ความไวและความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดไดคลอร์วอส โดยใช้พอลิไดแอเซทิลีนร่วมกับกรดไขมันบนกระดาษ

Sensitivity and Selectivity of Dichlorvos Detection Using Polydiacetylene Incorporated with Fatty Acid on Paper

รุ่งนภา พิมเสน* จรสวรรณ จันทร์เรือง และ สุภัสสรณ์ สังสัมพันธ์****
Rungnapa Pimsen*, Jarasawan Janruang** and Supassorn Sangsampan****

บทคัดย่อ

ไดคลอร์วอสเป็นสารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตที่มีการนำไปใช้อย่างกว้างขวางมีความสามารถเป็นพิษอย่างเฉียบพลันและเรื้อรังเป็นวัตถุอันตรายที่มีความเสี่ยงต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม องค์การอนามัยโลก (WHO) กำหนดค่าสูงสุดของไดคลอวอสที่สามารถยอมรับให้มีได้ในตัวอย่างแต่ละชนิดแตกต่างกัน อยู่ในช่วงระหว่าง 10 พีพีบี-15 พีพีเอ็ม ความเป็นพิษของไดคลอร์วอสสัมพันธ์กับฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอเซทิลโคลีนเอสเทอร์เรส (acetycholinesterase, AChE) ของไดคลอร์วอสบนพื้นฐานของความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์นี้ การตรวจวัดสีของไดคลอร์วอสที่มีความไวและจำเพาะเจาะจงถูกพัฒนาขึ้นโดยใช้พอลิไดแอเซทิลีนบนกระดาษเป็นตัวแสดงผล โดยใช้ไมริสโทอิลโคลีนที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถเหนี่ยวนำให้พอลิไดแอเซทิลีนบนกระดาษเกิดการเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเป็นสีแดง เมื่อไมริสโทอิลโคลีนถูกบ่มด้วยเอนไซม์แอเซทิลโคลีนเอสเทอร์เรสจะถูกเอนไซม์ไฮโดรไลซ์เป็นกรดไมริสติกและโคลีนที่ซึ่งไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเป็นสีของพอลิไดแอเซทิลีนบนกระดาษ เมื่อเอนไซม์แอเซทิลโคลีนเอสเทอร์เรสผสมกับไดคลอร์วอสก่อนการบ่มด้วยไมริสโทอิล-โคลีนสามารถทำให้พอลิไดแอเซทิลีนบนกระดาษเกิดการเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเป็นสีแดงอีกครั้ง สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจวัดสารไดคลอร์วอสโดยใช้พอลิไดแอเซทิลีนบนกระดาษเป็นตัวแสดงผลคือ MC 200 µM, AChE 3 U/mL และ pH 6.5 การเปลี่ยนสีสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่าที่ระดับความเข้มข้นของไดคลอร์วอส 500 พีพีบี การเติมกรดไขมันชนิดต่างๆ ได้แก่ กรดลอริก กรดไมริสติก กรดปาล์มมิติก และกรดเสตียริกพบว่า พอลิไดแอเซทิลีน/ 30% กรดเสตียริกบนกระดาษสามารถสังเกตการเปลี่ยนสีด้วยตาเปล่าที่ระดับความเข้มข้นของไดคลอร์วอสลดต่ำลงในระดับ 150 พีพีบี

คำสำคัญ : ไดคลอร์วอส,เอนไซม์แอเซทิลโคลีนเอสเทอร์เรส, พอลิไดแอเซทิลีน,ออร์แกโนฟอสเฟต

* อาจารย์ประจำหลักสูตรเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช
e-mail: rung_cha@yahoo.com

** นักศึกษาหลักสูตรเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

Abstract

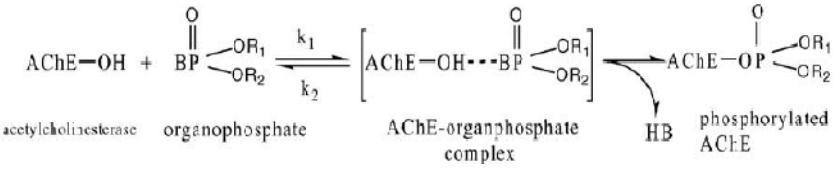
Dichlorvos is a wildly used organophosphate pesticide which possesses both acute and chronic toxicity instigating hazardous risks to humans and environment.The World Health Organization (WHO) defines the maximum acceptable to the different samples in the range between 10 ppb-15 ppm. The toxicity of dichlorvos is closely related to its strong acetycholinesterase inhibition activity. Based on this enzyme inhibition activity, a sensitive and selective colorimetric detection of dichlorvos is developed with a polydiacetylene (PDA) on paper. Using a threshold concentration of myristoylcholine, poly(10,12-pentacosadynoic acid) on paper was induced to exhibit a blue-to-red color transition. When incubating with acetylcholinesterase, myristoylcholine is enzymatically hydrolyzed to myristic acid and choline that preclude the color transition of the PDA on paper. When acetylcholinesterase is mixed with dichlorvos prior to the incubation with myristoylcholine, the color transition is resumed upon the addition of the PDA on paper. The optimum conditions for dichlorvos detection were MC 200 μM, AChE 3 U/mL andpH 6.5.The color transition is also observable by naked eye in which 500 ppb dichlorvos.The addition of fatty acids such as lauric acid, myristic acid, palmitic acid and stearic acid, polydiacetyle/30%stearic acid can be visually detected. The limit of detection is lowered to 150 ppb.

