



การตรวจหาปริมาณ Cyanide ในเลือดโคด้วยวิธี Microdiffusion spectrophotometry

สนทนา มิมะพันธุ์^{1,*} อนุสรณ์ อยู่เย็น¹ เบญจมา เมธรัตน์อนุกุล¹ และสาวิตรี อินทร์อุดม¹

¹กลุ่มพิษวิทยาและชีวเคมี สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เขตกลาง กรุงเทพฯ 10900

บทคัดย่อ: cyanide เป็นสารเคมีที่ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย ได้แก่ การผลิต สแตนเลส การถลุงเงินหรือทอง การผลิต ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าหนู นอกจากนี้ยังพบในธรรมชาติจากพืชที่มีสาร cyanogenic glycosides เป็นส่วนประกอบ เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด ไม้ยาสูบไร้นาม เป็นต้น ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดพิษจากไซยาไนด์ (cyanide poisoning) ในปศุสัตว์ที่กินพืชเหล่านี้เข้าไป การศึกษานี้เป็นการพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ cyanide ในเลือดโค เริ่มจากการหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด cyanide ออกจากเลือดโคด้วยเทคนิค microdiffusion แล้วนำเวลาที่เหมาะสมดังกล่าวไปใช้ในขั้นตอนการทดสอบความถูกต้องของวิธี ตรวจหาปริมาณ cyanide ในสารละลายที่สกัดได้ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 587 นาโนเมตร ผลการศึกษาพบว่า ขั้นตอนการสกัด cyanide ใน microdiffusion cell ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมงให้ผลดีที่สุด จากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นพบว่ามีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.2 – 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r) เท่ากับ 0.997 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) เท่ากับ 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างแม่นยำ (LOQ) เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืน (%Recovery) อยู่ในช่วงร้อยละ 102-109 และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) เท่ากับ 2.56 ผลการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีจากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดโคที่เติม cyanide ที่ทราบค่าแน่นอนใน 3 ระดับความเข้มข้นคือ 0.5, 1.0 และ 3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่าความแม่นยำมีค่าเฉลี่ย %Recovery เท่ากับ ร้อยละ 105.16, 97.24 และ 92.43 ตามลำดับ โดย %Recovery ของทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วงร้อยละ 90 - 108 (เกณฑ์ที่ยอมรับได้อยู่ในช่วงร้อยละ 80 - 120) ส่วนความเที่ยงที่ประเมินด้วย %RSD พบอยู่ในช่วงร้อยละ 1.73 – 2.56 (เกณฑ์ที่ยอมรับได้น้อยกว่าร้อยละ 10) และค่า HorRat อยู่ในช่วง 0.16 – 0.26 (เกณฑ์ที่ยอมรับได้น้อยกว่า 2) ซึ่งทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ เมื่อนำวิธีไปวิเคราะห์กับตัวอย่างเลือดโคนมที่กินกากมันสำปะหลังเป็นอาหารจำนวน 48 ตัวอย่าง ผลตรวจวิเคราะห์ cyanide พบว่ามีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.24-0.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงของความเข้มข้น cyanide ที่พบได้ในเลือดของสัตว์ปกติ สรุปได้ว่า วิธี microdiffusion spectrophotometry ที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ตรวจหาปริมาณ cyanide ในเลือดโค ได้อย่างแม่นยำเที่ยงตรง และเชื่อถือได้ โดยเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับเลือดสัตว์ชนิดอื่นได้

คำสำคัญ: Cyanide เลือด โค Microdiffusion spectrophotometry

*ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2559. 11(2): 125-139.

E-mail address: sontanam@dld.go.th

Determination of Cyanide in Cattle Whole Blood by Microdiffusion Spectrophotometric Method

Sontana Mimapan^{1,#}, Anusorn Yooyen¹, Benjama Metharatanukul¹,
and Sawittree Inudom¹

¹Toxicology and Biochemistry Section, National Institute of Animal Health, Bangkok, Thailand 10900

Abstract: Cyanide is a chemical substance found in plants, pesticides, rodenticides and salts used in the industrial process such as stainless, refining precious metals (gold and silver). Cyanogenic glycoside, one of the chemical forms of cyanides, is naturally presented in many plants including cassava, sorghum and mimosa. Consuming toxic forage is the main cause of acute cyanide poisoning in livestock. In this study, we developed microdiffusion spectrophotometric method to validate the quantitative determination of cyanide in cattle whole blood. Microdiffusion extraction method was performed and the time required to achieve full recovery in the extraction was studied. The optimal time then was used to validate the quantitative determination of cyanide using UV-Vis spectrophotometer at 587 nm wavelength. It was found that the time required to achieve full recovery in the microdiffusion extraction was considerably 2 hours. The established method gave a linearity in a concentration ranging from 0.2 to 4.0 µg/ml. ($r=0.997$). The limit of detection (LOD) was 0.2 µg/ml while the limit of quantitation (LOQ) was 0.5 µg/ml (102 – 109% Recovery, 2.56 %RSD). The accuracy was evaluated using fortified sample blanks (0.5, 1.0 and 3.0 µg/ml) was 105.16, 97.24 and 92.43 µg/ml, respectively which ranged from 90-108% (standard at 80-120%) and the precision was evaluated by %RSD ranging from 1.73-2.56 (standard at <10) and HorRat ranging from 0.16-0.26 (standard at <2) which all are acceptable. The method was then used for the determination of cyanide in 48 whole blood samples of cassava pulp-fed dairy cattle. The results revealed that the concentrations of cyanide ranged from 0.24 to 0.54 µg/ml, which were in the same range of normal expectation in blood of most animal species. In conclusion, the microdiffusion spectrophotometric method developed in this study provided accuracy and precision as well as proved to be easy and reliable and it should be suitable for use in blood of other species.

Keywords: Cyanide, Whole blood, Cattle, Microdiffusion spectrophotometry

[#]Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2016. 11(2): 115-139.

