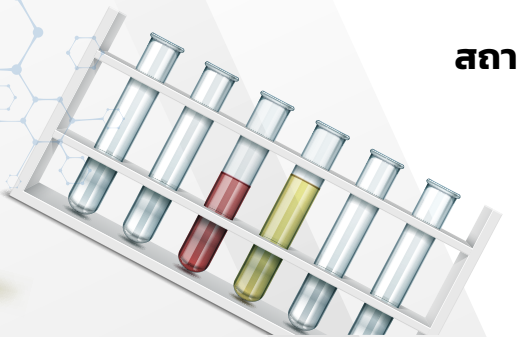
พิษวิทยาทางสัตวแพทย์:

สารพิษและเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ สำหรับห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคสัตว์

Veterinary Toxicology:

Toxicants and Analylical Techniques for Animal Disease Diagnostic Laboratory

ISBN 978-616-629-434-7



อนุสรณ์ อยู่เย็น

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

พิษวิทยาทางสัตวแพทย์:
สารพิษและเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ สำหรับห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคสัตว์

Veterinary Toxicology:
Toxicants and Analylical Techniques for Animal Disease Diagnostic Laboratory

เรียบเรียงโดย

นายอนุสรณ์ อยู่เย็น
สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ
เกษตรกลาง ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900
กรมปศุสัตว์
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

พิมพ์ครั้งที่ 1 จำนวน เล่ม
ปีที่พิมพ์ พ.ศ. 2568

ข้อมูลทางบรรณานุกรม
จัดทำโดย นายอนุสรณ์ อยู่เย็น
เรื่อง พิษวิทยาทางสัตวแพทย์: สารพิษและเทคนิคการตรวจวิเคราะห์
สำหรับห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคสัตว์
Veterinary Toxicology: Toxicants and Analylical Techniques
for Animal Disease Diagnostic Laboratory
สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2568, 127 หน้า
ISBN (e-book) 978-616-629-434-7
สงวนลิขสิทธิ์ ห้ามคัดลอก จัดพิมพ์ หรือทำซ้ำรวมทั้งดัดแปลงเป็นสื่ออื่น ๆ ก่อนได้รับอนุญาต

คำนำ

การเพิ่มขึ้นของประชากรโลกและความต้องการอาหารที่สูงขึ้น ทำให้หลายประเทศรวมถึงประเทศไทยต้องเร่งพัฒนาภาคการเกษตรและอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง มีการนำสารเคมีทางการเกษตรมาใช้เพื่อควบคุมศัตรูพืชและสัตว์ในปริมาณสูง แม้จะช่วยเพิ่มผลผลิตและคุณภาพอาหาร แต่การใช้สารเคมีอย่างไม่ถูกต้อง หรือมากเกินไปอาจก่อให้เกิดการตกค้าง ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ความปลอดภัยของอาหาร รวมถึงสุขภาพของคนและสัตว์ สารพิษที่เกี่ยวข้องมีหลายกลุ่ม เช่น สารเคมีกำจัดแมลง สารกำจัดวัชพืช สารกำจัดหอย สารกำจัดสัตว์ฟันแทะ โลหะพิษ สารพิษระเหยได้ และสารพิษจากเชื้อรา ซึ่งล้วนเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญต่อสุขภาพของสัตว์ หากได้รับเข้าสู่ร่างกายในระดับที่เป็นอันตราย ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์สารพิษเหล่านี้ทางห้องปฏิบัติการจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อนำผลการตรวจวิเคราะห์ที่ได้ใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการวินิจฉัยและตัดสินใจของสัตวแพทย์ในการรักษา ป้องกันภาวะพิษตลอดจนชันสูตรหาสาเหตุการเจ็บป่วยและตายจากการได้รับสารพิษในสัตว์เลี้ยง สัตว์เศรษฐกิจ และสัตว์ป่า

คู่มือเล่มนี้จัดทำขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมองค์ความรู้พิษวิทยาทางสัตวแพทย์จากเอกสารทั้งในและต่างประเทศ และจากประสบการณ์ของผู้เขียน แล้วนำมาเรียบเรียงจัดทำเนื้อหาในแต่ละบทประกอบไปด้วยความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพิษวิทยาทางสัตวแพทย์ ความสำคัญของห้องปฏิบัติการพิษวิทยา สารพิษกลุ่มต่าง ๆ (แหล่งที่มา กลไกการออกฤทธิ์ อาการทางคลินิก ค่าความเป็นพิษในสัตว์ และวิธีการตรวจวิเคราะห์) เทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษทางห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคสัตว์ โดยครอบคลุมตั้งแต่การทดสอบการเกิดสี (Color test) เทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดต่าง ๆ เช่น Thin Layer Chromatography (TLC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Gas Chromatography (GC) และ Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) เป็นต้น ตลอดจนการประยุกต์ใช้เทคนิค UV-Visible spectrophotometry ซึ่งเป็นเครื่องมือพื้นฐานที่สำคัญของห้องปฏิบัติการพิษวิทยา นอกจากนี้ยังได้นำเสนอเนื้อหาและวิธีการสืบค้นข้อมูลทางเคมีและพิษวิทยา จากแหล่งข้อมูลที่มีความน่าเชื่อถือไว้อีกด้วย

ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าคู่มือนี้จะช่วยเพิ่มพูนองค์ความรู้ สนับสนุนการปฏิบัติงาน และเป็นประโยชน์กับผู้สนใจงานด้านพิษวิทยาทางสัตวแพทย์ไม่มากก็น้อย ขอขอบคุณครอบครัว และเจ้าหน้าที่กลุ่มพิษวิทยาและชีวเคมี สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติทุกท่านที่ให้การสนับสนุนและให้กำลังใจ สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ คุณชนกพร บุญศาสตร์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการจัดเตรียมต้นฉบับ

อนุสรณ์ อยู่เย็น

สารบัญ

บทที่ 1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพิษวิทยาทางสัตวแพทย์ 1

สาขาของพิษวิทยา (Branches of Toxicology) 2

บุคคลสำคัญในประวัติศาสตร์ทางด้านพิษวิทยา 3

พิษวิทยาในอดีตและความเชื่อมโยงกับสัตวแพทยศาสตร์และพิษวิทยาทางสัตวแพทย์ 5

คำศัพท์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับพิษวิทยา 7

พิษจลนศาสตร์ [Toxicokinetics (TK); ADME] 11

การจำแนกชนิดของสารพิษ (Classification of poisons) 12

บทที่ 2 ความสำคัญของห้องปฏิบัติการพิษวิทยา 15

ประเด็นสำคัญ 16

กรณีการวินิจฉัยภาวะพิษข้อมูลสำคัญที่ต้องส่งไปยังห้องปฏิบัติการ 16

การเก็บตัวอย่าง (Collection of Samples) 17

ขั้นตอนการส่งตัวอย่าง 18

บทที่ 3 เทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาสารพิษสำหรับห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคสัตว์ 23

3.1 การทดสอบการเกิดสี (Color test or spot test) 24

3.2 Thin Layer Chromatography (TLC) 25

3.3 UV-Visible spectrophotometry 35

3.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 37

3.5 Gas Chromatography (GC) 42

3.6 Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) 44

3.7 เทคนิคการเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation techniques) 47

บทที่ 4 สารเคมีกำจัดแมลง (Insecticides) 49

4.1 สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphates; OPs) และ คาร์บาเมต (Carbamates; CMs) 50

4.1.1 สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม OPs 50

4.1.2 สารกำจัดแมลงกลุ่ม CMs 51

4.2 สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorines; OCs) 54

4.3 สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์ (Pyrethroids; PYRs) 57

4.4 การตรวจวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม OPs, CMs, OCs และ PYRs ในตัวอย่างทางปศุสัตว์ 60

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 5 สารกำจัดวัชพืช (Herbicides) 64

5.1 อะทราซีน (Atrazine; ATZ) 65

5.2 ไดยูรอน (Diuron; DIU) 66

5.3 พาราควอต (paraquat) 66

5.4 การตรวจเอกลักษณ์สารกำจัดวัชพืชชนิด atrazine และ diuron ด้วยวิธี TLC 68

5.5 การตรวจหาปริมาณสารกำจัดวัชพืชชนิด atrazine และ diuron ด้วยวิธี UV-Vis Spectrophotometry 69

5.6 การตรวจหาพาราควอตโดยวิธี Chemical test หรือ Color test 71

บทที่ 6 สารกำจัดสัตว์ฟันแทะ (Rodenticides) 73

6.1 โลหะฟอสไฟด์ชนิดซิงค์ฟอสไฟด์ (Zinc phosphide) และอะลูมิเนียมฟอสไฟด์ (Aluminium phosphide) 74

6.2 สตริกนิน (Strychnine) 76

6.2.1 การตรวจวิเคราะห์หาเอกลักษณ์ Strychnine โดยวิธี TLC 78

6.3 วาร์ฟาริน (Warfarin) และคูมาเตตราลิล (Coumatetralyl) 79

6.3.1 การตรวจวิเคราะห์สารกำจัดสัตว์ฟันแทะชนิด warfarin และ coumatetralyl โดยวิธี TLC 80

บทที่ 7 สารกำจัดหอย (Molluscicides) 82

7.1 เมทัลดีไฮด์ (Metaldehyde) 82

7.2 วิธีการตรวจเอกลักษณ์สารกำจัดสัตว์ฟันแทะชนิด metaldehyde ด้วยวิธี TLC 85

บทที่ 8 อะฟลาทอกซิน (Aflatoxins) 87

8.1 การตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซินโดยวิธี Fluorometry 89

บทที่ 9 โลหะพิษ (Toxic metals) 91

9.1 การแบ่งกลุ่มโลหะพิษ 92

9.2 สารหนู (Arsenic; As) 93

9.3 ปรอท (Mercury; Hg) 96

9.4 การตรวจวิเคราะห์หาสารประกอบฟอสไฟด์ และโลหะพิษ (Arsenic, Mercury, Antimony และ Bismuth) ด้วย Gutzeit test and Reinsch test 99

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 10 สารพิษระเหยได้ (Volatile poisons) 103

10.1 ไซยาไนด์ (cyanide) 104

10.2 การตรวจวิเคราะห์หา cyanide โดยวิธี Color test หรือ Paper strip test 106

10.3 การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ cyanide ในเลือดโค โดยวิธี Microdiffusion spectrophotometry 108

บทที่ 11 การสืบค้นข้อมูลทางเคมีและพิษวิทยา 111

11.1 แหล่งข้อมูลทางเคมีและพิษวิทยา 111

11.1.1 พิษวิทยาเชิงวิเคราะห์ (Analytical toxicology) 111

11.1.2 พิษวิทยาทางสัตวแพทย์ (Veterinary toxicology) 115

บรรณานุกรม 123

สารบัญรูป

รูปที่ 1-1	Paracelsus หรือ Philippus Theophrastus Aureolus Bombastus von Hohenheim	3
รูปที่ 1-2	Mathieu Joseph Bonaventure Orfila	3
รูปที่ 1-3	Claude Bernard	4
รูปที่ 1-4	Alice Hamilton	4
รูปที่ 1-5	Rachel Carson	4
รูปที่ 1-6	กระบวนการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ของสารพิษเมื่อเข้าสู่ร่างกาย (Toxicokinetics)	11
รูปที่ 2-1	หน้าต่างที่เป็นหน้าหลักของระบบบริหารจัดการห้องปฏิบัติการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (DLD LIMS)	18
รูปที่ 2-2	หน้าต่างของระบบบริหารจัดการห้องปฏิบัติการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (DLD LIMS) ในส่วนของกลุ่มพิษวิทยาและชีวเคมี	18
รูปที่ 3-1	แสดงความมีขั้วชนิดของเฟสอยู่กับที่ชนิดต่าง ๆ ของ TLC	26
รูปที่ 3-2	แสดงการเกิดสัมพรรคภาพของ functional group ต่าง ๆ กับเฟสอยู่กับที่ชนิด silica gel	26
รูปที่ 3-3	A คือ ตัวทำละลายที่ใช้เป็น mobile phase ซึ่งพบได้บ่อย จัดเรียงตามลำดับความมีขั้วที่เพิ่มขึ้น B คือ ความสามารถในการชะ (elution power) ของตัวทำละลายเมื่อใช้ซิลิกาเจลเป็น stationary phase	27
รูปที่ 3-4	อุปกรณ์สำหรับ coat plate (a) Moveable spreader (b) Aligning tray	30
รูปที่ 3-5	วิธีการ coat plate (a) Silica gel 60 GF_{254} และน้ำกลั่น (b) เช็ดกระจกด้วย acetone (c) เท Silica gel 60 GF_{254} ที่ผสมด้วยน้ำกลั่นลงใน Moveable spreader (d) ค่อยๆลาก Moveable spreader ไปข้างหน้าสุดทาง และ (e) TLC ที่อบเรียบร้อยแล้ว เก็บในตู้เก็บ TLC plate	30
รูปที่ 3-6	การเตรียม TLC plate เพื่อตรวจวิเคราะห์สารพิษ (a) One-dimensional TLC (b) Two-dimensional TLC	31
รูปที่ 3-7	(a) แสดงการทำหลอด capillary ใช้เอง (b) หลอด capillary สำเร็จรูปแบบมีสเกลและไม่มีสเกล	32
รูปที่ 3-8	(a) TLC chamber ที่ผลิตในเชิงพาณิชย์ (b) TLC chamber ที่เป็นขวดแก้วพร้อมฝาปิด	33
รูปที่ 3-9	ตัวอย่างการคำนวณหาค่า R_f ของสารละลายมาตรฐานกำจัดวัชพืชชนิด ametryn (AME), atrazine (ATR) และ diuron (DIU) บนแผ่น TLC	34
รูปที่ 3-10	ส่วนประกอบของเครื่อง UV-Vis spectrophotometer	36
รูปที่ 3-11	Flow diagram ของการแยกสารด้วยเทคนิค HPLC	38
รูปที่ 3-12	ส่วนประกอบสำคัญของเครื่อง GC	44

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ 3-13	Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) principles	45
รูปที่ 4-1	สูตรโครงสร้างทั่วไปของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม Organophosphates	50
รูปที่ 4-2	ตัวอย่างสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม Organophosphates บางชนิดและสารทำลายประสาทซาริน	50
รูปที่ 4-3	สูตรโครงสร้างทั่วไปของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม Carbamates	51
รูปที่ 4-4	สูตรโครงสร้างของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม Carbamates บางชนิด	51
รูปที่ 4-5	กลไกการออกฤทธิ์ของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม Organophosphates โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetyl cholinesterase (AChE)	52
รูปที่ 4-6	ตัวอย่างสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม Organochlorines ชนิดต่างๆ พร้อมสูตรโครงสร้าง	55
รูปที่ 4-7	ตัวอย่างสูตรโครงสร้างของ Type I Pyrethroids และ Type II Pyrethroids	58
รูปที่ 4-8	TLC Chromatogram ของสารมาตรฐานกลุ่ม Organophosphates (OPs)	62
รูปที่ 4-9	TLC Chromatogram ของสารมาตรฐานกลุ่ม Carbamates (CMs)	62
รูปที่ 4-10	TLC Chromatogram ของสารมาตรฐานกลุ่ม Organochlorines (OCs)	63
รูปที่ 4-11	TLC Chromatogram ของสารมาตรฐานกลุ่ม Pyrethroids (PYRs)	63
รูปที่ 5-1	Paraquat 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium ion (dichloride)	67
รูปที่ 5-2	กลไกการออกฤทธิ์ของพาราควอต	67
รูปที่ 5-3	TLC Chromatogram ของการหาค่า LOD ของวิธี ด้วยการทำ spiked sample (n=10) โดยใช้ system chloroform : acetone (7:3) และพ่นด้วย o-TKI reagent	69
รูปที่ 5-4	การตรวจหาพาราควอตโดยวิธี Color test	72
รูปที่ 6-1	แสดงตัวอย่างของเหยื่อพิษรูปแบบต่าง ๆ โดย a = ขนมปังผสมกับไขมันและผงสีดำ b = มันฝรั่งยัดซิงค์ฟอสไฟด์และ c = เมล็ดข้าวเปลือกคลุกผงสีดำ	75
รูปที่ 6-2	การเกิดแก๊สฟอสฟีน (PH_3) จากซิงค์ฟอสไฟด์ (Zn_3P_2) และอะลูมิเนียมฟอสไฟด์ (AlP) หลังทำปฏิกิริยากับน้ำหรือกรด	75
รูปที่ 6-3	สูตรโครงสร้างสตริกนิน	76
รูปที่ 6-4	TLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน strychnine ที่ปริมาณต่าง ๆ กัน	79
รูปที่ 6-5	สูตรโครงสร้างของ Warfarin และ Coumatetralyl	79
รูปที่ 6-6	TLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน warfarin และ coumatetralyl	81
รูปที่ 7-1	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ metaldehyde	83
รูปที่ 7-2	metaldehyde ที่อยู่ในรูปของเหยื่อชนิดเม็ดสีฟ้าและสีเขียว	83
รูปที่ 7-3	ไส้กรอกและแอปเปิลยัดไส้ด้วย metaldehyde	83

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ 7-4	TLC Chromatogram ของการทดสอบหาค่า LOD ของวิธีตรวจหา metaldehyde ในอาหารในกระเพาะ	86
รูปที่ 9-1	Mercury Cycle	97
รูปที่ 9-2	Biomagnification ของ Methyl mercury ในระบบนิเวศน์	97
รูปที่ 9-3	แสดงผลบวกของสารมาตรฐาน As และ Zinc phosphide จากการตรวจวิเคราะห์หาสารกำจัดหนู โดย Gutzeit test	101
รูปที่ 9-4	สีน้ำเงินบนกระดาษกรองจากการทำ Molybdenum blue test	101
รูปที่ 9-5	ผลบวกของสารมาตรฐาน As จากการตรวจวิเคราะห์โดย Reinsch test	102
รูปที่ 9-6	Sublimation test	102
รูปที่ 10-1	สูตรโครงสร้างของโซเดียมไซยาไนด์	105
รูปที่ 10-2	สูตรโครงสร้างของ linamarin	105
รูปที่ 10-3	การเปลี่ยนแปลงซองไซยาโนเจนิกไกลโคไซด์จนเกิดไฮโดรเจนไซยาไนด์	105
รูปที่ 10-4	อุปกรณ์สำหรับใช้ตรวจวิเคราะห์ไซยาไนด์ โดยวิธี Paper Strip Test	107
รูปที่ 10-5	การตรวจหาไซยาไนด์ในตัวอย่างอาหารในกระเพาะรูเมนด้วยวิธี paper strip test	107
รูปที่ 10-6	แสดงตัวอย่างและส่วนประกอบของ microdiffusion cell	109
รูปที่ 11-1	หน้าต่างของ EXTOXNET	118
รูปที่ 11-2	รายการของสารกำจัดศัตรูพืช	118

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1-1 การแบ่งระดับความเป็นพิษของสารพิษตามความรุนแรง 12

ตารางที่ 2-1 ขีดความสามารถทางห้องปฏิบัติการพิษวิทยาและชีวเคมี 20

ตารางที่ 4-1 แสดงตัวอย่างค่า LD_{50} ของสารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่ม OPs และ CMs 54

ตารางที่ 4-2 แสดงค่าความเป็นพิษของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม Organochlorines บางชนิด 56

ตารางที่ 4-3 ตัวอย่างชนิดของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม Pyrethroids ใน Type I และ Type II Pyrethroids 57

ตารางที่ 4-4 ตัวอย่างค่าความเป็นพิษของ Type I Pyrethroids และ Type II Pyrethroids 60

ตารางที่ 5-1 ค่า LOD และ LOQ ของ ATZ และ DIU ในอาหารในกระเพาะ โดยวิธี UV-Vis Spectrophotometry 71

ตารางที่ 6-1 แสดงขนาดของสตริกนินที่ทำให้ตายได้โดยการกิน (oral lethal dose values) ที่มีการรายงาน 77

ตารางที่ 9-1 ตารางเปรียบเทียบผลการทดสอบของวิธีหาสารประกอบฟอสไฟด์ และโลหะพิษ 102

ตารางที่ 11-1 แสดงค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ max) ของ principal peak และ subsidiary peak ของสารประกอบในสารละลายกรด ด่าง และกลาง 114

บทที่ 1
ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพิษวิทยาทางสัตวแพทย์

พิษวิทยา (Toxicology) เดิมมีนิยามว่า “ศาสตร์แห่งสารพิษ” ต่อมาเมื่อมีความรู้ความเข้าใจมากขึ้น เกี่ยวกับวิธีที่สารต่าง ๆ สามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ คำจำกัดความจึงมีความครอบคลุมมากกว่าเดิม โดยพิษวิทยาเป็น “วิทยาศาสตร์สาขาหนึ่งที่ศึกษาถึงผลกระทบของสารเคมีหรือสิ่งกระตุ้นทางกายภาพต่าง ๆ เช่น รังสี คลื่นเสียง ที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต” ซึ่งนักวิทยาศาสตร์หรือนักวิจัยที่ทำการศึกษาวิเคราะห์ถึงสาเหตุของผลกระทบดังกล่าว เรียกว่า นักพิษวิทยา (Toxicologist)

พิษวิทยามีส่วนเกี่ยวข้องและสัมพันธ์กันกับหลายสาขาวิชา มีการผสมผสานหลักการของศาสตร์ต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้ เช่น พยาธิวิทยา (Pathology) สรีรวิทยา (Physiology) ชีวเคมี (Biochemistry) ชีววิทยาระดับโมเลกุล (Molecular biology) พันธุศาสตร์ (Genetics) สถิติ (Statistic) และระบาดวิทยา (Epidemiology) เป็นต้น ทำให้เกิดการพัฒนาความรู้ทางด้านพิษวิทยามากขึ้น ในขณะเดียวกันก็มีศาสตร์หลายด้านที่นำความรู้ทางด้านพิษวิทยาไปประยุกต์ใช้ เช่น การแพทย์ (Medicine) เภสัชศาสตร์ (Pharmacology) สัตวแพทยศาสตร์ (Veterinary medicine) นิติวิทยาศาสตร์ (Forensic science) อาชีวอนามัย (Occupational health) และ อนามัยสิ่งแวดล้อม (Environmental health) เป็นต้น

สาขาของพิษวิทยา (Branches of Toxicology)

พิษวิทยาสามารถแบ่งออกเป็นหลายสาขาย่อยตามลักษณะการศึกษาและการประยุกต์ใช้ความรู้ ดังนี้

1. พิษวิทยาเชิงกลไก (Mechanistic Toxicology) ศึกษากระบวนการและกลไกการออกฤทธิ์ของสารพิษในระดับโมเลกุล เซลล์ อวัยวะ ของสิ่งมีชีวิต เพื่ออธิบายว่าสารพิษก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและสรีรวิทยาอย่างไร

2. พิษวิทยาเชิงบรรยาย (Descriptive Toxicology) มุ่งเน้นการทดสอบและบันทึกผลพิษที่เกิดจากการสัมผัสสารต่าง ๆ ทั้งในสัตว์ทดลองและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ข้อมูลที่ได้จะถูกนำไปใช้สนับสนุนการกำหนดมาตรฐานความปลอดภัยของสารเคมี

3. พิษวิทยาเชิงกฎหมาย (Regulatory Toxicology) เป็นการประยุกต์ข้อมูลจากการศึกษาพิษวิทยาเพื่อกำหนดมาตรฐานและเกณฑ์ความปลอดภัยในการใช้สารเคมี โดยหน่วยงานของรัฐจะนำข้อมูลนี้ไปใช้ในการออกข้อบังคับหรือกฎหมายที่เกี่ยวข้อง

4. นิติพิษวิทยา (Forensic Toxicology) ศึกษาและประยุกต์ใช้ความรู้ทางพิษวิทยาในกระบวนการยุติธรรม เช่น การหาสาเหตุการเสียชีวิต การตรวจหาสารพิษหรือยาจากตัวอย่างชีวภาพในคดีอาญา

5. พิษวิทยาคลินิก (Clinical Toxicology) เน้นการวินิจฉัยและการรักษาผู้ป่วยหรือสัตว์ที่ได้รับพิษ รวมถึงการใช้ยาต้านพิษ (antidotes) และมาตรการรักษาประคับประคอง

6. พิษวิทยาสิ่งแวดล้อม (Environmental Toxicology) มุ่งศึกษาผลกระทบของสารพิษต่อสิ่งแวดล้อม ระบบนิเวศ และสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในนั้น เช่น ผลของมลพิษทางอากาศ น้ำ และดิน

7. พิษวิทยาอาหาร (Food toxicology) เป็นสาขาที่มุ่งเน้นในการพิจารณาความเป็นพิษในอาหาร การวิเคราะห์สารเติมแต่ง (Food additive) และสารปนเปื้อน (contaminant) ในอาหาร รวมถึงผลของพิษนั้นต่อคนหรือสัตว์ที่บริโภคเข้าไป

8. พิษวิทยาพฤติกรรม (Behavioral toxicology) เป็นสาขาที่มุ่งเน้นศึกษาผลของสารพิษที่มีต่อการเรียนรู้ ความจำ และพฤติกรรม ของคนและสัตว์ที่ได้รับสารพิษเข้าไป

9. พิษวิทยาอาชีวอนามัย (Occupational toxicology) หรือที่ในอดีตเรียกว่า **พิษวิทยาอุตสาหกรรม (Industrial toxicology)** เป็นแขนงหนึ่งของพิษวิทยาที่ประยุกต์ใช้ความรู้ด้านพิษวิทยาในทางอาชีวอนามัย มีเป้าหมายหลักในการศึกษาผลกระทบของสารพิษที่ผู้ปฏิบัติงานอาจได้รับจากสภาพแวดล้อมในการทำงาน ทั้งในภาคอุตสาหกรรม เกษตรกรรม และงานบริการ โดยมุ่งเน้นการป้องกันและควบคุมอันตรายที่อาจก่อให้เกิดโรคหรือภาวะพิษจากการทำงาน

10.พิษวิทยาทางสัตวแพทย์ (Veterinary Toxicology) ประยุกต์ใช้ความรู้ทางพิษวิทยามาใช้ประโยชน์ทางสัตวแพทย์ ในการศึกษาสาเหตุ อาการทางคลินิก การประเมินภาวะเป็นพิษ การระบุและจำแนกลักษณะของสารพิษ กลไกการแพร่กระจายของสารพิษในร่างกาย และการรักษาการเกิดพิษในสัตว์ที่ได้รับสัมผัสสารพิษจากพืชพิษ สารเคมีทางการเกษตร ยารักษาโรค อาหารและสิ่งแวดล้อม

บุคคลสำคัญในประวัติศาสตร์ทางด้านพิษวิทยา

บุคคลที่มีบทบาทสำคัญในการวางรากฐานทางพิษวิทยา เช่น

พาราเซลซัส (Paracelsus) หรือ Philippus Theophrastus Aureolus Bombastus von Hohenheim (ค.ศ. 1493 - 1541) เป็นแพทย์ นักเคมี และนักเล่นแร่แปรธาตุชาวสวิสเซอร์แลนด์ในยุคฟื้นฟูศิลปวิทยา (Renaissance) ได้พัฒนาทฤษฎีใหม่ที่เน้นเรื่องเคมีและพิษวิทยา จุดประกายความคิดเห็นซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นที่มีค่ายิ่ง และมีความสำคัญกับการแพทย์และวิชาพิษวิทยาในปัจจุบัน โดยแนวคิดพื้นฐาน 4 ข้อที่พาราเซลซัสเสนอ ได้แก่

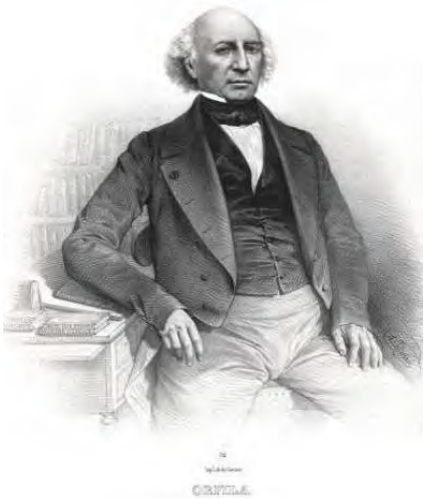
1. การทดลองมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการตรวจสอบการตอบสนองของร่างกายต่อสารเคมี
2. ควรแยกความแตกต่างระหว่างคุณสมบัติในการรักษาและความเป็นพิษของสารเคมี
3. คุณสมบัติในการรักษาและความเป็นพิษมีความเกี่ยวข้องกันอย่างใกล้ชิด และสามารถแยกแยะได้โดยขนาดหรือปริมาณความเข้มข้นของสาร
4. สามารถระบุความจำเพาะเจาะจงของสารเคมี และผลกระทบที่เกิดจากการใช้ในการรักษาและการเกิดพิษได้

จากแนวคิดเหล่านี้ ทำให้เห็นได้ชัดว่า พิษวิทยาและ เภสัชวิทยาเป็นสาขาวิชาที่มีความเกี่ยวข้องกันอย่างใกล้ชิด เภสัชวิทยามุ่งเน้นไปที่ยา รวมถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยของยา ในขณะที่พิษวิทยาครอบคลุมถึงสารเคมีทุกชนิดและปัจจัยอื่น ๆ ที่อาจก่อให้เกิดผลกระทบทางสุขภาพในระดับต่าง ๆ

รูปที่ 1-1 Paracelsus หรือ Philippus Theophrastus Aureolus Bombastus von Hohenheim
ที่มา: https://www.britannica.com/biography/Paracelsus#/media/1/442424/125196

นอกจากนี้พาราเซลซัสยังเป็นที่รู้จักจากคำกล่าวที่มีชื่อเสียงว่า “All substances are poisons; there is none which is not a poison. The right dose differentiates a poison from a remedy.” แปลเป็นไทยว่า “สารทุกชนิดเป็นสารพิษ ไม่มีสารใดเลยที่ไม่เป็นพิษ ปริมาณของสารเป็นตัวกำหนดว่าสารนั้นเป็นพิษหรือเป็นยา” ดังรูปที่ 1-1 อีกทั้งพาราเซลซัสมีผลงานมากมายที่เป็นคุณูปการแก่วงการพิษวิทยาจึงได้รับการยกย่องให้เป็น “บิดาแห่งพิษวิทยา” (Father of Toxicology)

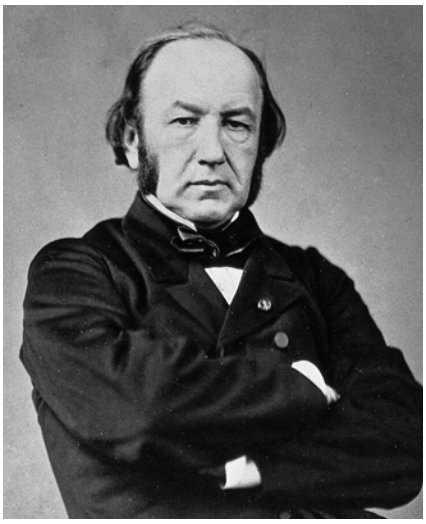
ออร์ฟิลา (Orfila ชื่อเต็ม Mathieu Joseph Bonaventure Orfila; ค.ศ. 1787 - 1853) แพทย์และนักพิษวิทยาชาวสเปน เป็นคนในรุ่นต่อมาที่มีส่วนพัฒนาองค์ความรู้ทางด้านพิษวิทยาให้ก้าวหน้าขึ้นไปอีกมาก เป็นผู้พัฒนาวิธีการตรวจหาสารพิษจากศพ ใช้การวิเคราะห์ทางเคมีอย่างเป็นระบบ และนำผลทดสอบนั้นมาใช้เป็นหลักฐานในกระบวนการยุติธรรม ซึ่งเป็นแนวทางที่ได้รับการยอมรับของวิชานิติวิทยาศาสตร์ (Forensic science) จนถึงปัจจุบัน ออร์ฟิลานั้นได้รับการยกย่องว่าเป็นบิดาแห่งวิชาพิษวิทยาสมัยใหม่ (Modern toxicology) (รูปที่ 1-2)



รูปที่ 1-2 Mathieu Joseph Bonaventure Orfila
ที่มา: “Courtesy of the Smithsonian Libraries and Archives” https://library.si.edu/image-gallery/72871

โคลด แบร์นาร์ด (Claude Bernard; ค.ศ. 1813–1878)

นักสรีรวิทยาชาวฝรั่งเศส ผู้บุกเบิกการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารพิษ เขาศึกษาพิษของคูราเร (curare) และคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) ทำให้เข้าใจว่าพิษสามารถออกฤทธิ์ต่อระบบอวัยวะและโมเลกุลเป้าหมายได้อย่างไร ถือเป็นจุดเริ่มต้นของ mechanistic toxicology (รูปที่ 1-3)



รูปที่ 1-3 Claude Bernard
ที่มา: Fielding Hudson Garrison https://commons.wikimedia org/w/index.php?curid=5879152

รูปที่ 1-4 Alice Hamilton
ที่มา: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1638174

อลิซ แฮมิลตัน (Alice Hamilton; ค.ศ. 1869–1970)

นักวิทยาศาสตร์หญิงชาวสหรัฐอเมริกา ผู้บุกเบิกงานด้านพิษวิทยาอาชีวอนามัย (occupational toxicology) ทำการศึกษาโรคจากสารพิษในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น ตะกั่ว ปรอท และสารทำละลายอินทรีย์ ทำให้เกิดความตระหนักถึงความปลอดภัยในการทำงาน (รูปที่ 1-4)

ราเชล คาร์สัน (Rachel Carson; ค.ศ. 1907 - 1964) นักชีววิทยาชาวสหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ. 1962 ได้ตีพิมพ์หนังสือเรื่อง Silent spring ซึ่งมีเนื้อหาเกี่ยวกับผลกระทบของการใช้สารปราบศัตรูพืช เช่น ดีดีที (DDT) ต่อนกและสัตว์ชนิดต่าง ๆ หนังสือเล่มนี้ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย และทำให้เกิดความตื่นตัวในการพิทักษ์สิ่งแวดล้อมในสังคมตามมา เกิดการจัดตั้งหน่วยงาน Environmental Protection Agency (EPA) ขึ้นในปี ค.ศ. 1970 และมีการยกเลิกการใช้สารดีดีทีในประเทศสหรัฐอเมริกา และถูกยกย่องให้เป็นผู้ริเริ่มด้านการเคลื่อนไหวเพื่อสิ่งแวดล้อม (Environmental movement) (รูปที่ 1-5)

รูปที่ 1-5 Rachel Carson
ที่มา: https://www.fws.gov/media/rachel-l-carson

พิษวิทยาในอดีตและความเชื่อมโยงกับสัตวแพทยศาสตร์และพิษวิทยาทางสัตวแพทย์

มนุษย์รู้จักเรื่องสารพิษกันมาตั้งแต่สมัยโบราณกาลแล้ว รู้จักสังเกตว่าสัตว์และพืชบางชนิดมีพิษ และนำพิษเหล่านั้นมาใช้ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น การล่าสัตว์ การทำสงคราม การฆาตกรรม การฆ่าตัวตาย หรือการลงโทษประหารชีวิต ตัวอย่างที่เป็นที่รู้จักกันดี เช่น การฆ่าตัวตายของพระนางคลีโอพัตรา (Cleopatra) โดยใช้งูพิษ หรือการตัดสินโทษประหารโสเครติส (Socrates) ในสมัยกรีกโบราณโดยให้ดื่มยาพิษจากต้นเฮมล็อค (Hemlock) เป็นต้น ในกระดาษเอเบอร์ (Eber) ซึ่งเป็นคัมภีร์สมัยอียิปต์โบราณ ซึ่งมีการกล่าวถึงเรื่องพิษชนิดต่าง ๆ เอาไว้ และอาจถือได้ว่าเป็นหลักฐานที่เป็นเอกสารทางด้านพิษวิทยาที่เก่าแก่ที่สุด เมื่อมีการเริ่มเลี้ยงสัตว์ เชื่อว่าการสังเกตเกี่ยวกับพิษที่ส่งผลต่อมนุษย์สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับสัตว์เลี้ยงได้ อย่างไรก็ตามสัตว์เลี้ยงไม่ได้มีความสามารถในการเรียนรู้ที่จะหลีกเลี่ยงพืชพิษและอันตรายอื่น ๆ ได้ดีเท่ามนุษย์ ทำให้สัตวแพทย์ยังคงพบกรณีสัตว์ได้รับพิษจากพืชพิษและสารพิษอื่น ๆ

ประวัติศาสตร์ของพิษวิทยาถูกบันทึกไว้โดยนักวิชาการร่วมสมัยหลายคน แต่ประวัติศาสตร์ของพิษวิทยาทางสัตวแพทย์ยังไม่ได้รับการบันทึกไว้อย่างแพร่หลาย แม้ว่าจะเห็นได้ชัดว่าพิษวิทยาทางสัตวแพทย์เป็นส่วนหนึ่งของสัตวแพทยศาสตร์มาตั้งแต่ยุคแรกเริ่ม สัตวแพทยศาสตร์เป็นสาขาหนึ่งของวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่มีหลักสูตรการศึกษาอย่างเป็นทางการและนำไปสู่การได้รับปริญญาวิชาชีพ นักวิชาการหลายคนได้ศึกษาประวัติของสัตวแพทยศาสตร์ เช่น Smithcors (1957) Stahlheim (1994) Swabe (1999) และ Wilkinson (2005) บทบาทของพิษวิทยาทางสัตวแพทย์ในหลักสูตรสัตวแพทย์ได้รับการบันทึกไว้ในมหาวิทยาลัยสัตวแพทย์ที่เก่าแก่ที่สุดแห่งหนึ่งคือ Free University of Berlin โดย Wilsdorf & Graf (1998) ได้ให้ข้อมูลเกี่ยวกับการพัฒนาของพิษวิทยาทางสัตวแพทย์ในมหาวิทยาลัยแห่งนี้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1790 ถึง 1945 นอกจากนี้ Oehme (1970) ยังได้ทำการทบทวนโดยย่อเกี่ยวกับการพัฒนาพิษวิทยาทางสัตวแพทย์ในสหรัฐอเมริกา ซึ่งแสดงให้เห็นถึงวิวัฒนาการของศาสตร์นี้ในระดับนานาชาติ

พิษวิทยาทางสัตวแพทย์มีรากฐานมาจากการดูแลสุขภาพสัตว์เพื่อป้องกันและรักษาพิษที่เกิดขึ้นจากสารเคมีและสิ่งแวดล้อม ในอดีตสัตว์ถูกมองว่าเป็นเพียงทรัพยากรของมนุษย์ ใช้เป็นอาหาร แรงงาน กีฬา และการปกป้องทรัพย์สิน จนกระทั่งสัตว์บางชนิดกลายมาเป็นสัตว์เลี้ยงใกล้ชิด การรักษาโรคในสัตว์อาศัยแพทย์พื้นบ้านที่ใช้สมุนไพร น้ำมนต์ และพิธีกรรมเพื่อบรรเทาความเจ็บป่วย ต่อมามีการพัฒนาไปสู่แนวทางที่มีหลักวิทยาศาสตร์มากขึ้น โดยมีการศึกษาสาเหตุของโรค การวินิจฉัยทางการแพทย์ และการรักษา การศึกษาทางพิษวิทยาในสัตว์มีพัฒนาการคู่ขนานไปกับการแพทย์ของมนุษย์ ความกังวลเรื่องการสูญเสียปศุสัตว์จากพืชพิษนำไปสู่การวิจัยและเผยแพร่ข้อมูลเพื่อป้องกันความเสียหายให้แก่เกษตรกรในช่วงปี ค.ศ. 1920-1930 สงครามโลกครั้งที่ 2 ส่งผลให้มีการใช้ยาฆ่าแมลงและอาวุธเคมี ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาด้านพิษวิทยาในสัตว์และสิ่งแวดล้อม หลังสงครามสารเคมีเหล่านี้ถูกนำมาใช้ในภาคเกษตร ทำให้สัตวแพทย์ต้องมีบทบาทในการควบคุมและรักษากรณีที่เกิดพิษจากสารเหล่านี้ ศูนย์วิจัยและสถาบันการศึกษา เช่น Texas A&M University และ Poisonous Plant Research Laboratory ที่ Logan, Utah ได้ศึกษาผลกระทบของสารเคมีและพืชพิษที่มีต่อสัตว์ นักพยาธิวิทยาทางสัตวแพทย์ เช่น C.C. Morrill, W.L. Sippel, K. McEntee และ P. Olafson เริ่มให้ความสนใจปัญหาพิษที่พบมากขึ้นเรื่อย ๆ ปี ค.ศ. 1958 มีการก่อตั้ง American College of Veterinary Toxicologists (ACVT) โดยสัตวแพทย์ 11 คนที่มีความสนใจด้านพิษวิทยา วัตถุประสงค์ขององค์กรคือ พัฒนาและส่งเสริมความรู้ด้านพิษวิทยาทางสัตวแพทย์ กำหนดมาตรฐานสำหรับผู้เชี่ยวชาญในสาขานี้ ตลอดจนสนับสนุนการวิจัยและฝึกอบรม ปี ค.ศ. 1967 มีการสอบรับรองผู้เชี่ยวชาญพิษวิทยาทางสัตวแพทย์โดย American Board of Veterinary Toxicology (ABVT) และ

มีการจัดสอบต่อเนื่องทุกปี มีงานวิจัยและตำรามากมายเกี่ยวกับพิษวิทยาทางสัตวแพทย์ เช่น “Veterinary Toxicology: Basic & Clinical Principles” ซึ่งครอบคลุมหัวข้อสำคัญ เช่น เภสัชจลนศาสตร์และระเบียบข้อบังคับ ผลกระทบของสารพิษต่ออวัยวะต่าง ๆ สารพิษจากพืช เชื้อรา โลหะหนัก และสารเคมีในสิ่งแวดล้อม รวมถึงสารเคมีทางการเกษตร เช่น ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าหนู และยากำจัดวัชพืช เป็นต้น

การพัฒนาของพิษวิทยาทางสัตวแพทย์เกิดขึ้นพร้อมกับวิวัฒนาการของวิชาชีพสัตวแพทยศาสตร์และศาสตร์ด้านพิษวิทยา วิชาชีพสัตวแพทยศาสตร์ในยุคแรกมุ่งเน้นไปที่สัตว์เลี้ยงในบ้าน โดยเฉพาะสัตว์ที่ใช้เป็นอาหาร ให้เส้นใย ใช้ในการขนส่ง และให้พลังงานสำหรับการเกษตรและการเดินทาง ด้วยการเติบโตของการเกษตรที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะทางมากขึ้น รวมถึงแนวทางการผลิตสัตว์ที่พัฒนาอย่างต่อเนื่อง วิชาชีพสัตวแพทย์ซึ่งมีความเชื่อมโยงกับปศุสัตว์จึงขยายตัวตามไปด้วย พิษวิทยาทางสัตวแพทย์เริ่มต้นจากการศึกษาเกี่ยวกับพืชมีพิษ และต่อมาได้พัฒนาการค้นคว้าเกี่ยวกับสารต้านพิษ (antidotes) สำหรับพิษชนิดต่าง ๆ ช่วงต้นศตวรรษที่ 20 วิชาชีพสัตวแพทย์เผชิญกับความท้าทายเป็นพิเศษ เนื่องจากการใช้ม้าและล่อในการเกษตรลดลง และถูกแทนที่ด้วยเครื่องจักรที่ขับเคลื่อนด้วยเครื่องยนต์สันดาปภายใน (internal combustion engines) ในช่วงเวลานั้น คงมีความไม่แน่นอนอย่างมากเกี่ยวกับอนาคตของวิชาชีพนี้ อย่างไรก็ตาม ในช่วงกลางศตวรรษที่ 20 มีการเปลี่ยนแปลงครั้งสำคัญที่ส่งผลต่อสัตวแพทยศาสตร์ 3 ประการ ได้แก่

1. ความเกี่ยวข้องกับรากฐานดั้งเดิมของวิชาชีพในด้านการเกษตรและปศุสัตว์ โดยมีการมุ่งเน้นไปที่การเลี้ยงสัตว์ขนาดใหญ่ในระบบการผลิตที่มีความเชี่ยวชาญสูง
2. การให้ความสนใจเพิ่มขึ้นในการให้บริการทางสัตวแพทย์แก่ประชากรสัตว์เลี้ยงที่ขยายตัวอย่างต่อเนื่อง
3. การเปลี่ยนแปลงของแนวทางปฏิบัติทางสัตวแพทยศาสตร์จากเดิมที่อาศัยการสังเกต มาเป็นการแพทย์ที่มีพื้นฐานจากวิทยาศาสตร์มากขึ้น

ในช่วงเวลาดังกล่าว นักพิษวิทยาทางสัตวแพทย์ (Veterinary Toxicologists) เริ่มมีบทบาทสำคัญในห้องปฏิบัติการวินิจฉัยทางสัตวแพทยศาสตร์ ทั้งในโรงเรียนสัตวแพทย์และหน่วยงานของรัฐและรัฐบาลกลาง การเสริมสร้างรากฐานทางวิทยาศาสตร์ในสัตวแพทยศาสตร์ รวมถึงคุณภาพของหลักสูตรสัตวแพทยศาสตร์ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งก็คือการขยายบทบาทของสัตวแพทยศาสตร์เชิงเปรียบเทียบ (Comparative Medicine) ให้มีความชัดเจนยิ่งขึ้นและได้รับการสนับสนุนมากขึ้น การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ส่งผลให้สัตวแพทย์มีส่วนร่วมมากขึ้นในงานวิจัยเกี่ยวกับสัตว์ชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับวิชาชีพสัตวแพทย์ ไม่ว่าจะเป็นปศุสัตว์หรือสัตว์เลี้ยง นอกจากนี้สัตวแพทย์ยังมีบทบาทในงานวิจัยชีวเวชศาสตร์ (biomedical research) ที่กว้างขวางขึ้น ซึ่งรวมถึงการใช้สัตว์ทดลองในห้องปฏิบัติการแบบดั้งเดิม โดยมีแรงขับเคลื่อนหลักจากความห่วงใยในสุขภาพของมนุษย์

พิษวิทยาทางสัตวแพทย์ในอนาคต

วิชานี้มีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพสัตว์และมนุษย์ โดยมีการศึกษาระดับโมเลกุลและพันธุกรรมเพื่อทำความเข้าใจกลไกของสารพิษ คาดว่าในอนาคต พิษวิทยาทางสัตวแพทย์จะขยายขอบเขตไปสู่การพัฒนายาและการรักษาพิษเฉพาะทาง การศึกษาสารพิษในสิ่งแวดล้อมและผลกระทบต่อสัตว์ป่า และการวิจัยด้านนาโนเทคโนโลยีและสารก่อมะเร็ง

คำศัพท์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับพิษวิทยา

➢ poison/ toxicant (สารพิษ) หมายถึง สารใด ๆ ที่ทำให้เกิดผลกระทบที่เป็นอันตรายเมื่อเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิต ไม่ว่าจะเกิดจากอุบัติเหตุหรือจงใจ

➢ toxin หมายถึง สารพิษที่เป็นโปรตีนจำเพาะสร้างโดยสิ่งมีชีวิต (พืช สัตว์ และจุลินทรีย์บางชนิด) ซึ่งเป็นพิษสูงต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เช่น พิษงู และ botulinum toxin ที่สร้างโดย *Clostridium botulinum* เป็นต้น

➢ venom (พิษจากสัตว์) หมายถึง สารพิษที่สัตว์ผลิตขึ้นเพื่อใช้โจมตีเหยื่อ เช่น พิษงู หรือพิษผึ้ง

➢ toxic หมายถึง ผลที่สารพิษทำให้เกิดขึ้น

➢ toxicity หมายถึง ความเป็นพิษที่เกิดจากสารพิษ แบ่งเป็น

- acute toxicity (พิษเฉียบพลัน) หมายถึง ความเป็นพิษในสัตว์ที่เกิดจากการได้รับสารพิษเพียงครั้งเดียวหรือมากกว่า 1 ครั้ง ใน 24 ชั่วโมง
- subacute toxicity (พิษกึ่งเฉียบพลัน) หมายถึง ความเป็นพิษในสัตว์ที่เกิดจากการได้รับสารพิษต่อเนื่องกันน้อยกว่า 30 วัน
- subchronic toxicity (พิษกึ่งเรื้อรัง) หมายถึง ความเป็นพิษในสัตว์ที่เกิดจากการได้รับสารพิษต่อเนื่องกันตั้งแต่ 1-3 เดือน
- chronic toxicity (พิษเรื้อรัง) หมายถึง ความเป็นพิษในสัตว์ที่เกิดจากการได้รับสารพิษต่อเนื่องกัน ตั้งแต่ 3 เดือนขึ้นไป

➢ toxicosis หมายถึง โรคที่เกิดจากสารพิษ โรคถูกพิษ หรือความเป็นพิษ เป็นคำที่มีความหมายคล้ายคลึงกับคำว่า intoxication และ poisoning

➢ intoxication (ภาวะเป็นพิษ) หมายถึง โรคหรือความผิดปกติ ซึ่งเป็นผลจากการได้รับสารพิษ

➢ antidote (ยาต้านพิษ ยาแก้พิษ ยาถอนพิษ หรือ สารแก้พิษ) หมายถึง กลุ่มยาที่มีฤทธิ์ขัดขวาง หรือยับยั้งกระบวนการที่เป็นอันตรายต่อร่างกายอันเนื่องมาจากสารพิษ

➢ carcinogen (สารก่อมะเร็ง) หมายถึง สารเคมีหรือกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับสารเคมีที่สามารถกระตุ้นให้เกิดเนื้องอกที่ไม่ได้พบโดยทั่วไป หรือทำให้เกิดเนื้องอกเร็วขึ้นหรือมากกว่าปกติ

➢ distribution (การกระจายตัวของสารพิษ) หมายถึง การเคลื่อนที่ของสารพิษจากจุดที่เข้าสู่ร่างกายไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ รวมถึงการอธิบายถึงความเข้มข้นของสารพิษที่แตกต่างกันในแต่ละบริเวณของร่างกาย

➢ biotransformation (การเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ) หมายถึง การเปลี่ยนแปลงกลไกของร่างกายสิ่งมีชีวิตที่เกิดจากปฏิกิริยา oxidation และ reduction มักเกิดโดยปฏิกิริยาของ microsomal enzyme ในตับ ทำให้กลไกการเกิดพิษเปลี่ยนแปลงไปจากคุณสมบัติเดิมของสารที่เริ่มเข้าสู่ร่างกาย เช่น อาจทำให้เกิดพิษรุนแรงขึ้นกว่าเดิม หรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและทำให้ความรุนแรงลดน้อยลง

➢ dosage (ขนาดใช้) หมายถึง ปริมาณของสารพิษ ยา หรือสารเคมีอื่น ๆ ที่ได้รับหรือใช้ โดยแสดงเป็นค่าที่สัมพันธ์กับสิ่งมีชีวิต เช่น มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน

➢ dose (ขนาดของสารที่ได้รับ) หมายถึง ปริมาณรวมของสารพิษ ยา หรือสารเคมีที่สิ่งมีชีวิตได้รับเข้าไป

➢ Dose-Response Relationship หมายถึง ความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างปริมาณของสารพิษที่ได้รับเข้าไปกับการตอบสนองต่อการเกิดพิษของสารพิษ

➢ Threshold dose หมายถึง ปริมาณสารพิษในระดับต่ำสุดที่สิ่งมีชีวิตเมื่อได้รับจะเริ่มแสดงความผิดปกติ หรืออาการความเป็นพิษให้ตรวจได้

➢ LC_{50} (Lethal concentration 50%) หมายถึง ความเข้มข้นของสารเคมีในอากาศหรือในน้ำที่ทำให้สัตว์ทดลองตายลงไปครึ่งหนึ่ง (50%) ของสัตว์ทดลองที่ใช้ทั้งหมด และระบุถึงระยะเวลาที่สัตว์หายใจเอาสารเคมีเข้าไปหรือระยะเวลาที่สัตว์น้ำอยู่ในน้ำที่มีสารเคมีละลายอยู่

➢ Lethal dose (LD) ปริมาณสารเคมีต่ำสุดที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย มักแสดงออกเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยทั่วไป LD ที่ใช้ คือ Lethal dose 50 หรือ LD_{50}

➢ LD_{50} (median Lethal dose หรือ Lethal dose 50%) หมายถึง ปริมาณของสารเคมีที่ให้กับสัตว์ทดลองทั้งหมดเพียงครั้งเดียว แล้วทำให้สัตว์ทดลองตายลงไปครึ่งหนึ่ง (50%) ของจำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ทั้งหมด

➢ No-observed-effect level (NOEL) หมายถึง ปริมาณสารเคมีสูงสุดที่ได้รับทุกวันแล้วยังไม่ทำให้เกิดผลหรือการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ต่อร่างกายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

➢ No-observed-adverse-effect level (NOAEL) หมายถึง ปริมาณสารเคมีสูงสุดที่ได้รับทุกวันแล้วยังไม่ทำให้เกิดผลไม่พึงประสงค์ใด ๆ ต่อร่างกาย ความแตกต่างระหว่างค่า NOEL กับ NOAEL คือผลที่เกิดขึ้นจัดเป็นผลไม่พึงประสงค์หรือไม่เป็นผลไม่พึงประสงค์ ถ้าหากสารเคมีที่ใช้ทดสอบทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่จัดเป็นผลไม่พึงประสงค์ เรียกว่า NOAEL

➢ Lowest-observed-effect level (ค่า LOEL) หมายถึง ปริมาณสารเคมีน้อยที่สุดที่ได้รับทุกวันแล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของร่างกายอย่างใดอย่างหนึ่งขึ้น

➢ Lowest-observed-adverse-effect level (ค่า LOAEL) หมายถึง ปริมาณสารเคมีน้อยที่สุดที่ได้รับทุกวันแล้วทำให้เกิดผลไม่พึงประสงค์อย่างใดอย่างหนึ่งขึ้น ซึ่งมักเป็นความผิดปกติชั่วคราวที่กลับมาเป็นปกติได้ เช่น น้ำหนักตัวลดลง

➢ pharmacokinetics (เภสัชจลนศาสตร์) หมายถึง การศึกษาความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างการดูดซึม การกระจายตัว และการขับออกของสารเคมีและสารเมแทบอไลต์ในร่างกาย

➢ pollution (มลพิษ) หมายถึง การปนเปื้อนของดิน น้ำ อาหาร หรืออากาศ จากการปล่อยหรือการผสมของสารอันตราย

➢ risk analysis (การวิเคราะห์ความเสี่ยง) หมายถึง การประเมินความเสี่ยงร่วมกับการสื่อสารความเสี่ยงและการจัดการความเสี่ยง

➢ risk assessment (การประเมินความเสี่ยง) หมายถึง กระบวนการพิจารณาผลกระทบทางสุขภาพจากการได้รับสารเคมี รวมถึงการกำหนดความเสี่ยงเชิงคุณภาพและปริมาณ

➢ hazard (อันตราย) หรือ risk (ความเสี่ยง) หมายถึงความเป็นไปได้ที่สารเคมีหรือยาจะก่อให้เกิดอันตรายภายใต้เงื่อนไขที่กำหนด

➢ xenobiotic (สารแปลกปลอม) หมายถึง สารที่ร่างกายไม่มีและไม่ได้สร้างขึ้น โดยปกติแล้วจะไม่พบในร่างกาย เช่น ยาปฏิชีวนะ และสารเสพติด เป็นต้น

➢ route of exposure of toxicants หมายถึง วิถี (ทาง) เข้าสู่ร่างกายของสารพิษ หรือเส้นทางการรับสัมผัสสารพิษ มีหลายทาง เช่น การสูดดม (inhalation) ทางปาก (oral) ทางผิวหนัง (dermal) เป็นต้น

แหล่งที่มาของการเกิดพิษ (Sources of poisoning)

การได้รับสัมผัสกับสารพิษของสัตว์และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ อาจเกิดขึ้นได้จากหลายกิจกรรม เช่น การกินสารพิษโดยเจตนา การได้รับสัมผัสจากสิ่งแวดล้อม รวมถึงการเกิดพิษโดยอุบัติเหตุหรือโดยเจตนาร้าย ความเป็นพิษของสารแต่ละชนิดอาจแตกต่างกันไปตามทางเข้าสู่ร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นทางเดินอาหาร ปอด หรือผิวหนัง

- การวางยาพิษโดยเจตนาร้าย (Malicious poisoning) หมายถึง การฆ่ามนุษย์หรือสัตว์โดยมิชอบด้วยกฎหมายหรือด้วยเจตนาทางอาชญากรรม โดยการให้สารพิษหรือสารที่มีคุณสมบัติเป็นพิษ
- การเกิดพิษโดยอุบัติเหตุ (Accidental poisoning) การเกิดพิษโดยอุบัติเหตุอาจเกิดขึ้นเมื่อมนุษย์หรือสัตว์ได้รับสารพิษเข้าไปโดยไม่ตั้งใจ หรือมีการปนเปื้อนสารพิษโดยไม่ได้ตั้งใจในอาหาร อาหารสัตว์ หญ้าเลี้ยงสัตว์ หรือแหล่งน้ำดื่ม แหล่งที่มาของสารพิษเหล่านี้อาจมีได้ทั้งจากธรรมชาติและจากการกระทำของมนุษย์
  - แหล่งธรรมชาติ (Natural sources) การกินพืชพิษ การถูกสัตว์เลื้อยคลานที่มีพิษกัดหรือต่อย การกินอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษ การดื่มน้ำที่ปนเปื้อนด้วยแร่ธาตุที่เป็นอันตราย เป็นต้น
  - แหล่งที่มนุษย์สร้างขึ้น (Man-made sources) ยารักษาโรค สารเคมีในครัวเรือน สารเคมีทางการเกษตร และสารที่มนุษย์ผลิตขึ้นประเภทอื่น ๆ

ปัจจัยที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารพิษ

ประสิทธิภาพและความรุนแรงของสารพิษไม่ได้ขึ้นกับปริมาณของสารเพียงอย่างเดียว แต่ยังได้รับอิทธิพลจากหลายปัจจัย ได้แก่

1. **ขนาดและระยะเวลาการได้รับสาร (Dose and duration of exposure)** ขนาดของสารพิษที่ได้รับเป็นปัจจัยหลักในการกำหนดผลกระทบ โดยการได้รับขนาดสูงในช่วงเวลาสั้นอาจทำให้เกิดพิษเฉียบพลัน ขณะที่การได้รับขนาดต่ำอย่างต่อเนื่องสามารถก่อให้เกิดพิษเรื้อรัง
2. **วิถี (ทาง) เข้าสู่ร่างกาย (Route of administration/exposure)** การดูดซึมและความเป็นพิษแตกต่างกันไปตามทางเข้าสู่ร่างกาย เช่น ทางปาก ทางการหายใจ หรือทางผิวหนัง ซึ่งมีผลต่อการกระจายตัวของสารพิษ
3. **สายพันธุ์ ชนิด และอายุของสิ่งมีชีวิต (Species, breed, and age)** ความไวต่อสารพิษอาจแตกต่างกันระหว่างชนิดสัตว์หรือแม้แต่ระหว่างสายพันธุ์เดียวกัน โดยสัตว์อายุน้อยและสัตว์อายุมากอาจมีความเสี่ยงมากกว่าเนื่องจากระบบเมแทบอลิซึมหรือการขับถ่ายยังไม่สมบูรณ์หรือเสื่อมลง
4. **เพศและสภาวะทางสรีรวิทยา (Sex and physiological state)** ความแตกต่างระหว่างเพศ รวมถึงสภาวะตั้งครรภ์ การให้นม และภาวะโภชนาการ สามารถมีผลต่อการตอบสนองต่อพิษของร่างกาย
5. **ปฏิสัมพันธ์กับสารอื่น (Interaction with other chemicals)** การได้รับสารพิษร่วมกับสารอื่นอาจก่อให้เกิดการเสริมฤทธิ์ (synergism) ต้านฤทธิ์ (antagonism) หรือทำให้ฤทธิ์พิษเปลี่ยนแปลงไป
6. **สภาวะแวดล้อม (Environmental factors)** ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ความเครียด หรือการติดเชื้อโรค อาจส่งผลต่อความรุนแรงของการเกิดพิษ

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารและการตอบสนอง (Dose–Response Relationship)

หลักการพื้นฐานของพิษวิทยากำหนดว่า “ขนาดของสาร (dose) เป็นตัวกำหนดผลการตอบสนอง (response)” แนวคิดนี้มีรากฐานมาจากคำกล่าวของ Paracelsus ที่ว่า “The dose makes the poison”โดยทั่วไป **dose–response relationship** แบ่งได้เป็น 2 ลักษณะสำคัญ คือ

1. **Graded Dose–Response**

o ใช้อธิบายการตอบสนองในระดับความรุนแรงที่เปลี่ยนแปลงตามขนาดสารในสิ่งมีชีวิตหนึ่งตัว เช่น หนูทดลอง 1 ตัว มีความดันโลหิตสูงขึ้นเรื่อย ๆ ตามขนาดยาที่ให้ เป็นต้น

2. **Quantal Dose–Response**

o ใช้กับ population of organisms โดยประเมินว่ามีสัดส่วนเท่าใดของประชากรที่แสดงการตอบสนอง เช่น การเสียชีวิต (LD_{50}) หรือการเกิดผลเฉพาะอย่าง

o ช่วยอธิบายความไว (sensitivity) ของประชากรต่อสารพิษ

ความสำคัญของ dose–response relationship

- เป็นเครื่องมือหลักในการประเมินความเป็นพิษและความปลอดภัยของสารเคมี ยา และสารพิษ
- ใช้กำหนด ค่า LD_{50}, ED_{50} และ TD_{50} เพื่อนำไปประเมินดัชนีความปลอดภัย (safety index หรือ therapeutic index)
- เป็นพื้นฐานของการประเมินความเสี่ยง (risk assessment) ทางพิษวิทยา

➢ ED_{50} (Median Effective Dose) คือ ขนาดของสาร (dose) ที่ทำให้เกิดผลทางชีวภาพหรือผลการรักษา (therapeutic effect) ใน 50% ของประชากรหรือกลุ่มตัวอย่างที่ทดสอบ ใช้บ่งชี้ระดับขนาดที่คาดว่าจะให้ผลในครึ่งหนึ่งของประชากร เช่น ยาลดความดันโลหิตที่มีค่า ED_{50} = 10 mg/kg หมายถึง 50% ของกลุ่มทดลองแสดงการลดความดันโลหิตที่ระดับขนาดนั้น

➢ TD_{50} (Median Toxic Dose) คือ ขนาดของสาร (dose) ที่ทำให้เกิด ผลไม่พึงประสงค์หรือพิษ ใน 50% ของประชากรหรือกลุ่มตัวอย่างที่ทดสอบ ตัวอย่างเช่น ถ้ายาใดมี TD_{50} = 100 mg/kg หมายถึงครึ่งหนึ่งของประชากรที่ได้รับขนาดดังกล่าวแสดงอาการเป็นพิษ

ค่า ED_{50} และ TD_{50} ใช้ร่วมกันในการเปรียบเทียบประสิทธิผล (efficacy) และ ความปลอดภัย (safety) ของยา/สาร รวมถึงเป็นพื้นฐานของการคำนวณ Therapeutic Index (TI) หรือดัชนีความปลอดภัย ซึ่งคำนวณจากอัตราส่วน $TD_{50} \div ED_{50}$

o ค่าดัชนีสูง ⟶ ยาปลอดภัยมากขึ้น

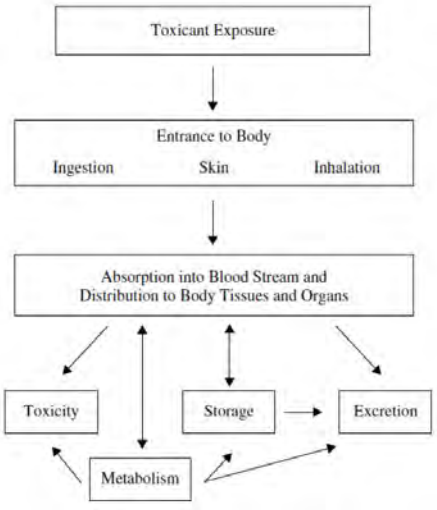
o ค่าดัชนีต่ำ ⟶ ยามีความเสี่ยงสูง ต้องควบคุมการใช้เข้มงวด

พิษจลนศาสตร์ [Toxicokinetics (TK); ADME]

พิษจลนศาสตร์เป็นการศึกษาการเคลื่อนที่ไปของสารพิษภายในร่างกายสิ่งมีชีวิต ตั้งแต่สารพิษถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายไปจนถึงถูกขับออกจากร่างกาย โดยพิษจลนศาสตร์ ประกอบไปด้วย 4 กระบวนการ คือ กระบวนการดูดซึม (absorption) กระบวนการกระจายตัว (distribution) กระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) และกระบวนการขับออกจากร่างกาย (excretion) นิยมเรียกกระบวนการทั้งสี่นี้อย่างย่อว่า ADME

การได้รับสารพิษของมนุษย์และสัตว์ หรือสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ อาจเกิดขึ้นจากปัจจัยหลายประการ เช่น การรับสารพิษผ่านทางการบริโภค การสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมในสถานที่ทำงาน หรือจากอุบัติเหตุ รวมถึงการได้รับสารพิษโดยเจตนา เช่น การพยายามฆ่าตัวตายหรือการลอบวางยาพิษ ความเป็นพิษของสารแต่ละชนิดอาจแปรผันไปตามทางที่เข้าสู่ร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นทางระบบทางเดินอาหาร ทางปอด หรือทางผิวหนัง นอกจากนี้วิธีการให้สารโดยการทดลอง เช่น การฉีดเข้าสู่ร่างกายอาจให้ผลที่แตกต่างกันอย่างมาก ดังนั้นความเป็นพิษของสารเดียวกันอาจแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับวิธีการฉีด เช่น การฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ (Intravenous: IV) ช่องท้อง (Intraperitoneal: IP) กล้ามเนื้อ (Intramuscular: IM) หรือใต้ผิวหนัง (Subcutaneous: SC) ความเป็นพิษของสารอาจแตกต่างกันได้มากถึงสิบเท่าตามเส้นทางการเข้าสู่ร่างกาย จากรูปที่ 1-6 เมื่อสารพิษเข้าสู่ร่างกายแล้วจะถูกดูดซึม (absorption) เข้าสู่กระแสเลือด และกระจาย (distribution) ไปยังเนื้อเยื่อและอวัยวะของร่างกาย และอาจเกิดสิ่งที่ตามมาดังนี้

- ความเป็นพิษ (toxicity) สารพิษสามารถก่อให้เกิดผลกระทบทางชีวภาพที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย
- การเผาผลาญ (metabolism) ร่างกายสามารถเปลี่ยนแปลงสารพิษผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม ซึ่งอาจช่วยลดความเป็นพิษ หรือในบางกรณีอาจทำให้สารนั้นเป็นพิษมากขึ้น
- การสะสม (storage) สารพิษบางชนิดอาจถูกเก็บสะสมไว้ในอวัยวะหรือเนื้อเยื่อบางประเภท เช่น ตับ ไต หรือไขมัน
- การกำจัดสารพิษหรือการขับออก (Excretion) สารพิษจะถูกขับออกจากร่างกายได้หลายทาง ไตจะเป็นอวัยวะที่สำคัญในการขับสารพิษหลายชนิดออกนอกร่างกาย โดยพบว่าสารพิษจะถูกเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้แล้วถูกขับออกมากับปัสสาวะ นอกจากนี้สารพิษอีกหลายชนิดสามารถถูกขับออกมาทางน้ำดีได้ โดยผ่านตับแล้วถูกขับออกไปกับอุจจาระ ส่วนปอดสามารถทำหน้าที่ในการขับสารพิษที่อยู่ในรูปก๊าซออกนอกร่างกาย (ลมหายใจ) และสารพิษยังถูกขับออกจากร่างกายผ่านทางเหงื่อ น้ำตา และน้ำนมได้อีกด้วย



รูปที่ 1-6 กระบวนการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ของสารพิษเมื่อเข้าสู่ร่างกาย (Toxicokinetics)
ที่มา: Hodgson (2004)