Keywords: Dichlorvos, acetycholinesterase, polydiacetylene, organophosphate

1. บทนำ

สารกำจัดศัตรูพืชไดคลอร์วอส (Demikhovsky, *et al*., 2011) (Dichlorvos) เป็นวัตถุอันตรายทางการเกษตร (Pesticides) ใช้เป็นสารเคมีกำจัดแมลงอยู่ในกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตมีประโยชน์ คือสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มนี้นำไปใช้ในการเกษตรและใช้ในครัวเรือนเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะมีผลต่อระบบอวัยวะส่วนต่างๆ ของร่างกาย เช่น ระบบประสาท กล้ามเนื้อ การหายใจ และสมอง เป็นต้น องค์การอนามัยโลก (WHO) พบว่า ปริมาณไดคลอร์วอสที่ยอมรับได้ในหนูมีได้อยู่ในช่วงระหว่าง 56-108 mg/kg และมีค่าปริมาณของสารที่ทำให้เกิดอันตรายอย่างรุนแรงต่อชีวิตโดยเฉียบพลัน (IDLH) เท่ากับ 11 ppm โดยกำหนดค่าสูงสุดของไดคลอร์วอสที่สามารถยอมรับให้มีได้ในตัวอย่างแต่ละชนิดแตกต่างกัน อยู่ในช่วงระหว่าง10 พีพีบี-15 พีพีเอ็ม (Mishra, Dominguez & Bhand, 2012) สารออร์กาโนฟอสเฟตย่อยสลายได้ง่ายดังนั้นปัญหามลพิษที่เกิดจากสารสะสมตัวในสิ่งแวดล้อมทั้งในดิน น้ำ และอากาศจึงไม่รุนแรงแต่หากมีการสัมผัสสารกลุ่มนี้โดยตรงจะทำให้เกิดภาวะเป็นพิษเฉียบพลันรุนแรงเนื่องจากสารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ที่สำคัญคือไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase (AChE)) เอนไซม์ชนิดนี้จะทำหน้าที่ย่อยแอเซทิลโคลีน

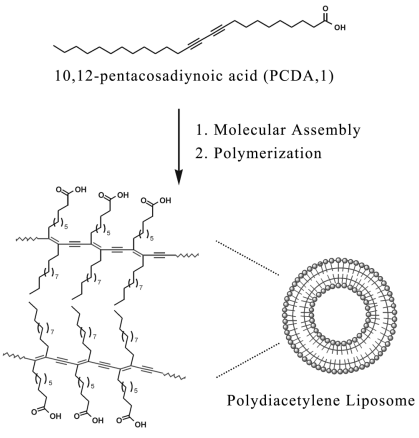
(Acetylcholine) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาททำให้มีปริมาณแอเซทิลโคลีน คั่งค้างในร่างกายมากมีอาการเหมือนการกระตุ้นระบบประสาทมีการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบในทางเดินอาหารคลื่นไส้อาเจียนปวดเกร็งในท้องท้องเดินน้ำหลั่งต่างๆ เพิ่มมากขึ้นรูม่านตาหดหลอดลมตีบกล้ามเนื้ออ่อนกำลังและมีการกระตุกกล้ามเนื้อที่ใช้ในการหายใจเกิดอัมพาตและตายได้กลไกการยับยั้งดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 กลไกการยับยั้งเอนไซม์แอเซทิลโคลีนเอสเทอเรสโดยสารออร์กาโนฟอสเฟต
ที่มา: Shengye, *et al*., 2004.

ปัจจุบันการวิเคราะห์หาปริมาณออร์กาโนฟอสเฟตมีหลายวิธีเช่น gas chromatography (GC), high performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความถูกต้องและแม่นยำในการวิเคราะห์สูงแต่การวิเคราะห์จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพงทำการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการโดยนักวิเคราะห์ซึ่งต้องมีการจัดส่งตัวอย่างใช้เวลานานในการวิเคราะห์และค่าใช้จ่ายสูงการพัฒนาชุดตรวจสอบที่ใช้งานได้ง่ายและสังเกตเห็นการวิเคราะห์ได้ด้วยตาเปล่าจึงมีความน่าสนใจ

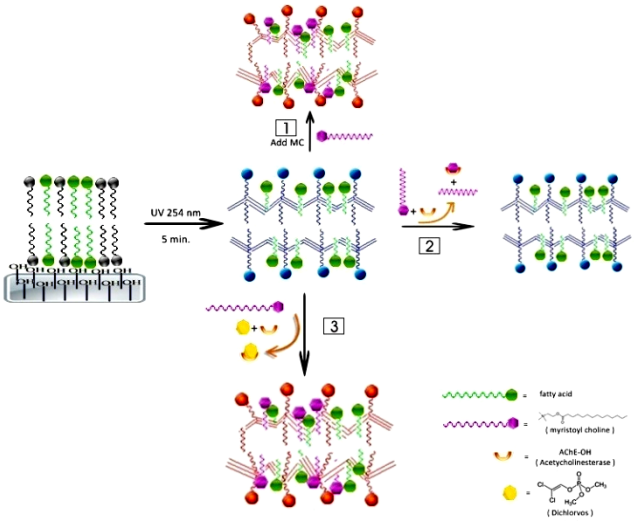
พอลิไดแอเซทิลีนเป็นคอนจูเกตพอลิเมอร์ประกอบด้วยคอนจูเกตของพันธะคู่ (Ene) และพันธะสาม (Yne) เตรียมจาก 10,12-เพนตะโคซะไดอายโนอิกแอซิด ผ่านปฏิกิริยาโฟโตพอลิเมอไรเซชันด้วยการฉายแสงยูวี ที่ 254 นาโนเมตร ได้สารละลายสีน้ำเงินเข้มที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร โครงสร้างทางเคมีของ 10,12-เพนตะโคซะไดอายโนอิกแอซิด จะมีส่วนหัวที่ชอบน้ำคือหมู่คาร์บอกซิลิกและส่วนหางที่ไม่ชอบน้ำคือหมู่แอลคิล เมื่อเกิดปฏิกิริยาโฟโตพอลิเมอไรเซชันในสารละลายส่วนหางจะถูกซ่อนไว้เกิดเป็นไบเลเยอร์เมื่อได้รับแรงกระทำไบเลเยอร์จะจัดเรียงตัวเป็นทรงกลมที่เรียกว่าเวสิเคิล โดยหมู่คาร์บอกซิลิกจะอยู่ที่ขอบของเวสิเคิลและเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกด้วยกัน ดังแสดงในภาพที่ 2 พอลิไดแอเซทิลีนสามารถเปลี่ยนสีได้เนื่องจากระบบคอนจูเกตของพอลิไดแอเซทิลีนทำให้อิเล็กตรอนสามารถเกิดการเคลื่อนที่ไปมาในสายโซ่หลักได้ทำให้เห็นเป็นสารละลายสีน้ำเงินความยาวคลื่นประมาณ 640 นาโนเมตร แต่เมื่อมีการกระตุ้นจากสิ่งเร้าและสารเคมีบางชนิดเช่น ความร้อน(Xiaoqiang & Juyoung, 2011) (สารประกอบอะโรมาติก (Champaiboon, *et al.,* 2009) และโลหะหนัก (Narkwiboonwong, *et al*., 2011) เป็นต้น จะทำให้สายโซ่เกิดการบิดตัวอิเล็กตรอนไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ในช่วงที่สายโซ่มีการบิดตัวส่งผลให้คอนจูเกตสั้นลงสีที่เห็นจะเป็นสีแดงที่ความยาวคลื่นประมาณ 540 นาโนเมตร ลักษณะเด่นของพอลิไดแอเซทิลีนคือมีสมบัติการเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเป็นสีแดงได้จึงนิยมใช้เป็นเซนเซอร์วัดโมเลกุลเป้าหมายที่สามารถสังเกตการเปลี่ยนสีได้ด้วยตาเปล่า



