ศึกษาความเสี่ยงภัยจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร chlorpyrifos ในแปลงปลูกพริก ต่อผู้ใช้และผู้บริโภค

Risk Assessment of Chlorpyrifos Used in Chili Plantation to Applicator and Consumer

วิภา ตั้งนิพนธ์ ประกิจ จันทร์ติ๊บ เอกราช สิทธิมงคล

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

ศึกษาในแปลงพริกมัน (*Capisicum annuum* Linn.) ของเกษตรกร ตำบลบางตาเถร อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี ปลูกพริก ระหว่างเดือนมกราคม 2553 – พฤษภาคม 2553 ฉีดพ่นสารพิษ chlorpyrifos 3 ครั้ง เมื่อต้นพริกมีอายุ 99,106 และ 113 วัน สูตร 40 % W/V EC ในอัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ด้วยเครื่องยนต์สะพายหลัง ภายหลังการฉีดพ่น เก็บแผ่นผ้าที่ติดบนส่วนต่างๆ ของร่างกาย น้ำล้างมือและน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่นสารพิษมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ chlorpyrifos ที่ปนเปื้อนบนร่างกาย เก็บตัวอย่างเลือดของผู้ฉีดพ่นก่อนการฉีดพ่นและภายหลังการฉีดพ่นที่ 1 วัน 3 วัน 5 วันและ 7 วัน ตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสในเม็ดเลือดแดง (Acetylcholinesterase Activity, AChE Activity) เก็บเกี่ยวพริกภายหลังการฉีดพ่นครั้งสุดท้ายที่ระยะเวลา 0,1, 3, 5, 7, 10, 15, 20 และ 30 วัน ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง chlorpyrifos ในพริก ผลการทดลองที่ได้จากการศึกษามาประมวลกับข้อมูลทางพิษวิทยาของ chlorpyrifos เพื่อประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพอนามัยจากการฉีดพ่นของผู้ใช้พบว่าการฉีดพ่น chlorpyrifos ในแปลงปลูกพริก ผู้ฉีดพ่นมีโอกาสปนเปื้อนสารพิษ chlorpyrifos ปริมาณ 0.4197-0.8215 mg/kg Bw/day เป็นระดับที่มีความเสี่ยงสูง และพบว่าระดับการทำงานของ AChE Activity ของผู้ฉีดพ่นลดลงเหลือ 63 - 84 เปอร์เซนต์ ภายหลังการฉีดพ่นในระยะ 1 วัน ถึง 7 วัน ซึ่งแสดงว่าได้รับผลกระทบจาก chlorpyrifos ปนเปื้อนบนร่างกาย ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง chlorpyrifos ในพริกภายหลังการฉีดพ่นที่ระยะเวลาต่างๆ พบปริมาณตกค้างที่ 0 วัน 0.7691 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเริ่มลดปริมาณสารพิษตกค้างลงอย่างช้าๆแปรผันตามเวลา อัตราการสลายตัวของ chlorpyrifosในพริกมีค่า half life นาน 17.5 วัน ผลการประเมินความเสี่ยงของการบริโภคพริกภายหลังการฉีดพ่น chlorpyrifos ตั้งแต่ระยะเวลาเก็บเกี่ยวที่ 0 วัน ถึง 19 วัน มีความเสี่ยงสูงเมื่อเปรียบเทียบกับค่า Chronic RfD(Reference Dose) = 0.0003 mg/kg/day ผลการประมวลข้อมูลจากการศึกษา chlorpyrifos ความเสี่ยงสูงต่อผู้ฉีดพ่นสมควรระมัดระวังสวมชุดป้องกันการปนเปื้อนร่างกายในระหว่างการฉีดพ่น ขอเสนอให้มีการเข้มงวดการใช้ ส่วนการบริโภคพริกในระยะเก็บเกี่ยวหลังการฉีดพ่น 0 ถึง 19 วัน ไม่มีความปลอดภัย เกษตรกรต้องงดใช้ chlorpyrifos ฉีดพ่นในแปลงปลูกพริกระยะเริ่มติดผล

