

รายงานสัตว์ป่วย : การตายของช้างป่าจากสารเคมีกำจัดแมลง กลุ่ม carbamate ชนิด methomyl

อนุสรณ์ อยู่เย็น* ณัฐกร ราชบุตร ดวงทอง ปัจฉิมะศิริ สุรกาญจน์ ขำชื่น
สาวิตรี อินทร์อุดม เบญจมา เมธาร์ตน์อนุกุล สันทนา มิมะพันธุ์

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

*ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 0 2579 8908 – 14 โทรสาร 0 2579 8919 e-mail : anusorn.y@dld.go.th

บทคัดย่อ

ในเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2557 พบช้างป่าเพศผู้ อายุ 8 ปี น้ำหนักประมาณ 2,500 กิโลกรัม ตายในเขตอุทยานแห่งชาติแห่งหนึ่ง การตรวจสภาพภายนอก (external examination) พบว่าสภาพซากค่อนข้างเน่า มีเลือดออกทางปาก และทวาร ผลการผ่าซากไม่สามารถตรวจหารอยโรคได้ เนื่องจากอวัยวะภายในเน่า แต่พบว่าอาหารในกระเพาะ (stomach content) มีลักษณะคล้ายสารสีฟ้าอมเขียวเคลือบปนอยู่กับส่วนของอาหาร ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบการเน่าของเนื้อเยื่ออวัยวะภายใน จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ทางพิษวิทยาโดยการสกัดตัวอย่างอาหารในกระเพาะและตับด้วยวิธี QuEChERS แล้วนำสารละลายที่สกัดได้ไปตรวจเบื้องต้นด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) เพื่อตรวจหาสารเคมีกำจัดแมลง 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม carbamate (CM) organophosphate (OP) และ organochlorine (OC) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน พบว่าตัวอย่างอาหารในกระเพาะให้ผลบวกสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม CM ส่วนตัวอย่างตับตรวจไม่พบสารเคมีกำจัดแมลงทั้ง 3 กลุ่ม จากนั้นทำการตรวจยืนยันผลเพื่อหาชนิดและปริมาณด้วยวิธี Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS) แบบ Three-way splitter ผลตรวจพบสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม CM ชนิด methomyl ปริมาณ 974.33 mg/kg เมื่อคำนวณหาปริมาณสารพิษที่ช้างป่าได้รับจากอาหารที่กินเข้าไป แล้วเปรียบเทียบกับค่า Reference dose (Rfd) พบว่ามีปริมาณของ methomyl สูงกว่าค่า Rfd และค่า median lethal dose (LD_{50}) ของสัตว์หลายชนิด สรุปว่าการตายของช้างป่าในครั้งนี้เกิดจากได้รับสารกำจัดแมลงกลุ่ม carbamate ชนิด methomyl ในปริมาณสูง

คำสำคัญ : ช้างป่า สารเคมีกำจัดแมลง carbamate methomyl

บทนำ

ช้างป่าในประเทศไทยเป็นช้างเอเชีย มีขนาดตัวและน้ำหนักกว่าช้างแอฟริกา หัวมีสองโหนก และหลังโก่ง ช้างเอเชียมีน้ำหนักราว 3-5 ตัน เป็นสัตว์บกที่ใหญ่ที่สุดในทวีปเอเชีย เป็นสัตว์ที่มีอายุยืนและฉลาดมาก อาจมีอายุได้ถึง 70 ปี กินอาหารหลักคือหญ้า ยอดไม้ เปลือกไม้ ผลไม้ ช้างป่าต้องการอาหารในรอบ 12 ชั่วโมง ปกติช้างกินอาหารคิดเป็นน้ำหนักสดประมาณ 250 กิโลกรัมต่อวัน (วิมุติ, 2558 ; รองลาม, 2556) แหล่งที่อยู่อาศัยของช้างในประเทศไทยสามารถพบได้ทั่วไปตามแนวเทือกเขาติดชายแดนประเทศเมียนมาร์ ภาคใต้ตามชายแดนมาเลเซีย ภาคตะวันออกเฉียงเหนือในป่าดงพญาเย็น-เขาใหญ่อุทยานแห่งชาติและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าหลายแห่ง (Choudhury et al., 2008) อย่างไรก็ตามจำนวนประชากรช้างเอเชียในปัจจุบันกำลังมีแนวโน้มลดลง เนื่องจากการล่าเพื่อเอางา หรือเป็นชิ้นส่วนอวัยวะบางส่วนไปทำเป็นยาซึ่งเชื่อว่าจะช่วยเพิ่มสมรรถนะทางเพศ นอกจากนี้ถิ่นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติของช้างป่ายังถูกคุกคามจากการเจริญเติบโตของประชากร และการทำเกษตรกรรมของมนุษย์ ส่งผลให้แหล่งอาหารลดลง บังคับให้ช้างป่าต้องหาแหล่งอาหารอื่นซึ่งก็คือ ผลผลิตทางการเกษตรในพื้นที่เกษตรกรรมของมนุษย์ที่เข้ามาแทนที่ถิ่นที่อยู่อาศัยดั้งเดิมของช้างป่า ทั้งนี้โดยธรรมชาติช้างเป็นสัตว์ที่มีขนาดใหญ่ สามารถก่อความเสียหายร้ายแรงต่อที่อยู่อาศัย และแหล่งเพาะปลูกเกษตรกรรมเพียงชั่วข้ามคืน ส่งผลให้ช้างป่าถูกฆ่าเพื่อเป็นการโต้ตอบ (รองลาม, 2556 ; WWF, 2014) นอกจากนี้พบรายงานจำนวนช้างป่าที่ตายด้วยสาเหตุต่างๆ ในประเทศไทยระหว่างปี 2549-2554 จำนวน 35 ตัว โดยสาเหตุการตายแบ่งเป็น จากการล่า 15 ตัว วางยาพิษ 8 ตัว ไม่ทราบสาเหตุ 7 ตัว ความขัดแย้งกับคน 3 ตัว อุบัติเหตุ 1 ตัว และไฟฟ้าช็อต 1 ตัว (รองลาม, 2558) จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่ายาพิษหรือสารพิษก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ช้างตาย โดยสารพิษที่นำมาใช้ในทางที่ผิด (misuse) ที่เคยตรวจชันสูตรพบทางห้องปฏิบัติการพิษวิทยาของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติมักเป็นสารพิษประเภทสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ (Pesticides) โดยนำมาใช้ผสมในอาหารหรือเหยื่อล่อให้สัตว์กิน เช่น ยัดในไส้แตงกวา เคลือบบนชิ้นเนื้อไก่ เป็นต้น