ภาพที่ 2 แสดงพอลิไดแอเซทิลีนเวสิเคิลที่เตรียมจาก 10, 12-เพนตะโคซะไดอายโนอิกแอ
ที่มา: Ji, Ahn & Kim, 2003.

จากการศึกษางานวิจัยพบว่าเอนไซม์แอเซทิลโคลีนเอสเทอเรสสามารถย่อยสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุบวกที่มีส่วนหัวเป็นโคลีน ซึ่งเป็นแอมโมเนียมไอออนได้เป็นแอซิด (Acid) และโคลีน (Choline) (Kim, *et al*., 2008) โดยสารดังกล่าวจะไปรบกวนการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างส่วนหัวที่เป็นหมู่ฟีนอลิก โดยแรงกระทำไอออนิกระหว่างหมู่ฟีนอเลตของส่วนหัวกับหมู่แอมโมเนียมของสารลดแรงตึงผิวส่งผลให้โครงสร้างหลักของพอลิไดแอเซทิลีนเกิดการบิดตัวระบบคอนจูเกตสั้นลงจึงทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของพอลิไดแอเซทิลีนจากสีน้ำเงินเป็นสีแดง (Xiaoqiang, *et al*., 2009) และสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงสนใจที่จะนำหลักการสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุบวกสามารถเปลี่ยนสีของพอลิไดแอเซทิลีน จากน้ำเงินเป็นสีแดง เมื่อมีการเติมเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสเอนไซม์จะย่อยสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวกได้ประจุลบทำให้เกิดการผลักกันของประจุลบ (Charge repulsion) ระหว่างส่วนหัวของพอลิไดแอเซทิลีนและประจุลบของสารลดแรงตึงผิวความยาวของระบบคอนจูเกตของพอลิไดแอเซทิลีนไม่มีการเปลี่ยนแปลง ทำให้สารลดแรงตึงผิวดังกล่าวไม่สามารถเปลี่ยนสีของพอลิไดแอเซทิลีนได้แต่เมื่อมีการเติมสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต สารกลุ่มนี้จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสทำให้สารลดแรงตึงผิวไม่ถูกย่อยส่วนหัวยังคงเป็นประจุบวกเหมือนเดิมทำให้มีการเปลี่ยนสีของพอลิไดแอเซทิลีนจากน้ำเงินเป็นสีแดงอีกครั้ง

ดังนั้นเพื่อให้สะดวกในการใช้งานงานวิจัยนี้จึงมีการพัฒนาเป็นแผ่นตรวจวัดพอลิไดแอเซทิลีนบนกระดาษให้ผลเป็นบวกเมื่อมีสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและให้ผลเป็นลบเมื่อไม่มีสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตดังกลไกที่เสนอในภาพที่ 3 จากหลักการดังกล่าวจะสามารถตรวจวัดหาสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ซึ่งงานวิจัยนี้ใช้ไดคลอร์วอสเป็นตัวแทนสารกลุ่มนี้ได้โดยเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน ราคาถูกและรวดเร็ว



ภาพที่ 3 กลไกการตรวจวัดไดคลอร์วอสโดยใช้พอลิไดแอเซทิลีนเป็นตัวแสดงผล

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

2.1 วัสดุ อุปกรณ์

- 10, 12-Pentacosadynoic acid (PCDA) บริษัท GFS, USA

- Acetycholinesterase (EC3.1.1.7, V-Stype from electric eel, 2000 units mg^{-1} proteinบริษัทSigma Aldrich, Germany

- 2, 2-Dichoroethenyl dimethyl phosphate (Dichlorvos)บริษัทFluka, Switzerland

-Myristoylcholine (MC) บริษัทSigma Aldrich

- Lauric acidบริษัท Merck, Germany

-Myristic acid บริษัท Merck, Germany

-Palmitic acid บริษัท Merck, Germany

- Stearic acid บริษัท Merck, Germany

- UV Lamp, TUV 15W/G15 T18 lamp บริษัท Philips, Holland

- Ultrasonicatorบริษัท Elma, Germany

- Hot plated magnetic stirrer บริษัท IKA, Germany

- Scanner บริษัท Epson v33

โดยสารเคมีและตัวทำละลายที่ใช้ในงานวิจัยเป็นเกรดวิเคราะห์ทุกชนิด

2.2 วิธีการวิจัย

2.2.1 การเตรียมไดแอเซทิลีน 0.7mM

นำไดแอเซทิลีนมอนอเมอร์ (PCDA) 0.035 mmol ละลายในคลอโรฟอร์ม ปรับปริมาตรเป็น 50 mL โดยใช้คลอโรฟอร์ม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ̊C ก่อนนำไปใช้งาน

2.2.2 การเตรียมพอลิไดแอเซทิลีนเวสิเคิลติดบนกระดาษกรอง

นำ 0.7 mm ไดแอเซทิลีนมอนอเมอร์ (PCDA) ปริมาตร 0.1 µl หยดลงบนกระดาษกรอง จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา polymerization ด้วยรังสียูวี 254 nm เป็นเวลา 5 นาที

2.2.3 การเตรียมสารละลายไมริสโทอิลโคลีน (MC)

ชั่ง MC 0.0053 g ละลายด้วยน้ำกลั่น25 mL คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

