

การตรวจวิเคราะห์ไทโอไซยาเนตด้วยเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส
ร่วมกับเครื่องตรวจวัดปริมาณสารด้วยค่าความนำไฟฟ้า

ANALYSIS OF THIOCYANATE MARKER BY
CAPILLARY ELECTROPHORESIS WITH CONDUCTIVITY DETECTION

ผู้วิจัย ฐปณัท ศรีสุขพันธ์

อาจารย์ที่ปรึกษา 1. ดร.รัตติกาล จันทิวาสัน

2. รศ.ดร.ประพิณ วิไลรัตน์

3. รศ.ดร.สุดา เรียงโรจน์พิทักษ์

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ (หลักสูตรนานาชาติ) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

การตรวจวิเคราะห์สารไทโอไซยาเนตโดยใช้เทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส (Capillary Electrophoresis : CE) ได้ถูกพัฒนาขึ้นร่วมกับวิธีตรวจวัดปริมาณสารที่วิเคราะห์โดยใช้ค่าความนำไฟฟ้า อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ประกอบด้วยเครื่องปล่อยศักย์ไฟฟ้า ท่อแคปิลลารี กล้องนิรภัย เครื่องตรวจวัดค่าความนำไฟฟ้า และหน่วยบันทึกผล สภาวะของการทดลองแคปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ใช้แยกสาร ได้แก่การใช้สารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid และ L-Histidine ความเข้มข้น 20 mM (pH 6.0) ใช้ท่อแคปิลลารียาว 30.2 cm ที่มีความยาวจากปลายท่อแคปิลลารีด้านทางเข้าถึงตัวตรวจวัดเท่ากับ 18.5 cm ความต่างศักย์ที่ใช้มีค่า -8 kV และใช้กรดมาเลอิก ความเข้มข้น 1.5 mM เป็นสารละลายมาตรฐานภายใน ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของความเข้มข้นของไทโอไซยาเนตที่ศึกษา มีค่าอยู่ในช่วง 0.2 mM ถึง 4.0 mM และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9965 โดยมีกระบวนการตรวจสอบเทคนิคให้เหมาะสมก่อนใช้วิเคราะห์ไทโอไซยาเนตในน้ำลาย ทั้งนี้ ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ไทโอไซยาเนตในผู้สูบบุหรี่และผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ ซึ่งปริมาณไทโอไซยาเนตที่วัดได้สามารถนำไปใช้บ่งชี้ว่าบุคคลดังกล่าวเป็นผู้สูบบุหรี่เองหรือเป็นผู้ได้รับควันบุหรี่โดยทางอ้อม

คำสำคัญ : แคปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส, ไทโอไซยาเนต, น้ำลาย, การสูบบุหรี่

Abstract

An analytical method of capillary electrophoresis (CE) with conductivity detection was developed for analysis of a thiocyanate marker. The CE instrument composed a high voltage (HV) power supply, a capillary column, a safety box, a conductivity detector and a data recording unit. The conditions of CE separations were as follows; the running buffer: 20 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid

with L-Histidine (pH 6.0), capillary length of 30.2 cm with the effective length of 18.5 cm, and the applied high voltage of -8 kV. Maleic Acid (1.5 mM) was used as an internal standard for CE separation. The standard calibration curve was linear in the range of 0.2 mM to 4.0 mM with a correlation coefficient of 0.9965. The method was validated before applying to analysis of salivary thiocyanate. The thiocyanate contents from cigarette smokers and non-smokers were investigated. Measurement of thiocyanate in saliva is potentially used as a marker for active and passive smokers.

Key Words: Capillary Electrophoresis, Thiocyanate, Saliva, Cigarette Smoking

บทนำ

สารไทโอไซยาเนต (Thiocyanate : SCN⁻) เป็นสารช่วยป้องกันการติดเชื้อในช่องปากที่มีอยู่ตามธรรมชาติในน้ำลายมนุษย์ (Seto Y. et al., 2000) แต่ในกรณีที่ร่างกายได้รับควันบุหรี่เข้าไป ก็จะได้รับสารไซยาไนด์ (Cyanide) เข้าไปด้วย ซึ่งร่างกายจะมีกระบวนการกำจัดสารไซยาไนด์ดังกล่าวออกด้วยการเติมหมู่ซัลเฟอร์ (Sulfuration) เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างไซยาไนด์ให้กลายเป็นไทโอไซยาเนต และขับออกผ่านทางน้ำลาย เหงื่อ ปัสสาวะและซีรัม โดยขับออกทางน้ำลายเป็นส่วนใหญ่ (Luepker R. et al., 1981) ด้วยเหตุนี้เองปริมาณไทโอไซยาเนตในน้ำลายของผู้ได้รับควันบุหรี่จึงมีปริมาณสูงขึ้นกว่าปกติ ฉะนั้นหากทราบปริมาณความเข้มข้นของไทโอไซยาเนตในน้ำลาย ก็จะสามารถบ่งชี้การได้รับควันบุหรี่ของบุคคลนั้น ๆ ได้