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ทำการเกษตรกรรม จึงมีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ในปริมาณสูง (แสงโสม, 2556) โดยสารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์เป็นสารเคมีที่ใช้ในการกำจัด ควบคุม ศัตรูพืชและสัตว์ แบ่งได้เป็นหลายชนิดตามลักษณะการใช้ อาทิเช่น สารเคมีกำจัดศัตรูพืช (herbicide) สารเคมีกำจัดเชื้อรา (fungicide) สารเคมีกำจัดสัตว์ฟันแทะ (rodenticide) และสารเคมีกำจัดแมลง (insecticide) ซึ่งสารเคมีกำจัดแมลงสามารถจำแนกตามลักษณะโครงสร้างได้อีก 4 กลุ่ม คือ กลุ่ม organophosphate (OP), carbamate (CM), organochlorine (OC) และ pyrethroid (PY) มีการใช้สารเหล่านี้กันทั่วไป เนื่องจากประมาณร้อยละ 30 ของผลผลิตเกษตรกรรมได้รับความเสียหายจากแมลงศัตรูพืช ทำให้เกิดการปนเปื้อนและตกค้างในสิ่งแวดล้อม ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของคน และสัตว์ ที่อาจได้รับสารเคมีเข้าไปโดยไม่ตั้งใจ (มาลี และคณะ, 2556) นอกจากนี้ในปัจจุบันพบว่ามีคนนำสารเคมีมาใช้ในทางที่ผิด โดยอาศัยคุณสมบัติความเป็นพิษของสารเคมี นำไปใช้ผิดวัตถุประสงค์ เช่น การฆ่าตัวตาย หรือก่ออาชญากรรม ซึ่ง methomyl เป็นสารกำจัดแมลงกลุ่ม CM ที่มักถูกนำมาใช้ในกรณีนี้ (ปัตพงษ์ และคณะ, 2556) โดยสารเคมี

กำจัดแมลงทั้งกลุ่ม CM และ OP เมื่อร่างกายได้รับเข้าไปแล้วจะออกฤทธิ์โดยไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส ส่งผลให้เกิดการคั่งของอะซิติลโคลีน ทำให้เกิดการกระตุ้นของระบบประสาทอย่างต่อเนื่อง สัตว์ที่ได้รับอาจแสดงอาการเกิดพิษ ได้แก่ ภาวะมีน้ำในปอดมาก หลอดลมหดเกร็ง ชีพจรเต้นช้า น้ำลายไหล น้ำตาไหล ความดันโลหิตต่ำ ม่านตาหดตัว อาเจียน ท้องเดิน เหงื่อออก กล้ามเนื้อสั่นเกร็งและอ่อนแรง หายใจลำบาก และสัตว์มักตาย เนื่องจากหายใจไม่ออก (มาลินี, 2523)

รายงานสัตว์ป่วยตายในครั้งนี มีวัตถุประสงค์เพื่อรายงานสาเหตุการตายของช้างป่าอันเนื่องจากการได้รับสารเคมีกำจัดแมลงในปริมาณสูง เพื่อเป็นข้อมูลที่สำคัญอีกด้านหนึ่ง อันจะเป็นประโยชน์ต่อเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องในการป้องกันและเฝ้าระวังช้างป่าในประเทศไทยต่อไป

อุปกรณ์ และวิธีการ

ประวัติสัตว์ป่วย

เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2557 พบช้างป่า เพศผู้ อายุ 8 ปี น้ำหนักประมาณ 2,500 กิโลกรัม ตายในเขตอุทยานแห่งชาติแห่งหนึ่ง สภาพซากพบว่ามีเลือดออกทางปาก และทวาร ไม่พบร่องรอยบาดแผลจากอาวุธ ฟ้าผ่าหรือไฟฟ้าช็อต เบื้องต้นคาดว่าเสียชีวิตมาแล้ว 2 ถึง 3 วัน (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ช้างป่าตายในเขตอุทยานแห่งชาติแห่งหนึ่ง

การตรวจทางพยาธิวิทยา

ตรวจดูรอยโรคภายนอกด้วยตาเปล่า (external examination) แล้วทำการผ่าซากเพื่อตรวจดูรอยโรคของอวัยวะภายใน (internal examination) ได้แก่ หัวใจ ปอด ตับ ม้าม ไต ลำไส้ กระเพาะอาหาร และลิ้น โดยเก็บชิ้นเนื้อดังกล่าวใน 10% neutral buffered formalin เพื่อนำมาผ่านกระบวนการมาตรฐานทางพยาธิวิทยา แล้วฝังชิ้นเนื้อใน paraffin นำไปตัดให้มีความหนาประมาณ 5 ไมครอน เพื่อทำเป็นสไลด์

เนื้อเยื่อ แล้วย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E) ตามวิธีของ Luna (1968) จากนั้นนำสไลด์ไปตรวจหาโรคทางจุลพยาธิวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การตรวจทางปรสิตวิทยา

ตรวจทางปรสิตวิทยาในตัวอย่างตับและม้าม ด้วยวิธี stamp smear โดยกรีดผ่าอวัยวะตามแนวขวาง หั่นหน้ารอยตัดกดเบาๆลงบนกระจกสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้ง fix ด้วย methanol แล้วย้อมด้วย 5% Gimsa's solution นำไปตรวจหาปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วย objective lens x100

การตรวจทางแบคทีเรียวิทยา

ตรวจทางแบคทีเรียวิทยาโดยนำตัวอย่างหัวใจ ปอด ตับ ม้าม ไต กระเพาะ และลิ้น มาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 7% defibrinated sheep blood agar (SBA) และ MacConkey agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วตรวจหาโคโลนีที่สงสัยเป็นเชื้อก่อโรค แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

