



สัตวแพทยสาร

Journal of the Thai Veterinary Medical Association

ISSN 0125-0620

ปีที่ 75 เล่มที่ 2

Vol. 75 No. 2



คณะกรรมการบริหารสัตวแพทยสมาคม แห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์

วาระ: พ.ศ. ๒๕๖๗-๒๕๖๘

คณะกรรมการที่ปรึกษา

๑. อธิบดีกรมปศุสัตว์		ที่ปรึกษา
๒. อธิบดีกรมประมง		ที่ปรึกษา
๓. อธิบดีกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช		ที่ปรึกษา
๔. พลตำรวจเอก ดำรงศักดิ์ กิตติประภัสร์		ที่ปรึกษา
๕. นายธัญญา ณะอบเหล็ก		ที่ปรึกษา
๖. นายอดิพงษ์ โลหะบัณฑิตวงศ์		ที่ปรึกษา
๗. ผู้อำนวยการองค์การสวนสัตว์แห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์		ที่ปรึกษา
๘. ผู้อำนวยการสำนักอนามัย กรุงเทพมหานคร		ที่ปรึกษา
๙. นายกสมาคมสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์แห่งประเทศไทย		ที่ปรึกษา
๑๐. นายกสมาคมสัตวบาลแห่งประเทศไทย ในพระราชูปถัมภ์ฯ		ที่ปรึกษา
๑๑. นายกสมาคมธุรกิจเวชภัณฑ์สัตว์		ปรึกษา
๑๒. สมาคมสัตวแพทย์สวนสัตว์และสัตว์ป่าแห่งประเทศไทย		ที่ปรึกษา

กรรมการสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์

๑. นายสัตวแพทย์ปราโมทย์ ตาพวัฒน์		นายกสัตวแพทยสมาคมฯ
๒. นายสัตวแพทย์รักไทย งามภักดิ์		อุปนายกสมาคมฯ คนที่ ๑
๓. นายสัตวแพทย์เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล		อุปนายกสมาคมฯ คนที่ ๒
๔. นายสัตวแพทย์อุดม เจือจันทร์		เลขาธิการ
๕. นายสัตวแพทย์วีระเดช โปธาคณาพงศ์		ผู้ช่วยเลขาธิการ
๖. นายสัตวแพทย์สิริพงศ์ สุขถาวรเจริญพร		เหรัญญิก
๗. นายสัตวแพทย์ดุสิต เลาสินณรงค์		นายทะเบียน
๘. นายสัตวแพทย์นฤเบศ เนินทอง		สารานุกรม
๙. นายสัตวแพทย์วัชรพล โชติยะปุตตะ		วิเทศสัมพันธ์
๑๐. นายสัตวแพทย์ณรงค์ เลี้ยงเจริญ		เผยแพร่วิชาการ
๑๑. นายสัตวแพทย์ชัยวุฒิ คุนาค		ประชาสัมพันธ์
๑๒. ศ.สัตวแพทย์หญิง ดร.เกวลี ฉัตรตรงค์		กรรมการกลางสามัญ
๑๓. สัตวแพทย์หญิงศุภาภรณ์ เต็มยอด		กรรมการกลางสามัญ
๑๔. ศ.นายสัตวแพทย์ ดร.นิวัตร จันทรศิริพรชัย		กรรมการกลางสามัญ
๑๕. นายสัตวแพทย์รุชติโรจน์ จิโรจน์วงศ์		กรรมการกลางสามัญ
๑๖. สัตวแพทย์หญิง ดร.นุชนารถ ทิพย์มงคลศิลป์		กรรมการกลางสามัญ

สัตวแพทยสาร

JOURNAL OF THE THAI VETERINARY
MEDICAL ASSOCIATION

ปีที่ 75 เล่มที่ 2
Vol. 75 No. 2

กรกฎาคม - ธันวาคม 2567
July - December 2024

ที่ปรึกษา

นายสัตวแพทย์เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์
สพ.ญ.นพวรรณ บัวมีรูป สำนักควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์

สารานุกรม

นายสัตวแพทย์นฤเบศ เนินทอง สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

กองสารานุกรม

รศ.น.สพ.ดร.ธีรวัฒน์ ธาราศานิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ.น.สพ.ดร.เกษม รัตนปัญญาพิทักษ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รศ.สพ.ญ.ดร.สุกัญญา ทองรัตน์สกุล วิทยาลัยสัตวแพทยศาสตร์อัครราชกุมารี
มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
รศ.น.สพ.ดร.วิฑูรย์ วิริยะรัตน์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ.สพ.ญ.ดร.ศรดา ติวะนันท์กร คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
รศ.สพ.ญ.ดร.สิริขจร ตั้งควัฒนา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผศ.น.สพ.ดร.ทนต์ศักดิ์ มะมม คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร
อ.สพ.ญ.มนทกานต์ จิระจันทร์ วิทยาลัยสัตวแพทยศาสตร์อัครราชกุมารี
มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
ผศ.น.สพ.ดร.ชัยวัฒน์ บุญแก้ววรรณ วิทยาลัยสัตวแพทยศาสตร์อัครราชกุมารี
มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
สพ.ญ.ดร.อรพรรณ อาจคำภา สำนักงานปศุสัตว์เขต 4 กรมปศุสัตว์
น.สพ.ประภิต บุญพรประเสริฐ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์
น.สพ.อัจฉบุญณ์ แสงศิริรักษ์ สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์
กรมปศุสัตว์

สารบัญ

Research articles.....

Identification and quantification of herbicides atrazine and diuron in stomach contents by Thin Layer Chromatography and UV-Vis Spectrophotometry การตรวจเอกลักษณ์และหาปริมาณสารกำจัดวัชพืชชนิด atrazine และ diuron ในอาหาร ในกระเพาะด้วยวิธี Thin Layer Chromatography และ UV-Vis Spectrophotometry อนุสรณ์ อยู่เย็น ณ์ัฐกร ราชบุตร	1-15
Case study : Study on Suspected virulent strain of isolated FMDV, O/ME-SA/Ind-2001e Lineage, Outbreak in Prachuap Khiri Khan and Saraburi Province, Thailand, 2022 กรณีศึกษา : การศึกษาความรุนแรงและคุณสมบัติของเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อย ซีโรไทป์ O สายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e ที่แยกได้จากระบาดในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และจังหวัดสระบุรี ปี 2565 นลินี หงษ์ชุมพล กิ่งกานต์ บุญสุยา สิริโย จีรนันท์ โชติทิฆัมพร ณ์ัฐกานต์ สุวรรณกิจวัฒน์ ทวิวัฒน์ ตีมะการ จรรยา สมานิตย์	16-28

หนังสือยืนยัน

การเผยแพร่ในสัตวแพทยสาร (Journal of the Thai Veterinary Medical Association under Royal Patronage)

เรียน สาราณียากร

ข้าพเจ้า.....ตำแหน่ง.....

สถานที่ทำงาน.....

โทรศัพท์.....โทรศัพท์มือถือ.....E-mail.....

ขอยืนยันว่าเรื่อง.....

.....

.....

ประเภทผลงาน ผลงานวิชาการ บทความ สำหรับหน่วยงานราชการได้ผ่านการพิจารณา
จากคณะกรรมการพิจารณาผลงานวิชาการของหน่วยงาน เรียบร้อยแล้ว

ทั้งนี้ ข้าพเจ้ารับทราบและยอมรับการปฏิบัติตามระเบียบการเผยแพร่ผลงานในสัตวแพทยสาร

ขอรับรองว่าข้อความข้างต้นเป็นความจริงทุกประการ

ลงชื่อผู้เขียน

.....
(.....)

ตำแหน่ง.....

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

สัปดาห์วารสารเป็นวารสารทางวิชาการของสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ซึ่งลงบทความ ผลงานค้นคว้าวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ที่เกี่ยวกับวิชาการในสาขาสัตวแพทยศาสตร์ คณะผู้จัดทำสัปดาห์วารสาร ยินดีรับ เรื่องจากทุกท่านที่กรุณาส่งมาเพื่อเผยแพร่ และเพื่อความสะดวกในการพิจารณาเรื่อง ขอเสนอแนะดังนี้

1. เรื่องที่จะนำลง

1.1 งานค้นคว้าทดลองหรือวิจัยทางวิชาการ ที่เกี่ยวกับสัตว์ ผลิตภัณฑ์สัตว์ หรือพืชอาหารสัตว์ ทั้งที่ทำในประเทศและต่างประเทศ หรือวิทยานิพนธ์

1.2 บทความวิจัย (Research article) บทความปริทัศน์ (Review article) บทความวิจัยสั้น (Short communication) และรายงานสัตว์ป่วย (Case report) ที่เป็นประโยชน์ และเกี่ยวข้องกับวิชาการสัตวแพทย และสัตวบาลทุกสาขา

1.3 เรื่องอื่น ๆ ที่คณะผู้จัดทำ พิจารณาเห็นสมควร

2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่ส่งมาลงพิมพ์ในสัปดาห์วารสาร ต้องไม่เป็นเรื่องที่เคยเผยแพร่ หรือกำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อลงในหนังสือ หรือวารสารอื่นใดมาก่อน

2.2 ต้นฉบับเป็นภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษ ใช้ตัวอักษร Microsoft San Serif 12 หรือ ThSarabun PSK 16 โดยพิมพ์ด้วยโปรแกรม Microsoft word

2.3 ความยาวของเรื่องสำหรับบทความชนิดต่าง ๆ จำนวนไม่เกิน 20 หน้า สำหรับบทความวิจัยสั้นหรือรายงาน สัตว์ป่วยจำนวนไม่เกิน 5 หน้า หรือตามที่เห็นสมควร

2.4 ผลงานวิชาการที่ตีพิมพ์ในสัปดาห์วารสารแล้ว ถือเป็นลิขสิทธิ์ของหนังสือที่ผู้เขียนจะนำไปเผยแพร่ที่อื่นอีกไม่ได้

2.5 ตารางและภาพที่ใช้ประกอบในบทความ ควรแนบไฟล์ต้นฉบับของตารางและภาพนั้นมาด้วย

3. บทความวิจัย (Research article)

3.1 วัตถุประสงค์

เพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัยทางด้านสัตวแพทยและ สัตวบาลฉบับสมบูรณ์

3.2 รูปแบบโดยรวม

3.2.1 ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 20 หน้า กระดาษ A4

3.2.2 จำนวนรูปและตาราง ตามความเหมาะสมของบทความ

3.3 การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

3.3.1 ชื่อเรื่อง (Title) มีทั้งภาษาไทยและ ภาษาอังกฤษ ควรตั้งชื่อให้สั้นกะทัดรัด ชัดเจน และสื่อ ความหมายได้

3.3.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน (Author and co-workers) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและ ภาษาอังกฤษ พร้อมทั้งระบุสถานที่ทำงาน จังหวัด รหัส ไปรษณีย์และ กรณียบอกหมายเลขโทรศัพท์หรืออีเมลของ ผู้เขียน/ผู้รับผิดชอบ เพื่อการติดต่อ

3.3.3 บทคัดย่อ (Abstract) เขียนสั้น ๆ ให้ ได้เนื้อความครอบคลุมทั้งหมด โดยต้องมีชื่อเรื่องและ บทคัดย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ความยาวไม่เกิน 300 คำต่อภาษา

3.3.4 คำสำคัญ (Key words) เป็นคำที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้น ๆ ระบุ อยู่ใต้บทคัดย่อ ทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ รวมกัน แล้วไม่เกินภาษาละ 5-7 คำ ทั้งนี้เพื่อให้ผู้วิจัยอื่นใช้ในการ ค้นหา ในกรณีที่เป็นคำสำคัญที่จะใช้เป็นคำทับศัพท์ภาษา อังกฤษ ให้ใช้คำภาษาอังกฤษ

3.3.5 บทนำ (Introduction) บรรยายความเป็นมาสั้น ๆ ควรมีการตรวจเอกสาร (literature review) รวมทั้งอธิบายจุดประสงค์ของงาน

3.3.6 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) ในกรณีที่เป็นการคิดค้นขึ้นใหม่ควรอธิบาย อย่างละเอียด ถ้าเป็นวิธีการที่ทราบกันอยู่แล้วและตีพิมพ์แล้ว ไม่ต้องบรรยายซ้ำ ควรเขียนในลักษณะข้ออ้างอิง (ขึ้นกับ ความเห็นของผู้พิจารณา) ในกรณีที่มีการใช้สัตว์ทดลอง ขอให้ระบุรหัสการอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ของผู้รับผิดชอบบทความที่ออกโดยคณะกรรมการของ สถาบัน (institutional review board) เช่น เลขที่การ อนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของสถาบัน สุขภาพสัตว์แห่งชาติ EA 011/61 (R) กรณีหน่วยงานของ ผู้วิจัยไม่มี IRB ให้ขอหน่วยงานอื่นที่เทียบเท่า ทั้งนี้ขึ้นอยู่ กับการดุลพินิจของสารานุกรม ในกรณีงานวิจัยเกี่ยวข้อง

กับมนุษย์ ต้องได้รับการอนุมัติล่วงหน้าสำหรับการวิจัยในมนุษย์โดยคณะกรรมการของสถาบัน หรือคณะกรรมการจริยธรรมที่เทียบเท่า หรือต้องได้รับความยินยอมโดยได้รับข้อมูล (informed consent) ซึ่งอาจขอความยินยอมด้วยการลงนามหรือด้วยวาจา หรืออธิบายว่าทำไมไม่ได้รับความยินยอม

3.3.7 ผลการทดลอง (Results) และวิจารณ์ (Discussion) รายงานผลการทดลองเป็นคำบรรยาย ควรให้รายละเอียดและเข้าใจง่าย หากเป็นไปได้ควรเสนอผลในรูปของตาราง รูปภาพ หรือกราฟ ไม่ควรแสดงถึงผลที่เหมือนกัน ถ้าเป็นตาราง (tables) ควรพิมพ์ให้ชัดเจนและขนาดพอเหมาะกับขนาดของหน้าของสัปดาห์วารสาร ตารางควรมีความหมายในตัวเอง และต้องมีคำอธิบายเหนือตารางด้วย ในกรณีที่ เป็นรูปภาพ (figures) ควรมีคำอธิบายสั้น ๆ เป็นภาษาเดียวกับเนื้อเรื่อง สามารถเป็นภาพขาวดำหรือภาพสี ต้องส่งมาเป็นไฟล์แนบมาด้วยขนาดไม่ต่ำกว่า 250 pixels และอธิบายรายละเอียดภาษาเดียวกับเนื้อเรื่องไว้ได้รูป การวิจารณ์ เป็นการวิจารณ์ผลการทดลองโดยควรมีการเปรียบเทียบกับผลงานของผู้อื่นที่ได้กระทำมาแล้ว และเน้นถึงสิ่งที่ได้ค้นพบ

3.3.8 สรุป (Conclusion) และคำแนะนำ (Suggestion) หากเป็นบทความควรมีการตรวจเอกสาร (review papers) หรือเป็นการทดลองที่มีหลายข้อ ควรมีบทสรุปที่เขียนใจความสำคัญ

3.3.9 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgment) อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เรียบเรียงย่อหน้าเดียวแบบกระชับ ระบุแหล่งทุนวิจัย บุคคลและหน่วยงานที่ได้รับความช่วยเหลือ หรือความร่วมมือในงานค้นคว้าวิจัย

3.3.10 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. การเขียนอ้างอิงในเนื้อเรื่องควรอ้างอิง ดังนี้ คือ

1. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นคนไทย เมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น นรสุทธิ์ และคณะ (2550) หรือเมื่อผู้รายงานอยู่กลางหรือท้ายประโยค เช่น (นิวัต, 2550) หรือ (พรเพ็ญ และคณะ, 2550)

2. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นชาวต่างประเทศเมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น Tomazewski and Daniel (1992), Taylor *et al.* (1992) หรือเมื่อ

ผู้รายงานอยู่กลางหรือท้ายประโยค เช่น (Tomazewski and Daniel, 1992), (Taylor *et al.*, 1992)

3. กรณีอ้างอิงบุคคล หรือเรื่องที่ไม่เคยลงพิมพ์มาก่อน (personal communication) ให้อ้างอิงเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปลงในรายชื่อเอกสารอ้างอิง

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่องควรอ้างอิงเอกสารภาษาไทยก่อนแล้วตามด้วยภาษาอังกฤษ โดยเขียนเรียงลำดับพยัญชนะของชื่อผู้เขียน (ถ้าเป็นภาษาอังกฤษใช้ชื่อสกุล ตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง) ตามด้วย ปี ชื่อเรื่อง ชื่อหนังสือหรือชื่อย่อวารสาร (พิมพ์ตัวเอน) ปีที่ฉบับที่ และหน้าที่อ้างอิง ดังตัวอย่าง คือ

นรสุทธิ์ บ้างภูมิ นุช โชติช่วง สุพจน์ อวาสกุลสุทธิ วนิดา พัศดุรงค์ วิมล เพชรกาญจนางค์ กาญจน อิมศิลป์ ธีระศักดิ์ พราพงษ์ วรรณดา สุจริต และ ศิริวรรณ พราพงษ์. 2550. สรีระเปรียบเทียบทางด้านสุขภาพของโคมนมที่ได้รับตำรับพิษสมุนไพรรักษาในระยะก่อนคลอด คลอดและหลังคลอด. *สัปดาห์วารสาร*. 58 (2): 1-11.

Suradhat, S., Kesdangsakonwut, S., Sada, W., Buranapraditkun, S., Wongsawang, S. and Thanawongnuwech, R. 2006. Negative impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the efficacy of classical swine fever vaccine. *Vaccine*. 24 (14): 2634-2642.

ค. ในกรณีที่อ้างอิงตำรา (textbook) ให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อตำรา (พิมพ์ครั้งที่เท่าใดและชื่อบรรณาธิการหากมี) สำนักพิมพ์ เมืองและประเทศที่พิมพ์หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง

Krammer, J.W. 1989. Clinical enzymology. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 4th eds., edited by J.J. Kaneko. Academic Press, USA. p. 346.

