

การพัฒนาการตรวจการปนเปื้อนของสารออร์กาโนฟอสเฟตจากวงันตาของปลาแฟนซีคาร์พ  
(*Cyprinus carpio*)



นายศรัณย์สิริ นวลมณี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

DEVELOPMENT OF THE DETECTION OF ORGANOPHOSPHATE CONTAMINATION  
FROM FANCY CARP (*CYPRINUS CARPIO*) VITREOUS HUMOR

Mr. Saransiri Nuanmanee



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Medicine

Department of Veterinary Medicine

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาการตรวจการปนเปื้อนของสารออร์กาโนฟอสเฟตจากวุ้นตาของปลาแพนซีคาร์พ (Cyprinus carpio)

โดย

นายศรัณย์สิริ นวลมณี

สาขาวิชา

อายุรศาสตร์สัตวแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.นันทริกา ชันชื้อ

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.นิวัตร จันทศิริพรชัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.นันทริกา ชันชื้อ)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.อนงค์ บิณฑวิหค)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.อัจฉริยา ไสละสูต)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ดร.อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล)

ศรัณย์สิริ นวลมณี : การพัฒนาการตรวจการปนเปื้อนของสารออร์กาโนฟอสเฟตจากวุ้นตาของปลาแฟนซีคาร์พ (*Cyprinus carpio*). (DEVELOPMENT OF THE DETECTION OF ORGANOPHOSPHATE CONTAMINATION FROM FANCY CARP (*CYPRINUS CARPIO*) VITREOUS HUMOR) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. สพ.ญ. ดร.นันทริกา ชันช่อ, 82 หน้า.

การปนเปื้อนสารกำจัดแมลงในแหล่งน้ำเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพคนและสัตว์น้ำ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของสารออร์กาโนฟอสเฟตในน้ำจากอวัยวะต่างๆของปลาโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี-แทนเด็มแมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS/MS) โดยใช้ปลาแฟนซีคาร์พ (*Cyprinus carpio*) จำนวน 63 ตัวแบ่งเป็น 2 การทดลอง ศึกษาการตกค้างและการสลายตัวของสารออร์กาโนฟอสเฟต โดยเลี้ยงในน้ำที่มีสารไดคลอวอสความเข้มข้น 1,000 และ 4,000 พีพีบี เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างตามเวลาที่กำหนด การศึกษาการตกค้างพบว่าที่ความเข้มข้น 1,000 พีพีบีมีการตกค้างในวุ้นตาและเนื้อร้อยละ 2.76 และ 1.71 ตามลำดับแต่ไม่พบการตกค้างในตับและเลือด ความเข้มข้น 4,000 พีพีบีมีการตกค้างในวุ้นตาและเนื้อ ร้อยละ 6.79, 5.66 และ 5.54 ตามลำดับแต่ไม่พบการตกค้างในเลือด การศึกษาการสลายตัว พบว่าวุ้นตาจากซากปลาในที่แห้งและในน้ำสามารถตรวจพบสารไดคลอวอสตกค้างได้แม้จะเก็บตัวอย่างไว้นานถึง 72 ชั่วโมง ผลทางจุลพยาธิวิทยาของตับ ไตและเหงือกมีความรุนแรงของรอยโรคเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสารไดคลอวอส แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของตาและกล้ามเนื้อ จากผลการทดลองสรุปได้ว่า วุ้นตาเป็นตัวอย่างที่ใช้ตรวจการปนเปื้อนสารออร์กาโนฟอสเฟตได้ดี เพราะสามารถตรวจพบจากปลาอยู่ในน้ำที่มีความเข้มข้นของสารต่ำ อีกทั้งตรวจพบได้จากปลาที่ตายในลักษณะต่างๆ ตามธรรมชาติได้นานถึง 72 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาควิชา อายูรศาสตร์

ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา อายูรศาสตร์สัตวแพทย์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2556

# # 5375562431: MAJOR VETERINARY MEDICINE

KEYWORDS: ORGANOPHOSPHATE / DICHLORVOS / GAS CHROMATOGRAPHY /  
FANCY CARP / VITREOUS HUMOR

SARANSIRI NUANMANEE: DEVELOPMENT OF THE DETECTION OF ORGANOPHOSPHATE CONTAMINATION FROM FANCY CARP (*CYPRINUS CARPIO*) VITREOUS HUMOR. ADVISOR: ASSOC. PROF. NANTARIKA CHANSUE, 82 pp.

Pesticide contamination in water resources is a problem that effects aquatic animals and human health. The objective of this study was to detect organophosphate in water from fish by using Gas chromatography - Tandem Mass Spectrometry (GC-MS/MS). Sixty three of fancy carp (*Cyprinus carpio*) were separated in two experiments, study on residue and degradation of pesticide after death. They were exposed to dichlorvos for 72 hours, in 1,000 ppb and 4,000 ppb. Experimental fish organs were collected at various points of times. The result indicated that at 1,000 ppb the residue levels in vitreous humor and muscle were 2.76 and 1.71% respectively, but none was found in liver and blood. At 4,000 ppb the liver, vitreous humor and muscle residue levels were 6.79, 5.66 and 5.54% respectively, but none was found in blood. Result in degradation experiment showed that dichlorvos residue in vitreous humor from dead fish in dry or wet condition could be detected until 72 hrs after death. Histopathology of liver, kidney and gill showed the severity of pathognomonic lesions were higher increased to the higher concentrations of dichlorvos. However eye and muscle tissue had no remarkable change. These results showed that the vitreous humor could be useful for analyzing pesticide contamination from fish since dichlorvos could be detected even in low contamination and detectable period was up to 72 hrs postmortem.

Department: Veterinary Medicine

Student's Signature .....

Field of Study: Veterinary Medicine

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2013

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยคามอนุเคราะห์ และความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รศ.สพ.ญ.ดร.นันทริกา ชันซื่อ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งให้คำแนะนำปรึกษา และข้อเสนอแนะ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ตลอดจนการให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณมาลินี จงเจริญใจ นักวิทยาศาสตร์ ประจำศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการ ออกแบบและแปลผลการทดลองในการทำวิจัยครั้งนี้ และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ในศูนย์วิจัยโรค สัตว์น้ำทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ในการเลี้ยงสัตว์ ทำวิจัยในสัตว์ทดลอง

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่จากบริษัทห้องปฏิบัติการกลาง ประเทศไทย สาขารุงเทพ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ตลอดจนคำแนะนำในการแปลผล ทางด้านเคมี

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ช่วยกรุณาชี้แนะและให้คำปรึกษา เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่กรุณาให้ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (90th Year Chulalongkorn Scholarship) ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบิดา (นายบรรพต นวลมณี) มารดา (นางพิณทอง นวลมณี) ที่คอยเป็น แรงผลักดันช่วยเหลือ ให้ความสนับสนุนทั้งกำลังกาย และกำลังใจตลอดมา รวมทั้งญาติพี่น้อง และ เพื่อน พี่ และน้องทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือ จนทำให้ข้าพเจ้าทำงานได้สำเร็จ ลุล่วงมาได้ด้วยดี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐานการวิจัย.....	2
1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดของงานวิจัย.....	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 วนัตา.....	4
2.2 สารออร์กาโนฟอสเฟต.....	6
2.3 ผลกระทบที่เกิดจากการปนเปื้อนสารออร์กาโนฟอสเฟต.....	10
2.4 การตรวจวินิจฉัยความเป็นพิษจากสารกำจัดแมลง.....	13
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	17
3.1 สัตว์ทดลอง.....	17
3.2 การทดลองที่ 1.....	18
3.3 การทดลองที่ 2.....	27
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	30
4.1 ผลคุณภาพน้ำ.....	30
4.2 ผลการศึกษาการตกค้างสารออร์กาโนฟอสเฟตในแต่ละเนื้อเยื่อ.....	31
4.3 ผลการศึกษาอัตราส่วนของการสะสมสารออร์กาโนฟอสเฟตจากน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อ.....	35
4.4 ผลการศึกษาอัตราการสลายตัวของสารออร์กาโนฟอสเฟตในแต่ละเนื้อเยื่อของปลาหลังการตาย.....	35

4.5 ผลทางจุลพยาธิวิทยา.....	41
4.6 ผลการเปลี่ยนแปลงทางพฤติกรรม.....	47
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย ข้อเสนอ และข้อเสนอแนะ .....	49
5.1 อภิปรายผลการวิจัย.....	49
5.2 ข้อเสนอและข้อเสนอแนะ .....	54
ภาคผนวก.....	57
ภาคผนวก ก ตารางและแผนภูมิแสดงคุณภาพน้ำในการทดลอง.....	58
ภาคผนวก ข ตารางแสดงจำนวนปลา ความยาว น้ำหนักและพฤติกรรมปลาขณะทำการทดลอง.....	63
ภาคผนวก ค ตารางแสดงข้อมูลการตรวจหาปริมาณสารไดคลอวอสทางห้องปฏิบัติการ.....	65
ภาคผนวก ง ภาพลักษณะปลาในแต่ละชั่วโมงหลังตาย.....	73
รายการอ้างอิง .....	76
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	82



## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การตกค้างของสารฆ่าแมลงกลุ่มต่างๆ ในแม่น้ำสายหลักของประเทศไทยระหว่างปีพ.ศ. 2528-2531 (Tapinta and Hudak, 1998).....	8
ตารางที่ 2 การตกค้างของสารฆ่าแมลงกลุ่มต่างๆ ในพื้นที่เกษตรกรรมของประเทศไทยระหว่างปีพ.ศ. 2539-2540 (Tapinta and Hudak, 1998).....	9
ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐานปริมาณการตกค้างของสารไดคลอวอสจาก ตัวอย่าง ณ ชั่วโมงที่ 0 หลังการตาย.....	32
ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปริมาณสารไดคลอวอสตกค้างในอวัยวะต่างๆ จากซากปลาที่เก็บไว้ในภาชนะแห้ง.....	37
ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปริมาณสารไดคลอวอสตกค้างในอวัยวะต่างๆ จากซากปลาที่เก็บไว้ในน้ำสะอาด.....	38
ตารางที่ 6 พฤติกรรมของปลาแต่ละกลุ่มระหว่างการทดลอง.....	47

## สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 โครงสร้างลูกตาของปลากระดูกแข็ง.....	4
ภาพที่ 2 สূตรโครงสร้างของสารไดคลอวอส.....	6
ภาพที่ 3 สূตรโครงสร้างของสารไตรคลออร์ฟอน.....	6
ภาพที่ 4 การทำงานของสารสื่อประสาทและเอนไซม์ acetylcholinesterase .....	10
ภาพที่ 5 การทำงานของสารสื่อประสาท เอนไซม์ acetylcholinesterase และ การออกฤทธิ์ของสาร organophosphate (A) การทำงานของสารสื่อประสาท (B) การทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase และ (C) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase โดยสาร organophosphate.....	11
ภาพที่ 6 การเลี้ยงระหว่างการกักโรค.....	17
ภาพที่ 7 การเลี้ยงในการทดลองที่ 1 .....	18
ภาพที่ 8 สารไดคลอวอส (ไพธัน®; Dichlorvos 50% w/v).....	19
ภาพที่ 9 การตรวจน้ำ (A) เครื่องพีเอชมิเตอร์ (B) ชุดทดสอบคุณภาพน้ำอย่างง่าย.....	19
ภาพที่ 10 การทำการรุนยฆาต (A) แยกปลาเพื่อทำการการรุนยฆาต (B) การตัดไขสันหลังบริเวณ cervical column .....	20
ภาพที่ 11 การเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์โดยแก๊สโครมาโทกราฟี (A) การเปิดช่องท้องเพื่อเก็บตัวอย่างตับ (B) การเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อ (C) การเก็บตัวอย่างรังไข่ (D) การเก็บตัวอย่างเลือด.....	21
ภาพที่ 12 การเลี้ยงในการทดลองที่ 2 .....	27
ภาพที่ 13 การตรวจอุณหภูมิอากาศและความชื้นสัมพัทธ์โดยเครื่องไฮโกรมิเตอร์.....	28
ภาพที่ 14 การเก็บซากปลา (A) เก็บในที่แห้ง (B) เก็บในน้ำสะอาด .....	29
ภาพที่ 15 ปริมาณสารไดคลอวอสในน้ำจากกลุ่ม 1,000 พีพีบี และกลุ่ม 4,000 พีพีบี.....	30
ภาพที่ 16 โครมาโทแกรมจากการตรวจโดย GC-FPD จากน้ำที่มีสารไดคลอวอส 1,000 พีพีบี แกนตั้ง แทนความเข้มข้นของสัญญาณ (picoAmp; pA) แกนนอนแทนเวลา (minute).....	31
ภาพที่ 17 ปริมาณการตกค้างของสารไดคลอวอสเปรียบเทียบในแต่ละตัวอย่างจากกลุ่มควบคุม กลุ่ม 1,000 พีพีบี และกลุ่ม 4,000 พีพีบี.....	32
ภาพที่ 18 โครมาโทแกรมจากการตรวจโดย GC-MS/MS จากกุ้งที่มีสารไดคลอวอส 1 พีพีบี แกนตั้ง แทนความเข้มข้นของสัญญาณ (kilo counts per second; Kcps) แกนนอนแทนเวลา (minute). 33	
ภาพที่ 19 การยืนยันสารไดคลอวอสโดยการนำไปแตกตัวครั้งที่สอง จากการตรวจด้วย GC-MS/MS จากกุ้งที่มีสารไดคลอวอส 1 พีพีบี.....	33

ภาพที่ 20 โครมาโทแกรมจากการตรวจโดย GC-MS/MS จากวุ้นตาที่มีสารไดคลอวอส 100 พีพีบี  
 แกนตั้งแทนความเข้มข้นของสัญญาณ (kilo counts per second; Kcps) แกนนอนแทนเวลา  
 (minute) ..... 34

ภาพที่ 21 การยืนยันสารไดคลอวอสโดยการนำไปแตกตัวครั้งที่สอง จากการตรวจด้วย GC-MS/MS  
 จากวุ้นตาที่มีสารไดคลอวอส 100 พีพีบี ..... 34

ภาพที่ 22 ร้อยละการตกค้างของสารไดคลอวอสในแต่ละตัวอย่างจากสองกลุ่มความเข้มข้น ..... 35

ภาพที่ 23 สภาวะอากาศระหว่างทำการทดลองที่ 2 ..... 36

ภาพที่ 24 การเปรียบเทียบปริมาณสารในตัวอย่างตับ วุ้นตาและเนื้อในเวลาที่ต่างๆ จากซากปลาเก็บที่  
 แห่ง ..... 39

ภาพที่ 25 การเปรียบเทียบปริมาณสารในตัวอย่างตับ วุ้นตาและเนื้อในเวลาที่ต่างๆ จากซากปลาเก็บใน  
 น้ำ ..... 39

ภาพที่ 26 ปริมาณสารไดคลอวอสในตัวอย่างตับจากซากที่เก็บในที่แห้งและในน้ำ ..... 40

ภาพที่ 27 ปริมาณสารไดคลอวอสในตัวอย่างวุ้นตาจากซากที่เก็บในที่แห้งและในน้ำ ..... 40

ภาพที่ 28 ปริมาณสารไดคลอวอสในตัวอย่างกล้ามเนื้อจากซากที่เก็บในที่แห้งและในน้ำ ..... 41

ภาพที่ 29 จุลพยาธิวิทยาของเหงือกปลาแพนซีคาร์พกลุ่มไดคลอวอส 4,000 พีพีบี ที่พบลักษณะ  
 telangiectasis (1) ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 40 เท่า (2) ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์  
 ขนาดกำลังขยาย 400 เท่า (C) chloride cell และ (T) telangiectasis (H&E)..... 41

ภาพที่ 30 จุลพยาธิวิทยาของเหงือกปลาแพนซีคาร์พ กำลังขยาย 400 เท่า (1) กลุ่มควบคุม (2) กลุ่ม  
 ไดคลอวอส 1,000 พีพีบี (3) กลุ่มไดคลอวอส 4,000 พีพีบี (P) primary lamellae (S) secondary  
 lamellae และ (C) chloride cell (H&E) ..... 42

ภาพที่ 31 จุลพยาธิวิทยาของไตปลาแพนซีคาร์พ กำลังขยาย 400 เท่า (1) กลุ่มควบคุม (2) กลุ่มได  
 คลอวอส 1,000 พีพีบี (3) กลุ่มไดคลอวอส 4,000 พีพีบี (L) low columnar epithelial cells (B)  
 brush border (P) proximal tubule (D) distal tubule (C) collecting tubule (TN)  
 tubulonephrosis (H&E) ..... 43

ภาพที่ 32 จุลพยาธิวิทยาของตับปลาแพนซีคาร์พ กำลังขยาย 400 เท่า (1) กลุ่มควบคุม (2) กลุ่มได  
 คลอวอส 1,000 พีพีบี (3) กลุ่มไดคลอวอส 4,000 พีพีบี (H) hepatocyte (H&E)..... 44

ภาพที่ 33 จุลพยาธิวิทยาของตาปลาแพนซีคาร์พ กำลังขยาย 400 เท่า (1) กลุ่มควบคุม (2) กลุ่มได  
 คลอวอส 1,000 พีพีบี (3) กลุ่มไดคลอวอส 4,000 พีพีบี (V) vitreous chamber (N) nerve fiber  
 layer (G) ganglion cell layer (IP) inner plexiform layer (I) inner nuclear layer (OP)  
 outer plexiform layer (O) outer nuclear layer (RC) rods and cones; photoreceptor  
 layer และ (P) pigment layer (H&E) ..... 45

ภาพที่ 34 จุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อปลาแพนซีคาร์พ กำลังขยาย 400 เท่า (1) กลุ่มควบคุม (2) กลุ่มไดคลอวอส 1,000 พีพีบี (3) กลุ่มไดคลอวอส 4,000 พีพีบี (M) muscle fiber (N) nucleus และ (A) adipose tissue (H&E)..... 46

ภาพที่ 35 พฤติกรรมปลาในกลุ่มเลี้ยงในน้ำ 4,000 พีพีบี (1) วันที่ 1 ปลามีการว่ายน้ำรวมกลุ่มกัน (2) วันที่ 2 ปลาแสดงอาการว่ายน้ำแบบไร้ทิศทาง (3) วันที่ 3 ปลาแสดงอาการนอนตะแคงก้นตู้..... 48



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

วุ้นตาเป็นของเหลวทางชีวภาพที่ใช้ตรวจหาสารพิษตกค้างได้และมีข้อดีคือสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากแบคทีเรียภายนอกและการเน่าเสียได้ดี (Mulla, 2005) มีรายงานการตรวจสอบว่าแมลงตกค้างจากวุ้นตาของมนุษย์หลังการตายโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟีพบว่า ปริมาณสารกำจัดแมลงตกค้างในวุ้นตาของมนุษย์มีค่าสูงเมื่อเทียบกับ เนื้อเยื่อของอวัยวะหรือของเหลวทางชีวภาพอื่นๆ (Moriya and Hashimoto, 2005)

แก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography) เป็นเทคนิคหนึ่งของโครมาโทกราฟีที่ใช้ในการแยกสารที่ผสมรวมกันอยู่หลายชนิดให้ออกจากกัน สามารถหาได้ทั้งชนิดและปริมาณซึ่งสารตัวอย่างจะต้องสามารถระเหยได้ แก๊สโครมาโทกราฟีมีหลักการแยกองค์ประกอบคือ สารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบจะถูกทำให้เป็นสถานะแก๊ส สารที่ระเหยแล้วจะเข้าไปใน 2 เฟสที่ไม่เข้ากัน ได้แก่ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือ carrier gas ซึ่งจะนำพาสารทดสอบที่ระเหยแล้วไหลผ่าน เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) สารแต่ละชนิดมีคุณสมบัติต่อเฟสทั้งสองที่ต่างกัน ซึ่งส่งผลให้สารแต่ละชนิดใช้เวลาในการเดินทางผ่านเฟสทั้งสองไม่เท่ากัน เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคที่มีข้อดีที่สำคัญคือ ใช้แยกสารต่างๆ ได้ดี มีค่าการแยกสูง (high resolution) มีความไวสูงและวิเคราะห์ได้ถึงระดับหนึ่งในพันล้านส่วน หรือพีพีบี t(แมน อมรสิทธิ์ et al., 2553)

ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ส่งออกสินค้าทางการเกษตรและสินค้าอุตสาหกรรมอาหารแปรรูป ในแง่การเพาะปลูกเกษตรกรมีความเชื่อมั่นในการใช้สารกำจัดแมลงว่าสามารถป้องกันการสูญเสียของผลผลิตที่เกิดจากแมลงศัตรูพืช ซึ่งทำให้ได้ผลผลิตต่อไร่ในปริมาณมากและเป็นผลผลิตที่มีคุณภาพดี (Panuwet et al., 2012) กลุ่มของสารเคมีที่ใช้กำจัดแมลงในการเกษตรที่สำคัญได้แก่ ออร์กาโนคลอรีน (organochlorines) ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphates) คาร์บามेट (carbamates) และไพริทรอยด์ (pyrethroids) (สำนักจัดการคุณภาพน้ำ, 2554)

การใช้สารกำจัดแมลงทางการเกษตรที่เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนสารกำจัดแมลงลงสู่แหล่งน้ำมากขึ้นทั้งโดยตั้งใจและไม่ตั้งใจ เช่น โดยการพัดเอาละอองของสารลงสู่แหล่งน้ำจากการปล่อยน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมและบ้านเรือน แต่ทางหลักของการปนเปื้อนสู่แหล่งน้ำเกิดจากสารที่ตกค้างตามบริเวณผิวดินของแหล่งเกษตรกรรมถูกชะล้างโดยน้ำบนผิวดินสู่แหล่งน้ำ (Thapinta and Hudak, 2000; Ray and Ghosh, 2006) สารกำจัดแมลงไม่เพียงแต่ใช้ควบคุมแมลง

ศัตรูพืชเท่านั้น ในการทำประมงหรือในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้มีการนำสารกำจัดแมลงมาใช้เพื่อการกำจัดพยาธิภายนอก (external parasite) ที่ก่อโรคในปลาเช่นกัน ซึ่งสารกำจัดแมลงที่นิยมใช้มากที่สุดในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำปัจจุบันได้แก่ สารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (Monteiro et al., 2006)

โดยปกติแล้วเมื่อเกิดปัญหาการปนเปื้อนของสารกำจัดแมลงขึ้นในแม่น้ำหรือแหล่งน้ำไหล การไหลของกระแสน้ำได้พัดพาเอาสารเคมีไปเป็นจำนวนมากหรือจนหมดไป ในกรณีเกิดเหตุการณ์ปนเปื้อนของสารกำจัดแมลงในบ่อเลี้ยงผู้เลี้ยงมักทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำจึงทำให้ยากต่อการตรวจสอบสาเหตุที่แท้จริงจากน้ำ การตรวจจากตัวสัตว์จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถตรวจสอบได้ แต่สัตว์น้ำเป็นสัตว์ที่เกิดการเน่าสลายได้ไวหลังจากการตาย (Aberoumand, 2010; Ghaly et al., 2010) การตรวจจากซากสัตว์จึงมีข้อจำกัดเรื่องการเน่าเสีย ดังนั้นวิธีอื่นที่เป็นอวัยวะที่มีอัตราการเน่าสลายช้าจึงเป็นตัวอย่างที่คาดว่าจะสามารถพัฒนาการตรวจการปนเปื้อนสารกำจัดแมลงได้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการตกค้างสารออร์กาโนฟอสเฟตระหว่างวันตากับอวัยวะอื่น
2. เพื่อศึกษาการสลายตัวของสารออร์กาโนฟอสเฟตในวันตาและอวัยวะอื่นๆของปลาหลังการตาย

## 1.3 สมมติฐานการวิจัย

วันตาสามารถนำมาใช้ในการตรวจการปนเปื้อนของสารออร์กาโนฟอสเฟตในน้ำได้ทั้งก่อนและหลังการตาย

## 1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดของงานวิจัย

ทำการศึกษาการตกค้างของสารออร์กาโนฟอสเฟตในปลา โดยใช้ปลาแพนซีคาร์พเป็นตัวแทนของปลาและใช้สารไดคลอวอสเป็นตัวแทนสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการตกค้างของสารไดคลอวอสจากอวัยวะต่างๆของปลาที่เลี้ยงในน้ำต่างความเข้มข้น อวัยวะที่ทำการศึกษาได้แก่ ตับ กล้ามเนื้อ เลือดและวันตา เพื่อให้ทราบถึงลักษณะการตกค้างในอวัยวะต่างๆในแต่ละความเข้มข้น และได้ทำการศึกษาในด้านการสลายตัวของสารไดคลอวอสจากซากปลาทายในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน เพื่อให้ทราบถึงอัตราการสลายตัวของสารดังกล่าวในอวัยวะต่างๆ

### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.สามารถนำวัฏมาเป็นการวินิจฉัยทางเลือกในการวินิจฉัยภาวะปนเปื้อนของสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตในน้ำได้

2.การตรวจสอบสารฆ่าแมลงในวัฏสามารถนำไปใช้เพื่อการเฝ้าระวังการปนเปื้อนสารฆ่าแมลงในสิ่งแวดล้อมทางน้ำได้

3.การตรวจสอบสารฆ่าแมลงในวัฏสามารถนำไปตรวจหาการปนเปื้อนสารฆ่าแมลงในปลาบริเวณในท้องตลาดได้

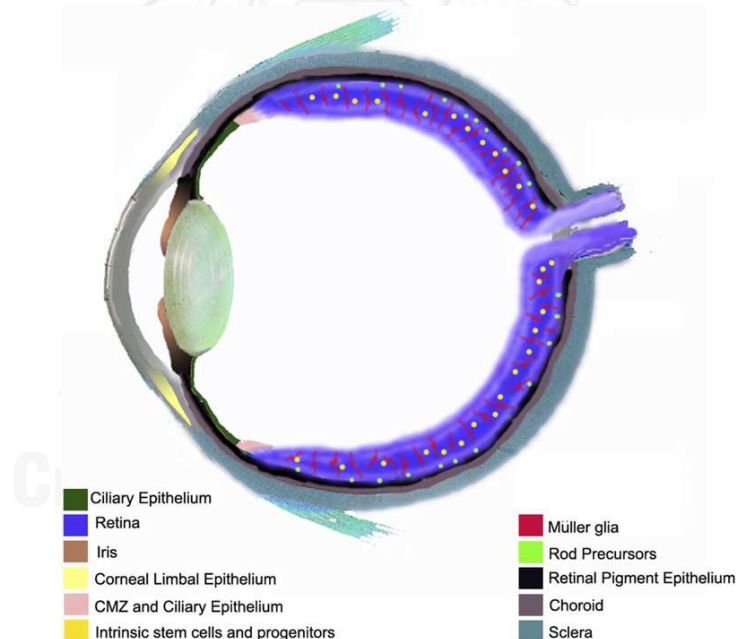
4.สามารถนำเอาวิธีการตรวจสอบสารกำจัดแมลงตกค้างในวัฏไปประยุกต์ใช้กับสารพิษอื่นๆต่อไปได้

5.สามารถนำไปใช้พัฒนาเป็นดัชนีชี้วัดการปนเปื้อนสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตในแหล่งน้ำสาธารณะเพื่อเป็นแนวทางในการกำหนดนโยบายสาธารณะในการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม

## บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 วุ้นตา

วุ้นตา (vitreous humor) มีลักษณะเป็นเจลคอลลาเจน (collagenous gel) เป็นของเหลวใส ไม่มีเซลล์ มีความหนืด อยู่ภายใต้ชั้นของลูกตาทั้งสามชั้นได้แก่ sclera coroid และ retina (ภาพที่ 5) โดยวุ้นตามีหน้าที่ดังนี้ ด้านการมองเห็น (optical) โดยเป็นตัวกลางในการหักเหแสง ด้านกายภาพ (mechanical) โดยเป็นตัวค้ำจุนเซลล์และโครงสร้างของลูกตา ด้านการสันดาป (metabolic) โดยเป็นตัวพาโมเลกุลสารที่สำคัญเข้าและออกจากเรตินา (retina) องค์ประกอบหลักของวุ้นตาคือ น้ำ 99% เกลือแร่ 0.9% (ได้แก่ NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub> และ MgCl<sub>2</sub>) และ เส้นใยโปรตีน (collagen type II fibrils) ร่วมกับสายโพลีแซคคาไรด์แบบมีขั้ว (hyaluronic acid) อีก 0.1% (Nickerson, 2006)



ภาพที่ 1 โครงสร้างลูกตาของปลากระดุกแข็ง

ที่มา: Tsonis PA and Tsonis KDR, 2004



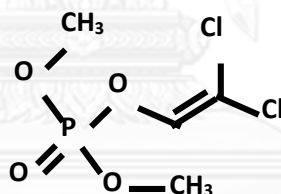
วุ้นตาเป็นของเหลวทางชีวภาพที่ถูกป้องกันจากการเสื่อมสลายหลังการตายและการปนเปื้อน (postmortem degradation and contamination) (Mulla, 2005) การเก็บตัวอย่างจากวุ้นตามีข้อได้เปรียบของเหลวทางชีวภาพอื่นๆ เช่น femoral serum, ventricle serum, pericardial fluid และ cerebrospinal fluid โดยเป็นวิธีที่ง่ายต่อการเก็บตัวอย่าง มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อโรคและเนื้อเยื่อใกล้เคียงขณะเก็บตัวอย่างน้อยรวมทั้งง่ายในเก็บรักษา (Luna, 2009)

การศึกษาทางนิติวิทยาศาสตร์ได้มีการนำเอาวุ้นตาไปศึกษาความสัมพันธ์ต่างๆ ได้แก่ การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอิเล็กโทรไลต์ (electrolytes) ในวุ้นตาเทียบกับอิเล็กโทรไลต์ในซีรัมก่อนตาย (antemortem serum electrolytes) การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอิเล็กโทรไลต์ในวุ้นตากับระยะเวลาหลังการตาย (postmortem interval) (Drolet et al., 1990; Jashnani et al., 2010)