การตรวจทางพิษวิทยา

ตัวอย่าง

อาหารในกระเพาะและตับ

สารมาตรฐานและสารเคมี

1) สารมาตรฐานกลุ่ม CM 13 ชนิด ได้แก่ methomyl, baygon, isoprocarb, bendiocarb, baycarb, carbofuranphenol, carbofuran-3-keto, carbofuran-3-hydroxy, carbofuran, metocarb, carbaryl, methiocarb และ carbosulfan 2) สารมาตรฐานกลุ่ม OP 8 ชนิด ได้แก่ dichlofos, diazinon, dimethoate, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, fenitrothion, malathion, และ mevinphos 3) สารมาตรฐานกลุ่ม OC 13 ชนิด ได้แก่ 4, 4'-DDT, 4, 4'-DDE, 4, 4'-DDD, alpha-BHC, beta-BHC, gamma-BHC, endosulfan sulfate, endosulfan (alpha isomer), heptachlor, heptachlor epoxide, dieldrin, endrin และ chlordane ทุกสารมาตรฐานมีความบริสุทธิ์ 97% ขึ้นไป ยี่ห้อ Dr. Ehrenstorfer GmbH และ Chem Service ส่วนสารเคมีอื่นๆเป็นชนิด analytical grade ของ Merck, Germany และ J.T.Baker, USA.

เครื่องมือ

เครื่อง Gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) รุ่น 7890A GC System/5975C inert XL EI/CI MSD with Triple-Axis detector (Three-way splitter) ; mass detector (MS), electron captured detector (ECD) และ flame photometric detector (FPD) ยี่ห้อ Agilent, USA. แคปิลลารี

คอลัมน์ที่ใช้คือ HP-5MS ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์มที่ใช้เคลือบในคอลัมน์ 0.25 ไมโครเมตร

การเตรียมตัวอย่าง

ทำการสกัดตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Anastassiades and Lehotay (2003) โดยชั่งตัวอย่าง 10 กรัม (ทำแบลงค์ควบคู่ไปด้วย โดยใช้ น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง) ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม acetonitrile 10 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่อง vortex 1 นาที จากนั้นเติม Magnesium sulfate anhydrous (MgSO_4) 4 กรัม และ Sodium chloride (NaCl) 1 กรัม ผสมด้วยเครื่อง vortex 1 นาที แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 15 °C นาน 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทั้งหมดลงในหลอดแก้วกันแหลมแบบมีสเกล มาเป่าปรับปริมาตรด้วยแก๊สไนโตรเจน (99.99%) ใน water bath อุณหภูมิ 40 °C ให้เหลือ 1 มิลลิลิตร แล้วดูดใส่ micro centrifuge tube ที่บรรจุ primary secondary amine (PSA) 25 มิลลิกรัม กับ MgSO_4 150 มิลลิกรัม ผสมด้วยเครื่อง vortex 30 วินาที แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 10 °C นาน 3 นาที ดูดส่วนใสทั้งหมดใส่ในหลอดแก้วกันแหลม เป่าให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ใน water bath อุณหภูมิ 40 °C แล้วละลาย residue ด้วย acetone (PR grade) 1 มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC และ GC-MS

การวิเคราะห์เบื้องต้นด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

ตรวจเบื้องต้นเพื่อหาสารเคมีกำจัดแมลง 3 กลุ่มคือ CM OP และ OC โดย spot สารละลายแบลงค์ และตัวอย่างที่สกัดได้อย่างละ 20 ไมโครลิตรลงบนเพลท TLC ชนิด silica gel GF 254 (Merck, Germany) ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร จำนวน 3 แผ่น แล้ว spot 10 ไมโครลิตรของสารละลายมาตรฐาน 1,000 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร ลงบนเพลทแยกตามกลุ่ม เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ แผลท TLC ใน Chromatography chamber ที่มี system หรือสารละลายผสม (mobile phase) ของ Hexane: Acetone อัตราส่วน 3:2 3:1 และ 5:1 สำหรับสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม CM OP และ OC ตามลำดับ แล้วทำการตรวจวัดด้วย spray reagent ต่างๆ จากนั้นเปรียบเทียบกับสีของสารมาตรฐานและค่า Rf (Rate of flow) ซึ่งเป็นระยะทางที่สารเคลื่อนที่(เซนติเมตร)ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่(เซนติเมตร) ถ้าสารละลายตัวอย่างมี matrix รบกวนให้ทำ TLC แบบ Two Dimension แทนโดยใช้ system 1 เป็น Hexane: Acetone (3:1) และ system 2 เป็น Hexane: Acetone (3:2) ในการแผลท แล้วตรวจวัดด้วย spray reagent ตามกลุ่มที่ตรวจพบอีกครั้ง ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (Limit of detection; LOD) อยู่ในช่วง 1-10 ไมโครกรัม

การตรวจวัดสารเคมีกำจัดแมลงด้วย spray reagent

1) ตรวจวัดกลุ่ม CM โดยพ่นเพลท TLC ด้วย spray reagent 10% sodium hydroxide แล้วพ่นทับด้วย Indicator (0.2 กรัม 4-Nitrobenzene diazonium tetrafluoroborate ใน 10% Polyethylene glycol ใน acetone) ถ้าตัวอย่างให้ผลบวก บนเพลท TLC จะเกิด spot สีแดง ม่วง น้ำเงิน แล้วแต่ชนิดของสารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่มและมีค่า Rf เท่ากับ 2) ตรวจวัดกลุ่ม OP โดยพ่นเพลท TLC ด้วย spray reagent 1% nitrobenzene pyridine นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 110 °C นาน 10 นาที แล้วพ่นทับด้วย 10% tetraethylene pentamine ใน acetone ถ้าตัวอย่างให้ผลบวก บนเพลท TLC จะเกิด spot สีฟ้าหรือน้ำเงินเหมือนกับสารมาตรฐานและมีค่า Rf เท่ากัน 3) ตรวจวัดกลุ่ม OC โดยพ่นเพลท TLC ด้วย spray reagent Chromogenic silver nitrate แล้วนำไปส่องแสง ultraviolet ด้วย UV lamp 254 นาโนเมตร นาน 5-10 นาที ถ้าตัวอย่างให้ผลบวก บนเพลท TLC จะเกิด spot สีน้ำตาลหรือสีดำเหมือนกับสารมาตรฐานและมีค่า Rf เท่ากัน