หมายเหตุ ชื่อทางวิทยาศาสตร์ทั้งภาษาอังกฤษและทับศัพท์ภาษาไทยให้พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรที่ต่างจากตัวเรื่อง

4. บทความปริทัศน์ (Review article)

4.1 วัตถุประสงค์

- การสำรวจงานวิจัยที่มีอยู่แล้ว
- บทความสำหรับประมวลความรู้ในเรื่องหรือประเด็นใดประเด็นหนึ่ง
- บทความที่แสดงถึงการเคลื่อนไหว ความเป็นมา เป็นไป และชี้แนวทางการทำวิจัยที่ควรเกิดขึ้น
- การประเมินสถานะความรู้ที่ผ่านมา
- การให้ข้อมูลแก่ผู้อ่าน ถกเถียง ตีความ อภิปราย ชี้แนวทาง ให้ข้อเสนอแนะ บอกทางบวก ทางลบ
- บทความที่เรียบเรียงโดยมีการวิเคราะห์วิจารณ์ เปรียบเทียบวรรณกรรมที่มีการดำเนินการมาแล้วจนถึงปัจจุบัน สังเคราะห์ให้เกิดความรู้ที่แสดงภาพของงานวิจัยในหัวข้อเรื่องที่ศึกษา

4.2 การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

4.2.1 ชื่อเรื่อง สั้น ชัดเจน ไม่เยิ่นเย้อ

4.2.2 บทคัดย่อ คือบทสรุปที่นำมาไว้นำเรื่องหลักเกณฑ์แบบเดียวกับงานวิจัย แต่ไม่ต้องมีหัวข้อต่าง ๆ ควรเน้นถึงความสำคัญของเรื่อง ปัญหา อุปสรรค และข้อเสนอแนะ หรือบทวิจารณ์ของผู้อื่นและของผู้เขียนเอง

4.2.3 บทนำ เพื่อให้ผู้อ่านตระหนักถึงความสำคัญของเรื่องที่จะตามมา อาจมีเอกสารอ้างอิงหรือไม่ก็ได้ ไม่ควรให้บทนำยาวเกินไป และควรเป็นข้อเขียนที่เข้าใจง่าย

4.2.4 เนื้อเรื่อง ไม่มีกฎเกณฑ์ตายตัวใด ๆ ในเรื่องหัวข้อของเนื้อเรื่อง แต่ขึ้นกับเรื่องที่คุณเขียนเรียบเรียง ควรแบ่งเป็นหัวข้อใหญ่ ๆ และอาจมีหัวข้อย่อยตามจำเป็น ผู้เขียนสามารถนำข้อมูล ความคิดเห็นข้อวิจารณ์ของผู้อื่นมาเสนอในรูปแบบใหม่ ซึ่งอาจเป็น รูป ตาราง รูปภาพ กราฟฯ แต่ไม่ควรลอกสิ่งเหล่านี้มาลงโดยไม่ได้ดัดแปลง ตัดทอน หรือเรียบเรียงใหม่ หากทำเช่นนั้นควรให้เครดิตแก่เจ้าของเรื่อง ถ้าเป็นข้อความควรจัดอยู่ในเครื่องหมายคำพูด

4.2.5 บทวิจารณ์ ควรมีการวิจารณ์ของผู้เรียบเรียง เพื่อให้ผู้อ่านคล้อยตามในประเด็นที่ผู้เขียนเห็นว่าสำคัญ หากมีข้อโต้แย้งในเรื่องใด ผู้เขียนควรหาประจักษ์พยานมาอ้างอิง และสรุปเป็นข้อยุติ หากยังมีข้อสงสัย ควรเสนอแนะให้มีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติม

4.2.6 คำขอบคุณ โดยปกติจะไม่มี แต่หากผู้เขียนได้รับความช่วยเหลือต่าง ๆ ในการเรียบเรียงและจัดเตรียมต้นฉบับ เช่น การหาข้อมูล รูปภาพ กราฟ ตารางฯ จากผู้อื่น และนำสิ่งนั้นมาตีพิมพ์โดยไม่มี การดัดแปลง ก็ควรขออนุญาตเจ้าของและแสดงความขอบคุณไว้ในตอนนี้อย่างน้อย

4.2.7 บรรณานุกรม ไม่จำเป็นต้องมีการอ้างอิงในเนื้อเรื่อง แต่หลักการเขียนใช้แบบเดียวกับบทความวิจัย

5. บทความวิจัยสั้น (Short communication)

5.1 วัตถุประสงค์

5.1.1 รายงานการพัฒนา/ปรับปรุงวิธีการที่ใช้ในปัจจุบัน

5.1.2 รายงานการประยุกต์ใช้สาร/เครื่องมือต่าง ๆ ที่ไม่เคยใช้มาก่อน

5.1.3 รายงานที่ข้อมูลสมบูรณ์ระดับหนึ่ง แต่ต้องรีบเผยแพร่

5.2 รูปแบบโดยรวม

5.2.1 ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 5 หน้ากระดาษ A4

5.2.2 รูปและตารางไม่เกิน 2 ชิ้น ต่อบทความ

5.3 การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

5.3.1 บทคัดย่อ ความยาวไม่เกิน 100 คำ

5.3.2 คำสำคัญ ไม่เกิน 5 คำ

5.3.3 คำนำ

5.3.4 อุปกรณ์และวิธีการ

5.3.5 ผลและวิจารณ์

5.3.6 สรุปและข้อเสนอแนะ

5.3.7 กิตติกรรมประกาศ จะมีหรือไม่ก็ได้

5.3.8 เอกสารอ้างอิง 6-10 เรื่อง เขียน

รูปแบบเดียวกับบทความวิจัย

6. รายงานสัตว์ป่วย (Case report)

6.1 วัตถุประสงค์

6.1.1 รายงานการพบโรค/อาการ/กลุ่มอาการ ในสัตว์

6.1.2 รายงานการตรวจวินิจฉัยโรค/รอยโรค ในสัตว์

6.1.3 รายงานการใช้ยา/สารเคมี/อาหาร/
แร่ธาตุ ในสัตว์

6.2 รูปแบบโดยรวม

6.2.1. ความยาวทั้งหมด 4 - 10 หน้ากระดาษ

A4

6.3 มีการเขียนได้ 2 แบบคือ

6.3.1 **แบบที่ 1** มีรูปแบบ คือ แบ่งหัวข้อต่าง ๆ
เหมือนบทความวิชาการ ได้แก่

6.3.1.1 บทคัดย่อ

6.3.1.2 คำสำคัญ ไม่เกิน 5 คำ

6.3.1.3 คำนำ

6.3.1.4 อุปกรณ์และวิธีการ

6.3.1.5 ผลและวิจารณ์

6.3.1.6 สรุปและข้อเสนอแนะ

6.3.1.7 กิตติกรรมประกาศ จะมีหรือไม่ก็ได้

6.3.1.8 เอกสารอ้างอิง เขียนรูปแบบเดียว

กับบทความวิจัย

6.3.2 **แบบที่ 2** ไม่มีรูปแบบ ไม่แบ่งหัวข้อ

6.3.2.1 บทคัดย่อ

6.3.2.2 คำสำคัญ ไม่เกิน 5 คำ

6.3.2.3 เนื้อเรื่อง

6.3.2.4 กิตติกรรมประกาศ จะมีหรือไม่ก็ได้

6.3.2.5 เอกสารอ้างอิง เขียนรูปแบบเดียว

กับบทความวิจัย

สารจากสารานุกรม

เรียน ผู้อ่านทุกท่าน

ขอสวัสดิ์ท่านผู้อ่านทุกท่าน พบกันครั้งนี้เป็นฉบับที่ 2 ของปีที่ 75 ของสัตวแพทยสารแล้ว
หวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะเป็นประโยชน์กับผู้อ่าน สมดังเจตนารมณ์ของวารสาร

กองสารานุกรม ขอขอบพระคุณผู้พิมพ์ที่ให้ความสนใจส่งบทความเผยแพร่ใน
สัตวแพทยสาร ท่านผู้ทรงคุณวุฒิที่สละเวลาพิจารณาบทความบทความให้ความถูกต้อง สมบูรณ์
ท่านนายกสมาคมและกรรมการสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย พระบรมราชูปถัมภ์ให้การสนับสนุน
ตลอดจนทีมงานทุกท่าน ไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

นายสัตวแพทย์นฤเบศ เนินทอง
สารานุกรม

Identification and quantification of herbicides atrazine and diuron in stomach contents by Thin Layer Chromatography and UV-Vis Spectrophotometry

Anusorn Yooyen* Nuttakorn Ratchabut

Abstract

Background: Atrazine (ATZ) and diuron (DIU) are used herbicides globally to control weeds and protect agricultural yields. Their extensive use has raised concerns about adverse impacts on animals and the environment. This study aimed to develop and validate Thin Layer Chromatography (TLC) and UV-Vis Spectrophotometry methods for the identification and quantification of ATZ and DIU in stomach content samples.

Method: Optimal conditions for analysis were determined and subsequently applied to validate the identification and quantification of ATZ and DIU. A modified QuEChERS technique was utilized for sample extraction from stomach contents.

Result: For the TLC method, optimal conditions were achieved using TLC silica gel 60 F₂₅₄, with chloroform : acetone (7:3) as the mobile phase, and o-TKI spray reagent to visualize gray-black or green spots depending on the concentration of the standard compounds. The R_f values for ATZ and DIU were 0.58 and 0.52, respectively. Repeatability showed a coefficient of variation (CV) of 0.0–3.8% and specificity tests showed no interference from matrix components. The limit of detection (LOD) for ATZ and DIU using TLC was 0.02 µg/g and 0.04 µg/g, respectively. For the UV-Vis Spectrophotometry method, ATZ and DIU exhibited linearity over the ranges of 0.10–4.01 µg/ml and 0.50–20.13 µg/ml with correlation coefficients (r) of 0.997 and 0.999, respectively. The LOD and limits of quantification (LOQ) for ATZ were 0.10 µg/ml and 0.50 µg/ml, respectively, while for DIU, they were 0.10 µg/ml and 0.63 µg/ml, respectively. The accuracy of the method, evaluated as percentage recovery, ranged from 71-101% for ATZ and 74-105% for DIU (standard at 70–120%). Precision, as indicated by HORRAT values, ranged from 0.82-1.12 for ATZ and 0.47-1.11 for DIU (standard at < 2).

Conclusion: The developed TLC and UV-Vis Spectrophotometry methods are accurate and precise for the identification and quantification of ATZ and DIU in stomach content samples. These methods are suitable for application in Toxicology laboratories for diagnosing and investigating the causes of animal morbidity and mortality potentially associated with herbicide poisoning.

Keywords: atrazine, diuron, stomach contents, Thin Layer Chromatography, UV-Vis Spectrophotometry

National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, 50/2 Phahonyothin Road, Lat Yao, Chatuchak, Bangkok, 10900

*Corresponding Author: Tel. 0 2579 8910 anusornyoyen@yahoo.com

Received:

Revised:

Accepted:

การตรวจเอกลักษณ์และหาปริมาณสารกำจัดวัชพืชชนิด atrazine และ diuron ในอาหารใน กระเพาะด้วยวิธี Thin Layer Chromatography และ UV-Vis Spectrophotometry

อนุสรณ์ อยู่เย็น* ณิชกร ราชบุตร

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: atrazine (ATZ) และ diuron (DIU) เป็นสารกำจัดวัชพืชที่ใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก เพื่อควบคุมวัชพืชและป้องกันความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตร การใช้ในปริมาณสูงทำให้เกิดปัญหาส่งผลกระทบต่อสัตว์และสิ่งแวดล้อม การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธี Thin Layer Chromatography และ UV-Vis Spectrophotometry สำหรับตรวจหาเอกลักษณ์และปริมาณ ATZ และ DIU ในอาหารในกระเพาะ

วิธีการ: ทดสอบหาสถานะที่เหมาะสม แล้วนำไปใช้ในขั้นตอนการทดสอบความถูกต้องของวิธีตรวจหาเอกลักษณ์และปริมาณ ATZ และ DIU โดยใช้เทคนิค QuEChERS ที่ดัดแปลงมาใช้สำหรับสกัดตัวอย่างอาหารในกระเพาะ

ผลการศึกษา: สำหรับวิธี TLC สถานะที่เหมาะสมคือใช้ TLC silica gel 60 F₂₅₄ เฟสเคลื่อนที่ chloroform : acetone (7:3) และน้ำยาพ่น o-TKI ให้ spot สีเทาดำหรือสีเขียวยื่นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน โดยมีค่า Rf ของ ATZ และ DIU เท่ากับ 0.58 และ 0.52 ตามลำดับ ความสามารถในการทวนซ้ำมีค่า CV อยู่ในช่วง 0.0-3.8% ความจำเพาะเจาะจงพบว่าไม่มี spot จาก matrix รบกวน ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) ของวิธี TLC ของ ATZ และ DIU มีค่าเท่ากับ 0.02 µg/g และ 0.04 µg/g ตามลำดับ สำหรับวิธี UV-Vis Spectrophotometry พบว่า ATZ และ DIU มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.10-4.01 µg/ml และ 0.50-20.13 µg/ml โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.997 และ 0.999 ตามลำดับ ค่า LOD และค่า LOQ ของ ATZ และ DIU มีค่าเท่ากับ 0.10 µg/ml และ 0.50 µg/ml กับ 0.10 µg/ml และ 0.63 µg/ml ตามลำดับ ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธี พบว่ามีค่า %Recovery ของ ATZ และ DIU อยู่ในช่วงร้อยละ 71-101 และ 74-105 เกณฑ์ที่ยอมรับได้อยู่ในช่วงร้อยละ 70-120 ส่วนความเที่ยงพบว่า ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.82-1.12 และ 0.47-1.11 เกณฑ์ที่ยอมรับได้น้อยกว่า 2 ตามลำดับ

สรุป: วิธี TLC และ UV-Vis Spectrophotometry ที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้ตรวจหาเอกลักษณ์และปริมาณสารกำจัดวัชพืชชนิด ATZ และ DIU ในตัวอย่างอาหารในกระเพาะได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ เหมาะสมในการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการพิษวิทยา เพื่อการตรวจชันสูตรโรค หาสาเหตุการป่วยตายของสัตว์ที่อาจได้รับพิษจากสารกำจัดวัชพืชทั้งสองชนิดนี้ได้

คำสำคัญ: atrazine diuron อาหารในกระเพาะ Thin Layer Chromatography UV-Vis Spectrophotometry

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ 50/2 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

*ผู้รับผิดชอบบทความ: โทร. 0 2579 8910 anusornyooyen@yahoo.com

บทนำ

Atrazine (ATZ) และ diuron (DIU) เป็นสารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ (pesticides) ประเภทสารกำจัดวัชพืช (herbicides) ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก เพื่อควบคุมวัชพืชและป้องกันความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรในพื้นที่เพาะปลูก ซึ่งประเทศไทยมีการนำเข้าสารทั้งสองชนิดดังกล่าวตั้งแต่ปี พ.ศ. 2561-2565 ในปริมาณสูงและจัดอยู่ใน 10 ลำดับแรกตามข้อมูลการนำเข้าวัตถุอันตรายโดยสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร (2566) ATZ หรือ 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-triazine; $C_8H_{14}ClN_5$ เป็นสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม Triazines โดย ATZ ใช้สำหรับกำจัดวัชพืชในไร่อ้อย สับปะรด และข้าวโพด ออกฤทธิ์กำจัดได้ทั้งวัชพืชใบแคบ เช่น หญ้านกสีชมพู หญ้าดอกขาว หญ้าตีนกา เป็นต้น และวัชพืชใบกว้าง เช่น ผักโขม ผักโขมหิน เป็นต้น สามารถใช้งานได้ทั้งก่อนและหลังวัชพืชงอก (ปัสตรา และคณะ, 2564) การใช้ในปริมาณสูงทำให้เกิดการตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม ถูกจัดเป็นสารมลพิษที่สำคัญ เพราะเป็นสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ (endocrine disruptor) และพบว่า ATZ เป็นสาเหตุที่ทำให้ตับโต และหัวใจในสัตว์และมนุษย์เกิดความเสียหาย และในหนูเพศเมียมีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นในการพัฒนาเป็นเนื้องอกในเต้านม (Pathak and Dikshit, 2011) ATZ เป็นพิษต่อคนและสัตว์ โดยในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เมื่อกิน ATZ เข้าไปในปริมาณมาก จะเกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง กล้ามเนื้อล้า และน้ำลายฟูมปาก โดยอาการเกิดพิษในโคจากการกินจะพบอาการทางคลินิก ได้แก่ อ่อนหภูมิร่างกายสูงกว่าปกติ ซิพจรและอัตราการหายใจสูงขึ้น เดินเซ ปวดบ่ง เบื่ออาหาร ข้อแข็ง กล้ามเนื้อหลังกระตุก น้ำลายไหล และตาย และพบรอยโรค ได้แก่ หลอดเลือดดำของไต ปอด ตับขยายตัว ต่อมหมวกไตขยายใหญ่ มีเลือดออกในกล้ามเนื้อลาย ต่อมไทมัส ต่อมไพโรยด์ และหัวใจ (Props *et al.*, 2021) สัตว์เคี้ยวเอื้องมีความไวต่อการเกิดพิษเฉียบพลันมากกว่าสัตว์ฟันแทะ หากโค กระบือ และแกะ ได้รับ ATZ ขนาด 250 mg/kg จำนวน 2 ครั้ง สามารถทำให้ตายได้ และมีรายงานการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันโดยการให้ทางปากในสัตว์ฟันแทะชนิดต่าง ๆ พบว่ามีค่า LD_{50} อยู่ในช่วง 1700-4000 mg/kg (IPCS, 1990)

DIU หรือ 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea; $C_9H_{10}Cl_2N_2O$ เป็นสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม Phenylurea โดย DIU ใช้สำหรับกำจัดวัชพืชในไร่อ้อย สับปะรด และมันสำปะหลัง ออกฤทธิ์กำจัดได้ทั้งวัชพืชใบแคบ เช่น หญ้าตีนนก หญ้าตีนกา หญ้านกสีชมพู เป็นต้น และวัชพืชใบกว้าง เช่น ผักเบี้ยหิน ผักเสี้ยนผี เป็นต้น สามารถใช้งานได้ทั้งก่อนและหลังวัชพืชงอก (พงศกร และดาวจรัส, 2560) ขนาดของ DIU 50 mg/kg จำนวน 10 ครั้ง ทำให้โค กระบือ แกะ และสัตว์ปีกที่ได้รับแล้วเกิดอาการพิษ โดยสัตว์จะมีอาการเบื่ออาหาร ท้องเดิน ซึมอ่อนเพลีย ไม่มีแรง และพบรอยโรค ได้แก่ เกิดการบวมของปอด ตับ ม้าม และเยื่อหุ้มสมอง (มาลินี, 2523) ค่า LD_{50} (oral rats) ของ DIU เท่ากับ 1017 mg/kg (NCBI, 2024) การตรวจวิเคราะห์ ATZ และ DIU สามารถตรวจได้ในตัวอย่างทั้งทางสิ่งแวดล้อม (น้ำและดิน) และในตัวอย่างชีววัตถุ (อาหารในกระเพาะ ม้าม ตับ ไต) โดยใช้วิธี Thin Layer Chromatography (TLC) (Pawar *et al.*, 2018) ซึ่งเป็นการตรวจหาเอกลักษณ์หรือเป็นการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพ ใช้สำหรับการตรวจคัดกรองเบื้องต้น (screening test) ส่วนการตรวจวิเคราะห์เพื่อยืนยัน (confirmation test) หรือหาปริมาณ ATZ และ DIU นั้นสามารถตรวจได้หลายวิธี เช่น High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Shah *et al.*, 2011) Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (Props *et al.*, 2021) Liquid Chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (Blanchoud *et al.*, 2020) เป็นต้น แต่วิธีหาปริมาณดังกล่าวมีขั้นตอนที่ซับซ้อน ต้องอาศัยอุปกรณ์ที่มีราคาแพง การบำรุงรักษาเครื่องมือมีค่าใช้จ่ายสูง ตลอดจนผู้ตรวจวิเคราะห์ต้องมีความรู้ความชำนาญในการใช้เครื่อง ส่วนวิธี UV-Vis Spectrophotometry เป็นเทคนิคการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ ซึ่งสามารถทำได้ง่ายและประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าการตรวจหาปริมาณ ATZ และ DIU ด้วยวิธีอื่น ๆ จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาที่ตรวจพบ ATZ ในตัวอย่างที่ได้จากสัตว์ป่วยตายจากการกินสารกำจัดวัชพืชนี้เข้าไป เช่น Jowett *et al.* (1986) ตรวจพบ ATZ ในตัวอย่างอาหารในกระเพาะโค 12300 mg/kg ตับ 75-79 mg/kg และไต 53-67 mg/kg ซึ่งจะพบว่า ATZ ตกค้างในตัวอย่างอาหารในกระเพาะโคมากที่สุด นอกจากนี้ Props

