

การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับตรวจวัดเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสจากการสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต

Development of Paper-Based Device for Cholinesterase Enzyme Analysis from Exposure to Organophosphate Pesticides

วัชรารณ วงศ์สกุลกาญจน์^{1*}, พชรวรรณ รัตนทรงธรรม²

Watcharaporn Wongsakoonkan^{1*}, Pacharawan Ratanasongtham²

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับตรวจวัดเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสจากการสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตโดยอาศัยการทำปฏิกิริยาเคมีระหว่าง 5-5-ไดไธโอบิส-2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด (5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, DTNB) acetylthiocholine chloride และเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส (Cholinesterase enzyme) เกิดการเปลี่ยนสีจากไม่มีสีเป็นสีเหลืองบนกระดาษทดสอบ สามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยการถ่ายภาพด้วยโทรศัพท์มือถือ (iPhone 12) ประมวลผลภาพด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ (Image J) ความเข้มสี Red-Green-Blue (RGB) ที่ได้จะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์กับวิธีมาตรฐาน Ellman's method จากนั้นทดสอบภาคสนามในกลุ่มตัวอย่างเกษตรกรจากตำบลหน้าไม้ อำเภอลาดหลุมแก้ว จังหวัดปทุมธานีจำนวน 40 คน ผลการศึกษา กระดาษทดสอบที่พัฒนาขึ้นให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้นของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสตั้งแต่ 0.01-2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9832 ผลการวิเคราะห์ Ellman's method พบค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ R^2 เท่ากับ 0.9892 ผลการคัดกรองด้วยกระดาษทดสอบในกลุ่มเกษตรกรพบว่า ร้อยละ 95 ของเกษตรกรพบเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสในเลือดมีค่าอยู่ระหว่าง 0.39-1.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลจากการพัฒนาอุปกรณ์นี้สามารถนำไปใช้เป็นเครื่องมือในการคัดกรองความเสี่ยงทางสุขภาพของเกษตรกรที่ทำงานกับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชได้

คำสำคัญ: อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ, เอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส, สารเคมีกำจัดศัตรูพืช, ออร์กาโนฟอสเฟต

Citation:

Wongsakoonkan W, Ratanasongtham P. Development of paper-based device for cholinesterase enzyme analysis from exposure to organophosphate pesticides. Health Sci J Thai 2024; 6(3): 44-50. (in Thai); <https://doi.org/10.55164/hsjt.v6i3.266955>

¹ หลักสูตรอาชีวอนามัยและความปลอดภัย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี 13180
² หลักสูตรเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี 13180

¹ Department of Occupational Health and Safety, Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage Pathum Thani Province, 13180, Thailand

² Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage Pathum Thani Province, 13180, Thailand

* Corresponding author: Email: watcharaporn@vru.ac.th, Tel: 080-9047871
Received: Dec 27, 2023; Revised: Mar 5, 2024; Accepted: Jun 18, 2024
<https://doi.org/10.55164/hsjt.v6i3.266955>

Abstract

This research study aimed to develop a paper-based device for cholinesterase enzyme analysis from exposure to organophosphate pesticides using the chemical reaction between 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), acetylthiocholine chloride, and cholinesterase enzyme caused a color change from colorless to yellow on the test paper. Quantitative analysis was done by taking pictures with a mobile phone (iPhone 12). Images were processed with an image processing program (Image J). The resulting Red-Green-Blue (RGB) color intensity is directly proportional to the concentration of cholinesterase enzyme. Ellman's method was used to test the accuracy of the analytical method. Then, field testing was conducted among 40 farmers from Na Mai subdistrict, Lat Lum Kao District, Pathum Thani Province. The paper-based device provided a linear dynamic range between 0.01-2.0 $\mu\text{g/ml}$ with a correlation coefficient (R^2) of 0.9832. The result of Ellman's method analysis found the correlation coefficient (R^2) equal to 0.9892. The screening results with a paper-based device found that 95 percent of farmers had the cholinesterase enzyme in their blood between 0.39 to 1.97 $\mu\text{g/ml}$. The development of this device could serve as a tool for screening the health risks of farmers who are exposed to pesticides.