การวิเคราะห์ยืนยันผลด้วยวิธี GC-MS แบบ three-way splitter

ตรวจยืนยันผลด้วยวิธี GC-MS แบบ Three-way splitter (มาลี และคณะ, 2556) โดยมีค่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (Limit of detection; LOD) และ ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (Limit of Quantitation; LOQ) ตามตารางที่ 1

วิธี GC-MS แบบ three-way splitter สามารถใช้ตรวจหาสารเคมีกำจัดแมลงได้ทั้ง 3 กลุ่มคือ CM OP และ OC ในคราวเดียวกัน เพราะมีตัวตรวจวัด (detector) 3 ชนิดคือ mass selective detector (MSD), electron capture detector (ECD) และ flame photometric detector (FPD) การวิเคราะห์ผล GC-MS แบบ Scan mode โดยดูเวลาที่ออก (RT; Retention time) และเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของ spectrum เทียบกับ library ของ Pesticide และ NIST (The National Institute of Standards and Technology) รายงานผลการพบชนิดสารเคมีกำจัดแมลงและหาปริมาณโดยการเทียบกับ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานกลุ่ม Carbamates 13 ชนิด Organophosphates 8 ชนิด และ Organochlorines 13 ชนิด

ตารางที่ 1 ค่า LOD และ LOQ ของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม CM OP และ OC โดยวิธี GC/MS

กลุ่มสารเคมีกำจัดแมลง	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
carbamate	0.38 – 0.61	1.25 – 1.66
organophosphate	0.41 – 0.47	1.37 – 1.66
organochlorine	0.025 - 2.0	2.0 - 8.0

ผล

ผลการตรวจทางพยาธิวิทยา

จากการผ่าซาก ณ จุดที่ข้างปาดายและสังเกตรอยโรคด้วยตาเปล่า พบอวัยวะภายในเริ่มเน่าและมีกลิ่นเหม็น เมื่อผ่ากระเพาะอาหารข้างพบว่าอาหารในกระเพาะมีสารสีฟ้าอมเขียวติดอยู่ตามส่วนของเปลือก เนื้อ และเม็ดมะม่วงเป็นจำนวนมาก (รูปที่ 2) คาดว่าสารนี้อาจถูกใส่ในผลมะม่วงเพื่อลอบวางยาเบื่อกับข้างป่า จึงเก็บตัวอย่างส่งตรวจหาสารพิษทางห้องปฏิบัติการพิษวิทยา ส่วนการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบการเน่าของเนื้อเยื่ออวัยวะภายในหัวใจ ปอด ตับ ม้าม ไต ลำไส้ กระเพาะอาหาร และลิ้น



รูปที่ 2 อาหารในกระเพาะข้างป่าประกอบไปด้วยส่วนต่างๆของผลมะม่วงที่มีสารสีฟ้าอมเขียวติดอยู่

ผลการตรวจทางปรีติวิทยา

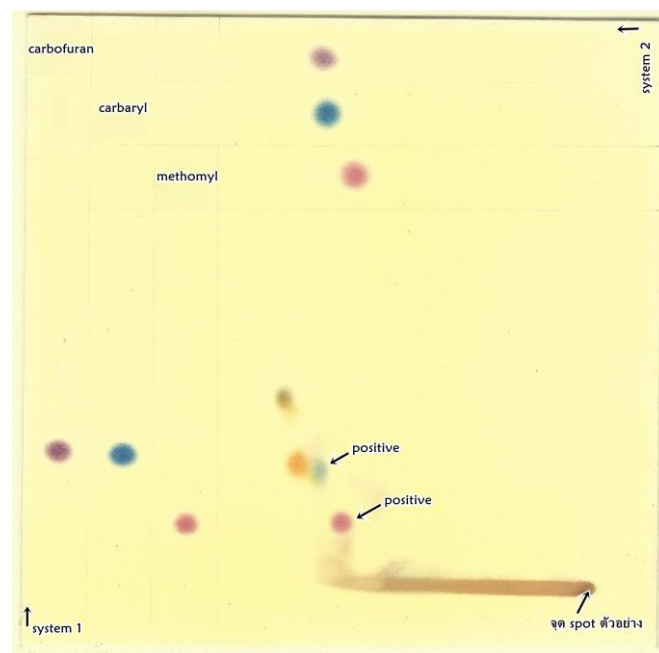
ไม่พบปรีติ

ผลการตรวจทางแบคทีเรียวิทยา

ไม่พบเชื้อที่ก่อโรค

ผลการตรวจทางพิษวิทยา

ผลการตรวจเบื้องต้นหาสารเคมีกำจัดแมลงด้วยวิธี TLC พบว่าในตัวอย่างอาหารในกระเพาะให้ผลบวกกับสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม CM และตรวจไม่พบกลุ่ม OP และ OC แต่ spot ของสารที่ให้ผลบวกกับกลุ่ม CM นั้นยังแยกออกจาก matrix ของตัวอย่างได้ไม่ดี จึงทำ TLC แบบ two dimension ผลพบว่าเกิด spot สี 2 spot คือสีแดงและสีน้ำเงินแยกออกจากกัน และมีค่า Rf เท่ากับ 0.16 กับ 0.33 (system 1) และ 0.63 กับ 0.72 (system 2) เมื่อเทียบกับสีและค่า Rf ของสารละลายมาตรฐาน methomyl และ carbaryl ที่ใช้เป็นตัวแทนกลุ่ม CM แล้วมีสีเหมือนกันและค่า Rf เท่ากัน (รูปที่ 3) ส่วนตัวอย่างดับตรวจไม่พบสารเคมีกำจัดแมลงทั้ง 3 กลุ่มคือกลุ่ม CM OP และ OC (ตารางที่ 2)



รูปที่ 3 TLC Chromatogram แบบ Two dimension ของการตรวจหาสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม CM

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจเบื้องต้นหาสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม CM OP และ OC ในตัวอย่างด้วยวิธี TLC

ชนิดตัวอย่าง	กลุ่ม carbamate			กลุ่ม organophosphate			กลุ่ม organochlorine		
	post/neg	สี spot	Rf value	post/neg	สี spot	Rf value	post/neg	สี spot	Rf value
อาหารในกระเพาะ	post	แดง น้ำเงิน	0.16 ^a , 0.63 ^b 0.33 ^a , 0.72 ^b	neg	-	-	neg	-	-
ตับ	neg	-	-	neg	-	-	neg	-	-

post = positive , neg = negative

a = system 1 ; Hexane: Acetone (3:1)

b = system 1 ; Hexane: Acetone (3:2)