et al. (2021) ตรวจพบ ATZ ในตัวอย่างอาหารใน กระเพาะโคและตับ ด้วยวิธี GC-MS แต่ไม่ได้ตรวจหา ปริมาณ เป็นต้น จะเห็นว่าเมื่อสัตว์เสียชีวิตจากการได้รับ สารพิษ มักพบสารพิษตกค้างในกระเพาะอาหาร เนื่องจาก กระเพาะอาหารเป็นที่แรกที่สารพิษเข้าสู่ร่างกายผ่าน การกินอาหารหรือดื่มน้ำ สารพิษที่ยังไม่ถูกดูดซึมเข้าสู่ กระแสเลือดจะคงอยู่ในกระเพาะอาหาร ทำให้สามารถ ตรวจพบได้หลังการเสียชีวิต ดังนั้นเพื่อเป็นการเตรียมความ พร้อมและเพิ่มศักยภาพห้องปฏิบัติการพิษวิทยา ในการ รองรับความต้องการการตรวจชันสูตรโรคหาสาเหตุ การป่วยตายของสัตว์ที่อาจได้รับพิษจากสารกำจัดวัชพืช ดังกล่าวที่มีการใช้ในปริมาณสูงแล้วตกค้างในสิ่งแวดล้อม และพืชอาหารสัตว์ หรืออาจได้รับการวางยา การศึกษา ครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและทดสอบความถูกต้อง ของวิธี (method validation) TLC และ UV-Vis Spectrophotometry ตรวจหาเอกลักษณ์และปริมาณ สารกำจัดวัชพืชชนิด ATZ และ DIU ในตัวอย่างอาหารใน กระเพาะ เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ รายงานผลวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือ และห้องปฏิบัติ การนำไปใช้ปฏิบัติได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียดทศนิยมสองตำแหน่ง (Sartorius BP 3100S, Germany) และทศนิยมสี่ตำแหน่ง (Sartorius BP 221S, Germany), Vortex mixer Genie 2 G560E (Scientific Industries, USA.), High speed refrigerated centrifuge 6500 (Kubota, Japan), Water bath W-350 (Mettler, Germany), Nitrogen evaporator XcelVap (Horizon Technology, USA.), Fume hood WZ-1500GP (WiZard, Thailand), UV cabinet MinUVIS (Desaga, Germany), TLC silica gel 60 F₂₅₄ glass plates 10x20 cm and 20x20 cm (Sigma-Aldrich, Germany), Disposable micropipettes intraMARK ขนาด 5 µL (BLAUBRAND®, Germany), TLC developing tank (Sigma-Aldrich, Germany), Supelclean™ ENVI-Carb SPE Tube (Supelco, USA.),

UV-Vis Spectrophotometer Specord 210 PLUS (Analytik Jena, Germany)

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: chloroform (ACS grade, Merck, Germany), acetone (Pesticide grade, RCI Labscan, Thailand), acetonitrile (Pesticide grade, RCI Labscan, Thailand), methanol (AR grade, RCI Labscan, Thailand), s (Ultra RESI-ANALYZED™ reagent grade, J.T. Baker, USA.), o-tolidine (Sigma-Aldrich, Germany), benzidine (Fluka AG, Switzerland), potassium iodide (Merck, Germany), primary secondary amine; PSA (Supelco, USA.), p-aminoacetophenone (TCI, Japan), และ DI water (Type II มีค่า resistivity > 18 mΩ.cm) ส่วนสารเคมี อื่น ๆ เป็นชนิด AR grade ของ Merck, Germany และ J.T. Baker, USA.

สารมาตรฐาน: Certified reference standard ATZ และ DIU เป็นผลิตภัณฑ์ของ Dr. Ehrenstorfer GmbH, Germany ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.37 และ 98.70, Lot number G1084826 และ G1078248 ตามลำดับ

วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน ATZ เพื่อเป็น stock solution โดยชั่ง ATZ 0.0100 g ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 ml ละลายด้วย acetone ปรับปริมาตรจนครบ ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายมาตรฐาน ATZ ความเข้มข้น 993.70 µg/ml

เตรียมสารละลายมาตรฐาน DIU เพื่อเป็น stock solution โดยชั่ง DIU 0.0102 g ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml ละลายด้วย acetone ปรับปริมาตรจนครบ ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายมาตรฐาน DIU ความเข้มข้น 1006.74 µg/ml

วิธีเตรียมน้ำยาเคมี

1) น้ำยาพ่น (spray reagent) ชนิด o-tolidine + potassium iodide [o-TKI] เตรียมปริมาตร 500 ml

เตรียมจาก o-tolidine 0.5 g ละลายด้วย acetic acid 10 ml และ potassium iodide (KI) 2 g ละลายด้วย DI water 10 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วย DI water

2) spray reagent ชนิด Vidict's reagent โดยเตรียมสารละลาย (ก) benzidine อิมิตัวใน 2% acetic acid ด้วยการปิเปต glacial acetic acid 10 ml ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 ml ปรับด้วย DI water จนครบปริมาตร จากนั้นตวงมา 350 ml ลงใน beaker แล้วค่อย ๆ เติม benzidine ลงไป ผสมให้เข้ากัน จนกว่า benzidine ไม่สามารถละลายต่อไปได้อีก นำไปเก็บไว้ในที่มีดค้างคืน จากนั้นเตรียมสารละลาย (ข) 1% potassium iodide โดยชั่ง KI 2 g ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 200 ml ละลายและปรับด้วย DI water จนครบปริมาตร แล้วนำ (ก) 350 ml และ (ข) 150 ml ผสมกันใน beaker ใส่ในขวดสีชา เก็บในตู้เย็น (4-8 °C)

3) ก๊าซคลอรีน [$Cl_2(g)$] 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 ที่เกิดขึ้นอิมิตัวทั่ว tank ก่อนอบ TLC plate

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

5) pyridine reagent โดยปิเปต pyridine 18 ml และ DI water 12 ml ลงใน beaker ผสมให้เข้ากัน ปิเปต conc. HCl ลงไป 3 ml ผสมให้เข้ากัน การศึกษานี้ใช้อาหารในกระเพาะโคที่ตรวจด้วยวิธี TLC แล้วไม่พบ ATZ และ DIU เป็นตัวแทนอาหารในกระเพาะสัตว์ สำหรับใช้เป็น sample blank เพื่อนำมาเตรียม spiked sample โดยการ เติมสารมาตรฐาน ATZ และ DIU จาก stock standard solution ลงไปใน sample blank ให้ได้ตามความเข้มข้นที่ต้องการ แล้วนำไปใช้ในขั้นตอนของการทดสอบความถูกต้องของวิธี

วิธีสกัดตัวอย่าง

สกัดตัวอย่างด้วยเทคนิค QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) ซึ่งดัดแปลงวิธีจาก Anastassiades and Lehotay (2003) โดยชั่งตัวอย่างอาหารในกระเพาะโค 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 ปิเปตส่วนสีทั้งหมดลงใน 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 ส่วนสีที่ได้กับการสกัดครั้งแรก 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 ปิเปตส่วนสีทั้งหมดใส่ในหลอดแก้วกันแหลมระเหยแห้งด้วย Nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C แล้วละลาย residue ด้วย acetone 1 ml เก็บใส่ vial นำไปตรวจหาเอกลักษณ์ของ ATZ และ DIU ด้วยวิธี TLC และหาปริมาณด้วยวิธี UV-Vis Spectrophotometry

การตรวจเอกลักษณ์ ATZ และ DIU ด้วยวิธี TLC
ดัดแปลงจากวิธีของ IAEA (2005) และ Afful *et al.* (2009)

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

ทดสอบหาเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมาะสมในการตรวจเอกลักษณ์ ATZ และ DIU โดยใช้หลอด capillary หรือ disposable micropipette แบบมีสเกล ขนาด 5 μ L ปิเปต stock standard solution ATZ และ DIU ชนิดละ 1, 5 และ 10 μ L ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1, 5 และ 10 μ g หยดลงบน TLC plate ขนาด 10x20 cm จำนวน 2 แผ่น โดยนำแผ่นที่ 1 ไปจุ่มแช่ใน TLC developing tank ที่มี mobile phase system 1 เป็น Hexane : acetone (4:1) และนำแผ่นที่ 2 ไปจุ่มแช่ใน mobile phase system 2 เป็น chloroform : acetone

(7:3) บันทึกร่องหมึกห้องและระยะเวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนบน TLC plate จากจุดที่ spot สารหรือจุดตั้งต้น (origin) ไปจนถึงจุดสิ้นสุด (solvent front) เมื่อถึง front นำแผ่น TLC ออกจาก tank วางทิ้งไว้ใน fume hood ให้ organic solvents ระเหย จากนั้นนำ TLC plates ไปวางในตู้ UV cabinet เพื่อส่องดู spot ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm สังเกตการดูดกลืนแสงและการแยกของสารมาตรฐาน แล้วทดสอบการติดสีของสารมาตรฐาน ATZ และ DIU บน TLC plates ทั้ง 2 แผ่นข้างต้น โดยนำ TLC plates ไปอบก๊าซ Cl₂ นาน 1 นาที แล้วไล่ก๊าซ Cl₂ ที่เกินออก โดยใช้ blower เป่าลมร้อนสลบลมเย็น ไล่ให้ทั่วทั้งแผ่น ประมาณ 5 นาที จากนั้น 1 แผ่น พ่นทับด้วย spray reagent o-TKI และอีก 1 แผ่น พ่นทับด้วย Vidict's reagents สังเกตการติดสีของ spot ของสารมาตรฐาน ATZ และ DIU (Visualization of spots) จากการทำปฏิกิริยากับน้ำยาเคมีทั้งสองชนิด และหาค่า Retention Factor (Rf) จากสูตรดังนี้

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่จากจุดตั้งต้น}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่จากจุดตั้งต้นไปถึงจุดสิ้นสุด}}$$

ทดสอบความถูกต้องของวิธี TLC โดยทำตาม EURACHEM (2014) ดังนี้

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection: LOD) ของสารละลายมาตรฐาน โดย หยอด stock standard solution ATZ และ DIU ชนิดละ 0.5, 1, 2, 3, 4, และ 5 µL ลงบนแผ่น TLC ขนาด 20x20 cm จำนวน 2 แผ่น นำไปทดสอบตามสภาวะที่เหมาะสมที่หาได้ ถ้าผลการทดสอบพบว่า spot ของสารมาตรฐานที่ระดับต่ำสุด (0.5 µL) ยังคงติดสี ให้เจือจาง stock standard solution ของสารมาตรฐาน ATZ และ DIU ด้วย acetone ให้มีความเข้มข้นต่ำลง นำมาทดสอบอีกครั้งตามขั้นตอน แล้วตัดสินจุดสุดท้ายที่ spot ของสารมาตรฐานติดสีด้วยสายตา กำหนดเป็นค่า LOD ของสารละลายมาตรฐาน ความสามารถในการทวนซ้ำ (repeatability) ของสารละลายมาตรฐาน ATZ และ DIU ด้วยการหยอดสารละลายมาตรฐาน ATZ และ DIU ที่ทราบค่า LOD แล้ว ลงบนแผ่น TLC ชนิดละ 3 ซ้ำ จำนวน 12 plates แบ่งเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 จำนวน 6 plates ใช้ Hexane :

acetone (4:1) โดย plate 1-3 spray ด้วย Vidict's reagent และ plate 4-6 spray ด้วย o-TKI reagent ชุดที่ 2 จำนวน 6 plates ใช้ chloroform : acetone (7:3) โดย plate 7-9 spray ด้วย Vidict's reagent และ plate 10-12 spray ด้วย o-TKI จากนั้นคำนวณหาค่าเฉลี่ย (x) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรผัน (Coefficient of Variation, CV) ของค่า Rf ของทั้งสองสารมาตรฐาน

ความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของวิธีโดยวิเคราะห์ blank (DI water), matrix blank (อาหารในกระเพาะโค 3 ตัวอย่าง), spiked matrix blank (อาหารในกระเพาะโคที่ตรวจด้วยวิธี TLC แล้วไม่พบ ATZ และ DIU นำมา spiked สารมาตรฐาน ATZ และ DIU ให้ได้ความเข้มข้น 39.75 และ 40.25 µg/g ซึ่งค่าที่เตรียมนี้มีค่าต่ำกว่า LD₅₀ และเตรียมตาม Afful *et al.*, 2007) นำไปสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เพื่อความบริสุทธิ์ (impurities) สารที่เกิดจากการสลายตัว (degradants) และ matrix ของตัวอย่างรบกวนสารที่สนใจ ศึกษาหรือไม่

วิเคราะห์หาค่า LOD ของวิธี โดยการเติม (spiked) 2 ml ของสารละลายมาตรฐาน ATZ 99.37 µg/ml และ DIU 100.67 µg/ml ลงใน sample blank (อาหารในกระเพาะโคที่ไม่มี ATZ และ DIU) 5 g จำนวน 10 หลอด (n=10) นำไปสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS ปริมาตรสุดท้าย จะได้ความเข้มข้นของ ATZ และ DIU ใน spiked sample แต่ละหลอดเท่ากับ 198.74 และ 201.34 µg/ml ตามลำดับ (39.75 และ 40.25 µg/g ตามลำดับ) แล้ววิเคราะห์ด้วยวิธี TLC ในทำนองเดียวกับการหาค่า LOD ของสารละลายมาตรฐาน คำนวณหาค่า LOD ของวิธี

วิธี UV-Vis Spectrophotometry

1) การตรวจหาปริมาณสารกำจัดวัชพืชชนิด ATZ ในอาหารในกระเพาะ ตัดแปลงจากวิธีของ Kesari and Gupta (1998)

การ Clean up สารละลายตัวอย่าง 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 นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จากเทคนิค QuEChERS 100 µL ผสมกับ acetone 900 µL ปิเปตลงใน SPE column ปล่อยให้สารละลายหยดลงด้วยอัตราการใช้ 1 หยดต่อวินาที แล้ว elute ด้วย acetone 4 ml ลงใน centrifuge tube แก้วขนาด 15 ml ระบายแห้งด้วย Nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C แล้วละลาย residue ด้วย acetone 200 µL นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ ATZ

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 นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer (Analytik Jena, Germany) รุ่น SPECORD® 210 PLUS ที่ความยาวคลื่น 470 nm

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ทดสอบการทำปฏิกิริยาการเกิดสีของสารมาตรฐาน ATZ กับน้ำยาเคมีต่าง ๆ ในวิธีวิเคราะห์ (pyridine reagent, NaOH และ PAAP) โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน ATZ ให้มีเนื้อสารอยู่ที่ 40.14 µg แล้วทำตามวิธีวิเคราะห์ข้างต้น ดูสีและลักษณะ spectrum ที่เกิดขึ้น และหาค่าความยาวคลื่นสูงสุดของ spectrum (λ_{max})

ทดสอบความถูกต้องของวิธี UV-Vis Spectrophotometry สำหรับหาปริมาณ ATZ โดยทำตาม ดติย (2547) และทิพวรรณ (2549) ดังนี้

ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and range)

หาช่วงการวิเคราะห์ (range) โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน ATZ จาก working std. ATZ 10.04 และ 100.36 µg/ml ใน DI water ให้มีความเข้มข้น 8 ระดับ โดยเติมสารละลาย ATZ ลงใน graduated tube

ขนาด 10 ml จำนวน 8 หลอด ให้มีเนื้อสารอยู่ในช่วง 1-60 µg (1.00, 3.01, 5.02, 10.04, 20.07, 30.11, 40.14, และ 60.22 µg) ดำเนินการตามวิธีวิเคราะห์ข้างต้น ระดับละ 1 ซ้ำ ซึ่ง final volume จะได้สารละลายมาตรฐาน ATZ ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.10-6.02 µg/ml นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer 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 โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2024)

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) สกัด spiked sample (ตัวอย่างอาหารในกระเพาะที่เติมสารมาตรฐาน ATZ) ความเข้มข้น 10 mg/kg นำไปสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS จำนวน 10 ซ้ำ ผ่านการ clean up แล้วทำตามวิธีวิเคราะห์ คำนวณความเข้มข้นเฉลี่ย (\bar{x}) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของ spiked sample แล้วคำนวณหาค่า LOD จากสูตร $LOD = 3SD$ และหาขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณหรือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างแม่นยำ (Limit of quantitation, LOQ) จากสูตร $LOQ = 10SD$ ความแม่นยำและความเที่ยง (accuracy and precision) วิเคราะห์ spiked sample 3 ระดับ ระดับละ 10 ซ้ำ คำนวณหาค่า % Recovery, % RSD และหาค่า HORRAT (Horwitz's ratio) จากสมการ

$$HORRAT \text{ (Horwitz's Ratio)} = \frac{\text{Experimental \%RSD}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

ประเมินความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ (accuracy) โดยพิจารณาจากค่า % Recovery ให้อยู่ในช่วงร้อยละ 70-120 (SANCO/12571/2013, 2014) ส่วนความเที่ยง (precision) นั้นประเมินจากค่า HORRAT โดยเกณฑ์การยอมรับ คือ น้อยกว่า 2 (Horwitz and Albert, 2006)

2) การตรวจหาปริมาณสารกำจัดวัชพืชชนิด DIU ในอาหารในกระเพาะ ดัดแปลงจากวิธีของ Galera *et al.* (1995)

การ Clean up สารละลายตัวอย่าง ด้วยวิธี TLC ดังนี้ Streak สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จากเทคนิค QuEChERS 100 μ L 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 จากนั้น นำ TLC plates ไปส่องภายใต้แสง UV ในที่มืด ที่ความยาวคลื่น 254 nm การดูกลิ่นแสงของแถบตัวอย่าง (band) ที่ขึ้นตรงกับ spot ของสารมาตรฐาน DIU ใช้ดินสอวงรอบแถบตัวอย่าง แล้วชุบ silica gel บริเวณที่วงไว้ให้หลุดทดสอบ เติมน้ำ acetone 2 ml ผสมด้วย vortex mixer 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 rpm ปิดเปิดส่วนใสไประเหยแห้งด้วย Nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C แล้วละลาย residue ด้วย acetonitrile : methanol (1:1) 1 ml

วิธีวิเคราะห์ นำสารละลายตัวอย่างจากการ clean up หรือสารละลายมาตรฐาน DIU ที่เตรียมได้ไปตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer (Analytik Jena, Germany) รุ่น SPECORD® 210 PLUS ที่ความยาวคลื่น 250 nm

ศึกษาสถานะที่เหมาะสม ทดสอบหาตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน DIU ที่ความเข้มข้น 10.07 μ g/ml ใน DI water และ acetonitrile : methanol (1:1) นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 200-350 nm บันทึกค่า λ_{max} ของ spectrum และค่า absorbance ที่ได้จากแต่ละตัวทำละลาย

ทดสอบความถูกต้องของวิธี UV-Vis Spectrophotometry สำหรับหาปริมาณ DIU โดยทำตาม ตติย (2547) และทิวรรณ (2549) ดังนี้

ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and range)

หาช่วงการวิเคราะห์ (range) โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน DIU จาก working std. DIU 50.34

