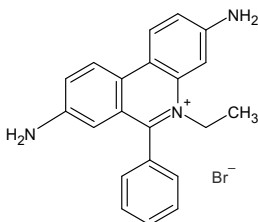


ข้อเสนอแนะด้านความปลอดภัยสำหรับของเสีย ethidium bromide (EtBr)

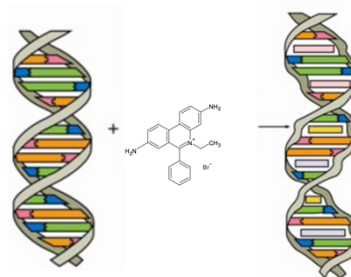
ดร.องอาจ ธนคณิตย์ และนายธีรพัฒน์ คล้ายมุข
ศูนย์ความปลอดภัย อาชีวอนามัยและสิ่งแวดล้อม จุฬาฯ
(24 มิถุนายน 2564)

ethidium bromide (EtBr) เป็นสารเคมีที่นิยมนำมาใช้งานเป็น non-radioactive marker โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการใช้ย้อมกรดนิวคลีอิกในการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) EtBr เป็นสารเคมีของแข็งสีแดงเข้มที่อุณหภูมิห้องสามารถละลายในน้ำได้ปานกลาง จัดเป็นสารเคมีที่มีความเป็นอันตรายต่อสุขภาพทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง อีกทั้งถูกจัดเป็นสารเคมีอันตรายในกลุ่มสารก่อกลายพันธุ์ (mutagen) โดย EtBr สามารถชักนำทำให้ยีนในร่างกายเกิดการกลายพันธุ์ ก่อให้เกิดการสร้างโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไป และส่งผลให้เกิดความผิดปกติและเกิดผลกระทบต่อระบบร่างกายได้ เช่น ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง (carcinogenic effect) ก่อให้เกิดความผิดปกติหรือความพิการแต่กำเนิดได้ (teratogenic effect) การเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกิดขึ้น ยังสามารถถ่ายทอดลักษณะผ่านทางพันธุกรรมไปสู่รุ่นต่อไปได้ (heredity)¹⁻³

EtBr จัดเป็นสารก่อกลายพันธุ์ในแบบ intercalating agent โดยสามารถแทรกตัวเข้าไปในคู่เบสของสาย DNA (เนื่องด้วย EtBr มีโครงสร้างทางเคมีที่แบนเรียบและเป็นวงแหวนติดกัน ดังแสดงในรูปที่ 1) จึงทำให้ DNA มีระยะห่างกันมากพอ ที่จะทำให้มีการเติมเบสส่วนเกินเข้าไปในกระบวนการ DNA replication ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในแบบ frameshift mutation ได้ ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ EtBr



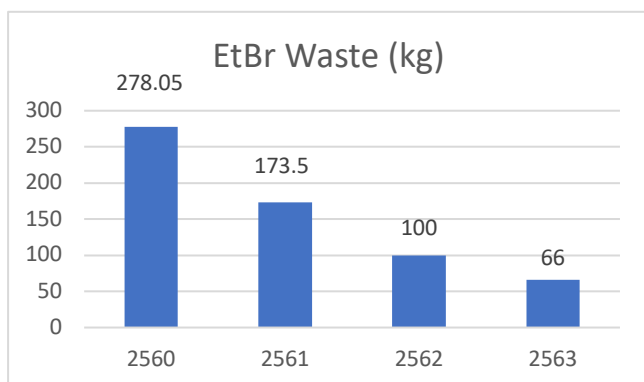
รูปที่ 2 การเกิด frameshift mutation ของ DNA ซึ่งเป็นผลจากการ intercalation ของ EtBr

(ที่มาของภาพ: Studfiles 2015. Intercalating Agents Distort the Double Helix (image) Available at: <

<https://studfile.net/preview/2276460/page/3/> [Accessed 15 June 2021].)