E-mail address: sontanam@dld.go.th

บทนำ

ปัจจุบันโรคที่เกิดจากสารพิษถือเป็นปัญหาที่สำคัญและนับวันจะทวีความรุนแรงมากขึ้น ไฮยาไนด์ (cyanide) เป็นสารพิษชนิดหนึ่งที่เป็นอันตรายต่อคนและสัตว์ มีโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยคาร์บอน 1 อะตอม และไฮโดรเจน 1 อะตอม อาจพบได้ทั้ง 3 สถานะ เช่น ในรูปของแข็งคือเกลือ cyanide สารละลาย และในรูปของแก๊สไฮโดรไซยานิก (HCN) เป็นต้น cyanide เป็นสารเคมีที่ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย ได้แก่ การผลิตสแตนเลส การถลุงเงินหรือทอง การชุบโลหะ อุตสาหกรรมปิโตรเคมี การผลิตยาฆ่าแมลง ยาฆ่าหนู และนำมาใช้ในการเตรียมบ่อ เตรียมน้ำเพื่อเพาะเลี้ยงกุ้งและสัตว์น้ำอื่นๆ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมี cyanide ที่เกิดจากควันทูบรี และการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงอาจพบสารนี้ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมทั่วไป ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อคนและสัตว์ (Way, 1984) ทั้งนี้สาเหตุการได้รับสารพิษเหล่านี้เข้าไปอาจเกิดจากการใช้ที่ขาดความระมัดระวัง ใช้เกินปริมาณที่กำหนดหรือได้รับเข้าไปโดยไม่ตั้งใจ รวมถึงการใช้สารเคมีในทางที่ผิด โดยอาศัยคุณสมบัติความเป็นพิษของสาร cyanide นำไปใช้ผิดวัตถุประสงค์ เช่น การฆ่าตัวตายหรือก่ออาชญากรรม วางยาเบื่อสัตว์ เป็นต้น cyanide จากธรรมชาติที่พบในพืชที่เป็นอาหารของคนและสัตว์ซึ่งจะมีสารประกอบ cyanogenic glycosides เป็นองค์ประกอบ เช่น มันสำปะหลัง ข้าวฟ่าง หน่อไม้ ไม้ยราบไต้หวัน เป็นต้น ซึ่งหากสัตว์เคี้ยวเอื้องกินพืชเหล่านี้เข้าไปจะเป็นสาเหตุหลักของการเกิดพิษจาก cyanide (Arnold *et al.*, 2014) โดยเมื่อคนหรือสัตว์กินและถูกย่อยโดยเอนไซม์จะปลดปล่อย cyanide ที่เป็นพิษออกมา (The Merck Veterinary Manual, 2014) ทั้งนี้ปริมาณต่ำสุดของ

cyanide ที่ทำให้สัตว์โดยทั่วไปเสียชีวิตได้ (minimal lethal dose) เท่ากับ 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และปริมาณของ cyanide ในพืชอาหารสัตว์ที่สูงเกิน 200 หนึ่งในล้านส่วน (ppm) จะทำให้สัตว์แสดงอาการพิษได้ (Radostits *et al.*, 2000)

อาการเกิดพิษของ cyanide มีทั้งแบบเฉียบพลัน (acute cyanide poisoning) และแบบเรื้อรัง (chronic cyanide poisoning) โดยกลไกของการเกิดพิษแบบเฉียบพลันนั้นเมื่อสัตว์ได้รับ cyanide ในขนาดสูง สารพิษนี้จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cytochrome C oxidase บน membrane ของ mitochondria ทำให้เซลล์ไม่สามารถนำออกซิเจนไปใช้ในกระบวนการเผาผลาญพลังงานได้และทำให้เกิดภาวะ cellular hypoxia โดยเฉพาะอย่างยิ่งกล้ามเนื้อหัวใจและสมองทำให้สัตว์แสดงอาการกระวนกระวาย หายใจขัด ตัวสั่น ล้มลงนอน ชัก และเสียชีวิตในที่สุด เมื่อเจาะเลือดดูหลังจากที่สัตว์เสียชีวิตใหม่ๆ จะเห็นเลือดเป็นสีแดงสด (cherry red) เนื่องจากเลือดมีออกซิเจนค้างสูง อาการเกิดพิษจะเกิดภายใน 15-20 นาที จนถึง 2-3 ชั่วโมง หลังจากสัตว์เริ่มได้รับสารพิษทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณสารพิษที่สัตว์ได้รับเข้าไป (มาลินี, 2527; Ballantyne, 1987) สำหรับรายงานการเกิดพิษของ cyanide ในคนนั้นมีรายงานในกรณีที่คนงานที่ลงไปใ้ในบ่อหมักหน่อไม้ต้องประสบเหตุหมดสติพร้อมกัน 8 รายและเสียชีวิต 2 คนจากการสูดดม cyanide ที่ถูกปลดปล่อยจากหน่อไม้ (ปานทิพย์, 2551) ส่วนการเกิดพิษของ cyanide แบบเรื้อรังจะพบในกรณีที่สัตว์ได้รับ cyanide หรือกินพืชที่มี cyanide ในปริมาณความเข้มข้นที่ต่ำแต่ได้รับเป็นระยะเวลานานโดยจะส่งผลกระทบต่อระบบประสาทส่วนกลางและการทำงานของต่อมไทรอยด์ทำให้เกิดภาวะ

hypothyroidism นอกจากนี้ยังสามารถพบภาวะ กระเพาะปัสสาวะอักเสบ (cystitis) ภาวะปัสสาวะ เล็ด (urine incontinent) และภาวะเดินไม่สัมพันธ์ กัน (ataxia) เป็นต้น ซึ่งเรียก ภาวะ เหล่านี้ว่าcystitis ataxia syndrome โดยที่สามารถพบได้ทั้งในม้า วัว แพะ แกะ เป็นต้น (The Merck Veterinary Manual, 2014) สำหรับรายงานความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน ของ cyanide ในสัตว์นั้น ในปี 2517 สมใจและเชิด ชัย ได้รายงานความเป็นพิษในไก่กระทงที่ให้กิน อาหารผสมมันสำปะหลัง โดยไก่จะมีอาการซึมและ ตายอย่างรวดเร็ว พบจุดเลือดออกที่อวัยวะภายใน มาลีและคณะ (2525) รายงานความเป็นพิษในโค พันธุ์อเมริกันบราห์มันจำนวน 5 ตัวที่กินไมยราบไร้ หนาม (*Mimosa invisa*) แล้วโคแสดงอาการป่วย อย่างรุนแรง มีอาการน้ำลายฟูมปาก กล้ามเนื้อสั่น หายใจลำบากและเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว และ McKenzie and McMicking (1977) รายงานพิษที่ เกิดขึ้นในโคที่กินข้าวฟ่างอ่อนในทุ่งหญ้า แสดงอาการ กล้ามเนื้อสั่นและปัสสาวะเล็ด ล้มลงนอน และ เสียชีวิตอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังมีรายงานการเกิด พิษของ cyanide แบบเรื้อรังในแกะ โดยสัตว์แสดง อาการกล้ามเนื้อสั่น หัวสั่น คอบิดและเสียชีวิต ผล การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาพบการอักเสบของสมอง และไขสันหลัง การเสื่อมของเส้นประสาท axon (Bradley *et al.*, 1995; Bourke *et al.*, 2008) และ ยังมีการศึกษาพิษของ cyanide แบบเรื้อรังในแพะ พบว่าทำให้เจริญเติบโตช้า มีรอยโรคที่ต่อมไทรอยด์ และตับอ่อน (Soto-Blanco *et al.*, 2001) ส่วนใน สุนัขจะทำให้เกิดการเสื่อมของตับ ไตและอวัยวะใน ระบบประสาท (Manzano *et al.*, 2007) และจาก การศึกษาในแม่สุกรที่ตั้งท้องพบว่า cyanide ทำให้

