การพัฒนาชุดทดสอบแบบรวดเร็ว สำหรับตรวจหาสารไธโอไซยาเนตในน้ำนมดิบ

วงศ์อนันต์ ณรงค์วาณิชการ[1*] อัจฉรา ธีระพันธ์[1]

[1] กลุ่มชีวเคมีและพิษวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

*ผู้เขียนและรับผิดชอบบทความ 02-579-8908 -14, e-mail: rhchu@hotmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการพัฒนาชุดทดสอบแบบรวดเร็ว สำหรับตรวจหาสารไธโอไซยาเนตในน้ำนมดิบ โดยตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมดิบด้วยสารละลาย 20% trichloroacetic acid แล้วแยกเอาส่วนใส ที่มีสารไธโอไซยาเนต มาทำปฏิกิริยาออกซิไดซ์ในระบบปิด ด้วยสารละลายโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนตและกรดซัลฟูริก ได้ก๊าซไฮโดรไซยาไนด์ไปทำปฏิกิริยาเปลี่ยนสีเหลืองของ picric acid ที่ชุบติดกับกระดาษกรองกลายเป็นสารประกอบสีน้ำตาล isopurpuric acid ซึ่งสีจะเข้มขึ้นเมื่อปริมาณของสารไธโอไซยาเนตเพิ่มขึ้น ผลการศึกษานี้สามารถพบสีน้ำตาลของสาร isopurpuric acid เกิดขึ้นบนกระดาษ picrate ในหลอดทดสอบ ที่มีสารไธโอไซยาเนต ปริมาณต่ำสุดเพียง 1 ppm ที่อุณหภูมิ 75^{0}C ภายในเวลา 5 นาทีเท่านั้น หลังจากปฏิกิริยาดำเนินต่อไปจนครบหนึ่งชั่วโมง นำกระดาษทดสอบมาแช่น้ำ เพื่อละลาย isopurpuric acid แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดความเข้มของสี ด้วยวิธีวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ค่าที่วัดได้ใช้คำนวณหาปริมาณของสารไธโอไซยาเนตในตัวอย่างได้ ซึ่งชุดทดสอบแบบรวดเร็วที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ มีความไวและความแม่นยำ ที่สามารถตรวจหาสารไธโอไซยาเนตในน้ำนมดิบได้ตั้งแต่ 1 – 10 ppm

คำสำคัญ : ชุดทดสอบแบบรวดเร็ว ไธโอไซยาเนต ไซยาไนด์ น้ำนมดิบ กระดาษ picrate picric acid

บทนำ

ไฮโดรไซยาไนด์ (hydrocyanide; HCN) หรือ prussic acid เป็นสารพิษร้ายแรงต่อคนและสัตว์ ในธรรมชาติจะพบอนุมูลไซยาไนด์ (CN^-) อยู่สองชนิด ชนิดที่หนึ่ง รวมตัวกับสารอนินทรีย์ เช่น KCN NaCN AgCN เป็นต้น และชนิดที่สอง พบรวมกับสารอินทรีย์เป็นสารพิษประเภทไซยาโนจีนิก กลูโคไซด์ที่พืชบางชนิดสามารถสร้างขึ้นได้ เช่น มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) เผือก (*Alocasia macrorrhizos*) หญ้าซอร์กัม (*Sorghum vulgare*) ไผ่ (*Bambusa arundinacea* Wild) แอปเปิ้ล (*Malus* spp.) เป็นต้น (Francisco and Pinotti, 2000; Haque and Bradbury, 2002; Okafor, 2004)พืชเหล่านี้เมื่อถูกทำลายจากการตัด ปอก เคี้ยว ย่อย สารไซยาโนจีนิก กลูโคไซด์ที่อยู่ภายในเซล จะถูกทำลายและปล่อยสารไฮโดรไซยาไนด์ออกมา เมื่อสัตว์กินพืชหรืออาหารที่มีสารเหล่านี้ ปนเปื้อนอยู่เข้าไปประมาณ 80% ของอนุมูลไซยาไนด์ทั้งหมด จะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิต แล้วกระจายไปยังอวัยวะต่างๆทั่วร่างกาย (Semionova and Fishbien, 2004) หลังจากนั้นพิษของสารดังกล่าวจะลดลง เพราะตับจะหลั่งเอนไซม์โรดาเนส (rhodanese) ไปเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของอนุมูลไซยาไนด์กับหมู่ไธโอซัลเฟต (thiosulfate; $S_2O_3^-$) กลายเป็นสารไธโอไซยาเนต (thiocyanate; SCN^-) (Bradbury et al.,1988; Montgomery,1980) ดังสมการ

$$CN^- + S_2O_3^- \xrightarrow{\text{Rhodanese}} SCN^- + SO_3^-$$

ซึ่งสารไธโอไซยาเนตนี้สามารถตรวจพบได้ในซีรัม พลาสมา และสารคัดหลั่งต่างๆ เช่น น้ำนม น้ำตา น้ำลาย และปัสสาวะ (Blanco and Gorniak, 2003; Boxer and Rickards, 1952; Lundquist et al., 1979; Haque and Bradbury, 1999; Vesey et al., 1999)