พิษพลศาสตร์ (Toxicodynamics; TD)

พิษพลศาสตร์ คือการศึกษาว่า “สารพิษทำอะไรกับร่างกาย” โดยอธิบายปฏิสัมพันธ์ของสารพิษหรือเมตาบอไลต์กับเป้าหมายทางชีวภาพ ตั้งแต่ระดับโมเลกุลถึงระดับอวัยวะ แล้วเชื่อมโยงไปสู่ผลกระทบทางหน้าที่และทางโครงสร้างของเซลล์ แตกต่างจากพิษจลนศาสตร์ (TK) ซึ่งเน้น “ร่างกายทำอะไรกับสาร” เช่น ดูดซึม กระจาย เปลี่ยนรูป และขับออก ขณะที่ TD มุ่งที่การจับเป้าหมาย การส่งต่อสัญญาณ การเกิดความเสียหาย และผลลัพธ์สุดท้ายของความเป็นพิษ

ตัวอย่างพิษพลศาสตร์ในสัตว์

- ออร์กาโนฟอสเฟต/คาร์บาเมต ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) ⟶อะเซทิลโคลีนคั่งในไซแนปส์ ⟶ กระตุ้นตัวรับมิวสคารินิก/นิโคตินิกมากเกินไป ทำให้เกิดอาการโคลิเนอร์จิก (น้ำลายไหล หายใจลำบาก กล้ามเนื้อสั่น ชัก) ในสัตว์
- อะฟลาทอกซิน B_1 ถูกเมแทบอลิซึมโดยไซโตโครม P450 เป็น Aflatoxin B1 exo-8,9-epoxide ซึ่งทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอ/โปรตีนในตับ ⟶ เกิดพิษต่อตับ ความเสียหายของเซลล์ และความเสี่ยงการก่อมะเร็ง ในสัตว์เคี้ยวเอื้องอาจสัมพันธ์กับการเปลี่ยนผ่านสู่ AFM_1 ในน้ำนม
- ไซยาไนด์ (พืชมีไซยาโนเจนิกไกลโคไซด์) ไซยาไนด์จับกับไซโตโครม c ออกซิเดส (Complex IV) ในไมโตคอนเดรีย ⟶ หยุดการฟอสโฟรีเลชันแบบออกซิเดทีฟ ⟶ ภาวะขาดออกซิเจนในระดับเซลล์แบบเฉียบพลัน (histotoxic hypoxia) อาการเกิดเร็ว เช่น หอบ เขียว ชัก ตายฉับพลัน

การจำแนกชนิดของสารพิษ (Classification of poisons)

มีวิธีการหรือแนวทางมากมายที่ได้รับการพัฒนาเพื่อช่วยในการจำแนกความเป็นพิษของสารประกอบต่าง ๆ ขึ้นกับวัตถุประสงค์การนำไปใช้งาน โดยอาจจำแนกตามคุณสมบัติ ตามการออกฤทธิ์ และตามความรุนแรงของสาร ดังตารางที่ 1-1

ตารางที่ 1-1 การแบ่งระดับความเป็นพิษของสารพิษตามความรุนแรง (Tiwari & Sinha, 2010)

ระดับความเป็นพิษ	Oral LD_{50} in rats (mg/kg)	Probable Lethal Dose in man	ตัวอย่าง
เป็นพิษร้ายแรงมาก (Super toxic)	< 5	5 หยด	strychnine
เป็นพิษร้ายแรง (Extremely toxic)	5-50	1 ช้อนชา	parathion
เป็นพิษมาก (Very toxic)	50-500	1 ออนซ์	phenobarbital
เป็นพิษปานกลาง (Moderately toxic)	500-5000	1 ปอนด์ (หรือ 1 ไพนต์)	ethanol
เป็นพิษเล็กน้อย (Slightly toxic)	5000-15000	1 ควอร์ต	ethanol
ไม่เป็นพิษ (Practically nontoxic)	>15000	>1 ควอร์ต	Linseed oil

การคำนวณเกี่ยวกับความเข้มข้น (Calculations Concerning Concentration)

✓ **ความสัมพันธ์ระหว่าง ppm (parts per million) และ ppb (parts per billion)** โดยทั่วไป ความเข้มข้นของสารพิษหรือยาที่พบในอาหารสัตว์ น้ำ หรือเนื้อเยื่อ มักแสดงค่าในรูปของ **ppm (ส่วนในล้านส่วน)** หรือ **ppb (ส่วนในพันล้านส่วน)** ซึ่งมักเป็นรูปแบบมาตรฐานที่รายงานผลการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ นักสัตวแพทย์จึงจำเป็นต้องสามารถแปลข้อมูลดังกล่าวให้อยู่ในรูปที่ใช้ได้จริงทางคลินิก

- 1 ppm หมายถึง สารวิเคราะห์ (เช่น ยาหรือสารพิษ) 1 ส่วน ในสารตัวอย่าง (อาหารสัตว์ น้ำ ดิน) 1,000,000 ส่วน
- ในระบบเมตริก ความสัมพันธ์นี้ชัดเจนและเข้าใจง่าย เช่น
  - 1 ppm = 1 mg/kg = 1 µg/g

✓ **ความสัมพันธ์ระหว่าง ppm และ เปอร์เซ็นต์ (%)** มีความสัมพันธ์โดยตรงระหว่าง **ppm** และ **% ความเข้มข้น** ซึ่งสามารถอธิบายได้จากความจริงที่ว่า 1 ppm = 1 mg/kg

- 1 ppm = 1 mg/kg
- 1 ppm = 1 มิลลิกรัม / 1,000,000 มิลลิกรัม
- 1 ppm = 1 / 1,000,000
- 1 ppm = 0.000001
- 1 ppm = 0.0001%

ดังนั้น การแปลงค่าทำได้ดังนี้

- จาก **%** ⟶ **ppm** : เลื่อนจุดทศนิยมไปทางขวา 4 ตำแหน่ง
- จาก **ppm** ⟶ **%** : เลื่อนจุดทศนิยมไปทางซ้าย 4 ตำแหน่ง

ข้อสังเกต: ค่า **ppm** จะมีค่ามากกว่า **%** เสมอ

สำหรับ **ppb** จะมีความสัมพันธ์คล้ายกับ ppm โดย

- **1 ppb = 1 µg/kg**
- 1 ส่วนของสารวิเคราะห์ใน 1,000,000,000 ส่วนของสารทั้งหมด

ตัวอย่างการคำนวณ

คำถาม 1 ตัวอย่างกากเมล็ดฝ้าย (cottonseed meal) มี gossypol 0.25% ความเข้มข้นที่แนะนำให้ใช้คือค่าในหน่วย ppm ต้องการหาว่ามีความเข้มข้น gossypol เท่าใดในหน่วย ppm

- **คำตอบ** 0.25% ⟶ เลื่อนจุดทศนิยม 4 ตำแหน่ง ⟶ 2500 ppm gossypol

คำถาม 2 ตัวอย่างกากเมล็ดฝ้ายมี gossypol 0.25% ต้องการหาปริมาณ gossypol ในหน่วยมิลลิกรัมต่อปอนด์

- **คำตอบ**
  - 0.25% = 2500 ppm
  - 1 ppm = 1 mg/kg
  - ดังนั้น 2500 ppm = 2500 mg/kg ของกากเมล็ดฝ้าย
  - แปลง kg ⟶ lb (1 kg = 2.204 lb)
  - 2500 mg/kg ÷ 2.204 = 5510 mg/lb gossypol

✓ **ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์ (Percentage Relationships)**

1. **เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อน้ำหนัก (% w/w)**

   จำนวนกรัมของสารต่อ 100 กรัมของตัวอย่าง

   % (w/w) = (กรัมของสาร ÷ กรัมของตัวอย่าง) × 100

2. **เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร (% w/v)**

   จำนวนกรัมของสาร/100 มิลลิลิตรของสารละลาย

   % (w/v) = (กรัมของสาร ÷ 100 ml ของของเหลว)

ตัวอย่าง:

N-Acetylcysteine (ยาแก้พิษพาราเซตามอล) มีจำหน่ายในรูปสารละลาย 10% และ 20%

- 10% solution = 10 g/100 ml
- 10% solution = 0.1 g/ml
- 10% solution = 100 mg/ml
- ดังนั้น สารละลาย 10% มี NAC 100 mg/ml
- สารละลาย 20% มี NAC 200 mg/ml

มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ (mg%)

- หมายถึง มิลลิกรัมของสารในสารละลาย 100 ml
- เช่น สารละลาย 12 mg% = 12 mg/100 ml

บทที่ 2

ความสำคัญ ของห้องปฏิบัติการพิษวิทยา

ห้องปฏิบัติการพิษวิทยามีบทบาทสำคัญในการวินิจฉัยและจัดการกรณีสัตว์ได้รับสารพิษ โดยอาศัยองค์ความรู้ด้านพิษวิทยาคลินิก (Clinical toxicology) และเคมีวิเคราะห์ (Analytical chemistry) ร่วมกัน พิษวิทยาคลินิกมุ่งเน้นเกี่ยวกับการศึกษาถึงผลกระทบของสารพิษต่อสุขภาพของสัตว์ ขณะที่เคมีวิเคราะห์มุ่งเน้นการตรวจและหาปริมาณของสารพิษที่อาจเป็นสาเหตุของอาการผิดปกติ การวินิจฉัยภาวะเป็นพิษต้องอาศัยการเชื่อมโยงอาการทางคลินิกกับแหล่งที่มาของสารพิษที่เป็นไปได้ โดยเริ่มจากการเก็บตัวอย่างที่เหมาะสมเพื่อการตรวจวิเคราะห์ อย่างไรก็ตาม การตรวจวินิจฉัยอาจเผชิญความท้าทายจากข้อมูลประวัติที่ไม่ครบถ้วนหรือการเก็บตัวอย่างที่ไม่ถูกต้อง การเก็บตัวอย่าง การจัดการ และการส่งตัวอย่างทางพิษวิทยา จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความถูกต้องแม่นยำของผลการตรวจวิเคราะห์ตลอดจนการเลือกชนิดของตัวอย่าง ปริมาณที่เหมาะสม การบรรจุภัณฑ์ การขนส่ง และการให้ข้อมูลประกอบ เช่น ประวัติทางคลินิก อาการผิดปกติ ผลการตรวจทางเคมีคลินิก ฉลากตัวอย่าง และรายงานการชันสูตรซากล้วนมีความสำคัญ หากมีข้อผิดพลาดหรือขาดข้อมูลในขั้นตอนเหล่านี้ อาจส่งผลต่อการแปลผลและนำไปสู่ข้อสรุปที่ไม่ถูกต้อง การศึกษาทำความเข้าใจเกี่ยวกับการเก็บ การส่ง และการจัดเก็บตัวอย่างที่ถูกต้องเหมาะสมเพื่อการตรวจวิเคราะห์ทางพิษวิทยาจึงมีความจำเป็นสำหรับผู้ใช้บริการ เพื่อที่สัตวแพทย์ผู้รักษาและเจ้าหน้าที่ปศุสัตว์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องสามารถนำข้อมูลผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการไปใช้ประกอบในการตัดสินใจวินิจฉัยช่วยเหลือสัตว์ที่มีภาวะเป็นพิษ ป้องกัน จัดการกับภัยคุกคามจากสารพิษที่ส่งผลกระทบในสัตว์เลี้ยง สัตว์ป่า และปศุสัตว์ ตลอดจนเพื่อการชันสูตรโรคจากสารพิษ หาสาเหตุการป่วยและตายได้

ประเด็นสำคัญ

- พิษวิทยาคลินิกทางสัตวแพทย์ เป็นศาสตร์ที่ผสมผสานระหว่าง พิษวิทยาวินิจฉัย เคมีวิเคราะห์ และการป้องกันและการรักษา ดังนั้น คำถามสำคัญที่ต้องตอบคือ สารเคมีทำให้สัตว์ป่วยหรือตายหรือไม่ และถ้าใช่ คือสารเคมีชนิดใด แม้ว่าคำถามนี้จะดูเรียบง่าย แต่กลับเป็นเรื่องที่ท้าทายอย่างยิ่งต่อการหาคำตอบ เนื่องจากจำเป็นต้องมีการตรวจสอบทางเคมีเพื่อยืนยันการวินิจฉัย
- สำหรับการวินิจฉัยภาวะพิษ (diagnosis of toxicosis) จำเป็นต้องใช้หลักฐานแวดล้อม ประวัติ อาการทางคลินิก รอยโรค การตรวจทางห้องปฏิบัติการ
- หลักฐานแวดล้อม มีความสำคัญและควรได้รับการบันทึก แต่ไม่สามารถทดแทนการตรวจร่างกายและการชันสูตรซากสัตว์ได้ ประวัติที่ได้รับจากเจ้าของสัตว์อาจมีข้อมูลที่คลาดเคลื่อน และคำว่า “การตายกะทันหัน” (sudden death) มักหมายถึง “การสังเกตล่าช้า”หรือบางครั้งสัตว์อาจถูกพบว่าเสียชีวิตไปแล้วโดยไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด
- กระบวนการวิเคราะห์ทางเคมี จำเป็นต้องใช้ในการตรวจพบ การหาเอกลักษณ์ และการตรวจหาปริมาณของสารประกอบแปลกปลอม เช่น สารเคมี สารกำจัดศัตรูพืชละสัตว์ ยา สารเสพติด และสารพิษธรรมชาติในตัวอย่างชีววัตถุและตัวอย่างอื่น ๆ
- การส่งตัวอย่างที่เหมาะสม เป็นปัจจัยสำคัญในการวิเคราะห์ทางพิษวิทยา หากส่งตัวอย่างไม่ถูกต้อง อาจทำให้กระบวนการวิเคราะห์เกิดข้อผิดพลาดและให้ผลที่คลาดเคลื่อน
- ตัวอย่างที่สำคัญที่สุดที่ต้องเก็บ ได้แก่ อาหารในกระเพาะ ตับ ไต เลือดครบส่วน (Whole blood) พลาสมาหรือซีรัม ปัสสาวะ และวัตถุอื่น ๆ ที่สงสัยที่ตกอยู่ในที่เกิดเหตุ
- มาตรการป้องกันและรักษา ต้องใช้วิธีการช่วยชีวิต เช่น
  - การป้องกันการดูดซึมของสารพิษ
  - การเร่งกำจัดสารพิษ
  - การรักษาแบบประคับประคอง
  - การใช้สารต้านพิษเฉพาะทาง

กรณีการวินิจฉัยภาวะพิษข้อมูลสำคัญที่ต้องส่งไปยังห้องปฏิบัติการ

เพื่อให้กระบวนการวิเคราะห์ทางพิษวิทยามีประสิทธิภาพ จำเป็นต้องส่งข้อมูลที่ครบถ้วนและถูกต้อง ซึ่งอาจมีความสำคัญในกรณีที่เกี่ยวข้องกับข้อกฎหมาย ตัวอย่างข้อมูลที่จำเป็น ได้แก่

1. จำนวนสัตว์ที่ได้รับสารพิษ/ ป่วย/ ตาย อายุ น้ำหนัก และลำดับเหตุการณ์ที่เกิดขึ้น
2. อาการทางคลินิกและการดำเนินของโรค
3. ประวัติโรคประจำตัวของสัตว์
4. รอยโรคที่พบในการชันสูตรซาก รวมถึงการตรวจสอบอาหารที่สัตว์กินเข้าไป
5. การตอบสนองต่อการรักษา และรายชื่อยาเพื่อลดความสับสนในการตรวจวิเคราะห์
6. เหตุการณ์ที่เกี่ยวข้อง เช่น การเปลี่ยนแปลงอาหาร แหล่งน้ำ การใช้ยาหรือสารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์
7. รายละเอียดของสถานที่เกิดเหตุ (อาจใช้ภาพถ่ายหรือแผนผังประกอบ)

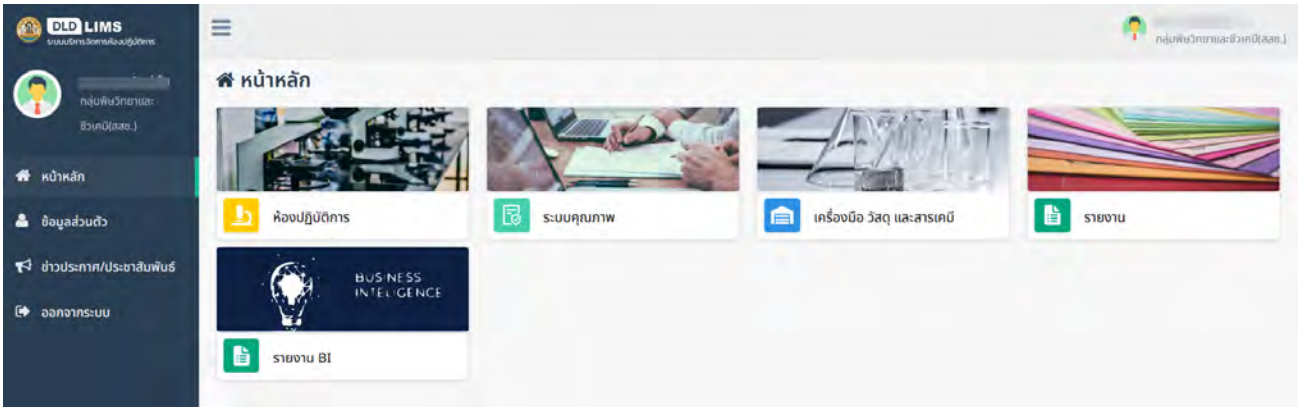
8. ข้อมูลเกี่ยวกับตำแหน่งที่สัตว์เคยไปและเวลาที่ถูกเคลื่อนย้าย

หากมีข้อสงสัยเกี่ยวกับปริมาณหรือประเภทของตัวอย่างที่ควรส่งไปยังห้องปฏิบัติการ ควรติดต่อสอบถามห้องปฏิบัติการก่อน

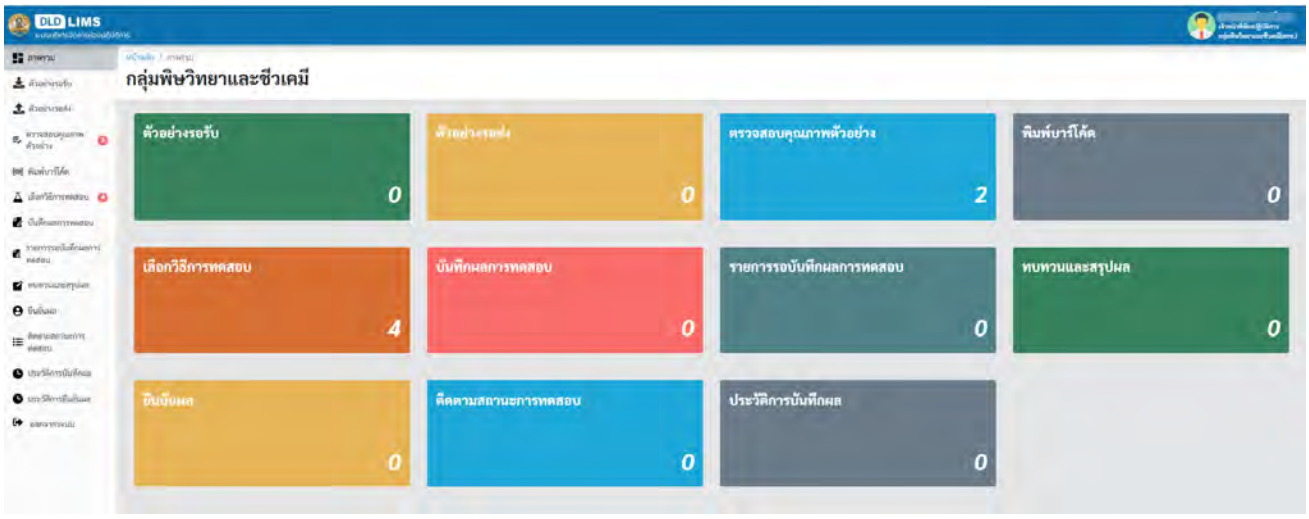
การเก็บตัวอย่าง (Collection of Samples)

นักพิษวิทยามักต้องทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ ซึ่งอาจมีการเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ เนื่องจากมีการพัฒนาวิธีการตรวจใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น วิธีการตรวจที่อาศัยกระบวนการวิเคราะห์ทางวิทยาศาสตร์มักต้องมีการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ ซึ่งในบางกรณีอาจมีความซับซ้อนมาก ห้องปฏิบัติการวินิจฉัยโรคแต่ละแห่งมีชุดการตรวจเฉพาะที่แตกต่างกันออกไป โดยเฉพาะเทคนิคใหม่ ๆ ที่อาศัยชีววิทยาระดับโมเลกุล ซึ่งสะท้อนถึงแนวโน้มที่มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ด้วยเหตุนี้ แนวทางและขั้นตอนในการเก็บตัวอย่างและส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการจึงอาจมีการเปลี่ยนแปลงตามการพัฒนาเทคนิคใหม่ ๆ ดังนั้น สัตวแพทย์ผู้ส่งตัวอย่างและเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องสื่อสารกันอย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อให้สามารถดำเนินกระบวนการวินิจฉัยได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว ตลอดจนให้บริการที่ดีที่สุดแก่ลูกค้า สัตวแพทย์ควรระบุรายละเอียดเกี่ยวกับการตรวจที่ต้องการให้ชัดเจนและเฉพาะเจาะจง (specific and clear test requests) เพื่อให้ห้องปฏิบัติการสามารถดำเนินการได้อย่างถูกต้อง หากมีข้อสงสัยเกี่ยวกับวิธีการเก็บตัวอย่างหรือการจัดการตัวอย่าง ห้องปฏิบัติการสามารถให้คำแนะนำได้ นอกจากนี้ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการยังมีบทบาทสำคัญในการช่วยแปลผลการตรวจให้เข้าใจง่ายขึ้น นอกจากนี้ห้องปฏิบัติการวินิจฉัยส่วนใหญ่มักเผยแพร่แนวทางปฏิบัติหรือคู่มือสำหรับการเก็บและส่งตัวอย่างที่เหมาะสม ยกตัวอย่างเช่น คู่มือการเก็บตัวอย่างของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (2567) ผู้รับบริการหรือผู้สนใจสามารถ download ดูได้ที่ https://niah.dld.go.th/webnew/service/laboratory-of-animal-diseases/sampling-guide67

ห้องปฏิบัติการจะต้องมีระบบบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับการรับตัวอย่างและการรายงานผลการตรวจ ซึ่งโดยทั่วไปจะดำเนินการผ่านระบบคอมพิวเตอร์ที่เรียกว่า “ระบบบริหารจัดการห้องปฏิบัติการ” หรือ Laboratory Information Management Systems (LIMS) ซึ่งช่วยให้สามารถติดตามตัวอย่างและรายงานผลได้อย่างเป็นระบบ ยกตัวอย่าง เช่น DLD LIMS ของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ประจำภูมิภาค กรมปศุสัตว์ เป็นต้น โดย DLD LIMS นี้ จะมีการมอบสิทธิ์ตามลำดับชั้นในการเข้าถึงหรือการเข้าไปใช้งานของเจ้าหน้าที่แต่ละบุคคลที่มีส่วนเกี่ยวข้องในแต่ละขั้นตอนของการปฏิบัติงาน ว่าใครสามารถเข้าถึงข้อมูลหรือเข้าไปดำเนินการในระบบได้และมีสิทธิ์เข้าถึงได้ถึงขั้นตอนใด (การตรวจสอบคุณภาพตัวอย่าง เลือกวิธีทดสอบ บันทึกผลการทดสอบ ทบทวนและสรุปผลยืนยันผล) โดยมี username และ รหัสผ่านที่ผู้ดูแลระบบออกให้ (รูปที่ 2-1 และ 2-2)



รูปที่ 2-1 หน้าต่างที่เป็นหน้าหลักของระบบบริหารจัดการห้องปฏิบัติการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (DLD LIMS)



รูปที่ 2-2 หน้าต่างของระบบบริหารจัดการห้องปฏิบัติการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (DLD LIMS) ในส่วนของกลุ่มพิษวิทยาและชีวเคมี

ขั้นตอนการส่งตัวอย่าง

ไม่ว่าวิธีการส่งตัวอย่างจะเป็นแบบใด ข้อมูลประวัติสัตว์ป่วยโดยละเอียดควรแนบไปกับตัวอย่าง เพื่อช่วยให้เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสามารถระบุการวินิจฉัยที่ถูกต้อง ข้อมูลที่ควรแนบ ได้แก่

- เจ้าของสัตว์ (Owner)
- ชนิดพันธุ์ของสัตว์ (Species)
- สายพันธุ์ (Breed)
- เพศ (Sex)
- อายุ (Age)
- หมายเลขระบุตัวสัตว์ (Animal Identification)
- อาการทางคลินิก (Clinical Signs)
- ลักษณะของรอยโรค (Gross Appearance of Lesions) รวมถึง ขนาดและตำแหน่ง (Size and Location)
- การรักษาก่อนหน้า (ถ้ามี)
- ระยะเวลาของการเกิดซ้ำจากการรักษาก่อนหน้า
- อัตราการป่วยและตายในกลุ่มสัตว์ (Morbidity and Mortality in the Group)

หากมีข้อสงสัยเกี่ยวกับโรคที่สามารถติดต่อจากสัตว์สู่คน (Zoonotic Disease) ควรระบุข้อมูลดังกล่าวไว้ในแบบฟอร์มการส่งตัวอย่าง เพื่อแจ้งให้เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทราบ

การส่งตัวอย่างที่เหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญต่อความสำเร็จของการวิเคราะห์ทางพิษวิทยา หากมีการส่งตัวอย่างที่ไม่เหมาะสมอาจส่งผลเสียต่อกระบวนการการตรวจวิเคราะห์และทำให้ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่คลาดเคลื่อน

องค์ประกอบสำคัญของการส่งตัวอย่างที่เหมาะสม

- การเลือกตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ
- ปริมาณตัวอย่างที่เหมาะสม
- การบรรจุภัณฑ์ที่ถูกต้อง ติดฉลากบ่งชี้ตัวอย่าง ชื่อเจ้าของหรือผู้ส่ง สถานที่เก็บ วันเดือนปีที่เก็บ
- เงื่อนไขการขนส่งที่เหมาะสม
- เอกสารที่ครบถ้วนพร้อมประวัติ อาการทางคลินิก เคมีคลินิก ฉลากอาหาร รายงานการผ่าซาก หรือข้อมูลที่เกี่ยวข้องอื่น ๆ

ข้อกำหนดเกี่ยวกับตัวอย่างสดและแช่แข็ง

- ตัวอย่างเนื้อเยื่อสดหรือแช่แข็งควรได้รับการ จัดเก็บอย่างถูกต้องเพื่อการวิเคราะห์
- ตัวอย่างเลือดครบส่วน (Whole Blood) ควรแช่เย็น
- ต้องปฏิบัติตามแนวทางเกี่ยวกับขนาดตัวอย่างและเงื่อนไขการขนส่งที่ระบุในส่วนของการทดสอบที่มีอยู่ของห้องปฏิบัติการวินิจฉัยทางสัตวแพทย์
- ตัวอย่างบางชนิด สามารถจัดเก็บที่อุณหภูมิห้อง
- อย่างไรก็ตาม สารพิษบางชนิดสามารถระเหยได้ง่ายหรือถูกเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี หากไม่ได้รับการบรรจุที่ถูกต้อง

ตัวอย่างสำหรับการตรวจวิเคราะห์ทางพิษวิทยา

หากสงสัยว่าสารพิษเป็นสาเหตุของอาการป่วย ต้องร้องขอการตรวจวิเคราะห์เฉพาะทางเสมอห้องปฏิบัติการไม่สามารถตรวจวิเคราะห์หาสารพิษโดยทั่วไปได้โดยไม่มีข้อมูลเบื้องต้นที่เหมาะสม รายละเอียดที่ครบถ้วนเกี่ยวกับอาการทางคลินิกและข้อมูลระบาดวิทยาอาจช่วยแยกแยะภาวะพิษ (poisoning) ออกจากโรคติดเชื้อที่แสดงอาการคล้ายกัน ตัวอย่างที่สำคัญที่สุดที่ต้องเก็บ เช่น อาหารในกระเพาะ ตับ ไต เลือดครบส่วน (Whole Blood) พลาสมา/ซีรัม ปัสสาวะ เป็นต้น ส่วนตัวอย่างเพิ่มเติมที่อาจจำเป็นต้องตรวจ ได้แก่ น้ำ อาหารสัตว์ หรืออาหารอื่น ๆ เหยื่อล่อ (Bait) ที่นอนสัตว์ (animal bedding) และวัตถุอื่น ๆ ที่สงสัยหรือตกในที่เกิดเหตุ

ตัวอย่างอวัยวะหรือของเหลวควรได้รับการแช่เย็น ในบางการวิเคราะห์การแช่แข็งตัวอย่างเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อป้องกันการสลายตัวของสารเคมีที่ระเหยง่าย เช่น ไซยาไนด์ และในบางกรณีที่ตัวอย่างหายาก อาจจำเป็นต้องใช้วัตถุกันเสียเพื่อช่วยรักษาตัวอย่าง สำหรับขีดความสามารถทางห้องปฏิบัติการพิษวิทยาและชีวเคมีในการตรวจทางพิษวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ดังตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 ขีดความสามารถทางห้องปฏิบัติการพิษวิทยาและชีวเคมี

การตรวจทางพิษวิทยา

ลำดับที่	การตรวจวิเคราะห์	วิธีทดสอบ	ชนิดตัวอย่าง	ปริมาณตัวอย่าง	การเก็บรักษาตัวอย่างส่งตรวจ	ขีดความสามารถในการตรวจ	ระยะเวลาของการตรวจ	รูปแบบการรายงานผล
1.	สารพิษจากเชื้อรา (Mycotoxin)							
	Total Aflatoxin	Fluorometry	ตับ	100 - 500 กรัม	แช่เย็น/แช่แข็ง	10 ตัวอย่าง/สัปดาห์	5 วันทำการ	ปริมาณที่ตรวจพบ หน่วยเป็น ppm หรือ ppb
	Ochratoxin Zearalenone Fumonisin		อาหารเม็ด สำเร็จรูป อาหารข้น อาหารผสมเอง วัตถุดิบอาหารสัตว์	500 - 1,000 กรัม	อุณหภูมิปกติ	10 ตัวอย่าง/สัปดาห์		ปริมาณที่ตรวจพบ หน่วยเป็น ppm หรือ ppb
	Aflatoxin M_1		น้ำนมดิบ	100 มิลลิลิตร	แช่เย็น	10 ตัวอย่าง/สัปดาห์		ปริมาณที่ตรวจพบ หน่วยเป็น ppm หรือ ppb
2.	Heavy metals and Minerals							
	Arsenic (As), Cadmium (Cd), Calcium (Ca), Chromium (Cr), Copper (Cu), Iron (Fe), Lead (Pb), Magnesium (Mg) Manganese (Mn), Nickel (Ni), Phosphorus (P), Potassium (K), Selenium (Se), Sodium (Na), Zinc (Zn)	ICP-OES	น้ำ	100 มิลลิลิตร	แช่เย็น	25 ตัวอย่าง/สัปดาห์	5 วันทำการ	ปริมาณที่ตรวจพบ หน่วยเป็น mg/dL หรือ mEq/L
			อาหารสัตว์ พืชอาหารสัตว์	50 กรัม	แช่เย็น	5 ตัวอย่าง/สัปดาห์	7 วันทำการ	ปริมาณที่ตรวจพบ หน่วยเป็น mg/dL หรือ mEq/L
	Arsenic (As), Cadmium (Cd), Chromium (Cr), Copper (Cu), Iron (Fe), Lead (Pb), Zinc (Zn)	ICP-OES	อาหารในกระเพาะ ตับ ไต	10 กรัม	แช่เย็น/แช่แข็ง	5 ตัวอย่าง/สัปดาห์	7 วันทำการ	ปริมาณที่ตรวจพบ หน่วยเป็น mg/dL
	Arsenic (As), Cadmium (Cd), Chromium (Cr)	ICP-OES	เลือด (EDTA)	10 มิลลิลิตร	แช่เย็น	40 ตัวอย่าง/สัปดาห์	7 วันทำการ	ปริมาณที่ตรวจพบ หน่วยเป็น mg/dL
	Lead (Pb), Potassium (K), Sodium (Na)	ICP-OES	เลือด (Heparin)	10 มิลลิลิตร	แช่เย็น	40 ตัวอย่าง/สัปดาห์	7 วันทำการ	ปริมาณที่ตรวจพบ หน่วยเป็น mg/dL หรือ mEq/L
	Copper (Cu), Potassium (K), Sodium (Na), Zinc (Zn)	ICP-OES	ซีรัม	3 มิลลิลิตร	แช่เย็น/แช่แข็ง	40 ตัวอย่าง/สัปดาห์	7 วันทำการ	ปริมาณที่ตรวจพบ หน่วยเป็น mg/dL หรือ mEq/L
	Arsenic (As) Selenium (Se)	ICP-OES-HVG	เลือด (Clotted blood)	10 มิลลิลิตร	แช่เย็น	40 ตัวอย่าง/สัปดาห์	7 วันทำการ	ปริมาณที่ตรวจพบหน่วยเป็น mg/dL
			ซีรัม	3 มิลลิลิตร	แช่เย็น/แช่แข็ง			

ตารางที่ 2-1 ขีดความสามารถทางห้องปฏิบัติการพิษวิทยาและชีวเคมี (ต่อ)

การตรวจทางพิษวิทยา

ลำดับที่	การตรวจวิเคราะห์	วิธีทดสอบ	ชนิดตัวอย่าง	ปริมาณตัวอย่าง	การเก็บรักษาตัวอย่างส่งตรวจ	ขีดความสามารถในการตรวจ	ระยะเวลาของการตรวจ	รูปแบบการรายงานผล
3.	Pesticides หมายเหตุ: การตรวจวิเคราะห์สารพิษมากกว่า 1 กลุ่ม ใช้ระยะเวลาในการตรวจ 15 วัน							
	สารเคมีกำจัดแมลง (Insecticides)							
	Organochlorine, Organophosphate, Carbamate, Pyrethroid	TLC, GC-MS, UV-VIS Spectrophotometry, HPLC	อาหารในกระเพาะ ตับ ไต อาหารในลำไส้	100 กรัม	แช่เย็น/แช่แข็ง	30 ตัวอย่าง/สัปดาห์	10 วันทำการ	ตรวจพบ/ ตรวจไม่พบ *หากตรวจพบจะรายงานปริมาณที่ตรวจพบในหน่วย mg/kg, mg/L หรือ ppm
			อาหารสัตว์	200 กรัม	แช่เย็น			
			พืชอาหารสัตว์ (หญ้า เปลือกสับปะรด เปลือกข้าวโพด ฯลฯ)	100 กรัม				
			น้ำ	1 - 2 ลิตร				
			วัตถุต้องสงสัย เช่น สารเคมีที่พบในที่เกิดเหตุ เหยื่อล่อ เป็นต้น	100 กรัม/ 100 มิลลิลิตร	แช่เย็น/ แช่แข็ง			
	สารกำจัดสัตว์ฟันแทะ (Rodenticides)							
	Warfarin, Coumatetralyl	TLC, UV-VIS Spectrophotometry	อาหารในกระเพาะ อาหารในลำไส้	100 กรัม	แช่เย็น/ แช่แข็ง	30 ตัวอย่าง/สัปดาห์	7 วันทำการ	ตรวจพบ/ ตรวจไม่พบ *หากตรวจพบจะรายงานปริมาณที่ตรวจพบในหน่วย mg/kg, mg/L หรือ ppm
			อาหารสัตว์	200 กรัม	แช่เย็น			
			พืชอาหารสัตว์	100 กรัม	แช่เย็น			
	สารประกอบฟอสไฟด์, Arsenic (As)	Chemical test	(หญ้า เปลือกสับปะรด เปลือกข้าวโพด ฯลฯ)			30 ตัวอย่าง/สัปดาห์	7 วันทำการ	ตรวจพบ/ ตรวจไม่พบ
			น้ำ	1 - 2 ลิตร	แช่เย็น			
	Strychnine	TLC, UV-VIS Spectrophotometry	น้ำ	1 - 2 ลิตร	แช่เย็น	30 ตัวอย่าง/สัปดาห์	7 วันทำการ	ตรวจพบ/ ตรวจไม่พบ *หากตรวจพบจะรายงานปริมาณที่ตรวจพบในหน่วย mg/kg, mg/L หรือ ppm
			วัตถุต้องสงสัย เช่น สารเคมีที่พบในที่เกิดเหตุ เหยื่อล่อ เป็นต้น	100 กรัม/ 100 มิลลิลิตร	แช่เย็น/ แช่แข็ง			
	Herbicides							
	Paraquat	Chemical test, UV-VIS Spectrophotometry, HPLC	อาหารในกระเพาะ	100 กรัม	แช่เย็น/ แช่แข็ง	30 ตัวอย่าง/สัปดาห์	7 วันทำการ	ตรวจพบ/ ตรวจไม่พบ *หากตรวจพบจะรายงานปริมาณที่ตรวจพบในหน่วย mg/kg, mg/L หรือ ppm
	Glyphosate และ AMPA	HPLC	น้ำ	100 มิลลิลิตร	แช่เย็น	30 ตัวอย่าง/สัปดาห์	7 วันทำการ	ตรวจพบ/ ตรวจไม่พบ *หากตรวจพบจะรายงานปริมาณที่ตรวจพบในหน่วย mg/L หรือ ppm
	Molluscicides							
	Metaldehyde	TLC	อาหารในกระเพาะ อาหารในลำไส้	100 กรัม	แช่เย็น/ แช่แข็ง	30 ตัวอย่าง/สัปดาห์	7 วันทำการ	ตรวจพบ/ ตรวจไม่พบ
			น้ำ	500 มิลลิลิตร	แช่เย็น			
			วัตถุต้องสงสัย เช่น สารเคมีที่พบในที่เกิดเหตุ เหยื่อล่อ เป็นต้น	100 กรัม/ 100 มิลลิลิตร	แช่เย็น/ แช่แข็ง			

ตารางที่ 2-1 ขีดความสามารถทางห้องปฏิบัติการพิษวิทยาและชีวเคมี (ต่อ)

การตรวจทางพิษวิทยา

ลำดับที่	การตรวจวิเคราะห์	วิธีทดสอบ	ชนิดตัวอย่าง	ปริมาณตัวอย่าง	การเก็บรักษาตัวอย่างส่งตรวจ	ขีดความสามารถในการตรวจ	ระยะเวลาของการตรวจ	รูปแบบการรายงานผล
4.	Other Toxic Substances หมายเหตุ : การตรวจวิเคราะห์สารพิษมากกว่า 1 กลุ่ม ใช้ระยะเวลาในการตรวจ 15 วันทำการ							
	สารพิษระเหยได้ชนิด Cyanide	Chemical test	อาหารในกระเพาะอาหารในลำไส้	100 กรัม	แช่เย็น/ แช่แข็ง	30 ตัวอย่าง/ สัปดาห์	7 วันทำการ	ตรวจพบ/ ตรวจไม่พบ
			อาหารสัตว์	200 กรัม	แช่เย็น			
			พืชอาหารสัตว์ (หญ้า เปลือกสับปะรด เปลือกข้าวโพด ฯลฯ)	100 กรัม				
			น้ำ	500 มิลลิลิตร				
			วัตถุต้องสงสัย เช่น สารเคมีที่พบในที่เกิดเหตุ เหยื่อล่อ เป็นต้น	100 กรัม/ 100 มิลลิลิตร	แช่เย็น/ แช่แข็ง			
		UV-VIS Spectrophotometry	เลือด	10 มิลลิลิตร	แช่เย็น			ตรวจพบ/ ตรวจไม่พบ *หากตรวจพบจะรายงานปริมาณที่ตรวจพบในหน่วย mg/L หรือ ppm
	Urea	Spectrophotometry	น้ำ	100 - 500 มิลลิลิตร	แช่เย็น	10 ตัวอย่าง/ สัปดาห์	7 วันทำการ	ปริมาณที่ตรวจพบในหน่วยเปอร์เซ็นต์, mg/L
			อาหารสัตว์	200 กรัม	อุณหภูมิปกติ/ แช่เย็น			ปริมาณที่ตรวจพบในหน่วยเปอร์เซ็นต์
			อาหารในกระเพาะ	100 กรัม	แช่แข็ง			
	Nitrate		พืชอาหารสัตว์	500 กรัม	อุณหภูมิปกติ/ แช่เย็น			ปริมาณที่ตรวจพบหน่วยเป็น mg/kg

บทที่ 3

เทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาสารพิษสำหรับห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคสัตว์

ในการชันสูตรโรคสัตว์ สารพิษถือเป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญที่ส่งผลให้เกิดการเจ็บป่วยหรือการตายโดยไม่ทราบสาเหตุ โดยเฉพาะในกรณีที่สัตว์เลี้ยง สัตว์เศรษฐกิจ หรือสัตว์ป่าได้รับสารพิษจากสิ่งแวดล้อม อาหาร น้ำ หรือยารักษาโรค การวินิจฉัยหาสารพิษที่เป็นสาเหตุของโรคจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการรักษา การสอบสวนโรค การป้องกันโรคในระดับฟาร์มหรือพื้นที่การเกษตร และการกำหนดมาตรการความปลอดภัยด้านสุขภาพสัตว์ ซึ่งในห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคสัตว์ทางด้านพิษวิทยา เทคนิคการวิเคราะห์สารพิษมีความหลากหลายและมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง โดยสามารถจำแนกได้ตั้งแต่เทคนิคขั้นพื้นฐาน เช่น การตรวจสอบเชิงคุณภาพ (qualitative tests) หรือการทดสอบการเกิดสี (color test) ไปจนถึงเทคนิคขั้นสูงที่ให้ความแม่นยำสูง เช่น High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Gas Chromatography (GC), Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, (LC-MS/MS), UV-Vis Spectrophotometry เป็นต้น

การเลือกใช้เทคนิคใดในการตรวจวิเคราะห์หาสารพิษขึ้นอยู่กับ 1) ชนิดของตัวอย่าง เช่น เลือด ปัสสาวะ อวัยวะภายใน และอาหารในกระเพาะ เป็นต้น 2) ชนิดสารพิษที่ตรวจหรือคาดว่าจะพบ เช่น สารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ โลหะหนัก ยาสัตว์ 3) ความไวและความจำเพาะของวิธีการ และ 4) ข้อจำกัดด้านงบประมาณและทรัพยากรของห้องปฏิบัติการ โดยในกรณีเร่งด่วน screening test ที่ให้ผลรวดเร็ว เช่น color test หรือ Thin layer Chromatography (TLC) อาจใช้เป็นวิธีเบื้องต้น ก่อนทำการยืนยันผลหรือตรวจหาปริมาณด้วยเทคนิคขั้นสูงต่อไป

ดังนั้น ความเข้าใจในหลักการ ข้อดี/ข้อเสียหรือข้อจำกัดของแต่ละเทคนิค รวมถึงการประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมกับสถานการณ์จริงในห้องปฏิบัติการชันสูตรด้านพิษวิทยาจึงเป็นหัวใจสำคัญของการตรวจวิเคราะห์สารพิษ เพื่อสนับสนุนการชันสูตรโรคและการวินิจฉัยโรคในสัตว์ที่ได้รับสารพิษได้อย่างมีประสิทธิภาพ

3.1 การทดสอบการเกิดสี (Color test or spot test)

Color test เป็นหนึ่งในเทคนิคการวิเคราะห์เชิงคุณภาพที่ใช้ในงานหลายด้าน เช่น พิษวิทยาเชิงวิเคราะห์ นิติวิทยาศาสตร์ และเภสัชวิทยา เป็นต้น เพื่อคัดกรองและระบุเบื้องต้นสารพิษหรือสารต้องสงสัยที่อยู่ในกลุ่มยาเสพติด สารเคมีอันตราย หรือสารอนินทรีย์บางชนิด การทดสอบนี้อาศัยปฏิกิริยาเคมีระหว่างสารวิเคราะห์กับน้ำยาทดสอบ (reagent) ที่เหมาะสมแล้วก่อให้เกิดสีเฉพาะตัว สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า และใช้เป็นตัวบ่งชี้ชนิดของสารได้

Color test ส่วนใหญ่ใช้สำหรับทดสอบสารพิษในตัวอย่างปัสสาวะ อาหารในกระเพาะ และตัวอย่างจากที่เกิดเหตุ สารพิษหลายชนิดที่อยู่ในตัวอย่าง หากมีปริมาณเพียงพอและไม่มีสารรบกวนในการทดสอบ สามารถให้สีที่มีลักษณะเฉพาะได้เมื่อทำปฏิกิริยากับ reagent ที่เหมาะสม การทดสอบการเกิดสีบางวิธีให้ผลเฉพาะเจาะจงกับสารแต่ละชนิด แต่โดยทั่วไปแล้วสารที่มี functional group คล้ายกันก็สามารถทำปฏิกิริยาได้เช่นกัน ดังนั้นในการทดสอบการเกิดสีบางครั้งอาจเกิดการรบกวนจากสารพิษชนิดอื่น เมแทบอไลต์ หรือสารปนเปื้อนอื่น ๆ ในตัวอย่างได้

ข้อดี

- ใช้งานง่ายและรวดเร็ว ใช้เวลาทดสอบเพียงไม่กี่นาที
- ต้นทุนต่ำ ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือวิเคราะห์ขั้นสูง
- เหมาะสำหรับการคัดกรองเบื้องต้น โดยเฉพาะในภาคสนามหรือห้องปฏิบัติการที่มีข้อจำกัดด้านทรัพยากร
- ตรวจสารพิษได้หลายชนิด เพราะมี reagent หลากหลายชนิดสำหรับทดสอบสารในกลุ่มต่าง ๆ

ข้อเสีย

- ขาดความจำเพาะ เนื่องจากสารที่มีโครงสร้างคล้ายกันอาจให้ผลสีเดียวกัน ทำให้เกิด false positive ได้
- การทดสอบมีความไวต่ำ และมักใช้ได้กับตัวอย่างที่มีปริมาณสารพิษมาก เช่น ปัสสาวะหรือสารตกค้างจากกระเพาะอาหาร แม้สามารถสกัดสารพิษจาก biological fluids แล้วนำมาทดสอบได้ แต่โดยทั่วไปไม่ทำกับตัวอย่างเหล่านี้ เนื่องจากความเสี่ยงต่อผลลบลวง
- ไม่สามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ ใช้บอกได้เพียงว่ามีหรือไม่มีสารเท่านั้น
- ผลขึ้นอยู่กับการสังเกตของผู้ทดสอบ เนื่องจากการรับรู้สีของแต่ละคนแตกต่างกัน สีที่เกิดขึ้นอาจมีความเข้มไม่เท่ากัน มีโอกาสเกิดความคลาดเคลื่อนสูงหากไม่ใช้มาตรฐานในการเปรียบเทียบสี

Color test สามารถทำได้ในหลอดแก้วใส แต่การใช้ spotting tile หรือกระเบื้องพอร์ซเลนเคลือบขาวที่มีหลุมตื้น ๆ (porcelain tile) จะให้พื้นหลังสม่ำเสมอ ช่วยให้ประเมินสีได้แม่นยำยิ่งขึ้น และใช้ reagent ในปริมาณน้อยลง ในการวิเคราะห์หาสารพิษด้วยวิธี Color test สิ่งสำคัญที่ต้องทำการวิเคราะห์ไปพร้อมกับตัวอย่างคือ 1) reagent blank เป็นตัวอย่างที่เหมาะสม และทราบแน่ชัดว่าไม่มีสารที่สนใจหรือต้องการทดสอบ เช่น หากทำการทดสอบในปัสสาวะ ควรใช้ปัสสาวะที่ปราศจากสารที่ต้องการวิเคราะห์หรือใช้น้ำกลั่นที่ไม่มีไอออน 2) positive control เป็นตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม หากใช้ปัสสาวะควรเป็นของสัตว์ที่รับสารพิษชนิดนั้น แต่หากหาไม่ได้ ให้ใช้ blank urine หรือปัสสาวะที่ไม่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์ จากนั้นเติมสารที่ต้องการวิเคราะห์ในปริมาณที่ทราบลงไป

3.2 Thin Layer Chromatography (TLC)

Thin-layer chromatography (TLC) เป็นเทคนิคโครมาโทกราฟีเชิงดูดซับแบบ solid-liquid adsorption chromatography เช่นเดียวกับ Column chromatography ต่างกันตรงที่ว่า Column chromatography นั้นปล่อยให้ตัวทำละลายไหลลงซึ่งเป็นแบบ descending แต่ TLC จะให้ตัวทำละลายไหลขึ้นเป็นแบบ ascending TLC ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย เนื่องจากใช้วัสดุและอุปกรณ์น้อย ประหยัดเวลาและต้นทุน ให้ข้อมูลเชิงคุณภาพได้ดี ใช้ตัวอย่างในปริมาณเพียงไม่กี่ไมโครกรัมก็เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์หนึ่งครั้งอย่างมีประสิทธิภาพ โดย TLC เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการของการดูดซับระหว่างเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) บนแผ่นรองรับ โดยเฟสอยู่กับที่จะมีตัวดูดซับ (absorbent) ซึ่งมักเป็นซิลิกาเจล (SiO_2) เคลือบบางๆอยู่บนแผ่นรองรับที่เป็นแก้ว อะลูมิเนียม หรือพลาสติก และเฟสเคลื่อนที่จะเป็นตัวทำละลายหรือสารละลายผสมที่เคลื่อนที่ผ่านชั้นซิลิกาของเฟสอยู่กับที่ เพื่อพาสารตัวอย่างที่เป็นสารผสมให้แยกจากกันตามคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมี เช่น ความมีขั้วและแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุล TLC เป็นเทคนิคที่เหมาะสำหรับใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ ใช้แยกองค์ประกอบในสารผสม ตรวจสอบเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของสารประกอบ ติดตามความคืบหน้าของปฏิกิริยาเคมี เตรียมแยกสารในปริมาณน้อย รวมถึงใช้พิสูจน์สาร โดยเปรียบเทียบ Rf ของสารตัวอย่างกับตัวอย่างแท้ (authentic sample) หรือสารมาตรฐาน อีกทั้งสามารถใช้กับตัวอย่างหลากหลายชนิดได้ เช่น อาหารในกระเพาะ ตับ ไต เลือด ปัสสาวะ พืชอาหารสัตว์ น้ำ ดิน และวัตถุต้องสงสัย เป็นต้น

3.2.1 องค์ประกอบสำคัญของระบบ TLC

1) แผ่นรองรับสำหรับเฟสอยู่กับที่ (supports for stationary phase)

- แผ่นกระจก: เป็นแผ่นรองรับที่มีความแข็งแรงสูง มีความแข็งแกร่ง โปร่งใส ทนทานต่อสารเคมี และมีเสถียรภาพต่อความร้อนได้ดี สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ ทำให้มีความคุ้มค่า ลดงบประมาณ อย่างไรก็ตาม แผ่นกระจกมีน้ำหนักมากและมีความหนา ไม่สามารถตัดให้ได้ขนาดตามต้องการได้อย่างง่ายดาย อีกทั้งแผ่นกระจกยังมีความเปราะบางและแตกหักได้ง่าย จึงมีประเด็นเรื่องความปลอดภัยที่ต้องพิจารณา
- แผ่นอลูมิเนียม: ถือเป็นวัสดุที่เหมาะสมที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุรองรับอื่น ๆ สำหรับแผ่น TLC โดยเมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นกระจก อลูมิเนียมมีความบาง เบา และจับถือสะดวก สามารถตัดให้ได้ขนาดที่ต้องการด้วยกรรไกร และสามารถเก็บไว้ในสมุดแลบได้อย่างสะดวก นอกจากนี้ แผ่นอลูมิเนียมยังมีคุณสมบัติในการยึดติดกับชั้นดูดซับได้ดี และเหมาะสำหรับใช้งานร่วมกับตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นของน้ำสูง อย่างไรก็ตาม แผ่นอลูมิเนียมมีความต้านทานต่อสารเคมีต่ำกว่ากระจก โดยเฉพาะต่อสารที่มีฤทธิ์กัดกร่อนสูง เช่น กรดแก่ แอมโมเนียเข้มข้น หรือไอโอดีน (กล่าวคือ ไม่สามารถทนต่อการสัมผัสไอโอดีนเป็นเวลานานภายใน iodine chamber ได้)
- แผ่นพลาสติก: แผ่นฟิล์ม polyethylene terephthalate (PET) ปัจจุบันมีแนวโน้มในการใช้งานน้อยลง แม้ว่าจะมีข้อดีคล้ายกับแผ่นอะลูมิเนียม เช่น ความบาง เบา จับถือสะดวก และสามารถตัดได้ง่าย แต่ข้อเสียที่สำคัญคือมีความยืดหยุ่นสูงเกินไป (ชั้นดูดซับอาจแตกร้าวได้ง่าย) และไม่ทนต่อความร้อน

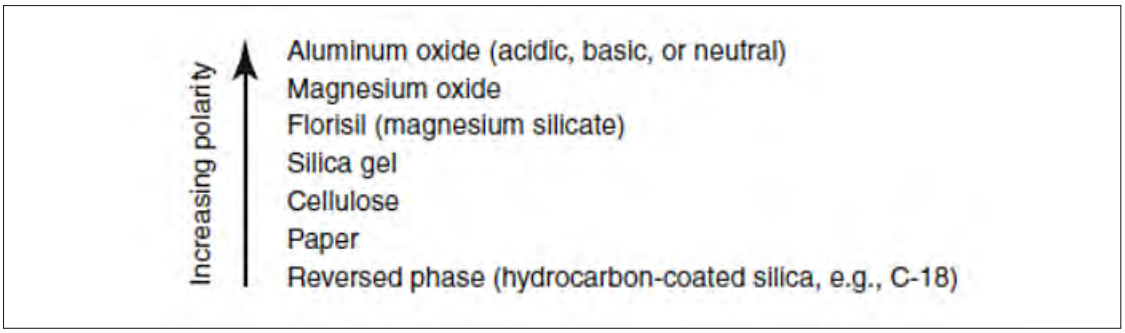
2) ตัวดูดซับ (absorbent) และเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) การเคลือบด้วยซิลิกามาตรฐาน (silica 60 ซึ่งมีขนาดรูพรุนเฉลี่ย 60 Å) เป็นตัวดูดซับที่ใช้งานกันอย่างแพร่หลายในเทคนิค TLC อย่างไรก็ตาม สำหรับสารบางชนิดที่ไวต่อการสลายตัว อาจเลือกใช้ตัวดูดซับที่มีความสามารถในการดูดซับต่ำกว่า เช่น aluminum oxide เพื่อหลีกเลี่ยงการสลายตัวของสารตัวอย่าง นอกจากนี้ ในช่วงเริ่มต้นของการพัฒนาเทคนิคนี้ ยังมีการรายงานการใช้ cellulose, polyamide และ florisil (magnesium silicate) เป็นชั้นดูดซับด้วยเช่นกัน ในการเลือกชนิดของตัวดูดซับ

ควรพิจารณาจากคุณสมบัติของสารที่ต้องการแยก ได้แก่1) ความสามารถในการละลายของสารตัวอย่าง ว่าเป็นสารที่ชอบน้ำ (hydrophilic) หรือชอบไขมัน (hydrophobic) 2) ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับตัวดูดซับหรือกับตัวทำละลายเคลื่อนที่ จากเกณฑ์ดังกล่าว จึงมีคำแนะนำทั่วไปสำหรับการเลือกใช้ชนิดของตัวดูดซับ ดังนี้

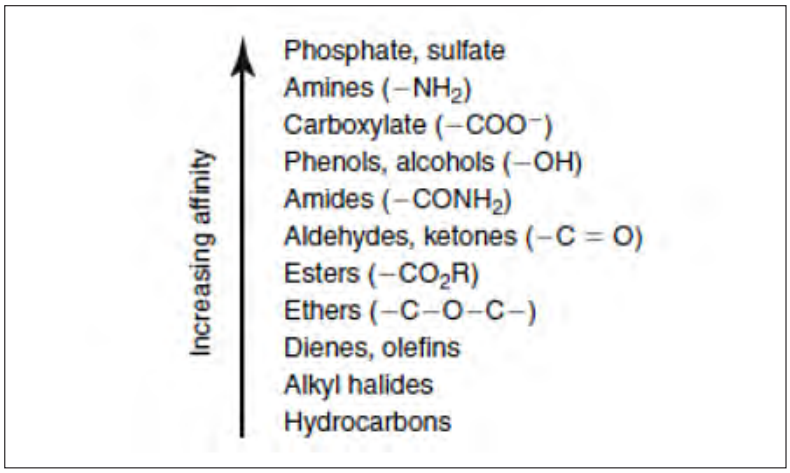
➢ สำหรับสารที่มีลักษณะชอบไขมัน (lipophilic substances) ควรใช้ silica, aluminum oxide, acetylated cellulose หรือ polyamide

➢ สำหรับสารที่มีลักษณะชอบน้ำ (hydrophilic substances) ควรใช้ cellulose, cellulose ion exchangers, polyamide และ reversed-phase silica

ชนิดของเฟสอยู่กับที่ใน TLC มีหลายประเภท โดยสามารถจัดลำดับตามความมีขั้ว (polarity) (รูปที่ 3-1) และการเกิดสัมพรรคภาพ (affinity) ของหมู่ฟังก์ชันทั่วไปกับ silica gel (รูปที่ 3-2) แผนภาพทั้งสองนี้มีประโยชน์อย่างยิ่งในการช่วยคาดการณ์ลำดับของการแยกสาร หากใช้ตัวดูดซับที่มีขั้วสูง เช่น silica gel จะพบว่า สารที่มีขั้วสูงจะเคลื่อนที่ช้ากว่าหรือไม่เคลื่อนที่ เนื่องจากจะถูกจับอยู่กับตัวดูดซับบนแผ่น TLC ในขณะที่สารที่มีขั้วน้อยหรือพวก nonpolar จะเคลื่อนที่เร็วกว่า จะถูกพาขึ้นไปตอนบนของแผ่น TLC การเคลื่อนที่ของสารที่เป็น nonpolar จึงเป็นไปได้ไวกว่าสารที่มีขั้วสูง ทำให้แยกสารออกจากกันได้ ซึ่งบนแผ่น TLC จะเห็น Chromatogram ของสารที่เป็น nonpolar อยู่สูงกว่าหรือให้ค่า Rf มากกว่าสารที่มีขั้วสูง



รูปที่ 3-1 แสดงความมีขั้วชนิดของเฟสอยู่กับที่ชนิดต่าง ๆ ของ TLC
ที่มา: Cai (2014)

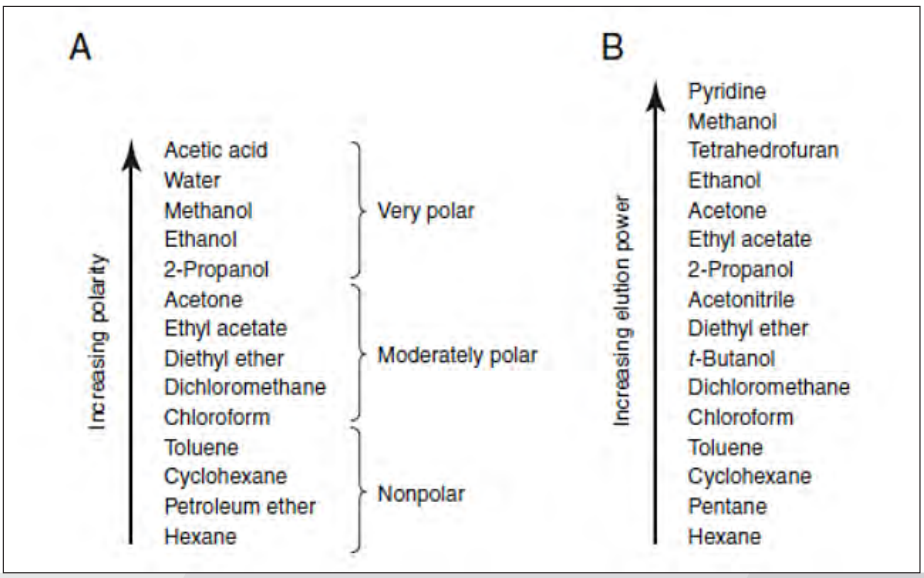


รูปที่ 3-2 แสดงการเกิดสัมพรรคภาพของ functional group ต่าง ๆ กับเฟสอยู่กับที่ชนิด silica gel
ที่มา: Cai (2014)

3) เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) การหาตัวทำละลายหรือระบบเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมถือเป็นขั้นตอนที่ยากที่สุดในกระบวนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC และเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลมากที่สุดต่อผลการแยกสาร ในบางกรณีเท่านั้นที่สามารถใช้ตัวทำละลายเพียงชนิดเดียวได้ โดยทั่วไปมักใช้ระบบผสมของตัวทำละลายตั้งแต่สองถึงห้าชนิดร่วมกัน ไม่ว่าจะมีองค์ประกอบกี่ชนิด mobile phase ที่เตรียมขึ้นจะต้องเป็นระบบเนื้อเดียว (homogeneous) โดยไม่ปรากฏความขุ่นหรือแยกชั้น

การเลือกตัวทำละลายพิจารณาจากเกณฑ์หลัก 3 ประการ ได้แก่ ความสามารถในการละลาย (solubility), การเกิดสัมพรรคภาพ (affinity), และประสิทธิภาพในการแยก (resolution) ขั้นตอนแรกของการเลือก mobile phase คือการประเมินความสามารถในการละลายของสารตัวอย่าง โดย mobile phase ที่เหมาะสมควรสามารถละลายสารตัวอย่างได้ดี และมีความสมดุลระหว่างความชอบของสารต่อ mobile phase และ stationary phase เพื่อให้ได้การแยกที่ชัดเจน ประสิทธิภาพในการแยกจะดีขึ้นเมื่อสามารถปรับความสัมพันธ์ระหว่างสาร ตัวทำละลาย และ stationary phase ได้อย่างเหมาะสม โดยทั่วไป ระบบ mobile phase ที่ใช้ใน TLC ประกอบด้วยตัวทำละลายที่มีขั้ว (polar solvent) และตัวทำละลายที่มีขั้วน้อย (less polar solvent) ในรูปที่ 3-3 แสดงรายชื่อของตัวทำละลายที่ใช้เป็น mobile phase ตามลำดับความมีขั้วและความสามารถในการชะ (elution power) โดยใช้ซิลิกา 60 เป็นเฟสอยู่กับที่ โดยมีการระบุระบบเฟสเคลื่อนที่ที่มักใช้ร่วมกับซิลิกาเจลในการแยกสารอินทรีย์ เช่น

- Hexane (or petroleum ether)/ethyl acetate
- Dichloromethane (or chloroform)/methanol
- Pentane/ether
- Petroleum ether/acetone
- Hexane/dichloromethane
- Dichloromethane/ethyl acetate
- Ethyl acetate/methanol
- Toluene/acetonitrile
- Water/methanol (for C18-reversed phase silica)
- Water/acetonitrile (for C18-reversed phase silica)



รูปที่ 3-3 A คือ ตัวทำละลายที่ใช้เป็น mobile phase ซึ่งพบได้บ่อย จัดเรียงตามลำดับความมีขั้วที่เพิ่มขึ้น
B คือ ความสามารถในการชะ (elution power) ของตัวทำละลายเมื่อใช้ซิลิกาเจลเป็น stationary phase
ที่มา: Cai (2014)

แนวทางง่ายที่สุดในการเริ่มต้นพัฒนา mobile phase คือการค้นหาเงื่อนไขที่เคยใช้กับสารที่มีโครงสร้างคล้ายกันจากแหล่งอ้างอิง พร้อมทั้งพิจารณาความชอบหรือสัมพรรคภาพของสารต่อ silica (รูปที่ 3-2) และความสามารถในการชะของตัวทำละลาย (รูปที่ 3-3) เพื่อปรับ mobile phase ให้เหมาะสม หากไม่มีข้อมูลระบบ mobile phase ที่เคยรายงานไว้ แนะนำให้เริ่มต้นด้วยระบบที่มีขั้วน้อย เช่น Hexane/ethyl acetate แล้วสังเกตผลการแยก หากสารไม่เคลื่อนที่หรือเคลื่อนที่น้อยมากบนแผ่น TLC ให้เพิ่มปริมาณหรือตัวทำละลายที่มีขั้ว (polar solvent) มากขึ้นในระบบ เช่น เพิ่มสัดส่วน ethyl acetate แล้วเปรียบเทียบการแยกของสารกับแผ่นที่ดำเนินการไปก่อนหน้า ถ้า spot ของสารยังคงอยู่แถว original spot หรือจุดเริ่มต้น ให้เปลี่ยนไปใช้ระบบที่มีขั้วสูงขึ้น เช่น Dichloromethane/methanol ในทางกลับกัน หากสารเคลื่อนที่ไปใกล้ solvent front (หรือมีค่า $R_f > 0.8$) ให้เพิ่มตัวทำละลายที่มีขั้วน้อย (nonpolar solvent) หรือเปลี่ยนไปใช้ระบบที่มีขั้วน้อยกว่า เช่น Pentane/ether ในการพัฒนาเทคนิคในครั้งแรกมักจะมีการทดลองระบบ mobile phase ตั้งแต่ 3–6 ชุด โดยทั่วไปการเปลี่ยนตัวทำละลายที่มีขั้วมากมักส่งผลต่อประสิทธิภาพในการแยก (resolution) ขณะที่การเปลี่ยนตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยมักส่งผลต่อค่า Rf ของสารตัวอย่าง

โดยทั่วไปแผ่น TLC ที่ใช้ มี 2 แบบให้เลือกใช้ตามความต้องการของห้องปฏิบัติการ คือ

1) แบบที่เตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ

ข้อดี

- ปรับแต่งชนิดของสารดูดซับ ความหนา หรือสารเติมแต่งได้ตามความเหมาะสม
- ประหยัดค่าใช้จ่าย โดยเฉพาะในห้องปฏิบัติการที่มีงบประมาณจำกัด
- เหมาะสำหรับงานวิจัยพื้นฐานหรือทดลองทางการศึกษา

ข้อเสีย

- ความไม่สม่ำเสมอของชั้นสารดูดซับอาจทำให้ความสามารถในการแยกสารลดลง
- ความเหนียวและความยึดติดของชั้นซิลิกาอาจต่ำกว่าแบบสำเร็จรูปทำให้แผ่นแตกร้าวหรือหลุดล่อนง่าย

2) แบบสำเร็จรูป

แผ่น TLC แบบสำเร็จรูปที่ผลิตในเชิงพาณิชย์มักผ่านกระบวนการควบคุมคุณภาพอย่างเข้มงวด มีความหนาของชั้นซิลิกาและความสม่ำเสมอของชั้นดูดซับสูง อีกทั้งสามารถเลือกชนิดของสารดูดซับ (เช่น silica gel 60 F_{254}) ความหนา pH ตัวบ่งชี้ UV และวัสดุรองรับ (กระจก อลูมิเนียม พลาสติก) ได้ตามวัตถุประสงค์ รวมถึงมีให้เลือกใช้หลายขนาด เช่น 5x20, 10x10 หรือ 20x20 เซนติเมตร (ซม.) เป็นต้น

ข้อดี

- ความสม่ำเสมอสูง ส่งผลให้ผลการแยกสารมีความเที่ยงตรงและแม่นยำ
- ความสามารถในการทำซ้ำสูง เหมาะสำหรับงานวิเคราะห์ที่ต้องการความน่าเชื่อถือ
- มีหลายรูปแบบให้เลือก เช่น UV254, fluorescence, Reversed Phase Thin Layer Chromatography (RP-TLC), High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) เป็นต้น
- ประหยัดเวลาและลดภาระในการเตรียมแผ่น