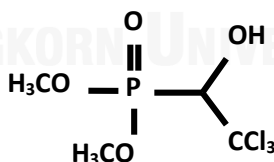
การชันสูตรศพในมนุษย์ที่เสียชีวิตเนื่องจากการกินสารกำจัดแมลงได้มีการนำวุ้นตาเพื่อเป็นหนึ่งในตัวแทนของเหลวทางชีวภาพที่สามารถใช้ตรวจหาสารกำจัดแมลงตกค้างได้ โดยทำการชันสูตรศพทดสอบเปรียบเทียบการคงอยู่ของสารกำจัดแมลงในตัวอย่างจากของเหลวทางชีวภาพและอวัยวะต่างๆหลังการตายที่ 40 ชั่วโมง ดังนี้ เลือดจากเส้นเลือดดำ เลือดจากหัวใจ น้ำไขสันหลัง วุ้นตา น้ำในเยื่อหุ้มหัวใจ น้ำดี กล้ามเนื้อหัวใจ ปอด ตับ ไต และสมอง (cerebral cortex, diencephalon cerebellum) พบว่าในของเหลวทางชีวภาพ 2 ชนิด ได้แก่ น้ำไขสันหลังและวุ้นตามีการตรวจพบการตกค้างของสารกำจัดแมลงมากที่สุดและพบว่า แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับตัวอย่างอื่นๆ สรุปได้ว่า กระบวนการสลายตัวของสารกำจัดแมลงเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในเลือดและในเนื้อเยื่อภายหลังเสียชีวิต อีกทั้งพบว่าน้ำไขสันหลังและวุ้นตามีการทำงานของเอนไซม์เอสเตอเรส (esterase enzyme) ในระดับที่ต่ำมาก เป็นผลให้ของเหลวทางชีวภาพทั้งสอง มีปริมาณของสารกำจัดแมลงตกค้างสูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ (Moriya and Hashimoto, 2005)

## 2.2 สารออร์กาโนฟอสเฟต

ออร์กาโนฟอสเฟตเป็นสารกำจัดแมลง (insecticide) กลุ่มหนึ่งที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดปรสิตภายนอก ได้แก่ หนอนสมอ (*Lernea* sp.) และเห็บปลา (*Argulus* sp.) สารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตที่นิยมใช้ในการประมงและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ได้แก่ ไดคลอวอส (dichlorvos) (ภาพที่ 1) และไตรคลออร์ฟอน (trichlorfon) (ภาพที่ 2) (Hannam et al., 2008) ซึ่งไตรคลออร์ฟอน (2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonate) หากนำไปใช้จะถูกไฮโดรไลซ์อย่างรวดเร็วจนกลายเป็นไดคลอวอส (2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate) ซึ่งเป็นสารมีพิษที่แรงขึ้น (Guimarãesa et al., 2007) สารออร์กาโนฟอสเฟตมีการออกฤทธิ์ได้กว้างแบบ non-target species นอกจากจะออกฤทธิ์ในสัตว์กลุ่มแมลงแล้วยังสามารถเกิดพิษในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังได้เช่นกัน กระบวนการเกิดพิษของออร์กาโนฟอสเฟตในปลาเริ่มจากสารออร์กาโนฟอสเฟตปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำ จากนั้นสารจะเข้าสู่ร่างกายโดยวิธีการดูดซึมผ่านผิวหนัง เหงือกหรือทางเดินอาหาร โดยจะไปยับยั้งกลุ่มเอนไซม์ cholinesterase และ pseudocholinesterase (Guimarãesa et al., 2007; Varó et al., 2007)



ภาพที่ 2 สูตรโครงสร้างของสารไดคลอวอส



ภาพที่ 3 สูตรโครงสร้างของสารไตรคลออร์ฟอน

การปนเปื้อนของสารออร์กาโนฟอสเฟตในแหล่งน้ำ ไม่เพียงเกิดขึ้นจากการใช้สารออร์กาโนฟอสเฟตเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเท่านั้น การปนเปื้อนโดยไม่ตั้งใจก็เป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้สารออร์กาโนฟอสเฟตปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำได้ เช่น การปล่อยน้ำที่มีการปนเปื้อนสารออร์กาโนฟอสเฟตจากโรงงานอุตสาหกรรม พื้นที่เกษตรกรรมและจากครัวเรือนสู่แหล่งน้ำ การพัดพาของสารออร์กา

โนฟอสเฟตลงสู่แหล่งน้ำโดยกระแสลมและการชะล้างสารออร์กาโนฟอสเฟตที่ตกค้างอยู่บนผิวดินลงสู่แหล่งน้ำ (Thapinta and Hudak, 2000; Ray and Ghosh, 2006)

อย่างไรก็ตามสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของสารออร์กาโนฟอสเฟตในแหล่งน้ำคือการใช้สารออร์กาโนฟอสเฟตในภาคเกษตรกรรมที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งได้มีการนำสารออร์กาโนฟอสเฟตมาใช้เพื่อเพิ่มผลผลิตต่อไร่ให้สูงขึ้น โดยลดความสูญเสียที่เกิดจากการทำลายของแมลงศัตรูพืช ซึ่งแนวโน้มการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ของประเทศไทยมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามลำดับ ดังเช่นในปี พ.ศ. 2536 มีปริมาณนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ 25,165 เมตริกตัน คิดเป็นมูลค่า 3,052.31 ล้านบาท พ.ศ. 2546 มีปริมาณนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ 73,029 เมตริกตัน คิดเป็นมูลค่า 10,035.82 ล้านบาท และในปี พ.ศ. 2556 ได้มีปริมาณนำเข้าของสารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์เพิ่มขึ้นเป็น 198,573 เมตริกตัน คิดเป็นมูลค่า 24,348.43 ล้านบาท ตามลำดับ (สำนักงานปลัดกระทรวงพาณิชย์, 2556)

การปนเปื้อนของสารกำจัดแมลงในแหล่งน้ำตามธรรมชาติไม่ได้มีเพียงแต่สารออร์กาโนคลอรีนซึ่งคงอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นานมากถึง 20 ปี เช่น สารดีดีที (Van Dyk and Pletschke, 2011) แต่ยังคงพบสารออร์กาโนฟอสเฟตในสิ่งแวดล้อมได้เช่นกัน ดังเช่นในการศึกษาหาการตกค้างของสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาบารเมตจากน้ำในนาข้าวและแปลงผักของประเทศบังกลาเทศ มีการตรวจพบสารออร์กาโนฟอสเฟตและคาบารเมต เป็นจำนวน 5 ตัวอย่างจาก 27 ตัวอย่าง สารที่พบได้แก่ malathion diazinon carbaryl และ carbofuran (Chowdhury et al., 2012) ในปี 2007 ได้มีการสำรวจการตกค้างของสารออร์กาโนฟอสเฟตจากแม่น้ำ Qarasu และ Gorgan ในประเทศอิหร่าน พบว่ามีสาร azinphos methyl และ diazinon (Shayeghi et al., 2012)

การศึกษาการตกค้างของสารกำจัดแมลงชนิดต่างๆ ในแม่น้ำสายหลักและในพื้นที่เกษตรกรรมของประเทศไทยในอดีตพบว่ามีสารกำจัดแมลงตกค้างดังตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 การตกค้างของสารฆ่าแมลงกลุ่มต่างๆ ในแม่น้ำสายหลักของประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2528-2531 (Thapinta and Hudak, 2000)

Chemical	Type	Concentration ( $\mu\text{g/L}$ )				Standard ( $\mu\text{g/L}$ )
		1985	1986	1987	1988	
Aldrin	OC	NA	NA	0.01-0.44	0.01-0.02	0.1
Alpha-BHC	OC	0.01	NA	NA	<0.01	0.02
Beta-BHC	OC	0.04	NA	NA	NA	0.2
Gamma-BHC	OC	0.01-0.02	NA	NA	NA	-
DDT	OC	0.01-0.02	NA	0.02-0.55	0.10-0.35	1.0
Dieldrin	OC	0.01-0.13	NA	0.003-0.10	0.01-0.13	0.1
Heptachlor	OC	NA	NA	0.01-0.14	0.01-0.30	0.2
Heptachlor epoxide	OC	0.01-0.07	NA	NA	NA	0.2
Lindane	OC	NA	NA	0.04	0.04	-
Methyl parathion	OP	0.01-0.20	NA	0.09-0.68	0.01-0.68	-
Dimethoate	OP	0.03-0.24	NA	0.06	0.06	-
Diazinon	OP	0.19	NA	0.07-0.28	0.01-0.28	-
Carbofuran	OC	0.01-1.37	NA	0.01-1.37	NA	-

หมายเหตุ: NA (ไม่มีข้อมูล); OC (organochlorine insecticide); OP (organophosphate insecticide); C (carbamate insecticide)

ตารางที่ 2 การตกค้างของสารฆ่าแมลงกลุ่มต่างๆ ในพื้นที่เกษตรกรรมของประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2539-2540 (Thapinta and Hudak, 2000)

Chemical	No. samples	Type	Concentration ( $\mu\text{g/L}$ )		Standard ( $\mu\text{g/L}$ )
			1996 <sup>a</sup>	1997 <sup>b</sup>	
Alpha-BHC	47	OC	NA	0.002-0.005	0.02
Beta-BHC	78	OC	NA	0.001-0.024	0.2
Gamma-BHC	61	OC	NA	0.001-0.032	-
Aldrin	38	OC	NA	0.001-0.006	0.1
DDT	56	OC	0.007	0.001-0.089	1.0
Dieldrin	33	OC	0.003-0.576	0.006-0.017	0.1
Endrin	21	OC	NA	0.003-0.011	0.0
Endosulfan	79	OC	0.003-1.350	0.001-0.460	-
Heptachlor	57	OC	NA	0.001-0.006	0.2
Heptachlor epoxide	79	OC	NA	0.001-0.300	0.2
Methyl parathion	21	OP	0.007-8.720	NA	-
Methamidophos	11	OP	0.002-0.011	NA	-
Meviphos	21	OP	0.014-47.500	NA	-
Permethrin	10	PY	2.81	NA	-
Dicofol	21	A	0.007-10.510	NA	-

หมายเหตุ: NA (ไม่มีข้อมูล); OC (organochlorine insecticide); OP (organophosphate insecticide); PY (pyrethroid insecticide); A (acaricide)

a ข้อมูลจากภาคเหนือของประเทศไทย

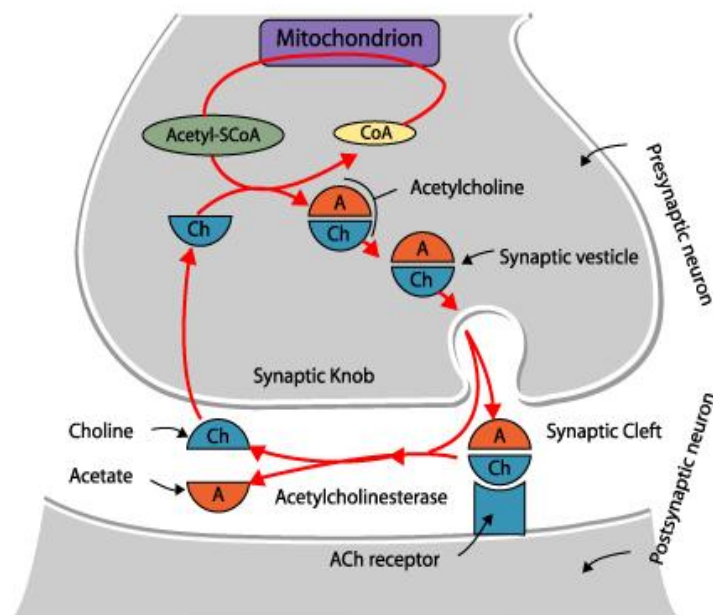
b ข้อมูลจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

## 2.3 ผลกระทบที่เกิดจากการปนเปื้อนสารออร์กาโนฟอสเฟต

### 2.3.1 ผลกระทบด้านสุขภาพ

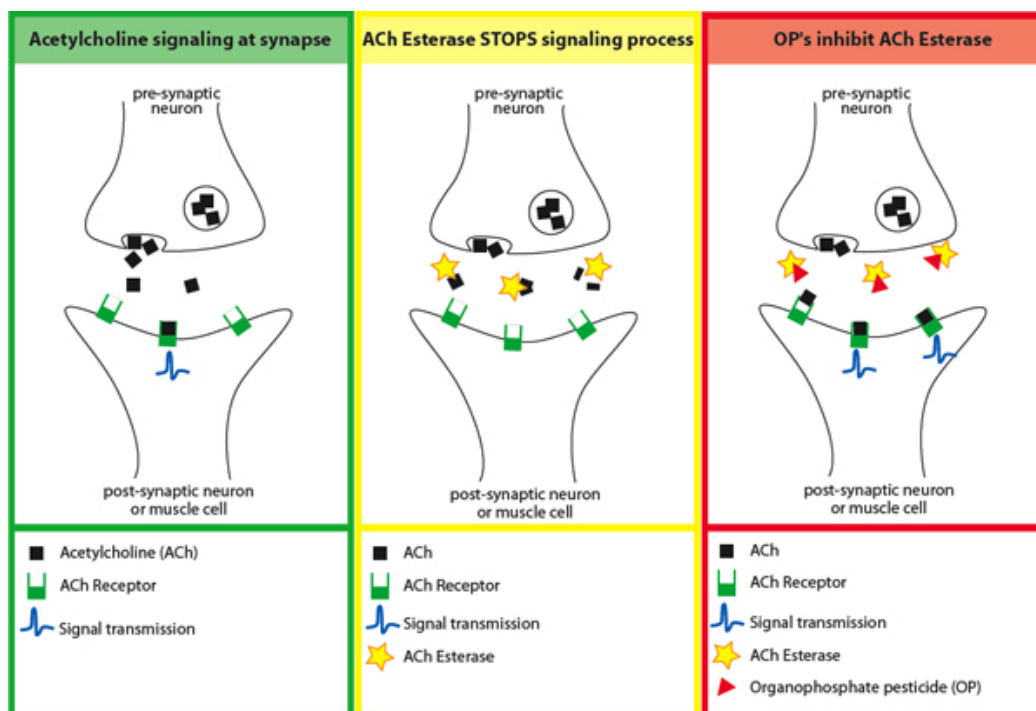
กระบวนการเกิดพิษของออร์กาโนฟอสเฟตเริ่มจากการเข้าสู่ร่างกายโดยทางการสูดดมอากาศที่มีการปนเปื้อน การซึมผ่านผิวหนังเมื่อสัมผัสกับสารโดยตรงหรือสัมผัสกับน้ำหรือดินที่มีการปนเปื้อน หรือการกินน้ำและอาหารที่ปนเปื้อน (Lim, 1996)

ออร์กาโนฟอสเฟตมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ acetylcholinesterase (AChE) ซึ่งโดยปกติแล้ว AChE มีหน้าที่ hydrolyze สารสื่อประสาทประเภท acetylcholine (ACh) ที่บริเวณจุดประสานประสาท (synapses) ของปลายประสาท cholinergic (ภาพที่ 4) ซึ่งพบได้ทั้งที่ระบบประสาทส่วนกลางและส่วนปลาย (central and peripheral nervous system) ทำให้เกิดการค้างคั้งของ ACh ที่บริเวณจุดประสานประสาท ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นของระบบประสาทมากกว่าปกติจนระบบประสาทไม่สามารถทำงานได้ (Arufe et al., 2007)(ภาพที่ 5) และอาจเกิดอาการอื่นๆ นอกจากอาการทางระบบประสาทได้เช่นกัน



ภาพที่ 4 การทำงานของสารสื่อประสาทและเอนไซม์ acetylcholinesterase

ที่มา : <http://www.frca.co.uk/images/acetylcholine.jpg>



ภาพที่ 5 การทำงานของสารสื่อประสาท เอนไซม์ acetylcholinesterase และ การออกฤทธิ์ของสาร organophosphate (A) การทำงานของสารสื่อประสาท (B) การทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase และ (C) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase โดยสาร organophosphate

ที่มา : <http://depts.washington.edu/opchild/acute.html>

ผลต่อระบบทางเดินหายใจ เมื่อเกิดการกระตุ้นของปลายประสาท cholinergic จึงทำให้เกิด cholinergic effect ได้แก่ การเพิ่มสารคัดหลั่งในทางเดินหายใจ (bronchial secretions) การหดตัวของหลอดลม (bronchoconstriction) และกล้ามเนื้อที่ช่วยในการหายใจไม่ทำงานเนื่องจากไม่สามารถส่งกระแสประสาทไปควบคุมกล้ามเนื้อ (neuromuscular junctions block) ซึ่งอาจส่งผลให้เสียชีวิตได้ ผลต่อระบบทางเดินอาหาร ทำให้ทางเดินอาหารมีการเคลื่อนไหวมากกว่าปกติจึงเกิดอาการท้องเสีย ผลต่อผิวหนัง เกิดขึ้นโดยการสัมผัสสารโดยตรง ในบริเวณผิวที่สัมผัสจะเกิดอาการอักเสบ (dermatitis) และเป็นผื่นแดง (erythema) ผลต่อดวงตา ทำให้น้ำม่านตาหดแคบ เกิดจากการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบรอบดวงตาหรือที่เรียกว่าม่านตา (iris) เนื่องจากการถูกกระตุ้นของระบบประสาทพาราซิมพาเทติก (parasympathetic nerve system) ผลต่อน้ำหนักตัว มีรายงานในหนูทดลองที่สัมผัสสารไดคลอวอส 600 พีพีบี ในอากาศตลอดเวลา เป็นระยะเวลา 2 ปี พบว่ามีน้ำหนักน้อยกว่าหนูกลุ่มควบคุมร้อยละ 20 ผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน มีการรายงานในกระต่ายเมื่อให้สารไดคลอ

วอส 0.3 - 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 5 วันต่อสัปดาห์ ติดต่อกัน 6 สัปดาห์ พบว่าเกิดการกดภูมิคุ้มกันชนิด humoral immune โดยไปลดการสร้าง IgM ผลต่อระบบสืบพันธุ์ ได้มีการทดลองในหนู โดยเมื่อฉีดสารไดคลอวอสเข้าสู่ช่องท้องหนูตัวผู้ในขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 5 วัน พบว่าลักษณะของตัวอสุจิมีความผิดปกติถึงร้อยละ 1.8 แต่เมื่อทดลองในหนูตัวเมียโดยให้สัมผัสสารไดคลอวอสในอากาศที่ความเข้มข้น 55 มิลลิกรัมต่อตารางเมตร เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่าอัตราการตั้งท้องเท่ากับหนูตัวเมียในกลุ่มควบคุม ผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนา ยังไม่พบว่ามี ความผิดปกติของตัวอ่อนในหนูและกระต่ายเมื่อทดลองให้สารไดคลอวอสในอากาศที่ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อตารางเมตร ผลต่อพันธุกรรม พบการรายงานการเกิดความผิดปกติในระดับพันธุกรรมเซลล์หนู hamster และ เซลล์มนุษย์ (human embryonic epithelial cell line) ผลต่อการเกิดมะเร็ง ในหนูทดลองมีการตรวจพบเนื้องอกดังนี้ pancreatic adenoma, mononuclear leukemia, mammary gland carcinomas, mammary gland fibroadenomas, mammary gland adenomas, forestomach papillomas และ forestomach carcinomas (Lim, 1996; Ritchter and Corcoran, 1997)

ด้านผลกระทบต่อสุขภาพต่อตัวปลา เมื่อปลามีการสะสมของ Ach ที่บริเวณจุดประสานประสาท ส่งผลให้เกิดความไม่สัมพันธ์กันระหว่างการทำงานของกล้ามเนื้อและระบบประสาท อาการที่แสดงออกได้แก่ กล้ามเนื้อเกร็ง วายน้ำแบบไร้ทิศทาง และจมลงสู่ใต้น้ำ อันเป็นผลจากระบบประสาทส่วนกลางถูกกระตุ้นมากเกินไป อาการอื่นๆ ได้แก่ มีการขับถ่ายอุจจาระมากขึ้นเนื่องจาก muscarinic receptors ถูกกระตุ้นส่งผลให้กล้ามเนื้อเรียบในทางเดินอาหารบีบตัวมากขึ้น มีการขับเมือกมากเนื่องจากการคายเคืองผิวและเยื่อเมือกของปลา สีตัวอ่อนลงเนื่องจากต่อมใต้สมอง (pituitary gland) ถูกรบกวนส่งผลให้เซลล์โครมาโตฟอร์ (chromatophores) ลดจำนวนและลดขนาดลง (Singh et al., 2009) ผลระยะยาวอาจทำให้เกิดการเจริญที่ผิดปกติเนื่องจากเกิดการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อจนเกิดความเสียหายต่อกระดูกสันหลังหรืออาจทำให้กระดูกสันหลังหัก ซึ่งปลาที่ไวต่อสารเคมีดังกล่าวได้แก่ปลาในกลุ่ม characins cyprinids และ elasmobranchs (Wildgoose, 2001)

### 2.3.2 ผลกระทบด้านเศรษฐกิจและสังคม

สารออร์กาโนฟอสเฟตนอกจากจะเป็นประโยชน์เมื่อใช้ในการควบคุมโรคที่เกิดจากพยาธิภายนอกของสัตว์น้ำแล้วหากใช้ในปริมาณที่ไม่ถูกต้องก็เกิดพิษเฉียบพลันต่อตัวสัตว์น้ำทำให้สัตว์น้ำเสียชีวิตได้เช่นกัน ทำให้เกิดความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจต่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

สารออร์กาโนฟอสเฟตยังสามารถตกค้างได้ในสิ่งแวดล้อมดังนั้นในการแก้ไขปัญหาดังกล่าวรัฐบาลมีความจำเป็นต้องใช้งบประมาณในการกำจัดและบำบัดสารกำจัดแมลงตกค้างในสิ่งแวดล้อม



ตลอดจนใช้งบประมาณเพื่อการบำบัดรักษาผู้ป่วยที่ได้รับผลกระทบจากสารกำจัดแมลง (Ritchter and Corcoran, 1997)

ในด้านการส่งออกและนำเข้าสินค้าทางการเกษตรระหว่างประเทศ โดยในแต่ละกลุ่มประเทศ หรือแต่ละประเทศได้มีกฎเกณฑ์ทางการค้าที่นอกเหนือจากภาษี (Non-Tariff Measures; NTM และ Non-Tariff Barriers; NTB) เพื่อใช้เป็นมาตรการปกป้องผู้บริโภคและปกป้องราคาสินค้าภายในของตนเอง เช่น ในสหภาพยุโรปได้มีการตั้ง มาตรฐานด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Sanitary and Phytosanitary Measures; SPS) ในระดับที่สูงที่สุดในโลก ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อประเทศกำลังพัฒนา ทำให้ยากต่อการเจาะตลาดของสหภาพยุโรป นอกจากนี้ยังมีมาตรฐานระหว่างประเทศที่นิยมใช้ได้แก่

-มาตรฐาน Codex Alimentarius Commission หรือ Codex จัดตั้งขึ้นเมื่อปี 2506 โดยองค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) และองค์การอนามัยโลก (WHO) มุ่งเน้นในด้านความปลอดภัยและสุขอนามัยของผู้บริโภค

-มาตรฐาน International Plant Protection Convention หรือ IPPC เป็นมาตรฐานทางด้านสุขอนามัยที่เกี่ยวข้องกับพืช ซึ่งอยู่ในความรับผิดชอบของ FAO

-มาตรฐาน Hazard Analysis and Critical Control Point System หรือ HACCP เป็นมาตรฐานการผลิตที่มีมาตรการป้องกันอันตรายที่ผู้บริโภคอาจได้รับจากการบริโภคอาหาร โดย HACCP มุ่งเน้นด้านการป้องกันอันตรายตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบจนถึงมือผู้บริโภค และสามารถป้องกันอันตรายหรือทางชีวภาพ เคมี และกายภาพของอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ

-มาตรฐาน Good Manufacturing Practice หรือ GMP เป็นมาตรฐานมุ่งเน้นการป้องกันตั้งแต่การควบคุมสุขลักษณะส่วนบุคคล การควบคุมแมลงและสัตว์นำโรค การออกแบบโครงสร้างอาคารผลิต รวมถึงเครื่องจักรอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต

นอกเหนือจากมาตรฐานระหว่างประเทศแล้วยังคงมีมาตรฐานของภาคเอกชนเช่นกัน มาตรฐานเอกชนที่สำคัญได้แก่ Global Good Agricultural Practice หรือ GlobalGAP มาตรฐาน British Retail Consortium หรือ BRC และ มาตรฐาน International Food Standard หรือ IFS เป็นต้น (Allshouse et al., 2003)

## 2.4 การตรวจวินิจฉัยความเป็นพิษจากสารกำจัดแมลง

การตรวจวินิจฉัยสารกำจัดแมลงตกค้างในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทำได้หลายวิธีทั้งทางตรงและทางอ้อม การตรวจวินิจฉัยทางอ้อมได้แก่ การตรวจการทำงานของเอนไซม์ cholinesterase ที่ลด

ต่ำลงในเนื้อเยื่อ (Guimarãesa et al., 2007; Bakar et al., 2010) การตรวจการกลับมาทำงานใหม่ของ cholinesterase ในเนื้อเยื่อ (Stansley, 1993) และการตรวจสารที่บ่งบอกถึงภาวะ oxidative stress ในอวัยวะต่างๆ เป็นต้น (Thomaz et al., 2009)

สำหรับการตรวจหาสารออร์กาโนฟอสเฟตโดยตรงที่นิยมคือ การตรวจโดยใช้หลักโครมาโทกราฟีซึ่งทำได้หลายวิธี โดยวิธีการสกัดสารและการเลือกเครื่องมือที่ใช้ต้องมีความสอดคล้องกับตัวสารที่สนใจตรวจ เครื่องมือที่ใช้ตรวจหาสารออร์กาโนฟอสเฟตโดยหลักการโครมาโทกราฟีได้แก่ Gas chromatography (GC), Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), Gas chromatography-electron capture detector (GC-ECD) และ Gas chromatography-nitrogen phosphorous detector (GC-NPD) เป็นต้น ซึ่งวิธีเหล่านี้สามารถตรวจการปนเปื้อนในน้ำ อาหาร ได้โดยตรงหรือตรวจจากการสะสมสารออร์กาโนฟอสเฟตในร่างกายสัตว์น้ำได้เช่นกัน (Lee et al., 1996; Tsatsakis et al., 1996; Leong et al., 2007; Wang et al., 2009)

แก๊สโครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคหนึ่งของโครมาโทกราฟีที่ใช้ในการแยกสารที่ผสมรวมกันอยู่หลายชนิดให้ออกจากกัน ซึ่งสารจะต้องมีความสามารถในการระเหยได้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 450 องศาเซลเซียสและมีความเสถียรที่อุณหภูมินั้นๆ แก๊สโครมาโทกราฟีสามารถหาได้ทั้งชนิดและปริมาณ มีหลักการแยกองค์ประกอบคือ นำสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบเข้าไปใน 2 เฟสที่ไม่เข้ากัน เฟสเคลื่อนที่ หรือ carrier gas ซึ่งจะนำพาสารที่ระเหยแล้วไหลผ่านเฟสอยู่กับที่ ในระหว่างการเคลื่อนที่นั้นจะเกิดอันตรกิริยาของสารในตัวอย่างกับเฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่ ทำให้สารแต่ละชนิดใช้เวลาหน่วงเหนี่ยว (retention time) ผ่านแต่ละเฟสแตกต่างกันออกไป ดังนั้นสรุปได้ว่าการแยกสารจะเกิดขึ้นได้ในเวลาที่แตกต่างกันตามคุณสมบัติของสารที่มีแต่เฟสทั้งสอง เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคที่มีข้อดีที่สำคัญดังนี้

- ใช้แยกสารต่างๆ ได้ดี มีค่าการแยกสูง (high resolution)
- มีความไวสูงและวิเคราะห์ได้ถึงระดับ หนึ่งในพันล้านส่วน (พีพีบี; ppb)
- ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์น้อย อยู่ในระดับนาที่
- ทำได้ง่ายและสะดวก
- สามารถปรับเปลี่ยนอุปกรณ์ให้สอดคล้องในการตรวจวัดสารชนิดต่างๆ ได้
- สามารถทำงานได้เองแบบอัตโนมัติ (แม้น อมรสิทธิ์ et al., 2553)

สารออร์กาโนฟอสเฟตสามารถสลายตัวเองได้ตามธรรมชาติโดยกระบวนการออกซิเดชัน ซึ่งสามารถเกิดออกซิเดชันได้ง่ายในน้ำเนื่องจากในน้ำมี OH<sup>-</sup> group ที่ได้มาจากกระบวนการ photolysis ของ nitrate และสามารถไปสลายสารกำจัดแมลงในน้ำได้ แต่ในน้ำอาจมี สารอินทรีย์ซึ่งจะไปแย่งจับกับ OH<sup>-</sup> group ก่อนที่จะไปทำลายสารกำจัดแมลง ดังนั้นจึงทำให้การสลายตัวของ ออร์กาโนฟอสเฟตเนื่องจาก OH<sup>-</sup> group ตามธรรมชาติเป็นไปอย่างช้าๆ กระบวนการอื่นๆที่ช่วยเร่ง การสลายของออร์กาโนฟอสเฟตได้แก่ photochemical, photocatalytic, sonochemical และ radiolytic ซึ่งล้วนเป็นตัวช่วยเร่งให้เกิดปฏิกิริยาการสลายสารทางเคมี (chemical degradation) (Huston and Pignatello, 1999; Singh et al., 2004; Harnly et al., 2005)