จากการค้นคว้างานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ไทโอไซยาเนต (Luepker R. et al., 1981; Rubab Z. et al., 2006; Rubae D.E. et al., 2010; Seto Y. et al., 2000) พบว่าเทคนิคที่นิยมใช้คือเทคนิคการวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometry) โดยมักวิเคราะห์จากตัวอย่างซีรัมและตัวอย่างน้ำลาย ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของไทโอไซยาเนตมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในตัวอย่างที่ได้จากคนที่ได้รับควันบุหรี่ แต่อย่างไรก็ตาม เทคนิคการวัดค่าดูดกลืนแสงก็เป็นเทคนิคที่ต้องใช้ตัวอย่างในปริมาณมากและไม่เป็นระบบอัตโนมัติ อีกทั้งยังสามารถเกิดการรบกวนจากสารที่มีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นช่วงเดียวกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ ซึ่งอาจทำให้การแปลผลเกิดความผิดพลาดได้ง่าย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องใช้เทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการแยกสาร มีความถูกต้อง แม่นยำ และสามารถตรวจวัดสารที่มีความเข้มข้นต่ำได้ เพื่อให้ได้วิธีตรวจวิเคราะห์ไทโอไซยาเนตที่น่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

เทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส (Capillary Electrophoresis : CE) เป็นเทคนิคที่ตอบโจทย์ข้างต้นได้ เพราะมีประสิทธิภาพของการแยกสูง ใช้ตัวอย่างปริมาณน้อยระดับนาโนลิตร อีกทั้งแยกสารได้ในเวลาอันรวดเร็ว (Johns C. et al., 2009) หลักการของเทคนิคนี้คืออาศัยความแตกต่างในการเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าของสารแต่ละชนิด สารที่มีประจุขนาดเล็กและมีจำนวนประจุมากจะเคลื่อนที่ไปถึงปลายท่อแคปิลลารีได้เร็วกว่าสารอื่น ๆ นอกจากนี้ยังมีเทคนิคในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าแบบไม่สัมผัสสาร (C⁴D) ซึ่งกำลังเป็นที่นิยมและมีการนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิค CE ด้วย เพราะเครื่องตรวจวัดดังกล่าวสามารถตรวจวัดสัญญาณสารโดยอาศัย

ความแตกต่างของความสามารถในการนำไฟฟ้าของสารแต่ละชนิดที่แตกต่างกันโดยไม่มีส่วนใด ๆ ของเครื่องตรวจวัดที่สัมผัสกับสารที่วิเคราะห์ จึงไม่มีการปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นบนผิวอิเล็กทรอนิกส์ของเครื่องตรวจวัด นอกจากนี้การตรวจวัดด้วยเครื่อง C⁴D ยังให้ความไวในการตรวจวัด (Sensitivity) สูงกว่าเครื่องตรวจวัดชนิดอื่น ๆ ด้วย

ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้นำเสนอการใช้เทคนิค CE ร่วมกับเครื่องตรวจวัดแบบ C⁴D เพื่อเปรียบเทียบปริมาณไทโอไซยานเนตในตัวอย่างน้ำลายของผู้ได้รับควันบุหรี่โดยตรง คือเป็นผู้สูบบุหรี่เอง (Active Smoker) ผู้ไม่สูบบุหรี่ และผู้ได้รับควันบุหรี่โดยทางอ้อม (Passive Smoker) คือไม่ได้สูบบุหรี่เองแต่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีการสูบบุหรี่ โดยใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างอย่างง่ายโดยเจือจางตัวอย่างน้ำลายกับสารละลายบัฟเฟอร์แล้ววิเคราะห์ด้วยอุปกรณ์ที่ประกอบขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถทำได้สะดวกและให้ผลการตรวจวัดในเวลารวดเร็ว จึงเหมาะสำหรับการวิเคราะห์ในกรณีที่มีตัวอย่างในปริมาณมาก