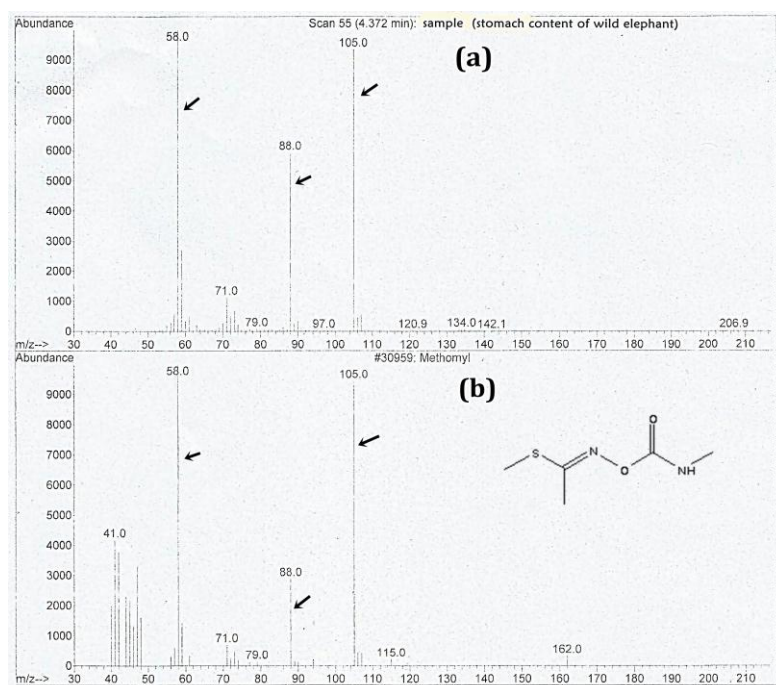
จากการตรวจยืนยันเพื่อหาชนิดและปริมาณสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม CM ในตัวอย่างอาหารในกระเพาะด้วยวิธี GC-MS แบบ three-way splitter พบสารกำจัดแมลงกลุ่ม carbamate ชนิด methomyl 974.33 mg/kg และ 1-naphthol (เมตาบอไลต์ของ carbaryl) 5.68 mg/kg ที่ RT เท่ากับ 4.372 และ 8.995 นาที ตามลำดับ และตรวจไม่พบกลุ่ม OP กับ OC ส่วนตัวอย่างตับตรวจไม่พบสารเคมีกำจัดแมลงทั้ง 3 กลุ่มคือกลุ่ม CM OP และ OC (ตารางที่ 3) เมื่อเทียบ spectrum ของ methomyl และ 1-naphthol ในตัวอย่างอาหารในกระเพาะ กับ methomyl และ 1-naphthol ใน Pesticide และ NIST library ของเครื่อง GC/MS พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของ spectrum ของสารทั้งสองเท่ากับ 72 % และ 96%

ตามลำดับ โดย methomyl ที่พบในตัวอย่างและของ library มี base peak ion (m/z 105) และ additional fragment ions (m/z 88 และ 58) เหมือนกัน (รูปที่ 4) ส่วน 1-naphthol ที่พบในตัวอย่างและของ library มี base peak ion (m/z 144) และ additional fragment ions (m/z 115 และ 89) เหมือนกัน (รูปที่ 5)

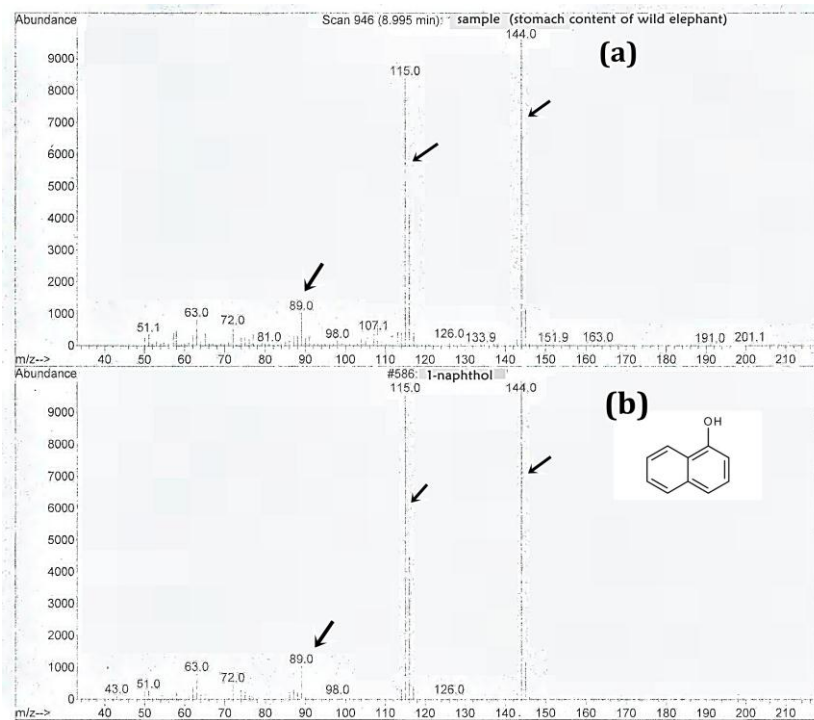
ตารางที่ 3 แสดงผลการตรวจยืนยันหาสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม CM OP และ OC ในตัวอย่างด้วยวิธี GC/MS แบบ Three-way splitter

ชนิดตัวอย่าง	กลุ่ม carbamate			กลุ่ม organophosphate			กลุ่ม organochlorine		
	ชนิด	ปริมาณ (mg/kg)	RT	ชนิด	ปริมาณ (mg/kg)	RT	ชนิด	ปริมาณ (mg/kg)	RT
อาหารในกระเพาะ	post methomyl	974.33	4.372	neg	-	-	neg	-	-
	1-naphthol	5.68	8.995						
ตับ	neg	-	-	neg	-	-	neg	-	-

post = positive , neg = negative



รูปที่ 4 (a) electron ionization mass spectrum ของ methomyl ในตัวอย่างอาหารในกระเพาะ ด้วยเทคนิค GC-MS เทียบกับ (b) methomyl ของ library