Keywords: Paper-based device, Cholinesterase enzyme, Pesticide, Organophosphate

บทนำ

ประเทศไทยเป็นเมืองแห่งเกษตรกรรมเป็นแหล่งการผลิตอาหารที่สำคัญสำหรับประชากรไทยมาช้านานเนื่องจากลักษณะภูมิศาสตร์ที่เอื้อต่อการทำเกษตร ดินอุดมสมบูรณ์ ระบบชลประทานดีทำให้แต่ละปีเกษตรกรสามารถสร้างผลผลิตได้เป็นจำนวนมาก⁽¹⁾ แต่ด้วยสภาพภูมิประเทศที่อยู่ในเขตอบอุ่นจึงเอื้อต่อการเจริญเติบโตและแพร่ระบาดของศัตรูพืชส่งผลให้เกิดปัญหาด้านศัตรูพืชรุนแรงสร้างความเสียหายต่อผลผลิตอย่างมาก เกษตรกรจึงใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีความสวยงามและตรงตามความต้องการของผู้บริโภค⁽²⁾ จากรายงานของกรมวิชาการเกษตร ปี พ.ศ. 2564 พบการนำเข้าวัตถุดิบทางการเกษตรจำนวน 136,141 ตัน 3 อันดับแรกประกอบด้วยสารกำจัดวัชพืช 74,204 ตัน สารกำจัดแมลง 29,554 ตัน และสารป้องกันกำจัดโรคพืช 24,248 ตัน กลุ่มสารเคมีที่มีการนำเข้าสูงสุดคือ สารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต⁽³⁾ เกษตรกรได้รับสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืชเข้าสู่ร่างกายระหว่างการทำงานทั้งสูดดมไอรระเหยช่วงผสม ฉีดพ่นหรือดูดซึมผ่านผิวหนังจากการหก กระเด็น ขนถ่ายสารเคมีกำจัดศัตรูพืชจากถังผสมสู่ปะทะพวยหลังสำหรับฉีดพ่น หากมีการรับสัมผัสสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตเข้าสู่ร่างกายย่อมก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพตามมา⁽⁴⁾

ผลกระทบต่อสุขภาพที่เกิดจากการรับสัมผัสสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาทส่วนกลางเนื่องจากสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตจะเกิดกลไกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเตอเรส ทำให้สารอะซีทิลโคลีนสะสมที่บริเวณปลายประสาท⁽⁵⁾ นำไปสู่การเกิดอาการต่าง ๆ ทั้งแบบเฉียบพลันเช่น คลื่นไส้อาเจียน ปวดหัว ปวดกล้ามเนื้อ กล้ามเนื้อเกร็ง กระตุก ท้องร่วง หายใจติดขัด ตาพร่ามัว แสบตา เป็นต้น และแบบเรื้อรัง เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคอัมพฤกษ์ โรคอัมพาต โรคผิวหนังต่าง ๆ เป็นต้น⁽⁶⁾ เมื่อพิจารณารายงานสถานการณ์ผู้ป่วยโรคจากพิษสารเคมีกำจัดศัตรูพืชปี พ.ศ. 2563 ของกรมควบคุมโรคพบผู้ป่วยโรคจากพิษสารเคมี

กำจัดศัตรูพืชจำนวน 5,721 ราย คิดเป็นอัตราป่วยเท่ากับ 8.62 ต่อประชากรแสนคน⁽⁷⁾ และแนวโน้มสถานการณ์การใช้สารเคมีในประเทศไทยยังคงสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง

การตรวจคัดกรองการรับสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืชจึงเป็นแนวทางในการเฝ้าระวังการรับสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืชเพื่อให้เกิดการแก้ไขและป้องกันได้อย่างรวดเร็ว วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการเฝ้าระวังการรับสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตจะดำเนินการตรวจคัดกรองโดยการเก็บตัวอย่างปัสสาวะหรือเลือดหลังการสัมผัสและนำส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการด้วยเครื่องมือขั้นสูง ได้แก่ Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)⁽⁸⁾ UV/VIS Spectrometry⁽⁹⁾ อย่างไรก็ตาม วิธีการเหล่านี้ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ ระยะเวลาในการอ่าน และมีราคาสูง ดังนั้นการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจคัดกรองการรับสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่สามารถใช้งานง่าย อ่านค่าได้รวดเร็ว ราคาถูกจึงเป็นเป้าหมายในการพัฒนาอุปกรณ์ครั้งนี้

การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจคัดกรองการรับสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืชโดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาเคมีบนกระดาษทดสอบเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในปัจจุบันเนื่องจากพกพาสะดวก อ่านค่าได้อย่างรวดเร็ว⁽¹⁰⁻¹²⁾ โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างสารเคมีที่สามารถทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสแล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนสีบนกระดาษทดสอบและสามารถอ่านค่าสีที่เปลี่ยนไปโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน การศึกษาก่อนหน้านี้ได้มีการทดสอบความเหมาะสมของสารเคมีในการเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสพบว่า 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) มีความเหมาะสมในการนำไปพัฒนาต่อเนื่องจากเมื่อ 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสจะเกิดการเปลี่ยนสีของสารละลายจากไม่มีสีเป็นสีเหลือง⁽¹³⁾

ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ตรวจคัดกรองการรับสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืชสำหรับตรวจวัดเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีระหว่าง

5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) และระดับเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ บนกระดาษทดสอบ ซึ่งสามารถมองเห็นการเปลี่ยนสีได้ด้วยตาเปล่า (Qualitative analysis) และสามารถประยุกต์การถ่ายภาพกระดาษทดสอบด้วยโทรศัพท์มือถือและนำภาพที่ได้ไปประมวลผลความเข้มสี Red-Green-Blue (RGB) โดยใช้โปรแกรมประมวลผลภาพ (Image J) ในแต่ละระดับความเข้มข้น จากนั้นนำค่าความเข้มสี RGB มาสร้างชาร์ตมาตรฐานสำหรับบ่งบอกถึงค่าความเข้มข้นของระดับเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส (Quantitative analysis) ผลจากการพัฒนาอุปกรณ์นี้จะสามารถนำไปใช้เป็นเครื่องมือในการคัดกรองความเสี่ยงทางสุขภาพของเกษตรกรที่ทำงานสัมผัสกับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชได้อย่างรวดเร็วแม่นยำ ผลจากการคัดกรองนี้จะนำไปสู่การสร้างความตระหนักในพฤติกรรมการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชให้ใช้อย่างถูกต้องและป้องกันตนเองในขณะมีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชได้

วิธีการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (Experimental research) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติพรรณนา ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ร้อยละและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างวิธีที่พัฒนาและวิธีมาตรฐาน Ellman's method ทำการ

ศึกษา ณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี

การเตรียมสารละลายทดสอบ

- สารละลาย A (Reagent A) ประกอบด้วย 5-5-ไดไธโอบิส-2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด (5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, DTNB) และฟอสเฟตบัฟเฟอร์

- สารละลาย B (Reagent B) ประกอบด้วยสารละลาย acetylthiocholine chloride

- เอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase human, Sigma-Aldrich) โดยเตรียมความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปริมาตรโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ สำหรับการทดลองควบคุม ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส (สารละลาย blank)

การออกแบบกระดาษทดสอบ (Paper-based device)

ใช้กระดาษกรอง Whatman เป็นตัวดูดซับ โดยตัดกระดาษกรองขนาด 1.3 x 1.3 เซนติเมตร จัดวางให้พอดีกับช่องบล็อกกระดาษแม่แบบ จากนั้นนำไปเคลือบด้วยแผ่นฟิล์ม laminate โดยใช้ความร้อน ตัดแผ่นตรวจวัดที่เคลือบแล้วให้ได้ขนาด 3.5 x 6 เซนติเมตร ดังแสดงในภาพที่ (Figure) 1

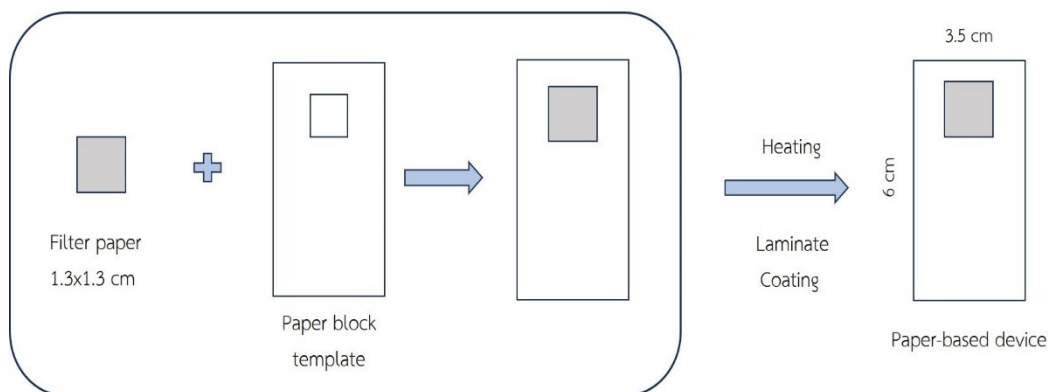


Figure 1 Paper-based device

วิธีการคัดกรองความเสี่ยงต่อการสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตด้วยกระดาษทดสอบร่วมกับโทรศัพท์มือถือ

หยดสารละลาย A จำนวน 200 ไมโครลิตร ลงบนช่องตรวจวัดของกระดาษทดสอบทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นหยดสารละลายเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสจำนวน 200 ไมโครลิตรลงบนกระดาษทดสอบ จากนั้นหยดสารละลาย B จำนวน 200 ไมโครลิตรทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำกระดาษทดสอบที่เปลี่ยนสีแล้วไปวางจุดกึ่งกลางของตู้ถ่ายภาพที่ระยะห่าง 290 มิลลิเมตร จากนั้นถ่ายภาพด้วยโทรศัพท์มือถือ (iPhone 12) ดังแสดงในภาพที่ (Figure) 2 หลังจากนั้นนำภาพที่ถ่ายได้ไปตรวจวัดค่าความเข้มสี Red-Green-Blue (RGB) ด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ (Image J) วัดค่าความเข้มสี