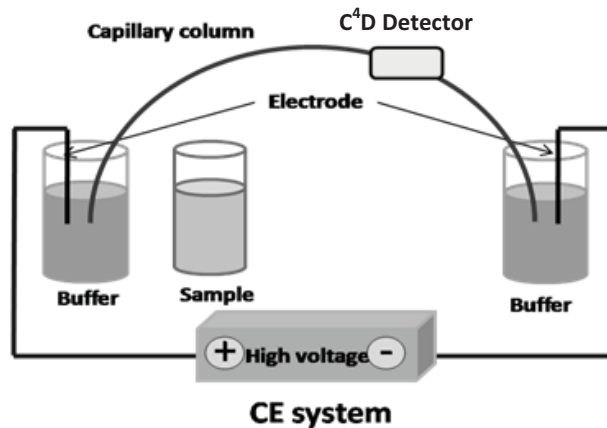
วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อใช้เทคนิค CE-C⁴D ศึกษาความแตกต่างของปริมาณไทโอไซยานเนตในน้ำลายของผู้ได้รับควันบุหรี่
2. ทดสอบประสิทธิภาพการใช้งานของเทคนิค CE-C⁴D เพื่อพิสูจน์ความถูกต้องแม่นยำของเทคนิคก่อนการวิเคราะห์กับตัวอย่างน้ำลาย
3. เพื่อสร้างฐานข้อมูลเบื้องต้นของปริมาณไทโอไซยานเนตที่ตรวจวัดได้ในน้ำลายของผู้ได้รับควันบุหรี่ด้วยเทคนิค CE-C⁴D

วิธีการวิจัย

1. เครื่องมือที่ใช้

อุปกรณ์ CE-C⁴D ที่ใช้เป็นอุปกรณ์ที่ประกอบขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งประกอบด้วยท่อแคปิลลารีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 50 ไมโครเมตรสำหรับการแยกสาร เครื่องตรวจวัดค่าความนำไฟฟ้าแบบไม่สัมผัสสาร (C⁴D) ขวดใส่สารละลายบัฟเฟอร์ด้านทางเข้าและทางออกของท่อแคปิลลารี อุปกรณ์ข้างต้นถูกติดตั้งในกล่องนิรภัยเพื่อป้องกันสัคย์ไฟฟ้าแรงสูงในระบบ นอกจากนี้ยังมีเครื่องให้สัคย์ไฟฟ้าแรงสูงทำหน้าที่นำสารที่ต้องการวิเคราะห์เข้าสู่ท่อแคปิลลารีด้านทางเข้าและทำหน้าที่ในการทำให้สารสามารถเคลื่อนที่ภายในท่อแคปิลลารีได้ ส่วนสุดท้ายคือ เครื่องบันทึกสัญญาณ (e-DAQ) ทำหน้าที่บันทึกสัญญาณและแปลงสัญญาณออกมาในรูปอิเล็กทรอนิกส์ (Electropherogram)



ภาพ 1. ส่วนประกอบของเทคนิค CE-C⁴D

2. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งเป็นสารละลายผสมของ 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) และ L-Histidine (L-His) ความเข้มข้น 20 mM ที่เติม Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ความเข้มข้น 0.1 mM และมีค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ เท่ากับ 6.0 ทั้งนี้ในการตรวจวัดทุกครั้ง จะใช้กรดมาเลอิกความเข้มข้น 1.5 mM เป็นสารละลายมาตรฐาน ภายใน (Internal Standard) และมี Stock Standard ของสารไทโอไซยานตความเข้มข้น 1 M เตรียมไว้ สำหรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ส่วนตัวอย่างน้ำลาย เก็บจากอาสาสมัครที่มีอายุระหว่าง 22-56 ปี จำนวนทั้งสิ้น 6 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3-5 mL

ผล/สรุปผลการวิจัย

1. การแยกและวิเคราะห์ไทโอไซยานตด้วยเทคนิค CE-C⁴D

ทดสอบการแยกและตรวจวัดปริมาณไทโอไซยานตด้วยเทคนิค CE-C⁴D โดยให้สภาวะของระบบ ดังนี้ ความยาวทั้งหมดของท่อแคปิลลารีเท่ากับ 30.2 cm ความยาวจากปลายท่อแคปิลลารีด้านทางเข้าถึงตัวตรวจวัดเท่ากับ 18.5 cm การฉีดสารใช้วิธีไฮโดรไดนามิก โดยให้ความต่างระดับความสูงของปลายท่อแคปิลลารีที่ความสูง 7.5 cm เป็นเวลา 3 วินาที ค่าความต่างศักย์ที่ใช้ มีค่า -8 kV