รูปที่ 5 (a) electron ionization mass spectrum ของ 1-naphthol ในตัวอย่างอาหารในกระเพาะ
ด้วยเทคนิค GC-MS (b) 1-naphthol ของ Library

วิจารณ์และสรุป

การเสียชีวิตของช้างป่าจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ประเทศไทยนั้น เป็นหนึ่งของผลจากการบุกรุกป่า และการลดลงของพื้นที่ป่าที่เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหารตามธรรมชาติของช้างป่า เนื่องมาจากการสร้างสาธารณูปโภคต่างๆ เช่น ถนน อ่างเก็บน้ำขนาดใหญ่ การขยายตัวของพื้นที่การเกษตรและที่อยู่อาศัยของมนุษย์ (รองลาม, 2556) เมื่อถิ่นที่อยู่อาศัยลดลงแหล่งอาหารก็ลดลงตามไปด้วยทำให้ช้างป่าลงมากินอาหารในพื้นที่เกษตรกรรมเหล่านี้ ส่งผลให้ผลผลิตเสียหาย จึงเกิดเป็นหนึ่งในความขัดแย้งระหว่างคนกับช้างป่า (Human-Elephant conflict) โดยมีการนำสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ มาใช้ในทางที่ผิด เพื่อการล่าหรือปกป้องผลผลิตทางการเกษตร การตายของสัตว์ป่าเนื่องจากสารเคมีในพื้นที่อนุรักษ์สามารถพบได้ทั่วโลก เช่น ที่ประเทศสเปน กรีซ อิตาลี ฝรั่งเศส และเบลเยียม พบส่วนใหญ่เป็นสัตว์ปีกประเภทนกน้ำ (Guitart et al., 2010) นอกจากนี้ ยังพบรายงานการตายของสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่าด้วยสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม CM ในประเทศสาธารณรัฐเช็กช่วงปี ค.ศ. 2004-2009 จากการศึกษาตัวอย่างทั้งหมด 181 ตัวอย่าง ตรวจพบ CM ชนิด carbofuran 89 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างชนิดสัตว์ที่ตรวจพบส่วนใหญ่เป็นนกชนิดต่างๆ เช่น White-tailed Eagle Rough-legged Buzzard นกวงศ์กาพวก corvids raven และ crow เป็นต้น รวมถึงสุนัข นาก นอกจากนี้ยังตรวจพบ CM ชนิด methomyl อีก

19 ตัวอย่าง โดยตรวจพบในหมูป่า 9 ตัวอย่างและวัวกระทิง 10 ตัวอย่าง (Novotny et al., 2011) และยังพบรายงานกรณีช้างป่าที่อุทยานแห่งชาติ Hwanga ประเทศซิมบับเว กว่า 300 ตัวตาย เนื่องจากได้รับสารไซยาไนด์ (cyanide) จากกลุ่มผู้ล่าสัตว์ป่า (Muboko et al., 2014 ; The Telegraph, 2013)

การตรวจหาสารเคมีกำจัดแมลงด้วยวิธี TLC และ GC-MS ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการช่วยในการยืนยันผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างซึ่งกันและกันอย่างน้อย 2 วิธี ทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ได้มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ ซึ่งพบสารกำจัดแมลงกลุ่ม CM ชนิด methomyl และ 1-naphthol ในตัวอย่างอาหารในกระเพาะความเข้มข้นเท่ากับ 974.33 mg/kg และ 5.68 mg/kg ตามลำดับ คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Tennakoon และคณะ (2009) ประเทศศรีลังกาที่ตรวจพบ CM ชนิด carbofuran ในกระเพาะและอาหารจากกระเพาะของช้างป่า วัว และสุนัข เท่ากับ 35, 0.9 และ 800 mg/kg ตามลำดับ ด้วยวิธี TLC GC-MS และ HPLC ซึ่งทั้ง methomyl และ carbofuran ต่างก็จัดเป็นสารพิษที่มีความเป็นพิษสูงเช่นเดียวกันคือมีค่า median lethal dose (LD_{50}) น้อยกว่า 50 mg/kg (มาลินี, 2523) โดย LD_{50} (oral rats) ของ methomyl และ carbofuran เท่ากับ 17 และ 8 mg/kg ตามลำดับ (Gupta and Milatovic, 2012) นอกจากนี้ยังพบรายงานการเสียชีวิตของคน 3 คนที่ได้รับ methomyl เข้าไป โดยการกิน ซึ่งตรวจพบในตัวอย่างอาหารในกระเพาะ เท่ากับ 17.8, 11.6 และ 5.3 mg/L ตามลำดับ (Garcia-Repetto et al., 1994) ซึ่งจะเห็นว่าสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม CM นี้ส่งผลกระทบต่อทั้งคนและสัตว์ไม่ว่าจะเกิดจากการจงใจหรือเกิดจากการใช้โดยปราศจากความระมัดระวังก็ตาม สำหรับการตรวจตัวอย่างอาหารในกระเพาะช้างป่าครั้งนี้ยังตรวจพบ 1-naphthol ซึ่งเป็นสารเมตาบอไลต์หลักของ carbaryl เท่ากับ 5.68 mg/kg อีกด้วย ซึ่ง 1-naphthol มีค่า LD_{50} (oral rats) สูงเท่ากับ 2,590 mg/kg จัดเป็นสารพิษในกลุ่มที่มีความเป็นพิษเล็กน้อย (มาลินี, 2523) อีกทั้งความเข้มข้นที่ตรวจพบนั้นมีค่าน้อยกว่าที่ตรวจพบ methomyl มาก จึงไม่น่าเป็นสาเหตุหลักของการตายของช้างป่าตัวนี้ ส่วนในตัวอย่างตับที่ตรวจไม่พบ methomyl นั้น อาจเป็นเพราะช้างป่าได้รับ methomyl ในปริมาณที่สูง ทำให้เกิดพิษแบบเฉียบพลัน (acute toxicity) ส่งผลให้ช้างตายก่อนที่จะมี methomyl จะสลายตัวเข้าไปตกค้างไปถึงระดับเนื้อเยื่อ สอดคล้องกับรายงานของ Moriya and Hashimoto (2005) ที่ตรวจหา methomyl ในตัวอย่างชีววัตถุจากคนที่ฆ่าตัวตาย ด้วยวิธี GC-MS ผลพบ methomyl ในตัวอย่างอาหารในกระเพาะมีปริมาณสูง พบในเลือดเล็กน้อย และตรวจไม่พบเลยในตับ

