

องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดจากเถาแห้งกับประสิทธิภาพการลดปริมาณ
สารเคมีกำจัดศัตรูพืชคลอร์ไพริฟอสตกค้างในถั่วฝักยาว
THE CHEMICAL COMPONENT OF *COSCIINIUM FENESTUM* (HAMM)
STEM EXTRACTION AND THE REDUCTION EFFICACY OF PESTICIDE
CHLORPYRIFOS RESIDUE IN YARD LONG BEAN
(*VIGNA UNGUICULATA*).

ภิญญาพัชญ์ ดุงโคกกรวด* และจารุวรรณ วิโรจน์

Pinyapach Dungkokkrud* and Jaruwat Viroj

บทคัดย่อ

การลดปริมาณสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในผักโดยใช้สารสกัดจากพืชธรรมชาติเป็นทางเลือกที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้ศึกษาการลดปริมาณสารคลอร์ไพริฟอสตกค้างในถั่วฝักยาวด้วยสารสกัดจากเถาแห้งและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดแห้ง โดยการนำเถาแห้งมาสับและสกัดสารด้วยวิธีการหมักเย็น เพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดโดยใช้เครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ และทำแห้งแบบเยือกแข็ง ละลายสารสกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นำไปแช่ถั่วฝักยาวที่ปนเปื้อนสารคลอร์ไพริฟอส ตรวจวิเคราะห์สารพิษด้วยชุดทดสอบสารกลุ่มออการ์โนฟอสเฟต-คาร์บาเมต (GT-test kit) ตรวจยืนยันปริมาณสารคลอร์ไพริฟอสด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี ผลการศึกษาพบว่าการสกัดแห้งด้วยเอทานอลมีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดปริมาณสารพิษตกค้าง แต่การสกัดด้วยน้ำเป็นวิธีที่สะดวกและให้ผลผลิตมากกว่า การสกัดด้วยเอทานอลและน้ำได้ผลผลิต 1.80 และ 9.72%w/w ตามลำดับ สารสกัดแห้งจากเอทานอลระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ความเข้มข้น 45%w/v และระยะเวลาการล้างสารพิษ 10 นาที ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการล้างสารคลอร์ไพริฟอส โดยตรวจไม่พบสารพิษตกค้าง

คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

Faculty of public health, Mahasarakham University, Kantarawichai District, Mahasarakham Province 44150

*corresponding author e-mail: pinyapach.dk@msu.ac.th

Received: 27 September 2021; Revised: 13 November 2021; Accepted: 17 November 2021

DOI: <https://doi.org/10.14456/lsej.2022.10>

การตรวจยืนยัน พบว่า ประสิทธิภาพในการลดสารคลอโรไพริฟอสของสารสกัดแห้งด้วยเอทานอลเท่ากับ 99.02% ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดแห้งด้วยเอทานอลและน้ำพบสาร Oleyl Alcohol และ 2,3-Butylene glycol มากที่สุด ตามลำดับ การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร Berberine ในสารสกัดแห้งด้วยเอทานอลพบในปริมาณสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำ

คำสำคัญ: แห้้ม การล้างสารกำจัดศัตรูพืชตกค้าง คลอโรไพริฟอส เบอร์เบอรีน ถั่วฝักยาว

Abstract

Reduction of pesticide from vegetables using natural plant extract is the alternative way as environment friendly. This research aimed to study the efficacy of *Coscinium fenestum* (Hamm) stem extraction on reducing chlorpyrifos residue in yard long bean and its chemical components. The Hamm stems were chopped and extracted by maceration method. The supernatant was concentrated using a rotary evaporator and freeze dry. The crude extract was extended to various concentrations by water and used for washing the chlorpyrifos residue in yard long beans. The toxicant residue was detected by the GT-Test kit for organophosphate-carbamate pesticide group. The quantity of chlorpyrifos residue in yard long bean was confirmed by gas chromatography-mass spectrophotometer (GC-MS). The results showed that ethanoic extraction gave the highest ability to reduce the toxicant residue. In contrast, extraction with water is a convenient and environment friendly method. Moreover, Hamm extraction with water yielded a higher product than ethanoic extraction at 1.80 and 9.72 %w/w, respectively. The results found that ethanoic extraction 45% w/v at 48 hours of maceration with 10 minutes of washing had the highest efficacy to reduce chlorpyrifos residue. The GT-test kit cannot detect the toxicant residue and the chlorpyrifos residue detected by GC-MS revealed the reduction quantity of chlorpyrifos with efficacy at 99.02%. The most chemical components in Hamm extraction were Oleyl Alcohol from ethanoic extraction and 2,3-Butylene glycol in water extraction. Berberine detection was found in Hamm ethanoic extraction higher than that of water extraction at the same concentration.

Keywords: *Coscinium fenestum* (Hamm), Pesticide residue washing, Chlorpyrifos, Berberine, Yard long bean

บทนำ

โรคภัยไข้เจ็บส่วนใหญ่สาเหตุมาจากการที่รับประทานอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะและได้รับสารพิษตกค้างในผัก ผลไม้และอาหาร การล้างทำความสะอาดสารพิษที่อาจตกค้างในผักและผลไม้ก่อนรับประทานจึงมีความสำคัญ จากข้อมูลการสำรวจของเครือข่ายเตือนภัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืช (Thai-PAN : Thailand Pesticide Alert Network) ปี 2563 ตรวจพบสารเคมีที่แบนแล้ว (วัตถุอันตรายชนิดที่ 4) จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ คลอร์ไพริฟอส เอ็นโดซัลแฟน เมธามิโดฟอส เพ็นตาคลอโรฟีนอล และซัลโฟเทพ รวมทั้งพบสารนอกบัญชีวัตถุอันตรายอีก 32 ชนิด ผักที่พบการตกค้างเกินมาตรฐานมากที่สุดคือ มะเขือเทศผลเล็ก พริกชี้หนู พริกแดง ขึ้นฉ่าย คะน้า พบตกค้างเกินมาตรฐานทั้งหมดทุกตัวอย่าง (100%) ผักผลไม้ที่พบการตกค้างรองลงมาได้แก่ กะเพรา (81%) มะระ (62%) ผักบุ้ง (62%) หัวไชเท้า (56%) บร็อกโคลี (50%) ถั่วฝักยาว (44%) แครอท (19%) กระจับเขียว (6%) และหน่อไม้ฝรั่ง (6%) ส่วนมันฝรั่งพบการตกค้างในระดับไม่เกินมาตรฐาน และข้าวโพดหวานไม่พบการตกค้างเลย (Thai-PAN, 2020)