จากข้อมูลทางสถิติของ ChemTrack&WasteTrack 2016 ซึ่งเป็นโปรแกรมการจัดการสารเคมีและของเสียอันตรายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่ามีของเสีย EtBr ที่ถูกดำเนินการส่งกำจัดผ่านระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016 จากส่วนงานต่าง ๆ ภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2560-2563 มีปริมาณรวมทั้งสิ้น 618 กิโลกรัม ดังแสดงในแผนภาพที่ 1 จากกราฟแสดงให้เห็นว่า ปริมาณของเสีย EtBr ที่ถูกส่งกำจัดผ่านระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016 ในช่วงปี 2560-2563 มีแนวโน้มที่ลดลงอย่างต่อเนื่อง [-38% (ปี 2561), -42% (ปี 2562), -34% (ปี 2563) หมายเหตุ ค่า % คือ ร้อยละของของเสีย EtBr ที่ลดลง

เมื่อเทียบกับปีก่อนหน้า] ซึ่งคาดว่าส่วนงานต่าง ๆ ในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีการลดการใช้งาน EtBr อย่างต่อเนื่อง จึงเป็นผลให้มีปริมาณของของเสีย EtBr ในช่วงปี 2560 -2563 ลดลงตามลำดับ



แผนภาพที่ 1 แสดงปริมาณของเสีย EtBr ที่ถูกดำเนินการส่งกำจัดผ่านระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016 จากส่วนงานต่าง ๆ ภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2560-2563

สำหรับห้องปฏิบัติการในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ยังคงมีการใช้งาน EtBr ในการเรียนการสอน หรือในงานวิจัยนั้น สามารถร่วมลดการใช้งาน EtBr ซึ่งจะช่วยลดการก่อเกิดของเสีย EtBr ได้โดยการใช้สารเคมีทางเลือกชนิดอื่น^{1,4,5} ที่มีความปลอดภัยในการใช้งานมากกว่า EtBr และ ไม่เป็นสารที่ก่อการกลายพันธุ์ เช่น SYBR Safe™ DNA gel GelRed และ GelGreen ในกรณีที่ต้องใช้ EtBr ในการทำงาน ก็ควรใช้ในปริมาณที่น้อยที่สุด และควรมีการครอบครอง EtBr (ในปริมาณ) เท่าที่จำเป็นเท่านั้น

ในกรณีที่มีการก่อเกิดของเสีย EtBr ควรดำเนินการบำบัดของเสียอันตรายด้วยตนเองก่อน (ถ้าสามารถทำได้) เพื่อลดความเป็นอันตรายเนื่องจากสารเคมี รวมทั้ง ลดความเสี่ยงในการเกิดอันตรายเนื่องจากการสะสมของเสีย EtBr (เพื่อรอส่งกำจัด) ในสถานที่ทำงาน ลดภาระค่าใช้จ่ายในการกำจัดของเสียอันตรายของทางมหาวิทยาลัย และ สามารถจัดการของเสีย EtBr ในหน่วยงานตนเองได้อย่างยั่งยืน หากทำไม่ได้ จึงค่อยดำเนินการส่งกำจัดของเสีย EtBr ผ่านระบบของทางมหาวิทยาลัย ดังรายละเอียด

I. การบำบัดของเสีย EtBr ด้วยตนเอง^{3,6-8}

การบำบัดของเสีย EtBr (ที่อยู่ในรูปสารละลาย) ด้วยตนเอง สามารถทำได้หลากหลายวิธี ตัวอย่างเช่น การดูดซับ EtBr โดยใช้ตัวดูดซับที่มีความเหมาะสม เช่น ผงถ่านชาร์โคล (ซึ่งมีขายในรูปของ destaining bag⁶) เครื่องสกัด (เช่น ของ Schleicher & Schuell) และการกำจัดโดยวิธีย่อยสลายด้วยสารเคมี เช่น การบำบัดของเสียอันตราย EtBr โดยใช้สารฟอกขาว (bleach)³ การบำบัดของเสียอันตราย EtBr โดยใช้วิธีของ Lunn & Sansone⁷⁻⁸

ในการบำบัดของเสีย EtBr นั้น ผู้ปฏิบัติงานต้องสวมใส่ PPE ที่มีความเหมาะสมตามคำแนะนำจากเอกสารข้อมูลความปลอดภัยของสาร (SDS) และต้องทำงานในตู้ดูดควัน รวมทั้ง ทุกครั้งก่อนเทสารละลายหลังการบำบัดทิ้งลงท่อน้ำทิ้ง ต้องตรวจสอบด้วย UV ว่าไม่มีการปนเปื้อนของ EtBr ในสารละลาย