แม่สุกรแท้งและลูกสุกรตายแรกคลอด (Andre *et al.*, 2015)

การตรวจวิเคราะห์ cyanide โดยทั่วไป สามารถตรวจได้จากตัวอย่างอาหารในกระเพาะของ สัตว์ที่ตายโดยใช้วิธี paper strip test หรือ colorimetric test โดยเป็นการตรวจวิเคราะห์เชิง คุณภาพและใช้เพื่อการคัดกรองเป็นส่วนใหญ่ (Ballantyne and Marrs, 1987) อย่างไรก็ตามการ ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ cyanide จากตัวอย่าง เลือดถือว่ามีความสำคัญในการวินิจฉัยพิษจาก cyanide เพราะเป็นวิธีทดสอบเชิงปริมาณและ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธี Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS) (Murphy *et al.*, 2006; Boadas-Vaello *et al.*, 2008) วิธี Fluorometry (Morgan and Way, 1980) และวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Chinaka *et al.*, 1998) เป็นต้น แต่วิธีเหล่านี้มีขั้นตอนที่ซับซ้อน ต้อง อาศัยอุปกรณ์ที่มีราคาแพง การบำรุงรักษามีต้นทุนสูง และผู้ปฏิบัติต้องมีความรู้ความชำนาญสูงทำให้ต้นทุน การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างมีราคาแพง

Microdiffusion เป็นวิธีการทำตัวอย่างให้ บริสุทธิ์ โดยอาศัยการระเหยของสารจากตัวอย่าง และถูกดักเก็บโดยสารเคมีที่เหมาะสมและแยกเก็บใน ช่องอีกส่วนซึ่งทำในระบบปิด การศึกษาครั้งนี้จึงเป็น การพัฒนาวิธีการตรวจหาปริมาณสาร cyanide ใน ตัวอย่างเลือดโคโดยอาศัยเทคนิค microdiffusion spectrophotometry ซึ่งเป็นเทคนิคการตรวจ วิเคราะห์เชิงปริมาณ สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการ พิษวิทยา พื้นฐานทั่วไปที่มีเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ซึ่งสามารถทำได้ง่ายและ

ประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าการตรวจหาปริมาณสาร cyanide ด้วยเทคนิควิธีอื่นๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

สารเคมี

Potassium cyanide (AR grade, Asia Pacific Specialty Chemicals Ltd, Australia), Barbituric acid 99% (ReagentPlus®, Sigma-Aldrich Co. LLC., Germany), Sodium hydroxide (AR grade, Merck, Germany), Sodium dihydrogen phosphate (AR grade, Merck, Germany), Chloramine-T trihydrate 97% (ACROS Organics, U.S.A.), Sulfuric acid (AR grade, QR&C, New Zealand), Pyridine (AR grade, VWR International, LLC., EU)

วัสดุและเครื่องมือ

Microdiffusion cell ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรอบนอก (Outer Diameter: O.D.) 83 มิลลิเมตร ขนาดของช่องบรรจุสารด้านใน (center compartment) เส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร ลึก 4 มิลลิเมตร และ ขนาดของช่องบรรจุสารด้านนอก (outer compartment) เส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร ลึก 10 มิลลิเมตร (Bel-Art products, U.S.A.), UV-Vis Spectrophotometer model DU-64 (BECKMAN, U.S.A.) พร้อมด้วยระบบ Sipper, analytical balance model BP 221S (Sartorius, Germany)

วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลาย cyanide มาตรฐานเพื่อเป็น stock solution ให้ได้ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง potassium cyanide 0.0500

กรัม ละลายด้วยสารละลาย sodium hydroxide 0.1 M ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนครบ หลังจากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับใช้งาน (working standard cyanide solution) โดยทำการเจือจางสารละลายมาตรฐาน cyanide เข้มข้น ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0.2, 1.0, 2.0 และ 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีเตรียมน้ำยาเคมี

เตรียม pyridine-barbituric acid reagent โดยชั่ง barbituric acid 6 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรเติมกรด hydrochloric เข้มข้น 6 มิลลิลิตร เจือจางด้วย pyridine 30 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ (ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ต้องการใช้)

เตรียม สารละลาย 0.25% chloramine-T โดยชั่ง chloramine-T 0.25 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติม ค่อยๆเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนละลาย แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ

วิธีเตรียมตัวอย่างควบคุม

เตรียมโดยการทำ ตัวอย่างเลือดโคที่เติม cyanide ที่ทราบค่าความเข้มข้นแน่นอนหรือ fortified sample blank โดยเติมสาร cyanide มาตรฐาน ลงใน sample blank หรือ pooled cattle whole blood ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 1 และ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

1) การสกัด cyanide ออกจากสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างเลือดโคด้วยเทคนิค microdiffusion และตรวจวัดด้วยวิธี

spectrophotometry วิธีวิเคราะห์ที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Flanagan *et al.* (1995)

1.1 การสกัดสาร cyanide จากสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างด้วยเทคนิค microdiffusion

ปิเปตสารละลาย 0.1 M sodium hydroxide 2 มิลลิลิตร ลงใน center compartment ของ microdiffusion cell (ดังรูปที่ 1) แต่ละอันที่ label ชื่อน้ำกลั่น(blank) สารละลายมาตรฐาน ตัวอย่างควบคุม หรือตัวอย่างเลือดไว้ จากนั้นปิเปต blank สารละลายมาตรฐาน ตัวอย่างควบคุม หรือตัวอย่างเลือดที่จะตรวจวิเคราะห์อย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในส่วนของ outer compartment ก่อน ตามด้วยสารละลาย 1 M sulfuric acid 1 มิลลิลิตร จากนั้นปิดฝา microdiffusion cell ที่ทำด้วยซิลิโคนกรีซ และ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในตู้ดูดควันเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