เตรียมสารละลายมาตรฐานไทโอไซยานตที่ความเข้มข้น 0.2 mM 0.5 mM 1 mM 2 mM 3 mM และ 4 mM จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE-C⁴D แล้วนำสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area Ratio) ระหว่างสัญญาณไทโอไซยานตแต่ละความเข้มข้น และสัญญาณสารมาตรฐานภายในมาคำนวณหาสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linear Equation) ของความเข้มข้นของไทโอไซยานต โดยพบว่าสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของความเข้มข้นของไทโอไซยานตในงานวิจัยนี้ คือ $y = 0.40x + 0.015$

โดย x คือค่าความเข้มข้นของไทโอไซยานเนต และ y คือสัดส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟสัญญาณความเข้มข้นของไทโอไซยานเนต และสัญญาณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานภายใน

โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient : R^2) ของเทคนิค CE-C⁴D ที่คำนวณได้จากสมการเส้นตรงนี้ คือ 0.9965 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เทคนิคนี้สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of Detection : LOD) คือ 0.04 mM ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เทคนิคนี้สามารถวิเคราะห์ได้ในตัวอย่างและมีความถูกต้องแม่นยำที่เชื่อถือได้ (Limit of Quantification : LOQ) คือ 0.12 mM ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation : %RSD) คือ 3.0% และค่าความผิดพลาดสัมพัทธ์ (Relative Error : %RE) เท่ากับ 0.9%

2. การวิเคราะห์ปริมาณไทโอไซยานเนตในตัวอย่างน้ำลาย

ตัวอย่างน้ำลายที่วิเคราะห์ เป็นตัวอย่างน้ำลายที่เก็บจากอาสาสมัครที่มีอายุระหว่าง 22-56 ปี โดยกลุ่มแรกเป็นผู้สูบบุหรี่ จำนวน 2 คน ซึ่งมีพฤติกรรมสูบบุหรี่เป็นกิจวัตรต่อเนื่องมาอย่างน้อย 5 ปี และสูบบุหรี่เฉลี่ยวันละ 5-10 มวน กลุ่มที่สองเป็นผู้ที่ไม่ได้สูบบุหรี่แต่ได้รับควันบุหรี่โดยทางอ้อม จำนวน 2 คน และกลุ่มที่สามเป็นผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ จำนวน 2 คน โดยอาสาสมัครทั้งสามกลุ่มต้องงดดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ภายใน 12 ชั่วโมง งดทานอาหารภายใน 1 ชั่วโมง และแปรงฟันในช่วงเวลาอย่างน้อย 30 นาที ก่อนจะบ้วนน้ำลายลงในขวดพลาสติก คนละประมาณ 1-3 mL

ก่อนการวิเคราะห์ ตัวอย่างน้ำลายที่เก็บได้จะถูกปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที เพื่อแยกเสมหะและสิ่งเจือปนต่าง ๆ ออก โดยเก็บแยกส่วนใส (supernatant) ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ และเมื่อจะทำการวิเคราะห์ก็นำตัวอย่างน้ำลายมาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 1:1

จากผลการวิเคราะห์ พบว่าเทคนิค CE-C⁴D สามารถตรวจวัดสัญญาณปริมาณความเข้มข้นของไทโอไซยานเนตในน้ำลายได้ภายในเวลาไม่ถึง 3 นาที โดยมีความแตกต่างระหว่างปริมาณความเข้มข้นของไทโอไซยานเนตของทั้งสามกลุ่มอย่างชัดเจน ตัวอย่างน้ำลายของกลุ่มที่ไม่สูบบุหรี่มีปริมาณความเข้มข้นของไทโอไซยานเนตอยู่ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 0.2 mM ในขณะที่กลุ่มผู้สูบบุหรี่มีปริมาณความเข้มข้นของไทโอไซยานเนตในน้ำลายอยู่ในช่วง 0.98 – 3.71 mM ทั้งนี้ พบว่าตัวอย่างน้ำลายของผู้ไม่สูบบุหรี่ที่ได้รับควันบุหรี่โดยทางอ้อม มีปริมาณความเข้มข้นของไทโอไซยานเนตอยู่ในช่วง 0.24 – 0.37 mM ซึ่งต่ำกว่าปริมาณความเข้มข้นของไทโอไซยานเนตที่ตรวจวัดได้ในกลุ่มผู้สูบบุหรี่ (0.98 – 3.71 mM) ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 1