Blanco และ Gorniak (2003) ได้ศึกษาผลกระทบของสารไธโอไซยาเนตในน้ำนม โดยเปรียบเทียบลูกแกะที่กินน้ำนมจากกลุ่มแม่แกะที่ได้รับอาหารปนเปื้อนไซยาไนด์ กับลูกแกะที่เกิดจากกลุ่มแม่แกะที่ได้รับอาหารปกติ เป็นเวลา 90 วันตั้งแต่หลังคลอด พบว่าไม่มีความแตกต่างด้านอัตราการเจริญเติบโต แต่พบรอยโรคที่สมอง ไธรอยด์ ตับ และไต ซึ่งสรุปได้ว่าสารไธโอไซยาเนตที่อยู่ในร่างกายแม่สามารถผ่านทางน้ำนม และเป็นพิษต่อลูกหากได้รับปริมาณมากๆ ติดต่อกันเป็นเวลานาน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าผู้บริโภคที่ดื่มน้ำนมที่มีปริมาณสารไธโอไซยาเนตเท่ากับ 60 – 80 ppm จะป่วยเป็นโรคคอพอกได้ด้วย (Banerjee et al., 1997) ดังนั้นการตรวจพบสารไธโอไซยาเนตในน้ำนมนั้น นอกจากสามารถบ่งชี้ว่าสัตว์ได้รับสารไซยาไนด์แล้ว ยังช่วยป้องกันผู้บริโภคอีกทางหนึ่งด้วย ซึ่งวิธีการตรวจหาสารไธโอไซยาเนตนั้นมีหลายวิธีได้แก่ การใช้ gas chromatography mass spectrometry technique (GC-MS) (Tsuge and Seto, 2002) การใช้ high performance liquid chromatography (HPLC) (Chen et al., 1996) และการใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ตรวจวัดความเข้มของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างสารไธโอไซยาเนตกับธาตุต่างๆ หลายชนิด เช่น ไอออนของเหล็ก (Butts et al., 1974) โบรไมด์

สารหนู และเบนซิดีน (Aldridge, 1944; 1945; Bark and Higson, 1964; Pettigrew and Fell, 1973) แต่วิธีดังกล่าวข้างต้นมีข้อจำกัดที่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง มีวิธีใช้ที่ยุ่งยากซับซ้อน ไม่สามารถนำออกไปใช้ตรวจนอกสถานที่ได้ และมีการใช้สารพิษที่จำเป็นต้องทำการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเท่านั้น นอกจากนี้ผู้ทำการวิเคราะห์จะต้องมีความรู้และความชำนาญด้วย

Hlasiwetz (1859) (อ้างถึงโดย Williams and Edwards, 1980) ค้นพบการเกิดปฏิกิริยาเคมีระหว่าง cyanide และ picric acid (2, 4, 6-trinitrophenol) ได้สารประกอบสีน้ำตาล 2, 6-dinitro-5-hydroxy-4-hydroxylamino-1, 3-dicyanobenzene หรือ Isopurpuric acid ($C_8H_3O_6N_5$) และได้มีการใช้ปฏิกิริยาเคมีดังกล่าว ไปตรวจหาสารไธโอไซยาเนตในซีรัม หรือปัสสาวะ ของผู้ที่สูบบุหรี่ หรือบริโภคมันสำปะหลัง โดยทำการออกซิไดซ์สารไธโอไซยาเนตในตัวอย่างด้วยสารละลายโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนตและกรดซัลฟูริกในระบบปิด ซึ่งจะได้ก๊าซไฮโดรไซยาไนด์ (Haque and Bradbury, 1999) ดังสมการ

$$6MnO_4^- + 5SCN^- + 13H^+ = 6Mn_2^+ + 5HCN + 5SO_4^{2-} + 4H_2O$$

หลังจากนั้นก๊าซไฮโดรไซยาไนด์ (HCN) จะทำปฏิกิริยากับสารละลาย Picric acid ที่ชุบติดกับกระดาษกรอง (Haque and Bradbury, 1999; Lundquist et al., 1979; Okafor, 2004; Pettigrew et al., 1972; Vesey et al., 1999) ซึ่งความเร็วของการเกิดสีน้ำตาลของ isopurpuric acid นั้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับปริมาณของ picric acid แล้ว ยังขึ้นอยู่กับอุณหภูมิขณะเกิดปฏิกิริยาด้วย เช่น ที่อุณหภูมิ 30°C และ 20°C จะใช้เวลานาน 5 และ 22 ชั่วโมง ตามลำดับ (Williams and Edwards, 1980)

ในการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์ เพื่อพัฒนาชุดทดสอบแบบรวดเร็ว สำหรับตรวจหาสารไธโอไซยาเนต ในน้ำนมดิบโค ผลจากการศึกษานี้จะทราบวิธีสกัดสารไธโอไซยาเนต จากตัวอย่างน้ำนมดิบ และการใช้ชุดทดสอบที่ให้ผลรวดเร็ว มีวิธีใช้ที่ง่าย สะดวก ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยากซับซ้อน และสามารถปรับใช้ได้ทั้งในและนอกห้องปฏิบัติการ ซึ่งประโยชน์ที่ได้สามารถนำไปตรวจหาสารไธโอไซยาเนตในน้ำนมสัตว์ป่วย ที่สงสัยว่าได้รับสารพิษไซยาไนด์เข้าไป และเป็นการป้องกันผู้บริโภคอีกทางหนึ่งด้วย

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สารละลาย

1. สารละลายมาตรฐานที่ใช้

1.1 $KMnO_4$ 0.1 M

1.2 H_2SO_4 1 M

1.3 20% Trichloroacetic acid (TCA)

1.4 $Fe(NO_3)_3$ ใน 2 M HNO_3

2. สารละลายที่เตรียม

2.1 สารละลายโซเดียมไธโอไซยาเนต (NaSCN)

เตรียมสารละลายโซเดียมไธโอไซยาเนตในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นของไธโอไซยาเนตเท่ากับ 100 ppm จากนั้นเจือจางสารละลายดังกล่าวเป็น 1, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 20, 30, 50 และ 100 ppm

2.2 สารละลาย picric acid และกระดาษ picrate

เตรียม 0.5% picric acid ใน 2.5% (w/v) สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 100 มล. จะได้สารละลายสีเหลือง จากนั้นนำกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 1 ขนาด 3 × 1 ซม. ชุบสารละลายดังกล่าวให้ชุ่มแล้วตากให้แห้ง ห่อให้พ้นแสงแล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น (Bradbury et al.,1999)

วิธีการตรวจวิเคราะห์

1. การหาปริมาณสารไธโอไซยาเนตในสารละลายโซเดียมไธโอไซยาเนต

1.1 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ตามวิธีของ Cosby และ Sumner (1945)

ดูดสารละลายโซเดียมไธโอไซยาเนตที่เตรียมไว้ทุกความเข้มข้น และน้ำกลั่นซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมผลลบอย่างละ 1.5 มล. ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย $Fe(NO_3)_3$ ปริมาตรเท่ากันลงไปผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 460 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ DU-64 ยี่ห้อ Beckman

1.2 การวิเคราะห์ด้วยกระดาษ picrate

ดูดสารละลายโซเดียมไธโอไซยาเนต ทุกความเข้มข้นปริมาณ 1 มล. ใส่หลอดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. ยาว 7 ซม. จำนวน 5 ชุดทดลอง ซึ่งแต่ละชุดมีหลอดที่เติมน้ำกลั่นเป็นหลอดควบคุมผลลบ จากนั้นเติม 0.1 M $KMnO_4$ และ 1 M H_2SO_4 อย่างละ 0.1 มล. ลงไปในทุกหลอดผสมให้เข้ากัน แล้วรีบนำจุกยางที่มีกระดาษ picrate 1 แผ่นติดอยู่ ปิดหลอดทันที (Haque and Bradbury, 1999) โดยนำชุดที่หนึ่งวางในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 37°C สังเกตการเปลี่ยนแปลงทุกชั่วโมงนาน 16 ชั่วโมง และที่เหลืออีกสี่ชุดนำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 75°C สังเกตการเปลี่ยนแปลงของกระดาษ picrate ทุกๆ 5 นาที ในชั่วโมงแรกของการทดลองและบันทึกเวลาที่กระดาษ picrate เริ่มเปลี่ยนสี แล้วปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไปจนครบ 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 5 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง จากนั้นนำกระดาษ picrate ไปแช่ในน้ำกลั่น 5 มล. นาน 30 นาที แล้ววัดการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

2. การหาปริมาณสารไธโอไซยาเนตในน้ำนมดิบ

2.1 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

เติมสารละลายโซเดียมไธโอไซยาเนตลงในน้ำนมดิบ ให้มีความเข้มข้นของไธโอไซยาเนตเพิ่มขึ้น 1, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 20, 30, 50 และ 100 ppm แล้วทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยการเติมสารละลาย 20% trichloroacetic acid 2 มล. ลงในน้ำนมดังกล่าว 4 มล. ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จึงกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 40 จากนั้นดูดส่วนใสที่กรองได้ไปตรวจหาปริมาณไธโอไซยาเนตตามวิธีการในข้อ 1.1 โดยมีส่วนใสจากน้ำนมดิบที่ไม่ได้เติมสารละลายโซเดียมไธโอไซยาเนตเป็นตัวควบคุมเพื่อตรวจหาความเข้มข้นเริ่มต้นของไธโอไซยาเนตในน้ำนมดังกล่าว

2.2 การวิเคราะห์ด้วยกระดาษ picrate

ดูดส่วนใสที่กรองได้จากตัวอย่างน้ำนมในข้อ 2.1 มาทำการทดลองตามวิธีในข้อ 1.2 ที่มีผลการทดลองที่ดีที่สุดเพียงหนึ่งการทดลอง