สำหรับผลการตรวจทางปฐพีวิทยาและแบคทีเรียวิทยาไม่พบปรสิตใดๆและไม่พบเชื้อก่อโรคตามลำดับ ทำให้ตัดประเด็นการตายของช้างป่าจากเชื้อเหล่านี้ไป ส่วนการตรวจทางพยาธิวิทยาจากซากช้างป่า โดยการสังเกตรอยโรคด้วยตาเปล่า พบว่าอาหารในกระเพาะมีความผิดปกติ เนื่องจากมีมะม่วงที่ช้าง

กินเข้าไปนั้นมีสารสีฟ้าอมเขียวติดอยู่ตามส่วนของเปลือก เนื้อ และเม็ดมะม่วงเป็นจำนวนมาก ซึ่งอาจเป็นลักษณะทางกายภาพของสารเคมีกำจัดแมลงที่ถูกนำมาใช้ในทางที่ผิด เช่น methomyl ซึ่ง methomyl มีคุณสมบัติเป็นสารสีขาว คล้ายน้ำตาลทราย แต่ในขบวนการผลิตทางโรงงานนิยมเติมสารสีฟ้าเขียวเข้าไปในผลิตภัณฑ์ จึงทำให้ methomyl เป็นผงหรือสารละลายสีฟ้าเขียว เพื่อป้องกันการเข้าใจผิดในการนำไปใช้งาน มีชื่อการค้ามากกว่า 300 ชื่อ ตัวอย่าง เช่น แลนเนท เวนเจอร์ เมธาวิน เมทโทเมกซ์ โซว์รุม โกลเด็นฟลาย เป็นต้น (กัมพล และ วินัย, 2549) แต่อย่างไรก็ตามสามารถพบ methomyl ได้ทั้งสองสีคือสีขาวและสีฟ้าอมเขียว (มาลี, 2556) นอกจากนี้การศึกษาของ Buchweitz et al. (2015) ที่สังเกตเห็นอาหารในกระเพาะของ feral cat มีสีฟ้าและใช้เป็นเบาะแสหรือข้อมูลชี้แนะในการตรวจหาสารเคมีกำจัดแมลง ซึ่งเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS ก็พบ methomyl เช่นเดียวกัน

เมื่อนำความเข้มข้นของ methomyl ที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารในกระเพาะของข้างป่าคือ 974.33 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม มาคำนวณหาค่าปริมาณของ methomyl ที่ข้างได้รับเข้าไปตามวิธีของมาลี (2523) ได้ค่าเท่ากับ 31.18 mg/kg (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวของข้างป่า) แล้วอนุมาน (extrapolate) ค่านี้เทียบกับค่า Reference dose (Rfd) ที่คำนวณจากค่า NOEL (No observable effect level) ของ methomyl ที่ให้หนู rat กิน (3.6 mg/kg/day) (IPCS, 1996) หารด้วย uncertainty factor ที่เกิดจาก interspecies (10) และ intraspecies (10) (Pedersen, 1997) ได้ค่า Rfd เท่ากับ 0.036 mg/kg/day ซึ่งจะเห็นว่าปริมาณของ methomyl ที่ข้างตัวนี้ได้รับเข้าไปมีปริมาณสูงกว่าค่า Rfd มากเกือบ 900 เท่า อีกทั้งยังมีค่าสูงกว่าค่า median lethal dose (LD_{50}) ของสัตว์อีกหลายชนิดที่ให้โดยการกิน เช่น หนู rat เท่ากับ 17 mg/kg (Gupta and Milatovic, 2012) หนู mice เท่ากับ 10 mg/kg หนูตะเภา 15 mg/kg นกยูง เท่ากับ 15.4 mg/kg (Gupta, 2014) สรุปได้ว่าการตายของข้างป่าในการศึกษานี้เกิดจากได้รับสารกำจัดแมลงกลุ่ม CM ชนิด methomyl เกินขนาด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณมาลี ธีรานุสนธิ อดีตผู้เชี่ยวชาญด้านชีวเคมีและพิษวิทยา ที่ช่วยให้ข้อเสนอแนะในการศึกษา ตลอดจนเจ้าหน้าที่กลุ่มพยาธิวิทยาทุกท่านที่ออกพื้นที่เพื่อผ่าซากและเก็บตัวอย่าง ทำให้รายงานครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กัมพล อำนวนพัฒนาพล และวินัย วนานุกุล. 2549. ToxCase Conference เรียนรู้จากข่าว “สารออร์กาโรนิกไนโตรเจน”. จุลสารพิษวิทยา. 14(2): 18-20.
- ปัตพงษ์ เกษสมบูรณ์ นุศราพร เกษสมบูรณ์ นาถิดา วีระปรียากุล และสดวงค์ ศุภผล. 2556. “สรุปผลกระทบต่อสุขภาพของ Methomyl.” [Online]. Available : <http://www.thaipan.org/node/524>. [3 กุมภาพันธ์ 2558]
- มาลินี ลิ้มโกคา. 2523. พิษวิทยาและการวินิจฉัยโรคทางสัตวแพทย์. โรงพิมพ์จรัสสินทวงศ์. กรุงเทพฯ. หน้า 47-63.
- มาลี ธีรานุสนธิ. 2556. คุณรู้หรือไม่ methomyl คืออะไร???. จดหมายข่าวสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. 12 (6): 1-3.
- มาลี ธีรานุสนธิ วงศ์อนันต์ ณรงค์วัฒนาการ อนุสรณ์ อยู่เย็น สุรกาญจน์ ขำชื่น และสาวิตรี อินทร์อุดม. 2556. การเฝ้าระวังการปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ในเปลือกส้มปละที่เลี้ยงโคนม. สัตวแพทย์สาร. 64: 41-51.
- รองลาม สุขมาสรวง. 2556. “องค์ความรู้เกี่ยวกับช้างป่าในประเทศไทย1/5 Body of knowledge.... Elephant Conservation and the problem solution strategies in Thailand. ” [Online]. Available : <https://www.academia.edu/5206277/องค์ความรู้เกี่ยวกับช้างป่าในประเทศไทย>. [7 พฤษภาคม 2558]
- รองลาม สุขมาสรวง. 2558. “สถานการณ์ และการแก้ไขปัญหาช้างป่าในประเทศไทย.” [Online]. Available : <https://www.academia.edu/11367117/สถานการณ์ช้างป่าและแนวทางแก้ไข>. [7 พฤษภาคม 2558]
- วิมุติ วสะหลาย. 2558. “ ช้างเอเชีย, ช้างอินเดีย, ช้างไทย (Asian Elephant, Asiatic Elephant).” [Online]. Available:<http://www.verdantplanet.org/animalfiles/viewanimalfile.php?species=ช้างเอเชีย>. [7 พฤษภาคม 2558]
- แสงโสม ศิริพานิช. 2556. สถานการณ์และผลกระทบต่อสุขภาพจากสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ปี พ.ศ. 2556. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์. 4(44): 689-692.
- Anastassiades, M. and Lehotay, S.J. 2003. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. J. AOAC Int. 86: 412-431.