ข้อเสีย

- ราคาสูงกว่าการเตรียมเอง
- ไม่สามารถปรับแต่งส่วนประกอบได้มากนัก

3.2.2 ขั้นตอนการดำเนินการของ TLC

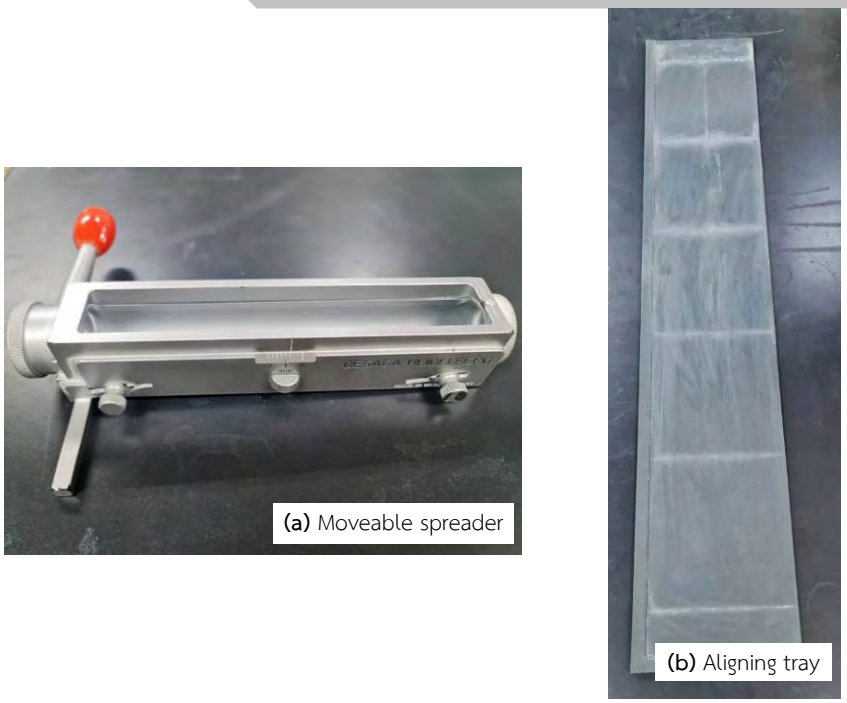
3.2.2.1 การเตรียมแผ่น TLC

1) อุปกรณ์และสารเคมี

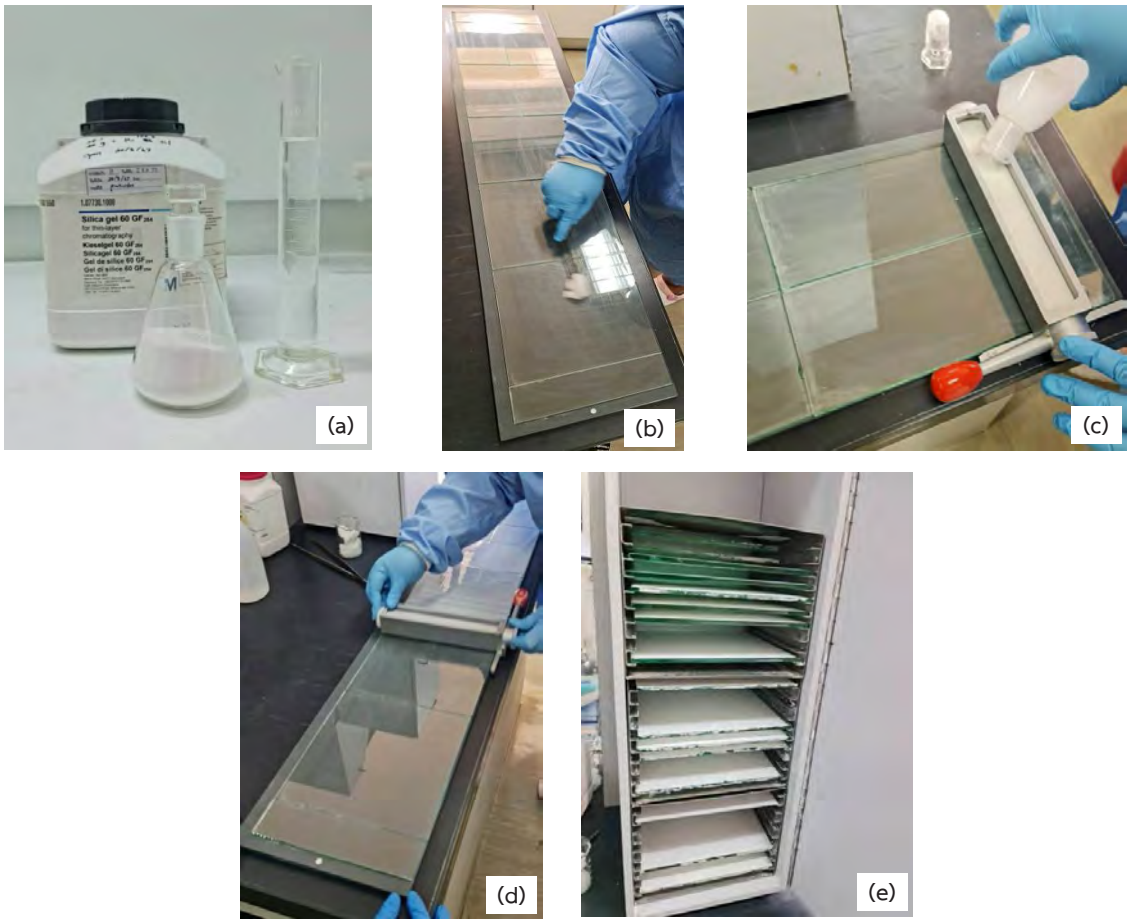
- Moveable spreader (รูปที่ 3-4 a)
- แผ่นรองสำหรับ coat plate (Aligning tray) (รูปที่ 3-4 b)
- แผ่นกระจกหนา 0.4 มม. ขนาด 5x20, 10x10 หรือ 20x20 ซม.
- Erlenmeyer flask ขนาด 300 ml
- กระบอกตวง ขนาด 100 ml
- ผ้าสะอาดสำหรับเช็ดกระจก
- Rack อลูมิเนียมใส่แผ่น TLC สำหรับอบ
- Hot air oven
- ตู้เก็บ TLC plate
- Silica gel 60 GF254 (ซิลิกาที่มีความละเอียดสูง particle size ~5–40 µm, pore size ~60 Å มี fluorescent indicator ที่เรืองแสงภายใต้ UV ที่ 254 nm และมี calcium sulfate ($CaSO_4$) ~10–15% ทำหน้าที่ยึดเกาะซิลิกากับแผ่นกระจก)
- Acetone (AR grade)
- น้ำกลั่น

2) วิธีการ coat plate (รูปที่ 3-5)

- **เต**รียมแผ่นกระจกขนาด 20x20 ซม. จำนวน 5 แผ่น วางลงบน Aligning tray เช็ดกระจกด้วย acetone ให้สะอาด
- ชั่ง Silica gel 60 GF254 มา 57 กรัม ลงใน Erlenmeyer flask แล้วเติมน้ำกลั่น 120 ml ปิดจุก flask เขย่าแรงๆ นาน 5 นาที จากนั้นเทลงใน Moveable spreader ที่ปรับตั้งความหนา 0.75 มม.
- ค่อยๆลาก Moveable spreader ไปข้างหน้าจนสุดทาง นำ plate ออกจาก tray ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที แล้วนำไปใส่ใน rack อลูมิเนียม
- อบใน Hot air oven ที่อุณหภูมิ 110°C นาน 30 นาที นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้ plate เย็น แล้วเก็บทั้ง rack ไว้ในตู้เก็บ TLC plate



รูปที่ 3-4 อุปกรณ์สำหรับ coat plate

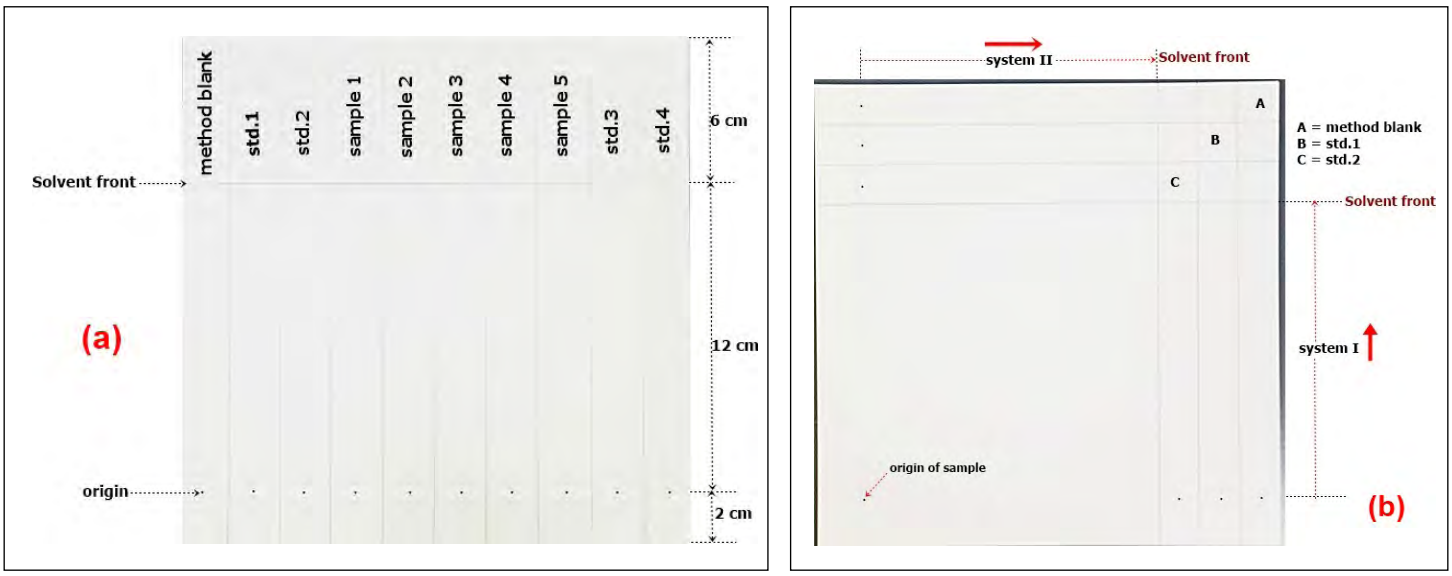


รูปที่ 3-5 วิธีการ coat plate (a) Silica gel 60 GF_{254} และน้ำกลั่น (b) เช็ดกระจกด้วย acetone (c) เท Silica gel 60 GF_{254} ที่ผสมด้วยน้ำกลั่นลงใน Moveable spreader (d) ค่อยๆลาก Moveable spreader ไปข้างหน้าสุดทาง และ (e) TLC ที่อบเรียบร้อยแล้ว เก็บในตู้เก็บ TLC plate

3) การเตรียมแผ่น TLC เพื่อตรวจวิเคราะห์

นำแผ่น TLC ที่เคลือบใช้เอง (silica gel 60 GF_{254} ขนาด 20×20 เซนติเมตร) หรือแบบสำเร็จรูป (silica gel 60 F_{254} ขนาด 20×20 เซนติเมตร) อบที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนการใช้งาน ทำการแบ่งเพลทเป็นช่อง ความกว้างช่องละไม่เกิน 2 เซนติเมตร (ตามความเหมาะสมของจำนวนตัวอย่างและสารมาตรฐานที่ทำการตรวจวิเคราะห์) ให้จุดเริ่มต้นห่างจากขอบล่าง 2 เซนติเมตร วัดระยะห่างจากจุดเริ่มต้นถึงขีดระดับที่กำหนดไว้ 12 เซนติเมตร เป็นการเตรียมเพลท สำหรับวิเคราะห์สารพิษแบบ One-dimensional (1D) TLC (รูปที่ 3-6a) ซึ่ง 1D-TLC นี้จะใช้สำหรับในการแยกสารบนแผ่น TLC ด้วย mobile phase เพียงทิศทางเดียว โดยปกติจะหยด (spot) สารละลายตัวอย่างที่ “จุดเริ่มต้น” (origin) ใกล้ขอบล่างของแผ่น TLC แล้วปล่อยให้ mobile phase เคลื่อนที่ในแนวดิ่งขึ้นไปตามแรงแคปิลลารี เมื่อสิ้นสุดการเคลื่อนที่ที่ตำแหน่ง solvent front จะทำให้สารต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในสารละลายตัวอย่างแยกออกจากกันตามค่า Rf ที่แตกต่างกัน ส่วน Two-dimensional (2D) TLC (รูปที่ 3-6b) เป็นการเตรียมแผ่น TLC เพื่อใช้ในการแยกสารแบบสองทิศทาง โดยเริ่มจากการทำ 1D-TLC ก่อน โดยใช้ mobile phase (System I) ในการ develop แผ่น TLC เมื่อ mobile phase เคลื่อนที่ถึงตำแหน่ง solvent front แล้วนำแผ่น TLC ออกมาจาก TLC chamber ทิ้งไว้ใน Fume hood เพื่อให้ solvent ระเหยแห้ง จากนั้นหมุนแผ่น TLC ไป 90 องศา แล้ว develop แผ่น TLC อีกครั้งด้วย mobile phase อีกชุดที่แตกต่างจาก 1D-TLC วิธีนี้มีประโยชน์คือ

- ช่วยเพิ่มความสามารถในการแยกสารที่ซ้อนทับกันใน 1D-TLC
- ช่วยแยกสารที่มีค่า Rf ใกล้เคียงกันในระบบเดียว
- เพิ่มความละเอียดของการแยกสารในตัวอย่างที่ซับซ้อน เช่น ตับ ไต เลือด ปัสสาวะ พืชอาหารสัตว์ อาหารสัตว์สำเร็จรูป อาหารในกระเพาะ ฯลฯ
- เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารพิษหลายชนิดที่มีโครงสร้างคล้ายกันในตัวอย่างเดียว
- ลดปัญหา matrix effect และการซ้อนทับของสาร



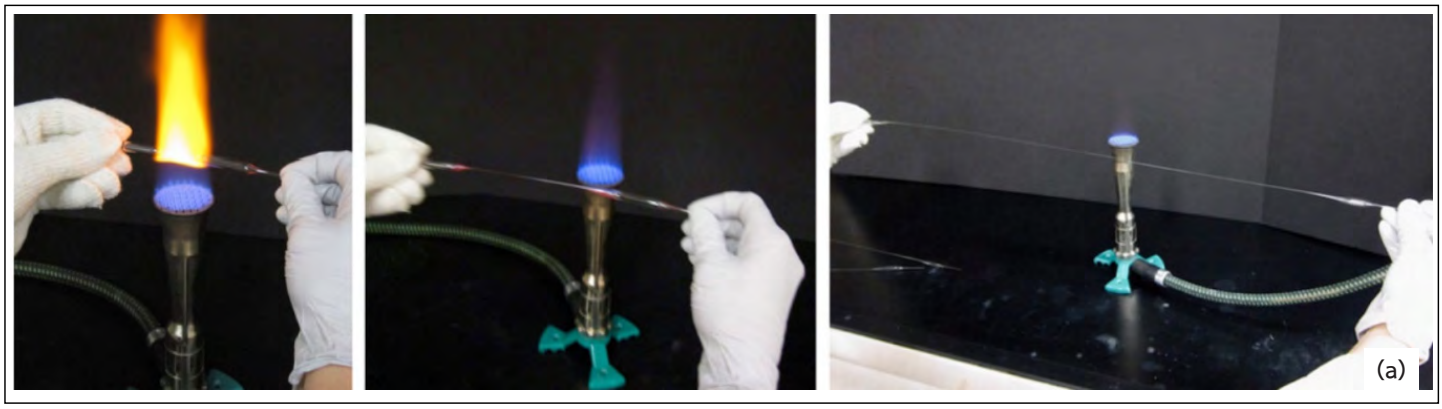
รูปที่ 3-6 การเตรียม TLC plate เพื่อตรวจวิเคราะห์สารพิษ (a) One-dimensional TLC (b) Two-dimensional TLC

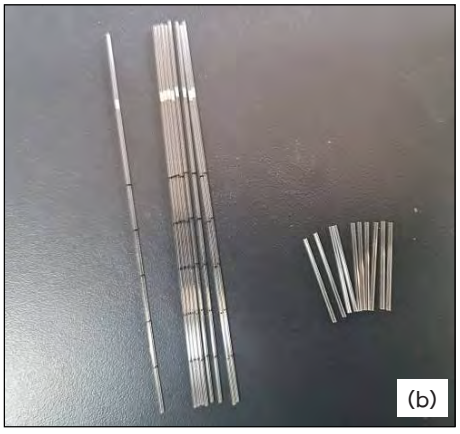
3.2.2.2 การหยดตัวอย่างลงบนแผ่น TLC (Application of samples)

หลอด capillary ที่ใช้ในการหยด หรือ spot ตัวอย่างลงบนแผ่น TLC มี 2 แบบ คือ

แบบที่ 1 ทำใช้เอง โดยการยืด Pasteur pipette ด้วยการจับปลาย Pasteur pipette ทั้งสองด้าน (ขณะทำควรสวมถุงมือหนาเพื่อความปลอดภัย) ให้ความร้อนบริเวณตรงกลางหลอดด้วยเปลวไฟของตะเกียงบุนเสน จนกระทั่งเนื้อแก้วเริ่มอ่อนตัว (แก้ว borosilicate จะเริ่มอ่อนตัวที่อุณหภูมิประมาณ 820 องศาเซลเซียส ซึ่งต้องใช้เวลาสักพัก) ในระหว่างที่หลอดอยู่ในเปลวไฟ ให้หมุนหลอดอย่างสม่ำเสมอ แต่ห้ามดึงหรือยืดหลอดขณะยังอยู่ในเปลวไฟ เมื่อหลอดเริ่มนิ่ม ให้ยกออกจากเปลวไฟทันที แล้วดึงหลอดออกอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ได้หลอดที่มีปลายเรียวยาว (รูปที่ 3-7a) จากนั้นสามารถหักส่วนปลายที่ดึงยืดแล้วออกเป็นท่อนยาวประมาณ 4-5 ซม. สำหรับใช้หยดสารลงบนแผ่น TLC ได้ตามต้องการ

แบบที่ 2 แบบสำเร็จรูป จากการผลิตขายในเชิงพาณิชย์ มีลักษณะเป็นหลอด capillary ชนิด end to end คือปลายเปิดทั้งสองทาง มีทั้งแบบที่มีและไม่มีสเกล (รูปที่ 3-7b) รวมถึงขนาดให้เลือกใช้ เช่น 2, 5, 10 µl เป็นต้น





รูปที่ 3-7 (a) แสดงการทำหลอด capillary ใช้เอง (ที่มา: Nichols, 2025) และ (b) หลอด capillary สำเร็จรูปแบบมีสเกลและไม่มีสเกล

ในการหยดตัวอย่างลงบนแผ่น TLC นั้น ถ้าตัวอย่างหรือสารมาตรฐานเป็นของแข็งให้ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม เช่น chloroform, acetone หรือ dichloromethane เป็นต้น ให้ได้ความเข้มข้นที่เพียงพอให้สามารถตรวจพบสารที่สนใจได้ โดยทั่วไปจะใช้ปริมาตรประมาณ 1–5 µl ซึ่งมีปริมาณสารละลายอยู่ในช่วง 1 ng ถึง 10 µg ต่อจุด แต่ถ้าสารมาตรฐานหรือตัวอย่างเป็นของเหลว หรือตัวอย่างอยู่ในรูปของสารละลายที่ได้จากการสกัดตัวอย่างก็สามารถหยดได้เลย โดยหยดสารลงบนแผ่น TLC ในรูปแบบของจุด (spot) ด้วยการใช้หลอด capillary

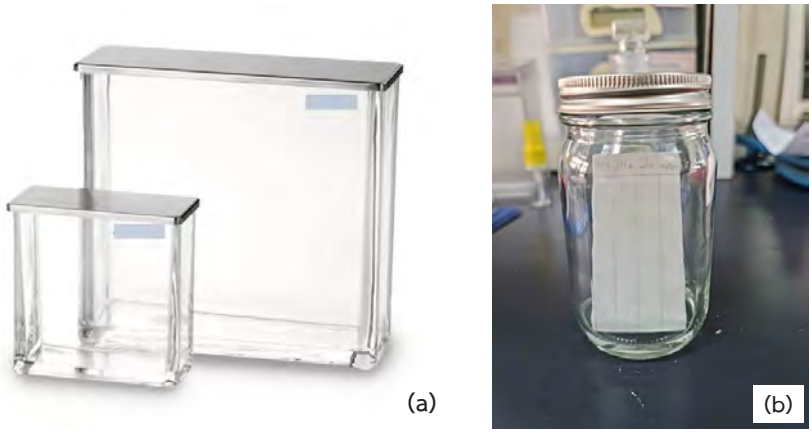
จุ่มลงไปในสารละลายตัวอย่าง แล้วนำไปหยดลงบนแผ่น TLC เบาๆ แล้วยกขึ้น สารละลายในหลอด capillary จะไหลลงสู่แผ่น TLC โดย capillary action พยายามให้สารละลายที่หยดลงไปมีเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ เพื่อให้การแยกสารมีประสิทธิภาพ จึงนิยมใช้เทคนิคการหยดซ้ำด้วยปริมาตรน้อยหลายครั้งที่ตำแหน่งเดิม ซึ่งการหยดซ้ำเพื่อให้สารเข้มข้นต้องรอให้สารที่หยดไปครั้งก่อนหน้านั้นแห้งก่อน เพื่อไม่ให้เส้นผ่านศูนย์กลางที่ได้กว้างเกินไป การระเหยของตัวทำละลายจากตัวอย่างควรระเหยจนหมดอย่างสมบูรณ์ เพื่อป้องกันไม่ให้สมรรถนะของเฟสเคลื่อนที่และตำแหน่งของ spot บนโครมาโตแกรมถูกเปลี่ยนแปลง การทำให้แห้งสามารถเร่งได้ด้วยการใช้เครื่องเป่าผมเป่าลมเย็นเบา ๆ ผ่านแผ่น TLC ในขณะหยดสาร โดยขนาดของจุดเริ่มต้น (initial spot size) สำหรับ TLC มักมีขนาดประมาณ 3–6 มิลลิเมตร ถ้าจุดเริ่มต้นมีปริมาณของสารตัวอย่างมากเกินไป จะทำให้เกิดการแยกของสารได้ไม่ดี มีลักษณะเป็นหาง (tailed zones) ในระหว่างกระบวนการจุ่มแช่แผ่น TLC

3.2.2.3 การ develop แผ่น TLC (Development of TLC plates)

ภาชนะที่ใช้สำหรับจุ่มแช่ หรือ develop แผ่น TLC เรียกว่า TLC chamber หรือ developing chamber ซึ่งมีทั้งที่ผลิตขายในเชิงพาณิชย์ให้เลือกใช้หลายขนาด (รูปที่ 3-8a) แต่ภาชนะทรงกระบอกก้นแบนที่มีปากกว้าง เช่น ขวดแก้วพร้อมฝาปิดที่มีขนาดพอเหมาะกับแผ่น TLC ก็สามารถใช้งานได้ดีเช่นกัน (รูปที่ 3-8b)

ขั้นตอนการ develop แผ่น TLC

- เตรียม developing solvent หรือ mobile phase เช่น ethyl acetate, hexane/acetone (3:2) หรือ mobile phase อื่น ๆ ตามความเหมาะสมกับสารที่ต้องการจะตรวจวิเคราะห์
- เติม mobile phase ที่เตรียมได้ลงใน TLC chamber ให้มีระดับความสูงจากก้น chamber ไม่เกิน 0.5 ซม. (ผนังภายใน chamber มีกระดาษกรองตัดให้พอดีกับภาชนะพิงอยู่ เพื่อช่วยส่งเสริมการสร้างภาวะอิ่มตัวของ mobile phase และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกสาร รวมถึงความสามารถในการทำซ้ำ) ตั้ง TLC chamber ทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที เพื่อให้ mobile phase ที่อยู่ภายใน chamber อิ่มตัว
- ค่อย ๆ หย่อนแผ่น TLC ที่ผ่านการหยดตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์แล้ว ลงใน TLC chamber โดยให้ด้านหลังของแผ่นส่วนบนพิงผนังด้านในของภาชนะที่มีกระดาษกรองบรรจุอยู่ และปิดฝาภาชนะทันที
- ตรวจสอบให้แน่ใจว่าจุดเริ่มต้น (origin) ของ spot ตัวอย่างหรือสารมาตรฐานอยู่สูงกว่าระดับของ mobile phase เพื่อป้องกันไม่ให้สารตัวอย่างหรือสารมาตรฐานละลายลงไปใน mobile phase



รูปที่ 3-8 (a) TLC chamber ที่ผลิตในเชิงพาณิชย์
ที่มา: https://www.carlroth.com/de/en/accessories-for-thin-layer-chromatography/flat-bottom-chamber-for-tlc-camag/p/1n66.1
(b) TLC chamber ที่เป็นขวดแก้วพร้อมฝาปิด

- ไม่ควรเปิดฝา TLC chamber ในระหว่างการ develop เพื่อรักษาสภาวะอิ่มตัวของไอสารละลาย สามารถสังเกตการเคลื่อนที่ของ mobile phase ที่เกิดขึ้นบนแผ่น TLC ไปยัง solvent front ผ่านผนังด้านข้างของ TLC chamber ได้โดยไม่ต้องเปิดฝา
- เมื่อ mobile phase เคลื่อนที่ไปถึง solvent front ให้เปิดฝาอย่างรวดเร็ว นำแผ่น TLC ออกมาตั้งทิ้งไว้ใน fume hood เพื่อให้ solvent ที่แผ่น TLC ระเหย หรือใช้เครื่องเป่าผมเป่า เพื่อทำให้แห้งก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการทำให้ spot ของสารปรากฏ หรือ การทำให้มองเห็นสาร (Visualization)
- หากไม่สามารถแยกสารได้ดีด้วยการ develop เพียงครั้งเดียว อาจใช้ develop หลายครั้ง โดยจะทำการ develop แผ่น TLC สองครั้งขึ้นไป โดยให้แผ่นแห้งระหว่างแต่ละรอบการ develop ทั้งนี้อาจใช้ชนิดของ mobile phase เดิมหรือต่างกันก็ได้

3.2.2.4 การทำให้ spot ของสารปรากฏ หรือ การทำให้มองเห็นสาร (Visualization)

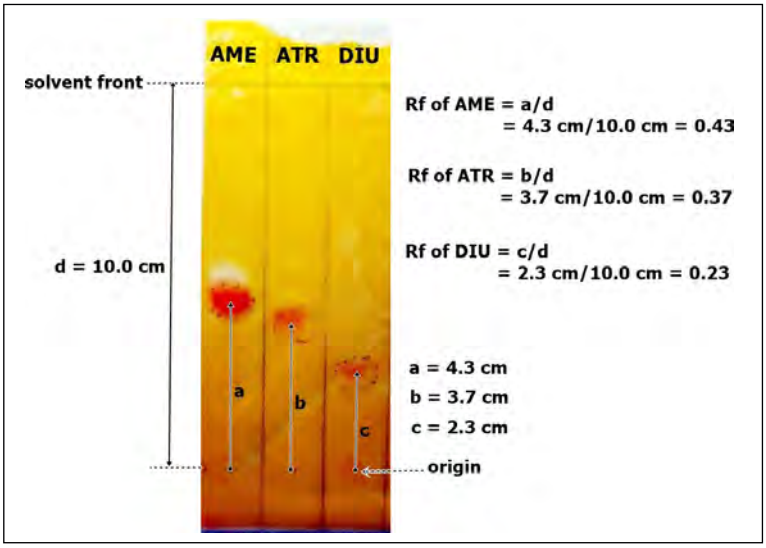
วิธีการตรวจสอบสารที่ผ่านการ develop มาแล้ว ไม่มีสีของ spot เกิดขึ้น มีหลายวิธี เช่น

- นำแผ่น TLC ไปส่องดูภายใต้แสง ultraviolet (UV 254 nm) ถ้าสารที่ต้องการตรวจสอบเป็นสารเรืองแสง จะมองเห็น spot ของสารบนแผ่น TLC สำหรับสารที่ไม่เรืองแสง การตรวจสอบสามารถทำได้โดยการเลือกใช้ชนิดของ TLC ที่มีตัวดูดซับผสมสารเรืองแสง เช่น silica gel GF254 (F แสดงว่ามีสารเรืองแสงผสมอยู่) สารเรืองแสงที่ผสมอยู่กับตัวดูดซับจะทำให้แผ่น TLC ปรากฏเป็นสีเขียวตลอดแผ่น เมื่อนำไปส่องใต้แสง ultraviolet แล้ว spot ของสารที่แยกบนแผ่น TLC จะปรากฏเป็นสีม่วงเข้มถ้าสารนั้นสามารถดูดแสง ultraviolet ให้วง spot ของสารเอาไว้ด้วยดินสอ
- นำแผ่น TLC ไปทำปฏิกิริยากับ spray reagent จำเพาะต่อสารนั้น ๆ เพื่อให้เกิดสีขึ้นมา ทำให้สามารถมองเห็น spot ของสารได้

3.2.2.5 การคำนวณค่า R_f (R_f value)

ค่า R_f (Retention factor หรือ Retardation factor) เป็นค่าที่ใช้ในการบันทึกข้อมูลการเคลื่อนที่ของสารในการทำ TLC โดยเป็นค่าคงที่ที่เกิดจากอัตราส่วนของระยะทางจากจุดเริ่มต้น (origin) ที่สารนั้นเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่สูงสุดที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ (solvent front) จากจุดเริ่มต้นเดียวกัน ตัวอย่างการคำนวณค่า Rf ของสารดังรูปที่ 3-9

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (ซม.)}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (ซม.)}}$$



รูปที่ 3-9 ตัวอย่างการคำนวณหาค่า R_f ของสารละลายมาตรฐานกำจัดวัชพืชชนิด ametryn (AME), atrazine (ATR) และ diuron (DIU) บนแผ่น TLC

ค่า R_f ของสารหนึ่งภายใต้สภาวะเดียวกันจะมีค่าคงที่ โดยค่า R_f จะเปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของตัวดูดซับ ชนิดของตัวทำละลาย และความหนาของตัวดูดซับที่เคลือบบนแผ่นรองรับ เป็นต้น โดยค่า R_f ที่เหมาะสมในการแยกสารอยู่ในช่วง 0.3–0.5 สำหรับการแยกที่ดี ควรเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน และดำเนินการในสภาวะเดียวกันเพื่อให้ได้ผลที่

แม่นยำ เมื่อหาค่า R_f ออกมาแล้ว ถ้าต้องการบ่งชี้ให้ชัดลงไปว่าเป็นสารชนิดนั้น ๆ ควรทำการทดสอบหรือตรวจวิเคราะห์ต่อด้วยวิธีอื่น ๆ เพื่อหาข้อมูลเพิ่มเติมและสนับสนุนว่าเป็นสารนั้นจริง (confirmation) เพราะสารสองชนิดอาจให้ค่า R_f ออกมาเท่ากันได้ เหมือนกับที่สารสองชนิดอาจมีจุดหลอมเหลวเท่ากันได้

3.2.2.6 ความปลอดภัยในการใช้เทคนิค TLC

- หลีกเลี่ยงการสูดดมฝุ่นซิลิกาเจลหรือตัวทำละลายอินทรีย์ที่ระเหยง่าย
- ใช้ตู้ดูดไอสารเคมีและอุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล (PPE) ทุกครั้ง

3.3 UV-Visible spectrophotometry

เทคนิค UV-Visible spectrophotometry เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการดูดกลืนแสงของสารในช่วงความยาวคลื่นที่ครอบคลุมบริเวณรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV, 200–400 nm) ไปจนถึงแสงที่ตามองเห็น (Visible, 400–800 nm) หรือแสงขาว โดยเครื่องมือที่ใช้ในการวัดคือ เครื่อง UV-Vis spectrophotometer ซึ่งทำหน้าที่ตรวจวัดค่าความเข้มของแสง (intensity) ที่ผ่านตัวอย่างภายใต้ความยาวคลื่นต่าง ๆ ทั้งในรูปของการส่องผ่าน การสะท้อน และการทะลุผ่านของแสง สารแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่เฉพาะเจาะจงในช่วงความยาวคลื่นที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถใช้คุณลักษณะดังกล่าวในการระบุชนิด (qualitative analysis) และปริมาณ (quantitative analysis) ของสารได้ โดยเฉพาะสารที่มีโครโมฟอร์ (chromophore) เช่น สารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อน และสารอนินทรีย์บางชนิด หลักการทำงานของเทคนิคนี้อาศัยปรากฏการณ์การดูดกลืนแสงซึ่งทำให้อิเล็กตรอนในอะตอมหรือโมเลกุลของสารได้รับพลังงานจากแสงและเกิดการกระตุ้น (excitation) ไปยังระดับพลังงานที่สูงขึ้น เมื่ออิเล็กตรอนคายพลังงานกลับสู่ระดับพลังงานเดิม จะมีการปลดปล่อยพลังงานในรูปของแสง ซึ่งเครื่องตรวจวัดจะบันทึกการเปลี่ยนแปลงของค่าความเข้มแสง ณ ความยาวคลื่นต่าง ๆ

การประมวลผลข้อมูลจากการวัดอาศัย กฎของ Beer-Lambert (Beer-Lambert's law) ซึ่งระบุว่าค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของสารภายในตัวอย่าง กล่าวคือ ค่า absorbance จะแปรผันตรงกับจำนวนโมเลกุลของสารที่สามารถดูดกลืนแสงได้ในความยาวคลื่นนั้นๆ

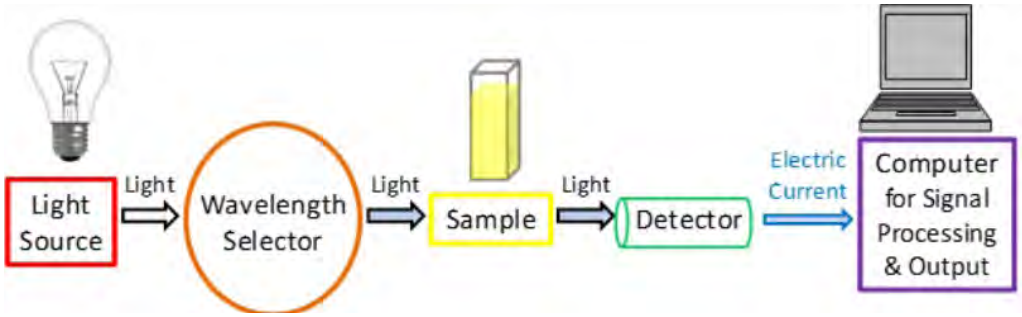
$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

โดยที่ A คือ ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance), ε คือ ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืน (molar absorptivity), b คือ ความยาวของเซลล์ตัวอย่าง (cm) และ c คือ ความเข้มข้นของสารละลาย (mol/L)

ดังนั้น เทคนิค UV-Visible spectrophotometry จึงเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สารในด้านต่าง ๆ ทั้งการระบุชนิดและการวัดปริมาณสารในตัวอย่างอย่างถูกต้องและแม่นยำ

3.3.1 ส่วนประกอบของเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (รูปที่ 3-10)

- แหล่งกำเนิดแสง (Light source) – ใช้หลอด Deuterium (ความยาวคลื่น UV), Tungsten (แสงที่ตามองเห็น) หรือ LED (Light Emitting Diode)
- อุปกรณ์คัดเลือกความยาวคลื่น (Wavelength selector) – มักใช้ monochromator (prism หรือ diffraction grating) เพื่อแยกความยาวคลื่น
- เซลล์ใส่ตัวอย่าง (Cuvette) – ทำจากควอตซ์หรือแก้วใส เพื่อให้แสงผ่านได้ในช่วงที่ต้องการ
- ตัวตรวจวัด (Detector) – เช่น photodiode หรือ photomultiplier ทำการวัดความเข้มของแสงหลังผ่านตัวอย่าง



รูปที่ 3-10 ส่วนประกอบของเครื่อง UV-Vis spectrophotometer
ที่มา: https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/uv-vis-spectroscopy-principle-strengths-and-limitations-and-applications-349865

UV-Vis spectrophotometer จำแนกประเภทของเครื่องมือออกเป็น 2 แบบหลัก ๆ คือแบบ Single Beam และ Double Beam ซึ่งมีหลักการทำงานและข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน ดังนี้

1. Single Beam UV-Vis Spectrophotometer หลักการทำงานในระบบ single beam แหล่งกำเนิดแสงจะส่องแสงผ่าน monochromator เพื่อเลือกช่วงความยาวคลื่น จากนั้นแสงที่ได้จะเดินทางผ่านเซลล์ใส่ตัวอย่าง (cuvette) ที่มีสารทดสอบอยู่ และเข้าสู่ detector เพื่อวัดระดับการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

ในการทำงานแบบ single beam เครื่องจะวัดค่าการดูดกลืนของตัวอย่าง (sample) เพียงอย่างเดียวในขณะนั้น หากต้องการวัดค่า blank (สารละลาย/ตัวทำละลายเปล่า ๆ) ผู้ใช้ต้องทำการวัดแยกต่างหากและใช้ค่าเหล่านี้เป็นการอ้างอิงในภายหลัง

ข้อดี

- โครงสร้างง่าย ราคาถูกกว่าระบบ double beam
- เหมาะสำหรับงานทั่วไปที่ไม่ต้องการความแม่นยำสูงมาก
- ใช้งานง่ายและบำรุงรักษาน้อย

ข้อเสีย

- ความเสถียรไม่ดี ในระยะยาวความแม่นยำอาจน้อยกว่า เนื่องจากแหล่งกำเนิดแสงอาจมีความเข้มแสงไม่คงที่
- ต้องวัดค่า blank แยกต่างหาก ไม่สามารถวัดค่า blank และ sample พร้อมกันได้ ทำให้เสียเวลา

2. Double Beam UV-Vis Spectrophotometer หลักการทำงานในระบบ double beam แหล่งกำเนิดแสงจะแยกแสงออกเป็น 2 ลำแสงโดยใช้ beam splitter หรือกระจกบางชนิด แสงลำหนึ่งจะส่องผ่านช่องใส่ blank/reference และอีกลำหนึ่งจะส่องผ่านช่องใส่ sample โดย detector จะวัดแสงทั้งสองทางพร้อมกันหรือสลับอย่างรวดเร็ว (ขึ้นอยู่กับกลไกของเครื่อง) ระบบนี้ทำให้สามารถเปรียบเทียบค่า absorbance หรือ transmittance ของตัวอย่างเทียบกับค่ามาตรฐานได้อย่างแม่นยำในขณะเดียวกัน ลดปัญหาความแปรปรวนจากความไม่เสถียรของแหล่งกำเนิดแสง

ข้อดี

- ให้ค่าการวัดที่แม่นยำและมีความเสถียรสูง
- ไม่ต้องวัดค่า blank แยกก่อนการวัด sample
- เหมาะกับการวัดที่ต้องการ precision และ reproducibility สูง

ข้อเสีย

- เครื่องมีราคาสูงกว่าและซับซ้อนกว่าระบบ single beam
- ต้องการการบำรุงรักษาและสอบเทียบมากกว่า

ข้อดีและข้อจำกัดของเทคนิค UV-Visible spectrophotometry

ข้อดี

- ไม่ทำลายตัวอย่าง (Non-destructive) เนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีหรือโครงสร้างของตัวอย่าง เพราะเป็นเพียงการวัดการเปลี่ยนแปลงของพลังงานอิเล็กตรอนในโมเลกุลเท่านั้น โดยเฉพาะการกระโดดของอิเล็กตรอนจากระดับพลังงานต่ำ (ground state) ไปยังระดับพลังงานสูง (excited state) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบ reversible
- รวดเร็ว และใช้งานง่าย เหมาะกับการวิเคราะห์ที่ต้องการความเร็ว
- ให้ผลเชิงปริมาณตามกฎของ Beer–Lambert
- ราคาค่อนข้างประหยัด และมีเครื่องมือให้เลือกหลากหลาย

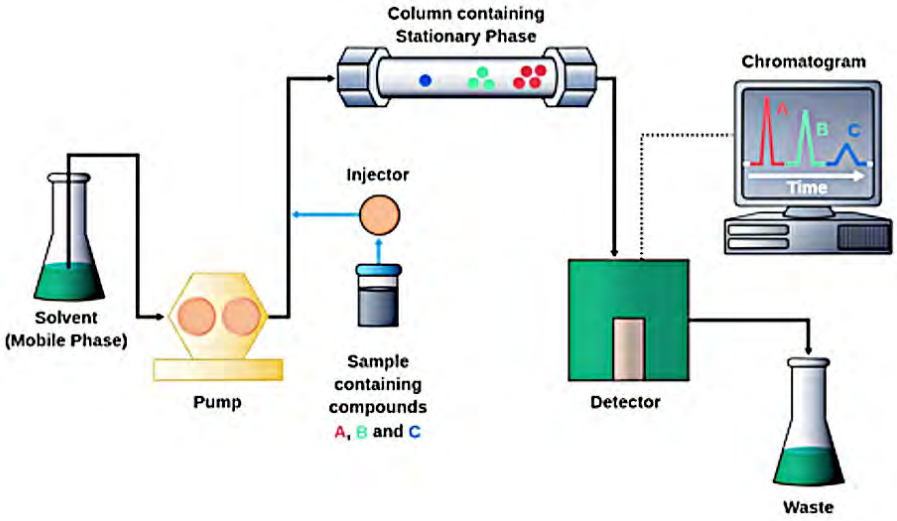
ข้อจำกัด

- ต้องเป็นสารที่มี โครโมฟอร์ (Chromophore) เท่านั้นถึงจะสามารถวัดได้
- ช่วงความเข้มข้นที่ตรงกับกฎของ Beer–Lambert ไม่กว้าง ที่ความเข้มข้นสูง อาจเกิด absorption flattening จนไม่เป็นเส้นตรง
- สัญญาณรบกวน เช่น แสงรั่ว (stray light) ระบบตรวจวัดอาจวัดเกินจริงได้
- ความกว้างแถบสเปกตรัม (Spectral bandwidth) หากกว้างเกินไป อาจทำให้ความละเอียดต่ำ ใช้เวลาทดสอบเร็ว แต่ละมวลสารแยกไม่ชัดเจน
- ความแม่นยำขึ้นกับเงื่อนไขการวัด เช่น pH อุณหภูมิ ตัวทำละลาย และอุปกรณ์

3.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC เป็นเทคนิคทางวิเคราะห์ที่ใช้สำหรับการแยก วิเคราะห์ และระบุชนิดของสารผสมในรูปของสารละลาย ได้ทั้งในเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (Qualitative) และปริมาณวิเคราะห์ (Quantitative) โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ส่วนใหญ่นิยมใช้วิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยยาก หรือมีน้ำหนักโมเลกุลสูง เครื่องมือที่ใช้ตรวจวิเคราะห์เรียกว่า เครื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง หรือเครื่อง HPLC ในการแยกอาศัยหลักการคือ สารผสมจะถูกแยกออกจากกันระหว่างสองเฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ซึ่งอยู่ภายใน column และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ไหลผ่าน column ดังกล่าว กระบวนการแยกสารขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างสารนั้นกับเฟสทั้งสอง โดยสารที่มี affinity หรือความสามารถในการเคลื่อนที่ไปกับ mobile phase สูงจะถูกพาออกจาก column ก่อน (ถูกแยกออกมาก่อน) ส่วนสารที่มีปฏิสัมพันธ์กับกับ stationary phase ได้มากกว่าจะเคลื่อนที่ออกจาก column ได้ช้ากว่า (ถูกแยกออกมาทีหลัง) เมื่อสารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ออกจาก column แล้ว จะถูกตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector) ซึ่งสัญญาณที่บันทึกได้จาก detector จะมีลักษณะเป็น peak เรียกว่า โครมาโทแกรม (chromatogram) โดยแต่ละ peak ของสารที่ถูกแยกออกมาจะมีค่า RT ที่แตกต่างกัน (รูปที่ 3-11)

Retention time (RT) คือ เวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ในการเคลื่อนที่ผ่าน column ตั้งแต่จุดที่สารถูกฉีดเข้าสู่ระบบ (injection point) จนกระทั่งถูกตรวจจับโดย detector ซึ่งแสดงออกมาเป็นยอดพีค (peak) บนโครมาโทแกรม โดยปกติจะแสดงเป็นหน่วยนาทีนับจากเวลาเริ่มต้นของการวิเคราะห์ถึงตำแหน่งเวลาที่ detector อ่านสัญญาณสูงสุด (peak)



รูปที่ 3-11 Flow diagram ของการแยกสารด้วยเทคนิค HPLC
ที่มา: https://theory.labster.com/niche_hplc/

3.4.1 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC ได้แก่

1. ภาชนะบรรจุเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase reservoirs)

ภาชนะบรรจุเฟสเคลื่อนที่ควรผลิตจากวัสดุที่มีความเฉื่อยทางเคมี เช่น ขวดแก้วคุณภาพสูง เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยากับตัวทำละลายที่ใช้เป็น mobile phase ซึ่งอาจส่งผลต่อความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ โดยทั่วไปขวดบรรจุ mobile phase จะมีฝาปิดที่สามารถต่อท่อสำหรับดูดสารเคลื่อนที่เข้าสู่ระบบ และมีช่องสำหรับเติมก๊าซเฉื่อย เช่น ฮีเลียมหรืออาร์กอน เพื่อขจัดออกซิเจนหรืออากาศที่ละลายอยู่ในสารละลาย และเพื่อลดการระเหยของตัวทำละลาย ซึ่งอาจส่งผลต่อความคงตัวขององค์ประกอบและความดันภายในระบบ

ก่อนใช้งาน mobile phase จำเป็นต้องกรองผ่าน filter membrane ที่มีขนาดรูพรุนประมาณ 0.2–0.45 ไมโครเมตร เพื่อกำจัดอนุภาคแขวนลอยที่อาจทำให้เกิดการอุดตันในท่อหรือ column นอกจากนี้ควรมีการกำจัดก๊าซที่ละลายอยู่ในสารละลาย (degassing) เช่น การใช้อัลตราโซนิก การดูดสูญญากาศ หรือการผ่านก๊าซเฉื่อย เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศ ซึ่งจะส่งผลต่อความสม่ำเสมอของอัตราการไหลและแรงดันของระบบ

สารที่ใช้เป็น mobile phase อาจเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล อะซิโตรไนไตรล์ หรือน้ำที่มีการปรับ pH และ/หรือเติมบัฟเฟอร์ โดยมีการเลือกใช้ให้เหมาะสมกับชนิดของตัวอย่างและ detector ที่ใช้ในการตรวจวัด

คุณสมบัติของ mobile phase ที่ดีควรประกอบด้วย

- มีความบริสุทธิ์สูง (HPLC-grade)
- สามารถละลายตัวอย่างได้ดี
- มีความหนืดต่ำ เพื่อให้ไหลผ่าน column ได้สะดวก
- ปราศจากฝุ่น ผง หรืออนุภาคที่อาจก่อให้เกิดการอุดตัน
- ไม่ทำปฏิกิริยากับ stationary phase

- เข้ากันได้กับระบบตรวจวัดสัญญาณ (detector compatibility)
- มีจุดเดือด ความเป็นพิษ และความสามารถในการติดไฟที่อยู่ในระดับปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงาน
- มีราคาที่เหมาะสมและประหยัดในการใช้งานประจำ

การเลือก mobile phase และภาชนะบรรจุอย่างเหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพ ความเสถียร และความแม่นยำของระบบ HPLC ทั้งหมด

2. ระบบปั๊ม (pumping system) เป็นองค์ประกอบสำคัญของเครื่อง HPLC โดยทำหน้าที่สร้างแรงดันให้กับ mobile phase เพื่อผลักดันให้ไหลเข้าสู่ column ในอัตราการไหลที่สามารถควบคุมได้อย่างแม่นยำและสม่ำเสมอ ซึ่งเป็นเงื่อนไขจำเป็นต่อการแยกสารผสมที่มีประสิทธิภาพและให้ผลวิเคราะห์ที่สามารถทำซ้ำได้ (reproducibility) ความดันในระบบจะสัมพันธ์โดยตรงกับอัตราการไหล (flow rate) ของ mobile phase และความต้านทานภายในระบบ ซึ่งขึ้นอยู่กับลักษณะของ column ขนาดอนุภาคของ stationary phase ความหนืดของ mobile phase รวมถึงอุณหภูมิ หากมีการตั้งค่าให้อัตราการไหลของ mobile phase สูงขึ้น ความดันที่ปั๊มสร้างขึ้นก็จะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ในระบบ HPLC ทั่วไป ความดันที่ใช้งานอยู่ในช่วง 50–400 บาร์ (bar) โดยไม่ควรเกินขีดจำกัดสูงสุดที่ระบุโดยผู้ผลิต เนื่องจากอาจทำให้ระบบเสียหาย

สัญญาณเตือนที่สัมพันธ์กับค่าความดันของระบบ ได้แก่

- หากระหว่างการทำงาน (run chromatogram) พบว่าค่าความดันลดลงอย่างผิดปกติจนใกล้ศูนย์ (0 bar) มักเกิดจากการรั่ว (leak) ในระบบ เช่น ข้อต่อไม่แน่น หรือท่อแตก ควรทำการตรวจสอบจุดเชื่อมต่อต่าง ๆ และแก้ไขทันที
- หากค่าความดันสูงเกินปกติ (โดยเฉพาะสูงกว่า 400 bar) อาจเกิดจากการอุดตัน (blockage) ภายในคอลัมน์ ฟิลเตอร์ หรือตัวอย่างที่มีอนุภาคตกค้าง ควรตรวจสอบความสะอาดของระบบ และอาจจำเป็นต้องเปลี่ยนคอลัมน์หรือทำการ backflush

ระบบปั๊มในเครื่อง HPLC แบบสมัยใหม่มักใช้เทคโนโลยี dual piston หรือ binary pump ที่สามารถส่งสารเคลื่อนที่ได้ต่อเนื่อง ลดการสั่นสะเทือนของแรงดัน (pressure ripple) ซึ่งส่งผลดีต่อความแม่นยำในการวิเคราะห์ โดยเฉพาะเมื่อใช้ร่วมกับ detector ที่ไวต่อสัญญาณ เช่น UV-Vis หรือ MS

3. หน่วยฉีดสารตัวอย่าง (injection unit) ทำหน้าที่นำสารละลายตัวอย่างเข้าสู่เฟสเคลื่อนที่เพื่อเข้าสู่ column โดยต้องมีความแม่นยำและเที่ยงตรงสูง เพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้องและสามารถทำซ้ำได้ injector สำหรับฉีดสารตัวอย่างแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลัก ได้แก่ ระบบฉีดด้วยมือ (manual injector) และระบบฉีดอัตโนมัติ (autosampler หรือ automatic injector) โดยทั่วไป ปริมาตรที่ใช้ในการฉีดสารตัวอย่างจะอยู่ในช่วง 0.1–100 µL ขึ้นกับความไวของ detector และขนาดของ column อย่างไรก็ตาม ปริมาตรของตัวอย่างที่ฉีดเข้าสู่ระบบต้องไม่เกินความจุสูงสุดของ column หรือระบบฉีด เนื่องจากการใช้ปริมาตรมากเกินไปอาจก่อให้เกิดการกระจายตัวของสาร (band broadening) ซึ่งส่งผลลดประสิทธิภาพของการแยกสารใน column

injection unit ต้องสามารถทนแรงดันสูงได้ โดยทั่วไปสามารถทำงานได้ภายใต้ความดันถึง 4,000 psi (ประมาณ 275 bar) และต้องควบคุมให้มีการฉีดอย่างรวดเร็วและแม่นยำ โดยไม่ทำให้เกิดแรงกระแทกต่อ column หรือระบบท่อส่ง ซึ่งอาจกระทบต่อความเสถียรของค่าความดันหรือการไหลของ mobile phase ระบบฉีดอัตโนมัติแบบหมุนวาล์ว (rotary valve) ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เนื่องจากช่วยเพิ่มความแม่นยำ ลดความผิดพลาดจากผู้ปฏิบัติงาน และสามารถตั้งค่าการทำงานแบบต่อเนื่องร่วมกับซอฟต์แวร์ควบคุมได้

4. คอลัมน์ (column หรือ stationary phase) column เป็นบริเวณที่เกิดการแยกสารผสมแต่ละชนิดในสารละลายตัวอย่าง column มีรูปร่างเป็นแท่งตรงทรงกระบอก ทำจากโลหะสแตนเลส (stainless steel) ทนทานต่อแรงดันสูงและสารเคมี โดยมีความยาวตั้งแต่ 10-30 เซนติเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในประมาณ 4-10 มิลลิเมตร ภายใน column บรรจุอนุภาคของ stationary phase ขนาด 3-10 µm ซึ่งทำจากซิลิกาเคลือบสารที่เหมาะสมกับโหมดของ HPLC เช่น C18, C8 ฯลฯ

column ในระบบ HPLC แบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลัก ได้แก่

- **guard column** ใช้เพื่อป้องกันคอลัมน์หลัก หรือคอลัมน์วิเคราะห์จากการปนเปื้อน เช่น อนุภาคตกค้าง สารที่ไม่ละลาย สารปนเปื้อนหรือ matrix ของตัวอย่างที่อาจยึดติดกับ stationary phase ซึ่งจะช่วยยืดอายุการใช้งานของ analytical column
- **คอลัมน์วิเคราะห์ (analytical column)** เป็นคอลัมน์หลักที่ทำหน้าที่แยกสารในกระบวนการวิเคราะห์ โดยมีการออกแบบ stationary phase ให้เหมาะกับโหมดในการแยกของ HPLC เช่น reverse phase, normal phase, ion-exchange หรือ size-exclusion

วิธีการแยก (separation mode) ของ HPLC ที่โดยทั่วไปมีวิธีการแยกสารหลัก ๆ ดังนี้

➢ Reverse Phase Chromatography (RP-HPLC) เป็นโหมดที่นิยมมากที่สุดในการวิเคราะห์สารอินทรีย์ โดย stationary phase มีลักษณะไม่ชอบน้ำ (non-polar) เช่น C18 หรือ C8 ส่วน mobile phase มีขั้ว (polar) เช่น น้ำ methanol หรือ acetonitrile กลไกการแยกอาศัยความแตกต่างของความสามารถในการละลายระหว่างสารที่ชอบน้ำกับสารที่ชอบไขมัน โดยสารที่มีขั้วน้อยจะติดอยู่กับ column นานกว่า ทำให้มีเวลาออกจาก column ช้ากว่าสารที่มีขั้วมาก

➢ Normal Phase Chromatography (NP-HPLC) โหมดนี้ใช้ stationary phase ที่มีขั้ว เช่น silica หรือ aminopropyl และใช้ mobile phase ที่ไม่มีขั้ว เช่น hexane หรือ chloroform สารที่มีขั้วมากจะจับกับเฟสอยู่กับที่ได้นานกว่า ทำให้เวลาการไหลผ่านนานกว่าสารไม่มีขั้ว ใช้สำหรับการแยกสารอินทรีย์ที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วต่ำ รวมถึงสารประกอบไอโซเมอร์

➢ Ion Exchange Chromatography (IEC) ใช้สำหรับแยกสารที่มีประจุ เช่น กรดอะมิโน แอนไอออน หรือแคตไอออน โดย stationary phase จะมีหมู่ประจุบวกหรือลบที่สามารถจับกับสารตัวอย่างผ่านแรงดึงดูดทางไฟฟ้า การเปลี่ยนแปลงของค่า pH หรือความเข้มข้นของไอออนใน mobile phase จะส่งผลต่อการแยกสาร นิยมใช้ในงานที่เกี่ยวข้องกับสารชีวภาพ โปรตีน หรือเปปไทด์

➢ Size Exclusion Chromatography (SEC) หรือ Gel Filtration ใช้หลักการแยกตามขนาดของโมเลกุล โดย stationary phase มีรูพรุนที่โมเลกุลเล็กสามารถแทรกเข้าไปได้ ทำให้เคลื่อนที่ช้ากว่าโมเลกุลใหญ่ที่ผ่าน column เร็วกว่าเพราะไม่สามารถเข้าไปในรูพรุนได้ SEC เหมาะกับการแยกสารชีวโมเลกุล เช่น โปรตีน พอลิเมอร์ หรือสารที่ไม่ทนต่อสภาวะของ pH หรือไอออน

➢ Affinity Chromatography (AFC) ใช้หลักการจับจำเพาะระหว่างคู่โมเลกุล เช่น แอนติบอดี–แอนติเจน หรือเอนไซม์-ซับสเตรต โดย stationary phase จะมีลิแกนด์ที่จับจำเพาะกับสารเป้าหมายในตัวอย่าง เป็นวิธีที่ให้ความจำเพาะสูงมาก เหมาะกับการแยกสารชีวภาพที่มีความบริสุทธิ์สูง เช่น แอนติบอดี รีเซพเตอร์ หรือโปรตีนเฉพาะชนิด

5. เครื่องตรวจวัดสัญญาณ (detector) คือ อุปกรณ์ในระบบ HPLC ที่ใช้ในการตรวจวัดสารประกอบที่ถูกแยกออกมาจาก column โดยแปลงปริมาณของสารนั้นให้เป็นสัญญาณไฟฟ้า ซึ่งแสดงผลในรูปแบบ chromatogram สัญญาณที่ได้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่ตรวจวัด หน้าที่ของ detector คือ ระบุชนิด และวัดปริมาณของสาร โดยอาศัยคุณสมบัติเฉพาะของสาร เช่น การดูดกลืนแสง การเรืองแสง หรือคุณสมบัติทางไฟฟ้า ชนิดของ detector มีหลากหลายชนิด สามารถแบ่งตามลักษณะการทำงานได้ ดังนี้

- **UV-Vis detector** วัดการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่นเฉพาะในช่วงอัลตราไวโอเลต (UV) หรือแสงขาว (Visible) ตามกฎเบียร์-แลมเบิร์ต มีความไวสูง เหมาะกับสารที่มีโครงสร้างดูดกลืนแสง เช่น benzene, aromatics หรือสารอินทรีย์ แบ่งเป็นชนิดย่อย ได้แก่
    - Fixed wavelength detector: ตรวจวัดที่ความยาวคลื่นคงที่ เช่น 254 nm
    - Variable wavelength detector: ปรับความยาวคลื่นได้ตามชนิดของสาร
    - Diode array detector (DAD): ตรวจวัดหลายความยาวคลื่นพร้อมกัน
- **Fluorescence detector (FLD)** วัดการเรืองแสงของสารหลังจากถูกกระตุ้นด้วยแสงที่มีพลังงานสูง มีความไวสูงกว่าตรวจด้วย UV ถึง 100–1000 เท่า มีข้อจำกัดคือใช้ได้กับสารที่เรืองแสงโดยธรรมชาติ หรือสารที่ผ่านการดัดแปลงด้วย fluorescent tag
- **Refractive index detector (RID)** ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของดัชนีหักเหของสารละลายเมื่อสารออกจาก column ใช้กับสารที่ไม่ดูดกลืนแสง UV เช่น น้ำตาล แอลกอฮอล์ มีข้อเสีย คือ ความไวต่ำ และไม่สามารถใช้ร่วมกับระบบ gradient elution ได้ดี
- Evaporative light scattering detector (ELSD) ตรวจจับละอองสารโดยการกระจายแสงหลังจากระเหยตัวทำละลายออกไป สามารถตรวจได้ทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์ ไม่จำเป็นต้องมีโครโมฟอร์หรือเรืองแสง แต่มีข้อเสียคือต้องควบคุมอุณหภูมิอย่างแม่นยำ
- Conductivity detector วัดความสามารถในการนำไฟฟ้าของสารในน้ำ ใช้ในระบบ Ion chromatography หรือการแยกสารอนินทรีย์ เช่น $NO3^{-}$, Cl^{-}, Na^{+}
- Mass Spectrometry detector (MSD) วัดมวลต่อประจุ (m/z) ของไอออนจากสารที่ถูกแยก มีความจำเพาะสูงมาก เหมาะสำหรับการวิเคราะห์โครงสร้างและยืนยันตัวตนของสาร ข้อเสียคือราคาสูง ต้องมีทักษะและการดูแลเฉพาะ

6. เครื่องบันทึกข้อมูลและประมวลผล (recorder and data processing) ปัจจุบัน ระบบการบันทึกและประมวลผลข้อมูลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC สามารถดำเนินการได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้ ซอฟต์แวร์คอมพิวเตอร์เฉพาะทาง ซึ่งพัฒนาโดยบริษัทผู้ผลิตเครื่องมือแต่ละราย ซอฟต์แวร์เหล่านี้มีความสามารถในการควบคุมการทำงานของอุปกรณ์ HPLC ทั้งระบบ ตั้งแต่การตั้งค่าพารามิเตอร์การทำงาน การควบคุมการไหลของ mobile phase การตั้งอุณหภูมิของ column ไปจนถึงการบันทึกและวิเคราะห์สัญญาณจาก detector การใช้ระบบคอมพิวเตอร์เข้าช่วยในกระบวนการวิเคราะห์ดังกล่าว ช่วยเพิ่มความถูกต้อง (accuracy) และความเที่ยงตรง (precision) ของผลการวิเคราะห์อย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งข้อมูลที่ถูกบันทึกลงในหน่วยความจำของคอมพิวเตอร์สามารถเรียกดู นำกลับมาวิเคราะห์ซ้ำ หรือจัดเก็บไว้ในรูปแบบดิจิทัลได้โดยสะดวก โดยไม่จำเป็นต้องพิมพ์ข้อมูลลงกระดาษ ซึ่งช่วยลดการใช้ทรัพยากรและส่งเสริมแนวทางการทำงานแบบไม่ใช้กระดาษ (paperless laboratory) นอกจากนี้ ซอฟต์แวร์ยังสามารถทำหน้าที่ในการคำนวณค่าเฉพาะ เช่น พื้นที่ใต้พีค (peak area) หรือ ความสูงของพีค (peak height) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) รวมถึงการระบุหรือตรวจเอกลักษณ์ของสาร (identification) โดยการเปรียบเทียบค่า RT กับสารมาตรฐานที่กำหนดไว้ล่วงหน้า

3.5 Gas Chromatography (GC)

Gas Chromatography (GC) เป็นเทคนิควิเคราะห์ทางเคมีที่ใช้ในการแยกและวิเคราะห์สารอินทรีย์ที่สามารถระเหยได้ง่าย รวมถึงสารกึ่งระเหย โดยอาศัยหลักการแยกระหว่างสองเฟส ได้แก่ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ซึ่งเป็นสารที่เคลือบหรือบรรจุอยู่ภายในคอลัมน์ และ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งในกรณีนี้คือแก๊สพา (carrier gas) เช่น ฮีเลียม โดยทั่วไปเมื่อทำการฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบที่บริเวณหัวฉีดซึ่งมีการให้ความร้อนสูง สารตัวอย่างจะระเหยกลายเป็นไอ และถูกนำเข้าสู่คอลัมน์โดยแก๊สตัวพา ระหว่างที่สารไอเคลื่อนผ่านคอลัมน์ซึ่งถูกควบคุมอุณหภูมิด้วยตู้ให้ความร้อน สารแต่ละชนิดจะเกิดการแยกจากกันขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของแต่ละโมเลกุล เช่น จุดเดือด น้ำหนักโมเลกุล และโครงสร้างโมเลกุล สารที่ถูกแยกแล้วจะไหลเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) และแสดงผลออกมาในรูปของโครมาโทแกรม (chromatogram)

ส่วนประกอบสำคัญของเครื่อง GC ดังรูปที่ 3-12 ได้แก่

1. **แก๊สตัวพา (carrier gas)** ทำหน้าที่ลำเลียงสารตัวอย่างที่กลายเป็นไอจากหัวฉีดผ่านคอลัมน์ไปยังตัวตรวจวัด แก๊สที่นิยมใช้ ได้แก่ ฮีเลียม ไฮโดรเจน และไนโตรเจน ซึ่งล้วนเป็นแก๊สเฉื่อยที่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง
2. **ส่วนฉีดสาร (injector port)** เป็นจุดที่ใช้สำหรับฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบ โดยมีตัวทำความร้อนเพื่อระเหยสารให้กลายเป็นไอก่อนถูกพาเข้าสู่คอลัมน์ หากเป็นสารตัวอย่างในสถานะแก๊สจะใช้วาล์วสำหรับตัวอย่างแก๊ส (gas sampling valve) ส่วนสารตัวอย่างที่เป็นของเหลวจะใช้ micro syringe ฉีดผ่าน silicone septum เข้าสู่ระบบ
3. **คอลัมน์ (column)** เป็นส่วนที่ใช้ในการแยกสารผสม ภายในบรรจุหรือเคลือบ stationary phase ซึ่งทำหน้าที่แยกสารแต่ละชนิดออกจากกัน โดยทั่วไปมี 2 ประเภท คือ

➢ Packed column เป็นคอลัมน์ที่ภายในบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งขนาดเล็ก ซึ่งเคลือบด้วยเฟสอยู่กับที่ มักมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-4 มม. และความยาวประมาณ 1-6 เมตร เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณมากหรือวิเคราะห์ทั่วไปที่ไม่ต้องการความละเอียดสูง

➢ Capillary column ภายในเป็นท่อกลวง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กมาก (0.1-0.53 มม.) และความยาวมักอยู่ในช่วง 10-100 เมตร มี 2 ประเภทหลัก คือ 1) Wall-coated open tubular (WCOT): ผนังด้านในเคลือบด้วยฟิล์มของเฟสอยู่กับที่ และ 2) Support-coated open tubular (SCOT): ผนังภายในเคลือบผงของแข็งที่รองรับเฟสอยู่กับที่ capillary column นั้นให้ประสิทธิภาพการแยกที่สูงมาก เนื่องจากมี plate number สูงถึง 100,000-500,000 plates

stationary phase ที่ใช้ในคอลัมน์ GC อาจเป็นของเหลวอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเฉื่อย เคลือบบนผนังของคอลัมน์ โดยเลือกใช้ตามลักษณะทางเคมีของสารเป้าหมาย เช่น

➢ Polar stationary phase เช่น polyethylene glycol (PEG) สำหรับแยกสารมีขั้วสูง

➢ Non-polar stationary phase เช่น dimethylpolysiloxane สำหรับแยกสารไม่มีขั้ว เช่น ไฮโดรคาร์บอน

4. **เตาให้ความร้อน (oven)** เป็นส่วนควบคุมอุณหภูมิของ column ในเครื่อง GC เพื่อให้การแยกสารเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีการควบคุมอุณหภูมิอย่างแม่นยำ และสามารถปรับโปรแกรมอุณหภูมิได้ตามลักษณะของการวิเคราะห์

5. **ตัวตรวจวัด (detector)** ทำหน้าที่ตรวจวัดสารแต่ละชนิดที่แยกออกจากคอลัมน์ และแปลงสัญญาณเป็นข้อมูลเพื่อประมวลผลในระบบคอมพิวเตอร์ ตัวอย่างของ detector ที่นิยมใช้ เช่น

➢ **Flame Ionization Detector (FID)** เป็นหนึ่งในตัวตรวจวัดที่ใช้อย่างแพร่หลายในระบบแก๊สโครมาโทกราฟี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการตรวจวัดสารประกอบอินทรีย์ที่มีพันธะคาร์บอน-ไฮโดรเจน (C–H) และคาร์บอน-คาร์บอน (C–C) เป็นส่วนประกอบหลัก เช่น ไฮโดรคาร์บอน แอลกอฮอล์ คีโตน เอสเตอร์ และกรดอินทรีย์บางชนิด FID ตรวจวัดสารโดยอาศัยการเผาไหม้ของสารประกอบอินทรีย์ในเปลวไฟไฮโดรเจน-อากาศ (hydrogen–air flame) ซึ่งจะทำให้เกิด ไอออน และ อิเล็กตรอนอิสระ โดยเฉพาะจากพันธะ C–H ในโมเลกุลของสารเป้าหมาย เมื่อสารอินทรีย์ที่แยกได้จากคอลัมน์ GC เข้าสู่หัวตรวจวัด FID มันจะถูกพ่นเข้าไปในเปลวไฟที่มีไฮโดรเจนและอากาศเป็นเชื้อเพลิง สารอินทรีย์จะถูกเผาไหม้และสลายตัว กลายเป็นอนุภาคคาร์บอน ซึ่งจะเกิดการไอออไนซ์ให้เป็นไอออนและอิเล็กตรอน กระแสไอออนที่เกิดขึ้นระหว่างขั้วไฟฟ้า (collector electrode กับ polarizing electrode) จะถูกตรวจวัดเป็นกระแสไฟฟ้า ขนาดของกระแสไฟฟ้าที่วัดได้ แปรผันตามปริมาณของคาร์บอนในสารประกอบอินทรีย์

