จากผึ้ง พัฒนาชุดทดสอบสารกำจัดแมลงในตัวอย่างทางการเกษตร พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจได้อยู่ในช่วง 0.50-4.75 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งตัดสินจากค่า %ChE inhibition ที่ระดับ 50% ในขณะที่ Chiu et al. (1991) ศึกษาการใช้เอนไซม์ ChE จากหัวแมลงวัน ตรวจหาสารกำจัดแมลงในตัวอย่างผักและผลไม้ โดยตัดสินจากค่า %ChE inhibition ที่ระดับ 25% พบมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจได้อยู่ในช่วง 0.001-5.670 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ผลการตรวจหาสารกำจัดแมลงกลุ่ม CM และ OP ในตัวอย่าง unknown (อาหารสัตว์ อาหารในกระเพาะและตับของสัตว์) ด้วยเทคนิค electrometric method โดยใช้ pH meter ที่พัฒนาขึ้นมา

เปรียบเทียบกับเทคนิค HPLC (ตารางที่ 7) พบว่า ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับ HPLC มีจำนวนทั้งหมด 18 ตัวอย่าง โดย 16 ตัวอย่าง มีค่า %ChE inhibition มากกว่า 50% ในขณะที่มี 2 ตัวอย่าง มีค่า %ChE inhibition น้อยกว่า 50 คือ 22 และ 25 ซึ่งทำให้เกิดเป็นผลลบเทียม จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบสาร aldicarb sulfone และ aldicarb sulfoxide ซึ่งเป็นสาร metabolite จึงมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ChE น้อยกว่า จึงทำให้ตรวจไม่พบโดยวิธีนี้ ดังนั้น หากตัวอย่างเป็นตับของสัตว์หรืออวัยวะภายในแนะนำให้ใช้เกณฑ์ตัดสินจากค่า %ChE inhibition ที่ระดับมากกว่า 20% เพื่อเป็นการคัดกรองตัวอย่างบวกได้มีความถูกต้องมากขึ้น ในขณะที่ผลการเปรียบเทียบกับเทคนิค TLC พบว่า ให้ผลบวกไม่ตรงกัน จำนวน 2 ตัวอย่าง เนื่องจากน้ำยาเคมีที่ใช้เป็น spray developer reagent ในเทคนิค TLC ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์สาร aldicarb ได้ จึงทำให้เกิดเป็นผลบวกเทียม นอกจากนี้ การทดสอบนี้อาจให้ผลบวกเทียม หรือ cross reaction กับสารอื่นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ChE ได้เช่นเดียวกับสารกำจัดแมลงกลุ่ม CM และ OP

ผลการประเมินประสิทธิภาพของวิธีโดยเปรียบเทียบกับเทคนิค HPLC และ TLC พบว่า มีความไว ความจำเพาะ ความแม่นยำ ความสามารถในการทำนายผลบวก และความสามารถในการทำนายผลลบของวิธี มากกว่า 80% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (Eleftherios, 2002) ดังนั้น สรุปได้ว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นมาสามารถนำไปใช้ตรวจคัดกรองความเป็นพิษของสารกำจัดแมลงกลุ่ม CM และ OP ในตัวอย่างปศุสัตว์ อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับวิธีนี้ต้องตรวจพิสูจน์ยืนยันด้วยเทคนิค HPLC หรือ GC ต่อไป เพื่อให้สามารถนำไปประกอบการวินิจฉัยทางพิษวิทยาในสัตว์ได้อย่างถูกต้อง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีวเคมีและพิษวิทยา ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน จ.ลำปาง ที่ช่วยทำการวิเคราะห์และทดลอง ทำให้การศึกษาในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

จำรัส เลิศศรี พรพรรณ เล่าลือ และชัยวัฒน์ วิทุระกุล. 2556. การพัฒนาวิธีตรวจหาสารกำจัดแมลงกลุ่มคาร์บาเมทในตัวอย่างปศุสัตว์โดยใช้เอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสในซีรัมโค. เรื่องเต็มการประชุมวิชาการสุขภาพสัตว์ประจำปี 2556 ณ โรงแรมเมทวาลัย ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี. หน้า 76-84.

มาลินี ลิ้มโกคา. 2523. พิษวิทยาและการวินิจฉัยโรคทางสัตวแพทย์. โรงพิมพ์จรัสสินทวงศ์. กรุงเทพฯ. หน้า 47-63.