1.2 การตรวจวัดปริมาณสาร cyanide ด้วยวิธี spectrophotometry

ปิเปตสารละลาย 0.1 M sodium hydroxide 0.5 มิลลิลิตรจาก center compartment ในแต่ละความเข้มข้นที่ได้ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร แบบมีฝาปิด แต่ละหลอดเติมสารละลาย sodium dihydrogen phosphate 1 มิลลิลิตรและสารละลาย 0.25% chloramine-T 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นเติมน้ำยา pyridine-barbituric acid 1.5 มิลลิลิตรลงในหลอด ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนของแสง (absorbance) ที่ 587 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer โดยใช้ peristaltic sipper สร้างกราฟมาตรฐาน (standard calibration curve) โดยนำค่าการดูดกลืนแสง

(absorbance) ของสารละลายมาตรฐานที่เครื่องวัดได้มาสร้างเป็นแกน y และปริมาณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแต่ละระดับมาสร้างเป็นแกน x คำนวณหาความเข้มข้นของ cyanide ในเลือดโคจากสมการ linear regression; $y = ax + b$

2) การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในขั้นตอนการสกัด cyanide ด้วยเทคนิค microdiffusion

ทำโดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน cyanide ในน้ำกลั่นความเข้มข้น 0.2, 1.0, 2.0 และ 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 3 ชุดพร้อม blank มาวิเคราะห์ตามขั้นตอนในข้อ 1.1 ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ โดยตั้ง microdiffusion cell ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในตู้ดูดควันเป็นเวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นเมื่อครบเวลาในแต่ละชั่วโมง นำสารละลาย sodium hydroxide จาก inner chamber ที่ได้ไปวิเคราะห์ตามขั้นตอนในข้อ 1.2 หาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ ร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) ของค่า absorbance ที่วัดได้จากเครื่อง spectro photometer พิจารณาเปรียบเทียบหาระยะเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในขั้นตอนการสกัด แล้วนำช่วงเวลาดังกล่าวไปใช้ในการศึกษาในขั้นตอนการทดสอบความถูกต้องของวิธีการต่อไป

3) การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) การทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ทำตาม ทิพวรรณ (2549); ตติย (2547)

3.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and range)

หาช่วงการวิเคราะห์ (range) โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน cyanide ให้มีความเข้มข้น 8 ระดับ คือ 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 และ 6.0

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 1.1 และ 1.2 ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐาน (แกน x) กับค่า absorbance (แกน y) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

หาความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยดูจากกราฟของ range เลือกช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงมาอย่างน้อย 6 ระดับ วิเคราะห์ตามวิธีความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐานที่ตรวจพบกับค่า absorbance คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson's correlation coefficient: r) เกณฑ์การยอมรับ r มากกว่าหรือเท่ากับ 0.995

3.2 การหาขีดจำกัดในการตรวจพบหรือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (Limit of detection: LOD)

นำ sample blank (pooled cattle whole blood) มาวิเคราะห์ตามขั้นตอนใน 1.1 และ 1.2 จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณค่าความเข้มข้นและความเข้มข้นเฉลี่ย ($\bar{X}$) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของ sample blank แล้วคำนวณหาค่า LOD จากสูตร $LOD = \bar{X} + 3SD$

3.3 การหาขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณหรือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างแม่นยำ (Limit of quantitation: LOQ)

หาค่า LOQ เบื้องต้นจากค่า LOD โดยคำนวณจากสมการ $LOQ = \bar{X} + 10SD$ (ของค่า LOD) จากนั้นยืนยันค่า LOQ โดยการเตรียม fortified sample blank (เติมสาร cyanide มาตรฐานลงใน sample blank) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOQ (ที่ประมาณการ) หรือใกล้เคียง วิเคราะห์ตามขั้นตอนในข้อ 1.1 และ 1.2 จำนวน 10 ซ้ำ จากนั้นคำนวณหา

ปริมาณเทียบกับสารมาตรฐานแล้วคำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) จากสมการ

$$\%Recovery = \frac{C1-C2}{C3} \times 100$$

โดย C1 คือ ความเข้มข้นเฉลี่ยของ fortified sample

C2 คือ ความเข้มข้นของ sample blank

C3 คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน cyanide ที่เติมและหาร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) จากสมการ

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

3.4 การทดสอบหาความแม่นยำและความเที่ยง (accuracy and precision)

เตรียม fortified sample blank โดยการเติมสาร cyanide มาตรฐานลงใน sample blank ให้ได้ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ระดับ LOQ, 1 และ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ละความเข้มข้นวิเคราะห์ตาม ขั้นตอนในข้อ 1.1 และ 1.2 จำนวน 10 ซ้ำ จากนั้นคำนวณหาค่า % Recovery, % RSD และหาค่า HorRat (Horwitz ratio) จากสมการ

$$HorRat\ ratio = \frac{\%Experimental\ RSD}{Predicted\ HorwitzRSD}$$

ประเมินความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ (accuracy) โดยพิจารณาจากค่า % Recovery ให้อยู่ในช่วงร้อยละ 80-120 ส่วนความเที่ยง (precision) นั้นประเมินจากค่า HorRat (Horwitz ratio) โดยเกณฑ์การยอมรับ คือ น้อยกว่า 2 (Horwitz and Albert, 2006)