μ g/ml ใน acetonitrile : methanol (1:1) ให้มีความเข้มข้น 8 ระดับ คือ 0.50, 1.01, 2.01, 3.02, 4.03, 5.03, 10.07 และ 20.13 μ g/ml นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer แล้วดำเนินการทดสอบส่วนที่เหลือในการทำงานเดียวกันกับการทดสอบความถูกต้องของวิธี UV-Vis Spectrophotometry สำหรับหาปริมาณ ATZ ข้างต้น โดยหาความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ LOD, LOQ, ความแม่นยำ และความเที่ยง

การนำไปประยุกต์ใช้

นำวิธีที่ผ่านการทดสอบความถูกต้องแล้ว มาใช้ในการตรวจหาเอกลักษณ์และหาปริมาณสารกำจัดวัชพืชชนิด ATZ และ DIU ในอาหารในกระเพาะโค จากตัวอย่างที่ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการพิษวิทยาและชีวเคมี ในปี 2567 ที่เก็บไว้ในตู้เย็น -20°C จำนวน 10 ตัวอย่าง

ผลและวิจารณ์

วิธี TLC

ผลการศึกษาหาสถานะที่เหมาะสมพบว่า TLC silica gel 60 F₂₅₄ plate ที่ทดสอบกับ mobile phase system ทั้ง 2 ระบบ system 1 [Hexane : acetone (4:1)] และ system 2 [chloroform : acetone (7:3)] สามารถแยกสารมาตรฐาน ATZ และ DIU จากกันได้ โดยสังเกตจาก TLC plate ทั้ง 2 แผ่น ที่นำไปส่องดูใน UV cabinet พบว่า spot ของสารมาตรฐาน ATZ และ DIU ที่ 1, 5 และ 10 μ g ดูดกลืนแสง UV 254 nm มีลักษณะเป็น spot กลมสีม่วง และอยู่ห่างกัน ซึ่งเมื่อนำไปพ่นด้วย Vidict's และ o-TKI reagent พบว่า spot ที่ 1 μ g ติดสีเขียว ที่ 5 กับ 10 μ g ติดสีเทาดำ โดยมีค่าเฉลี่ยของค่า Rf อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการทดสอบของสารทั้งสองระบบตามตารางที่ 1 เมื่อพิจารณาข้อมูลพบว่า chloroform : acetone (7:3) จะมีความมีขั้ว (polarity) สูงกว่า Hexane : acetone (4:1) เพราะให้ค่า Rf ของ ATZ และ DIU สูงกว่า (0.58 และ 0.52) โดยทั่วไป mobile phase ที่มีประสิทธิภาพในการแยกสารควรให้ค่า Rf อยู่ในช่วง 0.3-0.7 (Tommasone, 2021) ซึ่ง Hexane : acetone (4:1) จะให้ค่า Rf ของ ATZ และ DIU ต่ำกว่า

ช่วงดังกล่าว (0.27 และ 0.13) การศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ IAEA (2005) ที่ใช้ TLC silica gel 60 F₂₅₄ -Ethyl acetate system และตรวจวัดด้วย o-TKI reagent มีค่า Rf ของ ATZ และ DIU เท่ากับ 0.64 และ 0.41 อยู่ในช่วง 0.3-0.7 เช่นกัน ซึ่งการที่ได้ค่า Rf ต่างกันไปขึ้นอยู่กับ ชนิดตัวทำละลายที่เลือกใช้เป็น mobile phase ชนิดของตัวดูดซับที่ใช้เป็น stationary phase เป็นต้น

ตารางที่ 1 แสดงผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารกำจัดวัชพืชชนิด atrazine (ATZ) และ diuron (DIU) ด้วยวิธี TLC

Herbicide	TLC plate 1			TLC plate 2			
	mobile phase system 1			mobile phase system 2			
	Hexane : acetone (4:1)			chloroform : acetone (7:3)			
of Rf	อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ใช้ (นาที)	of Rf	อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ใช้ (นาที)	o-TKI reagent	
ATZ (1, 5, 10 µg)	0.27	25	20	0.58	25	26	spot สีเทาดำ หรือ สีเขียว
DIU (1, 5, 10 µg)	0.13			0.52			spot สีเทาดำ หรือ สีเขียว

ข of Rf มาจากผลรวมของค่า Rf ของ ATZ หรือ DIU ที่ 1, 5 และ 10 µg ทาร 3

ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี TLC

เมื่อพ่น plate ด้วย Vidict's reagent พบว่า LOD ของสารละลายมาตรฐาน ATZ และ DIU มีค่าเท่ากับ 0.75 และ 1 µg ตามลำดับ และเมื่อพ่น plate ด้วย o-TKI reagent มีค่า LOD ของสารละลายมาตรฐาน ATZ และ DIU เท่ากับ 0.25 และ 0.5 µg ตามลำดับ และทั้ง 2 spray reagents ให้ spot สีเทาอ่อนหรือสีเขียว เพราะความเข้มข้นเจือจางลง แสดงให้เห็นว่า o-TKI reagent มีความไวมากกว่า Vidict's reagent เพราะสามารถตรวจพบ ATZ และ DIU ได้ในระดับที่ต่ำกว่า

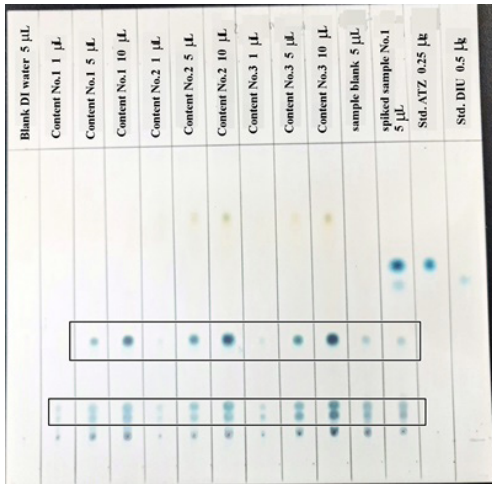
ตารางที่ 2 Rf values ของสารกำจัดวัชพืช ATZ และ DIU ด้วย TLC ชนิด silica gel 60 F₂₅₄

Mobile phase system	Spray reagent	Herbicide ที่ระดับ LOD	Plate 1		Plate 2		Plate 3	
			Rf ^a	CV (%)	Rf ^a	CV (%)	Rf ^a	CV (%)
Hexane : acetone (4:1)	Vidict's	ATZ 0.75 µg	0.29	1.7	0.27	1.8	0.30	0.0
		DIU 1 µg	0.13	3.8	0.13	3.8	0.14	3.6
	o-TKI	Plate 4		Plate 5		Plate 6		
		ATZ 0.25 µg	0.29	1.7	0.28	3.4	0.29	0.0
		DIU 0.5 µg	0.13	0.0	0.13	0.0	0.13	0.0
		Plate 7		Plate 8		Plate 9		
chloroform : acetone (7:3)	Vidict's	ATZ 0.25 µg	0.58	0.8	0.54	0.9	0.57	0.0
		DIU 0.5 µg	0.52	0.9	0.48	0.0	0.50	0.0
	o-TKI	Plate 10		Plate 11		Plate 12		
		ATZ 0.25 µg	0.58	0.0	0.57	0.8	0.57	0.8
		DIU 0.5 µg	0.51	0.9	0.50	1.0	0.49	0.0
		Plate 13		Plate 14		Plate 15		

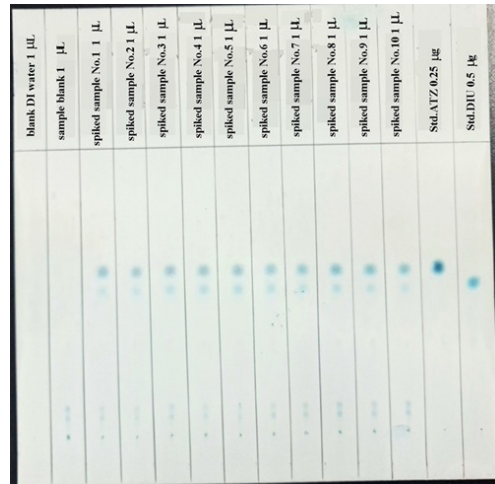
a) ค่าเฉลี่ยของ Rf values ที่เกิดจากการทำ 3 ซ้ำ ใน 1 plate

ความสามารถในการทวนซ้ำ (repeatability) ของสารละลายมาตรฐาน ATZ และ DIU ที่ LOD พบว่าทุก spot ของสารละลายมาตรฐาน ATZ และ DIU ติดสี spray reagent ทั้งสองชนิด โดยมีค่าเฉลี่ยของค่า Rf และค่า CV ของสารละลายมาตรฐาน ATZ และ DIU ตามตารางที่ 2 โดยค่า CV ที่ได้ทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.0-3.8% ซึ่งไม่เกิน 10% แสดงให้เห็นถึงความใกล้เคียงกันของผลการวิเคราะห์ซ้ำภายใต้สภาวะที่กำหนด นั่นคือวิธีที่ศึกษานี้มีความเที่ยง สอดคล้องกับ IAEA (2005) ที่ได้ค่า CV ของสารละลายมาตรฐาน ATZ และ DIU ไม่เกิน 10% เช่นกัน

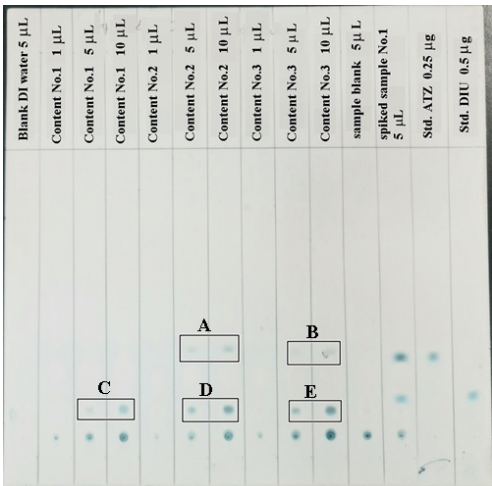
ความจำเพาะเจาะจง (specificity) เมื่อทดสอบสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัด blank (DI water), matrix blank (sample blank), spiked matrix blank (spiked sample) ด้วยวิธี TLC เทียบกับสารมาตรฐาน ATZ และ DIU โดยใช้ system chloroform : acetone (7:3) และ o-TKI reagent พบว่าไม่มี spot จากสารปนเปื้อน สารที่เกิดจากการสลายตัว หรือ matrix ของตัวอย่างขึ้นบริเวณที่บริเวณ Rf เดียวกันกับ spot ของสารมาตรฐาน ATZ และ DIU รวมถึงสารมาตรฐาน ATZ และ DIU ที่เติมลงไป ใน spiked matrix blank สามารถแยกออกจากกันได้ดี แสดงว่าวิธี TLC ในสภาวะดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจงหรือมีความสามารถในการจำแนก ATZ และ DIU ที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากสารอื่น ๆ ได้ (รูปที่ 1) ซึ่งต่างจากที่ทดสอบด้วย system Hexane : acetone (4:1) จะพบว่ามี spot จาก matrix ของตัวอย่างขึ้นใกล้เคียงหรือ overlap กับ spot ของสารมาตรฐาน ซึ่งอาจรบกวนการวิเคราะห์ (รูปที่ 2) ดังนั้นจึงเลือกใช้ chloroform : acetone (7:3) ในการหาค่า LOD ของวิธี



รูปที่ 1 TLC Chromatogram แสดงความจำเพาะเจาะจงของ ATZ และ DIU ในตัวอย่างอาหารในกระเพาะโค (content No.1-3 ที่ 1, 5 และ 10 µL) ด้วย system chloroform : acetone (7:3)- o-TKI reagent โดย A และ B เป็นบริเวณที่เกิด spot ของ matrix ในตัวอย่าง



รูปที่ 3 TLC Chromatogram ของการหาค่า LOD ของวิธี ด้วยการทำให้ spiked sample (n=10) โดยหยดสารละลาย spiked sample No.1-10 ปริมาตร 1 µL/lane บน TLC plate เรียงตามลำดับ โดยใช้ system chloroform : acetone (7:3) และพ่นด้วย o-TKI reagent



รูปที่ 2 TLC Chromatogram จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงในตัวอย่างอาหารในกระเพาะโคจำนวน 3 ตัวอย่าง (content No.1-3 ที่ 1, 5 และ 10 µL) ด้วย system Hexane : acetone (4:1) และ o-TKI reagent โดย A-E เป็นบริเวณที่เกิด spot ของ matrix ในตัวอย่าง

จากการหาค่า LOD ของวิธี หรือขีดจำกัดของการตรวจพบของ ATZ และ DIU ในอาหารในกระเพาะด้วยวิธี TLC เมื่อหยดสารละลาย spiked sample No.1-10 (n=10) ปริมาตร 1 µL/lane บน TLC plate แล้ววิเคราะห์ด้วย chloroform : acetone (7:3) – o-TKI reagent พบว่ามีค่าเฉลี่ย ATZ และ DIU เท่ากับ 0.04 µg/g ทั้งสองสารแต่ spot ของ ATZ ยังติดสีเข้มอยู่ (รูปที่ 3) จึงเจือจางสารละลาย spiked sample No.1-10 ลงอีก 5 เท่า แล้ววิเคราะห์ด้วย TLC อีกครั้ง พบ spot ของสารมาตรฐาน ATZ ติดสีเข้ยวจาง ๆ และมองเห็นด้วยสายตาทั้ง 10

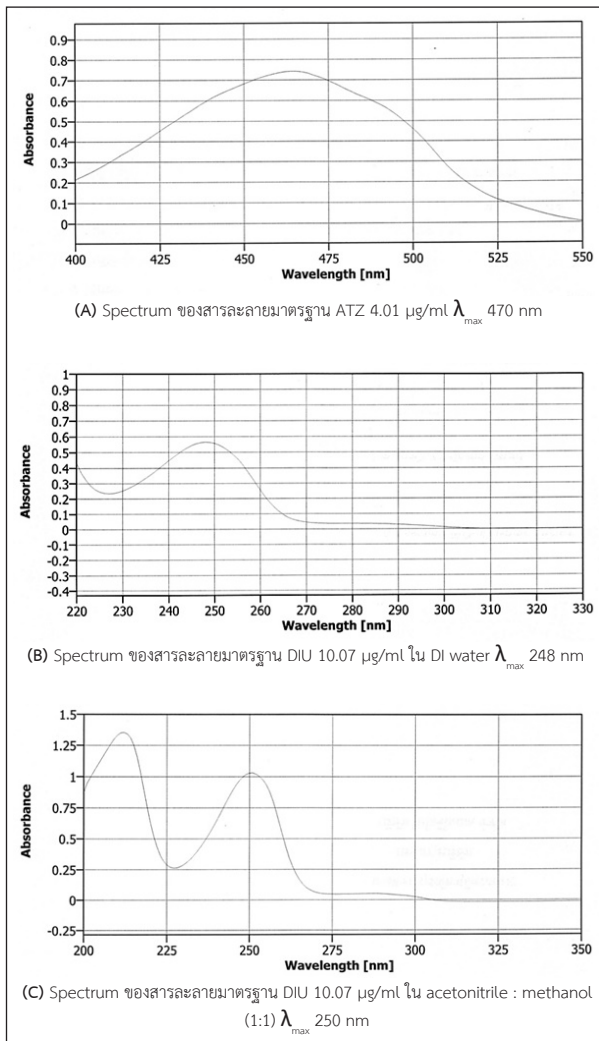
ตัวอย่าง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.02 µg/g และไม่พบ spot DIU เกิดขึ้น ดังนั้น LOD ของวิธีของการตรวจพบ ATZ และ DIU ในอาหารในกระเพาะ มีค่าเท่ากับ 0.02 µg/g และ 0.04 µg/g ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสอดคล้องกับที่พบในรายงานการศึกษาก่อนหน้าในเรื่องของค่า LOD ของ ATZ ที่สามารถตรวจพบได้ในระดับที่ต่ำกว่าหรือมีความไวมากกว่า DIU ถึงแม้จะมี matrix ของตัวอย่างที่แตกต่างกัน เช่น การศึกษาของ Tiryaki and Aysal (2005) ที่พบ LOD ของ ATZ และ DIU ในตัวอย่างสารสกัดจากข้าวสาลี มีค่าเท่ากับ 1.25 µg/g และ 1.5 µg/g ตามลำดับ และการศึกษาของ Afful *et al.* (2009) ที่พบค่า LOD ของ ATZ และ DIU ในตัวอย่างดิน เท่ากับ 0.008 µg/g และ 0.159 µg/g ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองรายงานดังกล่าวศึกษาด้วยวิธี TLC และตรวจวัดด้วย o-TKI reagent ชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในการศึกษานี้

วิธี UV-Vis Spectrophotometry

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของสารมาตรฐาน ATZ และ DIU

สภาวะที่เหมาะสมของสารมาตรฐาน ATZ ที่ความเข้มข้น 4.01 µg/ml พบว่าสามารถเกิดสารละลายใสสีส้ม โดยมี spectrum, $\lambda_{max} = 470 \text{ nm}$ และ absorbance = 0.73 ตามรูปที่ 4 (A) แสดงว่า ATZ สามารถทำปฏิกิริยา

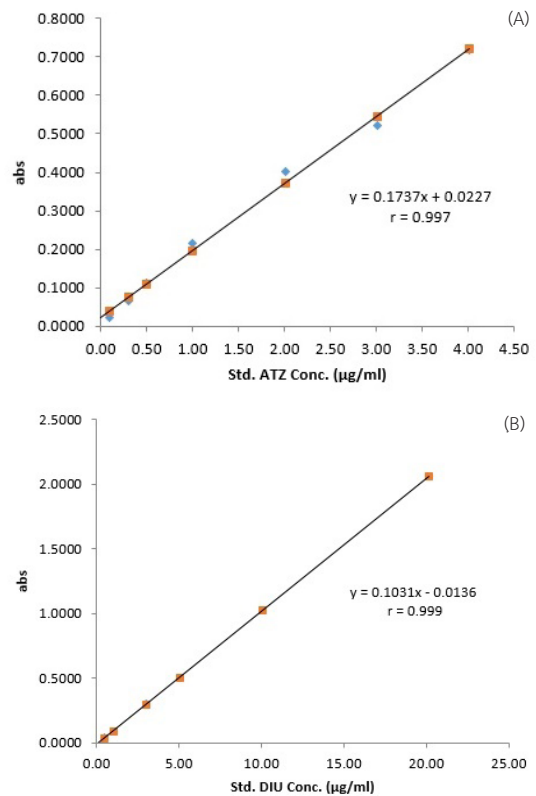
กับ PAAP ในสภาวะที่ทำการทดสอบเกิดเป็นสารประกอบ
 ที่ให้สารละลายมีสีส้ม สอดคล้องกับการศึกษาของ Kesari
 and Gupta (1998) แต่แตกต่างจากการศึกษาของ (Zhang
 and Pan (2011) ที่มี spectrum, $\lambda_{max} = 466 \text{ nm}$ ซึ่งมี
 ค่าต่างกันถึง 4 nm อาจเป็นเพราะในขั้นตอนของวิธี
 วิเคราะห์ของ Shang and Pan (2011) มีการเติม
 สารละลายเคมีที่แตกต่างกันอยู่หนึ่งชนิด คือ
 cetyltrimethyl ammonium bromide (CTMAB) จึง
 ทำให้ค่า λ_{max} ที่ได้ shift ไปตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับ
 เตรียมสารมาตรฐานและการตรวจหาปริมาณ DIU คือ
 acetonitrile : methanol (1:1) เพราะให้ค่า absorbance
 จาก spectrum ของ DIU ที่ความเข้มข้น 10.07 $\mu\text{g/ml}$
 เท่ากับ 1.03 ซึ่งเพิ่มมากขึ้นเป็นเท่าตัว เมื่อเทียบกับค่า
 absorbance จาก spectrum ของ DIU ใน DI water ที่
 ความเข้มข้นเดียวกัน (0.57) ตามรูปที่ 4 (B-C)