2.2.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของไดคลอร์วอสที่สามารถเปลี่ยนสี poly(PCDA)

2.2.4.1 ศึกษาการตอบสนองการเปลี่ยนสีของ poly(PCDA) ต่อสภาวะ pHและความเข้มข้นของMC ที่เหมาะสม

เตรียมสารละลาย PBS บัฟเฟอร์ 0.1 M โดยใช้ชั่ง NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g , Na_2HPO_4 1.25 g, KH_2PO_4 0.2 g นำแต่ละส่วนค่อยๆ ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ของสารละลายให้ได้ pH5.5, 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 ตามลำดับ ปรับความเข้มข้นของ MC ที่ความเข้มข้นต่างกัน (0- 400 µM) ด้วย PBS บัฟเฟอร์ และน้ำกลั่น จากนั้นปิเปตสารละลายผสม 12 µL หยดลงบน poly(PCDA) ที่เตรียมไว้บนกระดาษกรอง ตั้งทิ้งไว้ 5นาที นำแผ่นทดสอบไปสแกนด้วยเครื่องสแกนเนอร์

2.2.4.2 ศึกษาการตอบสนองการเปลี่ยนสีของ poly(PCDA) ต่อปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสม

สารละลายไมริสโทอิลโคลีน (MC: 200 µM) ใน PBS บัฟเฟอร์ pH 6.5 ทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสม คือ4, 8 และ 12 µL หยดลงบน poly(PCDA)บนกระดาษกรองตั้งทิ้งไว้ 5นาที แล้วนำไปสแกนด้วยเครื่องสแกนเนอร์

2.2.4.3 เตรียม poly(PCDA/fatty acid) บนกระดาษกรอง

ผสม 7 mM PCDA กับ 7 mM กรดไขมันชนิดต่างๆ คือ กรดลอริก (LA) กรดไมริสติก (MA) กรดปาล์มิติก (PA) และกรดสเตียริก (SA) ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด ในอัตราส่วนความเข้มข้นของกรดไขมันตั้งแต่ 0 – 50 % ปิเปตสารละลายผสม 0.1 µL หยดลงบนกระดาษกรอง แล้วนำไปทำปฏิกิริยาpolymerization ด้วยรังสี UV 254 nm เป็นเวลา 5 นาที

2.2.4.4 ศึกษาการตอบสนองการเปลี่ยนสีของ poly(PCDA) ต่อชนิดและความเข้มข้นของ fatty acid ที่เหมาะสม

ปิเปตสารละลายไมริสโทอิลโคลีน (MC; 200 µM) ใน PBS บัฟเฟอร์ pH 6.5 ปริมาตร 12 µL หยดลงบน poly(PCDA/fatty acid) ที่เตรียมได้จาก 2.2.3.3 ตั้งทิ้งไว้ 5นาที แล้วนำไปสแกนด้วยเครื่องสแกนเนอร์

2.2.4.5 ศึกษาการตอบสนองต่อการเปลี่ยนสีของ poly (PCDA/30%SA) ต่อปริมาณ MC ที่เหมาะสม

เตรียมสารละลาย MC ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0 – 400 µM) ใน PBS บัฟเฟอร์ pH 6.5 และน้ำกลั่น จากนั้นปิเปตสารละลาย MC 12 µL หยดลงบน poly (PCDA/30%SA) ตั้งทิ้งไว้ 5นาที แล้วนำไปสแกนด้วยเครื่องสแกนเนอร์

2.2.4.6 ศึกษาการตอบสนองการเปลี่ยนสีของpoly(PCDA/fatty acid) ต่อ MC/AchE

สารละลายไมริสโทอิลโคลีน (MC; 100 µM) ผสมกับ AChE ที่จำนวนเอมไซม์ต่างๆ (0–5 U/ml) ใน PBS บัฟเฟอร์ pH 6.5 นำสารละลายผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ๐C เป็นเวลา 30 นาทีจากนั้นปิเปตสารละลายผสม 12 µL หยดลงบน poly (PCDA/30%SA) แล้วนำไปสแกนด้วยเครื่องสแกนเนอร์ ที่เวลา 5 นาที

2.2.4.7 ศึกษาการตอบสนองการเปลี่ยนสีของpoly(PCDA/30%SA) ต่อ MC/AChE/Dichlorvos

ผสม AChE (2 U/ml) กับ Dichlorvos ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0–7.5 ppm) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ๐C เป็นเวลา 10 นาทีเติมสารละลาย MC (100 µM) นำสารละลายไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 30 ๐C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายผสม 12 µL หยดลงบนกระดาษกรองที่มีpoly (PCDA/30%SA) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาทีแล้วนำไปสแกนด้วยเครื่องสแกนเนอร์

2.2.5 การคำนวณค่า %RGB

ตัดภาพเฉพาะส่วนที่แสดงผลขนาด 2x2 cm^2 (ความละเอียดภาพ 72 $pixel/inch^2$) วัดค่า RGB จากโปรแกรม Adobe Photoshop CS5 เปอร์เซ็นต์ของสีแดง (%R) เปอร์เซ็นต์ของสีเขียว (%G) และ เปอร์เซ็นต์ของสีน้ำเงิน (%B) สามารถคำนวณได้ดังสมการ

$$\%R=R/(R+G+B) \times 100$$

$$\%G=G/(R+G+B) \times 100$$

$$\%B=B/(R+G+B) \times 100$$

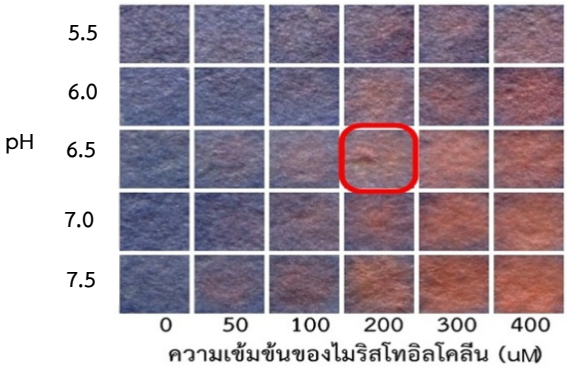
นำค่า %R, %G และ %B ที่คำนวณได้ในแต่ละขั้นตอนของการศึกษาไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ โดยจุดตัดระหว่างเส้นกราฟของ %R และ %B เป็นจุดที่มีการเปลี่ยนสีจะเป็นจุดที่ใช้ในการประมวลผลค่าความสามารถในการตรวจวัด