4) การประยุกต์ใช้เพื่อตรวจหาปริมาณสาร cyanide กับตัวอย่างเลือดโค

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ cyanide ในตัวอย่างเลือดโค จำนวน 48 ตัวอย่างที่กินกากมันสำปะหลังเป็นส่วนผสมหลักของการให้อาหารชั้นตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 1.1 และ 1.2 พร้อมกับตัวอย่างควบคุม (fortified sample blank) 3 ระดับ เพื่อหา %Recovery เทียบกับสารละลาย cyanide มาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2, 1.0, 2.0 และ 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และระหว่างการวิเคราะห์ตัวอย่างจะทำการวิเคราะห์ซ้ำ (Duplicate analysis) 1 ตัวอย่างในทุกๆ 10 ตัวอย่างที่ตรวจหรืออย่างน้อย 10% ของตัวอย่างที่ทำการตรวจ เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ควบคุมไปด้วย จากนั้นคำนวณหา %ความแตกต่างสัมพัทธ์ (%Relative percent difference; %RPD) โดยมีเกณฑ์การยอมรับของการวัดซ้ำน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10% จากผลการ

$$\%RPD = \frac{(A1 - A2)}{(A1+A2)/2} \times 100$$

A1 คือ ผลการทดสอบครั้งที่ 1

A2 คือ ผลการทดสอบครั้งที่ 2

ผลการศึกษา

จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในขั้นตอนการสกัด cyanide ด้วยเทคนิค microdiffusion ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าที่ระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดอยู่ที่ชั่วโมงที่ 2 โดยให้ค่า absorbance แปลผกผันตามความเข้มข้นที่สูงขึ้นของปริมาณ cyanide ที่ใช้ในการทดสอบ นอกจากนั้นแล้วค่า % RSD ในชั่วโมงที่ 2 ยังมีความ

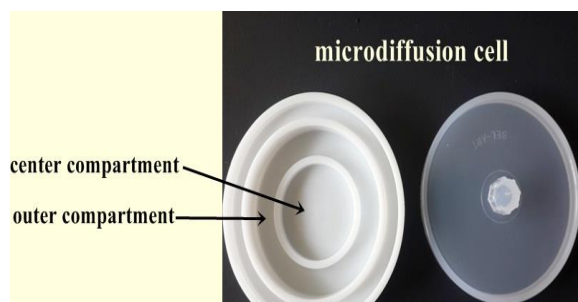
ใกล้เคียงกันโดยแตกต่างกันน้อยกว่า 2% (เกณฑ์การยอมรับที่น้อยกว่า 10%) ส่วนชั่วโมงที่ 3 ให้ผลเช่นเดียวกันแต่ใช้เวลามากกว่า ทางผู้วิจัยจึงเลือกใช้ระยะเวลาในชั่วโมงที่ 2 สำหรับนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนการทดสอบความถูกต้องของวิธีการต่อไป

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and range) พบว่าช่วงการวิเคราะห์มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.2 - 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r) เท่ากับ 0.997 ดังแสดงในกราฟที่ 1

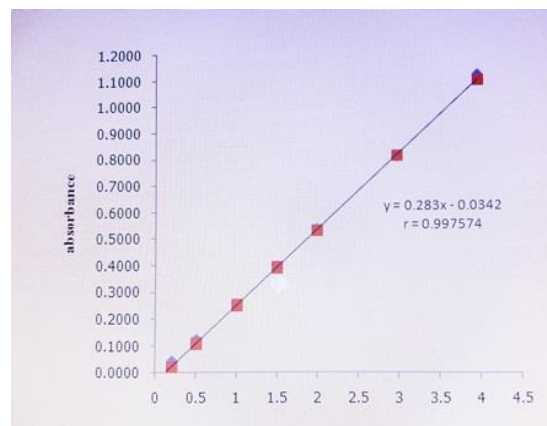
ผลการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (Limit of detection: LOD) มีค่าเท่ากับ 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณได้อย่างแม่นยำ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยมีค่า %Recovery อยู่ในช่วงร้อยละ 102-109 และ %RSD เท่ากับ 2.56

ผลการทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของวิธีการวิเคราะห์จากตัวอย่าง fortified sample blank ที่ 3 ระดับความเข้มข้นคือ 0.5, 1.0 และ 3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่าความแม่นยำ ค่าเฉลี่ย % Recovery เท่ากับ 105.16, 97.24 และ 92.43 ตามลำดับ โดย %Recovery ของทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ ช่วงร้อยละ 80 - 120 ส่วนการประเมินความเที่ยง พบว่าค่า %RSD อยู่ในช่วง 1.73 - 2.56 ซึ่งน้อยกว่าร้อยละ 10 และค่า HorRat ratio พบอยู่ในช่วง 0.16 - 0.26 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือน้อยกว่า 2 ดังนั้นการทดสอบความแม่นยำของวิธีการและการทดสอบความเที่ยงจึงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

จากการตรวจหาปริมาณสาร cyanide จากตัวอย่างเลือดโคที่กินอาหารซึ่งใช้กากมันสำปะหลังเป็นส่วนผสมหลักด้วยวิธีดังกล่าว จำนวน 48 ตัวอย่างพบปริมาณสาร cyanide ในเลือดโคในช่วงความเข้มข้น 0.24 - 0.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เฉลี่ย 0.38 ± 0.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างควบคุมที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า %Recovery อยู่ในช่วงร้อยละ 95 - 117 และ %RPD จากการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำ มีค่าไม่เกินร้อยละ 10



รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างและส่วนประกอบของ micro diffusion cell



กราฟที่ 1 แสดงผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์จากสารละลาย cyanide มาตรฐาน ที่ช่วงความเข้มข้น 0.2- 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยแกน x คือ ความเข้มข้นของสารละลาย cyanide มาตรฐาน แกน y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (r) เท่ากับ 0.997

ตารางที่ 1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (abs), ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และ %RSD ของสารละลาย cyanide มาตรฐาน ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ โดยการสกัดด้วยเทคนิค microdiffusion ในช่วงเวลาที่ 1, 2 และ 3

Std. cyanide ($\mu\text{g/ml}$)	ระยะเวลา 1 ชั่วโมง			ระยะเวลา 2 ชั่วโมง			ระยะเวลา 3 ชั่วโมง		
	abs (mean)	SD	%RSD	abs (mean)	SD	%RSD	abs (mean)	SD	%RSD
blank	0.0134	0.0005	3.98	0.0143	0.0005	3.41	0.0154	0.0005	3.46
0.2	0.0340	0.0037	11.00	0.0484	0.0008	1.62	0.0487	0.0005	1.00
1.0	0.1931	0.0476	24.63	0.2474	0.0008	0.31	0.2456	0.0005	0.22
2.0	0.3669	0.1112	30.31	0.5353	0.0023	0.42	0.5563	0.0090	1.62
4.0	0.6370	0.2469	38.77	1.0889	0.0085	0.77	1.1125	0.0084	0.74

ตารางที่ 2 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (LOD) และ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้อย่างแม่นยำ (LOQ) ของวิธีการตรวจหาปริมาณ cyanide ในเลือดโคด้วยวิธี microdiffusion spectrophotometry