RGB ของแต่ละความเข้มข้นด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ เพื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าสีและความเข้มข้น สำหรับการทดลองควบคุม จะใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แทนสารละลายเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส

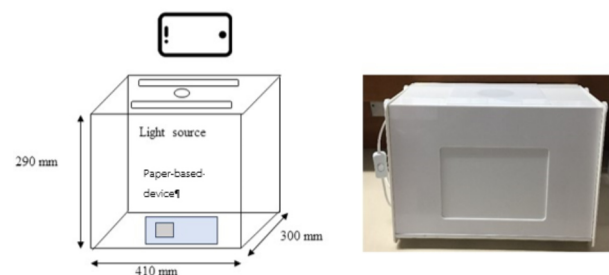


Figure 2 Photography light box

การศึกษาชนิดของกระดาษกรองที่เหมาะสม

คัดเลือกกระดาษทดสอบที่เหมาะสมจากกระดาษกรอง Whatman no. 1, 5 และ 40 โดยทำการทดสอบกับเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสทุกความเข้มข้นได้แก่ 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่า R^2 ที่ได้จากการหาหาค่าสี RGB และความเข้มข้นเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส เลือกกระดาษกรองที่มีค่า R^2 ที่ดีที่สุดในการนำไปพัฒนากระดาษทดสอบที่เหมาะสมต่อไป

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสที่ตรวจวัดได้จากวิธีการทดสอบด้วยกระดาษทดสอบ ร่วมกับโทรศัพท์มือถือกับวิธีมาตรฐาน (Ellman's method) โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) และความชันจากสมการเส้นตรงของการวิเคราะห์ปริมาณ เอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยเทคนิค microplate reader UV-vis spectrophotometry โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร

การประยุกต์ใช้กระดาษทดสอบในการคัดกรองความเสี่ยงต่อการสัมผัสสารออร์กาโนฟอสเฟตในเกษตรกร

การศึกษานี้ผ่านการรับรองทางจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ เลขที่ 0058/2566 ก่อนเริ่มดำเนินโครงการ

ประชากรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นเกษตรกรตำบลหน้าไม้ อำเภอลาดหลุมแก้ว จังหวัดปทุมธานีจำนวน 120 คน คำนวณกลุ่มตัวอย่างแบบทราบบจำนวนกลุ่มประชากรที่แน่นอนตามสูตรของ Taro Yamane⁽¹⁴⁾ ได้ 92 คน โดยมีเกณฑ์คัดเข้าคือ เป็นเกษตรกรที่อาศัยอยู่ในตำบลหน้าไม้ อำเภอลาดหลุมแก้ว จังหวัดปทุมธานี ทำการเกษตรอย่างน้อย 1 ปี ยินยอมเข้าร่วมงานวิจัย เกณฑ์คัดออกคือ ไม่สามารถเข้าร่วมกิจกรรมการตรวจคัดกรองในช่วงเวลาที่กำหนด

การเก็บตัวอย่างเลือดดำเนินการโดยนักสาธารณสุขโดยใช้สำลีปราศจากเชื้อขูดแอลกอฮอล์ 70% เช็ดบริเวณปลายนิ้วที่จะทำการเจาะเลือด จากนั้นใช้เข็มเจาะด้านข้างของปลายนิ้ว นำหลอดฮีมาโตคริตที่เคลือบสารกันเลือดแข็ง (Heparin) และบริเวณหยดเลือดเอียงทำมุมประมาณ 45 องศา อดปลายด้านหนึ่งด้วยดินน้ำมัน นำหลอดมาปั่นแยกซีรัมโดยใช้เครื่องฮีมาโตคริตความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที แยกส่วนใสด้านบนออกด้วยการหักหลอด จากนั้นหยดสารละลาย A บนกระดาษทดสอบ 200 ไมโครลิตรทิ้งไว้ 2 นาที หยดซีรัม และหยดสารละลาย B 200 ไมโครลิตรทิ้งไว้ 5 นาที และนำกระดาษทดสอบวางตรงจุดกึ่งกลางของตู้ถ่ายภาพจากนั้นถ่ายภาพด้วยโทรศัพท์มือถือ (iPhone 12) นำภาพที่ได้ไปวัดค่าสี RGB ด้วยโปรแกรมประมวลผล