3. ผลการวิจัย

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ poly (PCDA) ร่วมกับ fatty acid เพื่อใช้เป็นตัวตรวจวัดไดคลอร์วอส โดยใช้ MC เป็นตัวเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงสีของ poly (PCDA) และ PBS บัฟเฟอร์เป็นตัวควบคุมสภาวะ pH ของระบบ โดยสามารถสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเป็นสีแดง และสามารถยืนยันผลในทางปริมาณด้วยการคำนวณค่า %RGB และนำมาเขียนกราฟเพื่อสังเกตจุดตัดของกราฟ %R และ %B ซึ่งเป็นจุดที่ poly (PCDA) มีการเปลี่ยนสี ซึ่งผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจวัดเป็นดังต่อไปนี้

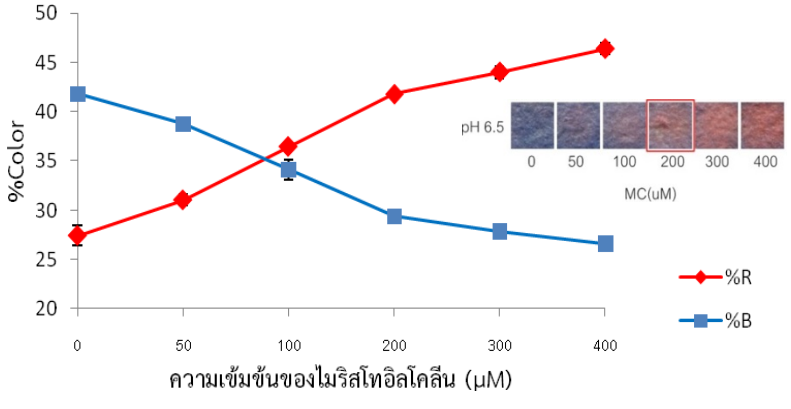
3.1 ผลการศึกษาการตอบสนองการเปลี่ยนสีของ poly(PCDA) ต่อสภาวะ pH และความเข้มข้น MC ที่เหมาะสม

จากการศึกษาการตอบสนองการเปลี่ยนสีของ poly (PCDA) ต่อสภาวะ pH และความเข้มข้น MC ที่เหมาะสม พบว่า poly (PCDA) จะเริ่มเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเป็นสีแดง เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของ MC เมื่อค่า pH เพิ่มขึ้นจะทำให้การเปลี่ยนสีเกิดขึ้นได้ง่ายขึ้น ภายในเวลา 5 นาที ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 การเปลี่ยนสีของ poly (PCDA) ที่ระดับความเข้มข้นของ MC 0, 50, 100, 200, 300 และ 400 µM และที่ pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 ในเวลา 5 นาที

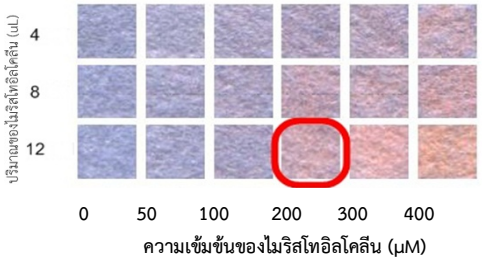
พบว่าที่ pH 6.5 poly (PCDA) มีการเปลี่ยนสีที่ความเข้มข้นประมาณ 200 µM และค่า %R มีแนวโน้มสูงขึ้น การเปลี่ยนสีของ poly (PCDA) จะเป็นสีแดงและเริ่มคงที่ ดังแสดงในภาพที่ 5 ดังนั้นความเข้มข้น MC 200 µM pH 6.5 และเวลา 5นาที จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่จะทดลองร่วมกับ fatty acid ต่อไป



ภาพที่ 5 เปอร์เซ็นต์การตอบสนองการเปลี่ยนสีของ poly(PCDA) ที่มีต่อความเข้มข้น MC 0, 50, 100, 200, 300 และ 400 µM ภายใต้สภาวะ pH 6.5 เวลา 5 นาที

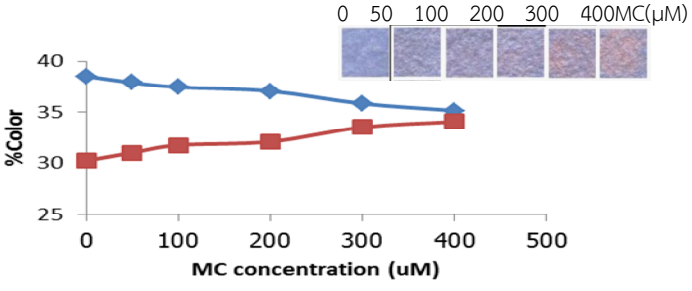
3.2 ผลการศึกษาการตอบสนองการเปลี่ยนสีของ poly (PCDA) ต่อปริมาณMC ที่เหมาะสม

การศึกษาการตอบสนองการเปลี่ยนสีของ poly (PCDA) ต่อปริมาณ MC ที่เหมาะสมพบว่า เมื่อใช้ปริมาตร MC 12 µL จะเกิดการเปลี่ยนสี poly (PCDA) ชัดเจน ที่ความเข้มข้น MC 200 µM ดังนั้น ปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง คือ MC 12 µL ดังแสดงในภาพที่ 6 และ ภาพที่ 7

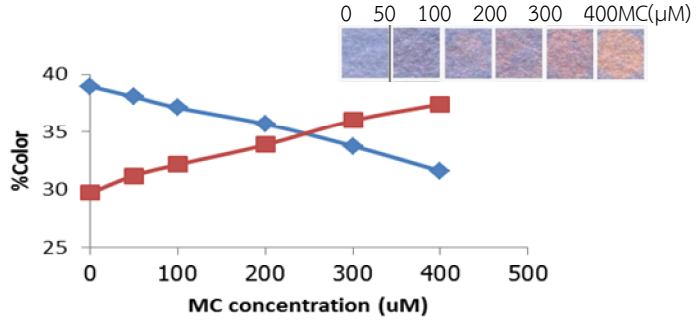


ภาพที่ 6 การเปลี่ยนสีของ poly (PCDA) ที่ปริมาณMC 4, 8 และ 12 µL ความเข้มข้นของ MC 0, 50, 100, 200, 300 และ 400 µM ภายใต้สภาวะ pH 6.5 เวลา 5 นาที