ชนิดสาร	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)
Cyanide	0.2	0.5

ตารางที่ 3 แสดงค่า %Recovery ของการทดสอบความแม่นยำ ค่า%RSD และค่า HorRat ratio ของการทดสอบความเที่ยง ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	%Recovery $\pm$ SD	%RSD	HorRat ratio
0.5	105.16 $\pm$ 2.70	2.56	0.22
1.0	97.24 $\pm$ 1.68	1.73	0.16
3.0	92.43 $\pm$ 2.17	2.35	0.26

วิจารณ์

จากการศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์การตรวจหาปริมาณ cyanide ในเลือดโคด้วยวิธี microdiffusion spectrophotometry ที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Flanagan *et al.* (1995) ซึ่งเป็นวิธีตรวจหาปริมาณ cyanide ในเลือดคน พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด cyanide จากเลือดโคด้วยเทคนิค microdiffusion อยู่ที่ชั่วโมงที่ 2 ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งใช้เวลาน้อยกว่าวิธีของ Flanagan *et al.* (1995) 1 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากการศึกษานี้มีการปรับใช้ปริมาตรของสารละลาย cyanide มาตรฐาน ตัวอย่างเลือดและน้ำยาเคมีที่ใช้ในการทดสอบต่างกันจึงส่งผลให้การตรวจวัดได้ระยะเวลาที่เหมาะสมแตกต่างกัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Lundquest *et al.*, 1995 ที่พบว่าปริมาตรของสารละลายมีผลต่อค่า absorbance อย่างไรก็ดีตามระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด cyanide ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ใช้เวลามากกว่าการศึกษาของ Tsuge *et al.* (2001) ที่ใช้เวลาในขั้นตอนการสกัด cyanide ที่ปนเปื้อนใน

เครื่องต้มเพียง 1 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการศึกษาครั้งนี้ทำการสกัดที่อุณหภูมิห้อง แต่การศึกษาของ Tsuge *et al.* (2001) ทำการสกัด Cyanide ที่อุณหภูมิ 40°C ซึ่งอุณหภูมิที่สูงขึ้นกว่าอุณหภูมิห้องนี้ มีผลช่วยเร่งการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง cyanide ในตัวอย่างกับกรดได้ดีขึ้นทำให้ใช้เวลาน้อยลง (Holzbecher and Ellenberger, 1985) ทั้งนี้แก๊สที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยา คือ แก๊สไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) จะถูกจับไว้ด้วยสารละลาย 0.1 M sodium hydroxide ใน center compartment ของ microdiffusion cell ก่อนนำสารละลายดังกล่าวมาตรวจหาปริมาณ cyanide ด้วยเครื่อง spectrophotometer

เมื่อเปรียบเทียบค่า LOD, LOQ, %Recovery และ %RSD ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้กับการศึกษาของ Shafi *et al.* (2015) ที่ใช้วิธี Headspace GC/FID ตรวจวิเคราะห์ cyanide มีค่า LOD เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, LOQ เท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, %Recovery เท่ากับร้อยละ 95 - 102,

%RSD เท่ากับร้อยละ 1.3 - 3.9 พบว่าการศึกษาครั้งนี้มีค่า LOD และ LOQ ต่ำกว่า และค่าของ %Recovery มีช่วงกว้างกว่า แต่ %RSD มีค่าน้อยเช่นเดียวกัน บ่งชี้ว่าวิธี microdiffusion spectrophotometry สามารถตรวจหาปริมาณ cyanide ในเลือดได้ในระดับที่ต่ำกว่าวิธี Headspace GC/FID แต่ทั้งสองวิธีมีความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยวิธี microdiffusion spectrophotometry มีข้อเสียคือใช้เวลาในการวิเคราะห์นานกว่า เนื่องจากต้องใช้เวลาในขั้นตอนการสกัดตัวอย่างนานถึง 2 ชั่วโมง แต่วิธี Headspace GC/FID ไม่ต้องสกัดตัวอย่างก่อนนำไปตรวจวัด นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Mateus *et al.* (2005) ที่ใช้วิธี HPLC ตรวจหาปริมาณ cyanide ในเลือดหนูซึ่งมีค่า LOQ เท่ากับ 0.025 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (LOD ไม่พบรายงานข้อมูล) %Recovery เท่ากับร้อยละ 103 - 112, %RSD เท่ากับร้อยละ 5.4 - 7.9 พบว่าวิธี HPLC มีค่า LOQ ต่ำกว่าวิธี microdiffusion spectrophotometry ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ แสดงว่าวิธี HPLC สามารถตรวจหาปริมาณ cyanide ในเลือดได้ในระดับที่ต่ำกว่าวิธี microdiffusion spectrophotometry แต่ทั้งสองวิธีมีความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามเครื่อง HPLC มีราคาสูงกว่า ระบบการทำงานมีความยุ่งยากซับซ้อนมากกว่าเครื่อง spectrophotometer ทั้งนี้การจะนำวิธีใดไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างขึ้นอยู่กับนักวิเคราะห์ที่จะเลือกพัฒนาวิธีให้เหมาะสมกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการนั้น ตลอดจนพิจารณาระดับหรือค่าความเป็นพิษของ cyanide ที่ทำให้สัตว์ชนิดนั้นเสียชีวิตเพราะเครื่องมือ

แต่ละประเภทมีขีดความสามารถในการตรวจวัดสารได้ไม่เท่ากัน

เมื่อนำวิธีที่พัฒนาได้มาวิเคราะห์กับตัวอย่างเลือดโคนมที่กินกากมันสำปะหลังเป็นอาหาร จำนวน 48 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณ cyanide อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.24 - 0.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (เฉลี่ย 0.38 ± 0.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งค่าที่ตรวจพบดังกล่าวไม่เกินค่าปกติ โดยความเข้มข้นของ cyanide ที่ไม่ทำให้เกิดพิษในสัตว์คือน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (The Merck Veterinary Manual, 2014) ทั้งนี้เนื่องจากสาร cyanogenic glycosides ในมันสำปะหลังเมื่อถูกบด กรอง อัด จากกระบวนการสกัดเอาแป้งมันออกจนกลายเป็นกากมัน จะทำให้สารนี้ละลายออกไปส่งผลให้ HCN ที่เป็นพิษลดลง (ศิริรัตน์, 2555)