วิธีการบำบัดของเสีย EtBr ด้วยตนเอง

วิธีที่ 1 การบำบัดของเสีย EtBr โดยใช้สารฟอกขาว (bleach)³

1. เตรียมหรือเจือจาง EtBr ที่ต้องการบำบัด โดยให้สารละลายมีความเข้มข้นของ EtBr น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.034% W/V (34 mg/ 100 mL)
2. เติมน้ำฟอกขาว (bleach) 10 mL ต่อ 1 mg ของ EtBr (bleach ที่ใช้งานต้องเป็น bleach ที่เตรียมใหม่ หรือเตรียมไว้ไม่นานเกิน 1 สัปดาห์ และยังไม่เสื่อมสภาพ)
3. คนสารให้ละลายเข้ากันอย่างต่อเนื่องเป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง (หรือทิ้งไว้ข้ามคืน)
4. นำสารละลายจากข้อ 3 มาส่องด้วยแสง UV ก่อนทิ้ง เพื่อให้มั่นใจว่า EtBr ได้ถูกทำลายจนหมด
5. เจือจางสารละลายในข้อ 4 ด้วยน้ำประปาอย่างน้อย 20 เท่า แล้วปล่อยลงอ่างน้ำทิ้ง

วิธีที่ 2 การบำบัดของเสีย EtBr ด้วยตนเอง โดยวิธีของ Lunn & Sansone⁷⁻⁸

1. เตรียมหรือเจือจาง EtBr ที่ต้องการบำบัด โดยให้สารละลายมีความเข้มข้นของ EtBr น้อยกว่า 0.05% W/V (50 mg/ 100 mL)
2. แบ่งสารละลาย EtBr ในข้อ 1. ปริมาตร 100 mL จากนั้น เติมน้ำ 5% hypophosphorous acid (H_3PO_2) ปริมาตร 20 mL และ สารละลาย sodium nitrite 0.5 M ปริมาตร 12 mL จากนั้น คนสารให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. ตรวจสอบค่า pH ของสารละลาย ควรมีค่า pH น้อยกว่า 3 และทำการตั้งสารละลายทิ้งไว้ไม่น้อยกว่า 20 ชั่วโมง
4. นำสารละลายจากข้อ 3 มาส่องด้วยแสง UV ก่อนทิ้ง เพื่อให้มั่นใจว่า EtBr ได้ถูกทำลายจนหมด
5. ทำสารละลายให้เป็นกลาง โดยเติมน้ำกลั่นที่มีความเหมาะสม เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมคลอไรด์
6. หลังจากสารละลายเป็นกลางแล้ว สามารถเทสารละลายลงท่อน้ำทิ้งและเปิดน้ำตามในปริมาณมาก

II. การส่งกำจัดของเสีย EtBr^{2,9} (ผ่านระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016)

ในกรณีที่ไม่สามารถบำบัดของเสีย EtBr ด้วยตนเอง ให้ดำเนินการจัดการของเสีย EtBr ตามแนวทางดังต่อไปนี้

ของเสีย EtBr	แนวทางในการจัดการของเสียอันตราย
1.1) ของแข็ง EtBr (crystal and powder) – ที่ยังไม่หมดอายุ หรือไม่เสื่อมคุณภาพ	ให้ดำเนินการบริจาดสารเคมีผ่านระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016 โดยสามารถบริจาดผ่านขั้นตอน “การบริจาดสารเคมี” ในระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016 ได้ (https://www.shecu.chula.ac.th/data/boards/412/ctwtmanual2020.pdf , หน้า 53-54) เพิ่มเติม การ reuse สารเคมี จะช่วยลดภาระงาน รวมทั้งค่าใช้จ่ายในการกำจัดสารเคมีอันตรายของมหาวิทยาลัย
1.2) ของแข็ง EtBr (crystal and powder) – ที่หมดอายุ หรือเสื่อมคุณภาพ	ให้ส่งกำจัดผ่านระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016* โดยดำเนินการดังนี้ 1) จำแนกประเภทและติดฉลากของของเสียอันตรายตามระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016 2) ดำเนินการจัดส่งของเสียอันตรายตามระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016
2) สารละลาย EtBr (stock solution)	ให้ส่งกำจัดผ่านระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016* โดยดำเนินการดังนี้ 1) จำแนกประเภทและติดฉลากของของเสียอันตรายตามระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016