➢ **Electron Capture Detector (ECD)** เป็นตัวตรวจวัดในระบบแก๊สโครมาโทกราฟีที่มีความไวสูงต่อสารประกอบที่สามารถจับอิเล็กตรอนได้ดี (high electron affinity) โดยเฉพาะสารประกอบอินทรีย์ที่มีหมู่ฮาโลเจน เช่น คลอรีน โบรมีน หรือฟลูออรีน หลักการทำงานของ ECD คือ ภายในห้องตรวจวัดจะมีการติดตั้งแหล่งกำเนิดรังสีเบต้า เช่น ไอโซโทปกัมมันตรังสี Ni-63 หรือ 3H (Tritium) ซึ่งปล่อยอิเล็กตรอนพลังงานต่ำออกมา โดยอิเล็กตรอนเหล่านี้จะชนกับโมเลกุลของแก๊สตัวพา เช่นไนโตรเจน ทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ตรวจวัดได้โดย collector electrode เมื่อโมเลกุลของสารตัวอย่างที่ถูกแยกผ่านคอลัมน์เข้าสู่ detector โมเลกุลเหล่านี้จะ ดูดจับอิเล็กตรอน (electron capture) และลดจำนวนอิเล็กตรอนอิสระในระบบ ส่งผลให้กระแสไฟฟ้าลดลง การลดลงของกระแสนี้จะถูกแปลงเป็นสัญญาณไฟฟ้าส่งไปยังระบบบันทึกผล ECD มีความไวสูงมาก โดยสามารถตรวจวัดสารในระดับ picogram (pg) และเหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารในกลุ่ม organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls (PCBs), nitroaromatics, และฟอสฟอรัสเอสเทอร์บางชนิด ซึ่งไม่สามารถตรวจวัดได้ดีด้วย detector ชนิดอื่น เช่น FID

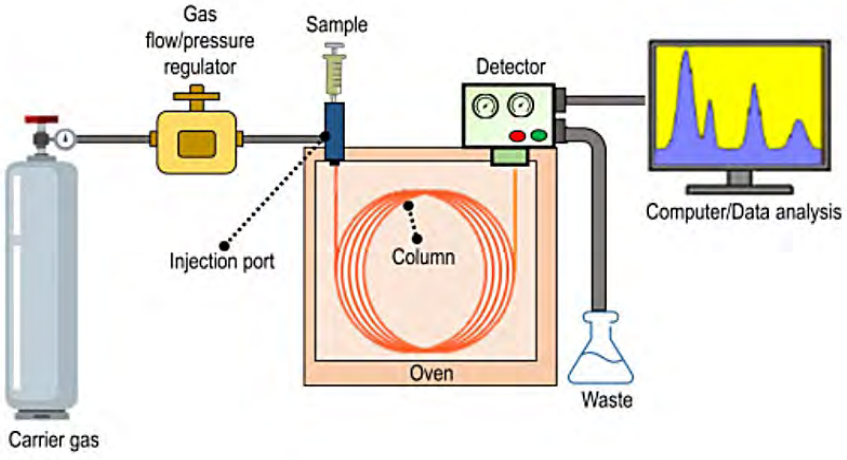
➢ **Flame Photometric Detector (FPD)** เป็นตัวตรวจวัดในระบบแก๊สโครมาโทกราฟีที่ใช้การปล่อยแสงของอะตอมที่ถูกกระตุ้นด้วยพลังงานความร้อนของเปลวไฟในการตรวจวัด โดยตัว detector ประกอบด้วยหัวพ่นแก๊สไฮโดรเจนร่วมกับอากาศเพื่อสร้างเปลวไฟ และ photomultiplier tube (PMT) สำหรับตรวจจับแสงที่ปล่อยออกจากสารตัวอย่าง เมื่อสารประกอบที่มีธาตุ ซัลเฟอร์ (S) หรือ ฟอสฟอรัส (P) ถูกพ่นเข้าสู่เปลวไฟ อะตอมของธาตุเหล่านี้จะถูกกระตุ้นให้เกิดการปล่อยแสงที่มีความยาวคลื่นจำเพาะ เช่น ฟอสฟอรัสปล่อยแสงที่ประมาณ 526 นาโนเมตร ซัลเฟอร์ปล่อยแสงที่ประมาณ394 นาโนเมตร แสงนี้จะถูกส่งไปยัง photomultiplier ซึ่งจะแปลงพลังงานแสงเป็นสัญญาณไฟฟ้าและส่งสัญญาณไปยังระบบประมวลผล FPD มีความจำเพาะสูงมากต่อสารประกอบที่มีธาตุ S และ P เช่น

- สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม organophosphate (ตรวจ P) เช่น malathion, parathion
- สารประกอบกำมะถัน (ตรวจ S) เช่น thiophenes, mercaptans, sulfides

➢ **Mass Selective Detector (MSD)** หรือที่มักเรียกกันว่า Mass Spectrometer เป็นตัวตรวจวัดที่ทำงานร่วมกับเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC-MS) โดยอาศัยหลักการตรวจวัดไอออนของสารที่ผ่านการแยกแล้วในคอลัมน์ GC โมเลกุลของสารที่ถูกแยกโดย GC จะถูกนำเข้าสู่ห้องไอออไนเซชัน (ionization chamber) ซึ่งอยู่ในสภาวะสุญญากาศ และถูกกระทบด้วยลำแสงอิเล็กตรอน (electron impact) หรือแหล่งพลังงานอื่น จนกลายเป็นไอออน โมเลกุลไอออนที่เกิดขึ้นจะถูกส่งเข้าสู่เครื่องแยกมวล (mass analyzer) เพื่อแยกตาม อัตราส่วนมวลต่อประจุ

(mass-to-charge ratio หรือ m/z)จากนั้น ไอออนจะถูกตรวจวัดด้วย detector และแสดงผลออกมาเป็นสเปกตรัมมวล (mass spectrum) ซึ่งสามารถนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของสเปกตรัมมาตรฐาน เพื่อระบุชนิดของสารประกอบที่ตรวจพบได้อย่างแม่นยำทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ

6. **ระบบประมวลผลข้อมูล (Data System)** ใช้คอมพิวเตอร์ประมวลผลและวิเคราะห์ผลการตรวจวัด โดยสามารถระบุเวลา retention time ของสารแต่ละชนิดได้ ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพเพื่อระบุชนิดของสาร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน และใช้พื้นที่ใต้พีคในโครมาโทแกรมเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ



รูปที่ 3-12 ส่วนประกอบสำคัญของเครื่อง GC
ที่มา: https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/gas-chromatography

3.6 Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

LC-MS/MS หรือ Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry เป็นเทคนิควิเคราะห์ทางเคมีที่ผสานการแยกสารด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC หรือ LC) เข้ากับการตรวจวัดมวลของสารเป้าหมายด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์แบบ tandem (MS/MS) ซึ่งประกอบด้วย mass analyzer 2 ชุด ทำให้สามารถวิเคราะห์สารได้อย่างแม่นยำ มีความจำเพาะ และไวสูง เหมาะสำหรับการตรวจสอบสารในปริมาณต่ำมาก เช่น สารตกค้างในอาหาร ยา สารพิษในเลือด หรือสารชีวโมเลกุล เป็นต้น

หลักการทำงานของ LC-MS/MS ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่

1. การแยกสารด้วย LC

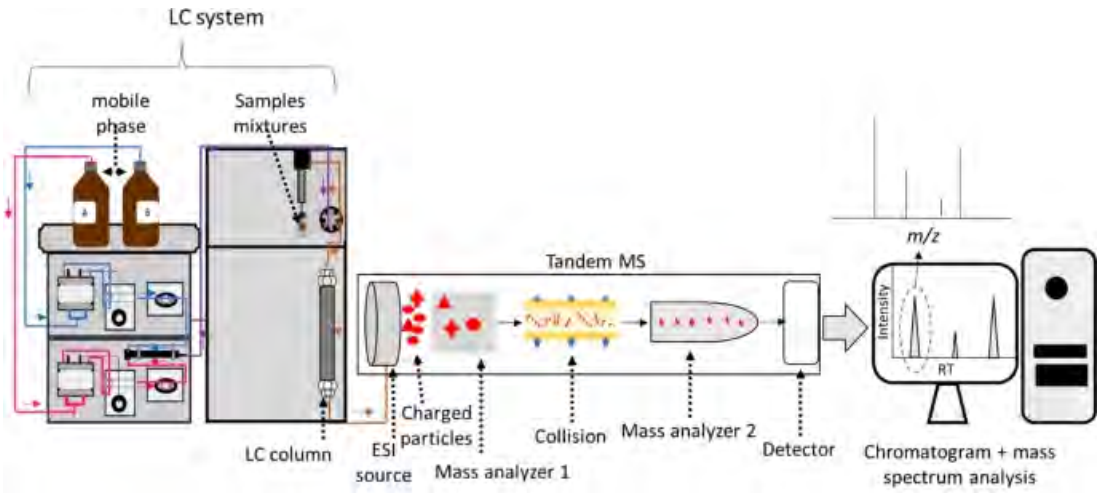
สารผสมถูกแยกด้วยคอลัมน์ของระบบ HPLC โดยพึ่งปฏิสัมพันธ์ระหว่างเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และเฟสอยู่กับที่ (stationary phase)

2. การเปลี่ยนสถานะเป็นไอออน (Ionization)

สารที่ออกจากคอลัมน์จะถูกทำให้เป็นไอออนด้วยเทคนิคเช่น ESI (Electrospray Ionization) หรือ APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)

3. การวิเคราะห์มวลด้วย MS/MS

MS ตัวแรกจะเลือกไอออนเป้าหมาย (precursor ion) จากนั้นทำให้แตกตัวเป็นไอออนลูก (product ions) ใน collision cell และตรวจวัดมวลของ product ions ด้วย MS ตัวที่สอง



รูปที่ 3-13 Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) principles
ที่มา: Dewi *et al.*(2023)

ส่วนประกอบหลักของเครื่อง LC-MS/MS ดังรูปที่ 3-13

การทำงานของ LC-MS/MS อาศัยการประสานกันอย่างซับซ้อนของระบบ HPLC และเครื่อง Mass Spectrometer ซึ่งประกอบด้วยหน่วยสำคัญต่าง ๆ ดังนี้

1. ระบบโครมาโทกราฟีของเหลว (Liquid Chromatography Unit)

ระบบ LC ทำหน้าที่แยกสารประกอบในตัวอย่างออกจากกัน ก่อนที่จะถูกส่งต่อไปยัง mass spectrometer ประกอบด้วย

- **ภาชนะบรรจุ mobile phase:** ต้องใช้เกรด HPLC-grade หรือ LC-MS grade เพื่อหลีกเลี่ยงสารปนเปื้อนที่อาจเกิด signal interference
- **Degasser:** ขจัดแก๊สละลายใน mobile phase ซึ่งช่วยลดการเกิดฟองอากาศในระบบ
- **ระบบปั๊ม (pump):** ให้แรงดันสูง (200–600 bar) เพื่อดัน mobile phase ผ่านคอลัมน์
- **Auto-sampler:** ฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบอัตโนมัติอย่างแม่นยำ
- **คอลัมน์ (Analytical Column):** เป็นส่วนที่แยกสารผสมด้วยหลักการของ reverse phase หรือโหมดอื่นตามที่เหมาะสม

ค่าการแยกสารที่ดี (resolution) ส่งผลโดยตรงต่อความไว (sensitivity) ของการตรวจวัดใน MS

2. Ionization Source (แหล่งกำเนิดไอออน) หน้าที่หลักคือเปลี่ยนสารที่แยกออกจาก LC ให้กลายเป็นไอออนที่สามารถเข้าสู่ MS ได้ มี 2 mode ที่ใช้มากที่สุด คือ

2.1 Electrospray Ionization (ESI)

- เหมาะกับสารที่มีขั้วและละลายน้ำได้ดี เช่น ยาปฏิชีวนะ และสารชีวโมเลกุล (peptide, protein, nucleotide) เป็นต้น
- กลไก: สารละลายถูกพ่นผ่าน capillary ใต้ศักย์ไฟฟ้าสูง (3-5 kV) เกิดเป็นละอองหยด (charged droplets) จากนั้นระเหยจนเกิดไอออนที่เรียกว่า gas-phase ions
- มักได้เป็น protonated $[M+H]^+$ หรือ deprotonated $[M-H]^-$ ion
- เป็น soft ionization ⟶ ทำให้โครงสร้างไม่แตก (intact molecule) ⟶ เหมาะกับการวิเคราะห์เชิงโครงสร้าง

2.2 Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)

- เหมาะกับสารอินทรีย์ที่ไม่ขั้ว เช่น พวก steroid หรือ pesticide
- ใช้ความร้อนทำให้สารกลายเป็นไอ ⟶ ใช้ corona discharge สร้างไอออนในเฟสแก๊ส
- การระเหยเป็นไอของสารจะเกิดก่อน แล้วจึงรับประจุในแก๊ส ⟶ เหมาะกับสารที่ระเหยได้ดี
- ให้ไอออนแบบ protonated $[M+H]^+$ หรือ deprotonated $[M-H]^-$ เช่นกัน

การเลือก ion source ต้องคำนึงถึงสมบัติของสาร วิเคราะห์แมทริกซ์ และความไวที่ต้องการ

3. Mass Analyzer (ตัวแยกมวล) ทำหน้าที่แยกไอออนตามอัตราส่วนมวลต่อประจุ (m/z) โดยใช้สนามไฟฟ้าหรือแม่เหล็ก มีหลายชนิด เช่น

- **Quadrupole (Q):** ใช้สี่แท่งอิเล็กโทรดเพื่อแยกไอออนตามค่า m/z ⟶ ความแม่นยำดี, ราคาประหยัด
- **Time-of-Flight (TOF):** วัดเวลาที่ไอออนเดินทางถึง detector ⟶ ได้ความละเอียดมวลสูง (high resolution)
- **Orbitrap และ Ion Trap:** ใช้หลักการกับดักไอออนด้วยสนามไฟฟ้า ⟶ วัดความถี่การเคลื่อนที่ของไอออน

LC-MS/MS มักใช้ Triple Quadrupole (QqQ): Q1 (คัดไอออนเป้าหมาย) ⟶ q2 (ชน) ⟶ Q3 (ตรวจวัด)

4. Collision Cell (เซลล์ชนไอออน)

- ไอออนที่เลือกใน Q1 จะถูกส่งเข้าสู่ collision cell (q2)
- ภายในมีแก๊สเฉื่อย เช่น ไนโตรเจนหรืออาร์กอน ⟶ ชนไอออนให้แตกเป็น product ions (fragmentation)
- กระบวนการนี้เรียกว่า collision-induced dissociation (CID) หรือ higher-energy collisional dissociation (HCD)

Product ions ที่ได้มีลักษณะเฉพาะตัว สามารถใช้เป็น “ลายนิ้วมือ” ในการยืนยันตัวตนของสาร

5. Ion Detector (ตัวตรวจจับไอออน)

- วัดสัญญาณของไอออนที่มี m/z เฉพาะที่ออกจาก analyzer
- Detector ชนิดที่ใช้บ่อย: Electron multiplier หรือ dynode array
- ความไวสามารถวัดได้ถึงระดับ femtogram หรือ 10^{-15} กรัม

สัญญาณที่ได้จะถูกประมวลผลเป็น chromatogram หรือ mass spectrum

6. ระบบประมวลผลและควบคุมข้อมูล (Data System)

- ซอฟต์แวร์เฉพาะของเครื่อง LC-MS/MS ทำหน้าที่
  - ➢ ควบคุมการฉีดสาร วิเคราะห์ ตั้งค่าพารามิเตอร์
  - ➢ คำนวณค่า area/height ของ peak
  - ➢ สร้าง calibration curve และคำนวณความเข้มข้น
  - ➢ วิเคราะห์ MRM transition และการ validate ผลวิเคราะห์

โปรแกรมที่นิยม เช่น Analyst® (SCIEX), MassHunter (Agilent), Xcalibur (Thermo Fisher)

3.7 เทคนิคการเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation techniques)

การเตรียมตัวอย่าง (Sample Preparation) ถือเป็นขั้นตอนเบื้องต้นที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการวิเคราะห์สารพิษ โดยมีบทบาทในการส่งเสริมความถูกต้อง ความแม่นยำ และความไวของผลการตรวจวิเคราะห์ ชนิดของตัวอย่างที่เก็บจากสัตว์ เช่น เลือด ปัสสาวะ ซีรัม อวัยวะภายใน อาหารในกระเพาะ อาหารสัตว์ วัตถุที่ตกในที่เกิดเหตุ และตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อม (ดิน อากาศ และน้ำ) มักประกอบด้วยองค์ประกอบเชิงซ้อน อาทิ โปรตีน ไขมัน เอนไซม์ เกลืออินทรีย์ หรือสารชีวโมเลกุลอื่น ๆ ซึ่งอาจทำให้เกิดการรบกวน (interference) ต่อการวิเคราะห์ทางเคมีหรือชีวเคมี

ดังนั้น การเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมจึงมีบทบาทสำคัญในการแยกสารพิษเป้าหมายออกจาก matrix ซับซ้อนของตัวอย่าง เพิ่มปริมาณหรือความเข้มข้นของสารพิษที่มีอยู่ในระดับต่ำ และลดหรือขจัดสารรบกวนที่อาจส่งผลต่อการวิเคราะห์ เพื่อให้ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่เชื่อถือได้ ทั้งนี้ตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการเตรียมอย่างถูกต้องสามารถนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเบื้องต้น เช่น การทดสอบสี (color test) หรือ TLC รวมถึงเทคนิคชั้นสูงอื่น ๆ เช่น HPLC, GC และ UV-Vis spectrophotometry เป็นต้น ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การเลือกเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมควรคำนึงถึงลักษณะของสารพิษเป้าหมาย ได้แก่ ความคงตัวทางเคมีและฟิสิกส์ ขนาดโมเลกุล ความสามารถในการละลาย รวมถึงชนิดของตัวอย่าง หากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างดำเนินการไม่เหมาะสม อาจทำให้ได้ผลวิเคราะห์ที่เป็น false positive หรือ false negative ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการวินิจฉัยโรคหรือการประเมินความเสี่ยงทางพิษวิทยาได้

เทคนิคการเตรียมตัวอย่างในงานด้านพิษวิทยา

เทคนิคการเตรียมตัวอย่างมีหลากหลายวิธีที่ถูกพัฒนาเพื่อให้สอดคล้องกับประเภทของตัวอย่างและเทคนิคการวิเคราะห์ที่ใช้ ยกตัวอย่าง เช่น

- **Protein precipitation** เทคนิคนี้ใช้เพื่อลดปริมาณโปรตีนในของเหลวชีวภาพ เช่น ซีรัมหรือพลาสมา โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น acetonitrile หรือ methanol ทำให้โปรตีนตกตะกอนและสามารถแยกออกจาก supernatant ได้ ซึ่งเหมาะสำหรับสารพิษที่ละลายในเฟสของเหลว
- **Liquid–Liquid Extraction (LLE)** เป็นเทคนิคพื้นฐานที่อาศัยความแตกต่างของความสามารถในการละลายของสารพิษในตัวทำละลายอินทรีย์กับน้ำ มักใช้กับสารประกอบอินทรีย์ที่มีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายจำเพาะ เช่น ethyl acetate หรือ chloroform โดยมีการควบคุม pH เพื่อเพิ่ม selectivity
- **Solid-Phase Extraction (SPE)** เทคนิค SPE เป็นที่นิยมในงานวิเคราะห์สมัยใหม่เนื่องจากให้ผลที่แม่นยำ ลดปริมาณ solvent ที่ใช้ และสามารถทำซ้ำได้ดี ตัวดูดซับที่ใช้ เช่น ซิลิกา C18 หรือ polymer-based resin สามารถคัดเลือกสารพิษเป้าหมายและขจัดสารรบกวนได้อย่างมีประสิทธิภาพ
- **Dispersive Solid-Phase Extraction (dSPE)** เป็นส่วนหนึ่งของเทคนิค QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) ซึ่งเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชหรือสารพิษในอาหารสัตว์และตัวอย่างทางชีวภาพ โดยใช้การสกัดด้วย acetonitrile ตามด้วยการทำความสะอาดด้วย dSPE เช่น magnesium sulfate และ PSA
- **Concentration or Evaporation** เป็นเทคนิคที่ทำให้สารพิษเข้มข้นขึ้นโดยการระเหยตัวทำละลายออก เช่น การใช้ nitrogen blow-down หรือ vacuum evaporation เป็นเทคนิคเสริมที่ใช้หลังจากขั้นตอนสกัด เพื่อเพิ่มความสามารถในการตรวจวัดของสารพิษที่มีความเข้มข้นต่ำ

- **Microdiffusion** เป็นเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่ใช้หลักการแพร่ของสารระเหย (volatile compounds) จากสารละลายตัวอย่างหนึ่ง ไปยังอีกเฟสหนึ่งที่ทำหน้าที่ดูดซับหรือดักจับสารนั้นไว้ โดยไม่ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เทคนิคนี้เหมาะสำหรับการตรวจวัดสารพิษที่มีลักษณะเป็นสารระเหยหรือสามารถเปลี่ยนเป็นรูปแบบระเหยได้ เช่น แอมโมเนีย ไซยาไนด์ หรือซัลไฟต์ ในระบบไมโครดิฟฟิวชันทั่วไป ตัวอย่างจะถูกวางไว้ในช่องหนึ่งของภาชนะปิด (เช่น Conway cell หรือ microdiffusion cell และในอีกช่องหนึ่งจะเป็นตัวดูดซับ (เช่น กรดหรือด่าง) เพื่อดักจับสารระเหยที่แพร่ออกมา เมื่อปิดภาชนะไว้ให้มิดชิดและตั้งทิ้งไว้ในระยะเวลาที่เหมาะสม สารระเหยจะเคลื่อนที่ผ่านช่องว่างอากาศ (air gap) ไปยังเฟสดูดซับ และสามารถนำเฟสดังกล่าวไปวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิคการวัดทางสเปกโตรสโกปีหรือโครมาโทกราฟี ข้อดีของ microdiffusion คือสามารถแยกสารเป้าหมายออกจากเมทริกซ์ที่มีองค์ประกอบรบกวนจำนวนมาก เช่น เลือดหรือเนื้อเยื่อสัตว์ เทคนิคนี้ใช้ได้เฉพาะกับสารที่มีคุณสมบัติระเหยได้หรือสารที่สามารถเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของสารที่ระเหยได้เท่านั้น

บทที่ 4

สารเคมีกำจัดแมลง (Insecticides)

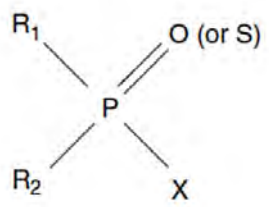
สารเคมีกำจัดแมลง (Insecticides) เป็นสารเคมีที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมประชากรแมลงศัตรูพืชและแมลงพาหะของโรคต่าง ๆ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพืชผลทางการเกษตรและป้องกันโรคที่ติดต่อผ่านแมลง สารกำจัดแมลงถูกใช้มาตั้งแต่ยุคโบราณ โดยเริ่มจากสารธรรมชาติ เช่น ซัลเฟอร์ สารสกัดจากพืช และโลหะหนัก ซึ่งมีหลักฐานการใช้งานย้อนหลังได้นานกว่า 4,000 ปี ต่อมาในช่วงศตวรรษที่ 19 และ 20 ได้มีการพัฒนาและใช้สารเคมีกำจัดแมลงสังเคราะห์ อาทิ DDT และสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ซึ่งให้ประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงสูง แต่ในขณะเดียวกันก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม สุขภาพมนุษย์ และสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมาย

สารเคมีกำจัดแมลง (Insecticides) เป็นสารกำจัดศัตรูพืช (Pesticides) ประเภทหนึ่งแบ่งตามโครงสร้างของสารได้ดังนี้คือ กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphates) คาร์บาเมต (Carbamates) ออร์กาโนคลอรีน (Organochlorines) และไพรีทรอยด์ (Pyrethroids)

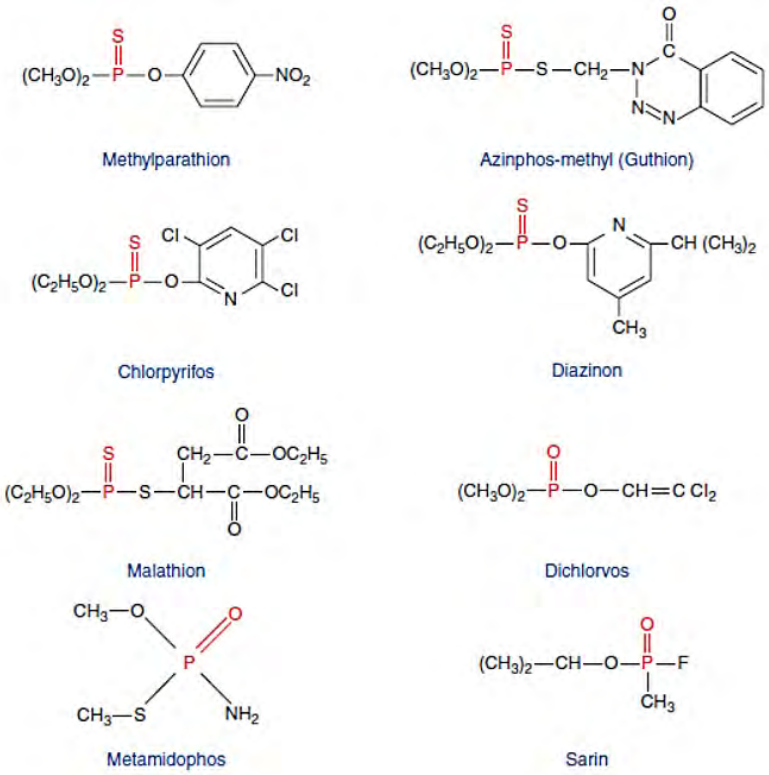
4.1 สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphates; OPs) และคาร์บาเมต (Carbamates; CMs)

เรียกรวมว่า anticholinesterase insecticides เป็นกลุ่มสารประกอบสังเคราะห์ที่มีการใช้งานอย่างแพร่หลายเพื่อวัตถุประสงค์หลากหลาย ได้แก่ (1) เป็นสารเคมีกำจัดแมลงเพื่อปกป้องพืชผลทางการเกษตร สวนหย่อม ที่พักอาศัย และสำนักงาน (2) เป็นอาวุธในการสงคราม ภัยคุกคาม และการก่อการร้าย และ (3) เป็นสารรักษาโรคในทางการแพทย์ทั้งในมนุษย์และสัตวแพทย์ สารกลุ่มนี้มีการใช้อย่างกว้างขวางในการปกป้องสุขภาพของประชาชนจากโรคต่าง ๆ เช่น โรคมาลาเรีย โรคติดเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ โรคลายม์ (Lyme disease) และโรคอื่น ๆ โดยควบคุมพาหะนำโรค เช่น ยุง เห็บ เป็นต้น นอกจากนี้สารเคมีกำจัดแมลงเหล่านี้ยังถูกนำมาใช้ในการวางยาพิษโดยเจตนาในมนุษย์ และการวางยาพิษโดยมุ่งร้ายในสัตว์ และสัตว์ป่า ปัจจุบัน OPs และ CMs ถือเป็นกลุ่มสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่มีการใช้งานมากที่สุดในภาคการเกษตร อุตสาหกรรมการปลูกไม้ดอก และป่าไม้ทั่วโลก

4.1.1 สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม OPs มีต้นกำเนิดมาจากการศึกษาก๊าซพิษต่อระบบประสาท (nerve gases) ในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 OPs เข้ามาแทนที่สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม OCs ที่ถูกห้ามใช้ โดย OPs มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ไม่ดี ออกฤทธิ์กำจัดแมลงได้ดี มีปัญหาในการตกค้างน้อย ไม่สะสมในร่างกาย และในไขมัน ปกติมีการใช้อยู่ในรูปแบบของสารเดี่ยวหรือใช้ร่วมกับสารอื่น ๆ OPs เป็นสารประกอบที่มีหมู่ฟอสเฟตหรืออนุพันธ์ของฟอสเฟตเป็นส่วนหนึ่งของ organic molecule (ซึ่งมีธาตุคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ) โดยทั่วไป OPs มักอยู่ในรูปของ esters, amides หรืออนุพันธ์ของ thiol ของกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) มีสูตรโครงสร้างทั่วไป (รูปที่ 4-1) ซึ่งชนิดของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม OPs มีมากมายหลายชนิด เช่น methyl parathion, chlorpyrifos, malathion azinphos-methyl, diazinon, dichlorvos, methamidophos และ สารทำลายประสาทซาริน (nerve agent sarin) เป็นต้น (รูปที่ 4-2)



รูปที่ 4-1 สูตรโครงสร้างทั่วไปของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม Organophosphates
ที่มา: Klaassen (2013)



รูปที่ 4-2 ตัวอย่างสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม Organophosphates บางชนิดและสารทำลายประสาทซาริน
ที่มา: Klaassen (2013)

4.1.2 สารกำจัดแมลงกลุ่ม CMs เป็นสารอนุพันธ์ของกรดคาร์บามิก (carbamic acid; NH_2COOH) ซึ่งเป็นสารพื้นฐานที่มีความไม่เสถียรสูง จึงนิยมใช้เป็นสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม CMs โดย CMs มีสูตรโครงสร้างทั่วไป ดังรูปที่ 4-3 พบว่าสารอนุพันธ์ที่มีหมู่เอ็น-เมทิล (N-methyl derivatives) เช่น คาร์บาริล (carbaryl) หรือ 1-naphthyl N-methylcarbamateซึ่งรู้จักกันในชื่อทางการค้าว่า “Sevin” เป็นสารกำจัดแมลงที่ถูกนำมาใช้แพร่หลายมากที่สุดในกลุ่มนี้ นอกจากนี้ CMs ยังมีอีกหลายชนิด เช่น methomyl, carbofuran, carbosulfan, thiodicarb และ aldicarb เป็นต้น โดยมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 4-4

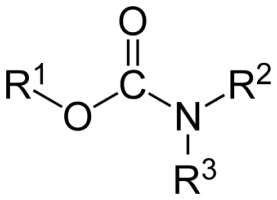
กลไกการออกฤทธิ์

สารกำจัดแมลงกลุ่ม Organophosphates (OPs) และ Carbamates (CMs) ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส (cholinesterase; ChE) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสลายสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีน (acetylcholine; ACh) ในระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทอัตโนมัติ สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม OPs บางชนิดมีความเป็นพิษสูง โดยกลไกการออกฤทธิ์ของสารเหล่านี้คล้ายคลึงกันทั้งในแมลงและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมChE แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่

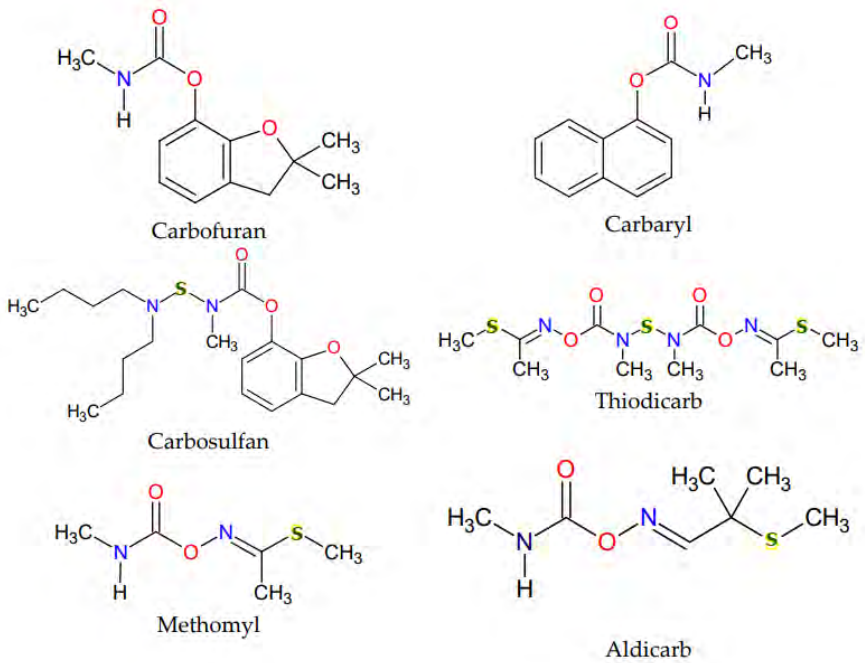
1. Acetylcholinesterase (AChE) หรือ *true cholinesterase* พบในเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง ปลายประสาท ปอด และเนื้อเยื่อสมอง

2. Pseudocholinesterase (PChE) หรือ *plasma/serum cholinesterase* ซึ่งสร้างโดยตับ พบในพลาสมา ตับอ่อน หัวใจ และสมอง

ในทางคลินิก การยับยั้ง AChE นับว่ามีความสำคัญมากที่สุด OPs จะจับกับ AChE โดย OPs ทำหน้าที่ phosphorylate หมู่กรดอะมิโน serine บนเอนไซม์ ส่งผลให้ AChE ไม่สามารถทำงานได้ การย้อนกลับของการจับขึ้นอยู่กับโครงสร้างของหมู่แทนที่ใน OPs โดยบางชนิดอาจจับแน่นและไม่สามารถย้อนกลับได้ง่าย โดยเฉพาะเมื่อเวลา



รูปที่ 4-3 สูตรโครงสร้างทั่วไปของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม Carbamates
ที่มา: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Carbamate-group-2D.png



รูปที่ 4-4 สูตรโครงสร้างของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม Carbamates บางชนิด
ที่มา: Pereira *et al*. (2023)

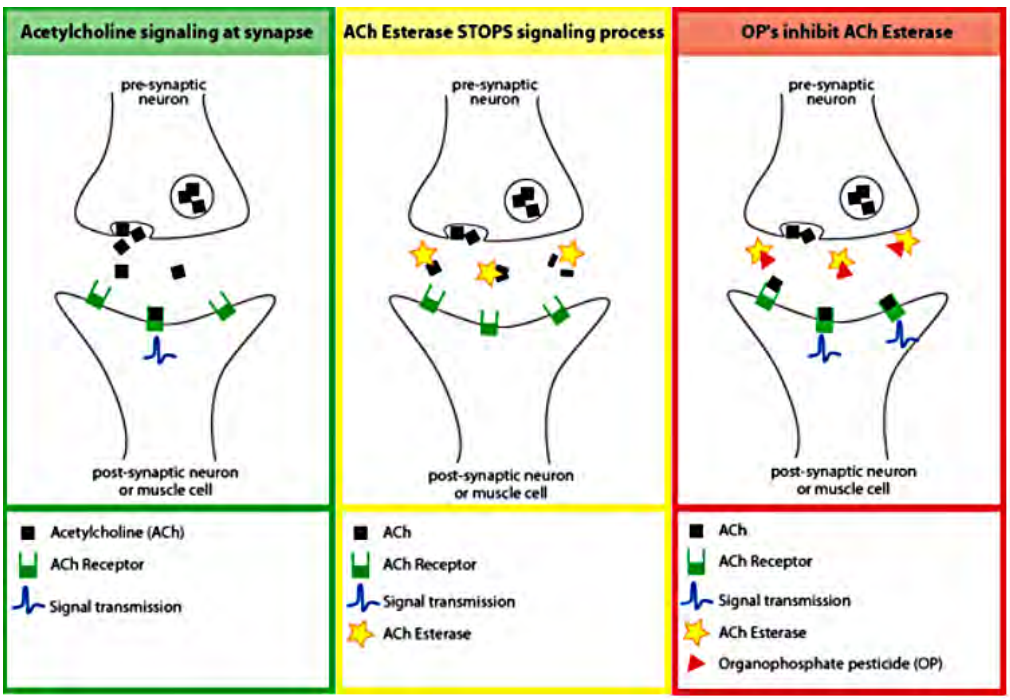
ผ่านไปหลังจากการจับ เรียกกระบวนการนี้ว่า aging ซึ่งทำให้การฟื้นคืนการทำงานของเอนไซม์เป็นไปไม่ได้ ส่งผลให้เกิดพิษเพิ่มขึ้น ส่วนกลไกการเกิดพิษของ CMs เกิดจากการที่ AChE ถูกยับยั้งโดยการเกิดกระบวนการคาร์บามิเลชัน (carbamylation) ซึ่งเป็นการยับยั้งแบบย้อนกลับได้ (reversible inhibition) ลักษณะอาการพิษจะปรากฏเร็วกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ OPs โดยเอนไซม์จะสามารถกลับมาทำงานได้เองอย่างรวดเร็ว (spontaneous reactivation)

ในภาวะปกติ ACh ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทจะถูก AChE ย่อยสลาย (hydrolysis) ไปเป็น choline และกรดอะซิติก (acetic acid) ภายหลังการส่งกระแสประสาท ถ้าเอนไซม์ AChE ถูกยับยั้งโดย OPs หรือ CMs จะเกิดการสะสมของ ACh ในบริเวณปลายประสาท ทำให้เกิดการกระตุ้นที่มากเกินไป (รูปที่ 4-5) โดยเฉพาะในบริเวณที่มีการส่งสัญญาณผ่านตัวรับ cholinergic ได้แก่

- จุดเชื่อมต่อแบบ muscarinic cholinergic synapses ของระบบประสาทอัตโนมัติพาราซิมพาเทติก (PNS) และระบบประสาทส่วนกลาง (CNS)
- จุดเชื่อมต่อแบบ nicotinic cholinergic synapses หรือ neuromuscular junction ระหว่างปลายประสาทกับกล้ามเนื้อในกล้ามเนื้อเรียบ กล้ามเนื้อหัวใจ และต่อมมีท่อต่างๆ

ความแตกต่างที่สำคัญระหว่าง OPs และ CMs คือ

- OPs จะจับกับ AChE อย่างถาวรเมื่อเกิดกระบวนการ aging ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้อีก (irreversible) ต้องรอให้ร่างกายสร้างเอนไซม์ใหม่
- CMs จะจับกับ AChE แบบชั่วคราว (reversible) โดยมีครึ่งชีวิตประมาณ 30–40 นาที ซึ่งแม้เป็นระยะเวลาสั้น แต่ก็สามารถทำให้เกิดอาการพิษและถึงขั้นเสียชีวิตได้หากไม่ได้รับการรักษาอย่างเหมาะสม



รูปที่ 4-5 กลไกการออกฤทธิ์ของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม Organophosphates โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetyl cholinesterase (AChE)
ที่มา: https://depts.washington.edu/opchild/acute.html

อาการทางคลินิก

อาการทางคลินิกมักเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายหลังการได้รับ OPs หรือ CMs ทางปาก โดยทั่วไปจะปรากฏภายในระยะเวลาไม่เกิน 6 ชั่วโมง กรณีที่ได้รับผ่านทางผิวหนังอาการทางคลินิกอาจแสดงออกช้ากว่าเดิม แต่ถ้าได้รับในปริมาณมาก และเป็น OPs หรือ CMs ชนิดที่มีความเป็นพิษสูง อาจเกิดการล้มลงทันที หายใจไม่ออก (asphyxiation) และตายจากการหายใจล้มเหลว

อาการที่พบมีลักษณะของการกระตุ้นระบบโคลิเนอร์จิก แบ่งได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ อาการแบบ muscarinic, nicotinic และอาการจากระบบประสาทส่วนกลาง (CNS signs)

อาการพิษแบบมัสคารินิก (Muscarinic type)

จะเกิดอาการน้ำลายไหลมากผิดปกติ การเคลื่อนไหวของระบบทางเดินอาหารมากเกิน ปวดเกร็งในช่องท้อง อาเจียน ท้องเสีย น้ำตาไหล เหงื่อออก ปัสสาวะบ่อย หายใจลำบากจากการหดตัวของหลอดลมและการคั่งของสารคัดหลั่งในปอด รูม่านตาหดเล็ก ผิวหนังเขียวคล้ำ (cyanosis)

อาการพิษแบบแบบนิโคตินิก (Nicotinic type)

จะเกิดเกิดการกระตุ้นของกล้ามเนื้อลายมากเกิน ทำให้กล้ามเนื้อใบหน้า หนังตา และลิ้นกระตุก อาจเกิดภาวะเกร็งทำให้สัตว์เดินลักษณะขาแข็งเหมือนม้าน้ำ และมีอาการอ่อนแรงจนถึงอัมพาตของกล้ามเนื้อลายและกล้ามเนื้อหายใจ

อาการพิษแบบระบบประสาทส่วนกลาง (CNS type)

อาการพิษแบบนี้แตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ โดยสัตว์ที่ผลิตขึ้นสำหรับใช้เป็นอาหารมักจะแสดงอาการกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางมากเกิน แต่อาการชักกระตุกพบไม่บ่อย (ยกเว้นในสุนัขและแมว) กระวนกระวาย ซึมตามด้วยการกดประสาทส่วนกลาง และตายในที่สุด

วัวและแกะมักแสดงอาการกดประสาทอย่างรุนแรง OPs บางชนิด (เช่น amidothioates) ไม่เข้าสู่สมองได้โดยง่าย อาการจึงอ่อน อาการเริ่มแสดงหลังได้รับ OPs ภายในไม่กี่ชั่วโมง หรืออาจล่าช้าถึง 2 วัน ความรุนแรงและอาการของการเกิดพิษขึ้นอยู่กับขนาดหรือปริมาณและวิธีการได้รับสัมผัส ในกรณีพิษเฉียบพลัน อาการทางคลินิก แรกเริ่มอาจพบการกดการหายใจและล้มลง และตายเนื่องจากกล้ามเนื้อหายใจเป็นอัมพาต

ความเป็นพิษ

ความผิดพลาดที่เกิดจากการใช้ การผสม หรือการจัดเก็บสารกำจัดแมลงที่เหลือใช้ที่ไม่เหมาะสม เป็นสาเหตุที่พบบ่อยของการได้รับสารพิษในสัตว์ ซึ่งนำไปสู่ภาวะพิษได้ เนื่องจาก OPs บางชนิดมีความเป็นพิษสูง สัตว์จึงสามารถได้รับพิษได้เพียงแค่เลียถุงที่ว่างเปล่า สีหรือกลิ่นของสารกำจัดแมลงอาจช่วยให้เจ้าของสามารถระบุสารดังกล่าวได้ แต่กลิ่นหรือสีเหล่านั้นไม่ได้ช่วยยับยั้งการกินเข้าไปของสัตว์ แม้ว่าสารกำจัดแมลง ทั้ง OPs และ CMs จะประกอบด้วยผลิตภัณฑ์ที่มีความเป็นพิษสูงที่สุดที่เคยมีการวางจำหน่าย (เช่น ค่า LD_{50} ต่ำกว่า 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) แต่ระดับความเป็นพิษก็มีความหลากหลายอย่างมาก การพิจารณาความเข้มข้นของสูตรหรือเงื่อนไขการใช้งานมีแนวโน้มที่จะเป็นปัจจัยที่สำคัญกว่าสำหรับสัตวแพทย์ในการประเมินโอกาสการเกิดพิษ สัตว์อายุน้อยมีแนวโน้มได้รับพิษจากสารเหล่านี้ในขนาดที่ต่ำกว่า เนื่องจากระบบเอนไซม์ที่ใช้ในการสลายสารพิษยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ ตัวอย่างค่า LD_{50} ของสารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่ม OPs และ CMs ดังแสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 แสดงตัวอย่างค่า LD_{50} ของสารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่ม OPs และ CMs (มาลี และอนุสรณ์, 2556; National Center for Biotechnology Information, 2025)

ชนิดสารเคมีกำจัดแมลง	กลุ่ม	ค่า LD_{50} (oral)		ค่า LD_{50} (dermal)	
		ชนิดสัตว์	ปริมาณ (mg/kg)	ชนิดสัตว์	ปริมาณ (mg/kg)
Chlorpyrifos	OPs	goats	500	rats	202
		rats	82	rabbits	1233
Azinphos-methyl	OPs	rats	7	rats	88
Diazinon	OPs	rats	66	rats	180
Malathion*	OPs	rats	290	rabbits	4100
Methyl parathion**	OPs	rats	6	rats	67
		mice	14.5-19.5	rabbits	300
		dogs	90	mice	1200
Parathion***	OPs	rats	3	rats	6.8-50
		mice	5-25	mice	19
		guinea pigs	8-32	guinea pigs	45
		rabbits	10	rabbits	15
		cats	0.93	-	-
		dogs	3-5	-	-
Monocrotophos	OPs	rats	8	rabbits	354
Methomyl	CMs	rats	17	rats	5000
		mice	10	rabbits	5880
		dogs	20	-	-
Carbaryl	CMs	rats	307	rabbits	2000
		mice	100-650	rabbits	>2000
Carbofuran	CMs	rats	8	rabbits	2550
		dogs	19	rabbits	>1000
		chickens	6.3	-	-
		ducks	0.415	-	-
		pheasants	4.2	-	-
		quails	5	-	-
		wild birds	0.42	-	-

* = ขนาดของ Malathion ที่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลันทางปากในลูกโคอยู่ที่ประมาณ 10-20 mg/kg และในโคและแกะโตเต็มวัยอยู่ที่ประมาณ 50-100 mg/kg ส่วนค่า LD_{50} ทางปากในลูกกระบือเท่ากับ 53 mg/kg

** = ขนาดของ Methyl parathion ที่ทำให้โคตายเท่ากับ 100 mg/kg

*** = ขนาดต่ำสุดของ Parathion ที่ทำให้สัตว์ตายเมื่อได้รับทางปาก (minimum oral lethal dose) เช่น

- แกะ เท่ากับ 20 mg/kg
- แพะ เท่ากับ 50 mg/kg
- แมว เท่ากับ 0.93 mg/kg
- สุนัข 5 mg/kg

4.2 สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorines; OCs)

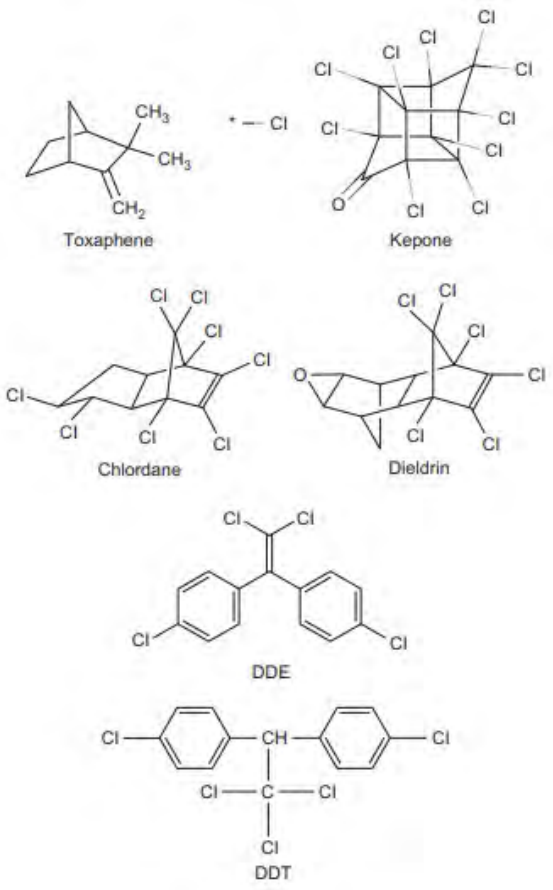
สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม OCs หรือ chlorinated hydrocarbons เป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชอินทรีย์กลุ่มแรกที่มนุษย์สังเคราะห์ขึ้น โดยมีการใช้อย่างแพร่หลายทั่วโลกตั้งแต่ช่วงทศวรรษ 1940 เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดแมลง OCs ส่วนใหญ่ได้ถูกสั่งห้ามใช้ในประเทศสหรัฐอเมริกาเมื่อช่วงทศวรรษ 1980 อย่างไรก็ตาม แม้จะมีคำสั่งห้ามใช้อย่างเป็นทางการแล้ว สารเคมีเหล่านี้ก็ยังคงส่งผลกระทบทางสุขภาพในสัตว์และคนทั้งในประเทศ

สหรัฐอเมริกาและทั่วโลก OCs สามารถสะสมในไขมันและในสิ่งแวดล้อมได้ดี จึงทำให้เกิดการตกค้างและปนเปื้อนเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารไปยังสัตว์และคนได้ OCs มีฤทธิ์ตกค้างยาวนานในสิ่งแวดล้อม (persistent organic pollutants; POPs) และหลายชนิดเป็นสารก่อมะเร็ง ปัจจุบันทั่วโลกได้ยกเลิกการใช้ การนำเข้า หรือมีการควบคุมการใช้เท่าที่จำเป็น

OCs เป็นเป็นสารอินทรีย์สังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบของคลอรีน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

- กลุ่ม Dichlorodiphenylethanes เช่น Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), Dicofol และ Methoxychlor
- กลุ่ม Chlorinated cyclodienes เช่น Aldrin, Dieldrin, Endrin, Chlordane, Endosulfan และ Heptachlor
- กลุ่ม Chlorinated benzenes และ Cyclohexanes เช่น Lindane (Gamma-BHC และ HCH), Chlordecone (Kepone), hexachlorocyclohexanes, Mirex และ Toxaphene

ตัวอย่างสูตรโครงสร้างของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม OCs ดังรูปที่ 4-6



รูปที่ 4-6 ตัวอย่างสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม Organochlorines ชนิดต่าง ๆ พร้อมสูตรโครงสร้าง
ที่มา: Gupta (2018)

กลไกการออกฤทธิ์

กลไกความเป็นพิษของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม Organochlorines ส่วนใหญ่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามสารเหล่านี้ล้วนก่อให้เกิดภาวะที่เซลล์ประสาทของระบบประสาทส่วนกลางมีความไวต่อการกระตุ้นสูงกว่าปกติ (central nervous hyperexcitability) มีรายงานว่า DDT รบกวนการทำงานของ sodium channels ในเยื่อหุ้มเซลล์ประสาท โดยส่งผลให้มีการไหลเข้าของโซเดียมเพิ่มขึ้นและยับยั้งการไหลออกของโพแทสเซียม ทำให้ไปกระตุ้นการออกฤทธิ์และเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดอาการชัก

นอกจากนี้ metabolite บางชนิดของ DDT ยังสามารถทำให้เกิดเนื้อเยื่อตายเฉพาะที่ (selective necrosis) ในบริเวณ zona fasciculata และ zona reticularis ของต่อมหมวกไต โดย Mitotane ซึ่งใช้ในการรักษาภาวะต่อมหมวกไตทำงานมากเกิน (hyperadrenocorticoidism) เป็นหนึ่งใน metabolite ดังกล่าว แม้ว่ากลไกการออกฤทธิ์ของ OCs กลุ่ม Chlorinated cyclodienes ยังไม่ชัดเจน แต่มีหลักฐานว่าสารกลุ่มนี้ก่อให้เกิดการกระตุ้นของระบบประสาทและจัดเป็น OCs กลุ่มที่มีความเป็นพิษสูงที่สุด โดยเชื่อว่ามีผลเพิ่มการหลั่งสารสื่อประสาทที่ cholinergic synapses และอาจยับยั้งการสังเคราะห์ glutamine ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มของแอมโมเนียในสมอง สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม OCs บางชนิด เช่น Lindane, Heptachlor และ Mirex สามารถยับยั้งการจับของ GABA ที่ตำแหน่ง postsynaptic โดยทั่วไป ค่า LD_{50} ในสุนัขอยู่ในช่วง 15 ถึง 65 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม และแมวเป็นสัตว์เลี้ยงที่ไวต่อพิษมากที่สุดในบรรดาสัตว์เลี้ยงทั้งหมด

อาการทางคลินิก

อาการทางคลินิกระยะแรกในสัตว์ คือ ตื่นเต้น กระวนกระวาย กล้ามเนื้อสั่น การเคลื่อนไหวไม่ประสานกัน และไวต่อสิ่งเร้าเกินปกติ สัตว์อาจมีพฤติกรรมก้าวร้าว สำหรับโคอาจพบว่ามีการเดินถอยหลัง หรือมีพฤติกรรมเคี้ยวหรือเลียสิ่งของอย่างผิดปกติ อาการทางคลินิกอาจปรากฏภายในไม่กี่นาทีหลังจากได้รับสาร หรืออาจล่าช้าได้นานถึง 2 วัน เมื่อภาวะพิษดำเนินต่อไป สัตว์จะเริ่มมีอาการกล้ามเนื้อกระตุก โดยมักเริ่มที่กล้ามเนื้อบริเวณหัวและลำคอ จากนั้นจะเกิดอาการชักเป็นระยะ ซึ่งมักลุกลามจากส่วนหัวไปยังส่วนท้ายของร่างกาย และอาจพบอาการเกร็งหลังแอ่น (opisthotonus) ถีบขาไม่เป็นจังหวะ และการขบกรามระหว่างอาการชัก สัตว์อาจมีสภาพปกติหรือซึมก็ได้ มักพบว่ามีภาวะไข้สูงร่วมด้วย และอาการชักอาจคงอยู่ได้นานถึง 3 วัน สัตว์จะมีอาการซึมลงเรื่อย ๆ และตายในที่สุด

ความเป็นพิษ

แมวเป็นสัตว์ที่ไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม OCs มากที่สุด โดยมีค่า LD_{50} ของ Endrin อยู่ที่ 3-6 mg/kg กลุ่ม Chlorinated cyclodienes เป็นกลุ่มที่ทำให้เกิดอาการชักได้มากกว่าและมีค่า LD_{50} ต่ำกว่าสารกลุ่ม DDT ในสัตว์ส่วนใหญ่ สำหรับหนูทดลองค่าความเป็นพิษทางปาก (oral LD_{50}) ของ DDT อยู่ระหว่าง 113-2500 mg/kg และค่าความเป็นพิษทางหลอดเลือดดำ (IV LD_{50}) อยู่ที่ 47 mg/kg ในมนุษย์อาการพิษจากการได้รับสาร OCs ทางปากสามารถปรากฏได้เมื่อรับเข้าสู่ร่างกายในปริมาณประมาณ 10 mg/kg ค่าความเป็นพิษเฉียบพลันของ OCs ในหนูและกระต่ายแสดงไว้ในตารางที่ 4-2

- การได้รับสาร OC แบบเฉียบพลันและเรื้อรังสามารถก่อให้เกิดผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์และการพัฒนาทั้งในสัตว์และมนุษย์ โดยมีรายงานว่าการได้รับ DDT แบบเรื้อรังส่งผลให้เปลือกไข่ของนกป่าบางชนิดบางลง และทำให้อัตราการสืบพันธุ์ลดลง
- ลูกโคมีความไวต่อ Lindane สูงมาก และสามารถเกิดภาวะพิษได้จากการได้รับ Lindane ทางปากเพียงครั้งเดียวในขนาด 4.4 mg/kg สำหรับแกะอาการทางคลินิกแบบไม่รุนแรงจะปรากฏเมื่อได้รับสารในขนาด 22 mg/kg และตายเมื่อได้รับขนาด 100 mg/kg โคเต็มวัยสามารถทนต่อ Lindane ขนาด 13 mg/kg ได้โดยไม่แสดงอาการ
- ลูกโคตายได้ ถ้าได้รับ Chlordane ขนาด 44 mg/kg และขนาดที่ก่อให้เกิดพิษต่ำสุดในโคอยู่ที่ประมาณ 88 mg/kg ค่าเฉลี่ยของขนาดที่ทำให้หนู (rats) กระต่าย และสุนัขตายได้ โดยให้ Chlordane ทางปากเพียงครั้งเดียวประมาณ 200-300 mg/kg แพะมีความไวสูงต่อสารพิษชนิดนี้
- ลูกโคนมสามารถทนต่อ Heptachlor ได้ถึงขนาด 13 mg/kg โดยไม่แสดงอาการ แต่จะแสดงอาการพิษเมื่อได้รับในขนาด 22 mg/kg แกะสามารถทนต่อขนาด 22 mg/kg แต่จะเกิดพิษเมื่อได้รับขนาด 40 mg/kg
- ลูกโคนมสามารถทนต่อ Methoxychlor ได้ถึง 265 mg/kg และขนาด 500 mg/kg จัดว่าเป็นขนาดที่ทำให้เกิดพิษเล็กน้อย ในขณะที่ขนาด 1 g/kg จะทำให้เกิดพิษอย่างรุนแรงในลูกโค แต่ไม่พบอาการพิษในแกะ

ตารางที่ 4-2 แสดงค่าความเป็นพิษของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม Organochlorines บางชนิด (Gupta, 2018)

Compound	Rat Acute Oral LD_{50} (mg/kg)	Rabbit Dermal LD_{50} (mg/kg)
Lindane	76-190	500
Aldrin	39-60	65
Dieldrin	40	65
Endrin	3	12
Chlordane	283-1100	580
Endosulfan	18-76	74
Mirex	235->3000	800
Kepone	95-125	345
Toxaphene	40-127	600

4.3 สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์ (Pyrethroids; PYRs)

สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม PYRs เป็นสารสังเคราะห์เลียนแบบ pyrethrins โดย pyrethrins นั้นเป็นสารออกฤทธิ์ในการกำจัดแมลงที่พบอยู่ในสารธรรมชาติคือ pyrethrum ซึ่งสกัดได้จากดอกเบญจมาศ (*Chrysanthemum cinerariaefolium* หรือ *Pyrethrum cinerariaefolium*) ในทางเคมี PYRs จัดเป็นเอสเตอร์ของ chrysanthemic acid โดยมีชื่อทางเคมีว่า ethyl 2,2-dimethyl-3-(1-isobutenyl) cyclopropane-1-carboxylate PYRs เป็นสารกำจัดแมลงสังเคราะห์ประเภทอินทรีย์ ซึ่งมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายตั้งแต่ช่วงทศวรรษ 1980 เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง มีความเป็นพิษต่ำ ตลอดจนมีความคงตัวต่อแสง (photostability) และการตกค้างในสิ่งแวดล้อมต่ำ จึงเป็นเหตุให้ PYRs เข้ามาแทนที่สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม OPs และ CMs

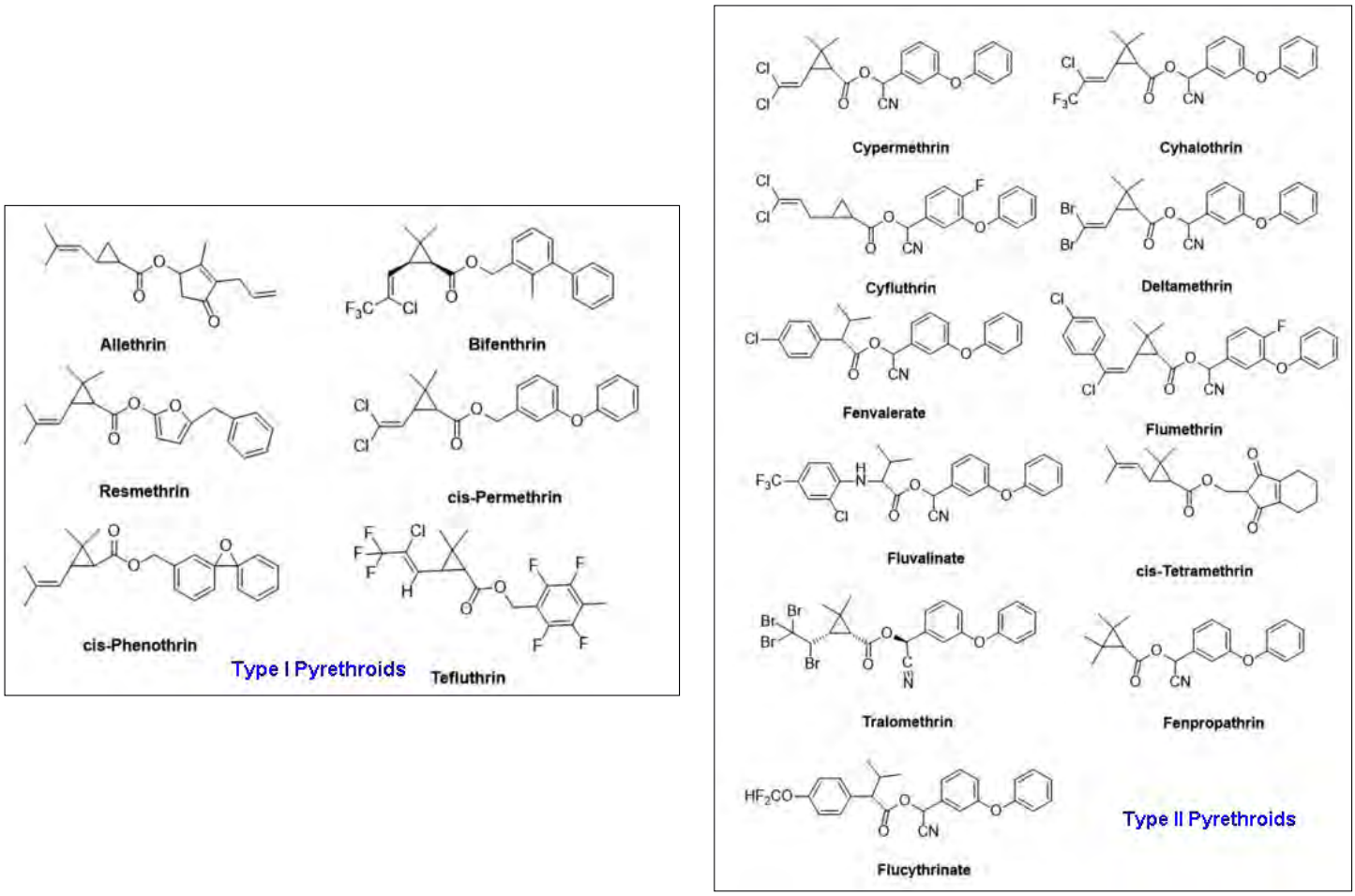
PYRs มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชหลากหลายชนิด ทั้งในสัตว์เลี้ยงและสัตว์เศรษฐกิจ อีกทั้งยังมีการนำมาใช้ในภาคเกษตรกรรม ภายในบ้านเรือน สวน และในการควบคุมแมลงเพื่อการสาธารณสุขในวงกว้าง เนื่องจากมีระดับความปลอดภัยสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารกำจัดแมลงกลุ่มอื่น ๆ โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม OCs

ผลิตภัณฑ์ไพรีทรอยด์ส่วนใหญ่ถูกนำมาใช้กับสัตว์โดยการใช้ทางผิวหนัง อย่างไรก็ตามเนื่องจากพฤติกรรมเลียทำความสะอาดตัวของสัตว์ อาจมีการได้รับสัมผัสทางปากและทางการหายใจร่วมด้วย การดูดซึมผ่านผิวหนังของ PYRs ที่ใช้ภายนอกนั้นน้อยกว่า 2% การได้รับ PYRs ทางปากหรือทางการหายใจจะทำให้ PYRs เข้าสู่ระบบได้เร็วกว่าการใช้ทางผิวหนัง PYRs เป็นสารที่ละลายได้ดีในไขมัน สามารถจะกระจายตัวไปยังเนื้อเยื่อที่มีไขมันสูง เช่น เนื้อเยื่อไขมันและระบบประสาท รวมถึงตับ ไต และน้ำนม

PYRs สามารถจำแนกออกเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ Type I Pyrethroids และ Type II Pyrethroids โดยพิจารณาจากโครงสร้างทางเคมี ซึ่ง Type II มีหมู่ α-cyano อยู่ในโมเลกุล ขณะที่ Type I ไม่มีหมู่ดังกล่าว โครงสร้างที่แตกต่างกันนี้ทำให้ทั้ง 2 กลุ่มมีความเป็นพิษและลักษณะทางคลินิกต่างกัน โดยทั่วไปแล้ว Type II มีความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสูงกว่า Type I ตัวอย่างชนิดของ PYRs ที่อยู่ใน Type I และ Type II ดังตารางที่ 4-3 และสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 4-7

ตารางที่ 4-3 ตัวอย่างชนิดของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม Pyrethroids ใน Type I และ Type II Pyrethroids (Dalefield, 2017)

Type I Pyrethroids	Type II Pyrethroids
Allethrin	Cyfluthrin
Bifenthrin	Cyhalothrin
Permethrin	Cypermethrin
Phenothrin	Deltamethrin
Resmethrin	Genvalerate
Sumithrin	Flumethrin
Tefluthrin	Fluvalinate
Tetramethrin	Tralomethrin



รูปที่ 4-7 ตัวอย่างสูตรโครงสร้างของ Type I Pyrethroids และ Type II Pyrethroids
ที่มา: Ravula and Yenugu (2021)

กลไกการออกฤทธิ์

สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม PYRs มีฤทธิ์ขัดขวาง sodium channel ในเยื่อหุ้มแอกซอนของเซลล์ประสาทในสมอง ทำให้การทำงานของ sodium channel ที่ได้รับผลจาก PYRs นั้น เปิดและปิดช้ากว่า sodium channel ปกติ มีผลทำให้เซลล์ประสาทอยู่ในสภาวะที่มีความไวต่อการกระตุ้นสูงกว่าปกติ (hyperexcitability) หรือกล่าวอีกนัยหนึ่ง PYRs ทำให้การเปิด-ปิดของ sodium channel ในเซลล์ประสาทชะลอลง ส่งผลต่อกระแสโซเดียมช่วงท้าย (sodium tail currents) ซึ่งพบว่ายาวนานเป็นพิเศษใน Type II Pyrethroids เมื่อเปรียบเทียบกับ Type I Pyrethroids ผลกระทบที่ตามมาคือ Type I Pyrethroids มักก่อให้เกิดการปล่อยกระแสประสาทซ้ำ ๆ (repetitive discharges) ส่วน Type II Pyrethroids มีแนวโน้มทำให้เกิดภาวะการลดลงของศักย์ไฟฟ้า (depolarization) ของเยื่อหุ้มเซลล์มากกว่า

Type I Pyrethroids ก่อให้เกิดกลุ่มอาการทางระบบประสาทจากผลกระทบต่อทั้งระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทส่วนปลาย โดยมีอาการแสดง ได้แก่ สั่น การเคลื่อนไหวไม่ประสานกัน อ่อนแรง ชัก และตายในที่สุด

Type II Pyrethroids ออกฤทธิ์หลักผ่านกลไกของระบบประสาทส่วนกลาง ก่อให้เกิดกลุ่มอาการ choreoathetosis/salivation syndrome ซึ่งแสดงออกด้วยอาการตื่นตัวมากผิดปกติ หลังโก่ง น้ำลายไหล สั่น และมีการเคลื่อนไหวที่ไม่ประสานกัน โดยอาการจะพัฒนาไปเป็นการเคลื่อนไหวแบบบิดเบี้ยว

อาการทางคลินิก

อาการทางคลินิก ได้แก่ อาการน้ำลายไหล อาเจียน ไวต่อสิ่งเร้า สั่นอย่างรุนแรงและยาวนาน หายใจลำบาก ผิวหนังหรือเยื่อเมือกเขียวคล้ำจากการขาดออกซิเจน (cyanosis) อ่อนเพลีย และตาย อาการชักพบไม่บ่อยในสัตว์ส่วนใหญ่ แต่พบได้บ่อยในแมวที่ได้รับผลิตภัณฑ์ชนิดหยดหลังซึ่งออกแบบมาสำหรับสุนัข หรือแมวที่สัมผัสใกล้ชิดกับสุนัขที่ได้รับผลิตภัณฑ์ดังกล่าว อาการชักไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดได้ แต่ถ้าเกิดขึ้นแล้วมักรุนแรงและควบคุมได้ยาก การเกิดพิษจาก PYRs นี้มักเป็นแบบเฉียบพลันเสมอ ยังไม่พบรายงานภาวะพิษกึ่งเรื้อรังหรือเรื้อรัง

ภาวะพิษจาก PYRs พบได้บ่อยที่สุดในแมว โดยอาการที่พบอาจได้แก่ เท้าสั่น หูและหางกระตุก ผิวหนังบริเวณหลังกระตุก แมวบางตัวขณะเดินมีการเคลื่อนไหวของแขนขาที่ผิดปกติ