ตาราง 1. ผลการวิเคราะห์ปริมาณไทโอไซยานตในตัวอย่างน้ำลายด้วยเทคนิค CE-C⁴D

ตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	จำนวนบุหรี่ที่สูบในแต่ละวัน (มวน)	ความบ่อยของการสูบบุหรี่	ระยะเวลาที่สูบบุหรี่	ความเข้มข้นของไทโอไซยานตที่วัดได้ (mM) ± SD*
ผู้สูบบุหรี่ (1)	ชาย	27	5	ทุกวัน	มากกว่า 5 ปี	0.98 ± 0.01
ผู้สูบบุหรี่ (2)	ชาย	22	10	ทุกวัน	มากกว่า 5 ปี	3.71 ± 0.01
ผู้ได้รับควันบุหรี่โดยทางอ้อม (1)	หญิง	22	-	-	-	0.24 ± 0.01
ผู้ได้รับควันบุหรี่โดยทางอ้อม (2)	หญิง	24	-	-	-	0.37 ± 0.03
ผู้ไม่สูบบุหรี่ (1)	หญิง	56	-	-	-	0.20 ± 0.01
ผู้ไม่สูบบุหรี่ (2)	ชาย	27	-	-	-	< 0.04

* SD คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการตรวจวัดตัวอย่างละ 3 ครั้ง

อภิปรายผล

จากผลการวิจัย พบว่าเทคนิค CE-C⁴D ที่ใช้มีค่าความน่าเชื่อถือในระดับที่ยอมรับได้เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (0.9965) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (3.0%) และค่าความผิดพลาดสัมพัทธ์ (0.9%) โดยมีขั้นตอนเตรียมตัวอย่างน้ำลายเพื่อตรวจวัดปริมาณไทโอไซยานตที่ไม่ยุ่งยาก อีกทั้งให้ผลการวิเคราะห์ได้รวดเร็วภายในเวลาไม่เกิน 3 นาที นอกจากนี้สามารถแยกความแตกต่างของปริมาณไทโอไซยานตในน้ำลายของผู้ได้รับควันบุหรี่โดยตรง ผู้ได้รับควันบุหรี่โดยทางอ้อมและผู้ไม่ได้รับควันบุหรี่ได้อย่างชัดเจน เทคนิคดังกล่าวจึงมีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ตรวจวัดตัวอย่างในปริมาณมาก ๆ เพื่อใช้ผลบ่งชี้การได้รับควันบุหรี่ของบุคคลได้

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการพัฒนาให้ระบบอย่างง่ายนี้มีความเป็นอัตโนมัติยิ่งขึ้นโดยใช้การควบคุมจากการสั่งงานด้วยระบบคอมพิวเตอร์ เพื่อให้การทดลองมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์เชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ ซึ่งจะเพิ่มความถูกต้องและแม่นยำ อย่างเช่น ช่วยลดความผิดพลาดในการจับเวลาในขั้นตอนการฉีดสาร เป็นต้น

รายการอ้างอิง

- Johns C., Hutchinson J.P., and Haddad P.R. (2008). "Identification of inorganic ions in post-blast explosive residues using portable CE instrumentation and capacitively coupled contactless conductivity detection." **Electrophoresis**. Vol. 29, 4593-4602.
- Johns C., Michael C.B., and Haddad P.R. (2009). "Recent significant developments in detection and method development for the determination of inorganic ions by CE." **Electrophoresis**. Vol.30, 53-67.
- Kuban P., Kobrin E., and Kaljurand M. (2012). "Capillary electrophoresis – A new tool for ionic analysis of exhaled breath condensate." **Journal of Chromatography A**. Vol.1267, 239-245.
- Kuban P., Durc P., Bittova M., and Foret F. (2014) "Separation of oxalate, formate and glycolate in human body fluid samples by capillary electrophoresis with contactless conductometric detection." **Journal of Chromatography A**. Vol.1325, 241-246.
- Luepker R., and Pechacek T.F. (1981). "Saliva Thiocyanate: A chemical indicator of cigarette smoking in adolescents." **AJPH**. Vol.71, 1320-1324.
- Rubab Z., and Rahman MA. (2006). "Serum thiocyanate levels in smokers, passive smokers and never smokers." **J Pak Med Assoc**. Vol.56, 323-326.
- Rubae D.E., Hussani N.K., and Kadhum H. (2010). "Toxic thiocyanate levels in saliva of healthy adult smokers and non smokers from Baghdad City." **Al Taqani**. Vol.23, 99-103.
- Salivabio LCC., and Salimetrics LCC. (2013). **Saliva Collection and Handling Advice 3rd Edition**. Carlsbad CA: Salimetrics.
- Seto Y., Kataoka M., and Tsuge K. (2000). "Cyanide and thiocyanate levels in blood and saliva of healthy adult volunteers." **Journal of Health Science**. Vol.46, 343-350.