ผลการทดลอง

1. การหาปริมาณสารไธโอไซยาเนตในสารละลายโซเดียมไธโอไซยาเนตด้วยวิธีวัดการดูดกลืนแสง

เมื่อเติมสารละลาย $Fe(NO_3)_3$ ลงไปในตัวอย่างสารละลายโซเดียมไธโอไซยาเนต สีของสารละลายที่ได้จะเปลี่ยนจากใสไม่มีสีกลายเป็นสีน้ำตาลอ่อน ซึ่งสีสารละลายและค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมไธโอไซยาเนตเพิ่มขึ้น กล่าวคือมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของโซเดียมไธโอไซยาเนต ดังรูปที่ 1 โดยมีค่าความสัมพันธ์ (R^2) = 0.9979 และสมการสำหรับหาปริมาณของสารไธโอไซยาเนตในสารละลายโซเดียมไธโอไซยาเนตคือ

ปริมาณของสารไธโอไซยาเนต = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ x 27

2. การใช้กระดาษ picrate ตรวจวัดปริมาณสารไธโอไซยาเนต

2.1 ผลของอุณหภูมิ

เมื่อทำการทดลองที่อุณหภูมิ 37°C ภายในเวลา 3 ชั่วโมง ไม่พบการเปลี่ยนสีของกระดาษ picrate เนื่องจากปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างช้าๆ หลังจากนั้นจะเริ่มพบสีน้ำตาลจากหลอดที่มีปริมาณสารไธโอไซยาเนตมากก่อน และพบได้ในทุกตัวอย่างเมื่อครบ 16 ชั่วโมง เมื่อเร่งปฏิกิริยาด้วยการนำหลอดตัวอย่างทั้งสองชนิดไปแช่ในอ่างน้ำร้อน พบว่าที่อุณหภูมิ 75°C สีเหลืองของ picric acid เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลได้ในทุกตัวอย่างสารละลาย ที่มีปริมาณสารไธโอไซยาเนตต่ำสุดตั้งแต่ 1 ppm ขึ้นไปภายในเวลาเพียง 5 นาที

เท่านั้น จากการสังเกตพบว่าหลังจากปฏิกิริยาผ่านไป 1 ชั่วโมง ความเข้มของสีน้ำตาลบนกระดาษ picrate ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

2.2 ผลของเวลา

เมื่อนำกระดาษสีน้ำตาลจากทุกการทดลองที่อุณหภูมิ 37°C และ 75°C ไปแช่ในน้ำกลั่นเพื่อวัดความเข้มสีของสารละลาย และนำค่าที่ได้มาหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของโซเดียมไธโอไซยาเนต พบว่าเวลาไม่มีผลต่อการทำปฏิกิริยา เมื่อตัวอย่างมีปริมาณสารโซเดียมไธโอไซยาเนตตั้งแต่ 1 - 10 ppm แต่ที่ 10 ppm ขึ้นไป ค่าที่ได้มีแนวโน้มเข้าใกล้ค่าคงที่ (รูปที่ 2) ดังนั้นจึงใช้วิธีทดลองที่อุณหภูมิ 75°C ในเวลา 1 ชั่วโมง สำหรับการตรวจหาปริมาณสารไธโอไซยาเนตในน้ำนมดิบในการทดลองต่อไป

3. การหาปริมาณสารไธโอไซยาเนตในน้ำนมดิบ

3.1 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

เมื่อใช้ตัวอย่างสารละลายที่กรองได้จากน้ำนมดิบมาทำการทดลอง จะได้ผลเช่นเดียวกับสารละลายโซเดียมไธโอไซยาเนต โดยมีความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารไธโอไซยาเนตในน้ำนม (R^2) = 0.9887 (ดังรูปที่ 1) และปริมาณของสารไธโอไซยาเนตในน้ำนมดิบจะมีความสัมพันธ์ดังสมการ

ปริมาณของสารไธโอไซยาเนต = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ x 36.4

3.2 การใช้กระดาษ picrate ตรวจวัดปริมาณสารไธโอไซยาเนต

เมื่อเติมสารละลายโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนตในสภาวะที่เป็นกรดลงไป พบว่าสีม่วงที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนเป็นใสไม่มีสีอย่างรวดเร็ว และที่อุณหภูมิ 75°C เวลา 1 ชั่วโมง สีเหลืองของกระดาษ picrate เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลภายในเวลา 5 นาทีเช่นกัน ความสัมพันธ์ของสารละลายสีน้ำตาลแดงกับสารสกัดน้ำนมดิบที่มีปริมาณสารไธโอไซยาเนต 1 – 10 ppm (R^2) = 0.9233 (ดังรูปที่ 4) ดังสมการ

ปริมาณของสารไธโอไซยาเนต = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ x 18.8

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการตรวจหาสารไธโอไซยาเนตในตัวอย่างสองชนิด ด้วยวิธีการวัดปริมาณไธโอไซยาเนตโดยตรงจากความเข้มของสีที่เกิดจากปฏิกิริยากับไอออนเหล็ก เปรียบเทียบกับการใช้กระดาษ picrate ซึ่งเป็นวิธีอ้อม จากการทดลองในสารละลายโซเดียมไธโอไซยาเนตและสารสกัดจาก