กระบวนการสลายสารทางชีวภาพ (biological degradation) เป็นอีกทางหนึ่งในการสลาย สารเคมีโดยเกิดขึ้นจากแบคทีเรีย แบคทีเรียจะนำเอาฟอสฟอรัสและคาร์บอนจากสารประกอบของ สารกำจัดแมลงไปใช้ในการเจริญเติบโต แบคทีเรียที่มีรายงานดังกล่าวได้แก่ *Enterobacter asburiae*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium sp.*, *Pseudomonas diminuta*, *Pseudomonas putida* (Chaudhry et al., 1988; Chen and Mulchandani, 1998; Singh et al., 2003) นอกจาก การสลายเองตามสภาพธรรมชาติแล้วได้มีการทดลองเกี่ยวกับ ค่าครึ่งชีวิต (half-life) ของสารกำจัด แมลงชนิดต่างๆต่อสภาพแวดล้อมของน้ำที่แตกต่างกัน ซึ่งผลการทดลองสรุปได้ว่า ที่อุณหภูมิที่สูงขึ้น และ pH สูงขึ้น ทำให้อัตราการสลายตัวของสารกำจัดแมลงไวขึ้น ส่งผลให้ค่า half-life ลดลง (Freed et al., 1979) ดังเช่นสารไดคลอวอสมิค่าครึ่งชีวิต (half-life) ในน้ำไม่เกิน 1 วัน เพราะเป็นสารที่ สลายตัวไว ระบายได้ง่าย ไวต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและการย่อยสลายโดยจุลชีพ จึงทำให้ยากต่อการ ตรวจสอบการปนเปื้อนในน้ำ (Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, 2011)

จากปัจจัยต่างๆข้างต้นเห็นได้ว่า หากทิ้งระยะเวลาผ่านไปการตรวจหาสารออร์กาโน ฟอสเฟตตกค้างในน้ำจะมีความยากลำบากขึ้น การตรวจสารออร์กาโนฟอสเฟตจากตัวสิ่งมีชีวิตหรือ ดัชนีบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) เป็นวิธีที่ทำการศึกษากการปนเปื้อนของสารในสิ่งแวดล้อมอย่าง แพร่หลายวิธีหนึ่ง เช่นใน ปลาตาเดียว (Flounder, *Platichthys flesus*) (Kirby et al., 2000), ปลา นิล (Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*) (Thomaz et al., 2009), ปลากระพงแดง (Gilthead seabream; *Sparus aurata*) (Arufe et al., 2007; Varó et al., 2007), ไส้เดือนทะเล (Lugworm; *Arenicola marina*) (Hannam et al., 2008)

แต่การตรวจสารตกค้างในสัตว์น้ำมีข้อจำกัดคือ การเน่าเสียเร็วของตัวอย่าง ซึ่งในระยะเวลา เพียงไม่กี่ชั่วโมงหลังการตายปลาจะเกิดการเกร็งของกล้ามเนื้อทั่วตัว (rigor mortis) จากนั้นภายใน 12 ชั่วโมงเนื้อปลาจะเริ่มเกิดการสลายตัวเอง (autolysis) การสลายตัวเองได้เริ่มเกิดขึ้นเนื่องจาก

หายใจในระดับเซลล์แบบใช้ออกซิเจนได้หยุดลง เปลี่ยนมาเป็นการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน กระบวนการที่สำคัญที่เซลล์จะได้พลังงานมาคือกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) หรือ กระบวนการสลาย ไกลโคเจน (glycogen) ซึ่งเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นผลให้เกิดการสร้างและสะสมกรดแล็กติกเป็นจำนวนมาก ทำให้ค่า pH ของเนื้อปลาลดลง รวมไปถึงการเสียหายของเซลล์ซึ่งเซลล์ที่เสียหายเหล่านั้นได้มีการหลั่งเอนไซม์สลายตัวเอง (autolytic enzyme) ออกสู่ภายนอกและเป็นผลทำให้เกิดสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรีย โดยปกติในปลาที่มีชีวิตจะพบแบคทีเรียได้ที่เหงือก ผิวหนังและลำไส้โดยที่ไม่ทำอันตรายต่อเนื้อปลา แต่เมื่อปลาทายแบคทีเรียเหล่านั้นสามารถเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อปลาและทำลายเซลล์เหล่านั้นส่งผลให้สารต่างๆในเซลล์ออกสู่ภายนอก ซึ่งเป็นอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียภายนอกต่อไป (Aberoumand, 2010; Ghaly et al., 2010) ความรวดเร็วในการเสื่อมสลายของเนื้อปลาจึงเป็นปัญหาในการตรวจสอบสารตกค้างในตัวสัตว์ได้ การหาตัวอย่างอวัยวะหรือตัวอย่างของเหลวทางชีวภาพที่ได้รับผลกระทบน้อยจากการกระบวนการ autolysis และการปนเปื้อนหลังการตายจึงเป็นสิ่งที่ควรทำการศึกษาเพื่อนำมาใช้ในการเก็บตัวอย่างส่งตรวจต่อไป

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 สัตว์ทดลอง

##### 3.1.1 ชนิดและลักษณะปลา

ปลาแพนซีคาร์พ (*Cyprinus carpio*) สุขภาพดี ขนาดความยาวจากปลายปากถึงโคนหาง (standard length) ระหว่าง 9-14 เซนติเมตร อายุประมาณ 1-2 เดือน น้ำหนักระหว่าง 20-80 กรัม ไม่จำกัดเพศ

##### 3.1.2 จำนวนปลาและการแบ่งกลุ่ม

ปลาแพนซีคาร์พ จำนวน 63 ตัว ทำการแบ่งปลาเป็น 2 กลุ่มการทดลอง ในการทดลองที่ 1 ใช้ปลาจำนวน 21 ตัว และในการทดลองที่ 2 ใช้ปลาจำนวน 42 ตัว

##### 3.1.3 การดูแลและการเลี้ยงดูระหว่างการกักโรค

ทำการกักพยาธิภายนอกโดยการแช่ฟอร์มาลิน 25 พีพีเอ็ม ทุก 72 ชั่วโมง จำนวน 3 ครั้ง เลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสส์ขนาด 80 x 120 x 50 เซนติเมตร และมีการให้อากาศโดยหัวทรายจำนวน 2 หัว ใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปในการเลี้ยง ทำการพักปลาเพื่อกักกันโรคก่อนทำการทดลองอย่างน้อย 2 สัปดาห์จนพบว่าไม่มีโรค (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 การเลี้ยงระหว่างการกักโรค

### 3.2 การทดลองที่ 1

#### 3.2.1 ลักษณะการเลี้ยงขณะทำการทดลอง

ใช้ตู้กระจกขนาด 39.5 x 44.5 x 45.5 เซนติเมตร (ปริมาตรน้ำ 50 ลิตร) จำนวน 7 ตู้ โดยมีปลาตู้ละ 3 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มควบคุมลบ 1 ตู้ กลุ่มเลี้ยงในน้ำ 1,000 พีพีบี 3 ตู้และกลุ่มเลี้ยงในน้ำ 4,000 พีพีบี 3 ตู้ แต่ละตู้มีหัวทรายให้อากาศอย่างเพียงพอให้อาหารวันละ 1 ครั้งในปริมาณร้อยละ 3 ของน้ำหนักตัว (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 การเลี้ยงในการทดลองที่ 1

#### 3.2.2 การใส่สารออร์กาโนฟอสเฟต

ใช้สารไดคลอวอส (ไพธัน®; Dichlorvos 50% w/v) (ภาพที่ 8) เป็นตัวแทนของสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ด้วยระบบน้ำที่ควบคุมความเข้มข้นให้คงที่ (static renewal system) โดยละลายไดคลอวอส 50% w/v ด้วยน้ำสะอาดให้เป็นสารละลายไดคลอวอส จากนั้นใส่สารละลายไดคลอวอสตามปริมาณที่กำหนดตามแต่ละกลุ่มดังนี้

- กลุ่มควบคุมลบ ไม่ใส่สารไดคลอวอส
- กลุ่มเลี้ยงในน้ำ 1,000 พีพีบี ใส่สารละลายไดคลอวอส 50 มิลลิกรัมต่อน้ำ 50 ลิตร
- กลุ่มเลี้ยงในน้ำ 4,000 พีพีบี ใส่สารละลายไดคลอวอส 200 มิลลิกรัมต่อน้ำ 50 ลิตร

เลี้ยงปลาทั้งสามกลุ่มในน้ำที่มีความเข้มข้นของสารไดคลอวอสดังกล่าวจนครบ 72 ชั่วโมง นำปลาทั้งหมดมาทำการการุณยฆาตและเก็บตัวอย่าง



ภาพที่ 8 สารไดคลอวอส (ไพธัน®; Dichlorvos 50% w/v)

### 3.2.3 การตรวจวัดคุณภาพน้ำ สิ่งแวดล้อมและพฤติกรรมของสัตว์ทดลอง

ทำการตรวจคุณภาพน้ำประจำวัน โดยตรวจค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ในการวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ ความเป็นกรดต่าง โดยเครื่องพีเอชมิเตอร์ (Cyberscan pH 500®, Singapore) ความเป็นด่าง แอมโมเนีย ไนไตรท์ คลอรีน ความกระด้าง โดยชุดทดสอบอย่างง่าย (Aqua-VBC, Thailand) และ อุณหภูมิโดยเทอร์โมมิเตอร์ ทำการวัดคุณภาพน้ำหลังจากเปลี่ยนน้ำ รวมทั้งจดบันทึกพฤติกรรมของปลาก่อนการทดลองและขณะทำการทดลอง

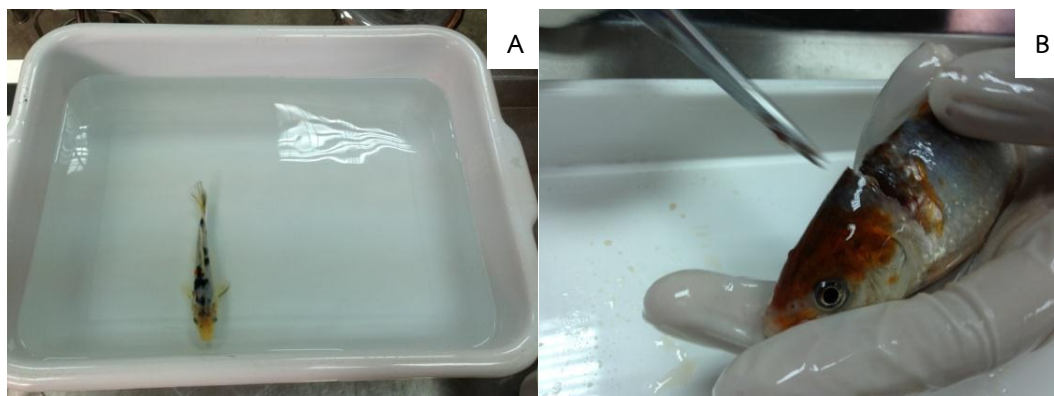


ภาพที่ 9 การตรวจน้ำ (A) เครื่องพีเอชมิเตอร์ (B) ชุดทดสอบคุณภาพน้ำอย่างง่าย



### 3.2.4 การรณยฆาต

ทำโดยการลดอุณหภูมิน้ำลงให้ใกล้เคียง 0 องศาเซลเซียส เพื่อให้ปลาอยู่ในภาวะสลบ ทำการชั่งน้ำหนักและวัดขนาด จากนั้นตัดไขสันหลังบริเวณ cervical column (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 การทำการรณยฆาต (A) แยกปลาเพื่อทำการการรณยฆาต (B) การตัดไขสันหลังบริเวณ cervical column

### 3.2.5 การเก็บตัวอย่าง

การวิเคราะห์โดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี

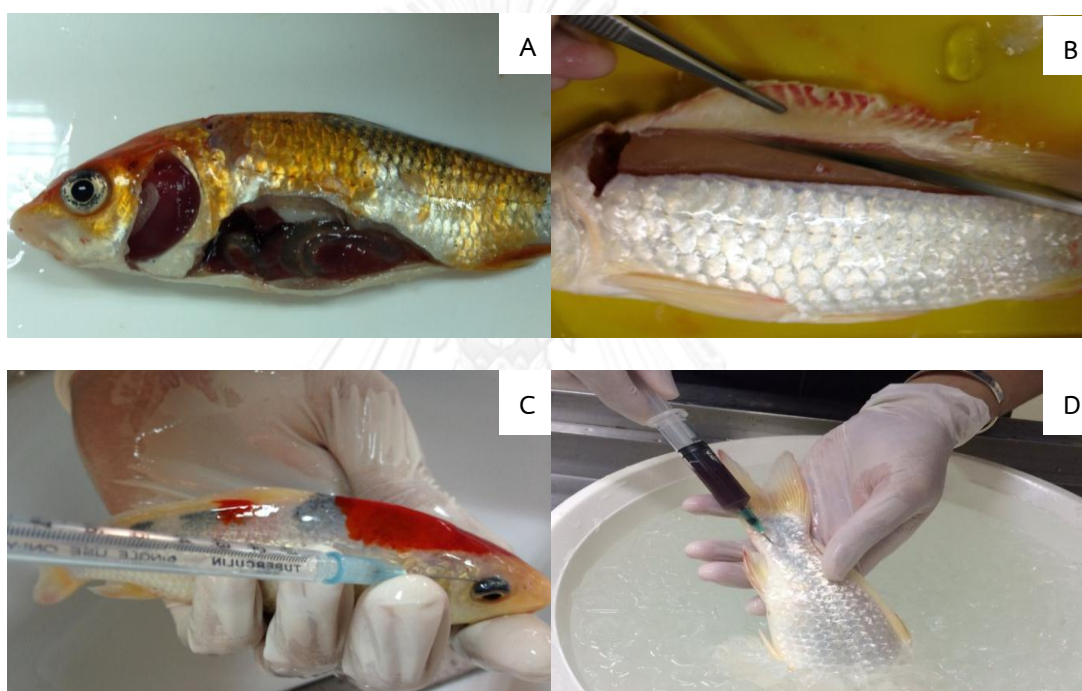
เก็บตัวอย่างน้ำในปริมาณ 500 มิลลิลิตรทุกวันของการทดลองเพื่อตรวจหาสารไดคอลลอสในน้ำ โดยเก็บตัวอย่างน้ำหลังจากทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำประจำวันด้วยภาชนะพลาสติกมีฝาปิดสนิท เก็บในที่มืดอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำการสกัดตัวอย่างภายใน 1 อาทิตย์หลังจากเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจหาปริมาณไดคอลลอสในแต่ละตัวอย่างโดยวิธีดังหัวข้อ 3.2.6.1

เมื่อปลาทั้งหมดถูกการรณยฆาตแล้ว ทำการสุ่มเลือกปลา 1 ตัวจากแต่ละตู้มาเก็บตัวอย่าง ได้แก่ ตับ กล้ามเนื้อ วัจนตาและเลือด โดยตัวอย่างที่เป็นชิ้นเนื้อ (ตับและกล้ามเนื้อ) เก็บในปริมาณอย่างน้อย 1 กรัมต่ออวัยวะ และตัวอย่างที่เป็นของเหลว (วัจนตาและเลือด) เก็บปริมาณอย่างน้อย 0.1 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำการสกัดตัวอย่างภายใน 1 อาทิตย์หลังจากเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจหาปริมาณไดคอลลอสในแต่ละตัวอย่างโดยวิธีดังหัวข้อ 3.2.6.2 - 3.2.6.4



### การวิเคราะห์ทางจุลพยาธิวิทยา

เก็บลูกตา เหงือก กล้ามเนื้อ ตับ และ ไต จากปลาทั้งสามกลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว รวมทั้งหมด 9 ตัว โดยเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อขนาดไม่เกิน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใน formalin 10% เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงเพื่อเก็บรักษาสภาพชิ้นเนื้อ และเตรียมสไลด์ชิ้นเนื้อโดยวิธีดังหัวข้อ 3.2.6.5



ภาพที่ 11 การเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์โดยแก๊สโครมาโทกราฟี (A) การเปิดช่องท้องเพื่อเก็บตัวอย่างตับ (B) การเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อ (C) การเก็บตัวอย่างวุ้นตา (D) การเก็บตัวอย่างเลือด

### 3.2.6 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.2.6.1 การวิเคราะห์ปริมาณไดคอกลอสในน้ำโดยใช้เครื่อง Gas chromatography - Flame photometric detector (GC-FPD)

การสกัดตัวอย่างและการทำความสะอาด

- ทำความสะอาดภาชนะและอุปกรณ์ทั้งหมดด้วย acetone

- นำตัวอย่างมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอจนกระทั่งตัวอย่างมีอุณหภูมิใกล้เคียงอุณหภูมิห้อง 20-30 องศาเซลเซียส)
- เติมเกลือ (NaCl) 25 กรัม เพื่อช่วยในการแยกชั้นของสาร ลงในกรวยแยก (separatory funnel)
- นำตัวอย่างน้ำ 250 มิลลิลิตร ใส่ในกรวยแยก จากนั้นเขย่าเกลือให้ละลายน้ำจนเป็นเนื้อเดียวกัน
- เติมสาร dichloromethane (A.R.) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้สารสัมผัสกับน้ำเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ให้สาร dichloromethane แยกชั้นจากน้ำเป็นเวลา 5 นาที
- แยก dichloromethane ออกจากน้ำโดย ไซสารละลายส่วนล่างผ่านกรวยกรองที่มีเกลือ  $\text{NaSO}_4$  ลงสู่ขวดก้นกลม (round bottom flask)
- สกัดซ้ำด้วย dichloromethane 100 มิลลิลิตร อีกครั้ง
- นำ dichloromethane ที่ได้ไประเหยที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส โดยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) จนสารละลายแห้ง
- เติมเกลือ  $\text{MgSO}_4$  ปริมาณเล็กน้อยเพื่อจับน้ำที่เหลือในขวดก้นกลม
- เก็บสารละลายทั้งหมดโดยค่อยๆเติม ethyl acetate เพื่อละลายเอาสารที่อยู่ในขวดก้นกลม เก็บใส่ขวดวัดปริมาตร 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate
- ดูดสารที่ได้ 1 มิลลิลิตร ใส่ vial ขนาด 2 มิลลิลิตร
- ฉีดสารเข้าเครื่อง GC-FPD

รายละเอียดของเครื่องมือมีดังนี้ เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีรุ่น 6890N (Agilent®, USA) คอลัมน์ที่ใช้ คือ DB171 ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาโดยระบบ split/splitless ในอัตราการไหลของแก๊ส 50 มิลลิลิตรต่อนาที เปิด 0.75 นาที ฉีดสารในปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใช้อุณหภูมิในการฉีดสารละลายตัวอย่าง 220 องศาเซลเซียส อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นที่ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที เพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 12 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึง 180

องศาเซลเซียส จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 40 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึง 275 องศาเซลเซียสและให้อุณหภูมิกคงที่ ที่ 275 องศาเซลเซียสเป็นเวลาต่อไปอีก 4.29 นาที

การทำงานในระบบ FPD มีพื้นฐานการทำงานโดยการเผาไหม้สารและตรวจจับสารที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ โดยให้ความร้อน 250 องศาเซลเซียส แก่สารที่ถูกแยกออกมาจากส่วน GC ร่วมกับอากาศที่มีอัตราไหล 100 มิลลิลิตรต่อนาที และไฮโดรเจน 75 มิลลิลิตรต่อนาทีเพื่อช่วยในการเผาไหม้สารประเภทฟอสฟอรัส สารที่ถูกความร้อนจะมีการปล่อยความยาวคลื่นต่างออกมา จากนั้นเลือกตรวจจับเฉพาะช่วงความยาวคลื่นที่ 526 นาโนเมตร ซึ่งเป็นคลื่นของสารประกอบฟอสฟอรัส

### 3.2.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณไดคอลลอสในชิ้นเนื้อ (ตับและกล้ามเนื้อ) โดยใช้เครื่อง Gas chromatography - Tandem Mass Spectrometry (GC-MS/MS)

#### การสกัดตัวอย่าง

- ชั่งตัวอย่างชิ้นเนื้อ 1 กรัม ใส่หลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร
- เติมเกลือ NaCl 4 กรัม เพื่อทำให้เกิดการแยกชั้นของชั้นน้ำในตัวอย่างกับ organic phase
- เติม acetone : dichloromethane (2:1) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร
- นำตัวอย่างไปปั่นโดยเครื่อง homogenizer เป็นเวลา 2 นาที
- กรองตะกอนและน้ำผ่านกรวยกรองที่มี  $MgSO_4$  ลงสู่ขวดกั้นกลม
- นำ acetone : dichloromethane ที่ผ่านการกรองแล้วไประเหยที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส โดยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุนจนสารละลายแห้ง
- เก็บสารละลายด้วย ethyl acetate 5 มิลลิลิตร

#### ทำความสะอาดตัวอย่าง

- ดูดสาร ethyl acetate ด้วยปิเปต ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- เติมสาร 3 ชนิดได้แก่ PSA 50 มิลลิกรัม  $MgSO_4$  150 มิลลิกรัม และ C18 50 มิลลิกรัม เพื่อกำจัด น้ำตาล และ fatty acid, น้ำ และ ไขมัน ตามลำดับ

- ทำให้สารผสมกันโดยการ vortex
- นำไปตกตะกอนโดย centrifuge 14,000 รอบต่อนาที, 4 องศาเซลเซียส, 10 นาที
- กรองสารที่ได้ด้วย nylon membrane ขนาด 0.22 ไมครอน ใส่ vial ขนาด 2 มิลลิลิตร
- ฉีดสารเข้าเครื่อง GC-MS/MS

รายละเอียดของเครื่องมีดังนี้ เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีรุ่น 436-GC (Bruker®, Netherlands) แมสส์สเปกโตรเมตรีชนิด triple quadruple (MS/MS) รุ่น SCIONTQ (Bruker®, USA) คอลัมน์ที่ใช้ คือ RTX-5MS w/5m Integra-Guard® ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาโดยระบบ split/splitless ในอัตราการไหลของแก๊ส 50 มิลลิลิตรต่อนาที เปิด 0.75 นาที ฉีดสารในปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใช้อุณหภูมิในการฉีดสารละลายตัวอย่าง 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นที่ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที เพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 12 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึง 180 องศาเซลเซียส จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 40 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึง 300 องศาเซลเซียสและให้อุณหภูมิคงที่ ที่ 300 องศาเซลเซียสเป็นเวลาต่อไปอีก 5.67 นาที

การทำงานในระบบ triple quadruple (MS/MS) เริ่มจาก มีการให้พลังงานความร้อน 250 องศาเซลเซียส ที่ quadruple ที่ 1 จนสารที่ต้องการตรวจสอบแตกตัวและทำการเลือกเฉพาะสารที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 185 (precursor ion หรือ parent ion) จากนั้นสารที่มีมวลโมเลกุลดังกล่าวจะเข้าสู่ quadruple ที่ 2 ซึ่งมีการใช้แก๊สอาร์กอน (Argon) ภายใต้แรงดัน 1 mTorr เพื่อชนตัวสารที่ถูกเลือกมาจาก quadruple ที่ 1 ให้แตกตัวออกไปเป็น product ion หรือ daughter ion จากนั้น quadruple ที่ 3 ทำหน้าที่เลือกสารที่แตกตัวได้สารที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 93 และ 109 เท่านั้น จากนั้นเปรียบเทียบสารมวลโมเลกุลเท่ากับ 93 ต่อสารมวลโมเลกุลเท่ากับ 109 จะต้องอยู่ในสัดส่วนระหว่าง 3.2 ถึง 43.2 เพื่อเป็นการยืนยันว่าสารที่ quadruple ที่ 1 เลือกมาเป็นสารใดคลอวออย่างแท้จริง

### 3.2.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณไดคอลลอสในวุ้นตา โดยใช้เครื่อง Gas chromatography - Tandem Mass Spectrometry (GC-MS/MS)

#### การสกัดตัวอย่างและการทำความสะอาดตัวอย่าง

- นำวุ้นตา 0.030 กรัม ใส่ใน micro centrifuge tube
- เติมเกลือ NaCl ปริมาณ 0.1 กรัม
- เติม acetonitrile 1 มิลลิลิตร
- ปั่น vortex ให้สารผสมกันเป็นเวลา 1 นาที
- เป่าแห้งด้วยเครื่อง N- Evap
- เติม MgSO<sub>4</sub> เล็กน้อย และเติม ethyl acetate ขนาด 0.3 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดน้ำ และเก็บสารละลาย ตามลำดับ
- ปั่น vortex ให้สารผสมกันเป็นเวลา 1 นาที
- กรองสารที่ได้ด้วย nylon membrane ขนาด 0.22 ไมครอน ใส่ vial ขนาด 2 มิลลิลิตร
- ฉีดสารเข้าเครื่อง GC-MS/MS โดยรายละเอียดเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.2.6.2

### 3.2.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณไดคอลลอสในเลือด โดยใช้เครื่อง Gas chromatography - Tandem Mass Spectrometry (GC-MS/MS)

#### การสกัดตัวอย่าง

- นำเลือด 0.3 กรัม ใส่ใน micro centrifuge tube
- เติม methanol ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร
- ปั่น vortex ให้สารผสมกันเป็นเวลา 30 วินาที
- เติม hexane : diethyl ether (1:1) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
- ปั่น vortex ให้สารผสมกันเป็นเวลา 30 วินาที
- นำไปตกตะกอนโดย centrifuge 3,500 รอบต่อนาที, 4 องศาเซลเซียส, 5 นาที

- ดูดสารส่วนใส (hexane, diethyl ether) แยกเก็บไว้
- สกัดด้วย hexane : diethyl ether ซ้ำอีก 2 รอบ
- นำส่วนใสที่เก็บไว้ทั้งสามซ้ามารวมกัน
- เป่าแห้งด้วยเครื่อง N- Evap
- เติม ethyl acetate ขนาด 0.3 มิลลิลิตร

#### การทำความสะดวกตัวอย่าง

- เติม PSA และ C18 เล็กน้อย เพื่อ กำจัด organic acid, pigment และ lipid
- ปั่น vortex ให้สารผสมกันเป็นเวลา 30 วินาที
- เติม MgSO<sub>4</sub> เล็กน้อย ใน syringe ที่ใช้กรอง
- ฉีดสารทั้งหมดผ่าน syringe กรองผ่าน nylon membrane ขนาด 0.22 ไมครอน ใส่ vial ขนาด 2 มิลลิลิตร
- ฉีดสารเข้าเครื่อง GC-MS/MS โดยรายละเอียดเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.2.6.2

#### 3.2.6.5 การวิเคราะห์ทางจุลพยาธิวิทยา

ล้างตัวอย่างด้วยน้ำสะอาดหลังจาก เก็บรักษาด้วย formalin 10% เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อเตรียมเข้าสู่ขั้นตอน การตัดแต่งอวัยวะให้ได้รูปเพื่อให้พาราฟินแทรกเข้าสู่ชิ้นเนื้อได้ดีในขั้นตอนถัดไป และเพื่อให้ง่ายต่อการนำชิ้นเนื้อไปทำการฝังเนื้อเยื่อบนแบบพิมพ์ (embedding) หลังจากนั้นนำชิ้นเนื้อเข้าเครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ เพื่อให้พาราฟินแทรกเข้าไปภายในชิ้นเนื้อทำให้เนื้อเยื่อเกิดการอิมต้ว (impregnating) ในขั้นตอนนี้ได้แบ่งย่อยเป็นอีกหลายขั้นตอน ประกอบไปด้วย เมื่อได้เนื้อเยื่อที่ถูกพาราฟินแทรกแล้ว ให้ทำการฝังเนื้อเยื่อ (embedding) ลงบนฐานโดยใช้แบบพิมพ์ (mold) ซึ่งมีรูปร่างเป็นทรงสี่เหลี่ยมขึ้นรูป พร้อมกับเทพาราฟินใส่ลงไปบนแบบพิมพ์ให้เต็ม จากนั้นใช้ฐานประกบทับลงไปด้านบน ปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที รอจนกว่าพาราฟินแข็งตัว แล้วจึงค่อยๆแกะแบบพิมพ์ออกจากแม่พิมพ์ จากนั้นเก็บตัวอย่างไว้ในที่เย็น เมื่อตัวอย่างเย็นดีแล้วทำการตัดตัวอย่างชิ้นเนื้อ (sectioning) โดยนำแบบพิมพ์ติดตั้งบนเครื่องตัด (microtome) และปรับให้เครื่องตัด ตัดความหนาของชิ้นเนื้อเท่ากับ 4 ไมครอน จากนั้นทำการย้อมสี hematoxylin & eosin stain และปิดชิ้นเนื้อลงบนแผ่นสไลด์ (mounting) ด้วย น้ำยา permount (DePX)

### 3.2.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

#### 3.2.7.1 การศึกษาการตกค้างสารออร์กาโนฟอสเฟตในแต่ละเนื้อเยื่อ ในความเข้มข้นเดียวกัน

นำค่าที่ได้จากแต่ละกลุ่มตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (One-Way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )

#### 3.2.7.2 การศึกษาการตกค้างสารออร์กาโนฟอสเฟตในเนื้อเยื่อเดียวกัน แต่ต่างความเข้มข้น

ใช้ข้อมูลการตกค้างในเนื้อเยื่อเดียวกันจากกลุ่ม 1,000 และ 4,000 พีพีบี เพื่อวิเคราะห์ค่ากลาง (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SE) ภายในกลุ่มอวัยวะของตนเอง และเปรียบเทียบระหว่างสองความเข้มข้นโดยใช้วิธี independent sample t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )

### 3.3 การทดลองที่ 2

#### 3.3.1 ลักษณะการเลี้ยงขณะทำการทดลอง

ใช้ตู้กระจกขนาด 42 x 52 x 47 เซนติเมตร (ปริมาตรน้ำ 80 ลิตร) จำนวน 3 ตู้ โดยมีปลาตู้ละ 14 ตัว แต่ละตู้มีหัวทรายให้อากาศอย่างเพียงพอ ให้อาหารวันละ 1 ครั้งในปริมาณร้อยละ 3 ของน้ำหนักตัว (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 การเลี้ยงในการทดลองที่ 2