ภาพ (Image J) คำนวณค่าความเข้มข้นของระดับเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสด้วยสมการจากกราฟมาตรฐาน

ผลการศึกษา

ผลการทดสอบชนิดของกระดาษกรองที่เหมาะสม

นำชุดอุปกรณ์ตรวจวัดจากกระดาษกรอง ได้แก่ Whatman no. 1, 5 และ 40 ไปทดสอบกับสารละลายเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสที่ความเข้มข้น 5 ระดับ ได้แก่ 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรจำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นนำกระดาษทดสอบมาถ่ายภาพและวัดค่าความเข้มสี RGB ของแต่ละความเข้มข้นด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพเพื่อนำมาสร้างกราฟระหว่างค่าสี RGB และความเข้มข้นเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสพบว่า กราฟที่ได้เป็นเส้นตรงโดยกระดาษทดสอบ Whatman no.1, 5 และ 40 มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9167, 0.9097 และ 0.9832 ตามลำดับ พบว่ากระดาษทดสอบ Whatman no. 40 มีความเหมาะสมในการพัฒนาเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดสำหรับตรวจวัดเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสดังแสดงในภาพที่ (Figure) 3-5

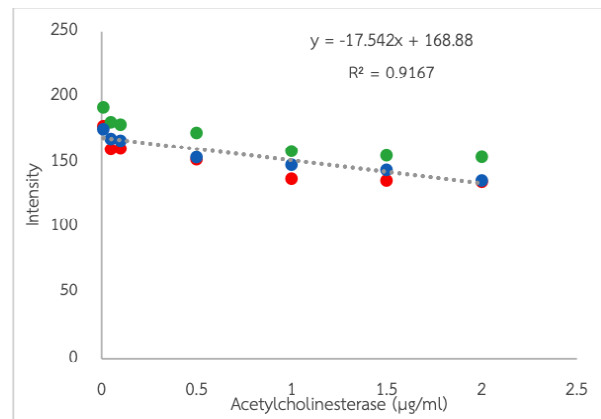


Figure 3 Color intensity of Whatman no. 1 paper-based device after testing with acetylcholinesterase at various concentrations

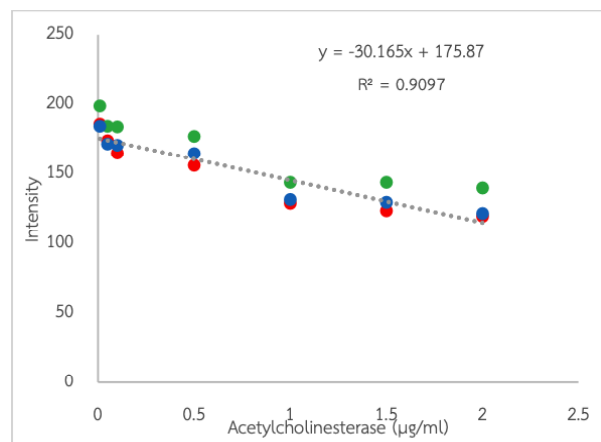


Figure 4 Color intensity of Whatman no. 5 paper-based device after testing with acetylcholinesterase at various concentrations

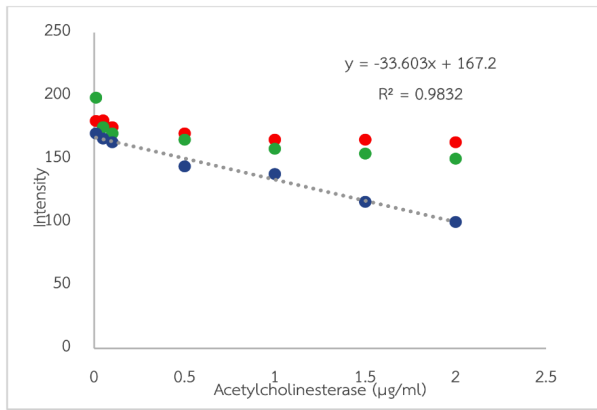


Figure 5 Color intensity of Whatman no. 40 paper-based device after testing with acetylcholinesterase at various concentrations

ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยการสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสและการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร พบว่ากราฟที่ได้เป็นกราฟเส้นตรง (สมการ $y = 0.1503x + 0.2056$) มีค่า $R^2 = 0.9892$ ดังแสดงในภาพที่ (Figure) 6