น้ำนมพบว่า เมื่อเติมสารละลายโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนตลงไปในสารสกัดจากน้ำนมแล้ว สีม่วงจะจางหายไปอย่างรวดเร็ว แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในสารละลายโซเดียมไธโอไซยาเนต ซึ่ง Haque และ Bradbury (1999) รายงานว่าพบผลการทดลองเช่นนี้ได้ในตัวอย่างปัสสาวะ และสรุปว่าเกิดจากสารยับยั้งปฏิกิริยาบางชนิด ซึ่งมีผลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารสกัดจากน้ำนมมีค่าน้อยกว่าสารละลายโซเดียมไธโอไซยาเนต ดังแสดงในรูปที่ 1 อย่างไรก็ตาม ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากทั้งสองตัวอย่างจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของไธโอไซยาเนต

เมื่อใช้กระดาษ picrate ในการตรวจหาสารไธโอซายาเนต พบว่าที่อุณหภูมิ 75°C สีเหลืองของ picric acid เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของ isopurporic acid เร็วขึ้น เพราะก๊าซไฮโดรไซยาไนด์ได้รับพลังงานเพิ่มขึ้น จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาเร็วขึ้น อย่างไรก็ตาม ระดับความเข้มของสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นนั้น นอกจากขึ้นอยู่กับปริมาณของก๊าซไฮโดรไซยาไนด์ ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันสารไธโอไซยาเนต ด้วยสารละลายโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนต และกรดซัลฟูริกแล้ว ปริมาณของ picric acid ที่ติดอยู่บนกระดาษกรองก็เป็นปัจจัยสำคัญ จากการทดลองพบว่า ปริมาณ picric acid บนกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 1 ขนาด 3 × 1 ซม. ที่เตรียมขึ้นมีปริมาณพอดีสำหรับตรวจหาสารไธโอไซยาเนตในตัวอย่าง ที่มีปริมาณ 1 – 10 ppm

สรุป

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้พัฒนาชุดทดสอบสำหรับตรวจหาสารไธโอไซยาเนตในน้ำนมดิบที่ให้ผลรวดเร็วภายหลังจากเตรียมตัวอย่างสำหรับทดสอบแล้วในเวลา 5 นาที มีวิธีใช้ที่ง่าย สะดวก ประหยัด ไม่ต้องใช้สารเคมีที่มีพิษและสามารถนำไปใช้ได้ทุกแห่ง อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของชุดทดสอบดังกล่าวคือไม่สามารถยืนยันผลเชิงปริมาณในการตรวจสอบตัวอย่าง ที่มีความเข้มข้นของสารไธโอไซยาเนตมากกว่า10 ppm ได้ ซึ่งปัญหาดังกล่าวเป็นเรื่องที่จะต้องพัฒนาในการศึกษาต่อไป อนึ่ง สาร picric acid ยังเป็นสารอันตรายที่ระเบิดได้ ดังนั้นผู้ทดลองต้องมีความรู้ และระมัดระวังการใช้สารดังกล่าวด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ. ละณี สุขถิ่นไทย ที่ให้คำแนะนำในการศึกษาครั้งนี้ น.สพ. ณชัย ศราธพันธุ์ ที่ให้การอนุเคราะห์สาร picric acid และ น.ส. สุภา โพธิจันทร์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทดลอง

หนังสืออ้างอิง

Aldridge, W. N. 1944. A new method for estimation of micro quantities of cyanide and thiocyanate. Analyst (London) 69: 262-265.

Aldridge, W. N. 1945. The estimation of micro quantities of cyanide and thiocyanate. Analyst (London) 70: 474-476.

Banerjee, K. K., Marimuthu, P., Bhattacharyya, P. and Chatterjee, M. 1997. Effect of thiocyanate ingestion through milk on thyroid hormone homeostasis in women. British J. Nutrition. 78: 679-681.

Bark, L. S. and Higson, H. G. 1964. Investigation of the reagents for the colorimetric determination of small amount of cyanide. Talanta. 11: 471-479, 621-631.

Blanco, B. S. and Gorniak, S. L. 2003. Milk transfer of cyanide and thiocyanate: cyanide exposure by lactation in goats. Vet. Res. 34: 213-220.

Boxer, G. E. and Rickards, J. C. 1952. Determination of thiocyanate in body fluids. Arch. Biochem. Biophys. 39: 292-300.

Bradbury, J. H. and Holloway, WD. 1988. Chemistry of tropical root crops: significance for nutrition and agriculture in the pacific. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia. 102 p.

Bradbury, M. G., Egan, S. V. and Bradbury, J. H. 1999. Picrate paper kit for determination of total cyanogens in cassava roots and all forms of cyanogens in cassava products. J. Sci. Food Agric. 79: 593-601.

Butts, W. C., Kuehneman, M. and Widdowson, G. M. 1974. Automated method for determining serum thiocyanate to distinguish smokers from nonsmokers. Clin. Chem. 20: 1344.