ในโคที่ได้รับการรักษาด้วยผลิตภัณฑ์ PYRs ในรูปแบบราดหลัง อาจแสดงอาการกระสับกระส่ายและรู้สึกไม่สบายที่ผิวหนังบริเวณหลังอย่างชัดเจน

อาการทางคลินิก อาจเกิดขึ้นภายในไม่กี่นาทีหลังจากสัมผัสสาร หรือภายใน 2–3 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับหนทางของการได้รับสัมผัส โดยสัตว์มักจะฟื้นตัวหรือตายภายใน 72 ชั่วโมง ในแมวอาจพบระยะเวลาของการแสดงอาการยาวนานกว่า

อาการแพ้ทางผิวหนังต่อ PYRs เป็นอาการที่พบได้บ่อย แต่อาการแพ้แบบรุนแรง (anaphylactic reaction) นั้นพบได้น้อย

ในทางสัตวแพทยศาสตร์ พบว่ามีการตอบสนองแบบเฉพาะตัว (idiosyncratic reaction) ต่อ PYRs ซึ่งเป็นปฏิกิริยาทางพิษที่เกิดในสัตว์บางตัวแม้ได้รับปริมาณต่ำกว่าระดับที่ก่อให้เกิดพิษในประชากรทั่วไป โดยปฏิกิริยาประเภทนี้มักคงอยู่ ดังนั้นจึงไม่ควรใช้ PYRs ในสัตว์ที่เคยมีการตอบสนองแบบเฉพาะตัวมาก่อน

ความเป็นพิษ

สัตว์ที่มีภาวะอ่อนแอหรือสุขภาพทรุดโทรมจากการถูกหมัดรบกวนอย่างรุนแรงหรือจากสภาวะอื่น ๆ จะมีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นต่อความเป็นพิษของ PYRs โดยผลิตภัณฑ์ PYRs ส่วนใหญ่ที่ใช้ในภาคการเกษตร (ยกเว้นการใช้กับปศุสัตว์และบริเวณสถานที่เลี้ยงสัตว์) จัดเป็นวัตถุอันตรายชนิดควบคุมการใช้ (Restricted-Use Pesticides: RUPs) เนื่องจากอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ ปลาเป็นสิ่งมีชีวิตที่ไวต่อผลิตภัณฑ์ PYRs อย่างมาก จึงควรหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนในแหล่งน้ำ เช่น ทะเลสาบ ลำธาร บ่อน้ำ หรือถิ่นอาศัยทางน้ำอื่น ๆ

เจ้าของบ้านที่มีตู้ปลาควรปิด tank pump ขณะใช้ผลิตภัณฑ์ PYRs ชนิดพ่นควันหรือชนิดอื่น ๆ ภายในบ้าน ซึ่งอาจทำให้ละอองสารเคมีถูกดูดเข้าสู่ระบบหมุนเวียนอากาศของตู้ปลา ควรปิดตู้ปลาและช่องรับอากาศก่อนการใช้ และเปิดอากาศถ่ายเทภายในบ้านให้ดีหลังการใช้ ก่อนเปิดฝาครอบและเปิดปั๊มอีกครั้ง

สำหรับสัตว์ชนิดพิเศษ (exotic species) หลายชนิด เช่น สัตว์จำพวก lagomorph และสัตว์เลื้อยคลาน ความไวต่อสารดังกล่าวยังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจน จึงควรใช้ด้วยความระมัดระวัง การใช้ PYRs ในนกโดยทั่วไปถือว่าปลอดภัยพอสมควร แต่อาจมีความเสี่ยงต่อระบบทางเดินหายใจจากสารตัวพา (carriers) หรือสารขับดัน (propellants) ที่ใช้ในสูตรสเปรย์ การศึกษาความเป็นพิษในนกโดยทั่วไปอาจไม่ครอบคลุมถึง exotic avian species จึงควรใช้ด้วยความระมัดระวังเช่นกัน ตัวอย่างค่าความเป็นพิษของ Type I Pyrethroids และ Type II Pyrethroids ดังแสดงในตารางที่ 4-4

ตารางที่ 4-4 ตัวอย่างค่าความเป็นพิษของ Type I Pyrethroids และ Type II Pyrethroids (Gupta, 2018)

Type I Pyrethroids	Oral LD_{50} (mg/kg) in Rat	Type II Pyrethroids	Oral LD_{50} (mg/kg) in Rat
Pyrethrin I	900	Cypermethrin	500
Allethrin	680	Deltamethrin	31
Tetramethrin	4640	Fenvalerate	450
Resmethrin	100	Fluvalinate	1000
Permethrin	2000	-	-

4.4 การตรวจวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม OPs, CMs, OCs และ PYRs ในตัวอย่างทางปศุสัตว์

หลักการตรวจวิเคราะห์ สารเคมีกำจัดแมลงที่อยู่ในตัวอย่างจะถูกสกัดออกมาด้วยเทคนิค QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) ซึ่งดัดแปลงวิธีจาก Anastassiades and Lehotay (2003) โดยในขั้นตอนการสกัดจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เข้ากับน้ำได้ดี เติมเกลือลงไปเพื่อดูดน้ำและทำให้เกิด salting out ตามด้วยการกำจัด matrix (clean up) ส่วนสกัดที่ได้โดยใช้ dispersive SPE นำส่วนใสที่ได้ไประเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วละลาย residue กลับด้วย acetone จากนั้นนำไปตรวจหาเอกลักษณ์สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม OPs, CMs, OCs และ PYRs ตามหลักการ TLC โดยเทียบกับสารมาตรฐาน กรณีที่ตรวจพบสารเคมีกำจัดแมลงชนิดใดชนิดหนึ่งให้ทำการตรวจยืนยันด้วยวิธี HPLC หรือวิธีอื่นที่เหมาะสมอีก 1 วิธี

ตัวอย่างที่ใช้ : อาหารในกระเพาะ ตับ ไต พืชอาหารสัตว์ อาหารสัตว์สำเร็จรูป ดิน น้ำ และวัตถุอื่นที่พบในที่เกิดเหตุ ทั้งนี้ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่เป็นอวัยวะ และพืชอาหารสัตว์ เช่น ตับ ไต หญ้า ฟาง เปลือกข้าวโพดตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ

สารเคมีและการเตรียม

- สารมาตรฐานสารเคมีกำจัดแมลงทุกชนิดที่ใช้ควรมีความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 90 (EURL/SANCO Guideline, 2006)
  - กลุ่ม OPs เช่น methyl parathion, monocrotophos, dimethoate, dichlorvos, chlorpyrifos และ diazinon เป็นต้น
  - กลุ่ม CMs เช่น methomyl, carbofuran, carbaryl, carbosulfan, bendiocarb และ methiocarb เป็นต้น
  - กลุ่ม OCs เช่น 4, 4'-DDT, heptachlor, chlordane, endrin และ dieldrin เป็นต้น
  - กลุ่ม PYRs เช่น cypermethrin และ deltamethrin เป็นต้น
- สารละลายมาตรฐานสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม OPs, CMs, OCs และ PYRs ความเข้มข้นชนิดละประมาณ 1000 µg/ml (ppm) เตรียมโดยชั่งสารมาตรฐานสารเคมีกำจัดแมลงประมาณ 0.0100 g ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml เติม acetone (PR grade) ลงไปประมาณ 2-3 ml ค่อย ๆ หมุน flask (swirl) แนวนอน ให้สารเคมีกำจัดแมลงละลาย แล้วเติมด้วย acetone จนครบปริมาตร ผสมให้เข้ากัน
- สารละลาย 2% (w/v) NBP : ชั่ง 4-(4-Nitrobenzyl-2-pyridine) 2 g ลงใน beaker เติม acetone 100 ml ผสมให้เข้ากัน
- สารละลาย 10% (v/v) Tetraehtylene pentamine (TEP) : ปิเปต TEP 10 ml ลงใน beaker เติม acetone 100 ml ผสมให้เข้ากัน
- สารละลาย 10% (w/v) Sodium hydroxide (NaOH) : ชั่ง NaOH 10 g ลงใน beaker เติมน้ำกลั่น 100 ml ผสมให้เข้ากัน

- สารละลาย 10% (v/v) Polyethylene glycol ใน acetone : ปิเปต Polyethylene glycol 600 ปริมาตร 10 ml ลงใน beaker เติม acetone 100 ml ผสมให้เข้ากัน
- สารละลาย Indicator : ชั่ง 4-Nitrobenzenediazonium tetrafluoroborate 0.2 g ลงใน beaker ละลายด้วยสารละลาย 10% (v/v) Polyethylene glycol ใน acetone 10 ml (เตรียมใหม่ ๆ ก่อนใช้)
- สารละลาย Chromogenic silver nitrate : ชั่ง Silver nitrate 1.7 g ลงใน beaker ละลายด้วยน้ำกลั่น 5 ml เติม 2-phenoxyethanol 10 ml จากนั้นเติม acetone 20 ml และ hydrogen peroxide 1 หยด
- สารละลาย 0.5% (w/v) o-Tolidine ใน 95% ethanol : ชั่ง o-Tolidine 0.5 g ลงใน beaker เติม 95% ethanol 100 ml ผสมให้เข้ากัน
- แก๊สคลอรีน [Cl2(g)] ชั่ง potassium permanganate (KMnO4) 1 g ลงใน beaker ขนาด 100 ml เติมกรด concentrated hydrochloric (conc. HCl acid) 10 ml นำไปวางใน TLC chamber ปิดฝา ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อให้ Cl2 อิ่มตัวทั่ว chamber ก่อนอบแผ่น TLC
- สารละลาย o-TKI : (1) ชั่ง o-Tolidine 0.2 g ลงใน beaker ละลายด้วย acetic acid 4 ml (2) ชั่ง potassium iodide (KI) 0.8 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 4 ml จากนั้นผสมสารละลายข้อ (1) และ (2) เข้าด้วยกัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 200 ml

วิธีวิเคราะห์

1. การสกัดตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง 10 g (ทำ blank ควบคู่ไปด้วย โดยใช้น้ำกลั่น 10 ml แทนตัวอย่าง) ใส่ใน centrifuge tube พลาสติกขนาด 50 ml เติม acetonitrile 10 ml ผสมด้วยเครื่อง vortex 1 นาที แล้วเติม Magnesium sulfate anhydrous ($MgSO_4$) 4 g และ Sodium chloride (NaCl) 1 g ผสมด้วยเครื่อง vortex 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 rpm อุณหภูมิ 15 °C นาน 5 นาที ปิเปตส่วนใสทั้งหมดลงใน centrifuge tube แก้วขนาด 15 ml (กรณีตัวอย่างที่สกัดเป็นน้ำ ให้ดูดส่วนใสข้างบนซึ่งเป็น acetonitrile) นำไประเหยด้วย Nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C ให้เหลือ 1 ml แล้วปิเปตใส่ microcentrifuge tube ที่บรรจุ PSA 25 mg กับ $MgSO_4$ 150 mg ผสมด้วยเครื่อง vortex 30 วินาที นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 6,000 rpm อุณหภูมิ 10 °C นาน 3 นาที ปิเปตส่วนใสทั้งหมดใส่ในหลอดแก้วก้นแหลม ระเหยแห้งด้วย Nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C แล้วละลาย residue ด้วย acetone 1 ml เก็บใส่ vial นำไปตรวจหาเอกลักษณ์ของ OPs, CMs, OCs และ PYRs ด้วยวิธี TLC

2. การตรวจเอกลักษณ์สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม OPs, CMs, OCs และ PYRs ด้วยวิธี TLC

2.1 สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม OPs

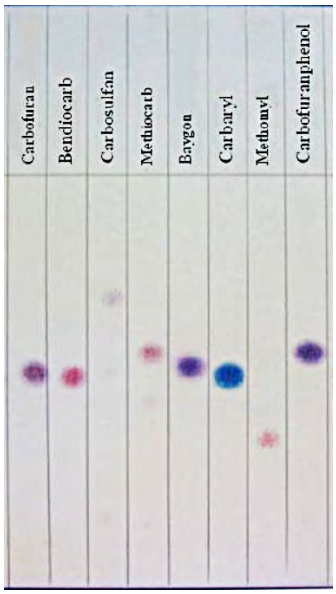
➢ นำสารละลายที่ได้จากการสกัดตัวอย่างในข้อ 1 และ blank มา spot ลงบนแผ่น TLC ที่เตรียมไว้ดูได้จากบทที่ 3 ข้อ 3) การเตรียมแผ่น TLC เพื่อตรวจวิเคราะห์] อย่างละ 20 µl และ spot สารละลายมาตรฐานที่เป็นตัวแทนกลุ่ม OPs เช่น methyl parathion, monocrotophos และ diazinon ชนิดละ 10 µl

➢ นำแผ่น TLC ไปแช่ใน TLC chamber ที่มี mobile phase เป็น Hexane:Acetone (3:1) เมื่อ mobile phase เคลื่อนที่มาถึง solvent front ให้นำแผ่น TLC ออกมาตั้งทิ้งไว้ให้ organic solvent ระเหยแห้งใน Fume hood

➢ นำไปทำให้ spot ของสารปรากฏหรือทำให้มองเห็นสาร (Visualization) ด้วยการ spray ด้วย สารละลาย 2% NBP นำไปอบใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 110°C นาน 10 นาที แล้ว spray ทับด้วย 10% TEP

➢ การแปลผล : ผลบวกจะได้ spot สีฟ้า หรือสีน้ำเงิน เหมือนกับสารมาตรฐาน (รูปที่ 4-8)

รูปที่ 4-8 TLC Chromatogram ของสารมาตรฐานกลุ่ม Organophosphates (OPs)



รูปที่ 4-9 TLC Chromatogram ของสารมาตรฐานกลุ่ม Carbamates (CMs)

2.2 สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม CMs

➢ นำสารละลายที่ได้จากการสกัดตัวอย่างในข้อ 1 และ blank มา spot ลงบนแผ่น TLC ที่เตรียมไว้อย่างละ 20 µl และ spot สารละลายมาตรฐานที่เป็นตัวแทนกลุ่ม CMs เช่น methomyl, carbofuran, carbaryl และ carbosulfan ชนิดละ 10 µl

➢ นำแผ่น TLC ไปแช่ใน TLC chamber ที่มี mobile phase เป็น Hexane:Acetone (3:2) เมื่อ mobile phase เคลื่อนที่มาถึง solvent front ให้นำแผ่น TLC ออกมาตั้งทิ้งไว้ให้ organic solvent ระเหยแห้งใน Fume hood

➢ นำไป spray ด้วย สารละลาย 10% NaOH แล้ว spray ทับด้วยสารละลาย Indicator

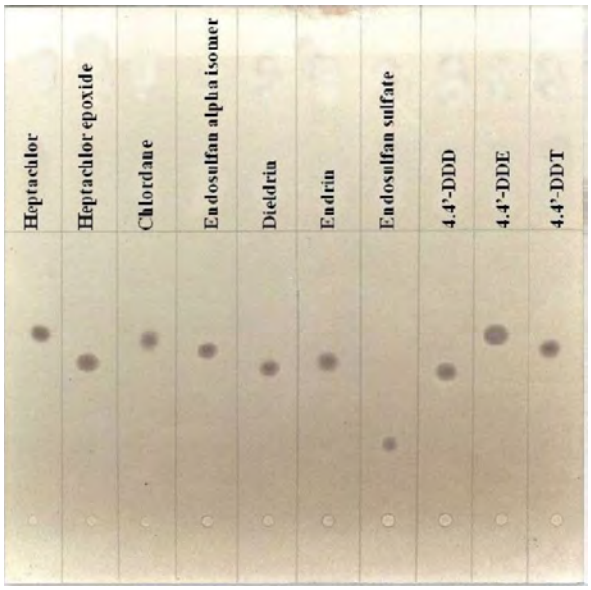
➢ การแปลผล : ผลบวกจะได้ spot สีชมพู แดง ม่วง น้ำเงิน แล้วแต่ชนิดของ CMs เหมือนกับสารมาตรฐาน (รูปที่ 4-9)

➢ นอกจากนี้ยังมีน้ำยาเคมีอื่นที่ให้เลือกใช้เพื่อทำให้ spot ของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม CMs ปรากฏ เช่น สารละลาย o-TKI โดยการนำแผ่น TLC ไปอบด้วยแก๊สคลอรีน [Cl_2(g)] ประมาณ 30 วินาที จากนั้นเป่าลมร้อนไล่แก๊สคลอรีนที่มากเกินพอด้วยลมร้อนจาก blower แล้วจึง spray ทับด้วยสารละลาย o-TKI ซึ่งการแปลผล : ผลบวกจะได้ spot สีฟ้า เทาขอบฟ้า

2.3 สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม OCs

➢ นำสารละลายที่ได้จากการสกัดตัวอย่างในข้อ 1 และ blank มา spot ลงบนแผ่น TLC ที่เตรียมไว้อย่างละ 20 µl และ spot สารละลายมาตรฐานที่เป็นตัวแทนกลุ่ม OCs เช่น 4, 4'-DDT, endrin และ dieldrin ชนิดละ 10 µl

➢ นำแผ่น TLC ไปแช่ใน TLC chamber ที่มี mobile phase เป็น Hexane:Acetone (4:1) เมื่อ mobile phase เคลื่อนที่มาถึง solvent front ให้นำแผ่น TLC ออกมาตั้งทิ้งไว้ให้ organic solvent ระเหยแห้งใน Fume hood



รูปที่ 4-10 TLC Chromatogram ของสารมาตรฐานกลุ่ม Organochlorines (OCs)

รูปที่ 4-11 TLC Chromatogram ของสารมาตรฐานกลุ่ม Pyrethroids (PYRs)

➢ นำไป spray ด้วย สารละลาย Chromogenic silver nitrate แล้วนำไปอังแสง ultraviolet (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 nm นาน 10 นาที

➢ การแปลผล : ผลบวกจะได้ spot สีน้ำตาล หรือดำ เหมือนกับสารมาตรฐาน (รูปที่ 4-10)

➢ หรืออาจ spray TLC plate ด้วยสารละลาย 0.5% o-Tolidine ใน 95% ethanol แล้วนำไปอังแสง ultraviolet (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 nm นาน 5 นาที

➢ การแปลผล : ผลบวกจะได้ spot สีเขียว เขียวอมเหลือง

2.4 สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม PYRs

➢ นำสารละลายที่ได้จากการสกัดตัวอย่างในข้อ 1 และ blank มา spot ลงบนแผ่น TLC ที่เตรียมไว้อย่างละ 20 µl และ spot สารละลายมาตรฐานที่เป็นตัวแทนกลุ่ม PYRs เช่น cypermethrin และ deltamethrin ชนิดละ 10 µl

➢ นำแผ่น TLC ไปแช่ใน TLC chamber ที่มี mobile phase เป็น Hexane:Acetone (4:1) เมื่อ mobile phase เคลื่อนที่มาถึง solvent front ให้นำแผ่น TLC ออกมาตั้งทิ้งไว้ให้ organic solvent ระเหยแห้งใน Fume hood

➢ นำแผ่น TLC ไปอบด้วยแก๊สคลอรีน [Cl2(g)] ประมาณ 30 วินาที จากนั้นเป่าลมร้อนไล่แก๊สคลอรีนที่มากเกินพอด้วยลมร้อนจาก blower แล้วจึง spray ทับด้วยสารละลาย o-TKI

➢ การแปลผล : ผลบวกจะได้ spot (รูปที่ 4-11)

บทที่ 5

สารกำจัดวัชพืช (Herbicides)

สารกำจัดวัชพืช (herbicides) หรือที่เรียกกันทั่วไปว่า “ยาฆ่าวัชพืช” คือ สารเคมีที่ใช้เพื่อควบคุม กำจัด หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของวัชพืช ซึ่งเป็นพืชที่ไม่ต้องการในระบบการเกษตร จัดเป็นสารพิษต่อพืช (phytotoxic chemicals) ที่ใช้ทำลายวัชพืชหลายชนิด โดยมีระดับความจำเพาะแตกต่างกัน การใช้สารกำจัดวัชพืชทั่วโลกคิดเป็นเกือบร้อยละ 48 ของการใช้สารกำจัดศัตรูพืช (pesticides) ทั้งหมด สารเคมีรุ่นแรกที่ใช้เป็นสารกำจัดวัชพืช ได้แก่ กรดซัลฟิวริก โซเดียมคลอเรต อาร์เซนิกไตรออกไซด์ โซเดียมอาร์เซเนต และน้ำมันปิโตรเลียม ส่วนเฟอร์รัส/เฟอร์ริกซัลเฟต คอปเปอร์ซัลเฟต หรือโซเดียมโบเรต มักจัดการได้ยากและ/หรือมีความเป็นพิษ มีความจำเพาะต่ำ และอาจก่อพิษต่อพืชที่เพาะปลูกเช่นเดียวกับพืชไม่พึงประสงค์ หากไม่ได้ใช้ในช่วงเวลาที่เหมาะสม ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา สารกำจัดวัชพืชเป็นกลุ่มที่มีการเติบโตเร็วที่สุดของอุตสาหกรรมสารกำจัดศัตรูพืช ส่วนหนึ่งเนื่องมาจาก (1) การเปลี่ยนไปสู่ระบบเกษตรเชิงเดี่ยว (monoculture) และ (2) การใช้เครื่องจักรกลทางการเกษตรเพิ่มขึ้นจากต้นทุนแรงงานที่สูงขึ้น ผลที่ตามมาคือเกิดการพัฒนาสารที่มีโครงสร้างทางเคมีหลากหลาย อาศัยนวัตกรรมทางเคมีเพื่อให้ได้มาซึ่งสารกำจัดศัตรูพืชทางชีวภาพ (biopesticides) ที่มีความจำเพาะต่อชนิดพืชสูงและมีความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต่ำ เป้าหมายคือการปกป้องพืชเศรษฐกิจและเพิ่มผลผลิต โดยกำจัดพืชไม่พึงประสงค์อย่างเลือกจำเพาะเพื่อลดการแข่งขันแย่งธาตุอาหาร ปัญหาสุขภาพของสัตว์และมนุษย์ที่เกิดจากการสัมผัสสารกำจัดวัชพืชส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการใช้ที่ไม่ถูกต้อง หรือการทิ้งภาชนะบรรจุอย่างประมาท

โดยทั่วไปสามารถจำแนกได้หลายกลุ่มตามกลไกการออกฤทธิ์หรือโครงสร้างทางเคมี ซึ่งแต่ละกลุ่มมีคุณสมบัติและพิษวิทยาที่แตกต่างกัน รวมถึงอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสัตว์หากได้รับสัมผัสหรือปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมหรืออาหารสัตว์ ยกตัวอย่างกลุ่มของสารกำจัดวัชพืช เช่น

กลุ่ม Triazines เช่น อะทราซีน (atrazine) และซิมาซีน (simazine) ออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยการยับยั้ง Photosystem II ทำให้วัชพืชไม่สามารถสร้างพลังงานและตายในที่สุด อย่างไรก็ตาม การได้รับสารกลุ่มนี้ในสัตว์อาจก่อให้เกิดความผิดปกติทางฮอร์โมน ระบบสืบพันธุ์ และความเป็นพิษต่อตับและไต หากได้รับในปริมาณสูงหรือต่อเนื่อง

กลุ่ม Phenylurea เช่น ไดยูรอน (diuron) และลินูรอน (linuron) ซึ่งมีการออกฤทธิ์คล้ายคลึงกับไตรอะซีน โดยการรบกวน Photosystem II การได้รับในสัตว์อาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยา เช่น ความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง ค่า hematocrit และ hemoglobin ลดลง รวมถึงผลกระทบต่อระบบประสาทในกรณีที่ได้รับในระดับสูง

กลุ่ม Bipyridyl compounds หรือ Quaternary ammonium herbicides เช่น พาราควอต (paraquat) และไดควอต (diquat) ซึ่งออกฤทธิ์โดยสร้างอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species; ROS) ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์พืชจนเกิดการตายของเซลล์ แต่หากสัตว์ได้รับสารเหล่านี้จะเกิดพิษเฉียบพลัน โดยเฉพาะพาราควอตซึ่งมีความเป็นพิษสูงต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ก่อให้เกิดความเสียหายต่อปอด ตับ ไต และระบบประสาท ทำให้เกิดภาวะหายใจล้มเหลวและตาย

5.1 อะทราซีน (Atrazine; ATZ)

ATZ หรือ 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-striazine; $C_8H_{14}ClN_5$ เป็นสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม Triazines โดย ATZ ใช้สำหรับกำจัดวัชพืชในไร่อ้อย สับปะรด และข้าวโพด ออกฤทธิ์กำจัดได้ทั้งวัชพืชใบแคบ เช่น หญ้านกสีชมพู หญ้าอกขาว หญ้าตีนกา เป็นต้น และวัชพืชใบกว้าง เช่น ผักโขม ผักโขมหิน เป็นต้น สามารถใช้งานได้ทั้งก่อนและหลังวัชพืชงอก การใช้ในปริมาณสูงทำให้เกิดการตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม ถูกจัดเป็นสารมลพิษที่สำคัญ เพราะเป็นสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ (endocrine disruptor) และพบว่า ATZ เป็นสาเหตุที่ทำให้ตับ ไต และหัวใจในสัตว์และมนุษย์เกิดความเสียหาย และในหนูเพศเมียมีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นในการพัฒนาเป็นเนื้องอกในเต้านม

กลไกการออกฤทธิ์

ATZ ออกฤทธิ์รบกวนการทำงานของระบบประสาทส่วนกลางและต่อมไร้ท่อ มีผลต่อการทำงานของ hypothalamus และฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ เช่น Luteinizing Hormone (LH) และ prolactin ทำให้เกิดการลดลงของการหลั่ง Gonadotrophin Releasing Hormone ซึ่งส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์ มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของเนื้องอกในต่อมน้ำนมของสัตว์ทดลอง

อาการทางคลินิก

โดยในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เมื่อกิน ATZ เข้าไปในปริมาณมาก จะเกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง กล้ามเนื้อล้า และน้ำลายฟูมปาก โดยการเกิดพิษในโคจากการกินจะพบอาการทางคลินิก ได้แก่ อุณหภูมิร่างกายสูงกว่าปกติ ชีพจรและอัตราการหายใจสูงขึ้น เดินเซ ปวดเบ่ง เบื่ออาหาร ข้อฝืด กล้ามเนื้อหลังกระตุก น้ำลายไหล และตาย และพบรอยโรค ได้แก่ หลอดเลือดดำของไต ปอด ตับขยายตัว ต่อมหมวกไตขยายใหญ่ มีเลือดออกในกล้ามเนื้อลาย ต่อมไทมัส ต่อมไทรอยด์ และหัวใจ

ความเป็นพิษ

สัตว์เคี้ยวเอื้องมีความไวต่อการเกิดพิษเฉียบพลันมากกว่าสัตว์ฟันแทะ หากโค และแกะ ได้รับ ATZ ขนาด 250 mg/kg จำนวน 2 ครั้ง ภายใน 24 ชม. สามารถทำให้ตายได้

- LD_{50} (oral) ในหนู (rats) เท่ากับ 672 mg/kg
- LD_{50} (oral) ในหนู (mice) เท่ากับ 850 mg/kg
- LD_{50} (oral) ในกระต่าย เท่ากับ 750 mg/kg
- LD_{50} (oral) ในแฮมสเตอร์ เท่ากับ 1000 mg/kg

5.2 ไดยูรอน (Diuron; DIU)

Diuron (DIU) หรือ 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea ($C_9H_{10}Cl_2N_2O$) เป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชประเภทสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม Phenylurea ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก เช่นเดียวกับ ATZ เพื่อควบคุมและป้องกันความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรที่เกิดจากวัชพืชในพื้นที่เพาะปลูก ใช้สำหรับกำจัดวัชพืชในไร่อ้อย สับปะรด และมันสำปะหลัง ออกฤทธิ์กำจัดได้ทั้งวัชพืชใบแคบ เช่น หญ้าตีนนก หญ้าตีนกา หญ้านกสีชมพู เป็นต้น และวัชพืชใบกว้าง เช่น ผักเบี้ยหิน ผักเสี้ยนผี เป็นต้น สามารถใช้งานได้ทั้งก่อนและหลังวัชพืชงอก

กลไกการออกฤทธิ์

DIU ถูกเผาผลาญให้เป็นสารเมตาบอไลต์หลายชนิด รวมถึง 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) ซึ่งเป็นเมตาบอไลต์ที่พบได้ในสารกำจัดวัชพืชอื่นๆ เช่น Linuron และ Propanil สารเมตาบอไลต์นี้ก่อให้เกิดผลกระทบทางพิษวิทยาในสัตว์ การได้รับไดยูรอนเป็นเวลานานอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยา เช่น จำนวนเม็ดเลือดแดงลดลง ค่า hematocrit และ hemoglobin ต่ำ

อาการทางคลินิก

เมื่อสัตว์ได้รับ DIU ในปริมาณสูงส่งผลให้เกิดอาการซึม เบื่ออาหาร น้ำหนักลด กล้ามเนื้อขาหลังอ่อนแรง ในโคอาจทำให้รบกวนการทำงานของกระเพาะหมัก (rumen)

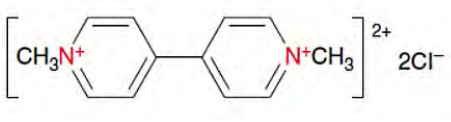
ความเป็นพิษ

ขนาดของ DIU 50 mg/kg จำนวน 10 ครั้ง ทำให้โค กระบือ แกะ และสัตว์ปีกที่ได้รับแล้วเกิดอาการพิษ โดยสัตว์จะมีอาการเบื่ออาหาร ท้องเดิน ซึม อ่อนเพลีย ไม่มีแรง และพบรอยโรค ได้แก่ เกิดการบวมของปอด ตับ ม้าม และเยื่อหุ้มสมอง

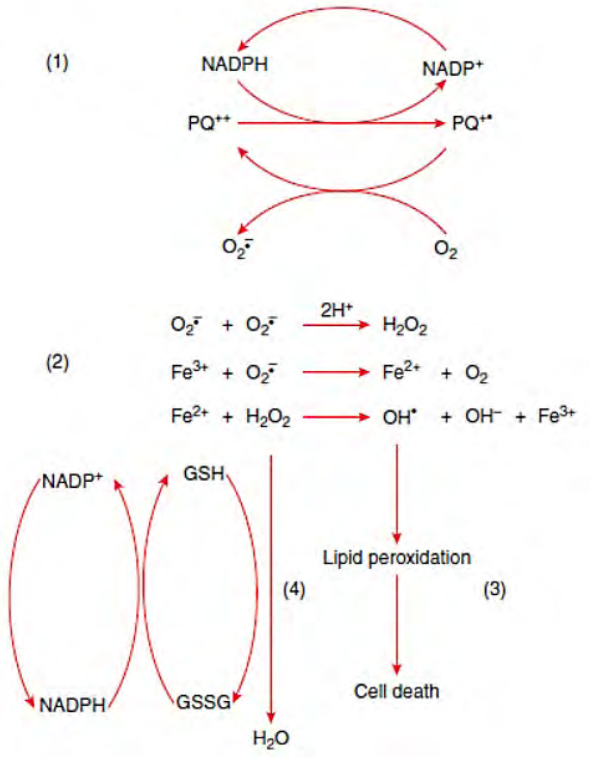
- LD_{50} (oral) ในหนู (rats) เท่ากับ 1017 mg/kg
- LD_{50} (oral) ในเป็ดมาลลาร์ด (Mallard duck) > 2000 mg/kg

5.3 พาราควอต (paraquat)

พาราควอต (Paraquat; 1,1′-dimethyl-4,4′-bipyridinium dichloride; $C_{12}H_{14}Cl_2N_2$) (รูปที่ 5-1) เป็นสารกำจัดวัชพืชชนิดสัมผัส (contact herbicide) ในกลุ่ม Bipyridyl compounds มีคุณสมบัติในการฆ่าวัชพืชทั้งใบแคบและใบกว้าง ออกฤทธิ์อย่างรวดเร็ว (fast-acting) โดยมักใช้เพื่อกำจัดวัชพืชในไร่อ้อย ข้าวโพด มันสำปะหลัง และพืชไร่อื่น ๆ ตลอดจนในพื้นที่เกษตรกรรมและนอกพื้นที่เพาะปลูก พาราควอทไม่สามารถเคลื่อนย้ายในพืชได้มากนัก (limited translocation) แต่มีฤทธิ์ทำลายเนื้อเยื่อพืชในส่วนที่สัมผัสโดยตรง ส่งผลให้เกิดการแห้งตายอย่างรวดเร็ว



รูปที่ 5-1 Paraquat
1,1′-dimethyl-4,4′-bipyridylium ion (dichloride)
ที่มา: Klaassen (2013)



รูปที่ 5-2 กลไกการออกฤทธิ์ของพาราควอต
ที่มา: Klaassen (2013)

กลไกการออกฤทธิ์ เริ่มจากขั้นตอนดังต่อไปนี้ (รูปที่ 5-2)

(1) เกิดปฏิกิริยาแบบ redox cycling โดยที่พาราควอต (PQ^{++}) รับอิเล็กตรอนจาก NADPH และถูกรีดิวซ์เป็นรูปกึ่งอนุมูลอิสระ ($PQ^{+\bullet}$) ซึ่งจะไปทำปฏิกิริยากับออกซิเจน (O_2) เกิดเป็นซุปเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{-\bullet}$) และหมุนเวียนกลับเป็น PQ^{++} ทำให้วงจรนี้ดำเนินต่อเนื่องและสร้างอนุมูลอิสระอย่างต่อเนื่อง

(2) ซุปเปอร์ออกไซด์จะถูกเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และสามารถทำปฏิกิริยากับ Ferrous/Ferric ion (Fe^{2+}/Fe^{3+}) ผ่านปฏิกิริยา Fenton reaction เกิดอนุมูลไฮดรอกซิล ($\bullet OH$) ซึ่งมีความเป็นพิษสูง

(3) อนุมูลไฮดรอกซิลนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation และนำไปสู่ความเสียหายของโครงสร้างเซลล์จนเกิด cell death ในที่สุด อย่างไรก็ตาม ร่างกายมีกลไกป้องกัน

(4) โดยอาศัยระบบ glutathione reductase/peroxidase (GSH/GSSG cycle) ที่ใช้ NADPH ในการกำจัด H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำ (H_2O) เพื่อลดความเป็นพิษ แต่เมื่อการสร้างอนุมูลอิสระมีมากเกินกว่าที่ระบบกำจัดจะรองรับได้ความเสียหายของเซลล์จึงเกิดขึ้นและนำไปสู่การตายของเซลล์ในที่สุด

ปฏิกิริยาลูกโซ่อนุมูลอิสระของไขมัน (lipid free radical chain reaction) นี้ส่งผลให้เกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์ (cellular degeneration) และเนื้อตาย (necrosis) เกิดความเสียหายต่ออวัยวะสำคัญ โดยเฉพาะปอดซึ่งเป็นอวัยวะเป้าหมายหลักของพิษจากพาราควอต

อาการทางคลินิก

อาการในระยะเริ่มแรกอาจไม่รุนแรงและสังเกตได้ยาก แต่หากได้รับในขนาดสูง อาจพบการอาเจียน อาการเจ็บปวดในระบบทางเดินอาหาร และรอยโรคในช่องปาก อาการที่รุนแรงที่สุดและมักทำให้เสียชีวิตคืออาการทางระบบหายใจ ซึ่งมักปรากฏล่าช้าหลังได้รับสารแล้วอย่างน้อย 2–7 วัน โดยสัตว์จะมีอาการหายใจลำบาก มีเสียงกรอบแกรบในปอด ภาวะเขียวคล้ำ และพบการทำงานของไตบกพร่อง ในระยะสุดท้ายของการได้รับพิษพาราควอตจะเกิดพังผืดในปอดอย่างต่อเนื่อง (progressive pulmonary fibrosis) ทำให้หายใจลำบากและตายในที่สุด

ความเป็นพิษ

พาราควอตจัดเป็นสารกำจัดวัชพืชที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันสูง โดยเฉพาะเมื่อรับเข้าสู่ร่างกายทางปาก

- LD_{50} (oral) ในหนู เท่ากับ 100 mg/kg
- LD_{50} (oral) ในแมว เท่ากับ 48 mg/kg
- LD_{50} (oral) ในลิง เท่ากับ 50 mg/kg
- LD_{50} (oral) ในโค เท่ากับ 50-70 mg/kg

5.4 การตรวจเอกลักษณ์สารกำจัดวัชพืชชนิด atrazine และ diuron ด้วยวิธี TLC

หลักการตรวจวิเคราะห์ สารกำจัดวัชพืชชนิด atrazine และ diuron ที่อยู่ในตัวอย่างจะถูกสกัดออกมาด้วยเทคนิค QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) ซึ่งดัดแปลงวิธีจาก Anastassiades and Lehotay (2003) โดยในขั้นตอนการสกัดจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เข้ากับน้ำได้ดี เติมเกลือลงไปเพื่อดูดน้ำและทำให้เกิด salting out ตามด้วยการกำจัด matrix (clean up) ส่วนสกัดที่ได้โดยใช้ dispersive SPE นำส่วนใสที่ได้ไประเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วละลาย residue กลับด้วย acetone จากนั้นนำไปตรวจหาเอกลักษณ์สารกำจัดวัชพืชชนิด ATZ และ DIU ตามหลักการ TLC โดยเทียบกับสารมาตรฐาน กรณีที่ตรวจพบสารกำจัดวัชพืชชนิดใดชนิดหนึ่ง ให้ทำการตรวจยืนยันด้วยวิธี UV-Vis Spectrophotometry หรือวิธีอื่นที่เหมาะสมอีก 1 วิธี

ตัวอย่างที่ใช้ : อาหารในกระเพาะ

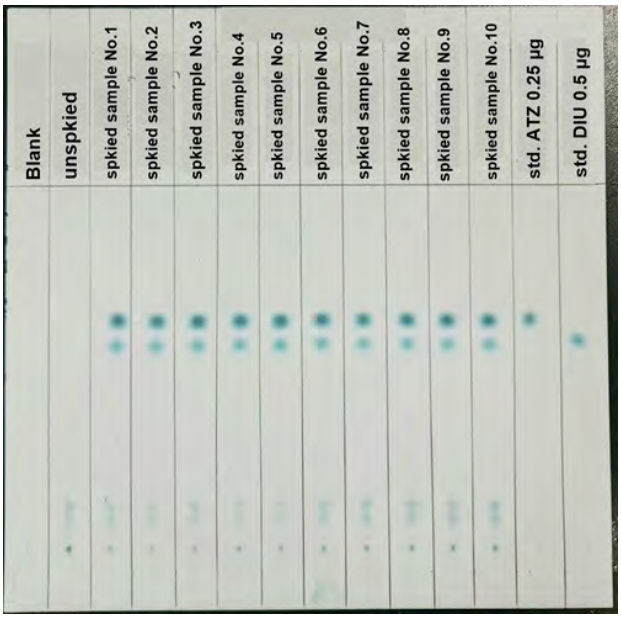
สารเคมีและการเตรียม

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน ATZ 1000 µg/ml เพื่อเป็น stock solution โดยชั่ง ATZ ประมาณ 0.0100 g ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml ละลายด้วย acetone ปรับปริมาตรจนครบ ผสมให้เข้ากัน
- สารละลาย o-TKI : (1) ชั่ง o-Tolidine 0.2 g ลงใน beaker ละลายด้วย acetic acid 4 ml (2) ชั่ง potassium iodide (KI) 0.8 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 4 ml จากนั้นผสมสารละลายข้อ (1) และ (2) เข้าด้วยกัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 200 ml
- แก๊สคลอรีน [$Cl_2(g)$] ชั่ง potassium permanganate ($KMnO_4$) 1 g ลงใน beaker ขนาด 100 ml เติมกรด concentrated hydrochloric (conc. HCl) 10 ml นำไปวางใน TLC developing tank ปิดฝา tank ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อให้ Cl_2 ที่เกิดขึ้นอิ่มตัวทั่ว tank ก่อนอบ TLC plate

วิธีวิเคราะห์

1. การสกัดตัวอย่างด้วยเทคนิค QuEChERS

ชั่งตัวอย่างอาหารในกระเพาะโค 5 g ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 50 ml เติม acetonitrile 10 ml ผสมด้วยเครื่อง vortex 1 นาที แล้วเติม Magnesium sulfate anhydrous ($MgSO_4$) 4 g และ Sodium chloride (NaCl) 1 g ผสมด้วยเครื่อง vortex 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 rpm อุณหภูมิ 15 °C นาน 5 นาที ปิเปตส่วนใสทั้งหมดลงใน centrifuge tube แก้วขนาด 15 ml สกัดตัวอย่างซ้ำโดยเติม acetonitrile 5 ml ผสมด้วยเครื่อง vortex 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 rpm อุณหภูมิ 15 °C นาน 5 นาที pool ส่วนใสที่ได้กับการสกัดครั้งแรก นำไประเหยด้วย Nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C ให้เหลือ 1 ml แล้วปิเปตใส่ microcentrifuge tube ที่บรรจุ PSA 25 mg กับ $MgSO_4$ 150 mg ผสมด้วยเครื่อง vortex 30 วินาที นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 6,000 rpm อุณหภูมิ 10 °C นาน 3 นาที ปิเปตส่วนใสทั้งหมดใส่ในหลอดแก้วก้นแหลม ระเหยแห้งด้วย Nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C แล้วละลาย residue ด้วย acetone 1 ml เก็บใส่ vial นำไปตรวจหาเอกลักษณ์ของ ATZ และ DIU ด้วยวิธี TLC



รูปที่ 5-3 TLC Chromatogram ของการหาค่า LOD ของวิธี ด้วยการทำ spiked sample (n=10) โดยใช้ system chloroform : acetone (7:3) และพ่นด้วย o-TKI reagent

2. การตรวจเอกลักษณ์สารกำจัดวัชพืชชนิด atrazine และ diuron วิธี TLC

นำสารละลายที่ได้จากการสกัดตัวอย่างในข้อ 1 และ blank มา spot ลงบนแผ่น TLC ที่เตรียมไว้ อย่างละ 20 µl และ spot สารละลายมาตรฐานที่ atrazine และ diuron ชนิดละ 10 µl

➢ นำแผ่น TLC ไปแช่ใน TLC chamber ที่มี mobile phase เป็น chloroform : acetone (7:3) เมื่อ mobile phase เคลื่อนที่มาถึง solvent front ให้นำแผ่น TLC ออกมาตั้งทิ้งไว้ให้ organic solvent ระเหยแห้งใน Fume hood

➢ จากนั้นนำไปอบด้วยแก๊สคลอรีน [Cl_2(g)] ประมาณ 1 นาที จากนั้นเป่าลมร้อนไล่แก๊สคลอรีนที่มากเกินพอด้วยลมร้อนจาก blower แล้วจึง spray ทับด้วยสารละลาย o-TKI

➢ การแปลผล : ผลบวกจะได้ spot สีเทาดำ หรือ สีเขียว เหมือนกับสารมาตรฐาน และมีค่า Rf ของตัวอย่างตรงหรือเท่ากันกับสารมาตรฐาน (รูปที่ 5-3)

➢ LOD ของ ATZ เท่ากับ 0.02 µg/g และ DIU เท่ากับ 0.04 µg/g

5.5 การตรวจหาปริมาณสารกำจัดวัชพืชชนิด atrazine และ diuron ด้วยวิธี UV-Vis Spectrophotometry

ตัวอย่างที่ใช้ : อาหารในกระเพาะ

สารเคมีและการเตรียมสำหรับวิเคราะห์ ATZ

- สารละลายมาตรฐาน ATZ 1000 µg/ml เพื่อเป็น stock solution โดยชั่ง ATZ ประมาณ 0.0100 g ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml ละลายด้วย acetone ปรับปริมาตรจนครบ ผสมให้เข้ากัน

➢ สารละลาย 1% p-aminoacetophenone (PAAP) ใน 20% HCl ชั่ง PAAP 1 g ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml ละลายและปรับด้วย 20% HCl จนครบปริมาตร

➢ pyridine reagent โดยปิเปต pyridine 18 ml และ DI water 12 ml ลงใน beaker ผสมให้เข้ากัน ปิเปต conc. HCl ลงไป 3 ml ผสมให้เข้ากัน

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ATZ ในอาหารในกระเพาะ ดัดแปลงจากวิธีของ Kesari and Gupta (1998)

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน ATZ จาก working std. ATZ 10.00 และ 100.00 µg/ml ใน DI water ให้มีความเข้มข้น 6 ระดับ โดยเติมสารละลาย ATZ ลงใน graduated tube ขนาด 10 ml จำนวน 6 หลอด ให้มีเนื้อสารอยู่ในช่วง 1-40 µg (1.00, 3.00, 5.00, 10.00, 20.00, 30.00 และ 40.00) ดำเนินการตามวิธีวิเคราะห์ ระดับละ 1 ซ้ำ ซึ่ง final volume จะได้สารละลายมาตรฐาน ATZ ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.10-4.00 µg/ml
2. การสกัดตัวอย่างด้วยเทคนิค QuEChERS (ตามข้อ 5.4)
3. นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ไป Clean up ด้วยวิธี Solid phase extraction (SPE) column ชนิด Graphitized Non-Porous Carbon ปริมาณ 500 mg ขนาด 6 ml (Supelclean™ENVI-Carb™SPE Tube) ดังนี้ ต่อ SPE column เข้ากับชุด vacuum manifold ปรับสภาพ SPE ด้วย methanol 3 ml ตามด้วย acetone 3 ml จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จากเทคนิค QuEChERS 100 µL ผสมกับ acetone 900 µL ปิเปตลงใน SPE column ปล่อยให้สารละลายหยดลงด้วยอัตราการไหล 1 หยดต่อวินาที แล้ว elute ด้วย acetone 4 ml ลงใน centrifuge tube แก้วขนาด 15 ml ระเหยแห้งด้วย Nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C แล้วละลาย residue ด้วย acetone 200 µL

วิธีวิเคราะห์ ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 200 µL ลงใน graduated tube ขนาด 10 ml เติม pyridine reagent 0.2 ml ลงในแต่ละหลอด ปิดฝา ผสมให้เข้ากันด้วย vortex นำไปแช่ใน water bath อุณหภูมิประมาณ 100 °C 15 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติม 2 M NaOH 1 ml และ PAAP 2 ml ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้เกิดสีอย่างสมบูรณ์ แล้วปรับด้วย DI water จนครบปริมาตร 10 ml ผสมให้เข้ากัน ทั้งนี้ทำ blank (DI water) ควบคู่กันไปด้วย นำ blank สารละลายมาตรฐาน และสารละลาตัวอย่างที่เตรียมได้ ไปตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer (Analytik Jena, Germany) รุ่น SPECORD® 210 PLUS ที่ความยาวคลื่น 470 nm คำนวณหาปริมาณ ATZ ในตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Standard calibration curve)

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณ DIU ในอาหารในกระเพาะ ดัดแปลงจากวิธีของ Galera et al. (1995)

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน DIU จาก working std. DIU 50.00 µg/ml ใน acetonitrile : methanol (1:1) ให้มีความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 0.50, 1.00, 2.00, 4.00, 10.00 และ 20.00 µg/ml นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐาน (แกน x) กับค่า absorbance (แกน y)
2. การสกัดตัวอย่างด้วยเทคนิค QuEChERS (ตามข้อ 5.4)
3. การ Clean up สารละลายตัวอย่าง ด้วยวิธี TLC ดังนี้ Streak สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จากเทคนิค QuEChERS 100 µL ลงบน TLC plate โดยหยดสารละลายมาตรฐาน DIU เทียบด้วย นำไปจุ่มแช่ใน TLC developing tank ที่มี mobile phase เป็น chloroform : acetone (7:3) เมื่อถึง front นำแผ่น TLC ออกจาก tank วางทิ้งไว้ใน fume hood ให้ organic solvents ระเหย จากนั้นนำ TLC plates ไปส่องภายใต้แสง UV ในที่มืด ที่ความยาวคลื่น 254 nm สังเกตการณ์ดูดกลืนแสงของแถบตัวอย่าง (band) ที่ขึ้นตรงกับ spot ของสารมาตรฐาน DIU ใช้ดินสอวงรอบแถบตัวอย่าง แล้วขูด silica gel บริเวณที่วงไว้ใส่หลอดทดสอบ เติม acetone 2 ml ผสมด้วย vortex mixer 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 rpm ปิเปตส่วนใสไประเหยแห้งด้วย Nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C แล้วละลาย residue ด้วย acetonitrile : methanol (1:1) 1 ml

วิธีวิเคราะห์ นำสารละลายมาตรฐาน DIU ที่เตรียมได้ และสารละลายตัวอย่างจากการ clean up ไปตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer (Analytik Jena, Germany) รุ่น SPECORD® 210 PLUS ที่ความยาวคลื่น 250 nm

ตารางที่ 5-1 ค่า LOD และ LOQ ของ ATZ และ DIU ในอาหารในกระเพาะ โดยวิธี UV-Vis Spectrophotometry

Herbicides	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
ATZ	0.10	0.50
DIU	0.10	0.63

5.6 การตรวจหาพาราควอตโดยวิธี Chemical test หรือ Color test

หลักการตรวจวิเคราะห์ พาราควอตจะทำปฏิกิริยากับ Sodium dithionite ในสภาวะที่เป็นด่าง เกิดเป็นสารละลายสีฟ้าหรือสีน้ำเงิน

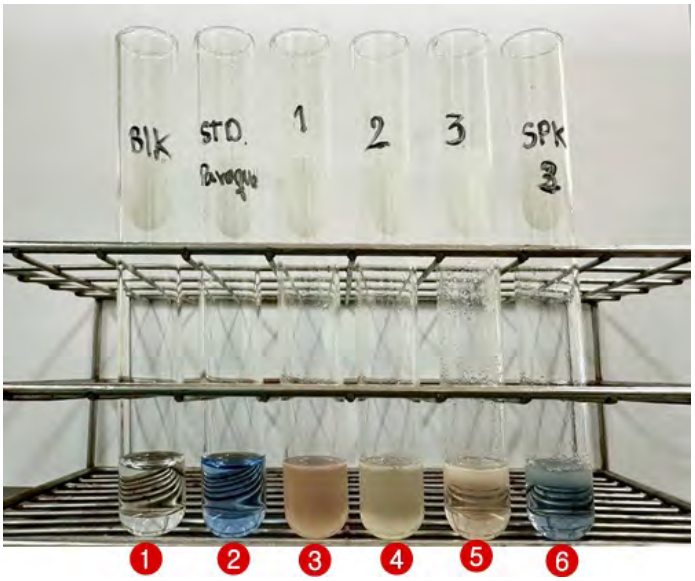
ตัวอย่างที่ใช้ : อาหารในกระเพาะ ปัสสาวะ น้ำ และวัตถุตัวอย่างอื่นที่พบในที่เกิดเหตุ

สารเคมีและการเตรียม

- Sodium dithionite อยู่ในรูปของแข็ง เป็นผงละเอียดสีขาว (เก็บใน desiccator)
- สารละลาย 10% Sodium hydroxide เตรียมโดย ชั่ง Sodium hydroxide 10 g ละลายในน้ำกลั่น 10 ml
- สารละลายมาตรฐานพาราควอต 1 µg/ml เตรียมจาก Paraquat dichloride hydrate (analytical standard, ≥ 90% purity)
  - ชั่งสาร paraquat dichloride (น้ำหนักแม่นยำด้วย analytical balance) ปริมาณ 10.0 mg
  - ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน (DI water) ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml
  - ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีด 100 ml ⟶ ได้ความเข้มข้น 100 µg/ml (100 ppm) ของสารละลายมาตรฐานหลัก (stock solution)
  - การเตรียมสารละลายมาตรฐานใช้งาน (Working standard solution) ใช้วิธี serial dilution จาก stock solution โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย ดังนี้
  - การเจือจาง 1.0 ml stock (100 µg/ml) + เติมน้ำกลั่นจนถึง 10 ml ⟶ 10 µg/ml
    1.0 mL working 10 µg/ml + เติมน้ำกลั่นจนถึง 10 ml ⟶ 1.0 µg/ml

วิธีวิเคราะห์

- ถ้าตัวอย่างเป็นของแข็ง ให้ละลายด้วยน้ำกลั่น
- ปิเปตน้ำกลั่น (blank) สารละลายมาตรฐานพาราควอต 1.0 µg/ml และตัวอย่าง อย่างละ 1 ml ลงในหลอดทดลอง (แยกหลอด)
- เติมสารละลาย 10% Sodium hydroxide หลอดละ 1 ml
- เติม Sodium dithionite หลอดละประมาณ 20 mg แล้วผสมให้เข้ากัน
- การแปลผล : ผลบวกจะได้สารละลายสีฟ้าหรือสีน้ำเงิน
- LOD 1 µg/ml
- หมายเหตุ: ถ้าสารละลายตัวอย่างมีสีรบกวน ให้ spike สารละลายมาตรฐานลงไป เพื่อใช้ในการดูเปรียบเทียบ



รูปที่ 5-4 การตรวจหาพาราควอตโดยวิธี Color test

❶ = blank (น้ำกลั่น) + 10% NaOH + 0.2 g Sodium dithionite
❷ = สารละลายมาตรฐานพาราควอต 1.0 µg/ml+ 10% NaOH + 0.2 g Sodium dithionite
❸ = ตัวอย่างที่ 1 + 10% NaOH + 0.2 g Sodium dithionite
❹ = ตัวอย่างที่ 2 + 10% NaOH + 0.2 g Sodium dithionite
❺ = ตัวอย่างที่ 3 + 10% NaOH + 0.2 g Sodium dithionite
❻ = ตัวอย่างที่ 3 spiked สารละลายมาตรฐานพาราควอต + 10% NaOH + 0.2 g Sodium dithionite

บทที่ 6

สารกำจัดสัตว์ฟันแทะ (Rodenticides)

สารกำจัดสัตว์ฟันแทะ (Rodenticides) เป็นสารเคมีที่ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ควบคุมและกำจัดสัตว์ฟันแทะ เช่น หนูบ้าน หนูนาทุ่ง หรือหนูขนาดเล็กชนิดต่าง ๆ ที่เป็นปัญหาสำคัญทางการเกษตร การเลี้ยงสัตว์ ตลอดจนการแพร่กระจายโรคติดต่อสู่คนและสัตว์อื่น สัตว์ฟันแทะเป็นพาหะสำคัญของโรคติดเชื้อ เช่น เลปโตสไปโรซิส ซาลโมเนลโลซิส และกาฬโรค รวมถึงสร้างความเสียหายต่ออาหารสัตว์และพืชผลทางการเกษตร จึงทำให้การใช้สารกำจัดสัตว์ฟันแทะเป็นหนึ่งในมาตรการที่มีความจำเป็นในระบบการเกษตรและการควบคุมโรคติดต่อในสัตว์

ในเชิงประวัติศาสตร์ มนุษย์รู้จักใช้สารพิษในการกำจัดหนูมาตั้งแต่สมัยโบราณ โดยในช่วงแรกนิยมใช้สารอนินทรีย์ เช่น สารหนู (arsenic) ปรอท และธาลเลียม ซึ่งมีพิษรุนแรงต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ต่อมาในช่วงคริสต์ศตวรรษที่ 19–20 ได้มีการนำสารอัลคาลอยด์ตามธรรมชาติ เช่น สตริกนิน (strychnine) มาใช้ เนื่องจากมีฤทธิ์รุนแรงและทำให้สัตว์ตายรวดเร็ว อย่างไรก็ตามสารเหล่านี้มีข้อจำกัด คือมีพิษสูงต่อสัตว์เลี้ยงและมนุษย์เช่นกัน จึงนำไปสู่การค้นคว้าและพัฒนาสารกำจัดสัตว์ฟันแทะรุ่นใหม่ที่มีความจำเพาะมากขึ้น การเปลี่ยนแปลงครั้งสำคัญเกิดขึ้นเมื่อมีการค้นพบและใช้สารกลุ่ม anticoagulants เช่น วาร์ฟาริน (warfarin) ในช่วงกลางศตวรรษที่ 20 ซึ่งกลายเป็น “มาตรฐานทองคำ” ของ rodenticides เนื่องจากออกฤทธิ์ช้าทำให้สัตว์ไม่สามารถเชื่อมโยงการกินเหยื่อกับอาการเจ็บป่วย ลดโอกาสการหลีกเลี่ยงอาหารที่มีพิษ นอกจากนี้ยังมีความจำเพาะต่อระบบการแข็งตัวของเลือด โดยทำให้เกิดการตกเลือดภายในจนถึงตาย ซึ่งนับว่าเป็นกลไกที่แตกต่างและมีประสิทธิภาพสูง แม้ว่า rodenticides จะถูกออกแบบมาเพื่อกำจัดสัตว์ฟันแทะเป้าหมาย แต่ก็ยังมีความเสี่ยงที่จะส่งผลกระทบต่อสัตว์อื่นทั้งโดยตรง (primary poisoning) จากการกินเหยื่อเข้าไป และโดยอ้อม (secondary poisoning) เช่น สัตว์นักล่า แมว สุนัข หรือสัตว์ป่าที่กินหนูที่มีพิษสะสมในร่างกาย ผลกระทบเหล่านี้เป็นปัญหาสำคัญทางพิษวิทยาสัตวแพทย์และสิ่งแวดล้อม เพราะอาจก่อให้เกิดการตาย การเจ็บป่วยเรื้อรัง หรือแม้กระทั่งการสะสมของสารพิษในห่วงโซ่อาหาร

ดังนั้น สารกำจัดสัตว์ฟันแทะจึงมีบทบาทสองด้าน คือเป็นเครื่องมือที่จำเป็นต่อการควบคุมศัตรูพืชและโรคจากสัตว์ฟันแทะ แต่ในขณะเดียวกันก็เป็นแหล่งของสารพิษที่อาจสร้างผลกระทบในสัตว์เลี้ยงและสัตว์เศรษฐกิจ การทำความเข้าใจประวัติ กลไก และการแบ่งกลุ่มของ rodenticides รวมถึงผลกระทบที่เกิดขึ้นในสัตว์ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการประเมินความเสี่ยง การวินิจฉัยโรค และการจัดการทางพิษวิทยาในงานสัตวแพทย์

การแบ่งกลุ่มของ rodenticides

rodenticides สามารถแบ่งออกได้หลายกลุ่มตามโครงสร้างทางเคมีและกลไกการออกฤทธิ์ โดยแบ่งกลุ่มสำคัญได้ดังนี้

1. กลุ่มสารยับยั้งการแข็งตัวของเลือด (Anticoagulant rodenticides)

รุ่นแรก (First-generation anticoagulants) เช่น วาร์ฟาริน (warfarin), ฟีโนคลูมารอล (phenocoumarol) คูมาเตตราริล (coumatetralyl) และคลอโรฟาซิโนน (chlorophacinone) ออกฤทธิ์โดยยับยั้งการหมุนเวียนของ vitamin K ทำให้การสร้าง clotting factors ในตับลดลง ต้องรับพิษหลายครั้งจึงแสดงอาการ

รุ่นที่สอง (Second-generation anticoagulants) เช่น โบรไดฟาคูม (brodifacoum), โบรมาดิโลน (bromadiolone) และไดฟีทิโอโลน (difethialone) มีความแรงสูงและใช้เพียงครั้งเดียวก็ทำให้สัตว์ตายได้

2. กลุ่มสารที่มีผลต่อระบบประสาท (Neurotoxic rodenticides)

Strychnine: อัลคาลอยด์จากพืช *Strychnos nux-vomica* ทำให้เกิดการบล็อก glycine receptor ในไขสันหลัง ส่งผลให้เกิดการกระตุกและชักอย่างรุนแรง

Bromethalin: สารสังเคราะห์ที่รบกวนการถ่ายทอดพลังงานในไมโทคอนเดรีย ทำให้เกิดภาวะบวมน้ำในสมองและระบบประสาทล้มเหลว

3. กลุ่มสารที่มีผลต่อการเผาผลาญ (Metabolic poisons)

Sodium fluoroacetate (Compound 1080): ขัดขวางวงจรกรดซิตริก (Krebs cycle) ทำให้เซลล์ไม่สามารถสร้างพลังงานได้ ส่งผลให้เกิดอาการชัก หัวใจเต้นผิดปกติ และเสียชีวิต

Zinc phosphide: เมื่อเข้าสู่กระเพาะอาหารจะปลดปล่อยก๊าซฟอสฟีน (phosphine gas) ซึ่งมีพิษรุนแรงต่อระบบทางเดินอาหารและระบบหายใจ

4. กลุ่มสารอนินทรีย์และโลหะหนัก (Inorganic rodenticides)

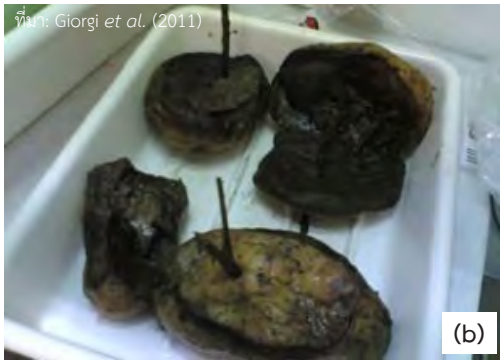
เช่น สารหนู (arsenic), ธาลเลียม (thallium), แบเรียมคาร์บอเนต ซึ่งเป็นกลุ่มที่ใช้ในอดีต ปัจจุบันเลิกใช้หรือใช้จำกัดมากเนื่องจากพิษสูงต่อสิ่งมีชีวิตอื่นและสิ่งแวดล้อม

5. กลุ่มอื่น ๆ

เช่น คอเลแคลซิเฟอรอล (cholecalciferol; vitamin D3) ที่ทำให้เกิดภาวะแคลเซียมเกินและการทำลายไต หรือ alpha-chloralose ที่กดประสาทกลางและทำให้เกิดอาการโคม่าในสัตว์เป้าหมาย

6.1 โลหะฟอสไฟด์ชนิดซิงค์ฟอสไฟด์ (Zinc phosphide) และอะลูมิเนียมฟอสไฟด์ (Aluminium phosphide)

โลหะฟอสไฟด์ชนิดซิงค์ฟอสไฟด์ (Zinc phosphide, Zn_3P_2) และอะลูมิเนียมฟอสไฟด์ (Aluminium phosphide, AlP) เป็นสารกำจัดหนูและแมลงที่มีประสิทธิภาพสูงและใช้กันอย่างแพร่หลายมากว่า 100 ปีในการควบคุมศัตรูพืชและปกป้องเมล็ดพืช



รูปที่ 6-1 แสดงตัวอย่างของเหยื่อพิษรูปแบบต่าง ๆ โดย a = ขนมปังผสมกับไขมันและผงสีดำ b = มันฝรั่งยัดซิงค์ฟอสไฟด์และ c = เมล็ดข้าวเปลือกคลุกผงสีดำ

$$Zn_3P_2 + 6H_2O \longrightarrow 3Zn(OH)_2 + 2PH_3$$
$$Zn_3P_2 + 6H^+ \longrightarrow 3Zn^{2+} + 2PH_3$$
$$AlP + 3H_2O \longrightarrow Al(OH)_3 + PH_3$$
$$AlP + 3H^+ \longrightarrow Al^{3+} + PH_3$$

รูปที่ 6-2 การเกิดแก๊สฟอสฟีน (PH_3) จากซิงค์ฟอสไฟด์ (Zn_3P_2) และอะลูมิเนียมฟอสไฟด์ (AlP) หลังทำปฏิกิริยากับน้ำหรือกรด
ที่มา: Proudfoot *et al.* (2009)

ซิงค์ฟอสไฟด์ มีลักษณะเป็นผงสีดำหรือเทาดำ ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาในปี ค.ศ. 1740 และถูกนำมาใช้เป็นสารกำจัดสัตว์ฟันแทะ (Rodenticides) ครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1911 ในประเทศอิตาลี เพื่อควบคุมสัตว์จำพวก หนูแพรรี่ด็อก ตุ่น กระต่าย ฯลฯ และถูกนำเข้าสู่ประเทศสหรัฐอเมริกาในช่วงสงครามโลกครั้งที่สอง ส่วนอะลูมิเนียมฟอสไฟด์ มีลักษณะเป็นผงหรือเม็ดสีดำ ถูกนำมาใช้เป็นสารรมควัน (Fumigant) ในไซโลหรือห้องที่เก็บผลิตผลทางการเกษตร เพื่อกำจัดหนู มอด และแมลง มาตั้งแต่ปี ค.ศ.1940 สารทั้งสองชนิดนี้ใช้กันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ โดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนา มีราคาถูก ใช้งานง่าย และมีประสิทธิภาพสูง วิธีการใช้โดยผสมกับเมล็ดพืชหรืออาหารคลุกให้เข้ากัน แล้วนำเหยื่อพิษไปวางไว้ตามทางเดินของหนู หรือแหล่งที่หนูอาศัย ด้วยลักษณะการใช้เป็นแบบเหยื่อล่อนี้อาจทำให้สัตว์ชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ศัตรูพืช เช่น สัตว์เลี้ยง (สุนัข และแมว) ได้รับพิษเข้าไป สาเหตุการเกิดพิษอีกกรณีหนึ่งคือ มีผู้จงใจวางยาสัตว์ โดยนำเหยื่อพิษที่ทำขึ้น เช่น ขนมปังผสมกับไขมันและผงสีดำ มันฝรั่งยัดซิงค์ฟอสไฟด์ และเมล็ดข้าวเปลือกคลุกผงสีดำ (รูปที่ 6-1) ไปให้สัตว์กิน ทำให้สัตว์ได้รับสารพิษ

กลไกการออกฤทธิ์

เมื่อสัตว์กินอาหารหรือเหยื่อที่มีโลหะฟอสไฟด์เหล่านี้เข้าไป โลหะฟอสไฟด์จะทำปฏิกิริยากับน้ำหรือกรดในกระเพาะอาหารเกิดเป็นแก๊สฟอสฟีน (Phosphine gas, PH_3) (รูปที่ 6-2) เป็นแก๊สไม่มีสีหรือกลิ่น แต่ถ้าออกมาสู่อากาศจะมีกลิ่นเหม็นคล้ายกระเทียมหรือกลิ่นปลาเน่า แก๊สฟอสฟีนที่เกิดขึ้นในกระเพาะอาหารนั้นจะถูกดูดซึมได้อย่างรวดเร็วเข้าสู่กระแสเลือด ส่วนน้อยจะถูกดูดซึมโดยตรงในรูปของฟอสไฟด์ แล้วไป metabolize ที่ตับ ฟอสฟีนมีความเป็นพิษต่อระบบทางเดินหายใจ โดยไปขัดขวางเอนไซม์ cytochrome C oxidase เป็นผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ ATP ใน mitochondria จากปฏิกิริยา Oxidative phosphorylation เกิดอนุมูลอิสระมากขึ้นจากปฏิกิริยา lipid peroxidation ทำให้การสร้างพลังงานของเซลล์ล้มเหลวเกิด cell necrosis และ cell death

อาการทางคลินิก

อาการเกิดพิษเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 15 นาทีถึง 4 ชั่วโมง หลังจากเหยื่อพิษเข้าไป สัตว์จะแสดงอาการโดยทั่วไป คือเบื่ออาหารและตามด้วยอาการหายใจเร็วและลึก อาเจียน พร้อมกับแสดงอาการปวดหลัง พบอาการเสียดท้องในม้าและอาการท้องขึ้นในโคกระบือ ต่อมาสัตว์จะอ่อนเพลียล้มลงนอนไม่ยอมลุก อ้าปากหายใจ กระวนกระวายคล้ายกับขาดอากาศหายใจ ถ้ากินในปริมาณมาก สัตว์มักตายภายใน 3-5 ชั่วโมงหลังจากเกิดอาการดังกล่าว

ความเป็นพิษ

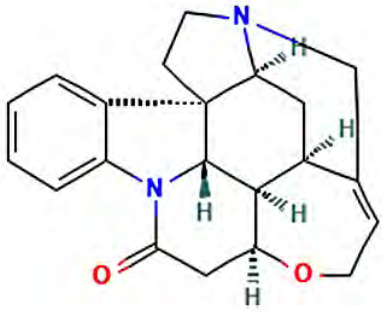
ความเป็นพิษและปริมาณซิงค์ฟอสไฟด์ที่ทำให้สัตว์ตายได้แตกต่างกันไป ขึ้นกับชนิดสัตว์ ความเป็นกรดในกระเพาะอาหารหรือทางเดินอาหาร และปริมาณเหยื่อพิษที่สัตว์กินเข้าไป ปริมาณต่ำสุดที่ทำให้ตายได้ที่พบมีการรายงาน (LD_{LO} , Lowest reported lethal dose) ในสุนัข แมวและกระต่ายคือ 40 mg/kg ส่วนค่า LD_{50} ของซิงค์ฟอสไฟด์ในสัตว์ทดลองชนิดอื่นๆ เช่น LD_{50} (oral, rat) 12 mg/kg, LD_{50} (oral, ruminants) 60 mg/kg, LD_{50} (oral, wild birds) 23.7 mg/kg, LD_{50} (oral, duck) 37.5 mg/kg และ LD_{50} (oral, chickens) 25 mg/kg เป็นต้น
สำหรับอะลูมิเนียมฟอสไฟด์มีค่า LD_{50} (oral, rat) 11.5 mg/kg

การตรวจวิเคราะห์สารประกอบฟอสไฟด์

(ดูบทที่ 9)

6.2 สตริกนิน (Strychnine)

สตริกนินเป็นอัลคาลอยด์ในกลุ่มอินโดล (Indole alkaloid) ซึ่งสกัดได้จากเมล็ดของต้น *Strychnos nux-vomica* (แสลงใจ หรือ ตูมกาแดง) เป็นไม้ยืนต้นในป่าเบญจพรรณ เป็นพืชพื้นเมืองของประเทศอินเดีย โดยสารนี้ถูกนำมาใช้เป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืช โดยเฉพาะในการควบคุมประชากรหนู ตัวตุ่น ตัวโกเฟอร์ และหมาป่าในเชิงพาณิชย์ โดยผลิตในรูปของเหยื่อพิษลักษณะเป็นเม็ดสีแดงหรือสีเขียว มีความเข้มข้นต่ำ (ไม่เกิน 0.5%) มีสูตรทางเคมีคือ $C_{21}H_{22}N_2O_2$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 334.41 และมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 6-3



รูปที่ 6-3 สูตรโครงสร้างสตริกนิน
ที่มา: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Strychnine.