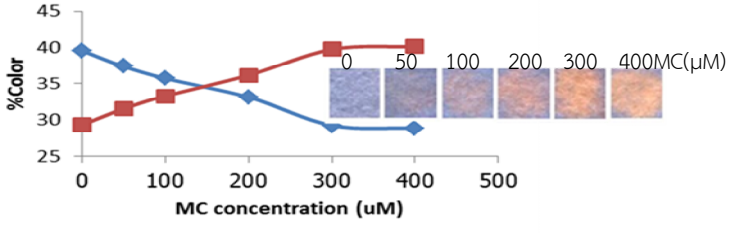
a)MC 4 µL



b)MC 8 µL



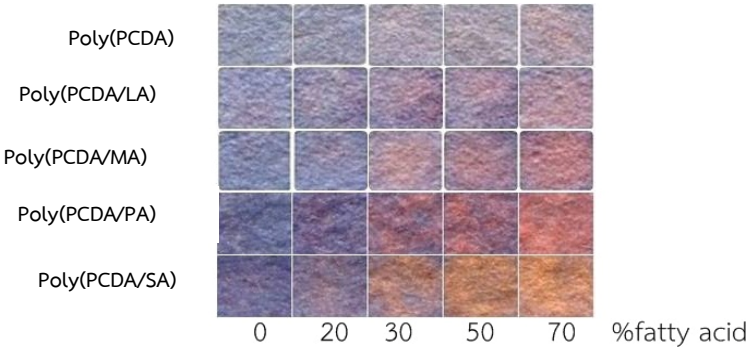
c) MC 12 µL



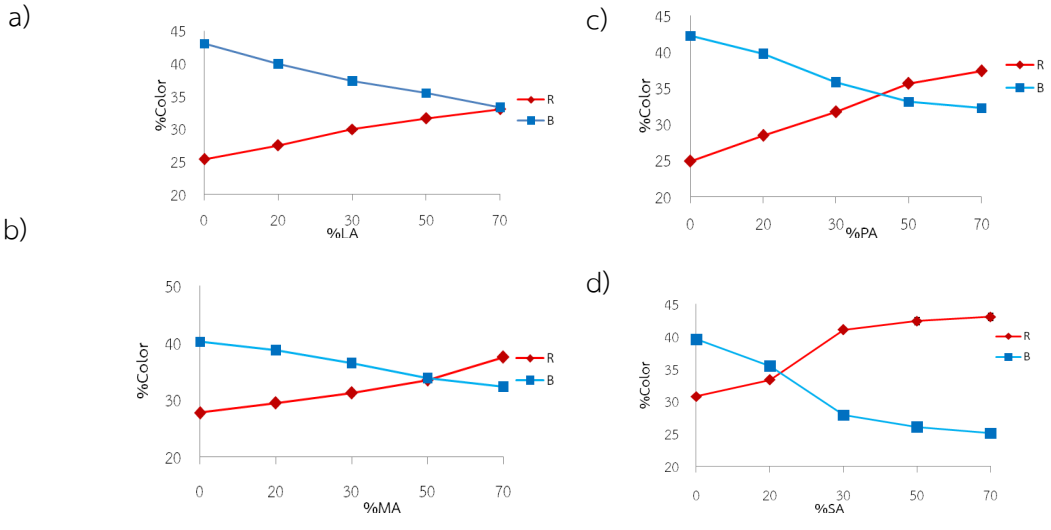
ภาพที่ 7 เปอร์เซ็นต์การตอบสนองการเปลี่ยนสีของ poly(PCDA) ที่มีต่อปริมาณ MC a) 4 µL, b) 8 µL และ c) 12 µL

3.3 ผลการศึกษาการตอบสนองการเปลี่ยนสีของ poly(PCDA) ต่อชนิดและความเข้มข้นของ fatty acid ที่เหมาะสม

จากการศึกษาการตอบสนองการเปลี่ยนสีของ poly(PCDA) ต่อชนิดและความเข้มข้นของ fatty acid ที่เหมาะสม ด้วย MC (12 µL, 200 µM) พบว่า poly (PCDA/30%SA) เกิดการเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเป็นสีแดงได้ชัดเจนขึ้นกว่า fatty acid ชนิดอื่นๆ ดังภาพที่ 8 และภาพที่ 9 ดังนั้น 30%SA จึงเป็นความเข้มข้นและชนิด fatty acid ที่เหมาะสมในการทดลอง



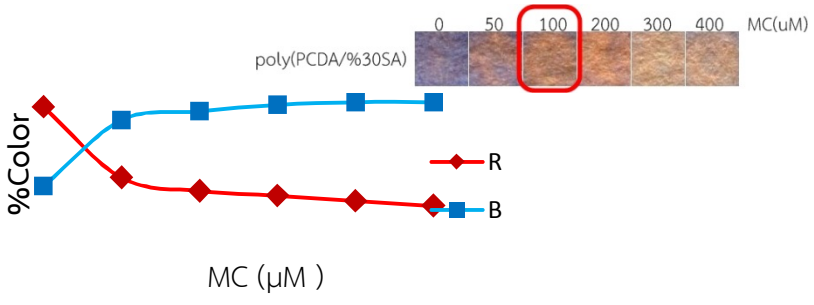
ภาพที่ 8 การเปลี่ยนสีของ poly(PCDA/fatty acid) ที่มีต่อความเข้มข้นของ fatty acid (LA, MA, PA, SA) 0, 20, 30, 50 และ 70% โดยใช้ MC 200 µM, 12 µL



ภาพที่ 9 เปอร์เซ็นต์การตอบสนองการเปลี่ยนสีของ poly(PCDA) ที่มีต่อชนิดและความเข้มข้นของ fatty acid ที่เหมาะสม a) poly (PCDA/LA), b) poly (PCDA/MA) , c) poly (PCDA/PA) และ d) poly (PCDA/SA)