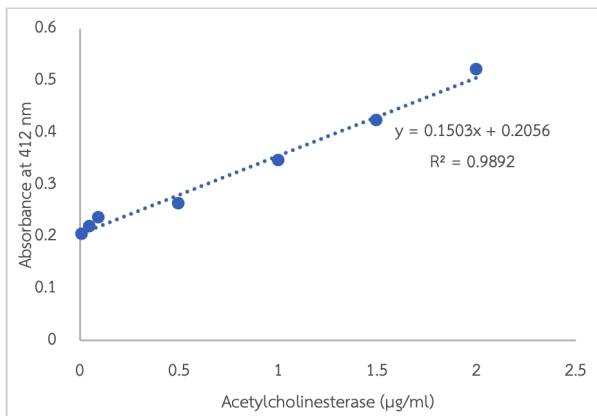


Figure 6 Results of acetylcholinesterase quantity analysis using microplate reader UV-vis spectrophotometry technique

ผลการประยุกต์ใช้กระดาษทดสอบในการคัดกรองความเสี่ยงต่อการสัมผัสสารออร์กาโนฟอสเฟตในกลุ่มเกษตรกร

ผลการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสในเลือดของกลุ่มตัวอย่างเกษตรกรด้วยกระดาษทดสอบจำนวน 40 คน พบว่าร้อยละ 95 ของเกษตรกรกลุ่มตัวอย่างพบเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสในเลือด เมื่อนำค่าที่ได้วิเคราะห์ได้จากโปรแกรมประมวลผลภาพมาแทนค่าในสมการ พบว่า เอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสมีค่าอยู่ระหว่าง 0.39-1.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ (Figure) 7

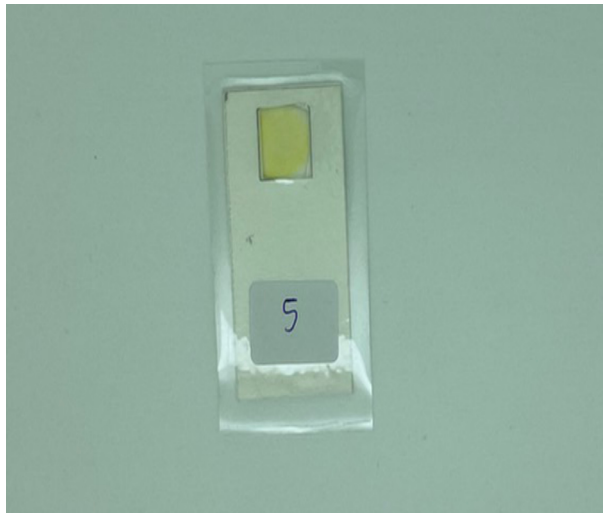


Figure 7 Paper-based device changes color after serum dripped from farmer's blood

อภิปรายผล

การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับตรวจวัดเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสจากการสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตมาจากแนวคิดในการลดความซับซ้อนของการทำการทดลองในห้องปฏิบัติการมาไว้ในกระดาษทดสอบที่อาศัยคุณสมบัติของกระดาษกรองในการดูดซับของเหลวได้ และมีเส้นใยเซลลูโลสในการยึดเกาะให้สารต่าง ๆ ได้ทำปฏิกิริยาต่อการทดสอบการเปลี่ยนแปลงสีบนกระดาษกรอง (Paper-based device) ในการหาปริมาณของสารวิเคราะห์ที่สนใจเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากขึ้นในปัจจุบัน เนื่องจากข้อดีของกระดาษกรองที่มีราคาถูก หาซื้อได้ง่าย บางเบา พกพาไปใช้งานได้สะดวก การเปลี่ยนสีสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และสามารถนำกระดาษกรองไปประยุกต์กับเทคนิคการอ่านค่าสีเพื่อบ่งบอกถึงความเข้มข้นของสารวิเคราะห์ที่สนใจได้⁽¹⁵⁾

แม้ว่าในประเทศไทยมีการพัฒนากระดาษทดสอบสำหรับใช้เป็นอุปกรณ์คัดกรองความเสี่ยงจากการสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตที่มองเห็นการเปลี่ยนสีได้ด้วยตาเปล่า (Screening test)⁽¹⁶⁾ แต่อาจไม่สามารถระบุความเข้มข้นของระดับสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตได้ การนำเทคโนโลยีการถ่ายภาพและการสร้างแถบสีมาตรฐานจึงเป็นแนวทางในการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษที่จะสามารถบอกถึงปริมาณเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสจากการสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตได้ การทำปฏิกิริยาระหว่างสารเคมี 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) และสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตทำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสเกิดการเปลี่ยนสีจากไม่มีสีเป็นสีเหลืองและความเข้มของสีแปรผันตามปริมาณของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต⁽¹⁷⁾ สามารถบ่งบอกถึงการรับสัมผัสสารเคมี