อย่างไรก็ตามจากการตรวจหาปริมาณสาร cyanide ในตัวอย่างเลือดโค 48 ตัวอย่างนี้ พบว่ามีเพียง 7 ตัวอย่างมีค่า cyanide สูงกว่าระดับ LOQ ซึ่งเป็นค่าที่สามารถรายงานปริมาณที่มีความแม่นยำและเที่ยงตรงในระดับที่ยอมรับได้ (ทิพวรรณ, 2549) ส่วนอีก 41 ตัวอย่างที่เหลือ พบปริมาณสาร cyanide ต่ำกว่าค่า LOQ ดังนั้นในการรายงานผลการตรวจวัดระดับปริมาณสาร cyanide จากตัวอย่างควรมีการระบุค่า LOD และค่า LOQ ของวิธีที่ใช้ตรวจไว้ในใบรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างร่วมด้วย รวมถึงระดับหรือค่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดพิษในสัตว์ ทั้งนี้เพื่อให้ผู้รับบริการได้ทราบและใช้ประกอบการวินิจฉัย

เมื่อพิจารณาถึงผลกระทบจากพิษของ cyanide ต่อสุขภาพสัตว์พบว่าพืชอาหารสัตว์หลายชนิดมีสาร cyanogenic glycosides และ nitrate สะสมอยู่ในต้น มาลินี (2525) รายงานความเป็นพิษแบบเฉียบพลันในโคพันธุ์อเมริกันบราห์มัน 5 ตัวใน

จังหวัดขอนแก่นที่ผูกให้กินแปลงไมยราบไร้หนามแล้ว แสดงอาการป่วยอย่างรุนแรงและเสียชีวิต โดยโค 3 ตัว-เสียชีวิตภายใน 3 วัน และ โคอีก 2 ตัว เสียชีวิตภายใน 11-12 วันต่อมา ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการจากตัวอย่างอาหารในกระเพาะพบสารพิษ nitrate และ cyanide โดยการเทียบกับสารมาตรฐานซึ่งเป็นการตรวจเชิงคุณภาพในขณะที่ Lertsri *et al.* (2014) รายงานความเป็นพิษแบบเฉียบพลันในโค 9 ตัวในจังหวัดบุรีรัมย์ที่กินไมยราบไร้หนามแล้วแสดงอาการป่วยในลักษณะเดียวกัน และเสียชีวิต ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการพิษวิทยาจากตัวอย่างไมยราบไร้หนามและอวัยวะภายในของโคที่เสียชีวิต คือ หัวใจ ตับ ไต พบสารพิษ nitrate แต่ตรวจไม่พบ cyanide อย่างไรก็ตามรายงานเหล่านี้ชี้ชัดให้เห็นถึงพิษของไมยราบไร้หนามที่เจ้าของสัตว์พึงระมัดระวังไม่นำมาเป็นพืชอาหารสัตว์เพราะมีหลายการศึกษาวิจัยที่ยืนยันถึงอันตรายที่ร้ายแรงของพิษชนิดนี้ (Alex, 1991; Rajan *et al.*, 1986; Usha *et al.*, 2009) จากการศึกษาครั้งนี้ วิธีตรวจหาปริมาณ cyanide ในเลือดโคด้วยเทคนิค microdiffusion spectrophotometry ที่ได้พัฒนาขึ้น สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ cyanide ในเลือดเพื่อบ่งบอกถึงระดับความเป็นพิษได้ โดยสามารถตรวจจากตัวอย่างเลือดโคที่กำลังแสดงอาการป่วย หรือจากตัวอย่างเลือดโคที่เสียชีวิตใหม่ๆ ซึ่งจะช่วยทำให้สามารถยืนยันการวินิจฉัยโรคได้ อย่างไรก็ตามตัวอย่างส่งตรวจควรส่งมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการให้เร็วที่สุด หากไม่สามารถทำได้ควรเก็บรักษาสภาพตัวอย่างเลือดไว้ในอุณหภูมิ 4 °C และควรส่งตัวอย่างให้เร็วที่สุดภายใน 1-2 วัน (Ballantyne, 1987) ทั้งนี้เป็นการเตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการพิษวิทยาให้ทันต่อ

สถานการณ์ และแก้ปัญหาที่อาจเกิดขึ้นจากการได้รับสารพิษชนิดนี้ได้ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ Dr. Sung-Won Park และ Dr. Sohee Kim จาก Analytic Toxicology Laboratory, Animal and Plant Quarantine Agency (QIA) ประเทศเกาหลี ที่ให้คำปรึกษาในด้านเทคนิค Microdiffusion spectrophotometry จนสามารถนำมาปรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์ Cyanide เชิงปริมาณในการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

- ตติย สี่ห่วย. 2547. เอกสารประกอบการอบรม-สัมมนาวิชาการด้านอุตสาหกรรมอาหาร: การตรวจพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี. สถาบันอาหาร. กรุงเทพฯ. หน้า 1-44.
- ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี โดยห้องปฏิบัติการเดียว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 124 หน้า.
- ปานทิพย์ ศิริโชติ. 2551. เหตุการณ์กรณีผู้ประสบเหตุหมดสติและเสียชีวิตในโรงงานหล่อไม้ดอง. การสัมมนาเครือข่ายนิติพิษวิทยาแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 2 ณ กรีนเลค รีสอร์ท อ. เมือง จ. เชียงใหม่. [Online]. Available: <http://www.med.cmu.ac.th/dept/forensic/2012/images/files/forensic-toxicology2560.pdf>, Accessed August 31, 2016.
- มาลินี ลิ้มโกคา. 2523. พิษวิทยาและการวินิจฉัยโรคทางสัตวแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์จรัญสนิทวงศ์, กรุงเทพฯ. 276 หน้า.