Arnot, L.F., Veale, J.H., Steyl, J.C.A. and Myburgh, J.G. 2011. Treatment rationale for dogs

- poisoned with aldicarb (carbamate pesticide). J. S. Afr. Vet. Assoc. 82(4): 232–238.
- Chiu, C.S., Kao, C.H. and Cheng, E.Y. 1991. Rapid bioassay of pesticides residues (RBPR) on fruits and vegetables. J. Agric. Res. China. 40(3): 188-203.
- Clarke, M.L., Harvey, D.G. and Humphreys, D.J. 1981. Veterinary toxicology. 2nd ed., Cassell Ltd., London, England. p. 146-154.
- Eleftherios, C.V. 2002. Diagnostic accuracy of laboratory tests and the establishment of reference range in laboratory management and clinical correlations. Lippincott Williams & Wilkins. p. 109-121.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. and Featherstone, R.M. 1961. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology. 7: 88-95.
- Kim, B.M., Abd El-Aty, A.M., Hwang, T.E., Jin, L.T., Kim, Y.S. and Shim, J.H. 2007. Development of an acetylcholinesterase-based detection kit for the determination of organophosphorus and carbamate pesticide residues in agricultural samples. Korean Chem. Soc. 28(6): 929-935.
- Lea, P. and Mladen, F. 2003. Photothermal bioanalytical methods for pesticide toxicity testing. Arh. Hig. Rada Toksikol. 54: 197-205.
- Meerdink, G.L. 2003. Anticholinesterase insecticides. In: Clinical Veterinary toxicology. edited by H.P. Konnie. Philadelphia, U.S.A. p. 178-180.
- Mohammad, F.K., Al-Zubaidy, M.H.I. and Alias, A.S. 2007. Electrometric determination of erythrocyte, plasma and whole blood cholinesterase activities in sheep, goats and cattle and Their *in vitro* inhibition by anticholinesterase insecticides. Journal of Pharmacology and Toxicology. 2: 131-141.
- Sophie, M., Kelly, F., Georgia, M., Olga, M., Alexandros, M. and Spiridon, K. 2008. Assessment of organophosphate and carbamate pesticide residues in cigarette tobacco with a novel cell biosensor. Sensors. 8: 2818-2832.
- Wilson, B.W. and Henderson, J.D. 1992. Blood esterase determination as makers of exposure. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 128: 56-69.
- Windholz, M., Budavari, S., Blumetti R.F. and Otterbein, E.S. 1983. The Merck index. 10th ed. Merck and Co., Rahway. p.246-247.

Development of Method for Carbamate and Organophosphate Poisoning Diagnosis in Livestock Samples by pH Meter

Jamras Lertsri* Wattanasak Chamlaikhorn Sirikhuan Sangmanee

Veterinary Research and Development Center (Upper Northern Region) Hangchat, Lampang 52190

*Corresponding author Tel. 081-7835485, 082-6619714. E-mail: vrd_np@dld.go.th

Abstract

The objective of this study was to develop electrometric method by using pH meter based on cholinesterase inhibition technique to detect carbamate and organophosphate insecticides in livestock samples including animal feed, stomach content and liver which was used to diagnose the both group of insecticides poisoning. In order to determine the efficiency of developed method; limit of detection (LOD) and compare the results from developed method, high performance liquid chromatography (HPLC) and thin layer chromatography (TLC) to evaluate the test performances. The test performance was evaluated using relative sensitivity, relative specificity, relative accuracy, relative positive predictive value and relative negative predictive value. The results showed that LOD of 4 carbamate insecticides : carbofuran, 3-hydroxycarbofuran, methomyl, carbaryl and 4 organophosphate insecticides chlorpyrifos, dichlorvos, methy-parathion, prothiofos were ranging from 0.20-4.00 and 0.50-4.00 mg/kg, respectively. The comparison of results which detected by this method and HPLC showed 88.9% relative sensitivity, 100.0% relative specificity, 98.1% relative accuracy, 100.0 % relative positive predictive value and 97.8% relative negative predictive value. Whereas, the comparison of results which detected by this method and TLC showed 100% relative sensitivity, 97.8% relative specificity, 98.1% relative accuracy, 87.5 % relative positive predictive value and 100% relative negative predictive value. In conclusion, the developed method has been developed for the determination of carbamate and organophosphate insecticides in livestock samples which can be used for poisoning diagnosis. This method is simple, time reduction, cost-effectiveness and can be done in the field.

Keywords: carbamate, organophosphate, livestock sample, cholinesterase inhibition, pH meter