สารคลอร์ไพริฟอส (Chlorpyrifos) เป็นสารกำจัดแมลงที่ไม่ดูดซึมเข้าเนื้อเยื่อพืช ออกฤทธิ์เมื่อสัมผัสถูกเข้าสู่ร่างกายได้โดยการกิน หายใจ และซึมเข้าทางผิวหนัง มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเตอเรส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยอะซีทิลโคลีน และเป็นตัวควบคุมการนำส่งกระแสความรู้สึกที่รอยต่อระหว่างเซลล์ประสาทและเป็นตัวกลางในการส่งกระแสประสาท การได้รับสารคลอร์ไพริฟอสในปริมาณมากจะเกิดอาการพิษเฉียบพลัน ส่วนการได้รับในปริมาณน้อยติดต่อกันเป็นเวลานานจะเกิดอาการพิษแบบเรื้อรัง สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสเข้าไปจะเกิดความผิดปกติของระบบประสาท การยับยั้งระบบต่อมไร้ท่อ และโรคเกี่ยวกับกล้ามเนื้อหัวใจ (CVDs) การเคลื่อนไหวและระบบหายใจ (Hafiz Ubaid et al., 2021) รวมถึงระบบสืบพันธุ์ (Jinwang et al., 2019)

จากการปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดศัตรูพืช การล้างผักผลไม้ก่อนการบริโภคจึงมีความสำคัญ มีงานวิจัยเกี่ยวกับการล้างสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในผัก เช่น การใช้โอโซน (Jiguo et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้สารเคมีอื่น ๆ ที่นำมาใช้ล้างผัก ได้แก่ การใช้ $KMnO_4$, ascorbic acid, acetic acid, malic acid, oxalic acid, $NaHCO_3$ และ NaCl ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงตั้งแต่ 50-80% เปรียบเทียบกับการใช้น้ำเปล่าที่มีประสิทธิภาพการลดสารคลอร์ไพริฟอสตกค้างได้ประมาณ 30% (Gouri et al., 2012) ส่วนน้ำยาล้างผักและผลไม้มีส่วนประกอบหลักคือ สารลดแรงตึงผิว ได้แก่ sodium lauryl sulfate, sodium dodecyl sulphate มีคุณสมบัติในการทำความสะอาดได้ดีทำให้เกิดฟองได้เร็ว สารเคมีต่าง ๆ แม้จะมีประสิทธิภาพสูงแต่การใช้สารจากธรรมชาติก็เป็นอีกทางเลือกที่ปลอดภัยและต้นทุนต่ำ หากเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ได้มาจากพืชธรรมชาติ ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่ำ และสามารถย่อยสลายได้ด้วยตัวเองมาทดแทนจะช่วยให้การบริโภคผักผลไม้มีความปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมยิ่งขึ้น งานวิจัยเกี่ยวกับสารธรรมชาติพบว่า ราข้าวมีประสิทธิภาพในการลดสารเคมีกำจัดศัตรูพืชตกค้างในแตงกวาและมะเขือได้ดี (Adachi & Okano, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่า น้ำสกัดสมุนไพร 6 ชนิด คือ

รากพลับพลึง ใบย่านาง ใบยอ หัวผักกาด แห้ม และว่านหางจระเข้ พบว่ามีสมุนไพรมานาน 4 ชนิด ที่มีผลทำให้ความเป็นพิษของออร์กาโนฟอสเฟตหรือคาร์บาเมตลดลง ได้แก่ ว่านหางจระเข้ แห้ม หัวผักกาด และใบยอ (Tawe, 2010) งานวิจัยนี้สนใจศึกษาสารสกัดแห้ม ซึ่งในประเทศไทยมีการนำแห้มมาทำเป็นผลิตภัณฑ์แห้มผงใช้ชงดื่มเป็นที่นิยมทางภาคเหนือ และพบว่ามีการนำแห้มมาทำเป็นผลิตภัณฑ์แห้มผงใช้ชงดื่มเป็นที่นิยมทางภาคเหนือ และพบว่ามีการนำแห้มมาทำเป็นผลิตภัณฑ์แห้มผงใช้ชงดื่มเป็นที่นิยมทางภาคเหนือ และพบว่ามีการนำแห้มมาทำเป็นผลิตภัณฑ์แห้มผงใช้ชงดื่มเป็นที่นิยมทางภาคเหนือ และพบว่ามีการนำแห้มมาทำเป็นผลิตภัณฑ์แห้มผงใช้ชงดื่มเป็นที่นิยมทางภาคเหนือ

แห้มหรือแยมม์ [*Coscinium fenestratum* (Gaertn.) Colebr.] เป็นพืชในวงศ์ Menispermaceae ซึ่งพบตามท้องถื่นของแต่ละภาคในประเทศไทย มีสารเบอร์เบอรีน (berberine) เป็นองค์ประกอบหลัก ในรากและเถาของแห้ม (Pinho et al., 1992) มีโครงสร้างทางเคมีเป็นไอโซควินอลีนอัลคาลอยด์ (isoquinoline alkaloid) (Keawpradub, 1992) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดแห้มซึ่งมีสาร Berberine (Bbr) นั้นมีฤทธิ์ต้านไวรัส (Hattori et al., 1995) แบคทีเรีย (Palasuntheram et al., 1982) เชื้อรา และยีสต์ได้ด้วย (Palasuntheram et al., 1982)