- มาลินี ลิ้มโกคา สุชาติ ศรารพันธุ์ วิมล จิระธนวัฒน์
วิมลพร จิระวัฒนพงศ์ นวรัตน์ สาครรัตน์
นิยมศักดิ์ อุทุม และ ชาญยุทธ เทพา. 2525.
ไมยราบไร้หนามเป็นพิษในโค. กรุงเทพฯ:
วารสารสัตวแพทย์. 3(1): 43-48.
- มาลินี ลิ้มโกคา. 2527. พิษวิทยาและปัญหาที่พบในสัตว์.
โรงพิมพ์เจริญสินทวงศ์ กรุงเทพฯ. หน้า 364.
- ศิริรัตน์ บัวผัน. 2555. เทคนิคการใช้กากมันสดเป็น
อาหารโคนม. วารสารปศุสัตว์เกษตรศาสตร์. ปี
ที่38. ฉบับที่ 151. หน้า 48-50.
- Alex, P.C., Rajankutty, K., Valsala, K.V. and Nair,
K.N.M. 1991. Mimosa poisoning in a
heifer. *J. Vet. Anim. Sci.* 22(1): 134-136.
- Andre, T.G., Isis, M.H., Helena, M., Viviane,
M.M., Paulo, C.M. and Silvana, L.G. 2015.
Intoxication by cyanide in pregnant
sows: prenatal and postnatal
evaluation. *J. Toxicol.* 2015: 1-9.
- Arnold, M., Gaskill, C., Smith, R. and Lacefield,
G. 2014. Cyanide poisoning in
ruminants. University of Kentucky
College of Agriculture, Food and
Environment. p. 1-2. [Online]. Available:
<http://www2.ca.uky.edu/agcomm/pubs/ID/ID220/ID220.pdf>. Accessed August
30, 2016.
- Ballantyne, B. 1987. Toxicology of cyanides.
In: Ballantyne, B., Marrs, T.C., editors.
Clinical and Experimental Toxicology of
Cyanides. Bristol, UK: Wrights. p. 41-126.
- Ballantyne, B. and Mars, T.C. 1987. Clinical
and Experimental Toxicology of
Cyanides. Bristol, UK, Wright.
- Bourke, C.A., Bunker, E.C., Reece, R.L. and
Whittaker, S.J. 2008. Cerebella ataxia in
sheep grazing pastures infested with
Romulea rosea (onion grass or Guildford
grass). *Aust. Vet. J.* 86(9): 354-6.
- Bradley, G.A., Metcalf, H.C., Reggiardo, C.,
Noon, T.H., Bicknell, E.J., Lozano-
Alarcon, F., Reed, R.E. and Riggs, M.W.
1995. Neuroaxonal degeneration in
sheep grazing Sorghum pastures. *J. Vet.
Diag. Invest.* 7: 229-336.
- Boadas-Vaello, P., Jover, E., Llorens, J. and
Bayona, J.M. 2008. Determination of
cyanide and volatile alkyl nitriles in
whole blood by headspace solid-phase
microextraction and gas
chromatography with nitrogen
phosphorus detection. *J Chromatogr. B
Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*
870(1): 17-21.
- Chinaka, S., Takayama, N., Michigima, Y., and
Ueda, K. 1998. Simultaneous
determination of cyanide and
thiocyanate in blood by ion
chromatography with fluorescence and
ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B
Biomed. Sci. Appl.* 713: 353-359.
- Flanagan, R.J., Braithwaite, R.A., Brown, S.S.,
Widdop, B. and de Wolff, F.A. 1995.

- Cyanide. In: Basic Analytical Toxicology. World Health Organization. Geneva. p. 117-121.
- Holzbecher, M. and Ellenberger, H.A. 1985. An evaluation and modification of a microdiffusion method for the emergency determination of blood cyanide. *J. Anal. Toxicol.* 9: 251 – 253.
- Horwitz, W. and Albert, R. 2006. The Horwitz Ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. *J. AOAC Inter.* 89: 1095–1109.
- Lerdsri, J., Doonsungnern, A. and Chuachan, U. 2014. Nitrate poisoning due to ingestion of *Mimosa invisa* in cattle. Proceedings of the 3rd Thailand-Japan joint conference on animal health. p. 41.
- Lundquist, P., Kagedal, B. and Nilsson, L. 1995. An improved method for determination of thiocyanate in plasma and urine. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 33: 343–349.
- Manzano, H., de Sousa A.B., Soto-Blanco B., Guerra J.L., Maiorka P.C. and Gorniak S.L. 2007. Effects of long-term cyanide ingestion by pigs. *Vet. Res. Commu.* 31(1): 93-104.
- Mateus, F.H., Lepera, J.S. and Lanchote, V.L. 2005. Determination of acetonitrile and cyanide in rat blood: Application to an experimental study. *J. Anal. Toxicol.* 29(2): 105–109.
- McKenzie, R.A. and McMicking, L.I. 1977. Ataxia and urinary incontinence in cattle grazing sorghum. *Aust. Vet. J.* 53: 496-497.
- Morgan, R.L. and Way, J.L. 1980. Fluorometric determination of cyanide in biological fluids and pyridoxal. *J. Anal. Toxicol.* 4(2): 78-81.
- Murphy, K.E., Schantz, M.M., Butler, T.A., Benner, B.A., Wood, L.J. and Turk, G.C. 2006. Determination of cyanide in blood by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Clin. Chem.* 52: 458-467.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. and Constable, P.D. 2007. Veterinary Medicine; A text book of the disease of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10th ed. Saunders Publishers, London, UK. p. 1852-1854.
- Rajan, A., Manomohan, C.B., Valsala, K.V., Sreekumaran, K.M. and Nair, N.D. 1986. Experimental studies on the toxicity of the plant *Mimosa invisa* in calves. *Kelara J. Sci.* 17: 91-98.
- Shafi, H., Subhani, A., Imran, M., Watoo, S.A., Sarwar, M., Hussan, S.S., Latif, A., Ashiq, M.Z., Tahir, M.A. and Tahir, A.M. 2015. Determination of cyanide in biological and non-biological matrices by headspace gas chromatography coupled to flame - ionization detector.

Arab J. Foren. Sci. Foren. Med. 1(1):
123-129.

Soto - Blanco, B., Gorniak, S.L. and Kimura, E.T.
2001. Physiopathological effects of the
administration of chronic cyanide to
growing goats- a model for ingestion of
cyanogenic plants. *Vet. Res. Commun.*
25(5): 379-389.

The Merck Veterinary Manual. 2014.
“Overview of Cyanide Poisoning”.
[Online]. Available : http://www.merckvetmanual.com/mvm/toxicology/cyanide_poisoning/overview_of_cyanide_poisoning.html. Accessed February 12, 2016.

Tsuge, K., Kataoka, M. and Seto, Y. 2001. Rapid
determination of cyanide and azide in
beverages by microdiffusion
spectrophotometric method. *J. Anal. Toxicol.* 25: 228-236.

Usha, P.T.A., Gopakumar, N. and
Chandrasekharan, A.M.N. 2009. Toxicity
of fresh juice of *Mimosa invisa* in
rabbits. *J. Vet. Anim. Sci.* 40: 6-8.

Way, J.L. 1984. Cyanide intoxication and its
mechanism of antagonism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24: 451-481.