### 3.3.2 การใส่สารออร์กาโนฟอสเฟต

ใช้สารไดคลอวอส (ไพธัน®; Dichlorvos 50% w/v) เป็นตัวแทนของสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ด้วยระบบน้ำที่ควบคุมความเข้มข้นให้คงที่ (static renewal system) โดยละลายไดคลอวอส 50% w/v ด้วยน้ำสะอาดให้เป็นสารละลายไดคลอวอส จากนั้นใส่สารละลายไดคลอวอสในน้ำเลี้ยงปลาให้ได้ความเข้มข้น 4,000 พีพีบี (320 มิลลิกรัมต่อน้ำ 80 ลิตร) เลี้ยงจนครบ 72 ชั่วโมง นำปลาทั้งหมดมาทำการการุณยฆาตและเก็บตัวอย่าง

### 3.3.3 การตรวจวัดคุณภาพน้ำ สิ่งแวดล้อมและพฤติกรรมของสัตว์ทดลอง

ทำการตรวจคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 (ดังหัวข้อ 3.2.3) หลังจากปลาตายบันทึกอุณหภูมิอากาศและความชื้นสัมพัทธ์สูงสุดและต่ำสุดในรอบวันโดยเครื่องไฮโกรมิเตอร์ (TM-870 FZ, Thailand) (ภาพที่ 13)

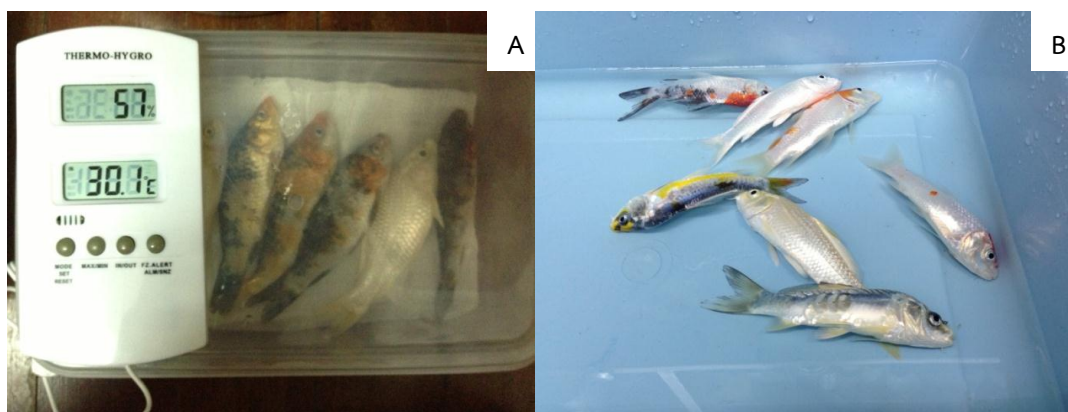


ภาพที่ 13 การตรวจอุณหภูมิอากาศและความชื้นสัมพัทธ์โดยเครื่องไฮโกรมิเตอร์

### 3.3.4 การุณยฆาต

ทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 (ดังหัวข้อ 3.2.4) จากนั้นแบ่งปลาทั้ง 14 ตัว เป็นสองกลุ่ม กลุ่มละ 7 ตัว โดยที่กลุ่มที่ 1 จะถูกเก็บซากไว้ที่แห้ง ณ อุณหภูมิปกติ กลุ่มที่ 2 จะถูกเก็บซากไว้ในน้ำ ณ อุณหภูมิปกติ เก็บตัวอย่างตามเวลาที่กำหนด และทำการทดลองเหมือนกันทั้ง 3 ตู้ (ภาพที่ 14)





ภาพที่ 14 การเก็บซากปลา (A) เก็บในที่แห้ง (B) เก็บในน้ำสะอาด

### 3.3.5 การเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์ตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำในปริมาณ 500 มิลลิลิตรทุกวันของการทดลองเพื่อตรวจหาสารไดคอกลาสในน้ำ โดยเก็บตัวอย่างน้ำหลังจากทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำประจำวันด้วยภาชนะพลาสติกมีฝาปิดสนิท เก็บในที่มืดอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำการสกัดตัวอย่างภายใน 1 อาทิตย์หลังจากเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจหาปริมาณไดคอกลาสในแต่ละตัวอย่างโดยวิธีดังหัวข้อ 3.2.6.1

ทำการสุ่มซากปลาทั้งสองกลุ่ม (กลุ่มเก็บไว้ที่แห้งและกลุ่มเก็บไว้ในน้ำสะอาด) เพื่อเก็บตัวอย่างตับและกล้ามเนื้ออย่างละ 1 กรัม วุ้นตาปลา ครั้งละ 0.1 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ณ เวลาชั่วโมงที่ 0 12 24 48 และ 72 หลังตาย เก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำการสกัดตัวอย่างภายใน 1 อาทิตย์หลังจากเก็บตัวอย่างโดยวิธีดังหัวข้อ 3.2.6.2 - 3.2.6.3

### 3.3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

#### 3.3.6.1 การศึกษาการสลายตัวของสารออร์กาโนฟอสเฟตในแต่ละตัวอย่างของปลาหลังตาย

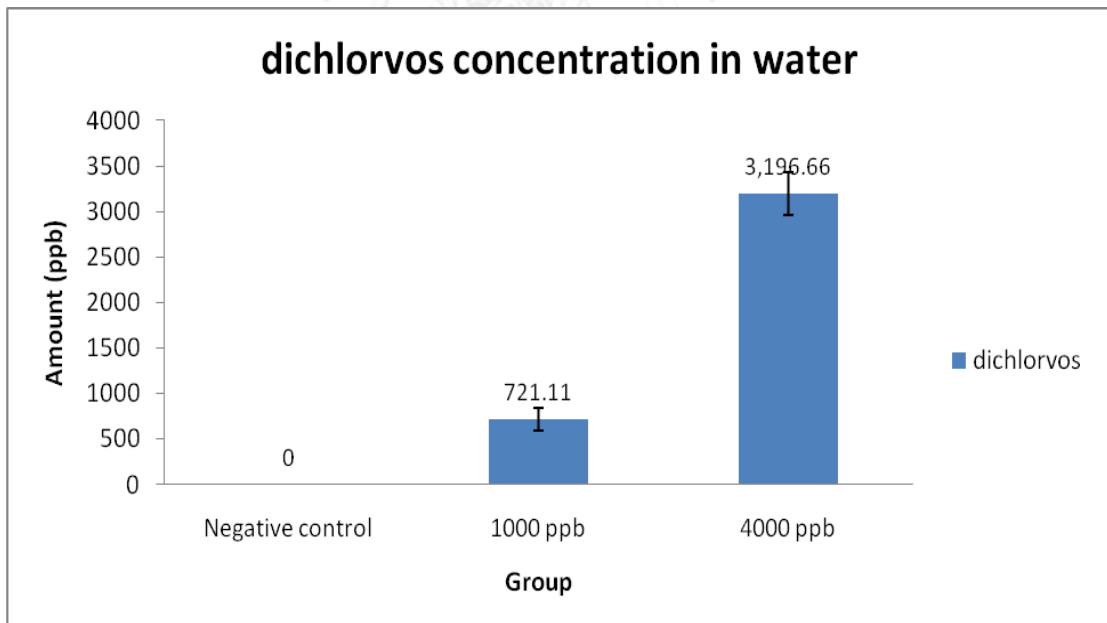
อธิบายสถิติเชิงพรรณนา โดยใช้ค่ากลาง (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SE) ประกอบกับแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการตกค้างและเวลาหลังตาย

## บทที่ 4 ผลการทดลอง

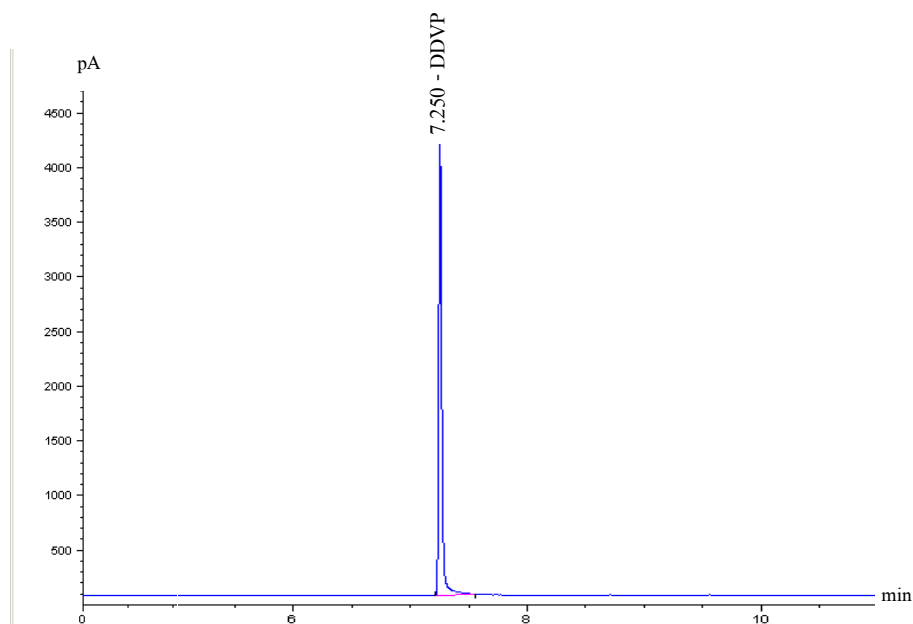
### 4.1 ผลคุณภาพน้ำ

ปริมาณสารไดคลอวอสในน้ำเลี้ยงปลากลุ่ม 1,000 พีพีบี มีค่าระหว่าง 520-850 พีพีบี ซึ่งคิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $721.11 \pm 122.11$  พีพีบี และปริมาณสารไดคลอวอสในน้ำเลี้ยงปลากลุ่ม 4,000 พีพีบี มีค่าระหว่าง 2,730-3,540 พีพีบี ซึ่งคิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $3196.66 \pm 236.65$  พีพีบี (ภาพที่ 15)

การวิเคราะห์ปริมาณไดคลอวอสในน้ำโดยใช้เครื่อง Gas chromatography - Flame photometric detector มีค่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ (limit of detection; LOD) เท่ากับ 1 พีพีบี เวลาที่สารไดคลอวอสใช้ในคอลัมน์ (retention time) อยู่ระหว่าง 7.391 – 7.401 นาที และมีค่า sample spike recovery ของตัวอย่างน้ำอยู่ระหว่างร้อยละ 79.00 ถึง 97.00



ภาพที่ 15 ปริมาณสารไดคลอวอสในน้ำจากกลุ่ม 1,000 พีพีบี และกลุ่ม 4,000 พีพีบี



ภาพที่ 16 โครมาโทแกรมจากการตรวจโดย GC-FPD จากน้ำที่มีสารไดคลอวอส 1,000 พีพีบี แกนตั้งแทนความเข้มข้นของสัญญาณ (picoAmp; pA) แกนนอนแทนเวลา (minute)

#### 4.2 ผลการศึกษาการตกค้างสารออร์กาโนฟอสเฟตในแต่ละเนื้อเยื่อ

จากกลุ่มปลาที่เลี้ยงในน้ำที่มีไดคลอวอสเข้มข้น 1,000 พีพีบี พบว่าในวงตาและกล้ามเนื้อมีการตกค้างเฉลี่ยเท่ากับ  $19.92 \pm 12.23$  และ  $12.36 \pm 7.72$  ตามลำดับ ส่วนตับและเลือดมีค่าต่ำกว่า 2 พีพีบี ซึ่งเป็นค่าปริมาณต่ำสุดที่ผ่านการสอบเทียบที่สามารถวิเคราะห์ได้ (the lowest calibration level; LCL) จากกลุ่มปลาที่เลี้ยงในน้ำที่มีไดคลอวอสเข้มข้น 4,000 พีพีบี พบว่าในตับ วงตาและกล้ามเนื้อมีปริมาณไดคลอวอสตกค้างเฉลี่ยเท่ากับ  $217.07 \pm 149.08$ ,  $180.93 \pm 7.00$  และ  $177.03 \pm 28.85$  ตามลำดับ แต่ในเลือดมีค่าต่ำกว่าค่า LCL เช่นเดียวกับกลุ่มปลาที่เลี้ยงในน้ำที่มีไดคลอวอสเข้มข้น 1,000 พีพีบี (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 17)

ผลการควบคุมคุณภาพวิธีการสกัดสารทางห้องปฏิบัติการพบว่าตัวอย่างตับ มีค่า sample spike recovery อยู่ระหว่างร้อยละ 65.26 ถึง 82.40 retention time อยู่ระหว่าง 7.156 ถึง 7.191 นาที ตัวอย่างวงตามีค่า sample spike recovery อยู่ระหว่างร้อยละ 77.33 ถึง 100.58 retention time อยู่ระหว่าง 7.124 ถึง 7.146 นาที ตัวอย่างกล้ามเนื้อมีค่า sample spike recovery อยู่ระหว่างร้อยละ 68.00 ถึง 76.47 retention time อยู่ระหว่าง 7.133 ถึง 7.146 นาที และตัวอย่างเลือดมีค่า sample spike recovery อยู่ระหว่างร้อยละ 77.85 ถึง 91.20 retention time อยู่ระหว่าง 7.133 ถึง 7.159 นาที

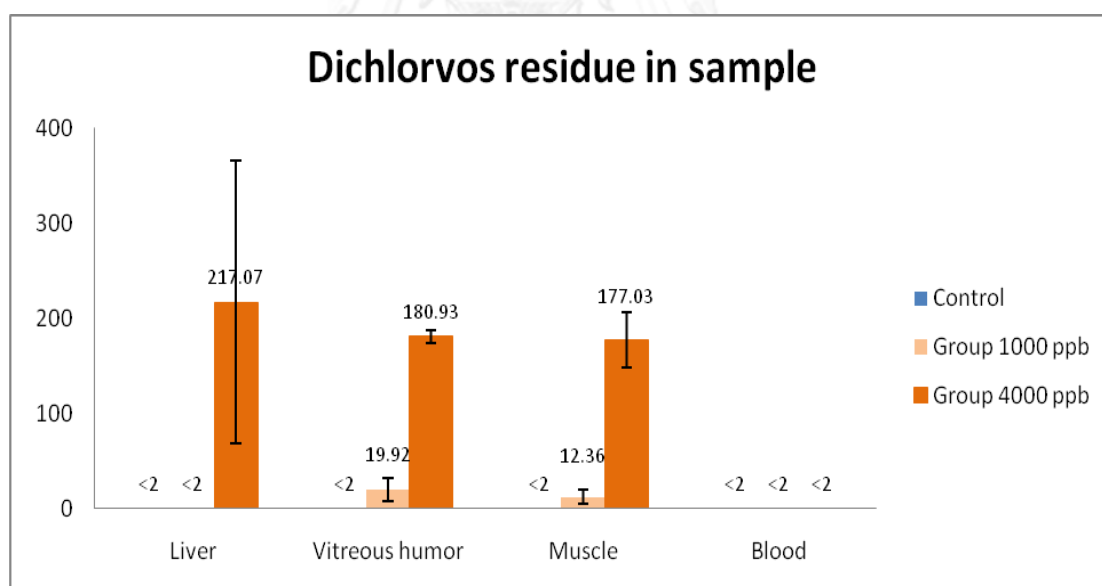
ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐานปริมาณการตกค้างของสารไดคลอวอสจากตัวอย่าง ณ ชั่วโมงที่ 0 หลังการตาย

Group	Dichlorvos residue (ppb)			
	Liver	Vitreous humor	Muscle	Blood
Negative Control	ND	ND	ND	ND
Group 1,000 ppb	ND <sup>b</sup>	19.92±12.23 <sup>a</sup>	12.36±7.72 <sup>a,b</sup>	ND <sup>b</sup>
Group 4,000 ppb	217.07±149.08 <sup>A</sup>	180.93±7.00 <sup>A</sup>	177.03±28.85 <sup>A</sup>	ND <sup>B</sup>

ND = not detectable at the lowest calibration level (LCL) (2 ppb)

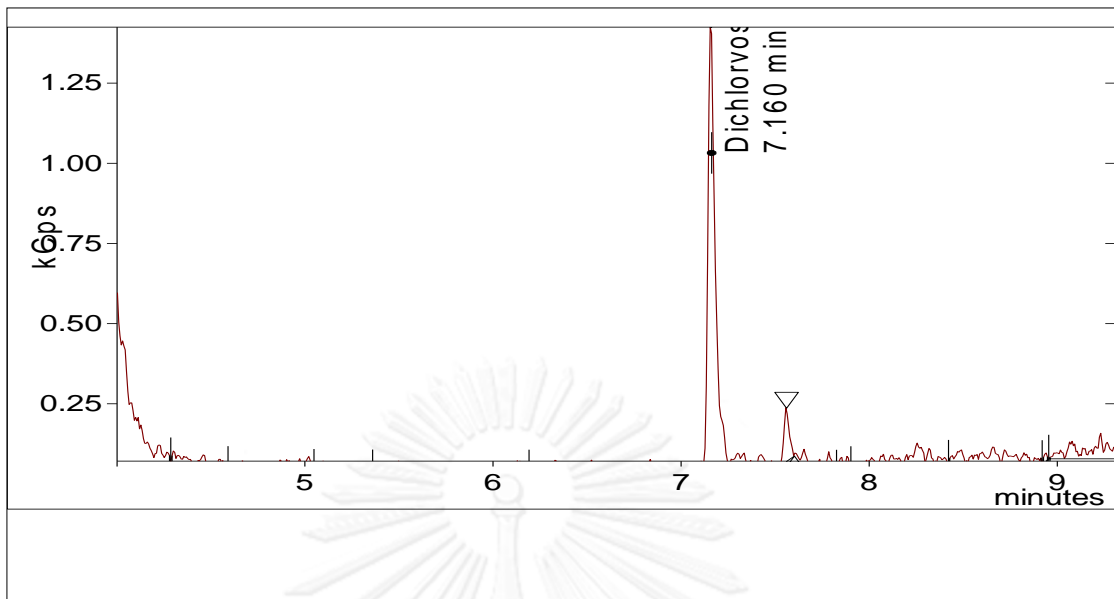
<sup>a,b</sup> Different letters in the same row indicate differences statistically significant ( $p < 0.05$ )

<sup>A,B</sup> Different letters in the same row indicate differences statistically significant ( $p < 0.05$ )

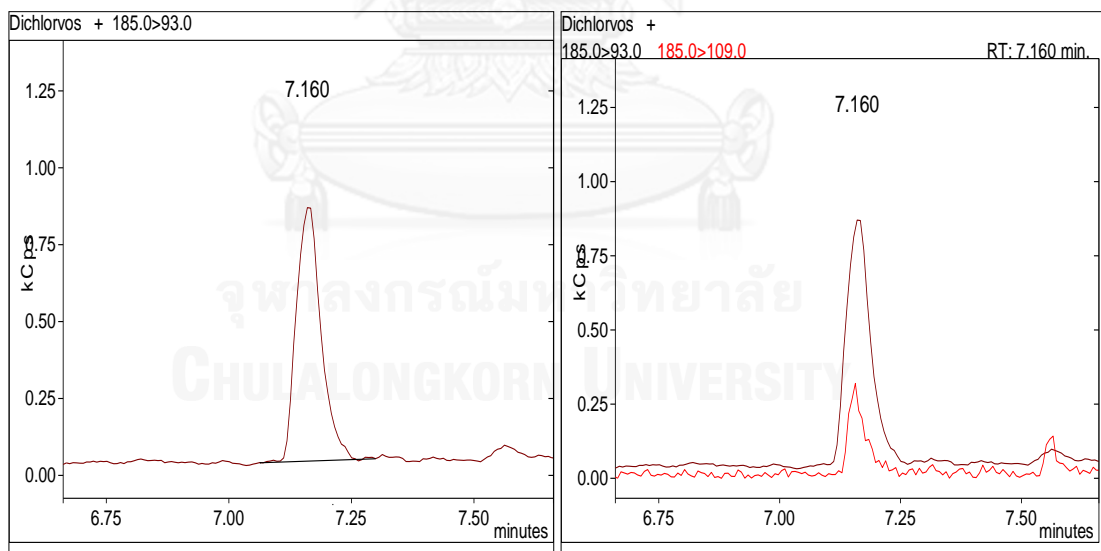


\*GC detectable limit 2 ppb

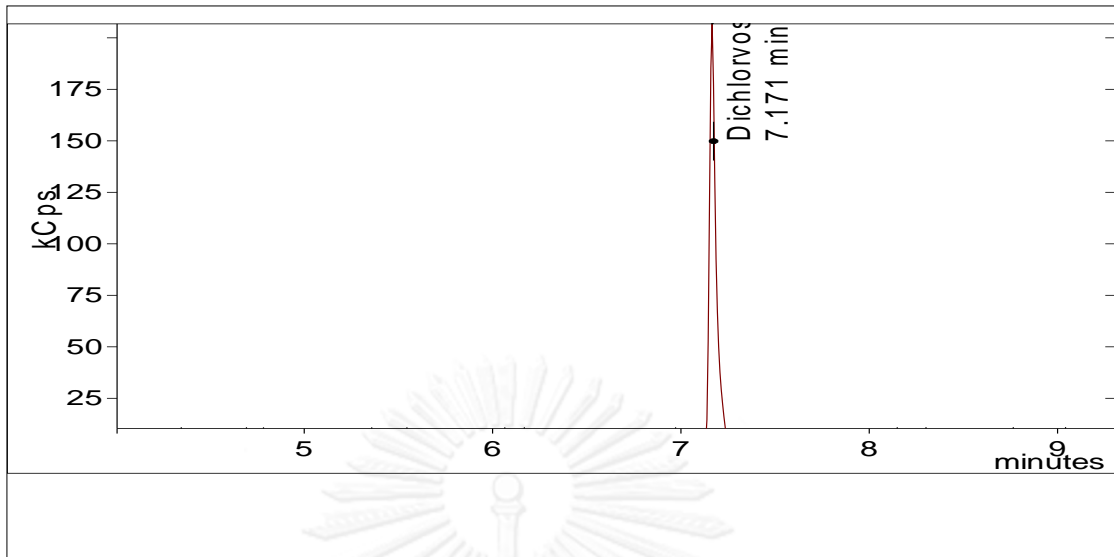
ภาพที่ 17 ปริมาณการตกค้างของสารไดคลอวอสเปรียบเทียบในแต่ละตัวอย่างจากกลุ่มควบคุม กลุ่ม 1,000 พีพีบี และกลุ่ม 4,000 พีพีบี



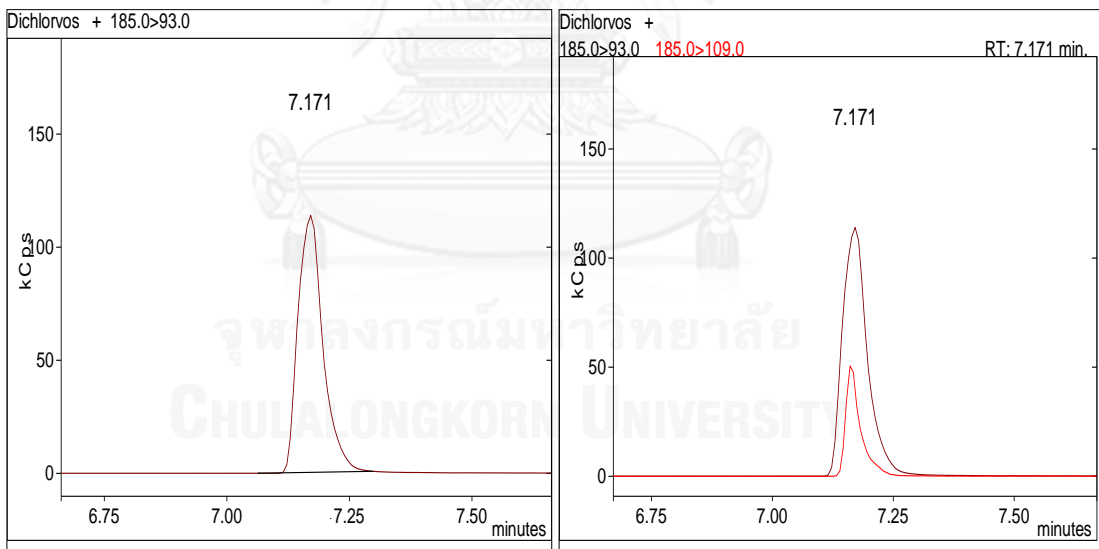
ภาพที่ 18 โครมาโทแกรมจากการตรวจโดย GC-MS/MS จากวุ้นตาที่มีสารไดคลอวอส 1 พีพีบี แกนตั้งแทนความเข้มข้นของสัญญาณ (kilo counts per second; Kcps) แกนนอนแทนเวลา (minute)



ภาพที่ 19 การยืนยันสารไดคลอวอสโดยการนำไปแตกตัวครั้งที่สอง จากการตรวจด้วย GC-MS/MS จากวุ้นตาที่มีสารไดคลอวอส 1 พีพีบี



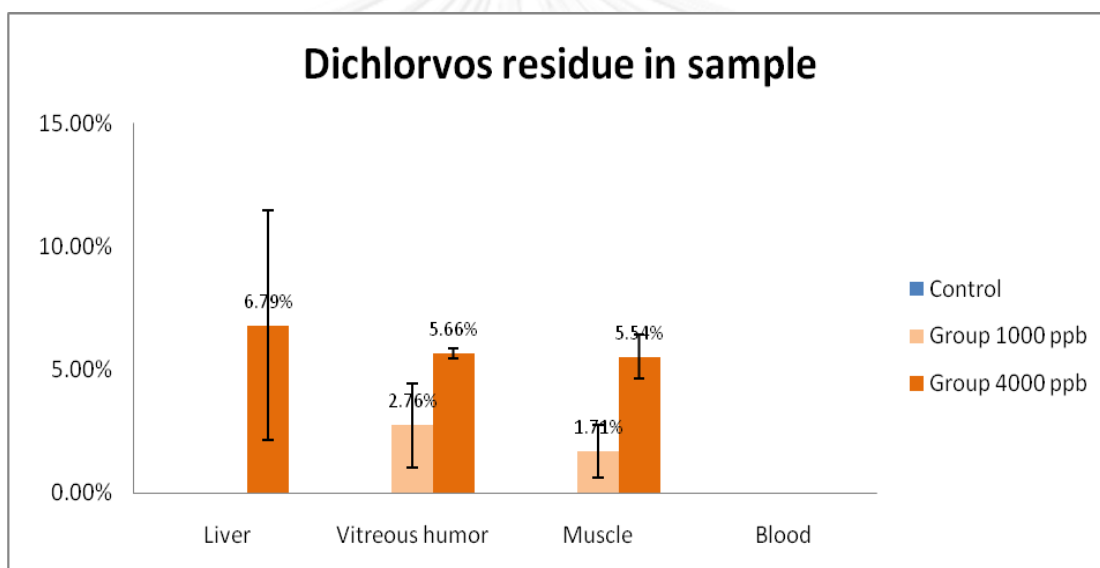
ภาพที่ 20 โครมาโทแกรมจากการตรวจโดย GC-MS/MS จากควันต่าที่มีสารไดคลอวอส 100 พีพีบี แกนตั้งแทนความเข้มข้นของสัญญาณ (kilo counts per second; Kcps) แกนนอนแทนเวลา (minute)



ภาพที่ 21 การยืนยันสารไดคลอวอสโดยการนำไปแตกตัวครั้งที่สอง จากการตรวจด้วย GC-MS/MS จากควันต่าที่มีสารไดคลอวอส 100 พีพีบี

#### 4.3 ผลการศึกษาอัตราส่วนของการสะสมสารออร์กาโนฟอสเฟตจากน้ำเข้าสู่แต่ละเนื้อเยื่อ

หากนำค่าเฉลี่ยการตกค้างของสารไดคลอวอสจากกลุ่มปลาที่เลี้ยงในน้ำไดคลอวอสเข้มข้น 1,000 พีพีบี มาคิดเป็นร้อยละของการตกค้างในแต่ละอวัยวะโดยเทียบกับความเข้มข้นของสารไดคลอวอสในน้ำเฉลี่ยซึ่งมีค่าเท่ากับ 721.11 พีพีบี พบว่าวุ้นตาและเนื้อมีการตกค้างร้อยละ  $2.76 \pm 1.70$  และ  $1.71 \pm 1.07$  ตามลำดับ หากนำค่าเฉลี่ยจากกลุ่มปลาที่เลี้ยงในน้ำไดคลอวอสเข้มข้น 4,000 พีพีบีมาคิดเป็นร้อยละของการตกค้างในแต่ละอวัยวะโดยเทียบกับความเข้มข้นของสารไดคลอวอสในน้ำเฉลี่ยซึ่งมีค่าเท่ากับ 3196.66 พีพีบี พบว่าตับ วุ้นตาและเนื้อมีการตกค้างร้อยละ  $6.79 \pm 4.66$ ,  $5.66 \pm 0.22$  และ  $5.54 \pm 0.90$  ตามลำดับ (ภาพที่ 22)

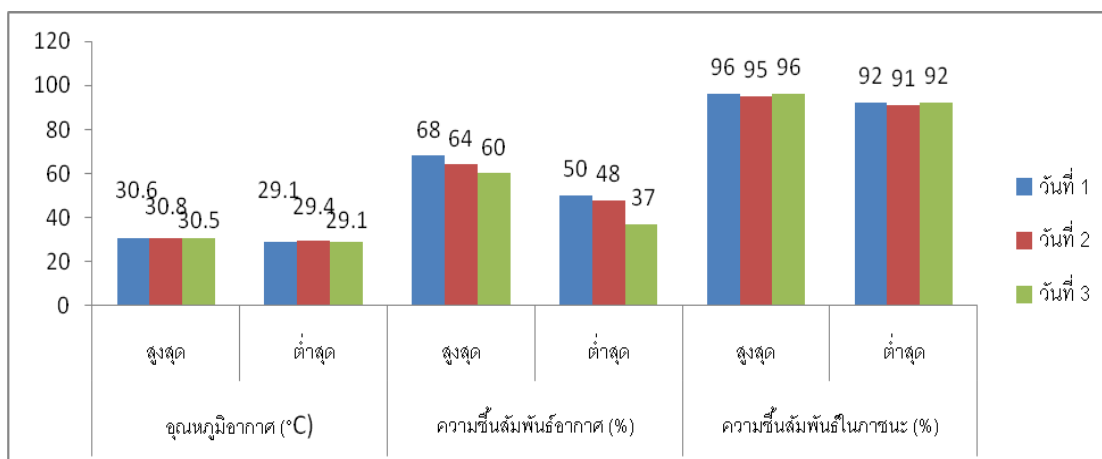


\*GC detectable limit 2 ppb

ภาพที่ 22 ร้อยละการตกค้างของสารไดคลอวอสในแต่ละตัวอย่างจากสองกลุ่มความเข้มข้น

#### 4.4 ผลการศึกษาอัตราการสลายตัวของสารออร์กาโนฟอสเฟตในแต่ละเนื้อเยื่อของปลาหลังการตาย

หลังจากการรณยฆาตปลาในการทดลองที่ 2 ที่เลี้ยงไว้ในน้ำซึ่งมีความเข้มข้นของสารไดคลอวอส 4,000 พีพีบี ได้มีการเก็บซากปลาดังกล่าวไว้ ณ สิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน คือ ที่แห้งและในน้ำสะอาด ซึ่งอุณหภูมิอากาศมีค่าระหว่าง 29.1-30.8 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศมีค่าร้อยละ 37-68 และความชื้นสัมพัทธ์ในภาชนะมีค่าร้อยละ 91-96 (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 สภาพอากาศระหว่างทำการทดลองที่ 2

การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารไดคลอวอสของซากปลาที่เก็บไว้ในที่แห้งมีดังนี้ (ตารางที่ 4 และ ภาพที่ 24)

-ดับ สามารถตรวจพบสารได้ถึง 72 ชั่วโมงหลังตาย แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตลอดการทดลอง

-วันตา ณ ชั่วโมงที่ 12 หลังตายพบว่าปริมาณสารในวันตาลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสามารถตรวจพบสารได้ถึง 72 ชั่วโมงหลังตาย

-กล้ามเนื้อ ณ ชั่วโมงที่ 12 หลังตายพบว่าปริมาณสารในกล้ามเนื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเวลาสุดท้ายที่ตรวจพบสารตกค้างคือชั่วโมงที่ 24 หลังตาย

การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารสารไดคลอวอสของซากปลาที่เก็บไว้ในน้ำมีดังนี้ (ตารางที่ 5 และ ภาพที่ 25)

-ดับ สามารถตรวจพบสารได้ถึง 72 ชั่วโมงหลังตาย แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตลอดการทดลอง

-วันตา ณ ชั่วโมงที่ 12 หลังตายพบว่าปริมาณสารในวันตาลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสามารถตรวจพบสารได้ถึง 72 ชั่วโมงหลังตาย

-กล้ามเนื้อ ณ ชั่วโมงที่ 12 หลังตายพบว่าปริมาณสารในกล้ามเนื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเวลาสุดท้ายที่ตรวจพบสารตกค้างคือชั่วโมงที่ 48 หลังตาย



ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปริมาณสารไดคลอวอสตกค้างในอวัยวะต่างๆ จากซากปลาที่เก็บไว้ในภาชนะแห้ง

In air	Dichlorvos residue (ppb)				
	Postmortem time				
	0 hr	12 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Liver	217.07±149.08 <sup>NS</sup>	290.59±278.28 <sup>NS</sup>	241.94±127.24 <sup>NS</sup>	52.09±48.71 <sup>NS</sup>	20.48±7.76 <sup>NS</sup>
Vitreous Humor	180.93±7.01 <sup>a</sup>	21.97±3.84 <sup>b</sup>	19.36±4.32 <sup>b</sup>	12.12±4.27 <sup>b</sup>	18.22±5.72 <sup>b</sup>
Muscle	177.03±28.85 <sup>A</sup>	9.74±5.91 <sup>B</sup>	5.46±0.42 <sup>B</sup>	<2* <sup>C</sup>	<2* <sup>C</sup>

NS Data is not significant different (p<0.05)

<sup>a,b</sup> Different letters in the same row indicate differences statistically significant (p<0.05)

<sup>A,B,C</sup> Different letters in the same row indicate differences statistically significant (p<0.05)

\* GC detectable limit 2 ppb

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปริมาณสารไดคลอวออสตกค้างในอวัยวะต่างๆ จากซากปลาที่เก็บไว้ในน้ำสะอาด

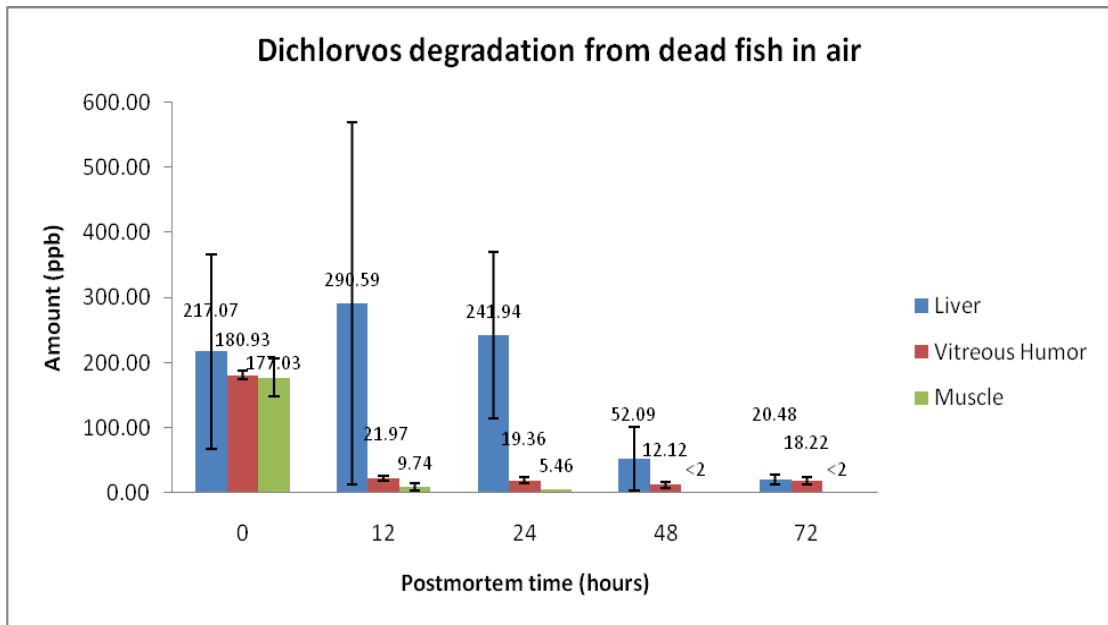
	Dichlorvos residue (ppb)				
	0 hr	12 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Liver	217.07±149.08 <sup>NS</sup>	195.08±167.79 <sup>NS</sup>	404.26±260.99 <sup>NS</sup>	301.10±75.06 <sup>NS</sup>	40.16±26.63 <sup>NS</sup>
Vitreous Humor	180.93±7.01 <sup>a</sup>	13.46±8.35 <sup>b</sup>	21.57±3.85 <sup>b</sup>	15.44±6.55 <sup>b</sup>	22.24±3.31 <sup>b</sup>
Muscle	177.03±28.85 <sup>A</sup>	16.33±1.00 <sup>B</sup>	12.96±5.65 <sup>B</sup>	6.58±1.67 <sup>B</sup>	<2* <sup>C</sup>

<sup>NS</sup> Data is not significant different (p<0.05)

<sup>a,b</sup> Different letters in the same row indicate differences statistically significant (p<0.05)

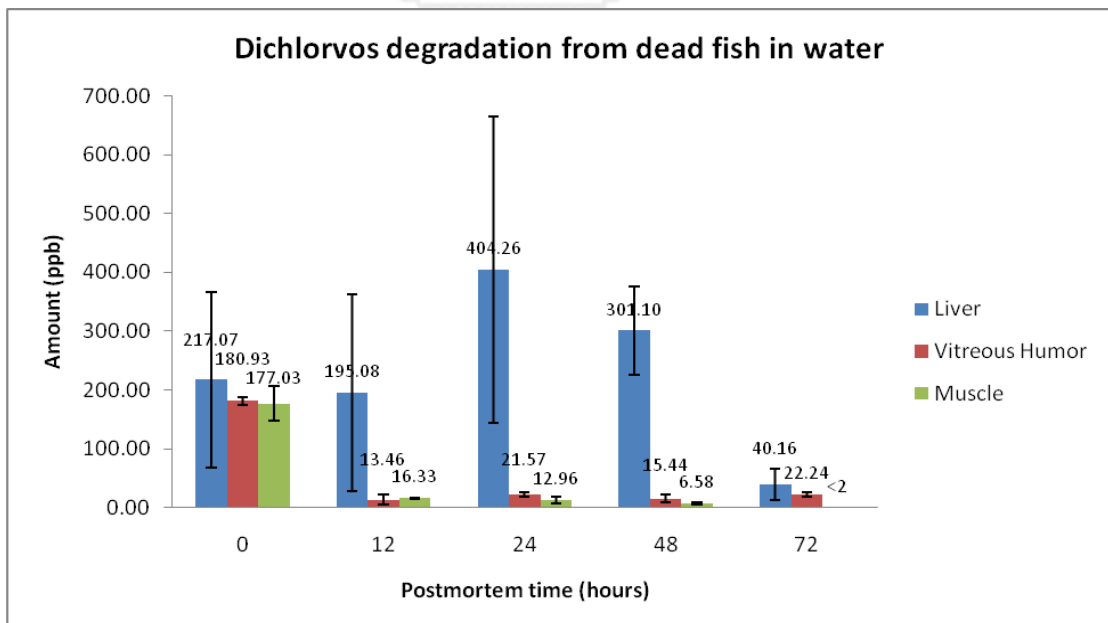
<sup>A,B,C</sup> Different letters in the same row indicate differences statistically significant (p<0.05)

\* GC detectable limit 2 ppb



\* GC detectable limit 2 ppb

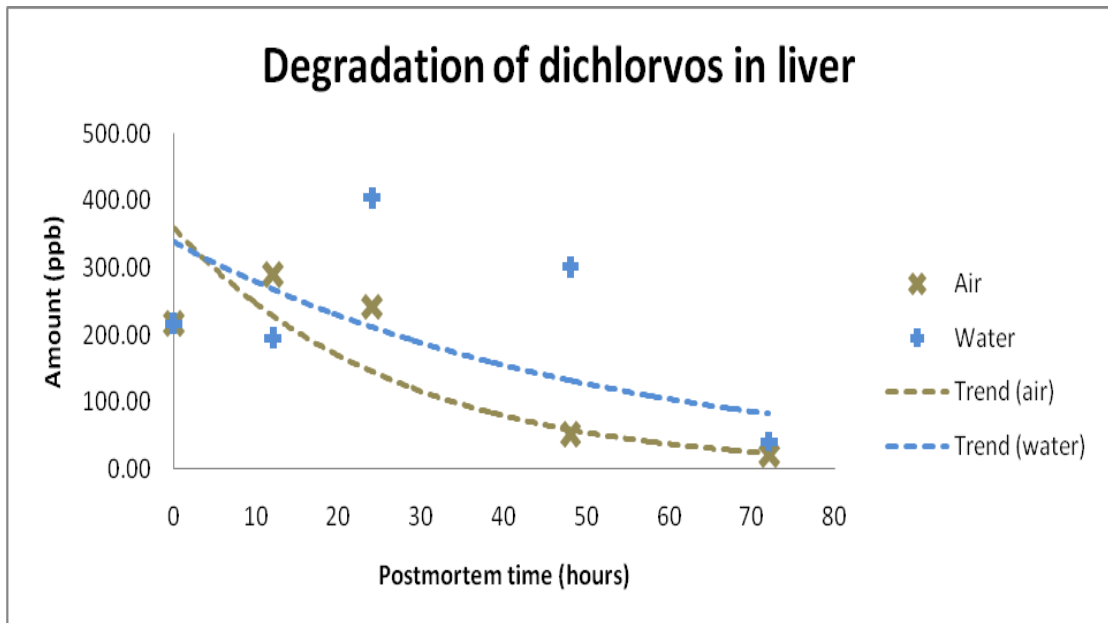
ภาพที่ 24 การเปรียบเทียบปริมาณสารในตัวอย่างตับ วัุ้นตาและเนื้อในเวลาที่ต่างๆ จากซากปลา เก็บที่แห้ง



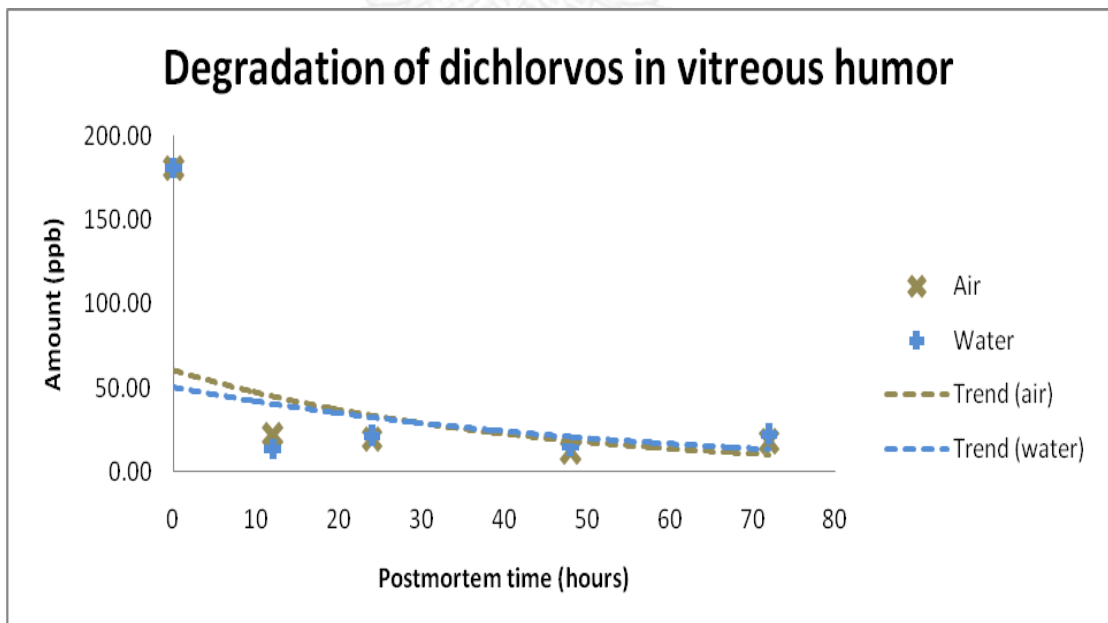
\* GC detectable limit 2 ppb

ภาพที่ 25 การเปรียบเทียบปริมาณสารในตัวอย่างตับ วัุ้นตาและเนื้อในเวลาที่ต่างๆ จากซากปลา เก็บในน้ำ

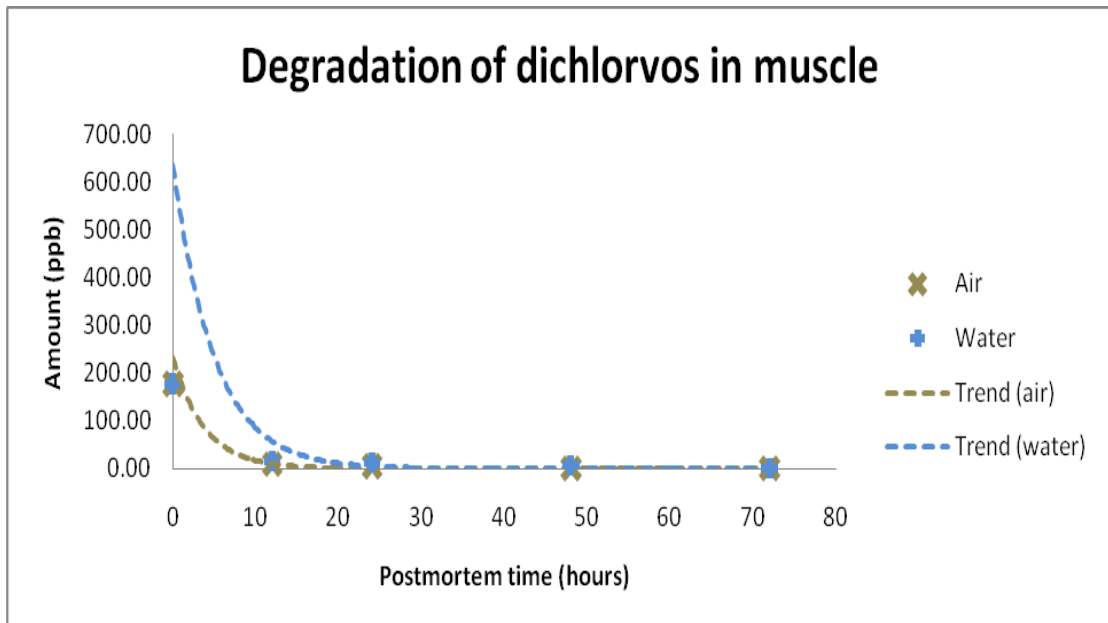
เมื่อนำค่าเฉลี่ยการตกค้างในแต่ละอวัยวะแต่ละช่วงเวลาหลังการตายพบว่าแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารกำจัดแมลงตกค้างและเวลาหลังการตายมีความสัมพันธ์แบบผกผัน



ภาพที่ 26 ปริมาณสารไดคลอวอสในตัวอย่างตับจากซากที่เก็บในที่แห้งและในน้ำ



ภาพที่ 27 ปริมาณสารไดคลอวอสในตัวอย่างวุ้นตาจากซากที่เก็บในที่แห้งและในน้ำ

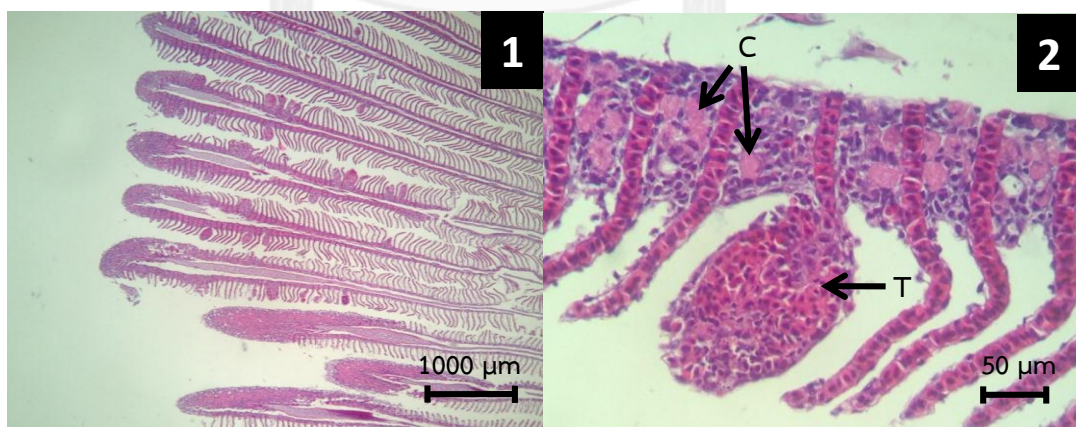


ภาพที่ 28 ปริมาณสารไดคลอวอสในตัวอย่างกล้ามเนื้อจากซากที่เก็บในที่แห้งและในน้ำ

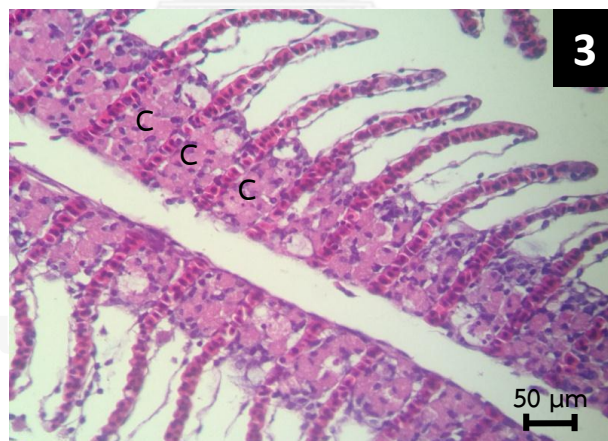
#### 4.5 ผลทางจุลพยาธิวิทยา

เหงือก

พบภาวะ telangiectasis ในทุกกลุ่มการทดลอง (ภาพที่ 29) และมีการเพิ่มขึ้นของคลอไรด์เซลล์ (Chloride cell) มากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสารไดคลอวอส (ภาพที่ 30)



ภาพที่ 29 จุลพยาธิวิทยาของเหงือกปลาแพนซีคาร์พกลุ่มไดคลอวอส 4,000 พีพีพี ที่พบลักษณะ telangiectasis (1) ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 40 เท่า (2) ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 400 เท่า (C) chloride cell และ (T) telangiectasis (H&E)

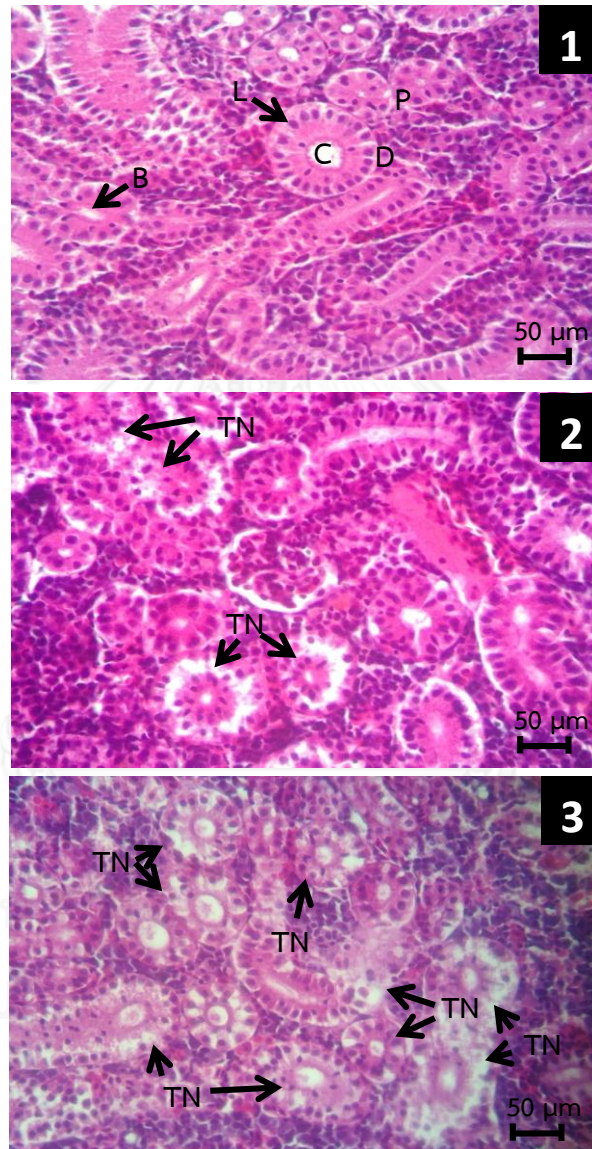


ภาพที่ 30 จุลพยาธิวิทยาของเหงือกปลาแบนซีคาร์พ กำลังขยาย 400 เท่า (1) กลุ่มควบคุม (2) กลุ่มไตคลอวอส 1,000 พีพีบี (3) กลุ่มไตคลอวอส 4,000 พีพีบี (P) primary lamellae (S) secondary lamellae และ (C) chloride cell (H&E)



ไต

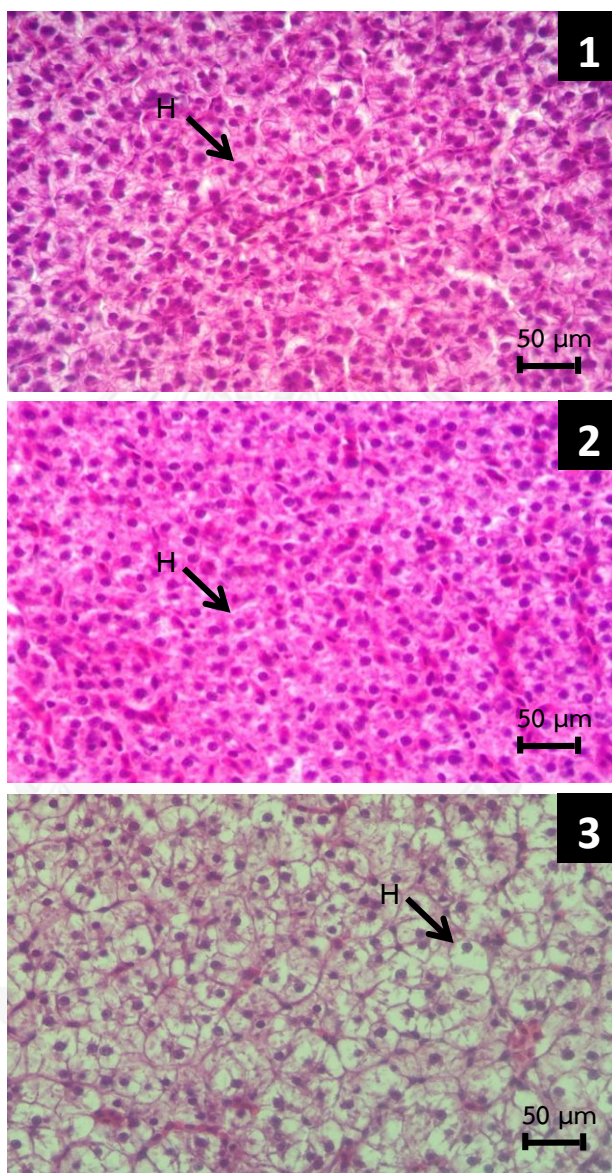
ปลาในกลุ่มควบคุมไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาแต่กลุ่มเลี้ยงในน้ำ 1,000 พีพีบี เริ่มพบภาวะการตายของเซลล์เยื่อบุท่อไต (tubular epithelial necrosis; tubulonephrosis) และพบมากในกลุ่มเลี้ยงในน้ำ 4,000 พีพีบี (ภาพที่ 31)



ภาพที่ 31 จุลพยาธิวิทยาของไตปลาแพนซีคาร์พ กำลังขยาย 400 เท่า (1) กลุ่มควบคุม (2) กลุ่มไตคลอวอส 1,000 พีพีบี (3) กลุ่มไตคลอวอส 4,000 พีพีบี (L) low columnar epithelial cells (B) brush border (P) proximal tubule (D) distal tubule (C) collecting tubule (TN) tubulonephrosis (H&E)

ตับ

พบว่าในกลุ่มควบคุมและกลุ่มเลี้ยงในน้ำ 1,000 พีพีบีไม่พบความผิดปกติในเนื้อเยื่อตับ (ภาพที่ 54) แต่ในกลุ่มเลี้ยงในน้ำ 4,000 พีพีบีพบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาคือ พบ vacuolar degeneration ในเซลล์ตับ (hepatocyte) (ภาพที่ 32)

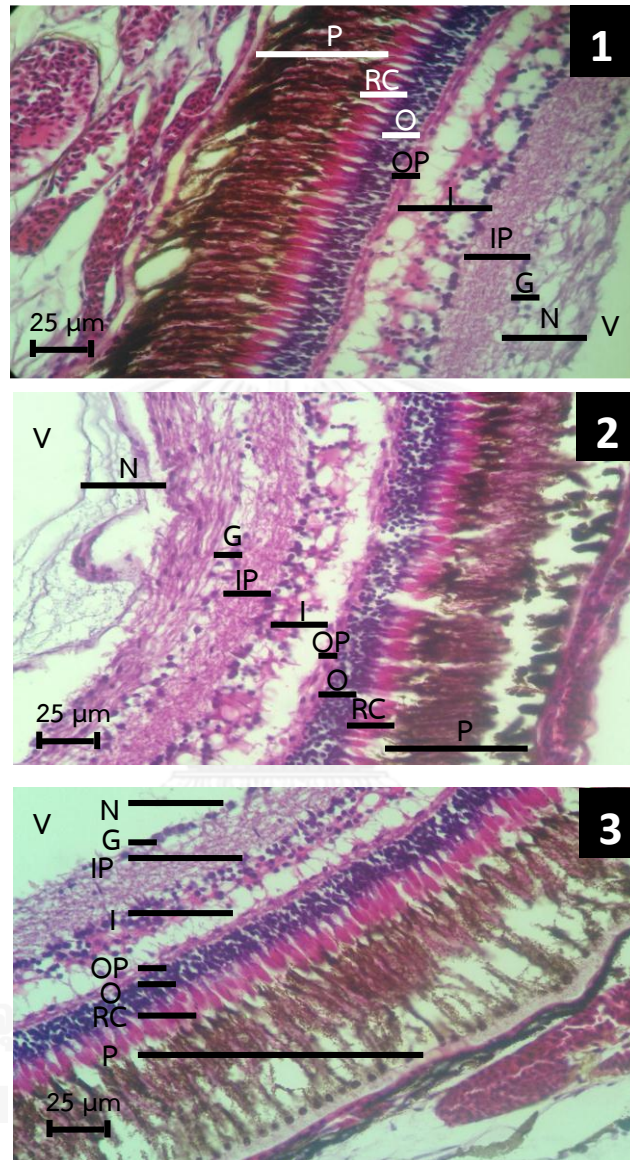


ภาพที่ 32 จุลพยาธิวิทยาของตับปลาแฟนซีคาร์พ กำลังขยาย 400 เท่า (1) กลุ่มควบคุม (2) กลุ่มไดคลอวอส 1,000 พีพีบี (3) กลุ่มไดคลอวอส 4,000 พีพีบี (H) hepatocyte (H&E)