กลไกการออกฤทธิ์

สตริกนินถูก ionized ได้ดีในสภาวะที่มี pH เป็นกรด แล้วถูกดูดซึมได้อย่างรวดเร็วและสมบูรณ์ผ่านทางลำไส้เล็ก หลังจากเข้าสู่ร่างกาย สารนี้จะผ่านกระบวนการเผาผลาญโดย microsomal enzymes ในตับ และมีการกระจายตัวไปยังระบบไหลเวียนโลหิต โดยพบความเข้มข้นสูงสุดของสารนี้ในเลือด ตับ และไต สตริกนินและเมตาบอไลต์จะถูกขับออกทางปัสสาวะ ทั้งนี้ปริมาณของสารที่ได้รับและมาตรการรักษาที่นำมาใช้จะเป็นตัวกำหนดระยะเวลาการกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย โดยส่วนใหญ่จะถูกกำจัดออกภายใน 24-48 ชั่วโมง

กลไกการเกิดพิษของสตริกนินเกิดจากการที่สารนี้สามารถยับยั้งการทำงานของสารสื่อประสาทชนิดไกลซีน (glycine) ได้แบบแข่งขันและย้อนกลับได้ (competitive and reversible inhibition) โดยกระบวนการนี้เกิดขึ้นที่บริเวณ postsynaptic neuronal sites ในไขสันหลังและก้านสมองส่วนท้าย (medulla oblongata) ทำให้ไม่มีการยับยั้งสัญญาณประสาท ส่งผลให้เซลล์ประสาทสั่งการ (motor neurons) ถูกกระตุ้นอย่างไม่มีการควบคุม กล้ามเนื้อลายทั้งหมดในร่างกายได้รับผลกระทบจากกระบวนการดังกล่าว โดยเฉพาะ extensor muscles ซึ่งมีแรงมากกว่า flexor

muscles ทำให้เกิดภาวะเกร็งแข็งทั่วร่างกาย และอาการชักแบบกล้ามเนื้อหดเกร็งสลับกับการกระตุก (tonic-clonic seizures) ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของการได้รับพิษจากสตริกนิน การตายของสัตว์ที่ได้รับพิษมักเกิดจากภาวะขาดออกซิเจน (anoxia) และความเหนื่อยล้าจากอาการชักอย่างต่อเนื่อง

อาการทางคลินิก

อาการพิษจากสตริกนินมักแสดงอย่างรวดเร็ว โดยหลังจากได้รับสารทางการกิน อาการจะเริ่มปรากฏภายใน 30-60 นาที หากมีอาหารอยู่ในกระเพาะอาหารการแสดงอาการอาจล่าช้าออกไป อาการเริ่มต้นที่พบ ได้แก่ ความ กระสับกระส่าย กระวนกระวาย กล้ามเนื้อตึง และร่างกายแข็งทื่อ ในสัตว์ที่ได้รับพิษมักไม่พบการอาเจียน อาการชักแบบหดเกร็งอาจเกิดขึ้นได้เองหรือถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้าภายนอก เช่น การสัมผัส เสียง หรือแสงที่สว่างจ้า ลักษณะเฉพาะของการชักจากสตริกนินคือภาวะเกร็งของกล้ามเนื้อ โดยขาหน้าถูกเหยียดออกไปข้างหน้าและขาหลังเหยียดออกไปข้างหลัง ทำให้สัตว์มีท่าทางแข็งทื่อ (sawhorse stance) ซึ่งลักษณะคล้ายขาตั้งเลื่อยไม้ อุณหภูมิร่างกายอาจสูงขึ้นถึง 40-41°C เนื่องจากภาวะเกร็งกล้ามเนื้อและอาการชัก โดยเฉพาะในสุนัข การชักอาจกินเวลาตั้งแต่ไม่กี่วินาทีจนถึงประมาณ 1 นาที โดยในระยะแรกอาจมีช่วงของการคลายตัวของกล้ามเนื้อระหว่างอาการชัก แต่เมื่ออาการรุนแรงขึ้น ช่วงเวลาดังกล่าวจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เยื่อเมือก (mucous membranes) อาจเปลี่ยนเป็นสีม่วงคล้ำ (cyanosis) เนื่องจากการขาดออกซิเจน และรูม่านตา ขยาย ความถี่ของอาการชักจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งสัตว์ตายจากภาวะอ่อนล้าหรือขาดออกซิเจนระหว่างชักหากไม่มีการรักษา อาการพิษจากสตริกนินอาจดำเนินไปอย่างรวดเร็วและทำให้สัตว์ตายภายใน 1-2 ชั่วโมงโดยทั่วไป สัตว์ที่ตายจากพิษสตริกนินจะไม่แสดงรอยโรคทางพยาธิวิทยาที่จำเพาะเจาะจง อย่างไรก็ตามในบางกรณี อาจพบภาวะเลือดออกในหัวใจและปอดจากการชักรุนแรงก่อนตาย รวมถึงภาวะคั่งของเลือดจากการขาดออกซิเจน สัตว์ที่ตายจากพิษสตริกนินจะเข้าสู่ภาวะการแข็งเกร็งของกล้ามเนื้อหลังความตาย (rigor mortis) อย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญที่อาจช่วยสัตวแพทย์ในการวินิจฉัยโรค

ความเป็นพิษ

สตริกนินเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงต่อสัตว์เลี้ยงหลายชนิด โดยค่า LD_{50} ทางปากในสุนัข โค ม้า และสุกรอยู่ในช่วง 0.5-1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ขณะที่แมวมีค่าดังกล่าวสูงกว่าเล็กน้อย คือประมาณ 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ขนาดของสตริกนินที่ทำให้ตายได้โดยการกิน (oral lethal dose values) ที่มีการรายงานดังแสดงในตารางที่ 6-1

ตารางที่ 6-1 แสดงขนาดของสตริกนินที่ทำให้ตายได้โดยการกิน (oral lethal dose values) ที่มีการรายงาน (Plumlee, 2004)

ชนิดสัตว์	ขนาด (mg/kg body weight)
สุนัข	0.5-1.2
แมว	2
สุกร	0.5-1
มนุษย์	30-60
โค	0.5
ม้า	0.5
Mule deer	17-24
Rainbow trout	2.3
Golden eagle	5-10
Sage grouse	42.5
นกยูง	8.5-24.7
หนู (rats)	2.2-14

6.2.1 การตรวจวิเคราะห์หาเอกลักษณ์ Strychnine โดยวิธี TLC

หลักการตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่างถูกสกัดในสภาวะที่เป็นเบสด้วยตัวทำละลาย (Solvent) นำตัวทำละลายที่สกัดได้ไประเหยแห้ง จากนั้นละลาย residue แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์หาเอกลักษณ์ด้วยเทคนิค TLC โดยเทียบกับสารมาตรฐานสตริกนิน

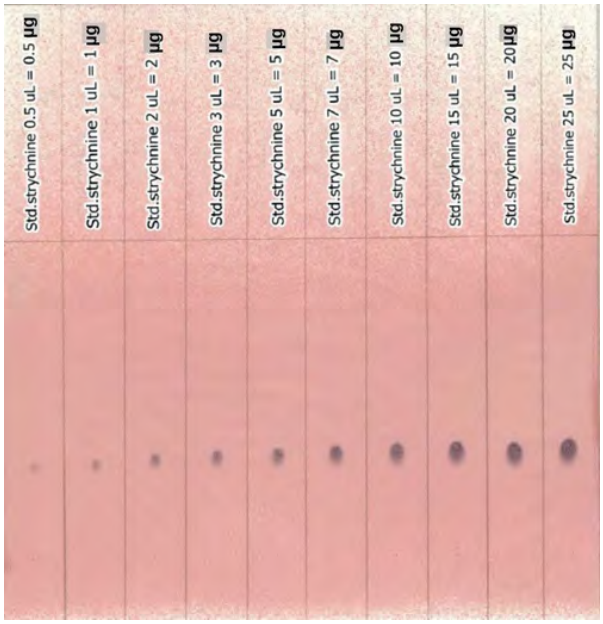
ตัวอย่างที่ใช้ คือ อาหารในกระเพาะ หรือวัตถุที่ต้องสงสัย ตัวอย่างที่เป็นของเหลวใช้ประมาณ 5-50 มิลลิลิตร ถ้าเป็นของแข็ง ใช้ประมาณ 5-50 กรัม นำมาตัดหรือบดให้ละเอียด

สารเคมีและการเตรียม

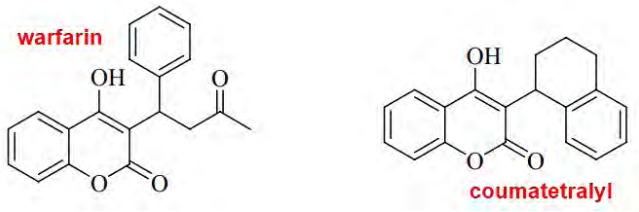
- สารละลายมาตรฐาน Strychnine 1000 µg/ml โดยชั่ง Strychnine ประมาณ 0.0100 g ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml ละลายด้วย methanol ปรับปริมาตรจนครบ ผสมให้เข้ากัน
- Iodoplatinate reagent: ชั่ง Platinic chloride 0.25 g และ Potassium iodide 5 g ละลายและผสมให้เข้ากันในน้ำกลั่น 100 ml เติม conc. Hydrochloric acid 5 ml

วิธีตรวจวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างของแข็ง 5 g (เติมน้ำกลั่น) หรือปิเปตตัวอย่าง 5 ml ลงใน separatory funnel วัด pH ของตัวอย่างด้วยกระดาษ pH ถ้าตัวอย่างมีสภาพเป็นกลางหรือเป็นกรดให้ปรับ pH ตัวอย่างด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์จนเป็นเบสประมาณ 9-10
2. เติม dichloromethane ปริมาตรเท่าตัวของตัวอย่าง ทำการสกัดโดยค่อย ๆ เขย่าขณะสกัดหากเกิด emulsion ให้นำไปปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ทำการสกัด 2 ครั้ง ขณะสกัดตัวอย่างให้ทำการสกัด blank (น้ำกลั่น) ควบคู่ไปด้วย
3. นำ dichloromethane ที่สกัดได้ 2 ครั้งรวมกัน แล้วเติม Sodium sulfate anhydrous เพื่อดูดความชื้น จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสารโดยใช้ N_2 gas
4. ละลาย residue กลับด้วย methanol : dichloromethane (1:1) 0.5 ml เก็บไว้ในขวด vial
5. spot blank และตัวอย่างที่สกัดลงบนช่องที่ขีดไว้บนเพลท TLC อย่างละ 20 µl ส่วนสารละลายมาตรฐาน Strychnine 1000 µg/ml spot 3 µl
6. นำไปแช่ใน TLC chamber ที่มีสารละลายผสมของ Methanol : Ammonium hydroxide (100:1.5) เป็น mobile phase
7. เมื่อ mobile phase เคลื่อนที่ถึง solvent front ให้นำออกมาผึ่งให้แห้งใน Chemical fume hood ให้แอมโมเนียระเหยไปให้หมด (อาจใช้ hair dryer ช่วยเป่า โดยใช้ลมเย็นสลับกับลมร้อน)
8. Spray เพลท ด้วย Iodoplatinate reagent
9. การแปลผล : ผลบวกจะได้ spot สีน้ำตาล (รูปที่ 6-4)



รูปที่ 6-4 TLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน strychnine ที่ปริมาณต่าง ๆ กัน



รูปที่ 6-5 สูตรโครงสร้างของ Warfarin และ Coumatetralyl
ที่มา: Jung & Park (2009)

6.3 วาร์ฟาริน (Warfarin) และคูมาเตตราลิล (Coumatetralyl)

วาร์ฟาริน (Warfarin) และคูมาเตตราลิล (Coumatetralyl) จัดเป็นสารกำจัดสัตว์ฟันแทะ (rodenticides) ในกลุ่มคูมาริน (coumarin derivatives) (รูปที่ 6-5) ที่มีการนำมาใช้ทั้งในทางการแพทย์และสัตวแพทย์ โดยเฉพาะในด้านการควบคุมสัตว์ฟันแทะที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อการเกษตรและสุขภาพสัตว์เลี้ยง สารทั้งสองชนิดนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มยาต้านการแข็งตัวของเลือดแบบออกฤทธิ์ช้า (anticoagulant rodenticides; first-generation) ที่สามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษได้หากสัตว์เลี้ยงหรือสัตว์ป่าได้รับโดยไม่ตั้งใจ วาร์ฟารินถูกค้นพบและนำมาใช้ตั้งแต่กลางศตวรรษที่ 20 ส่วนคูมาเตตราลิลเป็นอนุพันธ์ที่ถูกพัฒนาต่อมา มีความแรงน้อยกว่าสารในกลุ่มรุ่นที่สอง แต่ก็ยังคงก่อให้เกิดอันตรายทางคลินิกได้

กลไกการออกฤทธิ์

กลไกหลักของวาร์ฟารินและคูมาเตตราลิลคือการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ vitamin K epoxide reductase ทำให้กระบวนการรีไซเคิลวิตามินเคในตับถูกรบกวน ส่งผลให้การสร้างปัจจัยการแข็งตัวของเลือดที่ขึ้นกับวิตามินเค ได้แก่ Factors II, VII, IX และ X ลดลงอย่างมาก เมื่อสัตว์ได้รับสารเหล่านี้ ระบบการแข็งตัวของเลือดจึงไม่สามารถทำงานได้อย่างปกติ ส่งผลให้เกิดภาวะเลือดออกผิดปกติ (coagulopathy) และหากไม่ได้รับการรักษาอาจทำให้ตายได้

อาการทางคลินิก

อาการของพิษจากวาร์ฟารินและคูมาเตตราลิลมักปรากฏหลังจากสัตว์ได้รับสารเข้าสู่ร่างกายแล้ว 2–5 วัน เนื่องจากต้องใช้เวลาที่ปัจจัยการแข็งตัวที่มีอยู่หมดลง อาการสำคัญที่พบ ได้แก่ อ่อนเพลีย ซีด หายใจลำบากจากการมีเลือดออกในช่องอกหรือช่องท้อง มีเลือดออกในทางเดินอาหาร ปัสสาวะหรืออุจจาระมีเลือดปน เลือดออกใต้ผิวหนังหรือกล้ามเนื้อ และในบางกรณีอาจพบเลือดออกภายในสมองหรือข้อ ทำให้เกิดอาการทางระบบประสาท เช่น ซึม เดินเซ หรือชักในสัตว์เลี้ยง เช่น สุนัขและแมว มักพบอาการซ่อนเร้น จนกว่าจะมีเลือดออกอย่างรุนแรงจึงจะถูกสังเกตเห็น

ความเป็นพิษ

ความเป็นพิษของวาร์ฟารินและคูมาเตตราลิลขึ้นกับปริมาณ ระยะเวลา และความไวของสัตว์แต่ละชนิด โดยทั่วไปสัตว์กินเนื้อ เช่น สุนัขและแมว มีความไวต่อสารเหล่านี้มากกว่าสัตว์ฟันแทะที่เป็นเป้าหมาย

ค่าความเป็นพิษ (Oral LD_{50}) ของ warfarin ในสัตว์หลายชนิด เช่น

- หนู (Rat) เท่ากับ 3 mg/kg
- หนู (Mouse) เท่ากับ 60 mg/kg
- แมว เท่ากับ 2.5-20 mg/kg
- แกะ เท่ากับ 60-70 mg/kg
- โค ประมาณ 200 mg/kg/day เป็นเวลา 5 วัน

และมีรายงานว่าสุกรตายจากการได้รับ warfarin ทางปาก (oral LD_{lo} for warfarin in pigs) ในขนาดต่ำสุดที่ 1.2 mg/kg

ค่าความเป็นพิษ (Oral LD_{50}) ของ coumatetralyl ในสัตว์หลายชนิด เช่น

- หนู (Rat) เท่ากับ 16.5 mg/kg (single dose) และ 0.3 mg/kg (5 วัน)
- สุกร เท่ากับ 1-2 mg/kg (1-7 วัน)
- ไก่ตัวเมีย เท่ากับ 50 mg/kg (8 วัน)

6.3.1 การตรวจวิเคราะห์สารกำจัดสัตว์ฟันแทะชนิด warfarin และ coumatetralyl โดยวิธี TLC

หลักการตรวจวิเคราะห์ สารกำจัดสัตว์ฟันแทะชนิด warfarin และ coumatetralyl ที่อยู่ในตัวอย่างจะถูกสกัดออกมาด้วยเทคนิค QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) ซึ่งดัดแปลงวิธีจาก Anastassiades and Lehotay (2003) โดยในขั้นตอนการสกัดจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เข้ากับน้ำได้ดี เติมเกลือลงไปเพื่อดูดน้ำและทำให้เกิด salting out ตามด้วยการกำจัด matrix (clean up) ส่วนสกัดที่ได้โดยใช้ dispersive SPE นำส่วนใสที่ได้ไประเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วละลาย residue กลับด้วย acetone จากนั้นนำไปตรวจหาเอกลักษณ์สารกำจัดสัตว์ฟันแทะชนิด warfarin และ coumatetralyl ตามหลักการ TLC โดยเทียบกับสารมาตรฐาน กรณีที่ตรวจพบสารกำจัดสัตว์ฟันแทะชนิดใดชนิดหนึ่ง ให้ทำการตรวจยืนยันด้วยวิธี HPLC หรือวิธีอื่นที่เหมาะสมอีก 1 วิธี

ตัวอย่างที่ใช้ : อาหารในกระเพาะ หรือวัตถุที่ต้องสงสัย

สารเคมีและการเตรียม

- สารมาตรฐานสารกำจัดสัตว์ฟันแทะชนิด warfarin และ coumatetralyl ที่ใช้มีความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 90
- สารละลายมาตรฐาน warfarin และ coumatetralyl ความเข้มข้นชนิดละประมาณ 1000 µg/ml (ppm) เตรียมโดยชั่งสารมาตรฐาน warfarin และ coumatetralyl ชนิดละประมาณ 0.0100 g ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml (แยก flask) เติม acetone (PR grade) ลงไปประมาณ 2-3 ml ค่อย ๆ หมุน flask (swirl) แนวนอนให้สารมาตรฐานละลาย แล้วเติมด้วย acetone จนครบปริมาตร ผสมให้เข้ากัน
- 1% $KMnO_4$ ใน 0.025 M H_2SO_4 สารละลาย Acidified potassium permanganate สำหรับ spray TLC plate (เตรียมใหม่เสมอ) : ชั่ง Potassium permanganate 0.2 g ละลาย ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติม Sulfuric acidเข้มข้น 0.3 ml ผสมให้เข้ากัน

รูปที่ 6-6 TLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน warfarin และ coumatetralyl

วิธีวิเคราะห์

1. **การสกัดตัวอย่าง** (ให้ดำเนินการสกัดเหมือนบทที่ 4 ข้อ 4.4 หัวข้อย่อย 1. การสกัดตัวอย่าง หน้า 61)
2. **การตรวจเอกลักษณ์สารกำจัดสัตว์ฟันแทะชนิด warfarin และ coumatetralyl ด้วยวิธี TLC**

➢ นำสารละลายที่ได้จากการสกัดตัวอย่างในข้อ 1 และ blank มา spot ลงบนแผ่น TLC ที่เตรียมไว้ [ดูได้จากบทที่ 3 ข้อ 3) การเตรียมแผ่น TLC เพื่อตรวจวิเคราะห์] อย่างละ 20 µl และ spot สารละลายมาตรฐาน warfarin และ coumatetralyl ชนิดละ 10 µl

➢ นำแผ่น TLC ไปแช่ใน TLC chamber ที่มี mobile phase เป็น Chloroform : Acetone (80:20) เมื่อ mobile phase เคลื่อนที่มาถึง solvent front ให้นำแผ่น TLC ออกมาตั้งทิ้งไว้ให้ organic solvent ระเหยแห้งใน Fume hood

➢ นำไปทำให้ spot ของสารปรากฏหรือทำให้มองเห็นสาร (Visualization) ด้วยการ spray ด้วยสารละลาย 1% $KMnO_4$ ใน 0.025 M H_2SO_4

➢ การแปลผล : ผลบวกจะได้ spot สีเหลืองอมน้ำตาลบน Background สีม่วง (รูปที่ 6-6)

➢ LOD = 3 µg

บทที่ 7

สารกำจัดหอย (Molluscicides)

สารกำจัดหอย (molluscicides) คือสารที่ใช้ควบคุมหรือกำจัดหอย โดยเฉพาะหอยที่จัดเป็นศัตรูในระบบเกษตรกรรมหรือเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น ทาก (slugs) และหอยทาก (snails) ซึ่งเป็นอันตรายต่อพืชที่เพาะปลูก สารเหล่านี้อาจอยู่ในรูปของเหยื่อ สเปรย์ ผง เกล็ด หรือเป็นเม็ด โดยออกฤทธิ์โดยตรงหรือยับยั้งการกินพืชของหอย

สัตว์ในกลุ่มหอย (molluscs) เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในไฟลัม Mollusca ประกอบด้วยหมึก หอย หอยทาก และทาก มีลักษณะเด่นคือมีลำตัวอ่อนนุ่ม มักมีเปลือกแข็งคลุมลำตัว และมีเท้าแข็งแรงสำหรับการเคลื่อนที่หอยมีบทบาททางนิเวศในแหล่งน้ำจืด น้ำเค็ม และบนบก แต่บางชนิดเป็นพาหะนำโรคหรือศัตรูพืช เช่น หอยโข่งที่แพร่พยาธิใบไม้ สารกำจัดหอยจึงมีบทบาทสำคัญในการควบคุมจำนวนประชากรหอยเหล่านี้

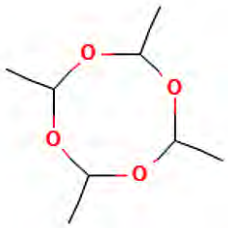
สารกำจัดหอยมีหลายชนิด เช่น bromoacetamide, allicin, metaldehyde, copper sulfate และ niclosamide เป็นต้น โดยบทนี้จะขอกล่าวเพียง metaldehyde

7.1 เมทัลดีไฮด์ (Metaldehyde)

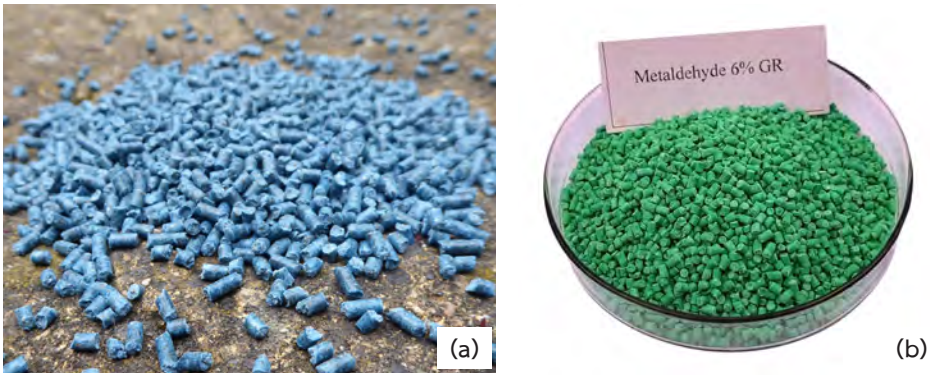
metaldehyde (สูตรโมเลกุล; $C_8H_{16}O_4$) เป็นสารเคมีกำจัดหอยชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นสารประกอบประเภท tetramer โดยประกอบไปด้วยโมเลกุลของ acetaldehyde สี่หน่วยที่เรียงตัวกันเป็นวงแหวน eight-membered ring metaldehyde (รูปที่ 7-1) ใช้เป็นสารออกฤทธิ์หลักในผลิตภัณฑ์สารกำจัดหอย ผลิตภัณฑ์ทางการค้าของ metaldehyde มีได้หลากหลายรูปแบบ ได้แก่ เหยื่อชนิดเม็ด (pelleted bait) เม็ดเกล็ด (granules) ของเหลว (liquids) หรือผงที่ละลายน้ำได้ (wettable powder) ผู้ผลิตบางรายจะผสมสีย้อม เช่น สีฟ้า สีเขียว หรือสีอื่นๆ ลงในผลิตภัณฑ์เพื่อวัตถุประสงค์

ด้านความปลอดภัย (รูปที่ 7-2) ในบางประเทศได้มีข้อกำหนดให้มีการออกแบบสูตรตำรับ (formulation) ของผลิตภัณฑ์ให้ไม่น่าดึงดูดต่อสัตว์ชนิดอื่นที่ไม่ใช่เป้าหมาย (nontarget species) อย่างไรก็ตามการเติมส่วนผสมของวัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ลงในเหยื่อ เช่น กากน้ำตาล (molasses) แอปเปิล ข้าว ถั่วเหลือง และข้าวโอ๊ต ทำให้ผลิตภัณฑ์เหยื่อดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะดึงดูดสัตว์ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ทากและหอย ให้เข้ามากินเพิ่มมากขึ้น

metaldehyde นิยมใช้ในช่วงฤดูฝนเพื่อควบคุมทากและหอยที่เป็นศัตรูพืช มักใช้งานโดยการโรยตามบริเวณสวนตามบ้านเรือนหรือพื้นที่เกษตรกรรมที่มีการระบาดของทากและหอยเพื่อป้องกันความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตร หรือพืชสวนสวยงาม ในประเทศไทยนิยมนำมาใช้ฆ่าหอยเชอรี่ตามบริเวณนาข้าว หรือพื้นที่เกษตรกรรมที่มีน้ำขัง เนื่องจากลักษณะการใช้เป็นแบบเป็นเหยื่อล่อนี้ อาจทำให้ nontarget species เช่น สัตว์เลี้ยง (สุนัข และแมว) ได้รับพิษจากการกินเหยื่อล่อ หรืออาจเกิดจากมีผู้จงใจวางยาสัตว์ โดยการยัดเม็ด metaldehyde ไว้ในอาหาร เช่น ไส้กรอกหรือผลไม้แล้วใช้เป็นเหยื่อล่อให้สัตว์กิน เป็นต้น (รูปที่ 7-3) พบรายงานการเกิดพิษจาก metaldehyde ในแถบยุโรป อเมริกาเหนือ และประเทศอิสราเอล ในสัตว์หลายชนิด ได้แก่ สุนัข แมว วัว แกะ ม้า และนก



รูปที่ 7-1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ metaldehyde
ที่มา: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metaldehyde#section=2D-Structure



รูปที่ 7-2 metaldehyde ที่อยู่ในรูปของเหยื่อชนิดเม็ดสีฟ้าและสีเขียว
(a) ที่มา: https://www.vpisglobal.com/2020/06/02/metaldehyde-poisoning-in-dogs/ (b) ที่มา: https://www.awiner.com/product/metaldehyde-insecticide/

รูปที่ 7-3 ไส้กรอกและแอปเปิลยัดไส้ด้วย metaldehyde
ที่มา: Giorgi *et al.* (2011)

กลไกการออกฤทธิ์

ทฤษฎีปัจจุบัน กล่าวว่า metaldehyde ส่งผลให้ระดับของ Gamma-Aminobutyric acid (GABA) noradrenalin และ 5-HT (serotonin) ในสมองลดลง ซึ่งนำไปสู่การสูญเสียกลไกการยับยั้งการส่งสัญญาณประสาทในระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system: CNS)

ทฤษฎีเดิมเชื่อว่า metaldehyde จะถูกเปลี่ยนเป็น acetaldehyde ในสภาวะที่มีความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร จากนั้น acetaldehyde จะยับยั้งการสลายของ serotonin ส่งผลให้มีการสะสมของ serotonin ในสมองมากเกินไป อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะตรวจพบ metaldehyde ในเนื้อเยื่อสมองของสัตว์ที่ได้รับพิษ แต่ยังไม่เคยมีรายงานการตรวจพบ acetaldehyde ในเนื้อเยื่อสมองภายหลังการได้รับพิษดังกล่าว

อาการทางคลินิก

สัตว์จะเริ่มแสดงอาการหลังจากได้รับ metaldehyde เข้าไปประมาณ 30 นาที ถึง 3 ชั่วโมง

สุนัข

- **ระยะเริ่มต้น:** แสดงอาการกระวนกระวายและไม่อยู่นิ่ง
- **ระยะกลาง:** น้ำลายไหล รูม่านตาขยาย (mydriasis) กล้ามเนื้อสั่น (tremors) และเดินเซ (ataxia)
- **ระยะท้าย:** กล้ามเนื้อคอและหลังเกร็งอย่างรุนแรง (opisthotonus) อาการชักเกร็งต่อเนื่อง ภาวะเขียวคล้ำจากการขาดออกซิเจน (cyanosis) ลูกตากระตุก (nystagmus) ภาวะไข้สูง (hyperthermia) และตายจากภาวะหายใจล้มเหลว

หมายเหตุ: สุนัขมักไม่แสดงภาวะไวต่อสิ่งกระตุ้น (hyperesthesia) มากเท่ากับในกรณีของพิษจาก strychnine ซึ่งเป็นการวินิจฉัยแยกโรคที่สำคัญ

- สัตว์ที่รอดชีวิตจากพิษของ metaldehyde อาจเกิดภาวะตับล้มเหลวภายใน 2–3 วันหลังได้รับสารพิษ

แมว

- อาการใกล้เคียงกับในสุนัข โดยอาการเด่นชัดคือ ภาวะลูกตากระตุก (nystagmus)

สัตว์เคี้ยวเอื้อง (Ruminants)

- อาการเด่นได้แก่ การเดินเซ (ataxia) และกล้ามเนื้อสั่น (tremors)
- ในโค อาจพบอาการน้ำลายไหล ท้องเสีย และในบางรายอาจแสดงอาการเหมือนไม่สามารถมองเห็น (คล้ายตาบอด)

ม้า

- อาการที่พบได้บ่อยที่สุดได้แก่ อาการจุกเสียด (colic) ท้องเสีย เหงื่อออก กล้ามเนื้อสั่น และภาวะไวต่อสิ่งกระตุ้น (hyperesthesia)

หมายเหตุ: มักพบภาวะ metabolic acidosis ร่วมด้วย โดยมีสาเหตุจากการเกิดของ acetaldehyde

ความเป็นพิษ

metaldehyde เป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อสัตว์ทุกชนิด และมีรายงานการเกิดพิษในสุนัข แมว นก ม้า หนู แกะ สุกร แพะ และโค อย่างไรก็ตามสุนัขเป็นสัตว์ที่พบการเกิดพิษจาก metaldehyde บ่อยที่สุด กรณีที่ได้รับการยืนยันส่วนใหญ่เกิดขึ้นในพื้นที่ชายฝั่งของประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีประชากรของหอยทากและหอยเชอรี่จำนวนมากสัตว์มักได้รับพิษจากการกินเหยื่อที่มีส่วนผสมของ metaldehyde เข้าไปทางปาก การหายใจเอาสารพิษเข้าสู่ร่างกายหรือการสัมผัสทางผิวหนังไม่ใช่เส้นทางหลักในการก่อให้เกิดพิษ พบรายงาน LD_{50} แบบเฉียบพลันทางปากของmetaldehyde

ในหนูทดลอง (rats) สุนัข และแมว มีค่าเท่ากับ 283, 210-600 และ 207 mg/kg ตามลำดับ ในโคโตเต็มวัย ถ้าได้รับ metaldehyde ในขนาด 200 mg/kg ทำให้ตายได้ และลูกโคสามารถตายได้ถ้าได้รับขนาดต่ำกว่านี้ ขนาดของ metaldehyde ที่ทำให้ตายได้ (Lethal dose) ในแกะ ม้า และลูกม้า มีค่าเท่ากับ 300, 60-360 และ 100 mg/kg ตามลำดับ ขนาดต่ำสุดที่ทำให้ตาย (minimum lethal dose) ในไก่เท่ากับ 500 mg/kg และในเป็ดเท่ากับ 300 mg/kg

7.2 วิธีการตรวจเอกลักษณ์สารกำจัดหอยชนิด metaldehyde ด้วยวิธี TLC

หลักการตรวจวิเคราะห์ สารกำจัดหอยชนิด metaldehyde ที่อยู่ในตัวอย่างจะถูกสกัดออกมาด้วยเทคนิค QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) ซึ่งดัดแปลงวิธีจาก Anastassiades and Lehotay (2003) โดยในขั้นตอนการสกัดจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เข้ากับน้ำได้ดี เติมเกลือลงไปเพื่อดูดน้ำและทำให้เกิด salting out ตามด้วยการกำจัด matrix (clean up) ส่วนสกัดที่ได้โดยใช้ dispersive SPE นำส่วนใสที่ได้ไประเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วละลาย residue กลับด้วย acetone จากนั้นนำไปตรวจหาเอกลักษณ์สารกำจัดหอยชนิด metaldehyde ตามหลักการ TLC โดยเทียบกับสารมาตรฐาน กรณีที่ตรวจพบสารกำจัดหอยชนิด metaldehyde ด้วยวิธี TLC ให้ทำการตรวจยืนยันด้วยวิธี HPLC หรือวิธีอื่นที่เหมาะสมอีก 1 วิธี

ตัวอย่างที่ใช้ : อาหารในกระเพาะ

สารเคมีและการเตรียม

- สารมาตรฐาน metaldehyde ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 90 (EURL/SANCO Guideline, 2006)
- สารละลายมาตรฐาน metaldehyde ความเข้มข้นประมาณ 1000 µg/ml (ppm) เตรียมโดยชั่งสารมาตรฐาน metaldehyde ประมาณ 0.0100 g ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml ค่อย ๆ ละลายด้วย acetone 2-3 ml แล้วปรับจนครบปริมาตร ผสมให้เข้ากัน
- สารละลาย 0.4% 2,4- Dinitrophenylhydrazine: ชั่ง 2,4- Dinitrophenylhydrazine 0.4 g ลงใน beaker ละลายด้วย 100 ml ของ 2 N HCl แล้วเติม absolute ethanol 1 ml ผสมให้เข้ากัน

วิธีวิเคราะห์

1. **การสกัดตัวอย่าง** ให้ดำเนินการสกัดเหมือนบทที่ 4 ข้อ 4.4 หัวข้อย่อย 1. การสกัดตัวอย่าง หน้า 61
2. **การตรวจเอกลักษณ์สารกำจัดหอยชนิด metaldehyde ด้วยวิธี TLC**

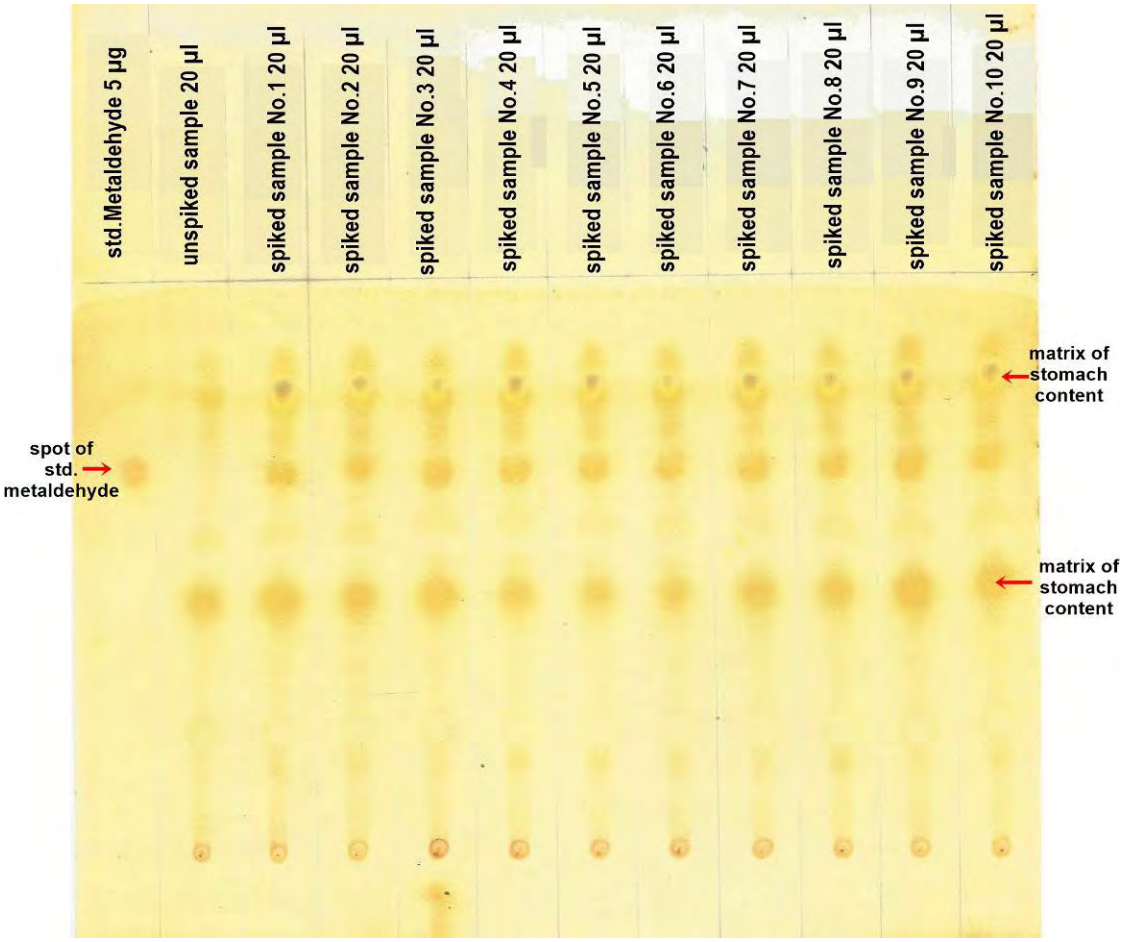
➢ นำสารละลายที่ได้จากการสกัดตัวอย่างในข้อ 1 และ blank มา spot ลงบนแผ่น TLC ที่เตรียมไว้ [ดูได้จากบทที่ 3 ข้อ 3) การเตรียมแผ่น TLC เพื่อตรวจวิเคราะห์] อย่างละ 20 µl และ spot สารละลายมาตรฐาน metaldehyde 2 µl

➢ นำแผ่น TLC ไปแช่ใน TLC chamber ที่มี mobile phase เป็น Ethyl acetate หรือ Acetone : Benzene (20:80) เมื่อ mobile phase เคลื่อนที่มาถึง solvent front ให้นำแผ่น TLC ออกมาตั้งทิ้งไว้ให้ organic solvent ระเหยแห้งใน Fume hood

➢ นำไปทำให้ spot ของสารปรากฏหรือทำให้มองเห็นสาร (Visualization) ด้วยการ spray ด้วยสารละลาย 0.4% 2,4- Dinitrophenylhydrazine

➢ การแปลผล : ผลบวกจะได้ spot สีเหลือง เหมือนกับสารมาตรฐาน (รูปที่ 7-4)

➢ LOD = 1 µg/g (ppm)



รูปที่ 7-4 TLC Chromatogram ของการทดสอบหาค่า LOD ของวิธีตรวจหา metaldehyde ในอาหารในกระเพาะ

บทที่ 8

อะฟลาทอกซิน (Aflatoxins)

Aflatoxins (AFs) เป็นสารพิษจากเชื้อราที่สร้างขึ้นโดย *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* และ *A. nomius* พบได้บ่อยในวัตถุดิบอาหารสัตว์ เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี ถั่วลิสง และถั่วเหลือง เป็นต้น รวมถึงอาหารสัตว์สำเร็จรูป AFs สามารถเกิดขึ้นทั้งในระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อราในไร่และระหว่างการเก็บรักษา หากมีความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยทั่วไปหมายถึงอุณหภูมิกลางวันและกลางคืนที่มากกว่า 21°C AFs ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติแบ่งเป็น 4 ชนิด ได้แก่ AFB1, AFB2, AFG1 และ AFG2 นอกจากนี้ยังมีสารอนุพันธ์ที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในร่างกายสัตว์ คือ AFM1 และ AFM2 ซึ่งเกิดจากการได้รับ AFB1 และ AFB2 เข้าไปตามลำดับ สามารถตรวจพบ AFM1 และ AFM2 ได้ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในน้ำนม AFB1 เป็นสารที่เมื่อผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมในตับ ส่งผลให้เกิดเมตาบอไลต์หลายชนิด หนึ่งในนั้นคือสารอีพอกไซด์ (epoxide) ที่มีความว่องไวสูงในการทำปฏิกิริยากับกรดนิวคลีอิกและโปรตีน AFs ถูกขับออกจากร่างกายเป็นหลักทางปัสสาวะ โดยส่วนใหญ่จะถูกขับออกภายใน 96 ชั่วโมง หลังจากสิ้นสุดการสัมผัสสาร อย่างไรก็ตาม อาจพบสารตกค้างในตับหรือไตได้นานถึง 2 สัปดาห์ พบรายงานการปนเปื้อนของ AFB1 ในธรรมชาติสูงสุด โดย AFB1 เป็นสารพิษที่มีความเป็นพิษมากที่สุดในกลุ่ม AFs องค์กรวิจัยโรคมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Research on Cancer; IARC) ได้จัดให้ AFB1 และ AFM1 เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ในมนุษย์ (IARC กลุ่มที่ 1) อีกด้วย การตอบสนองต่อ AFs และการเกิดโรค aflatoxicosis (โรคหรือภาวะพิษที่เกิดจากสารพิษ AFs) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีกขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดพันธุ์ เพศ อายุ สถานะทางโภชนาการ ระยะเวลาที่ได้รับสารพิษ และระดับของ AFs ในอาหารสัตว์

การเกิดโรค aflatoxicosis พบได้ในหลายพื้นที่ทั่วโลก และส่งผลกระทบต่อสัตว์ปีกที่กำลังเจริญเติบโต (โดยเฉพาะลูกเป็ดและลูกไก่งวง) ลูกสุกร แม่สุกรตั้งท้อง ลูกโค และสุนัข สัตว์เคี้ยวเอื้องที่โตเต็มวัย เช่น โค แพะ และแกะ มีความต้านทานต่อโรคแบบเฉียบพลัน แต่หากได้รับอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษในระยะเวลานานก็อาจได้รับผลกระทบได้เช่นกัน จากการทดลองพบว่าสัตว์ทุกชนิดที่ได้รับการทดสอบมีความไวต่อสารพิษนี้ในระดับหนึ่ง ระดับของ AFs ในอาหารที่ยอมรับได้โดยทั่วไปคือ ได้แก่ ในสัตว์ปีกอายุน้อย = 50 ppb สัตว์ปีกโตเต็มวัย = 100 ppb ลูกสุกรหย่านม = 50 ppb สุกรขุน = 200 ppb ลูกโค < 100 ppb และในโคโตเต็มวัย < 300 ppb นอกจากนี้ AFs ในระดับต่ำเพียง 10-20 ppb อาจนำไปสู่การตรวจพบเมตาบอไลต์ AFM1 และ AFM2 ในน้ำนมได้ ดังนั้นอาหารสัตว์ที่ปนเปื้อน AFs จึงไม่ควรนำมาใช้เลี้ยงโคนม

กลไกการออกฤทธิ์

AFs สามารถจับกับสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ โดยเฉพาะกรดนิวคลีอิกและนิวคลีโอโปรตีน ผลกระทบ จากพิษของ AFs ได้แก่ การเกิดกลายพันธุ์โดยผ่านกระบวนการ alkylation ของ DNA ภายในนิวเคลียส การก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogenesis) ก่อให้เกิดความผิดปกติของทารกในครรภ์ (teratogenesis) การลดลงของการสังเคราะห์โปรตีน และการกดภูมิคุ้มกัน เป็นต้น การลดลงของการสังเคราะห์โปรตีนส่งผลให้การผลิต metabolic enzymes ที่จำเป็นและ structural proteins ที่สำคัญลดลง อวัยวะหลักที่ได้รับผลกระทบคือ ตับ โดยการได้ AFs ในปริมาณสูงอาจทำให้เกิดภาวะเนื้อตับตายรุนแรง ในขณะที่การได้รับ AFs ในระดับต่ำต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานอาจนำไปสู่การชะลอการเจริญเติบโตและภาวะตับโต

สัตว์เคี้ยวเอื้อง (ruminants) มีความไวต่อพิษของ AFs น้อยกว่าสัตว์ที่มีระบบทางเดินอาหารแบบกระเพาะเดี่ยว (monogastric species) และสัตว์โตเต็มวัยมีความไวต่อพิษน้อยกว่าสัตว์ที่มีอายุน้อย

อาการทางคลินิก

ในกรณีเฉียบพลันสัตว์อาจตายภายหลังจากช่วงระยะเวลาสั้นๆ ที่สัตว์เบื่ออาหาร สำหรับกรณีกึ่งเฉียบพลันอาการที่พบโดยทั่วไป ได้แก่ ภาวะร่างกายทรุดโทรม อ่อนแรง เบื่ออาหาร และการตายอย่างเฉียบพลัน อะฟลาทอกซินในอาหารที่มีความเข้มข้นมากกว่า 1,000 ppb มักเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะพิษจาก AFs เฉียบพลัน (acute aflatoxicosis) บ่อยครั้งที่พบอุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อร่วมสูง มักเป็นโรคทางเดินหายใจ ซึ่งตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะได้ไม่ดี

ความเป็นพิษ

พบรายงานการปนเปื้อนของ AFB1 ในธรรมชาติสูงสุด โดย AFB1 เป็นสารพิษที่มีความเป็นพิษมากที่สุดในกลุ่ม AFs โดยมีค่าความเป็นพิษทางปาก (oral LD_{50}) ในลูกโคเท่ากับ 0.5-1.0 mg/kg ถ้าระดับของ AFB1 ในอาหารสัตว์เกิน 100 ppb ถือว่ามีความเป็นพิษต่อโค องค์กรวิจัยโรคมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Research on Cancer; IARC) ได้จัดให้ AFB1 และ AFM1 เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ในมนุษย์ (IARC กลุ่มที่ 1) อีกด้วย

8.1 การตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซินโดยวิธี Fluorometry

อะฟลาทอกซิน (Aflatoxins; AFs) เป็นสารพิษจากเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษคือ การเรืองแสง (fluorescence) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV light) โดยเฉพาะ AFs ชนิด B1, B2, G1 และ G2 ที่สามารถดูดกลืนพลังงานจากแสง UV และปลดปล่อยออกมาเป็นแสงเรืองสีฟ้า–เขียว (blue–green) ที่ความยาวคลื่นสูงกว่าเดิม หลักการของ Fluorometry อาศัยการตรวจวัดความเข้มของแสงเรืองที่สารปลดปล่อยออกมา โดยทั่วไปกำหนดให้ใช้ Excitation wavelength ประมาณ 360-365 นาโนเมตร (UV light) และEmission wavelength ประมาณ 440–450 นาโนเมตร เมื่ออะฟลาทอกซินได้รับการกระตุ้นด้วยแสง UV จะเกิดการเปลี่ยนผ่านอิเล็กตรอนจากระดับพลังงานต่ำขึ้นสู่สถานะกระตุ้น และเมื่ออิเล็กตรอนกลับลงสู่สถานะพื้นฐาน จะปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปของแสงเรือง (fluorescence emission) ซึ่งสามารถวัดปริมาณได้โดยเครื่อง fluorometer โดยสัญญาณที่ตรวจวัดได้จะมีความเข้มสัมพันธ์กับปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่าง

หลักการตรวจวิเคราะห์

อะฟลาทอกซินในตัวอย่างจะถูกสกัดออกมาด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และน้ำ แล้วนำมาผ่านขั้นตอน clean-up ด้วยเทคนิค immunoaffinity column (IAC) เพื่อลดการรบกวนจากสารอื่น ๆ ที่มีอยู่ใน matrix ของตัวอย่าง ซึ่งอาจเรืองแสงเช่นกัน เมื่อได้สารบริสุทธิ์มากขึ้นจึงนำไปวัดด้วย fluorometer โดยตรง ซึ่งสามารถเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (Calibration standard) เพื่อคำนวณหาปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ อาหารสัตว์สำเร็จรูป ฟาง ธัญพืช ตับ

สารเคมีและการเตรียม

- การเตรียม stock standard ของอะฟลาทอกซินชนิด B1, B2, G1 และ G2 ที่ความเข้มข้นชนิดละ 1.0 µg/mL (1.0 ppm) โดยเติม acetonitrile (HPLC grade) หรือ methanol (HPLC grade) ตามคำแนะนำผู้ผลิตสารมาตรฐาน
- Extraction solvent [methanol : water (80:20)] : ตวง methanol 800 ml และน้ำกลั่น 200 ml (เตรียมใช้ใหม่ ๆ)
- Elution solvent สำหรับใช้ชะ (elute) อะฟลาทอกซินออกจาก IAC : methanol (HPLC grade)
- Blank (methanol) & Reagent blank (DW)

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่าง 50.0 g และ NaCl 5.0 g นำไปใส่ลงในเครื่องปั่น
2. เติม methanol : water (80:20) ปริมาตร 100 ml หลังจากนั้นทำการปั่นโดยใช้เครื่องปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง No.1 เพื่อแยกของแข็งออกจนได้สารสกัดใส เก็บสารสกัดชั่วคราวในขวดแอมเบอร์เพื่อป้องกันการสลายตัวจากแสง
3. Clean-up สารละลายที่สกัดด้วย IAC โดยปรับสภาพคอลัมน์ตามคำแนะนำผู้ผลิต ด้วยการล้างด้วยน้ำ จากนั้นโหลดสารสกัดให้ไหลผ่านคอลัมน์อย่างช้า ๆ และสม่ำเสมอ เพื่อให้แอนติบอดีจับอะฟลาทอกซินได้อย่างมีประสิทธิภาพ แล้วล้างคอลัมน์ด้วยน้ำจนแน่ใจว่าไม่มีสิ่งเจือปน จากนั้น elute AFs ออกด้วย methanol ปริมาตร 1 ml เก็บ eluate ใน cuvette

4. นำไปวัดด้วยเครื่อง Fluorometer รุ่น SERIES-4EX (VICAM, USA.) โดยตั้งค่าความยาวคลื่น excitation (ประมาณ 360–365 nm) และ emission (ประมาณ 440–450 nm) ตามชนิด AFs ที่ต้องการวัด ใส่ blank และสารมาตรฐานในลำดับก่อนแล้วจึงวัดตัวอย่างแต่ละหลอด วัดความเข้มของ AFs ในตัวอย่าง บันทึกค่าและตรวจสอบว่าไม่มี saturated signal หรือ background สูงผิดปกติ หากใช้ cuvette ให้แน่ใจทำความสะอาด cuvette ระหว่างการอ่าน

5. LOD เท่ากับ 0.69 ppb (µg/kg หรือ µg/L) และ LOQ เท่ากับ 2.3 ppb

บทที่ 9

โลหะพิษ (Toxic metals)

โลหะ (metals) เป็นองค์ประกอบทางธรรมชาติที่พบได้อย่างกว้างขวางทั้งในดิน น้ำ อากาศ และสิ่งมีชีวิต โดยหลายชนิดจัดว่าเป็นธาตุจำเป็นต่อการดำรงชีวิต เช่น เหล็ก (Fe) สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) แมงกานีส (Mn) และซีลีเนียม (Se) เนื่องจากทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ต่าง ๆ และเกี่ยวข้องกับการเผาผลาญพลังงาน การสร้างฮีโมโกลบิน และระบบภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ตาม เมื่อได้รับเกินขนาดหรือสะสมในร่างกายเกินความต้องการ โลหะเหล่านี้สามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษได้ และบางชนิดไม่จำเป็นต่อร่างกายเลยแต่มีพิษสูง เช่น ปรอท (Hg) ตะกั่ว (Pb) แคดเมียม (Cd) และสารหนู (As) ซึ่งจัดเป็น โลหะพิษ (toxic metals) ประวัติการเกิดพิษจากโลหะเป็นที่รับรู้กันมานานในสังคมมนุษย์ เช่น การใช้สารหนูเป็นพิษฆาตกรรมในสมัยโบราณ การเกิดโรคมินามาตะ (Minamata disease) จากการปนเปื้อนสารปรอทในญี่ปุ่นช่วงกลางคริสต์ศตวรรษที่ 20 หรือโรคอิไตอิไต (itai-itai disease) ในญี่ปุ่นซึ่งเกิดจากการได้รับแคดเมียมเรื้อรังจากน้ำและอาหาร เหตุการณ์เหล่านี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของโลหะพิษทั้งในแง่สาธารณสุขและสิ่งแวดล้อม ในทางสัตวแพทย์ โลหะพิษถือเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคทั้งในสัตว์เศรษฐกิจและสัตว์เลี้ยง เนื่องจากสัตว์อาจได้รับจากอาหารสัตว์ น้ำดื่ม ยา เวชภัณฑ์ สารเคมีทางการเกษตร หรือสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อน การได้รับโลหะพิษอาจเป็นแบบเฉียบพลัน acute) เช่น สัตว์กินเกลือที่มีตะกั่วหรือปรอทปนเปื้อน หรือแบบเรื้อรัง (chronic) ที่มีการสะสมทีละน้อยแต่ต่อเนื่อง เช่น การได้รับแคดเมียมหรือสารหนูในระดับต่ำแต่ยาวนาน ผลกระทบทางพิษวิทยาของโลหะขึ้นกับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ชนิดโลหะ รูปแบบเคมี (oxidation state, organic/inorganic form) ปริมาณและระยะเวลาที่ได้รับ ชนิดของสัตว์ และภาวะโภชนาการร่วม กลไกการออกฤทธิ์ของโลหะพิษมีความหลากหลาย เช่น การจับกับกลุ่มซัลไฮดริล (-SH) ของโปรตีนทำให้เอนไซม์สูญเสียการทำงาน (เช่น ตะกั่วและปรอท) การรบกวนสมดุลแคลเซียมและกระบวนการส่งสัญญาณในเซลล์ (เช่น แคดเมียม)

การก่ออนุมูลอิสระและความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) หรือการทดแทนธาตุที่จำเป็นในระบบชีวภาพ (เช่น ตะกั่วแทนแคลเซียมในกระดูกและระบบประสาท) ผลลัพธ์คือความผิดปกติของระบบต่าง ๆ ทั้งระบบประสาท ระบบเลือด ไต ตับ ระบบสืบพันธุ์ และภูมิคุ้มกัน ในเชิงพิษวิทยาทางสัตวแพทย์ ความสำคัญของโลหะพิษไม่เพียงแต่อยู่ที่ผลกระทบโดยตรงต่อสัตว์เลี้ยงหรือสัตว์เศรษฐกิจเท่านั้น แต่ยังรวมถึงผลกระทบต่อความปลอดภัยอาหาร (food safety) เช่น การสะสมของสารตะกั่ว ปรอท หรือแคดเมียมในเนื้อสัตว์ น้ำนม หรือผลิตผลจากสัตว์ ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ทำให้ต้องมีมาตรการกำกับดูแลอย่างเข้มงวด ทั้งในระดับกฎหมาย มาตรฐานอาหารสัตว์ และการควบคุมสิ่งแวดล้อม กล่าวโดยสรุป โลหะพิษเป็นปัญหาสำคัญที่เชื่อมโยงระหว่างสัตวแพทย์ มนุษย์ และสิ่งแวดล้อม การทำความเข้าใจคุณสมบัติ กลไกการออกฤทธิ์ การแบ่งกลุ่มของโลหะพิษ ตลอดจนการตรวจวิเคราะห์โลหะพิษทางห้องปฏิบัติการจึงเป็นพื้นฐานสำคัญในการวินิจฉัย ควบคุม และป้องกันผลกระทบจากสารพิษกลุ่มนี้

9.1 การแบ่งกลุ่มโลหะพิษ สามารถจำแนกได้หลายวิธี ทั้งตามสมบัติทางเคมี ความจำเป็นต่อร่างกาย หรืออวัยวะเป้าหมาย โดยแบ่งกลุ่มที่สำคัญได้ดังนี้

9.1.1 โลหะที่ไม่จำเป็นต่อร่างกายและมีพิษสูง

- ตะกั่ว (Lead, Pb) – พบจากสี สารเติมแต่งน้ำมัน และท่อประปา กลไกคือรบกวนการสร้าง heme และแทนที่แคลเซียมในกระดูกและระบบประสาท ทำให้เกิดภาวะซีด ชัก และปัญหาพฤติกรรมในสัตว์
- ปรอท (Mercury, Hg) – มีทั้งรูปอนินทรีย์และอินทรีย์ (methylmercury) สะสมในระบบประสาทและไต ทำให้เกิดความเสียหายต่อสมอง การทรงตัว และการทำงานของไต
- แคดเมียม (Cadmium, Cd) – มักปนเปื้อนจากอุตสาหกรรมโลหะและปุ๋ยฟอสเฟต สะสมในไตและตับ ทำให้เกิดไตวายเรื้อรัง และรบกวนเมแทบอลิซึมของแคลเซียม
- ธาลเลียม (Thallium, Tl) – พบในสารกำจัดหนูบางชนิดที่เลิกใช้แล้ว ทำให้เกิดอาการทางประสาทและการหลุดร่วงของขน

9.1.2 โลหะที่จำเป็นแต่มีพิษเมื่อเกินขนาด

- ทองแดง (Copper, Cu) – เป็นธาตุจำเป็น แต่เมื่อสะสมเกินในสัตว์เคี้ยวเอื้องบางชนิด เช่น แกะ จะทำให้เกิด hemolysis และไตวาย
- เหล็ก (Iron, Fe) – ขาดทำให้เกิดภาวะซีด แต่เมื่อได้รับเกิน เช่น จากยาบำรุงเลือด อาจทำให้เกิดการระคายเคืองต่อทางเดินอาหารและช็อกจากพิษเหล็ก
- สังกะสี (Zinc, Zn) – มีความจำเป็นต่อเอนไซม์หลายชนิด แต่เมื่อสัตว์กินโลหะผสมสังกะสีหรือสารเคลือบสังกะสีมากเกินไป อาจทำให้เกิดภาวะ hemolytic anemia และไตวาย
- ซีลีเนียม (Selenium, Se) – จำเป็นในปริมาณน้อย แต่เกินขนาดทำให้เกิด “alkali disease” ในโค กระทบต่อระบบประสาท กล้ามเนื้อ และการสืบพันธุ์

9.1.3 โลหะและกึ่งโลหะที่ก่อมะเร็งหรือก่อกลายพันธุ์ได้

- สารหนู (Arsenic, As) – มีทั้งรูปอนินทรีย์และอินทรีย์ ใช้ในอุตสาหกรรมเหมืองแร่และยาฆ่าแมลงบางชนิด พิษเฉียบพลันทำให้เกิดอาเจียนรุนแรงและช็อก ส่วนพิษเรื้อรังสัมพันธ์กับการก่อมะเร็งผิวหนังและตับ
- เฮกซะวาเลนต์โครเมียม (Hexavalent chromium, Cr^{6+}) – ใช้ในอุตสาหกรรมโลหะและสีย้อม มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และมะเร็ง

9.1.4 การจัดกลุ่มตามอวัยวะเป้าหมายหลัก

- โลหะที่มีพิษต่อระบบประสาท: ตะกั่ว ปรอท แมงกานีส ธาลเลียม
- โลหะที่มีพิษต่อไต: แคดเมียม ตะกั่ว ปรอท ยูเรเนียม
- โลหะที่มีพิษต่อตับ: ทองแดง เหล็ก สารหนู
- โลหะที่มีพิษต่อระบบเลือด: ตะกั่ว (ยับยั้งการสร้าง heme) และสังกะสี (hemolysis)

9.2 สารหนู (Arsenic; As)

สารหนูมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 74.92 เป็นที่รู้จักและใช้กันมานาน โดยใช้เป็นทั้งยาพิษและยารักษาโรคปัจจุบัน สารประกอบของสารหนูถูกนำมาใช้ประโยชน์สำหรับเบื่อหนู กำจัดปลวก กำจัดแมลงและเชื้อรา เป็นต้นโดยทั่วไปแล้วแบ่งสารหนูออกเป็น 2 กลุ่ม คือ สารหนูอนินทรีย์ (inorganic arsenicals) และสารหนูอินทรีย์ (organic arsenicals)

พิษสารหนูในสัตว์เกิดจากสารหนูประเภทอนินทรีย์และอินทรีย์หลายชนิด ความเป็นพิษจะแตกต่างกันตามปัจจัยต่าง ๆ เช่น สถานะออกซิเดชันของสารหนู ความสามารถในการละลาย ชนิดของสัตว์ที่ได้รับ และระยะเวลาของการได้รับสารพิษ ดังนั้น ผลกระทบของสารพิษที่เกิดจาก phenylarsonic ที่ใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารสัตว์ สารหนูอนินทรีย์อื่นๆ และสารหนูอินทรีย์ต้องแยกออกจากกัน

สารหนูอนินทรีย์ (inorganic arsenicals)

สารหนูอนินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นเกลือ มี 2 รูปแบบ คือ trivalent (As^{3+} ; arsenites) และ pentavalent (As^{5+} ; arsenates; AsO_4^{3-}) สารหนูอนินทรีย์พบได้ทั่วไปทั้งในดินและแร่ หรืออาจพบอยู่ในรูปที่ผสมกับโลหะหรือแร่ธาตุตัวอื่น ๆ เช่น กำมะถัน (Sulfur; S) ที่พบมากในธรรมชาติอยู่ในรูปของ Pyrites (Arsenopyrite; AsFeS)

trivalent arsenic salts ที่สำคัญ ได้แก่

- arsenic trioxide (As_2O_3)
- sodium arsenite ($NaAsO_2$)
- arsenic trichloride ($AsCl_3$)

pentavalent arsenic salts ที่สำคัญ ได้แก่

- arsenic pentoxide (As_2O_5)
- arsenic acid (AsH_3O_4)
- arsenate (sodium arsenate; $AsNa_3O_4$ และ potassium arsenate; KH_2AsO_4)

สารหนูในรูปแบบ trivalent มีความสามารถในการละลายได้ดีและมีความเป็นพิษสูงกว่าสารหนูในรูปแบบ pentavalent

กลไกการออกฤทธิ์

สารหนูอนินทรีย์ที่อยู่ในรูปแบบที่สามารถละลายน้ำได้ดีจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายผ่านทางเดินอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ หลังการดูดซึม สารหนูส่วนใหญ่จะจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดง (RBC) และกระจายไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยมีความเข้มข้นสูงสุดในตับ ไต หัวใจ และปอด ในกรณีได้รับสารหนูในระดับต่ำแต่ต่อเนื่องเป็นเวลานาน สารหนูจะสะสมในผิวหนัง เล็บ กีบ ต่อมเหงื่อ และเส้นผม สารหนูที่ถูกดูดซึมส่วนใหญ่จะถูกขับออกทางปัสสาวะในรูปแบบของสารหนูอนินทรีย์หรือในรูป methylated กลไกการเกิดพิษของสารหนูจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสารหนู อวัยวะที่มี

oxidative enzymes มาก เช่น ทางเดินอาหาร ตับ ปอด เยื่อบุผิวของหลอดเลือด และหนังกำพร้า จะมีความไวต่อพิษของสารหนูมาก เกิดความเสียหาย สารหนูอนินทรีย์ในรูป trivalent และ aliphatic organic arsenic สามารถยับยั้งเอนไซม์ที่มีหมู่ซัลไฟดริล (sulfhydryl enzymes) ส่งผลให้การเผาผลาญของเซลล์ถูกรบกวน นอกจากนี้ arsenate ยังสามารถยับยั้งกระบวนการ oxidation และ phosphorylation ได้

อาการทางคลินิก

อาการของการเป็นพิษจากสารหนูอนินทรีย์มักเกิดขึ้นแบบเฉียบพลัน โดยมีผลกระทบหลักต่อระบบทางเดินอาหารและระบบหัวใจและหลอดเลือด สารหนูอนินทรีย์มีผลโดยตรงต่อเส้นเลือดฝอย ทำให้เกิดความเสียหายต่อความสมบูรณ์ของเส้นเลือด ทำให้พลาสมาไหลซึมออกจากหลอดเลือด สูญเสียเลือด และเกิดภาวะช็อก อาการที่พบบ่อยได้แก่ ท้องเสียรุนแรง อุจจาระเป็นน้ำปนเลือด อาการปวดท้องรุนแรง อ่อนเพลีย อัตราการเต้นของหัวใจช้าลง และภาวะหัวใจล้มเหลว อาการเหล่านี้มักปรากฏภายในไม่กี่ชั่วโมง (สูงสุด 24 ชั่วโมง) และอาจดำเนินไปเป็นเวลาหลายวันถึงหลายสัปดาห์ ขึ้นอยู่กับปริมาณสารหนูที่ได้รับ ในกรณีที่ได้รับสารหนูอนินทรีย์ในปริมาณสูงมาก อาจพบสัตว์ตายกะทันหันโดยไม่มีอาการแสดง

ความเป็นพิษ

ขนาดที่ทำให้เกิดพิษถึงชีวิตโดยการกิน sodium arsenite ในสัตว์ส่วนใหญ่มีค่าระหว่าง 1-25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แมวอาจมีความไวต่อสารพิษมากกว่าสัตว์ชนิดอื่น arsenate มีความเป็นพิษน้อยกว่า arsenite ประมาณ 5-10 เท่า ปัจจุบันพบการเป็นพิษจากสารเหล่านี้ได้น้อยลงเนื่องจากมีการลดการใช้สารดังกล่าวในสารเคมีกำจัดแมลงเหยื่อกำจัดมด และสารป้องกันการผุกร่อนของเนื้อไม้ arsenite ยังคงถูกใช้บางส่วนในการกำจัดเห็บ และ Lead arsenate อาจถูกใช้เป็นสารกำจัดพยาธิตัวตืดในแกะ

LD_{50} ของ As_2O_3 เช่น

- LD_{50} Mice (several strains) gavage 26-47 mg/kg
- LD_{50} Rat gavage 15 mg/kg
- LD_{50} Rat oral (in food) 145 mg/kg
- LD_{50} Rat ip 871 mg/kg