คำนำ

Chlorpyrifos เป็นวัตถุมีพิษการเกษตรกลุ่ม non-systemic Organophosphorus insecticide ที่องค์การอนามัยโลก WHO จัดให้มีระดับความเป็นพิษ Moderately hazard class II ประเภทป้องกันกำจัดแมลงเป็นพิษโดยการกิน และการสัมผัสมีค่า LD_{50} 82-163 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในหนูขาวใหญ่ทางปาก (Hartley and Kidd,1991) มีความเป็นพิษรุนแรงต่อผึ้ง ตัวห้ำ ตัวเบียน และสัตว์ป่าทั่วไปเป็นสารพิษที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase Activity, AChE Activity) ที่มีบทบาทในขบวนการสื่อสัญญาณประสาทถ่ายทอดสัญญาณจากเซลล์ประสาทหนึ่งไปสู่อีกเซลล์หนึ่ง เมื่อสารพิษนี้เข้าสู่ร่างกายจะเกิดอาการกล้ามเนื้อเกร็ง ชักกระตุก ถ้ารุนแรงอาจเสียชีวิต

ประเทศไทยนำเข้า chlorpyrifos เพื่อจำหน่ายมากถึง 1,256 ตัน จากรายงานสรุปการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตรประเภทสารกำจัดแมลงที่มีการนำเข้ามากเป็นลำดับที่ 4 ในปี 2552 จากสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร จึงปรากฏการใช้อย่างกว้างขวางกับพืชทั่วไป แม้ว่าฉลากกลางของสารชนิด chlorpyrifos แนะนำการใช้กับพืชชนิด ถั่วลิสง ถั่วเหลือง มันเทศ ข้าว ฯลฯ ซึ่งเป็นพืชไร่เท่านั้น เนื่องจากผลิตผลของพืชไร่ที่ใช้บริโภคส่วนมากปลอดภัยจากสารพิษตกค้างชนิดนี้ เพราะมีเปลือกหุ้ม และใช้เวลาเก็บในโรงเก็บนานก่อนการบริโภค ซึ่งแตกต่างจากผักและผลไม้ที่ส่วนมากบริโภคได้ทันทีหลังการเก็บเกี่ยวจึงพบรายงานข้อมูลการตรวจพบสารพิษตกค้างในพืชผักผลไม้ ปีงบประมาณ 2546-2548 จากศูนย์บริการทางวิชาการแบบเบ็ดเสร็จกรมวิชาการเกษตร ชนิดสารที่ตรวจพบมาก ได้แก่ methamidophos, cypermethrin, chlorpyrifos และ triazophos และชนิดของผักที่พบสารพิษตกค้างเกินมาตรฐานจำนวนมากในปี 2549 ได้แก่ พริก กระเจี๊ยบเขียว ใบกะเพรา และผักอื่นๆ ซึ่งเป็นสินค้าเพื่อการส่งออกทั้งหมด ผลการสำรวจการผลิตส้มของผู้ประกอบการในเขต อำเภอฝาง แม่อาย และไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ปี 2552 พบสารพิษตกค้างกลุ่ม Organophosphorus โดยเฉพาะชนิด chlorpyrifos พบในตัวอย่างส้มมากที่สุด แม้ว่าจะมีปริมาณไม่เกินค่า Codex MRL1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ลาภิสรา และคณะ 2553)

chlorpyrifos เป็นสารที่มีวิธีการใช้โดยการฉีดพ่น เกษตรกรใช้สารพิษชนิดนี้เพื่อกำจัดเพลี้ย หนอน ขณะพ่นเกิดละอองฟุ้งในอากาศโอกาสรับสารพิษเข้าสู่ร่างกายได้มากทางลมหายใจแล้วเข้าสู่ปอด และละอองสารพิษยังสัมผัสทุกส่วนของร่างกายตั้งแต่หัวจรดเท้า เมื่อเกษตรกรขาดความระมัดระวังในการป้องกันตัวเองในขณะฉีดพ่น เช่น ไม่ใส่รองเท้า ถุงมือ ผ้าปิดจมูก หมวก โดยเฉพาะอย่างยิ่งไม่รีบชำระล้างร่างกายภายหลังการฉีดพ่นสารพิษติดต่อกันเป็นเวลานาน อีกทั้งอาจรับประทานอาหาร ดื่มน้ำ และสูบบุหรี่ระหว่างปฏิบัติงาน จึงมีรายงานของกระทรวงสาธารณสุขระบุถึงจำนวนผู้ป่วยที่ได้รับพิษจากการฉีดพ่นวัตถุมีพิษทางการเกษตรอยู่เสมอ นอกจาก chlorpyrifos จะเป็นอันตรายต่อเกษตรกรผู้ใช้แล้วยังเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคสูงเมื่อบริโภคผลผลิตที่มีสารพิษตกค้าง