ตา

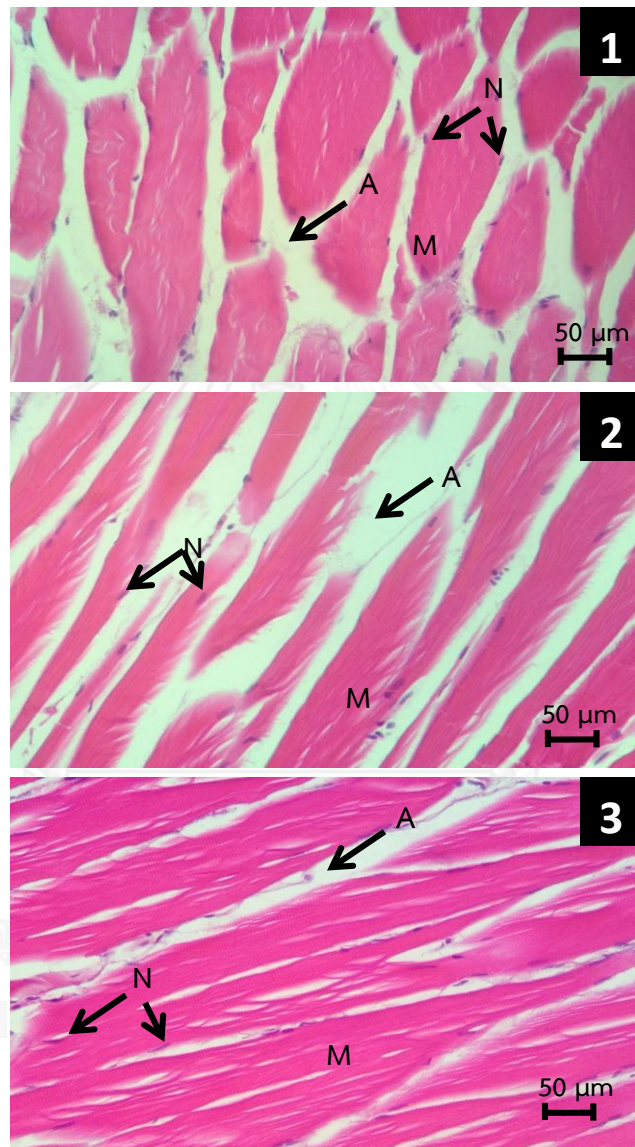
ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา (ภาพที่ 33)



ภาพที่ 33 จุลพยาธิวิทยาของตาปลาแฟนซีคาร์พ กำลังขยาย 400 เท่า (1) กลุ่มควบคุม (2) กลุ่มไดคลอวอส 1,000 พีพีบี (3) กลุ่มไดคลอวอส 4,000 พีพีบี (V) vitreous chamber (N) nerve fiber layer (G) ganglion cell layer (IP) inner plexiform layer (I) inner nuclear layer (OP) outer plexiform layer (O) outer nuclear layer (RC) rods and cones; photoreceptor layer และ (P) pigment layer (H&E)

กล้ามเนื้อ

ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา



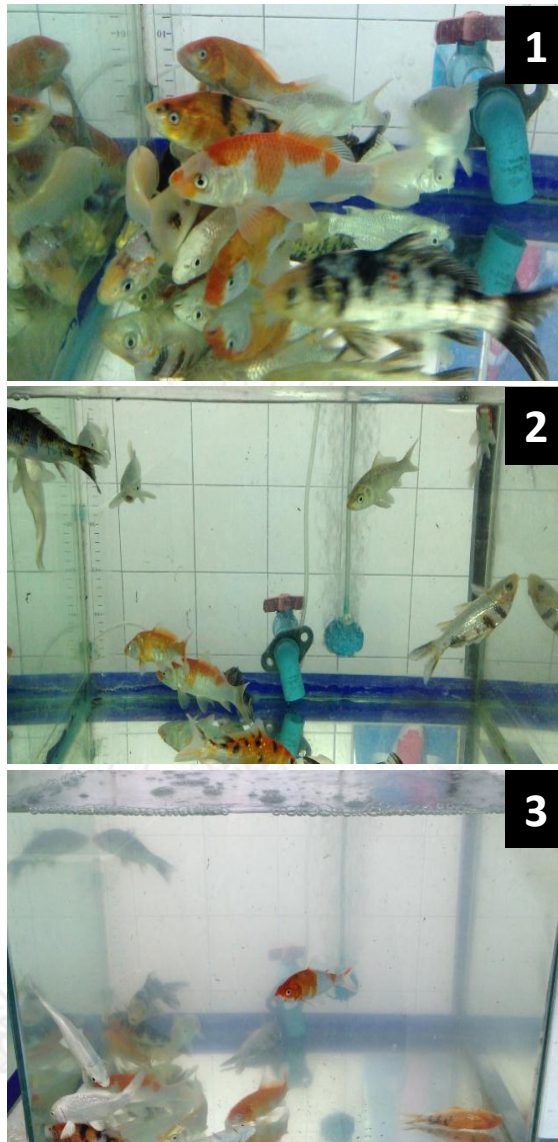
ภาพที่ 34 จุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อปลาแพนซีคาร์พ กำลังขยาย 400 เท่า (1) กลุ่มควบคุม (2) กลุ่มไตคลอวอส 1,000 พีพีบี (3) กลุ่มไตคลอวอส 4,000 พีพีบี (M) muscle fiber (N) nucleus และ (A) adipose tissue (H&E)

#### 4.6 ผลการเปลี่ยนแปลงทางพฤติกรรม

จากการทดลองทั้ง 3 ซ้ำ พบว่าปลาคาร์พกลุ่มควบคุมและกลุ่มเลี้ยงในน้ำไดคลอวอสเข้มข้น 1,000 พีพีบี ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพฤติกรรมตลอดเวลาที่เลี้ยง ในกลุ่มเลี้ยงในน้ำไดคลอวอสเข้มข้น 4,000 พีพีบี พบว่าเมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมงปลามีอาการตื่นตกใจง่าย ปลาส่วนใหญ่ไม่กินอาหาร แต่ยังคงว่ายน้ำได้ปกติ เมื่อชั่วโมงที่ 48 พบว่าปลาทุกตัวมีอาการตกใจง่าย ไม่กินอาหาร ว่ายน้ำแบบไร้ทิศทาง (erratic swimming) 1 ตัว และมีปลานอนตะแคงอยู่ที่พื้นไม่สามารถว่ายน้ำได้ (lateral recumbency) 1 ตัว เมื่อครบ 72 ชั่วโมง พบว่าปลาทุกตัวมีอาการตกใจง่าย ไม่กินอาหาร กล้ามเนื้อเกร็งกระตุก 3 ตัว (muscle trembling) ว่ายน้ำแบบไร้ทิศทาง (erratic swimming) 4 ตัว นอนตะแคงอยู่ที่พื้น 5 ตัว และลำตัวคดงอ (lordosis) 1 ตัว

ตารางที่ 6 พฤติกรรมของปลาแต่ละกลุ่มระหว่างการทดลอง

Day	Control	Concentration of dichlorvos	
		1,000 ppb	4,000 ppb
1	Normal	Normal	Excited, Stop feeding
2	Normal	Normal	Excited, Stop feeding Erratic swimming Lateral recumbency
3	Normal	Normal	Excited, Stop feeding Lateral recumbency Muscle trembling Erratic swimming Lordosis



ภาพที่ 35 พฤติกรรมปลากลุ่มเลี้ยงในน้ำ 4,000 พีพีบี (1) วันที่ 1 ปลามีการว่ายรวมกลุ่มกัน (2) วันที่ 2 ปลาแสดงอาการว่ายแบบไร้ทิศทาง (3) วันที่ 3 ปลาแสดงอาการนอนตะแคงก้นตู่

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการวิจัย ข้อสรุป และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 อภิปรายผลการวิจัย

##### 5.1.1 ผลคุณภาพน้ำ

ผลการตรวจปริมาณสารไดคลอวอสในน้ำจากการทดลองทั้งสอง พบว่า ปริมาณสารที่ตรวจพบในน้ำจากทางห้องปฏิบัติการมีค่าน้อยกว่าปริมาณสารที่ใส่ลงไปในการคำนวณ ดังเช่นในการทดลองที่ 1 ได้มีการนำสารไดคลอวอสตั้งต้น (Dichlorvos 50% w/v) คิดเป็น 500 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำด้วยความเข้มข้น 1,000 พีพีพี (50 มิลลิกรัมต่อน้ำ 50 ลิตร) แต่ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการพบสารไดคลอวอสในน้ำระหว่าง 520-850 พีพีพี ซึ่งคิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $721.11 \pm 122.11$  พีพีพี และในน้ำเลี้ยงปลาที่ความเข้มข้น 4,000 พีพีพี (200 มิลลิกรัมต่อน้ำ 50 ลิตร และ 320 มิลลิกรัมต่อน้ำ 80 ลิตร) แต่กลับตรวจพบสารไดคลอวอสในน้ำอยู่ระหว่าง 2,730-3,540 พีพีพี ซึ่งคิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $3196.66 \pm 236.65$  พีพีพี

ปริมาณสารที่ตรวจพบได้น้อยอาจเป็นผลจากสองปัจจัยคือ ปัจจัยจากคุณสมบัติกายภาพและคุณสมบัติทางเคมี (physico-chemical properties) เนื่องจากประสิทธิภาพการละลายของไดคลอวอสในน้ำที่มีค่าน้อยเพียงร้อยละ 1 แต่ละลายได้ดีมากในแอลกอฮอล์และตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents) (Department of Pesticide Regulation California Environmental Protection Agency USA, 1996) อีกทั้งยังสามารถระเหยจากน้ำได้ปานกลาง โดยมีค่าคงที่ของเฮนรี (Henry's Law Constant; H) เท่ากับ  $3.92 \times 10^{-5}$  (Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, 2008) และการสลายตัวเองตามธรรมชาติจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยกลุ่ม  $\text{OH}^-$  จากน้ำและสารอินทรีย์ที่เจือปนในน้ำ (Harnly et al., 2005)

ปัจจัยที่สองเกิดจากการการสูญเสียของเนื้อสารระหว่างการตรวจทางห้องปฏิบัติการสังเกตได้จากการทำ sample spike recovery ของตัวอย่างน้ำพบว่ามียุทธศาสตร์ 79-97 และเมื่อคำนวณย้อนกลับพบว่าค่าที่ตรวจได้มีค่าน้อยกว่าค่า sample spike recovery เล็กน้อย จากทั้งสองปัจจัยล้วนส่งผลให้ค่าที่ตรวจพบจากทางห้องปฏิบัติการมีค่าน้อยกว่าค่าจากการคำนวณ



### 5.1.2 ผลการศึกษาการตกค้างสารออร์กาโนฟอสเฟตในแต่ละเนื้อเยื่อ

เมื่อเปรียบเทียบการตกค้างของสารไดคลอวอสใน ตับ วัณตา กล้ามเนื้อและเลือด จากปลาที่เลี้ยงในน้ำที่ความเข้มข้น 1,000 พีพีบี พบว่า ปลาไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ และไม่มีปลาตายระหว่างการเลี้ยง ผลจากทางห้องปฏิบัติการพบว่าสามารถตรวจพบการตกค้างได้ในวัณตาและกล้ามเนื้อในอัตราร้อยละ 2.76 และ 1.71 ตามลำดับเมื่อเทียบกับความเข้มข้นของสารในน้ำ 721.11 พีพีบี ส่วนปลาที่เลี้ยงในน้ำที่ความเข้มข้น 4,000 พีพีบี พบว่าปลามีการว่ายน้ำที่ผิดปกติไว้ทิศทางกล้ามเนื้อเกร็งและกระตุก ตื่นตกใจง่าย ไม่กินอาหาร และไม่พบปลาตายระหว่างการเลี้ยง ผลจากทางห้องปฏิบัติการพบว่าสามารถตรวจพบการตกค้างได้ในตับ วัณตาและกล้ามเนื้อในอัตราร้อยละ 6.79 5.66 และ 5.54 ตามลำดับเมื่อเทียบกับความเข้มข้นของสารในน้ำ 3196.66 พีพีบี

เมื่อสารไดคลอวอสเข้าสู่ร่างกายสัตว์จะส่งผลให้เกิดการเร่งกระบวนการตายของเซลล์ (programmed cell death) เนื่องจากสภาวะความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) การตอบสนองของร่างกายต่อสารกำจัดแมลงโดยกลุ่มของเอนไซม์ cytochrome P450 (CYP) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารโดยกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในเซลล์ (biotransformation) ซึ่งทำให้สารดังกล่าวมีความเป็นพิษลดลง ในทางกลับกันอาจทำให้เกิดสารที่มีความเป็นพิษมากขึ้นได้เช่นกัน (Abass et al., 2012) แต่อย่างไรก็ตามปลาหรือสัตว์อื่นล้วนมีกระบวนการป้องกันตัวเองด้วยสารต้านออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ได้แก่ สารกลูตาไธโอน (glutathione) เพื่อใช้ในการสร้างกลุ่มแอนติออกซิแดนซ์เอนไซม์ (antioxidant enzymes) (Pena-Llopis et al., 2003) การที่ไม่พบสารตกค้างในเลือดและตับ ที่ระดับความเข้มข้นของสารไดคลอวอสในน้ำ 1,000 พีพีบี เนื่องจากในเลือดและตับมีเอนไซม์ glutathione-dependent enzyme ในปริมาณสูงซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงไดคลอวอสให้เป็นสารที่ไม่เป็นพิษคือ desmethyl-dichlorvos และขับออกทางปัสสาวะ (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1997; Ozdikicioglu et al., 2008) จึงเป็นเหตุทำให้ไม่สามารถตรวจพบการตกค้างในเลือดและตับ

ที่ในระดับความเข้มข้นของสารไดคลอวอสในน้ำ 4,000 พีพีบี ไม่พบการตกค้างในเลือดแต่กลับตรวจพบในตับเนื่องจากสองปัจจัย ปัจจัยแรกคือเกิดภาวะการสะสมสารในตับมากกว่าการทำลายในตับ เนื่องจากประสิทธิภาพในการทำลายสารพิษของเอนไซม์ glutathione-dependent enzyme ลดลงเมื่อเจอสารไดคลอวอสในปริมาณสูง (Sharma and Singh, 2012) ดังเช่นการทดลองในปลาแคร์พ (*Cyprinus carpio*) พบว่าสารไดคลอวอสที่เพิ่มขึ้นเป็นผลทำให้ปริมาณกลูตาไธโอนในตับลดลง (Hai et al., 1997) ปัจจัยที่สองเกิดจากสารไดคลอวอสสามารถละลายในไขมันได้ดีกว่าน้ำ เนื่องจากไดคลอวอสมีค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในชั้นน้ำและชั้นออกทานอล (Partition Coefficient) มีค่า 1.16 (Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, 2008)

อีกทั้งตัวยังเป็นแหล่งสะสมของไกลโคเจนและไขมัน (นันทริกา ชันชื้อ, 2553) จึงเป็นเหตุให้ดับพบการตกค้างของสารไดคลอวอสในปริมาณสูง แต่ในการศึกษาก่อนหน้ากล่าวว่ารุ้งตาของมนุษย์ที่ดื่มสารกำจัดแมลงเพื่อทำอหิวากรรมมีการตกค้างของสารมากที่สุด (Moriya and Hashimoto, 2005) ซึ่งขัดแย้งกับการทดลองครั้งนี้ เนื่องจากสารดังกล่าวคือ เมทโทมิว (methomyl) เมทโทมิวเป็นสารกำจัดแมลงกลุ่มคาร์บาเมตและละลายในน้ำได้ดีกว่าในไขมัน โดยมีค่า Partition Coefficient เท่ากับ 0.60 (Adler, 2007) อีกทั้งรุ้งตามีน้ำเป็นองค์ประกอบถึงร้อยละ 99 (Nickerson, 2006) จึงเป็นเหตุให้รุ้งตามีเมทโทมิวตกค้างสูงกว่าตัวอย่างอวัยวะอื่นๆ

#### 5.1.3 ผลการศึกษาอัตราส่วนของการสะสมสารออร์กาโนฟอสเฟตในแต่ละเนื้อเยื่อ

ตัวอย่างจากปลาที่เลี้ยงไว้ในน้ำที่มีสารไดคลอวอสสองระดับความเข้มข้นเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเนื้อของปลาที่เลี้ยงในน้ำที่มีสารไดคลอวอส 4,000 พีพีบี มีการสะสมสารไดคลอวอสสูงกว่าเนื้อของปลาที่เลี้ยงในน้ำที่มีสารไดคลอวอส 1,000 พีพีบี เท่ากับ 14.32 เท่าตัว รุ้งตาของปลาที่เลี้ยงในน้ำที่มีสารไดคลอวอส 4,000 พีพีบี มีการสะสมสารไดคลอวอสสูงกว่ารุ้งตาของปลาที่เลี้ยงในน้ำที่มีสารไดคลอวอส 1,000 พีพีบี เฉลี่ยเท่ากับ 9.08 เท่าตัว ตับของปลาที่เลี้ยงในน้ำที่มีสารไดคลอวอส 4,000 พีพีบี มีการสะสมสารไดคลอวอส 271.07 พีพีบี ในขณะที่ไม่สามารถตรวจพบสารไดคลอวอสจากตับของปลาที่เลี้ยงในน้ำที่มีสารไดคลอวอส 1,000 พีพีบี ซึ่งคิดเป็น 201.07 เท่าตัว ในขณะที่ตัวอย่างเลือดปลาคาร์พที่ไม่สามารถตรวจพบสารไดคลอวอสจากปลาที่เลี้ยงในน้ำที่มีสารไดคลอวอสเข้มข้น 1,000 พีพีบี และ 4,000 พีพีบี

จากผลการทดลองพบว่าดับมีอัตราส่วนการตกค้างที่สูงสุดใน 4 ตัวอย่างอวัยวะ แต่เมื่อพิจารณาผลทางสถิติ กลับพบว่าดับมีค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error) สูงที่สุดใน 4 ตัวอย่างอวัยวะเช่นกัน ทำให้ดับไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสองความเข้มข้นคือ 1,000 และ 4,000 พีพีบี ดังนั้นจึงทำให้รุ้งตาและกล้ามเนื้อมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มความเข้มข้น 1,000 และ 4,000 พีพีบี

#### 5.1.4 ผลการศึกษาอัตราการสลายตัวของสารออร์กาโนฟอสเฟตในแต่ละเนื้อเยื่อของปลาหลังการตาย

จากการทดลองโดยการจำลองลักษณะการตายสองลักษณะคือตายในที่แห้งและตายในน้ำ ล้วนส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณการตกค้างของสารไดคลอวอสในซากปลาที่แตกต่างกัน พบว่าภาพรวมของความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและปริมาณการตกค้างในสามอวัยวะ มีแนวโน้มความสัมพันธ์แบบผกผัน กล่าวคือขณะที่เวลาหลังการตายเพิ่มมากขึ้นปริมาณสารไดคลอวอสในตัวอย่างกลับลดต่ำลง

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเก็บซากทั้งสองวิธีพบว่าโดยรวมแล้วการตกค้างของสารไดคลอวอสจากซากปลาในน้ำมีแนวโน้มลดลงน้อยกว่าซากปลาในถัง กล่าวคือสารไดคลอวอสในปลาที่ตายในน้ำมีการสลายตัวช้ากว่าบนบก เนื่องจากสองประเด็น ประเด็นแรกซากที่ตายในน้ำเน่าช้ากว่าซากบนบก ดังเช่นในมนุษย์ศพที่ตายบนบกมีการสลายตัวไวกว่าศพที่ตายในน้ำถึงสองเท่าตัว (Guharaj and Chandran, 2003) ได้มีการทดลองในซากสุกรพบว่าการสลายตัวบนบกไวกว่าในน้ำถึงสองเท่าตัวเช่นกัน (Ayers, 2010) เมื่อเกิดการเน่าสลายเซลล์ต่างๆในร่างกายได้มีการหลั่ง autolytic enzyme มาเพื่อย่อยสลายเนื้อเยื่อโดยปฏิกิริยาทางเคมี อีกทั้งมีการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียในซากปลาทำให้เกิดการย่อยสลายทางชีวภาพ ซึ่งสารไดคลอวอสสามารถถูกทำให้สลายตัวโดยปฏิกิริยาทางเคมี (Harnly et al., 2005) และสลายตัวทางชีวภาพได้เช่นกัน (Singh et al., 2003) จึงเป็นเหตุให้สารไดคลอวอสจากซากในน้ำซึ่งเน่าสลายช้าคงตัวอยู่ได้นานกว่าซากบนบกซึ่งเน่าสลายไว ประเด็นที่สอง อุณหภูมิส่งผลต่อค่าครึ่งชีวิต จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิอากาศมีค่าระหว่าง 29.1 ถึง 30.8 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิน้ำมีค่าระหว่าง 24.1 ถึง 24.8 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้พบว่า ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสารไดคลอวอสมีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 17.6 ชั่วโมงแต่ ณ อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสกลับมีค่าครึ่งชีวิตเพิ่มขึ้นเป็น 31.4 ชั่วโมง (Suter, 1981) เป็นเหตุให้ซากในน้ำพบการตกค้างสูงกว่าซากบนบก

#### 5.1.5 ผลทางจุลพยาธิวิทยา

##### เหงือก

เหงือกเป็นอวัยวะสำคัญที่ใช้ในการบ่งชี้ที่ดีถึงคุณภาพน้ำ โดยเป็นอวัยวะแรกที่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา (Velmurugan et al., 2009) ในปลาทุกกลุ่มพบการเกิดโครงสร้างแบบปุ่ม (knobbed structure) ซึ่งเกิดจากการโป่งพองของ secondary gill lamellae พยาธิสภาพดังกล่าวเรียกว่า telangiectasis ได้มีการศึกษาในปลานวลจันทร์เทศ (*Cirrhinus mrigala*) ขนาดความยาวลำตัว 6-8 เซนติเมตร ทดลองโดยการให้สารไดคลอวอสในขนาด 910 และ 1,820 พีพีบี พบความผิดปกติที่เหงือกคือมีการโป่งพองของเส้นเลือดซึ่งอาจเรียกว่า aneurysm เช่นกัน (Velmurugan et al., 2009) การตอบสนองดังกล่าวเกิดจากการระคายเคืองซึ่งมีความเป็นไปได้จากหลายสาเหตุเช่น การระคายเคืองจากสารเคมีในน้ำ ระคายเคืองทางกายภาพจากปรสิตรหรือแบคทีเรีย (Department of Water Affairs and Forestry South Africa, 2012) ในการสำรวจปลาคาร์พที่เลี้ยงในบ่อดินจากฟาร์มแห่งหนึ่งพบว่าเหงือกสามารถพบวิการ telangiectasis ได้บ่อยจากการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำ (Raskovic et al., 2010) ดังนั้นภาวะ telangiectasis อาจมีความสอดคล้องกับสารไดคลอวอสรวมกับการระคายเคืองจากสาเหตุอื่นๆ ได้ เช่น ภาวะการติดเชื้อปรสิตภายนอก การใช้สารเคมีเพื่อกำจัดปรสิตภายนอก เป็นต้น



ในการทดลองครั้งนี้พบว่าปริมาณของ chloride cell มีการเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไดคลอวอส ซึ่ง chloride cell เป็นเซลล์ที่มี mitochondria มากหรือเรียกว่า ionocytes ในปลาน้ำเค็ม มีบทบาทในการขับ  $\text{Cl}^-$  ออกจากร่างกาย ทำให้ปลาน้ำเค็มพบ chloride cell มาก ส่วนในปลาน้ำจืด chloride cell มีหน้าที่ควบคุมสมดุลของไอออนต่างๆ กล่าวคือช่วยในการดึง  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Cl}^-$  และ  $\text{Na}^+$  จากน้ำเข้าสู่ร่างกาย หน้าที่ควบคุมสมดุลกรดต่างของร่างกาย จากการทดลองในปลาเรนโบว์เทราต์ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ chloride cell เมื่อร่างกายเกิดภาวะเป็นด่าง (metabolic alkalosis) (Perry, 1997) ในทางตรงกันข้ามการทดลองในปลาหมอ (*Anabas testudineus*) พบว่าสภาพที่เป็นกรด ส่งผลให้ chloride cell ลดจำนวนลง (Saenphet et al., 2009) และหน้าที่ควบคุมการแลกเปลี่ยนแก๊ส ในภาวะปกติ chloride cell จะกระจายอย่างเบาบางในผิวเหงือกส่วน lamella หากปลาอยู่ภายใต้ภาวะที่รบกวนการแลกเปลี่ยนประจุไอออนในน้ำได้แก่ การอยู่ในน้ำที่มีความกระด้างน้อยหรือน้ำที่มีไอออนประจุว่น้อย (soft water) และการอยู่ในน้ำที่มีสารพิษ chloride cell จะมีการเพิ่มจำนวนขึ้นส่งผลให้ lamella หนาตัวขึ้นซึ่งเป็นกลไกในการป้องกันให้เลือดสัมผัสกับน้ำน้อยลง (Perry, 1997)

#### ไต

เกิดภาวะ acute tubular nephrosis คือมีการตายของเซลล์บุผิวท่อไต (tubular epithelial cells) ในปลาที่สัมผัสสารไดคลอวอสและเห็นได้ชัดเจนที่ระดับความเข้มข้นของไดคลอวอสเท่ากับ 4,000 พีพีบี โดยไม่พบความผิดปกติดังกล่าวในปลากลุ่มควบคุม ความผิดปกติดังกล่าวมีความเป็นไปได้เนื่องจากภาวะการขัดขวางหรือรบกวนการไหลเวียนของเลือด ดังเช่นในการทดลองในกลุ่มสุนัขที่ได้รับสารไดคลอวอสเข้ากระแสเลือดจนตายในเวลา 7 นาทีถึง 2 ชั่วโมง พบว่ามีภาวะที่มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณเลือดมาyingเนื้อเยื่อ (hyperemia) และภาวะคั่งเลือดทั่วร่างกาย (generalised congestion) (Snow, 1973) ได้มีการทดลองในหนูโดยให้สารไดคลอวอสในขนาด  $\text{LC}_{50}$  ได้มีการชันสูตรซากในกลุ่มหนูที่ตายพบว่าไตมีภาวะการคั่งเลือดเช่นกัน (Tierfarm and Sissel, 1969)

#### ตับ

ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีไดคลอวอส 1,000 พีพีบีพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่ในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีไดคลอวอส 4,000 พีพีบีพบการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนคือเกิด fatty change หรือ vacuolar degeneration สัมพันธ์กับการทดลองก่อนหน้าในปลานวลจันทร์เทศพบว่าเพียง 980 พีพีบี สามารถพบอาการดังกล่าวได้ (Velmurugan et al., 2009) ซึ่งการทดลองครั้งนี้ไม่พบที่กลุ่มความเข้มข้น 1,000 พีพีบีผลการทดลองที่แตกต่างกันอาจเกิดได้จาก ความไวต่อการเป็นพิษของปลาแต่ละชนิดแต่ละขนาดมีความแตกต่างกัน ระยะเวลาในการให้สารเคมีแตกต่างกัน โดยที่การทดลองของ Velmurugan ให้สารเคมีในขนาดดังกล่าวเป็นเวลา 20 วัน ในขณะที่การทดลองครั้งนี้มี

ระยะเวลาสัมผัสสารน้อยกว่าโดยให้เพียง 3 วัน มีการรายงานในปลาฆ่าตาย (*Brachydanio rerio*) ที่สัมผัสสาร Dimethoate 500<sup>®</sup> ซึ่งเป็นสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตในขนาด LD<sub>50</sub> (12.5 พีพีพี) พบว่า เซลล์ตับมีขนาดของ vacuole เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน (Rodrigues and Fanta, 1998)

กล้ามเนื้อและตาของทั้งสองกลุ่มการทดลองไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพที่ชัดเจน

## 5.2 ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

### 5.2.1 การเลือกอวัยวะตัวอย่างที่เหมาะสมในการใช้ตรวจสอบสารกำจัดแมลงตกค้างในน้ำ

จากการทดลองพบว่าอวัยวะที่มีการตกค้างของสารกำจัดแมลงมี 3 ตัวอย่างอวัยวะได้แก่ ตับ วัจนตาและกล้ามเนื้อ โดยสิ่งที่นำมาพิจารณาในการเก็บตัวอย่างอวัยวะได้แก่ การมีชีวิตของปลา ระดับความเข้มข้นของสารเคมีในน้ำ ชนิดของสารเคมี ระยะเวลาการตาย รูปแบบการตาย ปริมาณการเก็บตัวอย่างและความบริสุทธิ์ของตัวอย่าง

ในปลาที่ยังคงมีชีวิตตัวอย่างที่สามารถเก็บเพื่อตรวจสอบสารกำจัดแมลงตกค้างได้แก่ เลือดและวัจนตา แต่จากการทดลองพบว่าเลือดไม่พบการตกค้างของสารไดคลอวอสทั้งในที่มีความเข้มข้นต่ำและในความเข้มข้นสูง จึงเป็นเหตุให้วัจนตาเป็นเพียงตัวอย่างเดียวที่เหมาะสมในการตรวจสอบสารกำจัดแมลงตกค้างในปลาที่มีชีวิต

ระดับความเข้มข้นของสารเคมีในน้ำจากการทดลองพบว่าวัจนตาและกล้ามเนื้อสามารถตรวจพบสารไดคลอวอสได้ทั้งสองระดับความเข้มข้น (1,000 และ 4,000 พีพีพี) ในขณะที่ตับตรวจพบการตกค้างได้เพียงที่ระดับความเข้มข้น 4,000 พีพีพีเท่านั้น และตรวจไม่พบการปนเปื้อนในเลือดจากทั้งสองระดับความเข้มข้น

ชนิดของสารเคมีเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของสารแต่ละชนิดส่งผลต่อการตกค้าง โดยประเด็นที่หนึ่งคือสารแต่ละชนิดมีความสามารถในการละลายน้ำแตกต่างกันทำให้ความเข้มข้นของสารในน้ำแตกต่างกัน ประเด็นที่สองคือสารแต่ละชนิดมีการสลายตัวแตกต่างกัน ทั้งคุณสมบัติการระเหย การออกซิไดซ์ การสลายโดยแบคทีเรีย ค่าครึ่งชีวิต อุณหภูมิและสภาพกรดต่างล้วนมีผลต่อปริมาณสารในน้ำ ดังนั้นในการทดลองจึงต้องมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำและปรับความเข้มข้นของสารไดคลอวอสเป็นประจำทุกวันตลอดการทดลอง และควรบันทึกคุณภาพน้ำขณะทดลองเพื่อใช้ในการอ้างอิงกับงานทดลองอื่น ประเด็นที่สามคือความสามารถในการละลายได้ในไขมัน เนื่องจากเนื้อเยื่อของแต่ละอวัยวะมีส่วนไขมันที่ต่างกัน เห็นได้จากการทดลองพบว่าสารไดคลอวอสมีการตกค้างที่ดับในปริมาณสูง แต่กลับพบน้อยในวัจนตา ดังนั้นหากต้องการศึกษาการตกค้างของ