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษา ประสิทธิภาพสารสกัดแห้มด้วยตัวสกัดต่าง ๆ ในการล้างสารเคมีกำจัดศัตรูพืชคลอร์ไพริฟอสที่ตกค้างในถั่วฝักยาว โดยศึกษาวิธีการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry) และการระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator) ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี ตลอดจนวิเคราะห์ปริมาณสารเบอร์เบอรีนในสารสกัดแห้ม ซึ่งเป็นสารสำคัญที่มีรายงานว่าพบมากที่สุดในเถาแห้ม เพื่อตรวจสอบสอดคล้องกับประสิทธิภาพของสารสกัดแห้มในการลดปริมาณสารคลอร์ไพริฟอสในถั่วฝักยาว ซึ่งจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตเป็นน้ำยาล้างผักที่ปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 การเตรียมสารสกัดแห้ม

1.1.1 การเปรียบเทียบสารสกัดแห้ม

นำเถาแห้มมาสับเป็นแว่น ๆ ขนาดประมาณ 2-3 ซม. แล้วนำมาสกัดโดยวิธีการหมักเย็น (maceration) โดยแช่ในเอทานอล (AR. grade, Merk) คลอโรฟอร์ม (AR. grade, Labscan) เมทานอล (AR. grade, Merk) และน้ำกลั่นเป็นตัวสกัด ขั้นตอนการหมักโดยการนำชิ้นส่วนแห้มสับมาแช่ในสารสกัดอัตราส่วนแห้มต่อสารสกัด 1:4 หมักแห้มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง จะได้สารสกัดแห้มในรูปสารละลาย เก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อเตรียมการทดลอง

1.1.2 การเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดแห้ม

นำเถาแห้มมาสับเป็นแว่น ๆ แล้วนำมาสกัดโดยวิธีการหมักเย็น (maceration) โดยแช่ในเอทานอลและน้ำกลั่นเป็นตัวสกัด ขั้นตอนการหมักโดยการนำชิ้นส่วนแห้มสับมาแช่ในสารสกัด

อัตราส่วนแห้งต่อสารสกัด 1:4 หมักแห้งตามระยะเวลาต่าง ๆ ที่ทดลอง กรองด้วยผ้าขาวบาง และระเหยตัวทำละลายออกด้วย Rotary Evaporator (ยี่ห้อ S.K. Power รุ่น FHS50) และเข้ากระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry) เก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อเตรียมการทดลอง 2.2

1.2 การเตรียมตัวอย่างถั่วฝักยาวที่ปนเปื้อนสารคลอรีไพริฟอส

สุ่มตัวอย่างถั่วฝักยาวที่ปลูกโดยปลอดสารพิษในเขตจังหวัดมหาสารคาม (ติดต่อซื้อจากเกษตรกรผู้ปลูกโดยตรง) นำมาฉีดพ่นสารคลอรีไพริฟอส (โคฟอส 40 ยี่ห้อเจียไต่) ใช้อัตราส่วนการผสมตามฉลากคือ สารคลอรีไพริฟอส : น้ำ เท่ากับ 50 ml : 20 L จากการสัมภาษณ์เกษตรกรที่ใช้จริงพบว่าใช้สารคลอรีไพริฟอสที่ผสมแล้ว อัตราส่วนสารละลายคลอรีไพริฟอส 40 ml : ถั่วฝักยาว 0.1 g โดยฉีดพ่นในภาชนะปิดและตั้งทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดลอง

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดแห้งในการล้างสารคลอรีไพริฟอสในถั่วฝักยาว

2.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดแห้งที่สกัดด้วยสารสกัดต่างกัน

นำสารสกัดแห้งจากข้อ 1.1 ที่หมักด้วยสารสกัดต่าง ๆ (เอทานอล คลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำกลั่น การทดลองนี้ใช้ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง) มาละลายน้ำที่ความเข้มข้น 35.7% w/v จากนั้นนำมาแช่ถั่วฝักยาวที่ฉีดพ่นสารคลอรีไพริฟอสมาล้างด้วยสารสกัดแห้งที่หมักด้วยสารสกัดต่าง ๆ การล้างสารคลอรีไพริฟอสโดยการแช่ถั่วฝักยาวในสารสกัดแห้งเป็นเวลา 30 นาที (อัตราส่วนถั่วฝักยาวต่อสารสกัดแห้งเท่ากับ 1: 3 w/v) จากนั้นจึงนำไปล้างด้วยน้ำเปล่า 1 ครั้ง นำไปตรวจหาสารพิษตกค้างในถั่วฝักยาวด้วยชุดทดสอบสารพิษตกค้างกลุ่มฟอสเฟต-คาร์บาเมต (GT-Test kit) ยืนยันความแตกต่างของสีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (ยี่ห้อ GENESYS 20) ที่ความยาวคลื่นแสง 410 นาโนเมตร เปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างสารสกัดแห้งที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล คลอโรฟอร์ม และน้ำกลั่น

2.2 ศึกษาระยะเวลาการหมักสารสกัดแห้งและระยะเวลาการล้างสารเคมีตกค้างในถั่วฝักยาวด้วยสารสกัดแห้ง

นำสารสกัดแห้งจากข้อ 1.1 ที่หมักด้วยเอทานอล และน้ำกลั่น หมักเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มาละลายน้ำที่ความเข้มข้น 45% w/v นำผักที่ฉีดพ่นสารคลอรีไพริฟอสมาแช่ในสารละลายของสารสกัดแห้ง เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที และล้างน้ำเปล่า 1 ครั้ง นำไปตรวจหาสารพิษตกค้างในถั่วฝักยาวด้วยชุดทดสอบ GT ยืนยันความแตกต่างของสีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างสารสกัดแห้งที่สกัดด้วยเอทานอล และสกัดด้วยน้ำ (จากการทดลองที่ 2.1 พบว่าสารสกัดแห้งด้วยเมทานอลและคลอโรฟอร์มมีประสิทธิภาพน้อยในการล้างสารคลอรีไพริฟอสในถั่วฝักยาว จึงเลือกทำการทดลอง 2.2 โดยใช้สารสกัดเอทานอลและน้ำ)

หมายเหตุ การยืนยันสีของชุดทดสอบ GT ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ 410 นาโนเมตร เป็นเพียงการยืนยันผลการเปลี่ยนแปลงสีของชุดทดสอบ GT เพื่อให้เห็นความแตกต่าง