กลุ่มงานวิจัยผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร จึงได้จัดทำชุดโครงการวิจัยเพื่อศึกษาประเมินความเสี่ยงต่อการสัมผัสสารเคมี chlorpyrifos ที่ไม่ใช่สารก่อมะเร็ง เป็นการเปรียบเทียบปริมาณสารเคมีที่ร่างกายได้รับ กับค่าความเป็นพิษของสารเคมีนั้น ๆ เพื่อบ่งชี้ว่าปริมาณสารเคมีที่ได้รับมีความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้ใช้ และผู้บริโภคหรือไม่ ประกอบด้วยการศึกษาปริมาณสารพิษปนเปื้อนบนร่างกายผู้ฉีดพ่นในแหล่งปลูกพริก ปริมาณสารพิษปนเปื้อนมือผู้เก็บเกี่ยวพริก การสลายตัวและสารพิษตกค้างของ chlorpyrifos ในพริกภายหลังการฉีดพ่นเพื่อให้ได้ข้อมูลการประเมินความเสี่ยงของผู้ใช้สารพิษและของผู้บริโภคผลิตผลที่มีสารพิษตกค้าง เป็นข้อมูลสำหรับกรมวิชาการเกษตรในการพิจารณาบริหารจัดการควบคุมวัตถุมีพิษที่มีอันตราย เพื่อความเข้มงวดการใช้ การจำกัดการใช้ หรือการห้ามใช้เป็นความปลอดภัยของผู้ใช้ ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. แปลงปลูกพริกมัน (*Capisicum annuum Linn.*)
2. แผ่นผ้าฝ้ายขนาด 10x10 ตารางเซนติเมตร จำนวน 16 แผ่น
3. ผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลง chlorpyrifos ที่ใช้ฉีดพ่นในแปลงทดลอง คือ ลอร์สแบน 40% w/v EC
4. เครื่องแก้ว volumetric flask, volumetric pipette, separatory funnel, Erlenmeyer flask, cylinder, beaker, round bottom flask, chromatographic column, filtering funnel, pipette, petri-dish, glass vial, disposable pasteur pipette, test tube
5. เคมีภัณฑ์ชนิดต่างๆ
   5.1 สารเคมี analytical grade (AR) ได้แก่ acetone, ethyl acetate, dichloromethane ,anh. sodium sulphate, sodium chloride
   5.2 สารเคมี pesticide grade (PR) ได้แก่ ethyl acetate
   5.3 สาร substrate ชนิด acetylthiocholine iodide ความเข้มข้น 156 mM
   5.4 สาร reagent ชนิด Dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB) 0.26 mM เตรียมโดยการละลาย 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid M.W. 396.3 ใน phosphate buffer pH 7.2
6. glass wool และ filter paper No.1
7. สารพิษมาตรฐาน chlorpyrifos ความบริสุทธิ์สูง บริษัท Dr. Ehrenstorfer
8. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เครื่องชั่งหยาบ และเครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) เครื่องสกัดวัตถุมีพิษชนิด homogenizer และ Blender เครื่องเขย่า (reciprocal shaker) เครื่องลดปริมาตรชนิด rotary evaporator ตู้อบสารเคมี (digital oven) เตาเผาอุณหภูมิสูง (muffle furnace) เครื่องทำสุญญากาศ (Vacuum pump) เครื่องลดปริมาตร ชนิด Nitrogen Evaporator เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) ตู้ดูดความชื้น (Desiccator) ตู้เย็นแช่แข็ง (Deep freezer) ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ -20 °C เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)
9. การวิเคราะห์สารพิษ EPN ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph (GC) พร้อม Auto injector และตัวตรวจวัดชนิด Flame Photometric Detector (FPD) โดยปรับสภาวะการทำงานของเครื่อง ดังนี้

   Detector : Flame Photometric Detector

   Mode : Splitless

   Column : SPB-5 / DB 1701 fused siliga capillary column

   ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 mm ความยาว 30 m สารเคลือบหนา 0.25 µm

   Initial flow : 1.4 ml/นาที Temperature : Injector 230 °C, Detector 280 °C

   Oven : $80^{\circ}C$ (1 นาที) $\xrightarrow{20\ ^{\circ}c/นาที}$ $194^{\circ}C$ (1 นาที) $\xrightarrow{2\ ^{\circ}c/นาที}$ $197^{\circ}C$ (1 นาที) $\xrightarrow{5\ ^{\circ}c/นาที}$ $250\ ^{\circ}C$ (10 นาที)