สารเคมีชนิดอื่นควรมีการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของสารนั้นก่อนเพื่อใช้เป็นตัวกำหนดอวัยวะเป้าหมายที่ใช้ในการศึกษา

ระยะเวลาการตายมีผลต่อปริมาณสารกำจัดแมลงตกค้างและการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ กล่าวคือ ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้สารไดคลอวอสในระดับสูงเพื่อให้เกิดการตกค้างในอวัยวะในระดับสูง พบว่ามีเพียงตัวอย่างตับและไตที่ตรวจพบการตกค้างได้นานถึง 72 ชั่วโมงหลังตาย ในขณะที่กล้ามเนื้อตรวจพบเพียง 24 และ 48 ชั่วโมงหลังตายจากซากปลาในที่แห้งและในน้ำ ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพมีผลต่อการเลือกอวัยวะ ดังในการทดลองพบว่าเมื่อปลาตายอวัยวะภายในช่องท้องเริ่มเกิดการย่อยสลายโดยแบคทีเรียจนทำให้อวัยวะภายในได้แก่ ตับ ม้าม ไตและลำไส้ มีลักษณะอ่อนนุ่มขึ้นจนกลายเป็นของเหลว ทำให้ยากต่อการแยกซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้การใช้ตับมีค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานสูง ในขณะที่ไตและกล้ามเนื้อยังคงความบริสุทธิ์ไม่เกิดการปนเปื้อนเนื้อเยื่ออื่นทำให้มีค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานต่ำ

รูปแบบการตายมีผลต่อเวลาการสลายตัวของสารไดคลอวอสในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน โดยอวัยวะจากซากปลาที่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างอัตราการสลายตัวในที่แห้งและในน้ำ ได้แก่ตับและไต จากการทดลองพบว่าตับจากซากปลาในน้ำมีอัตราการสลายตัวที่ช้ากว่าที่แห้ง ในทางกลับกันไตจากซากปลาในที่แห้งมีอัตราการสลายตัวที่ช้ากว่าในน้ำ

ปริมาณการเก็บตัวอย่างมีผลในการเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) โดยหากเปรียบเทียบตัวอย่างที่มีการตกค้างเท่ากัน ตัวอย่างที่มีปริมาณมากเมื่อเข้าสู่กระบวนการสกัดตัวอย่างของเหลวที่ได้ก่อนฉีดเข้าสู่เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีจะมีความเข้มข้นมากกว่าตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย ดังนั้นในการนำไปใช้จริงทางคลินิกเพื่อตรวจหาการตกค้างของสารใดๆ ควรเก็บตัวอย่างในปริมาณที่มากเท่าที่เป็นไปได้ กล่าวคือ ในปลาขนาดเล็กการเก็บอวัยวะใดอวัยวะหนึ่งให้ได้ปริมาณมากเป็นสิ่งที่ไม่ได้ยาก ดังนั้นอาจต้องพิจารณาวิธีการเก็บตัวอย่างใหม่ เช่น เก็บจากปลาหลายตัวรวมกัน เป็นต้น

ความบริสุทธิ์ของตัวอย่างมีผลในการสกัดสารและการทำความสะอาดตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ หากตัวอย่างเกิดการปนเปื้อนเนื้อเยื่อหลายชนิดหรือมีไขมันปนเปื้อนจึงมีความจำเป็นต้องเพิ่มขั้นตอนในการทำให้ตัวอย่างเกิดเป็นสารเนื้อเดียวกัน ขั้นตอนการกรองและขั้นตอนใช้สารเคมีในการกำจัดสารที่รบกวนการวิเคราะห์ เช่น ไขมัน ไฮโดรคาร์บอน น้ำตาล เป็นต้น หากตัวอย่างมีความบริสุทธิ์สูงจะช่วยลดขั้นตอนดังกล่าวส่งผลให้ระยะเวลาในการวิเคราะห์น้อยลง

### 5.2.2 การนำวันตามาใช้ตรวจสารกำจัดแมลงตกค้างในน้ำ

จากการศึกษาพบว่าในกรณีเกิดปัญหาพิษจากสารกำจัดแมลงกรณีที่ปลามีชีวิต ตัวอย่างที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงตกค้างมีเพียงตัวอย่างเดียวคือ วันตา กรณีปลาตายไม่ว่าจะ

เป็นการตายในลักษณะไตวันตาสามารถวิเคราะห์ได้ภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมงหลังการตาย ปริมาณการเก็บตัวอย่างอย่างน้อยควรเก็บตั้งแต่ 0.1 มิลลิลิตร ขึ้นไปและเก็บที่ตู้ทำความเย็นที่มีอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิสูงสามารถเร่งอัตราการสลายตัวของสารกำจัดแมลงได้ จากนั้นควรนำไปวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการภายในระยะเวลา 7 วัน ในกรณีปลาตายในที่แห่งการเก็บวันตาอาจทำได้ลำบาก ดังนั้นควรเก็บลูกตาทั้งหมดไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารกำจัดแมลงทางห้องปฏิบัติการ

เนื่องจากวันตาเป็นตัวอย่างที่สะอาด เน่าสลายช้า มีความบริสุทธิ์สูงและสามารถตรวจพบการตกค้างของสารกำจัดแมลงได้นาน ถึงแม้ว่าในการศึกษานี้มีค่าการตกค้างน้อยกว่าดับ แต่ในกรณีที่อวัยวะเกิดการสลายตัวไม่สามารถแยกตัวมาได้ วันตาจึงเป็นตัวอย่างที่ควรใช้ในการตรวจหาการตกค้างของสารกำจัดแมลง

จากงานวิจัยขึ้นนี้พบว่าการใช้วันตาพร้อมกับแก๊สโครมาโทกราฟีสามารถระบุได้ถึงชนิดและปริมาณของสารออร์กาโนฟอสเฟตได้เป็นอย่างดี อีกทั้งพบว่าปริมาณสารออร์กาโนฟอสเฟตในวันตาแปรผันตามปริมาณสารออร์กาโนฟอสเฟตในน้ำ ดังนั้นการพัฒนาเพื่อใช้วันตาเป็นดัชนีตรวจวัดระดับการตกค้างของสารออร์กาโนฟอสเฟตในสิ่งแวดล้อมจึงควรมีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นของสารออร์กาโนฟอสเฟตในน้ำและในวันตาโดยละเอียด เพื่อให้สามารถกำหนดรายละเอียดของระดับสารออร์กาโนฟอสเฟตในวันตาที่สามารถอ้างอิงถึงปริมาณการปนเปื้อนในน้ำได้ การศึกษาดังกล่าวอาจนำไปใช้กำหนดมาตรฐานการปนเปื้อนของสารออร์กาโนฟอสเฟตในสิ่งมีชีวิตในน้ำและในแหล่งน้ำได้ และอาจนำไปประยุกต์ใช้เพื่อกำหนดนโยบายสาธารณะด้านสิ่งแวดล้อมทางน้ำได้



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

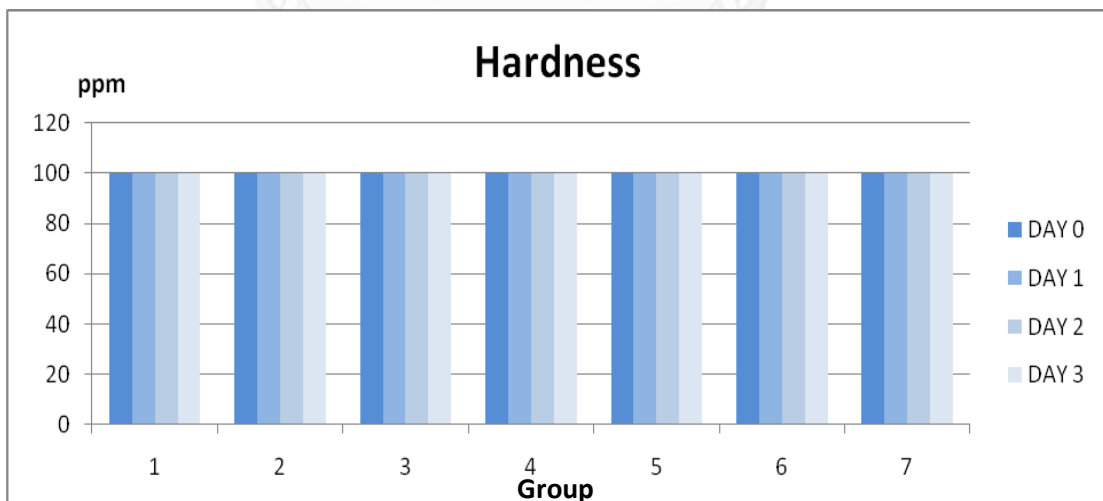
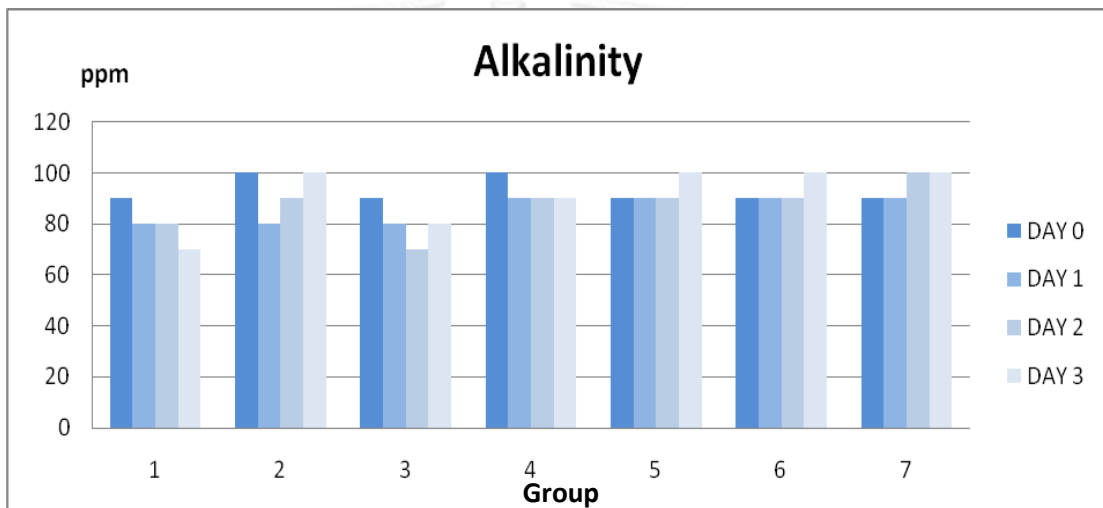
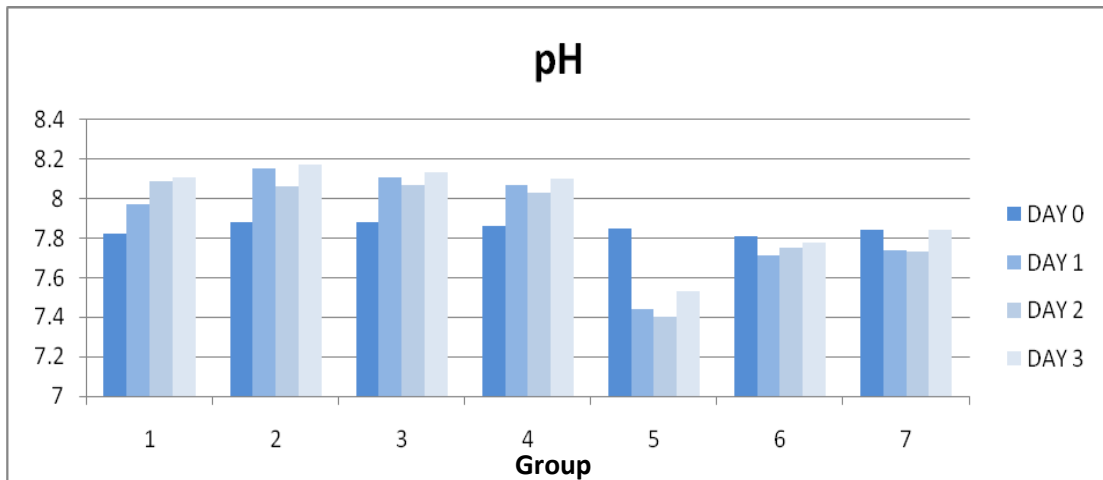
ภาคผนวก ก  
ตารางและแผนภูมิแสดงคุณภาพน้ำในการทดลอง

Day	Group	Concentration	pH	Alkalinity	Hardness	Ammonia	Nitrite	Temp
0	1	control	7.82	90	100	0	0	24.1
	2	1 ppm	7.88	100	100	0	0	24.1
	3	1 ppm	7.88	90	100	0	0	24.1
	4	1 ppm	7.86	100	100	0	0	24.1
	5	4 ppm	7.85	90	100	0	0	24.1
	6	4 ppm	7.81	90	100	0	0	24.1
	7	4 ppm	7.84	90	100	0	0	24.1

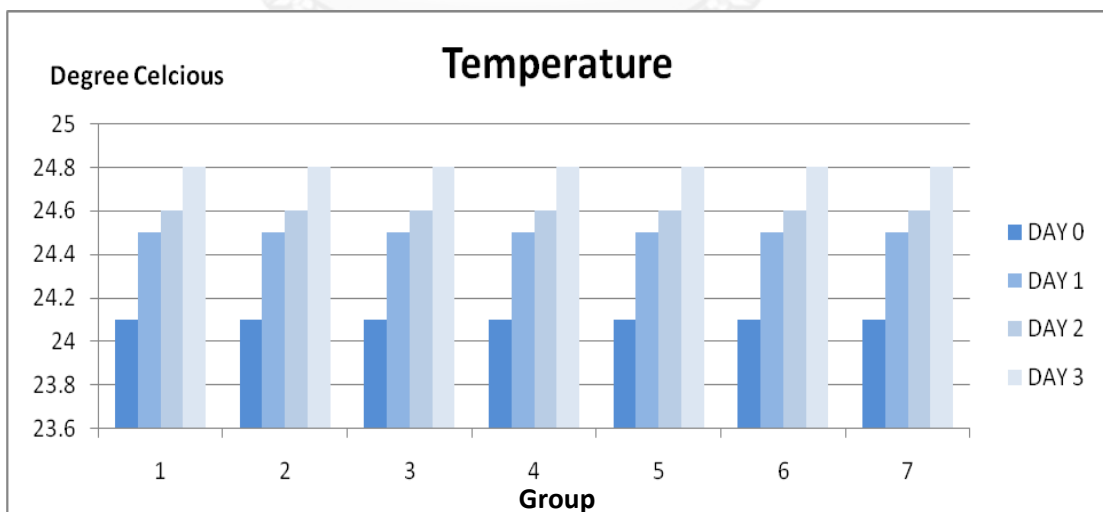
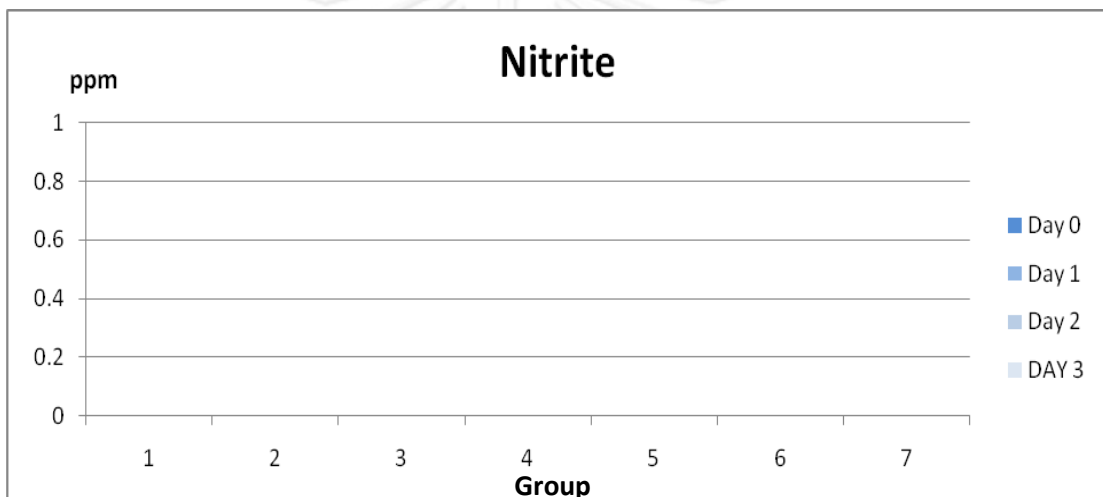
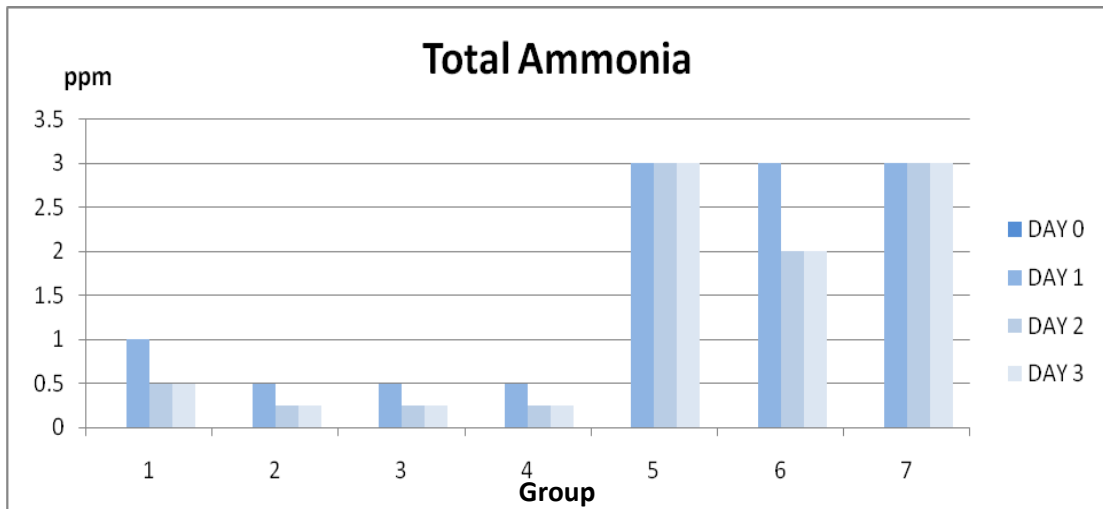
Day	Group	Concentration	pH	Alkalinity	Hardness	Ammonia	Nitrite	Temp
1	1	control	7.97	80	100	1	0	24.5
	2	1 ppm	8.15	80	100	0.5	0	24.5
	3	1 ppm	8.11	80	100	0.5	0	24.5
	4	1 ppm	8.07	90	100	0.5	0	24.5
	5	4 ppm	7.44	90	100	3	0	24.5
	6	4 ppm	7.71	90	100	3	0	24.5
	7	4 ppm	7.74	90	100	3	0	24.5

Day	Group	Concentration	pH	Alkalinity	Hardness	Ammonia	Nitrite	Temp
2	1	control	8.09	80	100	0.5	0	24.6
	2	1 ppm	8.06	90	100	0.25	0	24.6
	3	1 ppm	8.07	70	100	0.25	0	24.6
	4	1 ppm	8.03	90	100	0.25	0	24.6
	5	4 ppm	7.40	90	100	3	0	24.6
	6	4 ppm	7.75	90	100	2	0	24.6
	7	4 ppm	7.73	100	100	3	0	24.6

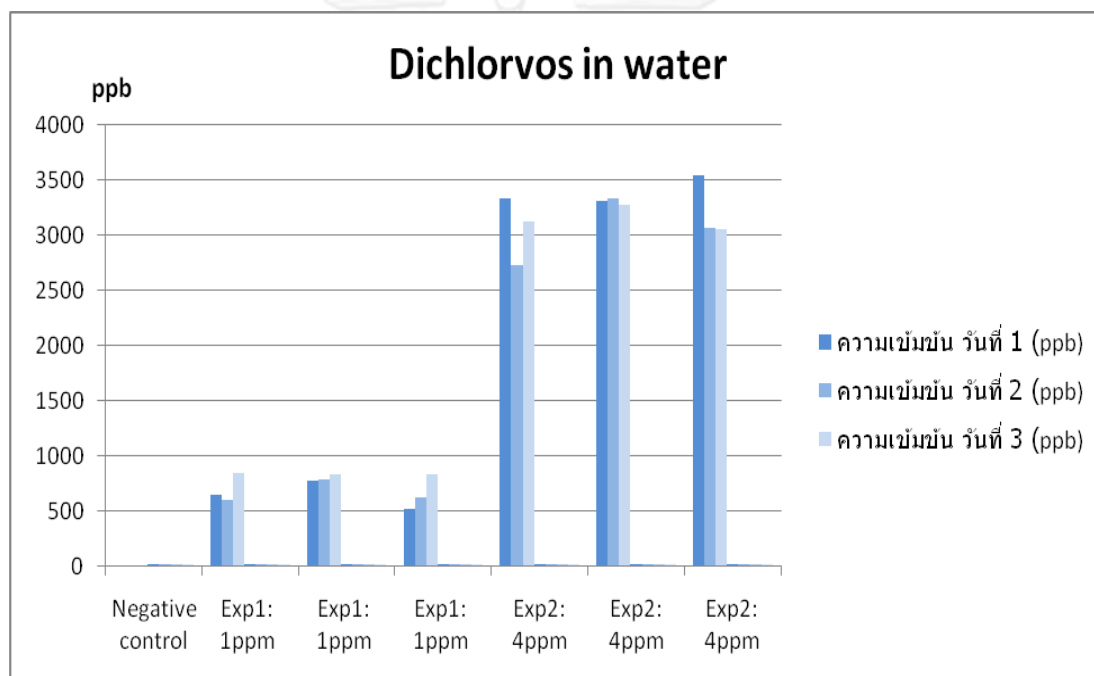
Day	Group	Concentration	pH	Alkalinity	Hardness	Ammonia	Nitrite	Temp
3	1	control	8.11	70	100	0.5	0	24.8
	2	1 ppm	8.17	100	100	0.25	0	24.8
	3	1 ppm	8.13	80	100	0.25	0	24.8
	4	1 ppm	8.10	90	100	0.25	0	24.8
	5	4 ppm	7.53	100	100	3	0	24.8
	6	4 ppm	7.78	100	100	2	0	24.8
	7	4 ppm	7.84	100	100	3	0	24.8







Group	Amount of dichlorvos in water (ppb)				
	expected	Day 1	Day 2	Day 3	Average
Negative control	0	0	0	0	0.00
Group: 1ppm	1000	650	600	850	700.00
Group: 1ppm	1000	780	790	840	803.33
Group: 1ppm	1000	520	630	830	660.00
Group: 4ppm	4000	3330	2730	3130	3063.33
Group: 4ppm	4000	3310	3330	3280	3306.67
Group: 4ppm	4000	3540	3070	3050	3220.00



**ภาคผนวก ข**  
**ตารางแสดงจำนวนปลา ความยาว น้ำหนักและพฤติกรรมปลาขณะทำการทดลอง**

Day	Group	Concentration	Standard length (cm)	Body Weight (g)	Behavior
0	1	control	10.32	30.75	Normal, Appetite
	2	1 ppm	10.00	29.00	Normal, Appetite
	3	1 ppm	10.60	34.50	Normal, Appetite
	4	1 ppm	10.35	33.50	Normal, Appetite
	5	4 ppm	10.20	29.04	Normal, Appetite
	6	4 ppm	10.06	28.69	Normal, Appetite
	7	4 ppm	10.55	31.94	Normal, Appetite
1	1	control	10.32	30.75	Normal, Appetite
	2	1 ppm	10.00	29.00	Normal, Appetite
	3	1 ppm	10.60	34.50	Normal, Appetite
	4	1 ppm	10.35	33.50	Normal, Appetite
	5	4 ppm	10.20	29.04	Excite, Appetite
	6	4 ppm	10.06	28.69	Excite, Anorexia
	7	4 ppm	10.55	31.94	Excite, Anorexia
2	1	control	10.32	30.75	Normal, Appetite
	2	1 ppm	10.00	29.00	Normal, Appetite
	3	1 ppm	10.60	34.50	Normal, Appetite
	4	1 ppm	10.35	33.50	Normal, Appetite
	5	4 ppm	10.20	29.04	Excite, Anorexia
	6	4 ppm	10.06	28.69	Excite, Anorexia
	7	4 ppm	10.55	31.94	Excite, Anorexia (Lateral recumbency = 1 fish) (Erratic swimming = 1 fish)

Day	Group	Concentration	Standard length (cm)	Body Weight (g)	Behavior
3	1	control	10.32	30.75	Normal, Appetite
	2	1 ppm	10.00	29.00	Normal, Appetite
	3	1 ppm	10.60	34.50	Normal, Appetite
	4	1 ppm	10.35	33.50	Normal, Appetite
	5	4 ppm	10.20	29.04	Excite, Anorexia (Muscle cramp = 1 fish) (Erratic swimming = 2 fish)
6	4 ppm	10.06	28.69	Excite, Anorexia (Lateral recumbency = 2 fish) (Erratic swimming = 1 fish) (Muscle cramp = 2 fish)	
				Excite, Anorexia (Lateral recumbency = 3 fish) (Erratic swimming = 1 fish) (Lordosis = 1 fish)	
7	4 ppm	10.55	31.94	Excite, Anorexia (Lateral recumbency = 3 fish) (Erratic swimming = 1 fish) (Lordosis = 1 fish)	

## ภาคผนวก ค

## ตารางแสดงข้อมูลการตรวจหาปริมาณสารไดคลอวอสทางห้องปฏิบัติการ

Sample: น้ำเลี้ยงปลา

Method: GC-FPD

Name	concentration	result
	Sample blank spike 1 ppm (recovery)	0.79
	Sample blank spike 4 ppm (recovery)	3.87
Control Day1	Negative Control	0.00
A1 Day1	1 ppm	0.65
A2 Day1	1 ppm	0.78
A3 Day1	1 ppm	0.52
B1 Day1	4 ppm	3.33
B2 Day1	4 ppm	3.31
B3 Day1	4 ppm	3.54
Control Day2	Negative Control	0.00
A1 Day2	1 ppm	0.60
A2 Day2	1 ppm	0.79
A3 Day2	1 ppm	0.63
B1 Day2	4 ppm	2.73
B2 Day2	4 ppm	3.33
B3 Day2	4 ppm	3.07

Name	concentration	result
Control Day3	Negative Control	0.00
A1 Day3	1 ppm	0.85
A2 Day3	1 ppm	0.84
A3 Day3	1 ppm	0.83
B1 Day3	4 ppm	3.13
B2 Day3	4 ppm	3.28
B3 Day3	4 ppm	3.05

Sample: เนื้อปลา

Method: GC-MS-MS

Time after death	group	sample name	results
	recovery 1	Sample blank spike 10 ppb	7.397
	recovery 2	Sample blank spike 20 ppb	14.560
ชั่วโมงที่ 0	Negative Control	0	0.000
ชั่วโมงที่ 0	Negative Control	Douplcation 1 spike 15 ppb	11.470
ชั่วโมงที่ 0	Negative Control	Douplcation 2 spike 15 ppb	10.200
ชั่วโมงที่ 0	1 ppm		10.530
ชั่วโมงที่ 0	1 ppm		26.560
ชั่วโมงที่ 0	1 ppm		9.106
ชั่วโมงที่ 0	4 ppm		216.000
ชั่วโมงที่ 0	4 ppm		120.700

Time after death	group	sample name	results
ชั่วโมงที่ 0	4 ppm		194.400
ชั่วโมงที่ 12 (ที่แห้ง)	4 ppm		2.202
ชั่วโมงที่ 12 (ที่แห้ง)	4 ppm		5.627
ชั่วโมงที่ 12 (ที่แห้ง)	4 ppm		21.400
ชั่วโมงที่ 12 (ในน้ำ)	4 ppm		17.330
ชั่วโมงที่ 12 (ในน้ำ)	4 ppm		ND
ชั่วโมงที่ 12 (ในน้ำ)	4 ppm		15.330
ชั่วโมงที่ 24 (ที่แห้ง)	4 ppm		5.139
ชั่วโมงที่ 24 (ที่แห้ง)	4 ppm		4.948
ชั่วโมงที่ 24 (ที่แห้ง)	4 ppm		6.289
ชั่วโมงที่ 24 (ในน้ำ)	4 ppm		8.530
ชั่วโมงที่ 24 (ในน้ำ)	4 ppm		24.180
ชั่วโมงที่ 24 (ในน้ำ)	4 ppm		6.159
ชั่วโมงที่ 48 (ที่แห้ง)	4 ppm		4.873
ชั่วโมงที่ 48 (ที่แห้ง)	4 ppm		ND
ชั่วโมงที่ 48 (ที่แห้ง)	4 ppm		ND
ชั่วโมงที่ 48 (ในน้ำ)	4 ppm		9.167
ชั่วโมงที่ 48 (ในน้ำ)	4 ppm		7.099
ชั่วโมงที่ 48 (ในน้ำ)	4 ppm		3.471
ชั่วโมงที่ 72 (ที่แห้ง)	4 ppm		ND
ชั่วโมงที่ 72 (ที่แห้ง)	4 ppm		ND
ชั่วโมงที่ 72 (ที่แห้ง)	4 ppm		ND

Time after death	group	sample name	results
ชั่วโมงที่ 72 (ในน้ำ)	4 ppm		2.487
ชั่วโมงที่ 72 (ในน้ำ)	4 ppm		ND
ชั่วโมงที่ 72 (ในน้ำ)	4 ppm		ND