ระหว่างสารพิษตกค้างที่เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม (negative control) และหลอดตัดสิน (positive control) เพื่อให้ได้ค่าที่แน่นอนมากกว่าการสังเกตเปรียบเทียบสีด้วยตาเปล่า

2.3 การตรวจยืนยันปริมาณสารคลอร์ไพริฟอสที่ตกค้างในผัก ด้วยเครื่อง GC-MS

นำถั่วฝักยาวมาหั่น และเตรียมตรวจวัด %Area ของสารคลอร์ไพริฟอสที่ตกค้างในถั่วฝักยาว เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Chlorpyrifos (Mix standard) (Sigma-Aldrich) ที่นำมาเจือจางด้วยเอทิลอะซิเตตเพื่อทำการหาปริมาณ วิเคราะห์โดยใช้ GC-MS (Shimadzu, Japan) ใช้คอลัมน์ HP-5 MS (30 m x 250 μ m x 0.2 μ m) Mass spectrometer ใช้โหมด Electron impact Ionization (EI) นีดี 1 μ l ต่อตัวอย่าง

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดแห้งโดย GC-MS

นำสารสกัดแห้งที่ได้มาวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง gas chromatography-mass spectrophotometer (GC-MS) (ยี่ห้อ SHIMADSU ประเทศญี่ปุ่น รุ่น RTX-5MS) ใช้ก๊าซฮีเลียม เป็นก๊าซพาอัตราการไหล 1.00 ml/min ปริมาณตัวอย่าง 10 μ l สภาพของ GC-MS คือ อุณหภูมิ injection เท่ากับ 230 องศาเซลเซียส อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 50 องศาเซลเซียส ค้างไว้ 5 นาที และเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 140 องศาเซลเซียส ในอัตรา 6 องศาเซลเซียสต่อนาที และเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 230 องศาเซลเซียส ในอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ค้างไว้ 10 นาที ส่วนอุณหภูมิ detector เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส สัดส่วนมวลต่อประจุ (m/z) เท่ากับ 30-500 คอลัมน์ (Column) ชนิด HP-5MS 5 % phenyl methyl silox ยาว 30 m เส้นผ่านศูนย์กลาง 250 μ m หนา 0.25 μ m ตรวจชนิดองค์ประกอบที่แยกได้จากเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟีโดยใช้เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (Gas Chromatograph/ Mass Spectrometer, GC/MS) โดยใช้พลังงานในการทำให้เป็นไอออน 70 อิเล็กตรอนโวลต์แล้ว เปรียบเทียบแมสสเปกโตรแกรมขององค์ประกอบที่แยกได้แต่ละชนิดกับแมสสเปกโตรแกรมของสารมาตรฐานที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (NIST library) (Masruri et al., 2012)

4. การวิเคราะห์ปริมาณสารเบอเบอรินในสารสกัดแห้งโดยใช้ HPLC

นำสารสกัดแห้งความเข้มข้น 80 mg/ml มาวิเคราะห์หาปริมาณสารเบอเบอรินเปรียบเทียบกับระหว่างสารสกัดแห้งในเอทานอลและน้ำ สารมาตรฐาน Berberine chloride dihydrate (anhydrous basis, Sigma Aldrich Cat.No.14050) และเตรียมตัวอย่างโดยละลายในเมทานอล ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 25, 100, 200, 300 และ 400 ppm วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC (Shimadzu, Japan) โดยใช้คอลัมน์ C18 (250x4.6 mm, 5 μ m) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ acetonitrile : methanol: 20 mM phosphate (35:20:45, v/v/v) ตรวจวัดที่ความยาวคลื่นแสง 344 นาโนเมตร อัตราการไหล 0.8 ml/min และปริมาณตรวจ 20 μ l ต่อตัวอย่าง

ผลการวิจัย

1. สารสกัดแห้ง

1.1 สารสกัดแห้งจากการสกัด 1.1 พบว่าเป็นสารละลายสีเหลืองใส ดังภาพที่ 1 (Figure 1) ความเข้มข้นสูงสุดที่ได้เท่ากับ 35.7% w/v



Figure 1 The maceration of Hamm in various solvents

1.2 การสกัดแห้งด้วยการหมักในเอทานอลและน้ำ ที่นำมาทำให้เข้มข้นโดยการระเหยตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดที่หมักโดยเอทานอล ได้ผลผลิตเท่ากับ 1.80 %w/w ลักษณะสารสกัดเป็นก้อนหนืดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนสารสกัดแห้งด้วยการหมักในน้ำกลั่นได้ผลผลิตเท่ากับ 9.72 %w/w ลักษณะสารสกัดเป็นผงละเอียดสีเหลือง ดังภาพที่ 2 (Figure 2)

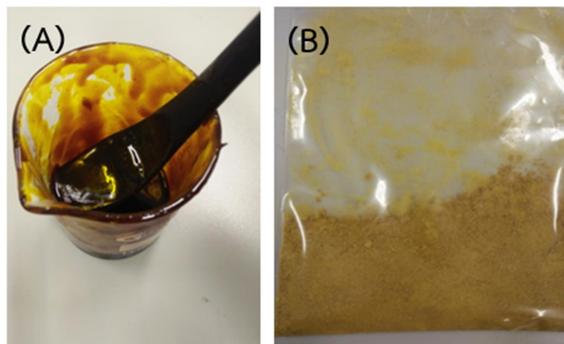


Figure 2 A) The maceration of Hamm in ethanol 95% B) Compared with distilled water

2. ประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารคลอโรไพริฟอสด้วยสารสกัดแห้ง ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดแห้งจากเอทานอล มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดปริมาณสารพิษตกค้างในถั่วฝักยาว ผลจากชุดทดสอบ GT หลังการล้างด้วยสารสกัดแห้งในเอทานอลไม่พบสารพิษตกค้าง ส่วนการล้างด้วยสารสกัดแห้งจากเมทานอล คลอโรฟอร์ม และน้ำกลั่น ยังคงพบสารพิษตกค้างในระดับปลอดภัย ดังภาพที่ 3 (Figure 3)