	2) ดำเนินการจัดส่งของเสียอันตรายตามระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016
3) สารละลายบัพเฟอร์ที่มี EtBr น้อยกว่า 0.01% โดยน้ำหนัก	สามารถเทสารละลายบัพเฟอร์ลงในท่อน้ำทิ้งและเปิดน้ำตามในปริมาณมาก
4) Agarose gel ที่มี EtBr ปนเปื้อนในปริมาณน้อย (0.3-0.5 ug/ mL)	ให้ส่งกำจัดผ่านระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016* โดยดำเนินการดังนี้ 1) เก็บไว้ในถุง leak proof ที่สามารถปิดได้มิดชิด เช่น ถุง Ziploc™ 2) จำแนกประเภทและติดฉลากของของเสียอันตรายตามระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016* 3) ดำเนินการจัดส่งของเสียอันตรายตามระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016*
5) อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล (PPE) ที่มีการปนเปื้อนของ ethidium bromide เช่น PPE หลังจากการใช้งานเกี่ยวกับ EtBr ที่หกั่วไหล	ให้ส่งกำจัดผ่านระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016* โดยดำเนินการดังนี้ 1) ใส่บรรจุลงในถุง 2 ชั้น (double bags) 2) จำแนกประเภทและติดฉลากของของเสียอันตรายตามระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016* 3) ดำเนินการจัดส่งของเสียอันตรายตามระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016*
6) ของมีคมที่มีการปนเปื้อน EtBr เช่น Pasteur pipette ทิป (tip)	ให้ส่งกำจัดผ่านระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016* โดยดำเนินการดังนี้ 1) ให้ทิ้งลงภาชนะบรรจุของเสียสำหรับของมีคม (sharped container) 2) จำแนกประเภทและติดฉลากของของเสียอันตรายตามระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016* 3) ดำเนินการจัดส่งของเสียอันตรายตามระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016*
7) ขวดภาชนะเปล่าที่เคยบรรจุ EtBr	ให้ส่งกำจัดผ่านระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016* โดยดำเนินการดังนี้ 1) จำแนกประเภทและติดฉลากของของเสียอันตรายตามระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016 2) ดำเนินการจัดส่งของเสียอันตรายตามระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016

หมายเหตุ *การจำแนกประเภทและการส่งกำจัดของเสียอันตรายตามระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016: <https://www.shecu.chula.ac.th/home/content.asp?Cnt=134>

ในกรณีที่สารละลายหรือของเสีย EtBr หกั่วไหล ผู้ตอบโต้ต้องประเมินความเสี่ยงจากเหตุการณ์ที่เกิดขึ้น หากสามารถดำเนินการตอบโต้ได้ ให้ปฏิบัติตามข้อแนะนำในเอกสารด้านความปลอดภัยของสาร (SDS) ของ EtBr เพื่อ decontamination สารเคมีโดยทันที หากไม่สามารถดำเนินการตอบโต้ได้ ต้องรีบแจ้งผู้รับผิดชอบหรือผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้อง เพื่อติดต่อหรือประสานงานไปยังหน่วยงานที่รับผิดชอบและมีศักยภาพในการดำเนินการตอบโต้ต่อโดยเร็ว (ตามแผนของหน่วยงาน)

ตัวอย่างวิธีการ decontamination ในกรณีที่สารละลาย EtBr เกิดหกั่วไหล (เช่น ในกรณีที่ สารละลาย EtBr หกั่วไหลไม่เกิน 250 mL)^{3,7-8}