รูปที่ 4 ลักษณะ Spectrum ของสารละลายมาตรฐาน ATZ และ DIU

ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการ
 วิเคราะห์ (linearity and working range) พบว่า ATZ
 และ DIU มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น
 0.10–4.01 $\mu\text{g/ml}$ และ 0.50–20.13 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ
 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r) เท่ากับ
 0.997 และ 0.999 ตามลำดับ (รูปที่ 5) และผลการทดสอบ
 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) และ
 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณได้
 อย่างแม่นยำ (LOQ) ช่วง %Recovery และค่าเฉลี่ย %RSD
 ของ ATZ และ DIU มีค่าดังตารางที่ 3



รูปที่ 5 แสดงกราฟของผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์
 ของสารละลายมาตรฐาน ATZ (A) และสารละลายมาตรฐาน DIU (B)

ตารางที่ 3 ค่า LOD LOQ ช่วง %Recovery และค่าเฉลี่ย %RSD ของ
 ATZ และ DIU โดยวิธี UV-Vis Spectrophotometry

Herbicide	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	Range of %Recovery	Mean of %RSD
ATZ	0.10	0.50	80-101	0.78
DIU	0.10	0.63	99-118	4.74

ผลการทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของวิธีการวิเคราะห์ ATZ จากตัวอย่าง spiked sample ที่ 3 ระดับความเข้มข้นคือ 10.04, 20.07 และ 40.15 mg/kg วิเคราะห์ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่าความแม่นยำมีค่าเฉลี่ย %Recovery เท่ากับ 87.85, 88.47 และ 78.17 ตามลำดับ โดย %Recovery ของทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ ช่วงร้อยละ 70-120 ส่วนการประเมินความเที่ยง พบว่าค่า %RSD อยู่ในช่วง 5.53-7.93 ซึ่งน้อยกว่าร้อยละ 10 และค่า HORRAT พบอยู่ในช่วง 0.82-1.12 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือน้อยกว่า 2 ดังนั้นการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีตรวจหาปริมาณ ATZ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ตารางที่ 4)

ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ DIU จากตัวอย่าง spiked sample ที่ 3 ระดับความเข้มข้นคือ 10.07, 20.13 และ 30.20 mg/kg วิเคราะห์ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่าความแม่นยำมีค่าเฉลี่ย %Recovery เท่ากับ 92.29, 77.56 และ 81.89 ตามลำดับ โดย %Recovery ของทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ ช่วงร้อยละ 70-120 ส่วนการประเมินความเที่ยง พบว่าค่า %RSD อยู่ในช่วง 3.18-8.30 ซึ่งน้อยกว่าร้อยละ 10 และค่า HORRAT พบอยู่ในช่วง 0.47-1.11 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือน้อยกว่า 2 ดังนั้นการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีจึงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงค่า accuracy และ precision ของ ATZ และ DIU ใน spiked sample (n=10) 3 ระดับ ด้วยวิธี UV-Vis Spectrophotometry

ครั้งที่	ระดับความเข้มข้นของ spiked sample (mg/kg)					
	ATZ			DIU		
	10.04	20.07	40.15	10.07	20.13	30.20
1	9.61	17.10	30.85	8.40	15.94	22.79
2	8.12	16.83	34.60	9.44	14.93	23.80
3	9.51	17.47	30.41	8.63	16.15	24.18
4	10.16	17.64	34.96	8.55	15.44	26.18
5	8.59	17.28	31.70	10.53	15.12	23.34
6	8.54	19.19	31.18	9.52	15.23	26.23
7	8.76	17.34	29.30	9.52	15.48	24.29
8	8.43	17.32	28.96	10.41	16.24	23.93
9	8.29	19.90	28.51	8.49	16.28	26.29
10	8.15	17.50	33.37	9.41	15.36	26.30
ช่วง %Recovery	81-101	84-99	71-87	83-105	74-81	75-87
%Recovery เฉลี่ย	87.85	88.47	78.17	92.29	77.56	81.89
SD	0.70	0.98	2.28	0.77	0.50	1.37
%RSD	7.93	5.53	7.27	8.30	3.18	5.55
HORRAT	1.06	0.82	1.12	1.11	0.47	0.88

จากการศึกษาพัฒนาวิธีการสกัดตัวอย่างอาหารในกระเพาะโดยใช้เทคนิค QuEChERS ที่ดัดแปลงมาจาก Anastassiades and Lehotay (2003) ซึ่งเป็นการตรวจวิเคราะห์ ATZ และ DIU ในตัวอย่างผักและผลไม้ พบว่าสามารถสกัดเอา ATZ และ DIU ออกจากอาหารในกระเพาะได้ ด้วยการนำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ไปใช้ในขั้นตอนการทดสอบความถูกต้องของวิธีทั้ง TLC และ UV-Vis Spectrophotometry โดยข้อดีการสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS คือ ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณน้อย และใช้เวลาในการสกัดน้อยกว่า ทำได้ง่าย รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ และปลอดภัย ต่างจากการศึกษาของ IAEA (2005), Afful *et al.* (2009), Kesari and Gupta (1998) และ Galera *et al.* (1995) ที่ใช้วิธีสกัดเป็นแบบ solid liquid extraction ซึ่งใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมาก และใช้เวลานาน เพื่อสกัดเอา ATZ และ DIU ออกจากตัวอย่างพืชผัก และตัวอย่างดิน อย่างไรก็ตามสารสกัดที่ได้จากทั้งเทคนิค QuEChERS และ solid liquid extraction ก็ยังคงมี impurity อยู่ ดังนั้นจึงมีการ clean up สารสกัดให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปตรวจหาปริมาณ ATZ หรือ DIU ด้วยวิธี UV-Vis Spectrophotometry, HPLC, GC-MS หรือวิธีอื่นๆต่อไป สำหรับการตรวจหาปริมาณ ATZ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ Envi-carb SPE tube ในการ clean up สารสกัดจากตัวอย่างอาหารในกระเพาะ ซึ่งเมื่อนำไปตรวจหาปริมาณ spiked sample ทั้ง 3 ระดับแล้วให้ %Recovery อยู่ในช่วง 71-101 อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Trajkovska *et al.* (2001) ที่มีการใช้ Envi-carb SPE tube ในการสกัดตัวอย่างน้ำที่ spiked ATZ ความเข้มข้น 3 ระดับ แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปตรวจหาปริมาณ ATZ ด้วยวิธี HPLC-DAD และ GC-FID ซึ่งก็ให้ผล %Recovery อยู่ในช่วง 94-105 และ 89-104 และอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้เช่นกัน ส่วนการตรวจหาปริมาณ DIU ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ TLC ชนิด silica gel 60 F₂₅₄ ในการ clean up สารสกัดจากตัวอย่างอาหารในกระเพาะซึ่งเมื่อนำไปตรวจหาปริมาณ spiked sample ทั้ง 3 ระดับแล้วให้ %Recovery อยู่ในช่วง 74-105 อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Goswami and Jiang (2018) ที่ใช้ Strata-XL 100 µm Polymeric Reversed Phase SPE ในการสกัด

ตัวอย่างน้ำที่ spiked DIU 1 µg/ml แล้วตรวจหาปริมาณ DIU ด้วยวิธี UV-Vis Spectrophotometry ให้ค่าเฉลี่ยของ %Recovery เท่ากับ 106.3 อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ เมื่อเปรียบเทียบกับ LOD LOQ %Recovery และ %RSD ของวิธีตรวจหาปริมาณ ATZ ในอาหารในกระเพาะด้วยวิธี UV-Vis Spectrophotometry ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้กับการศึกษาของ Martins *et al.* (2016) ที่ใช้วิธี spectrophotometric detection ในสารสกัดจากดิน มีค่า LOD เท่ากับ 0.15 µg/ml LOQ เท่ากับ 0.45 µg/ml %Recovery อยู่ในช่วง 69-102 และ ค่าสูงสุดของ %RSD เท่ากับ 17 พบว่าการศึกษานี้มีค่า LOD เท่ากับ 0.10 µg/ml และ LOQ เท่ากับ 0.50 µg/ml ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาดังกล่าว แต่ %Recovery และ %RSD มีค่าดีกว่าคืออยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ 71-101 และ 5.53-7.93

เมื่อเปรียบเทียบกับ LOD LOQ %Recovery และ %RSD ของวิธีตรวจหาปริมาณ DIU ในอาหารในกระเพาะด้วยวิธี UV-Vis Spectrophotometry ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้กับการศึกษาของ Araujo *et al.* (2023) ที่ใช้วิธี HPLC ในตัวอย่างดิน มีค่า LOD เท่ากับ 0.032 µg/ml LOQ เท่ากับ 0.107 µg/ml %Recovery อยู่ในช่วง 80-103 และ ค่าสูงสุดของ %RSD อยู่ในช่วง 6-8 พบว่าการศึกษานี้มีค่า LOD เท่ากับ 0.10 µg/ml และ LOQ เท่ากับ 0.63 µg/ml ซึ่งมีค่าสูงกว่าการศึกษาดังกล่าว อย่างไรก็ตาม %Recovery และ %RSD ของทั้งสองวิธีมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ จะพบว่าวิธี HPLC มีความไวมากกว่าหรือมีความสามารถในการตรวจหาปริมาณ DIU ได้ในระดับที่ต่ำกว่าวิธี UV-Vis Spectrophotometry แต่ทั้งสองวิธีมีความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้เช่นเดียวกัน

การนำไปประยุกต์ใช้

ผลจากการนำวิธี TLC (screening test) มาประยุกต์ใช้ กับตัวอย่างอาหารในกระเพาะโค จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่าตรวจไม่พบสารกำจัดวัชพืชชนิด ATZ และ DIU ในตัวอย่างทั้งหมด จึงไม่ได้ตรวจหาปริมาณด้วยวิธี UV-Vis Spectrophotometry

สรุป และข้อเสนอแนะ

วิธี TLC และ UV-Vis Spectrophotometry ที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้ตรวจหาเอกลักษณ์และปริมาณสารกำจัดวัชพืชชนิด ATZ และ DIU ในตัวอย่างอาหารในกระเพาะได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และเหมาะสมในการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการพิษวิทยา เพื่อการตรวจชันสูตรโรคทางสัตวแพทย์ของสัตว์ที่อาจได้รับพิษจากสารกำจัดวัชพืชทั้งสองชนิด อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาและพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ที่อาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพและชีวิตสัตว์ให้ครอบคลุมทั้งชนิดสารพิษและชนิดตัวอย่าง เพื่อให้ทันต่อสถานการณ์ที่มีการนำเข้ามาและใช้วัตถุที่มีพิษทางการเกษตรในปริมาณสูง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ. เสริมพันธุ์ สุนทรชาติ หัวหน้ากลุ่มพิษวิทยาและชีวเคมี ที่ให้การสนับสนุนและให้คำแนะนำ และ น.ส. อัญญณัฐ เมธรัตน์อนุกุล ที่ให้ความช่วยเหลือตลอดการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- ตติย สิริราช. 2547. เอกสารประกอบการอบรมสัมมนาวิชาการด้านอุตสาหกรรมอาหาร: การตรวจพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี. สถาบันอาหาร. กรุงเทพฯ. หน้า 1-44.
- ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี โดยห้องปฏิบัติการเดียว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 124 หน้า.
- ปัทสรา คุณเลิศ สิริพร เหลืองสุนกุล ประกิจ จันทร์ดี และมลิสาวะชยานนท์. 2564. “การประเมินผลกระทบสารกำจัดวัชพืชอะทราซีนตกค้างในไร่ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์.” [Online]. Available: <https://doa.go.th/research/attachment.php?aid=2990>. [2 มกราคม 2567].
- พงศกร ดันตะรวงศา และดาวจรส เกตุโรจน์. 2560. การตกค้างของสารไดยูรอนในดินที่ใช้ปลูกสับปะรด. *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 55*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. ระหว่างวันที่ 31 มกราคม-3 กุมภาพันธ์ 2560. หน้า 17-24.
- มาลินี ลิ้มโกคา. 2523. พิษวิทยาและการวินิจฉัยโรคทางสัตวแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์เจริญสุนทวงศ์, กรุงเทพฯ. 276 หน้า.

- สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2566. “สรุปข้อมูลการนำเข้า-ส่งออกวัตถุอันตรายทางการเกษตร พ.ศ.2561-2565.” [Online]. Available: https://www.doa.go.th/ard/?page_id=386. [4 กุมภาพันธ์ 2567].
- Anastassiades, M. and Lehotay, S.J. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86: 412-431.
- Afful, S., Akpabli, C.K., Yeboah, P.O. and Dogbe, S.A. 2009. Comparison of two detection methods in thin layer chromatographic analysis of some herbicides in a Coastal Savanna soil in Ghana. *West Afr. J. Appl. Ecol.* 12(1): 1-7. doi:10.4314/wajae.v12i1.45778
- Araujo, G.R., da Silva, L.B.X., Vaz, V., Borges, M.P.d.S., Spolidorio, E.S. and Mendes, K.F. 2023. Cucumber Bioassay and HPLC Analysis to Detect Diuron Residues in Remineralized Soils Following *Canavalia ensiformis* Cultivation as a Phytoremediator. *Horticulturae*. 9(12): 1251. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9121251>.
- Blanchoud, H., Alliot, F., Chen, N. and Valdes, D. 2020. Rapid SPE - LC MS/MS analysis for atrazine, its by-products, simazine and S metolachlor in groundwater samples. *MethodsX*. 7: 100824. doi:10.1016/j.mex.2020.100824.
- Eurachem. 2014. “The Fitness for Purpose of Analytical Methods-A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2nd ed.” [Online]. Available: www.eurachem.org. [February 4, 2024].
- 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.
- Goswami, A. and Jiang, J. 2018. Simultaneous quantification of Gabapentin, Sulfamethoxazole, Terbutryn, Terbutylazine and Diuron by UV-Vis spectrophotometer. *Biointerface Res. Appl. Chem.* 8(1): 3111-3117.
- Horwitz, W. and Albert, R. 2006. The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision. *J. AOAC Int.* 89(4): 1095-1109.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS). 1990. Atrazine health and safety guide No. 47, WHO Geneva, Switzerland. 22 p.
- International Atomic Energy Agency (IAEA). 2005. Validation of thin-layer chromatographic methods for pesticide residue analysis. IAEA, Vienna, Austria. July.
- Jowett, P.L., Nicholson, S.S. and Gamble, G. A. 1986. Tissue levels of atrazine in a case of bovine poisoning. *Vet. Hum. Toxicol.* 28(6): 539-540.
- 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.
- Martins, E.C., Melo, V.D.F. and Abate, G. 2016. Evaluation of flow injection analysis method with spectrophotometric detection for the determination of atrazine in soil extracts. *J. Environ. Sci. Health B*. 51(9): 609-615.
- Microsoft Corporation. 2024. “Excel (Microsoft 365 Subscription) [Computer Software].” [Online]. Available: [https://www.microsoft.com/en-us/microsoft-365/excel#:~:text=Microsoft%20Excel%20with%20a%20Microsoft,Excel%202007%2C%20and%20Excel%202003](https://www.microsoft.com/en-us/microsoft-365/excel#:~:text=Microsoft%20Excel%20with%20a%20Microsoft,Excel%202007%2C%20and%20Excel%202003.). [February 4, 2024].
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2024. “PubChem Compound Summary for CID 3120, Diuron.” [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diuron>. [February 4, 2024].
- Pathak, R.K. and Dikshit, A.K. 2011. Atrazine and Human Health. *Int. J. Ecosyst.* 1(1): 14-23.
- Pawar, U.D., Pawar, C.D., Kulkarni, U.K., Shinde, D.B. and Pardeshi, R.K. 2018. Use of Dragendorffs reagent for Thin Layer Chromatographic detection of triazine class herbicide atrazine. *World J. Pharm. Res.* 7(7): 1951-1955.
- Props, A. J., Richards, H. J., Hooser, S. B., Burcham, G. N. and Wilson-Frank, C. R. 2021. Atrazine intoxication in cattle, confirmed by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Vet. Diagn. Invest.* 33(6): 1163-1167.
- Shah, J., Rasul Jan, M., Ara, B. and Shehzad, F.U. 2011. Quantification of triazine herbicides in soil by microwave-assisted extraction and high-performance liquid chromatography. *Environ. Monit. Assess.* 178(1-4): 111-119.
- SANCO/12571/2013 (19 Nov. 2013). 2014. “Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.” [Online]. Available: https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcr/AqcGuidance_Sanco_pesticides.eu/library/docs/allcr/AqcGuidance_Sanco_2013_12571.pdf. [February 4, 2024].

- Trajkowska, V., Petrovska-Jovanović, S. and Cvetkovski, M. 2001. Development and optimization of a method for the determination of simazine, atrazine and propazine using solid-phase extraction and HPLC/GC. *J. Serb. Chem. Soc.* 66(3): 199–204.
- Tiryaki, O. and Aysal, P. 2005. Applicability of TLC in Multiresidue Methods for the Determination of Pesticides in Wheat Grain. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75: 1143-1149.
- Tommasone, S. 2021. “Thin Layer Chromatography (TLC): An Overview.” [Online]. Available: [https://www.azolifesciences.com/article/Thin-Layer-Chromatography-\(TLC\)-An-Overview.aspx](https://www.azolifesciences.com/article/Thin-Layer-Chromatography-(TLC)-An-Overview.aspx). [February 4, 2024].
- Zhang, G. and Pan, J. 2011. Simultaneous spectrophotometric determination of atrazine and cyanazine by chemometric methods. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 78(1): 238–242.

Case study : Study on Suspected virulent strain of isolated FMDV, O/ME-SA/Ind-2001e Lineage, Outbreak in Prachuap Khiri Khan and Saraburi Province, Thailand, 2022

Nalinee Hongchumpon¹, Kingkarn Boonsuya Seeyo¹, Jeeranant Chottikamporn¹,
Nuttakarn Suwankitwat², Taweewat Deemagarn² and Janya Samanit¹

Abstract

This study aimed to investigate the characteristics of the foot-and-mouth disease virus (FMDV) belonging to the O/ME-SA/Ind-2001e lineage, which was isolated from outbreaks in Prachuap Khiri Khan and Saraburi provinces in 2022. The findings were intended to serve as a reference for monitoring potential future changes in viral properties. Four virus isolates were confirmed as FMDV serotype O using the ELISA serotyping method. Molecular analysis identified all four isolates as belonging to the O/ME-SA/Ind-2001e lineage, with nucleotide sequence similarities of 97.00 – 98.10 % to the RRL reference FMDV strain. Vaccine matching test demonstrated that the serotype O vaccine strain produced by the government showed a good match with the field isolates, suggesting that the current vaccine is likely effective in preventing the field virus in these outbreaks.