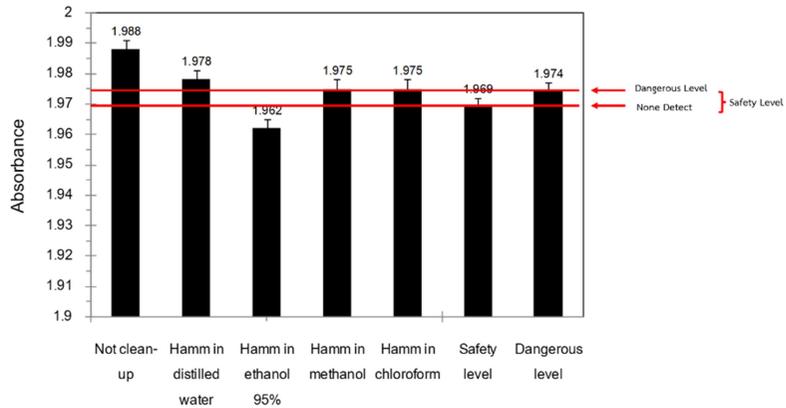


Figure 3 The reduction of chlorpyrifos residue in yard long bean by Hamm extract with various solvents. Absorbance (A) is measured of GT-test kit color confirm by spectrophotometer at 410 nm.

การศึกษาเปรียบเทียบระยะเวลาการหมักสารสกัดและระยะเวลาการล้างสารตกค้าง พบว่าการหมักแห้งที่เวลา 48 ชั่วโมง และระยะเวลาการล้างสารตกค้าง 10 นาที สามารถลดปริมาณสารตกค้างได้ดีที่สุด ดังตารางที่ 1 (Table 1)

Table 1 The reduction of chlorpyrifos residue in yard long bean after clean up by ethanoic extract of Hamm in various time.

Extraction time (hrs.)	Positive control (Danger level)	Negative control (Safety level)	Clean up time (min.)		
			10	20	30
-	2.043 ± 0.070	2.018 ± 0.053	-	-	-
24	-	-	1.986 ± 0.014	2.064 ± 0.056	2.088 ± 0.035
48	-	-	1.918 ± 0.021	1.923 ± 0.021	1.933 ± 0.042
72	-	-	1.937 ± 0.007	1.956 ± 0.063	1.940 ± 0.007

Remark Absorbance (A) is measured of GT-test kit color confirm by spectrophotometer

การตรวจยืนยันผลด้วยเครื่อง GC-MS พบว่ามีผลตรงกันกับการตรวจด้วยชุด GT คือ การสกัดแห้งด้วยเอทานอล 95% ที่สภาวะการหมักแห้งที่ 48 ชั่วโมง และระยะเวลาการแช่ผักที่ 10 นาที มีประสิทธิภาพในการลดสารคลอไรไพริฟอสตกค้างได้ดีที่สุด ปริมาณการลดลงของสารเหลือ 0.18 %Area คิดเป็นประสิทธิภาพ 99.02% ดังภาพที่ 4 (Figure 4)

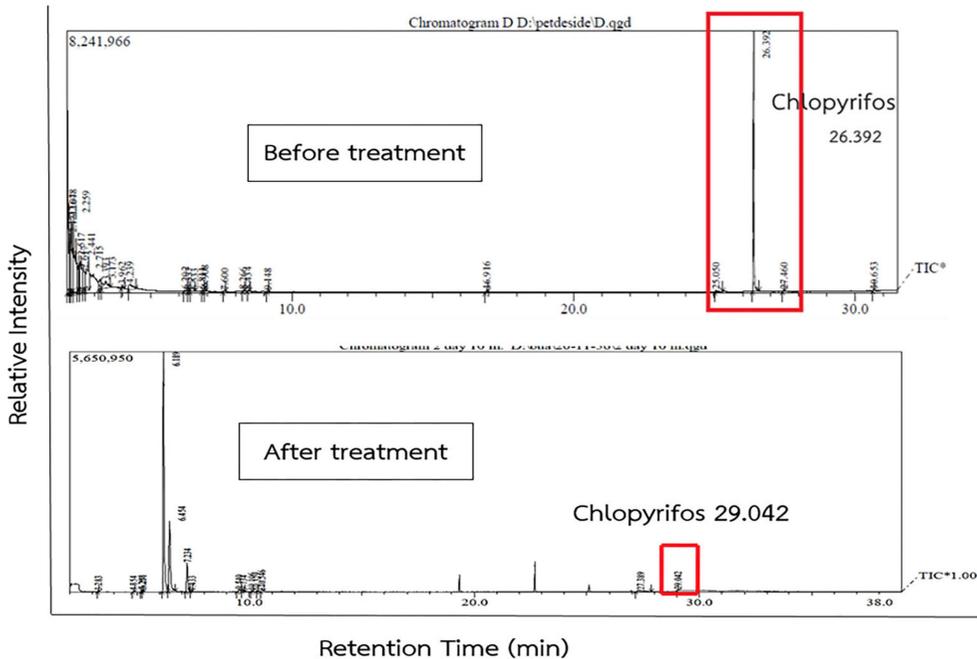


Figure 4 The reduction of chlorpyrifos residue in yard long bean by ethanoic Hamm extract detected by GC-MS.