1. เตรียมสารละลายสำหรับทำความสะอาด EtBr (decontamination solution) โดยชั่ง sodium nitrite น้ก 2 กรัม และ hypophosphorous acid (50%) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมลงในน้ำปริมาตร 300 มิลลิลิตร
2. ใช้กระดาษดูดซับ เช่น กระดาษเช็ดมือกระดาษ (paper towel) ที่ชุ่มด้วย decontamination solution (ที่เตรียมได้จาก 1) นำไปเช็ดบริเวณพื้นที่ที่มี EtBr หกั่วไหลและดูดซับจนแห้ง

3. ใช้กระดาษดูดซับที่ชุ่มด้วยน้ำ เช็ดบริเวณพื้นที่ดังกล่าว ทำซ้ำรวม 5 ครั้ง (เปลี่ยนใช้กระดาษแผ่นใหม่ในทุกครั้ง)
4. ใช้ UV lamp ในการตรวจสอบพื้นที่ปนเปื้อน ว่ามี EtBr หลงเหลืออยู่หรือไม่ (ระมัดระวังในการใช้งาน UV lamp เนื่องจากแสง UV มีความเป็นอันตรายต่อดวงตาและผิวหนัง) ถ้าพบว่ามี EtBr หลงเหลืออยู่ ให้ทำความสะอาดต่อจนกระทั่งไม่มีการหลงเหลือของ EtBr
5. ให้นำกระดาษดูดซับที่ใช้งานทั้งหมด มาแช่ลงใน decontamination solution ซึ่งบรรจุอยู่ในถัง (ที่มีขนาดเหมาะสม) เป็นเวลานานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง
6. ให้แยกกระดาษดูดซับหลังการ decontamination ลงในถุง leak proof ที่สามารถปิดได้มิดชิด เช่น ถุง Ziploc™ ส่วน decontamination solution ให้ใส่ลงในภาชนะบรรจุที่เหมาะสม ตัดฉลากระบุประเภทของของเสียอันตรายและดำเนินการส่งกำจัดผ่านระบบ ChemTrack&WasteTrack 2016 ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- 1) EHS.UCSC.edu. 2012. *Ethidium Bromide* [online] Available at: <<https://ehs.ucsc.edu/lab-safety-manual/specialty-chemicals/ethidium-bromide.html>> [Accessed 15 June 2021].
- 2) EHS.Harvard.edu. 2012. *Ethidium Bromide Waste Management Bulletin* [online] Available at: <https://www.ehs.harvard.edu/sites/default/files/ethidium_bromide_waste_management_bulletin.pdf> [Accessed 15 June 2021].
- 3) คณะอนุกรรมการมาตรฐานความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ คณะกรรมการพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. *การใช้สารเคมีอย่างปลอดภัย: Ethidium Bromide* [online] Available at: <https://www.si.mahidol.ac.th/project/sicsm/download_files/5_1.pdf> [Accessed 15 June 2021].
- 4) OldDominionUniversity.edu. n.d. *Ethidium Bromide Hazards and Precautions* [online] Available at: <<https://www.odu.edu/content/dam/odu/offices/environmental-health-safety/docs/ethidium-bromide-fact-sheet.pdf>> [Accessed 15 June 2021].
- 5) Thermo Fisher Scientific. 2021. *SYBR Safe DNA Gel Stain* [online] Thermofisher.com. Available at: <<https://www.thermofisher.com/th/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/dna-stains/sybr-safe.html>> [Accessed 15 June 2021].
- 6) AMRESKO, LLC. 2015. *Destaining Bags* [online] Available at: <<http://www.bio-protech.com.tw/upload/20170913025503.pdf>> [Accessed 15 June 2021].
- 7) EHS.OregonState.edu. 2009. *Ethidium Bromide Waste* [online] Available at: <https://ehs.oregonstate.edu/sites/ehs.oregonstate.edu/files/pdf/si/ethidium_bromide_waste_si077.pdf> [Accessed 15 June 2021]
- 8) Lunn, G. and Sansone, E. B. 1994. *Destruction of Hazardous Chemicals in the Laboratory*. John Wiley and Sons, Inc. pp. 185-186.
- 9) EHS.Harvard.edu. 2012. *Laboratory Chemical Waste FAQs* [online] Available at: <https://www.ehs.harvard.edu/sites/default/files/chemical_waste_faqs_labs_0.pdf> [Accessed 15 June 2021].