Chen, S. H., Yang, Z. Y., Wu, H. L., Kou, H. S. and Lin, S.J. 1996. Determination of thiocyanate anion by high – performance liquid chromatography with fluorimetric detection. J. Anal. Toxicol. 20: 38-42.

Cosby, E. L. and Sumner, J. B. 1945. Rhodanese. Archives Biochem. 7: 457-460.

Drochioiu, G., Mangalagiu, I. and Tataru, V. 2000. Specific spectrophotometric determination of hydrocyanic acid in the environment. Analyst. 125:939-941.

Egan, S. V., Yeoh, H. H. and Bradbury, J. H. 1998. Simple picrate paper kit for determination of the cyanogenic potential of cassava flour. J. Sci. Food Agric. 76: 39-48.

Francisco, I. A. and Pinotti, M. H. P. 2000. Cyanogenic glycosides in plants. Brazil. Arch. Bio. Tech. 43:487-492.

Haque, M. R. and Bradbury, J. H. 1999. Simple method for determination of thiocyanate in urine. Clin. Chem. 45: 1459-1464.

Haque, M. R. and Bradbury, J. H. 2002.Total cyanide determination of plants and foods using the picrate and acid hydrolysis methods. Food Chem. 77: 107-114.

Lundquist, P., Martensson, J., Sorbo, B. and Ohman, S. 1979. Method for determining thiocyanate in serum and urine. Clin. Chem. 25:678-681.

Montgomery, R. D. 1980. In : Toxic constituents of plant foodstuffs. Liener I.E., ed. New York, Academic Press, USA.p. 143-160.

Okafor, P. N. 2004. Assessment of cyanide overload in cassava consuming populations of Nigeria and the cyanide content of some cassava based foods. African J. Biotech. 3: 358-361.

Pettigrew, A. R. and Fell, G. S. 1972. Simplified colorimetric determination of thiocyanate in biological fluids and its application to investigation of the toxic amblyopias. Clin. Chem. 18: 996-1000.

Pettigrew, A. R. and Fell, G. S. 1973. Microdiffusion method for estimation of cyanide in whole blood and it application to the study of conversion of cyanide to thiocyanate. Clin. Chem. 19: 466-471.

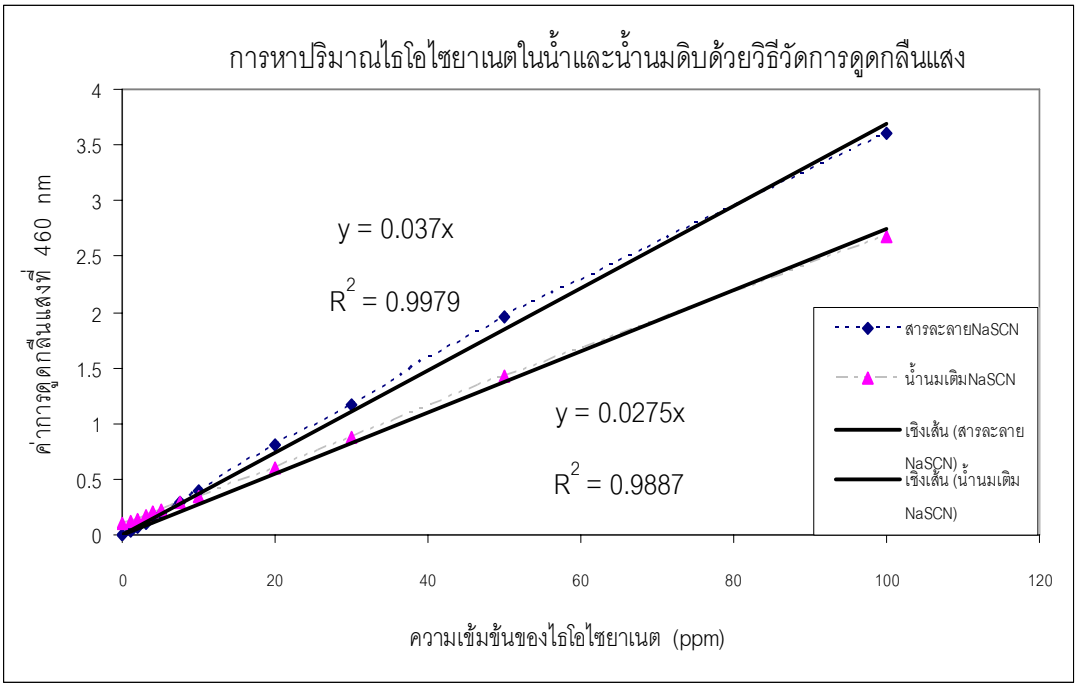
Semionova, F. P. and Fishbien, L. 2004. Hydrogen cyanide and cyanides: Human health aspects. In : Concise International Chemical Assessment Document 61. WHO.

Tsuge, K. and Seto, Y. 2002. Simultaneous detection of anionic toxic substances using GC-MS analysis of pentafluorobenzyl derivatives. Jpn. J. Sci. Tech. Iden. 7: 19-35.