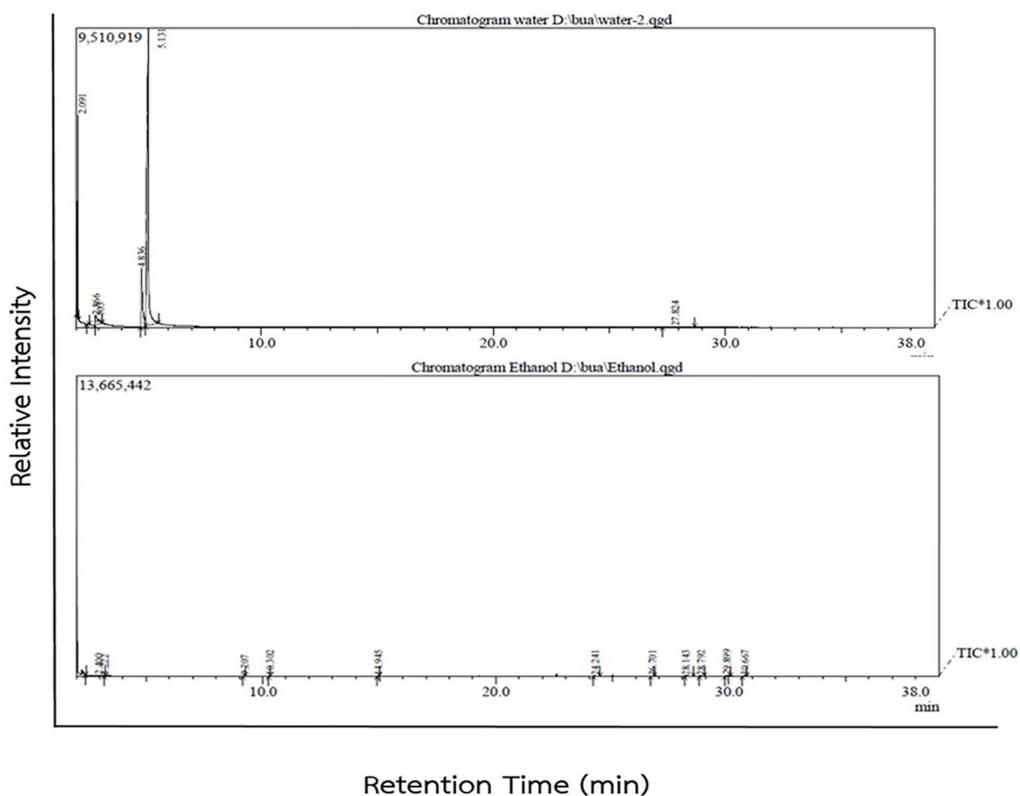
3. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดแห้งด้วยเครื่อง GC-MS สารสกัดแห้งที่สกัดด้วยน้ำกลั่น มีจำนวนพีคที่ตรวจวัดได้ 6 พีค สามารถระบุชนิดด้วย GC-MS ได้ 6 ชนิด สารที่พบมากที่สุดจากสารสกัดแห้งที่สกัดในน้ำกลั่น คือ 2,3-Butylene glycol ที่ 74.44 %Area ดังตารางที่ 2 (Table 2) และภาพที่ 5 บน (Figure 5-upper)

Table 2 Component of Hamm extract with distilled water.

Peak Number	Component	Area(%)
1	3-Butynyl alcohol	9.30
2	Trimethylamine	0.09
3	Acetic acid	3.81
4	2,3-Butanediol	11.82
5	2,3-Butylene glycol	74.44
6	Benzene sulfonamide	0.54

Table 3 Component of Hamm extracted with ethanol 95%

Peak Number	Component	Area (%)
1	3-Butynyl alcohol	0.57
2	Hexamethyl acetone	2.40
3	Isobutyl propionate	3.22
4	Camphor	4.77
5	3-Cyclohexylpropyl alcohol	7.68
6	Pentadecane	8.75
7	Octyl disulfide	9.12
8	Tetradecanoic acid	2.74
9	2-Methyloctanoic acid	18.45
10	methyl ester	10.91
11	Oleyl Alcohol	31.40

**Figure 5** Hamm extract component with distilled water (Upper) and ethanol 95% (Lower), the chromatogram detected by GC-MS.

ส่วนสารสกัดแห้งจากการสกัดด้วยเอทานอล มีจำนวนพีคที่ตรวจวัดได้ 6 พีค สามารถระบุชนิดด้วย GC-MS ได้ 6 ชนิด พบสาร Oleyl Alcohol มากที่สุดที่ 31.40 %Area ดังตารางที่ 3 (Table 3) และภาพที่ 5 (ล่าง) (Figure 5- lower)

4. การตรวจหาปริมาณสารเบอเบอรีนในสารสกัดแห้ง การตรวจวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง HPLC เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเบอเบอรีนพบว่า ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (80 mg/ml) สารสกัดแห้งในเอทานอล พบปริมาณสารเบอเบอรีนเฉลี่ย 73.752%Area มีปริมาณสูงกว่าสารสกัดแห้งในน้ำกลั่นที่พบปริมาณสารเบอเบอรีนเฉลี่ย 67.343%Area ดังตารางที่ 4 (Table 4)

Table 4 The quantity of berberine in Hamm extracted with ethanol 95% compared with distilled water

Condition number	Extraction	Area (%)	Mean \pm S.D.
1	Hamm-Ethanol	73.892	73.752 \pm 0.154
		73.778	
		73.587	
2	Hamm-H ₂ O	66.582	67.343 \pm 1.382
		66.510	
		68.939	

อภิปรายผล

1. การสกัดแห้งโดยวิธีการหมักด้วยเอทานอลและระเหยตัวทำละลายเพื่อให้ได้สารสกัดที่เข้มข้นขึ้น ปริมาณผลผลิตได้น้อยกว่าเปรียบเทียบกับหมักด้วยน้ำ ลักษณะสารสกัดที่ได้เป็นก้อนเหนียวสีเหลือง ในขณะที่หมักด้วยน้ำจะได้เป็นผงสีเหลืองซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและให้ผลผลิตมากกว่านำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายกว่า อย่างไรก็ตาม ทั้งการสกัดด้วยเอทานอลและน้ำให้ผลผลิตที่ค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณวัตถุดิบเริ่มต้น

2. การศึกษาการสกัดแห้งด้วยตัวสกัดที่แตกต่างกัน พบว่า ถั่วฝักยาวที่แช่ในสารสกัดแห้งด้วยเอทานอล มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารพิษตกค้างในถั่วฝักยาวสูงกว่าการสกัดด้วยเมทานอล คลอโรฟอร์มและน้ำกลั่น แสดงให้เห็นว่าเอทานอลสามารถสกัดสารสำคัญที่มีผลต่อการลดปริมาณสารพิษตกค้างได้มากกว่า สอดคล้องกับการวิจัยที่พบว่าการหมักด้วยเอทานอล 80% เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารหลักที่พบมากที่สุดในการสกัดแห้งคือสารเบอเบอรีนโดยได้ %yield ของสารสกัดหยาบออกมาสูงที่สุด โดยสารเบอเบอรีนเป็นสารกลุ่มมีขั้วระดับปานกลางจึงสามารถถูกดึงดูดด้วยสารมีขั้วเช่นเอทานอลออกมาได้ดีกว่า (Rojsanga et al., 2006) ตามหลักการละลายของสาร ตัวถูกละลายที่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วด้วยแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลแบบ dipole-dipole จากการศึกษาครั้งนี้