กำจัดศัตรูพืชได้ การอ่านผลการทดสอบกรณีด้วยตาเปล่าถ้าพบสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตจะเห็นสีเหลืองบนกระดาษทดสอบ และจะเป็นสีเหลืองเข้มขึ้นตามความเข้มข้นที่พบแต่การดูด้วยตาเปล่าจะไม่สามารถบอกถึงปริมาณที่ตรวจพบได้

การประยุกต์ใช้ผลการวัดค่าความเข้มสี RGB ในการวิเคราะห์ทางเคมีเป็นวิธีที่ใช้อย่างแพร่หลายในการรายงานค่าปริมาณความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณบนกระดาษ⁽¹⁸⁾ และการวัดความเข้มสี RGB จะนิยมใช้อุปกรณ์ดิจิทัลในการถ่ายภาพผลการทดสอบบนกระดาษทดสอบทั้งกล้องถ่ายรูป เครื่องสแกน แต่ปัจจุบันโทรศัพท์มือถือเป็นอุปกรณ์ที่นิยมใช้มากที่สุด⁽¹⁹⁾ การวัดค่าสีทำได้โดยนำกระดาษทดสอบไปวางในตู้ถ่ายภาพที่มีแหล่งแสงสว่างเดียวกันและระยะห่างในการวางกระดาษทดสอบกับระยะการถ่ายภาพจากโทรศัพท์มือถือที่เท่ากันทุกครั้งเพื่อให้ได้ภาพถ่ายที่มาจากสภาวะเดียวกัน จากนั้นนำภาพถ่ายกระดาษทดสอบไปวิเคราะห์ค่าความเข้มสี RGB ด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ

จากการทดสอบเพื่อคัดเลือกชนิดของกระดาษกรองที่เหมาะสมในการนำไปพัฒนาเป็นกระดาษทดสอบพบว่า Whatman no.40 มีค่า $R^2 = 0.9832$ เมื่อเปรียบเทียบกับกระดาษกรอง Whatman no.1 และ Whatman no. 5 จะเห็นได้ว่า R^2 ของกระดาษกรอง Whatman no.40 ให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำ และยอมรับได้มากกว่า อาจเนื่องมาจากการทดลองนี้เป็นการทดสอบการเปลี่ยนสีของสารละลายบนกระดาษกรองกระดาษกรองที่มีความหนามากกว่าจะอุ้มน้ำได้ดีกว่ากระดาษกรองที่บาง กระดาษกรอง Whatman no.1 มีความหนา 180 ไมโครเมตร Whatman no.5 มีความหนา 200 ไมโครเมตร และ Whatman no.40 มีความหนา 210 ไมโครเมตร ดังนั้นกระดาษกรอง Whatman no.40 จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวดูดซับในกระดาษทดสอบมากที่สุด

จากการวิเคราะห์ Ellman's method ผลการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส โดยสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร พบว่ากราฟที่ได้เป็นกราฟเส้นตรง (สมการ $y = 0.1503x + 0.2056$) มีค่า $R^2 = 0.9892$ แสดงว่าการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดังกล่าวให้ผลการทดลองที่ยอมรับได้และมีความแม่นยำ เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟวิเคราะห์ด้วยกระดาษทดสอบจากกระดาษกรอง Whatman no.40 ร่วมกับการใช้โทรศัพท์มือถือเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดพบว่า การวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธี มีค่าความแม่นยำที่ใกล้เคียงกันโดยพิจารณาจากค่า R^2 ที่ได้จากกราฟ

การคัดกรองความเสี่ยงต่อการสัมผัสสารออร์กาโนฟอสเฟตในกลุ่มเกษตรกรตำบลหน้าไม้ อำเภอลาดหลุมแก้ว จังหวัดปทุมธานี ที่มีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชพบว่า กลุ่มตัวอย่างจำนวน 92 คน

ยินยอมเข้าร่วมการคัดกรองความเสี่ยงด้วยกระดาษทดสอบจำนวน 40 คน ดำเนินการเจาะเลือดแยกซีรัมและทำการทดสอบบนกระดาษทดสอบจากนั้นถ่ายภาพด้วยโทรศัพท์มือถือและวิเคราะห์ค่าสี RGB ด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสโดยนำค่าสีไปแทนค่าในสมการ $y = -33.603x + 167.2$ ผลการทดสอบพบว่า ร้อยละ 95 ของเกษตรกรกลุ่มตัวอย่างพบเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสในเลือดมีค่าเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสในเลือดอยู่ระหว่าง 0.39-1.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม แสดงให้เห็นว่ากลุ่มตัวอย่างเกษตรกรมีความเสี่ยงจากการสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต จากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สรุปได้ว่า การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับตรวจวัดเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจคัดกรองการสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตกับเกษตรกรที่สัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนโครงการจากมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี (สัญญาเลขที่ ววน 006/2566) ขอขอบคุณผู้อำนวยการโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพส่วนตำบลหน้าไม้ นักวิชาการสาธารณสุข เจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง อาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน และเกษตรกรตำบลหน้าไม้ อำเภอลาดหลุมแก้ว จังหวัดปทุมธานีที่เล็งเห็นถึงความสำคัญของโครงการวิจัยและให้ความร่วมมือด้วยดีเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