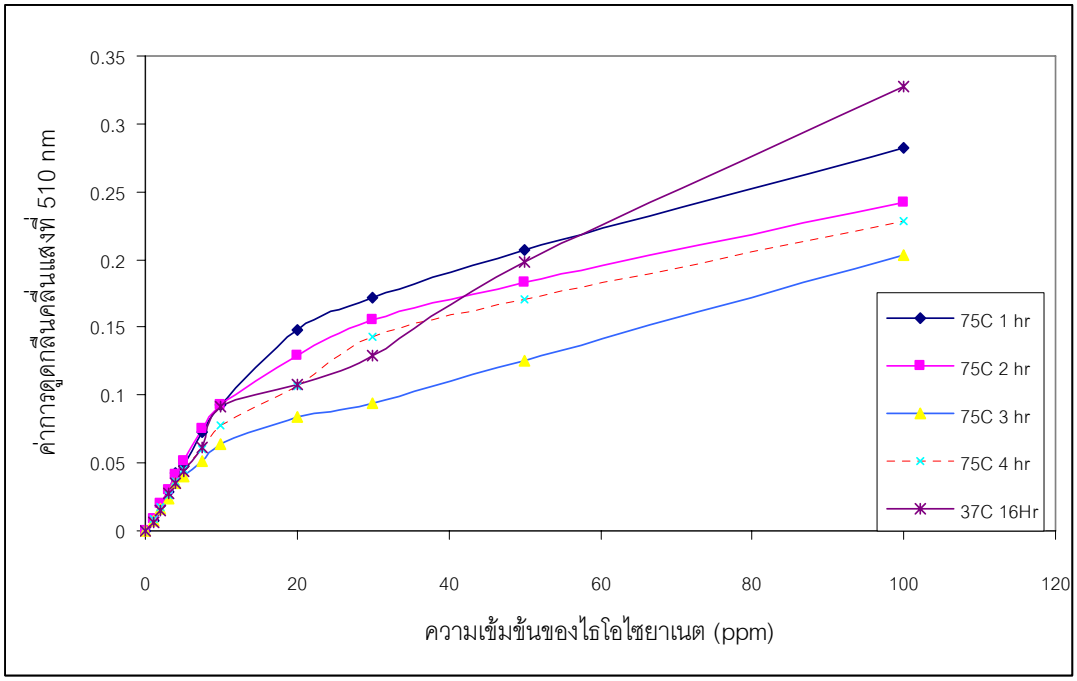
Vesey, C. J., McAllister, H. and Langford, R. M. 1999. A safer method for the measurement of plasma thiocyanate. J. Anal. Toxico. 23:134-135.

Williams, H. J. and Edwards, T. G. 1980. Estimation of cyanide with alkaline picrate. J. Sci. Food Agri. 31: 15-22.

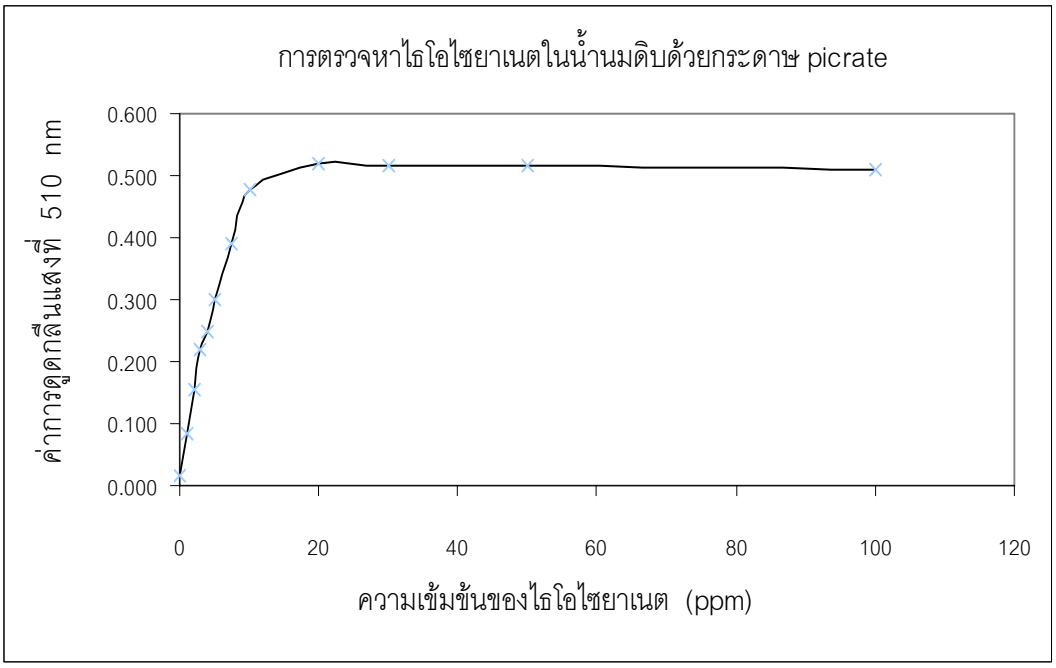
Wilson, W. M., O Brien, G. M. and Dufour, D. L. 2000. Application of a picrate semi-quantitative screening assay for the cyanogenic potential of cassava roots at a remote field site. J. Sci. Food Agric. 80: 590-594.