- Buchweitz, J.P., Bokhart, M., Johnson, M. and Lehner, A. 2015. Determination of methomyl in the stomach contents of baited wildlife by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Vet. Diagn. Invest.* 25(6): 744-749.
- Choudhury, A., Lahiri Choudhury, D.K., Desai, A., Duckworth, J.W., Easa, P.S., Johnsingh, A.J.T., Fernando, P., Hedges, S., Gunawardena, M., Kurt, F., Karanth, U., Lister, A., Menon, V., Riddle, H., Rübel, A. and Wikramanayake, E. 2008. *Elephas maximus* - The IUCN Red List of Threatened Species. [Online]. Available : <http://www.iucnredlist.org/details/7140/0>. Accessed June 26, 2015.
- Garcia-Repetto, R., Giminez, M.P., Medenez, M. and Repetto, M. 1994. Three lethal cases of poisoning involving methomyl. *Bull. Int. Assoc. Forensic Toxicol.* 24(3): 37-40.
- Guitart, R., Sachana, M., Caloni, F., Croubels, S., Vandenbroucke, V. and Berny, P. 2010. Animal poisoning in Europe. Part 3: Wildlife *Vet. J.* 183: 260-265.
- Gupta, R.C. and Milatovic, D. 2012. Organophosphate and Carbamates. In : *Veterinary Toxicology*. 2nd ed., edited by R.C. Gupta. Academic Press, California, U.S.A. p. 579.
- Gupta, R.C. 2014. "Carbamate Insecticides (Toxicity)." In : *The Merck Veterinary Manual*. [Online]. Available : http://www.merckvetmanual.com/mvm/toxicology/insecticide_and_acaricide_organic_toxicity/carbamate_insecticides_toxicity.html. Accessed June 26, 2015.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS). 1996. "Methomyl (ECH 178)." [Online]. Available : <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc178.htm>. Accessed June 26, 2015.
- Luna, L. G. 1968. *Manual of Histologic Staining Methods of the Arm Forces Institute of Pathology*. 3rd ed. McGraw-Hill Inc., New York. 217 p.
- Moriya, F. and Hashimoto, Y. 2005. A fatal poisoning caused by methomyl and nicotine. *Forensic Sci. Int.* 149: 167-170.
- Muboko, N., Muposhi, V., Tarakini, T., Gandiwa, E., Vengesayi, S. and Makuwe, E. 2014. Cyanide poisoning and African elephant mortality in Hwange National Park, Zimbabwe: a preliminary assessment. *Pachyderm.* 55: 92-94.

- Novotny, L., Misík, J., Honzlova, A., Ondráček, P., Kuča, K. and Vávra, O. 2011. Incidental poisoning of animals by carbamates in the Czech Republic. *J. Appl. Biomed.* 9: 157–161.
- Pedersen, T.L. 1997. “Dose-Response Assessment.” [Online]. Available : <http://www.extoxnet.orst.edu/faqs/risk/dose.htm>. Accessed August 3, 2015.
- Tennakoon, S., Perera, B. and Haturusinghe, L. 2009. Intentional poisoning cases of animals with anticholinesterase pesticide-carbofuran in Sri Lanka. *Leg. Med.* 11: S500-S502.
- The Telegraph. 2013. “Poachers kill 300 Zimbabwe elephants with cyanide.” [Online]. Available : <http://www.telegraph.co.uk/news/worldnews/africaandindianocean/zimbabwe/10390634/Poachers-kill-300-Zimbabwe-elephants-with-cyanide.html>. Accessed February 3, 2015.
- World Wildlife Fund (WWF). 2014. “ELEPHANT.” [Online]. Available : <https://www.worldwildlife.org/species/elephant>. Accessed November 1, 2014.

Case Report : The death of a wild elephant from the carbamate insecticide methomyl

Anusorn Yooyen* Nuttakorn Ratchabutt Tuangthong Patchimasiri Surakarn Kumchum
Sawitree Inudom Benjama Matharatanukul Sontana Mimapan

National Institute of Animal Health, Kaset klang, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

* Corresponding person: Tel. 0 2579 8908-14 Fax. 025798919 email: anusorn.y@dld.go.th

Abstract

In May 2014, an 8-year-old male wild elephant, weighing about 2,500 kilograms was found dead in the National Park. An external examination of a carcass showed rotten tissue and bleeding from the mouth and anus. The necropsy was unable to give information of the diseases due to the internal organs rotten. However, the blue-green substance filled in stomach content was observed. Histopathological findings revealed the autolyzed tissue organs. Then toxicological analyses were performed from extracted stomach content and the liver by QuEChERS technique. Screening tests of carbamate (CM), organophosphate (OP) and organochlorine (OC) insecticides were carried out using Thin Layer Chromatography (TLC). The test showed a positive result of a carbamate insecticide in stomach content. Then, the quantitative analysis was carried out by Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS) with three-way splitter for confirmation. The results demonstrated that the carbamate insecticides methomyl concentration was 974.33 mg/kg. The amount of exposed methomyl by the elephant was calculated by comparing with the reference dose(Rfd). The detected methomyl concentration was higher than Rfd and the median lethal dose (LD_{50}) of many species. In conclusion, the wild elephant died from ingestion of food containing methomyl in high-dose.

Keywords: wild elephant, insecticide, carbamate, methomyl