LD_{50} ของ As_2O_5 เช่น

- LD_{50} Rat oral 8 mg/kg
- LD_{50} mouse oral 55 mg/kg

สารหนูอินทรีย์ (organic arsenicals)

สารหนูอินทรีย์ ได้แก่ สารหนูอินทรีย์ประเภท aliphatic, aromatic และ phenylarsonic โดยสารหนูอินทรีย์ประเภท phenylarsonic มีความเป็นพิษน้อยกว่าสารหนูอนินทรีย์ประเภท aliphatic และ aromatic

สารหนูอินทรีย์ประเภท aliphatic รวมถึงกรดคาโคดิลิก (cacodylic acid) และกรดอะเซตาร์โซนิก (acetarsonic acid) ซึ่งโดยทั่วไปใช้เป็นสารกระตุ้นในสัตว์ขนาดใหญ่ แต่ปัจจุบันไม่ได้รับความนิยมแล้ว นอกจากนี้ สารหนูอินทรีย์ประเภท aliphatic เช่น monosodium methanearsonate (MSMA) และ disodium methanearsonate (DSMA) ปกติแล้วใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชในฝ้ายและหญ้าตีนนก การตกค้างอยู่ ในดินของ MSMA หรือ DSMA และแนวโน้มในการสะสมในพืช อาจก่อให้เกิดพิษจากสารหนูในสัตว์ที่กินหญ้าได้ อาการทางคลินิก รอยโรค และแนวทางการรักษาของสารหนูอินทรีย์ประเภท aliphatic คล้ายกับสารหนูอนินทรีย์

สารหนูอินทรีย์ประเภท aromatic ได้แก่ trivalent phenylorganicals เช่น thiacetarsamide และ arsphenamine ซึ่งเคยถูกใช้ในการรักษาพยาธิหัวใจในสุนัข และสารประกอบ pentavalent เช่น phenylarsonic acids และเกลือของมัน อย่างไรก็ตาม thiacetarsamide และ arsphenamine ยกเลิกการใช้ไป เนื่องจากมีการนำ melarsomine dihydrochloride มาใช้แทน

สารประกอบ phenylarsonic ใช้เป็นสารเติมแต่งอาหารเพื่อเพิ่มผลผลิตในสุกรและสัตว์ปีก และใช้รักษาโรคบิดในสุกร สารหลักในกลุ่มนี้ ได้แก่ arsanilic acid, roxarsone หรือ 4-hydroxy-3-nitrophenylarsonic acid) และ nitarsone หรือ 4-nitro-phenylarsonic acid

กลไกการออกฤทธิ์

สารหนูอินทรีย์ในรูปแบบ pentavalent ที่ใช้เป็น feed additive ในอาหารสัตว์สามารถก่อให้เกิดภาวะ myelin sheath ถูกทำลาย (demyelination) การเสื่อมสลายของแอกซอน และผลกระทบต่อระบบประสาทส่วนกลางอื่น ๆ ได้ หากได้รับเป็นเวลานานเกินไปหรือได้รับในปริมาณที่มากเกินไป ปัญหาดังกล่าวมักพบในสุกรและสัตว์ปีก โดยสัตว์ปีกมีความไวต่อผลกระทบเหล่านี้น้อยกว่าสุกร พิษของ thiacetarsamide พบได้ในสุนัขประมาณ 10%–15% ของสุนัขที่ได้รับขนาดยารักษาตามปกติ สารนี้เป็นพิษต่อตับและไต melarsomine ก่อให้เกิดผลกระทบที่คล้ายกัน แต่มีรายงานว่ามีความเป็นพิษน้อยกว่า thiacetarsamide

อาวุธเคมีที่เป็นสารหนูอินทรีย์ โดยหลักแล้วทำหน้าที่เป็นสารทำให้เกิดแผลพุพอง (vesicants) และสารพิษต่อระบบทางเดินหายใจ (pulmonary agents) สารบางชนิดถูกพัฒนาขึ้นโดยเฉพาะเพื่อกระตุ้นการอาเจียน (vomiting) เพื่อขัดขวางมาตรการป้องกัน เช่น หน้ากากกันแก๊ส สารกำจัดวัชพืชที่เป็นสารหนูอินทรีย์ มีผลกระทบที่คล้ายกับพิษของสารหนูอนินทรีย์ อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าสารกำจัดวัชพืชที่เป็นสารหนูอินทรีย์ มีความเป็นพิษต่อมนุษย์น้อยกว่าสารหนูอนินทรีย์ ในสัตว์เคี้ยวเอื้องพบว่ามีความไวต่อพิษของสารกลุ่มนี้มากกว่ามนุษย์

อาการทางคลินิก

อาการแรกเริ่มในสุกรคือน้ำหนักลด ตามมาด้วยการสูญเสียการทรงตัว อัมพาตที่ขาหลัง และอาจรุนแรงถึงขั้นอัมพาตทั้งตัว สัตว์ที่ได้รับพิษมักยังคงตื่นตัวและกินอาหารได้ ปัญหาการมองเห็นเป็นลักษณะเฉพาะของพิษที่เกิดจาก arsanilic acid แต่ไม่พบในสารหนูอินทรีย์ประเภทอื่น ๆ ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง ภาวะพิษจาก phenylarsonic มีลักษณะคล้ายกับที่เกิดจากสารหนูอนินทรีย์ โดยทั่วไปจะไม่พบรอยโรคจำเพาะ แต่สามารถพบภาวะ myelin sheath ถูกทำลายและภาวะเสื่อมของ peripheral nerves peripheral nerves, optic tract และ optic nerves ผ่านการตรวจทางพยาธิวิทยา การตรวจพบ phenylarsonic ในอาหารสัตว์ในปริมาณสูงสามารถช่วยยืนยันการวินิจฉัยได้

ภาวะพิษจาก phenylarsonic ในสุกรควรได้รับการแยกแยะจากภาวะพิษจากสารเคมีกำจัดแมลง และโรคพิษสุนัขบ้าเทียม ส่วนในโคควรแยกภาวะพิษที่เกิดจากสารหนูอินทรีย์ออกจากภาวะพิษจากตะกั่ว สารเคมีกำจัดแมลง และโรคติดเชื้อ เช่น โรคโบวายไวรัลไดอะเรีย (Bovine Viral Diarrhea, BVD) ในโค

ความเป็นพิษ

พิษของสารกลุ่มนี้เกิดจากการได้รับสารหนูมากเกินไปจากอาหารสุกรหรือสัตว์ปีกสัตว์ ความรุนแรงและระยะเวลาที่แสดงอาการขึ้นอยู่กับขนาดที่ได้รับ อาการอาจล่าช้าเป็นสัปดาห์หลังจากได้รับสารในปริมาณ 2-3 เท่าของระดับที่แนะนำ (100 ppm) หรืออาจเกิดขึ้นภายในไม่กี่วันหากได้รับในระดับที่สูงกว่า 10 เท่าของระดับที่แนะนำ สัตว์ปีกสามารถทนต่อ arsanilic acid ได้ แต่ roxarsone อาจก่อให้เกิดพิษในไก่งวงได้เมื่อได้รับเพียงสองเท่าของขนาดที่แนะนำ (50 ppm) และมีความเป็นพิษสูงในสุกรมากกว่า phenylarsonic ชนิดอื่น ๆ

LD_{50} ของ cacodylic acid เช่น

- LD_{50} Rat oral 644 mg/kg
- LD_{50} Mouse oral 1200 mg/kg

LD_{50} ของ MSMA เช่น

- LD_{50} Rat oral 700 mg/kg
- LD_{50} Rabbit oral 102 mg/kg
- LD_{50} Mouse oral 1800 mg/kg

LD_{50} ของ DSMA เช่น

- LD_{50} Rat oral 821 mg/kg
- LD_{50} Mouse oral 1150 mg/kg

LD_{50} ของ arsanilic acid เช่น

- LD_{50} Rat oral >1 gm/kg

LD_{50} ของ roxarsone เช่น

- LD_{50} Rat oral 81 mg/kg
- LD_{50} Mouse oral 244 mg/kg
- LD_{50} Dog oral 50 mg/kg
- LD_{50} Chicken oral 110 mg/kg

9.3 ปรอท (Mercury; Hg)

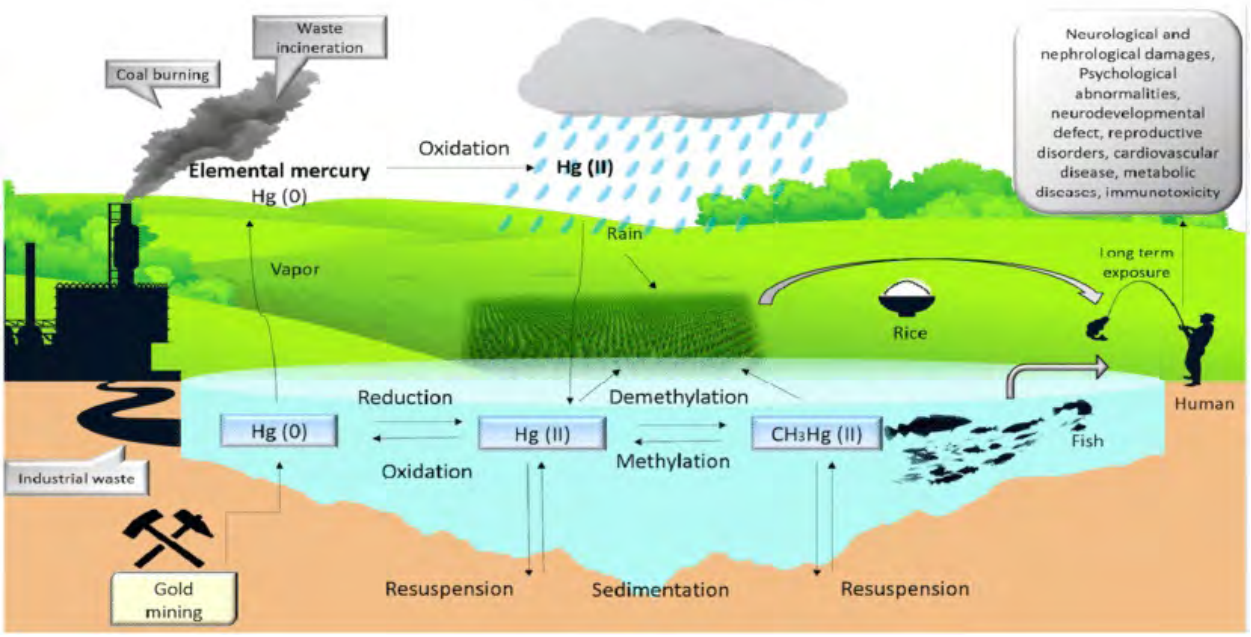
ปรอท มีน้ำหนักโมเลกุล 200.59 g/mol ในธรรมชาติอาจพบได้ทั้งชนิดปรอทอนินทรีย์ (Inorganic mercury) และปรอทอินทรีย์ (Organic mercury)

ปรอทอนินทรีย์ ได้แก่ Elementary mercury เกลือของ Mercuric chloride ($HgCl_2$) และ Mercurous chloride (Hg_2Cl_2; calomel) ปรอทอนินทรีย์สามารถพบได้ในเทอร์โมมิเตอร์รุ่นเก่า บารอมิเตอร์ แบตเตอรี่ หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์บางชนิด และอุปกรณ์ตรวจวัดแรงดันบางประเภท เกลือของปรอทอนินทรีย์อาจถูกใช้เป็นวัตถุกันเสียหรือ fixatives เช่น สีลาเท็กซ์ เครื่องสำอางบางชนิดที่ทำให้ผิวขาว และน้ำยาฆ่าเชื้อรุ่นเก่า (เช่น mercurochrome) รวมถึงสารเคมีกำจัดแมลง ปรอทอนินทรีย์สามารถถูกเปลี่ยนให้เป็น methyl mercury (CH_3Hg) ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน

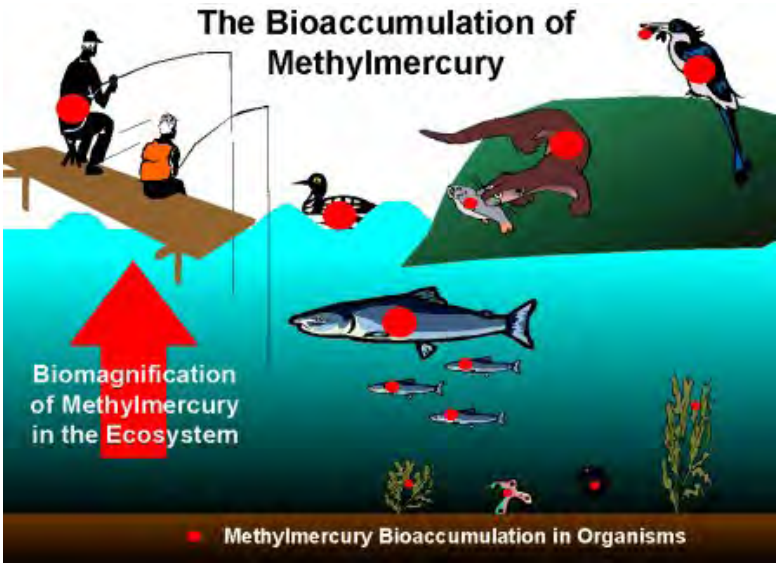
ปรอทอินทรีย์ เช่น alkyl mercury, methyl mercury และ ethyl mercury อาจใช้เป็นยาฆ่าเชื้อรา ส่วน aryl mercury อาจพบในสียับยั้งเชื้อราในผนัง อาหารที่มีปลากินเนื้อ (carnivorous fish) ในปริมาณสูงอาจนำไปสู่การได้รับ methyl mercury มากเกินไป มีรายงานพิษ methyl mercury ในสัตว์ที่ได้รับเมล็ดธัญพืชซึ่งถูกเตรียมไว้สำหรับเพาะปลูก แต่กลับถูกใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยเมล็ดเหล่านั้นถูกเคลือบด้วยสารฆ่าเชื้อราชนิด methyl mercury

การได้รับปรอทผ่านการปนเปื้อนที่พบอยู่ในอาหารและสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นผลมาจากกิจกรรมเหมืองแร่ อุตสาหกรรม เครื่องไฟฟ้า การผลิตเยื่อกระดาษ และการผลิตคลอรีนและด่าง ยังคงเป็นประเด็น ปัญหาทั้งในทางสัตวแพทย์และทางการแพทย์ ในธรรมชาติจุลชีพที่อยู่ในตะกอนดินก้นแม่น้ำหรือใต้ทะเลจะทำหน้าที่เปลี่ยน ปรอทอนินทรีย์ให้อยู่ในรูปของ Organic alkyl forms เช่น methyl mercury และ ethyl mercury ซึ่ง methyl mercury จัดเป็นปรอทที่มีความเป็นพิษมากที่สุด เมื่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำได้รับ methyl mercury เข้าไปจะเกิดการสะสมทาง

ชีวภาพ (Bioaccumulation) โดยสะสมในร่างกายของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ (individual organisms) ในขณะเดียวกันปรอทอินทรีย์ก็สามารถสลายตัวเป็นปรอทอนินทรีย์ได้อย่างช้าๆ เกิดเป็นวงจร “Mercury Cycle” (รูปที่ 9-1) ยิ่งไปกว่านั้นการส่งผ่านของปรอทจากสิ่งแวดล้อมเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารยังเกิดขึ้นในลักษณะของ Biomagnification ซึ่งเป็นกระบวนการที่ความเข้มข้นของปรอทเพิ่มสูงขึ้นเมื่อปรอทนั้นถูกส่งผ่านจากระดับ trophic หนึ่งไปยังอีกระดับหนึ่งในห่วงโซ่อาหาร โดยสัตว์ที่อยู่ในระดับบนของห่วงโซ่อาหารจะมีการสะสมของสารพิษมากกว่าสัตว์ที่อยู่ในระดับล่าง เช่น สาหร่ายดูดซึมสาร CH_3Hg ⟶ ปลาตัวเล็กกินสาหร่าย ⟶ ปลาขนาดกลางกินปลาตัวเล็ก ⟶ ปลาขนาดใหญ่หรือสัตว์นักล่ากินปลาขนาดกลาง ⟶ ความเข้มข้นของ CH_3Hg สูงที่สุดในสัตว์นักล่า จะเห็นว่ามนุษย์เป็นผู้บริโภคขั้นสุดท้ายจะมีความเสี่ยงต่อการได้รับปรอทปริมาณสูงที่สุด (รูปที่ 9-2)



รูปที่ 9-1 Mercury Cycle
ที่มา: Busairi & Syahir (2018)



รูปที่ 9-2 Biomagnification ของ Methyl mercury ในระบบนิเวศน์
ที่มา: https://joshgitalis.com/wp-content/uploads/2012/08/i-f-bom-e.jpg

กลไกการออกฤทธิ์

สารประกอบเกลือปรอทอนินทรีย์ (Inorganic mercurial salts) ก่อให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อโดยตรง รวมถึงการทำลายท่อไต ทำให้เกิดการตายของเซลล์ (renal tubular necrosis) โดยปรอทไอออนจะจับกับกลุ่มซัลเฟอร์แบบโควาเลนต์ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่มีหมู่ sulfhydryl ซึ่งอยู่ในไมโครโซม และไมโตคอนเดรีย นอกจากนี้เกลือของปรอทยังสามารถจับกับโปรตีนในรูปของ mercaptide ได้อีกด้วย

สำหรับสารปรอทอินทรีย์ในกลุ่ม alkyl mercury จะรบกวนกิจกรรมของกระบวนการเผาผลาญ และยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็น ส่งผลให้เกิดการเสื่อมสภาพและตายของเซลล์ โดยเป้าหมายของสารเหล่านี้คือสมอง

methyl mercury สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในสมองได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยมีลักษณะการยับยั้งแบบย้อนกลับได้ในเซลล์ประสาทของ cerebrum และ Purkinje cells ขณะที่ใน granule cell ของ cerebellum การยับยั้งเป็นแบบไม่สามารถย้อนกลับได้ ผลกระทบนี้มักเกิดขึ้นก่อนที่อาการทางคลินิกจะปรากฏการออกฤทธิ์แบบจำเพาะเจาะจงต่อสมองดังกล่าว อาจเนื่องมาจากข้อเท็จจริงที่ว่าเซลล์ประสาทบางชนิดมีความไว เนื่องจากไม่สามารถซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดขึ้นจาก methyl mercury ได้

อาการทางคลินิก

การได้รับสารปรอทในรูป elemental mercury ในขนาดที่เป็นพิษ สามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อไต ส่วนการได้รับเกลือปรอทในขนาดที่เป็นพิษจะทำให้เกิดอาการทางคลินิก เช่น เยื่อบุช่องปากอักเสบ (stomatitis) คออักเสบ อาเจียน ท้องเสีย ภาวะขาดน้ำ และช็อก ซึ่งอาจทำให้ตายภายในไม่กี่ชั่วโมงหลังได้รับสาร หากสัตว์รอดจากภาวะพิษเฉียบพลัน อาจพบภาวะปัสสาวะน้อย (oliguria) และภาวะไนโตรเจนในเลือดสูง (azotemia) ตามมา

ในกรณีของภาวะพิษจาก alkyl mercury อาการจะพัฒนาอย่างช้าๆ ภายในระยะเวลา 7 ถึง 21 วัน อาการเริ่มต้น ได้แก่ ผิวหนังแดง เยื่อบุตาอักเสบ น้ำตาไหล และเยื่อบุช่องปากอักเสบ อาการระยะกลางประกอบด้วย ซึมเดินเซ การเคลื่อนไหวผิดปกติ อัมพาตบางส่วน และตาบอด ต่อมาจะมีการเกิดผื่นผิวหนัง ฝีพุพอง และแผลที่เยื่อบุผิวหนังเพิ่มมากขึ้น ภาวะโลหิตจางสามารถเกิดขึ้นได้จากการมีเลือดในปัสสาวะ (hematuria) และอุจจาระดำ (melena) อาการระยะสุดท้ายของการเป็นพิษ ได้แก่ ความบกพร่องด้านการรับรู้ตำแหน่งและการเคลื่อนไหวของร่างกาย วางท่าทางผิดปกติ (abnormal posture) การสูญเสียการมองเห็นอย่างสมบูรณ์ เบื่ออาหาร อัมพาต การหายใจช้าลง หมดสติ และตาย โดยอัตราการตายของสัตว์ที่ได้รับพิษนี้อยู่ในระดับสูง

ในปศุสัตว์อาการทางคลินิกของการเป็นพิษจากปรอทมีความแตกต่างกันไป ตัวอย่างเช่น ในโค อาการพิษประกอบด้วย เดินโซเซ การเคลื่อนไหวผิดปกติ ไตวาย ชัก และตาย โดยเฉลี่ยเวลาตั้งแต่กินจนถึงตายประมาณ 20 วัน การกิน phenylmercuric acetate อาจทำให้ตายฉับพลัน โดยมีเลือดออกภายในอย่างรุนแรง โดยไม่แสดงอาการพิษอื่น ๆ มาก่อน โดยในม้า การได้รับพิษแบบเฉียบพลันจะเกิดการอักเสบรุนแรงของระบบทางเดินอาหารและไต ส่วนในกรณีเรื้อรัง อาการอาจรวมถึงความผิดปกติทางระบบประสาทและอุ้งเท้าอักเสบ (laminitis) ในแกะ ภาวะพิษมีลักษณะเด่นคืออาการทางระบบประสาทรุนแรง และอัมพาตทั้งสี่ขา (tetraplegia) ในสุกร อาการที่พบได้แก่ เดินโซเซ การเคลื่อนไหวผิดปกติ ขาอ่อนแรง นอนนิ่ง และตาย

ความเป็นพิษ

ความเป็นพิษของปรอทจะแตกต่างกันไปตามรูปแบบทางเคมีของปรอท ชนิดสัตว์ ปริมาณ ระยะเวลาและหนทางที่ได้รับ ปรอทในทุกรูปแบบได้รับการยืนยันว่ามีความเป็นพิษต่อทั้งมนุษย์และสัตว์ .แม้ว่าผลกระทบที่เกิดจากพิษปรอทในรูปแบบต่าง ๆ ของปรอทจะมีลักษณะคล้ายคลึงกันหลายอย่าง แต่ก็มีความแตกต่างกันอยู่ด้วย พบว่าปรอท

ในรูปแบบอินทรีย์ (organic mercury) มีความเป็นพิษสูงกว่าและมักพบการเกิดภาวะพิษจากการกินเข้าไปโดยตรง อวัยวะเป้าหมายหลักของพิษจากปรอทอนินทรีย์คือ ไต และปรอทอินทรีย์ คือ ระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) โดยการได้รับ methyl mercury เรื้อรังสามารถก่อให้เกิดพิษได้ในขนาดตั้งแต่ 0.2 ถึง 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ไตเป็นอวัยวะที่มีการสะสมของปรอทสูงที่สุดหลังจากได้รับสารประกอบเกลือปรอทอนินทรีย์หรือการสัมผัสไอปรอท (เช่น จากเทอร์โมมิเตอร์) ส่วนสารปรอทอินทรีย์มีแนวโน้มสูงที่จะสะสมในสมอง

LD_{50} ของ methyl mercury

- LD_{50} Rat oral 58 mg/kg

LD_{50} ของ phenylmercuric acetate

- LD_{50} Rat oral 41 mg/kg
- LD_{50} Mouse oral 13.25 mg/kg

LD_{50} ของ Mercuric chloride

- LD_{50} Rat oral 1 mg/kg
- LD_{50} Mouse oral 6 mg/kg
- LD_{50} Quail oral 36 mg/kg

9.4 การตรวจวิเคราะห์หาสารประกอบฟอสไฟด์ และโลหะพิษ (Arsenic, Mercury, Antimony และ Bismuth) ด้วย Gutzeit test and Reinsch test

9.4.1 Gutzeit test

หลักการตรวจวิเคราะห์ เป็นการไฮโดรไลส์โลหะหนักด้วยกรด โดยมี Zn เป็น catalyst ทำปฏิกิริยากับ Silver nitrate ($AgNO_3$) กลายเป็นสารประกอบสีดำหรือสีน้ำตาลดำ

ตัวอย่างที่ใช้ : อาหารในกระเพาะ อาหารสัตว์ พืชอาหารสัตว์ ดิน น้ำ และวัตถุอื่นที่สงสัย

สารเคมีและการเตรียม

- สารละลายมาตรฐาน As 1,000 µg/ml (stock standard solution) : ชั่ง Arsenic trioxide ประมาณ 0.0132 g ลงใน beaker ขนาด 50 ml ละลายด้วย 10% NaOH 10 ml เติมสารละลาย phenolphthalein 1 หยด สารละลายจะเป็นสีม่วงชมพู แล้ว neutralized ด้วย 10% H_2SO_4 จนจุด end point เกิดเป็นสารละลายใส รินลงขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย 0.1% H_2SO_4 จนครบ 100 ml ผสมให้เข้ากัน
- สารละลายมาตรฐาน As 100 µg/ml : ปิเปต stock As 1,000 µg/ml มา 10 ml ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย 0.1% H_2SO_4 จนครบ 100 ml ผสมให้เข้ากัน
- สารละลายมาตรฐาน working As 10 µg/ml : ปิเปตสารละลายมาตรฐาน As 1,00 µg/ml มา 1 ml ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 ml ผสมให้เข้ากัน
- สารละลายมาตรฐาน Zinc phosphide 100 µg/ml : ชั่ง Zinc phosphide ประมาณ 0.0100 g ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ (เขย่าก่อนใช้)
- สารละลาย 6 N Hydrochloric acid : เตรียมน้ำกลั่นประมาณ 500 ml ใน beaker ขนาด 1000 ml แล้วค่อย ๆ เติม HCl เข้มข้น 500 ml ลงไปพร้อมกวนเบา ๆ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml
- สารละลาย 10% (w/v) Copper sulphate : ชั่ง copper sulphate 10 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml

- Activated Zinc : นำสังกะสีชนิดเป็นเม็ด (granule) ตามจำนวนที่ต้องการใส่ 10% Copper sulphate จนท่วม ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที เทของเหลวทิ้ง นำไปอบให้แห้ง แล้วเก็บใส่ขวด
- สารละลาย 10% (w/v) lead acetate : ชั่ง lead acetate 10 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml
- สารละลาย 10 % (w/v) Silver nitrate : ชั่ง Silver nitrate 10 g ละลายใน methanol 100 ml
- สารละลาย Ammonium molybdate : ชั่ง Ammonium molybdate 5 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml เติมกรดไนตริกเข้มข้น 35 ml เก็บใส่ขวดปิดฝาให้สนิท
- สารละลาย Benzidine : ละลาย Benzidine 0.5 g ใน Glacial acetic acid 10 ml แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น
- ให้ครบ 100 มิลลิลิตร
- แก๊สคลอรีน [Cl_2(g)] ชั่ง potassium permanganate ($KMnO_4$) 1 g ลงใน beaker ขนาด 100 ml เติมกรด concentrated hydrochloric (conc. HCl acid) 10 ml

วิธีวิเคราะห์

1. ตัวอย่าง 1 g หรือ 1 ml (ถ้าเป็นผงแห้งให้เติมน้ำกลั่นลงไป 1 ml) ใส่ลงในหลอดทดสอบ
2. เติม activated zinc ประมาณ 1 g
3. เติม 6 N Hydrochloric acid 1-2 ml
4. นำสำลีที่ผ่านการชุบ 10% Lead acetate มาชุบน้ำ กลั่นพอหมาด ๆ แผ่เป็นแผ่นบาง อุดในหลอดทดสอบ ต่ำกว่าปากหลอดทดสอบประมาณ 1 เซนติเมตร เพื่อดักจับ sulphur
5. นำกระดาษกรองที่หยดด้วยสารละลายอิ่มตัว silver nitrate ใน methanol มาปิดปากหลอดทดสอบ ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที

ผลบวก : เกิดสีน้ำตาล หรือ สีดำ บนกระดาษกรองตรงบริเวณที่หยดสารละลายอิ่มตัว Silver nitrate ในmethanol แสดงว่าอาจมีโลหะ Arsenic, Antimony หรือมี Sulphide หรือ Phosphide อยู่ในตัวอย่าง (รูปที่ 9-3)

Confirmation of Gutzeit test (Molybdenum blue test)

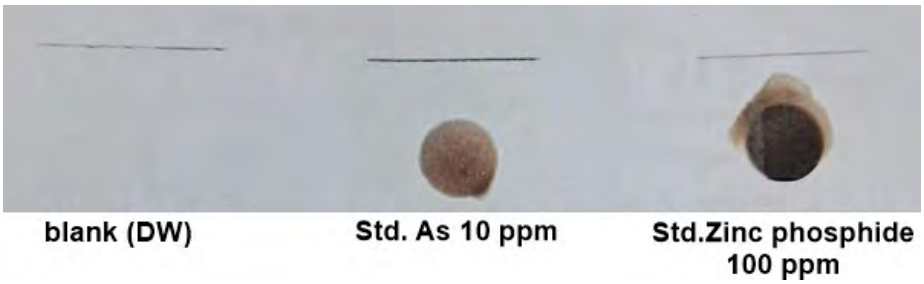
การแยก Arsenic, Antimony, Sulphide และ Phosphide โดยใช้วิธีการตรวจยืนยัน ด้วยวิธี Molybdenum blue test โดยนำกระดาษกรองที่ให้ผล positive คือเกิดสีน้ำตาลหรือสีดำจากการทำ Gutzeit test มาแยกวิเคราะห์หาโลหะแต่ละชนิดที่สงสัย ดังนี้

Molybdenum blue test

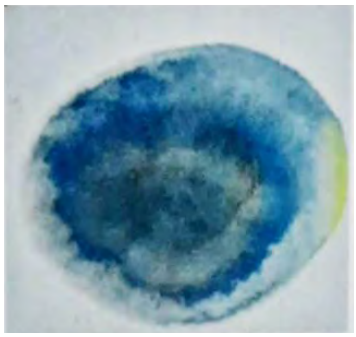
1. นำกระดาษกรองที่เกิดสีดำไปฟอกด้วย Chlorine gas (เตรียมโดยใช้ปฏิกิริยาของ conc. Hydrochloric acid กับ Potassium permanganate) จนหมดสีดำ เป่าไล่ Chlorine ออกให้หมดด้วย blower
2. วางกระดาษกรองลงบนกระจกนาฬิกา แล้วหยดสารละลายของ Ammonium molybdate 1 หยด ทิ้งไว้สักครู่ จึงเป่าด้วยลมร้อน นานประมาณ 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วหยดสารละลายของ Benzidine ลงไป 1 หยด นำกระดาษกรองนี้ไปอังไอ ammonia แล้วดูผลที่เกิดขึ้น

ผลบวก : เกิดสีน้ำเงินบนกระดาษกรองบริเวณที่เคยติดสีดำจาก Gutzeit test (รูปที่ 9-4) แสดงว่ามี Phosphide หรือ Arsenic อยู่ในตัวอย่าง ซึ่งการตรวจแยก Phosphide และ Arsenic นั้น ใช้วิธีดูผลจากการทำ Reinsch's test มาประกอบการพิจารณา กล่าวคือ ถ้าเป็น Arsenic จะให้ผลบวกกับ Reinsch's test (รูปที่ 9-5) แต่ถ้าเป็น Phosphide ให้ผลลบ กับ Reinsch test ดังตารางที่ 9-1

สำหรับโลหะ Antimony กับ Sulphide จะไม่ให้ spot สีน้ำเงินในการทำ Molybdenum blue test ถือว่าเป็น Negative



รูปที่ 9-3 แสดงผลบวกของสารมาตรฐาน As และ Zinc phosphide จากการตรวจวิเคราะห์หาสารกำจัดหนู โดย Gutzeit test



รูปที่ 9-4 สีน้ำเงินบนกระดาษกรอง
จากการทำ Molybdenum blue test

9.4.2 Reinsch test

หลักการตรวจวิเคราะห์ เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างแผ่นทองแดงกับโลหะหนัก โดยมีกรดเป็น Catalyst ทำให้โลหะหนักมาเกาะอยู่ที่ผิวทองแดง

ตัวอย่างที่ใช้ : อาหารในกระเพาะ อาหารสัตว์ พืชอาหารสัตว์ ดิน น้ำ และวัตถุอื่นที่สงสัย

สารเคมีและการเตรียม

- สารละลายมาตรฐาน As 1,000 µg/ml (stock standard solution) : ชั่ง Arsenic trioxide ประมาณ 0.0132 g ลงใน beaker ขนาด 50 ml ละลายด้วย 10% NaOH 10 ml เติมสารละลาย phenolphthalein 1 หยด สารละลายจะเป็นสีม่วงชมพู แล้ว neutralized ด้วย 10% H_2SO_4 จนจุด end point เกิดเป็นสารละลายใส รินลงขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย 0.1% H_2SO_4 จนครบ 100 ml ผสมให้เข้ากัน
- สารละลายมาตรฐาน As 100 µg/ml : ปิเปต stock As 1,000 µg/ml มา 10 ml ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย 0.1% H_2SO_4 จนครบ 100 ml ผสมให้เข้ากัน
- สารละลายมาตรฐาน working As 5 µg/ml : ปิเปตสารละลายมาตรฐาน As 1,00 µg/ml มา 0.5 ml ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 ml ผสมให้เข้ากัน
- Nitric acid : น้ำกลั่น (1:1) โดยตวง nitric acid 50 ml เติมลงในน้ำกลั่น 50 ml

วิธีวิเคราะห์

1. ตัวอย่าง 5-10 g หรือ ml (ถ้าเป็นผงแห้งให้เติมน้ำกลั่นลงไป 10 ml) ใส่ใน beaker ขนาด 50 ml
2. ใส่แผ่นทองแดง ขนาดประมาณ 3x3 mm 1-2 ชิ้น โดยแผ่นทองแดงที่ใช้ต้องผ่านการล้างด้วย Nitric acid : น้ำกลั่น (1:1) จนแผ่นทองแดงสะอาด แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดกรด ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง
3. เติมกรด Hydrochloric เข้มข้น ประมาณ 3 ml

4. นำไปตั้งบน Water bath หรือตั้ง Hot plate โดยใช้ไฟอ่อนประมาณ 10 นาที

ผลบวก : ถ้ามีคราบสีดำติดบนแผ่นทองแดง แสดงว่าอาจมีโลหะ Arsenic, Antimony และ Bismuth อยู่ในตัวอย่าง (รูปที่ 9-5) แต่ถ้าบนแผ่นทองแดงมีสีเงินวาว แสดงว่าอาจมีโลหะ Hg อยู่ในตัวอย่าง จากนั้นให้นำแผ่นทองแดงที่ให้ผลบวกนี้ไปทำการตรวจยืนยันด้วยวิธี Sublimation test ต่อไป ดังตารางที่ 9-1

Confirmation of Reinsch test (Sublimation test)

หลักการตรวจวิเคราะห์ เป็นการใช้ความร้อนเผาให้โลหะที่ติดอยู่บนผิวของแผ่นทองแดงระเหิดออกมา แล้วใช้ความเย็นควบแน่นไอของโลหะให้เป็นผลึกจับอยู่ที่ผิวภายในหลอดแก้ว

Sublimation test

1. นำแผ่นทองแดงที่ได้จากการอ่านผลบวก ใส่ลงในหลอดระเหิด 1-2 แผ่น
2. ใช้สำลีชุบน้ำหมาด ๆ พันรอบ ๆ หลอดระเหิด เหนือกระเปาะที่บรรจุแผ่นทองแดงเล็กน้อย
3. นำหลอดระเหิดไปเผาไฟด้วยตะเกียง Bunsen เพื่อทำให้โลหะ As และ Hg ระเหิดไปเกาะอยู่ในบริเวณกระเปาะของหลอด (รูปที่ 9-6)
4. เมื่อหลอดระเหิดเย็นแล้ว เอาสำลีออก นำหลอดไปส่องดูผลึกของโลหะด้วยกล้องจุลทรรศน์

การแปลผล : ถ้าผลึกที่เห็นเป็นรูปแปดเหลี่ยม แสดงว่ามีสารหนู (As) อยู่ในตัวอย่าง
ถ้าผลึกที่เห็นเป็นรูปทรงกลม แสดงว่ามีปรอท (Hg) อยู่ในตัวอย่าง
สำหรับพลวง (Sb) และ บิสมัท (Bi) จะไม่ระเหิด

หมายเหตุ : วิธีตรวจวิเคราะห์ Gutzeit test และ Reinsch test ต้องทำคู่กันเสมอ หากให้ผล Negative แสดงว่าตรวจไม่พบ Arsenic, Antimony, Mercury, Bismuth และ สารประกอบ phosphide แต่ถ้าให้ผล Positive ในวิธีทดสอบใดวิธีหนึ่ง ต้องทำการวิเคราะห์ด้วย Molybdenum blue test หรือ Sublimation test ต่อไป จากการทดสอบแต่ละวิธีสามารถเปรียบเทียบผลได้ ตามตารางที่ 9-1

รูปที่ 9-5 ผลบวกของสารมาตรฐาน As จากการตรวจวิเคราะห์โดย Reinsch test

รูปที่ 9-6 Sublimation test

ตารางที่ 9-1 ตารางเปรียบเทียบผลการทดสอบของวิธีหาสารประกอบฟอสไฟด์ และโลหะพิษ

ชนิดสาร	วิธีการทดสอบ			
	Gutzeit test	Molybdenum blue test	Reinsch test	Sublimation test
Phosphide	positive	positive	negative	-
Arsenic (As)	positive	positive	positive (สีดำ)	ผลึกรูปแปดเหลี่ยม
Antimony (Sb)	positive	negative	positive (สีดำ)	-
Bismuth (Bi)	negative	negative	positive (สีดำ)	-
Mercury (Hg)	negative	negative	positive (สีเทา หรือ เงินวาว)	ผลึกรูปทรงกลม

บทที่ 10

สารพิษระเหยได้ (Volatile poisons)

สารพิษระเหยได้ (Volatile poisons) คือสารพิษที่มีคุณสมบัติระเหยเป็นไอได้ง่ายที่อุณหภูมิห้องหรือใกล้เคียง ทำให้สามารถเข้าสู่ร่างกายสัตว์ได้อย่างรวดเร็วผ่านการหายใจ การซึมผ่านผิวหนัง และบางครั้งทางระบบทางเดินอาหาร ความสำคัญของสารพิษกลุ่มนี้ในพิษวิทยาสัตวแพทย์อยู่ที่การก่อพิษเฉียบพลัน รวดเร็ว และอาจรุนแรงถึงชีวิต โดยแหล่งที่มามีทั้งจากสิ่งแวดล้อม อุตสาหกรรม เกษตรกรรม และการใช้สารเคมีในห้องปฏิบัติการ

สารพิษระเหยสามารถจัดแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่

1. **แอลกอฮอล์ (Alcohols)** เช่น เมทานอล (methanol), เอทานอล (ethanol), ไอโซโพรพานอล (isopropanol) ใช้ในเชื้อเพลิง การแพทย์ และอุตสาหกรรม
2. **คีโตนและเอสเทอร์ (Ketones and esters)** เช่น อะซีโตน (acetone), เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมเป็นตัวทำละลาย
3. **สารทำละลายอินทรีย์ (Organic solvents)** เช่น เบนซีน (benzene), โทลูอีน (toluene), ไซลีน (xylene) ที่ใช้ในน้ำมันเชื้อเพลิงและอุตสาหกรรมเคมี ซึ่งมีความเสี่ยงต่อระบบประสาทและตับ
4. **แก๊สพิษ (Toxic gases)** เช่น คาร์บอนมอนอกไซด์ (CO), ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S), ฟอสจีน (phosgene) และไนโตรเจนออกไซด์ ซึ่งเกิดจากการเผาไหม้หรือกระบวนการอุตสาหกรรม
5. **สารระเหยทางเกษตรกรรม (Agricultural volatile compounds)** เช่น fumigants ได้แก่ เมทิลโบรไมด์ (methyl bromide), คลอโรพิครีน (chloropicrin) ใช้ในการควบคุมแมลงและศัตรูพืช
6. **ไซยาไนด์ (Cyanide)** โดยเฉพาะในรูปของไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogen cyanide, HCN) ระเหยได้ง่าย พบได้จากอุตสาหกรรมเคมี การเผาไหม้สารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจน และในพืชที่มีไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์ เช่น มันสำปะหลัง และหญ้าบางชนิด เป็นต้น

กลไกการออกฤทธิ์ อาการเกิดพิษ และความเป็นพิษในสัตว์ กลไกการเกิดพิษของสารระเหยแตกต่างกันไปตามชนิด แต่โดยรวมมีลักษณะสำคัญดังนี้

- **แอลกอฮอล์และสารทำละลายอินทรีย์** ทำให้เกิดการกดประสาทส่วนกลาง (CNS depression) โดยมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์และตัวรับ GABA ทำให้สัตว์มีอาการซึม มึนงง เดินโซเซ และหมดสติ
- **เมทานอล** มีอันตรายจากการเมแทบอลิซึมเป็นฟอร์มาลดีไฮด์และกรดฟอร์มิก ซึ่งมีผลต่อระบบประสาทและดวงตา
- **แก๊สพิษ**

o คาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) จับกับฮีโมโกลบินแทนออกซิเจน ทำให้เกิด tissue hypoxia อาการเด่นคือเลือดและเยื่อเมือกมีสีแดงสด

o ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ระคายเคืองรุนแรงต่อทางเดินหายใจและยับยั้งเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดสทำให้เสียชีวิตเฉียบพลัน

o ฟอสจีน (phosgene) ทำลายถุงลมปอดและก่อให้เกิด pulmonary edema

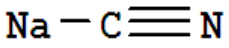
ในส่วนของไซยาไนด์ซึ่งมีพิษรุนแรงมากทั้งในสัตว์และสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ และเคยเกิดเหตุการณ์สัตว์ได้รับพิษและตายจากการกินพืชที่มีไซยาไนด์เข้าไป ดังนั้นจะขอกล่าวในรายละเอียดและวิธีการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ดังต่อไปนี้

10.1 ไซยาไนด์ (cyanide)

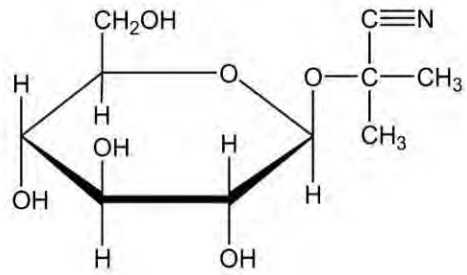
ไซยาไนด์ (cyanide) หมายถึงสารประกอบใด ๆ ที่มีไซยาไนด์ไอออน (CN^-) อยู่ โดยโมเลกุลจะมีคาร์บอน (C) 1 อะตอม ยึดติดกันกับไนโตรเจน (N) 1 อะตอม ไว้ด้วยพันธะสาม ($C\equiv N$) เป็นสารพิษที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ออกฤทธิ์ได้รวดเร็วและร้ายแรงมาก โดยไซยาไนด์ที่มนุษย์สังเคราะห์ขึ้นนั้นมีทั้งที่อยู่ในสถานะแก๊สคือ ไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogen cyanide; HCN) และสถานะของแข็ง ได้แก่ โซเดียมไซยาไนด์ (sodium cyanide; NaCN) (รูปที่ 10-1) และโพแทสเซียมไซยาไนด์ (potassium cyanide; KCN) ซึ่งไซยาไนด์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นนี้สามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ มากมาย ได้แก่ การผลิตสแตนเลส การถลุงเงินหรือทอง การผลิตยาฆ่าแมลง ยาฆ่าหนู เป็นต้น ส่วนไซยาไนด์ในพืชอย่างน้อย 2,650 ชนิด พบอยู่ในรูปของไซยาโนเจนิกไกลโคไซด์ (Cyanogenic glycoside) ชนิดต่าง ๆ มากกว่า 75 ชนิด จากพืช 130 วงศ์ รวมถึงวงศ์ Euphorbiaceae, Rosaceae, Asteraceae, Passifloraceae, Fabaceae และ Poaceae พืชที่มีไซยาโนเจนิกไกลโคไซด์ เช่น มันสำปะหลัง ข้าวฟ่าง หญ้าปล้อง หน่อไม้ ถั่วไลมา อัลมอนด์ และยางพารา ฯลฯ โดยไซยาโนเจนิกไกลโคไซด์ที่พบในยางพาราเป็นชนิด linamarin (รูปที่ 10-2)

กลไกการออกฤทธิ์

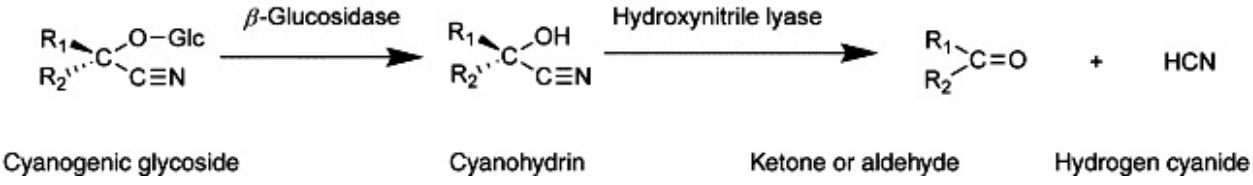
ปศุสัตว์เกิดภาวะพิษจากไซยาไนด์จากการกินพืชที่มีไซยาโนเจนิกไกลโคไซด์เข้าไป ซึ่งไกลโคไซด์นี้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) จากกระบวนการ Hydrolysis โดยเอนไซม์ beta-glucosidase (linamarase) และ hydroxynitrile lyases ของพืชเอง (รูปที่ 10-3) หรือเกิดจากการที่โครงสร้างของเซลล์พืชเสียหายหรือถูกทำลายจากการแช่แข็ง การสับ การฟัน หรือจากการบดเคี้ยว รวมถึงการย่อยสลายพืชที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วหรือกระเพาะรูเมน (rumen) ก็ทำให้เกิด HCN ได้ ซึ่ง HCN ถูกดูดซึมได้อย่างรวดเร็วเข้าสู่เยื่อเมือกและเยื่อหุ้มเซลล์ (เนื้อเยื่อของอวัยวะเป้าหมายคือ ตับ สมอง ม้าม เลือด ไต และปอด) HCN นั้นมีพิษสูงต่อสิ่งมีชีวิต สามารถยับยั้งกระบวนการหายใจระดับเซลล์ได้



รูปที่ 10-1 สูตรโครงสร้างของโซเดียมไซยาไนด์



รูปที่ 10-2 สูตรโครงสร้างของ linamarin
ที่มา: https://www.researchgate.net/figure/Molecular-formula-of-linamarin_fig1_225306197



รูปที่ 10-3 การเปลี่ยนแปลงของไซยาโนเจนิกไกลโคไซด์จนเกิดไฮโดรเจนไซยาไนด์
ที่มา: Yamane *et al.* (2010)

สัตว์เคี้ยวเอื้อง (โค กระบือ) มีความไวต่อความเป็นพิษของ HCN ได้มากกว่าสัตว์กระเพาะเดี่ยว (ม้า สุกร) เพราะว่าในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องมี pH ค่อนข้างเป็นกลาง ซึ่งจะช่วยส่งเสริมให้เอนไซม์ beta-glucosidase (linamarase) และ hydroxynitrile ทำงานย่อยสลายไซยาโนเจนิกไกลโคไซด์แล้วเกิดเป็น HCN ประกอบกับเอนไซม์ของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน สามารถย่อยสลายไซยาโนเจนิกไกลโคไซด์ทำให้เกิด HCN ได้ด้วย ส่วน pH ในกระเพาะของสัตว์กระเพาะเดี่ยว (ม้า สุกร) มีความเป็นกรดมากซึ่งจะไปจำกัดกระบวนการ hydrolysis โดยการทำลายเอนไซม์ beta-glucosidase และ hydroxynitrile lyases ของพืชไปก่อนที่จะเปลี่ยนไซยาโนเจนิกไกลโคไซด์ไปเป็น HCN

อาการทางคลินิก

อาการทางคลินิกของการได้รับพิษไซยาไนด์อาจเป็นแบบเฉียบพลันหรือเรื้องรัง โดยกลไกของการเกิดพิษแบบเฉียบพลันนั้นเมื่อสัตว์ได้รับ HCN ในปริมาณสูง สารพิษนี้จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cytochrome C oxidase บน membrane ของ mitochondria ทำให้เซลล์ไม่สามารถนำออกซิเจนไปใช้ในกระบวนการเผาผลาญพลังงานได้ และทำให้เกิดภาวะ cellular hypoxia โดยเฉพาะอย่างยิ่งกล้ามเนื้อหัวใจและสมองทำให้สัตว์แสดงอาการกระวนกระวาย หายใจขัด ตัวสั่น ล้มลงนอน ชัก และตายในที่สุด เมื่อเจาะเลือดดูหลังจากที่สัตว์ตายใหม่ๆ จะเห็นเลือดเป็นสีแดงสด (cherry red) เนื่องจากเลือดมีออกซิเจนคั่งสูง อาการเกิดพิษจะเกิดภายใน 15-20 นาที จนถึง 2-3 ชั่วโมง หลังจากสัตว์เริ่มได้รับสารพิษ

ความเป็นพิษ

ปริมาณของ HCN ที่ทำให้ที่โค กระบือ และแกะตายได้ ประมาณ 2.0 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ส่วนประกอบของพืชที่มีไซยาโนเจนิกไกลโคไซด์อยู่ 20 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม (200 ppm) สามารถฆ่าให้ปศุสัตว์ตายได้ โดยทำให้เกิดภาวะหายใจไม่ออก ค่าความเข้มข้นของไซยาไนด์ในเลือดที่พบได้ตามปกติในสัตว์ชนิดต่าง ๆ ส่วนใหญ่มักมีค่าต่ำกว่า 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ค่าความเข้มข้นของไซยาไนด์ในเลือดที่ทำให้สัตว์เสียชีวิตอย่างน้อย (minimal lethal concentration) อยู่ที่ประมาณ 3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรหรือต่ำกว่า

ทั้งนี้ความเป็นพิษที่ได้รับจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆอย่าง เช่น ขนาดและชนิดของสัตว์ ปริมาณของไซยาโนเจนิกไกลโคไซด์ที่มีอยู่ในพืช ปริมาณพืชที่สัตว์กินและอัตราการกิน ชนิดของพืชที่มีไซยาโนเจนิกไกลโคไซด์ที่สัตว์กินเข้าไป เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายในพืชและในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ และความสามารถในการกำจัด (Detoxify) ไซยาไนด์ของสัตว์

10.2 การตรวจวิเคราะห์หา cyanide โดยวิธี Color test หรือ Paper strip test

หลักการตรวจวิเคราะห์ HCN ที่ระเหยมาจากตัวอย่าง จะถูกดักจับบนกระดาษกรองที่มีลักษณะเป็นแถบยาว (paper strip) ซึ่งถูกชุบด้วยสารละลาย ferrous sulphate ($FeSO_4$) และสารละลาย sodium hydroxide โดย NaOH ทำให้ HCN แตกตัวเป็น CN^- จากนั้น CN^- จะรวมกับ Fe^{2+} จาก $FeSO_4$ เกิดเป็นคอมเพล็กซ์เฟอร์โรไซยาไนด์(ferrocyanide, $[Fe(CN)_6]^{4-}$) จากนั้น Fe^{3+} (Ferric ion) จากสารละลาย ferric chloride ในกรด HCl ทำปฏิกิริยากับเฟอร์โรไซยาไนด์เกิด complex ion ของเหล็ก จะได้สารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีน้ำเงินเข้ม เรียกว่า Prussian blue (Ferric ferrocyanide, $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$) ดังสมการ

$$HCN + OH^- \longrightarrow CN^- + H_2O$$

$$6CN^- + Fe^{2+} \longrightarrow [Fe(CN_6)]^{4-}$$

$$3[Fe(CN_6)]^{4-} + 4Fe^{3+} \longrightarrow Fe_4[Fe(CN)_6]_3 .XH_2O$$

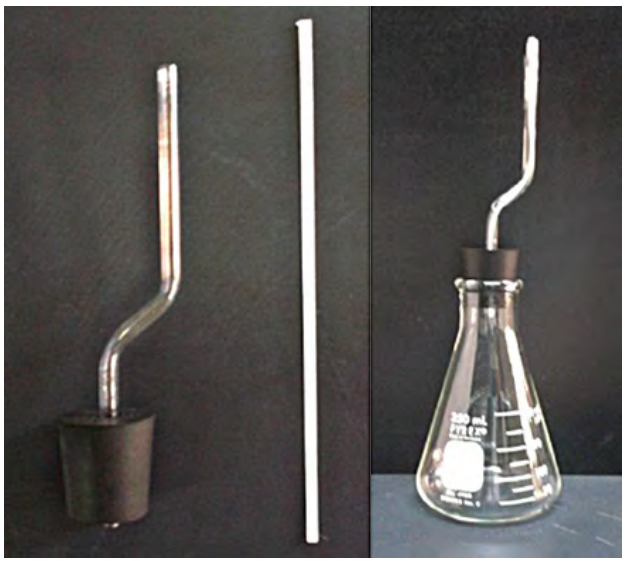
ตัวอย่างที่ใช้ : อาหารในกระเพาะ พืชอาหารสัตว์ อาหารสัตว์สำเร็จรูป ดิน น้ำ และวัตถุอื่นที่พบในที่เกิดเหตุ ทั้งนี้ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่เป็นพืชอาหารสัตว์ เช่น หญ้า ฟาง หรือเปลือกข้าวโพดตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ เป็นต้น

สารเคมีและการเตรียม

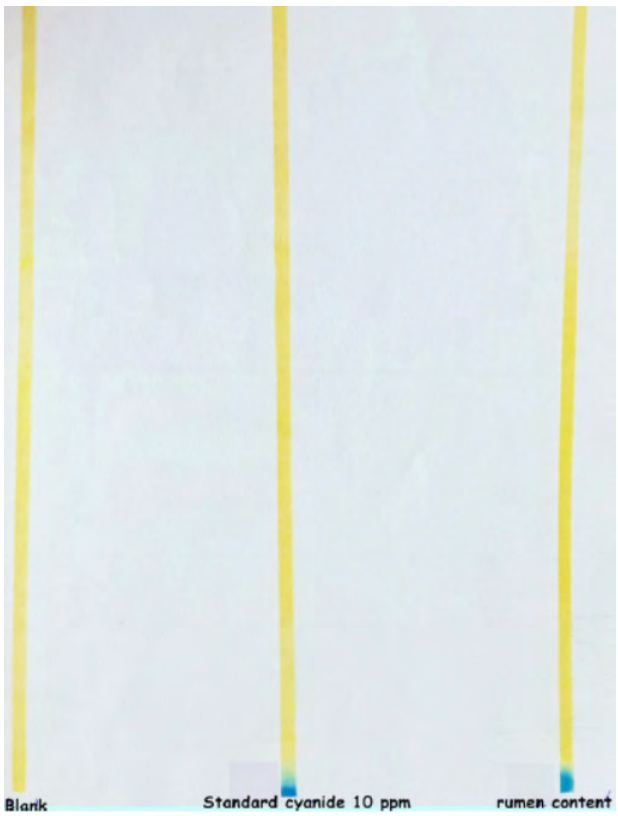
- สารละลาย 10% (v/v) Sulfuric acid : ตวงกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 10 ml ใส่ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 ml ที่มีน้ำกลั่นอยู่ประมาณครึ่งหนึ่ง จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ml และผสมให้เข้ากัน
- สารละลาย 10% (w/v) Sodium hydroxide (NaOH) : ชั่ง NaOH 10 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml ผสมให้เข้ากัน
- สารละลาย 6 N Hydrochloric acid : เตรียมน้ำกลั่นประมาณ 500 ml ใน beaker ขนาด 1000 ml แล้วค่อย ๆ เติม HCl เข้มข้น 500 ml ลงไปพร้อมกวนเบา ๆ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml
- สารละลาย Ferrous sulfate : เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ โดยใช้ Ferrous sulfate ประมาณเท่าเมล็ดถั่วเขียวละลายในน้ำกลั่น 1 ml
- สารละลาย 5% (w/v) Ferric chloride ($FeCl_3$) : ชั่ง Ferric chloride 5 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml
- สารละลาย 0.1 M sodium hydroxide : ชั่ง NaOH 0.4 g ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย จากนั้นย้ายสารละลายลงขวดวัดปริมาตร 100 ml และปรับด้วยน้ำกลั่นจนครบปริมาตร
- สารละลายมาตรฐาน cyanide (stock solution) ความเข้มข้น 200 µg/ml : ชั่ง potassium cyanide 0.0500 g ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml ละลายด้วยสารละลาย 0.1 M sodium hydroxide ปรับปริมาตรจนครบ (ควรระวังเมื่อใช้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น)
- สารละลายมาตรฐานสำหรับใช้งาน (working standard cyanide solution) 10 µg/ml : ปิเปต stock solution 5 ml ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml เจือจางด้วยสารละลาย 0.1 M sodium hydroxide ปรับปริมาตรจนครบ

วิธีตรวจวิเคราะห์

1. เตรียม Paper strip โดยตัดกระดาษกรองเป็นแถบยาวกว้าง 2-3 มิลลิเมตร ชุบด้วยสารละลาย Ferrous sulfate แล้วให้เป่าแห้งด้วย hair dryer แล้วชุบต่อด้วย 10% Sodium hydroxide เป่าให้แห้งอีกครั้ง นำมาใส่ลงในแท่งหลอดแก้วกลวง ซึ่งมีลักษณะงอเป็นรูปตัว S โดย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร (รูปที่ 10-4)
2. ชั่งตัวอย่าง 5-10 g ลงใน Erlenmeyer flask แล้วเติมน้ำกลั่น 10 ml
3. เติมเม็ดสังกะสีประมาณ 2 g
4. เติม 10% Sulfuric acid 3-5 ml ปิดปาก Erlenmeyer flask ด้วยจุกยางที่มีแท่งหลอดแก้วเสียบอยู่พร้อมกับกระดาษกรองที่ผ่านการชุบ ดังรูปที่ 10-4
5. ตั้งบน Water bath ที่มีอุณหภูมิของน้ำอยู่ที่ประมาณ 80 °C นาน 30 นาที
6. นำ Paper strip ออกมาราดด้วยสารละลายผสมของ 6 N Hydrochloric acid กับ 5% Ferric chloride ในอัตราส่วน (1 ml : 5 drops) ประมาณ 2-3 ml
7. หมายเหตุ : ตัวอย่างทำควบคู่ไปกับ Blank (น้ำกลั่น) และสารละลายมาตรฐาน cyanide 10 µg/ml
8. การแปลผล : ผลบวกจะได้สีน้ำเงินบน Paper strip (แสดงว่ามี cyanide) ดังรูปที่ 10-5
9. LOD = 10 µg/ml (ppm)



รูปที่ 10-4 อุปกรณ์สำหรับใช้ตรวจวิเคราะห์ไซยาไนด์โดยวิธี Paper Strip Test



รูปที่ 10-5 การตรวจหาไซยาไนด์ในตัวอย่างอาหารในกระเพาะรูเมนด้วยวิธี paper strip test

10.3 การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ cyanide ในเลือดโค โดยวิธี Microdiffusion spectrophotometry

หลักการตรวจวิเคราะห์

ไซยาไนด์ (CN^-) ในสภาวะกรดจะเปลี่ยนรูปเป็นก๊าซไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) ซึ่งสามารถระเหยและแพร่ผ่านไปยังช่องดักจับที่บรรจุสารละลายด่าง (sodium hydroxide) เพื่อเปลี่ยนกลับเป็น CN^- ที่ละลายน้ำได้ จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยากับ chloramine-T เกิดสาร cyanogen chloride (CNCl) ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อกับ pyridine และ barbituric acid ให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีแดง–ม่วง โดยมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 587 นาโนเมตร นำไปวัดหาค่าการดูดกลืนของแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่นดังกล่าว ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer

ตัวอย่างที่ใช้ : เลือด (Whole blood) ที่ใส่สารกันเลือดแข็งตัว EDTA

สารเคมีและการเตรียม

- pyridine-barbituric acid reagent : ชั่ง barbituric acid 6 g ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml เติมกรด hydrochloric เข้มข้น 6 ml เจือจางด้วย pyridine 30 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ (ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ต้องการใช้)
- สารละลาย 0.25% chloramine-T : ชั่ง chloramine-T 0.25 g ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml เติม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรจนครบ
- สารละลาย 1 M Sulfuric acid : เตรียมน้ำกลั่นประมาณ 200–250 ml ใน beaker ขนาด 500 ml ตวงกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 27.8 mL ด้วยกระบอกตวงแก้ว ค่อย ๆ เติมกรดลงในน้ำ (ห้ามเติมน้ำลงในกรด) พร้อมกวนช้า ๆ เพื่อควบคุมความร้อน หลังจากเย็นแล้ว ย้ายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 ml
- สารละลายมาตรฐาน cyanide (stock solution) ความเข้มข้น 200 µg/ml : ชั่ง potassium cyanide 0.0500 g ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml ละลายด้วยสารละลาย 0.1 M sodium hydroxide ปรับปริมาตรจนครบ (ควรระวังเมื่อใช้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น)
- สารละลายมาตรฐาน cyanide ความเข้มข้น 20 µg/ml : ปิเปต stock solution 5 ml ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 ml ด้วยสารละลาย 0.1 M sodium hydroxide ปรับปริมาตรจนครบ
- สารละลายมาตรฐานสำหรับใช้งาน (working standard cyanide solution) 0.2, 1.0, 2.0 และ 4.0 µg/ml : ปิเปตสารละลายมาตรฐาน cyanide 20 µg/ml 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 ml ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml (แยกขวด) ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 ml

วิธีเตรียมตัวอย่างควบคุม

เตรียมโดยการทำ fortified sample blank โดยเติมสารมาตรฐาน cyanide ลงในเลือดโค (sample blank) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 1 และ 3 µg/ml ดังนี้

- Control sample level 1 (0.5 µg/ml) : ปิเปตเลือดโค 2.0 ml ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 ml จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐาน cyanide ความเข้มข้น 20 µg/ml ปริมาตร 125 µl เติมลงไป แล้วปรับปริมาตรด้วยเลือดโคจนถึงขีดบอกปริมาตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน

- Control sample level 2 (1.0 µg/ml) : ปิเปตเลือดโค 2.0 ml ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 ml จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐาน cyanide ความเข้มข้น 20 µg/ml ปริมาตร 250 µl เติมลงไป แล้วปรับปริมาตรด้วยเลือดโคจนถึงขีดบอกปริมาตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน
- Control sample level 3 (3.0 µg/ml) : ปิเปตเลือดโค 2.0 ml ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 ml จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐาน cyanide (stock solution) ความเข้มข้น 200 µg/ml ปริมาตร 75 µl เติมลงไป แล้วปรับปริมาตรด้วยเลือดโคจนถึงขีดบอกปริมาตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน

วิธีตรวจวิเคราะห์

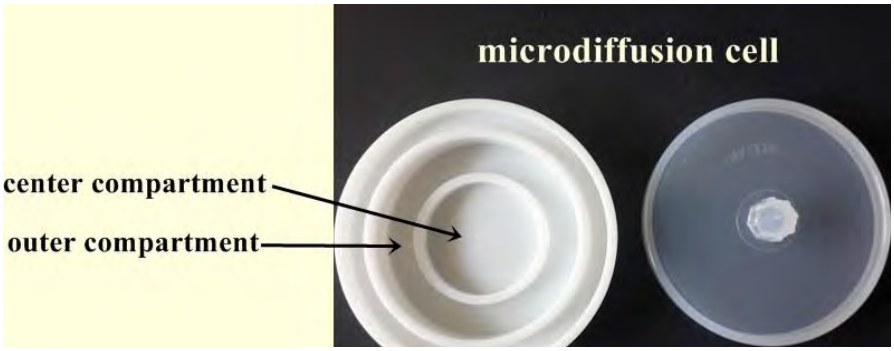
1. การสกัด cyanide ออกจากสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างเลือดโคด้วยเทคนิค microdiffusion และตรวจวัดด้วยวิธี spectrophotometry วิธีวิเคราะห์ดัดแปลงมาจากวิธีของ Flanagan et al. (1995)

1.1 การสกัดสาร cyanide จากสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างด้วยเทคนิค microdiffusion

ปิเปตสารละลาย 0.1 M sodium hydroxide 2 ml ลงใน center compartment ของ microdiffusion cell (ดังรูปที่ 10-6) แต่ละอันที่ label ชื่อน้ำกลั่น (blank) สารละลายมาตรฐาน ตัวอย่างควบคุม หรือตัวอย่างเลือดไว้ จากนั้นปิเปต blank สารละลายมาตรฐาน ตัวอย่างควบคุม หรือตัวอย่างเลือดที่จะตรวจวิเคราะห์อย่างละ 1 ml ลงในส่วนของ outer compartment ก่อน ตามด้วยสารละลาย 1 M sulfuric acid 1 ml จากนั้นปิดฝา microdiffusion cell ที่ทาด้วยซิลิโคนกรีซ และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในตู้ดูดควันเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

1.2 การตรวจวัดปริมาณสาร cyanide ด้วยวิธี spectrophotometry

ปิเปตสารละลาย 0.1 M sodium hydroxide 0.5 ml จาก center compartment ในแต่ละความเข้มข้นที่ได้ลงในหลอดทดลองขนาด 15 ml แบบมีฝาปิด แต่ละหลอดเติมสารละลาย sodium dihydrogen phosphate 1 ml และสารละลาย 0.25% chloramine-T 0.5 ml ลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นเติมน้ำยา pyridine-barbituric acid 1.5 ml ลงในหลอด ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดหาค่าการดูดกลืนของแสง (absorbance) ที่ 587 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer model DU-64 (BECKMAN, U.S.A.) โดยใช้ระบบ peristaltic sipper จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐาน (standard calibration curve) โดยนำค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารละลายมาตรฐานที่เครื่องวัดได้มาสร้างเป็นแกน y และปริมาณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแต่ละระดับมาสร้างเป็นแกน x คำนวณหาความเข้มข้นของ cyanide ในเลือดโคจากสมการ linear regression; $y = ax + b$



รูปที่ 10-6 แสดงตัวอย่างและส่วนประกอบของ microdiffusion cell

- คำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) จากสมการ

  %Recovery = [(C1-C2)/C3] x 100 โดย

  C1 = ความเข้มข้นของ fortified sample

  C2 = ความเข้มข้นของ sample blank

  C3 = ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน cyanide ที่เติม

  โดย %Recovery ของตัวอย่างควบคุม ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นอยู่ ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ ช่วงร้อยละ 80-120

- ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (Limit of detection: LOD) มีค่าเท่ากับ 0.2 µg/ml ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณได้อย่างแม่นยำ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.5 µg/ml

บทที่ 11

การสืบค้นข้อมูลทางเคมีและพิษวิทยา

การสืบค้นข้อมูลทางเคมีและพิษวิทยาของสารพิษ มีความจำเป็นและสำคัญสำหรับผู้ที่ปฏิบัติงานด้านพิษวิทยา เพราะจะทำให้ได้มาซึ่งข้อมูลที่สามารถนำไปใช้ในการช่วยสนับสนุนการตรวจวิเคราะห์สารพิษทางห้องปฏิบัติการ การศึกษาวิจัย และการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารพิษที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพและชีวิตสัตว์ ตลอดจนสัตวแพทย์ผู้รักษาหรือเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องสามารถนำข้อมูลไปประกอบในการวินิจฉัย วางแผนการป้องกัน และกำหนดมาตรการในการลดความเสี่ยงของสัตว์จากการสัมผัสสารพิษได้ โดยในการสืบค้นข้อมูลฯนั้น สิ่งที่ผู้ทำการสืบค้นควรตระหนักคือต้องเลือกแหล่งข้อมูลที่เหมาะสม และใช้คำค้นที่ตรงประเด็น ถึงจะทำให้ได้ข้อมูลที่มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ และนำไปใช้ได้อย่างมั่นใจ สำหรับในบทนี้ผู้เขียนได้ยกตัวอย่างแหล่งข้อมูลทางเคมีและพิษวิทยาที่มีความน่าเชื่อถือ วิธีการสืบค้นข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต และการนำข้อมูลไปประยุกต์ใช้ในงานด้านพิษวิทยาไว้ เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานและผู้สนใจได้ศึกษาเรียนรู้และนำไปใช้เป็นแนวทางในการดำเนินงานการตรวจวิเคราะห์ วิจัยสารพิษที่ตนรับผิดชอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ

11.1 แหล่งข้อมูลทางเคมีและพิษวิทยา

11.1.1 พิษวิทยาเชิงวิเคราะห์ (Analytical toxicology)

พิษวิทยาเชิงวิเคราะห์ คือ การตรวจหา จำแนกชนิด และหาปริมาณยาและสารพิษ (สารแปลกปลอม) รวมถึงเมตาบอไลต์ ในตัวอย่างทางชีวภาพและตัวอย่างที่เกี่ยวข้อง เพื่อช่วยในการวินิจฉัย การรักษา การพยากรณ์โรค และป้องกันพิษ

วัตถุประสงค์ในการวิเคราะห์ดังกล่าว ได้แก่

- ตรวจหาระดับการได้รับสัมผัสกับสารพิษที่อาจเกิดขึ้นผ่านอากาศ น้ำ หรืออาหาร
- ตรวจสอบระดับการสัมผัสกับปริมาณสารในสัตว์ที่ใช้ในการศึกษาทดลอง
- ตรวจหาระดับของสารแปลกปลอม (xenobiotics) หรือสารพิษ และสารเมตาบอไลต์จากการศึกษาในสัตว์
- ตรวจเลือดและปัสสาวะเบื้องต้น เพื่อหาสารเสพติดหรือเมตาบอไลต์
- ตรวจเลือด ปัสสาวะ และเนื้อเยื่อเบื้องต้น เพื่อหายา สารพิษ หรือเมตาบอไลต์
- ตรวจวัดระดับของสารประกอบภายในร่างกาย เพื่อประเมินการทำงานและความเสียหายของอวัยวะ (เคมีคลินิก)
- ตรวจหาสารเมตาบอไลต์และสารเชื่อมโยงกับโมเลกุลขนาดใหญ่ เพื่อระบุกลไกการทำงาน

แหล่งข้อมูลพิษวิทยาเชิงวิเคราะห์ สามารถสืบค้นข้อมูลได้จาก หนังสือ/ตำรา วารสาร และเว็บไซต์ ดังนี้

หนังสือ/ตำรา

1) Moffat, A.C., Osselton, M.D., Widdop, B. and Watt J. (2011)

***"Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material" 4th* edition, Pharmaceutical Press, London**

เป็นหนังสือเกี่ยวกับการตรวจวิเคราะห์ยาและสารพิษของ Clarke มีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาด้านยา และการสืบสวนทางนิติเวช และกรณีศึกษาทางคลินิก ซึ่งสนับสนุนนักพิษวิทยาในทุกแง่มุมของการทำงาน ตั้งแต่ยาเสพติดและระดับแอลกอฮอล์ในเลือดขณะขับรถ ไปจนถึงการตรวจทางพิษวิทยาหลังการเสียชีวิต แหล่งข้อมูลที่เชื่อถือได้นี้เขียนโดยผู้เชี่ยวชาญระดับนานาชาติมากกว่า 40 คน และมีคณะที่ปรึกษาบรรณาธิการที่เป็นนักวิทยาศาสตร์ที่มีชื่อเสียงระดับโลกมากกว่า 45 คน ฉบับปรับปรุงใหม่นี้ได้รับการแก้ไขเพิ่มเติมอย่างสมบูรณ์และอัปเดต ประกอบด้วย 2 เล่ม หนังสือเล่มนี้มีความจำเป็นสำหรับนักพิษวิทยาทางนิติเวชและคลินิก นักพยาธิวิทยา เภสัชกรในโรงพยาบาล นักวิเคราะห์ยา นักเภสัชวิทยาคลินิก ห้องปฏิบัติการทางคลินิกและนิติเวช และศูนย์ข้อมูลพิษ

เล่มที่ 1 มีเนื้อหาเกี่ยวกับวิธีการและเทคนิคการวิเคราะห์ จำนวน 44 บทเขียนโดยนักวิทยาศาสตร์ระดับนานาชาติชั้นนำที่ครอบคลุมถึงภาคปฏิบัติและขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ที่ใช้ในด้านพิษวิทยา

เล่มที่ 2 มีเนื้อหาเกี่ยวกับข้อมูลการตรวจวิเคราะห์และข้อมูลด้านพิษวิทยา รวมถึงดัชนีข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ ประกอบไปด้วยบทความทางวิชาการเฉพาะเรื่อง (monograph) เกี่ยวกับยาและสารพิษ จำนวน 2,111 เรื่อง ซึ่งมีรายละเอียดคุณสมบัติทางกายภาพ วิธีการตรวจวิเคราะห์ ข้อมูลเภสัชจลนศาสตร์ ข้อมูลความเป็นพิษ ดัชนีข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ รวมถึงข้อมูลทั้งหมดสำหรับวิธี Color test, วิธีทาง Chromatography, UV-Vis Spectrophotometry, infrared spectrometry และ mass spectrometry

กรณีตัวอย่างและวิธีการนำข้อมูลจากหนังสือ *Clarke's analysis of drugs and poisons* ไปประยุกต์ใช้ เช่น

กรณีที่ 1 เมื่อต้องการดูข้อมูลต่าง ๆ ของสารเคมีกำจัดแมลง monochrotophos ในกลุ่ม Organophosphate เพื่อนำไปใช้ประกอบในการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ สามารถดูได้ที่ monograph ของยาและสารพิษที่เรียงตามลำดับตัวอักษรตั้งแต่ A-Z ในที่นี้เลื่อนไปดูที่ตัวอักษร M จะพบ monograph ของ monocrotophos ซึ่งจะประกอบไปด้วยข้อมูลดังต่อไปนี้ ได้แก่ การนำไปใช้ สูตรโมเลกุล สูตรโครงสร้าง น้ำหนักโมเลกุล ชื่อตาม IUPAC ชื่อพ้อง ชื่อการค้า คุณสมบัติทางเคมี (ลักษณะของผลึกและสี จุดหลอมเหลว และข้อมูลการละลายในตัวทำละลาย

ต่าง ๆ) วิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีต่างๆ เช่น TLC, Gas Chromatography, UV spectrum พร้อมค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ max) ของ peak หลัก (principal peak) Mass spectrometry รวมถึงข้อมูลสภาวะที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ การตรวจหาปริมาณในซีรัม เภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics) ข้อมูลความเป็นพิษ และตัวอย่างกรณีศึกษาการตายจากการได้รับ monocrotophos เป็นต้น

กรณีที่ 2 เมื่อมีตัวอย่างชีววัตถุ (อาหารในกระเพาะ ตับ ไต) ซึ่งเป็น unknown sample ถูกส่งเข้ามาตรวจยังห้องปฏิบัติการ ผู้ส่งตัวอย่างไม่ได้ให้ข้อมูลประวัติสัตว์ อาการเกิดพิษ และไม่มีข้อมูลใดๆที่ผู้ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างสามารถนำไปใช้ในการเชื่อมโยงหรือคาดการณ์ว่าสัตว์ตายจากการได้รับสารพิษกลุ่มใด เพียงแต่ระบุในหนังสือนำส่งตัวอย่างว่าตรวจหาสารพิษ กรณีนี้ทางห้องปฏิบัติการพิษวิทยาควรดำเนินการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อหาสารพิษทุกกลุ่มเท่าที่ศักยภาพของห้องปฏิบัติการเปิดให้การบริการในงานประจำอยู่ในปัจจุบัน ซึ่งบางครั้งจะพบว่าเมื่อนำสารละลายที่ได้จากการสกัดตัวอย่างไปตรวจเบื้องต้นด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) แล้วมี spot ของสารประกอบที่น่าสงสัยเกิดขึ้นบน TLC plate จากการส่องดูภายใต้แสง UV 254 nm และการตรวจวัดด้วย spray reagent แล้วให้ค่า Rf และการติดสี spray reagent ไม่ตรงกับสารมาตรฐานที่มีอยู่ ผู้ตรวจวิเคราะห์สามารถขูด silica gel ตรงบริเวณ spot ที่สงสัยนั้นใส่หลอดทดสอบแยกหลอด 3 หลอด แล้วละลายด้วยตัวทำละลายที่มีความเป็นกรด (0.1 N HCl) และด่าง (0.1 N NaOH) และกลาง (methanol หรือ ethanol) ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer นำไปปั่นตกตะกอน นำส่วนใสที่ได้ในแต่ละตัวทำละลายไป scan ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 200-400 nm (ส่วนใหญ่ข้อมูลในหนังสือเล่มนี้ scan ในช่วงนี้) หรือ 200-800 nm สมมติว่าผลที่ได้จากการ scan พบว่าในสารละลายที่เป็นกรดได้ค่า λ max ของ peak หลัก เท่ากับ 254 nm ส่วนในด่างและกลางให้ค่า λ max ของ peak หลัก เท่ากับ 255 และ peak รอง (subsidiary peak) เท่ากับ 278 nm ให้นำข้อมูลที่ได้เหล่านี้ไปเทียบกับ Indexes of Analytical Data ในตารางตอนท้ายของหนังสือในส่วนของ Ultraviolet Absorption Data โดย unknown compound ควรเปรียบเทียบ λ max กับตารางดังกล่าวโดยใช้ค่าความคลาดเคลื่อน ±2 nm เพื่อให้ได้รายชื่อสารประกอบที่มีความเป็นไปได้ว่าจะเป็นสารที่อยู่ใน unknown sample ซึ่งจะพบว่า spot ของสารประกอบที่สงสัยนั้นมีค่า λ max เมื่อละลายอยู่ในตัวทำละลายทั้งสามชนิดตรงกับสตริกนิน (strychnine) (ตารางที่ 11-1) ให้คาดการณ์ไว้ว่าสารประกอบที่สงสัยนี้อาจเป็นสตริกนินไว้ก่อน จากนั้นทำการตรวจเอกลักษณ์ด้วยวิธี TLC (screening test) โดยเปลี่ยน mobile phase และ spray reagent ที่มีความจำเพาะที่หนังสือเล่มนี้ให้ข้อมูลมาคือ acidified iodoplatinate และยืนยันผล (confirmation test) และหาปริมาณในตัวอย่างด้วยวิธีอื่นอีก 1 วิธี เช่น UV-Vis Spectrophotometry หรือ HPLC หรือ GC-MS เป็นต้น โดยมีสารมาตรฐานเปรียบเทียบ พร้อมทำตัวอย่างควบคุม (control sample) ด้วยการทำ spiked sample เพื่อหา %Recovery ซึ่งถ้าให้ผลตรงกันสองวิธีสรุปได้ว่าสารประกอบหรือสารพิษที่ตรวจพบในตัวอย่างนั้นเป็นสตริกนิน เป็นต้น ในการทำ unknown sample บางครั้งการตรวจเบื้องต้นด้วยวิธี TLC หรือ UV-Vis Spectrophotometry หรือ GC-MS อาจทำให้พอทราบว่าเป็นสารพิษชนิดใด แต่ ณ ขณะตรวจวิเคราะห์นั้นห้องปฏิบัติการอาจยังไม่มีสารมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบ ทั้งนี้การแก้ไขปัญหาเฉพาะหน้าคือ การขอความอนุเคราะห์สารมาตรฐานจากหน่วยงานราชการด้วยกันหรือเครือข่ายนักวิชาการที่ผู้ตรวจวิเคราะห์รู้จัก หรือซื้อสารเคมีที่เป็น commercial grade ที่มีสารเคมีที่สนใจเป็นสารออกฤทธิ์ที่มีวางขายตามร้านค้าขายวัตถุเคมีทางการเกษตรนำมาสกัดตามวิธี และทำให้บริสุทธิ์ด้วยการ clean up แล้วนำมาใช้ทดแทนสารมาตรฐาน ซึ่งในการตอบผลวิเคราะห์อาจตอบได้เพียงพบหรือไม่พบสารพิษชนิดนั้น อย่างไรก็ตามการตอบผลการตรวจวิเคราะห์หาเอกลักษณ์และปริมาณของสารพิษด้วยความถูกต้องและมั่นใจ ควรใช้สารมาตรฐานที่เป็น standard grade และทราบ purity ที่แน่นอน

ตารางที่ 11-1 แสดงค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ max) ของ principal peak และ subsidiary peak ของสารประกอบในสารละลายกรด ด่าง และกลาง (Moffat et al., 2011)

In acid solution			In alkali solution			In neutral solution		
λ max of Principal peak (nm)	Compound	λ max of Subsidiary peak (nm)	λ max of Principal peak (nm)	Compound	λ max of Subsidiary peak (nm)	λ max of Principal peak (nm)	Compound	λ max of Subsidiary peak (nm)
252	Proadifen	259, 264, 270, 327, 337	253	Apomorphine	-	253	Chlortetracycline	284, 346
253	Medazepam	-	254	Sorbic Acid	-	254	Promazine	306
254	Perphenazine	307	255	Strychnine	278	255	Pentobarbital	-
254	Prochlorperazine	305	255	Sulfacarbamide	-	255	Strychnine	278
254	Strychnine	-	255	Talbutal	-	255	Sulfacarbamide	-
254	Tropicamide	-	255	Thiopental	304	255	Talbutal	-
255	Aciclovir	-	256	Alimemazine	310	255	Thiopental	304
255	Propyl Hydroxybenzoate	-	256	Cyclobarbital	-	256	Dapsone	292
256	Pyritidium Bromide	313	257	Paracetamol	-	257	Barbituric	-

2) Flanagan, R.J., Braithwaite, R.A., Brown, S.S., Widdop, B. and de Wolff, F.A. (1995)

"Basic Analytical Toxicology"

World Health Organization, Geneva, Switzerland

คู่มือนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อช่วยให้ห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลในประเทศกำลังพัฒนา สามารถให้บริการการตรวจวิเคราะห์พิษวิทยาขั้นพื้นฐานโดยใช้เครื่องมือพิเศษน้อยที่สุด ไม่ได้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดแทนตำราเรียน แต่เพื่อให้ข้อมูลเชิงปฏิบัติเกี่ยวกับการตรวจวิเคราะห์สารหลายชนิดที่มักเกี่ยวข้องกับเหตุการณ์การเกิดพิษเฉียบพลัน ตลอดทั้งเล่มเน้นถึงอันตรายและปัญหาทั่วไป และอภิปรายถึงข้อควรระวังด้านสุขภาพและความปลอดภัยพื้นฐานสำหรับผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการด้วย สามารถ download ได้ฟรี ซึ่งเป็นฉบับภาษาอังกฤษได้ที่เว็บไซต์ https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/37146/9241544589.pdf?sequence=1

วารสาร

Analytical and Bioanalytical Chemistry

Annals of Clinical Biochemistry

Biomedical Chromatography

Forensic Science International

Journal of Analytical Toxicology

Journal of Chromatography B (formerly known as Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications)

Journal of Forensic Science Therapeutic Drug Monitoring

เว็บไซต์

World Health Organization (WHO) Basic analytical toxicology:
https://www.who.int/publications/i/item/9241544589

11.1.2 พิษวิทยาทางสัตวแพทย์ (Veterinary toxicology) สามารถสืบค้นข้อมูลได้จาก หนังสือ/ตำรา วารสาร และเว็บไซต์ ดังนี้

หนังสือ/ตำรา

1) Gupta, R.C. (Ed.) (2007)

"Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles"

Elsevier, Academic Press, New York

เป็นหนังสือที่เน้นเนื้อหาด้านพิษวิทยาทางสัตวแพทย์ ทั้งในแง่ของหลักการพื้นฐานและการประยุกต์ใช้ในทางคลินิก โดยมีเนื้อหาหลักของหนังสือ ได้แก่

- พิษวิทยาในสัตว์: ศึกษาเกี่ยวกับสารพิษที่มีผลกระทบต่อสัตว์ ไม่ว่าจะเป็นสารพิษจากธรรมชาติ สารเคมี หรือยาที่ใช้ในมนุษย์และสัตว์ รวมถึงการวิเคราะห์กลไกการทำงานของสารพิษในร่างกายสัตว์
- หลักการวินิจฉัยและการจัดการสารพิษ : อธิบายวิธีการวินิจฉัยและจัดการปัญหาที่เกิดจากการสัมผัสหรือได้รับสารพิษ รวมถึงการป้องกันและการรักษาอาการที่เกิดจากพิษ
- การใช้พิษวิทยาในงานสัตวแพทย์คลินิก : ให้ข้อมูลที่เหมาะสมสำหรับสัตวแพทย์ในการจัดการสถานการณ์ที่เกี่ยวข้องกับสารพิษในสถานการณ์จริง ตัวอย่างกรณีศึกษา และแนวทางการปฏิบัติที่ใช้ได้จริง

หนังสือเล่มนี้ถือเป็นคู่มือที่สำคัญสำหรับสัตวแพทย์ นักพิษวิทยา และผู้ที่ทำงานในสายงานด้านสุขภาพสัตว์ เพราะมีข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับพิษวิทยา ซึ่งช่วยให้ผู้เชี่ยวชาญสามารถระบุปัญหาที่เกิดจากสารพิษ และจัดการปัญหาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2) Plumlee KH (Ed.) (2004)

"Clinical Veterinary Toxicology"

Mosby, St. Louis, MO

เป็นคู่มือสำคัญที่เน้นด้านพิษวิทยาเชิงคลินิกในสัตวแพทย์ โดยให้ข้อมูลที่ครอบคลุมเกี่ยวกับการวินิจฉัย การรักษา และการจัดการกรณีสัตว์ที่ได้รับสารพิษ โดยมีเนื้อหาหลักของหนังสือ ได้แก่

- การวินิจฉัยทางคลินิกเกี่ยวกับสารพิษในสัตว์: รวมวิธีการวินิจฉัยที่เน้นการประยุกต์ใช้ในสถานการณ์จริง เช่น การวิเคราะห์อาการทางคลินิกและการตรวจในห้องปฏิบัติการ แนะนำวิธีการระบุสารพิษและสารเคมีที่เป็นอันตราย
- พิษวิทยาในสัตว์ชนิดต่างๆ: เจาะลึกถึงผลกระทบของสารพิษที่มีต่อสัตว์เลี้ยงในบ้าน เช่น สุนัข แมว และสัตว์ฟาร์ม เช่น วัว ม้า สุกร และวิเคราะห์กลไกการออกฤทธิ์ของสารพิษในร่างกายสัตว์และอาการแสดง
- การจัดการและการรักษา: แนวทางในการรักษาสัตว์ที่ได้รับพิษ โดยเน้นการใช้ยาและการดูแลในกรณีฉุกเฉิน รวมถึงวิธีการล้างพิษ การใช้สารต้านพิษ (antidotes) และการดูแลรักษาสัตว์ในระยะยาว
- ตัวอย่างกรณีศึกษาและข้อมูลอ้างอิง: รวมกรณีศึกษาที่หลากหลายเพื่อเป็นแนวทางในการวินิจฉัยและการรักษา มีตารางและแผนภูมิที่ช่วยให้เข้าใจง่ายและสามารถใช้ข้อมูลได้ทันที

หนังสือเล่มนี้ออกแบบมาเพื่อเป็นแหล่งข้อมูลสำคัญสำหรับสัตวแพทย์ที่ต้องการข้อมูลเชิงปฏิบัติด้านพิษวิทยาในคลินิก ทั้งในแง่ของการจัดการกรณีฉุกเฉินและการรักษาระยะยาว เหมาะสำหรับ สัตวแพทย์ นักศึกษาในสาขาสัตวแพทยศาสตร์ นักพิษวิทยา และผู้ที่เกี่ยวข้องในงานด้านสุขภาพสัตว์

วารสาร

1) Clinical Toxicology (2005–)

Taylor and Francis, Philadelphia, PA

เป็นวารสารทางวิชาการที่จัดพิมพ์โดย Taylor and Francis ในนครฟิลาเดลเฟีย รัฐเพนซิลเวเนีย สหรัฐอเมริกา เริ่มตีพิมพ์ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2005 และเป็นวารสารอย่างเป็นทางการของ American Academy of Clinical Toxicology และ European Association of Poisons Centres วารสารนี้มุ่งเน้นการนำเสนอบทความทางวิชาการเกี่ยวกับ พิษวิทยาคลินิกในมนุษย์ แต่บทความส่วนใหญ่ยังมีความเกี่ยวข้องกับพิษวิทยาในสัตวแพทย์ด้วยเช่นกัน วารสาร Clinical Toxicology มีการสานต่อเนื้อหาจากวารสารเดิมชื่อ Journal of Toxicology: Clinical Toxicology ซึ่งจัดพิมพ์ระหว่างปี ค.ศ. 1982–2004 บทความในวารสารนี้ครอบคลุมหัวข้อที่หลากหลาย เช่น การวินิจฉัยและการรักษาภาวะพิษในมนุษย์ การวิจัยเชิงคลินิกเกี่ยวกับสารพิษ ยา และสารเคมี รวมถึงการจัดการเหตุการณ์เกี่ยวกับสารพิษในสถานการณ์ฉุกเฉิน โดยเนื้อหาเหล่านี้มีความสำคัญทั้งต่อบุคลากรทางการแพทย์และสัตวแพทย์ที่เกี่ยวข้องกับการจัดการด้านพิษวิทยา

2) Journal of Veterinary Diagnostic Investigation (1988–)

Allen Press, Lawrence, KS

เป็นวารสารวิชาการที่ตีพิมพ์ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1988 โดย Allen Press ในนครลอว์เรนซ์ รัฐแคนซัส สหรัฐอเมริกา วารสารนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเผยแพร่บทความด้านวิทยาศาสตร์การวินิจฉัยในสัตวแพทย์ครอบคลุมหลากหลายสาขาสาขาวิชาที่สำคัญในวารสาร ได้แก่

- พยาธิวิทยากายวิภาค (Anatomical Pathology): การศึกษาความผิดปกติของเนื้อเยื่อและอวัยวะในสัตว์
- แบคทีเรียวิทยาและเชื้อรา (Bacteriology/Mycology): การวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่เกี่ยวข้องกับโรคในสัตว์
- พยาธิวิทยาคลินิก (Clinical Pathology): การประเมินตัวอย่างทางคลินิก เช่น เลือด ปัสสาวะ และของเหลวอื่น ๆ
- ระบาดวิทยา (Epidemiology): การศึกษาการกระจายของโรคในประชากรสัตว์
- ภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunology): การวิจัยเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์
- การจัดการข้อมูลห้องปฏิบัติการ (Laboratory Information Management): ระบบการจัดเก็บและวิเคราะห์ข้อมูลในห้องปฏิบัติการ
- ชีววิทยาระดับโมเลกุล (Molecular Biology): การใช้เทคโนโลยีชีววิทยาโมเลกุลในการวินิจฉัยโรค
- ปรสิตวิทยา (Parasitology): การศึกษาปรสิตและผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์
- สาธารณสุข (Public Health): การเชื่อมโยงระหว่างสุขภาพสัตว์กับสุขภาพมนุษย์
- พิษวิทยา (Toxicology): การวิเคราะห์สารพิษและผลกระทบที่เกิดกับสัตว์
- ไวรัสวิทยา (Virology): การศึกษาการติดเชื้อไวรัสในสัตว์
- เป็นแหล่งข้อมูลสำคัญสำหรับสัตวแพทย์ นักวิทยาศาสตร์ และนักวิจัยด้านการวินิจฉัยโรคในสัตว์ ส่งเสริมการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยและการจัดการโรคสัตว์ที่ทันสมัย มีเว็บไซต์อย่างเป็นทางการที่สามารถเข้าถึงข้อมูลและบทความได้ที่ http://jvdi.org/

ฐานข้อมูล

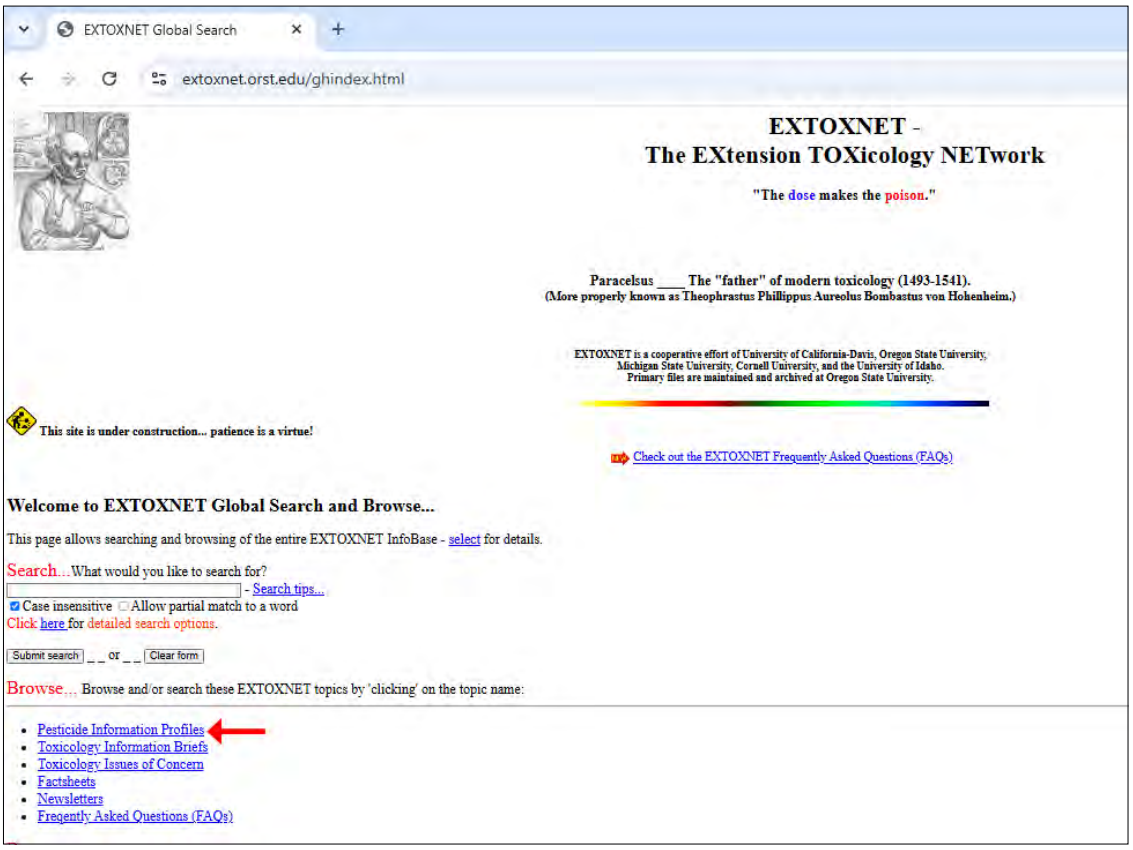
อินเทอร์เน็ตเต็มไปด้วยข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับพิษวิทยาทางสัตวแพทย์ และเป็นแหล่งข้อมูลสำคัญที่สามารถเข้าถึงข้อมูลได้อย่างรวดเร็ว มีแหล่งข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับพิษวิทยาทางสัตวแพทย์จำนวนมากเกินกว่าจะรวบรวมไว้ทั้งหมด แต่ผู้เขียนได้รวบรวมบางเว็บไซต์ที่สำคัญซึ่งเป็นฐานข้อมูลฟรีออนไลน์ และมีความน่าเชื่อถือน่าเชื่อถือไว้ตามด้านล่างนี้

EXTOXNET (http://extoxnet.orst.edu/ghindex.html)

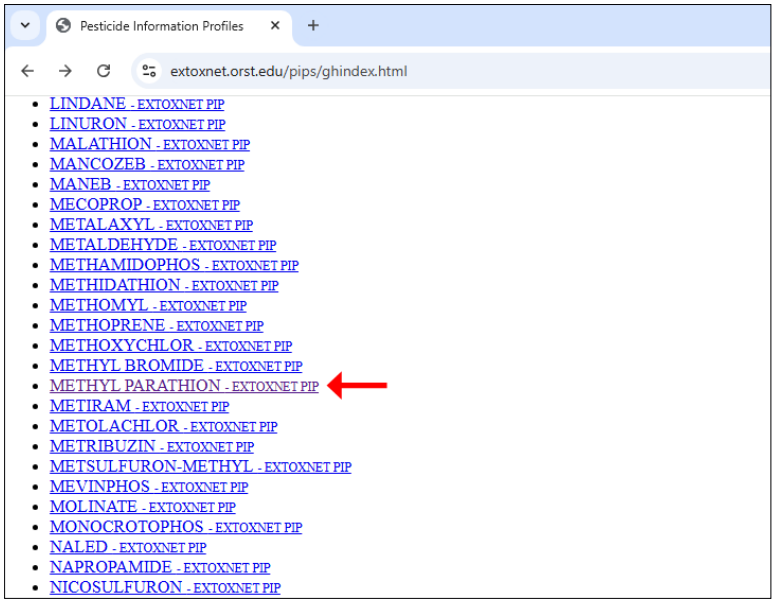
EXTOXNET เป็นความร่วมมือของมหาวิทยาลัยแคลิฟอร์เนียเดวิส มหาวิทยาลัยโอเรกอนสเตท มหาวิทยาลัยมิชิแกนสเตท มหาวิทยาลัยคอร์เนลล์ และมหาวิทยาลัยไอดาโฮ ไฟล์หลักจะได้รับการบำรุงรักษาและเก็บถาวรที่มหาวิทยาลัยโอเรกอนสเตท โดย EXTOXNET นั้นเป็นฐานข้อมูลที่สามารถใช้สืบค้นข้อมูลที่หลากหลายเกี่ยวกับสารกำจัดศัตรูพืช แบ่งเป็นหัวข้อต่างๆ ได้แก่ โปรไฟล์ข้อมูลสารกำจัดศัตรูพืชที่ให้ข้อมูลจำเพาะ บทสรุปข้อมูลด้านพิษวิทยา (การอภิปรายแนวคิดด้านพิษวิทยาและด้านเคมีสิ่งแวดล้อม) ปัญหาเกี่ยวกับพิษวิทยา ใบแสดงความคิดเห็น ข่าวเกี่ยวกับพิษวิทยา จดหมายข่าว แหล่งที่มาของข้อมูลพิษวิทยา และข้อมูลด้านเทคนิค

วิธีการสืบค้นข้อมูลสารเคมีจาก EXTOXNET เช่น ต้องการสืบค้นข้อมูลสารกำจัดแมลงชนิด methyl parathion สามารถดำเนินการได้ดังนี้

1. พิมพ์ URL https://extoxnet.orst.edu/ghindex.html ของ EXTOXNET หน้าจอจะปรากฏหน้าต่างของฐานข้อมูล ดังรูปที่ 11-1
2. คลิกเข้าไปที่ Pesticide Information Profiles ตามลูกศรชี้ จะปรากฏข้อมูลรายการของสารกำจัดศัตรูพืชให้เลือกดังรูปที่ 11-2 คลิกไปที่คำว่า methyl parathion
3. บนหน้าจอคอมพิวเตอร์จะปรากฏข้อมูลแบ่งเป็นหัวข้อเกี่ยวกับ methyl parathion เช่น ชื่อสามัญ ชื่อการค้า การควบคุม การจำแนกกลุ่มสาร บทนำ รูปแบบของสาร ผลกระทบทางพิษวิทยาและนิเวศวิทยา (พิษเฉียบพลัน พิษเรื้อรัง ผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ผลกระทบต่อนกสิ่งมีชีวิตในน้ำและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ) การเปลี่ยนแปลงในสิ่งแวดล้อม คุณสมบัติทางกายภาพ แนวทางการสัมผัสสารเป็นต้น แต่ละหัวข้อจะมีรายละเอียดของข้อมูลให้ผู้ใช้งานสามารถเลือกและนำไปใช้ประโยชน์ในงานด้านพิษวิทยาได้ เช่น ADI (Acceptable Daily Intake) เป็นระดับการได้รับสัมผัสสารเคมีที่ยอมรับได้ในด้านอาหารจากฐานข้อมูลนี้กล่าวถึง methyl parathion ว่ามีค่า ADI เท่ากับ 0.02 mg/kg/day เราสามารถนำข้อมูลนี้ใช้ศึกษาเรื่องการประเมินความเสี่ยงต่อไปได้ เป็นต้น



รูปที่ 11-1 หน้าต่างของ EXTOXNET



รูปที่ 11-2 รายการของสารกำจัดศัตรูพืช

PubMed

U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health

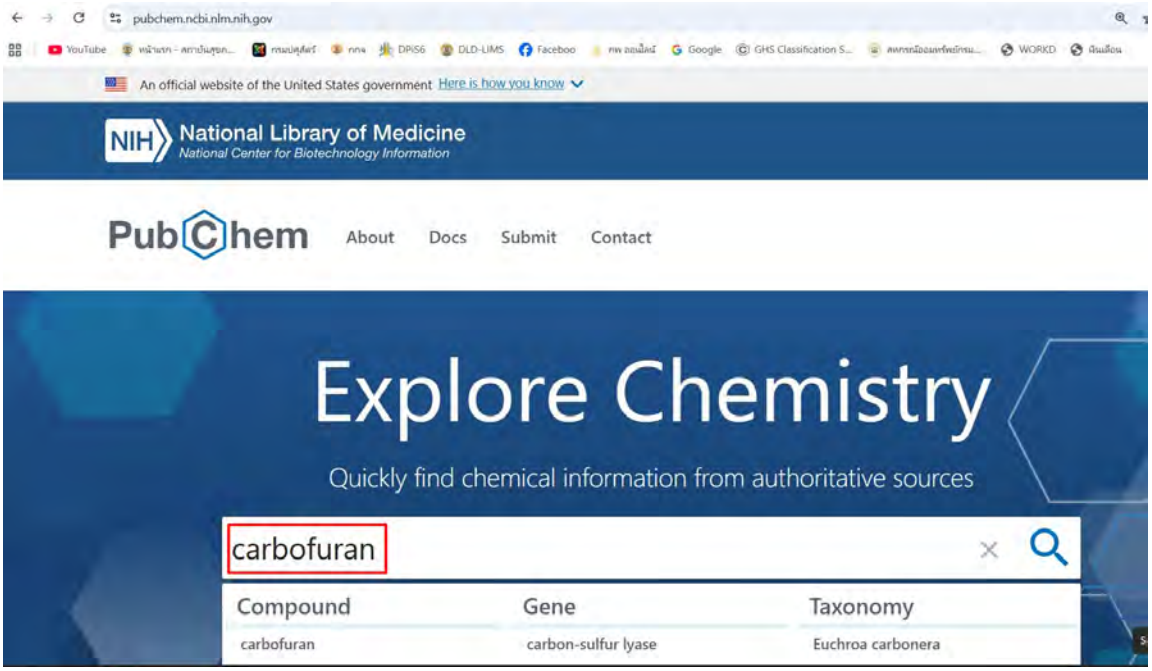
Web: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed

PubMed เป็นฐานข้อมูลที่รวบรวมบทความมากกว่า 16 ล้านรายการจาก MEDLINE และวารสารวิทยาศาสตร์ชีวภาพอื่น ๆ ย้อนหลังไปถึงช่วงทศวรรษ 1950 โดยมีการเชื่อมโยงไปยังบทความฉบับเต็มและแหล่งข้อมูลที่เกี่ยวข้องอื่น ๆ

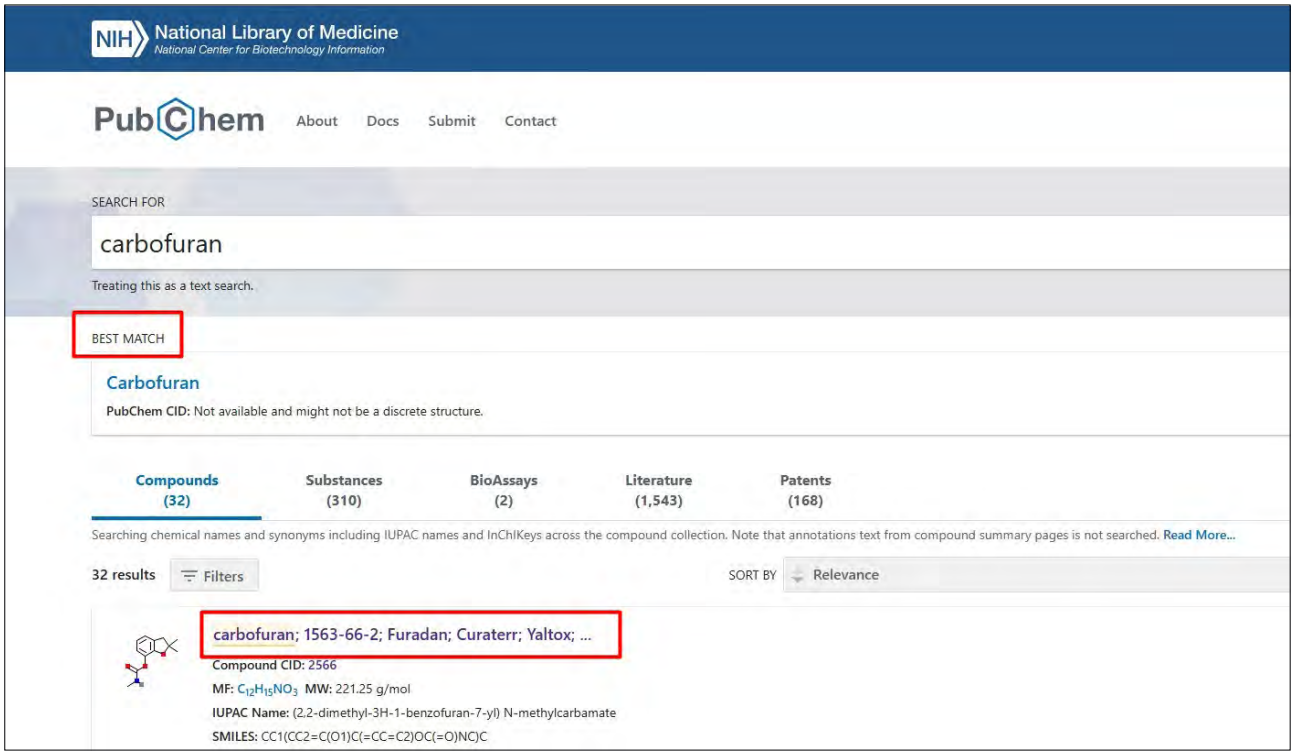
Hazardous Substances Data Bank (HSDB)

HSDB เป็นฐานข้อมูลออนไลน์ที่ครอบคลุมข้อมูลพิษวิทยาของสารเคมีที่อาจเป็นอันตราย ได้ถูกโอนย้ายไปยังระบบ PubChem ผู้สนใจสืบค้นข้อมูลสามารถปฏิบัติตามขั้นตอนดังต่อไปนี้เพื่อค้นหาเนื้อหา HSDB ภายใน PubChem ดังนี้

1. เริ่มต้นด้วยการค้นหาใน PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/) โดยป้อนชื่อสารเคมี สูตรทางเคมี หมายเลข CAS RN, SMILES หรือ InChI identifier ยกตัวอย่าง เช่น ต้องการสืบค้นข้อมูลพิษวิทยาของสารเคมีกำจัดแมลงชื่อ carbofuran



2. เลือกสารเคมีในผลลัพธ์ที่แสดงว่าเป็น “Best Match”

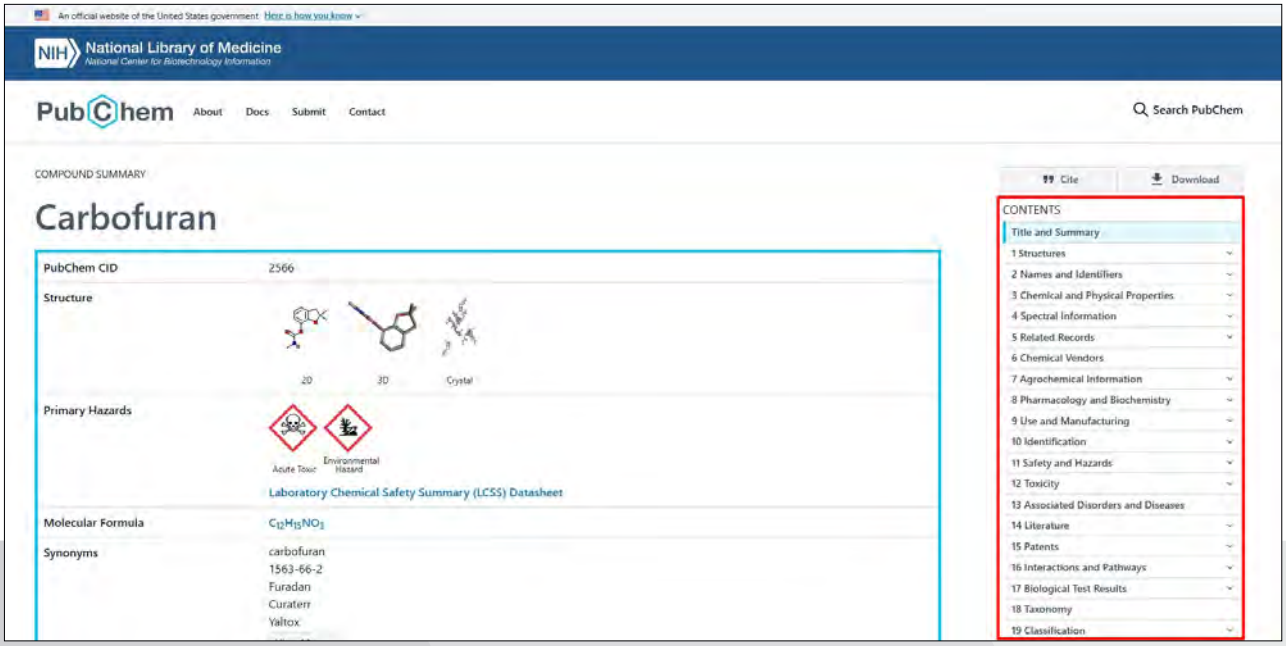


3. เนื้อหา HSDB จะปรากฏกระจายอยู่ในส่วนต่าง ๆ และในช่องข้อมูลของ PubChem ซึ่งอาจไม่ตรงกับโครงสร้างเดิมของ HSDB ที่คุ้นเคย

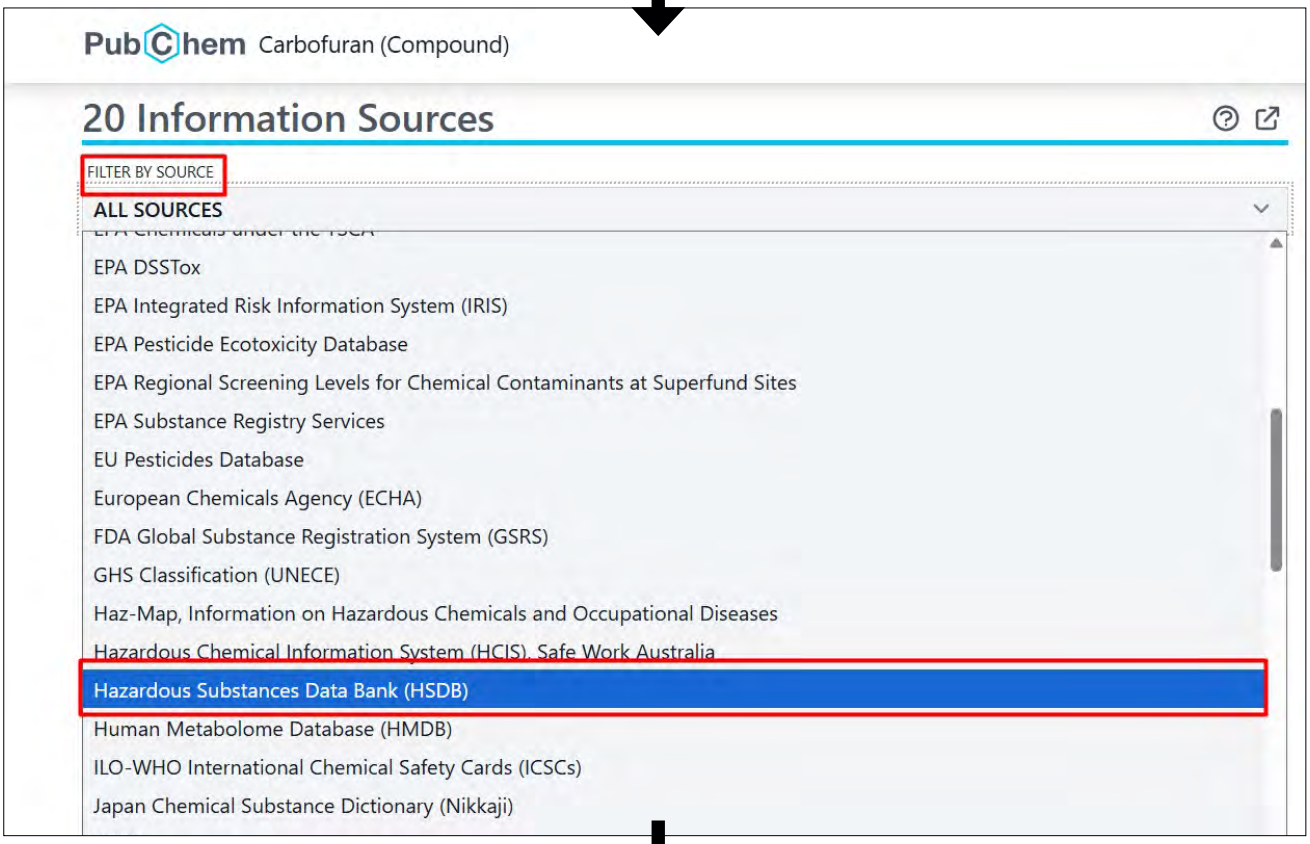
- ใช้เมนูแบบ “accordion” (พับย่อ/ขยาย) เพื่อดูเนื้อหาแต่ละส่วน
- หากต้องการค้นหาชื่อส่วนที่ต้องการ สามารถใช้คำสั่ง Ctrl + F บนคีย์บอร์ดเพื่อค้นหาอย่างรวดเร็ว

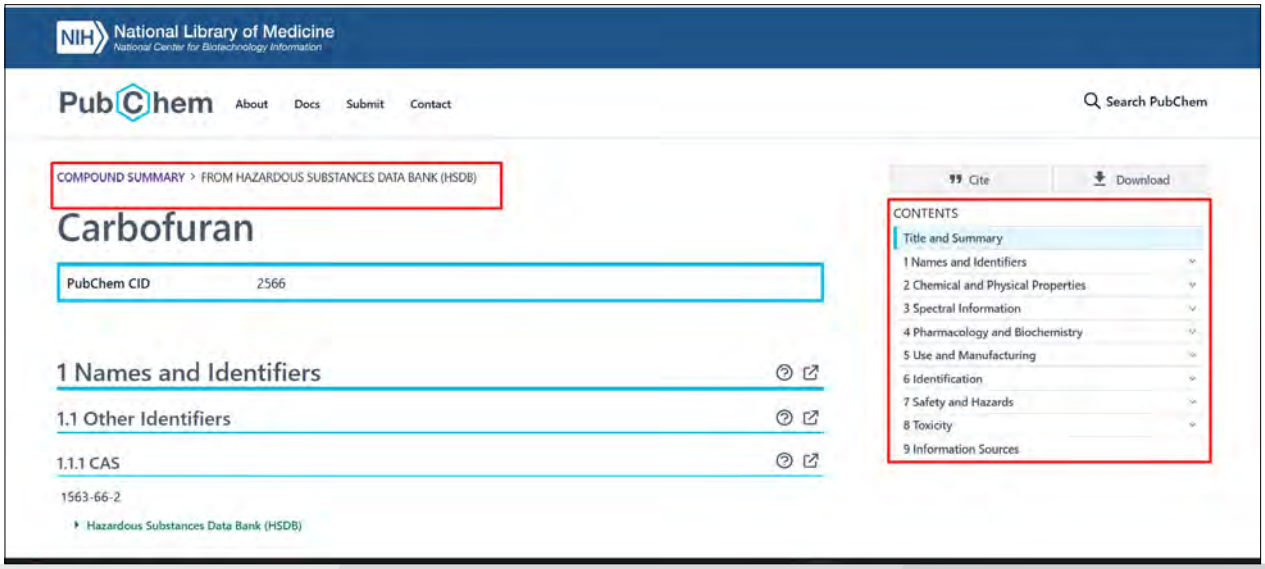
4. ถ้าต้องการดูเฉพาะเนื้อหาที่มาจาก HSDB เท่านั้น ให้ดำเนินการดังนี้ (ดังรูปด้านล่างเรียงตามลำดับ)

- **ที่**เนื้อหาทางขวามือให้เลื่อนลงไปยังหัวข้อสุดท้ายที่ชื่อว่า “Information Sources”
- ขยายเมนู “FILTER BY SOURCE”
- เลือก Hazardous Substances Data Bank (HSDB)
- ระบบจะกรองและแสดงเฉพาะเนื้อหาที่มาจาก HSDB เท่านั้น



17 Biological Test Results
18 Taxonomy
19 Classification
20 Information Sources


PubChem Carbofuran (Compound)
20 Information Sources
FILTER BY SOURCE
ALL SOURCES
EPA DSSTox
EPA Integrated Risk Information System (IRIS)
EPA Pesticide Ecotoxicity Database
EPA Regional Screening Levels for Chemical Contaminants at Superfund Sites
EPA Substance Registry Services
EU Pesticides Database
European Chemicals Agency (ECHA)
FDA Global Substance Registration System (GSRS)
GHS Classification (UNECE)
Haz-Map, Information on Hazardous Chemicals and Occupational Diseases
Hazardous Substances Data Bank (HSDB)
Human Metabolome Database (HMDB)
ILO-WHO International Chemical Safety Cards (ICSCs)
Japan Chemical Substance Dictionary (Nikkaji)


National Library of Medicine
PubChem
About
Docs
Submit
Contact
Search PubChem
COMPOUND SUMMARY > FROM HAZARDOUS SUBSTANCES DATA BANK (HSDB)
Carbofuran
PubChem CID 2566
Cite
Download
CONTENTS
Title and Summary
1 Names and Identifiers
2 Chemical and Physical Properties
3 Spectral Information
4 Pharmacology and Biochemistry
5 Use and Manufacturing
6 Identification
7 Safety and Hazards
8 Toxicity
9 Information Sources
1 Names and Identifiers
1.1 Other Identifiers
1.1.1 CAS
1563-66-2
Hazardous Substances Data Bank (HSDB)

ในรูปสุดท้ายนี้ทางขวามือจะปรากฏชื่อหัวข้อหลักของข้อมูล carbofuran ให้เลือกกดเข้าไปดูในรายละเอียดที่ต้องการสืบค้นได้ตามต้องการ เช่น สูตรโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุล ความหมายของสาร สูตรโครงสร้างที่เป็น 2 มิติ ชื่อ IUPAC คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ ข้อมูล Mass Spectrometry ของ GC-MS, MS-MS เภสัชวิทยาและชีวเคมี การนำไปใช้ ข้อมูลความเป็นพิษในคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม อาการเกิดพิษ หนทางการได้รับสารพิษยาต้านพิษและการรักษาฉุกเฉิน ค่า LD_{50} และ LC_{50} ในสัตว์ชนิดต่าง ๆ วิธีตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ความปลอดภัย การปฐมพยาบาลเบื้องต้น ฯลฯ แต่ละหัวข้อจะมีรายละเอียดของข้อมูล ผู้ใช้งาน HSDB สามารถเลือกและนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ในการทำงานด้านพิษวิทยาได้ เช่น ในฐานข้อมูลกล่าวเกี่ยวกับความสามารถในการละลายของ carbofuran ไว้ว่า “Highly soluble in N-methyl-2-pyrrolidone, dimethylformamide, dimethyl sulfoxide, acetone, acetonitrile, methylene chloride, cyclohexanone, benzene, xylene” ซึ่งสามารถนำข้อมูลนี้ไปใช้ประโยชน์ในห้องปฏิบัติการด้านพิษวิทยา เช่น พิจารณาเลือกตัวทำละลายอินทรีย์เหล่านี้ให้เหมาะสมกับงานศึกษาวิจัย หรือการเลือกใช้เป็นตัวทำละลายเพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐาน carbofuran เป็นต้น ส่วนในเรื่องของความเป็นพิษของ carbofuran จากฐานข้อมูลกล่าวไว้ว่า carbofuran มีค่า LD_{50} (oral, rat) เท่ากับ 5 mg/kg บ่งชี้ว่าสารนี้มีความเป็นพิษร้ายแรง (Extremely toxic) เมื่อมนุษย์และสัตว์ได้รับเข้าสู่ร่างกายทำให้เกิดอันตรายต่อชีวิตได้ เป็นต้น

บรรณานุกรม

เกริก รัตอาภา, กิจชัย ศิริวัฒน์, & วิไลวรรณ ตันจ้อย. (2531). *คู่มือการตรวจสารพิษอย่างง่าย* (หน้า 18–58). กองพิษวิทยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (2545). *คู่มือวิธีวิเคราะห์ทางพิษวิทยา* (เอกสารประกอบการฝึกอบรมด้านพิษวิทยา วันที่ 28–30 สิงหาคม 2545, หน้า 6–14). กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

เนาวรัตน์ สุธัมนาถพงษ์. (2559). *พิษวิทยาทางการสัตวแพทย์* (พิมพ์ครั้งที่ 1). สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มาลินี ลิ้มโภคา. (2523). *พิษวิทยาและการวินิจฉัยโรคทางสัตวแพทย์* (พิมพ์ครั้งที่ 1). โรงพิมพ์จรัลสนิทวงศ์.

มาลี ธีรานุสนธิ์, & อนุสรณ์ อยู่เย็น. (2556). *คู่มือวิธีตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นพิษวิทยาทางสัตวแพทย์*. กลุ่มชีวเคมีและพิษวิทยา, สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ, กรมปศุสัตว์, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

วิวัฒน์ เอกบูรณะวัฒน์. (2556). หลักการพื้นฐานทางด้านพิษวิทยา. มูลนิธิสัมมาอาชีวะ – ฐานข้อมูล OCCTOX. https://www.summacheeva.org/occtox/basic

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์. (2567, 5 กันยายน). *การเก็บตัวอย่างสัตว์ป่วย ซาก และอวัยวะ*. กรมปศุสัตว์. https://niah.dld.go.th/webnew/images/animal_diseases/INT-AHM-103_SpecimenManual_67-09-05.pdf

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ, กรมปศุสัตว์. (2568, กุมภาพันธ์–มีนาคม). พิษจากสารกำจัดหอยชนิดเมทัลดีไฮด์. *จดหมายข่าวสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ, 24*(3), 1–3. https://niah.dld.go.th/webnew/knowledge/newsletter_niah/2568/newsletter2568v3

สนทนา มิมะพันธุ์, อนุสรณ์ อยู่เย็น, เบญจมา เมธารัตน์อนุกูล, & สาวิตรี อินทร์อุดม. (2559). การตรวจหาปริมาณไซยาไนด์ในเลือดโคด้วยวิธี Microdiffusion spectrophotometry. *สัตวแพทย์มหานครสาร, 11*(2), 125–139.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. (2566). *สรุปข้อมูลการนำเข้า–ส่งออกวัตถุอันตรายทางการเกษตร พ.ศ. 2561-2565*. กรมวิชาการเกษตร. สืบค้นเมื่อ 4 กุมภาพันธ์ 2567, จาก https://www.doa.go.th/ard/?page_id=386

อนุสรณ์ อยู่เย็น. (2562, เมษายน–พฤษภาคม). พิษจากไซยาไนด์ในใบยางพารา. *จดหมายข่าวสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ, 18*(4), 1–4. สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ, กรมปศุสัตว์.

อนุสรณ์ อยู่เย็น, & ณัฐกร ราชบุตร. (2567). การตรวจเอกลักษณ์และหาปริมาณสารกำจัดวัชพืชชนิด atrazine และ diuron ในอาหารในกระเพาะด้วยวิธี thin layer chromatography และ UV-Vis spectrophotometry.*สัตวแพทยสาร, 75*(2), 1–15.

อารี สุขประเสริฐ, พิมพรรณ เกิดอุดม, & วิไลลักษณ์ อิ่มอุดม. (2520). *คู่มือปฏิบัติการวิชาพิษวิทยา* (หน้า 46–56). คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Akashe, V. B., Gholve, V. M., & Kamble, G. S. (2018). A review on classification of pesticide and its adverse effect on environment. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 7*(5), 2509–2518. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.705.291

Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International, 86*(2), 412-431. https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412

Ansari, I., Singh, A., & Kumar, A. (2024). Introduction and sources of molluscicides. *Medicinal and Analytical Chemistry International Journal, 8*(1), Article 000195. https://doi.org/10.23880/macij-16000195

AOAC International. (1999). *AOAC official method 999.07: Determination of aflatoxins in foods by fluorometry*. AOAC International.

Baselt, R. C. (2008). *Disposition of toxic drugs and chemicals in man* (8th ed.). Biomedical Publications.

Busairi, N., & Syahir, A. (2018). Recent advances in mercury detection: Towards enabling a sensitive and rapid point-of-check measurement. *Journal of Toxicology and Risk Assessment, 4*(1), Article 010. https://doi.org/10.23937/2572-4061.1510010

Cai, L. (2014). Thin layer chromatography. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques, 6,* 3.1–3.18 https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0603s08

California Environmental Protection Agency, Office of Environmental Health Hazard Assessment. (2002, September). *Evidence on the developmental and reproductive toxicity of diuron* [Hazard identification document; Draft]. Author. https://oehha.ca.gov/sites/default/files/media/downloads/crnr diuronhid.pdf

Clarke, E. G. C. (2004). *Clarke’s analysis of drugs and poisons*. Pharmaceutical Press.

College of Agricultural Sciences, Oregon State University, et al. (n.d.). *Pesticide Information Profiles (PIPs)*. EXTOXNET—the Extension Toxicology Network. Retrieved May 24, 2025, from https://extoxnet. orst. edu/pips/ghindex.htm

College of Agricultural Sciences, Oregon State University, et al. (1996, June). *Paraquat*. In *Pesticide Information Profiles (PIPs)*. EXTOXNET—the Extension Toxicology Network. Retrieved May 24, 2025, from https://extoxnet.orst.edu/pips/paraquat.htm

Dalefield, R. (2017). *Veterinary toxicology for Australia and New Zealand*. Elsevier.

Dewi, K. R., Ismayati, M., Solihat, N. N., Yuliana, N. D., Kusnandar, F., Riantana, H., Heryani, H., Halim, A., Acter, T., Uddin, N., & Kim, S. (2023). Advances and key considerations of liquid chromatography–mass spectrometry for porcine authentication in halal analysis. *Journal of Analytical Science and Technology, 14*(1), Article 13. https://doi.org/10.1186/s40543-023-00376-3

Dorne, J. L. C. M., Fernández-Cruz, M. L., Bertelsen, U., Renshaw, D. W., Peltonen, K., Anadon, A., Feil, A., Sanders, P., Wester, P., & Fink-Gremmels, J. (2011). Risk assessment of veterinary medicines: The need for a holistic approach. *Food and Chemical Toxicology, 49*(9), 2117-2121. https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.038

Eason, C. T., & Wickstrom, M. (2001). *Vertebrate pesticide toxicology manual (poisons)* (Department of Conservation Technical Series 23). Department of Conservation.

Ellenhorn, M. J. (1997). *Ellenhorn's medical toxicology: Diagnosis and treatment of human poisoning* Lippincott Williams & Wilkins.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Feather-Stone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology, 7*(2), 88–95. https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9

Extension Toxicology Network (EXTOXNET). (1996). *Pesticide information profile: Warfarin*. Oregon State University. Retrieved September 1, 2025, from http://extoxnet.orst.edu/pips/warfarin.htm

European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General. (2006). *Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed (SANCO/10232/2006, rev. 6).* European Union Reference Laboratories (EURL). https://www.eurl-pesticides.eu/ library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2006_10232.pdf

Flanagan, R. J., Braithwaite, R. A., Brown, S. S., Widdop, B., & de Wolff, F. A. (1995). Basic analytical toxicology. World Health Organization.

Flanagan, R. J., Connally, G., Evans, J. M., & Battershill, J. M. (2007). *Fundamentals of analytical toxicology* John Wiley & Sons.

Gad, S. C., & Sullivan, D. W. (2014). *Clinical and translational toxicology*. Wiley.

Galera, M.M., Vidal, J.L.M., Frenich, A.G. and Vazquez, P.P. 1995. Spectrophotometric Method To Determine Ternary Mixtures of Atrazine, Diuron, and Chlorpyrifos in Water and Soil by a Ratio Spectrum-Zero Crossing Method. J. Am. Oil Chem. Soc. Int. 78(2): 423-430.

García-Reyes, J. F., Hernando, M. D., Molina-Díaz, A., & Fernández-Alba, A. R. (2007). Comprehensive screening of target, non-target and unknown pesticides in food by LC-TOF-MS. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, 26*(3), 225–236. https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.009

Giorgi, M., & Mengozzi, G. (2011). Malicious animal intoxications: Poisoned baits. *Veterinární Medicína, 56*(4), 173–179. https://doi.org/10.17221/3148-VETMED

Gupta, P. K. (2019). *Concepts and applications in veterinary toxicology: An interactive guide*. Springer Nature Switzerland AG. https://doi.org/10.1007/978-3-030-22250-5

Gupta, R. C. (2007). Veterinary toxicology: Basic and clinical principles. Academic Press.

Gupta, R. C. (2011). *Veterinary toxicology: Basic and clinical principles* (2nd ed.). Academic Press.

Gupta, R. C. (Ed.). (2018). *Veterinary toxicology: Basic and clinical principles* (3rd ed.). Academic Press.

Gupta, R. C., & Doss, R. B. (2024, September). *Carbamate toxicosis in animals*. In *MSD Veterinary Manual*. MSD Animal Health. Retrieved from https://www.msdvetmanual.com/toxicology/insecticide and-acaricide-organic-toxicity/carbamate-toxicosis-in-animals?query=carbamates%20toxicity

Gupta, R. C., & Doss, R. B. (2024, September). *Organophosphate toxicosis in animals*. In *MSD Veterinary Manual*. MSD Animal Health. Retrieved from https://www.msdvetmanual.com/toxicology/ insecticide-and-acaricide-organic- toxicity/organophosphate-toxicosis-in-animals

Hodgson, E. (Ed.). (2004). *A textbook of modern toxicology* (3rd ed.). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.

International Agency for Research on Cancer. (1999). *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans (Vol. 73): Some chemicals that cause tumours of the urinary tract in rodents and some other substances (Section: Atrazine).* IARC Press.

Jung, J.-C., & Park, O.-S. (2009). Synthetic approaches and biological activities of 4-hydroxycoumarin derivatives. *Molecules, 14*(11), 4790–4803. https://doi.org/10.3390/molecules14114790

Kazakevich, Y., & LoBrutto, R. (2007). *HPLC for pharmaceutical scientists*. Wiley.

Kesari, R. and Gupta, V.K. 1998. A simple method for the spectrophotometric determination of atrazine using p-aminoacetophenone and its application in environmental and biological samples. Talanta. 47: 1085–1092.

Klaassen, C. D. (Ed.). (2013). *Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons* (8th ed.). McGraw-Hill Education.

Koli, P., Bhardwaj, N. R., & Mahawer, S. K. (2019). Agrochemicals: Harmful and beneficial effects of climate changing scenarios. In P. Singh, V. P. Singh, & S. Singh (Eds.), *Climate change and agricultural ecosystems* (pp. 65–94). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816483-9.00004-9

McNair, H. M., & Miller, J. M. (2009). *Basic gas chromatography* (2nd ed.). John Wiley & Sons.

Mdeni, N. L., Adeniji, A. O., Okoh, A. I., & Okoh, O. O. (2022). Analytical evaluation of carbamate and organophosphate pesticides in human and environmental matrices: A review. *Molecules, 27*(3), 618. https://doi.org/10.3390/molecules27030618

Moffat, A. C., Osselton, M. D., & Widdop, B. (Eds.). (2011). *Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material* (4th ed.). Pharmaceutical Press.

Nagy, A. L., Bolfa, P., Mihaiu, M., Catoi, C., Oros, A., Taulescu, M., & Tabaran, F. (2015). Intentional fatal metallic phosphide poisoning in a dog: A case report. *BMC Veterinary Research, 11,* Article 158. https://doi.org/10.1186/s12917-015-0495-5

Nichols, L. (2025). Thin layer chromatography (TLC). In *Organic chemistry lab techniques* (Butte College ed., sec. 2.3). LibreTexts. Retrieved May 24, 2025, from https://chem.libretexts.org/@go/page/182324

National Center for Biotechnology Information. (2025). *Diazinon*. In *PubChem* [Database]. National Library of Medicine. Retrieved August 21, 2025, from https://pubchem.ncbi.nlm.nih,gov/compound/Diazinon

National Center for Biotechnology Information. (n.d.). *PubChem* [Database]. National Library of Medicine. Retrieved May 24, 2025, from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/

National Library of Medicine. (n.d.). *Mercury*. In *PubChem* [Database]. Retrieved May 24, 2025, from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23931

Oehme, F. W. (1970). The development of toxicology as a veterinary discipline in the United States. *Clinical Toxicology, 3*(2), 211–220. https://doi.org/10.3109/15563657008990085

Pereira, A. K. S., Silva, L. F., Barbosa, G. A. F., Miranda, T. G., Sousa, R. R., Sarmento, R. A., Souza, N. L. G. D., Pereira, D. H., & Cavallini, G. S. (2023). The socio-environmental and human health problems related to the use of pesticides and the use of advanced oxidative processes for their degradation: Brazil. *Water, 15*(8), 1608. https://doi.org/10.3390/w15081608

Plumlee, K. H. (2004). *Clinical veterinary toxicology*. Mosby.

Poole, C. F. (2012). *The essence of chromatography*. Elsevier.

Poppenga, R. H., & Spoo, W. (2009). Veterinary toxicology. In P. Wexler, P. J. Hakkinen, A. Mohapatra, & S. G. Gilbert (Eds.), *Information resources in toxicology* (4th ed., pp. 515–522). Academic Press.

Proudfoot, A. T. (2009). Aluminium and zinc phosphide poisoning. *Clinical Toxicology, 47*(2), 89–100. https://doi.org/10.1080/15563650802520675

Ravula, A. R., & Yenugu, S. (2021). Pyrethroid based pesticides – chemical and biological aspects. *Critical Reviews in Toxicology, 51*(4), 297–329. https://doi.org/10.1080/10408444.2021.1879007

Roder, J. D. (2001). *Veterinary toxicology: The practical veterinarian*. Butterworth–Heinemann. ISBN 0-7506-7240-4

Sherma, J., & Fried, B. (2003). *Handbook of thin-layer chromatography* (3rd ed.). CRC Press.

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2007). *Principles of instrumental analysis* (6th ed.). Brooks Cole.

Smithcors, J. F. (1957). *Evolution of the veterinary art*. Veterinary Medicine Publishing.

Stahlheim, O. H. V. (1994). *The winning of animal health: 100 years of veterinary medicine*. Iowa State University Press.

Stefanello, F. M., Oliveira, J. L. M., Martins, M. L., Azevedo, A. G. A., Costa, N. S., Mores, R., Costa, L. B., da Silva, A. S., & Tonin, A. A. (2022). Screening and confirmatory toxicological analysis in veterinary forensic toxicology. *Toxicology Reports, 9,* 1910–1920. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.10.022

Swabe, J. (1999). *Animal, disease, and human society: Human-animal relations and the rise of veterinary medicine*. Routledge.

Tiwari, R. M., & Sinha, M. (2010). *Veterinary toxicology*. Oxford Book Company.

Touchstone, J. C. (1992). *Practice of thin layer chromatography* (2nd ed.). Wiley-Interscience.

Wilkinson, L. (2005). *Animals and disease: An introduction to the history of comparative medicine*. Cambridge University Press.

Wilsdorf, G., & Graf, C. (1998). Historical review of development of veterinary toxicology in Berlin from 1790–1945 [In German]. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 111*(1), 21–26.

Yamane, H., Konno, K., Sabelis, M., Takabayashi, J., Sassa, T., & Oikawa, H. (2010). Chemical defence and toxins of plants. In L. Mander & H.-W. Lui (Eds.), *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology* (Vol. 4, pp. 339–385). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00099-X