Furthermore, preliminary findings indicated that the virus samples obtained from deceased adult dairy cattle during the 2022 outbreaks in Prachuap Khiri Khan and Saraburi provinces may represent a virulent strain of FMDV. These results provide fundamental insights into the viral properties of the outbreak strain. Further studies focusing on the genetic determinants of virulence are recommended to enhance understanding of highly virulent strains and to support the development of effective prevention and control strategies.

Keywords: Foot-and-Mouth disease virus virulence O/ME-SA/Ind-2001e

¹Regional Reference Laboratory for Foot and Mouth disease in Southeast Asia, Pak Chong, Nakhonratchasima, 30130

² National Institute of Animal Health, Chatuchak, Bangkok, 10900

Received:

Revised:

Accepted:

กรณีศึกษา : การศึกษาความรุนแรงและคุณสมบัติของเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อย
ซีโรไทป์ O สายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e ที่แยกได้จากระบาดในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์
และจังหวัดสระบุรี ปี 2565

นลินี หงษ์ชุมพล¹ กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโอ¹ จีรนนท์ โชติพิชัยมพร¹ ณัฐกานต์ สุวรรณกิจวัฒน์²
ทวีวัฒน์ ตีมะการ² จรรยา สมานิตย์¹

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อย สายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e ที่แยกได้จากระบาดในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดสระบุรี ปี 2565 และใช้เป็นแนวทางในการศึกษาคุณสมบัติของไวรัสที่อาจมีการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์ในอนาคต โดยนำตัวอย่างเชื้อไวรัสที่เก็บจากโคนมที่ป่วยและตายในการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อย ปี 2565 จากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดสระบุรี จำนวน 4 ตัวอย่าง มาตรวจทางห้องปฏิบัติการผลการตรวจหาและจำแนกเชื้อด้วยวิธี ELISA typing ยืนยันเป็นเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ O และพบสารพันธุกรรมเชื้อ FMDV ด้วยวิธี real time RT-PCR การทดสอบเพื่อดูความรุนแรงของเชื้อ FMDV ในเซลล์ BHK-21 ด้วยวิธี plaque assay พบว่าไวรัสที่ได้เกิด Cytopathic effect ระดับ 50% ชั่วโมงที่ 30 และ 100% ชั่วโมงที่ 48 ผลการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าเชื้อ FMDV ทั้ง 4 ตัวอย่าง ยืนยันเป็นซีโรไทป์ O โทโปไทป์ Middle East-South Asia (O/ME-SA) สายพันธุ์ย่อย Ind-2001e มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อเทียบกับไวรัสอ้างอิงของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สายพันธุ์ O/ME-SA/ Ind-2001e เท่ากับ 97.00 - 98.10% เมื่อทดสอบ vaccine matching โดยเทียบกับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนของกรมปศุสัตว์ พบว่าทุกตัวอย่างให้ผล good matching แสดงให้เห็นว่าไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนของกรมปศุสัตว์ยังคงให้ความคุ้มโรคต่อไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้

จากผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการสรุปเบื้องต้นได้ว่าเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ O สายพันธุ์ย่อย O/ME-SA/Ind-2001e ที่แยกได้จากโคตายของจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดสระบุรีในการศึกษานี้มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นเชื้อ FMDV สายพันธุ์ที่มีความรุนแรง อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัส เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนในการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงของไวรัสที่มีความรุนแรงมากขึ้น และช่วยประกอบการพิจารณาคัดเลือกสายพันธุ์วัคซีนป้องกันโรค รวมถึงเตรียมความพร้อมในการการปรับมาตรการควบคุม ป้องกันโรคที่เหมาะสมในอนาคต

คำสำคัญ: ไวรัสปากและเท้าเปื่อย ความรุนแรง O/ME-SA/Ind-2001e

¹ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

²สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease, FMD) เป็นโรคระบาดรุนแรงในสัตว์กีบคู่ ที่กำหนดอยู่ในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2558 เกิดจากเชื้อ foot and mouth disease virus (FMDV) ซีโรไทป์ที่พบการระบาดในประเทศไทยและในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ซีโรไทป์โอ (O) เอ (A) และเอเชียวัน (Asia1) ซึ่งซีโรไทป์ Asia1 ไม่พบในประเทศไทยตั้งแต่ปี 2541 (ร่วมพฤษชัยและวิไล, 2549) อาการสัตว์ที่ป่วยเป็นโรคปากและเท้าเปื่อยจะมีไข้สูง ซึม น้ำลายไหล เกิดตุ่มใสที่ลิ้น เหงือก ช่องปาก กีบ เต้านม กินอาหารไม่ได้ เดินขาเกเปลก การตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการที่ใช้เพื่อจำแนกและยืนยัน เชื้อไวรัสทำได้หลายวิธี เช่น ELISA typing, Virus isolation, Polymerase chain reaction (PCR), sequencing เป็นต้น เนื่องจากเชื้อ FMDV เป็นเชื้อไวรัสที่มีสารพันธุกรรมชนิด Ribonucleic acid (RNA) ที่มีความแปรปรวนสูงและมีความหลากหลายทางพันธุกรรมจึงพบสายพันธุ์ใหม่เกิดขึ้นได้บ่อยครั้ง (ร่วมพฤษชัย, 2564) มีรายงานการระบาดของสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001 พบระบาดครั้งแรกที่อินเดีย พ.ศ. 2544 แล้วแพร่กระจายไปทั่วโลก (Hemadri *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังพบการระบาดของสายพันธุ์ย่อย O/ME-SA/Ind-2001d และ O/ME-SA/Ind-2001e ในภูมิภาคแอฟริกาเหนือ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Bachanek-Bankowska *et al.*, 2018) การติดเชื้อ FMDV มีความรุนแรงค่อนข้างต่ำ โดยทั่วไปในโคมีอัตราการติดเชื้อสูงถึง 100% แต่พบอัตราการตายเพียง 0.2-5% เท่านั้น (กรมปศุสัตว์, 2566) โดยสัตว์ที่ตายส่วนใหญ่พบเป็นลูกสัตว์ซึ่งตายจากการติดเชื้อและมักพบก้ามเนื้อหัวใจตายมีลักษณะวิการที่เรียกว่า tiger heart (Islam *et al.*, 2017) ในการแยกความแตกต่างของเชื้อ FMDV ชนิดรุนแรงและไม่รุนแรงใช้วิธี plaque assay โดยเพาะไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงและย้อมสีเพื่อดูการเกิด cytopathic effect (CPE) ในเซลล์เพาะเลี้ยง ไวรัสสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงจะพบการเกิด plaque ที่มีบริเวณกว้างและมีความชัดเจนกว่าสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรง (Morioka *et al.*, 2008) และการเปรียบเทียบ

ความรุนแรงระหว่างเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ O, A และ Asia1 โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะการหดตัวของเซลล์ Baby Hamster Kidney (BHK) หลังเพาะไวรัส (Qureshi *et al.*, 2022)

ในประเทศไทยพบระบาดของสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e ตั้งแต่ปี 2561 ในจังหวัดแถบภาคตะวันตกและภาคใต้ ในปัจจุบันพบระบาดทั่วทุกภาคของประเทศ จากข้อมูลการตรวจวินิจฉัยในปี 2565 ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ศอ.) ได้รับตัวอย่างจากห้องที่เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยจำนวน 314 ตัวอย่าง ผลการตรวจพบเป็นเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ O จำนวน 162 ตัวอย่าง (51.59%) ซีโรไทป์ A จำนวน 45 ตัวอย่าง (14.33%) ไม่พบเชื้อจำนวน 31 ตัวอย่าง (9.87%) และไม่สามารถจำแนกซีโรไทป์ จำนวน 76 ตัวอย่าง (24.20%) จังหวัดประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดสระบุรี เป็นจังหวัดที่พบการระบาดของซีโรไทป์ O และจากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี sequencing เป็นสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e ซึ่งการระบาดของทั้งสองจังหวัดนี้มีโคนมโตเต็มวัยป่วยและตาย การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความรุนแรงและคุณสมบัติของเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อย ซีโรไทป์โอ สายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e ที่ระบาดในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดสระบุรี ในปี 2565 และใช้เป็นแนวทางในการศึกษาคุณสมบัติของไวรัสที่อาจมีการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์ในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

ไวรัสปากและเท้าเปื่อย

ตัวอย่างเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อยจากโคนมจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 2 ตัวอย่าง และจากจังหวัดสระบุรี จำนวน 2 ตัวอย่าง ตัวอย่างทั้งหมดได้ตรวจจำแนกเป็นซีโรไทป์ O สายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e นำมาเพาะแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง BHK-21 โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม บ่มในตู้บ่มเซลล์ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เมื่อเซลล์เพาะเลี้ยงเกิด CPE ประมาณ 80% แยกเชื้อไวรัสออกจากเซลล์โดยแช่แข็ง

เซลล์ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำซ้ำ 2 รอบ นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แยกส่วนใสเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการทดลอง

การตรวจหาและจำแนกเชื้อ FMDV ด้วยวิธี ELISA typing

ใช้ rabbit trapping antibody ที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ศอ.) เตรียมขึ้นเอง ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ O, A และ Asia1 โดยในแต่ละซีโรไทป์ ใช้ความเข้มข้นที่ 1:5,000 นำมาเคลือบหลุมของ ELISA plate ชนิด 96 หลุม (Thermo Scientific, Denmark) วางบนเครื่องเขย่าในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (หรือเก็บค้ำคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) ล้าง ELISA plate 5 ครั้ง ด้วย phosphate buffer saline (PBS) เตรียมสารละลายแอนติเจนควบคุม (control antigen) และสารละลายน้ำเลี้ยงไวรัส โดยเติมลงใน microtube โดยใช้ ELISA diluent (PBST) ทำการเจือจางแอนติเจนควบคุมแบบ 5-fold serial dilution ไป 3 dilution หยดลงใน ELISA plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร วางบนเครื่องเขย่าในตู้บ่มเชื้อ นาน 1 ชั่วโมง ล้าง ELISA plate 5 ครั้ง จากนั้นเติม guinea pig detecting antibody ที่จำเพาะต่อเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ที่จะตรวจ โดยใช้ความเข้มข้นตามที่ได้ดำเนินการ titration ก่อน นำมาดำเนินการทดสอบ จากนั้นวาง ELISA plate ลงบนเครื่องเขย่าในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้าง ELISA plate 5 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย horseradish peroxidase conjugate (DAKO, Germany) หลุมละ 50 ไมโครลิตร วางบนเครื่องเขย่าในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้าง ELISA plate 7 ครั้ง แล้วเติม 0.01% tetramethylbenzidine substrate (TMB substrate) (Sigma-Aldrich, USA) ปลอ่ยให้เกิดปฏิกิริยาในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เติม stop solution (1M H₂SO₄) เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate แล้วจึงนำไปอ่านค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

ด้วยเครื่องอ่าน ELISA reader (VersaMax, China) การรายงานผลเป็นไม่พบเชื้อหรือพบเชื้อและระบุเป็นซีโรไทป์ของเชื้อ

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ FMDV ด้วยวิธี real-time Reverse Transcriptase -Polymerase Chain Reaction (real-time RT-PCR)

ตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี real-time RT-PCR โดยสกัด RNA จากตัวอย่างด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (Omega, USA) เตรียม master mix จากนั้นเติม RNA product ที่สกัดได้ 5.0 µl ลงใน master mix ที่หยอดในหลุม multi-well plate นำ plate เข้าเครื่อง real-time PCR (LightCycler 480, Roche Diagnostic, Germany) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

- 1) Reverse transcription อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ
 - 2) Pre-denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 1 รอบ
 - 3) Denature and annealing อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 45 รอบ
 - 4) Elongation อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 1 รอบ
- การรายงานผล เป็นบวก (positive) หรือลบ (negative) โดยพิจารณาจากค่า Ct (จาก 45 รอบ)
- ค่า Threshold (Ct) ต่ำกว่า 40 รายงานเป็นบวก
 - ค่า Threshold (Ct) สูงกว่า 41 หรือไม่สามารวัดค่า Ct ได้ รายงานเป็นลบ
 - ค่า Threshold (Ct) อยู่ในช่วง 40-41 ไม่สามารถสรุปผลได้ (inconclusive) หรือผลไม่แน่ชัด

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ FMDV ด้วยวิธี nucleotide sequencing ส่วนยีน VP1

นำตัวอย่างเชื้อ FMDV ทั้ง 4 ตัวอย่าง ที่ได้ผ่านการเพาะแยกเชื้อไวรัสมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีการของ Knowles *et al.* (2016) โดยการสกัด RNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (Omega, USA) และเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม

ในส่วนของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน VP1 ด้วยวิธี Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ O ผสมกับน้ำยา master mix สำเร็จรูป Light Cycler Multiplex RNA Virus Master (Roche Diagnostic, Germany) เพิ่มจำนวน สารพันธุกรรมโดยใช้ เครื่อง thermocycler (Bio-Rad, USA) จากนั้น นำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Germany) แล้วจึงนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA) ร่วมกับไพรเมอร์ NK72; (Sequence 5'-3': GAAGGGCCAGGGTTGGACTC) จากนั้นกำจัดน้ำยา BigDye ส่วนเกินด้วย ZR DNA Sequencing Clean-up kit (Zymo research corporation, USA) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต แล้วนำไปหาลำดับเบสของสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนม (whole genome sequencing, WGS) ด้วยเทคนิค next-generation sequencing (NGS)

นำ DNA library ของตัวอย่างเชื้อ FMDV แต่ละตัวอย่างมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 4 nM ด้วย resuspension buffer (Illumina, USA) จากนั้นนำ DNA library ที่เจือจางแล้ว ตัวอย่างละ 5 µl มาใส่ผสมรวมกันในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml นำ DNA library ที่ผสมเข้ากันแล้วปริมาตร 5 µl มาใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ แล้วเติมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.2 N ปริมาตร 5 µl ผสมให้เข้ากัน เพื่อให้ DNA library แยกเป็น DNA สายเดี่ยว (denature) นำ DNA library ที่เป็นสายเดี่ยวแล้วมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 16 pM ด้วย hybridization buffer (Illumina, USA) แล้วเติม PhiX control (Illumina, USA) ตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นดูด DNA library ปริมาตร 600 µl ใส่ลงในกล่องชุดน้ำยา MiSeq

Reagent Micro Kit v2 (300 cycles) (Illumina, USA) แล้วนำกล่องไปใส่ในเครื่อง next-generation sequencer ยี่ห้อ Illumina รุ่น MiSeq (Illumina, USA) เพื่อตรวจหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมด้วยเทคนิค NGS โดยใช้วิธี paired-end sequencing (2x151bp) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการตรวจด้วยเครื่อง next-generation sequencer ซึ่งอยู่ในไฟล์นามสกุล fastq มาประเมินคุณภาพของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม FastQC เวอร์ชัน 0.11.9 (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc) จากนั้นใช้โปรแกรม Geneious เวอร์ชัน 9.1.8 (Biomatters Ltd., New Zealand) ในการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อประกอบเป็นจีโนม (genome assembly) ด้วยวิธี De novo assembly โดยใช้ Geneious assembler ร่วมกับวิธี map to reference assembly โดยใช้ Geneious mapper และวิเคราะห์หาตำแหน่งของยีนบนจีโนม (genome annotation) ด้วยวิธี transfer annotation จาก reference genome

การตรวจคุณสมบัติของไวรัสปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี Plaque assay

เพาะเซลล์ BHK-21 ในเพลทพลาสติกชนิด 96 หลุม ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี fetal bovine serum 5% บ่มในตู้บ่มเซลล์ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เมื่อเซลล์เจริญเติบโต 80-100% เจือจางไวรัสทั้ง 4 ตัวอย่าง และไวรัสควบคุมบวก ให้เป็น 1:8 ทุกตัวอย่าง จากนั้นเพาะในเซลล์หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง บันทึกผลโดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์และชั่วโมงการเกิด CPE ที่ 24 ชั่วโมง 30 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง และบันทึกภาพถ่ายของเซลล์แต่ละตัวอย่างที่ส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ (Olympus) จากนั้น fix cell ด้วย 4% paraformaldehyde และล้างด้วย PBS 1 ครั้ง เคาะเพลทเบา ๆ และนำไปบันทึกภาพถ่าย เพื่อใช้เปรียบเทียบพื้นที่การหลุดลอกของเซลล์เพาะเลี้ยงของไวรัสทั้ง 4 ตัวอย่าง ไวรัสควบคุมบวกและเซลล์ควบคุมลบ

การหาความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาของไวรัสที่ระบาดกับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนด้วยวิธี LP-ELISA (Vaccine matching หรือ r-value) (ร่มพฤษและสมใจ, 2555)

การหาความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาของไวรัสที่ระบาดในท้องที่กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนหรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า vaccine matching หรือ r-value โดยใช้อัตราส่วน

$$r\text{-value} = \frac{\text{serum titer against field strain}}{\text{serum titer against vaccine strain}}$$

วิธีการแปลผล ดังนี้

- r-value \geq 0.4 หรือ Good Matching เชื้อไวรัสในพื้นที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยายังจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อไวรัสในวัคซีน

- r-value \geq 0.2-0.39 หรือ Moderated Matching เชื้อไวรัสในพื้นที่ที่มีการเปลี่ยนแปลงความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาปานกลางเมื่อเทียบกับเชื้อไวรัสในวัคซีน

- r-value $<$ 0.2 หรือ Poor Matching เชื้อไวรัสในพื้นที่มีการเปลี่ยนแปลงความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาสูงหรือจัดอยู่คนละกลุ่มกับเชื้อไวรัสในวัคซีนที่ระบาด

ผล

ผลการตรวจหาและจำแนกเชื้อ FMDV ทั้ง 4 ตัวอย่าง ด้วยวิธี ELISA typing ยืนยันเป็นไวรัสปากและเท้าเปื่อย ซีโรไทป์ O ผลการตรวจหาเชื้อ FMDV ด้วย real-time RT-PCR พบสารพันธุกรรมของเชื้อ FMDV มีค่า Ct เท่ากับ 22.04, 15.11, 23.92 และ 24.86 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ผลการทดสอบความรุนแรงในเซลล์เพาะเลี้ยงและการตรวจสอบคุณสมบัติด้วยวิธี Plaque assay เมื่อนำไวรัสมาเพาะเลี้ยงในเซลล์ BHK-21 เพื่อดูการเกิด CPE เป็นเปอร์เซ็นต์และระยะเวลา นับเป็นชั่วโมงของการเกิด CPE พบว่าไวรัสที่ได้จากสัตว์ตาย (sample 2 และ 4) เกิด CPE ที่ระดับ 50% ที่ชั่วโมงที่ 30 และที่ระดับ 100% ที่ชั่วโมงที่ 48 (ตารางที่ 2) พบว่าเซลล์ที่เพาะไวรัส sample

2 และ 4 ซึ่งเป็นไวรัสที่เก็บจากสัตว์ตาย เกิดลักษณะหดตัวกลมและมีเซลล์หลุดลอกได้อย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เพาะด้วยไวรัส sample 1 และ 3 และ Negative control (รูปที่ 1) เมื่อเพาะไวรัสจนถึง 48 ชั่วโมง พบว่าทุกตัวอย่างทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงหดตัวและลอกหลุดจากพื้นผิว (รูปที่ 2)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจสอบและจำแนกเชื้อ FMDV ด้วยวิธี ELISA typing วิธี real-time RT-PCR และ วิธี nucleotide sequencing ส่วนยีน VP1 ของไวรัสตัวอย่าง sample 1-4