Sample: ตับ

Method: GC-MS-MS

Time after death	group	sample name	results
	recovery 1	Sample blank spike 10 ppb	6.526
	recovery 2	Sample blank spike 20 ppb	16.480
	recovery 3	Sample blank spike 1000 ppb	757.100
ชั่วโมงที่ 0	Negative Control		0.000
ชั่วโมงที่ 0	Negative Control	Douplcation 1 spike 30 ppb	24.490
ชั่วโมงที่ 0	Negative Control	Douplcation 2 spike 30 ppb	22.250
ชั่วโมงที่ 0	1 ppm		0.000
ชั่วโมงที่ 0	1 ppm		0.000
ชั่วโมงที่ 0	1 ppm		0.000
ชั่วโมงที่ 0	4 ppm		227.500
ชั่วโมงที่ 0	4 ppm		548.300
ชั่วโมงที่ 0	4 ppm		37.410
ชั่วโมงที่ 12 (ที่แห้ง)	4 ppm		5.854
ชั่วโมงที่ 12 (ที่แห้ง)	4 ppm		18.810



Time after death	group	sample name	results
ชั่วโมงที่ 12 (ที่แห้ง)	4 ppm		847.100
ชั่วโมงที่ 12 (ในน้ำ)	4 ppm		56.150
ชั่วโมงที่ 12 (ในน้ำ)	4 ppm		529.100
ชั่วโมงที่ 12 (ในน้ำ)	4 ppm		2.984
ชั่วโมงที่ 24 (ที่แห้ง)	4 ppm		11.310
ชั่วโมงที่ 24 (ที่แห้ง)	4 ppm		264.100
ชั่วโมงที่ 24 (ที่แห้ง)	4 ppm		450.400
ชั่วโมงที่ 24 (ในน้ำ)	4 ppm		259.700
ชั่วโมงที่ 24 (ในน้ำ)	4 ppm		910.900
ชั่วโมงที่ 24 (ในน้ำ)	4 ppm		42.180
ชั่วโมงที่ 48 (ที่แห้ง)	4 ppm		100.800
ชั่วโมงที่ 48 (ที่แห้ง)	4 ppm		0.000
ชั่วโมงที่ 48 (ที่แห้ง)	4 ppm		3.386
ชั่วโมงที่ 48 (ในน้ำ)	4 ppm		449.100
ชั่วโมงที่ 48 (ในน้ำ)	4 ppm		248.900
ชั่วโมงที่ 48 (ในน้ำ)	4 ppm		205.300
ชั่วโมงที่ 72 (ที่แห้ง)	4 ppm		27.000
ชั่วโมงที่ 72 (ที่แห้ง)	4 ppm		29.410
ชั่วโมงที่ 72 (ที่แห้ง)	4 ppm		5.030
ชั่วโมงที่ 72 (ในน้ำ)	4 ppm		66.780
ชั่วโมงที่ 72 (ในน้ำ)	4 ppm		0.000
ชั่วโมงที่ 72 (ในน้ำ)	4 ppm		13.530

Sample: ฐันตา

Method: GC-MS-MS

Time after death	group	sample name	results
	recovery 1	Sample blank spike 30 ppb	23.200
	recovery 2	Sample blank spike 50 ppb	42.110
	recovery 3	Sample blank spike 1000 ppb	849.30
ชั่วโมงที่ 0	Negative Control		0.000
ชั่วโมงที่ 0	Negative Control	Douplcation 1 spike 60 ppb	55.960
ชั่วโมงที่ 0	Negative Control	Douplcation 2 spike 60ppb	60.350
ชั่วโมงที่ 0	1 ppm		7.732
ชั่วโมงที่ 0	1 ppm		42.160
ชั่วโมงที่ 0	1 ppm		17.610
ชั่วโมงที่ 0	4 ppm		170.000
ชั่วโมงที่ 0	4 ppm		194.000
ชั่วโมงที่ 0	4 ppm		178.800
ชั่วโมงที่ 12 (ที่แห้ง)	4 ppm		25.400
ชั่วโมงที่ 12 (ที่แห้ง)	4 ppm		26.220
ชั่วโมงที่ 12 (ที่แห้ง)	4 ppm		14.300
ชั่วโมงที่ 12 (ในน้ำ)	4 ppm		30.160
ชั่วโมงที่ 12 (ในน้ำ)	4 ppm		4.975
ชั่วโมงที่ 12 (ในน้ำ)	4 ppm		5.252
ชั่วโมงที่ 24 (ที่แห้ง)	4 ppm		21.110

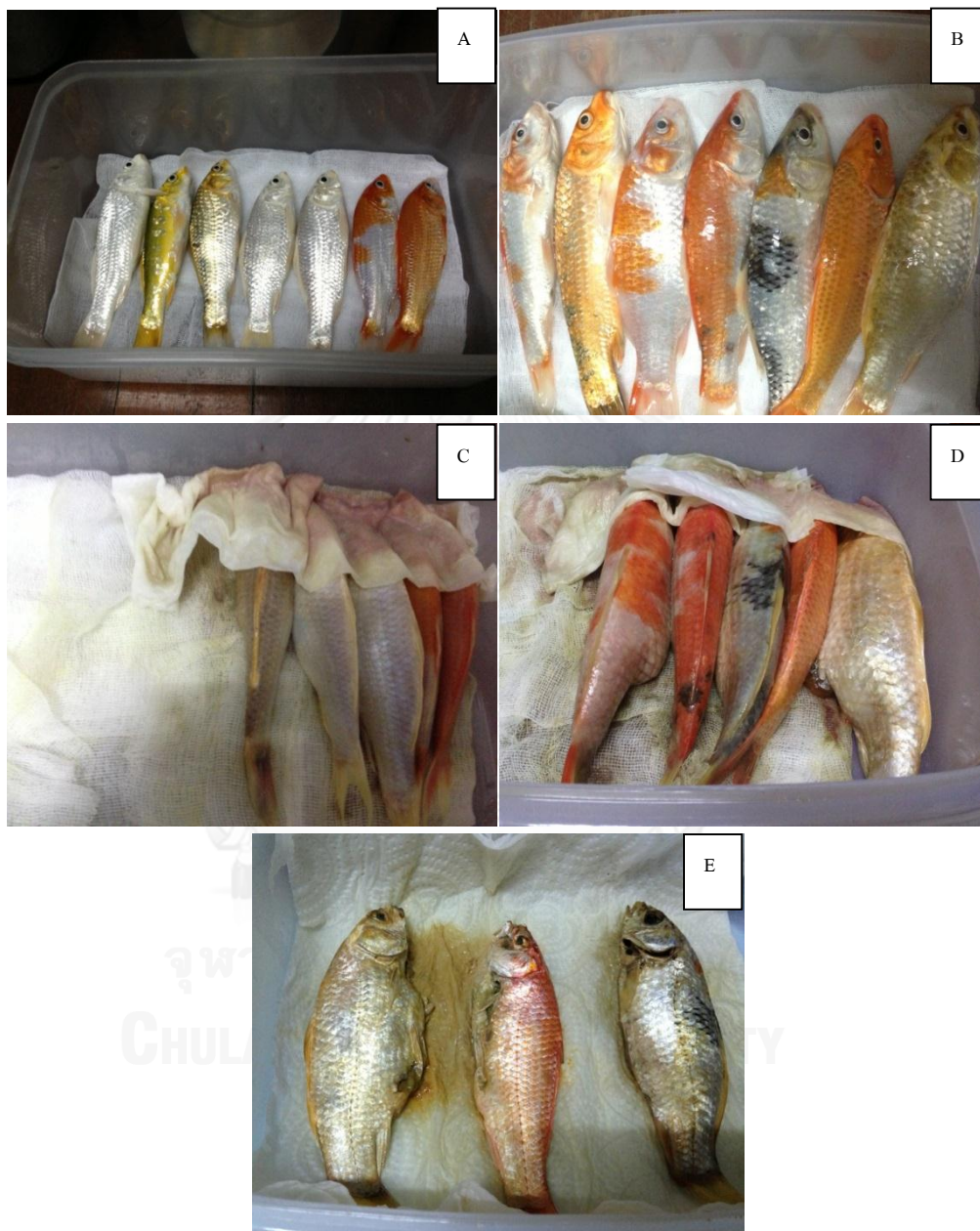
Time after death	group	sample name	results
ชั่วโมงที่ 24 (ที่แห้ง)	4 ppm		25.810
ชั่วโมงที่ 24 (ที่แห้ง)	4 ppm		11.170
ชั่วโมงที่ 24 (ในน้ำ)	4 ppm		16.840
ชั่วโมงที่ 24 (ในน้ำ)	4 ppm		29.190
ชั่วโมงที่ 24 (ในน้ำ)	4 ppm		18.690
ชั่วโมงที่ 48 (ที่แห้ง)	4 ppm		73.540
ชั่วโมงที่ 48 (ที่แห้ง)	4 ppm		9.143
ชั่วโมงที่ 48 (ที่แห้ง)	4 ppm		6.681
ชั่วโมงที่ 48 (ในน้ำ)	4 ppm		7.464
ชั่วโมงที่ 48 (ในน้ำ)	4 ppm		10.430
ชั่วโมงที่ 48 (ในน้ำ)	4 ppm		28.440
ชั่วโมงที่ 72 (ที่แห้ง)	4 ppm		7.579
ชั่วโมงที่ 72 (ที่แห้ง)	4 ppm		27.160
ชั่วโมงที่ 72 (ที่แห้ง)	4 ppm		19.930
ชั่วโมงที่ 72 (ในน้ำ)	4 ppm		18.930
ชั่วโมงที่ 72 (ในน้ำ)	4 ppm		0.000
ชั่วโมงที่ 72 (ในน้ำ)	4 ppm		25.540

Sample: เลือด

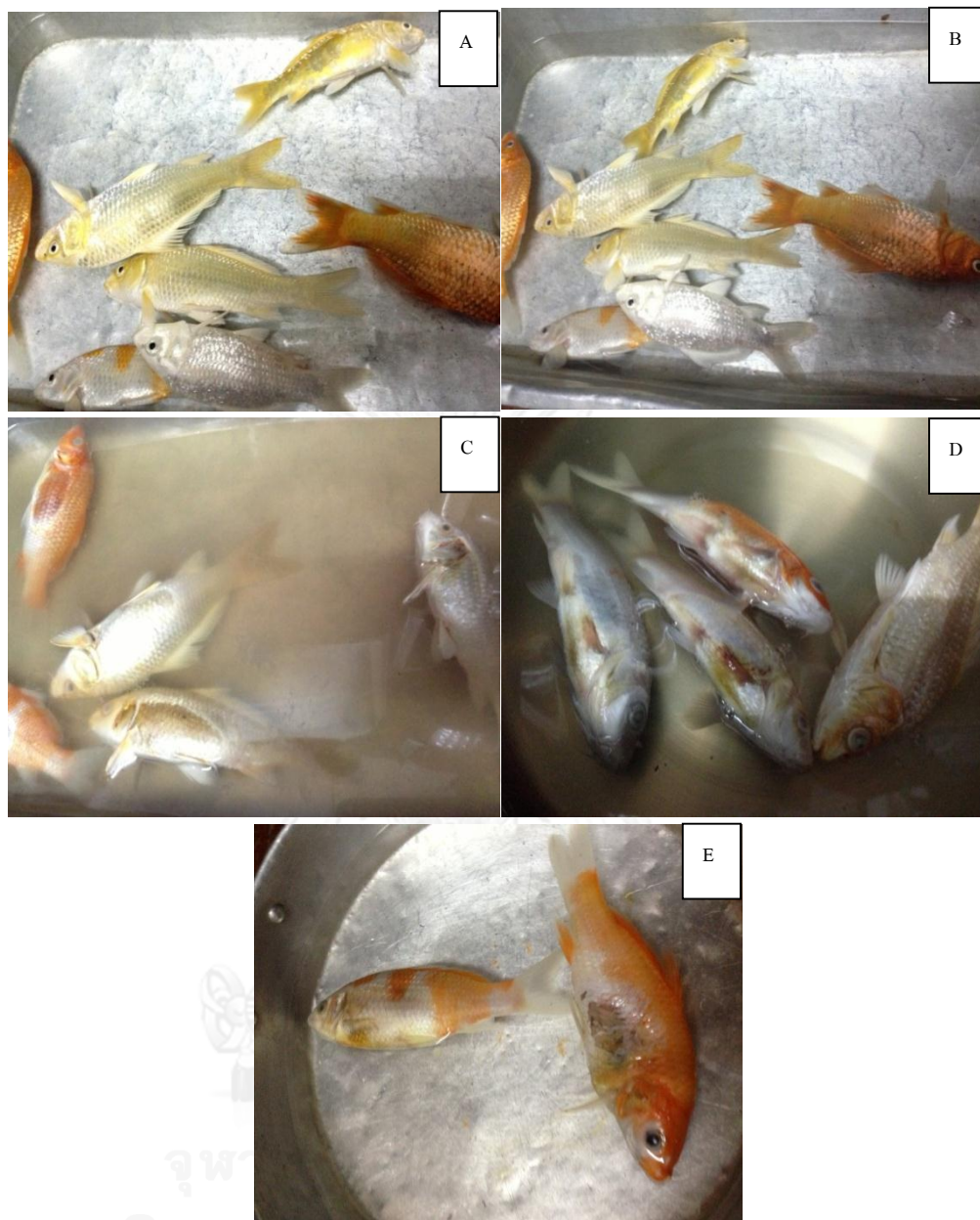
Method: GC-MS-MS

Time after death	group	sample name	results
	recovery 1	Sample blank spike 10 ppb	9.122
	recovery 2	Sample blank spike 20 ppb	15.570
ชั่วโมงที่ 0	Negative Control		0.000
ชั่วโมงที่ 0	Negative Control	Douplication 1 spike 40 ppb	36.264
ชั่วโมงที่ 0	Negative Control	Douplication 2 spike 40 ppb	33.490
ชั่วโมงที่ 0	1 ppm		0.000
ชั่วโมงที่ 0	1 ppm		0.000
ชั่วโมงที่ 0	1 ppm		0.000
ชั่วโมงที่ 0	4 ppm		0.000
ชั่วโมงที่ 0	4 ppm		0.000
ชั่วโมงที่ 0	4 ppm		0.000

ภาคผนวก ง  
ภาพลักษณะปลาในแต่ละชั่วโมงหลังตาย



ภาพซากปลาในที่แห้ง (A) ชั่วโมงที่ 6 หลังตาย (B) ชั่วโมงที่ 12 หลังตาย (C) ชั่วโมงที่ 24 หลังตาย (D) ชั่วโมงที่ 48 หลังตาย และ (E) ชั่วโมงที่ 72 หลังตาย



ภาพซากปลาในน้ำ (A) ชั่วโมงที่ 6 หลังตาย (B) ชั่วโมงที่ 12 หลังตาย (C) ชั่วโมงที่ 24 หลังตาย (D) ชั่วโมงที่ 48 หลังตาย และ (E) ชั่วโมงที่ 72 หลังตาย





ภาพซากปลาชั่วโมงที่ 12 (บน) ซากปลาในที่แห้ง (ล่าง) ซากปลาในน้ำ



ภาพลักษณะตาของปลาชั่วโมงที่ 48 หลังตาย (A) ซากในที่แห้ง (B) ซากในน้ำ

### รายการอ้างอิง

- Abass K, Lämsä V, Reponen P, Küblbeck J, Honkakoski P, Mattila S, Pelkonen O and Hakkola J. 2012. Characterization of human cytochrome P450 induction by pesticides. *Toxicology*. 294(1): 17-26.
- Aberoumand A. 2010. Investigation of some microbiological and chemical parameters associated with spoilage of cod fish. *World J Fish and Marine Sci*. 2(3): 200-203.
- Adler N. 2007. "Protocol for the Ambient Air Monitoring of Methomyl and Carbaryl" (online). Available: [http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/tac/studies/methomyl\\_carbaryl\\_appendix\\_b.pdf](http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/tac/studies/methomyl_carbaryl_appendix_b.pdf). Accessed 11 January 2014
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1997. "Public Health Statement for Dichlorvos" (online). Available: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp88.pdf>. Accessed 24 March 2014
- Allshouse J, Buzby JC, Harvey D and Zorn D. 2003. International Trade and Seafood Safety. In: *International Trade and Food Safety*. 1<sup>st</sup> ed. Buzby Jean C. (editor). United States Department of Agriculture. 109-124.
- Arufe MI, Arellano JM, García L, Albendin G and Sarasquete C. 2007. Cholinesterase activity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae: characterization and sensitivity to the organophosphate azinphosmethyl. *Aquat Toxicol*. 84(3): 328-336.
- Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. 2008. Dichlorvos - Environmental Assessment. Commonwealth of Australia, Kingston. 67 pp.
- Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. 2011. Dichlorvos Review – Final Review Report And Regulatory Decision. Commonwealth of Australia, Kingston. 114 pp.
- Ayers LE. 2010. Differential Decomposition in Terrestrial, Freshwater and Saltwater Environment: a Pilot Study. (Master Thesis). Department of Anthropology. Texas State University-San Marcos. 104 pp.
- Bakar IA, Ayub MK, Yatim AM and Sani NA. 2010. Pesticide and antibiotic residues in freshwater aquaculture fish: chemical risk assessment from farm to table. *As J Food Ag-Ind*. 3(03): 328-334.
- Chaudhry GR, Ali AN and Wheeler WB. 1988. Isolation of a methyl parathion-degrading *pseudomonas* sp. that possesses dna homologous to the opd gene from a *flavobacterium* sp. *Appl Environ Microbiol*. 54(2): 288–293.



- Chen W and Mulchandani A. 1998. The use of live biocatalysts for pesticide detoxification. *Trends Biotechnol.* 16(2): 71-76.
- Chowdhury AZ, Banik S, Uddin B, Moniruzzaman M, Karim N and Gan SH. 2012. Organophosphorus and carbamate pesticide residues detected in water samples collected from paddy and vegetable fields of the Savar and Dhamrai Upazilas in Bangladesh. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9(9): 3318-3329.
- Department of Pesticide Regulation California Environmental Protection Agency USA. 1996. "Dichlorvos (DDVP) Risk Characterization Document." (online). Available: <http://www.cdpr.ca.gov/docs/risk/rcd/ddvp.pdf>. . Accessed 16 March 2014
- Department of Water Affairs and Forestry South Africa. 2012. "Fish health and edibility for the edibility of freshwater fish in selected dams in the north west province" (online). Available: <http://www.harties.org.za/documents/ProgressReport/FishEdibilityProgressReportNov2012.pdf>. Accessed 19 March 2014
- Drolet R, D'Allaire S and Chagnon M. 1990. The evaluation of postmortem ocular fluid analysis as a diagnostic aid in sows. *J Vet Diagn Invest.* 2(1): 9-13.
- Freed VH, Chiou CT and Schmedding DW. 1979. Degradation of selected organophosphate pesticides in water and soil. *J Agric Food Chem.* 27(4): 706-708.
- Ghaly AE, Dave D, Budge S and Brooks MS. 2010. Fish spoilage mechanisms and preservation techniques. *Am J Applied Sci.* 7(7): 859-977.
- Guharaj PV and Chandran MR. 2003. Death: Its diagnosis and changes that follow. In: *Forensic Medicine.* 2<sup>nd</sup> ed. Guharaj PV (editor). Hyderabad: Orient Longman. 59-73.
- Guimarães ATB, Silva De Assis HC and Boeger W. 2007. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 68(1): 57-62.
- Hai DQ, Varga SI and Matkovic B. 1997. Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 117C:83-88. Cited in Llopis SP, Ferrando MD and Peña JB. 2003. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquat Toxicol.* 65(4): 337-360.
- Hannam ML, Hagger JA, Jones MB and Galloway TS. 2008. Characterisation of esterases as potential biomarkers of pesticide exposure in the lugworm *Arenicola marina* (Annelida: Polychaeta). *Environ Pollut.* 152(2): 342-350.

- Harnly M, McLaughlin R, Bradman A, Anderson M and Gunier R. 2005. Correlating agricultural use of organophosphates with outdoor air concentrations: a particular concern for children. *Environ Health Perspect.* 113(9): 1184-1189.
- Huston PL and Pignatello JJ. 1999. Degradation of selected pesticide active ingredients and commercial formulations in water by the photo-assisted fenton reaction. *Wat Res.* 33(5): 1238–1246.
- Jashnani KD, Kale SA and Rupani AB. 2010. Vitreous humor: biochemical constituents in estimation of postmortem interval. *J Forensic Sci.* 55(6): 1523-1527.
- Kirby MF, Morris S, Hurst M, Kirby SJ, Neall P, Tylor T and Fagg A. 2000. The use of cholinesterase activity in flounder (*Patichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. *Mar Pollut Bull.* 40(9): 780-791.
- Lee XP, Kumazawa T, Sato K and Suzuki O. 1996. Detection of organophosphate pesticides in human body fluids by headspace solid-phase microextraction (SPME) and capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Chromatographia.* 42(3-4): 135-140.
- Leong KH, Tan LL and Mustafa AM. 2007. Contamination levels of selected organochlorine and organophosphate pesticides in the Selangor River, Malaysia between 2002 and 2003. *Chemosphere.* 66(6): 1153-1159.
- Lim LO. 1996. Dichlorvos (DDVP) risk characterization document. Department of Pesticide Regulation California Environmental Protection Agency USA. 93 pp.
- Luna A. 2009. Is postmortem biochemistry really useful? Why is it not widely used in forensic pathology?. *Leg Med (Tokyo).* 11 Suppl 1: S27-30.
- Monteiro DA, de Almeida JA, Rantin FT and Kalinin AL. 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 143(2): 141-149.
- Moriya F and Hashimoto Y. 2005. A fatal poisoning caused by methomyl and nicotine. *Forensic Sci Int.* 149(2-3): 167-170.
- Mulla A. 2005. Role of vitreous humor biochemistry in forensic pathology. (Master Thesis). Department of Pathology, College of Medicine. University of Saskatchewan. 146 pp.
- Nickerson CS. 2006. Engineering the mechanical properties of ocular tissues. (Doctor of Philosophy Thesis). Division of Chemistry and Chemical Engineering. California Institute of Technology. 163 pp.

- Ozdikicioglu F, Dere E and Tosunoglu H. 2008. The Effect of dichlorvos on glutathione S-transferase activity in some tissues of rats. *J Appl Biol Sci.* 2(1): 35-33.
- Panuwet P, Siriwong W, Prapamontol T, Ryan PB, Fiedler N, Robson MG and Barr DB. 2012. Agricultural pesticide management in Thailand: situation and population health risk. *Environ Sci Policy.* 17: 72-81.
- Pena-Llopis S, Ferrando MD and Pena JB. 2003. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquat Toxicol.* 65(4): 337-360.
- Perry SF. 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu Rev Physiol.* 59: 325-347.
- Raskovic B, Poleksic V, Zivic I and Spasic M. 2010. . Histology of carp (*Cyprinus carpio*, L.) gill and pond water quality in semiintensive production. *Bulg J Agric Sc.* 16(3): 253-262.
- Ray AK and Ghosh MC. 2006. Aquatic toxicity of cabamates and organophosphates. In: *Toxicology of organophosphate and carbamate compounds.* 1<sup>st</sup> ed. RC Gupta (editor). California: Elsevier Academic Press. 657-672.
- Ritcher P and Corcoran J. 1997. Toxicological profile for dichlorvos. Department of Health and Human Services USA. 199 pp.
- Rodrigues EDL and Fanta E. 1998. Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* hamilton-buchman after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate dimethoate 500. *Revta Bras Zool.* 15(2): 441-450.
- Saenphet S, Thaworn W and Saenphet K. 2009. Histopathological alteration of the gills liver and kidney in *Anabas testudineus* (Bloch) fish living in an unused lignite mine Li district, Lumphun province, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 40(5): 1121-1126.
- Sharma P and Singh R. 2012. Dichlorvos and lindane induced oxidative stress in rat brain: Protective effects of ginger. *Pharmacognosy Res.* 4(1): 27-32.
- Shayeghi M, Khoobdel M, Bagheri F, Abtahi M and Zeraati H. 2012. Organophosphorous residue in *Liza aurata* and *Cyprinus carpio*. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2(7): 564-569.
- Singh BK, Walker A, Morgan JA and Wright DJ. 2004. Biodegradation of chlorpyrifos by enterobacter strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils. *Appl Environ Microbiol.* 70(8): 4855-4863.
- Singh BK, Walker A, Morgan JAW and Wright DJ. 2003. Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium. *Appl Environ Microbiol.* 69(9): 5198-5206.

- Singh RN, Pandey RK, Singh NN and Das VK. 2009. Acute toxicity and behavioral responses of common carp *Cyprinus carpio* (Linn) to an organophosphate (dimethoate). *World J of Zool.* 5(3): 183-188.
- Snow DH. 1973. The acute toxicity of dichlorvos in the dog: 2. Pathology. *Australian Veterinary Journal* 49:120-125. Cited in Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. 2008. Dichlorvos - Toxicology Assessment. Commonwealth of Australia, Kingston. 164 pp.
- Stansley W. 1993. Field results using cholinesterase reactivation techniques to diagnose acute anticholinesterase poisoning in birds and fish. *Arch Environ Contam Toxicol.* 25(3): 315-321.
- Suter P. 1981. Rate of hydrolysis of dichlorvos (Nogos<sup>®</sup>, Nuvan<sup>®</sup>) under laboratory conditions. Unpublished. Cited in Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. 2008. Dichlorvos - Environmental Assessment. Commonwealth of Australia, Kingston. 164 pp.
- Thapinta A and Hudak P. 2000. Pesticide use and residual occurrence in Thailand. *Environ Monit Assess.* 60(1): 103-114.
- Thomaz JM, Martins ND, Monteiro DA, Rantin FT and Kalinin AL. 2009. Cardio-respiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (NEGUVON<sup>®</sup>). *Ecotoxicol Environ Saf.* 72(5): 1413-1424.
- Tierfarm and Sissel. 1969. Report on the determination of the acute dermal LD50 to the rat of DDVP technical. Unpublished. Cited in Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. 2008. Dichlorvos - Toxicology Assessment. Commonwealth of Australia, Kingston. 164 pp.
- Tsatsakis AM, Tsakalof AK, Siatitsas Y and Michalodimitrakis EN. 1996. Acute poisoning with carbamate pesticides: the Cretan experience. *Sci Justice.* 36(1): 35-39.
- Van Dyk JS and Pletschke B. 2011. Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. *Chemosphere.* 82(3): 291-307.
- Varó I, Navarro JC, Nunes B and Guilhermino L. 2007. Effects of dichlorvos aquaculture treatments on selected biomarkers of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fingerlings. *Aquaculture.* 266(1-4): 87-96.
- Velmurugan B, Selvanayagam M, Cengiz EI and Unlu E. 2009. Histopathological changes in the gill and liver tissues of freshwater fish, *Cirrhinus mrigala* exposed to dichlorvos. *Braz Arch Biol Technol.* 52(5): 1291-1296.

- Wang D, Weston DP and Lydy MJ. 2009. Method development for the analysis of organophosphate and pyrethroid insecticides at low parts per trillion levels in water. *Talanta*. 78(4-5): 1345-1351.
- Wildgoose WH. 2001. Internal Disease. In: BSAVA Manual of Ornamental Fish. 2<sup>nd</sup> ed. Wildgoose W H (editor). Barcelona: Grafos. 123-134.
- นันทริกา ชันซื่อ. 2553. โรคปลา: อายุรศาสตร์และคลินิกปฏิบัติ. พิมพ์ครั้งที่ 2. โฮลิสติก แพ็บลิชซิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ. 610 หน้า.
- แม่น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, พลกฤษณ์ แสงวณิช, ภควดี สุทธิไวยกิจ, มาณพ สิทธิเดช, สายสุนีย์ เทลียวเรืองรัตน์, อุมาพร สุขม่วง and วันเพ็ญ ช้อนแก้ว. 2553. แก๊สโครมาโทกราฟี. ใน: หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ – Principle and Techniques of Instrumental Analysis Part2 Chromatography and Others. ชวนพิมพ์ 50 จำกัด. กรุงเทพฯ. 243-259.
- สำนักงานปลัดกระทรวงพาณิชย์. 2556. "โครงสร้างสินค้านำเข้า" (online). Available: <http://www2.ops3.moc.go.th>. Accessed 24 มีนาคม 2557
- สำนักจัดการคุณภาพน้ำ. 2554. "รายงานสถานการณ์ มลพิษทางน้ำจากนาข้าว" (online). Available: [http://www.pcd.go.th/public/Publications/print\\_water.cfm?task=water\\_rice2](http://www.pcd.go.th/public/Publications/print_water.cfm?task=water_rice2). Accessed 24 มีนาคม 2557

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายศรัณย์สิริ นวลมณี เดิม ณีภูฏ์ นวลมณี เกิดวันที่ 4 เดือนกันยายน พ.ศ. 2527 จังหวัดเชียงใหม่ จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนปรินส์รอยแยลส์วิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่ เมื่อปี พ.ศ. 2544 จบการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อปี พ.ศ. 2551 เมื่อจบการศึกษาได้เข้าทำงานในตำแหน่งสัตวแพทย์ประจำศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดกรุงเทพมหานคร เป็นเวลา 1 ปี และทำงานในตำแหน่งสัตวแพทย์ ประจำโรงพยาบาลสัตว์เมตตา จังหวัดเชียงใหม่ เป็นเวลา 1 ปี มีความสนใจในด้านสัตว์น้ำจึงเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553

มีผลงานทางวิชาการที่ตีพิมพ์เผยแพร่ได้แก่

ณีภูฏ์ นวลมณี ภูติก วงศ์เสถียร รัชต์ ชัตติยะ อติกันต์ ทองทาบ และอุทุมมา มัชฌิมิ. 2551. ผลของการปรับค่ากิโลโวลท์ พีค ของเครื่องถ่ายภาพรังสีต่อคุณภาพของภาพรังสี ในปลาทอง (*Carassius auratus*). วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มช. 18(2):120-130.

ศรัณย์สิริ นวลมณี มาลินี จงเจริญใจ และนันทริกา ชันชื้อ. 2557. การพัฒนาการตรวจการปนเปื้อนของสารออร์กาโนฟอสเฟตจากวันตาของปลาแฟนซีคาร์พ (*Cyprinus carpio*). วารสารสัตวศาสตร์แห่งประเทศไทย. 1(2):243-246.