มีความเป็นไปได้ว่าสารเบอปีรีนซึ่งเป็นสารที่พบมากที่สุดในการสกัดแห้งอาจเป็นกลไกสำคัญในการชะล้างสารคลอโรไพริฟอสจากถั่วฝักยาว

3. การศึกษาระยะเวลาการหมักด้วยเอทานอล 48 ชั่วโมง และระยะเวลาการแช่ถั่วฝักยาวด้วยสารสกัดแห้งจากเอทานอล 95% เป็นเวลา 10 นาที ในการลดปริมาณสารคลอโรไพริฟอสที่ตกค้างในถั่วฝักยาว ตรวจพบสารพิษตกค้างอยู่ในระดับที่ปลอดภัย และการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลด้วยเครื่อง GC-MS พบว่าสารสกัดแห้งด้วยเอทานอลมีความสามารถในการลดสารคลอโรไพริฟอสที่ตกค้างในถั่วฝักยาว คิดเป็นประสิทธิภาพเท่ากับ 99.02% ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบว่า การแช่ฝักด้วยสารละลายต่างทั้งทิมและสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต สามารถลดสารฆ่าแมลงตกค้างในฝักในระดับที่ต่ำกว่าค่า MRLs ได้ในเวลา 10 และ 15 นาที ตามลำดับ (Gouri et al., 2012) ดังนั้น ไม่ควรใช้เวลาในการหมักนานเกินไปเพื่อสกัดสารเพราะอาจทำให้สารเกิดการเสื่อมสภาพหรือประสิทธิภาพลดลง นอกจากนี้การใช้เวลาหมักที่เหมาะสมจะช่วยประหยัดเวลาในการเตรียมสารสกัดด้วย ส่วนการล้างสารพิษตกค้างในถั่วฝักยาวไม่ควรใช้เวลานานเกินไป เพราะอาจทำให้สารพิษตกค้างกลับติดที่ผิวของฝักมากขึ้น

4. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดแห้ง สารที่พบมากที่สุดจากสารสกัดแห้งที่สกัดในน้ำกลั่น คือ 2,3-Butylene glycol ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารกำจัดศัตรูพืช ส่วนสารสกัดแห้งจากตัวการสกัดด้วยเอทานอล พบสารกลุ่ม Oleyl Alcohol มากที่สุด (cis-9-Octadecen-1-ol, Z-9-Dodecen-1-ol) ซึ่งเป็นสารกลุ่มลดแรงตึงผิวไม่มีประจุและเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Klaus & Sigurd, 2006) ซึ่งสารดังกล่าวทำให้มีผลต่อการชะล้างสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่เกาะบนผิวพืชผักได้ อย่างไรก็ตามการตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS ไม่พบสารประกอบหลักในแห้งดังกล่าววิจัยอื่น คือ สารเบอปีรีน (Keawpradub, 1992) อาจเนื่องจากรีการตรวจวิเคราะห์ยังไม่เหมาะสม

5. การตรวจหาปริมาณสารเบอปีรีนในสารสกัดแห้งพบปริมาณสารเบอปีรีนมีผลที่สอดคล้องกับประสิทธิภาพการลดปริมาณสารคลอโรไพริฟอสตกค้าง นั่นคือสารสกัดแห้งในเอทานอลพบปริมาณสารเบอปีรีนเฉลี่ยสูงกว่าสารสกัดแห้งในน้ำกลั่น มีความเป็นไปได้ว่าสารเบอปีรีนมีผลต่อประสิทธิภาพการล้างสารคลอโรไพริฟอสออกจากฝัก เนื่องจากพบว่าเบอปีรีนเป็นสารประกอบหลักกลุ่ม isoquinoline alkaloid สำคัญที่พบมากที่สุดในการสกัดแห้ง (Keawpradub, 1992) และพบว่า การหมักด้วยเอทานอล 80% เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารเบอปีรีนจากถั่วฝัก โดยได้ %yield ของสารสกัดหยาบออกมาสูงที่สุด (Rojsanga et al., 2006)

งานวิจัยนี้จึงสามารถยืนยันผลการลดปริมาณสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกนอโฟสเฟตที่ตกค้างในถั่วฝักยาวได้ ทั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติความมีขี้ผึ้งที่ใกล้เคียงกัน สารคลอโรไพริฟอสเป็นสารกลุ่มมีขี้ผึ้งสามารถถูกละลายได้ด้วยสารเบอปีรีนที่มีความมีขี้ผึ้งระดับปานกลาง ในขณะที่สารเบอปีรีน

มีคุณสมบัติ hydrophobicity คือละลายน้ำได้น้อย ซึ่งมีความใกล้เคียงกับสารคลอไพริฟอส ดังจะเห็นได้จากเมื่อเปรียบเทียบการล้างสารคลอไพริฟอสด้วยน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียวจะมีประสิทธิภาพน้อยกว่าการล้างด้วยสารสกัดแห้งแล้วตามด้วยน้ำกลั่น