ตัวอย่าง Field virus	จังหวัด	ชนิดตัวอย่าง	ELISA typing	real-time RT-PCR (Ct value)
Sample 1	ประจวบคีรีขันธ์	สัตว์ป่วย	O	22.04
Sample 2	ประจวบคีรีขันธ์	สัตว์ตาย	O	15.11
Sample 3	สระบุรี	สัตว์ป่วย	O	23.92
Sample 4	สระบุรี	สัตว์ตาย	O	24.86

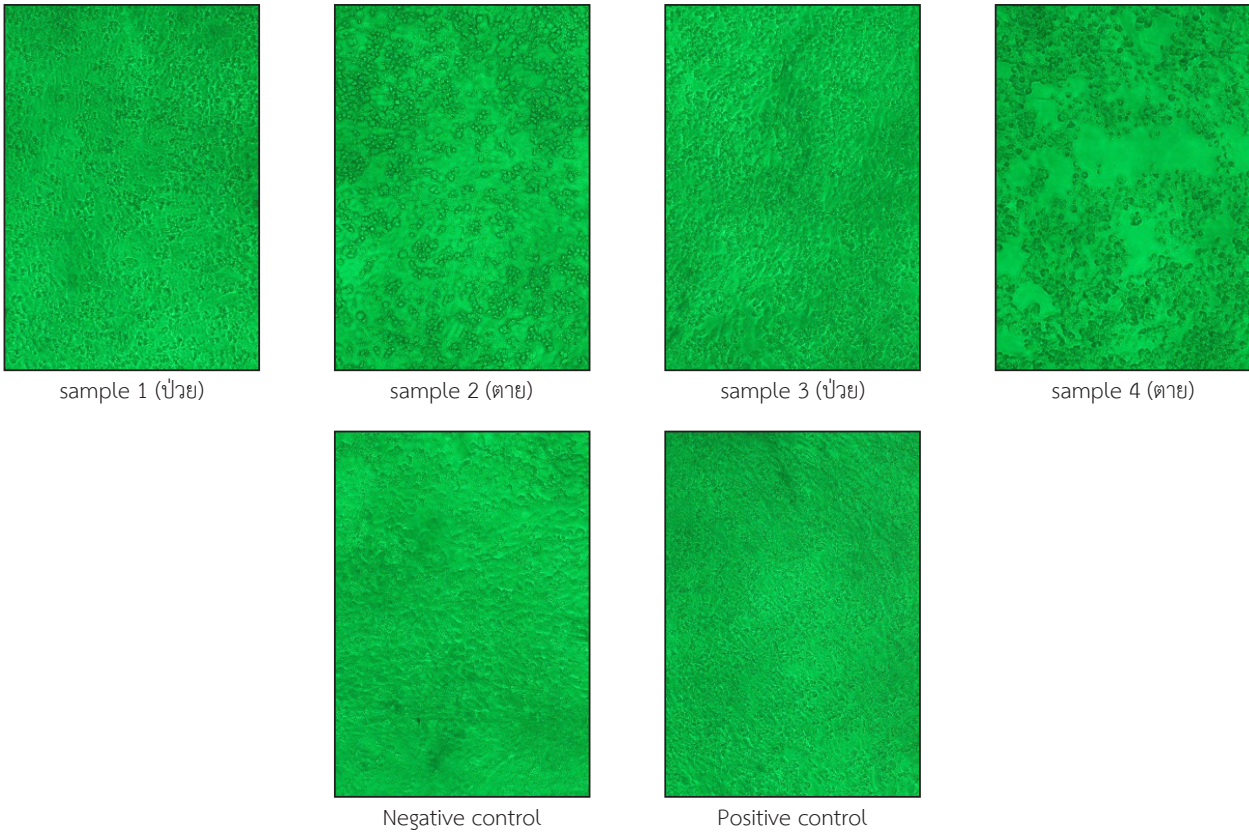
ตารางที่ 2 เปอร์เซนต์การเกิด CPE ของเซลล์ BHK-21 เมื่อเพาะด้วยไวรัสตัวอย่าง sample 1-4

ตัวอย่าง Field virus	จังหวัด	ชนิดตัวอย่าง	% CPE		
			ชั่วโมงที่ 24	ชั่วโมงที่ 30	ชั่วโมงที่ 48
Sample 1	ประจวบคีรีขันธ์	สัตว์ป่วย	-	10 %	50 %
Sample 2	ประจวบคีรีขันธ์	สัตว์ตาย	5 %	50 %	100 %
Sample 3	สระบุรี	สัตว์ป่วย	-	20 %	70 %
Sample 4	สระบุรี	สัตว์ตาย	5 %	50 %	100 %

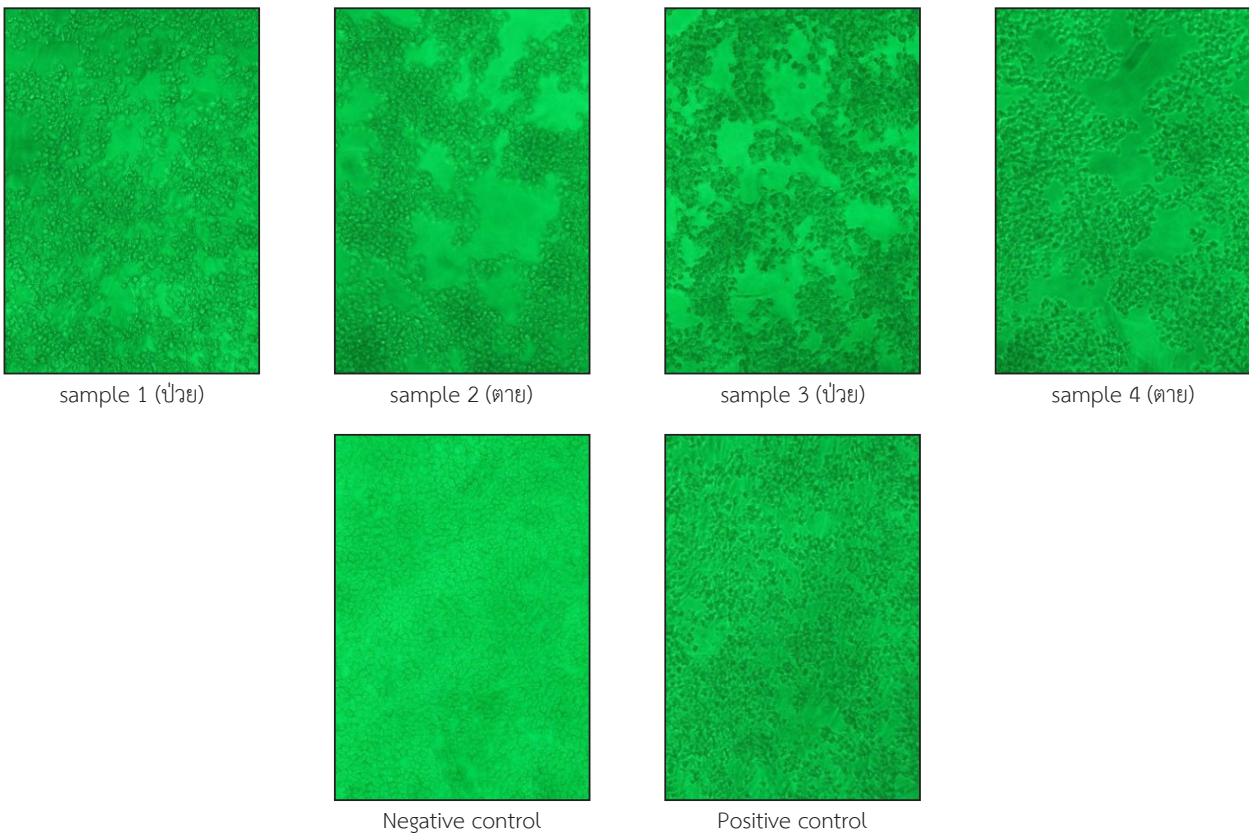
ตารางที่ 3 เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence identity) ของไวรัสตัวอย่าง Field virus sample 1, sample 2, sample 3, and sample 4 กับไวรัสอ้างอิงของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ศอ.) และไวรัสในวัคซีนของกรมปศุสัตว์ (Seed vaccine virus)

ตัวอย่าง Field virus	สายพันธุ์	% Identity		
		O/TAI/RRL/O/Ind/16-2/2020 (RRL)*	O/TAI/189/87**	O/Cathay**
Sample 1	O/ME-SA/Ind-2001e	96.70	83.50	81.50
Sample 2	O/ME-SA/Ind-2001e	97.00	83.80	81.80
Sample 3	O/ME-SA/Ind-2001e	98.10	83.40	82.40
Sample 4	O/ME-SA/Ind-2001e	97.10	83.70	82.00

* ไวรัสอ้างอิงของ ศอ. ** ไวรัสในวัคซีนของกรมปศุสัตว์ (Seed vaccine virus)

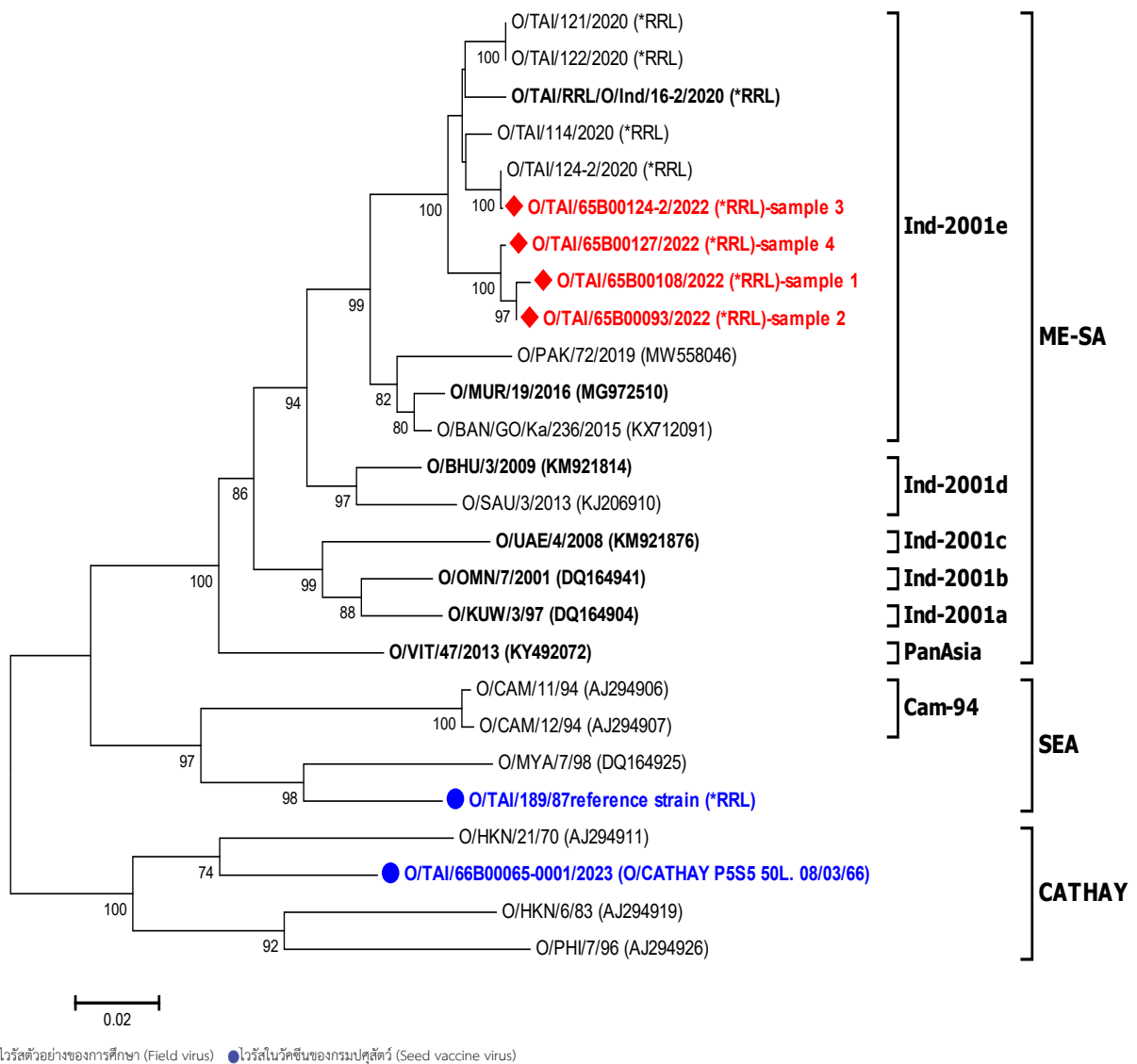


รูปที่ 1 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 เท่า ของการทดสอบ plaque assay หลังเพาะไวรัสในเซลล์ BHK-21 นาน 30 ชั่วโมง

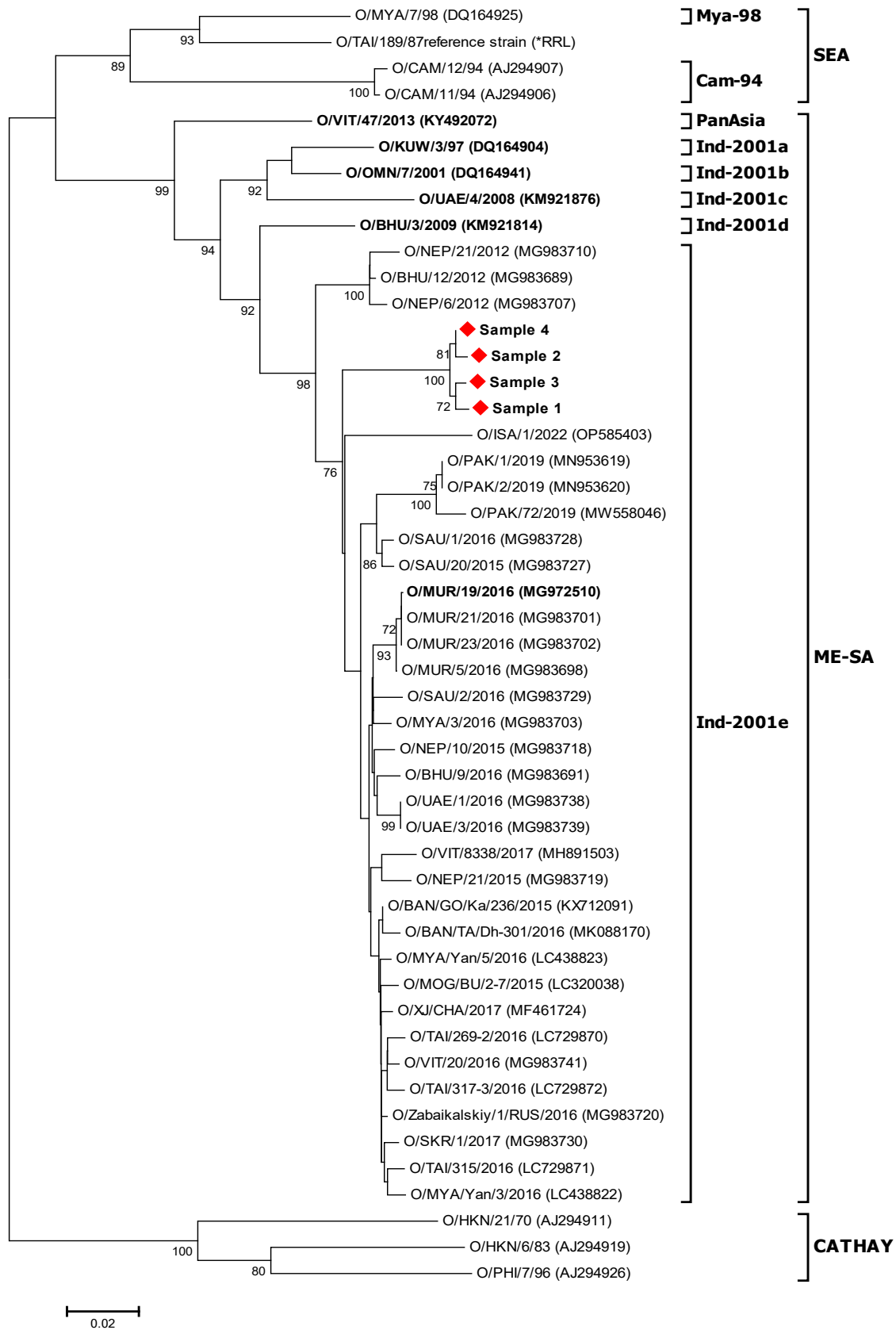


รูปที่ 2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 เท่า การทดสอบ plaque assay หลังเพาะไวรัสในเซลล์ BHK-21 นาน 48 ชั่วโมง

ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ FMDV ส่วนยีน VP1 และนำมาทำเป็น phylogenetic analysis เพื่อจัดกลุ่มของสายพันธุ์ไวรัสพบว่าเชื้อ FMDV ทั้ง 4 ตัวอย่าง เป็นซีโรไทป์ O อยู่ในโทโปไทป์ Middle East-South Asia (O/ME-SA) (ตารางที่ 3) และอยู่คนละโทโปไทป์กับไวรัสในวัคซีนของกรมปศุสัตว์ (seed vaccine virus) ซึ่งอยู่ในโทโปไทป์ SEA และ CATHAY (รูปที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากวิธี whole genome sequencing กับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ FMDV ที่มีรายงานใน GenBank ที่พบในประเทศอื่น ๆ พบว่าเชื้อ FMDV ทั้ง 4 ตัวอย่าง จัดอยู่ในกลุ่มสายพันธุ์ย่อย Ind-2001e ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบระบาดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (รูปที่ 4)



รูปที่ 3 Phylogenetic analysis ของเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ O ส่วนยีน VP1 ของไวรัสตัวอย่าง sample 1-4



รูปที่ 4 Phylogenetic analysis ของเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ O ส่วน whole genome sequencing ของไวรัสตัวอย่าง sample 1-4 เทียบกับเชื้อ FMDV สายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e ที่มีรายงานใน GenBank

วิจารณ์ผลและสรุป

การศึกษานี้เป็นการศึกษาการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อย ในปี 2565 ที่มีตัวอย่างจากโคนม โคเนื้อและสัตว์กบคู่อื่น ๆ ส่งตรวจเป็นเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ O ถึง 51.59 % (ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้, 2566) ซึ่งจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดสระบุรีเป็นจังหวัดที่พบการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อย ซีโรไทป์ O และมีรายงานโคนมโตเต็มวัยป่วยและตายจากการระบาดในครั้งนี เมื่อนำตัวอย่างจากทั้งสองจังหวัดมาวินิจฉัยและจำแนกซีโรไทป์ ด้วยวิธี ELISA typing ยืนยันเป็นเชื้อ FMDV เป็นซีโรไทป์ O จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนยีน VP1 พบเป็นสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวกันกับไวรัสที่ระบาดภูมิภาคแอฟริกาเหนือ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Bachanek-Bankowska *et al.*, 2018) ผลการทดสอบเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อ FMDV ด้วยวิธี plaque assay เพื่อศึกษาความรุนแรงของเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าเชื้อ FMDV ที่แยกได้จากสัตว์ตาย มีความรุนแรงทำให้เซลล์ BHK-21 หลุดลอกจากพื้นผิวเพาะเลี้ยง 100% ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งมีความแตกต่างจากเชื้อ FMDV ที่แยกได้จากสัตว์ป่วยที่พบการหลุดลอกเพียง 50-70% ซึ่งผลการทดสอบ มีความสอดคล้องกับหลายประเทศที่มีการศึกษาถึงความรุนแรงของเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ O การศึกษาของ Morioka *et al.* (2008) ใช้วิธี plaque assay ในการแยกความแตกต่างของเชื้อไวรัส O/JPN/2000 พบว่าสายพันธุ์รุนแรงจะพบการเกิด plaque ที่มีขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรง และ Qureshi *et al.* (2022) เปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อ FMDV ในเซลล์ BHK-21 พบว่าซีโรไทป์ A มีความรุนแรงมากที่สุดและรุนแรงใกล้เคียงกับซีโรไทป์ โดยการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ BHK-21 เมื่อ inoculation ด้วยเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ A, O และ Asia1

เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence identity) พบว่ามีความเหมือนกับไวรัสอ้างอิงของ ศอ. ซึ่งเป็นสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e เป็น 97.00-98.10% และมีความเหมือนกับไวรัสในวัคซีนของกรมปศุสัตว์ (Seed vaccine virus) สายพันธุ์ O/TAI/189/87 เป็น 83.40-83.80% และสายพันธุ์ O/Cathay เป็น 81.50-82.40% (ตารางที่ 3) และไวรัสตัวอย่างมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ 95.30-96.00% เมื่อเทียบกับเชื้อ FMDV ที่มีรายงานใน GenBank (ตารางที่ 4) ผลการทดสอบ Vaccine matching กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนของกรมปศุสัตว์ (Seed vaccine virus) พบว่าไวรัสทุกตัวอย่างให้ค่า r-value มากกว่า 0.4 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence identity) ของไวรัสตัวอย่าง Field virus (sample 1-4) กับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่ระบาดในต่างประเทศ (GenBank*) สายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e

ลำดับ	GenBank*	% Identity			
		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
1	O/MYA/Yan/5/2016 (LC438823)	95.70	95.70	95.70	96.00
2	O/XJ/CHA/2017 (MF461724)	95.60	95.60	95.60	95.90
3	O/SAU/20/2015 (MG983727)	95.60	95.60	95.60	95.90
4	O/SKR/1/2017 (MG983730)	95.40	95.40	95.40	95.70
5	O/Zabaikalskiy/1/RUS/2016 (MG983720)	95.40	95.40	95.40	95.70
6	O/BAN/GO/Ka/236/2015 (KX712091)	95.40	95.40	95.40	95.70
7	O/MYA/3/2016 (MG983703)	95.30	95.30	95.30	95.70
8	O/BHU/9/2016 (MG983691)	95.30	95.30	95.30	95.60
9	O/UAE/3/2016 (MG983739)	95.30	95.30	95.30	95.60
10	O/SAU/1/2016 (MG983728)	95.30	95.30	95.30	95.60

* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>

ตารางที่ 5 ค่า r-value ของไวรัสตัวอย่าง sample 1-4 กับไวรัสในวัคซีนของกรมปศุสัตว์ (Seed vaccine virus) จากการทดสอบ Vaccine matching ด้วยวิธี LP ELISA

ตัวอย่าง Field virus	จังหวัด	ชนิดตัวอย่าง	r-value			
			O/TAI/189/87**		O/TAI/189/87 + O/Cathay**	
			≥0.4	≥ 0.2-0.39	≥0.4	≥ 0.2-0.39
Sample 1	ประจวบคีรีขันธ์	สัตว์ป่วย	1.0	-	1.0	-
Sample 2	ประจวบคีรีขันธ์	สัตว์ตาย	0.5	-	1.0	-
Sample 3	สระบุรี	สัตว์ป่วย	0.5	-	1.0	-
Sample 4	สระบุรี	สัตว์ตาย	0.5	-	1.0	-

** ไวรัสในวัคซีนของกรมปศุสัตว์ (Seed vaccine virus)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ FMDV ทั้ง 4 ตัวอย่างมาสร้างเป็น phylogenetic analysis (รูปที่ 3) แสดงให้เห็นว่าเชื้อ FMDV จากการระบาดครั้งนี้อยู่ใน โทโปไทป์ ME-SA ซึ่งเป็นโทโปไทป์เดียวกับไวรัสอ้างอิง ของ คออ. ที่ยืนยันเป็นสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e โดยมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ 96.70 – 98.10% แต่อยู่คนละโทโปไทป์กับ seed vaccine virus ของกรมปศุสัตว์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ O/TAI/189/87 อยู่โทโปไทป์ SEA และสายพันธุ์ O/CATHAY อยู่โทโปไทป์ CATHAY และมีลำดับ นิวคลีโอไทด์เหมือนกับ seed vaccine virus ของ กรมปศุสัตว์ เท่ากับ 83.40-83.80% และ 81.50-82.40% ตามลำดับ (ตารางที่ 3) โดยทั่วไปวัคซีนป้องกันโรค FMD จะไม่ให้ความคุ้มข้ามสายพันธุ์กัน (cross-protection) แม้จะเป็นซีโรไทป์เดียวกันก็ตาม (Cao *et al.*, 2014) ซึ่งการระบาดของโรค FMD สายพันธุ์ O/ME-SA/ Ind-2001e ในประเทศเวียดนาม รัสเซีย คาซัคสถาน และ มองโกเลีย จึงได้ปรับมาตรการควบคุมป้องกันโรคโดย คัดเลือกไวรัสที่จะนำมาผลิตวัคซีนใหม่ให้มีความใกล้เคียง กับสายพันธุ์ที่ระบาดเพื่อให้วัคซีน มีประสิทธิภาพในการ ป้องกันควบคุมโรคได้ดี (Palinski *et al.*, 2019; Nikiforov *et al.*, 2023) แต่ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ ระหว่างเชื้อ FMDV ที่ระบาดในครั้งนี้นี้กับ seed vaccine virus ของกรมปศุสัตว์ (vaccine matching) มีค่า r-value มากกว่า 0.4 (ตารางที่ 5) ซึ่งอยู่ในกลุ่ม good matching แสดงให้เห็นว่า seed vaccine virus ของ กรมปศุสัตว์ยังคงให้ความคุ้มโรคต่อเชื้อ FMDV ที่ระบาด ในพื้นที่ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ สอดคล้องกับการศึกษา ของกิงกานต์และคณะ (2567) พบว่าเชื้อ FMDV สายพันธุ์ ที่ใช้เป็น seed vaccine virus ของกรมปศุสัตว์ มีค่าความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาที่ใกล้เคียงกับ O/ME-SA/Ind-2001 ที่แพร่ระบาดในประเทศไทย อย่างไรก็ตามมีบางการศึกษาพบว่าวัคซีนป้องกันโรค FMD ซีโรไทป์ O เป็นวัคซีน ที่ป้องกันข้ามสายพันธุ์ได้ในวงกว้างจึงถูกนำมาใช้อย่าง แพร่หลาย (กิงกานต์, 2567) Nagendrakumar *et al.* (2011) ทดลองฉีดวัคซีนสายพันธุ์ O1/Manisa ที่มีปริมาณ ไวรัสสูงให้กับสัตว์ทดลองพบว่าให้ความคุ้มโรคต่อไวรัส

สายพันธุ์ O1/Campos และสายพันธุ์ O/SEA/MYA-98 ซึ่งเป็นเชื้อ FMDV ที่อยู่ต่างโทโปไทป์ได้

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคติดต่อในสัตว์กีบคู่ ที่ก่อความเสียหายด้านเศรษฐกิจทั่วโลกซีโรไทป์โอ (O) เป็นซีโรไทป์ที่พบได้มากที่สุดในแถบเอเชีย ซึ่งมีหลาย สายพันธุ์ เช่น O/SEA/Mya-98, O/ME-SA/PanAsia, O/Cathay และ O/ME-SA/Ind-2001 (Li *et al.*, 2023) ในกลุ่มโทโปไทป์ O/ME-SA/Ind-2001 ประกอบไปด้วย สายพันธุ์ย่อย a, b, c, d และ e ที่พบระบาดมากขึ้นใน แถบตะวันออกกลาง แอฟริกาเหนือ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Ryoo *et al.*, 2021) ประเทศไทยเริ่มพบการ ระบาดของสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e ในจังหวัด แถบภาคตะวันตกและภาคใต้ซึ่งเป็นพื้นที่เขตชายแดน ติดต่อกับประเทศเพื่อนบ้าน ซึ่งมีความสอดคล้องกับ Ryoo *et al.* (2021) ที่พบการระบาดข้ามกลุ่มประเทศได้ มากขึ้นจากสัตว์ป่า การเคลื่อนย้ายสัตว์ข้ามแดน และการ ขนส่งสินค้าที่เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของยีน VP1 ยังเป็น อีกวิธีหนึ่งที่ใช้ชี้ว่าไวรัส O/JPN/2000 มีความรุนแรง มากกว่า O/JPN/2010 (Nishi *et al.*, 2019) และการ เปลี่ยนแปลงของยีนส่วน 5'untranslated region (5'UTR) ของซีโรไทป์ O ที่ระบาดในประเทศจีนมีผล ต่อความรุนแรงของไวรัส โดยพบการติดเชื้อแบบ host specific คือพบเชื้อในสุกรแต่ไม่พบในโค (Yang *et al.*, 2020) ซึ่งการศึกษาดังกล่าวนี้น่าจะนำมาใช้เป็น แนวทางในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง เชื้อ FMDV จากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดสระบุรี ในส่วนยีนที่มีความจำเพาะมากยิ่งขึ้นในอนาคตได้ เพื่อ หาค่าการเปลี่ยนแปลงของยีนที่ส่งผลให้เชื้อ FMDV มีการ เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติในการก่อโรค

จากผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการสรุปเบื้องต้น ได้ว่าเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ O สายพันธุ์ย่อย O/ME-SA/ Ind-2001e ที่แยกได้จากโคตายของจังหวัด ประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดสระบุรีในการศึกษานี้มีความ เป็นไปได้ที่จะเป็นเชื้อ FMDV สายพันธุ์ที่มีความรุนแรง อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความ เปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัส เพื่อเป็นข้อมูล

สนับสนุนในการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงของไวรัสที่มีความรุนแรงมากขึ้น และช่วยประกอบการพิจารณาคัดเลือกสายพันธุ์วัคซีนป้องกันโรค รวมถึงเตรียมความพร้อมในการการปรับมาตรการควบคุม ป้องกันโรคที่เหมาะสมในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

รมพฤกษ์ อุดล และ วิไล ลินจงสูงภกช. 2549. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่แยกได้จากประเทศไทยและภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ระหว่างปีพ.ศ. 2547-2548. *สัตวแพทยสาร*. 57(1):15-23.

รมพฤกษ์ อุดล. 2564. องค์ความรู้:เอกสารวิชาการ:คู่มือผู้เชี่ยวชาญสถาบันสุขภาพสัตว์. [Online] แหล่งที่มา : <https://niah.dld.go.th/webnew/knowledge/expert-s-guide/foot-and-mouth-disease>. 28 สิงหาคม 2566.

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. 2566. ภารกิจ. [Online] แหล่งที่มา : <https://rrl.dld.go.th/webnew/organization-information/mission>. 28 สิงหาคม 2566.

กรมปศุสัตว์. 2566. ระบบต้นแบบการวิเคราะห์เพื่อการพยากรณ์และเตือนภัยโรคปากและเท้าเปื่อย-โรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease, FMD) บทความที่ 1. [Online] แหล่งที่มา : <http://predict.dld.go.th/%E0%B9%82%E0%B8%A3%E0%B8%84%E0%B8%9B%E0%B8%B2%E0%B8%81%E0%B9%81%E0%B8%A5%E0%B8%B0%E0%B9%80%E0%B8%97%E0%B9%89%E0%B8%B2%E0%B9%80%E0%B8%9B%E0%B8%B7%E0%B9%88%E0%B8%AD%E0%B8%A2/%E0%B8%84%E0%B8%A7%E0%B8%B2%E0%B8%A1%E0%B8%A3%E0%B8%B9%E0%B9%89%E0%B8%97%E0%B8%B1%E0%B9%88%E0%B8%A7%E0%B9%84%E0%B8%9B%E0%B9%82%E0%B8%A3%E0%B8%84%E0%B8%9B%E0%B8%B2%E0%B8%81%E0%B9%81%E0%B8%A5%E0%B8%B0%E0%B9%80%E0%B8%97%E0%B9%89%E0%B8%B2%E0%B9%80%E0%B8%9B%E0%B8%B7%E0%B9%88%E0%B8%AD%E0%B8%A2>. 30 กันยายน 2566

กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย. 2567. แนวทางการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยจากข้อมูลทางระบาดวิทยาในประเทศไทย. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ISBN 978-616-608-765-9.

กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย จิรนนท์ โชติพิทักษ์พร สหวัชร อัจฉินขจรธรณ มารุต พงศ์ พุ่มพวง ภาวนา ทศพิทักษ์กุล และ จรรยา สมานิตย์. 2567. การเปรียบเทียบคุณลักษณะทางแอนติเจนของสายพันธุ์วัคซีน

โรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ O กับไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ O/ME-SA/Ind2001 ที่แพร่ระบาดในประเทศไทย. [Online] แหล่งที่มา <https://rrl.dld.go.th/webnew/knowledge/academic-papers/210267>

Bachanek-Bankowska, K., Di Nardo, A., Wadsworth, J., Mioulet, V., Pezzoni, G., Grazioli, S., Brocchi, E., Kafle, S.C., Hettiarachchi, R., Kumarawadu, P.L., Eldaghayes, I.M., Dayhum, A.S., Meenowa, D., Sghaier, S., Madani, H., Abouchoaib, N., Hoang, B.H., Vu, P.P., Dukpa, K., Gurung, R.B., Tenzin, S., Wernery, U., Panthumart, A., Seeyo, K.B., Linchongsubongkoch, W., Relmy, A., Bakkali-Kassimi, L., Scherbakov, A., King, D.P., and Knowles, N.J. 2018. Reconstructing the evolutionary history of pandemic foot-and-mouth disease viruses: the impact of recombination within the emerging O/ME-SA/Ind-2001 lineage. [Online] Available: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-32693-8>. August 15, 2023.

Cao, Y., Lu, Z., Li, D., Fan, P., Sun, P., Bao, H., Fu, Y., Li, P., Bai, X., Chen, Y., Xie, B., and Liu, Z. 2014. Evaluation of cross-protection against three topotypes of serotype O foot-and-mouth disease virus in pigs vaccinated with multi-epitope protein vaccine incorporated with poly(I:C). [Online] Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378113513005464>. January 22, 2024.

Hemadri, D., Tosh, C., Sanyal, A., and Venkataramanan, R. 2002. Emergence of a new strain of type O foot-and-mouth disease virus: Its phylogenetic and evolutionary relationship with the PanAsia pandemic strain. [Online] Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12206305/>. August 15, 2023.

Islam, M.S., Habib, M.A., Islam, M.R., Mahmud, M.S., Saha, P.C., Ruba, T., Das, P.M., and Khan, M.A.H. 2017. Clinicopathological Investigation of Foot and Mouth Disease and Serotype Identification of the Viruses in Cattle of Bangladesh. *Immunology and Infectious Diseases*. 5(2):16-23. [Online] Available: https://www.researchgate.net/figure/Lesion-specific-to-tiger-heart-disease-was-seen-in-the-heart-of-an-infected-and-death_fig3_321490516. September 30, 2024.

Knowles, N.J., Wadsworth, J., Bachanek-Bankowska, K., and King, D.P. 2016. VP1 sequencing protocol for foot and mouth disease virus molecular epidemiology. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 35(3) : 1-28.

- Li, F., Li, Y., Ma, J., Wu, R., Zou, X., Liu, Y., Zhao, Q., and Zhu, Y. 2023. Molecular evolution, diversity, and adaptation of foot-and-mouth disease virus serotype O in Asia. [Online] Available: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2023.1147652/full>. October 1, 2024.
- Morioka, K., Fukai, K., Ohashi, S., Sakamoto, K., Tsuda, T., and Yoshida, K. 2008. Comparison of characters of the Plaque-Purified viruses from Foot and mouth disease virus O/JPN/2000. *J. Vet. Med. Sci.* 70(7) : 653-658.
- Nagendrakumar, S.B., Srinivasan, V.A., Madhanmohan, M., Yuvaraj, S., Parida, S., and Antonello, D.N. 2011. Evaluation of cross protection between O1 Manisa and O1 Campos in cattle vaccinated with foot and mouth disease virus vaccine incorporating different payloads of vaccinated O1 Manisa antigen. *Vaccine.* 29(10) : 1906-1912.
- Nikiforov, V., Shcherbakov, A., Chvala, I., Kremenchugskaya, S., Korennoy, F., Mayorova, T., Timina, A., Tyulegenov, S., Abdrakhmanov, S., Berdikulov, M., Sainnokhoi, T., Gombo-Ochir, D., Tserenchimed, T., Prokhvatilova, L., and Sprygin, A. 2023. Insights into the molecular epidemiology of Foot-and-Mouth disease virus in Russia, Kazakhstan, and Mongolia in terms of O/ME-SA/Ind-2001e sublineage expansion. [Online] Available: <https://www.mdpi.com/1999-4915/15/3/598>. September 4, 2023.
- Nishi, T., Morioka, K., Saito, N., Yamakawa, M., Kanno, T., and Fukai, K. 2019. Genetics determinants of virulence between two foot and mouth disease virus isolates which caused outbreaks of differing severity. [Online] Available: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/msphere.00294-19> [Online]. August 15, 2023.
- Palinski, R.M., Bertram, M.R., Vu, L.T., Pauszek, S.J., Hartwig, E.J., Smoliga, G.R., Stenfeldt, C., Fish, I.H., Hoang, B.H., Phuong, N.T., Hung, V.V., Vu, P.P., Dung, N.K., Dong, P.V., Tien, N.N., Tho, N.D., Dung, D.H., and Arzt, J. 2019. First genome sequence of Foot-and-Mouth disease virus serotype O sublineage Ind-2001e from Southern Vietnam. [Online] Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6406109/>. September 4, 2023.
- Qureshi, S.S., Khan, B., Khan, S., Rahman, H.U., and Subhan, M. 2022. Comparative study of the virulency of different serotypes of Foot and Mouth disease virus by using Baby Hamster Kidney-21 cell line. *Sarhad Journal of Agriculture.* Vol 38. Issue 3. P.778-782.
- Ryoo, S., Lee, H., Lim, D.R., Lee, J.W., Bunnary, S., Tum, S., Lee, D.S., Hwang, H., Jeong, S.G., Nah, J.J., Ku, B.K., Kim, J.M., and Cha, S.H. 2021. Identification of the O/ME-SA/Ind-2001e sublineage of Foot-and-Mouth disease virus in Cambodia. [Online] Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34778434/>. October 20, 2023.
- Yang, F., Zhu, Z., Cao, W., Liu, H., Wei, T., Zheng, M., Zhang, K., Jin, Y., He, J., Guo, J., Liu, X., and Zheng, H. 2020. Genetic determinants of altered virulence of Type O Foot-and-Mouth Disease virus. [Online] Available: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/jvi.01657-19>. January 17, 2024.