1. Thongmeethip K. Agricultural development in Thailand in terms of community development and quality of life. PSDS Journal of Development Studies 2021; 4(1): 132-162. (In Thai)
2. Setchan W. Factors effecting behaviors of pesticide use by monkey apple growing farmers in Phon sub-district, Khammuang district, Kalasin province. UBRU Journal for Public Health Research 2019; 8(2): 78-88. (In Thai)
3. Department of Agriculture. Summary report on imports of agricultural hazardous substances. 2020. [Cited 19 October 2023]. Available from: <https://www.doa.go.th/ard/wp-content/uploads/2022/03/5. Summary report on imports of agricultural hazardous substances.pdf>.
4. Damalas CA, Koutroubas SD. Farmers' exposure to pesticides: toxicity types and ways of prevention. Toxics 2016; 4(1). 1.

5. Skomal AE, Zhang J, Yang K, Yen J, Tu X, Suarez-Torres J, et al. Concurrent urinary organophosphate metabolites and acetylcholinesterase activity in Ecuadorian adolescents. *Environmental Research* 2022; 207: 112163.
6. Yord-in C, Chodnock K, Promprakone K. Health risk assessment from organophosphate pesticide in farmers: case study of Makatai community, Banyang subdistrict, Mueang district, Buriram province. *Journal of Health Science of Thailand* 2023; 32(6): 989-99. (In Thai)
7. Department of Disease Control. Annual epidemiological surveillance report 2020. [Cited 19 October 2023]. Available from: https://apps-doe.moph.go.th/boeeng/download/AW_AESR_NCD_2563.pdf.
8. Hung C-C, Simaremare SRS, Hsieh C-J, Yiin L-M. Simultaneous determination of pyrethroid, organophosphate and carbamate metabolites in human urine by gas chromatography-mass spectrometry (GCMS). *Applied Sciences* 2019; 9(5): 879.
9. Wulandari DD, Santoso AP, Wulansari DD. Effect of beetroot (*Beta Vulgaris* L.) juice on cholinesterase activity in farmers exposed to organophosphate pesticides. *Indonesian Journal of Medical laboratory Science and Technology* 2019; 18;1(2): 80-87.
10. Apilux A, Siangproh W, Praphairaksit N, Chailapakul O. Simple and rapid colorimetric detection of Hg(II) by a paper-based device using silver nanoplates. *Talanta* 2012; 97: 388-94.
11. Chen X, Chen J, Wang F, Xiang X, Luo M, Ji X, et al. Determination of glucose and uric acid with bienzyme colorimetry on microfluidic paper-based analysis devices. *Biosens Bioelectron* 2012; 35: 363-368.
12. Hu J, Wang S, Wang L, Li F, Pingguan-Murphy B, Lu TJ, et al. Advances in paper-based point-of-care diagnostics. *Biosens Bioelectron* 2014; 54: 585-597.
13. Pohanka M, Holas O. Evaluation of 2,6-dichlorophenolindophenol acetate as a substrate for acetylcholinesterase activity assay. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 2015; 30(5): 796-9.
14. Yamane, T. *Statistics, An Introductory Analysis*, 2nd. Ed., New York : Harper and. Row; 1967.
15. Ko A, Liao C. Paper-based colorimetric sensors for point-of-care testing. *Analytical Methods* 2023; 15(35): 4377-404.
16. Bureau of Occupational and Environmental Diseases. Knowledge about screening for risk from exposure to pesticides using cholinesterase reactive paper. [Internet]. 2017 [Cited in 25 December, 2023]. Available from: <https://www.ddc.moph.go.th/uploads/files/151f742628c5261c7d2062ff5c61123f.pdf>. (In Thai).
17. Shetab-Boushehri SV. Ellman's method is still an appropriate method for measurement of cholinesterase activities. *EXCLI journal* 2018; 17: 798-799.
18. Guan H, Du S, Han B, Zhang Q, Wang D. A rapid and sensitive smartphone colorimetric sensor for detection of ascorbic acid in food using the nanozyme paper-based microfluidic chip. *LWT* 2023; 184: 115043.
19. Morbioli GG, Mazzu-Nascimento T, Stockton AM, Carrilho E. Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) - A review. *Analytica Chimica Acta* 2017; 970: 1-22.