3.4 ผลการศึกษาการตอบสนองต่อการเปลี่ยนสีของ poly (PCDA/30%SA) ต่อความเข้มข้น MC ที่เหมาะสม

จากการศึกษาการตอบสนองต่อการเปลี่ยนสีของ poly(PCDA/30%SA) ต่อปริมาณ MC ที่เหมาะสมพบว่า poly (PCDA/30%SA) จะเกิดการเปลี่ยนสีได้ไวขึ้น โดยเริ่มมีการเปลี่ยนสีที่ระดับความเข้มข้นของ MC ที่ 50 µM และมีการเปลี่ยนสีที่ชัดเจนขึ้นที่ความเข้มข้น 100 µM ดังแสดงในภาพที่ 10 ดังนั้นจึงเลือก ความเข้มข้นของ MC ที่ 100 µM ในการทดลองต่อไป



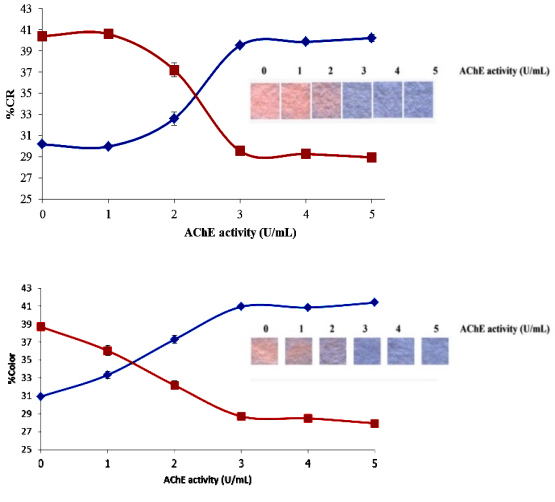
ภาพที่ 10 เปอร์เซ็นต์การตอบสนองการเปลี่ยนสีของpoly(PCDA/30%SA) ที่มีต่อต่อความเข้มข้น MC 0, 50, 100, 200, 300 และ 400 µM

3.5 ผลการศึกษาการตอบสนองการเปลี่ยนสีของ poly(PCDA/fatty acid) ต่อ MC/AChE

จากการศึกษาการตอบสนองต่อการเปลี่ยนสีของ poly(PCDA/fatty acid) ต่อMC/AChE พบว่า เมื่อใช้ poly (PCDA/30%SA) จะเกิดการเปลี่ยนสีของ poly (PCDA/30%SA) จากสีแดงเป็นสีน้ำเงินที่ AChE 2 U/mL ซึ่งมีค่าน้อยกว่าการเปลี่ยนสี poly (PCDA) โดยไม่มี fatty acid ซึ่งเกิดการเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีน้ำเงินที่ 3 U/mL ดังแสดงในภาพที่ 11 ดังนั้น AChE 2 U/mL จึงเหมาะสมในการทดลองขั้นต่อไป

a)

b)

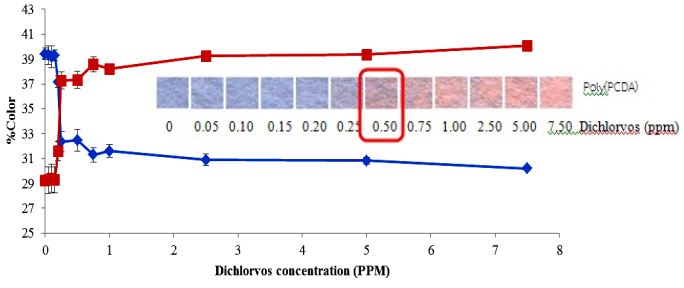


ภาพที่ 11 เปอร์เซ็นต์การตอบสนองการเปลี่ยนสีของa) poly (PCDA) และ b) poly (PCDA/30%SA) เมื่อปริมาณ AChE 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 U/mL

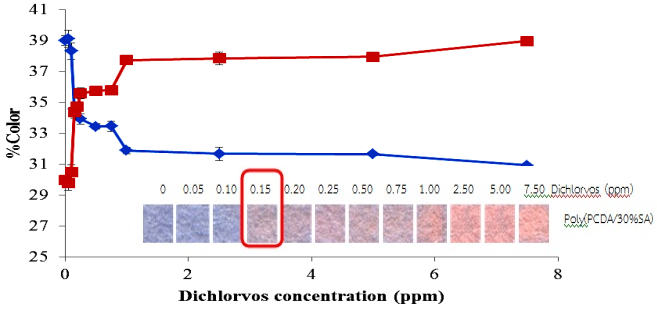
3.6 ผลการศึกษาการตอบสนองการเปลี่ยนสีของ poly (PCDA/30%SA) ต่อ MA/AChE/ Dichlorvos

จากศึกษาการตอบสนองการเปลี่ยนสีของ poly (PCDA/30%SA) ต่อ MA/AChE/ Dichlorvos พบว่า การใช้ 30%SA ร่วมกับ PCDA จะทำให้การเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเป็นสีแดงเกิดขึ้นได้ไวกว่าการใช้เฉพาะ PCDA ซึ่ง poly (PCDA/30%SA) จะมีการเปลี่ยนสีเมื่อปริมาณ Dichlovas น้อยกว่า poly (PCDA) ดังแสดงในภาพที่ 12

a)



b)



ภาพที่ 12 เปอร์เซ็นต์การตอบสนองการเปลี่ยนสีของpoly (PCDA)ที่มีต่อ MA/AchE/Dichlorvos a) poly (PCDA) และ b) poly (PCDA/30%SA)

4. วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการตรวจวัดไดคลอร์วอสโดยใช้พอลิไดแอเซทิลีนร่วมกับกรดไขมันบนกระดาษ พบว่า PCDA monomer สามารถตรึงบนกระดาษกรองได้เพราะ กระดาษกรองมีโครงสร้างทางเคมีเป็นเซลลูโลสซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซีที่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับหมู่คาร์บอกซิลิกที่ส่วนหัวของพอลิไดแอเซทิลีนเกิดเป็นไบเลเยอร์ เมื่อนำไปทำปฏิกิริยาpolymerization ด้วยรังสียูวี 254 nm โดยมีกลไกการเกิดพอลิเมอร์ผ่าน 1, 4 addition polymerization เป็น poly (PCDA) ซึ่งเป็นคอนจูเกตพอลิเมอร์แบบพันธะคู่สลับกับพันธะสาม โดยหมู่คาร์บอกซิลิกจะอยู่ที่ขอบบน และเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกด้วยกัน พอลิไดแอเซทิลีนสามารถเปลี่ยนสีได้เนื่องจากอิเล็กตรอนสามารถเกิดการเคลื่อนที่ไปมาในสายโซ่หลักของระบบคอนจูเกตของพอลิไดแอเซทิลีนทำให้เป็นสีน้ำเงิน เมื่อเติมMC ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุบวก จะเกิดการเปลี่ยนสีของพอลิไดแอเซทิลีนจากสีน้ำเงินเป็นสีแดง เนื่องจาก MC จะแทรกส่วนหางที่ไม่มีขั้วเข้าไปในสายโซ่หลักของพอลิไดแอเซทิลีน โดยหมู่

แอมโมเนียมของ MC สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่คาร์บอกซิลิก ทำให้เกิดการบิดตัวของโครงสร้างหลักของพอลิไดแอเซทิลีนระบบคอนจูเกตสั้นลงจึงทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของพอลิไดแอเซทิลีนจากสีน้ำเงินเป็นสีแดง (Xiaoqiang, *et al*., 2009) เมื่อมีการเติมเอนไซม์แอเซทิลโคลีนเอสเทอเรส เอนไซม์จะย่อย MC ได้ผลิตภัณฑ์คือกรดไมริสติกและโคลีน ทำให้เกิดการผลักกันของประจุลบ (charge repulsion) ระหว่างส่วนหัวของพอลิไดแอเซทิลีนและประจุลบของสารลดแรงตึงผิว ไม่ส่งผลต่อความยาวของระบบคอนจูเกตสีของพอลิไดแอเซทิลีนยังคงเป็นสีน้ำเงิน แต่เมื่อมีการเติมไดคลอร์วอส สารนี้จะมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส จึงทำให้ MC ไม่ถูกย่อยจึงสามารถทำให้มีการเปลี่ยนสีของพอลิไดแอเซทิลีนจากน้ำเงินเป็นสีแดงได้ สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจวัดสารไดคลอร์วอสโดยใช้พอลิไดแอเซทิลีนบนกระดาษเป็นตัวแสดงผลคือ MC200 µM, AChE 3 U/mL และ pH 6.5 สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าที่ระดับความเข้มข้นเของไดคลอร์วอสเท่ากับ 500 พีพีเอ็ม เมื่อทำการศึกษาการเพิ่มความไวในการตรวจวัดโดยใช้ fatty acid ที่แตกต่างกันเช่น LA, MA, PA และ SA พบว่า poly (PCDA/30%SA) มีความสามารถในการเปลี่ยนสีได้ง่ายขึ้น เนื่องจากSA จะเข้าไปแทรกอยู่ระหว่างโมเลกุลของ PCDA ทำให้พันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลของpoly (PCDA) มีความอ่อนลง โดยปริมาณ MC ที่ใช้มีปริมาณลดลงอยู่ที่ 100 µM ส่งผลให้จำนวน AChE เข้าไปในระบบก็น้อยลงจาก AChE3 เป็น 2 U/mL ก็สามารถยับยั้งการเปลี่ยนสีของ poly (PCDA/30%SA) บนกระดาษได้อย่างสมบูรณ์ และสามารถเพิ่มความไวในการตรวจวัดได้โดยความเข้มข้นต่ำสุดของไดคลอร์วอสที่สังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าคือ 150 พีพีบี

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดิน พ.ศ.2558 มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศ.ดร.มงคล สุขวัฒนาสินิทธิ์ ที่ให้คำปรึกษา แนะนำจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วง รวมทั้งขอขอบคุณสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ วัสดุ อุปกรณ์ในการทำวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

Champaiboon, T.; Tumcharern, G.; Potisatityuenyong, A.; Wacharasindhu, S. & Sukwattanasinitt, M.(2009). A polydiacetylene multilayer film for naked eye detection of aromatic compounds. **Sensorsand Actuators B.,** 139, 532–537.

Demikhovsky, Y.; Kolusheva, S.; Geyzer, M. & Jelinek, R. (2011).Polydiacetylene-supported silica films formed at the air/water interface. **J Colloid Interface Sci**., 428–34.

Ji, E.K.; Ahn, D.J. & Kim, J.M.(2003). The fluorescent polydiacetylene liposome. **Bulletin of theKorean Chemical Society.,** 24, 667-670.

Kim, K.W.; Choi, H.; Lee, G.S.; Ahn, D.J. & Oh, M.K. (2008). Effect of phospholipid insertion on arrayed polydiacetylene biosensors**. Colloids and Surfaces B.,** 66, 213–217.

Mishra, RK.; Dominguez, RB. & Bhand S. (2012). A novel automated flow-based biosensor for the determination of organophosphate pesticides in milk. **Biosens Bioelectron.,** 32:56–61.

Narkwiboonwong, P.; Tumcharern, G.; Potisatityuenyong, A.; Wacharasindhu, S. & Sukwattanasinitt, M., (2011). Aqueous sols of oligo(ethylene glycol) surface decorated polydiacetylene vesicles forcolorimetric detection of Pb^{2+}. **Talanta**, 83, 872–878.

Shengye, J.; Zhaochao, X.; Jiping,Ch., Xinmiao, L.; Yongning, W. & Xuhong, Q. (2004). Determinationof organophosphate and carbamate pesticides based on enzyme inhibition using apH-sensitivefluorescence probe. **Analytica Chimica Acta**, 523, 117–123.

Xiaoqiang, Ch.; Jung, L.; Min, J.J.; Jong-Man, Kim. & Juyoung, Y. (2009). Colorimetric and fluorometric detection of cationic surfactants based on conjugated polydiacetylenesupramolecules. **Chemical Communications**., 3434–3436.

Xiaoqiang, Ch. & Juyoung, Y. (2011). A thermally reversible temperature sensor based on polydiacetylene:synthesis and thermochromic properties. **Dyes and Pigments.,** 89, 194-198.