นอกจากนี้สารที่พบว่าเป็นส่วนประกอบในสารสกัดแห้ง ได้แก่ 2,3-Butylene glycol และ Oleyl Alcohol เป็นสารกลุ่มมีขี้ผึ้งจึงมีผลในการละลายสารคลอไพริฟอสได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติความชอบน้ำ จะพบว่า 2,3-Butylene glycol ที่พบในสารสกัดแห้งที่สกัดด้วยน้ำกลั่นนั้นมีคุณสมบัติ hydrophobicity ต่ำกว่า Oleyl Alcohol ที่พบจากสารสกัดแห้งที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย อย่างไรก็ตามมีผลงานวิจัยที่พบว่า การสกัดสารเบอร์ปรีนจากเถาแห้งนำมาผสมกับดินเบนโทไนต์ช่วยเพิ่มการดูดซับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมทได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Tha-in, 2013) ดังนั้นกลไกการลดปริมาณสารคลอไพริฟอสที่ตกค้างในถั่วฝักยาวอาจมีหลายกลไกที่ทำให้เกิดประสิทธิภาพพร้อมกัน

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาพบว่า สารสกัดแห้งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการล้างสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคลอไพริฟอสในถั่วฝักยาวได้อย่างมีประสิทธิภาพ อาจมีผลมาจากสารเบอร์ปรีนหรือสารกลุ่มอื่น ๆ ซึ่งเป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์ ประกอบกับสาร Oleyl Alcohol และ 2,3-Butylene glycol ที่เป็นสารลดแรงตึงผิวช่วยชะล้างสารเคมีกำจัดศัตรูพืชออกจากพืชผักได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามในการนำไปใช้ล้างผักหรือผลไม้ก่อนการบริโภค ควรคำนึงถึงระยะเวลาในการแช่ผักผลไม้ในสารสกัดเพื่อทำให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการลดปริมาณสารพิษตกค้าง นอกจากนี้สารสกัดที่ได้จากแห้งมีลักษณะเป็นสีเหลือง แม้จะไม่มีผลกับการเปลี่ยนสีของถั่วฝักยาว แต่หากจะนำไปใช้ล้างผักหรือผลไม้ชนิดอื่นที่มีสีอ่อน อาจต้องคำนึงถึงสีของผักหรือผลไม้เปลี่ยนแปลงไป ส่วนกลิ่นของถั่วฝักยาวไม่มีความเปลี่ยนแปลงเนื่องจากสารสกัดที่นำมาใช้มีความเจือจาง และได้มีการแช่น้ำล้างหลังจากล้างด้วยสารสกัดก่อน ผลการศึกษาที่ได้สามารถนำสารสกัดสารเข้มข้นเพื่อนำไปใช้ในครัวเรือนหรือในทางพาณิชย์ ได้แก่ การทำเป็นผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผัก ผลไม้ ต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงบประมาณการวิจัยจากคณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม งบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2556 ตามเลขสัญญาที่ 008/2556 ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการคณะสาธารณสุขศาสตร์ และห้องปฏิบัติการกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ และสถานที่ทำการวิจัย คุณนิยพร ศรีกังพาน นักวิทยาศาสตร์ ตลอดจนนิสิตคณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่ให้ความร่วมมือและช่วยเหลือในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Adachi A, Okano T. Pesticide residue reduction in selected vegetables using rice-bran. *Journal of Health Science* 2006;52(3):320-323.
- Gouri S, Yogesh K, Tyagi R, Kumar G. Removal of Organophosphorus (OP) pesticide residues from vegetables using washing solutions and boiling. *Journal of Agricultural Science* 2012;4(2):69-78.
- HafizUbad UR, Waqas A, Wahab N, Mansur AS, Anwaar AN. A comprehensive review on chlorpyrifos toxicity with special reference to endocrine disruption: Evidence of mechanisms, exposures and mitigation strategies. *Science of The Total Environment* 2021;755(2):142-149.
- Hattori M, Nakabayashi T, Lim Y. Inhibitory effect of various ayurvedic and panamanian medicinal plants on the infection of herpes simplex virus-I in vitro and in vivo. *Phytotherapy Research* 1995;9(4):270-276.
- Singh GB, Singh S, Malhotra S. Hypotensive action of *Coscinium fenestratum* stem extract. *Journal of Ethnopharmacology* 1990;30(2):151-155.
- Jiguo W, Tiangang L, Chongyu L, Thomas WL, Gilbert YS. Removal of residual pesticides on vegetable using ozonated water. *Food Control* 2007;18(5):466-472.
- Jinwang L, Guofang P, Fazheng R, Bing F. Chlorpyrifos-induced reproductive toxicity in rats could be partly relieved under high-fat diet. *Chemosphere* 2019;229(1):94-102.
- Keawpradub S. The alkaloids from the stems of *Coscinium fenestratum* (Gaertn.) *Colebr.* Master degree thesis. Chulalongkorn University, Thailand; 1992.
- Klaus EA, Sigurd BO. Allergic contact dermatitis from oleyl alcohol in Elidel® cream. *Contact Dermatitis* 2006;55(6):354-356.
- Masruri S, Warsito M, Adi P. Renewable oil extracted from Indonesian Srikaya's (*Annona squamosal* sp.) seed: another potent source for biodiesel. *The Journal of Pure and Applied Chemistry Research* 2012;1(1);51-57.
- Palasuntheram C, Lyer KS, De Silva LB, De SilvaT. Antimicrobial activity of *Coscinium fenestratum* *Colebr.* against *Clostridium tetani*, *Indian Journal of Medical Research* 1982;76(1):71-76.
- Pinho PMM, Pinto MMM, Kijjoa A, Pharadai K, Diaz JG, Herz W. Protoberberine alkaloids from *Coscinium fenestratum*, *Phytochemistry* 1992;31(4):1403-1407.
- Rojsanga P, Gritsanapan W, Suntornsuk L. Determination of berberine content in the stem extracts of *Coscinium fenestratum* by TLC Densitometry. *Medical Principles and Practice* 2006;15(5):373-378.
- Tawee R. Detoxification of organophosphate and carbamate by Thai herbal plants. Bachelor degree thesis. Boromarajonani College of Nursing Chiang Mai, Thailand; 2010.
- Tha-in S, Dau HA, Dumri K. The enhanced carbamate adsorption of modified bentonite with *Coscinium fenestratum*. *International Journal of Environmental Science and Development* 2013;4(4):415-418.
- Tushar KV. *Coscinium fenestratum* (Gaertn.) *Colebr.* A review on this rare, critically endangered and highly-traded medicinal species. *Journal of Plant Sciences* 2008;3(2):133-145.