   Volume injected : 1 ไมโครลิตร

วิธีการ

เลือกแปลงทดลองของเกษตรกรที่ปลูกเพื่อการค้า เหมาะสมสำหรับการทดลองที่ ตำบลบางตาเถร อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี และมีการใช้สารพิษ chlorpyrifos เป็นประจำ ลักษณะแปลงปลูกแบบยกร่องดินขึ้นและมีคูน้ำล้อมรอบ ทดน้ำจากแม่น้ำท่าจีนเข้าสู่สวนเกษตรกรปลูกผักชนิดถั่วฝักยาวและบวบ หมุนเวียนติดต่อกันตลอดทั้งปีเกษตรกรใช้สารพิษอย่างหลากหลาย ระยะการทดลองในแปลง เดือนมกราคม 2553 – พฤษภาคม 2553

การปฏิบัติงานในแปลงทดลอง

1. แปลงทดลองพริกมัน มีพื้นที่ขนาด 2 ไร่ ยกร่องปลูก มีร่องน้ำระหว่างแปลงกว้าง 1.5 เมตร ขนาดแปลงปลูก 3.5 X 53.5 เมตร จำนวน 8 แปลง ปลูกพริกมัน จำนวน 4 แถว ในแต่ละแปลง เริ่มเก็บเกี่ยวผลพริก เมื่ออายุ 120 วัน และเก็บผลผลิตได้นานประมาณ 3 เดือน

2. เกษตรกรฉีดพ่นสารพิษเพื่อกำจัดศัตรูพืชเป็นระยะ สารพิษที่ใช้เป็นประจำได้แก่ abamectin, emametin benzoate, buprofezin+cypermethrin, phenthoate, diazinon, metalaxyl, carbendazim, difenoconazole, bacillus subtilis propiconazole+prochloraz และได้ใช้สารพิษ chlorpyrifos เพื่อป้องกันกำจัดหนอนเมื่อพบการระบาด ประมาณ 2 - 3 ครั้งต่อฤดูปลูก

3. กำหนดการฉีดพ่น chlorpyrifos จำนวน 3 ครั้ง การฉีดพ่น chlorpyrifos ครั้งแรก เมื่อพริกอายุ 99 วัน ครั้งที่ 2 เมื่อพริกอายุ 106 วัน และ ครั้งที่ 3 เมื่อพริกอายุ 113 วัน ซึ่งเป็นระยะเริ่มเก็บเกี่ยว อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ฉีดพ่นด้วยเครื่องยนต์สะพายหลัง และบันทึกเวลาการฉีดพ่นทุกครั้ง

4. การติดแผ่นผ้าบนร่างกายเกษตรกรผู้ฉีดพ่น ก่อนการฉีดพ่นสารพิษทุกครั้ง ติดแผ่นผ้าฝ้ายขนาด 10x10 ตารางเซนติเมตร บนเสื้อผ้าตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย ได้แก่ หมวก แผ่นผ้าปิดจมูก อกเสื้อด้านในอกเสื้อ ไหล่ แขนเสื้อ หลังเสื้อ ด้านในของหลังเสื้อ ต้นขา หน้าแข้ง และด้านในหน้าแข้ง

5. ก่อนเริ่มการฉีดพ่น chlorpyrifos ครั้งสุดท้าย ต้องเก็บตัวอย่างผลพริก ในแปลงทดลองมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง รวมทั้งเลือดของเกษตรกรผู้ฉีดพ่น มาตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสในเม็ดเลือดแดง เพื่อเป็นค่า Base-line level หรือค่าต่ำสุดก่อนที่ตัวอย่างจะปนเปื้อนสารพิษ