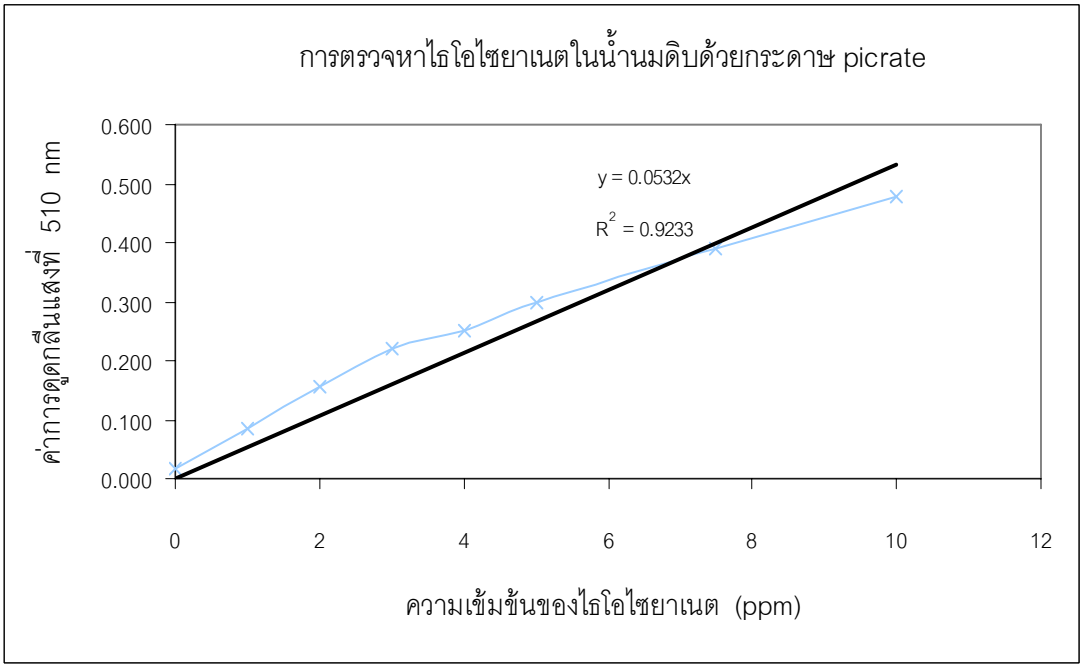
รูปที่ 1. การตรวจหาสารไธโอไซยาเนตในสารละลายโซเดียมไธโอไซยาเนตและน้ำนมดิบ โดยการวัดความเข้มของสีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์



รูปที่ 2. การเปรียบเทียบเวลาและอุณหภูมิ ที่ใช้ในการตรวจหาไธโอไซยาเนต ในสารละลายโซเดียมไธโอไซยาเนตด้วยกระดาษ picrate ที่อุณหภูมิ 75°C นาน 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมงและ ที่ 37°C นาน 16 ชั่วโมง



รูปที่ 3. การตรวจหาปริมาณไธโอไซยาเนตในตัวอย่างน้ำนมดิบด้วยกระดาษ picrate ที่อุณหภูมิ 75°C นาน 1 ชั่วโมง



รูปที่ 4. การเปรียบเทียบปริมาณไธโอไซยาเนตในน้ำนมดิบที่ตรวจโดยการใช้กระดาษ picrate กับค่าการดูดกลืนแสงที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

Development of rapid test kit for detection of thiocyanate in raw milk

Wonganun Narongwanichgarn[1*] Achara Theeraphan[1]

[1]Biochemistry and Toxicology Section, National Institute of Animal Health, Bangkok

[*]corresponding auther: 02-579-8908 -14, e-mail: rhchu@hotmail.com

Abstract

A rapid test kit was developed for detection of thiocyanate in raw milk. Thiocyanate was prior released from milk protein by 20% trichloroacetic acid, and precipitate was removed by filtration. The thiocyanate in protein-free extraction was oxidized to be gas hydrocyanide by potassium permanganate and sulfuric acid in closed vial with a sheet of picrate paper attached inside the stopper. Then hydrocyanide was reacted with yellow picric acid to be isopurpuric acid in red-brown color. The color intensity is depend on the amount of thiocyanate. In this study the detection limit of developed test kit can detect thiocyanate at least 1 ppm at 75^{0}C in 5 minutes. After incubation for 1 hour, the tested paper was dipped in water to elute isopurpuric acid, and the absorbance of the solution was determined at 510 nm. Then absorbance value was calculated for concentration of thiocyanate. The developed rapid test kit for detection of thiocyanate , with picrate paper and a color chart with some shades of red brown color to allow visual comparison of colors, is able to detect thiocyanate in raw milk between 1 – 10 ppm.

Key words: rapid test kit, thiocyanate, cyanide, picric acid, picrate paper