6. หลังการฉีดพ่น chlorpyrifos เก็บตัวอย่างสิ่งต่างๆ ดังต่อไปนี้
   - 6.1 ทันทีที่ฉีดพ่นเสร็จในแต่ละครั้งเก็บแผ่นผ้าที่ติดบนร่างกาย น้ำล้างมือ น้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่นนำมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษปนเปื้อนบนร่างกาย
   - 6.2 เก็บตัวอย่างเลือดของผู้ฉีดพ่น หลังการฉีดพ่น (ครั้งสุดท้าย) 24 ชั่วโมง 3, 5 และ 7 วัน มาตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสในเม็ดเลือดแดง
   - 6.3 เก็บตัวอย่างพริกเพื่อตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้างที่ระยะเวลาต่างๆ ดังนี้ ภายหลังการฉีดพ่น 0 วัน เมื่อใบแห้ง (หลังการฉีดพ่น ครั้งสุดท้าย) 1 วัน 3 วัน 5 วัน 7 วัน 10 วัน 15 วัน 20 วัน และ 30 วัน
   - 6.4 ทันทีที่เกษตรกรเก็บตัวอย่าง พริกเสร็จในแต่ละวันที่กำหนดข้างต้น ต้องชำระล้างมือแล้วเก็บน้ำล้างมือนั้นของผู้เก็บพริกเพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษ chlorpyrifos เปื้อนบนมือทุกครั้ง

วิธีการเก็บตัวอย่างแต่ละชนิด

1. การเก็บตัวอย่างแผ่นผ้าจากแต่ละส่วนของร่างกายแยกกันใส่ Erlenmeyer flask และปิดฝาขวด

2. การเก็บตัวอย่างน้ำล้างมือ น้ำล้างเท้าของเกษตรกรผู้ฉีดพ่น และน้ำล้างมือของผู้เก็บพริก โดยการล้างมือหรือเท้าด้วยน้ำประปา ครั้งละ 1 ลิตร แล้วแยกบรรจุใส่ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ

3. การเก็บตัวอย่างเลือดของเกษตรกรก่อนและหลังการฉีดพ่น โดยพาเกษตรกรไปอนามัยตำบล เพื่อเจาะเลือดที่ท้องแขน จำนวน 2 มิลลิลิตร 2 หลอด และใส่ EDTA เพื่อเป็น anticoagulant ในสัดส่วน 0.5MEDTA 100 ไมโครลิตร ต่อปริมาณเลือด 1 มิลลิลิตร และนำหลอดตัวอย่างเลือดแช่ในถังน้ำแข็งทันที

4. การเก็บตัวอย่างพริก สุ่มเก็บจากทั้งแปลง โดยเก็บจากหลายๆจุดรวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง ให้ได้น้ำหนักไม่ต่ำกว่า 1 กิโลกรัม ต่อตัวอย่าง เก็บใส่ถุงพลาสติก จำนวน 10 ตัวอย่างต่อวันที่กำหนด การเก็บรักษาตัวอย่างเพื่อนำส่งห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างทุกชนิดหลังจากเก็บจากแปลงทดลอง จะเก็บในถุงพลาสติกหรือใส่ภาชนะที่เหมาะสม แล้วปิดให้สนิท พร้อมทั้งเขียนรายละเอียดกำกับให้ชัดเจนในแต่ละตัวอย่าง ได้แก่ ชนิดตัวอย่าง วันที่เก็บ ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง แล้วนำใส่ในถังน้ำแข็งโดยวางน้ำแข็งไว้ข้างล่างและข้างบนของตัวอย่างนำกลับมาตรวจวิเคราะห์หาข้อมูลต่างๆในห้องปฏิบัติการ

วิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษ chlorpyrifos

1. วิธีการตรวจวิเคราะห์ chlorpyrifos บนแผ่นผ้า

สกัดตัวอย่างแผ่นผ้า โดยใช้ mixer และ shaker ใช้ ethyl acetate เป็นสารสกัด กรองสารละลายผ่าน anh. Na_2SO_4 นำไปลดปริมาตรโดยใช้ rotary evaporator ปรับปริมาตรให้แน่นอน ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษด้วยเครื่อง GLC/FPD

ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการตรวจวิเคราะห์ (Recovery) ที่ความเข้มข้น 0.5, 2 และ 5 นาโนกรัมต่อ ตารางเซนติเมตร ได้ผลระหว่าง 106 - 128 เปอร์เซนต์ มีค่า LOQ 0.5 นาโนกรัมต่อตารางเซนติเมตร

2. วิธีการตรวจวิเคราะห์ chlorpyrifos ในพืช ใช้วิธีการของ Steinwandter,1985 ดังนี้

นำตัวอย่าง พริกที่บดแล้วชั่ง 25 ± 0.1 กรัม เติม acetone 50 มิลลิลิตร 15 กรัม sodium chloride และ 40 มิลลิลิตร dichloromethane โดยใช้ dispenser แล้วปั่นด้วย homogenizer ที่ระดับความเร็วประมาณ 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที รินส่วนใสใส่ Erlenmeyer flask ที่เติม sodium sulfate ไว้ประมาณ 1 ช้อนโต๊ะ (~ 30 กรัม) ปิดฝาแล้วทิ้งไว้นานประมาณ 10 นาที กรองผ่าน sodium sulfate ให้ได้ 100 มิลลิลิตร ใส่ใน cylinder แล้วเทลง flat bottom flask ล้าง cylinder ด้วย ethyl acetate ~ 10 มิลลิลิตร นำไปลดปริมาตรด้วย เครื่อง rotary evaporator ให้เหลือ ประมาณ 1 มิลลิลิตรถ่ายสารละลายใส่ใน volumetric flask ขนาด 5 มิลลิลิตร โดยใช้ ethyl acetate PR ปรับปริมาตรให้ได้ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แบ่งสารละลายตัวอย่างลงใน autosampler vial สำหรับฉีดเข้าเครื่อง GC

ความถูกต้องและแม่นยำของวิธีตรวจวิเคราะห์ โดยการหาค่าเปอร์เซนต์ recovery ที่ความเข้มข้น 0.0102, 0.1029, 1.0219, 1.05329 และ 2.0438 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้ค่าระหว่าง 87 – 115 เปอร์เซนต์ มีค่า LOQ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

3. วิธีการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส

ใช้วิธีการของ Ellman et al.,1961 อาศัยหลักการทำงานของ photometric method โดยเอนไซม์ acetylcholinesterase เป็นตัวการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของสาร acetylthiocholine ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัว substrate แล้วเกิดสาร thiocholine และ acetate เมื่อ thiocholine ทำปฏิกิริยากับ 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoate ion (DTNB) จะเกิดเป็นสารสีเหลืองของ 5-thio-2-nitro-benzoic acid (TNB)

สมการการเกิดสารสีเหลืองมีดังนี้

acethylthiocholine $\xrightarrow{\text{acetylcholinesterase}}$ thiocholine + acetate

thiocholine + DTNB $\longrightarrow$ formation of TNB (yellow colour)

(5-thio-2- nitrobenzoic acid)

ในสภาวะที่สารพิษกลุ่ม organophosphorus ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จะทำให้เกิดอัตราการเกิดปฏิกิริยาสีเหลืองน้อยลง โดยการวัดความเข้มของสีเหลือง (reaction rate of color) จากค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ของเครื่อง Spectrophotometer วิธีการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสในเม็ดเลือดแดง

วิธีการแยกเม็ดเลือดแดง

เติมน้ำเกลือ (physiological saline) 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ใน test tube ที่บรรจุเลือด (whole blood) 1 มิลลิลิตรปิดฝา tube แล้วกลับไปมาเพื่อให้ของเหลวผสมกันอย่างเบาๆ แล้วนำไปปั่นแยกของเหลวออกจากเม็ดเลือดโดยเครื่อง ปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ของเหลวส่วนบนดูดทิ้งไป แล้วล้างเม็ดเลือดอีก 2 ครั้ง ด้วยน้ำเกลือ 2 มิลลิลิตร ดำเนินการเหมือนเดิม เมื่อล้างเม็ดเลือดแดงแล้วเติมน้ำเกลือปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร เท่าเดิม

วิธีการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสในเม็ดเลือดแดง (Angerer, et.al, 1990)

นำเม็ดเลือดแดงที่ผ่านการล้างแล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตร เป็น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันดีแล้วดูดมา 20 ไมโครลิตร ใส่ลงใน test tube อีกหลอดที่มี DTNB จำนวน 3,000 มิลลิลิตร เติมสาร Acetylthiocholine iodide 100 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่อง vortex แล้วเทใส่ cuvette ต่อจากนั้นนำไปวัดด้วย Spectrophotometer แบบ visible ที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร วัดทุก 1/2 นาที นาน 2 นาที

การคำนวณอัตราการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส ดังสมการต่อไปนี้

$$R = \frac{A}{0.05\ \text{min} \cdot 1.33\ \text{L} \cdot \text{m mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot 10\ \text{mm}} \cdot \frac{3.12\ \text{ml}}{0.02\ \text{ml}}$$

$$= A \cdot 23460\ \frac{\mu\ \text{mol}}{\text{min . L}}$$

R = rate in moles substrate hydrolyzed per min per litre of red blood cell or plasma

A = absorbance per 1/2 min

$1.33\ \text{L} \cdot \text{m mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ = the extinction coefficient